

調査研究成績報告書

— 家畜保健衛生業績発表集録 —

第55報（平成25年度）

埼玉県農林部畜産安全課

目 次

— 第 1 部 —

- 1 牛白血病浸潤状況調査と今後の対応 ----- 1
中央家畜保健衛生所 中 里 有 子 ほか
- 2 当所における牛白血病への対応 ----- 4
熊谷家畜保健衛生所 吉 田 香 ほか
- 3 管内酪農家における搾乳実態調査 ----- 11
中央家畜保健衛生所 吉 田 輝 美 ほか
- 4 チームで取り組む乳質向上 ----- 19
熊谷家畜保健衛生所 梅 野 杏 奴 ほか
- 5 県内BSE検査施設の現状について ----- 25
中央家畜保健衛生所 平 田 文 吾 ほか
- 6 オーエスキー病清浄化への取組 ----- 32
中央家畜保健衛生所 土 門 尚 貴 ほか
- 7 高病原性鳥インフルエンザ発生を想定した埼玉県防疫演習 ----- 36
川越家畜保健衛生所 森 田 梢 ほか
- 8 アンケート調査にみる管内みつばち事情 ----- 42
熊谷家畜保健衛生所 田 代 卓 也 ほか
- 9 畜産への理解醸成のための食育活動 ----- 48
川越家畜保健衛生所 塩 入 陽 介 ほか

— 第 2 部 —

- 10 牛B群ロタウイルスに関する成牛下痢症マルチプレックスRT-PCR法の再検討
----- 52
中央家畜保健衛生所 曾 田 泰 史 ほか
- 11 牛呼吸器病由来 *Mannheimia haemolytica* 株の性状調査および同定法に関する
一考察 ----- 59
中央家畜保健衛生所 荒 井 理 恵
- 12 種豚に発生した増殖性腸炎（急性型） ----- 65
中央家畜保健衛生所 畠 中 優 唯 ほか
- 13 カリニ肺炎等複数の日和見感染症がみられた離乳子豚の大腸菌症 ----- 71
熊谷家畜保健衛生所 伊 藤 麗 子 ほか
- 14 ミニブタにみられた出血と尿細管壊死を伴う間質性腎炎と膵臓の多発性巣状
壊死の一症例 ----- 77
中央家畜保健衛生所 平 野 晃 司 ほか
- 15 県内養豚場における *Cryptosporidium* の分子生物学的手法を用いた疫学調査
----- 84
中央家畜保健衛生所 油 井 武
- 16 大腸菌が関与した肉用鶏における *Mycoplasma gallisepticum* 感染事例
----- 92
熊谷家畜保健衛生所 田 嶋 径 佳 ほか

— 第 3 部 —

- 17 彩の国ふれあい牧場の現状と課題 ----- 100
秩父高原牧場 宇 田 川 浩 一 ほか
- 18 おいしい黒豚を食卓へ ～先端技術を用いた効率的な繁殖方法～ ----- 105
農林総合研究センター畜産研究所 中 村 嘉 之

1 牛白血病浸潤状況調査と今後の対応

中央家畜保健衛生所

○中里 有子・中井 悠華・河合 正子

I はじめに

牛白血病は、平成10年に届出伝染病に指定されて以降、全国的に発生が増加している。発生のはほとんどは、牛白血病ウイルス（BLV）の感染により発症する地方病性牛白血病であり、その感染経路は感染牛の血液・体液を伴う接触感染が90%で、感染母牛からの感染は10%と言われている。本症は感染率は高いものの発症率は2~5%と低いため、一度感染したウイルスは、媒介昆虫や感染血の接触等により農場へ広がっている可能性がある。

そこで、今回、管内のBLVの浸潤状況を取りまとめるとともに、清浄化対策や感染リスクを把握するため、管内の牛飼養者にアンケート調査を行い、今後の対策について検討したので、その概要について報告する。

II 抗体検査

集計は今年度の牛法定検査の余剰血清を用いた結果及び、平成22年度以降、導入時やと場での発生を機に実施した全頭検査の結果等を取りまとめた。（酪農：16戸、肉牛1戸）

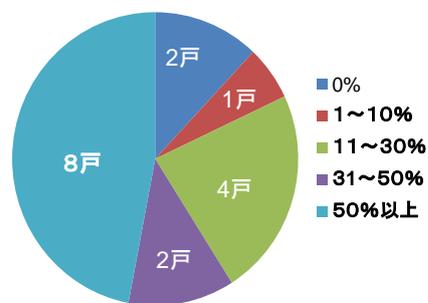
(1) 抗体陽性率50%以上が8戸、31~50%が2戸、11~30%が4戸、1~10%が2戸、全く感染がない農場は2戸であった。（図1）感染率0%の2戸は導入がなく、自家産100%であった。

(2) 抗体陽性率50%以上の農場について（表1）

表1 抗体50%以上農家の概要

農場	陽性/検査(頭)	検査実施動機	サシバエ飛来状況	導入状況	対策
A	51/58	H22と場発生	多い	約2%導入	初乳加温機導入 直検手袋交換
B	28/50	H24と場発生	中	100%	直検手袋交換 導入時検査
C	20/35	H21と場発生	中	約30%	直検手袋交換 AI対策
D	28/49	H25牛検定期	多い	15%	(-)に後継牛種つけ 手袋交換、子牛導入 AI対策
E	10/17	H22と場発生	多い	100%	導入時検査、直検手 袋交換、区画管理
F	15/19	H25牛検定期	多い	約40%	

図1 抗体検査結果



抗体陽性率50%以上の農場では、繋ぎ牛舎6戸中4戸が、と場発生後に全頭検査で陽性率50%以上を確認していた。

全ての農場において、少なくとも年1頭を導入しており、ほとんどの農場でサシバエが多く確認されていた。

(3) 陽性率が高い 2 農場の事例

陽性率の比較的高い農場の中で、対照的な 2 農場の調査を行った。(表 2)

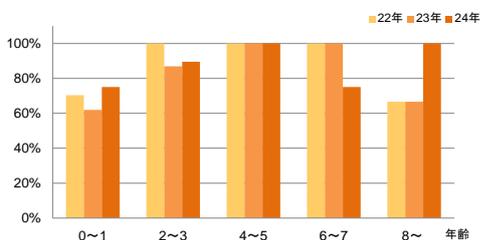
A 農場は、と場発生後の全頭検査で陽性率 50%以上を確認した農場で、初乳加温機を導入し、清浄化対策を進めている。

J 農場は、導入時検査で陽性が確認され、全頭検査で陽性率 44%を確認した農場で、定期的に浸潤状況を確認している。

表2 清浄化の取り組み事例

	A農場	J農場
1 飼養頭数	60頭	50頭
2 検査の動機	H22.1と場発生	H23.1導入時検査
3 初回陽性率	H22.3 72.7%	H23.3 44.0%
4 牛舎形態	つなぎ牛舎	つなぎ牛舎
5 導入状況	2~3頭/年	3~4頭/年
6 実践項目	・1頭毎の手袋の交換 ・殺虫剤散布 ・初乳加温機使用	・1頭毎の手袋交換 ・殺虫剤散布 ・代用乳給与

図2 A農場の年齢別陽性率の推移



ア A 農場の陽性率及び飼養状況

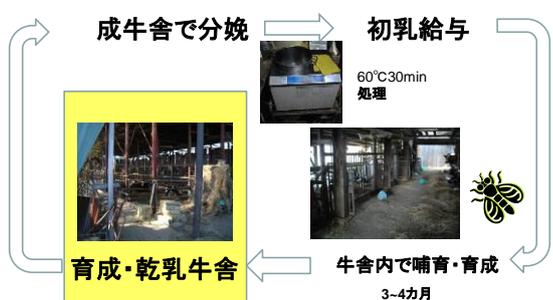
A 農場は初乳の加温処理に加え、計画的淘汰も実施しているが、全ての月齢で抗体陽性牛が多く、1歳未満でも陽性率 60%以上であった。(図 2)。

飼養管理方法を調査したところ、A 農場では、成牛舎で分娩させ、子牛には 60℃30 分で処理

した初乳を給与し、作業の効率性から 3~4 ヶ月間は、サンバエが飛び交う成牛舎で育成し、5 ヶ月齢以降に成牛舎から数メートル離れた育成舎へ移動していた。(図 3)

抗体陽性率も年々増加しており清浄化意欲も薄れている。

図3 A農場飼養管理方法

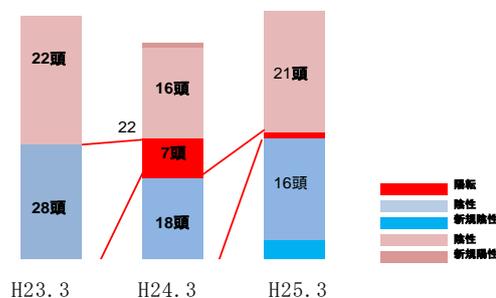


イ J 農場の陽性率及び飼養状況 (図 4)

J 農場は牛の飼養期間が平均 9 年と長いですが、今年度行った検査では陽転牛は 1 頭であった。

飼養管理状況を調査したところ、J 農場では、成牛舎で分娩させ、子牛には代用乳を給与し、少なくとも 24 時間以内には子牛を成牛舎から離れた育成牛舎へ移動していた。陽転率は年々減少しており、清浄化への意欲も高まっている。

図4 J農場の陽性率の推移



Ⅲ アンケート調査

(1) 管内の牛飼養農家で酪農家 41 戸、肉用牛農家 10 戸計 51 戸にアンケート調査を行ったところ、酪農家で 21 戸、肉用牛農家で 6 戸、計 27 戸の回答があった。

ア 牛白血病に関する知識について

近年発生が増加していること、ウイルスが原因で感染率が高いこと、感染牛の血液が感染源となり吸血昆虫や注射針の使い回しにより広がること、発症率は低いと、と場発生で発見された場合全廃棄となることは酪農家で 7 割以上が理解していたが、肉用牛の 5 割以上及び酪農家の 2 戸は認識しておらず、管内の牛飼養農家の牛白血病に対する知識に差が見られた。

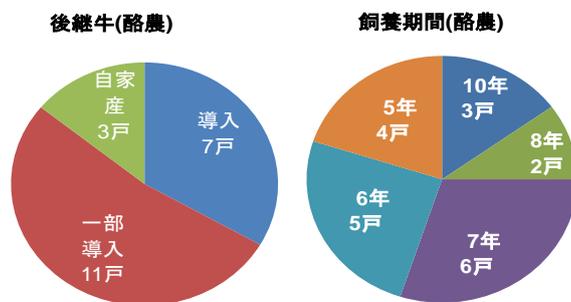
イ 自農場の浸潤状況の把握について

酪農家 21 戸中 15 戸は過去に 1 度は BLV 抗体検査を行っていたが、自農場の現在の浸潤状況を把握している農家は 8 戸であった。

ウ 酪農家の後継牛の導入状況と飼育期間について (図 5)

- ① 酪農家の後継牛は、一部導入が 11 戸、高齢や都市化で育成牛が飼育できず、全て導入する農場が 7 戸、全て自家産は 3 戸であった。
- ② 飼養牛の飼育期間は 5～10 年で平均は約 7 年であった。

図 5 酪農家の概要



Ⅳ まとめと対策

BLV による牛白血病は、管内に多く浸潤しており、本症に対する知識は農家ごとによらつきが大きかった。後継牛を導入している農家も多く、それら農家は BLV 抗体陽性率が高い傾向にあった。また、管内の搾乳牛の廃用までの平均飼養年数は約 7 年と長く、農場での発症が懸念されるとともに、感染防止には、分娩後早期に母牛から隔離して飼育することが極めて重要と思われた。

今後は、牛白血病に対して認識が不十分な農家に対して個別に啓発を行うとともに、定期的に浸潤状況の確認を行い、各農場にあった清浄化プログラムを作成する。また、牛白血病の清浄化対策には生産者の意欲と診療獣医師の協力が不可欠であるため、今後も連携をとりあい、実施可能な計画を策定し、清浄化に向けて取り組んでいきたい。

2 当所における牛白血病への対応

熊谷家畜保健衛生所

○吉田 香・福田 昌治・山田 均

I はじめに

牛白血病は、家畜伝染病予防法の届出伝染病に指定されており、全国における届出数は、年々増加している¹⁾。

当所の牛白血病ウイルス(以下BLV)抗体検査の実績は、平成23年度に延べ73戸668頭(陽性150頭22.5%)、平成24年度が延べ88戸994頭(陽性332頭33.4%)と増加し、また、今年度(平成25年11月末現在)のBLV抗体検査実績は、延べ60戸(陽性925頭18.5%)であった。

これらの検査成績を感染拡大防止対策に有効活用するため、検査実績から問題点を抽出し、牛飼養農家へ衛生指導を実施したので、その概要を報告する。

II BLV抗体検査状況

1 検査実績の推移

平成21年7月に病性鑑定指針が一部改正され、免疫酵素測定法(以下ELISA法)が追加されたことを受けて、当所の血清学的検査は寒天ゲル内沈降反応から、平成24年5月よりELISA法へ移行した。

平成21年に安里ら²⁾が比較検討したとおり、ELISA法は多検体を迅速に検査できるなどの利点がある。近年、検査依頼は増加し、今年度の11月末現在の時点で、すでに昨年度の検査頭数と同等程度となった(表1)。

一方、検査戸数では、管内の牛飼養農家約270戸のうち、BLV抗体検査を実施しているのは、3分の1程度の60~90戸にとどまり、本病に対する問題意識を向上させる必要があると思われる。

表1 BLV抗体検査状況

年度	検査戸数	検査頭数	病性鑑定指針の改正(H21年7月)	
			・寒天ゲル内沈降反応(ゲル沈)	・免疫酵素測定法(ELISA法)
			陽性頭数	陽性率
H23	73 (17)	668 (33)	150 (4)	22.5%
H24	88 (1)	994 (1)	332 (0)	33.4%
H25 (11月末現在)	60 (0)	925 (0)	172 (0)	18.5%

※()はゲル沈

2 抗体検査の事業区分

BLV 抗体検査は、埼玉県の公共牧場に乳牛の育成を委託する農家が依頼する「入牧検査」及び、まん延防止のための「病性鑑定」で実施している(図1)。なお、入牧検査では、公共牧場管理規則により、抗体陽性牛は入牧できないことになっている。

以下、検査実績が増加している「病性鑑定」について記述する。

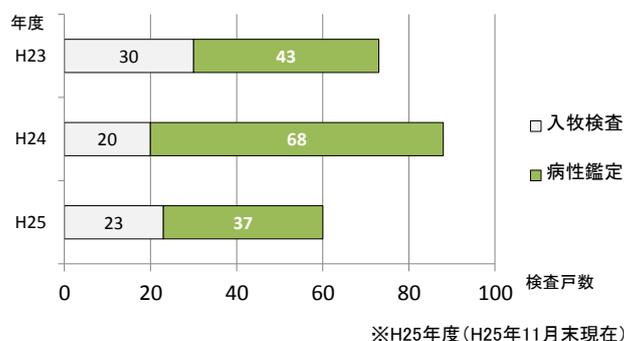


図1 抗体検査戸数の事業区分

III 病性鑑定のBLV抗体検査

1 抗体検査の実施状況

病性鑑定の抗体検査について、農家全体の感染状況を把握するため飼養頭数の半数以上を検査する「全頭検査」と、導入牛や、全頭検査後に生まれた育成牛の検査をする「一部検査」に区分した(図2)。

平成23~24年にかけて、「一部検査」が増えていたが、「全頭検査」の依頼戸数は、ほぼ横ばい状態であった。しかし、「一部検査」だけでは、農家全体の感染状況(陽性率)を把握することはできないため、清浄化を達成するには、「全頭検査」で陽性率を把握したうえで、導入牛や育成牛の「一部検査」を行うことが重要と思われた。

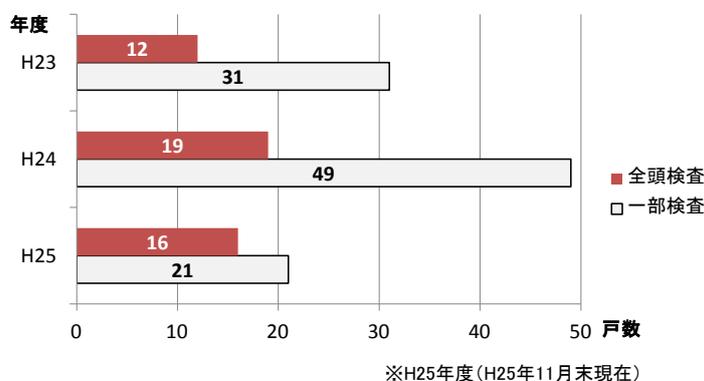


図2 病性鑑定のBLV抗体検査状況

2 全頭検査成績

全頭検査戸数は、平成23年度12戸、H24年度19戸、平成25年度16戸、計47戸であったが、3年継続して全頭検査をしていたのは1戸のみ、2年継続して検査をしていたのは3戸であった(図3)。

全頭検査で、感染状況を把握しても、陽性牛のいない「陰性農家」は安堵し、逆に、陽性牛が全体の50%を超える「重度陽性農家」は、清浄化をあきらめてしまい、定期的な検査が行われていなかった。

全頭検査を継続しなければ、各農家における新たな感染、すなわち「陽転率」が把握できない。「陽転率」がわからなければ、この結果を検証できないことがわかった。

そこで、農家が継続して感染防止対策に取り組むように衛生指導方針に基づき、農家指導を行った。

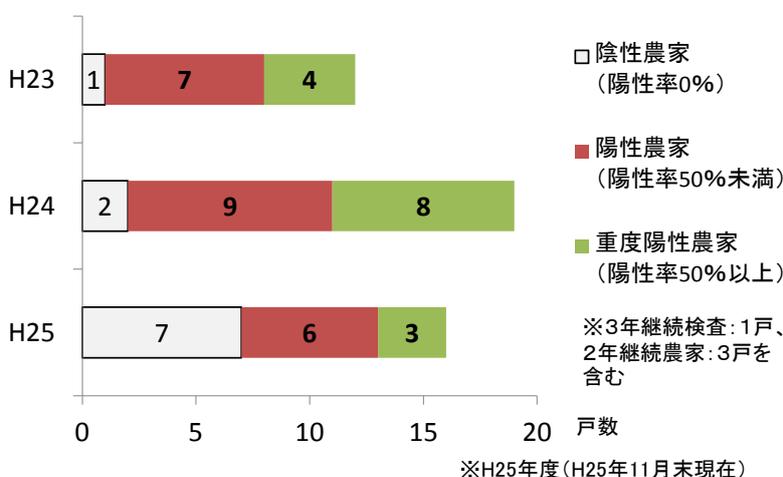


図3 全頭検査の成績

IV 衛生指導方針

1 検査依頼者への事前説明

今年度、検査依頼時から、畜主等に対して、本病の清浄化には継続した検査が必要なこと、抗体陽性牛が発症するのは非常に少ないこと等を説明した。これにより、牛白血病を正しく理解してもらえることにより、抗体検査成績が衛生対策に効果的に反映されるようにした。

2 対象農家に応じた個別対策

依頼農家により、感染状況(陽性率)、畜舎構造、経営状態等が各々違うため、これらを考慮した個別対策を実施することで、農家取り組みやすい対策から実施した。

3 関係者の協力と連携

血液や体液が付着した器具からの感染を予防するために³⁾、人工授精師や管理獣医師に協力を依頼した。特に、直腸検査や超音波診断装置のプロープに使用するポリ手袋の1頭毎の交換と消毒、陽性牛の検査を最後にするように注意喚起した。

V 陽性農家への対策(表2)

牛白血病の感染経路には、「水平感染」と「垂直感染」がある⁴⁾が、陽性農家の対策では、水平感染を防止することを指導した。水平感染の防止対策として、陽性牛と陰性牛を分けて飼育する「分離飼育」において、同一牛舎内で分離する場合は、陰性牛と陽性牛の間隔を2m以上確保するか、目の細かいネットを設置することとした。また、複数牛舎の場合は別棟で分離飼育するように指導した。さらに、重度陽性農家には公共牧場を利用し、BLV抗体陰性の育成牛を一時的に避難させる対策を提案した。

次に、母牛からの垂直感染を防止するために、陰性牛の初乳が確保できない場合には、加温殺菌(56℃～60℃で30分)又は、完全凍結(-30℃を推奨)処理した初乳を給与するように指導した。さらに、重度陽性農家には人工初乳を推奨した。

以下、実際に指導した2事例について記述する。

表2 陽性農家への対策

- | | | |
|------------|---|--|
| 1. 分離飼育 | { | 同一牛舎内:陽性牛と陰性牛を区分
複数牛舎:陽性牛と陰性牛を別棟で飼育
公共育成牧場を利用:陰性牛を委託飼育 |
| 2. 子牛の初乳給与 | { | 陰性牛の初乳、人工初乳
処理した初乳(加温または凍結) |
3. 血液が付着する器具の取扱いと作業順序
 4. 吸血昆虫(サシバエ)の駆除
 5. 陰性牛の導入(抗体検査を実施)
 6. 清浄化へのシュミレーション表を提示(目標)

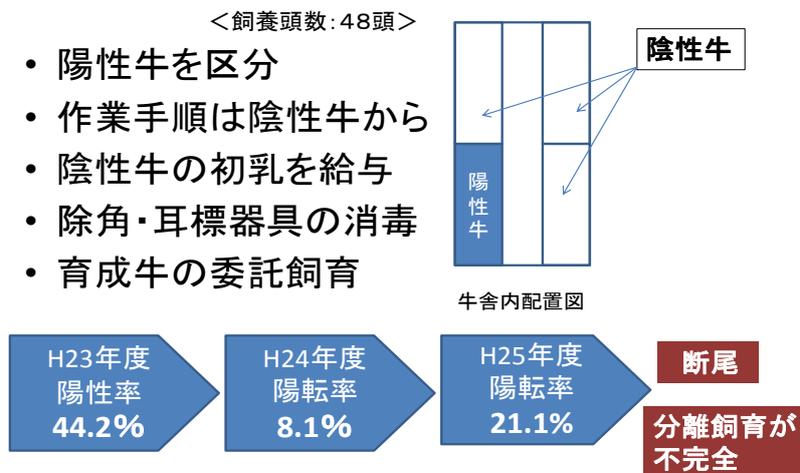
1 指導事例1:酪農家の対策(表3)

平成23年度陽性率44%の酪農家(飼養頭数48頭:つなぎ飼い牛舎)では、主に「分離飼育」と「初乳給与」について指導した。当該農家は牛舎が1棟のみのため、牛舎内を陽性牛と陰性牛に分離し、陰性牛から陽性牛の順に管理作業を実施した。陰性牛の初乳を給与し、除角、耳標装着の器具は1頭毎に消毒した。また、育成牛は公共牧場を利用した。

新たな感染を示す陽転率は、平成24年度に8.1%であったが、平成25年度に21.1%と上昇した。この原因として、断尾の傷口からの出血をサシバエ等が吸血したことにより、同居牛への感染が広がったと考えられた。

また、牛を増頭したため、陽性牛と陰性牛の間隔が確保できず、分離飼育が不完全となった。これらの原因を農家へ伝えたところ、現在は分離飼育され、断尾が中止された。

表3 指導事例1:酪農家の対策

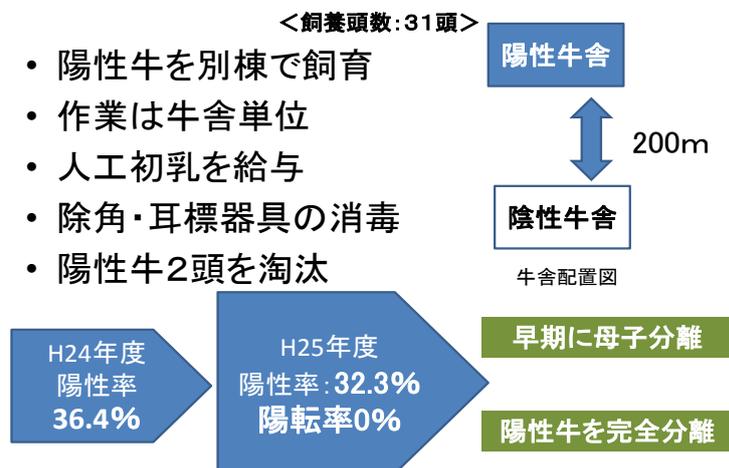


2 指導事例2:肉牛農家の対策(表4)

肉牛繁殖農家(飼養頭数31頭:群飼育)は牛舎2棟を所有していた。そこで、陽性牛舎と陰性牛舎に完全分離が可能であった。また、人工初乳を給与し、陽性牛2頭をとう汰した。

平成24年度陽性率は36.4%であったが、平成25年度に32.3%となり、新たな感染を示す陽転率は0%となった。分離飼育を完全に行い、早期に母子分離して人工初乳を給与すること、陽性牛をとう汰することが有効であると思われた。

表4 指導事例2:肉牛農家の対策



VI 陰性農家への対策(表5)

今年度、全頭検査した16戸のうち、陰性農家7戸は、つなぎ飼いの酪農家であり、牛を導入せずに、全て自家産の牛を飼養している農家であった。陰性農家で自家産の牛を飼養することは、他農場から本病の侵入を防止することになり、自家産による後継牛の確保を推奨した。

また、陽転率を確認する全頭検査を継続し、吸血昆虫の駆除や病原体侵入防止対策の徹底を指導した。

表5 陽性農家と陰性農家の比較

H25年度	飼養形態(戸)	導入牛の有・無
陽性農家 (9戸)	つなぎ飼い:7 フリーストール:2	有
陰性農家 (7戸)	つなぎ飼い:7	無

表6 今後の課題と取組

清浄化 メリット	<ul style="list-style-type: none"> 清浄化した農場を後継者へ 埼玉畜産ブランドの強化戦略 肥育素牛や初任牛の付加価値
継続した 衛生指導	<ul style="list-style-type: none"> 法定検査の残余血清を利用 陽性農家→陽転率を上げない 陰性農家→清浄性の確認検査
淘汰補償 なし	<ul style="list-style-type: none"> 陽性牛の計画的淘汰 リアルタイムPCR法→高リスク牛の選定 陽転率を抑える→清浄化

VII まとめ(表6)

管内牛飼養農家の牛白血病に対する問題意識は低いと思われるが、引き続き清浄化によるメリットを訴えていけば、清浄化へ取り組む意識が高まることが期待される。

特に、後継者がいる農家では、「何年かかっても清浄化したい」と意欲を示す農家もあり、今後の取り組みに希望が持てる。

また、肥育素牛を販売するために、BLV抗体検査を依頼してくる肉牛繁殖農家も認められるようになり、今後、BLV陰性であることが「付加価値」になる可能性が示唆された。

今回、清浄化に向けてのBLV抗体検査及び衛生指導は、継続することが重要であると考えられた。また、全頭検査をしている農家については、今後も検査を継続するように指導してゆく。

牛白血病によるとう汰補償がない現状では、農家に積極的な陽性牛のとう汰は推進できない状況にある。本県では平成26年度から、従来のELISA法に加え、感染ウイルス量を定量できるリアルタイムPCR法の検査も実施する予定である。

このリアルタイム PCR 法の検査により、重度陽性農家は、感染を拡大する高リスク牛を選定し、牛の更新順位がつけられるようになり、計画的とう汰が進むことが期待される⁵⁾。

今後は、農家の全頭検査で陽性牛を把握し、分離飼育や初乳給与等の対策を講じ、継続した検査で陽転率を確認しながら、対策の効果を検証して清浄化を目指していきたい。

VIII 引用文献

- 1) 監視伝染病発生状況の累計比較：農林水産省消費安全局ホームページ，(2013)
- 2) 安里誠, 田口清明, 田中哲也：牛白血病の抗体検査法の比較検討. 調査報告書-家畜保健衛生業績発表集録-, 第 51 報, 埼玉県, 45-48(2009)
- 3) 一般社団法人日本人工授精師協会：家畜人工授精新技術マニュアル-感染防止と受胎率向上をめざして-, (2013)
- 4) 大谷芳子, 榊原裕二, 須永清二：管内酪農団地における牛白血病浸潤状況と清浄化への取り組み. 第 51 回家畜保健衛生業績発表会集録, 茨城県農新水産部畜産課, 1-8(2009)
- 5) 濱谷景祐, 米山洲二, 齋藤俊哉ら：野外における牛白血病ウイルス感染動態と分離飼育による感染予防効果の検証. 第 54 回家畜保健衛生業績発表会集録, 栃木県, 34-37(2012)

3 管内酪農家における搾乳実態調査

中央家畜保健衛生所

○吉田 輝美・青山 達也・木下 明子

熊谷家畜保健衛生所

武末 寛子

I はじめに

良質な生乳の生産に、乳房炎は大きな影響を与えている。乳房炎は、乳牛の病気の中で最も多く、経済的損失額は甚大である。一方、毎日の搾乳作業は、乳房炎をコントロールする上でも重要だが、推奨される方法はあるものの、実際に行われている方法は農家により様々である。

今回、酪農家における搾乳衛生の実態を把握し、乳質改善指導の一助とするため、管内酪農家における搾乳実態調査を実施したので、その概要を報告する。

II 管内酪農家飼養状況

1 搾乳牛飼養状況

管内酪農家43戸中、搾乳牛1～10頭を飼養する農家が4戸、11～20頭飼養が17戸、21～30頭飼養が6戸、31～50頭飼養が15戸、51頭以上が2戸で11～30頭の飼養規模の農家が33戸と半数以上を占めている。

2 使用搾乳システムの種類

ほとんどの農家(39戸)が繋ぎ飼い牛舎におけるパイプラインで搾乳しているが、その他にフリーストール牛舎におけるミルクパーラー使用農家が2戸、バケット搾りのみの農家が2戸、ロボット搾乳を行う農家が1戸存在する。今回の調査には、その性質上、ロボット搾乳は含まれていない。

3 乳質成績(体細胞数)の分布

体細胞数を指標とした乳質成績の分布については、バルク乳の体細胞数20万/ml以下の成績良好な農家が20戸、20～30万/mlの農家が15戸、ペナルティーの対象となる31万/ml以上の農家が10戸であった。なお、体細胞数については、平成24年度、クーラーステーションで実施した特別検査を含む月4回の旬報検査(各戸バルク乳成績)の年間平均数を農家ごとに算出した。

III 調査方法および調査項目

平成24年7月～平成25年2月、管内酪農家43戸に対し、搾乳衛生に係る30項目について聞き取りを実施した。その後も立入等の機会に追加聴取を実施した(表1)。

また、これらの項目について推奨される搾乳方法と乳質成績の関係を検討した。

なお、本調査に用いた推奨方法は、中央酪農会議作成の「良質乳生産ガイド」を参考とした。

表1 調査方法および調査項目

実施期間 : 平成24年7月12日～平成25年2月7日			
調査戸数 : 43戸			
調査方法 : 聞き取り			
調査項目			
1	システム(パーラー・パイプライン・バケット)	15	搾乳の流れ
2	ユニット数(2・3・4・5・6・10・12・ロボット)	16	ユニット持参して開始
3	作業人数	17	プレディッピングの有無
4	作業員1人あたりの台数	18	前搾り回数
5	着脱1人あたり	19	前搾り受ける容器の有無
6	システム点検回数	20	前搾り後1分装着の意識の有無
7	ライナー交換回数	21	乳頭のみ清拭(はい・いいえ)
8	パイプラインの洗浄方法	22	乳頭乾燥(はい・いいえ)
9	バルク洗浄方法	23	ライナースリップ(ある・時々・ない)
10	作業形態	24	マシンストリップング実施(はい・一部・いいえ)
	ユニット分担(場所分担・牛指定・ランダム)	25	搾乳時間5分の意識(有・無)
	作業分担	26	ポストディッピング(ディッパー・スプレー・なし)
	ランダム	27	ディッピング後立たせる
11	清拭(ペーパー・タオル1頭1布・タオル枚数)	28	1頭ごとライナーの消毒(有・無)
12	バケツの数	29	病牛最後搾乳
13	清拭水(温水・薬剤)	30	乾乳軟膏(はい・一部・いいえ)
14	手袋着用の有無		

IV 成績

調査の結果、その他の方法と比較し推奨方法の方が、体細胞数 20 万/ml 以下の乳質良好な農家の占める割合が、著しく高い項目、やや高い項目、やや低い項目の3つに分類された。

1 推奨方法が著しく高い項目

推奨方法の方が乳質良好な農家の占める割合が著しく高い項目は、①清拭水に殺菌剤を使用する、②乳頭乾燥の実施、③ポストディッピングの実施、④1頭ごとのライナー消毒、の4項目となった。

(1) 清拭水に殺菌剤使用

清拭水に殺菌剤を使用する農家は28戸、不使用が15戸であった。推奨される方法である「使用する」の方が、体細胞数 20 万/ml 以下の率が大幅に上回った。また、体細胞数 10 万/ml 以下の全ての農家が推奨方法を実施していた(図1)。

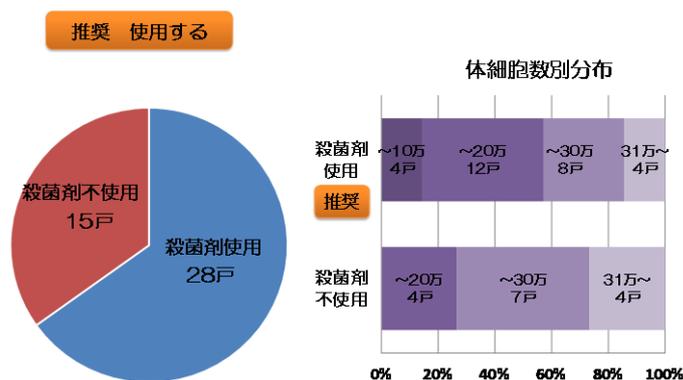


図1 清拭水 殺菌剤の使用

(2) 乳頭乾燥の実施

ペーパータオルで乳頭の水分を拭き取る作業は、乳頭の細菌数を減少させライナーズリップを防止する効果がある。実施する農家が39戸、しない農家が4戸であった。体細胞数20万/ml以下の農家は全て乳頭乾燥を実施していた。(図2)

