

令和 6 年度

(第 6 6 回)

高知県畜産技術職員研修会

発 表 集 録

高知県農業振興部 畜産振興課

はじめに

- 1 高知県畜産技術職員研修会は、家畜保健衛生所及び畜産試験場の職員が、日常業務に関連して行った事業・調査・研究等の業績について発表することにより、畜産の現状に即した業務の改善や技術の向上に資することを目的としています。
- 2 本集録は、令和6年12月23日（月曜日）に高知県庁正庁ホールで開催された、令和6年度高知県畜産技術職員研修会における、下記の発表内容の全文を掲載したものです。

記

（1）家畜保健衛生所業績発表会

家畜保健衛生所の運営及び家畜保健衛生の企画推進に関する業務

家畜保健衛生所及び病性鑑定室における家畜の保健衛生に関する試験及び調査成績

（2）研究発表（本集録に掲載なし）

畜産試験場の研究及び調査成績

目次

家畜保健衛生所業績発表

- ・人材育成支援による労働生産性向上への取り組み (中央) 鹿又峻… 1
- ・キジの孵化率向上を目的とした効果的な取り組み (西部) 中脇美香… 5
- 肉用牛一貫農場における生産性向上に向けた取り組み (西部) 濱崎健太… 9
- 高病原性鳥インフルエンザ発生時の円滑な防疫対応に向けた取り組み (幡多) 松永隆仁…13
- ・浮腫病が発生した豚飼養農場での衛生対策 (西部) 橋田菜々子…18
- ・管内大規模農場の畜産環境対策(第1報) (中央) 恒石望太郎…22
- ・家保で実施する細菌検査の基本手技手引の作成 (中央) 森木啓…27
- ・関節切開術を実施した多発性関節炎の一症例 (嶺北) 高野雅…34
- ・著しい発育不良を呈した子牛の一症例 (田野) 西明仁…38
- ・褐毛和種(高知系)におけるBoLA-DRB3遺伝子とBLV感染牛のプロウイルス量との関連性の解析 (中央) 森光智子…41
- ◎迅速性及び簡便性の向上を目的とした核酸抽出方法の比較検証 (中央) 高橋学…48
- ・ヨーネ病検査の概要及び本年度の摘発事例 (中央) 川村隆史…57

○：中国四国ブロック家畜保健衛生業績発表会の参加演題

◎：全国家畜保健衛生業績発表会の参加演題

家畜保健衛生所 業績発表

人材育成支援による労働生産性向上への取り組み

中央家畜保健衛生所
鹿又峻、北川咲

1 はじめに

近年、畜産業においては飼料価格高騰等のコスト増加が経営に大きな影響を与えており、これらの外的影響を受けにくい畜産への構造転換が畜産経営の安定化にとって重要である。県内では令和5年度から構造転換支援の一環としてトヨタ式カイゼン（以下、カイゼン）を取り入れた労働生産性向上への取り組みを実施している。

カイゼンの手法として整理整頓をはじめとした環境整備や生産物の不良をなくすための品質管理などがあげられ、人材育成は重要な要素の一つである。管内A農場において畜産経験が浅い従業員を対象に、人材育成に焦点を当てたカイゼンを実施した。

2 課題

A農場は約100頭規模の酪農で、12haの放牧地を利用した飼養管理を行っている。作業には主に雇用主と雇用1年目1名、3年目2名の3人の従業員が携わっており、一日の作業内容は搾乳に加え、飼養管理や自給飼料の作出、放牧地の点検などの環境整備と多岐にわたる。

A農場の生産性向上に向けた課題として、従業員の能力向上のためのフォローアップが挙げられた。3名の従業員はそれぞれ畜産経験が浅く、スキルのばらつきが見られる。さらに、雇用主は飼養管理に加えて経營業務や従業員教育など多くの業務を担っている。また、牧場外での業務も多数受け持っており常時従業員をフォローアップすることが難しい状況である。農場の生産性を向上させるためには各従業員が主体的に作業を進めることが望ましいが、上記の理由から教育に課題を伴っていた。

そこで、課題を解決するために、カイゼンの専門家であるカイゼンマイスターと作業の様子を視察し、雇用主も交えて今後の取り組み内容を話し合う現地診断を実施して具体的な取り組み方針を決定した。

3 取り組み内容

現地診断を基に「作業標準書の作成」と「作業習得目標の設定と評価」を実施した。

(1) 作業標準書の作成

はじめに従業員教育の円滑化のために作業標準書の作成に着手した。「作業標準書」とは誰がやっても同じ結果が出るように作業の手順や正しい方法を明確化したマニュアルのことで、作業の教育をする上で教科書のような役割を果たす。作成に当たり農場の一日の作業内容について時間の内訳を確認したところ、飼養管理に続いて自給飼料生産が大きな割合を占めていることがわかった（図

1)。カイゼンの取り組み順序を考える際には、大きな効果が見込める順に取り組むこと、またやりやすいものから手をつけることが推奨されていることから、今回は自給飼料生産についての作業標準書を作成した。作業を行う上での遵守事項がもれなく記入できる様式を家畜保健衛生所（以下、家保）が雇用主に提示し（図2）、記載内容について提案や確認を行いながら、雇用主を中心に WCS およびイタリアンライグラス乾草作成に関する作業標準書を作成した。

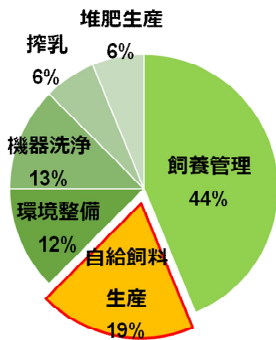


図1 作業時間内訳

作業の内容	作業名		作業手順	作業時間目安	注意点
	工程名				
	作業の目的				
1	○○○○○○○○○○○○○○○○○○		写真		

図2 作業標準書様式

作業手順の欄は使用する機械や刈取のタイミングについて写真を活用しながら記載し、注意点の欄には雇用主が作業を行って来て身につけた「カン」や「コツ」、細かな補足を記載した（図3、4）。

WCS作成 マニュアル	作業名	WCS作成	
	工程名	飼料箱の刈取、ラッピング	
	作業の目的	水田のストック	
	用意するもの	各種重機（作業手順の写真参照）	
1	作業手順	<p>8月ごろ乳熟期に入った飼料箱を収穫機にて刈り取りロールにする</p>	<p>乳熟期</p> <p>刈取前の作業機の点検 ・作付水田マップ確認 ・雑草と併に耕種作業には水も切ってもらい、雑草の4週間後から刈取 ・作業機もスライダートラックにて現地周辺への搬入は運賃に付る指図が乾燥状態での刈取 ・水田まで自力搬送 ・ロールもダンテープルの中央に正しく搭載 ・胎室の内部に巻く ・ロール深さは、ワイヤル破砕に適量</p>
	注意点		
2	作業手順	<p>飼料箱ロールを、直ちにラッピングする</p>	<p>キャベツ335</p> <p>ラッピングマシン</p>
	注意点		

図3 WCS作成についての作業標準書（抜粋）

WCS作成 マニュアル	作業名	イタリアンライグラス乾草作成	
	工程名	イタリアンライグラスの播種・刈取・梱包	
	作業の目的	水田のストック	
	用意するもの	動力耕種機、各種重機（作業手順の写真参照）	
1	作業手順	<p>播種機</p> <p>CAT</p>	<p>※播種機や重機が水田からの戻り、播種機や重機の燃費、播種作業でタイヤが水田に泥を踏みつけ、高野田を完結させると乾燥機で乾燥</p>
	注意点		
2	作業手順	<p>トラクター</p> <p>マシン</p>	<p>※播種機で完結しない場合はCATで、2回作業が済むように、マシンは播種機、高野田を完結させると乾燥機で乾燥</p>
	注意点		
3	作業手順	<p>トラクター</p> <p>トラクター</p>	<p>※播種機はジョイントはヘリコプター型は播種機、高野田を完結させると乾燥機で乾燥</p>
	注意点		

図4 イタリアンライグラス乾草作成についての作業標準書（抜粋）

(2) 作業習得目標の設定と評価

次に従業員の方々のやる気醸成に向けた取り組みとして作業習得目標の設定と作業習得状況の評価を取り入れた。挑戦する習得目標を明確にするために「いつまでに」「何を」「どの水準に」という内容を具体的に整備した目標シートを家保が作成し、雇用主が各従業員について目標の設定と訓練の実施計画の策定した。目標シートにはフィードバックに活用し次の目標に繋げることができるように、継続的に進捗状況の確認と記録が可能な記録欄を設けた（図5）。

さらに各種農場作業について習得状況の評価表も作成し評価することで、習得状況の確認と見える化を行った。

評価基準は一通りの手順習得ができた A 評価からはじまり、最高評価は作業の指導ができる D 評価となるように設定した（図 6）。

取組②作業習得目標の設定と評価

◆作業習得目標の設定

習得目標を具体的に整理

習得目標

いつまでに	何も	どの水準に	進捗状況

継続的に進捗状況を記録
フィードバックに活用

挑戦する習得目標を明確に！

図 5 作業習得目標シート

取組②作業習得目標の設定と評価

◆習得状況の評価

作業習得状況一覧

作業名 氏名	習得	作業 状況	評価基準
	A B C D	A B C D	

評価基準
A：手順習得
B：標準作業ができる
C：手順と品質確保が出来る
D：作業の指導が出来る

習得状況の見える化で達成感と自信を醸成！

図 6 作業習得状況評価表

(3) 従業員との面談

最後に現地診断を基に実施をした 2 つの取り組みに加えて、家保と従業員の間で個別面談を実施した。

雇用主と家保職員間では取り組みの状況や標準書等の作成依頼、従業員の様子について継続的に話し合いながら取り組みを進めた。その中で雇用主から、従業員が自分には直接言いづらい仕事のやりづらさや悩みを第三者になら話しやすいのではないかという意見が上がった。この意見を受けて、従業員の率直な意見の聴取が雇用主と従業員の相互理解に繋がり人材育成の一助になると考え、従業員との個別面談を実施した。

面談では仕事のやりがいや悩み、課題、目標について、聞き取りシートを準備した上で聴取した。また雇用主が打合せの際に話していた、自身の不在時に従業員をまとめることのできる人材がいると安心できるという従業員に目指してほしい姿を面談の中で代弁した。

4 結果

写真付きで注意点まで細かく記載された作業標準書および具体的な訓練計画を明記し継続的なフォローアップや作業習熟度の確認が可能な評価表を作成し、形として残る「仕組み」を構築することで教育体制の整備を行った。作業標準書の整備と運用は従業員教育を円滑化し従業員の能力向上を補助する効果が期待される。また作業の習熟度を把握し従業員に安心して任せることが出来る作業が増えることで、雇用主の負担が軽減するだけでなく従業員の達成感や自信を醸成しモチベーションの維持向上にも繋がると考えられる。これらの仕組みは現在雇用している従業員に対してだけでなく今後の新規雇用者の指導にも活用でき、長期的にも農場全体の人材育成に役立つことが期待される。

また個別面談の実施では従業員自身による目標の言語化が目標認識や課題発見につながり、面談以降作業スピードの向上や雇用主の不在時に後輩従業員に指示を出すなど自主性や積極性が向上した。

全ての取り組みを通して得られた成果として、雇用主の人材育成への意識が大きく向上した。取り組み実施前はこれまでの指導内容が十分に定着していない様子から教育に対する期待が薄れており、従業員自身の意識が自発的に変わらない限りは課題は解決しないと考えられていた。取り組み実施後は人材育成にアプローチする着眼点を学び、取り組みにも積極的に協力し、人材育成に対して前向きな姿勢を示すようになった。

5 考察

本取り組みではカイゼンの手法を活用して、人材育成を課題とする農場において体制の整備を行い、従業員の能力向上への第一歩を踏み出した。作業標準書は作業習得の教科書として機能し、従業員にとっての仕事の難しさを教育・訓練によってやりに近づける助けになる。また評価表を用いた目標設定や習熟度の評価、従業員との個別面談は、雇用主と従業員の間での目標・目的の共有化、相互理解に寄与した。以上の取り組みを通して、農場の人材育成を進める上で重要な雇用主と従業員の円滑な連携の実現に貢献した。

今後は作業標準書の改訂と追加作成および目標設定と評価の効果の検討を行うことで、取り組みの効果的な運用を図る。

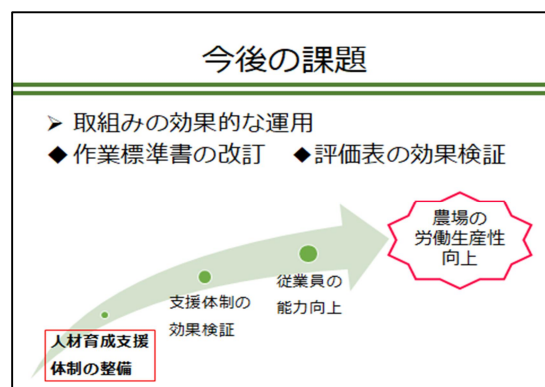


図 7 今後の課題

6 謝辞

カイゼンを実施するにあたって基礎知識の講義・研修や農場指導に関してアドバイスをしてくださった(株)カイゼン・マイスターの佐々木秀樹先生、清水伸悦先生に深謝いたします。

キジの孵化率向上を目的とした効果的な取り組み

西部家畜保健衛生所
中脇美香

1 はじめに

管内では、コウライキジを2戸の農家で約2,300羽(うち種キジ約500羽)平飼いで飼養しており、キジ肉の生産から加工までを行っている。第5期高知県産業振興計画の高幡地域アクションプランに位置づけられ、生産体制の確立と生産羽数の増加に向けて取り組んでいる。A農家は、地域にあるキジ生産部の部長であり、10年ほどキジを飼養している。B農家は、新規就農者として令和5年からキジの飼養を開始し、令和6年には増羽に対応するため、新たに鶏舎を増設した。

しかし、昨年の孵化率は約50%(種卵4,660個から2,325羽が孵化)と低迷し、必要とするキジ肉の販売量を確保できなかつたため、今年は昨年の2倍となる孵化羽数5,000羽確保することとした。また、安定的な生産体制を確保するために、県内のキジ飼養農家を参考にして受精率90%以上、孵化率70%以上を目標とした。

2 取組内容

目標達成のために5つの取り組みを実践した。

(1)種キジの雌雄割合を検討

種キジの雌雄の割合を決めずに種卵を生産していたことで孵化率が低迷した原因の1つと考えられたため、種キジの効果的な受精を促すように、家禽の雌雄割合を参考にして、雌キジ10羽に対して雄キジ1羽となるよう割合を検討した。

(2)種卵消毒の実施

集卵後、卵が汚染された状態で孵化作業を行っていたため、種卵を流水で洗い、アルコールまたは水で希釈した次亜塩素酸水溶液で消毒を行うよう指導した。

(3)貯卵環境の改善

集卵後、孵卵器に入卵するまで常温での保管や貯卵期間が3週間から1ヶ月と不規則であったため、貯卵庫を導入後、以下の3点について改善するよう指導した(図1)。

- ①種卵は貯卵日数が経つにつれて孵化率が低下するため、貯卵期間を最長で2週間までに制限する。
- ②貯卵時の温度や湿度は孵化率に大きく影響するため、貯卵庫内の温度を12℃～14℃に保ち、乾燥を防ぐために水を入れたバケツを設置する。
- ③卵の鋭端側よりも鈍端側を上にして保管することで孵化率が向上するため、全ての卵の鈍端側を上にして保管する。



図1 改善後の貯卵環境

(4) 検卵の実施

無精卵や中止卵の孵卵を続けると緑膿菌が増殖して爆発し、孵卵器内が汚染されるため、入卵後10日以降に検卵を行い、無精卵と中止卵を除去した。検卵は、暗室の中で卵の鈍端側をライトで照らし、気室の有無や血管の発達から卵の状況を判断した(図2、3)。検卵回数が多いと孵卵器内の温度が下がり、孵化率が低下するため、検卵は原則1回に制限するよう指導した。

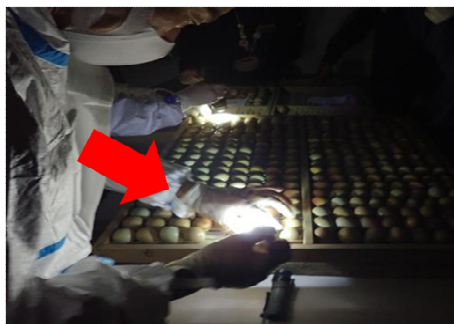
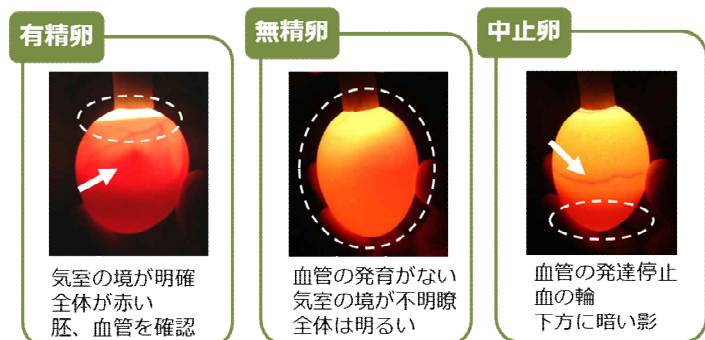


図2 検卵の様子



※写真は独立行政法人家畜改良センター岡崎牧場HPより引用

図3 卵の見分け方

(5) 記録

入卵・孵化台帳に入卵個数、検卵を行った時に除去した無精卵数、中止卵数および孵化羽数を記入し、各農家の受精率や孵化率、中止率の算出を指導した(図4)。

入卵・孵化台帳①								No. 1						
入卵日	R6.4.16							入卵数(個)A	1,338					
検卵日	R6.5.1							孵化羽数(羽)E	960					
発生日	R6.5.10							出荷羽数(羽)G						
種卵区分 [部屋番号]	A	B	C	D	D/A	E	F	F/A	F/D	F/E	G	G/A	G/E	備考 (中止率)
	入卵数 (個)	無精卵 数(個)	中止卵 数(個)	受精卵数 (個)	×100 (%)	残卵数 (個)	孵化羽 数(羽)	×100 [対]	×100 [対]	×100 [対]	出荷数 (羽)	×100 [対]	×100 [対]	
A農家	822	62	43	760	92.5	717	603	73.4	79.3	84.1	—	—	—	5.2%
B農家	516	69	20	447	86.6	427	357	69.2	79.9	83.6	—	—	—	3.9%
合計	1,338	131	63	1,207	90.2	1,144	960	71.7	79.5	83.9	—	—	—	4.7%

図4 入卵・孵化台帳

3 結果

孵化作業を4回行った結果、平均受精率は約92.8%だった(図5)。平均孵化率は約72.7%と昨年の約49.9%と比べ、約23%向上した(図6、7)。今年の入卵個数は9,759個であり、7,095羽のヒナが孵化した。

しかし、4回目の孵化作業でB農家の孵化率が大きく低下し、また、中止率が約34.1%まで上昇した(図8)。

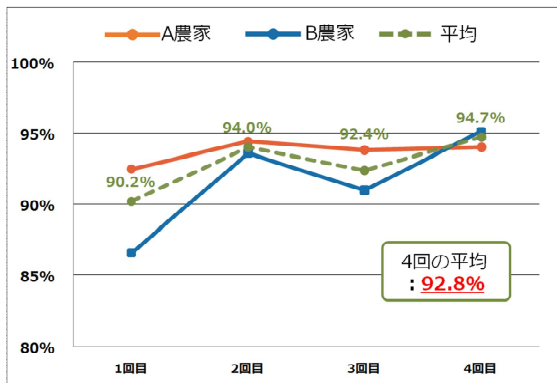


図5 受精率

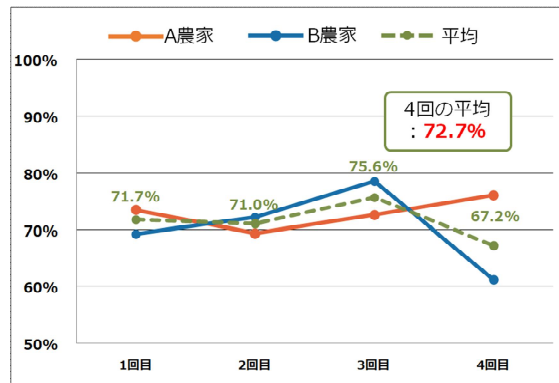


図6 孵化率

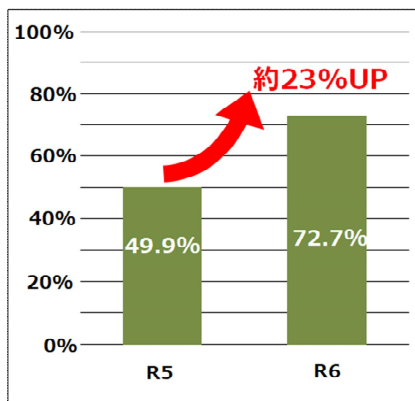


図7 平均孵化率

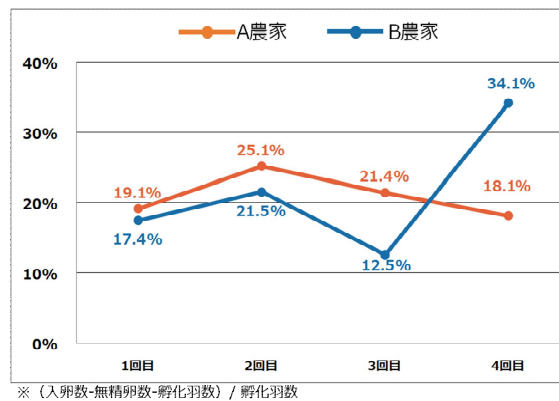


図8 中止率

4 考察

B農家において4回目に孵化率の低下と中止率の増加が見られたが、孵卵器には問題が見られなかったため、集卵方法や貯卵庫へ保管するまでに何らかの不備があった可能性があると考えられた。そこで、B農家に聞き取りを行った結果、1日の寒暖差が大きい時期に集卵後の卵を貯卵庫に入れずに放置していたことが判明し、孵化率が低下したのではないかと考えられた。そのためB農家には、集卵回数を増やし、集卵後は速やかに貯卵庫へ保管するよう指導した。

