

令和5年度

家畜保健衛生業績発表会
集 録

石 川 県

目 次

第1部

No

- | | | | | | |
|-----|-----------------------------------|------|------|-----|----|
| 1 | 和牛繁殖農家の能登牛増産に向けた繁殖成績改善への取り組み | 北部家保 | 吉川菜穂 | ... | 1 |
| ◎ 2 | 大規模酪農場の子牛生産性向上の取組 | 南部家保 | 岸本和也 | ... | 7 |
| ○ 3 | 登録飼養衛生管理者による豚熱ワクチン接種制度の開始に伴う対応と課題 | 北部家保 | 山内由佳 | ... | 13 |

第2部

- | | | | | | |
|-----|---|------|------|-----|----|
| 4 | RAISING(Rapid Amplification of Integration Site without Interference by Genomic DNA contamination)法を活用した肉用牛農場における地方病性牛伝染性リンパ腫対策 | 北部家保 | 木村祐太 | ... | 20 |
| ○ 5 | <i>Pasteurella multocida</i> による和牛子牛の化膿性肉芽腫性精巣上体炎の一例 | 南部家保 | 寺尾 彩 | ... | 27 |
| 6 | 管内酪農場と養鶏場から分離された <i>Salmonella</i> Corvallis に対する検討 | 北部家保 | 竹山哲矢 | ... | 34 |
| 7 | 乳牛における血中 β -ヒドロキシ酪酸を指標とした受胎率向上効果の検討(第1報) | 北部家保 | 増原紋加 | ... | 37 |
| 8 | ウイルス検査における自動核酸抽出装置の活用に向けた検証 | 南部家保 | 玉鉾紗智 | ... | 42 |

参考資料

※ ○は東海・北陸ブロック代表、◎は全国代表

第 1 部

和牛繁殖農家の能登牛増産に向けた繁殖成績改善への取り組み

北部家畜保健衛生所

○吉川菜穂、森下康

昨今の和牛子牛取引価格の下落や飼料価格の高騰等により、和牛繁殖農家は厳しい状況におかれている（図 1）。管内には意欲のある若手農家もいるが、経営が厳しく先行きが見通せないとの声があがっている。打開策の一つとして、和牛繁殖農家の繁殖成績を向上させ、所得向上および経営安定につながるにより、石川県のブランド食材である「能登牛」を効率的かつ安定的に生産することが重要と考える。

今回、繁殖成績の低い管内の和牛繁殖農家 A と B において、現状の繁殖成績における課題を把握し、改善に取り組んだので報告する。

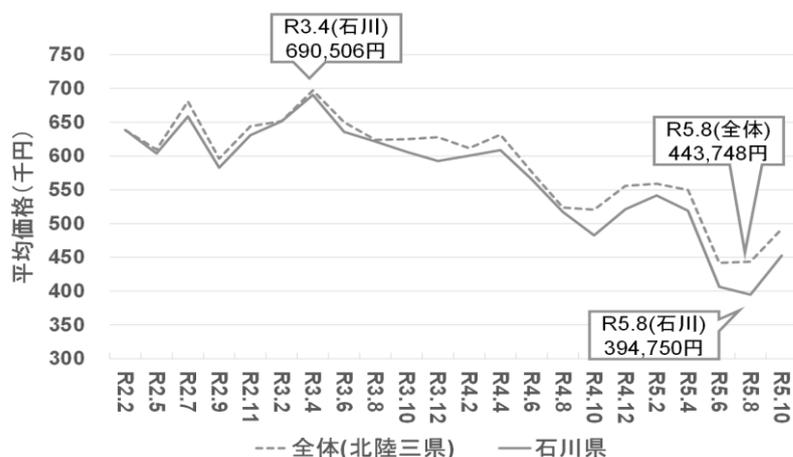


図1. 北陸三県和牛子牛市場の平均価格推移

農場の概要

A は月齢 94.4 ± 38.8 カ月齢の黒毛和種繁殖雌牛（経産牛）20 頭、黒毛和種繁殖雌牛（未經産牛）6 頭、4 カ月齢未満の子牛 11 頭、4 カ月齢～30 カ月齢の肥育牛 48 頭を飼養する一貫経営で、従業員 2 名の家族経営である。繁殖牛は繋留されているが、時期によって併設された運動場で放牧されている。また、繁殖牛は分娩後 4 カ月間自然哺育のため、子牛と同居飼養である。B は、月齢 120.6 ± 51.1 カ月齢の黒毛和種繁殖雌牛（経産牛）30 頭、9 カ月齢未満の子牛 11 頭を飼養している繁殖農家で、畜主 1 名で経営し、繁殖牛は繋留飼養である。また、繁殖牛は分娩後 4 カ月間自然哺育のため、子牛と同居飼養である。

課題と対策

1 A 農家

A では繁殖牛の発情徴候が微弱であること、行動観察が不十分であること、分娩後の発情回帰の遅延等があげられ、長期不受胎牛が多いことが課題であった。また、子牛の発育が不十分であることや、子牛の呼吸器病の診療件数が多いこともあげられ、子牛の損耗が多い点も課題とした。対策として、月 1～2 回の定期繁殖検診の実施により、不受胎牛には定時人工授精 (AI) または定時受精卵移植 (ET) プログラム、あるいは GnRH 製剤 (コンセラル注射液, シオノギファーマ株式会社, 大阪)、PG 製剤 (ダルマジン, 共立製薬株式会社, 東京) を用いたホルモン治療を積極的に実施した。子牛損耗対策については、呼吸器病に対する免疫付与のため、令和 5 年 1 月から RS・BPIV3・IBR 混合生ワクチン (TSV-3, ゴエティスジャパン株式会社, 東京) の接種を開始した。

2 B 農家

B では繁殖牛の発情徴候が微弱であること、治療効果の乏しい平均月齢が 140 ± 40.5 カ月齢の牛が多いこと、長期不受胎牛が多いことが課題であった。対策として、月 1～2 回の定期繁殖検診の実施により、不受胎牛には定時 ET プログラム、または GnRH 製剤や PG 製剤を用いたホルモン治療を積極的に実施した。さらに、治療効果の乏しい 8 頭の廃用を実施した。なお、定時プログラムを行う際は、畜主の希望により ET で実施することとした。

結果

1 A 農家

(1) 妊娠頭数の割合

令和 4 年度は 55.1%、令和 5 年度は 46.3%であった。定時 AI・ET プログラムや積極的な治療を開始した令和 5 年 7 月末から約 3 カ月後の 11 月には 66.7%を示し、12 月も 64.3%と高い値を維持した (表 1)。

表1. 妊娠頭数の割合(%) (A農家)

R4			R5				
	妊娠割合	妊娠頭数	空胎頭数		妊娠割合	妊娠頭数	空胎頭数
4月	54.2	13	11	4月	50.0	9	9
5月	43.5	10	13	5月	23.1	6	20
6月	57.7	15	11	6月	27.6	8	21
7月	53.6	15	13	7月	44.8	13	16
8月	55.6	15	12	8月	41.4	12	17
9月	48.0	12	13	9月	48.3	14	15
10月	56.0	14	11	10月	51.7	15	14
11月	63.6	14	8	11月	66.7	18	9
12月	60.0	15	10	12月	64.3	18	10
1月	61.5	16	10				
2月	52.4	11	10				
3月	55.0	11	9				
平均	55.1	13.4	10.9	平均	46.3	12.6	14.6

* 割合は $\frac{\text{妊娠頭数}}{\text{妊娠頭数} + \text{空胎頭数}} \times 100$

(2) 定時 AI・ET プログラム

令和4年度の定時 AI プログラムは4頭実施し3頭が受胎、定時 ET プログラムについては3頭実施し1頭が受胎した。令和5年度の定時 AI プログラムは10頭実施し2頭が受胎、定時 ET プログラムについては5頭実施したが、受胎しなかった。対策後の結果としては、定時 AI プログラムは5頭実施し1頭が受胎、定時 ET プログラムについては3頭実施したが、受胎しなかった(表2)。

表2. 定時AI・ETプログラム (A農家)

	R4		R5(4~12月)	
	実施頭数	受胎頭数	実施頭数	受胎頭数
AI	4	3	10 (5)	2 (1)
ET	3	1	5 (3)	0
計	7	4	15	2

* ()内は対策後の頭数

(3) 対策後の分娩後初回種付け日数

対策前平均 112.1 ± 69.1 日に対し、令和5年7月末の対策以降、分娩した牛は2頭であり、分娩後初回種付け日数は、それぞれ78日、122日であった

(4) 子牛の診療件数（8 か月齢以下のみ対象）

呼吸器病が令和 4 年度 17 件から対策後の令和 5 年度 8 件に減少したことにより、全体として令和 4 年度 26 件から令和 5 年度 11 件と半減した（表 3）。

表3. 子牛の診療件数（A農家）

病傷名	R4	R5
呼吸器	17	8
消化器	7	2
寄生虫	1	0
その他	1	1
計	26	11

2 B 農家

(1) 妊娠頭数の割合

令和 4 年度は 39.7%、令和 5 年度は 48.1%であった。令和 5 年 5 月から定時 ET プログラムや積極的な治療を開始し、治療効果の乏しい平均月齢が 145.6±40.4 カ月齢の 7 頭を廃用とした。令和 5 年 6 月から 3 カ月後の 9 月には 75.0%を示し、12 月までの平均は 62.5%と高い値を維持した（表 4）。

表4. 妊娠頭数の割合 (%)（B農家）

R4	妊娠割合	妊娠頭数	空胎頭数	R5	妊娠割合	妊娠頭数	空胎頭数
4月	30.0	6	14	4月	21.1	4	15
5月	42.9	9	12	5月	20.0	4	16
6月	52.4	11	10	6月	50.0	7	7
7月	55.0	11	9	7月	64.3	9	5
8月	55.6	10	8	8月	58.3	7	5
9月	47.4	9	10	9月	75.0	9	3
10月	38.9	7	11	10月	61.5	8	5
11月	35.3	6	11	11月	50.0	7	7
12月	33.3	5	10	12月	63.6	7	4
1月	29.4	5	12				
2月	31.6	6	13				
3月	21.1	4	15				
平均	39.7	7.4	11.3	平均	48.1	6.9	7.5

* 割合は $\frac{\text{妊娠頭数}}{\text{妊娠頭数} + \text{空胎頭数}} \times 100$

(2) 定時 AI・ET プログラム

定時 ET プログラムの令和 4 年度は 1 頭実施中 1 頭が受胎した。令和 5 年度は 3 頭実施中 2 頭が受胎し、対策後に 2 頭実施中 2 頭が受胎した (表 5)。

表5. 定時AI・ETプログラム (B農家)

	R4		R5(4~12月)	
	実施頭数	受胎頭数	実施頭数	受胎頭数
AI	0	0	0	0
ET	1	1	3(2)	2(2)
計	1	1	3	2

* ()内は対策後の頭数

(3) 分娩後初回種付け日数

対策前平均 111.0 ± 54.4 日 (1 頭の長期不受胎牛 1033 日を除く) に対し、令和 5 年 5 月の対策以降、分娩した牛は 5 頭であり、そのうち 1 頭は 85 日、その他の 4 頭は令和 5 年 12 月時点で初回種付け未実施であった。

まとめ及び考察

1 A 農家

定時 AI・ET プログラムの結果では、受胎頭数の割合が低かったが、対策後の実施頭数は対策前と比較して増加し、かつその後の定時プログラムで不受胎であった個体が、次回周期で明瞭な発情を示す傾向がみられ、AI 機会が確実に増えた。そのため、妊娠頭数の割合が令和 4 年度 55.1% から令和 5 年 11 月には 66.7% を示し、12 月も 64.3% と高い値を維持した。鈍性発情の治療の一つに、定時プログラムで使用している膈内留置型黄体ホルモン製剤 (CIDR1900, ゴエティスジャパン株式会社, 東京) を用いる方法が報告されている [2]。今回、同製剤を用いて鈍性発情牛にプログラムを実施しており、CIDR 留置やホルモン製剤により、繁殖機能が正常に機能し、次発情が明瞭になったと推察された。また、超音波画像診断装置を用いた確実な妊娠鑑定により、不受胎牛に次の AI を確実に実施できたことが改善につながったと思われる。分娩後初回種付け日数が微増したことについては、一般的に、子牛の哺乳刺激は母牛の卵巣機能の回復を抑制し、分娩後の発情回帰を遅らせるとの報告があることから [6]、子牛の離乳が遅れたため発情回帰が遅延し、分娩後初回種付け日数が延長したと考えられた。また、子牛の診療件数については、令和 4 年度から令和 5 年度にかけて半減しており、呼吸器病ワクチン接種により子牛の損耗を軽減することができたと考えられた。

2 B 農家

不受胎牛に定時 ET プログラムや治療を積極的に行い、治療効果の乏しい牛を淘汰した結果、妊娠頭数の割合が令和 4 年度 39.7%から令和 5 年度は 48.1%まで回復し、令和 5 年 9 月から 12 月までの平均は 62.5%と高い値を維持した。分娩後初回種付け日数については、対策前と比較し 1 頭において短縮したが、1 年 1 産を目指すにはさらなる分娩間隔短縮の対策が必要である。

今後の取り組み

不受胎牛の不受胎要因を除去する方法として、子宮内洗浄やイソジン液などの薬液注入を実施することで受胎率が向上したとの報告もあることから [1, 3, 4]、今後、定時 AI・ET プログラム前に子宮洗浄や薬液注入等を選択肢として取り入れていきたい。また、子牛の哺乳を人為的に抑制することで、母牛の卵巣機能の回復を促進させ得るとの報告もあることから [5]、分娩間隔短縮のため、制限哺乳や早期離乳等の指導により、和牛繁殖農家を支援し、「能登牛」のブランド力をより強化できるように尽力していきたい。

参考文献

- [1] 秋田真司：The Journal of Farm Animal in Infectious Disease, Vol. 6, No. 4 (2017)
- [2] 藤島信賢, 与斎和博, 斎藤一秋, 伊豆肇, 児玉肇, 鈴木敏規, 小松茂：東北家畜臨床研誌, 21(1), 20-22 (1998)
- [3] 森川繁樹, 藤井侑里子, 中川もも, 可児宏章, 田渕雅彦：徳島畜研報, No. 22 (2023)
- [4] 村田友香莉, 椎名博美, 石毛太一郎, 小島敏之：The Journal of Farm Animal in Infectious Disease, Vol. 9, No. 1 (2020)
- [5] 鈴木修, 佐藤匡美：日畜会報, 56(5), 384-390 (1985)
- [6] 塚本章夫, 中村行雄, 小田頼政, 谷本昭直, 辻誠之, 白石太郎, 森大二：岡山総畜セ研報, 2, 23-26 (1991)

近年、飼料価格の高騰等生産費の増加により畜産農家の経営状況は厳しく、その対策として酪農現場では生乳販売のみではなく、子牛出荷による副収入の増加や、HACCPやJGAP認証の取得により生産物に付加価値を付ける必要性に迫られている [1]。

令和4年4月、管内の一酪農場からF1子牛の出荷時体重の増量で増収を目指すため、飼養衛生管理指導の依頼があった。そこで家保がこの農場に対し、2年間継続して衛生管理指導の取組を実施したので、その概要について報告する。

農場の概要

当該農場は酪農団地に位置する従業員20人、成牛約300頭、育成牛約100頭、子牛約70頭の大規模酪農場であり、生乳は系列ブランドにより販売している。哺育牛の飼養場所は以前は野外のハッチで飼養していたが、規模拡大に伴い、隣接する廃業牛舎を哺育舎とし、令和4年1月から第5牛舎、令和4年11月からは第6牛舎に移転している(図1)。

