

令和 5 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 6 年 8 月
福井県家畜保健衛生所

目 次

第Ⅰ部

- Ⅰ 県内の平飼い採卵鶏農場の線虫寄生対策
友膳弘喜 . . . Ⅰ
- 2 過去 20 年間の山羊病性鑑定成績
二本木俊英 . . . 5
- 3 豚熱発生から 4 年、清浄化への取り組み
竹内隆泰 . . . 10
- 4 定時受精卵移植を活用した若狹子牛生産の試み
西川清文 . . . 16
- ◎ 5 県内一酪農場で発生した牛ウイルス性下痢（BVD）について（第Ⅰ報）
清水誠也 . . . 21

第Ⅱ部

- 6 県内一養鶏農家におけるクロストリジウム・パーフリンゲンス（Cp）感染症と
鶏コクシジウム病の併発例
木村美貴 . . . 25
- 7 県内一養豚場における豚増殖性腸炎の発生
新田 愛 . . . 34
- 8 県内一養豚場の豚熱ワクチン接種時期の検討
落井真史 . . . 39
- 9 県内で発生した過去 20 年間の地方病性牛伝染性リンパ腫症例のまとめと一考察
武田佳絵 . . . 43

◎ 第 65 回全国家畜保健衛生業績発表会選出演題

○ 第 65 回東海北陸ブロック家畜保健衛生業績発表会選出演題

はじめに

近年、養鶏現場では、アニマルウェルフェアの観点や、嗜好性の多様化によって、生産者・消費者ともに、より自然に近い形の飼養形態である平飼い飼養に価値を見出す動きがある。一方で、平飼い飼養の問題の一つに寄生虫病があげられる。鶏に寄生する寄生虫の一つに線虫類があり、その代表的なものとして、鶏回虫と鶏盲腸虫が知られる。

線虫類について

鶏回虫は中型で小腸に寄生し、基本的には無症状であることが多いが、重度寄生の場合、下痢といった消化器症状や発育不良や産卵率低下を起こす。またごくまれに鶏卵内に虫体がみられる。鶏盲腸虫は小型で盲腸に寄生し、鶏回虫と似た症状をみせる。この2種の線虫は虫卵の形態や外界での発育も非常に酷似し、鶏の糞便と共に排出された虫卵は、その時点では感染力はなく、成熟するまでに2～3週間必要であるが、好適発育温度の30度以上では最短7日で成熟するとされ、初夏から寄生率が高くなるといわれている。ミミズやヤスデ類が待機宿主となるが、必ずしも必要ではなく、環境中の成熟卵や成熟卵を含んだ待機宿主を経口摂取することで寄生が成立する。虫卵との接触を完全には断ち切ることが難しいことから、平飼い飼養で問題となる。

一般的な対策としては、虫卵が成熟するよりも短い期間での定期的な除糞、敷料の交換、消石灰を混ぜ込んでの土壌の消毒が効果的とされる。駆虫剤もよく効くとされているが、現在採卵鶏に使えるものはなく、鶏を飼養する前に線虫に汚染されていない環境を用意することが重要となる[1]。

事例：A農場（図1）

令和5年10月、飼養羽数1,800羽規模の県内の平飼い採卵鶏農場のA農場から当所に「卵の中から回虫が出てきた」と相談があった。聞き取りを実施したところ、加工場で卵を割った際に虫体が出てきた、9月中旬からくしゃみが徐々に農場全体に広がっている、とのことだった。鶏舎内に立ち入ると下痢便のほか、くしゃみや流涙の臨床症状を呈した生体を確認（図2、3）し、糞便検査および解剖を実施した。

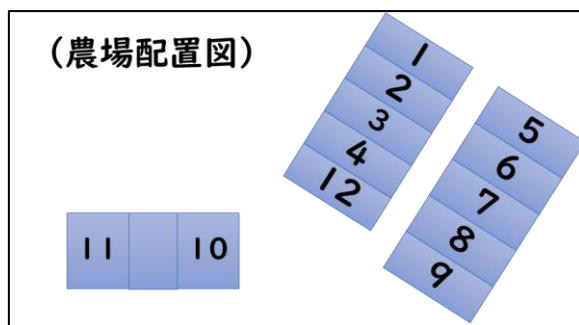


図1 農場配置図



図2 鶏舎内糞便（下痢）



図3 流涙

材料および方法

1 飼養群あたり 3～6 個の比較的新鮮な落下糞便を採取し混和、計 12 群から採材した。マックマスター法で虫卵数を測定した。なお、鶏回虫、鶏盲腸虫の虫卵は形態が酷似し判別が困難なため、合わせて線虫卵とした。

結果

飼養している全 12 群のうち 10 群から線虫卵を検出し、最も多い群で 2,600EPG であった（表 1）。

解剖では、10 羽中 8 羽の小腸内に線虫の寄生を確認し、重度のものでは、十二指腸から空腸、回腸まで虫体が充満していた。なお、有意な菌、ウイルスは検出されなかった。

表 1 A 農場の各群の EPG

群	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
EPG	1,600	1,400	2,200	2,600	0	200	1,000	500	300	600	0	800

対策とその効果

結果を受け、農場には次のことを指導した。飼養中の群については、短い期間での定期的な除糞、消石灰による土壌の消毒、新たに導入する際には表層の土や敷料を除去し消石灰を散布、そこに消石灰を混ぜ込んだ敷料を新たに入れることや駆虫効果の報告 [2] がある生にんにくの投与を提案した。生にんにくの投与は、バケツ 1 杯の餌に対してレンゲ 1 杯分の市販すりおろし生にんにくを添加し、連続 5 日間にんにくを添加した餌を給与、続く 9 日間は添加なしの餌を給与し、この 14 日間を 1 クールとして 3 クール実施した。

同年 12 月、同様の糞便検査を実施し効果を確認した。鶏の出入りがなかった 6 群で比較すると、EPG が最大で 2600 あったものが、200～500 にまで減少していた（表 2）。また、下痢が減少し、くしゃみも改善した。

表2 A農場の対策前後でのEPG比較

群	1	2	3	4	6	7
対策前 EPG	1,600	1,400	2,200	2,600	200	1,000
対策後 EPG	300	300	300	500	200	500

事例：他農場

A農場で線虫の寄生が確認されたことを受け、県内の他の平飼い採卵鶏農場でも調査を実施した。

材料および方法

令和5年10月から令和6年1月の期間で、県内平飼い採卵鶏6農場を対象とした。1農場当たり1〜2群で採材し、調査1と同様に1群あたり3〜6個の落下糞便を混和し、マックマスター法で虫卵検査を実施し、鶏回虫卵、鶏盲腸虫卵を合わせて線虫卵とした。

結果

6農場のうち4農場で線虫の寄生を確認した（表3）。なお、すべての農場で下痢等の臨床症状は見られなかった。

表3 県内6農場のEPG

農場	B	C	D	E	F	G
EPG	0	150	3,750	100	0	500

まとめ

採卵鶏に使用できる駆虫剤はないものの、鶏舎内の定期的な除糞、清掃、消毒といった環境面と生にんにく投与という飼料の面との総合的な対策によって、線虫卵数の減少、臨床症状の緩和という効果が得られた。

また、今回の調査では、約7割の平飼い採卵鶏農場で線虫の寄生が確認でき、線虫寄生が非常に身近な問題であることがわかり、調査をしていない農場でも寄生している可能性が高いことが示唆された。そのため、小規模を含めた県内全養鶏農場に対して、「家保だより」を通して情報提供、注意喚起を行った（図4）。

現在、採卵鶏に使用できる駆虫剤はなく、先述した予防、対策が何よりも重要であり、衛生的な飼養管理は寄生虫に限らず、鳥インフルエンザをはじめとした他の感染症予防としても効

家さんの疾病発生と対策

令和5年に県内の家さん農場で発生した疾病とその対策についてご紹介します。どちらも平飼い飼育での発生でした。

★鶏クロストリジウム・パーフリンゲンス感染症（回虫死性腸炎）

クロストリジウム・パーフリンゲンス（Cp）感染症は消化器障害を起こす細菌感染症です。Cpは土壌や下水といった環境のほか、糞を含む飼料の飼養内に（多くはありませんが）存在しています。様々な要因によりCpが異常増殖することで発症します。代表的な要因はコアシジウムの感染で、他に伝染性ファブリカウイルス感染症やコレラ菌による免疫低下、食物繊維の多い消化しにくい餌、タンパク質を多く含む魚粉などの餌、ストレス（暑熱、移動、産卵、衛生管理の不備など）によってもCpが異常増殖し、発症します。発症すると食欲不振、沈鬱、嘔吐、下痢等の症状を呈し、急性の経過をたどり、著しく衰弱した鶏は短時間のうちに死亡しますが、感染に耐えて慢性的な下痢、発育不良となる個体もいます。

本県で5月に発生した農場周囲を調べたところ、周囲のドブ、ドブの中にいた巻貝、イトミミズ、雑草の根っこに集いた土からCpが検出されており、12月になっても発生家さん舎の落下糞、周農場の別の家さん舎の落下糞からCpが検出されています。**環境に普遍にいる菌です。餌で摂れた野菜などを食べる場合は糞を除去して、よく洗ひましょう。**

発生した際の対策としては、使用可能な殺菌剤なら抗菌剤の投与により被害を最小限に抑えた後、推測される発生要因の除去に努め、適切な飼養衛生管理を行うことが重要です。家さん舎の十分な洗浄と、芽胞に有効な消毒薬を用いた消毒（ヨード剤、ホルマリン燻蒸、火炎消毒、消石灰散布）で早期終息および再発の防止は十分に可能です。

★鶏回虫症

鶏に感染する寄生虫は数多く知られていて、鶏回虫はその中でもよく見られるものの一つです。鶏の消化管、特に小腸に寄生し、オスで3〜8cm、メスで6〜12cmにもなります。少数の寄生では無症状ですが、濃厚感染すると下痢や血便などの消化器症状や、貧血、発育不良、産卵率低下を引き起こし、他の病気にかかりやすくなります。またごく稀に、**卵のうちに鶏回虫が進入することもあります。**

鶏回虫はその生活から、**特に平飼い飼育で問題**になります。寄生された鶏の糞便中に回虫の卵が含まれ、土壌やミミズなどの中間宿主内で生存し、それを口にした他の鶏へと感染が広がってしまいます。糞便と一緒に排出された直後の回虫卵には感染する能力がなく、土壌中だと21〜28日で成熟し感染能力を獲得します。（図）

図 鶏回虫の生活環

図4 家保だより

果的である。線虫寄生は初夏から増えるため、鳥インフルエンザシーズンの冬季だけでなく年間を通じた継続した情報提供と、飼養衛生管理指導が重要である。

参考文献

- [1] 猪熊壽ら：養鶏における生産システムと疾病の防除対策：新基本方針対応型獣医療提供マニュアル
- [2] 井上恵美ら：卵黄色低下を示した放牧・平飼い鶏の寄生虫寄生．鶏病研究会報 43 巻 3 号 154-160 （2007）

2 過去 20 年間の山羊病性鑑定成績

家畜保健衛生所 二本木俊英

はじめに

近年、除草や愛玩、乳製品加工を目的として山羊を飼養するケースが全国的に増えており、福井県内においても飼養戸数、頭数とも増加傾向にある（図 1）。しかしながら、飼養管理に関する知識が不十分なことから疾病に罹患し死廃に至る事例が少なくないものと考えられる。このため、過去 20 年間に家畜保健衛生所（以下、家保）が実施した 190 件、320 頭の山羊病性鑑定成績について表 1 に示す項目について検討し、若干の考察を加えたのでその概要を報告する。

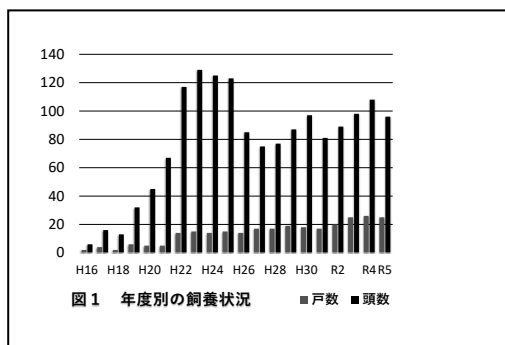
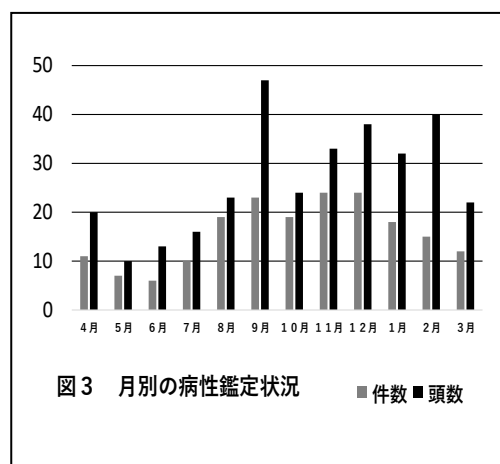
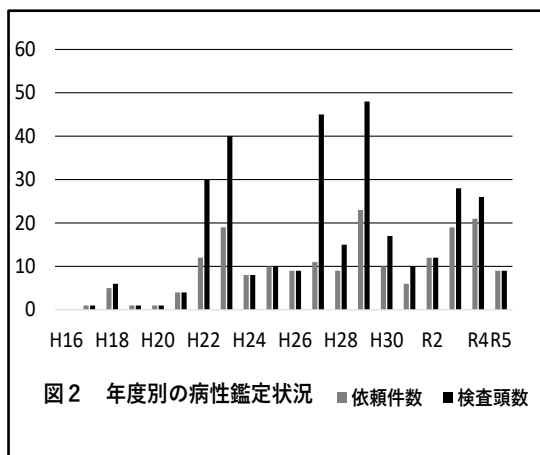


表 1 検討した内容
<ul style="list-style-type: none"> ・平成16年4月～令和5年12月の山羊病性鑑定について ・検討した項目 <ul style="list-style-type: none"> ✓ 年度別、月別の病性鑑定依頼状況 ✓ 依頼目的別の病性鑑定状況 ✓ 月別の死亡状況 ✓ 死因の分類、伝達性海綿状脳症（TSE） ✓ 糞便の寄生虫検査（虫卵数、オーシスト数） ・多頭飼育牧場（A牧場、B牧場）の病性鑑定状況 <ul style="list-style-type: none"> ✓ 飼養状況、死亡状況 ✓ 寄生虫症による損益

病性鑑定概要

年度別の病性鑑定の依頼は、図 2 のとおりで、20 年間で 190 件、320 頭の依頼があった。飼養戸数、頭数の増加に伴い、依頼件数、頭数とも増加している。平成 22 年、23 年、27 年および 29 年は、1 件当たり複数の糞便の寄生虫検査の依頼があったため突出した検査頭数となった。

月別の病性鑑定依頼状況は図 3 のとおりで、6 月以降の夏場にかけて依頼件数、頭数とも増加し、依頼件数は 12 月以降 5 月にかけて徐々に減少する傾向がみられた。また、9 月以降は、糞便の寄生虫検査の依頼の増加に伴い検査頭数の増加がみられた。



依頼目的別の病性鑑定依頼状況を図4に示した。依頼のほとんどが、死因の究明と下痢の原因究明を含めた糞便の寄生虫検査であった。

病性鑑定成績

図5は月別の死亡状況である。6月以降に死亡頭数が増加し、12月にピークに達した後、翌年春先にかけて徐々に減少する傾向がみられた。寄生虫症による死亡も同じような傾向がみられた。内訳は、寄生虫症による死亡例が49頭、寄生虫症以外の死亡例が83頭であった。

家畜伝染病予防法（家伝法）第5条に基づくTSE検査（図6）は、平成18年以降80頭を検査し、すべて陰性を確認している。なお、検査は検体を農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生検査部門に送付し実施を依頼している。

132頭の死因の内訳（表2）は、寄生虫症が49頭、衰弱死が18頭、寄生虫症以外の感染症が16頭、胃腸疾患が16頭、飼養管理失宜が14頭、その他の疾患が19頭であった。