今回、目標達成のための取り組みを行ったことで高い受精率、計画以上の孵化羽数を確保することができた。また、孵化率の現状を把握し、改善を行うことで農家の意識向上に繋がった。

引き続き孵化率向上に向けた取り組みを継続し、今後は、種キジの一群あたりの同居羽数を制限し、産卵期の闘争による事故率の低減や雌の採食負けを防止

することで産卵率向上を目指す。また、産卵率が40%に達した日から集卵を開始することで、1日に種卵を200個ほど集め、2週間間隔で孵化を行い、孵化回数を現状の4回から3回に削減することで、より安定的な生産体制を確保できるよう指導を行っていく。

肉用牛一貫農場における生産性向上に向けた取り組み

西部家畜保健衛生所
濱崎健太

1 はじめに

令和6年度の家畜保健衛生所の組織再編により新体制の西部本所が設置された。これにより、マンパワーが集約され診療サービスを充実・強化できる環境が整備された。今回、地域の中核である肉用牛一貫農場において生産性向上に向けた多角的な取り組みを行ったので報告する。

2 取組内容

以下の3つの項目に分けて対策を実施した。

①繁殖成績向上対策

繁殖分野において平均分娩間隔の長期化や平均授精回数が多いことが課題となっていた。そこで、県が支援する「次世代こうち新畜産システム推進事業」によるファームノートを活用した繁殖管理システムを運用し、繁殖情報の共有を行った。また、NOSAI 獣医師による定期繁殖検診に同行し、栄養改善指導や治療などのアドバイスをを行った。

②疾病低減対策

令和5年度、全診療件数のうち呼吸器疾患が45%と多く、そのうち81%は10ヶ月齢未満であったことから子牛の呼吸器疾患が多いことが課題となっていた(図1)。そこで抗体価の測定により子牛のワクチン投与適期を把握し、NOSAI 獣医師との診療方針の協議を行った(図2)。

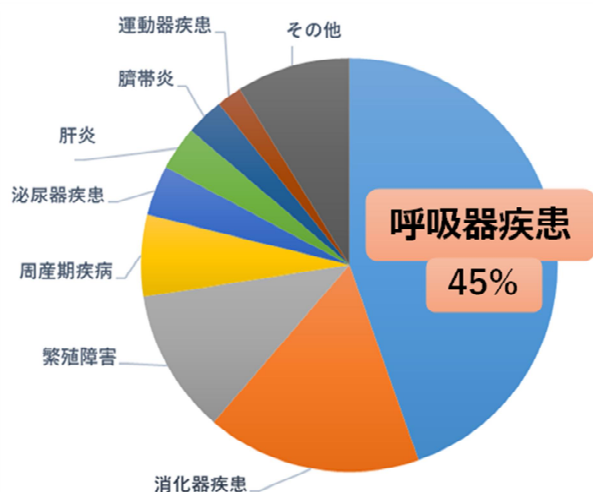


図1 令和5年度における診療内訳

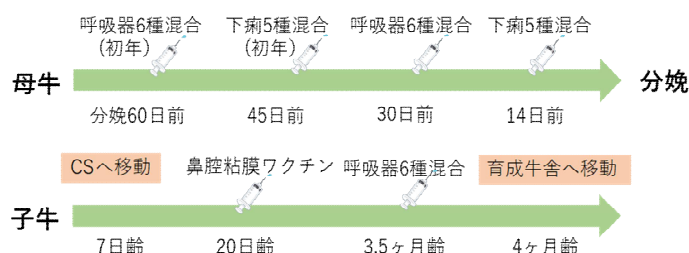


図2 現行のワクチンプログラム

③生産振興対策

日々の作業に時間がかかることで従業員が常に繁忙であり、牛の観察を行う時間が取れていないことや従業員の中で経験や知識に差があることで若い従業員が現場での対応に苦勞していること、その他活用できる事業などの情報を知る機会がないことなどが課題となっていた。そこで、県が支援する「飼料高騰対応畜産経営体質強化事業」における労働生産性向上への取り組みとして、トヨタ式カイゼンを実施し、キャトルステーションでの哺乳作業の効率化を指導した。また、地域農家や農協を交えた勉強会を定期的に行い、牛の見方を通じた飼育指導や病気の話など飼養衛生管理指導、畜産振興事業の紹介などを行い有益な情報を提供した（図3）。



図3 勉強会の中で様々な情報を発信

3 結果

①繁殖成績向上対策

平均分娩間隔は、令和6年4月時点の448.9日から同年10月時点で443.8日に減少。授精回数については、令和6年4月時点の2.3回から同年10月時点で2回となり改善傾向がみられた。

②疾病低減対策

現行のワクチンプログラムでは移行抗体により3.5ヵ月齢での接種がワクチンブレイクを起こしていることが判明したため（図4）、呼吸器6種混合ワクチンを4.5ヵ月齢での接種に変更し移行抗体によるワクチンブレイクを回避、ワクチンの効果を高めることができると推測した（図5）。その結果、呼吸器疾患の初診件数は令和5年度47件だったものが令和6年度は15件に減少した（図6）。また、全病傷の初診件数についても令和5年度152件だったものが令和6年度は77件まで減少した。

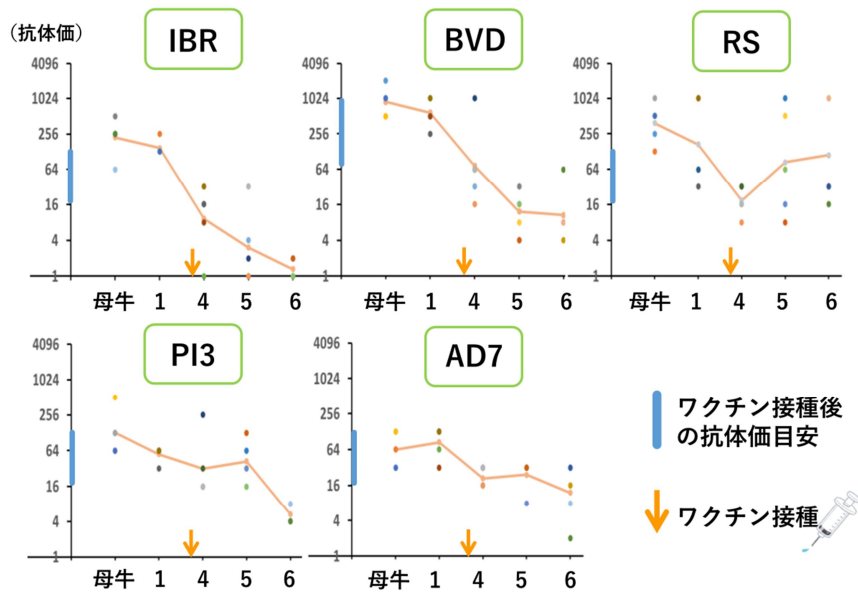


図4 呼吸器ウイルスに対する抗体価

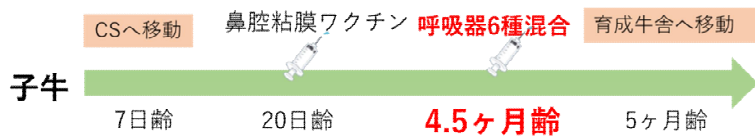


図5 変更後のワクチンプログラム

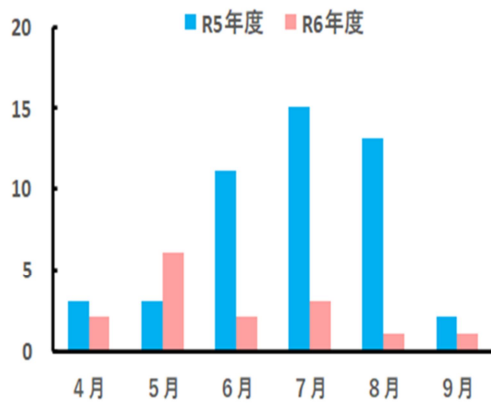


図6 呼吸器疾患 初診件数

③生産振興対策

トヨタ式カイゼンの実施によりミルク作成・片付けにかかる時間が短縮され、短縮された時間を利用してその他の生産性向上への取り組みを検討・実施することができた。また、勉強会の開催が地域の繁殖農家との意見交換の場となり、農場が希望する「よい子牛」が地域で生産され、家畜市場での取引につながっている。

4 まとめ

家保再編により集約されたマンパワーを活かしたサービスの充実・強化が整備され、様々な取り組みを実施することができた。

今後も更なる多角的な取り組みにより農場の生産性向上を支援していく。

高病原性鳥インフルエンザ発生時の円滑な防疫対応に向けた取り組み

西部家畜保健衛生所幡多支所
松永隆仁

1 はじめに

近年、高病原性鳥インフルエンザ（以下 HPAI）の国内発生が続いており、今後も国内での HPAI 発生リスクが高まっている。高知県では、飼養羽数 1 万羽以上の養鶏農家の HPAI 発生時に備え、特定家畜防疫指針に基づいた対処計画を作成しており、HPAI 発生時には対処計画に基づいた迅速な初動対応が必要である。今回、対処計画の検証のため県内最大規模の養鶏農場で防疫演習を実施したので、その概要を報告する。

2 農場・埋却候補地、防疫演習の概要

防疫演習を行った農場は山間部に位置し、肉用鶏農場、常時飼養羽数 24 万羽、鶏舎数 18 棟である（図 1）。埋却候補地は農場から約 10 km 離れた位置にあり、山を切り開いた国営農地である。埋却候補地（図 2）は面積が約 5000m² あり、最大 50 万羽の埋却が可能である。面積は十分だが、掘削を行っていないので重機の侵入、地下水の有無は不明である。

2024 年 10 月 9 日に町役場、交通会社、県関係機関から 38 名を参集し、農場、埋却候補地で防疫演習（以下演習）を行った。演習では、マイクロバスによる、山間部に位置する農場・埋却候補地までの動員者の輸送方法、衛星電話・業務用携帯電話を用いた農場・埋却候補地との連絡方法、重機の侵入、地下水の有無を確認するため、埋却候補地の掘削の可否を検証した。

3 防疫演習の結果

- (1) 山間部に位置する農場・埋却候補地までの動員者の輸送方法
車幅約 2.5m の 25 名乗りのマイクロバスによる輸送が可能、農場



図 1 農場概要



図 2 埋却候補地概要

までに幅 3m の道や急カーブがあったが切り返しなしで走行が可能であった (図 3)。

検証内容①: 動員者輸送方法

利用可能な車両、輸送ルートの確認

- 使用車両: 2種類
25名乗りマイクロバス、20名乗りマイクロバス
- 検証内容
中継基地⇄農場・埋却候補地の輸送について
バスの運転手に
農場・埋却候補地まで利用可能な車両を確認
輸送ルートを確認

検証結果①: 動員者輸送方法



25名乗りのマイクロバスで輸送可能

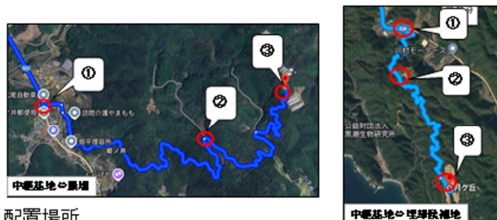
図 3 動員者輸送方法

(2) 農場・埋却候補地との連絡方法

中継基地から農場間の 4 カ所、中継基地から埋却候補地の 4 カ所の合計 8 カ所で連絡方法の確認を行った。業務用携帯電話は一部繋がらない場所があったが、衛星電話は全ての場所で連絡が可能であった (図 4)。

検証内容②: 連絡方法

中継基地⇄交通整理要員⇄農場・埋却候補地
業務用携帯電話・衛星電話の通信状況を確認



検証結果②: 連絡方法

中継基地⇄農場					中継基地⇄埋却候補地						
受	発	農場	国道入り口	分岐部	農場前	受	発	埋却候補地	国道入り口	分岐部	候補地前
			○	△	○				△	△	△
		○		△	○			△		○	△
		△	△		△			△	○		△
		○	○	△				△	△	△	

○: 業務用携帯電話、衛星電話両方繋がる △: 衛星電話だけ繋がる

一部通信状態に問題はあったものの
衛星電話を使用することで連絡可能

図 4 農場・埋却候補地との連絡方法

(3) 埋却候補地の掘削の可否

埋却候補地で 4 カ所掘削を行った。どの地点も掘削用重機の侵入、4m の掘削が可能で、地下水は確認されなかった (図 5)。

検証内容③: 埋却候補地の掘削可否



検証結果③: 埋却候補地の掘削可否

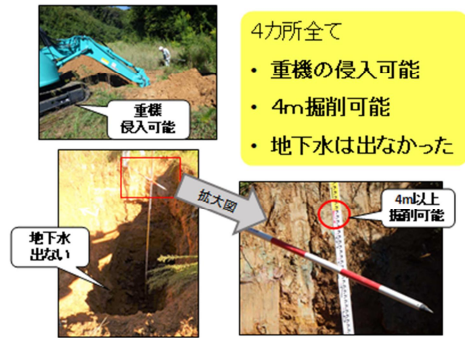


図 5 埋却地の掘削の可否

4 防疫演習の課題と対策案

防疫演習終了後、参加者にアンケート調査を実施し、防疫演習の良かった点、課題点、その他気づいた点を記載してもらった。良かった点は、防疫作業のイメージができた、中継基地が使いやすいそうだった、埋却候補地が使用可能と確認できたことが挙げられた。課題点は5つ挙げられた。

(課題 1) 交通整理要員の配置場所

配置場所から農場までの道が1本道でないこと、農場に向かう関係車両と民間車両の区別がつかないことが課題としてあげられた。対策として、配置場所を分岐のない山道側に変更することを検討している(図6)。



図 6 交通整理要員の配置場所

(課題 1) 交通整理要員配置場所の環境整備

交通整理要員を配置した場所は雨風をしのげる場所がなく、近くにトイレや休憩場所がなかった。道の駅は配置場所から車で片道25分かかる場所にあるため、持ち場を一時離れることも簡単にできなかつた。対策として、テント、簡易トイレの設置を検討している(図7)。

課題2: 交通整理要員配置場所の環境整備

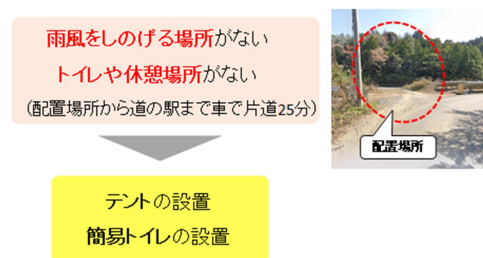


図 7 交通整理要員配置場所の環境

(課題 3) 衛星電話の使用条件

衛星電話は通信が遮蔽物や天気の影響を受けやすい。今回使用した、衛星電話は使用条件として①通信機器のアンテナを衛星のある南に向ける、②頭上に木の枝等遮蔽物がない開けた場所で使用する③雲が出ていと通信が悪くなるため、天気のいい日に使用する、がある。対策として、通信がしやすい高さの台を使用。違う種類の衛星電話を活用および悪天候に備え、無線の活用を検討している (図 8)。

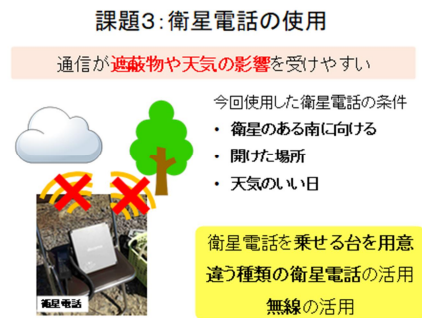


図 8 衛星電話の使用条件

(課題 4) 動員者輸送ルートの見直し

演習で使用した動員者の輸送ルートは、同じ道を往復するため輸送の車両がすれ違う可能性があった。アンケート調査で新たに一方通行のルートが提案された。新しいルート案は帰路で集落を通る必要があるため、大型車両の通行が可能かなど、現地確認を行い、使用を検討している (図 9)。

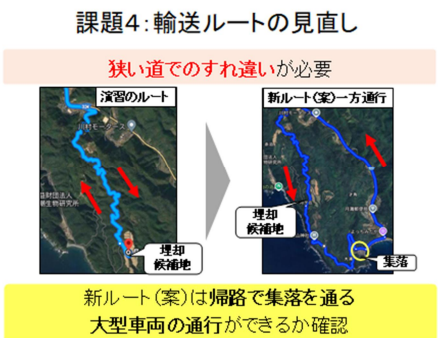


図 9 動員者輸送ルートの見直し

(課題 5) 動員者の長時間移動

動員者の一次集合場所である高知県庁から農場までは片道 3 時間かかり、農場までの道のりもカーブや段差がある。アンケート調査では、移動中で車酔いが起きやすいのではないかと意見があった。対策として、一次集合場所を幡多福祉保健所にする、地域の動員者を中心とした動員計画や、動員者を中継基地で一度休憩させてから農場へ移動することを検討している (図 10)。

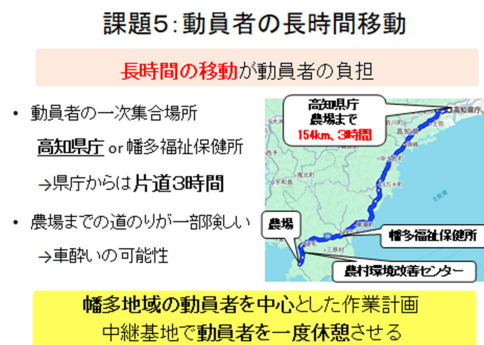


図 10 動員者の長時間移動

5 まとめ

防疫演習は事故なく無事に終了できた。演習で行った3つの検証により、使用可能機材を確認でき、演習後のアンケートから発覚した、新たな5つの課題は現地確認などを行い対策を検討している。

今回の防疫演習にて得られた結果、意見を参考にし対処計画を見直し、体制整備と強化を図る。

浮腫病が発生した豚飼養農場での衛生対策

西部家畜保健衛生所
橋田菜々子、福島佳子

1 はじめに

浮腫病は離乳した子豚に多く、志賀毒素産生性大腸菌(STEC)により引き起こされる病気で、浮腫や神経症状、突然死等の症状を示す。致死率が高いため農家の経済的・精神的打撃が大きい。今回、令和6年6月に管内の農場において約70日齢の肥育豚の死亡が多発した。病性鑑定の結果、浮腫病と診断し、発生防止対策として衛生指導を実施したので、その概要について報告する。

2 農場の概要

母豚347頭飼養の一貫経営農場である。令和5年度に新設した繁殖豚舎で生まれた子豚は1日齢で抗コクシジウム剤を投与、約20日齢で離乳及びCSF・PCV2・マイコプラズマワクチンを接種する。約60日齢になると繁殖豚舎から従来の肥育豚舎(前期)へ移動し、約100日齢で肥育豚舎(前期)から肥育豚舎(後期)へ移動。肥育豚舎(後期)で出荷まで飼養される。

3 経緯

令和6年6月12日、肥育豚舎(前期)で約70日齢の肥育豚の死亡頭数が増加したと通報があった。繁殖豚舎で飼養されていた豚に異状はなかった(図1)。病性鑑定の結果、3検体中1検体が胃潰瘍で、他2検体については原因不明であった。管理獣医師の判断によりドキシサイクリンの飼料への添加及びアモキシシリンによる治療を開始。これにより一時的に肥育豚の死亡増加は抑えられた。しかし、同年6月27日に再度約70日齢の肥育豚の死亡頭数が増加したと通報があり、3検体の病性鑑定を実施。



