

平成28年度 成績概要書

課題コード（研究区分）  3102-214561（経常研究）

1. 研究課題名と成果の要点

- 1) 研究成果名：地域防疫のための酪農場の感染症モニタリング法
（研究課題名：地域防疫における酪農場の感染症モニタリング手法の開発）
- 2) キーワード：防疫、牛舎環境材料、バルク乳、サルモネラ、マイコプラズマ
- 3) 成果の要約：酪農場において牛舎環境材料やバルク乳を用いてサルモネラ、マイコプラズマ、牛ウイルス性下痢・粘膜病ウイルスを定期的に検査すること（感染症モニタリング）は、陽性農場の検出に有効であり、地域の防疫対策向上に寄与できる。現地における感染症モニタリング試行の結果から、実施時の注意事項および実施手順を提示した。

2. 研究機関名

- 1) 担当機関・部・グループ・担当者名：畜試・基盤研究部・家畜衛生G・主査 福田茂夫、生物工学G
- 2) 共同研究機関（協力機関）：（A町家畜伝染病自衛防疫組合）

3. 研究期間：平成26～28年度（2014～2016年度）

4. 研究概要

1) 研究の背景

近年の酪農場は多頭化が進むとともに、TMR センターや哺育育成牧場の利用が増加し、農場間を家畜や資材運搬などの人・車両が頻繁に往来することから、感染症発生の危険性が高まっている。特にサルモネラ症、マイコプラズマ乳房炎および牛ウイルス性下痢・粘膜病（BVD-MD）は、疾病発生時の経済的損失が大きく、防疫対象疾病として重要である。これら感染症の発生低減には、地域が一体となって取り組む「地域防疫」が必要である。地域防疫の推進にあたっては、導入牛検査や農場への入場規制等の対策を農場間で共有するとともに、病原体侵入の有無や防疫対策の効果確認のための定期的な感染症モニタリングが必要である。

2) 研究の目的

採材が容易な牛舎環境材料を用いて、より少ない検体数で効率的にサルモネラを検出する検査方法を明らかにする。さらに、モデル地区において実規模でのサルモネラ症、マイコプラズマ乳房炎および BVD-MD のモニタリングを試行し、その結果をもとに効果的な酪農場の感染症モニタリング法を提案する。

5. 研究内容

1) 牛舎環境材料によるサルモネラの検査手法の確立

ねらい：（1）牛舎環境材料の乾燥または凍結がサルモネラの検出に及ぼす影響を明らかにする。

（2）サルモネラを効果的に検出するための牛舎環境の採材場所を明らかにする。

試験項目等：

- （1）サルモネラ（*S. Typhimurium*）を添加した搾乳牛の糞尿材料を用い、乾燥処理は実験室内で13週間自然乾燥させ、凍結処理は-30℃での凍結と室温での解凍を2回繰り返した。損傷菌*を含むサルモネラ菌数を混釈重層培養法*および最確数法*による増菌培養法で測定した。（*用語説明参照）
- （2）サルモネラ症発生農場4戸（いずれもフリーストール牛舎）において農場内40か所以上から環境採材を行い、検出頻度を比較した。

2) モデル地区での感染症モニタリングの試行と実施方法の改善

ねらい：モデル地区において実規模の感染症モニタリングを試行し、効果的なモニタリング法を明らかにする。

試験項目等：A町をモデル地区とし、3年間感染症モニタリングを試行し（表2）、試行前の病原体検出状況および陽性時における全頭検査との比較と実施上の課題や対応方法について調査した。

3) 地域防疫における感染症モニタリングの実施手順

ねらい：1) および2) の結果から地域での感染症モニタリングを実施する際の手順をまとめる。

6. 成果概要

- 1) -（1）自然乾燥開始後3週目で糞尿材料の推定水分含量は0%となり、損傷菌を含むサルモネラの菌数は乾燥前の約1/10に減少した。しかし、3週目以降の菌数は13週目までほとんど低下せず、検出が可能であった。また2回の凍結・解凍により損傷菌を含むサルモネラの菌数は約1/10に減少したが、検出は可能であった。EEMブイヨン培地による前増菌を用いた培養検査方法は、損傷菌を検出できることから牛舎環境材料を用いた検査に有効であった。
- 1) -（2）サルモネラの検出頻度は堆肥場や牛床清掃の終末部で高かった（表1）。したがって、採材場所は堆肥場を第一選択とし、各牛舎の清掃終末部等、農場規模に合わせ複数か所とするのが有効であると考えられた。
- 2) サルモネラは3年間で3戸から検出され、試行前の9年間で1戸よりも検出頻度が高く（表2）、検査回数の増加や採材方法の改善による効果が示唆された。マイコプラズマは3年間で9戸から検出されたが（表2）、検出戸数や全頭検査で摘発される陽性頭数は年次を追って減少し、おおむね2ヶ月間隔の検査による早期発見がマイコプラズマ乳房炎の発生低減に寄与したと考えられた。サルモネラおよびマイコプラズマ検出農場のうち、1戸および6戸で陽性牛が摘発され（表2）、清浄化対策がとられた。BVDVは3年間で3戸から検出され、うち1戸で陽性牛が摘発・とう汰された（表2）。以上のことから、試行したモニタリング検査は、モデル地区における防疫対策の向上に寄与したと考えられた。なお、モニタリング検査陽性でも陽性牛が確認されない場合があり、病原体の過去の侵入や一過性の感染を検出したと考えられた。
試行において、検出時の対応、陽性牛のとう汰等の同意、採材方法の統一等の課題が認められたことから、モニタリング実施上の注意事項を整理して示した（表2）。
- 3) 以上の調査や検討結果を踏まえ、地域での感染症モニタリングを実施する際の手順等を示した（図1）。