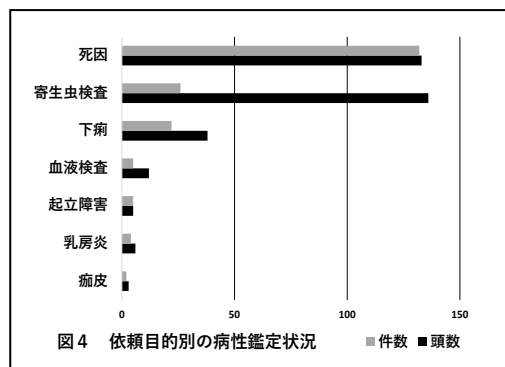


図4 依頼目的別の病性鑑定状況

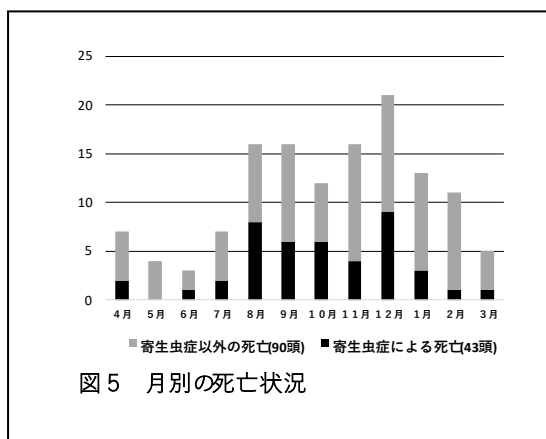


図5 月別の死亡状況

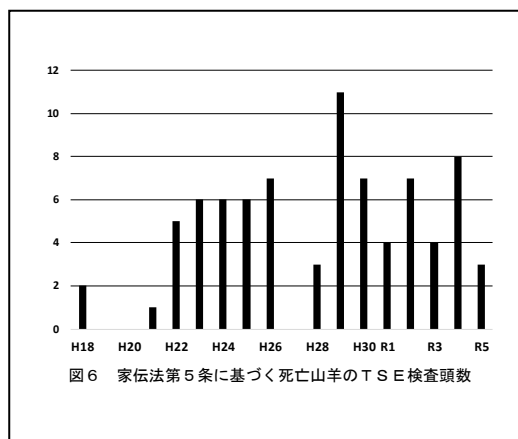


図6 家伝法第5条に基づく死亡山羊のTSE検査頭数

表 2 死因の内訳				
大分類	小分類	頭数	小計	合計
寄生虫症	消化管管内線虫症	29	49	132
	消化管管内線虫症 +コクシジウム症	8		
	コクシジウム症	3		
	肝蛭症	4		
	腰麻痺	3		
	鞭虫症	2		
	衰弱死			
寄生虫以外の感染症	大腸菌症	4	16	
	肺炎	4		
	化膿性脳脊髄炎	3		
	山羊関節炎・脳炎	2		
	心嚢炎	1		
	敗血症	1		
	クロストリジウム感染症	1		
胃腸疾患	第一胃食滞	8	16	
	鼓張症	4		
	嵌頓ヘルニア	1		
	第四胃右方変位	1		
	腸重積	1		
	急性胃腸炎	1		
	飼養管理失宜	栄養失調		
事故死		4		
窒息死		3		
溺死		1		
その他の疾患	脱水症	7	19	
	中毒	4		
	子宮破裂	2		
	分娩事故・産褥熱	1		
	尿路結石	1		
	尿毒症	1		
	熱中症	1		
	リンパ腫	1		
	多臓器不全	1		

糞便（172 検体）の寄生虫検査の結果（図 7）、3,000 以上の EPG, OPG を検出した割合は消化管内線虫卵で 18.6%、コクシジウムオーシストで 8.1%、乳頭糞線虫卵で 4.1%、捻転胃虫卵で 0.6%であった。

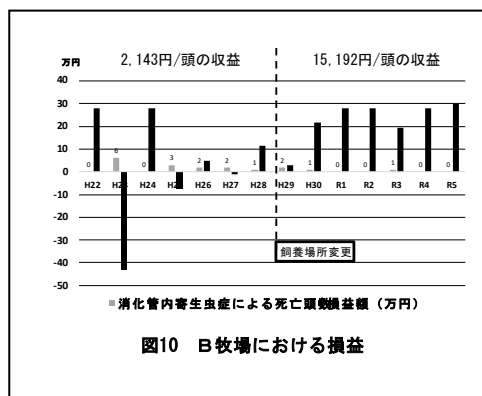
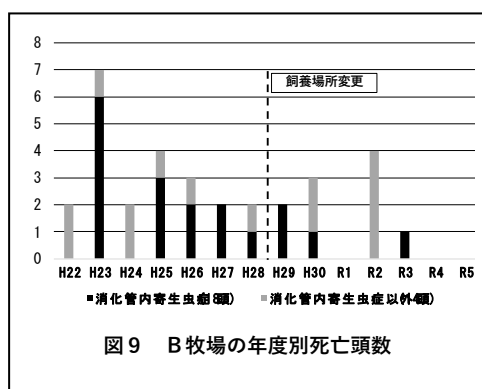
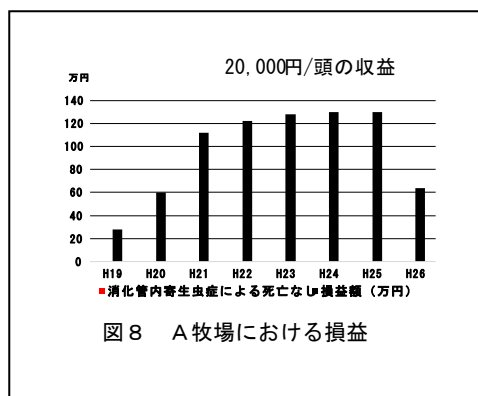
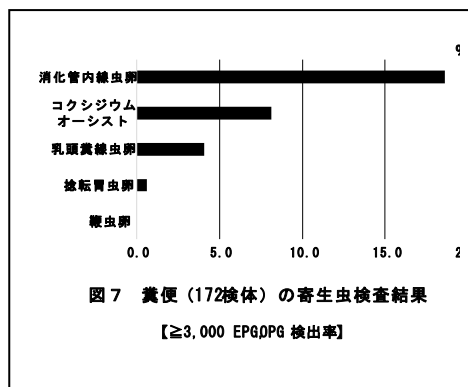
多頭飼育牧場（A 牧場、B 牧場）の状況

最大 65 頭を飼養していた A 牧場では、平成 19 年から平成 26 年までの 8 年間の飼養期間中、死亡したのは 6 頭（死因は分娩事故 3 頭、胃腸疾患 2 頭、化膿性脳炎 1 頭）のみで寄生虫症による死亡はみられなかった。A 牧場では、家畜改良センター長野牧場と連絡を密にとり飼養管理のアドバイスを受けており、このことが適正な飼養管理と疾病の発生予防につながったものと考えられた。一方、B 牧場は平成 22 年の飼養開始以来、常時 15 頭を飼養する牧場で、飼養開始以降、32 頭が死亡し、そのうち 18 頭が消化管内寄生虫症が原因で死亡していた。平成 29 年の飼養場所変更後は次第に死亡する山羊も減少し、令和元年以降、寄生虫症で死亡したのは 1 頭のみであった。

この 2 つの牧場について、生産された山羊を販売（50,000 円/頭）したと仮定するとともに、支出として駆虫薬、消毒薬などの衛生費（5,000 円/頭）および損失として死亡した山羊（50,000 円/頭）を想定し、消化管内寄生虫症による死亡がどの程度損益に影響するかを大まかに試算してみた。

A 牧場では消化管内寄生虫症による死亡がなかったため、支出は衛生費のみで 1 頭当たり換算すると 2 万円の収益があったものと考えられた（図 8）。

一方、B 牧場では寄生虫症による死亡が続いたため（図 9）損失が大きく、利益が少ない年度が続いたため、飼養場所変更前の 7 年間では、2,000 円程度の収益しか見込めなかったものと考えられた。飼養場所変更後は線虫症による死亡も減少し、黒字が続いたことから 15,000 円の収益があったものと考えられた（図 10）。



以上のことから、消化管内寄生虫症の発症を抑えることが死廃を防ぐ重要なポイントで、生産性収益性の増大に大いに寄与するものと示唆された。

まとめ

家保には、新規で山羊を飼いたいとの相談や既に飼育を始めているので定期報告書を提出したいとの申し出や相談が増えつつある。相談者に対しては、表 3 に示す助言や指導を行っている。今後も、飼育に関する研修会を開催するなど知識の普及に努め、病性鑑定事例から得られた知見を飼養者に還元するとともに、効果的衛生対策の取り組みにより事故のない飼養衛生管理の啓発に努めていきたい。

表 3 相談者に対する助言、指導

- 健康状態（食欲、元気）観察
- 糞便の状態（下痢、血便）観察
- 飼育場所の消毒
- 定期的駆虫
- 踏み込み消毒槽の設置、消毒薬の交換
- 放牧地周辺の雑木の伐採
- 放牧地の有毒植物や異物の除去
- 管理区域への飼養者以外の立入制限
- 定期報告書の提出

参考文献

- [1] 家畜保健衛生事業計画・事業成績（平成 16 年度～令和 4 年度）
- [2] 猪熊壽：家畜診療，61：283-291
- [3] 山羊の飼養衛生管理マニュアル：家畜改良センター長野牧場業務課

3 豚熱発生から4年、清浄化への取り組み

家畜保健衛生所 竹内隆泰 清水誠也

はじめに

平成30年9月に岐阜市で国内26年ぶりに豚熱が発生した。さらに、野生イノシシの豚熱の感染を確認したため、本県においても野生イノシシの豚熱の検査を開始した。

令和元年7月、大野市、越前市の捕獲野生イノシシで豚熱の感染を確認した。
7月29日、越前市内養豚場で県1例目の豚熱が発生し、8月12日、近隣の養豚場で2例目が発生した。

9月から国のワクチンベルト計画により南越前町以南で令和元年度から2年度にかけて野生イノシシに対する経口ワクチン散布が実施された。

10月24日、県内の飼育豚（ペット含む）に対する豚熱ワクチン接種が開始され、現時点で、県内養豚場での豚熱の続発は無い。

本県における豚熱対策は、表1のとおりである。養豚場対策として、飼養衛生管理基準の遵守指導で豚舎内に「ウイルスを入れない」、豚熱ワクチン接種による「感染防止」である。

野生イノシシ対策としては、野生イノシシの豚熱検査で「感染状況把握」と「養豚場への情報提供、注意喚起」、経口ワクチン散布で「感染イノシシを減らす」、野生イノシシの捕獲強化で「野生イノシシの絶対数を減らす」である [1]。

材料および方法

今回、表2のとおり野生イノシシの検査結果（PCR検査、ELISA検査）について検討した

ので概要を報告する。検討項目は、1.豚熱感染頭数、感染率の推移、2.豚熱感染率と抗体保有率と感受個体率の関係、3.野生イノシシへの経口ワクチン散布の効果検証となる。

表1 豚熱対策（全国共通）

養豚場対策	
・飼養衛生管理基準の遵守	➡ 豚舎内にウイルスを入れない 防護柵、消毒、畜舎専用長靴
・豚熱ワクチン接種	➡ 免疫による豚熱感染防止 年2回の抗体価確認と追加接種 （抗体保有率80%以上維持）
野生イノシシ対策	
・野生イノシシ豚熱検査	➡ 感染状況の把握 養豚場へ情報提供と注意喚起
・経口ワクチン散布	➡ 感染イノシシの減少
・野生イノシシ捕獲強化	➡ 野生イノシシ絶対数の減少

表2 野生イノシシ検査結果の検討

期 間： H30年9月～R5年12月	
地 域： 県内全域	
検査材料： 死亡イノシシ(扁桃、脾臓、腎臓、血液) 20検体 捕獲イノシシ(血液) 2,492検体	
検査方法： 抗原検査(PCR法) 2,512検体 抗体検査(ELISA法) * 抽出検査 血液1,603検体	
検討項目： 豚熱感染頭数、感染率の推移 豚熱感染率と抗体保有率と感受個体率の関係 野生イノシシへの経口ワクチン散布の効果検証	

結果

図1は、年度別の感染頭数と感染率を示したものである。感染頭数は令和2年度が71頭と最も多く、感染率は令和3年度が最も高く13.6%となった。令和4年度は、感染頭数、感染率共に減少したが、令和5年度に再び増加傾向となった[2]。

図2は、感染率、抗体保有率、感受個体率の関係を示したものである。PCR(+)の場合、ELISA(+)(-)ともに感染個体となる。PCR(-)の場合、ELISA(+)は免疫個体、ELISA(-)は感受個体となる[3]。

感染個体は後に死亡するか回復して免疫個体となり豚熱に感受性は無い、免疫個体は豚熱に感受性は無い、感受個体だけが豚熱に感受性有となり、感受個体率が低下すると流行が収まる。

通常、感受個体率=PCR(-)ELISA(-)個体/ELISA検査数×100であるが、今回、ELISA検査が抽出検査のため、感受個体率=100-抗体保有率-感染率×0.35とした。PCR(+)個体でELISA検査の内訳を見たところ(+):65%、(-)35%であったため、感染率に0.35をかけて引くことにより感受個体率を推計した。

そこで、地域ごとに感染率、抗体保有率、感受個体率の推移を比較した。図3は最初に感染したと考えられる奥越、高志、坂井地区の抗体保有率、感染率、感受個体率の推移である。3地区ともに、令和元年度すでに感染率、抗体保有率が高い状況であった。また、感受個体率が約30%で、感染する野生イノシシが少なくなっていた。令和2年度には3地区共に感染率は0~5%に低下したが、奥越、高志地区では5年度に感染率の再上昇が認められた。

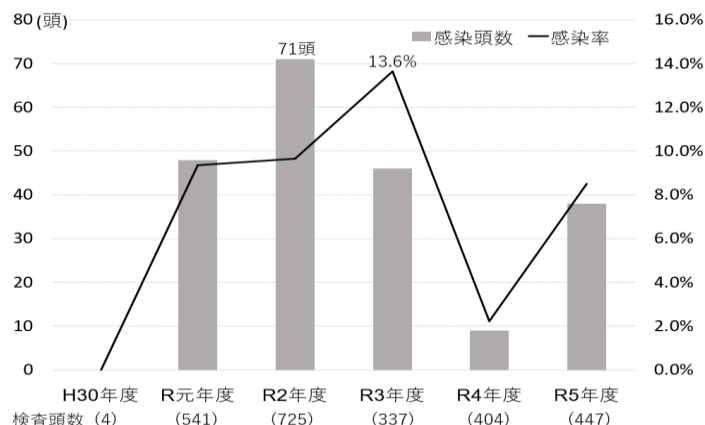


図1 野生イノシシの感染頭数・感染率の推移

	PCR(+)	PCR(-)
ELISA(+)	感染個体	免疫個体
ELISA(-)	感染個体	感受個体

感染個体⇒後に死亡or免疫獲得、豚熱に感受性なし

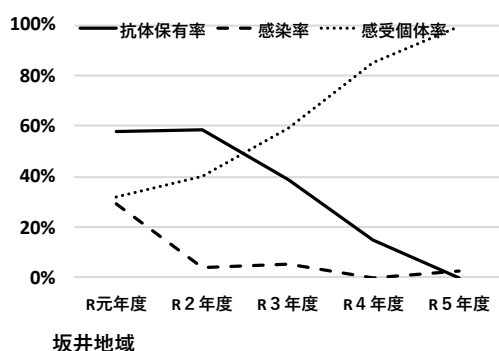
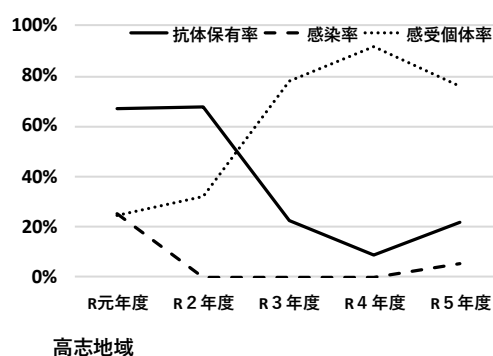
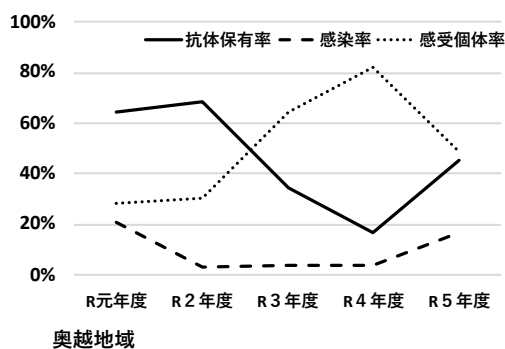
免疫個体⇒豚熱に感受性なし
(感染抗体+ワクチン抗体 区別不可)

感受個体⇒豚熱に感受性有、感受個体率が低下すると流行が収まる

感受個体率=100-抗体保有率-感染率×0.35*

* PCR(+)のうちELISA(+):65%、ELISA(-):35%による補正

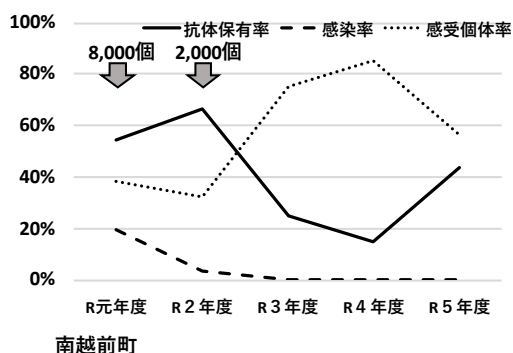
図2 感染率と抗体保有率と感受個体率の関係



奥越、高志、坂井地域

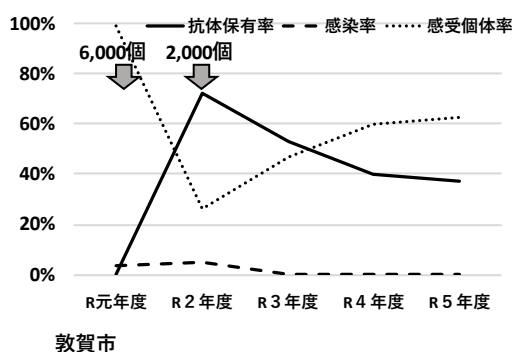
- ・元年度の抗体保有率、感染率が高い
⇒ 豚熱侵入が半年から1年前の可能性
- ・元年度の感受個体率が30%
⇒ 2年度以降感染率は低下した
- ・奥越、高志は、5年度に感染率再上昇