図1 繁殖豚舎の様子

同日に行った立入検査では、肥育豚舎(前期)で飼養されていた約70日齢の肥育豚で神経症状や後肢麻痺等の症状がみられた(図2)。病性鑑定個体の外貌からは眼瞼浮腫や体表の蒼白を確認(図3)。また、解剖時に回腸粘膜の暗赤色、頭部皮下水腫、腸管膜リンパ節の赤色腫大等がみられた(図4)。病理組織検査では、結腸において粘膜下組織の水腫性肥厚、血管内皮細胞の腫大、血管平滑筋の軽度膨化等を確認(図5)。細菌検査では、Stx2e及びF18遺伝子陽性大腸菌を検出し、その他の所見とあわせて浮腫病と診断した。



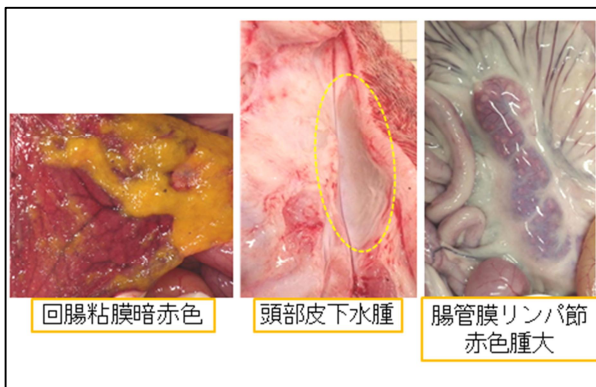
図2 肥育豚舎(前期)の様子



眼瞼浮腫

体表の蒼白

図3 外貌所見

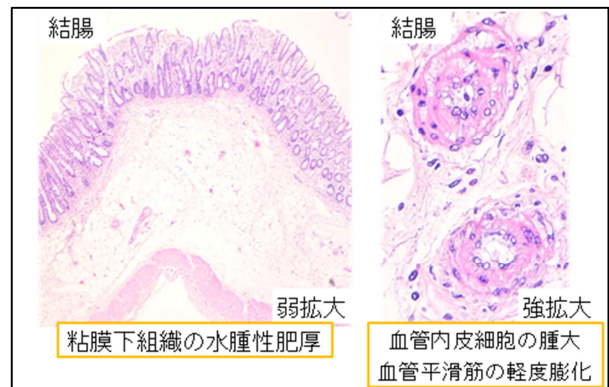


回腸粘膜暗赤色

頭部皮下水腫

腸管膜リンパ節
赤色腫大

図4 解剖結果



結腸

結腸

弱拡大

強拡大

粘膜下組織の水腫性肥厚

血管内皮細胞の腫大
血管平滑筋の軽度膨化

図5 病理組織検査結果

4 対策

新しく衛生環境が整った繁殖豚舎から従来の肥育豚舎へ移動したことによる移動ストレス・環境ストレスが原因で浮腫病が発生したと考察。また、衛生対策実施前までは豚舎の洗浄・消毒、死亡記録の管理が不十分で従業員の飼養衛生管理に対する意識が低かった。

そこで、浮腫病発生防止のため①従業員の飼養衛生管理に対する意識付けのため正確な死亡頭数の管理を徹底、②豚舎の効果的な洗浄・消毒の徹底、③薬剤感受性試験に基づく薬剤の適正使用の3つの衛生対策を実施。

5 結果

(1) 死亡頭数の管理徹底

「Porker」という養豚場管理システムを用いて、死亡頭数、死亡原因の内訳、現在の飼養頭数、豚の移動年月日等を従業員が自ら記録するようになった。

(2) 豚舎の洗浄・消毒の徹底

対策前はオールアウト後に豚房の洗浄のみを行い、繁殖豚舎から豚をオールインしていた。対策後はオールアウト後、洗浄→乾燥→消毒液→乾燥→消石灰→オールインする行程に変更した(図6)。また、84~105日齢の豚の直腸便および環境材料各12検体を検査した結果、志賀毒素産生性大腸菌は分離されなかった(図7)。

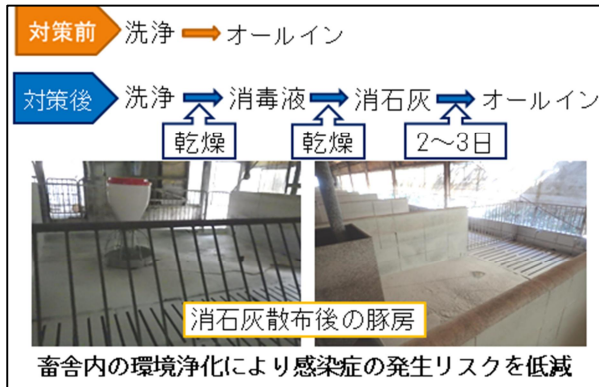


図6 豚舎の洗浄・消毒の徹底

74日齢、83日齢、91日齢、99日齢、105日齢の豚房から直腸便・環境材料を採材

検査材料	検体数	Stx2e
直腸便	12	—
環境材料	12	—

消毒後豚房での環境材料：DHL培養で分離菌なし

図7 衛生指導後の大腸菌検査結果

(3) 薬剤の適正使用

薬剤感受性試験の結果(表1)に基づいた適正な薬剤の使用を指導し、浮腫病の疑いがある豚にはマルボシルを使用。また、管理獣医師の判断で浮腫病対策として、大腸菌に効果があるアプラマイシンを餌へ添加した。

表1 薬剤感受性試験の結果

薬剤名	判定(感受性)
アモキシシリン	+/-
セファゾリン	+
ドキシサイクリン	+/-
ストレプトマイシン	+/-
ST合剤	+/-
コリスチン	+
マルボフロキサシン	+

(4) 死亡率の推移

離乳後の死亡率は、浮腫病による死亡豚増加時(6月)は37.6%であったのに対し、衛生対策後(7~11月)は平均7.1%に鎮静化した(図8)。

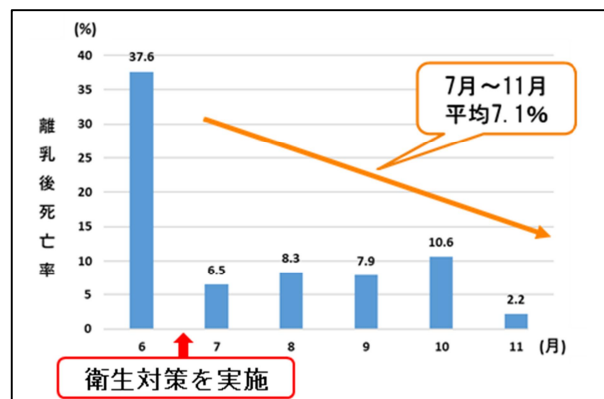


図8 死亡率の推移

6 考察

養豚場管理システムを用いて従業員が自ら正確な死亡頭数を記録することで、正確な死亡率の増減を可視化し、従業員の飼養管理に対する意識向上につながったと考える。また、効果的な洗浄消毒方法への見直しにより、畜舎内の環境浄化を行い、大腸菌をはじめとした感染症発生リスク低減を図ることができたと考える。加えて、図9のように細胞壁や細胞膜を破壊するタイプの抗菌剤は大腸菌の菌体内からの毒素放出を助長する。抗菌剤の作用機序を考慮し、より慎重に使用薬剤の選択するようになったことと感受性のある抗菌剤の使用により浮腫病の発生を防ぐことができたと推測する。

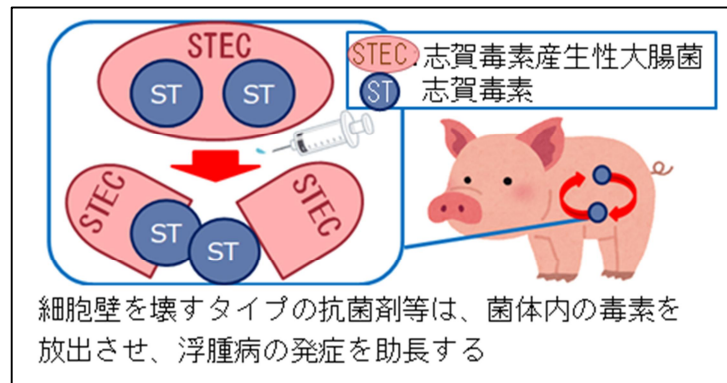


図9 抗菌剤作用機序の一例

7 まとめ

基本的な飼養衛生管理を見直すことで浮腫病による肥育豚の死亡率が減少した。今後も洗浄消毒の励行、健全な飼養環境の維持、薬剤耐性に考慮した適切な抗菌剤使用の指導を継続することが重要である。

8 謝辞

今回の衛生対策実施にあたり、検査及びご助言いただきました明治アニマルヘルス株式会社及び株式会社サン・ダイコーの皆様に深謝いたします。

管内大規模農場の畜産環境対策

中央家畜保健衛生所
恒石望太郎

1 はじめに

近年、国内の畜産公害に対する苦情発生戸数は農家数の減少に伴い減少傾向にあるが、苦情発生戸数を農家戸数で割った発生率は依然 2%前後で推移している。苦情内容として最も多いのが悪臭関係、続いて水質汚濁、害虫関係と続き、その他は糞尿流出や鳴き声等の騒音となっている。(図 1)

管内 A 農場においても臭気に関する苦情が役場や家保に寄せられている。

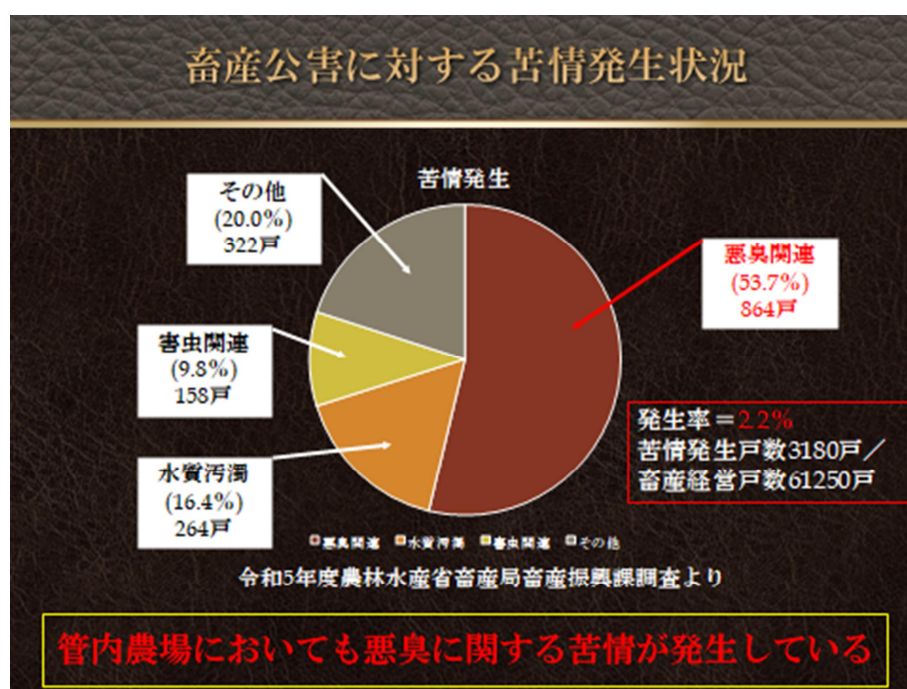


図 1 畜産公害に対する苦情発生状況

A 農場では、以前から苦情が発生するたびに地域住民との話し合いと改善を繰り返してきた。近年は農場と市町村や県が連携し、定期的な環境ミーティングや臭気モニタリングに取り組んでいる。

そんな中、令和 6 年 4 月の新規搾乳牛舎完成(図 2)以降、臭気モニタリングにおける感知数が増加し、農場や家保への臭気の相談も増加した。

苦情発生エリアが農場近隣、農場遠方東側、西側の 3 エリアにまたがり広範囲であること、また、農場は高低差のある複雑な地形に建っており、牛舎や堆肥場が広い農場に点在していることから、臭気発生要因分析と対策立案が困難であることが課題となっている。

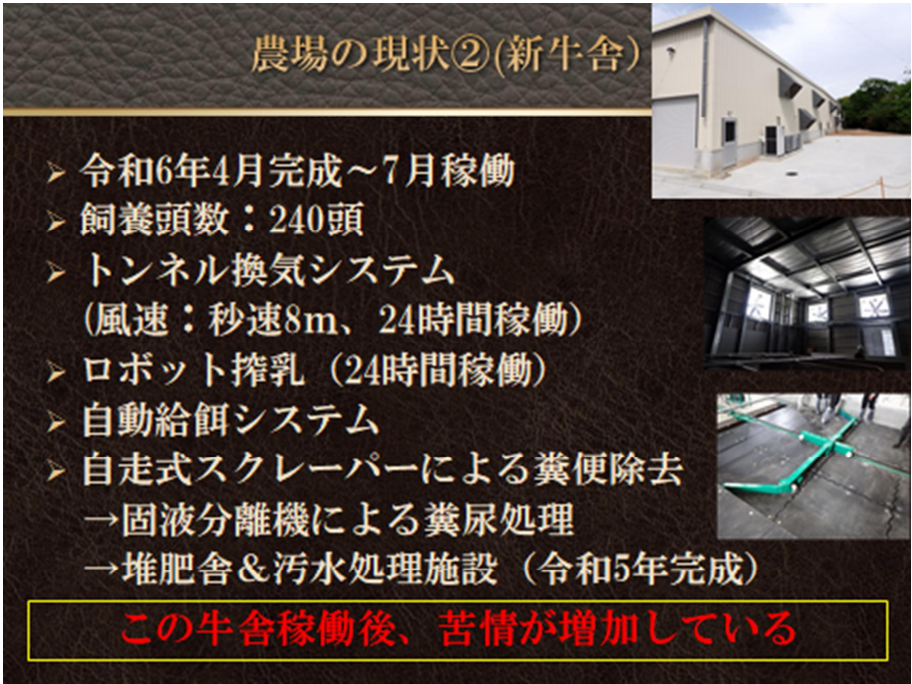


図2 新規搾乳牛舎

2 対策内容

複雑な地形や広域にわたる臭気拡散ルート分析と対策指導ができる専門家の協力が必要と判断し、従来の取組と連携体制に加え、畜産環境対策の専門機関である一般社団法人畜産環境整備機構（以下機構）に協力を依頼した。機構が主催する堆肥流通体制支援事業を活用し、現地調査による臭気発生要因の分析とその対策について話し合う検討会を開催した。（図3）

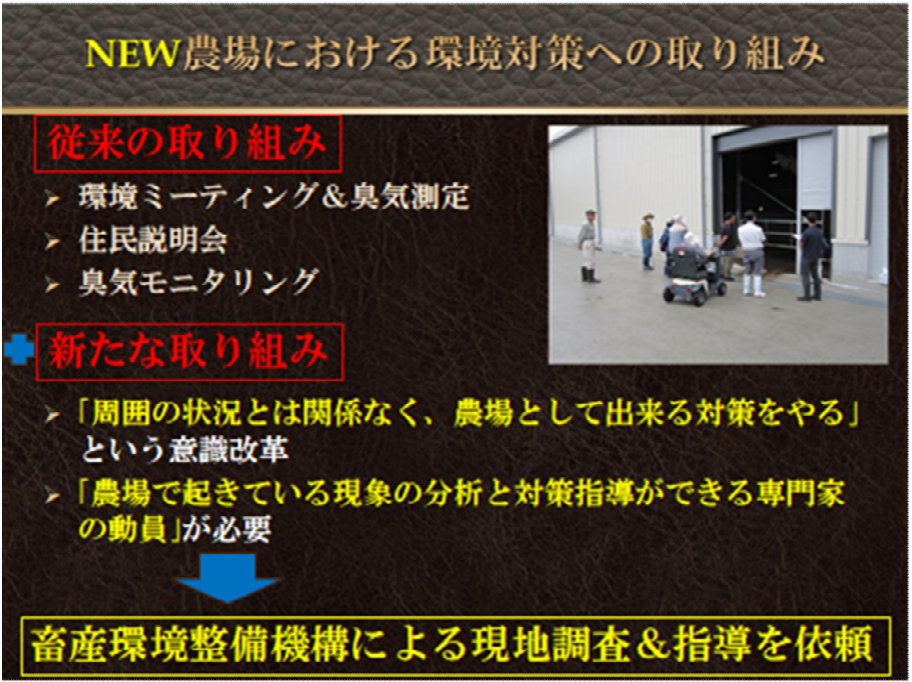


図3 農場における環境対策への取り組み

3 結果

機構の現地調査から、臭気的主要な発生源は堆肥舎にあり、そこで処理されている一部の汚泥堆肥の処理が発生要因と指摘された。汚泥を処理する際、凝集剤で粘土状に固まり、堆肥施設での攪拌と通気がうまく行われず、残留水分が嫌気性発酵を起こすことで低級脂肪酸などが発生、苦情に繋がっていると分析された。(図4)

対策としては、汚泥堆肥に対する副資材の利用や強制通気による好気性発酵への誘導と遮蔽壁などによる臭気の拡散防止策を中心に行うこととした。また、対策の効果検証のために臭気マップの作成も有効な手段とのアドバイスをいただいた。(図5)

臭気の拡散ルートに関しては複雑で、農場主の考えている高いところから低いところへというルート以外にも複数の拡散ルートがあるとの指摘があった。例えば、高い山に囲まれている堆肥舎であっても、昼間温められた堆肥舎周辺の臭気が夜間に冷やされることで上昇し、強い気流に乗って遠方に拡散しているとのこと。なお、低級脂肪酸などの畜産臭の空気は、普通の空気と水と油の関係で混ざらないので、遠方であっても薄まらずに遠くに届くとのこと。どのような拡散ルートをとっているにしても、臭気の出発点をたたくことが第一の対策であることがわかった。



図4 現地調査

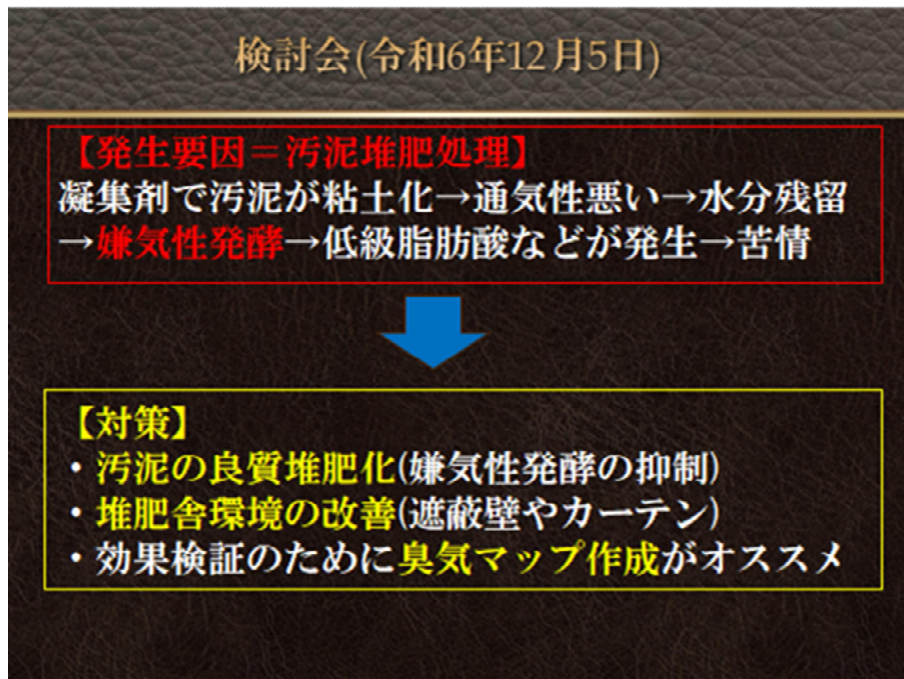


図 5 検討会

4 考察

機構の調査結果から汚泥堆肥が臭気の原因と指摘があり、農場主から「そういえば汚泥堆肥の処理を始めて苦情が増えた気がする」との発言があった。臭気モニタリングの結果(図 6)を見ると、令和 5 年 7 月に污水处理施設が完成し汚泥堆肥の処理が開始、ここから臭気感知数も増加し、令和 6 年度 4 月新牛舎が完成、ここでの糞尿は全て汚泥堆肥として処理されていることから、農場の汚泥堆肥量が増加し臭気の増加に繋がった。つまり新牛舎完成と苦情増加理由が一致した。これにより汚泥堆肥対策を中心に勧めることで農場主の納得が得られた。

今後、家保としては、機構と協力して環境対策の導入と効果検証を行い、その中で臭気マップを作成することで対策効果の見える化を図り、農場とともに地域住民の理解醸成を図っていく。

