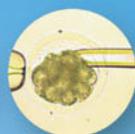


家畜の健康維持と

先端技術の開発をめざして

— 衛生・バイテク研究主要成果集 —



北海道立畜産試験場

北海道立根釧農業試験場

はじめに

新得畜産試験場および滝川畜産試験場における衛生研究は、昭和37年に種畜場および種羊場が、それぞれ試験場として改組・整備された時に始まります。また、根釧農業試験場では昭和59年の機構改革により乳牛の衛生研究がスタートしています。さらに、昭和62年には新得畜産試験場に畜産生物工学科が新設され、バイオテクノロジーを用いた試験研究を開始しています。

今日までの約40年間、牛の乳房炎や下痢症などの感染症、乳牛の起立不能症や脂肪肝、肉牛のセレン欠乏症や肝臓病などの代謝性疾患に対する診断予防技術の開発を始め、代謝プロファイルテストなどのモニタリング技術および豚のSPF化技術の実用化を図ってきました。バイオテクノロジー分野では、受精卵移植技術、クローン技術および遺伝子診断技術を用いて、八つ子のクローン牛の誕生やLAMP法による牛胚の性別判別など優れた業績を挙げています。

今回、平成12年の機構改革により畜産の試験研究体制が再編されたことを機に、これまでの衛生・バイオテクノロジー分野における試験研究から主要な成績を集め、本成果集を発行することとしました。成果は年代順ではなく、感染症、代謝性疾患、繁殖管理、モニタリング技術、受精卵移植および遺伝子診断などの各分野ごとに取りまとめています。

大腸菌O157等や加工乳による食中毒事件、牛海綿状脳症（BSE）の発生、牛肉偽装問題など、消費者の「食」の安全性への信頼が大きく揺らぐなか、本成果集が畜産技術の指導・普及に携わる方々や臨床獣医師などに広く活用され、家畜の健康維持・増進と畜産物の安全性確保に寄与することを願っております。

平成16年3月

北海道立畜産試験場長 田村千秋



目次

contents

はじめに

1. 牛の感染症診断と予防技術	1
1) 牛乳房炎の診断	2
2) 牛乳房炎の防除・予防対策	3
3) 牛乳房炎の治療	4
4) 未経産乳房炎の予防・治療	5
5) 子牛下痢症の治療・疫学	6
6) 牛ロタウイルス病の診断	7
7) 牛ロタウイルス病の予防	8
8) 子牛の呼吸器病の予防	9
9) サイレージ調製条件とリステリア属菌	10
10) 牛における腸管出血性大腸菌O157の低減技術	11
11) 肉牛における殺虫用イヤ・タグの利用	12
12) しよ糖液を用いた牛糞便内線虫卵検査法	13
2. 豚などの感染症防止とSPF化技術	15
1) 豚呼吸器感染症の予防・治療	16
2) 豚呼吸器感染症の簡易モニタリング法	17
3) 豚のSPF変換技術	18
4) SPF豚の清浄度維持と導入技術	19
5) めん羊のコリネバクテリウム感染症	20
6) 鶏卵黄抗体を用いたカスタム抗体の作成	21
3. 牛・羊の代謝性疾患診断と予防技術	23
1) 乳牛の起立不能症の発症要因	24
2) 陰イオン塩給与による乳牛の起立不能症の予防	25
3) 乳牛の脂肪肝	26
4) 乳牛の第四胃変位の発症要因とリスク評価	27
5) 乳牛およびめん羊の硝酸塩中毒	28
6) 肉牛における低マグネシウム血症の予防対策	29
7) めん羊の早春放牧と低マグネシウム血症	30
8) セレン分析法の改良と北海道のセレン欠乏実態	31
9) 子牛白筋症の予防対策	32
10) セレン補給による牛の感染防御機能向上	33
11) 肥育牛の肝臓瘍	34
12) 乳牛のカロテン・ビタミンA製剤添加効果	35
13) 乳牛の供用年数短縮の要因	36

4. 繁殖管理技術	
1) 乳牛の泌乳初期のエネルギー充足と繁殖機能	38
2) ボディコンディションと乳牛の繁殖性	39
3) 放牧時の蛋白質水準と乳牛の健康・繁殖性	40
4) 乳牛の繁殖成績に影響する要因	41
5) 周産期モニタリングによる乳牛の繁殖障害リスク評価	42
6) 乳牛の繁殖改善モニタリング	43
7) 排卵同期化による黒毛和種雌牛の定時人工授精	44
8) めん羊の季節外繁殖	45
9) めん羊の給餌時刻および夜間点灯と昼間分娩	46
10) 超音波画像解析による乳牛の繁殖機能診断	47
11) 胎子心電図による牛の双胎妊娠診断	48
12) 分娩警報装置による牛の分娩報知	49
13) 血糖値を用いた乳牛の分娩予測	50
5. 健康管理モニタリング技術	
1) 乳牛の血液成分の標準値	52
2) 代謝プロファイルテストの実用化	53
3) 乳牛におけるエネルギー不足の指標	54
4) 乳中尿素窒素によるモニタリング	55
5) 乳牛の行動解析によるモニタリング	56
6) 蹄疾患のモニタリング	57
6. 受精卵移植関連技術	
1) 牛体外受精胚の発生培地の開発	60
2) 肉牛の受精卵クロ - ン牛作出技術	61
3) 吸引法による性判別凍結胚の受胎率向上技術	62
4) 豚の受精卵移植技術の確立	63
5) 豚受精卵の液状保存とSPF豚群への応用	64
6) Hiroshima希釈液を用いた鶏精液の凍結技術	65
7. 遺伝子診断技術	
1) PCR法による小型ピロプラズマ病のDNA診断	68
2) 牛受精卵による遺伝性疾患診断法	69
3) 牛糞便中の腸管出血性大腸菌O157のPCR検出法	70
4) 牛受精卵のPCR法による性判別技術	71
5) 簡単で速い牛受精卵の性判別キット	72
6) LAMP法による牛糞便からのヨ - ネ菌遺伝子の検出	73
研究成果一覧	74



1

牛の感染症診断と 予防技術

牛乳房炎の診断

体細胞数による牛乳房炎診断の有用性を明らかにするとともに、培養法以外の方法による黄色ブドウ球菌性乳房炎の診断法について検討した。

体細胞数による乳房炎診断

主要な乳房炎起因細菌が検出されなかった分房乳の平均体細胞数は分娩直後および泌乳末期を除き、10万個/ml未満であった(図1)。主要な乳房炎起因細菌である黄色ブドウ球菌、減乳糖連鎖球菌および乳房連鎖球菌が検出された分房乳の平均体細胞数はいずれも20万個/ml以上を示した(表1)。しかし、黄色ブドウ球菌が検出された分房乳の36(23+13)% (図2)、乳房連鎖球菌が検出された分房乳の14.6%は体細胞数が10万個/ml未満であった。したがって、体細胞数が20万個/mlを越える乳汁は、乳房炎起因細菌に感染している可能性が高いが、体細胞数が低くても乳房炎起因細菌に感染している場合もある。

モノクローナル抗体を用いたELISA法による黄色ブドウ球菌の検出

黄色ブドウ球菌(SA)の標準株のひとつであるWood46株をマウスに免疫した後、その脾臓細胞とマウスミエローマ細胞を融合させたハイブリドーマを作製し、同菌に対するモノクローナル抗体を得た。また、同菌をウサギに免疫し、血液から同菌に対するポリクローナル抗体を作製した。これらの抗体を用いたサンドイッチELISA法によるSAの検出法を開発した。このELISA法ではSA以外のコアグラーゼ陰性ブドウ球菌、連鎖球菌、大腸菌は反応せず、特異性の高さが確認された。このELISA法の感度は $10^7 \sim 10^8$ CFU/mlであるので(図3) 試料を37℃で12時間程度インキュベートして増菌する必要がある。

【昭和63年度、平成5年度 新得畜試】

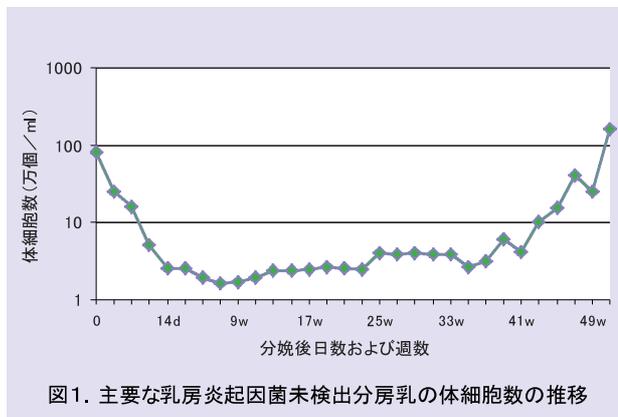
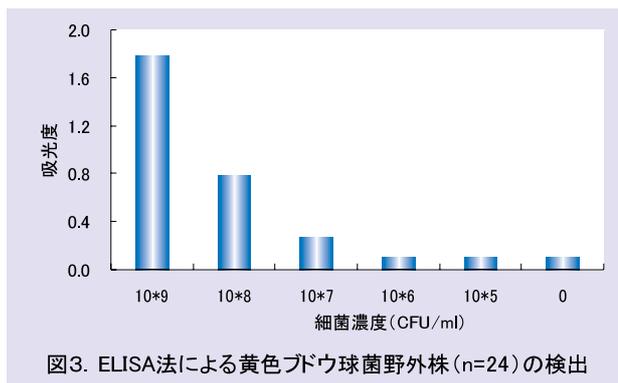
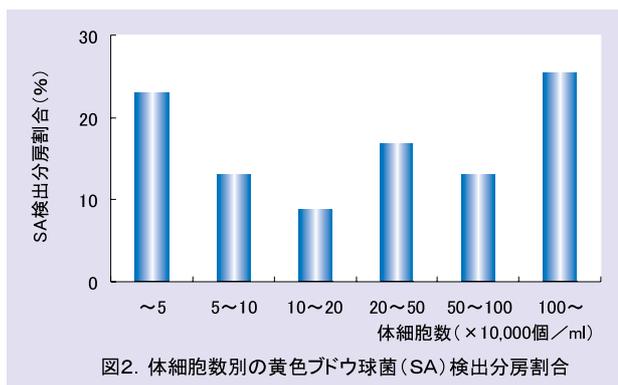


表1. 細菌種別の体細胞数(分房乳)

細菌種	体細胞数(万個/ml)
黄色ブドウ球菌 (n=161)	24.5
減乳糖連鎖球菌 (n=4)	86.3
乳房連鎖球菌 (n=116)	24.7
コアグラーゼ陰性ブドウ球菌 (n=376)	8.5
コリネバクテリウム・ボビス (n=241)	6.4
細菌 - (n=763)	2.8



牛乳房炎の防除・予防対策

乾乳時の持続性抗生物質注入やプレディッピングなど、搾乳衛生を中心した牛乳房炎の防除・予防対策を示した。

黄色ブドウ球菌性乳房炎の防除法

黄色ブドウ球菌性乳房炎の感染率が50%を越える牛群において、ティートディッピング、個体毎の清拭タオルの交換とティートカップの消毒、泌乳期治療、乾乳期治療、前搾り乳のストリップカップテスト、定期的な牛床消毒（月2回）などの搾乳衛生の徹底を図るとともに、治療無反応牛の淘汰により、牛群の黄色ブドウ球菌保菌牛率は10%以下に減少した（図1）。

乾乳期における乳房炎予防

乾乳時に持続性抗生物質（ペニシリン+ストレプトマイシン）を注入した分房と、無注入の分房を比較した。乾乳3週後における乳房炎新規感染割合は、注入分房が12.3%（11/89）、無注入分房が26.4%（23/87）であり、抗生物質注入の新規感染予防効果が確認された（表1）。

プレディッピングの乳房炎予防効果

プレディッピング用としても認可された0.1%ヨウ素乳頭消毒剤を用いて、プレおよびポストディッピングを行ったプレディッピング群（14頭）とポストディッピングのみを行った対照群（15頭）の乳房炎発生割合を比較した。プレディッピング群は乳房炎の発生がなかったが、対照群は4頭の環境性細菌による乳房炎の発生がみられた（表2）。また、ミルクー装着直前の乳頭表面細菌数もプレディッピング群の方が少なかった（図2）。乳汁中ヨウ素濃度は、プレディッピング（0.1%ヨウ素濃度製剤）と一般的な洗浄を比較しても差が認められなかった（図3）。これらから、プレディッピングは環境性細菌による乳房炎に対して予防効果があることが示された。【昭和58年度、平成6・10・13年度 新得畜試・根釧農試】

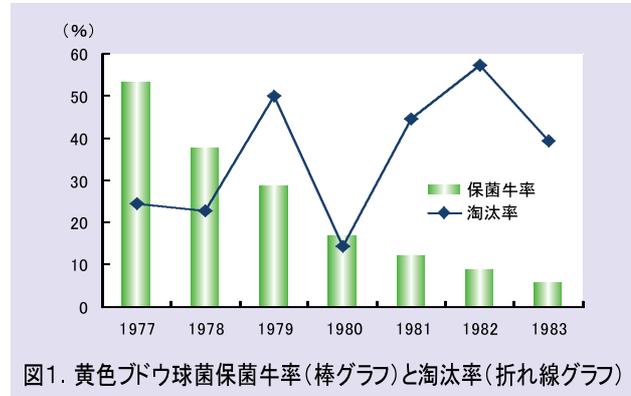


表1. 乾乳時の持続性抗生物質注入と乾乳中期の細菌感染分房の割合

	乾乳前の感染状況	処理分房数	感染分房数	割合 (%)
対照区	非感染	87	23	26.4
	感染	6	3	50.0
注入区	非感染	89	11	12.4
	感染	17	7	41.1

表2. 乳房炎発生率

プレディッピング群	0% (0 / 14)
対照群	27% (4 / 15)

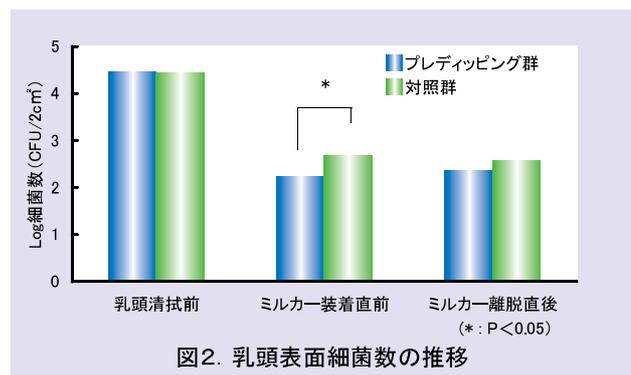


図2. 乳頭表面細菌数の推移

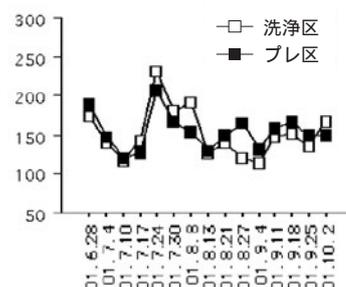


図3. 乳汁中ヨウ素濃度 (µg/L) の推移

牛乳房炎の治療

早期診断に基づく泌乳期早期治療により、細菌種を問わず、高い治癒率が得られることを明らかにした。また、サイトカインなど感染防御機能を高める治療法についても検討した。

早期診断に基づく乳房炎の泌乳期治療

畜試の搾乳牛群において、分娩直後、乳汁の異常や体細胞数の高値がみられた時、分房乳の細菌検査を行い、乳房炎起因細菌が検出された場合には、抗生物質の乳房内注入（重度では全身投与も併用）を1日1~2回、3日連続を1クールとした治療を行った。黄色ブドウ球菌の治癒率は、5日後で平均96%、21日後で74%であり、治療回数は1.2クールであった（表1）。また、環境性連鎖球菌や大腸菌などでも同様の成績が得られた。

牛の白血球機能増強法

薬剤投与により、牛の感染防御機能において重要な役割を担っている白血球（好中球）機能の増強法を検討した。薬剤は水溶性リポフラビン、テルペン系化合物ジヒドロヘプタプレノール（DHP）およびサイトカインの一種である顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子（rboGM-CSF）を用いた。いずれの薬剤も牛の皮下あるいは静脈内投与により、血液中の好中球殺菌機能の増強効果が確認された（図1、図2）。

サイトカインによる牛乳房炎の治療

組換えウシ型rboGM-CSFの乳房内注入による乳房炎治療効果を検討した。黄色ブドウ球菌に感染した牛5頭（5分房）、環境性連鎖球菌に感染した牛5頭（5分房）を用いた。2回目の注入後細菌が消失した分房は1分房（牛155C）、一時的に細菌が消失した分房は4分房、細菌数が一時的に減少した分房は5分房であった（表2）。これらから、サイトカインによる乳房炎治療の可能性が示唆された。

【平成5・11年度 新得畜試】

表1．黄色ブドウ球菌による乳房炎の治療成績

年次	5日後治癒率	平均治療回数	21日後治癒率
1988	100(20/20)*	1.4**	75(15/20)*
1989	100(20/20)	1.2	78(14/18)
1990	100(11/11)	1.0	91(10/11)
1991	87(20/23)	1.2	54(7/13)
計	96(71/74)	1.2	74(46/62)

* : % (治癒分房数 / 治療分房数)
** : クール数 / 分房

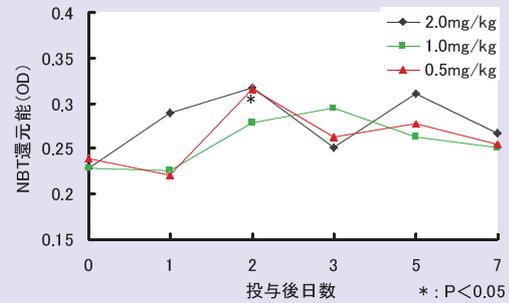


図1. DHP投与後の好中球NBT還元能の推移

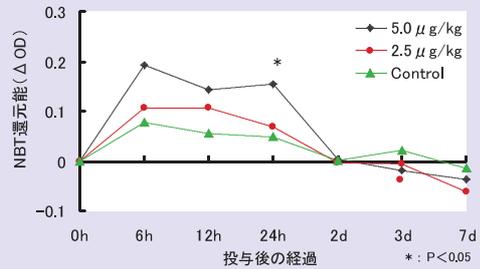


図2. rboGM-CSF投与後の好中球NBT還元能の推移

表2．rboGM-CSF乳房内注入による乳房炎治療成績

牛・分房	投与量	投与回数	細菌種	治療効果
20B	200 μg	3	SA	+
46B	"	1	"	++
103C	"	3	"	++
53D	"	1	OS	±
115D	"	1	"	+
54D	"	1	"	++
20C	"	1	"	±
103D	"	1	"	+
155C	400 μg	1	SA	++
"	"	1	"	+++
182B	"	1	"	++

分房 B : 左後 C : 右前 D : 右後
細菌種 SA : 黄色ブドウ球菌 OS : 環境性連鎖球菌
治療効果 ± : 細菌数が減少したが、治療開始時の10%未満にならず。
+ : 細菌数が治療開始時の10%未満。
++ : 細菌数が一時的に検出限界（20CFU/ml）以下。
+++ : 細菌数が1か月以上検出限界以下。

未経産乳房炎の予防・治療

未経産乳房炎の発生実態を明らかにするとともに、本症の予防にダストバックが有効であることを示した。また、菌体不活化ワクチンの感染予防効果を確認した。

未経産乳房炎の発生実態

留萌、空知、十勝、渡島地方で自然症例をそれぞれ40～54例観察したところ、発生は8～9月に多く（図1）、放牧中がほとんどを占め、13～18か月齢で最も多かった。自然症例で採取した26例の膿汁からコリネバクテリウム・ピオゲネス（C.p.現アルカノバクテリウム・ピオゲネス）（100%）、ペプトコッカス・インドリクス（P.i.）（88.5%）が主に検出された。

外部寄生昆虫防除による予防効果

カーバメイト系殺虫剤含有ダストバック（DB）の予防効果を検討したところ、発症率はDB強制利用牧野で最も低く、DB自由利用牧野、非利用牧野の順となり、DB強制利用牧野と非利用牧野間に有意差が認められた（表1）。

発症初期牛に対する治療効果

18～20か月齢の若雌牛2頭6分房にC.p.10⁹CFUを乳房内接種後、3日目あるいは7日目にP.i.10¹⁰CFUをそれぞれ3分房に接種した。C.p.接種10日後から膿汁排除後乳房炎軟膏の注入（連日）、抗生物質の筋肉内投与、エストラジオール製剤の投与（隔日）、DMSOあるいはプレドニゾロンを病状に合わせて併用し、治療の可能性を検討した。C.p.感染7日後にP.i.を重複感染させた分房では予後の泌乳が期待できる治療成績が得られたが、C.p.感染3日後にP.i.を感染させた分房では線維化が進み、硬結あるいは閉塞状態に陥り、治療効果は認められなかった。

ワクチンによる予防効果

20～22か月齢のホルスタイン雌牛6頭を用い、各々2頭にC.p.およびP.i.の菌体不活化ワクチン、C.p.およびP.i.の超音波処理ワクチン、C.p.ヘモリジン+C.p.プロテアーゼワクチンを2週間隔で筋

肉内および乳房内に接種し、その6週後にC.p.10⁹CFU/mlおよびP.i.10¹⁰CFU/mlの混合菌液2mlの乳房内攻撃を行った。発症分房数は1/8、8/8、4/8で、菌体不活化ワクチンの感染予防効果が高い傾向が認められた（表2）。

【昭和55・59年度 新得畜試・滝川畜試】

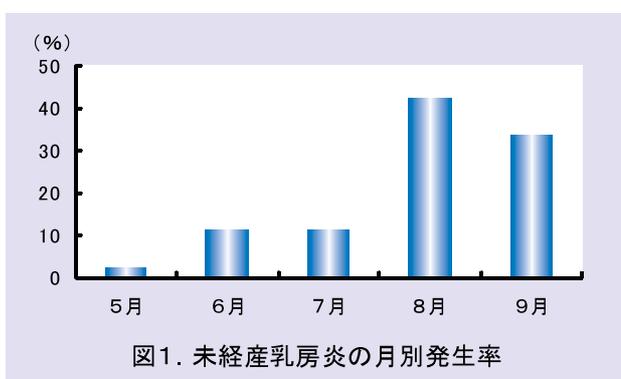


表1. ダストバックの利用と未経産乳房炎発症率

ダストバック利用法	牧野	平均発症率 (%)
強制利用	A	0.1
	B	1.0
	C	0.0
	平均	0.5*
自由利用	D	0.8
	E	1.9
	平均	0.8
非利用	F	0.6
	G	1.5
	A	0.0
	C	1.0
	平均	0.9

* P < 0.05 (DB非利用牧野に対して)

表2. C.p.ワクチンの安全性と効果

群	基礎免疫 局所腫脹		補強免疫						攻撃後の 発症分房
	1週	2週	1週	2週	3週	4週	5週	6週	
+	-	CM	CM	WM	ND	WM	WM	1/8	
+	+	P	P	P	ND	CM	(-)	8/8	
-	-	CM	CM	CM	ND	(CM)	(-)	4/8	

CM：凝固乳 WM：水様乳汁
P：膿汁 NO：検査せず

子牛下痢症の治療・疫学

経口電解質液の投薬器を用いた子牛下痢症の治療効果ならびに、ロタウイルス、K99保有大腸菌およびコロナウイルスの感染実態を明らかにした。

子牛下痢症に対する経口電解質液の治療効果

肉専用種の子牛下痢症の治療用に、経口電解質液投薬器を試作した(図1)。イルリガートルと導尿カテーテルを組み合わせた投薬器は、簡単かつ確実に経口電解質液2Lを約3分間で投与できる。経口電解質液を投与した子牛は、下痢持続期間が短く、血液成分および臨床症状においても病態改善効果が認められた。

子牛下痢症の発生要因

道内の肉専用種一貫経営の3農場において、2か月齢未満の下痢子牛から採取した糞便110例を用いて、牛ロタウイルス(BRV)およびK99保有大腸菌の浸潤度調査を行った。BRVはいずれの牛群からも検出され(15.4~30.4%)、道内での蔓延が推測された。K99保有大腸菌は2農場から検出されたが(表1)、検出日齢が2~3日齢の子牛に限られたことが注目された。

別の肉専用種農場の調査では、融雪によりパドックが泥濘化する3月~4月にかけてロタウイルスによる下痢が多発し、感染子牛の日齢は出生後数日~60日齢にわたっていた。この時期の母牛乳頭表面の大腸菌群数は、乾燥期に比べて多く、発生要因のひとつと考えられた(表2)。また、一部の子牛に低IgG血症が認められ、初乳摂取量および初乳中抗体量の不足の関与が示唆された。

従来分離が困難であったため感染実態に不明な点が多かった牛コロナウイルス(BCV)について、同ウイルスに感受性が高いヒト直腸癌由来株化細胞(HRT18)を用いて、野外の下痢子牛から分離を試みた。下痢便170例中3例からウイルスが分離され(図2)、道内の子牛下痢にBCVが関与していることが明らかとなった。

【昭和59・63年度 新得畜試】

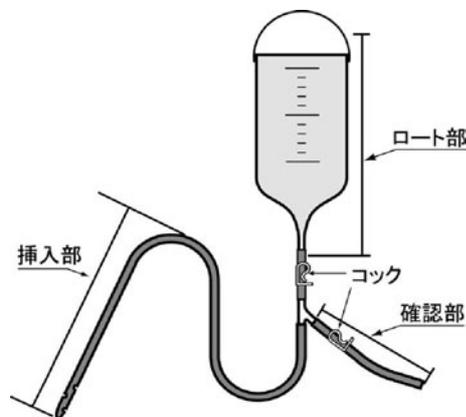


図1. 経口電解質液投薬器

表1. 野外下痢便における牛ロタウイルスおよびK99保有大腸菌の検出割合

農場	牛ロタウイルス	K99保有大腸菌
A	7 / 41	0 / 30
B	2 / 13	3 / 13
C	17 / 56	1 / 44

数字は陽性数 / 検査数

表2. 乳頭表面の大腸菌群汚染状況

時期	検査乳頭数	汚染乳頭割合	汚染乳頭の平均スコア
泥ねい期	80	61.3	1.71
乾燥期	32	9.4	1.00

スコア1: 大腸菌群数 1~9 CFU/10cm²
 スコア2: " 10~29 "
 スコア3: " 30~99 "
 スコア4: " 100 "

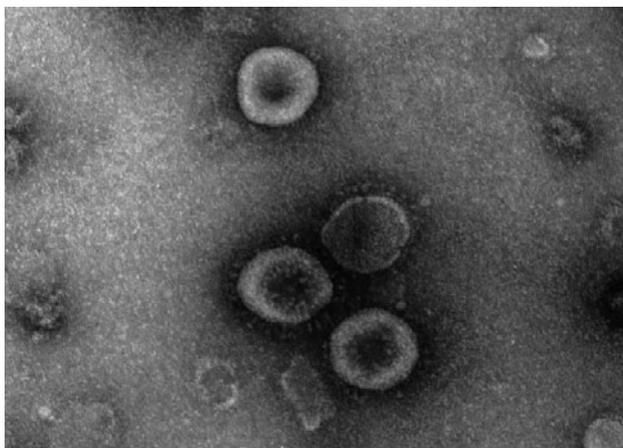


図2. ウシコロナウイルス

牛ロタウイルス病の診断

牛ロタウイルス病のELISA法を用いた診断法を確立するとともに、免疫クロマトグラフィ法の有用性を明らかにした。

牛A群ロタウイルスの検出法

牛A群ロタウイルスに対するモノクローナル抗体を作製し、これを用いた牛A群ロタウイルス(BRV)検出用サンドイッチELISA法を開発した。この方法の検出限界はBRV Lincoln株の完全粒子で98ng/ml、内殻粒子では24ng/mlであった。野外の下痢便材料を用いてELISA法とウイルス分離法を比較すると、一致率は95%と高い値を示した(表1)。これらから、この方法は牛A群ロタウイルス病の診断に有効な方法であることが明らかとなった。

免疫クロマトグラフィ法によるロタウイルス検出キット(スウェーデン製)の有用性をラテックス凝集法と比較した。ロタウイルス実験感染子牛の糞便では、両者の検出結果は一致し、野外下痢子牛では一致率は83.8%で、検出率は免疫クロマトグラフィ法の方が高かった(表2)。この方法は操作が簡単で検査時間も短く、有用性の高さが確認された。

牛C群ロタウイルスの検出法

下痢を示した乳牛(28~41カ月齢)の糞便から、世界で初めて牛C群ロタウイルスを分離した(図1)。これらの粒子は直径約70nmで二重殻構造を有していた。このウイルス粒子は抗C群ロタウイルス血清により凝集したが、抗A群ロタウイルス血清では凝集しなかった。RNA-PAGEパターンも豚C群ロタウイルスのものと類似していた。さらに、ELISA法を用いた同ウイルスの診断法を開発した。この方法では、C群ロタウイルスを含む材料は、豚、牛、人のすべての株で陽性を示したのに対し、AあるいはB群ロタウイルスを含む材料はすべて陰性であった(表3)。検出感度は、電子顕微鏡と同程度であった。

【昭和63年度、平成7・12年度 新得畜試・畜試】

表1. 野外の下痢便材料におけるELISA法とウイルス分離法による牛ロタウイルスの検出

ELISA法	ウイルス分離法	例数
+	+	22
+	-	4
-	+	3
-	-	58

表2. 野外の下痢発症子牛におけるウイルス検出法の比較

	ラテックス凝集法			一致率 %	
	+	-	判定不能		
免疫クロマト法	+	19	10*	1	83.8
	-	2**	43	1	
	判定不能	0	2	0	

* : 10検体中8検体からRNA-PAGEでウイルスRNA検出
** : 2検体ともRNA-PAGEでウイルスRNA検出されず

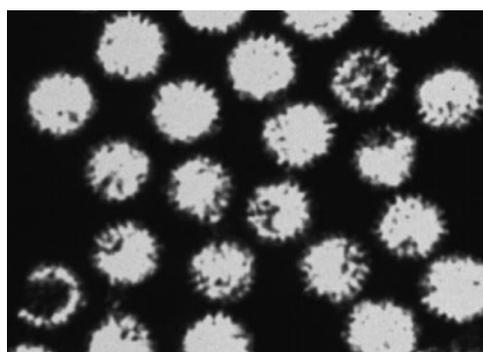


図1. 牛C群ロタウイルス

表3. C群ロタウイルス抗原検出用ELISAの特異性

ELISA法	ウイルス分離法	P/N比
豚 / C / Cowden	0.484	12.8
豚 / C / WH	1.996	24.3
豚 / C / KH	0.126	4.6
豚 / C / Ah	0.355	10.4
豚 / C / NB	2.732	6.1
豚 / C / Wi	0.139	4.6
牛 / C / Shintoku	0.766	8.3
人 / C / Ehime88-182	0.431	7.0
人 / C / Ehime88-196	2.985	46.5
人 / C / Ehime88-261	0.467	8.1
豚 / A / OSU	0.041	1.5
豚 / A / Gottfried	0.068	0.9
牛 / A / NC DV	0.070	1.1
人 / A / Wa	0.066	1.2
豚 / B / Ohio	0.055	0.9
牛 / B / ATI	0.075	0.9
ウイルス陰性材料	0.044	1.1

牛ロタウイルス病の予防

乳牛に牛ロタウイルスを免疫して得られた初乳を新生子牛に給与することにより、下痢症の発生が抑制され、乳汁免疫による牛ロタウイルス病予防の可能性を示した。

免疫初乳による牛ロタウイルス病の予防

初乳未摂取新生子牛19頭を用い、牛ロタウイルスの感染試験を行った。免疫初乳群（5頭）は、乳牛にロタウイルスを免疫して得られた免疫初乳（1および2型に対する中和抗体価25,000、35,000）を10%混和した代用乳を感染2時間前、次いで感染後1日2回、5日間給与した。正常初乳群（4頭）は、ロタウイルスで免疫しない乳牛の初乳（同中和抗体価4,000、5,300）を免疫初乳群と同様に給与した。対照群（10頭）は代用乳のみを給与した。

対照群は、感染24～48時間後から下痢を示し、最終的に10頭中7頭が死亡した。これに対し、免疫初乳群は、初乳給与中5頭中4頭は下痢を認めず、すべてウイルスは検出されなかった。正常初乳群は4頭すべてが下痢を示し、3頭からウイルスが検出されたが、症状は軽度ですべて生存した（表1）。

ワクチンによる牛ロタウイルス病の予防

牛A群ロタウイルスにフロイド不完全アジュバントを加え免疫原としたワクチンを作成し、分娩4～14週前の妊娠牛9頭（免疫群）に、筋肉内投与、その2週後に乳房内投与を行った。免疫群の血清中および乳汁中の中和抗体価は、分娩時および分娩4週後ともに対照群（10頭）より有意に高い値を示した（表2、3）。これらの牛から生まれた子牛の下痢発生率は、免疫群で55.6%、対照群で100%であった。これは母子免疫により牛ロタウイルス病を予防できることを示している。

血清中中和抗体の牛ロタウイルス病予防効果

自然哺乳を行っている肉専用種農場において、生後14日以内に牛ロタウイルスによる下痢を発症した子牛と発症しなかった子牛の生後2日目の血清中ウイルス中和抗体価は、前者が後者よりも有意に低かった（表4）。また、ロタウイルス病子牛において、同中和抗体価と下痢持続日数、下痢スコアならびにウイルス排泄日数とは負の相関が認められた。

