

令和3年度
第59回広島県畜産関係業績発表会
集 録

広島県農林水産局畜産課

令和3年度第59回広島県畜産関係業績発表会

1 目的

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

本冊子は、第59回広島県畜産関係業績発表会における発表全文を集録したものである。

2 主催

広島県農林水産局畜産課

3 開催方法

書面

4 開催日

令和4年6月20日に審査委員会を開催

5 発表者

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

6 発表内容

日常業務に基づく事業、調査、研究・開発等の業績

目次

I 畜産事務所（家畜保健衛生所）

- 1 管内一酪農家における牛伝染性リンパ腫清浄化に向けた取組
北部畜産事務所 渡久川 兼誉 … 1
- 2 高病原性鳥インフルエンザ発生後の当所管内における防疫体制強化の取組
北部畜産事務所 部屋 智子 … 6
- 3 広島県で発生した高病原性鳥インフルエンザの防疫対応
東部畜産事務所 品川 正臣 … 12
- 4 管内における蜜蜂の病性鑑定について
西部畜産事務所 朝倉 ひとみ … 17
- 5 牛から分離された*E. faecalis*についての一考察
西部畜産事務所 兼廣 愛美 … 20
- 6 愛玩鶏（矮鶏）に認められた糸状虫症
西部畜産事務所 細川 久美子 … 29
- 7 豚丹毒抗体検査に係る生菌凝集反応とELISAの比較検討
西部畜産事務所 船守 足穂 … 35

II 高等学校

- 8 ナイアシンを給与し乳牛を健康にする研究
広島県立西条農業高等学校 愛甲 結奏 … 39
- 9 プロジェクトZ ～短期肥育への挑戦！広島牛児の和牛革命！～
広島県立西条農業高等学校 西山 創太 … 43
- 10 昆虫の飼料化についての調査研究
広島県立庄原実業高等学校 片岡 菜月 … 47

III 広島県農業共済組合

- 11 広島県内フリーストール酪農場での牛マイコプラズマ性乳房炎発生事例
広島県農業共済組合東広島家畜診療所 高嶋 実和 … 52
- 12 温暖地域の福山地方における牛の受胎率と妊娠期間の調査
広島県農業共済組合府中家畜診療所 秋田真司 … 57

（注）

○：第63回中国・四国ブロック家畜保健衛生業績発表会 選出演題

管内一酪農家における牛伝染性リンパ腫清浄化に向けた取組

北部畜産事務所

○渡久川兼誉 河村美登里

はじめに

地方病性牛伝染性リンパ腫（以下 EBL）は、牛伝染性リンパ腫ウイルス感染による届出伝染病で、全身リンパ節の腫大、全身臓器での腫瘍形成を特徴とする疾病である¹⁾。令和元年には全国で4千頭以上発生²⁾するなど、近年、国内での発生が増加傾向にあり、その拡大が危惧されているが、ワクチンや治療法は存在せず生産現場で大きな問題となっている。

本ウイルスは EBL 陽性牛の血液や乳汁を介して水平及び垂直感染するため、清浄化対策には水平及び垂直感染対策の2点が必要となる³⁾。このうち、吸血昆虫を介した水平感染対策には、近年、ピレスロイド系成分を含有したポリエチレン製の防虫ネットによる対策が効果的であるとの報告⁴⁾が散見されているが、管内において防虫ネット対策を実施している農家はなく、多くの陽性農家では思うように清浄化対策が進んでいないのが実情であった。

今回、対策に苦慮する一酪農家において、令和2～3年度の2年間にわたり関係機関と連携のもと、一般社団法人広島県畜産協会の慢性感染症清浄化支援事業（以下、支援事業）を活用した取組を行い、一定の成果を得たので、その概要を報告する。

対象農家の概要

当該農家は、繋留対尻式牛舎で成牛約35頭を飼養する酪農家で、後継牛は自家生産の子牛を主体に確保し、育成は広島県酪農業協同組合の北海道預託事業を利用していた。農場は、田畑を抜けた小高い丘の上であり、風がよく吹く立地であった。

平成30年度の自主検査において、28頭中14頭が EBL 抗体陽性であったことを契機に、清浄化対策を開

始していた。

方法

(1) これまでの対策の整理及び課題の抽出

令和2年2月、当所と畜主で EBL 対策会議を開催し、当所が実施した平成30年度～令和元年度までの EBL 検査状況を取りまとめ、陽性牛の浸潤状況を確認した。また、畜主への聞き取りにより、これまで実施してきた具体的な対策について整理し、畜主とともに、農家周辺及び牛の飼養環境を確認した。これらの確認事項をもとに、農家の抱える課題を整理し、重点対策として次の2点の水平感染対策と、これらによる効果の確認を2年間継続することとした。

(2) 吸血昆虫対策

支援事業を活用し、吸血昆虫発生前の6月半ばに、日本全薬工業株式会社、広島県酪農業協同組合、一般社団法人広島県畜産協会等の関係団体、当所及び畜主と協力のもと、畜舎の窓や出入口等の開放部に、ピレスロイド系成分を含有した防虫ネット（ペルネット R6、日本全薬工業株式会社）を設置した。

(3) 陽性牛群対策

陽性牛と陰性牛は別区画で管理又は、両者間に空房を設けて飼育することとした。令和2年度は、口頭指導であったが、令和3年度は牛の配置図により、陽性牛と陰性牛の位置及び抗体陽転牛飼養場所を視覚化した。

(4) 効果の確認等

水平感染対策の効果確認のため、支援事業を活用して次の抗体検査及び遺伝子検査を実施した。

① 吸血昆虫発生前後の6月と11月の年2回、牛伝染性リンパ腫エライザキット（株式会社ニッポンジ

ーン) を用いて陰性牛全頭の抗体検査を実施し、陽性牛及び抗体陽転牛(以下、陽転牛)を把握した。

② 陽性牛は、リアルタイムPCR検査(岩手大学)により感染細胞率10%以上の高リスク牛を特定し、早期更新を指導した。

成績

(1) これまでの対策の整理及び課題の抽出

畜主は平成30年度から、EBL対策として、人工初乳給与及び陰性母牛からの後継牛育成等の垂直感染対策を実施していた。また、水平感染対策として、牛舎出入口や排水口等への忌避剤の散布、搾乳を陰性牛から行う等を実施してきた。しかし、これらの対策を実施していた平成30年～令和元年にかけては、EBL陽性率が50%を推移しており、畜主は、明確な効果を感じられず、今後の対策方針に行き詰っていた(図1)。

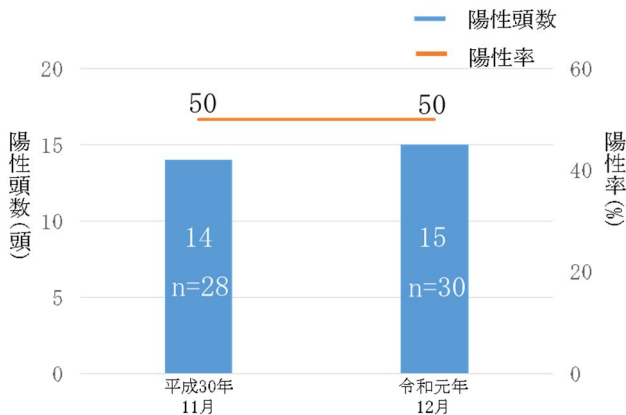


図1 支援事業活用以前の状況

畜主とともに農場周囲や牛舎内を確認したところ、牛舎周囲は草木に覆われ、藪の一部は牛舎外壁付近にまで達していた(図2)。これらは、草刈や伐採等により一時的な改善は認められたが、雨が降るとすぐに草木が生い茂るため、根本的な解決は困難とのことであった。また、アブやサシバエ等の吸血昆虫及びハエ等の衛生害虫が牛舎内外を大量に飛び交っており、牛体側面にアブが群がり吸血している様子が確認されたが、これらの衛生害虫等に対して忌避剤を散布して

も、効果は一時的とのことであった。

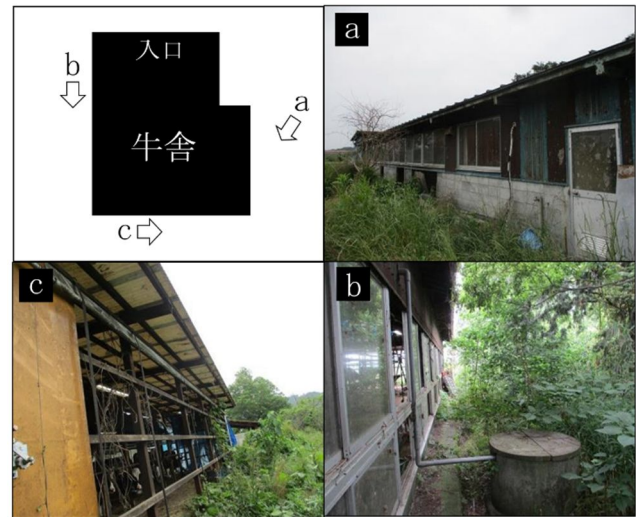


図2 農場全体図と各位置からの様子

以上から、本農家では、EBLウイルスを媒介する吸血昆虫による水平感染対策が喫緊の課題であることを畜主と認識共有し、支援事業を活用した防虫ネット設置による吸血昆虫対策を実施することにした。

なお、別途、畜主がこれまで実施してきた忌避剤散布による水平感染対策と、人工初乳給与及び陰性母牛からの後継牛育成等の垂直感染対策も継続するよう指導し、了承を得た。

(2) 吸血昆虫対策

対策1年目の令和2年度は畜舎の軒下にワイヤーを張り、ワイヤーからカーテン状にネットを設置した。出入口は開閉を容易にするためカーテンレール方式で設置し、風圧によるネットの巻き上がりや開放防止のためネット下端に鎖を取り付けた(図3)。その結果、牛舎内部の衛生害虫が顕著に減少したことを畜主から聴取した。しかし、牛舎出入口においては、人の出入りの際に防虫ネットの隙間から吸血昆虫の侵入を許してしまうこと、牛舎壁面は、外壁近くまで藪が接近しているため、軒下と防虫ネットの隙間から吸血昆虫が侵入していることを聴取した。

このため令和3年度は改良を加え、屋根からネットを設置、出入口はネット幅を横に長くし、さらに二重ネットとする等で畜舎開放部を完全に覆い防御を徹底

した(図4)。また、畜主に対して、防虫ネットの目づまり防止のためのメンテナンスや、畜舎出入り時にネットを開けた際は直ちに閉める等、日常管理を指導した。その結果、令和3年度は牛舎内に吸血昆虫を認められなくなり、来訪した畜産関係者からも、「牛舎内に吸血昆虫はもとより、衛生害虫自体がない」との感想を多数聴取したと、畜主から聞き取った。



図3 防虫ネット設置状況(令和2年度)



図4 防虫ネット設置状況(令和3年度)

(3) 陽性牛対策

分離飼育に関しては、当所から畜主に対して令和2年度は口頭で、令和3年度は可視化して指導した。口頭で分離飼育を指導した令和2年度は、陽性牛と陰性牛が混在して飼育され、改善が認められなかった。しかし、令和3年度に陽性牛の位置を視覚化し、高リス

ク牛の近くの牛が陽転していることを示してから、畜主は、陽性牛と陰性牛の分離飼育を行うようになった(図5)。

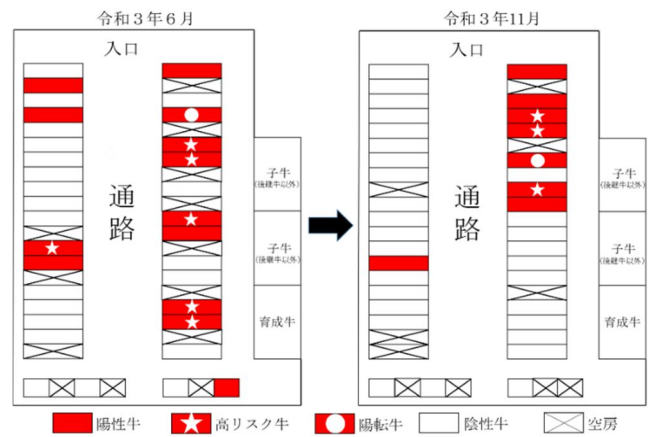


図5 牛の配置図

(4) 効果の確認

① 抗体検査(表1)

令和2年度は、吸血昆虫発生前(対策前)の6月は検査頭数35頭のうち陽性牛17頭(陽性率49%)、陽転牛6頭であったのが、吸血昆虫発生後(対策後)の11月は検査頭数44頭のうち陽性牛17頭(陽性率39%)、陽転牛3頭であった。同様に令和3年度の6月は検査頭数35頭のうち陽性牛12頭(34%)、陽転牛1頭、11月は検査頭数40頭のうち陽性牛8頭(陽性率20%)、陽転牛1頭であった。

表1 各年度における陽性状況と対策内容

検査年月	平成30年 令和元年		令和2年		令和3年	
	11月	12月	6月	11月	6月	11月
飼養頭数(頭)	28	30	35	44	35	40
陽性頭数(頭)	14	15	17	17	12	8
陽転牛(頭)	6	5	6	3	1	1
陽性率(%)	50	50	49	39	34	20
対策内容	← 支援事業以前		支援事業活用後 →			
忌避剤散布	○	○	○	○	○	○
人工初乳給与	○	○	○	○	○	○
防虫ネット設置			○	○	○	○
分離飼育					○	○

② リアルタイムPCR(表2)

令和2年6月(対策前)は高リスク牛6頭中、新規高リスク牛3頭、更新牛1頭、11月(対策後)は高リスク牛6頭中、新規高リスク牛1頭、更新牛2頭で

あった。令和3年6月は高リスク牛4頭中、新規高リスク牛0頭、更新牛0頭、11月は高リスク牛3頭中、新規高リスク牛1頭、更新牛3頭であり、徐々に高リスク牛の更新が進み、畜主は淘汰に積極的となった。

表2 高リスク牛と更新状況等

個体記号	検査年月			
	令和元年 12月※	令和2年 6月	令和2年 11月	令和3年 6月 11月
	← 対策前		→ 吸血昆虫対策後	
A	○	更新		
B	○	52	21	30 更新
C	○	16	更新	
D		42	13	死亡
E	○	5	10	9 27
F	○	1	14	21 更新
G		107	51	42 更新
H	○	62	更新	
I		2	7	8 16
J		19	死亡	
K			16	22 21
高リスク牛(頭)	6	6	6	4 3
新規高リスク牛(頭)	6	3	1	0 1
更新した高リスク牛(頭)	0	1	2	0 3

高リスク牛
数字：感染細胞率(%)

※ 令和元年はウイルス量で判定していたため○のみ記載

(5) 対策内容と陽性牛の推移

各年度における対策内容と陽性牛の推移は、表1のとおりで、忌避剤散布や人工初乳給与等による対策を主体とした平成30年及び令和元年度は、毎年5~6頭の陽転牛が認められていた。しかし、吸血昆虫対策実施後の令和2年11月は、陽転頭数が3頭に減少し、防虫ネットの設置方法を改良した後の令和3年11月は、1頭のみであった。

高リスク牛は、表2のとおり、更新や死亡により増減しながらも、令和元年度から令和2年度までは6頭程度を推移していたが、牛の更新及び分離飼育を推進した令和3年11月には、新規高リスク牛は1頭のみとなり、農場全体においても3頭に減少した。

これらの結果、農場全体の陽性率は支援事業開始以前の50%から20%へ減少した(表1)。

まとめ及び考察

EBL対策は新たな感染を防ぐことが重要で、農家毎の飼養環境や感染状況を把握し、その農場に合致した

垂直あるいは水平感染対策によってまん延させないことが必要である。

今回、まず、畜主と協議し、これまで畜主が独自で行ってきた対策を聞き取り、飼養環境を確認した。その結果、垂直感染対策は既に適切に実施されており、喫緊の課題はEBLウイルスを媒介する吸血昆虫対策であると判断し、水平感染対策を中心に行うことにした。検査は当該地域において吸血昆虫の活動が活発となる前後の6月と11月に実施した。また、アブやサシバエ等の吸血昆虫は、2m以下の地面近くを飛ぶ習性があり、既報では地表から1.5~2mの高さを目安に防虫ネットが設置されて⁵⁾いたことから、当所も同様に、令和2年度は地表から約2m高の高さの軒下からワイヤーで防虫ネットを設置した。その結果、令和2年11月は陽転牛が3頭と前年よりも減少した。しかし、当該農場は、牛舎と藪が非常に隣接しており、ネットを設置した軒上からも藪を伝って吸血昆虫が牛舎内に入り込んでいることを確認したため、令和3年度はネット設置方法を改良し、出入口を2重ネットとし、屋根の上から牛舎開放部を完全に覆った。その結果、畜主からは「牛舎内に吸血昆虫が見られなくなった」との報告があり、防虫ネットの効果を実感している様子であった。また陽転牛も前年度の3頭からさらに減少して1頭のみとなり(図6)、対策の効果に満足している様子であった。

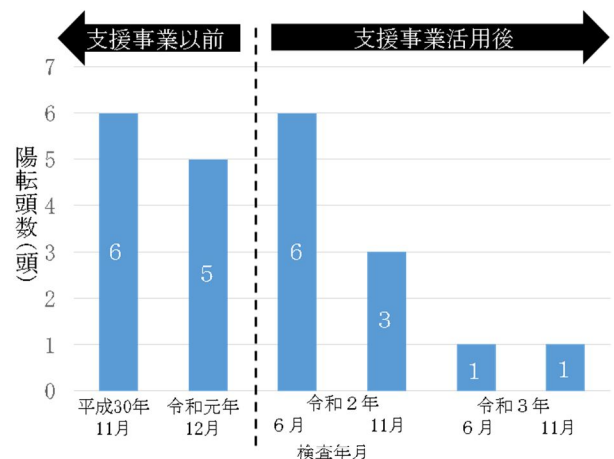


図6 支援事業開始前後の陽転頭数

防虫ネットの設置は牛舎内への吸血昆虫の侵入を防ぎ水平感染のリスクを低減させるが、本症例を通し、農家の飼養環境を踏まえた上で、個別の課題に合致したネットの張り方を行うことで、より一層効果を高められることが示された。

もう一点の水平感染対策として、当所から陽性牛と陰性牛の分離飼育や高リスク牛の更新を指導したが、令和2年度は実施されず、このことも、令和2年度に陽転牛が多かった一要因と考えられた。このため令和3年度に陽性牛や陽転牛の配置図を視覚化して指導した結果、陽転が減り一定の効果が得られた。しかし、陽転する牛を0頭にする事は出来なかった。当該農家では高リスク牛と陰性牛の間に1空房を設けていたが、空房は1空房以上設けると効果的と言われている³⁾。一方、実際に清浄化に成功した農家は3空房を設けていることを考慮すると⁶⁾、2空房以上設けることが望ましいと考えられた。また、未だに高リスク牛の隣房に陰性牛、陰性牛群の中に陽性牛がいるなど分離飼育が完全に実施はされておらず(図5)、今後は陽性牛群のみを飼育するエリアを設ける等の、さらなる強化が必要であると考えられた。

一方で、本疾病にはワクチンや治療法がなく、高リスク牛の感染細胞率の推移(表2)を鑑みても、陽性牛はいずれ高リスク牛になる可能性が高い。EBLが水平感染する特性を考慮すると、清浄化対策においては高リスク牛を中心とした陽性牛の更新が原則である。本事例においても陽性牛の更新を行ったことにより陽性率が減少した(表1,表2)。このことから、陽性牛の早期更新が最も望ましい対策方法であるが、様々な事情によりやむを得ず継続飼育する場合は、前述のように徹底した分離飼育を行う必要がある。

今回の農家は垂直感染対策がしっかりなされていたため、当所は水平感染対策に特化することが出来た。EBL感染予防に有効な対策を全て実施することは難しいかもしれないが、垂直感染対策は基本的な対策であり農家独自でも取り組みやすいので、他農家へも指導

を図りたいと考える。

当初、畜主は防虫ネットを用いた水平感染対策は専門知識を要するうえ、費用効果が不明のため対策に難色を示していた。しかし、2年間の事業の効果を確認した畜主は事業終了後の来年度以降も本対策を独自で継続する意向を示すまでとなった。

EBLの発生は全国で年々増加していて、広島県内でも清浄化が進んでいないのが現状である。本事例はEBL清浄化へ向けたモデルケースとして、関係機関と共有し、多くの農家へ紹介して清浄化に努めたいと考える。

参考文献

- 1) 明石博臣, 江口正志, 神尾次彦編: 牛病学第三版 近代出版 227-230 (2013)
- 2) 農林水産省: 牛伝染性リンパ腫とは リーフレット
- 3) 農林水産省: 牛白血病に関する衛生対策ガイドライン
- 4) 高取等: ピレスロイド系防虫成分を含有した畜舎用防虫ネットの有効性の検討, 平成28年度鳥取県畜産技術業績発表会集録
- 5) 荒川千夏ら: 酪農場における水平感染対策に重点を置いた牛白血病清浄化の取り組み, 第60回茨城県家畜保健衛生業績発表会集録
- 6) 公益社団法人 中央畜産協会: 地方病性牛白血病(EBL)と清浄化に向けた取り組み事例 リーフレット

高病原性鳥インフルエンザ発生後の当所管内における 防疫体制強化の取組

北部畜産事務所

○部屋智子 横田美希

はじめに

本県では、HPAI 発生時、可及的速やかに防疫措置を実施するため、平時から農場毎に防疫シミュレーションを作成し、殺処分時の動線等について検討を進めてきた。当所管内には、1 万羽以上の家きんを飼養する大規模農場 15 戸、100 羽以上の家きん飼養農場が 5 戸存在する。管内農場の飼養形態は、大規模ウインドウレス鶏舎が中心となるが、農場周囲の状況が異なり、防疫措置の方法も大きく異なるため、農場毎にシミュレーションを作成し、農場立入り時に併せて状況を確認し、内容の更新を行ってきた。

発生時の防疫措置については、広島県危機対策運営要領【重大な動物感染症（高病原性鳥インフルエンザ等）】（以下運営要領）に基づき全庁体制で実施することとしており、防疫作業に従事する県の職員に対して、役割に応じて防疫措置の説明を行ってきた。

このような体制の中、令和 2 年 12 月、本県で初めての高病原性鳥インフルエンザが発生した。疫学関連農場を含め、同時に 2 農場の防疫措置を行う必要があったことから、自衛隊にも協力を要請し、全庁体制で防疫措置を行なった。

発生農場における防疫措置については、発生地を管轄する畜産事務所が事前に農場状況を把握、シミュレーションを作成していたが、発生時の汚染物品が、想定以上に貯留していたことや防疫措置を進める上での資材等の配置や動線に齟齬が生じ、防疫措置の進捗に大きな影響を与えた。

さらに、発生農場外でも、初動対応に影響を及ぼす様々な課題が生じた。本庁、3 か所の畜産事務所及び発生現地や中継基地等の防疫措置の拠点（以下、事案対

策部）間での情報の共有、防疫措置の実施体制の中心となる各班との連携体制、市町との協力体制等が詳細に整理できていなかったため、発生農場において、資材不足による作業の遅延、事案対策部間での情報の錯綜、発生農場での指揮系統が十分に機能しない等の事態が起こった。

これらの反省を踏まえ、これまで作成してきた農場毎のシミュレーションの情報が発生農場の防疫措置の実働に即したものとなるよう、内容を再検討した。また、防疫措置を指揮する家畜防疫員を補佐して作業の推進役を担う班員が作業内容の理解を深めることを目的として行動マニュアルを作成したので、その概要を報告する。