図3 最初に感染した地域の抗体保有率・感染率・感受個体率の推移



南越前町

- ・元年度、2年度に10,000個の経口ワクチン散布
- ・感染率は元年度ピークに減少、3年度以降0%維持
- ・ワクチン後、抗体保有率上昇、感染率下降 ⇒ **ワクチンの効果認める**



敦賀市

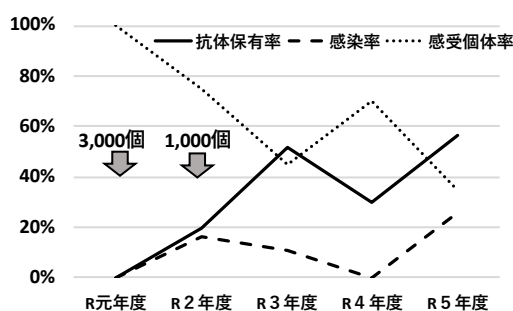
- ・元年度、2年度に8,000個の経口ワクチン散布
- ・感染率は元年度、2年度5%以下、3年度以降0%維持
- ・ワクチン後、感染率低く、抗体保有率上昇 ⇒ **ワクチンの効果認める**

図4 ワクチン個数の多い市町の抗体保有率・感染率・感受個体率の推移

図4は、ワクチンベルト計画のスタートで比較的ワクチン散布個数の多かった南越前町、敦賀市の推移である。南越前町は経口ワクチンを元年度、2年度に10,000個散布、

感染率は元年度をピークに減少し、3年度以降0%を維持した。ワクチン後、抗体保有率は上昇、感染率は下降し、ワクチンの効果が認められた。敦賀市は、経口ワクチンを元年度、2年度に8,000個散布、感染率は、元年度、2年度5%以下、3年度以降0%を維持した。ワクチン後、感染率は低く抑えられ、抗体保有率が70%に上昇し、ワクチンの効果が認められた。

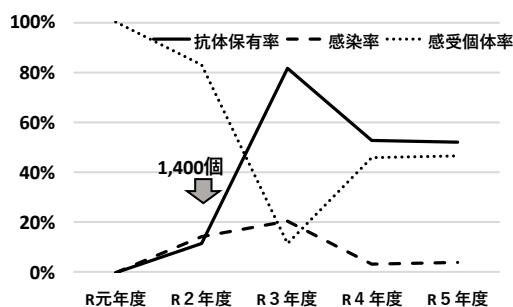
図5は、ワクチンの散布個数の少なかった美浜町、若狭町の推移である。美浜町は、元年度、2年度に4,000個の経口ワクチンを散布したが、ワクチン後、感染率、抗体保有率はともに上昇し、ワクチンの効果は不明であった。若狭町は、2年度に1,400個の経口ワクチンを散布したが、ワクチン後、感染率、抗体保有率はともに上昇し、ワクチンの効果は不明であった。



美浜町

美浜町

- ・元年度、2年度に4,000個の経口ワクチン散布
- ・ワクチン後、感染率、抗体保有率共に上昇
⇒ **ワクチンの効果不明**



若狭町

若狭町

- ・2年度に1,400個の経口ワクチン散布
- ・ワクチン後、感染率、抗体保有率共に上昇
⇒ **ワクチンの効果不明**

図5 ワクチン個数の少ない美浜町、若狭町の抗体保有率・感染率・感受個体率の推移

図6は、ワクチンの個数の少なかった小浜市、おおい町、高浜町である。2年度に800～1,700個の経口ワクチンを散布、ワクチン後、感染率、抗体保有率ともに大きく上昇、抗体保有率の上昇は感染によるものと考えられ、ワクチンの効果は認められなかった。

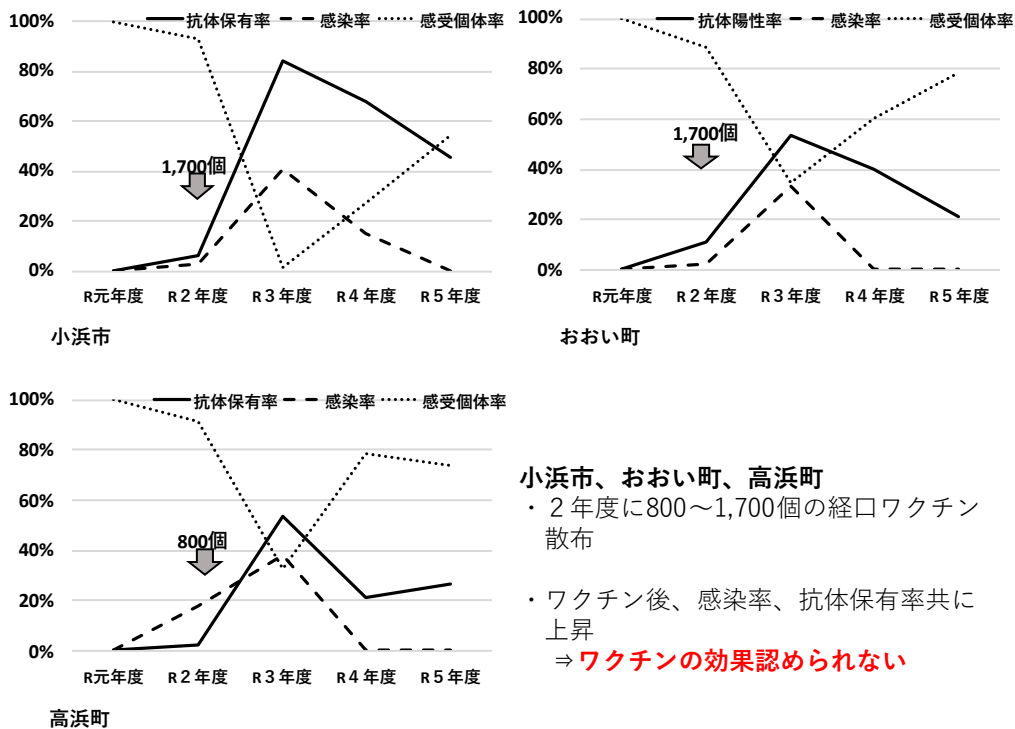


図6 ワクチン個数の少ない小浜市、おい町、高浜町の抗体保有率・感染率・感受個体率の推移

考察及びまとめ

本県の野生イノシシへの豚熱侵入は、初感染確認の令和元年7月より半年から1年早い可能性が示唆された。

感受個体率が30%前後になると翌年の感染率は激減し流行が収まる傾向が見られた。

感染率0%が2、3年続いても、抗体保有率が20%前後に低下すると、感受個体率が高くなり再流行の傾向が認められ、栗山らの報告と同様の傾向であった[3]。

野生イノシシに対する経口ワクチン投与は、散布個数が多い市町では経口ワクチン散布後抗体保有率の上昇と感染率の低下が明確で効果が認められたが、少ない市町では経口ワクチン散布後、抗体保有率は上昇したが感染率も上昇しており明確な効果は認められなかった。経口ワクチンで野生イノシシの豚熱を抑えるには、継続的に大量のワクチン散布が必要と考えられる[1,4]。

今後も、野外に豚熱ウイルスはいるという前提で、豚熱ウイルスを農場に入れない飼養衛生管理基準の遵守指導と豚熱ウイルスに感染させない適切な豚熱ワクチン接種指導で本県の数少ない養豚場を守っていきたいと考える。

引用文献

- [1] 菊池栄作：野生イノシシの豚熱対策～豚熱経口ワクチンの効果等～. 畜産技術, 45-50 2021-5
- [2] 福井県家畜保健衛生事業成績（平成30年度～令和4年度）

- [3] 栗山 武夫ら：兵庫県における 2022 年末までの豚熱の拡大の概要. 兵庫ワイルドライフモノグラフ, 15:60-71 2023
- [4] 栗山 武夫ら：兵庫県における経口ワクチン散布による豚熱対策の効果検証と摂食率に影響する要因の解明. 兵庫ワイルドライフモノグラフ, 15:72-83 2023

4 定時受精卵移植を活用した若狹子牛生産の試み

家畜保健衛生所 西川清文

はじめに

本県では、令和6年3月16日に北陸新幹線が敦賀まで延伸した。その新幹線延伸による観光客増加によって若狹牛の需要増加が見込まれている。当所では、昭和63年より「若狹牛」の生産振興を目的に牛受精卵移植技術（以下、ET）事業を実施しているが、ET活用による若狹子牛生産に期待がかかっている。

ETの活用法として、和牛繁殖農家では人工授精が基本であるため、その活用頻度は高くなく、優良血統後継牛の確保のために活用〔1〕されることがあった。酪農家においては若狹子牛の生産は生乳生産過程での副産物であり、副収入という考えが強かった。そのため、これまでのETは発情不明牛の排血確認による実施や長期不受胎牛に対する治療目的での実施が多かった。

しかし近年は、和牛繁殖農家においては子牛市場で血統がより重視されるようになったことで優良血統への母牛の更新が急務となっているが、飼料価格の高騰や農家自身の高齢化で更新が難しくなっており、優良血統の受精卵を移植し、若狹子牛を生産する農家もみられる。酪農家においては、雌精液の使用による後継牛の安定的な確保に加えて、飼料価格の高騰やホルスタイン雄子牛および交雑種子牛の販売価格の下落により、若狹子牛の生産、販売は貴重な収入源となっており、ETを利用する頻度は増加している。このような背景もあり、家畜保健衛生所（以下、家保）管内のET依頼件数は増加している（表1）。

現在、家保ではET依頼数の増加に対し、複数人体制で業務に対応〔2〕しているが、今後はET技術者不足や飼養衛生管理指導等の業務対応でET対応の困難も想定される。そこで、県内の和牛繁殖農家と酪農家の各1戸において、ホルモン製剤を活用した排卵同期化による定時ETを実施し、出勤回数の低減および移植頭数の増加を試み、その有用性を検討したため報告する。

表1 家保管内のET依頼頭数

年	R2年度	R3年度	R4年度	R5年度
依頼頭数	272	295	305	357

方法

・定時ETプログラム

卵巣静止牛等にも一定の効果のある定時人工授精プログラム〔3〕を応用した。対象となる牛に腔内留置型プロジェステロン製剤（CIDR）を挿入、エストロジェン製剤（E2）を投与した。CIDR挿入後8～10日後にCIDRを抜去、プロスタグランジン製剤（PG）を投与した。PG投与約2日後に飼養者は発情を確認し、性腺刺激ホルモン放出ホルモン製剤（GnRH）を投与、発情確認を家保に連絡することとした。家保は発情確認後の7～8日後に黄体検査を行ったのち、ETを実施した（図1）。

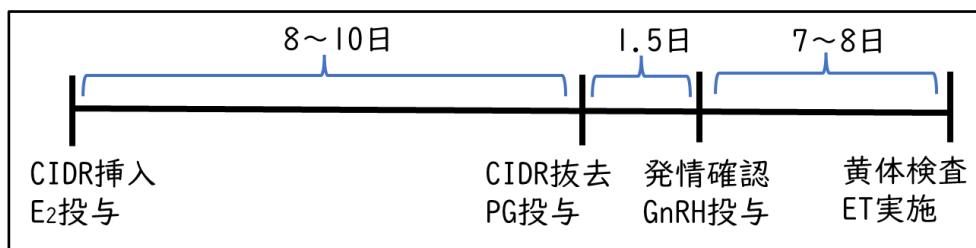


図1 定時 ET プログラム

ホルモン製剤活用については、臨床獣医師と相談し、繁殖管理事業や肉牛衛生指導事業等で指導、実施した。また、費用として福井県手数料条例にある移植手数料の他に、投薬代や CIDR 代等で約 4000 円が別途必要になる事を飼養者に説明し、実施した。

・有用性の検討

移植効率（移植頭数/出動回数）、移植率（移植頭数/依頼頭数）、受胎率（受胎頭数/移植頭数）について、定時 ET と通常 ET（定時 ET 以外の ET）を比較した。

農家概要および検討期間

A. 和牛繁殖農家

令和 2 年 9 月より、レシピエント用交雑種 4 頭および高齢で血統が古く、発情が分かりにくい黒毛和種 2 頭について ET 依頼があった。飼養者は他の仕事を兼務しており、早めに ET 日程を調整したいという希望もあった。そのため、肉牛衛生指導事業等に定時 ET プログラムを開始した。

有用性の検討は、令和 2 年 9 月から令和 5 年 12 月までの ET 結果を用いて行った。

B. 酪農家

令和 3 年 4 月より後継者に経営が移譲され、令和 4 年 4 月より高能力牛への雌精液の人工授精以外は全頭 ET の希望があった。そのため、繁殖管理時等に発情不明牛や卵巣静止牛に対して定時 ET プログラムを開始した。さらに、令和 5 年 5 月には飼養牛舎が移転し、飼養形態も繋ぎからフリーバーンへと変わり、牛も増頭したため、卵巣状態が正常な牛も含めて、ET 希望牛に対して定時 ET を開始した。

有用性の検討は、令和 4 年 4 月から令和 5 年 12 月までの ET 結果を用いて行った。

結果および考察

A. 和牛繁殖農家

検討期間内での総出動回数は 29 回で、依頼頭数 45 頭、移植頭数 35 頭であった。このうち、定時 ET による 2 頭同日移植が 1 回、3 頭同日移植が 1 回であった。定時 ET は移植効率 1.4 (15/11)、移植率 100%(15/15)、受胎率 66.7% (10/15) であり、通常 ET は移植効率 1.1 (20/18)、移植率 66.6% (20/30)、受胎率 45.0% (9/20) であり、定時 ET の方が通常 ET より全ての項目で高かった (表 2)。

表2 和牛繁殖農家 ET 成績（令和2年9月～令和5年12月）

	総計	定時ET	通常ET
出動回数	29	11	18
依頼頭数	45	15	30
移植頭数	35	15	20
移植効率	1.2	1.4	1.1
移植率(%)	72.7	100	66.6
受胎頭数	19	9	9
受胎率(%)	54.3	66.7	45.0

定時 ET の方が発情日を調節できるため、飼養者が日程を調整しやすいとの意見があり、牛の発情も定時 ET の方が明瞭で分かりやすいとの事だった。これは定時 ET 開始時に発情予定日を伝えているため、その予定日前後に飼養者が特に注意を払って発情を観察していたことが要因の1つと考えられた。また、飼養者および臨床獣医師との緊密な連携を行うことで、飼養衛生管理指導等の業務もスムーズに実施することもできた。

以上より、定時 ET 活用で出動回数を減少できつつ、若狹子牛生産頭数を増加させることが可能と考えられた。

B. 酪農家

・令和4年度(R4.4～R5.3)

総出動回数は41回で、依頼頭数67頭であった。このうち、定時 ET による2頭同日移植が3回、定時 ET と通常 ET の同日移植が2回あった。定時 ET は移植効率1.0 (9/9)、移植率69.2% (9/13)、受胎率33.3%(3/9)に対し、通常 ET は移植効率1.1 (37/34)、移植率68.5% (37/54)、受胎率45.9% (17/37) であった（表3）。

表3 酪農家 ET 成績（令和4年度）

	総計	定時ET	通常ET
出動回数	41	9	34
依頼頭数	67	13	54
移植頭数	46	9	37
移植効率	1.1	1.0	1.1
移植率(%)	68.7	69.2	68.5
受胎頭数	20	3	17
受胎率(%)	43.5	33.3	45.9

定時 ET の方が通常 ET よりも移植率および受胎率が低い結果となったが、これは発情不明牛や卵巢静止牛に対しての治療の目的を含めた実施のため、低くなったと考えられた。

令和4年度の全体 ET の結果としては、受胎数および受胎率ともに飼養者が満足する結果となった。

・令和5年度（R5.4～R5.12）

総出動回数は29回で、依頼頭数70頭であった。このうち、定時ETによる2頭同日移植が4回、3頭同日移植が4回、4頭同日移植が1回あった。定時ETと通常ETの同日移植が6回あった。定時ETは、移植効率1.9（25/13）、移植率80.6%（25/31）、受胎率52.0%（13/25）に対し、通常ETは移植効率1.3（29/22）、移植率74.4%（29/39）、受胎率27.6%（8/29）であり、定時ETが全ての項目で高かった（表4）。通常ETの受胎率が非常に低かった理由として、定時ETで受胎せず発情回帰が起こった牛に対してのETであることや、何度もETを行っても受胎しないリピーター牛がいたこと等が考えられた。

表4 酪農家ET成績（令和5年度）

	総計	定時ET	通常ET
出動回数	29	13	22
依頼頭数	70	31	39
移植頭数	54	25	29
移植効率	1.9	1.9	1.3
移植率(%)	77.1	80.6	74.4
受胎頭数	21	13	8
受胎率(%)	38.9	52.0	27.6

令和5年度と令和4年度の全体結果を比較すると、受胎率の低下がみられたが、これは牛舎移転や暑熱でのストレス増加が原因と考えられた。しかし、定時ETの活用により、受胎頭数の総計で飼養者の希望頭数を確保できた。