これらから、乳汁免疫による牛ロタウイルス病の予防の可能性が明らかとなった。

【昭和63年度、平成7・12年度 新得畜試・畜試】

表1. ロタウイルス感染に対する初乳の効果

処 理	感染ウイルス	供試 頭数	下痢 頭数*	ウイルス 検出頭数*	死亡 頭数
免疫初乳群	ロタウイルス1型	3	1	0	0
	ロタウイルス2型	2	0	0	0
	小 計	5	1	0	0
正常初乳群	ロタウイルス1型	2	2	2	0
	ロタウイルス2型	2	2	1	0
	小 計	4	4	3	0
対 照 群	ロタウイルス1型	6	6	6	5
	ロタウイルス2型	4	4	4	2
	小 計	10	10	10	7

*：初乳（対照群は代用乳）給与期間中

表2. 筋肉内および乳房内免疫後の血清中A群ロタウイルス中和抗体価

処 置 (頭数)	Lincoln		KK3	
	分娩時	分娩4週後	分娩時	分娩4週後
免疫群(9)	32,359a	22,387a	17,378a	12,589a
対照群(10)	490b	794b	832b	955b

異文字間に有意差あり

表3. 筋肉内および乳房内免疫後の乳汁中A群ロタウイルス中和抗体価

処 置 (頭数)	Lincoln		KK3	
	分娩時	分娩4週後	分娩時	分娩4週後
免疫群(9)	309,030a	2,344a	229,086a	1,288a
対照群(10)	3,388b	25b	7,585b	28b

異文字間に有意差あり

表4. 子牛血清中の総蛋白質(TP)濃度、免疫グロブリン(IgG)濃度およびウイルス中和抗体価

	TP(g/dl)	IgG(mg/ml)	中 和 抗体価
ロタウイルス病子牛(n=30)	5.8 ± 0.9*	21.1 ± 12.7*	442a
正常子牛(n=23)	6.0 ± 0.9	22.6 ± 12.2	947b

*：平均値 ± 標準偏差
異文字間に有意差あり (P < 0.05)

子牛の呼吸器病の予防

マイコプラズマ性肺炎の発病機構における複合感染と血液中抗体価との関連を明らかにし、子牛の呼吸器病予防のための初乳給与法を示した。

乳用雄子牛の集団哺育における損耗率

道内10箇所の乳用雄子牛哺育・育成農場の実態調査（昭和47年）では、損耗率は2～15.2%であり、そのうち下痢と肺炎によるものが89.3%を示した。損耗率は畜舎の衛生管理および畜舎環境が不備な農場ほど高かった。

マイコプラズマ性肺炎の発症機構

マイコプラズマの感染は、乳用雄子牛導入時の感染牛と未感染牛の同居や、畜舎内のマイコプラズマ汚染により、容易に成立することを明らかにした。子牛にマイコプラズマ・ボビス（*M. bovis*）およびパラインフルエンザウイルス3型（PIV-3）を単独感染させた場合には、軽度な肺炎病巣が形成された。複合感染では*M. bovis*接種時にPIV-3抗体価の低い牛が、臨床症状および肺炎病巣が重かった（図1）。このことは子牛肺炎の予防に初乳給与が重要であることを示している。

子牛への初乳給与

初乳を出生後4、8および12時間に1回給与（1.2kg）した子牛は、出生後12時間に血清総蛋白質およびγ-グロブリンが急増した。しかし、出生後24時間に給与した子牛は、4日目までほとんど増加しなかった（図2）。これは出生後24時間には初乳蛋白質の吸収能が非常に低下しているを示している。

また、分娩前の母牛にワクチンを接種することにより、子牛の疾病と関連が深いウイルスに対する抗体が、確実に含まれる初乳を作出できた。その初乳を摂取した子牛の血液中抗体は6～20週齢まで陽性を示した。初乳の1回給与量は、少なくとも体重1kg当たり35mlが必要と考えられた（図3）。

【昭和48・51・55・59年度 新得畜試・滝川畜試】

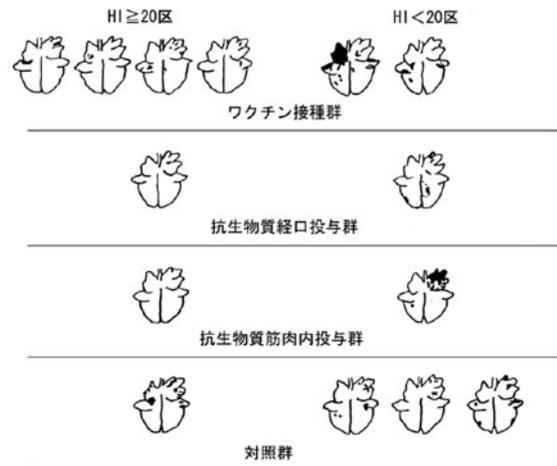


図1. *M. bovis*とPIV-3の複合感染試験における肺の肉眼病変

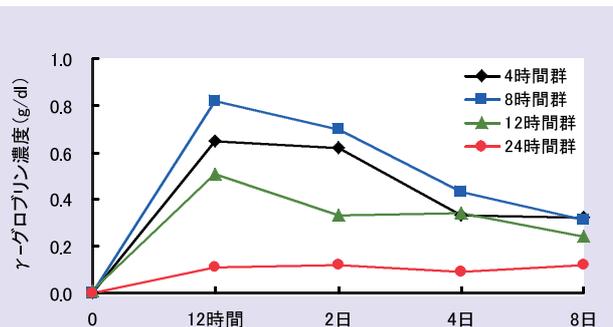


図2. 出生後の初乳給与と時間別γ-グロブリン濃度の推移

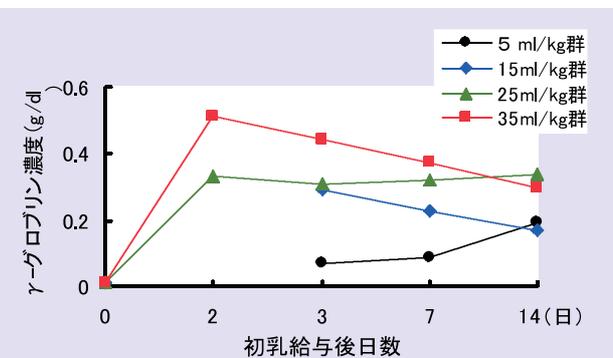


図3. 初乳給与と量別γ-グロブリン濃度の推移

サイレージ調製条件とリステリア属菌

リステリア属菌はタワーサイロおよびバンカーサイロの表層部とラップサイレージに広く分布するが、サイレージ発酵が良好な部位ではその増殖は抑えられる。

各種サイレージのリステリア属菌汚染状況

リステリア (Listeria) 菌によるサイレージの汚染は、牛や羊のリステリア脳症の原因となるばかりでなく、生乳への汚染は食品衛生上問題となる。根釧農業試験場で調製した各種牧草サイレージを対象に、リステリア属菌 (L属菌) の分離状況を調査した結果、タワーサイロおよびバンカーサイロで調製したサイレージでは、表層部 (シ - トの直下および下10 ~ 15cm)、特にサイロの壁際でL属菌が多数分離された (表1)。しかし、タワーサイロのシ - ト下110cm以下およびバンカーサイロのシ - ト下30cmでは、L属菌はほとんど分離されなかった。

ロ - ルベールラップサイレージ (以下ラップサイレージ) では、表層部と同様に内側からもL属菌が分離された (表2)。フィルムの巻き数による違いはみられず、穴のあるペ - ルでL属菌が多く分離された。翌春開封したラップサイレージからも多くのL属菌が分離されたことから、L属菌は耐寒性があり、春の高温で増殖する可能性もある。

また、実験的にサイレージ調製条件とL属菌分離状況の関係を検討したところ、フィルムに開けた穴が多いほど多数のL属菌が分離された。しかし、ギ酸添加による低減効果はみられなかった (表3)。

pH4.5以下ではL属菌の発育は困難

各種サイレージのpHと、L属菌分離状況との関係を見ると、L属菌はサイレージのpHが6.6以上で高率に分離され、4.5以下では少ない傾向がみられた (表4)。

これらから、タワーサイロおよびバンカーサイロの表層部とラップサイレージには、L属菌が広く分布するが、サイレージ発酵が良好な部位では、L属菌の増殖は抑えられると考えられた。また、ラップサイレージでは、調製時やカラスなどにより開けられた穴は塞いでおくことが大切である。

【平成11年度 根釧農試】

表1. 牧草サイレージのL属菌分離状況とPH

	表 層		内 側	
	L属菌数	PH	L属菌数	PH
タワー - サイロ				
シ - ト直下	5.8	8.9	2.5	4.4
シ - ト下10 ~ 15cm	4.0	6.6	4.4	4.8
シ - ト下35 ~ 40cm	2.0	4.4	2.0	4.4
シ - ト下110cm	0	4.3	2.0	4.4
シ - ト下170cm	0	4.1	0	4.8
バンカ - サイロ				
シ - ト直下	6.0	7.1	2.5	4.2
シ - ト下10 ~ 15cm	5.7	7.2	1.5	4.5
シ - ト下30cm	0	4.1	0	4.1

注1) 穴の右の数字は、穴の数を示す。

注2) L属菌数は指数平均値を示す。

表2. ロ - ルベ - ルサイレージのL属菌分離状況とPH

	表 層		内 側	
	L属菌数	PH	L属菌数	PH
4重巻き	2.7	5.0	2.7	5.0
6重巻き	4.0	8.3	1.0	5.0
8重巻き	4.3	5.4	4.0	5.6
翌春開封	5.8	5.6	4.3	5.3

注) L属菌数は指数平均値を示す。

表3. 牧草サイレージの調製条件とL属菌数

	無添加			ギ酸添加		
	穴0	穴3	穴30	穴0	穴3	穴30
高水分	0	0	1.8	0	0	4.0
中水分	0	3.0	6.0	0	2.6	4.2
低水分	0	2.2	6.6	0	0.6	・

注1) L属菌数は指数平均値を示す。

注2) 穴の右の数字は、穴の数を示す。

表4. 各種サイレージのPH域別 L属菌分離状況

	L属菌分離状況					
	4.5以下		4.6 ~ 6.5		6.6以上	
タワー - サイロ	15/66	23%	4/10	40%	9/10	90%
バンカ - サイロ	4/7	57%	1/3	33%	5/5	100%
ロ - ルベ - ル	2/32	6%	50/242	21%	8/19	42%

牛における腸管出血性大腸菌O157の低減技術

腸管出血性大腸菌O157はその保菌牛群内で再感染を繰り返して維持されている。その低減には、牛床への消石灰の散布消毒や感受性のあるサルファ剤の投与が有効であった。

O157の疫学的調査

O157の高率保菌牛群において個体別の排菌状況を継続的に調査したところ、2～3週間の単位で排菌牛は交替していた(表1)。O157の保菌牛群では、牛群内でO157の再感染が繰り返されることによって高保菌状態が維持されていた。

消石灰散布による再感染の防止

牛群内での再感染を減らすため、牛床への定期的な消石灰の散布消毒(週1回0.5kg/m²)を行ったところ、O157保菌率の低減が認められた(表2)。低減対策には環境中の菌を減らす対策、すなわち消石灰などによる消毒や敷料交換などを定期的に行うことが有効と考えられた。

サルファ剤投与による排泄低減

牛から分離されたO157の多くは種々のサルファ剤や抗生物質に感受性を示したが、一部は耐性を示した(表3)。感受性株のO157保菌牛群に対しては、サルファ剤(スルファモノメトキシ)の複数回投与でO157を排除あるいは低減することができた(表4)。しかし、耐性菌の場合は効果が認められないことから、投与時には保菌株の薬剤感受性を検査する必要がある。

その他の排泄低減方法の検討

O157に対し発育抑制効果があるとされる枯草菌や乳酸菌主体の生菌製剤2種の投与ではO157の低減効果は認められなかった。また乾草単独給与を行った場合、短期間(5～7日間)の給与では低減効果は不安定であった。

【平成15年度 畜試】

表1 O157濃厚感染牛群における個体別排菌状況

牛No.	初回検査		1週後		2週後		3週後	
	排菌*	菌数**	排菌*	菌数**	排菌*	菌数**	排菌*	菌数**
1	-	<3.30	+	<3.30	+	<3.30	-	<3.30
2	-	<3.30	-	<3.30	+	<3.30	+	<3.30
3	+	7.41	-	<3.30	-	<3.30	-	<3.30
4	+	7.00	+	3.60	-	<3.30	-	<3.30
5	-	<3.30	+	<3.30	+	4.56	-	<3.30
6	-	<3.30	+	<3.30	+	<3.30	+	<3.30
7	-	<3.30		4.30	-	<3.30	-	<3.30
8	-	<3.30	-	<3.30	+	5.51	+	6.87
9	-	<3.30	-	<3.30	-	<3.30	+	4.30
10	+	3.30	+	<3.30	-	<3.30	-	<3.30

注) *検出は免疫磁気ビーズ法。 **菌数の対数/g糞便(検出限界: 3.30)

表2 牛床への消石灰散布によるO157陽性率の推移

	消石灰散布区	対照区
散布前	16/18 (88.9)	10/18 (55.6)
定期散布1ヵ月後	3/17 (17.6)	6/15 (40.0)

注) 陽性頭数/検査頭数(%), 消石灰の散布は週1回0.5kg/m²

表3 十腸管内で分離されたO157、20株における薬剤感受性

	SMMX	SO	SXT	OTC	SM
感受性	14 (70%)	18 (90%)	18 (90%)	17 (85%)	18 (90%)
中間	1 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)
耐性	5 (25%)	2 (10%)	2 (10%)	3 (15%)	1 (5%)

注1) 一部耐性が認められたのは表に示した5種の抗菌剤のみで、他の抗菌剤は全て感受性であった。

注2) SMMX: スルファモノメトキシ、SO: スルファモノメトキシ・オルメトプリム合剤、SXT: スルファジメトキシ・オルメトプリム合剤、OTC: オキシテトラサイクリン、SM: ストレプトマイシン

注3) SMMXについては判定基準がないため、便宜的に感受性: MIC: 100, 中間: MIC100 < ~ 400, 耐性: MIC400 < ~ 阻止円無しとした。

表4 サルファ剤投与によるO157陽性率の推移

	SMMX投与区	SO投与区	対照区
投与前	5/8 (62.5)	8/8 (100.0)	3/9 (33.3)
第1回投与後	1/8 (12.5)	2/8 (25.0)	3/9 (33.3)
第2回投与後	1/8 (12.5)	3/8 (37.5)	7/9 (77.7)
全試験区へのSMMX投与後	0/8 (0.0)	0/8 (0.0)	0/9 (0.0)

注1) 陽性頭数/検査頭数(%), 検出はPCR法(検出限界1CFU/0.2~0.5g糞便)

注2) SMMX(スルファモノメトキシ)、SO(スルファモノメトキシ・オルメトプリム合剤)、飼料添加5日間

肉牛における殺虫用イヤータッグの利用

殺虫用タッグの肉牛への装着は、ハエ、ノシバエ等の害虫を長期に防除して、放牧牛の増体を向上し、伝染性角結膜炎の発症を少なくすることを明らかにした。

衛生昆虫の防除

放牧開始前に殺虫剤を含む合成樹脂製のイヤータッグ（以下殺虫用タッグ）を両耳または片耳に取り付けること（図1、図2）は、母牛と子牛のいずれにおいても両耳装着または片耳装着に差はなく、牛体に付着するノシバエやハエを長期間にわたって少なくすることを明らかにした（図3）。



図1 殺虫用タッグとアプリケーター

増体量の改善

殺虫用タッグの装着は、両耳装着または片耳装着のいずれにおいても放牧期における母牛の増体量を向上させ、また両耳装着は子牛において増体量を向上させる効果がみられた（表1）。



図2 子牛の両耳に殺虫用タッグを装着

忌避行動と伝染性角結膜炎の予防

両耳または片耳への殺虫用タッグ装着により、牛は尻尾を振る、皮膚を震わせるなどのノシバエやハエ等を追い払う動作が少なかった。

ハエは伝染性角結膜炎の伝播に係わっていることが知られているが、本試験において殺虫用タッグを装着した母牛での発症が少ない傾向がみられた（表2）。殺虫用タッグの装着は、伝染性角結膜炎の発生をなくすることは困難であるが、発症率を低減する効果があると考えられる。

【昭和61年度 新得畜試】

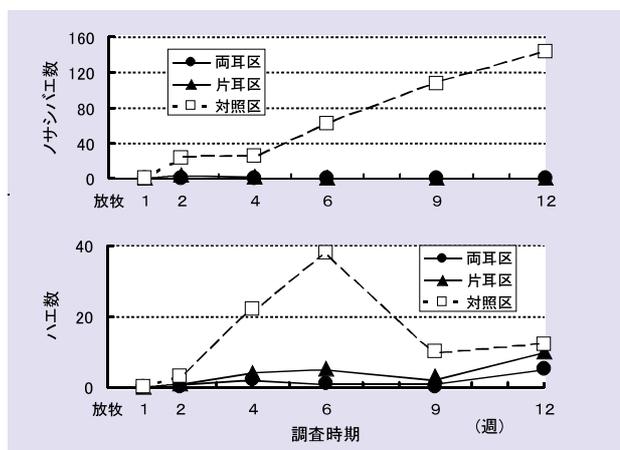


図3 ノシバエ数、ハエ数の推移

注意事項

殺虫用タッグの装着時期は、放牧前が望ましいが、放牧後の場合は遅くともハエが増加する前に装着する。

片耳に装着しても防除効果はあるが、子牛の増体などへの効果を考慮すると両耳装着の方がより適切である。

表1 母牛と子牛の増体量

	母牛	子牛	(kg)
両耳区	35.5	97.7	A ^a
片耳区	42.5	89.6	b
対照区	17.1	89.2	B

¹⁾ 放牧開始時から14週後までの増体量

²⁾ 異文字間に有意差 AB : P < 0.01、ab : P < 0.05

表2 伝染性角結膜炎の発症率

	母牛	子牛	(%)
両耳区	30.0	0	
片耳区	34.4	5.3	
対照区	59.1	2.8	

しょ糖液を用いた牛糞便内線虫卵検査法

しょ糖液による遠沈浮遊法を改良し、牛糞便内線虫卵の検査手法を確立した。本検査法は、現在もウイスコンシン変法として活用されている。

線虫卵検査法の検討

乳牛の糞便中消化管内線虫卵数は比較的少なく、従来の糞便1g中の虫卵数を数えるマックマスターEPG計算盤法では、正確に乳牛の線虫卵数を測定することができなかった。そこでウイスコンシン法に基づき、線虫卵検査法の改良を試みた。

浮遊液の種類と虫卵数との関係では、しょ糖が最も虫卵数が多く、比重だけでなく粘着性に優れているためと考えられた(図1)。しょ糖の比重では、原法は1.25であるが1.20の方が良好な結果であった(図2)。また、遠沈管に載せるカバ-ガラスの付着時間では、10分経過後は虫卵数に大きな差がなく、付着時間は10分で十分と考えられた(図3)。

ウイスコンシン変法

線虫卵検査手法をいくつか検討した結果、以下の操作手順を示した。

糞便10gを80メッシュの網(肝蛭検査用)を置いた乳鉢に入れ、60mlの水で溶解後、ろ過する。

15ml円錐形遠沈管2本にろ液を入れ、50~150Gで5~10分間遠沈する。

上清をすて、しょ糖(比重1.20)を遠沈管の1/3ほど入れミキサ-で混和後、しょ糖を遠沈管の9分目まで加え、50~150Gで5~10分間遠沈する。

遠沈管の管口までしょ糖を加え、カバ-ガラスを管口に付着させ、10分以上静置する。

カバ-ガラスをスライドガラスに載せ、40~100倍で全視野を鏡検する。

なお、この操作を再度行うことで、より正確な虫卵数を求めることができる。

野外の乳牛を用いて、糞便内線虫卵検査をウイスコンシン変法とEPG計算盤法で比較したところ、2地域ともウイスコンシン変法が高い陽性率を示し、虫卵数も多かった(表1)。

このように、本法は乳牛の糞便内線虫卵の検出率が高く、標準的な検査法として現在でも活用されている。
【昭和55年度 滝川畜試】

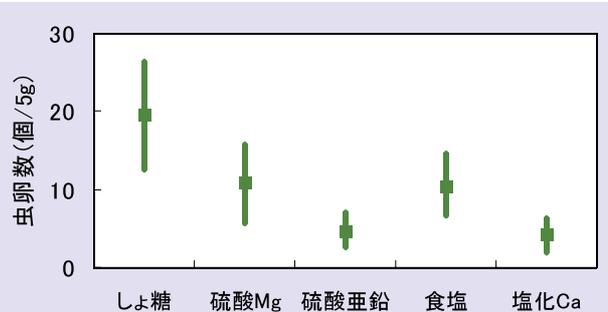


図1. 浮遊液の違いと虫卵数の関係

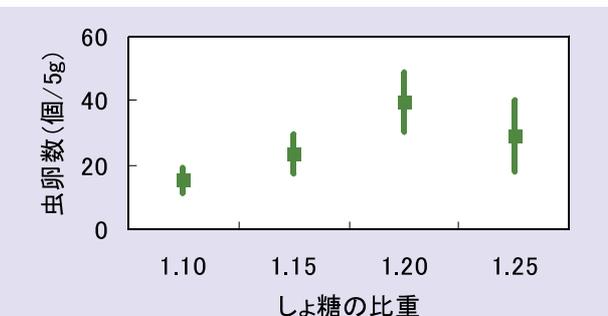


図2. しょ糖の比重と虫卵数との関係

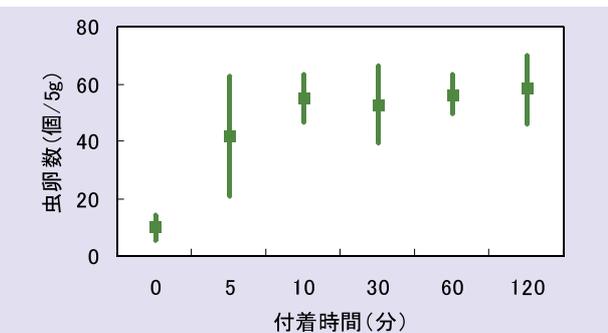


図3. カバ-ガラス付着時間と虫卵数の関係

表1. 乳牛の糞便内線虫卵検査法の比較

地域	検査法	頭数	陽性率	平均EPG*
芦別	ウイスコンシン変法	62	95.2	2.70 ± 1.81
	EPG計算盤法	62	11.3	0.6 ± 3.0
別海	ウイスコンシン変法	315	86.3	2.36 ± 1.76
	EPG計算盤法	315	5.7	0.3 ± 1.6

* : 平均EPGは糞便1g中の虫卵数の幾可平均値を示す

2 豚などの感染症防止と SPF化技術

豚呼吸器感染症の予防・治療

豚呼吸器感染症のワクチン、抗生物質による予防および治療効果を明らかにした。

豚の胸膜肺炎の防除

昭和52年に本道で最初に確認された胸膜肺炎の病態解明と防除法を検討した。症例は甚急性の経過をとり、原因菌は*Actinobacillus pleuropneumoniae* 血清型2型と同定された。肺の肉眼病変は出血性胸膜肺炎像を呈し、組織学的には全身に血栓形成が認められた。発生の早期に抗菌剤（ペニシリンとストレプトマイシンの合剤またはクロラムフェニコール）を全身投与することにより、一般症状は急速に改善され、1週間後には呼吸器症状も消失し、死亡を防止できた。また、豚舎の豚をオールアウトしてから、新たな豚を導入することにより本症の発生は認められなくなった。

豚の*Haemophilus parasuis*感染症の疫学

グレーサー病の原因菌である*Haemophilus parasuis* (Hps) は道内の15養豚場のうち13場で浸潤が確認された。鼻汁分離株の血清型は、型別不能株が最多で次いで1型、2型が多かった（表1）。しかし、道外で高率に分離される5型は検出されなかった。また、発症豚からは5型ばかりでなく、2、4および7型株が分離されたことから、北海道独自の予防対策の必要性が示された。さらに、市販ワクチンに用いられている5型株の免疫による2型株に対する交差防御が弱いことが明らかとなったため（表2）、分離された2型株（滝川188株）を用いた市販ワクチンが開発された。

豚マイコプラズマ肺炎ワクチンの投与効果

豚のマイコプラズマ肺炎（MPS）の原因菌である*Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp) の培養粗る液を主成分とする不活化ワクチンを子豚に2回（4、8週齢）筋肉内注射し、有効性、安全性について検討した。血清中CF抗体価が有意に上昇し、発育阻害は認められなかった。また、ワクチン注射によるMPS病変の形成阻止または軽減効果およびMhpの分離率低減効果が確認された。

同ワクチンを生産された子豚全頭に注射（2、4週齢）することにより、子豚期および肥育期における発育改善効果が認められた。

【昭和59、平成7・8・11年度 滝川畜試】

表1. 鼻腔スワブ中Hpsの血清型別陽性頭数

農場	調査頭数	陽性頭数	血清型							
			1	2	3	4	5	6	7	型別不能
A	5	3		1						2
B	10	9	2	2				2		9
C	5	0								
D	10	3	1	1		1				1
E	10	9	8	1						1
F	10	1		1						
G	10	2								2
H	9	7	3	1		1		1		6
I	25	15		5		2			1	11
J	10	4		1						3
K	36	11	3	3		1		2		7
L	32	16	3	7		2		1		4
M	5	1			1					
N	20	12	1	2	1	1		3		7
O	180	0								
計	377	93	21	25	4	6	0	9	1	53

N:SPFコマーシャル農場 O:SPF原々種豚場

表2. 不活化Hps菌体により免疫した豚に対する攻撃試験

		攻撃株*		
		188	599	Nagasaki
免	188(2型)	0/3**	0/3	0/3
疫	599(7型)	1/3	0/3	1/3
株	Nagasaki(5型)	2/3	0/3	0/3
	なし	3/3	2/2	1/1

*:10の5乗個を気管内接種

** :発病頭数 / 供試頭数

表3. 肉眼的なマイコプラズマ肺炎様肺病変の有無別頭数

処理区	肉眼所見による肺病変の程度			合計
	+	±	-	
ワクチン区	19 (33.3)	3 (5.3)	35 (61.4)	57 (100.0)
対照区	22 (59.5)	2 (5.4)	13 (35.1)	37 (100.0)

カッコ内の数字は%

豚呼吸器感染症の簡易モニタリング法

せき・くしゃみ回数計測による呼吸器病のモニタリングの有効性を明らかにした。

咳・くしゃみ回数の計測による豚呼吸器感染症のモニタリング

豚の呼吸器感染症の病原浸潤や発病程度の客観的指標として咳・くしゃみ回数の測定が利用可能か否かについて検討した。北海道内の8養豚場の離乳・肥育前期・肥育後期の各豚舎で、呼吸器感染症病原の浸潤状況調査および咳・くしゃみ回数の計測を行った。計測は管理作業が一段落した時間帯とし、農場ごとに一定にした。そして、豚舎内で10分間に聴取された咳・くしゃみの回数を各々計測し、100頭10分あたりの回数を求めた。病原浸潤検査は、血清中抗体価測定により豚繁殖呼吸障害症候群ウイルス、*M.hypopneumoniae*および*A.pleuropneumoniae*、鼻汁中細菌分離により*P. multocida*、*B. bronchiseptica*および*H.parasuis*について行った。その結果をもとに農場を陰性2戸、低汚染3戸、高汚染3戸に分類した。咳・くしゃみ回数の発育ステージによる変動を農場グループ毎に分析した結果、呼吸器感染症の病原が浸潤すると、有意に咳・くしゃみ回数が増加することが示された(図1、表1)。

前記8農場のうち新たな呼吸器感染症対策として、豚マイコプラズマ肺炎(MPS)不活化ワクチンを採用した2農場において、咳回数を測定するとともにと畜場出荷豚の肺廃棄率を調査し、ワクチン接種との関連を検討した。両農場ともにワクチン接種後咳回数の減少が認められた(図2)。特に肥育後期の咳回数の減少は、と畜場におけるSEP様肺炎(MPS様肺炎に相当)による肺の廃棄率の減少と一致し、同ワクチンの効果を判定できた。

これらのことから、咳・くしゃみ回数の計測は呼吸器感染症の浸潤・発病状況および対策効果のモニタリング法として有効であると考えられた。

【平成11年度 滝川畜試】

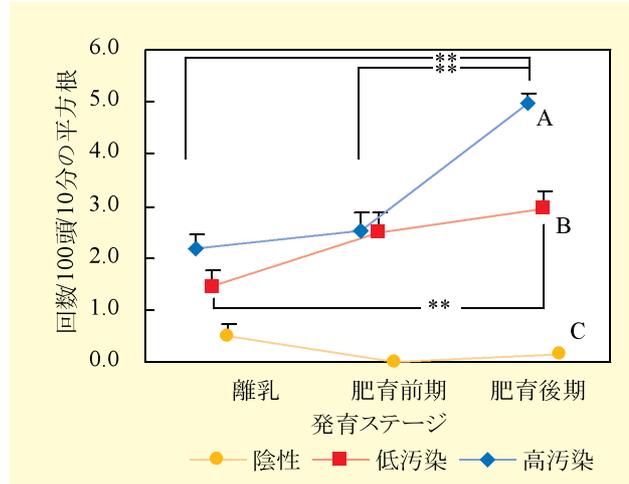


図1. 病原浸潤と発育ステージによる咳回数の変化
ABC異文字間、**間に有意差(P<0.01)

表1. くしゃみ回数の多重比較

農場グループ	発育ステージ		
陰性	1.39 ^A (0.29)	離乳	3.50 ^A (0.15)
低汚染	3.55 ^B (0.13)	肥育前期	2.63 ^{Ba} (0.22)
高汚染	3.23 ^B (0.13)	肥育後期	2.04 ^{Bb} (0.16)

数字は平均値(標準誤差)
AB, ab異文字間に有意差
(大文字P<0.01、小文字P<0.05)

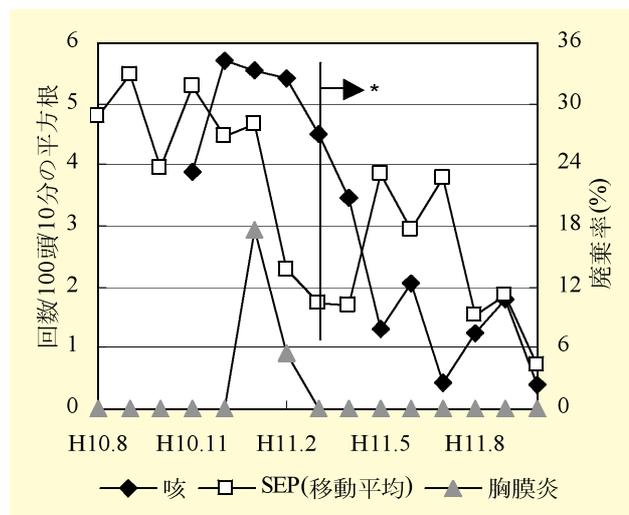


図2.1 養豚場における咳回数によるMPS不活化ワクチン接種効果の判定

*矢印以降全頭ワクチン接種済み、SEPおよび胸膜炎はと畜検査時の肺の廃棄理由

豚のSPF変換技術

豚舎新設方式および一括変換方式による豚のSPF変換技術を確立するとともに、SPF豚の発育性が優れていることを明らかにした。

優良道産系統豚「ハマナスW1」のSPF化

滝川畜試が造成した大ヨークシャー系統豚・ハマナスW1をSPF化した。外科的に妊娠末期の母豚から子豚を摘出することによりプライマリーSPF豚を作成し、使い捨て段ボールアイソレーターを用いて人工哺育した。その結果、育成率は96.9%とほとんどの子豚を育て上げることに成功した。マイコプラズマ肺炎、萎縮性鼻炎、グレーサー病等の感染症は全く認められず、SPF変換に成功したことが確認された。

既存養豚場のSPF変換方式

母豚40頭の小規模養豚場において一括変換を行った。高圧洗浄機による洗浄、トリメチル塩化アンモニウムメチレン、塩化ジデシルジメチルアンモニウム液およびホルマリン薫蒸による消毒により豚房の床、壁面および通路の細菌数は減少し、壁面を除き、一般細菌が10~102個/cm²、腸内細菌がほぼ検出限界以下となった(表1)。変換前に高度な浸潤があったSPF指定疾病のマイコプラズマ肺炎と萎縮性鼻炎は、変換後陰性であることが確認され、グレーサー病、胸膜肺炎も陰性となり(表2)と畜場における内臓廃棄も大きく減少した。また、母豚1頭当たりの年間離乳頭数が増加し、離乳時育成率も改善した。

豚舎新築方式によるSPF豚農場の開設

新設されたSPF豚舎(面積1,796m²)にSPF豚を導入するまでの清浄化作業を検討した。高圧洗浄機4台による水洗(1回)・塩化ジデシルジメチルアンモニウムによる消毒(2回)における作業能率(作業員5名/日)は2.07分/m²だった(表3)。このことから母豚100頭規模の施設(豚舎1,700m²)では水洗1回および消毒2回の作業に約60時間を要し、管理棟、車両の消毒、構内道路の石灰散布などに30時間程度必要と考えられた。また飼育開始後に、豚をオールアウトした後の水洗(1回)・消毒(1回)にお

