

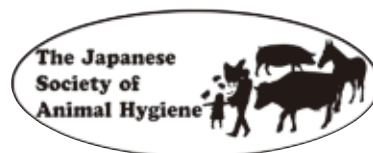
家畜衛生学雑誌

The Japanese Journal of Animal Hygiene

Vol.46 No.4
2021. MAR.

日本家畜衛生学会

The Japanese Society of
Animal Hygiene



家 畜 衛 生 学 雑 誌

日本家畜衛生学会 発行

理 事 長：河合一洋

副理事長：樋口豪紀

編集委員長：長井 誠

編集委員：末吉益雄・高井伸二・宮崎 茂

野上貞雄・福士秀人

The Japanese Journal of Animal Hygiene Published by the Japanese Society of Animal Hygiene

President : Kazuhiro KAWAI (*Azabu Univ.*)

Vice President : Hidetoshi HIGUCHI (*Rakuno Gakuen Univ.*)

Editor-in-Chief : Makoto NAGAI (*Azabu Univ.*)

Editorial Board : Masuo SUEYOSHI (*Miyazaki Univ.*)

Shinji TAKAI (*Kitasato Univ.*)

Shigeru MIYAZAKI (*Res. Inst. For Anim. Sci. in Biochem. and Toxicol.*)

Sadao NOGAMI (*Nihon Univ.*)

Hideto FUKUSHI (*Gifu Univ.*)

複写される方へ

日本家畜衛生学会は有限責任中間法人 学術著作権協会（学著協）に複写に関する権利委託をしていますので、本誌に掲載された著作物を複写したい方は、学著協より許諾を受けて複写して下さい。但し、社団法人日本複写権センター（学著協より複写に関する権利を再委託）と包括複写許諾契約を締結されている企業の社員による社内利用目的の複写はその必要はありません。（※社外頒布用の複写は許諾が必要です。）

権利委託先： 有限責任中間法人 学術著作権協会

〒107-0052 東京都港区赤坂9-6-41 乃木坂ビル3階

電話：03-3475-5618 FAX：03-3475-5619 E-mail：info@jaacc.jp

注意：複写以外の許諾（著作物の転載・翻訳等）は、学著協では扱っていませんので、直接日本家畜衛生学会へご連絡下さい。[電話：042-367-5780]

また、アメリカ合衆国において本書を複写したい場合は、次の団体に連絡して下さい。

Copyright Clearance Center, Inc.

222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923 USA

Phone：1-978-750-8400 FAX：1-978-646-8600

「家畜衛生学雑誌」第46巻第4号の送付にあたって

会員の皆様におかれましては、ますますご清栄のこととお慶び申し上げます。ここに、「家畜衛生学雑誌」第46巻第4号を刊行する運びとなりました。本号では、総説1編、原著論文3編、技術資料1編を掲載しております。

本誌では、原著論文・短報以外にも、総説、数ページ程度のミニレビュー、技術資料等の原稿を受け付けておりますので、会員の皆様の積極的なご投稿をよろしくお願い致します。ご不明な点は遠慮なく編集委員会事務局へお問い合わせください。

日本家畜衛生学会 理事長 河合一洋
家畜衛生学雑誌 編集委員長 長井 誠

日本家畜衛生学会・学会費納入のお願い

ご承知のように、学会は会員の皆様からの会費をもって運営されております。学会の運営を円滑に運ぶために、所定の会費を納入していただきますようお願い致します。

*会費は、正会員5,000円、学生会員2,000円です。

日本家畜衛生学会 理事長 河合一洋

払 込 取 扱 票																
00																
口座記号										口座番号(右詰めで記入)					金 額	
※ 0 0 2 4 0 3 ※										※ 4 3 1 7 1 ※					千 百 十 万 千 百 十 円	
加入者名 ※ 日本家畜衛生学会										料 金		特殊 取扱				
2016 2017 2018 2019 2020 年度 ()																
計 円																
通信欄																
ご依頼人 ※ おところ (郵便番号 -)																
※ おなまえ																
(電話番号 - -)																
裏面の注意事項をお読みください。																
これより下部には何も記入しないでください。																
受付局日附印																

各票の※印欄は、ご依頼人において記載してください。

切り取らないで郵便局にお出ください。

記載事項を訂正した場合は、その箇所に訂正印を押してください。

郵便振替払込請求書兼受領証														
口座記号番号 ※		0 0 2 4 0 3 ※												
加入者名 ※		日本家畜衛生学会												
金 額		千 百 十 万 千 百 十 円												
※ おなまえ														
※ ご依頼人		様												
(消費税込)		受 付 局 日 附 印												
料 金		円												
特殊取扱														

(ご注意)

- ・この用紙は、機械で処理しますので、口座番号及び金額を記入する際は、枠内にはっきりと記入してください。
- ・また、本票を汚したり、折り曲げたりしないでください。

- ・この払込請求書を郵便局の派遣員にお預けになるときは、引換えに預り証を必ずお受け取りください。

この受領証は、郵便振替の払込みの証拠となるものですから大切に保存してください。

この払込取扱票の裏面には、何も記載しないでください。

家畜衛生学雑誌

第46巻 第4号 2021

目 次

〈総 説〉

日本における家畜用ワクチンの現状と将来展望

..... 平山紀夫 165~179

〈原 著〉

パイン粕サイレージおよび紅茶粕が乳牛のルーメン発酵と乳生産に及ぼす影響

..... 青木直人・東浦裕紀・佐藤 幹・神田修平・板橋久雄 181~188

Effect of Sampling Volume for Viable Bacterial Count and Somatic Cell Count in Cows' Foremilk

..... Nana Kitano・Yoshio Kiku・Satoshi Gondaira・Toshihiko Takahashi 189~193

新型コロナウイルスSARS-CoV-2 診断キットにおける前処理試薬の

ウイルス不活化効果の評価

..... 松浦遼介・Lo Chieh-Wen・中川 優・武井正美・間 陽子 195~203

〈技術資料〉

2019年に埼玉県で発生した豚熱（CSF）の概要と防疫対応

..... 伊藤麗子・留場寛子・柵 友香・田代卓也・成田沙織・福田昌治 205~215

第46巻総目次 217~220

会員へのおしらせ 221

家畜衛生学雑誌投稿規程 222~223

日本家畜衛生学会会則 224~225

The Japanese Journal of Animal Hygiene

Vol. 46 No. 4 2021

Contents

〈Review〉

- The present and future of domestic animal vaccines in Japan
..... Norio Hirayama 165~179

〈Original report〉

- Effect of pineapple bran silage and dried black tea residue on rumen fermentation and milk production
in dairy cows
..... Naoto Aoki *et al.* 181~188

- Effect of sampling volume for viable bacterial count and somatic cell count in cows' foremilk
..... Nana Kitano *et al.* 189~193

- Evaluation of SARS-CoV-2 inactivation efficiency mediated by the reagent of COVID-19 diagnosis kits
..... Ryosuke Matsuura *et al.* 195~203

〈Technical report〉

- An outbreak of classical swine fever (CSF) and epidemic prevention measures in Saitama Prefecture, 2019
..... Reiko Ito *et al.* 205~215

- Contents of volume 46 217~220

- Information for Members 221

- Instruction for Authors 222~223

- The Regulations of The Japanese Society of Animal Hygiene 224~225

日本における家畜用ワクチンの現状と将来展望

平山紀夫¹⁾*

The present and future of domestic animal vaccines in Japan

Norio Hirayama¹⁾*

⁽¹⁾ Nippon Veterinary and Life Science University, 1-7-1, Kyonancho, Musashino, Tokyo, 180-8602, Japan

* Corresponding Author : Norio Hirayama (hirayamanorio@gmail.com)

(2020. 11. 10 受付 / 2020. 12. 24 受理)

Summary

The vaccination is the best method to control the infectious diseases. For example, smallpox and rinderpest have been eradicated by mass vaccination. Many vaccines for domestic animals have been developed in Japan and are useful to produce healthy animals. In the 1880's, Pasteur found the methods to attenuate the pathological virus or bacteria. Thereafter numerous live vaccines were developed by the Pasteur's methods. Since the 1990's new vaccines were developed by the gene recombination technology, such as the gene deletion vaccine, subunit vaccine, recombinant live vaccine. Just coming, DNA vaccine and mRNA vaccine are looking forward to innovative vaccines.

Key words : domestic animal vaccines, Pasteur, recombinant live vaccine, DNA vaccine, mRNA vaccine

家畜衛生学雑誌 46, 165~179 (2021)

I. はじめに

2019年12月中国武漢市で発生した新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は、パンデミックとなり、その対策のためのワクチン開発が世界中で進められている。通常、感染症の成立要件として①病原体、②感染経路、③宿主の3つの要件があり、感染症はこの要件のどれかを断ち切るにより防ぐことができる (図1)。病原体に対しては消毒薬の使用、感染経路に対しては隔離等が有効な手段である。宿主に対しては抵抗力を付けるワクチンの使用が効果的であり、各家畜における感染症に対して多くのワクチンが開発されてきた。健康な家畜を生産するための無くてはならないツールであるワクチンに

ついて、その現状と将来展望を解説する。なお、個々のワクチンについての具体的な解説は、成書^{3, 4)}に詳細に記載されているので、本稿では省略する。

・3つの要件のどれかを断ち切ること

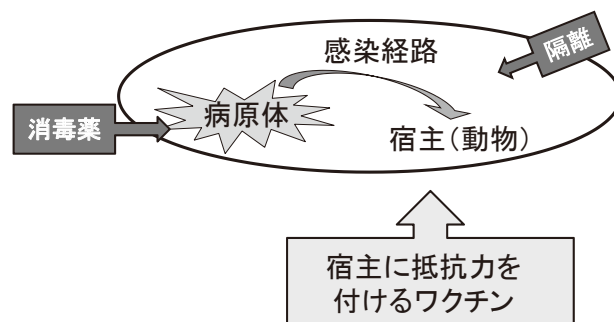


図1. 感染症を防ぐには

¹⁾ 日本獣医生命科学大学 (客員教授)

〒180-8602 東京都武蔵野市境南町 1-7-1

* 連絡著者: 平山紀夫 (hirayamanorio@gmail.com)

Ⅱ. ワクチンは感染症根絶に貢献した

1. 痘そう（天然痘）及び牛痘の根絶

人類が地球上から根絶した感染症は、1980年の痘そうと2011年の牛痘であるが、これらの快挙に大きな役割を果たしたのはワクチンである。

1) 天然痘ワクチン

人類最初のワクチンである Jenner が開発した牛痘接種法は、同属異種ウイルスを用いた自然の弱毒生ワクチンであった³⁶⁾。1958年世界保健機関が世界天然痘根絶計画を開始したが、この計画に使用されたワクチンは、ワクシニアウイルスを用いて牛の皮膚で製造された生ワクチンであった。日本では1948年ワクチンの義務接種で流行が沈静化し、1956年以降発生がなくなり、1976年ワクチン接種が中止された。なお、日本ではウサギ腎細胞の培養継代とクローニングにより作出されたワクシニアウイルス LC16m8 株を用いた生ワクチンが、副作用がない優れたワクチンとして1975年に承認されたが、翌年のワクチン接種の中止に伴い使用されることがなかった⁸⁾。一方、このワクチンは、バイオテロに備えた備蓄用ワクチンとして期待されるほか、LC16m8 株は組換え生ワクチンのベクターとして活用されている。

2) 牛痘ワクチン

牛痘に対する最初のワクチンは、1917年に蠣崎が開発した不活化ワクチンであり⁵⁶⁾、感染牛の脾臓乳剤をグリセリンで不活化したものであった。その後蠣崎は、トルエンで不活化することにより免疫持続時間が長くなることを見出した。この不活化ワクチンは、朝鮮・満州国境の牛に接種され、免疫ベルト地帯作成に威力を発揮し、朝鮮・日本への牛痘の侵入を防いだ。また、1938年に中村は、ウサギに百数十代連続継代して弱毒した L 株を作出し²⁴⁾、1953年にはこの L 株を発育鶏卵で330代継代し更に弱毒化した LA 株を開発した²⁵⁾。これらの生ワクチンは、中国や東南アジアでの牛痘撲滅に貢献した。1962年 Plowright らが牛腎培養細胞に90代継代した弱毒生ワクチンを開発し⁴²⁾、国連食糧農業機関が1993年に開始した牛痘撲滅プログラムで使用された。凍結乾燥された本ワクチンはアフリカ等の熱帯地域でも有効性を維持し、牛痘の発生は2001年ケニアの水牛が最後となった。2007年以降血清サーベイランスに切り替え、野外ウイルスによる抗体陽性例がないことを確認し、2011年国際獣疫事務局 (OIE) が牛痘の根絶を宣言した。

2. ワクチンの効果

天然痘ワクチンと牛痘ワクチン以外のワクチンでも感染症をコントロールしたワクチンが多くある。日本にお

ける事例を2・3紹介する。

犬の狂犬病は、1950年には867頭の発生があったが、狂犬病予防法に基づき狂犬病不活化ワクチン⁴⁹⁾の義務接種を行うことにより1957年には発生がなくなり、以降日本は狂犬病清浄国を維持している。

豚熱（豚コレラ）は、1960年代に年間2万頭の発生があった。当時は不活化ワクチンが使用されていたが、効果が十分でなかった。1969年から弱毒 GPE⁻株⁴⁷⁾による生ワクチンが使用された。本ワクチンの特徴は、接種後3日で感染防御するという極めて有効なワクチンであったことから、この生ワクチンの使用に伴い、豚熱の発生は激減し、2007年には撲滅を宣言し、2015年 OIE から豚熱清浄国のステータスが認定された。豚熱は2018年9月岐阜県で再発し、野生イノシシでの感染が防疫を困難にしているが、2019年10月からの豚へのワクチン接種により豚での発生が抑えられている。

ニューカッスル病は、1967～1968年には年間200万羽の鶏に発生があったが、不活化ワクチンから B1 株を用いた生ワクチン²¹⁾に切り替えたところ発生が激減し、現在でもワクチン接種することにより確実に発生を抑えている。

このようにワクチンは、感染症を防ぐために無くてはならない医薬品である。このことは、医薬品の販売高においても如実に示されている（図2）。日本における動物用医薬品の販売高は、800～1,100億円台で推移している²⁹⁾。2000年までは感染症に対して抗菌薬による治療が主に行われ、その販売高は50%を占めていたが、2005年以降はワクチン等の生物学的製剤の販売高が抗菌薬を上回るようになり、2014年にはワクチン等の販売高が40%近くを占めるようになった。このことは、一戸当たりの飼養頭羽数の増加に伴い、感染による被害拡大を防ぐ方策としてワクチンによる予防に重点が移っていることを示している。

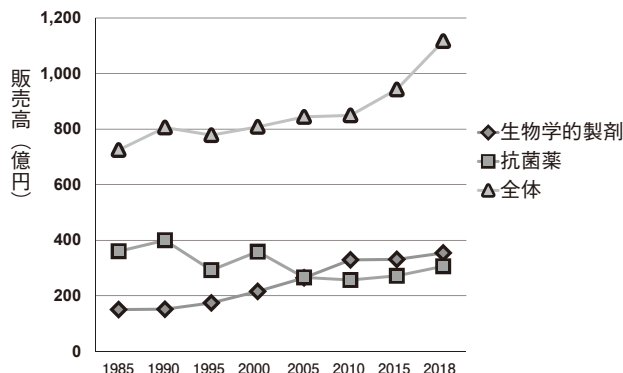


図2. 動物用医薬品販売高の推移

Ⅲ. ワクチンの法規制

ワクチンを含む医薬品は、「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保に関する法律」（医薬品医療機器等法：旧薬事法）により規制されている。本法は、人用の医薬品等に関する法律であるが、専ら動物に使用する医薬品等に関しては、「厚生労働大臣」や「厚生労働省令」は、「農林水産大臣」、「農林水産省令」とそれぞれ読み替えることとなっている（法第83条）。

1. ワクチンを製造販売するためには

ワクチンを含む医薬品は、人や動物に強く作用し、場合によってはそれらの生命を奪うこともあり、誰でも製造販売できるような物ではなく、医薬品医療機器等法上、大臣の許可及び承認を受けた者でなければ製造販売をしてはならないと規制されている。ワクチンを製造販売するためには、①法第12条の製造販売業の許可、②法第13条の製造業の許可及び③法第14条の製造販売の承認（品目ごとの承認）が必要である。②は、医薬品を製造する工場（製造所）の許可であり、工場を持たない者は製造を他者に委託することができる。

2. ワクチンの製造販売の承認

ワクチンの製造販売をしようとする者は、品目ごとにその製造販売について大臣の承認を受けなければならない（法第14条第1項）。ワクチンの製造販売業者は、有効性、安全性及び品質の良さを証明した試験成績資料を添付して申請する（法第14条第3項）。具体的な試験資料は、動物用医薬品等取締規則（以下「規則」）第26条

や局長通知で示されており、その詳細は成書²⁶⁾を参考にされたい。

3. 承認審査の流れ

承認審査の流れを図3に示す。ワクチン開発メーカーから提出された承認申請書は、先ず農林水産省動物医薬品検査所（魚用ワクチンの場合は農林水産省消費・安全局畜産安全管理課水産安全室）で事務局審査が行われる。事務局審査が終了し添付資料等の整備が終われば、薬事・食品衛生審議会に諮問され、調査会、部会、薬事分科会の三段階で審査を受ける。更に、食用動物に使用するワクチンの場合には、内閣府食品安全委員会でワクチンが接種された動物由来の食品（肉、乳、卵等）について人の健康に与える影響が評価される。これらの審査及び評価の結果、承認して差し支えないとの結論が出た場合に農林水産大臣が承認を与える。

4. ワクチンの国家検定

ワクチンは、製造したロット毎に国家検定に申請しなければならない。国家検定に合格したロットだけが市販できる（法第43条）。国家検定は、動物用生物学的製剤検定基準に基づき動物医薬品検査所で実施されている。

1) 国家検定の変遷

2008年にシードロットシステムが導入され、シードロット製剤として承認されたワクチンは、原則国家検定の対象から除外されるようになった^{28, 31)}。ただし、①家畜伝染病予防法第2条の家畜伝染病を対象とするワクチン、②狂犬病予防法で接種が義務付けられている狂犬病のワクチン及び③新規に承認され再審査中のワクチン

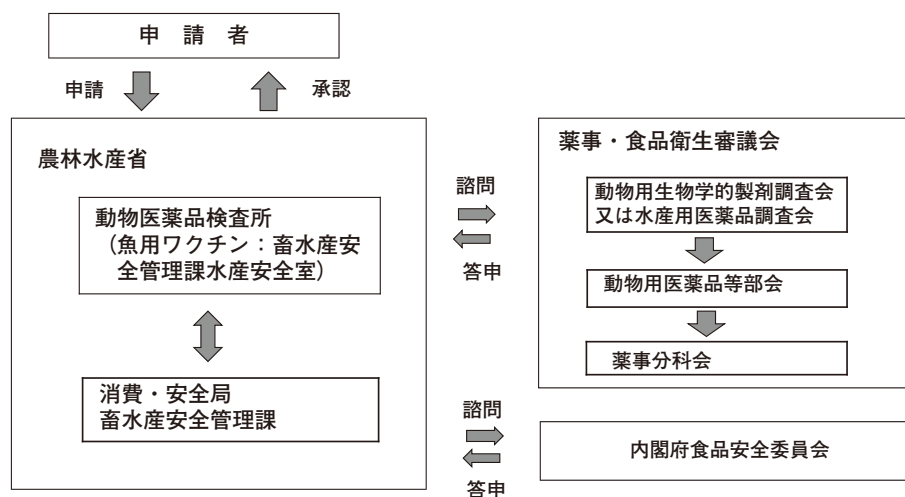


図3. 承認審査の流れ

- ・シードロット製剤は原則国家検定の対象から除外
- ・ただし以下のワクチンは検定を実施

検定を実施するワクチン	要約書(SLP)審査 (2019年から)	現物を用いた 試験 *
法定家畜伝染病を対象とする ワクチン	○	○
狂犬病ワクチン	○	○
上記以外の再審査中のワクチン	○	×

* 生ワクチン : ウイルス含有量試験・生菌数試験
不活化ワクチン: 力価試験

図4. 国家検定における要約書審査

(①及び②を除く)は検定が実施されている。混合ワクチンの場合、例えば「ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎生ワクチン」は、家畜伝染病であるニューカッスル病のワクチンが含まれるので、検定対象製剤であるが、検定はニューカッスル病についてのみ実施され、鶏伝染性気管支炎については実施されない。なお、検定項目も合理化され、生ワクチンの場合はウイルス含有量試験又は生菌数試験、不活化ワクチンの場合は力価試験のみが現物のワクチンを用いて実施されている。

2020年1月時点で240製剤がシードロット製剤として承認されている。シードロット製剤は、一般的名称の末尾に(シード)と記載して区別される。例えば、イバラキ病生ワクチンの場合「イバラキ病生ワクチン(シード)」と記載されていれば、シードロット製剤として承認されたワクチンのことである。

2) 書面審査の導入

2019年9月からは、国家検定の申請の際に製造工程全体に渡る記録等を要約した書類(要約書; Summary Lot Protocol)の添付が義務化され、当該書類の書面審査を行う制度(製造・試験記録等要約書(SLP)審査制度)が導入された³²⁾。本制度の導入に伴い、上記1)の③のワクチンについては書面審査のみで現物を用いた試験は実施されないこととなった(図4)。

5. ワクチンの適正使用のための法的規制

1) ワクチンの販売規制

動物用医薬品のうち、①使用に当たって獣医師の専門的な知識と技術を必要とするもの、②副作用の強いもの、③病原菌に対して耐性を生じやすいもの、④使用期間中獣医師の特別の指導等を必要とするものを要指示医薬品として農林水産大臣が指定している。ワクチンも要指示医薬品である。薬局開設者又は医薬品の販売業者は、獣医師からの処方せんの交付又は指示を受けた者以外

に要指示医薬品を販売・授与してはならないとされている(法第49条)。この規定に反して販売した販売業者には、3年以下の懲役若しくは300万円以下の罰金が科せられる。なお、ワクチンのうち鶏痘ワクチンは、使用法が簡単であること、長期間安全に使用されてきたことから要指示医薬品から除外されている。要指示医薬品の制度は、販売規制であるが、上記の指定理由からもわかるように、その使用に当たっては獣医師の指導等を受ける必要がある。

2) 獣医師法による規制

獣医師が診療を行うことなく、農家等の依頼に応じて投与または処方した場合に、家畜の死亡、病原体のまん延等の危害が生じる恐れのある医薬品については、その投与・処方に当たっては獣医師自らが診察することが義務付けられている(獣医師法第18条)。ワクチンもこのような要診察医薬品に指定されており、この規定に違反した獣医師には20万円以下の罰金が科せられる。

なお、獣医師法第18条の「診察」とは、獣医学的見地からみて疾病に対して一応の診断を下しう程度の行為をいい、獣医師が自ら定期的に巡回して当該農場の飼育動物の健康状態を把握している場合等において、飼育者から病状の聴取等をもって行うものも含まれる。

6. 未承認ワクチン

2010年宮崎県で発生した口蹄疫の際使用された口蹄疫不活化ワクチン及び2019年岐阜県等で発生した豚熱で使用されているイノシシ用の経口生ワクチンは、いずれも日本で承認されていない海外のワクチンである。このような未承認のワクチンが日本で使用できる理由は以下の法的根拠による。

医薬品医療機器等法第83条の2で製造業の許可業者でなければ動物用医薬品の製造及び輸入が禁止されている(動物用医薬品の製造及び輸入の禁止)。しかし、この禁

止規定には、試験研究の目的で使用するために製造又は輸入をする場合その他の農林水産省令で定める場合には、適用しないという例外規定（同条第3項）が設けられているからである。農林水産省令である規則第213条第1項の第4号で、国や都道府県が家畜伝染病の予防の目的で使用するために未承認の生物学的製剤を輸入（製造）できることが定められている。なお、家畜伝染病予防法第50条では、未承認の生物学的製剤は都道府県知事の許可を受けなければ使用してはならないとされているので、使用に当たっては都道府県知事の許可が必要となる。

Ⅳ. 市販ワクチンの現状

1. 市販ワクチンの種類

日本で市販されている家畜用ワクチンの種類を対象家畜別に表1に示す（2018年度）³⁰⁾。全体で132種類も市販されており、豚用ワクチン及び鶏用ワクチンが45種類と多い。生ワクチンより不活化ワクチンが約2倍も多く、魚用ワクチンは全て不活化ワクチンである。これは、1998年水産庁長官より魚用ワクチンの実用化は当面、不活化ワクチンのみとする通知が出されているためである⁵²⁾。

表1. 日本で市販されている家畜用ワクチンの種類

家畜種	生ワクチン	不活化ワクチン	生・不活化混合ワクチン	合計
牛	7	15	2	24
馬	1	6	0	7
豚	14	30	1	45
鶏	21	24	0	45
魚	0	11	0	11
計	43	86	3	132

2. 混合ワクチン

家畜の飼養頭羽数の増大につれ、ワクチン接種の省力化が求められ、混合ワクチンや多価ワクチンが市販されるようになった。混合ワクチンとは、複数の感染症を予防するため2種類以上のワクチンを混合したもので、1種類の場合、単味ワクチンと称している。同一の感染症で複数の血清型がある場合、それらを混合したワクチンを多価ワクチンと呼ぶが、表2では混合ワクチンに含めてある。多価ワクチンの例として、鶏伝染性コリザA型とC型が、また、牛ウイルス性下痢（BVD）ではI型とII型を混合したワクチン等が市販されている。混合ワクチンの比率は、55%で単味より少し多い。

表2にも示すが、混合ワクチンには生ワクチン同士あるいは不活化ワクチン同士を混合するものが主であるが、中には生ワクチンと不活化ワクチンを混合したものもある。牛用ウイルスワクチンでは牛伝染性鼻気管炎ウイルス等が生で、BVDウイルスが不活化された製剤があるが、BVD生ワクチンは妊娠牛等に接種できないことから、このような製剤設計となった。

ワクチンの名称として商品名の他に「一般的名称」があり、ワクチンの添付文書には両方が記載されている。しかし、動物用生物学的製剤基準や成書では一般的名称で記載されている。混合ワクチンの一般的名称をつけるルールとして、生ワクチンのみの混合の場合は「混合生ワクチン」、不活化ワクチンのみの混合の場合は「混合不活化ワクチン」、生と不活化が混合されている場合は単に「混合ワクチン」とされているので、一般的名称から混合の状態が推測できる。

3. 油性アジュバントワクチン

アジュバントは、ワクチンの抗原性を高めるために添加される物質である。ワクチン接種の省力化は、ワクチンの種類が多くかつ何回も接種しなければならない畜産農家にとって切実な要望であった。混合ワクチン化する

表2. 混合ワクチンの比率

家畜種	単味生	単味不活化	混合生	混合不活化	混合生・不活化	混合ワクチンの比率(%)
牛	4	2	3	13	2	75
馬	1	3	0	3	0	43
豚	10	11	4	19	1	53
鶏	16	9	5	15	0	44
魚	0	4	0	7	0	64
計	31	29	12	57	3	55

以外の方法として実用化されたのが油性アジュバントワクチンで、免疫を長期間持続させたものである。1990年に市販されたニューカッスル病（油性アジュバント加）不活化ワクチンでは、それまで3か月間程度であった免疫持続期間が1年間以上の免疫持続が可能となった。2018年度現在、鶏用の不活化ワクチンは、油性アジュバント製剤が主流を占め（40%）、豚用ワクチン（20%）にも応用されている。

なお、アジュバントが添加されたワクチンの一般的名称として、古くから使用されている水酸化アルミニウムやリン酸アルミニウムが添加されたワクチンは、単に「〇〇（アジュバント加）不活化ワクチン」、流動パラフィン等の油性アジュバントが添加されたワクチンは、「〇〇（油性アジュバント加）不活化ワクチン」とされる。近年ではカルボキシビニルポリマーや酢酸トコフェロール等も使用され、それぞれ括弧書きで記載されている。

4. 食用動物に用いるアジュバント加ワクチンの使用制限期間の見直し

上述のように、免疫の長期間の持続を図るため、油性アジュバント等を加えたワクチンが多く承認されている。これらのワクチンでは接種部位にアジュバントが長期間残存することから、食肉としての安全性に配慮し、接種部位からアジュバントが消失するまで当該動物をと畜場又は食鳥処理場に出荷しないことで対応していた。この期間を「使用制限期間」と呼んでおり、その旨が使用上の注意としてワクチンの添付文書に記載されていた。使用制限期間は、製剤ごとに決められており、鶏用ワクチンでは60週間と長いものもあった。

