

2 大規模酪農場における *Salmonella* Dublin 清浄化達成までの取組

県北家畜保健衛生所

加藤貴誉湖、高崎久子

はじめに

牛サルモネラ症は、様々な血清型のサルモネラの感染により、発熱、下痢、食欲不振及び肺炎等を呈する疾病で、1990年代以降、乳用牛の高泌乳化に伴い、特に搾乳牛での発生が増加している^{1), 2)}。本症のうち、届出伝染病に指定されているのは、血清型 Typhimurium (ST)、Dublin (SD) 及び Enteritidis によるもので、北海道においては ST による発生が6割以上を占めるが³⁾、近年では全国的に SD による本症の発生が増加している⁴⁾。SD による本症の特徴的な症状として、子牛の敗血症や成牛の早産・死産が知られており、加えて他の血清型と異なり、糞便中の排菌が必発ではないため、糞便を用いた SD の検出は困難とされている^{1), 5)}。

今回、管内の大規模酪農場において SD による本症が発生し、家畜保健衛生所（以下、家保）による多数の検査・指導及び農場による対策の実施により、約1年間で清浄化を達成したので、その概要を報告する。

農場概要

当該農場は乳用ホルスタイン種計1,877頭（成牛1,785頭、未經産牛92頭）、肥育用黒毛和種及び交雑種計622頭（子牛276頭、育成牛346頭）飼養の大規模酪農場で、黒毛和種及び交雑種は肥育用素牛として家畜市場へ出荷していた。牛舎構造は、乳用牛がフリーバーン、肥育用子牛がハッチ及び群飼、育成

牛が群飼であった。また、乳用牛が飼養されていた成牛エリアと、肉用牛が飼養されていた子牛エリアは80mほど離れていた（図1）。

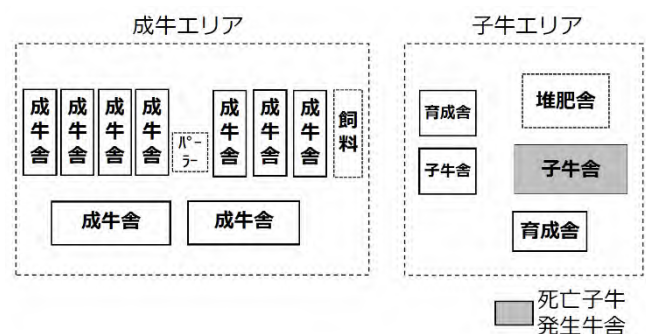


図1 牛舎配置図

発生経過

子牛舎（図1の発生牛舎）において、令和5年8月10日に10～30日齢の子牛、9頭が発熱及び呼吸器症状を呈したため、病性鑑定を実施したが原因不明であった。その8日後、8月18日に2か月齢の黒毛和種子牛が発熱、食欲低下及び喘鳴を呈した後に死亡したため、病性鑑定を実施したところ、肺、肝臓及び脾臓からSDが分離されたため、SDによる本症と診断した。なお、令和5年7月から8月にかけて、計12頭の子牛が死亡し、これは通常の3倍以上であった。

初期対応

当該農場の場長及び子牛舎担当者に対し、今後必要な対策を説明した。指導内容とそれに対する農場の対応を表1に示した。出荷牛全頭に対するサルモネラ検査は市場出荷牛の

みとなったが、農場は概ね家保の指導どおりの対策を開始した。

表1 指導内容と農場の対応

家保指導内容	農場の対応
発症牛への抗菌薬投与・隔離	マルボフロキサシン投与
全頭への生菌剤投与	子牛から順次投与
全頭へのサルモネラワクチン接種	子牛から順次投与
出荷時に全頭サルモネラ検査	市場出荷時のみ検査 (外部検査機関に依頼)
従業員の往来制限、清掃・消毒	エリア間の移動制限を徹底 成牛舎の敷料に消石灰

検査プログラム

通常の発生事例の場合、全頭検査によりまん延状況を確認し、発症牛や出荷牛の検査により排菌牛を摘発、環境検査で陰性確認後、清浄性確認検査として全頭検査を実施し、陰性の場合清浄化達成とするが、当該農場は頭数が多く、通常の検査プログラムが現実的ではなかった。そのため、全頭検査によるまん延状況確認の代替として環境検査を実施し、環境検査を複数回実施して陰性確認後、清浄性確認検査を実施し、陰性であれば清浄化とみなす、大規模農場に特化した検査プログラムを適応することとした。上述の対策に加えて当該検査プログラムについても説明したところ、概ね合意を得られた(図2)。

