

令和4年度  
第60回広島県畜産関係業績発表会  
集 録

広島県農林水産局畜産課

# 令和4年度第60回広島県畜産関係業績発表会

## 1 目的

県内の畜産関係者が、日常業務で取り組みを行った業績を発表することにより、技術の連携及び交換並びに研究開発意欲の高揚を図り、畜産の振興に資することを目的とする。

本冊子は、第60回広島県畜産関係業績発表会における発表全文を集録したものである。

## 2 主催

広島県農林水産局畜産課

## 3 開催方法

書面

## 4 開催日

令和5年6月5日に審査委員会を開催

## 5 発表者

- (1) 県畜産関係職員
- (2) 県畜産関係団体職員
- (3) その他県内畜産関係技術者

## 6 発表内容

日常業務に基づく事業、調査、研究・開発等の業績

# 目次

## I 畜産事務所（家畜保健衛生所）

- 1 広島血統和牛増産事業における受精卵産子の供給協定締結に関する取り組みについて  
西部畜産事務所 坂寄 淳平 … 1
- 2 動物用高度管理医療機器の製造業登録及び製造販売業許可に関する事務手続き  
西部畜産事務所 浜田 明日香 … 4
- 3 鶏マイコプラズマ検査効率化の取組  
西部畜産事務所 兼廣 愛美 … 7
- 4 臍帯炎から継発した椎体膿瘍により起立不能となった子牛の一症例  
西部畜産事務所 伊藤 弘貴 … 14
- 5 様々な菌叢の牛糞便を用いたSalmonella属菌検出条件の検討  
西部畜産事務所 船守 足穂 … 20
- 6 腹膜炎による子牛の死亡事例  
北部畜産事務所 小林 凌士 … 26

## II 広島県農業共済組合

- 7 広島県内の酪農場における乾乳方法と分娩後の乳汁中体細胞数に関する調査  
NOSAI北広島家畜診療所 東谷 暁人 … 33

## III 高等学校

- 8 銀イオンを用いた乳房炎予防～銀イオンの抗菌効果と大腸菌群への影響～  
広島県立西条農業高等学校 山根 智紗乃 … 38
- 9 短期肥育の鍵(キー)は赤ぬかペレット！？  
広島県立西条農業高等学校 中江 潤 … 43
- 10 フリーゲージ卵で庄原に新たなブランド卵を！！  
広島県立庄原実業高等学校 泉 陽翔 … 47  
西山 來沙  
森田 流花

(注)

○：第64回中国・四国ブロック家畜保健衛生業績発表会 選出演題

# 広島血統和牛増産事業における 受精卵産子の供給協定に関する取り組みについて

西部畜産事務所

○坂寄淳平 日高充次

## はじめに

広島県では広島血統和牛増産事業の一環として、県内酪農経営体で生まれた和牛受精卵産子が県内に保留・肥育される仕組みとして、平成 28 年度から酪農経営体と肥育経営体の直接取引（以下「供給協定」）を推進している。

今回、供給協定に係る取り組み成果を検証したのでその概要を報告する。

## 方法

### 1. 事業概要

従来、県産和牛の消費推進のため、酪農経営体への受精卵移植を推進してきたが、産子の市場出荷の際、県内肥育経営体の購買率は約半数であった。

このため、受精卵産子の県内保留向上対策として、酪農経営体と県内肥育経営体で供給協定を結び、市場を経由しないで取引する仕組みを構築した。（図 1）

### 2. 取り組み内容

#### 1) 供給協定の推進

供給協定の推進にあたり、酪農及び肥育経営体のターゲットリストを作成し、飼養頭数、受精卵移植実績及び今後の継続性を検討し、事業効果の高い経営体を選定し、重点経営体を中心に供給協定の説明を行い、協定締結を促した。協定締結に当たっては肥育経営体とのマッチングを行い、産子の円滑な流通を目指した。

#### 2) 受精卵移植の推進

受精卵移植を取り組む酪農経営体の裾野を広げるには、安定した受胎率が重要であるため、受胎率向上対策に取り組んだ。

##### ア 定期的な新鮮卵の配布

毎月 1 回希望する酪農経営体に対し、新鮮卵配布を行った。

##### イ 高受胎率受精卵の普及

広島県が開発した、農場でガラス化卵を融解できる受精卵ストロー（ビトラン 7）の普及のため、移植技術者に対し研修を行った。

#### 3) 事業効果の検証

これまでの推進結果を今後の取り組みに反映するため、事業効果を検証した。

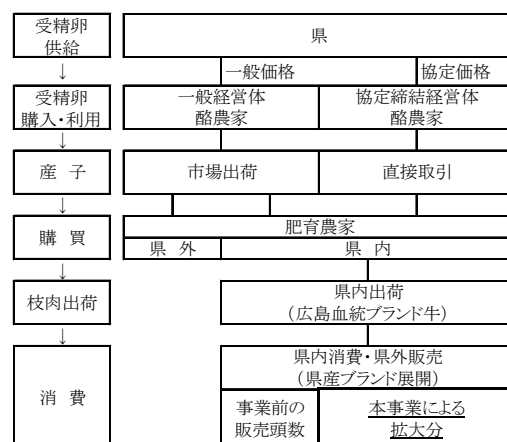


図 1 事業フロー

検証にあたっては (1) 協定経営体数 (2) 移植頭数 (3) 受胎率 (4) 産子の移動状況 (5) 受精卵移植に対する意識調査を指標とした。

## 成績

### 1) 協定経営体数

供給協定締結農家数は平成 28 年度の 2 戸から始まり、令和 4 年度には 13 戸にまで増加した。これは管内酪農経営体の 28% にあたる。(図 2)

### 2) 移植頭数

移植頭数は年によって増減はあるが増加傾向にある。(図 2、

3) 使用する受精卵の内訳は、供給協定の締結の推進により、供給協定卵の移植頭数が増加し、令和 4 年度は 98 頭となり一般販売の受精卵を上回った。

### 3) 受胎率

受胎率は年度によりばらつきがあるが、おおむね向上しており令和 4 年度は 47% であった。受精卵別では、新鮮卵 54%、ビトラン 46%、ガラス化卵 41% の順であった。(図 4)

ビトランの受胎率は、当初 20% 程度であったが技術者への技術指導により向上し新鮮卵には及ばないものの良好な受胎率となった。(図 4)

### 4) 産子の移動状況

当所管内の受精卵産子の移動頭数は、平成 30 年度から令和 2 年度の移植頭数の減少を反映し、令和 2 年度から令和 4 年度にかけて減少している。

産子の移動の内訳は、受精卵産子の市場である ET レースが減少傾向であるのに対し、協定農家への移動割合が増加している。全体の県内保留率は 82% で協定による事業効果を認めた。

(表 1) 枝肉出荷状況は、全体で 86% と高く、このうち供給協定による出荷牛の割合は増加傾向にあった。(表 2)

表 1 産子の移動状況

区分	移動先	H29	H30	R1	R2	R3	R4	総計
ETレース	県外	6	2	2	2	2	6	20
	県内	16	5	8	5	2	6	42
協定農家	県内	6	10	13	9	4	5	47
県内保留率		79%	88%	91%	88%	75%	65%	82%

表 2 枝肉出荷状況

出荷先	移動区分	R1	R2	R3	R4	総計
県外	ETレース	3	2	1	3	10
	協定農家	5	10	9	7	31
県内出荷率		86%	89%	93%	81%	86%

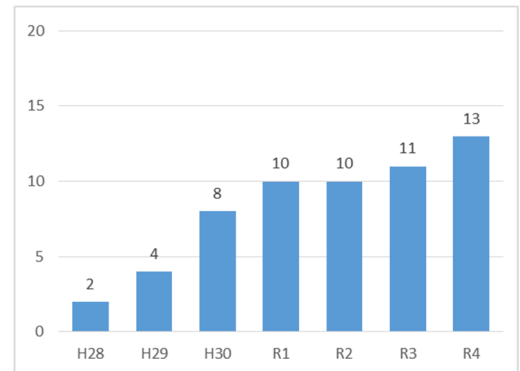


図 2 供給締結戸数

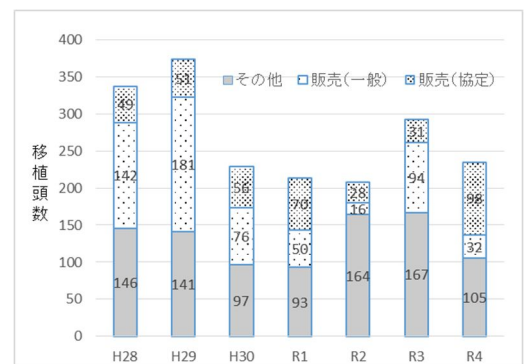


図 3 移植頭数の推移

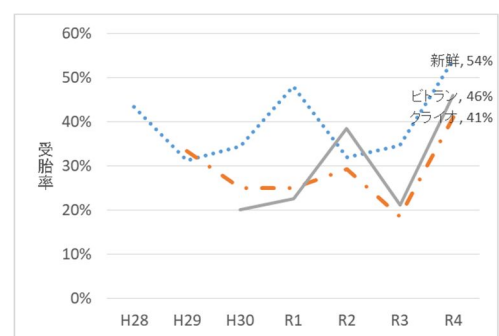


図 4 受胎率の推移

## 5) 農家の意識調査

酪農経営体に対する受精卵移植に関する意識調査では供給協定を締結していない酪農経営体は、①ET レースや子牛市場で自由に販売したい②所属団体の関係で免税制度を受けられないことが理由としてあがり、これが締結に至らない要因であった。また、受精卵移植を実施していない酪農経営体は①受精卵移植に興味がない②受胎率が人工授精に比べ低い③発情同期化等事前に行う処置が煩わしい④人手が足りず牛の管理が追い付かないなど様々であり、より十分な周知と説明が必要であることが判明した。

表3 農家の意識調査

経営体区分	取り組まない理由
供給協定 未締結	自由に販売したい
	所属団体の関係で免税制度を受けられない
受精卵移植 未実施	受精卵移植に興味がない
	受胎率が気になる
	発情同期化等、事前に行う処置が煩わしい
	人手が足りず受精卵移植に取り組む余裕がない

## まとめ

平成 28 年度に開始した供給協定の取り組みは、今回の検証により協定の推進、移植頭数、産子の県内保留等において一定の成果を確認した。しかし、協定経営体数が管内酪農家の約 30%程度であり、さらに多くの経営体の参加を呼びかける必要がある。また、受け入れる肥育経営体の戸数、頭数に限りがあるのでこれに対する対策も必要である。

現在、酪農経営体及び肥育経営体は生産費の高騰や販売価格の低下等により厳しい状況にある中で供給協定の取り組みはこの状況を乗り切るための対応策の一つになりうる。

酪農経営体においては、受精卵産子の販売による副収入の増加、肥育経営体では子牛の直接取引による安定した素牛確保及び販売面では県産ブランド牛の優位販売による売上げが見込まれる。また県としても、この取り組みの推進は県産ブランド牛の安定生産を通じ、広島県ブランドの確立に寄与するものとなる。

今後は、今回の検証結果をもとに酪農及び肥育経営体に対し供給協定のメリットの理解を進め、個々の経営体に応じた進め方をプロデュースしながらさらなる推進に務める。

# 動物用高度管理医療機器の製造業登録及び製造販売業許可に関する事務手続

西部畜産事務所

○浜田明日香 平井潤思

## はじめに

令和4年度に、動物用高度管理医療機器の製造業登録申請（以下「製造業申請」）及び製造販売業許可申請（以下「製造販売業申請」）が、1業者（以下「A業者」）から同時にあった。申請目的は、小動物用骨接合用品の輸入及び販売であった。

当所ではこれらの申請は初めてであり、事務処理に長い時間を要することが想定されたため、対応を整理した。また、今後、同様の申請があった際に円滑に対応することを目的に、今回の対応結果の概要を報告する。

## 事務手続内容

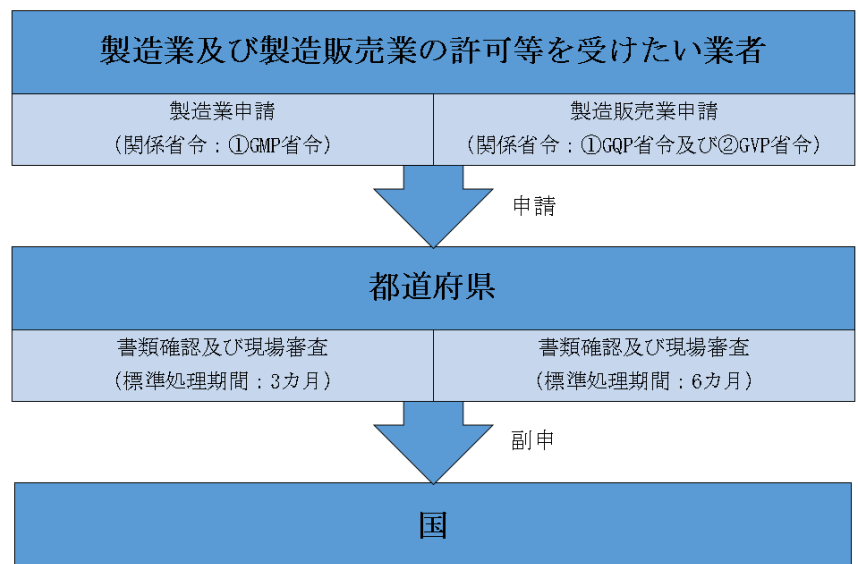
製造業申請及び製造販売業申請に関する事務手続は、国から都道府県に委託されている。都道府県は、手順書の整備内容が関係省令に基づいた点検表（平成12年3月31日付け12畜A第728号農林水産省畜産局長通知）と合致しているか、確認しなければならない。都道府県が申請を受理し、申請者に対し許可証等を交付するまでの標準処理期間（動物用医薬品等製造販売指針2020年版）は、製造業申請で3カ月、製造販売業申請は6カ月である。

表1 手続の流れ

製造業申請は、①GMP省令（動物用医療機器及び動物用体外診断用医薬品の製造管理及び品質管理に関する省令）に基づき、事業者が手順書を整備する必要がある。

製造販売業申請は、①GQP省令（動物用医療機器及び動物用体外診断用医薬品の製造管理及び品質管理に係る業務を行う体制の基準に関する省令）及び②GVP省令（動物用医薬品、動物用医薬部外品、動物用医療機器及び動物用再生医療等製

品の製造販売後安全管理の基準に関する省令）に基づき、事業者が手順書を整備する必要がある。



## 課題

1. A業者から当所に提出された申請書類のうち、手順書は29手順と、量が多かった。
2. 手順書は規定された様式がないため、省令と文言が異なっていた場合、手順書の内容が点検表のどこに合致するか確認に時間を要した。

3. 内容の誤り等を確認する際、記載内容が適当か判断に迷う事例があった。例えば、「安全確保業務に係る組織及び職員」(GVP 省令第 4 条)において十分に人員を配置することとしているが、どの程度的人员が必要なのか。また、「自己点検」(GVP 省令第 10 条)においては、定期的な自己点検を求めているが、どの程度の頻度が必要なのか等、省令に具体的な基準が示されていないものに関して、何を基に判断すればよいか不明であった。

## 対応

1. 主及び副担当で、各々、1 日に 1 手順書を確認することを目標に作業を進め、定期的に進捗状況等を協議した。複数人体制で対応したことで、短時間で確認することができた。

2. A 業者作成の手順書が、総則

表 2 手順書の構成について (GVP 省令)

及び各手順書・様式で構成されていることに着目し、総則に、関係省令に基づいた点検表に記載された項目と、各省令の該当条項が全て記載されていることを明らかにした。そこで、総則を基に必要な点検項目や該当条項を確認し、各手順書及び様式に詳細な内容(目的、手順、記録の保存等)が漏れなく記載してあることを確認することができた。

GVP省令点検表	
条項	項目
第3条	医薬品等総括製造販売責任者等の業務
第4条	安全確保業務に係る組織及び職員
第5条	製造販売後安全管理業務手順書等
第6条	安全管理責任者の業務
第7条	安全管理情報の収集
第8条	安全管理情報の検討及びその結果に基づく安全確保措置の立案
第9条	安全確保措置の実施
第10条	自己点検
第14条	安全確保業務に係る記録の保存

手順書		
	内容	確認方法
総則	全ての条項と項目が記載	GVP省令点検表を基に確認
各手順書・様式	総則に基づく、詳細内容(目的、手順、記録の保存等)が記載	主に動物薬事関係基準解説書集を基に確認

3. 動物薬事関係基準解説書集(公益社団法人日本動物用医薬品協会発刊)を参考とし、解説書集にある関係省令の解説や Q&A に記載された具体的な基準を活用して、効率的に確認することができた。また、解説書集には手順書及び様式のモデルも掲載されており、これらも参考とした。

4. 現場審査の前に A 業者と当所による打合せを実施し、手順書を紙面上だけでなく、実務的に機能していることを確認することができた。

## 結果及び考察

今回の事務手続では、手順書の総則に関係省令に基づいた点検表の項目と該当条項が全て記載されていたことから、効率的に手順書の内容を確認して、期間内に副申を行うことができた。

また、実際に申請される頻度は少ないものの、管内における製造業申請等の手続に関する問合せを確認したところ、令和 3 年度に 1 件、令和 4 年度に 2 件あった。これらの問合せに対し速やかに回答ができるよう、手続に関する内容や窓口、連絡先等を整備し、当所でリーフレット(図 1)を作成した。

## まとめ

製造業申請及び製造販売業許可に関する事務手続は、国から都道府県に委託されているが、事務に関する具



体的な審査基準は示されていない。担当者の異動等によって、後任者にうまく引き継がれない場合があるため、今回の対応内容を整備し、マニュアル化するとともに、他の畜産事務所と共有して、効率的な事務手続きを図っていく。

【海外から医薬品を仕入れ販売する際の手続きについて】

	内容	書類提出先	必要書類	期間	備考
①動物用医薬品の製造販売業許可申請	販売目的で輸入する、事業者としての手続き	許可を受けようとする事務所が所在する都道府県	農林水産省のHPに掲載	6カ月(許可証が申請者に交付されるまで)	
②動物用医薬品の製造販売届出申請	販売目的で輸入する、品目としての手続き	動物用医薬品検査所 企画連絡室 審査調整課	動物用検査所のHPに掲載	1週間程度(確認済印押印届出書の送付まで)	
③動物用医薬品の外国製造業者認定	仕入先となる外国製造業者に取得が必要な手続き	農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課 薬事監視指導班	農林水産省のHPに掲載	3カ月(登録証が申請者に交付されるまで)	既に認定を受けている外国製造業者については、農林水産省のHPに公表
④動物用医薬品製造業登録	輸入後の包装、表示、保管を行う事業者としての手続き	登録しようとする製造所が所在する都道府県	農林水産省のHPに掲載	3カ月(登録証が申請者に交付されるまで)	

【各手続きの相談窓口】

手続き	相談窓口	連絡先
①動物用医薬品等の製造販売業許可申請	中国四国農政局消費・安全部 畜水産安全管理課(動物薬事担当)	TEL:086-224-4511
②動物用医薬品等の製造販売届出申請	動物用医薬品検査所企画連絡室 審査調整課	TEL:042-321-1841(代表) MAIL:nval_iryokiki@maff.go.jp
③動物用医薬品等の外国製造業者認定	農林水産省消費・安全局 畜水産安全管理課 薬事監視指導班	TEL:03-3502-8701(直通) MAIL:yakuji_kansi@maff.go.jp
④動物用医薬品製造業登録	中国四国農政局消費・安全部 畜水産安全管理課(動物薬事担当)	TEL:086-224-4511

図1 リーフレット

### 参考文献

- 1) 動物用薬事関係法令集 上巻 (公益社団法人 日本動物用医薬品協会、2020年11月)
- 2) 動物用医薬品等製造販売指針 (公益社団法人 日本動物用医薬品協会 2020年版、令和2年2月)
- 3) 動物薬事関係基準解説書集 (社団法人 日本動物用医薬品協会、2008年2月)
- 4) 動物用医薬品等の製造販売業製造業許可等申請に関するQ&A集  
([https://www.maff.go.jp/j/syouan/tikusui/yakuji/y\\_gyokyoka/attach/pdf/forms-1.pdf](https://www.maff.go.jp/j/syouan/tikusui/yakuji/y_gyokyoka/attach/pdf/forms-1.pdf)、農林水産省HP)

# 鶏マイコプラズマ検査効率化の取組

西部畜産事務所

○兼廣愛美

## はじめに

マイコプラズマは *Tenericutes* 門 *Mollicutes* 綱 *Mycoplasmatales* 科に属する細胞壁をもたない人工培地で培養可能な最小の原核生物である。様々な生物に感染するマイコプラズマ約 120 種が同定されているが、鶏から分離されるのは 3 属 13 種<sup>1)</sup> で、そのうち *Mycoplasma gallisepticum* (MG) 及び *Mycoplasma synoviae* (MS) は、鶏群において眼窩下洞炎、気管炎、気嚢炎、肺炎等の呼吸器疾患及び滑膜炎等を引き起こし（鳥マイコプラズマ症）、家畜伝染病予防法上届出伝染病に指定されている<sup>2)</sup>。本菌による感染は長期間に渡って持続するため、採卵鶏で育成率や産卵率低下、ブロイラーで飼料効率や増体率の低下、廃棄率増加などにより養鶏業に重大な経済的損失をもたらす<sup>3)</sup>。

