

令和4年度  
福井県家畜保健衛生業績発表集録  
( 第1部・第2部 )



令和5年8月  
福井県家畜保健衛生所

## 目次

### 第1部

- 1 鳥インフルエンザ発生時の円滑な発生状況確認検査実施に向けた取り組み  
新田 愛 . . . . 1
- 2 移植率および受胎頭数を考慮した牛受精卵移植選定基準の検討  
西川清文 . . . . 5
- 3 ルーメンフィルスコアを用いた乾乳期の栄養状態の管理指導  
宮谷正巳 . . . . 11

### 第2部

- 4 疾病を予防し酪農経営を安定化するために推進した事業の概要  
二本木俊英 . . . 15
  - 5 一養鶏場における細網内皮症ウイルス遺伝子の組込みが確認された皮膚型鶏痘  
清水誠也 . . . . 18
  - ◎6 新生子牛の腸管外病原性大腸菌 (ExPEC) の敗血症症例の分子生物学的検索  
山崎俊雄 . . . . 24
- 
- ◎ 第64回全国家畜保健衛生業績発表会選出演題
  - 第64回東海北陸ブロック家畜保健衛生業績発表会選出演題

1 鳥インフルエンザ発生時の円滑な発生状況確認検査実施に向けた取組み

新田愛

はじめに

鳥インフルエンザが発生すると、発生農場における防疫措置のほかに制限区域内の周辺農場における発生状況確認検査が必要となる。発生状況確認検査では、衛生的な農場への立入り方および検査の実施が重要である。本県では畜産分野以外の（健康福祉部および安全環境部）家畜防疫員と発生地域の市町職員のペアで対応予定であるため、両者の連携が重要である。そこで、対象となる家畜防疫員と立入り戸数の多い地域の市職員に対して発生状況確認検査の防疫演習を実施した。

演習準備

1. 農場ごとの記録用紙作成

〇〇〇〇〇農場		鶏舎数：5	
農場住所	〇〇〇〇	農場電話番号	〇〇-〇〇〇〇
立入り日		立入り者	
農場図面 ※採材場所 を○で囲んで下さい			
聞き取り	直近3日の死亡羽数		
	異状の有無	無し 有り（死亡羽数増加・産卵率低下・）	
採材（家きん舎ごとに5羽）（ぬぐい液はうち3羽を死亡家きん、5羽分を1本に保存）			
鶏舎1 (せけむ) 1-1	<input type="checkbox"/> 血液（生鶏5羽） 1本ずつ保存	<input type="checkbox"/> 気管ぬぐい液（生鶏 羽、死鶏 羽）	<input type="checkbox"/> クロアかぬぐい液（生鶏 羽、死鶏 羽）
鶏舎2 (せけむ) 1-2	<input type="checkbox"/> 血液（生鶏5羽） 1本ずつ保存	<input type="checkbox"/> 気管ぬぐい液（生鶏 羽、死鶏 羽）	<input type="checkbox"/> クロアかぬぐい液（生鶏 羽、死鶏 羽）
鶏舎3 (せけむ) 1-3	<input type="checkbox"/> 血液（生鶏5羽） 1本ずつ保存	<input type="checkbox"/> 気管ぬぐい液（生鶏 羽、死鶏 羽）	<input type="checkbox"/> クロアかぬぐい液（生鶏 羽、死鶏 羽）
鶏舎4 (せけむ) 1-4	<input type="checkbox"/> 血液（生鶏5羽） 1本ずつ保存	<input type="checkbox"/> 気管ぬぐい液（生鶏 羽、死鶏 羽）	<input type="checkbox"/> クロアかぬぐい液（生鶏 羽、死鶏 羽）
鶏舎5 (せけむ) 3-4	<input type="checkbox"/> 血液（生鶏5羽） 1本ずつ保存	<input type="checkbox"/> 気管ぬぐい液（生鶏 羽、死鶏 羽）	<input type="checkbox"/> クロアかぬぐい液（生鶏 羽、死鶏 羽）

発生状況確認検査を行うのが鶏の扱いに慣れていない畜産分野以外の家畜防疫員であることから、昨年度も発生状況確認検査の演習を実施した。その結果、演習を行うことで検査の流れを具体的に理解、イメージできたが、農場に立入った経験のない職員には記録用紙がわかりにくいという課題が挙がっていた。

そこで、鶏舎配置図や必要な採材数を整理した記録用紙を農場ごとに作成した。

農場図面を記録用紙に入れることで家きん舎の数や配置がわかるようにし、家きん舎内の採材場所が記録できるようにしたほか、聞き取る内容や家きん舎ごと5羽ずつの採材が漏れなく実施できるようチェック欄を設けた（図1）。

図1 記録用紙

## 2. 気管スワブ採材方法の見直し

昨年度までは、保定者が片手で鶏の両足を保持し、もう片方の手でとさかを引っ張り、採材者が肉垂を引っ張って開口させる方法で気管スワブを採材していた。(図 2)。この方法では保定者への負担が大きく、鶏の扱いに不慣れな市職員には少し難しいと考えられた。そのため今回は、初めて鶏に触れる職員にも取り組みやすいように、保定者は鶏を抱きかかえるのみ、採材者が鶏の頭を保持して親指と人差し指で開口させて採材する、という方法を採用した(図 3)。



図 2 昨年度までの採材方法

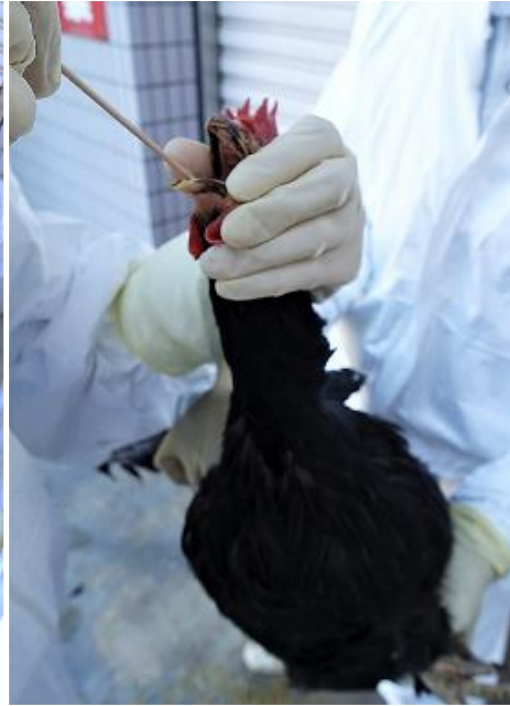


図 3 新しい採材方法

### 演習内容

#### 1. 対象者

畜産分野以外の家畜防疫員および立入り戸数が多い地域の市職員を対象とした。市職員が発生状況確認検査の防疫演習に参加するのは今回が初めてであり、参加した市職員 5 名のうち 3 名は初めて鶏に触れる職員であった。

#### 2. 座学

発生状況確認検査の検査内容の概要、農場立入り方法および採材方法について座学を行った。採血およびスワブ採材については事前に作成した動画も使用して、視覚的に理解しやすいよう工夫した。

#### 3. 演習

演習に参加した家畜防疫員 1 名と市職員 1 名の 2 名ペアで演習を行うことにより、両者の連携を図った。また、市職員向けには鶏の捕鳥および保定、家畜防疫員向けには血液およびクロアカスワブ採材に加え、新しい気管スワブ採材方法の演習も行った。

(1) 農場立入り

家畜保健衛生所（家保）を立入り対象農場とし、家保内の駐車場を衛生管理区域外とみなして1枚目の防護服、手袋、長靴を着衣した。その後、衛生管理区域内の家きん舎と想定した解剖室前で2枚目の防護服、手袋着用およびブーツカバーの着衣を行った。家畜防疫員が市職員に指示を出しながら実施した。

(2) 保定

市職員向けに、ケージの開け方、鶏の取出し方および保定の仕方について演習を行った。取り組みやすさを考慮し、抱き抱える保定方法を採用したことで、鶏に初めて触れる市職員でも問題なく実施できた（図4、5）。



図4 鶏の取出し



図5 保定

(3) 採材

家畜防疫員向けには、翼下静脈からの採血、クロアカスワブ採材および新しい方法での気管スワブ採材について演習を行った。慣れない作業でも、繰り返し練習することで問題なく実施できた。（図6-8）。



図6 翼下静脈からの採血



図7 クロアカスワブ採材



図8 新しい方法での気管スワブ採材



## 演習後の課題

アンケートでは、家畜防疫員からは繰り返しやらないと忘れる、気管スワブ採材が難しかった、昨年も実施したのでスムーズに実施できた、市職員からは鶏の出し入れが難しかった、初めてだったが保定は問題なくできた、参加して良かった、等の意見が寄せられた。

複数鶏舎へ立ち入る際の防護服着脱や採材資材の取り扱いが複雑であること、暗い鶏舎内では採材が難しいこと、市町職員へ指示を出しながらスムーズに検査を実施するには演習を繰り返し行って衛生的な方法に慣れる必要がある。といった課題が見つかった。

## まとめ

鳥インフルエンザの発生時には、迅速かつ的確な防疫対応がまん延防止および早期終息を図るために重要であり、万々に備えて防疫訓練を繰り返し行うことが大切である。今回、初めて市職員を含めた発生状況確認検査の防疫演習を行い、畜産分野以外の家畜防疫員とペアで実践することにより両者の連携が図れた。

今後、他地域を対象とした演習を実施する際に今回の演習を通じて見つかった課題を解決し、市町との危機意識の共有や職員のスキルアップを継続的に図りたい。また、農場立入り方法、複数鶏舎へ立入る際の防護服着脱や資材の取り扱い方法、鶏の取出しから保定、採材手順といった一連の流れについて動画を作成し、いつでもどこでも動員者が確認できるように共有して、円滑な発生状況確認検査実施につなげたい。

## 2 移植率および受胎頭数を考慮した牛受精卵移植選定基準の検討

西川清文

はじめに

本県では、受精卵移植により若狭牛の生産を推進するとともに受胎率の向上と技術の普及を図る目的で「受精卵移植技術向上対策事業」を昭和63年より開始し、乳用牛および繁殖用肉牛を借り腹とした受精卵移植（ET）を実施している。近年は、雌精液使用した人工授精で安定的に乳牛の後継牛生産がされてきており、ETでの若狭子牛生産の要望が増加している。さらに、令和4年度には飼料価格の高騰や交雑種および乳用種雄子牛の販売価格の下落などにより畜産農家の経営状況が悪化している。そのため、比較的価格が安定している若狭子牛生産の要望はさらに増加している。

