

目 次

総 説

プロスタサイクリンによる腎不全治療への展望

竹中 雅彦 広島県福山市開業 ..... 1

産業動物

乳成分を用いた牛群診断

桧山 尚子 ..... 6

牛RSウイルス病の早期診断法の検討

恵谷 美江, 山本 武, 平井 潤思 ..... 10

黒毛和種繁殖牛に発症したエンドファイト中毒症

玉川 朋治, 石田 恭子, 玉野 光博 ..... 13

ウシ胚からの性判別用細胞採取法の開発

尾形 康弘, 日高 健雅, 松重 忠美 ..... 16

レシピエント卵子の品種が核移植胚及び産子へ及ぼす影響

日高 健雅, 尾形 康弘, 松重 忠美 ..... 20

黒毛和種の白線部ヘルニアの1例

中谷 啓二, 山崎 一男, 平田 晴美, 太田 哲夫, 上高 宏, 石橋 一郎,  
国重 俊治, 大川 雄三, 篠塚 康典 ..... 24

飼料給与を時間軸で考える要因分析事業

篠塚 康典, 桧山 尚子 ..... 27

代謝プロファイルテストにおいてアルブミンの低下が認められた乳牛群の飼養状況とその要因

鈴木 俊彦 ..... 31

小 動 物

外科手術と化学療法で治療した頭蓋内髄膜腫の犬の1例

田村 慎司, 田村由美子, 菅原 淳也, 堀由 布子, 菅原 雅俊, 内田 和幸 ..... 34

持続的な嘔吐を呈した猫の肝嚢胞の1例

川上 正, 園田 康広, 川野 悦生 ..... 39

外科的結紮手術を行った犬の動脈管開存症の5例

園田 康広, 川上 正, 長澤 裕, 長澤 晶子, 小山 健, 川村奈津子,  
櫻田 晃, 長谷川孝寿, 大岡 恵 ..... 43

犬の両側手根関節脱臼の1例

櫻田 晃, 榎本已知彦, 板本 和宏, 大村 斉, 和田 安弘 ..... 47

ネコの頭部に発生した粘液肉腫の一例

竹内 良成, 福万 朋子, 塚根 美穂, 伊藤 雄悟, 山岡 和子, 角田 睦子,  
角田 利一, 平野 健 ..... 50

広島市における東洋眼虫のホンダヌキへの感染状況

渡辺 仁, 野田亜矢子, 南 心司, 大丸 秀士, 柴崎 桃子, 古本 佳代,  
古川 敏紀 ..... 54

---

---

## 公衆衛生

認定小規模食鳥処理施設における衛生対策に関する検討

東久保 靖, 伊坪堅香子, 土井 章三 ..... 56

中小規模学校給食施設における衛生指導について ～特にドライ運用について～

矢野美奈子, 新元 芳彦, 小田真紀子, 永田 猛, 向井 健, 山本 一夫 ..... 61

広島県内における実験動物施設の現状について

大原佳世子, 柳本 慎治, 久保田早苗, 池庄 司剛, 川西 秀則, 高橋 峰雄,  
松田 政明 ..... 65

広島市と畜場における地方病性牛白血病の抗体保有状況とその発生

大川 育之, 阿部 恵子, 太田 垣寧, 佐伯 幸三, 瀬尾 和範 ..... 68

*Clostridium perfringens*が分離された牛の壊疽性肝炎の1症例

赤木 雅彦, 仲宗根智彦, 玉岡 純也, 山根 伸久, 田口 和史, 佐藤 隆司 ..... 71

清涼飲料水等に含まれるベンゼンの実態調査について

岩井 徹, 西岡 達彦, 中島 敏浩, 重東 和宏, 三宅 伸子 ..... 75

## 会 報

関連学会案内

投稿規定

---

# プロスタサイクリンによる腎不全治療への展望

竹 中 雅 彦

(受付：平成19年3月23日)

## Prospects regarding the treatment of renal failure with prostacyclin

MASAHIKO TAKENAKA

Takenaka Animal Hospital

3-10-3 Zaocho, Fukuyama, Hiroshima, Japan

### はじめに

1930年に新鮮なヒト精液により子宮筋が規則的に収縮することが発見され、精液から分離された物質は、前立腺 (prostate) から作り出されたものでプロスタグランディン (prostaglandin: PG) と命名された。

その後、同様な分子構造の物質が犬を含むいくつかの動物から発見され、それらは循環器系、腎臓、凝固系などの生理学的機序に深く関与していることが解ってきた。

これらのPGは、アラキドン酸の合成経路から生成され、共通の前駆物質PGH<sub>2</sub>を経て各種PGに分化する。その中で生理的に重要なPGは、PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2</sub>α、プロスタサイクリン (PGI<sub>2</sub>)、トロンボキサンA<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) などである。

PGI<sub>2</sub>の血管拡張作用、抗血小板作用は古くから知られていたが、PGI<sub>2</sub>は、非常に不安定で、生体における半減期が数分ときわめて短いために、治療薬として用いるのは困難であった。しかしながら、1979年に経口投与が可能な安定したPGI<sub>2</sub>アナログであるベラプロストナトリウム (Beraprost Sodium: BPS) が世界に先駆けてわが国で開発された<sup>1, 2)</sup>。現在、主に閉塞性血管疾患の治療薬として使用されているが、近年PGI<sub>2</sub>の研究から従来知られている血管拡張作用、抗血小板作用に加え新たに血管新生、血管内皮の保護作用、線維化抑制作用やサイトカインに対する作用などが発見され臨床的意義が見直されるに至った。その中で人の腎臓内科領域でPGI<sub>2</sub>が注目されている。

腎不全に対する考え方は、1970年代までは主に糸球体障害が腎不全の本態であり間質障害は二次的な位置づけであった。しかし、最近の研究から糸球体障害よりも

しろ間質障害の程度が、腎不全の予後と相関することが解ってきた。腎不全を進展させる要因として、さまざまな因子が関与するが主な増悪因子として血液凝固系の亢進、各種炎症性サイトカインの産生増加、糸球体過剰濾過、間質線維化の亢進などが知られている。これらの因子が複雑に関与して間質障害を促進させ腎不全を悪化させることになる。

いかに間質性障害の進行を抑制し、さらに改善させるかが現在の慢性腎不全治療の基本的な考え方である。そこで注目されてきたのがPGI<sub>2</sub>の薬理作用で、先に述べたように腎不全の悪化因子をPGI<sub>2</sub>の薬理作用により改善させられる可能性が期待されている。

今回は、PGの生体における役割と作用について説明し、腎臓内科領域でのPGI<sub>2</sub>を用いた腎不全治療の可能性について説明する。

### 1. 生体における主なPGの役割

① プロスタサイクリン (PGI<sub>2</sub>)、トロンボキサンA<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) の生成PGは、様々な細胞から生産されるが先ず、細胞膜のリン脂質からフォスホリパーゼA<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) によりアラキドン酸が分離され更にシクロオキシゲナーゼ (COX) によりPG共通の前駆物質PGH<sub>2</sub>が形成される。PGI<sub>2</sub>は、PGH<sub>2</sub>からプロスタサイクリン合成酵素により生産され細胞外に放出され標的細胞上の受容体に接合し作用を発現する。

プロスタサイクリン (PGI<sub>2</sub>) は、主として血管内皮細胞で大部分生産され、血小板から産生されるトロンボキサンA<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) の作用に拮抗し、血行動態のホメオスタシスの維持に重要な働きをしている。

TXA<sub>2</sub>は、血小板にてアラキドン酸から生成されるPGH<sub>2</sub>をへてトロンボキサン合成酵素により生成される。

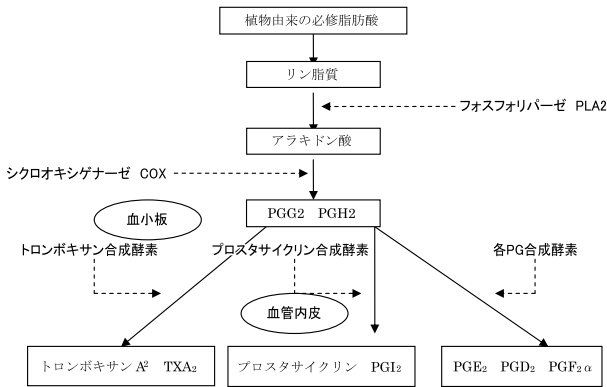


図1 プロスタサイクリン(PGI<sub>2</sub>), トロンボキサン A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) の生成

② PGI<sub>2</sub>とTXA<sub>2</sub>の生理学的作用PGI<sub>2</sub>は、強力な抗血小板機能作用をもつほか、血管拡張作用、気管支拡張作用、平滑筋細胞遊走及び増殖抑制作用、血管新生作用、血管内皮細胞の保護作用などの多彩な作用を持つ<sup>3-5)</sup>。一方TXA<sub>2</sub>は、PGI<sub>2</sub>と拮抗する作用をもち血小板凝集促進作用、血管収縮作用、気管支収縮作用、細胞崩壊作用を持っている。PGI<sub>2</sub>とTXA<sub>2</sub>は、相互拮抗する作用を持つことで生体の生理的平衡を保っている。

表1 PGI<sub>2</sub>とTXA<sub>2</sub>の作用比較

プロスタサイクリン	トロンボキサンA <sub>2</sub>
血小板凝集抑制	血小板凝集促進
血管拡張	血管収縮
気管支拡張	気管支収縮
細胞保護	細胞崩壊

(循環器疾患の薬物療法より転載・南江堂)

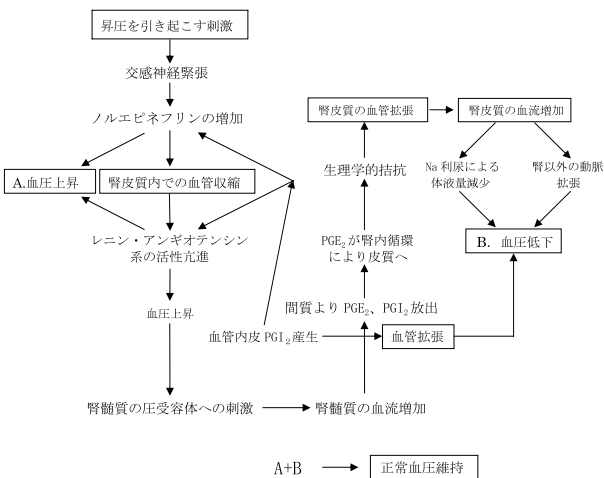


図2 PGと血圧調整 (循環器疾患の薬物療法より転載一部改変・南江堂)

③ PGと血圧調整

生体の血圧調整は、主に自律神経である交感神経と副交感神経、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系及びPGにより血圧を一定に保つように調整されている。その中でPGは、腎臓を介してノルアドレナリン及びアンジオテンシン II により上昇した血圧をPGI<sub>2</sub>とPGE<sub>2</sub>により低下させ血圧を調整している。

④ 腎血流量におけるPGとアンジオテンシン II の相互作用

腎血流量は、正常時において図-3Aのようにアンジオテンシン II とPG (PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>) の相互作用により調整されている。図-3Bのように、レニンが刺激を受けアンジオテンシン II が増加すると腎臓の血管は収縮するが、一方でPGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>の生成を促進させる。その結果、アンジオテンシン II の作用に拮抗し腎臓の血管は拡張されるので腎血流量及び血圧は変動しない。しかし、PGの産生量が少なければアンジオテンシン II の効果が優位になり腎臓の血管は、収縮傾向となり血流量が減少し、血管抵抗が上昇するため血圧も上昇する。

図-3Cのようにレニンが刺激を受けアンジオテンシン II 濃度が上昇している場合にシクロオキシゲナーゼ阻害薬である非ステロイド性抗炎症剤 (nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAID) を投与すると、PGの産生は極端に減少する。

その結果、アンジオテンシン II が優位になり腎血流量は減少する。GFRも減少する結果、尿量は減少し重度の場合では乏尿、無尿になることもある。

したがって、高血圧の患者、腎機能が低下している患者へのNSAIDの投与は注意を要する。

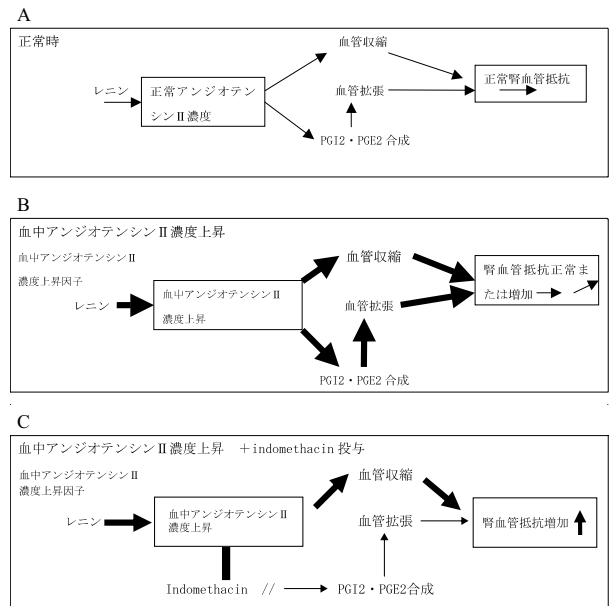


図3 腎血流量におけるPGとアンジオテンシンIIの相互作用 (循環器疾患の薬物療法より転載一部改変・南江堂)

2. 腎臓内科領域におけるプロスタサイクリン(PGI<sub>2</sub>)の臨床応用

PGの中でPGI<sub>2</sub>は、従来から知られていた抗血小板作用、血管拡張作用に加え最近の研究から線維化抑制作用、炎症性サイトカインの抑制、血管内皮細胞の再生と保護作用および血管新生作用など新たな薬理作用が報告されている。PGI<sub>2</sub>の作用について、いまだ完全には解明されておらず今後も更なる薬理作用の発見も期待されている。PGI<sub>2</sub>は半減期が数分間と非常に短く臨床応用は困難であったが、PGI<sub>2</sub>のアナログであるBPSの出現により臨床応用が可能になった。このBPSの臨床応用は、血管外科内科、循環器内科、糖尿病および内分泌、血液内科、脳神経外科、整形外科、皮膚科、眼科、耳科、腎臓内科、臓器移植、再生医療など多方面に渡る各科領域で使用され始めた。

その中で、腎臓内科領域におけるBPSの臨床応用について述べてみる。

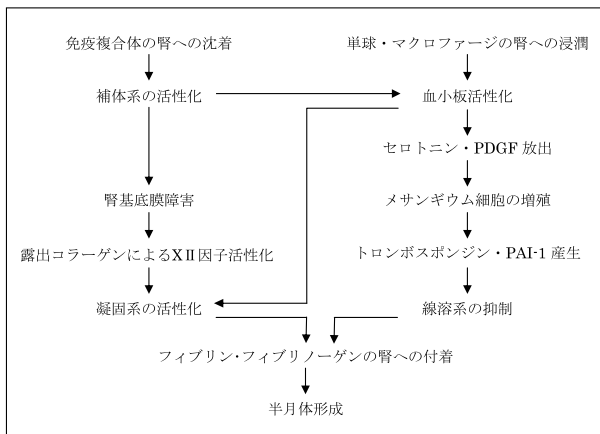


図4 腎疾患の進展における凝固・線溶系の関与 (プロスタサイクリンの多様性と今後の展望より転載・メディカルレビュー社)

① 腎疾患の病態について

腎疾患を病態別に分類すると糸球体腎炎と間質性腎炎に大別され、経過において急性腎不全と慢性腎不全に大別される。

糸球体腎炎の多くは免疫的機序により糸球体が障害を受けることにより発症する。糸球体において抗原抗体反応などの免疫学的機序により補体が活性化されマクロファージ、好中球の浸潤を受ける。また、血小板も活性化され凝固系の亢進や、炎症性サイトカインの放出などが起こり次第に糸球体は、機能を低下させる。これらの機序が長期間にわたり持続し慢性化すると腎臓の血流量は次第に低下し間質障害が進展し腎機能を更に悪化させる結果になる。

また一方では残存した糸球体への血流量増加は、過剰な過を招き残存糸球体への負荷を増し機能を低下させる。

② 腎疾患の特徴とPGI<sub>2</sub>投与で期待される効果

A. 糸球体腎炎、ループス腎炎

糸球体腎炎の多くは免疫的機序により起こることが知られている。

糸球体において沈着した抗原などから受ける免疫的刺激により補体活性が活性化されマクロファージ、好中球の浸潤や凝固系の活性化、TNF $\alpha$ やMCP-1などの炎症性サイトカインの放出などを引き障害が進行する。また慢性例では血中のPGE<sub>2</sub>が低下していると報告されている<sup>6)</sup>。

PGI<sub>2</sub>を投与すると炎症性サイトカインの産生や、血液凝固活性が抑制されさらに免疫複合体の糸球体への沈着も減少し糸球体障害が軽減されることが報告されている<sup>7)</sup>。

B. ネフローゼ症候群

ネフローゼ症候群はTXA<sub>2</sub>の産生が亢進して、それが大量の蛋白尿の原因の一つではないかとされている<sup>8)</sup>。そのためPGI<sub>2</sub>を投与しTXA<sub>2</sub>と拮抗させることで蛋白の漏出を軽減させることが期待されている。

C. 糖尿病性腎症

糖尿病ではTXA<sub>2</sub>の増加による血小板凝集亢進や糸球体過剰濾過による糸球体高血圧症を併発し<sup>9)</sup>、糸球体硬化症などの血管障害をおこす。PGI<sub>2</sub>を投与することでTXA<sub>2</sub>の作用に拮抗させ改善を期待されている。さらに糖尿病に伴う網膜症、末梢血管障害にBPSが有効であったという報告もあり<sup>10)</sup>今後治療において期待されている。

D. 急性腎不全

NSAIDによる急性腎不全が報告されている<sup>11)</sup>。これはシクロオキシゲナーゼ阻害によるPG産生低下によるものでありBPS投与により改善が期待される。

E. 慢性腎不全

腎不全初期では、腎においてPGE<sub>2</sub>の産生は増加し、代償的に腎機能を保持する。しかし、糸球体の荒廃が進むにつれて腎血流量は低下し、さらに間質の血流も低下する結果となる。そして腎不全は悪化する経路を進む。

PGの慢性腎不全への効果は、腎不全の増悪因子である血液凝固系の亢進、炎症性サイトカインの放出、間質の線維化などを抑制し、腎血流量の改善が期待されている<sup>12,13)</sup>。

3. まとめ

PGは、様々な細胞のリン脂質より生成され、アラキドン酸からPGH<sub>2</sub>を経てPG合成酵素により生成される。PGは、生成された局所にて作用を発現するが半減期が数十秒から数分と極めて短く、短時間に作用は消失する。このPGの作用は局所的、超短期的ではあるが様々な組織、臓器に作用し、その効果は生体全体に及ぶこともある。PGのなかでプロスタサイクリン (PGI<sub>2</sub>) は、血液



凝固, 循環器, 腎臓のホメオスターシスの維持に深く関与するが, 一方トロンボキサン<sub>A2</sub> (TXA<sub>2</sub>) やPGE<sub>2</sub>などは逆に病態形成にも関与する。

このようにPGは, 非常に多彩な作用を示しPGI<sub>2</sub>とTXA<sub>2</sub>のようにお互い相反する作用を持つことで, バランスをとりながら生体のホメオスターシスを維持している。しかし, そのバランスが崩れると血栓症, 高血圧, 腎機能低下などの病態を形成することになる。

PGI<sub>2</sub>の薬理作用として抗血小板作用と血管拡張作用は知られていたが, 先に述べたように極めて短時間で作用は消失するため臨床応用が困難であった。しかし, 世界に先駆けわが国でPGI<sub>2</sub>のアナログであるベラプロストナトリウム (BPS) の開発に成功し臨床応用が可能になった。BPSは, PGI<sub>2</sub>の受容体を介して効果を発揮するため, PGI<sub>2</sub>とほぼ同様の効果が認められる。現在BPSは, 抗血小板作用と血管拡張作用を生かした循環器系の疾患に臨床応用されている。

近年, 遺伝子解析の発展に伴いPGI<sub>2</sub>の新たな薬理作用が, 発見されている。新たに発見された主なPGI<sub>2</sub>の作用は, 線維化抑制作用 (血管平滑筋細胞に対する遊走・増殖抑制作用), 炎症性サイトカイン抑制作用 (マクロファージに対するPDGF産生抑制, TNF- $\alpha$ 産生抑制, IL-1産生抑制作用, コレステロールエステラーゼ活性促進作用) や好中球に対する遊走抑制, スーパーオキシドアニオン産生抑制作用, HGF (肝細胞増殖因子) 産生増加による血管新生作用, 血管内皮細胞の新生と保護作用, 血液凝固に対する線溶系活性化作用などが報告されている。これらの報告をうけてPGI<sub>2</sub>の臨床への再評価がなされ, 各科領域でBPSを用いて臨床応用が試みられている。

その中で腎臓内科領域では腎不全に対する治療が試みられている。BPSによる慢性腎不全治療の目的は, 初期の腎不全に対しては治療を, 慢性腎不全に対しては, 進行を抑制させ透析療法の遅延または回避を目指す薬物として治療に用いられ始めた。

腎不全の病態において, 糸球体病変よりもむしろ間質病変のほうが重要であり, 予後と相関することが解ってきた。間質病変とは, 主に間質の線維化病変のことであり, いかに線維化の進行を抑制するかが, 治療のポイントとなる。腎不全の進行過程は, まず腎臓疾患の初期において遊走してきた血小板, マクロファージ, 好中球などの刺激により炎症性サイトカインが活性化される。活性化された炎症性サイトカインは, 間質への平滑筋細胞の遊走, 浸潤を招き間質はしだいに線維化が進行する。その結果, 腎臓の血液循環量は次第に減少し腎不全は悪化する。

BPSは, 腎不全進行の各過程に抑制的に作用する。腎不全に対してBPSを投与して期待される効果は, PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>の低下に伴うアンジオテンシン II, TXA<sub>2</sub>とのバランス改善, 腎不全の増悪因子である炎症性サイトカイン

の抑制ならびに間質の線維化抑制, 糸球体毛細血管の内膜保護, 血管新生作用などにより腎血流量を改善させ腎不全の進行を抑制させることが期待されている。

慢性腎不全はヒトも動物においても根本的な治療法はなく対症療法に頼るしかないのが現状である。ヒトでは血液透析などの回避的な処置が期待できるが動物においては皆無である。獣医科領域において, 慢性腎不全は中, 高年齢の猫に多く認められ<sup>14)</sup>, 特に15歳以上の猫では全疾患の30%を占めている<sup>15)</sup>。

現在, 猫の慢性腎不全に対する治療方法は処方食および薬用活性炭などを使用する対症療法であるが, BPSによる治療は対症療法ではなく腎機能を改善させる積極的な治療方法と考えられる。BPSによる腎不全治療は, 最近になり取り組み始められた方法であり, 人において試験段階であるが, すでにいくつか良好な成績が報告されている<sup>16)</sup>。

近年, 腎不全治療に対する考え方が大きく変化してきている。現在, 慢性腎不全の治療は, 根本的な治療方法はなく最終的には透析療法に頼るところである。しかし, 腎不全の研究は, めざましいものがあり腎臓の再生医療への期待が膨らんでいる。BPSの治療法もまた広義において再生医療法の一つであるが, 実験的にシクロスポリン腎症モデルにおいてTGF- $\beta$ に対する中和抗体を投与すると, 線維化が消失し尿細管萎縮が改善し腎機能が保たれという報告がある<sup>17)</sup>。動物実験段階ではあるが間質の線維化が消失し, 尿細管萎縮が改善したことは, 慢性腎不全治療の有力な治療法の一つになるかもしれない。近い将来, BPS療法, 免疫療法などを含めた有効な治療法が確立されたならば, 慢性腎不全は不可逆的な疾患から可逆的な疾患へと変貌するであろう。

## 文 献

- 1) 西尾伸太郎: ベラプロストナトリウムの薬理作用, 現代医療24: 109-117, 1992
- 2) 西尾伸太郎, 車谷 元: 経口投与可能なPGI<sub>2</sub>誘導体ベラプロストナトリウムの薬理作用と臨床効果. 日薬理誌 (Folia Pharmacol Jpn) 117: 123-130, 2001
- 3) Lianos E. A.: Biosynthesis and role of arachidonic acid metabolite in glomerulonephritis. Nephron, 37: 73-77, 1984
- 4) Moncada S., Vane J. R.: An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxidases to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. Nature (Lond), 263: 663-665, 1976
- 5) Cheng Y., Austin S. C., Rocca B., et al: Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A<sub>2</sub>, Science, 296: 539-541, 2002
- 6) Papanicolaou N, Mountokalakis T, Palassides A, et al: Urinary prostaglandin in kidney disease. Prostaglandins Med 3: 47-51, 1979

- 7) Utsunomiya Y, Ogura M, Kawamura T, et al: Attenuation of immune complex nephritis in NZB/W F<sub>1</sub> by a prostacyclin analogue. *Clin Exp Immunol* 99: 454-460, 1995
- 8) Remmuzzi G, Imberti L, Rossini M, et al: Increased glomerular thromboxane synthesis as a possible cause of proteinuria in experimental nephrosis. *J Clin Invest* 75: 94-101, 1985
- 9) Wang LN, Tang Z, Shou I, et al: Effects of the PGI<sub>2</sub> analog beraprost sodium on glomerular prostanoid synthesis in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Nephron* 73: 637-643, 1996
- 10) Lianos EA: Biosynthesis and role of arachidonic acid metabolite in glomerulonephritis. *Nephron* 37: 73-77, 1084
- 11) Clive DM, Stoff JS: Renal syndrome associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med* 310: 563-572, 1984
- 12) Fujita T, Fuke Y, Satomura A, et al: PGI<sub>2</sub> analogue mitigates the progression rate of renal dysfunction improving renal blood flow without glomerular hypertension in patients with chronic renal insufficiency. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 65: 223-227, 2001
- 13) Gerber JG, Keller RT, Nies AS: Prostaglandins and renin release; The effect of PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> and 13, 14-Dihydro PGE<sub>2</sub> on the baroreceptor mechanism of renin release in the dog. *Circ Res* 44: 796-799, 1979
- 14) DiBartola S. P., Rutgers H. C., Zack P. M., Tarr M. J.: *J Am Vet Med Assoc*, 190, 1196-1202, 1987
- 15) Lulich J., O'Brien T., Osborne C., Polzin D.: *The Compendium Continuing Education*, 14, 127-152, 1992
- 16) Fujita T, et al: *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acid* 65: 223-227, 2001
- 17) Ling H, Li X, Jha S, Karetskaya L, et al: Therapeutic of TGF- $\beta$ -neutralizing antibody in mouse cyclosporin A nephropathy: Morphologic improvement associated with functional preservation. *J Am Soc Nephrol* 14: 377-388, 2003

# 乳成分を用いた牛群診断

桧 山 尚 子

(受付：平成19年1月23日)

## Evaluation of dairy herds by milk ingredient analysis

NAOKO HIYAMA

Miyoshi Veterinary Clinical Center, Hiroshima P.F.A.M.A.A  
3-6-36, Tohkaichi-higashi, Miyoshi, Hiroshima 728-0013

### SUMMARY

Feeding management guidance using data on milk components including milk urea nitrogen (MUN) in dairy cattle tests is widely performed. In 2000, Ikuta et al. reported a correlation between MUN and the milk protein percentage in their study entitled "Simple nutritional diagnosis of lactating cows based on MUN and the milk protein percentage." Based on this correlation, we analyzed data on milk components in dairy farms to determine to clarify the relationship between milk components and the feed sufficiency rate/feed balance, to establish in an optimal feeding situation, and evaluated problems in each farm. Data on 3 dairy farms within our jurisdiction were obtained, and all data were classified according to milk yield into groups. The mean value in each group was calculated, and its association with the results of feed calculation was evaluated.

In farm M, there were significant positive correlations between the sufficiency rate of the crude protein content (CP) and MUN as well as the milk protein percentage, between the sufficiency rate of the total digestible nutrients (TDN) and the milk protein percentage, and between MUN and the milk protein percentage. There was also a significant positive correlation between TDN/CP, representing feed balance, and the milk protein percentage. In farm Y, there were significant positive correlations between the CP sufficiency rate and MUN as well as the milk protein percentage, between the TDN sufficiency rate and the milk protein percentage, and between TDN/CP and the milk protein percentage. In farm K, there was a significant positive correlation between TDN/CP and the milk protein percentage. Milk component analysis in each cow allows only the determination of whether values are in the normal range, and is not appropriate for the evaluation of the tendency of the entire farm. Analysis of farms data based on correlations that should be present in an appropriate feeding situation facilitated the evaluation of the tendency of each farm.

### 要 約

乳中尿素態窒素（以下MUN）を含む乳牛検定の乳成分データを利用した飼養管理指導は広く行われている。今回の研究は、2000年に生田らが行った研究「乳中尿素態窒素と乳蛋白質率による泌乳牛の簡易栄養診断」で発表されたMUNと乳蛋白質率との相関関係を利用し、適正給与状況下で成立すべき飼料充足率・飼料バランスと乳成分の相関が実際の農場のデータで成立するのかどうかを分析し、その農場の問題点を探った。管内酪農家3戸のデータを供し、全データを乳量階層によりグループ分けし、それぞれの平均値を出し、飼料計算結果と相関を求めた。

M牧場は粗蛋白質含量（以下CP）充足率とMUNおよびCP充足率と乳蛋白質率との間に正の有



意な相関が成立した。可消化養分含量（以下TDN）充足率と乳蛋白質率およびMUNと乳蛋白質率の間に正の有意な相関が成立した。また、飼料バランスを示すTDN/CPと乳蛋白質率の間にも正の有意な相関が成立した。Y牧場はCP充足率とMUNおよびCP充足率と乳蛋白質率との間に正の有意な相関が成立した。TDN充足率と乳蛋白質率の間に正の有意な相関が成立し、またTDN/CPと乳蛋白質率との間にも正の有意な相関が成立した。

K牧場ではTDN/CPと乳蛋白質率の間に正の有意な相関が成立した。個体ごとの乳成分分析は正常値内に入っているか否かの判定のみで農場全体の傾向は捉えにくい。適正給与状況下で成立すべき相関をもとに実際の農場のデータを分析すると、農場の傾向がつかみやすいことが分かった。

## 序 文

広島県では平成17年よりMUNが乳牛検定成績表に記載されるようになった。MUNは血中尿素態窒素と相関があることが分かっており、飼料バランスを把握する指標となる。今回の研究の乳成分分析は、生田らによる<sup>1)</sup>「乳中尿素態窒素と乳蛋白質率による泌乳牛の簡易栄養診断」にみられた相関関係を利用したものである。飼料の適正給与状況下では相関関係が成立する。（表1）

表1 相関

	MUN	乳蛋白質率
CP充足率	—	—
TDN充足率	負の相関	正の相関
TDN/CP	負の相関	正の相関

—：相関成立せず  
MUN：乳中尿素態窒素

TDN充足率が高いほど余剰アンモニアは減少する。すなわちMUNは減少するため負の相関が成立する。乳蛋白質率はプロピオン酸発酵に反映するので可消化養分総量（以下TDN）と正の相関。TDN/粗蛋白質率（以下CP）この飼料バランスにMUNは負の、乳蛋白質は正の相関が認められたとしている<sup>1)</sup>。この相関を利用し、実際の農場のデータを用いて、生田の相関が成立するかを検証し、その結果から農場の問題点を探った。

## 材料と方法

平成17年5月～18年2月（但し、H17年6月・11月は除く）の管内酪農家3戸の経産牛乳成分データ（n=969）と要因分析事業での飼料計算結果を利用した。但し、管内酪農家3軒ともTMR飼料を給与、飼養形態はY牧場フリーストール、M・K牧場はタイストールである。乳成分データは月ごとではなく、農家ごとに全データを乳量階層によりグループ分けし、それぞれの平均値を出し、相関を求めた。求められた結果を生田の相関関係に照らし、データに矛盾が無いか検討した。

## 成 績

（図1・表2）M牧場は高泌乳グループでTDNとCP充足率の両方が低い傾向があった。特にCPの充足率は非常に低い状況であった。生田の相関と比較してみる。網掛けのマスは生田の相関と同じ相関関係であることを示している。M牧場はCP充足率とMUNに強い正の相関がみられ、CPが上がるほどMUNが高くなる関係が成立して、飼料計算どおりにCPの不足が問題であり、中でも分解性蛋白質の不足が乳成分からも推測できる。次にTDNの充足率をみるとMUNと正の相関が成立した。適切な飼養環境下では負の相関が成立する。（表1）必要な蛋白質が給与されていれば、エネルギー飼料の充足に伴ってMUNは低下するはずである。しかし、蛋白質の不足のためこの相関が成立しないと思われた。TDN充足率と乳蛋白質率の相関は生田の相関と同じく正の相関が成立した。正常なプロピオン酸発酵が行われている

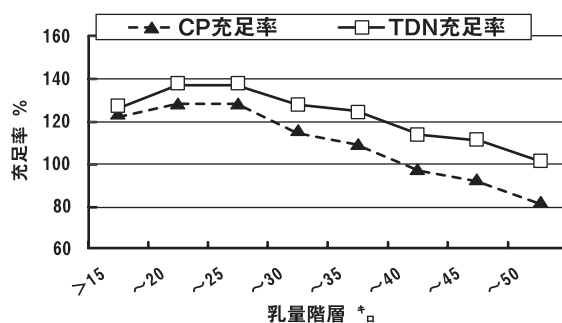


図1 M牧場の飼料充足率と乳成分の相関

表2 M牧場の飼料と乳成分の相関

	MUN	乳蛋白質率
CP充足率	0.900**	0.934**
TDN充足率	0.773*	0.799*
TDN/CP	NS	0.794*

\*\*： P<0.01 CP：粗蛋白質含量  
\*： P<0.05 TDN：可消化養分総量  
薄黒地：生田の相関と同じ NS：有意差なし

と推測できる。TDNをCPで割った飼料バランスをみると、MUNとは相関が成立しなかった。適正給与では、MUNとは負の相関が成立する。M牧場では絶対に蛋白質が不足しているためにこの関係は成立しないと思われた。飼料バランスと乳蛋白質率は生田と同じく正の相関が成立した。この農家では飼料中の分解性蛋白を上げて、乳成分の推移をチェックしていく必要があると考える。

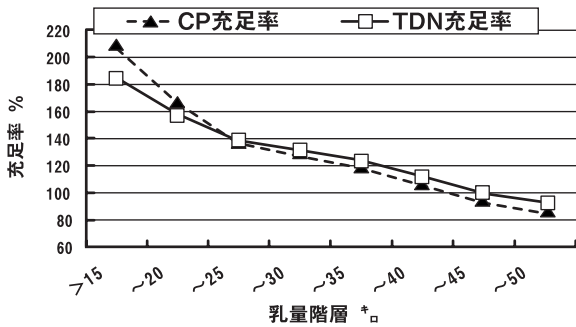


図2 Y牧場の飼料充足率と乳成分の相関

表3 Y牧場の飼料と乳成分の相関

	MUN	乳蛋白質率
CP充足率	0.722*	0.974**
TDN充足率	NS	0.977**
TDN/CP	NS	0.876**

CP: 粗たんぱく質  
TDN: 可消化養分総量  
NS: 有意差なし

(図2・表3) Y牧場は低乳量群は飼料が過剰であり、高泌乳牛群では蛋白質が不足していた。特に41キロ以上の2グループで充足率100%を切り、80%程度である。乳成分との相関をみると、CP充足率とMUN間およびCP充足率と乳蛋白質率との間に強い正の相関が成立した。先ほどのM牧場と同じく蛋白質が不足するために成立したと思われた。TDN充足率をみるとMUNとの間に相関は成立していない。適正給与下では負の相関が成立する。(表1) TDN充足率と乳蛋白質率では生田の相関と同じく強い正の相関が成立した。正常なプロピオン酸発酵が行われていると推測できる。飼料バランスとMUNの間に相関は成立せず、乳蛋白質率との間には生田と同じく強い正の相関が成立した。Y牧場は飼料中の蛋白質割合を上げ、乳量に見合った給与量に変更する必要があると思われた。

(図3・表4) K牧場の飼料充足率は、過剰気味ではあるがCP・TDNともにほぼ問題ないレベルであった。乳成分との相関をみると、CP充足率とMUNおよび乳蛋白質率との間に相関は成立しなかった。これは生田の相関どおりで、CPの充足率が適正なことが乳成分からも判断できる。次にTDN充足率をみるとMUNおよび乳蛋白質

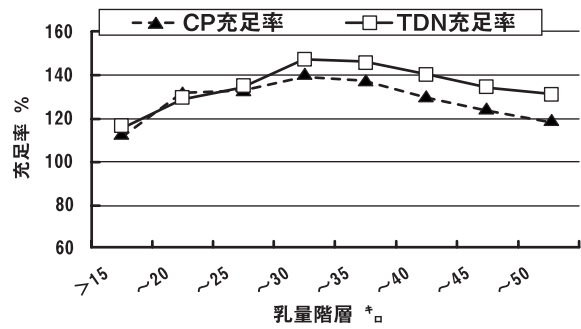


図3 K牧場の飼料充足率と乳成分の相関

表4 K牧場の飼料と乳成分の相関

	MUN	乳蛋白質率
CP充足率	NS	NS
TDN充足率	NS	NS
TDN/CP	NS	0.781*

CP: 粗たんぱく質  
TDN: 可消化養分総量  
MUN: 乳中尿素態窒素  
NS: 有意差なし

質率ともに相関は成立しなかった。CPが充足していてTDNも飼料計算上適正であるのに相関が成立していない。これは、エネルギー飼料の利用効率が悪い、分解スピードが蛋白質と一致していない、ルーメンマットの脆弱性・ルーメン発酵の不良などが考えられる。粗飼料中の繊維質のチェックとエネルギー飼料が未消化のまま糞に出ているか調べる必要がある。飼料バランスとMUNは相関が成立していないが、乳蛋白質率とは強い正の相関が成立した。K牧場ではエネルギー飼料の正常な消化吸収が行われているかどうかを確認する必要がある。

## 考 察

現在行われているMUNを含む乳成分を用いたデータ分析は、個体を月ごとに検討することが多く、その検討方法は正常値に入っているか否かの判定のみで、例えば高泌乳牛でエネルギーが不足している、分娩直後の牛が食い込み不足であるなど個々を評価するものである。今回実施したように農家ごとに複数月分をデータ集約し、乳量階層ごとにグループ分けする検討方法はあまり使われていない。

現在の状態を捉えるには月ごとの分析が有効だと思われるが、給与している飼料バランスの特徴やその農家の飼養管理の問題点を捉えるには、一月ごとよりも複数月に渡ってデータを集約した方がより正確にダイナミックな数字として現れると考えられる。購入乾草の質の低下や暑熱の影響により、乳成分は容易に変動するため、月毎の分析だけではデータを読み違える危険もある。さらに飼養頭数の少ない農家の場合、月毎の乳成分ではデータが少なすぎて傾向がつかみにくいが、今回用いた方法

であれば同じ個体から分娩後50日の情報も200日の情報も得ることができ、検討しやすい。他に適用例として、ウォーターカップの改修や飼槽の張り替えを行い、カウコンフォートが向上した時、その前後の比較にも利用できると思われる。

今回の結果から乳成分は牛群の飼料給与状況を反映しており、乳成分は個体で見るとよりもグループで比較する方が特徴をより把握しやすいことがわかった。飼料充足率が示すとおり、乳成分との相関が成立した農家もあれば、飼料計算上は問題ないのに、乳成分との相関が成立しない農家もあった。給与量の思い込み、飼料給与順序や間隔、あるいは飼料中諸成分の分解スピード、ルーメンの発酵状況などにより、実際の乳成分データは理論値とは異なっていた面があったことはいなめない。乳成分は実際の飼養管理に対して牛が返してきた結果であることを考え、これを利用し現在の問題点を探っていきたい。

今回は乳量グループを8階層に分けたが、その農家が給与している実態に即した方がより数字に表れやすいと思われる。乳成分の中でも乳蛋白質率は飼料状況をよく

反映していることが分かった。それは特に、TDN充足率・飼料バランスを良く反映しており、乳質の評価にはMUNだけでなく、乳蛋白質率も合わせて判断することが重要であると考えられる。飼料計算という計算上の理論と実際の牛の反応として返ってきた乳成分とを照らし合わせることによって、より正確な牛群診断が可能であることが分かった。但し、今回の分析では人的問題やカウコンフォートの問題などは全く考慮してないので、現場を見て農家と話し合いながら、問題点を見つけていく必要がある。

今回の分析を進めていて、飼料が乳成分へ与える影響が良く理解できた。指導者の育成等にも活用できると考えている。

### 参考文献

- 1) 生田 健太郎ほか：乳中尿素態窒素と乳蛋白質率による泌乳牛の簡易栄養診断，日獣会誌，53，289～292 (2000)

# 牛RSウイルス病の早期診断法の検討

恵谷 美江<sup>1)</sup> 山本 武<sup>1)</sup> 平井 潤思<sup>2)</sup>

(受付：平成19年1月26日)

## Evaluation of early diagnosis methods for bovine respiratory syncytial virus infection

MIE EYA<sup>1)</sup>, TAKESHI YAMAMOTO<sup>1)</sup>, JYUNJI HIRAI<sup>2)</sup>

- 1) Higashi-Hiroshima Livestock Health & Hygiene Service Center Hiroshima Prefecture  
1-15, Saijogojo-cho, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-0013
- 2) Geihoku Livestock Health & Hygiene Service Center Hiroshima Prefecture  
4-12-1, Kabe, Asakita-ku, Hiroshima 731-0221

### SUMMARY

For the diagnosis of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection, virus isolation or antibody examination using pair serum of cattle with this infection is generally used. However, the detection rate by virus isolation is very low, and long-term subculture is necessary. Since antibody examination using pair serum requires serum samples both at the time of onset and during the recovery period, a long period is necessary to obtain results.