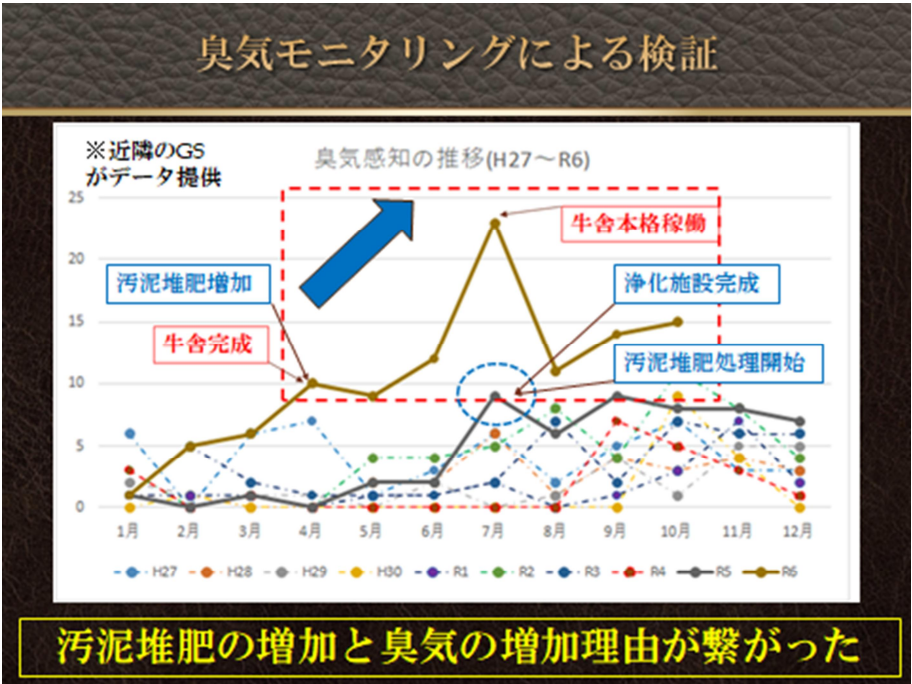


図6 臭気モニタリングによる検証

5 謝辞

A農場の環境対策に向け、ご指導いただいた畜産環境整備機構の原田副理事、道宗参与に深謝いたします。

家保で実施する細菌検査の基本手技手引の作成

中央家畜保健衛生所
森木啓

1 はじめに

家畜保健衛生所（以下、家保）では家畜伝染病対策や飼養衛生管理に係る指導・調査、豚熱ワクチン接種、豚熱経口ワクチン散布等、様々な事務および現場作業が増加している。そのため、若手職員が検査手技を習得する機会が少なく、実際の検査を通じて技術伝達している状況である。そこで、家保で実施できる細菌検査の中で、培地作製から培養、菌種絞込み等の基本的手技の注意点について、図・写真を交え要点をまとめた手引きを作成し、マニュアル化した。

2 内容

(1) 培地作製

培地の作製時は主にコンタミネーション防止に留意して作業する必要がある。以下に手順を示した。また、オートクレーブは水量不足で空炊きになり、中が焦げる事がよくあるので注意。

○培地作製

① 培地作製前に、検査台を片付けて、アルコールスプレーした後、キムタオル等で拭いておく

② 作製する培地を秤量してスターラーミキサー（磁石）と一緒に三角フラスコに入れる。

③ 規定量の蒸留水をメスシリンダーで量り、フラスコの壁についた培地の粉を流すように入れる。
→軽く攪拌して、培地を溶解。
(この時キレイに溶けていなくてもオートクレーブで溶けるので大丈夫)

*滅菌時の突沸等でオートクレーブ内を汚さないよう、培地はフラスコの8割以内になる容量で調整
*培地400ml作るなら500ml以上のフラスコで作成
*シャーレ1枚に培地20ml弱使用
↓
培地400mlで20枚+aできる計算

○培地作製

④ アルミホイルで蓋をして、各培地の作製法に従ってオートクレーブ滅菌する。
(多くは121℃15分、他に115℃15分等の培地もよくあるのでボトルの説明書をよく読むこと！)

アルミホイルを二つ折りにして、手でグッと握る程度で蓋をする。

後で間違わないよう、培地名を書きしておく。

○培地作製 (オートクレーブ使用前のチェック)

- 排気弁が開まっているか
- 排気ボトルの水位が適当か (HIGHとLOWの間に収まっているか)
- オートクレーブ内の水が足りているか (底板の上側まで水が入っているか)
- 排気ホースはドレン回収ボトルに入っているか

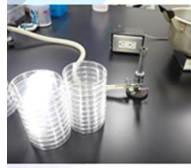
○培地作製



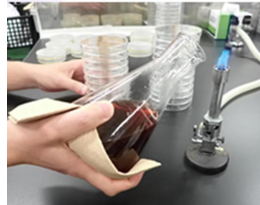
⑤オートクレープ後、50℃程度まで冷ます（フラスコの底を素手で触れる程度）。
*急ぐ場合は、鍋に水を入れて、湯煎の逆の要領で培地を攪拌しながら冷ます。冷まし過ぎに注意。



○培地作製



⑥シャーレに培地を流す。
・培地容量分以上のシャーレを準備し、ガスバーナーの近くに10枚ずつ並べておく
・三角フラスコの底を持ち（鍋で冷ました場合は壁の水溜を拭いておく）、口の部分をガスバーナーで炙り（水滴がとぶ程度、炙りすぎると割れる!）、バーナー横でシャーレに流す。



シャーレに培地を流す際は、エアコン等は消し風のない部屋、かつガスバーナーの側で上昇気流の発生している範囲で実施すること。

流し入れる培地の量は、シャーレの3/4に広がる程度。10枚入れた後、シャーレを静かに回すように動かせば培地は全体に広がる。

○培地作製

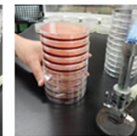


・10枚重ねたシャーレの上から5枚目のシャーレから培地を流し入れる→順に上側のシャーレに流し入れ、5枚入れたら下側の空の5枚と入れ替え、同様に上側のシャーレに流し入れていく。

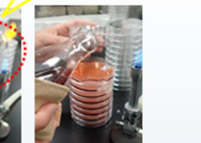
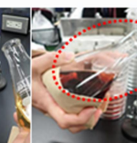


○培地作製

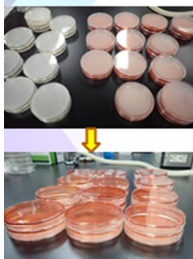
・培地の量はシャーレの3/4程度流し入れ、10枚入れ終わったら静かにシャーレを動かして全体に広げる。



コンタミ防止のため、容器の先に付いた培地の滴がフラスコ内に戻らないよう、フラスコを斜めに持ったまま保持！
シャーレを入れ替えた際（5枚ごと）に容器の口を炙る。



○培地作製



・フラスコ内の培地を全てシャーレに流したら、2枚ずつ机上に広げ、30分程度置いて固める。
・培地が固まったら、ひっくり返し（培地を上、蓋を下にして）37℃のインキュベーター内で蓋を開けて1時間程、乾燥させる。



落下細菌によるコンタミを防ぐため、インキュベーター内の作業は奥から手前へ、上の段から下の段へ。蓋を開けるときは逆の順。

○培地作製



・乾燥後、蓋をしてインキュベーターから出し、室温で30分程度置いてから冷蔵庫へ保存

*室温に戻した後に冷蔵しないと、蓋に水滴がつきやすい。
*保存時は培地を上側にすること！水滴が培地に垂れるとカビの原因となる



保存時は、培地名と作成日時を明記！



(2) 培養

検体の塗布・培養方法と、生えてきた菌の絞込み方法について以下に説明する。各コロニーの性状（大きさ、色、形、匂い、溶血性）の観察や、グラム染色後の菌形態の観察は同定の基本となるので特に重要と考える。

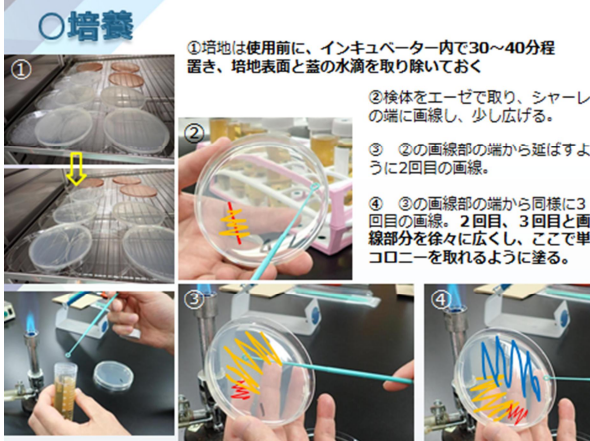
○培養

① 培地は使用前に、インキュベーター内で30~40分程置き、培地表面と蓋の水滴を取り除いておく

② 検体をエーゼで取り、シャーレの端に画線し、少し広げる。

③ ②の画線部の端から延ばすように2回目の画線。

④ ③の画線部の端から同様に3回目の画線。2回目、3回目と画線部分を徐々に広くし、ここで単コロニーを取れるように塗る。



○培養

培地を2分割して使う場合も同様に、基本3回画線。
(面積が狭い場合は2回画線でも可)

2回目の画線からは、エーゼを新しくして画線すること

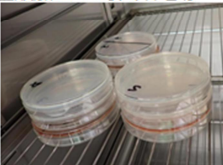
3回目の画線は、2回目のエーゼの逆側を使用



○培養

- ・ **好気培養**：普通寒天、5%羊血液寒天、DHL寒天培地等 多くの菌は1日培養で生える。真菌を疑う場合は2~3日程度培養。(その場合、インキュベーター内が胞子で汚染されないよう、タッパー等に入れて培養すると安心)
- ・ **微好気培養**：チョコレート寒天培地等 1~3日培養。ヘモフィルス、カンピロバクター等を狙う場合。現場で培養する機会は少ない。
- ・ **嫌気培養**：5%卵黄加GAM、5%羊血液加GAM寒天培地等 1~3日培養。クロストリジウム狙い。

培養中は、シャーレの蓋についた水滴が培地上に落下しないように、逆さにして培養すること。



○菌の絞込み

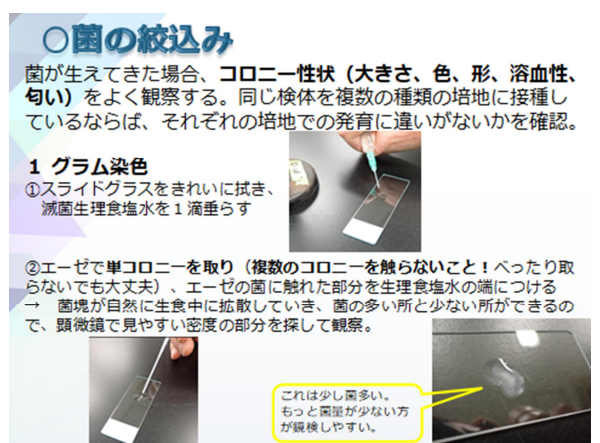
菌が生えてきた場合、コロニー性状（大きさ、色、形、溶血性、匂い）をよく観察する。同じ検体を複数の種類の培地に接種しているならば、それぞれの培地での発育に違いがないかを確認。

1. グラム染色

① スライドグラスをきれいに拭き、滅菌生理食塩水を1滴垂らす

② エーゼで単コロニーを取り（複数のコロニーを触らないこと！べったり取らないでも大丈夫）、エーゼの菌に触れた部分を生理食塩水の端につける → 菌塊が自然に生食中に拡散していき、菌の多い所と少ない所ができるので、顕微鏡で見やすい密度の部分を探して観察。

これは少し菌多い。もっと菌量が少ない方が観察しやすい。



○菌の絞込み

1. グラム染色

③ 生理食塩水が乾燥したら、ガスバーナーで数回炙り、火炎固定（い〜ちに〜い、さ〜ん程度で3回程、炎に出し入れする。塗抹面に直接、火を当てないこと！）

④ スライドグラスが冷めたら、グラム染色（フェイバーG等使用）。このとき脱色をしっかりすること。その上で、少しでも青染された菌があればグラム陽性と判断。

自然乾燥またはドライヤーで乾かして鏡検（油浸レンズ）



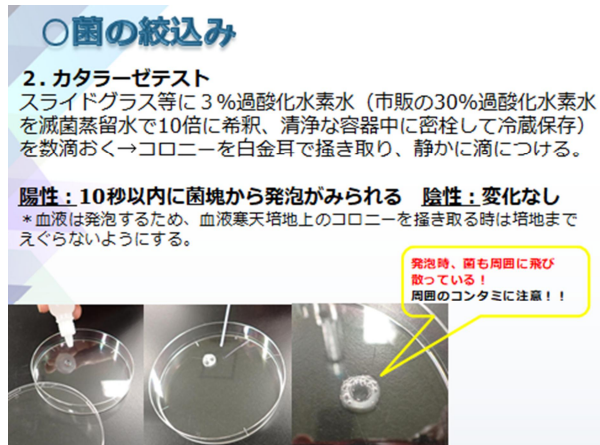
○菌の絞込み

2. カタラーゼテスト

スライドグラス等に3%過酸化水素水（市販の30%過酸化水素水を滅菌蒸留水で10倍に希釈、清浄な容器中に密栓して冷蔵保存）を数滴おく → コロニーを白金耳で掻き取り、静かに滴につける。

陽性：10秒以内に菌塊から発泡がみられる **陰性**：変化なし
* 血液は発泡するため、血液寒天培地上のコロニーを掻き取る時は培地までえぐらないようにする。

発泡時、菌も周囲に飛び散っている！
周囲のコタミに注意！！

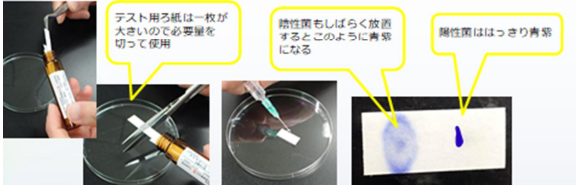


○菌の絞込み

3. オキシダーゼテスト

チトクロームオキシダーゼテスト用紙（日水、栄研）を蒸留水でろ紙全体がようやく湿潤する程度に湿らせる→白金耳でコロニーを多めにとり、ろ紙に塗抹する。

陽性：30秒以内に明瞭な青紫色がみられる 陰性：変化なし
 * 陰性コロニーであっても、塗抹後、放置しておく、青紫色に変化するので注意。たいていの陽性コロニーは塗抹してすぐに変化がみられる。



テスト用紙は一枚が大きいので必要量を切って使用

陰性菌もしばらく放置するとこのように青紫になる

陽性菌ははっきり青紫になる

○菌の絞込み

グラム染色、カタラーゼテスト、オキシダーゼテストの結果から菌種を絞り込む。

さらに他の性状試験が必要な場合は実施した後、その菌種群が同定できる同定キットを使用する。

なお、**同定キットで示された菌名を鵜呑みにしてはいけない。**発育した培地、発育時間、性状試験の結果、細菌の分離由来動物などを加味して、**総合的に判断すること。**

(3) 糞便検査

希釈法はサンプル（主に下痢便）を10倍段階希釈し、培養後のコロニー数からサンプル1g中の菌数を調べる方法である。主なターゲットは大腸菌、サルモネラ、クロストリジウムのため、羊血液寒天、DHL寒天（好気培養）、卵黄加GAM寒天培地（嫌気培養）を使用する。

○糞便検査（希釈法）

サンプル中の菌数を調べる。サンプルを10倍、100倍、と順番に希釈→希釈サンプルを寒天培地に塗抹→培養後発育してきたコロニー数を数え、サンプル中の菌数に換算。

1. 試験管を6本用意し、**希釈液（滅菌生理食塩水または滅菌PBS）**を2.7mlずつ分注しておく。
 * 希釈率が10倍であれば、希釈液量9ml、サンプル1ml送りである必要はない。試験管も、10mlセラビッツ管や15ml遠沈管が使やすい。

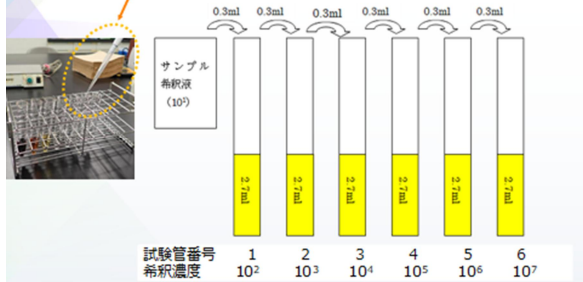
2. サンプルが固形物の場合には、サンプルを9倍量の希釈液で均一に懸濁化し（ 10^1 希釈）*1する。（液状の場合は、そのまま0.3mlを希釈液2.7mlに移す）



10mlセラビッツ管を使用した例

○糞便検査（希釈法）

3. サンプル希釈液（ 10^1 希釈）を試験管1に0.3ml移す。十分にピペットिंगし均一温度にした後、ピペットを替えて試験管2から試験管3に同様に0.3mlを移す。
 4. 3から4、4から5、5から6までこの操作を繰り返す。なお、**希釈毎に必ずピペット（チップ）を替える。**



○糞便検査（希釈法）

5. 各試験管*2の菌液 0.1 mlを培地*3にのせ、コンラージ棒で培地表面に均一にのぼす。

6. 孵卵器で37℃・24時間培養する。

7. 培地に発育してきた菌種*4毎のコロニーを数え、サンプル原液の菌数【***個/ml】に換算する*5。正確な菌数計算には、原則として、培地1枚あたり数10～数100個のコロニーが出現した希釈でのコロニー数を数える。



○糞便検査（希釈法）

*1: 希釈濃度が低い（サンプルが濃い）段階ではピペットが詰まってしまうことがあるので、その場合はピペットチップの先端を少しカットしたものを使用。

*2: 菌数が未知の場合は、奇数の希釈列（ 10^3 、 10^5 、 10^7 ）を測定。ただし、下痢症状が長く続いている場合は、菌数が少ないことがあるので、必ずしも菌数だけで病原性云々は判断できない。

*3: 羊血液寒天培地、DHL寒天培地、卵黄加GAM寒天培地の3種類使う。羊血液寒天培地、DHL寒天培地は好気培養、卵黄加GAM寒天培地は嫌気培養。

*4: 主なターゲットは、大腸菌とサルモネラ、クロストリジウムの3菌種。

*5: 例： 10^5 希釈試験管の0.1 mlを接種した培地上に発育したコロニーの数が500個だった場合の換算の仕方

(1) 10^5 希釈0.1 ml中に500個ということは、 10^6 希釈1 ml中には500個

(2) 10^5 希釈 = 10万倍希釈なので、10万倍希釈した液1 ml中に500個ということ

(3) 答え：サンプル1 g中の菌数は5000万個

1 gあたり5000万個 = 5.0×10^7 CFU/gと表現する。

(CFU: コロニー形成単位 colony forming unit)

これを計算式にすると... 10^6 = コロニーを数えた培地に使用した希釈濃度

菌数 (CFU/g) = コロニー数 $\times 10^6$

例の場合 $50 \times 10^5 \times 10 = 50 \times 10^6 = 5.0 \times 10^7$ CFU/g

○糞便検査（希釈法）

【検査後の対応】

- ・ **サルモネラを疑う菌が分離された場合**
分離株の性状試験を実施し、中央家保に菌株を送付、血清型を特定する。
- ・ **大腸菌症を疑う場合**
1 検体あたり大腸菌 3～4 株ほど釣菌し、中央家保に菌株を送付、毒素産生遺伝子の検出を依頼する。
溶血性コロニーと非溶血性コロニーが混在する場合は、両方の株を検査。

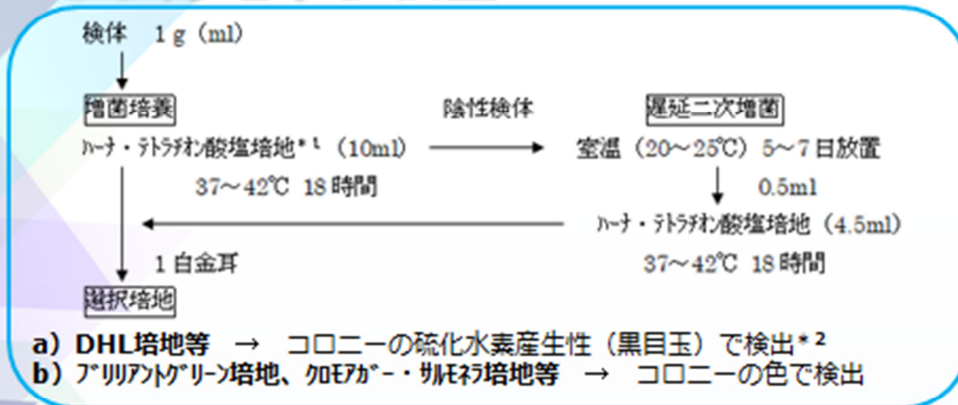
* 溶血性と病原性は、直接は関係ない。ただ、傾向としては、子牛の大腸菌症は非溶血性コロニーの大腸菌が多く、子豚の大腸菌症はβ溶血性コロニーの大腸菌が関与するが多い。