方 法

1 農場毎の防疫シミュレーションの再検討について

(1) 優先農場の選定

実際に発生農場で行った防疫措置を踏まえ、短期間に、精度の高いシミュレーションを検討する必要があるため、農場の規模、発生した場合の管内地域への影響の大きさ等を考慮し農場を選定した。

(2) 必須項目の見直し及び現地確認

HPAI 簡易キット陽性判明後に、シミュレーションをもとに農場内で殺処分を行うための準備を行ったが、実際の作業では、様々な情報において十分でなかったことが明らかとなった。そのため、防疫作業に影響を及ぼしたと考えられる課題を洗い出し、シミュレーションにおいて検討が必須となる項目を見直し、農場での情報収集が必要となる場合には、現地確認を行うこととした。

(3) 作成、管理上の課題検討

全ての課員を1~2戸の農場の作成担当者とし、シミュレーションの作成を行った。各作成担当者が作成を進めるにあたり、シミュレーションの完成時の水準に差異が生じることが予想されたため、作成に先立って2農場をモデルとしてシミュレーションの検討会を開催し、作成水準の目合わせを行うとともに、共通する課題については対処方法について課内で意見交換を行った。

また、数年に亘ってシミュレーション検討を行ってきたことにより、古いシミュレーション情報が混在し、内容の確認に時間を要するケースも見られたことから、作成後の管理方法についても検討を行った。

2 埋却地の検討

大規模農場8戸を対象に、農場責任者、農場統括担当者及び平時において農場メンテナンス等で農場へ出入りしている建設業者を参集し、当所が作成した防疫シミュレーションを基に埋却措置に関する検討会を開催した。

3 行動マニュアル作成

HPAI 発生以前、本県における重大な動物感染症危機管理対応については、「広島県危機管理指針」に基づき危機管理体制の確立及び対策本部等の運営について定めた運営要領、動員者に対して提示した「重大な動物感染症防疫対策県応援動員の手引き」、防疫対策本部の管理業務調整のための「広島県高病原性鳥インフルエンザ防疫対策ガイドライン」等が整備され、これらに基づいてシミュレーションの作成及び班員説明会、動員者説明会を行ってきた。しかし、発生農場で防疫措置を行う発生現地班の作業内容（殺処分等）に特化し、一連の流れを分かり易く取りまとめたマニュアルは作成されていなかった。

そのため、県内での発生を受けて、発生現地班の行動マニュアルを作成することとなり、当所防疫課にお

いても検討、作成を行った。

行動マニュアルの内容は、発生農場の防疫措置の中核を担い、動員者へ指示する立場となる班員に作業内容の理解を深めてもらうことを目的とし、各作業について必要最小限の記載に止め、理解され易いマニュアルとなることを重視した。

作成方法については、実際の発生時に発生農場での防疫措置業務に携わった家畜防疫員を中心に、役割、作業内容、作業内容詳細を書き出しマニュアルの原案を作成、この原案を基に、業務毎に作成担当者を指定し整理した。

作成中、内容の確認及び向上のため、月1回の検討会を実施した。

結果

1 農場毎の防疫シミュレーションの再検討

(1) 優先農場の選定について

当所管内の100羽以上の家きん飼養農場について、表1のとおり飼養羽数別に鶏舎構造等から農場の特徴について検討した結果、防疫措置終了までに日数を要し、多数の動員者を要する1万羽以上を飼養する農場15戸を選定し、優先的に見直しすることとした。

表1 管内家きん等飼養農場

	100~ 1,000羽	1,000~ 1万羽	1万~ 10万羽	10万羽以上
開放	5戸	0戸	0戸	0戸
ウインド レス	0戸	0戸	4戸	11戸

(2) 必須項目の見直し及び現地確認

発生後の課題整理時に出された班員、動員者等の意見を基に、これまで当所が作成していたシミュレーションの内容を確認し、不足している情報について検討を行った。

実際の防疫措置において大きな課題となった事象として、現地基地設営場所が十分に精査できていなかったため、当初計画していたレイアウト通りに現地基地

のテント等を設置できず、急遽、事前調査のために農場へ入った家畜防疫員が資材を運搬してきた業者とともに、現地を確認しながらレイアウトを検討して設営するといった事例があった。また、埋却地は設定されていたが、汚染物品量の把握が十分できておらず、必要となる掘削溝の規模についても十分に検討できていなかったため、発生時にどこまでの汚染物品を埋却できるか明確でなかった等があった。

以上のことから、次の7項目をシミュレーション作成時の必須項目とした。

- ア 作業スケジュール：簡易キット陽性から発生農場の防疫措置完了までのスケジュール
- イ 現地基地設営場所及びレイアウト
- ウ 汚染物品量
- エ 埋却地レイアウト

オ 殺処分計画：鶏舎構造及び立地条件に即した殺処分方法の立案

カ 動員者輸送方法

キ 必要人数

これらを必須項目とすることで、初動時の作業を明確にし、防疫措置開始後の作業を円滑に進めるための資料として農場側と共有した。

作業スケジュールは、容易に把握できるように様式を統一し、殺処分開始から防疫措置終了までの時間を記載、動員者要請の基礎資料となるよう修正した。

(図1)

現地基地については、動員者到着時刻までに完成させる必要があり、迅速な対応に迫られることが想定されることから、速やかに設営等できるよう具体的な大きさや詳細なレイアウトの記載を追加するよう変更した。(図2)

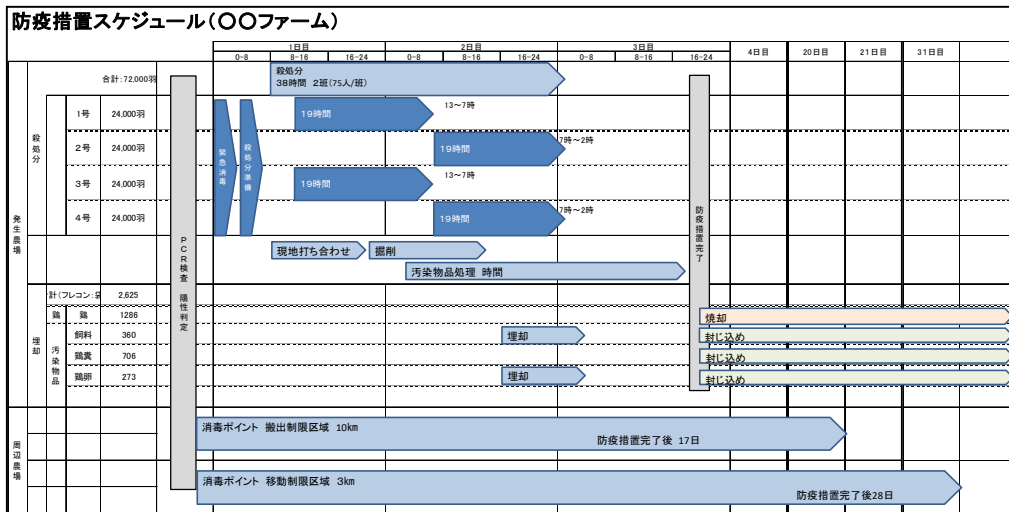


図1 スケジュール

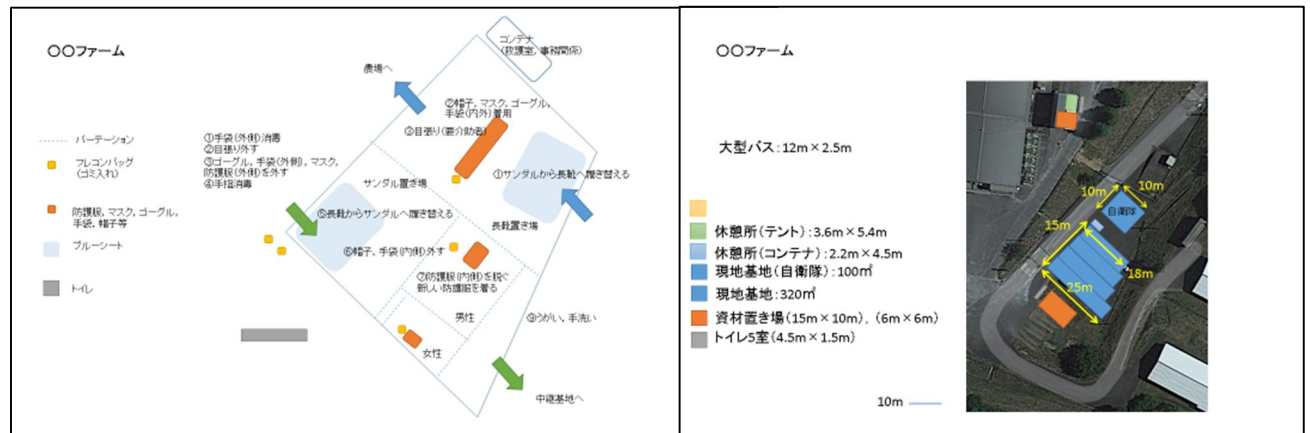


図2 現地基地設営場所及びレイアウト

農場内で大量に使用するフレコンバッグもしくは廃棄物容器の保管場所については、事前に農場側に確認して設定し、保管場所～使用場所～埋却もしくは焼却する際の農場内の汚染物品搬出の動線を確認した。

(3) 作成、管理上の課題検討

シミュレーション作成のための課内検討会では、次のことについて整理した。

汚染物品量については、シミュレーションの作成担当者によって日産卵量、鶏舎内鶏糞量等の汚染物品を積算する際の計算式が異なっており、農場毎に必要な埋却溝のシミュレーションに齟齬が生じた。

そのため、汚染物品の量の積算については、飼養羽数及び残存飼料量を入力すると、鶏糞、鶏卵、飼料及び殺処分鶏を含めた汚染物品量を計上できるようにし、必要となる埋却溝の積算については、国内での鳥インフルエンザ発生時に汚染物品等を埋却した他県事例等を参考に、課内で検討した。

これらを基に、埋却溝の総延長については、計上し

た汚染物品量から必要となるフレコンバック数を求め、そこから自動的に総延長か計上できるエクセルファイルを作成した。(図3)。

2 埋却地の確保

検討会前、8農場中1農場から鶏舎間等の土地を埋却地として利用したいと提案があった。

その情報を基に、当所でシミュレーションを作成し農場及び建設業者を交えての検討会で提示したところ、建設業者から、掘削の際の重機の移動場所の確保、掘削の際に出る土の置き場所等を考慮すると、提示された場所では掘削は不可能との意見が上がった。

また、汚染物品量から埋却溝面積を計上した結果、面積不足が明らかであることも判明した。

埋却溝の大体の面積が判明したことから、掘削・埋却作業に必要な作業用重機の数の想定もでき、作業用重機の運搬・侵入方法についても検討することができた。

OOファーム		数字は台帳から抜粋	R030909改訂 ①産卵と育成で重量、ペール羽数を分けて試算、②埋却溝の長さに自由記入項目を追加	殺処分終了までに清掃する日数を記載(10羽以上までは1日と想定)	基礎調査表の「埋却地設計」記載の燃料タンク容量を感火機と併せて記載			
O汚染物品量試算				7	日			
入力場所			殺処分場	7	日			
鶏舎	飼養羽数(羽)	日齢	ペール個数(成鶏7、育成18羽/1ペール)	フレコン個数(成鶏140、育成350羽/1フレコン)	7日あたりの鶏糞量(kg) (0.06又は0.14kg×7日分)	7日あたりの産卵量(kg) (0.9(産卵率)×0.06kg×7日分)	飼料(kg)	
1	45,000	151	6,429	322	44,100	17,010	18	5
2	45,000	151	6,429	322	44,100	17,010		
3	45,000	151	6,429	322	44,100	17,010		
4	45,000	151	6,429	322	44,100	17,010		
			0	0	0	0		
			0	0	0	0		
計(羽)	180,000	計(個)	25,716	1,288	176,400	68,040	90,000	計(kg)
			必要フレコン数(個)	1,288	706	273	360	

O汚染物品量		物品	フレコン個数	量(重量・t)
		鶏糞、鶏糞、卵、飼料	2627	694.44
		鶏糞、卵、飼料	1339	334.44
		鶏糞、卵、飼料	1921	518.04
		鶏のみ	1288	360
		鶏、卵	1561	429.04
		卵、飼料	633	158.04
		卵のみ	273	68.04
		GP卵	0	0

O埋却未数や時間の試算		埋却物品	長さ(m)	本数	埋却時間(h)
		鶏糞、卵、飼料	30	15	275
		卵、飼料	30	8	147

埋却不可能な汚染物品		内容	フレコン量(個)	代替処理方法
		鶏	997	焼却
		鶏糞	3828	埋却舎で封じ込め
		GP卵		



図3 汚染物品量計上ファイル

この検討会后、農場において埋却地確保の再検討が行われ、全ての農場において新たな埋却地の確保に至った。農場から埋却地への重機の侵入経路、距離についても、8戸中6戸において距離、道幅に問題なく、重機の運搬・侵入が可能であることを確認した。

3 行動マニュアル作成

HPAI が発生し、防疫措置経験後に各自で行動マニュアル作成に取り組むと、発生農場の防疫措置と連携するために必要となる、発生畜産事務所及び他畜産事務所での作業、埋却及び焼却作業、評価作業について、必要でありながらも詳細に記載がされていなかったことが明確になった。

改めて、発生現地業務を各作業別に詳細にした行動マニュアルの作成に取り組んだ結果、これまでの殺処分作業を中心とした防疫作業の在り方を見直すことができた(図4)。

毎月行っていた検討会では、それぞれが作成したマニュアルについて意見することで、より効率的な作業になるようマニュアルの作成に取り組み、県下で統一した行動マニュアルの基礎として他の畜産事務所及び畜産課を参集範囲とするワーク会議へ情報提供した。

4 ワーク会議

全所対応の発生現地班ワーク会議において、今回の発生から明らかとなった課題を受けて、情報伝達の方

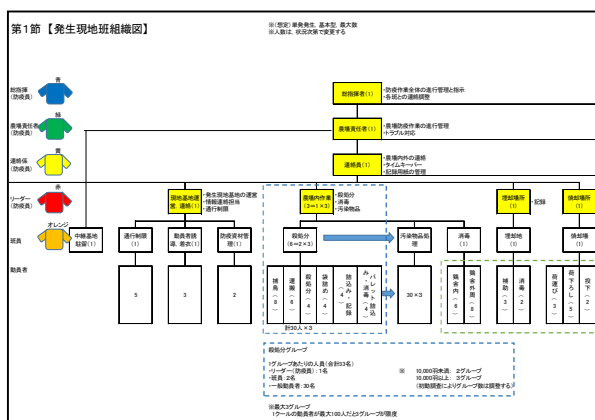


図4 発生現地班組織図
法と指揮系統の確立についても検討され、マニュアル

に記載することとした。

関係機関の間で防疫措置進行状況及び農場状況を共有するための連絡体制や発生現地内の各部署の責任者が明確にした。(図4)

まとめ

HPAI 発生時の防疫措置を迅速に行うためには、初動対応が重要である。十分な準備が整わないまま防疫措置に着手すると、想定外の作業が発生しスケジュールの遅延を引き起こす。

県内初のHPAI 発生事例に対応し、様々な課題が洗い出された結果、防疫措置に必要な情報や対応を整理することでより実効性の高いシミュレーションへ改良することができた。

作成されたシミュレーションは、HPAI のモニタリング調査等の農場立入り時を活用して農場責任者へ提示し打合せを行った。現地基地設置予定場所、埋却予定場所、農場内作業動線及び鶏舎構造等を現地確認することで、発生時の防疫措置についても農場と共有することができた。

また、家畜防疫の専門家の立場で農場及び建設業者を交えて埋却地の必要性を説明することで、農場の意識の向上も進み、埋却地の重要性及び埋却作業について理解を深め、効率的に埋却が行える新たな埋却地の確保に至った。

今後は、発生時に備え課内で農場毎のシミュレーションを共有しておく必要がある。

行動マニュアル作成に取り組むことで、作業に対する個人の理解を深め共通認識を持つことができ、マニュアル作成中に発生した令和3年の発生事例にもある程度心構えをもってあたることができた。

また、初動対応の重要性を見直し、初動タイムラインを作成することで、業務量に基づいた職員の人数とシフトを検討し、さらに発生現地班の組織図を可視化することで、班員にも説明しやすく納得のできる組織体制を構築することができた。今後は、発生現地班行

動マニュアルとして、班員説明会での説明資料として活用するとともに、各所の家畜防疫員においては机上もしくは実働での演習によって発生現地班業務について習熟していく必要がある。

広島県で発生した高病原性鳥インフルエンザの防疫対応

東部畜産事務所

○品川正臣 小林加奈子

はじめに

高病原性鳥インフルエンザ（以下 HPAI）は、A型インフルエンザウイルスによる感染症で、鶏等の致死率が高い疾病であり、伝播力が強い。養鶏場において発生が認められた場合は、当該養鶏場で飼養する鶏の殺処分等の迅速な防疫対応が必要となる。

令和2年度、管内（三原市）の採卵養鶏場において県内で初めてHPAIの発生が認められた。その際防疫対応等に課題が認められたため、当該課題を検証し対応方針案を作成した。

その後、令和3年度にも管内（福山市）の採卵養鶏場でHPAIの発生が認められ（図1）、令和2年度に検討した対応方針に基づき防疫対応をおこなった。そのうち、発生現地における対応について改善を認めたのでその概要を報告する。



図1. 令和3年度の発生現地での防疫作業の様子



図2. 令和3年度の班員説明会

方法

(1) 課題の抽出と整理

令和2年度のHPAI防疫対応後、防疫作業に携わった発生現地従事指揮者（以下 班員）、発生現地従事者（以下 一般動員者）、発生市町に対し、危機管理体制の改善に関するアンケート調査を実施した。作業毎に課題を分類後、課題解決のため早期に協議すべき重要な課題を把握し、整理をした。

(2) 対応方針の検討ととりまとめ

発生現地班（発生農場で殺処分及び焼却・埋却の指示等）、管理調整班（連絡調整、中継基地及び資材の管理等）、移動規制班（消毒ポイントの設置の統制等）毎に県下の西部、東部及び北部の3畜産事務所（以下 3所）から選出した検討委員を中心に、各班で取りまとめをおこない、課題の検証とその対応方針について検討

を行った（以下 ワーク会議）。発生現地班では週に1～2回、計20回に及ぶワーク会議を行った。
なお、各班での検討が一定程度進んだ後、共通の課題を中心に合同で検討を行うこととした。

成績

(1) 課題収集と重要な課題の抽出

アンケートの結果、早期に解決すべき課題は主に4点認められた。

- ア 初動対応（3所の連携）
- イ 班員に求める業務水準
- ウ 指揮命令系統、情報の共有
- エ 一般動員者の作業環境

(2) 課題検証、対応方針及び結果

ア 初動対応

1) 課題

令和2年度当初のマニュアルは、発生農場の管轄事務所の業務内容は決まっていたが、他の畜産事務所の役割やタイムスケジュールまでは決めていなかった。

そのため、令和2年度の発生時、発生事務所のみで対応したため、行うべき業務が過多となり、防疫対応の迅速性に支障をきたした。簡易検査陽性32時間後、全県対応となった。

また、初動タイムラインを作成し、必要人数を算出したところ、発生現地で防疫作業の対応を行う職員が最大で14人必要であり、発生農場の管轄事務所だけでは人員が不足していることが判明した。

2) 対応方針

初動から全県対応とし、簡易検査陽性直後に3所で防疫作業のローテーションを組むこととした。

3) 結果

令和3年度の発生では、簡易検査陽性判明5時間後、発生現地の応援に他所職員が到着したことで、現地基地の設営や緊急消毒の初動対応を円滑に実施することができた。

イ 班員に求める業務水準

1) 課題

令和2年度の発生時は、班員が発生現地での自身の業務への理解が不十分であり、本来の一般動員者を指揮する業務ではなく、一般動員者と同様の作業をすることが多かった。

2) 対応方針

令和3年度に2回の班員説明会を実施しては、班員の業務について、具体的な内容を図示するなど明確化して説明することにより、班員に周知徹底した（図2）。

3) 結果

令和3年度の発生では、班員が一般動員者と同様の作業をすることなく、指揮役としての業務に注力することができた。

また、業務内容の周知ができていたため、班員の交代時の引き継ぎ作業もスムーズに行われた。

ウ 指揮命令系統、情報の共有

1) 課題

①令和2年度の発生時は、指揮命令系統が不明確であったため、発生現地、発生事務所及び畜産課の間で情報が錯綜し、混乱が生じた（図3）。

②発生現地では全ての作業者が防護服を着用しており、動員者と班長等指揮者との区別が困難で、役割が不明瞭だった。

2) 対応方針

①命令系統を見直し、発生現地において農場責任者、連絡係を設けることで情報共有を円滑にした（図4）。

②畜産事務所職員及び班員は色分けしたビブスを着用し、役割を明記することで、指揮者を明確にした。

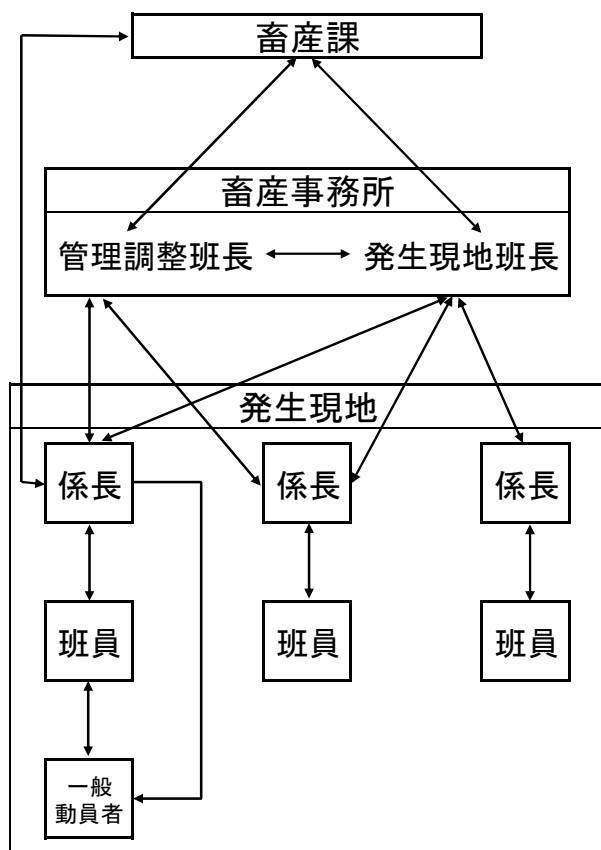


図3. 令和2年度の情報共有の流れ

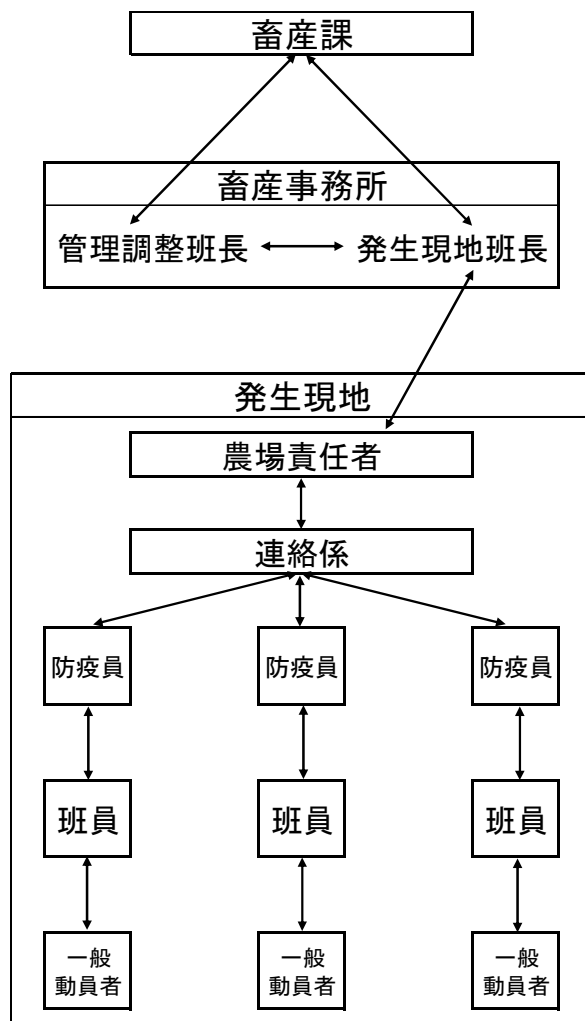


図4. 令和3年度の情報共有の流れ



図5. 班員が色分けしたビブスを着用し、業務の指揮をしている様子

3) 結果

①発生現地への連絡を畜産事務所からに限定し、現地における情報のやり取りは連絡係に一本化することで、情報共有が円滑となり、発生現地でスムーズに作業に従事することができた。