For the rapid diagnosis of BRSV infection, we evaluated the HRSV kit and PCR. The detection sensitivity was higher for PCR than for the HRSV kit. Some field cases in which BRSV was isolated were positive for only PCR. These results suggested the usefulness of PCR as a rapid diagnosis method for BRSV infection. At present, PCR is used as an adjunctive method and is not a diagnostic method according to the manual. However, PCR may be an important examination method allowing the rapid diagnosis of BRSV infection.

### 要 約

牛RSウイルス病の診断法としては、一般にウイルス分離、発症牛のペア血清による抗体検査等が用いられている。しかしながら、ウイルス分離は、検出率が極めて低く、長期の継代が必要である。また、ペア血清の抗体検査は発症期と回復期の血清が必要なため、検査結果が出るまでに長期間を要している。

今回、牛RSウイルス病を迅速に診断する方法について、HRSVキットとPCR法の2種類について検討を行ったところ、PCR法はHRSVキットより検出感度が高く、BRSVが分離された野外材料からもPCR法のみが陽性と判断された症例もあり、BRSV感染症を迅速に診断する方法としてPCR法は有効な方法と考えられた。PCR法は、補助的診断に用いるのみで、マニュアル上では定められた診断方法ではない。しかし、牛呼吸器病に対して迅速に対応していく重要な検査方法と考えられた。

---

1) 広島県東広島家畜保健衛生所 (〒739-0013 広島県東広島市西条御条町1-15)

2) 広島県芸北家畜保健衛生所 (〒731-0221 広島県広島市安佐北区可部4丁目12-1)



## はじめに

牛RSウイルス (BRSV) 病は、病性鑑定マニュアル第2版<sup>1)</sup>において、蛍光抗体法または酵素免疫測定法、抗体検査およびウイルス分離により診断される。現在、病性鑑定では、牛呼吸器病の原因究明依頼について、ウイルス分離と抗体検査を実施しているが、ウイルス分離はその検出率が極めて低く、長期の継代が必要である。また、抗体検査は、発症期と回復期の血清が必要なため、いずれも結果が出るまでに長時間を要している状況にある。今回、BRSV病に対する迅速検査方法として、15分で判定できる酵素抗体法：人用RSウイルス抗原検出キット (以下、「HRSVキット」という) と8時間程度で判定できるnested PCR法 (以下、「PCR法」という) の2種類を比較検討したので報告する。

## 試験項目および方法

### 1. 試験項目

下記の試験1、試験2、試験3で、酵素抗体法：人用RSウイルス抗原検出キット (以下、「HRSVキット」という) とnested PCR法 (以下、「PCR法」という) の2方法での検出状況等を比較検討した。

#### 1) 試験1

$10^0 \sim 10^6$  TCID<sub>50</sub>/0.1mlまで10倍階段希釈した既知のBRSV液 (NMK-7株) を用いて、検出可能な範囲を確認した。

#### 2) 試験2

過去の病性鑑定においてBRSVが分離された2症例 (鼻汁14検体、血清24検体) についてウイルス分離及び抗体検査結果を比較し、検出状況を比較検討した。

#### 3) 試験3

平成17年度に牛呼吸器病原因究明で依頼のあった52症例中、抗体検査からBRSV病と診断された6症例 (鼻汁26検体、血清50検体) についてウイルス分離及び抗体検査結果を比較し、更に、2方法での検出状況を比較検討した。

## 2. 方法

### 1) HRSVキットによるBRSVの検出

日本ベクトン・デッキンソン株式会社製“ディレクティジェンEZ RSV”を用い、使用説明書に従い、鼻汁 (1症例をプール) を添付されている試薬と混合して、テストプレートに滴下後、図1のように判定部のC及びTにラインが検出されたものを陽性、Cのみにラインが検出されたものを陰性とした。

### 2) PCR法によるBRSVの検出

ウイルスRNAの抽出は、ニッポンジーン社のISOGEN-LSを用いた。鼻汁及び既知のBRSV液250  $\mu$ lに750  $\mu$ lのISOGEN-LSを添加し攪拌、5分間室温に放置した。これをクロロホルム200  $\mu$ lで処理し、3分間室温に放置後、遠心分離 (15,000rpm, 10分) した。

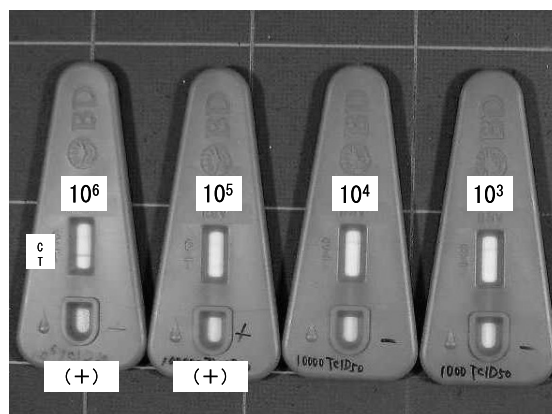


図1 HRSVキットによる検出

この遠心上清にイソプロパノールを加え、10分間室温に放置後、遠心分離 (15,000rpm, 10分) した。この沈査をエタノールで洗浄後、再度遠心分離 (15000 rpm, 15分) により沈査を回収後、超純水に再浮遊させて、抽出RNAとした。

BRSVに対するプライマー及び反応条件は、桐沢らの報告<sup>2)</sup>によるBRSV・Gタンパク遺伝子の約300bpを標的とした2種類の正方向のプライマー (F1 : ATC ACT CGT CAT CAC AGC CA, F2 : AAA GCA CCA CAC TGT CCC AA) と2種類の逆方向のプライマー (R1 : AGA GGA TGC CTT GTT GTG GA, R2 : TTT GAG GGT GAT TGT AGG GG) を使用した。プログラム恒温槽はASTEC社製PC-800を、酵素およびバッファーは、タカラバイオ (株) 社製TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 とPERKIN ELMER社製Gene Amp EZ rTth RNA PCR Kitを使用した。逆転写反応は、TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0に従い、30℃10分、42℃30分、99℃5分、5℃5分で行った。次に、F1, R1のプライマーセットで1回目のPCR反応 (DNA熱変性94℃1分、プライマーアニーリング60℃1分、伸長反応72℃3分で、30サイクル) を行い、F2, R2のプライマーセットで2回目のPCR反応 (DNA熱変性94℃1分、プライマーアニーリング60℃1分、伸長反応72℃3分で、30サイクル) を行った。

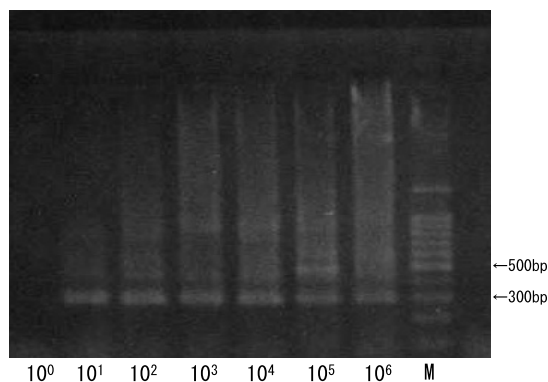


図2 PCR法による検出

増幅した遺伝子は、2%アガロースゲル電気泳動を実施後、エチジウムブロマイド染色を行い、1 kbのDNAラダーをマーカーとして同部位にバンドが確認されたものを陽性とした。

### 3) ウイルス分離および抗体検査

発症牛からのBRSVのウイルス分離は、鼻汁をVero細胞に接種後34℃、7日間回転培養を行い、細胞変性効果を指標に3代継代した。

BRSVの抗体検査は、BRSV NMK-7株を抗原として、Vero細胞で中和試験を実施した。BRSVが分離されるか、またはBRSV抗体が有意に上昇していた個体が認められた症例をBRSV感染症と診断した。

## 成 績

### 1. 試験 1

既知のBRSV液では、HRSVキットは $10^5 \sim 10^6$ TCID<sub>50</sub>/0.1mlまでが、PCR法は $10^1 \sim 10^6$ TCID<sub>50</sub>/0.1mlまでが陽性と判定した。(図1, 2)

### 2. 試験 2

過去の病性鑑定においてBRSVが分離された症例1及び2はHRSVキットでは検出されなかったが、PCR法では症例1は全検体、症例2は8検体中6検体が陽性であり、ウイルス分離と抗体検査によるBRSV感染症の診断とPCR法の結果は一致していた。(表1)

表1 ウイルス分離例における検出方法の比較

	ウイルス分離	ペア血清	HRSVキット	PCR法
症例1	1/6	1/5	陰性	6/6
症例2	1/8	3/7	陰性	6/8

### 3. 試験 3

平成17年度に抗体検査でBRSV病と診断された6症例からは、ウイルスは分離されなかった。このうち、HRSVキットで2症例が陽性と判定された。また、PCR法では、症例1及び3は全検体で、症例5では5検体中1検体が、症例6では4検体中2検体が陽性と判定した。

症例1及び3は抗体検査成績と2種類の方法の結果が、症例5及び6は抗体検査成績とPCR法の結果が一

致していた。しかし、症例2及び4の場合、抗体検査成績でBRSV病と診断されたが、検討した2種類の方法では陰性と判定された。(表2)

表2 抗体検査陽性例における検出方法の比較

	ウイルス分離	ペア血清	HRSVキット	PCR法
症例1	0/4	1/4	陽性	4/4
症例2	0/5	1/5	陰性	0/5
症例3	0/4	2/3	陽性	4/4
症例4	0/4	4/4	陰性	0/4
症例5	0/5	2/5	陰性	1/5
症例6	0/4	4/4	陰性	2/4

## 考 察

PCR法はHRSVキットより $10^4$ 倍検出感度が高かった。また、BRSVが分離された野外材料でPCR法のみが陽性と判断された症例もあり、BRSV病を迅速に診断する方法としてPCR法は有効な方法と考えられた。しかし、BRSV病が抗体検査により確実に診断された症例において、PCR法では確認できなかったものが認められており、必ずウイルス分離、抗体検査を実施し、PCR法との検出状況について比較確認していく必要があると考えられた。

PCR法は、補助的診断に用いるのみで、マニュアル上では定められた診断方法ではない。しかし、牛呼吸器病に対して迅速に対応していく重要な検査方法である。BRSV病にかかわらず、いかなる感染症に対しても、早期の防疫対応が重要であることから、今後も、その対応が十分に取れるよう、迅速かつ確実な検査方法を検討していく事が重要と考えられた。

## 文 献

- 1) 病性鑑定マニュアル (第2版): 牛RSウイルス病: 全国家畜衛生職員会: 62~63 (2001)
- 2) 桐沢力雄: ウシパラインフルエンザウイルス3型, ウシRSウイルス及びウシウイルス性下痢・粘膜病ウイルス感染のPCRによる検出: J. Rakuno Gakuen Univ. 1994(1):225~237(1994)



# 黒毛和種繁殖牛に発症したエンドファイト中毒症

玉川 朋治<sup>1)</sup> 石田 恭子<sup>2)</sup> 玉野 光博<sup>3)</sup>

(受付：平成19年1月26日)

## A black Japanese cow with endophyte toxicosis

TOMO HARU TAMAGAWA<sup>1)</sup>, KYOKO ISIDA<sup>2)</sup>, and MITUHIRO TAMANO<sup>3)</sup>

- 1) Akitakata Veterinary Clinical Center, Hiroshima, P.F.A.M.A.A.  
1775, Hongo, Midori-chou, Akitakata, Hiroshima, 731-0612
- 2) Fukuyama Livestock Health & Hygiene Service Center, Hiroshima Prefecture  
396-1, Fukae, Joge-chou, Fuchu, Hiroshima, 729-3421
- 3) Geihoku Livestock Health & Hygiene Service Center, Hiroshima Prefecture  
1-12-4, Kbe, Asakita-ku, Hiroshima, Hiroshima, 731-0221

### SUMMARY

In recent years, the provision of imported feed infected with endophytes has been shown to cause toxicosis due to toxins produced by the endophytes. We encountered a black Japanese cow maintained in a farm in Hiroshima Prefecture that developed endophyte toxicosis.

In this farm, import feed purchased as Italian ryegrass was given daily (about 6 kg/cow), and the affected cow showed neurological symptoms such as tremor of the four limbs and gait abnormalities. The imported feed was perennial ryegrass and showed endophyte hyphae. The concentrations of toxins were relatively high (ergovaline, 250 ppb; lolitrem B, 1,200 ppb), suggesting endophyte toxicosis.

### 要 約

近年、エンドファイトに感染した輸入飼料の家畜への給与による中毒が、エンドファイトの産生する毒素によって生じることが明らかになっている。今回、広島県内の農家で飼育されていた黒毛和種繁殖牛で発症したエンドファイト中毒症に遭遇した。

発生のあった農家は、イタリアンライグラスとして購入した輸入飼料を、1日1頭当たり6kg程度給与しており、患畜は四肢の振戦、歩様異常等の神経症状を呈した。輸入飼料はペレニアルライグラスであり、エンドファイト菌糸を認めた。毒素濃度は、エルゴバリン250ppb、ロリトレムB 1200ppbと比較的高く、エンドファイト中毒症を引き起こしたものと思われた。

### はじめに

エンドファイトは内生菌ともいわれ、植物体内で共生的に生活している菌類のことで、イネ科牧草を中心に300種以上の牧草で感染が確認されている。エンドファイトは菌自体が産生するアルカロイド等の毒素により牧草へ耐病虫性、多収性を付与することから人工的に利用されている。近年、エンドファイトに感染したペレニアルライグラスやトールフェスクの家畜への給与による中毒が、エンドファイトの産生する毒素により生じること

は菌自体が産生するアルカロイド等の毒素により牧草へ耐病虫性、多収性を付与することから人工的に利用されている。近年、エンドファイトに感染したペレニアルライグラスやトールフェスクの家畜への給与による中毒が、エンドファイトの産生する毒素により生じること

1) NOSAI広島 安芸高田家畜診療所 (〒731-0612 広島県安芸高田市美土里町本郷1775)

2) 広島県福山家畜保健所 (〒729-3421 広島県府中市上下町深江396-1)

3) 広島県芸北家畜保健衛生所 (〒731-0221 広島県広島市安佐北区可部1-12-4)

が明らかになっている<sup>1,2)</sup>。

今回、広島県庄原市内の農家で飼育されていた黒毛和種繁殖牛に発症したエンドファイト中毒症に遭遇したのでその概要について報告する。

### 発生農家の概要

飼育頭数約80頭の大型繁殖和牛農家で、4頭～6頭のストール飼い。分娩1ヶ月前より分娩舎にて1頭飼いとしていた。

飼料給与は、購入飼料のフェスク・稲ワラおよび自給飼料の給与体系をとっていたが、2005年10月20日から購入飼料のフェスクを米国Oregon州産のイタリアンストローに替えて給与することとした。給与量は、1日1頭

当たり4kg～6kg程度であった。

### 発症経過と臨床症状

発症の経過は、購入飼料変更後12日目から33日目までの間に7頭の成牛が活力消失、体温の低下、起立困難、四肢振戦、歩様異常等の神経症状を呈した。

購入飼料変更後12日目の発症牛1頭は血液検査により低Ca血症を呈したが、29日目の発症牛1頭と32日目の発症牛4頭には血液検査でのCa値の異常は認められなかった。これらの臨床症状によりエンドファイト中毒を疑い、エンドファイト菌糸の検出を家畜保健衛生所に、毒素濃度の定量を独立行政法人肥飼料検査所にそれぞれ依頼した。

表1 発症牛と臨床症状

症例番号	生年月日	性別	分娩予定日	発症日 (飼料変更後)	体温 (検査時)	症 状 等
1	H16. 1.29	雌	H17.12. 5	H17.11. 1 (12日目)	38.2	起立困難、後躯の振戦、前駆歩様蹠踏、泥状便
2	H16. 5.11	雌	H18. 4.21	H17.11.18 (29日目)	-	起立困難、後躯の振戦、前駆歩様蹠踏、泥状便
3	H12. 6.11	雌	H17.12.13	H17.11.21 (32日目)	38.5	起立困難、四肢の振戦、活力低下、胃腸運動微弱
4	H 5. 6. 1	雌	H18. 6. 7	H17.11.21 (32日目)	38.3	起立困難、四肢の振戦、活力低下、皮温低下
5	H14.10. 1	雌	H18. 7. 8	H17.11.21 (32日目)	38.4	起立困難、四肢の振戦、活力低下、皮温低下
6	H12.12. 3	雌	H18. 5. 5	H17.11.21 (32日目)	38.4	起立困難、四肢の振戦、活力低下、削瘦
7	H12.10.28	雌	H18. 6.15	H17.11.22 (33日目)	38.2	起立困難、四肢の振戦、活力低下、皮温低下

表2 初診時の血液検査結果

症例番号		1	2	3	4	5	6
検査年月日		H17.11.1	H17.11.18	H17.11.21	H17.11.21	H17.11.21	H17.11.21
RBC	( $\times 10^4/\mu l$ )	-	-	993	761	760	727
WBC	( $\times 10^2/\mu l$ )	-	-	109	97	63	112
HGB	(g/dl)	-	-	12.4	15.4	11.2	12.5
Ht	(%)	-	-	29	35	26	29
TP	(g/dl)	6.6	6.1	6.4	6.7	6.5	6.6
Alb	(g/dl)	3.8	-	3.3	4	3.4	3.6
Ca	(mg/dl)	5.1	12.2	11.7	11.4	11.8	11.4
Mg	(mg/dl)	-	2.3	2.4	2.3	2.5	2.2
IP	(mg/dl)	-	6.9	6.8	4.8	5.5	4.9
GOT	(IU/L)	83	80	56	56	64	60
GGT	(IU/L)	29	-	28	36	34	33
BUN	(mg/dl)	7	-	10	10	9	9
CPK	(IU/L)	>2000	701	219	43	148	263

発症牛 7 例の年齢は比較的若齢のものが多く、すべて妊娠牛であった。ほぼ全頭が低体温を示し、四肢振戦、歩様異常等の神経症状を認めた (表 1)。

初診時の血液検査結果からは、症例 1 に低Ca血症が認められたが、その他の 5 頭は正常のCa値であった。CPKとGOTに軽度の上昇が認められるものの、血清学的には著しい異常は無かった (表 2)。

購入飼料変更から 29 日目、2 頭目が発症した時点で購入飼料の給与中止を指示し、その後 6 日目には全頭に症状の改善が見られた。

## 結 果

検査の結果イタリアンライグラスとして購入された輸

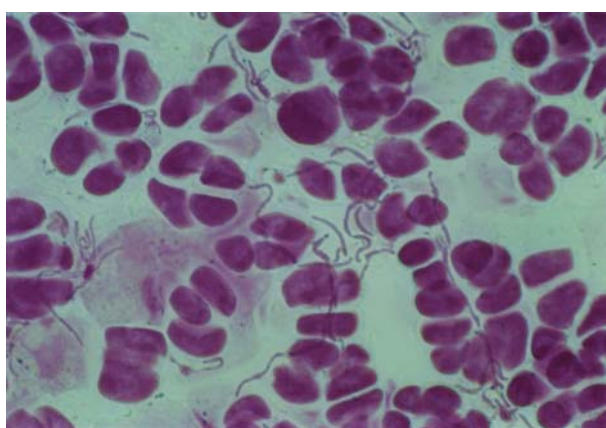


写真 1 検出されたエンドファイト菌糸

入飼料は、ペレニアルライグラスであった。

ローズベンガル染色においてエンドファイト菌糸が認められ (写真 1)、毒素濃度は、エルゴバリン 250ppb、ロリトレム B 1200ppb と比較的高値を示した。

類症鑑別として硝酸塩中毒とグラスタタニーも考えられたが、硝酸体窒素濃度は 261ppm と安全域であり、血中Mg濃度も正常であったため両疾病ともに否定された。

## 考 察

今回の事例は、輸入飼料に存在していたエルゴバリン、ロリトレム B の摂取によりエンドファイト中毒が発生したものと推測される。

毒素濃度は米国 Oregon 州における輸出前検査の基準値<sup>3)</sup>であるエルゴバリン 500ppb、ロリトレム B 1800ppb 以下の数値であったが、基準値以下であっても発症する例は報告されており<sup>1,4)</sup>、今回の毒素量は、中毒症状を起しうる濃度であったと思われる。

最初の発症牛 1 頭のみ低Ca血症であり、Ca剤の投与にて一時的に症状が軽減した。しかしながら、32日目には再び同一の神経症状を示し、輸入飼料の給与中止とともに症状の改善が見られたため、この 1 頭もエンドファイト中毒であると推測された。

今後このような症状に遭遇した場合、速やかに輸入飼料の給与中止又は給与量の減少を指示し、経過観察することが重要だと考えられた。

## 謝 辞

エンドファイト菌糸の検出、毒素濃度の定量において、ご尽力いただいた家畜保健衛生所の先生方に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 宮崎茂：エンドファイトが産生する毒素による家畜の中毒，臨床獣医，16 (5)，34-40 (1998)。
- 2) 仲嶺マチ子ら：エンドファイト感染輸入牧草給与牛に発生したライグラススタッガーが疑われた症例，臨床獣医，16 (11)，38-45 (1998)。
- 3) 榎本勝治，宮崎茂：黒毛和種に発生したライグラスストローによるエンドファイト中毒症，家畜診療，46，421-427 (1999)。
- 4) Cornell, C. N. et al.; Establishing ergovaline levels for fescue toxicosis, with and without endoparasites, under controlled climatic conditions. Proceedings of International symposium on Acremonium/Grass interactions, 75-79, (1990)

# ウシ胚からの性判別用細胞採取法の開発

尾形 康弘<sup>1)</sup> 日高 健雅<sup>1)</sup> 松重 忠美<sup>1)</sup>  
堀内 俊孝<sup>2)</sup>

(受付：平成19年1月29日)

## Development of a cell sampling method for the sexing of bovine embryos

YASUHIRO OGATA<sup>1)</sup>, TAKEMASA HIDAKA<sup>1)</sup>, TADAMI MATZUSHIGE<sup>1)</sup>, TOSHITAKA HORIUCHI<sup>2)</sup>

- 1) Hiroshima Prefectural Livestock Technology Research Center  
584, Nanatuka-cho, Shobara, Hiroshima 727-0023
- 2) Hiroshima Prefectural University  
562, Nanatuka-cho, Shobara, Hiroshima 727-0023

### SUMMARY

To improve the quality of sexed bovine embryos, we developed a cell dissection method that is simple and allows the collection of a small number of sample cells for sexing.

The number of cells collected by this method is about 1/5 of the conventional trophoblast metal blade cutting method. This method can increase the number of cells in embryos in the blastocyst stage before implantation without reducing the sexing rate for improvement in the quality of sexed embryos.

Conception of fresh embryos was not reduced by this method compared with no treatment or the trophoblast metal blade cutting method.

After the implantation of embryos sexed by this cell dissection method, the production of female dairy calves consistent with the results of sexing was possible.

### 要 約

ウシの性判別胚の品質改善を目的として、簡易で少数の性判別用サンプル細胞を採取できる細胞剥離法を開発した。

この方法は、従来の栄養膜細胞の金属製ブレード切断法と比較して、採取する細胞数を約1/5まで減少させることができる。

性判定率を低下させることなく、移植前の胚盤胞期胚の細胞数を増加させることができ、性判別胚の品質を改善することができる。

新鮮胚による受胎性も、無処置や栄養膜細胞の金属製ブレード切断法と比較して問題ないことが確認された。

細胞剥離法で性判別した胚を移植して、判定どおり雌乳用子牛を生産することができた。

---

1) 広島県立畜産技術センター (〒727-0023 広島県庄原市七塚町584)

2) 県立広島大学 (〒727-0023 広島県庄原市七塚町562)

## 序 文

妊娠期間が長く、単胎動物であるウシにおいて、生まれてくる子牛の性によって畜産農家の経営に与える影響は少なくない。

希望する性の産子を得るために、これまでも様々な研究が行われており、現在、主に利用されているウシの性判別方法は大きく分けて二つある。

一つは、フローサイトメーターとセルソーターを利用して、精子の段階でオス精子とメス精子に分画し人工授精を行うもので、一部試験的に行われ着実に成果<sup>1)</sup>を挙げている。

もう一つは受精胚での性判別で、体内受精7日目の栄養膜細胞の一部を金属製ブレードで切断するもの<sup>2,3)</sup>で、都道府県レベルでも性判別胚の供給を行っている。

従来のブレード切断法による性判別用細胞のサンプリングは、マイクロマニピュレータ等の高度な機器や熟練した技術を必要とすることや、金属製ブレードでの切断による細胞損傷によって性判別胚の受胎性と保存性を低下させてしまう等大きな問題があった。

これらの問題を解決し、性判別胚の実用化を図ることを目的として我々は実験を行い、核移植時のドナー胚の処理方法を応用して、新しい性判別用細胞の採取法を開発した。

この細胞剥離法は、従来法と異なり、マイクロマニピュレータ等の高度な機器を必要としない上、受精胚に対する傷害が少ないため、胚盤胞期胚の品質が従来の金属製ブレード切断法よりも高く、受胎性についても無処置胚やブレード切断胚と同等であることが確認され、性判別胚生産方法として有効性が高いと考えられる。

## 材料と方法

### 【体外受精胚の作出】

性判別に用いた体外受精胚は、と体卵巢由来もしくは、広島県立畜産技術センターに繋養している黒毛和種及びホルスタイン種からの経膈採卵によって得られた未成熟卵子を用いた。

と体卵巢からの卵子吸引は、37℃に加温した生理的食塩水に卵巢を入れ、輸送・保存後、21G5/8注射針を5mlのディスプレイに装着し、卵胞径10mm以下のものから吸引し集めた。

経膈採卵は、超音波画像診断装置（アロカ社SSD-1200）に経膈穿刺用コンベックス探触子（アロカ社UHT-9106-7.5）を装着し、ディスプレイ探卵針（ミサワ医科工業株式会社）及び卵子吸引システム（クック社K-MAR-5115）を用いて行った。

回収液は3%ウシ胎児血清（FCS）及び1.8ユニット/mlのヘパリンを添加した乳酸加リンゲル液を用い、吸引圧100mmHgの条件で卵胞液を吸引した。

それぞれの吸引液から卵丘卵子複合体のみを10%牛胎

児血清添加リン酸緩衝液に移し、3回以上洗浄した後、発生用培地TCM-199+5%FCSに移し、22~24時間成熟培養を行った。

体外受精は、当センターの常法<sup>4)</sup>に従い、凍結精液を用いて、精子濃度を6~12×10<sup>6</sup>/mlに調整して媒精を6時間行った。媒精後72時間目までmSOF培地+3mg/ml牛血清アルブミン（Sigma A-4378）+0.25mg/mlリノール酸アルブミン（Sigma L8384）で38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>、90%N<sub>2</sub>の低酸素条件下で培養し、それ以降は、mSOF培地+10%FCS+10μg/mlインスリン（Sigma I-6634）でVero細胞との共培養を38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、95%airの気相条件下で行った。

### 【性判別用サンプル細胞の採取】

性判別用のサンプル細胞の採取は、栄養膜細胞のブレード切断は、体外受精後7日目の胚盤胞期胚を用いた。

顕微操作は、位相差倒立顕微鏡（Nikon Diaphoto 300）と顕微操作システム（Leitz）に金属製ブレード（Micro Feather BLADE K-730）をセットし、栄養膜細胞の1/3程度を切断採取した。

胚の切断は、0.1Mサッカロース+20%FCS添加M2液内で行った。

サンプル細胞として採取した切断胚は、20%FCS添加M2液で6回洗浄した後、20%FCS添加mSOF培地でVero細胞と共培養を2~3時間行った。

細胞剥離法は、体外受精後5日目の桑実期胚を用いた。

桑実期胚を0.25%アクチナーゼE（科研製薬）に60秒ほど静置し、透明帯を溶解した後、20%FCS添加M2液で酵素の作用を停止させた。

透明帯を除去した胚を0.125%トリプシン（GIBCO 27250-042）+EDTA・4Na（Sigma E4DS）添加PBS-に入れ、市販のガラス製毛細管（Drummond 057910）をガスバーナーで細く伸ばしピペットに加工した。

そのピペットで数回ピペッティングすることで胚表層の細胞を剥離させた。数個の細胞が剥離したところで、20%FCS添加M2液で酵素の作用を停止させた。

細胞を剥離した胚は、20%FCS添加mSOF培地でVero細胞と共培養を48時間行った。

### 【性判別法】

性判別は、ブレード切断及び細胞剥離のサンプル細胞ともに20%FCS添加M2液で6回洗浄後、1mg/mlPVA添加PBS-液で更に6回洗浄し、Loopamp牛胚性判別試薬キット（栄研化学）で性判定を行った。

サンプリングした性判別用細胞及び判別用操作胚の細胞数は、蛍光色素Hoechst33342で細胞核を染色し、蛍光顕微鏡下で細胞数をカウントした。

### 【受精胚移植】

胚移植は、新鮮胚を発情後7日目の未経産ホルスタイ



ン種の黄体側子宮角内に頸管経由法で行った。

妊娠診断は、妊娠30日目（移植後23日目）前後に超音波画像診断装置を用いて、胎仔心拍をもって妊娠と判定した。

### 成 績

性判別用サンプル細胞の採取個数は、ブレード切断区13.2±1.4細胞（89胚）、細胞剥離区2.7±0.2細胞（81胚）であった。

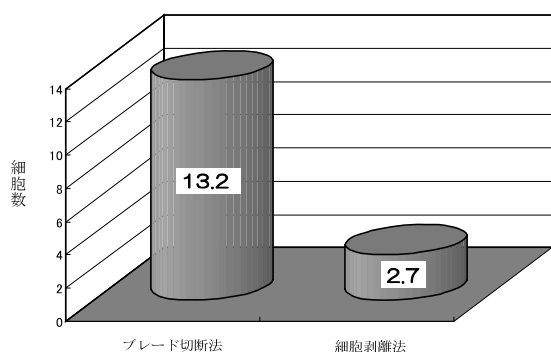


図1 性判別用サンプル細胞の採取個数

サンプリング法別の性判別率は、ブレード切断区95.0%（19/20）、細胞剥離区92.0%（46/50）であり、両者の間に有意差はなかった。

表1 サンプリング法別の性判別率

試験区	供試胚数	性判別数	判定率(%)
ブレード切断	20	19	95.0
細胞剥離	50	46	92.0

性判別胚の発育性は、ブレード切断区84.6%（77/91）が胚腔を再形成し、細胞剥離区91.4%（74/81）が胚盤胞期胚に発育し、両者に有意差はなかった。

表2 性判別胚の発育性

試験区	供試胚数	胚腔形成	胚腔形成率(%)
ブレード切断	91	77	84.6
細胞剥離	81	74	91.4

性判別胚の総細胞数は、無処置区119.9±4.5細胞、ブレード切断区77.0±2.7細胞及び細胞剥離区100.0±6.7細胞で、細胞剥離区はブレード切断区より有意に胚盤胞期胚の細胞数が多かった。

表3 性判別胚の総細胞数

試験区	供試胚数	総細胞数±S.E.
ブレード切断	91	77.0±2.7 <sup>a</sup>
細胞剥離	32	100.0±6.7 <sup>b</sup>
無処置	43	119.9±4.5 <sup>c</sup>

※異符号間で有意差（p<0.05）

性判別胚の移植成績は無処置区68.4%（13/19）、ブレード切断区83.3%（5/6）及び細胞剥離区68.0%（17/25）で、どの区間にも有意差はなかった。

表4 性判別胚の受胎性（新鮮胚）

試験区	移植頭数	受胎頭数	受胎率
ブレード切断	6	5	83.3
細胞剥離	25	17	68.0
無処置	19	13	68.4

### 考 察

これまで、性判別法として、染色体分析<sup>5)</sup>、パーコール密度勾配法<sup>6)</sup>による精子分離、H-Y抗原の利用<sup>7)</sup>や胚の発育スピードによる選別<sup>8)</sup>など様々な角度から研究が行われてきている。

ウシ胚のバイオプシーは金属製ブレードによる栄養膜切断法<sup>9)</sup>が現在は主流となっており、この他にも金属刃による細胞損傷を抑制するために透明帯にスリットを入れそこから膨出する細胞を採取するヘルニア法<sup>10)</sup>や、桑実期胚の割球をピペットで吸引する細胞吸引法<sup>11)</sup>等が行われているがいずれの方法も、マイクロマニピュレータ等の高度な機器と熟練した技術を必要とする。

しかもブレード切断法では、栄養膜細胞の切断による残りの胚へのダメージが大きく、このことが、その後の性判別胚の受胎性や保存性を低下させることがあり、これまで多くの研究機関で実用化試験が行われ、産子の生産も行われているが、酪農家への普及はそれほど進んでいない。

今回行ったウシ受精胚からの性判別用サンプル細胞の採取は、従来の切断法とはまったく異なり、刃物による切断ではなく、酵素の働きによって細胞間の結合を緩めて剥離する方法なので、サンプリングする細胞数も13.2細胞から2.7細胞に少なくすることができた。また、切断による細胞破壊によって細胞外へ溶出する水解小体等により、残りの胚細胞の一部が傷害を受けるなどの影響で細胞を破壊することがない細胞剥離法は細胞への傷害を最小限にすることができると考えられ、結果として、

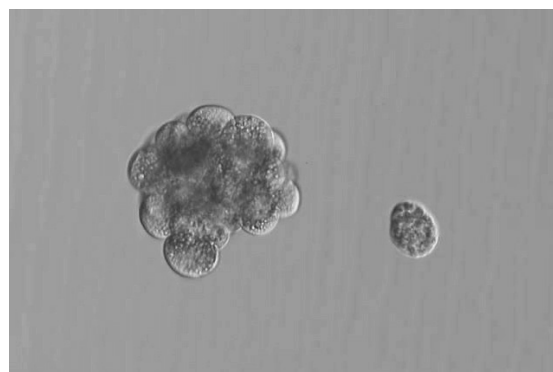


写真1 桑実期胚に細胞剥離法を適用した直後



細胞数の減少が抑制できたと考えられる。

実際、今回の実験でも、性判別胚の発育性には有意差がなかったものの、ブレード切断区と比較して6.8ポイント (84.6% vs 91.4%) 改善されており、7日目の胚盤胞期胚の総細胞数は、細胞剥離胚がブレード切断胚より有意に高いものとなっており、性判別胚の品質 (細胞数) を大幅に改善させることができた。

これまでの多くの報告で、凍結保存したバイオブシー胚の受胎性の低さが問題視されており、沼辺らの報告でも無処置胚と比較すると受胎率が10%程度低下している<sup>5)</sup>。これらを解決するために、緩慢凍結法ではなく、氷晶形成を伴わないガラス化法での性判別胚保存が試みられている<sup>12)</sup>。これらの胚のガラス化保存法とこの新しいサンプリング法を組み合わせることで、保存後の受胎性改善が期待できると考えている。

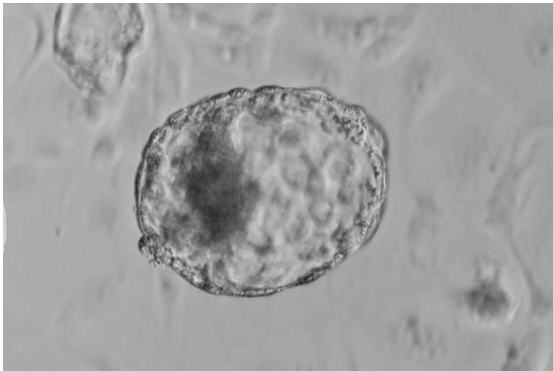


写真2 細胞剥離法で生産した性判別法

これまでも、受精胚の一部をバイオブシーしたのもでも産子が得られており、細胞剥離法で作出した性判別胚の受胎性も無処置の新鮮胚と同等であり、山中ら<sup>13)</sup>やNiemannら<sup>14)</sup>の報告にもあるように酵素処理や透明帯除去が受胎性に与える影響はないと考えられる。

この方法で生産された子牛も人工授精や受精胚移植産子と同じように、妊娠期間、分娩状況ともに正常であり、この方法で子牛を生産することは、現在のところ問題は見当たらない。

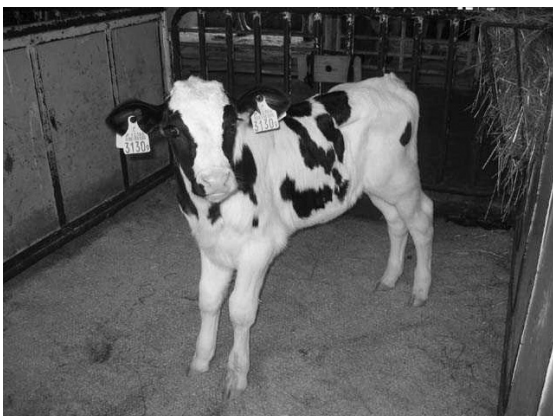


写真3 細胞剥離法で生まれた乳用雌ウシ

今後、新鮮胚で例数を重ねながら性判定結果の正確度調査を行い、最終的には、ガラス化保存した性判別胚を移植し、受胎性に与える影響を調査することで、実用化にむけた技術改善を行いたいと考えている。

## 文 献

- 1) Tubman, L. M., et al: Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry/cellsorting. *J. Anim. Sci*, 82, (4), 1029-1036, (2004)
- 2) Itagaki, Y., et al: Sexing of bovine embryos with male-specific repetitive DNA by polymerase chain reaction, 9, (1), 65-72, (1993)
- 3) Machaty, Z., et al. Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos, *J Reprod Fertil*, 98, 467-470 (1993)
- 4) 岩水正ら：ウシ体外受精胚の凍結保存，広島県獣医学雑誌，13, 59-62, (1998)
- 5) 沼辺孝ら：牛胚の性染色体分析法およびPCR法による性判別，日本胚移植学雑誌，17, 183-189, (1995)
- 6) 兼子智，押尾茂：細胞工学，秀潤社，13, (7), 605-611, (1984)
- 7) Utumi, K., et al: Embryo sex selection by a rat male - specific antibody and the cytogenetic and developmental confirmation in cattle embryos, 34, 25-32, (1993)
- 8) Avery, B., and Schmidt: Differential cleavage rates and sex determination in bovine embryos, *Theriogenology*, 32, (1), 139-147, (1989)
- 9) 後藤充宏ら：PCR法によるウシ胚の性判別と臨床応用，日本胚移植学雑誌17, (1), 19-25, (1994)
- 10) 青柳和重ら：新規法を用いたバイオブシー凍結胚による子牛の生産，平成15年度東北農業研究成果情報 360-361 (2004)
- 11) Herr. CM., Reed KC.: Micromanipulation of bovine embryos for sex determination, 35, 45-54, (1991)
- 12) Y. Agca, et al: Normalcalves from transfer of biopsied, sexed and vitrified IVP bovine embryos, 50, 129-145 (1998)
- 13) 山中昌哉ら：牛体外作出胚およびバイオブシー胚の生存性におよぼすトリプシン洗浄処理の影響 日本胚移植学雑誌19(2)89-93(1997)
- 14) Takeda, T., et al: Deep freezing of split and intact bovine embryo. *Theriogenology*, 27, (1), 285, (1987)

# レシピエント卵子の品種が核移植胚及び産子へ及ぼす影響

日高 健雅 尾形 康弘 松重 忠美

(受付：平成19年1月29日)

## The Effect of Recipient Oocytes Species on Embryo after Nuclear Transfer and Cloned Steers

TAKEMASA HIDAKA, YASUHIRO OGATA, and TADAMI MATSUSHIGE

Hiroshima Prefectural Livestock Technology Research Center  
584, Nanatuka-cho, Shobara, Hiroshima 727-0023

### SUMMARY

In order to investigate the effect of cytoplasm on embryos after nuclear transfer and cloned steers, we performed nuclear transfer using donor cell from Japanese Black Cattle and recipient oocytes from Japanese Black Cattle and Holstein Cattle. The developmental rate of embryos after nuclear transfer using recipient oocytes from Japanese Black Cattle was significantly higher than embryos using recipient oocytes from Holstein Cattle. The gestational period of cloned steers using recipient oocytes from Holstein Cattle was significantly longer than cloned steers using Japanese Black Cattle. In comparison of birthweight of cloned steers, embryos using recipient oocytes from Holstein Cattle was significantly heavier. In conclusion, it was considered that development of embryo and steers were influenced by cytoplasm. It was suggested that performing nuclear transfer using donor cell and recipient oocytes from same breed might prevent abnormal delivery.

