

平成29年度
福井県畜産技術業績発表集録
(第1部, 第2部)



福井しあわせ元気国体 2018

第73回 国民体育大会

織りなそう 力と技と美しさ

福井県家畜保健衛生所

目 次

第 1 部

- 1 一酪農家における地方病性牛白血病清浄化達成への取り組み
山崎俊雄・・・ 1
- 2 管内一和牛繁殖農家への肉用牛衛生指導の再開
生水誠一・・・ 5
- 3 管内における牛受精卵移植の現状組み
清水誠也・・・ 8
- 4 ET チャレンジ 50 をめざして～牛受精卵移植において
共存卵胞が受胎率に与える影響
小林崇之・・・ 11
- 5 誰でもがいつでも準備できる家畜保健衛生所鳥インフルエンザ対応手引き
武田佳絵・・・ 15

2 第 2 部

- ◎ 6 山羊の肝蛭症の 1 例
田中知未・・・ 19
- 7 県内で発生したロタウイルス C による成牛の集団下痢症と疫学的考査
岡田真紀・・・ 25
- 8 県内家畜より分離した *Trueperella pyogenes* の性状調査
武野侍那子・・・ 34

- 第 59 回東海北陸ブロック家畜保健衛生業績発表会選出演題
- ◎ 第 59 回全国家畜保健衛生業績発表会選出演題

1 一酪農家における地方病性牛白血病清浄化達成への取り組み

家畜保健衛生所 山崎俊雄 岡田真紀

はじめに

地方病性牛白血病（EBL）は牛白血病ウイルス（BLV）が原因で発生する。BLV の感染伝播には胎盤や産道、乳汁を介した垂直感染、もしくは BLV を含む血液が付着した器具や吸血昆虫を介した水平感染がある[1, 2, 3]。BLV 抗体陽性（陽性）牛から BLV 抗体陰性（陰性）牛になんらかの伝播様式で BLV が伝播した場合、その牛は終生ウイルスを保持する。潜伏期間を経て、陽性牛の 2～5%は EBL を発症し、20～30%が持続性リンパ球増多症となり、60%以上は無症状キャリアーとなる（図 1）[1, 2, 3]。EBL は発症率が低く、積極的に陽性牛を淘汰しても

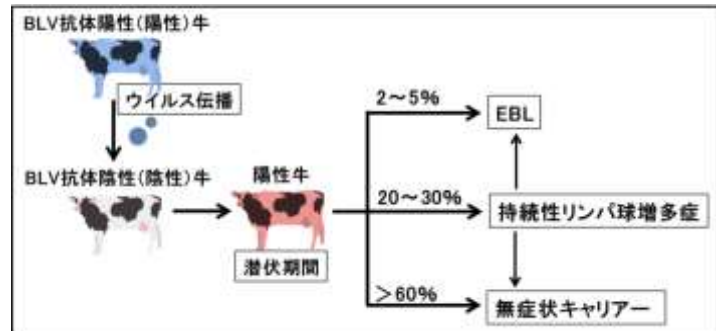


図 1 BLV 抗体陽性牛の病態

補償されないことから対策が進まない農家もある[4]。

今回、一酪農家で陽性牛が急激に加したため、農家とともに EBL 清浄化を試みたので、その概要を報告する。

農家の状況

農家の飼養形態は対尻式繋ぎ牛舎で、平成 27 年 2 月時点で 41 頭を飼養し、育成牛を県外に預託していた。21 年 6 月から 27 年 2 月までの農家の陽性率の推移は、21 年 6 月の 5 条検査で 5%であった陽性率が、26 年 6 月の 5 条検査では 17%と増加し、27 年 2 月には 24%と更に増加していた（図 2）。この間に陽性牛となった 11 頭の内訳は、着地検査で陰性であった 4 頭が陽転し、農家内での水平感染が考えられ、着地検査で 7 頭が陽性となり、預託先での水平感染が考えられた。陽性牛 11 頭の内、3 頭を淘汰していた。

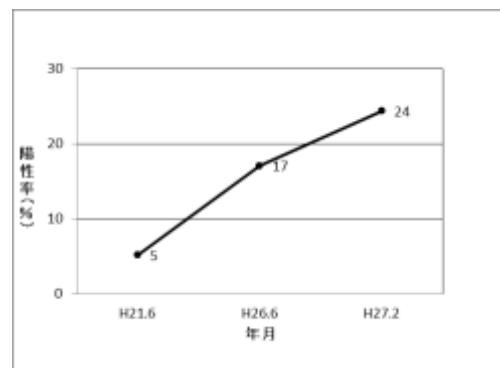


図 2 農家の陽性率の推移（平成 21 年 6 月から 27 年 2 月まで）

BLV 感染に対する既存の対策

陽性率が増加した 27 年 2 月まで、BLV 感染に対して農家、家畜保健衛生所（家保）、診療獣医師が行っていた既存の対策を図 3 に示した[1, 3, 5]。農家は分娩後早期に親子を分離し、出生子牛には陰性牛の凍結初乳を給与していた。削蹄などの出血を伴う処置の使用器具の洗浄消毒および陽性牛の淘汰を行っていた。家保は畜主、農場従業員およ

び診療獣医師に対して、牛白血病対策の講習と対策実施の意思の確認および着地検査を行っていた。家保および診療獣医師は注射針を 1 頭 1 針で使用していた。直腸検査および超音波画像診断装置のエコプローブに直腸検査手袋を 1 頭ごとに使用していた。

BLV 感染に対する強化対策

既存の対策を行っていたが、水平感染による更なる感染拡大が考えられた。淘汰更新を行っても新たな感染があると、清浄化が困難になることから、いかに新たな感染を抑えるかが重要となる。そこで、EBL 清浄化への強化対策として、以下の 6 つの対策を行った。

① BLV の感染伝播を防ぐには感染牛の隔離が有効との報告に基づき[3]、陰性牛と陽性牛の分離飼育を行った。農家には隔離のスペースがないことから、陰性牛と陽性牛を分離飼育することにした。図 4 は農家の牛の配置で、対策前は陽性牛が牛舎内で散らばって配置されていたが、対策後は陽性牛 10 頭を隣同士に並べて配置し、1 マス分の空房を隔てて、陰性牛を繋留した[5]。

② 搾乳や診療等の作業動線の見直しを行った[3]。図 5 の左下が陰性牛で、1 マス分の空房を隔てて、右上が陽性牛であり、陰性牛と陽性牛を分離飼育したことにより、必然的に搾乳順や繁殖検診順も陰性牛から陽性牛の順番となり、血液による感染伝播を予防した。

③ 防虫ネット[1, 3, 5]は、陰性牛との境目となっている空房から陽性牛 10 頭目まで陽性牛がネットで覆われるように、設置した(図 6)。防虫ネットは農家既存のものを使用したため、費用はかからなかった。飼槽など牛の前の部分と牛の体高よりやや上の部分は、ネットで覆わなかった(図 7)。ネットはレールにひもをかけて設置し(図 8)、陽性牛群内にヒトが出入りする場合は、ネットをカーテン式に開閉して使用した(図 9)。ネットの穴の大きさは 1cm 未満と物理的にアブなどを通さない大きさであった。

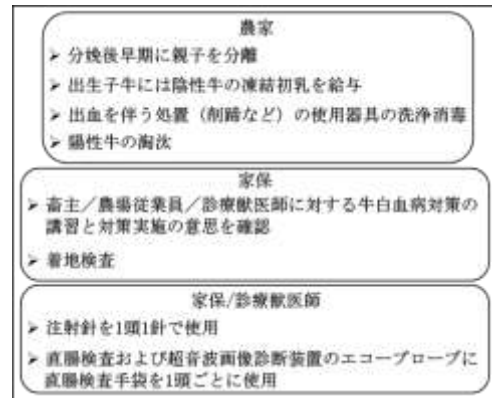


図 3 BLV 感染に対する既存の対策
(平成 27 年 2 月まで)

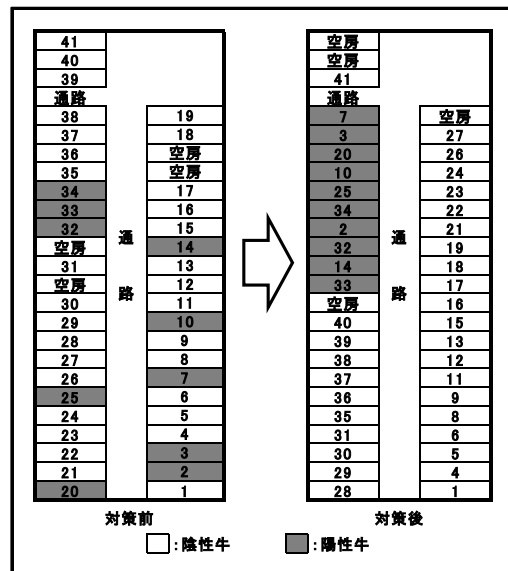


図 4 農家の牛の配置



図 5 搾乳、診療等の作業動線の見直し



図 6 防虫ネットの設置



図 7 陽性牛群（前部）



図 8 防虫ネット（レール部）



図 9 防虫ネット（開放時）

④約 4 ヶ月毎の全頭検査を行い、陽性牛を把握し、水平感染の防止に努めた[3]。

⑤陽性牛が伝播リスクとなるため、矢崎ら報告[6]に準じて陽性牛の EC の鍵判定や BLV 遺伝子コピー数を当所で検査し、EC の鍵判定と BLV 遺伝子コピー数により淘汰優先順位を決定した[3, 7, 8]。表 1 は農家に提示したものを簡略化したものであるが、EC の鍵判定がプラスで、コピー数が一番大きいものを淘汰順位 1 番とした。順位には、年齢や受胎成績は考慮しなかった。これらにより、淘汰順位を定め、農家への淘汰指導を行った。

表 1 淘汰優先順位

淘汰順位	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩
ECの鍵判定	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±
BLV遺伝子コピー数/ng	108.5	77.5	75	54.5	49.5	49	43	17.5	8	0.01
年齢	3歳	2歳	5歳	3歳	2歳	2歳	4歳	2歳	4歳	4歳

* + : 陽性 ± : 疑陽性

⑥預託先の陽性牛の情報把握を行った[3]。これまでの対策に加え、毎月の巡回指導の際に、対策の遵守状況の把握や受胎による淘汰順位の変更などを綿密に指導したことにより、農家の BLV に対する意識は更に向上し、預託先に連絡を取り、陽性牛の情報把

握に努めたところ、預託先の清浄化を確認した。

結果

既存の対策のみであった 21 年 6 月から 27 年 2 月までは陽性牛が増加し、陽性率が 24% とピークを示したが、水平感染を抑える強化対策を実施した結果、農家内と預託先で陽転はなく、29 年 6 月には全頭の陰性を確認し、わずか 2 年で EBL 清浄化を達成した (図 10)。

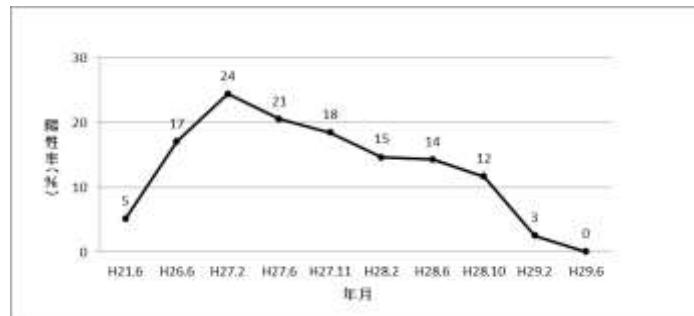


図 10 農家の陽性率の推移

まとめ

出生子牛に陰性牛の凍結初乳を給与するなど既存の対策に加え、分離飼育、防虫ネットの設置など水平感染の強化対策を実施し、併せて毎月の巡回指導の際に対策の遵守状況を把握し、受胎による淘汰順位の変更などの指導を強化したところ、農家の BLV 意識が向上した。その結果、費用はほとんどかからず、わずか 2 年で EBL 清浄化を達成できた。今後も清浄化の維持に努め、他の農家へも指導していきたい。

引用文献

- [1] 今内覚. 2015. 動薬研究. 71 : 1-11.
- [2] 小林創太. 2015. 岐阜大学博士論文. 博士 (獣医学) 乙第 139 号.
- [3] 小西美佐子. 2015. 動衛研ニュース. 59 : 1-59.
- [4] 柿沼清市. 大塚浩通. 大前佳穂里. 綾部杏子. 柿沼元治. 今内覚. 及川正明. 2011. 日獣会誌. 64 : 375-380.
- [5] 井川真一. 2015. J. Vet. Epidemiol. 19(2) : 114-118.
- [6] 矢崎竜. 木下正徳. 佐伯美穂. 平成 26 年大分県家畜保健衛生業績発表会. No4.
- [7] 稲垣華絵. 高島規之. 坂梨裕. 平成 22 年北海道家畜保健衛生業績発表会. No14.
- [8] 竹内美穂. 磯田加奈子. 藤森英雄. 平成 27 年度東京都家畜保健衛生業績発表会集録. : 37-40.