しかし、令和4年4月頃より飼料価格高騰による農家での給餌飼料の質および量の変更の報告が相次ぎ、5月以降、その変更が原因と考えられる子宮や卵巣の状態変化がみられ、移植率が低下し、受胎頭数が減少した（表1）。そのため、令和3年度からの移植選定基準（表2）では移植頭数および受胎頭数が減少することが考えられた。そこで、移植率を上げることで受胎頭数を増やしつつ、受胎率も維持（40%以上）できる新しい移植選定基準を、令和3年度の移植成績を基に検討し、令和4年6月より移植選定基準を変更したので、その結果を報告する。

表1 県内過去5か年および令和4年度管内4・5月ET実績

	H29	H30	R1	R2	R3	R4.4	R4.5
依頼数	583	487	537	499	623	28	21
移植頭数	355	301	323	325	431	20	11
受胎頭数	157	132	149	155	175	9	4
移植率(%)	60.9	61.8	60.1	65.1	69.2	71.4	52.4
受胎率(%)	44.4	44.0	46.1	47.7	40.7	47.4	36.4

表2 令和3年度作成移植選定基準

移植	不可	相談	可	
ランク	Poor	Fair	Good	Excellent
大きさ	<15mm	15mm	18mm	20mm $\leq$
黄体	無しは1ランク下げる、妊娠黄体の可能性			
内腔	50%以上			
輝度	低(黒)			
共存卵胞	20mm<	10mm以上は1ランク下げる		

令和3年度までの移植選定基準(以下、旧基準)では、超音波診断装置を使用し、黄体の大きさを基準にランク付けし、さらに黄体突起や共存卵胞の有無でそのランクを動かすことで、移植「可」、「相談」、「不可」に分類し、「相談」の場合は、農家と移植牛の状態や空胎期間などを基に話し合い、移植するかを判断した[1]。また、子宮収縮および子宮内貯留物の有無や子宮内膜の輝度(高輝度)も移植選定基準の判断材料としていた。

#### 検討内容

令和3年度の管内移植成績200頭(受胎率44.5%)について調査し、黄体の選定を中心に移植選定基準の検討を行った。

#### ① 黄体の平均直径(大きさ)

旧基準では、経産牛で黄体の大きさが15mmより大きければ実施、15mm程度で農家との相談としていた。移植日と大きさの関係を調査すると、6日目移植の場合は、15mm程度、18mm程度、20mmの割合(%)がそれぞれ37.3%(10頭)、35.5%(11頭)、32.3%(10頭)であり、7日目移植では、19.2%(19頭)、38.4%(38頭)、42.4%(42頭)、8日目移植では20.0%(10頭)、36.0%(18頭)、44.0%(22頭)であった(図1)。6日目は7日目、8日目より小さい黄体の割合が多いことが分かった。

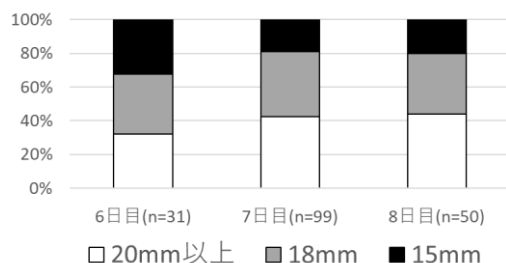


図1 移植日と大きさの関係



また、黄体の大きさを受胎率（受胎頭数/移植頭数）を比較すると、15mmが46.1%(18/39)、18mmが40.3%(27/67)、20mmが48.6%(36/74)で、すべて40%以上であった。

これらの結果から、移植日に関わらず黄体の大きさが15mm以上あれば移植を実施することとした。

未経産牛については、旧基準では設定がなく、各移植者の判断としていた。昨年度は20頭実施しており、黄体の大きさごとの移植頭数、受胎頭数および受胎率を表3に示した。黄体の大きさが13mm程度から受胎は確認できたが、18mm以上での受胎率が高かった。例数が少ないため、今後も更なる検討が必要と考えられるが、今回の検討の結果では、移植頭数を増やすため15mm程度を移植最低条件とした。

表3 未経産牛における黄体の大きさごとの、移植頭数、受胎頭数および受胎率

大きさ	10mm	13mm	15mm	18mm	20mm
移植頭数	2	4	8	4	2
受胎頭数	0	1	2	3	1
受胎率 (%)	0	25	25	75	50

## ② 共存卵胞の有無

小林ら [2] は、共存卵胞が存在しない場合（以下、無）、存在する場合（以下、有）（図2）より受胎率が高い傾向にあるとしている。令和3年度の結果について、検討を行うと共存卵胞無の場合の方が受胎率は高かった（表4）。さらに、共存卵胞（10～20mm）有の場合の受胎率を比較すると、黄体の大きさが大きいほど共存卵胞の影響は受けにくいことが考えられた（表5）。

そのため、共存卵胞が存在する場合、黄体の大きさが15mm以上で実施することにした。

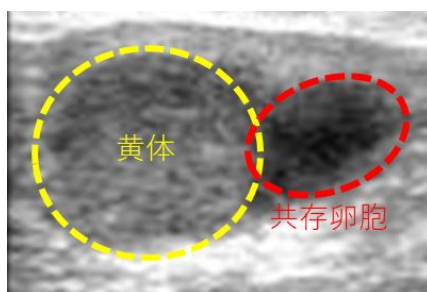


図2 黄体と共存卵胞

表4 共存卵胞の有無とその受胎率

共存卵胞	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
有	77	31	40.3
無	123	57	46.3

表5 共存卵胞有の場合の黄体の大きさと受胎率

大きさ(mm)	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
10	1	0	0.0
13	1	0	0.0
15	18	7	38.9
18	31	13	41.9
20以上	26	11	42.3

### ③ 突起の有無

発情して約1日後に排卵が起こり、卵胞が破裂した跡が火口状あるいは突起状物(以下、突起)になる[3]。この突起が超音波診断画像または触診で明瞭な場合を「突起有」、そうでない場合を「突起無」とし、この場合の受胎率を比較した。結果、突起有の場合は、42.4%(61/144)、突起無の場合は、48.2%(27/56)で共に受胎率40%以上であった。そのため、今年度は黄体突起の有無を選定材料とはしないことにした。

### ④ 内腔の有無

排卵後間もない形成期黄体には内腔が形成され、この内腔は黄体期の推移とともに縮小、消失する[4]。旧基準では、内腔が黄体に占める割合が50%以上の黄体では実施していない。そのため、内腔割合50%以下の内腔が存在する場合(以下、内腔有)と、存在しない場合(以下、内腔無)の受胎率を調査した。結果、内腔有は45.4%(74/163)、内腔無は37.8%(14/37)で内腔有が受胎率40%を超えていた。内腔無については、受胎率が内腔有よりも低かったが、30%後半の受胎率があったため、今年度は受胎頭数を増やすために内腔無でも実施することとした。ただし、黄体突起および黄体内腔共に無しの黄体については、妊娠黄体の可能性があるため、実施しないこととした。

以上のことから、表6のとおり旧基準を変更した。

表 6 旧基準および新基準の比較

	旧基準	新基準
平均直径(大きさ)	15mm で相談・以上で実施	15mm 以上で実施
黄体突起の有無	無で 1 ランク下げる	選定材料としない
黄体内腔	内腔割合 50%以下	内腔割合 50%以下 突起無・内腔無は実施せず
共存卵胞 (10～20mm)	有で 1 ランク下げる	黄体 15mm 以上で実施

#### ET 実施方法

新基準を用いて、令和 4 年 6 月から 12 月まで ET を実施した。

#### 結果

令和 4 年 6 月から 12 月までの移植結果は 129 頭、移植頭数 93 頭 (移植率 72.1%)、受胎頭数 38 頭、受胎率 41.3%であった。昨年度の結果と比較 (表 7) すると、移植率、受胎頭数は増加した。受胎率は低下したが、40%以上を維持した。仮に、旧基準を令和 4 年に適用したとすると、移植頭数 75 頭 (移植率 58.1%)、受胎頭数 32 頭 (受胎率 42.7%)であり、新基準使用により受胎頭数は 6 頭増加の結果となった。また令和 4 年 4 月～12 月の結果は移植頭数 170 頭、移植頭数 120 頭、受胎頭数 51 頭で昨年度同期間と比較 (表 8) すると、受胎率は低下したが、受胎頭数は前年と同程度であった。

表 7 令和 3 年および令和 4 年 6 月から 12 月までの ET 成績の比較

	R3. 6～12 月	R4. 6～12 月
検診頭数	127	129
移植頭数	84 (移植率 66.1%)	93 (移植率 72.1%)
受胎頭数	36 (受胎率 43.4%)	38 (移植率 41.3%)

表 8 令和 3 年および令和 4 年 4 月から 12 月までの ET 成績の比較

	R3. 4～12 月	R4. 4～12 月
検診頭数	162	170
移植頭数	110 (移植率 67.9%)	120 (移植率 72.1%)
受胎頭数	49 (受胎率 45.0%)	51 (受胎率 42.9%)

#### まとめ

移植選定基準を更新した結果、令和 4 年 4 月から 12 月までの受胎率は 40%以上を維持し、令和 3 年度同時期と同程度の受胎頭数を確保できた。今後も移植結果を検討、移植可否選定の精度を高め、農家需要や受胎頭数に応じて移植選定基準を更新する必要があると思われる。

引用文献

- [1] 西川清文：令和3年度福井県家畜保健衛生業績発表集録, No. 3
- [2] 小林崇之：平成29年度福井県畜産技術業績発表集録, No. 4
- [3] 農研機構：写真で見る繁殖技術  
<https://www.naro.affrc.go.jp/archive/nilgs/breeding/skill/027397.html>
- [4] 奥田潔：ウシの黄体の機能に関する研究, 1997

はじめに

ルーメンフィルスコア (RFS) は第一胃の充実度を容易に外観で評価する指標で、特に粗飼料の摂取量を判断する。RFS と同じように外観で飼料の摂取量を評価する指標にボディーコンディションスコア (BCS) があり、RFS は短期的な評価として BCS は長期的な評価として利用されている [1]。今回、就農 3 年目の酪農家の飼養管理改善のため、普及指導員 (普及員) と協力し乾乳期飼養管理に RFS を用いた指導に取り組んだ。家保が血液生化学検査と繁殖に関する検査を実施し、普及員が乾乳期の RFS と分娩後の BCS を指導と繁殖に関する記録の聞き取りを行った。

方法

- (1) 供試牛 令和 4 年 6 月～9 月に分娩予定の乾乳牛 8 頭。  
乾乳期初期に RFS3 で群分け
- (2) 調査内容 分娩後 60 日までの BCS、  
乾乳期 1 回と泌乳期 2 回の計 3 回の生化学検査  
検査項目は総コレステロール (TC) と Mg (採食量の指標)、  
Glu (エネルギー代謝の指標) [2]。  
繁殖に関する検査 (分娩後のフレッシュ期の直腸検査、  
子宮粘液 pH および子宮粘膜細胞診)  
繁殖に関する聞き取り調査 (初回種付けまでの日数、  
分娩から受胎するまでの日数、受胎するまでの種付け回数)