### 要 約

核移植胚及び核移植産子において、細胞質の違いが発生率や発育に及ぼす影響を調査するために、黒毛和種由来のドナー細胞と、黒毛和種及びホルスタイン種由来のレシピエント卵子を用いて核移植を行った。核移植胚の発生率は、黒毛和種由来のレシピエント卵子を用いた場合がホルスタイン種由来のレシピエント卵子を用いた場合より有意に高い発生率を示した。妊娠期間は、ホルスタイン種由来のレシピエント卵子を用いた核移植産子が黒毛和種由来のレシピエント卵子を用いた場合と比較して有意に長かった。核移植産子の生時体重は、ホルスタイン種由来のレシピエント卵子を用いた産子が有意に重かった。

このことから、レシピエント卵子の細胞質が、胚の発生や牛の発育に影響を及ぼしていることが考えられた。また、ドナー細胞とレシピエント卵子の品種を揃えることで異常産などが予防できる可能性が示唆された。

### 序 文

受精卵核移植技術においては、桑実期の受精胚をドナー細胞として、牛の卵巣から採取した未成熟卵子を体

外成熟後、除核したものをレシピエント卵子として用いて核移植を行う。その後体外培養を行い、胚盤胞まで发育した胚を移植し、核移植産子を作成する。

この一連の操作において、ドナー細胞は一つの桑実期

胚から用いるが、レシピエント卵子には異なった個体や品種の卵巣から採取した卵子を用いる場合が多いため、核のDNAは同一でも、全く異なる細胞質を保有する核移植産子が生産されることになる。

近年、細胞質内に存在するミトコンドリアのDNA (mtDNA) が脂肪交雑などの経済形質に影響を及ぼすと言われており、Boettcherら<sup>1)</sup>は、乳牛において生乳生産量に細胞質が影響していると報告している。また万年ら<sup>2,3)</sup>は肉用牛においてmtDNAのタイプに分けた群間に脂肪交雑などの経済形質に有意な差が認められたと報告している。このように母方からのみ遺伝する細胞質も育種を行う上での重要な要因である可能性が示唆されている。

一方で、Tessら<sup>4)</sup>は肉用牛の生産において細胞質の遺伝的影響は重要ではないと報告している。また核移植産子を生産する中で、核移植産子の流産などの異常産や過大子、核移植産子間の肉質や増体などの経済形質の相似性など不明な点が多数ある。

そこで今回我々は、核移植技術を活用して、品種の異なる牛から採取したレシピエント卵子を用いて核移植を行うことにより、細胞質が核移植胚や核移植産子に及ぼす影響を調査した。

## 材料と方法

### 1. 牛卵子の採取と成熟培養

牛卵子の採取は、黒毛和種の生体卵巣からの経膈採卵と、と体卵巣からの吸引採取により行った。

経膈採卵は、経膈穿刺用7.5Mhzコンバックス探触子(アロカ社UHT-9106-7.5)、超音波画像診断装置(アロカ社SSD-1200)及び穿刺針(ミサワ社、COVA)を用いて行った。回収液は乳酸加リンゲル1000mlにつき3mlの牛胎仔血清(FCS)と90ユニットのヘパリンNaを添加したものをを用い、吸引圧は100mgHgにより未成熟卵子の回収を行った。と体卵巣からの吸引は、と体卵巣に存在する直径7mm以下の卵胞から注射器(注射針:21G)を用いて卵胞液と共に卵子を吸引採取した。採取した牛未成熟卵子は、卵丘細胞の付着度及び卵子の形態的観察によりA~Eランクに分別し、卵丘細胞が2層以上付着し、かつ細胞質が均質なBランク以上の卵子を試験に供した。

成熟培養は10%FCS、50ng/ml上皮成長因子(EGF)、0.12au/ml卵胞刺激ホルモン(FSH)添加TCM199培地にて5%O<sub>2</sub>・95%air条件下で22~24時間行った。

### 2. 核移植

成熟培養終了後、0.1%ヒアルロニダーゼ、0.1%コラゲナーゼ添加M2液中でピペッティングにより顆粒層細胞を除去し、囲卵腔内に第一極体を放出した成熟卵子のみを以降の実験に供した。

除核はマイクロマニピュレーターを用いて透明帯にスリットを形成し、極体を目印にした細胞質押し出し法に

より行った<sup>5)</sup>。

除核卵子はカルシウムイオノフォア10μMとイノシトール3リン酸25μg/mlで5分間処理した後、ピューロマイシン100μg/mlと牛血清アルブミン(BSA)3mg/mlを添加したCR1aa培地で6時間培養する複合活性化処理を施した。除核卵子に、受精後5日目の桑実期胚をドナー細胞としてマイクロマニピュレーターにて挿入後、チンマーマン氏液中にて交流8.5V/mm 5sec、直流75V/mm 50μsec×2回の電気パルスを加えることにより細胞融合を行った。

体外培養は、電気インパルス印加後72時間目までは3mg/ml BSA添加CR1aa培地にて、5%O<sub>2</sub>・5%CO<sub>2</sub>・90%N<sub>2</sub>・38.5℃の条件下で、72時間目以降は10%FCS添加CR1aa培地にてVero細胞との共培養<sup>6)</sup>を行った。

### 3. レシピエント卵子の由来の異なる核移植胚の発生状況調査

核移植に用いたドナー細胞は、黒毛和種由来の受精後5日目の桑実期胚を用いた。試験区は、レシピエント卵子の由来別に区分し、未成熟卵子を黒毛和種の卵巣から採取した和牛区、ホルスタイン種及びF1(黒毛和種×ホルスタイン種)の卵巣から採取したホルス区とし、核移植胚の融合率、発生率、総細胞数を比較調査した。

### 4. 胚盤胞の構成細胞調査

総細胞数は、7日目に胚盤胞に発育したものについて、ヘキスト染色により胚を染色し、蛍光顕微鏡下にて核数を速やかにカウントすることにより確認した。

### 5. 核移植産子の分娩状況調査

1998年~2006年まで当センターで生産された核移植産子58頭について調査を行った。

試験区は、核移植胚の発生状況調査と同様に、レシピエント卵子の由来別に分類し、未成熟卵子を黒毛和種の卵巣から採取した和牛区、ホルスタイン種及びF1の卵巣から採取したホルス区とし、それぞれの未受精卵をレシピエント卵子として用いて作出した核移植産子の妊娠動態、生時体重を比較検討した。

核移植産子の作出のためのドナー細胞は全て黒毛和種由来の桑実期胚を用いた。

## 成 績

### 1. レシピエント卵子の由来の異なる核移植胚の発生状況調査

和牛区及びホルス区の核移植胚の発生成績は、和牛区では供試胚87個のうち融合率97.7%、8細胞期率77%、桑実期率66.7%、胚盤胞期率62.1%、ホルス区では供試胚83個のうち融合率95.2%、8細胞期率61.4%、桑実期率41.0%、胚盤胞期率31.3%で、有意に和牛区が高い発生率を示した。



表1 核移植胚の発生率

試験区	供試胚数 (%)	融合数 (%)	8細胞数 (%)	桑実期数 (%)	胚盤胞数 (%)
和牛区	87	85 (97.7)	67 (77.0)	58 (66.7)	54 <sup>a</sup> (62.1)
ホルス区	83	79 (95.2)	51 (61.4)	34 (41.0)	26 <sup>b</sup> (31.3)

異符号間に有意差あり (P<0.01)

## 2. 胚盤胞の構成細胞調査

胚盤胞期胚まで発育した核移植胚の総細胞数は、和牛区では、平均71.4±28.9個、ホルス区では70.4±28.8個で、両区間に有意な差は認められなかった。

表2 核移植胚の胚盤胞期胚の総細胞数

試験区	供試胚数	総細胞数±S.D
和牛区	38	71.4±28.9
ホルス区	17	70.4±28.8

## 3. 核移植産子の分娩状況調査

### ①核移植産子の妊娠期間

妊娠期間は、和牛区の平均は286±6日、ホルス区は289±2.3日と、ホルス区の方が約3日間、有意に長かった。また当センターでは分娩予定日を5日間経過した場合、分娩誘起処置を行っているが、和牛区では、48頭中8頭分娩誘起を行ったのに対し、ホルス区では10頭中5頭で分娩誘起を行っており、ホルス区で多くなる傾向が認められた。

表3 核移植産子の妊娠期間

試験区	産子数	妊娠期間±S.D	誘起分娩
和牛区	48	286±6.0 <sup>a</sup>	8
ホルス区	10	289±2.3 <sup>b</sup>	5

異符号間に有意差あり (P<0.05)

### ②核移植産子の生時体重

生時体重の平均は、和牛区では35.5±6.7kg、ホルス区では45.3±8.9kgであり、ホルス区が有意に大きい値を示した。

表4 核移植産子の生時体重

試験区	産子数	生時体重±S.D
和牛区	48	35.5±6.7 <sup>a</sup>
ホルス区	10	45.3±8.9 <sup>b</sup>

異符号間に有意差あり (P<0.05)

## 考 察

受精卵核移植技術は、一つの受精胚から同一の遺伝情

報を保有した牛を複数産出する技術であり、クローン検定などの種雄牛造成への活用のため多くの研究機関で研究されてきた。クローン検定は従来の育種選抜手法に比べ検定期間の大幅な短縮化など検定効率の向上ならびに省力化を可能にする手法として期待されている。また、近年の核移植技術の進展により核移植産子の生産効率も体外受精由来胚の成績に近いものになり、クローン検定の実用化が可能になっている。しかし、核移植胚作出において、ドナー細胞とレシピエント卵子に由来が異なる卵子を用いる場合があるため、核DNAと細胞質の由来が異なる核移植胚や核移植産子が作出されることになり、胚の発生や産子の発育等への影響が懸念される。

今回我々が行った核移植胚の発生成績は、和牛区がホルス区より有意に高い胚盤胞発生率を示した。

安部ら<sup>7)</sup>は、ミトコンドリアの活性が高く酸素消費量が高い胚が、胚盤胞への高い発生率を示し胚の質も良好であるとしている。ミトコンドリアの機能に必要な多くのタンパク質は、核にコードされた遺伝情報に依存しているため、ミトコンドリアの活性を高く維持するためにはmtDNAの正確な複製が行われる必要がある。ドナー細胞とレシピエント卵子に由来品種が異なる卵子を用いることにより、mtDNAの正確な複製が行われずミトコンドリアの呼吸活性などが低下し、その結果胚の発生成績が低下した可能性が考えられた。

家畜改良センターによる全国の試験機関アンケート<sup>8)</sup>によると、核移植産子における難産の発生率は24.4%であり、牛の平均生時体重も48.3±11.9kgと過大子が生産される傾向が窺える。核移植後に生産された牛の過大子はWilladsenら<sup>9)</sup>によって初めて報告され、その後牛や羊における操作胚から生産された胎仔の過大に関する報告が多く発表されている。その中でWalkerら<sup>10)</sup>によって、in vitroにおける牛や羊の胚の操作が過大子の発生の原因となっている可能性が示唆されている。しかし、胚における遺伝子の発現と過大子との関連性に関する調査は報告<sup>11)</sup>されているが、過大子の発生にかかわる詳細なメカニズムは未だ明らかになっていない。

本試験における核移植産子の調査では、和牛区と比較してホルス区の生時体重が約10kg重く、妊娠期間は約3日間長かった。Walkerらは妊娠期間の延長も認められるが、それだけでは生時体重の増加を説明するには不十分であるとしている。今回妊娠期間が290日以上であった和牛区の生時体重とホルス区の生時体重の比較においても、ホルス区の生時体重は有意に大きかったことから、妊娠期間の延長の以外にも生時体重の増加に影響する要素がある可能性が示唆された。

また、一般的な人工授精を行った場合、ホルスタイン種の妊娠期間は黒毛和種より短くなるが、今回ホルス区の妊娠期間の延長が認められたことから、ドナー細胞とレシピエント卵子の品種が異なることにより、分娩を誘起する機序に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆

された。

以上のことから、レシピエント卵子の細胞質が、胚の発生や牛の発育に影響を及ぼしていることが考えられた。またドナー細胞とレシピエント卵子の品種を揃えることで過大子やそれによる難産など異常産が予防できる可能性が示唆された。

我々は現在mtDNAのD-Loop領域からミトコンドリアのタイプ分けを行い県内の牛のmtDNAタイプの分布調査を行っているが、今後mtDNAタイプごとの性質やドナー細胞とレシピエント卵子のタイプ間における関連性を調査し、ミトコンドリアが牛の発育や肉質へ及ぼす影響等を検討していきたいと考えている。

## 文 献

- 1) Boettcher, PJ, et. al.: Relationships between Polymorphism for mitochondrial deoxyribonucleic acid and yield traits of holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 79, 647-654, (1996)
- 2) Mannen, H, et. al.: Effect of mitochondrial DNA variation on Carcass traits of Japanese black cattle. *Journal of Animal Science*, 76, 36-41, (1998)
- 3) Mannen, H, et. al.: Identification of mitochondrial DNA substitutions related to meat quality in Japanese Black cattle. *Journal of Animal Science*, 81, 68-73, (2003)
- 4) Tess, M. W, et. al.: Evaluation of cytoplasmic genetic effects in beef cattle using an animal model. *Journal of Animal Science*, 68, 1899-1909, (1990)
- 5) 高野ら：核移植実験系における電気刺激時の温度条件の検討, *繁殖技術会誌*, 13, 15-19 (1991)
- 6) 尾形ら：マイクロドロップレット法で凍結保存した牛のレシピエント卵子による核移植成績, *広島県獣医学会雑誌*, 15, 33-36 (2000)
- 7) Abe, Hiroyuki, et. al.: Evaluating the Quality of individual Embryos with a Noninvasive and Highly Sensitive Measurement of Oxygen Consumption by Scanning Electrochemical Microscopy. *Journal of Reroduction and Development*, 52, 55-64, (2006)
- 8) 橋谷田ら：肉用牛のクローン検定とそのための安定的双子クローン生産技術の展望と問題点, *畜産技術*, 8月号, 32-36, (1998)
- 9) Willadsen, SM, et.al.: The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. *Theriogenology*, 35, 161-170, (1991)
- 10) Walker, SK, et. al.: In vitro culture of sheep embryos without co-culture: successes and perspectives. *Theriogenology*, 37, 111-126, (1992)
- 11) Young, LE, et. al.: Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Reviews of Reproduction*, 3, 155-163 (1998)

# 黒毛和種の白線部ヘルニアの1例

中谷 啓二<sup>1)</sup> 山崎 一男<sup>2)</sup> 平田 晴美<sup>1)</sup> 太田 哲夫<sup>2)</sup> 上高 宏<sup>3)</sup>  
石橋 一郎<sup>1)</sup> 国重 俊治<sup>3)</sup> 大川 雄三<sup>1)</sup> 篠塚 康典<sup>1)</sup>

(受付月日 平成19年1月26日)

## A Japanese black calf with white line hernia

KEIJI NAKATANI<sup>1)</sup>, KAZUO YAMASAKI<sup>2)</sup>, HARUMI HIRATA<sup>1)</sup>, TETUO OOTA<sup>2)</sup>,  
HIROSI KAMITAKA<sup>3)</sup>, ITIROU ISHIBASHI<sup>1)</sup>, SHUNJI KUNISHIGE<sup>3)</sup>,  
YUUZU OOKAWA<sup>1)</sup>, and YASUNORI SHINOZUKA<sup>1)</sup>

- 1) Yamagata Veterinary Clinical Center, P.F.A.M.A.A.  
461-1, Haruki, Kitahiroshima-cho, Yamagata-gun, Hiroshima 731-1531
- 2) Hiroshima, P.F.A.M.A.A.  
1-2-23, Hikarimachi, Higashi-ku, Hiroshima, 732-0052
- 3) Higashihiroshima Veterinary Clinical Center, P.F.A.M.A.A.  
284-1, Inaki, Takaya-cho, Higashihiroshima, Hiroshima 739-2106

## SUMMARY

White line hernia in Japanese black cattle is rarely observed, and the treatment of large hernias is considered to be difficult. We report the treatment course in a Japanese black calf with white line hernia.

The calf showed no abnormalities at birth. About 3 months after birth, a hernial ring was observed in the white line immediately posterior to the navel, but it was healed after the 3rd operation.

The first and second operations were relatively easy, but hernia recurred from the lateral side of the suture area after each operation.

In the 3rd operation, suturing for reinforcement was performed on the bilateral sides of the hernial ring suture area using kitchen pads. Fever and suppuration persisted for about 40 days following operation, and the kitchen pads were removed 43 days postoperatively. Subsequently, inflammation subsided, resulted in healing.

## 要 約

黒毛和種の白線部ヘルニアは発生が稀で大きなものは治癒困難とされている。今回、黒毛和種仔牛の白線部ヘルニアに遭遇したので、その治療経過の概要を報告する。

発生子牛は、出生時には異常を認めなかったが、約3ヶ月齢で臍直後の白線部にヘルニア輪を認め3回目の手術で治癒させることが出来た。

1回目、2回目の手術は比較的容易であったが、いずれも縫合部の外側から再発した。3回目の手術ではキッチンパッドを用いヘルニア輪縫合部の両側に補強縫合を施した。手術後、約40日間は発熱と化膿が続き、43日目にキッチンパッドが排出され、その後炎症は消退し治癒した。

1) NOSAI山県家畜診療所 (〒731-1531 広島県山県郡北広島町春木461-1)

2) NOSAI広島 (〒732-0052 広島県広島市東区光町1-2-23)

3) NOSAI東広島家畜診療所 (〒739-2106 広島県東広島市高屋町稲木284-1)



## 序 文

黒毛和種の腹壁ヘルニアは発生が稀で、大きなものまた、特に白線部に発生したものは治療困難と言われている<sup>1,2)</sup>。

今回、我々は黒毛和種仔牛の白線部ヘルニアに遭遇し、3回目の手術で治療させることが出来たのでその治療経過を報告する。

## 患 畜

発生子牛は、黒毛和種、メスで平成17年1月15日生まれ(約3ヶ月齢)であった。

## 治 療 経 過

平成17年4月?日 患畜の臍部付近に径3cmの不明瞭なヘルニア輪をみとる。

平成17年5月6日 整復手術を行なう。ヘルニア輪は独特の硬さが認められず、整復手術は極めて容易に終了した。

平成17年5月17日 抜糸したが、ヘルニア輪は認めなかった。

平成17年5月25日 再発確認し、その後経過観察するも次第にヘルニア輪拡大する。

平成17年6月29日 臍直後に幅5cm、長さ15cmの縦長のヘルニア(写真1)となり再手術を行なった。ヘルニア輪は軟らかく、手術は比較的容易に終了した。

平成17年7月1日 術部後端にヘルニア輪発生を認める。

平成17年8月3日 ヘルニア輪、極めて拡大速く、円形で、径30cmを超え再々手術を実施した。

推定体重180kgで、キシラジン0.06g(セラクター3cc)を筋肉

注射し仰臥保定とした(写真2)。ヘルニア輪確認後直径40cm切皮する。比較的明瞭で硬度のあるヘルニア輪を認める。直径20cmのキチンパッドをヘルニア輪に縫い付け(写真3)、埋没させるようにヘルニア輪を縦に2重縫合した(写真4)。さらに、縫合部周囲から再発するため、縫合部から左右に長さ10cmづつ補強縫合を施した(写真5)。皮膚を縫合し、起立させ、包帯を巻き、手術を終了した(写真6)。

平成17年8月4日～9月15日

39.3～40.5℃の熱発が続き、皮下に膿瘍形成が見られ、切開洗滌、抗生剤の投与を続けた。食欲、発育は、順調であった。

平成17年9月16日 キチンパッドが押し出され創口から覗き、除去する。口周囲は、結合織が厚く造成している。



写真1 2回目の手術前



写真2 3回目の手術① ヘルニア輪の確認



写真3 3回目の手術② キチンパッドの装着

平成17年9月20日～12月15日

週1回創口の洗滌を行なう。体温の上昇は見られない。

平成18年1月13日

創口閉鎖し、脱出見られず、治癒したものと認める  
(写真7)。



写真4 3回目の手術③ ヘルニア輪の縫合



写真5 3回目の手術④ 補強縫合



写真6 3回目の手術⑤ 手術終了



写真7 3回目の手術後150日目の患牛

### 考察およびまとめ

黒毛和種の腹壁ヘルニアの発生要因は、種々の外的要因（衝突、墜落、角突など）によって腹筋が挫傷を受け、または皮下断裂をきたすことに起因して発生する<sup>1)</sup>。今回の発生は月齢からみて先天的なものではなく、何らかの外的要因によって発症したものと推察された。

また、再発の要因としては、腹壁ヘルニア、特に白線部に発生したものは、治癒しにくいと言われている<sup>1-3)</sup>。当該牛も2回修復手術を行い、それぞれ、19日目、2日目に再発した。2回とも、ヘルニア輪縫合部の外側から再発生していた。再々手術では、ヘルニア輪縫合部から左右に補強縫合を施し再発生を防ぐことが出来た。

手術後の熱発と化膿については、三回目の手術後約40日に亘り39.3～40.5℃の発熱が続き、術部が化膿した。平成17年9月16日キチンバットが押し出され、それを除

去してから発熱しなくなったことから、発熱の原因はキチンバットではないかと推察された。また、皮下の化膿は発熱の継続と補強縫合の非吸収性縫合糸が原因と思われる。しかし、この炎症による結合織の増成が更なるヘルニア輪の開口を防いだものと思われる。

今後黒毛和種の腹壁ヘルニアの手術を行う場合、ヘルニア輪縫合後、周囲の補強縫合を必ず施術することが必要と思われる。

### 参考文献

- 1) 木全春生：新動物外科学，167～168，地球社，東京（1975）
- 2) 幡谷正明・黒川和雄ら：家畜外科学第5版，417～419，金原出版，東京（1995）
- 3) 中村良一：獣医ハンドブック第8版，474～476，養賢堂，東京（1974）

# 飼料給与を時間軸で考える要因分析事業

篠塚 康典<sup>1)</sup> 檜山 尚子<sup>2)</sup>

(受付：平成19年1月31日)

## Factor analysis project in which feeding is considered along the time axis

YASUNORI SHINOZUKA<sup>1)</sup>, and NAOKO HIYAMA<sup>2)</sup>

- 1) Yamagata Veterinary Center, Hiroshima P.F.A.M.A.A.  
461-1, Haruki, Kitahiroshima-cho, Yamagata-gun, Hiroshima 731-1531
- 2) Miyoshi Veterinary Center, Hiroshima P.F.A.M.A.A.  
3-6-36, Tokaichi-higashi, Miyoshi-shi, Hiroshima 728-0013

### SUMMARY

In the factor analysis project performed in NOSAI Hiroshima, we used a graph representing the rumen fermentation state. In Farm A, this graph was applied to conventional feed formulation, and a safe feed design with synchronization of the protein degradation rate with the carbohydrate synchronization rate was possible. In Farm B, the reason for contradictions between the feed design based on metabolic profile tests and subsequent clinical symptoms could be clarified.

The incorporation of this graph in feed formulation may be useful because a feeding method necessary to attain the maximum rumen fermentation can be considered along the time axis.

### 要 約

NOSAI広島で実施している要因分析事業においてルーメン発酵状況を表すグラフを応用した。A農家では従来の飼料計算に本グラフを応用し、蛋白質の分解速度と炭水化物の分解速度をシンクロさせた安全な飼料設計を行うことができた。B農家では代謝プロファイルテストに基づいた飼料設計とその後の臨床症状の矛盾点が生じるにいたった理由が示された。

本グラフを飼料計算に組み込むことは、ルーメンの発酵を最大にするために必要な飼料給与方法を時間軸にそって考えることが容易となり、有用であると考えられた。

### 序 文

NOSAI広島では乳牛の要因分析事業を行っている。これは疾病多発や低生産性などの牛群の問題を解決する目的のみでなく生産性をさらに高めるためにも広く利用されている事業である。事業内容は飼料計算、牛群チェック、環境管理、代謝プロファイルテスト（以下MPT）などを実施し改善点を農家とともに協議し、数ヵ月後に同様の検査を行って牛群の反応をみていくことが主と

なっている。牛群の問題は不適切な飼養管理によることが多く、飼料設計は非常に重要な作業となっている。単胃動物とはきわめて異なる消化機能をもつ牛の飼料設計はルーメン発酵抜きにして考えることはできず、特に高泌乳牛ではルーメン微生物の機能を最大に発揮して栄養素の供給を効率的におこなう必要がある。最適なルーメン発酵、すなわち菌体蛋白質生産を最大にするためには、ルーメン微生物自身への蛋白質とエネルギーの効率的供給をおこなうことが重要で、そのために現在の飼料計算

1) NOSAI広島山県家畜診療所（〒731-1531 広島県山県郡北広島町春木461-1）

2) NOSAI広島三次家畜診療所（〒728-0013 広島県三次市十日市東3丁目6-36）



ではルーメン内分解蛋白 (RDP) と非繊維性炭水化物 (NFC) の量的バランスをとることによっている。しかし、ルーメンは連続発酵槽であり、RDPとNFCの分解スピードについて時間の概念がないために飼料設計の効果が思わしくないケースもある。そこで、筆者らの考案したルーメン発酵グラフを本事業に用いたところ有用であったのでその概要を報告する。

## 材料と方法

NOSAI広島で実施している要因分析事業実施農家のうち2農家 (A農家・B農家) を選定し、2005年2月から2006年1月にかけて行われた事業内容について時間軸を用いたルーメン発酵グラフを用いて考察を加えた。農家選定基準は当該農家が給与している飼料の炭水化物および蛋白質分画、通過スピードなどの基礎的データが既知であることとした。

### 1. A農家の例

当農家は40頭飼養のタイストール、TMR給与の中規模牛群であった。牛群の問題点は夏バテする牛が多く、第四胃変位が多い。また乳成分のうち無脂固形分が低いというものであった。

### 2. B農家の例

当農家は30頭飼養のタイストール、分離給与で自動給餌機、連続水槽の設けられた牛群であった。この農家の問題は繁殖成績が思わしくないということであった。繁殖成績を示すJMRは25で悪化傾向にあった。

これらの農家について、MPT、飼料計算、BCS測定、環境調査など要因分析事業を実施し、そのうち飼料給与内容 (品目・量・給与時間など) を聞き取り、筆者らの考案した方法 (文献1) を用いて第一胃内でのエネルギーおよび蛋白質の分解状況を24時間グラフ化した。結果を総合的に判断し改善を加えた後、数ヵ月後にもう一度当事業を実施し総括を行った。そして本方法を用いて作成したルーメン発酵状況グラフの事業における有用性について検討した。

## 成績

### 1. A農家の場合

当該農家で給与されていたTMRはNFC：RDPの比はバランスが取れていたが蛋白質の分解が先行するタイプの発酵パターンであった (図1)。このTMRと乾草 (オーツヘイ) を組み合わせて一日4回給餌が行われており、一日のルーメン発酵状況は図2のようであった。エネルギーと蛋白質の分解パターンはシンクロしており問題はないようだった。しかし、MPTの結果からNFC不足、臨床所見からルーメンマットの低形成が指摘されており、ルーメンマットの形成と安全にエネルギーレベルを上げることを目的に改善が行われた。オーツヘイとビートパルプを用いて給与飼料内容を変更したところルーメンの発酵状況は図3のようになり、ルーメン発酵のバランス

を崩すことなく安全に繊維レベル、エネルギーレベルを上げることができたことが確認された。飼料給与改善後は、牛の肋が起きる、糞中のコーンが見られなくなるなどルーメンマットの良好な形成を認め、疾病の発生率など当該農家の問題点は改善された。

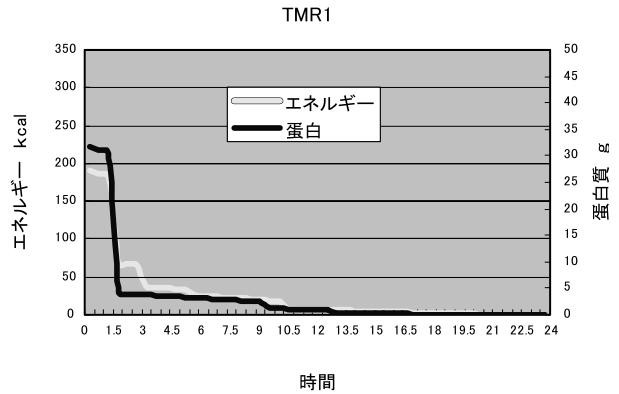


図1 A農家給与TMRの特徴

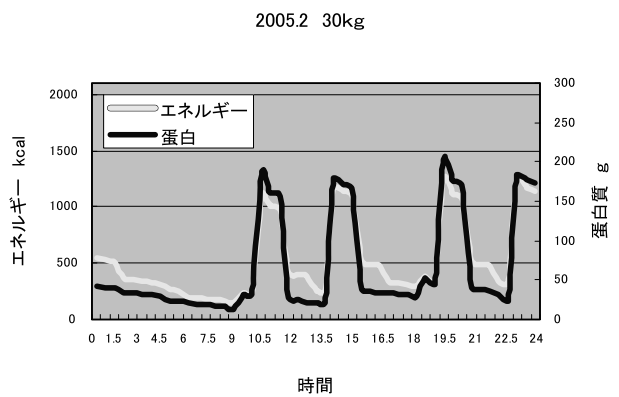


図2 A農家のルーメン発酵状況

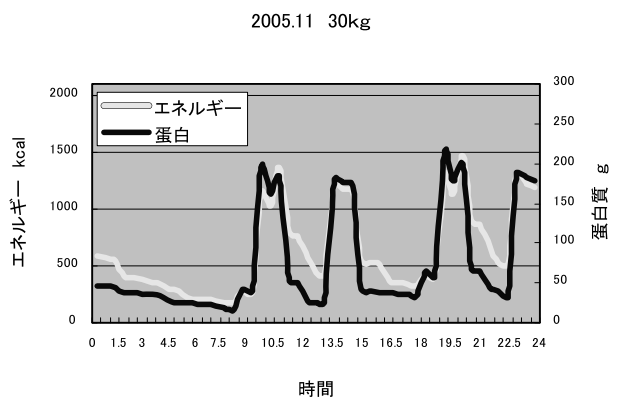


図3 A農家のルーメン発酵状況

### 2. B農家の例

当農家は自動給餌機を利用して1日7回、市販の配合飼料と自家配合飼料を給与していた。一日のルーメン発酵状況は図4のようであった。朝のスーダグ、ルーサンを給与した後と夜にソルゴーサイレージを給与した後に

蛋白の分解が先行するがその他の時間帯はエネルギーの分解が多いという日内パターンであった。飼料計算においては乾物量、エネルギー、蛋白質レベルとも満足のいくレベルであったが(表1)、MPTの結果、血糖値が低くBUNが高いという結果を得たため自家配合中のNFCの増量とRDPを若干下げる飼料給与変更を行った。数ヵ月後の再検査ではBUNは正常範囲内となり繁殖成績も改善した(JMR8.1)が、Htが上昇するなど慢性的なアシドーシス傾向が見られるようになり、疾病の発生が懸念された。その時点でのルーメン発酵状況は図5のようであり、一日のうち大半が蛋白に対してエネルギーの割合が多くなっていた。

考 察

1. A農家

飼料給与中のエネルギーレベル、特にNFCを上げるにはいくつかの方法があるが今回は分解スピードの中程度であるビートパルプを選択した。これは改善前のNFC：RDPが量的、時間的にも問題なくバランスが取れていたこのバランスを維持する必要があったこと、繊維を同時に補うことを目的としたからである。改善後のルーメン発酵状況もバランスの取れたものであることを確認することができた。本例はルーメン発酵に必要なエネルギーと蛋白質のバランスは取れていたが、ルーメンマットの形成が不十分であったために微生物発酵が計算どおりにいっていなかった例と考えられる。すなわち、ルーメンプロトゾアが利用すべきアンモニアとエネルギーが十分であるにもかかわらずルーメン内微生物の数が不十分で、かつ飼料の滞留時間が短いために十分利用されことなく下部消化管に送られていたと考えられる。結果として飼料の利用効率が低下し、牛体としてはエネルギー不足となり、低乳質や疾病多発につながっていたと考えられる。

2. 農家B

一般的にMPTにおいて高BUN、低血糖がみられる場合はルーメン内微生物の利用するエネルギーであるNFC不足によりルーメン内アンモニアが利用低下していると診断されることが多い。本例でもその診断に基づいてNFCの増量とRDPの若干の減量を行った。しかし、結果として返ってきた牛群の反応はルーメンアシドーシスであった。当初の飼料計算ではNFCとRDPのバランスは問題なかったが、MPTの結果に基づいてNFCを増量したわけで、血液性状と臨床症状が矛盾する結果となった。しかし、日内変動グラフでみてみるとMPTの採血が午前11時ごろ行われており、その2.5から4時間前に給与されている飼料給与内容はエネルギーの分解に比べ蛋白の分解が非常に多い内容であることがわかった。すなわち、ルーメン微生物が利用しきれないほどのアンモニアが大量に分解されオーバーフローしている状態となっている時間帯に採血を行っていたのである。オーバーフローしたアンモニアはルーメン壁から吸収され肝でBUNに代謝される。初回のMPTはこのBUNを反映していたと考えられる。

当農家では本事業を数年間継続して受けており飼料給与には細心の注意を払っている。今回の事業実施時においても飼料計算上エネルギー、蛋白質いずれの充足率も満たしていたので、今回のMPTの結果は採血時間の影響が強く出た例だと考えられる。日内変動の少ない蛋白代謝指標を用いることが望ましいが経費・手間の問題から複数の項目を一度に検査できる血清は有効に利用すべきである。したがって日内変動の大きいBUNを用いてMPTを行う際は、本グラフを利用して慎重に採血時間

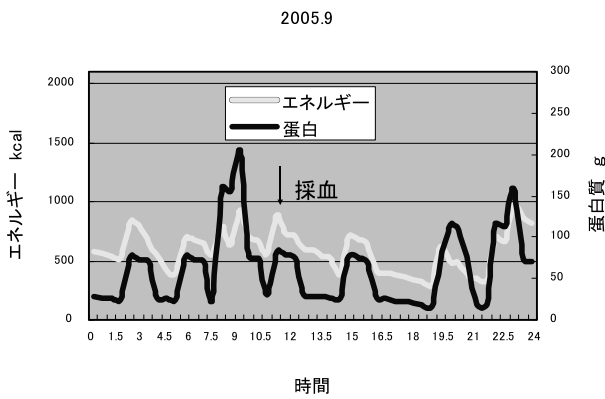


図4 B農家のルーメン発酵状況

表1 B農家飼料計算結果

	% (DM)	充足率 (%)
CP	14.9	105.6
TDN	74.1	116.5
NFC	29.4	

乳量30kg/day DMI 20.8kg/day

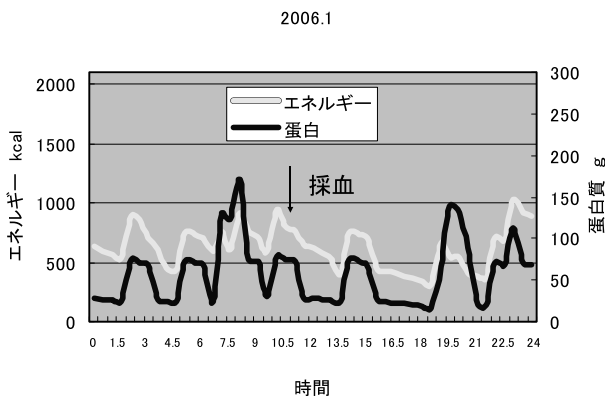


図5 B農家のルーメン発酵状況

を決定すべきであると考えられた。

ルーメンという連続発酵槽を持つ反芻動物の飼養管理は複雑である。すなわち、牛体そのものに対する要求量のみでなくルーメン微生物に対する要求量も同時に満足させなければならないからである。さらにルーメン微生物は適正なエネルギーと蛋白質の量的バランスを連続的に求め続けている。これはルーメン発酵を最大にするためには必要なことであり、牛のもつポテンシャルを最大限に引き出すための飼養管理には欠かせない考え方である。そのためには飼料のルーメン内分解エネルギー (NFC) とルーメン内分解蛋白質 (RDP) がどのように

分解されているかを知ることは必要不可欠であり、さらにそれらのバランスを時間軸にそった動的視点で考えることも重要なことである。複雑なこれらのことを視覚的にとらえることのできる本報でのグラフ化の方法はきわめて有用なものであり、現在利用されている飼料計算ソフトに組み込み本事業に応用することにより、さらに精密な飼料設計が可能になると考える。

## 文 献

- 1) 篠塚康典ら：牛のルーメン発酵状況のグラフ化の試み，広島県獣医学会雑誌, 21, 13-17 (2006)



# 代謝プロファイルテストにおいてアルブミンの低下が認められた乳牛群の飼養状況とその要因

鈴木 俊彦

(受付：平成19年2月8日)

## Breeding conditions and factors associated with low serum albumin levels observed in metabolic profile tests in dairy herds

TOSHIHIKO SUZUKI

Veterinary Clinical Training Center, Hiroshima P.F.A.M.A.A.

284-1, Inaki, Takaya-cho, Higashihiroshima, Hiroshima, 739-2106

### SUMMARY

We observed low albumin (alb) levels in metabolic profile tests in farms in Hiroshima Prefecture, and surveyed and analyzed the influences of this decrease on dairy herds and factors causing this decrease based on data in the management instruction project in 2005. As a result, low alb decreased milk production and increased the incidences of diseases, injuries, and accidents. To improve these problems and productivity, the re-evaluation of feed designs and feeding methods and improvement in the cowshed environment appropriate for high-level milk production may be necessary in many dairy farms.