診断方法には、血清学的診断方法として市販の MG あるいは MS 急速診断用菌液を用いた鶏全血または血清平板凝集反応や ELISA 法等があるが、これらはワクチン接種鶏も陽性反応を示すためワクチン抗体と感染抗体を識別できない。したがって鳥マイコプラズマ症の診断においては、原因菌の分離培養と分離菌同定（性状検査・遺伝子検査）による病原診断が定法である。しかし一方で鶏マイコプラズマの分離培養検査は、作製が煩雑で豚血清や  $\beta$ -NAD、新鮮イーストエキス等を添加した特殊な培地（Frey の培地等）と比較的長時間の培養時間を要する上、分離材料や投薬歴等により分離が困難な場合もある。さらに現在、鶏マイコプラズマ同定のために病性鑑定検査で汎用されているコンベンショナル PCR (cPCR) 法は、MG と MS を個別に実施する必要があるため手間と時間を要する<sup>4)</sup>。

今回、鶏マイコプラズマ分離培養検査に発育鶏卵接種法を導入することで分離率向上を図り、さらに遺伝子検査に従来法に代わるリアルタイム PCR (qPCR) 法の導入を検討することにより鶏マイコプラズマ検査の効率化に取り組んだので、その概要を報告する。

## 材料

### 1. 分離培養方法の検討

当所が所有する鶏由来 MG 株及び MS 株各 5 株（病性鑑定由来保存菌株）をタイトレーションにより菌液濃度を測定し、Trypticase Soy Broth (TSB) 培地で菌液濃度  $10^2 \sim 10^{-2}$  ccu/ml になるよう 10 倍段階濃度 ( $10^2$ 、 $10^1$ 、 $10^0$ 、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$  ccu/ml) に調整した菌液を用いた。通常、病性鑑定検査材料は鼻腔スワブや臓器乳剤等であるが、検査条件を同一化するために菌液を供試材料とした。

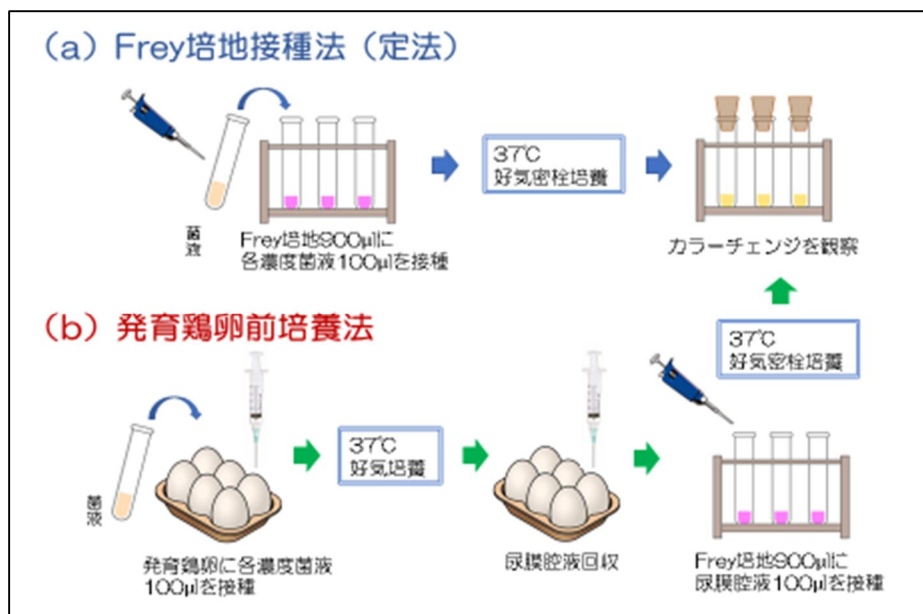
### 2. 遺伝子検査方法の検討

1 で用いた菌株と同じ MG 株及び MS 株各 5 株をタイトレーション後 TSB 培地で菌液濃度  $10^5 \sim 10^0$  ccu/ml になるよう 10 倍段階濃度 ( $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$ 、 $10^0$  ccu/ml) に調整した菌液と、あらかじめ一般細菌およびマイコプラズマ属菌陰性を確認した鶏肺乳剤に最終濃度  $10^5 \sim 10^0$  ccu/ml の 10 倍段階濃度になるように菌液を添加した MG/MS 添加臓器乳剤を供試検体とした。

## 方法

### 1. 分離培養方法の検討

1) Frey の液体培地接種法: 鶏マイコプラズマ分離培養方法の定法に準じて MG 株及び MS 株各 5 株の各濃度菌液 100 $\mu$ l を Frey の液体培地 900 $\mu$ l に接種し、マイコプラズマが増殖することで培地の pH が変化しカラーチェンジするまで 37 $^{\circ}$ C 最長 14 日間好気密栓培養した (図 1)。各濃度の菌液を接種した培地がカラーチェンジするま



(図 1) Frey 培地接種法と発育鶏卵前培養法

でに要した日数、すなわちマイコプラズマの発育増殖が認められるまでの日数と発育が認められる最小菌液濃度 (初代分離限界菌量) を記録した。

2) 発育鶏卵前培養法: MG 株及び MS 株各 5 株の各濃度菌液 100 $\mu$ l を前培養として発育鶏卵 (9~11 日齢) に尿膜腔内接種して 37 $^{\circ}$ C で 48 時間または 96 時間培養を行い、その後尿膜腔液を回収して 100 $\mu$ l を Frey の液体培地 900 $\mu$ l に接種、培地のカラーチェンジが認められるまで 37 $^{\circ}$ C 最長 14 日間好気密栓培養した (図 1)。各濃度の菌液を接種・前培養した発育鶏卵から回収した尿膜腔液を接種した各培地がカラーチェンジするまでに要した日数と発育が認められる最小菌液濃度 (初代分離限界菌量) を 1) の Frey の液体培地接種法と同様に記録した。

また、菌液 (濃度  $10^2$ ccu/ml) 100 $\mu$ l を発育鶏卵 8 個に接種したのち 37 $^{\circ}$ C で培養、各 2 個を培養時間 2 日間 (48 時間)、3 日間 (72 時間)、4 日間 (96 時間) 及び 7 日間の各時点で慎重に剖検して各発育鶏卵の状態と尿膜腔液量を測定した。試験は 10 回繰り返して各培養時間における発育鶏卵 1 個当たりの尿膜腔液量の最大値、最小値および平均尿膜腔液量を算出し、前培養を実施する場合の至適培養時間について検討した。

なお発育鶏卵尿膜腔内接種法とは、主に鳥インフルエンザやニューカッスル病、鶏伝染性気管支炎など鶏ウイルス疾患のウイルス分離やワクチン製造工程で用いられ、発育鶏卵の尿膜腔内に検体を接種し一定時間培養したのちに尿膜腔液を回収する方法である<sup>5)</sup>。

### 2. 遺伝子検査方法の検討

1) コンベンショナル PCR 法 (cPCR 法): MG は Kiss らの方法<sup>6)</sup> で、MS については Leuerman らの方法<sup>7)</sup> で各濃度の菌液及び MG/MS 添加臓器乳剤を検体として実施した。

2) リアルタイム PCR 法 (qPCR 法): 鶏マイコプラズマ同定のための qPCR 法は、各濃度の菌液及び MG/MS 添加臓器乳剤を用いて MG 用 Primer および Probe は Calisson らの方法<sup>8)</sup> で、MS 用 Promer は Lauerman らの方法<sup>7)</sup> で、Probe は Aline らの方法<sup>10)</sup> でそれぞれ設計されたものを用い、試薬は TaKaRa Probe qPCR Mix、使用機器は当所所有の Roche LightCycler 96 System と Thermo Fisher QuantStudio3 リアルタイム PCR システムを用いた。MG および MS の qPCR 法実施における反応液組成及び qPCR 反応条件は、上記試薬および使用機器に合わせて

今回独自に考案した。検量線は濃度  $10^5$ ccu/ml に調整した MG および MS 各菌液で DNA を抽出し、これを  $10^5 \sim 10^0$ ccu/ml に 10 倍段階希釈して設定した。MG 及び MS の遺伝子増幅は、qPCR 産物を 1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動し、それぞれ 139bp 及び 207bp サイズの増幅産物を確認した。

3) DNA 抽出方法の比較：cPCR 法を実施する際に汎用されている Bio-Rad InstaGene Matrix と qPCR 法で汎用されている DNA 抽出キットの 1 つである QIAGEN QIAamp DNA Mini Kit を用いて、既知の菌量の菌液と MG/MS 添加臓器乳剤を材料に DNA 抽出を行い、抽出方法による違いを比較した。

4) DNA 抽出効率の比較：QIAGEN QIAamp DNA Mini Kit を用いて、菌液（濃度  $10^5$ ccu/ml）200 $\mu$ l で Kit プロトコール通り DNA 抽出をした場合と、同菌液 1ml で前段階に検体濃縮処理工程、すなわち検体を 8000rpm5 分間遠心処理したのち上清を除去し、キット内蔵の試薬 BufATL と Proteinase K を添加、56°C で 1 時間インキュベート後キット内蔵の BufAL を添加して 70°C で 10 分インキュベートする工程を検体前処理として行い、その後 Kit プロトコールの通りに DNA 抽出した場合の DNA 抽出量を比較した。

## 成績

### 1. 分離培養方法の検討

MG については Frey の液体培地接種法では、接種菌量  $10^2$ ccu/ml で初代分離に要した日数は平均 3.5 日、 $10^1$ ccu/ml では平均 4.25 日で、初代分離限界菌量は  $10^0$ ccu/ml だった。

一方発育鶏卵前培養法では、前培養を 48 時間行った場合、前培養時間を含めて初代分離に要した日数は接種菌量  $10^2$ ccu/ml で平均 6.3 日、 $10^1$ ccu/ml では平均 6.5 日で初代分離限界菌量は  $10^0$ ccu/ml だった。前培養を 96 時間行った場合、初代分離に要した日数は接種菌量  $10^2$ ccu/ml 及び  $10^1$ ccu/ml で共に平均 7.25 日で、初代分離限界菌量は  $10^0$ ccu/ml だった。発育鶏卵前培養法に要した日数（前培養 48 時間：平均 6.3~6.5 日、前培養 96 時間：平均 7.25 日）から前培養時間の 48 時間あるいは 96 時間を差し引いた日数、つまり発育鶏卵による前培養後の Frey の液体培地培養時間は 4.3~4.5 時間（6.3~6.5 日-48 時間（2 日）=4.3~4.5 日）及び 3.25 時間（7.25 日-96 時間（4 日）=3.25 日）だった。

MS については、Frey の液体培地接種法では、接種菌量  $10^2$ ccu/ml で初代分離に要した日数は平均 4.0 日、 $10^1$ ccu/ml では平均 5.25 日で、初代分離限界菌量は  $10^0$ ccu/ml だった。

一方発育鶏卵前培養法では、前培養を 48 時間行った場合、前培養時間を含めて初代分離に要した日数は接種菌量  $10^2$ ccu/ml 及び  $10^1$ ccu/ml で共に平均 5.5 日、初代分離限界菌量は  $10^{-1}$ ccu/ml だった。前培養を 96 時間行った場合、初代分離に要した日数は接種菌量  $10^2$ ccu/ml 及び  $10^1$ ccu/ml で共に平均 6.75 日で初代分離限界菌量は  $10^{-1}$ ccu/ml だった。発育鶏卵前培養法に要し

（表 1）初代分離に要した日数と分離限界菌量

（上段：MG，下段：MS）

MG	Frey培地 接種法	発育鶏卵前培養法 (48hr=2日)		発育鶏卵前培養法 (96hr=4日)	
		初代分離に 要した日数	うちFrey培地接 種後日数	初代分離に 要した日数	うちFrey培地接 種後日数
$10^2$ ccu/ml	3.5日	6.3日	4.3日	7.25日	3.25日
$10^1$ ccu/ml	4.25日	6.5日	4.5日	7.25日	3.25日
分離限界	$10^0$	$10^0$		$10^0$	
MS	Frey培地 接種法	発育鶏卵前培養法 (48hr=2日)		発育鶏卵前培養法 (96hr=4日)	
		初代分離に 要した日数	うちFrey培地接 種後日数	初代分離に 要した日数	うちFrey培地接 種後日数
$10^2$ ccu/ml	4.0日	5.5日	3.5日	6.75日	2.75日
$10^1$ ccu/ml	5.25日	5.5日	3.5日	6.75日	2.75日
分離限界	$10^0$	$10^{-1}$		$10^{-1}$	

た日数（前培養 48 時間：平均 5.5 日、前培養 96 時間：平均 6.75 日）から前培養時間の 48 時間あるいは 96 時間を差し引いた日数、つまり発育鶏卵による前培養後の Frey の液体培地培養時間は 3.5 時間（5.5 日-48 時間（2 日）=3.5 日）及び 2.75 時間（6.75 日-96 時間（4 日）=2.75 日）であった（表 1）。

発育鶏卵前培養法における至適前培養時間を検討するために発育鶏卵（10 日齢）に菌液を接種して経時的に胎子及び付属物等の状態の観察と尿膜腔液量を測定した結果、日齢が進むほど発育鶏卵内部の血管の発達が進み、2 日間（48 時間）、3 日間（72 時間）、4 日間（96 時間）および 7 日間培養時の発育鶏卵 1 個当りの回収可能な尿膜腔液量はそれぞれ最大値 13.8ml、13.7ml、11.7ml、7.2ml、最小値 4.4ml、3.5ml、3.3ml、1.5ml、平均 8.18ml、8.9ml、8.09ml、4.18ml で、日齢が進むほど液量は減少し混濁を認めた。

## 2. 遺伝子検査方法の検討

従来法の MG 及び MS 同定 cPCR 法と表 2 の通り考案した反応液組成及び反応条件で qPCR を実施し両者を比較した結果、検査所要時間は cPCR 法で MG 約 1 時間 30 分、MS 約 3 時間（結果判定のためのアガロースゲル電気泳動の作業時間及び泳動時間約 1 時間は含まず）に対し、qPCR 法では MG、MS 共に所要時間は約 1 時間、泳動の必要はなく、MG、MS ともに反応液組成及び反応条件が同じであるため、同時検査が可能、つまり両菌種を一度に約 1 時間で結果を出すことができた。検出感度は cPCR 法で MG 菌量  $10^2$ ccu/ml、MS

（表 2）MG/MS qPCR 法の比較

【反応液組成 (with ROX)】		【PCR条件 (with UNG)】	
Probe qPCR Mix (2 ×)	10µl	* LightCycler 96 system	* QuantStudio3
PCR Forward Primer	0.4µl	Hold (25°C 10min)	Hold (25°C 10min)
PCR Reverse Primer	0.4µl	Cycle: 1 95°C 30sec	Cycle: 1 95°C 20sec
Probe	0.8µl	2 Step PCR	2 Step PCR
(ROX Reference Dye	0.2µl)	Cycle: 45 95°C 5sec	Cycle: 45 95°C 3sec
N-free water	6.4µl (6.2µl)	60°C 30sec	60°C 30sec
DNA template	2µl		
Total	20µl		

方法	所要時間	検出感度	コスト (1検体あたり)	長所	短所
cPCR法 (MG)	約1時間30分 +電気泳動60min	$10^2$	約95円	費用がやや安価	時間がかかる。 MG/MS個別に検査必要。 泳動の手間。
cPCR法 (MS)	約3時間 +電気泳動約60min	$10^3$			
qPCR法 (MG)	54min (LightCycler96)	$10^1$	約100円	速い。MG/MS 同時検査。定量 可能。泳動 不要	cPCR法に比べて やや高価。
qPCR法 (MS)	57min (QuantStudio3)	$10^0$			

菌量  $10^3$ ccu/ml に対して qPCR 法ではそれぞれ  $10^1$ ccu/ml 及び  $10^0$ ccu/ml 程度検出できた。1 検体当りの必要コストは cPCR 法で約 95 円、qPCR 法では約 100 円で、qPCR 法がややコスト高だった（表 2）。

菌液及び MG/MS 添加臓器乳剤を検体に Bio-Rad InstaGene Matrix と QIAGEN QIAamp DNA Mini Kit を用いてそれぞれ DNA 抽出を行い、qPCR 法で DNA 抽出量を定量して抽出効率を比較すると、QIAGEN QIAamp DNA Mini Kit を用いて菌液から DNA 抽出をした場合が MG、MS 共に最も抽出効率が良く（菌量  $10^5$ ccu/ml で Ct 値 (Cycle of Threshold) MG :  $30.5 \pm 1.5$ 、MS :  $23 \pm 1$ ）、臓器乳剤では含まれる夾雑物等で抽出が阻害される影響で DNA 抽出量は菌液の場合よりも多少減少した（菌量  $10^5$ ccu/ml で Ct 値 MG :  $31.5 \pm 1.5$ 、MS :  $24 \pm 1$ ）が、MG、MS 共に  $10^1$ ccu/ml 濃度まで qPCR 法での検出が可能だった。一方 Bio-Rad InstaGene Matrix を用いて MG/MS 添加臓器乳剤から DNA 抽出を行い qPCR 法を実施した場合、乳剤中の菌量  $10^5$ ccu/ml で Ct 値は MG :  $33.5 \pm 1.5$ 、MS :  $32 \pm 21$  で、MG、MS 共に菌量  $10^2$ ccu/ml 以下では検出できなかった。

QIAGEN QIAamp DNA Mini Kit を用い、検体濃縮工程を取り入れて抽出した DNA テンプレートによる qPCR の Ct 値は MG : 29.92、MS : 20.35、一方 Kit プロトコール通り DNA 抽出をした DNA テンプレートの場合は MG : 31.99、MS : 23.01 で、検体拘縮工程を取り入れた方法の方が抽出に供する検体量を増加できる分だけ Kit プロトコール通りに DNA 抽出をした場合よりも、より多くの DNA が回収できた。

## まとめおよび考察

MG 及び MS 両菌種を用いて、定法である Frey の液体培地接種法と今回試験した発育鶏卵前培養法を比較すると、後者は前者より Frey の液体培地がカラーチェンジするまでに要する時間が短縮したことから、両菌共に発育鶏卵内で発育及び増殖していると考えられた。しかしながら、MG は両方法間での初代分離限界菌量が同じであったため、発育鶏卵前培養法による MG 初代分離の分離率向上に効果的とは言えず、前培養に要する時間分だけ初代分離に余分な時間がかかるという結果だった。一方 MS については、発育鶏卵による前培養後の Frey の液体培地のカラーチェンジに要する時間に明らかな短縮が認められ、初代分離限界菌量も定法より約 1/10 濃度の菌量においても分離が可能だったことから、発育鶏卵前培養法による分離率向上が期待できると思われた。

鶏マイコプラズマ検査の効率化において、分離率向上と共に検査の迅速性は重要な点であるため、発育鶏卵前培養法における至適前培養時間を検討した結果、初代分離限界菌量は 48 時間と 96 時間のいずれの培養時間においても同じであった。一方で、発育鶏卵尿膜腔液量は経時的に減少すると共に鶏卵内の血管の発達が進み、尿膜腔液の回収作業が困難になることから、発育鶏卵による前培養時間は 48 時間が至適であると考えられた。

冒頭に記した通り、マイコプラズマは一般細菌が有する細胞壁を持たず、最外層は細胞膜（限界膜）で覆われている。細胞膜の構成成分は種によって異なるが、主成分はタンパク質（50～60%）及び脂質（20～40%）である一方、マイコプラズマは脂質の中で最も重要なコレステロールや脂肪酸の合成能を持たない。またマイコプラズマは、ミトコンドリアやゴルジ体などの細胞内小器官を持たず、一般細菌と比較して人工培地で発育・増殖するために必要な多種類の酵素を十分に有していない。さらに一般的にマイコプラズマは、十分なエネルギー産生システムを持っていないため、高分子物質の合成に必要なエネルギーを得るために大量の炭水化物を必要とする<sup>1) 10)</sup>。こうした特殊な構造と代謝機構を持つマイコプラズマの栄養要求性を満たすためには、培地中にコレステロール、脂肪酸及びタンパク質等の供給源としての血清を始め、各種ビタミン、ミネラル、アミノ酸、核酸及びその前駆体の供給源としての新鮮イーストエキス、窒素源としてペプトン、菌種によってはさらに DNA や  $\beta$ -NAD の添加が必要である。加えてマイコプラズマの分離に際しては、特に初代分離時に接種材料中のインヒビターや混在する一般細菌の影響で希釈培養をしないと分離されない場合があることが知られているため<sup>1)</sup>、マイコプラズマ検査には液体培地と固形培地を要するが、前述の栄養要求を満たしたこれらの培地を検査の都度準備することは非常に煩雑で手間がかかる。今回の試験では、発育鶏卵接種法における MG 及び MS の発育を確認する目的と実際の検査における初代分離後の継代や薬剤感受性試験等に供するための分離菌株のクローニング等を考慮して発育鶏卵接種法を前培養として位置づけ、前培養後に Frey の液体培地による培養を実施したが、初代分離及び菌種の同定 PCR 法を実施するだけであれば、発育鶏卵接種法を実施し 48 時間培養後の尿膜腔液で遺伝子検査を行うことが可能で、培地及び資材の節約と検査の迅速化に有効と考えられた。

微生物の増殖は一般的に誘導期、対数期、静止期、死滅期より構成され、マイコプラズマの増殖曲線も同様であるが、多くの菌種で一般細菌よりも静止期が短くすぐに死滅期に移行し、人工培地を用いた場合約 7 日程度で死滅する。一方でマイコプラズマは、HeLa 細胞等の培養細胞や発育鶏卵において血清添加なしに良く増殖し、かなり長期間にわたって静止期が維持されることが知られている<sup>10)</sup>。このことからマイコプラズマ分離検査に発育鶏卵接種法を応用することは分離率向上に効果的であると思われる。

また、近年の高病原性鳥インフルエンザ (HPAI) 発生をうけて、鶏の病性鑑定検査においては HPAI 検査が必須であり、発育鶏卵接種法を通常検査として実施している。この際、一般細菌の混入を避けるため検体は 0.45 $\mu$

m孔径程度のフィルター滅菌後に発育鶏卵に接種するが、MG 及び MS の大きさは 0.15~0.3 $\mu$ m であるため多少の菌数減少はあるがフィルターを通過する。したがって HPAI 検査で接種・回収した尿膜腔液を今回の発育鶏卵前培養法を用いた鶏マイコプラズマ分離検査に準用でき、この点においても検査の省力化を図ることが可能である。