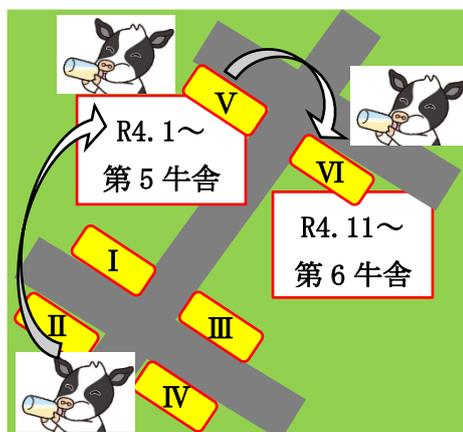


図1 農場の概要

飼養衛生管理指導

はじめに、哺育舎に立入り、作業状況の聞き取りをしたところ、衛生状況は概ね良好であった。聞き取り内容の確認のため、哺育舎の作業に一日立ち会い、給餌方法や哺乳器具の洗浄方法など、哺育における作業手順の確認を行ったところ、農場側が認識していない改善項目が約20見つかった(図2)。そこで、農場長、管理獣医師、哺育牛担当者を交え検討会を開催し、問題点の洗い出しと対策について協議した。改善案を提示したところ、農場からは、「多すぎて何からしたらいいかわからない」「改善案は本当に効果があるか疑問である」との声が聞かれた。その意見を受け、作業工程のリスク分析(表1)とATP拭取検査を行い、改善効果を数字により示し、指導することを試みた。

- 【措置事項】
目的 疫病の発生を減らす
1. 糞料の交換
 - i. 病原体の低減・汚れた部分を除去してから、糞料の追加を行う・上記ができない場合は、毎回全体を十分厚い量の糞料を追加する
 - ii. ストレスの軽減・糞料の追加投入時、石灰が気運に入るのを防ぐため、石灰は顆粒状のタイプに変更する
 2. 飼料給与
 - i. 病原体の低減
 - ①哺乳バケツ(共有アイテム)
 - ・哺乳バケツ及び乳首は塩素化アルカリ洗剤を用いた洗浄を実施し、すすぎ後殺菌剤につける。また、適回数程度酸性洗剤での酸洗浄を行う
 - ・処理の済、縦線用バケツ、計量カップ、洗浄ブラシ、エプロン及び雑巾、台車など、周辺環境についても、適切な洗浄、消毒(殺菌)、乾燥を行う
 - ②水バケツ(共有アイテム)
 - ・洗浄後に消毒を実施する
 - ③餌バケツ(非共有アイテム)
 - ・洗浄後に消毒を実施する
 - ④水/餌バケツを受ける箱(非共有アイテム)
 - ・汚れている場合は、洗浄する
 - ・汚れ移り防止のため、2つの箱は離すか、仕切りを設ける
 - ii. ストレスの軽減
 - ・ミルクは子牛に給与する際、40℃以下にならないように注意(定期的に温度を測って確認して欲しい)
 - ・消化性の下痢の原因となるため、哺乳後30分は水を給与しない
 - ・乾草はスターターを兼ねてから給与する(乾草の下にスターターが隠れており、スターターの採食を妨げている)
 3. その他
 - i. 病原体の低減
 - ①野生動物侵入防止
 - ・野鳥や虫には防鳥ネット等を設置する
 - ・殺菌剤や殺虫剤の散布、粘着シートの設置等を行う
 - ②車両消毒の実施
 - ・畜舎前に滑石灰帯を設ける
 - ・ローリー等の車室内に侵入する車両は特に、動噴等で全体の消毒を行う
 - ii. 病原体の拡散防止
 - ・早期発見、早期治療
 - ・誰もが分かるように、病気の牛に印をつける
 - ・病気の牛の作業順番を後回しにする
 - ・用具の洗浄及び消毒が実施できない場合は、病気の牛と健康な牛で用具を分ける

図2 改善項目

改善項目の優先順位をわかりやすくするため、作業工程のリスク分析を行った。各作業ごとに重篤性と頻度を1～3の三段階に分析し、その積でリスクの大きさを数値化した [2]。例えば、哺乳バケツの衛生に係る作業では、バケツはお湯で洗浄するのみであり、病原体が増加するリスクが高く、すぐに改善すべき項目であると提示した。

表1 作業工程のリスク分析

作業工程	リスクの種類	作業の特徴	リスクの評価		リスクの制御手段 (提案)
			重篤性	頻度	
飼料の給与	病原体の増加	【哺乳バケツの衛生】 ・哺乳バケツ及び乳首は朝は分解せず水(約40℃のお湯)洗いのみ ・乳首は夕方哺乳後にローテーション(1週間に1回)で取り外し、食器用洗剤で洗った後、次亜塩素酸ナトリウムで消毒を実施	3	3	・哺乳バケツ及び乳首は塩素化アルカリ洗剤を用いた洗浄を実施し、すすぎ後殺菌剤につける。また、週2回程度酸性洗剤での酸洗浄を行う
				9	

哺乳バケツの衛生状態を見える化するため、Lumitester PD-20 及び拭き取り綿棒 LuciPac A3 Surface (キッコーマンバイオケミファ株式会社、東京) を用い ATP 拭取検査を行った。ATP は生き物を含む多くの有機物に含まれる物質で、検査箇所表面の ATP 化学発光量を測定することで、清浄度の判定が可能である [3]。拭取箇所は、哺乳バケツの乳首のパッキン部分内側と外側を1周ずつ(図3)、哺乳バケツ等のバケツの底の10cm四方内を縦横それぞれ10往復ずつ(図4)とし、綿棒の先端が少し曲がる程度に圧力を加え、綿棒の先端を転がしながら採材した。

取組前、バケツはお湯で洗浄後、乾燥するのみで消毒はしていなかったため、取組後は哺乳バケツの乳首を下にし、乳首内に消毒液を通した状態でしばらく消毒液に浸すように改善した(図5)。なお、乳首のパッキン部分の洗浄、消毒手順は取組前後で変



図3 哺乳バケツの乳首のパッキン部分の拭取箇所



図4 バケツの底の拭取箇所

更はなく、1週間に1度分解し洗浄消毒している。消毒手順の改善により、乳首のパッキン部分や哺乳バケツなどいずれの器具においてもATP化学発光量の低下が認められた(図6)。これにより、哺育牛担当者はじめ農場側は取組の効果を実感し、リスク分析を実施した他の項目についても「できることから順番にする」「施設整備などお金がかかることでも第6牛舎に移ってから実施する」と改善に前向きな姿勢が認められた。



図5 消毒液を浸す様子

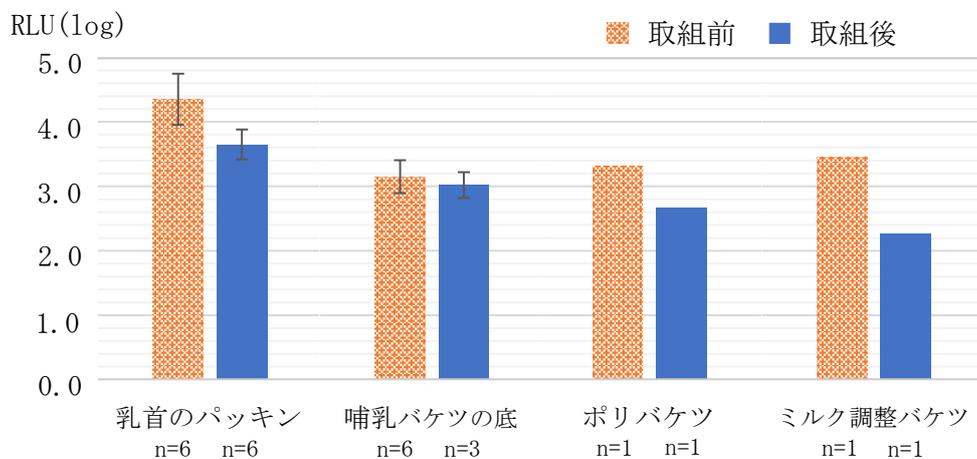


図4 バケツの底の拭取箇所

その他の改善点として、ミルクの温度管理については、取組前はボイラーが古くお湯の温度が安定せず、ミルク温度調整は手の感覚で行っており、低温のミルクの給与が下痢の一因であると考えられた。取組後はボイラーを交換し、また給与時の温度計による温度確認を定期的に行うようになり、一定の温度でミルクを給与できるようになった。

また、哺育舎への従業員の出入りについて、取組前は長靴の履き替えがされていなかったが、取組後は哺育舎入口に従業員分の長靴とすのこを設置し、ラインを引いて履き替え場所を区分した(図7)。

その他にも、立入記録簿を各牛舎に置くこと、衛生管理区域や動線の見直し、従業員教育として当該農場で死亡した牛の家保での解剖見学による死因の共有などを行った。



図7 長靴及びすのこの設置
矢印箇所にオレンジ色のライン

下痢及び呼吸器病対策

以上の取組を行いつつ、第 6 牛舎に子牛は移動したものの、移動前からの下痢の発生が継続して認められたため、哺育舎の全 40 頭から糞便を採取し、全頭でクリプトスポリジウム、牛ロタウイルス A・B・C、牛コロナウイルス及び牛トロウイルスの遺伝子検査を、そして下痢を呈する 6 頭においては *E. coli* の細菌培養試験による定量と Rainbow Calf Scours (コスモバイオ株式会社、東京) による簡易糞便検査を実施した。下痢を呈した 6 頭とも *E. coli* の菌量は 10^9 個/g 以下と正常値であったが、1 頭から簡易糞便検査でロタウイルスが陽性となり、遺伝子検査ではクリプトスポリジウムと牛ロタウイルス A が検出された。また、臨床症状を認めない子牛 6 頭からもクリプトスポリジウム、2 頭から牛ロタウイルス A が検出され、クリプトスポリジウムと牛ロタウイルス A が哺育舎に常在していることが示唆された。そのため、下痢対策としてさらなる飼養衛生管理の徹底 (敷料交換、牛同士の接触防止等) とワクチン接種を指導した。

呼吸器病対策として、換気扇のない第 5 牛舎において牛舎内の風量を測定した結果、空気が滞留している場所があることが判明し、扇風機の向きを調整するなどに対応した。第 6 牛舎でも移動直後は換気扇がなく、冬期に入り扇風機を止めて窓を閉め切ったことで呼吸器病が多発したが、令和 5 年 1 月には複数台の大型換気扇が設置された(図 8)。

また、当該農場はこれまで下痢及び呼吸器病の予防ワクチンを接種していなかったが、ワクチンの有用性を説明した結果、令和 5 年 6 月には呼吸器病予防に鼻腔粘膜ワクチン (TSV-3)、12 月には下痢予防に下痢 5 種混合不活化ワクチンの接種を開始した。



図 8 大型換気扇

指導効果

1 治療頭数の推移

哺育牛における治療頭数を週ごとに集計した(図 9)。第 6 牛舎移動後に治療頭数が急増したが、換気扇導入後に減少した。またワクチン接種により令和 5 年度は令和 4 年度の 6 割程度に減少した。



図9 哺育牛における週ごとの治療頭数

2 病性鑑定成績

疾病発生状況の確認のため、哺育牛の下痢検体と鼻腔スワブについて、取組を開始した令和4年4月から令和5年2月まで病性鑑定を実施した(図10)。

治療頭数の減少に伴い、下痢検体及び鼻腔スワブの依頼件数は令和5年度は令和4年度と比較し、

減少傾向にあった。下痢検体からは主に大腸菌、クリプトスポリジウム、牛ロタウイルスAが確認され、特に令和5年度はクリプトスポリジウムの比率が高くなっている。鼻腔スワブからは令和4年度は主にパストツレラ等が認められたが、令和5年度は有意菌は検出されていない。

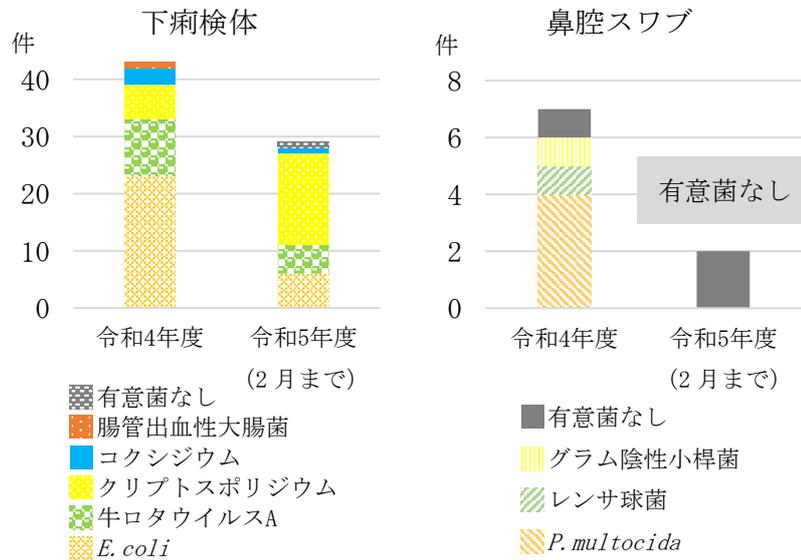


図10 病性鑑定件数および内訳

3 F1子牛の出荷時一日増体量(DG)及び体重

F1子牛の出荷時体重について、年度ごとにF1子牛の平均出荷時DG及び平均体重を算出し、取組前の令和3年度と取組後の令和4年度及び令和5年度を比較した。DGは(出荷時体重(kg)-出生時体重(kg)) / (出荷日齢-1)で算出した。年度平均DGは取組前の令和3年度が0.81、令和4年度が0.99、令和5年度が0.95であり、令和3年度

に比べ令和4年度と令和5年度では有意な増加 ($p<0.01$) が認められた。また、平均出荷時体重は令和3年度が85.0kg、令和4年度が99.3kg、令和5年度が103.6kgであり、令和3年度に比べ令和4年度と令和5年度では有意に増加した(図11)。

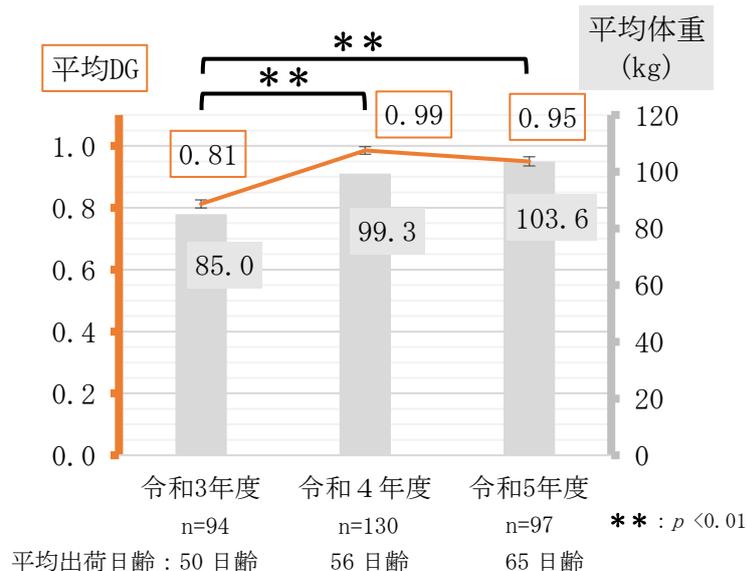


図11 F1子牛の出荷時における年度平均DG及び体重

まとめ及び考察

農場からの依頼に応じて哺育舎における飼養衛生管理指導及び各種取組を実施した。その結果、哺育牛の疾病は減少し、出荷時DGの上昇、出荷時体重の増加が認められ、子牛の生産性向上につながった。効果的であった点として、リスク分析やATP検査で改善項目の重要度や衛生指標の数値化したことで、農場は理解しやすく効果が実感でき、衛生意識の向上がみられたと考えられた。また、疾病要因究明のための各種検査を行い、疾病の発生状況を指標としたことで大型換気扇設置等の環境改善や予防ワクチン接種が開始された。さらに、衛生意識の向上や様々な衛生環境の改善に取り組むことで当農場は令和6年1月に県内初となるJGAP畜産認証を取得した。

今後も飼養衛生管理指導を継続し、損耗防止を図るとともに、出荷時体重のさらなる増量に向けて種雄牛の選定や飼料給与等についても指導していきたい。

参考文献

- [1] 赤松裕久, 朝日光久, 犬丸憲之, 岩田祐之, 片岡康, 河合一洋, 川邊久浩, 見學一宏, 小池郁子, 富田眞之, 西貝正彦, 西村雅明: 畜産農場における飼養衛生管理向上の取組認証基準(農場HACCAP認証基準)の理解と普及に向けて, 令和元年度改訂版, 89-93, 公益社団法人中央畜産会(2019)
- [2] 黒澤和寛: 畜産の情報=Livestock industries information, 農畜産業振興機構調査情報部情報課編, 65-75, 農畜産業振興機構調査情報部, 東京(2018)
- [3] 横澤こころ, 荒木悦子, 後藤裕克, 英俊征, 小嶋信雄: 神奈川県県家畜保健衛生業績発表会集録, 9-17(2020)

