

平成 26 年度

(第 59 回)

宮城県家畜保健衛生業績発表会集録

宮城県農林水産部畜産課

平成 26 年度宮城県家畜保健衛生業績発表会

開催月日 平成27年1月23日(金)
開催場所 宮城県庁 講堂
宮城県仙台市青葉区本町3丁目8番1号

審査員

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所病態研究領域
主任研究員 大崎 慎人

東北大学農学研究科応用生命科学専攻動物機能科学講座機能形態学分野
教授 麻生 久

宮城県農業農業共済組合連合会 家畜診療研修所
診療指導課長補佐 村山 勇雄

宮城県畜産試験場
場長 沼邊 孝

宮城県農林水産部畜産課
監視伝染病対策専門監 柴崎 卓也

目 次

【第 1 部】

- 1 「茂洋の郷」をスローガンとした全国和牛能力共進会宮城大会に向けた石巻地域肉用牛振興戦略 ...1
東部地方振興事務所畜産振興部 熊田修之、門脇宏、清水ゆう子
- 2 第 11 回全国和牛能力共進会宮城大会取り組み強化に向けた肉用牛振興支援5
◎北部家畜保健衛生所 佐藤文恵、村上哲也
- 3 管内ヨーネ病発生農場における清浄化に向けた取り組み8
北部地方振興事務所栗原地域事務所畜産振興部
鈴木一茂、石川知浩、清水俊郎、大友一博、高田直和
- 4 豚流行性下痢（PED）発生における対応11
仙台家畜保健衛生所 石澤勝嘉・網代隆・小寺文・橋本和広・加藤伸悦
- 5 豚流行性下痢（PED）発生に伴う管内の対応と感染拡大防止への取組15
◎東部家畜保健衛生所 柴田千尋、早坂駿哉、山田治、真鍋智、阿部隆樹
- 6 豚流行性下痢の発生予防対策及び迅速な初動防疫に向けた取組み19
北部家畜保健衛生所 高野泰司、鈴木歩、佐沢公子、山田侑希、三浦達弥、
我妻善博、豊島たまき
- 7 豚流行性下痢 4 例の発生に伴う防疫対応22
○大河原家畜保健衛生所 加藤 里子、大越 啓司、日野 正浩
- 8 公務員獣医師の職務理解醸成に向けた 4 年間の取組成果と今後の展望25
北部家畜保健衛生所 佐沢公子、三浦達弥、山田侑希、高野泰司、鈴木歩、
豊島たまき、齋藤裕、大場実

【第 2 部】

- 9 下痢を呈した豚群におけるデルタコロナウイルスの確認と県内浸潤状況29
◎◎仙台家畜保健衛生所 小寺 文、竹田百合子、千葉直幸、曾地雄一郎、
矢島りさ、西 清志
- 10 豚大腸菌症由来 O147 における薬剤耐性と分子疫学的解析34
○仙台家畜保健衛生所 矢島りさ、曾地雄一郎、千葉直幸、竹田百合子、
小寺文、西清志
- 11 県内の伝染性気管支炎ウイルス遺伝子型別調査とワクチン選択の検討38
仙台家畜保健衛生所 千葉直幸、小寺文、西清志
- 12 黒毛和種子牛にみられた牛アデノウイルス 4 型感染を伴う腸管外病原性大腸菌感染症 41
仙台家畜保健衛生所 曾地雄一郎、矢島りさ、千葉直幸、竹田百合子、小寺文、西清志
- 13 管内黒毛和種子牛で見られた散発型牛白血病の 2 症例44
東部家畜保健衛生所 阿部隆樹、早坂駿哉、山田治、真鍋智、柴田千尋
- 14 地方病性牛白血病へ進行していた持続性リンパ球増多症の一症例48
○仙台家畜保健衛生所 竹田百合子、小寺文、千葉直幸、曾地雄一郎、西清志

【第3部】

- 15 黒毛和種におけるGRIA1遺伝子型が採卵成績におよぼす影響.....51
宮城県畜産試験場 青沼達也, 齊藤陽介, 及川俊徳, 板橋知子, 沼辺孝
- 16 デュロック種系統豚維持群における雌雄の繁殖形質の遺伝的趨勢.....55
◎宮城県畜産試験場 齊藤隼人, 國井洋, 中條満, 佐久間晶子, 高橋健
- 17 水田の高度利用を目的とした飼料用イネー麦二毛作技術の検討58
宮城県畜産試験場 遠藤潤, 小野寺伸也

◎◎ 全国家畜保健衛生業績発表会選出

◎ 宮城県農林水産部畜産課長賞 (1部, 2部演題はブロック大会選出)

○ 宮城県獣医師会会長賞

1 「茂洋の郷」をスローガンとした全国和牛能力共進会宮城大会に向けた石巻地域肉 用牛振興戦略

東部地方振興事務所畜産振興部
熊田修之、門脇宏、清水ゆう子

1 はじめに

当管内で生産された種雄牛「茂洋」号は、平成19年3月に県基幹種雄牛に認定され、その成績は平成19年度広域後代検定成績1)において、ロース芯面積(6.28cm²)及びBMSNo.(7.63)の育種価が全国1位、枝肉重量が県歴代1位(443kg)と県歴代最高の成績を収めた。

この「茂洋」号を活用し地域一丸となった肉用牛振興に取り組むため、平成20年に「茂洋の郷づくりプロジェクト」を立ち上げ、生産者、消費者、販売業者それぞれに対し、生産から消費まで一体となった活動を展開した。

生産者に対しては、子牛共励会を開催し産子検査を実施することで茂洋産子の地域内保留を進め、併せて「茂洋交配マニュアル」を作成し、優良な茂洋産子の生産を推進した。また、肥育牛の代謝プロフィールテストを実施し、肥育技術向上による良質な牛肉の生産振興を図った。

これらの生産振興に加え、消費者向け「茂洋の郷づくり」をPRするため、マスコットキャラクター「しげひろ君」を作成するとともに、畜産フェスティバルを開催した。平成22年度からは茂洋産子の牛肉出荷開始に併せ、のぼり・ポスター等の作成・配布、賞味会などを開催し、「茂洋」号と「茂洋の郷」が地域の販売業者に認識され消費者へ伝わるよう働きかけ、茂洋産子を核とした石巻産牛肉を意識した販売・消費を促進し、「茂洋の郷」を作り上げてきた。そのような中、平成23年3月11日に発生した東日本大震災により活動は一時停滞した。

一方、平成29年に開催される全国和牛能力共進会が宮城県で開催されることが決定し、平成23年7月に準備委員会が設立された。平成24年7月には新たに実行委員会が設立され、本格的に大会

に向けて動き出した。大会への機運が高まる中、石巻地域においてもこれまでに作り上げた「茂洋の郷」をスローガンに、第11回全国和牛能力共進会宮城大会(以下、宮城全共という)に向けた活動を新たに展開させ、肉用牛振興を図ったのでその概要を報告する。

2 宮城全共に向けた組織体制づくり

宮城全共に向け生産者の技術向上、茂洋を中心とした和牛改良を推進するため、平成20年に立ち上げた「茂洋の郷づくりプロジェクトチーム」を再編し、平成24年8月に石巻地域対策会議を設置し、各関係機関の協力体制を構築した。また、和牛改良を中心とする組織づくりを支援し、平成26年7月に管内5つの和牛改良組合の組合員からなる「いしのまき和牛改良推進組合」が設立し宮城全共に向けた組織基盤を整えた。

3 茂洋産子の保留状況の現状と推進

平成23年度において、管内の基礎雌牛産子の種雄牛別割合は茂洋産子が52%(茂洋以外の県種雄牛2%)、県外種雄牛が46%の状況にあり、平成24年8月時点での茂洋産子の基礎雌牛は3%に過ぎず、保留が進んでいない状況であった。この状況を受け、JA繁殖牛部会の原種牛委員会において協議を重ね、宮城全共に向けた対策及び今後の改良基盤の強化に向け、基礎雌牛の指定交配を平成25年度からすべて県種雄牛で統一することを決定した。その結果、平成25年度の基礎雌牛産子はすべて県種雄牛となり茂洋産子は86%を占め、平成26年4月時点の茂洋産子の基礎雌牛は11%まで保留を進めることができた。

また、これらの保留を進めるにあたり、管内5つの改良組合において毎月子牛共励会を開催し、基礎雌牛の産子検査を実施した。その中で、A2級以上の優良な雌子牛を管内に積極的に保留するため、市、JAと検討を重ね、さらに県および全農の事業を活用することにより生産者の負担を軽減させ、最大で28万円の助成金を受け取れるよう各種助成金(表1)を充実させた。

表1 各種助成金

	県・全農	市	JA	改良推進組合	和牛改良組合
繁殖雌子牛	13万円(県) 10万円(全農)	5万円	5万円(茂洋) 4万円	4万円	1万円
肥育素牛		5万円			1万円

これらの保留推進活動の結果、平成23年度のA2級以上である基礎雌牛産子の保留頭数22頭のうち、茂洋産子は15頭(68%)であったが、平成25年度では23頭のうち、22頭(96%)が茂洋産子となった。その他、市や和牛改良組合から肥育素牛にも助成金を出し、積極的に管内一貫生産にも努めている(表2)

表2 基礎雌牛産子(A2級以上)の保留状況

	平成23年度	平成24年度	平成25年度
茂洋	15	26	22
県種雄牛	1	0	1
県外種雄牛	6	5	0
合計	22	31	23

4 宮城全共に向けた出品対策

毎年、管内では家畜改良意欲高揚のため、石巻地域肉用牛共進会を開催していたが、震災等により一時休止していた。平成24年度から再開した地域共進会では、出品条件を宮城全共にあわせて変更し、出品条件を満たす牛の育成目標を見定めることができるような環境を整えた。また、平成25年度に開催した石巻地域肉用牛研修会では、実際に生産者に宮城全共を実感してもらうため正式決定した会場や大会目標を説明し、今後どのように地域の改良を進めるべきかについて検討した。平成26年度は宮城全共に向けた交配が開始されるため、その交配計画に合わせ、対策会議を開催することにより交配計画を円滑に進めるように努めた。

5 全共に向けた意識統一の向上

管内の生産者及び関係機関が一致団結して宮城全共へ臨むため「いしのまきの和牛 いざ 宮城全共へ！」をスローガンに「しげひろ君」を活用したマグネットシートを作成(図1)した。これらを管内すべての繁殖農家及び関係機関へ配布し、車等に貼り付けて活動することにより、全共への意識統一、意欲向上を図ることができた。また、これらの活動が生産者以外の目にも留まることで、その活動を地域へ波及することもできた。



図1 意識統一のためのマグネットシート

6 消費者に向けた活動

地域共進会と同時に開催していた畜産フェスティバルは震災後、開催場所が確保できなくなり停止を余儀なくされたものの、平成25年度より新たにJA産直市の中で「いしのまき和牛地産地消フェア」として再開し、2年連続で開催した。このフェアでは仙台牛や仙台黒毛和牛のおいしさを味わってもらうため、管内で肥育された茂洋産子の牛肉を使い試食会を開催した。また、試食会に併せ、仙台牛ブランドの理解醸成のため、PRパンフレット(図2)を作成・配布するとともに、仙台牛の認知度に関するアンケートも実施した。アンケートでは仙台牛を知っている人は87%とその名称は知られていたが、仙台牛の定義、内容まで知っている人はその半分以下に留まっていたため、全国でも唯一、最高級ランクのみを扱うブランドであることの理解を高める必要があると考えられた。PRパンフレットでは仙台牛、仙台黒毛和牛を



図2 平成26年度版パンフレット(A4版4ページ)

わかりやすく説明しながら、地域で味わえる飲食・販売店を掲載し、消費を促進するとともに、平成26年度からは地元生産の種雄牛や宮城全共への取り組みを紹介し、消費者に対する理解醸成を図った。

7 宮城全共に向けた「茂洋の郷」プロジェクトの発展

平成29年に開催される宮城全共は全国規模の大会となることから、これまでの地域での活動だけではなく全国に向けた活動を展開するため、JAいしのまきと共同で「茂洋の郷いしのまき復興プロジェクト」を開始した。このプロジェクトは茂洋産子を中心とした石巻産牛肉や新商品を定期的に地元精肉店、スーパー、飲食店、JA産直市を通して消費者に届けることに加えて、全国に向け「茂洋の郷」をPRすることを目的としており、平成27年3月からはYAHOO復興デパートメント「石巻元気商店」によるネットを利用した茂洋産子牛肉の全国販売を開始することとしている。

プロジェクト開始初年度は、「復興応援キリン絆プロジェクト農業支援助成事業」を活用して新商品開発に取り組んだ。新商品として、長年地元の畜産農家で作られている手作りの焼き肉のタレに着目し、JAいしのまき畜産部会女性部による「仙台牛を

おいしく食べられる焼き肉のタレ」として開発。平成26年度いしのまき地産地消フェアに併せ、試作品を作成し、アンケート調査を行うことで商品化に向けた活動を進めた。

その他、「しげひろ君」を活用したグッズ(クリアファイル・缶バッジ)を作成(図3)し、焼き肉のタレのアンケートに回答して頂いた方に配布、さらに「しげひろ君」のお絵かきコーナーを設置するなど広く普及啓蒙を図った。また、JAいしのまきで同日販売した茂洋産子の石巻産仙台牛にはシール(図3)を貼り付けることで「茂洋の郷」の石巻産牛肉であることを明確化した。



図3 「しげひろ君」グッズ

8 まとめ・今後の取り組み

当管内で生産された「茂洋」号を中心とする肉用牛振興は「茂洋の郷づくり」としてプロジェクトチームにより生産基盤から石巻産牛肉の消費拡大まで展開し、定着化してきた。震災により活動は一時停滞したが、宮城全共を見据えた新たな活動を展開した。関係機関及び生産者組織の設立による組織基盤の強化、茂洋産子の優良雌子牛の保留、研修会・対策会議の開催等による和牛改良の推進を図った。さらに、「しげひろ君」を活用したマグネットシートの作成により、関係機関・生産者が宮城全共に向けた意識統一ができた。また、試食会の開催やパンフレット作成により消費拡大を図るとともに、石巻産牛肉や新商品を地元に残らず広く展開するため、ネット販売を計画し、その下地として焼き肉のタレの開発やグッズ作成に取り組んだ。今後の活動として、生産者組織を育種組合へ発展できるよう支援を継続していくとともに、交配計画を実行し、出品対策を充実させ、宮城全共での出

品・入賞を果たし日本一へ貢献できるよう取り組んでいく。また、地場産牛肉の販売を地元消費に留まらず全国的に販売する活動を継続させることで、「茂洋の郷」である和牛生産地として宮城全共に向けた肉用牛振興を図っていきたい。

9 参考文献

- 1) (独)家畜改良センター:広域後代検定事業に係る共同利用種雄牛の能力評価について(2008)

2 第11回全国和牛能力共進会宮城大会取り組み強化に向けた肉用牛振興支援

北部家畜保健衛生所
佐藤文恵、村上哲也

1 はじめに

当所管内である大崎地域は1市4町で構成され、宮城県の広域圏において耕地面積でトップに立つなど、農業の盛んな地域である。黒毛和種肉用繁殖雌牛及び子牛、肥育牛の飼養においては、飼養戸数932戸、飼養頭数は14,249頭であり、中でも肉用牛生産の基盤ともいえる繁殖雌牛は6,310頭である(平成26年2月1日の宮城県家畜改良関係飼養頭羽数調査総括表)。これらの戸数及び頭数はいずれも県内で2番目であり、当地域は宮城県において肉用牛の主要な生産地となっている。

平成29年度に第11回全国和牛能力共進会(全共)が宮城県で開催されることになった。当地域でも全共を見据え、生産基盤の強化や生産者の意識高揚を目的とした対策を立てる必要が生じた。

大崎地域は1市4町、さらに4農協からなり、町や農協の管内が複雑に交差している地域である。各農協の管内それぞれに特色があり、農協を中心とした個々で共進会等を行っている状況であり、県内有数の生産基盤を活かしきれていなかった。そのため、全共に向けて関係機関や生産者が連携し、大崎地域が一丸となる対策が求められた。一丸となることで地域全体の大きな頭数を土台に競わせることができ、また、全共後の地域の生産基盤を更に発展させるような対策が必要になった。

以上のことから、管内から全共の上位入賞だけではなく、子牛市場における管内生産牛の質や評価の向上を目指した体制の構築のため、今年度行った肉用牛振興支援について次項より報告を行う。

2 全共対策の検討・課題の把握

具体的な対策の内容について、関係機関や生産者と共に検討を重ねた。検討会として、市町及び農協の畜産主務課長を集めた大崎畜産振興協議会(畜振協)幹事会、市町及び農協の畜産担当者と

和牛生産者代表を集めた宮城県肉用牛改良推進大崎地域対策会議(対策会議)を行った。平成24年12月から平成26年3月までの間に行ったこれらの会議で(幹事会3回、対策会議1回)、管内各地で行われている共進会の課題が見えた。

現状では農協単位で各共進会が開催されており、また共進会を行っていない農協もあった。開催時期は県総合共進会(県共)の2、3週間前であり、開催経費は市町と農協で負担していた。出品牛の条件は県共の基準を基本としながらも、それぞれ独自の基準で月齢範囲等を定めていた。また、県共出品牛はそれぞれの農協の上位牛が割り当て頭数に応じて県共への代表牛として選出されていた。

これらの現状から見えてきた課題は以下のとおりであった。

開催時期について、現状では県共までの時間が少なく、出品牛の調整・調教が充分に行えなかった。また、このことは調整を十分に行って県共へ向かおうという積極性の欠如にも繋がってしまっていた。

各共進会の経費を市町と農協で負担していることから、大崎地域の行事を新たに取り組もうとした際、予算の対応等が間に合わないため、平成26年度の経費を市町及び農協の予算から捻出することは困難であった。

農協単位で定められている独自の出品条件は、県共の出品条件に全て合致したものではない。そのため、上位に選ばれた牛が県共の出品条件を満たさず出品できない場合もあり、条件を満たす下位の入賞牛が県共へ向かうという事例もあった。

3 課題の解決に向けた検討とその結果

前項に記したとおり、従前は県内有数の生産基盤を細切れにし、更に肉用牛生産及び改良にお

いて別々の方向を向いてしまっている、といった地域としてまとまりのない状況であった。

そこで、これらの課題を解決するため、大崎地域を包括した共進会を開催することが提案された。従前の共進会の上に、更に大崎地域を包括する共進会を行い県共への代表牛を選ぶことで、大崎地域が一丸になる体制が構築できると考えられた。そして、大崎地域を包括した共進会、大崎地域畜産共進会の開催に向けて、畜振協幹事会及び対策会議で具体的な検討を進めた。

まず開催時期について、県共まで十分な時間が取れるように7月23日と決定した。同時に、農協単位の共進会の開催も時期を早めることとなった。これによって県共まで2ヵ月弱の期間を設けることができ、調教や調整を十分に行えるようになった。

今年度の開催経費は畜振協の特別会計を取り崩すことが承認され、次年度以降は市町及び農協からの負担金で開催することも同時に決定された。

出品牛の条件については図1のように、第1区から第5区まで県共と同じ条件とした。また、農協単位の共進会においても同様の条件とした。

(例) 宮城県総合畜産共進会の出品区		
出品区分	資格月齢	備考
第1区(若雌の1)	14ヵ月～17ヵ月	単品
第2区(若雌の2)	17ヵ月～20ヵ月	単品
第3区(経産)	経産牛	単品
第4区(繁殖雌牛群)	経産牛	4頭1組
第5区(高等登録群)	14ヵ月以上	2頭1組
第6区(父系群)	17ヵ月～24ヵ月	4頭1組

第1区から第5区まで県共同条件

別途選抜→

図1 大崎地域畜産共進会の出品条件

4 大崎地域畜産共進会の体制

農協単位で共進会を行い(行わないところは農協が選出するという形)、大崎地域畜産共進会に精鋭を集め、競わせる体制とした。農協単位で県共の出品牛を選ぶよりも大きな母数での選抜が可能となり、また選抜の段階を増やすことにもなり、量・質ともに選抜圧を高めることができると考えられた。

そして、本大会を大崎地域の代表牛を選ぶ、県共の予選会と位置づけることで、次のステップへの明確な目標とすることができた。これにより、全共を

見据えた身近な目標として、生産者の意識の向上に寄与すると考えられた。



図2 大崎地域畜産共進会の位置付け

5 大崎地域畜産共進会開催の概要

- ・開催日時:平成26年7月23日
- ・開催場所:美里町 みやぎ総合家畜市場
- ・出品頭数:延べ63頭(重複区有り)

各農協からの出品頭数については表1に示す。

- ・出品区・条件:第1区から第5区まで

条件については図1を参照

表1 各農協からの出品頭数

	古川	いわでやま	加美よつば	みどりの
第1区	2	2	4	6
第2区	2	3	5	8
第3区	2	1	4	6
第4区	1組(4頭)		1組(4頭)	1組(4頭)
第5区	1組(2頭)		1組(2頭)	1組(2頭)
計	12頭	6頭	18頭	26頭

6 開催結果

出品頭数について、単品区においては全農協からの出品が達成された。群出品はいわでやま農協からの出品は無かったが、他3農協からの出品があり、選抜圧を高めることができた。

審査結果については表2に示す。一つの農協に偏ることなく、各農協が満遍なく入賞を果たした。県共出品牛についてもまた、同様であった(表3)。

表2 上位入賞牛の所属農協

出品区	最優秀賞		優秀賞	
	農協	農協	農協	農協
第1区	いわでやま	古川	加美よつば	みどりの
第2区	古川	みどりの	みどりの	みどりの
第3区	みどりの	古川	加美よつば	みどりの
第4区	JAみどりの和牛繁殖部会	加美郡和牛改良推進組合	古川和牛改良組合	
第5区	古川和牛改良組合	加美郡和牛改良推進組合	JAみどりの和牛繁殖部会	

表3 県共出品牛の所属農協

	最優秀賞	優秀賞		
第1区	いわでやま	古川	加美よつば	みどりの
第2区	古川	みどりの	みどりの	みどりの
第3区	みどりの	古川	加美よつば	みどりの
第4区	JAみどりの和牛繁殖部会	加美郡和牛改良推進組合		
第5区	古川和牛改良組合			

特に古川農協は11年間ほど農協単位での共進会を行えておらず、県共の出品も単品区で1, 2頭であった。しかし今回の大崎地域畜産共進会においては、全区への出品が達成され(表1), 表2及び表3のとおり、古川農協管内で上位入賞し、県共への出品も果たすという優秀な成績を収めた。

その他、育種組合を持つみどりの農協は上位入賞牛が最も多く、みどりの農協に次いで出品の多い加美よつば農協も安定した成績を収めた。いわでやま農協は出品頭数こそ少ないものの、その中から最優秀賞を出した。この牛は県共第1区においても最優秀賞5席を取得した。

7. 飼養管理技術の向上について

今回行った共進会は良い牛の更なるレベルアップに寄与したと考えられるが、共進会に参加しない生産者もいるのは事実である。子牛市場における管内生産牛の評価向上には、地域の飼養管理技術の底上げも重要であることから、平成27年1月16日(金)に子牛の育成に関する研修会を開催した。管内の全生産者へ呼びかけ、生産子牛の飼養管理技術向上を図った。講師にはZENOAQの後藤氏を招き、100名以上の出席があった。

8. まとめ

大崎地域畜産共進会を開催することで、農協単位、地域と多段階で選抜を行える体制を構築した。これにより、大きな母数を確保することで選抜圧の強化を図ることができ、県内有数の生産基盤を活かすことができた。

また、目覚ましい活躍をした農協があったことは、その農協だけでなく他の農協の子牛生産者にも刺

激になり、意識高揚に繋がったと考えられる。地域全体が一堂に会した場で代表牛の選抜が行われることで、出品牛の質の向上及び農協内での結束の強化が図られた。さらに、地域全体が集まることで情報交換等の場ともなり、一体感ももたらした。

今年度の県共では、残念ながら最優秀賞を獲得することはできなかったが、この体制を継続し選抜を続けていくことで、年々地域の出品牛のレベル向上が図られ、また、共進会と併せて研修会等を開催することで、地域全体の生産者の飼養管理技術の底上げを行い、更に勢いのある畜産地域となるよう振興を続けていきたい。

3 管内ヨーネ病発生農場における清浄化に向けた取り組み

北部地方振興事務所栗原地域事務所畜産振興部

鈴木一茂, 石川知浩, 清水俊郎, 大友一博, 高田直和

1 はじめに

平成26年7月及び8月、管内2戸の和牛繁殖農場(A及びB)で牛ヨーネ病が摘発された。

当部では各農場において、発生状況に応じた清浄化対策を実施し、その取り組みの中で若干の知見を得たので、概要を報告する。

2 A農場における取り組み概要

1) 農場概要

2棟の牛舎に飼養しており、ビニールハウス牛舎(以下ハウス牛舎)及び約300m離れた木造牛舎である。ハウス牛舎に繁殖11頭、育成1頭、子牛5頭、木造牛舎に繁殖10頭、育成1頭、子牛7頭、合計35頭を飼養していた。両牛舎における牛の移動はなかったが、飼養者は同一であった。導入先は自家育成の他、県内及び、青森県や秋田県等多数導入していた。

2) 発生概要

平成26年7月22日に実施した牛ヨーネ病定期検査において、スクリーニング検査の結果1頭陽性となり、糞便のリアルタイムPCR(以下rPCR)より牛ヨーネ病患者と決定した。

当該牛は平成21年に青森県から導入し、ハウス牛舎で飼養され4産した6歳の牛であり、最終分娩後は軟便気味であったと飼養者から報告があった。

患者の殺処分後、木造牛舎とハウス牛舎の順に清掃及び消毒薬散布、石灰乳塗布による畜舎消毒を実施した。

3) 清浄化対策(図1)

発生後に同居牛34頭の糞便培養検査を実施したところ、初発患者の子及び隣接牛房の県外導入牛とその子、計4頭が患者として摘発された。さらに、3ヶ月後の清浄性確認検査において、患者の隣接牛房に飼養する6頭についてrPCRを実施

し、1頭を患者として摘発した。この牛は、初発患者と同じ導入先であった。残る同居牛の糞便培養検査については現在実施中である。

同居牛検査(糞便培養)全34頭

No	年齢	検査内容	備考
1	7歳	糞便培養	県外導入
2	9歳	糞便培養	県外導入
3	1ヶ月	糞便培養	自家産 No.2の子
4	3ヶ月	糞便培養	自家産 初発牛の子

清浄性確認検査(糞便培養及びrPCR)全27頭

No	年齢	検査内容	備考
5	6歳	rPCR DNA量 0.00148pg/25µl	県外導入 (初発牛と 同一導入)



図1.A農場同居牛及び清浄性確認検査結果

3 B農場での取り組み概要

1) 農場概要

繁殖牛舎と子牛牛舎に分かれているが、パドックを通じて子牛は自由に移動でき、パドックはコンクリートと土の部分に分かれていた。繁殖10頭、育成2頭、子牛11頭、合計23頭を飼養していた。県内の他、青森県や宮崎県、鹿児島県等から導入していた。

2) 発生概要

平成26年8月19日にNOSAI診療センターの獣医師より難治性の下痢のため、病性鑑定依頼があり、rPCRを実施した結果、遺伝子量が810.26pg/25µlと非常に高い値を示し、牛ヨーネ病患者であることが判明した。

当該牛は、青森県から導入された6歳の牛で、A農場の初発患者と同一の市場及びトラック便で導入されていた。糞便採材時は、激しい水様性下痢をし、食欲及び飲水欲低下のため削瘦していた。

発生後は、A農場と同様患者の殺処分後、牛舎の清掃、消毒薬及び石灰乳による消毒を実施した。

土のパドックについては、上記の消毒ができないため、消石灰を散布した。

3) 清浄化対策(図2)