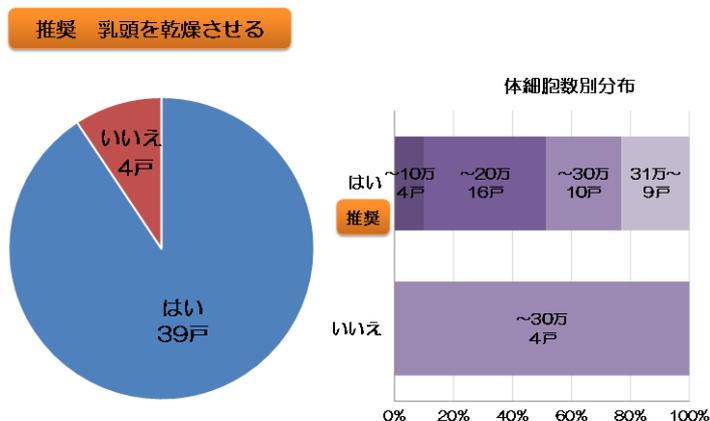


図2 乳頭の乾燥

(3) ポストディッピングの実施

搾乳終了後に実施するポストディッピングは、細菌の感染を予防する効果があり、ディッパー等で乳頭全体を浸漬することが重要である。実施する農家が40戸、うちディッパー使用が23戸、スプレー使用が16戸、ディッパーとスプレーを併用している農家も1戸あった。この項目では、体細胞数20万/ml以下全ての農家を実施する方に含まれた。(図3)

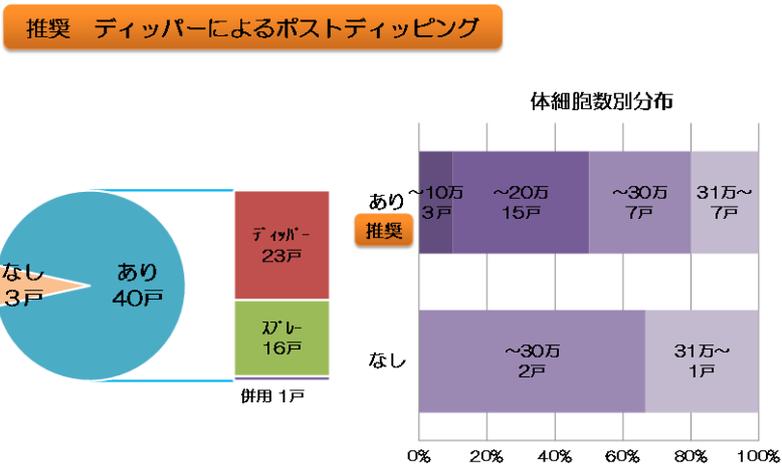


図3 ポストディッピングの実施

(4) 1頭毎のライナー消毒の実施

以前は個体間の感染を防ぐため、1頭毎にライナー消毒を行うことが推奨されていたが、現在はいわゆる「一瞬漬け」は殺菌効果が期待できない上、ライナーが濡れ、ライナーズリップの原因になるので実施しない方法が推奨される。実施しない農家が32戸、実施する農家が4戸と、実施しない農家が大幅に実施する農家を上回った。また、体細胞数10万/ml以下の農家は全て推奨方法に含まれた。(図4)

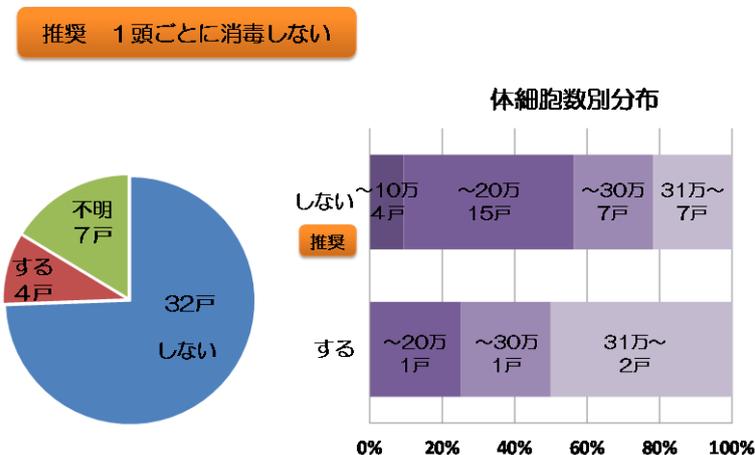


図4 1頭ごとのライナー消毒

2 推奨方法がやや上回る項目

推奨方法の方が乳質良好な農家の占める割合がやや高い項目は、①作業はユニット毎に分担する、②適正な1人当たりのユニット数、③搾乳時手袋の着用、④前搾り4回以上の実施、⑤清拭布1頭1布の使用、⑥清拭布使用前後のバケツを別ける、⑦乳頭のみ清拭、⑧マシンストリップの実施、⑨病牛の最後搾乳実施、の9項目となった。いくつかの項目について以下に示す。

(1) 作業の分担方法

複数人数で従事する場合、作業をどのように分担しているか聞き取りした。推奨方法は、作業の種類による分担をせず、ユニット毎に分担する。作業を機械的に分業すると、乳房炎を見逃したり、搾乳タイミングを逸し、過搾乳の原因にもなる。ユニット毎に分担する農家が15戸、作業ごとに分担する農家が12戸で、推奨方法の方が体細胞数20万/ml以下の農家が占める割合がやや高い結果となった。(図5)

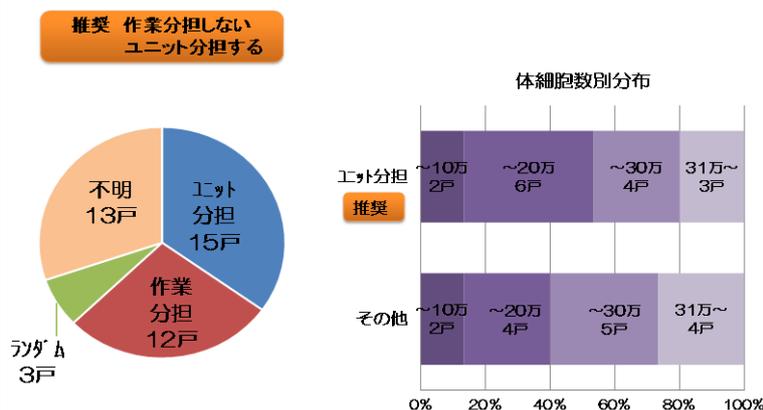


図5 作業の分担

(2) 前搾りの有無と回数

前搾りには、異常乳の発見や乳頭槽内の異常乳を搾出させる等の役割がある。乳頭槽内の異常乳を排出させるためには、最低4回以上の搾出が必要である。前搾りを実施する農家は28戸、一部実施する農家が9戸、実施しない農家が6戸だった。実施すると回答した農家の内、4回以上実施する農家は16戸だった。前搾りを4回以上実施する農家の方がその他の方法より、体細胞数20万/ml以下が占める割合が若干高かった。(図6)

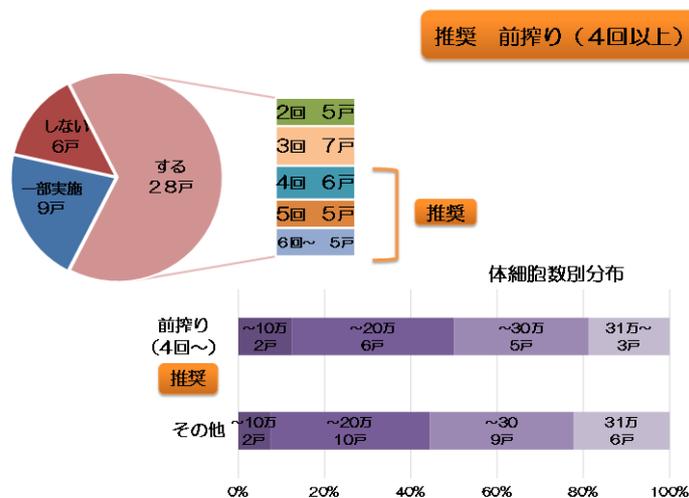


図6 前搾りの有無と回数

(3) 清拭布の使用(1頭1布)

乳頭の清拭は、消毒液に浸したタオル1頭1枚で乳頭のみを清拭する方法が推奨される。1頭1布が22戸、多頭1布が20戸、推奨方法の方が乳質良好な農家の占める割合がやや高かった。(図7)

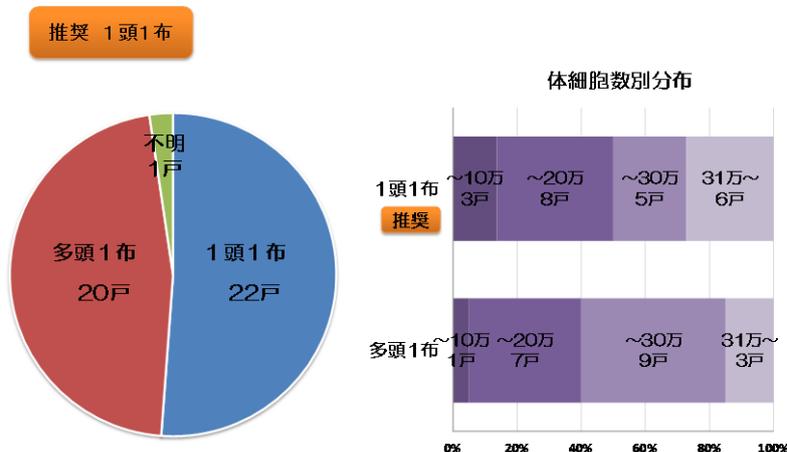


図7 清拭布の使用(1頭1布)

(4) 乳頭のみを清拭

乳頭清拭の目的は、乳頭の汚れを落とし付着している細菌数を減らすことであり、乳房の清拭は不要とされる。乳頭のみを清拭すると答えた農家は24戸、そうでないと答えた農家は19戸で、推奨方法の方が乳質良好な農家の占める割合がやや高かった。(図8)

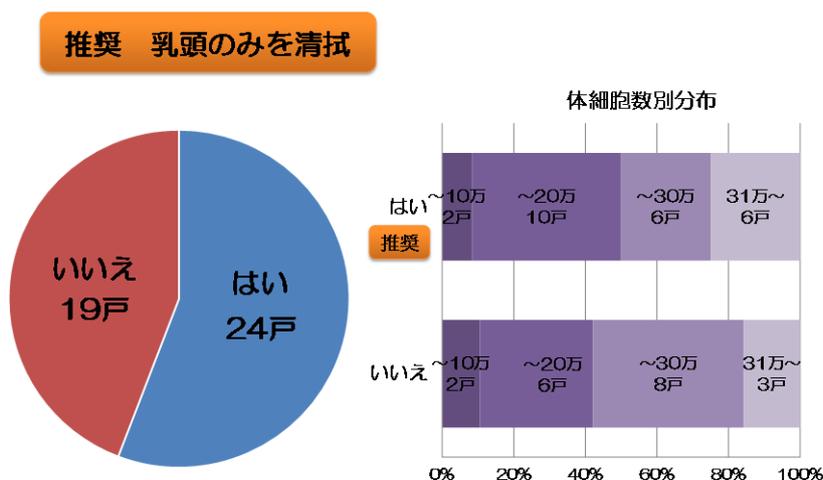


図8 乳頭のみを清拭

(5) 乳房炎牛の最後搾乳

健康な牛への感染を防ぐため、体細胞数の高い牛や乳房炎牛は最後にまとめて搾ることが重要である。実施する農家が34戸、実施しない農家が9戸で、推奨方法が体細胞数20万/ml以下の農家の率がその他の方法を上回った。また、体細胞数10万/ml以下の農家は全て推奨方法に含まれた。(図9)

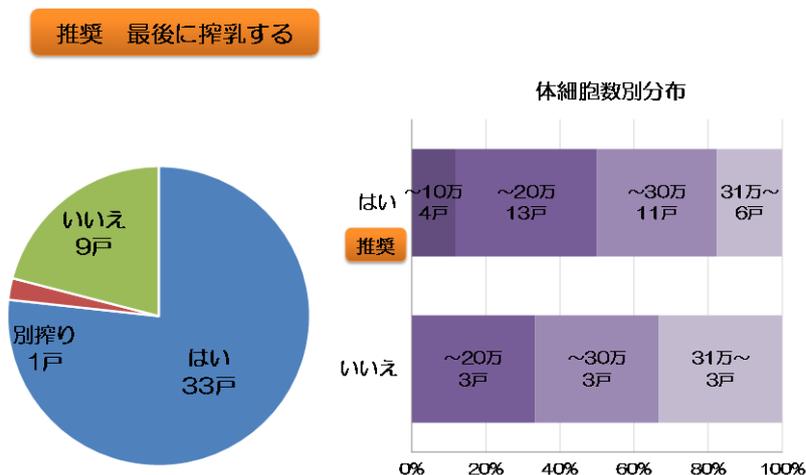


図9 乳房炎牛の最後搾乳

3 推奨法の方が低い項目

一方、推奨方法の方が乳質良好な農家の占める割合が低い項目は、①システムの点検頻度、②パイプラインの洗浄方法、③搾乳時間5分の意識の有無、④乾乳期治療の実施、の4項目であった。こちらも、いくつかの項目について以下に示す。

(1) 搾乳システム点検頻度

定期的を実施している農家が27戸、トラブル時に点検を依頼する農家が16戸で、定期的を実施している農家では、その回数は年2回が16戸と半数以上を占めた。定期的を実施する方が、20万/ml以下が低い結果となった。

(2) 乾乳期の治療の実施

乾乳初期は新規感染が発生しやすいため、選択的な治療より全頭全分房の治療が勧められる。乾乳期治療を実施する農家が29戸、一部実施が9戸、実施しない農家が4戸で推奨方法が20万/ml以下が低い結果となった。但し、10万/ml以下は全て推奨方法に含まれた。

V まとめ

調査の結果、推奨される搾乳方法を行っていない農家も少なくないことが明らかになった。また、項目毎に乳質成績と比較したところ、概ね推奨方法の方が成績良好農家の比率が高かったが、逆の項目も散見された。このことは、1項目単独での判定は難しいこと、

搾乳作業のほか、飼養管理、牛舎環境、様々な要因が影響しているためと考えられた。

今後は、これらの要因も対象とし調査を継続するとともに、酪農研修会で本調査の結果を情報提供する等、農家啓発に調査結果を活用し、乳質改善指導に役立てたい。

VI 参考文献

社団法人中央酪農会議，良質生産ガイド，関東生乳販売農業協同組合連合会

4 チームで取り組む乳質向上

熊谷家畜保健衛生所

○梅野 杏奴・黒沢 和久・田代 卓也

田中 美貴・山品 恒郎

I はじめに

乳質の向上は、酪農経営の安定のために常に努力すべきテーマであるが、近年の飼料高騰や為替レートの変動など厳しい経営環境が続いており、その重要性は増している。

そこで、県内の1農協連と協力し、新たに乳質改善指導班を立ち上げ、乳質の改善への取り組みを行ったので、報告する。

II A農業協同組合連合会の概要等

1 A農業協同組合連合会の概要

A農業協同組合連合会（以下、A組合）は県内で2か所のクーラーステーション（以下、CS）を運営。県内酪農家244戸中148戸（約61%）が所属しており、そのうち当所管内農家は79戸である（平成25年9月現在）。

また、A組合の年間生乳生産量は約42,741トンとなっている。

2 A組合の乳質の現状

A組合の乳質は図1で示した通り、関東生乳販売農業協同組合連合会（以下、関東生乳販連）の検査所で定期的に検査を行っている8団体の中で、近年、生乳中の総菌数が最も高くなっている。

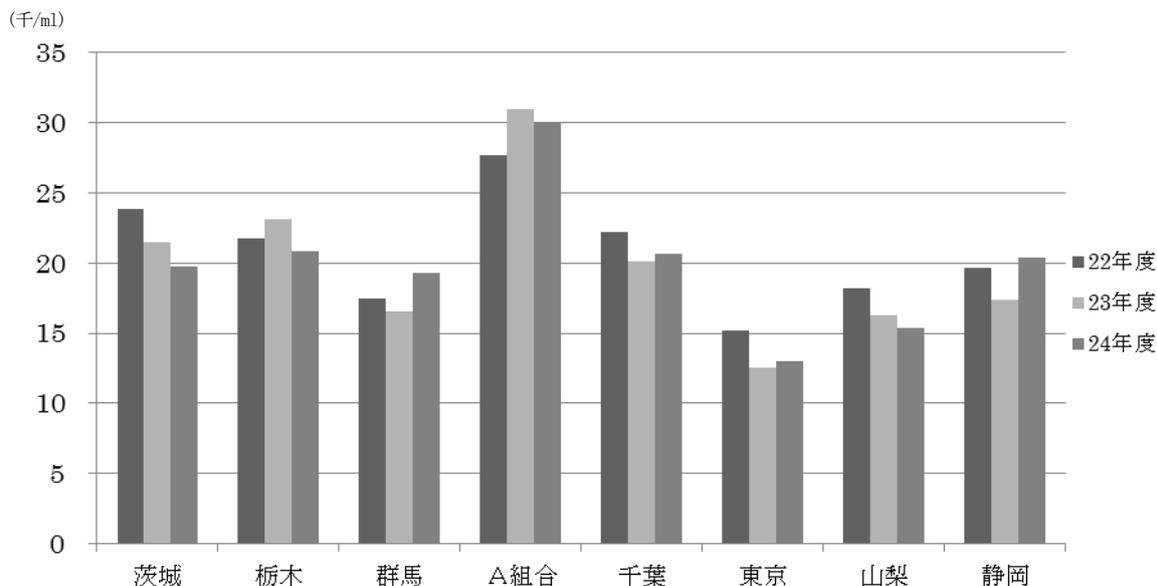


図1 関東生乳販連にて検査を行っている8団体の総菌数の比較

その他の検査項目のうち、体細胞数に他県と大きな差異が無かったことから、A組合の乳質向上のためには、乳房炎の防除だけでなく、搾乳手技や搾乳機器の洗浄消毒に改善の余地があると考えられた。

3 これまでの乳質改善指導と乳質改善指導班の発足

これまでの乳質改善指導では、乳房炎発生農家や乳質の定期検査において基準を満たさない農家に対し、診療獣医師、CS及び家畜保健衛生所（以下、家保）がそれぞれ指導を行っていた。家保は診療獣医師やCSに依頼された場合、協力を行ってきたが、3者全体での情報共有や協力体制の構築までは至っていなかった。

このような状況を踏まえ、平成24年6月、A組合が運営する2つのCS運営委員会の一本化を契機として、関係機関が協力し、「農家の乳質改善の取組み意識向上」を目的とする乳質改善指導班を立ち上げることとし、乳質改善指導班の構成員は、家保職員、農家代表、CS所長、農協職員及び臨床獣医師とした。

同年7月、第1回目の乳質指導班会議を開催し、主な活動内容を乳質検査結果に基づく乳質の改善指導と生乳生産管理チェックシートの記帳促進とした。

構成員の役割分担は、図2のとおりで、乳質の改善指導は家保、農家代表、CS所長、臨床獣医師が担当し、生乳生産管理チェックシートの記帳促進は農協職員が担当することとした。

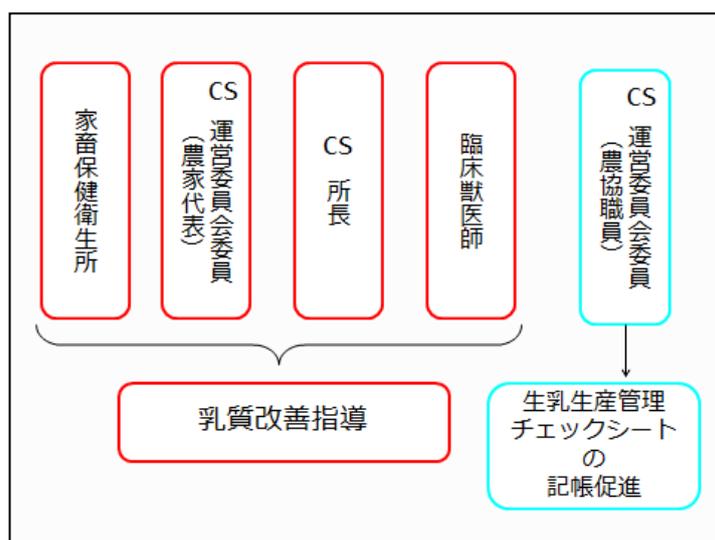


図2 乳質指導班の構成と役割分担

III 24年度の取り組み

1 バーンミーティング

県内2か所の農場において、乳質改善指導班の臨床獣医師が講師となり、「乳質向上のためのミルクカーの日常点検」をテーマとしたバーンミーティングを開催した。実践的で分かりやすい研修をとするため、実際に農場で使用している機器を使いながら実施した。

研修の内容は①ミルカーの一般構成とそれぞれの働き。②毎日、確認すべき項目として、真空圧の上がり方、レギュレーター、パルセーターの作動音等。③定期的に確認すべき項目として、真空ポンプ内の確認、チューブ、ライナーゴム等消耗品の交換、エアリーク等の確認方法。④ミルカー等の搾乳機器が乳質に与える影響についてである。

2 バルク乳細菌検査

A組合所属の全農家を対象にバルク乳の細菌検査を実施した。検査項目は、総生菌数、耐熱性菌数、無乳性連鎖球菌数、黄色ブドウ球菌数(SA)、環境性連鎖球菌数、大腸菌群数、環境性ブドウ球菌数(CNS)、その他の環境菌数の8項目。項目ごとに「正常」から「やや多い」、「多い」、「非常に多い」の4段階で評価を行った。

結果をバルク乳細菌検査成績表及び総生菌数順のランキング表として各農家に配布し、乳質改善意識の向上を促した。

また、特に改善が必要とされた農家には立入を行い、搾乳衛生などを指導した。

実施後の問題点として、一部の農家から「成績表のコメント欄(図3)がわかりにくい」、「改善は行いたい具体的な改善方法がわからない」等の意見が寄せられた。

成績表は民間検査所の様式のため変更は難しく、乳質改善指導班として何らかのフォローが必要と考えられた。

さらに、追加の個体乳細菌検査などの利用は一部の農家に限られたため、バルク乳の黄色ブドウ球菌陽性農家における感染牛把握等に不安が残る結果となった。

コメント	
注1:	黄色ブドウ球菌感染個体乳混入。
○	生菌数は正常範囲、耐熱菌がやや多い。
	耐熱菌はハチカ(枯草菌)搾乳衛生に注意。
	搾乳時衛生、機器洗浄、乳房炎菌混入に注意。
	黄色ブドウ球菌(乳房炎)の汚染に注意。
	環境性レンサ球菌(乳房炎)の汚染に注意。
	機器洗浄(ワイパー、ロー、ミルカー、ライン繋ぎ、パッキン、ゴム、塩ビ)の劣化、汚れに注意。
○	生菌数は正常範囲ですが、上記に注意。

図3 バルク乳細菌検査成績表 コメント欄

IV 25年度の取り組み

1 バルク乳細菌検査

バルク乳細菌検査を年2回実施することとし、第1回目は7月に行った。これは、検査頻度を高めることにより、継続的にバルク乳の性状を把握し、農家の乳質改善の意識を更に高めるためである。

また、24年度での、「成績表がわかりにくい」という問題点を踏まえ、検査成績表の見方をフロー

チャートで作成、配布した(図4)。

バルク乳細菌検査結果を判定して対策を取りましょう あなたの牛群はどのタイプ？												
バルク乳細菌検査成績を見ながら、 順序に沿って各細菌種類をチェックしていき下さい。牛群タイプとその対策が判ります。												
順序	環境性細菌					伝染性細菌				牛群タイプ		対策
	①	②	③		④	⑤	⑥					
細菌種類	生菌数	耐熱菌数	環境性レンサ球菌	環境性ブドウ球菌	大腸菌群	その他環境性細菌	無乳性レンサ球菌	黄色ブドウ球菌	体細菌	牛群タイプ		
まず、生菌数を見ます！	正常	正常	正常		正常	正常	正常	正常	正常	良好牛群	現状維持を！	
	多い	正常	いずれかが多い		多い	正常	正常～異常	やや多い	やや多い	搾乳衛生不良牛群	搾乳方法、清拭、牛床環境、慢性乳房炎牛対策を取りましょう！	
	多い	多い	正常		多い	正常	正常～異常	不定	洗浄不良牛群	洗浄、殺菌対策を点検しましょう！		
	異常に多い	異常に多い	やや多い～異常に多い		異常に多い	異常に多い	正常～異常	不定	冷却不良牛群	洗浄、殺菌対策に加え、冷却状態や採取方法の確認を！		
	異常に多い	正常	正常		正常	正常	正常	多い	特殊微生物汚染牛群	特殊微生物が感染しているかもしれない。		
							やや多い	やや多い	やや多い	伝染性細菌感染牛群	個体検査を実施しましょう！	

図4 検査成績表の見方

乳質改善指導班の打ち合わせ会議では、CS所長が取りまとめ役となり、臨床獣医師と家保が技術的助言を行うとともに、農家代表が生産現場の状況や農家の気持ちを代弁するなかで、具体的な指導について検討を行った。

また、バルク乳細菌検査結果を分析し、各農家を問題点ごとに分類し、効果的な指導方法について検討した。

さらに25年度の指導方針として、これまでの乳質指導では、定期検査で不合格となっている農家を中心に指導を行ってきたが、組合全体の乳質のレベルアップを図るためには、もっと広い範囲の農家に働きかけを行っていくべき必要があると確認された。

そして、乳質改善に意欲のある農家を支援するため、バルク乳細菌検査成績の活用状況アンケート調査を行うこととした。

2 バルク乳細菌検査成績活用状況アンケート

アンケート調査の実施方法と結果については、次のとおりであった。

なお、結果集計については、管内79戸のみとした。

- (1) 対象農家数：148戸(管内79戸)
- (2) 調査方法：調査票を集乳車で配布、回収
- (3) 調査項目：①バルク乳細菌検査成績の確認、②バルク乳細菌検査の結果を受けての対応、③乳質改善指導班の訪問指導の希望の有無
- (4) 結果(管内79戸分)
 - ・回答数：60戸(回答率 75.9%)
 - ・検査結果を確認した農家数：59戸(74.6%)

- ・バルク乳細菌検査の結果を受けての対応(図5):
 - 「問題ないと判断」10戸(13%)
 - 「改善する(又はした)」36戸(45%)
 - 「問題あるが改善のための行動をしていない」14戸(18%)
- ・乳質改善指導班の訪問希望農家数:9戸

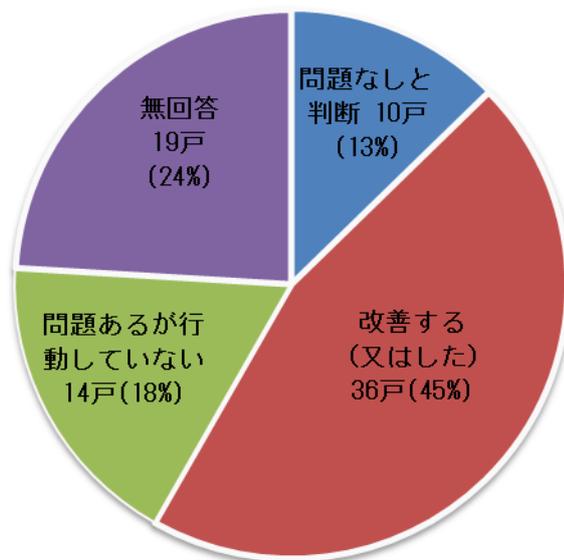


図5 バルク乳細菌検査結果を受けての対応状況

検査結果を確認したと回答したのは、59戸で、回答があった農家からみるとほぼ全ての農家が結果を確認していた。

また、バルク乳細菌検査の結果を受けての対応について、「問題ないと判断」との回答が10戸、「改善する(又はした)」と回答した農家が36戸であった。

一方、「問題あるが改善のための行動をしていない」と回答した農家も14戸存在した。「問題ない」と「改善する」の回答を合わせると、管内農家の約60%は現状維持も含め、バルク乳細菌検査を活用していると考えられる結果となった。

乳質改善指導班の訪問を希望した9戸の農家については、各戸訪問し現状確認と指導を行った。

3 訪問希望農家指導の一例

(1) 指導概要

指導を行ったK農場は飼養頭数35頭(搾乳頭数:17頭)。以前から体細胞数が高い傾向にあり、特に25年度に入ってから、定期検査の平均が50万/mlを超えて推移していた。

バルク乳細菌検査成績の特徴としては、総菌数が「やや多い」、黄色ブドウ球菌も「やや多い」、その他の環境性ブドウ球菌が「非常に多い」となっており、乳房炎牛の把握と環境改善など総合的な対策が必要と考えられた。

K農場はこれまでも家保が断続的に乳質改善のため指導を行ってきたが、更なる改善のため乳質改善指導班として指導を行うこととした。

訪問指導は、家保職員、CS所長、農家代表の3名で行った。農場の衛生状態、搾乳手技、搾乳機器の点検状況を確認しつつ、家保は黄色ブドウ球菌感染個体の把握を主目的とした細菌検査と搾乳衛生指導を実施し、農家代表が牛舎環境の改善について助言を行った。

家保は、搾乳牛全頭の細菌検査により、黄色ブドウ球菌及び環境性ブドウ球菌等感染牛を特定し、その情報を診療獣医師と共有することで治療計画への助言を行った。

(2) その後の改善状況

10月の乳質改善指導班の指導後、K農場は体細胞数の高い個体から順次治療を行った。

その結果、今年4月以降、体細胞数がバルク乳の定期検査で50万/ml以上だった体細胞数が急激に減少し、30万/ml近くまで改善した。(図6)

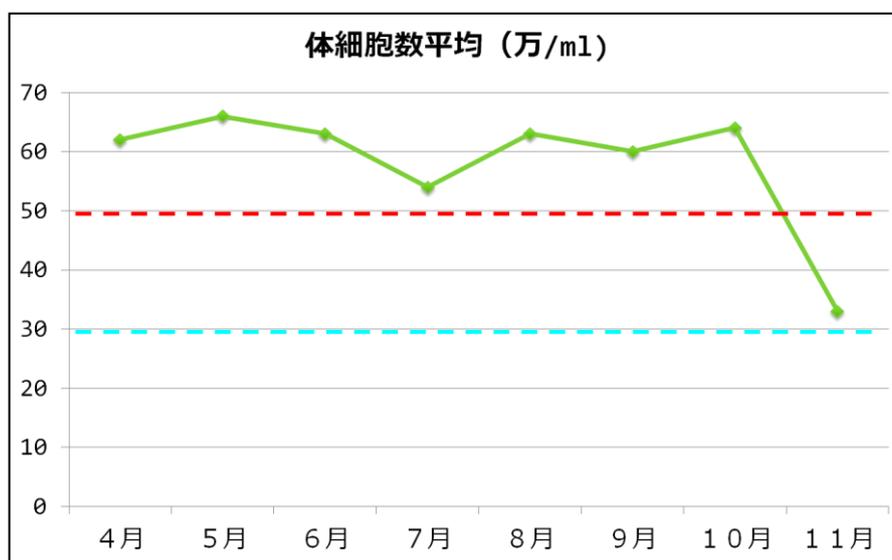


図6 K農場 体細胞数改善状況

V まとめ

今回の取り組みでは、これまで家保、診療獣医師、CS等が個々に乳質改善指導等を行ってきたが、乳質改善指導班としてチームで改善指導を行うことにより、次のような成果があった。

- ・農家の乳質改善意識の向上、関係者間での情報共有の円滑化とその検討による指導方針の明確化が図られた。
- ・バーンミーティングによる実践的な研修の開催と農家代表が直接乳質指導に関わる事により農家の気持ちに寄り添った指導を行うことができた。

今後の課題としては、改善意識のない農家等に対する意識向上対策の検討が必要である。

さらに、個々の農家の改善事例を積み重ねるとともに、農家全体の乳質向上意識をより高めることにより、A組合全体の乳質改善に繋げていきたい。

5 県内BSE検査施設の現状について

中央家畜保健衛生所

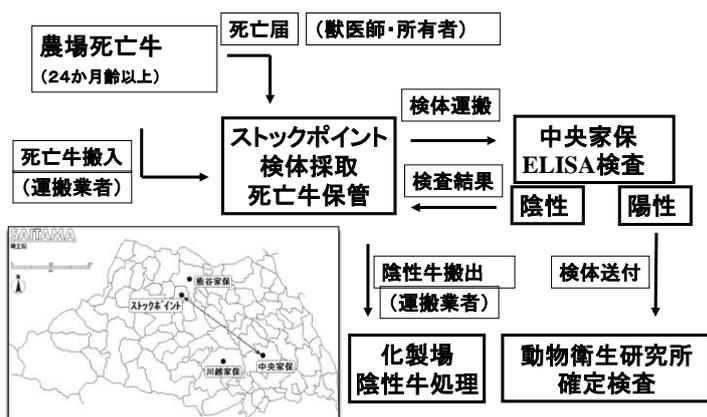
○平田 文吾・田口 清明

はじめに

牛海綿状脳症(以下BSE)特別措置法に基づく死亡牛のBSE検査が実施されてから11年が経過した。埼玉県では検査が開始された平成15年4月から平成25年11月末までに7,778頭を検査し、全ての死亡牛で陰性が確認されている。

一方、BSE検査施設(以下ストックポイント)は設置後11年が経過し、施設の老朽化が著しく、本年10月には全ての保冷库が故障し、保管牛の腐敗が進行して悪臭や衛生害虫が発生し労働環境の悪化は深刻となり、周囲からの苦情も懸念される状況となった。そこで、関係機関、運搬業者と協議して対策を講じたので、これまでの検査実施状況とともに概要について報告する。

1 検査業務の流れ



農場で牛が死亡すると、獣医師または所有者から死亡届がストックポイントに提出される。その後、輸送業者が死亡牛を農場からストックポイントに搬入し、職員が脳幹を大孔法により採材する。検体を中央家畜保健衛生所に搬送し、エライザ検査で陰性を確認した後に、死亡牛については輸送業者によりストックポイントから化製場に搬出される。(図1)

図1 埼玉県における死亡牛BSE検査組織図

2 施設の概要

施設の概要は図2のとおりで、主な設備として、第1、第2保冷库、フォークリフト、保冷库内の硫化水素を低減するための紫外線光触媒脱硫装置、排水浄化槽等がある。第1保冷库には2基、第2保冷库には1基の室内保冷ユニットがある。作業スペースは輸送業者が進入するオープンスペースと、フォークリフト保管場所兼パレットの洗浄などを行う屋内スペースがあり、ほかに事務室等がある。