<具体的データ>

表 1. サルモネラ発生フリーストール酪農場の環境材料検査における採材場所とサルモネラの検出

農場	飼養頭数	検体数	堆肥場	牛床清掃（糞尿）			バーラー		牛舎			分娩房	ハッチ	その他
				終末部	一時置き場	重機	床	待機場リターン	飼槽	水槽	床パドック			
I	約 300	42	3/3	2/3	0/1	0/3	1/1	0/3	0/4	0/3	0/4	0/12	0/4	0/1
II	>500	45	1/1		1/2*	1/2	0/1	1/1	0/10	0/10	0/10	0/2	0/6	なし
III	>500	54	0/3	1/1	なし	0/2	0/1	0/1	0/11	1/11	0/11	なし	0/10	0/3
IV	約 300	48	0/6		0/2*	0/4	0/1	0/2	0/6	0/6	1/8	0/6	0/3	0/4
		189	4/13	3/4	1/5	1/11	1/4	1/7	0/31	1/30	1/33	0/20	0/23	0/8

検出検体数/検体数 網かけ：サルモネラ検出場所 一時置き場：堆肥場へ運ぶ前の集積場所（※：牛舎清掃終末部が一時置き場となる）

表 2. 感染症モニタリングの試行による効果と実施時の注意事項

	試行前	試行	注意事項
サルモネラ牛舎環境材料検査			
実施年度	H17～25	H26～28	<事前の対応>
検査頻度	夏季に年 1 回 全戸（44～49 戸）	夏季を含む年 2 回 全戸（38～42 戸）	・検出時の対応をフローチャート化する
採材方法	牛舎清掃終末部、飼槽水槽、牛舎通路等から綿棒で採取	堆肥場、牛床清掃終末部を中心にチャック付袋で 1g 以上採取	・環境検査で検出されても、全頭検査で陽性牛が認められない場合があることを説明する
検出件数	H23:1 戸	H26: 2 戸 H27: 非検出 H28: 1 戸（4 頭陽性とう汰）	<採材時の注意点> ・フリーストール農場の場合、畜舎配置や糞尿清掃方法から採材場所を地図等で記録、確認する ・やむを得ず綿棒で採材する場合は、綿球全体に環境材料が厚く付着するように採材する
マイコプラズマバルク乳検査			
実施年度	H21～25	H26～28	<事前の対応>
検査頻度	年 3 回 全戸（43～48 戸）	H26 から順に年 5、6、4 回 全戸（38～43 戸）	・検出時の対応方針をフローチャート化する
検出件数	H21～25 で計 9 戸	H26: 6 戸（5 戸 26 頭陽性とう汰） H27: 3 戸（1 戸 1 頭陽性とう汰） H28: 非検出	<検出時の対応> ・再検査を行う ・再検査で陰性の場合、1 か月以内に再度検査し陰性確認を行うことが望ましい
BVDV バルク乳検査			
実施年度	未実施	H26～28	<事前の対応>
検査頻度	—	年 1 回、全戸（H26:5 戸、H27:39 戸、H28:40 戸）	・持続感染（PI）牛が主な感染源であることを説明し、PI 牛のとう汰について同意を得る
検出件数	—	H26: 非検出 H27: 1 戸（1 頭陽性とう汰） H28: 2 戸	・一時的な感染によって検出される場合があることを説明する

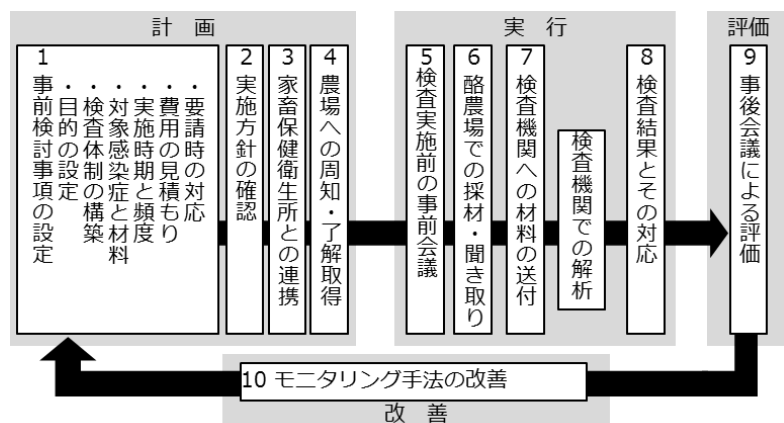


図 1. 地域での感染症モニタリングを実施する際の手順

7. 成果の活用策

1) 成果の活用面と留意点

- (1) 家畜伝染病自衛防疫組合等が、地域でサルモネラ等の自主検査を実施する際に活用する。
- (2) 本成績における試行と同等の感染症モニタリングにより、地域の防疫水準向上が期待できる。

2) 残された問題とその対応

8. 研究成果の発表等

<用語説明>

混釈重層培養法：損傷菌も発育可能な非選択培地と損傷菌は発育不可能な選択培地の 2 種類の平板培地を利用して、その差から損傷菌数を評価する方法。

最確数法：検体の 10 倍階段希釈液を調製して前増菌培地 3 本ずつに接種後、選択増菌し、分離選択培地に塗抹して、各希釈系列における試験管の陽性数を最確数表に当てはめて菌数を推定する。

損傷菌：外部ストレス等で損傷した状態の細菌で、一般環境での回復は不可能だが、適切な条件により健常菌に回復する。感染症予防には、損傷菌を含めた検査が必要。