しかし、移植日程の早期決定や、移植当日の黄体検査での移植可否判断への過剰信頼に伴う飼養者の発情発見意識の低下がみられた。そのため、発情や排卵は必ず確認するように指導しているが、飼養者の意識向上は見られていない。今後は、飼養者の繁殖に対するモチベーションを向上・維持させることが重要になってくると思われる。

2年間の結果の検討により、牛の繁殖状態に関わらず定時ET活用で出動回数を低減しつつ、若狭子牛生産頭数を増加させることは可能と考えられた。しかし、飼養者の発情発見意識の低下などの新たな問題もみられた。

現在、この飼養者は繁殖に関しては家保の繁殖管理事業およびETや臨床獣医師の定期巡回指導および人工授精に頼りきっており、自身で繁殖をみようという意識がなくなってしまった。このような農家を生んでしまった原因として、数少ない畜産農家を守ろうと手厚い支援を行った県を含めた畜産関係者にも問題があると考えられる。支援といって酪農家本来の業務である繁殖を飼養者以外が全て請け負うのは、長期的にみて問題が生じてくる可能性がある。今後、畜産農家に対する支援のあり方というもの福井県全体で考えていく必要がある。

まとめ

定時 ET を活用することにより、出勤回数を減少できつつ、若狭子牛生産頭数を増加させることが可能と考えられた。さらに、飼養者および臨床獣医師との緊密な連携を行うことで、飼養衛生管理指導等の業務もスムーズに実施することができた。

参考文献

- [1] 小林崇之ら：平成 29 年度福井県畜産技術業績発表集録
- [2] 西川清文ら：令和元年度福井県畜産技術業績発表集録
- [3] 大澤健司：LIAJ NEWS No.155 定時人工授精についての定言

5 県内一酪農場で発生した牛ウイルス性下痢（BVD）について（第Ⅰ報）

家畜保健衛生所 清水誠也

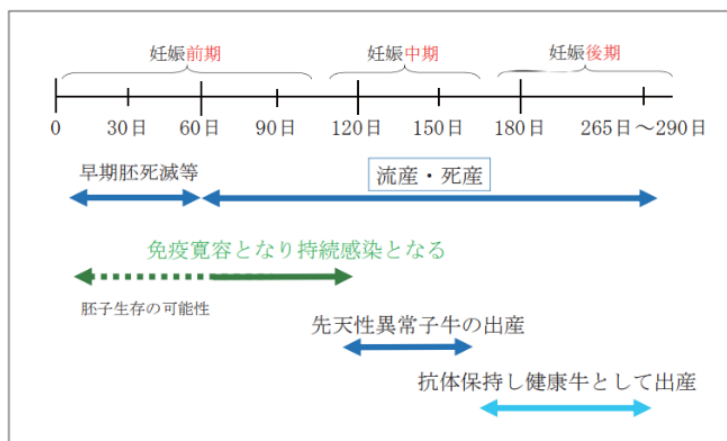
はじめに

BVD は牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）を原因とする感染症である。感受性動物は牛、水牛、めん羊、山羊、豚、鹿、ヤク、ラマ、アルパカなどで、最も感受性が高い動物は牛である。感染牛は下痢、発熱、呼吸器症状を発症するが不顕性に終わることもある。妊娠牛への感染は感染時期により流産、胎子奇形、胎子の持続感染（PI）を引き起し（図 1）、特に PI 牛はウイルスを常時排出し感染源となるため問題となる。BVD の発生は全国的に増加傾向にあり、令和 5 年、本県においても一酪農場で 19 年ぶりに BVD が発生した。

発生に伴い下記の課題が生じた。

- ・ 県内農家・関係機関への BVD について周知する必要があること
- ・ 県内の BVD 検査体制が整っていないこと
- ・ 公共牧場での BVD 対策の見直しが必要であること
- ・ 発生農家が公共牧場を利用していたため、公共牧場および関連農場で早急な清浄性確認が必要だったこと

これらの課題について対策を講じたのでその概要を報告する。



ウイルス性下痢・粘膜病〔1〕より引用

図 1 牛の妊娠期間における胎齢と BVD ウイルス感染により
発現する病態

発生概要

当該農場は乳用牛約 80 頭を飼養する酪農場で、公共牧場や県外預託牧場を利用して
いる。令和 5 年 12 月、当該農場で集団下痢が発生した。農場立ち入り時に採材した糞
便 10 検体を用い、遺伝子検査を実施した結果、2 検体から BVDV 遺伝子が検出された。
遺伝子が検出された搾乳牛 2 頭については鑑定殺し、病性鑑定を実施した。

病性鑑定結果

鑑定殺した牛を解剖した結果、重度の消瘦、血便、子宮粘膜の肥厚および充血が認められた。細菌学的検査の結果、糞便からサルモネラは検出されず、その他有意な菌も検出されなかった。ウイルス学的検査の結果、糞便から BVDV 遺伝子が検出され、制限酵素処理にて BVDV-2 型と判定した。病理組織学的検査の結果、腸管粘膜上皮の剥離（図 2）、粘膜固有層における炎症性細胞の浸潤（図 3）が認められた。以上の結果から、BVDV-2 型による下痢症と診断した。

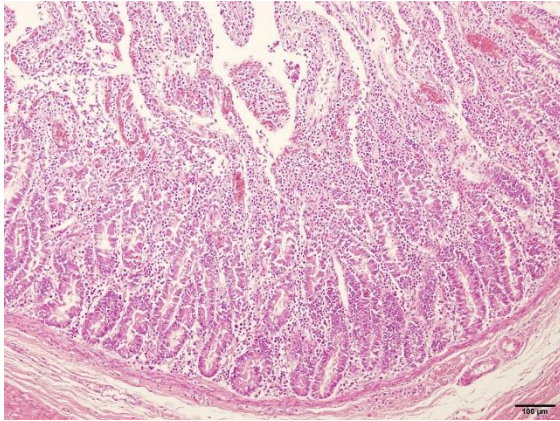


図 2 腸管粘膜上皮の剥離

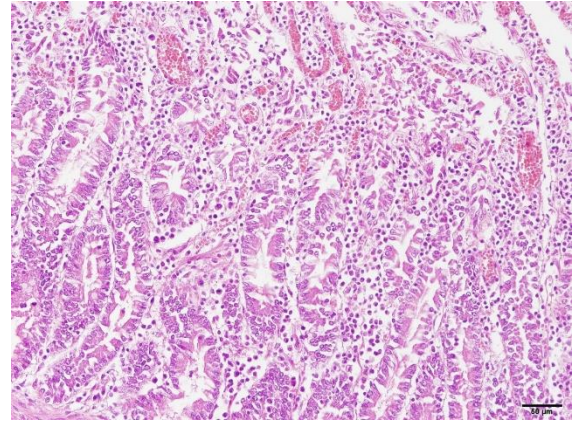


図 3 粘膜固有層における
炎症性細胞の浸潤

浸潤状況調査

当該農場において BVDV の浸潤状況を調査するため、全頭から採血し BVDV 遺伝子検査を実施した。結果、糞便から遺伝子が検出された搾乳牛以外に子牛 1 頭の血清から BVDV 遺伝子が検出された。PI 牛の判定のため、国のガイドライン[2]に従い、3 週間以上間隔を空けて再検査することとした。

PI 牛の判定および中和試験結果

浸潤状況調査から 1 か月後、PI 牛の判定および中和試験を実施するため、当該農場の全頭採血を実施した。その結果、搾乳舎 12 頭（内 1 頭は子牛）、育成舎の 1 頭（子牛）において BVDV-2 型対する中和抗体価の上昇が認められた（図 4）。また、前回 BVDV 遺伝子が検出された子牛は抗原 ELISA 陽性かつ抗体価上昇が認められなかったため PI 牛と判定し淘汰を推奨した。

公共牧場および関連農場の清浄性確認検査

当該農場は県内公共牧場を利用していたため、公共牧場および関連農場（9 農場）の清浄性確認検査を実施した。公共牧場については全頭（188 頭）採血し、牛舎毎のプール血清から遺伝子検査を実施した。関連農場では延べ 489 頭の遺伝子検査を実施した。なお、検査にはバルク乳および搾乳牛以外のプール血清（農場毎）を用いた。結果、すべての検体で BVDV 遺伝子は検出されなかった。

対策

BVD 発生後の対策として以下の対策を実施した。1 つ目に、家保だより発行にて県内農家および関係機関へ BVD の危険性を周知した。2 つ目に、BVD 検査体制の構築として、県外導入牛の着地検査に BVD 検査を追加、公共牧場預託前子牛の検査を実施、発生農場については新生子牛の PI 牛検査を実施することとした。3 つ目に、公共牧場における BVD 対策の見直しを行い、預託前子牛の検査および、新生子牛の PI 牛検査を実施することとした。また、ワクチンプログラムを従来の 6 ヶ月齢での不活化ワクチン 1 回接種から、3 か月齢で単味生ワクチン、6 か月齢で混合生ワクチン、18 か月齢で単味生ワクチンの接種に変更することとした。

搾乳舎				育成舎			
pre		post		pre		post	
8	256<	1		26	64	32	
32	64	2		27	<2	<2	
8	256<	3		28	64	32	
32	256<	4		29	<2	<2	
<2	<2	5		30	<2	<2	
256<	256<	6		31	64	出荷	
2	<2	7		32	32	16	
<2	<2	8		33	<2	2	
<2	<2	9		34	128	64	
128	128	10		35	<2	<2	
<2	256<	11		36	<2	<2	
<2	<2	12		37	256<	256<	
256<	256<	13		38	2	256<	
32	32	14		39	<2	<2	
<2	<2	15		40	256<	256<	
256<	256<	16		41	256<	256<	
<2	256<	17		42	<2	256<	
<2	256<	18		43	128	淘汰	
<2	256<	19		44	4	淘汰	
<2	淘汰	20		45	16	4	
4	256<	21		46	256<	256<	
256<	256<	22		47	256<	256<	
256<	256<	23		48	256<	256<	
64	256<	24		49	256<	256<	
256<	256<	25		50	256<	256<	
				51	<2	2	
				52	4	256<	
pre		post		pre		post	
<2	<2	53					
2	<2	54		68	256	128	
<2	<2	55					
32	8	56					
<2	<2	57		69	<2	256<	
<2	2	58					
<2	<2	59					
128	64	60		70	2	<2	
<2	<2	61		71	256<	256<	
4	4	62		72	2	<2	
<2	<2	63		73	64	32	
<2	<2	64		74	<2	<2	
16	16	65		75	<2	<2	
16	16	66		76	<2	<2	
16	8	67		77	<2	<2	
分娩舎							
2	淘汰	78					

図 4 BVDV-2 型に対する中和試験結果

まとめ・考察

本県において、BVD の発生は 19 年前の 1 件のみであったため、今回の発生前は農家および関係者の BVD に対する知識や危機感が不足していた。また、県内の BVD 検査体制は未整備な状態で、公共牧場における対策も不十分だった。以上のことから、県内の農家は BVDV に対して非常に無防備な状態だったと考えられる。今回の発生を機に、家保が一丸となって対策を講じた結果、BVD の危険性の周知、検査体制の構築、公共牧場での対策が確立された。また、公共牧場および関連農場における清浄性を確認した。

今回、発生農場以外で BVDV が検出されなかった要因として、PI 牛の早期発見が考えられる。冬季のウイルス性下痢は原因が判明しても治療法は無く、2、3 週間で回復するため検査を依頼しない農家も多い。当県は、毎月の繁殖管理業務で酪農場に立ち入るため、農場での疾病発生に気が付きやすく、牧場主とのコミュニケーションも取りやすい環

境だと考えられる。牧場主との良好な関係を築くことが、検査依頼のしやすさにも繋がり、疾病の早期発見、感染拡大の抑制の一助となっていると思われた。

今後、構築した検査体制を維持し、BVDV の清浄化に努めていきたい。

参考文献

- [1] 公益社団法人中央畜産会：牛ウイルス性下痢・粘膜病
- [2] 農林水産省：牛ウイルス性下痢・粘膜病に関する防疫対策ガイドライン

6 県内一養鶏農家におけるクロストリジウム・パーフリンゲンス (Cp) 感染症と鶏コクシジウム病の併発例

家畜保健衛生所 木村美貴 新田愛

はじめに

鶏クロストリジウム・パーフリンゲンス感染症（旧壊死性腸炎）は *Clostridium perfringens*（以下 Cp）を原因菌とする[1-4]。Cp は動物の腸管、土壌等に分布し、腸内細菌叢の一菌種である[1, 2]。明らかな臨床症状がみられない軽症例から、急性で顕著な腸管症状がみられる重症例まで様々である[1, 3]。様々なストレス・免疫低下により Cp が腸管内で異常増殖することで発症し、その代表的な原因はコクシジウム感染であることが特徴である[1]。コクシジウムが腸管粘膜に寄生し増殖する過程で粘膜は著しく損傷し、腸管腔への蛋白およびビタミンの漏出が起こり、Cp が増殖するのに適した環境となることが示唆されている[5, 6]。

発生概要

令和 5 年 5 月 15 日、県内の鶏飼養者から死亡鶏が増えているとの連絡を受け、家畜防疫員が現地に立ち入りをした。当該農場は平飼鶏舎にて採卵鶏（もみじ）約 120 羽を飼養し、鶏の他には牛・馬を飼養している。

鶏舎は 3 棟あり、今回異常がみられたのは 1 鶏舎のみだった。この鶏舎では約 210 日齢の鶏を 40 羽飼養していた。急な食欲不振、元気消失、産卵停止がみられ、2 日間で 40 羽中 10 羽が死亡し、最終的には 25 羽が死亡した。生存している鶏は全体的に元気がなく、重度の貧血がみられた。

死亡鶏 5 羽、生鶏 8 羽の計 13 羽で鳥インフルエンザ簡易検査を行ったところ、全て陰性だった。

従業員の聞き取りから、死亡鶏の増加がみられる 3、4 日前から農場周辺で採取した雑草を土が付着した根ごと給餌していたことが分かった。また、排水溝にいたイトミミズを給餌していたとのことであった。

材料および方法

1. 解剖検査および病理組織学的検査

死亡鶏 3 羽について解剖検査実施後、主要臓器について 10%ホルマリン液で固定後、定法に従いパラフィン包埋切片を作製してヘマトキシリン・エオジン（H.E.）染色およびグラム染色を実施した。

2. ウイルス学的検査

ニューカッスル病について、肺・肝・小腸内容物の乳剤を用いて発育鶏卵接種試験（9～11 日齢発育鶏卵に接種し 6 日間培養）および HA 試験（尿膜腔液の HA 性の確認）を行った。

3. 細菌学的検査

①臓器からの細菌検査

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%CO₂ 下で 37℃24 時間培養した。

②サルモネラの検査

小腸内容を Ig、HTT 培地（ヨウ素、ヨウ化カリウム添加）9ml に加えて 37℃24 時間培養した後、1 白金耳量を DHL 寒天培地に塗布して 5%CO₂ 下で 37℃24 時間培養し、黒色コロニーの有無を確認した。

③Cp の検出

小腸内容を 6 段階希釈し、カナマイシン加 CW 卵黄培地に 50 μl ずつ塗布して 37℃24 時間嫌気培養し、Cp に特徴的なコロニー（乳光反応を伴う隆起した円形で、コロニー周辺の培地が黄変）を計測することで Ig 当たりの Cp を定量した。分離された菌株に対しグラム染色を行い、その形状を確認後、カナマイシン加 CW 卵黄培地を用いて純培養した。37℃24 時間の嫌気培養後、InstaGene DNA 精製マトリックス（BIO-RAD 社）を用いて DNA を抽出し、A～G 型を識別可能な PCR 法[7]を用いて毒素型別を行った。

④薬剤感受性試験

分離した Cp の薬剤感受性試験は、ペニシリン、アンピシリン、ピペラシン、セフトリアキソン、セフメタゾール、イミペネム、メロペネム、クラブラン酸/アモキシシリン合剤、スルバクタム/アンピシリン合剤、タゾバクタム/ピペラシン合剤、クリンダマイシン、モキシフロキサシン、メトロニダゾールの 13 薬剤について、ドライプレート‘栄研’96 プレート DP53（嫌気性菌用）を用いて、微量液体希釈法にて実施した。感受性については CLSI（Clinical and Laboratory Standards institute）（M100-25, 2015 年）の嫌気性菌の基準を元に判定した。

4. 寄生虫学的検査

小腸内容を用いて簡易原虫検査を行った。病理検査でコクシジウムを確認していたため、小腸内容から DNeasy（QIAGEN 社）を用いて直接 DNA を抽出し、Nested PCR 法を用いて *Eimeria* の遺伝子を検出した。さらにそれを鋳型に種別の PCR を行った[5]。

5. 環境調査

①雑草・イトミミズ・巻貝

給餌した雑草の根やイトミミズに付着した Cp が原因ではないかと考え、7 月 18 日に立ち入りを行った。従業員の証言を基に、発生当時と同一の場所の雑草、イトミミズ入り泥を採取した。雑草については土の付いた根ごと採取し、嫌気的条件下で保存した。イトミミズは泥の中に深く潜り、尻を出して呼吸する生活をしているため[8]、付着している菌も嫌気的条件下にあることが示唆される。検査に供するまで泥を保管