ける作業能率は4.14分/m²であり、細菌数の有意な減少が認められた(図1)。

【平成3・9・13年度 滝川畜試・畜試】

表1. 変換作業過程と一般細菌数の推移

	洗浄前	第1回洗浄消毒		第2回洗浄消毒		ホルマリン薫蒸後
		洗浄後	消毒後	洗浄後	消毒後	
豚房床	7.8*	6.4	4.8	4.4	1.6	1.0
	7.8	6.7	5.3	4.5	3.1	2.0
	8.5	6.8	5.7	6.1	3.2	2.1
豚房壁	6.5	4.7	4.4	5.0	5.0	2.2
	7.0	5.5	4.9	5.0	5.5	3.8
	7.6	6.7	5.3	5.8	7.0	5.6
豚舎内通路	8.0	3.8	3.2	4.3	3.2	1.3
	8.4	5.5	3.9	4.7	3.5	1.5
	8.4	6.7	4.4	5.0	4.3	1.9

*: log₁₀細菌数/cm²

表2. 変換前後の慢性呼吸器病浸潤度

病原菌	陽性率(%)		
	変換前	変換後	
		6ヶ月	15ヶ月
<i>M.hypopneumoniae</i>	40	0	0
<i>P.multocida</i>	35	0	0
<i>B.bronchiseptica</i>	80	0	0
<i>H.parasuis</i>	85	0	0
<i>A.pleuropneumoniae</i>	0.5	0	0

表3. 新設豚舎のSPF豚導入前の水洗・消毒作業の能率

豚舎	面積(m ²)		延べ作業時間(時間)		消毒薬 使用量(L)	1m ² 面積当たり	
	延べ	豚室	水洗	消毒*		水洗・消毒(分)	消毒薬(ml)
分娩	773.76	603.7	19.7	12.3	40.1	2.48	52
肥育	901.54	716.8	10.5	20.0	63.1	2.03	70
繁殖	516.6	476.3	4.5	8.5	29.9	1.51	58
計	2191.9	1795.8	34.7	40.8	133.1	2.07	61

*: 2回

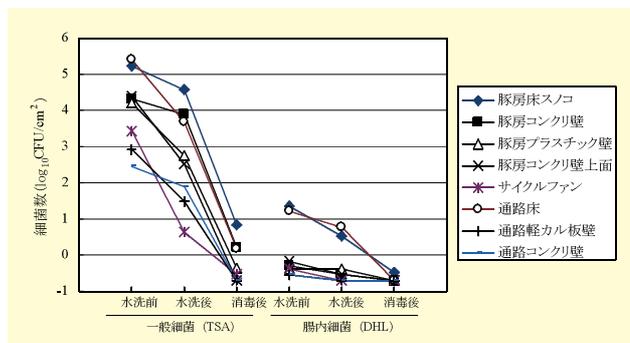


図1. 使用後豚舎各所の細菌数と水洗・消毒効果

SPF豚の清浄度維持と導入技術

SPF豚農場の清浄度をより高くすることにより生産性が上昇することを示すとともに、清浄度維持のための重要管理点を明らかにした。SPF豚の馴致導入マニュアルを作成した。

SPF豚農場の清浄度維持および回復技術

道内のSPF豚農場10場の間には、肺病変指数または萎縮性鼻炎病変指数の平均値で示される清浄度の差が認められた。清浄度の差を農場開設の条件、導入種豚、防疫規制の実態から解析した結果、清浄度維持のための重要管理点は、SPF変換時の既存豚舎の処理法、導入種豚の由来、農場設備・防疫管理の徹底度が考えられた。またSPF・CM農場の生産性は、コンベンショナル豚農場に比べ高かったが、肺病変およびAR病変の平均指数がより低い値となる清浄度水準を目指すことにより、さらに高い生産性を達成できることが明らかとなった(表1)。

豚繁殖呼吸器症候群(PRRS)の浸潤が確認されたSPF・CM農場において、子豚期豚舎のオールアウトによる清浄化効果を検討した。約2週の間生産された子豚を新たに建設した発酵床豚舎に離乳直後に導入し、既存の離乳および子豚豚舎を順次オールアウト、豚舎全体の洗浄・消毒を実施した。発酵床豚舎に導入した子豚はと畜場出荷まで同豚舎で飼育した。この処理を7か月間隔で2回反復した。その結果、子豚豚舎で見られたPRRSウィルスの水平感染が遮断され、新たな抗体陽性豚は認められなかった(図1)。このことから子豚期豚舎のオールアウト方式によるPRRS対策の有効性が示された。

コンベンショナル豚農場におけるSPF豚導入技術

マイコプラズマ肺炎、グレーサー病、胸膜肺炎、萎縮性鼻炎、パスツレラ症の病原菌の浸潤が認められるコンベンショナル豚農場9場に「ワクチン接種」および「抗生物質の飼料添加」の疾病予防処理を組み合わせて40頭のSPF豚を導入したところ、ほとんどの豚が発熱以外の臨床症状を示さず、と殺時にその60%が病変を保有しなかった。これらの成績を基にSPF種豚の馴致導入マニュアルを作成し(表2)、30場で313頭のSPF豚を馴致導入した。そのうちの9場178頭について追跡調査したところ、147頭・82.6%が生産に供され、馴致プログラムの有効性が確認された。【平成6・14年度 滝川畜試・畜試】

表1 SPF・CM農場の洗浄度と生産成績

病変指数による清浄度	年間離乳頭数/母豚	農場飼料要求率	母豚更新率(%)	肉豚事故率(%)	薬品費A(円)
	≥21.0*	≤3.30	≤30.0	≤2.0	≤600
上位4農場	23.1	2.93	26.2	1.39	46.3
下位3農場	22.3	3.17	32.3	2.48	101.0

*日本SPF豚協会の基準値

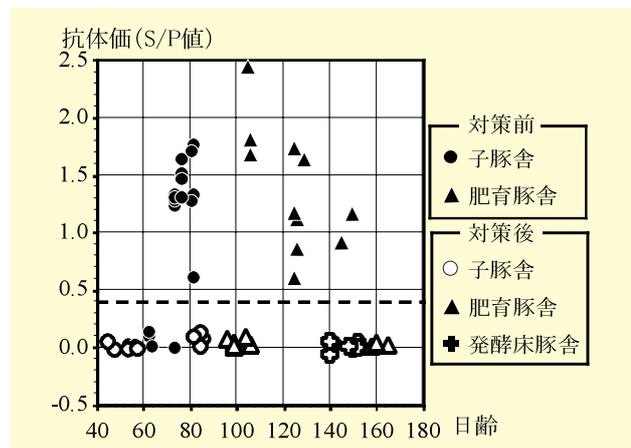


図1 清掃化対策前後における肥育豚の血清中PRRSウィルス抗体価の推移
S/P値0.4以上(図中点線)抗体陽性

表2 開発した馴致導入プログラム

導入前のワクチン接種*	グレーサー病、胸膜肺炎
導入後の抗生物質飼料添加	オキシテトラサイクリン等 5日添加-2日休薬-5日添加-3日休薬-4日添加-3日休薬-3日添加

*現在はマイコプラズマ肺炎、パスツレラ・トキシソイド等のワクチンも併用

めん羊のコリネバクテリウム感染症

めん羊のコリネバクテリウム感染症の疫学調査を行い、ヨードチンキ塗布による予防効果を明らかにするとともに、不活化ワクチンによる予防効果を確認した。

コリネバクテリウム感染症の発生状況

滝川畜試において死亡あるいは淘汰した羊の病理解剖を行い、膿瘍の発生状況を調査した。当才羊では23頭中2頭（8.7%）と低率であったが、2才羊では13頭中8頭（61.5%）、3才以上では60～90%と年齢が高いものほど膿瘍保有率が高かった（図1）。膿瘍の出現部位は、肺が65頭中42頭（64.6%）で最も多く、次いで肺の付属リンパ節が14頭（21.5%）であった。

膿瘍81例中*Corynebacterium pyogenes*（C.p.、現在*Arcanobacterium pyogenes*）が単独で分離されたものが66例（81.4%）、混合感染を含めると70例（86.4%）あり、大部分がC.p.によるものであった。C.p.の薬剤感受性試験では、エリスロマイシン、ペニシリンG、アミノベンジルペニシリンなどに高い感受性を示した。

一般健康羊のC.p.抗体陽性率は、当才羊では238頭中12頭（5.0%）と低かったが、2才羊では158頭中82頭（51.9%）まで上昇し、それ以上の年齢でも50～90%と高く、病変の年齢別発生率と一致した（図2）。C.p.抗体陽性率はせん毛3ヶ月後に他の時期よりも大きく上昇し、せん毛時の創傷が感染の大きな要因と考えられた（表1）。

ヨードチンキ塗布による予防

せん毛を初めて行うめん羊を用い、創傷部にヨードチンキを塗布しためん羊30頭と、塗布しないめん羊30頭の3ヶ月後のC.p.抗体陽性率を比較した。前者は23.3%、後者は56.7%で、前者が有意に低く、ヨードチンキ塗布による感染阻止効果が認められた（表2）。

C.p.毒素不活化ワクチンによる予防効果

C.p.毒素不活化ワクチン群（5頭）には、ワクチンとレバミゾールを1ヶ月間隔で2回大腿部皮下に接種し、対照群（4頭）と比較した。ワクチン接種後2週間でせん毛を行い、傷をつけた上にC.p.を塗

布し、2ヶ月後に解剖した。ワクチン群は対照群に比べ膿瘍数が少なく、分布範囲も限局しており、ワクチンによる予防効果が認められた。

【平成3年度 滝川畜試】

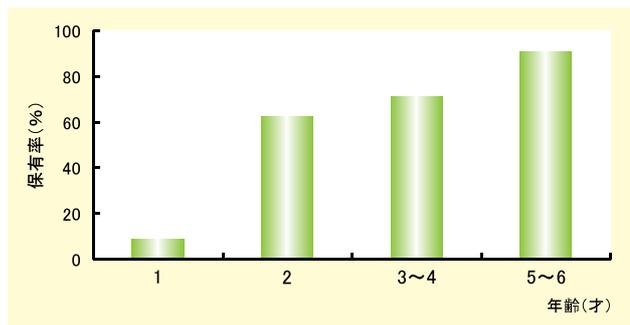


図1. 死亡・淘汰羊の年齢別膿瘍保有率

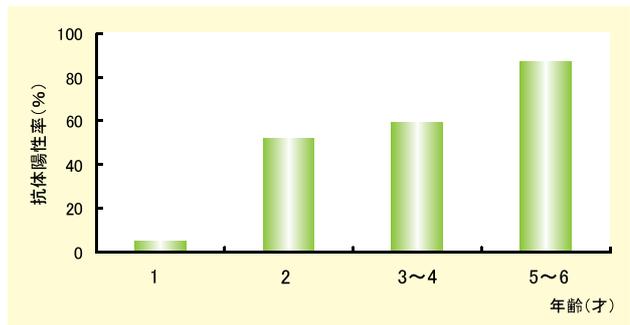


図2. 一般健康羊の年齢別抗体陽性率

表1. せん毛後におけるC.p.抗体陽転率

調査羊	せん毛年 (経験回数)	せん毛時 陰性頭数	せん毛3カ月後 陽転頭数(%)
1987年生	1988(0)	89	39(43.8)
	1989(1)	45	20(44.4)
	1990(2)	17	6(35.3)
1988年生	1989(0)	33	18(54.5)
	1990(1)	59	24(40.7)
1989年生	1990(0)	41	3(7.3)

表2. ヨードチンキ塗布試験

群	供試頭数	外傷	ヨードチンキ	3カ月後のC.p.抗体 陰性頭数(%)
I	30	有	塗布	23(76.7)a
II	30	有	無処置	13(43.3)b
III	13	無	無処置	12(92.3)ac

異文字間に有意差あり(P<0.01)

鶏卵黄抗体を用いたカスタム抗体の作成

抗原を14日間隔で、皮下注射した鶏の卵から分離される卵黄抗体は、カスタム抗体として利用できる。

抗原の投与部位は翼元部皮下が適当である

効率的な抗体の生産方法を検討するため、抗原を14日間隔で皮下、筋肉、腹腔に投与した。

筋肉及び腹腔に抗原を投与しても十分に抗体価が上昇しなかったが、皮下注射により抗体価は、今回設定した基準抗体価（ELISAで希釈倍率3200倍、吸光度0.2）以上になったことから、投与部位は皮下が適当と考えられた（表1）。

集卵日は抗原投与開始後49日が適当である

抗原投与開始後35日目と49日目の抗体産生を図1に示した。投与開始後35日目で基準抗体価に達していたが、49日目ではさらに上昇していたことから、抗体の収量や生産に要する時間などの生産性を考えると投与4回終了後の49日目の集卵が効率的と考えられた。

卵黄抗体をカスタム抗体として利用できる

エンドユーザー評価を収集するため、確安分画を2回繰り返し、試供品を作製した。

タンパク質を抗原に用いた時、試供品の抗体価が基準抗体価を越えた事例では多くのユーザーが、試供品である卵黄抗体をカスタム抗体として利用出来ると評価した（表2）。

合成ペプチドを抗原に用いた時、試供品の抗体価は半数の例で基準抗体価に達していたが、抗体価が基準抗体価を越えていても、ユーザーが利用できないと答えた例があった。

抗原の性質上、抗体価が上昇しないことはあり得ることなので、このことが短絡的に商品化を否定するものではない。卵黄抗体産生に個体による違いがあることが認められた。

【平成11年度 滝川畜試】

カスタム抗体とは

抗原抗体反応を用いる分析には、分析する微量物質に対応するオーダーメイドの抗体が必要となり、これらの抗体はカスタム抗体と呼ばれ、一つの市場が成立している。カスタム抗体市場ではウサギなど哺乳動物で作成していることが多いが、卵黄抗体を用いることで、安価で大量の抗体が供給できる。

表1 投与方法と卵黄中抗体価

投与開始後	35日 (3回免疫7日後)		49日 (4回免疫後7日後)	
	希釈倍率	吸光度	希釈倍率	吸光度
筋肉	3200	0.064	3200	0.015
腹腔	3200	0.075	3200	0.007
皮下	25000	1.279	*	*

抗原：タンパク質
抗体価の測定：ELISA、波長415nm
2個体数の平均値
*：測定せず

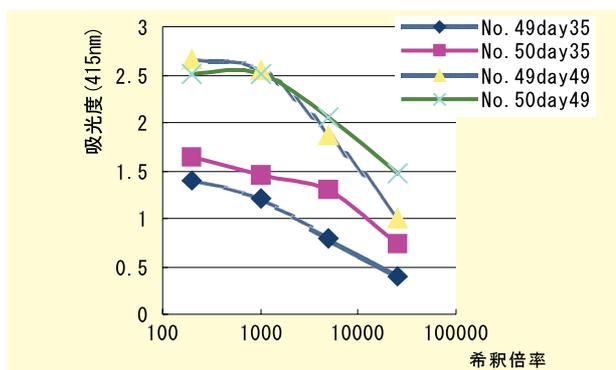


図1 抗原投与開始後の抗体価

表2 作成した試供品とエンドユーザーの評価

個体 No.	抗原の種類	IgY 産生 (抗体価による評価)	ユーザーの 評価
8208	合成ペプチド 1	+	?
8209		+	?
8221	合成ペプチド 2	+	-
8222		-	-
8223	合成ペプチド 3	-	-
8224		-	-
8210	タンパク質 1	+	+
8212		+	+
8213	タンパク質 2	+	+
8214		+	+
8215	タンパク質 3	+	+
8216		+	+
8217	タンパク質 4	+	?
8218		+	?
8225	タンパク質 5	+	+

集卵：免疫開始後49日
抗体価の評価：試供品を3200倍に希釈、ELISA波長415nmで測定
+：吸光度が0.2以上 -：吸光度が0.2以下
ユーザーの評価
+：商品として利用できる -：商品として利用できない
?：未回答

3

牛・羊の代謝性疾患 診断と予防技術

乳牛の起立不能症の発症要因

低カルシウム血症による乳牛の起立不能症は、妊娠末期の高タンパク質飼料と高カルシウム飼料の多給が大きな要因である。

放牧による低カルシウム血症の発症

妊娠末期（分娩前2週～分娩）の飼養法を 昼夜放牧、制限放牧（1日2時間放牧）+乾草給与、生草のみ給与、生草（1日2時間給与）+乾草給与の4処理区とし、低カルシウム（Ca）血症の発症を比較した。昼夜放牧区では7頭中3頭が分娩後低Ca血症（7mg/dl以下）を示し、うち2頭が起立不能症となった。また、生草給与区では7頭中1頭に低Ca血症がみられた。しかし、その他の区では低Ca血症がみられなかった（表1）。これは分娩前的高タンパク質飼養により起立不能症を発症しやすいことを示している。

カルシウム過剰摂取による低Ca血症の発症

妊娠末期のCa多給と低Ca血症の関連を検討するために、妊娠末期を生草+乾草で飼養した乳牛にCa添加剤をCa量で100、50、0g添加した（粗飼料からのCa摂取量は平均58g）。100g添加区では妊娠末期のCa充足率は419%となり、分娩後6頭中2頭に低Ca血症がみられ（表2）、分娩前のCa多給により起立不能症が発症しやすいことが示された。

高蛋白質および高Ca飼料が大きな要因

上記の試験から妊娠末期の養分充足と分娩後の血液成分との関係を検討した結果、妊娠末期の可消化粗タンパク質（DCP）充足率（日本飼養標準）が高くなるにともない、分娩後の血清Ca、Pi濃度は低下し、尿素窒素（BUN）は高くなった。さらに、妊娠末期のCa充足率が高くなると、分娩後の血清Ca濃度は低下する傾向にあった（表3）。これらから、低カルシウム血症による乳牛の起立不能症は、分娩前2～3週間の過剰なタンパク質あるいはCa含量の高い飼料の摂取が大きな要因と考えられる。

【昭和61年度 根釧農試】

表1．妊娠末期の飼養法と分娩後の血液成分

妊娠末期の飼養法	頭数	低Ca血症	分娩後の血液成分			
			Ca	Pi	Mg	BUN
	頭	頭	mg/dl			
昼夜放牧	7	3	7.29	2.59	2.33	28.2
制限放牧	6	0	8.92	4.55	2.27	27.4
生草のみ	7	1	7.55	2.11	2.37	23.1
生草+乾草	6	0	8.43	3.01	2.14	23.8

表2．妊娠末期牛のCa添加と分娩後の血液成分

Ca剤添加量	頭数	低Ca血症	分娩後の血液成分			
			Ca	Pi	Mg	BUN
	頭	頭	mg/dl			
100g区	6	2	8.16	2.96	1.54	20.9
50g区	6	0	8.22	3.47	1.88	22.0
0g区	6	0	8.40	3.15	1.88	18.8

表3．DCP・Ca充足率と分娩後の血液成分

	DCP 充足率 (%)			Ca 充足率 (%)		
	200>	200~250	250<	150>	150~250	250<
	mg/dl					
Ca	9.01	8.16	7.69	8.82	8.39	8.01
Pi	3.59	2.98	2.80	3.60	2.93	3.54
Mg	2.32	2.42	2.56	2.49	2.33	2.01
BUN	16.7	21.1	24.8	16.1	19.4	16.8

陰イオン塩給与による乳牛の起立不能症の予防

乳牛の分娩前に陰イオン塩を給与することで、分娩時の低カルシウム血症による起立不能症を低減できる。

給与粗飼料のイオンバランスと乳熱発症

酪農場9戸において、分娩前に給与していた粗飼料成分と乳熱発症との関連を調査したところ、推定イオンバランス(DCAD($\{[Na]+[K]\} - \{[Cl]+[S]\}$))が高い粗飼料、とくに+250mEq/乾物kg以上の粗飼料を給与していた農場では乳熱の発症率が高い傾向にあった(図1)。

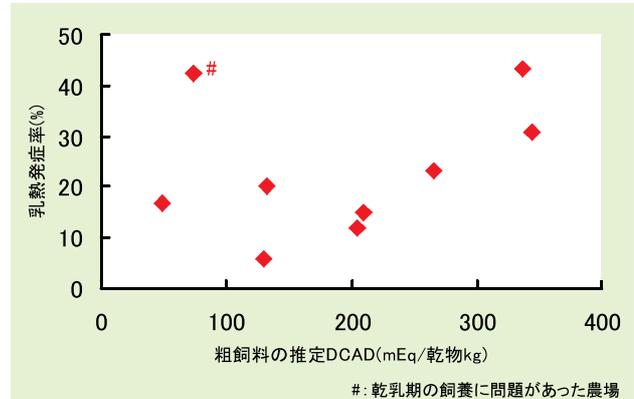


図1. 給与粗飼料の推定DCAD値と乳熱発症率との関係

陰イオン塩給与による低カルシウム血症の予防

経産牛8頭に対して分娩前2週間、陰イオン塩製剤を乾物中4.5%添加した混合飼料を給与(給与群)し、対照群9頭と比較した。対照群では血清Ca濃度が分娩翌日7.86mg/dlに低下し、低カルシウム血症(同濃度7.5mg/dl以下)を示した頭数割合が56%であったが、給与区では分娩後の血清Ca濃度の低下はみられず、低カルシウム血症の頭数割合は13%と低かった(表1)。

表1. 陰イオン塩給与後の血清Ca濃度と低Ca血症の頭数

	血清Ca濃度 (mg/dl)		低Ca血症の頭数*	
	分娩当日	分娩翌日	分娩当日	分娩翌日
対照群	8.63±0.82	7.86±0.96	3/9(33%)	5/9(56%)
給与群	8.51±0.70	8.71±0.86	2/8(25%)	1/8(13%)

*: 血清Ca濃度が7.5mg/dl以下を示した頭数。

大規模農場における低カルシウム血症予防の実証

大規模農場において、分娩前の経産牛に対して陰イオン塩製剤を乾物中約4%添加した混合飼料を約3週間給与したところ(給与期)、製剤を添加しない時期(無給与期)の乳牛に比べて低Ca血症発症頭数は減少する傾向にあった(表2)。

表2. 実証試験における低Ca血症発症頭数

	DCAD値	低Ca血症発症頭数
無給与期	+137~+145	12/75(16%)
給与期	-29~+17	1/28(4%)

これらから、陰イオン塩給与による低Ca血症の予防効果が示唆された。陰イオン製剤は給与粗飼料のDCADが+200mEq/乾物kg以上の時に、給与するのが望ましく、その期間は乾乳後期に限定すべきである。また陰イオン製剤は嗜好性が良くないので、混合飼料として給与することが望ましい。

【平成14年度 畜試】



乳牛の脂肪肝

脂肪肝は泌乳初期のエネルギー不足により起こり、肝機能および繁殖性が低下する。ボディコンディションスコア（BCS）の低下と乳脂肪率の高値が指標となる。

肝機能と繁殖性が低下する

分娩後2週の肝臓の脂肪沈着割合をもとに、脂肪肝と診断される中度群（7頭）；20%以上（平均27%）、軽度群（6頭）；10～19%（同14%）、正常群（29頭）；9%以下（同3%）に分け比較した。肝機能検査の1つである異物排泄能試験では、中度群の停滞率（30分値）は21%と高く、肝機能の低下がみられた。また、受胎までの日数も中度群で131日と正常群の97日に比べ34日長く、脂肪肝が繁殖性を低下させることが明らかとなった（表1）。

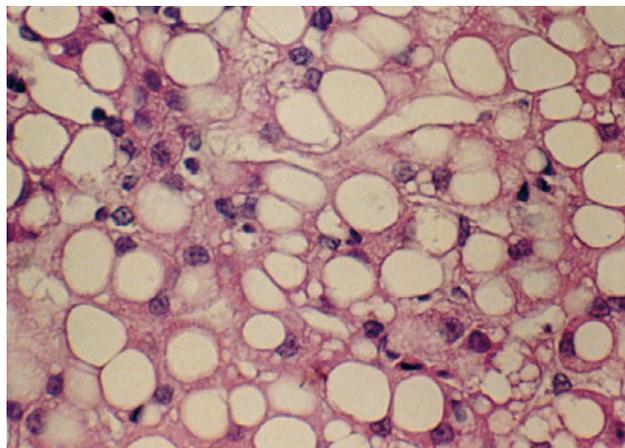


図1．肝臓での脂肪沈着（丸く白い部分）

BCSの低下と乳脂肪率の高値に注意を！

分娩後2週のTDN充足率は中度群で67%と低く、体脂肪動員の指標である血液中の遊離脂肪酸濃度も1306 μ Eq/Lと上昇し、ケトン体濃度も高く、摂取エネルギーが著しく不足していた。体重は分娩前2週から分娩後4週までに121kg減少し、BCSでおおよそ「1」の低下がみられた。また、体脂肪の動員により、乳脂肪中の長鎖脂肪酸が増え、乳脂肪率が高くなる。このため、泌乳初期の乳脂肪率の高値は、脂肪肝の重要な指標となる。

脂肪肝の予防

脂肪肝はケトーシス、第四胃変位、起立不能症などの生産病とも関係するといわれる。予防には乾乳後期から泌乳初期にバランスのとれた飼料を充分給与し、乾物摂取量を高めることが大切である。また、肥り過ぎた牛は、分娩後多くの体脂肪を動員するため、脂肪肝になりやすい。乾乳期のボディコンディションを3.5前後となるように、泌乳中・後期に調整するとよい。

【平成4年度 根釧農試】

表1. 肝臓の脂肪沈着が肝機能、繁殖性および血液・乳成分に及ぼす影響

群	脂肪沈着	異物排泄能※	受胎日数	TDN充足率	遊離脂肪酸	ケトン体	乳脂肪率
	%	%	日	%	μ Eq/L	μ mol/L	%
中度	27	21.1	131	67	1,306	1,562	4.76
軽度	14	6.7	82	79	712	905	3.90
正常	3	4.5	97	84	543	770	4.09

※肝機能検査の1つで、異物(色素)が排泄されずに血中に停滞する割合(30分値)

乳牛の第四胃変位の発症要因とリスク評価

第四胃変位の発症要因は分娩時の過肥および乾物摂取量不足であり、その低減にはBCSコントロールと分娩前後の乾物摂取量確保が重要である。

第四胃変位の発症要因調査

第四胃変位の発症要因について現地調査を行ったところ、本症は80%が分娩後1ヵ月以内に発症しており、分娩が発症に関与していた。分娩前のBCSが3.75以上の牛で本症の発症が多いが、3.25以下では発症がなく(図1)、過肥が発症に関与していた。本症多発年は少発年よりも分娩前後の乾物摂取量が低かった(図2)。また、多発年において、発症牛は非発症牛よりも過肥傾向にあり、分娩前後の乾物摂取量不足と過肥が発症に関与していた。

第四胃変位の発症要因として、分娩、乾物摂取量不足、過肥が考えられた。

第四胃変位の発症機序の解析

X線透視を用いて、妊娠牛と乾物摂取量不足の牛の消化管を観察したところ、妊娠末期の第四胃は著しく前方へ移動、変形して認められ、本症発症牛の第四胃形態と類似していた。摂取量不足による第一胃容積の減少は、第一胃前房と第二胃の浮上を招き、浮上によって生じた空隙のため、第四胃が上方に変位し易くなっていた。また、過肥牛が分娩前後に摂取量不足になると、体脂肪動員による肝機能障害(脂肪肝)を招き、本症の発症が促進されると考えられた。

これらより、妊娠による圧迫、摂取量不足による第一胃容積の減少および肝機能障害と、本症発症との関連が裏付けられた。

第四胃変位のリスク評価

本症発症のリスクファクターとして、分娩翌日の血中GOT、血糖値(Glu)、遊離脂肪酸(NEFA)、3-ヒドロキシ酪酸(3-HB)濃度、分娩前のBCS、前産次の空胎日数、授精回数、乾乳期間が挙げられた。それぞれのリスクファクターにおいて、カテゴリーランクの上昇に伴い、発症危険率が高まった(表1)。

【平成15年度 畜試】

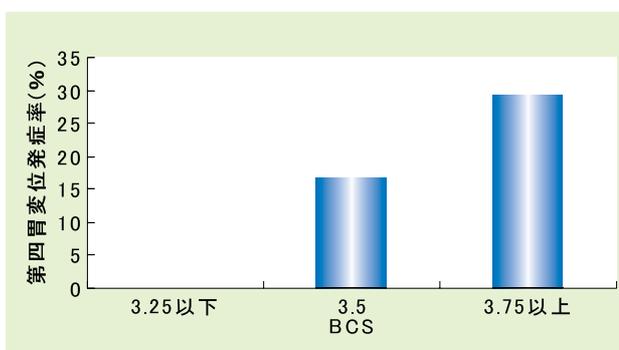


図1 分娩前のBCSと第四胃変位発症率

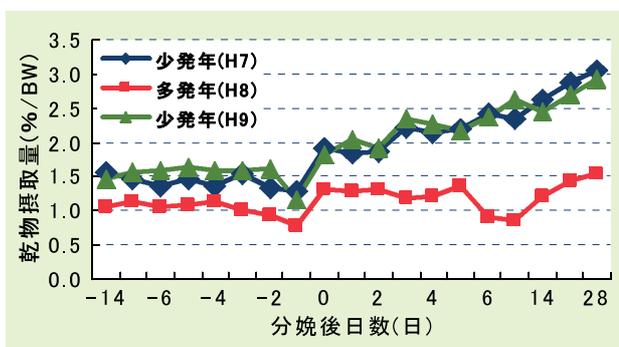


図2 第四胃変位多発年と少発年の分娩前後の乾物摂取量

表1 第四胃変位発症のリスクファクターとリスク評価

リスクファクター	カテゴリーのランク					リスク評価※			
	1	2	3	4	5	2	3	4	5
GOT(IU/L)	90未満	90~120	120~150	150~180	180以上	1.6	2.7	4.4	7.2
Glu(mg/dl)	40以上	40未満				12.1			
NEFA(μEq/L)	1000未満	1000以上				4.0			
3-HB(μmol/L)	800未満	800~1000	1000~1200	1200以上		1.9	3.5	6.5	
空胎日数	100日未満	100~150日	150~200日	200日以上		1.4	1.8	2.5	
乾乳期間	2ヶ月以内	3ヶ月	4ヶ月以上			2.0	3.9		
授精回数	3回以内	4~6回	7回以上			2.7	7.5		
BCS	3.25以下	3.5	3.75以上			3.4	11.7		

※各カテゴリーランクにおけるカテゴリー1に対する発症危険率の上昇度合い(倍率)
(例えばBCS3.75では3.25よりも、発症危険率が11.7倍上昇する)

乳牛およびめん羊の硝酸塩中毒

急性硝酸塩中毒の50%致死量は、硝酸態窒素で200～300mg / 体重kgだが、高硝酸塩草地への放牧では、急性および慢性硝酸塩中毒はみられなかった。

急性硝酸態中毒の致死量

めん羊に硝酸塩を経口投与したところ、50%致死量は硝酸態窒素で体重当たり200～300mgとなり、50mgでもメトヘモグロビン (M-Hb) の上昇がみられた。急性硝酸塩中毒では、投与後2～4時間でM-Hbが上昇し始め、11～15時間後にピーク値を示した。M-Hbは40%を越えると、呼吸が速くなるなどの臨床症状を示し、70%以上で死亡 (羊NO.1) した (図1)。

高硝酸塩牧草の危険性は？

放牧地への年間窒素施用量で12、24、48、96kg / 10aの4処理区を設け、めん羊を5か月間放牧した。96kg区では牧草中の硝酸塩含量は平均0.48%、最高0.88%を示したが、M-Hbの上昇はみられず (表1)、増体の抑制、肝機能障害、ミネラル障害等の慢性硝酸塩中毒も認められなかった。

しかし、めん羊を2日間絶食させたのち、硝酸態窒素含量0.21%の生草を3kg給与したところ、M-Hbは給与後6.5～8時間で10～38%に上昇し、軽～中等度の硝酸塩中毒がみられた (図2)。

妊娠牛への影響はみられなかった

硝酸態窒素含量0.41%の乾草を、分娩前4か月～分娩後1週まで乳牛に給与したが、M-Hbの上昇はなく流産等もみられなかった。また、妊娠牛に硝酸塩を経口投与し、長期間M-Hbを6%前後に高めた試験でも、肝臓および甲状腺の機能障害などの慢性硝酸塩中毒はみられなかった。

これらから、高硝酸塩牧草は一般的な飼養管理では硝酸塩中毒を発症させる可能性は少ないが、急速かつ多量に摂取した場合には、急性中毒の危険性がある。従って、高硝酸塩牧草を給与せざるを得ない場合には、給与回数を増すなど1度に多量摂取させないことが大切である。

【昭和52年度 新得畜試・滝川畜試】

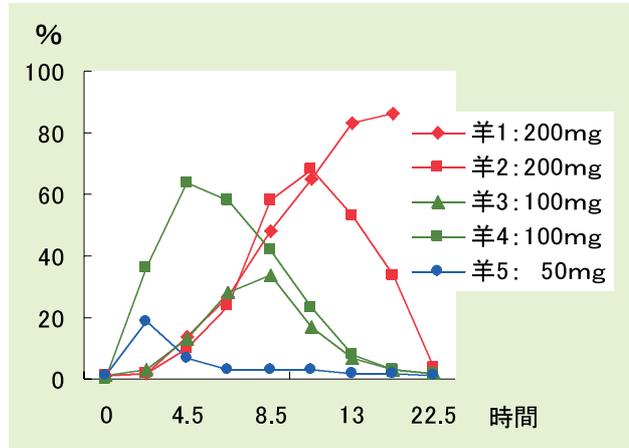


図1. 硝酸カリウム投与後のメトヘモグロビン濃度

表1. 窒素多肥草地へのめん羊の放牧試験

	窒素 施用量 kg/10a	硝酸態窒素		メトヘモ グロビン %
		牧草中 %	血液中 μg/ml	
12kg区	12	0.03	0.04	1
24kg区	24	0.13	0.33	1
48kg区	48	0.34	0.81	1
96kg区	96	0.48	1.69	1