で農家自身が確認できるようになった（図 3）[1]。

② 発情観察に腔鏡検査

徹底発情観察には腔鏡検査を徹底するよう指導した。発情観察はこれまでのスタンディング行動のみの観察に加え、腔鏡検査を追加することにより、長期不受胎牛では、子宮内膜炎が疑われる牛が確認できた。

③ AI 回数の見直し

受胎牛は、3 回までの AI で受胎しており、AI を 4 回しても受胎しない場合、発情が来ても AI を見送り、排卵確認や早期治療をすることとした。

④ 共同管理者による AI の実施

これまでは診療獣医師に AI を依頼していたが、昨年度人工授精師の資格を取得したことから、共同管理者自身でも AI ができるよう、直腸腔法による AI 手技を実践指導した。

Ⅱ 市場に出荷した子牛の増体に関する調査

① 過去 3 年間の市場出荷子牛と市場平均日齢増体との比較

27 年度は当農場から市場に出荷した去勢は 9 頭で平均日齢増体以上は 3 頭で、また出荷した雌は 2 頭ですべて平均日齢増体以下であった。28 年度は出荷した去勢は 8 頭で平均日齢増体以上が 2 頭で、また出荷した雌は 4 頭ですべて平均日齢増体以下であった。29 年度は年度途中であるが出荷した去勢は 5 頭で平均日齢増体以上が 1 頭で、また出荷した雌は 6 頭ですべて平均日齢増体以下であった（図 4）。

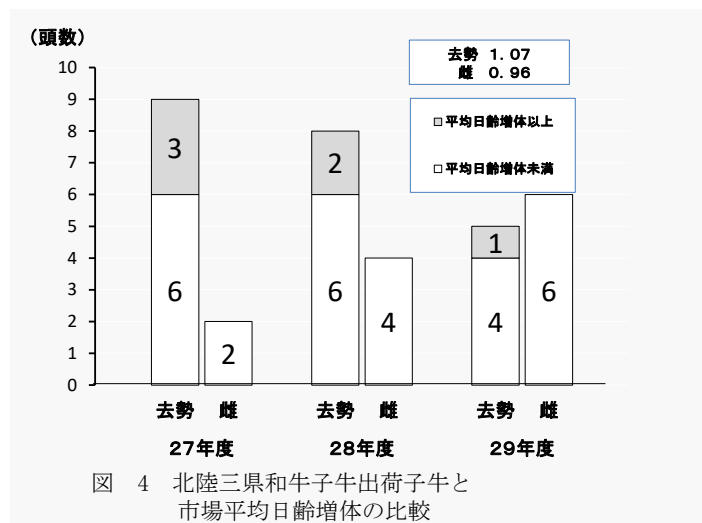


図 4 北陸三県和牛子牛出荷子牛と市場平均日齢増体の比較

② 衛生対策状況

平成 28 年度に実施した白血病およびヨーネ病はすべて陰性で、ワクチンは繁殖牛では異常産 3 種混合と下種混合ワクチンを、子牛では呼吸器 5 種混合を 2 回接種していた。駆虫は子牛のみコクシジウム症発症予防薬を投与していた。導入歴は自家育成中心であり、一昨年、県営牧場から育成牛の導入はあるが自家繁殖が中心であった。

③ 個別飼育中の疾病の発生状況

個別飼育中にもかかわらず、下痢を繰り返していることが明らかとなった（図 5）。

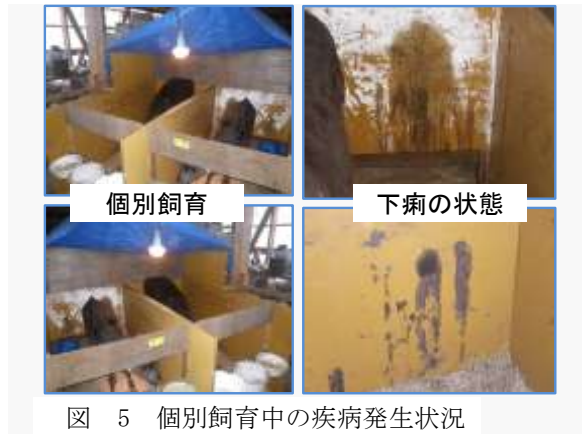


図 5 個別飼育中の疾病発生状況

表 2 寄生虫検査

	コクシジウム オーシスト	乳頭 糞線虫卵	肝蛭卵
雌成牛 (16頭)	2頭 200 OPG	2頭 100 EPG	—
子牛 (3頭)	—	—	NT

NT:未検査

また、全頭を対象に寄生虫検査を実施したところ、2頭の牛からコクシジウムオーシストと乳頭糞線虫卵を検出したが、下痢を繰り返していた3頭からは検出されなかった（表2）。

④ 下痢の原因

聞き取り調査、子牛の症状および下痢等の状態から、下痢の原因は代用乳の給与方法が一定していないことが考えられた（表3）。

表 3 下痢の原因

代用乳の給与方法の検討

- ・ 哺乳後直ちにお湯を哺乳する
- ・ 代用乳の希釈濃度を変える
- ・ 給与時間が変わる(季節によって)

感染性下痢の検討

- ・ 抗生物質投与により、下痢は一時的に治まる

まとめおよび考察

繁殖管理指導

繁殖台帳を継続作成することにより、今まで以上に個体の繁殖状況を把握することが可能となった。また、発情観察には腔鏡検査を徹底し、4回以上のAIで受胎しない長期不受胎牛の早期治療に努める必要がある。また、技術指導としてはAI手技の早期習得のために、繰り返し子宮頸管をしっかりとつかめるよう様々な牛で練習を続けていく。さらに、万が一の事故を防止するため、現在未使用の保定枠場を修繕し再活用していく。

子牛の育成指導

市場子牛の増体調査の結果等から、寄生虫や感染性下痢（細菌・ウイルス等）による原因は極めて低いと考えられ、代用乳は能書通りの給与方法を徹底することが基本であるため[2]、今後の分娩予定の子牛に対し、哺育育成方法から指導を開始していく。

今後、一年間を目途に、繁殖管理と子牛育成方法について、これらの課題の解決のために指導を続けていく。

引用文献

[1]生産獣医療システム 肉牛編 農文協

[2]子牛の科学 日本家畜臨床感染症研究会編 チクサン出版

3 管内における牛受精卵移植の現状

嶺南家畜保健衛生センター 清水誠也 横田昌己

はじめに

家畜保健衛生所（以下、家保）では、福井県ブランド牛「若狭牛」の改良増殖を効率的に推進し、肉牛経営を改善することを第 1 番目の目的に、乳牛の借り腹を利用した和子牛生産で酪農経営を改善することを第 2 番目の目的に、平成 3 年度から家保において受精卵移植（以下 ET）事業を実施している。

現在、管内酪農家の減少および初妊牛価格の上昇による後継牛確保が優先されるようになり、管内の ET 利用農家および ET 頭数は減少している。そこで、管内 ET の現状を把握することと今後の ET 事業推進のために、過去 10 年間の ET 推移、最近の ET 状況、ET に対する農家の思いの 3 項目について調査した。

I 過去 10 年間の ET 推移

10 年前には 11 戸あった ET 利用農家は、現在では 4～5 戸まで減少している

（図 1）。また、農家数の減少および初妊牛価格の高騰により後継牛確保が優先され、最大 175 頭だった ET 頭数はここ数年 30 頭前後に留まっている（図 2）。

当センターは受精卵の供給元である嶺南牧場から地理的に近いという利点を生かし、新鮮卵移植を積極的に実施してきた（図 3）。H28 年度と H29 年度は凍結卵のみを使用しており、H29 年度の移植頭数（12 月末現在）は、ここ数年と比較して減少している（図 3）。しかし、受胎頭数で見ると、H29 年度はここ数年と比較して同等またはそれ以上となっている（図 4）。

受胎率で比較すると、新鮮卵受胎率は 30～45% であり凍結卵受胎率の 10～15% 高い値で推移し、新鮮卵と凍結卵を合わせた全体の受胎率は約 30～35% で推移していたが、H28 年度および H29 年度は凍結卵受胎率が向上し、それぞれ 41.5%、61.9% となり新鮮卵受胎率に匹敵する受胎率となった（図 5）。新鮮卵受胎率向上の理由として、凍結方法、受精卵品質、器具の改善が考えられる。凍結方法を H28 年度から融解後の操作が複雑なストロー内 2 ステップ法から、操作が簡便なダイレクト法に変更した。受精卵品質は過剰排卵処理方法の変更により、凍結融解後の受胎率の高い収縮期桑実胚の回収率が増加し、これを中心に ET を実施できるようになった。器具は移植器をカテーテル式の「YT ガン（株式会社ヤマネテック）」に変更する

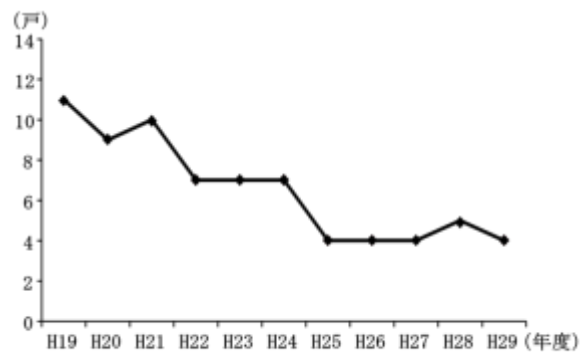


図1 ET利用農家数の推移

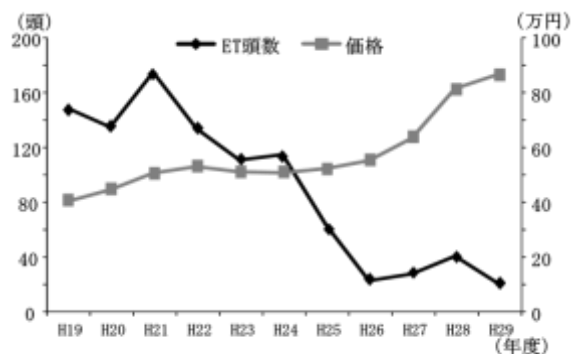


図2 ET頭数および初妊牛価格の推移

(ホクレン家畜市場)

ことで移植操作がこれまでより容易になった。以上 3 点の改善により受胎率が向上したと考えられる。

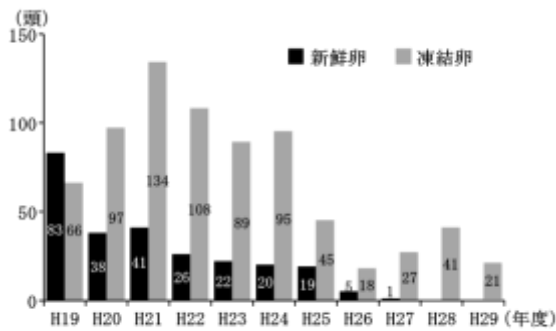


図3 新鮮卵および凍結卵の移植頭数

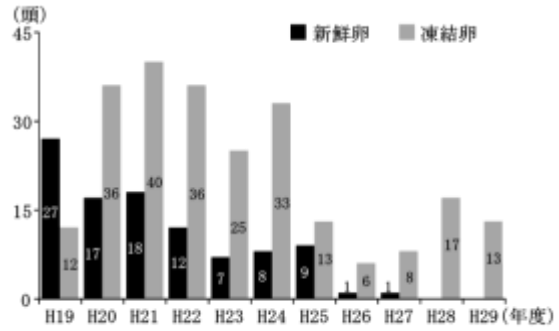


図4 新鮮卵および凍結卵の受胎頭数

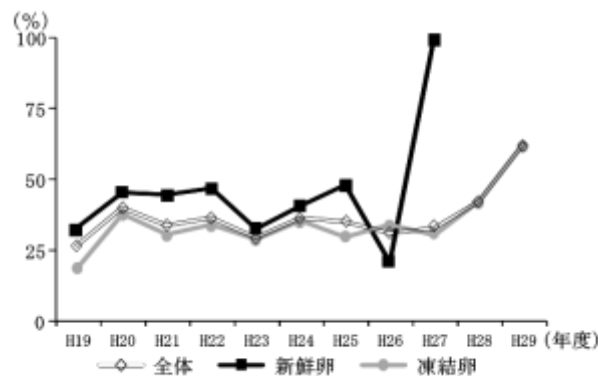


図5 新鮮卵、凍結卵および全体の受胎率

II 最近の ET 状況

ET 利用農家は酪農家が 80%を占めており、酪農家数は H25 年度から 3 戸のみとなっている（図 6）。そこで 3 酪農家について ET 成績を調査した。

ET 頭数は図 7 に示したように推移している。H26 年度から 3 戸とも ET 頭数が減少しているが、これは初妊牛価格の高騰により、外部からの導入が厳しくなったためと考えられる。特に、A 酪農家は H25 年度まで繁殖を ET 中心で行っており、ET 子牛の利益で外部から乳牛を導入していた。

農家毎の AI 回数および ET 回数とそれぞれの受胎率を示した（図 8）。ET 受胎率はどの酪農家も悪くなく、ここ 2 年間は 3 戸とも上昇している。また C 農家はホルスタイン ET も積極的に実施している。AI に関しては、A 酪農家は H25 年度からの AI 指導により H26 年度までは受胎率が好成績を示したが、それ以降あまりよくなく、現在も週 1 回の繁殖指導を実施している。B 酪農家も繁殖成績が優れない状態が続き、昨年度から当センターの事業で週 1 回の繁殖指導を実施している。

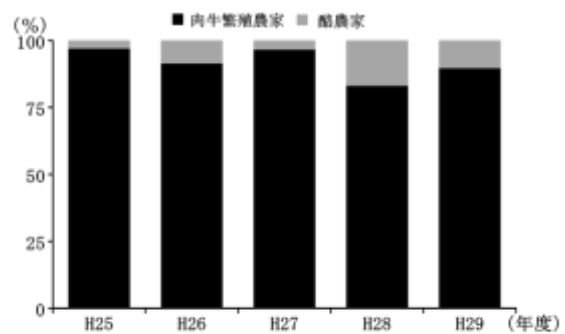


図6 ET頭数の農家種別割合

C 酪農家の繁殖成績は安定しており、月 1 回の定期検診で繁殖指導を実施している。

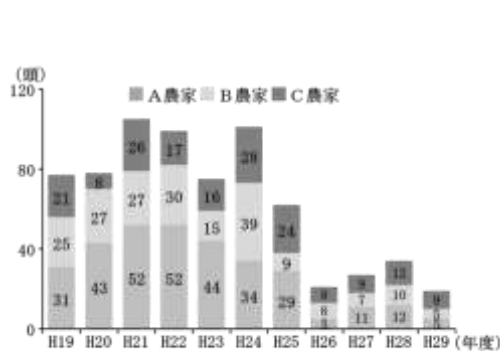


図7 3酪農家のET頭数の推移

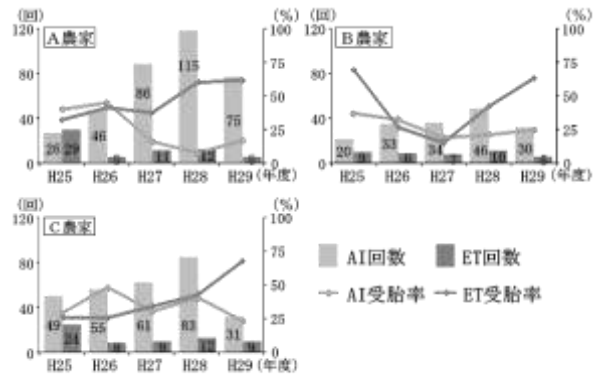


図8 3酪農家のAI回数およびET回数と受胎率

III ET に対する農家の思い (アンケートの結果)

今後も 3 酪農家が主な ET 利用農家になると考えられるため、ET に対する思いについてアンケート調査を実施した。

アンケートは、①ET 利用の目的、②ET の利点・欠点、③現状の ET への満足度、④今後の ET へ望むことの 4 項目で実施した。

ET 利用の目的でどの農家でも初めに挙げられたことは、「高額な副収入が得られるため」であった。その他に「AI で受胎しない牛が ET では受胎するときがあるため」、「発情を見逃した際に利用でき、受胎機会を増やすことができる」という意見もあった。

ET の利点については上記以外に、「難産防止になる」、「子宮や卵巣の異常を発見でき、すぐに臨床獣医に治療してもらえる」、「ホルスタイン ET で優秀な後継牛を確保できる」という意見が挙げられた。欠点として、「3 連休や年末年始に ET を利用できない」、「ホルスタイン受精卵をもっと利用したい」という意見が挙げられた。

現状の ET への満足度は 3 酪農家とも、「利益・受胎率ともに十分満足している」、「今後も ET を利用していきたい」という意見だった。

今後の ET 事業に望むことは「現在の ET レベルの維持・向上」、「より良い血統の受精卵の供給」、「ホルスタイン ET の利用促進」、「優良な後継牛の確保のため、農家採卵や奥牧買上牛の未経産牛採卵による自家産の ET」が挙げられた。

IV 今後の対応

「3 連休時に ET が利用できない時がある」、という意見については新鮮卵移植を利用した Day5 または Day9 移植を検討していきたい。また、ホルスタイン ET の利用促進と農家採卵の検討もしていきたい。ET レベルの維持・向上に関しては、近年の高い受胎率を維持し、農家満足度を今後も満たすために、後継者の育成、技術継承が重要だと感じた。