(4) サルモネラ検査

サルモネラ検査の流れを以下に示す。増菌培養後、選択培地でコロニーを検出。

畜産現場で分離されるサルモネラ菌の多くは硫化水素産生性で、DHL 寒天培地で見分けられるが、主に豚の病性鑑定で分離される *S. Choleraesuis* は硫化水素非産生性株が多く注意が必要。

○サルモネラ検査



元々、硫化水素を産生しないサルモネラ（*Choleraesuis*アメリカ型、*Pullorum*等）や産生が弱い株、産生能を失った株があるため、aタイプとbタイプの培地を併用するとよい。

* 1： *Choleraesuis*はこの培地では十分に増菌しないとされ、*Choleraesuis*を分離対象とする場合はラパポート培地が推奨されている。

* 2： サルモネラ以外の硫化水素産生菌（*Proteus*、*Citrobacter*等）も発育するので、必ずしも黒目玉＝サルモネラではない。性状試験を実施すること。

○サルモネラ検査

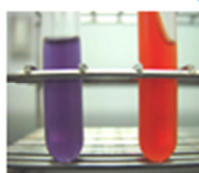
分離培養

↓ 普通寒天培地 (単コロニー分離)

性状試験

- ① TSI 培地 斜面：赤 高層：黒 (硫化水素非産生株は黄) ガス：+
- ② LIM 培地 リジン：+ インドール：- 運動性：株によって異なる

LIM培地 TSI培地



* LIM培地で判定するリジンテストはDHL培地で黒目玉を作る一部の菌種 (*Proteus*, *Citrobacter*) との判別に有効。

	リジン	インドール	運動性
サルモネラ	+	-	d
<i>Proteus</i>	-	d	d
<i>Citrobacter</i>	-	d	d

(d:株によって様々)



【インドール】培養後、I-試薬 1 ml 添加
陽性 (No.4)：赤色
陰性 (No.5)：変化無し (黄色)

【リジン】

陽性 (No.1)：高層部紫
陰性 (No.2)：高層部黄色

【運動性】

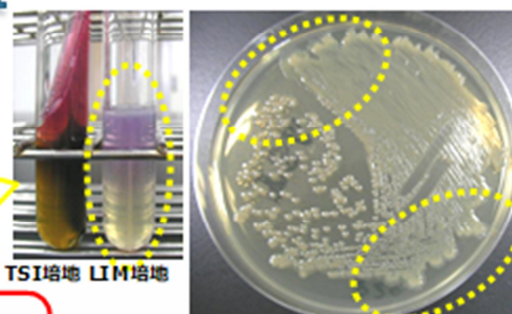
陽性 (No.1)：全体的に混濁
陰性 (No.3)：穿刺部のみ発育

○サルモネラ検査

プロテウスの性状試験結果

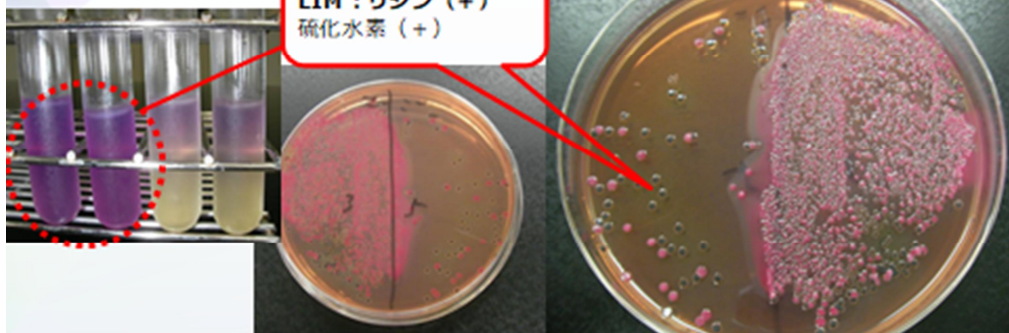
- ・ TSI：サルモネラと同
- ・ LIM：リジン (-)
- ・ コロニー周囲に遊走を認める

* サイトロバクターは乳糖・白糖分解する (サルモネラは-) ので TSI 寒天では斜面：黄変、高層：黄+黒になる。



TSI培地 LIM培地

サルモネラ
LIM：リジン (+)
硫化水素 (+)



(5) 検体採材時の注意点

○採材時の注意点

ある種の菌は、特定の部位にのみ病変を作るため、そのような疾病を疑う場合は、通常の採材部以外に、その部位の採材が必要（以下はその一例）。

- 化膿性肺炎：病変部と健康部の境目を採材。（膿瘍だらけの部位からは二次感染菌しか分離できない場合が多い）
- 流産：胃内容、胎盤や尿羊膜水を採材。腐敗や汚染がひどい場合は生材料は必要なし。
- 豚赤痢
症状：肥育豚の下痢（セメント状便、血便）、時に死亡
病変：大腸の水腫、肥厚 採材部位：大腸
- 増殖性腸炎
症状：肥育豚の下痢（タール様便）、時に死亡
病変：回腸の肥厚 採材部位：回腸
- リステリア症（脳炎型）
症状：旋回運動、流涎、起立不能、痙攣麻痺など
採材部位：脳幹部（BSE検査で採材している部位）

3 まとめ

今回は病性鑑定室へ持ち込む前の、家保で実施できる細菌検査の基礎的手技を説明したものを作成した。さらに詳細な手技および各種疾病にかかる様々な検査については2012年に中央家保病性鑑定室が作成した「病性鑑定基本手技」を参照されたい。

今後、乳房炎検査や腐蛆病検査等についての検査情報、写真も追加したい。

関節切開術を実施した多発性関節炎の一症例

中央家畜保健衛生所嶺北支所
高野雅

1 はじめに

管内一貫農場で外傷性細菌感染を疑い治療をしていた和牛子牛を精密検査により鑑別診断をした結果、臍帯炎に続発する多発性関節炎を発症した症例と診断した。関節切開術により骨融解を確認した右前肢手根骨遠位列を摘出し、術後の経過が良好であったので、その概要について報告する。

2 材料と方法

(1) 症例

褐毛和種の雌子牛、令和6年3月2日出生の初診時27日齢であった。

(2) 検査及び診断

①X線検査：ケンコートキナーPX-20BT、コニカミノルタaeroDRを使用し、右前肢手根骨及び左後肢球節のAP(前後)像、ラテラル像を撮影した。②超音波検査：動物用超音波画像診断装置HS-102Vを使用し、臍帯部芯構造の走行を描出した。③細菌検査：有意菌検査は血液寒天培地、チョコレート寒天培地を用いて培養した菌種を、アピコリネにて同定した。④薬剤感受性試験：同定した細菌は、簡易ディスク拡散法によりβラクタム、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ニューキノロン(第Ⅲ世代)について、薬剤感受性判定法表に基づき判定した。

3 結果

管内の一貫農家から、褐毛和種雌子牛(27日齢)が前日に肢にロープが絡まり起立困難になったとの稟告を受け、往診依頼があった。初診時は起立不能を呈し、横臥姿勢であった。発熱と右前肢の管骨・手根骨に疼痛を確認したが、肺雑音や臍帯部の熱感・疼痛は認められなかった。初期の外傷性細菌感染を疑い抗生剤の投与を行ったところ、改善がみられた。

第8病日に右前肢の腫脹が再発し、ステロイド処置と抗生剤の変更を行った(表1)。その後、抗生剤投与を継続するも、右前肢と後肢関節が腫脹、右前肢の負重消失、炎症が波及したため、第13病日に精密検査

表1 治療経過(1~8病)

病日	1	2	3	...	8
日付	3/28	3/29	3/30		4/4 AM 4/4 PM
日齢	27	28	29		34
体温	40.4	39.4			39.7
処置	デキサ OTC ネブス	OTC	OTC		CEZ Echo デキサ PCG
状態	起立不能	活力+	薬治		肢の腫脹 AMより 回復

※OTC:オキシテトラサイクリン、CEZ:セファゾリン、PCG:ペニシリン

表2 治療経過(9~17病)

病日	9	10	12	13	14	~17
日付	4/5	4/6	4/8	4/9	4/10	~4/13
日齢	35	36	38	39	40	~43
体温	38.7		39.7		38.8	
処置	デキサ CEZ	PCG	PCG	X-ray CEZ マルボ メタカム	Echo CEZ マルボ	CEZ マルボ
状態	活力+ 腫脹↓	薬治	右前肢 負重 なし	多発性 関節炎 関節液 採取	臍静脈 腫脹 を確認	薬治

※CEZ:セファゾリン、PCG:ペニシリン

を実施した(表 2)。2%キシラジン(0.1mg/kg)鎮静下(以下、キシラジン鎮静下)にて、患肢が下になるように横臥位に保定し、X線撮影を実施した結果、右手根骨の外側遠位部骨融解(図 1)と左後肢球節の炎症(図 2)が確認された。

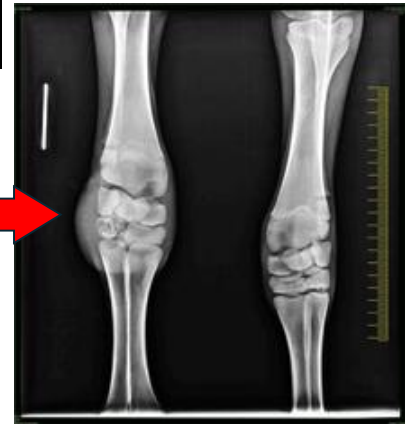
続いて、同じくキシラジン鎮静下において臍帯部の超音波検査を実施した。臍帯部から頭側に走行する臍静脈を確認し、内腔には高輝度の膿瘍と思われる構造を確認した。臍動脈、尿管らしき構造は確認されなかった。

また、左後肢球関節腫脹部より膿瘍を採取し、細菌検査を実施したところ、*Trueperella pyogenes* が検出された。

以上の所見から臍帯炎に起因した多発性関節炎と診断した。さらに、薬剤感受性試験を実施し、βラクタム系、テトラサイクリン系、ニューキノロン系に感受性を示した。

薬剤感受性試験に基づく抗生剤投与を行うも改善がみられず、畜主の強い要望により、第 84 病日に関節切開術を実施した。関節切開術は石山生産獣医科・石山先生の術式を参考に実施した。術前及び術中の麻酔管理は表 3 のとおり実施した。キシラジン鎮静下で横臥位に保定し、患部を洗浄及び消毒した後に、右手根関節を縦 10cm に切開した(図 3)。X線画像を参照して結合組織、炎症が疑われる右手根骨遠位列を切除した(図 4)。

第13病日 X線
【前肢】



右手根骨の外側遠位部の骨融解

図 1 術前の X線所見(前肢)

第13病日 X線
【後肢】



左後肢球節の炎症像

図 2 術前の X線所見(後肢)

表 3 術前術中の麻酔管理

時刻	キシラジン	塩酸プロカイン
13:30 術前麻酔	1.5ml	10ml(腕神経叢) 20ml(手根関節)
14:40	0.5ml	5ml(手根関節)
14:50		10ml(手根関節 頭・外側)
14:55		10ml(手根関節 背・内側)
15:10	0.5ml	10ml(腕神経叢)
15:40	0.5ml	10ml(手根関節 頭・外側)
15:55		10ml(手根関節 背・内側)
16:05	0.5ml	

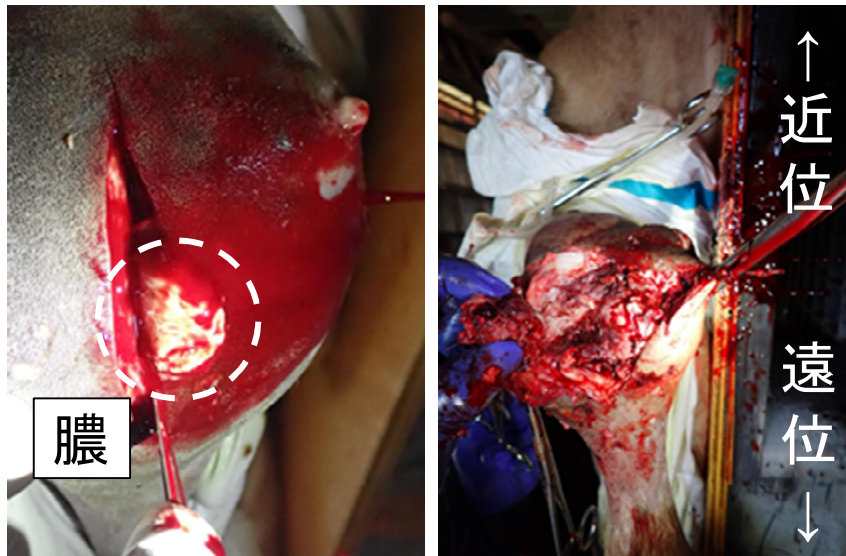


図 3 関節切開術

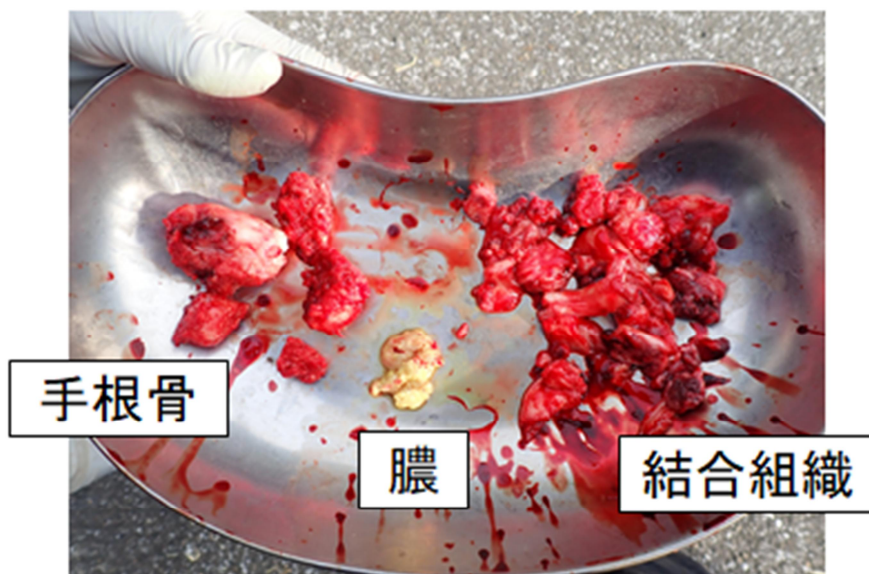


図 4 摘出された膿瘍及び手根骨

術後は、ギプス固定と抗生剤投与、関節内洗浄を数回実施した。術後 57 日目に術後観察のため X 線撮影をした。右手根関節において、融解がみられた遠位手根骨の消失、骨膜反応を確認した(図 5)。第 141 病日に患肢の負重、介助なしでの起立や歩行を認め、治癒したものと判定した。

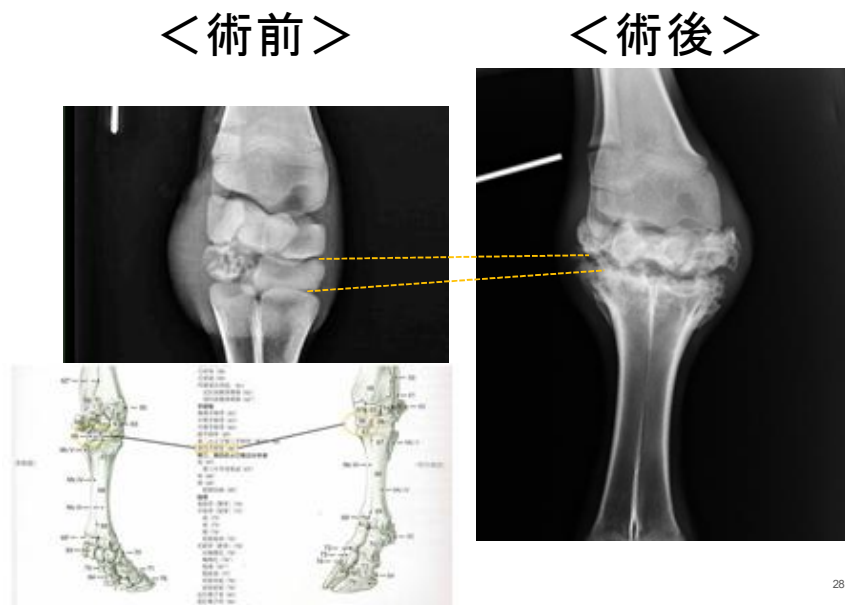


図 5 術後の X 線所見

4 考察

臍帯炎について、出生後間もない子牛は睡眠時間が長く、不衛生な敷料の環境に置かれると臍からの細菌の侵入を容易にするため、感染が誘発されやすい。加えて、症状が出る頃には発症から時間が経過していることが多く、関節炎に派生するほどの臍帯炎は臍帯部の異状が目立たないという報告もある。今回の症例は稟告が「前日にロープに絡まって動けない」であり、臍帯部に大きな異状がみられず、当牧場で過去 1 年間臍帯炎が発生がなかったことより、初診時の鑑別診断から臍帯炎を除外していたことで原因の究明が遅れ、内科療法が長引いてしまった。結合織の増生がみられる程の重度関節炎は関節内洗浄、関節切開術といった外科的処置の早期の実施が望まれる。今後は症状の有無に関係なく、こういった人為的ミスを防ぐため、子牛の診療ルーティンに臍帯部の触診を追加することを推奨する。

臍帯炎の予防として出生直後の臍帯部の消毒、子牛に衛生的な飼育場所の提供といった飼養衛生管理指導を徹底する。また、本症例のように予後判定の難しい症例に当たった時には、畜主からインフォームドコンセントを得て、さらなる治療に踏み込むことが決まった場合、諦めずに治療することの重要性を学ぶ機会となった。本症例においては、出荷時の枝肉成績を確認し、関節切開術の有用性を検証する必要がある。

5 謝辞

今回、本症例の治療にあたりご協力いただいた、岡山理科大学/井上 陽一 先生、篠塚 康典 先生、株式会社石山生産獣医科/石山 大 先生、麻布大学/風間 啓 先生の諸先生方に深謝いたします。

著しい発育不良を呈した子牛の一症例

中央家畜保健衛生所田野支所
西明仁

1 はじめに

発育不良牛とは一般的に標準的な体格を大きく下回る牛、外見的に小さい牛を指す。その原因は遺伝性疾患、ウイルス性疾患、内分泌疾患、慢性消耗性疾患、飢餓・栄養失調などが挙げられる。今回、臨床症状を示さない発育不良牛に遭遇したので、その概要を報告する。

2 材料と方法

症例牛は褐毛和種の雌、5ヶ月齢。同月齢牛と比べて発育が遅れていることを主訴に農家より相談（相談時3.5ヶ月齢）。既往歴は5日齢で臍帯炎と肺炎の治療、2ヶ月齢でコクシジウム症の治療を行っている。現症はない。外見的に小さい以外の臨床症状を示さないことから、内分泌疾患および飢餓・栄養失調を原因と疑い、早急に対策可能な飢餓・栄養失調に対する改善策を実施した。その後の経過は4ヶ月頃から第一胃にガスが貯留するようになり、暗褐色便を排泄、加療するもガス貯留頻度が増し、採食量が低下、消瘦が顕著となったため、約5ヶ月齢で予後不良と判定し、鑑定殺を実施した。

病性鑑定は、剖検後、細菌検査および病理組織学的検査を実施した。

3 結果

剖検の結果、腹水がわずかに貯留し、肺では左右でモザイク状に肝変化が見られた。第一胃～第四胃には食渣が充満。第一胃内容は水分が少なく固まり（図1）、第四胃の幽門部に径1.5cmの腫瘤を確認（図2）。十二指腸は腫瘤直下から数cmが顕著に充血（図3）。腸管は粘膜面に著変なく、固形物がわずかだった。

細菌学的検査では、脾臓・肝臓・腎臓・肺・心臓・脳・腹水を材料にDHL培地および血液寒天培地で37℃好気培養、チョコレート寒天培地で37℃微好気培養の結果、有意菌の分離なし。