しかし、2015年からは、畜水産物の安全を的確に確保する観点から、使用制限期間の設定の考え方を、注射部位からのアジュバント等の異物の消失に基づく方法から、アジュバント等添加剤として含まれる成分の人への健康影響評価に基づく方法に変更された。食品健康影響評価済みの成分（ワクチンの添加剤として使用される限りにおいて人への健康影響は無視できると考えられる成分）のみを添加剤として使用するアジュバント加ワクチンについては、使用制限期間の設定を要しなくなった。その結果、ほとんどのアジュバント加ワクチンで使用制限期間がなくなった。

ただし、「と畜場法」では生物学的製剤により著しい反応を呈しているものはと殺・解体が禁止されており、生物学的製剤を注射して20日以内の家畜の検査申請は受け付けけないとの通知¹⁶⁾が出されているので注意が必要である。

V. ワクチン接種の注意点

家畜用のワクチンは、上述のごとく多数市販されている。個々のワクチンの特徴や使用法の詳細は、成書に譲り、ここではワクチン接種に関する一般的な注意点を解説する。

1. ワクチンの選択と保管

ワクチンは、不活化ワクチンと生ワクチンに大別される。文字通り、ワクチンの本体であるウイルス株や細菌株が生きているもの（感染性があるもの）を生ワクチン、不活化され感染性がないものを不活化ワクチンと呼ぶ。なお、細菌の毒素をホルマリン等で不活化したトキソイドも不活化ワクチンの範疇である。生ワクチンは、接種された動物の体内で増殖し、液性免疫だけでなく細胞性免疫も惹起し、その結果、免疫の持続が長いという特徴を持つ。不活化ワクチンは体内増殖がないため、接種量（抗原量）を多くし、かつ免疫効果を上げるためにアジュバントが必要となる。ワクチンの使用に当たっては、まず、生ワクチンと不活化ワクチンの特徴を理解した上で選択することが重要である。

ワクチンは、上述のとおり要指示医薬品に指定されているため、獣医師の処方せんの交付又は指示を受けなければ購入できないことになっている。その貯蔵方法として通常、2～10℃となっており、直射日光、加温又は凍結により品質が保てなくなるので、冷蔵庫に保管しなければならない。なお、鶏用ワクチンのうちマレック病ワクチンは液体窒素で、マイコプラズマ・ガリセプチカムとマイコプラズマ・シノビエ感染症凍結生ワクチンは-20℃で保管することとなっている。

2. 用法用量を守り使用上の注意をよく読む

最近、テレビで「医薬品は用法用量を守り、使用上の注意をよく読んで正しく使いましょう」というコマーシャルが流れているが、ワクチンを使用する際にも同様である。

1) 用法用量の厳守

用法とは「皮下注射」などの接種方法・経路のことであり、用量とは「1mL」などの接種量のことである。ワクチンの開発にあっては、基礎的な試験や野外臨床試験を実施してこの用法用量を定めており、その他の用法用量では安全性や有効性が保証できないので、用法用量は厳守しなければならない。

接種時の注意としてワクチンは、よく振り混ぜて均一にする。雑菌等の混入を避けるため、ワクチン容器のゴム栓の消毒、接種部位の消毒を行い、滅菌済みの注射器

(特に注射針)は1頭ごとに取り替える。注射針の使い回しは、感染拡大につながるので避けなければならない。使い残りのワクチンは、雑菌の混入や効力の低下の恐れがあるので使用すべきでない。

2) 使用上の注意

使用上の注意は、基本的事項と専門的事項に大別されワクチンの添付文書に記載されている。全てのワクチンに共通する注意が多く記載されているが、当該ワクチンのみの注意があるので、よく読むことが必要である。使用上の専門的事項として①警告、②対象動物の使用制限等、③重要な基本的注意、④相互作用等が記載されているので、必ず使用前に読み、それらの指示に従わなければならない。

警告の例としては、BVDに対する生ワクチン株は、胎子に感染し持続感染牛を生じさせることから、BVD生ワクチンを含む混合生ワクチンは、「妊娠牛、交配後間がないもの又は3週間以内に種付けを予定している牛には接種しないこと」とされている。

重要な基本的注意の例としては、豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) 生ワクチンでは、「PRRS陰性農場では使用しないこと。PRRS汚染農場にPRRS陰性豚を導入する際にワクチンを投与する場合、ワクチン株が繁殖用豚へ伝播する機会を減少させるために、ワクチンを投与した豚を接種後6週間は繁殖用豚から隔離して飼育すること。ワクチンウイルスは投与豚から排泄され水平感染する場合があるので、妊娠中の雌豚及び繁殖用種雄豚へワクチンウイルスが伝播しないように投与豚(群)の飼育管理には注意すること。野外ウイルスが体内で増殖している豚にワクチンを投与した場合、ワクチン株と野外ウイルスの組換えが起こる可能性が否定できない。本剤を幼若な豚に投与する場合、母子免疫の影響を受けてワクチン効果が抑制されることがある。」と多くの注意が記載されている。

相互作用の例としては、アカバネ病生ワクチンは、「イバラキ病生ワクチンあるいは牛流行熱生ワクチンを

同時注射すると、ウイルス間の相互干渉作用により効果が抑制されるので、2週間以上の間隔をあけること」とされている。

3. ワクチンの接種適期

ワクチンの接種時期に大きな影響を与えるのが親から移行する抗体レベルである。

1) 抗体移行の様式

親から子への抗体移行の様式は、動物種による胎盤構造により異なる(表3)。人では母親の血清濃度と同レベルにまでIgGが胎生期に移行し、生後、IgA、IgMが乳により移行する。これに対して牛、豚、馬では胎生期に抗体は全く移行しないで、初乳を飲むことで抗体が子に移行する。牛では初乳、通常乳ともIgGが主体であるが、豚、馬では初乳はIgGが主体で、通常乳はIgAが主体となる。一方、犬・猫では胎生期にIgGが少し移行し、初乳、通常乳でIgG、IgAが移行する。当然のことであるが、初乳を十分に飲ませることにより親と同レベルのIgGが移行する。初乳の必要量として、生後2時間以内に子牛の体重の4%、24時間までに合計10%の初乳を飲ませることが重要と言われている。その理由は以下のとおりである。

- ① 新生子牛の腸管は、生後から24～36時間までの間は、免疫グロブリンのような大きな分子であってもそのまま吸収できようになっている。
- ② 母牛は分娩の経過と共に初乳中のIgG濃度が低下していき、分娩後2時間がピークである。

2) ワクチン接種適期

ワクチンの接種時期の注意点を図5に示す。出生後の動物は、親からの移行抗体をもらうため、特に生ワクチンの接種には注意を要する。移行抗体は、一般的には生後3ヵ月齢で消失するので、その時期(図中の③)での接種が推奨される。移行抗体の高い時期(図中の①)に接種された生ワクチンは、移行抗体により中和され、体内で増殖することができず、抗体が産生されない。

表3. 動物種による移行抗体の違い

動物種	胎盤構造	出生前の抗体レベル	出生後の抗体レベル
牛	結合繊絨毛型	—	+++
豚、馬	上皮絨毛型	—	+++
犬、猫	内皮絨毛型	+	++
人	血絨毛型	+++	±

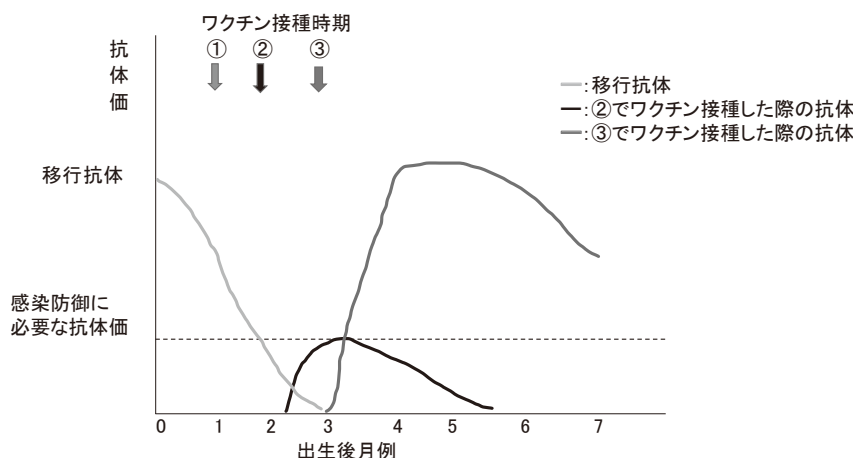


図5. ワクチンの接種時期

一方、親の抗体価や子の移行抗体価を測定するのは、費用や時間がかかり現実的ではなく、個体毎の抗体価レベルも一様ではない。また、移行抗体が完全に低下するまでワクチン接種をしないことは、感染のリスクが増加することとなる。このため、移行抗体消失前にワクチンを接種し、1ヵ月程度後に再接種する方法がとられる場合もある。

なお、犬用では抗体レベルを簡単に測定できる体外診断薬が市販され、ワクチン接種時期の判断に使用されている。多くの感染症についてこのような体外診断薬の開発が待たれる。

4. 接種後の注意

ワクチン接種後、少なくとも2日間は安静に努め、輸送等は避けることが重要である。また、ワクチン接種後の副作用、特に接種後短時間で起きるアナフィラキシーショックに注意しなければならない。エンドトキシンが含まれる細菌性不活化ワクチン（牛サルモネラ症、牛大腸菌性下痢症等の不活化ワクチン）は要注意である。

5. ワクチンの効能効果

1) ワクチンは必ず効くか

ワクチンの効能効果は、一般的には「〇〇病の予防」であり、使用する方もワクチンを接種すれば完全に〇〇病を予防できると期待している。しかし、接種した中には〇〇病に罹るものがあり、効果がなかったというクレームが出ることもある。この理由として①ワクチンの取扱いや接種方法が不適切であった、②接種動物の健康状態が悪かった、またはストレス状態にあった、③もともと免疫能が低い個体であった、④移行抗体が高かった、⑤

超強毒株による感染があった等が考えられるので、日頃からワクチン接種に注意したいものである。

2) 感染予防か発症予防か

「〇〇病の予防」という効能効果には、感染そのものを防ぐ（感染予防）場合と発症を防ぐ（発症予防）場合があり、見かけ上は区別できない。現在、市販されているワクチンについて感染予防型か発症予防型かを区分けすることは困難であるが、ワクチン接種後強毒株で攻撃し、その抗体価を測定することにより判別できる（図6）。すなわち、攻撃後抗体価の変動がない場合は、感染そのものを防ぎ、体内での増殖をさせなかった証であり、感染予防型ワクチンと判断できる。一方、攻撃後抗体価が上昇する場合は、攻撃株の感染、体内での増殖を完全に抑えられず、部分的な増殖を許したが、発症させるほどの増殖を防いだ証であり、発症予防型と判断できる。

3) 効能効果の多様性

1990年以前のワクチンの効能効果は、ほとんど「〇〇病の予防」であったが、1991年に承認された豚オーエスキュー病生ワクチンの効能効果は、豚オーエスキュー病の発症予防と、初めて「発症予防」とされた。本ワクチンは、ヘルペスウイルスの特性である神経節への持続感染を防止できないので、科学的にも妥当な効能効果であった。その後、「マイコプラズマ・ガリセプチカム感染による産卵率の低下の緩和」、「豚サーコウイルス2型感染に起因する死亡率の低下、発育不良豚の発生率の低減、増体重の低下の改善、臨床症状の改善及びウイルス血症発生率の軽減」等多様な効能効果が承認されるようになった。

このような効能効果の多様性は、ワクチンの効果を狭

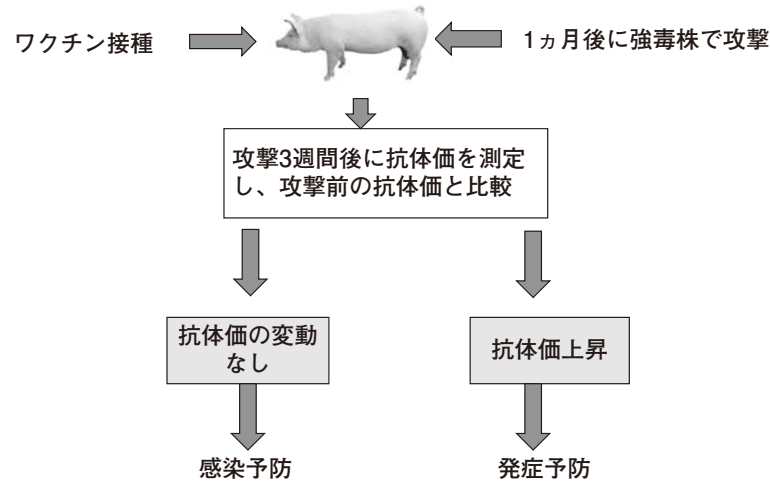


図6. 感染予防か発症予防か

い範囲で捉え、使用者にも誤解されないようにとの意図でもあるが、ワクチン開発を容易に行えるようにした契機にもなった。

VI. ワクチンの将来展望

1. これまでのワクチン株の作出方法

Jennerの天然痘ワクチンは、同属異種ウイルスを用いた自然の弱毒生ワクチンであったが、Pasteurは、人為的に変異させた弱毒株を用いるワクチンを開発し、その後のワクチン開発の基礎を築いた（表4）。

1) 長期間培養

Pasteurは、家禽コレラの病原菌（*Pasteurella multocida*）をたまたま培養したまま長期間放置していて、その菌をヒヨコに接種したが発症しなかった。そこで、これらのヒヨコに新鮮培養菌を再接種したところ、新たに準備したヒヨコは全て発症したにもかかわらず、これらのヒヨコは発症しないことを観察し、ワクチンとして使用できることを偶然に発見した。その後、8か月間まで培養期間を延ばし、経時的に病原性を調べた論文を1880年に発表した⁶⁾。

2) 高温培養

1880年頃フランスでは牛及び羊の炭疽が大きな被害を出していた。Pasteurは、鶏が炭疽菌に対して抵抗力が強いことに着目し、鶏の体温に近い42～43℃という高温で培養したところ、病原性が弱くなってくることを発見した。10頭中10頭の羊を殺す菌が、高温で8日間培養すると4～5頭しか殺さなくなり、10～12日間培養するともはや1頭も死亡させることがなくなった。しかもこの

表4. Pasteurの弱毒生ワクチン株の作出方法

作出方法	病原体	開発年
長期間培養	<i>Pasteurella multocida</i>	1880年
高温培養	炭疽菌	1881年
異種動物での継代	狂犬病ウイルス	1885年

弱毒株（Ⅱ苗）は、30～35℃で培養しても強毒株に復帰することがなく、強毒株の攻撃に耐える免疫原性を保持していた。そこで、1881年、60頭の羊を用いて野外の農場で公開試験を行った。先ず25頭により長く（24日間）高温で培養した菌（Ⅰ苗）を接種し、12日後Ⅱ苗を追加接種し、その2週後に強毒株で攻撃した。攻撃2日後、25頭の対照群のうち22頭は死亡、3頭も瀕死状態であったが、免疫した群の25頭と無投与無攻撃の10頭はいずれも異常が見られなかった¹⁵⁾。この炭疽菌Ⅱ苗は、多くの国で生ワクチンとして使用され、日本でも1977年度まで市販されていた。この弱毒生ワクチンの開発から100年後の1983年にMikesellらにより、高温培養することで110メガダルトンのプラスミドが脱落し弱毒化されることが証明された²²⁾。

3) 異種動物での継代

Pasteurは、狂犬病に自然感染した犬の脊髄をウサギの脳硬膜に接種し、継代を繰り返したところ、平均14日間であったウサギでの潜伏期間（ウイルス接種から発症するまでの期間）が徐々に短縮し、継代90代で7日間に

一定することを発見した。不定であった潜伏期間が7日間に固定されたことから、固定毒 (fixed virus) と呼び、野外で流行しているウイルスを街上毒 (street virus) と呼ぶ。固定毒は、街上毒と比べると末梢からの感染性が低くなっているが、そのままワクチンとするのにはまだ病原性が強かった。Pasteurは、水酸化カリウムを入れたビンに固定毒感染ウサギの脊髄を吊し乾燥させることにより減毒を図った。この乾燥固定毒を狂犬病の犬に咬まれた少年に応用した。11日間で13回 (2及び3日目は朝夕の2回)、最初は15日間乾燥したもの、その後順次乾燥日数を短くしたもの、最後は乾燥1日間のものを接種し、発病を防ぐことに成功した⁴⁹⁾。

なお、ワクチンは、通常感染症を予防するために当該病原体に感染する前に接種 (暴露前予防) するが、狂犬病では潜伏期が長い為、人が狂犬病感染動物に咬まれた後にワクチンを接種し発症を防ぐことが可能で、暴露後予防と称されている。

2. 現在と将来のワクチン株作出方法

1) 従来法

これまで開発されたワクチン株の作出方法の多くは、Pasteurの方法の踏襲か応用である。すなわち、①何回も継代を繰り返す方法 (長期間培養の一種)、②25～32℃の低温培養 (ウイルスの場合)、③発育鶏卵や培養細胞を用いた異種宿主での継代の3種類である。これらの方法により、被害の大きな急性感染症に対する多くのワクチンが開発された。

20世紀前半までは、牛痘や狂犬病ウイルスのように、動物での継代を繰り返すことにより弱毒株が作出された。20世紀後半に入ると、細胞培養が普及し始め、ウイルスの分離・継代に用いられるようになり、弱毒株の作出にも盛んに応用された。更に低温培養での継代により多くの弱毒株が作製された。例えば、当時の家畜衛生試験場で開発された牛伝染性鼻気管炎ウイルスのNo.758-43株¹³⁾、アカバネウイルスのTS-C2株¹⁷⁾、豚パルボウイルスのHT⁻/SK株⁷⁾は、現在も弱毒生ワクチンの製造用株として用いられている。

2) 遺伝子組換え技術

1970年代に開発された遺伝子組換え技術は、ワクチン開発にも応用された。

これには①病原遺伝子を削除した遺伝子欠損ワクチン、②抗原遺伝子を他種の微生物に組み込んだサブユニットワクチン、③抗原遺伝子を他の弱毒生ワクチン株等に組み込んだ遺伝子組換え生ワクチン、④プラスミドという環状のDNAに病原体の抗原遺伝子を組み込んだDNAワクチン、⑤メッセンジャーRNA (mRNA) ワク

チン等があり、盛んに開発されている。

(1) 遺伝子欠損ワクチン

日本で最初に承認された (1991年) 遺伝子欠損ワクチンは、豚オーエスキー病生ワクチンである⁹⁾。本ワクチン株は、糖たん白gI遺伝子等が自然欠損したもので遺伝子組換え技術によるものではない。なお、本ワクチンの承認に当たっては、ワクチン抗体と自然感染抗体を識別する診断キットが同時に承認されたが、薬事行政における画期的なことであった。これによりオーエスキー病の防疫体制を構築することが可能となった。家畜防疫にとって、ワクチン抗体と自然感染抗体を識別すること (differentiating infected from vaccinated animals: DIVA) が重要であり、その目的で使用されるワクチンをDIVAワクチンとも称されるが、豚オーエスキー病生ワクチンはその先駆けであった。

その後に市販された (2013年) 遺伝子欠損ワクチンは、馬鼻肺炎生ワクチンで糖たん白gE遺伝子を欠損したものである³⁷⁾。

(2) サブユニットワクチン

感染防御を担う抗原遺伝子のみを他種の微生物に組み込み、発現した抗原を精製しワクチンとしたものである。人用ワクチンでは培養が困難であったB型肝炎ウイルスの表面蛋白の遺伝子を酵母で発現させ、ワクチンとしたものが1988年に市販された。動物用ワクチンで最初に (1996年) 市販されたのは、猫白血病ウイルスのエンペロー糖たん白遺伝子が大腸菌で発現させたワクチンでフランスからの輸入であった (表5)。一方、1989年～1993年に当時の動物用生物学的製剤協会が国からの補助を受け、遺伝子組換え技術を用いロイコチトゾーン病ワクチンの開発研究事業を実施していた。本事業では、*Leucocytozoon caulleryi*の第2代シゾンが主な感染防御抗原となることが示され、クローニングした遺伝子が大腸菌で発現し、ワクチン開発に成功した¹²⁾。ワクチンとして市販されたのは2000年と遅かったが、本事業は、わが国の動物用生物学的製剤の開発に遺伝子組換え技術を普及させる契機となった。その後、表5に示すように多くのサブユニットワクチンが市販されている。

なお、抗原の発現系として植物を応用する試みもなされている。ニューカッスル病ウイルスのヘマグルチニン及びノイラミニダーゼをタバコの浮遊培養細胞で発現させたワクチンが2006年アメリカで市販された⁴⁰⁾。植物を発現系とする研究は、後述するように食べるワクチンとして開発されているが、このニューカッスル病ワクチンは皮下注射型のワクチンである。

(3) 組換え生ワクチン

1982年Paoletti³⁸⁾及びMoss¹⁹⁾のグループは、ワクシ

表5. 遺伝子組換えサブユニットワクチン

対象動物	疾 病 名	発 現 系	承認年
豚	豚アクチノバシラス・ブルロニューモニエ感染症	豚アクチノバシラス・ブルロニューモニエの無毒変異型毒素遺伝子を組み込んだ大腸菌	1998
	豚サーコウイルス感染症	豚サーコウイルス2型のORF2遺伝子を組み込んだバキュロウイルスを感染させた昆虫細胞	2008
	豚サーコウイルス感染症	豚サーコウイルス1型のORF2遺伝子を2型のORF2遺伝子に置換したキメラウイルスを感染させた培養細胞	2009
	豚丹毒	豚丹毒菌の表層防御抗原遺伝子を組み込んだプレバチルス・チョーシネンシス	2013
	萎縮性鼻炎	無毒変異型皮膚壊死毒遺伝子を組み込んだ大腸菌	2015
鶏	鶏大腸菌症	F11 線毛抗原及びペロ細胞毒性抗原遺伝子を組み込んだ大腸菌	1999
	ロイコチトゾーン病	ロイコチトゾーン・カウレリー第2代シゾントのR7遺伝子を組み込んだ大腸菌	2000
	鶏伝染性コリーザ	ヘモフィルス・パラガリナルム（A型菌及びC型菌）の組換え融合抗原遺伝子を組み込んだ大腸菌	2013
猫	猫白血病	猫白血病ウイルスのエンベロープ糖たん遺伝子を組み込んだ大腸菌	1996

ニアウイルスに外来抗原遺伝子を挿入して組換え生ワクチンが作製できるという考えを発表し、その後多くの感染症で組換え生ワクチンの開発が試みられた⁴⁶⁾。1990年には鶏痘ウイルスにニューカッスル病ウイルスのHN^{1, 5)}あるいはF遺伝子⁵⁴⁾を挿入する報告が相次いでなされ、1994年米国でニューカッスル病ウイルスのF遺伝子を鶏痘生ワクチンウイルス株に組み込んだ世界初の組換え生ワクチンが承認された¹⁴⁾。その後、鶏痘ウイルスをベクターとする鳥インフルエンザ、伝染性喉頭気管炎、鶏脳脊髄炎等のワクチンが主に米国やカナダで市販されている。

日本で最初の組換え生ワクチンは、ニューカッスル病ウイルスのF遺伝子をマレック病I型生ワクチン株に組み込んだもの⁵⁰⁾で、2010年に承認された¹⁰⁾。しかし、このような組換え生ワクチンが接種された鶏肉を食べたくないという消費者に配慮して、承認を取ったメーカーはほとんど市販しなかったばかりか、当該ワクチンの承認そのものを整理した。現在日本で市販されている組換え生ワクチンは、2012年に承認された猫白血病に対するワクチンのみである³⁵⁾。これは、カナリア痘ウイルスに猫白血病ウイルスのenv, gag及びpol遺伝子の一部を組み込んだものである。カナリア痘ウイルスは、哺乳動物の体内では感染性ウイルス粒子を形成できないことから、組換え生ウイルスが接種動物から排泄・伝播されることがない。なお、家畜用としてはカナリア痘ウイルスをベクターとする馬インフルエンザとウエストナイルウイルス感染症のワクチンが米国等で承認されているが、牛及び豚用ワクチンとしてまだ組換え生ワクチンが市販

されていない。また、豚丹毒菌等の細菌ベクターを用いる研究も盛んに行われているが^{34, 48)}、まだ実用化されたものはない。

(4) DNA ワクチン

哺乳類の細胞内で機能する発現プロモーター（人サイトメガロウイルスが良く使用される。）の下流に病原体の抗原遺伝子を挿入したプラスミドがDNA ワクチンである。DNA ワクチンの特徴^{23, 44)}として、①病原体の遺伝子配列が決まれば、直ぐに製造に取り掛かれる、②細胞内に取り込まれたDNAからmRNAが転写され、抗原タンパク質が作られるので、本来の病原体の感染成立過程と同様に免疫系に作用し、抗体と共に強い細胞性免疫が誘導できる、③生きた病原体を使用しないので安全である、④プラスミドは大腸菌等で安価に大量製造できる等の利点がある。一方、ほとんどないとされているが宿主ゲノムへの組込み、がん遺伝子の活性化、抗核酸抗体の産生等の不安が指摘されている。人用ワクチンとして多くの感染症で開発が試みられたが、まだ承認されたものがない。現在開発が急がれているCOVID-19に対するDNA ワクチンが承認されるか注目される。一方、動物用ワクチンとしては、2005年にカナダでサケ科魚類の伝染性造血器壊死症²⁷⁾、並びに米国で馬用のウエストナイルウイルス感染症²⁾のDNA ワクチンが世界で初めて承認された。この2種類のDNA ワクチンの用法は、いずれも筋肉内注射である。感染症に対するDNA ワクチンとして承認されているのはこの2種類だけであるが、おそらく投与された動物細胞への遺伝子の導入効率や抗原発現効率が高いことにより有効性が発揮されたものと思

われる。

なお、DNAの導入効率を上げる方法として遺伝子銃、皮膚パッチ、エレクトロポレーション等の投与方法が試みられている。

(5) mRNAワクチン

DNAワクチンは、細胞内でmRNAに転写され抗原たん白を合成するが、mRNAそのものを細胞内に送り込むとの発想で開発されたのがmRNAワクチンである。mRNAワクチンの開発は、周辺技術の進展により可能となった。本来、mRNAは生体内では極めて不安定な物質であるため、①mRNAの改変・最適化、②薬物輸送システム (drug delivery system: DDS) 等の開発が不可欠であった¹¹⁾。①としては、1個のアミノ酸を決める配列 (コドン) は複数あるので翻訳効率の高いコドンに改変することや核酸分解酵素に対する耐性を向上させる修飾核酸の導入等である。②としては、mRNAを脂質ナノ粒子⁴³⁾やポリマー粒子に抱合させ、効率よく標的細胞へ輸送させる方法が応用されている。なお、このようなDDSは、サブユニットワクチンや他の医薬品にも応用可能であり、さらなる開発が望まれる。

mRNAワクチンのメリットを表6に示す。安全性に関してはDNAワクチンの不安を解消し、極めて安全なワクチンである。有効性や開発性に関しては、DNAワクチンと同程度と思われる。これまで人用ワクチンとしてインフルエンザ、ジカ熱、狂犬病、ヒト免疫不全ウイルス感染症等で研究が進められているが承認されたものはない³⁹⁾。狂犬病での報告⁴⁵⁾では、3週間隔で2回皮内に接種すると市販ワクチンと同程度の中和抗体がマウスで産生され、脳内攻撃にも耐過し、抗体は1年間持続するという。また、新生子豚及び成豚においても抗体産生を確認している。

COVID-19に対してもmRNAワクチンの開発が盛んに進められており、承認されるか否か注目したい。おそらく、DNAワクチンと同様に有効性が認められるか否か

にかかるものと思われる。mRNAワクチンの効果を高める工夫として、①細胞内でmRNAを自己増殖させるプロモーターを組み込み²⁰⁾、抗原の発現を高める、②アジュバント効果を狙い、mRNAのポリアデニン配列の部分にポリウラシルを結合させた2本鎖RNA構造を付加する⁵⁵⁾等の試みが行われている。

(6) 組換え植物による食べるワクチン

多くのワクチンの用法は筋肉内や皮下に注射するので、大規模経営となっている近年の畜産農家では接種する手間と経費が問題となっている。この改善策として、病原体の感染防御抗原遺伝子を植物体に移入し、発現した抗原を食べさせるという経口ワクチンの開発が行われている。ワクチンの種類としては上述したサブユニットワクチンの範疇である。発現用植物としてトウモロコシやコメが利用できれば、飼料にもなり有用性が増し、室温でも保存できることから貯蔵・輸送の経費削減にもなる。経口ワクチンは、特に粘膜感染する感染症に対して有効性が期待され、粘膜ワクチンとも称されている。