直腸検査は超音波装置 (HS-101v HONDA 電子) を使用した。子宮粘液 pH 検査は pH 試験紙 (ロールタイプ BTB pH 6.2 - 7.8) を使用した。子宮粘膜細胞診はサイトブラシを使用し、100 細胞あたり 5% 以上の PMN が存在すれば子宮内膜炎と判断した [3]

(図 1)。

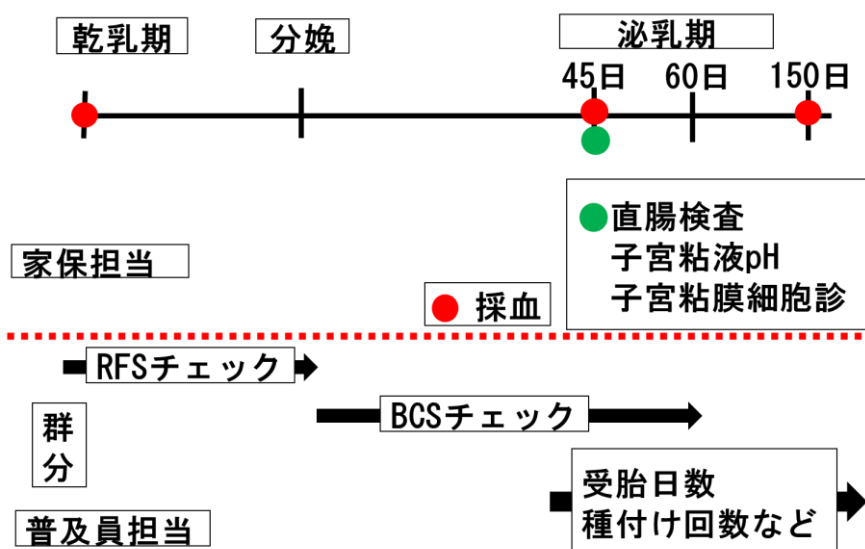


図 1 調査内容とスケジュール

## 結果

乾乳期間中の RFS の推移を示す (図 2)。RFS に関係なく分娩前 23 日ごろまでは一定の値だったが、分娩が近づくと RFS3 未満は RFS が不安定になり分娩前には数値を落とし分娩に備えた。一方 RFS3 以上は一時的に RFS を落とすが数値が 3 未満になることはなく分娩前に 3.5 に戻し分娩を迎えた。

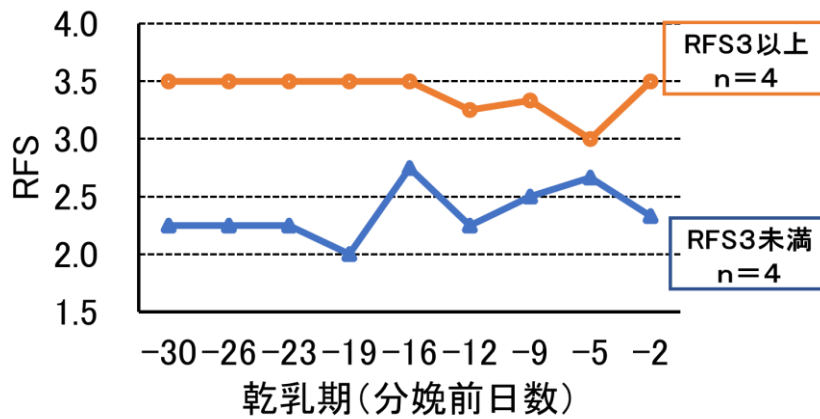


図 2 乾乳期 RFS の推移

群ごとの分娩後の BCS の変化を比較した (図 3)。RFS3 以上は分娩直後の BCS が平均 3.5 で分娩後 60 日は 2.75 となり BCS の差は 0.75 だった。RFS3 未満は分娩直後の BCS が平均 3.25 で分娩後 60 日は 2.5 になり BCS の差は 0.75 だった。泌乳期間中の RFS3 以上と 3 未満の泌乳期 (分娩後日数) BCS の差は平均 0.2 だった。

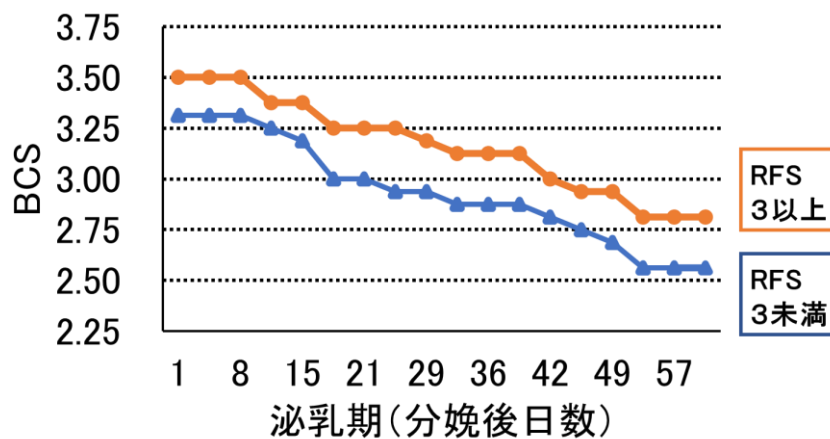


図 3 分娩後 60 日までの BCS 変化

血液生化学検査の結果を示す。(図4、5、6)。3つの項目で乾乳期、泌乳期ともにRFS3以上が高値であった。RFS3未満では泌乳期(45日)のGluの低下が見られた。

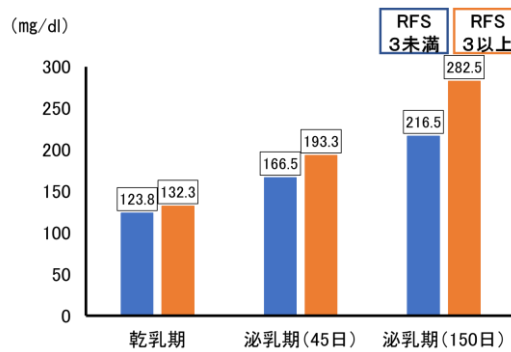


図4 TC

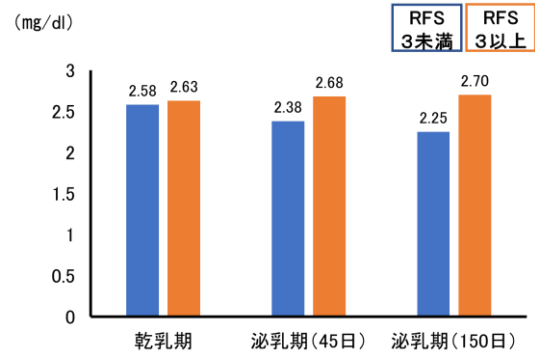


図5 Mg

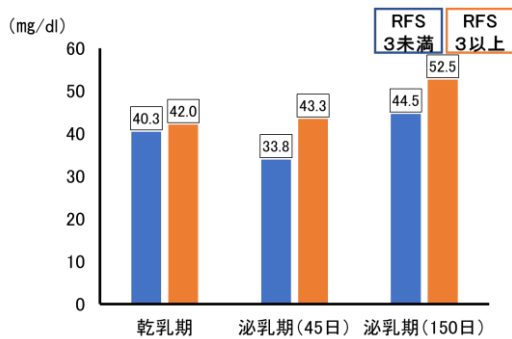


図6 Glu

泌乳期(45日)に行った直腸検査では、発情もしくは発情回帰が確認できた牛はRFS3以上で1頭だった。RFS3以上の内訳は発情前1頭、卵巢静止1頭、経過観察2頭、RFS3未満の内訳は卵胞のう腫1頭、経過観察が3頭だった。

子宮粘液pH検査のRFS3以上の内訳はpH6.8が1頭、pH7.6が1頭、pH7.8以上が2頭だった。RFS3未満は4頭ともpH7.8以上であった。(図7)。

子宮粘膜細胞診は全ての牛がPMN5%未満で子宮内膜炎ではなかった。

	RFS 3未満	RFS 3以上
pH6.8		1
pH7.6		1
pH7.8以上	4	2

図7 子宮粘液pH検査結果



初回種付けまでの日数はRFS3未満のほうが平均14.3日短い結果だったが、RFS3以上は受胎するまでの日数が平均17.2日短く、また受胎するまでの種付け回数も平均で1.5回少ない結果となった(図8)。

	RFS 3未満	RFS 3以上
受胎頭数	3頭	2頭
初回種付けまでの日数	91.7日	106日
受胎までの日数	160.7日	143.5日
受胎までの種付け回数	3.75回	2.25回

図8 繁殖記録(令和5年1月末日現在)

#### まとめ

RFSに関わらず分娩後のBCSはどちらも減少し、減少幅は0.75であった。生化学検査ではRFS3以上がTC、Mg、Gluともに高い値を示したことからRFS3以上が乾乳期だけでなく泌乳期においても採食量が維持されたと推察した。繁殖に関しては、RFSに関係なく子宮内膜炎は認めなかったがRFS3以上が受胎までの日数は短く、また受胎までの種付け回数も少ない結果となり採食量が繁殖成績にも影響することが示唆された。指導にあたって、乾乳期管理で見過ごしていた採食量が不足している牛の存在を農家が認識したこと、またRFS技術習得に加え、技術利点をデータで示したことで農家の乾乳期栄養管理の意識が高まった。ただし、RFS3未満の乾乳牛はTMRの増飼やハイキューブやチモシーなどといった飼料の追加で採食量を増やすことが難しく、今後の課題である。

#### 参考文献

- [1]赤松裕久：臨床獣医 December 2021 緑書房
- [2]水谷尚：牛の血液学 緑書房
- [3]大澤健司：日本胚移植学雑誌 35巻3号 2013 日本胚移植研究会
- [4]浜名克己ら：家畜繁殖研究会雑誌 21(4) 1976 日本繁殖生物学会

#### 4 疾病を予防し酪農経営を安定化するために推進した事業の概要

二本木俊英

はじめに

家畜保健衛生所（以下、家保）では、家畜保健衛生技術の普及強化を目的に事業を実施している。乳用牛については、牛乳の安定的供給と生産性の向上を目的に、繁殖管理技術指導事業（現在、継続実施中）の他、家畜生産阻害主要疾病対策事業（～平成3年度）や酪農経営技術向上対策事業（平成2～13年度）を実施してきた。

平成20年度以降は、酪農家の経営安定化を目的に事業を実施してきた（表1）。事業は、3年ごとに成績を検討し、内容を見直すとともに、重点施策を新たに立案しながら実施してきた。今回、事業成績を取りまとめたのでその概要を報告する。