②また、農場責任者、班長、班員がそれぞれ異なる色のビブスを着用することで、お互いが一目で役割を認識することができ、円滑な情報伝達につながった（図5）。

エ 動員者の作業環境

1) 課題

①班員が動員者の作業状況を把握できず、管理が不十分であった。

②照明がなく、暗く歩きにくい道があったことや簡易トイレはあるが手洗い場はなく不衛生であるなど、動員者の作業環境が整ってなかった。

2) 対応方針

①班員が一般動員者の作業を把握し、定期的に休憩時間を確保した。また、飲水ができる小休憩場所を確保し、ストーブを設置することで、休憩時間の快適性を向上させた。

②バス乗降所から作業場及び発生鶏舎までの道に照明を配置すること、手洗い場を設置することで作業の改善を図った。

3) 結果

一般動員者アンケートでは、動線の確保や休憩時間の確保に関して改善されたとの意見があった。

まとめ

令和2年度と令和3年度の発生では、農場の規模、関連農場の有無、鶏の殺処分方法（焼却と埋却）が異なるため、単純には比較ができない。しかし、令和3年度の発生では、初動からの全県対応による初動の迅速化、班員説明会時の業務の具体的な内容や図示による業務の明確化、現地での色分けビブスの着用による指揮者の明確化や連絡係の配置による情報共有の円滑化、一般動員者の作業環境の改善による作業の負担の軽減が図られ

た。これらのことにより防疫対応の効率化が図られた。

一方で、今回の発生では、発生農場での防疫対応に注力したため、他の農場での異常鶏対応に必要な防疫員が確保できなかった点や農場規模別の初動資材量の見直しが必要などの課題が新たに明らかとなった。また、令和3年度の発生が各班が検討している段階で発生したため、班間の調整ができていなかった。

この他、一般動員者アンケートではくもり止めを塗ってもゴーグルが曇り作業が難しかったことや動員招集時のアナウンス不足で食事がとれなかったことなどの意見が多数寄せられた。

これら課題や意見を踏まえ、引き続き定期的なワーク会議や防疫演習により、課題の検証と改善をおこない、班間調整を再開することで、更なる体制の確立を目指し、豚熱など他の畜種での危機事案が新たに生じた場合にも応用できるように効率的な防疫対応を実施していきたい。

管内における蜜蜂の病性鑑定について

西部畜産事務所

○朝倉ひとみ 舩下知穂

はじめに

近年、趣味としての養蜂が全国的に注目を集めている。当所管内においても、特にニホンミツバチの飼育戸数が増加しており、それに伴うように蜜蜂の病性鑑定依頼も増加傾向にある。今回、平成29年4月から令和3年11月までの期間について、管内の蜜蜂飼育状況及び当該期間に実施した蜜蜂の病性鑑定に関して取りまとめたので、概要を報告する。

材料及び方法

1. 蜜蜂飼育状況

本県及び他都道府県の各畜産事務所に提出された飼育届を基に、平成29年から令和3年の管内におけるニホンミツバチ、セイヨウミツバチそれぞれの飼育戸数及び群数と蜂場数を調査した。

2. 病性鑑定実施状況

当所で保管する病性鑑定記録簿を基に、平成29年度以降に当所で行った44件の実施月、診断結果等を調査した。

また、これらのデータから、管内における近年の蜜蜂飼育状況及び病性鑑定実施状況の傾向を分析した。

成績

1. 蜜蜂飼育状況

管内の蜜蜂飼育農家戸数及び群数は、平成29年に102戸3,393群、その後、117戸3,697群(H30)、140戸3,809群(H31・R1)、128戸4,233群(R2)、142戸4,422群(R3)と増加傾向にあった。特にニホンミツバチの飼育戸数は、平成29年には42戸であったが、令和3年には約1.7倍の73戸に増加した。それに対し、セイヨウミツバチの飼育戸数は、調査期間を通じて60～70戸前後で大きな変化がなかった。(図1、
2 農家戸数は、セイヨウミツバチ及びニホンミツバチ両方を飼育する農家について、それぞれ1戸として集計)。また、蜂場数については、いずれの年でも、5群以下を飼育する蜂場が最も多く、次いで20～49群を飼育する蜂場が多かった。しかし、この5年間での変化に注目すると、20～49群の蜂場が約1.3倍の増加であったのに対し、5群以下を飼育する蜂場は約1.8倍に増加していた(図3)。農家1戸あたりの蜂場

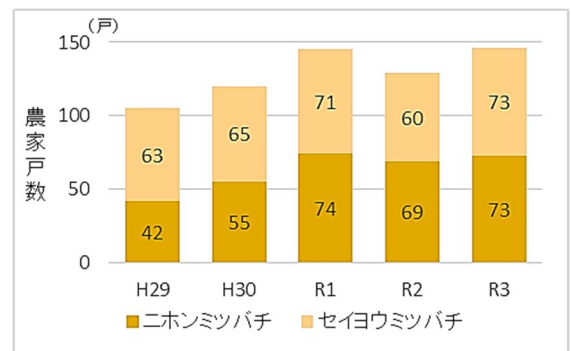


図1 管内の蜜蜂飼育農家戸数

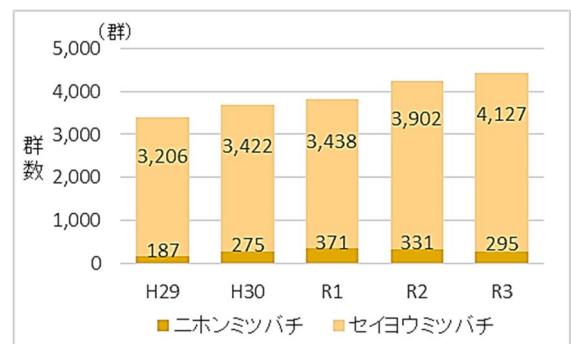


図2 管内の飼育群数

数をみると、いずれの年も、所有蜂場 2 か所以下の農家が圧倒的に多く、その戸数は 5 年間で約 1.4 倍に増加していた。それに対し、3 か所以上の蜂場を持つ農家の戸数に大きな変化はなかった（図 4）。

2. 病性鑑定実施状況

平成 29 年度には 3 件であった蜜蜂の病性鑑定依頼は、平成 30 年に 11 件に増加し、その後は令和 3 年度まで年度あたり 10 件を維持していた。しかし、病性鑑定全体に占める割合をみると、平成 29 年度には 3.9%、その後、11.0%(H30)、8.9%(H31・R1)、11.4%(R2)、17.5%(R3)と年々上昇傾向にあった。

平成 29 年度以降 5 年間の実施状況のうち、月別の実施件数では、5 月と 11 月が 18.2%と最も多く、次いで 10 月（13.6%）、3 月、4 月、6 月（各 9.1%）の順に多かった（図 5）。ニホンミツバチ農家からの依頼とセイヨウミツバチ農家からの依頼の比較では、それぞれ 77.3%と 22.7%で、ほとんどがニホンミツバチに関する依頼であった。また、依頼の 63.6%は、5 群以下を飼育する農家からであり、20 群以上を飼育する農家からの依頼は 13.7%に留まった（図 6）。なお、鑑定目的では、成蜂の死亡又は衰弱の原因究明が 88.6%を占め、蜂児の死亡原因究明は 6.8%と少なかった。診断結果では、原因不明 51.1%、アカリンダニ症 35.6%、バロア症 11.1%の順で、原因を特定できたものの中ではアカリンダニ症が最も多かった。

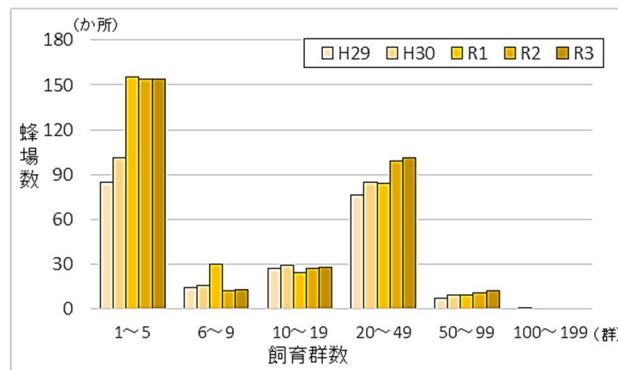


図 3 飼育群数別の蜂場数

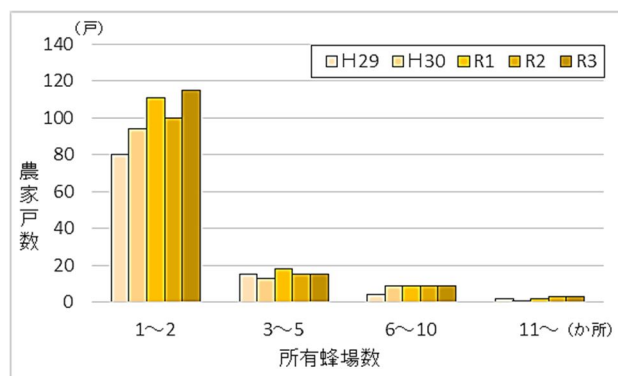


図 4 所有蜂場数別の農家戸数

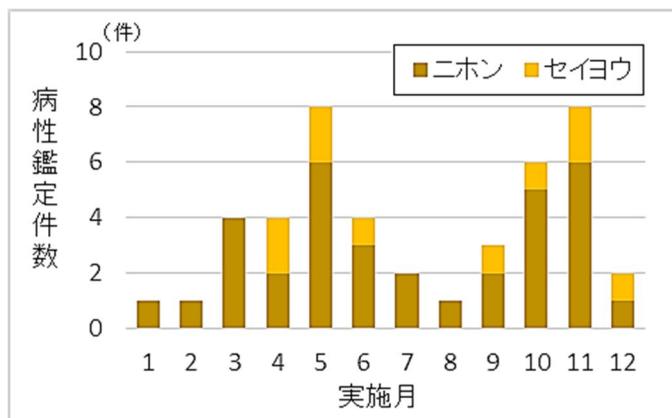


図 5 月別の病性鑑定件数 (H29~R3)

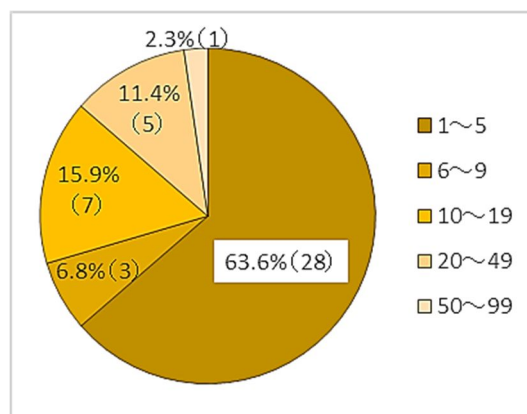


図 6 飼育群数別の病性鑑定件数と割合 (H29~R3)

まとめ

当所管内における飼育農家戸数、蜂場数及び飼育群数は、いずれも増加傾向にあった。その中でも、ニホンミツバチを飼育する農家の戸数及び 5 群以下を飼育する蜂場の大幅な増加から、この 5 年間で増加したのは、主

に趣味又は副業の養蜂家であることがわかった。また、病性鑑定依頼については、蜜蜂の活動が始まる春と、気温が低下し蜜蜂の体力が落ちる晩秋に二峰性の集中がみられた。更に、依頼先のほとんどは趣味又は副業で養蜂を行う農家であることが判明した。このことから、本来蜜蜂が弱ると考えられる冬季の病性鑑定依頼が少ないことの原因については、小規模養蜂家では冬季における巣箱の観察機会そのものが少ないことが推察された。

また、蜜蜂の病性鑑定件数及び病性鑑定全体に占める割合は増加傾向にあったが、その原因としては、まず、飼育戸数の増加が考えられた。更に、蜜蜂に異常が確認されたら畜産事務所に連絡するという情報が養蜂農家全体に広がっていることも推測された。今後も趣味又は副業を目的とした小規模群数の飼育戸数の増加が見込まれることや、生産物である蜂蜜の食品衛生上の観点からも、引き続き積極的な衛生指導が必要と考えられた。

牛から分離された *E.faecalis* についての一考察

西部畜産事務所

○兼廣愛美

はじめに

Enterococcus faecalis は、哺乳類の正常腸内細菌叢を構成する腸球菌の1つであり、畜産環境においても一般的に常在する日和見細菌である。一方ヒトでは、尿路感染症、細菌性心内膜炎、菌血症、創傷感染症等の原因菌の1つであるとともに医療現場における薬剤耐性菌、特にバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）の出現が問題となっており、感染症法上バンコマイシン耐性腸球菌症は、5類感染症に指定されている^{1) 2)}。こうした背景から、*E. faecalis* はヒトの医学および公衆衛生学分野では、様々な病原因子や薬物耐性獲得に関する遺伝子等が調査・研究されている^{3) 4) 5) 6) 7)} が、畜産分野においては、畜産物を介したヒトへの薬剤耐性菌伝搬の観点からの調査・報告例はあるものの、家畜に対する病原体としての *E. faecalis* については、小動物での尿路感染症⁸⁾ や牛における乳房炎症例⁹⁾ のほか、あまり知られていない。

今回、過去10年間に牛から分離された *E. faecalis* 株を用いて、病原性及び薬物耐性状況等について精査したので、その概要を報告する。

材料

平成24年4月から令和4年3月に病性鑑定を実施した牛（ホルスタイン・黒毛和種）から分離された *E. faecalis* 株19株（病畜由来15株：①～⑮、死産症例の母牛および同居健康牛糞便由来4株）を検査に供した。

詳細な内訳は表1の通りであるが、菌株①～⑥は同一死産症例胎子分離株、菌株⑫～⑭も同一死産症例胎子・胎盤分離株であり、その他の菌株はそれぞれ別症例からの分離株である。なお、菌株⑧および⑨は病畜由来株であるが、*E. faecalis* が関与したと見られる病理学的所見が認められなかったため、分離菌は死後増殖の可能性がある。また母牛および同居健康牛糞便由来4株は、

H24死産症例（菌株①～⑥）と同一農場由来の分離菌である。

方法

1. 疫学調査

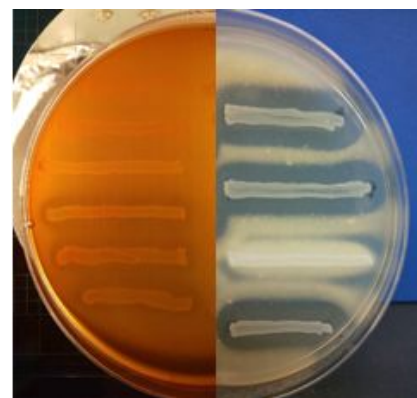
平成24年4月から令和4年3月の *E. faecalis* 分離状況と病性鑑定内容の調査および集計を実施した。

2. 病原因子

（表1）分離株の由来および病性鑑定内容

年度	病性鑑定内容	由来	診断
H24	死産原因究明	①脳、②腎臓、③肝臓 ④肺、⑤脾臓 ⑥第四胃内容物	化膿性肺炎 化膿性胎盤炎
		母牛及び同居牛糞便4株	外見上健康牛
	乳房炎	⑦乳房炎乳分離菌株	乳房炎
H25	異常産原因究明	⑧胎盤	原因不明
H28	流産原因究明	⑨第四胃内容物	原因不明
	流産原因究明	⑩胎盤	化膿性胎盤炎
H31	子牛の死亡原因究明	⑪腎臓	化膿性腎炎、敗血症
R3	死産原因究明	⑫脳、⑬肺、⑭胎盤	化膿性胎盤炎
	流産原因究明	⑮胎盤	壊死性胎盤炎 ※双子
	流産原因究明		

腸球菌の病原因子として知られている β -hemolysin 産生能、ゼラチナーゼ産生能、バイオフィーム形成能について保有の有無を確認した。*E. faecalis* の β 溶血能であり感染時の細胞傷害性に関与しているとされる β -hemolysin 産生能は、Ribeiro らが報告した方法¹⁰⁾ に準じて、5% 馬血液加 TSA 培地に分離菌株を画線し溶血環形成の有無を観察した。感染時の組織浸潤性とバイオフィーム形成に関与すると報告されているゼラチナーゼ産生能は、Creti らが報告した方法⁷⁾ に準じて 1.5% スキムミルク加 TSA 培地に分離菌株を画線して透明環形成の有無を確認した (図 1)。



(図 1) 左側 d~f : β -hemolysin 産生株
右側 a, b, d : ゼラチナーゼ産生株

腸球菌の抗生物質や宿主免疫に対する抵抗性および細菌間での接合伝達機能を増強するバイオフィーム形成能は、Baldassarri らが報告したマイクロプレート CV 染色法¹¹⁾ で判定した。すなわち 0.25% グルコース添加トリプトソイブロスで 37°C 24 時間培養した菌液を同培地で 1:10 に希釈し、96 穴マイクロプレートに 1 ウェルあたり 200 μ l ずつ接種したのち、37°C インキュベーター内で 24 時間好気培養した。培養後のプレートをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 300 μ l で 3 回静かに洗浄し、37°C 1 時間空気乾燥して固定したのちにハッカーのクリスタルバイオレットで染色した。余分な染色液は PBS で洗浄して室内風乾後にエタノール-アセトン溶液で溶出、マイクロプレートリーダーでの測定を行ってバイオフィーム形成能の有無を判定 (OD < 0.120 : 非形成, 0.120 < OD < 0.240 : 弱形成, OD > 0.240 : 強度形成) した。なおバイオフィーム形成能の測定は、各株に対して 5 ウェル設定し、3 回試験を繰り返した。

3. 病原性遺伝子

菌凝集と細胞への付着に関与する菌体表層タンパク質である菌体凝集物質 Agg (aggregation substance) の産生能をコードする *asa I* 遺伝子および溶血素ヘモリジン産生に関与する *cytA* 遺伝子については、Huycke らの方法¹²⁾ で、バイオフィーム形成能に影響すると報告されている腸球菌表面タンパク質産生に関与する *Esp* 遺伝子については Shankar らの方法¹³⁾ で PCR 法により実施した。

4. 薬剤耐性遺伝子

アミノ配糖体耐性遺伝子 (AG s 耐性遺伝子) については、Klundert らの方法¹⁴⁾ で、バンコマイシン耐性遺伝子 (*van* 耐性遺伝子) については、現在知られている 9 種類 (A, B, C, D, E, G, L, M, N) のうち特に *E. faecalis* で問題となる *vanA* および B について Dutka-Malen らの方法¹⁵⁾ で PCR 法により保有の有無を確認した。

5. 既報との比較

得られた病原因子および病原性遺伝子の保有率をヒトの感染症 (尿路感染症, 細菌性心筋症, 菌血症等) から分離された *E. faecalis* の報告^{5) 16) 17) 7)}, 口腔 (歯垢, 唾液, 歯牙感染症), 食品および臨床症例 (尿路感染症, 創傷感染等) からの分離報告¹⁸⁾, 動物 (プロイラー¹⁹⁾ および犬⁸⁾ から分離された *E. faecalis* の報告と比較した。

6. 薬剤感受性試験

微量液体希釈法 (米国臨床検査標準協会 (CLSI) のガイドラインに準拠) 及び一濃度ディスク拡散法 (BD センシ・ディスク) により、ペニシリン (PC), アンピシリン (ABPC), アモキシシリン (AMPC), セファゾリン (CEZ), セフォタキシム (CTX), カナマイシン (KM), ゲンタマイシン (GM), ストレプトマイシン (SM), エリスロマイ

シン (EM), エンロフロキサシン (ERFX), シプロフロキサシン (CPFX), ナリジクス酸 (NA), バンコマイシン (VA), テトラサイクリン (TC), クロラムフェニコール (CP), スルファモノメトキサール・トリメトプリム合剤 (ST 合剤) の 16 薬剤について実施した。

成績

1. 疫学調査

平成 24 年 4 月から令和 4 年 3 月までの 10 年間で *E. faecalis* が分離された病性鑑定件数は 10 件だった。内訳は流産・死産等の異常産 7 件, 乳房炎 1 件, 化膿性腎炎・敗血症による子牛死亡 1 件, 死産症例における母牛および同居牛糞便検査分離 (共に臨床症状なし) 1 件で, 異常産症例からの分離が多かった。同期間における異常産病性鑑定件数は全 124 件で, そのうち細菌および真菌を原因とする症例が 44 件 (全体の 35.5%), うち *E. faecalis* 分離例が 7 件で細菌性・真菌性異常産症例の 16%, 全異常産病性鑑定件数の 5.7% を占めていた。

2. 病原因子

病畜由来の *E. faecalis* 15 株 (菌株 ①~⑮) においては, β -hemolysin 産生株 2 株, ゼラチナーゼ産生株 14 株, バイオフィーム形成株 9 株で, それぞれ産生率は 13.3%, 93.3%, 60.0% だった。同一症例から分離された株 (菌株 ①~⑥および⑫~⑭) の病原因子は, 保有の有無に違いが見られ, 必ずしも完全に一致しなかった (表 2)。

(表 2) 病原因子と各種病原性遺伝子保有状況

	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪	⑫	⑬	⑭	⑮	陽性率%	
β -hemolysin 産生	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	13.3
ゼラチナーゼ産生	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	93.3
バイオフィーム形成	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	60
病原性	<i>asa I</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	20
	<i>cyIA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	<i>Esp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	6.7
薬剤耐性	AGs 耐性	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	66.7
	<i>vanA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	<i>vanB</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	6.7

死産症例の母牛および同居健康牛糞便由来 4 株は, 全ての株がゼラチナーゼ産生能を有し, さらにうち 2 株はバイオフィームを形成した。すなわちこれら 4 株は, 当該死産症例の胎子分離株である ①②③あるいは④⑤⑥とそれぞれ性状が一致していた。

3. 病原性遺伝子

病畜由来の *E. faecalis* 15 株 (菌株 ①~⑮) においては, *asa I* 遺伝子保有株 3 株, *Esp* 遺伝子保有株 1 株で, 病原性遺伝子保有率はそれぞれ 20.0% および 6.7% であったが, *cyIA* 保有株は認められなかった (表 2)。死産症例の母牛および同居健康牛糞便由来 4 株は, 全ての株がこれらの病原性遺伝子を保有しておらず, 当該死産症例の胎子分離株である ①~⑥と一致していた。