まだ承認されたワクチンはないが、豚伝染性胃腸炎 (TGE) での試みを紹介する^{18, 51)}。トウモロコシの実にTGEウイルスのスパイクたん白を発現させた経口ワクチンを作製し、10日齢の子豚に経口投与し12日後に強毒ウイルスで攻撃したところ、50%の子豚が発症防御した。また、市販のTGE生ワクチンで免疫した妊娠豚に経口ワクチンを投与したところ、血中、初乳及び通常乳の中和抗体の上昇がみられ、ブースター効果を確認した。経口ワクチンの実用化には、抗原の発現量を増加させ胃酸や消化酵素による分解を防ぎ、確実に腸管粘膜まで到達させる工夫が求められる。

なお、ワクチンではないが、2013年日本で世界初の遺伝子組換え植物が動物用医薬品として承認された。イヌインターフェロン α -4遺伝子をイチゴに組み込み、イチゴの実を粉末とした製剤で、イヌの歯肉炎を軽減するものである⁵³⁾。

3. 開発が期待されるワクチン

1) 未開発ワクチンの実用化

急性感染症に対するワクチンは、ほとんど開発されたが、慢性で難治性の感染症に対するワクチンの開発が望まれている。例えば、牛伝染性リンパ腫 (牛白血病)、ヨーネ病、ピロプラズマ症等の原虫症に対するワクチンである。また、人の食中毒の原因菌を動物体内で減少させるワクチンとして、既に鶏サルモネラ症ワクチンが市販されているが、カンピロバクターや大腸菌O157に対するワクチンが求められている。

表6. mRNAワクチンのメリット

事項	メリット
安全性	病原体や毒素を用いない 宿主のゲノムに挿入されるリスクがない 標的細胞をがん化させる危険はない 標的細胞内で自然に消滅
有効性	抗体産生と細胞性免疫の活性化
開発性	標的とする抗原の遺伝子配列が決まれば直ちに作成 新興感染症に対応できる mRNAは容易・大量に製造可能

2) 現行ワクチンの改良

安全性、有効性、利便性等を求めて現行ワクチンを改良することも重要であり、以下の課題の克服が求められる。①免疫持続に優れ、かつ接種部位での炎症が少ないアジュバントの開発、②接種時期に近いもの同士の混合化、③逆にブースター効果を上げるための単味ワクチンのラインナップ、④畜水産動物では接種経費の削減を目指し、より手間のかからない接種方法の開発、⑤副作用の少ないワクチン等である。

3) 新技術を用いたワクチン開発

未開発ワクチンの実用化や現行ワクチンの改良のため、遺伝子組換え技術を活用した開発が期待される。特に上述した組換え生ワクチン、DNA ワクチン、mRNA ワクチン、食べるワクチン等に注目したい。また、リバースジェネティクス法⁴¹⁾を用いたワクチン候補株をデザインする方法を活用することにより、より早くワクチン開発が進むものと思われる。

VIII. おわりに

ワクチンには、感染症を撲滅させるような優れた効果を発揮するものがある一方、単に症状を軽減する効果しかないものもある。それぞれのワクチンの特徴を理解した上で適正に使用することが肝要である。ワクチンを接種すると感染症に罹らないので、飼養管理の手間が省けるという考えは大間違いである。飼養衛生管理基準を遵守した上でワクチン接種を行えば、鬼に金棒であり、ワクチンを上手に使用し感染症をコントロールしたいものである。

COVID-19の流行により、ワクチン開発が世界の注目を浴びており、遺伝子組換え技術等でこれまでにないワクチンが実用化するものと思われる。家畜用ワクチンにも応用され、有効、安全で安価なワクチンが開発されることを期待する。

引用文献

- 1) Bournsnel, M.E.G., Green, P.F., Samson, A.C.R., et al. (1990) A recombinant fowlpox virus expressing the hemagglutinin-Neuraminidase gene of Newcastle disease virus (NDV) protects chickens against challenge by NDV. *Virology*. 178, 297-300.
- 2) Davis, B.S., Chang, G.J., Cropp, B. et al. (2001). West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Virology*. 75, 4040-4047.
- 3) 動物用ワクチン—その理論と実際— (2011). 動物用ワクチン—バイオ医薬品研究会編. 文永堂. 東京.
- 4) 動物用ワクチンとバイオ医薬品—新たな潮流— (2017). 動物用ワクチン—バイオ医薬品研究会監修. 文永堂. 東京.
- 5) Edbauer, C., Weinberg, R., Taylor, J., et al. (1990) Protection of chickens with a recombinant fowlpox virus expressing the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase gene. *Virology*. 179, 901-904.
- 6) 藤野恒三郎 (1985) ニワトリコレラ病原体の弱毒化. *微生物学の一里塚*. 169-174. 藤野恒三郎監訳. 近代出版. 東京.
- 7) Fujisaki, Y., Murakami, Y., Suzuki, H. (1982) Establishment of an attenuated strain of porcine parvovirus by serial passage at low temperature. *National Institute of Animal Health Quarterly*. 22, 1-7.
- 8) 橋爪 壮 (2011) 弱毒痘苗株LC16m8の開発とこのワクチンの現状. *小児感染免疫*. 23, 181-186.
- 9) 平山紀夫 (2008). 日本における動物用ワクチンの歴史. *日本獣医史学雑誌*. 45, 64-89.
- 10) 平山紀夫 (2017). 日本初の組換え生ワクチン承認までの法律・審査体制の整備. *動物用ワクチンとバイオ医薬品—新たな潮流—*. 62. 動物用ワクチン—バイオ医薬品研究会監修. 文永堂. 東京.
- 11) 位高啓史・秋永士朗・井上貴雄 (2019). mRNA医薬品開発の世界的動向. *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*. 50, 242-249.
- 12) 伊藤 亮 (2007). ロイコチトゾーン病 (油性アジュバント加) ワクチン (組換え型). *動物用ワクチン—その理論と実際—*. 257-259. 動物用ワクチン—バイオ医薬品研究会編. 文永堂. 東京.
- 13) 稲葉右二・高橋英二・黒木 洋ら (1975) 牛伝染性鼻気管炎生ウイルスワクチンの開発. *日本獣医師会雑誌*. 28, 410-414.
- 14) 入谷好一 (1995) 遺伝子組換え鶏用ワクチンについて. *鶏病研究会報*. 31, 153-159.
- 15) 葛西勝彌 (1935) 炭疽研究の回顧. *中央獣医学雑誌*. 48, 245-259.
- 16) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課長通知. と畜場法施行規則の一部を改正する省令等の施行について. 昭和47年6月20日付け. 環乳第52号.
- 17) Kurogi, H. Inaba, Y. Takahashi, E. et al. (1979)

- An attenuated strain of Akabane virus: a candidate for live vaccine. National Institute of Animal Health Quarterly. 19, 12-22.
- 18) Lamphear, B.J., Jilka, J.M., Kest, L., et al. (2004) A corn-based delivery system for animal vaccines: an oral transmissible gastroenteritis virus vaccine boosts lactogenic immunity in swine. Vaccine. 22, 2420-2424.
- 19) Mackett, M., Smith, G.L., Moss, B. (1982) Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 79, 7415-7419.
- 20) Maruggi, G., Zhang, C., Li, J. et al. (2019). mRNA as a transformative technology for vaccine development to control infectious diseases. Molecular Therapy, 27, 757-772.
- 21) 増渕啓一 (2011). ニューカッスル病生ワクチン. 動物用ワクチン—その理論と実際—. 182-184. 動物用ワクチン—バイオ医薬品研究会編. 文永堂. 東京.
- 22) Mikesell, P., Ivins, B.E., Ristoph, J.D et al. (1983). Evidence for plasmid-mediated toxin production in *Bacillus anthracis*. Infection and Immunity. 39, 371-376.
- 23) 村上賢二 (2017). DNA ワクチン. 動物用ワクチンとバイオ医薬品—新たな潮流—. 225-229. 動物用ワクチン—バイオ医薬品研究会監修. 文永堂. 東京.
- 24) 中村稔治・我妻正三郎・福所金松 (1938) 家兎ニ於ケル牛疫毒感染ニ就テ 第 I 報告: 基礎的試験. 応用獣医学雑誌. 17. 185-204.
- 25) Nakamura, J., Miyamoto, T. (1953) Avianization of lapineized rinderpest virus. American Journal of Veterinary Research. 14. 307-317.
- 26) 中村成幸 (2011) ワクチンの許認可制度. 動物用ワクチン—その理論と実際—. 53-58. 動物用ワクチン—バイオ医薬品研究会編. 文永堂. 東京.
- 27) 中西照幸・乙竹 充 (2009). 新しいワクチンの開発動向. 水産用ワクチンハンドブック. 58-64. 中西照幸・乙竹 充編. 恒星社厚生閣. 東京.
- 28) 農林省水産省告示. 医薬品, 医療機器等の品質, 有効性及び安全性の確保等に関する法律第43条第1項の規定に基づき, 農林水産大臣の指定する医薬品を定める等の件. 昭和36年2月1日付け. 第66号.
- 29) 農林水産省動物医薬品検査所ホームページ. 動物用医薬品等販売高年報.
<https://www.maff.go.jp/nval/iyakutou/hanbaidaka/index.html>
- 30) 農林水産省動物医薬品検査所ホームページ. 検定・検査情報
http://www.maff.go.jp/nval/kentei_kensa/index.html
- 31) 農林水産省消費・安全局長通知. 動物用シードロット製剤の品質確保に必要な措置に係る留意点等について. 平成21年7月1日付け. 21消安第2928号.
- 32) 農林水産省消費・安全局長通知. 動物医薬品等取締規則及び動物用医薬品の製造管理及び品質管理に関する省令の一部を改正する省令の施行等について. 令和元年9月19日付け. 元消安第2051号.
- 33) Ogawa, R., Yanagida, N., Saeki, S., et al. (1990) Recombinant fowlpox viruses inducing protective immunity against Newcastle disease and fowlpox viruses. Vaccine. 8, 486-490.
- 34) Ogawa, Y., Oish, E., Muneta, Y. et al. (2009) Oral vaccination against mycoplasmal pneumonia of swine using a live *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccine strain as a vector. Vaccine. 16. 4543-4550.
- 35) 小野恵利子・出浦裕理 (2017). 猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症2価・猫白血球減少症・猫白血病 (猫白血病ウイルス由来防御抗原たん白遺伝子挿入カナリア痘ウイルス)・猫クラミジア感染混合ワクチン. 動物用ワクチンとバイオ医薬品—新たな潮流—. 180-183. 動物用ワクチン—バイオ医薬品研究会監修. 文永堂. 東京.
- 36) 小沼 操 (2017). 動物用ワクチンの現状と疾病予防. 動物用ワクチンとバイオ医薬品—新たな潮流—. 1-17. 動物用ワクチン—バイオ医薬品研究会監修. 文永堂. 東京.
- 37) 大森崇司・佐藤朋子 (2017). 馬鼻肺炎生ワクチン. 動物用ワクチンとバイオ医薬品—新たな潮流—. 95-98. 動物用ワクチン—バイオ医薬品研究会監修. 文永堂. 東京.
- 38) Panicali, D., Paoletti, E. (1982) Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 79, 4927-4931.
- 39) Pardi, N., Hogan, M.J., Porter, F.W. et al. (2018). mRNA vaccines - a new era in vaccinology.

- Nature Reviews Drug Discovery, 17, 261-279.
- 40) Permyakova, N.V., Uvarova, E.A., Deineko, E.V. (2015) State of research in the field of the creation of plant vaccines for veterinary use. Russian Journal of Plant Physiology. 62, 23-38.
 - 41) Ping, J., Lopes, T.J.S., Nidom, C.A. et al. (2015) Development of high-yield influenza A virus vaccine viruses. Nature Communications. 6:8148. Doi: 10.1038/ncomms9148.
 - 42) Plowright, W., Ferris, R.D. (1962) Studies with rinderpest virus in tissue culture: the use of attenuated culture virus as a vaccine for cattle. Research in Veterinary Science. 3. 172-182.
 - 43) Reichmuth, A. M., Oberli, M. A., Jaklenec, A. et al. (2016). mRNA vaccine delivery using lipid nanoparticles. Therapeutic Delivery, 7, 319-334.
 - 44) 佐々木 津・福島 淳・奥田研爾 (1998). DNA ワクチンの現状と展望—感染症制圧のための新たなアプローチ. 日本細菌学雑誌. 53. 407-424
 - 45) Schnee, M., Vogel, A.B., Voss, D. et al. (2016). An mRNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein induces protection against lethal infection in mice and correlates of protection in adult and newborn pigs. PLOS Neglected Tropical Diseases. 10, e0004746.
 - 46) 志田壽利 (1986) ワクシニアウイルス・ベクター—ワクシニアウイルスの分子生物学と新型ワクチンの開発—. ウイルス. 36, 23-33.
 - 47) Shimizu, Y., Furuuchi, S., Kumagai, T. et al. (1970) A mutant of hog cholera virus inducing interference in swine testicle cell cultures. American Journal of Veterinary Research. 31. 1787-1794.
 - 48) Shimoji, Y., Oish, E., Kitajima, T. et al. (2002) *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-1 as a live vaccine vehicle for heterologous protein expression and intranasal immunization of pigs. Infection and Immunity. 70. 226-232.
 - 49) 添川正夫 (1979). わが国における狂犬病ワクチン. 動物用ワクチン. 80-101. 文永堂. 東京.
 - 50) Sonoda, K., Sakaguchi, M., Okamura, H. et al. (2000) Development of an effective polyvalent vaccine against both Marek's and Newcastle diseases based on recombinant Marek's disease virus type 1 in commercial chickens with maternal antibodies. Journal of Virology. 74, 3217-3226.
 - 51) Streatfield, S.J., Jilka, J.M., Hood, E.E., et al. (2001) Plant-based vaccines: unique advantages. Vaccine. 19, 2742-2748.
 - 52) 水産庁長官通知. 水産用生物学的製剤の開発研究について. 平成10年1月26日付け. 9水推第132号.
 - 53) 田村紀子・松村 健 (2014) 遺伝子組換えイチゴを原薬とする動物薬の開発. 生物工学. 92, 537-539.
 - 54) Taylor, J., Edbauer, C., Rey-Senelongue, A., et al. (1990) Newcastle disease virus fusion protein expressed in a fowlpox virus recombinant confers protection in chickens. Journal of Virology. 64, 1441-1450.
 - 55) Utida, S., Yosinaga, N., Yanagihara, K. et al. (2018). Designing immunostimulatory double stranded messenger RNA with maintained translational activity through hybridization with poly A sequences for effective vaccination. Biomaterials. 150, 162-170.
 - 56) 山内一也 (2009) 最初の牛疫ワクチン. 57-60. 史上最大の伝染病牛疫. 岩波書店. 東京.

要 旨

感染症を防ぐにはワクチン接種が最も効果的な方法であり、天然痘及び牛疫の根絶に威力を発揮したワクチンが如実に物語っている。家畜の感染症に対しても多くのワクチンが開発され、健康な家畜の生産に役立っている。1880年代にPasteurは、弱毒生ワクチンの作出方法を発明した。現在の多くの生ワクチンは、彼の作出方法を応用して開発された。1970年代以降、遺伝子組換え技術を用いたワクチン開発が行われるようになり、1990年代には病原遺伝子を削除した遺伝子欠損ワクチン、抗原遺伝子を他種の微生物に組み込んだサブユニットワクチン、抗原遺伝子を他の弱毒生ワクチン株等に組み込んだ遺伝子組換え生ワクチンが実用化された。今後は、プラスミドという環状のDNAに病原体の防御抗原遺伝子を組み込んだDNAワクチンやメッセンジャーRNAワクチン等に期待が寄せられている。

キーワード：家畜用ワクチン, Pasteur, 遺伝子組換え生ワクチン, DNAワクチン, mRNAワクチン

パイン粕サイレージおよび紅茶粕が乳牛のルーメン発酵と 乳生産に及ぼす影響

青木直人¹⁾・東浦裕紀¹⁾・佐藤 幹^{1, 2)}・神田修平¹⁾・板橋久雄^{1, 3)} *

Effect of pineapple bran silage and dried black tea residue on rumen fermentation and milk production in dairy cows

Naoto Aoki¹⁾, Yuki Higashiura¹⁾, Kan Sato^{1, 2)}, Shuhei Kanda¹⁾, Hisao Itabashi^{1, 3)} *

¹⁾ Tokyo University of Agriculture and Technology, Faculty of Agriculture,
3-5-8, Saiwai-cho, Fuchu, Tokyo, 183-8509, Japan

²⁾ Tohoku University, Graduate School of Agricultural Science, 468-1, Aoba, Sendai, 980-8752, Japan

³⁾ Japan Scientific Feeds Association, 2-6-16, Shinkawa, Chuo, Tokyo, 104-0033, Japan

* Corresponding Author : Hisao Itabashi (hita@cc.tuat.ac.jp)

(2020. 10. 19 受付/2020. 11. 13 受理)

Summary

The objective of this study was to investigate the effects of pineapple bran silage (PS) and dried black tea residue (BR) on rumen fermentation, blood metabolites and milk production in dairy cows. In trial 1, five Holstein cows were used to compare the diets in which PS replaced corn silage at rates of 0 (Control diet), 5% (PS5 diet) or 10% (PS10 diet) in dry matter. In trial 2, seven Holstein cows were used to compare the diets in which BR replaced corn silage and soybean meal at rates of 0 (Control diet) or 7% (BR diet) in dry matter. In trial 1, concentration of rumen ammonia was similar between the control and PS diets, while that of volatile fatty acid increased by PS5 diet before feeding. Proportion of propionic acid tended to be higher by PS5 and PS10. Dry matter intake, milk yield, milk composition, and milk anti-oxidant activity were similar between treatments. Palmitic acid contents in milk of cows fed PS5 and PS10 diets tended to be higher than those of control group. In trial 2, rumen fermentation was not affected by BR diet, but concentration of plasma non-esterified fatty acids increased by BR diet. Dry matter intake, milk production, milk somatic cell counts and anti-oxidant activity were not affected by BR. Proportion of conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat tended to be increased by BR diet. These results indicated that both PS and BR would be practically possible to use the feedstuffs as the “eco-feed” for dairy cows.

Key words : pineapple bran, black tea residue, rumen fermentation, milk production

家畜衛生学雑誌 46, 181~188 (2021)

¹⁾ 東京農工大学農学部
〒183-8509 東京都府中市幸町 3-5-8

²⁾ 東北大学大学院農学研究科
〒980-8752 宮城県仙台市青葉区468-1

³⁾ 日本科学飼料協会
〒104-0033 東京都中央区新川 2-6-16
* 連絡著者：板橋 久雄 (hita@cc.tuat.ac.jp)

序 文

反芻家畜の生産では粗飼料と濃厚飼料の両方の安定供給が必要であるが、わが国の飼料自給率は、粗飼料77%、濃厚飼料12%、全体として25%で低く推移している。輸入飼料に過度に依存した状況から国産飼料に立脚した畜産経営を図るため、飼料自給率の向上をめざした取組みが重要となっており、その一環として地域の未利用資源や食品残渣等を利用したエコフィードの生産の拡大が推進されている²⁰⁾。

パイン粕は、パイナップルジュース製造時に廃棄される搾り粕や外皮で、繊維質を豊富に含み、またパイナップル由来の有機酸を適度に含んでおり嗜好性が良いことから養牛用飼料として一部で利用されている。野中ら²¹⁾およびSruamsiri²⁴⁾は、パイン粕を乾燥またはサイレージ化した際の栄養成分量について、乾物 (DM) 当たり粗タンパク質 (CP) は4~8%、中性デタージェント繊維 (NDF) は60~72%、可溶性糖類は40~75%含まれていることを報告している。内田ら²⁵⁾は、パイン粕の可消化養分総量 (TDN) は74%であり、エネルギー源飼料としてかなり有効であるとしている。また本田ら¹⁰⁾は、黒毛和種去勢牛へ粗飼料源としてパイン粕を給与したところ、牧草バンガラグラス「トランスバーラ」の給与と比較して肥育成績に差は無く、食感が柔くなるなど肉質の改善が認められたことを報告している。しかし、乳牛へパイン粕を給与した研究は少なく、特にルーメン発酵や乳生産への影響に関しては明らかにされていない。

また、近年、茶系飲料の消費が増大しており、茶殻が大量に発生し、その多くは産業廃棄物として排出されている。茶系飲料残渣はタンパク質を豊富に含み、飼料価値が高いとされており、その一種の緑茶粕はサイレージ化等により、乳牛への飼料利用が進められている^{3, 4)}。茶葉にはカテキン等のポリフェノール化合物類が多く含まれ、茶カテキン類には血圧上昇抑制作用、抗酸化作用および抗菌性等、さまざまな効果があることが知られており⁸⁾、水谷ら¹⁷⁾は緑茶抽出物の乳牛への給与が、暑熱ストレスによる乳生産能低下の軽減に有効であると報告している。一方で、ヤギにおける過去の試験において、飼料乾物中の茶葉含量が多くなると、ルーメンの発酵に影響して、生産性に負の影響を与えることが危惧されている¹²⁾。しかし、紅茶粕が乳牛に与える影響についての研究は少ない。

そこで本研究では、乳牛の粗飼料の一部代替として、実験1ではパイナップルジュース搾り粕をサイレージ化したパイン粕サイレージ (PS) を給与し、実験2では

紅茶抽出残渣を加熱乾燥させた乾燥紅茶粕 (BR) を給与し、ルーメン発酵、血液性状および乳生産に及ぼす影響を検討して、これらのエコフィードの使用による乳生産が可能であることを明らかにすることを目的として試験を行った。

材料および方法

本研究における動物実験は、東京農工大学農学部附属広域都市圏フィールドサイエンス教育研究センターにおいて、東京農工大学の「動物実験などに関する規定」に基づいて実施した。

1. 実験1. パイン粕サイレージの給与がルーメン発酵と乳生産に及ぼす影響

ホルスタイン種泌乳牛5頭 (平均体重631 kg, 平均乳量22.4 kg/日, 平均分娩後日数186日, 平均産次数1.6) を供試した。供試牛はフリーストール牛舎で飼養し、採食、飲水、運動および休憩が自由にできるようにした。給与は1日2回 (9:30, 17:30) 行い、搾乳はオートタンデムミルクングパーラーで1日2回 (9:00, 17:00) 行い、乳量は自動的に記録した。

給与飼料の構成を表1に示した。主にトウモロコシサイレージ、ハイキューブ、スーダン乾草と濃厚飼料から成る基礎飼料を給与した対照区と、サイレージと濃厚飼料の割合を減らし乾草を増やし、PSをDM当たり5%配合したPS5区と、同様に10%配合したPS10区を設定し、3区の成分含量がほぼ同等になるように調製した。PSの成分組成 (DM%) は、CP: 6.6, 粗脂肪 (EE): 0.9, NDF: 67.9, 酸性デタージェント繊維 (ADF): 27.7であった。試験は、初めの3日間を基礎飼料を給与した予備期とし、以後、PS5区、PS10区、対照区の順に1期14日間で全3期の泌乳試験を行った。各飼料は給与前に混合し、TMRとして給与した。

乾物摂取量 (DMI) と乳量は、各期最終3日間の平均値を用いた。乳試料はミルクメーターに付けたオートサンプラーで乳量に応じて自動的に採取し、朝・夕の牛乳を乳量割合で合乳した後、乳成分測定に供した。乳脂率、乳タンパク質率、乳糖率、無脂乳固形分率および全固形分率は近赤外線自動分析機 (Milko-Scan 133, Foss Electric, Hillerød, Denmark) により測定した。また、乳試料の一部を-80℃で凍結保存し、乳脂肪酸組成の測定に供した。脂肪酸組成の測定は、Miyazawaら¹⁶⁾の方法に準じて行った。ガスクロマトグラフはGC-14B (島津製作所, 京都) を用い、スプリット比: 1/50で試料注入した。カラムは溶解シリカ・キャピラリーカラム (HR-SS-10, 60 m×0.24 mm, ID, 信和化工, 京都) を

Table 1. Ingredient and chemical composition of diets in Trial 1 and Trial 2.

Item	Diet 1 (Trial 1)			Diet 2 (Trial 2)	
	Control	PS5	PS10	Control	BR
Ingredient (% of DM)					
Sudangrass hay	8.7	12.0	13.0	8.7	8.9
Corn silage	27.0	20.4	17.0	38.5	31.5
Alfalfa hay cube	19.6	19.6	18.8	—	—
Concentrate mixture ¹	33.6	32.0	30.7	39.7	40.6
Wheat bran	1.8	1.8	1.7	2.4	2.5
Beet pulp	3.0	3.0	2.8	3.0	3.1
Rolled barley	1.5	1.5	1.4	1.2	1.3
Cotton seed	3.8	3.7	3.6	3.9	3.9
Soybean meal	1.2	1.2	1.1	2.6	1.3
Pineapple bran silage	—	5.0	10.0	—	—
Black tea residue	—	—	—	—	7.0
Nutrient composition (% of DM)					
Total degradable nutrients ²	73.7	73.1	72.8	72.8	72.4
Crude protein	16.0	15.7	15.4	14.9	15.5
Ether extract	3.0	2.8	2.7	3.2	3.2
Neutral detergent fiber	35.3	38.0	40.3	33.3	33.4

¹ Contained 47% grain (heat treated corn, barley, wheat flour, milo, rye), 27% chaff and bran (rice bran, corn gluten feed, wheat bran), 22% oil seed meals (soybean meal, rape seed meal, corn gluten meal, linseed meal), 4% others (molasses, calcium carbonate, sodium chloride, calcium phosphate).

² Estimated from Standard Tables of Feed Composition in Japan (Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat 2009).