4 ET チャレンジ 50 をめざして～牛受精卵移植において共存卵胞が受胎率に与える影響

家畜保健衛生所 小林崇之 山崎俊雄

はじめに

当所では、ブランド牛「若狭牛」の生産振興を目的に乳用牛を活用した和牛受精卵移植(ET)に取り組んでいる。受胎率の安定・向上を図るため、県内の関係機関の担当者が年に数回集まり、ET 検討会を開催している。これまでに受卵牛側の要因として、黄体サイズ、発情確認の有無[1]、粘液性状 [1]、および共存卵胞の有無 [1]、黄体突起の有無などを、また受精側側の要因として、ステージ [1, 2]、ランク [1, 2]、凍結方法 [2] および採卵方法 [3] など、術者側の要因として移植延べ頭数 [1] および移植器の違い [1] などについて検討を重ね受胎率向上に向け取り組んできた(図 1)。

その結果、当所の ET 受胎率は年度により多少のばらつきがあるものの、近年は 40%前後で推移しており、農林水産省が掲げる目標数値である ET チャレンジ 50 (年間成績が受胎頭数 50 頭以上、受胎率 50%以上) までもう少しというところまで安定している(図 2)。

最近の報告で、人工授精後の第 1 卵胞波の主席卵胞と黄体の同一卵巣内での共存は受胎率を低下させるとある [4]。これは、共存卵胞が局所的に子宮角に影響を及ぼしている可能性を示唆している。これまで ET 受胎率と共存卵胞の有無は関係がないとされてきたが、ET 実施時の共存卵胞が受胎率に与える影響を再度検討し受胎率向上に取り組んだので、その概要を報告する。

ET 時の黄体・卵胞の動き

牛は、発情周期中に卵胞の発育・退行を 2～3 回繰り返す(卵胞波)。ET 当日(発情後 7 日目前後)には、黄体と第 1 卵胞波の卵胞がどちらかの卵巣に存在している。ET 時の卵胞の存在パターンは、卵胞が黄体と反対側の卵巣に存在する非共存型と卵胞が黄体と同じ卵巣に存在する共存型に分類され、共存型の卵胞を共存卵胞といわれている。ET を実施する場合、非共存型および共存型は共に黄体側に受精卵を注入するが、共存卵胞が局所的に作



図1 受胎率向上のため様々な要因を検討

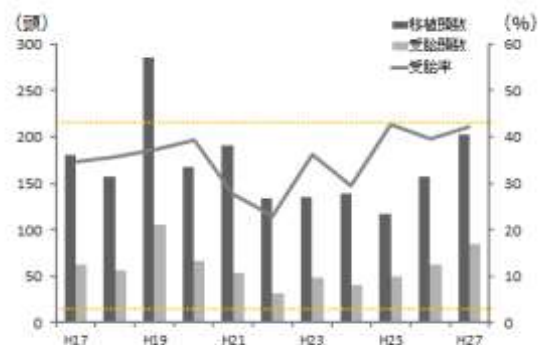


図2 ET受胎率の推移

用し、受精卵の発育や子宮内膜に何らかの影響を及ぼすと考えられると、共存卵胞の存在が受胎率を左右する要因となると考えられる（図 3）。

調査 I

ET における卵胞の影響調査

材料及び方法

調査期間は平成 28 年 4 月から平成 29 年 3 月までで、管内酪農家の乳用牛 129 頭（経産 110 頭・未経産 19 頭）を用いた。移植に供した受精卵は、耐凍剤として 10%エチレングリコールに 0.1M シュークロースを添加した溶媒を用い、ダイレクト法で凍結し、移植は 6 秒エアソーイング後 30℃の温湯で直接融解後 YT ガンを用いて実施した。調査区分として、移植当日の直腸検査で 1cm 以上の卵胞が確認でき、その卵胞が黄体側の卵巢に存在した牛を共存区、卵胞が確認できその卵胞が非黄体側の卵巢に存在した牛を非共存区、卵胞が確認できなかった牛をなし区と区分し、各区とも直径 1cm 以上の黄体が確認でき、移植可能と判断した牛に移植を実施した（図 4）。

結果

経産牛と未経産牛の受胎率を図 5 に示した。経産牛の受胎率は、共存区 30.8%、非共存区 45.5%、なし区 38.7%の合計 38.2%であった。有意差は認められなかったが、非共存区が最も高い傾向にあり、共存卵胞が受胎に何らかの影響を及ぼしていると考えられた。未経産牛の受胎率は、共存区 75.0%、非共存区 80.0%、なし区 60.0%の合計 68.4%であった。いずれの区も受胎率が 50%以上と高い傾向にあったことから、共存卵胞の影響は少ないと考えられた。以上のことから、平成 29 年 4 月以降の経産牛の選定基準に卵胞の位置を加え、受胎率向上について検討することとした。

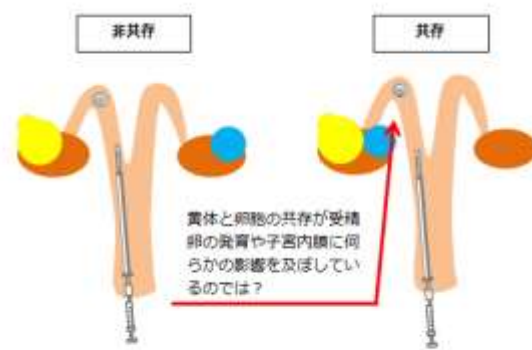


図3 黄体・卵胞の影響

調査項目 : ETにおける卵胞の影響調査
 調査期間 : H28.4～H29.3(12か月)
 供試牛 : 乳用牛129頭(経産110頭、未経産19頭)
 凍結方法 : 10%EG+0.1MSu ダイレクト法
 移植器 : YTガン
 調査区分

区	卵胞		黄体	
	1cm以上	位置	1cm以上	1cm以下
共存	あり	黄体側	○	×
非共存	あり	非黄体側	○	×
なし	なし	—	○	×

移植可能と判断した牛に移植を実施。

図4 材料および方法（調査 I）

区	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)
共存	26	8	30.8
非共存	22	10	45.5
なし	62	24	38.7
合計	110	42	38.2

区	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)
共存	4	3	75.0
非共存	5	4	80.0
なし	10	6	60.0
合計	19	13	68.4

図5 結果（調査 I）

調査Ⅱ

新しい選定基準の受胎率改善効果

材料及び方法

調査期間は平成 29 年 4 月から平成 29 年 12 月で、管内酪農家の乳用牛 64 頭（経産牛 54 頭・未経産牛 10 頭）を用いた。移植当日の直腸検査で 1cm 以上の卵胞が確認でき、その卵胞が黄体側の卵巣に存在した牛を共存区、卵胞が確認できその卵胞が非黄体側の卵巣に存在した牛を非共存区、卵胞が確認できなかった牛をなし区と区分し、共存区は黄体サイズが直径 2cm 以上、非共存区は 1cm 以上、なし区は 1cm 以上の黄体が確認できた牛で移植可能と判断し、移植を実施した（図 6）。

結果

各区の受胎率を図 7 に示した。経産牛の受胎率は、共存区 75.0%、非共存区 50.0%、なし区 46.7% で合計 53.1% であった。未経産牛の受胎率は、共存区 77.5%、非共存区 100%、なし区 66.7% で合計 80.0% であった。

まとめおよび考察

三浦らは、人工授精後の第一卵胞波の主席卵胞が黄体と同じ卵巣に存在した場合、受胎率が低下すると報告している [4]。これまで、ET における受胎と共存卵胞の有無は関係がないとされてきたが、今回の調査で共存卵胞が黄体側卵巣、非黄体側卵巣で受胎率を比較したところ、共存卵胞が黄体側にある牛で受胎率が低い傾向にあったことから、人工授精と同様に共存卵胞が受胎に何らかの影響を与えていることが考えられた。しかし、共存卵胞が存在しても黄体が直径 2cm 以上の牛では、受胎率が 75.0% と高かった。金子らは、黄体組織面積の大きさと血中プロゲステロン濃度は比例すると報告している [5]。今回の試験でも、黄体直径が 2cm 以上で血中プロゲステロン濃度が高いと推察される牛では、共存卵胞の影響は少ないと考えられた。これらのことから受精卵牛の選定には、黄体だけでなく卵胞の局所的な影響も考慮し、卵胞の存在場所も選定基準の一つとして組み入れる必要があると考えられる。

共存卵胞が確認できなかった牛での受胎率がやや低い傾向にあった。倉田らは、触診法と超音波画像診断法で卵巣の所見を比較したところ、触診において卵胞なしと判断したが、超音波画像診断法で卵胞ありと診断された割合は 61.9% としている [6]。今回の試験では、すべて直腸検査で卵巣を触診しており、直腸検査では確認できなかった卵胞が存在してい

調査項目 : 新しい選定基準の受胎率改善効果
 調査期間 : H29.4～H29.12
 供試牛 : 乳用牛64頭(経産54頭、未経産10頭)
 凍結方法 : 10%EG+0.1MSu ダイレクト法
 移植器 : YTガン
 選定基準 :

区	卵胞		黄体		
	確認	位置	Aランク 2cm以上	Bランク 2～1cm	Cランク 1cm以下
共存	あり	黄体側	○	×	×
非共存	あり	非黄体側	○	○	×
なし	なし	—	○	○	×

移植可能と判断した牛に移植を実施

図 6 材料及び方法（調査Ⅱ）

区	移植頭数	受胎頭数	不明	受胎率(%)
共存	9	6	1	75.0
非共存	30	13	4	50.0
なし	15	7	0	46.7
合計	54	26	5	53.1

区	移植頭数	受胎頭数	不明	受胎率(%)
共存	4	3	0	77.5
非共存	3	3	0	100
なし	3	2	0	66.7
合計	10	8	0	80.0

図 7 結果（調査Ⅱ）

た可能性があった。今後は直腸検査だけではなく超音波診断装置の活用も考えていく必要があると考える。未經産牛の受胎率は、いずれの区も高く共存卵胞の影響は少ないと考えられた。近年の経産牛は、改良が進み乳量の増加に伴い肝臓への血流量が増加し、ホルモン濃度が全般的に低いとされている [7, 8]。未經産牛は、乳を出さないことから、経産牛と比較して黄体サイズが小さくても十分なホルモン濃度を維持していたためと考えられた。今回の取り組みによって、移植基準を見直すことで不受胎の可能性が高い牛を効率的に除外できたと考えられた。

今回の取り組みで、平成 29 年度の当所の ET 成績は「受胎率 51.7%、受胎頭数 45 頭」と大きく改善することができ、順調にいけば ET チャレンジ 50 を達成する見込みである。

引用文献

- [1] 横田昌己ら：管内における牛受精卵移植の受胎要因の検討、平成 25 年福井県畜産技術業績発表会集録
- [2] 横田昌己ら：若狭牛増産のための牛受精卵の回収及び移植方法の変更とその移植成績、平成 27 年福井県畜産技術業績発表会集録
- [3] 横田昌己ら：嶺北管内における牛受精卵移植の受胎要因の検討（第 2 報）、平成 26 年畜産技術業績発表会集録
- [4] 三浦亮太郎：ウシの受胎性に関する人工授精後の第 1 卵胞波主席卵胞と黄体の位置関係、第 37 回動物臨床医学会（2016）
- [5] 金子一幸ら：超音波画像診断装置によるホルスタイン種乳牛における黄体機能の評価、日獣会誌、57. 431-434（2004）
- [6] 倉田佳洋ら：卵巢、子宮外陰部所見と受胎率の関係に関する調査、奈良県畜産技術センター研究報告、(39) 19-28. 2015
- [7] 砂川政広：把握困難な繁殖停滞の 2.3 の原因、LIAJ News No. 159
- [8] 平子誠ら：乳牛の繁殖性低下の現状と子宮環境、日本家畜臨床感染症研究会誌 6 巻 3 号 2011

- ・ 経産牛における受胎率は、38.2%から53.1%と改善。

共存卵胞があっても黄体が2cm以上であれば影響は少ない
受胎には、黄体だけでなく卵胞の局所的な影響も関与
卵胞の存在を考慮した受胎率の算定が重要

- ・ なし区の受胎率がやや低い（46.7%）傾向。

直腸検査では確認できなかった卵胞が存在した可能性があることから
今後は超音波診断装置の活用も視野

- ・ 未經産牛の受胎率は、どの区も高く共存卵胞の影響は少ない

- ・ 移植時の判定基準を見直すことで不受胎の可能性が高い牛を効率的に除外できた。

図 8 まとめおよび考察

病性鑑定班は、異常家きんの写真を記録し、異常家きん発生会において死亡家きんおよびチアノーゼ等の症状を呈している家きん(計10羽以上)から気管・クロアカスワブ、血液を採材し、簡易検査およびウイルス検査用の材料とする。
簡易検査の結果が判明した時点で、指針様式4ー1、検査結果および採材した検査材料を家畜保健衛生所に報告し、病鑑材料・資材運搬班にも連絡する。
1名が検査材料・携行品および防護衣類を精密に消毒したうえで、農場敷地境界線に向かう。
病鑑材料・資材運搬班は材料を受け取り帰庁する。

図2 家保マニュアルの抜粋

採 材 (12手順)	・ 既に異常家きんに検体採取するための作業を完了する。 ・ 死で異常家きんから採取可能な場合は全羽の簡易検査・ウイルス検査用試料を採取 ・ 死亡家きんは採材後、手拭きティッシュで口を拭き、口を縛る。等
報 告 (5手順)	・ 死亡家きんの簡易検査の結果が出たら電話で家保および病鑑材料・資材運搬班に連絡する ・ 様式4ー1に簡易検査結果を記入した後、病判別表の記入方法で報告する ・ シリット箱で、採取した試料を家保へターミナル送信する。等
消 毒 (7手順)	・ 家きん舎に入る前に出口付近に小型噴霧器、検体回収用ティッシュを設置する ・ 採材が終わったら、出口で小型噴霧器を使い自身の全身および周囲を消毒する ・ 簡易検査材料および血液は試験管にて回収し、消毒済のバケツに入れて回収する。等
受け取り (5手順)	・ 病性鑑定班は農場に到着したら、簡易検査キット、検体検査材料・血液運搬容器を発生管理区域境界付近に設置する ・ 運搬班は病性鑑定班が材料を持ってきたら、各運搬容器の蓋を開ける ・ 病性鑑定班は運搬容器に分別して材料を分類に入れる。等