図 1



図 2

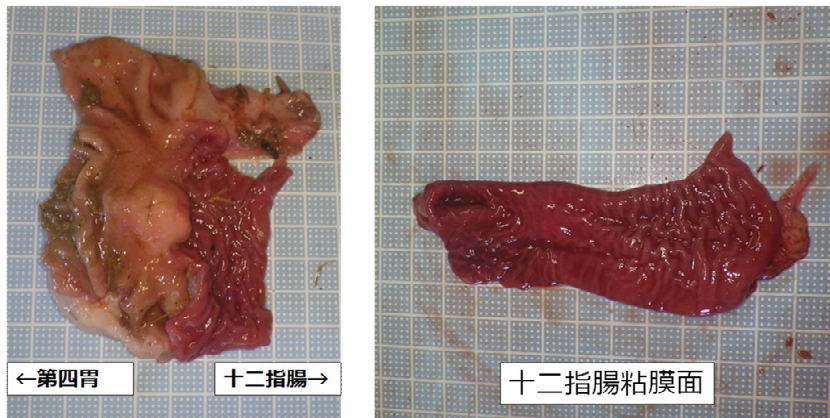


図 3

病理組織学的検査では、肺は重度にうっ血し、肺胞腔に好中球およびマクロファージの浸潤が見られた（図 4）。第四胃は粘膜上皮がびまん性に壊死し、粘膜固有層への炎症細胞浸潤が見られた。第四胃腫瘤部では、粘膜固有層に平滑筋および脂肪細胞が浸潤し、平滑筋の周囲には結合組織が増殖していた（図 5）。腫瘤の十二指腸起始部では微小な異物が陥入しており、好中球の浸潤、線維芽細胞の増殖および血管新生が確認された（図 6）。十二指腸の粘膜上皮はびまん性に壊死し、炎症細胞浸潤が見られた（図 7）。

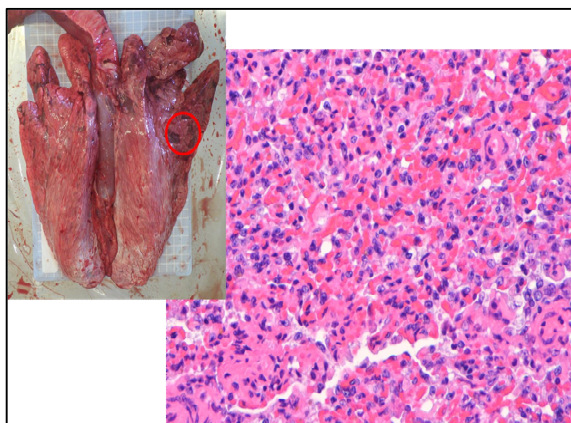


図 4

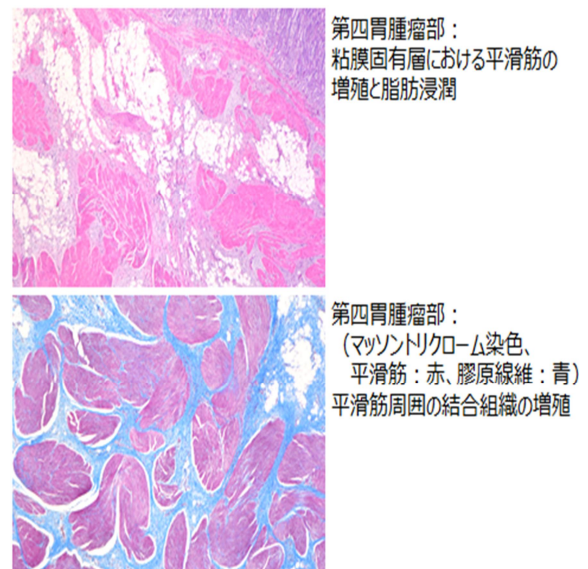


図 5

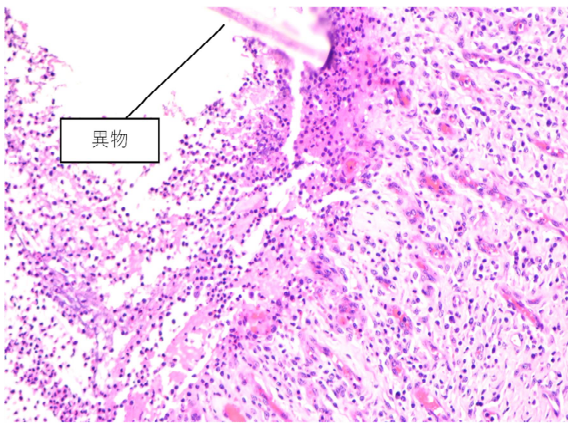


図 6

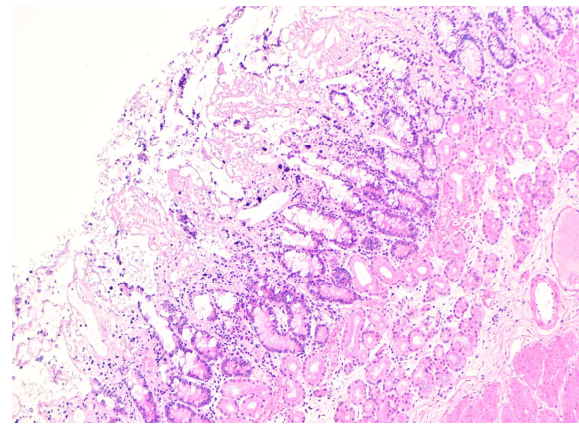


図 7

4 考察

本症例は幽門部に腫瘤が形成していたこと、第一胃～第四胃に食渣が充満していたことおよび下部消化管に固形物がほとんど含まれていなかったことから、幽門部の移送障害が原因で二次的に発症したと診断し、これが発育不良の原因と考えられた。また4ヵ月齢以降、徐々に徐脈を呈するようになったこと、特徴的な第一胃の鼓腸を示したことから三次的に迷走神経障害が関与していることが疑われた。

幽門部の腫瘤は腫瘍性の増殖ではなく、炎症や機械的刺激に対する反応性の増殖であり、何らかの外的要因が関与していることが疑われた。腫瘤起始部に植物片と思われる異物を確認したが、非常に微小で、持続的に刺激を与えようとは考えにくい。また、抗生物質は投与しており、感染性である可能性は低い。第四胃の異物としては金属や小石が挙げられるが特定することはできなかった。

第四胃食滞は特徴的な臨床症状に乏しく、確実な生前診断が難しい。また、今回のように腫瘤による移送障害から二次的に発症することもあり、診断をより困難にしている。経過が長い場合や原発疾患が予後不良の場合は治療は推奨されない。第四胃食滞に対する治療の反応を確認し、原発疾患の可能性、治癒が見込めるどうかよく検討すること重要。

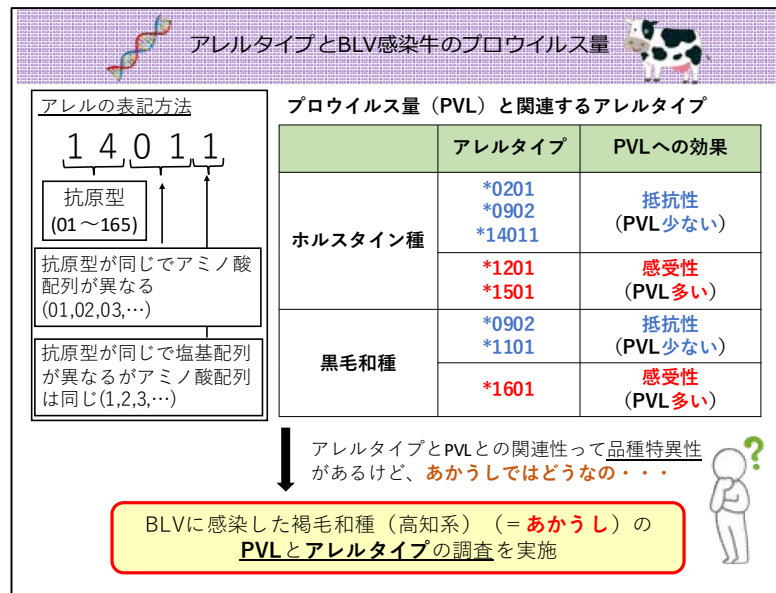
褐毛和種（高知系）の BoLA-DRB3 遺伝子と BLV 感染牛のプロウイルス量との関連性の解析

中央家畜保健衛生所
森光智子、西明仁

1 はじめに

牛伝染性リンパ腫（以下、EBL）は牛伝染性リンパ腫ウイルス（以下、BLV）に起因する牛の悪性リンパ腫である。これまでに、牛の主要組織適合遺伝子複合体（以下、BoLA）の DRB3 領域におけるアレルタイプが感染症への抵抗性や感受性に関連していることが報告されている。特に、このアレルタイプと BLV のプロウイルス

図1 PVL と関連するアレルタイプ



量（以下、PVL）との関連性については研究が進んでおり、ホルスタイン種と黒毛和種では PVL に関連するアレルが特定されている（図1）。ホルスタイン種と黒毛和種では*0902 の様に共通するアレルが存在するが、アレルタイプと PVL への抵抗性または感受性には種特異性があることが知られている。そこで今回、BLV に感染した褐毛和種（高知系）（以下、あかうし）のアレルタイプと PVL の関連性について調査を実施したのでその結果を報告する。

（1）BLV 未感染あかうしの BoLA-DRB3 アレル調査結果（表1）

令和2年度に BLV 未感染あかうし 32 頭のアレルタイプを調査したところ、未登録も含め 10 種類のアレルが確認された。ホルスタイン種、黒毛和種およびあかうしのアレル頻度を比較すると、あかうしで最もアレル頻度が高かった *3101 は他の 2 品種では確認されていないタイプのアレルであった。また、あかうしにおいて、ホルスタイン種と黒毛和種のそれぞれで確認されている抵抗性アレルを保有する牛はいるものの、感受性アレルを保有する牛はいなかった。

あかうしでは BLV が関与した EBL の発症が現在まで確認されておらず、BLV に対して抵抗性があるのではないかと考えられている。そのため、アレル頻度が最も高い、つまり保有する牛が多い *3101 があかうしでの抵抗性アレルの可能性があると考察された。

アレルタイプ	ホルスタイン	黒毛和種	褐毛和種(高知系)	アレルタイプ	ホルスタイン	黒毛和種	褐毛和種(高知系)
*0101	11.4	3.5	-	*1302	-	5.0	-
*0201	5.5	4.5	14.1	*14011	5.0	2.0	20.3
*0501	-	0.5	4.7	*1501	13.4	7.7	-
*0502	-	3.0	1.6	*1601	3.5	12.9	-
*0503	-	2.5	9.4	*1701	1.0	-	-
*0504	-	0.5	6.3	*20012	1.0	1.2	-
*0601	4.5	-	3.1	*2201	0.5	-	-
*0701	1.0	4.7	-	*2703	8.4	1.7	-
*0801	-	1.0	-	*3101	-	-	26.6
*0901	1.0	1.7	-	*3201	0.5	-	-
*0902	5.9	7.2	12.5	*3401	-	0.2	-
*1001	5.9	17.4	-	*4002	-	0.8	-
*1101	16.8	11.0	-	*4401	-	1.2	-
*1201	14.4	8.5	-	未登録	-	-	1.6

Takeshima et al 2003 よりデータ引用、一部改変

抵抗性アレル

感受性アレル

表 1 BLV 未感染褐毛和種（高知系）と他品種の BoLA-DRB3 のアレル頻度（%）

2 材料と方法

(1) BLV 感染あかうしの PVL 測定および他品種との比較

BLV への感染が確認されたあかうし 45 頭の全血から核酸を抽出し、CoCoMo-BLV Primer/Probe (株式会社ニッポンジーン) を用いてリアルタイム PCR にて PVL を測定、その結果を熊本県内のホルスタイン種、黒毛和種、褐毛和種（熊本系）の PVL と比較した。

(2) BLV 感染あかうしの PVL とその BoLA-DRB3 アレルとの関連性解析

(1) の 45 頭のうち、30 頭の核酸を用いて BoLA-DRB3 領域を PCR にて増幅、シーケンス解析により塩基配列を決定、登録されていた 384 種類のアレルと照らし合わせ、タイプを決定。決定したアレルタイプと PVL との関連性について統計学的に解析した。

3 結果

(1) BLV 感染あかうしの PVL 測定および他品種との比較

あかうしについては EBL の発症が確認されていないこともあり、BLV への感染状況の調査が積極的に行われず、抗体の陽性率についても不明であった。今回、BLV への感染が確認された 45 頭のうち、33 頭については 800 頭のあかうしの血清から抗体陽性の個体を確認している。この結果から、抗体陽性率は 4.1% であった。2009～2011 年にかけて農研機構動物衛生研究部門が実施した乳牛と肉用

繁殖用牛の全国調査の結果と比較しても、あかうしの抗体陽性率は極めて低いことが確認された（表2）。

※2009～2011年 動物衛生研究部門による全国調査結果

	乳牛（※）	肉用繁殖用牛（※）	褐毛和種（高知系）
BLV抗体陽性率	40.9%	28.7%	4.1%

表2 各品種のBLV抗体陽性率

次に、あかうしのPVLと熊本県内の黒毛和種、ホルスタイン種、褐毛和種（熊本系）のPVLを比較した（表3）。褐毛和種（熊本系）のPVLは他の2品種と比べると低かったが、本県のあかうしはさらに低く、中央値が4で最大値も最も低い値を示した。また、10,000copies/10⁵cells未満の割合はホルスタイン種43.7%、黒毛和種51.3%、褐毛和種（熊本系）83.5%、あかうし91.1%で本県のあかうしが最も占める割合が高かった。

品種	頭数	中央値 (copies/ 10 ⁵ cells)	範囲 (最小- 最大)	PVL別割合 (%)					
				<10,000	10,000- 20,000	20,000- 30,000	30,000- 40,000	40,000- 50,000	>50,000
褐毛和種 (高知系)	45	4	0- 25,651	91.1 (n=41)	6.7 (n=3)	2.2 (n=1)	0.0 (n=0)	0.0 (n=0)	0.0 (n=0)
褐毛和種 (熊本系)	97	746	0- 34,510	83.5 (n=81)	7.2 (n=7)	7.2 (n=7)	2.1 (n=2)	0.0 (n=0)	0.0 (n=0)
黒毛和種	672	9,415	0- 151,868	51.3 (n=345)	16.5 (n=111)	13.2 (n=89)	7.9 (n=53)	4.2 (n=28)	6.8 (n=46)
ホルス タイン種	378	14,176	0- 176,844	43.7 (n=165)	13.2 (n=50)	8.7 (n=33)	10.3 (n=39)	8.2 (n=31)	15.9 (n=60)

参考文献：Low proviral load in the Kumamoto strain of Japanese Brown cattle infected with the bovine leukemia virus

表3 BLV感染褐毛和種（高知系）と他品種のPVLの比較

(2) BLV 感染あかうしの PVL とその BoLA-DRB3 アレルとの関連性解析

決定した 30 頭の BoLA-DRB3 のアレルと PVL について表にまとめ、参考に他品種において抵抗性が確認されているアレルを色づけした (表 4)。この結果から 3 頭以上が保有するアレルを 6 種類、3 頭以上が保有するアレルの組み合わせ (遺伝子型) を 3 種類を抽出し、多群比較を実施した (図 2)。中央値では、アレルおよび遺伝子型のどちらにも差があるように見えたが、ノンパラメトリック検定では有意差が認められなかった ($P > 0.05$)。また、中央値が最大であった *14011 とその他のアレル、および中央値が最小かつ最大値も最小の *0902 とその他のアレルについて、それぞれ 2 群比較を実施 (図 3)。こちらについても有意差が認められず ($P > 0.05$)、今回実施した統計学的解析では BoLA-DRB3 アレルタイプと PVL との間に関連性がない、という結果となった。

PVL				PVL			
copies/10 ⁵ cells		BoLA DRB3アレル (遺伝子型)		copies/10 ⁵ cells		BoLA DRB3アレル (遺伝子型)	
1	0.37	0503	3101	16	0.00	0503	3101
2	66.69	0503	0508	17	0.00	3101	14011
3	0.00	0503	0902	18	13,592.69	0503	14011
4	4.08	0601	0902	19	0.00	0601	4301
5	0.00	3101	3101	20	0.00	0503	3101
6	1.20	0201	14011	21	3,910.63	0503	0503
7	0.00	0902	3101	22	94.61	0503	14011
8	0.00	0503	3101	23	3,170.30	14011	14011
9	0.00	0201	3101	24	9.79	0201	0601
10	0.75	0503	3101	25	9,495.94	0503	3101
11	3.67	14011	14011	26	0.00	0503	0902
12	1,543.67	0503	14011	27	6.55	0503	3101
13	10.08	0601	0508	28	524.91	0503	14011
14	112.93	0601	14011	29	4,520.50	0201	14011
15	0.00	14011	14011	30	0.00	0503	3101

■ : 他品種で確認されている抵抗性アレル

表 4 BLV 感染褐毛和種 (高知系) の PVL と BoLA-DRB3 アレルタイプ

図2 PVL と BoLA-DRB3 アレルの関連性解析（多群比較）

3頭以上が保有するアレル					多群比較	
アレル	のべ頭数	PVL (copies/10 ⁵ cells)				
		最小値	最大値	中央値		
1	0201	4	0.00	4,520.50	5.49	
2	0503	17	0.00	13,592.69	6.55	
3	0601	5	0.00	112.93	9.79	
4	0902	4	0.00	4.08	0.00	
5	14011	14	0.00	13,592.69	103.77	
6	3101	13	0.00	9,495.94	0.00	
ノンパラメトリック検定			P=0.083			
3頭以上が保有する遺伝子型						
遺伝子型 (アレルの組み合わせ)	頭数	PVL (copies/10 ⁵ cells)				
		最小値	最大値	中央値		
1	0503 3101	8	0.00	9,495.94	0.18	
2	14011 14011	3	0.00	3,170.30	3.67	
3	0503 14011	4	94.61	13,592.69	1034.29	
ノンパラメトリック検定			P=0.055			

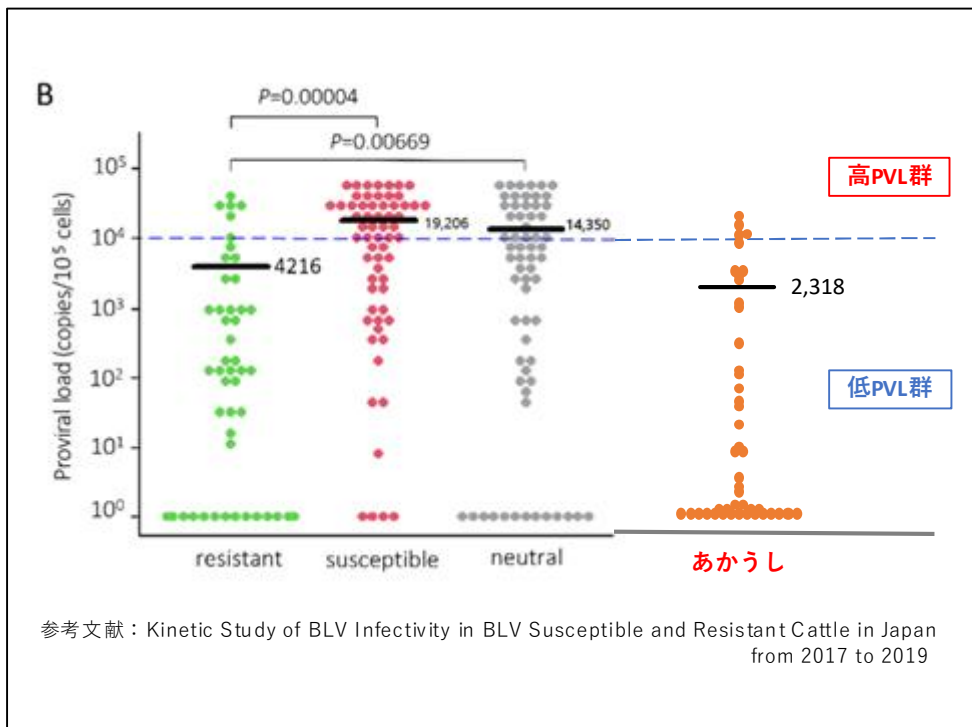
図3 PVL と BoLA-DRB3 アレルの関連性解析（2群比較）

①14011（中央値最大）とその他の比較					2群比較	
アレル	のべ頭数	PVL (copies/10 ⁵ cells)				
		最小値	最大値	中央値		
14011	14	0.00	13,592.69	103.77		
その他	43	0.00	13,592.69	0.37		
ノンパラメトリック検定			P=0.056			
②0902（中央値最小かつ最大値最小）とその他の比較						
アレル	のべ頭数	PVL (copies/10 ⁵ cells)				
		最小値	最大値	中央値		
0902	4	0.00	4.08	0.00		
その他	53	0.00	13,592.69	3.67		
ノンパラメトリック検定			P=0.125			

今回測定したあかうしの PVL について、論文のデータ等を引用して検証を実施した。10,000copies/10⁵cells を境に低 PVL 群と高 PVL 群に分類する方法が論文などでよく用いられている。これは 10,000copies/10⁵cells 以上で乳汁中、14,000copies/10⁵cells 以上で鼻粘膜、18,000copies/10⁵cells 以上では唾液中に BLV が検出されるようになり、PVL が 10,000copies/10⁵cells 以上になるとウイルスが全身に蔓延していると考えられ、他の牛に伝播しやすい状況にあると判断されるためである。熊本県内の牛と比較した表（表 3）を見てみると、あかうしの 91% が低 PVL 群に分類され、ほとんどのあかうしが他の牛へ伝播させにくいことが分かった。