登録飼養衛生管理者による豚熱ワクチン接種制度の開始に伴う対応と課題

北部家畜保健衛生所

○山内由佳、高井光、中田昌和

平成30年9月、国内養豚場で26年ぶりとなる豚熱（当時の名称は「豚コレラ」）の発生が確認されて以降、国は「豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針（以下、指針）」を改正し豚熱ワクチン接種推奨地域における接種を進めてきた。

本県では、令和元年10月から県内全域の全ての飼養豚を接種対象としてワクチン接種を開始し、同年11月初回接種が終了、その後は出生した子豚に対して継続的なワクチン接種を実施している。この間の接種は、すべて家畜防疫員が実施してきたが、令和4年12月の指針改正（以下、改正指針）により、登録飼養衛生管理者による豚熱ワクチン接種が可能となり、令和5年9月より本制度の運用を開始した。そこで、家畜保健衛生所（以下、家保）が取り組んだ運用開始までの対応と開始後の状況について、その概要を報告する。

背景

豚熱ワクチンの接種を確実に行うには、ワクチンを適切な時期に適切に接種するための接種者を家畜防疫員及び知事認定獣医師に限定し、知事の使用許可によってワクチンを厳格に管理することが家畜伝染病予防法（以下、家伝法）第50条に規定されている。

一方で、接種頻度によっては必ずしも適期での接種が困難であることや、豚熱や鳥インフルエンザ発生時の緊急防疫措置時等には防疫対応優先によるワクチン接種の停滞及び防疫措置実施体制への影響が懸念される。また、豚熱ワクチン接種業務に時間を取られ、飼養衛生管理の指導等、家保職員の他業務への対応に影響を及ぼすことが課題となっている。

これらの課題を踏まえ、改正指針では、家畜防疫員及び知事認定獣医師の指示・監督の下、家伝法第21条の3の2第1項に基づく飼養衛生管理者によるワクチン接種を可能とするよう接種体制が強化された。

本県ではワクチン接種を令和元年10月から実施しているが、知事認定獣医師による接種制度導入が可能になった令和3年9月以降も対象となる獣医師がいなかったため、家伝法第50条のワクチン使用許可は家保と県畜産試験場の家畜防疫員のみとし接種を継続してきた。令和5年度は

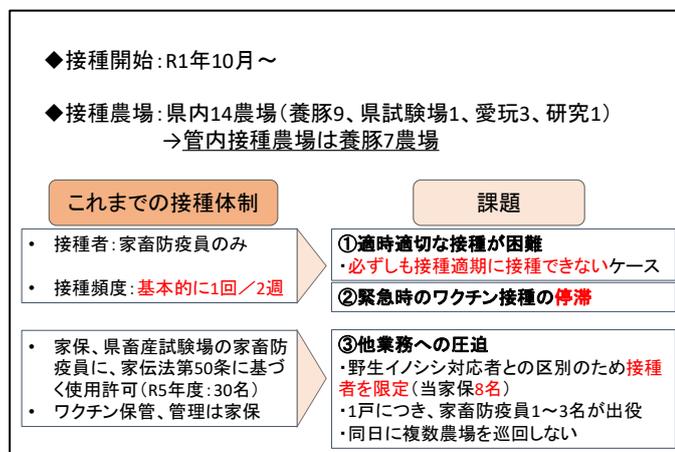


図1 これまでの接種体制と課題

30名の家畜防疫員で、県内14農場で基本的に1回/2週の頻度でワクチン接種を実施しているが、農場内での子豚の移動時期と接種予定日のタイミングによっては接種適期に必ずしも接種できないケースがある。当家保では野生いのししの豚熱サーベイランス担当者以外の8名家畜防疫員が管内7農場のワクチン接種を行っているが、1農場あたり1~3名で出役し、同日に複数農場を巡回しないこととしていることから、接種業務が他業務を圧迫していることが課題となっている（図1）。

そこで改正指針に基づき、農場に対しワクチン接種にかかる意向調査を実施したところ、登録飼養衛生管理者によるワクチン接種を希望する農場があったことから、令和5年4月に「石川県登録飼養衛生管理者による豚熱ワクチン接種に関する事務実施マニュアル」を策定し、対応することとした。

本制度開始までの流れ

1. 飼養衛生管理者の登録：県畜産振興・防疫対策課が開催する「登録飼養衛生管理者による豚熱ワクチン接種のための研修会」を座学で受講修了する。次に座学研修会の内容をもとに、農場毎に作業手順書を作成する。その後、家保が開催する実地研修会を受講し、農場認定のための認定要件確認審査を受ける。県畜産振興・防疫対策課は家保からの実施報告を受け、研修会修了証の交付と登録飼養衛生管理者名簿に登録する。登録飼養衛生管理者は認定農場での豚熱ワクチン使用許可を申請し、許可を受けて初めて本制度の運用を開始できることとなっている（図2）。

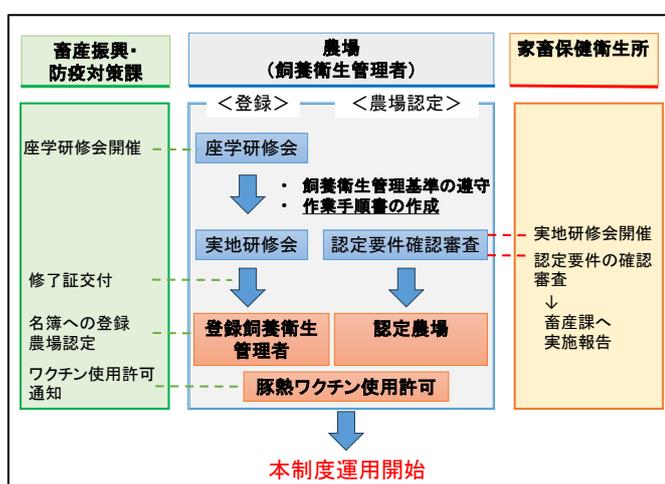


図2 制度開始までの流れ

2. 座学研修会：令和5年5月、6月に3回に分けて開催し、管内の7農場のうち、本制度の利用を希望した4農場の6名が受講した。農場への事前の意向調査で、防疫上、「他農場と接触したくない」「家保への来庁に抵抗がある」、「指定された期日は不都合」といった意見が上がったことから、開催日を複数回に、開催場所を家保の他、県庁にも設定するなど農場からの意見に柔軟に対応した。

講義内容は、本制度の概要と事務的な手続き及びワクチン接種技術についてとし、登録飼養衛生管理者及び認定農場が満たすべき要件を把握することを目的とした。また、作業手順書のひな形を配布し各農場で加筆修正し作成するよう指導した。

3. 実地研修会及び農場認定要件確認審査：令和5年6月から順次行った。実地研修会及び認定要件確認審査は同時に実施することとし、家保は事前準備のため農場の作業手順書作成のサポートから開始した。座学研修会で配布した作業手順書のひな形を用い、実際に各農場での実施方法を反映させ、実地研修会で手順書通りに実

行できるかを検証、精査し、完成させた。実地研修会では家保指導の下、実際に飼養衛生管理者がワクチンの溶解から接種までを実施しながら、ワクチン接種に必要な知識・技術や、使用済み注射針の適正な廃棄、クイッカー・連続注射器の適切な洗浄・消毒、ワクチン接種豚出荷時のマーキングの徹底等について講義し、登録飼養衛生管理者の要件である、適時適切なワクチン接種とワクチン管理について指導した。

農場認定要件確認審査では、飼養衛生管理基準の全項目の遵守を再確認するとともに、作業手順書の最終確認を行い、農場認定要件を満たしているか審査した。

また、今回は実地研修会と認定要件確認審査を同時に実施することで、飼養衛生管理者登録と農場認定をスムーズに進めることができた（図3）。

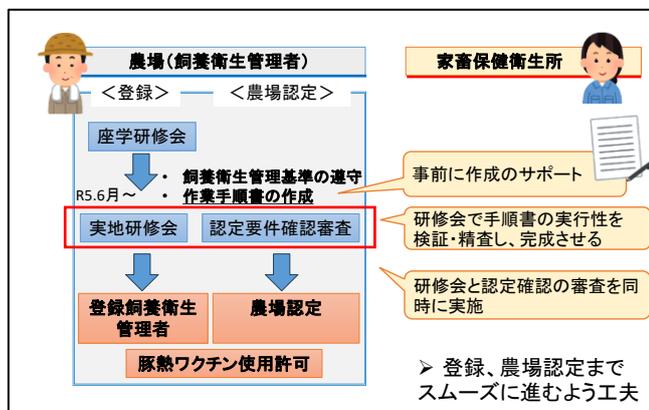


図3 実地研修会、認定要件確認審査

本制度の運用

1. 運用方法：農場は翌月分の接種予定頭数とワクチン使用本数を記入した接種計画と、豚熱ワクチン交付申請書を家保に提出し、手数料を納入する。家保は、1回/月、主に家畜防疫員1名で認定農場に立入りし、接種計画に基づいた接種対象豚の診察を行い、豚熱ワクチン接種票とワクチンを交付する。また、立入時には前月分の実績に基づきワクチン使用数の突合と空瓶の回収も行っている。ワクチン交付を受けた登録飼養衛生管理者は、適時適切なワクチン接種と、管理簿を備えてワクチンの保管管理を行い、月末締めで接種実績報告を家保に提出する。家保は農場立入の他、月に1回、認定農場からの実績報告の取りまとめと、ワクチンの在庫を管理している（図4）。

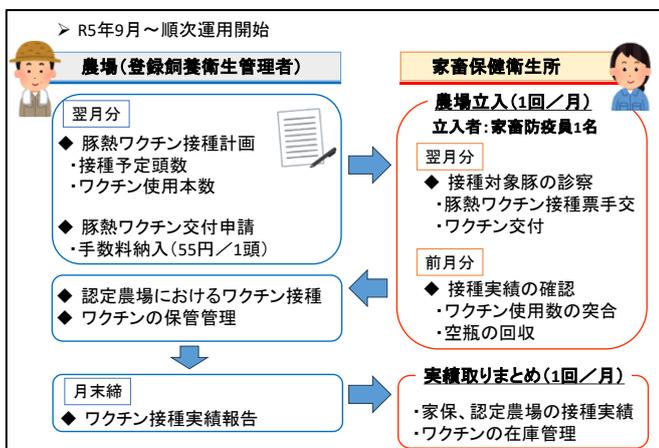


図4 本制度の運用方法

2. 運用後の状況

(1) 家保の業務：本制度導入前後を比較すると、家保の出役頻度は認定農場では月に1回と減少し、接種者の実人数は8名と変化はないが、月の平均出役人数は25名から15名と減少した。これにより、接種者の業務負担は軽減された。

一方、接種実績の取りまとめ作業は、家畜防疫員接種分に加え、登録飼養衛生管理者接種分も含める必要があり、事務担当者の負担は増加した。また、ワクチンの保管場所は、これまでの家保と県畜産試験場に加え、各認定農場にも保管されていることから、月末締めで実施しているワクチンの在庫確認が煩雑となった（表1）。

表1 本制度導入前後の比較

	導入前	導入後
管内ワクチン接種農場	7戸	認定農場: 4戸 非認定農場: 3戸
家保出役頻度	基本的に1回/2週	認定農場: 1回/月 非認定農場: 基本的に1回/2週
月の平均出役人数(対応職員実人数)	25名(8名)	15名(8名)
接種実績取りまとめ	・家畜防疫員接種分	・家畜防疫員接種分 ・登録飼養衛生管理者接種分
ワクチン保管場所	・家畜保健衛生所 ・県畜産試験場	・家畜保健衛生所 ・県畜産試験場 ・認定農場

> 出役人数が減少
 > 対応職員のワクチン接種業務負担軽減

> 事務担当者の負担が増加
 > ワクチン在庫管理が煩雑に

(2) 接種頭数: 令和5年度のワクチン接種頭数の推移では、認定農場A、Bで接種が開始された9月以降、家畜防疫員の接種頭数は順次減少している。今年度、認定を受けた4農場すべてで運用が開始された令和6年1月以降は、登録飼養衛生管理者接種頭数が家畜防疫員接種頭数を上回った。それぞれの認定農場で運用開始時期が違うため、一概に比較はできないが、本制度導入前(R5.4月~R5.8月)と導入後(R5.9月~R6.2月)の家畜防疫員の月平均接種頭数は3,056頭から1,508頭へと半減した。

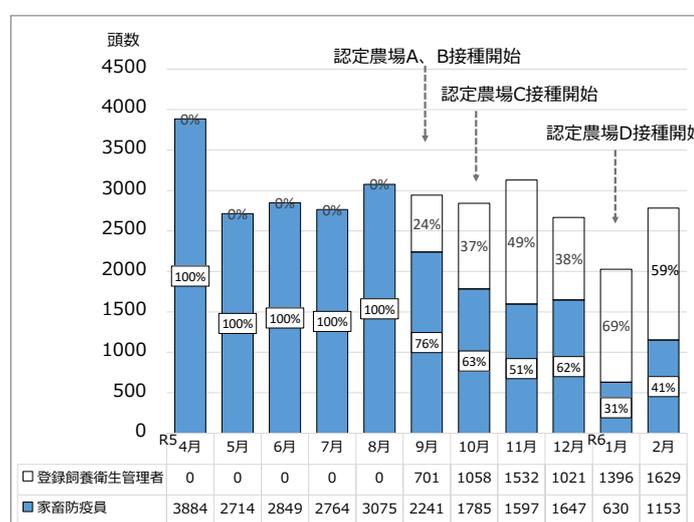


図5 豚熱ワクチン接種頭数の推移 (R5.4~R6.2)

また、能登半島地震が発生した令和6年1月には家畜防疫員による接種頭数が630頭と少なく(図5)、これは震災のため、認定を受けていない一部の農場で接種予定日に実施できなかったことが要因となっている。接種延期にした農場では、震災による豚舎の一部倒壊、断水等の対応に追われ、接種対象豚の選別等、接種日前日の準備まで手が回らないことが要因の1つであった。一方、認定農場でも同様に震災の影響を受け対応に追われていたものの、外部からの来場はないため日々の作業の流れで接種が可能であったことから、ほとんどの認定農場で月の接種計画通りに接種体制を維持できていた。

(3) 認定農場アンケート調査: 今後の運用方法の参考とするため、今年度認定を受けた4農場に対し、アンケート調査を実施した(図6)。

<p>問1. 本制度を開始して、メリットは感じられるか？</p> <p>回答 「はい」 4農場 「いいえ」 0農場</p> <p>問2. 問1で回答した理由は？（複数回答可）</p> <p>回答 「自分のタイミングで接種できるので作業効率が改善された」 4農場 「接種適期に確実に接種できる」 4農場 「1頭あたりの手数料が安価となったため経済的な負担が減った」 3農場 「研修会でワクチン接種にかかる知識、手技を再確認できた」 2農場 「飼養衛生管理を見直し、防疫意識が高まった」 1農場</p> <p>問3. 実績報告等の事務作業に負担を感じるか？</p> <p>回答 「かなり負担を感じる」 3農場 「少し負担を感じる」 1農場 「負担は感じない」 0農場</p> <p>問4. 次年度も本制度の利用を継続したいか？</p> <p>回答 「はい」 4農場 「いいえ」 0農場</p>
--

図6 認定農場アンケート

問1、4について、全農場で本制度にメリットを感じ、今後も継続を希望していた。問2で得られた「作業効率が改善した」という理由の背景には、豚舎移動のタイミングで接種できるようになったことを挙げた農場や、豚舎移動1週間後に接種するようになったことで豚の様子を見ながら接種できるという意見もあった。「接種適期に確実に接種できる」という理由については、例えば、接種頻度が1回/1週に増加した認定農場Bでは、制度開始前（～R5.8