病原因子の発現状況と病原性遺伝子の保有状況を総合的にみると, 溶血素産生遺伝子 *cyIA* 非保有株であっても 2 株で β -hemolysin 産生を認め, バイオフィーム形成に関与すると報告されている *Esp* 遺伝子保有株は 1 株であったにもかかわらず, *Esp* 非保有株を含む 9 株が実際にバイオフィームを形成した。一方, *Esp* 遺伝子と同様にバイオフィーム形成に関与すると報告されているゼラチナーゼは 14 株が産生能を有していたが, うち 6 株 (42.9%) はバイオフィームを形成しなかった。この傾向は同一症例分離株 (菌株 ①~⑥および⑪~⑬) 間でも認められ, ゼラチナーゼ産生能保有株の約半数の株がバイオフィームを形成しなかった。また, ゼラチナーゼ非産生株であっても *Esp* 遺伝子を保有した株 (菌株 ⑩) はバイオフィームを形成した。

4. 薬剤耐性遺伝子

病畜由来の *E. faecalis* 15 株 (菌株①~⑮) 中 10 株 (66.7%) が AGs 耐性遺伝子を保有していた。また、*vanB* 遺伝子保有株も 1 株 (菌株⑮) 認められた。死産症例の母牛および同居健康牛糞便由来 4 株は、全ての株が AGs 耐性遺伝子を有していた。

病原因子、病原性遺伝子および薬剤耐性遺伝子は、供試したほとんどの分離株が複数個保有していたが、病理所見を伴わず死後増殖の可能性のある分離株 (菌株⑧, ⑨) より病態への関与が疑われた症例から分離された株のほうが、より多くの因子や遺伝子を保有している傾向にあった。

5. 既報との比較

(表 3) 既報との比較

病原因子および病原性遺伝子の保有率をヒト、食品、動物等から分離された *E. faecalis* についての既報と比較すると、今回調査した分離菌株はゼラチナーゼ産生能保有率が高く、*asa I*, *cylA*, *Esp* 遺伝子保有率は低い結果であった。このことは、ヒト由来株が比較的高い *Esp* 保有率と低いゼラチナーゼ産生能を示すことに一致しなかった (表 3)。

報告 検査項目	本報	尿路感染症 (石井ら, 2001: 日)	感染症 (RO, Soaresら, 2014: 伯)	感染症 (R, Di Rosaら, 2005: 伊)	感染症 (R, Cretiら, 2004: 伊)	口腔, 食品, 臨床 (AC, Andersonら, 2015: 葡)	鶏 (健康) (TS, Lems addekerら, 2021: 独)	犬 (健康・尿路) (S, Pysniakら, 2021: 伊)	
β-hemolysin 産生	13.3 (2/15)	17.9 (63/352)	NT	NT	14.9 (11/74)	32 (31/97)	0 (0/10)	NT	
ゼラチナーゼ産生	93.3 (14/15)	47.4 (167/352)	33.5 (74/221)	29.1 (16/55)	27 (20/74)	10.3 (10/97)	60 (6/10)	NT	
バイオフィーム形成	60 (9/15)	62.5 (220/352)	87.3 (193/221)	96.4 (53/55)	NT	66.3 (57/86)	100 (10/10)	100 (30/30)	
病原性	<i>asa I</i>	20 (3/15)	82.7 (291/352)	63.4 (140/221)	NT	63.5 (47/74)	92 (81/88)	0 (0/10)	63.3 (19/30)
	<i>cylA</i>	0 (0/15)	46.6 (164/352)	NT	NT	23 (17/74)	47.4 (46/97)	0 (0/10)	53.3 (16/30)
	<i>Esp</i>	6.7 (1/15)	72.2 (254/352)	70.1 (155/221)	45.5 (25/55)	44.6 (33/74)	70.5 (62/88)	0 (0/10)	50 (15/30)

数字は%, () 内は陽性株数/分離株数

6. 薬剤感受性試験

(表 4) 薬剤感受性試験結果

供試した全ての株で 4~10 薬剤に対する多剤耐性が認められた (表 4)。セフェム系抗生物質 (CEZ, CTX) およびナリジクス酸 (NA) に対しては全ての株が耐性を示し、アミノグリコシド系 (KM, GM, SM), マクロライド系抗生物質 (EM), シプロフロキサシン (CPFX), テトラサイクリン (TC) およびクロラムフェニコール (CP) についても多くの株が耐性だった。特にアミノグリコシド系抗生物質に対して高度耐性を示した 9 株 (菌株①~⑦, ⑩および⑪) はすべて AGs 耐性遺伝子保有株であった。

薬剤 菌株	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪	⑫	⑬	⑭	⑮	B.P
PC	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
ABPC	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
AMPC	2	2	2	2	2	2	2	1 ≥	1 ≥	1 ≥	1 ≥	1 ≥	1 ≥	1 ≥	128	16
CEZ	32	32	32	32	32	32	32	32	32	16	16	16	16	16	16	4
CTX	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64
KM	128	128	128	128	128	128	128	32	32	128	128	32	32	16	16	128
GM	256	256	256	256	256	256	256	8	8	256	256	2	2	2	4	32
SM	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	64	128	64	64	128
EM	128	128	128	128	128	128	1	1	S	128	1	1	1	1	1	8
ERFX	1>	1>	1>	1>	1>	1>	1>	1>	1>	1>	1>	1>	1>	1>	1>	4
CPFX	2	2	2	2	2	2	1	1	4	1	1	2	2	2	1	2
NA	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	—
VA	1	1	1	1	1	1	4	1	1	2	1	1	1	1	1	16
TC	64	64	64	64	64	64	64	0.5 ≥	0.5 ≥	64	64	1	0.5 ≥	1	1	16
CP	32	32	32	32	32	32	32	8	8	32	8	8	16	8	4	32
ST	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.5	0.25	0.5	16	0.5	0.25	0.25	0.5	0.25	—

微量液体希釈法: 米国臨床検査標準協会 (CLSI) のガイドラインにより判定 単位: μg/ml
— 濃度ディスク拡散法 (BD社) S: 感受性 I: 中間 R: 耐性

一方ペニシリン系抗生物質 (PC, ABPC, AMPC), エンロフロキサシン (ERFX) およびスルフアモノメトキサール・トリメトプリム合剤 (ST 合剤) に対しては、多くの株が感受性を示した。バンコマイシン (VA) についても *vanB* 遺伝子保有株 (菌株⑮) を含めてすべての分離株が感受性であったが、*vanB* 遺伝子保有株はアモキシシリン (AMPC) に対して耐性を示した。なお、死産症例の母牛および同居健康牛糞便由来 4 株は、当該死産症例の胎子分離株である①~⑥と同様の結果だった。

まとめおよび考察

E. faecalis は、ヒトの臨床においては尿路感染症や敗血症、細菌性心内膜炎の原因菌として知られ、院内感染菌としても問題視されているが、病性鑑定症例の疫学調査結果によると異常産症例からの分離が多かったことから、牛においては細菌性異常産の原因菌の1つであることが示唆された。南アフリカにおける死産原因を調査した Shabir ら²⁰⁾ は、*E. faecalis* が細菌感染症による死産の原因菌の1つであったことを報告しており、本菌がヒトおよび牛において異常産の原因菌になり得ると考えられた。さらに死産症例の母牛および同居健康牛糞便からも病畜由来株と同様の性状をもつ *E. faecalis* が分離されたことから、同居牛や牛床などの畜産環境が保菌源になり得ること、そして本来日和見細菌である本菌の起病性には宿主側の要因（周産期の免疫寛容²¹⁾、子牛の胸腺発達不良や初乳摂取不良等による低免疫状態など）が関与する可能性が推測された。

また、化膿性腎炎および敗血症による死亡症例からも *E. faecalis* が分離されたことから、ヒトと同様に尿路疾患や敗血症をも起こしうると考えられた。

E. faecalis の病原因子と病原性遺伝子について、ヒトの臨床分離株では20~40%がβ溶血性を示すことが知られており、溶血性にはβ-hemolysin 産生をコードする溶血素産生遺伝子 *cyIA* が関与すると考えられている。一方 Moussa らは、ブロイラー鶏由来 *E. faecalis* において *cyIA* 保有非溶血株および *cyIA* 非保有溶血株を報告し、他の溶血性決定因子の存在を考察している²²⁾。今回の分離株では *cyIA* を保有していないにもかかわらずβ-hemolysin を産生しβ溶血性を示す株が認められたことから、*cyIA* 保有が本菌のβ溶血性に必要条件ではなく他の溶血性決定因子が存在する可能性が示唆された。

バイオフィームは、微生物とその代謝物である細胞外多糖（菌体外多糖 Exopolysaccharides: EPS）から構成される集合体のことで腸球菌の重要な病原因子の1つであり、抗生物質抵抗性や免疫抵抗性を増加させて感染症の難治化・慢性化の原因になるだけでなく、細菌間での情報伝達機能を増強している。バイオフィーム形成には、ゼラチナーゼ産生能とゼラチナーゼ産生に関与するとされる *gelE*（ゼラチナーゼ）遺伝子、*sprE*（セリンプロテアーゼ様蛋白質）遺伝子および *Esp* 遺伝子等が関与していると考えられており^{23) 24)}、今回の分離株においても病畜由来株15株中9株（60%）で形成が認められた。今回は *gelE* および *sprE* についての調査はしていないが、① *Esp* 非保有株にバイオフィームを形成が認められたこと、②ゼラチナーゼ産生を示した約半数の株がバイオフィームを形成しなかったこと、③ゼラチナーゼ非産生株であっても *Esp* 遺伝子を保有した株はバイオフィームを形成したこと、④バイオフィーム形成株はこれらの因子のいずれか1つは保有していたことから、バイオフィーム形成において *Esp* 遺伝子の保有やゼラチナーゼ産生能を有することは必要不可欠な因子でないが、バイオフィーム形成に関与する因子の1つである可能性が示唆された。

既報と比較すると今回調査した分離菌株は、高いゼラチナーゼ産生能保有率と低い病原性遺伝子保有率を示し、ヒト由来株が比較的高い *Esp* 保有率と低いゼラチナーゼ産生能を示すことに一致しなかった。Tsikrikonis ら²⁵⁾ は、ヒト由来株の方が動物由来株より有意に *Esp* 遺伝子保有率が高く、動物由来 *E. faecalis* のバイオフィーム産生の割合や程度はゼラチナーゼ産生に関連していると報告している。一方で Annette ら³⁾ や Kristich ら²⁶⁾ および Mohamed ら²⁷⁾ は、*Esp* や *gelE* の保有、ゼラチナーゼ産生とバイオフィーム形成能の間に有意な相関関係はなかったと報告している。今回の結果から動物（牛）由来である分離株の低い *Esp* 保有率は Tsikrikonis らの報告と一致するが、ゼラチナーゼ産生能を有していても約半数の株がバイオフィームを形成しなかったことを考慮すると、ゼラチナーゼ産生能とバイオフィーム形成能が必ずしも相関しているとはいえず、バイオフ

イル形成には *Esp* 遺伝子の保有やゼラチナーゼ産生能の有無とともに感染生体内外の条件やほかの因子が複合的に影響していると考えられた。

腸球菌属菌の薬剤耐性には、先天的に持っている自然耐性と突然変異や耐性遺伝子獲得による獲得耐性が知られており、*E. faecalis* は自然耐性として β -ラクタム系抗生剤のうち特にセフェム系薬剤、スルファメトキサール・トリメトプリム (ST) 合剤に耐性をゲンタマイシンなどのアミノグリコシド系およびリンコマイシンに低度耐性を示す。獲得耐性は、エリスロマイシンなどのマクロライド系、テトラサイクリン、ペニシリン系、クロラムフェニコールなどに認められるとともに、元々自然耐性を有するアミノグリコシド系やリンコマイシンに対しての高度耐性獲得が知られている。また近年特に、多剤耐性腸球菌に対する治療薬として汎用されてきたバンコマイシンに対して耐性を示す (MIC 値 16 μ g/ml 以上) バンコマイシン耐性腸球菌 (vancomycin-resistant enterococci:VRE) が、ヒトの臨床現場で問題となっている。ヒトからの VRE 分離は 1988~89 年に欧米で報告され、それ以降米国ではバンコマイシン後発品販売許可をきっかけに医療環境におけるバンコマイシン使用量が増加したことに伴って 1997 年以降 VRE の高い分離率が続いている。一方ヨーロッパでは、バンコマイシンと同じグリコペプチド系抗菌薬である動物用アボパルシンが家畜、主に鶏の成長促進を目的とした飼料添加物として長期間用いられていたため、鶏を含む家畜の腸管内の VRE を選択的に増やし、畜産環境を介してヒトに入ってきたとされている。

E. faecalis の薬剤耐性獲得に関する遺伝子については、ゲンタマイシンなどアミノグリコシド系薬剤への高度耐性獲得に関与しているアミノ配糖体 (AGs) 耐性遺伝子やバンコマイシンに対する耐性獲得に関与しているバンコマイシン耐性遺伝子 (van 遺伝子) などが知られている。特に van 遺伝子については現在 9 種類 (A, B, C, D, E, G, L, M, N) が報告されているが、*E. faecalis* で問題になるのは vanA と B 型である。

今回供試した分離株は全ての株が 4~10 薬剤に対する多剤耐性を示し、自然耐性と考えられるセフェム系薬剤 (CEZ, CTX) やオールドキノロンであるナリジクス酸 (NA) に対する耐性のみならず、アミノグリコシド系 (KM, GM, SM) への高度耐性、マクロライド系抗生物質 (EM)、テトラサイクリン (TC) およびクロラムフェニコール (CP) に対する獲得耐性を認めた。アミノグリコシド系薬剤に対して高度耐性を示した株はすべて AGs 耐性遺伝子を保有していたことから、耐性化に AGs 遺伝子獲得が関与していると考えられる。さらに腸内細菌群、緑膿菌などのグラム陰性菌に加え、グラム陽性球菌、マイコプラズマやクラミジアなどの非定型菌、嫌気性菌さらには抗酸菌にも抗菌力を示し、極めて広い抗菌スペクトルを有しているニューキノロンであるシプロフロキサシン (CPF) に対する耐性化も認められたことは留意すべき結果であった。またバンコマイシン (VA) については、vanB 遺伝子保有株 (菌株⑮) を含めてすべての分離株が感受性であったが、vanB 遺伝子保有株はアモキシシリン (AMPC) に対して耐性を示した。一般的に *E. faecalis* は β ラクタム感受性であるが、VRE は他のグリコペプチド系 (例: テイコプラニン)、アミノグリコシド系、および細胞壁に作用する β ラクタム系薬剤 (例: ベンジルペニシリン、アンピシリン) にも耐性の場合がある。今回テイコプラニン感受性については調査しておらず、vanB 遺伝子保有株 (菌株⑮) はアミノグリコシド系薬剤に対して感受性であったが、 β ラクタム系薬剤であるアモキシシリンに高度耐性を示したことは、今後薬剤耐性化が進む危険性がある。

腸球菌は本来、哺乳類の腸管内や畜舎環境に常在する日和見細菌である。今回牛から分離された *E. faecalis* について、その病原性及び薬物耐性状況等を精査することにより、ヒトと同様の疾患の起原因菌になり得る可能性と高いゼラチナーゼ産生能および獲得耐性を含む多剤耐性化リスクを有する細菌が、牛の腸管内や畜産環境

に常在し保菌されていることが明らかになった。こうしたことから、畜産環境の衛生管理の重要性を再認識するとともに、抗生剤使用には一層の注意を要するべきと思われる。

参考文献

- 1) NIID 国立感染症研究所感染症疫学センター：データベース
- 2) 感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（平成十年法律第百十四号）第六条6項九および厚生労働省令
- 3) Annette C. Anderson, Daniel Jonas, Ingrid Huber, Lamprini Karygianni, Johan Wölber, Elmar Hellwig, Nicole Arweiler, Kirstin Vach, Annette Wittmer, and Ali Al-Ahmad : *Enterococcus faecalis* from Food, Clinical Specimens, and Oral Sites: Prevalence of Virulence Factors in Association with Biofilm Formation. *Front Microbiol.* 6: 1534. (2016)
- 4) L. Baldassarri, R. Creti, C. R. Arciola, L. Montanaro, M. Venditti and R. Di Rosa : Analysis of virulence factors in cases of enterococcal endocarditis. *The European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI*, 10, 1006-1035 (2004)
- 5) 石井亜矢乃：尿路感染症由来 *Enterococcus faecalis* の病原性因子に関する分子疫学的検討. *岡山医学会雑誌*第 113 卷 April 2001, pp. 17-25
- 6) 池康嘉：腸球菌（*Enterococcus*）の病原性因子. *日本細菌学雑誌* 72 (2) : 189-211 (2017)
- 7) Creti R, mperi M, Bertuccini L, Fabretti F, Orefici G, Di Rosa R & Baldassarri L : Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *J Med Microbiol* 53: 13-20 (2004)
- 8) Dagmara Stepie Ń n-Py Ń niak, Fabrizio Bertelloni , Marta Dec, Giulia Cagnoli , Dorota Pietras-Ozga, Renata Urban-Chmiel and Valentina Virginia Ebani : Characterization and Comparison of *Enterococcus* spp. Isolates from Feces of Healthy Dogs and Urine of Dogs with UTIs. *MDPI Animals* 11, 2845. (2021)
- 9) Fernanda Gomes, Maria Jose Saavedra and Mariana Henriques : Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms. *FEMS Journals Pathogens and Disease*, 74 (2016)
- 10) Ribeiro T, Oliveira M, Fraqueza MJ, Lauková A, Elias M, Tenreiro R, et al. : Antibiotic resistance and virulence factors among *Enterococci* isolated from chouriço, a traditional Portuguese dry fermented sausage. *J Food Prot.* :74(3):465-9 (2011)
- 11) Baldassarri L, Cecchini R, Bertuccini L. et al. : *Enterococcus* spp. Produces slime and survives in rat peritoneal macrophages. *Med Microbiol Immunol* 190: 113-120 (2001)
- 12) Huycke MM and Gilmore MS: Frequency of aggregation substance and cytolysin genes among enterococcal endocarditis isolates. *Plasmid* 34 152-156 (1995)
- 13) Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G and Gilmore MS: Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun* 67: 193-200 (1999)
- 14) Van de Klundert Jam and Vliegthart JS: PCR detection of genes coding for aminoglycosidemodifying enzymes; in *Diagnostic Molecular Microbiology*, Persing DH, Smith TF, Tenover FC and White TJ eds,

American Society for Microbiology, Washington, DC(1993)pp.547-552.

- 15) Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P: Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol.* 33:24-27, (1995)
- 16) Renata O Soares, Ana Cláudia Fedi, Keli C Reiter, Juliana Caierão, and Pedro A d'Azevedo Federal : Correlation between biofilm formation and gelE, esp, and agg genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates. University of Science Health of Porto Alegre; Porto Alegre, RS Brazil *Virulence* 5:5, 634-637; July 1, (2014)
- 17) Roberta Di Rosa, Roberta Creti, Mario Venditti, Raffaele D' Ameliol, Carla R. Arciola, Lucio Montanaro, & Lucilla Baldassarri : Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol Lett* 256 (2006) 145-150
- 18) Annette C. Anderson, Daniel Jonas, Ingrid Huber, Lamprini Karygianni : *Enterococcus faecalis* from Food, Clinical Specimens, and Oral Sites: Prevalence of Virulence Factors in Association with Biofilm Formation. *Frontiers in Microbiology*. January (2016)
- 19) Teresa Semedo-Lemsaddek, João Bettencourt Cota, Tânia Ribeiro, Amélia Pimentel, Luís Tavares, Fernando Bernardo and Manuela Oliveira : Resistance and virulence distribution in enterococci isolated from broilers reared in two farming systems. *Irish Veterinary Journal* (2021) <https://doi.org/10.1186/s13620-021-00201-6>
- 20) Shabir A Madhi, Carmen Briner, Salome Maswime, Simpiwe Mose, Philiswa Mlandu, Richard Chawana, Jeannette Wadula, Yasmin Adam, Alane Izu, Clare L Cutland : Causes of stillbirths among women from South Africa: a prospective, observational study. *Lancet Glob Health* (2019) 7: e503-12
- 21) 石川潤 : 乳牛の周産期の免疫応答, 畜産の研究, 45, 307-312 (1991)
- 22) Moussa S. Diarra, Heidi Rempel, Julie Champagne, Luke Masson, Jane Pritchard, and Edward Topp : Distribution of Antimicrobial Resistance and Virulence Genes in *Enterococcus* spp. and Characterization of Isolates from Broiler Chickens. *Appl Environ Microbiol.* 2010 Dec; 76(24): 8033-8043.
- 23) Y.A. Su, M.C. Sulavik, P. He, K.K. Makinen, P.L. Makinen, S. Fiedler, R. Wirth & D.B. Clewell: Nucleotide sequence of the gelatinase gene (gelE) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* *Infect Immun.* 1991 Jan;59(1):415-20. doi: 10.1128/iai.59.1.415-420. (1991)
- 24) X. Qin, K.V. Singh, G.M. Weinstock & B.E. Murray: Effects of *Enterococcus faecalis* fsr genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect Immun.* 2000 May;68 (5) :2579-86. doi: 10.1128/IAI.68.5.2579-2586. (2000)
- 25) Tsirikonis, G., Maniatis, A. N., Labrou, M., Ntokou, E., Michail, G., Daponte, A., et al : Differences in biofilm formation and virulence factors between clinical and fecal enterococcal isolates of human and animal origin. *Microb. Pathog.* 52, 336-343. doi: 10.1016/j.micpath. (2012)
- 26) Kristich, C. J., Li, Y. H., Cvitkovitch, D. G., and Dunny, G. M: Esp-independent biofilm formation

- by *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 186, 154-163. doi: 10.1128/JB.186.1.154-163. (2004)
- 27) Mohamed, J. A., and Murray, B. E. : Lack of correlation of gelatinase production and biofilm formation in a large collection of *Enterococcus faecalis* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5405-5407. doi: 10.1128/JCM.43.10.5405-5407 (2005)

愛玩鶏（矮鶏）に認められた糸状虫症

西部畜産事務所

○細川久美子 伊藤弘貴

はじめに

鳥類の糸状虫症は、吸血昆虫によって媒介される線虫感染症で、一般に鳥類の宿主では病原性はないと考えられている¹⁻²⁾。鳥類の糸状虫症は多くが野鳥の報告であり、家禽での症例報告は非常に少ない。インドとマレーシアにおいて、糸状虫の種の同定に成功した家禽の糸状虫症が報告されている¹⁾。日本では、2017年に千葉県の愛玩鶏飼養農家において、死亡鶏の組織及び同居鶏の血液にミクロフィラリア (Mf) が確認されている¹⁾。本症例は日本で2例目の家禽における糸状虫症であり、日本では初めて、病理組織的検索により成虫が確認された事例である。

農場概要

令和3年7月、広島県の愛玩鶏飼養農家で糸状虫症を確認した。鶏群はチャボが11羽、名古屋コーチン4羽、ボリスブラウン2羽、烏骨鶏1羽であった。これらの鶏は全て自家繁殖であり、過去3年間に新たな導入はなかった。鶏群は個人消費用の市販飼料と古米を給餌され、昼間は飼い主の家の畑に放し飼いし、夜は鶏種毎に分かれた鶏小屋で飼育されていた。鶏群は過去に病気の発生はなく、予防接種や投薬による治療歴もなかった。飼養場所は、田畑に囲まれ、20m以内に小さな川と木立があった。7月20日、鶏群の飼料摂取量の低下が認められ、26日に2羽の鶏（ボリスブラウン、矮鶏）が死亡した。翌日、更に3羽の矮鶏が死亡したため、管轄の家畜保健衛生所に通報があった。高病原性鳥インフルエンザ否定後、これら3羽を対象に病性鑑定を実施した。