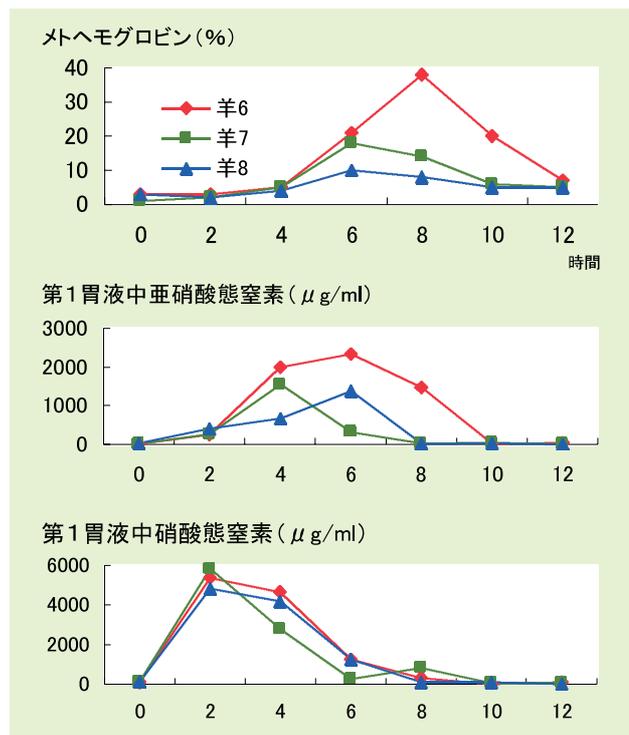


図2. 絶食後の高硝酸塩生草給与における変化

肉牛における低マグネシウム血症の予防対策

肉牛の低マグネシウム（Mg）血症は発症の危険時期に酸化Mgを30g/頭/日投与することで予防できる。発症しやすい牛を選別し、その牛だけを対象とした予防も可能である。

低マグネシウム血症の危険時期は

繁殖雌牛の血清Mg濃度の低下は、春分娩では分娩後～放牧開始後数日間、8月、10月末～11月の放牧末期、秋分娩では分娩後～2月および放牧開始後数日間にみられた（図1）。これらの時期は本症発症の危険時期と考えられる。また、その低下は飼料の摂取量不足または泌乳による体内から流出に起因すると考えられる。

本症は特定の牛で発生

血清Mgの著しい低下は、特定の牛に限ってみられたことから、本症を発症しやすい牛の存在が明らかとなった。これらの牛は消化管におけるMg吸収率が低く、かつ尿からMgが排泄されやすいため、Mg摂取不足などが加わると、血清Mg濃度が著しく低下すると考えられた。

低マグネシウム血症の予防法

本症の予防には、発症の危険時期に酸化Mgを成雌牛1頭当たり30g毎日添加することで十分である。添加方法は配合飼料1kgに酸化Mgを混和し給与してもよいが、炭水化物含量の高い濃厚飼料に混和した方がMgの吸収は良くなる。

また、本症を発症しやすい牛以外は酸化Mg無投与でも、血清Mg濃度が低下しにくいことから、発症しやすい牛だけを対象にした酸化Mg投与により経済的、かつ効率的な予防が可能である（図2）。なお、血清Mg濃度の低下しやすい放牧開始時と終牧時に2回以上全頭の血清Mg濃度を検査し、1度でも1.5mg/dl以下に低下した牛を発症しやすい牛として選別することができる。

【昭和57・62年度 新得畜試】



低マグネシウム血症でテタニ - 症状を示した肉牛

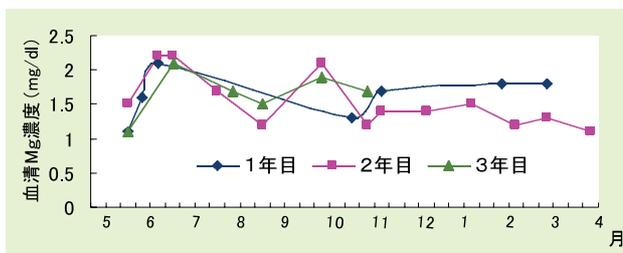


図1. 春分娩牛の血清Mg濃度の季節変動

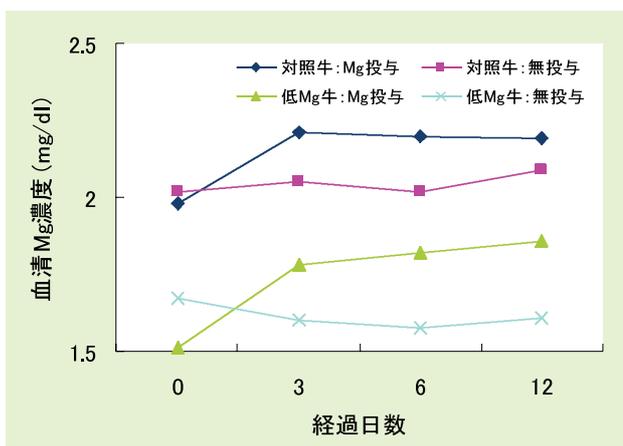


図2. 酸化Mg投与後の血清Mg濃度の推移

めん羊の早春放牧と低マグネシウム血症

早春放牧における低マグネシウム血症の要因として、放牧地への窒素およびカリの施用量の違いよりも、放牧前の栄養条件や泌乳の影響が大きいことを明らかにした。

カリ施用量と血清マグネシウム濃度の関係

牧草地へのカリ（K）施用量が多いと、低マグネシウム（Mg）血症を発症しやすくなるといわれることから、窒素およびK施用量（kg/10a）で区（10：10）、区（10：60）、区（40：10）、区（40：60）の4処理区を設け、めん羊を5カ月間放牧とした。

牧草中の窒素含量は窒素施用量の多い区で3.67、3.42%と高く、K含量はK施用量の多い区で4.22、4.53%と高くなった。K/Ca+Mg（m.e.比）は区で4.11、4.35と、Kempらが低Mg血症の危険値とする2.2を上回った（表1）。しかし、めん羊の血清Mg濃度は各区1.8～2.2mg/dl、血清K濃度は各区20.9～21.9mg/dlといずれも処理間に差がみられなかった。

放牧前の飼養条件が低マグネシウム血症に影響

放牧前の栄養条件で、去勢羊を適栄養群と低栄養群に分け、さらに仔つき母羊群を設け、上記と同様の放牧地へ早春に放牧した。適栄養群では放牧後の血清Mg濃度の低下はみられなかったが、低栄養群では放牧2日後に各区0.86～1.07mg/dlに低下し、テタニーの発生率が高くなるといわれる1mg/dl以下が20頭中12頭みられた。また、仔つき母羊群でも放牧2日後に血清Mg濃度は1.33～1.55mg/dlに低下した。しかし、いずれの群でも施肥処理による差はみられなかった（図1）。

これらから、低Mg血症の要因として、放牧地への窒素・カリ施用量の違いよりも、放牧前の栄養状態あるいは仔つき母羊のようにMg要求量の高い場合に、放牧後2～3日で急速に血清Mg濃度が低下することが明らかとなった。早春放牧における低Mg血症の予防には、放牧前の栄養管理と、馴致放牧などにより、飼料の急変を避けることが大切である。

【昭和55年度 滝川畜試】

表1. 牧草中の成分(乾物中%)と、K/Ca+Mg比

	N	P	K	Ca	Mg	K/Ca+Mg
I区	2.68	0.45	3.36	0.25	0.19	3.06
II区	2.61	0.44	4.22	0.23	0.18	4.11
III区	3.67	0.37	3.82	0.27	0.22	3.09
IV区	3.42	0.35	4.53	0.22	0.19	4.35

血清Mg濃度(mg/dl)

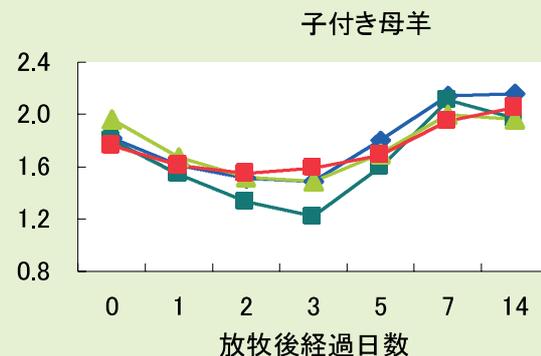
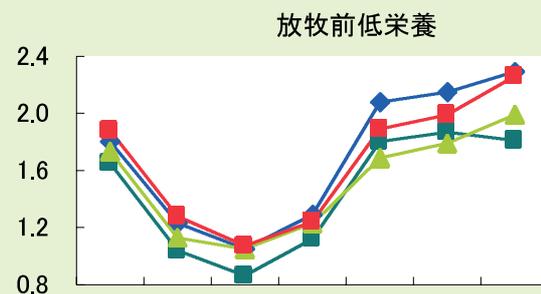
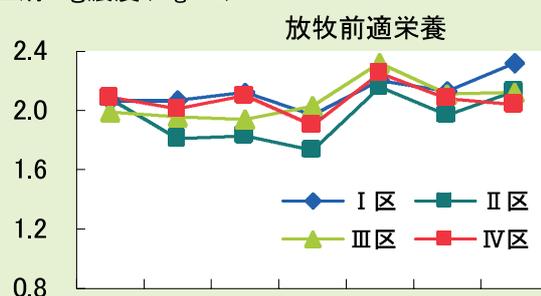


図1. 放牧前の飼養条件の違いと血清Mg濃度

セレン分析法の改良と北海道のセレン欠乏実態

北海道の牧草は全般的に著しいセレン欠乏の状態にあり、粗飼料主体の飼育では、牛がセレン欠乏に陥る危険性が極めて高い。

セレン分析法の改良

水素化物生成を利用した原子吸光法によるセレン分析法の改良と、簡易標準添加による検量線の組み合わせにより、従来法に比べ、簡便で精度の高い分析が可能となった。

北海道におけるセレン欠乏の実態

道内の主な肉牛飼養地帯である40市町村を対象として、放牧状態にある肉牛の血清セレン濃度を調査した。

牧草中セレン含量は平均0.023ppmで、全体の約9割に当たる35地区が0.04ppm以下の著しい低値を示した（図1）。土壌別では、火山灰系地帯の牧草セレン含量が概して低い傾向にあった。肉牛のセレン要求量は飼料中0.1～0.3ppmであるから、道内における牧草の多くが、要求量の1/100程度という驚くほどの低値である。

成牛の血清セレン濃度は、6.7～37.1ppb、平均21.2ppbで、18地区が20ppb以下の著しい欠乏値であった（図2）。

子牛の血清セレン濃度は、成牛よりさらに低く、平均13.5ppbと極端に低く、31地区、全体の8割の地区が20ppb以下の著しい欠乏値であった（図3）。特に十勝、網走、渡島、上川支庁管内では著しく低い傾向にあった。また、牧草セレン含量が低い地区ほ

ど、肉牛の血清セレン濃度も低く、粗飼料主体の飼育では、牛がセレン欠乏に陥る危険性が極めて高いことが明らかとなった。【昭和62・平成2年度 新得畜試】

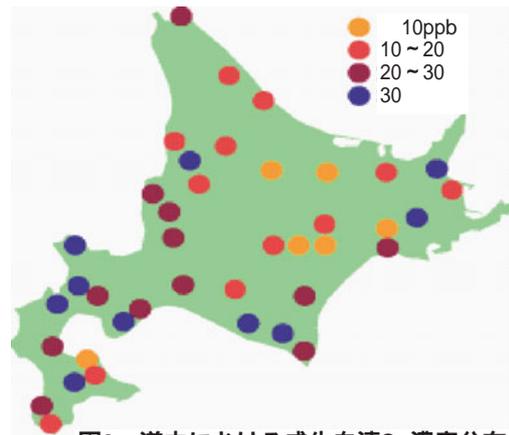


図2．道内における成牛血清Se濃度分布

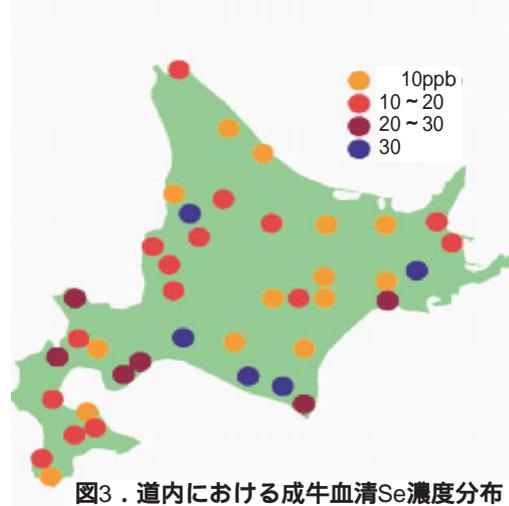


図3．道内における成牛血清Se濃度分布

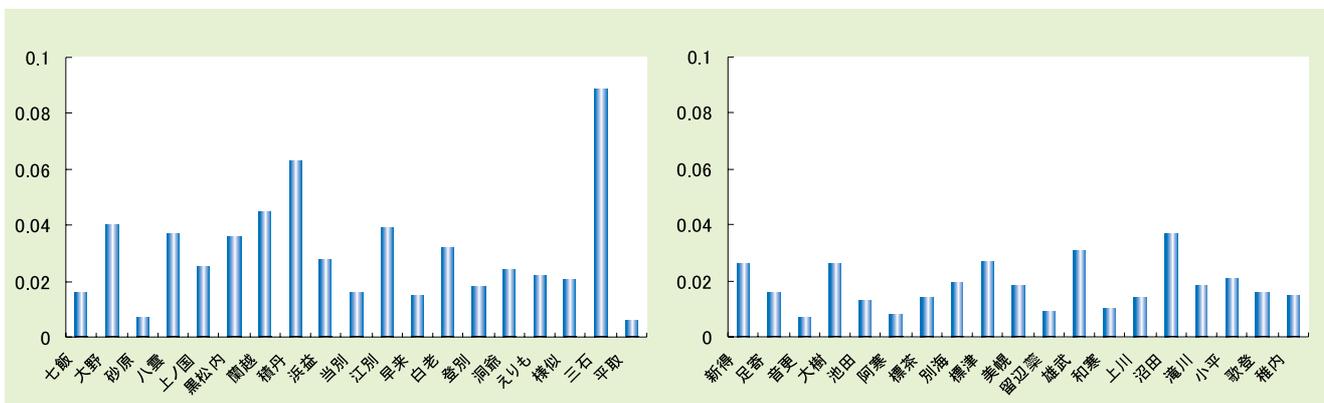


図1 北海道各地における牧草中セレン含量 (ppm)

子牛白筋症の予防対策

セレン・ビタミンE注射液およびセレン含有パン酵母（セレン酵母）を用いた子牛白筋症予防プログラムを策定した。

セレン・ビタミンE注射液の予防効果

セレン・ビタミンE注射液（1ml中セレン2.5mg、ビタミンE50IU含有）の投与量、投与時期についていくつか検討した。

出生直後の子牛に対する2ml 1回投与では、セレンが生体内で実際に作用するグルタチオンペルオキシダゼ（GSH-Px）という酵素が、投与後9週においても高値を維持した（図1）。これは2ml 1回投与で少なくとも9週間程度は、白筋症を予防できることを示している。

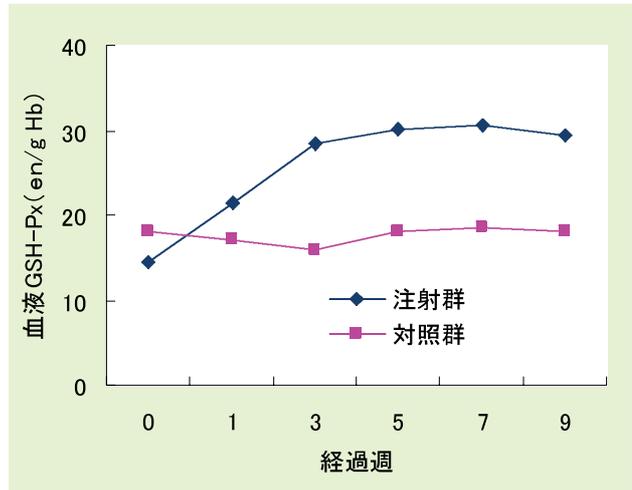


図1. セレン・ビタミンE注射後の血液GSH-Pxの推移

セレン酵母の予防効果

分娩後の母牛にセレン酵母（セレン1,000ppm含有）を、体重kg当たり4.2mg添加することにより、子牛の血清セレン濃度およびグルタチオンペルオキシダゼ活性値は著しく上昇した（図2）。これはセレン酵母が子牛への直接投与ばかりでなく、母牛への投与によっても乳汁を介して、子牛の白筋症の予防に効果があることを示している。なお、このセレン酵母添加量は、全飼料中セレン含量を0.2ppm上昇させる量に相当する。

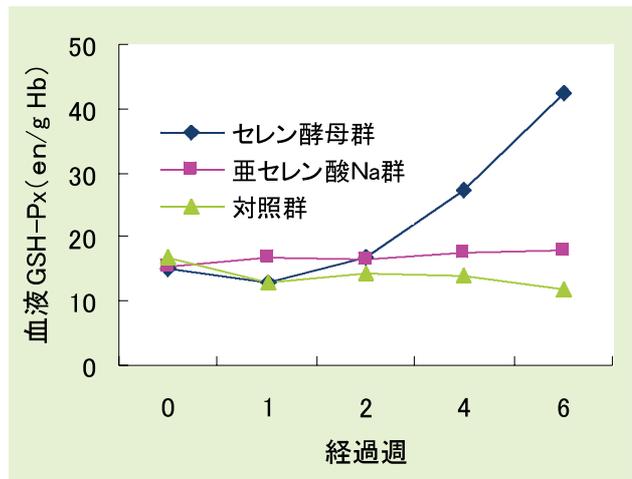


図2. セレン酵母添加後の血液GSH-Pxの推移

予防プログラムの策定

本症の発生は生後3カ月齢までに多いこと、放牧後は生草の採食によりビタミンE摂取量が増え、本症発症の危険性がほとんどなくなることを考慮し、セレン・ビタミンE注射液およびセレン酵母を用いた6通りの白筋症予防プログラム（図3）を策定した。飼養管理の実状に合わせプログラムを選択・実施することにより本症は予防できる。

セレン酵母はセレン含量が1000ppmと著しく高いことから、投与量および管理については十分注意する必要がある。また、セレン酵母を含有した他の飼料を用いる場合には、セレン酵母が上記の量となるように、給与量を決定すると良い。

【平成2年度 新得畜試】

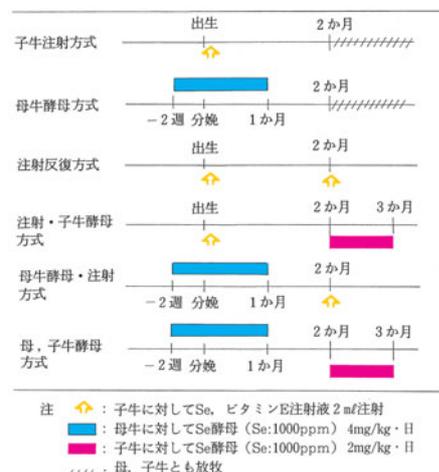


図3. 子牛白筋症予防プログラム

セレン補給による牛の感染防御機能向上

牛へのセレン補給により、感染防御機能に関わる白血球機能が増強するとともに、胎盤停滞の発生率と乳汁中体細胞数が低下する傾向にあった。

セレン酵母給与による白血球機能の増強

分娩後の肉用種の母牛と同居している子牛を供試し、母牛にセレン (Se) を1,000ppm含有する乾燥パン酵母を3.5%添加した配合飼料を給与した。母牛の血清Se濃度は給与3週後、血液グルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-Px) 活性は6週後に各々顕著に上昇した。子牛の血清Se濃度は給与3週後 (図1)、血液GSH-Px活性は8週後に各々顕著に上昇した。子牛の好中球殺菌能およびリンパ球幼若化能は5週後に増強が認められた (表1)。

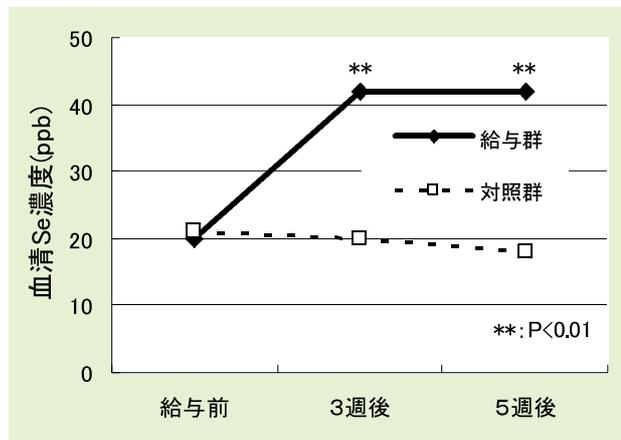


図1 Se酵母給与による子牛の血清Se濃度の推移

セレン注射による胎盤停滞および乳汁中体細胞数の低減効果

分娩予定3週前の乳牛に対して、Se・ビタミンE合剤を10mlまたは20ml筋肉内注射した。注射後血清Se濃度は有意に上昇が認められた。注射前の血清Se濃度が30ppb程度と低い経産牛では、10ml注射により胎盤停滞の発生率および乳汁中体細胞数が低減する傾向にあった。また、注射前の血清Se濃度が40ppb程度とやや低い初産牛では、20ml注射により乳汁中体細胞数が低減する傾向にあった (図2)。

これらから、血清Se濃度は50ppb以上であることが望ましい。Se補給方法には、Se含有固形塩、

分娩3週前にSe・ビタミンE合剤(1ml/45kg)の注射、分娩前1か月前～分娩までのSe酵母の飼料添加(Se量0.2～0.4mg/100kg)等がある。また、初産牛は経産牛より、Seが欠乏しやすいため、分娩前のSe補給について配慮が必要である。

【平成9年度 新得畜試】

表1. Se酵母給与による子牛の白血球機能の推移

	処理群	给与前	5週後
分離顆粒球化学発光反応 好中球化学発光指数値	给与群	58.0±8.9	62.1±14.2
	対照群	70.6±12.4	64.1±11.3
ピーク時間(秒)	给与群	278±38	192±53**
	対照群	260±19	303±58
リンパ球幼若化能 Con AIによる指数値	给与群	11.2±5.2	8.6±1.8*
	対照群	11.2±3.7	5.9±1.8

平均値±標準偏差、**：P<0.01,*：P<0.05

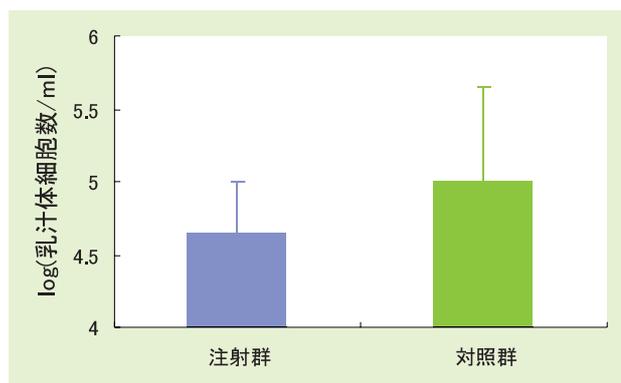


図2 初産牛に対するセレン20ml注射による分娩後の乳汁中体細胞数

肥育牛の肝膿瘍

肝膿瘍は育成期の粗飼料給与不足や選択採食による粗飼料摂取不足が大きな原因である。また、肝膿瘍多発農家では胃炎の発生が多く、枝肉成績も悪い傾向にある。

育成期の粗飼料採食不足が大きな要因

乳用雄肉牛農家での肝膿瘍の発生状況と飼料の給与方法との関連を調査したところ、粗飼料と濃厚飼料を混合給与している農家では肝膿瘍の発生が少なく、逆に分離給与している農家では肝膿瘍が多発する傾向にあった。これは分離給与では選択採食による粗飼料の採食不足が考えられた。

飼料給与量との関連は育成期での粗飼料給与量が多い農家ほど、肝膿瘍の発生が少なかった(図1)。また、育成期の粗飼料給与量が多い育成牛と少ない育成牛が、その後同じ環境で肥育された場合も、粗飼料の多い育成牛は少ない育成牛より肝膿瘍の発生が少なかった。これらから、肝膿瘍は育成期の粗飼料採食不足が大きな原因であることが明らかとなった。

肝膿瘍の低減効果

肝膿瘍発生の多い農家で、育成期間(4~7カ月)の総乾草給与量(現物)を1頭あたり75kgから123kgに増給したところ、肝膿瘍の発生が増給前より低減した(図2)。

肝膿瘍多発の飼養法は生産成績が悪くなる

肝膿瘍発生の多い農家では胃炎の発生も多く、また、枝肉成績については枝肉重量、格付け上物率(B3以上)ともに悪い傾向にあった(図3)。肝膿瘍は胃炎から起こる病気であるため、肝膿瘍の多い農家では、ほとんどの牛が胃炎になっている。このため、肝膿瘍を発生させる飼養管理では肥育効率が悪く、経済損失が大きい。

【平成11、12年度 畜試】

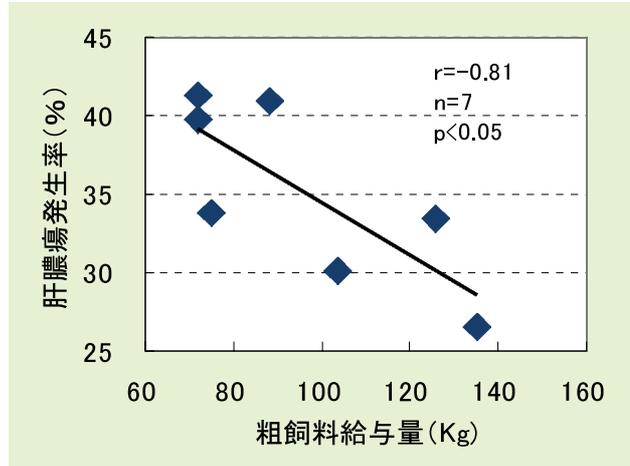
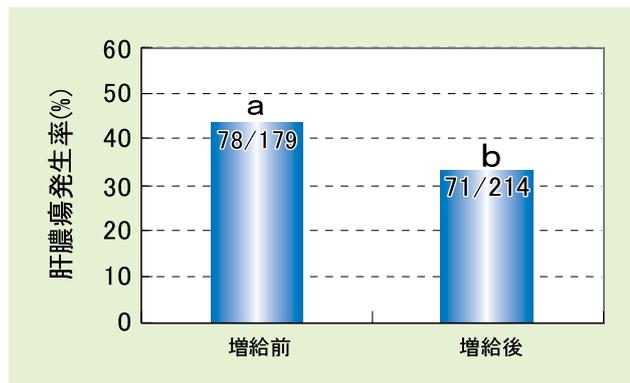


図1 育成期における粗飼料給与量と肝膿瘍発生率との関係



異文字間に有意差あり、 $p < 0.05$

図2 粗飼料増給前後の肝膿瘍発生率

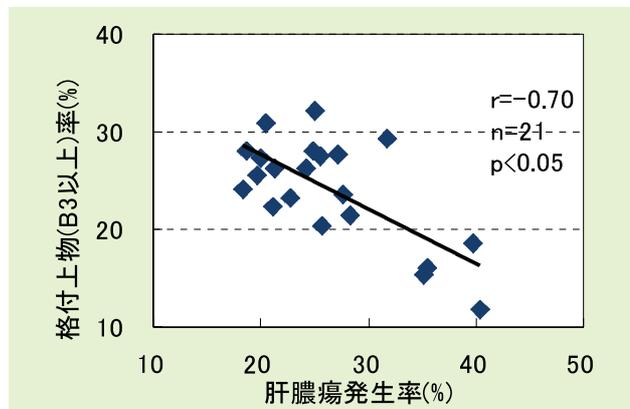


図3 農場別の格付上物率と肝膿瘍発生率との関係

乳牛の カロテン・ビタミンA 製剤添加効果

カロテンおよびビタミンA製剤の添加効果は、良質粗飼料が給与されている場合には少ないが、低カロテン飼料給与下では繁殖性の向上が期待される。

粗飼料中の カロテン含量の違いは大きい

牧草中の カロテン含量は、生育ステージとともに低下するため、牧草の刈り取り日の違いにより、開封時のサイレージ中含量の違いも大きい(図1)。また、カロテンは日光により分解されるため、調製日数6日を要した乾草では、その含量は原料草の約1/10に低下する。さらに、貯蔵中にもカロテン含量は低下し、調製時に比べサイレージでは50~80%、乾草では20%程度となる。

良質サイレージに カロテンの添加は必要ない

カロテンはビタミンAの前駆物質であるだけでなく、繁殖機能に関係するといわれる。そこで、泌乳牛を用いて、高および低カロテン含有(各々107、31mg/乾物kg)牧草サイレージ給与時におけるカロテン製剤添加(500mg/日)効果を検討した。

高カロテン飼料給与牛の血中カロテン濃度は、添加の有無にかかわらず、繁殖障害が起こるといわれる下限値200 μ g/dlを越えていた。しかし、低カロテン飼料給与牛では、無添加区の血中カロテン濃度は200 μ g/dl近くとなり、種付け適期となる3回目の排卵日数および受胎までの日数の延長がみられた。

また、子牛の血中カロテン濃度は初乳中のカロテン含量を反映していた(表1)。

ビタミンAは肝臓に貯蔵される

前記と同様の飼養条件で、ビタミンA製剤の添加(10万IU/日)効果について検討した。しかし、飼料中カロテン含量の違いおよび添加の有無にかかわらず、血中ビタミンA濃度に差がみられなかった。これは飼料中のカロテンがビタミンAに変換され、長期間肝臓に貯蔵されるためと推察された。

これらから、良質粗飼料や生草が給与されている場合には、カロテンおよびビタミンA製剤の添加は必要がないと考えられた。しかし、カロテン含量の低い乾草などが給与されている場合には、カロテン製剤の添加により、繁殖性の向上が期待される。【平成2年度 根釧農試】

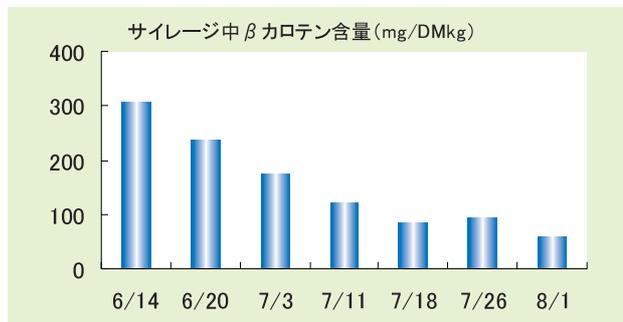


図1. 刈り取り日の違いとサイレージ中 β カロテン含量の関係

表1. β カロテン製剤添加と、血液成分および繁殖性の関係

		高 β カロテン飼料		低 β カロテン飼料	
		添加区	対照区	添加区	対照区
β カロテン摂取量	mg/日	2,038	1,338	789	302
成牛の血液成分					
β カロテン濃度	μ g/dl	1,306	924	747	228
ビタミンA濃度	μ g/dl	38	38	33	55
子牛の血液成分(生後7日目)					
β カロテン濃度	μ g/dl	60.5	30.3	9.1	6.8
ビタミンA濃度	μ g/dl	12.2	14.2	16.8	19.3
繁殖性					
3回目排卵日数	日	62	66	68	84
受胎日数	日	91	101	103	120

乳牛の供用年数短縮の要因

乳牛の供用年数の指標となる平均産次は、高泌乳・フリー・スト・ル化に伴い低下したことを示し、乳量水準および飼養形態と、疾病発生との関連性も明らかにした。

平均産次は3.5産から2.8産に低下

乳牛の供用年数の指標となる平均産次は、北海道では1983年の3.5産から1990年には2.9産に低下し、その後2.8~2.9産の低い水準で経過している（図1）。これは体細胞数の規制強化や、乳価、個体販売価格および生乳生産枠の変動を背景に、乳牛の淘汰・更新が進んだ結果と考えられる。

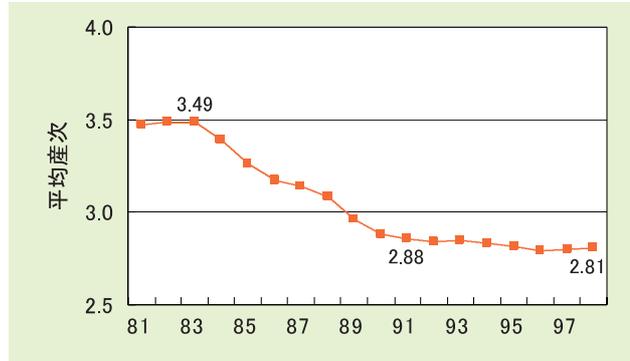


図1. 北海道における平均産次数の年次推移

高泌乳・フリー・スト・ル化は平均産次を下げた

北海道の乳検加入農家1,466戸を調査し、高泌乳農家（経産牛乳量9,000kg以上）は低泌乳農家（同7,999kg以下）に比べ平均産次が低く、さらに、フリー・スト・ル方式の農家がより低いことを示した（図2）。しかし、高泌乳でかつフリー・スト・ル方式の農家は、体細胞数が低く、空胎日数も短いことから、乳房炎や繁殖障害の牛を積極的に淘汰しているとも考えられた。