### 要 約

近年、広島県内の農家を対象とした乳牛の代謝プロファイルテストにおいて低下傾向がみられるアルブミン(以下alb)の牛群に及ぼす影響と要因について、平成17年度の管理指導事業のデータを元に調査、分析した。その結果、低albは乳量の低下や病傷事故の増加につながり、それを改善し生産性を向上させるためには、多くの酪農家で、飼料設計・飼料給与方法の見直しと高泌乳化に適応した畜舎環境の整備が必要であると思われた。

### 序 文

3種類の主要な血漿タンパク質のうち、最も高濃度に存在するalbは肝臓で合成され、微量元素や脂肪酸などを体組織に運搬する重要な役割を果たしている。近年、広島県内の酪農家を対象とした乳牛の代謝プロファイルテストにおいてalbは低下傾向がみられ、それらの牛群では繁殖障害をはじめ病傷事故が多発する傾向にある。そこで特に分娩後から泌乳最盛期にかけてalbの低下が認められた乳牛群の飼養状況とその低下要因について、代謝プロファイルテストを用いた管理指導事業のデータを元に調査、分析したのでその概要を報告する。

### 材料および方法

#### 1. 調査期間

2005年5月19日～2006年1月30日

#### 2. 調査対象

県内酪農家53戸で飼養されている乳牛、延べ1,334頭延べ69件の代謝プロファイルテストと各酪農家の飼料給与の調査、畜舎環境のチェック、および疾病に関するアンケート

成績

低albを示した牛群は69件中19件、標準レベルにあった牛群は15件で、そのほかの牛群においてもalbの低下傾向がみられた。アンケート調査の結果、albが標準レベルの農家では繁殖障害が多いと回答のあった割合は87%であり、低albの場合95%であった(図1)。肢蹄疾患については、多いと回答のあった割合は標準レベルではわずか7%であるが、低albの場合36%にもものぼった(図2)。乳房炎は標準レベルの20%に対し低albでは42%(図3)、周産期疾病は標準レベルの20%に対し、低albでは58%であった(図4)。乳牛1頭の1日当たりの泌乳量

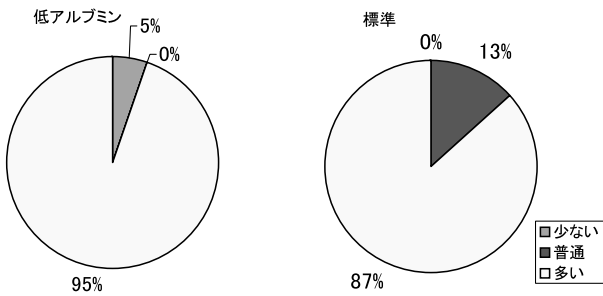


図1 アンケート調査の結果、繁殖障害の比較

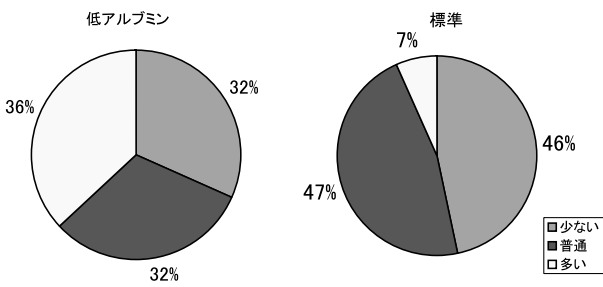


図2 アンケート調査の結果、肢蹄疾患の比較

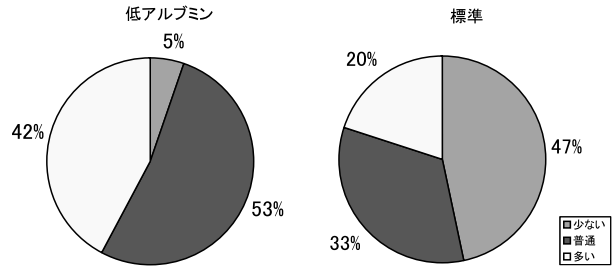


図3 アンケート調査の結果、乳房炎の比較

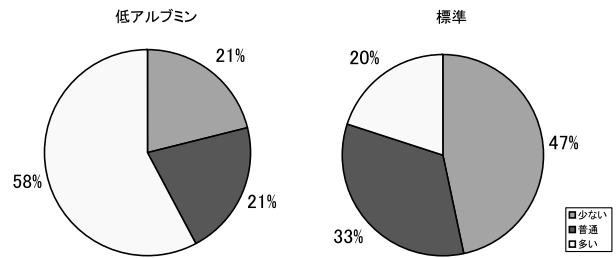


図4 アンケート調査の結果、周産期疾病の比較

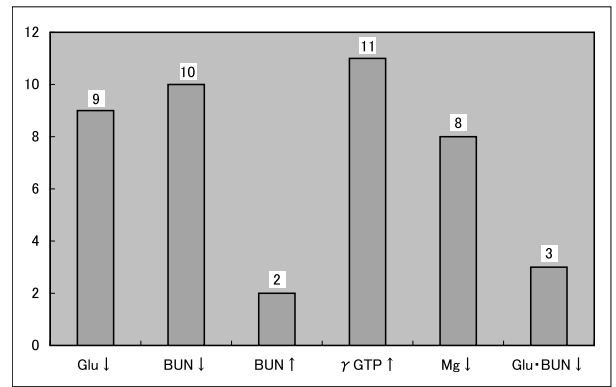


図5 低アルブミンと他のMPT項目との関係

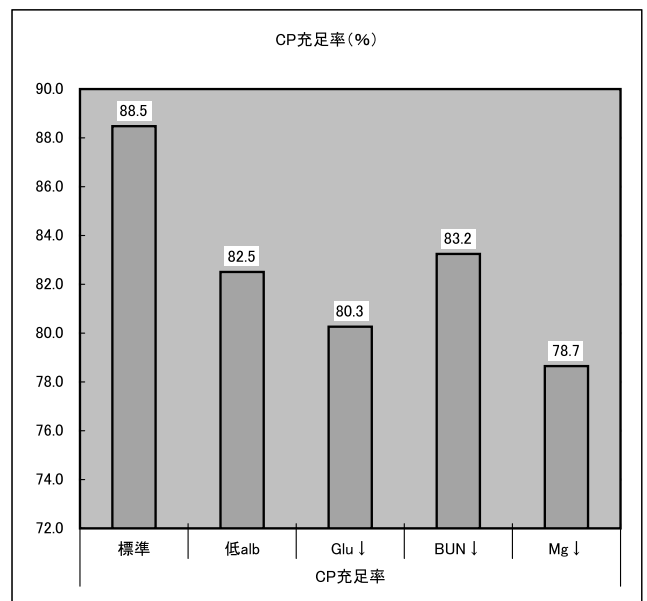
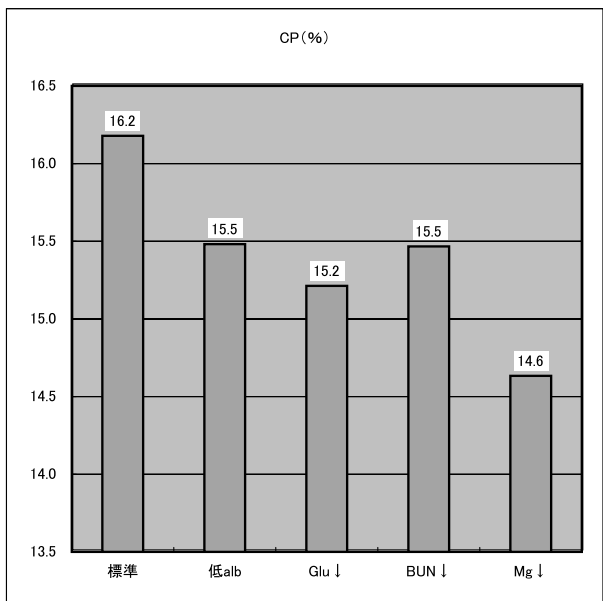


図6 給与飼料の比較, CP

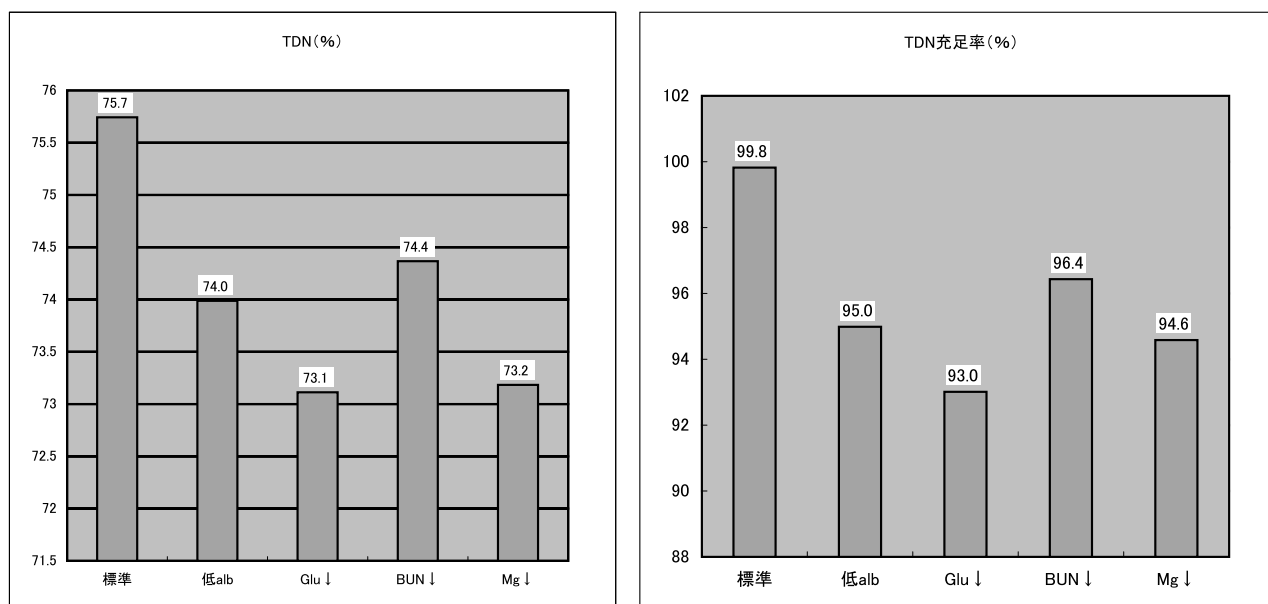


図7 給与飼料の比較, TDN

を比較すると、標準レベルの牛群では32kgであり、低alb牛群では28kgであった。低alb牛群において他の代謝プロファイルテスト項目との関連性を調査した結果、同時に、血糖の低下が見られたものは19件中9件、BUNの低下が見られたものは10件、BUNの上昇は2件、 $\gamma$ GTPの上昇は11件、Mgの低下は8件、血糖・BUN・albともに低下が見られたものが3件であった。(図5 y)。

給与飼料の栄養度を比較した結果、CPの濃度は標準レベルの16.2%に対し低alb牛群は15.5%で、同時に低血糖を示した牛群15.2%、低BUNを示した牛群15.5%、低Mgを示した牛群は14.6%であった。CP充足率は標準レベルの88.5%に対し、低alb牛群では82.5%であった(図6)。TDNの濃度は標準レベルの75.7%に対し低alb牛群は74.0%で、充足率は標準レベルの99.8%に対し、低alb牛群では95.0%であった(図7)。

### 考 察

代謝プロファイルテストにおいて牛群に低albが認められた酪農家は、アンケート調査の結果、繁殖障害、肢蹄疾患、乳房炎、周産期疾病のすべての項目に対して、標準レベルの農家よりも強い問題意識を抱えているケースが多くみられた。その中でも特に肢蹄疾患で悩んでいる農家が標準レベルの7%に対し、低alb牛群では36%と両者に大きな開きがみられた。これはalbの低下が筋

肉組織や角質の形成に悪影響を及ぼしているためと思われる。さらにalbの低下による栄養状態の悪化は繁殖障害や周産期疾病など、諸疾病の発生要因にもつながっているものと考えられた。また、低albを示した酪農家の半数前後が同時に低血糖、低BUN、低Mgあるいは高 $\gamma$ GTPを示したことから、その原因としては、栄養不足、乾物摂取不足、第一胃の発酵不良、肝機能の低下などに関連する飼養管理上の問題が考えられた。栄養不足に陥る要因の1つとして不適切な飼料設計が考えられ、TDN・CP%はその充足率とも標準レベルの農家を下回るケースが大半であった。泌乳能力の増大した最近の乳牛にとって従来のエサは栄養不足となり、能力を出し切れずに低泌乳を呈し、繁殖障害や肢蹄疾患などの疾病は増加する傾向にあるものと思われる。また、乾物摂取量の低下要因としては、飼料給与量の不足以外に乾乳牛の管理不足や飼槽・牛床・飲水施設など畜舎環境の不備も考えられ、第一胃の発酵不良を招く要因として、繊維の給与不足や飼料の不適切な給与順序なども見受けられた。

以上のことから、低albを改善し生産性を向上させるためには、多くの酪農家で、飼料設計・飼料給与法の見直しと高泌乳化に適応した畜舎環境の整備が必要であると思われる。

# 乳成分を用いた牛群診断

楡 山 尚 子

(受付：平成19年1月23日)

## Evaluation of dairy herds by milk ingredient analysis

NAOKO HIYAMA

Miyoshi Veterinary Clinical Center, Hiroshima P.F.A.M.A.A  
3-6-36, Tohkaichi-higashi, Miyoshi, Hiroshima 728-0013

### SUMMARY

Feeding management guidance using data on milk components including milk urea nitrogen (MUN) in dairy cattle tests is widely performed. In 2000, Ikuta et al. reported a correlation between MUN and the milk protein percentage in their study entitled "Simple nutritional diagnosis of lactating cows based on MUN and the milk protein percentage." Based on this correlation, we analyzed data on milk components in dairy farms to determine to clarify the relationship between milk components and the feed sufficiency rate/feed balance, to establish in an optimal feeding situation, and evaluated problems in each farm. Data on 3 dairy farms within our jurisdiction were obtained, and all data were classified according to milk yield into groups. The mean value in each group was calculated, and its association with the results of feed calculation was evaluated.

In farm M, there were significant positive correlations between the sufficiency rate of the crude protein content (CP) and MUN as well as the milk protein percentage, between the sufficiency rate of the total digestible nutrients (TDN) and the milk protein percentage, and between MUN and the milk protein percentage. There was also a significant positive correlation between TDN/CP, representing feed balance, and the milk protein percentage. In farm Y, there were significant positive correlations between the CP sufficiency rate and MUN as well as the milk protein percentage, between the TDN sufficiency rate and the milk protein percentage, and between TDN/CP and the milk protein percentage. In farm K, there was a significant positive correlation between TDN/CP and the milk protein percentage. Milk component analysis in each cow allows only the determination of whether values are in the normal range, and is not appropriate for the evaluation of the tendency of the entire farm. Analysis of farms data based on correlations that should be present in an appropriate feeding situation facilitated the evaluation of the tendency of each farm.

### 要 約

乳中尿素態窒素（以下MUN）を含む乳牛検定の乳成分データを利用した飼養管理指導は広く行われている。今回の研究は、2000年に生田らが行った研究「乳中尿素態窒素と乳蛋白質率による泌乳牛の簡易栄養診断」で発表されたMUNと乳蛋白質率との相関関係を利用し、適正給与状況下で成立すべき飼料充足率・飼料バランスと乳成分の相関が実際の農場のデータで成立するのかどうかを分析し、その農場の問題点を探った。管内酪農家3戸のデータを供し、全データを乳量階層によりグループ分けし、それぞれの平均値を出し、飼料計算結果と相関を求めた。

M牧場は粗蛋白質含量（以下CP）充足率とMUNおよびCP充足率と乳蛋白質率との間に正の有

意な相関が成立した。可消化養分含量（以下TDN）充足率と乳蛋白質率およびMUNと乳蛋白質率の間に正の有意な相関が成立した。また、飼料バランスを示すTDN/CPと乳蛋白質率の間にも正の有意な相関が成立した。Y牧場はCP充足率とMUNおよびCP充足率と乳蛋白質率との間に正の有意な相関が成立した。TDN充足率と乳蛋白質率の間に正の有意な相関が成立し、またTDN/CPと乳蛋白質率との間にも正の有意な相関が成立した。

K牧場ではTDN/CPと乳蛋白質率の間に正の有意な相関が成立した。個体ごとの乳成分分析は正常値内に入っているか否かの判定のみで農場全体の傾向は捉えにくい。適正給与状況下で成立すべき相関をもとに実際の農場のデータを分析すると、農場の傾向がつかみやすいことが分かった。

序 文

広島県では平成17年よりMUNが乳牛検定成績表に記載されるようになった。MUNは血中尿素態窒素と相関があることが分かっており、飼料バランスを把握する指標となる。今回の研究の乳成分分析は、生田らによる<sup>1)</sup>「乳中尿素態窒素と乳蛋白質率による泌乳牛の簡易栄養診断」にみられた相関関係を利用したものである。飼料の適正給与状況下では相関関係が成立する。（表1）

表1 相関

	MUN	乳蛋白質率
CP充足率	—	—
TDN充足率	負の相関	正の相関
TDN/CP	負の相関	正の相関

—：相関成立せず  
MUN：乳中尿素態窒素

TDN充足率が高いほど余剰アンモニアは減少する。すなわちMUNは減少するため負の相関が成立する。乳蛋白質率はプロピオン酸発酵に反映するので可消化養分総量（以下TDN）と正の相関。TDN/粗蛋白質率（以下CP）この飼料バランスにMUNは負の、乳蛋白質は正の相関が認められたとしている<sup>1)</sup>。この相関を利用し、実際の農場のデータを用いて、生田の相関が成立するかを検証し、その結果から農場の問題点を探った。

材料と方法

平成17年5月～18年2月（但し、H17年6月・11月は除く）の管内酪農家3戸の経産牛乳成分データ（n=969）と要因分析事業での飼料計算結果を利用した。但し、管内酪農家3軒ともTMR飼料を給与、飼養形態はY牧場フリーストール、M・K牧場はタイストールである。乳成分データは月ごとではなく、農家ごとに全データを乳量階層によりグループ分けし、それぞれの平均値を出し、相関を求めた。求められた結果を生田の相関関係に照らし、データに矛盾が無いか検討した。

成 績

（図1・表2）M牧場は高泌乳グループでTDNとCP充足率の両方が低い傾向があった。特にCPの充足率は非常に低い状況であった。生田の相関と比較してみる。網掛けのマスは生田の相関と同じ相関関係であることを示している。M牧場はCP充足率とMUNに強い正の相関がみられ、CPが上がるほどMUNが高くなる関係が成立して、飼料計算どおりにCPの不足が問題であり、中でも分解性蛋白質の不足が乳成分からも推測できる。次にTDNの充足率をみるとMUNと正の相関が成立した。適切な飼養環境下では負の相関が成立する。（表1）必要な蛋白質が給与されていれば、エネルギー飼料の充足に伴ってMUNは低下するはずである。しかし、蛋白質の不足のためこの相関が成立しないと思われた。TDN充足率と乳蛋白質率の相関は生田の相関と同じく正の相関が成立した。正常なプロピオン酸発酵が行われている

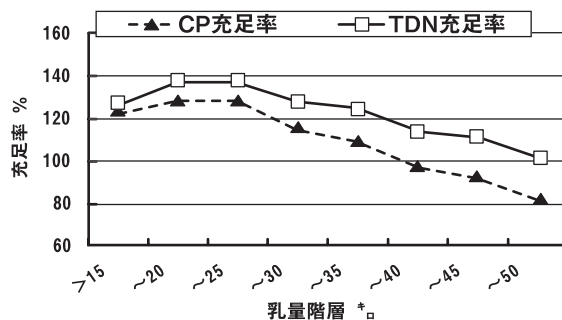


図1 M牧場の飼料充足率と乳成分の相関

表2 M牧場の飼料と乳成分の相関

	MUN	乳蛋白質率
CP充足率	0.900**	0.934**
TDN充足率	0.773*	0.799*
TDN/CP	NS	0.794*

\*\*： P<0.01 CP：粗蛋白質含量  
\*： P<0.05 TDN：可消化養分総量  
薄黒地：生田の相関と同じ NS：有意差なし



と推測できる。TDNをCPで割った飼料バランスをみると、MUNとは相関が成立しなかった。適正給与では、MUNとは負の相関が成立する。M牧場では絶対に蛋白質が不足しているためにこの関係は成立しないと思われた。飼料バランスと乳蛋白質率は生田と同じく正の相関が成立した。この農家では飼料中の分解性蛋白を上げて、乳成分の推移をチェックしていく必要があると考える。

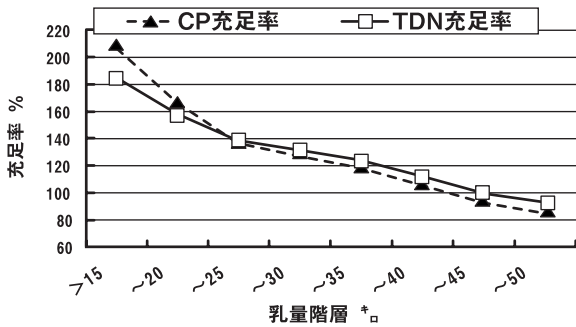


図2 Y牧場の飼料充足率と乳成分の相関

表3 Y牧場の飼料と乳成分の相関

	MUN	乳蛋白質率
CP充足率	0.722*	0.974**
TDN充足率	NS	0.977**
TDN/CP	NS	0.876**

CP: 粗たんぱく質  
TDN: 可消化養分総量  
NS: 有意差なし

(図2・表3) Y牧場は低乳量群は飼料が過剰であり、高泌乳牛群では蛋白質が不足していた。特に41キロ以上の2グループで充足率100%を切り、80%程度である。乳成分との相関をみると、CP充足率とMUN間およびCP充足率と乳蛋白質率との間に強い正の相関が成立した。先ほどのM牧場と同じく蛋白質が不足するために成立したと思われた。TDN充足率をみるとMUNとの間に相関は成立していない。適正給与下では負の相関が成立する。(表1) TDN充足率と乳蛋白質率では生田の相関と同じく強い正の相関が成立した。正常なプロピオン酸発酵が行われていると推測できる。飼料バランスとMUNの間に相関は成立せず、乳蛋白質率との間には生田と同じく強い正の相関が成立した。Y牧場は飼料中の蛋白質割合を上げ、乳量に見合った給与量に変更する必要があると思われた。

(図3・表4) K牧場の飼料充足率は、過剰気味ではあるがCP・TDNともにほぼ問題ないレベルであった。乳成分との相関をみると、CP充足率とMUNおよび乳蛋白質率との間に相関は成立しなかった。これは生田の相関どおりで、CPの充足率が適正なことが乳成分からも判断できる。次にTDN充足率をみるとMUNおよび乳蛋白質

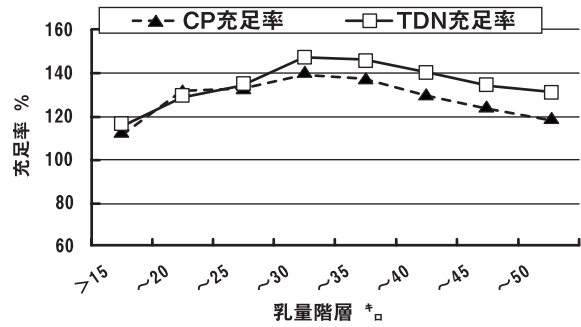


図3 K牧場の飼料充足率と乳成分の相関

表4 K牧場の飼料と乳成分の相関

	MUN	乳蛋白質率
CP充足率	NS	NS
TDN充足率	NS	NS
TDN/CP	NS	0.781*

CP: 粗たんぱく質  
TDN: 可消化養分総量  
MUN: 乳中尿素態窒素  
NS: 有意差なし

質率ともに相関は成立しなかった。CPが充足していてTDNも飼料計算上適正であるのに相関が成立していない。これは、エネルギー飼料の利用効率が悪い、分解スピードが蛋白質と一致していない、ルーメンマットの脆弱性・ルーメン発酵の不良などが考えられる。粗飼料中の繊維質のチェックとエネルギー飼料が未消化のまま糞に出ているか調べる必要がある。飼料バランスとMUNは相関が成立していないが、乳蛋白質率とは強い正の相関が成立した。K牧場ではエネルギー飼料の正常な消化吸収が行われているかどうかを確認する必要がある。

### 考 察

現在行われているMUNを含む乳成分を用いたデータ分析は、個体を月ごとに検討することが多く、その検討方法は正常値に入っているか否かの判定のみで、例えば高泌乳牛でエネルギーが不足している、分娩直後の牛が食い込み不足であるなど個々を評価するものである。今回実施したように農家ごとに複数月分をデータ集約し、乳量階層ごとにグループ分けする検討方法はあまり使われていない。

現在の状態を捉えるには月ごとの分析が有効だと思われるが、給与している飼料バランスの特徴やその農家の飼養管理の問題点を捉えるには、一月ごとよりも複数月に渡ってデータを集約した方がより正確にダイナミックな数字として現れると考えられる。購入乾草の質の低下や暑熱の影響により、乳成分は容易に変動するため、月毎の分析だけではデータを読み違える危険もある。さらに飼養頭数の少ない農家の場合、月毎の乳成分ではデータが少なすぎて傾向がつかみにくいが、今回用いた方法

であれば同じ個体から分娩後50日の情報も200日の情報も得ることができ、検討しやすい。他に適用例として、ウォーターカップの改修や飼槽の張り替えを行い、カウコンフォートが向上した時、その前後の比較にも利用できると思われる。

今回の結果から乳成分は牛群の飼料給与状況を反映しており、乳成分は個体で見るとよりもグループで比較する方が特徴をより把握しやすいことがわかった。飼料充足率が示すとおり、乳成分との相関が成立した農家もあれば、飼料計算上は問題ないのに、乳成分との相関が成立しない農家もあった。給与量の思い込み、飼料給与順序や間隔、あるいは飼料中諸成分の分解スピード、ルーメンの発酵状況などにより、実際の乳成分データは理論値とは異なっていた面があったことはいなめない。乳成分は実際の飼養管理に対して牛が返してきた結果であることを考え、これを利用し現在の問題点を探っていきたい。

今回は乳量グループを8階層に分けたが、その農家が給与している実態に即した方がより数字に表れやすいと思われる。乳成分の中でも乳蛋白質率は飼料状況をよく

反映していることが分かった。それは特に、TDN充足率・飼料バランスを良く反映しており、乳質の評価にはMUNだけでなく、乳蛋白質率も合わせて判断することが重要であると考えられる。飼料計算という計算上の理論と実際の牛の反応として返ってきた乳成分とを照らし合わせることによって、より正確な牛群診断が可能であることが分かった。但し、今回の分析では人的問題やカウコンフォートの問題などは全く考慮してないので、現場を見て農家と話し合いながら、問題点を見つけていく必要がある。

今回の分析を進めていて、飼料が乳成分へ与える影響が良く理解できた。指導者の育成等にも活用できると考えている。

### 参考文献

- 1) 生田 健太郎ほか：乳中尿素態窒素と乳蛋白質率による泌乳牛の簡易栄養診断，日獣会誌，53，289～292 (2000)

# 牛RSウイルス病の早期診断法の検討

恵谷 美江<sup>1)</sup> 山本 武<sup>1)</sup> 平井 潤思<sup>2)</sup>

(受付：平成19年1月26日)

## Evaluation of early diagnosis methods for bovine respiratory syncytial virus infection

MIE EYA<sup>1)</sup>, TAKESHI YAMAMOTO<sup>1)</sup>, JYUNJI HIRAI<sup>2)</sup>

- 1) Higashi-Hiroshima Livestock Health & Hygiene Service Center Hiroshima Prefecture  
1-15, Saijogojo-cho, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-0013
- 2) Geihoku Livestock Health & Hygiene Service Center Hiroshima Prefecture  
4-12-1, Kabe, Asakita-ku, Hiroshima 731-0221

### SUMMARY

For the diagnosis of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection, virus isolation or antibody examination using pair serum of cattle with this infection is generally used. However, the detection rate by virus isolation is very low, and long-term subculture is necessary. Since antibody examination using pair serum requires serum samples both at the time of onset and during the recovery period, a long period is necessary to obtain results.

For the rapid diagnosis of BRSV infection, we evaluated the HRSV kit and PCR. The detection sensitivity was higher for PCR than for the HRSV kit. Some field cases in which BRSV was isolated were positive for only PCR. These results suggested the usefulness of PCR as a rapid diagnosis method for BRSV infection. At present, PCR is used as an adjunctive method and is not a diagnostic method according to the manual. However, PCR may be an important examination method allowing the rapid diagnosis of BRSV infection.

### 要 約

牛RSウイルス病の診断法としては、一般にウイルス分離、発症牛のペア血清による抗体検査等が用いられている。しかしながら、ウイルス分離は、検出率が極めて低く、長期の継代が必要である。また、ペア血清の抗体検査は発症期と回復期の血清が必要なため、検査結果が出るまでに長期間を要している。

今回、牛RSウイルス病を迅速に診断する方法について、HRSVキットとPCR法の2種類について検討を行ったところ、PCR法はHRSVキットより検出感度が高く、BRSVが分離された野外材料からもPCR法のみが陽性と判断された症例もあり、BRSV感染症を迅速に診断する方法としてPCR法は有効な方法と考えられた。PCR法は、補助的診断に用いるのみで、マニュアル上では定められた診断方法ではない。しかし、牛呼吸器病に対して迅速に対応していく重要な検査方法と考えられた。

---

1) 広島県東広島家畜保健衛生所 (〒739-0013 広島県東広島市西条御条町1-15)

2) 広島県芸北家畜保健衛生所 (〒731-0221 広島県広島市安佐北区可部4丁目12-1)

## はじめに

牛RSウイルス (BRSV) 病は、病性鑑定マニュアル第2版<sup>1)</sup>において、蛍光抗体法または酵素免疫測定法、抗体検査およびウイルス分離により診断される。現在、病性鑑定では、牛呼吸器病の原因究明依頼について、ウイルス分離と抗体検査を実施しているが、ウイルス分離はその検出率が極めて低く、長期の継代が必要である。また、抗体検査は、発症期と回復期の血清が必要なため、いずれも結果が出るまでに長時間を要している状況にある。今回、BRSV病に対する迅速検査方法として、15分で判定できる酵素抗体法：人用RSウイルス抗原検出キット (以下、「HRSVキット」という) と8時間程度で判定できるnested PCR法 (以下、「PCR法」という) の2種類を比較検討したので報告する。

## 試験項目および方法

### 1. 試験項目

下記の試験1、試験2、試験3で、酵素抗体法：人用RSウイルス抗原検出キット (以下、「HRSVキット」という) とnested PCR法 (以下、「PCR法」という) の2方法での検出状況等を比較検討した。

#### 1) 試験1

$10^0 \sim 10^6$  TCID<sub>50</sub>/0.1mlまで10倍階段希釈した既知のBRSV液 (NMK-7株) を用いて、検出可能な範囲を確認した。

#### 2) 試験2

過去の病性鑑定においてBRSVが分離された2症例 (鼻汁14検体、血清24検体) についてウイルス分離及び抗体検査結果を比較し、検出状況を比較検討した。

#### 3) 試験3

平成17年度に牛呼吸器病原因究明で依頼のあった52症例中、抗体検査からBRSV病と診断された6症例 (鼻汁26検体、血清50検体) についてウイルス分離及び抗体検査結果を比較し、更に、2方法での検出状況を比較検討した。

## 2. 方法

### 1) HRSVキットによるBRSVの検出

日本ベクトン・デッキンソン株式会社製“ディレクティジェンEZ RSV”を用い、使用説明書に従い、鼻汁 (1症例をプール) を添付されている試薬と混合して、テストプレートに滴下後、図1のように判定部のC及びTにラインが検出されたものを陽性、Cのみにラインが検出されたものを陰性とした。

### 2) PCR法によるBRSVの検出

ウイルスRNAの抽出は、ニッポンジーン社のISOGEN-LSを用いた。鼻汁及び既知のBRSV液250  $\mu$ lに750  $\mu$ lのISOGEN-LSを添加し攪拌、5分間室温に放置した。これをクロロホルム200  $\mu$ lで処理し、3分間室温に放置後、遠心分離 (15,000rpm, 10分) した。

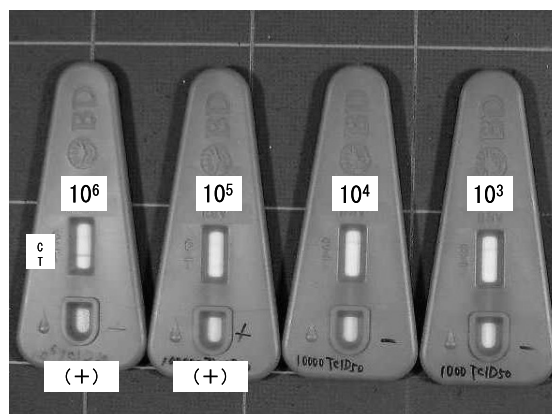


図1 HRSVキットによる検出

この遠心上清にイソプロパノールを加え、10分間室温に放置後、遠心分離 (15,000rpm, 10分) した。この沈査をエタノールで洗浄後、再度遠心分離 (15000 rpm, 15分) により沈査を回収後、超純水に再浮遊させて、抽出RNAとした。

BRSVに対するプライマー及び反応条件は、桐沢らの報告<sup>2)</sup>によるBRSV・Gタンパク遺伝子の約300bpを標的とした2種類の正方向のプライマー (F1 : ATC ACT CGT CAT CAC AGC CA, F2 : AAA GCA CCA CAC TGT CCC AA) と2種類の逆方向のプライマー (R1 : AGA GGA TGC CTT GTT GTG GA, R2 : TTT GAG GGT GAT TGT AGG GG) を使用した。プログラム恒温槽はASTEC社製PC-800を、酵素およびバッファーは、タカラバイオ (株) 社製TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 とPERKIN ELMER社製Gene Amp EZ rTth RNA PCR Kitを使用した。逆転写反応は、TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0に従い、30℃10分、42℃30分、99℃5分、5℃5分で行った。次に、F1, R1のプライマーセットで1回目のPCR反応 (DNA熱変性94℃1分、プライマーアニーリング60℃1分、伸長反応72℃3分で、30サイクル) を行い、F2, R2のプライマーセットで2回目のPCR反応 (DNA熱変性94℃1分、プライマーアニーリング60℃1分、伸長反応72℃3分で、30サイクル) を行った。

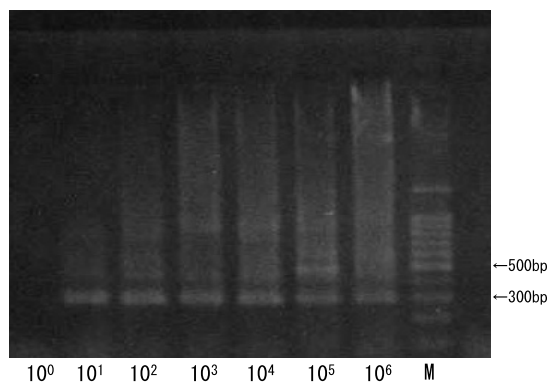


図2 PCR法による検出

増幅した遺伝子は、2%アガロースゲル電気泳動を実施後、エチジウムブロマイド染色を行い、1 kbのDNAラダーをマーカーとして同部位にバンドが確認されたものを陽性とした。

### 3) ウイルス分離および抗体検査

発症牛からのBRSVのウイルス分離は、鼻汁をVero細胞に接種後34℃、7日間回転培養を行い、細胞変性効果を指標に3代継代した。

BRSVの抗体検査は、BRSV NMK-7株を抗原として、Vero細胞で中和試験を実施した。BRSVが分離されるか、またはBRSV抗体が有意に上昇していた個体が認められた症例をBRSV感染症と診断した。

## 成 績

### 1. 試験 1

既知のBRSV液では、HRSVキットは $10^5 \sim 10^6$ TCID<sub>50</sub>/0.1mlまでが、PCR法は $10^1 \sim 10^6$ TCID<sub>50</sub>/0.1mlまでが陽性と判定した。(図1, 2)

### 2. 試験 2

過去の病性鑑定においてBRSVが分離された症例1及び2はHRSVキットでは検出されなかったが、PCR法では症例1は全検体、症例2は8検体中6検体が陽性であり、ウイルス分離と抗体検査によるBRSV感染症の診断とPCR法の結果は一致していた。(表1)

表1 ウイルス分離例における検出方法の比較

	ウイルス分離	ペア血清	HRSVキット	PCR法
症例1	1/6	1/5	陰性	6/6
症例2	1/8	3/7	陰性	6/8

### 3. 試験 3

平成17年度に抗体検査でBRSV病と診断された6症例からは、ウイルスは分離されなかった。このうち、HRSVキットで2症例が陽性と判定された。また、PCR法では、症例1及び3は全検体で、症例5では5検体中1検体が、症例6では4検体中2検体が陽性と判定した。

症例1及び3は抗体検査成績と2種類の方法の結果が、症例5及び6は抗体検査成績とPCR法の結果が一

致していた。しかし、症例2及び4の場合、抗体検査成績でBRSV病と診断されたが、検討した2種類の方法では陰性と判定された。(表2)

表2 抗体検査陽性例における検出方法の比較

	ウイルス分離	ペア血清	HRSVキット	PCR法
症例1	0/4	1/4	陽性	4/4
症例2	0/5	1/5	陰性	0/5
症例3	0/4	2/3	陽性	4/4
症例4	0/4	4/4	陰性	0/4
症例5	0/5	2/5	陰性	1/5
症例6	0/4	4/4	陰性	2/4

## 考 察

PCR法はHRSVキットより $10^4$ 倍検出感度が高かった。また、BRSVが分離された野外材料でPCR法のみが陽性と判断された症例もあり、BRSV病を迅速に診断する方法としてPCR法は有効な方法と考えられた。しかし、BRSV病が抗体検査により確実に診断された症例において、PCR法では確認できなかったものが認められており、必ずウイルス分離、抗体検査を実施し、PCR法との検出状況について比較確認していく必要があると考えられた。

PCR法は、補助的診断に用いるのみで、マニュアル上では定められた診断方法ではない。しかし、牛呼吸器病に対して迅速に対応していく重要な検査方法である。BRSV病にかかわらず、いかなる感染症に対しても、早期の防疫対応が重要であることから、今後も、その対応が十分に取れるよう、迅速かつ確実な検査方法を検討していく事が重要と考えられた。

## 文 献

- 1) 病性鑑定マニュアル (第2版): 牛RSウイルス病: 全国家畜衛生職員会: 62~63 (2001)
- 2) 桐沢力雄: ウシパラインフルエンザウイルス3型, ウシRSウイルス及びウシウイルス性下痢・粘膜病ウイルス感染のPCRによる検出: J. Rakuno Gakuen Univ. 1994(1):225~237(1994)



# 黒毛和種繁殖牛に発症したエンドファイト中毒症

玉川 朋治<sup>1)</sup> 石田 恭子<sup>2)</sup> 玉野 光博<sup>3)</sup>

(受付：平成19年1月26日)

## A black Japanese cow with endophyte toxicosis

TOMO HARU TAMAGAWA<sup>1)</sup>, KYOKO ISIDA<sup>2)</sup>, and MITUHIRO TAMANO<sup>3)</sup>

- 1) Akitakata Veterinary Clinical Center, Hiroshima, P.F.A.M.A.A.  
1775, Hongo, Midori-chou, Akitakata, Hiroshima, 731-0612
- 2) Fukuyama Livestock Health & Hygiene Service Center, Hiroshima Prefecture  
396-1, Fukae, Joge-chou, Fuchu, Hiroshima, 729-3421
- 3) Geihoku Livestock Health & Hygiene Service Center, Hiroshima Prefecture  
1-12-4, Kbe, Asakita-ku, Hiroshima, Hiroshima, 731-0221

### SUMMARY

In recent years, the provision of imported feed infected with endophytes has been shown to cause toxicosis due to toxins produced by the endophytes. We encountered a black Japanese cow maintained in a farm in Hiroshima Prefecture that developed endophyte toxicosis.

In this farm, import feed purchased as Italian ryegrass was given daily (about 6 kg/cow), and the affected cow showed neurological symptoms such as tremor of the four limbs and gait abnormalities. The imported feed was perennial ryegrass and showed endophyte hyphae. The concentrations of toxins were relatively high (ergovaline, 250 ppb; lolitrem B, 1,200 ppb), suggesting endophyte toxicosis.