発生後の同居牛検査において、糞便培養を実施した結果、19頭中5頭が患畜となり、5頭全てが子牛であった。また、出荷予定子牛の検査を実施した結果、6頭中4頭が患畜となった。以上の結果より、B農場はA農場に比べ子牛での発生率が高く、これは初発患畜のヨーネ菌遺伝子量が非常に多かったこと及び子牛が農場内を自由に移動できる飼養形態から、農場全体が依然として汚染されている可能性が推察された。したがって、農場のヨーネ菌汚染状況を把握するため、県内初の試みである環境検査を実施することとなった。

同居牛検査

19頭中5頭の患畜決定(子牛5頭)

No	年齢	検査内容	備考
1	8ヶ月	糞便培養	自家産
2	8ヶ月	糞便培養	初発牛の子
3	9ヶ月	糞便培養	自家産
4	12ヶ月	糞便培養	自家産
5	10ヶ月	糞便培養	自家産

子牛の出荷前検査

6頭中4頭の患畜決定

No	年齢	検査内容	備考
1	8ヶ月	rPCR DNA量 0.0172pg/25µl	自家産
2	7ヶ月	rPCR DNA量 0.00273pg/25µl	自家産
3	9ヶ月	rPCR DNA量 0.00471pg/25µl	自家産
4	9ヶ月	rPCR DNA量 0.0406pg/25µl	自家産

図2.B農場同居牛及び子牛出荷前検査結果

4) 環境検査の材料と方法(図3)

初発患畜を飼養していた場所を含む牛房や飼槽、パドック等計23箇所を1箇所ずつ手袋を交換しながら、滅菌蒸留水で湿らせた滅菌ガーゼで一定面積(10cm×10cm)を拭き取った。採材後、前処理としてガーゼを封付きビニール袋へ入れ、さらに滅菌蒸留水を20ml加え、よく揉んだ後、袋中のガーゼを絞り50mlチューブへ移した。絞った液体からDNAを抽出し、rPCRを実施した。5) 消毒前環境検査の結果(図4)

ほとんどの採材場所からヨーネ菌遺伝子が検出され、農場全体の汚染を確認した。

この結果を受け、子牛の更なる感染を防ぐため、再度畜舎消毒を実施した。消毒は前回と同様に牛舎やパドックの清掃を行った後、新たに熱湯洗浄を加え、消毒薬散布、石灰乳塗布を実施した。飼槽は牛房から取り外しができず、消毒薬や石灰乳

による消毒が困難であったため、スチームクリーナーで消毒を実施した。

牛舎見取図及び採材場所

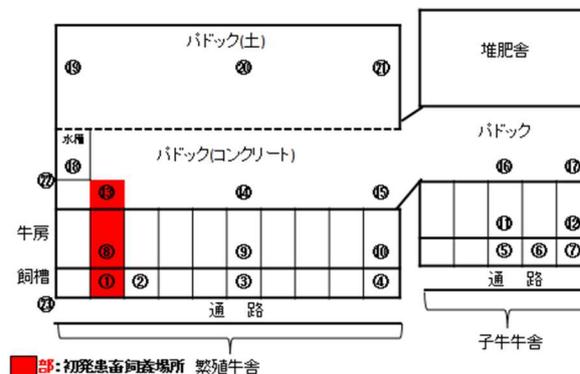


図3.牛舎見取図及び環境検査採材場所

環境検査結果(消毒前)

検体番号	採材場所	検査結果 (pg/25µl)	検体番号	採材場所	検査結果 (pg/25µl)
1	繁殖牛舎飼槽	7.39E-03	13	繁殖牛舎パドック	7.29E-03
2		-	14		7.12E-03
3		1.22E-02	15		1.98E-01
4		2.93E-03	16	子牛舎パドック	6.94E-01
5	-	17	パドック	8.32E-01	
6	子牛舎飼槽	-	18	飲水	-
7	-	5.43E-04	19	パドック(土)	3.85E-01
8	繁殖牛舎牛床	4.00E-01	20	パドック(土)	5.11E-01
9	繁殖牛舎牛床	1.33E-01	21	パドック入口	2.76E-01
10	-	2.10E-01	22	パドック入口	1.26E-02
11	子牛舎牛床	5.47E-03	23	畜舎入口	8.68E-04
12	子牛舎牛床	1.83E-03			

■:初発患畜飼養場所

図4.畜舎消毒前環境検査結果

6) 消毒後環境検査(図5)

消毒効果確認のため、2週間後に環境検査を再実施した。その結果、前回遺伝子が検出されたコンクリートパドックや一部の牛床、飼槽からヨーネ菌遺伝子が検出されず、他の多くの採材場所からもヨーネ菌遺伝子量の減少が確認された。土パドックについては消毒を行っていないため変化はなかった。一部、消毒前に遺伝子不検出だった飼槽から消毒後に検出された事については、飼養者が作業時に飼槽を跨いで移動する場合があります、その際に汚染された長靴からヨーネ菌が拡がった可能性が考えられたため、長靴の消毒の徹底と飼槽を跨がないよう指導した。

環境検査結果(消毒後)

検体番号	採材場所	検査結果 (pg/25μl)		検体番号	採材場所	検査結果 (pg/25μl)	
		消毒前	消毒後			消毒前	消毒後
1		7.39E-03	6.02E-06	13	繁殖牛舎	7.29E-03	-
2	繁殖牛舎 飼槽	-	-	14	繁殖牛舎 パドック	7.12E-03	-
3		1.22E-02	-	15		1.98E-01	-
4		2.93E-03	-	16	子牛牛舎	6.94E-01	-
5	子牛牛舎 飼槽	-	1.67E-03	17	子牛牛舎 パドック	8.32E-01	-
6		-	3.42E-04	18		18	18
7		5.43E-04	1.12E-03	19		3.85E-01	3.32E-01
8	繁殖牛舎 牛床	4.00E-01	2.59E-02	20	パドック(土)	5.11E-01	2.34E-01
9		1.33E-01	-	21		2.76E-01	3.24E-01
10		2.10E-01	3.08E-03	22	パドック入 口	1.26E-02	-
11	子牛牛舎 牛床	5.47E-03	9.48E-04	23	畜舎入口	8.68E-04	3.92E-04
12		1.83E-03	-				

■:初発患者飼養場所

このような畜舎構造を持つ農場は管内にも広く存在することから、今回の検査データ及びその対策を活用し、牛ヨーネ病撲滅に向け、指導を継続する。

図5.畜舎消毒後環境検査結果

7)その他の清浄化対策

当該農場の土パドックは、泥濘化及び冠雪して十分な消毒効果が得られないと判断したため、コンクリート部との境界に単管パイプで柵を設置し、土パドックの利用を当面の間控えること、さらに飼槽も十分な消毒効果が得られない可能性があるため、飼槽内にプラスチック容器を設置し、それを飼槽として利用し、洗浄・消毒を簡単に行えるよう指導した。

4 まとめと対策

1)A農場

初発牛房を中心に、隣接する牛房の牛でヨーネ菌の感染を確認した。その他の牛については、現在のところ感染は確認されていない。

A農場では、ヨーネ菌の汚染が一部であると推測されたため、今後も飼養衛生管理の徹底を指導しながら清浄性確認検査を継続する。

2)B農場

A農場と異なり、初発患者が多量のヨーネ菌を排出していた可能性があることや、子牛が牛舎内を自由に動き回れる畜舎構造から、子牛での牛ヨーネ病発生が相次ぎ、農場全体の汚染が推測された。

子牛への感染リスクの低減が急務であると考えたため、農場の汚染状況の把握とその後の畜舎消毒の効果を確保すべく環境検査を実施した。また、その結果をデータとして飼養者へ報告することにより、速やかな環境対策を講じることができた。

4 豚流行性下痢 (PED) 発生における対応

仙台家畜保健衛生所

石澤勝嘉・網代隆・小寺文・橋本和広・加藤伸悦

1 はじめに

平成25年10月に、7年ぶりに沖縄県で確認された豚流行性下痢症(以下PED)は全国的に発生が拡大した。本県でも平成26年4月に初発を認め、管内の一貫経営養豚農場で16症例目の発生が平成26年7月上旬に確認された。

今回の発生は、県内の15症例と発生状況に相違が認められ、病性鑑定によりウイルスの変異が示唆される結果が得られたので、沈静化及びまん延防止の防疫対策に取り組んだ経過と併せて、その概要を報告する。

2 発生農場の概要

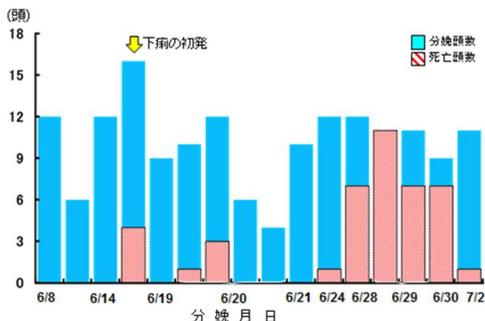
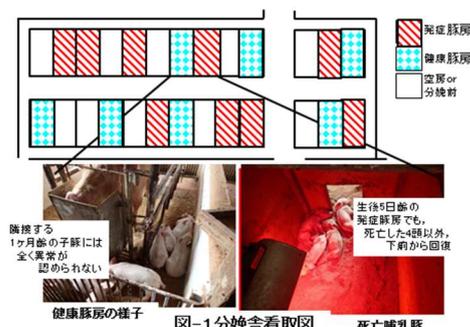
発生農場は、一貫経営(繁殖豚を120頭、肥育豚600頭、子豚250頭、種雄豚10頭飼養)で豚の導入は年間を通じて無く、肥育豚は管内のと畜場に週15頭から30頭を出荷している。給与飼料は、分娩舎の母豚及び子豚には購入飼料でそれ以外の母豚と肥育豚にはリサイクル飼料を給与していた。農場の作業は8名が交代制で従事していた。隣接地には、繁殖豚6頭を飼養する一貫経営の養豚場があり、発生農場との豚の移動は無かった。

3 発生状況

平成26年6月中旬以降に分娩した哺乳豚9腹97頭が下痢・嘔吐を発症し、うち42頭が死亡した。7月の立入り時の確認では、分娩豚舎内で16腹のうち発症したものが9腹に対して、症状を全く示さない未発症の7腹分の初生豚が混在しており、発症状況にムラが確認された。発症豚の母豚にはPEDワクチンは未接種であった。(図-1, 図-2)

4 材料および方法

病性鑑定材料には、5日齢の発症哺乳豚1頭及び同居豚5頭(母豚2頭、哺乳豚3頭)の糞便を用いた。病理学的検査は、発症豚を鎮静処置の上剖



検を行い、10%中性緩衝ホルマリン固定後、パラフィン包埋し、常法に従いヘマトキシリン・エオジン(H・E)染色を実施した。また、空腸、回腸の組織標本は、抗PEDウイルス(以下「PEDV」とする。)ウサギ血清及びヒストファインシンプルステインMAX-PO(MULTI)を用いて免疫組織化学染色を実施した。ウイルス学的検査は、剖検豚の扁桃を用いた豚コレラ蛍光抗体法(FA)、剖検豚の小腸内容と同居豚5頭の下痢便についてウイルス遺伝子の検索を行った。RNAは、市販のキット(QIA-amp Viral RNA Mini, QIAGEN)を用い、PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2(TAKARA)を用い、PEDV ORF3遺伝子領域⁴⁾、PEDV M遺伝子領域¹⁾、伝染性胃腸炎ウイルス(TGEV) S遺伝子領域⁶⁾、A群ロタウイルス(GARV) VP6遺伝子領域²⁾、B群ロタウイルス

(GBRV) VP7 遺伝子領域³⁾, C群ロタウイルス (GCRV) VP7 遺伝子領域⁵⁾, 豚デルタコロナウイルス (PDCoV) N 遺伝子領域⁷⁾ の RT-PCR 法を実施した。また, PEDV ORF3 遺伝子領域の RT-PCR 法で, 目的の産物サイズと異なる結果が得られたことから, 確認のため S 遺伝子領域について RT-PCR 法を追加試験を実施した。

さらに, PEDV ORF3 遺伝子領域を含めたウイルスの変異を疑い, 2頭の抽出 RNA を独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所(以下,「動衛研」とする)に送付し, 遺伝子解析を依頼した。

送付した RNA は, S1 遺伝子領域の遺伝子増幅についてカラム精製後 TA クローニング後に塩基配列を決定した。M 遺伝子及び ORF3 遺伝子については, ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。

5 検査結果

病理学的検査では, 剖検所見で空腸及び回腸の腸壁に重度の菲薄化が認められ, 組織所見でも腸間膜リンパ節の活性化を伴った広汎な絨毛の萎縮が観察された。空腸及び回腸組織標本を用いた免疫組織化学染色では, 粘膜上皮細胞の細胞質に PEDV の陽性抗原を認めた(図-3)。

ウイルス学的検査では, 豚コレラの FA 法は陰性であった。遺伝子検査は, GARV, GBRV, GCRV, TGEV, PDCoV は全頭陰性であった。PEDV ORF3 遺伝子の RT-PCR 法では, これまで県内で検出されているウイルス及び陽性対照として用いた NK94P6, Tr(-) 株と比較し 420bp 程度小さな産物が得られ, M 遺伝子領域は全て陽性であったが微弱な増幅反応となった。これは, 本県での PED 発生 15 症例に認められなかった反応であり, 確認のため S 遺伝子の RT-PCR を実施した結果, 良好な増幅が得られ(図-4), これらの検査結果から PED と診断した。

動衛研での遺伝子解析の結果, S1 遺伝子は北米型に分類され, S1 遺伝子, M 遺伝子領域に, 他の県内で検出されたウイルスと大きな差は認められな

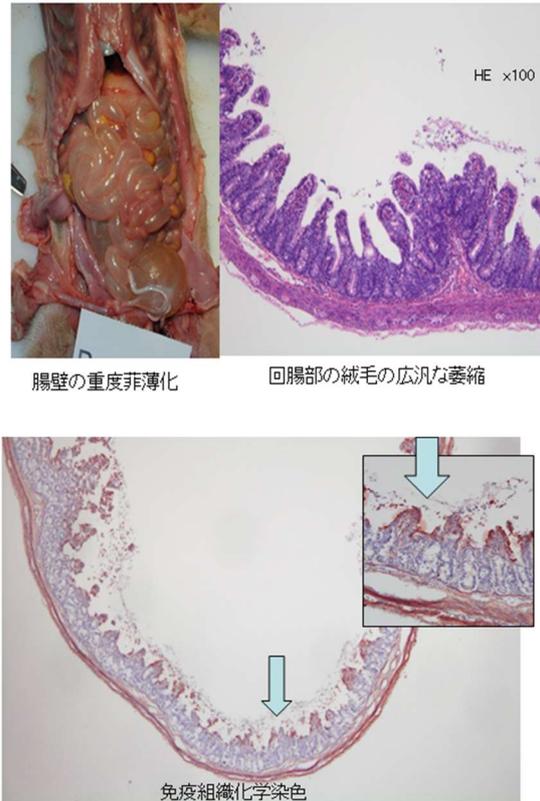


図-3 病理学的検査所見

	PED ORF3	PED M TGE S	PED S
RT-PCR 泳動像			
プライマー	Park SJら (2008)	Duarte MFら (1994)	Kim SYら (2001)
北米型 90年代株	○	1塩基相違 ○	1塩基相違 ○
本症例 (異なるサイズの産物)	-	PED + TGE -	+

図-4 ウイルス学的検査成績

かったのに対し, ORF3 遺伝子は, 2頭とも約 420bp の欠損が認められた。

6 対策

発生農場の沈静化および他の農場へのまん延防止を目的として発生農場への対策, 隣接農場への対策, 管内のと畜場での対策を重点的に実施した。

1) 発生農場への対策

① 分娩舎の作業従事者の専任化

8名の従事者が全畜舎での作業を共有していたのを分娩舎の対応従事者を専任化した。また、畜舎間での機材の共有の自粛を指導した。

② 畜舎内外の消毒、踏込消毒槽の増設

農場のウイルス量の低減対策として、全ての畜舎の入口に踏込消毒槽を設置し畜舎内外の消毒を実施した。

③母豚へのワクチン接種の徹底

ワクチン接種マニュアルに基づき母豚へのワクチンの全頭接種を実施した。

④出荷豚の健康状況の確認

と場への出荷時は家保による出荷豚の全頭の健康状況を行い、健康豚のみを出荷した。

2)隣接農場への対策

①飼養衛生管理の遵守徹底

通路を中心に畜舎内外の消毒をはじめ飼養衛生管理の遵守の徹底を指導した。

②定期的なモニタリング検査の実施

月1度の中和抗体価の動向を実施し、7月～12月で計55頭の検査を実施した。3頭で陽性値(2倍が2頭、4倍が1頭)を示した(表-1)。

表-1 隣接農場のモニタリング検査成績

採血月日	頭数	PED中和抗体価				
		<×2	×2	×4	×8	×8<
26.0724	10	9	1			
26.0819	10	10				
26.0930	10	8	1	1		
26.1022	10	10				
26.1125	8	8				
26.1222	7	7				
合計	55	52	2	1		

3)と畜場での対策

非発生農場への交差汚染の防止対応として、発生農場の出荷日時を制限し、車両の入出箇所の限定、運搬者への入退場時の車両、靴底、運転席の床マットの洗浄・消毒を指導し、定期的に家保による実施状況を現地確認した。

7 まとめ及び考察

平成27年7月、管内一養豚農場で、下痢・嘔吐が発生し、病性鑑定の結果、県内16例目のPED

発生と診断した。防疫面での対応で当農場では沈静化し、まん延防止対策により、隣接農場をはじめ新たな発生は見られていない。

本症例の特徴的所見として、同一の分娩舎内で発症豚と健康豚が混在していたこと、発症豚と同腹でも生存豚が存在したこと、当該農場では、飼養衛生管理が十分ではなく、通常から下痢が散発していた。

また、本症例におけるORF3遺伝子には、全長の約60%を超える約420bpの欠損が確認され、S1遺伝子やM遺伝子の結果から北米型のウイルスからの遺伝子欠損と推測されるが、その欠損の程度と範囲の詳細は、現在、調査を進めて頂いているところである。

1990年代に流行したPEDVと現在全国的に流行している北米型は、遺伝子レベルで若干の変異を認めることから、当所では、プライマーのミスマッチによる疾病の見落としを防ぐ目的で、ORF3遺伝子とM遺伝子領域の検査を実施していたが、今回、ORF3遺伝子領域のRT-PCRだけの結果では、陽性と判断することはできず、また、多くの県で実施しているS1遺伝子領域のみの検査では、今回の欠損の可能性を見つけることはできなかったと考える。

本症例でも農場立入及び聞きとりによる詳細な疫学調査を実施したが、ウイルスの侵入経路は不明であったが、県内で発生を認めた一連のPEDV(15症例最終発生:平成26年5月29日)から1ヶ月以上が経過した単発での発生事例であり、その後も、本症例と同様なウイルスは県内で確認されていないが、欠損ウイルスの動態について監視を続けたい。

隣接農場で確認された低いPEDV抗体は、全国での非発生農場でも散見されており、農林水産省動物衛生課の見解では、農場レベルでウイルスに暴露された可能性が高いと考える農場は、中和抗体価8倍以上の検体が検査頭数の半数以上の場合とされているが、その発生頻度は、PED発生県13,182検体に陽性587検体(4.5%)、非発生県1,239検体に陽性34検体(2.7%)、発生県に多い傾向にあり(平成26年12月8日開催PED防疫担当

者全国会議資料抜粋), 農場内へのウイルス侵入を否定することなく, 発生予防に努めるための資料として農家指導に活用しており, 分娩豚舎へのウイルス侵入防止対策に重点を置いた指導を継続している。

当該農場の飼養衛生管理の改善指導を重ねて実施しており, 完全ではないものの, 徐々に適正管理に移行しつつある。

しかし, 疫学調査での感染経路は不明であり, 全国的に非発生農場に復帰した農場での再発が確認されていることから, 引き続き, 再発と管内農場の発生予防につとめている。

8 謝辞

今回ウイルス遺伝子の分子疫学解析の実施と助言をいただきました独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構, 動物衛生研究所の鈴木亨先生に深謝いたします。

9 参考文献

- 1) Duarte M, Tobler K, Bridgen A, et al: Sequence analysis of the porcine epidemic diarrhoea virus genome between the nucleocapsid and spike protein genes reveals a polymorphic ORF, *Virology*, 198,466-476(1994).
- 2) Fujii Y, Shimoike T, Takagi H, et al : Amplification of all 11 RNA segments of group A rotaviruses based on reverse transcription polymerase chain reaction, *Microbiol Immunol*,56, 630-638(2012).
- 3) Kuga K, Miyazaki A, Suzuki T, et al : Genetic diversity and classification of the outer capsid glycoprotein VP7 of porcine group B rotaviruses, *Arch Virol*, 154, 1785-1795(2009)
- 4) Park SJ, Moon HJ, Luo Y, et al : Cloning and further sequence analysis of the ORF3 gene of wild-and attenuated-type porcine epidemic diarrhoea viruses, *Virus Genes*, 36,95-104(2008)
- 5) Tsunemitsu H, B. Jiang, L. J. Saif: Sequence comparison of the VP7 gene encoding the outer capsid glycoprotein among animal and human group C rotaviruses, *Arch Virol*, 141(3-4),705-713(1996)
- 6) Vaughn EM, Halbur PG, Paul PS : Three New Isolates of Porcine Respiratory Coronavirus with Various Pathogenicities and Spike (S) Gene Deletions, *J Clin Microbiol*, 32, 1809-1812 (1994)
- 7) Wang L, Byrum B, Zhang Y : Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pig, Ohio, USA, 2014, *Emerging infectious diseases*, 20:7,1227-1230(2014)

5 豚流行性下痢（PED）発生に伴う管内の対応と感染拡大防止への取組

東部家畜保健衛生所

柴田千尋，早坂駿哉，山田治，真鍋智，阿部隆樹

1 はじめに

平成25年秋、沖縄県での報告から始まった国内での豚流行性下痢（以下、PED）の流行は、平成26年2月には青森県、4月以降は北海道及び東北各県へ感染が拡大した。

管内では、管轄する4市2町の内、3市1町で養豚が行われており、県内有数の養豚地帯である。特にA市は、飼養戸数51戸と県内で最も多く、と畜場が1カ所、広域有機センターが7カ所存在し、養豚農場も多く利用している特徴がある。こうした背景での管内におけるPED発生確認前後の取り組みについて報告する。

2 発生前の関連施設での防疫対策強化

国内でのPED発生に伴い、家保では養豚関係者への情報提供や飼養衛生管理徹底の周知をすると共に、管内畜産関連施設の防疫対策強化を進めていた。

関連施設の防疫強化として、A市内の有機センターの内、養豚農家から搬入がある4カ所について、市及びJAと協議し、消毒巡回指導を行った。各施設では出入口付近の消石灰帯設置や車両通過ポイント（検量所前、入退場門付近等）への消毒マットの設置を指導した。また、受付には利用者への車両消毒案内を掲示し、職員には場内での消毒徹底を指導した。

管内と畜場には食肉衛生検査所と共に立入し、入退場門付近や車両通過ポイント（受付、堆肥場等）への消石灰帯設置と、係留所や駐車場の定期的な消毒を指導した。また、発生農場からの出荷豚対応について、非発生農場との交差汚染防止を図るよう事前に協議を行った。

3 PEDの発生

各施設での防疫対策強化を進めていた4月中旬、

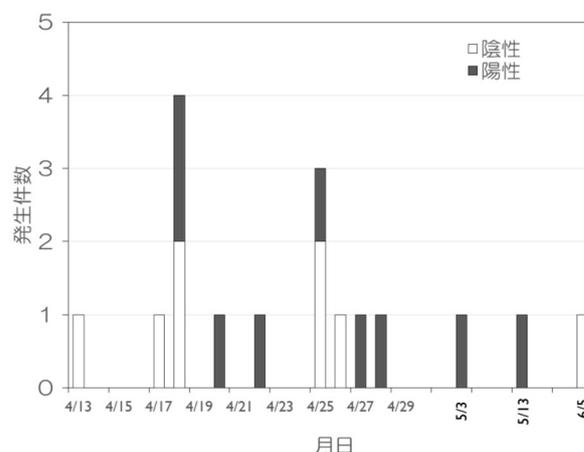


図1. 平成26年4～6月のPEDに係る管内病性鑑定対応状況

管内で県内1, 2例目となるPEDが発生した。

管内では、平成26年4月～6月にかけて合計16件の病性鑑定を実施したが、その内9件が陽性事例であった（図1）。特に1, 2例目発生日には、4件の通報が重なり、陰性事例と陽性事例が混在していたため、農場及び関連施設での交差汚染と蔓延防止に注意が必要であった。このことから、①関連施設での交差汚染防止への課題、②複数通報への課題、③発生農場への課題に対する検討が必要となり、それぞれについて以下の対応を行った。

4. PED発生に伴う蔓延防止のための課題と対応

(1) 関連施設での交差汚染防止

1, 2例目発生翌日、有機センターやと畜場での交差汚染防止のため、各施設での対応について協議した。

有機センターでの対応は、発生関連農場、市及びJAを招集して緊急会議を開催し、発生前の消毒体制に加え、発生農場と非発生農場の車両が交差しないように時間差での糞尿搬入と、動力噴霧器による車両消毒を指導し、すぐに実行した。時間差搬入は、時間帯を区切り、午前中の非発生農

場の搬入が終了した後に発生農場の搬入とし、作業終了後は場内の消毒を行った。

と畜場での対応は、臨時出荷者協議会において時間差搬入を決定し、すぐに開始した。さらに、毎月2回、食肉衛生検査所と共に消毒実施状況確認のための立入検査を行った。

いずれの施設でも発生前に事前協議を行っていたことで、消毒徹底や交差汚染対策としての時間差搬入の早期実施につながった。

(2) 複数通報への対応

病性鑑定の農場立入において、特に1, 2例目の通報があった日は4件の通報が重なり、また、現地から病性鑑定材料を仙台家保に搬入するには、地理的に少なくとも2時間を要することから、出勤する人や車の配置に苦慮した。このことから、通報に対し効率的かつ交差汚染防止に対応するため、初動対応を見直し、通報から帰庁までの間の連絡体制や作業手順をマニュアル化した初動対応表と、病性鑑定資材を写真で示した資材表を作成し活用した(図2)。

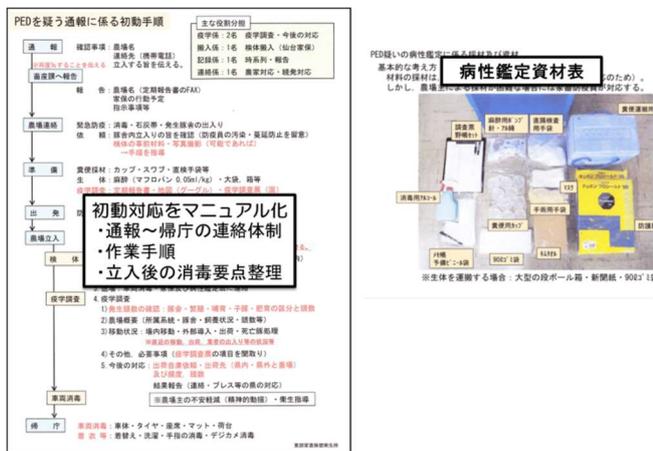


図2. 初動対応表と病性鑑定資材表

初動対応表では、立入は疫学調査員と検体搬入員の車2台で出勤すること、農場内立ち入りは原則1名、検体搬入員が採材後直ちに搬入に向かうことなど、人・車両の汚染や時間のロスを最小限とすることに配慮した。また、立入後の消毒は、車外・車内消毒、検査資材、衣服の交換等、要点を整理して示した。併せて、これらの情報はまだ発生のない家保に提供して、共有化を図ることで、各地域での通報への迅速な対応と、交差汚染防止に対応する