用いた。

各期最終日の朝の飼料給与前 (0h), 給与2時間後 (2h), 給与5時間後 (5h) にステンレス製胃カテーテル (ルミナー, 富士平工業, 東京) を用いてルーメン内容物を経口的に吸引採取した。採取後, 二重ガーゼで内容物をろ過し, ルーメン液を -30°C で凍結保存し, 分析に供した。揮発性脂肪酸 (VFAs) は, ルーメン液試料を除タンパクして遠心分離した上清を分析用試料とし, ガスクロマトグラフ GC-8A (島津製作所, 京都) により分析した。カラムは Thermo 3000-5% Shincarbon A (1.6 m $\times$ 3.2 mm, ID, 信和化工, 京都) を用い, カラム温度 130°C で分析した。アンモニア-N濃度はインドフェノール青法によるアンモニアテストワコー (和光純薬工業, 京都) の手順に従って行った。

血液試料は各期最終日の朝の飼料給与2 h後に, 頸静脈からヘパリン加真空採血管を用いて採取し, 遠心分離後に血漿を -30°C で凍結保存した。解凍後, 尿素態窒素 (BUN) はウレアーゼ・インドフェノール法による尿素態窒素B-テストワコー (和光純薬工業) の手順, グル

コースはムロターゼ・GOD法によるグルコースCII-テストワコー (和光純薬工業) の手順にそれぞれ従って測定した。

牛乳の抗酸化能の評価のために, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) を人工のラジカルとしてその消去活性を測定した。乳試料をクロロホルム・メタノールで2層に分離し, 上層の水溶性画分を乾固し, 蒸留水で溶解後, DPPH溶液と反応させ, 30分後に517 nmの吸光度を測定し, 蒸留水との差によりラジカル消去活性を求めた⁵⁾。

2. 実験2. 乾燥紅茶粕の給与がルーメン発酵と乳生産に及ぼす影響

ホルスタイン種泌乳牛7頭 (平均体重657 kg, 平均乳量23.3 kg/日, 平均分娩後日数180日, 平均産次数2.1) を供試した。供試牛を平均体重や乳量が同等になるように3頭と4頭の2群に分け, 予備期3日間, 試験期14日間のクロスオーバー法で試験を行った。

給与飼料の構成を表1に示した。主にトウモロコシサ

イレージ, スーダン乾草, 濃厚飼料と大豆粕等から成る基礎飼料を給与した対照区と, 基礎飼料中のサイレージと大豆粕を減らし, BRをDM当たり7 %配合したBR区を設定し, 両区の成分含量がほぼ同等になるように調製した。BRの成分組成(DM%)はCP:24.6, EE:1.8, NDF:43.6, ADF:28.6であった。また, タンニンが5.6 %, 無水カフェインが3.8 mg/g, エピガロカテキンガレートが4.3 mg/g含まれていた。

DMI, 乳量, 乳成分, 乳脂肪酸組成, ルーメン液性状および牛乳の抗酸化活性の測定は, 実験1と同様に行った。また牛乳の体細胞数をFossomatic 90 (Foss Electric) により測定した。血漿性状は, グルコースおよびBUNに加え, 遊離脂肪酸 (NEFA) 濃度をACS・ACOD法によるNEFA Cテストワコー (和光純薬工業) の手順に従って測定した。

3. 統計処理方法

実験1は一般線形, 実験2はクロスオーバーデザインの混合モデルにより分析した (PASW Statistics 18.0, IBM, NY 10504)。処理区, 期を固定効果とし, 個体をランダム効果とした。有意水準は $P < 0.05$ とし, $0.5 \leq P < 0.1$ を傾向ありとした。なお, 処理区と期の相互作用に有意な差は認められなかった。

結果および考察

1. パイン粕サイレージの給与がルーメン発酵と乳生産に及ぼす影響 (実験1: Diet 1)

ルーメン発酵および血液性状に及ぼすPS給与の影響について, 表2に示した。ルーメン液中のアンモニア-N濃度は, 各試験区間で有意差は認められなかった。飼料給与前 (0h) の総VFA濃度は対照区に比べ, PS5区で有意に高かった。VFA組成については, 酢酸の比率

Table 2. Effect of pineapple bran silage (PS) or black tea residue (BR) on ammonia-N, volatile fatty acid (VFA) in the rumen fluid, and glucose, BUN and NEFA in the blood plasma

Item	Hrs. aftter feeding	Diet 1			<i>P</i> -value ¹	Diet 2		<i>P</i> -value ¹
		Control (n=5)	PS5 (n=5)	PS10 (n=5)		Control (n=7)	BR (n=7)	
Rumen fluid								
Ammonia-N (mg/dL)	0	9.5	8.6	7.9	0.68	9.2	10.7	0.64
	2	8.7	8.7	11.5	0.73	11.3	12.7	0.64
	5	5.7	5.3	6.9	0.56	10.2	6.3	0.26
Total VFA (mM)	0	51.0 ^a	99.7 ^b	70.9 ^{ab}	0.02	59.6	60.4	0.83
	2	96.1	96.8	87.4	0.70	72.1	71.7	0.90
	5	75.8	70.7	87.4	0.43	79.3	78.2	0.73
VFA (molar %)								
Acetic acid	0	67.2	65.6	67.9	0.45	62.5	61.4	0.30
	2	66.0	67.4	65.3	0.41	57.5	57.8	0.84
	5	66.6	66.9	66.0	0.70	59.2	59.9	0.42
Propionic acid	0	17.1	19.3	17.1	0.10	19.4	19.4	0.95
	2	18.4	19.4	19.8	0.22	20.2	20.3	0.87
	5	17.9	18.8	19.4	0.17	19.7	19.6	0.96
Butyric acid	0	11.1	10.8	11.8	0.58	9.1	9.1	0.97
	2	11.3	9.6	11.6	0.18	12.6	12.7	0.74
	5	11.7	11.1	12.1	0.51	12.3	12.2	0.86
Blood plasma								
Glucose (mg/dL)	2	56.3	69.5	59.3	0.17	50.4	50.4	0.99
BUN (mg/dL)	2	18.0	22.3	9.6	0.08	29.2	26.7	0.18
NEFA (μEq/mL)	2	—	—	—	—	89.1 ^a	117.7 ^b	0.01

¹ Different scripts within a row are significantly different ($p < 0.05$).

は処理区間で差は認められなかったが、プロピオン酸の比率は対照区に対しPS5区では0 hで高い傾向を示し、PS10区では飼料給与2 hおよび5 h後で高い値を示した。内田ら²⁵⁾は、パイン粕をヒツジに給与した結果、ビートパルプ給与に比べプロピオン酸の比率が約10 %高まったと本実験と類似の報告をしている。パイナップル果実にはクエン酸やリンゴ酸等の有機酸が1 %程度含まれているので²³⁾、パイン粕にもこれらが残存し、ルーメン内の中間代謝産物利用菌に利用されプロピオン酸生成が促進されたものと推察される。

血中のグルコース濃度は対照区と比べてPS5区、PS10区ともに高い値を示したが、有意差は認められなかった。BUN濃度は対照区に比べPS5区では差はなかったがPS10区では低い値を示した。Gowdaら⁷⁾は、トウモロコシサイレージの一部をPSに置換しヒツジに給与した結果、BUN濃度に差がなかったことを報告している。本実験においては、ルーメン液中のアンモニア-N濃度に処理区間で差がなかったため、BUN濃度にも明確な差が生じなかったと考えられる。

DMIおよび乳生産の結果について表3に示した。PSの嗜好性に問題はなくDMIに区間差は認められなかった。乳量、各乳成分率および乳成分量についても区間差は認められなかった。Otagakiら²²⁾は、粗飼料源としてパイン粕を飼料中に30%配合し乳牛に給与した結果、乳生産に影響はなかったことを報告しており、本実験の結果も同様であった。

乳中脂肪酸組成およびDPPHラジカル消去活性を指標にした牛乳の抗酸化活性の結果について表4に示した。PSを添加した両区では対照区と比べ、乳脂肪中のパルミチン酸割合が増加する傾向が認められた。

牛乳の抗酸化活性は、PS添加区と対照区との間で差は認められなかった。パイン粕には抗酸化成分としてβ-カロテンやビタミンCが含まれ、パイナップルの果皮には脂溶性の抗酸化物質が多く存在する¹⁸⁾ことから、牛乳の抗酸化活性の増強が期待されたが、そのような効果は認められなかった。本実験では抗酸化活性の測定は、脂肪を除去した画分で行ったが、脂肪を含めた牛乳全体についても今後は検討することが必要と考えられる。

2. 乾燥紅茶粕の給与がルーメン発酵と乳生産に及ぼす影響 (実験2: Diet 2)

ルーメン液中のアンモニア-N、VFA濃度および血液性状の分析結果を表2に示した。アンモニア-N濃度はBR区と対照区との間に差は認められなかった。額爾敦ら³⁾は緑茶粕サイレージを飼料に10 %配合し乳牛に与えた場合、ルーメンアンモニア-N濃度は飼料給与後に低下すると報告している。これは茶葉に含まれるタンニンが、飼料中のタンパク質やルーメン微生物由来の酵素と強く結合し、ルーメンでのタンパク質分解を抑制するため¹⁵⁾と考えられる。さらに、BRには緑茶粕サイレージよりも中性デタージェント不溶性タンパク質や酸性デタージェント不溶性タンパク質が多く含まれており、in vitroの試験においてアンモニア-N濃度が低下したが¹³⁾、本実験の結果は異なった。本実験ではBRは飼料中7 %であったが、この程度の配合ではアンモニア-N濃度への影響は認められないと考えられる。

総VFA濃度およびVFA組成は、対照区とBR区の間で有意差は認められなかった。なお、生田ら¹¹⁾は、乳牛の飼料に乾燥茶殻を7.2 %配合すると酢酸の比率が低

Table 3. Effect of pineapple bran silage (PS) or black tea residue (BR) on feed intake, milk yield and milk composition

Item	Diet 1				Diet 2		
	Control (n=5)	PS5 (n=5)	PS10 (n=5)	P-value	Control (n=7)	BR (n=7)	P-value
Dry matter intake (kg/d)	22.2	22.2	22.9	0.71	21.0	21.3	0.86
Milk yield (kg/d)	22.3	21.2	23.4	0.73	23.1	23.7	0.86
Milk composition (%)							
Fat	4.50	4.24	4.28	0.48	4.36	4.50	0.59
Protein	3.59	3.47	3.55	0.61	3.81	3.73	0.57
Lactose	4.55	4.67	4.59	0.32	4.33	4.25	0.13
Total solids	13.64	13.38	12.75	0.98	13.54	13.51	0.93
Solids non-fat	9.14	9.13	9.14	0.45	9.24	9.06	0.28
Somatic cell counts ($\times 10^3$ /mL)	—	—	—	—	152	140	0.82

Table 4 Effect of pineapple bran silage (PS) or black tea residue (BR) on fatty acid composition of milk fat and DPPH¹ radical scavenging activity in milk

Item	Diet 1			<i>P</i> -value ²	Diet 2		<i>P</i> -value ²
	Control (n=5)	PS5 (n=5)	PS10 (n=5)		Control (n=7)	BR (n=7)	
Fatty acid (mg/100mg FAME ³)							
Caproic acid (C6:0)	1.63	1.70	1.73	0.39	1.68	1.61	0.58
Caprylic acid (C8:0)	1.16	1.19	1.24	0.46	1.22	1.16	0.46
Capric acid (C10:0)	2.74	2.86	2.92	0.46	3.04	2.86	0.54
Lauric acid (C12:0)	3.33	3.49	3.56	0.46	3.66	3.42	0.55
Myristic acid (C14:0)	11.39	11.65	11.78	0.48	11.57	11.14	0.56
Myristoleic acid (C14:1)	0.99	0.96	1.06	0.61	1.18	1.08	0.34
Palmitic acid (C16:0)	32.24	33.52	33.95	0.08	31.19	30.32	0.60
Palmitoleic acid (C16:1)	1.55	1.57	1.43	0.71	1.73	1.67	0.38
Stearic acid (C18:0)	10.66	10.07	10.14	0.37	9.63	10.23	0.62
Oleic acid (C18:1)	21.47	20.58	19.69	0.23	21.20	22.58	0.41
VA ⁴ (<i>t</i> -11 C18:1)	0.94	0.96	0.96	0.66	1.02	1.07	0.27
Linoleic acid (C18:2)	1.78	1.76	1.97	0.61	2.27	2.34	0.63
CLA ⁵ (<i>c</i> -9, <i>t</i> -11 C18:2)	0.81	0.79	0.84	0.44	0.80	0.88	0.09
Linolenic acid (C18:3)	0.62	0.55	0.51	0.40	0.54	0.59	0.39
Saturated fatty acids	69.16	70.36	71.18	0.18	68.31	66.78	0.17
Unsaturated fatty acids	30.84	29.64	28.82	0.18	31.69	33.22	0.18
DPPH (Unit/μL)	7.27	7.60	6.75	0.25	2.69	2.57	0.84

¹ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl.² *P*<0.10; tended to be increased or decreased.³ Fatty acid methyl ester.⁴ Vaccenic acid.⁵ Conjugated linoleic acid.

下するとし、額爾敦ら⁴⁾は、緑茶粕サイレージを飼料中10%以上配合するとプロピオン酸の比率が低下すると報告しているが、本実験の結果はこれらとは異なった。

血漿グルコースおよびBUN濃度については両区間で差は認められなかった。額爾敦ら³⁾は緑茶粕サイレージの給与でBUN濃度が低下したと報告しているが、本実験ではBR給与でルーメンアンモニア-N濃度が変化しなかったもので、BUN濃度に区間差が生じなかったと考えられる。一方、血中NEFA濃度はBR区で有意に増加したが、乳牛へのカフェインの投与によりNEFA濃度が高まることが知られており⁹⁾、本実験でも紅茶粕に含まれるカフェインによってその濃度が高まった可能性がある。

DMIおよび乳生産についての結果を表3に示した。DMI、乳量、乳成分および乳中体細胞数にはBR給与の影響は認められなかった。生田ら¹¹⁾は本実験と同程度の割合で茶殻を給与した結果、乳量、乳糖率および無脂

固形分率が低下し、これは飼料タンパク質の消化吸収が抑制されたためと考察している。さらに、額爾敦ら⁴⁾は緑茶粕サイレージを乳牛に給与した場合、10%添加で乳量と乳成分は低下し始め、15%添加で有意に低下したが、これはタンニンによる影響と報告している。その場合、緑茶粕サイレージ区のDMIは20.7 kg、サイレージのタンニン濃度は9.0 %で、1日当たり279 gのタンニン摂取量であったが、本実験では紅茶粕のタンニン濃度は5.6 %で1日当たり83.5 gのタンニン摂取であったため、乳生産への影響は認められなかったと考えられる。

乳中脂肪酸組成の分析結果について表4に示した。BR区では対照区に比べ、総不飽和脂肪酸割合が高い値を示した。抗がん作用などの機能性成分として知られている共役リノール酸 (CLA) の割合は、BR区の方が対照区よりも高い傾向が認められた。リノレン酸を多く含むアマニの給与により、乳中のCLAが増加することが報告されている²⁾。また、茶葉に含まれる脂肪酸の約

40%はリノレン酸、約25%はリノール酸であるので¹⁾、BR給与によるCLAや不飽和脂肪酸の増加傾向は、これらの多価不飽和脂肪酸が多く供給されたことが一因と考えられる。

牛乳の抗酸化活性について表4に示した。牛乳のDPPHラジカル消去活性は、両区間に差は認められなかった。茶葉にはエピガロカテキンなど各種のカテキン類が含まれているが、紅茶などの発酵茶ではカテキン類が製造途中に二量体に酸化され緑茶の半分程度まで減少し、抗酸化力についても緑茶より低下することが報告されている¹⁴⁾。本実験で用いた紅茶粕は4.3 mg/gのエピガロカテキンガレート含有しているため、DM当たりBRの7%給与により、1日当たり約6gのエピガロカテキンガレートが乳牛へ供給されたことになる。Gessnerら⁶⁾の乳牛に緑茶抽出物を給与した試験では、本実験と同程度量のポリフェノールが添加されたが、血中の抗酸化能や肝臓の抗酸化酵素のmRNA発現量の増強は認められなかった。このため、本実験でも十分な量のカテキン類が供給されなかったため、乳の抗酸化活性の向上にはつながらなかったと考えられる。このように、紅茶粕はルーメン発酵に大きな影響を与えることなく、CLA等の多い牛乳の生産に寄与できる可能性が示唆された。

以上の実験1と実験2の結果より、PSは乾物比10%程度、BRは7%程度の飼料配合であればルーメン発酵と栄養素の体内代謝に大きな影響を及ぼすことなく、エコフィードを使用した安全な牛乳生産に利用できることが明らかになった。

本研究の実施に際し、PSは雪印種苗株式会社より、BRは全国酪農業協同組合連合会を介して提供いただいた。泌乳試験の遂行にあたっては東京農工大学農学部附属フィールドサイエンス教育研究センターの小林 優氏、乃万 了氏をはじめとする技術職員の方々に多大のご支援をいただいた。乳成分分析については東京都農林水産振興財団農林総合研究センター青梅庁舎の皆様にも多大のご助力をいただいた。ここに記して感謝の意を表す。

引用文献

- 1) 阿南豊正・中川致之 (1977) 茶葉の脂質に関する研究 (第1報) 茶期・熟度による脂質含量および脂肪酸組成の変化. 日本食品工業学会誌. 24, 305-310.
- 2) Caroprese M., Marzano A., Marino R., et al. (2010) Flaxseed supplementation improves fatty acid profile of cow milk. Journal of Dairy Science. 93, 2580-2588.
- 3) 額爾敦巴雅爾・西田武弘・細田謙次ら (2003) 泌乳牛の飼料消化、ルーメン発酵および血液性状などに及ぼす緑茶飲料製造残渣サイレージ給与の影響. 日本畜産学会報. 74, 483-490.
- 4) 額爾敦巴雅爾・西田武弘・松山裕城ら (2005) 緑茶飲料製造残渣サイレージの給与水準の違いが採食量および乳生産に及ぼす影響. 日本畜産学会報. 76, 295-301.
- 5) Gazi, M.R., Yokota, M., Tanaka, Y., et al. (2007) Effects of protozoa on the antioxidant activity in the ruminal fluid and blood plasma of cattle. Animal Science Journal. 78, 34-40.
- 6) Gessner D.K., Brock C., Hof L.M., et al. (2020) Effects of supplementation of green tea extract on the milk performance of periparturient dairy cows and the expression of stress response genes in the liver. Journal of Animal Science and Biotechnology. 11: 57.
- 7) Gowda N.K.S., Vallesha N.C., Awachat V.B., et al. (2015) Study on evaluation of silage from pineapple (Ananas comosus) fruit residue as livestock feed. Tropical Animal Health and Production. 47, 557-561.
- 8) 原征彦 (2000) 茶カテキン類の機能性とそれらの応用例. 日本食品保蔵科学会誌. 26, 47-54.
- 9) Hawkins G.E., Davis W.E. (1970) Changes in plasma free fatty acids and triglycerides in dairy cattle after dosing with coffee or caffeine. Journal of Dairy Science. 53, 52-55.
- 10) 本田祥嵩・翁長桃子・安里直和ら (2015) パインアップルジュース搾り粕給与が黒毛和種肥育牛の肉質に及ぼす影響. 沖縄県畜産研究センター試験研究報告. 53, 1-6.
- 11) 生田健太郎・山口悦司・片岡敏 (2011) 泌乳牛への茶飲料製造残渣給与が乳生産性と栄養代謝に及ぼす影響. 兵庫県立農林水産技術総合センター研究報告. 畜産編. 47, 16-22.
- 12) Kondo M., Hidaka M., Kita K. et al. (2007) Feeding value of supplemented diet with black tea by-product silage: Effect of polyethylene glycol addition to the diet on digestibility of protein fractions in goats. Grassland Science. 53, 131-137.
- 13) Kondo M., Hirano Y., Kita K. et al. (2014) Fermentation characteristics, tannin contents and

- in vitro ruminal degradation of green tea and black tea by-products ensiled at different temperatures. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*. 27, 937-945.
- 14) 栗木隆吉・黒岩力也 (2004) 地域食品製造副産物を利用した高機能畜産物の生産技術の開発—地域食品製造副産物に含まれる機能性成分と飼料特性について—. 岡山県総合畜産センター研究報告. 15, 6-10.
 - 15) Makkar H.P.S., Blummel M., Becker K. (1995) Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in in vitro techniques. *British Journal of Nutrition*. 73, 897-913.
 - 16) Miyazawa K., Sultana H., Hirata T. et al. (2007) Effect of brewer's grain on rumen fermentation, milk production and milk composition in lactating dairy cows. *Animal Science Journal*. 78, 519-526.
 - 17) 水谷将也・山本泰也・濱口勇 (1999) 緑茶抽出物の飼料への添加による夏期における乳生産能低下の軽減効果. 三重県農業技術センター研究報告. 26, 13-19.
 - 18) 西場洋一・正田守幸・崎山澄寿ら (2011) 沖縄県産パイナップル (*Ananas comosus* (L.) Merr.) におけるラジカル消去成分の品種間差異. 日本作物学会九州支部会報. 77, 73-76.
 - 19) 農業・食品産業技術総合研究機構 (2009) 日本標準飼料成分表. 2009年版. 中央畜産会. 東京.
 - 20) 農林水産省 (2020) 飼料をめぐる情勢. [homepage on the Internet]. 農林水産省, 東京; [cited 6 February 2020]. Available from URL: https://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/_siryo/attach/pdf/index-499.pdf
 - 21) 野中和久・名久井忠・篠田 満 (1994) パイナップル粕・醤油粕混合飼料の飼料価値. 北海道畜産学会報. 36, 18-20.
 - 22) Otagaki K.K., Lofgreen G.P., Cobb E. et al. (1961) Net energy of pineapple bran and pineapple hay when fed to lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 44, 491-497.
 - 23) 塩見慎次郎・丁野久美・中村怜之輔 (2004) 成分変化からみたパイナップル果実の追熟性について. 日本食品保蔵科学会誌. 30, 231-234.
 - 24) Sruamisri S. (2007) Agricultural wastes as dairy feed in Chiang Mai. *Animal Science Journal*. 78, 335-341.
 - 25) 内田仙二・Lana I.K.・堀米隆男 (1980) フィリピン産パイナップルカスの飼料価値. 岡山大学農学部学術報告. 56, 55-62.

要 旨

パイン粕サイレージ (PS) と乾燥紅茶粕 (BR) が乳牛のルーメン発酵, 血液性状および乳生産に及ぼす影響について2つの実験を行った。実験1では5頭の乳牛を供試し, 基礎飼料のみを給与した対照区と基礎飼料のトウモロコシサイレージをPSで5%および10%置き換えた区を設定した。実験2では7頭の乳牛を供試し, 対照区と基礎飼料のトウモロコシサイレージと大豆粕をBRで7%置き換えた区を設定した。実験1ではPSの給与によりルーメンアンモニア濃度に区間差は認められなかったが, 総VFA濃度はPS5%区で飼料給与前(0h)に有意に高かった。VFA中のプロピオン酸の割合はPS5区およびPS10区で高い傾向が認められた。DMI, 乳量, 乳成分および抗酸化活性には区間差はなかったが, 乳脂肪のパルミチン酸の割合はPS5区とPS10区で高い傾向が認められた。実験2ではBRの給与によりルーメン発酵は変化しなかったが, 血漿NEFA濃度は増加した。DMI, 乳量, 乳成分, 乳の体細胞数と抗酸化活性は変化しなかった。BR給与により乳脂肪の共役リノール酸 (CLA) の増加傾向が認められた。本研究においてPSとBRは, 乳生産についてどちらも負の影響を及ぼすことなく, エコフィードとして飼料の一部代替が可能であることが示された。

キーワード: パイン粕, 紅茶粕, ルーメン発酵, 乳生産

Effect of Sampling Volume for Viable Bacterial Count and Somatic Cell Count in Cows' Foremilk

Nana Kitano¹⁾, Yoshio Kiku²⁾, Satoshi Gondaira^{3)*}, Toshihiko Takahashi^{1)*}

ウシ前搾り乳量が乳汁生菌数および体細胞数に及ぼす影響

北野菜奈¹⁾・菊 佳男²⁾・権平 智^{3)*}・高橋俊彦^{1)*}

¹⁾ Animal Hygiene Laboratory, Graduate School of Rakuno Gakuen University,
582 Midorimachi Bunkyo-dai Ebetsu, Hokkaido 069-8501 Japan

²⁾ National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization,
4 Hitsujigaoka, Toyohira, Sapporo, Hokkaido 062-0045, Japan

³⁾ Animal Health Laboratory, Graduate School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University,
582 Midorimachi, Bunkyo-dai, Ebetsu, Hokkaido 069-8501 Japan

* Correspondence to: Satoshi Gondaira (s-gondaira@rakuno.ac.jp)
Toshihiko Takahashi (toppi@rakuno.ac.jp)

(Received 13. Nov. 2020 / Accepted 27. Nov. 2020)

Summary

The present study sought to investigate the relationships between the foremilk and viable bacterial counts and somatic cell counts in milking cows. Milk samples were collected from 12 quarters of 12 clinically healthy Holstein cows prior to milking; 150 mL of foremilk per quarter were split into 10 groups (0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-50, 50-75, 75-100, 100-125, 125-150mL). The mastitis-inducing bacteria present within the foremilk were identified, and the viable bacterial counts and somatic cell counts in the samples were also measured. Coagulase-negative staphylococci (CNS) were isolated from 4 quarters, other Streptococci (OS) were detected in 4 quarters, both CNS and OS were found in 4 quarters, and *Staphylococcus aureus* was identified in 1 quarter. The amounts of bacteria in foremilk samples ranging from 20 to 150 mL were significantly lower than in foremilk samples from the first 0 to 5 mL. The foremilk harvested at 5 to 10 mL showed significantly higher bacterial counts than the foremilk bacterial levels in samples from 25 to 150 mL. While examining somatic cell counts, it was discovered that there were no significant differences according to the amount of foremilk. It was clarified that at least 20 mL or more of foremilk was necessary to maintain hygienic milk quality.

Key words : foremilk, mastitis, bacterial counts, somatic cell counts, cow

Jpn. J. Anim. Hyg. 46, 189~193 (2021)

¹⁾ 酪農学園大学 畜産衛生学ユニット
〒069-8501 北海道江別市文京台緑町582番地
²⁾ 農研機構 動物衛生研究部門
〒062-0045 北海道札幌市豊平区羊ヶ丘4

³⁾ 酪農学園大学 獣医学類獣医衛生学ユニット
〒069-8501 北海道江別市文京台緑町582番地
* 連絡著者：権平 智 (s-gondaira@rakuno.ac.jp)
高橋俊彦 (toppi@rakuno.ac.jp)

Introduction

Mastitis is caused by the invasion of microorganisms into the mammary gland⁴⁾. Since mastitis lowers milk yield, the disease has caused enormous economic losses for dairy farms worldwide^{5, 7)}. Mastitis also has significant effects on public health and the dairy industry in the production of safe, raw milk.

Bacteriological tests⁶⁾ and somatic cell counts are mainly used to monitor mastitis and make a clinical diagnosis. Milk is created by mammary epithelial cells from the blood, which synthesize milk and secrete the milk into the mammary alveoli. The milk stored within the mammary gland then descends via the milk duct and, in its final position, is stored within the gland cistern or teat cistern. It is possible that bacteria invade the teat via the top of the teat prior to milking, and that the milk located in the gland cistern or teat cistern is contaminated with high bacteria and somatic cell counts. It is known that the composition of milk varied before and after milking, and the electrical conductivity, which is an index of mastitis, is higher before milking⁸⁾. Thus, monitoring for and diagnosis of mastitis were generally conducted using milk after discarding the foremilk sample 3 to 4 times. However, no reported study has quantitatively analyzed foremilk contamination, and the foremilk volume appropriate for the mastitis test has not been determined.

In the present study, the relationships between the foremilk and viable bacterial counts and somatic cell counts in cows' milk were examined, and the appropriate stable milk volume needed to conduct a mastitis test with the foremilk was determined.

Materials and Methods

Animals

Holstein cows were fed and housed within the free stall barn of Rakuno Gakuen University Field Education and Research Center, which was set up as a dairy production station. Holstein cows during early lactation ($n = 2$), peak lactation ($n = 1$), mid-lactation ($n = 1$), and late lactation ($n = 8$) were used. Of these 12 cows (2 to 6 years of age), 12 quarters in which bacteria were detected within the foremilk were used. The parity of cows was 1 to 4.

Milk sampling

Following pre-dipping of the cow teat, sampling after cleanup using a fresh towel was conducted with up to 150 mL per quarter. A total of 150 mL of foremilk per quarter were split into 10 groups, and then each was placed into a separate sterile tube. The first 5-mL sample of foremilk was placed into a sterile tube (5 mL group), and the next 5 mL (i.e., 5 to 10 mL of foremilk) sample was placed into another sterile tube (10 mL group). The next 5 mL sample (10 to 15 mL of foremilk) was collected (15 mL group), and so forth for the 15 to 20 mL (20 mL group), 20 to 25 mL (25 mL group), 25 to 50 mL (50 mL group), 50 to 75 mL (75 mL group), 75 to 100 mL (100 mL group), 100 to 125 mL (125 mL group), and 125 to 150 mL (150 mL group) samples, all collected in the same manner.

Bacterial isolation and identification

The milk from each quarter was prepared following the method previously described¹⁾. Briefly, the sampled milk was applied to an approximately 5% sheep blood agar medium (BD, Franklin Lakes, NJ, USA), and the culture was then incubated at 37°C for 24 h. After cultivation, the isolated strains were identified by the presence or absence of hemolysis, Gram staining reaction, catalase test, and coagulase test using rabbit plasma. The viable bacterial count was measured in 1 mL using a 3M Petrifilm AC Plate (3M Health Care, Minneapolis, MN, USA).

Somatic cell counts

The numbers of somatic cells within the milk were counted using a DeLaval cell counter DCC (DeLaval, Tumba, Sweden).

Statistical analysis

The results are expressed as means $\pm$ standard deviation. A Friedman test was used for comparisons, with $p < 0.05$ considered significant.

Results

Mastitis-inducing bacteria were detected in 12 quarters: coagulase-negative Staphylococci (CNS) were detected in 3 quarters, other Streptococci (OS) in 4 quarters, both CNS and OS in 4 quarters, and *Staphylococcus aureus* was detected in 1 quarter. The

numbers of CNS, OS, CNS and OS, and SA in foremilk are shown in Table 1. The highest bacterial count was detected in the 5 mL group in CNS, OS, CNS and OS, and SA-containing milk, and tended to be larger than in the other volume groups. However, there was no significantly variation in the viable bacterial count in any amount of foremilk group depending on the species of CNS, OS, and CNS and OS. In one quarter in which SA was detected, a similar pattern to other bacterial species was noted. The highest bacterial count was recognized within the 5 mL group in total milk, and it was significantly ($p < 0.05$) higher than in the 20 mL to 150 mL groups. The milk of the 10 mL group had a significantly higher bacterial count ($p < 0.05$) than the 50 to 150 mL group milk.

The somatic cell counts in foremilk found to have CNS, OS, CNS and OS, and SA are shown in Table 2. Significantly variations in the numbers of somatic cells

by bacterial species (CNS, OS, CNS and OS) were not observed. In one quarter where SA was detected, unlike other bacterial species, somatic cell counts were variation. There was no significantly variation in the somatic cell counts in the total group.