#### 事業概要

平成20～22年度（Ⅰ期）は、「良質な牛乳生産のため乳房炎の検査および防除指導を実施し、安全・安心な酪農生産衛生体制の確立を図る」ことを目的に、モデル農家9戸を選定し「酪農生産衛生体制確立事業」を実施した。

平成23～25年度（Ⅱ期）では、「乾乳期の乳牛の健康状態を把握することにより、産前産後の疾病予防体制を確立し、乳牛の生産性の向上と酪農経営の安定化を図る」ことを目的に「乳牛における産前産後の疾病予防体制確立事業」を実施した。Ⅱ期以降は、県下全域の酪農家を事業の対象とした。

平成26～28年度（Ⅲ期）では、「泌乳期において死産率の高い疾病（乳房炎、換気機能障害、ケトーシスなど）を予防することにより、乳牛の健康な状態を良好な状態に保ち酪農経営の安定化を図る」ことを目的に「泌乳初期の疾病予防対策強化事業」を実施した。

平成29～令和元年度（Ⅳ期）では、「妊娠中の乳用牛を健康な状態に保ち、流産、早死産および奇形等の異常産を低減させるとともに健康な子牛を育てることにより、自家産後継牛を増頭し、酪農経営の安定化を図る」ことを目的に「異常産を減らして健康な子牛を育てよう事業」を実施した。

令和2～4年度（Ⅴ期）では、「妊娠期の乳牛の健康診断を実施し、産後の起立不能および乳房炎を減らし、酪農経営の安定化を図る」ことを目的に「酪農経営安定化事業」を実施した。

表1 酪農家の経営安定化を目的とした事業

平成20～22年度（Ⅰ期）	酪農生産衛生体制確立事業
平成23～25年度（Ⅱ期）	乳牛における産前産後の疾病予防体制確立事業
平成26～28年度（Ⅲ期）	泌乳期の疾病予防対策強化事業
平成29～31年度（Ⅳ期）	異常産を減らして健康な子牛を育てよう事業
令和2～4年度（Ⅴ期）	酪農経営安定化事業

## 検査方法

検査は、乳房炎簡易検査、乳汁の精密検査（菌分離、薬剤感受性試験）、血液生化学検査（肝機能、脂質代謝）を中心にボディコンディションスコア（BCS）検査や糞便の細菌検査を実施した。

乳房炎については、乳房炎防除マニュアルを作成し、これに基づき衛生指導を実施した。乳房炎検査、細菌精密検査および血液生化学検査項目は、表2、表3のとおりである。

## 事業推進体制

酪農経営安定化事業の推進体制を図1に示す。酪農家から乳房炎検査や血液検査などの健康診断の依頼を受け、家保が検査を実施し、結果を回答し指導した。また、酪農家から診療の依頼を受けた診療獣医師やNOSAI福井家畜診療所（以下、獣医師ら）は患畜の診療を実施するとともに、必要に応じ家保に検査を依頼する体制とした。農林総合事務所、畜産試験場、奥越高原牧場などの関係機関とも連携を密にし、事業を推進した。

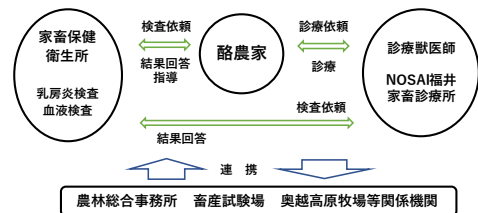


図1 酪農経営安定化のための事業推進体制

## 事業成績

事業実施成績は、実施時期（以下、事業期）ごとに3年間分を取りまとめた（表4）。巡回指導戸数は、モデル農家を選定したI期では100戸未満であったが、II期では270戸と約3倍に増加した。その後は、農家戸数の減少とともに次第に減少している。

表4 事業実施成績

事業期	巡回 延戸数	乳房炎 検査検体数	血液生化学 検査頭数
I期	88	766	779
II期	270	524	745
III期	252	585	601
IV期	210	449	363
V期	162	293	421

乳房炎検査件数、血液生化学検査頭数とも同様に減少傾向にある。乳房炎検査の結果は表5のとおりである。エンテロトキシンを産生し食中毒の原因となる黄色ブドウ球菌や環境性乳房炎の原因となるその他のブドウ球菌やレンサ球菌などが分離された。いずれの菌も分離される件数は減少傾向にある。

表5 乳房炎検査菌分離成績

事業期	菌分離なし	黄色 ブドウ球菌	その他の ブドウ球菌	レンサ球菌	その他の菌
I期	211	153	212	120	131
II期	243	112	252	129	109
III期	81	111	55	131	158
IV期	70	56	26	118	66
V期	174	70	42	58	56

血液生化学検査の結果は、表6のとおりである。肝機能低下、ケトーシス、炎症性疾患などと診断されるものが多数みられた。肝機能低下を示す検体は減少傾向にあるが、ケトーシスは横ばい、炎症性疾患は増加傾向にある。

表2 乳房炎検査・細菌精密検査（1件当たり580円）

- 報告、乳房炎簡易検査（CMT変法）
- 菌分離（血液寒天培地、菌数測定）
- 分離した菌の同定（生化学性状検査）
- 薬剤感受性試験
- ベンジルペニシリン、アミノペンシリン、セファゾリン、カナマイシン、ストレプトマイシン、エリスロマイシン、テトラサイクリン
- 乳房炎防除マニュアルに基づき指導

表3 血液生化学検査項目（1件当たり330円）

検査項目	単位	正常範囲	方法
血球数	Hb	28-40 %	ミカロメトリ法
白血球数	WBC	4000-12,000 / $\mu$ L	フェルリク、フローシトメトリ法
総タンパク	STP	6.2-7.8 g/dL	血液タンパク計
尿素窒素	BUN	10-20 mg/dL	
総ビリルビン	T-Bil	0.2-0.8 mg/dL	
グルコース	グルコース	< 100 mg/dL	
乳酸脱氢酵素	LDH	< 3000 IU/L	
γ-グルタミルトランスフェラーゼ	γ-GTP	< 40 IU/L	
総カルシウム	T-Ca	85-100 mg/dL	スポット法
クレアチニン	Cr	1.0以下 mg/dL	
グルコース	Glucose	45-75 mg/dL	
カルシウム	Ca	5.2-12.0 mg/dL	
リン	P	4.0-8.0 mg/dL	
マグネシウム	Me	1.5-3.2 mg/dL	

図2に血液検査の目的別依頼頭数の割合を示した。疾病の診断を目的とした獣医師らからの依頼頭数と健康診断を目的とした酪農家からの依頼頭数を表している。Ⅰ期からⅢ期にかけては、健康診断目的の血液検査の依頼頭数が40%以上を占めていたが、Ⅳ期には16%と大きく減少した。Ⅴ期には、関係機関との連携により27%にまで依頼頭数が増加した。

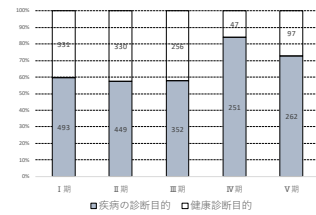


図2 血液検査の目的別依頼頭数の割合

#### まとめ

産後の乳房炎を予防するためには、乾乳前に検査を実施し、分離菌に対し有効な薬剤を選択することが重要である。また、産前産後の疾病を予防するためには乾乳期の健康診断により乳牛の健康状態を把握し、異常を認めた場合は、早期に治療を施すことが重要である。いずれにしても、早期に診断し、早期に治療することが重要であり、引き続き酪農家、獣医師ら、関係機関と情報を共有し、乳用牛の損耗防止に努めていきたい。

#### 参考文献

- [1] 家畜保健衛生事業計画（昭和61年度～令和4年度）
- [2] 家畜保健衛生事業成績（平成20年度～令和3年度）

## 5 一養鶏場における細網内皮症ウイルス遺伝子の組込みが確認された皮膚型鶏痘

清水誠也

はじめに

鶏痘は鶏痘ウイルス (FPV) を原因とする疾病で、病態により皮膚型、粘膜型、混合型に分けられる。皮膚型では肉冠、肉垂、顔面、脚など羽のない部分に病変がみられ、粘膜型では気管支粘膜に病変がみられる。ワクチンによる予防は有効だが、ワクチン接種農場での発生報告もある [1]。ワクチン接種鶏での発生には FPV 遺伝子への細網内皮症ウイルス (REV) 遺伝子の組込みが関与しているとの報告がある。REV はトリレトロウイルス科ガンマレトロウイルス属のウイルスで、野外鶏群に広く浸潤している。ウイルスは目、口腔、糞などを介して排泄され容易に同居感染し、発症鶏は急性細網細胞腫、慢性リンパ腫等を引き起こす。近年、FPV ゲノムへの REV 遺伝子の組込みが明らかにされ、鶏痘の流行に伴い REV が伝播する可能性が示唆されている。また、REV 感染は免疫機能を低下させるという報告もある [2]。

今回一養鶏場におけるワクチン接種鶏群での REV 遺伝子の組込みが確認された皮膚型鶏痘の発生概要について報告する。

発生概要

発生農家は成鶏約 90 羽、育成鶏 70 羽を飼養する採卵鶏農家。令和 4 年 10 月、約 230 日齢の鶏群で元気消失、産卵率低下、図 1 に示すような頭部皮膚の発痘および痂皮形成が続発したため死亡および衰弱した 4 羽の病性鑑定を実施した。



図 1 頭部の発痘および痂皮

材料および方法

### (1) 細菌学的検査

【材料】

死亡鶏 2 羽および症状が重度だった成鶏 2 羽の頭部皮膚および主要臓器

【方法】

常法に基づき一般細菌検査を実施した。

### (2) ウイルス学的検査

【材料】

死亡鶏 2 羽および症状が重度だった成鶏 2 羽の頭部皮膚および肉冠の 10% 乳剤 (PBS)



### 【方法】

ウイルス分離として発育鶏卵漿尿膜接種法を実施した。FPV 遺伝子検査として 10%乳剤から DNeasy Blood & Tissue Kits (QIAGEN) を用い DNA を抽出し、Lee, L.H らの方法 [3] で FPV の 4b 領域について PCR 法を実施した。

### (3) 病理組織学的検査

### 【材料】

死亡鶏 2 羽および症状が重度だった成鶏 2 羽の主要臓器、頭部皮膚、肉冠、総排泄腔、ウイルス分離した発育鶏卵漿尿膜。

### 【方法】

常法に基づきヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を実施した。

## 結果

### (1) 細菌学的検査

有意な菌は検出されなかった

### (2) ウイルス学的検査

発育鶏卵漿尿膜接種において図 2 に示すようなポックの形成が確認され、遺伝子検査では頭部皮膚、肉冠およびポック形成漿尿膜乳剤において FPV4b 領域に特異的なバンドが検出された(図 3)。