ことができ、初動防疫対応と早期診断に大きな貢献ができたと考えられる。

(3) 発生農場対応

発生直後、発生農場はパニックとなり、農場内の被害拡大(子豚死亡)、農場主(従業員)の精神的ダメージ、症状の持続や出荷対応への不安、再発症への不安等を訴えていた。こうしたことから、疫学調査や症状経過聴取時等には農場管理者の不安を解消するよう丁寧に対応することを心掛けた。また、各農場の現状を整理し、家保職員間で情報を共有するため、定期的に聞き取りした被害状況から、「発生状況経過表」を作成し(図3)、経過聞き取り時の資料として活用した。

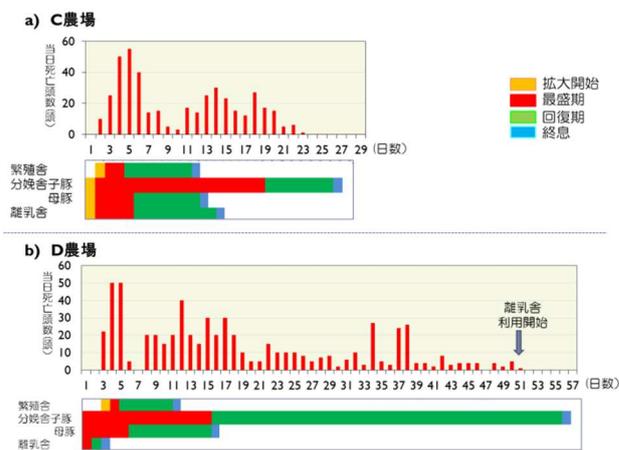


図3. 発生農場における症状経過

発生状況経過表は畜舎毎の症状経過を示し、農場管理者が、農場の現状を一目で理解できるように工夫した。農場出荷確認時には各農場へ提供し、その中でポイントをしばって畜舎消毒管理や豚群の移動等の指導に活用した。

沈静化確認時は全経過のデータを還元して沈静化までの経過を解説し、一緒に振り返りながら再発防止のための衛生管理やワクチン接種指導に供した。

以上、発生後の3つの課題に対し、交差汚染防止対策、初動対応の整理、発生状況経過表による発生農場ケアなどを行った結果、7月中旬までに管内全発生農場の沈静化を確認した。

5 発生農場での沈静化対策

今回の管内9件の陽性事例は、全ての農場でワクチン未接種、もしくは開始直後での発生であったため、個々の農場での死亡頭数も多く、最終的に管内では発症頭数8,534頭、死亡頭数3,682頭と大きな被害となった(表1)。沈静化までに要した日数は農場によって3週間から2か月と幅があったが、沈静化に至る経過には、多くの農場で分娩舎でのオールアウトや隔離分娩の実施が関与していると考えられた。例として、沈静化まで27日と比較的短かったC農場は、分娩舎と離乳舎での発生後、肥育舎を含む全豚舎へ感染は拡大した。当該農場は分娩舎が2カ所に存在したため、農場管理獣医師と協力し、一方をオールアウトして徹底的な消毒を行い使用するよう指導した。対策後、使用再開した分娩舎での新たな発症はなく、また、繁殖母豚の症状も回復し、使用中の分娩舎の症状も軽減してからは1週間程度で沈静化に至った(図3a)。

表1.管内での陽性事例と被害状況(全て一貫経営)

農場名	発生時期	総飼養頭数	発症頭数	死亡頭数	沈静化日数
A	4月	10,500頭	2,158頭	807頭	43日
B		4,388頭	1,031頭	447頭	49日
C		2,400頭	1,234頭	432頭	27日
D		3,600頭	957頭	622頭	55日
E		2,300頭	753頭	461頭	45日
F		2,400頭	1,143頭	384頭	34日
G		700頭	452頭	127頭	62日
H	5月	800頭	289頭	139頭	35日
I		2,200頭	517頭	263頭	24日
合計			8,534頭	3,682頭	

一方で、沈静化までに時間を要したD農場は、分娩舎及び離乳舎で発生後、全豚舎に感染は拡大し、他の豚舎は1週間以内に症状が改善したものの、分娩舎では沈静化まで約2カ月を要した(図3b)。その原因としては、分娩舎が一カ所一部屋しかなく、連続使用していることが考えられた。先に沈静化に至っていた農場の経緯から、分娩舎のオールアウトや部分的な(区画毎)空舎による徹底的な消毒作業が有効と考えられた。そこで、沈静化に向けて分娩用の空きスペースを確保するよう、農場管理獣医師と協力して指導・検討を続けたところ、哺乳豚の死亡から離乳舎に空き部屋が確保でき、

ホームセンター等で入手可能な工食用鉄パイプで簡易分娩柵を自作し、離乳舎の一部を隔離分娩室として使用開始したところ、新たな発症はなくなり、沈静化に至った。

これらの事例から、分娩舎のオールアウトや隔離分娩により、高感受性・多排菌豚である哺乳豚を隔離することが沈静化及び環境中のウイルス量低減に大きな効果があることが示唆された。

6 ウイルス消長調査でのワクチン接種後の抗体価の推移に関する知見

平成26年5月9日付農林水産省消費安全局・動物衛生課事務連絡の「豚流行性下痢のウイルス及び抗体の消長に関する調査」をH農場で実施した。調査材料及び方法は、哺乳豚(20日齢前後)、離乳豚(60日齢)、肥育豚(90, 120, 150日齢)、繁殖母豚の各5頭合計30頭について、沈静化後3週、9週、15週目の3回に渡り血清及び糞便を採材し、中和抗体検査及びウイルス遺伝子検査を実施した。なお、繁殖母豚のみ全3回を通して同一個体での採材とした。結果は、全3回とも全個体での糞便中のPED遺伝子は非検出で、中和抗体価GM平均値は哺乳豚を除き、回を追って低下する傾向が認められた(図4a)。哺乳豚の中和抗体価GM平均値が沈静化後15週目で222倍となったが、移行抗体の影響と推察された。また、繁殖母豚は、調査開始前にPEDワクチン接種歴があったことから、各母豚のワクチン接種後の中和抗体価の推移について示した(図4b)。なお、母豚4, 5については、ワクチン接種が1回のみであった。この結果から、発生農場でワクチン接種を実施した母豚でも、中和抗体価は5ヶ月程度で発症防御レベルとされる16倍以下1)になる可能性が推察された。このことから、発症予防には母豚への分娩毎の繰り返しのワクチン接種が必要なこと、さらに、発生農場においてはワクチン接種による再発予防対策は重要であることが示唆された。

7 まとめ

今回の事例から1)発生農場での沈静化対策として分娩舎のオールアウトや隔離分娩の実施と徹底

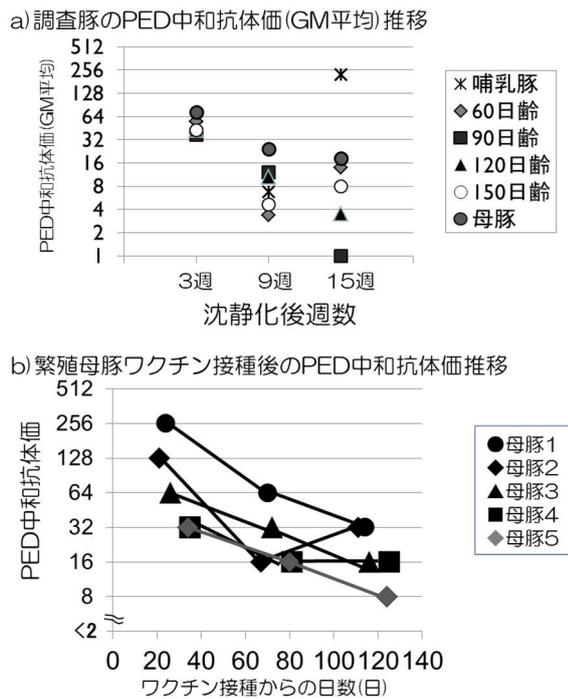


図4. ウィルス消長調査における中和抗体検査結果

的な消毒作業の実施は沈静化には大きな効果があること、2)発生農場でのワクチン接種母豚でもPED中和抗体価は接種後約5カ月で発症防御レベルとされる16倍以下となる可能性が推察され、分娩毎のワクチン接種の必要性、また、発生農場での再発予防対策としてのワクチン接種の重要性についての知見が得られた。

今回得られた成果を活かして、沈静化後再開した農場立入巡回や部会研修会等においては、国内でのPEDの現状や対策を示したリーフレットを配布・説明し、情報提供や衛生指導を行ってきた。これらを今後も関係機関と協力して継続し、管内の防疫意識の一層の向上に取り組んでいきたい。

8 参考文献

1)佐藤哲朗:「豚流行性下痢生ワクチンの特徴とその効果」。Pig Journal. 22-25. 02.2014.

6 豚流行性下痢の発生予防対策及び迅速な初動防疫に向けた取組み

北部家畜保健衛生所

高野泰司, 鈴木歩, 佐沢公子, 山田侑希, 三浦達弥, 我妻善博, 豊島たまき

1 はじめに

当管内は養豚農場76戸、飼養頭数8万3千頭の県内有数の養豚地域で、家畜伝染病発生時にはそのまん延が危惧される。平成23年には家畜伝染病予防法が一部改正され、「迅速・的確な初動対応」が強化された。迅速な初動対応、まん延防止には農場情報の事前の把握が不可欠であるため、当所では平成25年度より、従来の農家台帳に疫学情報を加え、内容の充実化を図ってきた。

平成25年10月に、国内7年ぶりとなる豚流行性下痢(PED)が沖縄県で発生し、平成26年8月までに38道県、817戸で確認された。県内では平成26年4月から7月までに16戸で確認され、うち2戸が当管内の農場であった。PEDの発生を受けて、当所では、農家台帳の整備を中核として、農家指導、農家支援並びに初動防疫体制の整備に取り組んだ。本稿では、平成25年4月から平成25年10月の沖縄県でのPED発生以前を「未発生期」、それ以後を「国内発生期」、県内1例目となる事例の通報日、平成26年4月18日以降を「県内発生期」として区分し、当所の取組みを報告する。

2 農家指導

伝染病の侵入防止、まん延拡大防止のためには、養豚関係者の防疫意識の向上が必要不可欠である。そのためには、何度も繰り返し指導することが効果的である。当所では、特に早期通報の徹底及び飼養衛生管理の徹底について、関係者への情報提供、農家への飼養豚の異常確認、畜産関係施設への立入指導等において、繰り返し指導、防疫意識の向上を図った(表1)。

1) 情報提供

76農場、6市町、養豚関係13団体、家畜防疫員26名に対して電話、FAX、会議等で、国内発生期には、県外発生事例、県内発生期には県内発生

表1 農家指導の概要

項目	通知・立入回数	国内発生期	県内発生期
情報提供	38回	10回 県外発生事例 8例 公文の通知	28回 県内発生例 16例 ワクチン情報 交付金事業情報
異常確認	6回	1回 (H26.4.18)	5回 (~H26.5.23)
畜産施設立入	5施設	2施設 家畜市場 死体保管施設	3施設 共同堆肥場

平成25年11月から平成26年8月までの実績

事例とPEDワクチン情報や交付金事業等について情報提供した。

2) 飼養豚の異常確認

国内発生が拡大するなか、平成26年4月から、週に1度、電話による全農場への飼養豚の異常の有無の確認を、国内発生期に1回、県内発生期に5回実施した。

3) 畜産関係施設の立入

国内発生期には、家畜市場と死体冷却保管施設各1箇所、県内発生期には共同堆肥場3箇所に立入し、消毒状況の確認及び指導を実施した。

1)から3)の取組みにより、踏み込み消毒槽の設置率が平成25年度89%に対し、平成26年度は100%となった(平成26年12月末日現在)。

3 農家支援策

農家支援として、国内発生期には、PEDワクチンの需要見込み量調査を実施し、県内発生期には、加えて、消毒薬の緊急配布と車両消毒機の整備を実施した。

1) ワクチン需要見込み量調査

PEDワクチンの安定供給を図るため、平成26年4月8日付け農林水産省消費・安全局動物衛生課課長補佐(保健衛生班)通知「PED対策に係るウイルス拡散防止対策及びワクチン安定供給体制」に基づき、養豚場へ1ヶ月ごと、半年間分のワクチン需

要見込み量を、国内発生期に1回(4月)、県内発生期に2回(8月、12月)、全農場に調査した。その結果、ワクチン接種率は、調査前12%に対し、調査後は74%(5・6月接種実績)に向上した。

2) 消毒薬の緊急的無償配布

管内一斉かつ継続的な消毒の徹底を図るため、管内全養豚農家に対して逆性石けん(1L)1,190本を無償配付した。配布本数は、県内にワクチンが流通し、子豚がPEDに対して十分な免疫を獲得する時期までに必要となる消毒薬を、各農場の飼養頭数に基づき算出した。配布は、市町の協力を得て実施した。

3) 車両消毒機の整備

農場内へのPEDウイルス侵入防止のため、消費・安全対策交付金事業を活用し、3団体に動力噴霧器4台を整備した。

4 初動防疫体制の整備

国内発生期には初動対応の課題を抽出し、対応策を検討した。県内発生期には、県内発生例を参考に、それらの改善を図った。

初動対応時の各過程における課題として次の①から⑤が浮上した。通報時には、①聞き取り項目・農場への指示事項を事前に把握しておく必要があること、準備段階(通報から家保出発まで)には、②資材や書類の準備及び農場の所在地の把握に時間を要すること、農場立入時には、③疫学調査終了後の検体搬入では時間的なロスが生じること、④疫学調査が多数あること、搬入時には、⑤交差汚染が懸念されること、があげられた。

これらの課題に対して、対応策を検討し、その後、県内発生例を参考にして、次の3点の対策を講じた。1点目に、初動フロー(東部家保提供)により対応手順を事前に確認した。2点目に、農場立入資材の事前準備を行った。病性鑑定採材資材、疫学調査票等の各種様式を事前に準備する他、農家台帳電子ファイルの共有化、各農場の定期報告書の電子ファイル化を併せて行い作業の効率化を図った。3点目に、立入時の作業効率化と交差汚染防止のため、採材疫学調査係2名と搬入係1名(車両2台)に役割分担した。採材疫学調査係は、採材

後、材料を農場外で待機している搬入係に渡し、その後疫学調査を実施する体制とした。

5 農家台帳の整備

平成25年度当初から取組んできた農家台帳の整備を、PEDの国内発生により強化した。各PED発生時期における農家台帳の強化点を表2に示す。

未発生期には従来の定期報告書の内容を基にした台帳に飼養状況、経営状況を追加して整備し、台帳の項目数は32となった。

国内発生期には、PED感染拡大の要因となると畜場や堆肥処理等の集合施設を追加した。

県内発生期には、平成26年4月に農林水産省から全国統一の参考様式として提示されたPED疫学調査票(以後、調査票)の内容について、追加調査を実施し、その内容を台帳の項目に反映させた。調査票の内容は、導入・出荷などの基本情報に加え、飼料、関係者及びその車両、排泄物処理等であった。追加調査方法として、PED発生に伴う情報提供、飼養豚の異常確認、ワクチン需要見込み調査等の取組みを活用した。関係者、関係車両及びそれらの立入頻度を強化点として調査し、台帳の項目数は58に増加した。これにより、農林水産省提示の調査票の86%を補完することができ、疫学調査の効率化が図られた。

表2 各PED発生時期における農家台帳強化点

段階	未発生期	国内発生期	県内発生期
期間	H25.4~H25.9	H25.10~H26.4	H26.4~
強化点	飼養状況、経営状況	集合施設、飼料	関係者、関係車両、立入頻度
主な追加項目	飼養状況、経営状況、導入・出荷、ワクチン	利用と畜場、堆肥処理施設、飼料製造者・業者	関係者立入状況、運搬車両、導入・出荷頻度、人工授精実施状況
項目数(増加数)	32 (18)	38 (6)	58 (20)
調査票一致割合	34%	54%	86%

6 管内事例対応

平成26年5月に、当所に対応した真症2例、疑い事例1例の概要を表3に示す。

発症から通報までには、2日ないし3日を要した。通報の明確な判断基準がないことも要因と思われた。

表3 管内事例対応

症例No	1	2	3	
区分	疑い例	真症	真症	
対応日	H26.5.4	H26.5.13	H26.5.29	
総飼養頭数	60頭 (一貫)	8,600頭 (一貫)	2,100頭 (一貫)	
所要時間	発症～通報	3日	3日	2日
	通報準備	30分	30分	30分
	採材	40分	30分	10分
	疫学調査	2時間	2時間	1時間45分

通報後から準備を含め、家保を出発するまでは、約30分、採材に10分から40分であり、円滑な対応が図られたと思われた。

疫学調査には約2時間を要した。正確な疫学調査を心がけたが、時間短縮について改善の余地があるものと思われた。

7 豚流行性下痢防疫マニュアル策定後の管内発生事例への対応

平成26年10月24日に農林水産省よりPED防疫マニュアルが策定された。マニュアルでは、PEDに有効な防疫対策が具体的に示され、関係者が連携して取り組むことが規定されている。一方、新たな防疫対策として、通報基準の明確化と発生農場名の公表ルールが規定された。

当所では、概要を関係者にFAX、郵送により周知すると共に、農協の協力を得て、小冊子を全養豚農家に配布した。

そのような中、マニュアル策定後、県内初となる事例が当管内で発生した。概要を図1に示す。

平成26年12月23日朝、1腹の哺乳豚が下痢を呈し、24日朝には複数の母豚、哺乳豚で下痢がみられた。マニュアルの通報要件に該当したことから、飼養者より24日朝8時30分に通報があり、対応した。所要時間を5月の事例と比較すると、疫学調査で時間短縮が図られた。

当所ではマニュアルに基づき、管内大崎地域の養豚場及び市町に農場名を公表し、注意喚起を図った。情報提供先に対しては、個人情報の適切な管理を厳重に指示した。

■ 農場概要	:一貫経営 約1,700頭飼養	
■ 経過	: H26.12.23朝、1腹の哺乳豚が下痢 H26.12.24朝、母豚20頭、哺乳豚200頭が下痢	
■ 通報	: 平成26年12月24日 8時30分	
■ 初動対応と所要時間		
	本事例	5月事例
家保出発	20分	30分
採材	15分	10～40分
疫学調査	1時間30分	2時間
■ 農場名の公表	公表先リストを整理し情報提供	

図1 PED防疫マニュアル策定後の初事例概要

8 まとめ及び課題

当所では、国内でのPED発生以降、農家台帳整備の強化を中核とした対策を講じた。

農家台帳においては、実践的な内容の台帳となり、現在も継続して情報収集中である。PED発生に伴い、発生の段階に応じた対策を講じ、踏み込み消毒槽設置率の向上やPEDワクチン接種率能向上等の成果を得ることができた。発生例に対しては、迅速な対応ができ、5月に発生した2事例は、いずれも沈静化し、現在までに再発生はみられていない。

PED防疫マニュアル策定後、県内初となる事例が当管内で発生したが、マニュアルに基づく対応を、迅速・的確に講じることができた。

平成26年度の県内発生期でのピーク以降、関係者のPEDに対する危機意識の低下が懸念されるため、情報提供と指導を継続して図る必要がある。また、今後、農場の地図情報や制限区域情報、防疫作業情報を盛り込んだ台帳を整備し、より実践的な台帳整備に取り組むとともに、飼養衛生管理が不十分な農場については、農協等の関係機関と連携し、防疫意識を向上させることなどの取組みも必要である。

7 豚流行性下痢 4 例の発生に伴う防疫対応

大河原家畜保健衛生所

加藤里子, 大越啓司, 日野正浩

1 はじめに

豚流行性下痢(以下, PED)は, 平成25年10月, 7年ぶりに沖縄県で確認されて以来, 全国的に発生が拡大し, 本県でも平成26年4月から7月までに16例の発生が見られた。そのうち管内では飼養形態の異なる農場で4例の発生を確認し, 本病のまん延防止及び清浄農場復帰に向けた取り組みを行ったので, その概要について報告する。

2 発生概要

管内では5月上旬から下旬にかけて, 4例の発生があった。発生農場は一貫経営(A農場), 繁殖(B農場), 肥育(C農場), 種豚場(D農場)であった。平成26年5月4日, A農場(繁殖豚469頭, 肥育2,800頭飼養)では, 分娩舎3棟で哺乳豚120頭が嘔吐・下痢を呈した。5月12日, B農場(繁殖豚1,535頭, 子豚2,300頭飼養)では, 分娩舎3棟で哺乳豚1,320頭が嘔吐・下痢を呈した。5月22日, C農場(肥育豚8,600頭飼養)では肥育舎2棟で肥育豚20頭が下痢を呈した。5月26日, D農場(繁殖豚300頭, 子豚2,400頭飼養)では, 分娩舎1棟で哺乳豚40頭が下痢を呈した。

3 病性鑑定方法

病性鑑定材料として, A及びB農場では, 発症哺乳豚1頭及び同居豚(哺乳豚)5頭の糞便5検体, C農場は肥育豚5頭の糞便5検体, D農場は哺乳豚5頭の糞便5検体を用いた。ウイルス学的検査では, RT-PCR法によりPEDウイルス, 伝染性胃腸炎(以下, TGE)ウイルス, ロタウイルス(A群・B群・C群)の遺伝子検査を実施した。病理組織学的検査では, 剖検後, 10%中性緩衝ホルマリン固定, パラフィン包埋し, 常法に従いヘマトキシリン(H・E)染色を実施し鏡検した。また空腸, 回腸の組織標本については, 抗PEDウイルスウサギ血清及びヒストファイ

ンシンプルスステMAX-PO(MULTI)を用いて免疫組織化学染色を実施した。

4 病性鑑定結果

ウイルス学的検査では全検体でPEDウイルス遺伝子陽性であった。また, B及びC農場ではA群ロタウイルス陽性であった。他, TGEウイルス, ロタウイルス(B群・C群)は陰性であった。病理組織学的検査では, 剖検所見で腸壁の菲薄化, 組織所見で空腸及び回腸における広汎な腸絨毛の萎縮を認め, 粘膜上皮細胞の細胞質にPEDウイルス陽性抗原を認めた。

5 発生経過

発症・死亡頭数は表-1に示すとおり, A, B, D農場では分娩舎で発生を認め, 特に哺乳豚の死亡頭数が多く被害が大きかった。また, 肥育豚での発生があったC農場では死亡は認められなかった。発症・死亡頭数の推移は図-1に示すとおりで, 1週間の発症ピークの後, 3日程度遅れて死亡のピークがあり, その後は徐々に減少した。発症期間はA農場25日, B農場40日, C農場11日, D農場12日で分娩頭数の多いB農場で最長となった。

表-1 発症・死亡頭数

	A農場	B農場	C農場	D農場
発症頭数	母豚805頭 哺乳2,437頭	母豚350頭 哺乳4,307頭	肥育2,415頭	母豚104頭 哺乳714頭
死亡頭数	哺乳583頭	哺乳2,240頭	0頭	哺乳251頭

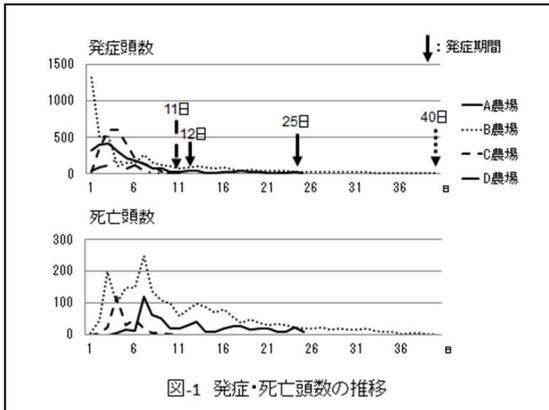


図-1 発症・死亡頭数の推移

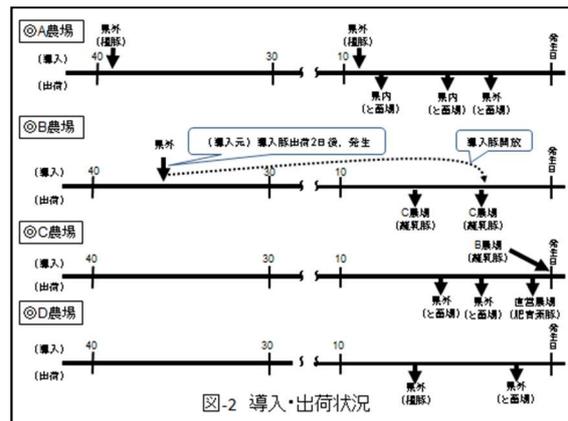


図-2 導入・出荷状況

6 疫学調査

発生前の各農場における導入・出荷状況は図-2に示すとおりであった。導入時、A農場は1ヶ月間の隔離観察を実施しており、導入種豚に異状は認められなかった。肥育豚は3回の出荷があった。B農場では、発生36日前に種豚導入があり、導入元はその種豚の出荷2日後にPEDが発生していた。この種豚の1ヶ月の隔離観察から解放3日後に発生した。

なお、この発生以前に直営C農場へ離乳豚の移動があった。

C農場は、発生当日にB農場からの離乳豚の移動があったが、離乳豚に症状は認められなかった。出荷は、と畜場の他、直営農場への肥育素豚の移動があった。

D農場では、1年以上、外部からの導入はなかったが、県外への種豚及びと畜場への出荷があった。

なお、C及びD農場は非区分出荷と畜場(PED発生農場と非発生農場の出荷を曜日・時間帯などで区分していないと畜場)への出荷があった。

その他の疫学情報として、B農場では県外から同一ロットの種豚を導入した系列4農場で、4月下旬に発生していた。C農場ではB農場の糞尿処理施設・ローダー・堆肥運搬車を共用していた。D農場は、発生農場への種豚出荷があった。

7 清浄化及びまん延防止対策

今回の発生状況及び疫学調査の結果を基に清浄化及びまん延防止の取組として以下の対策を行

った。

(1) 飼養衛生管理の再徹底の指導

①発生畜舎からのウイルス拡散防止策として農場内における作業者の専従化を図った。②ウイルスまん延防止策として発症豚の早期発見・隔離を徹底した。③豚舎内のウイルス低減・除去のため空豚房の洗浄・消毒を徹底した。④農場内外での交差汚染防止のため出荷運搬車の消毒を徹底した。

(2) 沈静化確認・通常出荷復帰(図-3)

県と関係機関で沈静化確認・通常出荷復帰へ向けて方針を検討した。発生後1週間は肥育豚の出荷自粛、健康状態の報告を受けた。自粛解除後は1週間毎に報告を受け、全豚舎でPEDを疑う症状を認めなくなってから1週間後に沈静化の確認のため立入を行った。更に3週間異状を認めなければ、4週間で通常出荷へ復帰させた。A農場では通常出荷復帰まで53日、B農場は68日、C及びD農場は約40日となった。

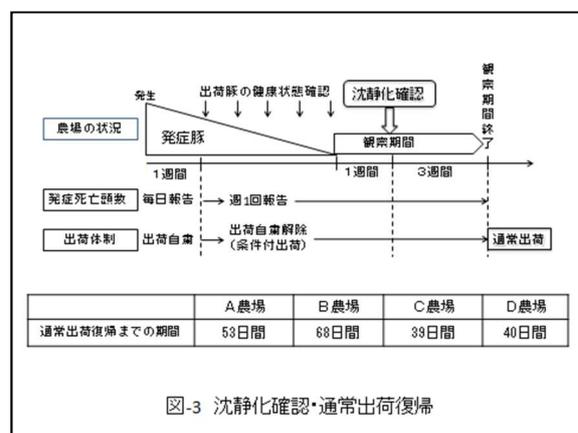
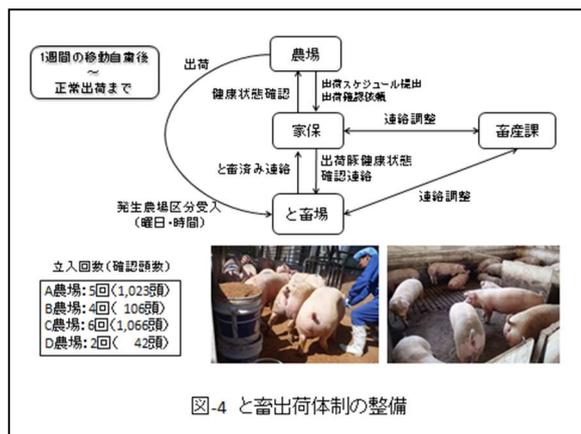