Discussion

It is not yet possible to accurately determine the development of mastitis and the occurrence of inappropriate treatment in cows with current techniques³. The method using foremilk intended for mastitis testing has not yet been standardized. In the present study, viable bacterial counts and somatic cell counts of sampled cow foremilk were both quantitatively measured to develop an appropriate mastitis test.

In the present study, the viable bacterial counts and the somatic cell counts did not differ significantly by

Table 1 Bacterial counts (cfu/ml) in foremilk

Isolated bacteria	n	5	10	15	20	25	50	75	100	125	150mL (ml)
CNS	3	15.8±12.9	1.9±1.4	1.7±1.1	1.2±0.7	1.2±0.9	0.4±0.4	0.5±0.3	1.8±2.1	1.6±2.4	0.8±0.6
OS	4	3.1±1.9	1.5±0.8	0.9±0.6	0.5±0.6	0.1±0.2	0.2±0.2	0.3±0.5	0.7±0.8	0.3±0.5	0.3±0.5
CNS+OS	4	10.8±16.2	1.0±0.6	0.9±0.7	0.3±0.3	0.3±0.3	0.2±0.1	0.2±0.1	0.1±0.2	2.2±4.2	0.1±0.2
SA	1	7.0	0.3	0.2	0.3	0.1	0.02	0.03	0.03	0.01	0.01
Total	12	9.1±11.4 ^a	1.3±0.9 ^c	1.0±0.8	0.6±0.6 ^b	0.4±0.6 ^b	0.2±0.2 ^{bd}	0.3±0.3 ^{bd}	0.7±1.2 ^{bd}	1.2±2.6 ^{bd}	0.3±0.5 ^{bd}

CNS; Coagulase-negative staphylococci, OS; Other Streptococci, SA; *Staphylococcus aureus*

^{a, b, c, d}, $p < 0.05$

Table 2 Somatic cell counts (10⁴ cells/ml) in foremilk

Isolated bacteria	n	5mL	10mL	15mL	20mL	25mL	50mL	75mL	100mL	125mL	150mL
CNS	3	30.8±46.9	33.8±71.3	29.8±60.2	30.5±84.0	26.9±107.3	17.7±88.4	18.9±102.7	16.4±79.6	16.7±87.9	18.3±91.2
OS	4	90.1±59.7	91.9±64.3	69.9±30.7	57.6±19.0	34.6±14.7	36.4±19.7	37.7±19.3	40.2±19.8	41.9±22.9	42.4±24.9
CNS+OS	4	44.1±23.4	47.6±25.5	36.7±20.6	31.2±24.1	30.7±23.6	30.0±24.5	27.5±22.8	29.5±30.1	30.1±30.7	30.3±30.5
SA	1	200.2	25.9	265.8	262.4	238.1	280.2	273.5	95.0	92.4	102.3
Total	12	69.1±60.0	57.1±45.0	65.1±68.4	59.1±67.3	48.3±61.7	49.9±74.8	49.2±72.9	35.2±28.4	35.9±28.8	37.3±30.7

CNS; Coagulase-negative staphylococci, OS; Other Streptococci, SA; *Staphylococcus aureus*

the bacterial species in the foremilk. The viable bacterial count in the SA-isolated foremilk was not significantly different from the foremilk with other bacterial species isolated. However, the somatic cell counts in the SA-isolated foremilk tended to be higher than in the foremilk with other bacterial species isolated. The somatic cell counts did not change significantly by differences in the foremilk volume samples, but bacterial counts in foremilk were significantly higher in the 5 mL group than in the 20 mL to 150 mL groups. The bacterial counts in foremilk were significantly higher in the 10 mL group than in the 50 mL to 150 mL groups. It has been reported that the somatic cell counts decrease in about 80 seconds immediately after the start of milking^{2,9)}. In addition, it has been reported that the electric conductivity values before and after milking are different⁸⁾, suggesting that the milk composition of the foremilk are different at the beginning, especially the first 5 mL. Thus, strict foremilk may not be properly tested for mastitis-causing bacteria.

The current study measured the somatic cell and bacterial counts in cow foremilk, and the findings suggest that there are higher levels of bacteria present in foremilk at the beginning of forestripping. Although somatic cell counts were not related to the amount of foremilk, it is related to the viable bacterial counts. Therefore, it was clarified that at least 20 mL or more of foremilk was necessary to maintain hygienic milk quality.

References

- 1) Adkins, R.F., Fox L.K., Godden S., et al. (2017) Laboratory Handbook on Bovine Mastitis, 3rd ed. National Mastitis Council Inc., New Prague, MN, USA
- 2) Bruckmaier R.M., Weiss D., Wiedemann M., et al. (2004) Changes of physicochemical indicators during mastitis and the effects of milk ejection on their sensitivity. *Journal of Dairy Research* 71, 316-321 DOI: <https://doi.org/10.1017/S0022029904000366>
- 3) Cha E., Smith R.L., Kristensen A.R., et al. (2016) The value of pathogen information in treating clinical mastitis. *Journal of Dairy Research* 83, 456-463. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0022029916000625>
- 4) Grönlund U., Johannisson A., Persson Waller K., (2006) Changes in blood and milk lymphocyte subpopulations during acute and chronic phases of *Staphylococcus aureus* induced bovine mastitis. *Research in Veterinary Science* 80, 147-154. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.05.002>
- 5) Halasa T., Nielsen M., De Roos A.P., et al., (2009) Production loss due to new subclinical mastitis in Dutch dairy cows estimated with a test-day model. *Journal of Dairy Science* 92, 599-606. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1564>
- 6) Jones G., Bork O., Ferguson S.A., et al. (2019) Comparison of an on-farm point-of-care diagnostic with conventional culture in analyzing bovine mastitis samples. *Journal of Dairy Research* 86, 222-225. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0022029919000177>
- 7) Jones G.M., Pearson R.E., Clabough G.A., et al. (1984) Relationships between somatic cell counts and milk production. *Journal of Dairy Science* 67, 1823-1831. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81510-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81510-6)
- 8) Khatun M., Bruckmaier R.M., Thomson P.C., et al. (2019) Suitability of somatic cell count, electrical conductivity, and lactate dehydrogenase activity in foremilk before versus after alveolar milk ejection for mastitis detection *Journal of Dairy Science* 107, 9200-9212. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15752>
- 9) Lehmann M., Wall S.K., Wellnitz O., et al. (2015) Changes in milk L-lactate, lactate dehydrogenase, serum albumin, and IgG during milk ejection and their association with somatic cell count. *Journal of Dairy Research* 82, 129-134 DOI: <https://doi.org/10.1017/S002202991400065X>

要 旨

本研究では、乳牛における前搾り乳汁量が生菌数および体細胞数に及ぼす影響を検討した。臨床的に健康なホルスタイン種雌牛12頭から12分房の乳汁を採取した。それぞれの分房乳150mLは、0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-50, 50-75, 75-100, 100-125 および125-150mLに分割して採取された。それぞれの前搾り乳汁において乳房炎原因菌の同定、生菌数および体細胞数を測定した。コアグラゼ陰性ブドウ球菌

(CNS) および連鎖球菌 (OS) の単独感染がそれぞれ4分房で検出され、両者の混合感染も4分房で検出された。また、黄色ブドウ球菌が1分房で検出された。0-5および5-10 mLで採取された前搾り乳汁の細菌数は、25-50, 50-75, 75-100, 100-125および125-150mLのそれに比較し有意 ($p < 0.05$) に高値を示した。体細

胞数では、各前搾り乳汁量による差は認められなかった。乳房炎防除を目的とした乳汁検査では、少なくとも20mL以上の前搾りを実施した後に、採乳することが重要であることが考えられる。

キーワード: 前搾り乳, 乳房炎, 生菌数, 体細胞数, ウシ

新型コロナウイルス SARS-CoV-2診断キットにおける 前処理試薬のウイルス不活化効果の評価

松浦遼介¹⁾・Lo Chieh-Wen^{1, 2)}・中川 優¹⁾・武井正美¹⁾・間 陽子^{1, 2, 3)}*

Evaluation of SARS-CoV-2 inactivation efficiency mediated by the reagent of COVID-19 diagnosis kits

Ryosuke Matsuura¹⁾, Chieh-Wen Lo^{1, 2)}, Masaru Nakagawa¹⁾, Masami Takei¹⁾, Yoko Aida^{1, 2, 3)}*

¹⁾ Division of Hematology and Rheumatology, Department of Medicine, Nihon University School of Medicine,
30-1 Oyaguchi, kami-cho, Itabashi, Tokyo 173-8610, Japan

²⁾ Laboratory of Global Animal Resource Science, Graduate School of Agricultural and Life Sciences,
the University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

³⁾ Benno Laboratory, Baton Zone Program, RIKEN Cluster for Science, Technology and Innovation Hub,
2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan

* Corresponding Author : Yoko Aida (aida@riken.jp))

(2021. 1. 28 受付 / 2021. 1. 31 受理)

Summary

Diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19) is mainly based on the detection of the RNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Since the handling of the clinical specimens which obtained from suspected or confirmed COVID-19 patient is conducted in biosafety level (BSL)-2 or BSL-3, respectively, sample transportation between the specimen collection facilities to the inspection facilities is sometimes needed. On the other hand, the handling of the clinical specimens in which SARS-CoV-2 is inactivated is in BSL-1. Long-term storage and transportation of clinical specimens for diagnosis have the potential risk of leakage as it is unclear whether SARS-CoV-2 within specimens is inactivated or not during the RNA extraction step. Here we show that all sample treatment reagents of viral RNA extraction kits and three out of four SARS-CoV-2 detection kits used in Japan could inactivate more than 99% SARS-CoV-2 in one minute. On the contrary, Universal Transport Medium which is recommended for the transportation of clinical specimens by World Health Organization and National Institute of Infectious Diseases did not inactivate SARS-CoV-2. These results provide the insight into the process by which SARS-CoV-2 is inactivated from RNA extraction to detection and ensure the safety during COVID-19 diagnose. In addition, we propose the possibility of a faster and safer diagnosis method by inactivating the collected clinical specimen on the spot and detecting the RNA of SARS-CoV-2 without BSL-2 and BSL-3 facilities.

Key words : COVID-19, SARS-CoV-2 inactivation, SARS-CoV-2 diagnosis kit reagent, viral RNA extraction kit reagent, Universal Transport Medium

家畜衛生学雑誌 46, 195~203 (2021)

¹⁾ 日本大学医学部 内科学系 血液膠原病内科学分野
〒173-8610 東京都板橋区大谷口上町30-1

²⁾ 東京大学大学院農学生命科学研究科 農学国際専攻国際動物資源科学研究室
〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

³⁾ 国立研究開発法人理化学研究所科技ハブ産連本部 辯野特別研究室

〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1

* 連絡担当：間 陽子 (aida@riken.jp)

序 文

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) は2019年12月に中国の湖南省武漢市で感染が報告されて以降、世界中に感染が広まり、パンデミックを引き起こしている⁸⁾。我が国でも感染者数は増加の一途をたどり⁶⁾、日本政府は2020年2月1日に新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) を指定感染症とした。現在の市中への蔓延化に伴って、COVID-19の診断に供する検体数の増加が見込まれるが、採材から遺伝子診断までの課程における検体の取り扱いに関わる感染リスク要因は未だ明らかになっていない。臨床の現場では、いかに安全に感染を広げずにSARS-CoV-2を診断するか、その検体の取り扱い手法の確立が急務となっている。

SARS-CoV-2遺伝子検査において、ヒト検体 (主に喀痰や気管吸引液の下気道由来検体、鼻咽頭ぬぐい液、唾液) の採取はbiosafety level (BSL) -1レベルで行われているが、採取された検体からのRNA抽出から遺伝子検査までの作業はSARS-CoV-2存在の疑い検体はBSL-2レベル、SARS-CoV-2存在の確定検体はBSL-3レベルが求められている⁵⁾。RNAウイルスであるSARS-CoV-2の遺伝子診断は検体からのRNA抽出を行うことが基本である²⁾。このウイルスRNA抽出の過程において、ウイルスの溶解が必要であるため、基本的にRNA抽出液はウイルスが不活性化された状態となる。ウイルス検査の運用においては、ウイルスが不活性化された検体の扱いはBSL-2レベルを必要としないと定義されているため、RNA抽出後のreal-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 等を用いた核酸増幅法によるウイルス遺伝子検査自体は、BSL-1レベルでの実施が可能である⁵⁾。そこで、一般的に検体採取後にできるだけ早期の段階でウイルス不活性化が担保されることが重要である¹⁾。しかし、実際にはSARS-CoV-2と同様にRNAウイルスであるエボラウイルスはSARS-CoV-2のRNA抽出に使われているQiaAmp viral RNA mini kit (QIAGEN) のサンプル処理試薬だけでは不活性化されないという報告がある⁴⁾。事実、RNA抽出キットによって、SARS-CoV-2が本当に不活性化されるどうかは検証されていない。

最近、検体中のウイルスからRNAを溶出したのちに、RNAの抽出・精製過程を省き、直接SARS-CoV-2の遺伝子検査を行うキットも販売されている。これらのキットを使用することで、より短時間かつ簡便にSARS-CoV-2の遺伝子診断が可能であるが、ウイルスの不活性化の過程が含まれていないために検体の取り扱いについては、RNA抽出と同様の設備が必要である。従って、可

能な限り早期にSARS-CoV-2を不活化することが求められている。

日本ではSARS-CoV-2の下気道由来検体はパラフィルムで封をしたスクリーキャップ付きプラスチックチューブに採取される⁷⁾。咽頭ぬぐい液は、スπιツ管中のウイルス輸送液あるいはリン酸緩衝液 (PBS) に懸濁される⁷⁾。唾液は滅菌容器に患者によって自己採取される⁷⁾。これらの検体は基本三重梱包を行い、公用車・社用車などの自動車または、世界保健機構 (WHO) の「感染性物質の輸送規制に関するガイダンス」におけるカテゴリーBに分類される臨床検体などの取り扱い可能な輸送業者を利用して、輸送される⁷⁾。つまり、現在日本で推奨されているマニュアルにおいて、検体は採材された後に、検査機関に到着し、ウイルスRNAの抽出が行われるまでは、感染性を有している。感染性を維持したウイルスの長期間の保存や輸送は時にウイルスの漏出のリスクとなりうる。仮にBSL-2レベル設備を有していない機関においても、検体を採取と同時に確実に不活化することができれば、後の核酸増幅などの操作も含めて、BSL-1レベルの設備でもウイルスRNAの検出が可能となると考えられる。

本研究では、国内で使用されているウイルスRNA抽出キットおよびSARS-CoV-2遺伝子検出キットのサンプル処理試薬、ウイルス輸送液であるUniversal Transport MediumのSARS-CoV-2の不活化能を明らかにした。

材料と方法

(1) 細胞およびウイルス

SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2/JPN/TY/WK-521株)³⁾ は国立感染症研究所より分与していただいた。Vero E6/TMPRSS2細胞³⁾ は10% 牛胎児血清 (FBS)、ペニシリン、ストレプトマイシンおよびL-グルタミン (PSG) および2% G418添加Dullbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) にて培養した。ウイルスの不活化試験には、2% FBSおよび1% PSG添加DMEM中のVero E6/TMPRSS2細胞にSARS-CoV-2を0.001 50% Tissue Culture Infectious Dose (TCID₅₀) の力価で感染させ、2日後に培養上清として、回収したものを使用した。

(2) 各試薬のウイルスの不活化能の測定

試験に供した試薬は表1のとおりである。ウイルスRNA抽出キットであるSmart Extract (株式会社ダナフォーム) のSSB, QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN) のBuffer AVL, Quick-RNA Viral kit

表1. 試験に用いた試薬

	本試験に用いた 試薬名	キット名	製造会社	URL
ウイルス RNA 抽出キット	SSB	SMART Extract	株式会社 ダナフォーム	https://www.dnaform.jp/ja/information/%e7%a0%94%e7%a9%b6%e7%94%a8%e8%a9%a6%e8%96%ac%e3%80%8c%e3%82%a6%e3%82%a4%e3%83%ab%e3%82%b9%e6%a4%9c%e4%bd%93%e6%8e%a1%e5%8f%96%e5%be%8c%e5%87%a6%e7%90%86%e6%b6%b2%e3%80%8d%e3%81%ae%e7%99%ba%e5%a3%b2/
	Buffer AVL	Viral RNA mini kit	QIAGEN	https://www.qiagen.com/jp/shop/pcr/qiaamp-viral-rna-mini-qiacube-kit/#resources
	Viral RNA Buffer	Quick-RNA Viral Kit	Zymo Research	https://www.zymoresearch.com/collections/quick-rna-viral-kits/products/quick-rna-viral-kit#components
	Lysis Buffer + Proteinase K solution	Maxwell [®] RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit	Promega	https://www.promega.jp/products/nucleic-acid-extraction/viral-rna-extraction-viral-dna-extraction/maxwell-rsc-viral-total-nucleic-acid-purification-kit/?catNum=AS1330#specifications
SARS-CoV-2 遺伝子 検出キット	DSR	Direct-SmartAmp 法	株式会社 ダナフォーム	https://www.dnaform.jp/ja/information/%e3%83%80%e3%82%a4%e3%83%ac%e3%82%af%e3%83%88%e6%96%b9%e5%bc%8f%e3%81%ab%e5%af%be%e5%bf%9c%e3%81%97%e3%81%9f%e6%96%b0%e5%9e%8b%e3%82%b3%e3%83%ad%e3%83%8a%e3%82%a6%e3%82%a4%e3%83%ab%e3%82%b9%e5%89%8d/
	Sample Treatment Reagent	2019新型コロナウイルス 検出試薬キット	株式会社 島津製作所	https://www.an.shimadzu.co.jp/bio/reagents/covid-19/index.htm
	前処理液	新型コロナウイルス 検出キット	東洋紡 株式会社	https://lifescience.toyobo.co.jp/detail/detail.php?product_detail_id=265
	Solution A	新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 検出キット	タカラバイオ 株式会社	https://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100009449
サンプル 輸送用 試薬	Universal Transport Medium	—	Copan	https://www.copanusa.com/sample-collection-transport-processing/utm-viral-transport/
陰性対照	リン酸緩衝液	—	ニッスイ	https://www.nissui-pharm.co.jp/pdf/products/059/05908.pdf

(Zymo Research) の Viral RNA Buffer, Maxwell[®] RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega) の Lysis buffer と Proteinase K solution の混合液を SARS-CoV-2 に対する不活化能を測定するために用いた。加えて、RNA 精製工程を省略し、直接試薬を混ぜるだけで SARS-CoV-2 の遺伝子診断が可能な SARS-CoV-2 遺伝子検出キットである Direct-SmartAmp (株式会社ダナフォーム) の DSR, 2019 新型コロナウイルス検出試薬キット (株式会社島津製作所) の Sample Treatment Reagent, 新型コロナウイルス検出キット (東洋紡株式会社) の前処理液, 新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 検出キット (タカラバイオ株式会社) の Solution A を SARS-CoV-2 に対する不活化能を測定するために用いた。さらに、ウイルス輸送試薬である Universal Transport Medium (Copan) を SARS-CoV-2 に対する不活化能を測定するために用いた。また、陰性対照として、PBS を用いた。

滅菌済みのフィンガーマッシャー (ザルスタット株式会社) 中の 200 μ L の試験試薬に、20 μ L の SARS-CoV-2 (ウイルス力価: 1.78×10^6 TCID₅₀/mL あるいは 3.16×10^7

TCID₅₀/mL) を加え、指で 10 度揉み、懸濁し、1, 5 および 10 分間室温で静置した。その後、50 μ L の懸濁液を、0.5% ウシ血清アルブミン添加 PBS で 1 時間平衡化した MicroSpin G-25 column (GE Healthcare) に加え、750 $\times$ g で 2 分間遠心した。濾液を再度 MicroSpin G-25 column に添加し、750 $\times$ g で 2 分間遠心後、濾液を 450 μ L の PBS で 10 倍希釈した。その後、ウイルス力価の測定を行った。

(3) ウイルス力価の測定

SARS-CoV-2 の力価の測定は TCID₅₀ 法を用いて行った。ウイルス感染の 24 時間前に 100 μ L の 2.0×10^5 個/mL の Vero E6/TMPRSS2 細胞を 96 穴プレートに播種した。力価を測定するウイルスサンプルを 1 倍から 10^7 倍まで 10 倍段階希釈し、培養上清を除いた Vero E6/TMPRSS2 細胞に 100 μ L のウイルス液を添加した。37°C, 5% CO₂ 環境下で 1 時間、静置したのちに、ウイルス液を取り除き、100 μ L の 10% FBS 含有 DMEM を加え、3 日間培養し、顕微鏡下で細胞変性効果を観察し、ウイルスの感染性を判定した。

(4) SARS-CoV-2の感染性の減少率の算出

各試薬の1分間の処理によるSARS-CoV-2の感染性の減少率は以下の計算式で、算出した。

$$(1 - (1 \text{ 分間の試薬処理後の感染性}) \div (1 \text{ 分間のPBS処理後の感染性})) \times 100 = (\text{各試薬の1分間の処理によるSARS-CoV-2の感染性の減少率}) (\%)$$

各試薬の1分間の処理によって、感染性が検出限界値以下に達していた場合には、上記の計算で産出された各試薬の1分間の処理によるSARS-CoV-2の感染性の減少率「以上」の不活化能を有すると判定した。

結 果

(1) ウイルスRNA抽出キットのサンプル処理試薬のSARS-CoV-2の不活化能

ウイルスRNA抽出キットのサンプル処理試薬のSARS-CoV-2の不活化能を確かめるために、200 μ LのSmart ExtractのSSB, QIAamp Viral RNA mini kitのBuffer AVL, Quick-RNA Viral kitのViral RNA Buffer, Maxwell[®] RSC Viral Total Nucleic Acid Purification KitのLysis bufferとProteinase K solutionの混合液に20 μ LのSARS-CoV-2（ウイルス力価： 1.78×10^6 TCID₅₀/mL）を添加した。また、陰性対照として、PBSを用いた。1分後、5分後、10分後に試薬の成分を除去するために、MicroSpin G-25 columnを用いて、2度濾過した。これらのサンプルの力価を測定したところ、Smart ExtractのSSBあるいはBuffer AVLで1分間、5分間、10分間処理したサンプルのいずれにおいても、感染性が認められず、力価は検出限界である1.0 TCID₅₀/mL以下であった（図1a）。一方で、Viral RNA bufferおよびLysis BufferとProteinase K solutionで処理したサンプルは、カラム濾過後にも細胞毒性が確認されたため、本実験では感染性を測定ができなかった（図1a）。陰性対照であるPBSで処理し、1分後にカラム濾過をしたサンプルの力価は、 1.0×10^4 TCID₅₀/mLであった（図1a）。このことから、1分間のSSBあるいはBuffer AVLによる処理で99.99%以上のSARS-CoV-2の不活化が可能であることが分かった。

カラム濾過後にも細胞毒性の残ったViral RNA bufferおよびLysis BufferとProteinase K solutionの混合液については、より正確に不活化能を測定するために、より高力価のSARS-CoV-2を用いて、再試験を行った。20 μ LのSARS-CoV-2（ウイルス力価： 3.16×10^7 TCID₅₀/mL）を200 μ LのViral RNA bufferおよびLysis BufferとProteinase K solutionの混合液に添加し、1分後、5分後、10分後に2度濾過した。これらのサンプルの力価

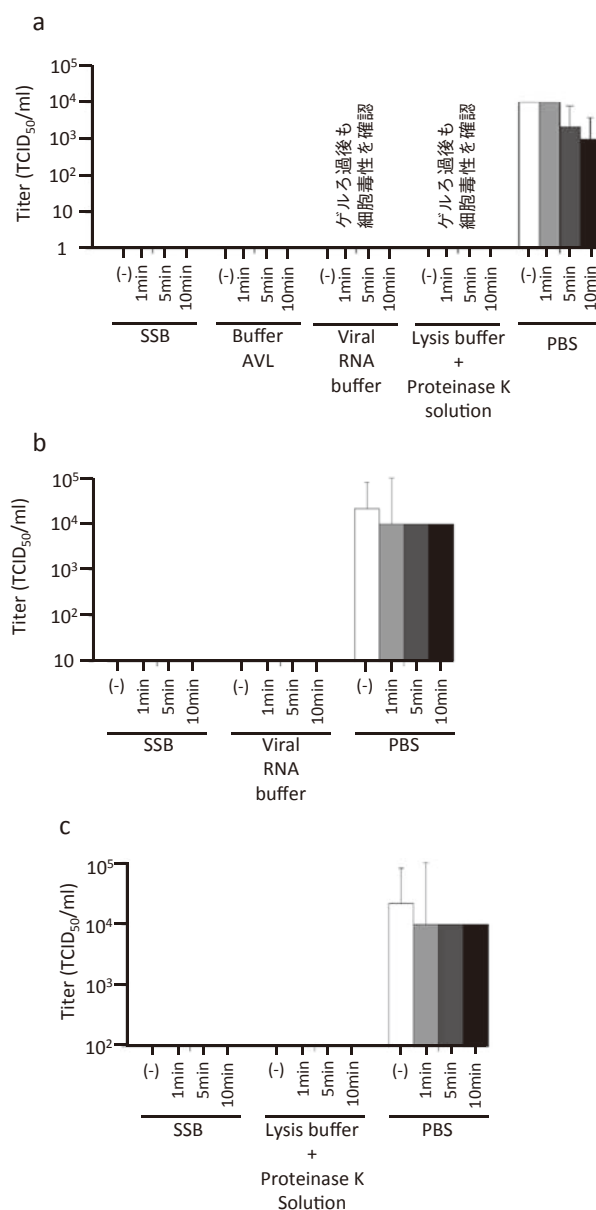


図1. ウイルスRNA抽出キットのサンプル処理試薬のSARS-CoV-2の不活化能の測定。

200 μ LのSmart extractのSSB, QIAamp Viral RNA mini kitのBuffer AVL, Quick-RNA Viral kitのViral RNA Buffer, Maxwell[®] RSC Viral Total Nucleic Acid Purification KitのLysis bufferとProteinase K solutionの混合液に20 μ LのSARS-CoV-2（ウイルス力価： 1.78×10^6 TCID₅₀/mL）を添加し、1分後、5分後、10分後に、MicroSpin G-25 columnを用いて、2度濾過し、TCID₅₀法で力価を測定した（a）。カラム濾過後にも細胞毒性の残ったViral RNA Buffer（b）およびLysis BufferとProteinase K solutionの混合液（c）については、より正確に不活化能を測定するために、より高力価のSARS-CoV-2（ウイルス力価： 3.16×10^7 TCID₅₀/mL）を用いて、試験を行った。また、陰性対照としてPBSを用いた。棒グラフは力価の平均値と標準偏差を示している。（-）はカラム濾過なしを示している。

をTCID₅₀法によって測定した(図1b, c). Viral RNA bufferで処理したサンプルは1倍希釈では細胞毒性が確認されたが, 10倍希釈することで細胞毒性が認められなくなった. そのため, 検出限界10 TCID₅₀/mLでの力価の検出が可能であった. また, 10倍希釈したサンプルを加えた細胞において, SARS-CoV-2による細胞変性は確認されなかった. このことから, Viral RNA bufferで処理したサンプルの力価は検出限界である10 TCID₅₀/mL以下であった(図1b). 一方, Lysis BufferとProteinase K solutionの混合液で処理したサンプルは1倍希釈, 10倍希釈では細胞毒性が確認されたが, 100倍希釈することで細胞毒性がみられなくなった. そのため, 検出限界100 TCID₅₀/mLでの力価の検出が可能であった. また, 100倍希釈したサンプルを加えた細胞において, SARS-CoV-2による細胞変性は確認されなかった. このことから, Lysis BufferとProteinase K solutionの混合液で処理したサンプルの力価は検出限界である100 TCID₅₀/mL以下であった(図1c). 陰性対照であるPBSで処理し, 1分後にカラム濾過をしたサンプルの力価は, 1.0×10^4 TCID₅₀/mLであった.

このことから, 1分間のViral RNA bufferによる処理で99.9%以上のSARS-CoV-2の不活化が可能であること, 1分間のLysis BufferとProteinase K solutionの混合液による処理で99%以上のSARS-CoV-2の不活化が可能であることが明らかになった.

また, PBSで処理したサンプルにおいて, カラム濾過

を行ったサンプルとカラム濾過を行わなかったサンプル間に, 大きな感染性の減少は認められないことから, 各試薬の処理による感染性の減少は試薬によるSARS-CoV-2の不活化であると考えられる.