しているうちに巻貝が水面に歩き出た。殻の巻き方および触角の形状等から、サカマキガイ (*Physa acuta*) であると同定した。土付き根・イトミミズ入り泥・サカマキガイをそれぞれすり鉢もしくはホモジナイザーで乳剤にし、クックドミート培地で 37℃ 24 時間嫌気培養して増菌後、カナマイシン加 CW 卵黄培地に塗布し、37℃ 24 時間嫌気培養した。分離された菌を小腸内容と同じく純培養し、DNA を抽出して毒素型別 PCR を実施した。

②落下便

12 月 12 日に立ち入りを行い、当該鶏舎および別鶏舎の落下便を採取した。落下便についてもこれまでと同じく増菌・分離・純培養・DNA 抽出・毒素型別 PCR を実施した。

6. 疫学的検査 (MLST 法)

以下の検査は国立農研機構動物衛生研究部門 動物感染症研究領域に依頼した。

①菌株の単離と DNA 抽出

Cp 16 株 (株 1~16: 鶏 2 個体 4 株、根付き土 2 株、イトミミズ入り泥 2 株、サカマキガイ 2 株、当該鶏舎落下便 3 株、別鶏舎落下便 3 株) を 5%卵黄加 GAM 寒天培地で 37℃ 48 時間嫌気培養した後、必要に応じてコロニーを同培地で純培養し、InstaGene DNA 精製マトリックス (BIO-RAD 社) を用いて DNA を抽出した。

②菌株の精選のための部分的 MLST 解析

上記 16 株について、Cp の MLST 解析で使用される 8 遺伝子 [9, 10] のうち、菌株間で塩基配列の多様性が大きい 2 遺伝子 (*p/c* と *colA*) を標的とした PCR を行った。増幅産物についてはサンガーシークエンス解析により塩基配列を決定した。

決定した塩基配列の Allele を PubMLST (<https://pubmlst.org>) で判定し、由来等も考慮した上で遺伝的に同一である可能性が高い株は代表株を 1 株選び、MLST 解析に用いる株を 11 株選定した。

③精選株での MLST 解析

上記 11 株について残りの 6 遺伝子を標的とした PCR を行い、②と同様にサンガーシークエンス解析および Allele 判定を行った。②で判定した 2 遺伝子の Allele と合わせて、PubMLST を使用して各株の Sequence Type (ST) を決定した [9]。

④系統樹の作成

上記 11 株各株の 8 遺伝子分の塩基配列を連結し、MEGA11 [11] 上で最尤法により距離計算を行い、系統樹を作製した。系統樹は iTOL (<https://itol.embl.de>) により描写した。

結果

1. 解剖検査および病理組織学的検査

解剖した死亡鶏 3 羽に共通して、鶏冠の褪色と腹囲膨満がみられた（図 1）。剖検所見では、小腸全体の著しい腫大、盲腸の膨満、腎臓の著しい退色、肝臓の脆弱化がみられた。筋胃内には異臭のする茶色の土のようなものがみられた。腫大した腸管内には凝固血液や炎症産物を含む偽膜が付着し、腸管粘膜の重度の肥厚および出血が認められた（図 2～4）。



図 1 剖検前の写真



図 2 剖検写真 小腸全体の腫大



図 3 剖検写真 盲腸の膨満



図 4 剖検写真 偽膜形成

病理組織学的検査では小腸粘膜上皮の壊死、脱落がみられ、炎症細胞の浸潤や出血が認められた（図 5）。脱落部にはグラム陽性大桿菌が確認された（図 6）。肝臓では肝細胞の変性、壊死がみられ、最も一般的な腸管以外の病変は肝臓で見られるという既報に一致した[2]。また、小腸上部の粘膜固有層にコクシジウムのトロフォゾイト・シズントが多数確認された（図 7）

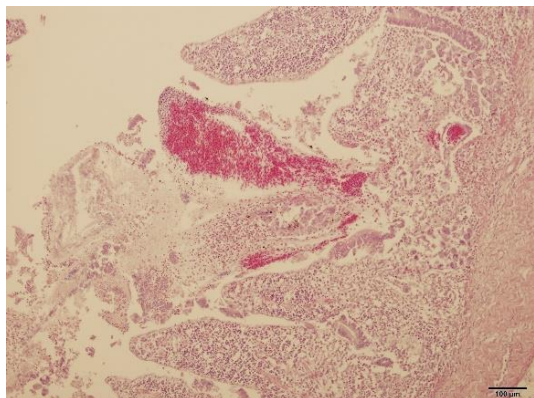


図 5 小腸 H.E. 染色 ×100

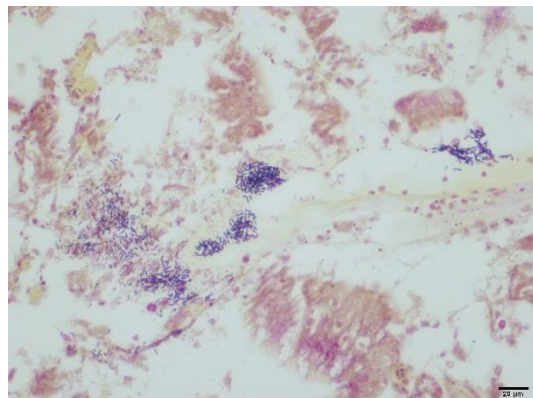


図 6 小腸 グラム染色 ×400

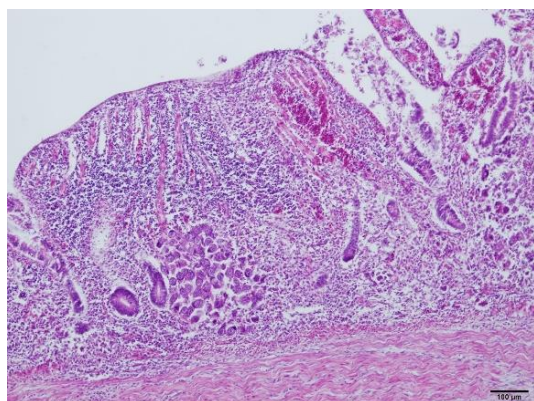


図 7 小腸 H.E. 染色 ×100

3. ウイルス学的検査

ニューカッスル病の陰性を確認した。

4. 細菌学的検査

①臓器からの細菌検査

主要な 6 臓器からは有意な菌は検出されなかった。

②サルモネラの検査

小腸内容からサルモネラは検出されなかった。

③Cp の検出

Cp に特徴的なコロニーが $4.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$ cfu/g 検出された。グラム染色によりグラム陽性大桿菌であることを確認した。毒素型別 PCR にて α 毒素および netB 毒素を検出したため、Cp G 型と判定した。

④薬剤感受性試験

全株が使用薬剤の全てに感受性を持ち、ペニシリン系・セフェム系・セファマイシン系・カルバペネム系・メトロニダゾールの感受性があるという既報[4, 12-15]に一致

した。クリンダマイシンについては耐性獲得株の出現が示唆されているが[14, 16]、本検査では耐性はみられなかった。

5. 寄生虫学的検査

小腸内容から寄生虫卵、コクシジウムオーシストは検出されなかったが、PCR 法では *Eimeria necatrix* の遺伝子が検出された。

6. 環境調査

①雑草・イトミミズ・巻貝

鶏の小腸内容と同様に検査したところ、小腸内容とは異なる Cp A 型が検出された。

②落下便

当該鶏舎から小腸内容とは異なる Cp A 型、別鶏舎から Cp G 型を検出した。

7. 疫学的検査（MLST 法）

①部分的 MLST 解析と菌株精選結果

同じ由来且つ同じ毒素型の株である同一個体小腸内容からの 4 株（株 1、2 および株 3、4）、根付き土由来の 2 株（株 5、6）および当該鶏舎落下便からの 3 株（株 14、15、16）は、それぞれ 2 遺伝子（*plc* と *colA*）の Allele が共通していたため、それぞれ代表の 1 株のみを以降の解析に使用した（表 1）。

表 1 各株の MLST 解析の結果

株名	毒素型	由来			MLST		Allele profile							
		動物種等	分離部位等	個体番号	ST	近縁な ST	<i>colA</i> 670 bp	<i>groEL</i> 685bp	<i>gyrB</i> 735 bp	<i>nadA</i> 689bp	<i>pgk</i> 681 bp	<i>plc</i> 671 bp	<i>sigK</i> 589 bp	<i>sodA</i> 554bp
1	G	鶏	小腸内容	10390	21	—	3	1	3	1	1	4	2	3
2	G	鶏	小腸内容	10390	—	—	3	—	—	—	—	4	—	—
3	G	鶏	小腸内容	10391	21	—	3	1	3	1	1	4	2	3
4	G	鶏	小腸内容	10391	—	—	3	—	—	—	—	4	—	—
5	A	環境	根付き土	—	465	—	7	94	75	119	1	144	2	122
6	A	環境	根付き土	—	—	—	7	—	—	—	—	144	—	—
7	A	環境	イトミミズ入り泥	—	Novel	ST32 と近縁	22	95	15	13	7	21	16	17
8	A	環境	イトミミズ入り泥	—	200	—	4	1	3	13	1	1	2	20
9	A	環境	サカマキガイ	—	32	—	22	5	15	19	7	21	16	17
10	A	環境	サカマキガイ	—	Novel	—	Novel	39	Novel	Novel	Novel	Novel	2	144
11	G	環境	落下便（別鶏舎）	—	21	—	3	1	3	1	1	4	2	3
12	G	環境	落下便（別鶏舎）	—	21	—	3	1	3	1	1	4	2	3
13	G	環境	落下便（別鶏舎）	—	21	—	3	1	3	1	1	4	2	3
14	A	環境	落下便（当該鶏舎）	—	Novel	ST304 と近縁	25	140	2	41	22	Novel*	27	46
15	A	環境	落下便（当該鶏舎）	—	—	—	25	—	—	—	—	Novel*	—	—
16	A	環境	落下便（当該鶏舎）	—	—	—	25	—	—	—	—	Novel*	—	—

*：同じ塩基配列

②MLST 解析結果

11 株（株 1、株 3、株 5、株 7、株 8、株 9、株 10、株 11、株 12、株 13、株 14）の ST は表の通り（Novel で示す 3 つの新規 ST は全て別の ST）（表 1）。

③系統解析の結果

同じ ST に型別された（即ち、解析した遺伝子領域の塩基配列が完全に一致した）鶏及び環境由来の G 型菌は系統樹上で 1 つのクレードを形成したのに対して、環境由来の A 型菌は系統的に多様であった。A 型菌のうち、根付き土由来の株 5 は G 型菌群と遺伝的に比較的近縁であったものの（図 8）、MLST の解析対象である 8 遺伝子中 6 遺伝子で G 型菌とは配列が異なっており（表 1）、本症例の G 型菌とは疫学的な関連はないと考えられた。



図 8 系統解析の結果

G 型菌について

MLST 解析の結果、鶏由来 G 型菌（株 1、株 3）および落下糞便由来 G 型菌（株 11、株 12、株 13）の G 型菌はいずれも同じ ST21 に分類された。ST21 に分類される既報の株はいずれも人由来または鳥由来の G 型菌であり、鳥類由来株は全て壊死性腸炎を呈した個体から分離されている（人由来株の臨床情報はない）。よって今回検査した G 型菌はいずれも鶏に病原性を示すと想定される。また、本養鶏場では、複数の鶏舎が同じ G 型菌株によって汚染されていると考えられる。

A 型菌について

由来の異なる A 型菌は、いずれも同じクレードを形成することはなかったため、互いに疫学的な関連はない株と考えられる。また、G 型菌群とも近縁関係にはないため、G 型の NetB をコードする病原性プラスミドの脱落による毒素型変化（G 型→A 型）によって発生した株ではないと考えられる。G 型菌群と系統的に比較的に近縁であった A 型菌（株 5）と同じ ST（ST465）は、人の臨床検体（病状は不明）からの分離株でも見つかっているため、この株と同じ遺伝的背景を持つ株が人および動物に病原性を示す可能性は否定できない。一方、ST32、ST200、ST304 に属する既報の株は、いずれも健康な動物（馬および鳥類）または環境由来の株であるため、これらの遺伝子型または近縁な遺伝子型に型別された A 型菌（株 7、株 8、株 9、株 14）が病原性を有する可能性は低いと推察される。一方、サカマキガイ由来の A 型菌（株 10）は、既報の株の中に近縁な株が見られない全く新しい遺伝子型であったため、その病原性等については推測することはできなかった。

考察及びまとめ

病性鑑定の結果から、本症例を Cp とコクシジウムの併発と診断した。鶏ではこの発症例が多く、コクシジウムによる粘膜障害が、Cp が異常増殖する要因となると考えられている[1]。環境由来の食餌を与えたことにより、これに含まれる Cp が直接の感染源であることは疫学的検査から否定された。本症例では、コクシジウムの感染に加え、食べ慣れない餌を食べたこと、気温の変化、産卵によるストレスにより発症し、また、農場全体が同じ菌に汚染されていると考えられた。このため、不衛生な餌を与えないこと、消毒薬もしくは熱湯で消毒すること、石灰を土に混ぜること、長靴を鶏舎ごとに履き替えることなどを指導した。10 月 30 日に立ち入りを行い、鶏舎ごとの踏み込み消毒槽および長靴セットの設置を行った。12 月 12 日に立ち入りを行った際、廃棄されず設置されていることを確認した。年に 3 回発行している家保だよりを使って、県内農家あて 189 の事業所に広く通知して、再発防止の抑止策とした。

謝辞

稿を終えるにあたり、Cp の MLST 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 動物感染症研究領域 細菌グループ 高松大輔先生、馬田貴史先生、サカマキガイの同定にご協力くださったローカル SD クリエーション 三田村佳政博士に深謝します。

引用文献

- [1]採卵養鶏場で散発するコクシジウム症、壊死性腸炎および大腸菌症（鶏病研究会報 第 51 巻 2 号 81-90 2015 年）
- [2]Necrotizing Hepatitis Associated with *Clostridium perfringens* in Broiler Chicks (Valerie Marcano Avian Dis. 2022 Oct;66(3):337-344.)
- [3]壊死性腸炎の軽度攻撃におけるブロイラーの生産成績および腸内細菌叢に対するクオラムシステム阻害剤の飲水投与効果（竹原一明 臨床獣医 2023.12）
- [4]The prevalence of antibiotic-resistant *Clostridium* species in Iran: a meta-analysis (Farzad Khademi Pathog Glob Health. 2019 Mar;113(2):58-66.)
- [5]鶏コクシジウムの遺伝子検査法およびその混合感染症（鶏病研究会報 第 52 巻 3 号 167-174 2016 年）
- [6]Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity (R B Williams Avian Pathol. 2005 Jun;34(3):159-80.)
- [7]Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme (Julian I Rood Anaerobe. 2018 Oct;53:5-10.)
- [8]冬期湛水・有機栽培水田の土壌動物—イトミミズの生態と機能—（伊藤豊彰 土と微生物 (Soil Microorganisms) 2011 Vol.65 No.2 94-99）
- [9]A wide variety of *Clostridium perfringens* type A food-borne isolates that carry a chromosomal cpe gene belong to one multilocus sequence typing cluster (Yinghua Xiao Appl Environ Microbiol. 2012 Oct;78(19):7060-8.)
- [10]Genetic Characterization of Type A Enterotoxigenic *Clostridium*

- perfringens* Strains (Agi Deguch PLoS One. 2009 May 19;4(5):e5598.)
- [11]MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11 (Koichiro Tamura Mol Biol Evol. 2021 Jun 25;38(7):3022-3027.)
- [12]外科感染症分離の *Clostridium* spp. とその薬剤感受性 (品川長夫 THE JAPANESE JOURNAL OF ANTIBIOTICS 60-3 171-180 2007)
- [13]A calf with hind limb paralysis and dysstasia and a genome sequence analysis of an isolated *Clostridium perfringens* toxinotype E strain (Takashi Mada J Vet Med Sci. 2023 Mar 1;85(3):279-289.)
- [14]沖縄県の土壌から分離した *Clostridium tetani* およびその他の *Clostridium* 属菌の薬剤感受性について (小林とよ子 CHEMOTHERAPY Vol.42 No.2 158-163 1994.2)
- [15] Antibiotic resistance of *Clostridium perfringens* isolates from broiler chickens in Egypt (K M Osman PMID: 24761735 Rev Sci Tech. 2013 Dec;32(3):841-50.)
- [16]Resistance of some species of *Clostridium* to Clindamycin (T.D.Wilkins Antimicrob Agents Chemother. 1973 Jan;3(1):136-7.)