遺伝子検査の効率化を図るため、鶏マイコプラズマ (MG・MS) 検査へのリアルタイム PCR 法の導入を検討した結果、今回考案した MG/MS qPCR 法は検出感度、検査所要時間、定量性及び作業の簡便性等で従来法である cPCR 法よりも優れていた。特に cPCR 法では個別に行う必要のある MG・MS 両菌種の遺伝子検査を同一反応系で実施できるため、作業時間及び作業工程を大幅に短縮・省力化できた。qPCR 法の定量については一般的に DNA コピー数を用いるが、当所では設備上 DNA (核酸) を定量することが出来ないため、MG・MS 各培養菌液をタイトレーションにより濃度調整して用いた。したがって定量値は DNA コピー数ではなく測定値も厳密な値ではないが、本取組みは鶏マイコプラズマ検査の効率化を目的に検査手法として qPCR の導入を模索したものであり、今回の遺伝子検査方法の検討により qPCR 法が従来法と比較して検出感度、検査所要時間、作業性等において検査の省力化および迅速化に有用であることが示唆された。また、今後の展望として既知の MG 及び MS のゲノムサイズ (*Mycoplasma gallisepticum* VA94\_7994-1-7P 株:0.96Mb, *Mycoplasma synoviae* ASMI339374v1 株:0.82Mb<sup>11)</sup>) と吸光度法による 260nm の吸光度 (A<sub>260</sub>=1) となる核酸濃度 (DNA=50ng/ $\mu$ L) から供試菌液中の DNA 濃度の定量を行い DNA コピー数を算出することで、より正確な検量線作成と定量 PCR が実施可能と考えられた。さらに今回考案した qPCR 法は、MG 及び MS 両菌種を同一反応液組成及び反応条件で実施できることから反応液組成をさらに工夫することにより、MG/MS Multiplex qPCR 法も可能であることが示唆された。

qPCR 法に供する DNA テンプレートについては、cPCR 法で多用されている Bio-Rad InstaGene Matrix による DNA 抽出よりも今回用いた QIAGEN QIAamp DNA Mini Kit もしくは同等の精製が可能な DNA 抽出キットを用いる方がより適しており、供試する検体が夾雑物等により DNA 抽出や PCR 効率が阻害される可能性のある臓器乳剤等の場合や菌量が少ないことが予想される場合には、DNA 抽出方法を工夫することで遺伝子検査の検出感度を上げることが出来ると考えられた。

今回実施した取組みにより、発育鶏卵接種法を取り入れた MG 及び MS 分離培養方法が人工培地では比較的分離困難であるこれらの菌種の分離率向上に有効な方法であり、遺伝子検査への qPCR 法の活用が従来法よりも高い検出感度と検査の迅速性を可能にするものであることがわかった。これらの方法を検査手技に組み合わせることで定法よりも鶏マイコプラズマ検査の効率化を図ることが出来ると思われた。

## 参考文献

- 1) 尾形学ら：マイコプラズマとその実験法，(株)近代出版：230-251, 336-340 (1988)
- 2) 家畜伝染病予防法（昭和二十六年法律第百六十六号）第四条第一項に基づく家畜伝染病予防法施行規則（昭和二十六年農林省令第三十五号）第二条
- 3) 宝達勉編：動物の感染症第四版，(株)近代出版：215-216 (2019)
- 4) 農林水産省消費安全局監修：病性鑑定マニュアル第4版，全国家畜衛生職員会：390-392 (2016)
- 5) 原澤亮ら：獣医微生物学実験マニュアル，チクサン出版社 134-138 (2009)
- 6) I Kiss, K Matiz, E Kaszanyitzky, Y Chávez, K E Johansson: Detection and identification of avian

- mycoplasmas by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism assay. *Vet. Microbiol.* 58, 23-30 (1997).
- 7) L H Lauerman, F J Hoerr, A R Sharpton, S M Shah, V L van Santen : Development and application of a polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis.* 37, 829-834 (1993)
  - 8) S. A. Callison, S. M. Riblet, S. Sun, N. Ikuta, et al. : Development and Validation of a Real-Time Taqman Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in Naturally Infected Birds. *Avian Dis.* 50, 537-544 (2006)
  - 9) Aline Padilha Fraga, Tatiana de Vargas, Nilo Ikuta, et al. : A Multiplex real-time PCR for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in clinical samples from Brazilian commercial poultry flocks. *Brazilian Journal of Microbiology* 44, 2, 505-510 (2013)
  - 10) 尾形学, 榎田晴美 : 不思議な微生物マイコプラズマの生物学, 化学と生物 : 8号, P265-275 (1970)
  - 11) HP:National Library of Medicine, NCBI (National Center for Biotechnology Information) : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>



# 臍帯炎から継発した椎体膿瘍により起立不能となった子牛の一症例

西部畜産事務所

○伊藤弘貴 細川久美子

## はじめに

子牛の臍帯炎は臍の消毒不足等を要因とし、血行性に全身感染につながる細菌感染症である<sup>1)</sup>。また、臍帯炎や肺炎等の細菌感染巣から血行性の波及により椎体に膿瘍が形成され、これが脊髄を圧迫することで神経症状を呈することがある<sup>2)</sup>。今回、起立不能となった子牛において、不顕性の臍帯炎に起因する肝病変及び椎体膿瘍を確認したので、その概要を報告する。

## 材料と方法

### 1. 症例概要

県内の乳用牛飼養農家で令和4年3月3日に出生した交雑種（雌）体重約50 kg。

同年3月11日に呼吸器、下痢（白痢）症状を主訴に加療。

4月6日介助により起立するが、直後に倒れ、左側横臥位を取る。食欲は旺盛。体温 39.0℃、WBC42,950/ $\mu$ l（加療：チアミン）

4月7日起立不能（加療：チアミン、デキサメタゾン、オキシテトラサイクリン）

4月8日起立不能（加療：デキサメタゾン、バイトリル）

4月12日起立不能、呼吸促拍、両前肢虚脱、体温 39.8℃。予後不良のため病性鑑定を依頼（39日齢）。

### 2. 病理学的検査

#### 1) 解剖学的検査

当該子牛について鑑定殺後、常法により、病理解剖を実施した。

#### 2) 組織学的検査

解剖学的検査により、採材した臓器（肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、舌、気管、食道、胸腺、第一～四胃、膵臓、小腸、大腸、脊髄、小脳、大脳、脳幹部、下垂体、三叉神経、頸部膿瘍、膿瘍部頸椎、臍静脈）を10%緩衝ホルマリンで固定、骨組織では脱灰処理後に常法により、組織標本を作製、HE染色、グラム染色及び免疫組織化学的染色を実施した。

#### 3) 免疫組織化学的染色

HE染色及びグラム染色で菌体を認めた病変部切片を用い、一次抗体に病原大腸菌免疫血清「生研」（デンカ生研）O20、ウサギ抗 *Trueperella pyogenes* (*T. p*) 抗体（動物衛生研究部門）を用い、常法により実施した。

### 3. 細菌学的検査

#### 1) 菌分離

脳、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、肺及び頸部膿瘍を材料として、5%羊血液加寒天培地（37℃、48時間、嫌気培養）及びDHL寒天培地（37℃、24時間、好気培養）を用いて分離培養を実施した。

## 2) 大腸菌O群血清型別

頸部膿瘍から分離された大腸菌1株について、病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いてスライド凝集反応法によりO群血清型別を実施した。

## 3) 薬剤感受性試験

有意と考えられる分離菌3株(肝臓由来 *T.p.*、頸部膿瘍由来 *Escherichia coli*(*E. c*)及び *Streptococcus equinus* (*S. e*)各1株)について、16薬剤(アンピシリン、アモキシシリン、ペニシリン、セファゾリン、セフトリオラム、カナマイシン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、エリスロマイシン、エンロフロキサシン、コリスチン、ST合剤、テトラサイクリン、リンコマイシン、フロロフェニコール及びホスホマイシン)を用いて一濃度ディスク拡散法により薬剤感受性試験を実施した。

## 成績

### 1. 病理学的検査

#### 1) 解剖学的検査

臍静脈は肝臓付近において大きく拡張、血管壁は肥厚し、その内腔には白色粥状で悪臭を伴う膿汁が貯留していた。肝臓では数mmから数cmの類円形で被包化された膿瘍(白色クリーム状またはチーズ様)が多数形成され(図1)、膿瘍が密集する実質では退色を認めた。第7頸椎から第1胸椎付近では胸腔側の気管食道傍まで及ぶ波動感のある膿瘍の形成を認めた(以下、頸部膿瘍、長軸約75mm、図2)。当該部位の脊柱管側では膿瘍が椎間板から脊柱管に向けやや突出、硬膜に癒着するとともに脊髄を圧迫していた(図3、4)。

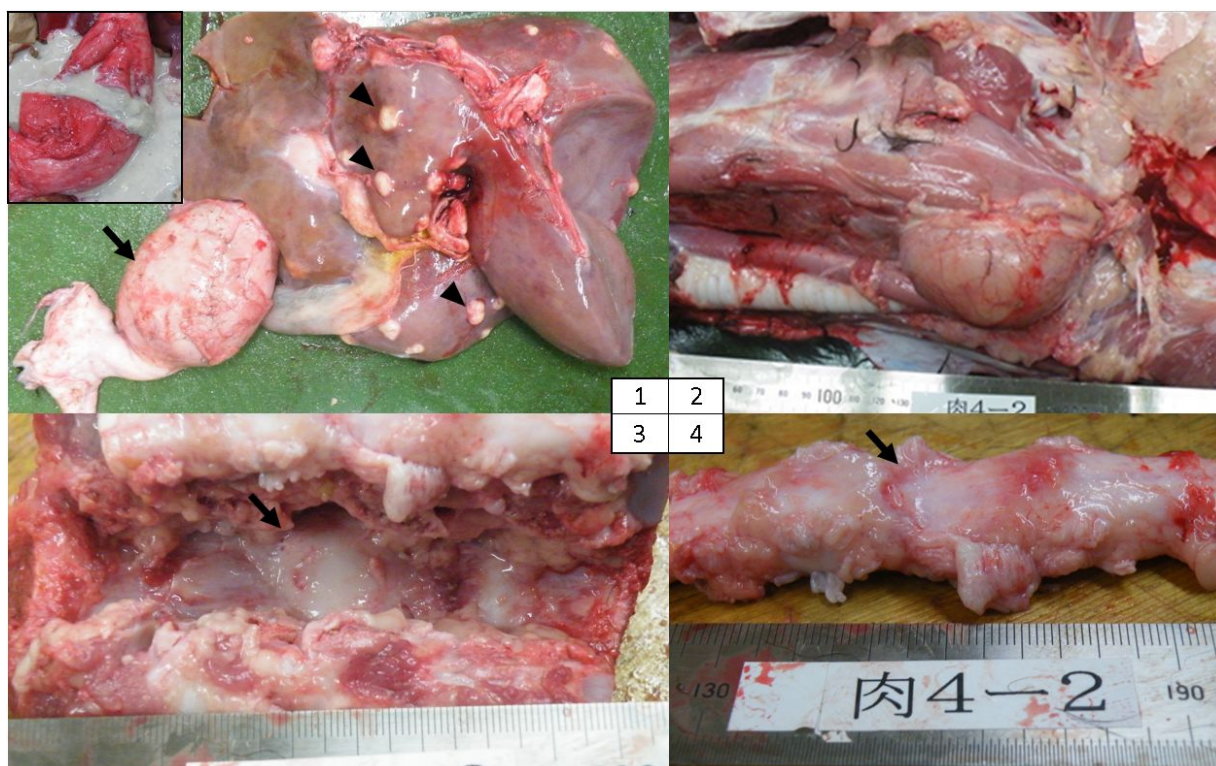


図 1. 臍静脈における血管拡張（矢印）と内腔での膿汁貯留（黒枠）、肝臓における膿瘍形成（矢頭）。図 2. 頸部膿瘍（頸椎腹側に形成し、気管や食道を圧迫している）。図 3. 図 2 の膿瘍と同一領域の脊柱管内では膿瘍形成に伴い椎間板が隆起している（矢印）。図 4. 図 3 の隆起部に相当する脊髄では、圧迫されて陥没している（矢印）。

## 2) 組織学的検査

臍静脈では、内腔に菌塊とデブリが貯留し内膜は壊死していた。静脈壁は線維性結合組織が増生し肥厚していた。肝臓において、大小不同の膿瘍は細胞退廃物、グラム陽性不定形及び球菌の菌塊、壊死した炎症細胞、石灰の沈着で構成されたデブリが貯留し、その周囲をマクロファージ、リンパ球、形質細胞、線維芽細胞で囲まれ、線維性結合組織によって被包化されていた。膿瘍周囲の肝細胞は変形、萎縮し類洞に好中球やマクロファージが認められた。病変部椎体の骨髄及び骨膜周囲では好中球、グラム陰性桿菌を伴う壊死組織を認め、この周囲にマクロファージ、線維芽細胞の浸潤及び血管新生を認めた。さらに、骨膜周囲の壊死巢外層は結合組織で重度に肥厚していた。（図 5）。圧迫部の脊髄では、白質に散在性の軸索変性及び灰白質に神経細胞の色質融解が散見され（図 6）、硬膜と硬膜外の結合組織にごく軽度の好中球及びリンパ球浸潤が認められた。

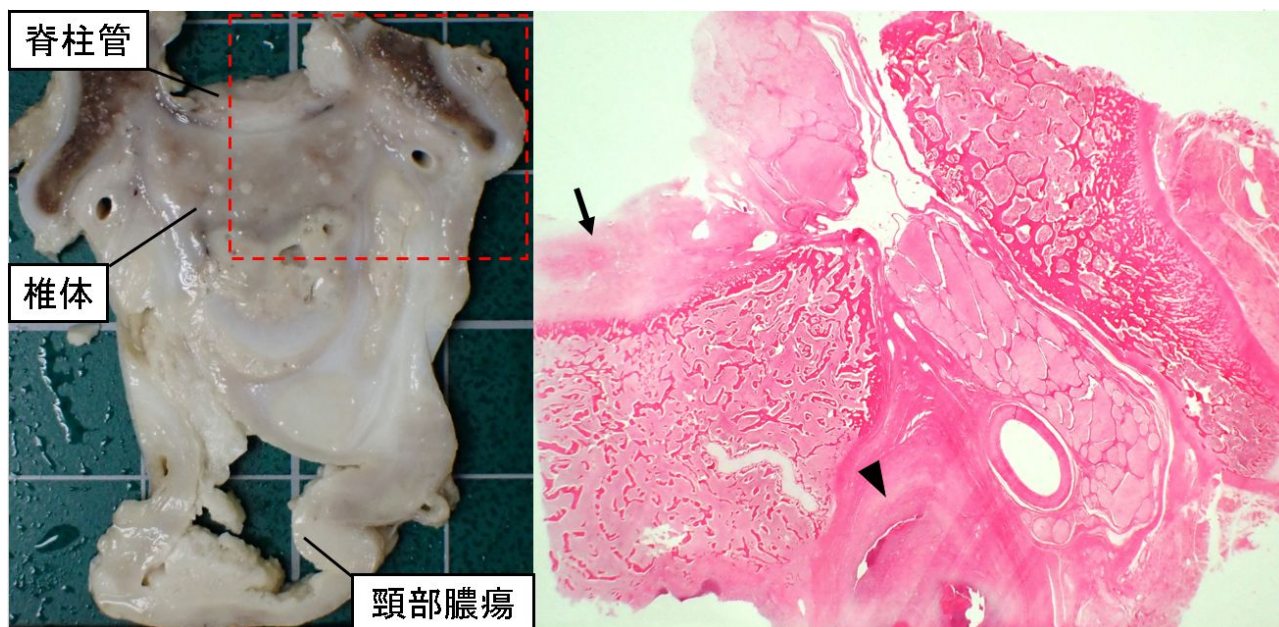


図 5. 頸部膿瘍を認めた領域における頸椎横断写真（左図；ホルマリン固定後）及び左図で赤枠の領域における HE 染色ルーペ像（右図）。脊柱管内膿瘍（矢印）、椎体周囲膿瘍（矢頭）を形成しており、椎骨の骨髄内には壊死組織が貯留し、一部では骨融解している。

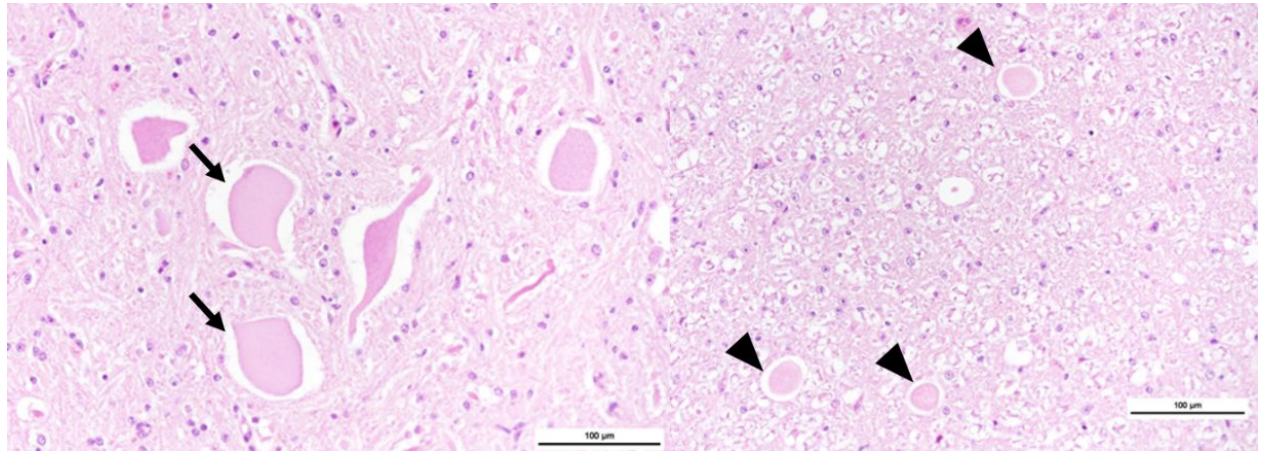


図 6. 圧迫部脊髄で認めた灰白質における神経細胞の中心性色質融解（左図、矢印）及び白質における軸索膨化（右図、矢頭）。

### 3) 免疫組織化学的染色

抗 *T. p* 抗体では頸部膿瘍、椎骨周囲炎症部及び脊椎硬膜において陽性反応を示す菌体をわずかに認めた。抗 O20 抗体では頸部膿瘍、椎骨周囲炎症部に陽性反応を示す菌体を散見した。肝臓では膿瘍単位で抗 O20 抗体や抗 *T. p* 抗体に陽性を示す菌体を認めた。

## 2. 細菌学的検査

### 1) 菌分離

肝臓から *T. p* が、頸部膿瘍から *T. p*、*E. c* 及び *S. e* がそれぞれ分離された（表 1）。

表 1：肝臓及び頸部膿瘍における分離結果

検体	菌種	菌量 (cfu/g)
肝臓	<i>Trueperella pyogenes</i>	$2.4 \times 10^3$
頸部膿瘍	<i>Escherichia coli</i>	$2.1 \times 10^3$
	<i>Trueperella pyogenes</i>	$1.8 \times 10^3$
	<i>Streptococcus equinus</i>	$3.2 \times 10^2$

### 2) 大腸菌 O 群血清型別

分離菌株は O20 に型別された。

### 3) 薬剤感受性試験

*T. p* は 1 薬剤に対し、*E. c* は 9 薬剤に対し、*S. e* は 3 薬剤に対し、耐性を示した（表 2）。

表 2：分離された菌株における薬剤感受性試験結果

薬剤名	判定			薬剤名	判定		
	<i>T. p</i>	<i>E. c</i>	<i>S. e</i>		<i>T. p</i>	<i>E. c</i>	<i>S. e</i>
アンピシリン	S	R	S	エリスロマイシン	I	NT	S
アモキシシリン	S	R	S	エンロフロキサシン	+++	R	++

ペニシリン	S	R	R	コリスチン	NT	R	NT
セファゾリン	S	I	S	ST 合剤	I	NT	S
セフトオフル	S	I	S	テトラサイクリン	S	R	R
カナマイシン	S	R	R	リンコマイシン	R	NT	NT
ストレプトマイシン	NT	R	NT	フロルフェニコール	+++	NT	+++
ゲンタマイシン	S	R	I	ホスホマイシン	NT	S	NT

判定 S：感受性、I：中間、R：耐性、NT：未実施、  
エンロフロキサシン- ~+++

## まとめ

本症例は、第7頸椎から第1胸椎付近の膿瘍形成と膿瘍に圧迫された頸髄の軸索変性及び色質融解が認められたことから、稟告の起立不能は脊柱管内膿瘍形成による脊髄圧迫が原因と推察された。

牛では細菌感染による二次性の椎体膿瘍は起こりやすく、特に *T. p* は最も多く分離される細菌である<sup>3)</sup>。本症例においても膿瘍から *T. p* が分離されたことから、本菌が膿瘍形成に関与したことが推察された。また、免疫組織化学的染色では *T. p* 及び *E. c* の抗原はいずれも限局的に確認された。一方で、本症例ではオキシテトラサイクリン及びエンロフロキサシンでの治療歴があり、分離された *T. p* は薬剤感受性試験においてこれらの抗生剤に対し感受性であったことが判明した。本症例では、抗原の分布などから膿瘍の形成に一義的に関与した菌種の診断には至らなかった。その一因として、抗生剤による治療が原因菌に対し有効であったことから病変部において抗原を有意には確認できなかったが、膿瘍形成による脊髄圧迫という物理的な起立不能の発症要因の抑制には至らず、症状は維持され予後不良と判断された可能性が考えられた。