図-3 沈静化確認・通常出荷復帰

(3)と畜場出荷体制の整備(図-4)

と畜出荷体制の整備として、と畜場での交差汚染防止のために関係機関と調整した。通常出荷までは、PEDを疑う症状を呈していない豚を出荷し、と畜場が定める条件に従うよう指導した。家保で立ち入り、出荷豚の異常の有無を確認後、と畜場への連絡を行い、受け入れとなった。

なお、立入回数は計17回、約2,200頭の確認を行った。



農場・関係機関と連携してと畜場への出荷体制の整備を実施し、家保による出荷豚の確認・と畜場の指示による区分出荷などを実施した。このことは、進入経路の特定が難しい本病のまん延防止には、有効な対策であると思われた。

PEDは農場への進入経路の特定が困難なこと、ほ乳豚の死亡率が高いこと、分娩舎で発生した場合は農場発症期間が長いことから防疫対応が困難な疾病である。このため平常時から早期発見・通報体制を整備し、迅速な病性鑑定・防疫対応ができたことは、本病の沈静化、まん延防止対策に一定の成果をあげることができたものと思われる。管内におけるPEDの発生は4農場にとどまったが、全国的にはまだPEDの発生が継続している。PED防疫対策マニュアル(平成26年10月24日付け26消安第337号消費・安全局長通知)の活用により、本病の養豚場への侵入防止、衛生管理の徹底による防疫対策を今後とも指導継続していく必要がある。

8 まとめ及び考察

今回発生した4例については飼養衛生管理基準の遵守を徹底している衛生意識の高い農場であった。

疫学調査では、B農場は発生農場から導入した種豚の隔離観察から解放後3日で発生したことから導入豚が感染源と推察された。C農場はB農場と堆肥舎・ローダー・堆肥運搬車を共用していたことから、これらが感染源と推察された。他の2農場については、非区分出荷と畜場への出荷のほか感染源となるものは見いだせなかった。

A及びB農場での発生状況から、本病が哺乳豚で発生した場合、死亡多発・長期化し、被害は甚大になると思われた。これは、分娩舎内でのウイルス排泄量が多く、感染を断ち切るのが非常に困難であるためと考えられた。D農場では分娩頭数が少なかったため、分娩舎での継続発生が見られなかった。このことから、特に分娩舎での感染を早期に断ち切ることが、被害抑制と発生期間短縮につながると考えられた。

8 公務員獣医師の職務理解醸成に向けた4年間の取組成果と今後の展望

北部家畜保健衛生所

佐沢公子, 三浦達弥, 山田侑希, 高野泰司, 鈴木歩, 豊島たまき, 齋藤裕, 大場実

1 はじめに

昨今の獣医療を取り巻く状況には著しい変化が見られ、BSE、高病原性鳥インフルエンザおよび口蹄疫など畜産業を脅かす家畜法定伝染病の国内発生を契機に、食の安全・安心を守る公務員獣医師の不足が深刻化している。

国内の獣医師数については、全国分野別獣医師数の推移(図1)より平成10年から24年までに小動物臨床分野の獣医師が14%増加し、公務員分野の獣医師が9%減少している。

本県においても宮城県獣医師採用状況の推移(図1)より、平成21年度以降採用数が予定数に満たない状況が続いており、今後他県と同様に公務員獣医師の確保が困難になることが予想される。

このような状況の中、農林水産省は平成22年8月31日、「獣医療を提供する体制の整備を図るための基本方針」を公表し、公務員獣医師を安定的に供給するための取組みや国民に対する職務理解の醸成について要点をまとめている。

今回、著者らは本県における公務員獣医師確保及び食の安全に対する地域社会の信頼を得ることを目的に「公務員獣医師の職業紹介出前講座」を4年間にわたり実施してきたのでその概要を報告する。

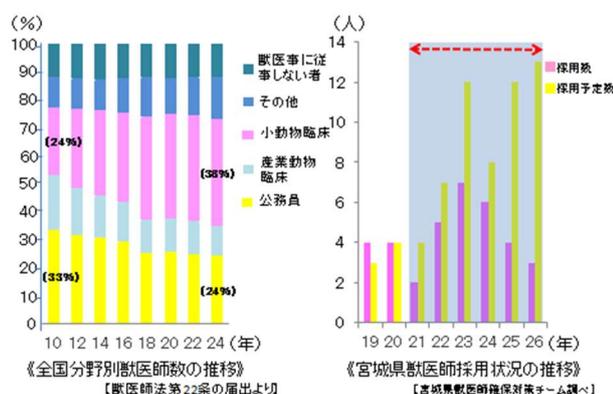


図1 全国分野別獣医師数及び宮城県獣医師採用状況の推移

2 管内学校へのPR活動

本取組みを開始するにあたり、管内の学校へPR活動を実施し、取組みの概要を説明した。その結果、出前講座開催に向けて前向きに検討してもらえることとなった。

(1) 小・中学校

小・中学校向けにパンフレットを作成し、宮城県教育委員会が掲げる「みやぎの志教育」に活用できる教材として提供した。パンフレットは北部教育事務所を通して全ての小・中学校73校へ配布した。

(2) 高等学校

管内高等学校10校に対して、直接学校を訪問し、資料を用いて講座について説明した。また、学生のキャリア支援事業を実施しているNPO法人ハーベストの「キャリアセミナー」に講師登録し、連携した活動も実施した。

3 出前講座の概要

(1) 目的

畜産物の安全・安心が身近な獣医師によって守られていることを理解してもらい、中・高校生が公務員獣医師を目指すきっかけを作り、食の安全に対する地域社会の理解と信頼を得ることを大きな柱とする。

(2) 対象

当所管内の中学校3校244、高等学校6校394名に対して実施した。また、今年度は獣医師会との連携により一般県民を対象とした講座も実施した。内訳詳細は以下のとおり。

【高等学校】

- ・古川学園高等学校1～3年生:311名
- ・加美農業高等学校3年生:28名
- ・涌谷高等学校1年生:11名
- ・田尻さくら高等学校1・2年生:18名

- ・古川黎明高等学校3年生:19名
- ・岩出山高等学校2年生:7名

【中学校】

- ・古川学園中学校3年生:50名
- ・古川中学校1年生:185名
- ・古川黎明中学校2年生:9名

【一般県民】

- ・第19回OSAKI動物セミナーin涌谷町:涌谷町民40名

(3) 講座内容

①パワーポイントのスライドを用いた講義(図2-①)

以下の内容について理解を深めるために、独自に作成したスライドを用いて説明した。

- ・獣医師の職業と獣医師になるまでの道のり
- ・県職員獣医師の仕事
- ・家畜保健衛生所の仕事
- ・産業動物獣医師と社会との関わり

②体験学習(図2-②～④)

古川黎明中学校については以下に示す通り、当所での業務の一部を体験してもらった。

- ・血液検査(血液塗抹の作成・鏡検)
- ・鳥インフルエンザの簡易検査
- ・口蹄疫の検体採材デモンストレーション
- ・防護服の着脱
- ・動力噴霧器による車両消毒



図2 出前講座の様子(講義及び業務体験)

4 アンケート調査による出前講座の効果検証

受講した高校4校367名 中学校2校173名を対象に講義前と講義後に以下の内容で実施した。

(1) 事前アンケート

問1 獣医師の仕事といえばどんなことを思い浮かべますか

問2 宮城県北部家畜保健衛生所を知っていますか

問3 将来の進路希望として獣医系大学を考えていますか

問4 出前講座「獣医師職業紹介」に興味がありますか

(2) 事後アンケート

問1 獣医師の職業について新たに分かったことは

問2 一番印象に残った内容は

問3 出前講座を聞いて、自分の進路の参考になりましたか

問4 今後もこのような講座を実施してほしいと思うか

(3) 結果及び考察

事前アンケートは図3に示す結果となった。問1では動物の治療等臨床に関する回答が合計70%と多くを占め、食肉検査など公務員の仕事に関する回答は合計5%だった。また、家畜保健衛生所(以下家保)の仕事に関する回答はなく、問2より宮城県北部家保を知っている生徒は5%だった。よって、獣医師の職業に対する理解として、身近な存在である「動物病院の獣医さん」のイメージが強く家保の職務に理解が得られていない現状であることが分かった。問3より進路希望として獣医系大学への進学を考えている生徒は7%とわずかだったが、問4より65%の生徒が出前講座へ興味を持っており、進路希望の有無に関わらず獣医師の仕事について知りたいという思いが強いことが分かった。

事後アンケートは図4に示す結果となった。問1では、獣医師の職業に対する新たな理解として「職域の広さ」(41%)及び「公務員としての獣医師の存在」(24%)との回答が多く、問2で一番印象に残った内容として「家保の具体的な仕事内容」が16%と多かったことから、出前講座により公務員獣医師の職務を理解してもらった効果があったものと考えられた。また、問1より「人の食生活に深く関わっていること」が初めて分かったとの回答が7%あり、

公務員獣医師が携わる仕事を身近に感じさせることができたものと考えられた。このように公務員獣医師が果たす役割について広く理解してもらうことは、獣医療に対する信頼向上や家畜伝染病発生に対するリスクコミュニケーションの基盤作りに結びつくものと期待される。問2では「獣医系大学の数・倍率の高さ」(22%)及「獣医師になるための道のり」(10%)が一番印象に残ったとの回答も多く、問3では進路について「大変参考になった」及び「参考になった」と回答した生徒は合わせて71%だった。このことは大学進学を間近に控えた中・高校生にとって重要な情報であり、獣医師を志すきっかけになったものと考えられた。問4では今後もこのような講座を「定期的を実施してほしい」と回答した生徒が45%おり、概ね好評であった。

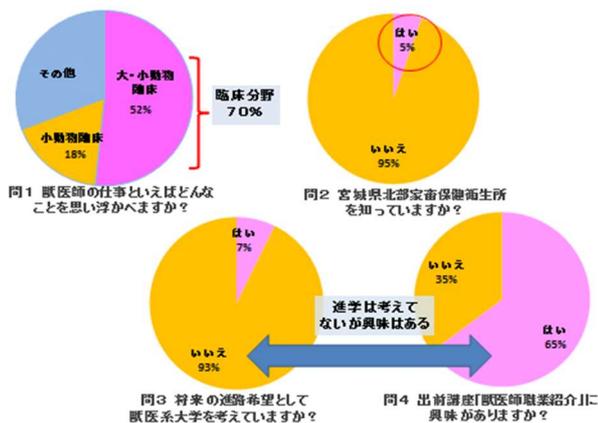


図3 講義前のアンケート結果

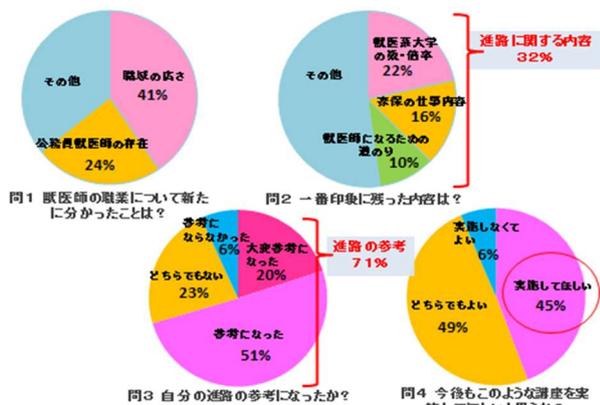


図4 講義後のアンケート結果

5 新たな課題解決に向けた宮城県獣医師職員への意識調査

出前講座を4年間継続することで県内の関係機関に取組が認知されてきたこともあり、今年度、管外の中学校及び高校から講座依頼が数件あった。しかし、移動距離及び時間等の問題で当所のみでの対応ができないという問題点が出てきた。同時期に当県では家保所長らによる「獣医師確保に関する検討会」が開催され、対応策の中に出前講座による公務員獣医師業務の広報が盛り込まれた。これらのことから、今後も講座の依頼が増えることが予想されるため、県内全域に取組を拡大し講座対応の充実を図る必要が出てきた。そこで、当所では取組拡大に向け宮城県獣医師職員を対象とした意識調査を実施した。調査の概要は以下の通りである。

(1) 目的

本取組を県内全域へ拡大するため、講座内容及び手法の改善策を導くことを目的とする。

(2) 対象

宮城県(農林水産部及び環境生活部の各種関係機関)に勤務する獣医職員101名を対象として実施した。

(3) 方法

アンケート用紙を配布し下記の項目について回答してもらった。

- 問1. 北部家保で出前講座を実施していることを知っているか
- 問2. 出前講座の対象として最もふさわしい対象はどれか
- 問3. 出前講座を行う場合どのような内容がふさわしいと思うか
- 問4. 出前講座の効果として考えられることは何か
- 問5. 出前講座の講師として参加したい意向はあるか
- 問6. 出前講座を今後拡大するとした場合の問題点は何か

(4) 結果及び考察

調査の結果は図5に示すとおりであった。問1より59%の職員が北部家保で出前講座を実施していることを知っていた。問2において講座の対象としてふさわしいのは中学生(34%)又は高校生(33%)

との回答が多かった。問3より講座内容として適しているのは「公務員獣医師の職業を広く紹介」との回答が多く60%であった。問4より講座によって得られる効果として「公務員獣医師の業務・役割への興味・理解」が73%と多数であった。よって、当所の実施している手法やねらいについては賛同が得られているものと思われた。しかし、出前講座の講師として参加したい意向のある職員は問5より38%と過半数に満たない状況であり、問6で挙げられた問題点を危惧しての結果と考えられた。問題点の中には通常業務との兼ね合いが難しい、主務課が関与し全県下で取り組むのが良いなどの「実施側の体制整備」(38%)及び教育行政機関との連携、獣医師職員以外の理解が必要等「関係機関との連携」(26%)が多く挙げられた。

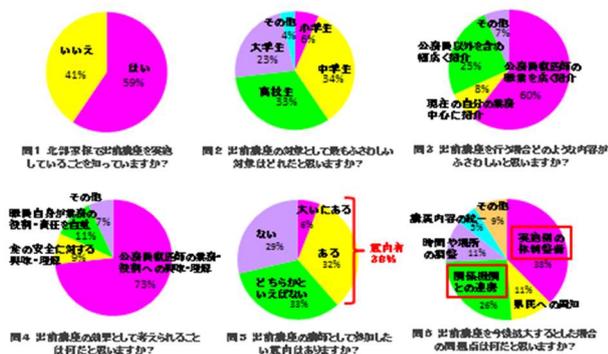


図5 宮城県獣医師職員の意識調査結果

6 今後の展開

今後は実施体制の整備や関係機関との連携を強化するため、畜産課が先導を取り、教育関係機関及び獣医師会等の各種関係機関と連携を図り、依頼のあった学校の地域を管轄する家保が出前講座を実施することで、通常業務への負担を軽減しながら取組を進められると考えられる。また、各家保で出前講座を開催して取組エリアを拡大するとともに、その対象も拡大し、学校の他一般県民への講座の機会も増やしていきたい。今後も獣医師の安定的確保、食の安全に対する地域社会の信頼向上を目的に県内全域で長期的な取組展開を目指したい。

9 下痢を呈した豚群におけるデルタコロナウイルスの確認と県内浸潤状況

仙台家畜保健衛生所

小寺 文, 竹田百合子, 千葉直幸, 曾地雄一郎, 矢島りさ, 西 清志

1 はじめに

平成26年4月下旬, 県内一養豚場で嘔吐及び水様性下痢が確認され, 精密検査の結果, 既知の下痢をおこす病原体の直接的関与を証明できず, 全検体から豚デルタコロナウイルス(PDCoV)を検出したため, 県内浸潤調査を実施した。その結果, PDCoVは県内に新たに侵入した下痢発症に関与するウイルスと示唆された。

PDCoVは, 平成24年に香港の豚の保存材料から初めて確認され¹⁾, 下痢を呈する豚への感染は, 平成26年, 米国で初めて報告され¹⁰⁾, 同国では, 同年4月から, PEDとともに届出感染症に指定⁸⁾されている。国内のPDCoV感染の確認及び下痢との関与に関する報告はない。

2 材料と方法

発生状況: 農場は, 繁殖雌150頭規模の一貫経営である。平成26年4月下旬, 分娩舎の母豚3頭が下痢を呈し, うち1頭の出産した5日齢哺乳子豚数頭も下痢を呈した。同日, PED発症を疑い, 母豚3頭及び哺乳豚3頭の計6頭(No.1被剖検豚, No.2~6糞便)の材料採取。翌日, 別豚舎の母豚20頭程度に食欲不振及び12頭に下痢を確認, 離乳豚舎でも23頭が下痢を呈し農場内に拡大傾向を認めたことから, 繁殖母豚3頭及び離乳豚2頭の計5頭(No.7~11糞便)の材料を追加採取した。農場管理者の稟告は, 食欲不振を伴う水様性の下痢で, 一部の豚に嘔吐を認めた。数日間に約6割の繁殖豚が下痢を呈したが, 子豚や離乳豚に大きな流行を認めることなく, 初発から6日程度で沈静化した。

病理学的検査: 15日齢の哺乳豚1頭は, マホプラジン製剤(マフロパン1%注射液, 共立製薬株式会社, 東京)により鎮静処置の上剖検した。10%中性緩衝ホルマリン固定後, パラフィン包埋し, 定法に

従いH・E染色を実施した。また, 免疫組織学的検査として, 抗PEDVウサギ血清を用い, 空腸及び回腸標本を材料に, 染色キット(ヒストファイน์ シンプルステインMAX-PO(MULTI), ニチレイバイオサイエンス, 東京)を用いた免疫組織化学染色を行った。

細菌学的検査: 被剖検豚1頭の一般細菌検査として, 肝臓・脾臓・腎臓・心臓・肺・大脳を材料に, 5%羊血液寒天培地及びDHL寒天培地を用い37°C18~48hr好気培養, 5%卵黄加GAM寒天培地を用い37°C18~48hr嫌気培養を行った。さらに, 小腸内容については, DHL寒天培地, ESサルモネラ寒天培地II及び5%卵黄加CW寒天培地を用い, 定法に従い定量培養を行った。

ウイルス学的検査: 被剖検豚1頭の空腸内容及び同居豚10頭の下痢便についてウイルス遺伝子の検索を行った。RNAは, 市販のキット(QIA-amp Viral RNA Mini, QIAGEN, U.S.A.)を用い抽出後-20°C保存とし, 抽出RNAはPrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2(TAKARA, 滋賀)を用い, 豚流行性下痢ウイルス(PEDV)ORF3遺伝子領域6), PEDV M遺伝子領域1), 伝染性胃腸炎ウイルス(TGEV) S遺伝子領域9), A群ロタウイルス(GARV) VP6遺伝子領域2), B群ロタウイルス(GBRV) VP7遺伝子領域3), C群ロタウイルス(GCRV) VP7遺伝子領域7)について, PCR法を実施した。

これらのウイルス学的検査, 細菌学的検査の結果, 下痢の主原因が特定できなかったことから, PDCoVもしくはPEDVの変異の可能性を考え, コロナウイルス亜科(panCoV)に共通のポリメラーゼ遺伝子領域⁹⁾のRT-PCRを実施し, 陽性検体の一部を, 動物衛生研究所に提供するとともに, PDCoV N遺伝子領域¹⁰⁾のRT-PCR法を実施し, 陽性2検体について, Applied Bio-systems3130

Genetic Analyzer(Life Technologies, U.S.A.)を用い遺伝子配列を決定し、MEGA6を用いClustalWによるマルチプルアライメントとNJ法による分子系統樹解析を行い、既知のPDCoVと比較した。併せて、PDCoVのORF1遺伝子、M遺伝子、S遺伝子の各断片を標的に、Marthaler Dら⁴⁾の方法に準じ、4 μ LのRNAについて、市販のキット(One Step PrimeScript RT-PCR Kit, TAKARA, 滋賀)及びリアルタイムPCRシステム(Applied Biosystems7500, Life Technologies, U.S.A.)を用いてリアルタイムRT-PCR法を実施した。反応条件は、逆転写反応48℃10分、酵素熱失活95℃10秒後、95℃5秒、60℃35秒を40サイクルとした。

浸潤調査: 平成26年4月13日～7月4日に採取した下痢便21戸(延べ26戸)117頭(検出率に反映させるため、前述の県内初検出農場1戸11頭含む)、聞き取りにより過去2か月以内に農場全体に感染性の下痢の発症を認めなかった農場の健康豚15戸88頭(採取日:平成26年6月30日～12月24日)、遡及調査として平成17～25年度に病性鑑定うち下痢材料の保存のあった13戸20頭について、N遺伝子領域のRT-PCRを実施した。また、全ての陽性農場について、検出した産物の一部の塩基配列決定により同定し、分子疫学解析に供した。

なお、健康豚の調査では、新たな病原体の監視強化と浸潤調査協力要請を目的にPDCoVに関する啓蒙リーフレットを作成し、豚の飼養者へ情報提供を行った。

3 成績

症状と病理学的検査: 剖検時の哺乳豚は、体重3kg、体温39.6℃で、削瘦は認めず自立していたが、元気消失し、黄色水様性下痢を呈していた。剖検では、空腸から結腸にかけて、腸壁は菲薄化し、黄色水様性内容物の貯留を認めた。H・E染色標本では、空腸の腸絨毛の一部が萎縮し、絨毛長の不均一を認めた。回腸及び回盲部では、腸絨毛が広汎に萎縮し、粘膜下リンパ組織の活性、結腸では、粘膜固有層にリンパ球主体の軽度細胞浸潤を認めた。なお、直腸及び消化管以外の主要臓器

には著変を認めなかった。また、抗PEDV免疫組織化学染色は、陰性であった(図1)。

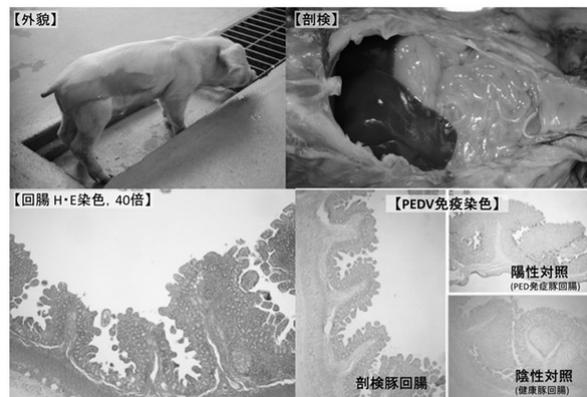


図1 剖検豚と組織病変

細菌学的検査: 一般細菌検査では、実施した全ての臓器から菌分離は陰性であった。また、定量培養では、溶血性大腸菌、サルモネラ及びクロストリジウム属菌の分離は認められず、大腸菌群数は104cfu/g未満であった。

ウイルス学的検査: 同居豚糞便は、哺乳豚1頭(No.6)が宿便様固形便の周囲に粘液の付着した状態であったほか、全て黄～緑褐色の水様性下痢だった。既知の下痢原性ウイルスについては、GARVが被剖検豚を含め6頭に遺伝子の増幅を認めた以外、全て陰性だった(表1)。しかし、材料は全て下痢発症後2日以内と、一般的に最もウイルス量の多い時期にも関わらず検出率は低く、特に哺乳豚で微弱陽性1頭に限られたこと、一般的な症例と比較し、増幅は明らかに微弱であったことから(図2)、今回の下痢の主原因はGARVではないと推察した。続いて実施したpanCoVは11頭中6頭で陽性だった(表1)。PDCoVは、全検体で目的のサイズの産物を得て、うち2頭の塩基配列を決定した結果、米国の既報PDCoV株と完全一致した。

表1 糞便の状態と病原検査結果

ウイルス	PEDV	TGEV	GARV	GBRV	GCRV	panCoV	PDCoV		下痢便の状態
							ORF3-M	S	
1 剖検豚	-/-	-	+	-	-	+	+	+	黄色水様性
2	1	-/-	-	+	-	-	-	+	黄褐色 ～緑褐色 水様性
3	母豚2	-/-	-	-	-	-	-	+	
4	3	-/-	-	-	-	-	-	+	
5	哺乳豚1	-/-	-	-	-	+	+	+	黄色水様性
6	2	-/-	-	-	-	+	+	+	宿便様便
7	4	-/-	-	+	-	-	-	+	黄褐色 ～緑褐色 水様性下痢
8	母豚5	-/-	-	+	-	-	-	+	
9	6	-/-	-	-	-	-	-	+	
10	離乳豚1	-/-	-	+	-	+	+	+	黄色水様性
11	2	-/-	-	+	-	+	+	+	

また、リアルタイムRT-PCRでも、ORF1, M, S遺伝子ともに、特異的反応を検出し(図3), 検出した遺伝子断片はPDCoVであると判断した。

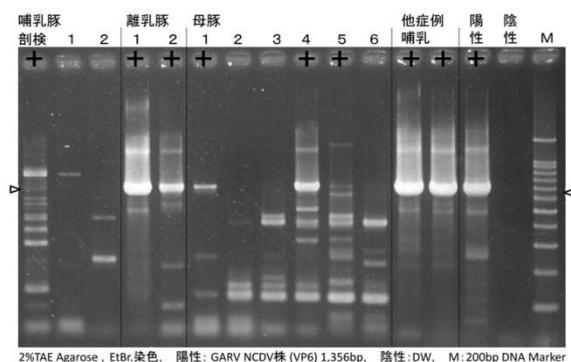
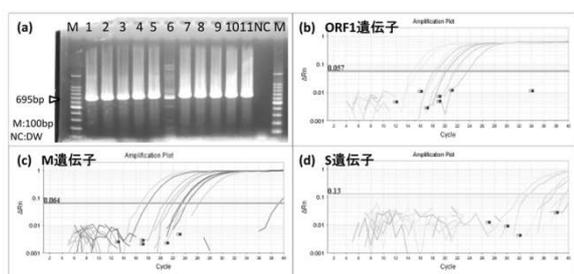


図2 A群ロタウイルスのRT-PCR結果



(a) N遺伝子 (RT-PCR) : 11検体全てで目的の695bpの断片を検出
 (b) ORF1遺伝子 (real time RT-PCR) : 全11検体 陽性 (CT値14.80~36.91)
 (c) M遺伝子 (real time RT-PCR) : 全11検体 陽性 (CT値16.74~39.18)
 (d) S遺伝子 (real time RT-PCR) : 11検体中7検体 陽性 (CT値32.42~39.64)

図3 PDCoV 遺伝子検査結果

浸潤調査: 平成26年度の下痢便4戸(19%, うち1戸がPEDVと混合感染)21頭(18%)からPDCoV遺伝子を検出した。陽性農場1は前述の初確認農場で、一貫経営、A県A農場から豚を導入し、C県と県内Bと畜場に出荷で、これらは陽性農場3に共通であった。陽性農場2は肥育経営でB県から素豚を導入し、県内Aと畜場へ出荷、陽性農場4は一貫経営、豚の導入は県内B農場、出荷先は県内Bと畜場であり、陽性農場2を除き、複数の疫学情報に共通項目を認めた。

各農場のpanCoV, PDCoV, PEDV, GARVの陽性数、下痢初発から沈静化までの日数は、陽性農場1は、11検体中6, 11, 0検体, 6日, 陽性農場2は、5検体中2, 5, 0, 5検体, 7日, 陽性農場3は、6検体中0, 3, 0, 6検体, 3日, 陽性農場4は、5検体中5, 2, 5, 5検体, 45日、PEDとの混合感染を認めた農場4を除き、沈静化までの日数の最長は7日であった。なお、TGEV, GBRV, GCRVについては、全検体陰性であった。