また、茨城県のある農場の乳牛のデータと比較した結果を示す（図 4）。緑が抵抗性アレル、赤が感受性アレル、灰色がどちらにも該当しないアレルを保有する牛の PVL をそれぞれプロットしたグラフにあかうしの結果を追加した。この農場の調査では抵抗性アレルを保有する群の平均値のみが低 PVL 群に属していたが、あかうしの結果はこの抵抗性アレルを保有する群の平均値をさらに下回り、最も低い値を示した。

図 4 A 農場（茨城県）の乳牛の PVL と BoLA-DRB3 アレル



4 考察

今回の調査で、あかうしの BLV 抗体陽性率はわずか 4.1% と低く、また BLV に感染したあかうしの PVL も非常に低いことが確認された。また、BLV 感染あかうしの約 90% は低 PVL 群に分類され、その PVL は抵抗性アレルを保有した他品種の牛と同程度であった。しかし、今回の統計学的解析では、あかうしでの抵抗性や感受性アレルの特定はできなかった。PVL 制御機構はこの BoLA-DRB3 のアレル

タイプ以外にも p 53 遺伝子、精子形成関連遺伝子 16 等いくつか知られている。あかうしが PVL を低く維持できる要因を解明するには、これらについても調査をしていく必要があると考えられた。

5 謝辞

BoLA-DRB3 のアレル解析並びにご助言をいただいた東京農業大学農学部動物科学学科動物衛生学研究室、小林朋子先生に深謝する。

迅速性及び簡便性の向上を目的とした核酸抽出方法の比較検証

中央家畜保健衛生所
高橋学

1 はじめに

迅速かつ的確な検査が求められる病性鑑定において、PCR 検査は感染症診断の主流となっている。PCR 検査では、前処理をした検体から核酸を抽出し、増幅反応を実施後に特異バンドや増幅曲線等の確認・解析を行い結果を判定する。検体からの核酸抽出は結果に直結する重要な工程であり、様々な方法が知られているが、病性鑑定においては磁性ビーズ法とスピнкаラム法の2種類が広く用いられている。

各核酸抽出方法の特徴として、磁性ビーズ法はビーズを操作するための専用器具を必要とするが、自動化が容易であり、迅速かつ簡便な核酸抽出が可能である。一方、スピнкаラム法は手技の習熟や専用装置は不要だが、プロセスが多段階に渡るため多検体処理には不向きである。

現在、当所では、通常の病性鑑定時には自動核酸抽出装置を用いた磁性ビーズ法（以下、自動法）、鳥インフルエンザウイルス（以下、AIV）や豚熱ウイルス（以下、CSFV）などの緊急病性鑑定時にはスピнкаラム法（以下、用手法）を使用している。緊急病性鑑定時に用手法を使用している理由は、国の AIV マニュアルに「RNA 抽出は、用手法等、これらと同等の性能を有する試薬を使用」と記載されていること、また、自動法で抽出した核酸において、AIV のコンベンショナル RT-PCR（以下、cRT-PCR）での非特異増幅や使用する PCR 試薬によっては検査精度が低下することが指摘されているためである。しかし、当所では、緊急病性鑑定時における自動法と用手法の性能比較や PCR 試薬との相性については未検証であった。

今回、用手法と同等の検査精度を担保しつつ、迅速性と簡便性の向上を目的として、緊急病性鑑定時における自動法の導入を検討し、既知試料における感度及び特異度、野外材料における特異度及び核酸抽出に要する作業時間及び操作数を自動法と用手法で比較検証したので、その結果を報告する。

2 材料と方法

(1) 既知試料を用いた感度及び特異度の比較（検証 1）

令和 5 年度外部精度管理用配付試料（AIV4 検体：H3 亜型・H5 亜型・H5 亜型・陰性、CSFV3 検体：陽性・陰性・陽性）を検体とし、自動法は MagDEA Dx SV（プレシジョンシステムサイエンス）、用手法及び PCR 試薬は特定家畜伝染病防疫指針に記載のものを使用した（表 1）。なお、自動法は通常病性鑑定時に使用しているキャリア高分子ありのプロトコル（以下、自動法 C）及び検体が倍量必要となるが検査精度低下の改善が報告されているキャリア高分子なしのプロトコル（以下、自動法 NC）の2種類について検証を実施した。また、令和 6 年 10 月にタカラバイオ社から発売された AIV の病性鑑定時に使用可能な新しいリアルタイム RT-PCR（以下、qRT-PCR）試薬については、開発にあたり自動法での検証は行われていないため、同時に検証を実施した。

表 1. 使用試薬

	AIV	CSFV
自動法	MagDEA Dx SV (プレジジョンシステムサイエンス)	MagDEA Dx SV (プレジジョンシステムサイエンス)
用手法	High Pure Viral RNA kit (Roche)	High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche)
cRT-PCR	PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit (タカラバイオ)	SuperScript III One-step RT-PCR kit (Invitrogen)
qRT-PCR	AgPath-ID One-Step RT-PCR Reagents (Thermo Fisher) AIV RT-qPCR Mix & Primer/Probe (タカラバイオ)	CSFV/ASFV Direct RT-qPCR Mix & Primer/Probe (with ROX Reference Dye) Ver.2 (タカラバイオ)

(2) 野外材料を用いた特異度の比較 (検証 2)

AIV 陰性を確認している鶏の気管スワブと CSFV 陰性を確認している豚の臓器 (扁桃・脾臓・腎臓) 及び血清を検体とし、試薬は上記 1 と同様のものを使用した。

(3) 核酸抽出に要する作業時間及び操作数の比較 (検証 3)

緊急病性鑑定を想定し、12 検体からの核酸抽出に要する作業時間及び操作数を比較した。なお、緊急病性鑑定時の検体数は、AIV は鶏の場合が 10 検体、鶏以外の家きんの場合が 20 検体、CSFV は死亡豚 1 頭あたり 4 検体となる。

3 結果

(1) 既知試料を用いた感度・特異度の比較（検証1）

AIV の cRT-PCR では、4 つの標的遺伝子全てにおいて結果は用手法と一致し、感度及び特異度はそれぞれ 100%であった（表 2）。なお、H7eu を標的としたものでは、わずかに非特異バンドが確認されたものの判定は可能であった（図 1）。

表 2. 検証 1 における AIV の cRT-PCR 結果

検体	抽出方法	標的			
		NP(A型)	H5	H7am	H7eu
H3	自動法 C	+	-	-	-
	自動法 NC	+	-	-	-
	用手法	+	-	-	-
H5	自動法 C	+	+	-	-
	自動法 NC	+	+	-	-
	用手法	+	+	-	-
H5	自動法 C	+	+	-	-
	自動法 NC	+	+	-	-
	用手法	+	+	-	-
陰性	自動法 C	-	-	-	-
	自動法 NC	-	-	-	-
	用手法	-	-	-	-

+ : 陽性 - : 陰性

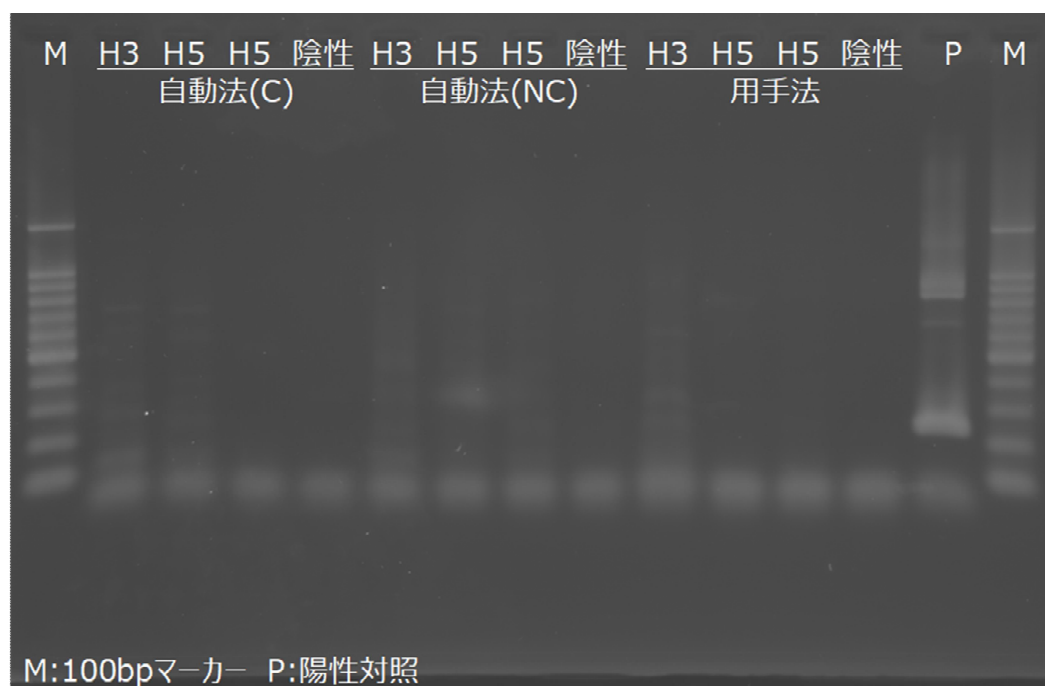


図 1. 検証 1 における AIV の H7eu 遺伝子を標的とした cRT-PCR 電気泳動像

AIV の qRT-PCR では、従来から使用されている ThermoFisher 社の試薬と新たに発売されたタカラバイオ社の試薬ともに、4つの標的遺伝子全てにおいて結果は用手法と一致し、感度及び特異度はそれぞれ 100%であった(表3)。また、非特異増幅は確認されず、ICが増幅していることから PCR は阻害されていないことが確認された(図2、3)。

表3. 検証1における AIV の qRT-PCR 結果

試薬	検体	抽出方法	標的				
			M(A型)	H5	H7am	H7eu	IC
Thermo Fisher	H3	自動法 C	+(23.43)	-	-	-	/
		自動法 NC	+(22.08)	-	-	-	/
		用手法	+(25.42)	-	-	-	/
	H5	自動法 C	+(30.04)	+(29.76)	-	-	/
		自動法 NC	+(28.83)	+(28.46)	-	-	/
		用手法	+(31.46)	+(30.70)	-	-	/
	H5	自動法 C	+(22.91)	+(22.91)	-	-	/
		自動法 NC	+(21.96)	+(21.89)	-	-	/
		用手法	+(24.43)	+(23.65)	-	-	/
	陰性	自動法 C	-	-	-	-	/
		自動法 NC	-	-	-	-	/
		用手法	-	-	-	-	/
タカラ バイオ	H3	自動法 C	+(25.28)	-(36.78)	-	-	(31.20)
		自動法 NC	+(24.18)	-(39.05)	-	-	(31.33)
		用手法	+(26.61)	-(38.52)	-	-	(31.14)
	H5	自動法 C	+(30.67)	+(31.51)	-	-	(31.15)
		自動法 NC	+(29.63)	+(30.42)	-	-	(31.25)
		用手法	+(31.49)	+(32.04)	-	-	(31.30)
	H5	自動法 C	+(23.85)	+(24.95)	-	-	(31.13)
		自動法 NC	+(22.73)	+(23.82)	-	-	(31.31)
		用手法	+(24.39)	+(25.12)	-	-	(31.12)
	陰性	自動法 C	-	-	-	-	(31.29)
		自動法 NC	-	-	-	-	(31.28)
		用手法	-	-	-	-	(31.25)

+ : 陽性 - : 陰性 カッコ内は Ct 値

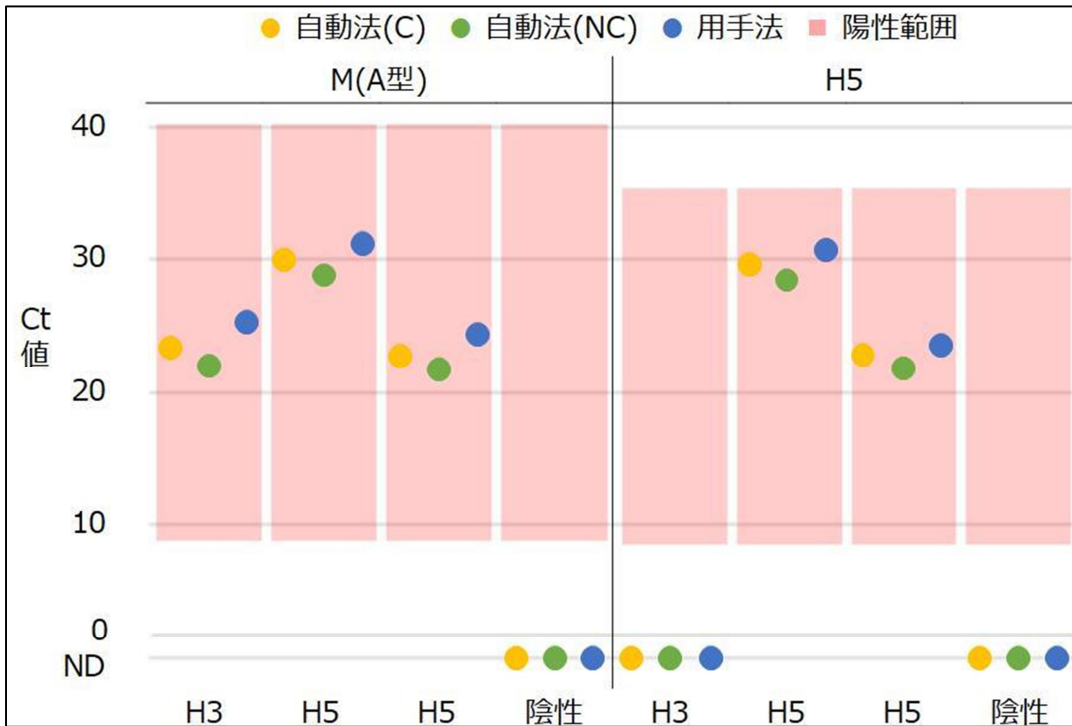


図 2. 検証 1 における AIV の qRT-PCR 結果 (ThermoFisher 社)

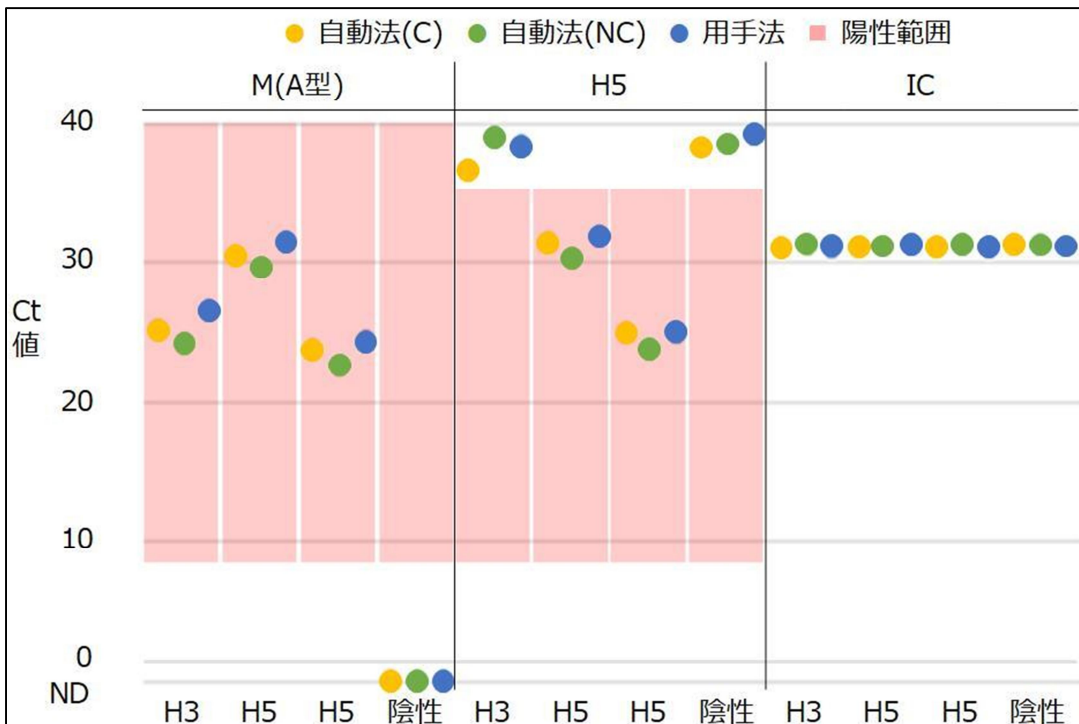


図 3. 検証 1 における AIV の qRT-PCR 結果 (タカラバイオ社)

CSFV の cRT-PCR 及び qRT-PCR では、結果は用手法と一致し、感度及び特異度はそれぞれ 100%であり、非特異反応は確認されなかった (表 4)。また、qRT-PCR では IC が増幅していることから PCR は阻害されていないことが確認され、使用した試薬

において同時に検出可能なアフリカ豚熱ウイルス（以下、ASFV）に対する非特異増幅は確認されなかった（図 4）。

表 4. 検証 1 における CSFV の結果

検体	抽出方法	cRT-PCR	qRT-PCR			
			CSFV	IC	ASFV	
陽性	自動法 C	+	+	(30.50)	(34.12)	-
	自動法 NC	+	+	(29.15)	(32.71)	-
	用手法	+	+	(30.53)	(34.54)	-
陰性	自動法 C	-	-	-	(35.49)	-
	自動法 NC	-	-	-	(34.14)	-
	用手法	-	-	-	(36.58)	-
陽性	自動法 C	+	+	(26.01)	(30.58)	-
	自動法 NC	+	+	(24.82)	(29.38)	-
	用手法	+	+	(28.56)	(32.19)	-

+:陽性 -:陰性 カッコ内は Ct 値

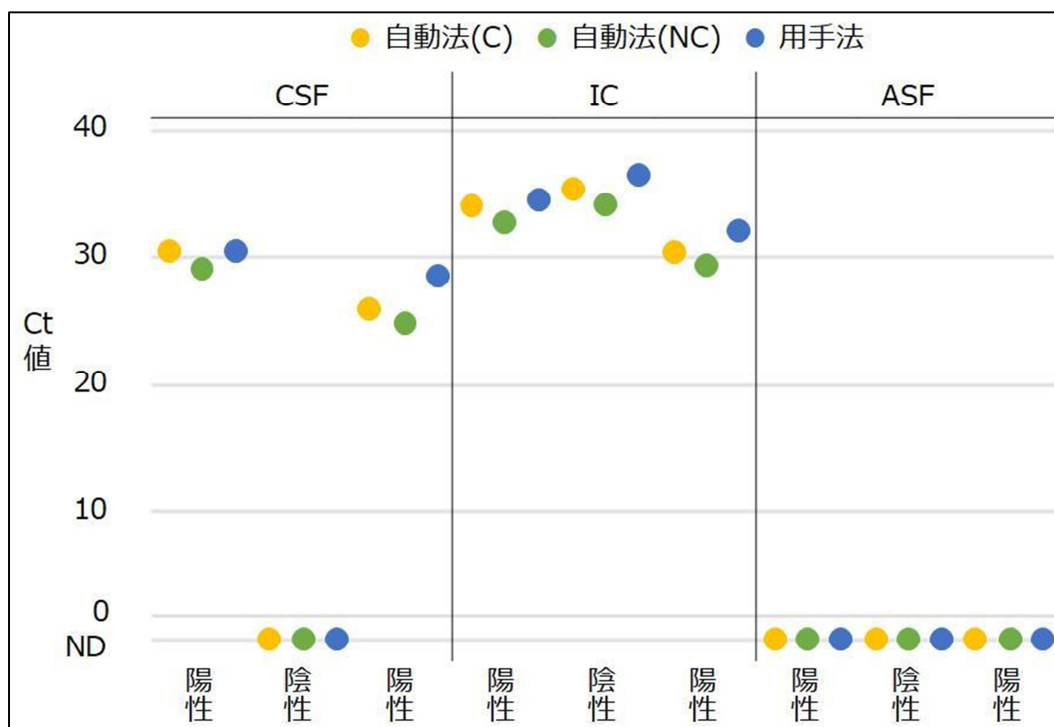


図 4. 検証 1 における CSFV の qRT-PCR 結果

(2) 野外材料を用いた特異度の比較 (検証 2)

AIV の cRT-PCR では、4 つの標的遺伝子全てにおいて結果は用手法と一致し、特異度は 100%であった (表 5)。なお、H5 及び H7eu を標的としたものでは、わずかに非特異バンドが確認されたものの判定は可能であった (図 5)。