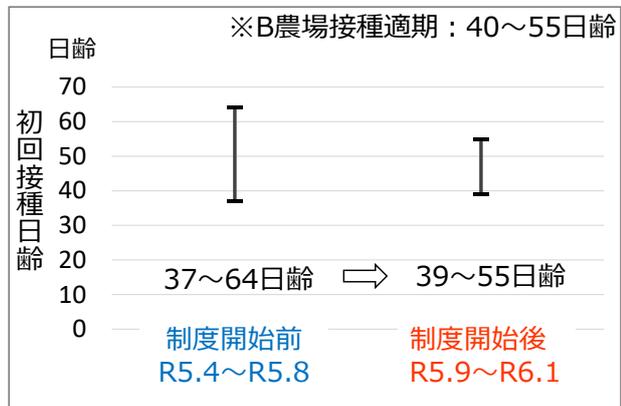


図7 認定農場Bにおける初回接種日齢の変化

月)は初回接種日齢が37~64日齢と幅が大きく、農場の接種適期である55日齢以降になったケースがあったのに対し、制度開始後(R5.9月～)は39~55日齢と、おおむね接種適期内で接種することができるようになった(図7)。「経済的な負担が減った」という理由については、家畜防疫員接種は280円/1頭(接種手数料)であったのに対し、登録飼養衛生管理者接種は55円/1頭(交付手数料)になったこ

とで負担が減ったと回答している。また、次年度、農場の登録飼養衛生管理者を増やしたいとの意見も得られた。

しかし、問3のように実績報告等の事務作業については、程度の差はあるが、全農場で「負担に感じる」との回答であった。接種計画頭数を出すのに時間がとられることや、ワクチン管理簿や報告様式が数枚にわたるため、簡易化を希望するという意見もあった。

(4) 非認定農場アンケート調査：今年度認定を受けなかった3農場へのアンケート調査も同時に実施した(図8)。

問1. 今年度実施しなかった理由は？(複数回答可)

回答 「人出不足」3農場

「登録・認定にかかる作業手順書の作成が大変そう」3農場

「登録・認定にかかる研修会への参加が面倒」2農場

問2. 今後本制度を実施したいですか？

回答 「今後も実施する予定はない」2農場

「いつかは実施したい」1農場

図8 非認定農場アンケート

今年度認定を受けなかった農場では、人手不足であることが大きな理由となっており、加えて、登録・認定にかかる事務的作業に対してハードルを感じている傾向があり、特に作業手順書の作成が本制度利用の妨げになっていた。

まとめ

本県では、今年度より登録飼養衛生管理者による豚熱ワクチン接種制度を導入し、6名が登録飼養衛生管理者に登録され、4農場が知事の認定を受けて、令和5年9月から順次運用を開始した。

その結果、認定農場では自分のタイミングで接種できるようになり、接種頻度が増加したことで適期でのワクチン接種が可能となった。また、今回震災時に非認定農場では接種を延期にした事例があった中、認定農場では接種体制を継続して維持しており、懸念されていた緊急時の豚熱ワクチン接種の停滞についても、本制度導入の利点を発揮した結果となった。さらに、家畜防疫員のワクチン接種業務が減少したことで、課題となっていた飼養衛生管理の指導など他業務への圧迫も解消傾向にある。

農場アンケート調査の結果では、全農場で本制度にメリットを感じ今後も継続する意向であり、農場の登録飼養衛生管理者を増やしたいという意見もあった。

一方、課題としては、認定農場と家保の両方において、事務作業の負担が考えられた。今後、認定農場においては、記入しやすい報告様式へと改正を行い、継続しやすい運用方法を検討するとともに、家保で煩雑となっているワクチン管理につい

では、保管場所の各々で作成している管理簿の内容を、家保で集約し把握できるような在庫管理シートを作成する等、事務担当者の負担を軽減できるような工夫が必要と考える。

これまで当県では、家畜伝染病予防事業で免疫付与状況確認検査を実施しており、この結果に基づき各農場の接種適期を把握し、家畜防疫員が適期での接種に努めてきたが、子豚の移動時期と接種予定日のタイミングによっては適期を外れて接種することもあった。今回、認定農場では確実に接種適期にワクチンを接種できるようになったことから、今後も各認定農場で免疫付与状況確認検査を行い、接種適期の検討を継続したい。

本県は他の都道府県と比べ養豚場が少ないが、少ないからこそ1農場に丁寧に接することができる利点がある。ワクチンの適時適切な接種とワクチンの厳格な管理が継続して担保できるよう、今後も家保は認定農場と連携を密にし、継続しやすい運用方法を検討したいと考えている。また、すでに認定を受けている農場とのやり取りの中で得られたノウハウを生かし作業手順書の作成をサポートする等、今年度は認定を受けていない農場へも制度利用のための丁寧な説明をすることで、本制度を利用できるよう取り組みたいと考えている。

最後に震災後の対応に忙しい中、アンケートにご協力いただいた養豚場の皆様に感謝するとともに、一日も早く復旧・復興できるよう支援したい。

第 2 部

RAISING(Rapid Amplification of Integration Site without Interference by Genomic DNA contamination)法を活用した肉用牛農場における地方病性牛伝染性リンパ腫対策

北部家畜保健衛生所

○木村祐太 山内由佳 市川雄一 玉鉾紗智 福田藤子 中田昌和

地方病性牛伝染性リンパ腫（EBL）はレトロウイルス科デルタレトロウイルス属の牛伝染性リンパ腫ウイルス（BLV）を原因とする牛の感染症である。感染した場合 70%程度の個体は無症状であるが、うち 30%が持続的リンパ球増多症（PBL）を、PBL 牛中数%（感染牛の 0.1~1%）が発症し、リンパ腫を呈す。その後、発症牛は一般状態の悪化を呈し予後不良となる。また、他のレトロウイルスと同じく BLV に感染した場合、ウイルス遺伝子が宿主遺伝子に挿入されプロウイルス化されるため、一度感染した個体からウイルスが排除されることはない。[4]

BLV の主要な感染経路対策として吸血昆虫による機械的伝播、初乳を介した垂直伝播、器具の使いまわしによる医源性伝播が知られている。

発症牛はと畜検査において全廃棄となるため、農場経営において経済的な被害が大きい。その一方、発症機構に不明な点が多いため生前の発症確定診断法は未だ確立されていない。さらに特異的な臨床症状に乏しく、と畜検査により偶発的に発見されることもしばしばである。

BLV は感染後体内に生涯にわたり残存する特徴から、清浄化には多大な時間が必要である。また、全廃棄以外の経済損失が不明瞭であるため対策が放置されている場合が多く、わが国においてはその感染が急速に拡大している。家畜衛生上、対策は急務であり現在様々な検査系や清浄化対策について研究開発が行われている [2]。

EBL に対する新たな検査系

現在研究開発されている発症検査の一つに BLV 遺伝子挿入部位を評価するクローナリティ解析が挙げられる。BLV は感染時に宿主細胞に自身のウイルス遺伝子を挿入するが、その挿入部位は任意であることが明らかとなってきた。このため、感染成立時の遺伝子挿入部位を感染リンパ球間で比較すると一致性に乏しいことが知られている。一方、発症は単一もしくは少数の感染リンパ球がモノクローナルに増殖する。宿主の細胞分裂に伴う DNA 複製時には、ウイルス遺伝子挿入部位は変化せず、体内のリンパ球のうち同一由来リンパ球が占める割合が向上するため、感染リンパ球間でのウイルス遺伝子挿入部位の一致性が上昇する（図 1）。この特性を利用し発症状態を評価することで、より高精度の発症確定診断および生前の発症確定診断、発症予測への応用が期待されている。[6]

クローナリティ解析には様々な手法が存在し、その一つに RAISING 法がある。RAISING 法は、BLV 挿入遺伝子直近の宿主遺伝子をシーケンスにより直

接解析する手法であり、遺伝子配列が一致もしくは近い場合は遺伝子配列挿入部位の同一性が高いと評価される（図2）。さらにこれを専用の解析ソフトCLOVAにより解析し、Cv（Clonality value）値に数値化して発症リスクを判定できることが特徴である。Cv値は0.17を超えると有意に発症牛の割合が増加することが報告されており、暫定的ではあるものの、現在本法においてCv値0.17を超える個体は発症高リスク牛と判定される（図3）。羊モデルにおいては、発症前にCv値上昇をとらえることが可能と報告されており、発症前に高リスク牛を特定し早期淘汰することでと畜検査における全廃棄を回避し損失軽減を可能とするものと期待されている [7]。

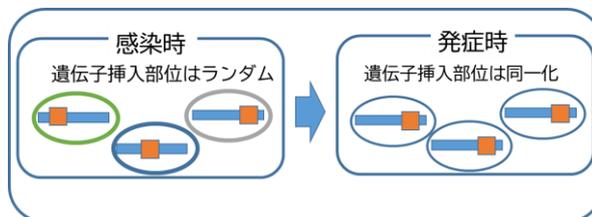


図1 感染時と発症時のウイルス遺伝子挿入部位置

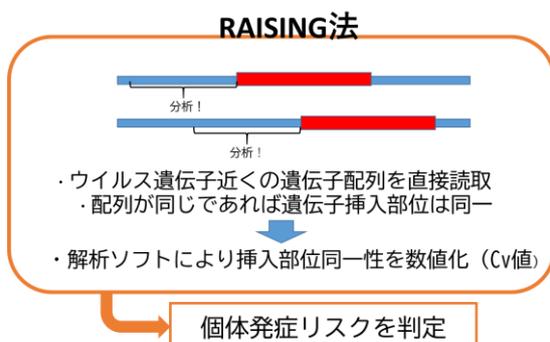


図2 RAISING法の原理

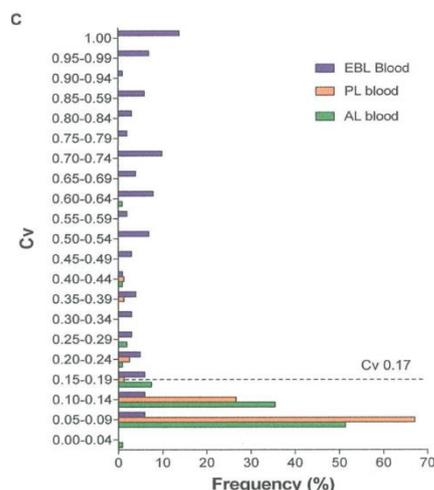


図3 BLV感染牛におけるCv値（引用：岡川ら 2022）[8]

肉用牛農場における取組

今回、金沢食肉流通センターのと畜検査において、管内の農場が出荷した肉用牛1頭が牛伝染性リンパ腫で摘発され全廃棄となった。当該農場は黒毛和種の成牛56頭を4つに分かれたフリーストールで飼養しており（図4）、摘発を受け、抗体検査（ELISA法；牛伝染性リンパ腫エライザキット（ニッポンジーン））実施したところ、56頭中49頭が陽性（陽性率87.5%）と高度に浸潤していることが判明した。

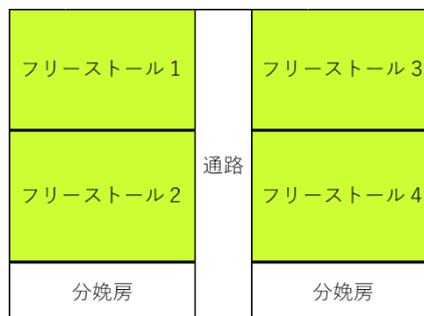


図4 農場簡易図

清浄化には感染牛の更新が必要であるが、感染頭

数が多いため更新には時間がかかることが考えられた。また、フリーストールという飼養形態はスタンションと比べ吸血昆虫を介した伝播が起こり易く、伝播防止対策が必要と考えられた。[5]

さらに今後も、と畜検査での摘発により全廃棄となれば農場の経済的損失が大きいことから、これを可能な限り回避するよう的確に早期淘汰対象を選定していく必要があると考えられた。

以上を踏まえ淘汰の優先順位付け及び、牛の再配置のため伝播リスク判定を実施した。加えて、全廃棄の回避を目的として、早期淘汰対象を摘発するため発症リスク判定を実施した。

材料と方法

1. 伝播リスク判定

(1) 材料

EDTAにより凝固抑制した牛全血を0.85%塩化アンモニウム溶血処理し分離した牛白血球56検体(56頭)を用いた。

(2) 方法

プロウイルス量測定はリアルタイムPCR法による遺伝子定量法により実施した。DNA抽出にはHigh Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche)を用いた。PCR反作用マスターミックスにはTaqMan® Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific)、rPCR試薬にはCoCoMo™-BLV Primer/Probe ((株)ニッポンジーン)を用いた。

反応および測定はApplied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems (Thermo Fisher)により行った。判定は、鼻汁や唾液にウイルスが排出されるプロウイルス量20000 copies/10⁵ cells以上の個体を伝播高リスク(「伝播高」)、20000 copies/10⁵ cells未満5000以上 copies/10⁵ cellsの個体を伝播中リスク(「伝播中」)、5000 copies/10⁵ cells未満1000 copies/10⁵ cells以上の個体を伝播低リスク(「伝播低」)、1000 copies/10⁵ cells未満の個体を伝播超低リスクとした(「伝播超低」)。
[8]。

なお、発症リスク判定やその他の指標とするため、残余全血を用いて自動血球計算器によりリンパ球数を測定した。

2. 発症リスク判定

(1) 材料

「伝播中」の中で、JBの鍵[1]による発症判定を実施し、陽性の牛白血球由来DNA8検体(伝播リスク判定の残余検体)を用いた。

(2) 方法

株式会社FASMACによる「RAISING法によるBLVクローナリティ解析サービス」を利用した。判定は、Cv値0.17を超えるものを発症高リスクと判定した[4]。

結果

1. 伝播リスク判定

全個体のプロウイルス量およびリンパ球数を測定した結果

伝播高が 16 頭確認された（表 1）。また、6 頭が遺伝子量検出限界未満であった。なお、遺伝子量検出限界未満であっても抗体陽性の場合には感染の可能性があるので、遺伝子または抗体一方が陽性の場合には感染牛とした結果、最終的な陽性率は 96.2%と判断した。

表 1 ウイルス遺伝子量および、リンパ球数

飼養マス	検査番号	月齢	ELISA結果	遺伝子量 (copies/10 ⁵ cells)	リンパ球 (/μl)	飼養マス	検査番号	月齢	ELISA結果	遺伝子量 (copies/10 ⁵ cells)	リンパ球 (/μl)	
右手前	1	46	+	37119.94	7800	右奥	16	96	+	15212.08	3800	
	2	74	+	31767.11	5100		17	82	-	14978.95	5300	
	3	53	+	2264.28	5100		18	85	+	10406.29	3700	
	4	46	+	33152.78	5700		19	73	+	13430.02	5300	
	5	77	+	1871.17	2600		20	85	+	18465.63	5100	
	6	58	+	53.52	4000		21	94	+	115.62	1800	
	7	75	+	#VALUE!	3400		22	79	+	4512.33	2700	
	8	52	+	45845.05	11000		23	76	+	11289.99	4400	
	9	48	-	7.70	3500		24	77	-	7.85	2600	
	10	69	+	746.03	3500		25	96	+	4014.38	2900	
	11	46	+	1.63	3900		26	50	+	5.14	3300	
	12	46	+	32314.01	5900		27	64	+	15840.87	2900	
	13	52	+	-	2900							
	14	74	+	12860.45	4100							
	15	53	+	-	4000							
左奥	28	73	+	15.92	3100	左手前	41	25	+	21156.46	6100	
	29	56	+	15949.25	4700		42	44	+	46458.54	12900	
	30	67	+	42465.18	4800		43	24	+	7324.48	4400	
	31	75	+	15952.60	3400		44	26	+	213.94	3500	
	32	46	+	15533.57	5400		45	37	+	30161.49	5400	
	33	54	+	2534.38	3300		46	42	+	23657.20	8500	
	34	73	+	26767.47	3900		47	46	+	16443.60	4400	
	35	79	-	#VALUE!	2100		48	25	+	35277.33	8500	
	36	69	+	5965.52	4000		49	48	+	47545.33	15200	
	37	49	+	#VALUE!	4100		50	46	+	3.26	4300	
	38	50	+	2943.02	5000		51	46	+	4662.40	3000	
	39	74	-	#VALUE!	3300		52	51	+	32186.33	6000	
	40	78	+	99.10	2600		53	50	+	26254.25	3500	
	右側分娩	54	22	+	41672.78		16900					
		55	76	-	0.86		2700					
56		13	-	1570.82	8800							