方法

1. 病理学的検査

(1) 解剖学的検査

死後24時間以上経過した矮鶏（死亡鶏）3羽（No.1～3）について、常法により病理解剖を実施した。

(2) 組織学的検査

採材臓器（脳、脊髄、心臓、肺、喉頭、気管、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、食道、そ嚢、腺胃、筋胃、臍臓、十二指腸、小腸、盲腸、直腸、坐骨神経、大腿筋、大腿骨、精巢、卵巣、および卵管、甲状腺、副腎、鶏冠及び眼球）を10%緩衝ホルマリンで固定後、常法により組織標本を作製、HE染色で病理組織学的検査を実施した。

2. 細菌学的検査

脳、心臓、腎臓、肝臓、脾臓及び肺を材料として、5%羊血液加寒天培地を用いて37℃、48時間、嫌気培養、DHL寒天培地を用いて37℃、24時間、好気培養を実施した。同定には簡易同定キット（ラピッドID32E、ID32スタファピ、アピ20E及びアピ50CH（シスメック・バイオメリュー（株）、東京））を使用した。

3. ウイルス学的検査

脳及び肝臓を材料として、発育鶏卵を用いたウイルス分離を2代実施した。

4. 媒介昆虫の調査

鶏小屋にライトトラップを一晩設置し、昆虫を捕獲した。捕獲した昆虫から吸血昆虫を集め、コンパウンドと共に -80°C のn-ヘキサンに浸漬し凍結切片を作製、ホルマリン固定後、HE染色及びメチレンブルー染色で観察した。

5. 糸状虫の解析

死亡鶏3羽の肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺及び同居鶏7羽の翼静脈から採血した全血を材料として、以下の検査を実施した。

(1) 同居鶏の血液検査

濃厚塗抹法及びアセトン集虫法により、Mfの検索を行った。

(2) 遺伝子検査（北海道大学大学院獣医学研究院へ依頼）

ア PCRと電気泳動

DNeasy® Blood & Tissue kit (QIAGEN)を用いて臓器及び全血から抽出したDNAをテンプレートとして、Sekiguchiら¹⁾の方法に従い線虫の18S rRNA及びミトコンドリア Cytochrome c oxidase Iを対象としてPCRを行った。

イ サンガーシーケンスとBLAST検索

PCRによって得られた増幅産物から、NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kitによってDNAを精製した。この精製DNAをテンプレートとし、Big Dye Terminator version 3.1 Cycle Sequencing kit (Thermo Fisher scientific)を用いてシーケンス反応を行い、3130x genetic analyserにより配列を取得した。配列の解析はATGCソフトウェア ver. 9.1により実施した。BLASTを用いて、得られた配列と相同性の高い配列を検索した。

ウ 系統樹作成

サンガーシーケンスで得られた18S rRNA配列を用いて、MEGA7により系統樹を作成した。

成績

1. 病理学的検査

(1) 解剖学的検査

No.1は雌で体重300gと削瘦していた。No.2及び3は雄で体重は700gと600gであった。3羽とも鶏冠に痲痲が形成され、皮下が軽度に乾燥していた。No.2の肝臓に多くの白斑が認められた。No.1及び3には1カ所ずつ小さな白斑が認められた。その他の臓器に肉眼的な異常は認めなかった。

(2) 組織学的検査

死亡鶏全羽の肺の毛細血管や肺動脈及び肺静脈内にMfが散見された(図1)。No.2では実質に異物巨細胞を伴った小型の肉芽腫形成が散見された。Mfは肺の他、No.2及び3の肝臓、腎臓、心臓にも確認され、特に心房内の血液中には多数のMfが認められた。また、No.3の心腔内では径150 μm 前後の成虫と推察される糸状虫が確認され、糸状虫の体内には多くのMfが存在した(図2)。

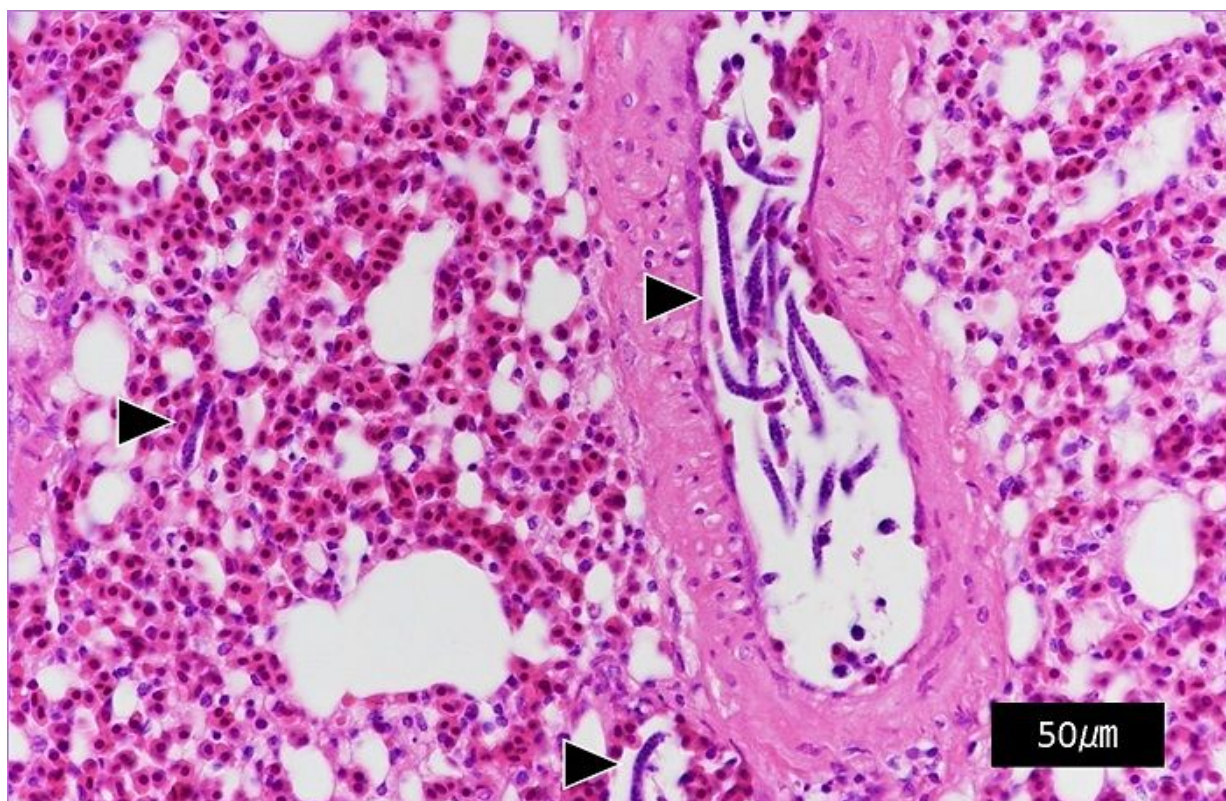


図1 肺, 毛細血管及び血管内のミクロフィラリア(矢頭)

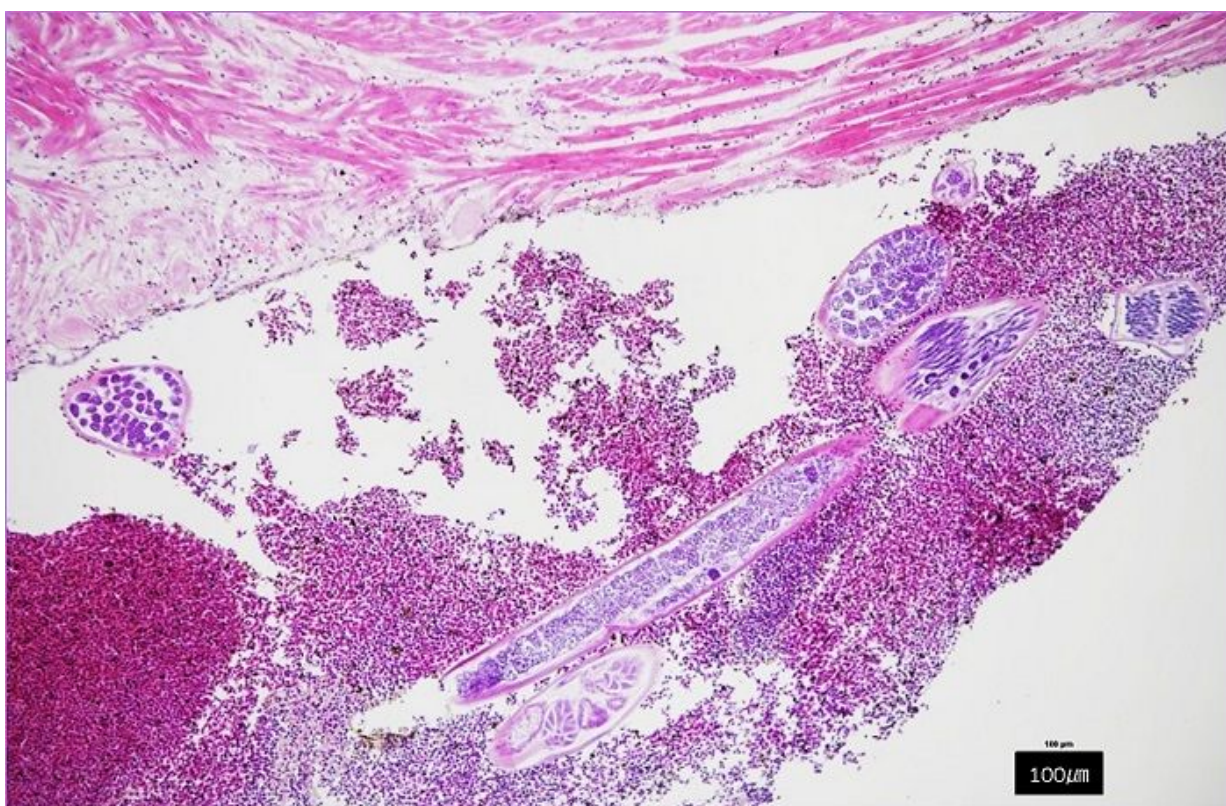


図2 心臓, 体内にミクロフィラリアを容れた糸状虫

肝臓では、No.2 において主に小葉中心性にグラム陰性桿菌を伴った腐敗又は変性、壊死が認められた。No.3 において、小壊死巣が散見され、一カ所で血管炎又は胆管炎と推察される肉芽腫形成が認められた。腎臓の尿細管内腔及び尿細管上皮細胞に好塩基性で類円形から不定形の結晶物沈着、尿管内に好酸性から好塩基性で円形から類円形の結晶物が認められた。鶏冠は部分的に表皮の肥厚及び細菌塊、細胞退廃物（デブリ）を伴った痂皮形成が認められ、真皮では軽度から中等度のリンパ球及び偽好酸球浸潤が認められた。脳脊髄において稀に軽度の囲管性細胞浸潤が認められた。

2. 細菌学的検査

主要臓器から 3 種類の細菌が分離された（表 1）が、死後 24 時間以上経過した検体であったため、これらの細菌は死後増殖と判断した。

3. ウイルス学的検査

ウイルスは分離されなかった。

4. 媒介昆虫の調査

翅の紋様から、鶏小屋で捕獲された吸血昆虫は多くがニワトリヌカカと推察された。捕獲された数千匹のニワトリヌカカの一部で吸血が確認されたが、検索したヌカカの体内に Mf や感染幼虫は確認できなかった。

5. 糸状虫の解析

(1) 同居鶏の血液検査

濃厚塗抹法では Mf は確認されなかった。アセトン集虫法において、同居鶏 7 羽中、No.1 及び 3 の血液中に Mf が認められた。

(2) 遺伝子検査

ア PCR

18S rRNA 領域を対象とした PCR では、同居鶏 No. 1, 3, 4, 7 の血液、死亡鶏 No. 2 の腎臓、心臓、肺から予想される増幅産物（約 1,000 bp）に近い PCR 産物（1,000–1,500 bp）が得られた（図 3）。ミトコンドリア Cytochrome c oxidase I を対象とした PCR では、鶏 No. 2 の心臓、肺から予想される増幅産物（約 650 bp）に近い PCR 産物（600–700 bp）が得られた（図 4）。

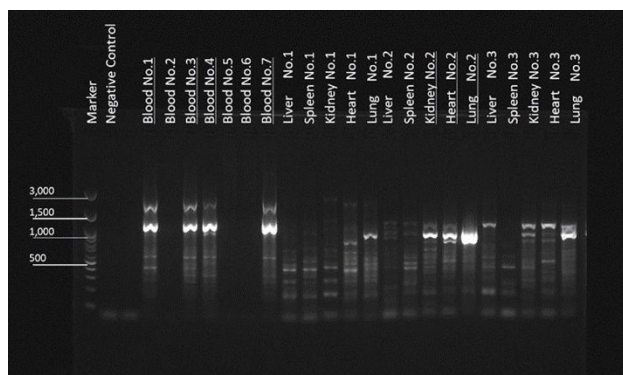


図3 18S rRNA領域（予想産物長：約1,000 bp）

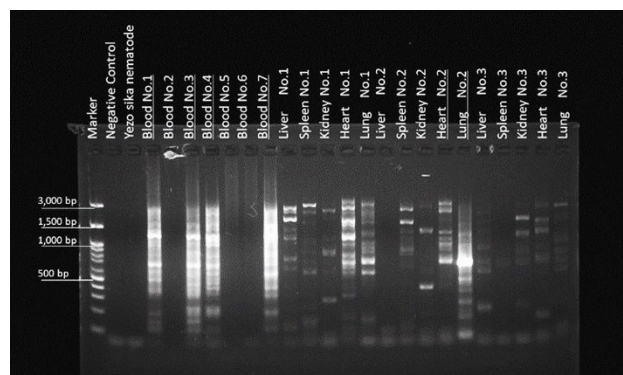


図4 Cytochrome c oxidase（予想産物長：約650 bp）

イ サンガーシーケンスと BLAST 検索

同居鶏 No. 1, 3, 4, 7 の血液で得られた 18S rRNA の PCR 産物は家禽の配列に相同であった。No. 2 の腎臓, 心臓, 肺から得られた 18S rRNA の産物は線虫の 18S rRNA に相同であり, Sekiguchi ら報告¹⁾の Onchocercidae sp. も候補に含まれていた。Cytochrome c oxidase I のシーケンスは波形が不明瞭でノイズが多く, 解析できなかった。

ウ 系統樹作成

今回得られた配列は Sekiguchi ら報告¹⁾の Onchocercidae sp. (LC378874.1) と 1 塩基違いで, 同じクレードに属した (図 5)。

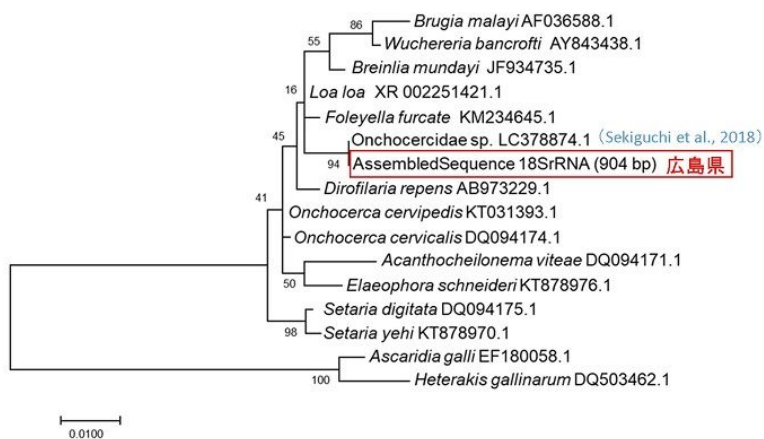


図5 系統樹

まとめ

本症例は国内 2 例目の鶏における鳥糸状虫症の報告である。この糸状虫は 2018 年に報告された千葉県¹⁾の鳥糸状虫¹⁾の遺伝子と 99.9%一致したため同種であると考えられた。このことから, 日本には鶏に感染する糸状虫が関東および中国地方に分布している可能性が示唆された。また, 本症例は過去 3 年間導入がない農場であったことから, 周囲の環境中にこの糸状虫の生活環に関わる中間宿主が存在²⁾し, 愛玩鶏などの放し飼いは感染リスクがあると考えられた。

鳥類の血液に生息する Mf は概日周期を示し, 末梢血よりも肺に集まる傾向がある³⁾⁴⁾。本症例でも既報¹⁾と同様に多くの Mf が肺の血管内に認められたが, 既報とは異なり, 顕著な病変は認められなかった。鳥類の糸状虫症は一般的に宿主に対して病原性はないと考えられている²⁾が, 今回は 3 羽同時期の死亡であり, 有意菌及びウイルス分離陰性であったことから, 糸状虫が死亡に関与した可能性も考えられた。

鳥類の糸状虫症は通常, 成虫または Mf の検出によって確認される¹⁻²⁾。糸状虫の種の同定は, 一般的に成虫の形態学的観察に基づいている²⁾。肉眼検査で成虫は確認できなかったが, 組織学的検査で心臓内腔に Mf を有する成虫が確認された。鳥類における成虫の寄生部位は, 糸状虫の種によって大きく異なるが, 一般的な寄生部位は, 体腔, 心臓, 頭と頸部の皮下組織及び脚の関節である²⁾。この糸状虫の寄生部位は心腔と判明し, 成虫の検出には心臓内腔を検査する必要があるものの, 径 150 μ m 前後とかなり小型であるため, 見逃しに注意が必要となる。今回の検索は, 鶏の糸状虫の種の同定に有用なデータとなった。今後は, 成虫採材による種の同定や中間宿主の検索, PCR による血液検査などの確立とサーベイの実施が重要と考えられた。

参考文献

- 1) Maki Sekiguchi, Nariaki Nonaka, Mamoru Adachi, Tamami Sekiya, and Yu Yamamoto. Case Report Avian Filariasis in Backyard Chickens in Japan. AVIAN DISEASES. 62: 326 - 329. 2018.

- 2) Chery M. Bartlett. Chapter 26 Filarioid Nematodes. Parasitic Diseases of wild birds. Carter T. Atkinson, Nancy J. Thomas, D. Bruce Hunter. 439-462. Wiley-Blackwell. 2008.
- 3) Hamer, G. L., T. K. Anderson, G. E. Berry, A. P. Makohon-Moore, J. C. Crafton, J. D. Brawn, A. C. Dolinski, B. L. Krebs, M. O. Ruiz, P. M. Muzzall, T. L. Goldberg, and E. D. Walker. Prevalence of filarioid nematodes and trypanosomes in American robins and house sparrows, Chicago USA. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 2:42 - 49. 2012.
- 4) Holmstad, P. R., A. Anwar, T. Iezhova, and A. Skorpung. Standard sampling techniques underestimate prevalence of avian hematozoa in willow ptarmigan (*Lagopus lagopus*). *J. Wildl. Dis.* 39:354 - 358. 2003.
- 5) Binkienė et al. Molecular and morphological characterization of three new species of avian Onchocercidae (Nematoda) with emphasis on circulating microfilariae. *Parasites Vectors.* 14. 137. 2021. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04614-8>

豚丹毒抗体検査に係る生菌凝集反応と ELISA の比較検討

西部畜産事務所 北部畜産事務所

○船守足穂 印具愛華

はじめに

豚丹毒は、*Erysipelothrix rhusiopathiae* 感染により豚に皮膚病変や関節炎、心内膜炎等の様々な病態を引き起こし、急性感染時は敗血症を呈し、高率で死亡する¹⁻²⁾。本病は国内で年間約 2,000 頭の発生が報告されており³⁾、対策の一環としてワクチン接種による予防や抗体検査による農場内の感染状況及びワクチンテイクの把握が重要である。本病の主な抗体検査法として、全国の病性鑑定施設で広く実施されている生菌 (Marienfelde 株) を利用した凝集反応 (以下 GA) の他、菌体表層の SpaA 抗原等を利用した ELISA が実施されている。今回、本病の清浄化対策に取り組む一養豚農場を対象に、GA 及び ELISA による抗体検査を実施し、その成績や有用性について比較・検討したので、概要を報告する。

農場及び発生概要

当該農場は母豚約 1,000 頭規模の繁殖・肥育一貫経営農場であり、豚舎はウインドウレス構造。産子は 21 日齢で離乳後、分娩舎から離乳舎に移動し、65 日齢で肥育舎に移動していた。ワクチンは、33~44 日齢でサーコウイルスワクチン、55~61 日齢で豚丹毒生ワクチンを接種していた (図 1)。なお、導入豚は全て SPF 豚であった。

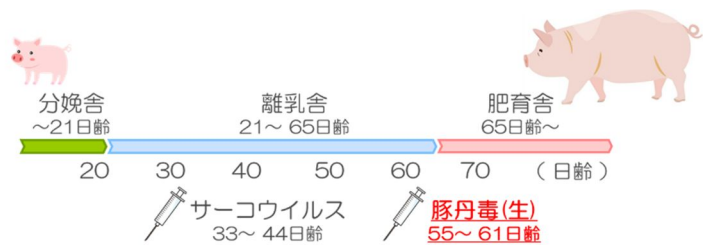


図 1：農場ピッグフロー

表 1：農場における豚丹毒年間発生頭数

年度	発生頭数
平成26年	4
平成27年	10
平成28年	23
平成29年	14
平成30年	11
令和元年	39

表 2：サーベイランスにおける母豚の平均抗体価推移

年度	平均抗体価	検査法
平成29年	10.4	スライド凝集反応 (アグテック SE)
平成30年	8.7	GA
令和元年	<4	GA

当該農場では、平成 26 年に出荷豚 1 頭で初めてワクチン株による豚丹毒 (関節炎型) の発生が確認されたが、翌年以降も発生が増加したため、平成 28 年に飼養衛生管理を中心とした対策指導を開始した⁴⁾。その結果、一度は発生頭数が減少したものの、令和元年は前年と比較して大幅に増加した (表 1)。そこで、当該農場における過去のサーベイランスにおける母豚の平均抗体価を調査したところ、3 年間で抗体価が大きく低下していることが判明し (表 2)、母豚群への免疫付与が不十分であることが発生頭数増加の一因と推察されたことから、今回ワクチンプログラムを再検討した。

材料及び方法

1. ワクチンプログラム検討

母豚に対しては、分娩20日後の離乳に併せて豚インフルエンザ混合不活化ワクチンを接種することとした。産子に対しては、母豚へのワクチン接種に伴い、接種時期を60日齢から80～90日齢に変更した。

2. 抗体検査

ワクチンプログラム変更に伴い、母豚は不活化ワクチン接種による抗体付与の確認を目的として、産子は生ワクチン接種日齢の妥当性を評価するため、以下の45検体を供試材料として、GA及びELISAにより豚丹毒抗体価を測定した（ELISAは株式会社微生物化学研究所に依頼）。

(1)母豚：最も抗体価が低いと考えられる分娩20日後（不活化ワクチン接種前）の血清5検体（5頭分）

(2)産子：(1)の産子各2頭（計10頭）における概ね20・50・90・110日齢の血清40検体

GAは野末らの報告⁵⁾に従い、4倍未満～256倍以上の8段階で評価し、ELISAは100倍未満～1600倍以上の6段階で評価した。なお、いずれの検体も採材前に抗菌性物質を使用していないことを確認している。