図3 手順の細分化



図4 実演の動画

② 家保職員携帯品の再検討

これまで、農場立入り者の携帯品は簡易検査や材料採材等を行う病性鑑定と、農場への人や物の出入り履歴等を調査する疫学調査の2つの作業に分けて分類し、各分類のボックスを用意しあらかじめ準備をしていた(図5)。今回実演を行った結果、両作業は病性鑑定班が行うこと、両作業に必要な物品がボックスに混在し分かり難いことから携帯品を改めて分類した。今回の分類では、防護着、ゴーグル等を防護具、消毒薬、噴霧器等を消毒、懐中電灯、デジタルカメラ等を照明・通信器具等、簡易検査キット、採材道具等を検査・採材・調査および用途により分類した(図6)。また、簡易検査が陽性となった時に必要となる、農場への立入り制限等を行う交通規制班の準備物および農林水産省の疫学調査用に指定された準備物を家保から農場に運搬する。そこで、前述4種の分類に、交通規制班の準備物および疫学調査班の準備物の2種を加え、計6種の分類とした(図7)。あらかじめ箱に収容できるものは、分類ごとのボックスに収容し、分かり易くするため、ボックスにアルファベット名をつけ、また、シールで明記した。緊急ボックス保管場所を指定し、ボックスが見つけ易いようにした。鳥インフルエンザと同様に緊急時の携帯品が必要となる口蹄疫についても、共通物品が多いことから併せて再分類した。「検査・採材・調査」については疾病ごとで携帯品が異なることからボックスを各々用意し、ボックス名と対象疾病名をシールで明記した(図8)。



図 5 これまでの携帯品分類



図 6 携帯品を用途で分類

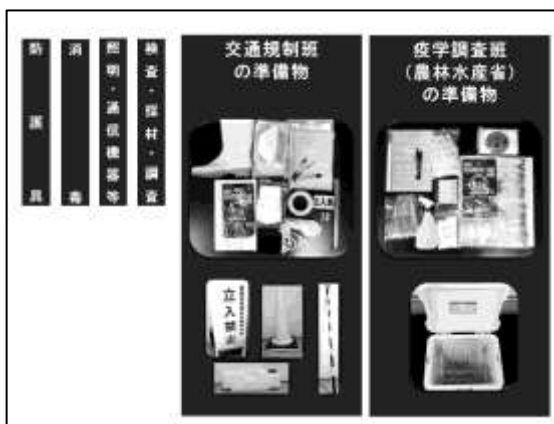


図 7 携帯品を 6 種に分類



図 8 ボックス名を明示して保管

③ 携帯品準備の円滑化

病性鑑定班と運搬班それぞれの携帯品一覧表を作成した（図 9）。一覧表には前述の分類名の下に、ボックス名とその収容物品が分かるように線で囲み、ボックスに入れることのできない物品も併せて記載した。また、全ての物品名に保管場所を併記した。緊急ボックス保管場所には、作成した一覧表と物品保管場所を明示した家保平面図を併せ

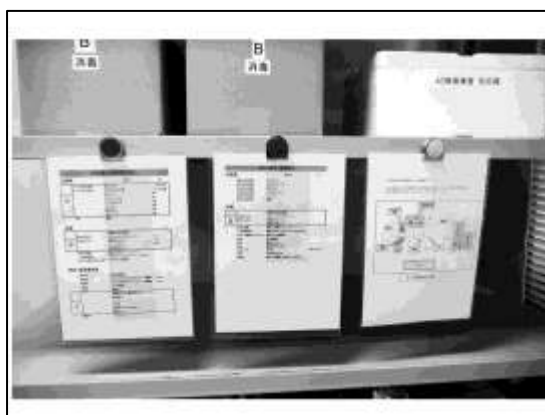


図 10 緊急ボックス保管場所での掲示

て掲示し（図 10）、誰でもが、いつでも掲示物を基に携帯品の準備ができるようにした。

④ 手引きの閲覧

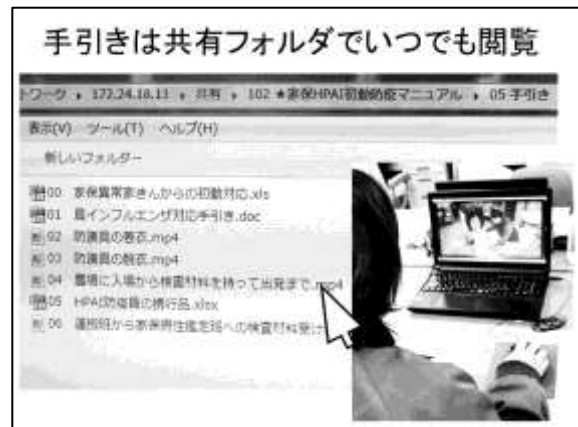
今回作成した動画や携帯品一覧表等は、発生状況聞き取り方法の資料や防護具の着脱方法説明動画とともに家保職員で共有するデータフォルダに手引きとして保存し、職員は誰でもがいつでも閲覧できるようにした（図 11）。

まとめ

誰でもが、いつでも準備をして家保初動対応できる体制を構築できた。手順の実演を行うことで、有事の際の職員の動きや必要な物品をイメージできた。携帯品はどこに何があるか分かるようになり、準備がし易いことに加え、日常点検や在庫管理も容易になると考えられる。毎年 9 月 10 日を緊急 (9) 点 (10) 検の日とし、携帯品の点検を実施することとした。実演の動画を職員間で共有することで、伝達が円滑にでき、また、手引きは、初めて配属となる職員の

図 11 手引きの閲覧

教育ツールとしても使用できる。今後、研修等を重ね、手引きやマニュアルを改善・追加していき、より円滑に対応できるようにしたい。



引用文献

- [1] 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
- [2] 全国家畜衛生職員会報第 167 号

6 山羊の肝蛭症の 1 例

家畜保健衛生所 田中知未 葛城肅仁

はじめに

肝蛭症は、主に反芻類の胆管に肝蛭が寄生することにより引き起こされ、多くの場合、症状を示さず慢性経過をたどる疾病であるが、消瘦、貧血、食欲減退、繁殖障害、泌乳量の低下等を呈し、経済的損失を与えることがある。最盛期には牛の感染率が 80%を超えた地域があったが、1990 年以降、駆虫薬の普及や水田の土地改良等により、国内における家畜の肝蛭症は激減している [1]。

今回、県内の山羊飼養農家にて肝蛭症が発生したので概要を報告する。

発生概要

平成 29 年 5 月 3 日、成山羊 5 頭を飼養する農家で、1 頭が歩様蹣跚を呈した後、用水路に転落し死亡した。同居山羊には異常はみられなかった。

当該農場では、山羊は水田の畦畔にて定置放牧されており、用水路の水を飲んでいて、水田は減農薬農法を取り入れていた。また、周辺でシカが多く出没することから、放牧場内への侵入防止のための金属柵が設置されていた。

I 死亡山羊の病性鑑定

材料・方法

1. 病理解剖

死亡山羊（ザーネン種、4 歳、雌）を常法により解剖した（図 1）。

2. 病理組織検査

病理解剖時に採材した脳および主要臓器を 10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、常法によりパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を実施した。

3. 細菌検査

病理解剖時に採材した脳および主要臓器を 5%羊血液寒天培地、チョコレート寒天培地用い、常法により培養した。

4. 寄生虫検査

病理解剖時に採材した直腸便を用い、浮遊法および沈殿法を実施した。

結果

1. 剖検所見

肝臓は辺縁部が退色しており、胆管は拡張し、胆管および胆嚢壁は肥厚していた（図 2）。管腔には褐色を帯びた粘稠液が大量に貯留しており、長径約 4 cm の肝蛭が多数認められた（図 3）。肝蛭は肥厚した胆嚢内や肝臓の断面にも認められた。また、気管および気管支内には泡沫性の液体が充満していた。

2. 病理組織検査

肝臓に肝蛭の虫体を容れた虫道が多数認められた（図 4）。虫道周囲には出血を伴い、好酸球を主体とする重度の細胞浸潤および線維組織の増生が認められた（図

5)。また、虫体では腸管、卵巣および精巣等の内部構造や皮棘が観察された（図 6）。小葉間胆管周囲には好酸球を主体とする細胞浸潤および線維組織の増生が認められ、線維化巣内には小胆管の増生が軽度に認められた（図 7）。一部の胆管では内腔に好酸球が浸潤していた。胆管周囲に増生した線維組織は小葉内に浸潤し、類洞には好酸球が浸潤していた。肺では肺胞、気管支腔内に漿液が貯留しており、肺胞内に好中球が軽度に浸潤していた。また、肺小葉間結合組織の肥厚が認められた（図 8）。

3. 細菌検査

有意な菌は検出されなかった。

4. 寄生虫検査

浮遊法にて線虫卵（6, 200 epg）が検出された。

II 肝蛭の遺伝子解析

材料・方法

死亡山羊より検出された肝蛭について、ミトコンドリア由来酵素である NADH 脱水素酵素サブユニット 1 遺伝子（ND1）の配列を決定し、BLAST 解析にて既知の配列との相同性検索を実施した。肝蛭の DNA は QIAamp DNA Kit を用いて抽出した。PCR のプライマーの塩基配列は Itagaki ら [2] の報告に従った。

結果

相同性検索の結果、死亡山羊より検出された肝蛭の ND1 配列は、*Fasciola hepatica*（KR422396）と 99%一致した。

III 同居山羊検査

材料・方法

山羊の放牧場に立入し、死亡山羊の病性鑑定後に導入した 2 頭を含む 6 頭の同居山羊の血液と糞便を採材した。採材した血液を用いて、血液生化学検査およびゲル内沈降反応による肝蛭の抗体検査を実施した。また、糞便を用いて、沈殿法による肝蛭の虫卵検査および ELISA（*Fasciola hepatica* ELISA キット）による肝蛭の抗原検査を実施した。

結果

平成 24 年に導入した山羊 1 頭で血清抗体および糞便抗原が陽性となった。また平成 28 年に導入した山羊 1 頭で血清抗体が陽性となった。いずれの山羊も糞便中に肝蛭の虫卵はみられなかった（表 1）。血液生化学検査では、血清抗体および糞便抗原が陽性となった山羊（No. 1）で γ -GTP の上昇がみられた。また、放牧場に立入した際に、用水路内に肝蛭の中間宿主であるヒメモノアラガイの生息を確認した（図 9）。

表 1 同居山羊検査の結果について

材料	山羊 No.	1	2	3	4	5	6
	導入年（平成）	24	28	28	28	29	29
血清	抗体検査	+	—	+	—	—	—
	虫卵検査	—	—	—	—	—	—
糞便	抗原検査	+	—	—	—	—	—



図 1 死亡山羊の外貌

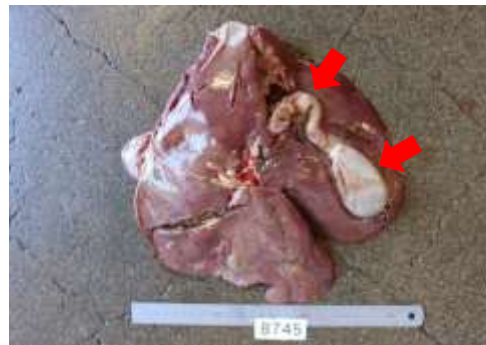


図 2 胆管の拡張、胆管および胆嚢壁の肥厚



図 3 胆管および胆嚢から検出された肝蛭

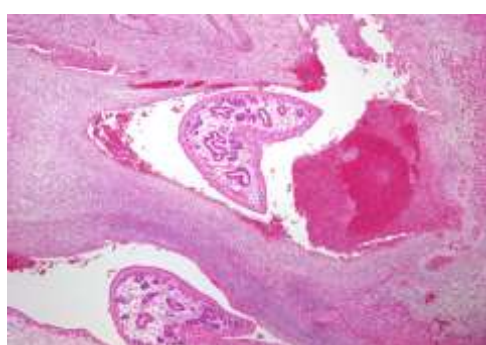


図 4 肺（HE 染色×40）虫体を容れた虫道

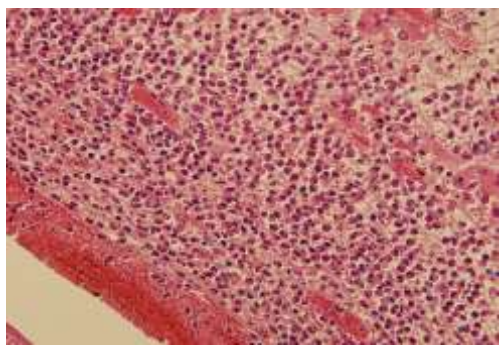


図 5 肝臓（HE 染色×400）

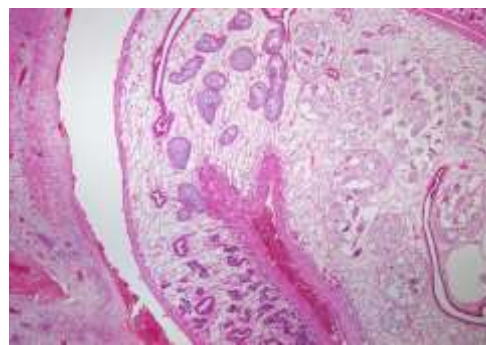


図 6 肝臓（HE 染色×40）

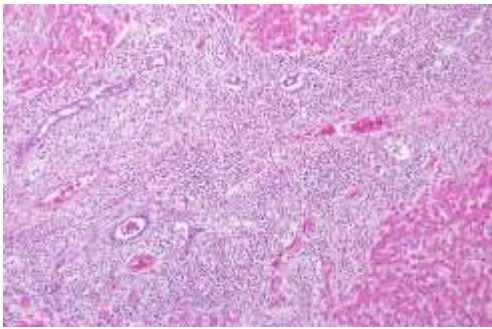


図 7 肝臓 (HE 染色×100)

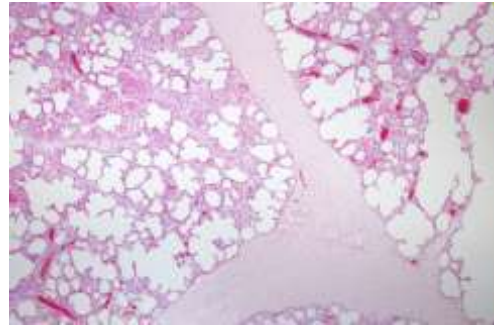


図 8 肺 (HE 染色×100)



図 9 用水路でみられたヒメモノアラガイ
(長径 0.3～0.5 cm)

IV 県内の汚染状況調査

材料・方法

県内牛飼養農家 45 戸で採材した 704 頭分の血清（平成 25 年度から平成 29 年度の 5 条検査の余剰検体）および県内山羊飼養農家 3 戸で採材した 8 頭分の糞便（平成 29 年度の病性鑑定の余剰検体）を用い、血清抗体検査および糞便の虫卵検査、抗原検査を実施した。

結果

牛血清を用いた抗体検査では 1 戸 4 頭で陽性となった。山羊の糞便を用いた虫卵検査および抗原検査の結果は全て陰性であった。

血清抗体が陽性となった牛飼養農場に立入し、牛舎横の水田跡で放牧していることや、放牧場にヒメモノアラガイが生息していることを確認した。また、飼養牛 6 頭分の糞便を採材し、虫卵検査および抗原検査を実施した結果、2 頭の糞便より虫卵が検出され（図 10）、虫卵が検出された 2 頭を含む 4 頭で抗原陽性となった。



図 10 糞便中の肝蛭卵

考察

死亡山羊の病性鑑定の結果、山羊は溺水により死亡したものと考えられた。また、肝蛭の重度寄生と線維化を伴う好酸球性肝炎が認められたことにより、本症例を山羊の肝蛭症と診断した。同居山羊検査で肝蛭の寄生が示唆されたことや、放牧場の用水路内に肝蛭の中間宿主であるヒメモノアラガイが確認されたことから、放牧場で肝蛭の生活環が成立し、山羊への感染を繰り返していたことが明らかとなった。肝蛭は野生動物と家畜の間で相互伝播することが知られており [3]、当該放牧場の周囲に野生のシカが多くみられていることから、山羊を導入する前に肝蛭の生活環が成立していた可能性がある。