本症例において出生直後の臍帯炎は治療済みで外貌から異常は認めない不顕性の臍静脈炎であったことが推察され、慢性経過の臍静脈炎により肝臓へ重度な膿瘍を形成し頸部椎体膿瘍へ血行性に波及したものと考えられた。

不顕性の臍帯炎は、11カ月齢を第1病日とした慢性化症例の報告もあり、その経過は様々である<sup>4)</sup>。本症例のように外貌上異常を認めないことが特徴であるが、超音波検査での腹腔内臍帯膿瘍形成確認により診断し外科的に治療した報告があることから<sup>5)</sup>、臍帯炎の程度次第では生前診断及び治療可能な疾病といえる。一方で、本症例の様に膿瘍形成により他臓器に波及した場合には治療が奏功しないことが懸念される。また、慢性経過の事例では長期に育成することになるため、農場の経済的な損失も大きい。既報では臍帯炎の既往歴がある症例も多いため、この既往歴がある個体については特に治療後注視し、難治性や断続的な発熱、呼吸器症状などの異常を認めた際には当該疾病を視野に入れた早期の診察や治療が必要であると考えられた<sup>6)</sup>。

## 参考文献

1) 木村久美子：子牛の潜在性臍帯炎に起因する肝病変の病理組織学的検索、日本獣医師会雑誌、73、96-

100 (2020)

- 2) 村田 芙花 : 椎体膿瘍および椎体周囲膿瘍による腰椎病的骨折のホルスタイン種育成牛にみられた後躯麻痺の 1 症例、産業動物臨床医学雑誌、10 (1)、22-25 (2019)
- 3) Dabareiner RM : Large Animal Internal Medicine. Smith BP ed, 4th ed, 1189-1258 (2009)
- 4) 真方 文絵 : 11 カ月齢の乳用育成牛における腹腔内の巨大な膿瘍形成を伴った臍帯炎の 1 症例、北海道獣医師会雑誌、55 (4)、128-130 (2011)
- 5) 笹倉 春美 : 超音波画像診断装置を用いた子牛の臍部異常の診断と治療法の選択、日本獣医師会雑誌、68、434-437 (2015)
- 6) 出口 祐一郎 : 潜在性臍炎と多発性膿瘍が認められた乳子牛の 1 症例、北海道獣医師会雑誌、53、159-161 (2009)

# 様々な菌叢の牛糞便を用いた *Salmonella* 属菌検出条件の検討

西部畜産事務所

○船守足穂

## はじめに

牛サルモネラ症は、*Salmonella enterica* を原因とした発熱や下痢を主徴とした伝染性疾病である<sup>1)</sup>。これらのうち、血清型 Typhimurium、Dublin、Enteritidis による疾病は届出伝染病に指定されており、国内では年間約 300 頭の発生が報告されている<sup>2)</sup>。本病は発生すると短期間での清浄化が困難で経済的被害が大きいため、対策として適切な抗菌剤による治療、畜舎の清掃・消毒に加え、糞便検査による保菌牛の摘発が重要である。一般に、本検査では糞便をハーナ・テトラチオン酸塩培地 (HTT) 等により増菌培養後、DHL 寒天培地 (DHL) 及び ES サルモネラ寒天培地 II (ES II) 等の選択平板培地によりサルモネラの分離培養を試みるが (図 1)<sup>3, 4)</sup>、本法によりサルモネラを検出可能な糞便中の菌量等については検証例が稀少であった。今回、人工的に再現した様々な糞便を用いて、サルモネラが検出される培養条件について検討した。

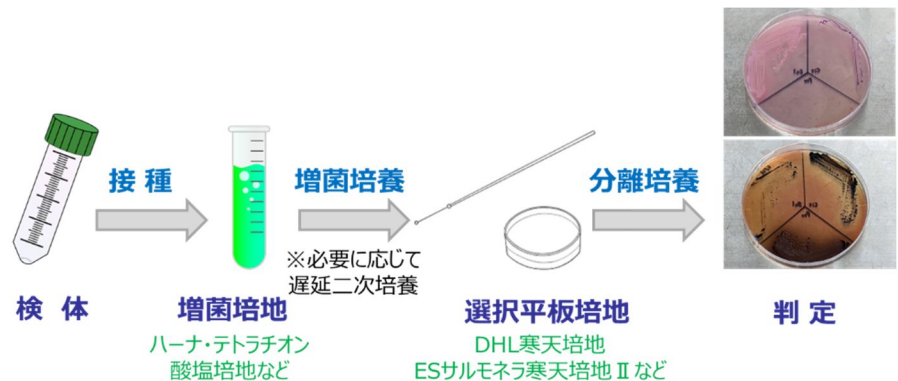


図 1: 糞便を用いたサルモネラ検査フロー図

## 材料及び方法

### 1. 供試菌株

過去に本県で分離された牛糞便由来サルモネラ 5 株 (血清型 Typhimurium、Dublin、Saintpaul、Stanley 及び Thompson 各 1 株) と、夾雑菌として糞便中に常在し HTT 中で増殖可能な細菌 4 株 (*Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Proteus mirabilis*、*Citrobacter freundii* 各 1 株) を供試した。

### 2. 検体の調製

予めサルモネラ陰性を確認した健康牛由来糞便に、1. のサルモネラを  $10^1 \sim 10^4$  cfu/g の 4 段階、夾雑菌を  $10^5$  もしくは  $10^8$  cfu/g となるように、(1)サルモネラ 1 株のみ、(2)夾雑菌による影響を調査するためサルモネラと夾雑菌を 1 株ずつ混合し、調製した糞便 (未希釈糞便) 及びその 10%PBS 乳剤を 3. のサルモネラ分離培養に供した (図 2)。

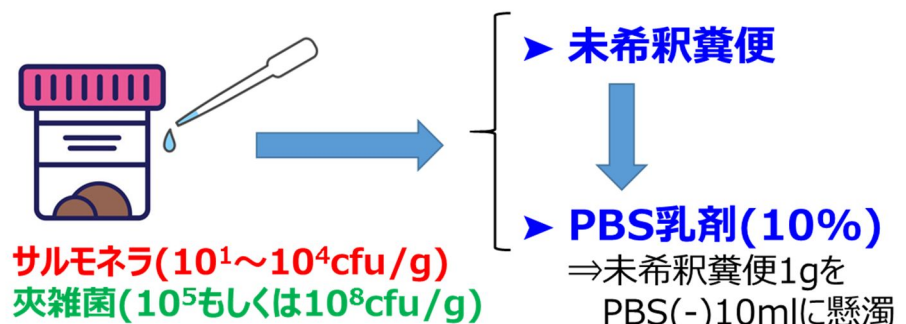


図 2: 検体の調製

### 3. サルモネラ分離培養

2. で調製した検体 1g を電子レンジ溶解 (600W・1分以内で吹きこぼれない程度に加熱) もしくはオートクレーブ (AC) 処理 (121°C・15分) した HTT10ml により増菌培養 (37°C24時間・好気培養) し、培養上清 1 エーゼ分を DHL 及び ES II に継代 (37°C24時間・好気培養) し、サルモネラの分離を試みた。検出されない場合、さらに遅延二次培養 (増菌培養後の HTT を室温で 7 日間静置後、培養上清 1mL を HTT10ml に接種して再度増菌培養 (37°C24時間・好気培養) し、培養上清 1 エーゼ分を DHL 及び ES II に継代 (37°C24時間・好気培養)) も実施した<sup>3, 5)</sup>。サルモネラの発育は、平板上に発育したコロニーを目視で確認することにより判定した。

### 成績

1. サルモネラのみ混合: いずれの血清型・菌量においてもサルモネラは分離されたが、PBS 乳剤については、菌量が  $10^1$ cfu/g の場合、一次増菌のみでは検出されないケースが認められた。また、*S. Dublin* は他血清型よりも発育が悪い傾向にあった (図 3)。

2. 夾雑菌存在下: 未希釈糞便については、*K. pneumoniae* を  $10^8$ cfu/g 混合した場合を除き、いずれの血清型・菌量の検体においてもサルモネラは分離されたが、PBS 乳剤は未希釈糞便よりも検出率が低く、*S. Dublin* は他血清型よりも発育が悪い傾向にあった (図 4-7)。

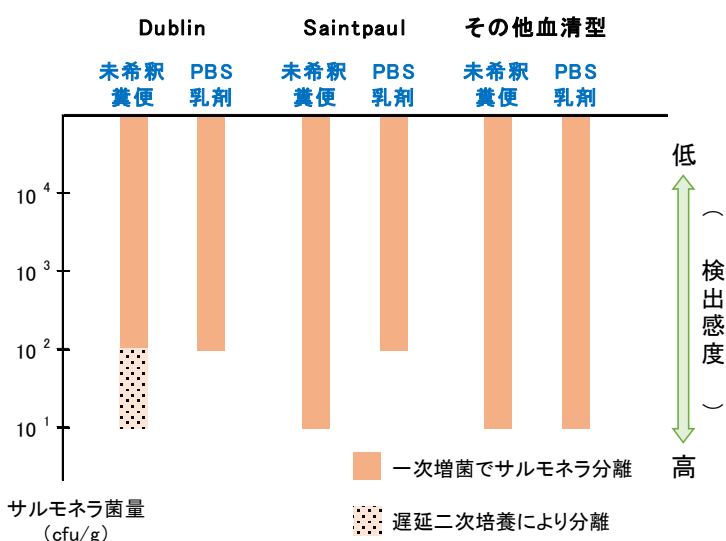


図 3: サルモネラ分離成績 (糞便にサルモネラのみ混合)

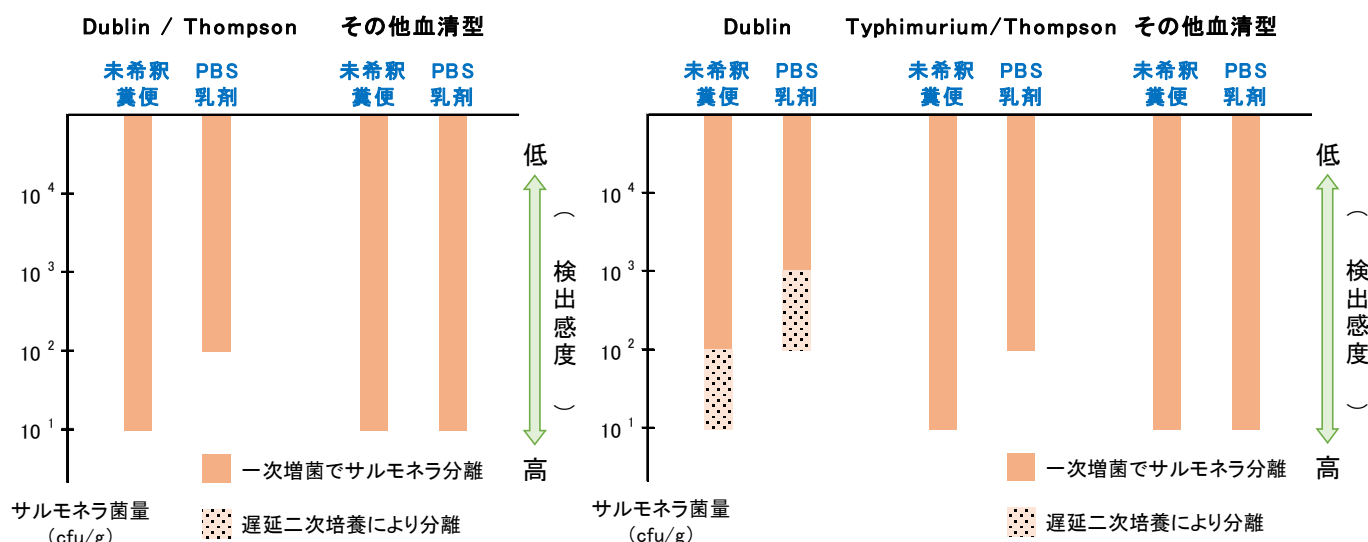


図 4: サルモネラ分離成績 (糞便にサルモネラ及び大腸菌 (左:  $10^5$ cfu/g、右:  $10^8$ cfu/g) を混合)



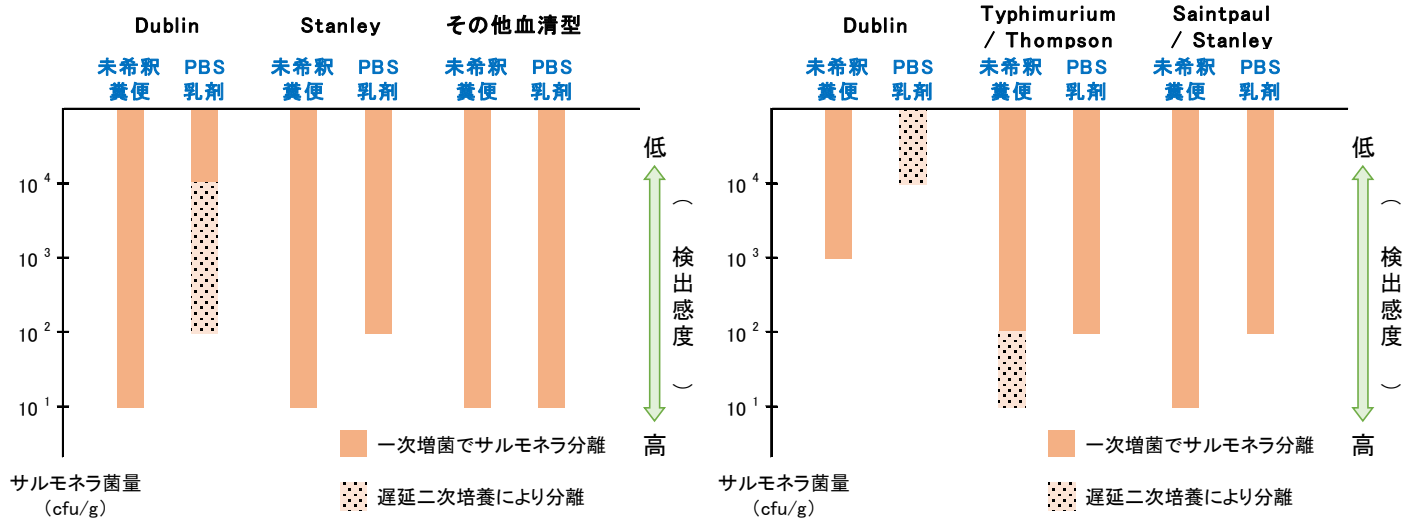


図5：サルモネラ分離成績（糞便にサルモネラ及びクレブシエラ（左： $10^5$ cfu/g、右： $10^8$ cfu/g）を混合）

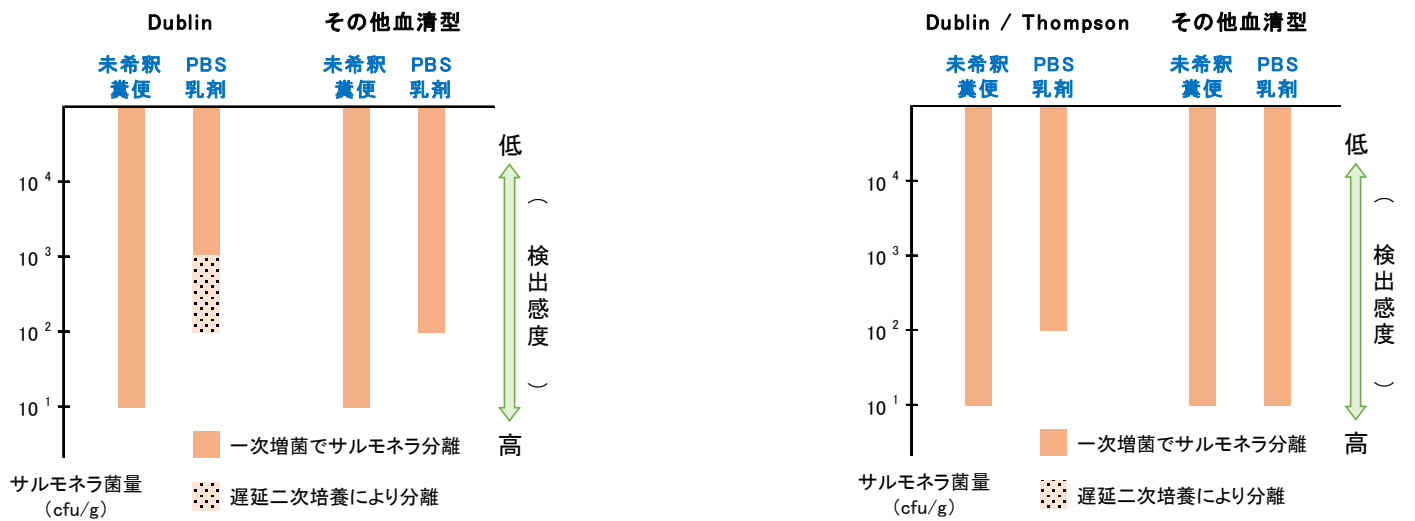


図6：サルモネラ分離成績（糞便にサルモネラ及び  
*P. mirabilis* ( $10^5$ cfu/g) を混合）

図7：サルモネラ分離成績（糞便にサルモネラ及び  
*C. freundii* ( $10^5$ cfu/g) を混合）

一次増菌培養については、レンジ溶解HTTの方がAC処理HTTよりもサルモネラを分離しやすい傾向にあり、一例として、*S. Typhimurium*  $10^2$ cfu/g・*K. pneumoniae*  $10^8$ cfu/gを混合した未希釈糞便を供試したところ、レンジ溶解HTTで増菌培養するとサルモネラが分離されたが、AC処理HTTで増菌培養した場合、サルモネラは分離されなかった（写真1）。

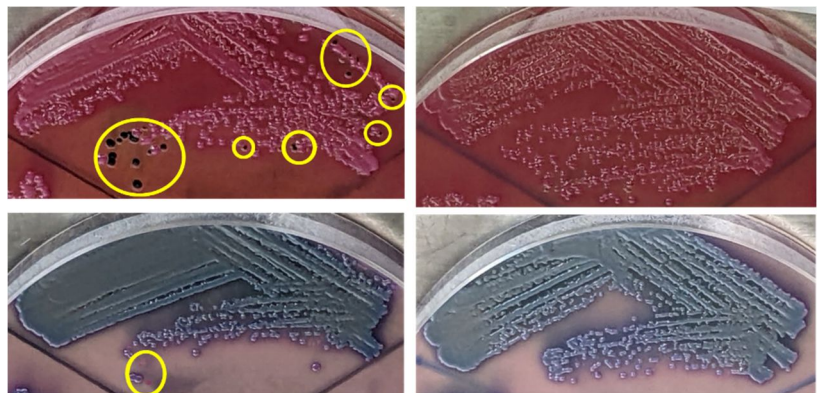


写真1：レンジ溶解HTT（左）とAC処理HTT（右）の比較

（上：DHL、下：ES II）レンジ溶解HTTで増菌培養した場合、サルモネラコロニー（○印）が確認された。

平板培地については、DHL・ES IIとも概ね同等の感度でサルモネラが分離されたが、夾雑菌が少量であれば DHLの方がサルモネラを分離しやすく、夾雑菌（特に硫化水素産生菌）が優位な場合は ES IIの方がサルモネラを分離しやすい傾向にあった。一例として、*S. Dublin* 10<sup>2</sup>cfu/g・*C. freundii* 10<sup>5</sup>cfu/gを混合した未希釈糞便を AC

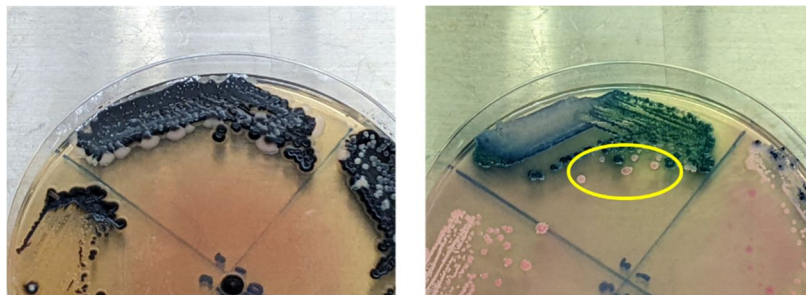


写真2：DHL（左）とES II（右）の比較  
ES IIのみサルモネラコロニー（○印）が確認された。

処理 HTT で一次増菌した培養上清を供試したところ、ES IIからはサルモネラが分離されたものの、DHL では *C. freundii* が優位に発育し、サルモネラコロニーは確認されなかった（写真2）。

### 考 察

サルモネラ保菌牛摘発を目的とした糞便検査でサルモネラ分離陰性であった場合、サルモネラ未感染牛なのか、あるいは排菌が少なく検出されなかったのか、判断に苦慮することがある。既報では、*S. Dublin* は糞便中の菌量が 10<sup>3</sup>cfu/g 以上で分離可能とされていたが<sup>6)</sup>、本調査においては糞便中に 10<sup>1</sup>cfu/g 以上サルモネラが存在すれば検出可能であった。これは既報<sup>6)</sup>と比較すると検出感度が高い成績であったが、本調査では繰り返し継代して人工培地に馴化したサルモネラ菌株を供試したため、良好に増殖したのではないかと考えられた。そのため、以下の考察は本調査に限ったものであり、野外症例においては検出感度が低下する可能性に留意する必要がある。

各血清型における検出感度を比較したところ、*S. Dublin* は他血清型より検出感度が低い傾向にあり、特に 10<sup>1</sup>cfu/g 程度の場合は一次増菌のみでは検出されないこともあった。このことから、疫学情報等により本血清型の関与が疑われる場合、夾雑菌の影響等により検出されにくいことに留意する必要があると考えられた。