7 県内一養豚場における豚増殖性腸炎の発生

家畜保健衛生所 新田愛 木村美貴

はじめに

豚増殖性腸炎（PPE）は、偏性細胞内寄生性細菌の *Lawsonia intracellularis* (Li) 感染によって起こる豚の下痢症で、タール状血便や急死が認められる急性型、死亡率は低いものの下痢や軟便が持続的に認められる慢性型のほか、下痢などの臨床症状を示さず増体重などの成績が低下する不顕性感染型に分けられる[1, 2]。有効な抗菌剤はあるものの的確な使用が難しく、経済的な損失が大きい疾病である[3, 4]。

発生概要

令和3年12月に、繁殖母豚100頭、肥育豚1000頭規模の一貫経営農場で未経産の繁殖母豚1頭がタール状の血便を排泄して急性経過で死亡した（発症例Ⅰ）。病性鑑定の結果、急性型のPPEと診断した。発症例Ⅰ以降令和4年3月まで急性型のPPEが続発したが、抗菌剤による治療で発症は小康状態となった。しかし、令和4年7月に以前より発育不良を呈していた肥育豚に食欲不振や黄色水様性下痢がみられた。改善見込みなしと判断されて鑑定殺となり、病性鑑定を実施した結果、慢性型のPPEと診断した（発症例Ⅱ）。発症例Ⅱ以降、肥育豚を中心に慢性型が断続的に発症し（図1）、農場全体に下痢や軟便を呈する豚が多くみられるようになった。

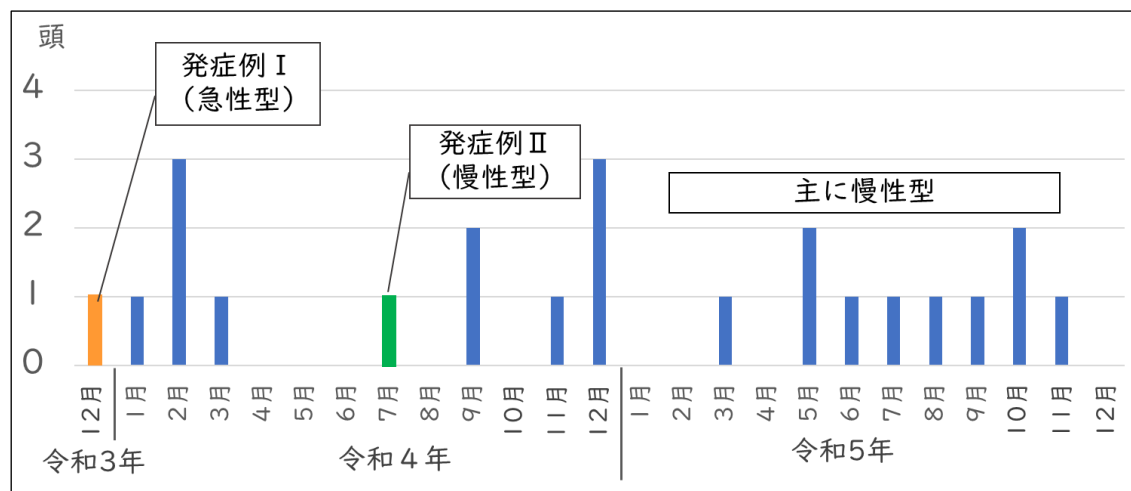


図1 当該農場におけるPPE発生頭数の推移

病性鑑定

1. 解剖検査および病理組織学的検査

発症例ⅠおよびⅡの解剖検査実施後、主要臓器、脳およびリンパ節について10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、定法に従いパラフィン包埋切片を作製してヘマトキシリン・エオジン（HE）染色およびワーチンスターリー染色を実施した。

2. 細菌学的検査およびウイルス学的検査

細菌学的検査では、主要臓器および脳を用いて定法に従い細菌検索を行ったほか、小腸

粘膜を用いて PCR 法による Li 特異的遺伝子検査を実施した。ウイルス学的検査では、扁桃、腎臓および脾臓を用いた PCR 法ならびに蛍光抗体法で豚熱およびアフリカ豚熱の検査を実施した。

3. 成績

発症例Ⅰでは、解剖検査で回腸のホース状肥厚と粘膜表面における黄色の偽膜形成がみられた。病理組織学的検査で回腸や盲腸に陰窩上皮細胞の腺腫様過形成や陰窩の伸長が認められ、陰窩腔内に細胞退廃物が確認された。ワーチンスターリー染色で、過形成した陰窩上皮細胞の内腔側細胞質内に好銀性の湾曲した小桿菌が確認された(図 2)。細菌学的検査では主要臓器からの有意菌分離はなく、小腸粘膜から Li 特異的遺伝子が検出された。ウイルス学的検査で豚熱およびアフリカ豚熱を否定した。これらの結果ならびにタール状の血便を排泄して急性経過で死亡している臨床症状から、急性型の PPE と診断した。

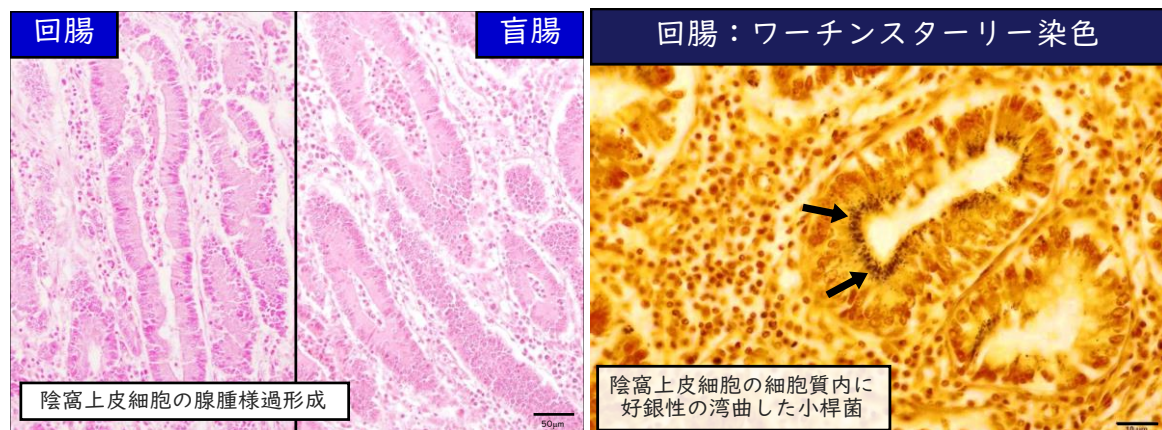


図 2 HE 染色像と回腸のワーチンスターリー像

発症例Ⅱでは、解剖検査で回腸のホース状肥厚と粘膜表面における黄色の偽膜形成がみられた。病理組織学的検査で回腸陰窩上皮細胞の腺腫様過形成、陰窩の分岐蛇行が認められ、陰窩腔内に細胞退廃物が確認された。回盲口では陰窩膿瘍が認められた。ワーチンスターリー染色で、過形成した陰窩上皮細胞に好銀性の湾曲した小桿菌が確認された(図 3)。細菌学的検査では主要臓器からの有意菌分離はなく、小腸粘膜から Li 特異的遺伝子が検出された。ウイルス学的検査で豚熱およびアフリカ豚熱を否定した。これらの結果ならびに発育不良、食欲不振、持続的な下痢といった臨床症状から、慢性型の PPE と診断した。

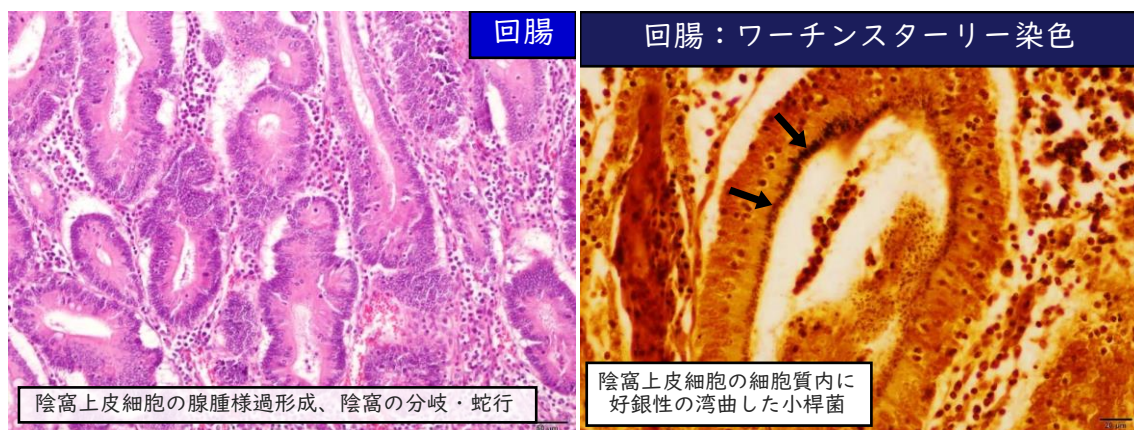


図 3 回腸の HE 染色像とワーチンスターリー染色像

と畜場成績

令和 3 年 12 月時点では平均の増体重は 730 g、出荷日齢は 160 日であったが、以降増体重は減少し、それに伴い出荷日齢は伸びていった。令和 4 年 7 月時点では平均の増体重は 650g、出荷日齢は 170 日と成績の悪化は顕著となり、以降も PPE 発生前の成績には戻っていない(図 4)。

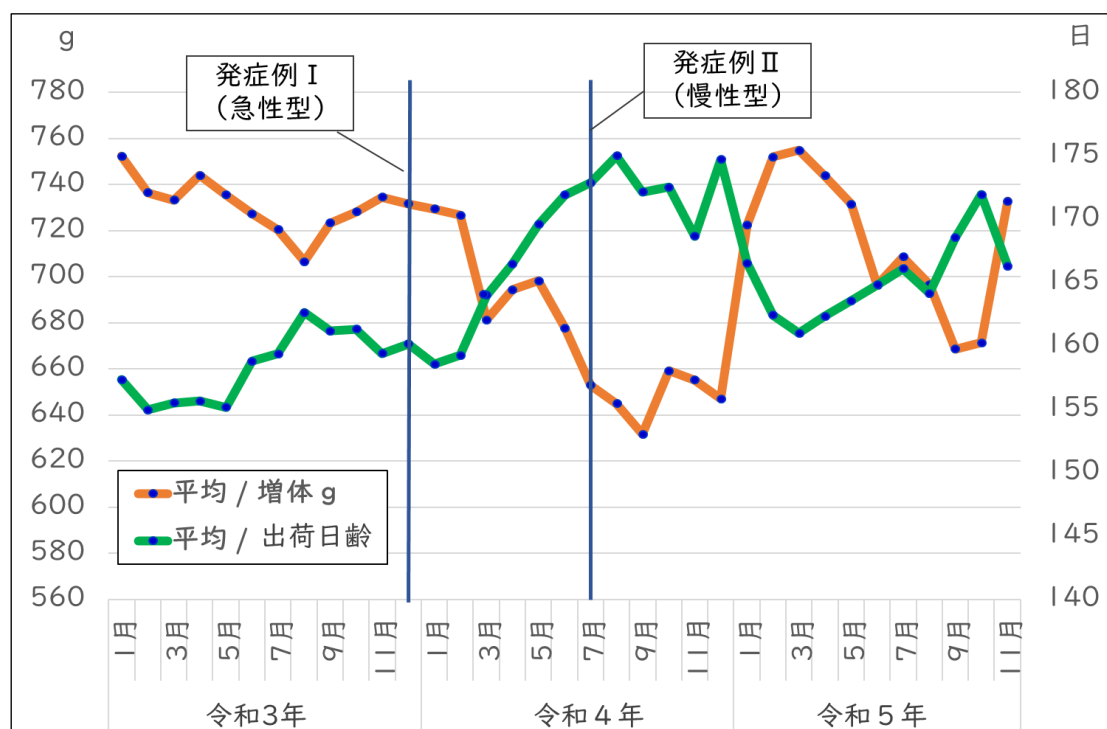


図 4 当該農場のと畜場成績

Li 抗原検索

1. 目的

農場における下痢や軟便、と畜場成績不良が継続していることから、農場内には顕在化している以上に Li 感染が拡大している可能性が懸念された。そこで、農場内の Li 感染拡大状況を確認し、ワクチン接種や飼養衛生管理の徹底を促す目的で Li 抗原検索を行った。

2. 材料および方法

令和 4 年 7 月から令和 5 年 12 月に発育不良を呈して死亡または鑑定殺した豚のうち、PPE 以外の疾病と診断された 20 例の病性鑑定材料を用いた。病理組織学的検査では、回腸の HE 染色およびワーチンスターリー染色を実施した。細菌学的検査では、小腸粘膜を用いた PCR 法による Li 特異的遺伝子検査を実施した。

3. 成績

急性型と慢性型の症例（発症例ⅠおよびⅡ）では剖検所見および組織所見が顕著に認められたが、抗原検索を行った 20 例では認められないか、認められても軽微なものであった。一方、ワーチンスターリー染色では 66%、遺伝子検査では 64%で Li 抗原陽性となり、総合すると 65%（20 例中 13 例）において Li 感染が確認された（図 5-7）。

	発症例Ⅰ (急性型)	発症例Ⅱ (慢性型)	抗原検索 20例
臨床症状	タール状血便	持続的な下痢	発育不良
剖検所見 (回腸粘膜の肥厚)	++	+	± 55%
組織所見 (陰窩上皮の過形成)	+	++	± 40%
特殊染色 (ワーチンスターリー)	+	+	+
遺伝子検査 (PCR法)	+	+	+
			66%
			+
			64%

図 5 Li 抗原検索結果

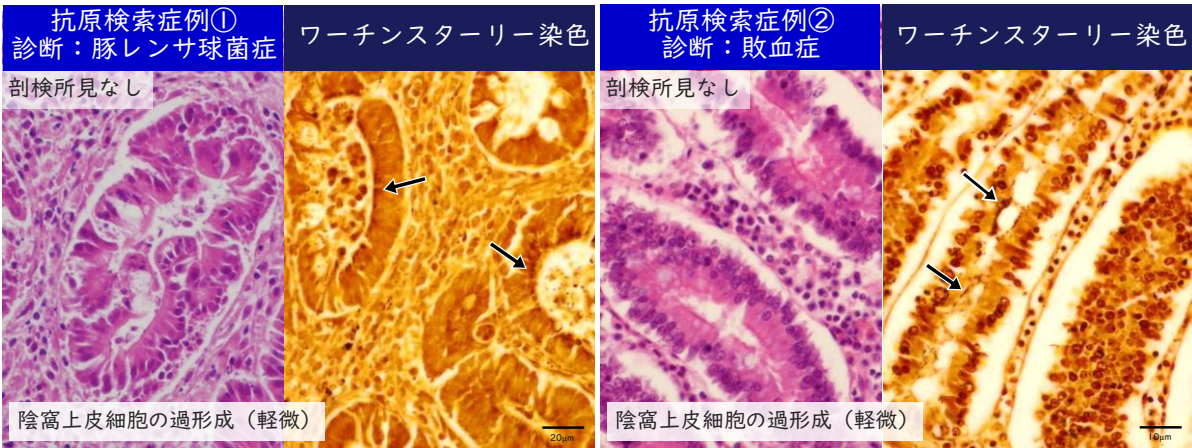


図 6 抗原検索例①

図 7 抗原検索例②

Li 抗体検査

令和 4 年 6 月に、管理獣医師によって Li 抗体検査が実施された。その結果、120 日齢以降で 30 倍以上の抗体価が認められた。野外感染による抗体は感染後 3 週間程度で上昇することから[5]、100 日齢ごろに感染していると考えられた(図 8)。

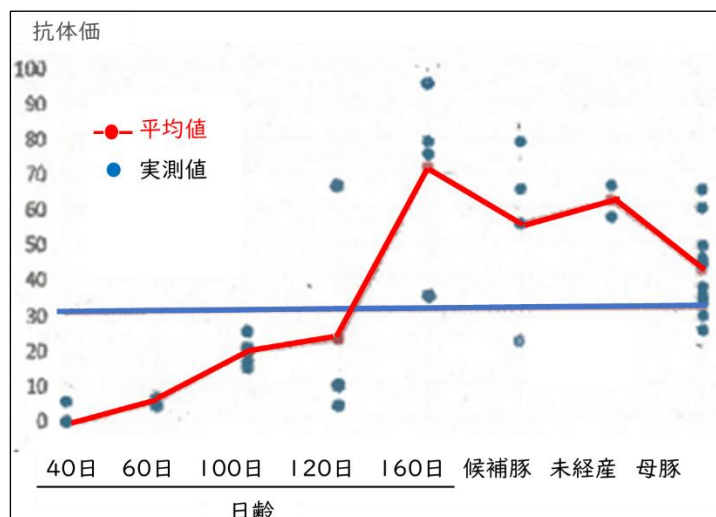


図 8 Li 抗体検査 (ELISA 法)

まとめと考察

今回行った抗原検索で、Li 感染に特徴的な下痢や軟便を示さないが、軽微な組織病変や抗原陽性を認める例が 65%確認された。Li 感染による PPE は、豚の免疫の程度、菌の暴露量、環境ストレスの強弱などで症状や回復度合いが異なり、不顕性感染として国内で広く流行していることが報告されている[6]。

当該農場ではタイロシンやチアムリンといった Li に有効な抗菌剤投与によるコントロールを試みていたが、感染・伝播の経過と抗菌剤投与タイミングを的確に見極めて使用することは難しく[3]、Li は長期間感染力を保持するため、汚染糞便が長靴を介して運ばれることで農場全体に不顕性感染が拡大していったと考えられる。

今回の結果を受けて、当該農場に対し飼養衛生管理の徹底を改めて指導し、令和 5 年 10 月より当所も協力して導入豚・哺乳豚・繁殖母豚へのワクチン接種を開始した。ワクチン接種開始以降、増体重や出荷日齢の改善がみられ、農場内の下痢や軟便頻度も低下している。ワクチン接種の効果が認められているものの、農場全体の菌数低下には時間を要するため、引き続き丁寧な病性鑑定と飼養衛生管理指導が必要と考える。