成績

(1)母豚：5頭中4頭においてGAで4～64倍、ELISAで200倍となり、1頭についてはGAで ≥ 256 倍、ELISAで $\geq 1,600$ 倍であった（表3）。

(2)産子：(1)で高値を示した母豚の産子1頭についてはGAで ≥ 256 倍（20日齢）・128倍（50日齢）・4倍（90日齢）・ < 4 倍（110日齢）、ELISAで $\geq 1,600$ 倍・800倍・100倍・ < 100 倍であったが、その他9頭についてはGAで $< 4 \sim 32$ 倍、ELISAで $< 100 \sim 400$ 倍であった（表3）。また、10頭中7頭がワクチン接種後の90日齢から110日齢にかけてGA・ELISAともに抗体価の上昇が認められた。なお、いずれの個体も感染が疑われるような抗体価の急激な上昇は認められなかった。

表3：抗体検査成績

検体	20日齢		50日齢		90日齢		110日齢	
	GA	ELISA	GA	ELISA	GA	ELISA	GA	ELISA
母豚1	8	200						
子豚1-1	8	< 100	< 4	< 100	< 4	< 100	< 4	< 100
子豚1-2	4	< 100	< 4	< 100	4	< 100	8	200
母豚2	4	200						
子豚2-1	4	100	< 4	< 100	< 4	100	8	200
子豚2-2	8	100	< 4	< 100	< 4	< 100	8	200
母豚3	4	200						
子豚3-1	4	< 100	< 4	< 100	< 4	100	4	200
子豚3-2	4	< 100	< 4	< 100	< 4	100	4	100
母豚4	$256 \leq$	$1600 \leq$						
子豚4-1	$256 \leq$	$1600 \leq$	128	800	4	100	< 4	< 100
子豚4-2	8	400	< 4	< 100	< 4	< 100	< 4	100
母豚5	64	200						
子豚5-1	32	< 100	4	< 100	< 4	< 100	4	100
子豚5-2	32		4	< 100	< 4	< 100	4	100

：未実施

まとめ

豚丹毒対策の一環として、適切なワクチン接種による発生予防が重要であるが、ワクチンプログラムの検討及び評価にあたっては、飼養豚の抗体保有状況を正確に把握する必要がある。保有抗体の把握には、通常ワクチン抗原を用いた ELISA 法により評価を行うが、その方法は特殊であるため当所を含む都道府県の病性鑑定施設における実施は困難である。本病の抗体検査法に係る比較検討については多く報告されているが⁵⁻⁶⁾、今回本県においても同一検体を用いて GA 及び ELISA を実施することで、農場のワクチンプログラムを評価するとともに、両者の特性について検討することができた。

本調査においては、GA・ELISA とともに概ね農場のワクチンプログラムを反映した成績であると考えられた。母豚については GA・ELISA とともに高い抗体価を示した 1 頭は採材以前に感染及び発症を疑う状態であったと推察されたものの、その他 4 頭は GA で 4~62 倍、ELISA で 200 倍であったことから、抗体価が最も低いと想定されるワクチン接種前のステージにおいても抗体が検出されたことから、ワクチン接種により概ね免疫が安定していると考えられた。

産子については、高い抗体価を示した母豚の産子 1 頭については、GA・ELISA とともに 20 日齢で抗体価が突出して高く、その後は経過と共に抗体価は低下したが、その他 9 頭については、GA・ELISA とともに 20 日齢から 50 日齢にかけて抗体価は減少傾向にあり、移行抗体の消失を反映したと考えられた。90 日齢から 110 日齢にかけて抗体価は上昇傾向にあり、ワクチン接種により免疫を獲得したと考えられた。また、本調査において産子の新規感染は疑われなかったことから、ワクチンプログラムが有効であると考えられた。

本調査における GA 及び

ELISA の成績を比較した結果、

既報⁵⁻⁶⁾と同様に両者は概ね

相関していたが、GA は特に母

豚群においてばらつきが大きい

傾向にあった(表 3)。一方、

ELISA において 100 倍未満(抗

体陰性)であった 22 検体のうち

8 検体については、GA では

4 倍から 32 倍(抗体陽性)に

分布していたことから、GA は

ELISA と比較して感度が高い

傾向にあると推察された。このことから、GA は抗体価が上昇しにくい生ワクチンの評価や、子豚の移行抗体消失期におけるワクチン接種時期の検討を目的とした抗体検査においては有用であると推察された。

一方、ELISA は家保における検査は困難であるが、GA と比較して短時間で多検体の検査が可能であるため、抗体価が高く上昇しやすい不活化ワクチンや感染抗体の評価を目的とした抗体検査においては有用であると推察された。また、生菌を用いる GA とは異なり抗菌剤による影響を受けにくいことから、農場の抗菌剤使用状況によっては ELISA による評価が望ましいと考えられた。

表 4 : GA と ELISA の比較

	ELISA 抗体価					
	<100	100	200	400	800	1600 ≤
G A 抗 体 価	<4	14	4			
	4	6	5	3		
	8	1	1	4	1	
	16					
	32	1				
	64			1		
	128				1	
	256 ≤					2

今回、一養豚農場における豚丹毒清浄化対策としてワクチンプログラムを再検討し、評価指標として抗体検査を活用することで、年間発生頭数は39頭（令和元年度）から4頭（令和3年度，2月現在）と大きく減少し、農場の生産性改善・向上に繋がった（表5）。今後も多くのデータを蓄積し検証を重ねることで、発生予防対策として抗体検査が有効に活用されることが期待される。

表5：対策後の発生頭数推移

年度	発生頭数
令和元年	39
令和2年	20
令和3年	4

謝辞

稿を終えるに当たり、ELISA検査を実施していただくとともに多くのご助言をいただいた株式会社微生物化学研究所の先生方に深謝いたします。

参考文献

- 1) Opriessnig T, et al: Erysipelas, Diseases of swine, Jeffrey JZ, Locke AK, Alejandro R, Kent JS, Gregory WS, eds, 11th ed, 835-843, Wiley-Blackwell Publishing, Ames, Iowa (2019)
- 2) 飯島俊哉：豚病学，第4版，342-352，近代出版（1999）
- 3) 農林水産省：監視伝染病の発生状況（2022），（https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/kansi_densen.html）
- 4) 山中裕貴ら：平成29年度広島県家畜保健衛生業績発表会集録，21-24（2018）
- 5) 野末紫央ら：豚丹毒抗体検査法の比較検討，家畜衛生学雑誌，35，47-50（2009）
- 6) 辻寛子ら：と畜場で豚丹毒が継続摘発された一肥育農場の衛生対策と抗体検査手法の検討，平成25年度神奈川県家畜衛生業績発表会集録，56-64（2014）

ナイアシンを給与し乳牛を健康にする研究

広島県立西条農業高等学校 畜産科 2年

○愛甲結奏, 葛 夏実

はじめに

乳牛は暑さにとても弱く、暑熱環境下では採食量の減少を引き起こす。このことにより乳量や乳質の低下を引き起こす。また、繁殖機能の低下も招くことから、夏季は受胎率が低下することが知られている。暑熱ストレスによる採食量の低下は免疫力の低下も引き起こし、乳房炎などの疾病を多発させる。

そこで、私たちは先輩方から「ナイアシンを給与し乳牛を健康にする研究」を受け継ぎ、大きな課題である嗜好性を改善するために様々なフレーバーを添加して検証することにした。

仮説

1. 泌乳牛

ナイアシンにフレーバーを加えることで、嗜好性が改善し、摂取量が増加することで、牛が受ける暑熱ストレスが軽減され、その結果、乳量、乳質及び飼料摂取量（乾草・濃厚飼料）を上昇させることができる。

2. 乾乳牛

ナイアシンにフレーバーを加えることで、嗜好性が改善し、摂取量が増加し、エネルギー状態が整い、周産期病の予防や分娩の危険性が減少する。また、熱中症にもなりにくくなり、健康状態を維持できる。

計画

1. 実験期間（フレーバー給与期間）

- 1) キャラメル 令和3年5月31日～6月30日
- 2) バニラ 令和3年7月1日～7月31日
- 3) ミルク 令和3年8月1日～8月31日
- 4) 糖蜜 令和3年9月1日～9月31日



図1 ナイアシン

2. 実験場所

西条農業高等学校畜産農場

3. 供試牛

- | | | | |
|--------|--------|-----------|----------------|
| 1) 試験区 | メイプル | | 分娩なし |
| | ベル | 乾乳期 6/13～ | 分娩日 8/19 |
| | アンズ | 乾乳期 4/22～ | 分娩日 6/22 |
| | ※エミリア | 乾乳期 4/1～ | 分娩日 6/17 |
| | | | ※事情により 6月17日出荷 |
| 2) 対照区 | ティファニー | 乾乳期 8/14～ | 分娩日 10/8 |
| | クレア | 乾乳なし | 分娩日 9/12 |

4. 調査項目

- 1) 直腸温度
- 2) 毎日の配合飼料給与量, ナイアシンの摂取量及び泌乳量
- 3) 血中成分(ケトン体, グルコース, 遊離脂肪酸, 尿素窒素, アルブミン, トリアシルグルセロール, 血清尿酸脱水素酵素, アルカリフォスファターゼ, γ -グルタミリトランスペプターゼ, アスパラギン酸アミノ基転移酵素, アラニンアミノ転移酵素, 総コレステロール)

実施

1. フレーバーナイアシンは配合飼料給餌時に 20 g 混ぜて給与し, 摂取量を測定した。
2. 直腸温を毎週火・水・金曜日に測定した。
3. 1 ヶ月に 1 回採血を行い, 血中成分の測定を行った。

1) 採血

- (ア) 供試牛を固定する。
- (イ) 真空採血管を利用して, 頸静脈から採血する。

2) 血中成分分析

- (ア) マイクロピペットを用いて血液を 5mL ずつ, マイクロチューブに移し, 遠心分離を行う。
- (イ) 遠心分離後, マイクロピペットを用いて 1.5mL の血漿を取り, マイクロチューブに入れ, 冷凍庫で保管する。
- (ウ) 広島大学で血中成分を分析していただいた。



図2 採血

4. 濃厚飼料摂取量と泌乳量は牛群検定の結果を利用した。
5. 最小二乗法を用いて, 統計処理をかけた。

結果

1. フレーバー別ナイアシン採食量及び個体別ナイアシン採食量はキャラメルフレーバーが最も高い値を示した。(図3, 図4)

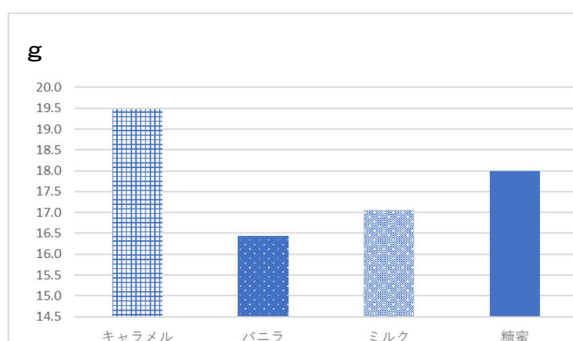


図3 フレーバー別ナイアシン採食量

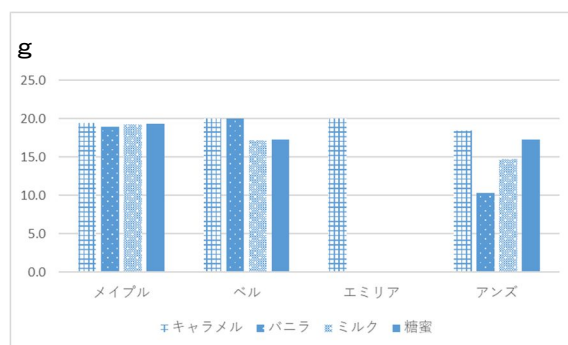


図4 個体別ナイアシン採食量

2. 直腸温度

有意差は見られなかったが、実験区の方が対照区よりも低い値を示していた。

3. 血中成分

アスパラギン酸アミノ基転移酵素、総ビリルビン、遊離脂肪酸及び血糖値はキャラメルフレーバーの期間で対照区よりも高く、有意差がみられた (図5, 図6, 図7, 図8 $p < 0.05$)。

アラニンアミノ転移酵素はバニラフレーバー, トリグリセリドはミルクフレーバーの期間で実験区の方が対照区よりも低く有意差が見られた (図9, 図10 $p < 0.05$)。

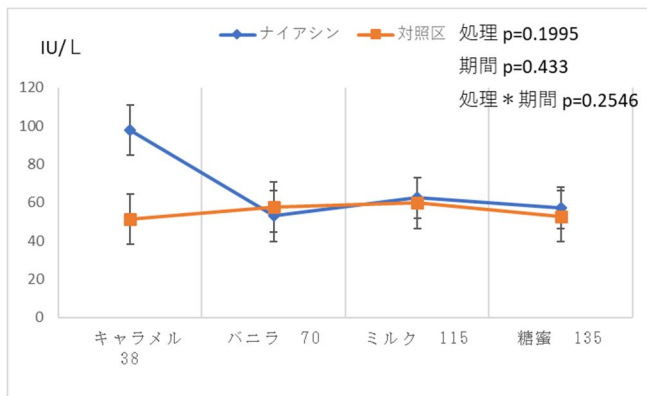


図5 アスパラギン酸アミノ基転移酵素

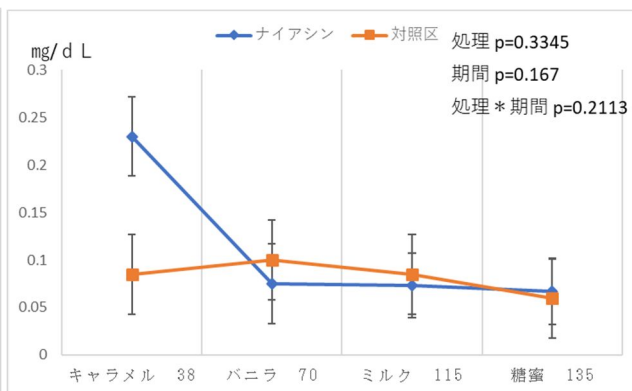


図6 総ビリルビン

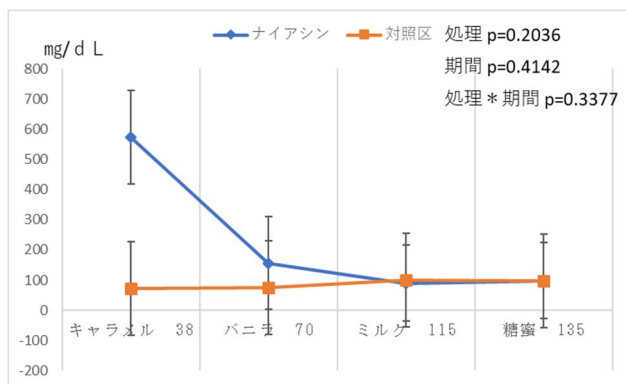


図7 遊離脂肪酸

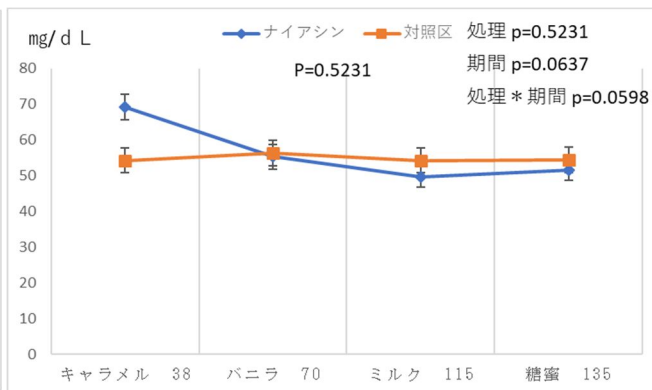


図8 血糖値

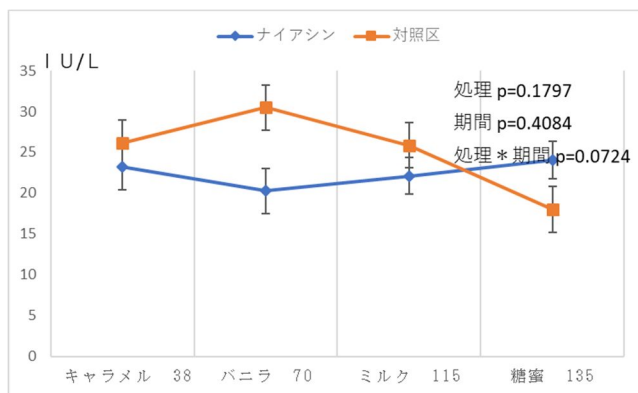


図9 アラニンアミノ転移酵素

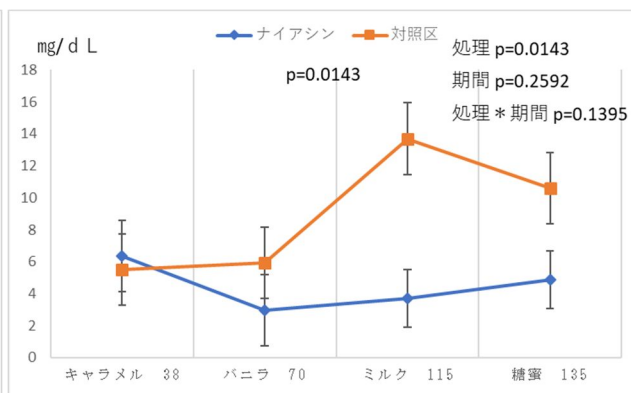


図10 トリグリセリド

4. 濃厚飼料摂取量・乳量

濃厚飼料摂取量及び乳量ともに実験区の方が対照区より高く、有意差がみられた(図 11, 図 12)。

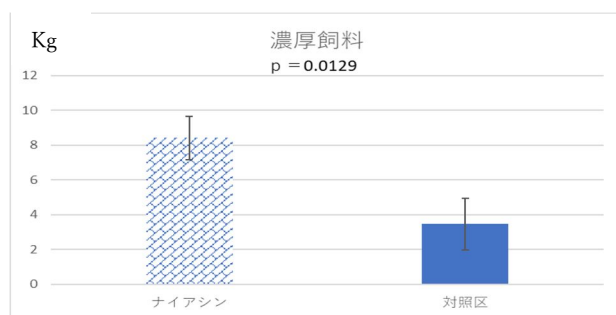


図 11 濃厚飼料摂取量

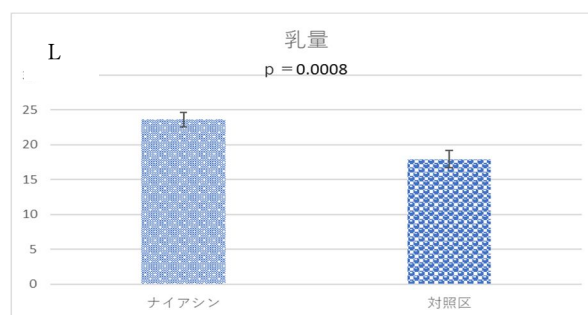


図 12 乳量

考察

フレーバーナイアシンを給与したことで、泌乳牛の配合飼料の採食量及び泌乳量は増加し、有意差が見られた(図 11, 図 12)。直腸温度には有意差は見られなかったが、試験区の方が対照区よりも数値的には低かった。このことから、今回の研究ではナイアシンは乳牛の体温を低下させる可能性が考えられ、泌乳量も上昇したことから暑熱ストレスを減少させる効果の可能性もあったのではないかと考えられる。

血中成分分析の結果、キャラメルフレーバーの期間で、アスパラギン酸アミノ基転移酵素(AST)、血糖値、総ビリルビン及び遊離脂肪酸が対照区と比べて高くなり、有意差を示した(図 5, 図 6, 図 7, 図 8)。またアラニンアミノ転移酵素(ALT)はバニラフレーバーの期間で、トリグリセリドはミルクフレーバーの期間で対照区と比べて低くなり、有意差を示した(図 9, 図 10)。ASTや総ビリルビンの濃度が高くなったのは、肝機能が向上し肝臓の代謝が良くなったためだと考えられる。遊離脂肪酸はエネルギー状態が悪くなると高くなる傾向にあるが、ケトン体が高くなってはおらず、オキサロ酢酸からの糖新生によりグルコースが血中に放出されたことで、血糖値も高くなったと考えられるため、エネルギー状態は悪くないと考えられる。また、トリグリセリドは乳量が上昇し、脂肪が乳生産に多く使われたため、減少したと考える(図 10)。ALTが低いのも肝機能が上昇しただけと考えられる。このことからナイアシンは肝機能を向上させる働きがあると考えられる。また、最も嗜好性が高かったキャラメルフレーバーの期間で有意差が多くみられたことから、フレーバーによりナイアシンの効果が高まったと考えられる(図 3, 図 4)。

成果

1. ナイアシンは、体温を低下させることが検証された。
2. ナイアシンは、肝機能を向上させる効果があることが検証された。
3. フレーバーを添加することで、ナイアシンの効果を高める効果があることが検証された。

参考文献

1. 暑熱期における乳牛のバイパスナイアシンの給与効果 埼玉県農業技術研究センター
<http://210.152.138.222/a0908/gyousekihappyou/documents/r01-09.pdf>

プロジェクトZ ～短期肥育への挑戦！広島牛児の和牛革命！～

広島県立西条農業高等学校 畜産科3年

○西山創太 小林佳奈 丸賀萌恵

はじめに

西条農業高等学校では3年前から和牛の短期肥育に取り組んでいる。昨年度、第4回和牛甲子園に出品した去勢牛「鈴之国」は生後約22ヵ月齢でありながら産肉成績がA-5、BMS11という好成績であった。一方でMUFA値は51.7と去勢牛の広島県平均62.4(令和2年夏冬枝肉共進会)に届かないという結果に終わった。そこで、今年度は短期肥育でもMUFA値の高い美味しい牛肉の生産を目指した取り組みを実施したので概要を報告する。

方法

1. 調査期間：令和元年11月～令和4年1月末
2. 材 料：供試牛(黒毛和種去勢牛4頭，雌1頭)，酒米糠(赤糠)

表1 供試牛一覧

供試牛	生年月日	血 統	
よつは	R1.10.1	沖茂神竜×安福久×平茂勝	雌
竜之福	R1.11.2	福之姫×沖茂神竜×安福久	去勢
勝己	R1.12.18	福之姫×田安照×安福久	去勢
竜之音	R2.4.19	沖茂神竜×安福久×勝忠平	去勢
照沖	R2.6.26	沖茂神竜×美津照重×勝忠平	去勢

3. 調査方法(表1)

令和2年11月より赤糠の嗜好性や健康状態の調査等の予備実験を実施し、令和3年2月9日より自家配合飼料(380kg)赤糠(20kg)約5%に決定し給与を開始した。

赤糠成分：乾物中(CP18.8% NDF22.4% NFC31.6% TDN89.9 P2.64%) ※萩酒米みがき協同組合

4. 調査項目：①アンケート調査(購買者，生産者)②採食率③増体重変化④産肉成績

結果

1. アンケート調査：令和3年7月20日(火)実施(生産者14名，購買者8名)