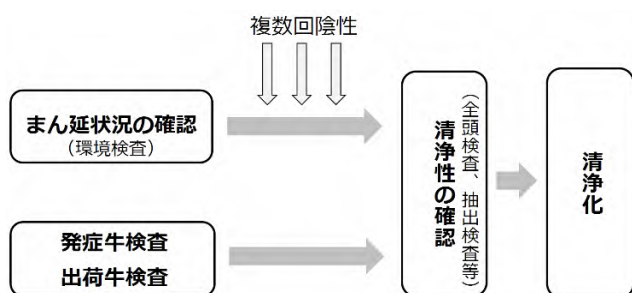


図2 検査プログラム

検査方法の検討とまん延状況確認検査

【検査方法の検討】

令和5年8月30日にまん延状況の確認のため環境検査(1回目)を実施した。採材箇所は全牛舎の牛床・飼槽、飼料保管庫及びパーラー91か所で、スキムミルクに浸した滅菌ガーゼにより拭き取りし、定法(適量の緩衝ペプトンによりガーゼを37℃で前培養し、培養液1mLをハーナテトラチオネート培地(HTT)にて42℃で増菌し、DHL培地に接種)により分離した(図3)。結果は91検体すべて陰性であったが、子牛の死亡頭数が改善されていなかったことから、環境中にSDが存在するにもかかわらず分離できなかったと考えられた。このことから、感度が高くSDに適した分離方法が必要と考えられ、既報⁶⁾を元に検査方法を改良した。

改良法は図4のとおり実施した。すなわち、定法には分離培地としてDHLとサルモネラESⅡ培地(ESⅡ)を用い、HTTに加えTT(ブリリアントグリーン未添加テトラチオネート培地)により増菌後、同じくDHL及びESⅡで分離した。また、遅延二次培養(HTT及びTTの増菌液を室温で5~7日間放置後再びHTT及びTTに1mLに接種し、以降は一次培養と同様)も行った。

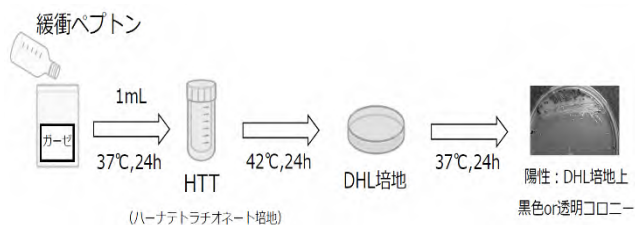


図3 環境検査方法(定法)

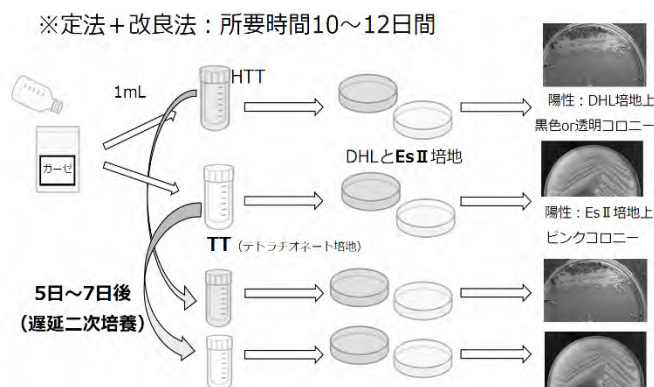


図4 環境検査方法（改良法）

【まん延状況確認検査（2～5回目）】

2～5回目のまん延状況確認検査（環境検査）の実施期間は令和5年12月11日～令和6年5月10日で、採材は概ね1～2か月ごとに実施した。採材箇所は、飼料保管庫、パーラー、飼槽・水槽及び牛床で、成牛エリアでは拭き取る牛舎が偏らないように採材場所を考慮し、概ね半数の牛舎の飼槽・水槽及び牛床について、子牛エリアではすべての牛舎について、延べ183か所採材した。その結果、令和5年12月11日に実施した2回目の検査において、成牛エリアでは成牛舎（飼槽・水槽）とパーラー（床）からSTが、子牛エリアでは育成舎からST（飼槽・水槽）、子牛舎2か所からSD（飼槽・水槽）、3か所からST（飼槽・水槽1か所、牛床2か所）が分離された。SDは改良法でTTからのみ分離された。一方、3～5回目の検査ではサルモネラは分離されなかった（表2）。

表2 環境検査結果

回数	2回目 (R5.12.11)	3回目 (R6.2.5)	4回目 (4.5)	5回目 (5.10)
場所				
成牛エリア				
成牛舎	1/14(ST)	0/14	0/14	0/14
パーラー等	1/3(ST)	0/3	0/3	0/3
子牛エリア				
育成舎	1/6(ST)	0/6	0/4	0/4
子牛舎	5/25(SD:2,ST:3)	0/25	0/24	0/21