日本に分布している肝蛭の学名は未確定で『日本産肝蛭』と総称されている。日本産肝蛭は形態的に変位幅が大きく多様であるが、DNA による遺伝子型から、*F. hepatica* に類似する虫体（遺伝子型 Fsp1）と *F. gigantica* に類似する虫体（遺伝子型 Fsp2）が識別されている [4] [5]。今回、死亡山羊から検出された肝蛭は遺伝子解析の結果、*F. hepatica* に類似する虫体（遺伝子型 Fsp1）であることが判明し、既知の国内分布状況 [2] に一致した（図 11）。

肝蛭に感染していても、糞便中に虫卵が検出されない場合があり、この原因として、肝蛭が未成熟であることや寄生数が少ないことなどが知られている。これは、糞便の虫卵検査のみでは肝蛭に感染した家畜の摘発が不十分であることを意味する。今回、死亡山羊の解剖時に、肝臓から多数の肝蛭が検出されたにもかかわらず、直腸便を用いた寄生虫検査で肝蛭の虫卵が検出されなかった。

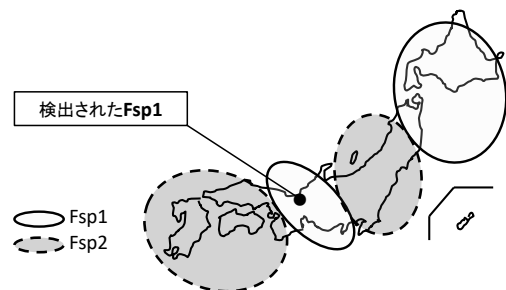


図 11 肝蛭の遺伝子型の国内分布状況

同居山羊の検査では、虫卵検査に加え、血清抗体検査および糞便抗原検査を実施し、いずれの山羊からも虫卵は検出されなかったが、6 頭中 2 頭で、血清抗体および糞便抗原の両方もしくは血清抗体のみが陽性となった。これらの結果から、糞便の虫卵検査結果のみで肝蛭の感染の有無を判断することは困難であり、感染家畜の摘発には、血清抗体検査や糞便抗原検査等を併せて実施することが必要性であると言える。

今回、余剰検体を用いた県内の汚染状況調査において、牛飼養農家 1 戸で肝蛭の汚染が確認された。当該農場の放牧場には以前よりヒメモノアラガイの生息が確認されており、継続的に牛に感染していたと考えられた。肝蛭の予防として中間宿主貝の駆除は現実的ではなく、給与する稲わらを 4 ヶ月以上保存することや、定期的な駆虫薬の投与が重要となる [4]。しかし、肝蛭に感染した家畜は症状を示さず、慢性経過をたどる傾向にあるため、肝蛭に汚染された農場においても、徹底した予防が行われないことが多い。今後、無農薬・減農薬農法等の環境保全を重視した農法の振興により、環境中に中間宿主貝が保持され、シカ等の野生動物によって肝蛭の汚染地域が拡大することが懸念される。したがって、家畜飼養者の意識向上のためにも、日頃の衛生指導の中で、肝蛭症の予防法について周知する必要があると考える。

引用文献

- [1] Okajima J, Shibata K, Takahashi E, Nagafuchi T, Okajima K, Nonaka N: Current status and its epidemiological consideration of *Fasciola* and *Eurytrema* infections in beef cattle of Japan. Vet Med Sci, 78, 785-790 (2016)
- [2] Itagaki T, Kikawa M, Sakaguchi K, Shimo J, Terasaki K, Shibahara T, Fukuda K: Genetic characterization of parthenogenic *Fasciola* sp. in Japan on the basis of the sequences of ribosomal and mitochondrial DNA. Parasitology, 131, 679-685 (2005)
- [3] 関まどか: 家畜・野生動物における肝蛭寄生バイオマーカーを用いた血清診断法の開発とその応用. 岩獣会報, 42, 2, 51-55 (2016)
- [4] 石井俊雄: 改訂 獣医寄生虫学・寄生虫病学 2 蠕虫他. 183-202
- [5] Madoka I, Noriyuki I, Tadashi I: DNA Types of Aspermic *Fasciola* Species in Japan. J. Vet. Med. Sci, 72, 10, 1371-1374 (2010)

7 県内で発生したロタウイルス C による成牛の集団下痢症と疫学的考察

家畜保健衛生所 岡田真紀 葛城肅仁

はじめに

ロタウイルス (RV) は、A～G までのウイルス種が知られているが、牛から検出される RV は A、B および C の 3 種である [1]。RVA は主に子牛に下痢を起こし、RVB および RVC は主に成牛に下痢を起こす [1]。RVC による下痢症の報告は近年増えているが [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9]、疫学的情報に乏しく、ウイルス分離の報告は少ない [2, 9]。県内の RVC による下痢症を平成 25、26 年に 2 例発生を確認している [7]。今回、平成 29 年 3 月と 6 月に同市内の二酪農家で発生した RVC による成牛の集団下痢症と、併せて過去の発生を加えた 4 事例について疫学的調査を行ったので、その概要を報告する。

発生概要

A 農場は繋飼い牛舎で搾乳牛 30 頭と子牛 4 頭を飼養する酪農家で、平成 29 年 3 月 6 日に搾乳牛 8 頭が下痢を発症し、その後 1 週間で 14 頭に拡大した。下痢発生 1 週間前に県外から未經産牛を 2 頭導入していた。下痢発症牛には泥状から水様性の下痢、食欲不振および乳量低下が認められた。また、下痢を発症していない牛 9 頭にも食欲不振および乳量低下が認められた (乳量低下牛)。未經産導入牛 (導入牛)、乾乳牛および子牛は下痢を発症しなかった。

B 農場は繋飼い牛舎で搾乳牛 40 頭を飼養する酪農家で、平成 29 年 6 月 2 日に数頭が下痢を発症し、その後 1 週間で約 10 頭に拡大した。下痢発生 10 日前に県外より未經産牛を 2 頭導入していた。下痢発症牛の症状は A 農場と同様であり、導入牛および泌乳量の少ない牛は下痢を発症しなかった。なお、B 農場は A 農場と同じ市内にあり直線で約 4.8 km 離れていた。

二農場の出荷乳量は下痢発生 2、3 日後から低下した (図 1)。A 農場では下痢未発症の牛にも乳量低下を認め、その内 1 頭は泌乳停止となったため乳量低下が著しく、約 20 日程度継続した。一方 B 農場では通常の乳量より 2 割程度減少したが、7 日間程度で回復した。

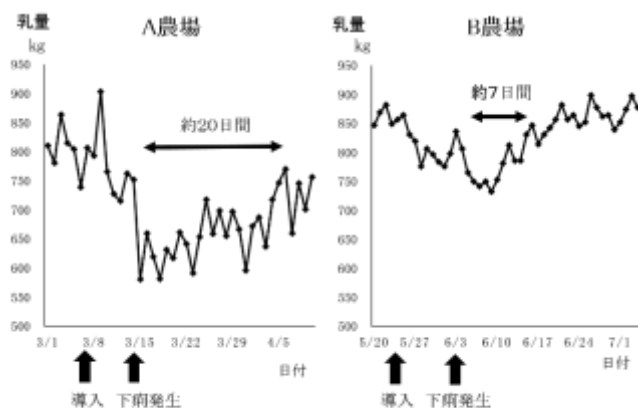


図1 A農場およびB農場の出荷乳量の推移

材料および方法材料として

A 農場の下痢発症牛 6 頭、下痢未発症牛である乳量低下牛 8 頭、導入牛 2 頭、乾乳牛 1 頭および子牛 2 頭の糞便およびペア血清を、B 農場の下痢発症牛 6 頭と導入牛 2 頭の糞便およびペア血清を用いた（表 1）。

1. ウイルス検査

遺伝子検査：糞便乳剤より抽出した RNA を用い RVC、RVB、牛コロナウイルス（BCV）、牛トロウイルス（BoTV）は Fukuda らの報告 [11] に準じて Multiplex RT-PCR を実施した。牛ウ

イルス性下痢ウイルス（BVDV）は Vilcek らの報告 [12] に基づき RT-PCR を実施した。

RVA 簡易検査：市販の簡易キット（ディップスティック栄研ロタ）を用いた。

血清抗体検査：RVA および RVC は間接蛍光抗体法（IFA）で行い、BoTV、BVDV1 および BVDV2 は中和試験、BCV は血球凝集抑制試験（HI）を実施した。

ウイルス分離：20%糞便乳剤をトリプシン（100 μ g/ml）処理後、MA104 細胞に接種し、37℃4 日間回転培養し、盲継代した。分離培養液より RNA を抽出し、RVC、RVB、BCV、BoTV [11]、BVDV [12]、哺乳類オルソレオウイルス [13]、牛エンテロウイルス [14] について RT-PCR を実施した。

2. 寄生虫検査

寄生虫検査は浮遊法により虫卵およびコクシジウムオーシスとの有無を確認した。

結果

1. ウイルス検査

遺伝子検査：A 農場の下痢発症牛 6 頭、乳量低下牛 8 頭、導入牛 2 頭の糞便および B 農場の下痢発症牛 6 頭の糞便から RVC 特異遺伝子を検出した（表 2, 3）。その他のウイルスは検出されなかった。

RVA 簡易検査：A 農場の子牛 1 頭のみ陽性だった。

血清抗体検査：A 農場では 19 頭中 13 頭、B 農場では 8 頭中 6 頭のポスト血清で RVC 抗体上昇が認められ、その他のウイルスに有意な抗体の上昇は認められなかった。A 農場の導入牛 1 頭および B 農場の導入牛 2 頭はプレ血清で高い RVC 抗体価を示した（表 4, 5）。

表 1 材料：糞便およびペア血清

		頭数
A農場	下痢発症牛	6
	乳量低下牛	8
	乾乳牛	1
	導入牛	2
	子牛	2
	合計	19
B農場	下痢発症牛	6
	導入牛	2
	合計	8

表2 A農場 糞便の遺伝子検査結果

	No.	RVC	BCV	RVB	BoTV	BVDV	RVA
下痢発症牛	1	+	-	-	-	-	-
	2	+	-	-	-	-	-
	3	+	-	-	-	-	-
	4	+	-	-	-	-	NT
	5	+	-	-	-	-	NT
	6	+	-	-	-	-	NT
下痢未発症	7	+	-	-	-	-	NT
	8	+	-	-	-	-	NT
	9	+	-	-	-	-	NT
	10	+	-	-	-	-	NT
	11	+	-	-	-	-	NT
	12	+	-	-	-	-	NT
	13	+	-	-	-	-	NT
	14	+	-	-	-	-	NT
	乾乳牛	-	-	-	-	-	NT
	16	+	-	-	-	-	NT
	導入牛	17	+	-	-	-	NT
	18	-	-	-	-	-	+
	子牛	19	-	-	-	-	-

表3 B農場 糞便の遺伝子検査結果

	No.	RVC	RVB	BCV	BoTV	BVDV
下痢発症牛	1	+	—	—	—	—
	2	+	—	—	—	—
	3	+	—	—	—	—
	4	+	—	—	—	—
	5	+	—	—	—	—
	6	+	—	—	—	—

表4 A農場血清抗体検査

		RVC		RVA		BCV		BVDV1		BVDV2		BoTV		
		No.	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post
下痢発症牛	1	<10	640	320	640	≥640	≥640	<2	<2	<2	<2	64	64	
	2	<10	320	640	640	≥640	≥640	<2	<2	<2	<2	128	64	
	3	<10	≥1280	320	640	≥640	≥640	<2	<2	<2	<2	64	64	
	4	<10	≥1280	NT	NT	≥640	≥640	<2	<2	<2	<2	128	32	
	5	<10	≥1280	NT	NT	≥640	≥640	<2	<2	<2	<2	128	128	
	6	<10	≥1280	NT	NT	≥640	≥640	<2	<2	<2	<2	128	128	
下痢未発症 乳量低下牛	7	<10	160	NT	NT	≥640	≥640	<2	<2	<2	<2	64	64	
	8	<10	640	NT	NT	160	≥640	<2	<2	2	2	32	32	
	9	<10	320	NT	NT	≥640	≥640	<2	<2	2	2	64	32	
	10	<10	160	NT	NT	≥640	≥640	≥256	≥256	≥256	≥256	128	32	
	11	160	320	NT	NT	NT	≥640	<2	<2	<2	<2	≥256	64	
	12	<10	320	NT	NT	≥640	≥640	<2	<2	<2	<2	128	128	
	13	320	640	640	320	≥640	≥640	<2	<2	<2	<2	≥256	64	
	14	320	320	640	320	≥640	≥640	<2	<2	<2	<2	128	128	
	乾乳	15	<10	160	NT	NT	≥640	≥640	<2	<2	16	16	≥256	32
	導入	16	40	320	640	640	≥640	≥640	≥256	≥256	≥256	≥256	32	32
	17	320	320	640	640	≥640	≥640	8	8	8	8	16	16	
	子牛	18	<10	<10	160	320	≥640	≥640	128	128	≥256	≥256	128	128
	19	<10	<10	320	320	≥640	≥640	<2	<2	8	2	64	64	

表5 B農場血清抗体検査

		IFA				中和試験						HI	
		RVC		RVA		BoTV		BVD1		BVD2		BCV	
No.		pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post
下痢発症牛	1	40	320	320	320	32	32	<2	<2	<2	<2	≥640	≥640
	2	<10	320	80	160	64	128	<2	<2	<2	<2	≥640	≥640
	3	40	≥1280	320	320	64	64	<2	<2	<2	<2	≥640	≥640
	4	NT	320	NT	NT	NT	64	NT	<2	NT	<2	NT	≥640
	5	40	320	320	160	≥256	128	≥256	128	16	8	≥640	≥640
	6	80	640	320	320	≥256	≥256	≥256	≥256	16	16	≥640	≥640
導入牛	7	320	640	640	320	64	64	≥256	64	≥256	64	≥640	≥640
	8	160	160	320	320	≥256	128	≥256	128	16	16	≥640	≥640

ウイルス分離：B農場の6検体中1検体の5代目で細胞変性効果を認めた（写真1）。分離培養液より抽出したRNAについてRT-PCRを実施したところRVC特異遺伝子を検出した。その他のウイルスは検出されなかった。しかし、安定したRVCの増殖に至らなかった。