分子疫学解析の結果、PDCoV N遺伝子は、陽性農場1, 2とも、それぞれ米国の既報ウイルスに完全一致した。また、陽性農場3, 4は、片側のプライマーに対する配列のみで同定を行ったことから参考値ではあるが、陽性農場1に完全一致した(図4)。

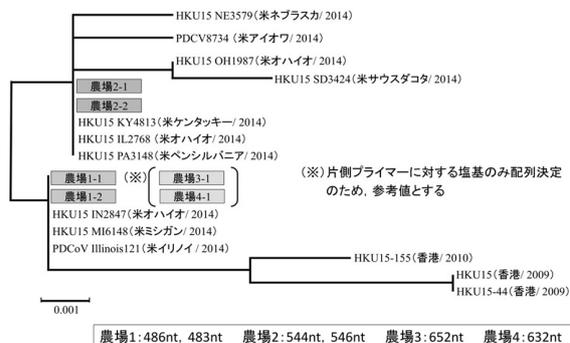


図4 PDCoV N遺伝子領域系統樹

全4陽性農場で、GARV遺伝子が検出されたことから、その意義を検討するため、前述健康豚15戸88頭の検査を実施した結果、5戸21頭(23.8%)の直腸便からGARV遺伝子が検出され、月齢別の陽性数/検体数は、哺乳豚3/6, 1月齢5/5, 3月齢3/5, 4月齢3/12, 5月齢2/6, 繁殖育成(未経産)5/23, 繁殖1/32であった。

4 考察

平成26年春、一連のPED病性鑑定(本県16例; 4月18日~7月4日)における期間内の病性鑑定対応は21(延べ26)農場であった。そのうち1農場の検査において、母豚、離乳豚、哺乳豚と全てのステージに水様性下痢が認められ、母豚中心に感染が拡大した。剖検所見を含め、豚群が高い免疫を持たないウイルスの新たな侵入による下痢症を疑い、PEDV, TGEV, GBRV, GCRVの検出を試みたが、実施した遺伝子検査では全て陰性であり、また、多くの農場で常在が認められるGARVも主原因と考えられなかった。さらに、農林水産省動物衛生課から米国の新たな動向として情報提供のあった国内未報告のPDCoVや、PEDVの変異による不検出を疑い検査を継続し、検査を実施した全頭からPDCoVを検出した。本症例の下痢は6日程度で沈静化したが、下痢の初発から18日後新たに哺乳豚を中心に下痢が発生しPEDと診断した。

診断時の全検体でPDCoVは非検出であった。当該農場のPED沈静化は24日を要し、県内16例の沈静化までの平均は36日で、本症例では、PDCoVの介在する下痢の直後に発生したPEDであっても、その沈静化が長期化することはなかった。

浸潤調査では、下痢発症豚4戸(19%)、21頭(18%)からPDCoVを検出し、健康豚及び遡及調査では全て非検出であったことから、PDCoVは、県内に新たに侵入した下痢に関与するウイルスであることが強く示唆された。

陽性4農場に共通する臨床症状は、嘔吐及び水様性下痢で、PEDとの混合感染のなかった3農場ではPEDと比較し、下痢の程度は軽く、死亡する個体も極めて少なく、農場内の感染拡大も強くない傾向。沈静化までの期間も最長7日と速やかだったのに対し、PEDと混合感染を認めた陽性農場4では45日で、県内平均と比較し、長期間を要す結果となった。Marthaler Dら⁴⁾は、米国の下痢に関与する293検体中89検体(30%)がPDCoV陽性で、単独感染とPEDやロタウイルスとの混合感染は、各20検体(22.5%)、69検体(77.5%)と報告しているのに対し、本県では、5検体(23.8%)、16検体(76.2%)であり、臨床症状を含め一致する結果となった。

多くの農場に常在することが知られているGARV遺伝子が健康豚の23.8%から検出され、その結果が母豚から乳汁免疫を受けていると思われる哺乳豚を除き日齢耐性に応じた検出率であったことから、直腸便からGARV遺伝子が検出されたという事実だけでは、下痢との直接的関連は不明であることや、panCoVのPCRは総じて感度が低い傾向にあったことは、今後の病性鑑定に活用したい。

今回4戸6頭の分子疫学解析の結果、塩基配列の相違と疫学関連の有無に相関を認めた。疫学調査からは、PDCoVの侵入経路は不明であったが、陽性農場には、過去に再発を疑う下痢の発症歴は見当たらないことから、一連のPEDの流行にあわせ県内に新たに侵入した可能性が推察され、PDCoVの疫学・病態解明には、全国的な野外症例の蓄積と疫学解析が重要と考える。

今回、国からの情報提供を参考に、新たな畜産経営に対する阻害要因となりうるウイルスの存在を確認し、県内豚飼養者への情報提供や、動物衛生研究所への材料提供をすることができたが、一連の対応において、家畜防疫を所管する家保の役割として、的確な情報収集、事態の把握、速やかな情報の公表と他県を含めた関係機関との連携の重要性について再認識した。今後も、本業績を畜産物の安全性確保と生産性向上に役立てたい。

稿を終えるにあたり、抗PEDVウサギ血清等の分与頂いたとともに、終始、多大なる御助言賜りました独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所の諸先生方に深謝します。

5 引用文献

- 1) Duarte M, Tobler K, Bridgen A, et al: Sequence analysis of the porcine epidemic diarrhoea virus genome between the nucleocapsid and spike protein genes reveals a polymorphic ORF, *Virology*, 198,466-476(1994).
- 2) Fujii Y, Shimoike T, Takagi H, et al : Amplification of all 11 RNA segments of group A rotaviruses based on reverse transcription polymerase chain reaction, *Microbiol Immunol*,56, 630-638(2012).
- 3) Kuga K, Miyazaki A, Suzuki T, et al : Genetic diversity and classification of the outer capsid glycoprotein VP7 of porcine group B rotaviruses, *Arch Virol*, 154, 1785-1795(2009)
- 4) Marthaler D, Raymond L, Jiang Y, et al: Rapid Detection, Complete Genome Sequencing, and Phylogenetic Analysis of Porcine Delta-coronavirus, *Emerging infectious diseases*,20, 8(2014)
- 5) Moës E, Vijgen L, Keyaerts E, et al: A novel pancoronavirus RT-PCR assay: frequent detection of human coronavirus

- NL63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium, *BMC Infect Dis*,5, 6 (2005)
- 6) Park SJ, Moon HJ, Luo Y, et al : Cloning and further sequence analysis of the ORF3 gene of wild-and attenuated-type porcine epidemic diarrhea viruses, *Virus Genes*, 36,95-104 (2008)
- 7) Tsunemitsu H, B. Jiang, L. J. Saif: Sequence comparison of the VP7 gene encoding the outer capsid glycoprotein among animal and human group C rotaviruses, *Arch Virol*, *Arch Virol*,141(3-4),705-713(1996)
- 8) United States Department of Agriculture News Release : Required Reporting of Cases Latest Measure to Slow Disease Spread, Release No.0066.14, 2014
- 9) Vaughn EM, Halbur PG, Paul PS : Three New Isolates of Porcine Respiratory Coronavirus with Various Pathogenicities and Spike (S) Gene Deletions, *J Clin Microbiol*, 32, 1809-1812(1994)
- 10) Wang L, Byrum B, Zhang Y : Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pig, Ohio, USA, 2014, *Emerging infectious diseases*, 20:7,1227-1230(2014)
- 11) Woo PC, Lau SK, Lam CS, et al. : Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus, *J Virol*,86,3995-4008(2012)

10 豚大腸菌症由来O147における薬剤耐性と分子疫学的解析

仙台家畜保健衛生所

矢島りさ, 曾地雄一郎, 千葉直幸, 竹田百合子, 小寺文, 西清志

1 はじめに

県内で豚大腸菌症が発生し、分離株はリジン脱炭酸反応陰性を特徴とする毒素原性大腸菌O147であった。リジン脱炭酸反応とは菌種同定に用いる生化学性状のひとつで、大腸菌は大半がリジン脱炭酸反応陽性となることから他の腸内細菌との鑑別に重要な項目とされる^{1),4)}。今回、同様の性状を示す過去の豚大腸菌症由来株と併せて各種解析を実施したので、その概要を報告する。

2 病性鑑定事例

(1) 発生概要

平成26年4月、母豚8頭を飼養する一貫農場で、離乳豚(約60日齢)が下痢を発症、生菌製剤やABPC投与を実施していた。5月に入り離乳豚1腹(47日齢)5頭中1頭が下痢、翌日1腹(38日齢)が発症し、それぞれERFX投与を行ったが2日後3頭が死亡、さらに2腹(44日齢, 64日齢)が発症したため病性鑑定を実施した。

(2) 材料および方法

離乳豚生体1頭と糞便4検体について、病理、細菌、ウイルス、生化学的検査を実施した。

1) 病理学的検査

常法に基づき標本を作製し、H・E染色、グラム染色を実施した。また、動物衛生研究所へ依頼し免疫組織化学的染色(抗O147, 抗A群ロタウイルス)を実施した。

2) 細菌学的検査

解剖豚の主要臓器(肝臓・脾臓・腎臓・心臓・肺・脳)、同居豚糞便4検体を用いて好気培養(5%羊血液寒天培地・DHL寒天培地・ESサルモネラ寒天培地Ⅱ)、嫌気培養(5%卵黄加GAM寒天培地)により細菌分離を実施した。また、解剖豚空腸内容物について好気培養(5%羊血液寒天培地・DHL寒天培地・ESサルモネラ寒天培地Ⅱ)、嫌気

培養(5%卵黄加CW寒天培地)により定量培養を実施した。

分離菌は簡易同定キットAPI20E(シスメックス・バイオメリュー)、市販免疫血清(デンカ生研)を用いたO群血清型別、一濃度ディスク法による薬剤感受性試験(12薬剤: ABPC・AMPC・CEZ・CXM・KM・GM・OTC・CL・ST・CP・FOM・ERFX)を当所で実施後、動物衛生研究所へ16SrRNA解析、O群血清型別を依頼した。病原遺伝子検索は毒素(LT・STa・STb・Stx1・Stx2)・付着因子(Intimin・F4・F5・F6・F18・F41)についてPCR検査を実施した。

3) ウイルス学的検査

解剖豚空腸内容物、同居豚糞便4検体を用いて豚流行性下痢ウイルス(PED)、伝染性胃腸炎ウイルス(TGE)、A群ロタウイルス(GAR)、B群ロタウイルス(GBR)、C群ロタウイルス(GCR)についてRT-PCR検査を実施した。

4) 生化学的検査

解剖豚のEDTA血や血清を用いて血球計数(全自動血球計算機MEK-6258)、白血球百分比(血液塗抹後に染色(ヘマカラー))、血液生化学的検査(富士ドライケム3000)、血清蛋白分画(セルロースアセテート膜電気泳動法)を実施した。

(3) 結果

1) 病理学的検査

回腸粘膜上皮細胞罫子縁にグラム陰性桿菌の付着を認め、同部位の免疫組織学的染色で菌体に一致してO147陽性抗原を多数認めた。A群ロタウイルスは解剖豚において明らかな陽性抗原はみられず、本症例は大腸菌が主症状と考えられた[図1]。

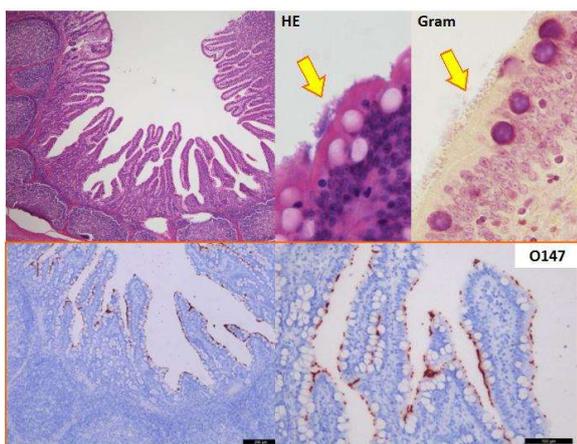


図1 解剖豚回腸 組織写真

2) 細菌学的検査

主要臓器からの菌分離は陰性であった。定量培養において完全溶血を示す大腸菌が 9.1×10^7 cfu/g 分離された。分離株はAPI20Eにおいて code:1144172, *Escherichia coli* 48.9%, 市販抗血清ではO群型別不能となったことから動物衛生研究所に依頼し, 16SrRNA解析において大腸菌と同定(データベース上の *E. coli* と99.6~100%一致), 血清型はO147と決定した。薬剤感受性試験ではABPC・AMPC・OTC・ST・CP・ERFX耐性であり, 病原遺伝子検索では毒素LT・STb, F18線毛遺伝子を保有していた。同様の株は糞便4検体からも分離された。

3) ウイルス学的検査

全検体からGARV遺伝子断片を検出, その他のウイルスは陰性であった。

4) 生化学的検査

赤血球数 ($857 \times 10^4 / \mu\text{l}$)・白血球数 ($24,300 / \mu\text{l}$) 増加, Ht 上昇 (47.4%), BUN (86.1mg/dl)・Cre (3.6mg/dl)・Glu (181mg/dl)・IP (13.2mg/dl)・CK (1,591U/L) 上昇, TG 低下 (22mg/dl), γ -Glb 分画減少がみられ, 脱水および筋の損傷が疑われた。

以上の結果から本症例を毒素原性大腸菌O147による豚大腸菌症と診断した。

3 過去の分離株との比較

(1) 材料および方法

1) 材料

過去20年間(H7~26)の県内家畜由来株のうちリジン脱炭酸反応陰性の株を用いた。リジン脱炭酸反応陰性株は今回の症例を含め3戸11株であり, API20Eで同一コード(code:1144172)を示した。3農場は発生年や所在する市町は異なるが, 離乳豚の大腸菌症のため病性鑑定を実施しており, 母豚の導入農場や出荷先などに直接または間接的に関連がみられた[表1]。

表1 供試株の詳細

農場	菌株	発生	農場形態	品種	日齢	症状	疫学関連情報		
							市町	導入農場	出荷先
A	5株	H26	一貫	D	41	下痢	a	I	i ii
B	4株	H22	一貫	D	28	下痢	b	I II	i
C	2株	H24	繁殖	LW	39	死亡	c	III	iii

* 導入農場III: IIから育成豚導入

2) 方法

下記のとおり実施した(※印:動物衛生研究所へ依頼)。

O群血清型別(※), 病原遺伝子検索: 前述の病性鑑定事例と同様に実施した。

薬剤感受性試験: 市販プレート(栄研化学)を用いた微量液体希釈法にて, ERFXの代謝物であるCPFXを含む12薬剤(ABPC・CEZ・CTX・SM・GM・KM・TC・CL・CP・TMP・NA・CPFX)について実施した。各薬剤のブレイクポイントはCLSI²⁾・薬剤耐性菌発現状況調査⁵⁾の値を参考とした。

Multilocus Sequence Typing (MLST, ※): 7つのハウスキーピング遺伝子(adk・fumC・gyrB・icd・mdh・purA・recA)について塩基配列を解析し, その配列からSequence Type (ST)を決定した。

パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE): 制限酵素Xba I, 泳動条件6V/cm, 5~50sec, 22hrにより実施した。

(2) 検査結果

A~C由来株は全て血清型O147, 病原遺伝子LT・STb・F18を保有していた。

薬剤感受性試験では全て複数薬剤に耐性であったが, 農場毎に異なりA由来株は7薬剤(ABPC・SM・TC・CP・TMP・NA・CPFX), B由来株は5薬

剤(ABPC・SM・CP・TMP・NA), C由来株は4薬剤(SM・CP・TMP・NA)耐性を示した。このうちキノロン系薬の最小発育阻止濃度(MIC)は, オールドキノロンであるNAは全株>128 μg/mL(耐性)であり, ニューキノロンであるCPFXはA由来株が8 μg/mL(耐性), B・C由来株は0.12~0.25 μg/mL(感受性)となった。

分子疫学的解析ではMLSTによるSequence Typeは全株がST42, PFGEではAの5株は2つの切断パターン, B・Cは農場毎に同じ切断パターンを示したが, 3農場とも類似しており, 対象として用いたリジン脱炭酸陽性O147(H7県内分離株)とは切断パターンが大きく異なった[図2]。

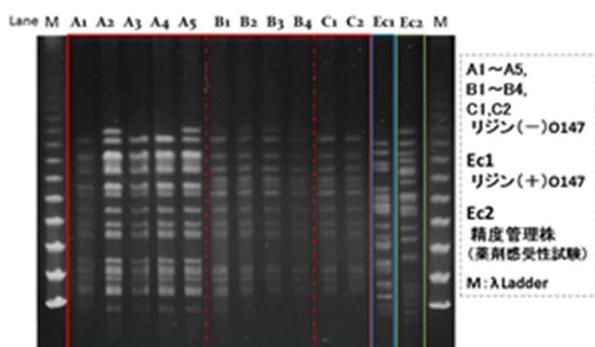


図2 PFGE結果

4 キノロン耐性機構の解析

(1)キノロン耐性機構

主に染色体とプラスミド伝達性耐性遺伝子の2つに分けられる。染色体性がキノロン耐性の主体とされ, キノロン系薬の作用部位であるDNAジャイレースやトポイソメラーゼIVのキノロン耐性決定領域(Quinolone Resistance Determining Region: QRDR)におけるアミノ酸変異により, キノロン系薬の作用部位への結合親和性が低下する。GyrAやParCでの変異箇所の増加に従いCPFXのMICは上昇しCPFX耐性となり, さらに変異箇所の増加やプラスミド伝達性耐性遺伝子などにより更にMICは上昇し高度耐性株となるとされる^{3), 9)} [図3]。

1. 染色体 ⇒ キノロン耐性決定領域(QRDR)におけるアミノ酸変異

DNAジャイレース GyrA		トポイソメラーゼIV ParC		CPFX MIC (μg/mL)	NA	CPFX
Ser-83	Asp-87	Ser-80	Glu-84			
●				~0.25	R	S
●		○ or ○	○	1~4	R	S
●	●	●		8~64	R	R
●	●	●	●	128~	R	R

2. プラスミド伝達性耐性遺伝子など

↓
MIC上昇・高度耐性株

図3 キノロン耐性機構

(2)キノロン耐性機構の解析

DNAジャイレース(GyrA・GyrB)やトポイソメラーゼIV(ParC・ParE)のQRDRにおけるアミノ酸変異解析及びプラスミド伝達性耐性遺伝子Qnr(qnrA・qnrB・qnrS)の塩基配列解析を動物衛生研究所に依頼した。また, プラスミド伝達性耐性遺伝子のうちQepAについてYamaneらの方法¹⁰⁾によりPCRを実施した。

その結果, GyrBやParEにおける変異, プラスミド伝達性耐性遺伝子は今回確認されなかった。GyrAやParCにおいてはA~C全株でGyrAの83位にSerからLeuの置換(S83L), A株のみGyrAのD87YとParCのS80Iが確認され, これは既報と同様の部位での変異であった。つまり, B・C由来株はGyrAにおける1か所の変異によりNA耐性に, A由来株はさらに2か所(GyrAとParC)の変異が加わりCPFXにも耐性を獲得したと判明した[表2]。

表2 キノロン耐性機構の解析結果

農場	薬剤感受性		染色体				プラスミド性	
	NA	CPFX	GyrA		ParC	ParE	Qnr	QepA
			Ser-83	Asp-87	Ser-80			
A	R	R	Leu	Tyr	Ile		-	-
B	R	S	Leu				-	-
C	R	S	Leu				-	-

Ser:セリン, Leu:ロイシン, Asp:アスパラギン酸

Tyr:チロシン, Ile:イソロイシン

5 まとめ及び考察

リジン脱炭酸反応陰性を特徴とする毒素原性大腸菌による豚大腸菌症は過去20年間のうち3件あり、すべて離乳豚の下痢や死亡のため病性鑑定を実施していた。このリジン脱炭酸反応陰性3戸11株はO群血清型、保有病原遺伝子、MLSTにより判定されたSTが同一であり、PFGEでも類似パターンを示したことから同一起源の株と推察された。

薬剤感受性試験では全株が複数薬剤に耐性を示し、とくにA由来株では県内の家畜由来株で初めてニューキノロン系薬耐性が確認された。キノロン耐性機構の解析によりA～C由来株はQRDRにおけるアミノ酸変異によりNAやCPFEXに耐性を獲得したと判明した。

Huangらは豚へのCPFEX経口連続投与により糞便由来株のMICが投与0日目1 μ g/mL, 1日目16 μ g/mL, 16日目128 μ g/mLと上昇したと報告している⁶⁾。A農場では発症群の治療に用いた抗生剤により耐性菌が選択された可能性が考えられた。

畜産分野におけるキノロン耐性大腸菌は昨年度の全国調査でも豚由来株でCPFEX耐性率0.8% (132株中1株)⁵⁾と極めて少なく、本県でも今回初めて確認された。一方、国内でも医療現場では多くの報告があり、ヒト下痢症患者由来株でCPFEX MIC256 μ g/mL⁷⁾の耐性株や、QnrやQepAなどプラスミド伝達性耐性遺伝子についての報告がある^{8)・10)}。今回の株はMIC8 μ g/mLであり高度耐性株ではなかったが、今後さらに QRDRにおける変異箇所の増加やプラスミド伝達性耐性遺伝子により高度耐性株になる危険性も考えられる。また、キノロン系薬は交差耐性を示すため、MICの上昇により最終的に全てのキノロン系薬に耐性となる危険性がある。耐性菌は畜産分野だけでなく公衆衛生においても世界的に重要な問題であり、抗生剤の適正使用について今後も継続して普及啓発に努めていきたい。

稿を終えるにあたり、各種検査に際し多大なご協力を賜りました動物衛生研究所の楠本正博先生並びに芝原友幸先生に深謝致します。

6 参考文献

- 1) G. I. Barrow & R. K. A. Feltham: Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria: 医学細菌同定の手引き 第3版(坂崎利一訳), 近代出版, 東京(1993)
- 2) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 17th Informational Supplement Vol.27 No.1 (2007)
- 3) A. Fabrega et.al.: Microbial Biotechnology 2(1), 40-61(2009)
- 4) J. J. Farmer et.al.: J. Clin. Microbiol. 21(1), 46-76(1985)
- 5) 平成25年度薬剤耐性菌発現状況調査 (http://www.maff.go.jp/nval/tyosa_kenkyu/tai-seiki/pdf/25jvarm.pdf)
- 6) K. Huang et.al.: J. Vet. Med. Sci. 76(9), 1213-1218(2014)
- 7) 石畝 史ほか: 感染症学誌 80(5), 507-512 (2006)
- 8) T. Sato et.al.: Antimicrob. Agents Chemother. 55(8), 3964-3965(2011)
- 9) J. Vila et.al.: Antimicrob. Agents Chemother. 40(2), 491-493(1996)
- 10) K. Yamane et.al.: Antimicrob. Agents Chemother. 52(4), 1564-1566(2008)

11 県内の伝染性気管支炎ウイルス遺伝子型別調査とワクチン選択の検討

仙台家畜保健衛生所
千葉直幸, 小寺文, 西清志

1 はじめに

伝染性気管支炎ウイルス(以下IBV)は、呼吸器症状、腎臓障害、産卵障害などを特徴とし、現在でも養鶏場に大きな被害を与えている疾病のひとつである。対策にはワクチンが有効であるが、IBVは血清型が多様で、市販のIBワクチンには、生・不活化ワクチンのそれぞれに複数のウイルス株が用いられている。血清型は、正確には中和試験で判定されるが、複数のウイルス株やペア血清等の材料が必要になることから検査されるケースは少なく、一般的には中和試験による血清型判定は行われていない。有吉らは、S1領域の遺伝子解析において、血清型と遺伝子型にある程度の相関性があり、S1遺伝子から血清型が推測可能であると報告している¹⁾。県内では、これまでIBV遺伝子型別調査は行われておらず、農場の浸潤状況や遺伝子型は不明である。そこで、これらを明らかにするため、遺伝子型別調査を行い、さらに、使用ワクチンと異なる遺伝子型が検出された1農場でワクチンを変更した結果、育成率の改善が認められたので、その概要を報告する。

2 調査概要

調査農場はH25～26年の2年間、遺伝子型がマサチューセッツ型(以下mass型)のワクチンを使用する県内肉用鶏飼養農場25戸延べ33戸である。(8戸:H25, 26継続, 17戸:H26新規追加)。IBワクチンは、1日齢散霧(1戸)、12日齢飲水(24戸)で投与されており、調査数は、660羽68鶏舎で、1戸あたり10～120羽、1鶏舎あたり5～10羽の気管スワブとクロアカスワブを採材した。

3 材料及び方法

採材検体は5羽プールし、気管スワブ、クロアカスワブ、各132検体を、RNA抽出キット(QIAamp

RNA Mini Kit, QIAGEN)を用いてRNAの抽出を行った。RT-PCRキットは(Prime Script One Step RT-PCR Kit ver.2, TAKARA)を用いてS1遺伝子を標的としたRT-PCRでIBVを検出し、得られた産物を用いた制限酵素断片長多型(RFLP)法により、遺伝子型別に分類した²⁾。

4 成績

IBV遺伝子検査において、気管あるいはクロアカスワブのいずれかで遺伝子陽性だった農場は、延べ33戸中29戸、132検体中108検体と、約9割の農場でIBVの浸潤が確認された。農場レベルの調査において、気管スワブのみの遺伝子検査では検出率に問題はないが、クロアカスワブのみでの調査では、検出率が大幅に低下し、検体レベルの調査では、気管あるいはクロアカスワブの一方の検査では、検出率が低くなることが判明した。このことから、陽性個体の見逃しを防ぐには、気管及びクロアカスワブ両部位の検査が必要であると考えられた(表1)。

表1. 調査成績 (IBV遺伝子検査)

	農場(%) n=33	検体(%) n=132
遺伝子陽性	29 (87.9)	108 (81.8)
気管のみ	29 (87.9)	92 (69.7)
クロアカのみ	19 (57.6)	63 (47.7)

また、本調査で検出された遺伝子型は、Mass, JP- I であり、MassとJP- I の混合感染が認められる農場もあった。継続調査した8農場の検出遺伝子型の推移は、5パターンで多様であった。(表2)。

表2.調査成績(遺伝子型)

調査農場(延べ33戸)の成績			継続調査した8農場の成績		
S1領域 遺伝子型	戸数		農場	H25	H26
	H25	H26			
mass	3	16	1	mass	mass
JP-I	1	1	2	mass	型別不明
混合*	1	4	3	mass	型別不明
型別不明	0	3	4	陰性	mass
陰性	3	1	5	陰性	mass
	8	25	6	陰性	mass
			7	混合*	mass
			8	JP-I	混合*

※MassとJP-I

継続調査した8農場のうち、7農場(No.1～7)では、育成率に特に問題が認められなかったが、ワクチン株と異なる遺伝子型が単独で検出された1農場(No.8)では、育成率が特に低かったため、病性鑑定を行い、その結果をもとにワクチン対策を実施した。

5 病性鑑定とワクチン対策

1) 農場概要:農場は約28万羽を飼養しており、死亡羽数が若干(1～3%)増加する鶏舎があり、顔面腫脹・異常呼吸音が散発、発育不良による淘汰率が上昇していた。IBVワクチンは、mass遺伝子型のワクチンを12日齢に飲水投与していた。

2) 材料と方法:検体は35日齢生鶏3羽、同居鶏の気管スワブ4検体(2羽プール)、同居鶏の血清23検体を用いて病性鑑定を実施した。病理学的検査は常法に基づき実施し、細菌学的検査は一般細菌検査とマイコプラズマ(*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*)の遺伝子検査、ウイルス学的検査は鳥インフルエンザ(以下AI)簡易抗原検査、ウイルス分離、IBVおよびトリニューモウイルス(以下APV)遺伝子検査を実施した。IBV中和試験は、練馬、C78、TM、AK、A5968の5株のウイルスについて、民間検査機関で実施した。