同一培養方法における検体（未希釈糞便もしくは PBS 乳剤）によるサルモネラ検出感度を比較すると、560 検体中 102 例は未希釈糞便の方が PBS 乳剤よりも良好にサルモネラが分離され、うち 78%はサルモネラ菌量が 10<sup>1</sup>cfu/g であった（表1）。これは、乳剤作製の際に希釈処理によってサルモネラ濃度が 1/10 となるため、検出感度が低下したと推察された。PBS 乳剤は病原検索材料として供試する機会が多いが、サルモネラ検出を目的とした増菌培養においては、PBS 乳剤ではなく未希釈糞便を供試するのが望ましいと考えられた。

表 1：未希釈糞便・PBS 乳剤におけるサルモネラ検出感度の比較

		PBS乳剤		
		++	+	-
未希釈糞便	++	441	16	57
	+	5	4	29
	-	0	0	8

(++：一次増菌でサルモネラを分離、+：遅延二次培養により分離、-：分離されず)

HTT 調製方法(電子レンジ溶解もしくはAC処理)によるサルモネラ検出感度を比較すると、両者は概ね同じ傾向であり、検出感度に与える影響は小さいと考えられた(表2)。但し、AC処理HTTにおいて良好にサルモネラが分離されたケースは5例あり、うち80%は夾雑菌非存在下であった。一方、電子レンジ溶解HTTにおいて良好にサルモネラが分離されたケースは25例あり、これらは全て夾雑菌存在下であった。このことから、夾雑菌が少量であればAC処理HTTの優位性は高いものの、夾雑菌が存在する一般的な糞便においては、電子レンジ溶解HTTの方がサルモネラ検出率は高いと考えられた。HTTには夾雑菌の発育を抑制するデスオキシコール酸ナトリウム等が含有されるが、これはAC処理等により過剰に加熱すると変性し、夾雑菌抑制作用が低下する恐れがある<sup>7)</sup>。検査者もしくは検査施設によっては、サルモネラ検出率の向上を目的としてAC処理HTTを使用することがあるが、上述の理由により、糞便の菌叢によっては逆効果となることが懸念された。

平板培地(DHLもしくはESII)による検出感度の比較においては、両者とも概ね同等であったが、ESIIの方がDHLよりも良好にサルモネラが分離されたケースが12例あり、うち83%は硫化水素産生菌存在下であった(表3)。このことから、ESIIはサルモネラ選択性が高く、夾雑菌(特にDHL上でコロニーの形態が類似する硫化水素産生菌)が優位な場合に有用と考えられた。但し、一般にESII上でサルモネラはピンク色、他菌種は青紫色コロニーを形成するとされているが、*C. freundii*の一部はサルモネラに類似したピンク色コロニーを形成したため、判別に注意が必要であった(写真3)。この場合、さらに一晚培養すると次第に紫色に近づき、翌日には完全に紫色となったため、判定が困難な場合には培養時間を延長することが効果的と考えられた。

表2：電子レンジ溶解HTT・AC処理HTTにおけるサルモネラ検出感度の比較

		AC-HTT		
		++	+	-
レンジ-HTT	++	467	21	0
	+	3	15	4
	-	2	0	48

(++：一次増菌でサルモネラを分離、+：遅延二次培養により分離、-：分離されず)

表3：DHL・ESIIにおけるサルモネラ検出感度の比較

		ESII		
		++	+	-
DHL	++	471	2	0
	+	12	22	0
	-	0	0	53

(++：一次増菌でサルモネラを分離、+：遅延二次培養により分離、-：分離されず)

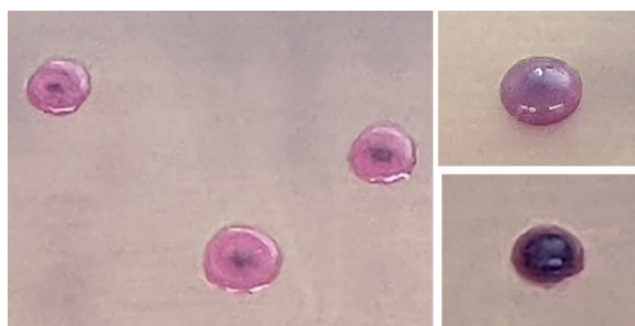


写真3：ESII上でピンク色コロニーを呈する*C. freundii*(左：培養24時間後、右上：48時間後、右下：72時間後)

一方、増菌培養後の同一 HTT から 1 エーゼ釣菌して DHL・ES II にそれぞれ接種すると、DHL は ES II よりも多くのサルモネラコロニーが発育する傾向にあった（写真 4）。これは、DHL は ES II と比較すると、夾雑菌だけでなくサルモネラに対する抑発育制作用も弱いことによると推察された。そのため、糞便中のサルモネラ及び夾雑菌が少量の場合、DHL の方が ES II よりもサルモネラコロニーの見落としリスクが低いと考えられた。

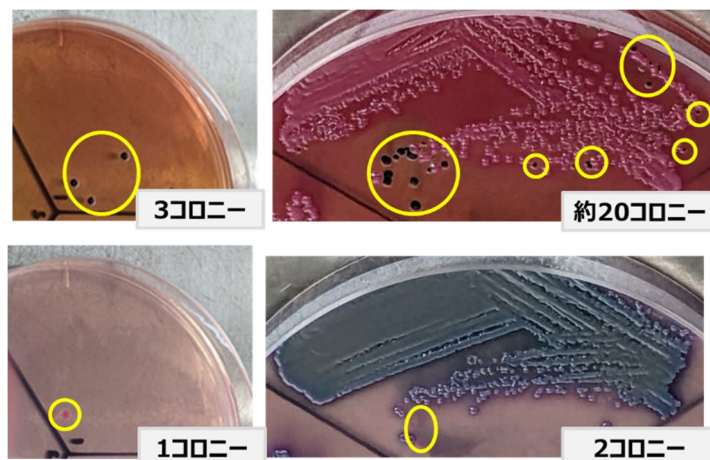


写真 4：同一の HTT から 1 エーゼ釣菌し、平板培地に継代 DHL（上）は ES II（下）よりも多くのサルモネラコロニー（○印）が確認された。

## まとめ

以上のことから、糞便からのサルモネラ分離率の向上には検体として PBS 乳剤よりも未希釈糞便を供すること、平板培地は DHL と ES II を併用することが望ましいと考えられた。HTT 調製においては、AC 処理といった過度な加熱はせず、培地成分の均一な溶解に必要な最低限の加温に留めることが重要である。野外症例においてサルモネラの分離培養を行う際は、本調査結果よりも検出感度が低下する可能性があることを想定しつつ、使用培地の特性等に留意して検査を実施する必要があると考えられた。

## 参考文献

- 1) 内田郁夫：牛のサルモネラ症、牛病学、明石博臣他編、第 4 版、262-264、近代出版（2013）
- 2) 農林水産省消費・安全局：監視伝染病の発生状況、([https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi\\_densen/kansi\\_densen.html](https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/kansi_densen.html))
- 3) 玉村雪乃：サルモネラ保菌牛の検査法、家畜診療、66(8)、507-508（2019）
- 4) 全国家畜衛生職員会：病性鑑定マニュアル、第 4 版（2016）
- 5) 中村政幸、矢島佳世、永田知史、竹原一明：鶏糞便からのサルモネラ培養法の検討、鶏病研究会報、36(4)、201-206（2000）
- 6) 山田真喜子、久保翠、稲原一幸：Salmonella Dublin の効率的な培養法の検討、第 69 回家畜保健衛生業績発表会集録（2022）
- 7) 大川三郎：培地学シリーズ 4、食品衛生コラム、株式会社バイオ・シータ、([https://www.bio-theta.co.jp/?食品衛生コラム\\_\\_◆培地学シリーズ\\_\\_培地学シリーズ4](https://www.bio-theta.co.jp/?食品衛生コラム__◆培地学シリーズ__培地学シリーズ4))

# 腹膜炎による子牛の死亡事例

北部畜産事務所

○小林凌士 部屋智子

## はじめに

牛では原発性の腹膜炎は極めて稀であり、多くは他の疾患に併発する形をとる<sup>1)</sup>。腹膜炎を継発する疾患では消化管、子宮、膀胱等の腹腔内臓器の損傷後に発症することが多い。症状としては、急性期は元気消失、沈鬱、腹部の疼痛、慢性期に移行すると漿膜と臓器が癒着を引き起こし、しばしば予後不良になる。従って、腹膜炎を疑う時には原発性の疾患の検索に注意を払う必要がある。

今回、臍帯炎の既往歴がある子牛が腹部の疼痛及び膨満を呈して死亡し、病性鑑定を行った結果、膀胱破裂によって併発した腹膜炎が原因と診断したので、その概要について報告する。

## 発生概要

発生農場では黒毛和種肥育育成牛を 127 頭、肥育子牛を 79 頭飼養していた。当該子牛は令和 4 年 6 月 14 日生まれの雄、10 日齢で当該農場に導入され、約 1 カ月間導入牛舎で飼養後、7 月中旬に別牛舎のカーフハッチへ移動した。当該子牛は繁殖農場にて臍帯炎の既往歴があり、時々下痢を発症するものの、食欲・活気共にあり異常は認められなかった。

9 月 4 日朝に飼養者が当該子牛が右横臥位状態で倒れているのを発見。体温 38.0℃、水様性下痢、発汗、触診で腹部の疼痛、聴診で腹部右側に腹水貯留を認めた。同居畜に同様の症状を呈する牛は認めなかった。抗生物質、解熱鎮痛剤、消化管運動改善薬、輸液による治療を開始し、夕方には起立及び飲水を確認した。なお、給餌は中止していたため食欲は不明であった。しかし、翌 9 月 5 日朝に死亡を確認したため、病性鑑定を実施した。

## 材料

死亡子牛（黒毛和種、雄、令和 4 年 6 月 14 日生、83 日齢）

## 方法

### 1. 病理解剖学的検査

定法に従い実施した。

### 2. 病理組織学的検査

死亡子牛の脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、消化管、膀胱、扁桃、各種リンパ節について 10%ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋、切片を作成し、定法に従いヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、グラム染色 (Brown-Hopps 法) を実施した。

### 3. 細菌学的検査

脳、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、肺、小腸上部、小腸下部、腹水を用いて、一般細菌 (5%羊血液加寒天培地、37℃、48 時間、嫌気培養)、腸内細菌 (DHL 寒天培地、37℃、24 時間、好気培養)、サルモネラ属菌 (ハーナ・

テトラチオン酸塩培地、37℃、24 時間、好気培養) についてそれぞれ分離培養を行った。

#### 4. 生化学的検査

腹水の遠心上清を用いて生化学自動分析装置 (富士ドライケム 7000V) により UN とクレアチニンを測定し、血液生化学検査基準値と比較した。

### 成績

#### 病理学的検査

##### 1. 病理解剖学的検査

体長は約 120 cm であり、腹部膨満、肛門周囲に泥状便の付着を認めた。

腹腔内は黄灰色腹水が中程度貯留しており、線維素析出を伴う腹膜炎、腹腔臓器癒着を認めた。また、尿膜管遺残 (尿膜管性膀胱憩室)、膀胱尖部で膀胱穿孔、膀胱内に膿様物 (5 mm 程度～約 2×1.5 cm)、軽度の膀胱粘膜肥厚、尿道口付近の粘膜面に出血を認めた。



図 1 死亡子牛外貌



図 2 線維素析出を伴う腹膜炎

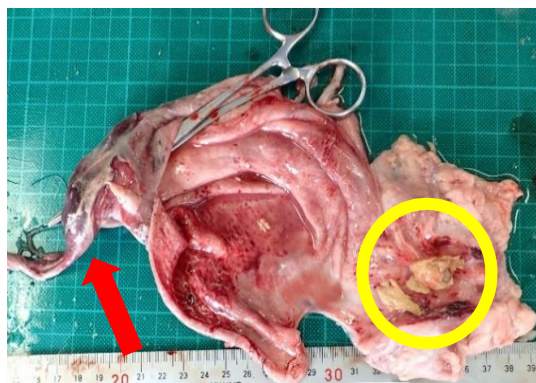


図 3 膀胱穿孔を鉗子で確認  
(矢印：尿膜管遺残部、円：膿様物)

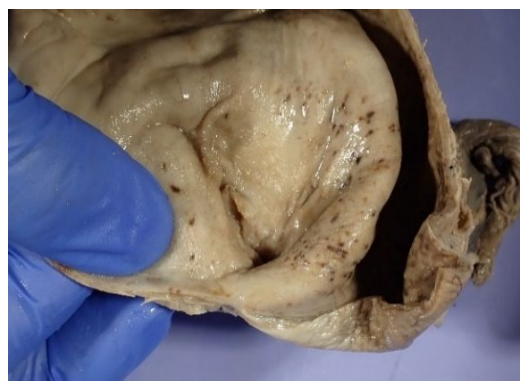


図 4 膀胱穿孔 (ホルマリン固定後)

##### 2. 病理組織学的検査

膀胱：膀胱三角では上皮が脱落し、好中球の浸潤、グラム陽性桿菌を主とした菌体付着を伴い、出血及び壊死していた。粘膜下組織は好中球を伴う出血、線維素析出を認めた。穿孔部において上皮は重度の好中球浸潤、グラム陽性桿菌を主とした多数の菌体付着を伴い出血壊死し、固有層ではマクロファージ浸潤を伴う出血及び壊

死層の形成を認めた。以上のことから化膿性出血性膀胱炎と診断した。

リンパ組織：多くのリンパ組織においてリンパ球の減数を認めた。

腹腔内臓器：多くの腹腔内臓器の漿膜面において、好中球浸潤、菌体を伴う線維素の析出を認めた。

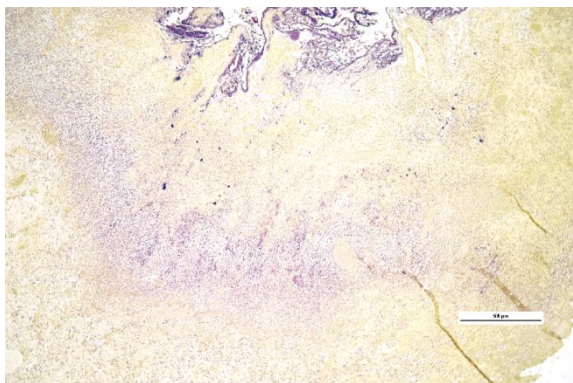


図5 グラム染色（膀胱穿孔部）

グラム陽性桿菌が付着

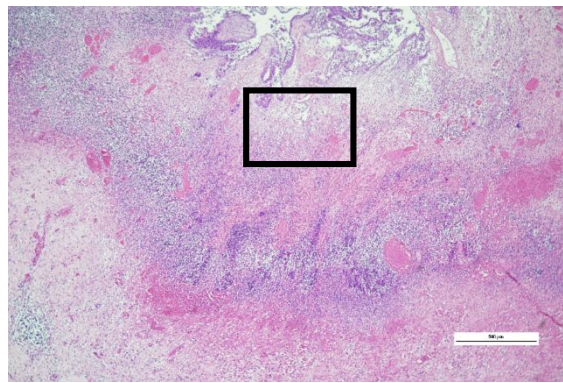


図6 HE染色（膀胱穿孔部）

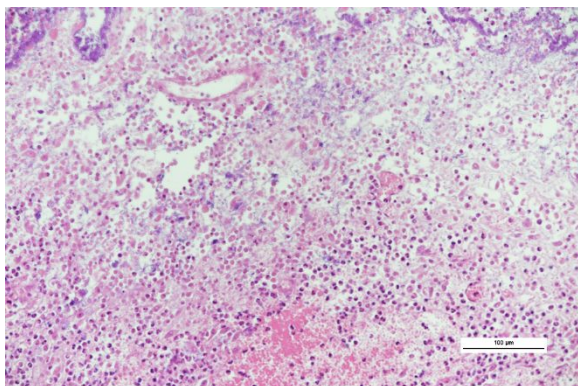


図7 図6黒枠を高倍率

好中球浸潤、出血壊死

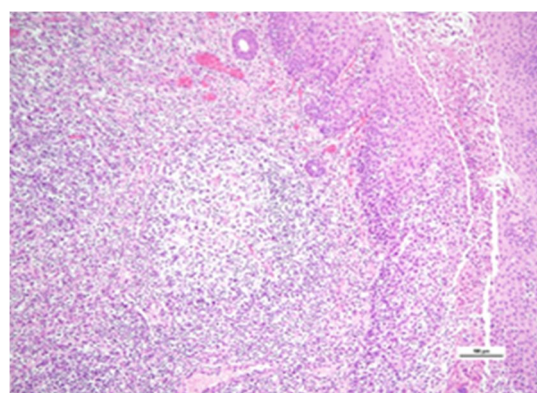


図8 HE染色（扁桃）

（丸：リンパ球の脱落）

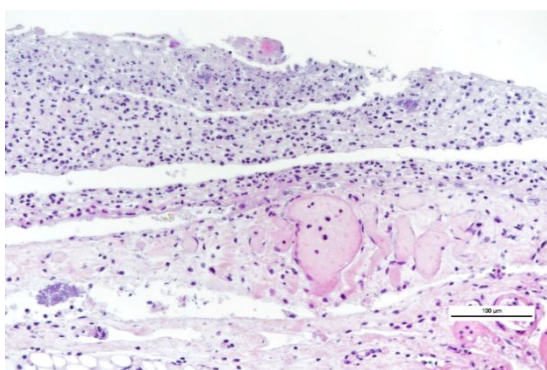


図9 HE染色（腎臓漿膜面）

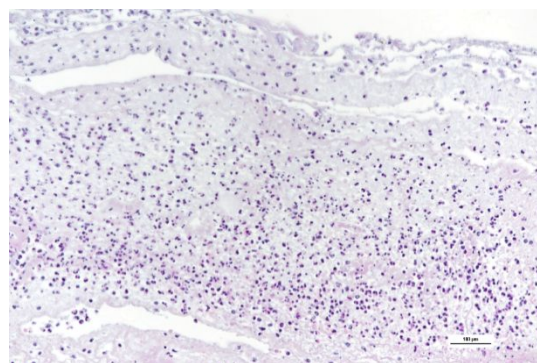


図10 HE染色（膀胱漿膜面）

### 3. 細菌学的検査

腎臓、肝臓、脾臓、腹水から *Trueperella pyogenes* が分離された（表1）。また、小腸から *Escherichia coli*

が分離され、上部及び下部由来の各 2 株を用いて、大腸菌病原因子検査 (F4 (K88)、F5 (K99) 及び F6 (987P)) のスライド凝集反応検査を実施したが、いずれも保有陰性であった。

表 1 各部位からの菌分離検査結果

検体	菌種	菌量(cfu/g)
腎臓、肝臓、脾臓	<i>Trueperella pyogenes</i>	10 <sup>4</sup> <
小腸上部	<i>Escherichia coli</i>	8.0×10 <sup>4</sup>
小腸下部	<i>Escherichia coli</i>	5.0×10 <sup>6</sup>
腹水	<i>Trueperella pyogenes</i>	5.1×10 <sup>2</sup>

#### 4. 生化学的検査

腹水において UN が 132.6mg/dl、クレアチニンが 57.75mg/dl であり、これは血清中の基準値と比較すると非常に高値であった。

表 2 腹水の生化学的検査結果

項目	測定値	血清中の基準値
UN (mg/dl)	132.6	10~25
クレアチニン (mg/dl)	57.75	0.5~1.8

#### 考察

本症例は腹腔内臓器と腹水から *Trueperella pyogenes* (以下: *T. p*) が分離され、剖検所見で膀胱穿孔が認められたことから、*T. p* 感染による膀胱破裂を伴う腹膜炎により死亡したと診断した。腹水において UN 値が血清中基準値よりも高値であったことも、既存報告にある膀胱破裂を呈した 2 症例 (腹水中の UN が 145mg/dl、186 mg/dl) と類似しており<sup>2)</sup>、腹腔内へ尿の漏出が強く示唆される結果であった。

牛での腹膜炎は他の疾患に併発することが多く、本症例でも膀胱破裂に起因するものであった。また、尿膜管遺残があることで、尿路感染症、膀胱破裂を継発する場合がある<sup>3,4)</sup>。尿膜管遺残の形態の中でも尿膜管性膀胱憩室は、尿膜管遺残が膀胱側のみ開口した状態であり、憩室があることで排尿後も尿が残りやすくなり、膀胱内は細菌増殖がしやすい環境となる。膀胱の病理組織所見では、膀胱尖部で固有層にまで及ぶ重度の出血及び壊死病変が認められ、特に穿孔部に多数の菌体付着などが認められた。このことは、尿膜管性膀胱憩室付近で形成された膿瘍物が膀胱内を移動、内尿道口を閉塞した可能性が考えられた。閉塞された膀胱は尿を排出できず膨張、重度の炎症を示した膀胱尖部が破裂し、尿が腹腔内に漏出し腹膜炎を併発したと推測した。

細菌性膀胱炎の多くは外尿道口からの上行性感染であり、牛では雌が多く<sup>5)</sup>、人では 20~50 代での細菌性膀胱炎の発生割合は女性が男性の約 50 倍多いという報告<sup>6)</sup>がある。これは外尿道口と膀胱までの距離が雄と比べ解剖学的に短いことによる。今回の症例でも、外尿道口からの感染の可能性も考えられたが、本症例は雄であり、臍帯炎の既往歴や尿膜管遺残があることから、膀胱炎の原因となった *T. p* が臍帯から尿膜管を経て膀胱まで到達した可能性についても考察した。