### 要 約

近年、エンドファイトに感染した輸入飼料の家畜への給与による中毒が、エンドファイトの産生する毒素によって生じることが明らかになっている。今回、広島県内の農家で飼育されていた黒毛和種繁殖牛で発症したエンドファイト中毒症に遭遇した。

発生のあった農家は、イタリアンライグラスとして購入した輸入飼料を、1日1頭当たり6kg程度給与しており、患畜は四肢の振戦、歩様異常等の神経症状を呈した。輸入飼料はペレニアルライグラスであり、エンドファイト菌糸を認めた。毒素濃度は、エルゴバリン250ppb、ロリトレムB 1200ppbと比較的高く、エンドファイト中毒症を引き起こしたものと思われた。

### はじめに

エンドファイトは内生菌ともいわれ、植物体内で共生的に生活している菌類のことで、イネ科牧草を中心に300種以上の牧草で感染が確認されている。エンドファイト

は菌自体が産生するアルカロイド等の毒素により牧草へ耐病虫性、多収性を付与することから人工的に利用されている。近年、エンドファイトに感染したペレニアルライグラスやトールフェスクの家畜への給与による中毒が、エンドファイトの産生する毒素により生じること

1) NOSAI広島 安芸高田家畜診療所 (〒731-0612 広島県安芸高田市美土里町本郷1775)

2) 広島県福山家畜保健所 (〒729-3421 広島県府中市上下町深江396-1)

3) 広島県芸北家畜保健衛生所 (〒731-0221 広島県広島市安佐北区可部1-12-4)

が明らかになっている<sup>1,2)</sup>。

今回、広島県庄原市内の農家で飼育されていた黒毛和種繁殖牛に発症したエンドファイト中毒症に遭遇したのでその概要について報告する。

### 発生農家の概要

飼育頭数約80頭の大型繁殖和牛農家で、4頭～6頭のストール飼い。分娩1ヶ月前より分娩舎にて1頭飼いとしていた。

飼料給与は、購入飼料のフェスク・稲ワラおよび自給飼料の給与体系をとっていたが、2005年10月20日から購入飼料のフェスクを米国Oregon州産のイタリアンストローに替えて給与することとした。給与量は、1日1頭

当たり4kg～6kg程度であった。

### 発症経過と臨床症状

発症の経過は、購入飼料変更後12日目から33日目までの間に7頭の成牛が活力消失、体温の低下、起立困難、四肢振戦、歩様異常等の神経症状を呈した。

購入飼料変更後12日目の発症牛1頭は血液検査により低Ca血症を呈したが、29日目の発症牛1頭と32日目の発症牛4頭には血液検査でのCa値の異常は認められなかった。これらの臨床症状によりエンドファイト中毒を疑い、エンドファイト菌糸の検出を家畜保健衛生所に、毒素濃度の定量を独立行政法人肥飼料検査所にそれぞれ依頼した。

表1 発症牛と臨床症状

症例番号	生年月日	性別	分娩予定日	発症日 (飼料変更後)	体温 (検査時)	症 状 等
1	H16. 1.29	雌	H17.12. 5	H17.11. 1 (12日目)	38.2	起立困難、後躯の振戦、前駆歩様蹠踏、泥状便
2	H16. 5.11	雌	H18. 4.21	H17.11.18 (29日目)	-	起立困難、後躯の振戦、前駆歩様蹠踏、泥状便
3	H12. 6.11	雌	H17.12.13	H17.11.21 (32日目)	38.5	起立困難、四肢の振戦、活力低下、胃腸運動微弱
4	H 5. 6. 1	雌	H18. 6. 7	H17.11.21 (32日目)	38.3	起立困難、四肢の振戦、活力低下、皮温低下
5	H14.10. 1	雌	H18. 7. 8	H17.11.21 (32日目)	38.4	起立困難、四肢の振戦、活力低下、皮温低下
6	H12.12. 3	雌	H18. 5. 5	H17.11.21 (32日目)	38.4	起立困難、四肢の振戦、活力低下、削瘦
7	H12.10.28	雌	H18. 6.15	H17.11.22 (33日目)	38.2	起立困難、四肢の振戦、活力低下、皮温低下

表2 初診時の血液検査結果

症例番号		1	2	3	4	5	6
検査年月日		H17.11.1	H17.11.18	H17.11.21	H17.11.21	H17.11.21	H17.11.21
RBC	( $\times 10^4/\mu l$ )	-	-	993	761	760	727
WBC	( $\times 10^2/\mu l$ )	-	-	109	97	63	112
HGB	(g/dl)	-	-	12.4	15.4	11.2	12.5
Ht	(%)	-	-	29	35	26	29
TP	(g/dl)	6.6	6.1	6.4	6.7	6.5	6.6
Alb	(g/dl)	3.8	-	3.3	4	3.4	3.6
Ca	(mg/dl)	5.1	12.2	11.7	11.4	11.8	11.4
Mg	(mg/dl)	-	2.3	2.4	2.3	2.5	2.2
IP	(mg/dl)	-	6.9	6.8	4.8	5.5	4.9
GOT	(IU/L)	83	80	56	56	64	60
GGT	(IU/L)	29	-	28	36	34	33
BUN	(mg/dl)	7	-	10	10	9	9
CPK	(IU/L)	>2000	701	219	43	148	263

発症牛 7 例の年齢は比較的若齢のものが多く、すべて妊娠牛であった。ほぼ全頭が低体温を示し、四肢振戦、歩様異常等の神経症状を認めた (表 1)。

初診時の血液検査結果からは、症例 1 に低Ca血症が認められたが、その他の 5 頭は正常のCa値であった。CPKとGOTに軽度の上昇が認められるものの、血清学的には著しい異常は無かった (表 2)。

購入飼料変更から 29 日目、2 頭目が発症した時点で購入飼料の給与中止を指示し、その後 6 日目には全頭に症状の改善が見られた。

## 結 果

検査の結果イタリアンライグラスとして購入された輸

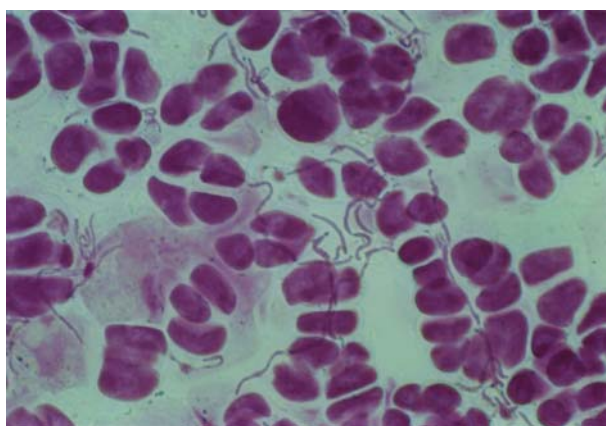


写真 1 検出されたエンドファイト菌糸

入飼料は、ペレニアルライグラスであった。

ローズベンガル染色においてエンドファイト菌糸が認められ (写真 1)、毒素濃度は、エルゴバリン 250ppb、ロリトレム B 1200ppb と比較的高値を示した。

類症鑑別として硝酸塩中毒とグラスタタニーも考えられたが、硝酸体窒素濃度は 261ppm と安全域であり、血中Mg濃度も正常であったため両疾病ともに否定された。

## 考 察

今回の事例は、輸入飼料に存在していたエルゴバリン、ロリトレム B の摂取によりエンドファイト中毒が発生したものと推測される。

毒素濃度は米国 Oregon 州における輸出前検査の基準値<sup>3)</sup>であるエルゴバリン 500ppb、ロリトレム B 1800ppb 以下の数値であったが、基準値以下であっても発症する例は報告されており<sup>1,4)</sup>、今回の毒素量は、中毒症状を起しうる濃度であったと思われる。

最初の発症牛 1 頭のみ低Ca血症であり、Ca剤の投与にて一時的に症状が軽減した。しかしながら、32日目には再び同一の神経症状を示し、輸入飼料の給与中止とともに症状の改善が見られたため、この 1 頭もエンドファイト中毒であると推測された。

今後このような症状に遭遇した場合、速やかに輸入飼料の給与中止又は給与量の減少を指示し、経過観察することが重要だと考えられた。

## 謝 辞

エンドファイト菌糸の検出、毒素濃度の定量において、ご尽力いただいた家畜保健衛生所の先生方に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 宮崎茂：エンドファイトが産生する毒素による家畜の中毒，臨床獣医，16 (5)，34-40 (1998)。
- 2) 仲嶺マチ子ら：エンドファイト感染輸入牧草給与牛に発生したライグラススタッガーが疑われた症例，臨床獣医，16 (11)，38-45 (1998)。
- 3) 榎本勝治，宮崎茂：黒毛和種に発生したライグラスストローによるエンドファイト中毒症，家畜診療，46，421-427 (1999)。
- 4) Cornell, C. N. et al.; Establishing ergovaline levels for fescue toxicosis, with and without endoparasites, under controlled climatic conditions. Proceedings of International symposium on Acremonium/Grass interactions, 75-79, (1990)

# ウシ胚からの性判別用細胞採取法の開発

尾形 康弘<sup>1)</sup> 日高 健雅<sup>1)</sup> 松重 忠美<sup>1)</sup>  
堀内 俊孝<sup>2)</sup>

(受付：平成19年1月29日)

## Development of a cell sampling method for the sexing of bovine embryos

YASUHIRO OGATA<sup>1)</sup>, TAKEMASA HIDAKA<sup>1)</sup>, TADAMI MATZUSHIGE<sup>1)</sup>, TOSHITAKA HORIUCHI<sup>2)</sup>

- 1) Hiroshima Prefectural Livestock Technology Research Center  
584, Nanatuka-cho, Shobara, Hiroshima 727-0023
- 2) Hiroshima Prefectural University  
562, Nanatuka-cho, Shobara, Hiroshima 727-0023

### SUMMARY

To improve the quality of sexed bovine embryos, we developed a cell dissection method that is simple and allows the collection of a small number of sample cells for sexing.

The number of cells collected by this method is about 1/5 of the conventional trophoblast metal blade cutting method. This method can increase the number of cells in embryos in the blastocyst stage before implantation without reducing the sexing rate for improvement in the quality of sexed embryos.

Conception of fresh embryos was not reduced by this method compared with no treatment or the trophoblast metal blade cutting method.

After the implantation of embryos sexed by this cell dissection method, the production of female dairy calves consistent with the results of sexing was possible.

### 要 約

ウシの性判別胚の品質改善を目的として、簡易で少数の性判別用サンプル細胞を採取できる細胞剥離法を開発した。

この方法は、従来の栄養膜細胞の金属製ブレード切断法と比較して、採取する細胞数を約1/5まで減少させることができる。

性判定率を低下させることなく、移植前の胚盤胞期胚の細胞数を増加させることができ、性判別胚の品質を改善することができる。

新鮮胚による受胎性も、無処置や栄養膜細胞の金属製ブレード切断法と比較して問題ないことが確認された。

細胞剥離法で性判別した胚を移植して、判定どおり雌乳用子牛を生産することができた。

---

1) 広島県立畜産技術センター (〒727-0023 広島県庄原市七塚町584)

2) 県立広島大学 (〒727-0023 広島県庄原市七塚町562)

## 序 文

妊娠期間が長く、単胎動物であるウシにおいて、生まれてくる子牛の性によって畜産農家の経営に与える影響は少なくない。

希望する性の産子を得るために、これまでも様々な研究が行われており、現在、主に利用されているウシの性判別方法は大きく分けて二つある。

一つは、フローサイトメーターとセルソーターを利用して、精子の段階でオス精子とメス精子に分画し人工授精を行うもので、一部試験的に行われ着実に成果<sup>1)</sup>を挙げている。

もう一つは受精胚での性判別で、体内受精7日目の栄養膜細胞の一部を金属製ブレードで切断するもの<sup>2,3)</sup>で、都道府県レベルでも性判別胚の供給を行っている。

従来のブレード切断法による性判別用細胞のサンプリングは、マイクロマニピュレータ等の高度な機器や熟練した技術を必要とすることや、金属製ブレードでの切断による細胞損傷によって性判別胚の受胎性と保存性を低下させてしまう等大きな問題があった。

これらの問題を解決し、性判別胚の実用化を図ることを目的として我々は実験を行い、核移植時のドナー胚の処理方法を応用して、新しい性判別用細胞の採取法を開発した。

この細胞剥離法は、従来法と異なり、マイクロマニピュレータ等の高度な機器を必要としない上、受精胚に対する傷害が少ないため、胚盤胞期胚の品質が従来の金属製ブレード切断法よりも高く、受胎性についても無処置胚やブレード切断胚と同等であることが確認され、性判別胚生産方法として有効性が高いと考えられる。

## 材料と方法

### 【体外受精胚の作出】

性判別に用いた体外受精胚は、と体卵巢由来もしくは、広島県立畜産技術センターに繋養している黒毛和種及びホルスタイン種からの経膈採卵によって得られた未成熟卵子を用いた。

と体卵巢からの卵子吸引は、37℃に加温した生理的食塩水に卵巢を入れ、輸送・保存後、21G5/8注射針を5mlのディスプレイに装着し、卵胞径10mm以下のものから吸引し集めた。

経膈採卵は、超音波画像診断装置（アロカ社SSD-1200）に経膈穿刺用コンベックス探触子（アロカ社UHT-9106-7.5）を装着し、ディスプレイ探卵針（ミサワ医科工業株式会社）及び卵子吸引システム（クック社K-MAR-5115）を用いて行った。

回収液は3%ウシ胎児血清（FCS）及び1.8ユニット/mlのヘパリンを添加した乳酸加リンゲル液を用い、吸引圧100mmHgの条件で卵胞液を吸引した。

それぞれの吸引液から卵丘卵子複合体のみを10%牛胎

児血清添加リン酸緩衝液に移し、3回以上洗浄した後、発生用培地TCM-199+5%FCSに移し、22~24時間成熟培養を行った。

体外受精は、当センターの常法<sup>4)</sup>に従い、凍結精液を用いて、精子濃度を6~12×10<sup>6</sup>/mlに調整して媒精を6時間行った。媒精後72時間目までmSOF培地+3mg/ml牛血清アルブミン（Sigma A-4378）+0.25mg/mlリノール酸アルブミン（Sigma L8384）で38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>、90%N<sub>2</sub>の低酸素条件下で培養し、それ以降は、mSOF培地+10%FCS+10μg/mlインスリン（Sigma I-6634）でVero細胞との共培養を38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、95%airの気相条件下で行った。

### 【性判別用サンプル細胞の採取】

性判別用のサンプル細胞の採取は、栄養膜細胞のブレード切断は、体外受精後7日目の胚盤胞期胚を用いた。

顕微操作は、位相差倒立顕微鏡（Nikon Diaphoto 300）と顕微操作システム（Leitz）に金属製ブレード（Micro Feather BLADE K-730）をセットし、栄養膜細胞の1/3程度を切断採取した。

胚の切断は、0.1Mサッカロース+20%FCS添加M2液内で行った。

サンプル細胞として採取した切断胚は、20%FCS添加M2液で6回洗浄した後、20%FCS添加mSOF培地でVero細胞と共培養を2~3時間行った。

細胞剥離法は、体外受精後5日目の桑実期胚を用いた。

桑実期胚を0.25%アクチナーゼE（科研製薬）に60秒ほど静置し、透明帯を溶解した後、20%FCS添加M2液で酵素の作用を停止させた。

透明帯を除去した胚を0.125%トリプシン（GIBCO 27250-042）+EDTA・4Na（Sigma E4DS）添加PBS-に入れ、市販のガラス製毛細管（Drummond 057910）をガスバーナーで細く伸ばしピペットに加工した。

そのピペットで数回ピペッティングすることで胚表層の細胞を剥離させた。数個の細胞が剥離したところで、20%FCS添加M2液で酵素の作用を停止させた。

細胞を剥離した胚は、20%FCS添加mSOF培地でVero細胞と共培養を48時間行った。

### 【性判別法】

性判別は、ブレード切断及び細胞剥離のサンプル細胞ともに20%FCS添加M2液で6回洗浄後、1mg/mlPVA添加PBS-液で更に6回洗浄し、Loopamp牛胚性判別試薬キット（栄研化学）で性判定を行った。

サンプリングした性判別用細胞及び判別用操作胚の細胞数は、蛍光色素Hoechst33342で細胞核を染色し、蛍光顕微鏡下で細胞数をカウントした。

### 【受精胚移植】

胚移植は、新鮮胚を発情後7日目の未経産ホルスタイ



ン種の黄体側子宮角内に頸管経由法で行った。

妊娠診断は、妊娠30日目（移植後23日目）前後に超音波画像診断装置を用いて、胎仔心拍をもって妊娠と判定した。

### 成 績

性判別用サンプル細胞の採取個数は、ブレード切断区13.2±1.4細胞（89胚）、細胞剥離区2.7±0.2細胞（81胚）であった。

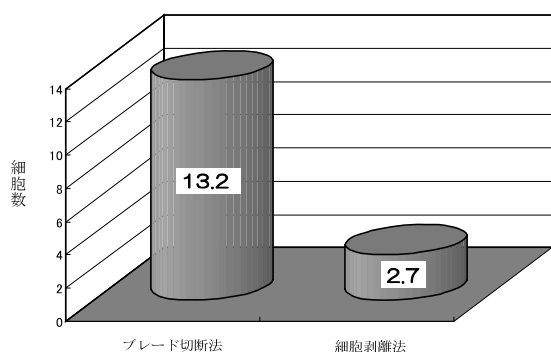


図1 性判別用サンプル細胞の採取個数

サンプリング法別の性判別率は、ブレード切断区95.0%（19/20）、細胞剥離区92.0%（46/50）であり、両者の間に有意差はなかった。

表1 サンプリング法別の性判別率

試験区	供試胚数	性判別数	判定率(%)
ブレード切断	20	19	95.0
細胞剥離	50	46	92.0

性判別胚の発育性は、ブレード切断区84.6%（77/91）が胚腔を再形成し、細胞剥離区91.4%（74/81）が胚盤胞期胚に発育し、両者に有意差はなかった。

表2 性判別胚の発育性

試験区	供試胚数	胚腔形成	胚腔形成率(%)
ブレード切断	91	77	84.6
細胞剥離	81	74	91.4

性判別胚の総細胞数は、無処置区119.9±4.5細胞、ブレード切断区77.0±2.7細胞及び細胞剥離区100.0±6.7細胞で、細胞剥離区はブレード切断区より有意に胚盤胞期胚の細胞数が多かった。

表3 性判別胚の総細胞数

試験区	供試胚数	総細胞数±S.E.
ブレード切断	91	77.0±2.7 <sup>a</sup>
細胞剥離	32	100.0±6.7 <sup>b</sup>
無処置	43	119.9±4.5 <sup>c</sup>

※異符号間で有意差（p<0.05）

性判別胚の移植成績は無処置区68.4%（13/19）、ブレード切断区83.3%（5/6）及び細胞剥離区68.0%（17/25）で、どの区間にも有意差はなかった。

表4 性判別胚の受胎性（新鮮胚）

試験区	移植頭数	受胎頭数	受胎率
ブレード切断	6	5	83.3
細胞剥離	25	17	68.0
無処置	19	13	68.4

### 考 察

これまで、性判別法として、染色体分析<sup>5)</sup>、パーコール密度勾配法<sup>6)</sup>による精子分離、H-Y抗原の利用<sup>7)</sup>や胚の発育スピードによる選別<sup>8)</sup>など様々な角度から研究が行われてきている。

ウシ胚のバイオプシーは金属製ブレードによる栄養膜切断法<sup>9)</sup>が現在は主流となっており、この他にも金属刃による細胞損傷を抑制するために透明帯にスリットを入れそこから膨出する細胞を採取するヘルニア法<sup>10)</sup>や、桑実期胚の割球をピペットで吸引する細胞吸引法<sup>11)</sup>等が行われているがいずれの方法も、マイクロマニピュレータ等の高度な機器と熟練した技術を必要とする。

しかもブレード切断法では、栄養膜細胞の切断による残りの胚へのダメージが大きく、このことが、その後の性判別胚の受胎性や保存性を低下させることがあり、これまで多くの研究機関で実用化試験が行われ、産子の生産も行われているが、酪農家への普及はそれほど進んでいない。

今回行ったウシ受精胚からの性判別用サンプル細胞の採取は、従来の切断法とはまったく異なり、刃物による切断ではなく、酵素の働きによって細胞間の結合を緩めて剥離する方法なので、サンプリングする細胞数も13.2細胞から2.7細胞に少なくすることができた。また、切断による細胞破壊によって細胞外へ溶出する水解小体等により、残りの胚細胞の一部が傷害を受けるなどの影響で細胞を破壊することがない細胞剥離法は細胞への傷害を最小限にすることができると考えられ、結果として、

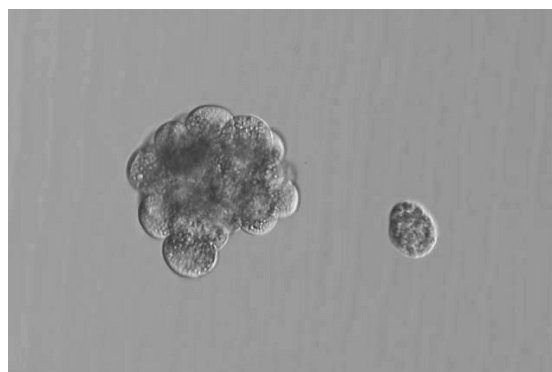


写真1 桑実期胚に細胞剥離法を適用した直後

細胞数の減少が抑制できたと考えられる。

実際、今回の実験でも、性判別胚の発育性には有意差がなかったものの、ブレード切断区と比較して6.8ポイント (84.6% vs 91.4%) 改善されており、7日目の胚盤胞期胚の総細胞数は、細胞剥離胚がブレード切断胚より有意に高いものとなっており、性判別胚の品質 (細胞数) を大幅に改善させることができた。

これまでの多くの報告で、凍結保存したバイオプシー胚の受胎性の低さが問題視されており、沼辺らの報告でも無処置胚と比較すると受胎率が10%程度低下している<sup>5)</sup>。これらを解決するために、緩慢凍結法ではなく、氷晶形成を伴わないガラス化法での性判別胚保存が試みられている<sup>12)</sup>。これらの胚のガラス化保存法とこの新しいサンプリング法を組み合わせることで、保存後の受胎性改善が期待できると考えている。

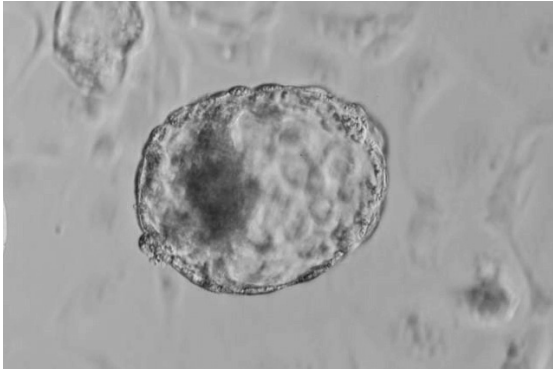


写真2 細胞剥離法で生産した性判別法

これまでも、受精胚の一部をバイオプシーしたのもでも産子が得られており、細胞剥離法で作出した性判別胚の受胎性も無処置の新鮮胚と同等であり、山中ら<sup>13)</sup>やNiemannら<sup>14)</sup>の報告にもあるように酵素処理や透明帯除去が受胎性に与える影響はないと考えられる。

この方法で生産された子牛も人工授精や受精胚移植産子と同じように、妊娠期間、分娩状況ともに正常であり、この方法で子牛を生産することは、現在のところ問題は見当たらない。

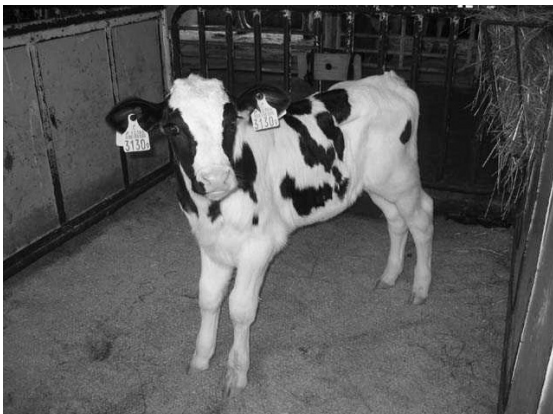


写真3 細胞剥離法で生まれた乳用雌ウシ

今後、新鮮胚で例数を重ねながら性判定結果の正確度調査を行い、最終的には、ガラス化保存した性判別胚を移植し、受胎性に与える影響を調査することで、実用化にむけた技術改善を行いたいと考えている。

## 文 献

- 1) Tubman, L. M., et al: Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry/cellsorting. *J. Anim. Sci*, 82, (4), 1029-1036, (2004)
- 2) Itagaki, Y., et al: Sexing of bovine embryos with male-specific repetitive DNA by polymerase chain reaction, 9, (1), 65-72, (1993)
- 3) Machaty, Z., et al. Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos, *J Reprod Fertil*, 98, 467-470 (1993)
- 4) 岩水正ら：ウシ体外受精胚の凍結保存, 広島県獣医学雑誌, 13, 59-62, (1998)
- 5) 沼辺孝ら：牛胚の性染色体分析法およびPCR法による性判別, 日本胚移植学雑誌, 17, 183-189, (1995)
- 6) 兼子智, 押尾茂：細胞工学, 秀潤社, 13, (7), 605-611, (1984)
- 7) Utumi, K., et al: Embryo sex selection by a rat male - specific antibody and the cytogenetic and developmental confirmation in cattle embryos, 34, 25-32, (1993)
- 8) Avery, B., and Schmidt: Differential cleavage rates and sex determination in bovine embryos, *Theriogenology*, 32, (1), 139-147, (1989)
- 9) 後藤充宏ら：PCR法によるウシ胚の性判別と臨床応用, 日本胚移植学雑誌, 17, (1), 19-25, (1994)
- 10) 青柳和重ら：新規法を用いたバイオプシー凍結胚による子牛の生産, 平成15年度東北農業研究成果情報 360-361 (2004)
- 11) Herr, C.M., Reed K.C.: Micromanipulation of bovine embryos for sex determination, 35, 45-54, (1991)
- 12) Y. Agca, et al: Normalcalves from transfer of biopsied, sexed and vitrified IVP bovine embryos, 50, 129-145 (1998)
- 13) 山中昌哉ら：牛体外作出胚およびバイオプシー胚の生存性におよぼすトリプシン洗浄処理の影響 日本胚移植学雑誌, 19(2) 89-93 (1997)
- 14) Takeda, T., et al: Deep freezing of split and intact bovine embryo. *Theriogenology*, 27, (1), 285, (1987)

# レシピエント卵子の品種が核移植胚及び産子へ及ぼす影響

日高 健雅 尾形 康弘 松重 忠美

(受付：平成19年1月29日)

## The Effect of Recipient Oocytes Species on Embryo after Nuclear Transfer and Cloned Steers

TAKEMASA HIDAKA, YASUHIRO OGATA, and TADAMI MATSUSHIGE

Hiroshima Prefectural Livestock Technology Research Center  
584, Nanatuka-cho, Shobara, Hiroshima 727-0023

### SUMMARY

In order to investigate the effect of cytoplasm on embryos after nuclear transfer and cloned steers, we performed nuclear transfer using donor cell from Japanese Black Cattle and recipient oocytes from Japanese Black Cattle and Holstein Cattle. The developmental rate of embryos after nuclear transfer using recipient oocytes from Japanese Black Cattle was significantly higher than embryos using recipient oocytes from Holstein Cattle. The gestational period of cloned steers using recipient oocytes from Holstein Cattle was significantly longer than cloned steers using Japanese Black Cattle. In comparison of birthweight of cloned steers, embryos using recipient oocytes from Holstein Cattle was significantly heavier. In conclusion, it was considered that development of embryo and steers were influenced by cytoplasm. It was suggested that performing nuclear transfer using donor cell and recipient oocytes from same breed might prevent abnormal delivery.

### 要 約

核移植胚及び核移植産子において、細胞質の違いが発生率や発育に及ぼす影響を調査するために、黒毛和種由来のドナー細胞と、黒毛和種及びホルスタイン種由来のレシピエント卵子を用いて核移植を行った。核移植胚の発生率は、黒毛和種由来のレシピエント卵子を用いた場合がホルスタイン種由来のレシピエント卵子を用いた場合より有意に高い発生率を示した。妊娠期間は、ホルスタイン種由来のレシピエント卵子を用いた核移植産子が黒毛和種由来のレシピエント卵子を用いた場合と比較して有意に長かった。核移植産子の生時体重は、ホルスタイン種由来のレシピエント卵子を用いた産子が有意に重かった。

このことから、レシピエント卵子の細胞質が、胚の発生や牛の発育に影響を及ぼしていることが考えられた。また、ドナー細胞とレシピエント卵子の品種を揃えることで異常産などが予防できる可能性が示唆された。

### 序 文

受精卵核移植技術においては、桑実期の受精胚をドナー細胞として、牛の卵巣から採取した未成熟卵子を体

外成熟後、除核したものをレシピエント卵子として用いて核移植を行う。その後体外培養を行い、胚盤胞まで发育した胚を移植し、核移植産子を作成する。

この一連の操作において、ドナー細胞は一つの桑実期

胚から用いるが、レシピエント卵子には異なった個体や品種の卵巣から採取した卵子を用いる場合が多いため、核のDNAは同一でも、全く異なる細胞質を保有する核移植産子が生産されることになる。

近年、細胞質内に存在するミトコンドリアのDNA (mtDNA) が脂肪交雑などの経済形質に影響を及ぼすと言われており、Boettcherら<sup>1)</sup>は、乳牛において生乳生産量に細胞質が影響していると報告している。また万年ら<sup>2,3)</sup>は肉用牛においてmtDNAのタイプに分けた群間に脂肪交雑などの経済形質に有意な差が認められたと報告している。このように母方からのみ遺伝する細胞質も育種を行う上での重要な要因である可能性が示唆されている。

一方で、Tessら<sup>4)</sup>は肉用牛の生産において細胞質の遺伝的影響は重要ではないと報告している。また核移植産子を生産する中で、核移植産子の流産などの異常産や過大子、核移植産子間の肉質や増体などの経済形質の相似性など不明な点が多数ある。

そこで今回我々は、核移植技術を活用して、品種の異なる牛から採取したレシピエント卵子を用いて核移植を行うことにより、細胞質が核移植胚や核移植産子に及ぼす影響を調査した。

## 材料と方法

### 1. 牛卵子の採取と成熟培養

牛卵子の採取は、黒毛和種の生体卵巣からの経膈採卵と、と体卵巣からの吸引採取により行った。

経膈採卵は、経膈穿刺用7.5Mhzコンバックス探触子(アロカ社UHT-9106-7.5)、超音波画像診断装置(アロカ社SSD-1200)及び穿刺針(ミサワ社、COVA)を用いて行った。回収液は乳酸加リンゲル1000mlにつき3mlの牛胎仔血清(FCS)と90ユニットのヘパリンNaを添加したものをを用い、吸引圧は100mgHgにより未成熟卵子の回収を行った。と体卵巣からの吸引は、と体卵巣に存在する直径7mm以下の卵胞から注射器(注射針:21G)を用いて卵胞液と共に卵子を吸引採取した。採取した牛未成熟卵子は、卵丘細胞の付着度及び卵子の形態的観察によりA~Eランクに分別し、卵丘細胞が2層以上付着し、かつ細胞質が均質なBランク以上の卵子を試験に供した。

成熟培養は10%FCS、50ng/ml上皮成長因子(EGF)、0.12au/ml卵胞刺激ホルモン(FSH)添加TCM199培地にて5%O<sub>2</sub>・95%air条件下で22~24時間行った。

### 2. 核移植

成熟培養終了後、0.1%ヒアルロニダーゼ、0.1%コラゲナーゼ添加M2液中でピペッティングにより顆粒層細胞を除去し、囲卵腔内に第一極体を放出した成熟卵子のみを以降の実験に供した。

除核はマイクロマニピュレーターを用いて透明帯にスリットを形成し、極体を目印にした細胞質押し出し法に

より行った<sup>5)</sup>。

除核卵子はカルシウムイオノフォア10 $\mu$ Mとイノシトール3リン酸25 $\mu$ g/mlで5分間処理した後、プューロマイシン100 $\mu$ g/mlと牛血清アルブミン(BSA)3mg/mlを添加したCR1aa培地で6時間培養する複合活性化処理を施した。除核卵子に、受精後5日目の桑実期胚をドナー細胞としてマイクロマニピュレーターにて挿入後、チンマーマン氏液中にて交流8.5V/mm 5sec、直流75V/mm 50 $\mu$ sec $\times$ 2回の電気パルスを加えることにより細胞融合を行った。

体外培養は、電気インパルス印加後72時間目までは3mg/ml BSA添加CR1aa培地にて、5%O<sub>2</sub>・5%CO<sub>2</sub>・90%N<sub>2</sub>・38.5 $^{\circ}$ Cの条件下で、72時間目以降は10%FCS添加CR1aa培地にてVero細胞との共培養<sup>6)</sup>を行った。

### 3. レシピエント卵子の由来の異なる核移植胚の発生状況調査

核移植に用いたドナー細胞は、黒毛和種由来の受精後5日目の桑実期胚を用いた。試験区は、レシピエント卵子の由来別に区分し、未成熟卵子を黒毛和種の卵巣から採取した和牛区、ホルスタイン種及びF1(黒毛和種 $\times$ ホルスタイン種)の卵巣から採取したホルス区とし、核移植胚の融合率、発生率、総細胞数を比較調査した。

### 4. 胚盤胞の構成細胞調査

総細胞数は、7日目に胚盤胞に発育したものについて、ヘキスト染色により胚を染色し、蛍光顕微鏡下にて核数を速やかにカウントすることにより確認した。

### 5. 核移植産子の分娩状況調査

1998年~2006年まで当センターで生産された核移植産子58頭について調査を行った。

試験区は、核移植胚の発生状況調査と同様に、レシピエント卵子の由来別に分類し、未成熟卵子を黒毛和種の卵巣から採取した和牛区、ホルスタイン種及びF1の卵巣から採取したホルス区とし、それぞれの未受精卵をレシピエント卵子として用いて作出した核移植産子の妊娠動態、生時体重を比較検討した。

核移植産子の作出のためのドナー細胞は全て黒毛和種由来の桑実期胚を用いた。

## 成 績

### 1. レシピエント卵子の由来の異なる核移植胚の発生状況調査

和牛区及びホルス区の核移植胚の発生成績は、和牛区では供試胚87個のうち融合率97.7%、8細胞期率77%、桑実期率66.7%、胚盤胞期率62.1%、ホルス区では供試胚83個のうち融合率95.2%、8細胞期率61.4%、桑実期率41.0%、胚盤胞期率31.3%で、有意に和牛区が高い発生率を示した。



表1 核移植胚の発生率

試験区	供試胚数 (%)	融合数 (%)	8細胞数 (%)	桑実期数 (%)	胚盤胞数 (%)
和牛区	87	85 (97.7)	67 (77.0)	58 (66.7)	54 <sup>a</sup> (62.1)
ホルス区	83	79 (95.2)	51 (61.4)	34 (41.0)	26 <sup>b</sup> (31.3)

異符号間に有意差あり (P<0.01)

## 2. 胚盤胞の構成細胞調査

胚盤胞期胚まで発育した核移植胚の総細胞数は、和牛区では、平均71.4±28.9個、ホルス区では70.4±28.8個で、両区間に有意な差は認められなかった。

表2 核移植胚の胚盤胞期胚の総細胞数

試験区	供試胚数	総細胞数±S.D
和牛区	38	71.4±28.9
ホルス区	17	70.4±28.8

## 3. 核移植産子の分娩状況調査

### ①核移植産子の妊娠期間

妊娠期間は、和牛区の平均は286±6日、ホルス区は289±2.3日と、ホルス区の方が約3日間、有意に長かった。また当センターでは分娩予定日を5日間経過した場合、分娩誘起処置を行っているが、和牛区では、48頭中8頭分娩誘起を行ったのに対し、ホルス区では10頭中5頭で分娩誘起を行っており、ホルス区で多くなる傾向が認められた。

表3 核移植産子の妊娠期間

試験区	産子数	妊娠期間±S.D	誘起分娩
和牛区	48	286±6.0 <sup>a</sup>	8
ホルス区	10	289±2.3 <sup>b</sup>	5

異符号間に有意差あり (P<0.05)

### ②核移植産子の生時体重

生時体重の平均は、和牛区では35.5±6.7kg、ホルス区では45.3±8.9kgであり、ホルス区が有意に大きい値を示した。

表4 核移植産子の生時体重

試験区	産子数	生時体重±S.D
和牛区	48	35.5±6.7 <sup>a</sup>
ホルス区	10	45.3±8.9 <sup>b</sup>

異符号間に有意差あり (P<0.05)

## 考 察

受精卵核移植技術は、一つの受精胚から同一の遺伝情

報を保有した牛を複数産出する技術であり、クローン検定などの種雄牛造成への活用のため多くの研究機関で研究されてきた。クローン検定は従来の育種選抜手法に比べ検定期間の大幅な短縮化など検定効率の向上ならびに省力化を可能にする手法として期待されている。また、近年の核移植技術の進展により核移植産子の生産効率も体外受精由来胚の成績に近いものになり、クローン検定の実用化が可能になっている。しかし、核移植胚作出において、ドナー細胞とレシピエント卵子に由来が異なる卵子を用いる場合があるため、核DNAと細胞質の由来が異なる核移植胚や核移植産子が作出されることになり、胚の発生や産子の発育等への影響が懸念される。

今回我々が行った核移植胚の発生成績は、和牛区がホルス区より有意に高い胚盤胞発生率を示した。

安部ら<sup>7)</sup>は、ミトコンドリアの活性が高く酸素消費量が高い胚が、胚盤胞への高い発生率を示し胚の質も良好であるとしている。ミトコンドリアの機能に必要な多くのタンパク質は、核にコードされた遺伝情報に依存しているため、ミトコンドリアの活性を高く維持するためにはmtDNAの正確な複製が行われる必要がある。ドナー細胞とレシピエント卵子に由来品種が異なる卵子を用いることにより、mtDNAの正確な複製が行われずミトコンドリアの呼吸活性などが低下し、その結果胚の発生成績が低下した可能性が考えられた。

家畜改良センターによる全国の試験機関アンケート<sup>8)</sup>によると、核移植産子における難産の発生率は24.4%であり、牛の平均生時体重も48.3±11.9kgと過大子が生産される傾向が窺える。核移植後に生産された牛の過大子はWilladsenら<sup>9)</sup>によって初めて報告され、その後牛や羊における操作胚から生産された胎仔の過大に関する報告が多く発表されている。その中でWalkerら<sup>10)</sup>によって、in vitroにおける牛や羊の胚の操作が過大子の発生の原因となっている可能性が示唆されている。しかし、胚における遺伝子の発現と過大子との関連性に関する調査は報告<sup>11)</sup>されているが、過大子の発生にかかわる詳細なメカニズムは未だ明らかになっていない。

本試験における核移植産子の調査では、和牛区と比較してホルス区の生時体重が約10kg重く、妊娠期間は約3日間長かった。Walkerらは妊娠期間の延長も認められるが、それだけでは生時体重の増加を説明するには不十分であるとしている。今回妊娠期間が290日以上であった和牛区の生時体重とホルス区の生時体重の比較においても、ホルス区の生時体重は有意に大きかったことから、妊娠期間の延長の以外にも生時体重の増加に影響する要素がある可能性が示唆された。

また、一般的な人工授精を行った場合、ホルスタイン種の妊娠期間は黒毛和種より短くなるが、今回ホルス区の妊娠期間の延長が認められたことから、ドナー細胞とレシピエント卵子の品種が異なることにより、分娩を誘起する機序に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆



された。

以上のことから、レシピエント卵子の細胞質が、胚の発生や牛の発育に影響を及ぼしていることが考えられた。またドナー細胞とレシピエント卵子の品種を揃えることで過大子やそれによる難産など異常産が予防できる可能性が示唆された。

我々は現在mtDNAのD-Loop領域からミトコンドリアのタイプ分けを行い県内の牛のmtDNAタイプの分布調査を行っているが、今後mtDNAタイプごとの性質やドナー細胞とレシピエント卵子のタイプ間における関連性を調査し、ミトコンドリアが牛の発育や肉質へ及ぼす影響等を検討していきたいと考えている。

## 文 献

- 1) Boettcher, PJ, et. al.: Relationships between Polymorphism for mitochondrial deoxyribonucleic acid and yield traits of holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 79, 647-654, (1996)
- 2) Mannen, H, et. al.: Effect of mitochondrial DNA variation on Carcass traits of Japanese black cattle. *Journal of Animal Science*, 76, 36-41, (1998)
- 3) Mannen, H, et. al.: Identification of mitochondrial DNA substitutions related to meat quality in Japanese Black cattle. *Journal of Animal Science*, 81, 68-73, (2003)
- 4) Tess, M. W, et. al.: Evaluation of cytoplasmic genetic effects in beef cattle using an animal model. *Journal of Animal Science*, 68, 1899-1909, (1990)
- 5) 高野ら：核移植実験系における電気刺激時の温度条件の検討, 繁殖技術会誌, 13, 15-19 (1991)
- 6) 尾形ら：マイクロドロップレット法で凍結保存した牛のレシピエント卵子による核移植成績, 広島県獣医学会雑誌, 15, 33-36 (2000)
- 7) Abe, Hiroyuki, et. al.: Evaluating the Quality of individual Embryos with a Noninvasive and Highly Sensitive Measurement of Oxygen Consumption by Scanning Electrochemical Microscopy. *Journal of Reroduction and Development*, 52, 55-64, (2006)
- 8) 橋谷田ら：肉用牛のクローン検定とそのための安定的双子クローン生産技術の展望と問題点, 畜産技術, 8月号, 32-36, (1998)
- 9) Willadsen, SM, et.al.: The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. *Theriogenology*, 35, 161-170, (1991)
- 10) Walker, SK, et. al.: In vitro culture of sheep embryos without co-culture: successes and perspectives. *Theriogenology*, 37, 111-126, (1992)
- 11) Young, LE, et. al.: Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Reviews of Reproduction*, 3, 155-163 (1998)

# 黒毛和種の白線部ヘルニアの1例

中谷 啓二<sup>1)</sup> 山崎 一男<sup>2)</sup> 平田 晴美<sup>1)</sup> 太田 哲夫<sup>2)</sup> 上高 宏<sup>3)</sup>  
石橋 一郎<sup>1)</sup> 国重 俊治<sup>3)</sup> 大川 雄三<sup>1)</sup> 篠塚 康典<sup>1)</sup>

(受付月日 平成19年1月26日)

## A Japanese black calf with white line hernia

KEIJI NAKATANI<sup>1)</sup>, KAZUO YAMASAKI<sup>2)</sup>, HARUMI HIRATA<sup>1)</sup>, TETUO OOTA<sup>2)</sup>,  
HIROSI KAMITAKA<sup>3)</sup>, ITIROU ISHIBASHI<sup>1)</sup>, SHUNJI KUNISHIGE<sup>3)</sup>,  
YUZO OOKAWA<sup>1)</sup>, and YASUNORI SHINOZUKA<sup>1)</sup>

- 1) Yamagata Veterinary Clinical Center, P.F.A.M.A.A.  
461-1, Haruki, Kitahiroshima-cho, Yamagata-gun, Hiroshima 731-1531
- 2) Hiroshima, P.F.A.M.A.A.  
1-2-23, Hikarimachi, Higashi-ku, Hiroshima, 732-0052
- 3) Higashihiroshima Veterinary Clinical Center, P.F.A.M.A.A.  
284-1, Inaki, Takaya-cho, Higashihiroshima, Hiroshima 739-2106

## SUMMARY

White line hernia in Japanese black cattle is rarely observed, and the treatment of large hernias is considered to be difficult. We report the treatment course in a Japanese black calf with white line hernia.