参考文献

- [1] 久保正法ら：豚病診断カラーアトラス
- [2] 芝原友幸ら：離乳後問題となる疾病. 日本豚病研究会会報, 2015(66), 22-26
- [3] 島田英明：豚増殖性腸炎(PPE)の原因. Swine Disease Infection, 2013, vol. 47
- [4] 庄山剛史：と畜場出荷豚における豚増殖性腸炎 76 例の病理組織学的特徴. 日本豚病研究会会報, 2016(68), 29-34
- [5] 島田英明：豚増殖性腸炎(PPE)の類症鑑別と対策. Swine Disease Information, 2013, vol. 48
- [6] 矢原芳博：特集豚増殖性腸炎、日本における浸潤状況. 臨床獣医, 2004, 22(1), 13-16

8 県内一養豚場の豚熱ワクチン接種時期の検討

家畜保健衛生所 落井真史 清水誠也

はじめに

平成 30 年 9 月に岐阜県で 26 年ぶりに豚熱が発生した。令和元年 7 月に福井県においても発生が確認され、令和 6 年 4 月までに 20 都県で 89 事例が発生している。令和元年 10 月 25 日に国内飼養豚でのワクチン接種を開始したが、以降も離乳豚を中心に発生がみられた。原因として、移行抗体の消失とワクチン接種までの免疫の空白期間における感染、および移行抗体によるワクチンブレイクが考えられており、離乳豚への適切なワクチン接種時期の判断が課題となっている。そこで県内一養豚場において母豚およびその子豚を用い、母豚抗体価と子豚移行抗体価の相関を求めワクチン接種モデルを作成した。実際にそれを用いて接種時期の検討を行った。

材料および方法

(1) 子豚へのワクチン接種適期モデルの作成

<材料>

母豚 10 頭およびその子豚 64 頭の血清

<方法>

- ・ワクチン接種後の母豚および 10～70 日齢子豚中和抗体価を測定
- ・半減期を 10 日とし、0 日齢子豚の推定移行抗体価を算出
- ・母豚抗体価と 0 日齢子豚の推定移行抗体価の相関を調べ、子豚へのワクチン接種適期モデルを作成

(2) ワクチン接種適期の検証

<材料>

母豚 3 頭およびその子豚 15 頭の血清

<方法>

- ・ワクチン接種後の母豚中和抗体価を測定
- ・子豚へのワクチン接種適期モデルを用いてワクチン接種時期を判断
- ・子豚へのワクチン接種後、40 日齢から 140 日齢まで 20 日間隔で採血し、中和抗体価を測定

(3) 中和試験

(1)(2)における中和試験は以下のとおり実施した。

使用細胞：CPK-NS 細胞

ウイルス：CSFV GPE (－)

- ① 56℃、30 分間血清を非働化
- ② 血清 25 μ l を培地で 2 倍階段希釈
- ③ 200TCID₅₀ /0.05ml に調整したウイルス液 25 μ l と階段希釈した血清を 37℃60 分間反応
- ④ 細胞浮遊液 50 μ l を分注
- ⑤ 37℃5%CO₂ 下で培養し、1 週間後判定

結果

(1) 子豚へのワクチン接種適期モデルの作成

母豚抗体価と0日齢子豚の推定移行抗体価には正の相関がみられた(図1)。グラフから0日齢子豚の推定移行抗体価を母豚抗体価と同等とみなし、子豚のワクチン接種適期モデルを作成した(図2)。移行抗体が、ワクチンテイク率が高く感染防御可能であるとされている16倍~32倍0となる日齢をワクチン接種適期とした。

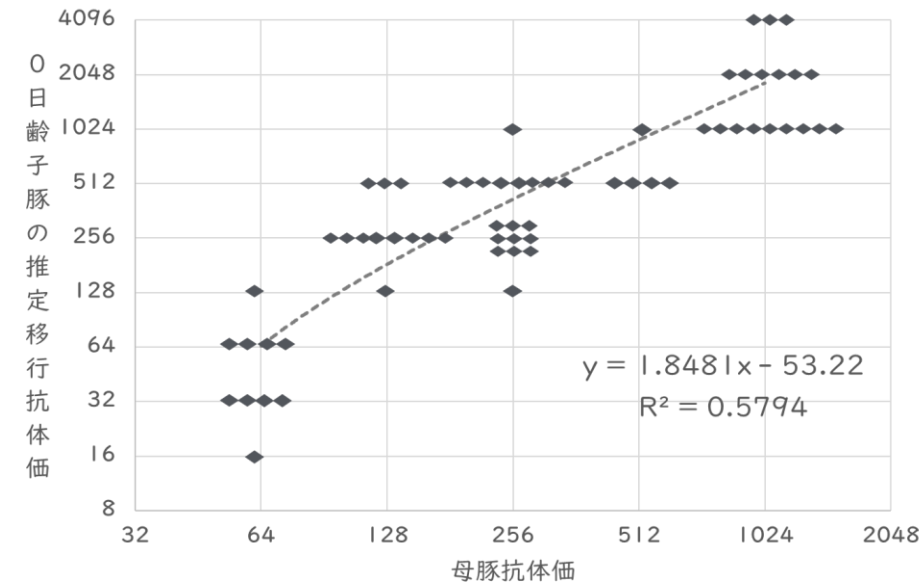


図1 母体抗体価と0日齢子豚推定移行抗体価の相関

		子豚の日齢						
		0日齢	10	20	30	40	50	60
母豚抗体価	32	32	16	8	4	2	1	
	64	64	32	16	8	4	2	1
	128	128	64	32	16	8	4	2
	256	256	128	64	32	16	8	4
	512	512	256	128	64	32	16	8
	1024	1024	512	256	128	64	32	16

図2 子豚のワクチン接種適期モデル

(2) ワクチン接種適期の検証

母豚(No.1、2、3)の抗体価はそれぞれ256倍、512倍、512倍であった。子豚のワクチン接種適期モデルから、No.1から生まれた子豚のワクチン接種適期を40日齢、No.2およびNo.3から生まれた子豚については50日齢と判断しそれぞれワクチン接種適期にワクチン接種を実施した。ワクチン接種時の子豚の移行抗体価の幾何平均値(GM値)は40日齢接種群で39.1倍、50日齢接種群の平均で57.8倍であった(表

1)。なお、50 日齢の抗体価（GM 値）は 40 日齢の抗体価から推定（40 日齢の抗体価の 1/2）した。抗体価は、ワクチン接種後から出荷直前の 140 日齢まで横ばいで推移し、抗体価 1 倍以上を維持した（図 3）。

表 1 子豚日齢と抗体価（GM 値）

母豚 No.	母豚 抗体価	子豚 頭数	子豚の日齢と抗体価（GM 値）						
			40 日齢	50	60	80	100	120	140
1	256	5	<u>39.1</u>	19.5	59.4	39.1	55.0	29.4	20.8
2	512	5	103.6	<u>51.8</u>	22.0	19.2	23.9	31.9	29.5
3	512	5	127.7	<u>63.9</u>	33.8	25.4	19.2	25.5	22.3

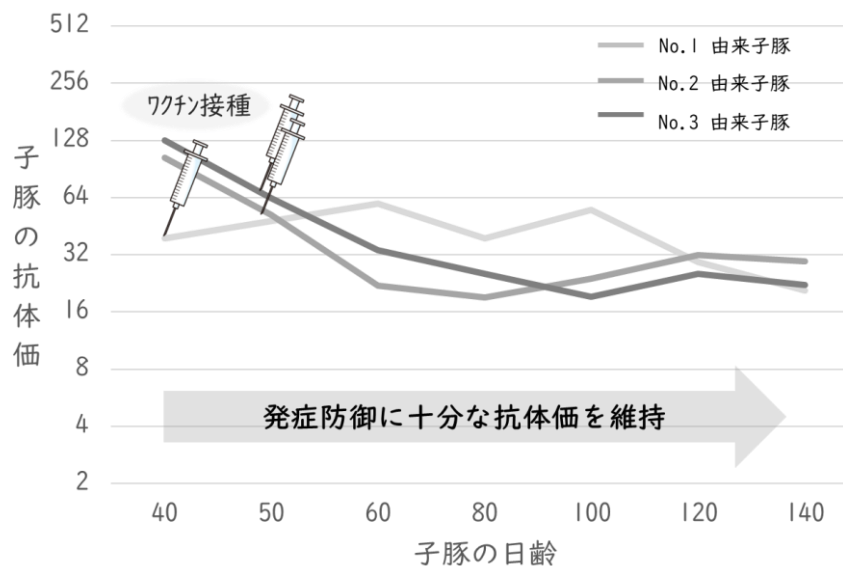


図 3 子豚日齢と抗体価（GM 値）

まとめ・考察

0 日齢子豚の推定移行抗体価は母豚抗体価とほぼ同等となり、母豚抗体価から子豚の推定移行抗体価を求めることで、子豚のワクチン接種適期を予測することが可能であると示唆された。また、予測されたワクチン接種適期の検証の結果、接種時の抗体価はワクチン接種に適切と考えられる 16～32 倍よりやや高くなったが、ワクチン接種後から出荷直前の 140 日齢まで、抗体価は 1 倍以上となり、感染防御に十分な抗体価を維持した。

これらのことから、母豚の抗体価からワクチン接種適期を判断し、ワクチン接種することで、接種後から出荷直前まで安定した群免疫を付与することができると考えられる。現在、農場では第 1 世代母豚（初回接種で初めて免疫付与された豚）および第 2 世代母豚（第 1 世代の母豚から生まれた豚）が混在しており、第 2 世代母豚について

は、母豚の抗体価および子豚の移行抗体価にバラつきがあることが分かっている。このことから、母豚の世代を考慮し、母豚ごとに子豚のワクチン接種適期を判断することが重要であり、引き続き適切なワクチン接種に関する指導を行っていく必要があると考える。

参考文献

- [1] 農林水産省 HP：豚熱の発生状況と今後の対応
- [2] 農林水産省 HP
https://www.maff.go.jp/j/council/seisaku/eisei/usibuta_sippe/88/attach/pdf/220712-9.pdf
- [3] 清水実嗣 豚コレラの診断と防疫 日本豚病研究会報 No.29 (1996)

9 県内で発生した過去 20 年間の地方病性牛伝染性リンパ腫症例のまとめと一考察

家畜保健衛生所 武田佳絵

はじめに

牛伝染性リンパ腫は家畜伝染病予防法の届出が必要な伝染病に指定されており、全国の届出頭数が 10 年間で倍増(農林水産省 HP 平成 25 年 2,310 頭、令和 4 年 4,334 頭)している。牛伝染性リンパ腫には牛伝染性リンパ腫ウイルス(BLV)感染が原因の地方病性牛伝染性リンパ腫(EBL)と、それ以外の散発性に分けられる。牛が BLV に感染すると、ウイルス遺伝子が B 細胞遺伝子ゲノムに組み込まれ、終生ウイルスを持ち続ける。感染源は BLV 感染リンパ球を含む血液や体液で、吸血昆虫、感染母乳、垂直伝播および器具等を介した人為的感染により農場内にまん延する。BLV 感染牛の 30%は持続性リンパ球増多症となり、血液中のウイルス量が多いことから、汚染源となりうる感染伝播高リスク牛とされる。高リスク牛の産子は、2 頭に 1 頭が BLV ウイルスを持って生まれ[1]、若齢発症の原因の一つに挙げられている[2]。BLV 感染牛の 5%以下が EBL を発症し、好発年齢は 4~8 歳とされる[3]。発症牛は、体表リンパ節の腫脹、削瘦、元気消失、食欲不振、眼球突出、乳量減少、下痢などを示し、死の転帰をたどるとされる[4]。また、リンパ腫はリンパ節をはじめ、肝臓、脾臓、心臓、消化管、泌尿生殖器、筋肉、時に脊髄周囲など全身に病巣がみられ、多中心性を示すものが大部分とされる[5]。

本県の EBL 発生状況

散発性を除く、BLV 感染を確認した牛伝染性リンパ腫届出事例を EBL とし、平成 16 年から令和 5 年の 20 年間の発生頭数を図 1 にまとめた。年ごとでは、1 年に 1 頭発生があるかないかの状況から、毎年 1 頭以上になり、令和に入ると毎年 2 頭以上となっていた。5 年ごとに区切ると、年を経るごとに右肩上がりに増加し、令和の 5 年間の増加は明らかだった。EBL 発症年齢の分布をみると、平成の 15 年間では 4 歳未満も散見されるが、令和の 5 年間では、EBL 好発年齢に入る 5 歳から 7 歳に集中していた(図 2)。

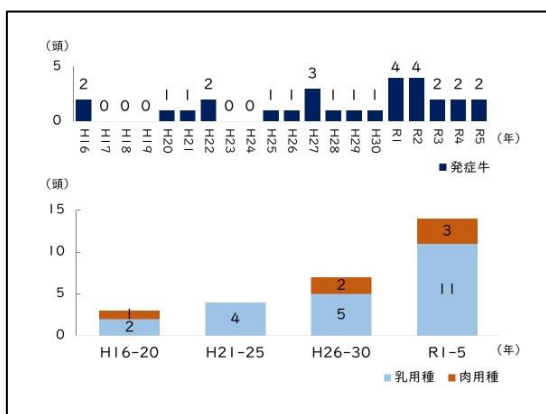


図 1 県内の EBL 頭数

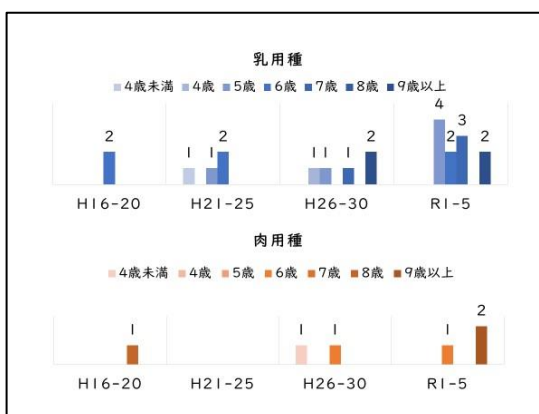


図 2 県内の EBL 発症年齢の分布

EBL の症状と病性鑑定結果

平成 16 年 1 月から平成 30 年 12 月までの 15 年間の乳用種 11 頭、肉用種 3 頭の計 14

頭を H 群、平成 31 年 1 月から令和 5 年 12 月までの 5 年間の乳用種 11 頭、肉用種 3 頭の計 14 頭を R 群として、①症状等、②腫瘍形成部位、③血液検査について比較した。なお、群の頭数は偶然一致したものである。

① 症状等

症状は、飼養者からの稟告（血液検査や解剖依頼時）を基に、表 1 にまとめた。1 頭につき複数の症状を計上、また、発生順不同となっている。

R 群では、死亡例より淘汰例が増加した。H 群では体表リンパ節腫脹や眼球突出が数例ずつあったが、R 群では 1 頭ずつと減少した。両群ともに食欲不振が最多で、続いて起立困難・不能、軟便や黒色便排出および乳量減少となった。直腸検査で腫瘤等を触知することが、H 群の 1 頭から R 群は 5 頭と増加していた。

表 1 症状等の比較

	H 群 (n=14)	R 群 (n=14)
死亡	8	5
淘汰	6	9
体表リンパ節腫脹	4	1
眼球突出	3	1
食欲不振	8	12
起立困難・不能	6	7
便性状変化（軟便・黒色化）	4	4
乳量減少	2	3
直腸検査（直検）で腫瘤等を触知	1	5

② 腫瘍形成部位

解剖で肉眼的に腫瘤を認め、かつ、その後の病理組織検査でリンパ球様細胞の腫瘍性増殖を確認したものを腫瘍形成部位とし、表 2 にまとめた。1 頭につき複数の腫瘍形成部位を計上している。

腫瘍形成部位に群差はなく、胃の漿膜や第四胃粘膜や幽門部および腸管など消化管が最多となった。心臓、リンパ節、腎臓および雌性生殖器が続いて多く確認された。脾腫は、両群 2 頭ずつ確認されており、これらのすべて肉用種であった。

表 2 腫瘍形成部位の比較

	H 群 (n=14)	R 群 (n=14)
第 1、2、3、4 胃（漿膜）	12	12
第 4 胃（粘膜、幽門部）	7	8
腸管（腸間膜、リンパ節含む）	9	10
心臓	8	11
体腔内リンパ節（骨盤腔、付属）	6	9
体表リンパ節	8	8
腎臓	7	7
雌性生殖器（子宮、膣）	4	5
脾臓（脾腫）	2	2
眼窩組織	3	1
その他：胸膜、腹膜、横隔膜、乳腺、肝臓、胆嚢、脊髄		