2. 発症リスク判定

解析の結果、Cv 値 0.17 以上を示す発症高リスク牛は確認されなかった。しかし、基準値に近い、Cv 値 0.14（検査番号 1）と Cv 値 0.16（検査番号 52）を示す個体が確認された。Cv 値はあくまで一時点の値であるため、当該個体に関しては再検査も視野に入れ経過観察することとした。（表 2）

表 2 発症リスク判定結果

検査番号	月齢	ウイルスコピー数 (/10 ⁵ cell)	リンパ球数 (/μl)	Cv値
1	46	3711.99	7800	0.1426
8	52	4584.51	11000	0.0779
42	44	4645.85	12900	0.0915
46	42	2365.72	8500	0.0984
48	25	3527.73	8500	0.0572
49	48	4754.53	15200	0.0649
52	51	3218.63	6000	0.1644
54	22	4167.28	16900	0.0621

3. 対応

検査結果を踏まえ、清浄化に向けて対応を検討した。

農場管理者からは経営上、陽性牛を淘汰すれば経営が成り立たないため、一部の肉質の遺伝的資質に優れる個体は「伝播中」であっても飼養を継続したいという強い要望があった。長期的に勘案し、EBLが原因の全廃棄による損害を、対策による減益が上回れば損害を軽減できないため、更新の優先順位を検討した。RAISING法検査牛8頭については、発症高リスク牛でなかったことに加え、牛群中で特に遺伝的資質に優れるという農場側の意向も踏まえ、「伝播中」であるが感染対策を行ったうえで当面飼養を継続することとした。他の「伝播中」に関しては資質を加味したうえで可能なものから順次更新の対象にするとした。

感染経路対策として伝播リスク判定に基づき牛をグループ化した（表3）。伝播高16頭を最も伝播リスクの高いグループ1とした。これ以外の「伝播中」をグループ2、「伝播低」及び伝播超低をグループ3とした。

風向きなどを考慮し、吸血昆虫から保護するため非感染牛を右奥に配置することとした。また、プロウイルス量の高い個体群は非感染牛から距離が遠くなるよう左手前に配置するよう指導した（図5）。

表 3 グループ分類

検査番号	月齢	ELISA結果	遺伝子量 (copies/10 ⁶ cells)	Lym (細胞/ul)	JBのカギ判定 ※	総合判断	伝播リスク分類	クローナリ ティ解析 (Cv)
7	75	+	-	3400	-	陽性	超低	NT
13	52	+	-	2900	-	陽性	超低	NT
15	53	+	-	4000	±	陽性	超低	NT
37	49	+	-	4100	±	陽性	超低	NT
55	76	-	0.86	2700	-	陽性	超低	NT
11	46	+	1.63	3900	-	陽性	超低	NT
50	46	+	3.26	4300	-	陽性	超低	NT
26	50	+	5.14	3300	-	陽性	超低	NT
9	48	-	7.70	3500	-	陽性	超低	NT
24	77	-	7.85	2600	-	陽性	超低	NT
28	73	+	15.92	3100	-	陽性	超低	NT
6	58	+	53.52	4000	±	陽性	超低	NT
40	78	+	99.10	2600	-	陽性	超低	NT
21	94	+	115.62	1800	-	陽性	超低	NT
44	26	+	213.94	3500	-	陽性	超低	NT
10	69	+	746.03	3500	-	陽性	超低	NT
56	13	-	1570.82	8800	+	陽性	低	NT
5	77	+	1871.17	2600	-	陽性	低	NT
3	53	+	2264.28	5100	±	陽性	低	NT
33	54	+	2534.38	3300	-	陽性	低	NT
38	50	+	2943.02	5000	±	陽性	低	NT
25	96	+	4014.38	2900	-	陽性	低	NT
22	79	+	4512.33	2700	-	陽性	低	NT
51	46	+	4662.40	3000	-	陽性	低	NT
36	69	+	5965.52	4000	±	陽性	中	NT
43	24	+	7324.48	4400	-	陽性	中	NT
18	85	+	10406.29	3700	-	陽性	中	NT
23	76	+	11289.99	4400	±	陽性	中	NT
14	74	+	12860.45	4100	±	陽性	中	NT
19	73	+	13430.02	5300	±	陽性	中	NT
17	82	-	14978.95	5300	±	陽性	中	NT
16	96	+	15212.08	3800	-	陽性	中	NT
32	46	+	15533.57	5400	±	陽性	中	NT
27	64	+	15840.87	2900	-	陽性	中	NT
29	56	+	15949.25	4700	±	陽性	中	NT
31	75	+	15952.60	3400	-	陽性	中	NT
47	46	+	16443.60	4400	-	陽性	中	NT
20	85	+	18465.63	5100	±	陽性	中	NT
41	25	+	21156.46	6100	±	陽性	高	NT
46	42	+	23657.20	8500	+	陽性	高	0.09837177
53	50	+	26254.25	3500	-	陽性	高	NT
34	73	+	26767.47	3900	-	陽性	高	NT
45	37	+	30161.49	5400	±	陽性	高	NT
2	74	+	31767.11	5100	±	陽性	高	NT
52	51	+	32186.33	6000	+	陽性	高	0.164407731
12	46	+	32314.01	5900	±	陽性	高	NT
4	46	+	33152.78	5700	±	陽性	高	NT
48	25	+	35277.33	8500	+	陽性	高	0.05716017
1	46	+	37119.94	7800	+	陽性	高	0.142648813
54	22	+	41672.78	16900	+	陽性	高	0.062087287
30	67	+	42465.18	4800	±	陽性	高	NT
8	52	+	45845.05	11000	+	陽性	高	0.077930477
42	44	+	46458.54	12900	+	陽性	高	0.091518823
49	48	+	47545.33	15200	+	陽性	高	0.064864865
35	79	-	-	2100	-	陰性	NT	
39	74	-	-	3300	-	陰性	NT	

グループ 3

グループ 2

グループ 1



図 5 配置図

考察及びまとめ

今回と畜場で発症牛が摘発され、抗体検査を行ったところ 87.5%と農場内で BLV が高度に浸潤していたため、清浄化に向けて伝播リスク、発症リスクを判定した。その結果「伝播高」が 16 頭確認された。一方、発症高リスク牛は確認されなかったものの基準値に近い値をしめした個体が 2 頭確認された。そこで清浄化への対応として、経営や個体の資質といった要素も重視した更新順位を検討し、さらに感染経路対策としてグループ分による牛の再配置を行うよう指導した。

今後、定期的に検査を実施し対策を継続していく予定であるが、長期的な取り組みの中で損失を軽減することは経営上重要である。BLV 清浄化の最終的な目的は経済被害をなくすことであり、清浄化対策が経営の重荷になることは、できる限り避けるべきである。このために、長期的飼養継続による発症リスクを判定できる RAISING 法は更新計画の一指標として有用であるものと考えられた。以上を踏まえ、RAISING 法で高リスクと判定されることは、損害が生じるリスクが高いと判断し、本農場においては RAISING 法で高リスク判定となった牛は、早期淘汰の対象とする方針とした。

長期間の対策を続けていく上では、飼養者のモチベーションの高さが重要と考えられる。今後も農場が長期的な取組を継続していけるような指導を心掛けていきたいと考える。

参考文献

- [1] Hirohisa Mekata, Mari Yamamoto, Yumi Kirino, Satoshi Sekiguchi, Satoru Konnai, Yoichiro Horii, Junzo Norimine: J VET MED SCI.: 80(2):316-319
- [2] Kenji Murakami, Souta Kobayashi, Misako Konishi, Kenichiro Kameyama, Toshiyuki Tsutsui: J VET MED SCI.: 75: 1123-1126 (2013)
- [3] 西森朝美: 畜産技術 2024-1: 6-10 (2024)
- [4] 農研機構: 家畜疾病図鑑 Web : https://www.naro.affrc.go.jp/org/niah/disease_dictionary/todoke/t08.html
- [5] 農林水産省: 牛白血病に関する衛生対策ガイドライン : https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/pdf/ebl_guide.pdf (2015)
- [6] 坂口加奈、前澤誠希、猪熊壽: 産業動物臨床医誌: 11(1): 1-4 (2020)
- [7] Tomohiro Okagawa, Honami Shimakura, Satoru Konnai, Masumichi Saito, Takahiro Matsudaira, Naganori Nao, Shinji Yamada, Kenji Murakami, Naoya Maekawa, Shiro Murata, Kazuhiko Ohashi : Microbiology Spectrum:10(6): e02595-22 (2022)
- [8] Yuan Yuan, Yuri Kitamura-Muramatsu, Susumu Saito, Hiroshi Ishizaki, Miwa Nakano, Satoshi Haga, Kazuhiro Matoba, Ayumu Ohno, Hironobu Murakami, Shin-Nosuke Takeshima, Yoko Aida: VIRUS RES : 210:248-254 (2015)

Pasteurella multocida による和牛子牛の化膿性肉芽腫性精巣上体炎の一例
南部家畜保健衛生所

○寺尾彩、早川裕二、玉鉾紗智、福田藤子

牛の精巣上体炎は、羊や犬等の動物と比較し、発生はまれである。炎症は精巣上体尾部に多く発生し、細菌感染による精巣上体炎は主に *Brucella* 属菌や *Histophilus somni* 等を原因とすることが多い[5, 9, 12]。

Pasteurella multocida (以下、*P. multocida*) はグラム陰性、通性嫌気性の短桿菌で、5種の莢膜抗原と16種の菌体抗原を有し、これらの組合せによって多くの血清型に分類される。単独あるいは *Mannheimia haemolytica* やウイルス、マイコプラズマとの複合感染により牛で肺炎を引き起こす[7]他に、臨床上異常の認められない牛の上部気道(鼻腔および扁桃)からもしばしば分離されるが[2]、牛の精巣上体から分離された報告は少ない[1]。

今回、和牛子牛で *P. multocida* による精巣上体炎に遭遇したので概要を報告する。

発生概要

当該農場(以下、A農場)は黒毛和種約90頭を飼養する繁殖農場である。当該牛は黒毛和種の雄で、令和5年1月に体重18kgで生まれた。2週齢頃に畜主が右陰囊の腫脹を発見したが、全身状態は良好であり、経過観察とした。3カ月齢頃に左右陰囊の腫脹と熱感、疼痛および発熱(39.8℃)が認められ、獣医師が抗生物質を投与し、熱感および発熱は軽減した。しかし、左右陰囊の腫脹は収まらず、11日後に両陰囊内容を摘出した。摘出時には陰囊内容と陰囊皮膚の癒着、精索の肥大および多量の出血がみられた。

材料および方法

1 肉眼所見および病理組織学的検査

摘出された左右陰囊内容から精巣上体の上部、中部、下部と精巣を採材した。採材部位を10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、パラフィン包埋し、薄切後ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、鏡検した。

また、免疫組織化学的染色は農研機構動物衛生研究部門に依頼し、ウサギ抗 *P. multocida* A型抗体を用いて、ビオチン標識二次抗体、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンおよび発色色素(3,3'-Diaminobenzidine)を使用したストレプトアビジン-ビオチンシステム(SAB法)により実施した。

2 細菌学的検査

左右陰囊内容および膿汁を用いて、5%羊血液寒天培地(極東製薬工業(株)、東京)で5%CO₂下にて培養(37℃、24時間)した。分離菌の同定はIDテストHN-20ラピッド「ニッスイ」(日水製薬(株)、東京)で実施した。分離菌株の薬剤感受性試験は、ペニシリン、アンピシリン、セファゾリン、セフロキシム、カ

ナマイシン、テトラサイクリン、エンロフロキサシン、エリスロマイシンおよびストレプトマイシンについて感受性ディスク（KB ディスク、栄研化学㈱、栃木）を用いた 1 濃度ディスク法により行った。血清型の推定は、InstaGene DNA 精製マトリックス（Bio-Rad Laboratories, U. S. A.）で抽出した核酸を用いて、Townsend らの方法 [11] による莢膜抗原型別プライマー（A 型、B 型、D 型、E 型、F 型）および Harper らの方法 [3] による菌体抗原型別プライマー（菌体抗原遺伝子型 L1、L2、L3、L4、L5、L6、L7、L8）でマルチプレックス PCR 法を行った。

また、遺伝子型の判定は農研機構動物衛生研究部門に依頼し、Subaaharan らの方法 [8] に従い、7 つのハウスキーピング遺伝子（*adk*、*est*、*gdh*、*mdh*、*pgi*、*pmi*、*zwf*）の塩基配列を解析し、配列の相違をデータベース（PubMLST）と照合する MLST 解析を行った。

3 分子疫学解析

令和 5 年 9 月に A 農場で飼養する当該牛（8 カ月齢）、当該牛の母牛（46 カ月齢）、当該牛と同時期に飼養され、現在もフリーバーン牛舎で同居している育成牛 5 頭（8 カ月齢）および採材時にカーフペンで飼養されている子牛 2 頭の計 9 頭から鼻腔スワブを採材し、細菌学的検査を実施した。分離された *P. multocida* 菌株（A 農場鼻腔株）は、精巣上体炎から分離された *P. multocida* 菌株（精巣上体炎株）および令和 2 年度から令和 5 年度に病性鑑定材料より県内 7 農場（B～H）から分離された *P. multocida* 菌株（病性鑑定株）とともに、農研機構動物衛生研究部門に依頼し、Sthitmatee らの方法 [4] に従い、抽出した DNA で制限酵素 *ApaI* を用いた PFGE を実施し、解析ソフト Bionumerics Ver. 7.6 により得られた PFGE バンドパターンをもとに系統樹を作成した。

成績

1 肉眼所見および病理組織学的検査

右陰囊内容は 17×8.5cm、左陰囊内容は 16×7cm で、表面に線維素析出と出血を伴っていた。陰囊内容の断面では、精巣上体は著しく腫大し、頭部・体部・尾部の境界は不明瞭であった。また、多数の膿瘍形成と著しい線維化がみられた（図 1）。右精巣は 4.5×2cm、左精巣は 3×2.5cm に萎縮していた。

病理組織学的検査では、左右精巣上体の大部分で、好中球の集簇を囲むマクロファージの浸潤と結合組織の増生、形質細胞とリンパ球の浸潤からなる膿瘍が多発していた。精巣上体管は減数し、拡張した管腔内には好中球がみられた（図 2）。一部の精巣上体管は破綻し、好中球や退廃物が管腔内から周囲に拡がっていた。左精巣上体上部のみでは、精巣上体管の減数や拡張、好中球の浸潤が軽度な部分のみみられた。間質では結合組織が高度に増生し、形質細胞の浸潤や血管新生がみられた。精巣では精細管が軽度に減数し、間質にリンパ球の浸潤や線維芽細胞の増殖がみられた。