出荷月齢の平均：短期肥育を実施している農家は去勢，雌共に1軒ずつであり，出荷月齢の平均は去勢牛27.8ヵ月齢，雌28.3ヵ月齢であった。

24～26ヵ月齢までの短期肥育への課題としては、うま味が少ない、MUFA値が低い、枝肉重量が少ないなどが挙げられた。

2. 採食率

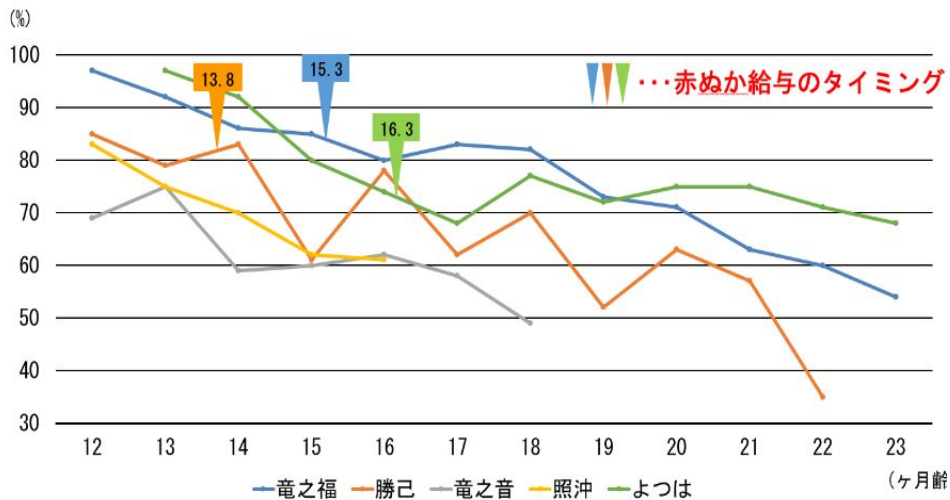


図 1 採食率

採食率は図1の通りである。竜之音、照沖は12ヶ月齢から赤糠の給与を開始している。勝己の採食率に急激な下降が見られるが、これは肩関節に異常が出てしまい、採食能力が低下したためである。

3. 増体重変化

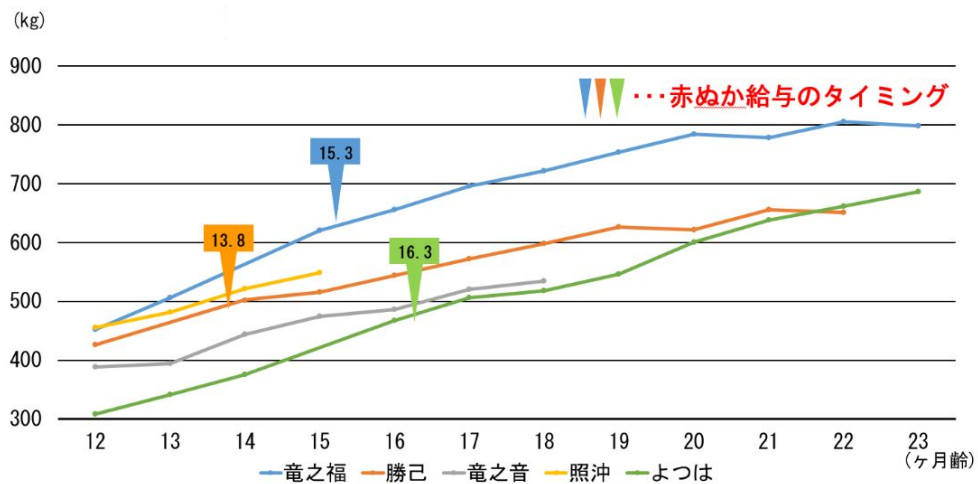


図 2 増体重変化

増体重は図2の通りである。増体重はおおむね DG 1 kg を上回っている。勝己は先述の通り採食率の落ち込みにより 21～22ヶ月齢において下降が見られる。竜之福も肥育後期の食べ止まりにより下降している。

4. 産肉成績



図3 勝己枝肉断面図



図4 竜之福枝肉断面図



図5 よつは枝肉断面図

表2 枝肉成績

供試牛	肥育月齢 (月)	去勢/雌	体重 (kg)	枝肉重量 (kg)	歩留		歩留等級	肉質等級	BMS	肉質		
					ロース (cm ²)	バラ (cm)				BCS	BFS	MUFA
よつは	27.6	雌	750	457	59	3.5	A	4	6	4	3	62.3
竜之福	25.2	去勢	856	564.4	84	8.8	A	5	9	3	3	65.8
勝己	23.6	去勢	698	459.6	52	7.6	B	5	8	4	3	62.8

今年度出荷した和牛の枝肉断面と枝肉成績は上記の通りである。いずれも短期肥育による出荷を実現させることができた。勝己、竜之福の肉質等級はA-5の成績であった。また、よつはに関してもBMSは高くはないがMUFA値の値は県の平均を上回るものとなった。

考察

1. アンケート調査

短期肥育の普及にとっての障壁となるのが、安定した枝肉重量を出せないという懸念とMUFA値やうま味などの味覚に関わる項目である。これらを改善するために、飼葉桶を用いた飼料計算を実施し、赤糠を給与しても、DGを1kg以上で推移させること、赤糠によりMUFA値を上昇させる可能性があることが検討された。

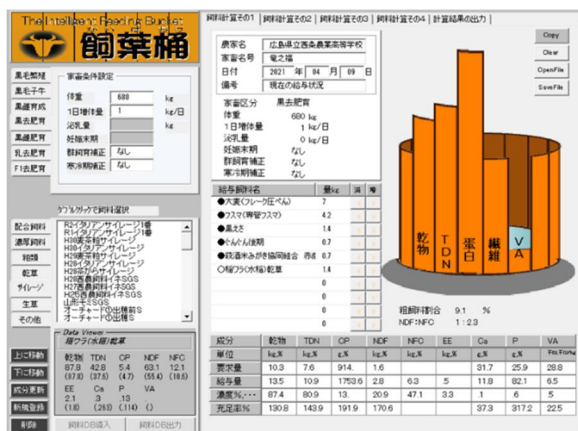


図6 飼葉桶

2. 採食率

赤糠給与による採食率の急落は起こらなかったことから、赤糠の嗜好性が低くはないことを結論付けることができる。また、夏場にかけて採食率の低下が見られることと、肥育後期にかけて食い止まりが起こることが確認されたことから赤糠を給与することで嗜好性が大きくプラスに転じることはなかった。夏場に採食率が低下しないよう気温やサシバエなどのストレスへの対策を講じる必要がある。

3. 増体重変化

飼料計算を元にCP等が100%を超えるよう設計した飼料を給与した。このことにより採食率がおおむね50%を上回る値を示せば、DGが1kg以上の増体重を実現することができると結論付けられる。

4. 産肉成績

今年度出荷した3頭の成績は、内2頭の肉質等級がA-5ランクであった。課題としていたMUFA値に関しては3頭すべてが県の平均である62.4を上回る高い値を記録した。このように短期肥育であっても高い値を示したことから粗脂肪を多く含有する赤糠にはMUFA値向上に作用する可能性があると考えられる。枝肉重量に関しては肩関節に異常が見られ採食率が低下した勝己においては500kgに満たない結果だったが竜之福は順調に増体を伸ばし最終的に564.4kgの枝肉重量を記録した。

まとめ

これらのことから、赤糠の給与と飼料計算による給与量の設計によって短期肥育は可能であると結論付けられる。現在肥育している竜之音、照沖の2頭は12ヶ月齢から赤糠の給与を開始しているため、赤糠による効果の、更なる期待が持てる。赤糠のリン酸含有量が多いため、来年度はリン酸が過多にならないようリン酸カルシウムの給与を取りやめる。

また、短期肥育によって約4ヶ月分の飼料費を削減することが可能である。さらには、牛舎の回転率の向上、病気や事故率の減少などの経済的効果も期待ができる。環境問題においても、輸入飼料の輸送に掛かるCO2の削減、短期肥育によるウシが排出する糞尿、温室効果ガスの削減などSDGsの面においても貢献することができる。

しかしながら、赤糠のルーメン内における消化吸収の作用等に関しては不明な点が多々あるため今後はルーメン内でのオレイン酸の消化吸収のメカニズムについて解明をしていきたい。

昆虫の飼料化についての調査研究

広島県立庄原実業高等学校

生物生産学科3年 ○片岡菜月

はじめに

現在、日本の畜産では家畜の穀物由来の濃厚飼料国内自給率は約27%となっており、低い状態が解決されていない。さらに、2050年には世界全体の家畜飼料としての穀物需要量の増加が予想され、世界人口が97億人に達するとされているため、食糧需要量は1.7倍になると予想されている。このような家畜飼料の課題を解決するために、高タンパク質で繁殖しやすい昆虫の飼料化に着目した。

そこで、国立大学法人京都大学大学院農学研究科の松浦教授、廣岡博之教授が取り組まれている「シロアリの破壊的木材分解能力を用いた未利用木材の飼料化と食料化」のプロジェクトである「シロアリ生体給与の効果」に参加させていただき、私たちは給与試験としてシロアリ生体を用いて、採卵鶏の採食意欲や採食量、採食時間などの計測を行い、シロアリ生体の飼料としての利用価値について調査研究に取り組んだ。

実施計画

1. 実施期間

令和3年7月12日から12月10日

2. 実施場所

本校鶏舎（庄原市西本町一丁目24番34号）

3. 供試鶏

品種名「もみじ」 卵用種（赤玉鶏）

飼育形態 平飼い

飼料給与量 100g/日

産卵率 31%

1) 試験器具

給餌用容器、電子計量器、メスシリンダー、シャーレ、スプレーボトル、精製水
グラインド器具（すりこ木、すり鉢、タイマー、茶こし、だしパック、ゴムベラ）

2) 供試飼料

ヤクシマオオシロアリ

コメ（令和2年産うるち米自家産）

ポップコーン（大黒天物産【株】）

マル中印成鶏飼育用配合飼料レイアー17（中部飼料株式会社）

実施内容

1. 供試飼料の嗜好性比較試験

1) 供試鶏羽数

31羽

2) 試験方法

各飼料3分間の採食量(g)を測定

3) 給与飼料量

シロアリ, 米粒, 配合飼料, 各10g

4) ワーカーシロアリの選別



写真1 ワーカーシロアリの選別

2. 抽出液を噴霧した飼料の嗜好性比較試験

1) 供試鶏羽数

31羽

2) 試験方法

抽出液を噴霧した飼料の3分間の採食量(g)を測定

3) 抽出液の作成

ア ワーカーシロアリの抽出

イ グラインド3分間

ウ ろ過: 1mmメッシュ茶こしを用いて2回のろ過を繰り返す。

エ 抽出液と残渣物を採取

オ 抽出液を2倍の精製水で希釈する。

カ 残渣物をだしパックに入れ10倍液に3日間浸す。

キ 米粒に2gの抽出液及び残渣物希釈液を噴霧する。

ク 3分間の採食量を測定する。



写真2 抽出液の作成(1)

3. 残渣物希釈液噴霧飼料の嗜好性比較試験

1) 供試鶏羽数

10羽

2) 試験方法

残渣物希釈液噴霧飼料と無処理区で3分間の採食量(g)を測定

3) 残渣物希釈液の作成

ア ワーカーシロアリの抽出

イ グラインド3分間

ウ ろ過: 2.4mmメッシュ茶こしを用いて2回のろ過を繰り返す。

エ 残渣物をだしパックに入れ10倍に希釈する。

オ 配合飼料に2gの抽出液及び残渣物希釈液を噴霧する。

カ 3分間の採食量を測定する。

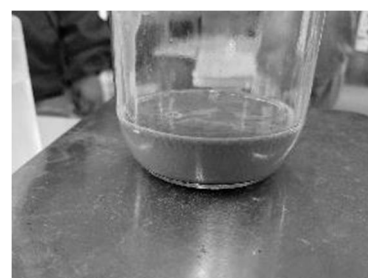


写真3 抽出液の作成(2)



写真4 シロアリ採食の様子

結果

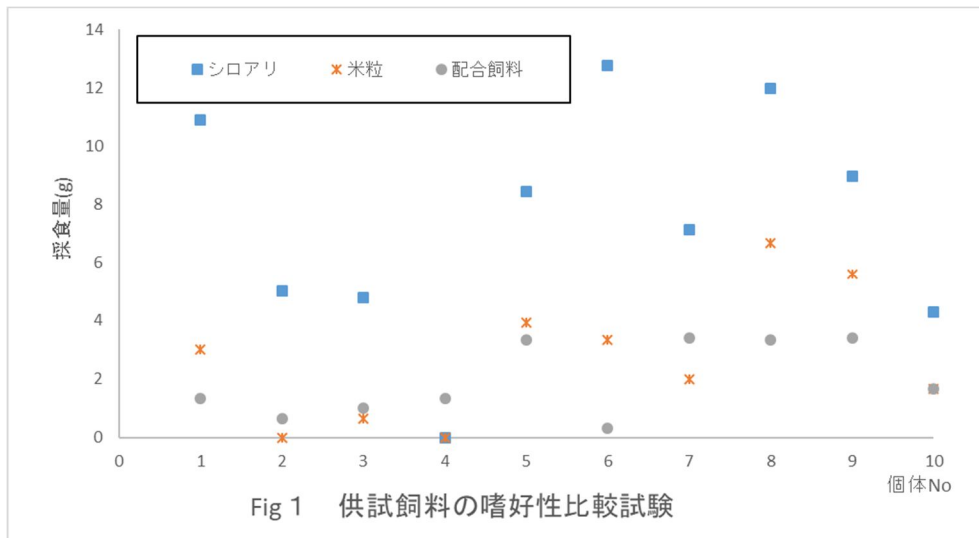
1. 供試飼料の嗜好性比較試験

1 分間当たりの採食量や完食率において、シロアリは他の供試飼料との間に有意水準 1% (Tukey-Kramer 法) で有意差が認められたため、明らかに採卵鶏は好んでシロアリを採食することが分かった。

Table1 供試飼料の採食量及び完食率

	採食量		採食量/分 (g/min)	完食率
	平均(g)	SD		
シロアリ	8.6	3.23	2.9	91%
米粒	6.2	4.24	2.1	23%
配合飼料	6.0	3.91	2.0	35%
	平均		2.3	

※採食時間は 3 分を上限とする

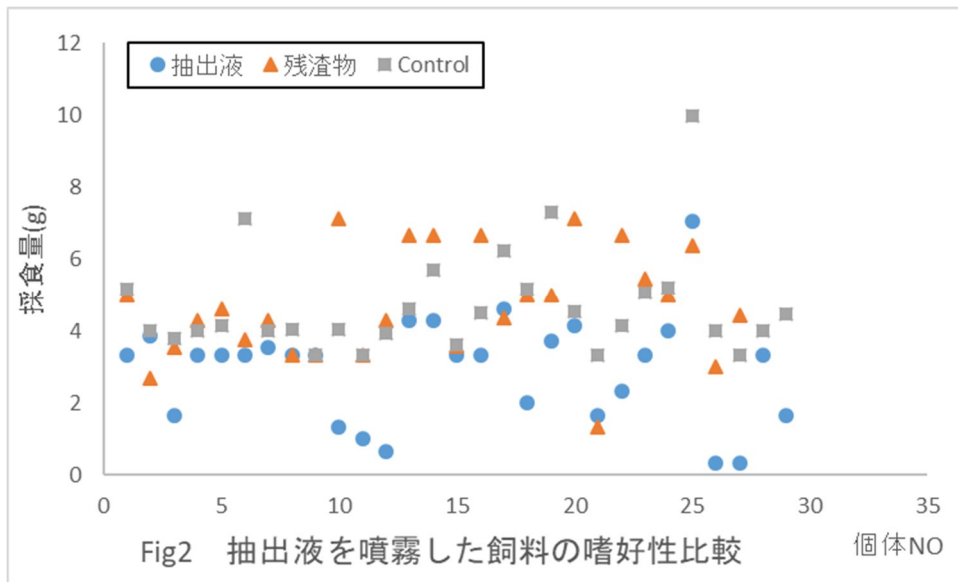


2. 抽出液を噴霧した飼料の嗜好性比較試験

抽出液を噴霧した各飼料間では、抽出液を噴霧した飼料と他 2 つの飼料の間に有意水準 1% (Tukey-Kramer 法) で有意差が認められた。しかし、残渣物とコントロール区の間には有意な差が認められなかった。

Table2 抽出液を噴霧した飼料の嗜好性比較
1分当りの採食量(g/min)

	抽出液	残渣物	Control
平均	2.86	4.48	4.54
標準偏差	1.54	1.68	1.67
最高値	7.06	7.14	10.00
最頻値	3.33	5.00	4.00
最低値	0.00	0.00	0.00
分散	2.30	2.74	2.69

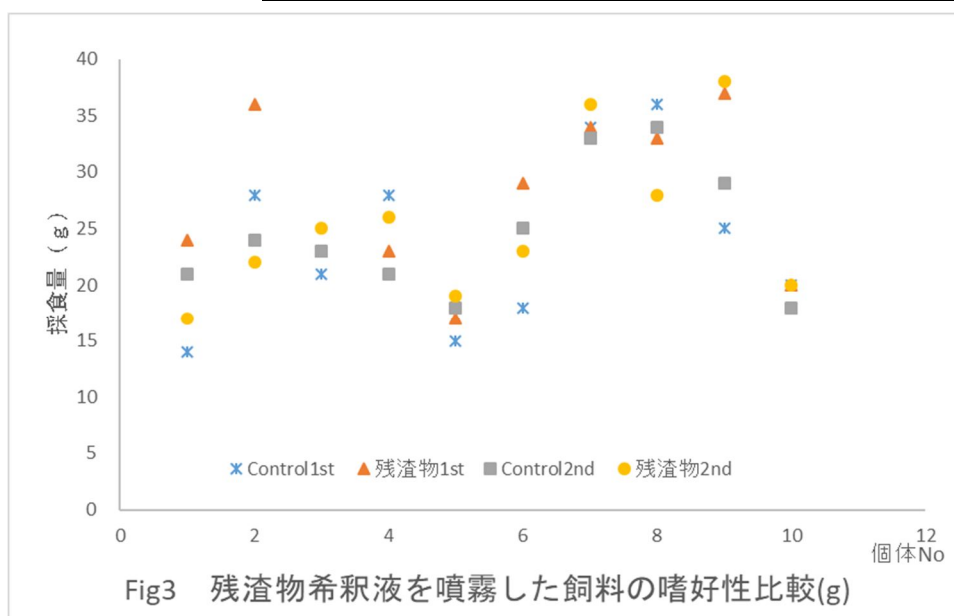


3. 残渣物希釈液噴霧飼料の嗜好性比較試験

残渣物希釈液噴霧飼料と Control（水を噴霧）では、2回ともに残渣物希釈液噴霧飼料との間に有意水準 5% (Tukey-Kramer 法) においても有意差が認められなかった。

Table3 残渣物希釈液を噴霧した飼料の嗜好性比較
1分当りの採食量 (g/min)

	残渣物1st	残渣物2nd	Control1st	Control2nd
平均	9.20	8.47	7.97	8.20
標準偏差	2.37	2.32	2.53	1.91
最高値	12.33	12.67	12.00	11.33
最頻値	7.67	—	9.33	7.00
最低値	5.67	5.67	4.67	6.00
分散	5.63	5.39	6.41	3.63



考察

1. 供試飼料の嗜好性比較試験

シロアリの採食を好む原因に飼料の食べやすさが影響しているのではないかと推測している。米粒は小さく硬いため、一粒をついばむことが難しくそうであった。シロアリは米粒より大きく程よい弾力があり、一匹一匹をついばむことがスムーズにできていた。

採食時間では表せない、ついばむときの強さの採食意欲は、明らかにシロアリで最も強く観察された。その原因は、昆虫が動くため視覚刺激されたのか、シロアリ生体であるため臭い成分が嗅覚を刺激したのか、それらの原因を調査する必要がある。

2. 抽出液を噴霧した飼料の嗜好性比較試験

抽出液を噴霧した飼料の採食量/分が最も良い結果となる仮説を立てていただが、残渣物希釈液とコントロールとの間のみ有意な差が認められず、抽出液を噴霧した飼料とそのほか2つの飼料の間に有意な差が認められた。そのため、仮説とは全く反対の結果となった。

米粒の採食量/分が増加しているが、米粒を採食することに適応してきたのではないかと推測する。また、米粒が濡れることにより容器に付着しやすくなり、飼料の容器をつつく振動で米粒が飛び跳ねることを防ぐことができ、採食量/分が増加したのではないだろうか。

3. 残渣物希釈液噴霧飼料の嗜好性比較試験

残渣物希釈液噴霧飼料と水を噴霧した飼料との間に有意な相関は確認できなかった。このため、明らかに抽出液噴霧飼料は嗜好性が低いことが分かった。

成果と課題

1. シロアリ生体の給与はニワトリにとって嗜好性の高い飼料であることが分かった。しかし、シロアリの分別作業に時間を要する。
2. 残渣物希釈液噴霧飼料より、シロアリへの高い嗜好性の理由は、生体による動きだけではない可能性が示された。
3. シロアリ給与のポジティブな可能性はまだ多く残されていると推察できる。
4. 昆虫生体を飼料とした試験は実例が少なく手探りであったが、生徒がアイデアを出し合いながら試験を展開することができた。

謝辞

京都大学大学院農学研究科 応用生物科学専攻畜産資源学分野 教授 廣岡博之 様

京都大学大学院農学研究科 応用生物科学専攻 昆虫生態学分野 教授 松浦健二 様

京都大学大学院農学研究科 応用生物科学専攻 昆虫生態学分野 特定研究員 三高雄希様

京都大学大学院農学研究科 応用生物科学専攻 昆虫生態学分野 学振 PD 特別研究員 田崎英祐 様

広島県内フリーストール酪農場での牛マイコプラズマ性乳房炎発生事例

東広島家畜診療所 ○高嶋実和

はじめに

牛マイコプラズマ（以下、Mp）性乳房炎は、乳量の著減もしくは泌乳停止を特徴とする乳房炎で、治療効果が乏しく廃用率、再発率が高いため甚大な経済損失を招くとされている。本疾病は本州では散発的な発生が見られる。1,2) 広島県では 2015 年に最初の発生が報告されている。3) 北海道では 2015 年～2017 年に実施された調査で、道内のバルク乳検査等にて 1.4～6.7%の農家で発生が確認された。4) 感染経路は乳汁による環境や搾乳器具の汚染による上向感染や、肺炎、関節炎からの下向感染などがある。5,6) このたび、2017 年 4 月～6 月計 4 頭の全身症状を伴うマイコプラズマ・ボビス（以下、*M.bovis*）による乳房炎が発生したので概要を報告する。本症例は広島県で 2 例目の報告である。

材料と方法

1 供試材料

1) 農家概要：広島県内の酪農場で、飼養形態はフリーストール、搾乳牛頭数は約 100 頭、3～4 名で搾乳を行っており、育成牛の一部を北海道から導入している。搾乳牛舎、育成牛舎、病牛・乾乳牛舎があり、このうち搾乳牛舎は 4 群に分かれている。病牛・乾乳牛舎では 10 頭前後の牛を飼養できる広さがある。（写真 1）子牛牛舎は搾乳牛舎から離れており（図 1）、子牛担当者は搾乳に従事していない。本農場では過去にマイコプラズマ性乳房炎の発生歴はなく、1 頭目の陽性牛を確認した時点で、成牛・子牛ともに呼吸器疾患や関節炎による往診依頼はなかった。



（写真 1）病牛・乾乳牛舎



（図 1）農場模式図

2 細菌学的検査

i) 血液寒天培地の直接鏡検：乳汁検査にて 5%羊血液寒天培地（37℃ 1～2 日間好気培養）上に認められた β 溶血部分を 1 cm² の格子状に切り取り Dienes 液で染色¹⁰⁾ し、顕微鏡にて青紫色に染色されたコロニーを観察する。

ii) 菌分離：*M. spp.* (DNA 添加変法 Hayflick 培地, BHL 液体培地, 37°C 1~2 日間 5% 炭酸ガス及び密栓培養), 腸内細菌 (DHL 寒天培地, 37°C 24 時間好気培養), 一般細菌 (5% 羊血液寒天培地, 37°C 48 時間 5% 炭酸ガス培養)

iii) 同定：PCR 法 (*M. bovis* 及び *M. spp* に特異的な遺伝子を標的とする)

iv) 薬剤感受性試験 (牛 A, 牛 B) : 最小発育阻止濃度 (以下, MIC)