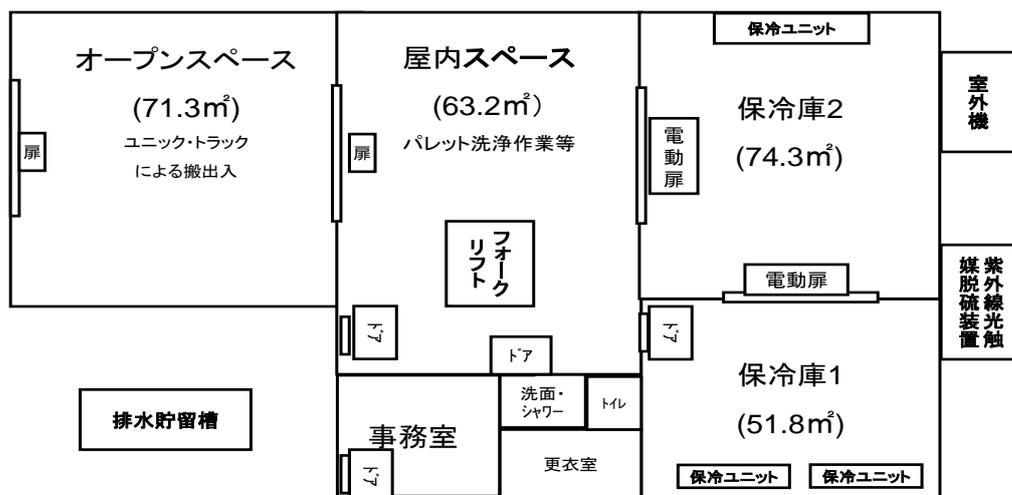


図2 BSE検査施設見取り図

3 搬出入・保管

搬入・搬出作業は輸送業者が行い、必要に応じて職員が誘導や補助を行う。また、保冷库内でのフォークリフトによる作業は通常3段までパレットを積み上げる必要があり、熟練を要する作業となる。なお、パレットの重量は約220kgであり、牛体の重量と合計すると800kgを超える場合もある。牛体の腐敗等の損傷が強い場合には滑りやすいなどの危険を伴う。



図3 搬入・出作業



図4 保冷库内での保管

4 死亡牛頭数の推移

年度別死亡頭数は、ストックポイントにおけるBSE検査が開始された平成15年度は946頭で、その後年々減少を続け近年はおおよそ600頭前後で推移している。検査頭数が前年より増加したのは埼玉県で記録的猛暑だった平成22年度のみである。

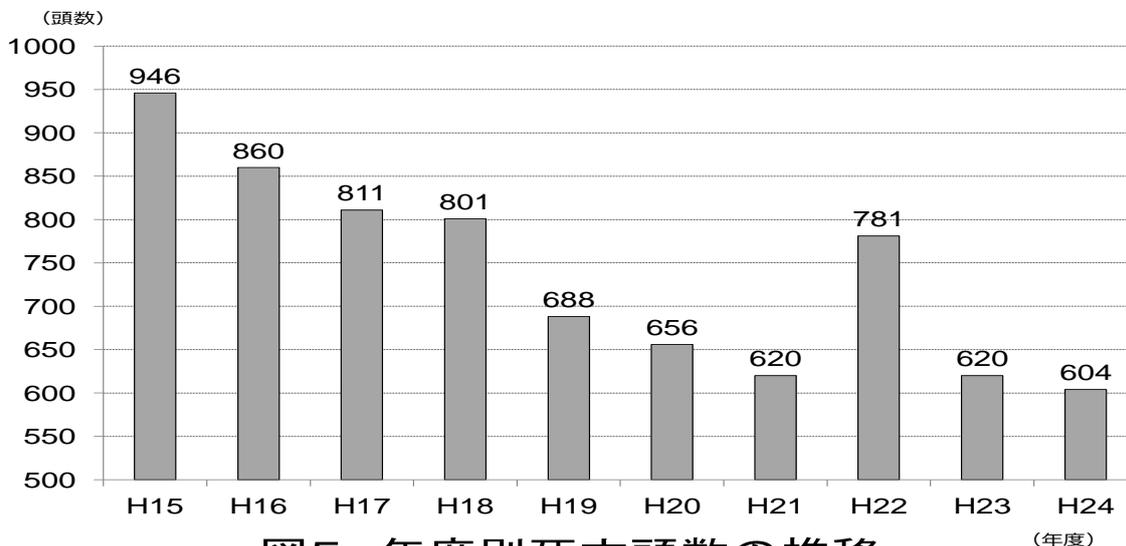


図5 年度別死亡頭数の推移

5 死亡届に基づく死亡原因

死亡届の届出者は90%以上が臨床獣医師であり、牛の品種別割合では約90%が乳用牛で残り約10%が肉用牛である。死亡原因は、心不全が約半数を占め、乳房炎、熱射病、鼓脹症、第四胃変位と続いている。

特に、乳用牛の死亡原因については、心不全、乳房炎、熱射病、鼓脹症、感染症、第四胃変位、ダウンナー症候群、敗血症の順であり、乳房炎の内訳は殆ど急性および甚急性乳房炎である。また、肉用牛の死亡原因は、心不全、急性鼓脹症、ビタミンA欠乏症、肺炎、窒息死、熱射病、縊死、肝炎、肝不全の順である。

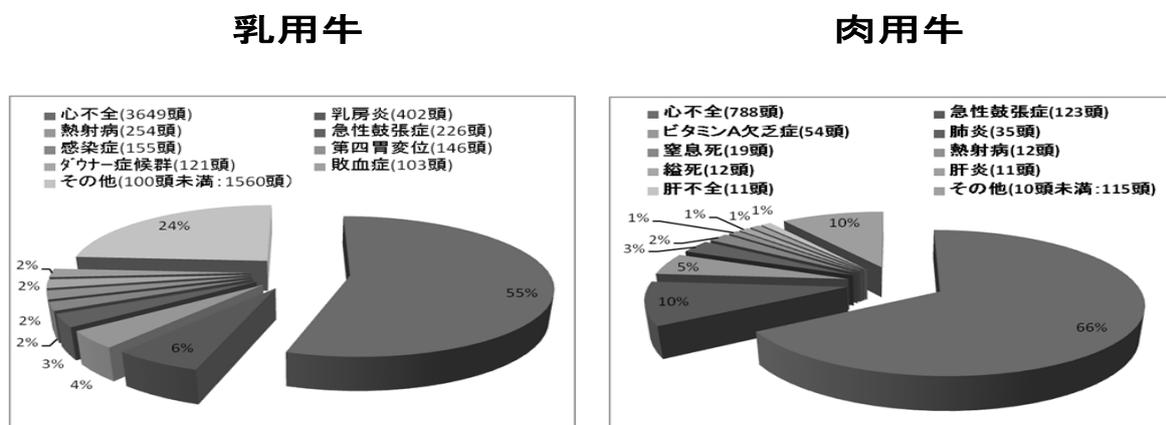


図6 死亡届に基づく死亡原因(H15~25)

6 肉骨粉規制前出生牛の割合

飼料安全法により、平成13年10月15日から肉骨粉などの動物由来たんぱく質を含む飼料の牛への給与は禁止された。この規制より前に生まれた牛が死亡牛としてストックポイントに搬入される割合は、検査開始当初の平成15年度には97.5%とほとんどの牛が該当していた。しかし、年々減少を続け、平成24年度には4.5%となり、平成25年度では11月時点で3.8%にまで減少している。

表1 肉骨粉規制前に生まれた牛の割合

年度 項目	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21	H22	H23	H24	H25 11月末
死亡頭数	946	860	811	801	688	656	620	781	620	604	391
出生日が 規制前の 頭数	922	713	546	407	236	149	84	64	52	27	15
割合(%)	97.5	82.9	67.3	50.8	34.3	22.7	13.5	8.2	8.4	4.5	3.8

7 1人当たり年間処理頭数の推移

平成15年度の検査開始当初からの担当職員一人当たりの処理頭数は237頭であったが、年々減少し平成21年度には200頭程度にまで減少した。しかし、平成19年度に職員が一名減の3人体制となり、平成22年度以降は2人体制にまで減員されたため、1人当たりの処理頭数は300頭以上となり、検査開始当初よりも現在のほうが業務は過重となっている。

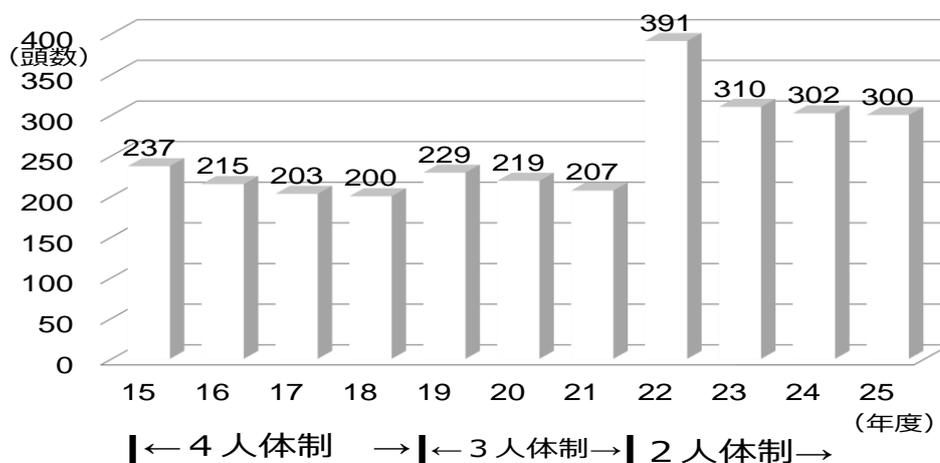


図7 1人当たり年間処理頭数の推移

8 スtockポイントにおける修繕・保守点検実施状況

第1保冷庫には冷却ユニットが2基あり、交互に交換を実施している。第2保冷庫は、第1保冷庫で保管しきれない場合に使用しているため使用頻度は低く、冷却ユニットは1基で、22年度に交換を実施した。次の交換は平成25年度の予定である。また、紫外線光触媒脱硫装置、フォークリフト、パレット他の修繕が毎年必要となっており、保冷庫と合わせて約200万円から300万円の修繕費が毎年必要である。さらに、修繕費とは別に保守・点検費用として毎年50万円から100万円が必要である

表2 修繕・保守点検実施状況

項目		年度						
		H19	H20	H21	H22	H23	H24	
修繕	保冷庫	No. 1 ユニット交換			A		B	A
		No. 2 ユニット交換				○		
		扉・その他修繕	○	○	○		○	○
	紫外線光触媒脱硫装置 修繕		○	○	○	○	○	○
	フォークリフト 修繕		○	○	○	○	○	
	パレット 修繕		○	○		○		
	修繕等 その他			○	○			
	合計(千円)		1,992	1,885	2,135	3,674	2,113	1,950
保守・点検	保冷庫 点検		○	○	○	○	○	○
	紫外線光触媒脱硫装置 点検		○	○	○	○	○	○
	フォークリフト 点検		○	○	○	○	○	○
	污水管等 高圧洗浄		○	○	○	○	○	○
	点検等 その他			○		○	○	○
	合計(千円)		1,132	802	817	644	604	660
○ 実施済 A・B:保冷庫1のユニット2基								

9 保冷庫の故障について

腐蝕と老朽化により、ストックポイントは様々な場所で故障が起きており、特に本年10月7日から12月7日までの2か月間、保冷庫が完全に停止した。その間、関係者に協力を要請し搬入を週2日とする制限措置を取ったが、その間悪臭や衛生害虫の発生など労働環境は深刻に悪化し、周辺からの苦情も懸念される状況となっていた。その経緯と状況は表3および図8のとおりである。

表3 保冷庫の故障について

経過

- ・ 9月20日 保冷庫1・2共に稼働不良。
- ・ 9月25日 業者点検、故障箇所確認。
- ・ 10月7日 保冷庫1・2共に完全機能停止。
- ・ 10月21日 業者故障箇所修理、保冷庫稼働せず。別の故障確認、ユニット1基発注。
- ・ 10月22日 関係機関と協議、搬入を週2日に制限、翌日に搬出体制。
- ・ 12月7日 エットクーラー納品、取り付け工事、保冷庫1再稼働。
- ・ 12月13日 工事確認検査完了、搬入制限解除。

状況

ウジ・ハエの大量発生、アンモニア等有毒ガスの発生顕著。
 保冷庫内は30～32℃、死亡牛の腐敗、胃内容物・脂肪等の汚物が大量発生。
 施設内の洗浄回数増、貯留槽の水位上昇。
 有毒ガス発生、庫内作業時にはガスマスクの装着が必要。
 死亡牛の腐敗進行により、搬出時のクレーン作業で四肢の脱落等、危険増大。



図8 保冷庫の故障による作業への影響

10 今後の課題

ストックポイントの設置に際し、冷却機は専用のものでなく一般食品用のものを使用していた。そのため、死亡牛から発生する腐蝕性のガスなどにより、冷却ユニットの腐蝕が予想以上に進行していた。施設の建設後には紫外線光触媒脱硫装置を追加設置するなど改善を図ってきた。それに加え、定期的な点検と機器の交換を行って検査業務を継続している。

死亡届については、現在もLANを通じて家畜保健衛生所等とデータを共有しており、農家の疾病や暑熱被害発生状況等の把握に役立っている。今後は予防衛生への応用など、より積極的な利用を進めるべきであると考えられる。また、現状では死亡牛の到着後に死亡届が提出されることも多く、そのため、死亡牛の個体識別情報の確認および検査準備が遅れ、搬出入作業が不効率となり、時間外勤務や、死亡牛の滞留時間の延長により有毒ガスの発生を招き施設の腐蝕や作業の危険性が増大する要因となっている。死亡届の事前徴求を徹底することにより、計画的な作業と施設の効率的な運用が可能になるため、関係者への一層の協力を依頼していく必要がある。

平成25年5月に日本は「無視できるBSEリスクの国」に認定されることが決定し、7月1日より、と畜場におけるBSE検査の対象月齢は48か月齢以上に引き上げられたが、死亡牛については現行24か月齢以上のまま変更はなく、当分現在の体制が維持される見通しである。一方、死亡牛検査について将来はOIE基準に基づく一定の検査が今後実施されると考えられ、現在の死亡牛全頭検査体制はいずれ変更される可能性がある。そのため、

- (1) 国の方針を見据えた、施設・設備の抜本的な改修・整備の検討
- (2) 国の検査体制の変更に備えた農場採材の方法などの検討
- (3) 検査体制の変更に対応した採材方法に備えた関係者との定期的な協議の継続

これらのことを実施していく必要があると考えられる。

6 オーエスキー病清浄化への取組

中央家畜保健衛生所

○土門 尚貴・河合 正子

1. はじめに

現在、我が国においてオーエスキー病（以下 AD）の清浄化が図られていない県は当県も含め 11 県ある。国は、平成 27 年度までの国内清浄化を目指している。AD 対策要領では市町村単位で地域区分を設定し、地域を飼養衛生管理状況や抗体検査結果に基づき、清浄度が低いものから高い順にステータスⅠ、Ⅱ前期、Ⅱ後期、Ⅲ、Ⅳの 5 段階に分けている。管内の 9 地域では、8 地域がⅡ前期、1 地域がⅢである。また、平成 25 年 4 月時点では、管内の豚飼養農家 19 戸のうち 1 戸（以下 A 農場）で AD の浸潤が確認されている。

2. 管内の AD 浸潤状況等（表 1）

平成 18 年度時点で管内に AD 浸潤農場はなかったが、平成 19 年度、A 農場において陽性繁殖豚の導入により、AD が再浸潤した。平成 21 年度には B 農場で AD の浸潤が確認されたが、早期の発見で陽性豚も少なかったため、早期とう汰により同年度中に清浄化された。平成 23 年度には C 農場にも AD が浸潤し、A 農場でも新規陽性豚が確認された。なお、C 農場は豚舎火災により平成 24 年度に廃業した。A 農場における AD 対策の強化を図ることとした。

表 1: 管内の AD 浸潤状況等

年度	農家戸数	AD 浸潤農場戸数 (農場名)	農場別浸潤状況等	検査状況		
				繁殖延頭数	肥育延頭数	野外陽性延頭数 (繁殖豚)
H18	24	0	浸潤農場なし	128	241	0
H19	24	1 (A農場)	A農場再浸潤	182	422	9 (1)
H20	24	1 (A農場)		175	179	16 (16)
H21	24	2 (A・B農場)	B農場浸潤、 清浄化	162	364	109 (9)
H22	22	1 (A農場)		161	216	28 (28)
H23	20	2 (A・C農場)	C農場浸潤	131	175	12 (12)
H24	20	2 (A・C農場)	C農場廃業	166	169	19 (19)
H25	19	1 (A農場)		634	283	1 (0)

3. 農場の概要（図 1）

A 農場は一貫経営で種雄豚 6 頭、繁殖母豚 72 頭、肥育豚約 850 頭を飼養している。繁

殖豚は年に約20頭を導入により更新している。農場には、母屋に隣接して種雄豚舎1棟、繁殖母豚ストール舎1棟、分娩離乳舎2棟があり、母屋から約200m離れた場所に子豚育成舎1棟、肥育豚舎1棟がある。ADワクチンはポーシリスベゴニアDFを使用し、繁殖豚には導入時に2回、その後、年に2回接種している。また、肥育豚には約3カ月齢時に1回接種している。



図1:A農場

4. 問題点

A農場における問題点を以下のとおり抽出した。

(1) ワクチン接種の不徹底

AD浸潤農場では、繁殖豚の導入時にワクチンを1回、さらにその1カ月後に追加接種することで十分なワクチン抗体を獲得させる必要がある。しかし、A農場では、導入繁殖豚の追加接種が徹底されておらず、1回目の接種から追加接種まで最大6カ月空いている等、ワクチン抗体の獲得が不十分である可能性があった。

(2) 個体管理の不徹底

畜主が陽性豚と陰性豚を誤って把握し、陽性種雄豚を陰性母豚との交配に使用する等、個体管理が十分になされていなかった。

(3) 陰性豚導入の不徹底

平成22年度にAD浸潤農場から陰性証明のない繁殖母豚を導入しており、陰性豚の導入が徹底されていなかった。

5. 指導内容等

A農場において指導等を次のとおり実施した。

(1) 浸潤状況の把握

平成23年5月以降(A農場で新規陽性豚3頭を確認後)、繁殖豚延166頭、肥育豚延138頭の抗体検査を実施し、AD浸潤状況の把握に努めた。抗体検査にはアイデック

スラボラトリーズ社のADVg1エリーザキットを使用し、繁殖豚では平成24・25年度それぞれで全頭検査、肥育豚では、平成25年度に約2、3、4、6カ月齢の肥育ステージ毎に検査を実施した。

(2) ワクチン接種や個体管理等の徹底

導入繁殖豚のワクチン追加接種および陰性証明取得の徹底、ワクチン接種手技、陽性繁殖豚の確実な把握等について、頻回な衛生管理指導を実施した。

6. AD抗体検査結果(表2)

繁殖豚は、平成24年度に実施した全頭検査で陽性豚19頭が確認され、その内5頭は新規陽性豚であった。同検査で確認された疑陽性豚1頭は検査直後にとり汰したため、再検査は実施していない。

肥育豚は、平成25年度に実施した肥育ステージ毎の検査で陽性豚1頭、疑陽性豚3頭が確認されたが、陽性母豚の移行抗体が完全に消失する4カ月齢以降で再検査を実施し、陰性であることを確認した。

表2:AD抗体検査結果

繁殖豚 (H23年5月以降の検査結果延頭数)			
	陽性 (S/N比 \leq 0.6)	疑陽性 (0.6<S/N比 \leq 0.7)	陰性 (0.7<S/N比)
H23年度			6
H24年度	19	1	60
H25年度			80

肥育豚 (H23年5月以降の検査結果延頭数)			
	陽性 (S/N比 \leq 0.6)	疑陽性 (0.6<S/N比 \leq 0.7)	陰性 (0.7<S/N比)
H23年度			10
H25年度	1※	3※	124

※陽性・疑陽性は、陽性母豚の移行抗体

7. 改善内容

A農場で3項目について改善を確認した。

(1) ワクチン接種

導入繁殖豚のワクチン追加接種が徹底され、ワクチン抗体の獲得がより確実なものとなった。

(2) 個体管理

豚舎内にホワイトボードを設置し、陽性繁殖豚の個体番号を記入することにより、畜主が陽性繁殖豚を適確に把握することができるようになった。これにより、陽性種雄豚を陰性母豚との交配に誤って使用することがなくなった。さらに、陽性繁殖豚を把握することにより計画的な陽性繁殖豚のとり汰も可能となり、毎月約1頭ペースの

とう汰を実施し、平成 25 年 3 月までにとう汰が終了するように計画した。また、当所でも衛生管理指導時に繁殖豚の更新の有無、とう汰・導入日、導入先等を確認し、これらの情報を記入した個体管理台帳を作成した。

(3) 陰性豚の導入

平成 23 年度以降、陰性証明の添付された繁殖豚の導入、または陰性農場からの導入が徹底された。当所も衛生管理指導時に導入繁殖豚の陰性証明書を確認している。

このように、A 農場は飼養衛生管理が向上し、畜主の協力により年間とう汰頭数を約 30 頭に増やしたため、予定より早い平成 25 年 11 月に陽性繁殖豚 19 頭のとう汰が完了した。とう汰終了後の平成 25 年 11～12 月に繁殖豚全 78 頭および肥育豚 14 頭の抗体検査を実施したところ、全頭陰性であった。その結果、A 農場は清浄性確認農場となり、管内に AD 浸潤農場はなくなった。

9. 管内全域での対策 (表 3)

今年度(平成 25 年 12 月末現在)、A 農場を含む管内の豚飼養農家 16 戸に対し衛生管理指導および延 917 頭の抗体検査を実施した。管内で新たな陽性豚は確認されていない。

表3:H25年度管内のAD抗体検査結果等

H25年度12月末現在

地域	ステータス	農家戸数	検査等実施戸数	検査延頭数	検査結果(野外抗体陽性)
A	Ⅱ前期	2	2	37	0
B	Ⅱ前期	5	5	748	1※
C	Ⅱ前期	1	0	0	0
D	Ⅱ前期	1	1	20	0
E	Ⅱ前期	1	1	14	0
F	Ⅱ前期	4	2	33	0
G	Ⅱ前期	1	1	14	0
H	Ⅱ前期	3	3	37	0
I	Ⅲ	1	1	14	0
計		19	16	917	1※

※陽性母豚の移行抗体

10. 今後の対策

農場へ AD が浸潤し、その発見が遅れると清浄化に多大な労力を要する。管内養豚農場への新たな AD 浸潤を防止するため、定期的な抗体検査および衛生管理指導を実施していきたい。また、清浄県を目指すには、地域ステータスの向上が必要となる。ステータス向上のための抗体検査やワクチン接種中止に抵抗のある管内豚飼養農家に対しては、今後も継続して協力を要請していきたい。

7 高病原性鳥インフルエンザ発生を想定した

埼玉県防疫演習

川越家畜保健衛生所

○森田 梢・加島 恭美・山井 英喜

I はじめに

高病原性鳥インフルエンザ(以下、本病)は伝染力が強く、死亡率の高い伝染病であり、ひとたび発生すれば養鶏産業に多大な影響を及ぼす。

現在でもアジアを中心に世界中で発生しているなか、物流のグローバル化や渡り鳥の飛来等により、国内への侵入・発生の危険は常に高い状態にある。

埼玉県では、本病発生時の初動防疫を迅速かつ適切に進めるための体制を強化する目的で、防疫演習を実施した。また、演習終了後にはアンケート調査を行い、今回の成果と今後の課題を検討したのでその概要を報告する。

II 防疫演習の概要

1 日時

平成25年11月13日(水) 10時から16時

2 場所

深谷市花園文化会館『アドニス』、JA全農さいたま北部総合センター内駐車場

3 参加者

142人

(生産者25人、市町村24人、関係団体・民間11人、獣医師4人、
関東農政局4人、他県14人、本県60人)

4 内容

机上演習、実地演習

III 机上演習の内容

鳥インフルエンザの症状や発生状況等の概要、異常鶏の発生通報から一連の防疫作業の流れをスライドにより説明した。また、生産者に対しては特に飼養衛生管理基準の遵守、早期通報の重要性や発生農場等への支援策を強調した。

IV 実地演習の内容

1 健康診断

保健所の協力を得て、参加者を代表した数名が医師、保健師による診察、血圧測定を受けた。(図1)



図1 健康診断

2 防疫服の着用

家畜保健衛生所職員による防疫服着脱の実演を行い、注意点を伝えた後、参加者も実際に防疫服を着用した。防疫服は二枚重ねて着用、袖口、ファスナーの合わせをガムテープで目張りし、ゴーグルやマスクも着用するなど実践的な方法で行った。

(図2)



図2 防疫服の着用

3 移動

防疫服を着用したまま、借り上げバスで3キロ離れた仮設農場に移動した。(図3)



図3 バスでの移動

4 仮設農場での作業

仮設農場ではコーンとコーンバーを使い汚染区域と清浄区域を分け、テント、折りたたみ机等で仮設鶏舎、靴置き場、救護所等を設置した。また、除染テントとして、農林水産省備蓄の一度に4人が利用できる大型テントを使用した。(図4)

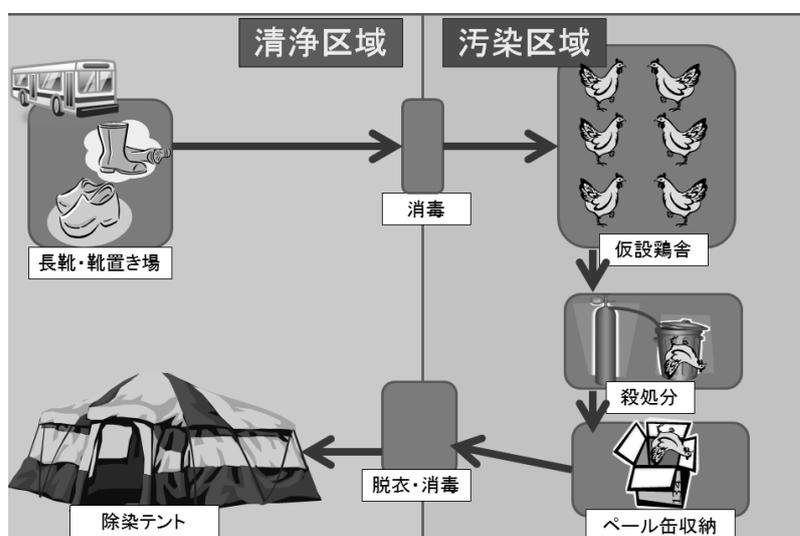


図4 仮設農場の見取り図

まず、参加者は靴置き場で長靴に履きかえた後、踏み込み消毒槽等で消毒してから汚染区域に入った。

次に仮設鶏舎に入り、実際に生きた鶏をケージから取り出し、殺処分用のペール缶に移した。

殺処分作業は、鶏に似せて1つ1.5kgの重さで作った模擬鶏を用い、炭酸ガスの注入により行った。注入後、焼却処分用のペール缶に入れ替えた。

有事の際には、殺処分後の鶏を、羽数確認の為に 10 羽ずつ一梱包にすることから、模擬鶏も焼却処分用のペール缶に 10 個ずつ入れ、その重さも確認した。(図 4、5)



図 4 生きた鶏をケージから取り出す作業



図 5 模擬鶏を用いた殺処分作業

仮設鶏舎での作業が終了した後、再び消毒、防疫服の脱衣を行い清浄区域に戻った。その際、ゴーグルを外した後、介助者が一枚目の防疫服の背中をフードまで切り開き、汚染された外側に触れないように袖を引っ張り脱衣させた。(図 6)



図6 防疫服の脱衣

その後、参加者は除染テントに移動し、テント内で内側の防疫服を脱いだ後、シャワーを浴び、新しい服に着替えてテントから退出した。(図7)

最後にバスで集合場所に移動し、演習は終了した。

実地演習は2グループに分けて行い、それぞれの待ち時間に、平成17年度に県内で本病が発生した時の記録映像を上映した。



図7 除染テントでの着替え

V 演習終了後のアンケート

1 参加者へのアンケート結果

机上・実地演習共に、内容を『十分』または『どちらかといえば理解出来た』が合わせて95%であった。

自分の役割についても『十分』または『どちらかといえば理解できた』が98%と高い割合であった。また、演習の必要性についても『必要だと思う』が93%と高い割合であった。

自由記述の部分で、今回の演習の良かった点は『防疫作業の一連の流れが理解出来た』、『養鶏農家を含めて関係者が一体的に取り組むことができた』、『防疫服の着脱の手順を理解出来た』、『実際に生きた鶏を扱えた』という意見があがった。

改善した方が良い点は『資材が不足し、仮設農場で汚染区域と清浄区域の区切りが分かりにくかった』、『防疫服着脱の実演は壇上で足元まで見えるようにしてほしい』、『会場の室温管理や設備等が不十分だった』等の意見があった。

防疫作業の不安な点は『夏の暑さ、体力』、『従事者のストレス、ホコリ、臭い対策』、『従事者による外部へのウイルス伝搬』等の意見があった。

2 主催者の意見

健康診断については『健康診断を受ける代表者以外の参加者は、何が行われているか良くわからないので、マイクを使うなど工夫した方が良かった』、防疫服着脱実演については『実演者の足元や細かい部分が見えづらかったので、壇上で行うなど工夫が必要であった』、殺処分作業については『より現実的な作業にするために、1ケージに複数の鶏を入れた方が良かった』、防疫服の脱衣については『介助者が少なく、混み合ってしまった』、『作業従事者の流れが1列になるような設営が必要であった』、その他として『机上演習と実地演習会場間の連絡系統が明確でなかった』という意見があった。

VI 今回の成果と今後の課題

今回の演習は、防疫服の完全装備、生きた鶏を用いた作業、除染テントの使用により作業のイメージが明確化し、臨場感の溢れるものになった。

参加者へのアンケートでは、『作業内容や自分の役割が理解出来た』という回答が9割以上を占め、当初の目的は達成できたと思われる。

一方、室温管理や設備等、会場の環境整備に対する意見があり、実際の有事の際にも考慮すべき点として明確になった。

生産者も参集し、飼養衛生管理基準の遵守や早期通報の重要性、発生農場等への支援策を説明したが、初めて参加した生産者が多く、防疫意識の強化につながった。今後はさらに多くの生産者が参加する演習としたい。

8 アンケート調査にみる管内みつばち事情

熊谷家畜保健衛生所

○田代 卓也・黒沢 和久・梅野 杏奴

田中 美貴・山品 恒郎

I はじめに

近年、宅地化に伴う蜜源植物の減少や趣味養蜂家の増加など、養蜂を取り巻く環境は大きく変化している。また、農作物等の花粉交配において養蜂が果たす役割は重要性を増している。こうした状況を受けて養蜂振興法が改正され、平成25年1月1日に施行された。主な改正点は以下の4点である。

1 養蜂の届出義務の見直し

改正前は養蜂業者のみに課されていた届出義務を、趣味養蜂家にも拡大した。

2 蜜蜂の適正な管理

蜜蜂の飼育を行うものは衛生的な飼養管理を行う等、蜜蜂の適切な管理に努める。また都道府県は蜜蜂が適正に管理されるよう蜜蜂の管理に関する指針の策定及び周知その他の必要な措置を講ずる。

3 蜜源植物の保護及び増殖

国及び地方公共団体は蜜源植物の保護及び増殖に関し必要な施策を講ずる。

4 蜂群の適正配置

都道府県は蜜蜂の飼育の状況及び蜜源の状態の把握、蜂群配置に係る調整、転飼の管理その他の必要な措置を講ずる。

この改正を受けて埼玉県では家畜保健衛生所の役割が拡大したが、これまで蜜蜂飼育に関する情報は不足しており、養蜂の現状を把握しきれていなかった。そこで今回、養蜂の実態及び課題を把握し、養蜂家指導の参考とするため、管内養蜂家に対してアンケート調査を実施したので報告する。

II 調査

1 方法

平成25年10月、管内蜜蜂飼育届出者127名に対してアンケート用紙を送付した。

2 結果

(1) 回答数

87名(68.5%)

(2) 業態(回答者86名)

本業:8名(9%)、副業:42名(48%)、趣味:36名(42%)

※本業、副業、趣味は各養蜂家の申告に基づいている。

(3) 飼育群数

アンケート回答者の平成25年1月1日現在における飼育蜂群数は次のとおりであった。

【全体】

3群以下：33名(38%)、4～9群：18名(21%)、10～49群：25名(29%)
50～99群：8名(9%)、100～199群：1名(1%)、200群以上：1名(1%)

【本業】

3群以下：0%、4～9群：0%、10～49群：37.5%
50～99群：50%、100～199群：12.5%、200群以上：0%

【副業】

3群以下：17%、4～9群：24%、10～49群：48%
50～99群：9%、100～199群：0%、200群以上：2%

【趣味】

3群以下：74%、4～9群：23%、10～49群：3%
50～99群：0%、100～199群：0%、200群以上：2%

(4) 飼育経験

【全体】(回答者86名)

3年以下：25名(29%)、4～10年：27名(32%)
11～30年：14名(16%)、31年以上：20名(23%)

【本業】(回答者8名)

3年以下：0%、4～10年：0%、11～30年：50%、31年以上：50%

【副業】(回答者42名)

3年以下：10%、4～10年：36%、11～30年：21%、31年以上：33%

【趣味】(回答者36名)

3年以下：56%、4～10年：34%、11～30年：4%、31年以上：6%

(5) 年代(回答者86名)

30代：2名(2%)、40代：2名(2%)、50代：11名(13%)
60代：39名(45%)、70代：24名(27%)、80代：9名(11%)

(6) 情報源(回答者87名)

蜜蜂飼育に関する情報の入手方法を複数回答で聞いたところ、知り合いの養蜂家68名(78%)、書籍42名(48%)、インターネット22名(25%)との結果となった。

(7) 蜂蜜販売(回答者86名)

蜂蜜販売の有無を質問したところ、48名(56%)が販売していると回答した。販売場所を複数回答で聞いたところ、最も多かったのは庭先販売(21名)で、続いてJA直売所(12名)、自社直営販売所(8名)、道の駅(6名)、小売店(4名)、インターネット(3名)であった。