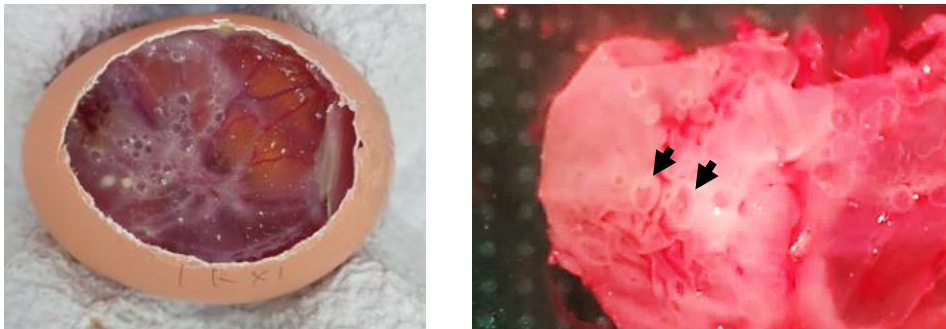


図 2 発育鶏卵漿尿膜に形成されたポック

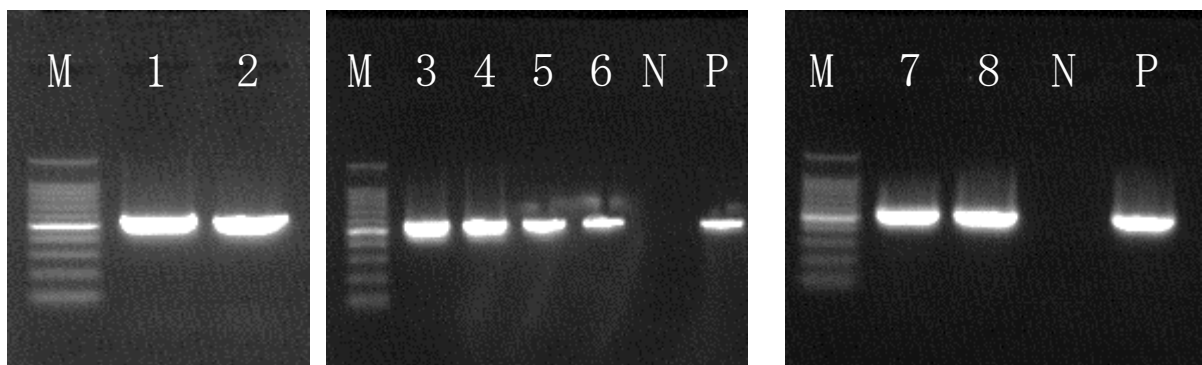


図 3 FPV4b 領域の遺伝子検査 (M:100bp マーカー、1, 2, 3, 5:頭部皮膚、4, 6:肉冠、7, 8:漿尿膜、N:陰性対照、P:陽性対照)

### (3) 病理組織学的検査

頭部皮膚、総排泄腔上皮およびポックが形成された漿尿膜において、図 4-6 に示すような細胞質内封入体（ボリングエル小体）が認められた。その他臓器について異常は認められなかった。

以上のことから、本症例を皮膚型鶏痘と診断し、当該養鶏場における発生状況調査を実施した。

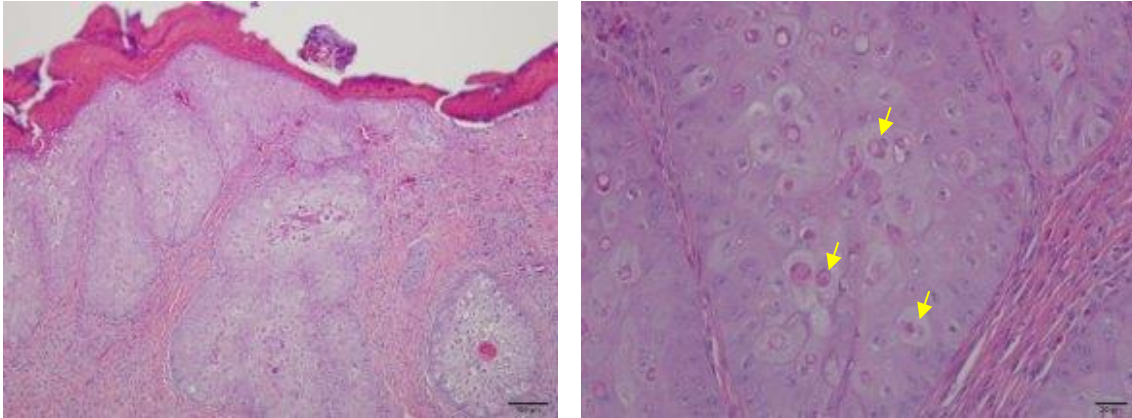


図 4 頭部皮膚上皮（左：×100、右：×400）

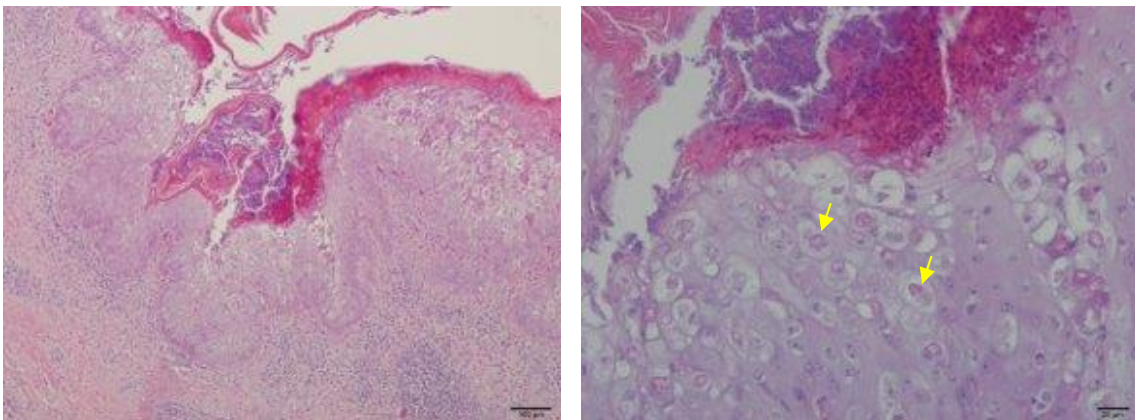


図 5 総排泄腔上皮（左：×100、右：×400）

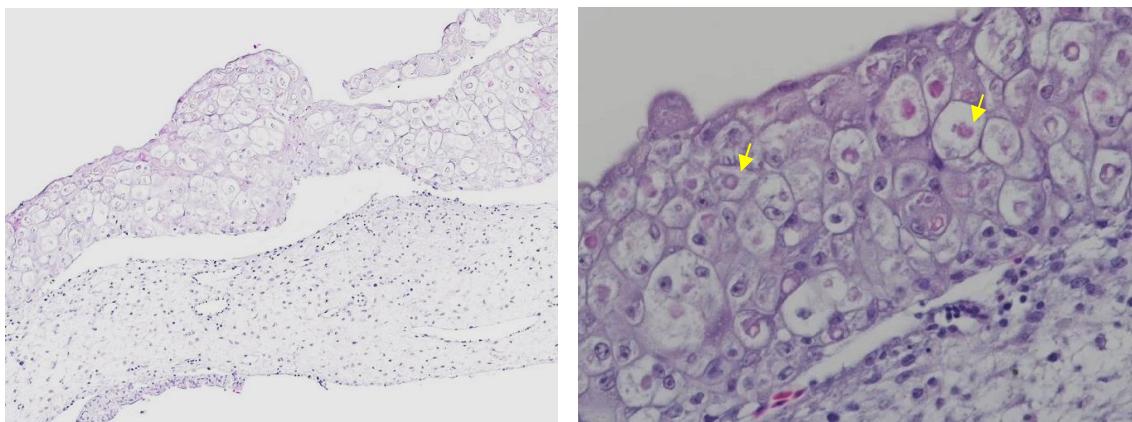


図 6 漿尿膜（左：×100、右：×400）



発生状況調査

養鶏場の模式図は図7の通りで、ワクモ対策としてケージ上に段ボールトラップが2m間隔で設置されていた。

調査の結果、2レーンの230日齢の鶏群約80%が図8に示すような異常を呈しており、その他の鶏群で異常は認められなかった。成鶏舎においてワクモが大量発生しており、対策として段ボールトラップを週1回交換しているとのことだった。段ボールトラップを回収しワクモを採集すると、トラップ1枚から図9に示すように大量のワクモが採集された。聞き取りの結果、鶏痘ワクチンは全羽接種済みだった。また、夏季に送風機が故障しており、換気は壁際の窓の開放のみで実施していた。