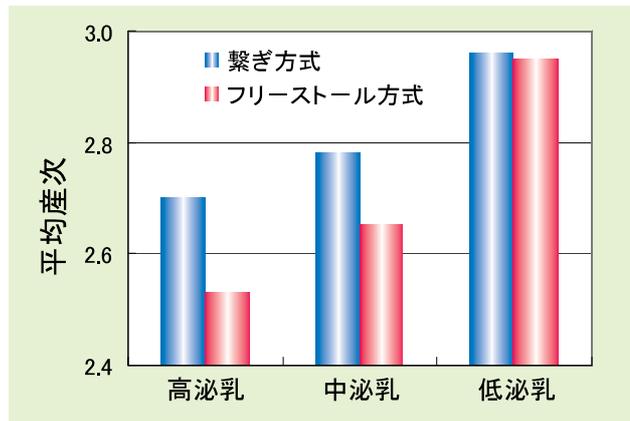


図2. 乳量水準・飼養形態別の平均産次

乳量水準・飼養形態で疾病の発生状況は異なる

高泌乳農家では中・低泌乳農家に比べ、全病傷危険率が約20ポイント高く、乳房炎、卵巣疾患、子宮疾患、第四胃変位、胃腸疾患、産褥熱およびケト・シスの発生率が高かった。また、繋ぎ方式では乳房炎、乳頭損傷および卵巣疾患、フリー・スト・ル方式では第四胃変位および乳熱が多く、飼養管理上の問題点と関連していた（表1、図3）。

【平成11年度 根釧農試・畜試】

表1. 217乳牛群の飼養形態・乳量水準別疾病発生状況(%)

	繋ぎ方式			フリー・スト・ル方式		
	高泌乳	中泌乳	低泌乳	高泌乳	中泌乳	低泌乳
乳房炎	27.6	22.8	22.4	19.9	13.8	16.2
卵巣疾患	25.8	19.1	24.5	21.7	10.8	17.2
乳熱	4.9	4.3	4.1	5.8	5.4	4.1
蹄疾患	2.8	2.8	3.6	5.3	5.9	2.8
ケト・시스	3.1	1.5	1.1	2.3	0.7	1.1
胃腸疾患	3.5	2.1	1.2	3.0	1.0	2.1
第四胃変位	1.5	1.3	0.9	2.6	1.0	1.1

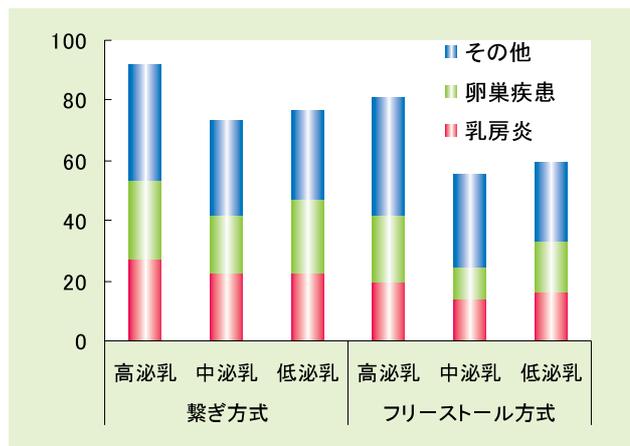


図3. 乳量水準・飼養形態別病傷事故率(%)

4 繁殖管理技術

乳牛の泌乳初期のエネルギー充足と繁殖機能

分娩後のTDN充足率は、卵胞発育状況に影響し、栄養充足率が速やかに回復するほど小型卵胞から中型～大型卵胞への移行が早くなり、初回排卵も早まる傾向にあった。

分娩後の栄養充足と卵巣の動態

分娩後のTDN充足率の変動パターンを **型** (充足率の回復が早い) および **型** (分娩後60日まで充足率が65～80%で推移、もしくは疾病等により充足率が50%以下と極端に低下) に分類し、卵巣動態と比較した。

型では、TDN充足率の増加に伴い、卵巣に初めて最大卵胞が形成され、小ピークの前後に初回排卵した(図1)。**型**では、分娩後の要求量に対し、TDN摂取量が不足し、TDN充足率が80%前後の低値で推移した場合には、その間、卵巣には複数の最大卵胞が形成されるものの排卵せず、閉鎖退行を繰り返した(図2)。また、TDN充足率が50%以下と極端に低下している期間中には、最大卵胞の形成がなく、卵巣静止の状態にあった。その後、充足率の回復とともに初回最大卵胞が形成された。

TDN充足率とその後の繁殖成績

初回排卵までの日数は、TDN充足率の回復が早い **型**で短く、TDN充足率の長期間の不足や極端な低下を示した **型**で長くなった。また、最終的に **型**ではほとんどの個体で受胎したのに比べ、**型**では、不受胎牛が多く、空胎日数も延長した(表1)。

このことから、分娩後のTDN充足率は、分娩後早期の卵胞発育状況に影響し、栄養充足率が速やかに回復するほど小型卵胞から中型および大型卵胞へ移行することを促進し、最大卵胞の発育や初回排卵までの日数を短縮する傾向にあった。TDN充足率の回復が早い牛は最終受胎率および空胎日数が良好であることから、分娩後速やかにTDN充足率を回復させることが卵巣機能を刺激し、早期に受胎するための必要条件である。

【平成4年度 根釧農試】

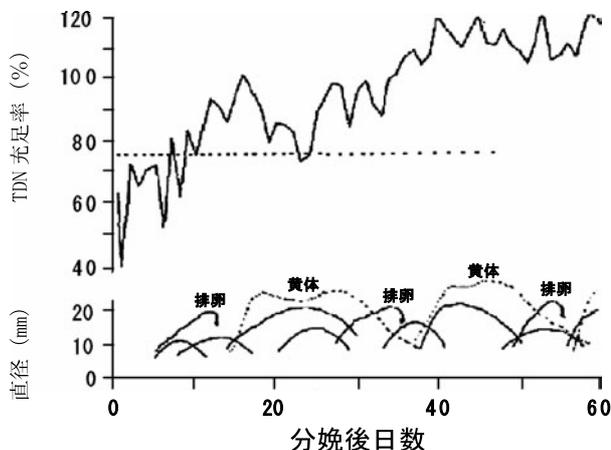


図1 分娩後60日のTDN充足率の変動(型)と卵巣動態

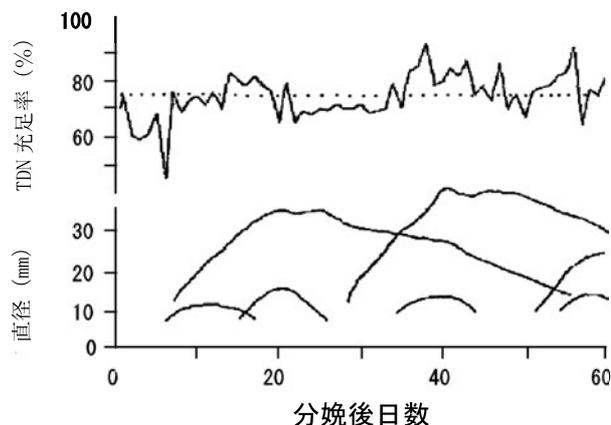


図2 分娩後60日のTDN充足率の変動(型)と卵巣動態

表1 分娩後のTDN充足率で、型に区分した牛群のその後の繁殖性

TDN充足率型	I	II
例数	34	13
受胎頭数	33	7
初回排卵日数	17.5	40.7
2回目排卵日数	40.6	68.3
最終受胎率	97.1	53.8
空胎日数	87.9	94.6

ボディコンディションと乳牛の繁殖性

乳牛の体蓄積脂肪の指標ひいてはエネルギー - 充足の代替になると考えられるボディコンディションスコア (BCS) を用いて、その推移と繁殖性との関連を検討した。

BCSの推移と繁殖成績

5農場のBCSの推移と繁殖成績の関係を調査したところ、各農場ごとに特徴的なBCSの推移が見られた。即ち、分娩時BCSが最適で分娩後の低下も適正で回復の早かったA農場の繁殖成績は良好であった。一方、分娩時BCSはほぼ良好であるが分娩後の低下が大きく回復の遅いB農場、分娩時BCSが低すぎるC農場および分娩時BCSが低い上に分娩後の低下も大きかったD農場の繁殖成績は劣った(図1、表1)

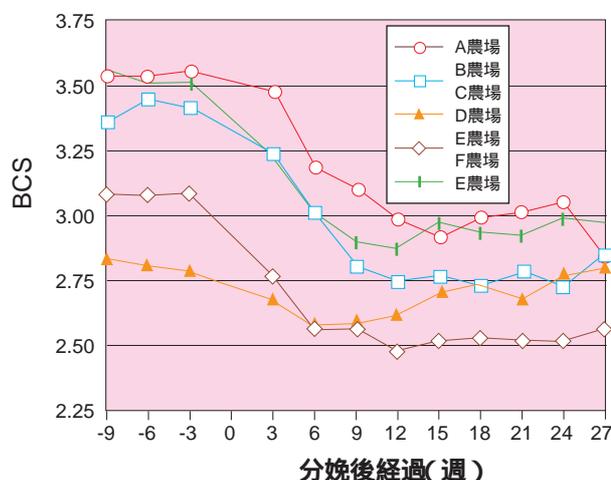


図1 農場別に見たBCSの推移

分娩後のBCSの低下と繁殖成績

分娩時のBCSが3.25 ~ 3.75と適正であった場合、分娩後のBCSの低下が小さい時には空胎日数は短く、BCSの低下が0.75以上と大きくなるとやや延長した。分娩時のBCSが4.0以上と高い場合には分娩後の低下が小さい場合には初回授精受胎率、空胎日数に影響は見られなかったが、低下が大きいと初回授精受胎率は低下し、空胎日数は延長した(表2)。

表1 各農場毎に特徴的なBCSと繁殖成績

農場	A	B	C	D	E
牛群頭数	24.8	45.5	56.3	63.4	56.7
平均産次	2.1	3.5	3.4	3.1	2.7
分娩時 BCS	3.61	3.46	2.88	3.09	3.56
分娩時から 8 週後 までの BCS 低下	0.55	0.61	0.39	0.61	0.62
搾乳牛 BCS ≤ 2.25	0-1%	17-10%	34-17%	41-24%	3-4%
分娩間隔	382	422	406	407	423
授精回数	1.2	2.1	1.9	2.4	2.9
初回授精受胎率	71.4%	35.8%	39.8%	29.1%	35.7%
空胎日数	93	144	138	137	139

人工授精後のBCSの変動と受胎率

分娩後150日以内に人工授精した281例の授精後4週間のBCSの変動と受胎との関係では、授精後4週目までにBCSの増減が - 0.5と大きい個体は受胎率が低かった(表3)。

表2 分娩時BCSおよび分娩後のBCS低下と繁殖成績

分娩時の BCS	分娩後の BCS 低下	頭数	初回授精日数	授精回数	初回受胎率	空胎日数
2.50 ~ 3.00	0 ~ 0.5	30	76 ± 26	1.7 ± 0.8	53%	100 ± 35
3.25 ~ 3.75	0 ~ 0.5	35	69 ± 26	1.7 ± 0.9	54%	94 ± 37
	0.75 以上	32	67 ± 23	1.9 ± 1.2	50%	101 ± 44
4.00 以上	0 ~ 0.5	4	67 ± 28	1.5 ± 0.6	50%	82 ± 17
	0.75 以上	4	81 ± 23	2.5 ± 0.6	0%	126 ± 32

牛群のBCSの採点は継続的に行い、個体管理まで利用できれば最善であるが、一時期の採点でも牛群全体の栄養状態を把握できる。

良好な繁殖成績を期待するには分娩後のBCS低下を避けること、分娩時のBCSを3.25 ~ 3.75にすること、授精後の急激なBCSの低下を避けることである。

表3 授精後4週間のBCS変化と受胎との関係

	授精後 4 週までの BCS の増減				
	-0.5	-0.25	0	+0.25	+0.5
授精頭数	3	27	189	50	12
受胎頭数	0	9	70	21	4
受胎率 (%)	0	33.3	37.0	42.0	33.3

【平成8年度 根釧農試】

放牧時の蛋白質水準と乳牛の健康・繁殖性

放牧時に併給する濃厚飼料の蛋白質水準を適正に維持することが、分娩後の乳牛の健康ならびに繁殖性の維持に重要である。MUN濃度は蛋白質水準の指標の一つとして有用である。

蛋白質水準は分娩後の卵巣機能および子宮の回復に影響する

放牧飼養される乳牛では舎飼時に比べて蛋白質が過剰となりやすい。そこで、放牧時に併給する濃厚飼料の粗蛋白質(CP)水準が分娩後の乳牛の繁殖機能回復に及ぼす影響について検討したところ、初回排卵および子宮修復日数は、CP水準が高くなるにしたがって短くなる傾向が見られた(表1)。

放牧時の蛋白質水準とMUN濃度との関係

低CP区では分娩後4週まで乳中尿素窒素(MUN)濃度が8mg/dl未満と低く、飼料摂取量が少ない産褥期では蛋白質が不足していた(図1)。他方、泌乳最盛期では高CP区のMUN濃度は23.2mg/dlとなり、蛋白質摂取量が過剰と判断された。

蛋白質水準が高すぎると肝機能に負担

分娩後1週目から高蛋白質水準の濃厚飼料を給与され続けた放牧牛では、泌乳最盛期に血清GOT活性が基準値を超え、肝機能に負担がかかっている状況がうかがえた(表2)。

適正水準の蛋白質給与が乳牛の健康と繁殖を維持する

繁殖障害として治療した牛は、低および中CP区に比べ高CP区で多い傾向があった(14.3%および13.3% vs 40%)。初回授精受胎率は、中CP区に比べて低および高CP区で低い傾向があり(40% vs 14.3%および20%)。実頭数受胎率はCP水準が高くなるにしたがって上昇した(85.7%、93.3%、100%、表3)。空胎日数は、中CP水準で最も短かった。

放牧飼養される分娩後の乳牛では、併給する濃厚飼料のCP水準が低いと産褥期の蛋白質摂取不足から卵巣機能の回復が遅れ、また、CP水準が長期にわたって高く設定された場合には繁殖障害をはじめとする疾病の発生が増加する。

表1 放牧時の飼料中粗蛋白質含量が乳牛の繁殖機能回復に及ぼす影響

処理区	低 CP 区 (n=14)	中 CP 区 (n=15)	高 CP 区 (n=5)
濃厚飼料中 CP 含量 (全飼料中 CP 含量)	9% (16.5%)	14% (18.5%)	19% (20.8%)
初回排卵日数	35.1 ± 18.1	25.4 ± 12.3	20.4 ± 4.0
初回発情日数	47.3 ± 10.2	41.3 ± 23.0	41.4 ± 12.1
子宮修復日数	39.6 ± 11.6	36.0 ± 7.7	34.2 ± 15.1

平均値±SDで示す。

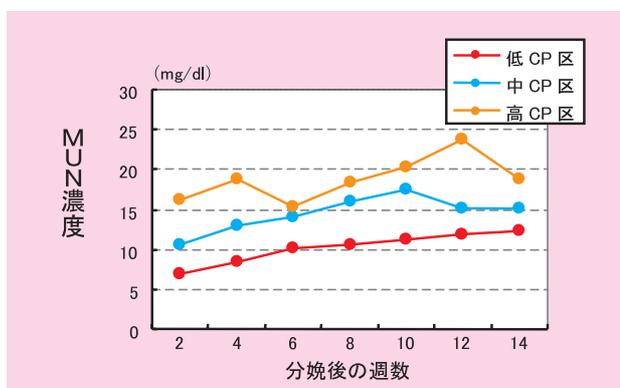


図1. 分娩後の飼料中 CP 水準と MUN 濃度との関係

表2 放牧時に併給する濃厚飼料の蛋白質水準と泌乳最盛期の血液性状との関係

項目\処理区	低 CP 区	中 CP 区	高 CP 区
BUN (mg/dl)	12.4 ± 3.7	14.6 ± 3.4	19.3 ± 2.2
血糖 (mg/dl)	60.5 ± 6.1	61.8 ± 4.2	61.3 ± 4.7
GOT (IU/L)	67.4 ± 9.6	73.3 ± 12.7	79.5 ± 12.7

泌乳最盛期の基準値、BUN: 16.05 ± 4.44mg/dl、血糖: 60.92 ± 6.7mg/dl、GOT: 64(52~77)IU/L

表3 放牧時の蛋白質水準が乳牛の繁殖に及ぼす影響

項目	低 CP 区 (n=14)	中 CP 区 (n=15)	高 CP 区 (n=5)
初回授精日数	62.4	63.7	73.4
空胎日数	116.1	106.2	123.2
受胎牛の AI 回数	2.5	2.1	2.0
初回授精受胎率 %	14.3	40	20
受胎頭数割合 %	85.7	93.3	100
繁殖障害発生率 %	14.3	13.3	40

乳牛の繁殖成績に影響する要因

乳牛の空胎日数は初回授精日数との相関が最も高く、初回授精日数を早めるには、難産・胎盤停滞を防ぎ、分娩後の栄養充足をはかり、的確な発情発見に努めることが重要である。

空胎日数に影響する要因は？

(周産期の健康・栄養充足・発情発見)

乾乳牛40頭の調査では、空胎日数は周産期の健康状態に関連する乾乳期のインスリン感受性低下(糖代謝異常)と胎盤停滞の発生、分娩後のエネルギー充足状況を表す産褥期および泌乳初期のTDN充足率、ならびに発情発見技術と関連する初回授精の日数および受胎率と空胎日数との間に有意な相関が認められた(表1)。

分娩前のエネルギー不足は難産率を高める

40頭の乳牛について飼料摂取量と分娩状況との関係を調べたところ、分娩前3週間の平均TDN充足率が低いほど難産率(分娩難易度3以上の割合)が高く、TDN充足率が100%以上では無介助の自然分娩が多かった(図1)。分娩前のTDN充足率を低下させる要因として乾乳期の過肥(BCS3.75以上)やインスリン感受性低下が挙げられた。難産は、疾病による淘汰を増加させ、授精率や妊娠率を低下させた。

エネルギー不足は発情発現率を低下させる

産褥期(分娩後3週間)のTDN充足率が80%以上の牛(H群)と、それ未満の牛(L群)に分けて通常の1日2回の行動観察から発情の発現状況を調べた。その結果、L群はH群に比べ泌乳前期の発情発現率が有意に低かった(p<0.01)。

発情行動検出率が高い農場は受胎率も高い

発情を行動(スタンディング・マウンティング)で発見する割合が50%以上と高い農場は、発情行動の検出率が低い農場に比べて、初回授精受胎率が有意に高かった(p<0.01)。これは、行動で発情を発見することで、発情開始からの時間が予測でき、適期に授精できたことによるものと推察された。

【平成15年度 根釧農試】

表1. 空胎日数と相関が見られた要因

対象	要因	相関係数(ρ)	改善事項
空胎日数	乾乳期のインスリン感受性	-0.415 *	周産期の健康
	胎盤停滞	0.456 **	
	産褥期TDN充足率	-0.479 **	分娩後のエネルギー充足
	泌乳初期TDN充足率	-0.412 *	
	初回授精日数	0.595 ***	発情発見
初回授精受胎率	-0.531 **		

Spearmanの順位相関係数(ρ) *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001
40分娩例について解析

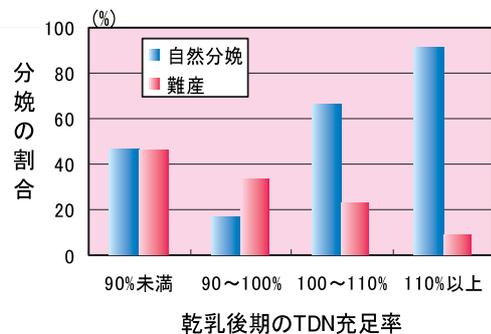


図1. 分娩前のTDN充足率と分娩状況との関係

表2 産褥期のTDN充足率と発情発見との関係

項目	H群 n=17	L群 n=10
初回排卵日数	37.1 ± 21.9	42.4 ± 22.6
初回発情日数	54.8 ± 22.7 ^a	97.2 ± 48.0 ^b
発情発現率 %	73.7 ^A	30.4 ^B
初回授精日数	69 ± 27 ^A	117 ± 44 ^B
空胎日数	109 ± 53 ^A	189 ± 70 ^B

¹⁾H群は産褥期(分娩後3週間)のTDN充足率が80%以上、L群は80%未満 ²⁾(発情発見回数/排卵回数)×100
A vs B, p<0.01, a vs b; p<0.05

表3 発情発見方法の違いによる初回授精受胎率

発情行動の検出	授精頭数	受胎頭数	初回授精受胎率(%)
高検出農場 ¹⁾	134	70	52.2 ^A
低検出農場 ²⁾	122	37	30.3 ^B

¹⁾ 発見した発情のうちスタンディングおよびマウンティングでの検出率50%以上を占める農場、²⁾ 同上50%未満の農場、
A vs B: p<0.01

周産期モニタリングによる乳牛の繁殖障害リスク評価

分娩状況やBCS、初乳性状などから乳牛の周産期における健康状態を評価し、繁殖障害を予測する周産期モニタリング手法を開発した。

分娩後の卵巣機能回復異常の原因

分娩後の卵巣機能回復が正常な牛と何らかの異常が見られた牛（初回排卵遅延・鈍性発情・卵巣嚢腫・黄体遺残等）に分けて、その違いを調べたところ、異常牛では分娩前のBCSが適正範囲からはずれる割合、難産や胎盤停滞の発生率、初乳のケトン体擬陽性検出率が高く、初乳比重は低かった（表1）。したがって、これらをモニタリングすることで、繁殖障害のリスクを予測することが可能と考えられた。

周産期モニタリング・チェックシート

周産期における乳牛の健康状態を評価し、繁殖障害のリスクが高い問題牛を予測するための「周産期モニタリング・個体チェックシート」を考案した（図1）。

周産期モニタリングの検証

6農場353頭について、乾乳期のBCS、分娩難易度、胎盤停滞、初乳の比重およびケトン体濃度から周産期モニタリングのスコアを算出したところ、合計ポイントの上昇に伴って初回授精日数および空胎日数の延長が認められ、周産期病の発生率も高かった（表2）。

【平成15年度 根釧農試】

個体番号	分娩月日		スコア				
乾乳前期のBCS	3.25~3.50	0	3.0以下	2	3.75以上	2	
難産	介助なし	0	介助あり	2	難産	4	
胎盤停滞	なし	0			あり	4	
初乳性状 比重	1.060以上	0	1.060~1.050	1	1.050未満	4	
初回搾乳時、室温20°Cでの値	初産は(1.050以上)		(1.050~1.040)		(1.040未満)		
〃 ケトン体	<100 μmol	0	100~<200	2	200 ≤	4	
スコアの合計							

※3ポイント以下はOK、6ポイント以上は淘汰または繁殖障害のリスク大

利用上の注意事項

1. 乾乳期のBCS：分娩の1~2ヶ月前のBCSを測定する
2. 難産については、分娩難易度1：介助無し、2：介助あり、3以上：難産、とする
3. 胎盤停滞：分娩後12時間以上停滞した場合に「あり」と判断する。
4. 初乳性状：分娩後最初に搾乳または手搾りした初乳を用いる。1~2日の冷蔵保存可
比重：20 で測定した値（40 で測定した値には0.008をプラスして判定）
ケトン体：試験紙（サンケットペーパー）を初乳に浸して色調から判定する。

図1 周産期モニタリング・個体チェックシート

表1 分娩後の卵巣機能回復に影響する要因

項目	分娩後の卵巣機能回復	
	正常 ¹⁾	異常
頭数	14	23
適正BCS割合 % ²⁾	50 (7/14)	30.4 (7/23)
難産発生率 %	14.3 (2/14)	26.1 (6/23)
胎盤停滞発生率 %	0 (0/14) ^a	26.1 (6/23) ^b
初乳比重	1.066 ± 0.009 ^a	1.057 ± 0.012 ^b
初乳ケトン体検出率 % ³⁾	0 (0/14)	17.4 (4/23)
初回授精日数	61 ± 19 ^A	103 ± 39 ^B
空胎日数	93 ± 38 ^A	167 ± 62 ^B
繁殖治療率 % ⁴⁾	0 (0/14) ^a	34.8 (8/23) ^b

¹⁾分娩後40日以内に初回排卵し、その後周期的に発情・排卵

²⁾乾乳期BCS3.25~3.5. ³⁾3-ヒドロキシ酪酸100 μmol/ml以上

⁴⁾卵巣静止、鈍性発情、卵巣嚢腫、黄体遺残など

A vs B: p<0.01, a vs b: p<0.05

表2 周産期スコア区分と繁殖成績との関係

項目	周産期スコア		
	3以下	4~5	6以上
頭数	221	67	65
初回授精日数 (日)	73.6 ^a	78.6	84.5 ^b
初回授精受胎率 (%)	40.6	39.6	31.3
空胎日数 (日)	101.5 ^A	119.1	137.2 ^B
空胎日数150日以内の割合 (%)	63.7 ⁺⁺	51.7 ⁺⁺	38.3 ⁺⁺
周産期病発生率 (%)*	17.9 ⁺⁺	26.5 ⁺⁺	55.2 ⁺⁺

A vs B: p<0.01, a vs b: p<0.05, ++: 群間に有意差あり(p<0.01)

*: 群間に有意差あり(p<0.05)

乳牛の繁殖改善モニタリング

乳牛の繁殖成績は、周産期の健康状態、栄養充足状況ならびに発情発見技術によって影響を受けており、これらをモニタリングすることで繁殖改善に向けたポイントを把握できる。

繁殖改善モニタリングで問題点を把握する

農場の繁殖状況を正確に把握するとともに、空胎日数と関係の深い周産期の健康、栄養充足ならびに発情発見技術を乳検情報等を活用して、モニタリングするためのチェックシートを作成した(図1)

牛群繁殖成績の概要

乳検情報の検定成績のうち牛群成績表から初回授精日数、空胎日数などの数値を利用する。空胎日数は受胎した牛についてのみの指標なので、牛群全体の繁殖効率を評価するため分娩後日数区分別の授精率、妊娠率などを算出する。毎月の個体成績を1年分または数ヶ月分集計する。

周産期スコアによる乾乳期管理評価

農場における乾乳期から分娩前後にかけての乳牛管理が適切かどうかを評価するため、前頁に示した周産期スコアを個体毎に算出し、牛群の成績として集計する。

乳成分による牛群の栄養管理評価

個体乳成分については、卵巣機能回復に重要な泌乳初期の栄養充足状況を評価するため、乳脂肪率高値(5.0%以上)を示す牛の割合、乳蛋白質率低値(2.8%未満)を示す牛の割合を算出する。乳脂肪率高値割合は体脂肪動員の程度、乳蛋白質率低値割合はエネルギー不足の程度を表す。

バルク乳の乳蛋白質率およびMUN濃度から、受胎率と関連する授精時期の栄養充足状況を評価する。乳蛋白質率は夏冬いずれの季節も低い場合に受胎率は低下し、MUN濃度は放牧期に低いと受胎率が低下しやすい。

発情発見技術の評価

空胎日数を良好に保つ上で、分娩後100日以内の発情発見はとくに重要である。そこで、分娩後100日以内の平均授精回数をチェックする。また、適期授精により受胎率を高めるうえで、発情行動検出率(発情をスタンディングやマウンティングといった発情行動で発見した割合)を高めることが重要である。

繁殖改善モニタリングは、牛群管理の問題点を明らかにし、繁殖成績向上に向けたポイントを把握するために活用できる。

【平成15年度 根釧農試】 図1 牛群の繁殖改善モニタリング・チェックシート

1. 牛群繁殖成績評価(概要)

牛群成績表(13ヶ月平均値)を利用			
初回授精日数		目標値 75日以内	91日以上は要改善
初回授精受胎率		50%以上	
空胎日数		115日以内	145日以上は要改善
除籍率		15%以内(乳用売却を除く)	
繁殖効率 ← 牛群検定個体成績(毎月)から1年分を算出			
授精率 91~120日		目標値 85%以上	60%未満は要改善
妊娠率 121~150日		60%以上	45%未満は要改善
長期未授精211~300日		9%以下	
長期空胎 211~300日		15%以下	

2. 周産期モニタリング牛群チェックシート(牛群の周産期管理を評価)

農場記録(周産期モニタリング・チェックシート)から算出			
スコア3以下の頭数		目標値:60%以上	
スコア4-5の頭数			周産期モニタリング・チェックシートから算出
スコア6以上の頭数		目標値:10%以下	平均スコア

※3ポイント以下は良好、4ポイント以上は周産期管理要改善

3. 乳成分評価(牛群の栄養評価→繁殖機能回復時期(泌乳初期)および人工授精実施時期の栄養充足)

個体乳成分異常値 ← 牛群検定個体成績(毎月)の過去1年分から算出			
異常値基準			
乳脂肪率	分娩後7~30日	高値(5.0%以上)出現割合	目標値 12%以下
乳蛋白質率	分娩後31~60日	低値(2.8%未満)出現割合	25%未満
	分娩後61~90日	低値(2.8%未満)出現割合	
バルク乳成分(毎旬値をグラフ化し、管内平均と比較して牛群栄養評価) ← バルク乳成分から集計			
乳蛋白質%		MUN濃度 mg/dl	
4月~9月	最低	最高	平均値
	放牧期		
	平均(夏:3.1~3.3%)		
10月~3月	最低	最高	平均値
	舎飼期		
	平均(冬:3.2~3.4%)		

(放牧時:10~17mg/dl) (舎飼時:8~14mg/dl)

4. 発情発見評価(泌乳前期:分娩後100日間) → 授精率と関連

農場授精記録から算出			
平均授精回数	(分娩後100日間の授精回数/分娩後100日以上在籍した分娩牛頭数)		回
(分娩後100日以上在籍した全分娩牛について集計)			※1.20以上は良好、0.80未満は要改善
発情行動検出率	(発情行動で発情発見した回数/発情発見回数)		%
(分娩後100日以上在籍した全分娩牛について集計)			※行動検出率50%以上を目標とする

排卵同期化による黒毛和種雌牛の定時人工授精

分娩後の黒毛和種雌牛をGnRHとPGF₂ の投与によって排卵同期化し定時人工授精を実施することで、空胎日数が短縮され、1年1産が可能となる。

排卵同期化処置は黒毛和種雌牛にも有効

分娩後4~10週の黒毛和種雌牛 60頭を4群に分け、1回目のGnRHを投与した後のPGF₂ および2回目のGnRHの投与時期の違いが受胎に及ぼす影響を検討した(図1)。その結果、1回目のGnRH注射後7日目にPGF₂ を投与し、さらにその30または48時間後に2回目のGnRHを投与して定時人工授精した処置1群および2群では、適期授精に匹敵する受胎率が得られた(表1)。また、これらの処置群の空胎日数は、発情を発見したのち適期に人工授精した対照群に比べると有意に短かった。

授精時のBCSと受胎との関係

供試牛のうち授精できた58頭について、BCSと受胎との関係についてみたところ、BCSが5.0~7.3であった牛に比べ5.0未満の牛では受胎率が低い傾向があった(表2)。

定時人工授精牛の受胎に影響する要因

前述の排卵同期化処置を行った3群45頭を受胎牛と不受胎牛に分けて比較したところ、処置開始時に大型卵胞が卵巣に存在した割合は不受胎牛に比べ受胎牛で高かった(表3)。

以上の結果から、黒毛和種牛の排卵同期化法としては、GnRH・PGF₂・GnRH処置が有効であり、PGF₂ 投与は1回目のGnRH投与後7日目に、そして、2回目のGnRH注射はPGF₂ 投与後30~48時間の間に行い、処置終了後18~22時間に定時人工授精すると高い受胎率が得られる。

【平成10年度 新得畜試】

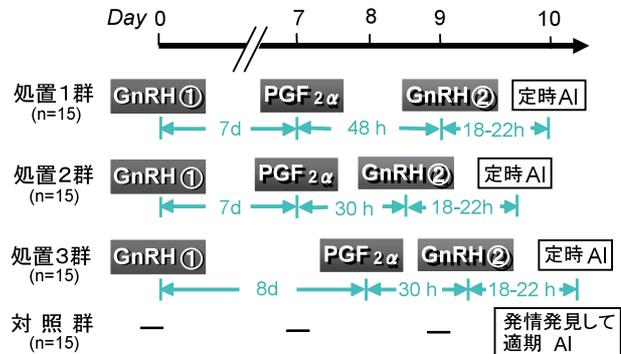


図1. 黒毛和種牛への排卵同期化処置スケジュール

表1. 排卵同期化処置の違いが分娩後の黒毛和種雌牛の繁殖成績

群	n	分娩から初回授精までの日数	初回授精受胎率%	受胎頭数割合%	空胎日数
処置1群	15	58.9±7.6	73.3	80.0	74.1±25.4 ^A
処置2群	15	55.5±10.4	80.0	86.7	60.2±18.4 ^A
処置3群	15	59.6±11.8	53.3	66.7	85.1±34.3
対照群	13	95.1±36.7	69.2	84.6	96.6±24.9 ^B

A vs B : p<0.01

表2. 授精時のBCSと受胎との関係

早期妊娠診断の結果	BCSの区分 ¹⁾	
	<5.0	5.0≤
受胎(頭数)	7	33
不受胎(頭数)	6	12
受胎率	53.8	73.3

1) BCSは1~9の9段階評価(全国和牛登録協会)