(8) 貸し蜂(回答者81名)

農作物の花粉受精のために貸し蜂を行っているか質問したところ、12名(15%)が行っている

と回答した。ありと回答したのは本業1名、副業11名であった。

貸出し先の作目はイチゴが最も多く10名が回答した。その他にはウメとナシが2名、メロン、キュウリ及びブルーベリーは1名が回答した。

(9) 経費 (回答者 63名)

蜜蜂1群の飼育にかかる年間経費(総経費、薬品費、飼料費、その他)を質問したところ、回答の平均額は表1のとおりであった。

表中の「その他」の内訳として多かったのは巣箱、巣枠、巣脾、防寒資材、スズメバチ対策資材であった。また少数ではあったが、蜜蜂の転飼に掛かる移動経費、巣箱設置場所の借地料といった回答もあった。

	1群当たり平均額 [円/年]			
	全体 (n=63)	本業 (n=6)	副業 (n=31)	趣味 (n=26)
飼料	2,882	3,083	3,330	2,162
薬品	1,846	1,592	1,845	1,299
その他	1,390	3,620	1,168	1,869
合計	6,118	8,295	6,343	5,330

表1 蜜蜂1群にかかる年間経費

(10) 蜜源植物 (回答者 76名)

蜜源植物について自由記述で回答を求めたところ、2名以上から挙げた植物は次のとおりであった。

ニセアカシア：56名、サクラ：24名、クリ：19名、ナタネ：17名、
フジ：9名、ウメ：7名、エゴ・ヘアリーベッチ：6名、カキ・柑橘類：5名
レンゲ・セイタカアワダチソウ：4名、ヤブガラシ・クローバー：3名
アレチウリ：2名

また地域別にみると、サクラやクリといった樹木の回答は秩父郡市や児玉郡市で多く、ナタネやヘアリーベッチといった草花は大里郡市や北埼玉郡市で回答が多かった。

(11) 蜜源植栽 (回答者 79名)

蜜源の植栽を実施しているかの質問では37名(47%)が実施していると回答した。また植栽植物について自由記述で回答を求めたところ、2名以上から回答があった植物は以下のとおりであった。

ナタネ：14名、ヘアリーベッチ：11名、レンゲ：6名、ニセアカシア：4名
クローバー：3名、ヒメイワダレソウ、トチ、ヒマワリ、エンジュ：2名

(12) 苦情 (回答者 80名)

これまでに蜜蜂飼育に関する苦情を受けた経験があるか質問したところ、16名(20%)が経

験ありと回答した。苦情内容としては刺傷9名、糞害6名、蜜蜂への恐怖3名との結果となった。これらの苦情は地域に関わらず発生していた。また飼育群数が3群以下の小規模養蜂家も苦情を受けるケースが存在した。

(13) 伝染病(回答者:本業8名、副業42名、趣味35名)

家畜伝染病予防法で家畜伝染病又は届出伝染病に定められている疾病について知っているか質問したところ、知っていると回答した人数は以下のような結果となった。

【腐蛆病】本業:8名(100%)、副業:39名(93%)、趣味:27名(77%)

【チョーク病】本業:8名(100%)、副業:39名(93%)、趣味:24名(69%)

【ノゼマ病】本業:3名(38%)、副業:13名(31%)、趣味:5名(14%)

【バロア病】本業:4名(50%)、副業:11名(26%)、趣味:23名(14%)

【アカリндаニ症】本業:4名(50%)、副業:19名(45%)、趣味:23名(66%)

腐蛆病やチョーク病については認知している養蜂家の割合が高く、ノゼマ病では低かった。また、業態別にみると本業で高く、趣味で低い傾向が認められた。

(14) 薬品(回答者:本業8名、副業41名、趣味35名)

蜜蜂への使用が認可されている3種の薬品について使用の有無を質問した。使用していると回答した人数は以下のとおりとなった。

【アピテン】本業:6名(75%)、副業:22名(54%)、趣味:5名(14%)

【アピスタン】本業:8名(100%)、副業:36名(88%)、趣味:21名(60%)

【アピパール】本業:8名(100%)、副業:17名(41%)、趣味:13名(37%)

使用率はアメリカ腐蛆病予防薬であるアピテンで低く、ミツバチヘギイタダニ駆除薬であるアピスタン及びアピパールで高い傾向となった。業態別にみると各薬品ともに本業が最も高く、趣味が最も低い結果となった。

(15) 衛生管理(回答者:本業8名、副業41名、趣味38名)

蜂場、蜂具及び巣箱の衛生管理を実施していると回答した人数は以下のとおりであった。

【蜂場(消石灰による土壌消毒)】

本業:3名(38%)、副業:5名(12%)、趣味:1名(3%)

【蜂具(薬剤による消毒)】

本業:4名(50%)、副業:17名(41%)、趣味:4名(11%)

【巣箱(水洗や火炎消毒)】

本業:7名(88%)、副業:36名(88%)、趣味:26名(81%)

巣箱については業態を問わず実施率が高かったが、蜂場は実施率が低かった。また、蜂場及び蜂具の実施率は本業が最も高く、趣味が最も低かった。

(16) 蜜蜂の被害

スズメバチ、スミスシ及び熊による蜜蜂の被害をこれまでに経験したことがあるか質問した。また、経験がありと回答した場合、被害群数を質問した。さらに、被害ありと回答した戸数の割合を地域ごとに比較した。(回答者:83名)

【スズメバチ】経験あり：61名(73%)

秩父郡：80%、児玉郡：69%、大里郡：73%、北埼玉郡：50%

【ススムシ】経験あり：35名(42%)

秩父郡：34%、児玉郡：46%、大里郡38%、北埼玉郡：88%

【熊】経験あり：4名(5%)

秩父郡：11%、児玉郡：0%、大里郡：0%、北埼玉郡：0%

(17) 失踪

蜜蜂の原因不明の失踪又は大量死を経験したことがあるか質問したところ、経験ありと回答したのは31名(39%)であった。総被害群数は233群であり、被害時期は8月から9月にかけて集中していた(図1)。

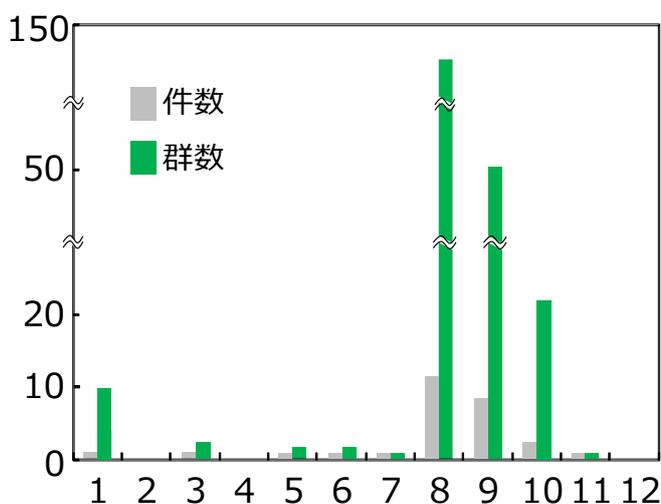


図1 蜜蜂の失踪又は大量死の月別被害件数・群数

III 養蜂家に対する周知

アンケートから、趣味養蜂家が全体の4割強を占めた。また、伝染病認知度、薬品使用率及び衛生管理実施率を業態別に比較したところ趣味養蜂家で低い傾向となった。以上のことから養蜂家、特に趣味で蜜蜂を飼育する者に対して伝染病、薬品の適正使用、衛生管理といった情報¹⁾を周知していく必要がある。そこで今回、一般的衛生管理の方法を掲載したリーフレットを作成し、管内養蜂家に配布した(図2)。リーフレットに掲載した内容は以下のとおりである。

- 1 蜂場の消毒：巣箱設置前に消石灰によって土壌消毒を行う。
- 2 靴底消毒：蜂場に入る前に次亜塩素酸や逆性石けん製剤を用いて靴底消毒を行う。
- 3 蜂具の消毒：ハイブツール等の蜂具を使用した後はグルタルアルデヒド製剤やヨウ素系製剤を用いて消毒を行う。また蜂蜜への消毒剤混入を防ぐため、消毒後には十分に水洗する。
- 4 巣箱の洗浄：巣箱は蜜蜂への影響や、蜂蜜への移行を防ぐため、消毒剤を使用せずに水洗する。水洗は巣箱に付着したプロポリスやロウを取り除いた後に行う。また、水洗後にバーナー等により火炎消毒を行うとより効果的である。
- 5 巣脾の定期交換：巣脾を安全かつ効果的に消毒する方法はないため、3年を目安に交換する。

蜜蜂の一般的な衛生管理

埼玉県熊谷家畜保健衛生所
TEL: 048-521-1274
FAX: 048-526-1063

蜜蜂の病気を防ぐために重要な衛生管理を御紹介しますので、日常の飼育管理の参考にしてください。

蜂場

消石灰による土壌消毒

巣箱を設置する前に消石灰を散布して、土壌消毒を行いましょ。

靴底消毒

次亜塩素酸系消毒剤や逆性石けん製剤が一般的に使用されます。



靴底消毒は蜂場へ入る前に巣箱から離れた場所で行いましょう。

蜂具

ハイブツール等の蜂具の消毒では

グルタルアルデヒド製剤やヨウ素系製剤などを使用します。消毒剤は蜜蜂に害があるので、消毒後は水洗を十分にいましょう。



希釈した消毒液に浸す方法が一般的です。

巣脾

巣脾を安全かつ効果的に消毒する方法はありません。巣脾は定期的に新しい物に交換しましょう。交換の目安は3年です。

巣箱

巣箱はプロポリスやロウを取り除いた後に水洗します。巣箱は蜜蜂が直接接触し、蜂害に移行する可能性があるため、消毒剤の使用は控えましょう。水洗後にバーナーなどにより火炎消毒をするとより効果的です。(火の取扱いには十分注意してください)

不明な点などがある方はお気軽に御相談ください。 図2 衛生管理周知のためのリーフレット

IV 今後の課題と対応

アンケートの結果から過去3年以内に蜜蜂飼育を始めた養蜂家が約3割に上ることが明らかとなった。このことから今後も養蜂家の増加が予想されるため、定期的に新規養蜂家に対して伝染病や薬品の適正使用、衛生管理といった情報の周知、指導を行っていく必要がある。

また養蜂家の増加に伴い苦情件数の増加も予想される。当所が受ける養蜂関係苦情の多くは糞害であり、市町村と連携して対応することもある。糞害苦情の発生傾向としては、3月から6月にかけて、巣箱の東から南方向100m以内で多発するとの報告がある²⁾³⁾。こうした傾向を踏まえて、一時的な蜂場の移転を養蜂家に提案するなど、今後は苦情への対応方法を検討していきたい。

蜜蜂の原因不明の失踪及び大量死に関しては回答者の約4割が経験ありと回答し、養蜂家からは原因究明を望む意見も見受けられた。この問題は蜂群崩壊症候群として2006年頃に米国で多く発生し、その後欧州でも確認されている。原因としては感染症、気候変動、蜜源植物減少、農薬などが考えられている⁴⁾が特定はされていない。今後、家畜保健衛生所としては養蜂家に対して適切な情報を提供し、相互の連絡体制を構築していく。

V 参考文献

- 1) みつばち協議会(2011), 養蜂マニュアル1:30-31
- 2) 武末寛子ら(2006), 管内養蜂の飼養実態調査～残留規制から糞害まで～, 埼玉県家畜保健衛生業績発表収録, 18-22
- 3) 赤松えり子ら(2002), ミツバチの糞について～アンケート調査の結果から, ミツバチ科学 23(1):5-11
- 4) 門脇辰彦(2010), 世界におけるミツバチの現状と減少要因, 科学と生物 48:577-582

9 畜産への理解醸成のための食育活動

川越家畜保健衛生所

○塩入 陽介・平田 圭子

I 目的とねらい

埼玉県では都市化の進展とともに、畜産農家が減少し、家畜を間近で見たことのない子供が増えている。

こうしたなか、家畜保健衛生所（以下「家保」）では、県民が畜産に慣れ親しみ、安全・安心な畜産物を作るための農家の努力や畜産の現状を知ること、畜産業への理解を深めてもらうとともに、併せて畜産物の消費拡大や、命をいただく事の大切さを啓蒙することを目的として、様々な食育活動に取り組んでいる。

II 具体的な取組み

家保が直接実施、又は協力している食育活動を図1に示した。

項目	事業主体	対象者	目的
わくわくモーモースクール	埼玉県酪農教育ファーム推進委員会	県内小学生	食と命の学びへの支援 酪農業への理解
県政出前講座 「のぞいてみよう家畜の暮らし」	川越家保	管内高校生	畜産業への理解
わくわくアグリスクール	管内JA	JAいるま野 管内小学生	地域農業への理解
S食育ネット ジョイント事業	S食育ネットワーク	大学生 (D大学)	食の安全・安心

図1 家保の取組み

1 「わくわくモーモースクール」(以下「スクール」)

スクールは県内の酪農・教育・行政関係者、乳業者、給食供給者、学識経験者からなる「埼玉県酪農教育ファーム推進委員会」が主催し、県内小学校を対象に、児童が搾乳体験

や子牛とのふれあいを通じ、牛乳や酪農に対する理解を深め、命の尊さと食を支えてくれている人々の心を学ぶことを目的としている。

平成18年3月から平成25年11月まで、県内21校、10,847人の児童を対象に実施している。

主な内容は、校庭へ連れてきた乳牛に直接触れ、搾乳や子牛への哺乳などを体験したり、酪農家の1日の作業などの話を聞く「酪農体験コーナー」(図2)、牛乳が製品になるまでをVTRで説明を受けたり、生クリームを攪拌・分離してバターづくりを体験をする「牛乳・乳製品コーナー」(図3)がある。家保は例年、バターづくり体験を担当している。



図2 酪農体験コーナー



図3 牛乳・乳製品コーナー

今年度、スクールを実施したA小学校で、実施前後でアンケート調査を実施した。

アンケートの結果から(図4、5)児童の半数以上が牛を近くで見たことが無かった。牛を「好き」か「嫌い」かの質問に対し、「好き」という回答は、実施前は38%だったが、実施後には57%と増加した。「嫌い」という回答は、実施前14%だったが、実施後には5%と減少した。牛に対する印象は、実施後には、「かわいい」「きれい」といった好印象が増加し、「怖い」「きたない」といった悪い印象が減少した。牛を飼うことについては、実施後に、「楽しそう」という回答が若干増加した。

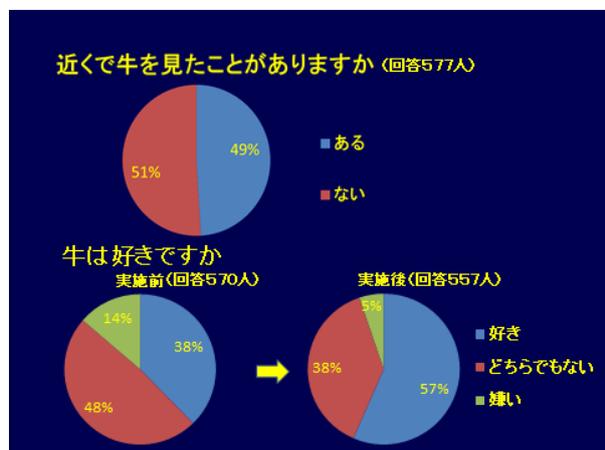


図4 アンケート結果

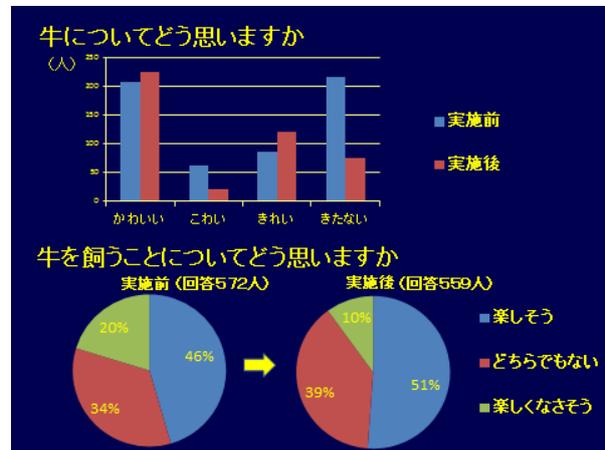


図5 アンケート結果

また、昨年度には、県内ろう学校にてスクールを実施した。特別支援学校でのスクールは全国でも初めてだったが、説明資料や模型(図6)などの視覚による説明を多用することにより、通常のスクールと何ら変わりなく実施できた。説明資料では、通常口頭にて説明しているバターづくりの方法を文書にして配布した。模型では、生乳中で脂肪球がタンパク質の被膜に包まれているものを、激しく振ることにより、脂肪がくっついてバターになるという原理を、脂肪球を工作用スポンジ、タンパク質の被膜をティッシュペーパーを使用して作成し、視覚化した。



図6 説明資料と模型

2 県政出前講座「のぞいてみよう家畜の暮らし」

管内B高校において、現代社会の授業の一環として、平成21年度から現在までに5回、毎年2クラス・394人の生徒を対象に実施している。スライド等を利用し、酪農を例にとって、家畜の一生や畜産業を取り巻く情勢を説明し(図7)、講座後にはアンケート調査を実施している。今年度のアンケートでは、94%の生徒から「講座は参考になった」との回答があった。また、家保の仕事内容や、経済動物としての家畜に対する理解、牛乳・乳製品を摂取することの大切さ、畜産農家の努力への敬意等の感想・意見が聞かれた。



図7 県政出前講座「のぞいてみよう家畜の暮らし」

3 わくわくアグリスクール

管内JAが主催し、農作業体験や家畜とのふれあいを通じた、地域農業への理解促進等を目的に、小学生を対象に実施している。搾乳体験や哺乳体験といった、スクールと同様の体験コーナーがある。(図8) 家保では子牛の世話等の手伝いを担当している。



図8 わくわくアグリスクール

4 S食育ネットジョイント事業

管内C保健所及び関係機関、D大学を中心とした食育について考えるネットワークの一員として、D大学の3年生を対象とした授業に参加している。

家保はブースを出展し、家保の業務内容、飼養衛生管理基準、乳質改善対策等を説明している。(図9)



図9 S食育ネットジョイント事業

III まとめ

家保では、スクールや県政出前講座などの活動を通じて、若い世代を中心に食育活動を実施している。アンケート調査では、児童からは「牛に対する親しみ」が増え、生徒からは「畜産業に理解」を示す回答があった。今後も、様々な機会を利用した食育活動を通じて、県民の畜産への理解促進に取り組んでいく。

10 牛B群ロタウイルスに関する成牛下痢症マルチプレックス

RT-PCR法の再検討

中央家畜保健衛生所

○曾田 泰史、 多勢 景人

熊谷家畜保健衛生所

福田 昌治

I はじめに

ロタウイルスはレオウイルス科ロタウイルス属に分類され、ヒトや動物の下痢症の一要因として知られている。本ウイルスは、内殻蛋白質 VP6 の抗原性及び遺伝学的差異により A~G の 7 群に分類され、牛では A~C 群の 3 群が検出されている¹⁾。このうち、牛 B 群ロタウイルス (RVB) は、日本国内では、血便を伴わない一過性の下痢及び乳量減少を主徴とする搾乳牛の下痢症 (牛 RVB 病) の報告が散見される²⁻⁷⁾。RVB については培養細胞を用いた分離例の報告はなく、検出法として RT-PCR 法が報告されている^{3, 8, 9)}。上述の牛 RVB 病国内発生事例では、Chinsangaram らによって報告された RT-PCR 法⁸⁾、または福田らによって報告された成牛下痢症関連 5 種ウイルス遺伝子マルチプレックス RT-PCR 法 (マルチ PCR)⁹⁾ によって RVB が検出されている。本県においても、牛 RVB の検出に際してはマルチ PCR を実施している。

平成 24 年 10 月から平成 25 年 5 月にかけて、県内で 4 件 (事例 1~4) の牛 RVB 病が発生した。そのうち、3 件 (事例 1~3) はマルチ PCR で検出することができず、主にシーケンス解析に用いられる RVB-VP7 遺伝子全長プライマーを使用したシングル PCR³⁾ により検出された。このシングル PCR は、通常の病性鑑定では実施していないため、事例 1~3 の牛 RVB 病は検出されなかった可能性がある。今回、事例 1~3 から検出された RVB 株がマルチ PCR で検出できなかった原因の究明及びマルチ PCR の改良を試みたので、その概要を報告する。

II 材料と方法

1 材料

事例 1~3 に加え、マルチ PCR で検出することができた事例 4 を比較のために検査に供した。事例 1~4 の発症牛糞便 23 検体 (事例 1 : 5 検体、事例 2 : 7 検体、事例 3 : 6 検体、事例 4 : 5 検体) を抗生物質添加 Eagle's MEM (日水製薬 (株)) を用いて 10% 糞便乳剤とした。続いて 3500rpm で 5 分間遠心し、上清から High Pure Viral RNA Kit (Roche) を用いて RNA を抽出して検体とした。

2 方法

(1) 遺伝子解析

マルチPCRとシングルPCRは、共にVP7遺伝子を標的遺伝子としているが、プライマー領域が異なる(表1)。マルチPCRは牛RVBの検出においては、Chinsangaramらによって報告されたプライマー⁸⁾を採用している。外殻蛋白遺伝子であるVP7遺伝子は変異が多いと考えられ、マルチPCRのプライマー(9B3/9B4)領域に変異が起り検出できなかったことが疑われた。このことを確認するため、VP7遺伝子の遺伝子解析を実施した。遺伝子解析は事例1~4から検出されたRVB株のVP7遺伝子について、既報の牛RVB国内検出株との比較を行い、相同性解析と分子系統樹解析を実施した。特に、プライマー領域の変異に注目して塩基配列を確認した。なお、検査は(独)動物衛生研究所に依頼して行った。

表1: RVB RT-PCRのプライマー詳細

	プライマー	標的遺伝子	位置※	配列(5'-3')	増幅サイズ (bp)	出典
マルチPCR	9B3	VP7	171-191	CAGTAACTCTATCCTTTTACC	281	Chinsangaramら (1994)
	9B4		433-451	CGTATCGCAATACAATCCG		
シングルPCR	U21	VP7	1-21	GGAATAATCAGAGATGGCGTT	794	Tsunemitsuら (1999)
	L19		797-815	GGGTTTTTTTATTGGCTTC		

※ Nemuro株 VP7遺伝子(Accession No.AB016818)の塩基番号に基づく

(2) RT-PCRキットの変更

当初の検査ではマルチPCRの実施にあたりA社キットを使用した。今回、検出感度が異なると思われるB社キットを使用してマルチPCRを実施、RVB検出感度を比較した。ならびに、B社キットを使用したマルチPCRによる事例1~4の再検査を実施した。

検出感度の比較は、福田らの報告³⁾と同様に、1mlあたりのRNAコピー数を調整したRNA溶液を10倍階段希釈して行った。今回は、 10^8 copies/mlのRVB RNA溶液をRNA Free Waterで10倍階段希釈し、 10^2 copies/mlまでのRVB RNA溶液を調整、A社及びB社のRT-PCRキットを用いてマルチPCRを実施した。

また、B社キットを使用するにあたり、B社キットの至適条件を考慮し、マルチPCRのPCR条件を変更した。まず、50°C30分の逆転写反応後、95°Cで15分加熱した。その後、94°C45秒、55°C45秒、72°C60秒のサイクルを35回繰り返し、さらに72°Cで10分反応させた後、4°Cで維持した。その他の条件は福田らの報告³⁾に従った。

(3) 牛RVB試作プライマーの新規設計

牛RVBを検出するための試作プライマーを新規設計し、マルチPCRで事例1~4の再検査を実施した。試作プライマーはVP7遺伝子を標的とし、国内外の既報牛RVB株VP7遺伝子内において塩基置換が0~1塩基であり、保存性の高い領域の配列を基に設計した。試作プライマー(461F/757R)の詳細は表2に示す。なお、RT-PCRキットはB社キットを使用した。

表2: RVB 試作プライマーの詳細

プライマー	標的遺伝子	位置 ※	配列 (5'-3')	増幅サイズ (bp)
フォワードプライマー	461F	VP7	GGTACATATTTTCCATTGTC	297
リバースプライマー	757R		TTATGCTCGTGGCTCAAAG	

※ Nemuro株 VP7遺伝子(Accession No.AB016818)に基づく

III 成績

1 遺伝子解析

同一事例から検出されたRVBの塩基配列は全て一致した。事例1~4から検出されたRVB株をそれぞれSAI-1~4とした。

(1) 相同性解析・分子系統樹解析(表3・図1)

SAI-1~4は過去の牛RVB国内検出株と同様に、クラスターはG3に分類された。SAI-1~4間の相同性は完全には一致せず、93.4~99.7%であった。SAI-1~3間の相同性が96.9~99.7%と高く、SAI-4とSAI-1~3との相同性は93.4~93.8%であった。過去のRVB国内検出株と比較すると、SAI-1~3はN-2 2012株との相同性が高く、96.8~100.0%を示した。特にSAI-2とN-2 2012株は完全に一致した。逆に、SAI-1~3とN-2 2012以外の国内検出株との相同性は93.1~94.6%に留まった。SAI-4はN-2 2012以外の国内分離株との相同性が高く、95.7~99.6%を示し、N-2 2012との相同性は93.4%であった。

表3: VP7 遺伝子の相同性解析(ヌクレオチド)

	SAI-2	SAI-3	SAI-4	Nemuro	F 2013	I 2012	K 2013	N-1 2012	N-2 2012
SAI-1	96.9	97.2	93.4	93.9	93.1	93.6	93.3	93.5	96.8
SAI-2	-	99.7	93.5	94.3	93.2	93.8	93.4	93.6	100.0
SAI-3	-	-	93.8	94.6	93.5	94.0	93.7	94.0	99.7
SAI-4	-	-	-	95.7	98.2	98.5	98.0	99.6	93.4

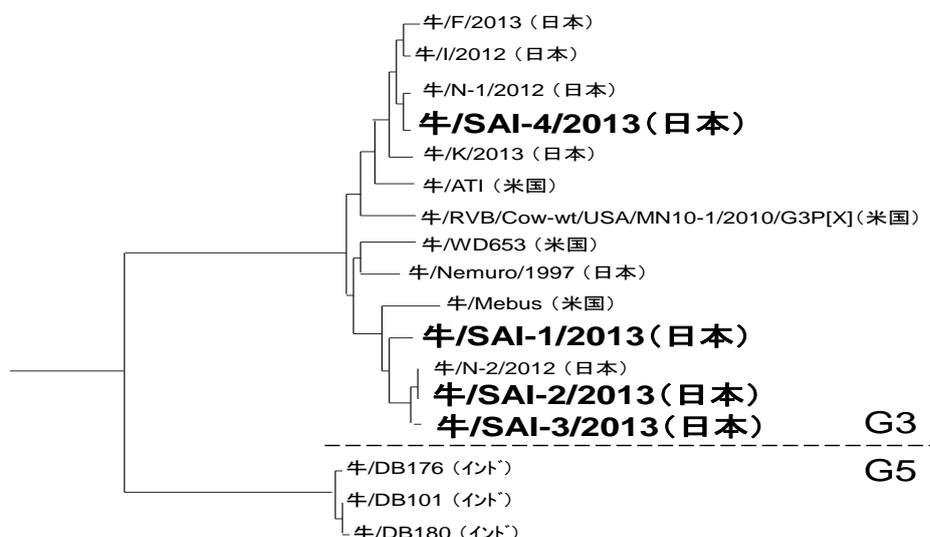


図1: RVB-VP7 遺伝子塩基配列に基づく分子系統樹

(2) マルチPCRプライマー領域の塩基置換(表4)

フォワードプライマー(9B3)領域21塩基中には、SAI-1では4塩基、SAI-2及び3では3塩基の置換が認められた。SAI-1~3の塩基置換は特に3'末端側に置換箇所が多く認められた。SAI-4の塩基置換は1塩基であった。リバープライマー(9B4)領域の保存性は高く、19塩基中にSAI-4で1つの塩基置換がみられたのみで、SAI-1~3に塩基置換はなかった。

表4: プライマー(9B3/9B4)領域の塩基配列

	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191
9B3	C	A	G	T	A	A	C	T	C	T	A	T	C	C	T	T	T	T	A	C	C
Nemuro	C	A	G	T	A	A	C	T	C	T	A	T	C	C	T	T	T	T	A	C	C
I 2012	C	A	G	T	A	A	C	T	C	T	A	T	C	T	T	T	T	T	A	C	C
F 2013	C	A	G	T	A	A	C	T	C	T	A	T	C	T	T	T	T	T	A	C	C
K 2013	C	A	G	T	A	A	C	T	C	T	A	T	C	T	T	T	T	T	A	C	C
N-1 2012	C	A	G	T	A	A	C	T	C	T	A	T	C	T	T	T	T	T	A	C	C
SAI-4	C	A	G	T	A	A	C	T	C	T	A	T	C	T	T	T	T	T	A	C	C
SAI-1	C	A	G	T	G	A	C	T	A	T	A	T	C	C	T	T	C	T	A	T	C
SAI-2	C	A	G	T	G	A	C	T	C	T	A	T	C	C	T	T	C	T	A	T	C
SAI-3	C	A	G	T	G	A	C	T	C	T	A	T	C	C	T	T	C	T	A	T	C
N-2 2012	C	A	G	T	G	A	C	T	C	T	A	T	C	C	T	T	C	T	A	T	C

	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451
9B4	C	G	G	A	T	T	G	T	A	T	T	G	C	G	A	T	A	C	G
Nemuro	C	G	G	A	T	T	G	T	A	T	T	G	T	G	A	T	A	C	G
I 2012	C	G	G	A	T	T	G	T	A	T	T	G	C	G	A	C	A	C	G
F 2013	C	G	G	A	T	T	G	T	A	T	T	G	C	G	A	C	A	C	G
K 2013	C	G	G	A	T	T	G	T	A	T	T	G	C	G	A	C	A	C	G
N-1 2012	C	G	G	A	T	T	G	T	A	T	T	G	C	G	A	C	A	C	G
SAI-4	C	G	G	A	T	T	G	T	A	T	T	G	C	G	A	C	A	C	G
SAI-1	C	G	G	A	T	T	G	T	A	T	T	G	C	G	A	T	A	C	G
SAI-2	C	G	G	A	T	T	G	T	A	T	T	G	C	G	A	T	A	C	G
SAI-3	C	G	G	A	T	T	G	T	A	T	T	G	C	G	A	T	A	C	G
N-2 2012	C	G	G	A	T	T	G	T	A	T	T	G	C	G	A	T	A	C	G

2 RT-PCRキットの変更

(1) RT-PCRキットの感度比較(図2)

A社キットでは 10^7 copies/mlまで明瞭な陽性反応が、 10^6 copies/mlで弱い陽性反応が認められた。B社キットでは 10^5 copies/mlまで強い陽性反応が認められた。この成績から、マルチPCRによるRVB特異遺伝子の検出において、B社キットがA社キットに比較して10~100倍感度が高いことが示された。

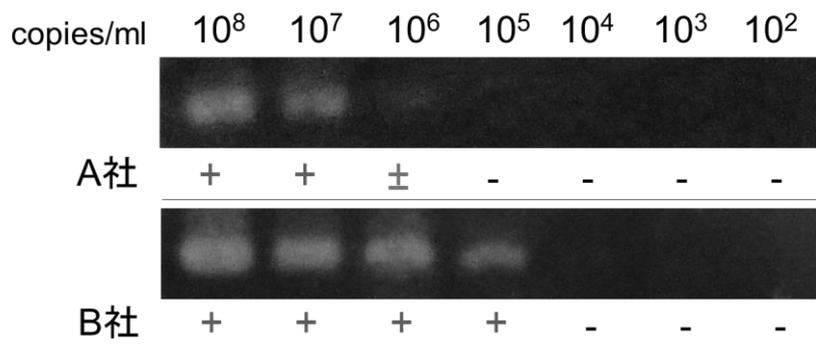


図2：A社及びB社キットを使用したマルチPCRの感度比較

(2) B社キットを使用したSAI-1～4の再検査(図3)

感度が高いことが示されたB社キットを用いることにより、SAI-2及び3はマルチPCRで陽性反応が得られた。しかし、SAI-1は検出することができなかった。

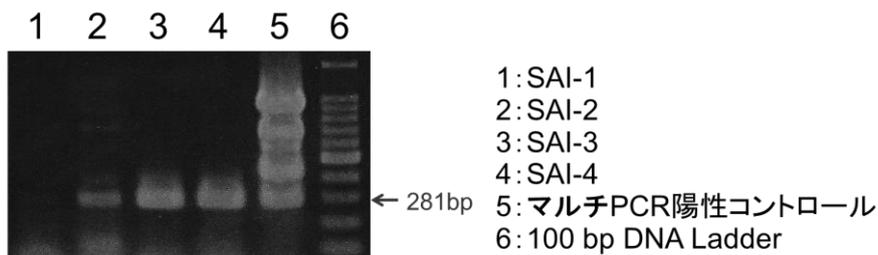


図3：B社キットを用いたSAI-1～4の再検査結果

3 RVB 試作プライマー(461F/757R)を使用したSAI-1～4の再検査(図4)

試作プライマーを用いることにより、検出できなかったSAI-1を検出することが可能となった。また、SAI-2～4及びマルチPCR陽性コントロールはいずれも陽性反応が認められた。しかし、SAI-2、3において、500 bp付近にこれまでは認められなかった非特異的の反応と考えられる陽性反応がみられた。また、マルチPCR陽性コントロールのC群ロタウイルスの陽性反応が弱くなった。