免疫組織化学的染色では、左精巣上体で好中球の集簇を囲むマクロファージを主体にウサギ抗 *P. multocida* A 型抗原陽性反応が認められ、好中球にも陽

性反応が散見された（図 3）。

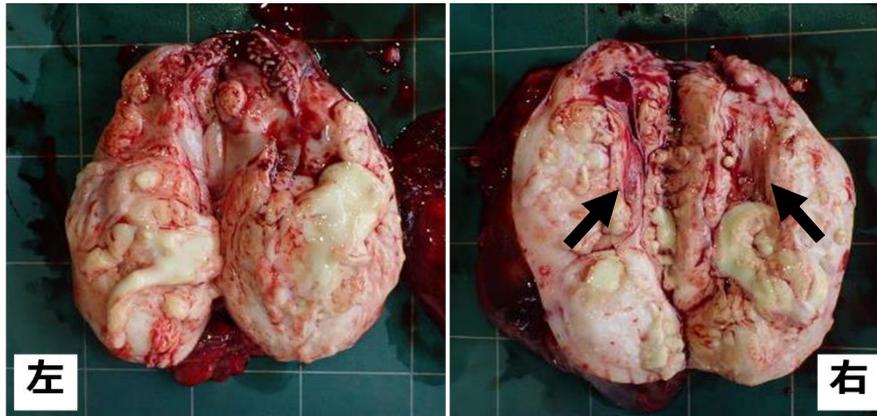


図 1. 陰嚢内容の剖面

精巣上部は著しく腫大し、多数の膿瘍と著しい線維化がみられる。右精巣は萎縮している（矢印）。

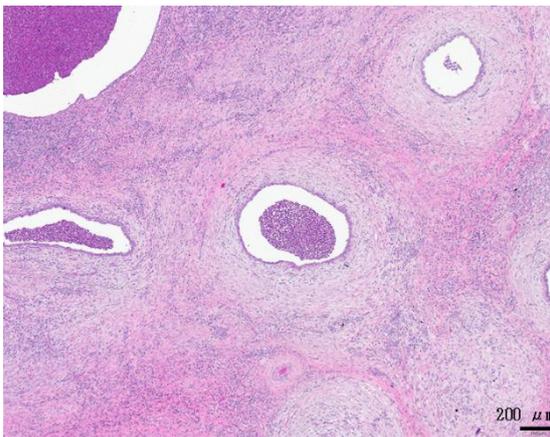


図 2. 左精巣上部

精巣上部管は減数し、拡張した管腔内には好中球がみられる。間質では結合組織が増生している。

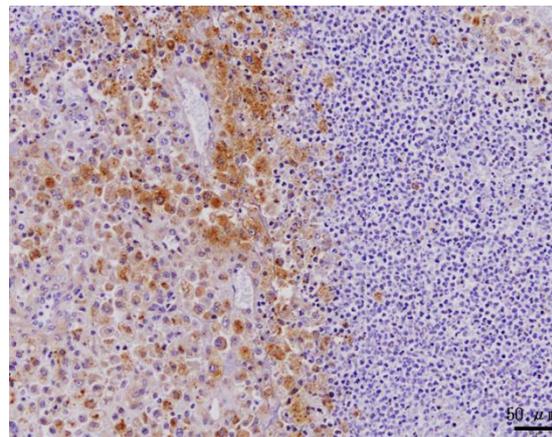


図 3. 左精巣上部の免疫組織化学的染色

好中球の集簇を囲むマクロファージを主体に *P. multocida* A 型抗原陽性反応が認められる。

2 細菌学的検査

左陰嚢内容および膿汁から灰白色、ムコイド状で非溶血性のコロニーが 5% 羊血液寒天培地上で分離され、*P. multocida* と同定された（表 1）。精巣上部炎株の薬剤感受性試験では、すべての薬剤に感受性を示した（表 2）。血清型別では、莢膜抗原 A 型、菌体抗原遺伝子型 L3 に特異的なバンドが確認された。菌体抗原遺伝子型 L3 は Heddleston の菌体抗原 3 および 4 型と対応している [3] ことから、血清型は莢膜抗原 A 型、菌体抗原 Heddleston の 3 型、4 型または 3, 4 型と推定された。MLST 解析による遺伝子型別では、精巣上部炎株は遺伝子型 ST13 に分類された。

表 1. *P. multocida* の分離成績

実施部位	コロニー数
右陰囊内容	—
左陰囊内容	3+
膿汁	4+

— : 接種寒天上のコロニー数 0個
 + : " " 1~10個
 2+ : " " 11~50個
 3+ : " " 51~100個
 4+ : " " 101~300個
 5+ : " " >300個

表 2. *P. multocida* の薬剤感受性試験成績

薬剤	感受性
ペニシリン	S
アンピシリン	S
セファゾリン	S
セフロキシム	S
カナマイシン	S
テトラサイクリン	S
エンロフロキサシン	S
エリスロマイシン	S
ストレプトマイシン	S

3 分子疫学解析

令和 5 年 9 月に鼻腔スワブを採材した牛 9 頭のうち、母牛を除く 8 頭から *P. multocida* が分離された。A 農場鼻腔株 (8 株)、精巣上体炎株および病性鑑定株 (7 株) の計 16 株を用いて PFGE を実施し、系統樹を作成した (図 4)。一部の菌株においてはバンドパターンが類似するグループ I ~ III が形成された。A 農場鼻腔株はグループ I に 5 株、グループ II に 3 株が分類された。精巣上体炎株は、いずれの菌株とも異なるバンドパターンを示した。グループ I とのバンドパターン一致率は約 59%、グループ II とのバンドパターン一致率は約 66% であり、精巣上体炎株は A 農場鼻腔株と遺伝的に近縁ではなかった。また、県内には遺伝的系統が異なる多様な *P. multocida* 菌株が浸潤していることが明らかになった。

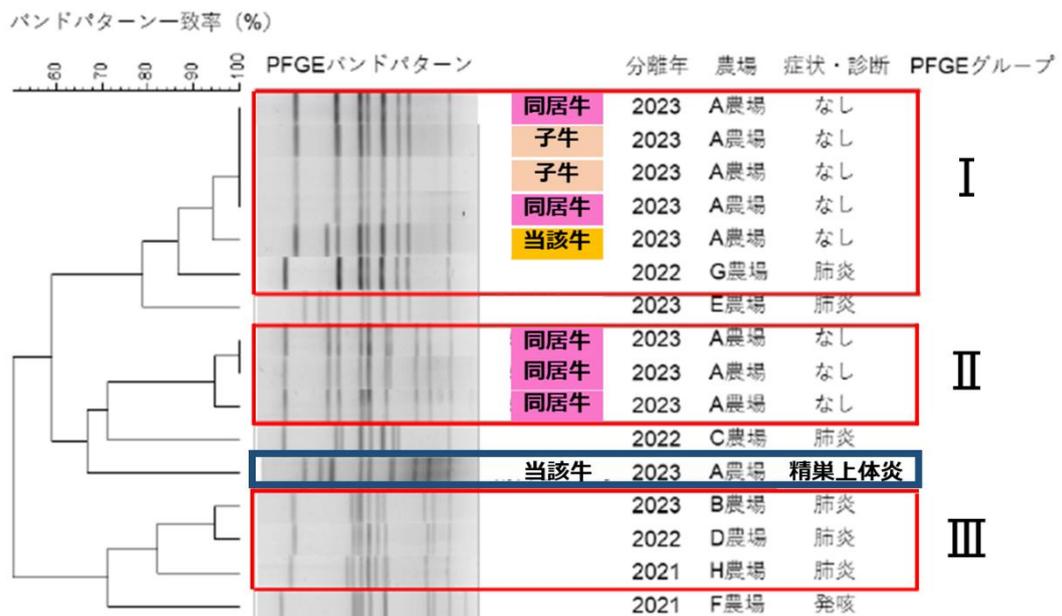


図 4. *P. multocida* 16 株の PFGE バンドパターン

まとめおよび考察

細菌学的検査では精巣上体から *P. multocida* が純粋に分離され、病理組織学的検査では精巣上体の膿瘍の多発と精巣上体管の減数、結合組織の増生がみられ、免疫組織化学的染色でウサギ抗 *P. multocida* 抗原陽性反応が確認されたことから、本症例を *P. multocida* による化膿性肉芽腫性精巣上体炎と診断した。病理組織学的検査において、精巣上体管の管腔内に浸潤した好中球、精巣上体管の破綻と周囲への好中球の拡がり、左精巣上体上部のみでの精巣上体管の軽度な減数や好中球の浸潤がみられたことから、*P. multocida* の上行性感染と精巣上体尾部から頭部にかけての炎症の波及が推察された。また、炎症によって著しく腫大した精巣上体に圧迫され、精巣が萎縮もしくは発育不良となったと考えられた。

分子疫学解析では、A農場鼻腔株、精巣上体炎株および病性鑑定株を用いて PFGE を実施したが、精巣上体炎株は A農場鼻腔株のいずれとも異なるバンドパターンを示し、遺伝的に近縁ではなく、由来の推定には至らなかった。当該牛は2週齢頃に右陰囊の腫脹を呈しており、感染時期は令和5年1月と推定される。そのため、A農場で鼻腔スワブを採材した令和5年9月までの8カ月間に農場内の優勢な *P. multocida* 菌株のグループが変化した可能性が考えられた。また、A農場の一部の牛から分離された *P. multocida* 菌株のみで分子疫学解析を実施していることから、A農場内に浸潤しているすべての *P. multocida* 菌株のグループが明らかになっていない可能性も考えられた。今後、同様の調査を実施する場合は、菌株の採材時期および採材範囲を考慮し、菌株の由来の検討をより深められるよう行いたい。

PFGE バンドパターン一致率が約85%以上となる菌株は疫学的に関連する可能性が示唆されており[10]、A農場鼻腔株はすべてグループIおよびIIに分類された。しかし、A農場とともにグループIに分類されたG農場は、A農場から約50km離れた酪農団地内にあり、A農場との疫学的関連は確認されなかった。また、グループIIIにはB、D、H農場が分類された。B農場は預託牧場であり、DおよびH農場から牛を受け入れていることから、B、D、H農場は疫学的に関連があり、バンドパターンが類似した可能性が考えられた。

遺伝子型 ST13 は牛呼吸器病由来株が多く型別される遺伝子型であるため、一般的な呼吸器由来の *P. multocida* 菌株が精巣上体に迷入し、精巣上体炎を引き起こしたと推察された。感染経路としては、敷料との接触や他の個体に舐められること等により、*P. multocida* が尿道から精巣上体に上行性に侵入したと思われた。当該牛の母牛からは *P. multocida* が分離されなかったが、当該牛は生後7日目まで母牛と同居していたことから、同居当時、母牛が精巣上体炎株と遺伝学的に近縁な *P. multocida* 菌株を保有していた可能性が考えられた。また、上行性に侵入した呼吸器由来の *P. multocida* 菌株は精巣上体の環境に適応するよう遺伝的系統が変化し、呼吸器と精巣上体で *P. multocida* 菌株のすみわけがなされているかもしれない。

佐野らの報告[6]によると、臨床的に健康な黒毛和種雄子牛の平均出生時体重は32.8kg±4.4kgであったが、当該牛の出生時体重は18kgと極めて小さく、免疫力の低い虚弱状態が疑われたことや出生時（1月）の寒冷ストレスは*P. multocida*の感染に影響したと思われる。蛇島らの報告[1]でも、本症例と同様に細菌学的検査で莢膜抗原A型の*P. multocida*が精巣上体から分離され、病理組織学的検査で精巣上体管の管腔内への好中球の浸潤と管腔の拡張、間質の結合組織の増生がみられている（表3）。しかし、本症例では左右精巣上体の頭部・体部・尾部の著しい線維化と精巣の萎縮がみられた。蛇島らの報告と比較して、陰嚢摘出月齢は異なるが、本症例の精巣萎縮を引き起こした広範囲に及ぶ重度な精巣上体の炎症は、虚弱や寒冷ストレスによる影響もあったと考えられた。当該牛の8カ月齢時の体重は184kgで同月齢の去勢雄（308kg）と比較して発育不良であったが、精巣上体炎による影響がどの程度あったのかは不明である。

表3. *P. multocida*による子牛の精巣上体炎の症例比較

	本症例	蛇島らの報告	
		症例1	症例2
品種	黒毛和種	黒毛和種	F1
出生時体重	18 kg	ND	ND
陰嚢腫脹発見時期	令和5年1月	平成29年6月	平成30年9月
陰嚢腫脹発見月齢	2週齢	5週齢	1週齢
陰嚢摘出月齢	3カ月齢	2カ月齢	2週齢
右陰嚢内容の大きさ	17×8.5 cm	約19×6 cm	約11.2×3 cm
左陰嚢内容の大きさ	16×7 cm	約10.5×3 cm（腫大なし）	約7×2 cm（腫大なし）
精巣上体の主な腫大部位	左右頭部・体部・尾部	右尾部	右尾部
精巣萎縮	+	-	-
<i>P. multocida</i> の分離部位	精巣上体、膿汁	精巣上体	精巣上体
<i>P. multocida</i> の莢膜抗原型	A型	A型	A型
精巣上体管腔内の好中球、管腔の拡張	+	+	+
間質の結合組織の増生	+	+	+
<i>P. multocida</i> 抗体による免疫染色	+	+	+
予後	発育不良	ND	ND

*P. multocida*による子牛の精巣上体炎の報告は国内で数例と少なく、感染経路や発症機序、発症牛の予後等不明な点が多い。適切な治療方法や予防方法を確立するためにも、今後も精巣上体炎に遭遇した際は詳細な病性鑑定の実施とデータの蓄積が望まれる。

謝辞

稿を終えるにあたり、本症例の遺伝子解析および免疫組織化学的染色を実施していただくとともに、多くのご助言をいただきました国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門動物感染症研究領域細菌グループ上野勇一先生ならびに疫学・昆虫媒介感染症グループ田中省吾先生に深謝いたします。

引用文献

- [1] 蛇島武久, 水上智秋, 出石節子: 令和元年度岡山県畜産関係業績発表会集録, 57-62 (2019)
- [2] 勝田賢: 子牛の科学, 日本家畜臨床感染症研究会編, 157-162, チクサン出版社, 東京 (2009)
- [3] Marina Harper, Marietta John, Conny Turni, Mark Edmunds, Frank St Michael, Ben Adler, Blackall PJ, Andrew D Cox, John D Boyce: J Clin Microbiol, 53, 477-485 (2015)
- [4] Nattawooti Sthitmatee, Yasushi Kataoka, Takuo Sawada: J Vet Med Sci, 72, 1465-1470 (2010)
- [5] Rachel Dobberstein: The Canadian Veterinary Journal, 61, 776-778 (2020)
- [6] 佐野公洋: 子牛の科学, 日本家畜臨床感染症研究会編, 85-91, チクサン出版社, 東京 (2009)
- [7] 澤田拓士: 獣医微生物学, 関崎勉他編, 第3版, 79-81, 文永堂出版, 東京 (2011)
- [8] Subaaharan S, Blackall LL, Blackall PJ: Vet Microbiol, 141, 354-361 (2010)
- [9] 高橋公正: 動物病理学各論, 日本獣医病理学会編, 第2版, 294-295, 文永堂出版, 東京 (2014)
- [10] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B: J Clin Microbiol, 33, 2233-2239 (1995)
- [11] Townsend KM, Boyce JD, Chung JY, Frost AJ, Adler B: J Clin Microbiol, 39, 924-929 (2001)
- [12] 全国家畜衛生職員会: 病性鑑定マニュアル, 第4版, 494-495, 東京 (2016)

管内酪農場と養鶏場から分離された *Salmonella* Corvallis に対する検討

石川県北部家畜保健衛生所

○竹山哲矢、市川雄一、早川裕二、玉鉾紗智、中田昌和

Salmonella Corvallis は鶏および鶏舎環境から分離されることの多い血清型である[3]。今回管内酪農場と養鶏場から SC が分離されたため、両農場間における疫学的関連性について検討したので、その概要を報告する。

概要

(1) 酪農場

フリーストールで乳用牛 58 頭、和牛繁殖牛舎で黒毛和種の繁殖雌牛 14 頭を飼養する乳肉複合経営農場で、令和 5 年 6 月 19 日の公共育成牧場入牧検査において、サルモネラが検出されたカウハッチの子牛 1 頭を含む合計 6 頭と育成舎の育成牛 12 頭の直腸スワブを用いた(図 1)。検体は令和 5 年 6 月から 10 月の 5 ヶ月間で、約 14 日間隔で 11 回採材し、延べ 63 検体を供した。

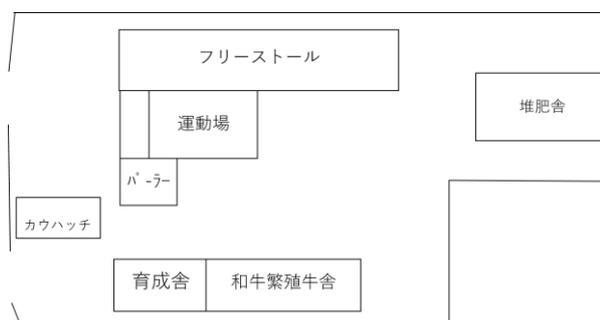


図1.酪農場の概要

(2) 養鶏場

ウインドレス鶏舎 8 棟で成鶏 20 万羽、大雛 3.5 万羽、幼雛 3.5 万羽を飼養する農場で、令和 5 年 8 月 21 日の鶏卵衛生検査において、成鶏 6 号舎の床拭き取り試料(20%濃度のスキムミルクを浸漬したガーゼ)を用いた(図 2)。