陽性数/検体数

発症牛及び出荷牛検査

発症牛検査は、発熱や下痢等を呈した牛延べ82頭の糞便82検体及び全血（ヘパリン加血液）48検体について採材した。糞便は環境と同様に改良法により培養した。全血は既報⁶⁾に基づき、1mLをBHI培地で増菌後DHL及びES IIで分離し、その後遅延二次培養として、BHI増菌液1mLをTTに接種し以降は一次培養と同様に分離した（図5）。その結果、9月に子牛3頭の血液からSDが、10月に1頭の糞便からSTが分離されたが、11月以降、発症牛からサルモネラは分離されなかった（表3）。

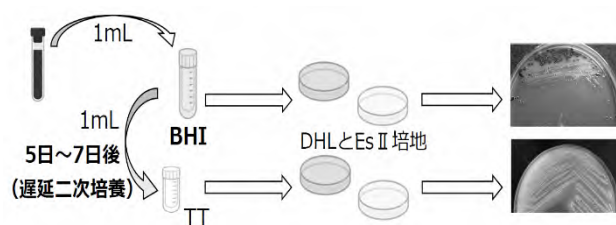


図5 発症牛及び出荷牛検査方法（全血）

表3 発症牛検査結果

日付	R5	9.6	10.30	11.13	R6	1.18	1.22	2.5	4.5	5.10
材料	8.30									
糞便	0/26	0/9	1/2 (ST)	0/5	0/12	0/5	0/10	0/1	0/11	
全血	NT	3/6 (SD)	NT	NT	0/12	0/5	0/10	0/1	0/11	

陽性数/検体数

出荷牛検査については、令和5年9月から清浄化達成まで実施し、市場に出荷する牛の糞便1,717検体及び全血1,629検体を材料とした。検査は民間の外部検査機関が実施し、結果はすべて陰性であった。検査方法は家保と外部検査機関で共有し、発症牛検査と同じ方法により実施した。

対策中の問題点と対応

【農場】

農場側の問題点として、対策意欲の低下が

あった。2 回目の環境検査以降陰性であったことから、農場内で既に SD の排菌はないと考え対策の必要性が感じられなくなったこと、出荷牛検査は費用が高額であり、労力が大きいことから度々検査中止の要望があった。

そのため、本社役員や場長等の農場責任者に対し説明会を定期的を開催することとした。計 6 回（令和 5 年 9 月, 12 月, 令和 6 年 1 月, 3 月, 5 月, 9 月）開催し、対策の必要性を粘り強く説明し、清浄化スケジュールについて毎回確認と修正を行った。定期的に説明することで農場側も他の農場に迷惑をかけない、コンプライアンス徹底のため必要であると納得し、対策の継続に理解が得られた。

【家保】

家保側の問題点として、清浄性確認検査を全頭実施した場合 2,777 検体となり、検体数が多く現実的でないことから、全頭検査以外の新たな清浄化の指標が必要となった。

そのため、統計学的手法を用いて標本の抽出法を検討した。抽出方法は、オーエスキー病防疫対策要領⁷⁾の清浄度確認検査及び清浄性確認条件（95%の信頼度で有病率 5, 10, 20%）を基礎とし、より有病率を低く設定し、95%の信頼度で有病率 3%とした。

この場合の検査必要頭数は 102 頭となり、全頭陰性であれば清浄化達成とした。ただし、抽出検査であるため、清浄化達成後も家保は農場の発生状況把握に努め、異状があれば相談を受けるという条件で全頭検査に代えることとした。

清浄性確認検査

環境検査で 3 回連続陰性を達成したことから、令和 6 年 7 月 16 日に清浄性確認検査を実施した。材料は上述のとおり有病率 3%で必

要検体数を算出し、成牛と子牛併せて 102 頭の糞便及び全血について、発症牛検査と同様に検査した。その結果、当該子牛舎の子牛 2 頭の全血から SD が分離された（表 4）。成牛エリアの牛からは SD が分離されなかったこと、子牛エリアから成牛エリアへの牛の移動や従業員の往来はなかったこと、成牛エリアで SD を疑う症状を呈する牛が認められなかったことから、成牛エリアのみ清浄化達成とした。子牛エリアは検査を継続することとした。

表 4 清浄性確認検査結果（1 回目）

	回数	1回目 (R6.7.16)
場所		
成牛エリア	成牛舎	0/72
子牛エリア	育成舎	0/5
	子牛舎	2/25

陽性数/検体数

子牛エリア延べ 44 検体の環境材料について、令和 6 年 8 月 26 日及び 9 月 24 日に再び環境検査を実施したところ、すべて陰性であった（表 5）。そのため、2 回目の子牛エリアの清浄性確認検査を実施した。