鶏痘発症群の一週間毎の平均産卵数を表すと図10のようになり、産卵率が上昇する日齢と同時期に鶏痘が発症していることが明らかとなった。

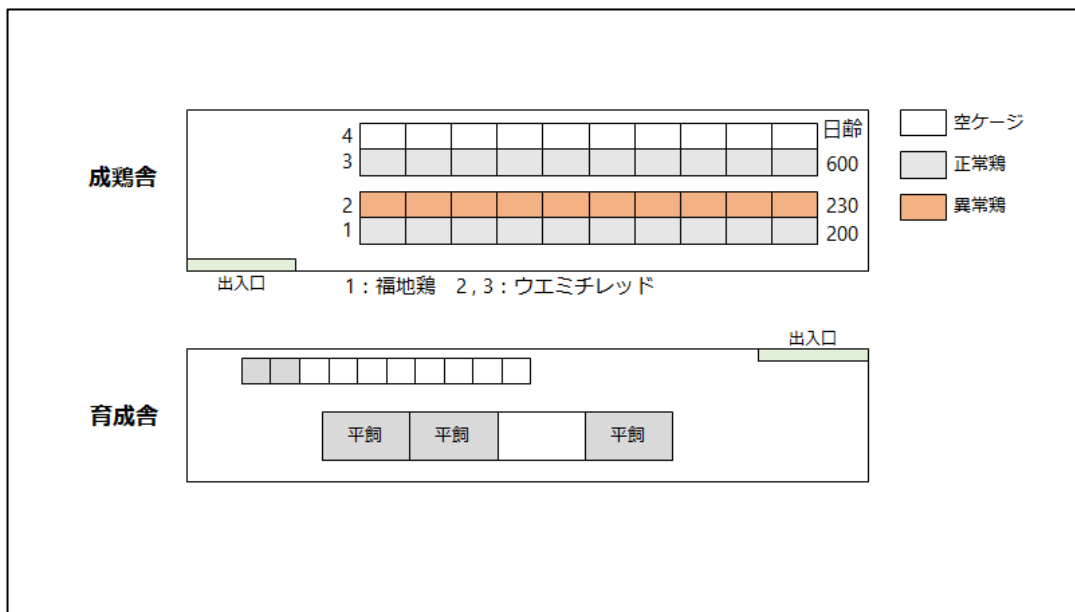


図7 養鶏場模式図



図8 異常鶏

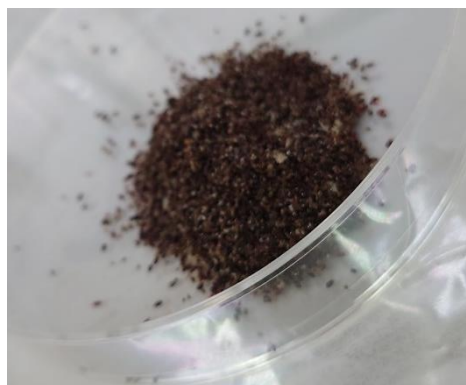


図9 採取したワクモ

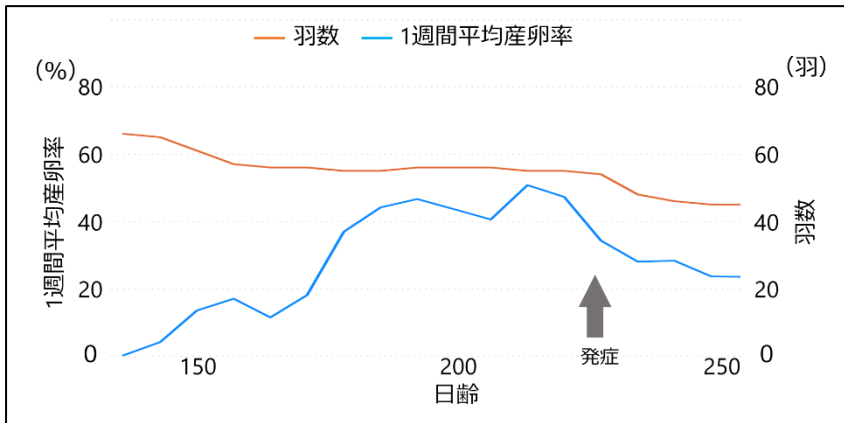


図 10 鶏痘発症群の産卵率の推移

### REV の関与

鶏痘の発生に REV が関与しているか調べるため、鶏痘発症鶏の頭部皮膚乳剤、主要臓器、鶏痘遺伝子が検出された漿尿膜乳剤、ワクモ乳剤、農場で使用しているものと同じ鶏痘ワクチンについて、過去の報告 [4] をもとに、REV の感染に必要な領域である env 領域、REV 全長および 5' LTR 領域について Ex Taq (TaKaRa) を用い遺伝子検査を実施した。その結果、図 11 に示すように、ワクチン以外の検体で REV env 領域が検出され、頭部皮膚および漿尿膜において REV 全長遺伝子も検出された。ワクチンからは 5' LTR 領域のみ検出された。

検体名	FPV (578 bp)	REV env (642 bp)	REV全長 (8000 bp)	REV LTR (530 bp)
頭部皮膚	+	+	+	+
漿尿膜	+	+	+	+
ワクモ	+	+	NT	NT
脳	+	+	NT	NT
心臓	-	+	NT	NT
肺	-	+	NT	NT
肝臓	-	+	NT	NT
腎臓	-	+	NT	NT
脾臓	-	+	NT	NT
鶏痘ワクチン	+	-	-	+

図 11 FPV 遺伝子および REV 遺伝子検査結果 + : 検出 - : 不検出 NT : 未検査

## まとめ・考察

県内一養鶏場の230日齢の鶏において頭部皮膚の発痘および痂皮形成が連続したため病性鑑定を実施した結果、皮膚型鶏痘と診断された。発生農場は鶏痘ワクチン接種しており、発症鶏群以外の鶏群では異常は認められなかった。発生状況調査として農場に立ち入ったところ、ワクモが大量発生しており、発症鶏群の約80%で同様の症状を呈していた。聞き取りの結果、夏に送風機が故障し換気が十分にされていなかったことが判明した。ワクモ対策として段ボールトラップを設置していたため、回収しFPV遺伝子検査を実施したところ、FPV遺伝子がワクモからも検出された。REV遺伝子を調べた結果、REV感染に必要なenv領域が複数検体から検出され、FPV発症鶏の検体からはREV全長遺伝子も検出された。FPVワクチン株にREV遺伝子の挿入が認められた事例も報告されているが[5]、当該農場が使用しているワクチン株にREVのenv領域の挿入は認められなかった。

今回、230日齢の鶏群でのみ鶏痘が発症した。その要因として、ワクモの大量寄生、送風機の故障による暑熱ストレス、産卵初期であったための体力消耗、REVの感染等による免疫力の低下があったと推察した。また、FPVワクチン株へのREV遺伝子の5'LTR領域の挿入も認められ、ワクチン効果への影響も考えられた。過去、国内でFPVの発生でワクモが関与していた事例が報告されている[6]。以上のことから、鶏痘の発生予防として飼養環境の改善によるストレスの軽減およびワクモ対策は重要であり、ワクチン接種を実施している農家に対しても鶏痘の発生予防に関する総合的指導を行う必要があると考える。

## 参考文献

- [1] 竹馬工ら:採卵養鶏場に発生した皮膚型鶏痘とワクモからの鶏痘ウイルスの検出. 鶏病研報 44, 113-117 (2008)
- [2] 湯浅 裏:細網内皮症ウイルスの流行と病原性. 鶏病研究会報, 47 巻 3 号, 149-159 (2011)
- [3] Lee, L.H. and Lee, K.H.: Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of fowl poxvirus infection. J. Virol. Methods, 63, 113-119 (1997)
- [4] Pratik Singh et al.: Reticuloendotheliosis Virus Sequences within the Genomes of Field Strains of Fowlpox Virus Display Variability. JOURNAL OF VIROLOGY, May 2003, p. 5855-5862
- [5] Fadly, A.M. et al.: An outbreak of lymphomas in commercial broiler breeder chickens vaccinated with a fowlpox vaccine contaminated with reticuloendotheliosis virus. Avian Pathol. 25, 35-47(1996)
- [6] 鶏病研究会:近年の鶏痘の発生状況と対策. 鶏病研究会報, 58 巻 4 号, 183-189 (2022)

## 6 新生子牛の腸管外病原性大腸菌 (ExPEC) の敗血症症例の分子生物学的検索

山崎俊雄

### はじめに

病原性関連遺伝子を保有する病原性大腸菌は下痢病原性大腸菌と腸管外病原性大腸菌 (ExPEC) に大きく2つに分類される。下痢病原性大腸菌は腸管内に感染する大腸菌で下痢を引き起こす。一方、ExPEC は腸管外に感染し、敗血症等を引き起こし、付着因子、鉄取込能、毒素等の病原性関連遺伝子を高率に保有するとされている[1, 2]。また、ExPEC は牛での詳細な報告が少なく、感染経路等不明な点が多いとされている[3]。

今回、2農場の新生子牛で ExPEC による敗血症 2 症例について、大腸菌の病原性関連遺伝子保有状況を調査し、症例 2 については子牛と母牛の大腸菌分離株間の関連性を調査するため、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 解析を実施した。また、薬剤感受性試験および基質拡張型  $\beta$  ラクターマーゼ (ESBL) 産生大腸菌判定試験を実施した。さらに、3 種類 (*chuA*, *yjaA*, TSPE4. C2) の遺伝子の保有状況により、大腸菌を4つの系統発生群 (A, B1, B2, D) に分類する方法である系統発生群識別 PCR 法を実施した[4]。

### <症例 1>

#### 発生概要

患畜は令和3年3月21日生まれの黒毛和種、雄で剖検時の体重は43 kgであった。生後すぐに起立困難を呈し、3日齢で死亡し、翌日、病性鑑定を実施した (図1)。



図1. 剖検前の写真

#### 材料および方法

##### 1. 病理組織学的検査

###### ①HE 染色

肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、大脳、小脳、延髄、第一胃、第二胃、第三胃、第四胃、小腸、回盲部、大腸を用いて実施した。

###### ②免疫組織化学的染色 (免疫染色)

HE 染色と同部位を用いて、一次抗体にウサギ抗 *E. coli* 抗体 054 を用いて実施した。

##### 2. 細菌学的検査

肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、大脳を用いて、5%羊血液寒天培地、DHL 寒天培地にそれぞれスタンプし、5%CO<sub>2</sub> 下で 37°C24 時間培養した。分離された菌株を普通寒天培地に塗布し、5%CO<sub>2</sub> 下で 37°C24 時間培養した。培養後、分離菌の同定は API20E

(バイオメリュー・ジャパン株式会社) を用いて行った。

①大腸菌 0 群血清型別検査

大腸菌 0 群血清 (デンカ生研、SSI 社、動衛研) を用いて、血清型別を実施した。

②病原性関連遺伝子の検索

大腸菌株の DNA を InstaGene DNA 精製マトリックス (BIO-RAD 社) にて抽出し、32 種類の病原性関連遺伝子 (付着因子 (*F17A*, *F17A-a*, *F17A-b*, *F17A-c/gafA*, *F17A-d*, *c1pG*, *afaE7*, *afaE8*, *papC*, *fimH*, *eae*<sup>\*</sup>, *F5*<sup>\*</sup>, *F41*<sup>\*</sup>), 侵入性 (*ipaH*, *ibeA*), 鉄取込能 (*iucD*, *iutA*, *fyuA*, *irp1*, *irp2*), 血清耐性 (*traT*), 莢膜 (*kpsMT II*, *kpsMT III*), 毒素 (*cnf1*, *cnf2*, *cdt III*, *cvaC*, *Stx1*<sup>\*</sup>, *Stx2*<sup>\*</sup>, *LT*<sup>\*</sup>, *Sta*<sup>\*</sup>, *Stb*<sup>\*</sup>)) を PCR 法にて検索した (\*印は下痢原性大腸菌の病原性関連遺伝子を示す) (表 1)。

表 1. 大腸菌の病原性関連遺伝子の検索 (PCR 法)