3) 成績:病理学的検査では、軽度結膜肥厚、諸臓器における軽度リンパ球浸潤が観察された。細菌学的検査では細菌分離陰性、マイコプラズマ遺伝子陰性であった。ウイルス学的検査では、AI簡易検査陰性、ウイルス分離陰性、遺伝子検査で1検体がIBV陽性(遺伝子型JP-I)であった。なお、当該農場のIBV遺伝子型別調査では9～50日齢

の24検体において、気管スワブ4検体、クロアカスワブ9検体で遺伝子陽性(遺伝子型:JP-I)であった(表3)。

表3.病性鑑定結果

病理学的検査:	結膜肥厚、眼窩洞著変なし 諸臓器における軽度リンパ球浸潤
細菌学的検査:	細菌分離陰性 マイコプラズマ遺伝子陰性
ウイルス学的検査:	AI簡易抗原検査陰性 ウイルス分離陰性(AIND否定) APV遺伝子陰性 IBV遺伝子は、同居鶏気管スワブ1検体陽性 [JP-I]

10/9のIBV遺伝子型別調査結果 [陽性全検体:JP-I]

n=12	日齢	IBV遺伝子型別調査結果														
		9	10	24	28	31	35	42	43	45	47	48	50			
採材部位 (検出=○)	気管			○	○		○									
	クロ			○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	アカ															

また、中和試験では、C78株(遺伝子型:JP-I)に対する中和抗体価に有意な上昇が認められ、当該農場の使用ワクチン株と異なる遺伝子型のIBV野外株の流行が示唆された(表4)。

表4.病性鑑定結果(中和抗体試験)

ウイルス株	S1領域 遺伝子型	GM値	
		Pre (35日齢)	Post (49日齢)
練馬	Mass	1.1	3.0
C78	JP-I	1.0	1176.3
TM	JP-II	6.1	24.3
AK	JP-III	1.1	3.5
A5968	Conn	1.0	1.3
		(n=11)	(n=12)

4) ワクチン対策:中和試験の結果と遺伝子型別調査の結果が一致していたことから、H25年に、ワクチンをmass型から、JP-I型に変更した。ワクチン変更前は、異常呼吸音や顔面腫脹などが散見され、育成率は90%であったが、ワクチン変更後には臨床症状が認められなくなり、育成率は、大雪の影響と暑熱被害で成績が悪かったロットを除き、95%と成績が向上した(図1)。

現在、本農場では、さらなる改善に向け飼養衛生管理等の見直しを行い、状況に応じたモニタリングによる効果的なIBワクチネーションの確立など、安定的な育成状況を確立するための計画を進めている。

- ワクチン対応: H25 [JP- I 型に変更], H26 [mass型追加]
- 農場状況: 異常呼吸音, 顔面腫脹等が改善
育成率向上 (90%→95%)

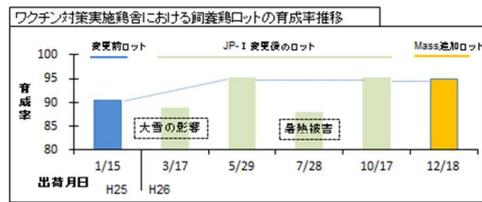


図1. ワクチン変更後の育成率推移

6 まとめ及び考察

IBVは血清型が多く、一致するワクチン選択が重要となる。血清型は、遺伝子型から推測することが可能だが、浸潤するIBV血清型を把握する農場は少なく、県内での調査履歴はこれまでなかった。そこで、Mass型ワクチン使用農場の遺伝子型別調査を行った結果、Mass型、JP- I 型、混合型 (Mass + JP- I)、型別不明など、検出状況は多様であった。調査農場のうち、使用ワクチンと異なる遺伝子型が検出され、育成率が低く、呼吸器症状などの臨床症状が認められた1農場において病性鑑定を行い、調査結果に基づきワクチン変更した結果、臨床症状と育成率が改善した。以上のことから、遺伝子型別調査に基づいたワクチン使用は、農場の育成率向上や衛生管理向上の一助として、状況に応じてモニタリングを行い、浸潤状況の把握に努め、効果的なIBワクチネーションについて検討をしていくことは有効と考えられる。

7 参考文献

- 1) Ariyoshi, R., Kawai, T., Honda, T., et al. :Classification of IBV S1 Genotypes by Direct Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Relationship between Serotypes and Genotypes of Strains Isolated between 1998and 2008 in Japan. J.Vet.Med.Sci. 72, 687-92 (2010).
- 2) Mase, M., Tsukamoto, K., Imai, K., et al. :hylogenic analysis of avian infectious

bronchitis virus strains isolated in Japan. Arch. Virol. 149, 2069-2078(2004).

- 3) Mase, M., Inoue, T., Yamaguchi, S., et al. : Existence of avian infectious bronchitis virus with a European-prevalent 4/91 genotype in Japan. J. Vet. Med. Sci. 70: 1341-1344(2008).
- 4) Mase, M., Kawanishi, N., Ootani, Y., et al.: A novel genotype of avian infectious bronchitis virus isolated in Japan in 2009. J Vet Med Sci, 72, 1265-1268 (2010).
- 5) Shimazaki, Y., Watanabe, Y., Harada, M., et al : Genetic analysis of the S1 gene of 4/91 type infectious bronchitis virus isolated in Japan. J Vet Med Sci. 71,583-588 (2009)
- 6) Shimazaki, Y., Harada, M., Horiuchi, T., et al :Serological Studies of Infectious Bronchitis Vaccines against Japanese Field Isolates of Homologous and Heterologous Genotypes. J Vet Med Sci, 71, 891-896 (2009)

12 黒毛和種子牛にみられた牛アデノウイルス4型感染を伴う腸管外病原性大腸菌感染症

仙台家畜保健衛生所

曾地雄一郎, 矢島りさ, 千葉直幸, 竹田百合子, 小寺文, 西清志

1 はじめに

腸管外病原性大腸菌(ExPEC)は下痢病原性大腸菌とは異なる病原因子を保有し、腸管以外の臓器に侵入し敗血症、髄膜炎等の全身症状を引き起こす。ExPECはヒトや様々な動物における大腸菌症に関与するとされており、子牛では福島県⁴⁾や山形県で報告があり、本県では平成23年度に確認されている⁶⁾。牛アデノウイルス(BAV)は発熱、呼吸器病、消化器病など多様な疾病を引き起こすとされており、9種類の血清型に分類されている^{2, 3)}。国内では病原性の強い7型の被害が多いが、その他の血清型については病態、病原性等に不明な部分が多い。今回髄膜炎を呈した牛に遭遇し、BAV4感染を伴ったExPEC感染症と診断、BAV4の病態への関与について病理組織学的な検索を行ったので報告する。

2 症例の概要

平成26年7月24日、黒毛和種繁殖農場で7日齢の子牛が突然元気消失、遊泳運動を呈した。抗生剤、ビタミンB1等の治療が行われたが、7月26日に昏睡状態となったため病性鑑定を実施した。

3 材料及び方法

(1) 材料

9日齢の雄子牛及び母牛血清・EDTA血を検査材料として、病理、細菌、ウイルス、生化学的検査を実施した。

(2) 病理学的検査

剖検後、10%中性緩衝ホルマリンにて固定、定法に従い標本を作製し、ヘマトキシリンエオジン染色(HE)、特殊染色(グラム染色)、免疫組織化学的染色(一次抗体:ウサギ抗大腸菌O23抗体(STATENS SERUM INSTITUT)、抗Ki-67抗体(動物衛生研究所)、2次抗体:ヒストファインシン

プルステインラットMAX-PO(MULTI)、ニチレイ)を実施した。

(3) 細菌学的検査

一般細菌検査は当該牛の臓器を用い、定法に従い実施した。分離菌は簡易キットAPI20E(シスメックス・ビオメリュー社)により同定し、O群血清型別(動物衛生研究所)を実施した。また、分離菌の病原遺伝子検索は毒素(Stx1, Stx2, LT, STa, STb, CNF1, CNF2, CDT III)、付着因子(インチミンF4, F5, F6, F18, F41, F17)、鉄取込能(iutA, iroN)についてPCRを実施した。

(4) ウイルス学的検査

当該牛の延髄、大脳を用い、オルソブニヤウイルスシンプ血清群、牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)のRT-PCRを実施した。また、当該牛の大脳を用い、牛アデノウイルス(BAV)のプロテアーゼ領域(プライマー:Pr-BA(L/R)(F/N))、ヘキソン領域(プライマー:BA(L/R)(F/N)・hexAA1885,1913)、小分子RNA領域(プライマー:VA3a,3b,6)を標的とするネステッドPCRを実施した。陽性産物はApplied Biosystems3130 Genetic Analyzer(Life Technologies, U.S.A.)により遺伝子配列を決定し、BLAST®により遺伝子解析を実施した。

(5) 生化学的検査

当該牛及び母牛の血清・EDTA血を用い、血球計数(全自動血球計算機MEK-6258)、白血球百分比、血液生化学的検査(富士ドライケム3000)、血清蛋白分画(セルロースアセテート膜電気泳動法)を実施した。

4 成績

(1) 剖検所見[図1]

当該牛は、起立不能を呈し、四肢の一部には擦過傷が認められ、関節結合織周囲に水腫が認められた。脳脊髄を覆う髄膜に出血を伴う広汎な混濁

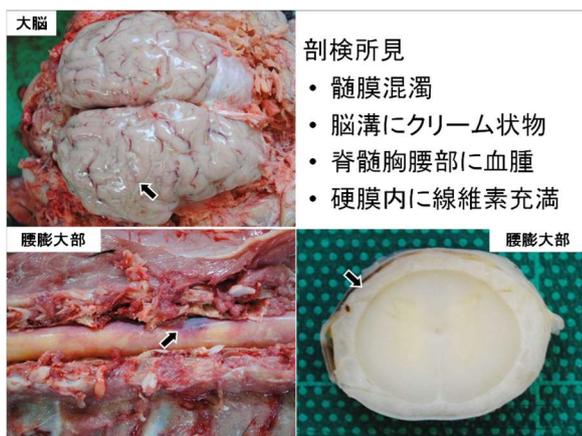


図1 剖検所見

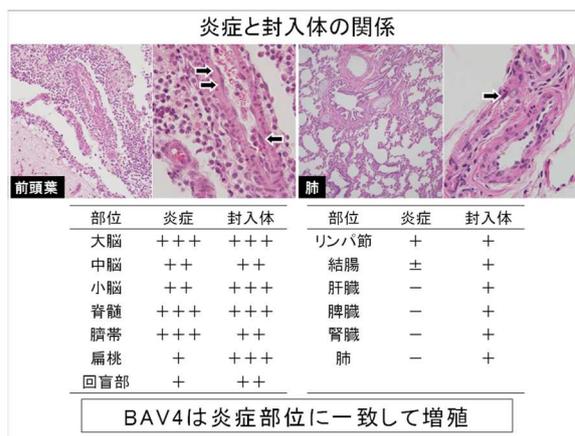


図3 炎症と封入体の関係

が認められた。脳溝にはクリーム状物が付着していた。脊髄胸腰部には血腫が認められ、入割すると硬膜内に多量の線維素が充満していた。

(2) 病理組織学的所見

大脳及び脊髄では、髄膜表面に出血及び線維素を伴った好中球主体の重度細胞浸潤が認められ、実質の血管周囲にも好中球主体の囲管性細胞浸潤が散見された[図2]。

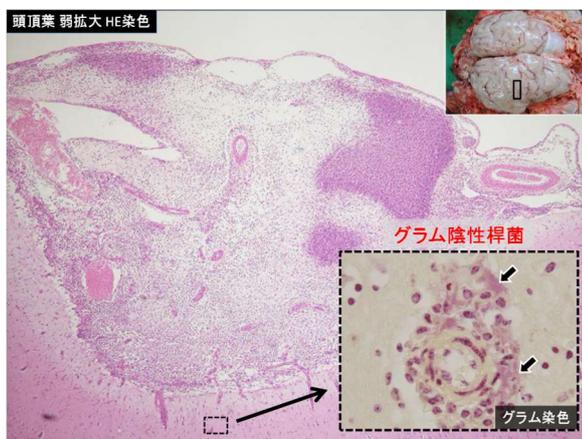


図2 病理組織学的所見

臍動脈では、器質化を伴った動脈内膜の壊死が認められ、内腔は細胞類廃物から構成される大型の梗塞巣により狭窄していた。大脳、脊髄、臍動脈の炎症部位にグラム陰性桿菌の集塊が認められた。髄膜の炎症が重度であった部位を中心として、全身の血管内皮細胞に主にfull型、haloを認めるcowdry A型の両染色核内封入体が認められた[図3]。

免疫染色では、抗大腸菌O23抗体は大脳、脊髄、臍動脈の炎症部位に認められた菌体に一致して陽性抗原が認められた。細胞増殖マーカーである抗Ki-67抗体は後頭葉の血管内皮において陽性抗原が多く認められ、空腸・肺の血管内皮において陽性抗原はほとんど認められなかった。

(3) 細菌学的検査

大脳、小脳、中脳、延髄、脊髄(頸部、胸部、腰部)、肝臓、脾臓、腎臓、関節腔液から大腸菌を分離した。O群血清型別はO23と決定した。病原遺伝子検索で分離株はCNF2, CDTIII, F17, iutA陽性であった。

(4) ウイルス学的検査

シンプ血清群ウイルス及びBVDV遺伝子は検出されず、これらウイルスの関与は否定された。大脳由来BAVプロテアーゼ遺伝子領域335ntの遺伝子配列を決定し、既知の遺伝子情報と比較した結果、複数のBAV4に100%一致していた。

(5) 生化学的検査結果

血球検査で桿状核好中球の増加を認めた。血液生化学的検査でTP:3.9g/dl, Glu:14mg/dl, T-cho:32mg/dlであった。血清蛋白分画でα-Glb分画の上昇, γ-Glb分画の減少を認めた。

5 まとめ及び考察

病理学的検査及び細菌学的検査から、本症例をExPECによる化膿性髄膜脳脊髄炎と診断した。ExPEC感染症の成立には、起立不能、貧血、胸腺萎縮等の免疫低下による宿主の易感染も言わ

れており、本症例では過去の症例と異なり胸腺リンパ球の軽度減数は認められたものの、萎縮は呈していなかった。しかし、生化学的に初乳摂取不十分であったことが示唆され、発症要因として疑われた。本症例では、大腸菌O23陽性抗原を伴う化膿性臍帯炎が認められたことから、脳脊髄への大腸菌の侵入経路は臍帯感染が疑われた。

また、病理学的検査及びウイルス学的検査から、BAV4感染が示唆された。本症例では、牛アデノウイルス病で主徴とされる呼吸器及び消化器における病変は認められなかったことから、BAVの病態への関与は低いと思われた。しかし、ExPECによる髄膜炎が認められた部位の血管内皮細胞では他部位より多くの封入体が確認された[図4]ことから、当該部位がウイルスの複製に有利な環境であることが疑われた。アデノウイルスは、感染細胞の細胞周期を増殖期へと誘導することが知られている¹⁾。このため、アデノウイルス感染によって血管内皮細胞が活性化していることが推察された。また、細菌性髄膜炎の際、炎症細胞が血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を分泌し、血管新生(増殖期)への誘導が起きるとされている⁵⁾。このため、ExPECによる髄膜炎によって増殖期に誘導された細胞が、ウイルスの増殖にとって有利に作用する可能性が示唆された。細胞増殖マーカーであるKi-67を用いて免疫染色を実施したところ、髄膜炎が見られた部位の血管内皮細胞では他の部位の血管よりも増殖活性が高い細胞が多かった。このことから、増殖活性の高さがウイルスの複製に有利に作用した可能性が推察された[図5]。

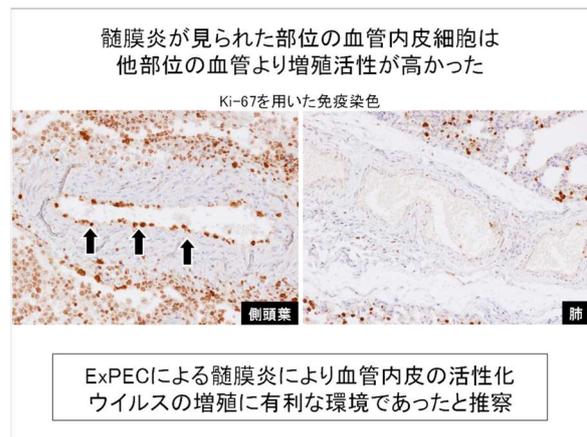


図5 免疫染色結果

過去に病理組織学的にExPECとBAVの関係を検討した症例は見当たらず、本症例は貴重な症例と思われた。

6 引用文献

- 1) Ben-Israel H: Adenovirus and cell cycle control. *Frontiers in Bioscience*. 7.369-395(2002).
- 2) 稲葉右二: 牛病学. 清水高正編. 第2版. 197-200. 近代出版(1988).
- 3) 大橋和彦: 動物の感染症. 明石博臣編. 第3版. 102-103. 近代出版(2011).
- 4) 菅原克: 子牛の腸管外病原性大腸菌感染症とPCRによる分離株の病原遺伝子の検索についての報告. *日獣会誌*. 65.689-683(2012).
- 5) 渋谷正史: 血管新生とその制御. 炎症と再生. (24)3.144-153.(2004).
- 6) 矢島りさ: 腸管外病原性大腸菌による虚弱子牛の化膿性脳脊髄炎. 平成23年度宮城県家畜保健衛生業績発表会集録

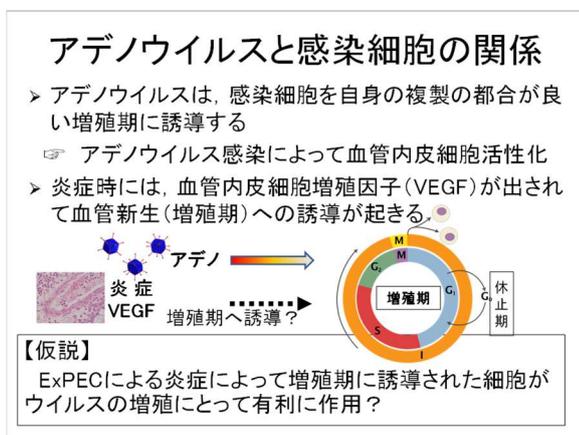


図4 アデノウイルスと感染細胞の関係

13 管内黒毛和種子牛で見られた散発型牛白血病の2症例

東部家畜保健衛生所

阿部隆樹, 早坂駿哉, 山田治, 真鍋智, 柴田千尋

1 はじめに

牛白血病は、牛白血病ウイルス(以下、BLV)が関与する地方病型及びBLVが関与しない原因不明の散発型に分類され、散発型は子牛型、胸腺型及び皮膚型に区分される¹⁾。牛白血病は平成10年に届出伝染病に指定され、地方病型の届出件数は全国的に増加傾向であるが、散発型の発生は稀である。平成10年以降、県内における散発型牛白血病の病性鑑定は4例のみであった。今回、著者らは当管内で発生した散発型牛白血病の2症例について、その概要を報告する。

2 概要

症例1では、黒毛和種、雌、3ヶ月齢の子牛(平成19年2月11日生)が、平成19年4月21日に元気消失し、4月23日から泥状下痢、発咳及び発熱を示し、加療を継続した。5月11日に両側の耳下腺及び腸骨下リンパ節腫大が認められ、5月14日には両側の下顎リンパ節も腫大したため、5月21日に鑑定殺を実施した。

症例2では、黒毛和種、雄、3ヶ月齢の子牛(平成26年4月20日生)が、平成26年6月上旬に、頸胸部にかけて腫大し、6月下旬にはその腫大は縮小したが、両側の下顎及び腸骨下リンパ節が腫大した。7月8日には両側性に全身体表リンパ節も腫大し、7月18日に元気消失したため、鑑定殺を実施した。

3 材料及び方法

1) 病理学的検査

当該牛2頭について、常法に従い、剖検及び組織標本を作製し、H・E染色及び抗CD3及びCD79a抗体を用いた免疫組織化学的染色を実施した。

2) ウイルス学的検査

BLV抗体検査は、血清を用い寒天ゲル内沈降反を実施した。BLV遺伝子検査は、症例1では、白血球、浅頸リンパ節及び腸骨下リンパ節から、症例2では白血球からDNAを抽出し、PCR検査を実施した。

3) 生化学的検査

当該牛2頭のEDTA血を用い、血液検査及び白血球百分比は、症例1は計3回、症例2は計2回経時的に実施した。血液塗抹標本は、症例1ではヘマカラー血液塗抹迅速染色(以下、ヘマカラー染色)、症例2ではメイギムザ染色及びヘマカラー染色後、鏡検し、白血球百分比を計測した。また、当該牛2頭の血清を用い、血液生化学的検査及び血清蛋白分画を実施した。血液生化学的検査は、TP, Alb, BUN, GLU, T-CHO, Ca, Mg, IP, AST, γ GTP, CK, LDH, ALP, CRE, T-BILの項目を測定した。

4 成績

1) 剖検所見(表1及び図1)

症例1では、体表リンパ節は大きさ5.5~10×4~6×2~4cmに腫大していた。肝臓は腫大し、腹側及び臓側面に1~2mm大の白斑が散在していた。肝門リンパ節は10×6×2cmに腫大し、断面は膨隆していた。脾臓は腫大し、断面は膨隆していた。腎臓には表面にやや隆起した粟粒大の白斑及び点状出血が認められた。肺では副葉が肝変化し、肺門リンパ節が大きさ5×4×3cmに腫大していた。胸腺は腫大し、点状出血が認められた。第四胃幽門部粘膜は散在性に出血し、十二指腸から回腸の粘膜には多発性に白色結節が認められた。腸間膜リンパ節は小豆大から拳大に腫大していた。心臓及び延髄に著変は認められなかった。

症例2では、体表リンパ節は一様に腫大し(3~11×2~7×2~6cm)、断面は髓様で固有の構造が崩壊していた。肝臓は37×30×8cmに腫大し、断面には多数の粟粒大乳白色結節がびまん性に認められた。肝門リンパ節は11×5.5×3cmに腫大していた。脾臓は表面辺縁部に出血が認められた。腎臓の表面は軽度に退色し、断面には皮質の一部に米粒大乳白色結節が認められた。第四胃は胃粘膜表面に点状出血が散見されたが、十二指腸から回腸の粘膜には著変は認められなかった。心臓、胸腺、膵臓、脳及び脊髄には著変は認められなかった。

表1 主要臓器の剖検及び組織所見

臓器	症例1		症例2	
	剖検所見	組織学的所見 腫瘍細胞	剖検所見	組織学的所見 腫瘍細胞
肝臓	腫大 米粒大乳白色結節 (表面)	+	腫大 粟粒大乳白色結節 (表面)	+
脾臓	腫大 断面(表面)	+	出血(辺縁部) 腫瘍	+
腎臓	腫大 点状出血(表面)	+	米粒大乳白色結節 (皮質)	+
心臓	OB	+	OB	OB
肺	肝変化(剖検)	+	大豆大の結節 (右後側縁)	±
胸腺	腫大 点状出血	+	OB	+
膵臓	周辺リンパ節腫大	±	OB	OB

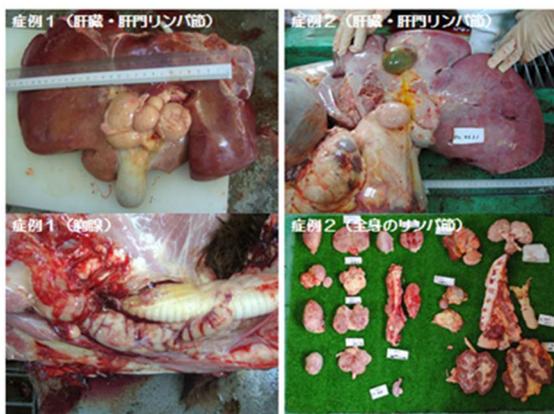


図1 症例1及び2の剖検所見

2) 病理組織学的所見(図2)

症例1の肝臓では、グリソン鞘及び中心静脈周囲に腫瘍細胞が広範囲に浸潤しており、壊死巣も認められた。脾臓は白脾髄が不明瞭であった。腎臓では皮質間質に腫瘍細胞が多発性巣状に浸潤していた。心臓の筋線維間及び心冠脂肪織には、軽度に腫瘍細胞が浸潤していた。肺では肺胞内に滲出液の貯留と出血、それに伴い線維素が析出していた。胸腺では重度に腫瘍細胞が浸潤し、正常構

造が崩壊していた。第四胃では粘膜固有層深層部に腫瘍細胞が浸潤していた。全身の各リンパ節の実質内には、核分裂像を含む腫瘍細胞が重度に浸潤しており、濾胞構造が不明瞭であった。各臓器及びリンパ節に浸潤していた腫瘍細胞は、クロマチン量が増量した核を有し、免疫染色では抗CD3抗体に陽性で、抗CD79a抗体に陰性であった。

症例2の肝臓では、門脈域及び小葉中心性に腫瘍細胞が多発巣状又はびまん性に浸潤し、肝組織の正常構造は崩壊し、類洞内にも腫瘍細胞が浸潤していた。脾臓では小血管周囲に腫瘍細胞が浸潤し、濾胞構造は不明瞭であった。腎臓では皮質から髓質に腫瘍細胞が多発巣状又はびまん性に浸潤し、腎組織の正常構造は崩壊していた。肺では、一部の細気管支粘膜下及び小動脈周囲に腫瘍細胞が軽度浸潤していた。胸腺では、皮質に腫瘍細胞が重度に浸潤し、正常構造は崩壊していた。空腸から直腸の粘膜固有層には腫瘍細胞が浸潤していた。全身の各リンパ節は皮髓不明瞭で腫瘍細胞が重度に浸潤していた。心臓及び骨髄に著変は認められなかった。各臓器及びリンパ節に浸潤及び増殖していた腫瘍細胞は、大小不同の核を有し、核異型が強くクロマチン量が増量しており、免疫組織化学的染色で抗CD79a抗体に陽性で、抗CD3抗体に陰性であった。

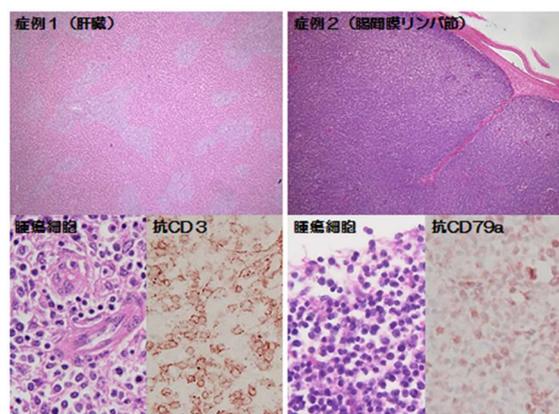


図2 症例1及び2の組織所見

3) ウイルス学的検査結果

2症例ともに、BLV抗体検査及びBLV遺伝子検査は陰性であった。

4) 生化学的検査結果(表2, 3, 4及び図3)

症例1における3回の血液検査及び白血球百分比計測では、白血球数は1 μ l当たり、9,400, 4,500, 3,600と漸減し、ヘマトクリット(Ht)値も26.9, 22.3, 20.4%と減少した。百分比のリンパ球は76, 94, 75%, 異型リンパ球は18, 6, 24%と推移した(表2)。血液生化学的検査の結果は、表3に示すとおりで、乳酸脱水素酵素(LDH)は2,723U/Lであった。血清蛋白分画は、表4及び図3で示すとおりで、血清総蛋白質(TP)が5.80g/dl, ガンマグロブリン(γ -glb)は0.10g/dlであった。

症例2における2回の血液検査及び白血球百分比計測では、白血球数は1 μ l当たり、14,500, 12,600と減少し、Ht値も22.7, 19.9%と減少した。百分比のリンパ球は65, 65%, 異型リンパ球は3, 22%と推移した。血液生化学的検査の結果は表3に示す通りで、LDHは7,060U/Lであった。血清蛋白分画は、表4及び図3で示すとおりで、TPは5.60g/dl, γ -glbは0.34g/dlであった。