③ 血液検査

(ア) 検査方法

全血では、常法に従い、末梢血 1 μ l あたりのリンパ球数を算出した。BLV 感染牛のリンパ球数増加の指標である EC の鍵(乳用種)および JB の鍵(黒毛和種) [6]で判定を行った(表 3)。牛の赤血球の直径が約 5 μ m であることから、血液塗抹上で赤血球とリンパ球の直径を比較し、小リンパ球は 1.5 個分まで、中リンパ球は 2 個から 3 個、大リンパ球は 3 個以上と分類し、計数した。EBL 判断基準に、「リンパ節の複数の腫大が認められかつ、血液検査において異型リンパ球数が末梢リンパ球数 5%以上認められるもの」とある[7]。異型リンパ球は、細胞質と核の大型化、細胞質の好塩基性が強い、核のクロマチン構造が粗いという特徴があり(図 3)、一部に細胞質内に空泡をもつものや、単球様の核形および核小体が明瞭なものもあるとされる[7]。大リンパ球より大きいことから、異型リンパ球を含む大リンパ球が 5%以上の EBL 頭数を算出した。また、ヘマトクリット値(Ht 値)を測定した。

表 3 EC の鍵・JB の鍵

	ECの鍵		
	正常	擬陽性	陽性
0-1歳	<10,000	10,000-12,000	>12,000
1-2歳	<9,000	9,000-11,000	>11,000
2-3歳	<7,500	7,500-9,500	>9,500
3-4歳	<6,500	6,500-8,500	>8,500
4歳以上	<5,000	5,000-7,000	>7,000

	JBの鍵		
	正常	擬陽性	陽性
0-1歳	<7,000	7,000-8,000	>8,000
1-2歳	<5,500	5,500-6,500	>6,500
2-3歳	<4,500	4,500-6,000	>6,000
3-4歳	<4,500	4,500-6,000	>6,000
4歳以上	<4,000	4,000-5,500	>5,500

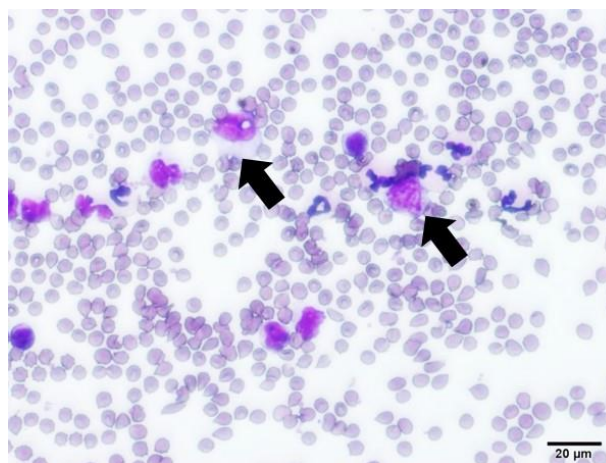


図 3 異型リンパ球(矢印)を含む血液塗抹像

血清では、屈折計で血清総タンパク質(STP)を測定した。また、EBLで上昇するとされる乳酸脱水素酵素(LDH)[8,9]をはじめとする生化学検査項目(CPK、GOT、BUN、T-bil、グルコース、総コレステロール、GGT、カルシウム、無機リン(IP)、マグネシウム、アルブミン)を乾式臨床化学分析装置で測定した。ケトン体(BTB)は簡易測定器で測定した。検査頭数は、生前に血液検査を実施できたもの、または、血液塗抹標本が残存していたものとする。

(イ) 検査結果

H 群では、全頭でリンパ球数が増加していたが、R 群では 8 頭中 3 頭が正常だった。リンパ球の割合測定は、R 群では小リンパ球が最多は 6 頭中 4 頭、中リンパ球と大リンパ球は 1 頭ずつだった。大リンパ球が 5%以上だったものは、両群で半数となった。LDH は、ほぼ全頭が正常限界値[10]を超える 1,500U/L 以上の値だった。また、その半数で CPK が 200U/L 以上と上昇していた(表 4)。

両群通じて得られた所見として、腫瘍が形成された場所や大きさにより、物理的に臓器の機能障害を起こす例が複数確認された。一つは、第四胃の幽門部に形成された腫瘍により食滞や通過障害となるものがあった(図 5)。また、骨盤腔内で腫瘍が増大し、尿路閉塞から腎機能低下を起こした例があり、生化学検査においても BUN や IP の上昇を認めた。また、血液検査の異常値と腫瘍形成部位に一部傾向が見られた。Ht 値の低下(12-26%)した 6 頭中 5 頭で褐色から黒色便の排出があり、また、6 頭中 5 頭で粘膜潰瘍を伴う第四胃の腫瘍形成を認めた。STP が低下(アルブミンの低下も含む)した 7 頭中 5 頭で Ht 値も低下していた。IP が上昇(9.1-15.6 mg/dl)した 8 頭中 6 頭で腎臓に腫瘍形成を認めた。

表 4 血液検査結果(抜粋)

	H 群	R 群
ECの鍵・JBの鍵 陽性	8/8	5/8
ECの鍵・JBの鍵 正常	0/8	3/8
小リンパ球の割合が最多	1/2	4/6
中リンパ球の割合が最多	1/2	1/6
大リンパ球の割合が最多	0/2	1/6
大リンパ球(異型含む)が5%以上	1/2	3/6
LDH上昇 (1,500 U/L以上)	8/10	10/10
LDH上昇 + CPK上昇 (200 U/L以上)	4/8	5/10
Ht値が低下(乳用牛27%未満、肉用牛34%未満)	3/10	4/9

その他異常があった項目 IP BUN STP グルコース GOT T-Bil GGT BTB



図 5 幽門部の腫瘍と粘膜潰瘍(矢印)

県内および農場での EBL 発生状況

平成 16 年から 5 年区切りで 4 期に分けて比較した。比較する項目は①県内(乳用種)の BLV 抗体陽性頭数と EBL 頭数、②発生農場ごとの EBL 頭数、③R 群で発生が多い農場の EBL 発生概要、④EBL 発生農場の BLV 抗体陽性頭数と陽性率とした。なお、BLV 抗体陽性頭数や率は、家畜伝染病予防法第 5 条の検査に併せて本県で実施する 5 年毎のサーベイランスの結果を基にした。

① 県内(乳用種)の BLV 抗体陽性頭数と EBL 頭数

サーベイランスの 5 年間の結果を合計し、県内 BLV 抗体陽性総頭数とした。県内 BLV 抗体陽性総頭数が増加すると、その 5 年後に EBL 頭数が連動して増加するという関係性を認めた(図 6)。乳用種の R 群頭数と平成 26 年から 30 年の BLV 抗体陽性頭数を基にした EBL 発症率は 4.7%であった。

② 発生農場ごとの EBL 頭数

R 群の発生農場は、乳用種 6 戸および肉用種 2 戸で、H 群の発生農場と重複するのは、乳用種 2 戸だった(図 7)。本県の農場では、おおむね 5 年に 1 頭程度の EBL 発生となっていた。K 農場では、令和元年から 5 年の間に 4 頭が EBL を発症しており、他農場と比較して目立っていた。

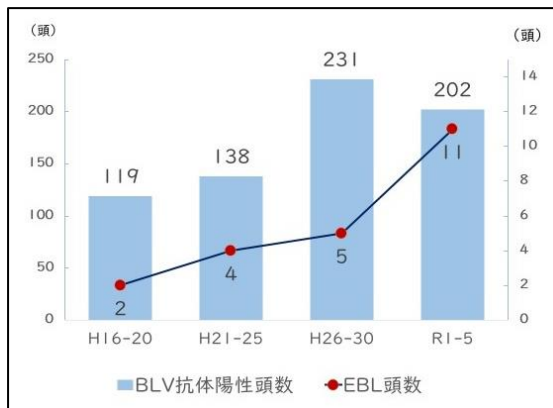


図6 BLV抗体陽性総頭数とEBL頭数

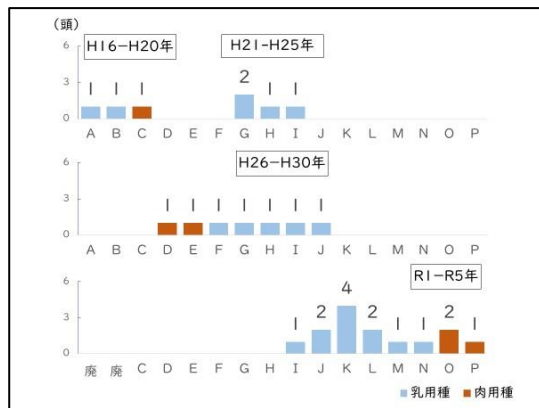


図7 発生農場ごとのEBL頭数

③ R群で発生が多い農場のEBL発生概要

K農場で発症した4頭の発生概要を表5にまとめた。4頭のうち3頭が淘汰例で、また、そのうち2頭の症状は、肢が原因の起立不能と食欲不振だった。この2頭の腫瘍形成部位は胃や腸管などの消化管に限定しており、発症後、比較的早期にEBL診断に至った事例と考えられた。

表5 K農場におけるEBL発生概要

	令和元年	令和3年	令和5年①	令和5年②
年齢	5歳6か月	6歳10か月	7歳10か月	6歳
死亡・淘汰	淘汰	死亡	淘汰	淘汰
症状等	食欲不振 眼球突出 直検で触知 黒褐色便	顔面の腫脹 食欲不振	肢の炎症 起立不能 食欲不振	食欲不振 食滞
腫瘍形成部位	内側腸骨下Ly 第4胃(漿膜、 粘膜、幽門部) 直腸(漿膜) 心臓 眼窩組織	頸部皮下 内側腸骨下Ly 直腸(漿膜) 心臓・心囊	前胃(漿膜) 第4胃(粘膜)	前胃(漿膜) 第4胃 (粘膜、幽門部) 腸管(漿膜)

④ EBL発生農場のBLV抗体陽性頭数と陽性率

平成16年から令和5年の間にEBL発症がみられ、かつ、平成26年から令和5年の間でサーベイランス検査を受けたCからP農場のBLV抗体陽性頭数と陽性率の推移を図8にまとめた。K農場では、5年間の間に陽性頭数が35頭から15頭に減少、また、陽性率も著しく低下した。K農場は、県内関係機関が協力の元、BLV清浄化対策に取り組んでいる。

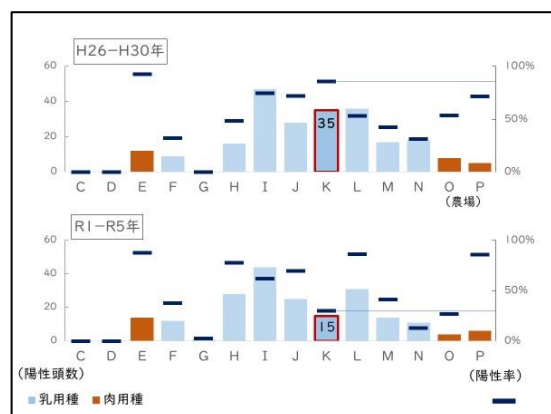


図8 発生農場のBLV抗体陽性頭数・率

まとめと考察

県内の R 群における EBL 頭数の増加は、県内の BLV 感染牛の増加と連動していた。R 群は好発年齢での発症がほとんどで、若齢化は認めなかった。一方で、EBL の症状とされてきた体表リンパ節腫脹や眼球突出を明らかに示す事例が減少し、食欲不振など一般的な疾病でもみられる症状を示す事例が増加した。また、直検で発症を疑う事例が増加しており、その理由として EBL の病態が広く周知されたこと、試験などで直検を実施する機会が増加したこと、また、EBL のリンパ腫好発部位が骨盤腔にある内側腸骨下リンパ節等とであること[11]が考えられた。BLV 感染牛の頭数が減少している K 農場で発生頭数の増加を認めた。本県でこれまで清浄化を達成した他農場において、BLV 感染牛が減少してから EBL が続発したことがあった。水平伝播防止策が機能し、かつ、繁殖成績が良好で廃用事故が少ない農場では、自ずと BLV 感染牛の年齢が EBL 好発年齢に集中する。BLV 清浄化対策を行っている農家での EBL 発生増加には、十分な説明を行い、対策を継続してもらう必要があると思われる。

現状、EBL を生前に確定診断することは困難とされ、様々な検査の結果から総合的に予後判定を行っている。リンパ球数の増加や血液塗抹上での異型リンパ球数の算出もその一つだ。EBL 発症時にリンパ球数は必ずしも増加するとは限らず、本調査でも 16 頭中 3 頭が正常だった。異型リンパ球は慢性的な抗原刺激により増加する非腫瘍性の細胞とされ[7]、ヒトでは、ウイルス感染症や結核などの細菌感染症や免疫疾患などで検出される[12]。また、ヒトのリンパ腫診断では、異常リンパ球の出現を確認することとされ、大型の細胞である異型リンパ球とは異なり、細胞の大きさは様々で腫瘍性の特徴を有していることが判断基準となっている[13]。本調査においても、小または中リンパ球大の細胞が増加している事例が半数以上であることから、EBL においても、異常リンパ球いわゆる腫瘍細胞の検出を併せて行うことが有用と考える。

牛では、LDH 総活性値および 5 つある LDH アイソザイム分画の 2 と 3 が EBL 発症マーカーとして有用であることが以前から報告され[8,9]、また、体表リンパ節の腫脹やリンパ球数増加を示す定型的 EBL と示さない非定型的 EBL の感度はいずれも 80% 以上で、総活性およびアイソザイム共に非定型的 EBL における感度は定型的 EBL に比べると低い有意差はないと報告がある[10]。本調査では、EC の鍵が正常で、かつ、体表リンパ節腫脹の稟告がなかった 3 頭の LDH 総活性値が 3,000 IU/L 以上と著しく上昇していた。非定型 EBL と炎症性疾患や EBL 以外の腫瘍性疾患との鑑別では、腫瘍性疾患との有意差はないとされる[10]ことや、一般的に LDH は筋肉や肝臓等様々な部位の損傷でも上昇することから、他の生化学検査項目の結果も併せて確認する必要がある。本調査においても、LDH 総活性値上昇に CPK 上昇を伴うものが半数あり、筋肉損傷との鑑別が必要であった。

本調査において Ht 値が低下していた牛で、第四胃粘膜の潰瘍を伴う腫瘍形成や黒色化を伴う軟便を認めた。STP が低下したものは、Ht 値も低下しているものが多く、第四胃の病変との関係性が疑われた。黒毛和種の EBL 生前診断法の報告に、BLV 感染牛で原因不明の何等かの症状がある牛の検査をした際に、JB の鍵が陽性かつ Ht 値の異常がある場合、EBL である的中率が 100% とあった[14]。このことから、Ht 値が低下し、かつ、リンパ球数の増加がある BLV 感染牛は、特に EBL 発症を疑い予後判定を行うことが必要

と考える。

血中 IP 濃度は、飼料からの摂取量、過剰分の腎臓からの排泄および Ca 代謝との連動により変化する。腎機能が低下すると IP が適切に排泄できずに高リン血症となり、また、正常な腎機能でも排泄し切れないほどの細胞内 IP が細胞外に放出された場合にも高リン血症となる[15]。本調査において、血中 IP 濃度が上昇した 8 頭中 6 頭で腎臓に腫瘍形成を認めた。この濃度上昇が腎機能低下によるものだけではないと考えるが、生前に腫瘍形成部位を推定することは可能かもしれない。

県内農場では EBL 発生は 5 年に 1 頭程度が主体であった。感染伝播高リスク牛では 4 産目以降の乳量および乳質低下[16]や乳房炎罹患時の臨床症状が重症化しやすいとの報告[17]もあるが、BLV 感染牛からの生産物の流通は非感染牛と扱いが同等のため、BLV による損害を認識しづらいのが現状である。全国的な EBL 発生報告は、と畜場で 6 割、農場で 4 割であり[18]、と畜場で肥育牛が全廃棄となり多大な損害が生じる事例もあるといわれる。

近年、BLV の研究が進むにしたがって、早期発症診断法や BLV 抵抗性遺伝子調査など新しい検査方法の開発や試行が多数なされている。本調査で得られた結果や新しい検査法の導入等により、今後も早期に正確な診断に努め、乳肉連携した総合的な対策も考慮しながら、県内の BLV 感染牛減少を目指して、継続して取り組んでいきたいと考える。

参考文献

- [1] Mekata, et. al: Veterinary Record. (2014)
- [2] 米山伸ら: 宮崎県家畜保健衛生所事業成績及び業績発表会集録
- [3] 農研機構動物衛生研究部門: 家畜の監視伝染病
- [4] 農林水産省ホームページ
- [5] 村上賢二: 地方病性牛白血病(EBL)と清浄化に向けた取り組み事例
- [6] Mekata, et. al: J. Vet. Med. Sci. 80(2)316-319, 2018
- [7] 全国農業共済協会: 家畜共済における臨床病理検査要領
- [8] Ishihara K, et al: Jpn J Vet Sci, 42, 289-295 (1980)
- [9] Yasutomi Y, et al: Jpn J Vet Sci, 49, 957-963 (1987)
- [10] 三浦沙織ら: 産業動物臨床医誌 6(4):149-153, 2016
- [11] 村上賢二: 畜産技術 2017 年 7 月号 40-44
- [12] 樋口敬和: medicina, 51(3), 435-439(2014)
- [13] 阿南建一ら: エビデンス血液形態学, 2-62, 近代出版, 東京(2014)
- [14] 羽生さち子ら: 新潟県中央家畜保健衛生所佐渡支所資料
- [15] 水谷尚: 臨床獣医 2020 年 12 月号:64-67
- [16] Yang et al: Journal of Dairy Science. (2016)
- [17] Watanabe et al: JVMS(2019)
- [18] 小林ら: 獣医疫学雑誌(2016)