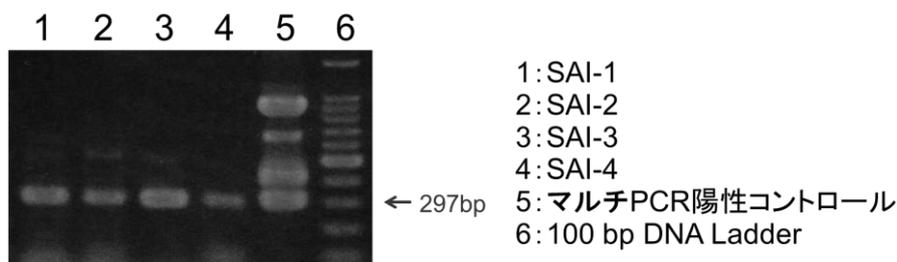


図4：試作プライマーを使用したマルチPCRによるSAI-1～4の再検査結果

V まとめと考察

以上の検査成績から、SAI-1～3がマルチPCRで検出できなかった原因として、まず、プライマー領域の塩基置換の影響が考えられた。遺伝子解析の結果、SAI-1～3ではフォワードプライマー領域に多くの塩基置換があることがわかった。特に、PCR反応の開始に重要な3'末端側に多くの置換がみられたことから、これらの変異がマルチPCRのRVB特異遺伝子検出感度を大幅に低下させたことが推察された。また、PCRキットがマルチPCRの検出感度に大きな影響を与えることも判明した。B社キットはマルチPCRによるRVB特異遺伝子検出において10～100倍高い感度を示し、A社キットでは検出できなかったSAI-2、3を検出することが可能となった。検査プロトコール、検査を行う環境、手技によって最適な試薬やキットは異なると考えられるので、今後、マルチPCRに関して、より感度が高いキットを選択する必要があると考えられた。

今回検出されたSAI-1～4は、VP7遺伝子の解析により、いずれも過去のRVB国内検出株と同様にクラスターはG3に分類された。これまでに確認されたRVB国内検出株は相同性が高く、その中で比較的遺伝的差異が大きい株はN-2 2012株のみであった⁷⁾。しかし、本県で検出されたSAI-1～3も牛RVB国内検出株とは遺伝的差異が比較的大きく、N-2 2012株と高い相同性を示した。系統樹解析においても、同一クラスターではあるが、N-2 2012株と同様に他の牛RVB国内検出株とは遺伝的差異が大きいことが確認された。特に、SAI-1はこれまで国内で主に使用されてきたプライマーで検出できないことが示された。VP7は外殻蛋白遺伝子であり、変異が起こる可能性が高いと考えられる。今後、さらに塩基置換が多い株が出現する可能性がある。そのようなRVB株に備え、現在使用しているプライマーよりも保存性が高く、スクリーニングに適した領域を標的とするプライマーを設計することが求められる。本報告でも試作プライマー(461F/757R)を設計し、マルチPCRを試行した。これによりSAI-1も検出することができたものの、非特異反応がみられるなど、マルチPCRでの使用については、さらに検討が必要と考えられた。しかし、本プライマーは、シングルPCRにおいては問題ないと考えられたので、当面、RVB病の可能性が否定出来ない事例においては、マルチPCRと並行して、本プライマー或いはVP7遺伝子全長プライマー³⁾によるシングルPCRを実施することを考慮しなければならない。今後、さらにスクリーニングに適したプライマーを選定或いは設計し、PCR条件の最適化のための検証試験を行い、マルチPCRを改良する必要がある。

謝辞

RVB遺伝子解析を実施していただいた独立行政法人動物衛生研究所ウイルス・疫学研究領域 鈴木 享主任研究員を始め、関係者の方々に深謝します。

引用文献

- 1) Estes M. K. and Kapikian A. Z. : Rotaviruses. In: Knipe D. M., Howley P. M., Griffin D. E., Lamb R. A., Martin M. A., Roizman B. and Straus S. E, [eds] Fields Virology, 5th edn., pp. 1917-1974 Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia (2009)
- 2) Hayashi M., Nagai M., Hayakawa Y., Takeuchi K. and Tsunemitsu H. : Outbreak of diarrhea and

- milk drop in cows infected with bovine group B rotavirus, *Vet. Rec.* 15, 331-332 (2001)
- 3) Tsunemitsu H. Morita D., Takaku H., Nishimori T., Imai K. and Saif L. J. : First detection of bovine group B rotavirus in Japan and sequence of its VP7 gene, *Arch. Virol.* 144, 805-815 (1999)
- 4) 葛城 肅仁, 仲村 和典, 生水 誠一, 宮地 利江, 武田 佳絵, 朝倉 裕樹, 恒光 裕 : 下痢、乳量減少及び食欲不振が認められた搾乳牛の牛B群ロタウイルス感染, *日獣会誌*, 59, 254-258 (2006)
- 5) 福田 昌治, 荒井 理恵, 河津 理子, 吉田 輝美, 安里 誠, 田口 清明, 田中 哲也, 小山 香 : 牛B群ロタウイルスが関与した搾乳牛下痢症の集団発生, 平成21年度埼玉県家畜保健衛生業績発表会抄録 (2009)
- 6) 宮本 博幸, 林 健 : 牛B群ロタウイルスによる搾乳牛集団下痢事例, *家畜衛生週報*, No. 3074 2009 10 19, 322-325 (2009)
- 7) 村山 和範, 会田 恒彦, 田中 健介, 篠川 有理, 福留 静, 樋口 良平, 中田 稔 : 県内で初確認されたB群及びC群ロタウイルスによる牛ロタウイルス病, 平成24年度新潟県家畜保健衛生業績発表会抄録 (2012)
- 8) Chinsangaram J., Akita G. Y. and Osburn B. I. : Detection of bovine group B rotaviruses in feces by polymerase chain reaction, *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 302-307 (1994)
- 9) Fukuda M., Tsunemitsu H. : Development and application of one-step multiplex reverse transcription PCR for simultaneous detection of five diarrheal viruses in adult cattle, *Arch Virol.* 157(6), 1063-1069 (2012)

11 牛呼吸器病由来 *Mannheimia haemolytica* 株の性状調査 および同定法に関する一考察

中央家畜保健衛生所

○荒井 理恵

I はじめに

Mannheimia haemolytica は牛呼吸器病の主要な原因菌であり、時に成牛の死亡も引き起こすことから重要視される病原体である。本菌はパスツレラ科に属するグラム陰性短桿菌であり、莢膜の抗原性により、現在、12種類の血清型に分類されている¹⁻³⁾。国内では血清型1型菌に対するワクチンが平成16年に販売開始された。ワクチン接種を検討する上で分離株の血清型は重要な情報となるが、型別に用いる抗血清は市販されておらず、県内分離株についてはこれまで血清型別を実施できていないのが現状である。また、*M. haemolytica* には性状が近縁な菌種が存在することが知られている。これらの菌種は *Mannheimia complex* と呼ばれ、*M. haemolytica*、*M. glucosida*、*M. ruminalis*、*M. granulomatis* および *M. varigena* の少なくとも5菌種が含まれる⁴⁾。これらの菌種は生化学性状が似通っていることから、市販の簡易同定キットでは正確な同定が難しいことが報告されている⁵⁾。当所の病性鑑定において、*M. haemolytica* の同定には簡易同定キットを用いていることから、*M. haemolytica* ではない株を誤同定しているかもしれない可能性が考えられる。さらに、前述したように、県内分離株について血清型等の基本情報も把握出来ていない状態である。

今回、過去の分離株が真に *M. haemolytica* であるかどうかを確認すること、県内分離 *M. haemolytica* 株について血清型等の基本性状を把握することを目的に以下の調査を行った。

II 材料および方法

1 供試株

M. haemolytica として当所に凍結保存されていた44株を用いた。これらは平成元年～25年に呼吸器症状を呈した牛の肺または鼻腔スワブから分離された株である。

2 一次性状の確認および簡易同定キット

全ての供試株について、コロニー形状の観察、グラム染色、カタラーゼ試験、オ

キシダーゼ試験を実施した。さらに、2種類の簡易同定キット（アピ20NE、IDテストHN-20ラピッド「ニッスイ」）に供試した。

3 *Mannheimia* 属菌同定用 Multiplex PCR

全ての供試株について、Alexanderらが報告した *Mannheimia* 属菌同定用 Multiplex PCR 法⁶⁾を行った。本PCRでは、*Mannheimia complex*の内、*M. haemolytica*、*M. glucosida*および *M. ruminalis*の3菌種が同定可能である。

4 血清型別および薬剤感受性試験

3により *M. haemolytica*と同定された株について、スライド凝集法による血清型別および一濃度ディスク法による薬剤感受性試験（8薬剤）を実施した。

5 16S rRNA 遺伝子解析

3により *M. haemolytica*が否定された株について、16S rRNAの部分塩基配列を決定し、EzTaxon-e⁷⁾（<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net>）、BLAST（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>）および CLUSTALW（<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-e.html>）により解析を行い、更なる同定作業を試みた。

III 成績

1 一次性状および簡易同定キットによる判定結果

44株全てが、5%羊血液加寒天培地上で溶血性を示す、灰白色・正円の中型コロニーを形成した（5%炭酸ガス培養・24時間）（図1）。全ての株がグラム陰性短桿菌、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陽性であり、いずれも *M. haemolytica*の性状と合致した。

さらに、アピ20NEおよびIDテストHN-20ラピッドのいずれの簡易同定キットにおいても、全ての株が *M. haemolytica*と判定された。



図1 羊血寒上のコロニー

2 *Mannheimia* 属菌同定用 Multiplex PCR 成績

PCRにより *M. haemolytica*と同定されたのは44株中42株（95.5%）であり、2株（4.5%）は、*M. haemolytica*、*M. glucosida*、*M. ruminalis*のいずれも否定された。

3 *M. haemolytica* 株の血清型および薬剤感受性

M. haemolytica 株 42 株の内、血清型 1 型は 19 株(45.2%)、6 型は 16 株(38.1%)、型別不能が 7 株(16.7%)であった。これらを分離年別に整理すると、平成元年～15 年までは 1 型菌のみが分離されていたが、平成 16 年以降、新たに 6 型菌の分離が確認されるようになった(図 2)。その分離株数も 6 型菌が半数以上を占めていた。さらに、分離株の血清型を症例別に確認すると、多くの症例で 1 型菌もしくは 6 型菌のいずれかが分離されていた。しかし、平成 16 年の一症例および平成 23 年の一症例では 1 型菌および 6 型菌の両方が分離されていた。

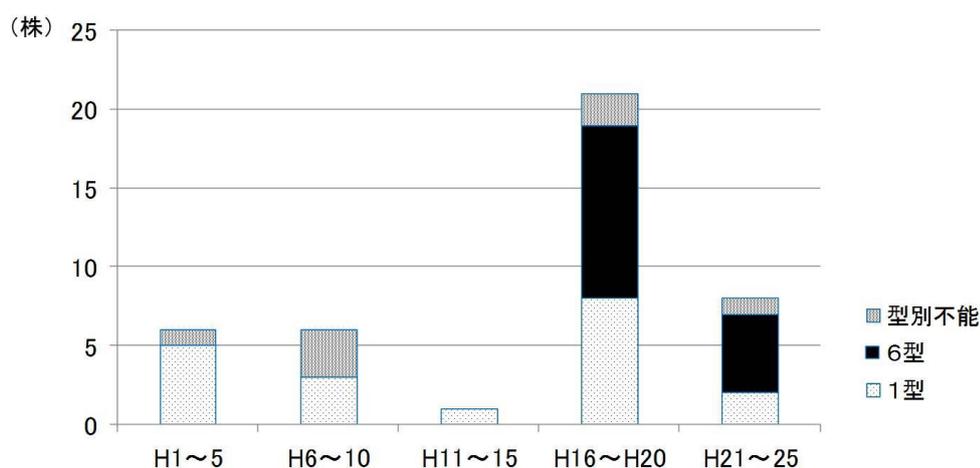


図 2 *M. haemolytica* 株の血清型 (分離年別)

薬剤感受性試験では供試薬剤 8 薬剤の内、ABPC、KM、OTC、CP、ERFX に耐性株が少数ではあるが認められた(図 3)。ERFX 耐性株は全て 6 型菌であり、かつ、6 型菌では多剤耐性の傾向が確認された(表 1)。

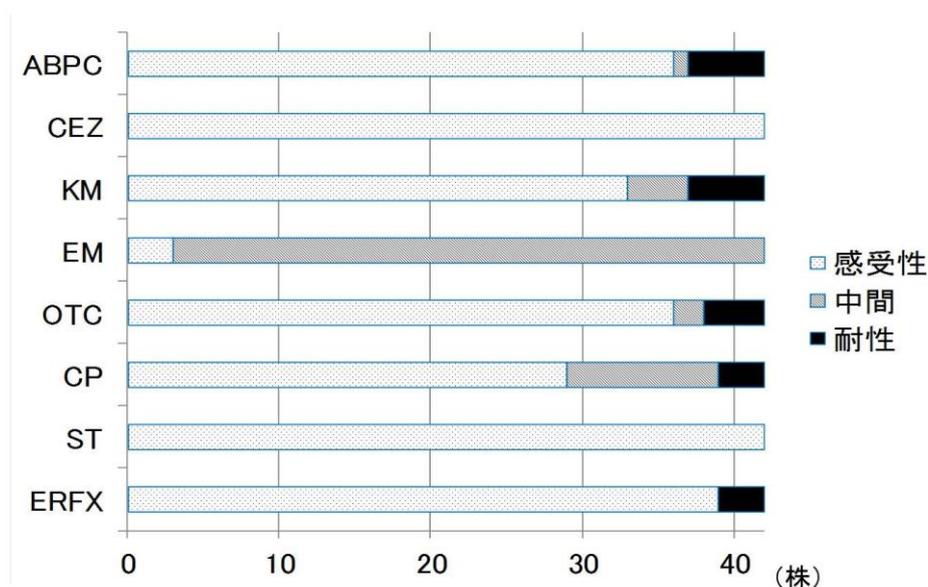


図 3 *M. haemolytica* 株の薬剤感受性試験成績

表1 *M. haemolytica* 株の薬剤感受性試験成績(血清型別)

血清型	薬剤耐性パターン	耐性薬剤数	株数
1型 (19株)	耐性薬剤なし	0	14 (73.6%)
	ABPC	1	3 (15.8%)
	KM	1	1 (5.3%)
	ABPC, OTC	2	1 (5.3%)
6型 (16株)	耐性薬剤なし	0	13 (81.2%)
	KM, CP, ERFX	3	1 (6.3%)
	KM, OTC, CP, ERFX	4	2 (12.5%)
型別不能 (7株)	耐性薬剤なし	0	6 (85.7%)
	ABPC, KM, OTC	3	1 (14.3%)

4 *M. haemolytica* が否定された2株の同定成績

PCRにより *M. haemolytica* が否定された2株(A株・B株)について16S rRNA 遺伝子解析を行った。EzTaxon-e および BLAST を用いた、データベース上の登録株との相同性検索の成績を表2に示す。本解析では相同性99%以上で同一菌種の可能性、相同性97%以上で近縁関係にあるとされていること、および一次性状・簡易同定キットの成績から、A株・B株のいずれも *Mannheimia* 属菌と同定され、種の同定には至らなかった。また、CLUSTALW を用いて、A株・B株の相同性を確認したところ、99.3%と高い相同性を示し、これらは同一菌種であることが示唆された。A株・B株ともに鼻腔スワブから分離された株であり、鼻腔粘膜の常在細菌等を *M. haemolytica* と誤同定してしまっていた可能性が考えられた。

表2 16S rRNA 遺伝子解析結果

	A株	B株
EzTaxon-eによる基準株との 相同性検索結果	① <i>Mannheimia varigena</i> (96.6%) ② <i>Mannheimia glucosida</i> (96.5%) ③ <i>Mannheimia granulomatis</i> (96.4%) ⋮ ⑧ <i>M. haemolytica</i> (95.6%)	① <i>Mannheimia granulomatis</i> (96.2%) ② <i>Mannheimia varigena</i> (96.2%) ③ <i>Mannheimia glucosida</i> (96.1%) ⋮ ⑧ <i>M. haemolytica</i> (95.3%)
BLASTによるデータベース上 全ての株との相同性検索結果	① <i>Mannheimia</i> sp. HPA121 (98.6%) ② <i>Mannheimia</i> sp. strain PH704 (98.5%) ③ <i>Mannheimia</i> sp. R19.2 (98.3%)	① <i>Mannheimia</i> sp. HPA121 (98.7%) ② <i>Mannheimia</i> sp. strain PH704 (98.6%) ③ <i>Mannheimia</i> sp. R19.2 (98.2%)

※ 相同性検索の結果、上位3菌種を示した。

IV まとめおよび考察

今回、保存株の再同定により、44株中2株は *M. haemolytica* と誤同定されていたことが確認された。勝田らも、簡易同定キット(アピ20NE)により *M. haemolytica* と同定された133株の内、遺伝子検査によっても *M. haemolytica* と同定されたのは

102株(76.7%)であると報告している⁵⁾。したがって、*M. haemolytica*の同定にあたっては、簡易同定キットのみを使用するのではなく、PCRなど遺伝子検査を活用する必要があると考えられた。特に、鼻腔スワブから菌分離を行う場合、常在細菌等の多種多様な菌が分離されてくることから、遺伝子検査は有効な方法と思われる。また、症例によっては複数の血清型(1型菌および6型菌)が同時に分離されていた。病性鑑定において原因となる病原体を正確に把握することは基本的かつ疾病予防のために重要であることから、一症例につき出来る限り複数個体・複数株の検査を実施する必要があるであろう。

県内分離*M. haemolytica*株について初めて血清型別を行ったところ、ワクチン株とは異なる6型菌の県内への侵入が明らかとなり、6型菌はERFX耐性を含む多剤耐性の傾向にあった。国内で初めて6型菌が分離されたのは平成5年であり、以降、その分離株数は全国的に増加傾向にある⁸⁾。しかも、本県分離株よりも多くの薬剤に耐性を示す株の存在も報告されている⁹⁾。*M. haemolytica*による呼吸器病は斃死に至る経済的損失の観点から重要視されており、有効な予防・治療のために、本菌の動向を今後とも注視していく必要があると考えられた。

V 謝辞

16S rRNA 遺伝子解析および*M. haemolytica*株の血清型別を実施頂いた動物衛生研究所の勝田賢先生に深謝いたします。

VI 参考文献

- 1) Biberstein. 1978. Biotyping and serotyping of *Pasteurella haemolytica*. Academic Press, London.
- 2) Fodor et al. 1988. ELISA for the measurement of sheep antibodies to the capsular antigens of *Pasteurella haemolytica* serotypes. Res Vet Sci 45: 414-415.
- 3) Angen et al. 1999. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 49 Pt 1: 67-86.
- 4) Angen et al. 1999. Investigations on the species specificity of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* serotyping. Vet Microbiol 65: 283-290.

- 5) 勝田ら 2009. *Mannheimia* 属菌の野外実態と同定法の確立. 動衛研研究報告 115: 15-18.
- 6) Alexander et al. 2008. A multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida* and *Mannheimia ruminalis*. Vet Microbiol 130: 165-175.
- 7) Kim et al. 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62: 716-721.
- 8) Katsuda et al. 2008. Serotyping of *Mannheimia haemolytica* isolates from bovine pneumonia: 1987-2006. Vet J 178: 146-148.
- 9) Katsuda et al. 2009. Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone-resistant *Mannheimia haemolytica* isolates from cattle with bovine pneumonia. Vet Microbiol 139: 74-79.

12 種豚に発生した増殖性腸炎（急性型）

中央家畜保健衛生所

○畠中 優唯・平野 晃司・荒井 理恵

吉田 輝美・油井 武

I はじめに

増殖性腸炎は *Lawsonia intracellularis* (Li) を原因とする伝染病で、主に豚や馬で発生する。豚では出血性下痢や突然死、貧血などが見られる急性型と、発育不良や慢性の下痢がみられる慢性型の2タイプに分けられる^{1~3)}。前者は肥育期以降、後者は離乳後から肥育前期の若い豚での発生が多い。今回、肥育豚600頭・母豚60頭・種豚6頭を飼養する一貫経営養豚場において、平成24年6月に10か月齢の種豚が血便を呈して死亡する事例があり、増殖性腸炎（急性型）と診断されたので報告する。

II 発生状況

平成24年3月に茨城県から導入した種豚(デュロック)1頭が、繁殖に供用し始めてから8日後の同年6月8日朝、血便を呈し1時間後に死亡した。死亡前日の食欲は普通であったが、当日の朝は若干食べ残していた。急死の原因究明のため、畜主より病性鑑定を依頼された。

III 材料および方法

1 材料

当該死亡豚1頭を、死亡当日に剖検し検査に供した。また、抗体検査のため、平成24年9月20日にステージ別(2か月齢、3か月齢、4か月齢、5か月齢および繁殖用雌豚)血清計25検体を採材した。

2 剖検及び病理組織学的検査

死亡豚を剖検し、主要臓器等を採材した。各臓器は10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬後、定法に従い病理組織標本を作成し、一般染色としてヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を、特殊染色としてワーチン・スターリー染色およびグラム染色を行った。また、マウス抗Liモノクローナル抗体、ウサギ抗*Clostridium* sp. 抗体、ウサギ抗*Brachyspira hyodysenteriae* serotype-A抗体を用いて免疫組織化学的検査を実施した。

3 細菌学的検査

肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、心嚢水について、5%羊血液加寒天培地(CO₂ 培養、48 時間)および DHL 寒天培地(好気培養、24 時間)を用いて、細菌分離を実施した。また、回腸内容を卵黄加カナマイシン含有 CW 寒天培地(嫌気培養、24 時間)で、結腸粘膜を DHL 寒天培地(好気培養、24 時間)および BJ 培地(嫌気培養、6 日間)を用いて定量培養を行った。その他、回腸粘膜および結腸粘膜を材料に、豚増殖性腸炎、豚赤痢、結腸スピロヘータ症について、PCR 検査^{4, 5)}を実施した。

4 ウイルス学的検査

扁桃の凍結切片を作成し、“京都微研”豚コレラ FA(微生物科学研究所)を用いた蛍光抗体法(以下、豚コレラ FA)により、豚コレラウイルス(以下、CSFV)抗原の検出を行った。

また、扁桃、肺、脾臓、腎臓、腸間膜リンパ節の 10%乳剤および血清を接種材料とし、CPK-CS 細胞、MARC 細胞を用いてウイルス分離(2 代 7 日間)を実施した。

その他、扁桃、肺、血清を材料とし、Christopher らの方法⁷⁾を用いて PRRS RT-PCR 検査を実施し、回腸内容を材料とし、Paton らの方法⁶⁾を用いて豚伝染性胃腸炎ウイルス(以下、TGE)RT-PCR 検査を実施した。

5 Li 抗体検査

当該農場における Li 浸潤状況を確認するため、スライド抗原を用いた間接蛍光抗体法による抗体検査をステージ別血清を用いて実施した。

IV 成績

1 剖検及び病理組織学的検査

剖検では、空腸下部から直腸の管腔に血液充満が顕著に認められた。結腸および直腸粘膜には血餅が付着しており、結腸粘膜にはうっ血がみられた(図 1)。HE 染色像では、空腸下部から結腸にかけて出血および粘膜上皮の剥離・壊死が認められた。また粘膜固有層へのリンパ球および好中球の浸潤と、陰窩上皮の腺腫様過形成がみられた(図 2)。ワーチン・スターリー染色で空腸下部から結腸にかけての陰窩上皮細胞質内に黒色菌体が確認された。特に空腸下部で菌体が多くみられた(図 3)。回腸と結腸を用いた免疫組織化学的検査では、菌体と一致して陰窩上皮に Li 抗原が検出された(図 4)。一方、*B. hyodysenteriae* および *Clostridium perfringens* 抗原は検出されなかった。



図1 結腸の血液充満および血餅付着

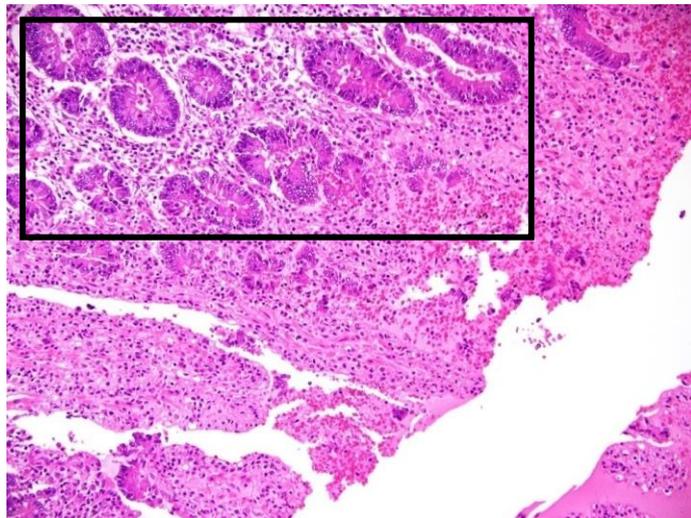


図2 回腸のHE染色像
(四角で囲われた部分は陰窩上皮の腸腺腫様過形)

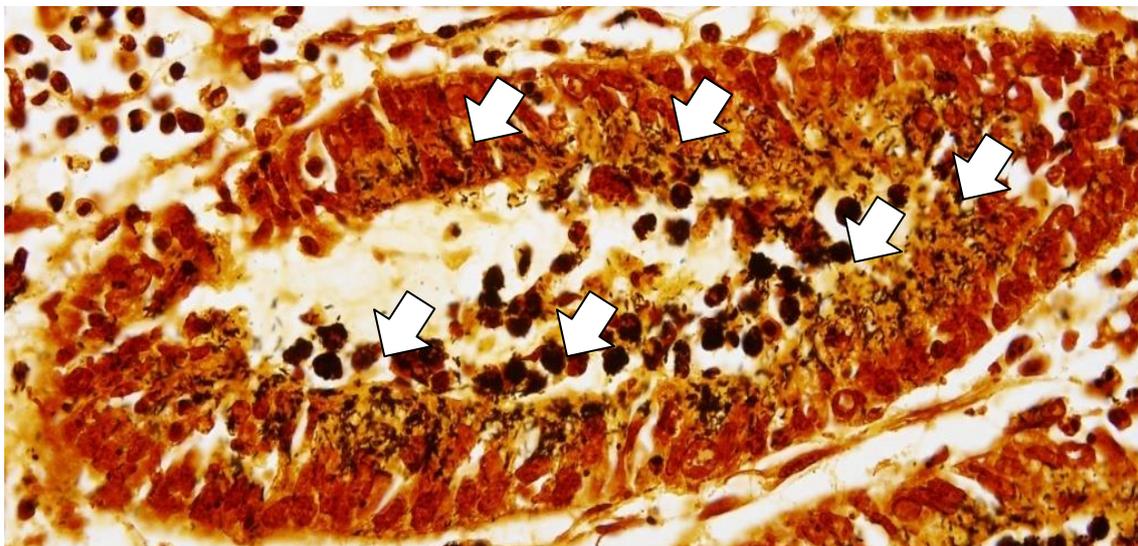
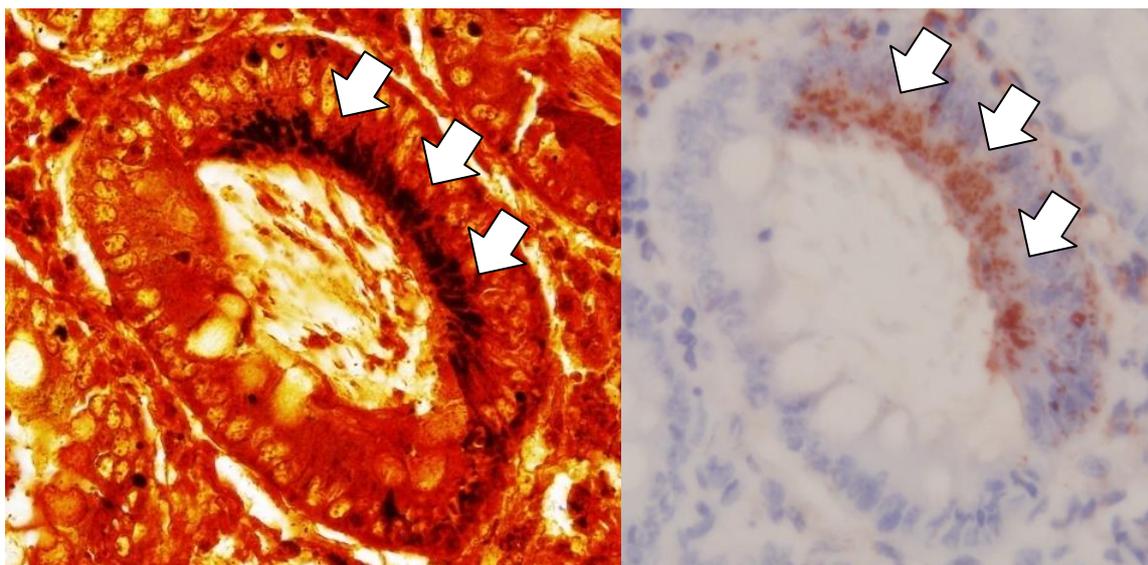


図3 空腸下部のワーチン・スターリー染色像(矢印は黒色に染まったコンマ状菌体)



ワーチン・スターリー染色像

免疫組織化学的染色像

図 4 結腸のワーチン・スターリー染色像および免疫組織化学的染色像（抗 Li 抗体）
（矢印は染色された菌体）

2 細菌学的検査

回腸および結腸粘膜を用いた PCR 検査において、Li 特異遺伝子が検出された。主要臓器および心嚢水から細菌は分離されなかった。また、結腸粘膜から *Salmonella* 属菌および *Brachyspira* 属菌は分離されなかった。

回腸内容から *C. perfringens* C 型が 1.1×10^7 CFU/g 分離されたが、病理組織学的検査の結果を鑑がみ、有意でないと判断した。

3 ウイルス学的検査

扁桃から CSFV 抗原は検出されず、いずれの臓器からも有意なウイルスは分離されなかった。

RT-PCR 検査では、PRRS ウイルスの特異遺伝子が肺から検出されたが、病理組織学的検査において、PRRS を疑う肺病変は認められなかった。また、TGE の特異遺伝子については検出されなかった。

4 Li 抗体検査

農場全体の抗体陽性率は 80%(20/25 検体)であった。ステージ別の抗体陽性率は、2 か月齢では 20%(1/5 検体)であったのに対し、3 か月齢と 5 か月齢では 100%(5/5 検体)、繁殖豚では 100%(5/5 検体)であった。

V まとめおよび考察

血便を呈し急死した種豚の病性鑑定を実施した結果、病理組織学的検査および細菌学的検査により増殖性腸炎と診断した。本症例は10か月齢であることや、消化管の重度出血を認めたことから、急性型に分類した。急性型の増殖性腸炎は、その剖検所見が豚赤痢、壊死性腸炎、サルモネラ症、伝染性胃腸炎や結腸スピロヘータ症と酷似しているため、これらの疾病との鑑別が必要である^{8~10)}。しかし本症例ではすべて否定された。増殖性腸炎の原因菌であるLiは長期間感染力を保持するため、汚染糞便が長靴やねずみを介して運ばれると、農場全体に広まる可能性がある。したがって、豚舎ごとの踏み込み消毒槽の設置や、日ごろの衛生管理が感染予防に重要となる¹¹⁾。

Liの浸潤率は世界的に極めて高く、日本でも農場の抗体陽性率はIFA法で95.8%¹²⁾、ELISA法で100%と報告されている¹³⁾。また、県内においても農場の抗体陽性は100%であった¹⁴⁾。本症例の発生農場における抗体調査では、2か月齢では抗体陽性率が低いものに対して3か月齢以降のステージではほぼ100%であった。したがって、移行抗体が消失し始める2か月齢前後に感染し、その後水平感染により農場内に蔓延していることが推察された。

当該農場ではその後急性型、慢性型ともに発生は認められておらず、被害は確認されていない。今後の対応としては、畜主と相談の上、新たに発症を認めた場合や豚を導入する際に状況に応じた対策をとることを考えている。

VI 謝辞

免疫組織化学的検査にご協力いただいた動物衛生研究所、芝原友幸先生、また抗体検査の実施にあたりスライド抗原を分与いただいた、日清丸紅飼料の関係各位に深謝いたします。

VII 参考文献

- 1) Steven McOrist, Jasni S, Mackie RA, MacIntyre N, Neef N, Lawson GH: Reproduction of porcine proliferative enteropathy with pure cultures of ileal symbiont intracellularis. Infect Immun., 1993, 61(10):4286-4292
- 2) 能勢泰宏: 増殖性腸炎-豚の古くて新しい病気-, 臨床獣医, 1997, 15(10):71-77
- 3) Vannucci FA, Pusterla N, Mapes SM, Gebhart C.: Evidence of host adaptation in *Lawsonia intracellularis* infection. Vet. Res., 2012, 43, 53
- 4) Jones GF, Ward GE, Murtaugh MP, Lin G, Gebhart CJ.: Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, ileal symbiont intracellularis, in feces by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol., 1993, 31(10):2611-2615
- 5) La T, Phillips ND, Hampson DJ.: Development of a duplex PCR assay for detection

- of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in pig feces. J. Clin. Microbiol., 2003, 41(7):3372-3375
- 6) Christopher-Hennings, J., Nelson, EA., et al.: Detection of Porcine and Respiratory Syndrome Virus in Boar Semen by PCR. J. Clin. Microbiol., 1995, 33(7):1730-1734
- 7) Paton, D., Ibata, G., Sands, J., McGoldrick, A.: Detection of transmissible gastroenteritis virus by RT-PCR and differentiation from porcine respiratory coronavirus. J. Virol., 1997, 66:303-306
- 8) Brandt D, Kaim U, Baumgärtner W, Wendt M.: Evaluation of *Lawsonia intracellularis* infection in a group of pigs in a subclinically affected herd from weaning to slaughter. Vet. Microbiol., 2010, 146(3-4):361-365
- 9) 農林水産省消費・安全局: 病性鑑定マニュアル, 全国家畜衛生委員会, 2008, 第三版, 267
- 10) 大宅辰夫ら: 豚病学, 近代出版, 1999, 第四版:323-327
- 11) Collins A, Love RJ, Pozo J, et al.: Studies on the ex vivo survival of *Lawsonia intracellularis*. Swine Health Prod., 2000, 8(5):211-215.
- 12) 矢原芳博: 特集豚増殖性腸炎、日本における浸潤状況, 臨床獣医, 2004, 22(1), 13-16
- 13) Kawashima K et al.: *Lawsonia intracellularis* in Japanese pig farms ; epidemiological survey results using a specific ELISA. Poster presentation of the 4th APVS congress, 2009
- 14) 吉田輝美ら: 県内一養豚場で発生した豚増殖性腸炎と県内浸潤状況. 平成18年度埼玉県家畜保健衛生業績発表会発表抄録, 2006, 9