病原性関連遺伝子 (32種類)	
付着因子	<i>F17A</i> [5], <i>F17A-a</i> [5], <i>F17A-b</i> [5], <i>F17A-c/gafA</i> [5], <i>F17A-d</i> [5], <i>c1pG</i> [6], <i>afaE7</i> [7], <i>afaE8</i> [7], <i>papC</i> [8], <i>fimH</i> [8], <i>eae</i> <sup>*</sup> , <i>F5</i> <sup>*</sup> , <i>F41</i> <sup>*</sup>
侵入性	<i>ipaH</i> [9], <i>ibeA</i> [8]
鉄取込能	<i>iucD</i> [10], <i>iutA</i> [8], <i>fyuA</i> [11], <i>irp1</i> [11], <i>irp2</i> [11]
血清耐性	<i>traT</i> [8]
莢膜	<i>kpsMT II</i> [8], <i>kpsMT III</i> [8]
毒素	<i>cnf1</i> [12], <i>cnf2</i> [12], <i>cdt III</i> [12], <i>cvaC</i> [8], <i>Stx1</i> <sup>*</sup> , <i>Stx2</i> <sup>*</sup> , <i>LT</i> <sup>*</sup> , <i>Sta</i> <sup>*</sup> , <i>Stb</i> <sup>*</sup>

③薬剤感受性試験

分離した大腸菌の薬剤感受性試験は、アンピシリン (ABPC)、ペニシリン (PCG)、セファゾリン (CEZ)、カナマイシン (KM)、ストレプトマイシン (SM)、エリスロマイシン (EM)、テトラサイクリン (TC)、第 3 世代セファロスポリン (CAZ:セフトラジジム, CTX:セフォタキシム, CPDX:セフポドキシム), 第 2 世代セファマイシン (FOX:セフォキシチン) について、CLSI (Clinical and Laboratory Standards institute) の方法に準拠し、1 濃度ディスク法にて実施した。

④ESBL 産生大腸菌判定試験

分離した大腸菌の ESBL 判定試験を MASTDISCS Combi AmpC&Es βL ID Set (Mast Group) を用いて実施した。



## 結果

### 1. 剖検

眼球陥凹、頸部の背側筋間および皮下に水腫を認め、肺は暗赤色化し、肺胸膜炎、腹膜炎を認めた。臍帯に約 5 cm 大の暗赤色膠様物を認め、第四胃粘膜は充血し、第四胃内容は水分含有量が多かった (図 2)。



図 2. 剖検写真

### 2. 病理組織学的検査

#### ①HE 染色

細気管支内、肺胞内、肺胸膜に好中球が中等度に浸潤し、肺胞内に線維素析出を伴う水腫様変性を認め、肺胞壁は充うっ血し、肺胸膜、肺胞内に細菌塊を認めた (図 3、図 4)。脾臓、第一胃、第四胃、小腸、回盲部に炎症所見、細菌塊を認めた。

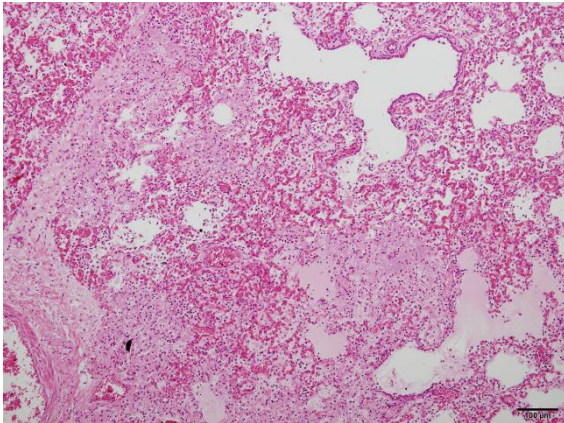


図 3. 肺 H.E 染色 ×100

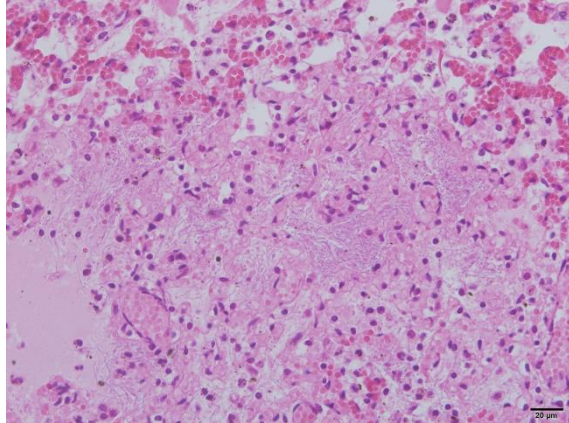


図 4. 肺 H.E 染色 ×400

#### ②免疫染色

肺胸膜病変部、肺胞内、脾臓、第一胃、第四胃、小腸、回盲部に認められた細菌塊に一致して、大腸菌 054 抗原が陽性を示した (図 5、図 6)。

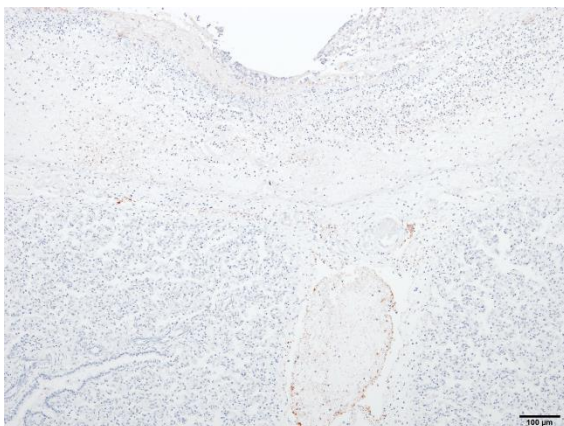


図 5. 肺 免疫染色 ×100

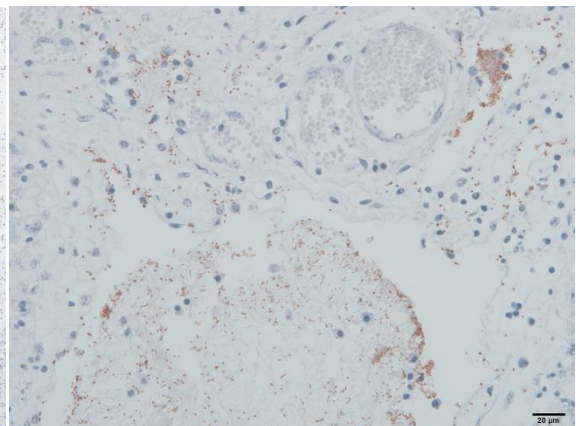


図 6. 肺 免疫染色 ×400

### 3. 細菌学的検査

肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、大脳から溶血を示す大腸菌を分離した。

#### ①大腸菌 O 群血清型別検査

分離した大腸菌の O 群血清型は 054 であった。

#### ②病原性関連遺伝子の検索

すべての株で付着因子 (*fimH*)、鉄取込能 (*fyuA*, *irp1*, *irp2*)、血清耐性 (*traT*)、毒素 (*cnf1*, *Stx1*) 遺伝子を保有していた (表 2)。

表 2. 大腸菌の病原性関連遺伝子保有状況

分離源	付着因子	鉄取込能			血清耐性	毒素	
	<i>fimH</i>	<i>fyuA</i>	<i>irp1</i>	<i>irp2</i>	<i>traT</i>	<i>cnf1</i>	<i>Stx1</i> ※
肝臓	+	+	+	+	+	+	+
脾臓	+	+	+	+	+	+	+
腎臓	+	+	+	+	+	+	+
心臓	+	+	+	+	+	+	+
肺	+	+	+	+	+	+	+
大脳	+	+	+	+	+	+	+

侵入性 (－)、莢膜 (－)

#### ③薬剤感受性試験

分離した大腸菌は、PCG、CEZ、KM、SM、EM で耐性を示した。

#### ④ESBL 産生大腸菌判定試験

分離した大腸菌は、ESBL 陰性であった。

以上より、症例 1 は ExPEC による敗血症と考えられた。

### <症例 2>

#### 発生概要

患畜は令和 4 年 5 月 21 日生まれ (分娩予定日 : 令和 4 年 6 月 22 日) のホルスタイン種、雄で剖検時の体重は 25.5 kg であった。分娩前、母牛の陰部に変色した粘液を認めた。2 日後、羊膜娩出後、分娩介助し、胎子を娩出した。娩出後、子牛は生存していたが、初乳は飲めず、1 日齢で死亡した。その翌日に病性鑑定を実施した。母牛は分娩 4 日後に牛伝染性リンパ腫で淘汰された (図 7)。



図 7. 剖検前の写真



## 材料および方法

### 細菌学的検査

症例 1 とほぼ同様であったが、症例 2 では、材料に患畜の第四胃内容物と母牛の膣スワブ、直腸便、牛床スワブを追加し、方法で子牛と母牛の分離株間でパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 解析を実施した。

## 結果

### 細菌学的検査

肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、大脳、第四胃、母牛の膣スワブ、直腸便、牛床スワブから溶血を示さない大腸菌を分離した。

#### ①大腸菌 O 群血清型別検査

分離した大腸菌の O 群血清は 0181 であった。

#### ②病原性関連遺伝子の検索

すべての株で付着因子 (*fimH*)、毒素 (*cnf2*) を保有しているものもあったが、鉄取込能の関連遺伝子は保有せず、血清耐性 (*traT*) は母牛の直腸便の分離株のみしか保有していなかった (表 3)。

表 3. 大腸菌の病原性関連遺伝子保有状況

分離源	付着因子						侵入性	血清耐性	毒素			
	<i>F17A</i>	<i>F17a-A</i>	<i>F17c-A</i>	<i>c1pG</i>	<i>fimH</i>	<i>eae</i> *			<i>ipaH</i>	<i>traT</i>	<i>cnf2</i>	<i>cdtIII</i>
子牛	肝臓	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
	脾臓	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
	腎臓	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+
	心臓	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
	肺	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
	大脳	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
	第四胃	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
母牛	膣	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+
	直腸便	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
	牛床	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-

鉄取込能 (-)、莢膜 (-)