The calf showed no abnormalities at birth. About 3 months after birth, a hernial ring was observed in the white line immediately posterior to the navel, but it was healed after the 3rd operation.

The first and second operations were relatively easy, but hernia recurred from the lateral side of the suture area after each operation.

In the 3rd operation, suturing for reinforcement was performed on the bilateral sides of the hernial ring suture area using kitchen pads. Fever and suppuration persisted for about 40 days following operation, and the kitchen pads were removed 43 days postoperatively. Subsequently, inflammation subsided, resulted in healing.

## 要 約

黒毛和種の白線部ヘルニアは発生が稀で大きなものは治癒困難とされている。今回、黒毛和種仔牛の白線部ヘルニアに遭遇したので、その治療経過の概要を報告する。

発生子牛は、出生時には異常を認めなかったが、約3ヶ月齢で臍直後の白線部にヘルニア輪を認め3回目の手術で治癒させることが出来た。

1回目、2回目の手術は比較的容易であったが、いずれも縫合部の外側から再発した。3回目の手術ではキチンパッドを用いヘルニア輪縫合部の両側に補強縫合を施した。手術後、約40日間は発熱と化膿が続き、43日目にキチンパッドが排出され、その後炎症は消退し治癒した。

1) NOSAI山県家畜診療所 (〒731-1531 広島県山県郡北広島町春木461-1)

2) NOSAI広島 (〒732-0052 広島県広島市東区光町1-2-23)

3) NOSAI東広島家畜診療所 (〒739-2106 広島県東広島市高屋町稲木284-1)

## 序 文

黒毛和種の腹壁ヘルニアは発生が稀で、大きなものまた、特に白線部に発生したものは治療困難と言われている<sup>1,2)</sup>。

今回、我々は黒毛和種仔牛の白線部ヘルニアに遭遇し、3回目の手術で治療させることが出来たのでその治療経過を報告する。

## 患 畜

発生子牛は、黒毛和種、メスで平成17年1月15日生まれ(約3ヶ月齢)であった。

## 治 療 経 過

平成17年4月?日 患畜の臍部付近に径3cmの不明瞭なヘルニア輪をみとる。

平成17年5月6日 整復手術を行なう。ヘルニア輪は独特の硬さが認められず、整復手術は極めて容易に終了した。

平成17年5月17日 抜糸したが、ヘルニア輪は認めなかった。

平成17年5月25日 再発確認し、その後経過観察するも次第にヘルニア輪拡大する。

平成17年6月29日 臍直後に幅5cm、長さ15cmの縦長のヘルニア(写真1)となり再手術を行なった。ヘルニア輪は軟らかく、手術は比較的容易に終了した。

平成17年7月1日 術部後端にヘルニア輪発生を認める。

平成17年8月3日 ヘルニア輪、極めて拡大速く、円形で、径30cmを超え再々手術を実施した。

推定体重180kgで、キシラジン0.06g(セラクター3cc)を筋肉

注射し仰臥保定とした(写真2)。ヘルニア輪確認後直径40cm切皮する。比較的明瞭で硬度のあるヘルニア輪を認める。直径20cmのキチンパッドをヘルニア輪に縫い付け(写真3)、埋没させるようにヘルニア輪を縦に2重縫合した(写真4)。さらに、縫合部周囲から再発するため、縫合部から左右に長さ10cmづつ補強縫合を施した(写真5)。皮膚を縫合し、起立させ、包帯を巻き、手術を終了した(写真6)。

平成17年8月4日～9月15日

39.3～40.5℃の熱発が続き、皮下に膿瘍形成が見られ、切開洗滌、抗生剤の投与を続けた。食欲、発育は、順調であった。

平成17年9月16日 キチンパッドが押し出され創口から覗き、除去する。口周囲は、結合織が厚く造成している。



写真1 2回目の手術前



写真2 3回目の手術① ヘルニア輪の確認



写真3 3回目の手術② キチンパッドの装着

平成17年9月20日～12月15日

週1回創口の洗滌を行なう。体温の上昇は見られない。

平成18年1月13日

創口閉鎖し、脱出見られず、治癒したものと認める  
(写真7)。



写真4 3回目の手術③ ヘルニア輪の縫合



写真5 3回目の手術④ 補強縫合



写真6 3回目の手術⑤ 手術終了



写真7 3回目の手術後150日目の患牛

### 考察およびまとめ

黒毛和種の腹壁ヘルニアの発生要因は、種々の外的要因（衝突、墜落、角突など）によって腹筋が挫傷を受け、または皮下断裂をきたすことに起因して発生する<sup>1)</sup>。今回の発生は月齢からみて先天的なものではなく、何らかの外的要因によって発症したものと推察された。

また、再発の要因としては、腹壁ヘルニア、特に白線部に発生したものは、治癒しにくいと言われている<sup>1-3)</sup>。当該牛も2回整復手術を行い、それぞれ、19日目、2日目に再発した。2回とも、ヘルニア輪縫合部の外側から再発生していた。再々手術では、ヘルニア輪縫合部から左右に補強縫合を施し再発生を防ぐことが出来た。

手術後の熱発と化膿については、三回目の手術後約40日に亘り39.3～40.5℃の発熱が続き、術部が化膿した。平成17年9月16日キチンバットが押し出され、それを除

去してから発熱しなくなったことから、発熱の原因はキチンバットではないかと推察された。また、皮下の化膿は発熱の継続と補強縫合の非吸収性縫合糸が原因と思われる。しかし、この炎症による結合織の増成が更なるヘルニア輪の開口を防いだものと思われる。

今後黒毛和種の腹壁ヘルニアの手術を行う場合、ヘルニア輪縫合後、周囲の補強縫合を必ず施術することが必要と思われる。

### 参考文献

- 1) 木全春生：新動物外科学，167～168，地球社，東京（1975）
- 2) 幡谷正明・黒川和雄ら：家畜外科学第5版，417～419，金原出版，東京（1995）
- 3) 中村良一：獣医ハンドブック第8版，474～476，養賢堂，東京（1974）



# 飼料給与を時間軸で考える要因分析事業

篠塚 康典<sup>1)</sup> 檜山 尚子<sup>2)</sup>

(受付：平成19年1月31日)

## Factor analysis project in which feeding is considered along the time axis

YASUNORI SHINOZUKA<sup>1)</sup>, and NAOKO HIYAMA<sup>2)</sup>

- 1) Yamagata Veterinary Center, Hiroshima P.F.A.M.A.A.  
461-1, Haruki, Kitahiroshima-cho, Yamagata-gun, Hiroshima 731-1531
- 2) Miyoshi Veterinary Center, Hiroshima P.F.A.M.A.A.  
3-6-36, Tokaichi-higashi, Miyoshi-shi, Hiroshima 728-0013

### SUMMARY

In the factor analysis project performed in NOSAI Hiroshima, we used a graph representing the rumen fermentation state. In Farm A, this graph was applied to conventional feed formulation, and a safe feed design with synchronization of the protein degradation rate with the carbohydrate synchronization rate was possible. In Farm B, the reason for contradictions between the feed design based on metabolic profile tests and subsequent clinical symptoms could be clarified.

The incorporation of this graph in feed formulation may be useful because a feeding method necessary to attain the maximum rumen fermentation can be considered along the time axis.

### 要 約

NOSAI広島で実施している要因分析事業においてルーメン発酵状況を表すグラフを応用した。A農家では従来の飼料計算に本グラフを応用し、蛋白質の分解速度と炭水化物の分解速度をシンクロさせた安全な飼料設計を行うことができた。B農家では代謝プロファイルテストに基づいた飼料設計とその後の臨床症状の矛盾点が生じるにいたった理由が示された。

本グラフを飼料計算に組み込むことは、ルーメンの発酵を最大にするために必要な飼料給与方法を時間軸にそって考えることが容易となり、有用であると考えられた。

### 序 文

NOSAI広島では乳牛の要因分析事業を行っている。これは疾病多発や低生産性などの牛群の問題を解決する目的のみでなく生産性をさらに高めるためにも広く利用されている事業である。事業内容は飼料計算、牛群チェック、環境管理、代謝プロファイルテスト（以下MPT）などを実施し改善点を農家とともに協議し、数ヵ月後に同様の検査を行って牛群の反応をみていくことが主と

なっている。牛群の問題は不適切な飼養管理によることが多く、飼料設計は非常に重要な作業となっている。単胃動物とはきわめて異なる消化機能をもつ牛の飼料設計はルーメン発酵抜きにして考えることはできず、特に高泌乳牛ではルーメン微生物の機能を最大に発揮して栄養素の供給を効率的におこなう必要がある。最適なルーメン発酵、すなわち菌体蛋白質生産を最大にするためには、ルーメン微生物自身への蛋白質とエネルギーの効率的供給をおこなうことが重要で、そのために現在の飼料計算

1) NOSAI広島山県家畜診療所（〒731-1531 広島県山県郡北広島町春木461-1）

2) NOSAI広島三次家畜診療所（〒728-0013 広島県三次市十日市東3丁目6-36）



ではルーメン内分解蛋白 (RDP) と非繊維性炭水化物 (NFC) の量的バランスをとることによっている。しかし、ルーメンは連続発酵槽であり、RDPとNFCの分解スピードについて時間の概念がないために飼料設計の効果が思わしくないケースもある。そこで、筆者らの考案したルーメン発酵グラフを本事業に用いたところ有用であったのでその概要を報告する。

### 材料と方法

NOSAI広島で実施している要因分析事業実施農家のうち2農家 (A農家・B農家) を選定し、2005年2月から2006年1月にかけて行われた事業内容について時間軸を用いたルーメン発酵グラフを用いて考察を加えた。農家選定基準は当該農家が給与している飼料の炭水化物および蛋白質分画、通過スピードなどの基礎的データが既知であることとした。

#### 1. A農家の例

当農家は40頭飼養のタイストール、TMR給与の中規模牛群であった。牛群の問題点は夏バテする牛が多く、第四胃変位が多い。また乳成分のうち無脂固形分が低いというものであった。

#### 2. B農家の例

当農家は30頭飼養のタイストール、分離給与で自動給餌機、連続水槽の設けられた牛群であった。この農家の問題は繁殖成績が思わしくないということであった。繁殖成績を示すJMRは25で悪化傾向にあった。

これらの農家について、MPT、飼料計算、BCS測定、環境調査など要因分析事業を実施し、そのうち飼料給与内容 (品目・量・給与時間など) を聞き取り、筆者らの考案した方法 (文献1) を用いて第一胃内でのエネルギーおよび蛋白質の分解状況を24時間グラフ化した。結果を総合的に判断し改善を加えた後、数ヵ月後にもう一度当事業を実施し総括を行った。そして本方法を用いて作成したルーメン発酵状況グラフの事業における有用性について検討した。

### 成績

#### 1. A農家の場合

当該農家で給与されていたTMRはNFC：RDPの比はバランスが取れていたが蛋白質の分解が先行するタイプの発酵パターンであった (図1)。このTMRと乾草 (オーツヘイ) を組み合わせて一日4回給餌が行われており、一日のルーメン発酵状況は図2のようであった。エネルギーと蛋白質の分解パターンはシンクロしており問題はないようだった。しかし、MPTの結果からNFC不足、臨床所見からルーメンマットの低形成が指摘されており、ルーメンマットの形成と安全にエネルギーレベルを上げることを目的に改善が行われた。オーツヘイとビートパルプを用いて給与飼料内容を変更したところルーメンの発酵状況は図3のようになり、ルーメン発酵のバランス

を崩すことなく安全に繊維レベル、エネルギーレベルを上げることができたことが確認された。飼料給与改善後は、牛の肋が起きる、糞中のコーンが見られなくなるなどルーメンマットの良好な形成を認め、疾病の発生率など当該農家の問題点は改善された。

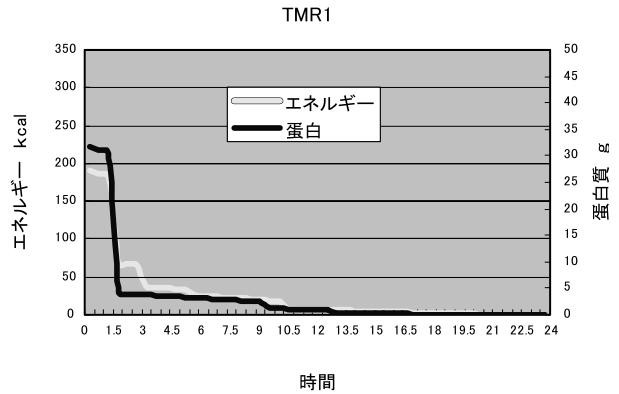


図1 A農家給与TMRの特徴

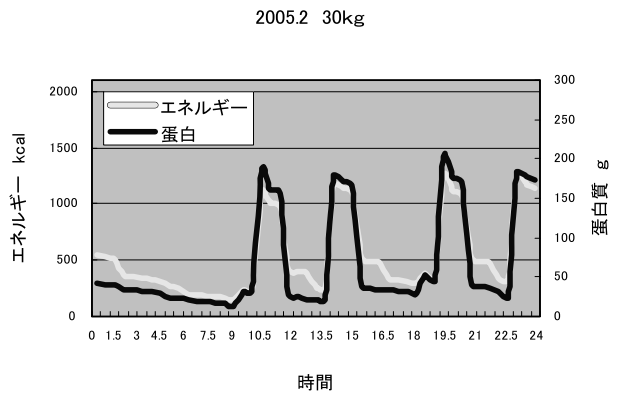


図2 A農家のルーメン発酵状況

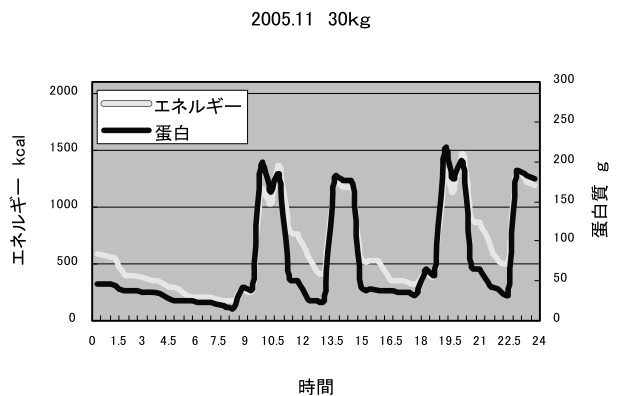


図3 A農家のルーメン発酵状況

#### 2. B農家の例

当農家は自動給餌機を利用して1日7回、市販の配合飼料と自家配合飼料を給与していた。一日のルーメン発酵状況は図4のようであった。朝のスーダグ、ルーサンを給与した後と夜にソルゴーサイレージを給与した後に

蛋白の分解が先行するがその他の時間帯はエネルギーの分解が多いという日内パターンであった。飼料計算においては乾物量、エネルギー、蛋白質レベルとも満足のいくレベルであったが(表1), MPTの結果、血糖値が低くBUNが高いという結果を得たため自家配合中のNFCの増量とRDPを若干下げる飼料給与変更を行った。数ヵ月後の再検査ではBUNは正常範囲内となり繁殖成績も改善した(JMR8.1)が、Htが上昇するなど慢性的なアシドーシス傾向が見られるようになり、疾病の発生が懸念された。その時点でのルーメン発酵状況は図5のようであり、一日のうち大半が蛋白に対してエネルギーの割合が多くなっていた。

## 考 察

### 1. A農家

飼料給与中のエネルギーレベル、特にNFCを上げるにはいくつかの方法があるが今回は分解スピードの中程度であるビートパルプを選択した。これは改善前のNFC:RDPが量的、時間的にも問題なくバランスが取れていたためこのバランスを維持する必要があったこと、繊維を同時に補うことを目的としたからである。改善後のルーメン発酵状況もバランスの取れたものであることを確認することができた。本例はルーメン発酵に必要なエネルギーと蛋白質のバランスは取れていたが、ルーメンマットの形成が不十分であったために微生物発酵が計算どおりにいっていない例と考えられる。すなわち、ルーメンプロトゾアが利用すべきアンモニアとエネルギーが十分であるにもかかわらずルーメン内微生物の数が不十分で、かつ飼料の滞留時間が短いため十分に利用されず下部消化管に送られていたと考えられる。結果として飼料の利用効率が低下し、牛体としてはエネルギー不足となり、低乳質や疾病多発につながっていたと考えられる。

### 2. 農家B

一般的にMPTにおいて高BUN、低血糖がみられる場合はルーメン内微生物の利用するエネルギーであるNFC不足によりルーメン内アンモニアが利用低下していると診断されることが多い。本例でもその診断に基づいてNFCの増量とRDPの若干の減量を行った。しかし、結果として返ってきた牛群の反応はルーメンアシドーシスであった。当初の飼料計算ではNFCとRDPのバランスは問題なかったが、MPTの結果に基づいてNFCを増量したわけで、血液性状と臨床症状が矛盾する結果となった。しかし、日内変動グラフでみるとMPTの採血が午前11時ごろ行われており、その2.5から4時間前に給与されている飼料給与内容はエネルギーの分解に比べ蛋白の分解が非常に多い内容であることがわかった。すなわち、ルーメン微生物が利用しきれないほどのアンモニアが大量に分解されオーバーフローしている状態となっている時間帯に採血を行っていたのである。オーバーフローしたアンモニアはルーメン壁から吸収され肝でBUNに代謝される。初回のMPTはこのBUNを反映していたと考えられる。

当農家では本事業を数年間継続して受けており飼料給与には細心の注意を払っている。今回の事業実施時においても飼料計算上エネルギー、蛋白質いずれの充足率も満たしていたので、今回のMPTの結果は採血時間の影響が強く出た例だと考えられる。日内変動の少ない蛋白代謝指標を用いることが望ましいが経費・手間の問題から複数の項目を一度に検査できる血清は有効に利用すべきである。したがって日内変動の大きいBUNを用いてMPTを行う際は、本グラフを利用して慎重に採血時間

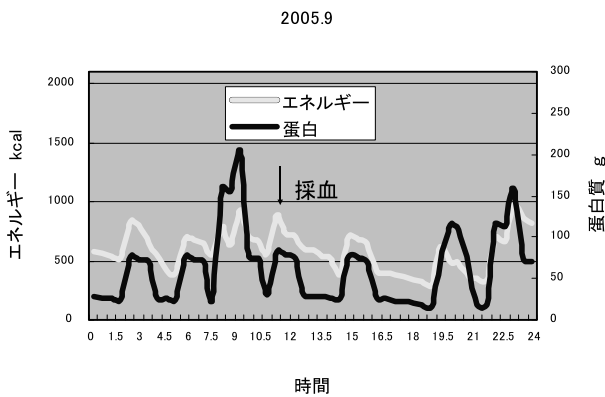


図4 B農家のルーメン発酵状況

表1 B農家飼料計算結果

	% (DM)	充足率 (%)
CP	14.9	105.6
TDN	74.1	116.5
NFC	29.4	

乳量30kg/day DMI 20.8kg/day

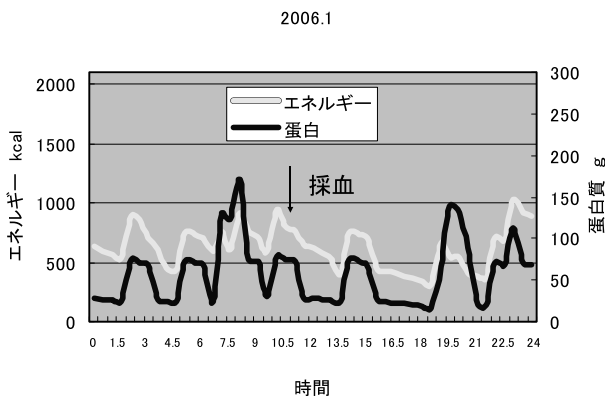


図5 B農家のルーメン発酵状況

を決定すべきであると考えられた。

ルーメンという連続発酵槽を持つ反芻動物の飼養管理は複雑である。すなわち、牛体そのものに対する要求量のみでなくルーメン微生物に対する要求量も同時に満足させなければならないからである。さらにルーメン微生物は適正なエネルギーと蛋白質の量的バランスを連続的に求め続けている。これはルーメン発酵を最大にするためには必要なことであり、牛のもつポテンシャルを最大限に引き出すための飼養管理には欠かせない考え方である。そのためには飼料のルーメン内分解エネルギー (NFC) とルーメン内分解蛋白質 (RDP) がどのように

分解されているかを知ることは必要不可欠であり、さらにそれらのバランスを時間軸にそった動的視点で考えることも重要なことである。複雑なこれらのことを視覚的にとらえることのできる本報でのグラフ化の方法はきわめて有用なものであり、現在利用されている飼料計算ソフトに組み込み本事業に応用することにより、さらに精密な飼料設計が可能になると考える。

## 文 献

- 1) 篠塚康典ら：牛のルーメン発酵状況のグラフ化の試み，広島県獣医学会雑誌, 21, 13-17 (2006)

# 代謝プロファイルテストにおいてアルブミンの低下が認められた乳牛群の飼養状況とその要因

鈴木 俊彦

(受付：平成19年2月8日)

## Breeding conditions and factors associated with low serum albumin levels observed in metabolic profile tests in dairy herds

TOSHIHIKO SUZUKI

Veterinary Clinical Training Center, Hiroshima P.F.A.M.A.A.

284-1, Inaki, Takaya-cho, Higashihiroshima, Hiroshima, 739-2106

### SUMMARY

We observed low albumin (alb) levels in metabolic profile tests in farms in Hiroshima Prefecture, and surveyed and analyzed the influences of this decrease on dairy herds and factors causing this decrease based on data in the management instruction project in 2005. As a result, low alb decreased milk production and increased the incidences of diseases, injuries, and accidents. To improve these problems and productivity, the re-evaluation of feed designs and feeding methods and improvement in the cowshed environment appropriate for high-level milk production may be necessary in many dairy farms.

### 要 約

近年、広島県内の農家を対象とした乳牛の代謝プロファイルテストにおいて低下傾向がみられるアルブミン(以下alb)の牛群に及ぼす影響と要因について、平成17年度の管理指導事業のデータを元に調査、分析した。その結果、低albは乳量の低下や病傷事故の増加につながり、それを改善し生産性を向上させるためには、多くの酪農家で、飼料設計・飼料給与方法の見直しと高泌乳化に適応した畜舎環境の整備が必要であると思われる。

### 序 文

3種類の主要な血漿タンパク質のうち、最も高濃度に存在するalbは肝臓で合成され、微量元素や脂肪酸などを体組織に運搬する重要な役割を果たしている。近年、広島県内の酪農家を対象とした乳牛の代謝プロファイルテストにおいてalbは低下傾向がみられ、それらの牛群では繁殖障害をはじめ病傷事故が多発する傾向にある。そこで特に分娩後から泌乳最盛期にかけてalbの低下が認められた乳牛群の飼養状況とその低下要因について、代謝プロファイルテストを用いた管理指導事業のデータを元に調査、分析したのでその概要を報告する。

### 材料および方法

#### 1. 調査期間

2005年5月19日～2006年1月30日

#### 2. 調査対象

県内酪農家53戸で飼養されている乳牛、延べ1,334頭延べ69件の代謝プロファイルテストと各酪農家の飼料給与の調査、畜舎環境のチェック、および疾病に関するアンケート

成績

低albを示した牛群は69件中19件、標準レベルにあった牛群は15件で、そのほかの牛群においてもalbの低下傾向がみられた。アンケート調査の結果、albが標準レベルの農家では繁殖障害が多いと回答のあった割合は87%であり、低albの場合95%であった(図1)。肢蹄疾患については、多いと回答のあった割合は標準レベルではわずか7%であるが、低albの場合36%にもものぼった(図2)。乳房炎は標準レベルの20%に対し低albでは42%(図3)、周産期疾病は標準レベルの20%に対し、低albでは58%であった(図4)。乳牛1頭の1日当たりの泌乳量

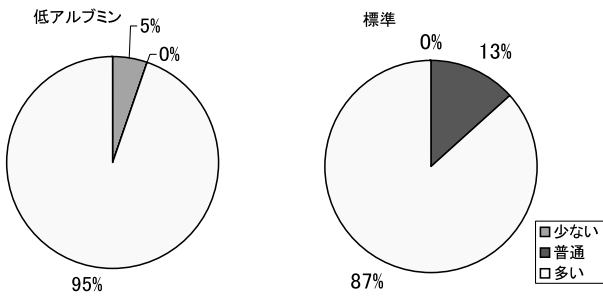


図1 アンケート調査の結果、繁殖障害の比較

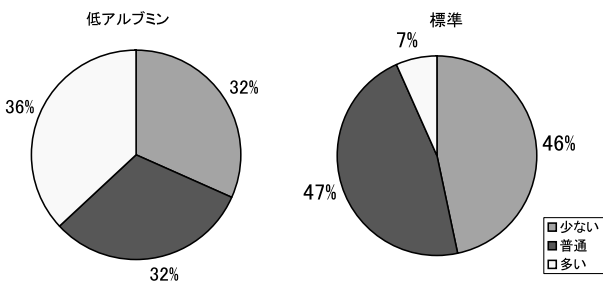


図2 アンケート調査の結果、肢蹄疾患の比較

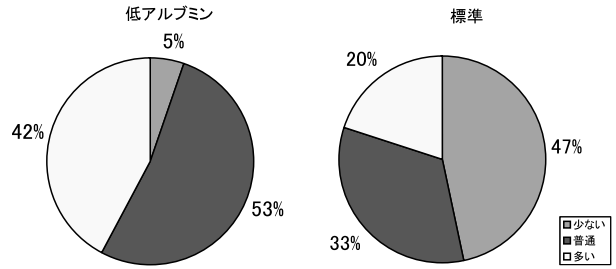


図3 アンケート調査の結果、乳房炎の比較

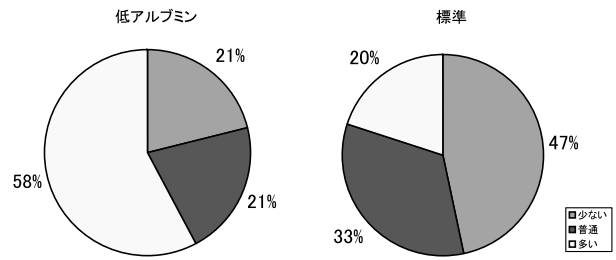


図4 アンケート調査の結果、周産期疾病の比較

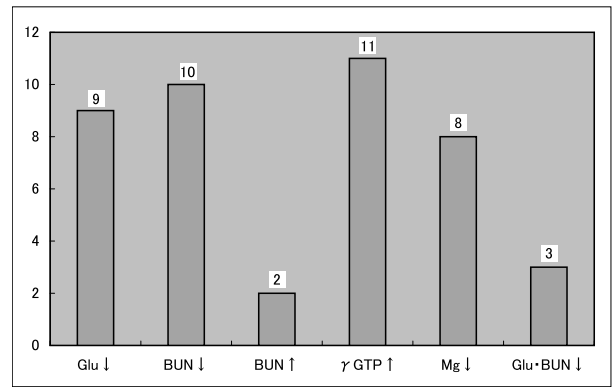


図5 低アルブミンと他のMPT項目との関係

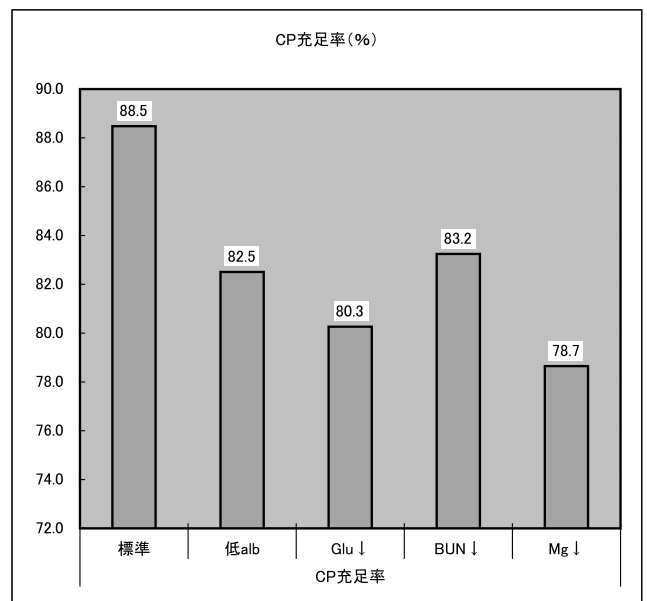
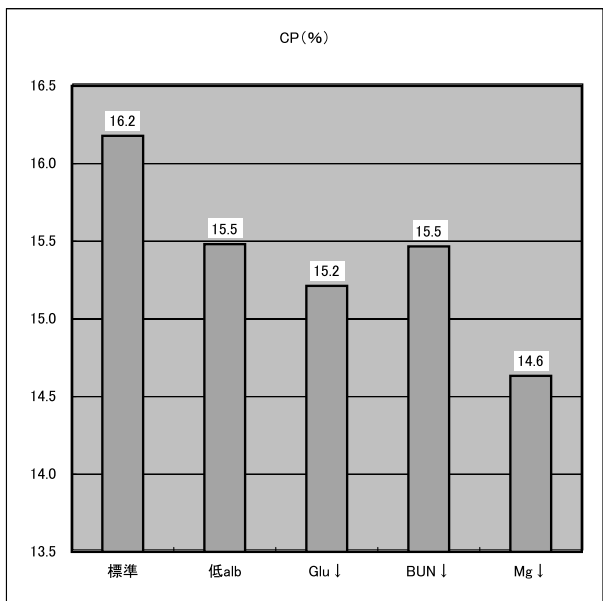


図6 給与飼料の比較, CP



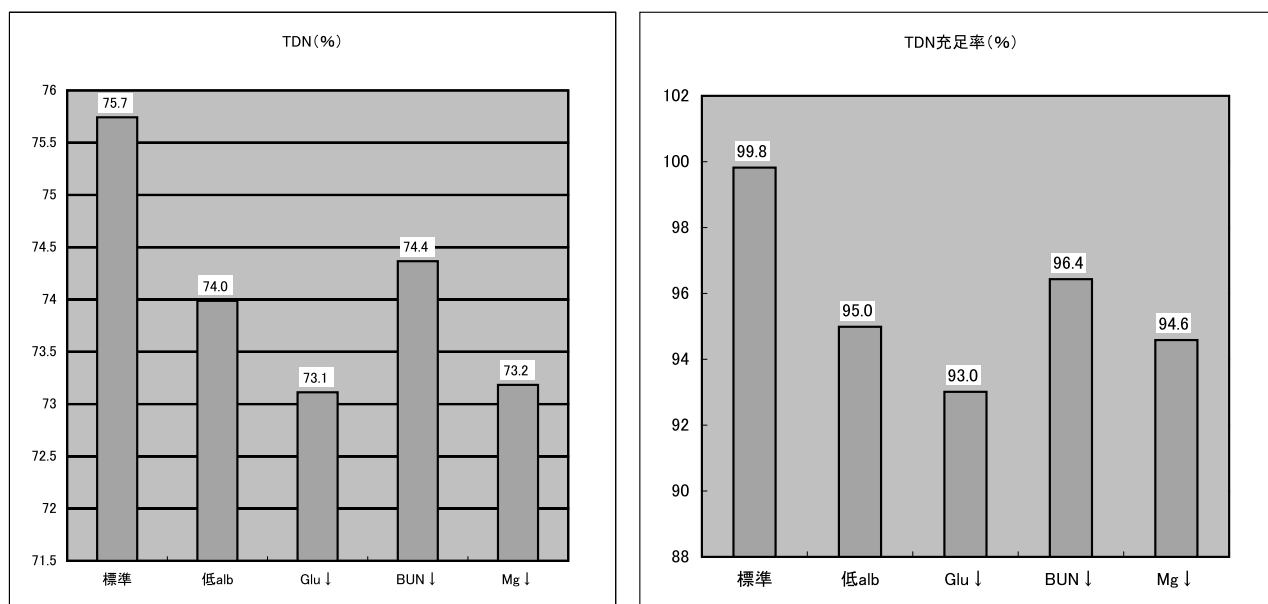


図7 給与飼料の比較, TDN

を比較すると、標準レベルの牛群では32kgであり、低alb牛群では28kgであった。低alb牛群において他の代謝プロファイルテスト項目との関連性を調査した結果、同時に、血糖の低下が見られたものは19件中9件、BUNの低下が見られたものは10件、BUNの上昇は2件、 $\gamma$ GTPの上昇は11件、Mgの低下は8件、血糖・BUN・albともに低下が見られたものが3件であった。(図5 y)。

給与飼料の栄養度を比較した結果、CPの濃度は標準レベルの16.2%に対し低alb牛群は15.5%で、同時に低血糖を示した牛群15.2%、低BUNを示した牛群15.5%、低Mgを示した牛群は14.6%であった。CP充足率は標準レベルの88.5%に対し、低alb牛群では82.5%であった(図6)。TDNの濃度は標準レベルの75.7%に対し低alb牛群は74.0%で、充足率は標準レベルの99.8%に対し、低alb牛群では95.0%であった(図7)。

### 考 察

代謝プロファイルテストにおいて牛群に低albが認められた酪農家は、アンケート調査の結果、繁殖障害、肢蹄疾患、乳房炎、周産期疾病のすべての項目に対して、標準レベルの農家よりも強い問題意識を抱えているケースが多くみられた。その中でも特に肢蹄疾患で悩んでいる農家が標準レベルの7%に対し、低alb牛群では36%と両者に大きな開きがみられた。これはalbの低下が筋

肉組織や角質の形成に悪影響を及ぼしているためと思われる。さらにalbの低下による栄養状態の悪化は繁殖障害や周産期疾病など、諸疾病の発生要因にもつながっているものと考えられた。また、低albを示した酪農家の半数前後が同時に低血糖、低BUN、低Mgあるいは高 $\gamma$ GTPを示したことから、その原因としては、栄養不足、乾物摂取不足、第一胃の発酵不良、肝機能の低下などに関連する飼養管理上の問題が考えられた。栄養不足に陥る要因の1つとして不適切な飼料設計が考えられ、TDN・CP%はその充足率とも標準レベルの農家を下回るケースが大半であった。泌乳能力の増大した最近の乳牛にとって従来のエサは栄養不足となり、能力を出し切れずに低泌乳を呈し、繁殖障害や肢蹄疾患などの疾病は増加する傾向にあるものと思われた。また、乾物摂取量の低下要因としては、飼料給与量の不足以外に乾乳牛の管理不足や飼槽・牛床・飲水施設など畜舎環境の不備も考えられ、第一胃の発酵不良を招く要因として、繊維の給与不足や飼料の不適切な給与順序なども見受けられた。

以上のことから、低albを改善し生産性を向上させるためには、多くの酪農家で、飼料設計・飼料給与法の見直しと高泌乳化に適応した畜舎環境の整備が必要であると思われた。

# 認定小規模食鳥処理施設における衛生対策に関する検討

東久保 靖 伊坪堅香子 土井 章三

(受付：平成19年1月21日)

## Study on sanitary control in small-scale poultry processing plants

YASUSHI TOUKUBO, TAKAKO ITUBO, SHOUSOU DOI

Hiroshima Prefectural Meat Sanitation Inspection Station  
1911-1, Awaya-cho, Miyoshi, Hiroshima 728-0025

### SUMMARY

Between June and July, 2006, we performed a survey of the sanitary state in a certified small-scale poultry processing plant (T plant). Carcasses after defeathering, cooling, towel wiping for the removal of moisture, and dismembering, instruments, and workers' fingers were wiped, and the standard plate count (SPC), total coliform count (cf), and the *Staphylococcus aureus* cell count (*S. aureus* count) were examined. After sanitary education, carcasses were wiped after towel wiping and dismembering, and a survey after the practice of sanitary measures was performed. The sanitary state survey in the plant showed a detection in each bacteria count after defeathering, a decrease in the bacteria count after cooling, but an increase after towel wiping, and a further increase after dismembering. From the fingers of a dismembering worker, many *S. aureus* cells were detected irrespective of before or during work. The survey after the practice of sanitary measures showed slight decreases in SPC and cf after towel wiping and dismembering, but a marked decrease in *S. aureus* after each process. These results suggest that work using bare hands is the main cause of contamination after cooling. In addition, secondary contamination may extend due to the use of towels contaminated by bacteria on the fingers and their inadequate washing/disinfection. We provided sanitary education in these suggested causes, and took measures. As a result, the *S. aureus* count markedly decreased.