表 5 環境検査結果（6～7 回目）

	回数	6回目 (8.26)	7回目 (9.24)
場所			
育成舎		0/4	0/3
子牛舎		0/24	0/13

陽性数/検体数

2 回目の清浄性確認検査は 7 回目の環境検査と同日に子牛エリアのみ採材した（令和 6 年 9 月 24 日）。1 回目と同様に有病率 3%で必要検体数を算出し、27 頭の糞便及び全血につ

いて1回目と同様に実施したところ、すべて陰性となり、これをもって清浄化達成と判断した。

まとめ及び考察

令和5年8月に発生後、農場側は生菌剤投与・ワクチン接種、出荷牛検査等を対策終了まで実施した。家保は説明会を対策期間中計6回、定期的に開催した。SDは令和5年12月の環境検査以降暫く陰性が続き、清浄性確認検査で子牛エリアが令和6年7月に陽性となったが、9月には子牛エリアも陰性となり、約1年間で清浄化を達成した(表6)。

SDは、環境検査では改良法によって、TTのみから分離され、HTTからは分離されなかった。また、一次培養のみからもしくは遅延二次培養のみから分離された場合もあったことから、本改良法により遅延二次培養まで実施することで、環境中から検出可能と考えられた。また、牛個体からは発症牛及び清浄性確認検査において、糞便からは分離されず、全血のみからSDが分離されたが、これは糞便

検査ではSD分離は困難であるとされる、既報通りの結果となった。よって、環境材料は遅延二次培養まで実施し、個体の場合は、糞便ではなく全血を材料とするなど、SDの分離のためには適切な検査方法及び検体の選択が必要と考えられた。本事例はSTも同時に発生したため定法も併用したが、HTTは使用せずTTのみでも、SDは分離可能と思われた。また、本事例のように、大規模農場における出荷牛検査については、外部検査機関の協力が不可欠であり、検査方法について共有するなど、連携が必要と考えられた。

また、対策が長期間に渡ったため、農場側の意欲低下が問題となったが、対策が継続可能となった要因としては、農場責任者を繰り返し説得し、定期的に現状の説明したことが考えられた。農場長や現場の担当者だけでなく、経営について大きな決定権をもつ本社役員に対して粘り強く説明することにより、対策の必要性や次に必要な検査スケジュールを定期的に認識してもらい、トップダウンで家

表6 清浄化対策及び検査結果

	R5	8月	9月	10月	11月	12月	R6	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月
初期対応	説明	抗菌薬、生菌剤投与・ワクチン接種														
説明会 (計6回)		開催			開催	開催	開催		開催		開催					開催
①まん延状況 の確認検査	-				2か所	6か所	-		-	-				-	-	↑ 子牛エリア
②発症牛検査	-	3頭	1頭	-	-	-	-	-	-	-						
③出荷牛検査	すべて陰性															
④清浄性確認 検査													成牛エリア	-	清浄化 達成	
													子牛エリア	2頭		-
	SD+	ST+														

保の指導どおりの対策が実施可能となったことも大きく影響したと推察された。

大規模農場における検査プログラムについては、他の血清型と比較して分離が困難とされる SD を検出できたことから、定期的な環境検査と個体抽出検査を併用することにより、省力化しつつ清浄化達成が可能と考えられた。しかし、清浄性確認検査については、本来全頭検査を実施するところを、抽出検査に代えて行うことから、清浄化達成後も、定期的に農場の発生状況を把握し清浄性を担保する必要がある。今後も SD を含めた本症が発生した場合、本事例の分離方法や検査プログラムを元に、清浄化対策をすすめていきたい。

引用文献

- 1) 玉村雪乃：牛由来 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium に関する分子疫学的研究、家畜感染学会誌、6 巻 1 号、13-20(2017)
- 2) 秋庭正人：牛のサルモネラ症, 動物の感染症, 第四版, 110-111(2019)
- 3) 中岡祐司：北海道における牛サルモネラ症の現状と対策, 家畜診療, 57, 279-285(2010)
- 4) 秋庭正人：牛のサルモネラ症の概説, 臨床獣医, 12 月, 18-21(2023)
- 5) 加藤千絵子：北海道における最近の発生状況と発生農場における清浄化事例 , 臨床獣医, 12 月, 33-36(2023)
- 6) 山田真喜子ら： *Salmonella* Dublin の効率的な培養法の検討, 平成 29 年度北海道家畜保健衛生総合検討会 第 65 回家畜保健衛生業績発表集録 (2017)
- 7) 農林水産省：オーエスキー病防疫対策要領, 平成 29 年 3 月 31 日付け 28 消安第 5862 号農林水産省消費・安全局長通知