(2) SARS-CoV-2遺伝子検出キットのサンプル処理試薬の不活化能

SARS-CoV-2遺伝子検出キットのサンプル処理試薬のSARS-CoV-2の不活化能を確かめるために, 200 μ LのDirect-SmartAmpのDSR, 2019新型コロナウイルス検出試薬キットのSample Treatment Reagent, 新型コロナウイルス検出キットの前処理液, 新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)検出キットのSolution Aに20 μ LのSARS-CoV-2(ウイルス力価: 1.78×10^6 TCID₅₀/mL)を添加した. また, 陰性対照として, PBSを用いた. 1分後, 5分後, 10分後に試薬の成分を除去するために, MicroSpin G-25 columnを用いて, 2度濾過した. これらのサンプルの力価を測定したところ, DSRあるいは前処理液で処理し, 1分後, 5分後, 10分後にカラム濾過したサンプルでは, 感染性が認められず, 力価は検出限界である1.0 TCID₅₀/mL以下であった(図2a). 一方で, Sample treatment reagentで処理したサンプルは1分間の処理で 1.0×10^3 TCID₅₀/mL, 5分間の処理で 4.6×10^2 TCID₅₀/mL, 10分間の処理で 4.6×10 TCID₅₀/mLと時間依存的に感染性が減少したが, SARS-CoV-2は完全には不活化されなかった(図2a). また, Solution A

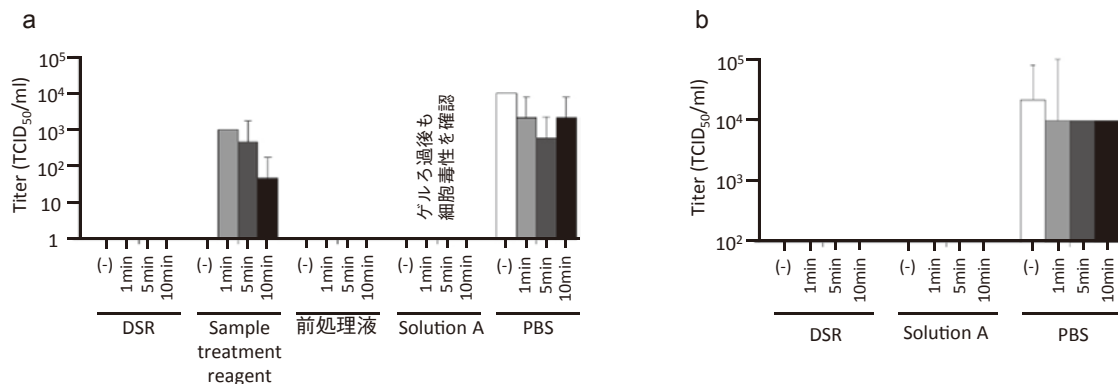


図2. ウイルスRNA抽出キットのサンプル処理試薬のSARS-CoV-2の不活化能の測定.

20 μ LのSARS-CoV-2(ウイルス力価: 1.78×10^6 TCID₅₀/mL)を200 μ LのDirect-SmartAmpのDSR, 2019新型コロナウイルス検出試薬キットのSample Treatment Reagent, 新型コロナウイルス検出キットの前処理液, 新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)検出キットのSolution Aに混合し, 1分後, 5分後, 10分後に, MicroSpin G-25 columnを用いて, 2度濾過し, TCID₅₀法で力価を測定した(a). カラム濾過後にも細胞毒性が残ったSolution Aについては, より正確に不活化能を測定するために, より高力価のSARS-CoV-2(ウイルス力価: 3.16×10^7 TCID₅₀/mL)を用いて, 試験を行った(b). また, 陰性対照としてPBSを用いた. 棒グラフは力価の平均値と標準偏差を示している. (-)はカラム濾過なしを示している.

で処理したサンプルは、カラム濾過後にも細胞毒性が確認されたため、本実験で感染性は測定できなかった。(図2a)。陰性対照であるPBSで処理し、1分後にカラム濾過をしたサンプルの力価は、 2.2×10^3 TCID₅₀/mLであった(図2a)。

この結果から、1分間のDirect-SmartAmpのDSRあるいは新型コロナウイルス検出キットの前処理液による処理で99.9%以上のSARS-CoV-2の不活化が可能であったが、1分間のSample Treatment Reagentによる処理では53.6%の不活化であることが明らかになった。

カラム濾過後にも細胞毒性の残ったSolution Aについては、より正確に不活化能を測定するために、より高力価のSARS-CoV-2を用いて、再試験を行った。20 µLのSARS-CoV-2(ウイルス力価： 3.16×10^7 TCID₅₀/mL)を200 µLのSolution Aに添加し、1分後、5分後、10分後に2度濾過した。これらのサンプルの力価をTCID₅₀法によって、測定した。Solution Aで処理したサンプルは1倍希釈、10倍希釈では細胞毒性が確認されたが、100倍希釈することで細胞毒性がみられなくなった。そのため、検出限界100 TCID₅₀/mLでの力価の検出が可能であった。また、100倍希釈したサンプルを加えた細胞において、SARS-CoV-2による細胞変性は確認されなかった。このことから、Lysis BufferとProteinase K solutionの混合液で処理したサンプルの力価は検出限界である100 TCID₅₀/mL以下であった(図2b)。陰性対照であるPBSで処理し、1分後にカラム濾過をしたサンプルの力価は、 1.0×10^4 TCID₅₀/mLであった。この結果から、新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)検出キットのSolution Aによる1分間の処理で99%以上のSARS-CoV-2の不活化が可能であることが明らかになった。

また、PBSで処理したサンプルにおいて、カラム濾過を行ったサンプルとカラム濾過を行わなかったサンプル間に、大きな感染性の減少は認められないことから、各試薬の処理による感染性の減少は試薬によるSARS-CoV-2の不活化であると考えられる。

(3) Universal Transport MediumのSARS-CoV-2の不活化能

ウイルス輸送用試薬であるUniversal Transport MediumのSARS-CoV-2に対する不活化能を測定するために、20 µLのSARS-CoV-2(ウイルス力価： 1.78×10^6 TCID₅₀/mL)を200 µLのUniversal Transport Mediumに混合した。また、陽性対象としてSSBを、陰性対照としてPBSを用いた。混合後、1分後、5分後、10分後にUniversal Transport Mediumの成分を除去するために、MicroSpin G-25 columnを用いて、2度濾過し

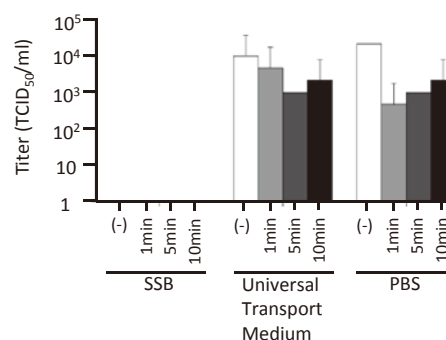


図3. ウイルス輸送用試薬であるUniversal Transport MediumのSARS-CoV-2の不活化能の測定。

20 µLのSARS-CoV-2(ウイルス力価： 1.78×10^6 TCID₅₀/mL)を200 µLのUniversal Transport Mediumに混合し、1分後、5分後、10分後に、MicroSpin G-25 columnを用いて、2度濾過し、TCID₅₀法で力価を測定した。また、陽性対象としてSSBを、陰性対照としてPBSを用いた。棒グラフは力価の平均値と標準偏差を示している。(－)はカラム濾過なしを示している。

た。これらのサンプルの力価を測定したところ、Universal Transport Mediumを1分間、5分間、10分間処理し、カラム濾過をしたサンプルにおいて、感染性の減少が認められなかった(図3)。

このことから、ウイルス輸送用試薬であるUniversal Transport MediumのSARS-CoV-2に対する不活化能を有さないことが明らかになった。

考 察

本研究ではウイルスRNA抽出キットおよびSARS-CoV-2遺伝子検出キットのサンプル処理試薬、ウイルス輸送液であるUniversal Transport MediumのSARS-CoV-2の不活化能について検証し(表2)、3つの主要な成果が得られた。

第一に日本国内で使用されているウイルスRNA抽出キットのサンプル処理試薬、Smart ExtractのSSB、QIAamp Viral RNA mini kitのBuffer AVL、Quick-RNA Viral kitのViral RNA BufferおよびMaxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification KitのLysis bufferとProteinase K solutionの混合液は全てSARS-CoV-2に対する不活化能を有し、1分間の処理で99%以上のSARS-CoV-2を不活化することが明らかになった。各キットのサンプル処理試薬は、検体をはじめに処理する試薬であることから、本結果は検体からのウイルスRNA抽出の際に、速やかにウイルスが不活化されることを示している。第二にSARS-CoV-2遺伝子検出キットのサンプル処理試薬であるDirect-SmartAmpのDSR、

表2. 各試薬のSARS-CoV-2に対する不活化能のまとめ

	本試験を用いた試薬名	感染性の減少（1分後）
ウイルスRNA抽出キット	SSB	99.99%以上
	Buffer AVL	99.99%以上
	Viral RNA Buffer	99.9%以上
	Lysis Buffer + Proteinase K solution	99%以上
SARS-CoV-2遺伝子検出キット	DSR	99.9%以上
	Sample Treatment Reagent	53.60%
	前処理液	99.9%以上
	Solution A	99%以上
サンプル輸送用試薬	Universal Transport Medium	なし

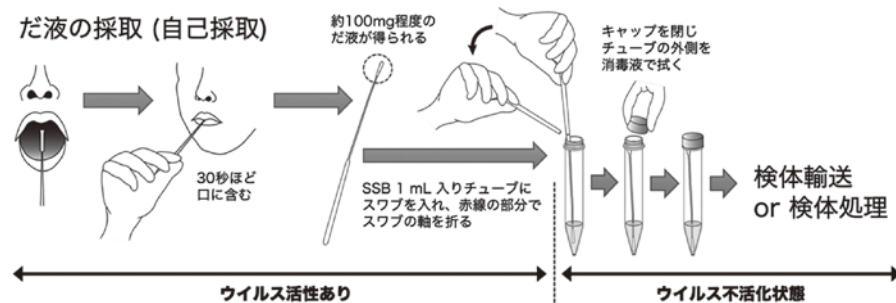


図4. SMART Extractの唾液サンプルの採材法。

SMART Extractに付属するスワブを被検者自身が口腔内に入れて、30秒以上唾液をスワブに含浸させる。その後、スワブをフィンガーマッシャー中のSSBに浸し、懸濁する。懸濁後に速やかに唾液中のSARS-CoV-2は不活化されると考えられる。

新型コロナウイルス検出キットの前処理液、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）検出キットのSolution AがSARS-CoV-2に対する不活化能を有し、1分間の処理で、99%以上のSARS-CoV-2を不活化することを明らかにした。一方で、2019新型コロナウイルス検出試薬キットのSample Treatment Reagentは時間依存的にSARS-CoV-2を不活化したが、他の試薬と比較した際にはその不活化能は弱く、10分間の処理でも、完全にはSARS-CoV-2を不活化することができなかった。本研究で用いたSARS-CoV-2遺伝子検出キットは全てサンプル処理試薬との混合後、5分間の加熱処理を必要とし、ウイルスもその過程で不活化されると考えられる。しかし、本研究の結果から試薬との混合だけでは、ウイルスが完全には不活化されない試薬もあることから、検体の取り扱いには慎重に行う必要がある。また、採材した検体を直接試薬で処理し、不活化することで、BSL-2設備がない施設においても、速やかにSARS-CoV-2の診断が可能となることが考えられるが、サンプル処理試薬の不活化能が弱い場合にはそのような適応は難しいと考えられる。第三にウイルス輸送液であるUniversal Transport Medium

がSARS-CoV-2の不活化能を有さないことを明らかにした。Universal Transport Mediumはウイルスや微生物の輸送、維持、長期保存を行うための試薬であり、SARS-CoV-2の不活化能がないことは、ウイルスの感染性を保ったまま、BSL-2やBSL-3を有する研究施設に輸送することで、ウイルスの単離や性質の調査が可能となるため、非常に重要な性質である。国立感染症研究所もUniversal Transport MediumやUniversal Transfer MediumやViral Transport Mediumで輸送することを推奨している⁷⁾。しかし、ウイルスからRNAの抽出が行われていない場合には基本三重梱包を行い、公用車・社用車などの自動車または、WHOの「感染性物質の輸送規制に関するガイダンス」におけるカテゴリーBに分類される臨床検体などの取り扱い可能な輸送業者を利用した輸送が必須である。このように厳重に輸送をするため、漏出のリスクはきわめて低いと考えられるが、ウイルスの遺伝子診断のみを行う際には、ウイルスを不活化してから運ぶことにより、さらに感染リスクを低減することができると考えられる。

本研究で試験した試薬のうち、特にSmart Extractの

SSBおよびDirect-SmartAmpのDSRは鼻咽頭ぬぐい液あるいは唾液をスワブで採材したのちに、直接スワブをSSBに浸し、ウイルスを溶出することが想定されている(図4)。本研究結果から、スワブで採材された検体中のウイルスは採材後にSSBおよびDSRによって速やかに不活化されると考えられる。これはSARS-CoV-2の漏出や検体からの感染のリスクを非常に低減するだけでなく、BSL-2設備を持たない施設においても、採材後速やかにウイルスRNAの抽出及び検出が行える可能性を示唆している。同様にQIAamp Viral RNA mini kitのBuffer AVLは、検体との混合後、10分以上のインキュベーションがマニュアル中で推奨されていないが、注釈として、10分以上のインキュベーションをしても、ウイルスRNAの品質に影響しないことが明記されている。このため、採材した検体を速やかにBuffer AVLで処理することで、ウイルスを不活化した状態で輸送・保存が可能であるかもしれない。一方で、現行の唾液の採取は、主に患者によって滅菌チューブの中に1-2 mL程度の自己採取とされている⁷⁾。採取された検体は、その後BSL2設備へと輸送され、診断に用いられるが、それまでの間、検体中のウイルスは感染性を維持しているものと考えられ、ウイルスの漏出のリスクを有すると考えられる。

本研究において、2019新型コロナウイルス検出試薬キットのSample Treatment Reagentは他の試薬と比較して、不活化能が弱いことが示された。本研究で使用した試薬の組成は完全には公開されていないため、推測の域を出ないが、このような不活化能の違いは試薬の組成を反映しているものと考えられる。試薬の成分が完全には公開されていない現状においては、各キットの試薬が不活化能を有するかは本研究のような試験が必要であると考えられる。一方で、本研究結果は全ての試薬について、推奨されているプロトコルとは異なる一定の液量で、培養ウイルス液と混合して、行われたものであるため、実際の検体を処理した際に、本研究と全く同じ不活化能を示さない可能性は存在する。しかし、本研究において得られた各キットのサンプル処理試薬の不活化能の有無の知見は、今後医療従事者が遺伝子診断をするにあたり、どのキットをどのように使用することで感染防御ができるかを示すきわめて重要なものである。また、本研究結果は、BSL-2やBSL-3設備のない施設においても、採取された検体をその場で不活化し、診断することで、より速やかな遺伝子診断ができる可能性を提言する成果である。

本評価研究の遂行にあたり、文部科学省「地域イノベーション・エコシステム形成プログラム」における平

成30年度採択事業、神奈川県および地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所(KISTEC)による神奈川県「ヘルスケア・ニューフロンティア」先導プロジェクトからのご支援を頂きましたこと、深く感謝いたします。

引用文献

電子ジャーナル

- 1) van Bockel D., Munier CML., Turville S., et. al. (2020) Evaluation of Commercially Available Viral Transport Medium (VTM) for SARS-CoV-2 Inactivation and Use in Point-of-Care (POC) Testing. *Viruses*. 12:1208. doi:10.3390/v12111208.
- 2) Corman VM., Landt O., Kaiser M., et. al. (2020) Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*. 25:2000045. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
- 3) Matsuyama S., Nao N., Shirato K., et. al. (2020) Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 117:7001-7003. doi: 10.1073/pnas.2002589117.
- 4) Smither SJ, Weller SA, Phelps A, et. al. (2015) Buffer AVL Alone Does Not Inactivate Ebola Virus in a Representative Clinical Sample Type. *J Clin Microbiol*. 53:3148-54. DOI: 10.1128/JCM.01449-15.

インターネット

- 5) 厚生労働省：新型コロナウイルス感染症に係る病原体核酸検査のみを行うために臨時的に開設した衛生検査所における感染管理や精度管理等について [Internet]. 2020 Mar. [cited 2021 Jan. 27]; Available from: <https://www.pref.ehime.jp/h25500/kansen/documents/eiseikensajo-kanri.pdf>.
- 6) 厚生労働省：新型コロナウイルス感染症の現在の状況と厚生労働省の対応について（令和3年1月27日版） [Internet]. 2021 Jan. [cited 2021 Jan. 27]; Available from: https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_16375.html
- 7) 国立感染症研究所：2019-nCoV（新型コロナウイルス）感染を疑う患者の検体採取・輸送マニュアル（2020年7月17日更新版） [Internet]. 2020 Jun. [cited 2021 Jan. 27]; Available from:

https://www.niid.go.jp/niid/images/pathol/pdf/2019-nCoV_200717.pdf

- 8) World Health Organization: Novel coronavirus (2019-nCoV) situation report-1
[Internet]. 2020 Jan 21
[cited 2020 Mar. 10]; Available from :
<https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200121-sitrep-1-2019-ncov.pdf>.

要 旨

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の遺伝子検査に供する検体の取り扱い、SARS-CoV-2存在の疑い検体は biosafety level (BSL) -2レベル、SARS-CoV-2存在の確定検体はBSL-3レベルが求められているため、時に検体を採材した施設から検査施設への輸送が必要となる。一方、SARS-CoV-2が不活化された検体の扱いはBSL-1レベルとなる。しかし、感染性を維持したウイルスの長期間の保存や輸送は時にウイルスの漏出のリスクとなりうるが、SARS-CoV-2が不活化されているかは明

確になっていない。本研究では、国内で使用されているウイルスRNA抽出キットのうち、研究に使用した4種中4種のサンプル処理試薬およびSARS-CoV-2遺伝子検出キットのうち、研究に使用した4種中3種のサンプル処理試薬が1分以内にSARS-CoV-2を99%以上不活化することを明らかとした。一方で、ウイルス輸送液である Universal Transport Medium はSARS-CoV-2を不活化しないことが確認された。本成果は、ウイルスRNA抽出キットおよびSARS-CoV-2遺伝子検出キットを使用するにあたり、どの過程において、SARS-CoV-2が不活化されるかの知見を与え、より安全にウイルス感染の診断が可能となる。また、BSL-2やBSL-3設備のない施設においても、採取された検体をその場で不活化し、診断することで、より速やかな遺伝子診断ができる可能性を提言しうる成果である。

キーワード：COVID-19, SARS-CoV-2不活化, SARS-CoV-2遺伝子検出キット試薬, ウイルスRNA抽出試薬, Universal Transport Medium

2019年に埼玉県で発生した豚熱（CSF）の概要と防疫対応

伊藤麗子¹⁾・留場寛子²⁾・梶 友香²⁾ #・田代卓也³⁾・成田沙織³⁾・福田昌治⁴⁾ *

An outbreak of classical swine fever (CSF) and epidemic prevention measures in Saitama Prefecture, 2019

Reiko Ito¹⁾, Hiroko Tomeba²⁾, Yuka Kunugi²⁾ #, Takuya Tashiro³⁾, Saori Narita³⁾, Masaharu Fukuda⁴⁾ *

¹⁾ Livestock Safety Division, Department of Agriculture and Forestry, Saitama Prefectural Government, 3-15-1 Takasago, Saitama-shi, Saitama 330-9301, Japan

²⁾ Saitama Prefectural Kumagaya Livestock Hygiene Service Center, 1-8-30 Enko, Kumagaya-shi, Saitama 360-0813, Japan

³⁾ Saitama Prefectural Kawagoe Livestock Hygiene Service Center, 152 Ishida, Kawagoe-shi, Saitama 350-0837, Japan

⁴⁾ Saitama Agricultural Technology Research Center, 784 Sugahiro, Kumagaya-shi, Saitama 360-0102, Japan

Present address : Repro Co., Ltd., 1472-5 Shimonara, Kumagaya-shi, Saitama 360-0802, Japan

* Corresponding author : Masaharu Fukuda (fukuda.masaharu@pref.saitama.lg.jp)

(2021. 1. 13 受付／2021. 1. 27 受理)

家畜衛生学雑誌 46, 205～215 (2021)

1. 緒 言

2018年9月に岐阜県において豚熱（Classical Swine Fever : CSF）が発生した。国内では1992年以来、26年振りであり、その後、防疫対策の再徹底などの方策が図られたが、愛知県、三重県、福井県と中部地方を中心に感染拡大が続いた。この間、野生イノシシでの感染拡大も確認され、岐阜県での初発からちょうど1年になる2019年9月には、埼玉県でCSFが発生した。これは2018年以降、関東における初めての農場発生であり、関係者に与えた衝撃は大きく、国のCSF防疫政策がワクチン接種へと大きく舵を切る転機となった。本稿では、今後の初動対応の参考とするため、2019年9～11月に埼玉県で発生したCSFの概要と発生農場における防疫対応の実際について報告する。

2. 発生概要

2019年9月13日、埼玉県秩父市の養豚場で国内41例目となるCSFの発生が確認された。その後、同月17日に2例目、10月に3、4例目、11月9日に5例目が確認された（図1）。5例6農場はいずれも県北西部に位置し、殺処分した豚の頭数は合計7,612頭であった。埼玉県内では36年振りの発生であり、現役の県職員にとっては未経験のCSF発生となった。特に3例目では、台風と重なり、防疫対応は困難を極めた。5例目は、県内のワクチン接種開始に伴い実施したワクチン接種前の清浄性確認検査において摘発された農場である。清浄性確認検査は、当該農場が最後であったため、発生農場の防疫措置と他の農場のワクチン初回接種を同時並行で実施することとなった。さらに、1例目発生直後に県内で初めて死

¹⁾ 埼玉県農林部畜産安全課
〒330-9301 埼玉県さいたま市浦和区高砂3-15-1

²⁾ 埼玉県熊谷家畜保健衛生所
〒360-0813 埼玉県熊谷市円光1-8-30

³⁾ 埼玉県川越家畜保健衛生所
〒350-0837 埼玉県川越市石田152

⁴⁾ 埼玉県農業技術研究センター
〒360-0102 埼玉県熊谷市須賀広784

現所属：リプロ株
〒360-0802 埼玉県熊谷市下奈良1472-5

* 連絡著者：福田昌治 (fukuda.masaharu@pref.saitama.lg.jp)

亡野生イノシシでのCSF感染が確認され、その後、農場発生地域を中心に野生イノシシのCSF陽性事例が確認された。

3. 防疫対応

埼玉県内で特定家畜伝染病が発生した場合、「埼玉県特定家畜伝染病防疫事務の手引き」(以下、手引き)¹⁾に基づき図2に示す体制で防疫措置を行うこととしていた。現地作業班の班員は県内3カ所の家畜保健衛生所(以下、家保)及び畜産関係機関の職員(全て家畜防疫員)である。防疫作業従事者(以下、作業員)は広く県職員から構成され、延べ3,196名(うち農場内作業員

2,430名)を動員した。他部局からの応援獣医師数は延べ145名であった。一連のCSF発生農場における防疫対応(殺処分、埋却、消毒ポイント、集合施設)の状況と課題について以下に報告する。

(1) 殺処分

患畜の殺処分等、発生農場の防疫対応は、現地対策本部(図2)のうち、発生農場班が担当した。5例のCSF発生農場において、殺処分にはそれぞれ1～4日を要し、防疫措置の完了には3～8日を要した(表1)。1班13～18名の家畜防疫員で作業に従事した。1, 2例目は防疫措置完了まで全員が交代無しで作業し、3例目以

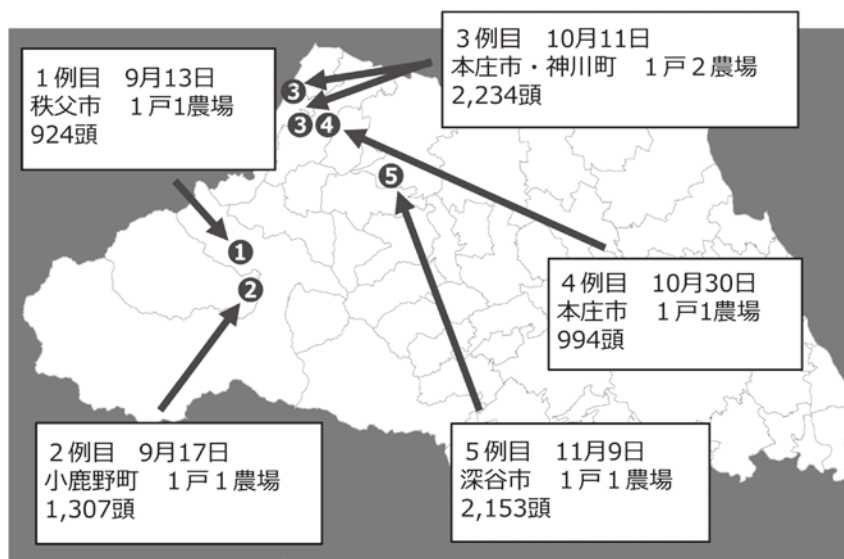


図1. 発生状況

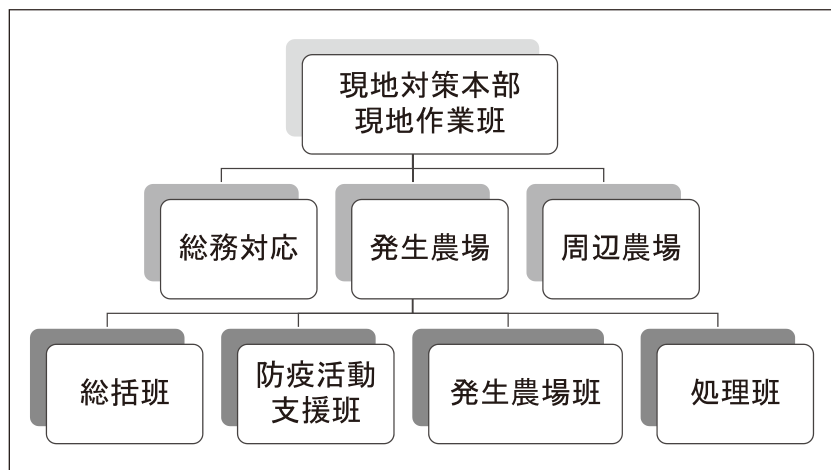


図2. 埼玉県内における特定家畜伝染病発生時の体制

降は1日3交代制で作業に従事した。

1) 概要

殺処分方法は、1例目では育成豚以下の子豚はガス殺、肥育豚以上の豚は1、2頭を豚舎出入口まで追い出して電殺・薬殺を行った。しかし、ガス殺は時間がかかること、電殺は追い出しに時間がかかるなどの問題が判明したため、その後の発生では少人数で実施可能な簡易的な殺処分法に適宜変更するとともに動線も見直していった。2例目では肥育豚は1頭ずつ通路に出すのではなく、豚房内で一気に殺処分した後に引き出す方法にしたところ、作業時間が短縮された。以後、哺乳豚のみガス殺を行い、他の豚は豚房内およびストール内で電殺した(図3)。雄豚は、2例目ではストール内に追い込んだ後、鎮静剤(マフロパン1%注射液、DSファーマアニマルヘルス(株)、大阪)で鎮静し電殺したが、より安全に実施するため、3例目以降はストール内に追い込んだ後、ストール上部に縄をかけ、豚の飛び出しを物理的に封じたうえで電殺を行った。

死体はフレコンバック(以下、フレコン)に詰めした後、重機で移動させ、埋却地へ搬出されるまで農場内に集積した。豚舎内で殺処分した死体は、豚舎外まで人力で引き出す必要があったため、ブルーシートを豚舎の通

路に敷き、シート上に粘稠性のある消毒薬と水を撒き、死体を引き出す際の摩擦を減らす工夫をした。

2) 課題

殺処分作業遂行上の課題として以下の3点が挙げられた。

a) 作業マニュアル通りの対応が困難

ア. 農場の立地や構造の違い

2例目では、山間地域に豚舎があり、平坦な場所が少なかったため、フレコンの集積場所が豚舎から遠かった。また、3例目及び5例目では、豚舎間の通路幅や農場の敷地が狭く、重機利用に制限があった。これらの条件により、搬出作業に時間を要した。