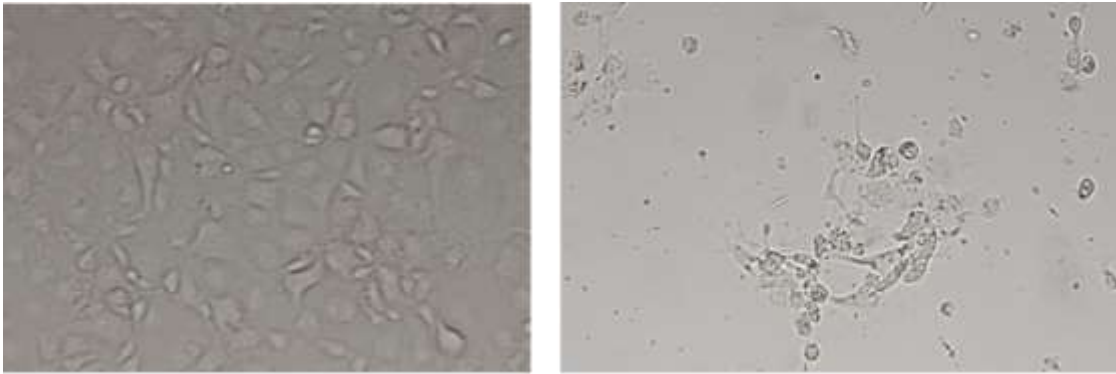


写真 1 MA104 細胞を用いたウイルス分離（100 倍）

左：陰性対照 右：分離 5 代目で CPE を確認

2. 寄生虫検査

寄生虫卵、コクシジウムオーシストは検出されなかった。

まとめ

以上の結果から、二農場とも RVC による成牛の集団下痢症と診断し、A 農場では下痢を発症しなかった牛についても RVC 感染により乳量低下を引き起こしたと診断した。

疫学的関連調査

概要

県内では過去に①平成 25 年に C 農場と②平成 26 年に A 農場で RVC による集団下痢症が発生しており、③平成 29 年 A 農場と④平成 29 年 B 農場の事例を加えて 4 例が確認されている（表 6）。A 農場と 4 例目の B 農場は直線で約 4.8km 離れた同じ市内にあり、1 例目の C 農場は A 農場と約 4.9km、B 農場と約 4.1km 離れた隣市にあり、全ての農場は 5km 以内に存在することが分かった（図 2）。なお、①、③、④例目は直前に県外から牛を導入しており、抗体検査の結果より導入牛が農場へ RVC を持ち込んだ可能性が示唆されている。これら 4 例について疫学的関連調査を行った。

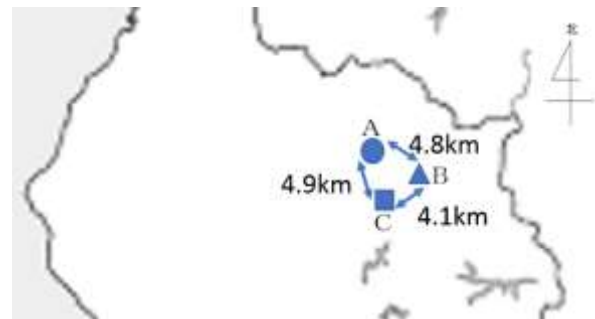


図 2 発生農家の位置関係

●A 農家 ▲B 農家 ■C 農家

材料および方法

材料は各事例の糞便 3 検体ずつとし、3 例目は導入牛の糞便 1 検体を含む 3 検体とした（表 6）。方法は糞便より抽出した RNA を用いて、RVC の VP6、VP7 および VP4 遺伝子についてダイレクトシーケンスによって塩基配列を決定し、相同性を比較した。また、既報の RVC 株の塩基配列を加えて系統樹解析を実施した。

表6 疫学的関連調査

発生年月	農場	疫学情報	材料
①H25年5月	C	直前に県外から牛を導入	糞便3検体
②H26年3月	A	不明	糞便3検体
③H29年3月	A	直前に県外から牛を導入	糞便3検体(導入牛1検体)
④H29年6月	B	直前に県外から牛を導入 A農場と同じ市内	糞便3検体

結果

各事例で採取した 3 検体は全て遺伝子が完全に一致し、1 事例で 1 株の RVC が侵入していたことが明らかとなった。各事例で得られた株の遺伝子配列を比較した結果をまとめ（表 7, 8, 9）、併せて各株の分子系統樹解析を図に示した（図 3, 4, 5）。各株はこれまでに牛 RVC 株が属する G2P [3] 遺伝子型に分類され、各株の比較で相同性が最も低かった株は、VP6 では③の株、VP7 では④の株、VP4 では①の株であった。また VP4 では②③の株は genogroup I に、①④の株は genogroup II に分類された。これらの結果から、4 株の相同性は低く、遺伝学的に異なる可能性が示唆された。

表7 各事例間のVP6遺伝子に関する相同性[%]

	①C農場 H25	②A農場 H26	③A農場 H29	④B農場 H29
①C農場 H25		99.0	94.8	99.4
②A農場 H26			94.5	98.5
③A農場 H29				94.6
④B農場 H29				

表8 各事例間のVP7遺伝子に関する相同性[%]

	①C農場 H25	②A農場 H26	③A農場 H29	④B農場 H29
①C農場 H25		98.5	96.4	92.3
②A農場 H26			95.3	91.6
③A農場 H29				91.6
④B農場 H29				

表9 各事例間のVP4遺伝子に関する相同性[%]

	①C農場 H25	②A農場 H26	③A農場 H29	④B農場 H29
①C農場 H25		77.1	76.7	95.3
②A農場 H26			96.5	77.2
③A農場 H29				77.2
④B農場 H29				

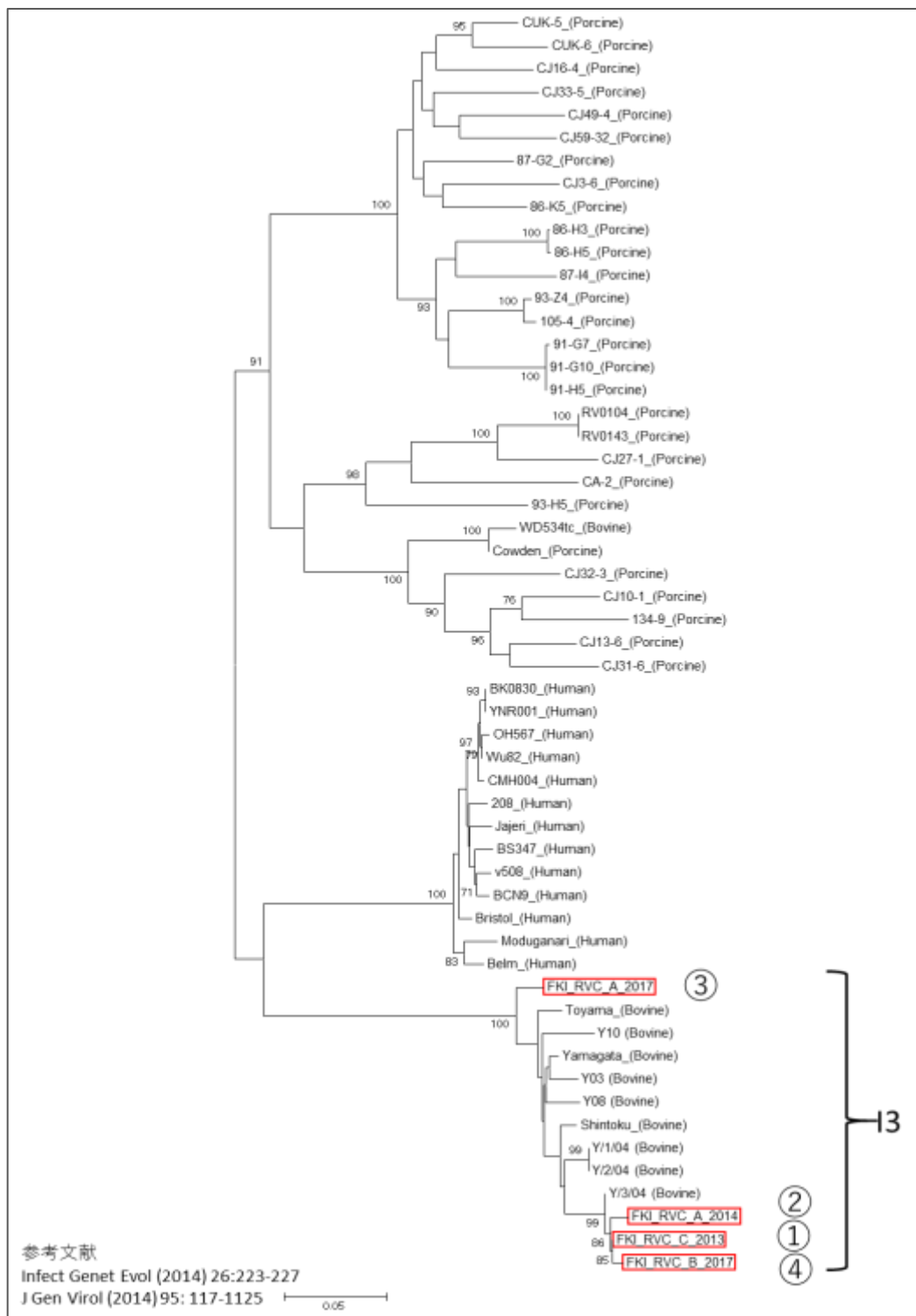


図 3 VP6 の分子系統樹

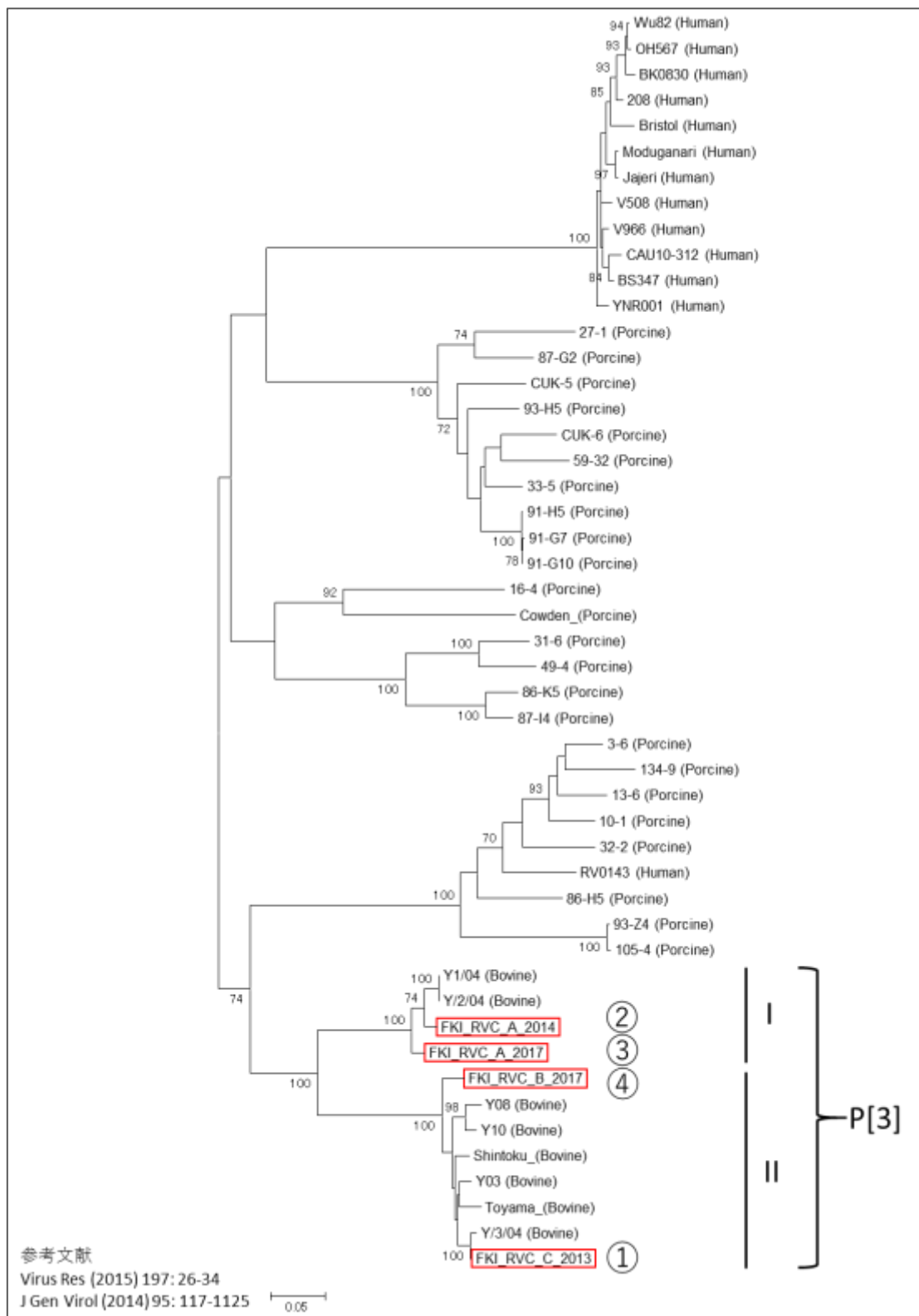


図 4 VP7 の分子系統樹

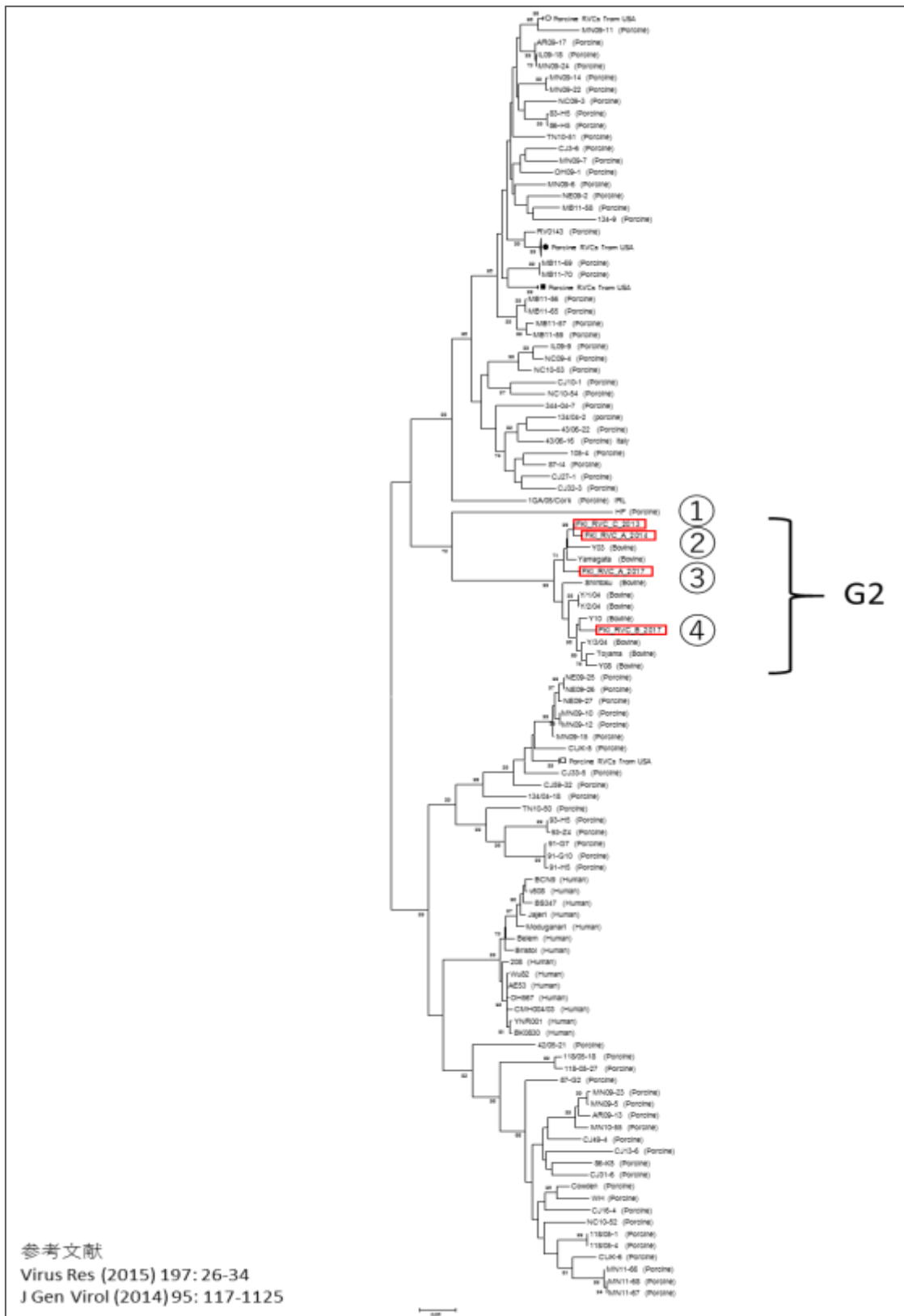


図 5 VP4 の分子系統樹

考察

平成 29 年 3 月と 6 月に同じ市内の二酪農家で成牛の集団下痢症が発生し、病性鑑定の結果から RVC による集団下痢症と診断した。乳量低下による減収は A 農場で約 18 万円、B 農場で 4 万 6 千円と試算（福井県農業共済組合）され、A 農場では下痢未発症の牛にも RVC 感染による乳量低下が広がったため経済的損失が大きかった。また、A 農場では RVC による集団下痢症の発生は 2 回目であり、何らかの対策が必要と考えられた。なお RVC は分離が難しいとされており、分離の報告はほとんどない [2, 9]。今回 B 農場の 1 検体から分離の可能性がある、安定的な増殖に向けて分離を継続中である。