### 要 約

平成18年6月から7月の間に、T認定小規模食鳥処理施設において、脱羽後、冷却後、水分除去のためのタオル清拭後（清拭後）、解体後のと体、器具及び従事者手指を拭き取り、一般生菌数（SPC）、大腸菌群数（cf）、黄色ブドウ球菌数（ブ菌）について施設の衛生状況調査を行った。また、衛生教育実施後に、清拭後、解体後のと体を拭き取り、衛生対策実施後調査を行った。

施設の衛生状況調査では、各菌種とも脱羽後には検出され、冷却後には減少するが、清拭後には再び増加し、解体後にはさらに高くなった。器具及び従事者手指のうち、解体者手指は作業前・中にかかわらず、ブ菌が多数検出された。ゴム手袋着用等の衛生対策実施後調査では、清拭後及び解体後のSPC、cfはやや減少した程度であったが、ブ菌はどちらも著しく減少した。

これらのことから、今回の調査では、素手での作業が冷却後の汚染の最も大きな原因と推測された。さらに、手指から汚染を受けたタオルの使用、及び、その不十分な洗浄消毒によって二次汚染が拡大していくものと考えられた。これらの推測された原因について、衛生教育を実施し対策を行ったことによって、ブ菌については顕著な改善効果がみられた。

## 序 文

近年、BSE、鳥インフルエンザなどの発生に伴い、消費者の食に対する関心が高まり、安全・安心な食肉の提供が重要な課題となっている。食鳥肉に関しては、平成4年4月に食鳥検査が始まり、安全の確保と同時に「食鳥処理場におけるHACCP方式による衛生管理指針」<sup>1)</sup>も通知されて、衛生管理の徹底が図られているところである。

しかし、食鳥処理施設のうち、特に、認定小規模処理施設においては、施設や従事者の衛生意識の問題もあり、微生物コントロールなどの衛生管理の向上は容易でない現状にある。

今回、従事者の衛生意識が比較的高く、衛生状態も良好な、管内のある認定小規模処理施設から、食鳥肉の自主検査で黄色ブドウ球菌が検出されるため、その対策について相談があった。そこで、その対策の指導、及び、他の認定小規模処理施設への衛生指導の参考とするために、当該施設の各処理工程における衛生状況を調査し、衛生対策の改善への取り組みを行ったので報告する。

## 材料及び方法

- (1) 調査期間：平成18年6月～7月
- (2) 調査対象施設：T 認定小規模食鳥処理施設（平成12年11月許可）
  - ア. 処理形態：生鳥からのと鳥、外剥ぎ方法による解体処理（手作業）
  - イ. 処理羽数：シャモ地鶏（150日齢、自家飼育）50～120羽/日/週3回
  - ウ. 従事者数：3名（うち食鳥処理衛生管理者2名）
- (3) 調査検体
  - ア. 施設の衛生状況調査（図1）
 

処理工程における脱羽後、冷却後、水分除去のためのタオル清拭後（清拭後）、外剥ぎ解体後（解体後）のと体胸部拭き取り検体各3～15検体の計72検体、器具（まな板、ナイフ）及び従事者手指の拭き取り検体各1～3検体の計17検体
  - イ. 衛生対策実施後調査
 

処理工程におけるタオル清拭後、解体後のと体胸部拭き取り検体各10～25検体の計35検体
- (4) 検査項目：一般生菌数（SPC）、大腸菌群数（cf）、黄色ブドウ球菌数（ブ菌）
- (5) 検査方法：「食鳥処理場におけるHACCP方式による衛生管理指針」<sup>1)</sup>及び「食品衛生検査指針」<sup>2)</sup>に準じて実施した。

## 結 果

- (1) 施設の衛生状況調査結果
  - ア. と体（図2、3、4）
 

各処理工程別のSPCは、それぞれ中央値（図中\*）

で、脱羽後 $1.2 \times 10^2/\text{cm}^2$ 、冷却後 $1.7 \times 10^1/\text{cm}^2$ 、清拭後 $2.4 \times 10^1/\text{cm}^2$ 、解体後 $1.9 \times 10^2/\text{cm}^2$ であった。脱羽後に検出されていたSPCは、冷却後には減少するが、清拭後には再び増加し、解体後には最も高くなった（図2）。

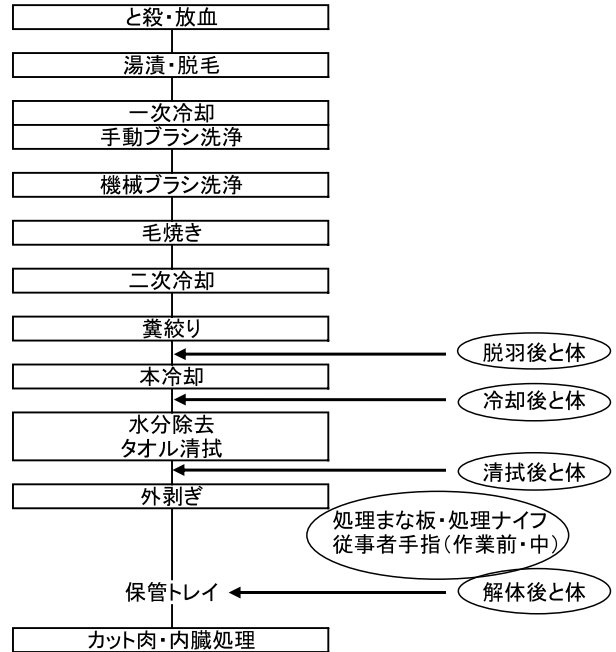


図1 当該施設の食鳥処理工程及び採材ポイント

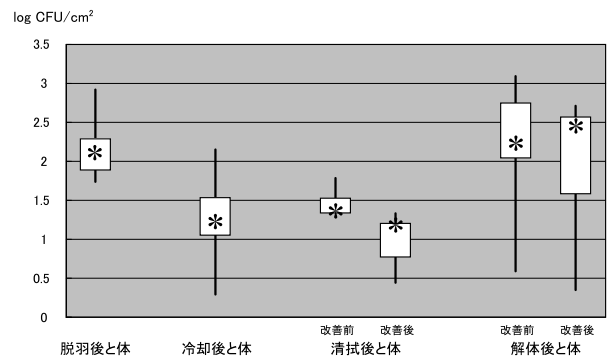


図2 各処理工程における一般生菌数

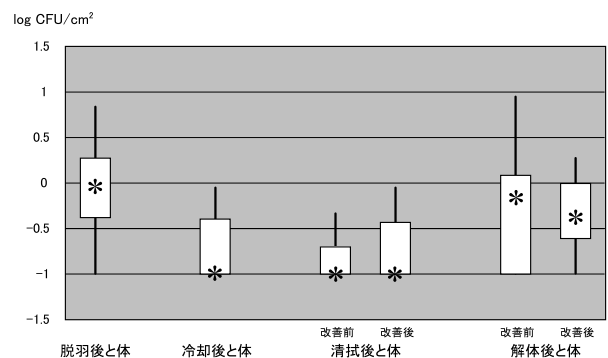


図3 各処理工程における大腸菌群数

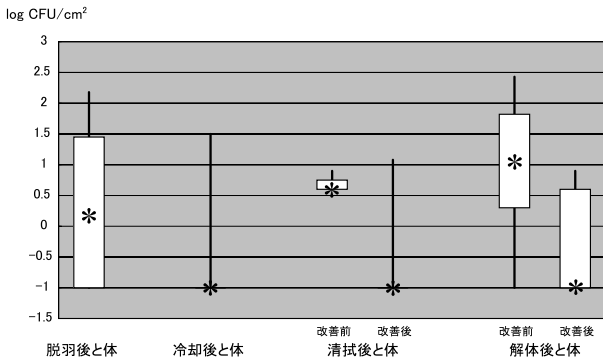


図4 各処理工程における黄色ブドウ球菌数

各処理工程別のcfは、それぞれ中央値で、脱羽後  $8.0 \times 10^{-1}/\text{cm}^2$ 、冷却後陰性、清拭後陰性、解体後  $6.0 \times 10^{-1}/\text{cm}^2$ であった。脱羽後に検出されていたcfは、冷却後、清拭後にはほとんど検出されなくなるが、解体後には再び検出されるようになった(図3)。

各処理工程別のブ菌は、それぞれ中央値で、脱羽後  $1.4 \times 10^0/\text{cm}^2$ 、冷却後陰性、清拭後  $4.0 \times 10^0/\text{cm}^2$ 、解体後  $1.2 \times 10^1/\text{cm}^2$ であった。脱羽後に検出されていたブ菌は、冷却後にほとんど検出されなくなるが、清拭後には再び増加し、解体後には最も高くなった。なお、検出されたブ菌は、全てエンテロトキシン陰性であり、コアグラゼ型Ⅶ型であった(図4)。

イ. 器具及び従事者手指(表1)

表1よりSPCは、器具、手指、作業前・中にかかわらず、ほぼ  $10^2 \sim 10^3/\text{cm}^2$ であった。cfは、作業前手指では陰性であり、他拭き取り場所でも  $10^{-1}/\text{cm}^2$ 程度であった。ブ菌は、器具では  $10^1/\text{cm}^2$ 程度であり、内臓処理者、整形者の手指でも陰性  $\sim 10^1/\text{cm}^2$ 程度であった。しかし、解体者手指では作業前・中にかかわらず、SPCとほぼ同数の  $10^2 \sim 10^3/\text{cm}^2$ であった。検出されたブ菌は、と体と同様に全てエンテロトキシン陰性であり、コアグラゼ型Ⅶ型であった。

(2) 衛生教育の実施及び衛生対策における改善点

(1)の衛生状況調査結果に基づいて、HACCP方式による自主衛生管理の導入推進を含めた衛生教育を、従事者全員に対して実施した。それによって、主に次の項目に

ついて改善が行われた。

- ア. ゴム手袋の着用
  - イ. 手洗いの励行
  - ウ. と体清拭用、解体処理用タオル及び器具の消毒の徹底(温湯による有機物洗浄後の消毒)
  - エ. 使用枚数の増加によるタオルの頻繁な交換の実施
  - オ. 本冷却槽における次亜塩素酸Na濃度の管理徹底
- (3) 衛生対策実施後調査結果(図2, 3, 4)

SPCは、清拭後では中央値で、改善前  $2.4 \times 10^1/\text{cm}^2$ 、改善後  $1.4 \times 10^1/\text{cm}^2$ 、解体後では改善前  $1.9 \times 10^2/\text{cm}^2$ 、改善後  $2.2 \times 10^2/\text{cm}^2$ であった。清拭後のSPCは、改善により減少したが、解体後のSPCは中央値では改善後にもやや増加した。しかし、解体後の改善前後における全体のデータの傾向をみると、改善後にはやや減少していた(図2)。

cfは、清拭後では中央値で、改善前陰性、改善後陰性、解体後では改善前  $6.0 \times 10^{-1}/\text{cm}^2$ 、改善後  $4.0 \times 10^{-1}/\text{cm}^2$ であった。清拭後のcfは、元々の菌数がほとんど検出されていないためあまり変動はなかったが、解体後のcfは改善によりやや減少した(図3)。

ブ菌は、清拭後では中央値で、改善前  $4.0 \times 10^0/\text{cm}^2$ 、改善後陰性、解体後では改善前  $1.2 \times 10^1/\text{cm}^2$ 、改善後陰性であった。清拭後及び解体後のブ菌は、いずれも改善により著しく減少した(図4)。

考 察

今回の調査対象施設は、管内の認定小規模処理施設の中でも、従事者の衛生意識が比較的高く、衛生状態のかなり良好な施設である。今回のSPCの結果を、HACCPの微生物学的目標基準(脱羽後  $1.0 \times 10^4/\text{cm}^2$ 以下、冷却後及び食鳥肉  $1.0 \times 10^3/\text{cm}^2$ 以下)と比較すると、中央値ではいずれも基準を満たしていた。さらに、他者報告<sup>3-8)</sup>と比べると、処理施設によって多少のバラツキはあるが、当該施設では菌数あるいは検出率はいずれの処理工程、菌種でも概ね低い傾向にあった。

また、当該施設では、脱羽後の汚染状況は他者報告<sup>3-8)</sup>と比べてそれほど高くなく、これは生鳥搬入時の病鳥、汚染鳥排除や餌切りなどの生鳥管理、及び、糞

表1 器具及び従事者手指における一般生菌数、大腸菌群数及び黄色ブドウ球菌数

検 体	一般生菌数 (CFU/cm <sup>2</sup> )				大腸菌群数 (CFU/cm <sup>2</sup> )				黄色ブドウ球菌数 (CFU/cm <sup>2</sup> )					
	検体数	<10	10	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	検体数 (-)	<1	1	10	検体数 (-)	<10	10	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
処理まな板	3		2	1		3		3		2		2		
処理ナイフ	3		2	1		3		2	1	2		2		
手指 解体処理者	作業前	2		1	1	2	2			2			1	1
	作業中	3		1	2	3	3			2			2	
手指 内臓処理者	作業前	1		1		1	1			1	1			
	作業中	2		1		2		1	1	2	1	1		
手指 整形処理者	作業前	1		1		1	1			1		1		
	作業中	2		2		2		2		2		2		



絞りによると体への糞便汚染の防止が徹底されていることによると思われた。脱羽後の汚染は、次亜塩素酸Naを添加した冷却槽での冷却後にはほとんど検出されなくなっている。これらは、他者報告<sup>4,5)</sup>を追認するものであり、生鳥から脱羽、冷却工程までの衛生管理が比較的コントロールできているものと考えられた。

今回の調査では、冷却後のタオル清拭及び解体処理により、菌数は脱羽後より増加している。これは、次亜塩素酸Na添加の冷却工程により減少した細菌汚染が、その後の処理工程により増加していくという他者報告<sup>5-7)</sup>を追認するものであった。また、器具及び従事者手指の調査により、解体処理従事者の手指は作業前からSPCと同程度の多数のブ菌が検出され、重度の手荒れ状態であった。

このことから、素手での作業が冷却後の汚染の最も大きな原因と推測された。さらに、手指から汚染を受けた清拭用及び解体処理用タオル、器具の使用、及び、その不十分な洗浄消毒によって二次汚染が拡大していくものとも考えられた。

一方で、冷却後には消毒工程がないことから、工程が進んでいくにつれて汚染が蓄積、拡大していくものとも考えられた。

これらの推測された原因について、衛生教育を実施し対策を行ったことによって、全ての菌種である程度の改善効果がみられた。特に、ブ菌については、改善前後では危険率5%で有意差が認められたことから、顕著な改善効果がみられたものと考えられた。

SPCやcfについては、当該施設の衛生管理が良好で元々の菌数が低く抑えられていることから、あまり改善効果がみられなかったものと考えられた。

ブ菌については、今回の汚染原因の推測及び改善策が適切であったことが示唆された。しかし、素手よりも手袋の方の汚染度が高くなるという報告<sup>8)</sup>もあることから、陰性、あるいは、より菌数の減少を目指すためには、手袋使用時の頻回の洗浄消毒、交換、さらには、生鳥段階からの総合的な衛生管理なども必要であると考えられた。

また、鶏の生鳥及びと体から分離されるブ菌は、鶏特有と考えられているコアグラゼ型Ⅱ型が多く、エンテロトキシンも陰性が多い<sup>9)</sup>。一方、ヒトの食中毒事例から分離されるブ菌は、コアグラゼ型Ⅱ、Ⅲ、Ⅵ、Ⅶ型が多く、エンテロトキシンもA型産生菌が比較的多い<sup>10)</sup>。

これらのことから、今回分離されたブ菌は全てエンテロトキシン陰性であるため、直接食中毒の原因となる可能性は低いと考えられた。

また、当該施設では、生鳥を飼養しており、その飼養管理を処理従事者が行っている。従って、元々の汚染源を特定するのは容易でないが、分離されたブ菌が全てコアグラゼ型Ⅶ型であることから、全て同一由来でヒト

由来である可能性が高いと推測された。さらに、養鶏場あるいは処理施設内では、生鳥、と体、器具及び従事者の間でブ菌による汚染が循環しているとも推測された。これらからも、生鳥段階からの総合的な衛生管理の必要性が示唆された。

一方で、今回の調査及び衛生教育の実施により、従事者自身が当該施設の具体的な衛生状況及び推測される汚染源の把握を行うことができ、従事者の衛生意識の向上がみられた。また、細菌汚染や、次亜塩素酸Naを使用すれば完璧な消毒が可能であるといった、いわゆる、“次亜塩神話”などの誤りを理解し、正しい知識の習得がなされたものと思われた。さらに、今回の衛生教育で得た衛生管理の手法について、可能な部分から導入していくという前向きな姿勢が窺えた。

なお、今回は、当該施設での自主検査が陰性であったこともあり、食鳥肉の衛生管理で重要なサルモネラ及びカンピロバクターの調査は実施していない。糞便汚染がこれらの食中毒起因菌の主要な汚染源と考えれば、当該施設のSPCやcfのデータは良好で、汚染の程度はかなり低いものと考えられた。しかし、これらに対しても、衛生状況調査及び衛生対策を検討する必要があると思われた。

また、当該施設において、HACCP方式による自主衛生管理の導入を試みたが、時間的制約やコスト面などで導入までには至らなかったことから、引き続き導入に向けての取り組みを指導していく必要があると思われた。

今後は、今回の調査結果を参考として、他の認定小規模処理施設への衛生講習会の開催、当該施設への見学の推奨及びHACCP方式による自主衛生管理の導入推進などの衛生指導を検討し実施していきたい。

## 文 献

- 1) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課編：食鳥処理場におけるHACCP方式による衛生管理指針(1993)
- 2) 厚生労働省：食品衛生検査指針(微生物編)、社団法人日本食品衛生協会、東京(2004)
- 3) 永田祥代ら：認定小規模食鳥処理場の拭き取り検査結果に基づく衛生指導について、平成16年度食鳥肉衛生技術研修会・衛生発表会資料、42~44(2005)
- 4) 桑折通房ら：腸管損傷が及ぼす食鳥と体表面の細菌数の動向について、平成12年度食鳥肉衛生技術研修会・衛生発表会資料、90~92(2001)
- 5) 片山正彦：食鳥処理方法別衛生実態調査について、平成7年度全国食品衛生監視員研修会研究発表等抄録、62~65(1996)
- 6) 清水俊夫ら：食鳥処理・加工ラインにおける衛生上の問題点と体及び部分肉の滞留について一、平成5年度全国食品衛生監視員研修会研究発表抄録、67~70(1994)
- 7) 安藤美保ら：小規模食鳥処理施設の衛生対策につい



- て一丸と体解体のための交差汚染防止マニュアルの作成について一, 食品衛生研究, 52, 75~81 (2002)
- 8) 中原賢一ら: 認定小規模食鳥処理場のHACCP方式導入における基礎調査, 平成8年度全国食品衛生監視員研修会研究発表等抄録, 267~268 (1997)
- 9) 新井孝典ら: 食鳥処理場における *Staphylococcus aureus* の汚染状況と分離株の性状, 日獣会誌, 57, 460~464 (2004)
- 10) 寺山武: 新訂食水系感染症と細菌性食中毒, 坂崎利一編, 454~472, 中央法規出版, 東京 (2000)

# 中小規模学校給食施設における衛生指導について

～特にドライ運用について～

矢野美奈子 新元 芳彦 小田真紀子  
永田 猛 向井 健 山本 一夫

(受付：平成19年1月29日)

## Hygiene guidance in small- and medium-scale schools providing meals —Dry use of the wet system—

MINAKO YANO, YOSHIHIKO SHINMOTO, ODA MAKIKO,  
TAKESHI NAGATA, KEN MUKAI, KAZUO YAMAMOTO

Bihoku Regional Health Center Hiroshima Prefecture  
4-6-1, Tohkaichi-higashi, Miyoshi, Hiroshima 728-0013

### SUMMARY

In A city within our jurisdiction, the provision of school meals was entrusted to a private enterprise, and cooks were replaced by new employees. Since this change raised concern about possible poor hygiene management, we repeatedly gave instructions to this institution, particularly regarding the dry use of the wet system, and obtained some findings.

Continuous surveillance was performed, instructions and training courses were given, and food stamps were distributed to promote voluntary examination. Surveillance was performed again, and kitchens were classified into those showing or not showing improvement, and instructions were given again. Kitchens in which workers misunderstood the dry system and did not clean the floor, showed improvement and maintained a hygienic state. In kitchens without improvement, since severe contamination was confirmed, instructions were given.

We attempted to increase hygiene knowledge by promoting voluntary examination, but this attempt sometimes had reverse effects. Though the introduction of the dry system has been advanced, cleaning is not performed due to misunderstandings in many institutions. Hygiene guidance that is more easily understood is necessary in the future.

### 要 約

管内A市で学校給食業務が民間会社に委託され、調理従事者が新規採用者に交代となった。衛生管理不良が懸念されたため、重点的に指導等を重ね、特にウェットシステムのドライ運用について指導を行い、若干の知見を得たので報告する。

継続監視を実施し、指導および講習会を実施し、フードスタンプを配布して自主検査を促した。再度監視を行い改善された調理場と改善のみられなかった調理場を選び、再度指導を行った。ドライシステムを誤解し、床掃除をしていなかった調理場は、改善により衛生的に保たれていることが確認できた。改善がみられなかった調理場では重度の汚染が確認されたため、指導を行った。

自主検査により、衛生知識の高揚を図ったが、却って逆効果を招くこともあり得ることが明らかになった。ドライシステムの導入が進められているが、誤解から清掃をしないという施設も多く、今後さらに理解しやすい指導の必要性を感じた。

序 文

管内A市では、学校給食調理業務が指定管理者制度に基づき、平成16年度から民間会社B社に委託された。それに伴い、調理従事者が調理経験のない新規採用者に交代となり、食品の取扱い不良等が懸念された。

そこで当所では、大量調理施設衛生管理マニュアルに基づき重点的に監視や衛生講習会等の指導を重ねてきた。今回、特にウェットシステムのドライ運用について指導を行い、若干の知見を得たので、そのうちの代表的な2施設について報告する。

指導および調査方法

1 期間

平成17年4月～平成18年7月

2 対象施設

1) C学校給食共同調理場

- i 食数等 4校へ配送 165食
- ii 調理従事者数 3名
- iii ウェットシステムのドライ運用を実施

2) D学校給食調理場

- i 食数等 単独調理 460食
- ii 調理従事者数 7名
- iii ウェット方式

3 指導方法

1) 平成17年4月～6月、A市内学校給食施設に対し、調理開始から盛り付けまでの作業工程に立ち会い、監視を実施した(以下「継続監視」という.)。また、その監視結果をもって、学校栄養士、調理従事者、教育委員会担当者およびB社担当者の4者同席の上で、改善指導および衛生講習を実施した。

2) 平成17年7月、フードスタンプ(標準寒天(SMA)生菌数用「ニッスイ」)を配布し、自主検査による取扱い等の自主改善を指導した。

3) 平成18年5月、監視指導を行い、指示事項の改善確認を行うとともに、学校栄養士および調理従事者に、自主検査の結果による改善事項について聞き取り調査を行った。

4) 平成18年6～7月、指示事項のうち、床等の管理方法について改善がなされていたC施設と、改善がみられなかったD施設の2施設を選び、フードスタンプを用いて施設内等の検査を食品衛生監視員が行い、持ち帰って24時間36℃培養後判定した。なお、コロニー数により0を- (汚染なし)、1～9を± (ごくわずかに汚染)、10～29を+ (軽度に汚染)、30～99を++ (中等度に汚染)、100以上を+++ (重度に汚染)とした。検査結果およびコロニーの写真を持参し、学校栄養士および調理従事者に検査結果を説明するとともに、再度改善指示を行った。

5) 平成18年7月、管理方法の改善状況確認を行った。

成 績

1. C施設の場合

1) 継続監視での指導事項

- i 床掃除を全く行っていないので、作業終了後に清掃をすること。
- ii 調理作業用エプロンの衛生的な保管を行うこと。
- iii 洗浄室用長靴のまま調理室を歩かないこと。
- iv その他、手洗い、そ族昆虫駆除、器具の消毒等について。

2) 聞き取り調査結果

- i 指導を受け、週1回の床掃除を行っていたが、自主検査により、床および壁が非常に汚染されていることが確認されたため、毎日作業終了後に床をブラッシングし、壁の拭き掃除と次亜塩素酸Naによる消毒を行うように改善した。
- ii エプロンは毎日洗浄し、壁から離れた場所にエプロン掛けを設置した。
- iii 洗浄室用長靴は、洗浄室でのみ使用するよう、履き替えを徹底した。
- iv 調理作業中は、完全に床をドライに保つよう、シンクのふちまで水を溜めない、野菜の水冷をシンク内で行うなど、作業に工夫を加えた。

3) フードスタンプでの検査結果

検査結果は、表1に示すとおりであった。毎日の清掃により、床の汚染は除去されており、衛生的な状態が保たれていることが確認された。また、調理用靴の底も生菌数は少なく、衛生的な状態が毎日維持されていることが推定された。ただ、意外な盲点として、アルコールスプレー式自動消毒器の内側や、手洗い前面の壁の汚染などが確認された。

表1 C施設簡易検査結果

拭取り場所	結果
下処理室 床 (下処理作業後)	++
調理室 床	+
調理室 床	-
保管ラック最下段	±
調理室用靴の底	+
作業台上	±
作業台上	±
配送車内 床	-
手洗い前面の壁	+++
アルコール消毒器内側側面	+++

以上の事項について、検査結果を基に学校栄養士、調理従事者全員に説明を行ったところ、「毎日の掃除は大変だと思っていたが、有効性が確認でき、さらに意欲が湧いた。また、汚染が確認された消毒器等についても今後は清掃する」との回答を得た。清掃だけで

なく、今後は手洗い等にも充分留意し、さらに二次汚染防止に努めるよう指導した。

4) 改善状況確認

清掃が徹底され、衛生状態が改善されていることを確認した。

2. D施設の場合

1) 継続監視での指導事項

- i 作業中に前掛けに水をかけて洗浄しないこと。
- ii ドライ用ザル置きに水をかけ水冷し、水があふれているので、床をぬらさないこと。
- iii 作業中に調理台の洗浄を行い、ホースで水をかけないこと。
- iv 調理作業と器具洗浄作業を直近で平行して行わないこと。また、床の上でホースを用いて洗浄しないこと。
- v その他、手洗い、そ族昆虫駆除、器具の消毒等について指導。

2) 聞き取り調査結果

- i 夏休み期間の大掃除後に、自主検査を行ったため汚染は確認できず、今まで通りで大丈夫であると思ひ、特に作業等に変更は加えなかった。
- ii 配膳缶時のエプロンを布製にしたが、他はゴム製エプロンで、水をかけている。
- iii 器具洗浄用シンクを決めたが、作業を平行して行っており、ホースをつないで床の上で洗浄を行っている。
- iv 履物の履き替えがない。
- v 作業中も作業台の水洗を行っている。

3) フードスタンプでの検査結果

検査結果は、表2のとおりであった。床は調理場のどの部分でも重度に汚染されており、床の水が流れることや、靴底によって汚染が調理場内すべてに拡散していることが示唆された。床清掃も週に1回程度しか行っておらず、はね水等による二次汚染が危惧された。配膳を行う配膳台と調理台は、水洗をしても中等度の汚染が確認され、やはりはね水等による汚染が考えられた。

表2 D施設簡易検査結果

拭取り場所	結果
調理場 床	+++
調理場 床	+++
ホースの手で握る部分	+++
作業台上	++
配膳台上	++
扇風機前面	+++
手洗い背面 壁	±
保管ラック 中段	±
冷凍庫取っ手	±
調理従事者手洗い後 親指	+++

以上について、検査結果を基に学校栄養士、調理従事者全員に説明を行ったところ、床の汚染の重大性に気付き、汚染が配膳台まで拡散していた事実を確認した。今後は床をぬらさないように工夫し、作業後の清掃にも努めるとの回答を得た。また、作業工程を改善し、作業台の洗浄、器具の洗浄を作業終了後に行うこととした。併せて手洗い等を実施し二次汚染の要因をなくすよう指導した。

4) 改善状況確認

ざるに水受けを設ける等、床をぬらさない作業を行っていた。また、清潔作業時は長靴を履くことをやめ、調理用靴と布エプロンで作業することにより、水を流さないように改善されていた。調査時には、調理中の床はドライに保たれており、調理場の湿度も改善前の80%以上から5%程度低下していることが確認された。

調理従事者からは、作業が楽になり、もっと早く試みれば良かったとの意見があった。

考 察

A市内の学校給食施設において給食調理従事者が全員入れ替わるという事態に対し、当所では立入り検査を始め、衛生講習会を繰り返すなど対応してきた。そして、フードスタンプによる自主検査などにより、衛生的な知識が深まるものと期待していた。その結果、多くの施設においては身近な汚染に気付き何らかの改善を行っていたが、D施設においては、却って逆効果を招く結果となった。フードスタンプの活用方法について、相手方に配布するのみでは、このような逆効果も有り得るということが判明し、今後の活用方法についての参考となった。今回、調理作業中に食品衛生監視員が検査を行い、結果を写真で見ながら詳しく説明したことにより、清掃作業の大切さが確認でき、D施設の調理従事者の考え方を変えることができた。その後は、ドライ運用にも積極的に取り組むようになった。

ウェットシステムでは、はね水等による二次汚染、調理場内湿度の増大などの問題があり、近年、ドライシステムの導入がすすめられている。小沼ら<sup>1)</sup>の報告によると、乾燥状態であっても有機物が残存している場合には、細菌は長時間生残する。しかし、実際の調理現場では、吉田ら<sup>2)</sup>の報告にもあるように、ドライだから床洗浄を行わなくてもよいという認識の施設が多い。C施設においても、ドライシステムの誤解から清掃がなされていなかったが、今回の指導により、毎日の床洗浄の必要性を認識し、清掃作業にさらに積極的となった。

今後は、この結果を講習会等を通じて広め、清掃作業の重要性についてさらに指導していきたい。また、今回はフードスタンプを用いて、調理従事者に対する視覚に訴えた具体的な指導の有効性を確認できた。今後は、リアルタイムで汚染度が判明するATP測定器等についても

使用を検討し、より理解しやすい指導を行っていきたい。

### 参 考 文 献

- 1) 小沼博隆 土屋禎「栄養分の有無ならびに湿潤・乾燥環境下における病原菌の挙動に関する研究」平成15年度農林水産省食品製造工程管理情報高度化促進事業 病原微生物データ分析実験作業成果報告書(2003)
- 2) 吉田まどか 田村有美 中野みずほ「学校給食施設における床洗浄の実態とその必要性の検討」平成17年度全国食品衛生監視員研修会研究発表等抄録165-166 (2005)



# 広島県内における実験動物施設の現状について

大原佳世子 柳本 慎治 久保田早苗  
池庄司 剛 川西 秀則 高橋 峰雄 松田 政明

(受付：平成19年1月31)

## Present status of laboratory animal facilities in Hiroshima Prefecture

KAYOKO OHARA, SHINJI YANAGIMOTO, SANAE KUBOTA, TSUYOSHI IKESYOJI,  
HIDENORI KAWANISHI, MINEO TAKAHASHI, MASAACKI MATSUDA

Hiroshima Prefectural Animal Management and Welfare Center  
8915-2, Minamigata, Hongo-cho, Mihara, Hiroshima 729-0413

### SUMMARY

To evaluate the present status of laboratory animal facilities, we performed an on-the-spot survey in 5 laboratory animal facilities as administrative organs to evaluate the present status. In all facilities, the care and use of laboratory animals were appropriate, and the 3R principles were also evaluated and observed. However, there were some institutions where there are no regulations in the facility, or chloroform, which is toxic to humans, is used for the anesthesia/killing of animals.

We informed the facilities of the results of this survey, thoroughly made the revision of the law known to each facility, and gave instructions in the care and use of animals according to "Standards relating to the care and management, etc., of experimental animals" for improvement.

### 要 約

実験動物施設の現状を把握するため、行政機関である実験動物施設5施設に立ち入り、実態を調査したところ、全施設において実験動物の取扱いは適切であり、3Rの原則についても、検討、遵守されていると判断された。しかし、動物の管理等について、所内規定等が整備されていない施設があることが明らかとなり、また、人に対して毒性があるとされるクロロホルムを動物の麻酔、処分に使用している施設があった。

今回の調査結果を各施設に通知するとともに、各施設に対して法改正の周知徹底を図り、「飼養保管基準」に従った動物の取扱いについて改善指導した。

### 序 文

「動物の愛護及び管理に関する法律」(以下、「動物愛護管理法」という。)が改正され、平成18年6月1日から施行された。今回の改正では、新たに動物を科学上の利用に供する場合等に新たな規定が設けられ、動物を適切に利用することに関する配慮事項として「3Rの原則」(動物の苦痛の軽減、使用数の削減、代替法の活用)が

明記された。

これに伴い、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」が改定され、実験動物の福祉に係る基本的考え方の充実等を盛り込んだ「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(以下「飼養保管基準」という。)が制定された。

これらのことから、当センターでは、実験動物施設の現状を把握するため、行政機関である実験動物施設に立

ち入り、実態を調査するとともに、各施設に対して法改正の周知徹底を図り、「飼養保管基準」に従った動物の取扱いについて改善指導したので、その結果を報告する。

### 調査方法

1. 調査対象：広島県立の実験動物飼養施設 5 施設
2. 調査方法：立入調査及び聞き取り調査
3. 実施時期：平成18年 6 月～7 月

#### 調査結果及び所見

##### 1. 実験動物の使用状況 (表 1)

ウサギ、ひよこをそれぞれ 1 施設が使用しており、その他はすべてげっ歯類であった。

実験動物として最も使用されているのはマウスで、5 施設中 4 施設で使用されていた。

表 1 実験動物の使用状況

施設	動物種	年間使用数 (匹)
A	マウス	1,225
	モルモット	3
B	ラット	176
	マウス	127
C	マウス	400
	ハムスター	20
	ウサギ	30
D	ひよこ	480
E	ラット	215
	マウス	1,644

##### 2. 実験動物取扱指針・マニュアル等

「飼養保管基準」において、努力規定となっている実験動物に関する取扱指針・マニュアル等について、制定しているのは 1 施設のみで、2 施設が一部制定しており、2 施設が未制定であった。

一部制定している施設については、より具体的な取扱指針の制定が必要と思われた。

##### 3. 管理者の設置

実験動物管理者について、取扱指針等で規定しているのは 1 施設のみであった。

##### 4. 職員研修等

実験実施者研修を実施しているのは 2 施設であった。

内 1 施設は、実験開始前に実験動物の専門家から 1 週間程度の研修を受けていた。

もう 1 施設については、職員である実験動物の専門家が常時実験実施者の指導に当たる形をとっていた。

研修未実施の 3 施設についても、実験動物に関する知識及び経験を有するものが実験を実施しており、検査手技の引継時に、動物の管理方法等を伝達しており、実験実施者に対する必要な教育訓練は実施されているものと考えられた。

##### 5. 管理記録

1 施設において、実験動物の管理状況が記録されていなかった。

管理状況を記録している施設は、実験記録に併せて、購入、繁殖、処分状況を記録していた。

##### 6. 飼養施設 (表 2)

すべての施設で、動物は動物舎もしくは実験室等の屋内にケージ等の容器を置いて飼育されていた。

ケージ等については、4 施設が動物の飼養専用容器を使用しており、専用容器を使用していない 1 施設においても、容器は衛生状態の維持及び管理が容易で、動物が傷害等を受けるおそれのない構造であり、動物が逃走しない構造及び強度は保たれていた。

また、動物が、日常的な動作を容易に行うための広さ及び空間は確保されており、エアコン、照明器具等の設置により、適切な温度、湿度、換気、明るさ等を保つことができる構造となっていた。

表 2 実験動物飼養施設

施設	動物種	飼養施設
A	マウス	ケージ (ポリカーボネート容器, 金網蓋)
	モルモット	ケージ (ステンレス)
B	ラット	ケージ (ポリカーボネート容器, 金網蓋)
	マウス	ケージ (ポリカーボネート容器, 金網蓋)
C	マウス	ケージ (ポリカーボネート容器, 金網蓋)
	ハムスター	ケージ (ポリカーボネート容器, 金網蓋)
D	ウサギ	ケージ (ステンレス)
	ひよこ	コンテナ (プラスチック), 金網蓋
E	ラット	ケージ (ポリカーボネート容器, 金網蓋)
	マウス	ケージ (ポリカーボネート容器, 金網蓋)

##### 7. 入手方法

4 施設が実験動物を実験動物販売業者から購入し、その内 2 施設は自家繁殖を併用していた。4 施設とも、業者からの輸送時は、必要に応じた給餌給水、温度管理がなされ、逃走防止措置もとられていた。

残りの 1 施設は、実験動物販売業者から有精卵を購入し、施設内で孵化させてひよこを使用していた。

##### 8. 管理方法

すべての施設で実験動物に対する給餌・給水、容器の清掃・消毒は適切に実施されていた。

複数の実験動物を同一容器内で飼養する場合には、組み合わせ、頭数の配慮がなされており、異なる種の実験動物を同一容器で飼育している施設はなかった。

##### 9. 健康状態の確認

すべての施設で、搬入時、および飼養中は健康状態を目視確認しており、2 施設で体重計測を行っていた。

健康状態に異常が認められた動物については、全ての施設において速やかに殺処分していた。

10. 動物の処分方法 (表3)

実験動物の処分方法は頸椎脱臼 (2施設)、麻酔下での放血殺 (3施設)、深麻酔殺 (4施設) であった。

吸入麻酔薬については、クロロホルムを使用している施設が2施設あり、その他はエーテルを使用していた。

「動物の処分方法に関する指針」において、「処分動物の処分方法は、化学的又は物理的方法により、できる限り処分動物に苦痛を与えない方法を用いて当該動物を意識の喪失状態にし、心機能又は肺機能を非可逆的に停止させる方法によるほか、社会的に容認されている通常の方法によること。」とされている。国際的に広く容認されているガイドラインによると、殺処分方法として、麻酔薬の注射、吸入麻酔薬または炭酸ガスの吸入等があり、マウス、ラット等については熟練した者による頸椎脱臼も容認されている<sup>1)</sup>。

今回、2施設で吸入麻酔薬としてクロロホルムを使用していたが、これは人に対して毒性があるとされており、麻酔薬の変更が必要と思われた。

処分後の死体の処理については、特別管理廃棄物として処分している (2施設)、一般廃棄物として処分している (2施設)、その他の施設に処分を依頼している (1施設) であった。

表3 動物種別の処分方法

動物種	処分方法
マウス	エーテル深麻酔殺 (1), エーテル麻酔下放血殺 (1), 頸椎脱臼 (2), クロロホルム深麻酔殺 (1), クロロホルム麻酔下放血殺 (1)
ラット	エーテル深麻酔殺 (1), エーテル麻酔下放血殺 (1), 頸椎脱臼 (1),
モルモット	クロロホルム麻酔下放血殺 (1)
ハムスター	頸椎脱臼 (1)
ウサギ	キシラジン深麻酔殺 (1)
ひよこ	クロロホルム深麻酔殺 (1), クロロホルム麻酔下放血殺 (1)

( ) 内は実施施設数

11. 生活環境の保全

動物飼養施設内はすべての施設において清潔に保たれていた。

また、汚物等は一般廃棄物もしくは特別管理廃棄物として処理されており、周辺環境の汚染は認められなかった。

12. 動物の苦痛の軽減

動物の苦痛の軽減について、2施設で実験の際に麻酔が使用されていた。

その他の施設については、実験の内容により、苦痛軽減措置が施せないもの、また、その必要がないものであった。

また、健康状態に異常が認められた動物については、速やかに殺処分するなど、全ての施設について、動物の苦痛の軽減に関して配慮がなされていた。

13. 使用数の削減、代替法の活用

3施設において実験に際して必要最小限の動物を使用していた。

2施設において必要最小限数以上の動物を飼養していたが、その理由は検査体制の整備等であり、業務の実施上止むを得ないものと思われた。

また、実験の性格上、代替はできないとのことであった。

ま と め

今回、調査対象とした5施設について、立入調査を実施したところ、飼養施設、管理方法、輸送方法等に関して、実験動物の取扱いは適切であった。

3Rの原則についても、各施設で検討・遵守されていると判断された。

しかし、動物の管理等について、「飼養保管基準」に基づいた取扱指針・マニュアル等を制定し、実験動物管理者を選定しているのは1施設であり、動物の福祉に対する配慮はなされているものの、所内規定等が整備されていない施設があることが明らかとなった。

また、2施設において、人に対して毒性があるとされるクロロホルムを動物の麻酔・処分に使用しており、実験実施者の健康管理の観点から、麻酔薬を変更すべきと思われた。

今回の調査結果については、各施設に通知するとともに、該当する各施設に対して改善指導を行った。

今後、他の実験動物施設に対しても、動物の福祉の保持に努めるとともに、指針等を整備し、「動物愛護管理法」及び「飼養保管基準」を遵守するよう、指導の徹底を図っていききたいと考えている。

文 献

1) 伊井泰行ほか, 実験動物の技術と応用 実践編, 社団法人日本実験動物協会編, 200~201, 株式会社アドスリー, 東京 (2004)

# 広島市と畜場における地方病性牛白血病の 抗体保有状況とその発生

大川 育之 阿部 恵子 太田垣 寧 佐伯 幸三 瀬尾 和範

(受付：平成19年1月31日)

## Survey on The Prevalence of Antibodies and The Incidence of Enzootic Bovine Leukosis in The Slaughterhouse in Hiroshima City.

YASUYUKI OKAWA, KEIKO ABE, YASUSHI OTAGAKI, KOUZOU SAIKI and KAZUNORI SEO

Hiroshima City Meat Inspection Office,  
1-11-1 Kusatsuminato, Nishi-ku, Hiroshima 733-0832

### SUMMARY

We surveyed the incidence situation of enzootic bovine leukosis and the prevalence of anti-bovine leukemia virus (BLV) antibody to the cattle brought in the slaughterhouse in Hiroshima City between April 2005 and August 2006. Among 331 cattle that were surveyed, 112 cases (33.8%) were positive, 8 cases of them were diagnosed as enzootic bovine leukosis and disposed. Even as for the cattle from 2 years old and under, anti-BLV antibody positivity rate was showed the high rate (27.3%), and then it seemed that both the number of incidence and positivity rate have been on a rise.