13 カリニ肺炎等複数の日和見感染症がみられた

離乳子豚の大腸菌症

熊谷家畜保健衛生所

○伊藤 麗子・武末 寛子

中央家畜保健衛生所

多勢 景人・平野 晃司・荒井 理恵

I. はじめに

日和見感染症は、健康な状態では病原性を示さない様な環境中や体内に常在する微生物が、宿主の免疫低下に伴い感染あるいは異常増殖することにより引き起こされる。ヒトでは、HIV 感染症や免疫疾患、抗がん剤治療を受けている患者、抵抗力の低下した高齢者などでみられる、MRSA 感染症、ニューモシスティス肺炎、カンジダ症などが代表的である。

一方家畜では、飼養環境の変化、移動、暑熱や寒冷といったストレスが原因となって発症する呼吸器症状や下痢が一般的で、豚では、グレーサー病、大腸菌症などが挙げられる。

今回、管内 1 養豚場で離乳豚の大腸菌症が発生し、カリニ肺炎を始めとする複数のいわゆる日和見感染症を高率に併発していたので、その概要を報告する。

II. 発生概要

1 農場概要

繁殖母豚約 80 頭を飼養する一貫経営養豚場で、28 日齢で離乳し母豚をストール舎へ移動、子豚はそのまま 1 週間分娩舎で過ごした後、2 腹ないし 3 腹を合わせ 20 頭 1 群とし子豚舎へ移動する。子豚舎で 2.5 か月齢まで育成し、肥育舎に移動、その後出荷まで移動はない。

ワクチン使用状況は、繁殖豚にオーエスキー病 (AD)、ボルデテラ・パスツレラ・豚丹毒 3 種混合、日本脳炎、豚パルボウイルス感染症、子豚にはマイコプラズマ ハイオニューモニエ (Mhp) のワクチンを接種している。

なお、当所が例年実施している抗体検査では、AD 野外抗体及び PRRS 抗体陰性である。

2 発生経過

平成 25 年 3 月上旬から、分娩舎と子豚舎において離乳後 4 日～1 週間の子豚に水様性下痢が発生した。一部には発咳も認められ、アンピシリン (ABPC) の筋肉注射、オキシテトラサイクリン (OTC) とフロロコールの経口投与、生菌剤の飼料添加を行ったが、ほとんど効果が認められず、当時の離乳群において発生率 100%、死亡率約 20%という状況が続いた。

畜主からの通報により 4 月 1 日及び 18 日に病性鑑定を実施し、10 日に当所職員がヨー

ド系消毒薬により発生豚舎の消毒を実施した。

また、1 回目の病性鑑定で分離された病原性大腸菌がコリスチン (CL) に感受性であったため、同剤の飼料添加を開始し、合わせて脱水防止の経口補液行ったところ、18 日までに発生率は 15%程度にまで改善、死亡率も 10%まで低下した。その後、生菌剤を炭酸亜鉛に切り換え、さらに有機酸粉末を添加することで、6 月中旬までに離乳後下痢は終息した。

III 材料および方法

2 回の病性鑑定で、発症豚 5 頭、死亡豚 2 頭の計 7 頭を供試した。

1 血液学的検査

発症豚 5 頭について、一般血液検査を実施した。

2 病理学的検査

病理解剖による肉眼検査後、常法に従いパラフィン包埋組織切片を作製、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、必要に応じて PAS 染色およびグロコット染色を実施した。

3 細菌学的検査

剖検時に採取した主要臓器について DHL 寒天培地、5%ヒツジ血液加寒天培地 (BA) を用い、37℃、8 時間好気培養した。小腸内容については、BA を用い常法に従って定量培養を行い、分離された溶血性大腸菌について PCR 法により病原因子検査を実施した。

分離培養で分離された各菌種は、1 濃度ディスク法で薬剤感受性試験を実施した。

また、肺については、PCR 法により Mhp 特異遺伝子の検出を試みた。

4 ウイルス学的検査

(1) ウイルス分離

扁桃、肺、脾臓、腎臓、腸間膜リンパ節 (全頭)、血清 (18 日採取の 3 頭) について CPK-CS 細胞及び MARC 細胞を用い、常法に従って 2 代継代し細胞変性効果 (CPE) を観察した。

(2) 遺伝子検査

下記により、各ウイルス特異遺伝子の検出を試みた。

表-1 ウイルス特異遺伝子の検出

区 分	検 体	検査法
豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS)	扁桃、肺	RT-PCR
豚流行性下痢 (PED) 豚伝染性胃腸炎 (TGE)	回腸内容物	RT-PCR
豚サーコウイルス 2 型 (PCV2)	脾臓、腎臓、腸間膜リンパ節、 血清 (18 日採取 3 頭分)	PCR

IV 検査成績

供試した7頭はいずれも発育不良著しく、個体によっては目標とされる体重の1割程度しかなかった。

1 病理学的検査成績(表-2)

剖検では、肺の退縮不全、限局性かつ小葉単位の肝変化、腸管の水腫性変化の他、有意な所見はなかった。組織学的には、軽度から中程度の化膿性気管支肺炎がみられ、4頭では肝変化病変と一致していた。5頭で全葉性のカリニ肺炎が中程度から重度にみられた。

組織学的に、肺では肺胞上皮が腫大し、マクロファージ、リンパ球、形質細胞の浸潤を伴った間質性肺炎が広範囲にみられ、肺胞腔内には好酸性の泡沫状物が集簇していた。泡沫状物が充満し、含気していない肺胞腔も多くみられた。特殊染色により、泡沫状物はPAS陽性、グロコット黒染を示し、厚さが不均一な膜構造を持ち径2~10μmで大小不揃いの球状体の集塊として広範囲に観察され、これらの組織変化はカリニ肺炎の特徴病変と一致した。

また、5頭で盲腸から直腸にかけてバランチジウムが寄生しており、うち1頭では結腸粘膜上皮の壊死、び爛、潰瘍を伴う大腸炎の像を呈していた。

表-2 病理学的検査成績

		4/1実施				4/18実施		
		①	②	③ ^死	④ ^死	⑤	⑥	⑦
週 齢		6	5	10.5	14	7	7	8
体重(kg)		2.6	2.7	2.7	10.1	1.8	2.45	3.13
目 標 体 重 [*] (28日離乳時8.5kg)		12.9	9.25	27~28	46~47	17.0	17.0	22~23
剖 検 所 見	肺退縮不全	○		○				
	小葉単位肝変化				○	○	○	○
	腸間膜LN腫大	○	○		○		○	
	腸管壁水腫					○	○	○
組 織 所 見	化膿性気管支肺炎		○	○	○	○	○	○
	カリニ肺炎	○		○		○	○	○
	大腸バランチジウム		盲・結	結		盲・直	盲・直	盲・結

※ Muirhead and Alexanderの指標を一部引用

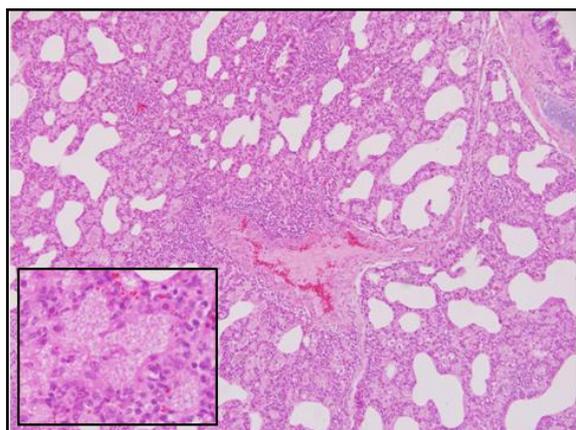


図-1 肺(HE染色)

肺胞上皮の腫大、リンパ球、形質細胞の浸潤を伴う間質性肺炎

挿入：肺胞腔内の泡沫状物

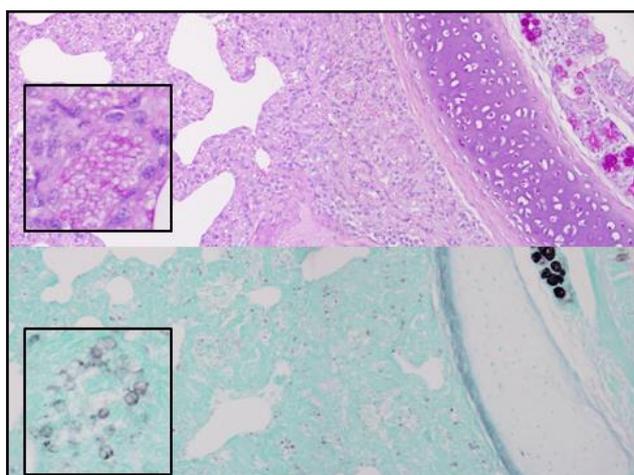


図-2 肺(特殊染色)

上: PAS 染色

下: グロコッ染色

挿入: PAS 陽性、グロコッ黒染する肺胞腔内
泡沫状物

2 細菌学的検査成績

肺からは、*Bordetella bronchiseptica* (4 頭)、*Hemophilus parasuis* (2 頭) が分離され、化膿性気管支肺炎の存在とほぼ一致していた(表-3)。

小腸内容の定量培養では、すべての豚から溶血性大腸菌が多数分離され、2.5 か月齢の 1 頭を除き病原因子 F18、LT を保有していた(表-4)。

表-3 肺細菌分離成績と病変分布

	4/1 実施				4/18 実施		
	①	②	③ ^死	④ ^死	⑤	⑥	⑦
<i>Bordetella bronchiseptica</i>		○		○	○	○	
<i>Hemophilus parasuis</i>						○	○
肺退縮不全	○		○				
小葉単位肝変化				○	○	○	○
化膿性気管支肺炎		○	○	○	○	○	○
カリニ肺炎	○		○		○	○	○

薬剤感受性試験では、分離された病原性大腸菌は各株に共通して、ABPC、ストレプトマイシン(SM)、OTC、クロラムフェニコール(CP)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム(SMX・TMP)合剤、キノロン系の計 7 剤に耐性、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、CL、ドキシサイクリン(DOXY)に感受性を示した(表-5)。

また、*B. bronchiseptica* は ABPC、ST 合剤に耐性、*H. parasuis* は供試した 8 剤に耐性はなかった(表-6 及び 7)。

肺の MhpPCR 検査では、2 頭で弱陽性を示した。

表-4 小腸内容定量培養成績と病変分布

	4/1実施				4/18実施		
	①	②	③ ^死	④ ^死	⑤	⑥	⑦
溶血性大腸菌 (cfu/g)	5.0×10 ⁸	1.0×10 ⁹	6.0×10 ⁸	2.1×10 ⁹	4.0×10 ⁹	2.5×10 ⁷	6.4×10 ⁶
定着因子 F18	○	○	○	—	○ [※]	○	○
毒素 LT	○	○	○	—	○	○	○
ST	—	—	—	—	—	—	—
Stx2e	—	—	—	—	—	—	—
定着因子 F4	/	/	/	—	—	/	/
F5	/	/	/	—	—	/	/
F6	/	/	/	—	—	/	/
eae	/	/	/	—	—	/	/
腸間膜 LN 腫大	○	○		○		○	
腸管壁水腫					○	○	○
パラチジウム		盲・結	結		盲・直	盲・直	盲・結

※脳、腸間膜 LN 由来株

表-5 薬剤感受性成績(病原性大腸菌;小腸内容由来)

薬剤名	ABPC	CEZ	SM	KM	GM	FOM	CL
感受性	R	I [※]	R	S	S	S [※]	S
薬剤名	OTC	DOXY	CP	SMX・TMP	ERFX	NFLX	
感受性	R	S	R	R	R	R	

表-6 薬剤感受性成績(*B. bronchiseptica*;肺由来)

薬剤名	ABPC	KM	GM	OTC	DOXY	CP	SMX・TMP	ERFX
感受性	R	S [※]	S	S	S	S	R	S

表-7 薬剤感受性成績(*H. parasuis*;肺由来)

薬剤名	ABPC	KM	GM	OTC	DOXY	CP	SMX・TMP	ERFX
感受性	S	S	S	S	S	S	S	S

(S:感性 I:中間 R:耐性) ※一部に耐性菌、耐性株出現

3 ウイルス学的検査成績

供試した全ての材料から、ウイルスは分離されなかった。遺伝子検査では、2頭の腸間膜リンパ節、うち1頭は脾臓からもPCV2特遺伝子が検出された。

なお、血液学的検査では有意な成績は得られず、Mhp 及び PCV2 については、それぞれ特徴的な組織病変はなかった。

V まとめと考察

本例は、離乳ストレスに伴い異常増殖した毒素原性大腸菌による典型的な離乳後下痢であった。一方、豚の一般的な複合感染症とは異なり、カリニ肺炎やヘモフィルスパラシス感染症、バランチジウム病等のいわゆる日和見感染症を複数併発していることが特徴と考えられた。

特にカリニ肺炎は、豚では原発性肺炎の集団発生が国内初発例として1991年に報告されているが、日和見感染的な事例としては、PRRSの二次感染や豚サーコウイルス関連疾病において散見される程度である。本例ではPRRSの関与は認められず、MhpやPCV2特遺伝子が一部の材料から検出されたものの組織病変を伴わず、発生状況等から総合的に判断して今回の発生に直接的な関与はないと考えられた。本例の様にカリニ肺炎が共通して重度かつ高率にみられる報告は他に見当たらないが、要因としては、離乳時に適正体重まで十分に発育しておらず、免疫応答能が未発達な状態であったことが考察された。離乳時に適正体重まで発育するのに必要な哺乳量を確保させることを課題とし、当面の間、初乳摂取の補助、分割授乳など分娩舎における授乳管理を手厚くするよう改善指導した結果、哺乳豚の増体、離乳率は徐々に回復が見られている。今後も引き続き、繁殖管理指導を段階的に進め、子豚の損耗防止と生産性の向上を図っていきたい。

VI 参考文献

- 1) 近藤 博 (1992) : 豚の *Pneumocystis carinii* 肺炎. 家畜衛生研修会 (病性鑑定病理部門, 1991) における事例記録. 日本獣医師会雑誌 45, 661-662
- 2) 川島健司・恒光 裕ほか (2003) : わが国の豚における離乳後多臓器性発育不良症候群 (PMWS) の実態解明. 動衛研研究報告第109号, 9-16
- 3) 福浦弘幸・安芸 博ほか (2002) : 豚サーコウイルス2型感染豚にみられたニューモシスティス・カリニ肺炎. 日本獣医師会雑誌 55(9), 584-586
- 4) 佐藤勝哉・加藤満年ほか (2003) : 三重県における離乳後多臓器性発育不良症候群 (PMWS) の実態調査. Proc. Jpn. Pig Vet. Soc., 42, 22-25
- 5) 久保正法 (2006) : 病理から見た豚複合感染の実態. JASV 会報 No. 5

14 ミニブタにみられた出血と尿細管壊死を伴う間質性

腎炎と膵臓の多発性巣状壊死の一症例

中央家畜保健衛生所

○平野 晃司・油井 武・曾田 泰史

荒井 理恵・吉田 輝美・多勢 景人

I はじめに

ミニブタに間質性腎炎と膵臓の多発性巣状壊死が認められた。腎炎を引き起こす要因は数多くある^{1~4)}一方で、膵臓の多発性巣状壊死が認められることは稀であり、その要因も限定される^{5,6)}。

今回、特に膵臓の病変に着目し、その原因について検討したので概要を報告する。

II 発生概要

1 経過

当該豚は5歳齢(平成19年8月1日生)の雌のミニブタで、平成19年12月3日より、県内動物園で展示用に飼育されていた。平成25年1月22日、元気消失、震え、食欲不振を示し、抗生物質による治療を実施した。翌日は食欲の回復が見られたが、1月24日、再び元気消失、頸部腫脹、両後肢湿疹を呈し、1月25日、回復が見られなかったため、当所に搬入され、鑑定殺による病性鑑定を実施した。他の同居豚に異常は認められなかった。

III 材料および方法

1 血液検査および血液生化学検査

解剖時、EDTA加血液を採取し、血液検査によりヘマトクリット値、赤血球数、白血球数、白血球百分率およびフィブリノーゲン値を測定した。また、分離した血清をスポットケムSP-4410(ARKRAY株式会社)を用いて血液生化学検査を実施した。

2 病理学的検査

剖検し、主要臓器等を採材、10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬後、常法により病理切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を実施した。また、腎臓、膵臓、下顎腺および下顎リンパ節の標本についてはPTAH染色および過ヨウ素酸シッフ(PAS)反応、腎臓の標本については鍍銀染色を実施した。また、腎臓について抗*Leptospira*属菌家兔血清、腎臓、心臓、膵臓、扁桃および鼠径リンパ節について抗豚サーコウイルス2型(PCV2)家兔血清、膵臓、腎臓、下顎腺および心臓について抗LPSモノクローナル抗体を用いて、免

疫組織化学的検査を実施した。

3 細菌学的検査

肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、脳および心嚢水について、5%羊血液加寒天培地（CO₂ 培養、48 時間）および DHL 寒天培地（好気培養、24 時間）を用いて、細菌分離を実施した。また、腎臓を材料に *Leptospira* 属菌特異的 PCR 検査⁷⁾を行った。

4 ウイルス学的検査

扁桃の凍結切片を材料とし、“京都微研”豚コレラ FA（微生物科学研究所）を用いて蛍光抗体法により、豚コレラウイルス（CSFV）抗原の検出を行った。ウイルス分離は、扁桃、肺、脾臓、腎臓、鼠径リンパ節の 10%乳剤を接種材料とし、CPK-CS 細胞および MARC 細胞を用いて、2 代 7 日間実施した。また、扁桃、肺を材料とし、PRRS ウイルス特異的 RT-PCR 検査⁸⁾を、脾臓、腎臓、鼠径リンパ節を材料とし、豚サーコウイルス 2 型（PCV2）、豚サイトメガロウイルス、豚アデノウイルス特異的 PCR 検査^{9~11)}を実施した。

IV 成績

1 血液検査および血液生化学検査

血液検査から、軽度貧血、好中球増加、好中球核の左方移動が認められた（表 1）。また、血液生化学的検査では、AST：132IU/L、LDH：1,112 IU/L、ALP：1,167 IU/L、BUN：137mg/dl、Cre：15.4 mg/dl、Ca：12.7 mg/dl、Mg：4.7 mg/dl、K：10.4mmol/l に高値を示した（表 2）。

表 1 血液検査成績

Ht (%)	RBC (個/mm ³)	WBC (個/mm ³)	白血球百分率 (%)										フィブリンゲン (mg/dl)		
			Eo	Baso	Neu	(Me)	St	Seg						Ly	Mo
								2	3	4	5				
31↓	408万↓	21175	2.5	0.5	55↑	0	7	20.5	17.5	8.5	1.5	41	1	500	
正常値	36-43	500万-700万	15000-22000	1-11	0-2		1-4	28-47					40-75	2-6	100-500

表 2 血液生化学検査成績

血糖 (mg/dl)	総蛋白 (g/dl)	アルブミン (g/dl)	A/G比	T-Cho (mg/dl)	AST (IU/L)	LDH (IU/L)	ALP (IU/L)	T-Bil (mg/dl)
83	6.5	2.8	0.76	74	132↑	1112↑	1167↑	0.3
正常値	65-95	6.3-7.8	2.7-3.8	0.74-1.15	75-110	15-55	380-634	40-160

BUN (mg/dl)	Cre (mg/dl)	Ca (mg/dl)	iP (mg/dl)	Mg (mg/dl)	Na (mmol/l)	K (mmol/l)	Cl (mmol/l)
137↑	15.4↑	12.7↑	9	4.7↑	134	10.4↑	94
正常値	8-25	0.8-2.3	7.1-11.6	5.3-9.6	2.3-3.5	135-150	4.4-6.7

2 病理学的検査

(1) 剖検所見

腎臓に著しい出血(図1)、麦稈色透明水様の心嚢水の貯留がみられ、その他の臓器に著変は認められなかった。



図1 剖検所見

(2) 病理組織学的所見

組織学的に腎臓は皮質から髄質にかけて広範の出血、壊死がみられた(図2)。出血部および壊死部周囲の尿細管構造は不整で、尿円柱および硝子滴を伴った尿細管上皮の変性が顕著に認められた。間質では好中球、マクロファージ、リンパ球の浸潤が認められた。脾臓は多発性巣状の壊死がみられ、好中球、マクロファージ、リンパ球の浸潤、軽度の線維素の析出、硝子血栓、一部に出血が認められた(図3)。壊死は下顎腺にもみられた(図4)。免疫組織化学的検査では、脾臓の一部の壊死巣に一致して、抗LPSモノクローナル抗体に弱陽性反応がみられた。その他の臓器は陰性であり、抗*Leptospira*属菌家兔血清を用いた検査では、腎臓に陽性抗原は検出されなかった。

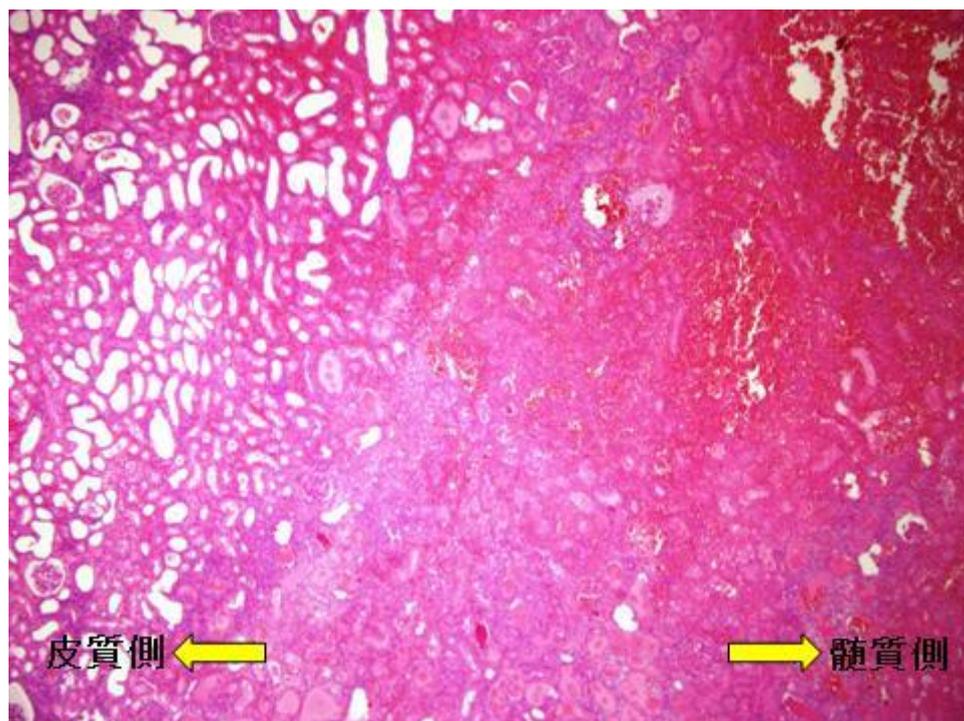


図2 腎臓 (HE)

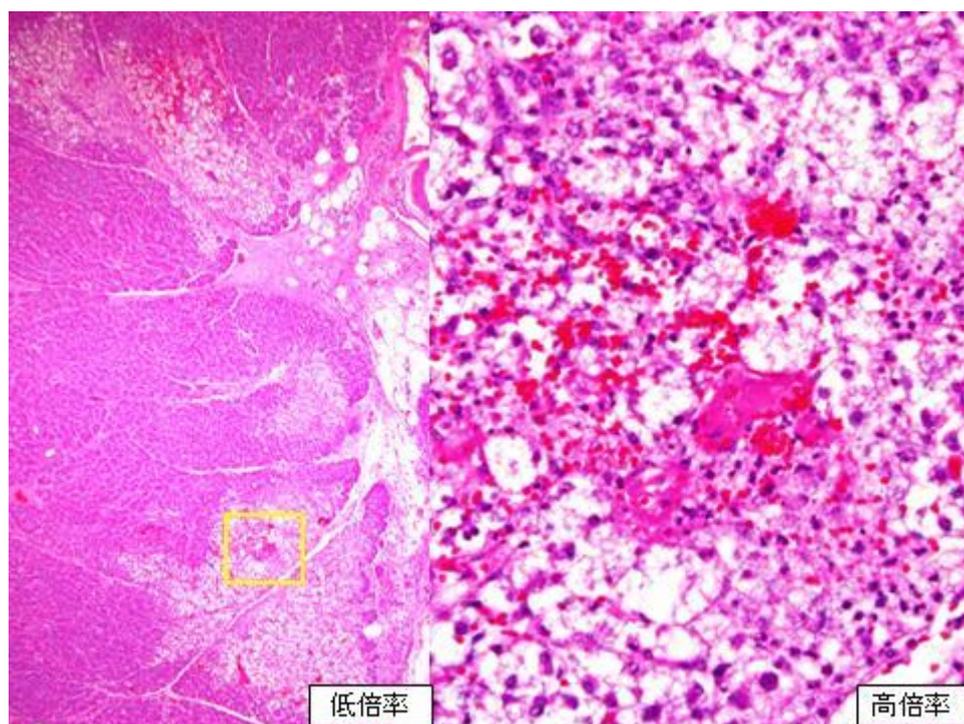


図3 脾臓 (HE)

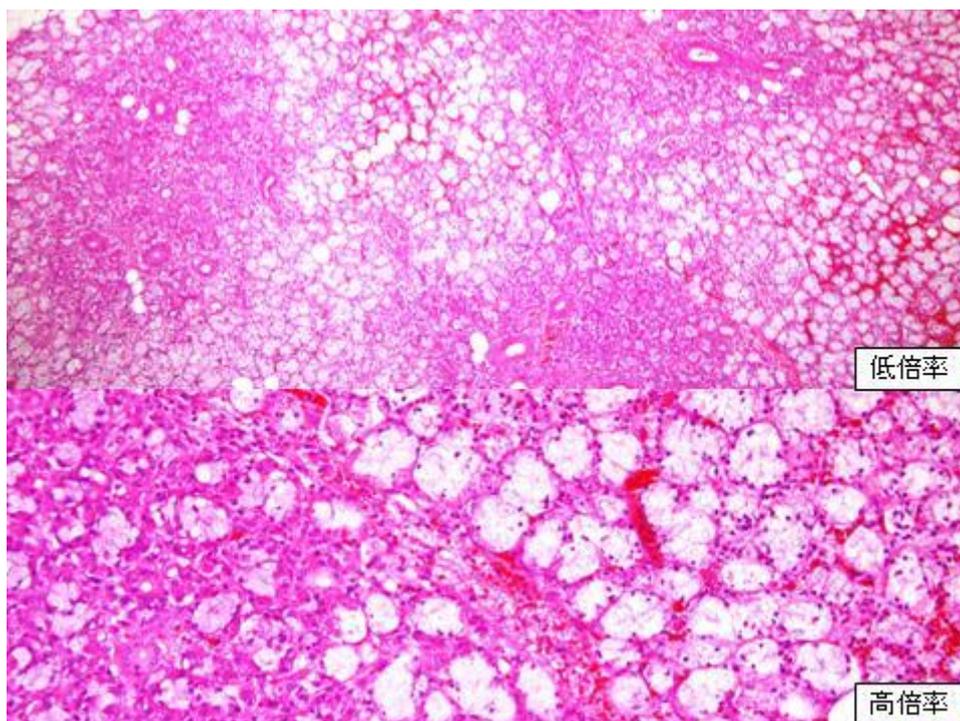


図4 下顎腺 (HE)

3 細菌学的検査

有意な細菌は分離されず、*Leptospira* 属菌特異的遺伝子は検出されなかった。

4 ウイルス学的検査

扁桃から CSFV 抗原は検出されず、いずれの臓器からも有意なウイルスは分離、検出されなかった。

V まとめおよび考察

本症例では、腎臓に著しい出血を認め、組織学的には出血と尿細管壊死を伴った間質性腎炎が認められた。血液生化学的検査では BUN 値が 100mg/dl を超え、尿毒症が疑われた。腎臓から、PCV2、サイトメガロウイルス、アデノウイルスおよび *Leptospira* 属菌の特異的遺伝子は検出されなかった。また、PCV2 および *Leptospira* 属菌については、組織切片による免疫組織化学的検査を実施したが、全て陽性抗原は検出されなかった。腎炎の発生については、その他非常に多くの要因が考えられた^{1~4)}。脾臓の多発性巣状壊死の発生要因は口蹄疫ウイルス、脳心筋炎ウイルス、アフリカ豚コレラウイルス、アデノウイルス、豚コレラウイルス(強毒株)および全身性トキソプラズマ症が知られている^{5,6)}。これらについて、国内での発生状況、当該豚の発生状況および臨床症状に加え、当所で行ったウイルス学的検査、病理学的検査から総合的に判断し、上記6症例の可能性は低いと判断した。

一方、病理組織学的に多臓器に認められた線維素析出と血栓形成、脾臓の壊死巣に認

められた抗LPSモノクローナル抗体陽性抗原、そして腎臓の顕著な出血から、敗血症が疑われた。敗血症に陥ると、LPSや炎症性サイトカンが大量に体内に発現する。LPSや炎症性サイトカインが単球やマクロファージや血管内皮細胞に作用すると、これらの細胞から組織因子が多量に産生されて、凝固活性化がおこり、線維素や微小血栓が多発する。そして血栓を形成する際、体内で血小板や凝固因子が大量に消費されるため、非常に出血しやすい状態となる¹²⁾。細菌感染症を疑う中で、細菌分離検査の結果が陰性であったことについては、鑑定殺3日前から抗生物質による治療が連日続いたことが影響したと考えられた。

以上のことから、腎臓病変からの検索、脾臓病変からの検索ともに原因の特定に至らなかったが、病理組織学および免疫組織化学的検査成績と敗血症の発症機序を考慮すると、グラム陰性菌による敗血症が最も疑われた。

VI 謝辞

最後に御助言および免疫組織化学的検査にご協力頂いた独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所 病態研究領域 播谷亮先生に深謝いたします。

VII 参考文献

- 1) 田口尚ら：尿細管・間質性腎疾患, 日本内科学会雑誌：18-25 (2000)
- 2) 板倉智敏ら：獣医病理組織カラーアトラス, 文永堂出版：104-109 (1990)
- 3) 墨鮎美：豚の腎病変とBUN値の相関について, 平成22年度 富山県食肉検査所 事業概要：34-36 (2011)
- 4) 菊池正美ら：尿毒症を疑う豚の腎病変, JVM 獣医畜産新報, vol159 No. 10: 845-848 (2006)
- 5) 日本獣医病理学会：動物病理学各論, 文永堂出版：245-246 (1998)
- 6) Marenberg SP, et al, Clin Chem, Jun;24(6)：881-884(1978)
- 7) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル レプトスピラ症：9-11 (2013)
- 8) Christopher-Hennings, J., Nelson, EA., Nelson, JK., Hines, RJ., Swenson, SL., Hill, HT., Zimmerman, JJ., Katz, JB., Yaeger, MJ., Chase, CC.: Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. J. Clin. Microbiol. 33(7):1730-1734(1995)
- 9) Kawashima K, Tsunemitsu H, Horino R, Katsuda K, Onodera T, Shoji T, Kubo M, Haritani M, Murakami Y: J Comp Pathol. 129:294-302(2003)
- 10) Widen, B. F., Lowings, J. P., Belak, S. and Banks, M. :Development of a PCR system for porcine cytomegalovirus detection and determination of the putative partial sequence of its DNA polymerase gene, Epidemiol Infect 123:177-180(1999)
- 11) Carlos Maluquer de Motes, Pilar Clemente-Casares, Ayalkibet Hundesa, Margarita Martín and Rosina Girones : Detection of Bovine and Porcine Adenoviruses for

Tracing the Source of Fecal Contamination, Applied and Environmental Microbiol
70(3): 1448-1454 (2004)

12) 日本獣医内科学アカデミー：獣医内科学 小動物編, 文永堂出版：441-442 (2005)

15 県内養豚場における *Cryptosporidium* の分子生物学的 手法を用いた疫学調査

中央家畜保健衛生所

○油井 武

I はじめに

クリプトスポリジウム(*Cryptosporidium*)属の原虫はアピコンプレックス門の寄生虫で、ヒトを含む多くの哺乳動物に感染する病原体として知られている³⁾。クリプトスポリジウム属は、極めて堅固なオーシストを持つことから、水や食物などの汚染物を摂取することによって間接的に感染することが知られている¹⁸⁾。

豚のクリプトスポリジウム感染症に関する近年の分子疫学的研究によれば、いくつかの国々で感染の報告がある^{2, 8)}。これまでに、豚は、*Cryptosporidium* sp. Eire w65.5、*Cryptosporidium* rat、および *C. suis*-like の各遺伝子型のほか、*C. parvum*、*C. hominis*、*C. suis*、*C. felis*、*C. meleagridis*、*C. muris*、*C. scrofarum*(*C. parvum* pig genotype II と呼ばれた)⁷⁾、*C. tyzzeri*、など、いくつかの種に対して感染することが報告されている^{9, 29)}。これらの種のうち、豚に最も特異的に見られるのは *C. suis* および *C. scrofarum* である^{7, 17)}。豚のクリプトスポリジウム感染症による下痢の発症は、オーシストの摂取量の程度に依存するとの研究報告もあるが¹⁴⁾、病原性については現在のところ未解明である。

日本の豚のクリプトスポリジウム感染の報告事例は他国と比較して少なく、過去には我々の報告を含む3報のみである。1報告目は、クリプトスポリジウムのオーシストが検出されず⁶⁾、2報告目は、形態学的同定により *C. parvum* の感染が確認されただけで、感染率は33.2%であった³⁾。近年、我々は制限断片長多型(RFLP)解析により、養豚場の豚から検出した株を *C. suis* または *C. scrofarum* と同定し²⁷⁾、さらに感染率が23.7%であると報告した²⁸⁾。これらの結果は、豚のクリプトスポリジウム感染が日本でも蔓延している可能性があることを示唆しているにも関わらず、日本の豚を対象とした分子疫学的調査はこれまでに全く実施されていない。

本報告では、養豚場における *Cryptosporidium* spp. の分布状況を明らかにするための調査を実施し、豚のクリプトスポリジウム感染症の病原性の他、年齢と個体数の関連について遺伝子学的に検討した。