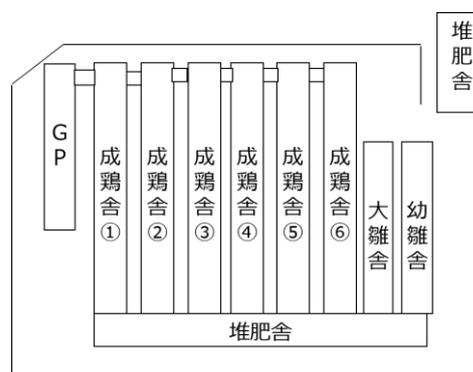


図2.養鶏場の概要

材料および方法

分離には、前培養として検体を緩衝ペプトン水(OXOID)1 ml 中に加え、37 °C、18~24 時間培養した。次に、増菌培養としてハーナテトラチオン酸塩培地(栄研化学)9 ml を加え、42 °C、18~24 時間培養し、最後に分離培養として DHL(栄研化学)、クロモアガー培地(関東化学)に画線培養し、37 °C で 18~24 時間培養した。分離された菌株はサルモネラ免疫血清(デンカ生研)による凝集反応を行い、血清型別を行った。

結果

酪農場では 63 検体中 8 検体からサルモネラが分離された。養鶏場の床拭き取り試料からもサルモネラが分離された。分離された両方の菌株の血清型は 08 : z4, z23 : -であったが、06 凝集反応が陰性のため、*S. Corvallis* と同定した。

分離後の対応

酪農場では、育成舎前の消毒槽の設置およびカウハッチ周囲での消石灰散布を指導した。その後の令和 5 年 9 月 25 日と 10 月 10 日の検査で、2 回連続してカウハッチと育成舎の全頭陰性を確認した。

養鶏場ではオールアウト時の鶏舎の消毒工程や消毒の方法に不備が無いことを確認し、重要な管理点や注意すべき点などを指導した。その後の当該鶏舎のオールアウト後の消毒の徹底により、その後に 4 回実施した確認検査は全て陰性であった。

疫学的検査および調査

酪農場と養鶏場より同一の血清型が分離されたため、両農場間の疫学的関連性について調査した。

(1) 疫学的検査

両農場から分離された 2 株を材料に、制限酵素 BlnI、XbaI を用いたパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による DNA フラグメント比較解析を行ったところ、PFGE では、2 株の BlnI-PFGE 像は一致、XbaI-PFGE 像において 2 本のバンドの相違が認められた (図 3)。

(2) 疫学的調査

聞き取りでは、酪農場と養鶏場間の距離は 45km 離れており、物流に関しても、共通点は確認されなかった。酪農場の近くに養鶏場の関連農場が位置していたが、養鶏場と関連農場間での人・車両の往来は無かった。

養鶏場と関連農場の過去のサルモネラの分離状況では、関連農場で令和 5 年に *S. Mbandaka*、令和 3 年に *S. Braenderup* が分離されていた (表 1)。

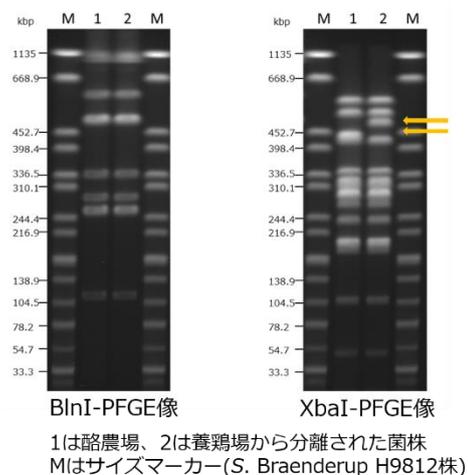


図3.PFGEによる比較解析

表1.サルモネラの分離状況

	養鶏場		関連農場	
	分離件数	血清型	分離件数	血清型
R5	1	Corvallis	1	Mbandaka
R4	0	—	0	—
R3	0	—	3	Braenderup
R2	0	—	0	—
R1	0	—	0	—

考察およびまとめ

テノバーらの基準によると、相違するバンド数が3本以内である場合、バンドの相違は、繰り返しの培養などにより一つの独立した遺伝子変異に起因するとされ、分離菌株の近縁度は高いとされている[2]。今回の疫学的検査ではバンドの相違が2本であったため、2株は密接な疫学的関連があると考えられた。

一方、疫学的調査結果では、酪農場と養鶏場間の距離が45 kmであり、物流における共通点も無かった。また養鶏場と関連農場間においても人・車両の往来が無く、酪農場と養鶏場間、養鶏場と関連農場間における交叉汚染の可能性は無かった。

SCは国内では食鳥処理場の汚水、東南アジアでは新鮮市場の床などの環境試料からの分離報告がある[1,3]。酪農場のカウハッチは野生動物が容易に侵入できる状況であったことから、酪農場については、野生動物関与の可能性が推測されたが、2株に密接な疫学的関連が考えられたことの原因究明には至らなかった。今後、農家とともに野生動物対策を行いつつ、家畜衛生のみならず、公衆衛生上な観点まで視野を広げ、SCの浸潤状況の動向に注視していきたい。

謝辞

本稿を作成するにあたり、ご助言並びにご協力を頂いた酪農学園大学感染・病理学分野獣医細菌学ユニット 秋庭正人先生及び国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 人獣共通感染症研究領域腸管病原菌グループ 新井暢夫先生に深く感謝申し上げます。

参考文献

- [1] CARLA L. SCHWAN, KARINA DESIREE, NORA M. BELLO, LEONARDO BASTOS, LYDA HOK, RANDALL K. PHEBUS, SARA GRAGG, JUSTIN KASTNER, JESSIE L. VIPHAM: *Journal of Food Protection*, 84, No.1, 73-79(2021)
- [2] FRED C. TENOVER, ROBERT D. ARBEIT, RICHARD V. GOERING, PATRICIA A. MICKELSEN, BARBARA E. MURRAY, DAVID H. PERSING, BALA SWAMINATHAN: *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 33, No.9, 2233-2239 (1995)
- [3] 山田 亨、河野喜美子、八木利喬：日本食品微生物学会雑誌, 20(3), 105-110 (2003)

乳牛における血中 β -ヒドロキシ酪酸を指標とした受胎率向上効果の検討
(第一報)

北部家畜保健衛生所能登駐在所
○増原 紋加

乳牛は分娩後の泌乳開始に伴い、多くのエネルギーを必要とする。分娩後エネルギーが不足している乳牛は負のエネルギーバランス状態になっており、体脂肪が分解され、生体内でケトン体（アセト酢酸、 β -ヒドロキシ酪酸、アセトン）が増量し、ケトーシスに陥る。ケトーシスには、元気活力及び食欲の低下、乳量減少及び消化管昨日の低下等が認められる臨床型ケトーシスと、明らかな臨床症状を伴わず、血中ケトン体濃度が上昇している潜在性ケトーシスとがある[5]。

表 1. 潜在性ケトーシスによる損失額の推定

項目	損失額	根拠
1. 乳量減少	2,520円	2週間1日あたり2Lの損失、乳価90円/kg 2L×14日間×90日
2. 空胎期間の遅延	16,800円	14日延長、1日延長で1,200円の損失 14日間×1,200円
3. 臨床型ケトーシス発生リスクの増加	2,250円	治療費15,000円、群の発生率5%、リスク比3.0 15,000円×5%×3.0
4. 第四胃変位発生リスクの増加	3,600円	治療費60,000円、群で発生率2%、リスク比3.0 60,000円×2%×3.0
計	25,170円	

出典：及川伸（2015）日獣会誌 68，P39

材料および方法

1 供試牛

管内酪農家8農場のホルスタイン種経産牛41頭を用い、令和5年1月から令和5年12月までの間に分娩後63日から287日経過した牛に膣内留置型黄体ホルモン製剤（シダー1900，ゾエティス・ジャパン株式会社，東京）または膣内挿入型プロジェステロン・安息香酸エストラジオール配合剤（プリッドデルタ，あすかアニマルヘルス株式会社，東京）を用いて排卵同期化プログラム（CIDR-synchプロトコール，PRID-synchプロトコール）を実施した[7]（図1）。受精卵は、農林総合研究センター畜産試験場能登畜産センターで採卵された黒毛和種受精卵を新鮮卵として移植に供試した。

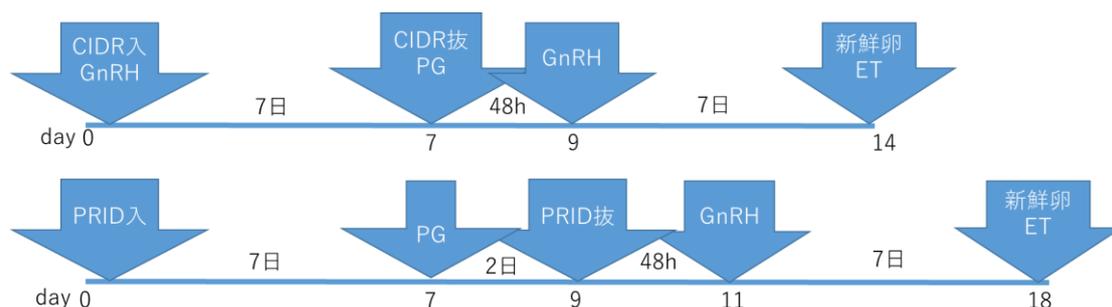


図 1. 排卵同期化プログラム

2 調査項目

(1) 血中 BHBA

排卵同期化処置前に携帯型超音波画像診断装置(SIUI 社 CTS-800)を用いて直腸検査を実施し、機能的黄体かつ直径 1mm 以上の卵胞があることを確認した。尾静脈から採血し、採血直後の全血を自己検査用 3-ヒドロキシ酪酸キット β -ケトン測定電極Ⅲ (アボット・ラボラトリーズ社, アメリカ)を用い、血糖測定装置 FreeStyle リブレ Reader (アボット・ラボラトリーズ社, アメリカ)で即時に測定した。

なお、血中 BHBA が 1.0mmol/L 未満を正常牛群、1.0mmol/L 以上を潜在性ケトーシス牛群と区分した(表 2)。

表 2. 潜在性ケトーシスの診断基準

区分	血中BHBA濃度
正常牛群	1.0mmol/L未満
潜在性ケトーシス牛群	1.0mmol/L以上

(2) 黄体検査

超音波診断装置を用いた直腸検査を発情から 7 日目である移植当日に黄体形成が認められた個体を実施し、黄体のランクについては、常法にしたがって区分した[3] (図 2)。

ランク	形状	基準
A		黄体形状は直径20mm以上で実質も充実したもの
B		黄体突起部から実質にかけて水腫が認められるが 実質は中等度以上に充実したもの
C		黄体形状は直径10mm程度で実質はやや硬いもの

図 2. 黄体のランク別形状と基準（発情後 7 日目）

（3） 移植率

排卵同期化プログラム実施後、移植当日に超音波診断装置を用いた直腸検査により黄体が A、B、C にランクされた牛を移植対象、黄体が形成されなかった牛を移植不可とし、頭数割合を算出した。

（4） 受胎率

受精卵移植実施から 60 日前後で超音波診断装置を用いて妊娠鑑定を実施し、受精卵移植した個体のうち受胎した割合を示した。

妊娠鑑定は令和 5 年 1 月から令和 5 年 10 月までに受精卵移植した牛を対象に実施した。

成績

（1） 血中 BHBA

血中 BHBA 濃度が 1.0mmol/L 未満の正常牛群は 35 頭、1.0mmol/L 以上の潜在性ケトーシス牛群は 6 頭であった。

（2） 黄体ランク

移植実施牛の黄体ランクを比較したところ、正常牛群は A:23 頭 (65.7%)、B:10 頭 (28.6%)、C:0 頭 (0.0%)、ランク外:2 頭 (5.7%)、潜在性ケトーシス牛群は A:2 頭 (33.3%)、B:1 頭 (16.7%)、C:1 頭 (16.7%)、ランク外:2 頭 (33.3%)であった (表 3)。

表 3. 黄体ランク

区分	Aランク		Bランク		Cランク		ランク外	
	頭数	A割合	頭数	B割合	頭数	C割合	頭数	割合
正常牛群	23	65.7%	10	28.6%	0	0.0%	2	5.7%
潜在性ケトーシス牛群	2	33.3%	1	16.7%	1	16.7%	2	33.3%

(3) 移植率

正常牛群は 35 頭中 33 頭 (94.3%) で黄体形成が認められ、受精卵移植を実施した。潜在性ケトーシス牛群は 6 頭中 4 頭 (66.7%) で黄体形成が認められ受精卵移植を実施した (表 4)。

表 4. 移植率

区分	供試牛	移植頭数	移植率
正常牛群	35	33	94.3%
潜在性ケトーシス牛群	6	4	66.7%

(4) 受胎率

正常牛群は移植頭数 25 頭中 7 頭が受胎し、受胎率は 28.0%であった (受胎未確認 8 頭)。潜在性ケトーシス牛群は 3 頭中 1 頭が受胎し、受胎率は 33.3%であった (受胎未確認 1 頭) (表 5)。

表 5. 受胎率

区分	移植頭数	受胎頭数	未鑑定	受胎率
正常牛群	25	7	8	28.0%
潜在性ケトーシス牛群	3	1	1	33.3%

考察

潜在性ケトーシス牛群において、黄体が形成されず移植不可となった個体の割合が高かったこと、黄体ランクでは 4 頭中 2 頭が B、C ランクであったことから、潜在性ケトーシスは黄体形成に悪い影響を及ぼしていることが示唆された。一般的に、黄体形成不全の原因は乾物摂取量、エネルギー、ビタミン E 不足があげられ、これらは子宮内膜炎にも起因することから、黄体形成不全は繁殖性を悪化させる可能性があると考えられる [4]。また、潜在性ケトーシス牛群の受胎率は 33.3%と正常牛より高かったが、正常牛群の妊娠鑑定で未鑑定牛があったこと、潜在性ケトーシス牛の検体数が少なく十分なデータが得られなかったこともあり、今後さらにデータを増やし調査を続けていきたい。

潜在性ケトーシス牛は、ポータブル測定器により血中 BHBA 濃度の測定を簡

易に測定することが可能であり、早期に摘発することができる。今回は分娩後63日から287日経過した牛を供試したが、受胎率と潜在性ケトーシスの相関が見られなかったため、分娩後約30日で行う繁殖検診（フレッシュチェック）時に血中BHBA濃度を測定し、分娩後早期に潜在性ケトーシス牛を摘発することも検討する必要があると考えられた。

今後の展開

潜在性ケトーシス牛は黄体形成に悪い影響を及ぼす可能性が示唆されたことから、排卵同期化プログラム開始時に血中BHBA濃度を測定、潜在性ケトーシス牛を早期摘発し、プロピレングリコール製剤・ブドウ糖等エネルギーとなる糖原を早期投与する治療を組み込んでいきたい[2]。さらに、エネルギー不足は潜在性子宮内膜炎等の原因でもあり併発している可能性もあるとの報告もあることから[6]、状況に応じて子宮洗浄またはイソジン注入等の治療を取り入れていきたい[1]。

これらを実施することにより、乳牛の移植率・受胎率の向上につながるか検討し、繁殖性の向上につなげていきたい。

引用文献

- [1] 秋田真司：家畜感染症学会誌，6巻4号，27-32(2017)
- [2] 小岩政照，田島誉士：主要症状を基礎にした牛の臨床 3，171-174(2020)
- [3] 小林大誠，久保田尚，千葉耕司，山下秀幸：千葉県畜産総合研究センター研究報告，第13号，15-22(2013)
- [4] 根室生産農業協同組合連合会 根室農業改良普及センター：2019 営農改善資料，23(2019)
- [5] 及川 伸：日獣会誌，68，33-42(2015)
- [6] 大澤健司：日本家畜臨床感染症研究会誌，6巻3号，115-121(2011)
- [7] 大澤健司：日本獣医師会雑誌，65巻9号，673-681(2012)

ウイルス検査における自動核酸抽出装置の活用に向けた検証

南部家畜保健衛生所
○玉鉾紗智、福田藤子

ウイルス性疾病の診断法の一つとして、遺伝子検査は一般的となっている。特に、豚熱（CSF）や高病原性鳥インフルエンザ（HPAI）及び低病原性鳥インフルエンザ（LPAI）等の法定伝染病の診断には、遺伝子検査法の一つである逆転写 PCR（RT-PCR）及びリアルタイム PCR（rPCR）を用いた迅速かつ的確な判断が求められる[9、10]。また、近年、牛伝染性リンパ腫ウイルス（BLV）の清浄化対策には、BLV 陽性牛全頭のプロウイルス量を把握するために rPCR が用いられ、多検体処理が必要となっている[8、14]。