疫学的関連調査の結果では、県内で発生した RVC による集団下痢症の事例は疫学的関連が低く、血清抗体検査の結果からも、導入牛がウイルスを農場内に持ち込んだ可能性が高いと考えられた。対策として、県外導入牛は下痢などの異常がなくても一定期間隔離することが非常に重要であることが再確認された。しかしながら隔離スペースのない農場も多く、個人での対策には限界がある。他県では廃業した鶏舎を改築した共同隔離牛舎を設置し、伝染性疾患のまん延を予防する取り組みが報告されており [10]、当県でも参考になると考えられる。導入牛の隔離は、口蹄疫などその他の伝染性疾患の侵入対策としても有効であることから、引き続き農家に対して指導をしていく。

謝辞

遺伝子解析を実施していただいた動物衛生研究部門、鈴木亨先生に深謝いたします。

引用文献

- [1] 牛病学 第三版 近代出版 237-239
- [2] Tsunemitsu H, Saif LJ : J Clin Microbiol, 29, 2609-2613(1991)
- [3] Mawatari T et al. : J Vet Med Sci, 66(7), 887-890(2004)
- [4] 宮本剛志ら：平成 23 年度富山県業績発表会抄録
- [5] 佐藤圭介ら：平成 23 年度新潟県業績発表会抄録
- [6] 宮本純子ら：平成 24 年香川県業績発表会抄録
- [7] 葛城肅仁ら：平成 25 年福井県業績発表会抄録
- [8] 大竹祥紘ら：平成 28 年栃木県業績発表会抄録
- [9] 中山恵：第 57 回全国業績発表会抄録
- [10] 福留信司ら：平成 21 年新潟県業績発表会抄録
- [11] Fukuda M et al. : Arch Virol, 157, 1063-1069(2012)
- [12] Vilcek S, et al. : Arch Virol, 136. 309-323(1994)
- [13] Thomas P. Leary et al. : J. Clin. Microbiol, 40, 1368-1375(2002)
- [14] Miquel A J, et al. : Appl Environ Microbiol, 71(7). 3536-3543(2005)

8 県内家畜より分離した *Trueperella pyogenes* の性状調査

家畜保健衛生所 武野侍那子 葛城肅仁

はじめに

Trueperella pyogenes (Tp) は、グラム陽性、非運動性、無芽胞の短桿菌で、主に反芻獣や豚などの家畜で肺炎、関節炎、乳房炎、肝膿瘍や子宮内膜炎などの生産性を低下させる疾病に関与する日和見感染症の病原体である。Tp は、動物の上部気道や泌尿生殖器、消化管粘膜に常在しており、物理的な傷害や他の微生物の感染後に二次的に感染し、化膿性病巣を形成する [1]。

近年、海外では獣医領域で分離された様々な株について、Tp の病原性因子として既知の、あるいは推定される因子である溶血性外毒素 pyolysin や宿主細胞への付着を促進する因子（ノイラミニダーゼ、コラーゲン結合蛋白および線毛）の保有状況などが調査されている [2-9]。Tp は家畜衛生分野において比較的分離される頻度の高い細菌であるものの、わが国の家畜由来株に関する報告はほとんどない [10]。そこで今回、本県の家畜由来株についてその性状を調査した。

材料

平成 22 年 3 月から 29 年 11 月までに、病性鑑定依頼のあった県内飼養家畜より分離した Tp 52 株を用いた。内訳は、乳用牛飼養農家 16 戸 39 株（肺炎 5 株、乳房炎 10 株、疣贅性心内膜炎 2 株、化膿性関節炎 3 株、膿瘍 8 株、子宮内膜炎 4 株、子宮蓄膿症 2 株、感染性死産 5 株）、肉用牛飼養農家 5 戸 6 株（肺炎 4 株、化膿性関節炎 1 株、膿瘍 1 株）、豚飼養農家 4 戸 7 株（肺炎 1 株、疣贅性心内膜炎 1 株、化膿性関節炎 3 株、膿瘍 2 株）で、様々な疾病の病変部位から Tp が分離された（図 1）。

供試菌株は、5%羊血液加トリプチケースソイ寒天培地で 37℃、5%CO₂ 条件下にて 48 時間まで培養した後、コロニー形態や溶血性、グラム染色、カタラーゼ試験、オキシダーゼ試験、簡易生化学性状検査（Api Coryne）により Tp と同定した。

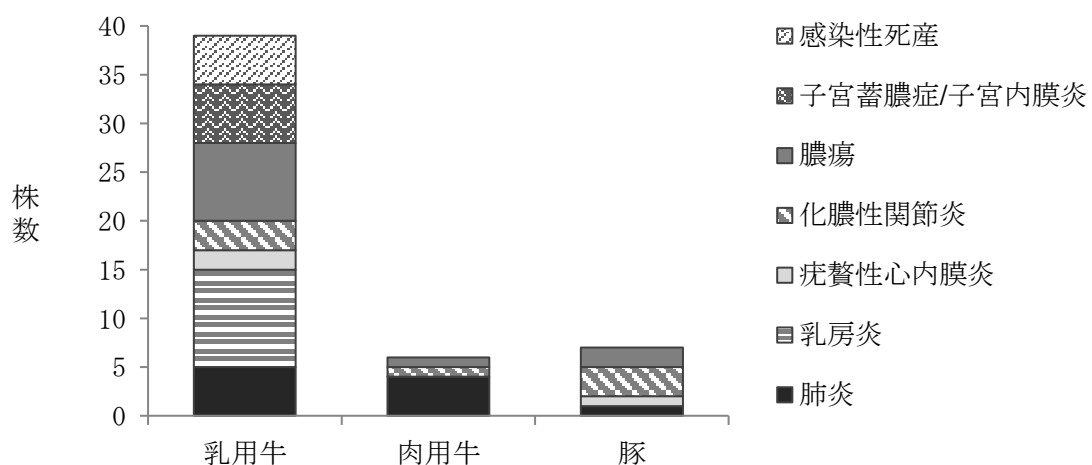


図 1 飼養家畜別の供試菌株数

方法

1) 病原性因子

簡易 DNA 抽出キット (InstaGene マトリックス) を用いてコロニーから DNA を抽出し、PCR 法で 4 つの病原性因子をコードする病原性関連遺伝子 (*plo*、*cbpA*、*nanH*、*nanP*、*fimA*、*fimC*、*fimE*および *fimG*) の検出を試みた (表 1) [1, 7]。

表 1 Tp の病原性因子

病原性因子 (病原性関連遺伝子)	
外毒素	pyolysin (<i>plo</i>)
細胞外マトリックス結合蛋白	コラーゲン結合蛋白 (<i>cbpA</i>)
	フィブリノゲン結合蛋白
	フィブロネクチン結合蛋白
細胞外酵素	Dnase
	ノイラミニダーゼ (<i>nanH</i> 、 <i>nanP</i>)
	プロテアーゼ
その他	上皮細胞への侵襲性
	マクロファージ内生存性
	バイオフィルム形成能
	線毛 (<i>fimA</i> 、 <i>fimC</i> 、 <i>fimE</i> 、 <i>fimG</i>)

2) 薬剤感受性

微量液体希釈法 [11, 12] でアンピシリン (ABPC)、セファゾリン (CEZ)、セフトオフル (CTF)、カナマイシン (KM)、タイロシン (TS)、チルミコシン (TMS)、オキシテトラサイクリン (OTC)、チアンフェニコール (TP)、エンロフロキサシン (ERFX) およびマルボフロキサシン (MBFX) の最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。

3) 分子疫学解析

県内に分布する Tp の多様性を調査するため、BOX-PCR 法 [7, 9] による分子疫学解析を行った。

結果

1) 病原性因子

病原性関連遺伝子 *plo*、*cbpA*、*nanH*、*nanP*、*fimA*、*fimC*、*fimE* および *fimG* の保有率は、それぞれ 100%、13.5%、63.5%、50%、100%、75%、88.5% および 19.2% であった。

同じ農家で分離された株であっても、保有する病原性関連遺伝子のパターンは様々であった（表 2）。また、由来となった疾病別の病原性関連遺伝子保有率には明確な差が認められなかった（表 3）。

表 2 農家別の病原性関連遺伝子保有パターン

保有する病原性関連遺伝子	農家別の分離株数												
	A	B	C	E	H	I	J	K	M	P	R	W*	X*
<i>plo</i> / <i>cbpA</i> / <i>nanH</i> / <i>nanP</i> / <i>fimA</i> / <i>fimC</i> / <i>fimE</i>					1				1				
<i>plo</i> / <i>cbpA</i> / <i>nanH</i> / <i>fimA</i> / <i>fimC</i> / <i>fimE</i>				1									
<i>plo</i> / <i>nanH</i> / <i>nanP</i> / <i>fimA</i> / <i>fimC</i> / <i>fimE</i> / <i>fimG</i>	2	1						1					
<i>plo</i> / <i>nanH</i> / <i>nanP</i> / <i>fimA</i> / <i>fimC</i> / <i>fimE</i>				1		1		1			1		2
<i>plo</i> / <i>nanH</i> / <i>nanP</i> / <i>fimA</i> / <i>fimE</i> / <i>fimG</i>		3											
<i>plo</i> / <i>nanH</i> / <i>nanP</i> / <i>fimA</i> / <i>fimC</i>						1							
<i>plo</i> / <i>nanH</i> / <i>nanP</i> / <i>fimA</i> / <i>fimE</i>				1					1				
<i>plo</i> / <i>nanH</i> / <i>fimA</i> / <i>fimC</i> / <i>fimE</i> / <i>fimG</i>							2						
<i>plo</i> / <i>nanH</i> / <i>fimA</i> / <i>fimC</i> / <i>fimE</i>			1					1		2			
<i>plo</i> / <i>nanH</i> / <i>fimA</i> / <i>fimE</i>		1										3	
<i>plo</i> / <i>nanP</i> / <i>fimA</i> / <i>fimC</i> / <i>fimE</i>	1					2							
<i>plo</i> / <i>nanP</i> / <i>fimA</i> / <i>fimE</i> / <i>fimG</i>	1												
<i>plo</i> / <i>fimA</i> / <i>fimC</i> / <i>fimE</i>				2	1		1		1		1		

*: 豚飼養農家

表 3 疾病別の病原性関連遺伝子保有率

疾病	株数	病原性関連遺伝子（単位：％）							
		<i>plo</i>	<i>cbpA</i>	<i>nanH</i>	<i>nanP</i>	<i>fimA</i>	<i>fimC</i>	<i>fimE</i>	<i>fimG</i>
肺炎	10	100	30	80	50	100	90	100	10
乳房炎	10	100	10	70	60	100	80	90	40
疣贅性心内膜炎	3	100	33.3	66.7	66.7	100	66.7	100	33.3
化膿性関節炎	7	100	14.3	71.4	42.9	100	71.4	100	14.3
膿瘍	11	100	9.1	81.8	54.5	100	81.8	81.8	18.2
子宮蓄膿症/ 子宮内膜炎	6	100	0	33.3	66.7	100	100	100	0
感染性死産	5	100	0	60	60	100	60	100	20

2) 薬剤感受性

各薬剤の 50%の菌株の発育を阻止した MIC (MIC_{50}) および 90%の菌株の発育を阻止した MIC (MIC_{90}) は、ABPC でともに $\leq 0.125\mu\text{g/mL}$ 、CEZ で $0.25\mu\text{g/mL}$ および $0.5\mu\text{g/mL}$ 、CTF でともに $1\mu\text{g/mL}$ 、KM でともに $2\mu\text{g/mL}$ 、TS でともに $\leq 0.125\mu\text{g/mL}$ 、TMS でともに $\leq 0.125\mu\text{g/mL}$ 、OTC で $8\mu\text{g/mL}$ および $16\mu\text{g/mL}$ 、TP でともに $1\mu\text{g/mL}$ 、ERFX でともに $1\mu\text{g/mL}$ 、MBFX でともに $1\mu\text{g/mL}$ であった。ほとんどの薬剤で MIC が低濃度に分布していたが、OTC の MIC は高濃度に分布し、大きく二峰性を示していた。また、1 株で KM の MIC が $64\mu\text{g/mL}$ 、別の 1 株で TS および TMS の MIC が $>128\mu\text{g/mL}$ であり、他の分離株に比べて高い値を示した (表 4)。

表 4 薬剤感受性試験の結果

薬剤	MIC ($\mu\text{g/mL}$)											MIC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	MIC_{90} ($\mu\text{g/mL}$)
	≤ 0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	>128		
ABPC	52											≤ 0.125	≤ 0.125
CEZ	4	34	14									0.25	0.5
CTF			15	37								1	1
KM					48	2	1			1		2	2
TS	51										1	≤ 0.125	≤ 0.125
TMS	51										1	≤ 0.125	≤ 0.125
OTC	1	16	2			2	6	24	1			8	16
TP			2	49		1						1	1
ERFX			20	32								1	1
MBFX				47	5							1	1

灰色:Tp 基準株 ATCC19411 の MIC [12]

ABPC:アンピシリン、CEZ:セファゾリン、CTF:セフトオフル、KM:カナマイシン、TS:タイロシン、TMS:チルミコシン、OTC:オキシテトラサイクリン、TP:チアンフェニコール、ERFX:エンロフロキサシン、MBFX:マルボフロキサシン