表2 血液検査及び白血球百分比

項目	単位	症例 1			症例 2	
		5.14	5.18	5.21	7.14	7.18
WBC	/ μ l	9,400	4,500	3,600	14,500	12,600
RBC	10 ⁴ / μ l	625	509	544	448	376
HCT	%	26.9	22.3	20.4	22.7	19.9
PLT	10 ⁴ / μ l	-	-	6.5	-	4.5
Baso		0	0	0	0	0
Eos		0	0	0	0	0
Stab		0	0	0	3	2
Seg	%	4	0	0	25	10
Lym		94	100	99	68	87
(異型)		(18)	(6)	(24)	(3)	(20)
Mono		2	0	1	4	1

表3 血液生化学的検査

検査項目	単位	症例 1	症例 2
TP		5.8	5.6
Alb	g/dl	2.3	3.2
BUN		44.6	18.9
GLU	mg/dl	42	3
T-CHO	mg/dl	90	115
AST(GOT)		165	657
γ -GTP		460	266
CK(CPK)		209	9,310
LDH	U/L	2,723	7,060

表4 症例1及び2の血清蛋白濃度

g/dl	TP	Alb	α -glb	β -glb	γ -glb	A/G
症例 1	5.80	2.08	1.46	2.16	0.10	0.56
症例 2	5.60	3.52	1.01	0.72	0.34	1.70

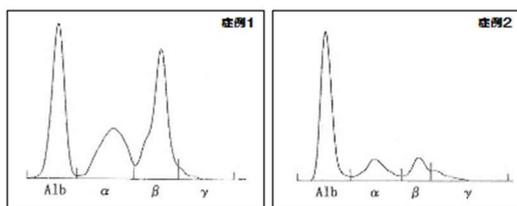


図3 症例1及び2の血清蛋白分画像

5 考察

散発型牛白血病のうち、子牛型は、6ヶ月齢未満で好発し、全身リンパ節の腫脹を主症状とし¹⁾、腫

瘍細胞はT細胞及びB細胞由来の2種類があると報告されている^{6,8)}。一方、胸腺型は6ヶ月齢から2歳未満で好発し、胸腺の腫大を主症状とし、腫瘍細胞はT細胞由来であるとされている¹⁾。

症例1では、胸腺が腫大し、抗CD3抗体陽性のT細胞由来腫瘍細胞であったことから、胸腺型とも考えられたが、本症例の月齢、主症状から子牛型白血病と診断した。しかし、Asahinaら(1995)は、散発型牛白血病の腫瘍細胞を免疫組織学的手法により組織学的に診断し、子牛型と胸腺型の中間型が存在すると報告している⁸⁾。詳細な組織化学的検討が必要であるが、本症例1は子牛型と胸腺型の中間型の可能性も否定できないものと考えられた。

症例2は、病理学的検査の結果、抗CD79a抗体陽性であったことから、B細胞由来の子牛型白血病と診断した。

LDHは、人の悪性腫瘍の診断に有用な酵素で、地方病型牛白血病でもその有用性が報告されている³⁾。複数の子牛型白血病でもLDHの高値が報告されており^{2,5)}、今回の2症例と同様に、LDHの測定は子牛型の診断に有用であった。

今回の2症例は、剖検時の生化学的検査で低 γ -glb血症であった。生体の液性免疫機構は、ナイーブヘルパーT細胞が抗原提示を受け2型ヘルパーT細胞(Th2)に分化し、次いでTh2がB細胞を活性化し、B細胞が抗体(免疫グロブリン; γ -glb分画の主成分)を産生する。2症例とも、T及びB細胞が腫瘍化し、正常な機能を失ったことにより、抗体産生できなかったと推察された。

散発型牛白血病では免疫機能の疲弊に関する報告は少なく、子牛型白血病の γ -glb値が健康牛と比較して低値であったとの報告や⁴⁾、白血球数及びHt値が経時的に減少したとの報告があるのみである⁷⁾。散発型牛白血病の病態は不明な点が多く、著者らが実施した経時的な血液検査は、それらを明らかにするための一助となると考えられる。併せて、LDHや血清蛋白分画の経時的な測定、細胞診や白血球ポピュレーションのモニタリングを行うことも、その解明の一助となると考えられる。

6 引用文献

- 1) 明石博臣ら:動物の感染症(第三版) 近代出版 (2011)
- 2) 阿部薫ら:起立不能を呈したホルスタイン種育成牛にみられた子牛型牛白血病の1症例 北獣会誌 56, 128-130 (2012)
- 3) 猪熊壽:牛白血病臨床診断のピットフォールと発症牛早期診断の試み 家畜診療 57(3), 137-143 (2010)
- 4) 大成京子ら:牛の腫瘍性および炎症性疾患における血清 α 1酸性糖蛋白. 日獣会誌 43, 19-23 (1990)
- 5) 鬼頭宗寛ら:出生時に発症を認めた子牛型白血病の一例 日本家畜臨床感染症研究会誌 5(1), 17-20 (2010)
- 6) Shan-ai YIN. : Relation between phenotype of tumor cells and clinicopathology in bovine leucosis. J.Vet.Med.Sci, 65, 599-606 (2003)
- 7) 藤掛斉ら:起立不能を呈した子牛のB細胞性リンパ腫 平成21年度青森県家畜保健衛生業績発表会 (2009)
- 8) M.Asahina. : Phenotypic analysis of neoplastic cells from calf,thymic,and intermediate forms of bovine leucosis. Vet Pathol, 32, 683-691. (1995)

14 地方病性牛白血病へ進行していた持続性リンパ球増多症の一症例

仙台家畜保健衛生所

竹田百合子, 小寺文, 千葉直幸, 曾地雄一郎, 西清志

1 はじめに

牛白血病は疫学のおよび臨床病理学的所見から、散発性牛白血病と地方病性牛白血病(EBL)に分類され、EBLは牛白血病ウイルス(BLV)の感染が原因とされている⁸⁾。BLVに感染した抗体陽性牛の殆どが無症状で推移するが20~30%の牛が持続性リンパ球増多症(PL)となる。その後、数ヶ月から数年の無症状期を経て、数%の感染牛がEBLを発症する。

今回、PL牛からEBLへ進行していた1症例について、9か月間の経時的観察および鑑定殺を行った詳細と、末梢血中樹状細胞(DC)を含む免疫状態について報告する。

2 症例の概要

A農場は成牛50頭、育成牛22頭を飼養し、BLV抗体陽性率が41.4%(平成26年度)の酪農経営である。A農場では平成21年の検査で抗体陽性牛21頭中PL牛5頭(平均リンパ球数:11,540/ μ l)を確認し、そのうちの1頭が本症例である。

本症例は平成17年9月22日生まれのホルスタイン種、雌であり、4歳(平成21年)の検査では白血球数14,100/ μ l、リンパ球数11,400/ μ lを呈した。7歳7ヵ月時に白血球数23,600/ μ l、リンパ球数15,400/ μ lに増加し、左臍部の体表リンパ節の軽度腫脹を確認した。しかし元気消失などの臨床症状は認められなかったため、経時的観察を9か月間実施し、その後鑑定殺に供した。

3 材料

(1)経時的観察および鑑定殺

経時的観察では、PL牛1頭の血液(全血、ヘパリン血、EDTA血)を9ヶ月間で10回(平成25年:6/6・7/8・8/6・8/27・9/24・10/22・11/19・12/17、平

成26年:1/14・2/25)採血した。その後、8歳5ヵ月時に鑑定殺に供した(平成26年2月27日)。

(2)免疫細胞の測定

牛5頭の血液(全血、ヘパリン血、EDTA血)を検査に供した。内訳は本症例1頭と同じA農場でBLV抗体陰性の同居牛2頭、EBLと診断した他農場の牛2頭である(表1)。本症例と同居牛は複数回採血を実施した。

表1: 免疫細胞の測定材料

No	検体名	区分	農場	品種	年齢	白血球数/ μ l	採血回数
1	本症例	PL→EBL	A	ホル	8歳	21,200	10
2	同居牛1	健康		ホル	4歳	7,480	5
3	同居牛2	健康		ホル	3歳	5,800	5
4	EBL1	EBL発症	B	黒毛	7歳	89,600	1
5	EBL2	EBL発症	C	黒毛	6歳	109,600	1

4 方法

(1)経時的採材および鑑定殺

1)生化学的検査

① 血液検査:全自動血球計数器MEK-6258で測定。血液塗抹はメイギムザ染色を実施した。

② 血液生化学性状およびLDHアイソザイム:富士ドライケム3000およびタイタンLDHアイソザイムキットで測定した。

③ 血清中チミジンキナーゼ:5検体(6/6, 8/6, 10/22, 12/17, 2/25 採血分)をRadio enzyme Assayで測定した。(株式会社SRL社へ依頼)

2)BLV遺伝子量の測定

経時的観察では末梢血白血球を、鑑定殺後は全身の37検体(白血球1検体、臓器14検体:皮膚・胸腺・肝・脾・腎・心・肺・扁桃・子宮・卵巣・大脳・胸髄・脊髄周囲脂肪組織・視神経、リンパ節22検体:右耳下腺・右下顎・腋窩・左/右浅頸・左/右腸骨下・左/右乳房上・膝窩・肝門・脾門・腎門・気管気管支・縦隔・空腸・回腸・回盲部・内腸骨・左/右臍

部体表・深鼠径)を材料として、qPCRを実施した。
(使用キット:牛白血病ウイルス検出用CY415/510
(TAKARA), 機器:ABI7500)

3)白血球ポピュレーション

一次抗体(CD21, CH138A, CD14, CD3)を用いてフローサイトメトリーを実施した。(機器:ベクトン・デッキンソン・ファックスキャリバー) (東北大学で測定)

4)病理組織学的検査

剖検後、常法に従い標本作成後、H・E染色を実施。免疫染色は乳房上リンパ節について1次抗体(ヒトCD20, CD5)を用いて実施した。(動物衛生研究所へ依頼)

(2)免疫細胞の測定

1)白血球ポピュレーション・T細胞サブセット

一次抗体(前述に加えCD4, CD8, TCR1-N2)を用いてフローサイトメトリーを実施した。(東北大学で測定)

2)末梢血中樹状細胞(DC)割合

Miyazawaら⁵⁾の方法を用いて、新鮮なヘパリン血約40mlより末梢血単核細胞(PBMC)を分離し、磁気細胞分離法によりT細胞(CD3), B細胞(B-B2), 単球(CD14)を除去後、フローサイトメトリーを実施した。CD11cおよびCD172a両方が陽性の細胞をDCとし、PBMC(CD3⁻ B-B2⁻CD14⁻)中のCD11c⁺CD172a⁺細胞の割合(%)で示した。(東北大学で測定)

5 結果

(1)経時的観察(図1)

1)臨床症状

食欲不振や消瘦などの異常なく、体表リンパ節の軽度腫脹も9ヶ月間著変を認めなかった。

2)生化学的検査

末梢血中白血球数は $21,200 \pm 992$ (平均値±標準偏差)/ μl ,リンパ球数は $12,600 \pm 1,181/\mu\text{l}$, LDHは $1,047 \pm 159\text{U/L}$, ASTは $88 \pm 11\text{U/L}$, LDH2と3の合計は $40.1 \pm 0.9\%$ で推移した。血清中チミジンキナーゼは $2.0 \pm 0.8\text{U/L}$ を示し、基準値(5.4U/L)⁷⁾以下であった。

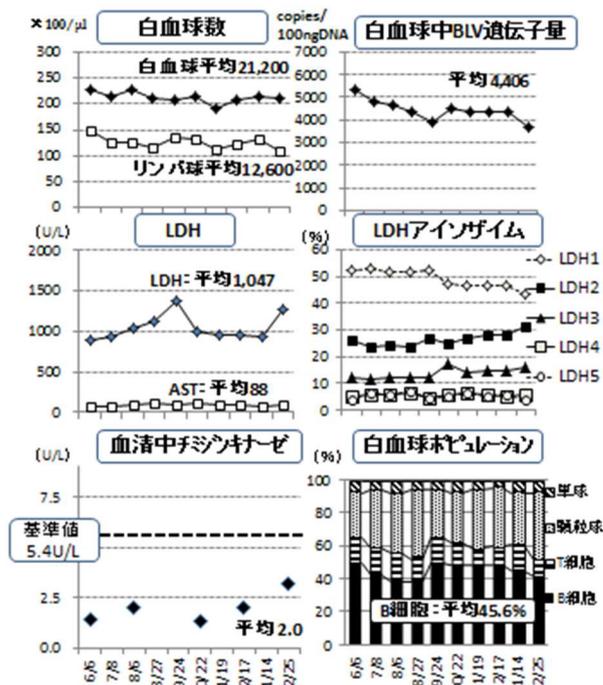


図1: 経時的観察結果

3)末梢血BLV遺伝子量

$4,406 \pm 447\text{copies}/100\text{ngDNA}$ で推移した。

4)白血球ポピュレーション

白血球中の割合はCD21+細胞(B細胞) $45.6 \pm 3.9\%$, CD3+細胞(T細胞) $13.8 \pm 2.2\%$, CH138A+細胞(顆粒球) $34.6 \pm 4.2\%$, CD14+細胞(単球) $6.0 \pm 1.0\%$ を示しB細胞の増加を認めた。

(2)鑑定殺

1)病理組織学的検査(図2)

外貌所見では、右浅頸と左臍部の体表リンパ節の軽度腫大を認めた。剖検所見では、一部のリンパ節に最大12cmの腫大を認めたが、その他臓器には肉眼所見は認めなかった。組織所見では、左乳房上リンパ節に出血壊死およびリンパ球様異型細胞の腫瘍性増殖を認めた。免疫染色でCD20(B細胞全般),CD5(B1a細胞)が共に陽性であったことから、多形型B細胞性リンパ腫と診断した。

2)生化学的検査

血液検査では、白血球数 $18,900/\mu\text{l}$, 赤血球数 $671 \times 10^4/\mu\text{l}$, Hb 11.2g/dl , Ht 37.7% , 白血球百分比ではリンパ球比80%(異型11%)を認め、

LDHは1,210U/L, うちLDH1: 40.5%, LDH2: 29.4%, LDH3:18.2%, LDH4: 7.3%を示し, LDH2と3の割合の上昇傾向を認めた。その他の項目は著変を認めなかった。(TP:7.6,Alb:3.8g/dl BUN:17.7,Glu:85,T-Chol:276mg/dl,AST:100, γ GTP:28,CPK:169U/L)



リンパ節	剖検時の大きさ(cm)
左乳房上	12×9
深鼠径	左10×6 右7.5×5
左臍部	①2×2.5 ②1.5×1.5 ③1.5×1
右浅頸	①3×2 ②1.5×1
右腸骨下	3.5×1.5

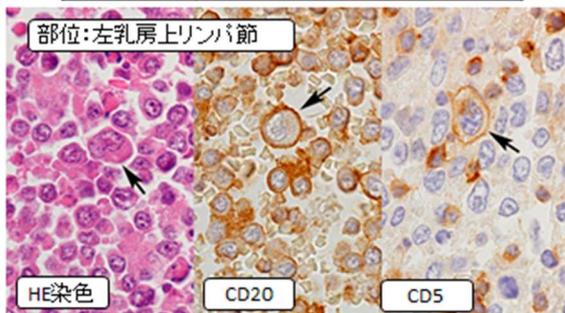


図2: 病理組織学的検査結果

3)BLV遺伝子量検査

37検体中36検体からBLV遺伝子を検出した(図3)。白血球は3,698, 臓器は0~402, リンパ節は52~5,994 copies/ 100ngDNAであり, 肉眼所見のなかった臓器の遺伝子量は低く, 著しく腫大していた深鼠径リンパ節と左乳房上リンパ節は高く検出された(夫々 5,994, 4,620 copies/100ng DNA)。

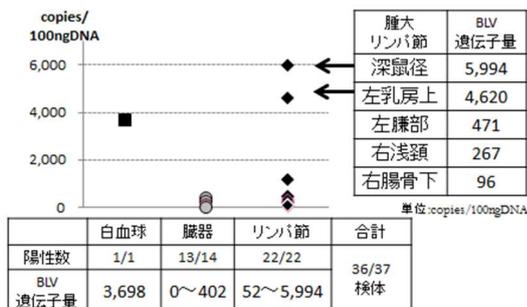


図3: BLV遺伝子量検査結果

(3)免疫細胞の測定(図4)

1) 白血球ポピュレーション・T細胞サブセット

本症例は同居牛と比較し白血球中のすべての細胞が有意に増加, 特にCD21+B細胞が増加していた(平均9,668/ μ l)。EBL牛2頭は使用した一次抗体陰性の細胞(CD21⁻CD3⁻CD14⁻CH138⁻細胞)が約90%を占めた。またEBL牛, 本症例, 同居牛の順でCD14⁺細胞(単球)が多い傾向を認めた。

T細胞サブセットは, 本症例は同居牛と比較しCD8⁺T細胞(主にキラーT細胞)とTCR1-N2⁺細胞(γ δ +T細胞)の有意な増加を認めたが, EBL牛2頭は増加傾向を認めなかった。

単位: $\times 10^3/\mu$ l

	本症例	同居牛1	同居牛2	EBL1	EBL2
CD21 ⁺	96.7 \pm 8.1 ^a	8.2 \pm 2.2 ^b	5.3 \pm 0.5 ^b	8.8	6.4
CD3 ⁺	29.4 \pm 5.3 ^a	18.6 \pm 4.4 ^b	7.7 \pm 0.7 ^b	8.6	19.6
CD14 ⁺	12.7 \pm 2.3 ^a	6.9 \pm 1.1 ^b	5.6 \pm 1.3 ^b	27.3	21.5
CH138 ⁺	73.5 \pm 8.5 ^a	41.2 \pm 7.3 ^b	39.4 \pm 7.8 ^b	27.8	32.6
CD21 ⁻ CD3 ⁻ CD14 ⁻ CH138 ⁻				823.5	1,016.0
CD4 ⁺	17.1 \pm 5.4 ^a	11.6 \pm 2.8	3.2 \pm 0.9 ^b	5.4	11.2
CD8 ⁺	16.8 \pm 5.9 ^a	3.7 \pm 1.2 ^b	3.5 \pm 0.9 ^b	2.0	6.1
TCR1-N2	6.7 \pm 1.7 ^a	3.1 \pm 0.4 ^b	0.9 \pm 0.4 ^b	0.8	1.6

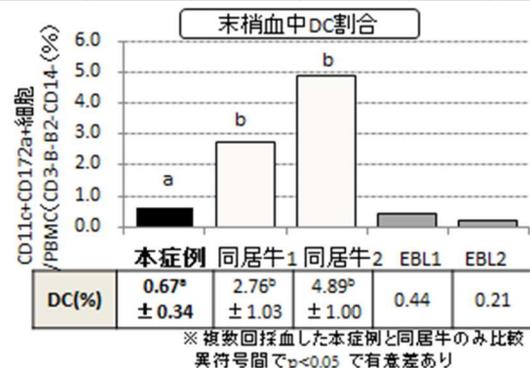


図4: 免疫細胞の測定結果

2)末梢血中DC割合

本症例は同居牛と比較し, 末梢血DC割合が平均0.67%と有意に低下していた。EBL牛2頭も, DCが低い傾向を認めた。

6 まとめ及び考察

本症例は4歳時にPL牛と確認し, 約4年後に体表リンパ節の軽度腫脹を認めたため9か月間の経時的観察を実施した症例である。白血病の診断基

準のひとつのECの鍵¹¹⁾では真症であり、BLVの標的細胞であるBリンパ球の増加、白血病で上昇するとされるLDH²とLDH³²⁾は上昇傾向を認め、EBL発症が疑われた。しかしその他の異常値は認めず、臨床症状の悪化がないことから、生前ではEBL発症の確定診断に至らなかった。剖検により、多形型B細胞性リンパ腫を確認し、BLV遺伝子量が腫大したリンパ節において他の臓器に比べ多量に検出されたことから、BLVの関与によりPLからリンパ腫へ進行していたと判断し、総合的にEBLと診断した。

本症例は一見健康牛と変わりなく、腫瘍部位が限局的であり、細胞の逸脱酵素であるLDHの著増はなく、腫瘍細胞の分裂が盛んなときに増加するとされるチミジンキナーゼが基準値以下であったことから、EBL初期の可能性が考えられた。

EBL発症には白血病抵抗性遺伝子などの遺伝的要因が関与するとの報告¹⁾や、牛の免疫状態の関与が報告されている³⁾⁴⁾。本症例の免疫状態の測定を実施したところ、CD8+T細胞と γ δ T細胞、単球の増加を認めた。柿沼ら⁴⁾はEBL未発症のBLV感染牛群の免疫状態として、CD8+T細胞や γ δ T細胞、単球を中心とした免疫応答の可能性を報告している。Lundbergら⁶⁾は感染していても病態が進まない牛では γ δ T細胞が抗ウイルス作用を発揮することを報告している。これらから、本症例が高く免疫応答をしていた可能性があり、未発症牛に近い免疫状態が示唆された。一方、伊澤ら³⁾は、黒毛和種において、EBL発症群はBLV抗体陰性群に比べ、単核球、単球の増加、 γ δ T細胞の減少を報告している。本症例のBリンパ球、単球の増加はEBL発症牛の特徴と一致したものの、 γ δ T細胞は減少していなかった。また、今回のEBL牛2頭はCD21+B細胞つまり成熟B細胞が少なく、その他の大型の細胞が90%を占めていたのに対し、本症例がCD21+B細胞で構成されていたことも、細胞の幼若化が進んでいないことが示唆され、EBL初期の可能性の裏付けとなると思われた。今回新たな試みとしては、末梢血DCの測定を実施した。DCは、1973年に発見された細胞⁹⁾で、成熟DCはMHCクラスIIを発現し、T細胞への強い

抗原提示能を持つ¹⁰⁾。ヒトや小動物の臨床ではがんの免疫療法として注目されているが、ウシにおいては報告が少ない。近年確立されたウシの末梢血DC割合の測定⁹⁾を実施したところ、本症例もEBL牛も、同居牛と比較し、DCが低い傾向を認めた。ヒトのDCは末梢組織で異物等を取り込み後、所属リンパ節へ移動するとの報告¹⁰⁾もあり、今回の結果が牛における新たな知見となる可能性が示唆されたが、更なる検討が必要である。

今回、1症例ではあるが、野外症例のPL牛の病態を確認し、一般症状のないEBLをとらえたことは貴重と考える。また、ウシのDCの研究は今後発展すると思われ、今回の測定はその足がかりとなると考える。このような調査の積み重ねにより、EBL発症への機構解析と早期診断へつながることを期待したい。

7 謝辞

検査にご協力いただいた東北大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 動物機能科学講座機能形態学分野 麻生久教授、浦川めぐみ研究員、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構、動物衛生研究所寒地酪農衛生研究領域北海道支所 門田耕一上席研究員に深謝します。

8 引用文献

- 1) 間陽子: MHCをマーカーとした牛白血病抵抗性牛作出に向けた育種戦略. 動物遺伝育種研究. 36, 9-19 (2008)
- 2) Ishihara, K., Ohtani, T., Kitagawa, H., and Onuma, M.: Clinical studies on bovine leukemia in Japanese Black cattle. III. Serum lactate dehydrogenase activity and its isoenzyme pattern in groups of cattle affected by bovine leukemia and with negative or positive antibodies against bovine leukemia virus. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 42, 289-295 (1980).
- 3) 伊澤智宏, 田中健一郎, 柿沼清市ほか: 牛白血病ウイルスに感染した黒毛和種牛の免疫状態. *日獣会誌*. 67, 328-332 (2014).

- 4) 柿沼清市, 大塚浩通, 大前佳穂里ほか: 牛白血病ウイルス感染搾乳牛における末梢血白血球ポピュレーション. 日獣会誌. 64, 375-380 (2011).
- 5) Miyazawa, K., Aso, H., Honda, M., et al.: Identification of bovine dendritic cell phenotype from bovine peripheral blood. *Res Vet Sci*, 81, 40-45 (2006).
- 6) Lundberg, P., Splitter GA: $\gamma\delta(+)$ T-Lymphocyte cytotoxicity against envelope-expressing target cells is unique to the alymphocytic state of bovine leukemia virus infection in the natural host. *J Virol*, 74, 8299-8306 (2000).
- 7) Sakamoto, L., Ohbayashi, T., Matsumoto, K., et al.: Serum thymidine kinase activity as a useful marker for bovine leucosis. *J Vet Diagn Invest*, 21, 871-784 (2009).
- 8) 清水悠紀臣, 鹿江雅光, 田淵清ほか: 獣医伝染病学第5版. 近代出版. 101-103 (1999).
- 9) Steinman, R.M., Corn, Z.A.: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*, 137, 1142-1162 (1973).
- 10) 矢田純一: 医系免疫学. 中外医学社, 273 (2001).
- 11) 安田純夫, 村上大蔵: 新版獣医内科学. 文永堂出版, 620 (1988).