表3. 定時授精による受胎の有無、栄養および卵巣所見の関連

初回授精時の受胎の有無	n	分娩から授精までの日数	BCS ¹⁾	日増体量 ²⁾ kg/日	卵巣所見 ¹⁾	
					黄体有%	大卵胞有%
受胎	31	58.8±10.2	5.4	0.17	64.5	96.8 ^a
不受胎	14	56.8±10.0	5.3	-0.08	60.0	57.1 ^b

1) 処置開始時、2) 処置開始時から50日間の日増体量
a vs b ; 異文時間に有意差あり (P<0.01)

めん羊の季節外繁殖

非繁殖季節の末期では、雄羊導入で繁殖季節の開始が早まる（雄効果）。分娩時期の夜間点灯とホルモン処理は雄効果による季節外繁殖を促すが、高い受胎率は得られない。

雄羊を同居させる時期と繁殖季節の開始

非繁殖季節の後期では雌羊群に雄羊を同居させることにより繁殖季節の開始を早めることができる。このような雄効果は8月初旬に雄羊を導入した場合（群）に最も有効で、発情同期化効果も高い。しかし、7月初旬（群）では確実性に乏しい。

この雄効果は北海道に飼養されるサフォーク雌羊では、自然の繁殖季節開始（9月中旬）の6週ほど前から有効と考えられ、繁殖季節を自然の場合よりも3週間ほど早く開始させることができる。

夜間点灯とホルモン処理による雄効果の促進

夜間点灯は分娩時期の2～3月に、ホルモン処理（PMSG・PGF₂）は5月下旬～6月上旬に実施し、雄羊は5月下旬にこれら雌羊群に同居させた。処理の組み合わせで季節外繁殖成績を比較したところ、分娩時期に夜間点灯せず自然日長で飼われていた雌羊に比べ、夜間点灯されていた雌羊の方が、発情誘起率および妊娠率は高い傾向があった（90%および50% vs 59.3%および28.1%、表1）。また、ホルモン処理された雌羊は、無処理のものよりも発情誘起

率および妊娠率は高い傾向にあった（81.8～95.5%および45.5～50% vs 64.7%および35.3%）。しかしながら、この方法による繁殖成績は不安定で、年次による違いが大きかった。

【平成5・10年度 滝川畜試】

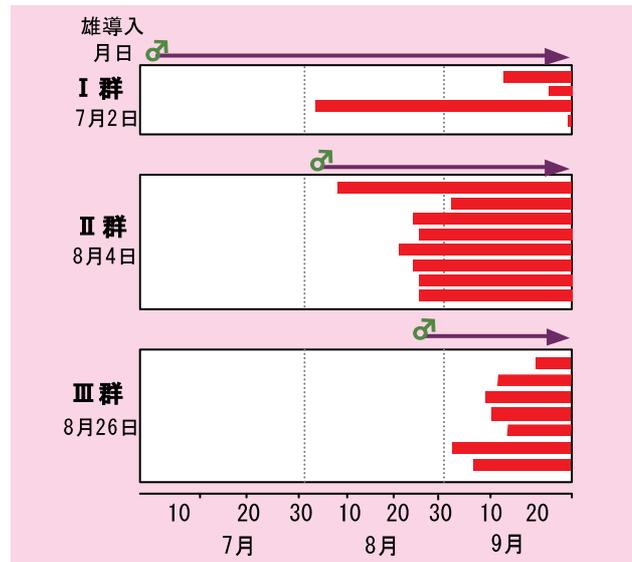


図1 非繁殖季節後期における雄羊の導入がサフォーク雌羊における繁殖季節開始時期に及ぼす影響

♂➡：雄羊の同居期
■：個々の雌羊の繁殖季節

表1 分娩時期の夜間点灯および離乳後のホルモン処理が雄羊同居による季節外繁殖に及ぼす影響

群	頭数	分娩時期の夜間点灯	ホルモン処理 ¹⁾	雄羊導入時期	発情誘起率 %	妊娠率 %	子羊生産率 ²⁾ %
M0	15	なし	なし	5月下旬	40.0	20.0	26.7
	19	あり			84.2	47.4	52.6
	34	小計			64.7	35.3	41.2
M1	8	なし	雄羊導入の13日後にPMSGとPGF _{2α} を同時に筋注	5月下旬	100.0	62.5	75.0
	14	あり			92.9	42.9	50.0
	22	小計			95.5	50.0	59.1
M2	4	なし	雄羊導入日にPMSG筋注、13日後にPMSGとPGF _{2α} を同時に筋注	5月下旬	50.0	0.0	0.0
	7	あり			100.0	71.4	114.3
	11	小計			81.8	45.5	72.7
計	27	なし			59.3	28.1	37.0
	40	あり			90.0	50.0	62.5
	67	合計			77.6	41.8	52.2

¹⁾ ホルモン剤の投与量は、PMSGは500iu、PGF_{2α}はジノプロストとして15mg

²⁾ 子羊生産率 (%) = (出生子羊頭数 / 供試雌羊頭数) × 100

用語解説

PMSG：妊馬血清性腺刺激ホルモンのことで、主として排卵を誘起する効果がある。

PGF_{2α}：プロスタグランディン F_{2α}の略で、卵巣に排卵後形成される黄体を退行させる作用がある。

めん羊の給餌時刻および夜間点灯と昼間分娩

めん羊では昼間の給餌が昼間分娩を増加させる。夜間点灯と朝給餌によって昼間分娩の割合を最大にし、深夜の分娩を減らすことができる。

夜間給餌はめん羊の昼間分娩率を減少させる

夜間点灯下で、1日1回20時に飼料を給与する夜給餌区と、朝9時30分と夕方16時の2回給与する朝夕給餌区を設け、分娩時刻に及ぼす影響を調べた。夜給餌区の昼間分娩率は29.2%であり、朝夕給餌区の64.8%に比べ有意に低かった。夜給餌区では18時～24時の分娩が最も多かったのに対し、朝夕給餌区では、9時～15時に分娩が集中した(図1)。

朝給餌と夜間点灯が昼間分娩を増やす

給餌時刻と夜間点灯(80lux以上)の有無との組み合わせが、めん羊の分娩時刻に及ぼす影響について調査した。給餌は朝1回とし、夜通し照明を点灯しておく、夜間の分娩が最も少なくなることがわかった(図2)。夜に点灯しても深夜に消灯すると、夜間の分娩を減らす効果は見られなくなる。

給餌時刻はコルチゾール分泌を変える

給餌時刻を変えると分娩の時刻が影響を受けるのはなぜか。これを調べるため、分娩開始と関わりのあるコルチゾール(副腎皮質ホルモン)分泌の日内変化を調べた。夜に餌を給与すると夜にコルチゾールの分泌が盛ん(夜型)になるめん羊が多く、朝に給餌すると朝型が多くなることがわかった。分娩は夜型のめん羊は夜間に、朝型は昼間に多い傾向があった(表1)。

朝給餌と夜間点灯によって、めん羊の夜間分娩を減少させることはできるが、なくすことはできない。したがって、分娩予定日を把握するとともに、分娩前の雪中運動や日光浴を励行して難産予防に努めるなど、適正な分娩管理が求められる。

【平成8年度 滝川畜試】

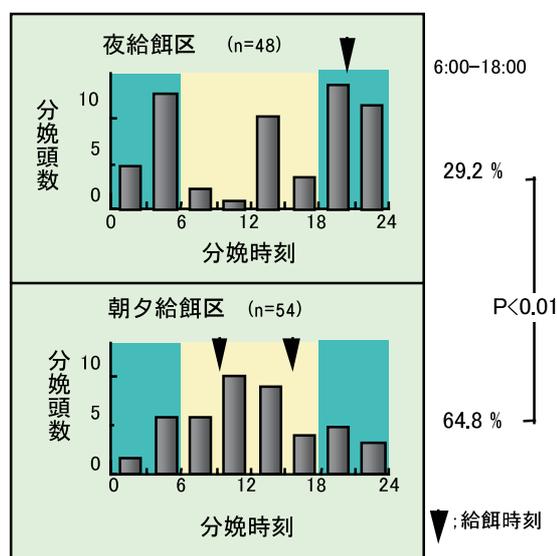


図1. 夜給餌がめん羊の分娩時間帯および昼間分娩率に及ぼす影響

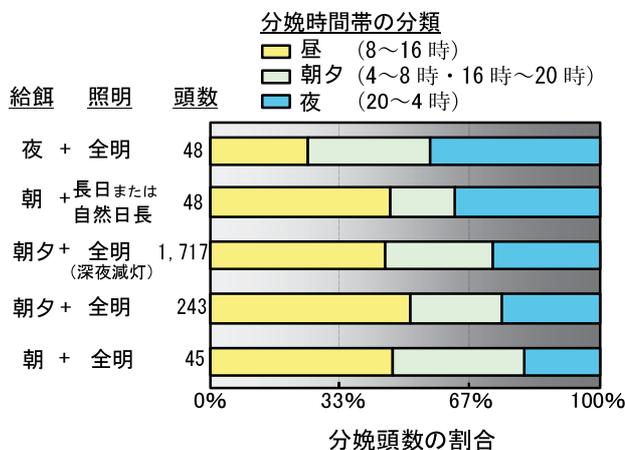


図2. 給餌方式および夜間点灯が雌羊の分娩時刻に及ぼす影響

表1 給餌時刻によるコルチゾール分泌と昼間分娩との関係

群	頭数	コルチゾールの日内変動パターン			昼間分娩率 %
		夜型	不整型	朝型	
夜給餌区	6	● ● ●	● ●	●	33%
朝給餌区	6		● ●	● ● ●	67%

● 夜間分娩、● 昼間分娩. ※朝給餌の1頭はサンプリング前に分娩

超音波画像解析による乳牛の繁殖機能診断

超音波断層装置による生殖器の観察では、乳牛に苦痛を与えることなく、小型卵胞を含めた卵胞数や黄体の内部構造ならびに子宮の修復経過を詳細に観察できる。

生殖器の超音波断層像

子宮角の超音波断層像は、2本の楕円の輪郭線に囲まれた部分として観察された（図1）。生体内と摘出子宮の画像比較から、生体内での超音波断層像による外側輪郭線は、子宮の血管層を表し、内側輪郭線は子宮内膜面を表した。

また、2mm以上の卵胞であればエコーフリーの黒い円、あるいは楕円形の画像として形態が確認でき、10mm以上の卵胞では、摘出した卵巣を直接観察した結果とほとんど差がなかった。黄体は、周囲の卵巣実質よりエコーレベルの低い楕円形の画像として描出された。



図1 生体内子宮角の超音波像
OL: 外側輪郭線で血管層を表す
IL: 内側輪郭線で子宮内膜面を表す

分娩後の卵胞発育状況

分娩後、直径10mm以上の最大卵胞が前回妊娠角の反対側卵巣に多く発現し、およそ半分はそのまま排卵した。初回排卵までの日数は、最大卵胞数が多くなるほど長くなった（表1）。

表1 初回排卵前の最大卵胞数と初回排卵日数

最大卵胞数	例数(頭)	分娩後日数(日)	
		初回最大卵胞の発現	初回排卵
1	25	7.9±3.0	16.0±3.9 ^A
2	10	7.3±1.3	24.2±5.0 ^B
3	4	11.3±6.8	37.5±4.2 ^C
4	1	17	55
平均	40	8.3±3.7	21.2±9.6

異文字間に有意差あり：p<0.01

子宮の修復状況

超音波断層装置により分娩後2週程までは、子宮腔内には悪露が確認された。子宮内膜の断面積は、分娩後3週間で急速に縮小し、分娩後6週目で妊娠角と非妊娠角はほぼ等しくなった（図2）。

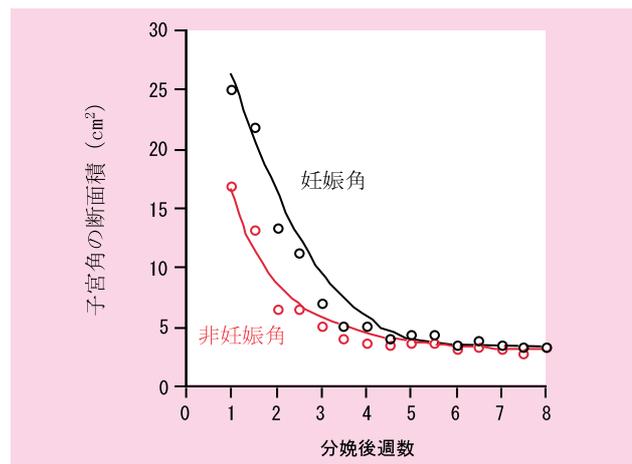


図2 分娩後の子宮角の断面積の変化

初回排卵と子宮回復

初回排卵日数を20日未満、20～25日、25日以降の3群に区分したところ、初回排卵日数が早いものほど子宮回復までの日数が短かった（表2）。

表2 初回排卵日数と子宮回復日数の関係

初回排卵日数区分	頭数	子宮回復日数
20 未満	8	42.8± 7.1
20～25 日	6	44.7± 6.6

子宮の修復状況を超音波断層法により詳細に観察でき、初回排卵の早いものほど子宮の修復が早かった。【平成4年度 根釧農試】

胎心電図による牛の双胎妊娠診断

妊娠149日目以降に胎心電図による双胎妊娠診断が可能である。左右側腹部間あるいは左右側腹部と臍直後の間の誘導で双胎心電図が得られ易い。

心電計

心電計は、母体用1要素（チャンネル3）と胎子用2要素（チャンネル1、2）を持ち、胎子用には増幅率1000倍の増幅器を取り付けた。また、9点の誘導点からの導線を一度に接続できる。

誘導点

誘導点を図1に示した。胎子用の誘導点は、**1**が最後位肋骨と肋軟骨の結合部付近、**2**が膝関節付近、**3**が**1**の直下の乳房の付け根付近、**4**が**3**の直下でとほぼ同じ高さ、**5**が臍直後の正中線上、**6**は**5**と左右対称の位置で、合計9点とした。母体心電図の誘導はA-Bとし、腰部にアースを設けた。胎子心電図の記録は、9点の全組合せである36組の双極誘導について、母体心電図の記録は、胎子心電図の記録と平行して行なった。誘導点の組合せは、側腹部の右右、左左よりも、左右側腹部間あるいは左右側腹部と臍直後部（ ）の組合せの検出率が高かった。

胎心電図の検出

双胎妊娠における胎心電図の実例を図2に示した。QRSのスパイクがリズムカルに比較的長い時間

にわたり追跡でき、その間隔が極めて規則正しく、他の誘導でも同様のスパイクが確認できる場合に双胎と診断した。表1に胎子数の診断結果をまとめた。双胎および単胎妊娠のいずれにおいても、妊娠149日目以降の診断では、36組の誘導のうちいずれかで53例全例で心電図が検出され、52例で胎子数の正確な診断ができた。また、妊娠180日目以降の方が双胎心電図が得られ易かった。

【平成6年度 新得畜試】

表1 胎心電図による胎子数の診断

	検査頭数	双胎妊娠			単胎妊娠		
		0	1	2	検査頭数	0	1
118-146	3	1	2	0	4	4	0
149-271	33	0	1	32	20	0	20

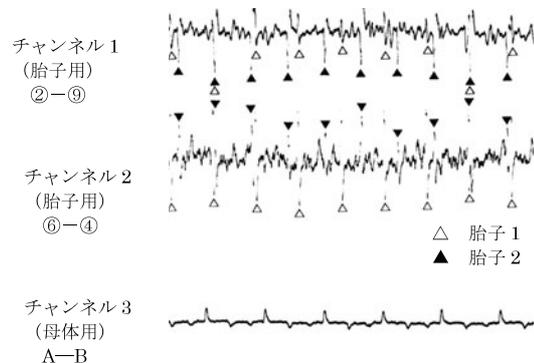


図2 胎心電図（双胎）

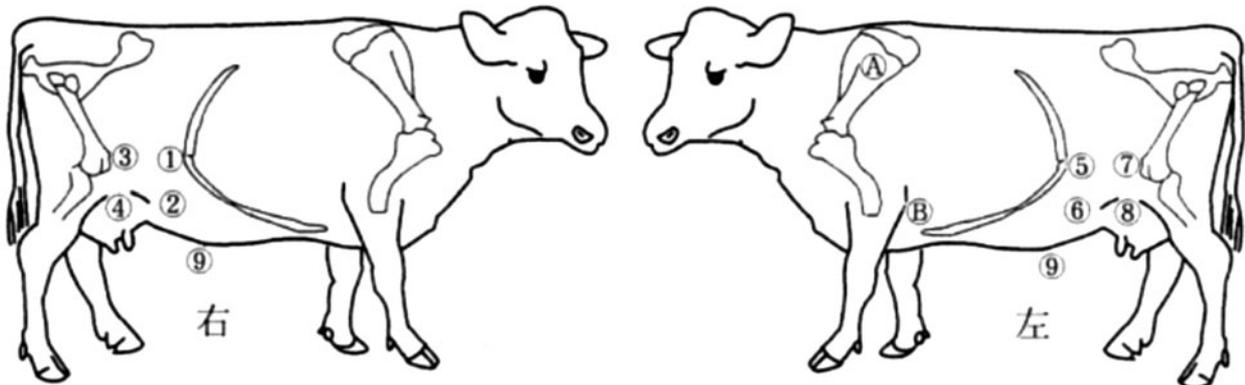


図1 心電図の誘導点

分娩警報装置による牛の分娩報知

分娩予定日の1週間程度前に本装置を装着することにより、分娩開始を知ることができ、分娩事故が減少する。

分娩警報装置

本装置は、温度センサー付き発信機を内蔵したプローブおよび携帯電話を内蔵した受信機からなる。原理は次のようなものである。分娩前の牛の膈内に挿入したプローブが、分娩に伴い胎胞等に押されて膈外に排出され、発信機が牛の体温から外気温への温度の低下を感知して信号を発信する。受信機がその信号を受信して受信機に組み込まれた携帯電話が指定の電話番号を呼び出し、分娩を知らせる。

プローブの排出と発信機および受信機の作動

プロ - ブは24頭中1頭で無排出、5頭で誤排出が発生した(表1)。5頭のうち3頭は再挿入して継続し、最終的に24頭中21頭が分娩に伴いプローブを排出した。これは腹腔内の広い牛では無排出、狭い牛では誤排出が発生するためである。受信機の作動を調査

した挿入期間では無作動および誤作動は発生せず、本機が正常に作動することが確認された。また、1～10日間のプローブの挿入では、挿入によると思われる炎症等は見られず、分娩時の母牛および胎子に影響もなかった。

分娩予定日の1週間前に本装置を装着することにより、分娩開始を知ることができ、分娩事故の減少に貢献できると考えられた。

注意事項

- 1) 牛舎構造により受信範囲が異なるので、あらかじめ設置場所で受信できることを確認する必要がある。
- 2) 気温が33℃を越えた場合や直射日光が当たる場所など、プローブの周辺が33℃を越える場合は、適用できない。

【平成13年度 畜試】

表 1. プローブの無排出、誤排出および発信機と受信機の無作動、誤作動の発生頻度

	供試牛頭数	挿入日数	無排出頭数 (%)	誤排出頭数 (%)	正常排出頭数 (%)	無作動頭数 (%)	誤作動頭数 (%)	正常作動頭数 (%)
第1期	13	1-10	1 (7.7)	3 (23.1)	10 (76.9)	—	—	—
第2期	11	3-6	0 (0)	2 (18.2)	11 (100)	0 (0)	0 (0)	11 (100)
合計	24	1-10	1 (4.2)	5 (20.8)	21 (87.5)	—	—	—

第1期は発信機不調のため、プローブの排出のみの試験とした。

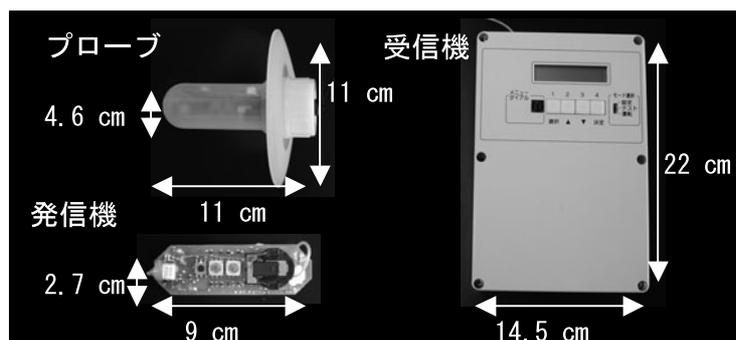


図 1. 分娩警報装置

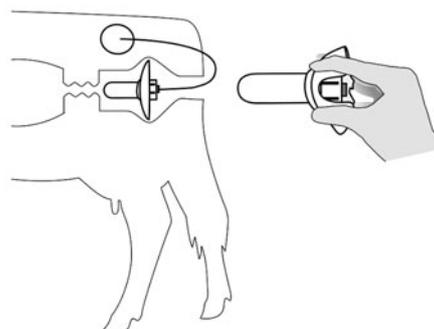


図 2. プローブの挿入

血糖値を用いた乳牛の分娩予測

乳牛の血糖値は分娩24時間前頃から上昇し、とくに分娩12時間前頃から顕著に上昇することから、分娩前の血糖値を用いて分娩予測が可能であった。

血糖値による分娩予測

妊娠ホルスタイン牛89頭を供試して、分娩数日前から1日1回頸静脈から血液を採取し、自動分析装置で血糖値を測定したところ、血糖値は分娩24時間前頃から上昇傾向がみられ、とくに分娩12時間前頃から顕著な上昇を示した(図1)。この上昇を捉えることにより、分娩予測が可能であった。

簡易測定器で測定した血糖値による分娩予測

妊娠牛38頭を供試して、尾静脈から血液を採取し、簡易測定器(グルコース脱水素酵素電極法)で血糖値を測定したところ、82mg/dl以上であると24時間以内に分娩する確率が81%と高く、68mg/dl未満では12時間以内に分娩する確率が4%と低かった(表1)。また、妊娠牛114頭を供試して、簡易測定器または自動分析装置で血糖値を測定して血糖値上昇率が18%以上になると24時間以内に分娩する確率が98%と非常に高く、10%未満では12時間以内に分娩する確率が18%と低かった(表2)。

これらの結果から、簡易測定器を用いた血糖測定による分娩予測マニュアルを作成した(表3)。

【平成15年度 畜試】

表1. 血糖値の区分による分娩割合

血糖値	24時間以内 の分娩割合	12時間以内 の分娩頭数	12~24時間後 の分娩頭数
82mg/dl以上	81%(17/21) ^a	9頭	8頭
68~82mg/dl	29%(19/66) ^b	7頭	12頭
68mg/dl未満	4%(2/55) ^c	0頭	2頭

abc: 異文字間に有意差(P<0.01)

表2. 血糖値上昇率の区分による分娩割合

血糖値上昇率	24時間以内 の分娩割合	12時間以内 の分娩頭数	12~24時間後 の分娩頭数
18%以上	98%(63/64) ^a	44頭	19頭
10~18%	53%(18/34) ^b	5頭	13頭
10%未満	18%(33/185) ^c	3頭	30頭

血糖値上昇率: $\frac{(\text{当日の血糖値}) - (\text{前日の血糖値})}{(\text{前日の血糖値})} \times 100(\%)$

abc: 異文字間に有意差(P<0.01)

表3. 血糖値・血糖上昇率の違いによる分娩確率と夜間の対応

	24時間以内 の分娩確率	12時間以内 の分娩確率	夜間の対応
血糖値			
82mg/dl以上	非常に高い	やや高い	数時間おきに観察
68~82mg/dl	やや低い	低い	一度観察
68mg/dl未満	非常に低い	非常に低い	観察しなくてよい
血糖値上昇率			
18%以上	非常に高い	高い	数時間おきに観察
10~18%	やや高い	低い	一度観察
10%未満	低い	非常に低い	観察しなくてよい

※分娩確率:

非常に高い: 80%以上、高い: 60%~79%、やや高い: 40%~59%
やや低い: 20%~39%、低い: 10%~19%、非常に低い: 10%未満

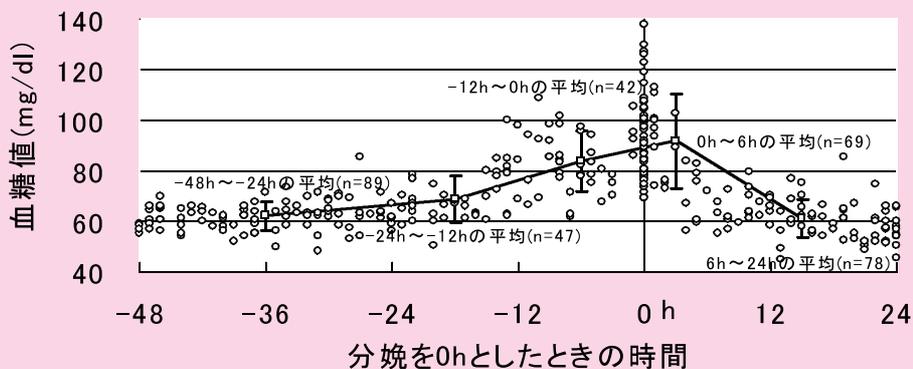


図1. 分娩前後の血糖値の推移(折れ線グラフは平均値±標準偏差)

5 健康管理モニタリング技術

乳牛の血液成分の標準値

乳牛の栄養状態を診断するために、血液成分の標準値を作成し、乳期、年齢、地域および泌乳能力による血液成分の違いを示した。

栄養診断のための血液成分の標準値

北海道における血液成分の標準値を作成するために、道内9地域、42農家で採血を行った。標準値の作成は採血日前後2カ月間に病気にかかった牛を除く1,247頭のデータを用いて行った。血液成分の平均値および標準偏差は表1に示した。変動係数の大きな項目は、尿素窒素とコレステロールであった。血液成分の分布状況は、遊離脂肪酸、カリウム、GOTが対数正規分布を示し、これら以外の項目は正規分布に近かった。

乳期、泌乳能力などによる血液成分の変動

血液成分の乳期、泌乳能力、地域および年齢による変動を検討した。乳期による変動は遊離脂肪酸、血糖、血球容積、GOTおよびコレステロールにみられた(表2)。泌乳能力の高い牛は、アルブミン、リンおよびコレステロールがやや高かった(表3)。地域による差異は、尿素窒素が最も大きく、コンサイエージが給与されている畑作型地域では 10.1 ± 2.9 mg/dlと、草地型酪農地域の 15.3 ± 4.3 mg/dlとの間に明らかな差がみられた。また、加齢により血球容積、アルブミン、カルシウム、リンおよびマグネシウムが若干低くなる傾向がみられた。

代謝プロファイルテストなどにより、乳牛の栄養状態を判定する場合、血液成分の乳期による変動、泌乳能力および飼養形態による差異を考慮する必要がある。 【昭和59年度 滝川畜試】

表1. 血液成分の標準値

項目	単位	平均値±SD	変動係数
遊離脂肪酸	μEq/L	166	・
血糖	mg/dl	58.0±5.5	9.5
尿素窒素	mg/dl	13.9±4.3	30.9
血球容積	%	32.4±3.2	9.9
アルブミン	g/dl	3.60±0.36	10.0
カルシウム	mg/dl	9.65±0.63	6.5
マグネシウム	mg/dl	2.21±0.28	12.7
リン	mg/dl	5.24±0.89	17.0
カリウム	mg/dl	20.7	・
GOT	k.u.	55.6	・
総コレステロール	mg/dl	159±46	28.9

表2. 血液成分の乳期による変動

項目	単位	前期	中期	後期	乾乳期
遊離脂肪酸	μEq/L	217	145	143	205
血糖	mg/dl	56.1	57.8	58.8	57.9
尿素窒素	mg/dl	13.8	14.7	14.3	12.6
血球容積	%	31.2	31.5	33.0	33.5
アルブミン	g/dl	3.61	3.59	3.59	3.63
カルシウム	mg/dl	9.62	9.62	9.66	9.60
マグネシウム	mg/dl	2.19	2.23	2.20	2.20
リン	mg/dl	5.07	5.20	5.30	5.38
GOT	k.u.	162	182	164	109
コレステロール	mg/dl	162	182	164	109

表3. 乳量水準(305日乳量)による血液成分の差

項目	単位	8000kg≤	6-8000kg	6000kg>
アルブミン	g/dl	3.75	3.61	3.59
リン	mg/dl	5.34	5.23	5.02
コレステロール	mg/dl	165	163	151



代謝プロファイルテストの実用化

脂肪肝、ケトーシス、起立不能症、繁殖障害、低マグネシウム血症などの「生産病」の診断・予防を目的に、牛群の血液検査に基づく代謝プロファイルテストを実用化した。

代謝プロファイルテストの方法

乳牛の脂肪肝、ケト-シス、起立不能症、繁殖障害、低マグネシウム血症などの「生産病」は、栄養摂取と乳生産との不均衡に基づく疾病と考えられる。これら生産病の診断・予防を目的に、代謝プロファイルテスト（以下、テスト）を実施した。テストは各乳期（泌乳前期・中期・後期および乾乳期）別に5～7頭採血し、その平均値およびバラツキから栄養および健康状態を判定する。

エネルギー代謝の指標

- ・遊離脂肪酸：体脂肪の動員状況を表し、エネルギー不足を鋭敏に反映する。
- ・血糖：重度あるいは慢性的なエネルギー不足で低下し、ストレス時に高くなる。

蛋白質代謝の指標

- ・尿素窒素：飼料中の分解性蛋白質と炭水化物のバランスを示す。また、ヒトグメジンなどにより結合性蛋白質が多くなると低下する。
- ・血球容積、アルブミン：中・長期的な蛋白質不足で低下し、飲水不足やアシド-シスで高くなる。

ミネラル代謝の指標

- ・カルシウム：ミネラル摂取の不均衡を反映する。
- ・マグネシウム：マグネシウムおよび飼料の摂取状況を示す。
- ・リン：概ねリン摂取量を反映する。

肝機能の指標

- ・GOT：肝臓および体組織の障害を示す。
- ・総コレステロール：肝機能および飼料摂取状況を示す。



北海道におけるテストの実施

北見、幌延、別海において、生産病の多い農家15戸、少ない農家11戸を選び、延べ70回のテストを実施した。生産病多発農家では、標準値 ± 1.3 標準偏差（SD）を越える項目が多かった（表1）。

テストは北海道NOSAIの損耗防止事業に取り上げられ、さらに発展を遂げ、北海道のみならず全国的に利用される予防獣医学技術の1つとして定着した。【昭和60年度 滝川畜試】

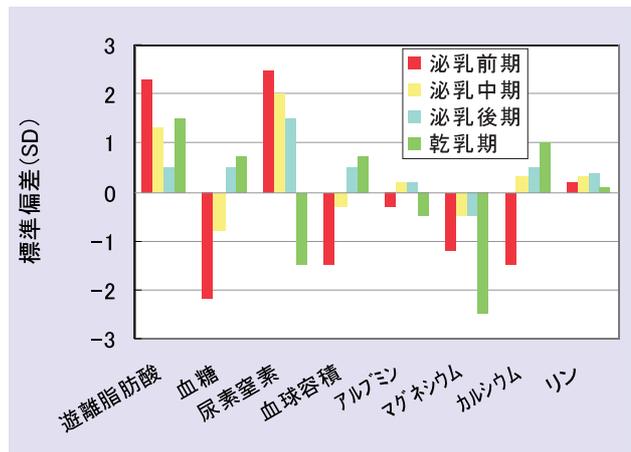


図. 代謝プロファイルテストの例

表1. 70回の代謝プロファイルテストにおける血液成分の異常と生産病発生との関係

	生産病多発農家数		生産病少発農家数	
	-1.3SD	>1.3SD	<-1.3SD	>1.3SD
遊離脂肪酸	0	10	0	3
血糖	2	0	2	2
尿素窒素	7	1	1	0
血球容積	3	3	0	0
アルブミン	0	0	0	0
カルシウム	5	2	1	1
マグネシウム	1	4	0	5
リン	1	3	0	4
GOT	0	4	0	3
総コレステロール	0	2	0	5
計	19	30	5	24

乳牛におけるエネルギー不足の指標

摂取エネルギーが不足すると、血液中の遊離脂肪酸、ケトン体は上昇し、血糖は低下する。また、乳成分では乳蛋白質率と、乳蛋白質率 / 乳脂肪率比の低下が指標となる。

血液中遊離脂肪酸、ケトン体、血糖が指標となる

分娩前後のエネルギー水準をTDN充足率で、高・低区130：80%、高・標区130：100%、低・低区80：80%、低・標区80：100%となるように、1週ごとに飼料給与量を設定した。

血液中の遊離脂肪酸濃度はもっとも鋭敏にエネルギー不足を反映し、分娩前低栄養の低・低区、低・標区では、分娩前2週に548、489 μ Eq/Lと高くなり、分娩後低栄養の高・低区、低・低区では、分娩後2週に1228、1035 μ Eq/Lと高値を示した(図1)。また、分娩後2週の高・低区では、血糖濃度が50.7mg/dlと低下し、ケトン体濃度が1,840 μ mol/Lと上昇した。

乳蛋白質率と、乳脂肪率との比が指標となる

乳蛋白質率は、分娩後低栄養の高・低区、低・低区が、分娩後9週以降0.26～0.30ポイント低く推移した(図2)。しかし、泌乳初期(分娩後2～8週)では、高・低区で乳蛋白質率の低下がみられなかった。これは体脂肪動員によりエネルギーが補給されたためであり、分娩前にある程度脂肪を付けておくことにより、泌乳初期の乳蛋白質率の低下は少なくなると考えられた。