牛の胎児期における臍帯は臍静脈、臍動脈、尿膜管から構成されている。出生時には臍帯が切断され、それぞ



れが退行し、肝門索、膀胱門索及び尿膜管索になる。出生時に臍動脈は直ちに退縮するのに対し、臍静脈と尿膜管は退行、閉塞するまでに2～3週間かかる(図11)<sup>7)</sup>。臍帯への細菌感染は、臍帯の断端が乾燥する生後一週間以内に生じると考えられている<sup>3)</sup>。

通常、尿膜管は自然に退行し尿膜管索となるが、人では約2%<sup>8)</sup>で、牛では数%の個体で、尿膜管が自然退縮せず先天的に遺残する<sup>4)</sup>。一方で、臍帯の早期断裂、炎症、感染および分娩介助の失宜などの原因によって尿膜管の閉鎖および退縮の過程が完了せず腹腔内に遺残する<sup>3)</sup>場合がある。本症例は臍帯炎の既往歴があるため、臍帯からの細菌感染が尿膜管に波及したことで尿膜管が遺残した、遺残した尿膜管で細菌が増殖し病変が形成されたという2点が推測された。

このことは、今回の事例が生後間もなくの臍帯消毒等を適切に行うことで予防が出来る疾患であった可能性が考えられた。臍帯疾患は外貌だけでは診断ができないことも多くあり、今回の症例でも特別の症状は認められなかった。しかし、増体不良、斃死などにより飼養者に多大な経済被害を与える疾病を併発することもある。また、広島県では例年1例程度の依頼であった臍帯疾患による病性鑑定が、令和4年度は5例と増加傾向であった(表3)。以上のことから、臍帯疾患は治療よりも発症させないことが重要であると考え、臍帯疾患予防に向けたリーフレット(図12)を作成した。リーフレットには、臍帯消毒のポイントや臍帯炎の危険性、臍帯の構造を記載し、飼養者に対し適切な臍帯消毒が大切であることを伝えるようにまとめた。このリーフレットを管内の牛飼養農家全戸に送付し、出生時の対処の大切さを啓発したことに加え、同じく3カ月齢で尿膜管遺残により膀胱破裂を併発し死亡した別の事例に遭遇した際、飼養者に直接渡し臍帯消毒の指導を実施した。

リーフレットを作成、送付からまだ一年も経過してないが、今後飼養者が臍帯消毒を確実に実施し、臍帯疾患の発生が減少していくことに期待したい。

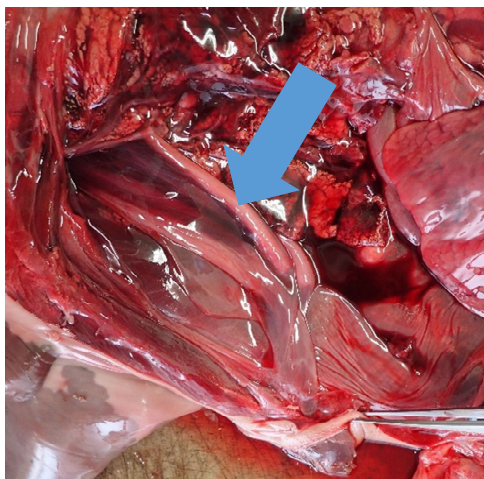


図11 出生2時間後に病性鑑定した異常産子牛  
臍動脈(矢印)は直ちに退行している。

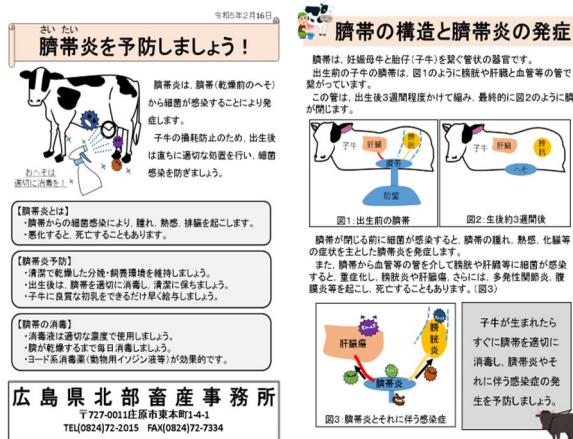


図12 作成したリーフレット

表3 広島県での臍疾患による病性鑑定（平成28年度から令和4年度）

年度	鑑定目的	結果
平成28年	流産の原因 (肉用牛、胎齢不明)	化膿性臍帯炎、第三胃及び第四胃の化膿性漿膜炎、化膿性肺炎
平成29年	子牛の死亡原因 (肉用牛、日齢不明)	臍周囲におけるグラム陽性菌を伴う皮下膿瘍、他
平成31年	子牛の死亡原因 (乳用牛、12日齢)	臍静脈炎からの肝、肺、関節等の化膿性炎、髄膜炎
令和2年	子牛の死亡原因 (肉用牛、62日齢)	臍動脈閉鎖不全、グラム陽性及び陰性菌を伴う化膿性臍動脈炎
令和4年	子牛の死亡原因 (肉用牛、83日齢)	化膿性出血性膀胱炎、膀胱破裂、腹膜炎
令和4年	子牛の起立不能の原因 (乳用牛、39日齢)	臍静脈炎及び頸髄の軸索変性及び色質融解、多発性被包化肝膿瘍、化膿性肺炎 外貌上は臍帯炎に見えなかった。
令和4年	牛の臍帯炎の原因追及 (肉用牛、8日齢)	栓塞性化膿性腎炎、腎盂腎炎、腎梗塞、化膿性膀胱炎
令和4年	子牛の死亡原因 (肉用牛、22日齢)	化膿性臍静脈炎、化膿性出血性肺炎
令和4年	子牛の死亡原因 (肉用牛、3日齢)	臍動脈遺残及び臍動脈炎、尿膜管遺残及び尿膜管周囲のグラム陰性菌を伴った化膿性漿膜炎、グラム陰性桿菌を伴った腹膜炎

#### 参考文献

- 1) Phil Scott DVM&S CertCHP DSHP FRCVS : Chronic peritonitis in adult cattle, Livestock, Volume 18, Issue 4, 102-108 (2013)
- 2) 福田恭秀、富岡美千子、辻村歩美、菊池元宏、渡辺大作 : 去勢肥育牛における尿路閉塞と膀胱破裂の鑑別と膀胱カテーテル留置後の予後判定のための臨床症状および血液性状の比較検討、産業動物臨床医誌、3(1)、13-20 (2012)
- 3) 望月奈那子、滄木孝弘、伊藤めぐみ、藤田理公、堀内雅之、古林与志安、猪熊壽、芝野健一 : ホルスタイン去勢牛における尿膜管遺残の関与が疑われた腹腔内巨大腫瘍の1症例、産業動物臨床医誌、7(1)、24-29 (2016)
- 4) 島山直一郎、西宮弘、庄司浩、高橋修二、伊豆肇、与斎和博、鈴木敏規 : 黒毛和種牛の尿膜管遺残の4例、東北家畜臨床研誌、18(2)、87-90(1995)
- 5) 加藤恵、金本淳也、前田洋祐、高橋史昭、鹿野達也、田邊太志、廣瀬和彦、渡辺大作 : 尿路感染症と診断された黒毛和種牛における原因菌と薬剤感受性、産業動物臨床医誌、10(5)、222-229 (2019)
- 6) MSD マニュアル、”細菌性膀胱炎”、2020年2月、<https://www.msmanuals.com/ja-jp> (参照 : 2023-6-20)

- 7) 真方文絵、渡辺謙一、下田崇、古林与志安、松井高峯、石井三都夫、猪熊壽：11 カ月齡の乳用育成牛における腹腔内の巨大な膿瘍形成を伴った臍帯炎の1 症例、北海道獣医師会雑誌、55 卷 4 号、128-130(2011)
- 8) 児玉匡、飯干泰彦、位藤俊一、水野均、山村憲幸、西谷暁子、藤井仁、人羅俊貴、藤井 亮知、伊豆蔵正明：尿管管洞の保存的治療、日小外会誌、第 49 卷 5 号、981-985(2013)

# 広島県内の酪農場における乾乳方法と分娩後の乳汁中体細胞数に関する調査

広島県農業共済組合 乳房炎グループ研究会

○東谷暁人 金本淳也 市場聖治 秋田真司 金子宗平

## はじめに

近年、PLテストや細菌検査などの乳汁検査を行わずに無条件に乾乳軟膏を注入することは、分娩後の新規乳房炎の予防としての著しい効果は得られず、むしろ農場に経済的な負担を与えているとの報告がある<sup>1)</sup>。また、乾乳軟膏をはじめとした抗菌薬の乱用は、薬剤耐性菌を出現させ、その後の抗菌薬治療の難化につながる。今回、乾乳期の乳房炎予防を再考するために、広島県内の酪農場の乾乳方法と分娩後の乳汁中体細胞数（SCC）との関連を調査し、若干の知見を得たので、報告する。

## 調査1の材料と方法

広島県内の酪農場の乾乳軟膏使用農場（42戸 447頭）のうち、乾乳軟膏を全個体に使用している全個体使用農場（36戸 392頭）と乾乳軟膏を使用する個体や分房を選択している個体・分房選択農場（6戸 55頭）に分けて、高体細胞数牛率（HSCC牛率）と分娩後SCCを調査、マン・ホイットニーのU検定を実施した。ここでいうHSCC牛率とは、乾乳前SCCが25万個/ml未満の個体うち、分娩後SCCが25万個/ml以上の個体の割合を表しているものとする。

## 調査1の結果

全個体使用農場と個体・分房選択農場間でHSCC牛率、分娩後SCCともに有意差は認められなかった。（図1、図2）

（図1、図2）調査1の結果：

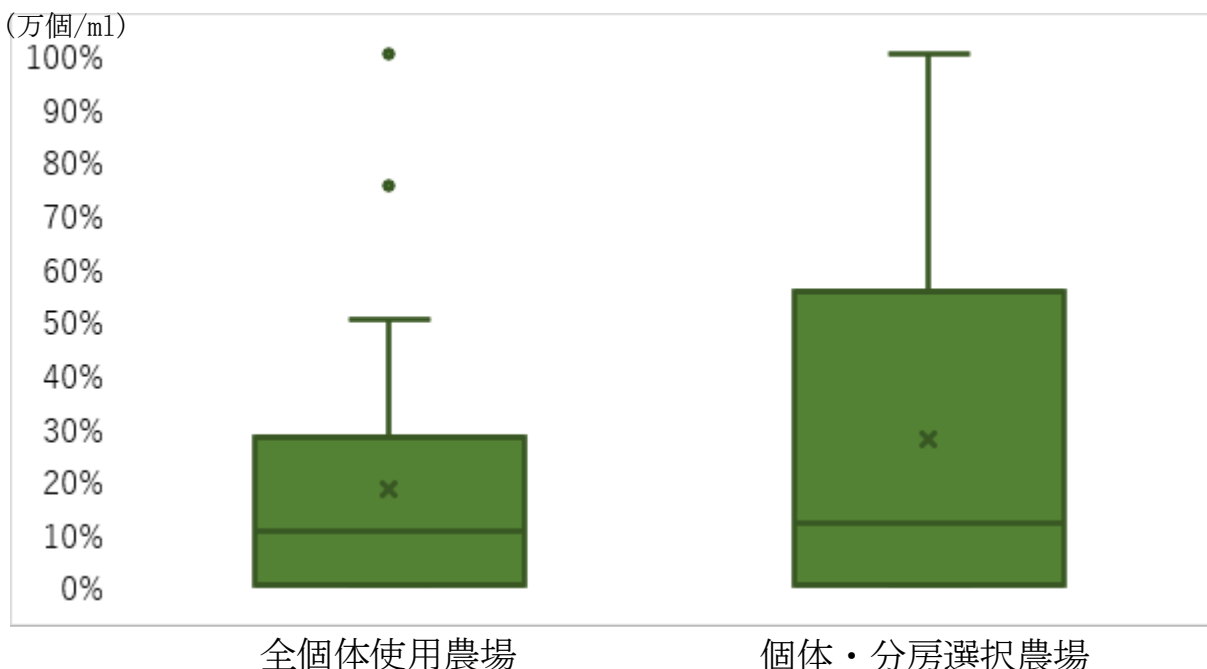


図1 HSCC牛率

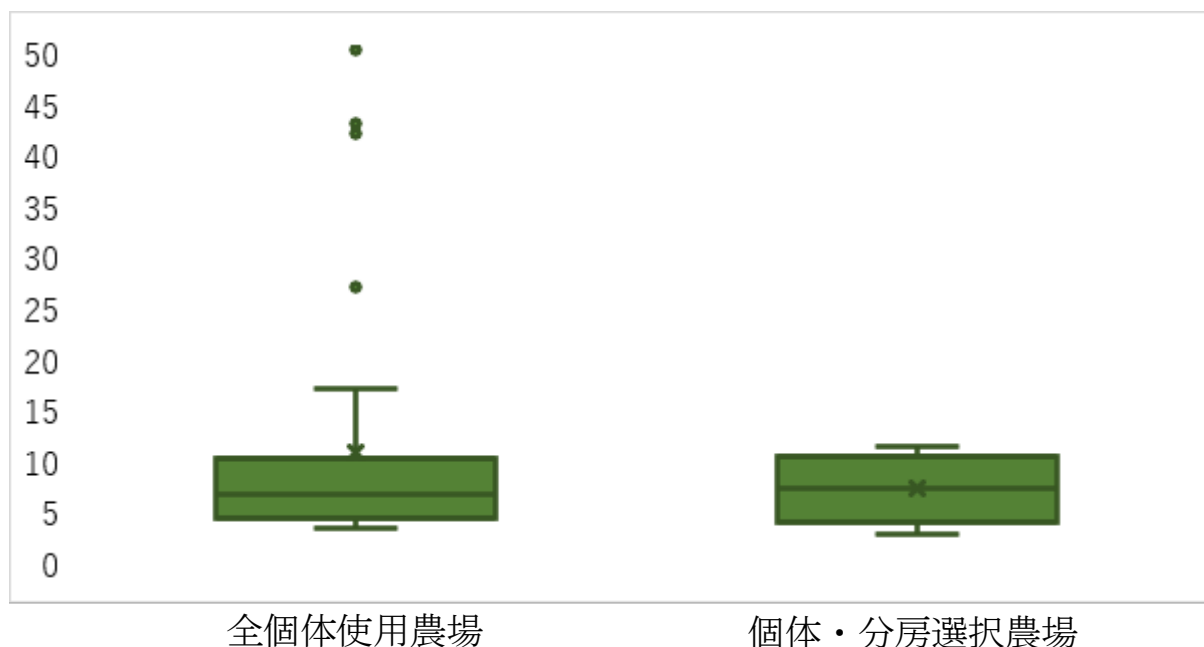


図2 分娩後 SCC

#### 調査1の考察

全個体使用農場と個体・分房選択農場間でHSCC牛率と分娩後SCCに差が認められなかったことから、乾乳軟膏の全個体使用に意義はないと考えられた。また、今後の乾乳軟膏の使用は、必要な個体を選択することが望ましいと考えられた。

#### 調査2の材料と方法

広島県内の酪農家94戸にアンケートを実施した。アンケート項目は、乾乳軟膏の種類、乾乳方法、乾乳前治療実施の有無、飼養形態、乾乳舎の有無、乾乳中のディッピングの有無、ワクチン使用の有無とした。

また、アンケートの回答を得た43農場の令和3年の1年間の乳検データより、乾乳前と分娩後のSCCを448頭を調査し、その結果から乾乳前SCCが25万個/ml未満で分娩後SCCが25万個/ml以上の牛を高SCC(HSCC)牛、25万個/ml以下の牛を低SCC(LSCC)牛とした。ただし、ここでいう乾乳前SCCとは乾乳日より30日以内に回収した乳汁のSCCのことを指し、分娩後SCCとは分娩日より30日以内に回収した乳汁のSCCのことを指すものとする。

乳検データのある酪農場43戸448頭のうち、乾乳軟膏全個体使用農場36戸392頭をHSCC牛46頭とLSCC牛261頭に分けて、乾乳前乳量、分娩後乳量、乾乳日数に対してマン・ホイットニーのU検定を、アンケート項目に対してはピアソンのカイ二乗検定をそれぞれ行い、比較検討した。

#### 調査2の結果

HSCCとLSCC牛間で乾乳前乳量、分娩後乳量、乾乳日数それぞれにおいて有意差は認められなかった。また、各アンケート項目においても有意差は認められなかった。(図3、図4、図5、表1)

(図3~図5) 調査2の結果:

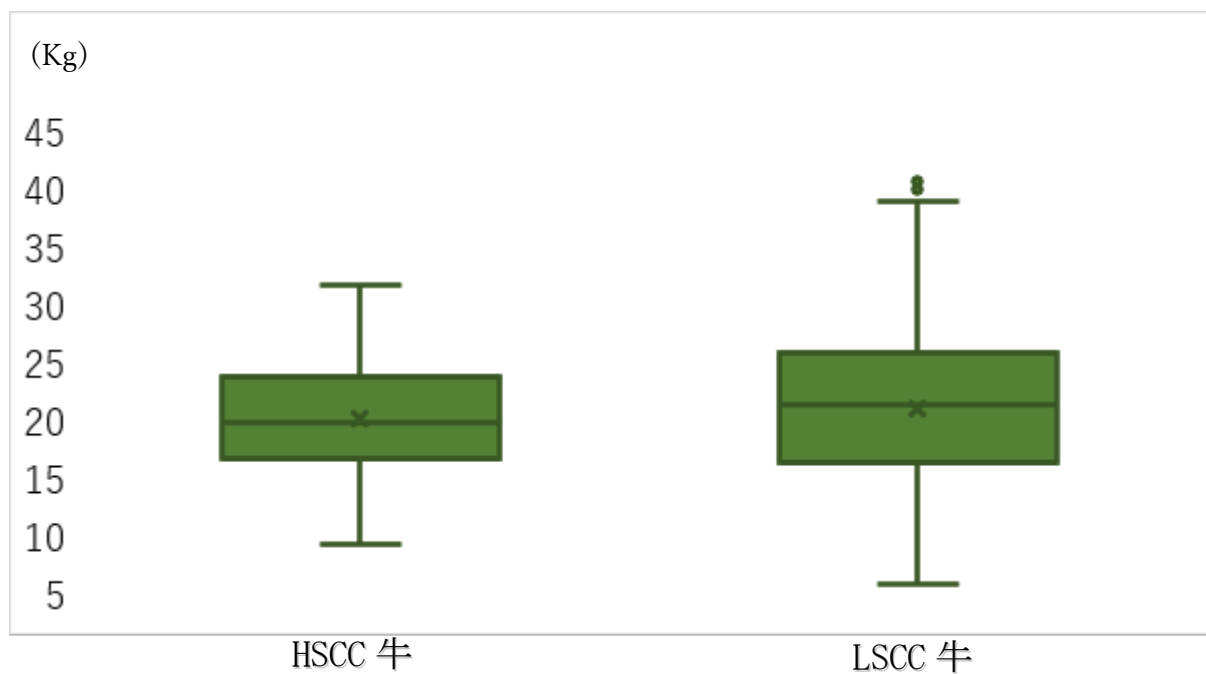


図3 乾乳前乳量

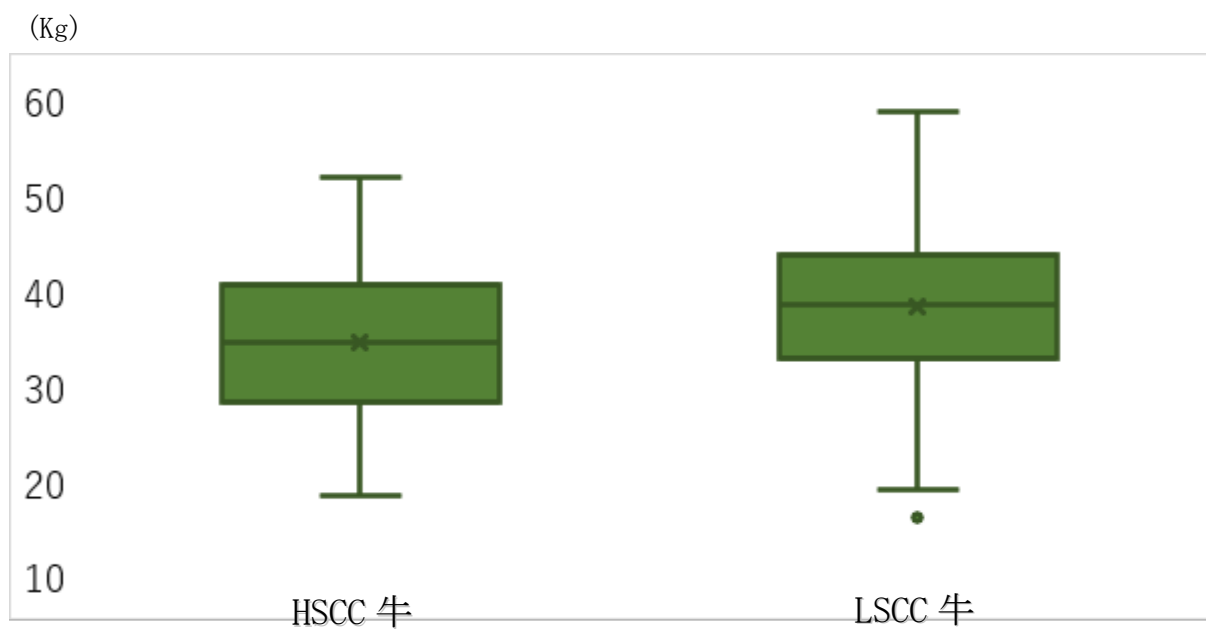


図4 分娩後乳量

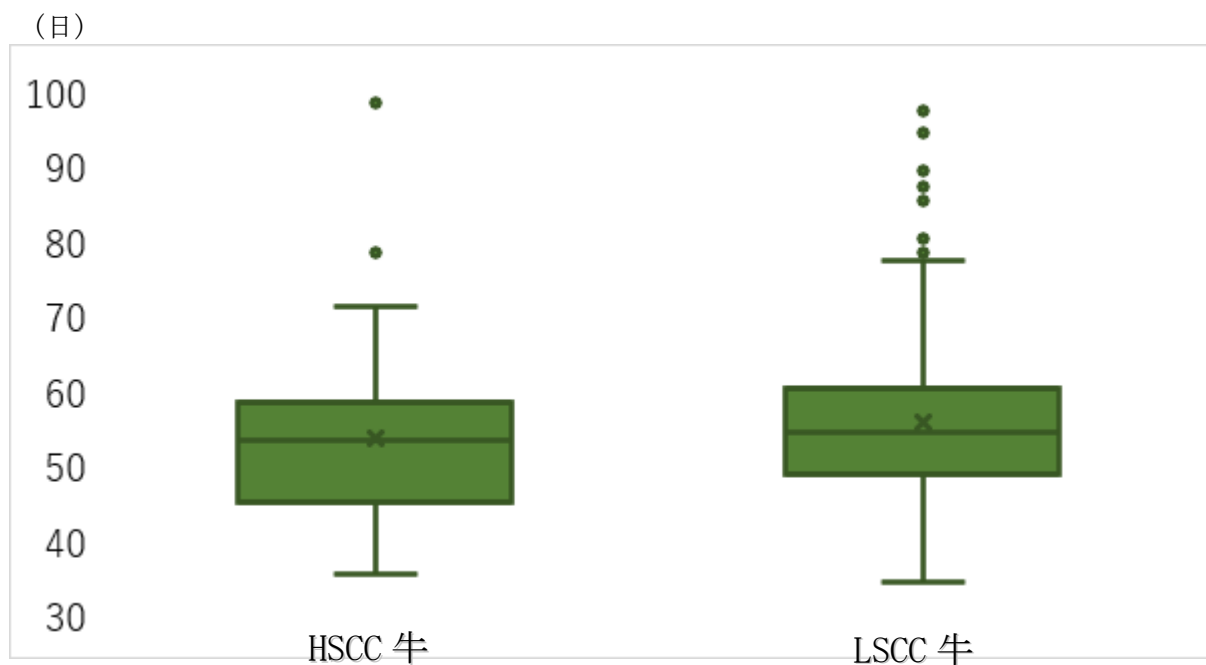


図5 乾乳日数

表1 アンケート項目

	連関係数	p 値
乾乳軟膏の種類	0.02	0.86
乾乳方法	0.09	0.17
乾乳前治療実施の有無	0.08	0.20
飼養形態	0.03	0.74
乾乳舎の有無	0.05	0.44
乾乳中のディッピングの有無	0.02	0.93
ワクチン使用の有無	0.05	0.44