現在、当所では PCR の第 1 工程である核酸抽出をスピнкаラム法（用手法）で実施している。この方法は、核酸をカラムのメンブレンフィルターへ吸着させ、遠心処理によって核酸の洗浄及び溶出操作を行うものである。手技の習熟や専用の装置が不要であるが、多検体処理の場合、操作の煩雑性及び作業時間を要することが課題である。一方、自動核酸抽出装置を用いた核酸抽出（自動法）は、磁性粒子に核酸を吸着させ、洗浄及び溶出までの工程を自動化することで、迅速化及び簡便化を可能としており、全国的に家保の病性鑑定施設で導入が進んでいる[1、2、11]。

今回、遺伝子検査の効率化のため、PCR 感度及び作業効率について、自動法と用手法を比較し、自動法の有用性を検証した。

材料および方法

試料

検証 1：結果が既知の試料を用いた RT-PCR 及び rPCR における自動法の有用性を検証するため、2023 年度外部精度管理調査（外部精度）で配布された、豚熱ウイルス（CSFV）の RT-PCR 用試料 3 検体（A、B 及び C）、CSFV の rPCR 用試料 3 検体（A、B 及び C）及び鳥インフルエンザウイルス（AIV）用試料 4 検体（A、B、C 及び D）を供した。

検証 2：野外材料を用いた rPCR における自動法の有用性を検証するため、2023 年 9 月に県内の 1 農場にて黒毛和種繁殖牛 41 頭から採血し、分離した白血球を供した。

検証 3：野外材料を用いた RT-PCR における自動法の有用性を検証するため、2023 年 3 月に管内酪農場にて牛コロナウイルス（BCV）の感染が確認されたホルスタイン種搾乳牛の糞便及び、2022 年 9 月に県内養鶏場にて鶏伝染性気管支炎ウイルス（IBV）の感染が確認された採卵鶏の腎臓を用い、PBS（-）で 10% 乳剤を作製した。各乳剤の上清を PBS で 10 倍から 10^4 倍まで階段希釈した検体を供した。

核酸抽出

自動法は Promega 社の核酸抽出キット Viral Total Nucleic Acid Kit (Promega、アメリカ)、用手法は、当所で使用している核酸抽出キット High Pure Viral

Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics、東京) を用い、各々のマニュアルに従って、各種検体 200 μ l から核酸 50 μ l を抽出した。なお、自動法には自動核酸抽出装置 Maxwell[®] RSC Instrument (Promega、アメリカ) を使用した。

プライマー及びプローブ

検証 1 : CSFV は、Vilcek S らのプライマー [13] により RT-PCR を実施した。また、rPCR キット CSFV/ASFV Direct RT-PCR Mix & Primer/Probe (タカラバイオ、滋賀) により、rPCR を実施した。

AIV は、HPAI 及び LPAI に関する特定家畜伝染病防疫指針に従い、A、H5、H7-1 及び H7-2 を標的とした 4 種のプライマーを用いた RT-PCR と、M、H5、H7am 及び H7eu 遺伝子を標的とした 4 種のプライマープローブセットを用いた rPCR を実施した。

検証 2 : BLV は、市販のキット CoCoMo-BLV Primer/Probe (ニッポンジーン、東京) により定量 rPCR を実施した。

検証 3 : BCV は Tsunemitsu H らのプライマー [12]、IBV は Mase M らのプライマー [6] を用いて RT-PCR を実施した。

電気泳動

得られた PCR 産物は、Gel Red[™]核酸染色液 ($\times 10,000$) (富士フィルム和光、大阪) を 5% 添加した 1.5% アガロースゲル (Thermo Fisher Scientific、東京) を用いて 100 V、30 分の電気泳動により判定した。

解析

rPCR において、CSFV は ABI 7500 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific、東京)、AIV 及び BLV は Quant Studio 3 (Thermo Fisher Scientific、東京) で解析した。また、検証 2 では、宿主遺伝子及び BLV 遺伝子のコピー数から、プロウイルス量 (コピー/ 10^5 細胞) を算出し、自動法及び用手法のプロウイルス量についてピアソンの相関係数を算出した。

作業時間の比較

検証 2 で実施した白血球 41 検体の核酸抽出に要した時間を自動法及び用手法で比較した。

成績

検証 1 : CSFV の RT-PCR では、自動法及び用手法は共に試料 A 及び C に特異的なバンドが認められ、試料 B は陰性を示した (図 1)。rPCR では、自動法及び用手法は共に、試料 A 及び C は陽性、試料 B は陰性であった (表 1)。また、自動法は RT-PCR 及び rPCR 共に用手法と同様、既報の結果 [3、4] と一致した。rPCR では、陽性試料の Ct 値はいずれも自動法が 0.2 低値であった (表 1)。

AIV の RT-PCR では、自動法及び用手法は共に A プライマーは試料 A、B 及び C、H5 プライマーは試料 B 及び C に特異的なバンドが認められ、H7-1 プライマー及び H7-2 プライマーには認められなかった (図 2)。また、rPCR では、M 遺伝子プライマープローブセットは試料 A、B 及び C、及び H5 遺伝子プライマープローブセットでは試料 B 及び C が陽性と判定され、H7am 及び H7eu 遺伝子プライマー

ローブセットは陰性と判定された（表 2）。自動法の結果は、AIV の RT-PCR 及び rPCR 共に用手法と同様に既報の結果[2、5]と一致した。rPCR における陽性試料の Ct 値は、M 遺伝子プライマープロブセットでは 1.7~2.7、H5 遺伝子プライマープロブセットでは 4.2~5.2、自動法が用手法より高値を示した。

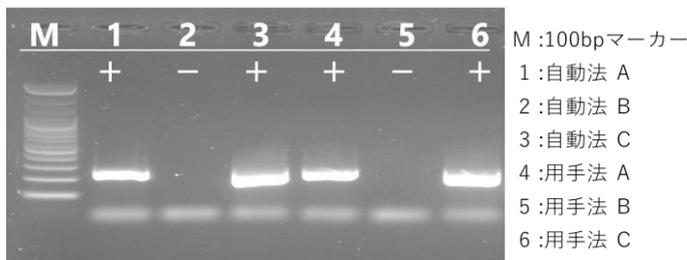


図 1 CSFV の電気泳動像

表 1 CSFV の rPCR 結果

抽出方法	判定(Ct値)		
	試料A	試料B	試料C
自動法	陽性 (28.9)	陰性	陽性 (24.0)
用手法	陽性 (29.1)	陰性	陽性 (24.2)

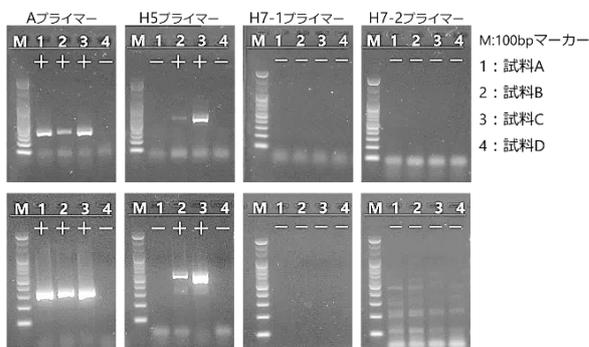


図 2 AIV の電気泳動像
(上段：自動法、下段：用手法)

表 2 AIV の rPCR 結果

抽出方法	判定(Ct値)							
	M				H5			
	試料A	試料B	試料C	試料D	試料A	試料B	試料C	試料D
自動法	陽性 (20.9)	陽性 (27.5)	陽性 (19.8)	陰性	陰性	陽性 (30.4)	陽性 (22.6)	陰性
用手法	陽性 (19.1)	陽性 (24.8)	陽性 (18.1)	陰性	陰性	陽性 (25.2)	陽性 (18.4)	陰性

抽出方法	判定(Ct値)							
	H7am				H7eu			
	試料A	試料B	試料C	試料D	試料A	試料B	試料C	試料D
自動法	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
用手法	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性

検証 2 : BLV の rPCR では、自動法及び用手法の結果が一致したのは、陽性の 32 検体、陰性の 4 検体の計 36 検体であり、その一致率は 87.8%であった。陽性の結果が一致した 32 検体の自動法及び用手法のプロウイルス量の相関係数は強い正の相関を示した ($r=0.98$) (図 3)。今回、結果が一致しなかった 5 検体は、用手法で陽性かつ自動法で陰性の 3 検体及び用手法で陰性かつ自動法で陽性の 2 検

表 3 BLV の rPCR 結果(検体数)

		用手法	
		陽性	陰性
自動法	陽性	32	2
	陰性	3	4

表 4 BLV の rPCR 結果に齟齬のあった 5 検体のプロウイルス量(コピー/10⁵細胞)

検体	プロウイルス量	
	自動法	用手法
1	0.1	nd
2	0.1	nd
3	nd	1.6
4	nd	3.3
5	nd	5.1

nd : 不検出

体であり、プロウイルス量はいずれも 5.1 コピー/ 10^5 細胞以下であった (表 4)。

検証 3: BCV の RT-PCR では、自動法は 10^2 倍、用手法は 10 倍 (図 4)、また、IBV の RT-PCR では、自動法は 10^3 倍、用手法は 10^2 倍まで特異的なバンドが認められた (図 5)。

作業時間については、用手法では 12 検体に約 90 分、自動法では最大 16 検体に約 60 分を要した。そのうち作業者の実働時間は、用手法では作業時間に等しかったが、自動法では試薬の分注等にかかる約 10 分であった。

白血球 41 検体分の核酸抽出に要した作業時間は、用手法では約 360 分、自動法では約 120 分、更に、そのうち実働時間は約 30 分であり、自動法によって、作業時間及び実働時間は短縮した。

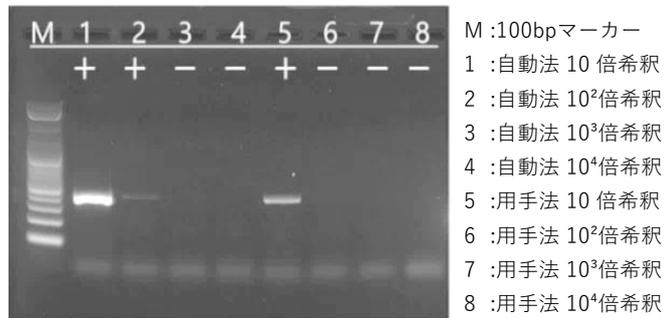


図 4 BCV の電気泳動像

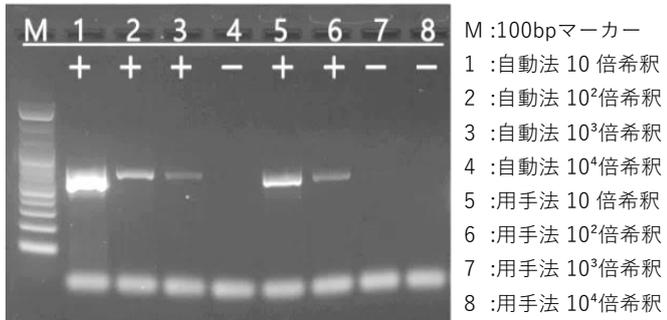


図 5 IBV の電気泳動像

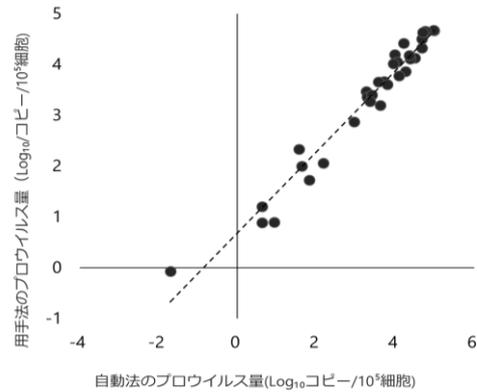


図 3 自動法及び用手法のプロウイルス量の相関

まとめおよび考察

CSFV の RT-PCR 及び rPCR において、自動法の結果は用手法と一致し、Ct 値に差が無かった。AIV の RT-PCR 及び rPCR の結果は、自動法及び用手法で一致したが、自動法の Ct 値は用手法よりもやや高値を示し、やや感度に劣る結果であった。しかし、自動法の Ct 値は、外部精度の報告書[5]で適切な結果と評価される範囲内であったことから、自動法は法定伝染病である CSFV 及び AIV の診断への応用が可能と考えられた。

BLV の rPCR において、プロウイルス量は自動法及び用手法の間に強い正の相関

が認められ、多検体処理の機会が多い BLV の遺伝子検査でも、自動法の活用が期待できると考えられた。BLV の自動法及び用手法の結果に齟齬のあった 5 検体は、2022 年の BLV 抗体検査により、感染牛であると確認されていた。その内、用手法で検出限界以下であった 2 検体は、自動法のプロウイルス量が 0.1 コピー/10⁵細胞であった。今回用いた rPCR キットは、用手法で 0.78 コピー/10⁵細胞まで、再現性をもって検出されたとの報告[7]があり、自動法の PCR 感度は高いと思われる。しかし、用手法で 1.6~5.1 コピー/10⁵細胞のプロウイルス量が検出された 3 検体は、自動法では陰性と判定された。これらの誤差が生じた要因について、自動法では凍結保存した白血球を用いたため、試料の均一性もしくは PCR 感度に影響を及ぼした可能性が考えられた。

BCV 及び IBV における RT-PCR の感度は、用手法と比較して自動法が 10 倍高く、乳剤等の病性鑑定材料を供する PCR においても自動法は有用であると考えられた。

以上より、今回の検証では、自動法の PCR 感度は用手法と比較し、ほぼ同等であった。

今回、検証 2 で実施した白血球 41 検体分の核酸抽出に要した作業時間は、用手法では約 360 分であったのに対して、自動法では約 120 分、更に、そのうち実働時間は約 30 分であった。このように、自動法によって多検体処理の作業時間及び実働時間は大幅に短縮され、PCR の迅速化及び効率化につながった。

自動法は、1 検体にかかる費用が約 980 円と、用手法よりも約 1.8 倍高くなったが、PCR の検査精度の維持及び作業の迅速化が可能であり、遺伝子検査において有用と思われた。

近年、当県では公務員獣医師の人員確保が課題となっており、多様化する業務を限られた人数で行っている現状にある。今後は、的確な検査を効率的に実施するため、自動核酸抽出装置の本格導入を検討したい。

引用文献

- [1]Bruna GM, Romario JS, Alicia EC, Juan CM, Jose JA, Celso PM : Carbohydr Polym, 197, 100-108 (2018)
- [2]一般財団法人生物科学安全研究所：2023 年度外部精度管理調査鳥インフルエンザ遺伝子検査 (RT-PCR 法) 最終報告書, 2-6 (2024)
- [3]一般財団法人生物科学安全研究所：2023 年度外部精度管理調査豚熱遺伝子検査 (コンベンショナル PCR 法) 最終報告書, 2-7 (2024)
- [4]一般財団法人生物科学安全研究所：2023 年度外部精度管理調査豚熱遺伝子検査 (リアルタイム PCR 法) 最終報告書, 2-7 (2024)
- [5]一般財団法人生物科学安全研究所：2023 年度外部精度管理調査鳥インフルエンザ遺伝子検査 (リアルタイム PCR 法) 最終報告書, 2-10 (2024)
- [6]Mase M, Tsukamoto K, Imai K, Yamaguchi S : Arch Virol, 149, 2069-2078 (2004)
- [7]Mayuko J, Shin-nosuke T, Hironobu M, Junko K, Naohiko K, Tamako M, Takashi O, Tetsuo N, Yoko A : BMC Vet Res, 8, 167 (2012)

- [8]農林水産省：牛白血病に関する衛生対策ガイドライン（2015）
- [9]農林水産省：豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針（2020）
- [10]農林水産省：高病原性鳥インフルエンザ及び低病原性鳥インフルエンザに関する特定家畜伝染病防疫指針（2020）
- [11]小幡公道：生体医工学，12，15-24（1998）
- [12]Tsunemitsu H, Smith DR, Saif LJ：Arch Virol, 144, 167-175（1999）
- [13]Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ：Arch Virol, 136, 309-323（1994）
- [14]米谷洲二，斎藤かおり，小笠原悠，陸拾七，間陽子：日獣会誌，75，e114-e121（2022）