また、泌乳初期のTDN充足状況と乳蛋白質率 / 乳脂肪率比をみた試験では、低栄養区でその比が0.7に低下し、栄養管理の指標として有用であることが示された(図3)。

摂取エネルギーの過不足の判定には、ボディコンディションスコアが最も利用されているが、体脂肪の動員の指標としては、血液中の遊離脂肪酸濃度が最も鋭敏に反応する。また、乳蛋白質率および乳蛋白質率 / 乳脂肪率比はエネルギー不足を反映することから、乳検情報からの判定も可能である。

【平成1・10年度 根釧農試】

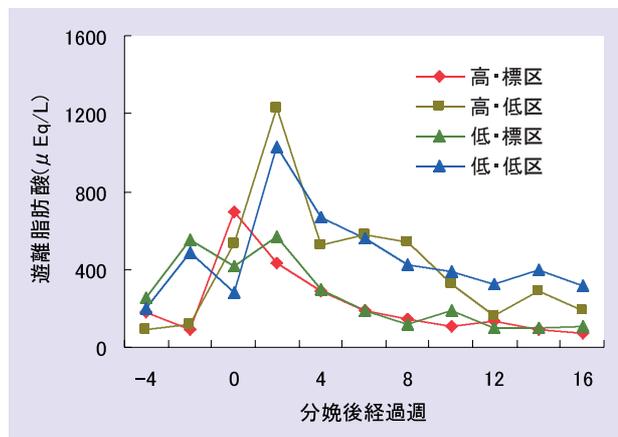


図1. 分娩前後のTDN充足率と遊離脂肪酸濃度

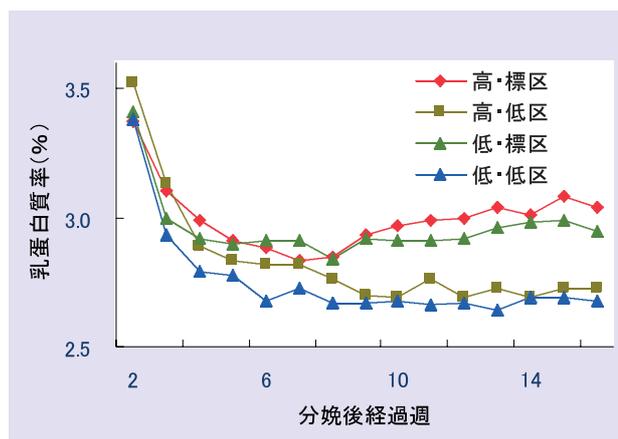


図2. 分娩前後のTDN充足率と乳蛋白質率

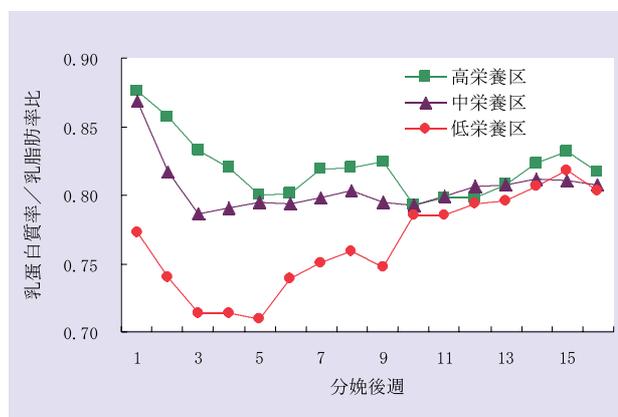


図3. 分娩後の養分充足と乳蛋白質率 / 乳脂肪率比の関係

乳中尿素窒素によるモニタリング

乳中尿素窒素は飼料中の栄養バランス（TDN / CP比）および尿への窒素排泄量低減の指標として有用であることを示し、その適正範囲を提示した。

乳中尿素窒素はTDN / CP比の指標となる

乳中尿素窒素は乳汁中の尿素を窒素量として表したものである。第1胃内で分解される蛋白質と糖、デンプンなどの炭水化物とのバランスが不均衡になると、余剰のアンモニアは肝臓で尿素に合成され、尿や乳汁に排泄される。放牧時には蛋白質が過剰となりやすく、乳中尿素窒素濃度は高くなり、TDN/CP比と負の相関がみられる（図1）。

栄養バランスから見た適正值は10～12mg/dlである

1997年に約2万の乳検データを解析し、暫定基準値を作成した（舎飼期 13.6 ± 3.9 mg/dl、放牧期 16.9 ± 4.1 ）（図2）。その後、2003年に約200万の乳検データを解析したところ、全道の平均は 11.4 ± 3.9 mg/dlとやや低くなった。

飼養標準に基づき算出した乳中尿素窒素の適正值は10～12mg/dlであり、放牧時の上限値は17mg/dlである。

乳中尿素窒素は尿窒素排泄量の指標となる

飼料中のTDN/CP比とアミノ酸バランスを考慮して設計（CP13・15%区）することにより、乳蛋白生産量を低下させることなく、尿への窒素排泄量を2～5割削減できることを明らかにした（表1）。また、尿への窒素排泄量は、乳中および血中尿素窒素濃度と相関が高く、これらの指標が環境への窒素負荷量の低減に有用であることを示した。

乳中尿素窒素濃度は、乳検データの1つとして農家でも利用可能であり、精密な飼料設計により、給与飼料の節減と窒素負荷量の軽減に役立つものと考えられる。【平成8・13・14年度 根釧農試】

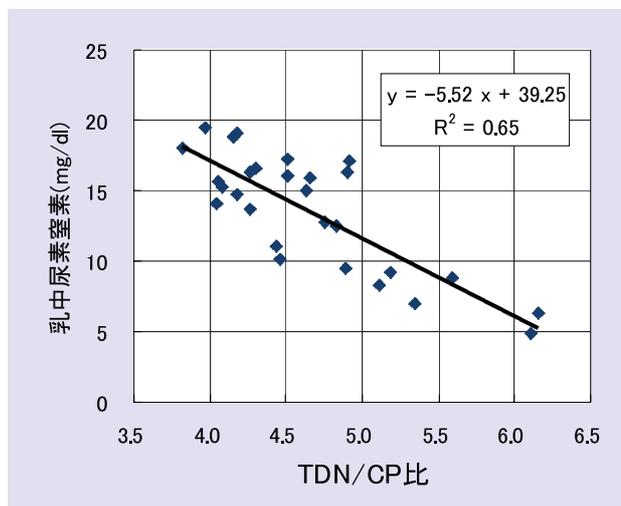


図1. 放牧時の全飼料中TDN/CP比と乳中尿素窒素濃度との関係

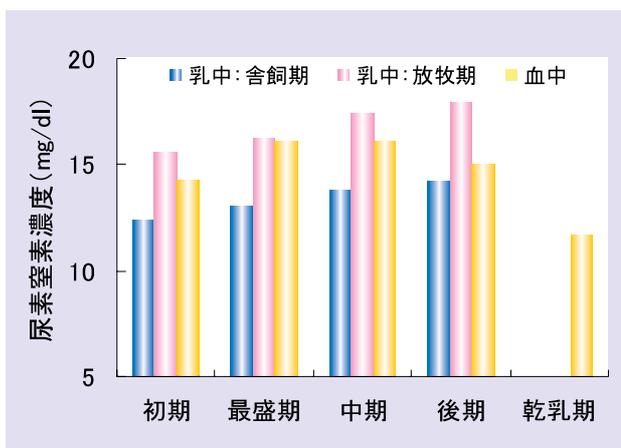


図2. 乳中・血中尿素窒素濃度の乳期による変化

表1. 窒素出納と、乳中および血中尿素窒素濃度

		13%区	15%区	17%区
窒素摂取量	g/日	435	503	573
窒素排泄量				
糞	g/日	161	174	171
尿	g/日	69 a	98 b	125 c
乳	g/日	150	157	154
乳中尿素窒素	mg/dl	7.3 a	10.6 b	14.3 c
血中尿素窒素	mg/dl	8.7 a	12.0 b	15.5 c

異文字間に有意差（ $P < 0.05$ ）

乳牛の行動解析によるモニタリング

フリー・スト・ル牛群の横臥、採食、反芻等の行動を観察することは、乳牛の健康状態、牛舎施設および飼養管理の適正さを判断するよい指標となる。

乳牛の横臥・起立行動で牛床快適性を判断する

15乳牛群の1日の平均行動パターンは、搾乳時間帯を除き、牛床で横臥する時間が652分（52.7%）、採食時間が270分（21.7%）、牛床起立時間が195分（15.0%）、通路起立時間が110分（10.6%）であった（図1）。牛床隔柵に問題があった農家では、牛床横臥時間が546分と短く、牛床起立時間が291分と長かった。

牛床の快適性を判断する指数： $\text{牛床横臥頭数} \times 100 / (\text{牛床横臥頭数} + \text{牛床起立頭数})$ は、70～80%であり、70%以下では牛床になんらかの問題点があった。

牛群の3割以上の牛が反芻していることが重要

1日の採食時間は270分（21.7%）、反芻時間は408分（31.8%）であった。反芻行動はおよそ8割が横臥中、2割が佇立中にみられた（図2）。搾乳時間帯の前後を除けば、反芻行動は牛群の3～4割の牛で観察されている。反芻頭数割合の減少は、乾物摂取量、繊維摂取量、飼料の物理性および給与順序等の問題点が指摘される。

弱い牛がより強く影響を受ける

乳牛15頭に対し、飼槽数および牛床数を15、10、5と減少させた試験では、それらの影響は初産牛により強く表れ、採食時間や牛床横臥時間が減少した。特に、牛床数の減少では初産牛が通路に横臥することが多く、牛群の中で弱い牛が大きな影響を受けることが明らかとなった。

【平成10年 根釧農試】



図1. 乳牛の1日の行動パターン

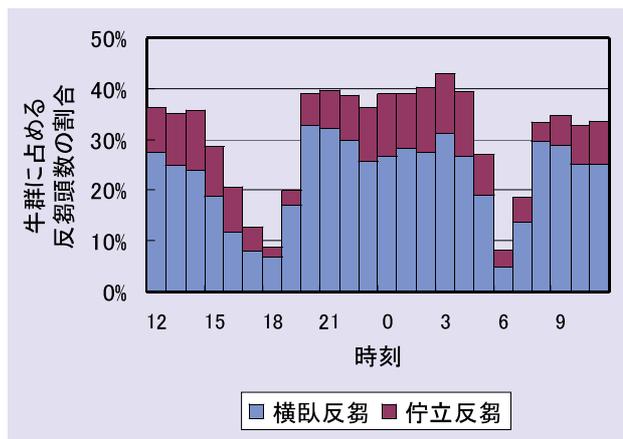


図2. 乳牛の1日の反芻パターン

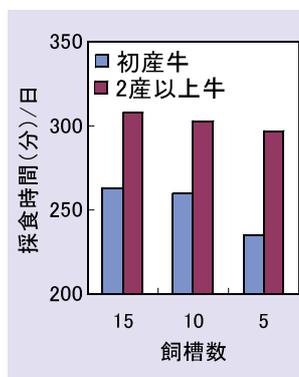


図3. 飼槽数と採食時間

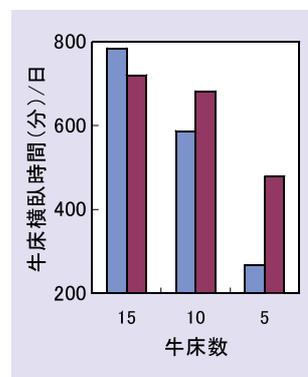


図4. 牛床数と牛床横臥時間

蹄疾患のモニタリング

乳牛の蹄病予防には、歩行異常の早期発見、適正なデンプン給与量および定期的削蹄が重要であることを示した。また、蹄輪は乳牛の疾病および栄養状態を反映した。

蹄病の早期発見は背線の湾曲がポイント

跛行スコア - は佇立時と歩行時の背部姿勢と歩行状態に基づき、5段階に分類されている。

蹄病の早期発見には歩行時に背線の湾曲がとどき観察されるスコア - 2の見極めが大切であることを示した。また、蹄疾患により、乳量の減少（図1）と繁殖性の低下がみられた。



蹄病の早期発見は背線の湾曲がポイント

デンプンの多給・繊維不足で蹄疾患に

飼料中デンプン含量が高くなると、第1胃内pHが低下し、pH5.8以下を示す時間が長くなり、蹄底出血も多くなることを明らかにした（表1）。

蹄病の予防には、飼料中のデンプン含量を25%以下とし十分粗飼料を給与するとともに、定期的削蹄により、内外蹄の負面バランスを適正に保つことが重要であることを示した。

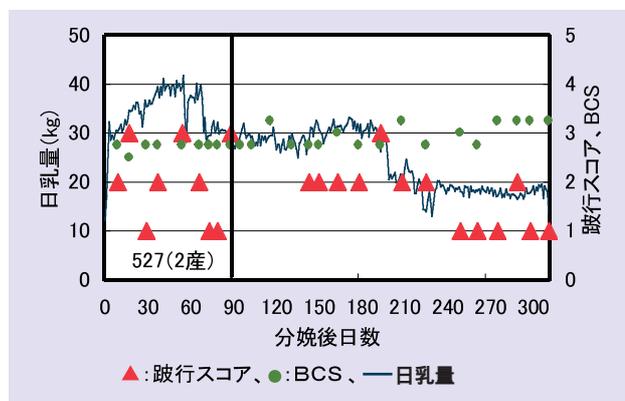


図1．蹄疾病による乳量の低下例

分娩後の疾病や栄養不足で蹄輪ができる

蹄輪（図2）の観察により、乳牛の疾病発生状況および栄養状態がモニタ - できることを明らかにした。蹄輪の溝が2mm以上ある場合（スコア - 3以上）疾病発生率は92%と高く、蹄病が68%みられた。また、スコア - 3以上では、泌乳初期のTDN充足率が87%と低く（表2）、分娩後の栄養状態と蹄輪形成との関連性が示唆された。

【平成14年度 根釧農試】

表1. 飼料中デンプン含量と蹄底出血の関係

		25%区	35%区	40%区
デンプン含量	%	24.8	34.9	39.8
繊維含量	%	36.0	27.4	23.1
第1胃pH(最低値)		5.80	5.52	5.23
pH5.8以下	分/日	12	139	271
蹄底出血スコア		3.4	6.0	8.6

表2. 分娩後2~4週の蹄輪スコアとTDN充足率

蹄輪スコア	TDN充足率
0-1	97%
2	90%
3-4	87%

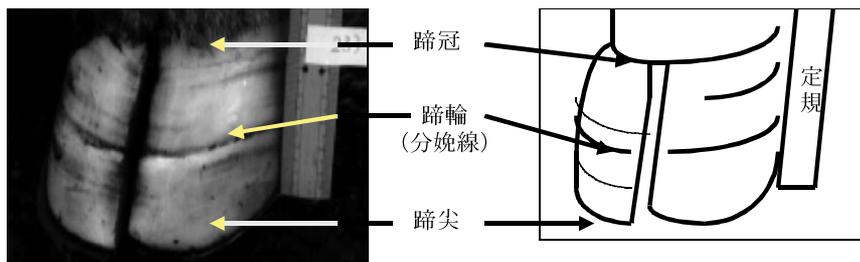


図2 牛の左前蹄の蹄壁と蹄輪



受精卵移植 関連技術

牛体外受精胚の発生培地の開発

血清またはBSAを添加した修正TALPは、体外受精胚の発生培養に適した培養液と考えられた。

修正TALP (mTALP) の開発

牛体外受精胚を効率的に生産するために、BavisterのTALP (1983) を改変し、新しい発生培地修正TALP (mTALP) を開発した。その組成を表1に示した。

他の培養液との比較

mTALPの有効性を証明するために、体外受精胚の培養に広く使用されているCR1およびmSOFと比較した。それぞれに子牛血清(CS)または牛血清アルブミン(BSA)を添加し、授精後の体外受精胚の培養を行なった。

卵子の採取、成熟培養、授精は常法に従った。授精後5-8時間目の卵子を、3%CSを添加したCR1aaおよびmTALP(Glucose不含)で、または0.3%BSAを添加したCR1aa、mSOFaaおよび0.1%BSAを添加したmTALPaaで培養した。発生培養は、39、5%CO₂、5%O₂、90%N₂の条件下で行い、授精後72および168時間目に発生状況を観察した。なお、必須アミノ酸、非必須アミノ酸およびグルタミンをaaと表記した。CSを添加した培地における2細胞期、8細胞期および胚盤胞への発生率は、CR1aaが79.5%、56.0%および42.0%、mTALPが87.4%、62.4%および41.6%で有意差はみられなかった。また、BSAを添加した培地における2細胞期、8細胞期および胚盤胞への発生率は、CR1aaが69.3%、28.6%および20.0%、mSOFaaが62.8%、28.8%および20.6%、mTALPaaが69.9%、30.3%および24.6%で有意差はみられなかったが、mTALPaaが最も高かった。

血清またはBSAを添加した修正TALPは、体外受精胚の発生培養に適した培養液と考えられた。

【平成7年度 新得畜試】

表1 CR1、mSOFおよびmTALPの組成

	M. W.	CR1 mM	mSOF mM	mTALP mM
NaCl	58.44	114.65	107.70	100.96
KCl	74.56	3.08	7.16	4.02
KH ₂ PO ₄	136.09		1.19	
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	156.01			0.38
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147.02		1.71	2.04
MgCl ₂ ·6H ₂ O	203.30		0.49	0.49
NaHCO ₃	84.01	26.19	25.07	25.00
L(+)-Lactic acid	109.10	5.04		
DL-Lactic acid	112.06		3.30	2.14
Pyruvic acid	110.04	0.36	0.30	0.55
Glucose	180.16		1.50	1.11
Osmolarity (実測値)		270	272	251

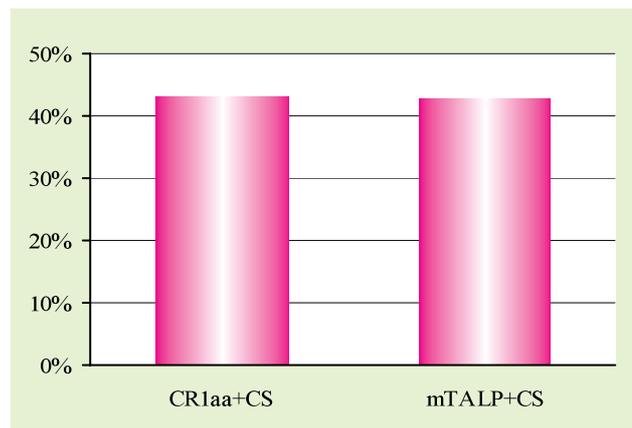


図1 子牛血清を添加したCR1aaとmTALPの胚盤胞への発生率の比較

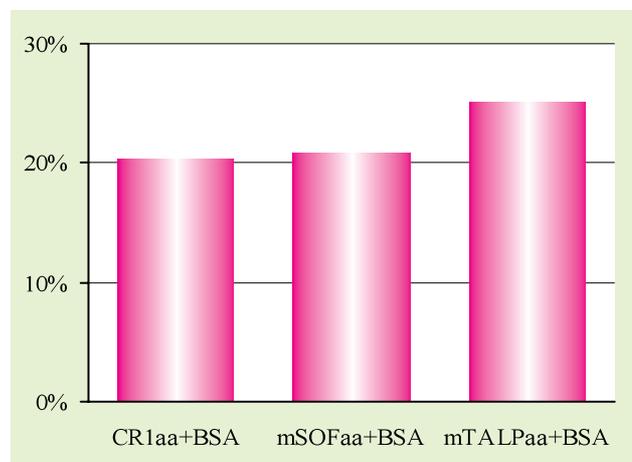


図2 BSAを添加したCR1aa、mSOFaa、mTALPaaの胚盤胞への発生率の比較

肉牛の受精卵クローン牛作出技術

核移植技術により、ひとつのドナー胚から性別の判明した4頭程度の受精卵クローン牛を安定して生産することができる。

核移植技術によるクローン牛の生産は、牛の育種改良を劇的に加速させることが可能である。具体的には種牛の選抜に受精卵クローン牛を利用することでこれまでより小頭数かつ短期間で高い正確度の検定を実施できる。ただし、そのためにはひとつのドナー胚から3頭以上の雄のクローン牛を安定して生産する技術が必須であった。そこで北海道立畜産試験場では、特にドナー胚の安定供給を中心とした研究を進めることで、クローン胚の効率的作出技術を確立した。さらに、この技術で作りに出したクローン胚の移植試験を実施し、受精卵クローン牛を安定的に生産する技術を実証した。

どの時期のドナー胚が核移植に適しているか？

ドナー胚を発生ステージで分類し核移植を実施した。細胞融合率は発生が進むに従って低下したが、分割率、発生率およびドナー胚1個あたりのクローン胚数に差はなく、細胞分離や注入操作が容易な小型化桑実胚が最も核移植に適していることがわかった。

ドナー胚を性別判別するには？

ドナー胚性別判別のための細胞採取法として、マイクロピペットを用いて割球を吸引する方法を開発した（吸引法）。この方法は切断法と比較して少数の細胞を採取でき、ドナー胚本体への損傷が少ないため、核移植に利用できるドナー細胞数を増加させることが可能である。

核移植に適した細胞融合装置

2機種種の細胞融合装置と2種類の電極の組み合わせで融合条件を検討した。卵子破壊率、融合率および発生率から、融合装置LF101とニードル電極の組み合わせが最適であった。

核移植に適した培養条件は？

発生培地としてmTALP、CR1およびIDV101を比較した。血清無添加の条件では、mTALPおよびIDV101で良好な発生率を得た。

クローン牛の生産効率

平成8～13年の受精卵クローン胚の受胎率は平均32.8%で、特に平成11年以降は30%以上を維持していた。本技術によりこれまでに最高8子のクローン牛が得られた。

クローン牛の能力は本当に同じなのか？

クローン牛2子3組の発育は、育成期および検定期を通じ類似しており、脂肪交雑値(BMS)は各組内で一致した。この結果クローン牛を全兄弟の代わりに産肉能力検定に利用することが可能であることを示した。

【平成14年度 畜試】



北海道立畜産試験場で生まれた1卵性8子クローン牛

吸引法による性判別凍結胚の受胎率向上技術

桑実期に回収し吸引法による細胞採取とそれに続く24時間の培養を行うことで、ダイレクト法で凍結しても高い受胎率が得られる性判別胚を生産できる。

性判別凍結胚の現状

牛胚の性判別技術を現場に普及していくには胚の凍結保存技術が不可欠である。しかし一般的に実施されている胚を金属刀で切断し、ダイレクト法で凍結する方法では凍結保存後の受胎率が大きく低下してしまう。そこで性判別胚に適した凍結技術の開発や、胚の耐凍性向上により、凍結後の受胎率を向上させることを目的として、細胞の吸引採取とそれに続く24時間の培養により性判別胚への損傷の低減を試みた。

吸引法による細胞採取

胚に与える損傷を低減し、透明帯を保存するために、マイクロピペットを用いて桑実期胚の胚から細胞を直接採取した(吸引法)(写真1)。細胞採取した胚はIVD101(機能性ペプチド研)で24時間培養し、胚盤胞にまで発生させてからダイレクト法で凍結した。吸引法では胚にほとんど損傷を与えることなく必要な数の細胞のみを採取することができた(写真2, 3)。また吸引法で細胞採取した胚すべてが24時間培養後にほぼ完全な透明帯を保持したまま胚盤胞まで発育した(写真4)。

この方法により作成した胚を移植し、受胎率を切断法で性判別凍結した胚および新鮮胚と比較したところ、切断法により細胞採取した胚と比較して有意に高く、吸引法で細胞採取した新鮮胚や、切断法で細胞採取した新鮮胚と比較しても大差のない成績が得られた(表1)。

この結果から、桑実期に回収し吸引法による細胞採取とそれに続く24時間の培養を行うことで、ダイレクト法で凍結しても高い受胎率が得られる性判別胚を生産できることを明らかにした。

【平成15年度 畜試】

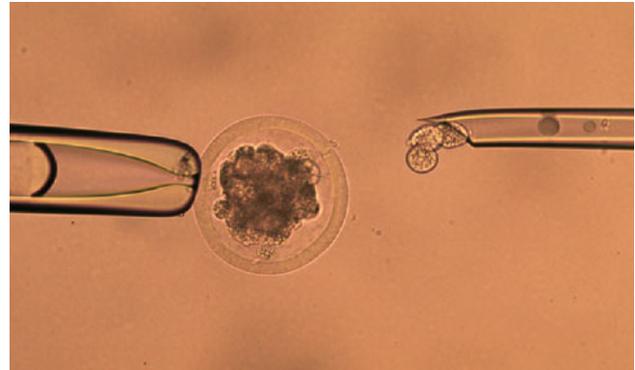


写真1. マイクロピペットによる細胞の吸引採取

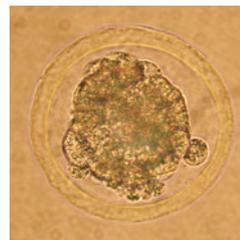


写真2 吸引前の受精卵



写真3 吸引後の受精卵と細胞



写真4 24時間培養後の受精卵

表1. 細胞採取法が凍結胚受胎率に及ぼす影響

細胞採取法	凍結法	移植数	受胎数(%)
吸引	ダイレクト	34	15(44.1) ^a
吸引	新鮮胚	20	10(50.0) ^a
切断	ダイレクト	73	15(20.5) ^b
切断	新鮮胚	80	41(51.3) ^a

a, b間に有意差あり(P < 0.05)

豚の受精卵移植技術の確立

外科的手法による豚の受精卵移植技術を確立した。受胎率67%、移植受精卵が子豚になる割合は48.3%であった。さらに、長距離輸送への応用について実証した。

豚の受精卵移植は豚群の疾病制御技術として期待されているが、豚では子宮が長いため受精卵の回収、移植が困難である。そこで、外科的手法によって受精卵移植を検討した。

受精卵の回収と移植

全身麻酔した豚の下腹部後方を約20cm切開し、腹壁を白線に沿って開腹し、子宮を体外へ露出する。回収は子宮体基部からバルーンカテーテルを挿入し、修正リン酸緩衝液50mlで左右の子宮を還流する(図1)。移植は卵管より約5cmの子宮にパスツールピペットで受精卵を注入する。子宮を腹腔に戻し、腹膜、腹壁、皮膚を縫合する。

移植成績

初回交配日より5日および6日に回収した受精卵を受卵豚9頭に移植したところ、6頭が受胎し、受胎率は67%であった。分娩した受卵豚は計87個の受精卵が移植されており、子豚を計42頭分娩したため、移植した受精卵が子豚になる割合は48.3%であった(表1)。

長距離輸送への応用

受精卵移植技術の実用化を実証するために、茨城県で回収された梅山豚の受精卵を空輸(輸送時間6~19時間15分)し、北海道でこの受精卵を受卵豚14頭に移植したところ、輸送時間が6時間または7時間40分であった受精卵を移植された3頭が受胎し、計24頭の子豚を分娩した(図2)。受精卵移植による長距離からの豚導入について実証した。

【平成2年度 滝川畜試】



図1 豚受精卵の回収

子宮にカテーテルを挿入し、還流している。

表1 移植成績

受胎率	67%	(6頭/9頭)*
子豚発生割合	48.3%	(42頭/87個)+

*: 受胎頭数/移植頭数

+: 子豚頭数/移植受精卵数



図2 受卵豚を哺乳する梅山豚(黒い子豚)

大ヨークシャー(白い子豚)は移植する受精卵数を確保するために入れた。

豚受精卵の液状保存とSPF豚群への応用

豚の受精卵は保存温度22℃で、48時間の保存が可能であった。また、SPF豚群への遺伝資源導入法として、受精卵移植の実用性を実証した。

液状保存

受精卵の保存温度を検討した。保存温度4℃では、24時間保存した受精卵でも形態的变化や劣化を認めなかった。しかし、受卵豚が受胎したのは4時間保存した受精卵を移植された1頭のみであり、産子数は2頭であった。3時間および24時間保存の受精卵では受胎しなかった。一方、保存温度22℃では、48時間保存の受精卵に軽度の発育を認めたが、24時間保存までには形態的な変化や劣化を認めなかった。受卵豚への移植成績は受精卵の保存時間が延長するとともに産子数が少なくなったが、48時間でも受卵豚は受胎し、分娩した(表1)。

SPF豚群への応用

SPF豚群への遺伝資源導入法として、受精卵移植技術の実用性を検討した(図1)。受精卵を移植した受卵豚15頭のうち9頭(受胎率60%)が受胎し、計61頭の子豚が分娩した。分娩した受卵豚には16.4個の受精卵が移植され、産子数は6.8頭であった。移植後の疾病検査で新たな疾病の侵入は認められなかった。

性周期の違いによる受胎成績

受精卵を回収した供卵豚と受卵豚との性周期の違い(供卵豚の発情日 - 受卵豚の発情日)による受胎成績は-2、-1、0および+1日で、それぞれ3/3、2/2、4/7および0/3(受胎頭数/移植頭数)であり、豚では受卵豚と供卵豚との性周期が一致するより、供卵豚より遅い性周期の受卵豚に移植した方が受胎しやすかった(表2)。【平成5年度 滝川畜試】

表1 保存した受精卵による移植成績

	3時間	4時間	24時間	48時間
4℃保存	0/1 #	1/1 (2頭)	0/4	未検討
22℃保存	1/1 (11頭)	1/1 (8頭)	2/3 (6頭)	2/2 (3頭) (流産) (2頭)

: 受胎頭数/移植頭数、()内は産子数

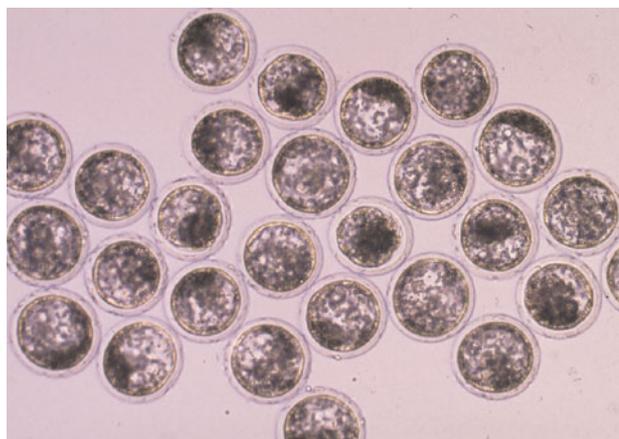


図1 SPF豚群へ移植した受精卵

疾病汚染状況で地理的エリアを設定し、通常領域のコンベエリアで回収された受精卵を、清浄領域のSPFエリアに運搬し、移植する。両エリア間で人や物品の交流は無く、受精卵は無菌操作によって受け渡される。

表2 性周期の違いによる受胎成績

-2日*	-1日	0日	+1日
3/3 #	2/2	4/7	0/3

* : 供卵豚の発情日 - 受卵豚の発情日

: 受胎頭数/移植頭数

Hiroshima希釈液を用いた鶏精液の凍結技術

Hiroshima希釈液を用いてペレット法で鶏精液を凍結すると、農場業務的な使用例でも実用的な受精率が得られる。

鶏凍結精液の注入量は0.05ml以上必要である。

凍結融解精液を採取時の精子濃度にし、精液注入量を0.025、0.05、0.1および0.2mlとしたときの受精率は、0.025mlのとき有意に低下した(図1)。

鶏凍結精液の再々希釈倍率は4倍までが適当である。

凍結融解精液を採取時の精子濃度にし、これを1、2、4および8倍に再々希釈したとき、再々希釈倍率が8倍では、受精率が有意に低下した(図2)。

人工授精後2～8日間で最も多くの受精卵を得る条件は、精液注入量0.05ml、再々希釈倍率4倍と試算された。

高い受精率が得られるのは再々希釈倍率が1で注入量が0.1および0.2mlの時であるが、凍結融解精液1mlで授精出来る羽数が減少するので、このとき得られる受精卵数を試算すると約6倍の差が生ずる(表1)。

人工授精を4回繰り返して、受精卵を生産することが出来る。

採取時の精子濃度にした凍結融解精液0.5mlを、7日間隔で4回授精したときの受精率の変化を図3に示した。

4週間の全期間の受精率は平均70.6%であった。

【平成2年度 滝川畜試】

ペレット法：希釈液を添加した精液をドライアイス上で凍結させる方法

再々希釈：凍結精液を融解し、再希釈液を加えグリセリンを除去した後、再度、再希釈液を加え精子数を調整する作業。

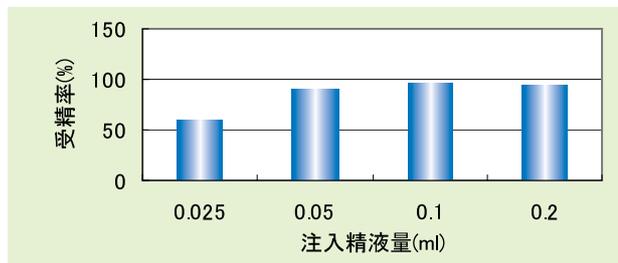


図1 注入精液量が受精率に及ぼす影響

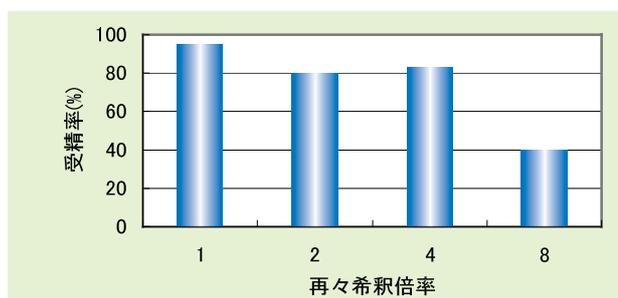


図2 再々希釈倍率が受精率に及ぼす影響

表1 実験結果から予測した凍結融解後の精液 1ml で人工授精後2～8日間に生産できる受精卵

精液注入量 (ml)	再々希釈倍率	授精可能雌鶏(羽)	受精率 (%)	試算受精卵数(個)
0.200	1	5	95	23.8
	2	10	80	40.0
	4	20	83	83.0
	8	40	40	80.0
0.100	1	10	97	48.5
	4	40	31	62.0
0.050	1	20	90	90.0
	2	40	68	136.0
0.025	1	40	61	122.0