表 5. 検証 2 における AIV の cRT-PCR 結果

抽出方法	標的			
	NP (A 型)	H5	H7am	H7eu
自動法 C	—	—	—	—
自動法 NC	—	—	—	—
用手法	—	—	—	—

—:陰性

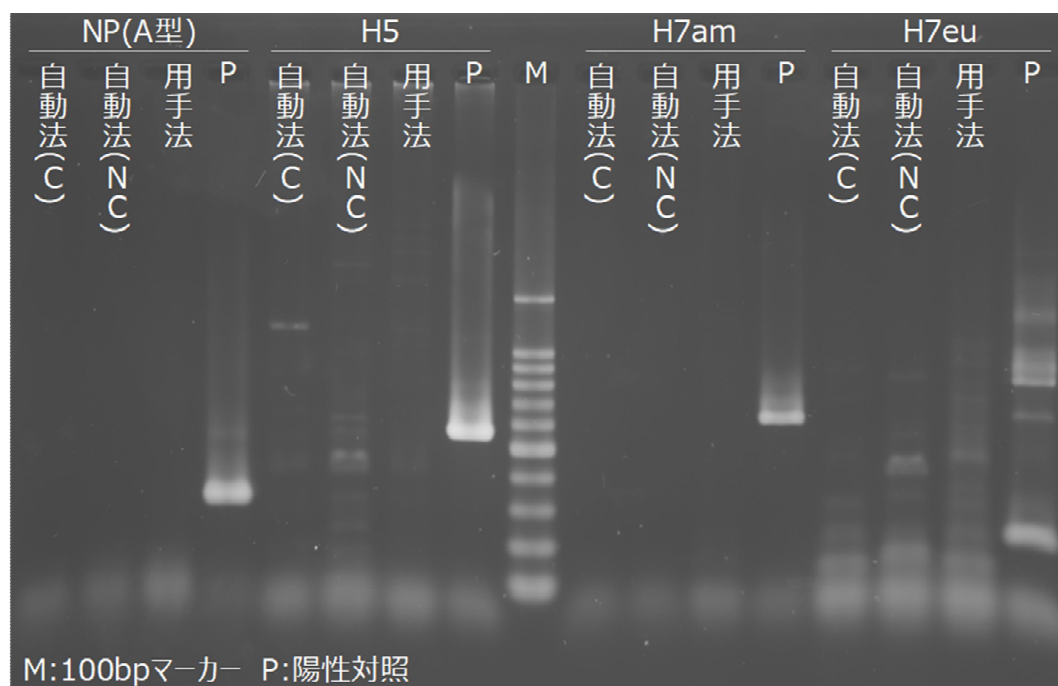


図 5. 検証 2 における AIV の cRT-PCR 電気泳動像

AIV の qRT-PCR では、2 社の試薬ともに、4 つの標的遺伝子全てにおいて結果は用手法と一致し、特異度は 100%であった (表 6)。また、非特異増幅や PCR 阻害は確認されなかった。

表 6. 検証 2 における AIV の qRT-PCR 結果

試薬	抽出方法	標的				
		M(A型)	H5	H7am	H7eu	IC
Thermo Fisher	自動法 C	—	—	—	—	—
	自動法 NC	—	—	—	—	—
	用手法	—	—	—	—	—
タカラ バイオ	自動法 C	—	— (41.10)	—	—	(31.26)
	自動法 NC	—	— (40.70)	—	—	(31.28)
	用手法	—	— (37.88)	—	—	(31.16)

—:陰性 カッコ内は Ct 値

CSF の cRT-PCR 及び qRT-PCR では、全ての検体において結果は用手法と一致し、特異度は 100%であった（表 7）。また、PCR 阻害や ASFV に対する非特異増幅は確認されなかった。

表 7. 検証 2 における CSFV の結果

検体	抽出方法	cRT-PCR	qRT-PCR		
			CSFV	IC	ASFV
扁桃	自動法 C	—	—	(19.23)	—
	自動法 NC	—	—	(18.81)	—
	用手法	—	—	(20.18)	—
脾臓	自動法 C	—	—	(23.35)	—
	自動法 NC	—	—	(21.10)	—
	用手法	—	—	(21.84)	—
腎臓	自動法 C	—	—	(23.15)	—
	自動法 NC	—	—	(21.32)	—
	用手法	—	—	(19.97)	—
血清	自動法 C	—	—	(24.92)	—
	自動法 NC	—	—	(24.44)	—
	用手法	—	—	(22.59)	—

—:陰性 カッコ内は Ct 値

(3) 核酸抽出に要する作業時間及び操作数の比較（検証 3）

核酸抽出時間は用手法が約 90 分、自動法が約 40 分であった。なお、自動法における実働時間は約 10 分であった。また、用手法で行っていた洗浄や遠心の操作も自動化され、操作数は減少した。

4 考察

既知試料及び野外材料を用いた検証では、AIV の cRT-PCR において若干の非特異バンドが確認されたものの、自動法と用手法の結果は一致した。既知試料における感度及び特異度、野外材料における特異度はそれぞれ 100%であり、自動法は用手法と同等の核酸抽出性能を有していると考えられた。また、Ct 値がより低値であったことから、抽出効率も自動法の方が優れていると推察される。なお、キャリア高分子の有無による差異は確認されなかったため、半量の検体から抽出が可能であるキャリア高分子ありのプロトコルを使用することとした。さらに、自動法は用手法と比較して、核酸抽出時間は約 50 分、実働時間は約 80 分短縮され、操作数も減少することから、迅速性及び簡便性が向上することを確認した。なお、自動法では装置による抽出開始後の約 30 分間に PCR 試薬調製等の作業を同時に行うことができるため、PCR 検査全体の時間はさらに短縮される。

以上より、検査精度を維持しつつ、より迅速かつ簡便な核酸抽出方法である自動法が緊急病性鑑定時にも使用可能であると判断した。自動法を導入することで、操作数が減少し、コンタミネーションや手技的失宜のリスクは低減する。また、通常病性鑑定時と同様の抽出方法であることから、検査担当者の心的負担も軽減される。さらに、タカラバイオ社の新試薬が自動法で抽出した核酸でも使用できることも確認された。本試薬はマルチプレックスの反応試薬であるため、自動法と併用することで、より迅速かつ省力的な遺伝子検査が可能となる。

今後は、野外材料を用いた感度の比較検証を実施するとともに、使用試薬の変更時等には検査精度を担保するために同様の検証を行っていきたい。

ヨーネ病検査の概要及び本年度の摘発事例

中央家畜保健衛生所

川村隆史

1 はじめに

ヨーネ病は、抗酸菌の1種であるヨーネ菌(*Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis*)の感染により長い潜伏期間後に慢性下痢、削瘦、泌乳量の低下を引き起こす。ヨーネ菌を含む糞便で汚染された餌等により経口感染するが、現在、実用的なワクチンや治療法はない。病原体の侵入及び感染の拡大を防止するために、導入時の検査や排菌牛の早期摘発が重要である。

ヨーネ病は、家畜伝染病予防法(以下、家伝法)第2条で家畜伝染病として定められ、家伝法施行規則第9条別表第一においてスクリーニング検査により陽性を確認した後に、確定検査を実施することが定められている。この家伝法施行規則が令和6年4月に新たに施行され、スクリーニング検査には10頭までのプール糞便を用いた定性リアルタイムPCR(以下、定性PCR)を追加、確定検査では補体結合反応が削除され、糞便を用いた定量リアルタイムPCR(以下、定量PCR)が新たな遺伝子検査キットに変更された。この改正により、スクリーニング検査では定性PCRによる抗体陰性排菌牛の早期摘発が可能となり、確定検査では特異性が向上した(図1)。

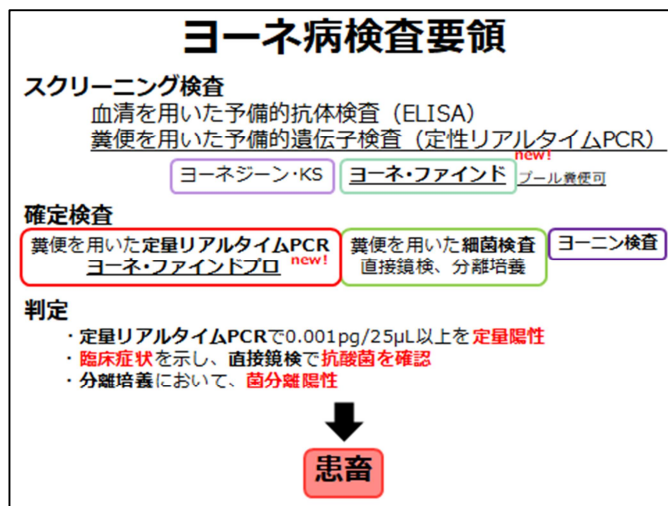


図1：ヨーネ病検査要領

高知県では家伝法第5条に基づく検査(以下、5条検査)を2年ごとに実施しており、従来の血清を用いたELISA法による抗体検査(以下、ELISA)でスクリーニング検査を実施し、糞便を用いた定量PCRの確定検査により、患畜を確定している。令和6年度の5条検査において3年ぶりに患畜を摘発し病性鑑定を実施したため、その概要を報告する。

2 材料と方法

本県は、ヨーネライザ・スクリーニング KS キットを用いた ELISA とヨーネ・ファインドプロを用いた定量 PCR を実施している。ELISA は 6 ヶ月齢以上の個体の血清を検査材料とし、スクリーニング検査、着地検査、畜産試験場の買い上げ牛等に適用している。定量 PCR は糞便を検査材料とし、スクリーニング検査陽性時の確定検査、ELISA を使用できない 6 ヶ月齢未満の買い上げ牛等に適用している。

令和 6 年度の ELISA・定量 PCR の検査実績（令和 6 年 11 月時点）は、それぞれ 2,946 頭・7 頭、うち陽性頭数はそれぞれ 5 頭・1 頭となった（図 2）。

この定量 PCR により摘発された患者 1 頭に対し、病性鑑定を実施した。検査材料は、ヨーネ病検査マニュアルに従い、①回盲部、②回腸 30 cm 部、③回腸 50 cm 部、④回腸 1m 部、⑤空腸部、⑥回盲リンパ節、⑦回腸部腸間膜リンパ節、⑧空腸部腸間膜リンパ節、⑨乳房上リンパ節、⑩糞便を採材した。病理組織学的検査として、抗酸菌染色（チール・ニールゼン法）と HE 染色、細菌学的検査として、抗酸菌染色（チール・ニールゼン法）による糞便塗抹検査、臓器乳剤を用いた定量 PCR、分離培養及び同定 PCR を実施した。

高知県の検査体制・実績		
検査体制		
・ ELISA : ヨーネライザ・スクリーニング KS		
検査材料 : 血清 (6 ヶ月齢以上)		
適用 : 5 条検査 (スクリーニング検査)		
着地検査、畜試買い上げ牛等		
・ 定量リアルタイム PCR : ヨーネ・ファインドプロ		
検査材料 : 糞便		
適用 : 5 条検査 (確定検査)		
畜試買い上げ牛等 (6 ヶ月齢未満)		
	検査頭数	陽性
ELISA	2,946	5
PCR	7	1

図 2 : 高知県の検査体制・実績

3 結果

(1) 剖検所見

回腸粘膜の軽度の肥厚と充血が確認され、雛壁の軽度形成が確認された（図 3）。

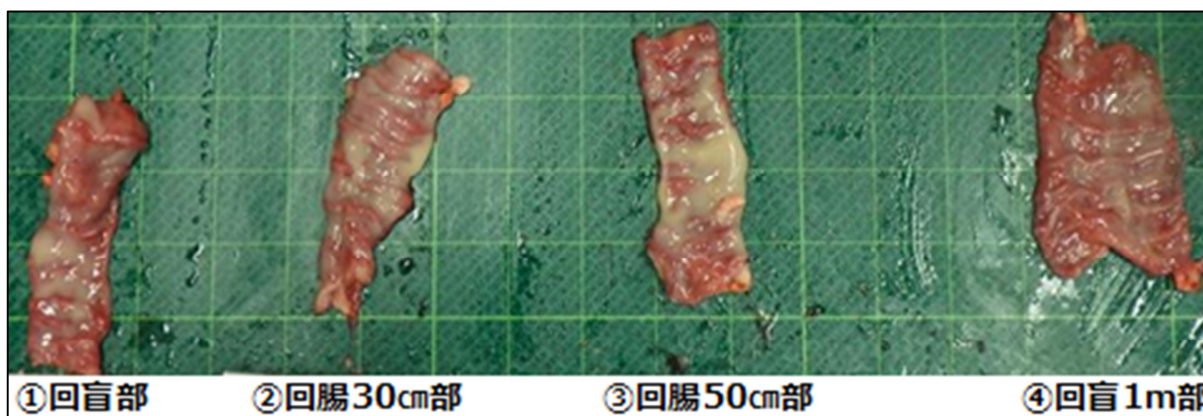


図 3 : 回腸部の粘膜面

腸管付属リンパ節で軽度腫脹が確認され、乳房上リンパ節では著変は確認されなかった（図4）。

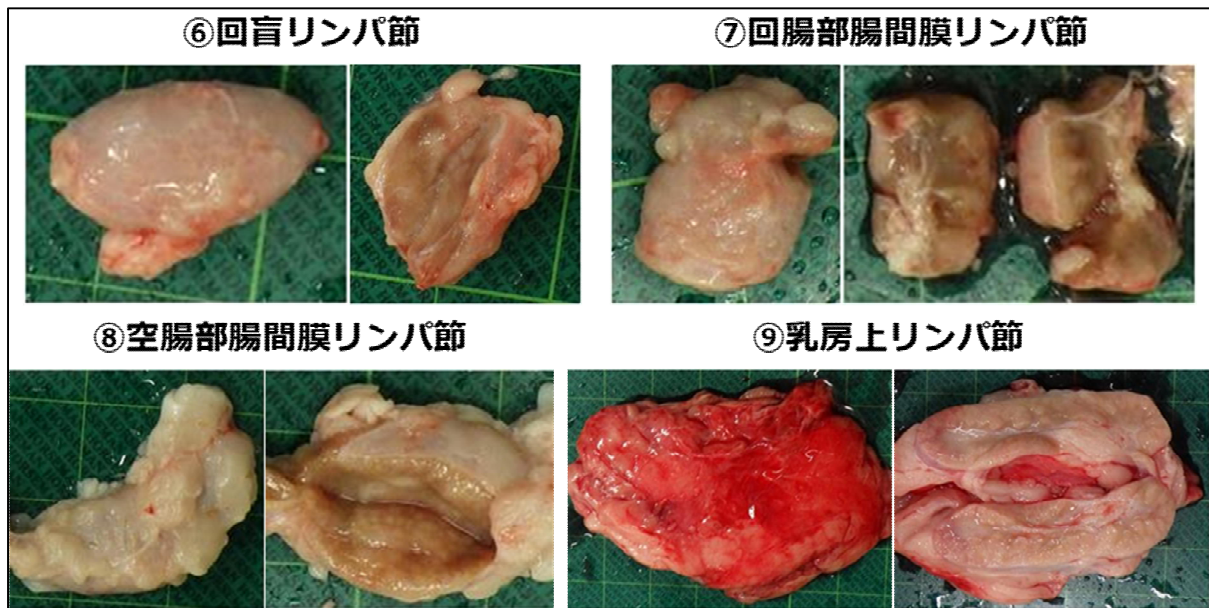


図4：各リンパ節の剖検所見

(2) 病理組織学的検査

抗酸菌染色では、各部位に菌体は確認されなかった。また、HE染色で類上皮細胞と多核巨細胞の検索を実施、回腸30cm部で多核巨細胞が確認された（図5）。

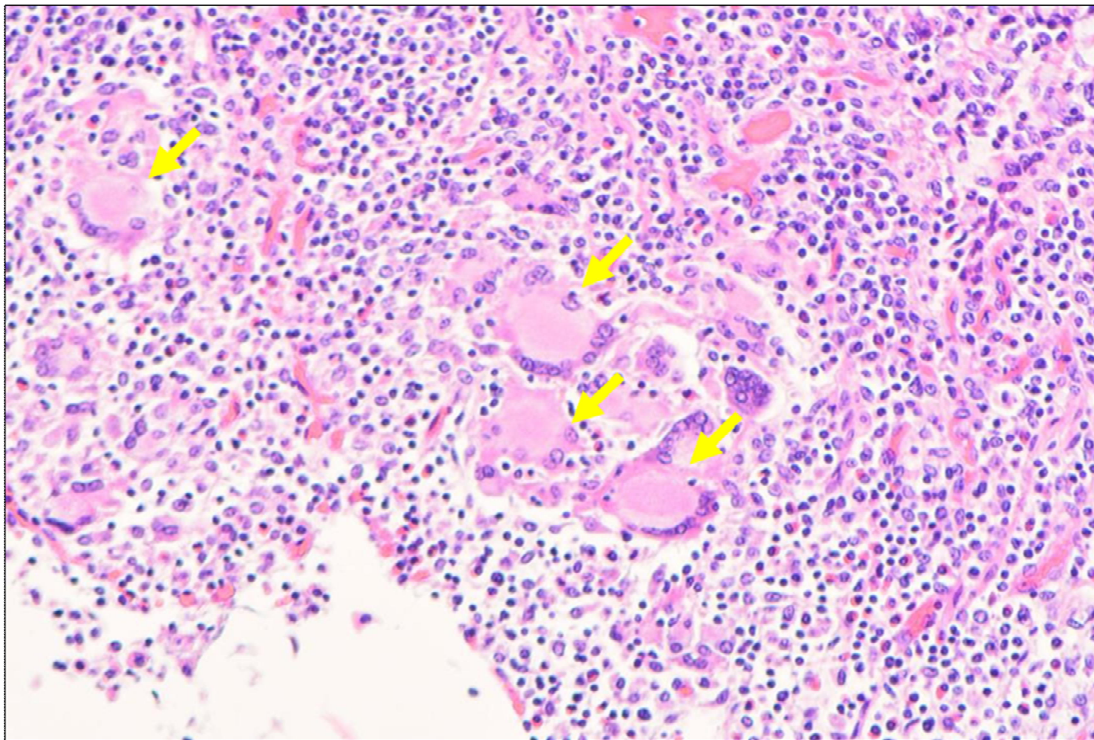


図5：回腸30cm部の病理組織像（HE染色）
黄色矢印：多核巨細胞

(3) 細菌学的検査

糞便塗抹検査では、ヨーネ菌は確認されなかった。臓器乳剤を用いた定量PCRでは、①～④回腸部、⑥～⑧空回腸付属リンパ、⑩糞便から遺伝子が検出された。遺伝子量は回腸付近で多く検出され、④回腸1m部が最多となった。⑧空腸部腸間膜リンパ節は遺伝子が検出されたが、遺伝子量が0.001pg/25 μ Lを下回っていたため、定量の判定は陰性となった。(表1)

表1：臓器乳剤を用いた定量PCR

	判定		遺伝子量 (pg/25 μ L)
	定性	定量	
①回盲部	+	++	0.0412
②回腸30cm部	+	++	0.0851
③回腸50cm部	+	+	0.0054
④回腸1m部	+	+++	0.8113
⑤空腸部	-	-	0
⑥回盲リンパ節	+	+++	0.2613
⑦回腸部腸間膜リンパ節	+	++	0.0276
⑧空腸部腸間膜リンパ節	+	-	0.0004
⑨乳房上リンパ節	-	-	0
⑩糞便	+	+	0.0095

分離培養では、遺伝子量の多い①～④回腸部と⑥・⑦回腸付属リンパ節から多くのコロニーが確認され、定量の判定が陰性だった⑧空腸部腸間膜リンパ節では菌分離は陰性となった。得られた白色目玉状のコロニーは、同定PCRによりヨーネ菌と同定された(図6)。

分離培養・同定PCR		
	菌分離	PCR
①回盲部	+++	+
②回腸30cm部	+++	+
③回腸50cm部	++	+
④回腸1m部	+++	+
⑤空腸部	-	X
⑥回盲リンパ節	+++	+
⑦回腸部腸間膜リンパ節	++	+
⑧空腸部腸間膜リンパ節	-	X
⑨乳房上リンパ節	-	X
⑩糞便	-	X

図6：分離培養及び同定PCR結果

4 考察

糞便塗抹検査及び病理組織学的検査では、菌体の確認はできなかったが、回腸 30 cm 部において多核巨細胞を確認した。また、臓器乳剤を用いた定量 PCR 及び分離培養により回腸部周辺で特異遺伝子及びヨーネ菌が確認された。剖検所見ではヨーネ病で特徴的な雛壁の形成が軽度で、回腸部に限局した菌分離であることから、ヨーネ病発症初期の摘発と考察した。

患畜はオーストラリア産、複数農場の移動歴、発生農場での 40 ヶ月間の飼養歴があるが、感染時期が特定できないため、侵入防止対策と環境対策が必要と考える。当該発生農場では、今後、畜舎増設による導入牛の増加が予定されているため、定性 PCR を活用した抗体陰性排菌牛の早期摘発を検討する。また、環境検査を実施し、農場の汚染状況を把握。得られた菌株の遺伝子解析による疫学的調査が重要と考える。