イ. 豚舎内の電源や給水設備の不足

複数の電殺機や夜間の照明に利用できる電気容量、洗浄や消毒に用いる水道の不足などで作業効率が低下した。

ウ. 自然災害の影響

3例目では台風19号の関東直撃と重なったため、人命を優先し、発生の3日後からの作業開始となったが、豚舎屋根の破損と雨水の浸入により豚房の泥漿化が発生し(図4)、殺処分が難航した。

表1. 防疫措置の概要

発生例	発生場所	農場数	殺処分頭数	殺処分日数(時間)	防疫措置日数	農場動員作業員数	応援獣医師数	発生農場防疫員
1	秩父市	1	924	2 (26)	4	420	19	24時間体制 (13~18人)
2	小鹿野町	1	1,307	2 (25.3)	3	550	33	
3	神川町・本庄市	2	2,234	4 (73.5)	8	900	24	
4	本庄市	1	994	1 (23)	3	240	15	交代制 (14人)
5	深谷市	1	2,153	2 (48)	7	320	54	
合 計		6	7,612			2,430	145	



図3. 豚房内での殺処分



図4. 豚房の泥漿化

b) 資材調達の遅れ

発生が週末や祝日に重なってしまったため、物資が発生農場に届くまで時間がかかり、殺処分開始の遅れなどが見られた。また、事前に準備していた資材リストに記載がなかったフレコンなどの資材が届かないトラブルも発生した。

c) 発生農場での家畜防疫員の不足

発生農場での家畜防疫員は、農場内での殺処分や搬出導線を把握・共有し、一般作業員や応援獣医師へ指示出しに専念することが理想であるが、仮設テントの設営、機材準備等の雑務に追われ、本来の業務に支障が生じた。

また、3例目以降、家畜防疫員は1日3交代のシフト制に変更したが、これにより農場内に常時いる家畜防疫員が1、2例目に比べ極端に少なくなってしまった。さらに、家畜防疫員と応援獣医師のシフトがずれていたため、情報共有がうまくできず農場内の作業効率が上がらなかった。

3) 対応策

a) 作業マニュアルの作成

農場の畜舎構造や配置などに応じて対応できる作業マニュアルを作成する。

b) 必要資材リストの作成

必要な資材を網羅したリストを作成するとともに、備蓄を充実させることや、民間企業等との資材調達協定を締結することも重要であると考え、特に備蓄に関しては投光器や動力噴霧器など、発生後すぐに必要になる資材を中心に準備する必要がある。

c) 応援獣医師との連携強化

家畜防疫員と応援獣医師のシフトを調節するなど、応援獣医師を家畜防疫員と同じ立場で作業ができるように他部局との連携を図ることが重要である。

(2) 埋却

死体の埋却作業は、現地対策本部(図2)のうち、処理班が担当する。「豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針」(以下、指針)²⁾には、死体の処理は原則として発生農場の病原体拡散防止措置完了後72時間以内に完了することと記載されており、埋却地の選定から埋却完了まで迅速な対応が求められる。しかし、実際の現場では事例ごとに様々な問題が発生し、それぞれの状況により個別に埋却方法を検討する必要があった。

1) 概要

埋却地の選定について指針²⁾には、「埋却地は人家、水源、河川および道路に近接しない場所であって、日常、人及び豚等が接近しない場所に限る」とされてい

る。本県での発生事例における埋却地の立地状況として次のような問題点があった。

(1, 4例目) 埋却地に住宅が隣接

(2, 3, 5例目) 埋却地から200m以内に住宅

(4, 5例目) 水路や国道、高速道路が近接

埋却処理は、死体を直接埋却溝に投入する方法が一般的であるが、本県の発生例においては、埋却地が農場から離れた場所にある事例が多かったため、死体はフレコンに梱包して運搬後、埋却溝に投入した。消毒は、フレコンをトラックに積み込む際に1つずつ実施し、さらに発生農場および埋却地に設置した動力噴霧器で車両全体の消毒を実施した。

飼養衛生管理基準³⁾では、埋却地の広さは肥育豚1頭当たりおよそ0.9㎡と想定している。本県の発生においても、これに基づいて埋却に必要な面積を決定した。

埋却作業は、以下のような手順で実施した(図5)。

a) 掘削

b) 底面に消石灰を散布

c) 底面および法面をブルーシートで覆う

d) ブルーシート上に再度消石灰を散布

e) 死体や汚染物品を詰めたフレコンを投入

f) 投入完了後、土を少し埋め戻して平坦にし、消石灰を散布

g) 法面を覆っていたブルーシートはフレコンを包むように折り返し、消石灰を散布

h) 完全に土を埋め戻して転圧

i) 消石灰散布

殺処分した頭数、埋却したフレコンの数、実際に埋却に使用した埋却地の面積、掘削した埋却溝のサイズは、表2のとおりである。

5例のうち、指針に定められている72時間以内に埋却を完了したのは2例のみで、他の3例では、農場内の堆肥や飼料の搬出に時間を要したこと、砂利質土壌のため埋却溝崩落の危険があったこと、埋却地が農場から遠いことなどから、作業に時間を要した(図6)。

2) 課題

埋却地に関する課題は、以下の3点に集約された。

a) 埋却地と住宅や水路との位置関係や道路状況等の周辺環境に関する事前情報の不足

発生以前に家保で保有している埋却地に関する情報が限られ、実際に現地確認をした際に明らかになる情報が多くあった。

b) 湧水、土壌の性質等の影響

湧水や土壌の性質等により、掘削の際に特別な対応が必要となる場合があった。これらも実際に現地での掘削作業開始後に判明するケースが多く、その都度柔軟な対



図 5．埋却方法

表 2．埋却状況の詳細

発生例	頭 数	フレコン数	面積 (a)	埋却溝サイズ (幅×長さ×深さm)
1	924	899	30	5×20×5×2本 + 県有地
2	1,307	738	20	6×30×5
3	2,234	705	16	6×50×4.5 + 6×15×4.5 (L字型)
4	994	374	27	5×40×4
5	2,153	819	23	5×50×4 + 4×15×4 (L字型)
合 計	7,612	3,535	116	

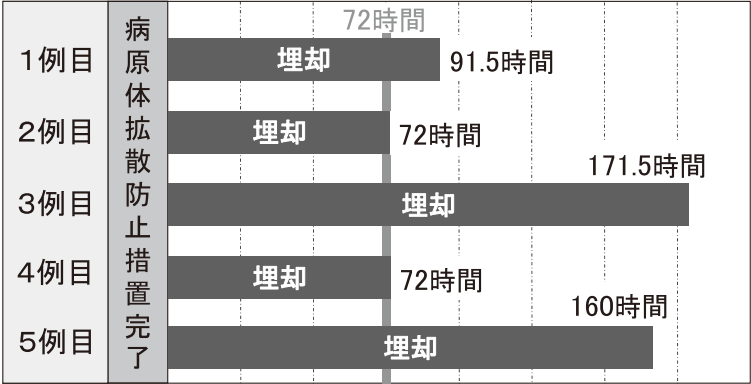


図 6．埋却処理の経過

応が必要となった。

c) 近隣住民への説明

本県では農場および埋却地が住宅街に近いケースが多く、防疫措置の開始にあたって近隣住民への説明が必要であり、時間を要した。

これらは他の農場において発生した際にも埋却地選定の際に明らかになり得る課題であり、家畜伝染病発生の際の円滑な埋却処理の妨げとなる可能性が考えられた。

3) 対応策

a) 発生経験を活かした農家指導

日頃の農家立入の中で、埋却地の土壌の性質や湧水が出る可能性の有無、周辺道路の広さについての聞き取りおよび現地確認を行っておくことが必要である。また、発生に備え埋却地への進入路を広く確保し、木などの障害物を除去しておく指導も必要である。

b) 不測の事態への対応方法についての事前の検討

湧水や土壌の性質等に関しては実際に掘削するまで不明なことが多いため、事前にあらゆる事案を想定し、どのような対応ができるかを演習する。本県での発生経験や他県の発生事例からの情報を収集し、起こり得る様々な問題を想定しておくことで、発生の際の想定外の事態にも柔軟に対応することができるようになると考えられた。

c) 市町村との協力体制の強化

近隣住民への説明は、資料を作成し地域で回覧板を回す、住民を集めて説明会を開催するなど、様々な方法が考えられる。発生後の住民対応の方法を事前に市町村と協議し、役割分担を整理しておくことで、発生の際の住民対応をより円滑に行うことができると考えられた。

(3) 消毒ポイント

現地対策本部(図2)のうち、移動規制班は、消毒ポイントの設置および発生農場における防疫措置を円滑に進めるための通行制限を担当した。消毒ポイントでは、車両外部の消毒、ハンドルやペダルなどの運転席内部の消毒、運転手等の手指及び靴底消毒を実施し、消毒作業終了後、運転手に消毒日時、積荷、発着地等を記録させ、最後に消毒済証明書を発行した。

今回、5例の発生に伴い、移動規制班は合計12カ所の消毒ポイントを設置し、その運営と消毒業務については、「口蹄疫等家畜伝染病発生時における緊急対策に関する基本協定」に基づき、一般社団法人埼玉県ペストコントロール協会(以下、PC協会)に委託して実施した。

1) 概要

a) 消毒ポイント設置状況

消毒ポイントの設置場所については、市町村との事前調整により選定した候補地を基本とし、特定家畜伝染病の発生時には道路網の状況、車両の通行量等を考慮して設置場所を決定した。埼玉県では便宜上、消毒ポイントを表3に示すとおり緊急消毒ポイントと通常消毒ポイントの2種類に区分した。5例の発生に伴い設置した緊急消毒ポイント及び通常消毒ポイント計12カ所の位置及び概要について図7および表4に示す。

3例目では発生農場から直線距離で約6kmの距離にある関連農場でも発生農場と同様の防疫措置を実施したため、それぞれの農場から1km付近に計2カ所の緊急消毒ポイント(⑥⑦)を設置した。また、一連の発生では、近距離に所在する農場で相次いで発生したため、続発する発生農場で継続使用した箇所が多かった(②～④、⑥⑧⑨)。

b) 消毒実績

2～4例目の緊急消毒ポイント(⑤⑥)は、防疫作業従事者の集合施設を兼ねており、関係車両を消毒する頻度が高かったため、消毒台数が多かった。

通常消毒ポイントでは、畜産農家の比較的多い県北地域に向かう関係車両の通行が多い箇所(②)や、付近にと畜場が存在する箇所(⑧)の消毒台数が多かった。消毒実施時間帯の調査では、②において稼働開始時刻の午前9時前にも消毒の記録があり、⑧でも午前7～9時が19%と割合が高く、比較的早い時間帯にも需要があることが示唆された。また、消毒車両の職種別割合は、②においては飼料運搬会社35%、農協15%、家畜商13%と続き、家畜診療獣医師(3%)や養豚農家(1%)も含まれていた。⑧では、飼料運搬会社が60%を占めた他、付近にと畜場が存在するため、養豚農家が23%(31台)と比率が高く、うち4台は県外農家であった。

2) 課題

a) 敷地の広さ

消毒ポイント(⑪)は、敷地が狭く、大型車両が進入できなかったため、広い敷地へ変更して欲しいという要

表3. 消毒ポイントの区分

区分	設置場所	設置期間
緊急消毒ポイント (24時間稼働)	発生農場周辺 (農場から概ね1km)	防疫措置 完了まで
通常消毒ポイント (9～17時が基本)	移動制限区域・ 搬出制限区域の境界 (CSFでは3km・10km)	制限解除 まで

望が飼料運搬業者などから挙がった。

b) 稼働時間

と畜場への生体の運搬は早朝に行われることが多いため、と畜場周辺の消毒ポイントでは午前6時や午前7時からの稼働が必要となった。また、飼料運搬車両は早朝や夜間に運行していることも多いため、飼料工場周辺の消毒ポイントでは、必要に応じ稼働時間を延長した。

c) 稼働期間

稼働期間延長及び年末年始の稼働についても飼料運搬業者などから要望された。

3) 対応策

狭い敷地の消毒ポイント(⑪)については、市役所等の関係機関と調整し、大型車両が進入可能な広い場所(⑫)に変更して対応したところ、消毒台数が大幅に増

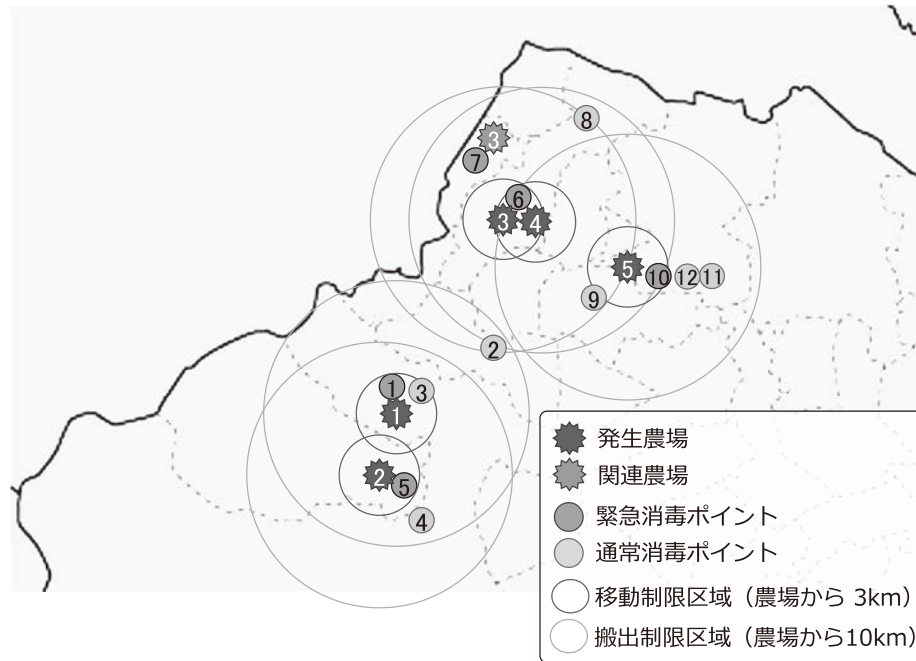


図7. 消毒ポイント12カ所の位置

表4. 消毒ポイント12カ所の概要

No.	区分	発生例	消毒台数	稼働期間 (日)	1日平均消毒 台数	立地状況
①	緊急	1	21	3	7.0	
②	通常	1, 2	247	35	7.1	
③	通常	1, 2	62	35	1.8	
④	通常	1, 2	12	35	0.3	
⑤	緊急	2	246	4	61.5	防疫作業者の集合施設内
⑥	緊急・通常※	3, 4, 5	627	48	13.1	防疫作業者の集合施設内
⑦	緊急	3	342	8	42.8	関連農場付近
⑧	通常	3, 4, 5	135	9	15.0	付近にと畜場あり
⑨	通常	3, 4	48	33	1.5	大型車両の侵入不可
⑩	緊急	5	235	8	29.4	
⑪	通常	5 (変更前)	10	3	3.3	⑪は大型車両が侵入不能のため、
⑫	通常	5 (変更後)	274	19	14.4	より広い⑫に変更

※3, 4例目で緊急消毒ポイントとして使用後、5例目で通常消毒ポイントとして使用

加した。稼働時間については、市町およびPC協会と調整し、午前6時30分から、または午後7時まで延長して対応した。稼働期間延長および年末年始の稼働については、関係市に改めて協力依頼するとともにPC協会と調整し、通常消毒ポイント2カ所（⑧⑫）について年度末（2019年3月31日）まで稼働を延長した。また、年末年始は運転手自身が消毒する形式で運営を継続した。

今後の対応として、消毒ポイント候補地について平時から市町村と再度調整を行うこととした。この際、現地で大型車両の進入の可否並びに水源、排水経路及び電源の有無を確認し、設置箇所や車両動線を想定しながら候補地を選定することとした。緊急時において、と畜場、飼料工場周辺および県境付近では車両消毒の需要が高いため、消毒ポイントの設置を積極的に検討することとした。消毒ポイントを運営する中では利用者から様々な要望が挙がるため、市町村等の関係機関と調整し、可能な限り積極的に応じていくことが重要であると考えられた。

（4） 集合施設

特定家畜伝染病が発生すると、防疫措置のために防疫作業従事者（以下、従事者）が動員され、発生農場近隣に設置した集合施設を基点として防疫作業に従事する。この際に集合施設の運営を担当するのが防疫活動支援班（以下、支援班）である。支援班担当者は6名から成り、発生を疑う段階から防疫作業の開始までに集合施設の体制整備を行った。

1) 概要

支援班の具体的な業務内容は、集合施設の調整、従事者の受け入れ・送り出し、従事者の健康管理、必要資機材の調達・搬入・搬出、従事者の食事等の調達などが挙げられる。集合施設を選ぶ際の条件として、24時間かつ1週間程度の借り上げが可能であり、最大200人程度の

収容が可能であること、出発前と帰着後の動線が区分可能であること等が挙げられる。

今回のCSF発生における集合施設の運営にあたっては、「動線の確保、資機材の管理、従事者の作業中の安全確保、ウイルスが持ち込まれないための備え」の4点に配慮した。なお、一連の集合施設稼働状況は表5のとおりである。

a) 動線の確保について

動員された従事者は、集合施設に到着後、受付をし、健康調査や作業内容等の説明を受け、必要資材を受け取り、着替えて、バスで農場に出発した。作業が終了し、バスで集合施設に戻ると帰着時入口で手指の消毒やうがいを行い、自分の荷物を受取り、出発時とは別の更衣室で着替え、退庁時刻を記帳し、帰宅した（図8）。

各集合施設により使用できる出入口やトイレ、更衣室等の数や位置が異なるため、作業に出発する従事者と農場から帰着する従事者の動線を交差させないように考慮した。集合施設が体育館の場合（図9）では、構造的に使用できる部屋数が少ないことから、アリーナ部分を出発エリアと帰着時エリアの半分に区切り、帰着時エリアに仮設の更衣エリアを設置して対応した。また、市の福祉施設を活用した場合では、110畳の和室をパーティションで3部屋に区切り、出発時の作業説明や更衣室として使用し、帰着時の更衣室として大浴場を活用した。

b) 資機材について

集合施設には従事者だけでなく、数多くの資機材も搬入され、支援班はこれらの管理も行った。初動で全てを揃えることができないため、随時発注や搬入・搬出を行った。迅速かつ効率的に初動防疫を行うため、従事者へ配布する資材は全て袋から出して事前に準備した。

c) 従事者の作業中の安全確保

作業中の安全を確保するため、従事者に対し、出発前に作業内容・注意事項、防護服の着用方法を丁寧に説明

表5. 集合施設稼働状況

発生例	発生場所	支援班員数	稼働日数	従事者動員数	バス実台数	バス延べ便数
1	秩父市	6	5	570	中型2台	54
2	小鹿野町	6	5	591	大型1台 中型2台	60
3	神川町・本庄市	6	12	969	中型1台	152
4	本庄市	6	5	392	大型2台 中型2台	42
5	深谷市	6	8	674	大型1台	20
合 計			35	3,196		328

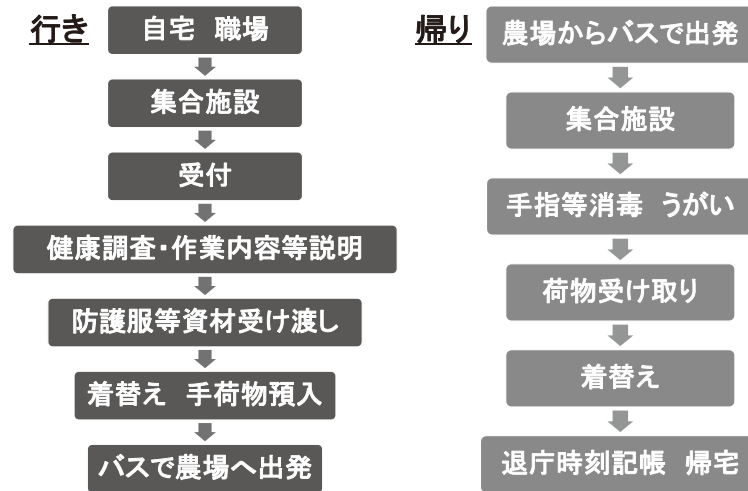


図8. 従事者の受け入れから退出まで

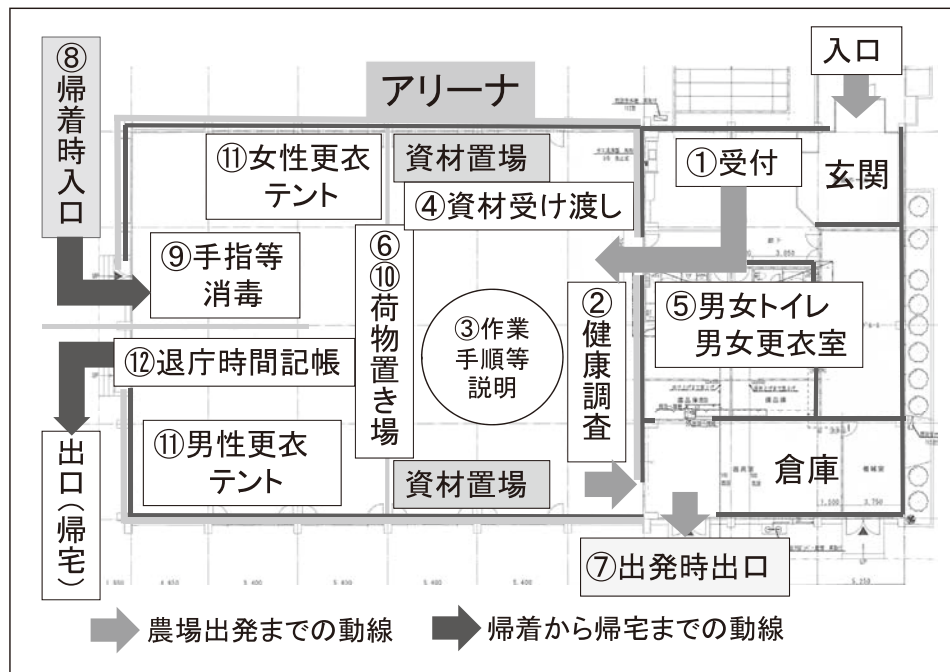


図9. 集合施設の動線設置例（3例目：体育館）

するとともに、保健師や看護師も動員し、従事者への健康調査や救急対応を行った。また、救急対応や少人数の輸送、資機材の移送を行う公用車ドライバーの他、2例目以降からは集合施設内で支援班業務を補助する従事者も動員された。

健康調査の結果、計60人以上が腰痛等、体調に不安があり、保健師と相談のうえ、農場での作業ではなく、集

合施設での支援班業務へ作業を変更した。健康状態によっては、従事させずにそのまま帰宅させたケースもあった。また、農場での作業中に体調不良者や負傷者が発生することもあり、保健師が現場に急行することもあった。

d) ウイルスが持ち込まれないための備えについて
帰着時の消毒は、農場からCSFウイルスが持ち込ま

れた場合に備え、従事者の手指消毒とうがいに加えて足元の消毒も重視し、使い捨て靴下の使用や消毒槽の設置による素足の消毒も行うようにした。

3) 課題

発生例を重ねるごとに改善された点も多いが、課題もいくつか残った。

集合施設を中心とした交通手段については、バスの大きさや使用台数が農場の周辺環境によって変わり、路線数が多く運行シフトが非常に複雑となるケースもあり、運行管理や乗り間違い防止等に細心の注意が求められた。そのため、輸送計画の見直しが課題であると考えられた。従事者に対しては、要所での人員点呼確認や体調不良者への速やかな対応と負傷者発生防止、従事者の従事後の心のケアが課題と考えられた。資機材に関しては、安定的な確保や、フォークリフトの運転手等有資格者の確保が課題と考えられた。

4) 対応策

今後の対応として、マニュアルの見直しや従事者の安全・安心のための動員前の情報提供が必要であると考えられた。また、支援班担当者6名が24時間体制で運営せざるを得なかったことから、集合施設運営スタッフの人員確保や、平時からの各関係機関との連携も重要であると考えられた。今後もより迅速かつ効率的な集合施設の運営に向け検討を重ね、体制を整える必要がある。

4. まとめおよび現在の取組み

一連の発生では、地元市町、県警、協定締結団体など多方面の協力を得、初発からほぼ3カ月目の12月15日、県内全ての発生例の制限区域を解除した(図10)。本県では以前から発生を想定した資材のリストアップおよび備蓄、作業マニュアルの整備、防疫演習などを実施していたが、実際の防疫措置では想定外の事象が多く発生し、現場の混乱は大きかった。

同年11月1日からは、県内でワクチン接種を開始したが、農場の防疫措置と同時進行で制限区域内の全ての農場についてワクチン接種前の清浄性確認検査を実施することとなり、家畜防疫員は一層不足した。各県から家畜防疫員を派遣いただき検査を進めることができたが、最後に検査を実施した農場が5例目の発生となってしまったことは非常に残念であった。続発を防ぐには、ワクチンの初回接種を早急に完了させる必要があったため、新たに他部局の獣医師を家畜防疫員に任命し、230余名の体制で2020年1月22日に初回接種を完了させた。その後、県内における新たな農場発生はなく、発生農場5戸のうち、3戸は2020年度に経営を再開した。

飼養豚でのCSF発生に伴い、野生イノシシの浸潤状況確認検査も始まった。農場発生以降、県内の野生イノシシでもCSF感染が確認されていたことから、交差汚染防止対策のため2019年12月より、野生イノシシのCSF



図10. 5例の防疫対応の経過

検査場所を病性鑑定施設のある中央家保から川越家保に移し、専任の担当者を配置した。また、県内3家保の家畜防疫担当者を発生前の18名から2020年度は24名に増員するとともに、畜産安全課の家畜防疫担当者も4名から6名に増員した他、家畜衛生業務を総括する家畜衛生幹を新たに配置した。

今回、県内のCSF発生に係る防疫対応により明らかになった様々な課題を検証した結果、本県では家畜防疫員が本来の役割を発揮できるような防疫体制の整備が必要であることが明らかとなった。防疫措置において家畜防疫員である獣医師が従事すべき業務、家畜防疫員である必要がない業務を精査し、現在、防疫体制の抜本的な見直しを進めている。高病原性鳥インフルエンザを始めアフリカ豚熱などの発生リスクを踏まえ、今後も発生時の迅速かつ的確な防疫対応に備えていきたい。

引用文献

- 1) 埼玉県農林部畜産安全課 (2017) 埼玉県特定家畜伝染病防疫事務の手引き. 埼玉県.
- 2) 農林水産省 HP: 豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針,
https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/katiku_yobo/k_bousi/attach/pdf/index-31.pdf
- 3) 農林水産省 HP: 飼養衛生管理基準 (豚, いのしし),
https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/katiku_yobo/k_shiyou/attach/pdf/index-127.pdf

第46巻 総目次

第46巻 第1号 2020

〈原著〉

北海道東部における乾乳軟膏の使用状況と分娩後の泌乳期乳房炎発生との関連性
 北野菜奈・菊 佳男・山田倫明・樋口雅也・高橋俊彦 1～6

Effect of presence of ciliate protozoa on the rumen fermentation and antioxidant activity of calves
 Masudur R Gazi・Naoto Aoki・Shuhei Kanda・Hisao Itabashi 7～13

〈特集〉 2018年より中部地方で発生している豚熱（CSF）について

1. 我が国における豚熱（CSF）の発生 青木博史・佐藤真澄 17～19
2. 我が国における豚熱（CSF）の発生と対応 室賀紀彦・菊池栄作 21～26
3. 2018年からわが国で発生しているCSFについて 深井克彦 27～32
4. イノシシによる国内でのCSFウイルスの拡散について 小寺祐二 33～38
5. 豚熱（CSF）ウイルスの分子生物学とワクチン 迫田義博 39～43
6. 我が国におけるCSFの防疫 津田知幸 45～48