15 黒毛和種におけるGRIA1遺伝子型が採卵成績におよぼす影響

畜産試験場

青沼達也, 齊藤陽介, 及川俊徳, 板橋知子, 沼辺孝

1 はじめに

受精卵移植技術においてドナーとなる供卵牛は、過剰排卵処理により複数の受精卵を生産することができる。しかし、受精卵の生産性においては個体差が知られている¹⁾。杉本らは牛の排卵制御に関わる遺伝子の特定を目的として研究を行い、イオンチャンネル型グルタミン酸受容体AMPA-1(GRIA1)遺伝子を同定した²⁾。GRIA1における一塩基多型(SNP)はアミノ酸置換を伴い、グアニン(G)型はセリンを、アデニン(A)型はアスパラギンをコードする。GRIA1遺伝子型をGG型、GA型、AA型に分類した場合、AA型と比較してGG型では採卵時回収卵数が多いという報告がある^{2)・3)・4)}。

そこで本試験では当該繫用黒毛和種供卵牛のGRIA1遺伝子型を判定し、GRIA1遺伝子型と採卵成績との関連を調査した。

2 材料および方法

1. 供試牛および過剰排卵処理

平成16年4月から平成26年12月までに分娩を挟まず5回以上連続で採卵した当該繫用黒毛和種供卵牛41頭を用いた。

過剰排卵処理はCIDR(Zoetis)を12日間またはPRID(TEIZO)を6~12日間挿入し、FSH(共立製薬)20A.U.を3日間漸減投与または単回投与して行った。CIDRまたはPRID(Meiji Seika ファルマ)抜去時にPGF2 α を投与し、人工授精はPGF2 α 投与後2日目に1回または2回実施した。胚の回収は人工授精後7日目に行った。

2. 遺伝子型判定

供試牛の遺伝子型判定は公益社団法人畜産技術協会附属動物遺伝研究所に依頼した。

3. 統計処理

統計処理ソフトR(version 3.1.2)を用いた。

3 結果

供試牛41頭の採卵回数は延べ428回、1頭当たり10.4回であった。採卵1回当たりの回収卵数は12.4個、正常胚数は6.9個、移植・凍結可能胚数は6.1個、変性卵数は2.1個、未受精卵数は2.8個であった。

表-1に供試牛群内のGRIA1遺伝子型頻度を示し、表-2にGRIA1遺伝子型別採卵成績を示した。回収卵数はAA型と比較してGA型で有意に多い結果であった(P <0.05)。その他各採卵成績において、遺伝子型間に有意な差は認められなかった。

表-1 供試牛群内GRIA1遺伝子型頻度

遺伝子型	頭数	遺伝子型頻度
GG	10	24.4%
GA	19	46.3%
AA	12	29.3%

図-1に供卵牛の系統別GRIA1遺伝子型頻度を示した。牛群を気高系、栄光系、田尻系、藤良系、茂金系の5系統に分類した場合、気高系10頭(24.4%)、栄光系3頭(7.3%)、田尻系7頭(17.1%)、藤良系4頭(9.8%)、茂金系17頭(41.5%)であった。各遺伝子型について、GG型は気高系(6頭、60%)、GA型は田尻系(6頭、31.6%)、AA型は茂金系(9頭、75%)が最も多か

表-2 GRIA1 遺伝子型別採卵成績

遺伝子型	採卵回数	回収卵数	正常胚数		移植・凍結可能胚数		変性卵数		未受精卵数	
			(個)	(%)	(個)	(%)	(個)	(%)	(個)	(%)
GG	100	13.5 ± 2.6	7.5 ± 1.6	55.8	6.3 ± 1.3	46.2	2.0 ± 0.4	15.8	3.4 ± 1.1	20.9
GA	193	14.3 ± 1.8 ^a	8.4 ± 1.2	58.9	7.7 ± 1.2	52.9	2.3 ± 0.4	17.5	3.0 ± 0.6	20.0
AA	135	7.6 ± 1.1 ^b	4.6 ± 0.7	61.3	4.2 ± 0.7	57.1	1.2 ± 0.3	14.6	1.2 ± 0.3	12.6

異符号間に有意差あり(a,b: P <0.05) 平均値 ± 標準誤差

った。

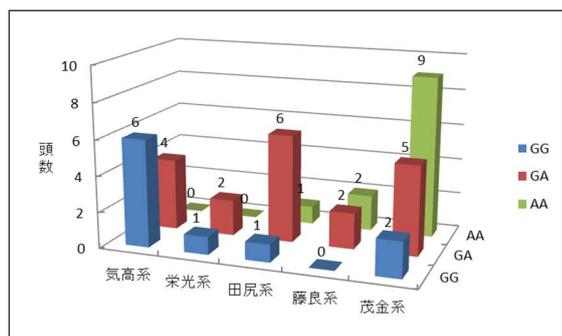


図-1 供卵牛系統別GRIA1遺伝子型頻度

表-3に供卵牛の系統別採卵成績を示した。回収卵数は茂金系と比較して気高系、田尻系で有意に多い結果であった(P <0.05)。正常胚数は茂金系と比較して栄光系、田尻系で有意に多い結果であった(P <0.05)。移植・凍結可能胚数は茂金系と比較して田尻系で有意に多い結果であった(P <0.05)。その他各採卵成績において、系統間に有意な差は認められなかった。

4 考察・まとめ

GRIA1遺伝子型別採卵成績において、AA型と比較してGG型、GA型で多い結果を示した。このことから、Gアリルを保有しない供卵牛と比較して、Gアリルを保有する供卵牛の採卵成績が優れており、Gアリルを1つでも保有すれば多くの受精卵を得ることが予測可能であると考えられた。

供卵牛の系統別採卵成績は、系統間で差がみられた。GRIA1遺伝子型頻度の系統間での偏りもみられ、これが系統間での採卵成績の違いの一要因であることが考えられた。

以上から、GRIA1遺伝子型を調べることにより採卵成績の予測が可能であり、効率的な受精卵の利用につながるとともに、採卵性の一指標となることが示唆された。また、農家段階など、GRIA1遺伝

子型を調査できない場合には、今回の結果から、系統からある程度の採卵成績を予測できる可能性が考えられた。

5 参考文献

- 1) 阪田 昭次、松岡 一仁、市野 清博、嶋屋 佳子、樫原 孝正:ウシの胚移植に関する研究(第5報). 山口県畜産試験場研究報告(16), 131-136, 2000-03.
- 2) Sugimoto, M., Sasaki, S., Watanabe, T., Nishimura, S., Ideta, A., Yamazaki, M., Matsuda, K., Yuzaki, M., Sakimura, K., Aoyagi, Y., Sugimoto, Y. : Iontropic Glutamate Receptor AMPA1 Is Associated with Ovulation Rate. PLoS ONE (2010) 5(11): e13817.
- 3) Hirayama, H., Kageyama, S., Naito, A., Fukuda, S., Fujii, T., Minamihashi, A. : Prediction of Superovulatory Response in Japanese Black Cattle Using Ultrasound, Plasma Anti-Mullerian Hormone Concentrations and Polymorphism in the Iontropic Glutamate Receptor AMPA1/GRIA1. J Reprod Dev (2012) 58(3):380-383.
- 4) 内藤 学、平山 博樹、武富 敏郎、福田 茂夫、藤井 貴志、玉田 学、不破 友宏、水尻 健二、堀川 盟夫、影山 聡一:黒毛和種ドナー牛の父系統およびGRIA1遺伝子型が胚回収成績に与える影響. 北海道牛受精卵移植研究会会報(2013) 32:44-47.

表 - 3 供卵牛系統別採卵成績

系統	採卵回数	回収卵数	正常胚数		移植・凍結可能胚数		変性卵数		未受精卵数	
			(個)	(%)	(個)	(%)	(個)	(%)	(個)	(%)
気高系	100	15.8 ± 2.5 ^a	8.8 ± 1.4	58.4	7.9 ± 1.4	52.3	2.1 ± 0.4	14.0	4.3 ± 1.3	23.9
栄光系	34	17.6 ± 1.6	12.3 ± 1.1 ^a	69.9	10.4 ± 0.5	59.6	2.9 ± 0.2	16.6	2.1 ± 0.4	11.6
田尻系	51	16.3 ± 3.5 ^a	10.2 ± 2.5 ^a	62.3	9.4 ± 2.2 ^a	57.3	2.2 ± 0.9	12.6	2.8 ± 0.9	14.9
藤良系	48	9.8 ± 1.8	4.1 ± 0.2	47.6	3.4 ± 0.3	41.4	2.6 ± 0.7	24.9	3.1 ± 1.3	26.6
茂金系	195	7.8 ± 1.2 ^b	4.5 ± 0.7 ^b	58.5	4.1 ± 0.7 ^b	52.0	1.3 ± 0.3	17.0	1.4 ± 0.3	15.1

異符号間に有意差あり(a,b: P <0.05)

平均値 ± 標準誤差

16 デュロック種系統豚維持群における雌雄の繁殖形質の遺伝的趨勢

畜産試験場

斉藤隼人, 國井洋, 中條満, 佐久間晶子, 高橋健

1 はじめに

デュロック種系統豚「しもふりレッド」は、近交係数の上昇とともに離乳時体重が年々減少している。その原因として、遺伝的能力の低下ではないことを報告している¹⁾。一方、近交退化の影響や雄側の繁殖形質である精液形質については詳細な検討が行われていない。このため、本研究では、雌の繁殖形質の遺伝的趨勢及び近交退化について検討することにより、離乳時体重減少の要因を明らかにしようとした。また、精液形質の表型値の年次推移と遺伝的趨勢を検討し、系統豚の維持経過に伴う精液性状への影響を明らかにすることを目的とした。さらに精液形質と雌の繁殖形質との遺伝的関連性を検討することにより、雌雄双方の繁殖形質を利用した効率的な育種改良の可能性を検討した。

2 材料及び方法

1) 雌の繁殖形質における表型値の年次推移、遺伝的趨勢及び近交退化の推定

デュロック種系統豚維持開始以降の2002年2月～2014年3月までの981腹の分娩記録を用いた。雌の繁殖形質として、生存産子数(NBA)、生時一腹総体重(LBW)、離乳頭数(NW)及び離乳時一腹総体重(LWW)についてBLUP法アニマルモデルにより育種価を推定後、遺伝的趨勢を検討した。

NBA, LBWの分析に用いたモデルは、

$$\text{NBA, LBW} = \text{分娩年} + \text{分娩月} + \text{産次} + \text{永続的環境効果} + \text{相加的遺伝効果} + \text{無作為誤差}$$

であり、NW, LWWの分析に用いたモデルは、

$$\text{NW, LWW} = \text{分娩年} + \text{分娩月} + \text{産次} + \text{一回帰の共変量(生存産子数)} + \text{永続的環境効果} + \text{相加的遺伝効果} + \text{無作為誤差}$$

である。ここで、分娩年、分娩月及び産次は母数効果であり、永続的環境効果及び相加的遺伝効果は変量効果である。ただし、これらの形質は、雌親の形質とした。遺伝的趨勢は、当該年に分娩した母豚の育種価の平均とした。また、近交退化の推定は、それぞれのモデルに雌親の近交係数を一回帰の共変量として加えた。

2) 精液形質における表型値の年次推移と遺伝的趨勢

2007年4月～2014年3月までの4,232例の精液採取記録を用いた。精液形質として、精子活力(Mo)及び総精子数(TNS)についてBLUP法アニマルモデルにより育種価を推定後、遺伝的趨勢を検討した。

MoとTNSの分析に用いたモデルは、

$$\text{Mo, TNS} = \text{採精年} + \text{採精月} + \text{採精間隔} + \text{月齢} + \text{相加的遺伝効果} + \text{永続的環境効果} + \text{無作為誤差}$$

である。ここで、採精年、採精月、採精間隔及び月齢は母数効果であり、相加的遺伝効果及び永続的環境効果は変量効果である。遺伝的趨勢は、当該年に精液採取した個体の育種価の平均として表した。

3) 雌雄の繁殖形質の遺伝的関連性

Moと雌の繁殖形質(NBA, LBW, NW及びLWW)との2形質REML法アニマルモデルで推定した。

4) 分析ソフト

分析ソフトは、VCE6.0.2²⁾を用いた。

3 結果

1) 雌の繁殖形質における表型値の年次推移、遺伝的趨勢及び近交退化の推定

LBWの表型値の年次推移と遺伝的趨勢を図1に示した。表型値及び遺伝的趨勢に、維持開始以降大きな変動はなかった。

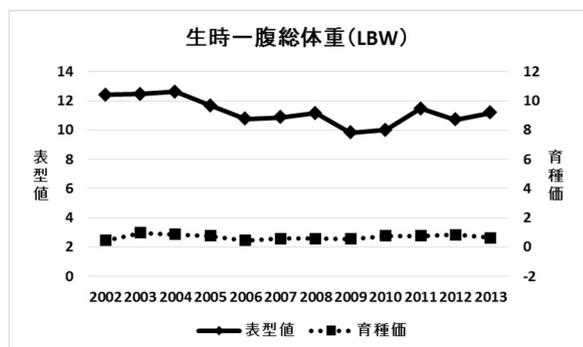


図1 生時一腹総体重における表型値の年次推移と遺伝的趨勢

LWWの表型値の年次推移と遺伝的趨勢を図2に示した。遺伝的趨勢に、維持開始時以降、大きな変動はなかった。一方、表型値は維持経過に伴い減少傾向であり、2013年の表型値は2002年と比較し、15.0kg減少していた。

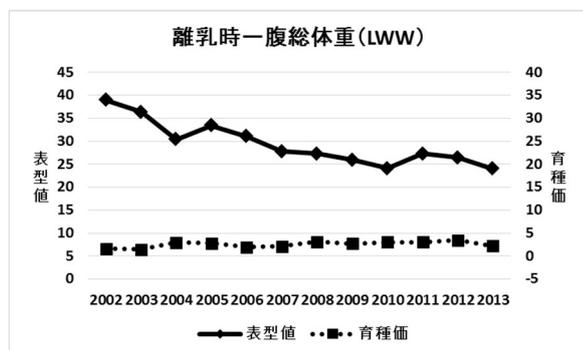


図2 離乳時一腹総体重における表型値の年次推移と遺伝的趨勢

雌の繁殖形質の近交退化の推定を表1に示した。NBA, LBW, NW及びLWWの近交係数の10%増加あたりの低下量はそれぞれ、0.35頭、0.11kg、0.41頭及び1.94kgと推定された。

表1 雌の繁殖形質における近交退化の推定

	生存産子数 (NBA)	生時一腹総体重 (LBW)	離乳頭数 (NW)	離乳時一腹総体重 (LWW)
近交係数10% 増加あたりの 低下量	0.35頭	0.11kg	0.41頭	1.94 kg

2) 精液形質における表型値の年次推移と遺伝的趨勢

Moの表型値の年次推移と遺伝的趨勢を図3に示した。遺伝的趨勢に、大きな変動はなかった。表型値は年により変動はあるものの、減少傾向は見られなかった。

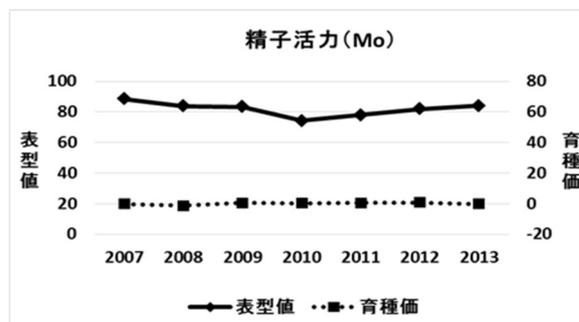


図3 精子活力における表型値の年次推移と遺伝的趨勢

TNSの表型値の年次推移と遺伝的趨勢を図4に示した。遺伝的趨勢に、大きな変動はなかった。表型値は年により変動はあるものの、減少傾向は見られなかった。

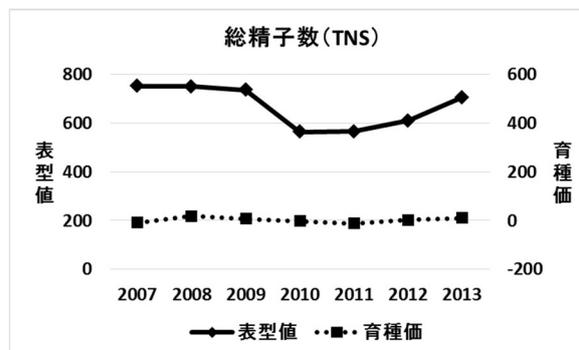


図4 総精子数における表型値の年次推移と遺伝的趨勢

3) 雌雄の繁殖形質の遺伝的関連性

精液形質と雌の繁殖形質間の遺伝的関連性について検討したところ、MoとNBA及びMoとLBWには、負の遺伝相関(それぞれ-0.22及び-0.11)が、MoとNW及びMoとLWW(それぞれ0.74及び0.63)には正の遺伝相関が推定された。

4 考察・まとめ

1) 雌の繁殖形質における表型値の年次推移, 遺伝的趨勢及び近交退化の推定

LBW及びLWWに遺伝的趨勢の大きな変動は見られなかった。一方, 表型値は, LWWが維持経過に伴い減少傾向であった。LWWの減少傾向の要因として, 遺伝的能力の低下は見られなかったことや近交退化の推定値よりも表型値の減少量が大きかったことから, 環境要因も考えられた。飼養管理の見直しや施設設備の改善を行っていく必要がある。

一方, 母性効果に影響される形質には近親交配の効果が二重に作用するため, 測定した形質と近交係数の関係は簡単には表現できないとされる³⁾。LWWは, 母豚の哺育能力などの母性効果と子豚自身の発育能力である直接効果の2つの近交退化の影響を受けていると考えられ, 今回の近交退化の推定は, 過小評価している可能性もある。LWWの表型値減少傾向の原因が近交退化と仮定した場合, 環境の改善や遺伝的能力の向上だけでは, 今後も減少傾向は変わらないと考えられる。外部からの種豚導入を考慮した「しもふりレッド」後継豚造成方法について検討する時期にきていると思われる。

2) 精液形質における表型値の年次推移と遺伝的趨勢

雌の繁殖形質と同様, 精液形質も遺伝的趨勢にほとんど変動は見られなかった。また, 精子活力及び総精子数の表型値は, 年によって変動はあるものの, 維持経過に伴う減少傾向は見られなかった。雄の更新豚は, 主に凍結精液によって生産されており, 近交係数の上昇が雌に比べ抑えられていることや精液性状の悪い個体はすぐに淘汰され, 更新が早く行われていることが要因と考えられる。

3) 雌雄の繁殖形質の遺伝的関連性

精液形質と雌の繁殖形質との遺伝的関連性は, MoとNW及びLWWには正の遺伝相関が推定された。雌の繁殖形質を改良する場合, 精液形質のデータを利用することで効率的に育種改良ができることが示唆された。一方, 精子活力と離乳頭数の遺伝相関は-0.07(大ヨークシャー種)及び0.00(ラ

ンドレース種)と報告されており⁴⁾, 本研究の推定値とは大きく異なった。雌雄の繁殖形質間の遺伝相関を推定する場合, 異なる個体のデータを用いているため, 推定値の精度は低い可能性がある。今後もデータを蓄積していく必要がある。

5 引用文献

- 1) 熊田, 清水: デュロック種系統豚維持群における早期発育形質の遺伝的パラメーターの推定及び遺伝的趨勢, 宮城県家畜保健衛生業績発表会集録(2010)
- 2) Groenevald, E., M.Kova, N. mielenz : VCE User 's Guide and Reference manual Version6.0. (2008)
- 3) D.S.ファルコナー: 量的遺伝学入門, 蒼樹書房 (1993)
- 4) Wolf, J.: Heritabilities and genetic correlations for litter size and semen traits in Czech Large White and Landrace pigs, J.Anim.Sci.88 2893-2903 (2010)

17 水田の高度利用を目的とした飼料用イネ－麦二毛作技術の検討

宮城県畜産試験場
遠藤潤，小野寺伸也

1 はじめに

近年、牧草などの粗飼料は労働力不足などにより生産面積が減少し、輸入飼料も価格が上昇傾向であるため、畜産経営を圧迫している。

一方、稲WCSや飼料米は、食用米栽培技術を活用できることや新たな機械化体系が開発されたこと、さらに、各種支援制度が充実しているため、平成25年における本県の稲WCSと飼料米(以下「飼料用稲」という)の栽培面積は3,039haまで拡大している。

他方、水稻裏作として栽培される麦類のうち、飼料用麦類の栽培面積は377haと食用麦2,147haの18%程度であるが、飼料用麦は①代表的な冬作のイタリアンライグラスと比べ残根が少なく後作との作業競合が軽減②水田とWCS専用収穫機の高度利用が可能③麦や大豆などの生産組織の機械や労働力をそのまま活用出来ることがメリットであり、拡大の可能性は大きい。

そこで、飼料用稲に飼料用麦を二毛作として組み合わせることで、水田などの農地や現有機械を有効活用した自給飼料の生産拡大を図ることが出来ると考え、平成22年から26年まで5年間にわたり「新技術導入に向けた試験研究(国産飼料プロ)・寒冷地水田における飼料稲一麦二毛作体系の開発と実証」として、WCS専用収穫機を用いたダイレクト収穫体系(以下「ダイレクト体系」という)による試験を実施した。なお、稲に係る試験は古川農業試験場、麦に関する試験は主に畜産試験場が実施した。

2 飼料用稲麦二毛作体系における課題

本県は稲－麦の二毛作限界地帯であるため、本技術の普及・拡大は次の3点が課題となる。

- ①春及び秋期の作業競合回避
- ②収量・品質の確保(稲麦で1.6tDM/10a)

③収益性の確保

そのため、春秋の限られた作業期に収穫から播種・移植を分散できるような、は種・収穫期の検討や飼料用麦類の品種選定、品質向上のためのサイレージの調製技術について試験を行った。

3 作期移動試験

1) 収穫時期による影響

ライ麦「ハルミドリ」と大麦「シュンライ」の2品種について、出穂2週間前から2週間後にわたり7日間隔で坪刈りによる調査を実施した。両品種とも収穫時期を遅くするほど収量性は高まったが、大麦のシュンライは倒伏もほとんど見られず、水分も徐々に低下し、出穂後30日に目標水分の70%を下回った。ライ麦のハルミドリは草丈の伸長に伴い倒伏が著しくなり、水分の低下もほとんど見られなかった。これらのことから、大麦の収穫適期は5月上旬から下旬までであったが、ライ麦の収穫適期は5月上旬の短い期間であった。

2) は種時期による影響

ライ麦「春一番」、ライ小麦「ライコッコⅡ」、大麦「シュンライ」の3品種を10月上・中・下旬には種し、生育ステージや収量性への影響を調査した。

10月中旬は種と10月下旬は種では3品種の生育ステージや水分に大きな差は見られなかったが、収量は10月中旬が有意に多くなり、シュンライでは800kg/10aを超えた。(表1)また、10月下旬は種は中旬は種より収量は低下したが、雑草の発生量が少なく、登録除草剤がない飼料用麦に有効な耕種的防除法と考えられた。

表1 は種時期による麦の収量への影響

	収穫日	熟期	草丈(cm)	倒伏(極微 1~甚9)	水分(%)	乾物収量 (kg/10a)
ライ麦 (ハルミドリ)	4/30	未出穂	107.3 C	1.5A	87.0 A	753 A
	5/6	出穂期	142.0 A	1.8A	85.9 A	907 A
	5/14	開花期	147.7 AB	7.5B	83.9 AB	943 A
	5/19	未熟期	152.2 B	7.5B	80.4 B	1147 B
大麦 (シュンライ)	4/30	未出穂	59.1 b	1.0a	82.4 a	441 a
	5/6	出穂期	78.2 a	1.0a	82.1 a	574 ab
	5/14	開花期	82.2 a	1.0a	77.9 b	698 bc
	5/19	未熟期	81.0 a	1.0a	74.6 c	809 cd
	5/27	乳熟期	82.1 a	1.3a	72.2 c	982 de
	6/7	糊熟期	81.1 a	1.0a	65.2 d	1125 e

4 品種比較試験

場内試験圃場でライ麦3品種、ライ小麦3品種、大麦4品種について、飼料用稲との二毛作を前提とするため10月中旬播種、5月中旬収穫の栽培期間とし、平成23年から26年の4年間調査した。

6条大麦のシュンライが収量性、耐倒伏性、収穫期の長さなどから最も適していると判断した。大麦のうち2条大麦3品種は雪腐れにより大きく収量を減らしたが、今後、根雪期間の短い地域における適応性について検討する必要がある。

ライ小麦は収量が最も多くなったが、出穂始期が5月中旬と遅いこと、収穫時の水分が80%以上で草丈も1mを超えること、ライ麦は4月下旬には収穫期を迎えたが、出穂期以降に倒伏が多くなることから、これらの草種はダイレクト体系には不向きと判断した。

表2 品種比較試験結果(4ヶ年平均 H22~H26)

	品種名	出穂始期	草丈(cm)	倒伏 (極微1~甚9)	水分(%)	乾物収量 (kg/10a)
ライ麦	春一番	4月30日	119.1	2.1	82.6	869.7
	ライ太郎	4月29日	89	1	81.8	242.1
	ハルミドリ	4月30日	121.2	2.2	82.0	917.4
ライ小麦	ライコッコII	5月13日	115.6	1	82.7	1,100.1
	ライスター	5月10日	104.8	1	79.6	1,045.1
	改良ライコーン	5月14日	106.2	1	82.4	1,004.3
大麦	シュンライ	5月7日	89.3	1	81.1	947.4
	ワセドリ2条	4月30日	61.4	1	76.3	371.0
	ハヤドリ2条	5月3日	69.1	1	78.1	321.3
	ムサンボウ	5月10日	91.1	1	80.2	403.5

5 サイレージ醗酵品質調査

1)ダイレクト体系と予乾体系の比較

ダイレクト体系は予乾体系と比較し収穫時の圃場ロスが少なく、各草種で乾物収量が予乾体系より上回った。5月中旬収穫のライ小麦・大麦で乾物収量670kg/10a以上となった。

ダイレクト体系は80%以上の高水分だったが、いずれの品種でもpHは4以下で、Vスコアも90点以上の良好な品質であった。また、各草種のTDNによる栄養成分は調製法による差は見られなかった。

表3 収穫体系による麦サイレージ醗酵品質への影響

品種	収穫調製日	収穫調製	乳酸菌	開封時水分(%)	pH	Vスコア	ヘル密度(DMkg/m)
ライ麦 (春一番)	5/5~6	ダイレクト	無添加	82.2 a	3.85 a	91.3 a	121.9 a
		ダイレクト	添加	82.2 a	3.80 a	90.2 a	123.5 a
		予乾	無添加	73.7 a	4.90 b	74.9 b	117.1 a
ライ小麦 (ライコッコII)	5/17~18	ダイレクト	無添加	82.6 a	3.84 a	94.4 a	115.1 a
		ダイレクト	添加	82.3 a	3.82 a	95.7 a	114.9 a
		予乾	無添加	57.8 b	5.34 b	83.9 b	169.8 b
大麦 (ライスター)	5/17~18	ダイレクト	無添加	82.0 a	3.95 a	93.0 a	109.7 a
		ダイレクト	添加	80.7 a	3.90 a	94.2 a	114.7 a
		予乾	無添加	48.5 b	5.93 b	96.3 a	162.3 b

2)保管期間と乳酸菌添加による品質への影響

ダイレクト体系で調製したサイレージは高水分であり長期保管による品質低下が懸念されるため、長期保管(180日間)の影響を調査した。

長期保管後も変敗は見られず、良好な品質を保持していた。乳酸菌添加の有無や乳酸菌の種類による差も見られなかったが、サイレージの水分は70%以上であり、開封後の二次醗酵が懸念されるため、出来るだけ早く給与する必要があると思われた。(表4)

ただし、一部には変形やラップの破損により気密性が失われたロールでは、著しい腐敗が見られた。

表4 保管期間による麦サイレージ醗酵品質への影響

添加剤	保管期間	開封時水分(%)	pH	Vスコア	サイレージ密度(DMkg/m)
無添加	2ヶ月	75.0	3.76	100.0	149.5
	4ヶ月	73.7	3.80	99.1	160.3
	6ヶ月	74.5	3.79	98.5	157.2
畜草一号	2ヶ月	73.7	3.82	99.8	166.7
	4ヶ月	75.5	3.76	99.9	148.7
	6ヶ月	76.0	3.73	99.9	149.7
乳酸菌A	2ヶ月	75.5	3.70	99.6	146.8
	4ヶ月	71.9	3.60	99.4	181.7
	6ヶ月	73.8	3.59	99.7	159.4
乳酸菌B	2ヶ月	72.1	3.71	100.0	166.3
	4ヶ月	74.1	3.70	100.0	147.1
	6ヶ月	74.2	3.73	99.9	163.4

6 まとめ

品種比較試験では6条大麦のシュンライが収穫適期が長く、収量性も良好だった。倒伏が多いライ麦や草丈の高いライ小麦はコンバイン型のダイレクト体系には適合していなかった。

作期移動試験では、10月中旬は種5月中旬収穫が収量性が高く、且つ、秋・春期の作業競合を軽減できた。

サイレージの発酵品質は、高水分となるダイレクト体系でも良好で、夏期の高温にさらされる6ヶ月の長期保管でも劣化しなかった。

先に飼料用稲麦二毛作の普及における課題としてあげた3点については、①春・秋の限られた作業期への対応策として、飼料稲収穫後の10月中下旬

	4月			5月			6月			7月			8月			9月			10月				
	上	中	下	上	中	下	上	中	下	上	中	下	上	中	下	上	中	下	上	中	下		
飼料用稲						移 ○	植 ○											収 △	穫 △	調 △	製		
飼料用麦			収 △	穫 △	調 △	製															播 ○	種 ○	

図1 飼料用稲一飼料用麦栽培体系例

は種、飼料稲の栽培前の5月中下旬収穫体系で作業競合回避が可能であった。(図1)

また、ダイレクト体系の導入や麦大豆等生産組織による外部化で労力軽減が可能と考えられた。

②収量については、最も高収量となる10月中旬は種で大麦WCSの乾物収量が700kg/10a、稲WCSの900kg/10aと併せて目標の1.6tを達成した。

また、糖含量が高い麦類のサイレージは、高水分であっても良好な乳酸発酵により長期保管が可能な品質であった。

③麦WCS普及に重要な収益性は、収入が麦WCSの流通価格を乾物1kgあたり35円、10aあたりの乾物収量700kgで計算すると、二毛作助成金の15,000円と併せて10aあたり約40,000円であり、費用は減価償却費及び労賃を除く物材費が10aあたり20,000円程度であるため収益が見込まれる。今後、収穫作業を外部へ委託した場合の費用を検討する必要があるが、飼料稲の裏作に麦WCSを導入することによって、水田を有効に活用した飼料増産が図られる。

6. 参考文献

- 1) ダイレクト収穫体系による飼料稲麦二毛作技術マニュアル(2013年度版)