調査2の考察

HSCC 牛と LSCC 牛間で乾乳前乳量、分娩後乳量、乾乳日数、各アンケート項目との関連は認められなかったが、これはサンプルサイズが少ない、もしくはばらつきが大きいことが要因として考えられた。今後も調査を続けることで、乳房炎発症リスクの少ない乾乳方法を模索していく必要があると考えられた。

## まとめ

無条件の乾乳軟膏の使用は、農場に経済的な損失をもたらし、その後の抗菌薬治療の難化につながる。そのため、乾乳軟膏の選択的使用を心がけるとともに、乳房炎発症リスクの少ない乾乳方法を模索することが重要だと考えられた。

## 参考文献

1) 鈴木直樹：乳頭シール活用し軟膏注入のリスクを抑え薬剤費も減らす, DairyJapan, 36-38, デーリイジャパン社, 東京 (2020)



# 銀イオンを用いた乳房炎予防～銀イオンの抗菌効果と大腸菌群への影響～

西条農業高等学校畜産科3年

○山根智紗乃 田中瑠奈 菅原風紗 井上姫華

## はじめに

乳用牛を飼育し、乳を生産する酪農において一番多い疾病が乳房炎と言われている。乳房炎とは乳房に細菌などの病原性微生物が侵入することでおこる病気である。乳房炎に罹患すると、乳の出荷ができなくなるとともに、治療費もかかるため酪農家にとっては大きな負担となる。

私たちは本校畜産農場における乳房炎の発症例を実際に見たことから、乳房炎を予防するための研究に着手することとした。乳房炎の原因は、伝染性乳房炎菌によるものと環境性乳房炎菌によるものがある。私たちは環境性乳房炎を予防するために、牛舎内の環境性乳房炎菌の発生を抑制する方法を研究することにした。環境性乳房炎菌の中でも発生頻度が高く、重症化リスクの高い大腸菌群に着目して、研究を行った。

大腸菌群に対して抗菌効果を持つ物質を調査する中で、銀イオンを発見した。先行研究から、濃度が0.02MmoLの銀イオン水溶液が、標準株の大腸菌に対する抗菌効果を持っていることが分かった。このことから、銀イオン水溶液を牛床に散布することで、牛床中の大腸菌株の発生を抑制し、大腸菌群による乳房炎を予防できると考えた。また、安定的な生乳生産を可能にする研究であることから、SDGsの2番『飢餓をゼロに』の目標達成に貢献する。

## 目的

1. 乳房炎に対して有効的な予防法を確立する。
2. 乳房炎の予防法を実用化し、社会に広める。
3. 酪農家の経済的損失を軽減させる。

## 計画

1. 実験期間 令和4年7月26日～令和4年8月23日

2. 実験場所

本校畜産農場・クリーンルーム・広島大学生物生産学部

3. 実験Ⅰ 牛舎内の大腸菌群数を把握し、罹患リスクが高い場所を特定する。

実験Ⅱ 牛床株の大腸菌群に対して効果が見られる銀イオン水溶液の濃度を特定する。

実験Ⅲ 敷料に散布するべき銀イオン水の量を特定する。

## 実施

### 1. 使用道具

ビニール手袋、直腸手袋、チャック付きビニール袋、DHL 寒天培地、PBS 液、マイクロピペット、電動ピペッター、マイクロチューブ、オートクレーブ、コンラージ棒、ストマッカー袋、ボルテックスミキサー、恒温器、銀イオン水、エッペンドルフチューブ



図1 銀イオン水

### 2. 実施内容

1) 牛舎内の大腸菌群数を把握し、罹患リスクが高い場所を特定する。(4回実施)

ア 牛舎内の9ヶ所からサンプリングを行う。(図2)

- a 1~2ヶ所目は牛床ベッドの敷料
- b 3~7ヶ所目は牛舎内通路の糞便が混ざった敷料
- c 8ヶ所目は直腸便
- d 9ヶ所目は未使用の敷料

イ 1~9のサンプリングした試料の質量を計測し、ストマッカー袋に入れ、質量の9倍のPBS液を添加しよく攪拌する。(10倍希釈液)

ウ エッペンドルフチューブにマイクロピペットでPBS液を900 $\mu$ Lずつ入れる。

エ ウの中にイを100 $\mu$ L入れ、ピペッティング及びボルテックスミキサーで攪拌する。(100倍希釈液)

オ エを10,000倍希釈液ができるまで繰り返す。(図3)

カ 培地を4等分し、希釈液を25 $\mu$ Lずつ取り、コンラージ棒でDHL寒天培地に塗抹する。(図4)

キ 37 $^{\circ}$ C~38 $^{\circ}$ Cの恒温器で培養する。

ク 目視でコロニー数を計測する。(図5)

ケ コロニー数 $\times 4 \times 10 \times$ 希釈倍率をすることにより、Cfu値を算出する。



図2 サンプリングの様子



図3 段階希釈の様子

2) 牛床株の大腸菌に対して殺菌効果が見られる銀イオン水溶液の濃度を特定する。

ア 1)の実験で培養した大腸菌群の中から、大腸菌を単離培養する。

イ 銀イオン水溶液と大腸菌を共培養し、減少率を算出する。

3) 敷料に散布するべき銀イオン水の量を特定する。

ア 牛床を3ヶ所サンプリングすることと新鮮な敷料を用意する。



図4 塗抹の様子

イ 牛床を 3g ずつそれぞれストマッカー袋に入れ、0mL・0.3mL・3mL の銀イオン水溶液を散布する。

ウ 3 時間インキュベートする。

エ 10 倍、100 倍、1,000 倍、10,000 倍に段階希釈する。

オ DHL 寒天培地に塗抹し、培養する。

カ コロニー数をカウントする。

キ 統計解析にかけ、フリードマン検定を実施する。

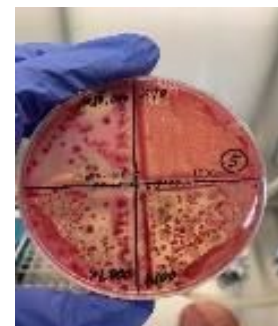


図 5 培養後の様子

## 結果

1. 実験Ⅰ 牛舎内の大腸菌群数を把握し、罹患リスクが高い場所を特定する。図 6 より直腸便や牛舎内通路ではなく、牛床付近が最も菌数が多いことが分かった。牛床は使用前から大腸菌群に汚染されていることが分かった。



図 6 ヒートスポット

2. 実験Ⅱ 牛床株の大腸菌に対して殺菌効果がある銀イオン水溶液の濃度を特定する。

表 1 より、銀イオン水 10ppm で大腸菌に対する殺菌効果が見られた。表 2 より、銀イオン水 10ppm でクレブシエラニューモニエに対する殺菌効果が見られた。

表 1 大腸菌 減少率

Ag+(ppm)	×1	×10	×100	×1000	cfu/ml	減少率(%)
10	0	0	0	0	<400	100
1	82	20	2	0	3280	90.78651685
0.1	>300	135	10	0	54000	-51.68539326
0	>300	89	0	0	35600	0

表2 クレブシエラニューモニエ 減少率

Ag+(ppm)	×1	×10	×100	×1000	cfu/ml	減少率(%)
10	0	0	0	0	<400	100
1	>300	84	6	1	33600	42.85714286
0.1	>300	90	16	1	36000	38.7755102
0	>300	147	13	0	58800	0

3. 実験Ⅲ 敷料に散布するべき銀イオン水の量を特定する。

図7より、牛床3gに対し、0.3mLの銀イオン水溶液を添加した時は、有意差は見られなかった。牛床3gに対して、3mLの銀イオン水溶液を添加した時は、有意に減少した。牛床：銀イオン水溶液=1：1の割合で混ぜると菌数が減少することが明らかになった。

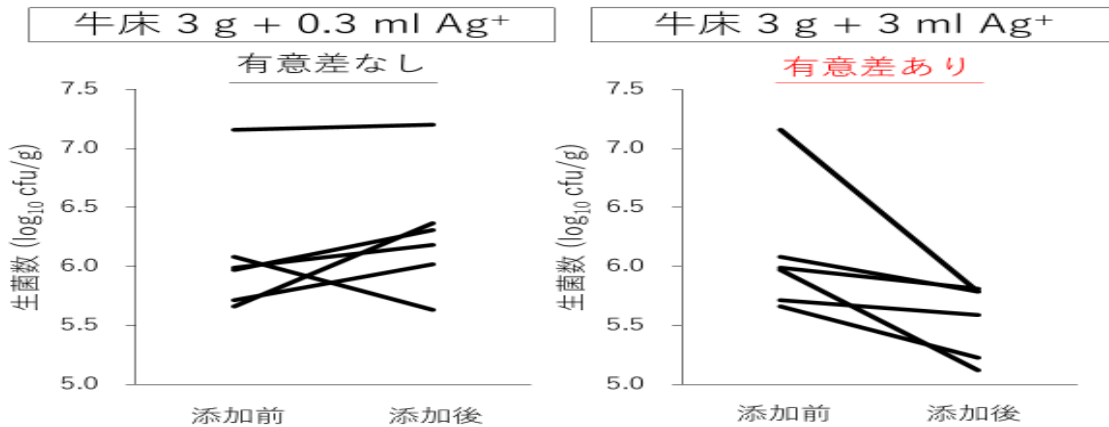


図7 銀イオン抗菌活性試験

考察

実験Ⅰより、牛床で直腸便ともみ殻のような牛床資材が混ざることにより大腸菌群増殖の場となっていると考えられる。したがって、牛床における大腸菌群数の低減が乳房炎予防には効果的である。10ppmの濃度で大腸菌とクレブシエラニューモニエに対する殺菌効果が見られた。また、牛床を1：1の割合で混ぜたときに菌数が有意に減少することが明らかになった。このことから銀イオン水溶液を牛床に散布することで、乳房炎の予防に効果的であると考えられる。

課題

1. 銀イオン水溶液と牛床を1:1の割合で混ぜると、水気が多くなってしまい実用化が困難である。
2. 市販の銀イオン水溶液を使用したため、原液の濃度である10ppmが維持されていたかが不明である。

終わりに

本研究を行うにあたり多くの協力をしてくださった、広島大学大学院統合生命科学研究科鈴木直樹助教と磯部直樹教授をはじめとする多くの方々に感謝申し上げます。

#### 引用文献・参考文献

- 1) 大腸菌群による乳房炎」十勝農業共済組合

[https://www.tokachi-nosai.or.jp/technical\\_list/technical\\_list-1414/](https://www.tokachi-nosai.or.jp/technical_list/technical_list-1414/)

- 2) 「銀イオンや銅イオンの抗菌性—作用メカニズムと微生物適応戦略」松村吉信

[https://doi.org/10.20665/kakyoshi.53.5\\_288](https://doi.org/10.20665/kakyoshi.53.5_288)

# 短期肥育の<sup>キー</sup>鍵は赤ぬかペレット！？

広島県西条農業高等学校 畜産科

○中江潤 榊田海菜 木崎弾瑛

## はじめに

本校では、黒毛和種（以下和牛）肥育牛の短期肥育に取り組んでいる。第4回和牛甲子園に出品した鈴之国（愛之国×安福久×勝忠平）は生後約22ヵ月齢での産肉成績はBMS11、枝肉重量519kgと好成績であったが、MUFA値51.7と課題が残った。そこで、地元企業である賀茂鶴酒造株式会社の協力により、オレイン酸を多く含む赤ぬか（玄米の表皮から内側10%）を給与した和牛雌よつは（沖茂神竜×安福久×平茂勝）は第5回和牛甲子園に出品した結果、生後約27ヵ月齢での産肉成績はBMS6、枝肉重量457kgという結果であったが、MUFA値62.3と数値は上昇した。しかし、赤ぬかを給与するには給与方法、給与割合、給与のタイミングおよび夏季における酸化等による保存性などの解決すべき課題が多くある。そこで、課題解決のための試験をしたので報告をする。また、和牛肉について消費者のアンケートをおこなったので合わせて報告をする。

## 材料および方法

1. 調査期間：令和2年10月～令和5年5月末
2. 材 料：供試牛（黒毛和種去勢牛6頭）表1 酒米ぬか（赤ぬか）

表1 供試牛

供試牛No.	名号	生年月日	血統
No.1	竜之音	R2. 4. 19	沖茂神竜×安福久×勝忠平
No.2	照 沖	R2. 6. 29	沖茂神竜×美津照重×勝忠平
No.3	光 揮	R2. 12. 22	美津照重×安福久×平茂勝
No.4	新 樹	R3. 1. 2	立烏帽子×沖茂神竜×安福久
No.5	晃之福	R3. 2. 22	福之姫×田安照×安茂勝
No.6	鈴鳴	R3. 4. 23	神竜岩田×安福久×勝忠平

3. 調査項目：赤ぬか給与割合/給与時期の見直し 採食率（No.3、No.4、No.5、No.6） ペレット化  
和牛肉消費者アンケート
4. 飼養管理：本校では和牛（去勢）生後0～6ヵ月齢（市販育成飼料）6～12ヵ月齢（自家育成飼料）12～24ヵ月齢（自家仕上げ飼料）を基本にしている。牛舎の関係上1頭飼育は、No.1、15.3ヵ月齢、No.2、13.1ヵ月齢、No.3、16.8ヵ月齢、No.4、16.4ヵ月齢、No.5 17.0ヵ月齢、No.6、17 本校の目標値（表2）

## 結果

1. 赤ぬか給与割合/給与時期の見直し（表 3、  
4）現在、赤ぬか給与の事例が少なく試行錯誤により、配合飼料に対し赤ぬか 2～5%混合（配合飼料最大値 13kg/日、赤ぬか 5%、620g/日）し生後約 6 ヶ月齢時から給与試験を開始した結果、MUFA 値は向上したが、BMS 数値が目標値を下回った。

そこで、赤ぬかの最大値を 5%と設定し 0.3%から徐々に上げていき適正值を見つけることにした。

表 3 赤ぬか 2～5%給与産肉成績

名号	性別	出荷月齢	枝肉重量 (kg)	BMS	MUFA 値
No.1	去勢	24.9	452.2	6	68.3
No.2	去勢	24.9	512.2	7	65.4

5%～0.3%変更時期。No.3、17.1 ヶ月齢、給与 22.1 ヶ月齢、No.4、16.7 ヶ月齢、No.5、15.1 ヶ月齢、No.6、13.1 ヶ月齢から 0.3%に変更したが、夏季の気温上昇に伴い酸化等により品質の低下を示したことで、赤ぬかをペレット化し給与を開始した。No.3、22.1 ヶ月齢から 40g/日給与、No.4、21.8 ヶ月齢 40g/日給与、22.7 ヶ月齢 300 g/日給与、No.5、20.1 ヶ月齢 40g/日給与、No.6、18.1 ヶ月齢 40g/日で開始をした。

表 4 赤ぬか 2～5～0.3%～赤ぬかペレット給与産肉成績

名号	性別	出荷月齢	枝肉重量 (kg)	BMS	MUFA 値
No.3	去勢	23.4	529.4	11	58.6
No.4	去勢	24.5	475.0	7	57.4
No.5	去勢	22.8	506.0	9	64.0
No.6	去勢	24.8	464.4	8	64.1

赤ぬか給与割合の見直しをした結果は表 4 の通りである。

## 2. 採食率（図 3）

仕上げ飼料給与からの採食率。

No.3、63～92%、平均 74%、No.4、47～98%、平均 69%、No.5、63～81%、平均 72%、No.6、54～81%、平均 66%という結果であった。

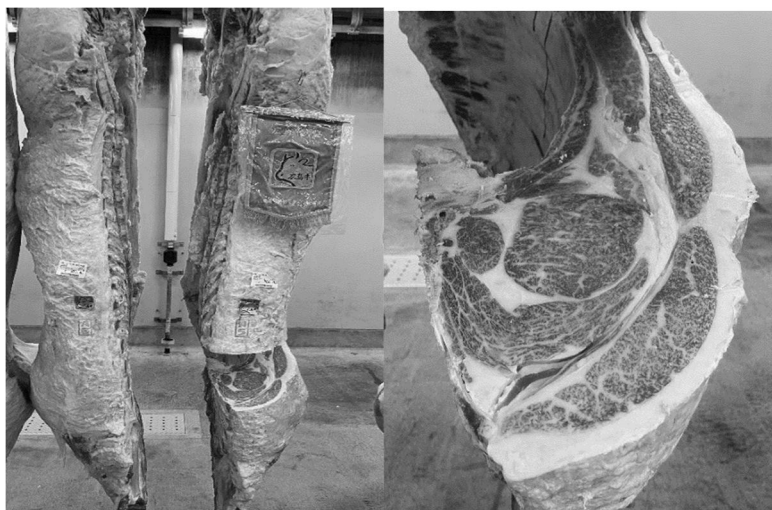


図 1 No.3 枝肉

図 2 No.3 枝肉

表 2 目標値

	去勢	雌
出荷月齢	23～25 ヶ月齢	25～27 ヶ月齢
出荷時体重	800kg 以上	720kg 以上
枝肉重量	500kg 以上	450kg 以上
BMS	8 以上	8 以上
MUFA 値	60 以上	62 以上

### 3. 赤ぬかペレット化(図 4. 5) (表 6)

赤ぬかの年間を通しての給与は利便性の改善及び夏季の気温の上昇による酸化等による品質の低下が課題に挙げられた。

そこで、利便性、品質の低下の改善をする目的で赤ぬかのペレット化に取り組んだ。

赤ぬかの乾燥温度は試験の結果カビの発生が確認されなかった 50℃に設定した。

飼料分析の結果、NDF、NFC に差がみられた。また P の数値が高い値を示したので飼料設計には考慮が必要である。

製造方法は、赤ぬか 2000 g × 水 500 ml、ペレットの直径 4 mm × 長さ 5 mm、赤ぬかの比重は 0.4 程度、沈下スピードは赤ぬか 15 分以上、赤ぬかペレット約 3 分で沈下した。赤ぬかペレット製造時水分 27.5%、50℃乾燥後水分 3.15%であった。赤ぬかペレットにより配合飼料の混合を中止し、個別に添加する方法に変更をした。

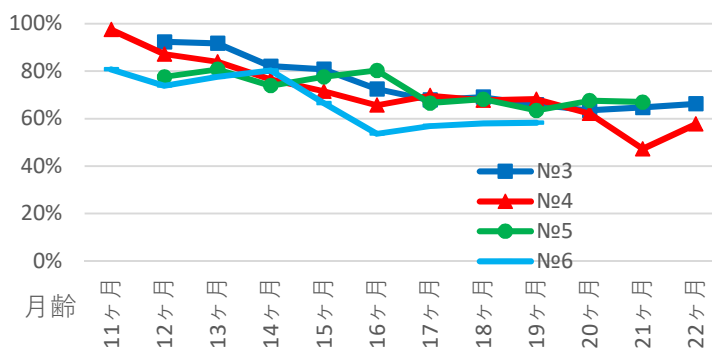


図 3 採食率



図 4 赤ぬかペレット製造 図 5 赤ぬかペレット

表 6 50℃乾燥 飼料分析結果

項目	単位	原物 (乾物中)	50℃ (乾物中)
乾物 (DM) ※原物中	%	87.3	91.3
粗タンパク質 (CP)	%	16.3	18.2
粗脂肪 (EE)	%	16.7	18.0
NDF (aNDFom)	%	23.0	12.6
NFC	%	35.1	42.3
可消化養分総量 (TDN)	%		96.0
りん (P) XRF	%	1.97	2.13