II 材料および方法

- 1 材料：2010年1月から2011年1月の間に、県内の8養豚場で糞便を採取し、糞便

の種類を「正常」、「軟便」、「水様便」の3つに分類した。月齢ごとに、1ヵ月未満の哺乳豚55頭分、1~2ヵ月齢豚65頭分、2~4ヵ月齢豚105頭分、4~6ヵ月齢豚67頭分、雌繁殖豚36頭分、雄繁殖豚16頭分の計344頭分を無作為に採材した。

- 2 方法：エーテル沈殿法による糞便1g当たりのオーシストのOPG算出^{15, 22)}：糞便1gを5 mL PBSに懸濁し、糞便懸濁液を二重ガーゼでろ過して15 mL 遠心分離管に入れ、酢酸エチル2 mL を加えて30秒間振盪させた。1,700×g で10分間遠心後、上澄から順に酢酸エチル、PBS、および沈殿物の3層に分離させた。上2層をデカントし、沈殿層をPBSで100~200 μLに希釈した。この懸濁液を7.5 μLを12穴のスライドガラスに合計10穴まで滴下後、乾燥させ、アセトンで固定した。免疫蛍光抗体染色後にスライドを蛍光顕微鏡で観察した。400倍視野でスライド上のオーシストをカウントし、OPGを算出した。不等分散のStudentのt検定により統計的有意水準を決定した。

遺伝子抽出：OPG10,000を超える糞便材料の遺伝子を抽出した。QIAamp DNA Stool Mini Kit(ドイツQIAGEN社)を使用し、糞便約200 mgからゲノムDNAを抽出した。精製したDNAは-20℃で保存した。

18S rRNA遺伝子の遺伝子解析：*Cryptosporidium* spp. を同定するために、クリプトスポリジウム特異的プライマーを使って18SリボソームRNA(18S RNA)遺伝子(約850bp)を増幅した²⁵⁾。1×PCR緩衝液、2 mM MgCl₂、dNTP各200 μM、プライマー各0.5 μM、TaKaRa Ex Taq Hot Start Version(宝酒造)0.625 U、テンプレート25 μLについてnested PCRにより遺伝子を増幅した。陽性対照に*C. parvum*、HNJ-1株¹⁾を用いた。QIAquick Gel Extraction(ドイツQIAGEN社)を使ってPCR生成物を精製し、ABI 3130自動シーケンサー(米国Applied Biosystems社)で両方向の配列分析を実施した。得られた遺伝子配列は、ClustalWを日本DNAデータバンク(DDBJ, <http://clustalw.ddbj.njg.ac.jp/top-j.html>)の初期設定パラメータ値を使用して、遺伝子型のヌクレオチド配列をアラインメントした。DDBJのFASTAプログラムを使い、得られた当該部分の遺伝子配列のホモロジー検索を行った。さらに、*C. suis* と *C. scrofarum*の混合感染を検証するために、18S rRNA遺伝子の種特異的プライマーによるnested PCRを実施した⁵⁾。

アクチン遺伝子の系統発生解析：18S rRNA遺伝子の配列解析により種が同定されたクリプトスポリジウム分離株について、アクチン遺伝子座(約1,100 bp)の遺伝子配列解析を実施した²⁰⁾。増幅された生成物の遺伝子配列が得られた後、前述と同様にアラインメントとホモロジー検索を実施した。1,000のブートストラップ標本を使い、Tamura-Neiの遺伝距離から産出した進化距離をもとに近隣接続アルゴリズムにより系統樹を作成した。作成された系統樹はMEGA version 5ソフトウェアにより描画した²¹⁾。

III 成績

Cryptosporidium spp. のオーシストは検査した全養豚場で検出された(表1)。感染率は全材料の平均で32.6%、養豚場により4.9%から58.1%の範囲で検出された。月齢別

の感染率は、離乳後の豚で最も高く、年齢に伴って低下し、繁殖豚で最も低く検出された。OPGは感染率と同様のパターンを示し、離乳後の豚から最大数のOPGが検出され、年齢に依存して低下し、繁殖豚で最も少なく検出された。糞便中に含まれたクリプトスポリジウムのオーシストと糞便性状の関係を表2に示した。下痢を発症した豚ではOPGが比較的多く検出されたが、OPGと糞便性状の間に統計学的有意差は認められなかった。

表1 8農場のクリプトスポリジウムの検出と遺伝子解析

農場No.	哺乳豚	1-2カ月豚	2-4カ月豚	4-6カ月豚	繁殖豚	合計	遺伝子検出	分離株の同定
1	3/5	0/0	10/11	2/5	3/10	18/31 (58.1%)	3 (11)	<i>C. scrofarum</i> 3株
2	3/5	3/6	10/12	6/15	2/11	24/49 (49.0%)	7 (14)	<i>C. suis</i> 3株、 <i>C. scrofarum</i> 3株 Mix 1株
3	5/14	14/17	9/10	1/11	0/8	29/60 (48.3%)	12 (15)	<i>C. suis</i> 6株、 <i>C. scrofarum</i> 4株 Mix 2株
4	2/13	8/11	3/7	0/10	1/3	14/44 (31.8%)	5 (7)	<i>C. suis</i> 1株、 <i>C. scrofarum</i> 2株 Mix 2株
5	0/4	1/6	5/10	4/9	0/5	10/34 (29.4%)	4 (7)	<i>C. suis</i> 2株、 <i>C. scrofarum</i> 1株 Mix 1株
6	2/13	5/25	2/5	—	1/12	10/55 (18.2%)	4 (6)	<i>C. suis</i> 1株、 <i>C. scrofarum</i> 1株 Mix 2株
7	0/0	0/0	5/30	0/0	0/0	5/30 (16.7%)	0 (0)	
8	0/1	-	0/20	2/17	0/3	2/41 (4.9%)	2 (2)	<i>C. scrofarum</i> 2株
合計	15/55 (27.3%)	31/65 (47.7%)	44/105 (41.9%)	15/67 (22.4%)	7/52 (13.5%)	112/344 (32.6%)	37 (62)	<i>C. suis</i> 13株、 <i>C. scrofarum</i> 16株 Mix 8株
OPG	5.00	5.02*	4.51	3.91	3.89			

OPG: 対数値

Mix: *C. suis*と*C. scrofarum*検出

*: 2-4カ月齢、4-6カ月齢 p<0.01

表2 糞便性状とクリプトスポリジウムの感染

区分	検体数	<i>Cryptosporidium</i> 検出	<i>Cryptosporidium</i> 陽性検体例の年齢別の分類	
			月 齢	OPG (例数)
正常便	221	56 (+) 165(+)	>1カ月齢豚	4.90 (4)
			1-2カ月齢豚	4.94 (10)
			2-4カ月齢豚	4.56 (28)
			4-6カ月齢豚	3.89 (8)
			繁殖豚	3.92 (6)
軟便	89	40(+) 49(-)	>1カ月齢豚	4.21 (6)
			1-2カ月齢豚	5.00 (14)
			2-4カ月齢豚	4.22 (12)
			4-6カ月齢豚	3.93 (7)
			繁殖豚	3.70 (1)
水様便	34	16(+) 18(-)	>1カ月齢豚	5.33 (5)
			1-2カ月齢豚	5.24 (7)
			2-4カ月齢豚	4.07 (4)
合計	344	112(+) 232(-)		

OPG: 例数の平均を対数値

PCRおよびシーケンスによる分離株の同定: 分離株の*Cryptosporidium* spp. を同定するために、18S rRNA遺伝子のシーケンスによる遺伝子解析を実施した。その結果、解析試料62検体のうち37検体はPCRで増幅された(表1)。37検体とも*C. suis* と*C.*

*scrofarum*のみ同定されたが、*C. parvum* を含むその他の種は同定されなかった。また、*C. suis*

表3 月齢別のクリプトスポリジウム種の感染

月齢別	総株数	<i>C. suis</i>	Mix (<i>C. suis</i> + <i>C. scrofarum</i>)	<i>C. scrofarum</i>
>1カ月齢豚	3	2	0	1
1-2カ月齢豚	11	6	4	1
2-4カ月齢豚	15	5	3	7
4-6カ月齢豚	7	0	0	7
繁殖豚	1	0	1	0
合計	37	13	8	16

と *C. scrofarum* の混合感染が8検体に認められた。全検体で検出された *C. suis* および *C. scrofarum* の部分配列は、報告された *C. suis* の KC481228、*C. scrofarum* の KC481229 株と遺伝子配列が一致した。これら2種の月齢別感染率を表3に示した。*C. suis* は哺乳豚と1~2カ月齢豚で多数検出された。混合感染を含む *C. scrofarum* の感染は、2カ月齢豚で増加し、4~6カ月齢豚では同定された全ての分離株が *C. scrofarum* であった。

アクチン遺伝子のシーケンス系統発生解析：18S rRNA 遺伝子のシーケンスにより種が同定された標本を用いて、アクチン遺伝子の解析を試みた。その結果、10検体で増幅された。遺伝子が増幅された株は、農場No. 2の分離株3例、農場No. 3で3例、農場No. 4は *C. suis* の1例であった。農場No. 2の2例と農場No. 3の1例は *C. scrofarum* であった。シーケンス後に、農場No. 3および農場No. 4の *C. suis* の全ての分離株は過去のデータ (accession No. F012373) と遺伝子配列が一致したが、農場No. 2の分離株はいずれも、accession No. EF012373

と1 bp ずつ異なった。さらに、農場No. 2および農場No. 3から採取された *C. scrofarum* の全分離株は、過去のデータ (accession No. EF012374) と2カ所塩基配列が異なった。系統発生樹を図1に示した。本報告で確認された *C. suis* (accession No. AB852579)

および *C. scrofarum* (accession No. AB852580) の2種の変異型は、それぞれ

既知の *C. suis* および *C. scrofarum* に由来と同じクレードを構成した(図1)。

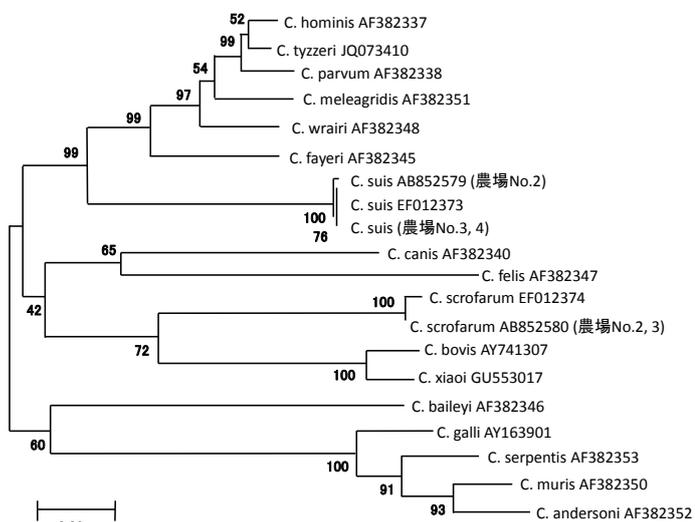


図1 *C. suis* と *C. scrofarum* およびその他のクリプトスポリジウム種の系統樹
同定された *C. suis* 種後の番号は受入番号。目盛りはヌクレオチド1個あたりの塩基置換数、枝上の数字はブートストラップ値(>1,000)

IV まとめと考察

本報告の豚のクリプトスポリジウム感染の感染率は全平均で32.6%であった。これまでに、世界各地の豚の感染率はオーストラリア西部で6.03%、スペイン北東部で22.5%、デンマークでは雌繁殖豚16%、肥育豚31%、離乳直後の豚100%と報告されていた^{10, 14, 16, 19, 24, 29})。他国のデータと比較すると、日本の豚の感染率は特に高くなかった。感染率の差違は、検査豚の月齢、診断方法、ブタの管理体制など、いくつかの要因が寄与していると考えられている¹⁰)。そのため、本報告で養豚場間の感染率の差違(58.1~4.9%)は、敷料などの汚染資材、感染豚の糞便の処理対策など、養豚場の衛

生環境に起因すると推察されたが、その根拠は検討されていなかった。

顕微鏡観察下でクリプトスポリジウム感染豚の糞便中のOPGを算出した。2ヵ月齢豚未満のOPGは比較的高かった。これらの結果は、過去に報告された結果と一致した⁵⁾。日本では、豚のクリプトスポリジウム感染症に関する報告は数少なく、2001年が33.2%、2013年で23.7%と報告されている^{4, 28)}。本報告の結果は過去の報告とほぼ一致したことから、日本の豚におけるクリプトスポリジウムの感染は広く伝播しており、感染率は高いと考えられた。

近年、豚の下痢は、クリプトスポリジウム・オーシスト脱落数と関連した報告¹⁴⁾や下痢の発症率と糞便中のクリプトスポリジウム・オーシストとの間に有意な相関は認めない報告もある^{13, 29)}。本報告では検査対象数が少ないため、他の下痢性病原体との関連を調査できなかったが、下痢の発症豚では、正常便や軟便と比較してオーシスト脱落率が高い傾向があり、その点で過去の見解を追認できると考えられた。

本報告は、18S rRNA遺伝子のシーケンスによって、分離株を*C. suis* または *C. scrofarum*と同定されたが、全試料を増幅させることはできなかった。本例の様に原因不明の遺伝子増幅失敗に関する報告があり²⁹⁾、その原因として、糞便中にPCR増幅阻害因子が含まれているか、保存糞便の状態により精製中に原虫のDNAが失われてしまう可能性を考える必要があった。

現在までに、本報告の2種を除き、*C. parvum*、*C. andersoni*、*C. felis* など、いくつかの種が日本の動物から検出されている^{11, 12, 26)}。しかし本研究では、*C. suis* と *C. scrofarum* の2種しか検出されなかった。従って、他種が豚に感染する可能性は低いと考えられた。本報告では、*C. suis*は比較的若齢豚に多く感染し、*C. scrofarum* は2ヵ月齢豚以上に多く感染した。従って、*C. suis*の感染は月齢に依存し、月齢が進むにつれて、*C. scrofarum*との混合感染に移行する可能性が考えられた。月齢に特異的な易感染性は、近年報告されている他の知見を追認するものと考えられた⁵⁾。

いくつかの分離株でアクチン遺伝子座のシーケンシングを実施した。その結果、*C. suis* および *C. scrofarum* の変異型が、農場No. 3および農場No. 2で検出された。日本で豚の*Cryptosporidium* spp. の変異型が検出されたのは初めてのことである。農場No. 3および農場No. 4から検出された*C. suis* の分離株の配列は他国で検出されたもの(ノルウェーの分離株に由来 EF012373)と一致したので、その変異型は、既知の*C. suis* に由来すると考えられた。一方、同定された*C. scrofarum* の分離株は全て、変異型であったため、このタイプが日本に広がっていると考えられた。しかし、日本の豚のクリプトスポリジウムのアクチン遺伝子の特性を評価するためには、さらに例数を増やして検討する必要があった。本報告では日本の豚におけるクリプトスポリジウム感染の感染率を調査し、分離株の遺伝子解析を実施した結果、日本の豚にクリプトスポリジウムの感染が広がっていたこと、他の諸国の分離株とは異なる変異型が存在していたことが明らかとなった。しかし、クリプトスポリジウム感染豚と月齢特異性、

下痢の病原性との関連性をより正確に評価するためには、さらに、広域で大規模な疫学的遺伝子型解析を実施する必要があると考えられた。

最後に、クリプトスポリジウムの遺伝子診断にご協力いただきました(独)農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所の松林誠先生、芝原友幸先生、大阪市立環境科学研究所の阿部仁一郎先生、埼玉県衛生研究所の山本徳栄先生、近真理奈先生に深謝いたします。

IV 参考文献

- 1) Abe N, Kimata I, Iseki M: Identification of genotypes of *Cryptosporidium parvum* isolates from a patient and a dog in Japan, J Vet Med Sci, 64, 165-168 (2002).
- 2) Budu-Amoako E, Greenwood SJ, Dixon BR, Barkema HW, Hurnik D, Estey C, McClure JT: Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in pigs on Prince Edward Island, Canada, Vet Parasitol, 184, 18-24 (2012).
- 3) Fayer R: Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*, Exp Parasitol, 124, 90-97 (2010).
- 4) Izumiyama S, Furukawa I, Kuroki T, Yamai S, Sugiyama H, Yagita K, Endo T: Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infections in weaned piglets and fattening porkers in Kanagawa Prefecture Japan, Jpn J Infect Dis, 54, 23-26 (2001).
- 5) Jeníková M, Němejc K, Sak B, Květoňová D, Kváč M: New view on the age-specificity of pig *Cryptosporidium* by species-specific primers for distinguishing *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II, Vet Parasitol, 176, 120-125 (2011).
- 6) Koyama Y, Satoh M, Maekawa K, Hikosaka K, Nakai Y: Isolation of *Cryptosporidium andersoni* Kawatabi type in a slaughterhouse in the northern island of Japan, Vet Parasitol, 130, 323-326 (2005).
- 7) Kváč M, Kestránová M, Pinková M, Květoňová D, Kalinová J, Wagnerová P, Kotková M, Vítovec J, Ditrich O, McEvoy J, Stenger B, Sak B: *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*), Vet Parasitol, 191, 218-227 (2013).
- 8) Kváč M, Hanzlíková D, Sak B, Kvetonová D: Prevalence and age-related infection of *Cryptosporidium suis*, *C. muris* and *Cryptosporidium* pig genotype II in pigs on a farm complex in the Czech Republic, Vet Parasitol, 160, 319-322 (2009).
- 9) Langkjær, R. B., Vigre, H., Enemark, H. L., Maddox-Hyttel, C., 2007. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. Parasitology 134, 339-350.

- 10) Maddox-Hyttel C, Langkjaer RB, Enemark HL, Vigre H: *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs—occurrence and management associated risk factors, *Vet Parasitol*, 141, 48–59 (2006).
- 11) Matsubayashi M, Nagano S, Kita T, Narushima T, Kimata I, Iseki M, Hajiri T, Tani H, Sasai K, Baba E: Genetical survey of novel type of *Cryptosporidium andersoni* in cattle in Japan, *Vet Parasitol*, 158, 44–50 (2008).
- 12) Murakoshi F, Tozawa Y, Inomata A, Horimoto T, Wada Y, Kato K: Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from calves in Ishikari district, Hokkaido, Japan, *J Vet Med Sci*, 75, 837–840 (2013).
- 13) Němejc K, Sak B, Květoňová D, Kernerová N, Rost M, Cama VA, Kváč M: Occurrence of *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium scrofarum* on commercial swine farms in the Czech Republic and its associations with age and husbandry practices, *Parasitol Res*, 112, 1143–1154 (2013).
- 14) Nguyen ST, Honma H, Geurden T, Ikarashi M, Fukuda Y, Huynh VV, Nguyen DT, Nakai Y: Prevalence and risk factors associated with *Cryptosporidium* oocysts shedding in pigs in Central Vietnam *Res, Vet Sci*, 93, 848–852 (2012).
- 15) Ritchie LS: An ether sedimentation technique for routine stool examinations, *Bull US Army Med Dep*, 8, 326 (1948).
- 16) Ryan UM, Samarasinghe B, Read C, Buddle JR, Robertson ID, Thompson RC: Identification of a novel *Cryptosporidium* genotype in pigs, *Appl Environ Microbiol*, 69, 3970–3974 (2003).
- 17) Ryan UM, Monis P, Enemark HL, Sulaiman I, Samarasinghe B, Read C, Buddle R, Robertson I, Zhou L, Thompson RC, Xiao L: *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*), *J Parasitol*, 90, 769–773 (2004).
- 18) Smith HV, Cacciò SM, Tait A, McLauchlin J, Thompson RC: Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans, *Trends Parasitol*, 22, 160–167 (2006).
- 19) Suárez-Luengas L, Clavel A, Quílez J, Goñi-Cepero MP, Torres E, Sánchez-Acedo C, del Cacho E: Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs in Zaragoza (northeastern Spain), *Vet Parasitol*, 148, 231–235 (2007).
- 20) Sulaiman IM, Lal AA, Xiao L: Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus, *J Parasitol*, 88, 388–394 (2002).
- 21) Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S: MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary

- distance, and maximum parsimony methods, *Mol Biol Evol*, 28, 2731-2739 (2011).
- 22) Waldman E, Tzipori S, Forsyth JR: Separation of *Cryptosporidium* species oocysts from feces by using a percoll discontinuous density gradient, *J Clin Microbiol*, 23, 199-200 (1986).
- 23) Wang R, Qiu S, Jian F, Zhang S, Shen Y, Zhang L, Ning C, Cao J, Qi M, Xiao L: Prevalence and molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in pigs in Henan, China, *Parasitol Res*, 107, 1489-1494 (2010).
- 24) Wieler LH, Ilieff A, Herbst W, Bauer C, Vieler E, Bauerfeind R, Failing K, Klös H, Wengert D, Baljer G, Zahner, H: Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in southern Germany, *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 48, 151-159 (2001).
- 25) Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, Fayer R, Lal AA: Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus, *Appl Environ Microbiol*, 65, 1578-1583 (1999).
- 26) Yoshiuchi R, Matsubayashi M, Kimata I, Furuya M, Tani H, Sasai K: Survey and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in owned companion animal, dogs and cats, in Japan, *Vet Parasitol*, 174, 313-316 (2010).
- 27) Yui T, Shibahara T, Kohmoto M, Yamashina H, Yoshida T, Fukuda M, Watanabe Y, Kubo M: 2010. Detection of *Cryptosporidium parvum* pig genotype II and *Cryptosporidium suis* from growing-fattening pigs infected with porcine circovirus type 2, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in growing-fattening pigs, *J Jpn Vet Med Assoc*, 63, 61-68 [in Japanese] (2010).
- 28) Yui T, Shibahara T, Kon M, Yamamoto N, Kameda M, Taniyama H: 2014. Epidemiological studies on intestinal protozoa in pigs in Saitama Japan, *JARQ*, (2014).
- 29) Zintl A, Neville D, Maguire D, Fanning S, Mulcahy G, Smith HV, De Waal T: Prevalence of *Cryptosporidium* species in intensively farmed pigs in Ireland, *Parasitology*, 134, 1575-1582 (2007).

16 大腸菌が関与した肉用鶏における *Mycoplasma gallisepticum* 感染事例

熊谷家畜保健衛生所

○田嶋 径佳・宮本 賢一・山田 均

中央家畜保健衛生所

荒井 理恵・平野 晃司

I はじめに

鶏マイコプラズマ病は、*Mycoplasma gallisepticum* (MG)、*Mycoplasma synoviae* (MS) の感染によって引き起こされる比較的伝染性の強い慢性呼吸器病であり、日本では、鶏及び七面鳥の MG、MS 感染症を家畜伝染病予防法の届出伝染病に指定している。一般に、MG あるいは MS による単独感染鶏は、不顕性に経過するが、他の細菌あるいはウイルスとの複合感染ならびに飼育環境条件の悪化などが誘因となって発症し、異常呼吸音、咳、鼻汁漏出、眼窩下洞炎および重度の気嚢炎を伴う慢性呼吸器障害を呈する¹⁾。

今回、管内の肉用鶏農場で、異常呼吸音を呈し死亡鶏が増加した事例を、大腸菌が関与した MG 感染症と診断したので、その概要を報告する。

II 発生概要

1 農場の概要

当該農場は平飼いの開放鶏舎が7鶏舎あり、各鶏舎内は東西で大きく2区画に仕切られており、1ロット約2,000~2,400羽ずつ、合計8ロット約16,000羽の肉用鶏が飼育されていた。各区画に初生雛を導入し、約90日飼育して出荷、オールアウト後は、敷料を鶏舎内で堆肥化し次の飼育時に敷料として利用していた。ワクチンは初生で鶏痘、マレック病、鶏伝染性気管支炎 (IB)、30日齢でニューカッスル病 (ND) が接種されていた。

2 発生概要

1号鶏舎の西側1区画において、95日齢の一鶏群に2012年12月下旬から呼吸器症状が認められた。通常、各区画の1週間の死亡羽数は約10羽であるが、このころから徐々に増え始め、翌年1月に入って1週間の死亡羽数が65羽となり、1月7日に家畜保健衛生所に通報があり、病性鑑定を実施した。同日立ち入り時の症状は、ゴロゴロという異常呼吸音、発咳、うずくまりが認められた。また、1号鶏舎の東側1区画においても軽度の異常呼吸音が認められたが



※()内は日齢

図1 鶏舎配置図

死亡羽数の増加は認められなかった。なお、隣接する他の鶏舎では、呼吸器症状や死亡羽数増加などの異常は認められなかった。

Ⅲ 材料及び方法

病性鑑定の材料としては、1号鶏舎の西側1区画の発症鶏3羽、死亡鶏1羽を供した。

1 病理学的検査

病理解剖の後、主要臓器等を10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、常法に従いパラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った。また、気囊については、グラム染色を行った。

2 細菌学的検査

一般細菌は、病鶏4羽の肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、脳、心囊水、気囊拭いおよび直腸内容を5%羊血液加寒天培地(CO₂培養、48時間)およびDHL寒天培地(好気培養、24時間)に直接塗抹し、分離培養した。分離大腸菌については一次性状を確認後、簡易同定キット(アピ20E;日本ビオメリュー)により同定した。さらに、大腸菌株の薬剤感受性試験を一濃度ディスク拡散法で実施した。

マイコプラズマは、病鶏4羽の気管スワブ、肺乳剤および気囊拭いを材料に、Freyの培地を用い、常法に従い分離培養した²⁾。また、分離に用いたのと同じ材料からインスタジーンマトリックス(BIO-RAD社)によりDNAを抽出し、MG及びMS特異的PCR法を行った³⁾⁴⁾。

3 ウイルス学的検査

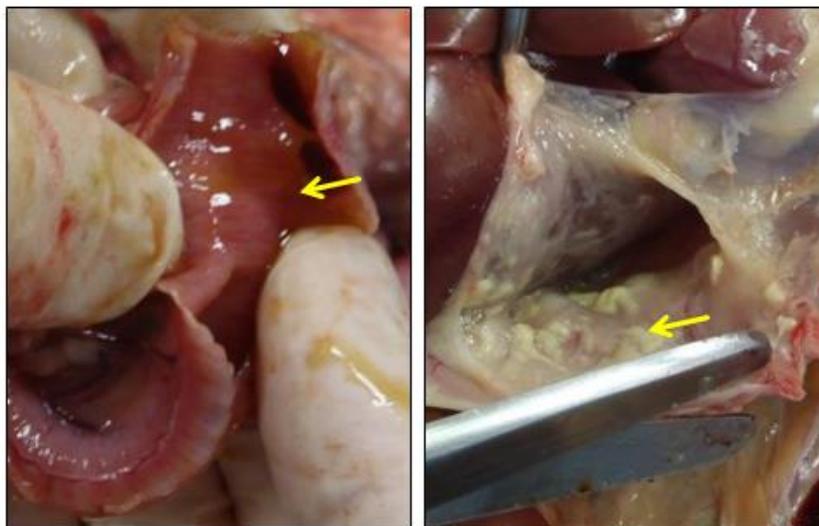
農場立ち入り時に、発症鶏3羽、死亡鶏3羽の気管スワブを材料とし、鳥インフルエンザウイルス(AIV)迅速診断キット(エスプラインAインフルエンザ;富士レビオ株式会社)を実施した。ウイルス分離は病鶏4羽の気管、直腸、肺の10%乳剤を作製し、9~11日齢の発育鶏卵尿膜腔内に接種し2代培養(5~7日間)した。なお、気管、直腸については2代5日間培養後、赤血球凝集試験(HA試験)を実施した。さらに気管、肺については漿尿膜上接種を実施し、5日間培養後、ポック形成の有無を確認した。また、発症鶏3羽の気管スワブと直腸スワブを材料として、AIV、ニューカッスル病ウイルス(NDV)特異的RT-PCR検査⁵⁾⁶⁾を、発症鶏3羽と死亡鶏1羽の気管スワブ、肺、腎臓を材料として、IBウイルス(IBV)特異的RT-PCR検査⁷⁾を実施した。

Ⅳ 成績

1 病理学的検査成績

(1) 剖検所見

気管内に血液または粘液の貯留が2羽で認められ、そのうち1羽に肺表面の白濁と一部黄白色化、気囊の肥厚と中にチーズ様物の貯留が認められた。心囊水の貯留が3羽に認められ、そのうち1羽は心外膜全体に白色の付着物が認められた(図2)。



気管:粘液の貯留

気嚢:肥厚及びチーズ様物の貯留

図2 剖検所見

(2) 病理組織学的所見

化膿性気管支炎と化膿性気嚢炎が主な病変であった。気管では、リンパ濾胞過形成とリンパ球浸潤により粘膜固有層が肥厚し、偽好酸球の浸潤や杯細胞の活性化もみられた(図3)。肺では、1次気管支は、粘膜固有層にリンパ濾胞過形成により気管支腔内の狭小化が認められた。2次、3次気管支腔内は、偽好酸球の浸潤や細胞退廃物が貯留し、重度病変部では肺の固有構造が消失していた(図4)。気嚢では、線維芽細胞の増生による気嚢壁の顕著な肥厚と、気嚢内に偽好酸球の高度な浸潤と細胞退廃物の貯留が認められ、軽度から中程度、グラム陰性の桿菌を伴っていた(図5)。また、偽好酸球とリンパ球が軽度に浸潤し化膿性心外膜炎が認められた。

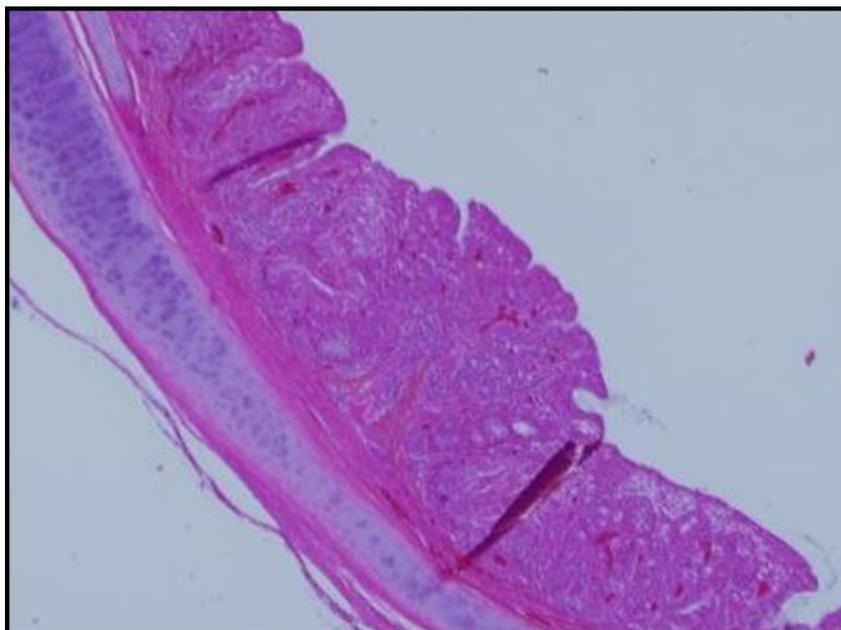


図3 気管 (HE 染色) : リンパ濾胞過形成とリンパ球浸潤による気管粘膜の肥厚

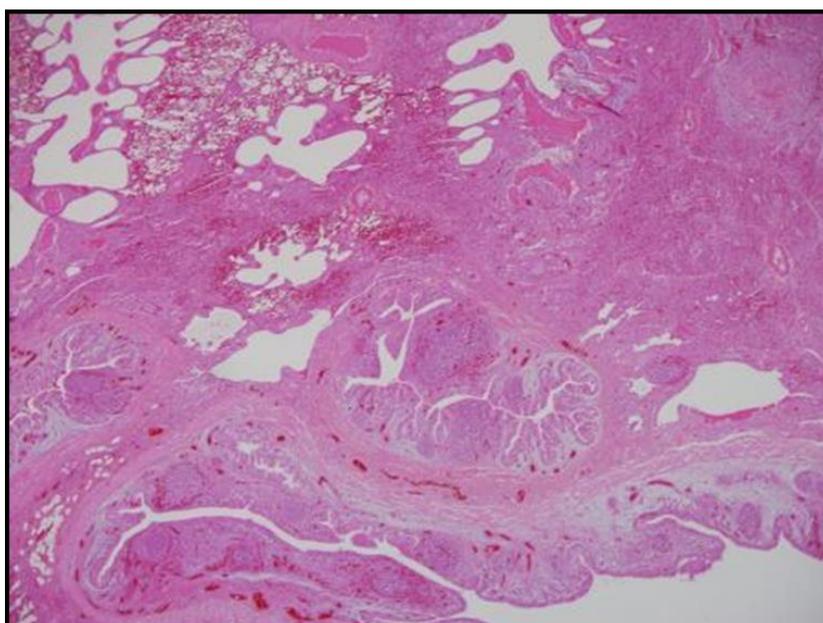


図4 肺 (HE 染色) : 1次気管支腔は、粘膜固有層のリンパ濾胞過形成による狭小化、偽好酸球浸潤と細胞退廃物の貯留により肺の固有構造が消失

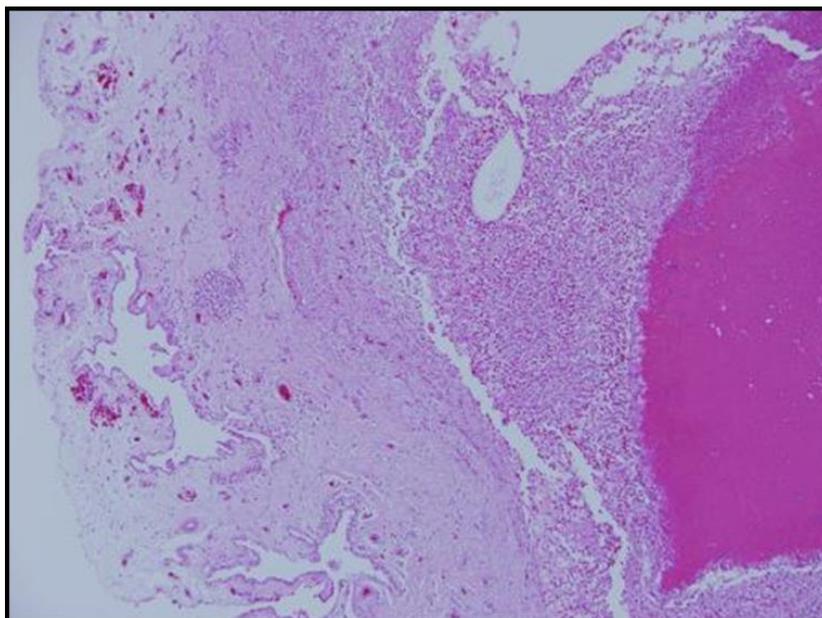


図 5 気嚢 (HE 染色) : 線維芽細胞増生による気嚢壁の顕著な肥厚と気嚢内の偽好酸球の高度な浸潤

2 細菌学的検査成績

ほとんどの主要臓器、心嚢水および気嚢拭いから大腸菌が分離された(表 1)。分離大腸菌株の薬剤感受性パターンは全ての供試株で同一であり、供試した 11 薬剤中ペニシリン系およびテトラサイクリン系の 4 薬剤に耐性が認められた(表 2)。マイコプラズマ PCR 検査では、発症鶏①の気管スワブと、発症鶏③の気管スワブ、肺乳剤、気嚢拭いから MG 特異遺伝子が検出された。分離培養では、全ての発症鶏の気管スワブ等から、中等量から多量に MG が分離された(表 3)。