3) 分子疫学解析

電気泳動後のバンドパターンにより、38 タイプに分類した。このうち、2 株以上で一致していたバンドパターンは 10 タイプ (タイプ 1~10) であった (図 2)。

タイプ 2 の株が分離された農家 A と農家 C は地理的に距離が離れており、互いの交流はなかったが、その他のタイプはすべて同一農家内あるいは近隣の農家間で分離された株によって構成されていた (図 3)。

各タイプを構成する分離株の由来となった疾病は様々であったが、病原性関連遺伝子では、同じタイプ内に 1 つあるいは 2 つの差を認めたものの概ね一致していた。薬剤感受性では、ABPC、KM、TS および TMS の MIC はすべて一致しており、CEZ、CTF、TP、ERFX および MBFX の MIC は同一タイプ内で認められる差が 2 倍までであった。OTC の MIC は異なる農家に由来するタイプ 4 で 64 倍、同じ農家に由来するタイプ 10 で 32 倍の差を認めた (表 5)。

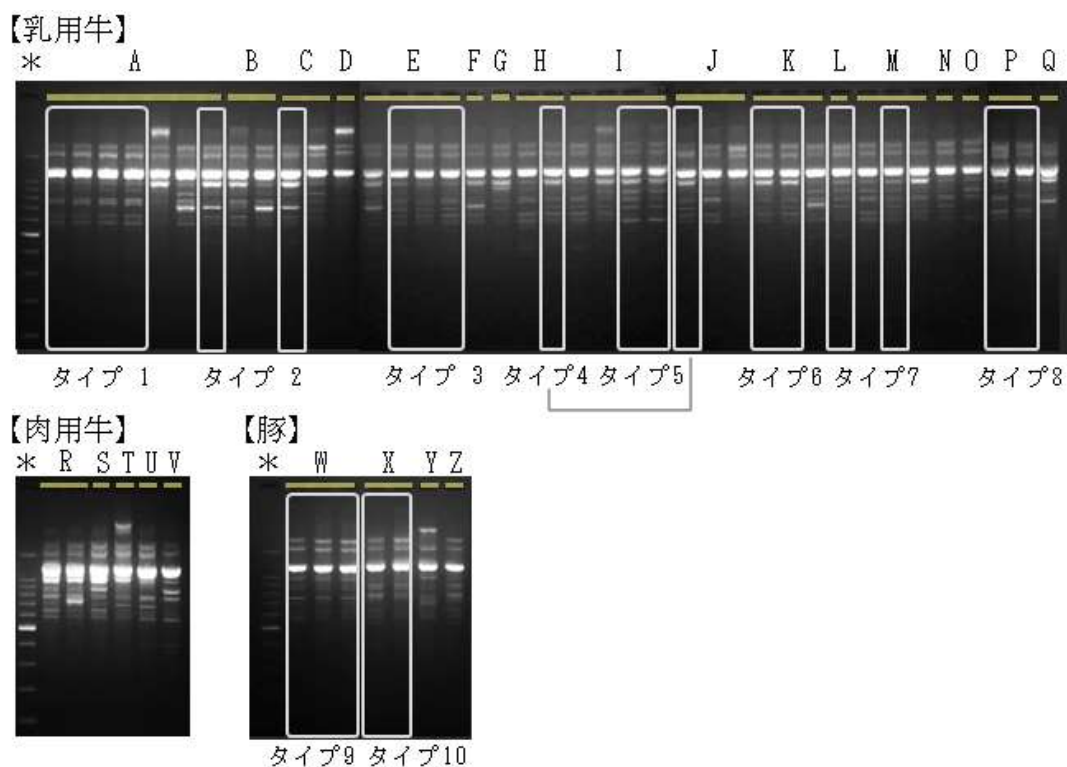


図 2 BOX-PCR 増幅産物の電気泳動写真

*:100bp DNA Ladder

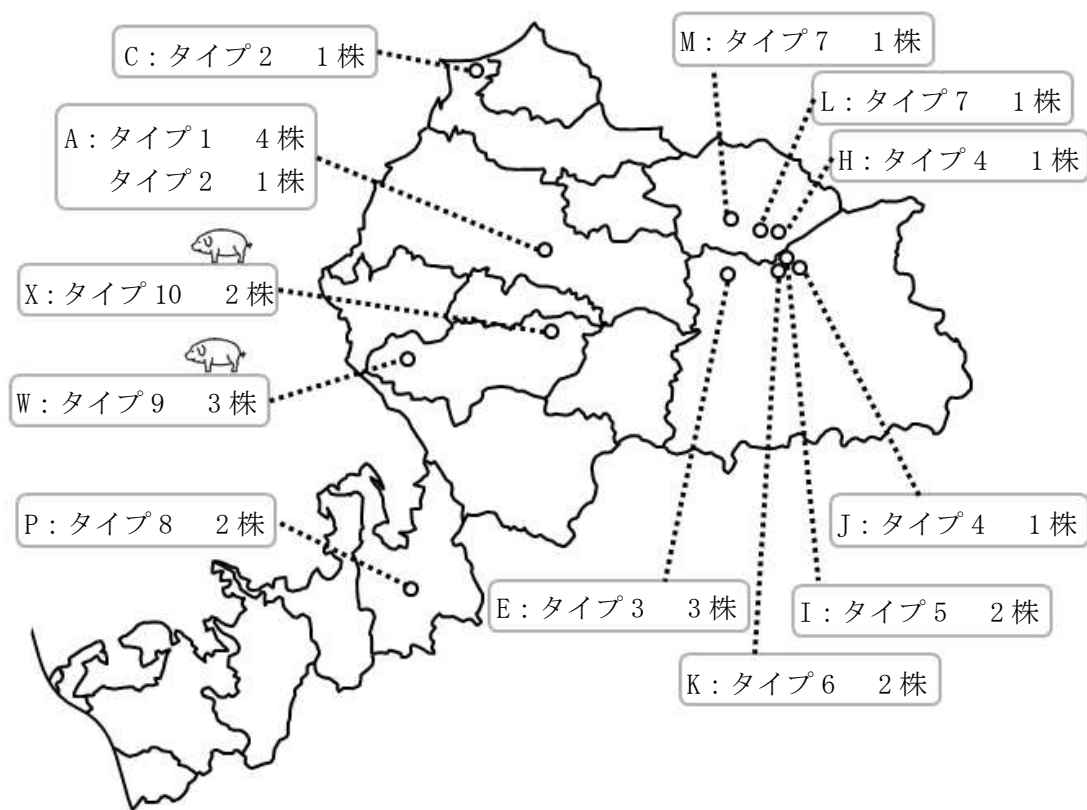


図 3 県内における各タイプの分布状況

:豚飼養農家

表 5 タイプ別の病原性関連遺伝子保有状況および薬剤感受性

タイプ	分離年	農家	病原性関連遺伝子	薬剤感受性 (μg/mL)					
				OTC	CEZ	CTF	TP	ERFX	MBFX
1	H22	A	<i>plo/nanH/nanP/fimA/fimC/fimE/fimG</i>	16	0.5	1	2	0.5	1
	H23	A	<i>plo/nanH/nanP/fimA/fimE/fimG</i>	16	0.25	1	2	1	1
	H23	A	<i>plo/nanH/nanP/fimA/fimE/fimG</i>	16	0.25	1	2	1	1
	H23	A	<i>plo/nanH/nanP/fimA/fimE/fimG</i>	16	0.25	1	2	1	1
2	H29	A	<i>plo/nanP/fimA/fimC/fimE</i>	16	0.5	1	2	0.5	1
	H29	C	<i>plo/nanH/fimA/fimC/fimE</i>	16	0.25	0.5	2	1	1
3	H27	E	<i>plo/nanH/nanP/fimA/fimE</i>	16	0.25	1	2	1	1
	H28	E	<i>plo/fimA/fimC/fimE</i>	16	0.25	1	2	1	1
	H29	E	<i>plo/fimA/fimC/fimE</i>	16	0.25	0.5	2	1	1
4	H25	H	<i>plo/fimA/fimC/fimE</i>	16	0.25	0.5	2	1	1
	H29	J	<i>plo/nanH/fimA/fimC/fimE/fimG</i>	0.25	0.5	0.5	2	1	1
5	H29	I	<i>plo/nanP/fimA/fimC/fimE</i>	0.25	0.25	1	2	1	1
	H29	I	<i>plo/nanP/fimA/fimC/fimE</i>	0.25	0.5	1	2	1	1
6	H29	K	<i>plo/nanH/fimA/fimC/fimE</i>	16	0.25	0.5	2	1	1
	H29	K	<i>plo/nanH/fimA/fimC/fimE</i>	16	≤0.125	0.5	2	0.5	1
7	H28	M	<i>plo/nanH/nanP/fimA/fimE</i>	0.25	0.5	1	2	1	1
	H29	L	<i>plo/nanP/fimA/fimC/fimE</i>	0.25	0.25	1	2	1	2
8	H29	P	<i>plo/nanH/fimA/fimC/fimE</i>	0.25	0.25	1	1	0.5	1
	H29	P	<i>plo/nanH/fimA/fimC/fimE</i>	0.25	0.25	1	2	0.5	1
9	H29	W*	<i>plo/nanH/fimA/fimE</i>	8	0.25	1	2	0.5	1
	H29	W*	<i>plo/nanH/fimA/fimE</i>	8	0.25	1	2	0.5	1
	H29	W*	<i>plo/nanH/fimA/fimE</i>	8	0.25	1	2	0.5	1
10	H27	X*	<i>plo/nanH/nanP/fimA/fimC/fimE</i>	8	0.25	0.5	2	0.5	1
	H27	X*	<i>plo/nanH/nanP/fimA/fimC/fimE</i>	0.25	0.25	0.5	2	0.5	1

*:豚飼養農家

OTC:オキシテトラサイクリン、CEZ:セファゾリン、CTF:セフトリオフル、TP:チアンフェニコール、ERFX:エンロフロキサシン、MBFX:マルボフロキサシン

まとめおよび考察

県内ではこれまで肺炎、関節炎、乳房炎、肝膿瘍や子宮内膜炎など様々な疾病から Tp を分離している。今回、県内家畜由来の 52 株についてその性状を調査した。

既報では Tp の病原性関連遺伝子保有率は、*plo* が 100%、*cbpA* が 6.8~100%、*nanH* が 15.2~100%、*nanP* が 43.8~100%、*fimA* が 76.4~100%、*fimC* が 58.3~88%、*fimE* が 72.2~98%、*fimG* が 5.6~75%である [2-9]。県内家畜由来株では、既報と同様にすべての株で *plo* と *fimA* が検出され、これらが病原性の発揮に重要な因子であると考えられた。供試菌株の由来となった疾病は様々であったが、それぞれに株数が少なかったことから、現段階では特定の

疾病に関与する病原性関連遺伝子を明らかにすることはできなかった。

薬剤感受性試験では、ほとんどの薬剤の MIC が低濃度に分布し、感受性を維持していると考えられた。しかし、Tp は膿瘍形成の進行やバイオフィルムの形成によって抗菌剤を用いた治療に反応しなくなるため、早期の治療が重要となる [1, 13-16]。また、多くの薬剤に感受性である一方、1 株で KM、別の 1 株で TS および TMS の MIC が高い値を示し、これらは耐性株であると考えられた。さらに、OTC に至っては半数以上の株で MIC が高濃度に分布し、耐性化が進んでいるものと考えられる。Tp の TS や OTC 耐性に関しては、耐性遺伝子の関与が報告されており [17-20]、常在菌である Tp が他の細菌へ耐性遺伝子の供給源となる可能性もあることから、今後さらなる調査が必要である。

分子疫学解析では、県内家畜由来株は 38 のタイプに分類され、遺伝的に多様な株が分布していることが明らかとなった。なかでも、2 株以上でバンドパターンが一致したタイプは、同一農家内あるいは近隣の農家間で分離された株によって構成されており、遺伝的に近縁な株が地域ごとに分布していた。さらに、これらのタイプは由来となった疾病が様々であったが、保有する病原性関連遺伝子および薬剤感受性が概ね一致していた。このことから、特定の病原性関連遺伝子の有無によって特定の疾病を発症するのではなく、農場内に常在している Tp が様々な疾病を引き起こし得るものと考えられた。

日和見感染症である Tp 感染症の予防には、宿主の健康状態を良好に維持すること、先行する病原体の感染および物理的な傷害（乳頭損傷、尾かじり）を防ぐことなど、日頃の飼養衛生管理が重要となる。今後、引続き農家巡回時の飼養衛生管理指導を徹底していくとともに、農場や疾病ごとにまとまった株を収集できるよう採材し、治療や予防の一助となるよう調査を継続したい。

引用文献

- [1] Jost, B. H. & Billington, S. J. (2005): Antonie Van Leeuwenhoek. 88, 87-102.
- [2] Ozturk, D., Turutoglu, H., Pehlivanoglu, F. et al. (2016): Israel J. Vet. Med. 71(3), 36-42.
- [3] Riseti, R. M., Zastempowska, E., Twaruzek, M. et al. (2017): Lett. Appl. Microbiol. 65(2), 125-132.
- [4] Rzewuska, M., Stefańska, I., Osińska, B. et al. (2012): Vet. Microbiol. 160, 69-76.
- [5] Rzewuska, M., Czopowicz, M., Gawryś, M. et al. (2016): Microb. pathog. 96, 35-41.
- [6] Santos, T. M. A., Caixeta, L. S., Machado, V. S. et al. (2010): Vet. Microbiol. 145, 84-89.
- [7] Silva, E., GaiVão, M., Leitão, S. et al. (2003): Vet. Microbiol. 21(7), 20-24.
- [8] Zastempowska, E. & Lassa, E. (2010): Vet. Microbiol. 161, 153-158.
- [9] Zhao, K., Tian, Y., Yue, B. et al. (2013): Arch. Microbiol. 60(2), 113-114.
- [10] 大石大樹. (2014): 第 56 回山口県家畜衛生業績発表会集録. 48-50.
- [11] 動物用抗菌剤研究会薬剤感受性試験法検討会. (2014): 動物抗菌会報. 36, 129-144.
- [12] de Boer, M., Heuer, C., Hussein, H. et al. (2015): J. Dairy Sci. 98, 4427-4438.
- [13] 東量三および竹内正太郎. (1977): 豚病学: 365-375.
- [14] Shalm, O. W., Carroll, E. J., Jain, N. C. et al. (1972): 牛の乳房炎. 275-277.
- [15] 十勝乳房炎協議会. (2014): MASTITIS CONTROL II, 29.
- [16] 農林水産省経営局. (2014): 家畜共済における抗菌性物質の使用指針.
- [17] Billington, S. J., Songer, J. G., Jost, H. B. (2013): Antimicrob. Agents Chemother. 46(5), 1281-1287.
- [18] Billington, S. J. & Jost, H. B. (2006): Antimicrob. Agents Chemother. 50(11), 3580-3587.
- [19] Jost, H. B., Field, A. C., Trinh, H. T. et al. (2003): Antimicrob. Agents Chemother. 47(11), 3519-3524.
- [20] Jost, H. B., Trinh, H. T., Songer, J. G. et al. (2003): Antimicrob. Agents Chemother. 48(3), 721-727.