### 4. 和牛肉消費者アンケート

(表 7) (図 6) JA 交流広場「とれたて元気市」東広島店にて消費者が求める和牛肉について約 100 名からアンケートを実施した結果。脂肪の量が適度で、色がきれいな和牛肉あることが分かった。さらに消費者が最も購入したいと考える BMS は 7~8 であった。消費者は脂肪の多い和牛肉を好まない傾向があることが分かった。

表 7 市場調査による BMS 人気度

BMS3	BMS4	BMS5	BMS6	BMS7	BMS8	BMS9	BMS10	BMS11	BMS12
6.7%	5.7%	6.7%	12.4%	23.8%	18.1%	8.6%	5.7%	7.6%	4.8%



## まとめ及び考察

給与割合/給与時期の見直しを赤ぬか給与割合を 2~5~0.3%~赤ぬかペレットに変更おこなった結果。表4でのBMSはNo.4を除き8以上と向上をした。またMUFA値供試牛No.3、4は本校の目標値には達成しなかったが、MUFA値は57以上であった。No.5、6は60以上であった。(第6回和牛甲子園は供試牛No.4、5を出品)このことから短期肥育での有効性が示唆された。採

食率は供試牛全頭平均70%であったが、赤ぬかのペレット化により採食量が上昇した事により今後の赤ぬか給与の安定化に繋がる事が示唆された。また、赤ぬか5%給与から配合飼料/日の採食率から算出した結果、赤ぬかペレット40g/日に決定しペレット給与に変更をおこない給与を開始した。赤ぬか給与及び赤ぬかペレットの参考文献が少なく試行錯誤の状態であった試験である。今後は今までの試験結果から赤ぬかペレットをルーメン内の影響(不飽和脂肪酸「植物性油脂」を水素添加によって飽和脂肪酸「動物性油脂」変換されること)を最小限に抑えてルーメン内の通過速度を上げるために、赤ぬかペレットの給与量、粒度、比重の試験を進めている。また、赤ぬかペレットの給与時期は現在、生後20ヵ月齢から40g/日で給与試験を行っている。

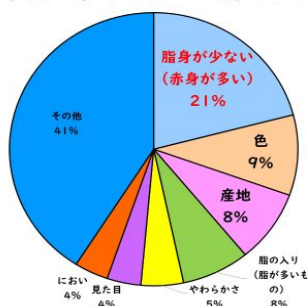
和牛肉の消費者アンケート結果、BMS7~8が好まれる傾向であったが、MUFA値を向上させ和牛肉の特徴である口どけ、風味の良い広島和牛の生産をおこない、安心安全な東広島の飼料赤ぬかペレットの給与技術を確立し広島和牛肉のもつ美味しさを消費者に提供していく。

## 参考文献

- 1) めん羊における各種飼料給与が第一胃内水素添加とVFA産生能に及ぼす影響  
山形大学農学部研究室 高橋 敏能
- 2) 令和2年度広島県畜産要覧 広島県農林水産局畜産課
- 3) 技術の窓No. 1820 生米ぬか給与による筋肉内脂肪の脂肪酸組成変化 H24. 1. 26
- 4) 酒米中ぬかのペレット調製と利用技術 高知畜試 大家畜科

## I 市場調査による消費者ニーズの把握

購入時に和牛肉に求めるものは何ですか？



どの和牛肉が好みですか？

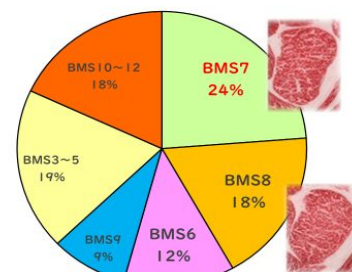


図6 アンケート結果

# フリーゲージ卵で庄原に新たなブランド卵を！！

広島県立庄原実業高等学校 生物生産学科

泉 陽翔 西山 来沙 森田 流花

## はじめに

広島県の鶏卵生産割合は令和2年度において全国で4番目であり、その多くが庄原地域で生産されているが、県内での認知度も低くまた庄原地域にブランドとなる鶏卵が存在しない。また国内での鶏卵生産は99%がバタリーゲージ飼育で行われている。しかし、フリーゲージでの飼育は国際的に主流となりつつある。そのため10年後の庄原地域の農業を支える畜産業を提案する一つ的手段として、資源循環を積極的に取り入れた、飼育環境で生産するフリーゲージ卵を庄原の新たなブランド農産品と提案するための活動に取り組んだ。

## 方法

### 1. 鶏舎の改築

採卵鶏舎築：昭和38年（5m×20m=100㎡）

令和2年度まで飼養方式：ゲージ方式（200羽）

令和3年度より飼養方式：平飼い方式（50羽）

1羽当り面積：2㎡

これまで採卵鶏を飼育していたゲージ（写真1）を全て撤去することなく、50羽分のゲージは残した。また、ゲージを乗せていた梁は止まり木として活用した。従来

から開放型鶏舎であったが、より通気性及び採光量を向上させるために北側と南側の壁である波板スレートを撤去した。鶏舎内の通気は鶏舎上部に設置された扇風機により下方に風向きを設定していたが、壁の撤去を受け床面より40-50cmの高さで南から北側の風向きとした。令和4年度には鶏舎内に内扉を設置した。鶏舎は野生動物侵入を防ぐため全面を亀甲金網で覆い、さらに防鳥ネットで鶏舎全体を覆った。採卵鶏1羽当たりの飼養スペースは430~555㎤とすること<sup>1)</sup>が推奨されているが、本校の飼育環境ではその40倍のゆとりのある飼育環境とした。



写真1 ゲージ飼育（令和2年以前）

### 2. 床土の循環化

床土には本校の新在家農場の畑の土を用いた。この畑の土を約30cmの高さまで投入した。ただし、排水環境を整えるために、鶏舎にあった排水用の水路が埋設しないように、竹垣の廃材を利用した水路の蓋を設置したのちに、砂を2トン設置し、その上部に本校の新在家農場の畑の土を設置した（写真2）。この新在家農場の畑の土は、第1学年が科目「農業と環境」の栽培プロジェクトで使用した畑の土である。ま



写真2 平飼い鶏舎への改築後

た、令和3年度に設置された畜糞乾燥機から排出される乾燥物を床土として用いることにより、農場内の物質循環の効率化を図った。また、床土が硬化しないように飼料給与方法をばら撒き法として、採卵鶏が床土を掻く行動の頻度を増やすことにより鶏糞と床土の攪拌を促した。また定期的に耕うん機による作業を行い良質な土壌づくりを実施した。

### 3. 品種「もみじ」での鶏卵生産

給与飼料 マル中印成鶏飼育用配合飼料レイヤー17 140g/回 1日2回給与

給与方法 ばら撒き

飼育期間 令和4年4月17日（119日齢）から令和4年12月15日（360日齢）

### 4. 循環型飼料の給与

本校農場の規格外の野菜や果物などの廃棄物を給与する手段について調査した。ここでは規格外の野菜や果物などの廃棄物を循環型飼料と表記する。

### 5. 卵黄色のコントロール

試験期間 5日間（令和4年8月1日から8月7日）

給与飼料 ピーマン

給与量 100g/羽

品種「もみじ」の卵黄色は一般的な鶏卵の卵黄色と比較し、淡い黄色であることが特徴である。しかし、消費者は濃い黄色の卵黄を好む傾向にある。そのため、循環型飼料（ピーマン）の給与で卵黄色を濃くすることが可能であるかを調査した。

### 6. 販路開拓

令和3年度に「実業の平飼いたまご もみじ」のラベル（写真3）を考案し6個入りパックを100円で校内販売した。令和4年度も継続的に販売を行った。地域のブランド化モデルとするために、持続可能な経営を目標として、やさいバス株式会社 エリア営業 才崎 敏判 様を講師として招き、新たな販路開拓と共に付加価値を付けた商品化を検討した。



## 結果

### 1. 床土の循環化

令和3年度の採卵鶏オールアウト後の床土ECは1.7mS/cmであった。本校の畑の土は約0.1-0.2mS/cmであり、1.5mS/cm以上であるため、養分過剰であると判断できる。この床土を本校の新在家農場の畑に4月17日に施肥した（写真4）。この新在家農場の畑は、令和4年度の第1学年が科目「農業と環境」の

栽培プロジェクトで野菜を栽培した。また、畜糞乾燥機から排出される乾燥物を定期的に床土に導入した。そのため、西本町農場内の畜糞は乳牛の戻し堆肥による牛床とともに循環を持続することができた。

## 2. 品種「もみじ」での鶏卵生産

品種「もみじ」の一般的な卵重平均<sup>2)</sup>は65.0g、平均産卵率<sup>2)</sup>は84.0%、生存率<sup>2)</sup>は97.0%とされる。

平飼い方式では採卵作業に労力を要するが、巣箱などで一羽一羽が産卵しやすい環境を整える必要があるが、本校では入口付近に2か所の箱の中で産卵する習性(写真5)となり、巣箱を設置する必要性がなかった。し

かし、7月以降に産卵された卵を突き割る鼓動が見られるようになり産卵率が低下した。そのため偽卵を導入しつき癖による卵の損失を防ぐ対策を講じたが、効果が顕著にあったのは初めの1か月程度であり、それ以降、偽卵に興味を示す行動が段階的に少なくなった。そのため、産卵率向上のために採卵作業を一日2回(朝・夕)から一日3回(朝・昼・夕)に増やした。また、9月以降から穴を掘り、そこに産卵する個体が増えた。健康管理と体重の測定(写真6)は毎週1度実施した。体重の減少や毛色、外傷を観察し健康不良が想定される個体を群れから外して別の鶏舎で飼育した。また、庄原市の日照時間が12月17日(土)に9時間49分と最短になるため、11月から50ルクスの照明を設置し1日の日照時間が15時間程度となるように調整した。

令和4年度平均卵重及び産卵率の推移をグラフ1に示す。日齢と共に産卵率は向上する傾向であったが、300日齢までの平均産卵率32.4%であり基準の84.0%<sup>(1)</sup>に達していない。また300日齢までの卵重年平均は67.5gであり基準の65.0g<sup>(1)</sup>よりわずかに上回った。また8か月間の生存率は98.0%であった。各個体の体重の推移をグラフ2に示す。305日齢で平均体重が約1.65kgであり300日齢の標準体重2.15kgと比較し下回る結果となった。

## 3. 循環型飼料の給与

循環型飼料は給与当初、床土の上に置き給与したが興味を持つ個体が少なく、採食できるものとの認識が低い様子であった。そのため、止まり木となる梁に循環型飼料をひもで吊るす(写真7)ことにより、飼料に動きを付け野菜や果物を積極的に採食するように学習させた。これにより、通常の採食行動より競い合いながらの突き行動をより多く行わせることができた。そして循環型飼料を突くと採食できる因果関係を学習させることができ、床土の上に循環型飼料を給与しても積極的に採食するようになった。



写真4 床土への施肥



写真5 産卵の様子

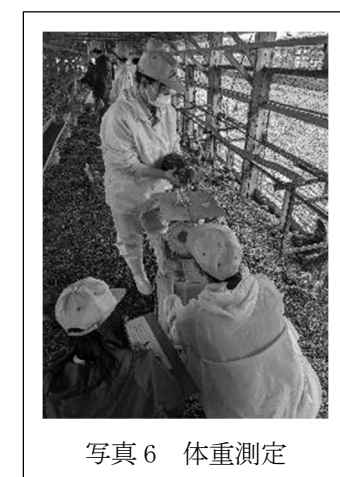


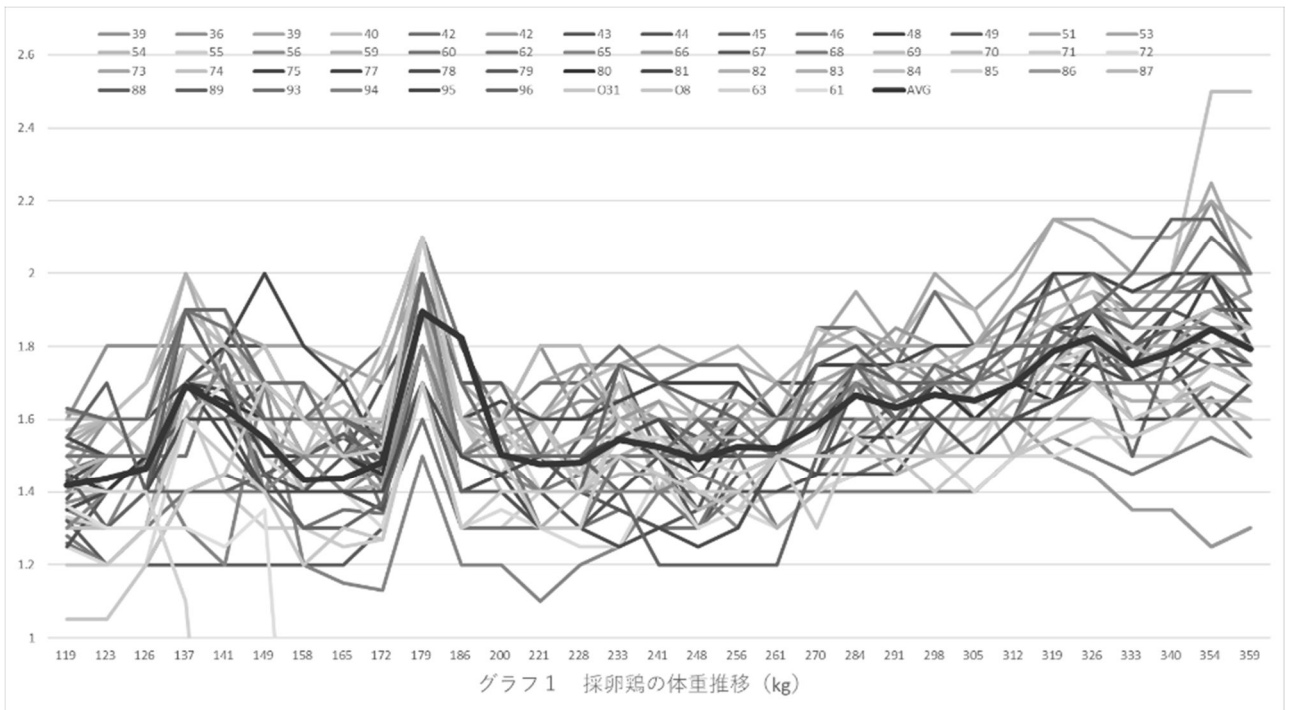
写真6 体重測定



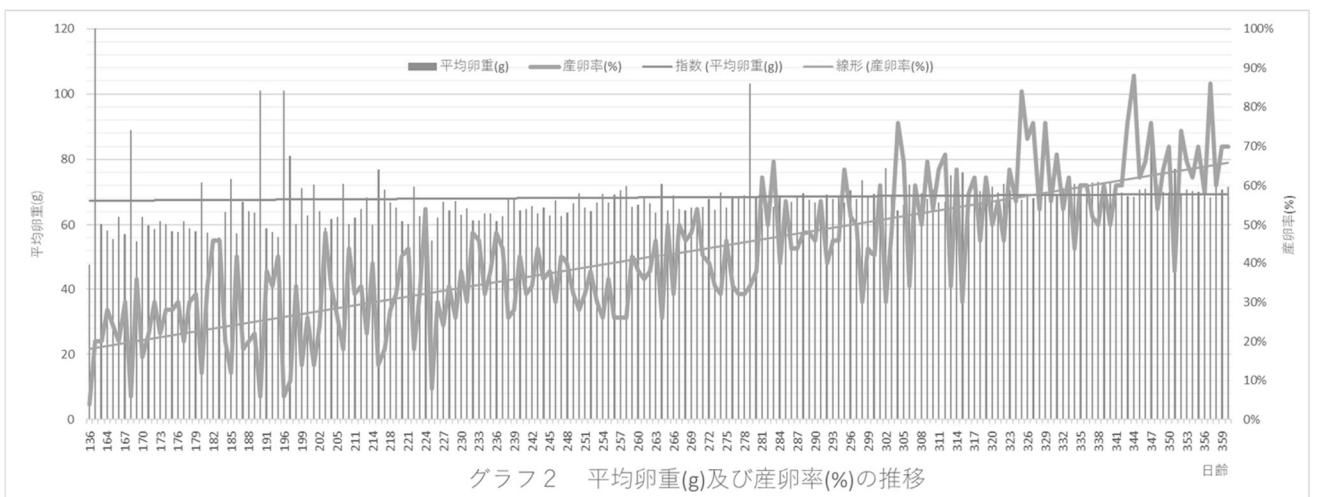
写真7 吊るした循環型飼料



写真8 秋の循環型飼料



グラフ1 採卵鶏の体重推移 (kg)



グラフ2 平均卵重(g)及び産卵率(%)の推移

#### 4. 卵黄色のコントロール

試験前での卵黄色がカラーファン No9 であったが、1 週間の給与によりカラーファン No6 まで卵黄色を濃くさせることができた。循環型飼料は本校の農場で生産されている季節の青果の廃棄物である。そのため、ナス、ピーマン、トマト、キュウリ、ダイコン、ハクサイ、ナシ、ブドウ、カキ、リンゴなど多種であり、これらを定期的に給与することにより常にカラーファン No7 の卵黄色で生産することができた。

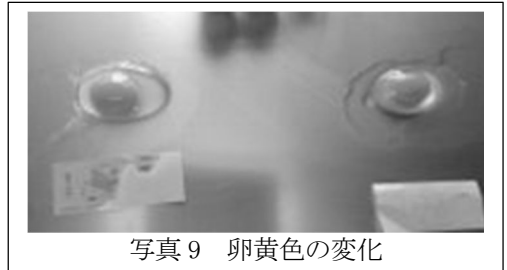


写真9 卵黄色の変化



写真10 ピーマン採食の様子

#### 5) 販路開拓

ブランド化を図るためにこれまでの校内販売のみの販売方法や物流方法を転換するため、やさいバスを利用した「そごう広島店」での販売実施に向けて取り組んだ。今後、ブランド卵として百貨店での販売を目標とするために商品のラベルや単価を再検討し提案する。



写真11 やさいバス営業部からの聞き取り



写真12 そごう広島店

### 考察

#### 1. 品種「もみじ」での鶏卵生産

アニマルウェルフェアの観点より、飼養面積当たりの飼養羽数は密にならないためストレスが軽減された環境であったが、産卵率や卵重及び体重に対してポジティブな影響を示さない。そのため経済性を向上させるために飼養羽数を増やすことが可能である。また、標準体重を下回る結果となっているため、濃厚飼料をより確実に給与できる給与方法を検討する必要がある。

産卵率が最も高くなったのは 344 日齢で 88%であった。産卵された卵を他の個体が直ちに突いて採食する行動が夏以降に頻繁に確認できた。偽卵による対策は長期間効果が見られなかったため、正確な産卵率を求められていないことが推測される。また、秋にかけて穴を掘って産卵する個体が増えた。今後、採卵作業がしやすくなおか突き行動を制限する対策が必要である。

## 2. 循環型飼料の給与

循環型飼料を吊るす給与方法では、飼料に動きがあるため興味を示し生得的行動である突く行動を多くの個体が示した。そして、その飼料から多くの水分を得ることができるなどの因果関係を学習したため、循環型飼料を積極的に採食する習得的行動を学習させることができたと考える。

## 3. 卵黄色の改善

卵黄色を濃くするためにはルテイン、ゼアキサンチンを多く含む緑葉の給与が有効<sup>3)</sup>であるが、これらは循環型飼料の青果である緑黄色野菜などに多く含まれているカロテノイドの一種であるため、品種「もみじ」の鶏卵であるが、カラーファン No9 をカラーファン No7 まで向上させることができ、消費者が求める濃い卵黄色に近づける鶏卵生産を行うことができた。

## 4. 販路開拓

鶏卵生産から販売まで実現可能な鶏卵生産体系により、庄原地域の鶏卵生産で生活できることを提案するためには、庄原地域で資源循環を図ったフリーゲージで生産された鶏卵について、どのような価値があるのかを再検討する必要がある、それを価格で表すことが必要である。来年度は実際に百貨店での販売を実施し経営的な課題を発見する。

## まとめ

令和 3 年度より継続的に取り組んでいる平飼い採卵鶏による鶏卵生産であるが、校内の農場の資源を循環するハブ的な役割を果たすことができることが証明されてきた。令和 3 度には中国四国地域未来につながる持続可能な農業推進コンクール 有機農業環境保全型農業の部 において中国四国農政局長賞を受賞した。今後も持続的に広島県や庄原地域の鶏卵生産が基幹産業であり続けられるよう、本校の鶏卵生産農場体系が地域のモデルとなれるよう継続して取り組む。

## 引用

- 1) 「アニマルウェルフェアの考えに対応した採卵鶏の飼養管理指針」 P8  
公益社団法人 畜産技術協会
- 2) [Http://takakisi.la.coocan.jp/momiji.htm](http://takakisi.la.coocan.jp/momiji.htm) ゴドウ 赤玉鶏「もみじ」について  
「各種経済能力」より
- 3) 「卵の科学」 朝倉書店 中村 良 編 P29

## 謝辞

株式会社 N.G.C 代表取締役 鈴木 康太郎 様  
株式会社 N.G.C 木戸農場長 保本 直紀 様  
やさいバス株式会社 エリア営業 才崎 敏判 様  
はやしなちゅらるふあーむ 早志 様