表 1 細菌分離成績

由来	培地条件	肝脾腎	心臓	肺	脳	心嚢水	気嚢拭い	直腸内容
発症鶏①	BA(CO ₂)	++	-	NT	-	-	NT	NT
	DHL	++	-	NT	-	-	NT	+++
発症鶏②	BA(CO ₂)	++	++	+++	-	+++	NT	NT
	DHL	++	++	+++	-	+++	NT	+++
発症鶏③	BA(CO ₂)	-	-	++	-	-	+	NT
	DHL	-	-	++	-	-	++	+++
死亡鶏④	BA(CO ₂)	+++	+++	+++	+++	NT	NT	NT
	DHL	+++	+++	+++	+++	NT	NT	+++

+++:多量 ++:中等量 +:少量 -:陰性 NT:未実施
 ※分離された菌は全て大腸菌

表2 薬剤感受性試験成績

由来	ABPC	AMPC	CEZ	KM	OTC	DOXY	GL	SMX-TMP	OFLX	NFLX	ERFX
発症鶏① 肝	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S
発症鶏② 肺	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S
発症鶏③ 肺	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S
死亡鶏④ 肝	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S

S:感性 R:耐性 ※菌種は大腸菌

表3 マイコプラズマ検査成績

由来	材料	PCR		分離培養	
		MG	MS	直接塗抹	増菌培養
発症鶏①	気管スワブ	+	-	++	+
発症鶏②	気管スワブ	-	-	++	+
発症鶏③	気管スワブ	+	-	+++	+
	肺乳剤	+	-	+++	+
	気嚢拭い	+	-	+++	+
死亡鶏④	気管スワブ	-	-	-	-

+++:多量 ++:中等量 +:少量(PCR法は陽性) -:陰性
 直接塗抹:Freyの寒天培地(CO₂)
 増菌培養:Freyの液体培地(好気)→Freyの寒天培地(CO₂)
 ※分離培養された菌は全てMG

3 ウイルス学的検査成績

AIV 迅速診断キットは陰性であった。ウイルスは分離されず、RT-PCR 検査において、AIV、NDV 及び IBV に特異的な遺伝子は検出されなかった。

V まとめおよび考察

今回、検査に供した発症鶏全ての気管スワブから MG が中等量から多量に分離され、気管スワブと気嚢拭い等から MG 特異遺伝子が検出された。

一般に、MG や MS は単独感染しても健康な鶏では臨床症状を示さず発病しないが、他の微生物との複合感染や飼育環境の悪化などのストレスによって臨床症状を示し、病勢が悪化することが知られている。まれだが、MG 単独発症が死亡の原因となった可能性が示唆される報告⁸⁾もあり、複合感染としては、野外では *Avibacterium (Haemophilus) paragallinarum*⁹⁾ や大腸菌の感染¹⁰⁾、強毒な伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスの感染¹¹⁾

による免疫抑制に起因する場合、生ワクチンウイルス (ND と IB¹²⁾) やアンモニアによる粘膜の損傷¹³⁾に起因する場合が知られている。

今回はさらに、主要臓器から大腸菌が分離され、病理組織学的にも化膿性気嚢炎や化膿性心外膜炎が認められたため、発症要因に少なからず大腸菌が関与していると考えられた。鶏に病気を起こす大腸菌は鶏病原性大腸菌 (APEC) と呼ばれ、上皮細胞付着性、血清抵抗性、鉄捕捉因子、血清抵抗性因子、毒素など多くの病原因子を保有する株が多い¹⁴⁾。今回分離株の病原性を正確に評価するためには、これら病原因子の検索が必要であると考えられる。

環境要因では、呼吸器症状が認められた 12 月下旬ころから農場周辺の外気の最低気温は氷点下を示す日が続いており、寒さによるストレスが考えられた。また寒さ対策でカーテンを締め切っており、発生時鶏舎内は、敷料に使用している戻し堆肥の塵埃が舞い上がるような乾燥した状態で、かつ軽度にアンモニア臭を感じたことから、鶏舎内飼育環境の悪化が考えられた。また当該農場では通常鶏舎内はオールアウト後水洗のみで消毒はしておらず、不適切な飼養管理も考えられた。

以上の結果から、今回、呼吸器症状を示し死亡羽数が増加した要因としては飼育環境の悪化により MG の病勢が悪化し、さらに常在する大腸菌が混合感染し重篤化したと考えられた。また、当該農場は、抗生物質や合成抗菌剤を基本的に使用しない飼養形態であり、ワクチンも最低限しか接種しないため、MG ワクチンが未接種であったことも発症要因の一つとして考えられた。

鶏マイコプラズマ病の感染予防対策としては、介卵感染並びに気道感染による鶏群へのマイコプラズマの伝播を防止することが基本であり、さらに、その他の感染症や環境要因の悪化による重篤化を防止する必要がある。そのためには、呼吸器病予防を目的とした適切なワクチンプログラムや、適切な鶏舎内環境を維持するように指導することが重要である。

当該農場に対してはその後の対策として、鶏舎の水洗後の消毒実施を指導し、また、通常の衛生管理として、若齢鶏から管理するといった鶏舎内管理の順番の変更や、各鶏舎における手指や長靴消毒の徹底などを指導したところ、当該鶏舎のみの発生で終息し、その後発生はみられてない。

VI 引用文献

- 1) 佐藤静夫, 片山宜朗: 鶏のマイコプラズマ病の現状と防疫. 鶏病研報 48 巻 2 号, 63-84 (2012)
- 2) 全国家畜衛生職員会, 病性鑑定マニュアル, 第 3 版, 338-340 (2008)
- 3) Kiss, I. et al.: Detection and identification of avian mycoplasmas by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism assay, Vet. Microbiol., 58, 23-30 (1997)

- 4) Lauerma, L. H. et al. : Development and application of a polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae*, *Avian Dis.*, 37, 829-834 (1993)
- 5) Lee, M. S., P. C. Chang, J. H. Shien, M. C. Cheng, and H. K. Shieh. : Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR, *J Virol Methods*. 2001 ; 97(1-2) : 13-22.
- 6) Mase M, Inoue T, Imada T. Genotyping of Newcastle disease viruses isolated from 2001 to 2007 in Japan. *J Vet Med Sci.* ; 71 : 1101-1104. (2009)
- 7) Mase M, Tsukamoto K, Imai K, Yamaguchi S. Phylogenetic analysis of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Japan. *Arch Virol.* ; 149 : 2069-2078. (2004)
- 8) 小高真紀子, 深水大, 石田剛, 小河大輔, 横山敦史, 芝原友幸 : 肉用鶏における *Mycoplasma gallisepticum* の野外感染例, *日獣会誌*, 66, 474-478 (2013)
- 9) Kato K : Infectious coryza of chickens. V. Influence of *Mycoplasma gallisepticum* infection on chicken infected with *Haemophilus gallinarum*, *Natl Inst Anim Hlth Q.* 5, 183-189 (1965)
- 10) Ando K : Respiratory mycoplasmosis in chickens [in Japanese], *Natl Inst Anim Hlth Q*, 62, 108-121 (1971)
- 11) Naoya T, Yagihashi T, Tajima M, Nagasawa Y : Occurrence of keratoconjunctivitis apparently caused by *Mycoplasma gallisepticum* in layer chickens, *Vet Pathol*, 32, 11-18 (1995)
- 12) Nonomura I, Sato S, Syoya S, Shimizu F, Horiuchi T : Multiplication of *Mycoplasma gallisepticum* and Newcastle disease virus B1 strain in the respiratory tract of chickens, *Natl Inst Anim Hlth Q*, 11, 1-10 (1971)
- 13) Sato S, Shaya S, Kobayashi H : Effect of ammonia on *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens, *Natl Inst Anim Hlth Q*, 13, 45-53 (1973)
- 14) 秋庭正人, *医学のあゆみ*, 医歯薬出版株式会社, 235 巻 4 号, 345-350 (2010)

17 彩の国ふれあい牧場の現状と課題

秩父高原牧場

○宇田川 浩一・田島 敏・鉢須 桂一

1 はじめに

平成9年度に、秩父高原牧場の一部に開設された「彩の国ふれあい牧場」は、これまで、県民へ酪農や畜産の情報発信、牧場体験および癒しの場を提供してきた。平成18年度からは、「牧場花いっぱい運動」を開始し、その結果、来場者が増加して現在では推定で年間40万人以上が牧場を訪れている。今では、地域の観光資源の一つとして、地元の活性化にも貢献している。

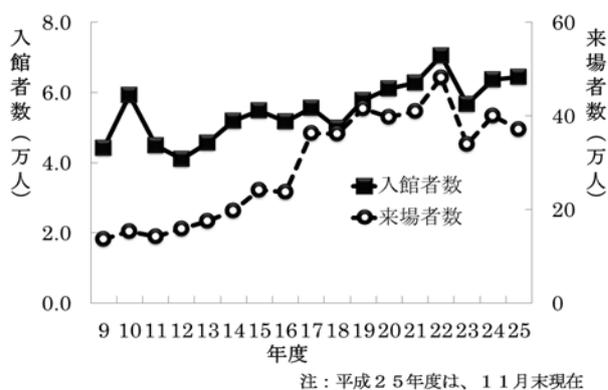


図1 モーモーハウス入館者数と来場者数

今回、牧場の現状や取り組みについて、乳製品手作り体験実習、イベントの開催、展示施設等の改善の3項目及び来場者のアンケートなどから今後の課題を検討した。

2 彩の国ふれあい牧場の現状と取り組み

(1) 乳製品手作り体験実習

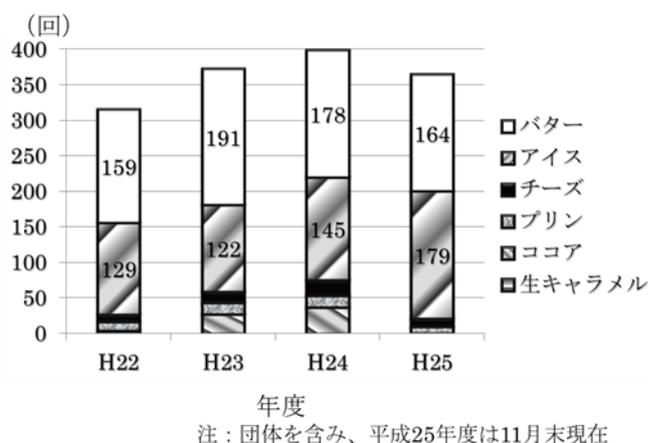


図2 乳製品手作り体験実施回数

1日当たりの実施回数を増やしたためであり、最近では、合計で年間400回程度実施

図1に展示館の「モーモーハウス」の入館者数と推定来場者数の開設からの推移を示した。入館者数および来場者数は、開設当初から年々増加し、平成23年度は震災の影響により減少したが、最近では入館者数が年間6万人以上、来場者数は年間約40万人以上となっている。

今回、牧場の現状や取り組みについて、

展示施設等の改善の3項目及び来場者の

乳製品手作り体験実習（以下、手作り体験）は、3月から12月の間の土曜・日曜・祝日には一般の方を、平日には団体を対象に実施している。現在実施しているメニューは、バター、アイスクリーム、チーズ、プリン、ミルクココアである。図2は、手作り体験の過去4年間の実施回数の推移を示す。年々増加傾向にあるが、これは参加希望者が多くなってきたため、バターやアイスクリームの

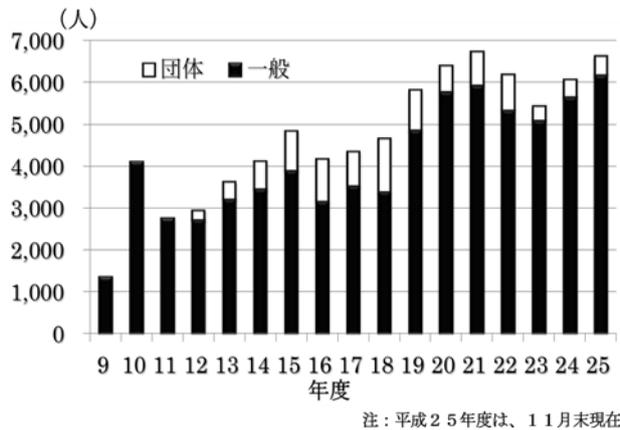


図3 乳製品手作り体験の参加者数

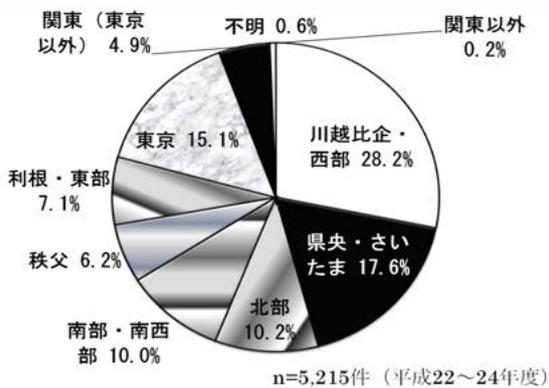


図4 乳製品手作り体験参加者の住所

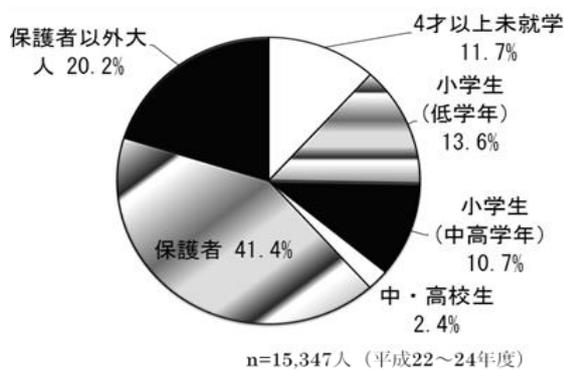


図5 乳製品手作り体験参加者の年齢

している。

図3は、開設からの手作り体験の参加者数の推移を示す。参加者は年々増加傾向にあり、最近では、年間6,000人以上が参加している。平成23年度は震災の影響で減少したが、その後は一般参加者が増加している。一般参加者が申し込みをする際に実施しているアンケートの過去3年間の結果を集計した。参加者がど

こから来たかの問いには、図4のように川越比企・西部地域が28.2%と最も多く、次いでさいたま・県央地域が多かった。県内の参加者が約80%だったが、東京を中心に県外からの参加者が20%以上であった。参加者の年齢層は、図5のように保護者を含めた小学生以下の家族連れが約80%を占めていた。

若い家族連れが多いため、最近では手作り体験の中で、紙芝居を活用して食と命の大切さを伝える取り組みを行っている。通常の実習では、「牛の一生」の紙芝居を通じて、乳牛の育成牧場の役割や酪農家に戻ってから出産して牛乳が出来ること、雌の乳牛は6~7歳で命を終えてお肉になることを伝え、イベントなどの際には、「いのちをいただく」という紙芝居を行い、食肉加工センターで働くお父さんの実話を通じて、食事のあいさつ「いただ



写真1 紙芝居とその様子



写真2 新聞・HPによる紹介

きます」の深い意味を伝えている(写真1)。この取り組みについては、平成24年8月1日付の埼玉新聞「ふるさとの食と農キャンペーン」で取り上げられ、新聞やHP(http://www.re-na.com/shokuno/closeup/2012_08.html)で紹介された(写真2)。

(2) イベントの開催

牧場では、春から秋にかけて、牧場春まつり(ゴールデンウィーク、5～7日間) 天空を彩るポピーまつり(5月中旬～6月上旬の土・日曜の計6日間)、牧場秋まつり(10月中旬の連休、2～3日間)、県民の日牧場まつり(11月14日前後、1～2日間)の各イベントを実施している。

ア) 天空を彩るポピーまつり

牧場最大のイベントの「天空を彩るポピーまつり」

は、平成20年度から地元地域や関係機関で構成する彩の国ふれあい牧場連絡協議会主催により開催しており、今年度で6回目となる。ポピーまつり会場は、昨年度、臨時駐車場の牧草地の管理道やポピー畑周囲の遊歩道

を整備し、来場者が観賞しやすくなった。まつり期間の土曜日、日曜日には地元地域物産や県内産畜産物の販売で賑わい、地元のお囃子もまつりを盛り上げている。図6は、過去6回のポピーまつり期間中の来場者数と約1カ月間の開花期間中の来場者数およびまつり会場と直売所のまつり期間の物産販売額の推移を示す。当初は4日間だったポピーまつり期間は、23年度から開花時期のずれを防ぐために6日間に増やしたため来場者が増加している。今年度は天候にも恵まれてまつり期間に約4万4千人、開花期間に8万7千人が来場した。22年度に来場者が過去最も多いが、これはNHKのテレビ放送による影響である。23年度からのまつり期間の来場者の増加にともなって販売額も増加し、今年度は過去最高の約700万円の販売額だった。

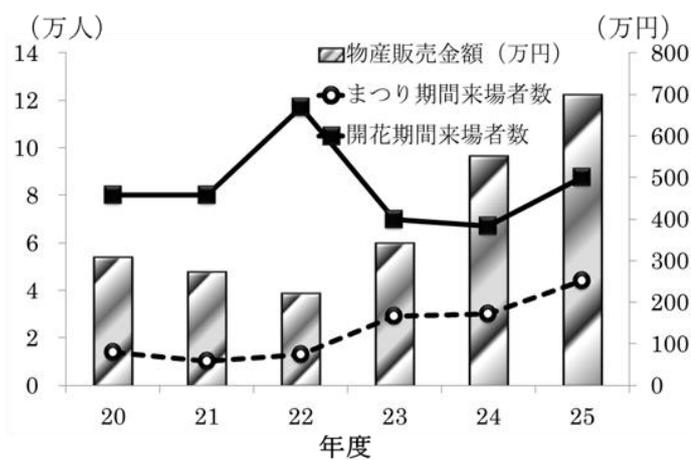


図6 「天空を彩るポピー」来場者数と物産販売額

イ) 春・秋まつり、県民の日まつり

ゴールデンウィークに開催している春まつり、10月の秋まつり及び県民の日まつりでは、ウサギ・ヤギ・ヒツジのえさやり体験の他、昨年秋から、牧場内の材料を用いて約3mの高さのヤギの橋を作り、「天空のヤギ橋わたり」というイベントを開催している。また、春や秋まつりでは展望広場で、仮設テントによる県内畜産物の販売も行って賑わい、直売所付近はクルマがあふれて大渋滞となる。

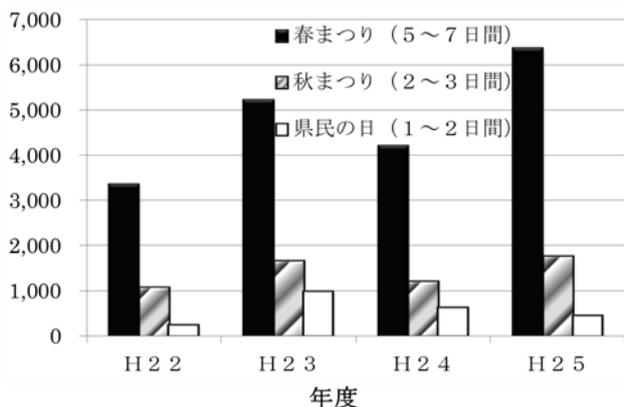


図7 各イベントの参加者数

モーモーハウス内では秋まつりで、埼玉県牛乳普及協会及び埼玉新聞社と連携して、元酪農家でシンガーソングライターのミルクおやじライブとバターづくりなどのイベントを開催している。今年の秋まつりでは、プロモーションビデオの撮影会も行われた。また、春や秋まつりではウシやウサギのお面作りを行い、県民の日には地元皆野町の講師を招き、牧場にある木の実等を素材にした自然工作

教室も開催している。図7は、各イベントの参加者の過去4年間の推移である。参加者は増加しており、今年度のゴールデンウィークは7日間開催し天候にも恵まれて6,000人以上がイベントに参加した。また、秋まつりにも2,000人近くが参加した。

(3) 展示施設等の改善

展示館のモーモーハウスは開設から17年を経過し、使用不能となった展示物が多くなってきた。このため職員手作りの本棚を置き、絵本コーナーを設置した。動物や食育に関する絵本を中心に、寄付や古本の購入により、現在200冊以上の絵本がある。絵本コーナーにはマットを敷いて親子でくつろげるようにし、職員からの寄付により、ベビーベッドも設置した。

また、高価な双方向でクイズ等ができた映像装置の「まきばシアター」が故障し修理不可能となったため、既存のスクリーンやミラー、スピーカー等を利用し、安価なプロジェクターやDVDプレーヤーを購入して牛の出産やポピーなどの映像を随時放映している。その他、ふれあい動物施設の手作りによる改善として、ふれあい広場の消毒槽(23年度)、ヒツジのふれあいスペース(22年度)を設置した。また、場内から切り出した間伐材を利用し、老朽化したヒツジ放牧場の屋根の建て替え(24年度)やふれあい広場の牧柵交換(22,23年度)を行った。

3 来場者のアンケート調査結果

ふれあい牧場に対する来場者の意向を把握するため、今年度、春まつりや秋まつりで、アンケート調査(回答335人)を実施した。まず、牧場にきた目的について複数回答で聞いた結果(図8)、動物とのふれあいを目的とした方が65%以上と最も多く、次いで景色を眺めるために来た方が40%以上と多いことがわかった。次いでバター作り体験、イベント参加、乳製品や地元物産の購入を目的とする方が多かった。(図8)

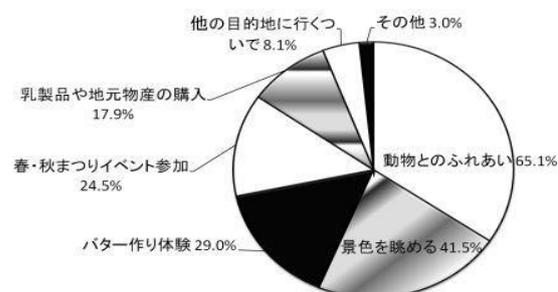


図8 イベント時の来場者の目的

ふれあい牧場全体の印象としての満足度については、とても満足した(61.5%)、まあまあ満足した(31.6%)方を合わせて90%以上であった。理由として、無料のふれあい動物へのえさやり体験で子供が喜んだこと、景観が素晴らしく、自然に癒されたなどの記述が多かった。

今後はどのような牧場にすべきか、選択による複数回答可で来場者の意向を聞いた結果、モーモーハウスの改修や乳製品手作り体験の充実(32.8%)、ふれあい動物施設の改修やふれあい体験の充実(31.0%)、県内産畜産物の販売や飲食施設の充実(30.7%)、搾乳牛を導入して乳搾り体験の実施や牧場産乳製品の販売(30.7%)の4項目が30%以上と多く、次いで花による景観の充実(25.1%)が多かった。食育活動や野外活動などの研修施設建設(6.0%)を希望する方は少なかった。しかし、民間委託により観光牧場に転換して様々な体験メニューを増やすことを選択した方は5.4%に過ぎず、逆に現状のままでよいという方が20.6%もいた。これらのことから、来場者は、ふれあい体験や飲食を含めた販売施設の充実を求めている一方、素朴で安価に楽しめ、景観や自然による癒しを与える現在の牧場から変化すべきでないという意向もあることが確認された。

4 今後の課題

以上の現状やアンケート結果などから今後の課題を考察した。

現在も進んでいるアクセス道路の拡幅により、今後さらに来場者が増加すると思われる。地元からは、東京方面から秩父地域への観光中継地点として牧場は期待されている。このため、今後、観光バスが来場した時の対応として、駐車場、トイレ、浄化槽、給水施設、休憩所等のインフラ整備が急務と考えられる。また、来場者の要望に答えるためには民間活力による県内畜産物の販売や飲食施設の整備も望まれる。さらに、老朽化したふれあい動物施設の改修や衛生面及び安全面からの視点による来場者の導線の見直しを検討すべきと思われる。

今後は、モーモーハウスの改修により充実度アップを図り、県内の酪農や畜産の情報に加えて、食と命の大切さを伝える食育の情報発信基地としての活用にも積極的に取り組むべきと考えられる。

18 おいしい黒豚を食卓へ

～先端技術を用いた効率的な繁殖方法～

農林総合研究センター畜産研究所

○中村 嘉之

I はじめに

埼玉県内で生産される黒豚は、英国産純粋種をもとに改良された伝統ある県内ブランド畜産物である。しかし、種豚の入手が困難であるため、農家において血縁の更新が来ず経営上大きな問題となっていた。そこで、H21年12月に英国から黒豚純粋種（雄2頭、雌4頭）を導入し、繁殖性や産肉性の能力評価、食味試験を実施するとともに、優良種豚候補豚を県内農家に払下げを実施した。また、先端繁殖技術を利用した貴重な遺伝資源保存方法や活用方法の開発を行った。

II 材料および方法

1 繁殖及び産肉能力評価

導入した黒豚純粋種を用いて、繁殖形質においては、一腹産子数および、平均離乳頭数、育成率、産肉形質においては、肉色、脂肪色、1日平均増体重(DG)、背脂肪厚(BF)、飼料要求率(FC)、出荷日齢、歩留まりについて県産黒豚と比較調査した。

2 食味試験

110kgまで育成した去勢肉豚を用いて、ロースおよびバラ肉を用いて、焼き肉および、しゃぶしゃぶで食味試験を実施した。30～60代の男女37名のパネリストにアンケート調査を行った。

3 農家への英国系種豚候補豚の払い下げ

平成22年度より、英国純粋種より生産された子豚から、生後2ヶ月齢および8ヶ月齢で資質の優れた種豚候補豚を2回選抜し、県内農家へ払下げを実施した。

4 超少量凍結精液の人工授精方法(MFSAI法)の開発

英国産黒豚より採精し凍結保存した精子を融解後に遠心分離処理し、耐凍剤を除去した後子宮深部に注入することで、従来の171分の1量の精子数3.5億個での受胎・分娩が可能か調査した。レシーピエントには、離乳後に自然発情した県内産黒豚純粋種計6頭を用いた。

5 体外受精卵作製技術の開発

食肉処理場でと殺された豚の卵巣から卵子を採取し、導入豚2頭から採取し凍結保存した精子を用いて体外授精を行った。体外授精時間および媒精用カフェイン濃度を常法

(3h, 5mM) をコントロール区として改良区 (5h, 5mM) と胚盤胞発生率を比較した。

III 成績

1 繁殖及び産肉能力評価

繁殖能力においては、産子数および平均離乳頭数が県産×県産の産子数が最も低く、英国×英国、英国×英国 F1 の組み合わせが有意に高かった。育成率において、有意な差は認められなかった (表 1)。

表 1 組合せによる繁殖成績

組合せ(♂×♀)	産子数	平均離乳頭数	育成率(%)
英国×英国	8.5 ^a	7.1 ^a	84
英国×英国 F1	9.0 ^a	8.0 ^a	89
英国×県産	8.7	7.8	90
県産×県産	7.0 ^b	6.1 ^b	81

縦列異符号間に有意差あり (p<0.01)

産肉能力においては、英国産黒豚が県産黒豚と比較して、DG が 137g 多く、出荷日齢も 29 日有意に短縮することが明らかとなった (表 2)。

表 2 英国産黒豚及び県産黒豚の産肉成績

品種	肉色*	脂肪色*	DG(g)	BF(cm)	FC(kg)	出荷日齢	歩留り(%)
英国産	4.2	1.0	587 ^a	3.9	4.9	216 ^a	84
県産	4.0	1.2	450 ^b	3.8	5.1	245 ^b	82

縦列異符号間に有意差あり (p<0.05)

*畜試式豚標準肉色・脂肪色により評価

2 食味試験

9 割以上のパネリストが味や柔らかさで、3 元交雑豚と比較して「大変良い」、もしくは「良い」と評価した (図 1)。

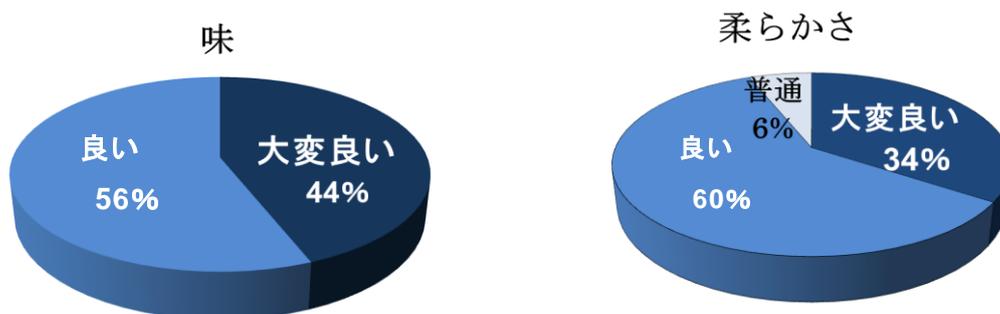


図 1 食味試験結果

3 農家への英国系種豚候補豚の払い下げ

平成22年度～26年度までに黒豚生産農家12戸へ繁殖用種豚52頭(雄13頭、雌39頭)、子豚53頭の計105頭を配布した。

4 超少量凍結精液の人工授精方法(MFSAI法)の開発

6頭の県内産黒豚にMFSAI法を実施した結果、5頭が受胎し(受胎率83%)、計31頭の子豚が誕生した(表3)。本手法の開発により、1回の射出精液から約170回の人工授精が可能となった(表4)。

表3 英国産黒豚及び県産黒豚の産肉成績

人工授精方法 (注入精子数/注入液量)	受胎・分娩率(%) (分娩頭数/AI頭数)	総産子数 (頭)	平均産子数 (頭)
従来法(50億/50ml)	33.3 ^a (2/6)	10	5
MFSAI法(3.5億/1ml)	83.3 ^b (5/6)	31	6.2

縦列異符号間に有意差あり(p<0.05)

表4 射出精液1回当たりの利用効率

授精方式	使用精液	精子懸濁液 注入量(ml)	精子数密度 (億/ml)	1回の注入 精子数(億)	1回の射出精液か ら利用できる 繁殖回数
自然交配	生精液	200	3.0	600	1
人工授精	生精液	70	0.5～3.0	35～210	3～17
人工授精	凍結精液	50～70	0.7～1.0	50	12
MFSAI	超少量凍結精液	1	3.5	3.5	171

5 体外受精卵作製技術の開発

体外授精時間および媒精用カフェイン濃度を3時間、2mMから、5時間、5mMにすることで、胚盤胞発生率が5.2%が19.7%、12.0%から21.3%に有意に向上した(表5)。

表5 体外授精条件による胚盤胞発生率

用いた凍結精液	コントロール区 (%)	改良区 (%)
Cuckley Namatojira 853	5.2 ^a	19.7 ^b
Kiplin Ambassdor 4	12.0 ^a	21.3 ^b

横列異符号間に有意差あり(p<0.05)

IV まとめおよび考察

英国から導入した英国産黒豚の繁殖および産肉成績は、県産黒豚より優れ、食味も優れていた。平成22年度から現在までに、県内農家に繁殖用種豚として52頭が供給され、現在も供給中である。当所から払下げされた、種豚は広く県内で血縁更新に活用され、近交退化による生産性の低下を阻止し、疾病の排除などに寄与しているものと思われる。超少量凍結精液の人工授精方法(MFSAI法)の開発においては、日本で初めて、超少量の凍結精液から子豚の生産に成功した。凍結精液を融解後に遠心分離処理し、精子密度を濃縮した精子懸濁液を子宮角深部に注入することで、超少量の凍結精液で受胎・分娩が可能であった。本技術は自然発情豚に利用が可能で、人工授精前のホルモン処置による排卵の同期化や、融解後の精子懸濁液に化学物質等を添加する必要がない。実証試験時には、超少量の凍結精子が子宮角の片側のみに注入されるので、両側から排卵される卵子と受精出来ずに、受胎率や産子数の低下が懸念されたが、今回その影響は認められず、受胎率の向上が認められた。いまのところまだ例数が少なく、品種も限られているため、様々な品種において、引き続き調査を続ける必要があると思われる。

今後、融解後の生存性の高い凍結・融解方法を開発し、精子のダメージがより少ない方法で耐凍剤などの除去が出来れば、さらに精子の少量化が期待できる。本技術を活用することで、自然交配や精液採取に必要な種雄豚の飼養頭数を縮減できれば、その導入や飼育にかかるコストを大幅に低減できる可能性がある。

V 参考文献

- 1) 丹羽太左右衛門 監修(1989):豚凍結精液利用技術マニュアル,日本家畜人工授精師協会発行.
- 2) Martinez, EA., et al., (2002) Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows. *Reproduction* 123:163-70.
- 3) Roca J. et al., (2003) Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology* 60(1):77-87.
- 4) Wongtawan T. et al., (2006) Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semen doses. *Theriogenology* 65(4):773-87.
- 5) 鈴木千恵, (2009) 新たに開発した豚子宮深部注入カテーテルを用いた人工授精の実用化試験. *日本獣医師会雑誌*. 62(10). 752-54.
- 6) 岡崎 哲司, (2009) 精子保護剤と着床促進剤を用いたブタ凍結精子による人工授精法の開発. *畜産技術*. (655), 8-11.
- 7) Brussow KP. et al., (2011) Sperm migration in pig after deep intrauterine and intraperitoneal insemination. *J Reprod Jun* 57(3):342-5.