成績

1) 発生経過

4 月 4 日病牛・乾乳牛舎の牛 A がほとんど泌乳しないとの稟告で往診した。初診時 39.5°C, 乳房の腫脹硬結はなく (写真 2) 食欲不振, 低 Ca 症状を併発していたが肺炎症状は見られなかった。初診日には有意菌陰性であったため, 4 月 6 日再度乳汁を採材し好気培養したところ羊血液寒天培地上に β 溶血 (写真 3) のみが認められ, コロニーを肉眼的に認めなかったことと臨床所見から, Mp が原因であることを疑い家畜保健所へ詳細な検査を依頼し, *M. bovis* と診断された。牛 A は治療され解熱し活力上昇したが泌乳回復せず, 4 月 19 日に淘汰された。その間, 牛 A は隔離されず, 病牛・乾乳牛舎で飼養されていた。その後, 4 月 21 日牛 A と同居していた牛 B が乳房炎で熱発, 乳房の腫脹硬結は認めず乳汁はブツを含んでおり検査にて *M. bovis* と診断された (表 1, 2)。牛 B は 5 月 1 日に育成牛舎に隔離され, 泌乳停止したが全身症状が改善したため肥育牛となり 9 月 7 日に出荷された。牛 C は 5 月 18 日に *M. bovis* 陽性となり, 抗生剤による治療を実施したが効果なく 6 月 6 日に淘汰された。牛 D は 6 月 19 日に *M. bovis* 陽性となり, 6 月 30 日に育成牛舎に隔離され 7 月 3 日に淘汰された。また, 6 月 26 日には乳汁検査で β 溶血を認める Mp 疑い牛が発生したが即淘汰されたため家畜保健所に検査を依頼していない。これら牛 A~D の詳細を (表 3) に発生時系列を (表 4) にまとめた。

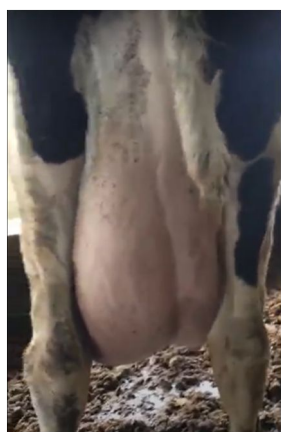


写真 2) 牛 A・牛 B の罹患乳房

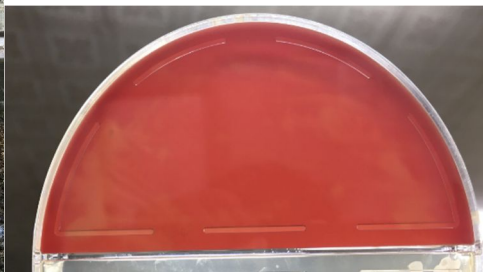
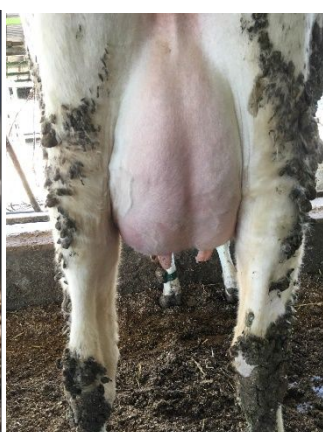


写真 3) 羊血液寒天培地上の β 溶血

(表 1) 牛 A・B 検査結果

	5%羊血液寒天培地 (β溶血)	直接鏡検 (Dienes染色)	菌分離	PCR <i>Mycoplasma</i> <i>bovis</i>	一般細菌
牛A	+	+	+	+	+
牛B	+	+	+	+	-

(表 2) 牛 A・B から分離された *M.bovis* の薬剤感受性

薬剤名	牛A <i>Mycoplasma bovis</i> ≥10 ⁶ (cfu/ml)	牛B <i>Mycoplasma bovis</i> ≥10 ⁶ (cfu/ml)
	OTC	25
チルミコシン	12.5	6.25
エンロフロキサシン	0.2	0.1
マルボフロキサシン	0.8	0.8
フロルフェニコール	6.25	3.13
タイロシン	25	25

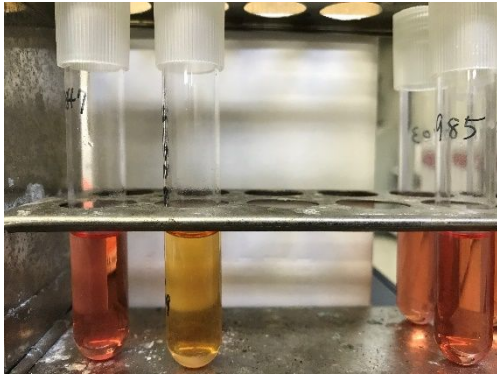
(表 3) *M.bovis* 陽性牛の詳細と予後

(表 4) Mp 対策中の陽性牛発生状況と検査の経過

牛	生年月日	導入 自家産	分娩 月日	初診 日	発生場所	体温	乳房 症状	治療	治療 回数	予後	2017年												
											3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	2018年 1月		
A	2011年 2/8	2012年 12月導入 (北海道)	3/22	4/4	病牛・乾乳 牛舎	39.5℃	泌乳停止	ABPC ERFX	7回	4/19 廃用	牛B同厩 牛2頭	淘汰											
											牛A	Mb+	淘汰										
B	2015年 4/18	2016年 12月導入 (北海道)	3/18	4/21	搾乳牛舎	41.0℃	乳汁ブツ	CEZ ERFX	6回	9/7 出荷	牛B	Mb+	隔離										
											牛C	Mb+	隔離										
C	2007年 7/4	自家産	5/2	5/18	病牛・乾乳 牛舎	39.8℃	乳汁ブツ	CEZ CKM ERFX MRFX	9回	6/6 廃用	牛D												
											Mp疑い 牛1頭												
D	2013年 8/23	自家産	6/9	6/17	病牛・乾乳 牛舎	40.5℃	乳房硬結 乳汁ブツ	ABPC ERFX	11回	6/30 廃用	バルク 乳検査	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
											乾乳前 検査												
											分娩後 検査												

2) Mp 乳房炎と診断後の対策

4月から1月までに6回、バルク乳検査を実施した。本検査法は100頭～300頭（1バルク）に1頭の陽性個体を検出できるという高い感度を有しているが、バルク乳では検出できない陽性個体も存在するという報告があり⁷⁾、*M.bovis* 陽性牛と同居していた牛に対し個体乳検査をおこなった。搾乳牛舎で同居していた牛は乾乳前検査を行い、病牛・乾乳牛舎での同居牛で病牛には乳汁検査を行い、陽性となれば治療を実施することとした。乾乳牛で陽性牛と同居していた牛は検査不可能であったため予防的治療を実施した。さらに5月～12月の期間、分娩後検査を実施した。検査は診療所でマイコプラズマ液体培地（マイコプラズマ用液体培地：ミヤリサン製薬）を使用し好気密栓培養をおこなった。培地が黄色に変化し陽性となった個体（写真4）では再度採材し、家畜保健所に詳細な検査を依頼した。4月のマイコプラズマ性乳房炎発生以降、5月にドロマイド石灰による病牛・乾乳牛舎の消毒を行った。その後も継続して陽性牛が摘発されたが6回のバルク乳検査はすべて陰性であった。また、乾乳前検査もすべて陰性で、分娩後検査では2頭の陽性反応が出たが1頭は検査結果判明前に淘汰されたため詳細な検査ができず、もう1頭は *Acholeplasma* 属菌であった。



(写真 4) マイコプラズマ液体培地での黄色変化

考察

この度の発生はすべて *M.bovis* による乳房炎で、病牛・乾乳牛舎内にて飼養されていた分娩後 2 カ月以内の牛が罹患した。感染源については呼吸器からの採材や悪露の細菌検査等を行っておらず、特定にはいたらなかったが、2016 年に導入された牛 B が感染源であると疑われた。本牛は育成牛舎で 3 月中旬に分娩し搾乳牛舎へ移動、3 月末に同居牛 2 頭が原因不明の泌乳停止で淘汰され、その後、病牛・乾乳牛舎へ移動した。多くの Mp 感染牛は一定の無症状期間を経て発症に至り排菌を継続するため⁸⁾、牛 B が感染源である可能性は否定できなかった。Mp 感染を疑う所見は好気条件下羊血液寒天培地上の β 溶血であり、一度の検査では検出できず複数回必要であった。牛の臨床症状や農場の導入履歴、呼吸疾患の発生状況等を考慮して泌乳の著減や停止を呈す原因不明の乳房炎については Mp 性乳房炎を視野に入れて再度検査をすべきである。*M.bovis* による乳房炎は他のマイコプラズマ属菌による乳房炎よりも難治性で廃用・再発率が高い。報告と同様に、抗生剤、抗菌剤による治療効果に乏しく罹患牛はすべて淘汰された。また今回、病牛・乾乳牛舎で感染が拡大した一因として、早期の隔離・淘汰ができなかったことが挙げられる。農場の隔離場所が搾乳不可能な場所であり、隔離と治療を同時に行えず複数の同居牛へ感染を拡大させ、Mp 性乳房炎を蔓延させないために、農場内に Mp 性乳房炎を持ち込んでしまった場合には、即淘汰・隔離を検討し隔離が不可能な場合にはロープ等を用いて簡易的に隔離、タイストールでは牛床を 2 床ほど空けるなどの対策を実施する必要がある。⁹⁾ 県外からの導入牛や、Mp 肺炎に罹患した育成牛は搾乳牛群へ Mp 性乳房炎を持ち込む可能性があるという危機意識を持ち、着地検査や分娩前後の乳汁検査を実施し陰性を確認するべきである。また今回、全頭検査をせず乾乳直前から分娩 1 週間までの個体乳検査、予防的治療を実施したが、農場関係者、NOSAI 獣医師、関係機関が連携し対策を決定・実施できたことが農場内 Mp 性乳房炎の清浄化につながった。

謝辞

この度の、Mp 対策実施において対策検討会議、バルク乳検査、PCR 検査等にご協力をいただきました北部、西部畜産事務所の方々に深謝いたします。

参考文献

- 1) 石山大：千葉県で確認された牛マイコプラズマ性乳房炎の 発生状況と清浄化対策 (2013)
- 2) 川畑 由夏ら：マイコプラズマ性乳房炎の清浄化対策推進による 大規模酪農経営体の健全経営支援 (2012)
- 3) 秋田真司:広島県で発生した全身症状を伴うマイコプラズマ性乳房炎の集団発生事例 (2015)
- 4) 村井：牛マイコプラズマ乳房炎の防除技術第 7 章, 31 (2018)
- 5) 樋口豪紀ら：マイコプラズマ性乳房炎の特徴 (2015)
- 6) 樋口豪紀：牛マイコプラズマ乳房炎の防除技術第 5 章, 27 (2018)
- 7) 樋口豪紀：牛マイコプラズマ乳房炎の防除技術第 4 章, 15-16, 19 (2018)
- 8) 樋口豪紀：マイコプラズマ性乳房炎の対策, 臨床獣医 臨時増刊号 (2019)
- 9) 樋口豪紀：牛マイコプラズマ乳房炎の防除技術第 4 章, 18 (2018)
- 10) 堀野敦子ら:検体の培養と観察,肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*) 検査マニュアル P14 (<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/MycoplasmaPn.pdf>) (参照 2022 年 3 月 22 日)

温暖地域の福山地方における牛の受胎率と妊娠期間の調査

広島県農業共済組合 府中家畜診療所

○秋田真司

要約

近年、乳用牛だけでなく肉用牛も受胎率の低下が問題視されてきている。乳用牛については泌乳能力の向上を要因とし、夏季における暑熱感作による酸化ストレスを伴った食欲低下が主な原因とされている。近年は異常気象とも言うべき豪雨、猛暑、四季の乱れなどが観測されている。広島県内で最も温暖な地域の1つである福山地方において、牛の繁殖実態を調査した。乳用牛では暑熱期に当たる夏季に授精件数、受胎率ともに低下していた。一方で黒毛和種については授精件数に季節的変動は少なかったが、冬期の受胎率低下の傾向がみられた。妊娠期間については、乳用牛が夏季に短く、肉用牛で冬季に短いことが認められた。乳用牛は暑熱の影響を、肉用牛は寒冷の影響を受けていたことが示唆された。肉用牛における寒冷対策として、冬季にエネルギーを17%増量したところ、妊娠期間短縮が解消された。

序文

乳量・乳質の能力向上により、乳用牛の受胎率が低下してきているが、一方で、乳用牛ほどに必要な栄養量が増加していない肉用牛でも受胎率の低下が報告されている。受胎率の向上や妊娠頭数の増頭のために定時授精や潜在性子宮内膜炎への対処法、黄体機能増強など様々な方法が試みられている^{1,3,11)}。しかし、近年、豪雨、猛暑などの異常気象が頻発しており、以前の四季とは明らかに異なってきている。このような環境変化の状況下で、気候による影響については、ホルスタインに対する暑熱感作の報告^{4,5,13,14,17)}が多くされているが、肉用牛についての報告は少ない。今回、気候が牛の繁殖性にどのような影響を与えるのかを検討するために、広島県内で最も温暖な地域である福山地方における牛の繁殖性に関する調査を行った。また、冬期における肉用牛の飼料給与について検討したので報告する。

材料と方法

調査期間は2017年1月から2020年12月の4年間。調査対象は福山地方の酪農家6戸と黒毛和種繁殖農家3戸で飼養されているホルスタインと黒毛和種。調査資料は家畜共済台帳、家畜人工授精台帳、JMR管理表、気象庁気象データ⁶⁾を用いた。調査項目は品種別・精液品種別・季節別の受胎率と妊娠期間について調査した。気象データは4年間の日ごと、月ごとの平均気温、最高気温、最低気温を収集した。また、冬期における黒毛和種の飼料給与量変更が妊娠期間に及ぼす影響について調査した。検定は受胎率が χ^2 検定、平均値がt検定を用いた。

成績

気象庁気象データを基に、平均気温が5℃以下の寒冷期を冬季、20℃以上の暑熱期を夏季、それぞれの間を春季、秋季と設定した。その結果、12月、1月、2月を冬季、3月、4月、5月を春季、6月、7月、8月、9月を夏

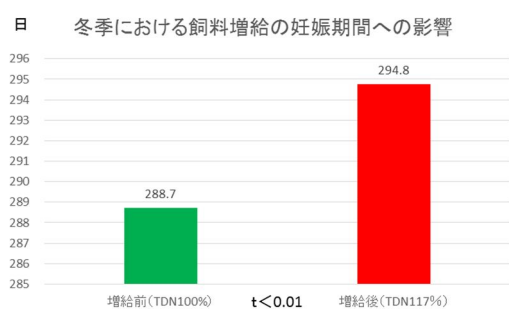
季、10月、11月を秋季と区分けした。(図1)

4年間における1ヶ月当たり季節別平均授精件数はホルスタイン(以下Hol)で、冬季が112.7件、春季が91.3件、夏季が71.5件、秋季が95.0件であり、夏季が最も少なかった。黒毛和種群(以下JB)は冬季が23.7件、春季が23.3件、夏季が23.3件、秋季が28.5件で季節による変動は無かった。

季節別受胎率はHolで冬季が42.3%、春季が38.0%、夏季が32.5%、秋季が36.8%だった。JBでは冬季が39.4%、春季が48.6%、夏季が55.9%、秋季が52.6%であった。Holは夏季の受胎率が冬期に比べ、有意に低かった。JBは冬季の受胎率が夏期より低い傾向であった。4年間における精液品種別の平均受胎率はホルスタイン雌牛-ホルスタイン精液群(以下hol-hol(s))が36.1%、ホルスタイン雌牛-黒毛和種精液群(以下hol-JB(s))が38.5%、JBが49.3%であった。JBがhol-hol(s)とhol-JB(s)よりも有意に高かったが、hol-hol(s)とhol-JB(s)の受胎率には差が無かった。

妊娠期間はhol-hol(s)が277.6±5.31日、hol-JB(s)が283.2±5.01日、JBが289.4±6.34日でそれぞれの群間で有意差が認められた。また、JBの胎子については、雄が289.7±4.74日、雌が289.1±7.07日で、性別による妊娠期間に有意差は認められなかった。季節別の妊娠期間について、hol-hol(s)では冬季が278.4±4.64日、春季が278.6±4.75日、夏季が274.0±8.56日、秋季が277.8±3.96日で、夏季は他の季節に比較して短い傾向が認められた($t > 0.05$)。hol-JB(s)では冬季が283.3±5.39日、春季が283.7±5.57日、夏季が282.4±4.68日、秋季が282.6±5.52日で季節的な差が無かった。JBは冬が286.1±9.09日、春が290.8±7.19日、夏が288.3±5.88日、秋が290.9±5.53日で、有意差は無いものの、冬季に短い傾向が見られた。

冬季において、JBの妊娠期間が短い傾向があり、受胎率も低い傾向が見られた。そのため、寒冷によるストレスを疑い、実分娩日の前の3~7日、8~14日、15~21日の平均気温、最高気温、最低気温、それぞれの気温変動、日内較差と妊娠期間との相関を調査したが、気温の変動との関連は認められなかった。そこで、寒冷によるエネルギーロスが結果としてNegative Energy Balance(以下NEB)となっていると想定し、2020年12月から2021年2月までの冬季に飼料増給を行い、TDN充足率を100%から117%へ増加させたところ、妊娠期間が288.7±3.67日から294.8±3.30日へ延長した。



考察

Holの受胎率はJBに比較して低く、Holの能力向上のほか、温暖地域の福山地方では4ヶ月以上続く暑熱期が影響したと推測された⁶⁾。夏季は受胎率だけでなく、授精件数も少なかった。その理由としては、自然発情が見られることが少なく、定時授精などの処置にも反応しない乳用牛が多くなっていたことによる。これらは暑熱によるDMI減退や酸化ストレスが大きな要因と考えられた^{4,5,17,18)}。hol-JB(s)は夏季における受胎率低下が顕著でなかったが、暑熱の影響を受けにくい未経産牛が半数を占めていたことと関連したと考えられた。また、夏

季における hol-hol (s) の妊娠期間が短くなっており、これも暑熱による NEB の影響と考えられた。

J B において、雌雄の性別による在胎期間に差がなかった。これは過去の雄胎子の在胎期間が長いという多くの報告^{10, 12, 15)}とは異なる。しかし、それらの報告でも、検定の結果で雄が長い、その差は1~2日で、臨床的問題がない数値と考えられる。むしろ、畜産農家が出産予定日を過ぎると、雄で、前だと雌だという思い込みがあること自体に問題があると考えられた。

J B の妊娠期間の延長は1995年頃から問題視されていたが、今回の調査でも一般に285日とされている妊娠期間よりも5日程度長くなっていた^{9, 16)}。季節別では J B において、春・秋に比べ冬季に短い傾向が見られた。そのため、妊娠期間短縮の要因を気温変動寒冷感作によるストレスを疑い、その影響を検討するために、実分娩日の1週間前、2週間前、3週間前の平均気温、最高気温、最低気温のそれぞれの気温変動、日内較差と妊娠期間との相関を調査した。しかし、いずれも関連を認めなかった。このことから、冬季の気温変動が牛にストレスを及ぼしたとは考えにくく、むしろ寒冷によるエネルギーロスによる NEB が、妊娠期間短縮という形で発現したと推察された。そこで、寒冷によるエネルギーロスを考慮して、冬季に飼料給与量を増量、TDN 充足率を日本飼養標準の100%から117%に強化したところ、妊娠期間の延長が認められた。J B だけに冬季の悪影響が現れたのは、Hol に比較して、産熱量が低い J B は1頭あたりの飼養面積も広く、寒冷感作を受けやすいことが要因と考えられた。また、温暖であることが、返って寒冷の影響を受けやすいのかもしれない。このことは宮崎県でも、J B が低温の影響を受けているとの報告と一致した^{2, 7)}。

夏季における猛暑が受胎率などの繁殖性に悪影響を及ぼすことは容易に推察されたが、冬季の J B の繁殖成績の低下が見られることは想定外であった。温暖地域と考えられていた福山地方でも低温の影響が示唆されたことから、低温によるエネルギーロスを緩和する飼養管理について、より詳しい調査が必要と考えられた。

参考文献

- 1) 秋田 真司：潜在性子宮内膜炎に対する低濃度ポピドンヨードの A I 後子宮内注入による治療効果、臨床獣医、36、7、62-66、(2018)
- 2) 上松瑞穂：黒毛和種繁殖雌牛の血液プロファイルテスト、臨床獣医、35、7、68-74、(2017)
- 3) 大澤健司：定時人工授精プログラムの新しい展開、臨床獣医、35、7、26-32、(2017)
- 4) 片桐成二：牛の受精卵の着床過程と早期胚死滅、臨床獣医、36、7、82-89、(2018)
- 5) 金澤朋美：ウシにおける季節と酸化ストレスの関係、家畜診療、65、1、39-40、(2018)
- 6) 気象庁 | 過去の気象データ：<https://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etm/index.php>
- 7) 児玉 暁：宮崎県都城北諸県地域の黒毛和種子牛における在胎機関の延長、日獣会誌、58、6、395-397、(2005)
- 8) 食品産業技術総合研究機構：寒冷時の養分要求量、日本飼養標準肉用牛2008、87、中央畜産会、東京 (2009)
- 9) Szenci O., Abodelmegeid M.K.: Predication of stillbirth in Holstein-Friesian dairy cattle by measuring metabolic and endocrine, Reprod Dc, 8, 4, (2018) 臨床獣医、36、11、74-75、(2018)
- 10) 高橋弥生、佐竹康明：交配種雄牛が黒毛和種産子の在胎日数や生時体重に及ぼす影響、愛媛県畜産研報、4、14-18、(2017)

- 11) 伊達麻衣子、他：黒毛和種の受胎に及ぼすフルニキシメグルミン投与の影響について、広島県獣医学学会雑誌、30、39-41、(2013)
- 12) 土江 博：管内黒毛和種繁殖牛の妊娠期間に及ぼす要因について、家畜人工授精、309、35-39、(2021)
- 13) Dransfield MB., Nebel RL., Pearson RE. : Comparison of three estrus detection systems during summer in a large commercial dairy herd, Animal Reproduction Science、29、12、59-72、(2004)
- 14) Nanas L.B. : Ultrasonographic finding of the corpus luteum and gravid uterus during heat stress in dairy cows、Reprod Dc doi:10.1111/rda.13996, in press、(2021)
- 15) 波平友之、高橋憲司、玉城政信：沖縄における黒毛和種繁殖雌牛の妊娠期間長期化に関する調査、日暖畜報、54、2、189-194、(2011)
- 16) 萩原精一：黒毛和種における長期在胎、家畜診療、64、5、280-284、(2017)
- 17) 真方文絵：牛卵母細胞における加齢の発生要因と胚発生能の低下のメカニズム、家畜診療、68、5、241-246 (2021)
- 18) 三浦亮太郎：発情時の排卵卵胞の左または右卵巣での発育に影響を与える要因とそのことが受胎性を与える影響、家畜人工授精、307、1-7、(2020)