会員へのおしらせ 49～57

家畜衛生学雑誌投稿規程 58～59

日本家畜衛生学会会則 60～61

第46巻 第2号 2020

〈原著〉

冬季の家畜運搬車におけるタイヤ噴射装置を利用した消毒法の検討と衛生意識の向上の取り組み
 中蘭将友・永井郁雄・手塚 聡・川内京子・宮根和弘・中岡祐司 67～71

バルク乳中体細胞数生産量上位牛の疫学を基にした乳房炎予防対策
 榎谷雅文 73～80

泌乳期に接種した牛乳房炎多価不活化ワクチンの乳中生菌数および体細胞数に与える影響
 北野菜奈・高橋俊彦 81～87

2007～2019年における牛呼吸器由来菌の薬剤感受性
 坂下満明・加藤晶子・廣瀬和彦 89～98

会員へのおしらせ 99～100

家畜衛生学雑誌投稿規程 101～102

日本家畜衛生学会会則 103～104

第46巻 第3号 2020

〈第92回大会講演要旨集〉

輸入初生ひなにおける薬剤耐性大腸菌保有状況調査

..... 吉田英二・久保顕志・古野美南子・西口明子 113~116

管内養豚場におけるCSF発生予防に向けた取り組み

..... 清水誠之・今井 文 117~120

カンガルー病に罹患した動物園飼育下オオカンガルーからのフソバクテリウム属菌の分離

..... 真砂聖令菜・高橋能理子・谷地田敬佑・齊藤純子
 外平友佳理・内田郁夫・鈴木一由・村田 亮 121~124

〈特別Web座談会「The 消毒」要旨集〉

企画説明 白井淳資 127

消毒の基礎 三宅眞佐男 129~138

豚環境の消毒 三宅眞佐男 139~144

牛環境の消毒 高橋英穂 145~150

鶏環境の消毒 大内義尚 151~154

家畜衛生学雑誌投稿規程 155~156

日本家畜衛生学会会則 157~158

第46巻 第4号 2021

〈総 説〉

日本における家畜用ワクチンの現状と将来展望

..... 平山紀夫 165~179

〈原 著〉

パイン粕サイレージおよび紅茶粕が乳牛のルーメン発酵と乳生産に及ぼす影響

..... 青木直人・東浦裕紀・佐藤 幹・神田修平・板橋久雄 181~188

Effect of Sampling Volume for Viable Bacterial Count and Somatic Cell Count in Cows' Foremilk

..... Nana Kitano・Yoshio Kiku・Satoshi Gondaira・Toshihiko Takahashi 189~193

新型コロナウイルスSARS-CoV-2診断キットにおける前処理試薬の

ウイルス不活化効果の評価

..... 松浦遼介・Lo Chieh-Wen・中川 優・武井正美・間 陽子 195~203

〈技術資料〉

2019年に埼玉県で発生した豚熱（CSF）の概要と防疫対応

..... 伊藤麗子・留場寛子・梶 友香・田代卓也・成田沙織・福田昌治 205~215

第46巻総目次 217~220

会員へのおしらせ 221

家畜衛生学雑誌投稿規程 222~223

日本家畜衛生学会会則 224~225

General Contents of Vol.46

Vol. 46 No. 1 2020

〈Original report〉

The relationship between the use of antibiotics at drying off period and the occurrence of postpartum mastitis in eastern Hokkaido

..... Nana Kitano *et al.* 1 ~ 6

Effect of presence of ciliate protozoa on the rumen fermentation and antioxidant activity of calves

..... Masudur R Gazi *et al.* 7 ~ 13

〈Special topic〉 Outbreak of classical swine fever from 2018 in Japan

1. Outbreak of classical swine fever in Japan

..... Hiroshi Aoki and Masumi Sato 17~19

2. Classical swine fever outbreak and control measure in Japan

..... Norihiko Muroga and Eisaku Kikuchi 21~26

3. Characteristics of classical swine fever that has occurred since 2018 in Japan

..... Katsuhiko Fukai 27~32

4. Free-living wild boars spread classical swine fever in Japan

..... Yuji Kodera 33~38

5. Molecular biology and vaccine of classical swine fever

..... Yoshihiro Sakoda 39~43

6. Control strategies of classical swine fever in Japan

..... Tomoyuki Tuda 45~48

Information for Members 49~57

Instruction for Authors 58~59

The Regulations of The Japanese Society of Animal Hygiene 60~61

Vol. 46 No. 2 2020

〈Original report〉

Analysis of truck tire disinfectants in cold weather and promotion of hygienic awareness among husbandry workers

..... Masatomo Nakazono *et al.* 67~71

Improving of bulk tank milk quality based on epidemiology of cows with high producing somatic cell counts

..... Masafumi Enokidani 73~80

Effects of bovine mastitis polyvalent inactivated vaccine inoculated during lactation on milk bacterial and somatic cell counts

..... Nana Kitano and Toshihiko Takahashi 81~87

Antimicrobial Susceptibility of Microbial Isolates from Bovine Respiratory Organs in 2007-2019

..... Mitsuaki Sakashita *et al.* 89~98

Information for Members 99~100

Instruction for Authors 101~102

The Regulations of The Japanese Society of Animal Hygiene 103~104

Vol. 46 No. 3 2020

〈Abstracts of oral presentations on 92th academic meeting〉	111~124
〈Abstracts of web discussion meeting “The disinfection”〉	125~154
Instruction for Authors	155~156
The Regulations of The Japanese Society of Animal Hygiene	157~158

Vol. 46 No. 4 2021

〈Review〉 The present and future of domestic animal vaccines in Japan Norio Hirayama	165~179
〈Original report〉 Effect of pineapple bran silage and dried black tea residue on rumen fermentation and milk production in dairy cows Naoto Aoki <i>et al.</i>	181~188
Effect of sampling volume for viable bacterial count and somatic cell count in cows' foremilk Nana Kitano <i>et al.</i>	189~193
Evaluation of SARS-CoV-2 inactivation efficiency mediated by the reagent of COVID-19 diagnosis kits Ryosuke Matsuura <i>et al.</i>	195~203
〈Technical report〉 An outbreak of classical swine fever (CSF) and epidemic prevention measures in Saitama Prefecture, 2019 Reiko Ito <i>et al.</i>	205~215
Contents of volume 46	217~220
Information for Members	221
Instruction for Authors	222~223
The Regulations of The Japanese Society of Animal Hygiene	224~225

会員へのおしらせ

① 「日本家畜衛生学会第92回大会」開催される

日本家畜衛生学会第92回大会が誌上発表されました。本年は、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の拡大防止の観点から、家畜衛生学雑誌第46巻3号において誌上発表により行われました。一般演題は3題の発表があり、内容に関する質疑応答は学会事務局で取り次ぐという形で行われました。

② 特別Web座談会「The 消毒」開催される

当初企画しておりました家畜衛生フォーラム2020の実施が新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の拡大防止の観点から困難であるとの判断から、代替企画としてオンラインリアルタイム配信による特別Web座談会が2020年12月19日（土）に実施されました。座談会は（一財）生物科学安全研究所との共催で開催され、白井淳資座長の進行により消毒の基礎と現場への応用について、以下の3名の先生方による4題の講演が行われました。当日は約170名の参加者があり、牛サルモネラ症や豚熱、高病原性鳥インフルエンザといった重要家畜伝染病防止に欠かすことのできない衛生管理の一つである消毒方法について活発な議論が交わされました。Web開催という初の試みでありましたが、チャット機能を利用した活発な質疑応答がなされました。なお、特別Web座談会「The 消毒」講演要旨については、本誌46巻3号（2020.12発行）をご覧ください。

1. 消毒の基礎
三宅眞佐男（AB Consulting（株））
2. 豚環境の消毒
三宅眞佐男（AB Consulting（株））
3. 牛環境の消毒
高橋英穂（北海道 計根別農業協同組合）
4. 鶏環境の消毒
大内義尚（茨城県畜産センター肉用牛研究所）

【お詫び】

今回の特別Web座談会への参加は完全予約制とし、事務局から参加アドレスと講演要旨を事前にメール連絡することとしておりましたが、一部の方に不達となっておりました。事務局の不手際でご迷惑をおかけしたことを、心より深くお詫び申し上げます。

「家畜衛生学雑誌」投稿規程

1. 本誌には原則として、家畜衛生に関する原著論文、短報、総説（刷り上がり4頁以下のミニレビューを含む）、技術資料を掲載する。なお、原稿は編集委員会事務局へ電子メール添付（PDFファイル）で提出する。印刷原稿3部（うち2部は鮮明なコピーでもよい）の書留郵便あるいはレターパックによる提出も可とする。
2. 投稿にあたり、論文掲載までの対応を行う連絡著者（コレスポンディングオーサー）は、投稿原稿が他誌にすでに掲載あるいは投稿中ではないこと、著者全員が投稿論文の内容及び掲載に同意していることを記載した文書（カバーレター）を提出すること。
3. 筆頭著者あるいは連絡著者は本学会会員であることが望ましいが、投稿の要件とはしない。
4. 掲載論文は原著論文、短報、総説（刷り上がり4頁以下のミニレビューを含む）、技術資料とする。
5. 全ての投稿論文は編集委員及び複数の審査員が審査し、編集委員長が掲載の採否を決定する。
6. 投稿論文は和文または英文とし、次の指示（記述順序など）に従うこと。
 - 1) 論文原稿は別に定める注意に従って作成すること。用紙サイズはA4とし、和文の場合は30字で25行程度、英文の場合はダブルスペース（70字で25行程度）とする。原稿本文の左側に行番号を表記すること。
 - 2) 和文の場合も句読点は「,」「.」「」を用いること。
 - 3) 論文原稿は第1ページに表題、著者名、所属機関名およびその所在地を和文と英文で記載するとともに、連絡著者とその電子メールアドレスを記載する。また、和文の場合は20字、英文の場合は40字以内の略表題（running head）を記載する。
 - 4) 原著論文の構成は原則として、Summary（本文が和文の場合も英語）、序文（Introduction）、材料および方法（Materials and Methods）、結果（Results）、考察（Discussion）、引用文献（References）、要旨（本文が和文であっても英文であっても、和文の要旨）とする。ただし、謝辞は、別項目を設けず、本文の最後に1行の空白をとった後に記載する。
 - 5) 英文Summaryは250語以内、和文要旨は600字以内とし、それぞれの最後の行に5つ以内の

Key words（キーワード）をつける。

- 6) 英語論文および和文論文の英文Summaryは、投稿前にしかるべき校閲を受けること。
 - 7) 原著論文で刷り上り8頁（30文字×25行＝750文字で、図表を含めて16枚程度）までは、印刷費を本学会で負担する。ただし、超過ページについては、その費用を著者の負担とする。なお、総説についてはこの限りではない。また、カラーや特殊な用紙での印刷は、その費用を著者の負担とする。
 - 8) 使用する動植物・微生物などの学名はイタリック体で表記する。
 - 9) 度量衡の単位、略記はSI単位系を基本とし、以下の例に従う。
- [例] m, cm, mm, μ m, nm, kg, g, mg, μ g, ng, L, mL, μ L, nL, M, mM, μ M, %, cm^2 , m^3 , hr, min, sec, $^{\circ}\text{C}$, pH, Pa（血圧はmmHg, 生体内圧力はTorr）など。
- 10) 表および図（写真を含む）は用紙1枚に1つとし、個々に番号と表題を記入し、投稿原稿の最後に添付する。
 - 11) 引用文献は下記の例にならって、アルファベット順にならべ、本文中では1), 3-6) のように上付き（superscript）で記入する。ただし、著者名は3名までとし、4人目以降は省略し、「ら」, 「et al」で示す。

[例]
雑誌

- 1) 内田孝治・藤井武・高山公一ら (1991) プロイラーにおける実験的大腸菌症に対するラノフロキサシンの治療効果および用量設定試験. 家畜衛生研究会報. 33, 19-24.
- 2) Oshida, T., Fukuyasu, T., Kohzaki, K., et al. (1993) A new treatment system for animal waste water using microorganism, soil and vegetation. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 6, 205-209.

電子ジャーナル

- 3) Wilson, D.J., Rood, K.A., Bunnell, J., et al. (2014) Johne's disease, mycoplasma and BVD in Utah-Bulk tank milk testing and comparison

to previous regional prevalence and individual herd results over time. Journal of Veterinary Science and Technology. 5:182. doi: 10.4172/2157-7579.1000182.

単行書

- 4) 伊予部志津子 (1980) 薬剤耐性因子 (R) の検出法, 薬剤感受性測定法. 22-48頁. 三橋進編, 講談社, 東京.
 - 5) McDonrd, P. (1976) Trends in silage making, Microbiology in Agriculture, Fisheries and Food. pp109-121. Shinner, F.A and Carr, J.G. eds. Acad. Press, London, NY.
- 12) 図はグラフィックソフトウェアで作成することが望ましい. 手書きで作成する場合は, そのまま製版できるよう, 白色紙または青色方眼紙にタイプやレタリングなどにより作成する.
 - 13) 投稿原稿が受理 (掲載決定) されたならば, 著者はすみやかに最終原稿の Microsoft Word ファイルを電子メールで提出すること. 図については, グラフィックソフトウェアで作成したファイルも併せて提出する.
7. 短報は, その内容を成績および考察 (Results and Discussion) としてまとめ, 要旨 (Summary) は英文では200字以内の和文, 和文では100語以内の英文をつける. 原稿の長さは刷り上りで, 2 頁以内とする. その他の規定については原著の場合に準じる.
 8. 総説及び技術資料の構成については特に規定を設けないが, 引用論文の記載法は原著論文の場合に準じることとする.
 9. 別刷り費用は著者の負担とするが, 筆頭著者あるいは連絡著者が本学会会員の場合は, 50部に限り無料とする.
 10. 本誌の発行は原則として, 年4回 (4月, 7月, 10月および1月) とする.
 11. 編集委員会事務局を下記に置く.
〒252-5201
神奈川県相模原市中央区淵野辺 1-17-71
麻布大学獣医学部伝染病学研究室内
日本家畜衛生学会編集委員会
Tel 042 (769) 1643
E-mail : jjah@azabu-u.ac.jp
 12. 本誌に掲載された論文の著作権は, 日本家畜衛生学会に帰属する.

附則

本規程は, 2015年1月1日以降の投稿論文に適用する.
本規程は, 2015年7月12日以降の投稿論文に適用する.
本規程は, 2016年11月5日以降の投稿論文に適用する.
本規程は, 2019年7月20日以降の投稿論文に適用する.

論文原稿を作成する上での注意

- 1) 執筆にあたり, 投稿規定をもう一度, 熟読すること.
- 2) 各行の行末での強制改行をしないこと.
- 3) 投稿論文が和文, 英文のいずれの場合も数字, 欧文は全て1バイト文字 (いわゆる半角) で入力すること. ただし和文ではかっこ () は2バイト文字 (いわゆる全角) とする. 「μ」 (マイクロ) は半角立体で入力すること.
- 4) 投稿論文原稿はPDFファイルとして事務局まで電子メールで提出すること. その際には必ずパスワードロックし, パスワードは別メールで事務局まで連絡すること. 特段の理由がある場合は, 印刷原稿3部 (うち2部は鮮明なコピーでも可) を事務局まで書留郵便あるいはレターパックで送付すること.
- 5) 写真は印刷に耐えうる鮮明なものを使用すること.
- 6) 図は, Microsoft PowerPoint, Excel, Adobe Photoshop, Illustrator等のソフトウェアで作成するのが望ましい.
- 7) 論文受理後の最終原稿は, Microsoft Word (あるいはMicrosoft Word 互換ソフトウェア) ファイルとして提出する. ただし, Microsoft Word 互換ソフトウェアを使用した場合は, Microsoft Wordで正しく表示されることを確認すること. グラフィックソフトウェアで作成した図データは, jpeg, tiff等の汎用フォーマットで提出する.

日本家畜衛生学会
編集委員会

日本家畜衛生学会会則

第一章（総 則）

第1条

1. 本学会は、日本家畜衛生学会（英文表記：The Japanese Society of Animal Hygiene）（以下、「学会」とする。）と称する。
2. 本学会の設立年月日を2002年7月6日とする。

第2条

学会の事務局は、理事長の所属する機関におき、学会の住所は事務局所在地とする。

第3条

学会は、家畜衛生とその関連領域における学究の向上を図り、畜産の進歩発展に寄与することを目的とする。

第4条

学会は、前条の目的を達成するために、次の事業を行う。

- （1）研究発表会及び学術講演会等の開催
- （2）学会誌「家畜衛生学雑誌」の発行
- （3）学会の発展に貢献した者への表彰
- （4）その他学会の目的達成のために必要な事業

第二章（会員および会費）

学会の構成員

第5条

学会の会員は正会員、学生会員、賛助会員および名誉会員より構成する。

- （1）正会員：学会の趣旨に賛同し、会費を納入した個人
- （2）学生会員：学会の趣旨に賛同し、会費を納入した学生、大学院生。ただし会員期間は単年度とする。
- （3）賛助会員：学会の趣旨に賛同し、その事業を援助するため、所定の会費を納入した個人又は団体
- （4）名誉会員：学会に永年功労があり、総会において承認された個人

第6条

会費は正会員にあっては年額5,000円、学生会員にあっては年額2,000円、賛助会員にあっては1口年額10,000円

とし、毎年7月末までに納入するものとする。

会員資格

第7条

学会の会員になろうとする者は、所定の手続を行い、定められた会費を納入すること。

会員の義務

第8条

1. 会員は本学会の会則に従い、本学会の運営に協力し、会費を納入する義務を負う。
2. 理事長は常務理事の中から庶務・会計を担当する事務局担当者を委嘱する。

会員の退会・除名

第9条

退会を希望する会員は、理事長に退会する旨を届出ること。

第10条

学会の名誉を傷つけたり、目的に反する行為があった場合、または会費を5年分以上滞納した場合は除名とする。

第三章（役員、役員会および委員会）

役員および役員会

第11条

1. 理事は理事長が委嘱し、総会の承認を受ける。
2. 理事は理事会を組織し、理事長を補佐し、学会の運営に関して第4条の事項を行う。

第12条

1. 理事長は、常務理事の互選により選出する。
2. 理事長は、学会を代表し、会務を総理する。
3. 理事長は、常務理事の中から庶務・会計を担当する事務局担当者（事務局長）を委嘱する。

第13条

1. 常務理事会および理事会は理事長が随時招集する。
2. 常務理事会及び理事会は常務理事又は理事のそれぞれの過半数の出席をもって成立し、議事は出席者の過半数をもって決定する。

委員会

第14条

1. 理事長は第4条の事業を達成するため常設の編集委員会、学術企画委員会およびホームページ管理委員会を設置する。
2. 委員会の委員は、原則として理事長が常務理事の中から指名する。但し、常務理事会が必要と認めた場合には会員の中から指名することができる。
3. 委員会の委員長は、委員の互選により選出し、理事長が指名する。

第四章（総 会）

第15条

通常総会は毎年1回、理事長が招集する。

第16条

理事長が必要と認めた場合は、臨時総会を招集することができる。

第17条

総会では次の事項を議決する。

- (1) 事業計画および事業報告に関する事項
- (2) 予算および決算に関する事項
- (3) 会則の改正に関する事項
- (4) その他、学会の目的を達成するために必要な事項

第五章（会 計）

第18条

学会の経費は会費その他の収入をもって、これにあてる。

第19条

会計年度は4月1日より、翌年3月31日までとする。

附 則

- (1) この会則は平成14年7月6日より施行する。
- (2) 学会設立時の役員は家畜衛生研究会（以下「研究会」と略す）の役員が、暫定的に就任することとし、理事長は研究会の会長が、常務理事は研究会の幹事が、理事は研究会の評議員が、監事は研究会の監事がそれぞれ就任する。
- (3) この会則は平成15年7月5日に改正し、同日に施行する。
- (4) この会則は平成16年7月3日に改正し、同日に施行する。
- (5) この会則は平成17年7月2日に改正し、同日に施行する。
- (6) この会則は平成21年7月4日に改正し、同日に施行する。
- (7) この会則は平成23年7月2日に改正し、同日に施行する。
- (8) この会則は平成27年7月11日に改正し、同日に施行する。ただし、平成27年度の会費は4,000円とし、平成28年度から会費を5,000円とする。
- (9) この会則は平成28年7月9日に改正し、同日に施行する。
- (10) この会則は2019年7月20日に改正し、同日に施行する。
- (11) この会則は2020年6月30日に改正し、同日に施行する。

協賛企業一覧

日本家畜衛生学会は以下の企業からの協賛を受けております。ここに記して謝意を表します（五十音順）。

MSD アニマルヘルス（株）

エランコジャパン（株）

（株）科学飼料研究所

共立製薬（株）

KM バイオロジクス（株）

士別三協（株）

住化エンバイロメンタルサイエンス（株）

ゾエティス・ジャパン（株）

田村製薬（株）

東亜薬品工業（株）

（一財）日本生物科学研究所

日本ハム（株）

日本全薬工業（株）

（株）微生物化学研究所

フジタ製薬（株）

プリマハム（株）

ベーリンガーインゲルハイムアニマルヘルス（株）

Meiji Seika ファルマ（株）

（株）メディプラス製薬

〔2021年2月現在〕

日本家畜衛生学会入会のすすめ



日本家畜衛生学会は家畜衛生とその関連領域における学術の交流を図り、畜産の進歩発展に寄与することを目的とした学会です。

<主な活動>

- ・ 年2回（7月、12月）の研究発表会
- ・ 年1回のフォーラム（12月ごろ）の開催
これまでの主なテーマ「狂犬病」、「口蹄疫」、
「鳥インフルエンザ」、「BSE」、「家畜ふん尿」など
- ・ 年4冊の機関誌「家畜衛生学雑誌」の発行
- ・ 学会賞の授与

年会費5,000円（但し、学生は2,000円）

御請求戴ければ、見本誌を贈呈します!!

The Japanese Society of Animal Hygiene

日 本 家 畜 衛 生 学 会

〒252-5201 神奈川県相模原市中央区淵野辺1-17-71

麻布大学獣医学部獣医学科衛生学第一研究室内

TEL / FAX : 042-850-2508

<http://www.kachiku-eisei.jp/>

e-mail : k-eisei@azabu-u.ac.jp

HPで活動内容がご覧になれます!!（日本家畜衛生で検索）

家畜衛生学雑誌 第46巻第4号

令和3年3月1日発行（会員配布）

発 行 日本家畜衛生学会 理事長 河合一洋

〒252-5201 神奈川県相模原市中央区淵野辺1-17-71

麻布大学獣医学部獣医学科衛生学第一研究室内

☎ / FAX : 042-850-2508

ホームページ : <http://www.kachiku-eisei.jp/>

e-mail : k-eisei@azabu-u.ac.jp

振替口座 : 00240-3-43171

印 刷 所 明誠企画株式会社

〒208-0022 東京都武蔵村山市榎2-25-5

☎ 042-567-6233 FAX 042-567-6230

動物用医薬品

鳥インフルエンザをはじめ
細菌・ウイルス・カビに優れた殺菌・殺滅力を発揮!!

ロンテクト®

逆性石鹼製剤で、塩化ジデシルジメチルアンモニウムを有効成分とする消毒薬



低毒性であり、安全で使い易い消毒薬です

特長

★
安定性、浸透性に優れ、防サビ効果を有しています

★
硬水による影響が少なく、効力の低下の心配がありません

★
より殺菌・消毒効果を発揮できる発砲消毒にも使用できます

★
鳥インフルエンザ対策にも効果的です



包装
1L×10、
18LBIB、180L

消毒で守る！
あなたの大切な
パートナー！



製造販売元



株式会社 科学飼料研究所

<http://www.kashiken.co.jp/>

動薬部

札幌事業所
東北事業所

TEL : 027-347-3223
FAX : 027-347-4577
TEL : 011-214-3656
TEL : 019-637-6050

関東事業所
北九州事業所
南九州事業所

TEL : 027-346-9091
TEL : 096-294-8322
TEL : 099-482-3044

令和 年 月 日

日本家畜衛生学会 御中

入 会 申 込 書

貴会への入会を下記の通り申込ます。

記

フリガナ

氏 名：

所属名称：

部 署：

役 職

所属住所：〒

TEL：

FAX：

e-mail：

自宅住所：〒

TEL：

e-mail：

会員の種類：○正 会 員 ・ ○学生会員 ・ ○名誉会員

会報送付先：○自 宅 ・ ○勤 務 先

○内にチェックを付して下さい。

1. 入会申込書は必要事項をすべて正確に記入し、郵便またはFAX（042-850-2508）にてご送付下さい。
2. 年会費は個人会員 5,000円、賛助会員 10,000円／口（1口以上）を郵便振替口座（加入者名：日本家畜衛生学会、No. 00240-3-43171）へお振込下さい。
3. 申込先は ☎252-5201 神奈川県相模原市中央区淵野辺 1-17-71
麻布大学獣医学部獣医学科衛生学第一研究室内
日本家畜衛生学会事務局宛 TEL／FAX：042-850-2508
4. ホームページからも申し込めます：<http://www.kachiku-eisei.jp/>

令和 年 月 日

日本家畜衛生学会 御中

変 更 届

変更手続きを下記の通り致します。

記

フリガナ

- ☐ 氏 名： _____
- ☐ 所属名称： _____
- ☐ 部 署： _____ 役 職 _____
- ☐ 所属住所：〒 _____
- _____
- ☐ TEL： _____ FAX： _____ e-mail： _____
- ☐ 自宅住所：〒 _____
- _____
- ☐ TEL： _____ e-mail： _____
- ☐ 会員の種類： ☐ 正会員 ・ ☐ 学生会員 ・ ☐ 名誉会員
- ☐ 会報送付先： ☐ 自 宅 ・ ☐ 勤務先

全てご記入の上、上記変更部位の○内にチェックを付して下さい。

-
1. 変更届出書は必要事項を正確に記入し、郵便またはFAX（042-850-2508）にてご送付下さい。
 2. 届け先は ☎252-5201 神奈川県相模原市中央区淵野辺 1-17-71
麻布大学獣医学部獣医学科衛生学第一研究室内
日本家畜衛生学会事務局宛 TEL/FAX：042-850-2508
 3. ホームページからも手続きできます： <http://www.kachiku-eisei.jp/>

リスクを減らす選択。

STEP

1



洗浄

汎用重質洗浄剤

バイオソルブ™

STEP

2



消毒

複合次亜塩素酸消毒剤
家畜伝染病予防法指定消毒薬成分含有製剤

アンテック
ビルコン®S

動物用医薬品

STEP

3



仕上げ

畜鶏舎用熱煙霧専用除菌剤

アンテック™
ハイペロックス™

医薬用外劇物 火気厳禁 衝撃注意

危険物第五類 危険等級Ⅱ 過酢酸 過酸化水素

輸入・販売元

エランコジャパン株式会社 〒107-0052 東京都港区赤坂四丁目15番1号

バイオソルブ™、アンテック ビルコン®、アンテック™、ハイペロックス™、 : エランコ又は関連会社の商標又は登録商標です。

〈乳房炎にもマルボシル〉

meiji

50mL



100mL



動物用医薬品 要指示医薬品 指定 第二次選択薬
マルボシル® 10%
1mL中 マルボフロキサシンとして100mg含有

※1※2
**牛乳房炎の
効能追加**
(10%製剤のみ)

マルボシル® 2%

1mL中 マルボフロキサシン 20 mg含有



100mL

- 静脈内投与(牛)及び筋肉内投与(牛・豚)が可能
- 筋肉内投与部位の局所変性を低減
- 短い使用禁止期間を実現 (使用禁止期間/牛:4日、牛乳:48時間、豚:4日)
- 牛のマイコプラズマ性肺炎に対しても有効

※1 大腸菌、クレブシエラ・ニューモニアによる甚急性及び急性乳房炎(第一次選択薬が無効の場合) ※2 静脈内投与のみ

動物用医薬品 要指示医薬品
指定 第二次選択薬

製造販売元 **Meiji Seika ファルマ株式会社**
(輸入) 東京都中央区京橋 2-4-16

※効能・効果、用法・用量、使用禁止期間、その他
ご使用の際は製品の添付文書をよくお読みください。

Meiji Seika ファルマの 殺虫剤・消毒剤シリーズ

清浄な環境を
バックアップ!



殺虫剤シリーズ

ネオニコチノイド系ハエ成虫駆除剤

フラッシュベイト-WP

包装: 10g×10、25g×10

ピレスロイド系殺虫剤

ラピタ®

包装: 1kg、5kg

有機リン系・ピレスロイド系配合殺虫剤

エスミック®

包装: 1kg、5kg、10kg

カーバメイト系吸血害虫駆除剤

バリゾン® 乳剤

包装: 17L

消毒剤シリーズ

リニアC10・カチオン系消毒薬

アストップ®

包装: 1L、18L、180L

アストップ® 200

包装: 18L、50L、180L

殺ウイルス・殺菌消毒薬

パコマ®

包装: 1L、18L、180L

パコマL®

包装: 1L、5L、18L

パコマ® 200

包装: 18L、180L

塩素系殺ウイルス殺菌消毒薬

クレンテ®

包装: 1kg、50kg

スミクロール®

包装: 2.5kg (発泡性錠剤)

殺オーシスト消毒薬

ゼクトン®

包装: 20kg、200kg

動物用医薬品

使用の際は製品のラベルをよくお読みください

Meiji Seika ファルマ株式会社
東京都中央区京橋 2-4-16