1週間の産卵数を5個と仮定し試算した受精率は今回の実験成績を用いた

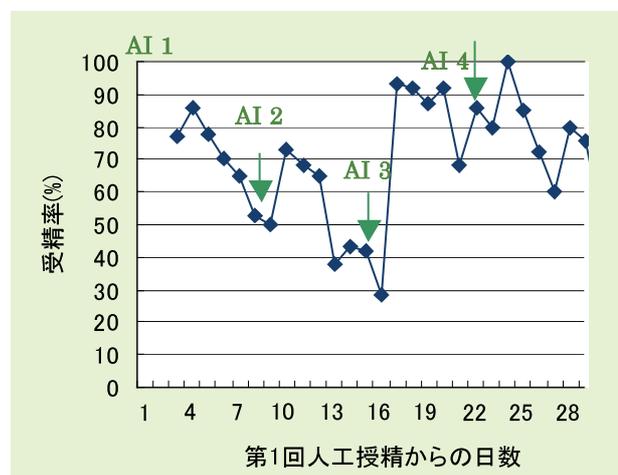


図3 7日間隔で人工授精したときの受精率の推移

7 遺伝子診断 技術

PCR法による小型ピロプラズマ病のDNA診断

PCR法を用いたDNA診断により小型ピロプラズマ病赤血球内寄生原虫を高感度で検出できることを示し、また本法を利用して本病が胎内感染することを明らかにした。

PCR法による小型ピロプラズマ病DNA診断

小型ピロプラズマ病赤血球内寄生原虫（以下Ts）主要蛋白質（分子量32kDaの表面抗原）を認識するプライマーを用いたPCR法で、Ts感染牛の血液から抽出したDNAを増幅、電気泳動することにより、血液中Tsが検出できることを明らかにした（図1）。

本法は、従来のギムザ染色した血液塗抹標本を鏡検する方法（塗抹鏡検法）では確認困難な低い寄生率(0.01%以下)の血液からもDNAの増幅が認められ、極めて高感度な検出が可能である（表1）。しかし、本法により寄生率を調べることは難しいので、寄生率は塗抹鏡検法を利用する必要がある。

胎内および舎内感染の確認

PCR法によるDNA診断および塗抹鏡検法により、出生1日または2日後における子牛の血液中にTsがみられ、胎内感染が確認された（図2）。

また、出生1日または2日後にTsがみられなかったが、放牧開始前の子牛の血液中にTsがみられた例があり、舎内感染が確認された（表2）。

このことから感染経路として、従来から知られている放牧地におけるダニを媒介した感染に加え、胎内感染および舎内感染が存在することが明らかになった。胎内感染子牛、舎内感染子牛の放牧後におけるTs寄生率およびヘマトクリット値は、いずれも非感染子牛とほとんど差はなく、胎内感染、舎内感染のいずれも放牧地での再感染に影響を及ぼさないものと考えられる。

【平成5年度 新得畜試】

表2 Ts感染の認められた子牛

	出生1日 または2日後	5月中旬 (放牧開始時)
DNA診断	8	23
塗抹鏡検法	5	13
調査頭数	100	100

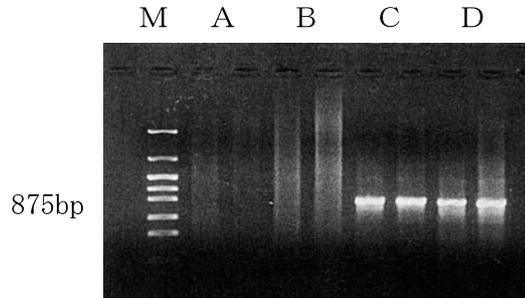


図1 PCR法によるTsDNAの検出

A、B：非感染牛
C、D：感染牛
M：分子量マーカー

表1 塗抹鏡検法とDNA診断の比較

牛No.	鏡検法による Ts寄生率 (%)	DNA診断
1	0	—
2	0	—
3	1.60	+
4	0	—
5	0	+
6	0	—
7	0.12	+
8	0	—
9	0.14	+
10	0.12	+
11	0	+
12	0.83	+
13	0.13	+
14	0	—
15	0	+
16	0	+
17	0.08	+
18	0	—
19	0.13	+
20	0.01	+

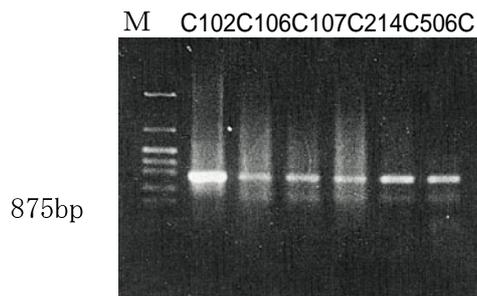


図2 胎内感染子牛のTsDNAの検出

M：分子量マーカー
C：コントロール

牛受精卵による遺伝性疾患診断法

牛受精卵から少数の細胞を採取し、効率的にDNAを抽出して、遺伝性疾患の診断が可能であることをバンド3欠損症をモデルにして実証した。

受精卵からの細胞採取法およびDNA抽出法の検討

受精卵への損傷をできるだけ与えないような細胞採取法および採取した少数の細胞から効率的にDNAを抽出する方法について検討した。桑実期胚および小型化桑実期胚には、マイクロピペットによる吸引法（写真1）が、初期胚盤胞期以降の受精卵では切断法（写真2）が適していることが明らかとなった。また、少数の細胞からDNAを抽出するには、酵素法が適していることが明らかとなった。

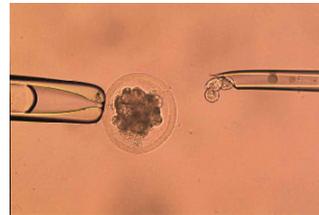


写真1 吸引法

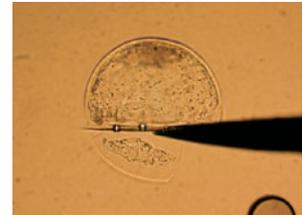


写真2 切断法

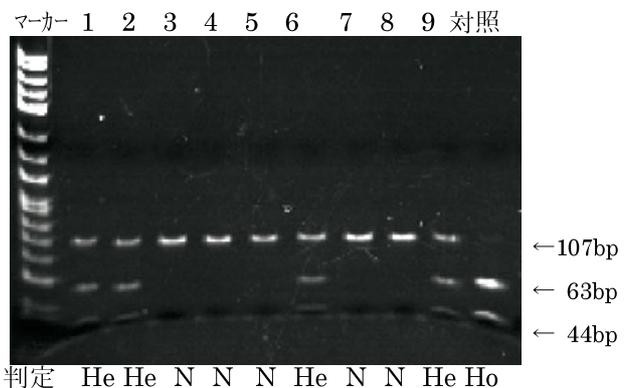
牛受精卵における「バンド3欠損症」の診断

受精卵の一部の細胞から抽出したDNAをサンプルとして、黒毛和種の遺伝性疾患であるバンド3欠損症の診断について検討した。供試した62個のサンプルのうち61個(98%)の受精卵においてバンド3欠損症の診断が可能であった（写真3）。1例については制限酵素消化後に泳動像が不鮮明となり、診断できなかった（表1）。

また、バンド3欠損症の診断と性判別の両方を行ったサンプルについては、バンド3の診断に関しては全てのサンプルにおいて、性判別に関しては39例のうち38例において診断および判別が可能であった（表2）。

このように、受精卵の一部分の細胞から抽出したDNAをPCRにより増幅し、制限酵素で消化することでバンド3欠損症の診断を行うことができた。また、同一のサンプルを用いて遺伝性疾患の診断と性判別を同時に行うことが可能であった。このことから、移植に用いる受精卵の性判別を行う際に、採取する細胞の数を増やすことなく遺伝性疾患の診断を行うことができ、性判別のみならず特定の遺伝性疾患の保因状況を基準とした受精卵の選別を行うことが可能であると考えられる。

【平成12年度 畜試】



判定 He He N N N He N N He Ho
(N: 正常受精卵、He: ヘテロ保因受精卵、Ho: ホモ接合型血液由来 DNA)

写真3 PCR産物の制限酵素消化によるバンド3欠損症の診断

表1 受精卵におけるバンド3欠損症の診断

供試 受精卵数	判 別			判別率 (%)
	正 常 受 精 卵	ヘ テ ロ 保 因 受 精 卵	不 明	
62	36	25	1	98.4

表2 受精卵におけるバンド3診断と性判別

供 試 受 精 卵 数	バンド3診断数 (%)	性判別数 (%)
39	39(100)	38(97.4)

牛糞便中の腸管出血性大腸菌O157のPCR検出法

牛糞便中のPCR阻害物質を除去するDNA抽出法とO157特異プライマーを開発し、PCR法による牛糞便からの腸管出血性大腸菌O157の高感度検出が可能となった。

O157検出のためのプライマーの開発

O157およびベロ毒素遺伝子検出用のプライマーとして、rfb-HkdおよびVT-Hkdを開発した。両プライマーは既往のプライマーに比べて増幅が優れ、高感度な検出が可能であった。

牛糞便からのDNA抽出法の開発と多検体処理

DNA抽出方法として糞便懸濁液の酸・アルコール処理、インスタジーン (Bio-Rad) による抽出とQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) による簡易精製を行うことで、濃厚な糞便懸濁液 (20%) でもPCRが可能となった。また96ウェルプレートでの処理が可能のように改良され、多検体処理が容易になった。

PCR法によるO157検出法

開発されたPCR検出法は、増菌培地に加えた糞便中 (0.2~1g) に1個の生菌が含まれていれば検出が可能であった。O157感染牛群の糞便材料で行った検査では、O157の高感度検出法である免疫磁気ビーズ法よりも安定した検出が可能であった (表1)。ベロ毒素とO157の同時検出では、rfb-Hkd単独より検出感度がやや低下する傾向が認められたが、ベロ毒素遺伝子とO157の同時検出も可能であることが確認された (図1)。

本法は、現在最も高感度とされる免疫磁気ビーズ法と同等の高検出感度を有し、免疫磁気ビーズ法の4日間より短期間の2日間で、安定した検出が可能である。また、その操作の大部分でマルチチャンネルピペットが使用可能なため、多検体処理が容易となった (表2)。

【平成13年度 畜試】

表1 両検査法による牛群検査結果の比較

	牛群	検査頭数	O157 陽性頭数	
			PCR 法	免疫磁気ビーズ法
濃厚感染牛群	A	18	17	8
	B	25	11	8
	C	36	13	9
陰性牛群	D	15	0	0
	E	19	0	0
	F	16	0	0
	G	17	0	0
	H	16	0	0

注) プライマーは rfb-Hkd のみを使用

表2 PCR検査法の利点

	PCR 法	免疫磁気ビーズ法
検査に必要な期間	2日間	4日間
検出感度	1CFU	1CFU
1回に処理可能な検体数	94検体	20検体
検出率	安定して高い	糞便中夾雑物により検出できない場合あり
他のベロ毒素大腸菌検査	VT-Hkd プライマーの使用により容易に検出可能	難しい

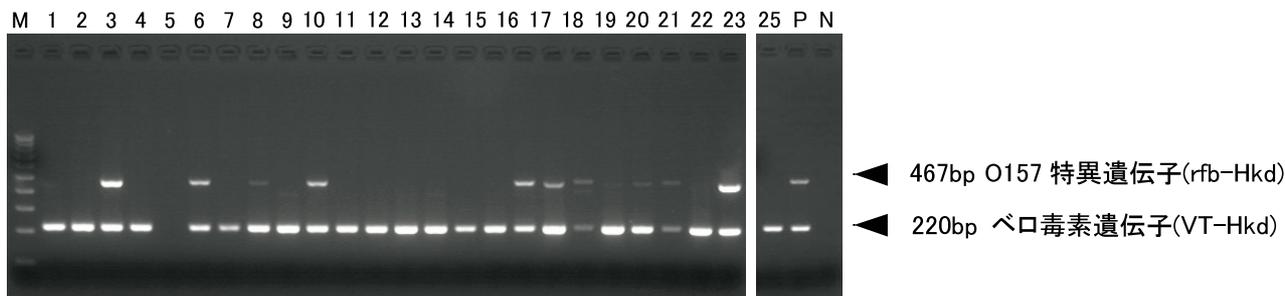


図1 O157濃厚感染牛群例におけるマルチプレックスPCR検査
(1~25:牛糞便検体, M:分子量マーカー, P:陽性対照, N, 陰性対照)

牛受精卵のPCR法による性別判別技術

牛受精卵の一部を切断してDNAを取り出し、PCR法により雄特異的DNAを増幅・検出することにより、移植前に性別を判定する技術を確立した。

牛雄特異的DNAの分離・同定と新プライマーの開発

雌雄の牛ゲノムDNAを分析して性別により違いの見られる部分を検索し、塩基配列を解析した。全長1542塩基対の雄特異的部分を含むDNA配列（S4）を同定した。繰り返し部分を除いた配列についてホモロジー検索を行ったが既知の配列との相同性は見いだされなかった。

得られた配列を基にプライマーをA、BおよびCの3組設計し、雌雄の牛ゲノムDNAを試料としてPCRを行った。プライマーAとCでは雄にのみバンドが1本検出され、プライマーBでは雄のバンドに加え、雌雄共通のバンドが検出された。

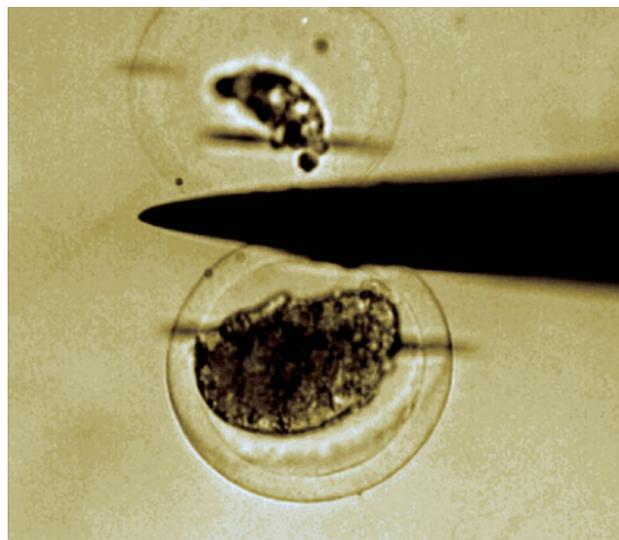


写真1 マイクロマニピュレータによるPCR用サンプルの採取

PCRと染色体検査の比較

プライマーBを用いて切断した受精卵の一部（写真1）をサンプルとしてPCRを行い（写真2）、残りの部分を用いた受精卵の染色体検査による雌雄判定結果と比較したところ全て一致した（表1）。

これらのことからプライマーBを用いたPCRにより、従来2組必要であったサンプリングミス（操作中における検体細胞の消失）のチェックと雌雄の判別が1組のプライマーで同時に行えることが示された。なお今回解析した雄特異的DNA配列とそれを基に設計した受精卵の性別判別用プライマーについては平成9年に特許を取得した。

【平成8年度 新得畜試】

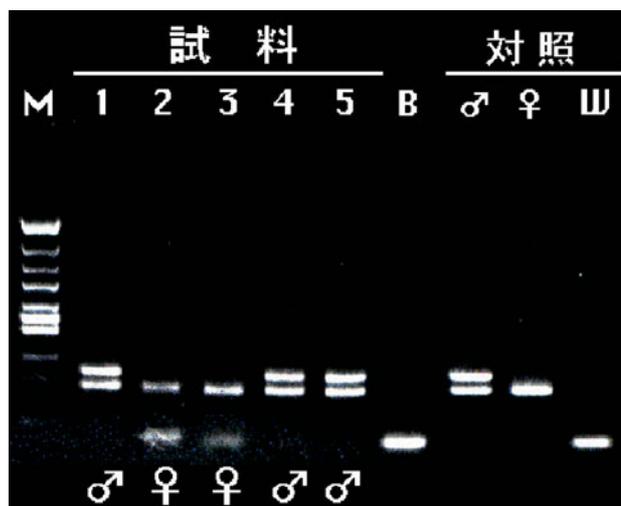


写真2 プライマーBを用いたPCRの電気泳動結果

M：サイズマーカー、B：洗浄バッファー、W：滅菌蒸留水

表1. プライマーS4-Bを用いたPCRと染色体検査の結果

供試受精卵数	PCRによる判定結果	染色体検査結果	判定一致率 (%)
36	♂ 26	♂ 26	100
	♀ 10	♀ 10	100

簡単で速い牛受精卵の性別判別キット

子牛の雌雄産み分けを容易にするために、新規DNA増幅法（LAMP法）を利用し、簡易かつ迅速に受精卵の性別判別ができるキットを開発した。

牛受精卵の性別判別キットの開発

新規DNA増幅法であるLAMP法¹⁾を利用した牛受精卵の性別判別キットを開発した(写真1)。当場では、これまでの研究で牛雄特異的DNA配列(S4)を同定しており、本キットは、LAMP法により受精卵の一部からS4を増幅・検出して性別判別を行う。

本キットにより、受精卵から採取した細胞を用いて性別判別を行った結果、5細胞を試料とすることで95%以上を正しく性別判別することができた(表1)。さらに、性別判別した受精卵を移植して生産した子牛の性は、すべて判定結果と一致した(表2)。

LAMP法は、操作が簡単で増幅効率も高く、反応液の白濁により増幅の有無を判定できる(写真2)。本キットは、わずか1時間で判定を終了することができ、従来法に比べて所要時間を1/3程度に短縮することができた(図1)。本キットの利用により、雌雄産み分けの普及が促進され、酪農畜産経営の効率化が図られることが期待される。

【平成14年度 畜試】

LAMP法

Loop-mediated Isothermal Amplification法。PCR法に代わる国産の新規DNA増幅法であり、様々な分野での応用が期待されている。

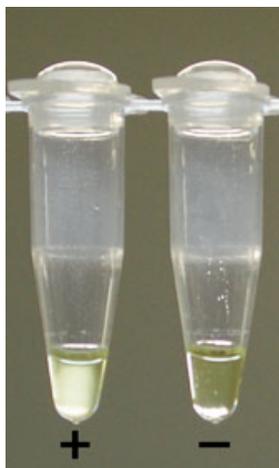


写真2 反応液の白濁によるDNA増幅の検出



写真1 LAMP法による牛受精卵性別判別キット

表1 受精卵由来細胞を用いたLAMP牛受精卵性別判別キットの検出感度評価

細胞数	実験数	判定可能数 (%)	LAMPによる判定結果			
			♂	一致数 (%) ^a	♀	一致数 (%) ^a
1	48	38 (79)	12	12 (100)	26	17 (65)
2	44	42 (95)	16	16 (100)	26	22 (85)
3	47	45 (96)	19	19 (100)	26	22 (85)
4	46	46 (100)	20	20 (100)	26	22 (85)
5	44	44 (100)	22	22 (100)	22	21 (95)

^a PCRによる性別判別結果との比較

(道立畜試, 2003)

表2 LAMP法による性別判別受精卵の移植試験

移植数	受胎数 (%)	分娩数 (%) ^a	一致数 (%)
61	35 (57)	33 (94)	33 (100) ^b

^a 早期胚死滅; 1頭、流産; 1頭

^b 雄; 12、雌: 21



図1 性別判別方法による所要時間の比較

LAMP法による牛糞便からのヨーネ菌遺伝子の検出

ヨーネ菌に特異的なLAMP用プライマーを作製し、LAMP法による牛糞便からのヨーネ菌遺伝子検出の基礎的条件を確立した。

LAMP法によるヨーネ菌遺伝子検出法の開発

ヨーネ菌に特異的な配列IS900、hspXおよびF57を増幅するLAMP用プライマーセットを多数作製し、それらの中からIS900をもとに作製した1つのプライマーセットを選択した。このプライマーセットは、近年ヨーネ菌に類似していると報告されている*M.cookii* str2333を含む9種43株の全てのヨーネ菌類似菌において反応がみられず、反応時間90分間でヨーネ菌DNA0.01pgを検出する高い感度を示した(図1)。

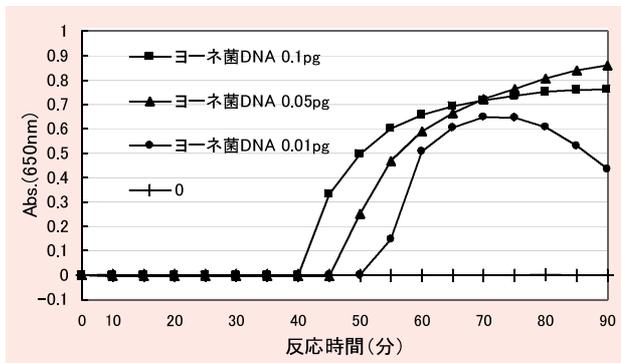


図1 LAMP法によるヨーネ菌DNAの検出

牛糞便からのヨーネ菌遺伝子検出法の検討

牛糞便からのヨーネ菌DNAの抽出は、ノンフェノールビーズ法が熱抽出法よりも良好であり、LAMP法によるヨーネ菌遺伝子の検出効率が高く、また、LAMP反応液に、糞便に含まれる反応阻害物質の作用を抑制する試薬Ampdirect®を添加することは、ヨーネ菌の検出率を高めた(表1)。

これらのDNA抽出法および添加試薬を用いて、LAMP法によりヨーネ菌遺伝子を検出したところ、培養したヨーネ菌を添加した牛糞便希釈液からヨーネ菌DNA 5 cfu/ml (cfu: colony forming unit) までの検出が可能であった(図2)。

さらに、牛糞便からのヨーネ菌遺伝子検出を試みたところ、LAMP法は、全ての糞便培養法陽性の試料からヨーネ菌遺伝子を検出した(表2)。

表1 Ampdirect®添加による検出率の改善

試料	コロニー数	Ampdirect®添加	無添加
A	1	2 / 8	1 / 8
B	1	2 / 8	0 / 8
C	2	6 / 8	0 / 8
D	2	8 / 8	4 / 8
E	3	2 / 8	1 / 8
F	4	6 / 8	5 / 8
G	14	7 / 8	6 / 8
H	0	0 / 8	0 / 8

検出率を検出数/反応回数で表す
コロニー数:ヨーネ菌用培地3本に形成したコロニー

表2 LAMP法およびnestedPCR法の比較

糞便培養法	LAMP法 (検出数)	nestedPCR法 (検出数)
陽性(9)	9	4
陰性(157)	26	8

()は試料数

【平成15年度 畜試】

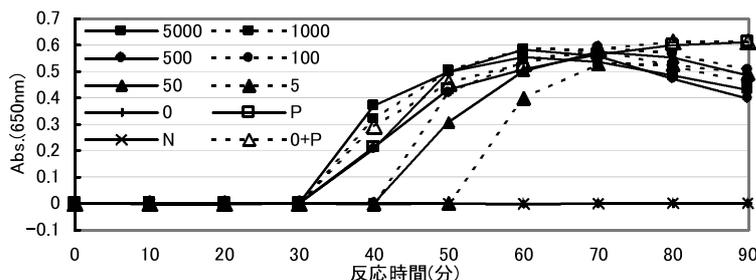


図2 牛糞便希釈液に添加したヨーネ菌の検出(単位 cfu/ml)

P:ヨーネ菌 DNA200pg (4×10^4 cfu)

N:蒸留水

衛生・バイオ分野における研究成果一覧

年度	成 果 (課 題 名)	担当場・科
昭49	牛乳房炎の乾乳期治療法	新得・衛生科、根釧・酪農科
49	牛肺虫の越冬と舎内感染及び草地での感染防止	滝川・衛生科、新得・衛生科
51	乳用雄子牛の集団哺育施設における損耗防止	滝川・衛生科、新得・衛生科
51	農家における採卵鶏の損耗と生産性	滝川・衛生科
51	草地型酪農地帯における乳牛に対するミネラル給与法の改善	根釧・酪農科
52	窒素多肥牧草による家畜の生理障害－硝酸塩中毒の検討－	滝川・衛生科、新得・衛生科
55	子牛の呼吸器病に対する初乳の効果的利用法	新得・衛生科
55	未経産牛乳房炎（夏季乳房炎）の防除法	滝川・衛生科、新得・衛生科
55	窒素、カリ質肥料多用牧草利用時における家畜の生理障害	滝川・衛生科、新得・衛生科
56	乳牛における妊娠末期の栄養条件と分娩性低カルシウム血症	根釧・酪農科
57	肉牛の低マグネシウム血症	新得・衛生科
57	乳牛への消化管内線虫薬サイアベンダゾールの応用	滝川・衛生科
59	牛乳房炎の総合防除法	滝川・衛生科、新得・衛生科
	成牛乳房炎の予防 夏季乳房炎の防除	
59	北海道における乳牛の血液成分の標準値	滝川・衛生科
59	豚のヘモフィルス性肺炎の防除	滝川・衛生科
59	哺乳雄子牛のマイコプラズマ性肺炎	新得・衛生科
59	肉専用種の下痢症子牛に対する投薬器を用いた経口電解質液の 治療効果	新得・衛生科
60	肉用牛における殺虫用エア- タッグの衛生昆虫類に対する防除効果	新得・衛生科
60	肉用牛の受精卵移植技術の改善 - 新鮮卵移植実用化試験 -	新得・生物工学科
60	北海道における乳牛群の代謝プロファイルテストの応用	滝川・衛生科
61	生乳の低温殺菌汚染	根釧・酪農二科
61	環境、生理条件および体細胞数が乳成分に及ぼす影響	根釧・酪農二科
61	乾乳牛の放牧期飼養法改善による分娩性低カルシウム血症の予防	根釧・酪農二科
62	繁殖経営における肉牛のマグネシウム及びセレン欠乏症予防	新得・衛生科
62	牛の凍結保存卵融解移植実用化試験 - 肉用牛の受精卵移植技術 -	新得・生物工学科
63	肉専用種子牛の下痢予防	新得・衛生科
63	潜在性乳房炎の診断基準	新得・衛生科
平 1	分娩前後のエネルギー水準が乳蛋白率、脂肪肝および血液成分に 及ぼす影響	根釧・酪農二科
1	めん羊における2年3産繁殖技術	滝川・衛生科
2	鶏精液の凍結技術	滝川・衛生科
2	豚胚（受精卵）移植技術の実用化	滝川・衛生科
2	乳牛に対する カロチンおよびビタミンA製剤の添加効果	根釧・酪農二科
2	北海道におけるセレン欠乏の実態と子牛白筋症の予防対策	新得・衛生科
2	牛の受精卵移植技術の改善と双子生産技術	新得・生物工学科
3	めん羊のコリネバクテリウム感染症の防除	滝川・衛生科
3	優良道産系統豚「ハマナスW1」のSPF化	滝川・衛生科
4	乳牛における分娩前後の栄養充足と脂肪肝	根釧・酪農二科
4	乳牛の超音波画像解析による繁殖機能と栄養状況	根釧・酪農二科

年度	成 果 (課 題 名)	担当場・科
平 5	ELISA法による牛乳房炎の診断法と泌乳期治療	新得・衛生科
5	PCR法による小型ピロプラズマ病のDNA診断と胎内感染	新得・衛生科
5	新鮮ラム肉の通年出荷のための繁殖技術	滝川・衛生科
5	常温環境下での豚胚移植ならびに胚の保存期間の延長	滝川・衛生科
6	乾乳期における乳牛の乳房炎予防技術	根釧・酪農二科
6	胎児心電図による牛の双児妊娠診断	新得・生物工学科
6	コンベンショナル養豚場におけるSPF種豚の導入技術	滝川・衛生科
7	北海道におけるHemophilus Parasuis感染症の実態解明と診断技術の開発	滝川・衛生科
7	ロタウイルスに起因する子牛下痢の疫学的解析と診断・予防法	新得・衛生科
7	体外受精技術を活用した良質胚多量確保技術の開発	新得・生物工学科
7	PCR法による牛胚の性別の新プライマ - の開発	新得・生物工学科
8	乳牛のボディコンディションスコアの推移と繁殖性との関連	根釧・酪農二科
8	乳中尿素窒素の基準値（暫定値）	根釧・酪農二科
8	給餌方式および夜間点灯がめん羊の分娩時刻に及ぼす影響	滝川・衛生科
8	豚マイコプラズマ肺炎不活化ワクチンの野外臨床試験	滝川・衛生科
8	小型ピロプラズマ原虫の遺伝子解析とワクチン開発の試み	新得・衛生科
9	セレン補給による牛の感染防御機能の増強と胎盤停滞の予防	新得・衛生科
9	既存養豚場のSPF変換方式	滝川・衛生科
9	チモシ - 基幹草地の集約放牧技術と牛乳の栄養成分	根釧・酪農一科
10	フリ - スト - ル経営における飼養管理と経済性評価	根釧・酪農一科
10	長日処理した雌羊に対する雄羊同居およびホルモン処理併用による季節外繁殖	滝川・衛生科
10	排卵同期化による黒毛和種の定時人工授精技術	新得・衛生科
10	キャピラリ - PCR法による牛胚性別判別所要時間の短縮	新得・生物工学科
10	0.1%ヨウ素乳頭消毒剤を用いたプレディッピングの牛乳房炎予防効果	新得・衛生科
11	乳用雄肥育牛における肝臓瘍の発生要因解析	新得・衛生科
11	乳牛の供用年数短縮の要因解析	根釧・酪農一科、新得・衛生科
11	生乳中の栄養・機能性成分の動態解明並びに乳脂肪組成がラットの生理・代謝機能に及ぼす影響	根釧・酪農二科
11	リステリア菌のサイレージにおける増殖条件と生乳への混入防止対策	根釧・酪農二科
11	牛胚性別判別技術の現場応用	新得・生物工学科
11	咳・くしゃみ回数の計測による豚呼吸器感染症のモニタリング	滝川・衛生科
11	豚マイコプラズマ肺炎不活化ワクチンによる肥育豚の発育改善	滝川・衛生科
11	鶏卵黄抗体を用いたカスタム抗体の作成	滝川・家禽科
11	生理活性物質による感染防御機能増強および牛乳房炎の治療	新得・衛生科
12	乳用雄肥育牛における肝臓瘍の発生要因解析（補遺）	畜試・代謝生理科
12	免疫クロマトグラフィ法によるロタウイルスの簡易検出法	畜試・感染予防科
12	凍結初乳の連続給与と人工哺育による肉専用種子牛の下痢症対策	畜試・感染予防科
12	チモシ - 主体粗飼料の - トコフェノ - ルおよび カロチン含量	根釧・乳質生理科

年度	成 果 (課 題 名)	担当場・科
平 13	豚舎新築方式によるSPF豚農場開設マニュアル	畜試・感染予防科
13	PCR法による牛糞便からの出血性大腸菌O157の検出システム	畜試・感染予防科
13	受精卵クローニングの効率的生産技術	畜試・受精卵移植科
13	受精卵の遺伝子解析による牛の遺伝性疾患診断法	畜試・遺伝子工学科
13	集約放牧における乳牛の繁殖性及び健康維持へのMUN濃度の利用	根釧・乳牛繁殖科
13	分娩警報装置による牛の分娩報知	畜試・代謝生理科
13	プレディッピングにおける薬液浸漬後の乳頭清拭法	根釧・乳質生理科
14	LAMP法による牛受精卵性判別キットの開発	畜試・遺伝子工学科
14	SPF豚農場の清浄度維持技術	畜試・感染予防科
14	乳牛の蹄疾患早期発見と蹄の健康管理技術	根釧・乳牛飼養科
14	陰イオン塩給与による乳牛の低カルシウム血症の予防	畜試・代謝生理科
14	乳牛検定成績における個体の乳中尿素窒素濃度の特性	根釧・乳質生理科
15	乳牛の繁殖改善モニタリング	根釧・乳牛飼養科
15	牛における腸管出血性大腸菌O157の低減技術	畜試・感染予防科
15	乳牛の第四胃変位の発症要因とリスク評価	畜試・代謝生理科
15	血糖値を用いた乳牛の分娩予測	畜試・代謝生理科
15	吸引法による性判別凍結胚の受胎率向上技術	畜試・受精卵移植科
15	LAMP法による牛糞便からのヨシネ菌遺伝子の検出	畜試・遺伝子工学科

家畜の健康維持と先端技術の開発をめざして
ー衛生・バイオテク研究主要成果集ー

北海道立畜産試験場
北海道立根釧農業試験場

平成 16 年 3 月 30 日 発行

発行者 北海道立畜産試験場
081-0038 北海道上川郡新得町
TEL (01566) 4-0613

印刷所 ソーゴ印刷株式会社



衛生・バイオテック研究主要成果集

北海道立畜産試験場
北海道立根釧農業試験場