#### ③薬剤感受性試験

分離した大腸菌は、PCG、CEZ、KM、SM、EM で耐性を示した。

#### ④ESBL 産生大腸菌判定試験

分離した大腸菌は、ESBL 陰性であった。

### ⑤PFGE 解析

子牛の肝臓および第四胃由来分離株、母牛の膣由来分離株間で電気泳動による切断パターンが完全に一致した (図 8)。

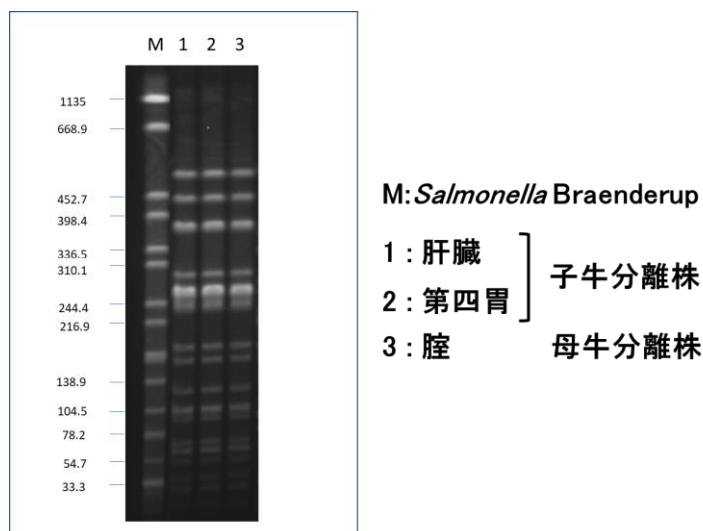


図 8. 供試菌株の XbaI-PFGE 像

以上より、症例 2 は ExPEC による敗血症と考えられた。

### 結果のまとめ

症例 1 では子牛の全身から大腸菌を分離し、病原性関連遺伝子は付着因子、鉄取込能、毒素、血清耐性遺伝子を保有していた。症例 2 では子牛の全身および母牛から大腸菌を分離し、病原性関連遺伝子は付着因子、毒素を保有していたが、血清耐性は母牛の直腸便からの分離株のみしか保有していなかった。症例 1 と 2 を、細菌の感染過程に重要な付着因子、鉄取込能、毒素遺伝子の保有状況で比較すると、症例 1 はすべてを保有し、症例 2 は鉄取込能を子牛も母牛も保有していなかった。症例 2 の PFGE では母子間で切断パターンが完全に一致したことから膣内に常在化した大腸菌が子牛に産道感染した可能性が示唆された (表 4)。

表 4. 分離した大腸菌の性状

症例 No.	分離由来	病原性関連遺伝子						PFGE
		付着因子	鉄取込能	毒素	侵入性	血清耐性	莢膜	
1	子牛(全身)	+	+	+	-	+	-	NT
2	子牛(全身)	+	-	+	+	-	-	一致
	母牛 (膣, 直腸便, 牛床)	+	-	+	+	+	-	

## 農家の衛生指導における課題と対応方法

ExPEC は検索する病原性関連遺伝子の数が多く、検索に時間と手間を要し、保有する病原性関連遺伝子の種類や数が様々で、分類が煩雑なため、農家の衛生指導は遅延し、具体的な衛生対策が不明である。そこで、農家の衛生対策に繋がる大腸菌の分類を迅速にできる検査方法について検討し、系統発生群識別 PCR 法を実施した。この PCR 法は、3 種類 (*chuA*, *yjaA*, TSPE4. C2) の遺伝子の保有状況により大腸菌を 4 つの系統発生群 (A、B1、B2、D) に分類する方法である [4, 13, 14]。病原性の高低は B2 群の病原性で最も高く、次に D 群、次に B1 群または A 群となり、B2 群は他の 3 群に比べ、病原性関連遺伝子の保有数が有意に多いとされている (図 9) [15, 16]。材料に症例 1、2 で分離した大腸菌を用いて PCR を実施した結果、症例 1 は病原性の高い B2 群、症例 2 が病原性の低い B1 群に分類された。

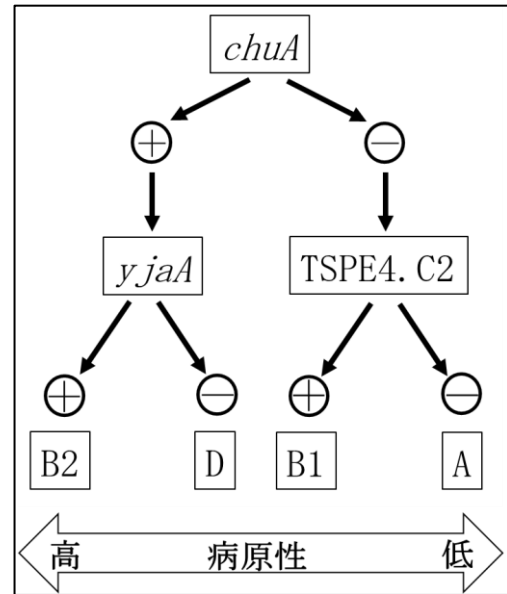


図 9. 系統発生群識別 PCR 法

## まとめおよび考察

系統発生群識別 PCR 法は、細菌の感染過程に重要な病原性関連遺伝子を保有していた症例 1 の分離株で、病原性の高い B2 群に分類された。また、鉄取込能を保有しておらず、血清耐性が母牛分離株のみであった症例 2 の分離株で病原性の低い B1 群に分類され、症例 1、2 とともに大腸菌分離株の性状を反映する結果となった [3]。今回の症例を例にして農場における衛生対策を考えると、病原性が高い大腸菌が分離された症例 1 では、分娩環境の消毒の実施、病原性の低い大腸菌が分離された症例 2 では、初乳給与等の受動免疫を確実にする子牛の免疫向上対策について指導することができた [17, 18]。

以上のことから、系統発生群識別 PCR 法は大腸菌のスクリーニング検査として簡便で有効な方法であり [4]、この検査方法で、大腸菌の性状に応じた衛生対策指導を迅速に実施できると考えられた。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、大腸菌の O 群血清型別検査や PFGE 解析でお世話になりました国立農研機構動物衛生研究部門 人獣共通感染症研究領域 腸管病原菌研究グループ 玉村雪乃先生に深謝します。

## 引用文献

- [1] 菅原 克, 松本 裕一, 壁谷 昌彦, 大西 英高, 稲見 健司, 穂積 愛美, 佐藤 敦

- 子, 井戸 徳子 : 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性関連遺伝子の検索についての報告, 日獣会誌 65, 2012, p. 689-693
- [2] 井上 恭彰, 矢口 弘美, 平松 美裕子, 和田 好洋 : 臍帯炎を伴った新生子牛の腸管外病原性大腸菌による化膿性髄膜炎, 日獣会誌 75, 2022, e51~e55
- [3] 水谷 恵子, 山本 香織, 井田 正巳 : 敗血症を呈した牛から分離された大腸菌の病原性関連遺伝子の検索, 日獣会誌 71, 2018, p. 307~310
- [4] OLIVIER CLERMONT, STEPHANE BONACORSI, and EDOUARD BINGEN : Rapid and Simple Determination of Escherichia coli Phylogenetic Group, Applied and Environmental Microbiology, Oct. 2000, P. 4555-4558
- [5] YOLANDE BERTIN, CHRISTINE MARTIN, ERIC OSWALD, and JEAN-PIERRE GIRARDEAU : Rapid and Specific Detection of F17-Related Pilin and Adhesin Genes in Diarrheic and Septicemic Escherichia coli Strains by Multiplex PCR, JOURNAL OF MICROBIOLOGY, Dec. 1996, p. 2921-2928
- [6] Yolande Bertin, Christine Martin, Jean-Pierre Girardeau, Pierre Pohl, Michel Contrepois : Association of genes encoding P fimbriae, CS31A antigen and EAST 1 toxin among CNF1-producing Escherichia coli strains from cattle with septicemia and diarrhea, FEMS Microbiology Letters 162(1998)235-239
- [7] CHANTAL LE BOUGUENEC, LILA LALIOUI, LAURENCE DU MERLE, MABEL JOUVE, PASCALE COURCOUX, SAEID BOUZARI, RANGARAJ SERVARANGAN, BOGDAN J. NOWICKI, YVES GERMANI, ANTOINE ANDREMONT, PIERRE GOUNON, and MARIE-ISABELLE GARCIA, Characterization of AfaE Adhesins Produced by Extraintestinal and Intestinal Human Escherichia coli Isolates: PCR Assays for Detection of Afa Adhesins That Do or Do Not Recognize Dr Blood Group Antigens, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, May 2001, p. 1738-1745
- [8] James R Johnson and Adam L. Stell : Extended Virulence Genotypes of Escherichia coli Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise, The Journal of Diseases, 2000; 181 : 261-72
- [9] K. R. S. Aranda, U. Fagundes-Neto, and I. C. A. Scaletsky : Evaluation of Multiplex PCRs for Diagnosis of Infection with Diarrheagenic Escherichia coli and Shigella spp, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Dec. 2004, p. 5849-5853
- [10] Anna Nowaczek, Marta Dec, Dagmara Stepien-Pysniak, Renata Urban-Chmiel, Agnieszka Marek and Pawel Rozanski : Antibiotic Resistance and Virulence Profiles of Escherichia coli Strains Isolated from Wild Birds in Poland, pathogens 2021,10,1059
- [11] H. KARCH, S. SCHUBERT, D. ZHANG, W. ZHANG, H. SCHMIDT, T. OLSCHLAGER, and J. HACKER, Infection : A Genomic Island , Termed High-Pathogenicity

- Island, Is Present in Certain Non-0157 Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Clonal Lineages, Immunity, Nov. 1999, p. 5994-6001
- [12] Istvan Toth, Frederique Herault, Lothar Beutin, and Eric Oswald : Production of Cytolethal Distending Toxins by Pathogenic Escherichia coli Strains Island from Human and Animal Sources: Establishment of the Existence of a New cdt Variant (Type IV), JOURNAL OF MICROBIOLOGY, Sept. 2003, p. 4285-4291
- [13] Ishii S, Meyer K.P, Sadowsky M.J : Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of Escherichia coli strains from diverse human and animal sources, Appl Environ Microbiol 73, 2007, 5703-5710
- [14] Wang L, Wakushima M, Aota T, Yoshida Y, Kita T, Maehara T, Ogasawara J, Choi C, Kamata Y, Hara-Kudo Y, Nishikawa Y : Specific Properties of Enteropathogenic Escherichia coli Isolates from Diarrheagenic Patients and Fecal Specimens from Cattle, Swine, and Healthy Carriers in Osaka City, Japan, Appl Environ Microbiol, 79, 2013, 1232-1240
- [15] Dora Stojevic, Andrea Humski, Marina Mikulic, Vesna Dobranic, Irena Reil, Sanja Duvnjak, Miroslav Benic, Relja Beck, Zeljko Cvetnic : Prevalence of virulence genes among Escherichia coli strains isolated from food and carcass swabs of different animal origins in Croatia, J Vet Res 66, 2022, 395-402
- [16] Mitchell N.M, Johnson J.R, Johnstone B, Curtiss R.3rd, Mellata M : Zoonotic potential of Escherichia coli isolates from retail chicken meat products and eggs, Appl Environ Microbiol, 81, 2015, 1177-1187
- [17] 渡戸 英里, 稲葉 七巳, 小松 徹也, 杉江 建之介, 井田 雄三, 芝原 友幸, 楠本 正博 : 腸管外病原性大腸菌による哺乳豚の大規模死亡事例, 日獣会誌 74, 2021, p. 623~630
- [18] 木崎 あゆみ, 高橋 真紀, 昆野 雄介, 熊谷 芳浩, 昆野 勝, 佐藤 裕夫 : 腸管外病原性大腸菌 0166 による哺乳豚の線維素化膿性髄膜炎, 日獣会誌 67, 2014, p. 747~753