### 要 約

平成17年4月から18年8月までに広島市と畜場に搬入された牛について、地方病性牛白血病の発生状況および抗体保有状況を調査した。抗体調査を実施した331頭中、抗体陽性牛は112頭(33.8%)で、このうち本疾患と診断され全廃棄になったものは8頭であった。年齢別にみると、2歳齢以下の牛でも27.3%と高い抗体陽性率を示し、発生頭数、抗体陽性率ともに上昇傾向がうかがえた。

### 序 文

地方病性牛白血病は、牛白血病ウイルス(BLV)による感染症で、と畜検査現場でも多発性腫瘍などとともにしばしばみられる疾病である。感染様式は節足動物による吸血や汚染器具などによる水平伝播、もしくは垂直伝播によると考えられている<sup>1)</sup>。感染牛の多くは不顕性といわれる<sup>2)</sup>が、BLVに感染した牛は抗体が陽転した後も体内から排除されず、持続感染状態となり、病態が進むと感染牛の約30%が、リンパ球増多ないしは持続性リンパ球増多症を示す。さらに病態が進行すると最終

的に感染牛の2～3%が発症するといわれており<sup>3)</sup>、発症した牛は全部廃棄の対象となるため、畜産農家への影響は大きく、BLVの蔓延は重要視されている。近年、広島市と畜場において、牛白血病又は悪性リンパ腫で全部廃棄となる事例が増加してきた。そこで、今回、広島市と畜場における発生状況を整理するとともに、搬入された牛331頭の抗体保有状況調査を行ったので報告する。

### 材料および方法

平成17年4月から平成18年8月までに、広島市と畜場に病畜として搬入された牛および生体検査で精密検査が



必要と判断し採血を実施した牛，さらに解体後の検査で多発性腫瘍を疑いその検査に供した牛，計331頭の血清について調査した。

抗体価の検査は受身赤血球凝集反応法（牛白血病抗体アッセイキット「日生研」）により実施した。判定は，測定キットの使用法に従い，定性試験，定量試験および阻止試験を行い，抗体価16倍以上のものを陽性とした。

成績

検査した牛331頭のうち，抗体価が陽性であったものは112頭，陽性率は33.8%であった。このうち病理学的に牛白血病と診断し，全部廃棄された牛は8頭であった（表1）。

8頭中7頭が心臓に腫瘍病変を認めた。また，その他ほ

表1 抗体保有状況

年度	検査頭数	陽性頭数	陽性率	発症頭数
17	204	59	28.9%	4
18	127	53	41.7%	4
計	331	112	33.8%	8

表2 発症牛の病変部位

症例	No1	No2	No3	No4	No5	No6	No7	No8
品種	ホル	ホル	F1	ホル	ホル	ホル	ホル	ホル
年齢	7歳1ヶ月	9歳3ヶ月	1歳7ヶ月	7歳2ヶ月	6歳6ヶ月	4歳9ヶ月	7歳11ヶ月	5歳1ヶ月
抗体価	1024	8192	512	512	2048	4096	128	4096
心臓	◎	○	◎		○	○	○	◎
肝臓	○		○	○		○		
腎臓		○		○		○		
肺				○				
胃腸	◎	○	○	◎	◎		○	○
腹部リンパ*	◎	◎	◎	○		◎		◎
体表リンパ*			◎			○		
胸部リンパ*	◎	◎	◎	○	○	○		○

○：軽度病変  
◎：重度病変

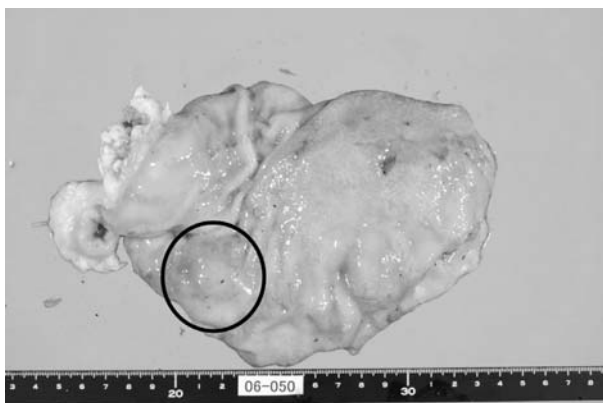


写真1 第四胃に小さなくるみ大の腫瘍（丸印）が1つ認められるのみ

とんどの症例では，消化管や胸部リンパ節に腫瘍病変を認めたが（表2），中には心臓と第4胃の小病変のみの症例も存在した（写真1）。

抗体陽性率を年度別に集計すると，平成17年度は204頭中，陽性牛が59頭で陽性率は28.9%，平成18年度は127頭中，陽性牛は53頭で陽性率は41.7%であった。また，好発年齢といわれる3歳齢<sup>4)</sup>で区切り，年齢別に集計すると3歳齢を超えるものでは37.9%であったが，2歳齢以下の牛でも27.3%もの抗体陽性率を示していた。品種別の集計では，ホルスタイン種37.9%，交雑種26.7%，黒毛和種8.8%であった（表3）。

抗体陽性牛のうち，発症する可能性が高いとされている<sup>5)</sup>，抗体価256倍以上のものは全体で46.4%であり，2歳齢以下でも，45.7%の牛が256倍以上と，高い抗体価を持つものがみられた（図1）。

地方病性牛白血病発症牛の8頭のうち7頭が512倍以上の高い抗体価を示し（図2），1歳7ヶ月齢という若齢での発症もみられた（表2）。

表3 年齢・品種別抗体保有状況

品種	2歳以下	3歳以上	計
乳用種	24/74	77/193	101/267 (37.8%)
F1	8/30	0/0	8/30 (26.7%)
黒毛和種	3/24	0/10	3/34 (8.8%)
計	35/128 (27.3%)	77/203 (37.9%)	112/331 (33.8%)

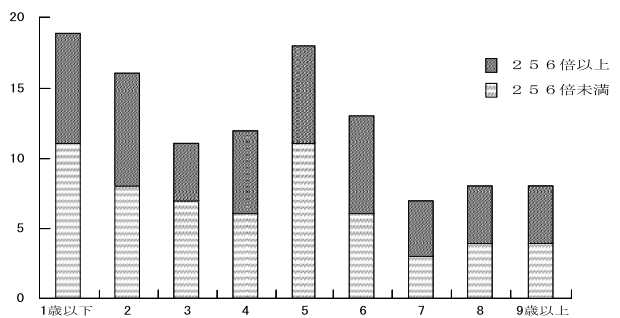
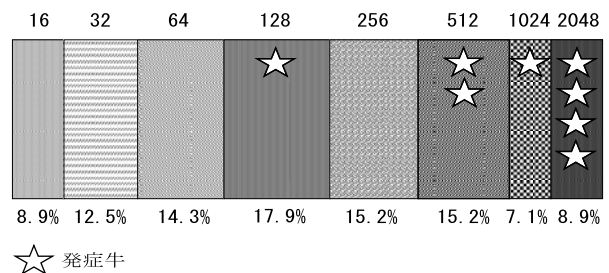


図1 年齢別抗体陽性頭数



☆ 発症牛

図2 抗体価の分布



## 考 察

牛白血病は、平成10年に届出伝染病に指定されて以来、全国的に発生頭数が増加してきているといわれている<sup>3)</sup>。平成元年4月から平成18年8月までに広島市と畜場に搬入され、牛白血病と診断された牛を、年度毎に、100万頭あたりの発生頭数に換算し、比較した。平成元年度から平成12年度までは、100前後で推移してきたが、平成13年度以降は増加傾向がみられ、平成17年度は406.1、平成18年度は980.9と、大幅に増加していた(図3)。抗体陽性率も、平成17年度と比較すると平成18年度は増加しており、ウイルス汚染の拡大傾向が示唆された。

地方病性牛白血病の好発年齢は、3歳齢以上(特に5歳齢から8歳齢)といわれている<sup>4)</sup>。今回の調査でも、発症牛8例中7例が3歳齢以上の牛であった。しかし、3歳齢以下の若齢での発症牛や高い抗体価を保有する牛も多く認めたことから、早期での感染が疑われ、年齢に係わらず注意が必要と考えられる。品種別の抗体陽性率は、乳用牛に比べ、肉用牛の方が高いとされている<sup>4)</sup>。今回、広島市では、黒毛和種に比べ、ホルスタイン種、

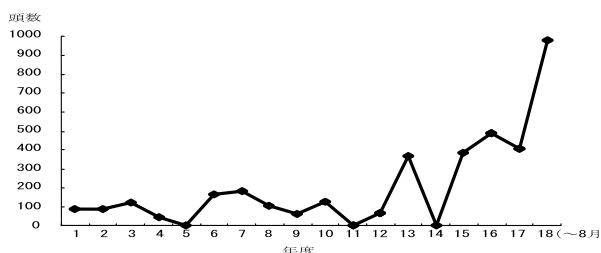


図3 100万頭あたりの発生頭数

F1が高い陽性率を示した。ホルスタイン種に関係した飼養形態や環境などの何らかの要因が関与しているのではないかと考えられた。高橋ら<sup>5)</sup>の調査では、発症牛のほとんどが256倍以上の抗体価を示していたが、今回私達の調査でも、発症牛の8頭中7頭は、512倍以上の高い抗体価を示していた。しかし、128倍で発症した事例や、腫瘍病変が数少ない事例、また小病変で見落としやすい事例もみられることから、今後は、牛白血病が増加している現状を念頭におき、搬入されると畜の検査の際には十分注意を払う必要がある。そのため、抗体価の検査結果を、できるだけ生体検査のデータとして活用できるように検査体制を整備し、地方病性牛白血病の確実な診断の向上に努めていきたい。また、発症牛や抗体陽性牛などの情報を可能な限り畜産農家現場にフィードバックし、地方病性牛白血病の減少につなげていければと考えている。

## 文 献

- 1) 小沼操：BLV伝播とその清浄化，臨床獣医，22(3)，15～19(2004)
- 2) 日本獣医病理学会編：動物病理学各論，第1版83～84，文永堂出版，東京(1998)
- 3) 小沼操：BLV感染と病態発現，臨床獣医，22(3)，10～14(2004)
- 4) 小山弘之：獣医伝染病学，第3版，104～106，近代出版，東京(1992)
- 5) 高橋壮一郎ら：地方病性牛白血病の検出状況と牛白血病ウイルス抗体調査，神奈川県食肉衛生検査所平成12年度事業概要(2000)

# *Clostridium perfringens*が分離された牛の壊疽性肝炎の1症例

赤木 雅彦 仲宗根智彦 玉岡 純也  
山根 伸久 田口 和史 佐藤 隆司

(受付：平成19年1月31日)

## A cow with gangrenous hepatitis from which *Clostridium perfringens* was isolated

MASAHIKO AKAGI, TOMOHIKO NAKASONE, JUNYA TAMAOKA,  
NOBUHISA YAMANE, KAZUFUMI TAGUCHI, and TAKASHI SATO

Fukuyama City Meet Sanitation Inspection Station  
1685-1, Nakatsuhara, Miyuki-cho, Fukuyama, Hiroshima 720-0004

### SUMMARY

Gangrenous hepatitis was observed in a slaughtered cow that was transported to a slaughterhouse as general livestock and showed no definite abnormalities in ante-mortem inspection. Therefore, pathological and bacteriological examinations were performed. The hepatic lesion slightly bulged on the diaphragmatic surface and had a putrefactive smell when cut. On the cut surface, there were many cavities varying in size. Histologically, extensive necrosis of hepatic cells, inflammatory cell aggregates, and masses of large-sized bacillus cells in the necrotic foci were observed. Bacterial culture of the lesion resulted in isolation of a gram-positive large-sized bacillus, which was identified as *Clostridium perfringens* by property tests. Based on these results, this cow was diagnosed as having gangrenous hepatitis due to *Clostridium perfringens*. In this cow, bacterial invasion into the liver via the portal vein and proliferation were suggested.

### 要 約

と畜場に一般畜として搬入され、生体検査において明瞭な異常を認めず、と畜された牛において壊疽性肝炎が見られた例について、病理学的検査及び細菌学的検査を実施した。肝臓の病変は横隔面においてやや膨隆、切開により腐敗臭を感じ、割面において大小不整形の空洞を多数認めた。組織学的には肝細胞の広範囲の壊死、炎症細胞の集簇、壊死巣における大型桿菌の菌塊を認めた。病変部の細菌培養からグラム陽性の大型桿菌が分離され、性状試験の結果から*Clostridium perfringens*と同定した。以上の結果から本症例を*C. perfringens*による壊疽性肝炎と診断した。本症例は門脈血行路を介した肝臓への菌の侵入、増殖によるものと推察された。

### 序 文

*Clostridium perfringens*は、動物の腸管、下水、土壤中  
等自然界に広く分布している菌である。また同時に、と  
畜場法における検査対象疾病である悪性水腫や食中毒の

原因となる菌でもあり<sup>1)</sup>、食品衛生上重要な細菌の一  
つである。本菌による疾病には菌体外毒素が関与して  
おり、その多くには浮腫、壊死、ガス産生や出血性病変が  
見られる<sup>1)</sup>。

今回、管内と畜場に一般畜として搬入され、と畜され

た牛に壊疽性肝炎が見られた。この病変について発生原因を明らかにするため、病理学的検査及び細菌学的検査を実施した結果、若干の知見を得たので報告する。

## 材料と方法

症例牛は、県内産の20ヶ月齢の交雑種（肉専用種×乳用種）去勢牛で、出荷時の体重は660kg、病歴・治療歴はなく、2006年7月12日に一般畜として搬入された。とさつ解体時に、壊疽性肝炎を確認したため、精密検査を実施した。

病理学的検査は、肝臓・肝リンパ節・小腸・腸間膜リンパ節を10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋及び薄切後、HE染色、グラム染色（ハッカー・コン法）、アザン染色、及びメチレンブルー染色を定法どおり実施し、鏡検した。

細菌学的検査は、肝臓病変部の直接塗抹標本にグラム染色を実施し、鏡検した。また、肝臓病変部を血液寒天培地（日本ベクトン・ディッキンソン：トリプチケースソイⅡ5%ヒツジ血液寒天培地）に塗抹し、好気及び嫌気条件下で37℃、48時間培養した。

分離菌について、グラム染色及びメチレンブルー染色を実施し、鏡検した。発育条件及び鏡検像からクロストリジウム属菌を疑い、性状試験として、細菌同定検査キット（日本ビオメリュー：API20A）を用いた試験、ブドウ糖・乳糖・白糖について糖発酵試験（Phillipsの嫌気性菌用血液寒天平板発酵法）<sup>2)</sup>、卵黄反応試験（日水製薬：卵黄加カナマイシン不含CW寒天基礎培地、乾燥ウエルシュ菌A型抗毒素ろ紙）を実施し、菌種を同定した。

## 結 果

### 1. 生体検査及び解体前検査所見

症例牛は生体検査において、望診等に異常を認めなかった。また、解体前検査において血液等に異常を認めなかった。

### 2. 内臓の肉眼所見

肝臓は全体にやや腫大、褪色しており、表面に点状出血を認めた。胆嚢はやや腫大し、胆嚢壁は肥厚しており、胆汁は黄色を呈していた。肝リンパ節の断面には出血が認められ、また肝リンパ節周囲の脂肪組織には水腫がみられた。肝臓の病変は横隔面において、右葉から方形葉にかけて実質が16cm×18cm程度やや膨隆し、硬度を増しており、表面が黄白色から赤色、暗赤色を呈していた（写真1）。病変部を切開すると、腐敗臭が感じられたがこの臭気は切開前には認められず、また、切開により液体の流出は認められなかった。病変部の断面には不潔黄白色や黒色を呈する部位全体に大小不整形の空洞を多数認めた（写真2）。

肝臓以外の臓器では、小腸炎、大腸炎、脾臓のうっ血、横隔膜炎が認められた。小腸は漿膜面においてやや赤色を呈していたが、ガスの貯留による膨満は認められな



写真1 肝臓横隔面

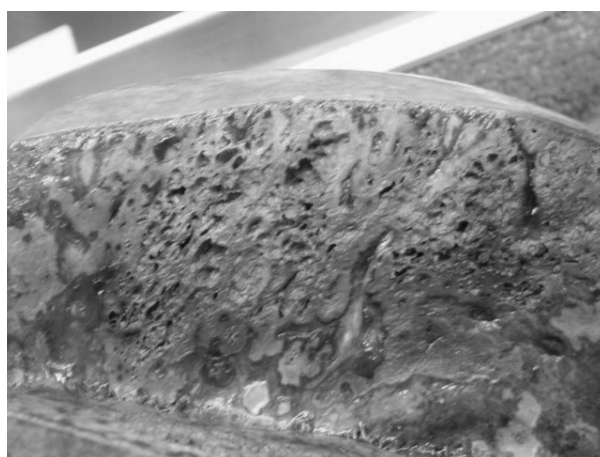


写真2 肝臓病変部剖面

かった。その他の臓器、体幹リンパ節、筋肉には異常を認めなかった。

### 3. 肝臓の組織学的所見

病変中心部では、肝臓の固有構造がほとんど失われており、また多くの肝細胞は核を失い、細胞質は均質に染色されていた。拡張した類洞に好中球やリンパ球の集簇を認め、一部には赤血球の充満も認められた（写真3）。アザン染色によりグリソン鞘を中心とした結合組織の軽度の増生が認められた。炎症細胞の集簇した層の内部にみられる壊死肝細胞は特に淡明に染色され、著しい細胞の萎縮、変形が認められた。しかしその細胞間には炎症細胞はほとんど認められなかったが、黄褐色の色素の沈着を認めた。また、押しつぶされたような扁平の壊死した細胞で内張りされた大小不整形の空隙が認められた（写真4）。これらは少量の赤血球や漿液を容れているものもあったが、ほとんど内容物は認められなかった。HE染色、メチレンブルー染色により空隙の周囲に大型桿菌の菌塊を多数認めた（写真5）。

病変辺縁部では、中心部に比べてグリソン鞘を中心とした結合組織の増生が多く認められたが、一部に肝臓の固有構造を保っている部位も認められた。しかし、壊死



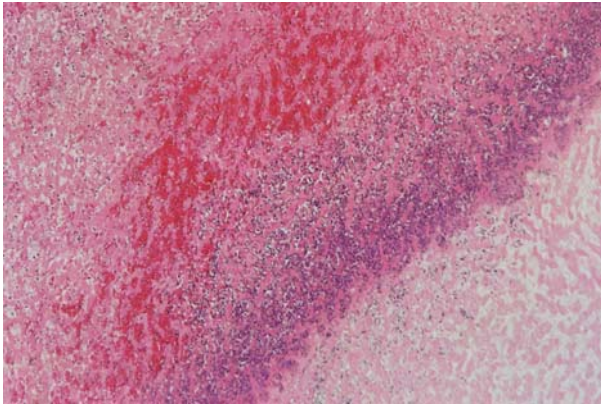


写真3 肝臓 炎症細胞及び赤血球の集簇  
(HE染色 弱拡大)

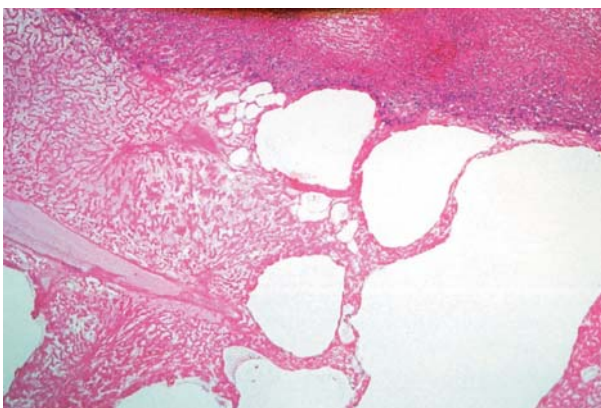


写真4 肝臓 大小不整形の空隙  
(HE染色 弱拡大)

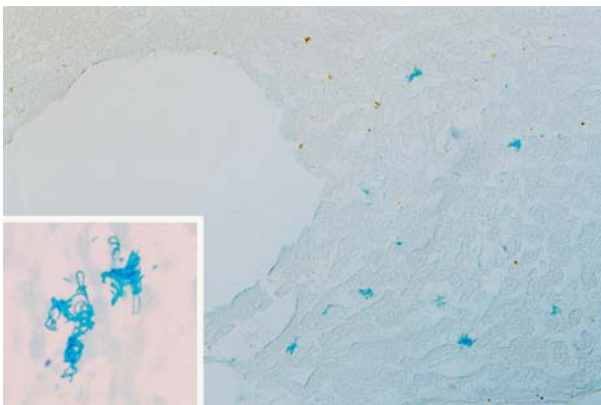


写真5 肝臓 空隙周囲の大型桿菌の菌塊  
(メチレンブルー染色 中拡大及び強拡大)

巣との境界は不明瞭であった。また、病変中心部と同様に拡張した類洞内に炎症細胞の集簇や赤血球の充満が認められたが、それら集簇層の内部の淡明に染色される部位には空隙の形成は認められなかった。この部位には病変中心部と同様の大型桿菌の菌塊を多数認めた。

肝臓の固有構造が保たれている部位でも、グリソン鞘を中心とした結合組織の増生が認められた。それらの小葉間静脈内にも病変部と同様の大型桿菌の菌塊を多数認

めた。

#### 4. 肝リンパ節、小腸、腸間膜リンパ節の組織学的所見

肝リンパ節は濾胞構造が一部消失しており、出血が認められた。また、肝臓で認められたものと同様の大型桿菌が認められ、その周囲には好中球の集簇を認めた。

小腸は粘膜上皮細胞の脱落や絨毛の萎縮が著しく、粘膜固有層にはリンパ球、陰窩には好中球の集簇が認められた。筋層及びその血管に著変は認められなかった。また、小腸及び腸間膜リンパ節の組織標本において細菌は確認できなかった。

#### 5. 細菌学的検査所見

肝臓病変部の直接塗抹標本には、グラム陽性の大型桿菌が認められ、一部に芽胞を有するものも見られた(写真6)。また、メチレンブルー染色標本において、莢膜の形成は認められなかった。

肝臓病変部の塗抹による菌分離において、嫌気培養平板のみから $\alpha$ 溶血を示すグラム陽性大型桿菌が分離されたが、好気培養平板からは菌は分離されなかった。分離菌は、芽胞や莢膜の形成は認められなかったが、好気条件下では発育せず、以上の性状から偏性嫌気性のクロストリジウム属菌であることが疑われた。性状試験の結果は、ブドウ糖発酵(+), 乳糖発酵(+), 白糖発酵(+), インドール(-), ゼラチン液化(+), ウレアーゼ(-), 乳光反応(+), 乾燥ウエルシュ菌抗毒素ろ紙による乳光反応の抑制(+), 真珠層の形成(-)であった。これをクロストリジウム属菌鑑別表<sup>2)</sup>と比較し、また、好気条件下では発育しなかったことから分離菌を*C. perfringens*と同定した(表1)。

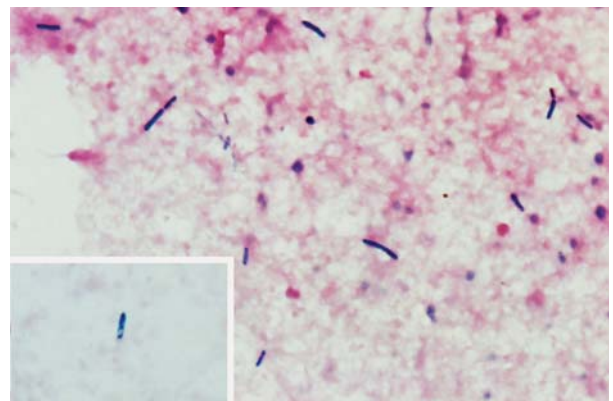


写真6 肝臓病変部の直接塗抹標本  
(グラム染色 ともに強拡大)

#### 6. 診断名

以上の所見から、肝臓の壊死巣及び空洞は*C. perfringens*の増殖に伴う毒素やガスの産生によるものであると推察され、本症例の診断名を*C. perfringens*による壊疽性肝炎とした。

表1 クロストリジウム属菌鑑別表

	炭水化物分解			インドール	ゼラチン液化	ウレアーゼ	卵黄反応		
	ブドウ糖	乳糖	白糖				乳光反応	ウエルシュ菌 抗毒素ろ紙に よる抑制	真珠層
<i>C. perfringens</i>	+	+	+	-	+	-	+	+	-
<i>C. chauvoei</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>C. septicum</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>C. botulinum</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	+
<i>C. novyi</i>	+	-	-	-	+	-	+	-	+
<i>C. tetani</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	-
分離菌	+	+	+	-	+	-	+	+	-

### 考 察

*C. perfringens*による牛の感染症には、悪性水腫、出血性壊死性腸炎、エンテロトキセミア等が知られている<sup>1)</sup>が、本症例のように肝臓においてのみ壊疽性病変の見られる症例は報告されていない。*C. perfringens*は正常な牛の消化管内に分布している菌である。常在微生物叢を構成する微生物はしばしば感染の原因となり、本来の存在箇所とは別の箇所に移動すると感染を起こすことが多い<sup>3)</sup>とされている。本症例では、小腸において著しい粘膜上皮細胞の脱落や絨毛の萎縮が認められ、また肝臓の小葉間静脈内に菌が認められたことから、本症例は門脈血行路を介して肝臓へ菌が侵入したものと推察される。しかし、今回の検査では小腸粘膜の塗抹標本の観察や、小腸内容物の細菌培養を行っておらず、小腸炎と*C. perfringens*の関係を断定するには至らなかった。したがって、本症例における*C. perfringens*の小葉間静脈への侵入の経緯については不明である。局所において*C. perfringens*の増殖が開始すると、各種毒素が産生され周辺の組織の破壊が起こり、また、菌の増殖による代謝産物としてのガスの貯留が起こり、壊死巣が拡大していく<sup>3)</sup>とされている。本症例においても、肝臓に侵入した*C. perfringens*が増殖する過程において産生される外毒素により肝細胞の広範囲の壊死が起こり、また、ガスの産生により肉眼的、組織学的に認められた大小不整形の空洞が形成されたと推察される。動物種は異なるが、ブロイラーの雛において*C. perfringens*感染による壊死性肝炎が報告されている<sup>4)</sup>。この症例では肉眼的に著明な病理学的変化が認められたのは肝臓だけであり、血行性あるいはリンパ行性の感染であるとされており、今回報告した症例はこれに類似したものであると推察される。

本症例に類似した*Clostridium novyi*による伝染性壊死性肝炎では、肝蛭幼虫の寄生による肝細胞の壊死が起因

となるとされている<sup>1)</sup>。この他にも*Clostridium*属菌感染症は、局所の壊死や血行不良等が偏性嫌気生菌である本菌の増殖の促進因子となる<sup>3)</sup>とされている。しかし、本症例において寄生虫や中毒等による壊死巣の形成や血行障害等の促進因子を特定することはできなかった。

今後のと畜検査においても類似の症例に遭遇する可能性が考えられる。*C. perfringens*による感染症では敗血症や毒血症へと進行していく可能性を十分に考慮する必要がある。生体検査時における発熱、腹痛、下痢、元気消失、皮下及び筋肉の浮腫等の異常や、解体後検査時における悪臭のあるガスや浸出物の貯留を伴う壊死病巣、点状出血等の異常<sup>5)</sup>に注意し、*C. perfringens*感染症が疑われる場合には適切な病理学的・細菌学的検査を実施し、診断を行うよう、本症例から得られた知見を生かしたと畜検査を行っていききたい。

### 参 考 文 献

- 1) 明石博臣ほか：獣医微生物学，見上彪編，第4版，107～111，文永堂出版，東京（1997）
- 2) Colman, G. et. al.: Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, Barrow, G. I. and Feltham, R. K. A. editors, 3rd ed., 92～95, Cambridge University Press, New York (1993)：医学細菌同定の手びき（坂崎利一監訳）近代出版，東京（1993）
- 3) 天児和暢ほか：戸田新細菌学，天児和暢，南嶋洋一編，第31版，505～518，南山堂，東京（1997）
- 4) Jun SASAKI, et. al.: Necrotic Hepatitis due to *Clostridium perfringens* Infection in Newly Hatched Broiler Chicks, J. Vet. Med. Sci. 65 (11): 1249～1251 (2003)
- 5) 明石博臣ほか：獣医伝染病学，清水悠紀臣ほか編，第5版，111～113，近代出版，東京（1999）



# 清涼飲料水等に含まれるベンゼンの実態調査について

岩井 徹 西岡 達彦 中島 敏浩 重東 和宏 三宅 伸子

(受付：平成19年2月5日)

## Present status survey of benzene contained in beverages such as soft drinks

TORU IWAI, TATSUHIKO NISHIOKA, TOSHIHIRO NAKASHIMA, SHIGETO KADUHIRO, NOBUKO MIYAKE

Fukuyama City Public Health Center

2-11-22, Miyoshi-cho-minami, Fukuyama-shi, Hiroshima 730-8512

### SUMMARY

Benzene was detected in some commercially available soft drinks in Japan, and the involvement of benzoic and ascorbic acids as additives in these products containing benzene has been suggested. At present, the mechanism of benzene formation is unclear. We performed a survey of benzene in samples of soft drinks and soy sauce containing benzoic acid that were produced by food production companies in the city. As a result, benzene was detected in a sample containing both benzoic and ascorbic acids and 2 samples containing benzoic acid alone, but not detected in the other 12 samples including 3 containing both benzoic and ascorbic acids. The samples containing benzene were all soft drinks. In addition, there was no correlation between the amounts of benzoic acid and benzene. The 3 samples containing benzene showed relatively high contents of Mg, Mn, Fe, Co, Sr, and Sn.

Since benzene was also detected in samples not containing ascorbic acid, there is a possibility that the coexistence of reducing organic acids or saccharides causes the reduction of benzoic acid, resulting in benzene formation. Benzene formation from benzoic acid may be associated with the complicated involvement of factors such as the presence of reducing substances or heavy metals and the time course.

### 要 約

国内で流通する清涼飲料水からベンゼンが検出された事例が発生し、当該製品に添加された安息香酸およびアスコルビン酸のベンゼンの生成への関与が示唆されている。現時点ではベンゼンの生成機序が明らかにされておらず、市内の食品製造業で製造された安息香酸を使用する清涼飲料水および醤油に含まれるベンゼン等の調査を行った。結果は、安息香酸およびアスコルビン酸の両剤が添加された1検体、安息香酸のみ添加された2検体からベンゼンを検出した。安息香酸およびアスコルビン酸が添加された3検体を含む12検体からは、ベンゼンは検出されなかった。ベンゼンを検出した検体は全て清涼飲料水であった。また、安息香酸とベンゼンの検出量に相関は見られなかった。ベンゼンが検出された3検体はMg, Mn, Fe, Co, Sr, Sn等の含有量が比較的高い傾向が見られた。

アスコルビン酸を含有しない検体からもベンゼンを検出したことから、アスコルビン酸に限らず、還元性のある有機酸や糖類等の物質が共存すると、安息香酸が還元されベンゼンが生成する可能性が考えられた。安息香酸からのベンゼンの生成には、還元性物質や重金属の存在、時間経過等の要因が複雑に関与している可能性が示唆された。

## 序 文

平成18年7月28日付け食安基発第0728008号厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長通知「清涼飲料水中のベンゼンについて」(以下、「通知」という。)によると、国内で流通する安息香酸およびアスコルビン酸の両剤を添加した清涼飲料水からベンゼンが検出された<sup>1)</sup>とのことであった。

現時点ではベンゼンの生成機序が明らかにされておらず、当該製品に添加された安息香酸およびアスコルビン酸のベンゼンの生成への関与が示唆されている。

そこで、安息香酸を使用する市内の清涼飲料水および醤油製造業施設で製造された製品に含まれるベンゼンの調査を行った。

あわせて、安息香酸の含有量、アスコルビン酸の使用の有無、pHおよび酸化還元電位、重金属の含有量についても調査し、ベンゼンの生成との関連性の調査を行ったところ、若干の知見を得たので報告する。

## 材料と方法

### 1. 調査期間

2006年(平成18年)8月

### 2. 対象施設

事前に聞き取り調査を行い、安息香酸または安息香酸ナトリウムの使用実態のある市内の清涼飲料水製造業5施設および醤油製造業2施設を選定した。

### 3. 対象製品

清涼飲料水および醤油のうち、安息香酸およびアスコルビン酸の両剤を添加した製品を優先し、安息香酸のみを使用した製品も対象とした。

検体数は清涼飲料水12検体、醤油3検体である。

### 4. 検査法

#### ア 安息香酸

食品衛生検査指針に基づき、HPLC法によって測定した。

#### イ ベンゼン

通知の「清涼飲料水中のベンゼンに関するQ&A」中の別紙1「清涼飲料水中のベンゼン試験法」(ヘッドスペースGC/MS法)によって測定した。

なお、希釈が必要な清涼飲料水は使用法のとおり希釈し、カキ氷シロップおよび醤油は5倍に希釈し、測定を行った。

#### ウ pH

pHメーターにより測定した。

#### エ 酸化還元電位

酸化還元電位計により測定した。

#### オ 重金属

ICP/MS法により78元素(同位体を含む。)の半定量を行った。

## 結 果

### 1. 安息香酸

15検体すべてから、0.14~0.54g/kg(安息香酸として)の安息香酸を検出した(表1)。

### 2. ベンゼン

今回の調査では、水道水質基準およびWHOの飲料水ガイドライン値の10ppbを超える検体はなかったが、検体記号F-1(以下、検体記号のみで表記する。)から1.06ppbのベンゼンを検出した。本来の検出限界(1ppb)未滿ながら、B、F-2からも0.67ppb、0.79ppbのベンゼンを検出した。F-1、F-2はアスコルビン酸の使用がないにもかかわらず、ベンゼンを検出した。

アスコルビン酸を含有するE-1、E-2、E-3を含むその他の検体からは、ベンゼンは検出されなかった。

ベンゼンを検出した検体は全て清涼飲料水で水道水を原水としており、醤油からは検出しなかった。また、安息香酸とベンゼンの検出量に相関は見られなかった(表1)。

検量線およびヘッドスペースGC/MS法の典型的なクロマトグラムを図1に示す。

### 3. pH

pHの測定値は2.4~4.9であった。

ベンゼンが検出されたB、F-1、F-2のpHはそれぞれ、2.4、4.2、4.2であった(表1)。

### 4. 酸化還元電位

酸化還元電位の測定値は-66~198mV、平均値は102mVで、全ての検体において還元系の領域にあった。

また、醤油からベンゼンは検出されていないが、3検体すべてが強い還元系にあった(表1)。

### 5. 重金属

F-1、F-2は重金属の含有量が全体的に高かった。

また、ベンゼンを検出したB、F-1、F-2はMg、Mn、Fe、Co、Sr、Sn等の含有量が比較的高い傾向が見られた(表2)。

## 考 察

ベンゼンは、安息香酸のカルボキシル基が還元されることによって生成すると考えられる(図2)。

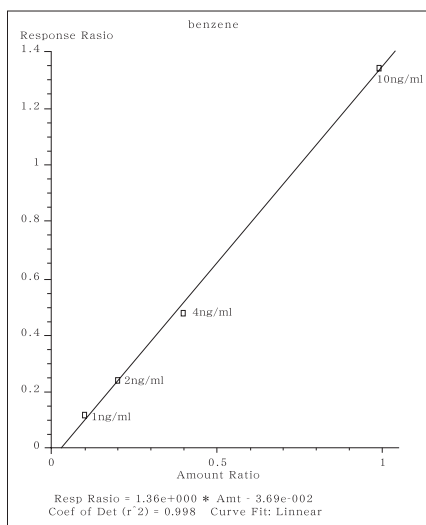
Bからベンゼンが検出されたが、アスコルビン酸を含有するE-1、E-2、E-3からはベンゼンは検出されなかった。

アスコルビン酸を含有しないF-1、F-2からもベンゼンが検出したことから、アスコルビン酸に限らず、安息香酸のカルボキシル基を還元する力のある有機酸や糖類、アルコール類等の物質が共存すると、安息香酸が還元されベンゼンが生成する可能性があることが考えられた。アスコルビン酸を含有するE-1、E-2、E-3からはベンゼンは検出されなかったが、これは添加されたアスコルビ

表1 検査結果 (重金属を除く)

検体記号	A	B	C-1	C-2	C-3	D-1	D-2	D-3		
製造者	A社	B社	C社	#	#	D社	#	#		
分類	醤油	清涼 飲料水	清涼 飲料水	清涼 飲料水	清涼 飲料水	清涼 飲料水	清涼 飲料水	清涼 飲料水		
製造日	2006/7/2	2006/6/27	2006/8/5	2006/8/5	2006/8/5	2006/6/16	2006/6/15	2006/6/27		
安息香酸 含有量	0.48g/kg	0.53g/kg	0.15g/kg	0.15g/kg	0.15g/kg	0.15g/kg	0.15g/kg	0.14g/kg		
アスコルビン酸(ビタ ミンC)の使用の有無										
アスコルビン酸 配合割合										
ベンゼン	0.00ppb	0.67ppb	0.00ppb	0.00ppb	0.00ppb	0.00ppb	0.00ppb	0.00ppb		
pH	4.7	2.4	3.9	3.8	4.1	3.5	3.4	3.5		
酸化還元電位(mV)	-66	198	168	148	138	128	150	134		
平衡電位	529	568	493	466	427	415	388	355		
平衡電位との差	-595	-370	-330	-318	-289	-287	-238	-221		
検体記号	E-1	E-2	E-3	F-1	F-2	G-1	G-2	平均値	最大値	最小値
製造者	E社	#	#	F社	#	G社	#			
分類	清涼 飲料水	清涼 飲料水	清涼 飲料水	清涼 飲料水	清涼 飲料水	醤油	醤油			
製造日	2006/8/1	2006/8/4	2006/8/4	2004/7/9	2006/4/21	2006/7/16	2006/7/16			
安息香酸 含有量	0.28g/kg	0.36g/kg	0.37g/kg	0.54g/kg	0.53g/kg	0.48g/kg	0.46g/kg	0.33g/kg	0.54g/kg	0.14g/kg
アスコルビン酸(ビタ ミンC)の使用の有無										
アスコルビン酸 配合割合										
ベンゼン	0.00ppb	0.00ppb	0.00ppb	1.06ppb	0.79ppb	0.00ppb	0.00ppb	0.17ppb	1.06ppb	0.00ppb
pH	4.2	3.5	3.4	4.2	4.2	4.8	4.9	3.9	4.9	2.4
酸化還元電位(mV)	97	153	161	118	90	-40	-41	343	198	-66
平衡電位	304	295	268	214	184	136	103	241	94	595
平衡電位との差	-207	-142	-107	-96	-94	-176	-144	-241	-94	-595

ベンゼン  
検量線



Method Name: C:\HPCHEM\1\METHODS\BENZSIM3.M  
Calibration table Last Updated: Fri Aug 11 10:29:23 2006

File : C:\HPCHEM\1\DATA\180811T\BENZ12-1.D  
Operator :  
Acquired : 11 Aug 106 5:46 pm using AcqMethod BENZESIM  
Instrument : 5989 - In  
Sample Name : 12-1  
Misc Info :  
Vial number : 23

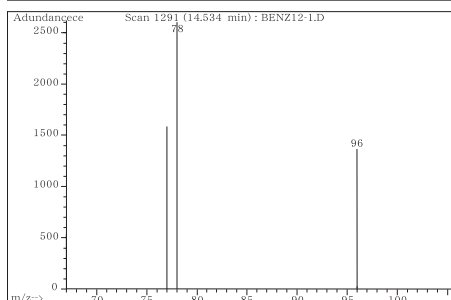
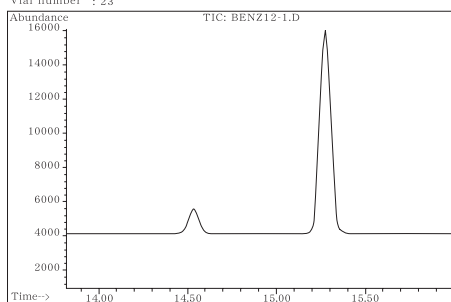


図1 検量線及びクロマトグラム



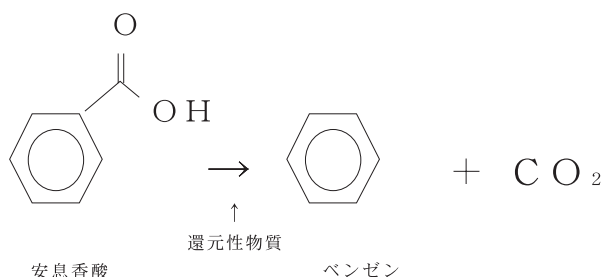


図2 化学反応式 (概念図)

ン酸がごく低濃度 (0.00125%) であることや、ベンゼンが生成されやすい何らかの条件がそろわなかったためと思われる。

また、F-1、F-2は同一製造者の同一製品で、製造日のみが異なり、先に製造されたF-1のベンゼンの検出値が高かったことから、経時的にベンゼンの生成が進むことも考えられたがデータ数が少ないため、データ数を積み上げ、経時変化の調査を行うことも検討したい。

pHおよび酸化還元電位との関連性についても調査を行ったが、全体として酸性傾向で、ベンゼンを検出した3検体にもばらつきが見られたため、pH単独での大きな関与は見られなかった。

酸化還元電位については、醤油が極めて低い値を示した。pHとあわせて考えると全ての検体で平衡電位より

還元性の雰囲気であり、酸化還元電位とベンゼンの生成との明確な関連性は不明であるが、F-1、F-2については平衡電位より還元性の雰囲気であったこともベンゼン生成の一因になったと考えられる。

また、今回重金属が還元剤の役割を果たしていることを想定して、その関与についても調査を行った結果、ベンゼンを検出したF-1、F-2で重金属の含有量が全体的に高かった。ベンゼンを検出した3検体で、取りうる価数の多い遷移金属類が比較的高濃度で含有されていたため、ベンゼン生成への金属の関与の可能性は考えられたが、それ以上踏み込んだデータ解析ができなかった。

結論として、安息香酸からのベンゼンの生成には、アスコルビン酸等の還元性物質や重金属の存在、時間の経過等様々な要因が複雑に関与している可能性が示唆された。

今後も、ベンゼン生成へのアスコルビン酸以外の有機物や重金属の関与の有無、生成の指標となる測定項目の特定等、更に調査を進め、明らかにしていきたい。

## 文 献

- 1) 厚生労働省：平成18年7月28日付け食安基発第0728008号厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長通知「清涼飲料水中のベンゼンについて」