

令和元年6月11日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08004

研究課題名(和文) 農場汚染指標病原体の検出と農場防疫対策への応用

研究課題名(英文) Detection of pathogenic indicators for evaluating bovine farm biosecurity conditions and application of the indicators to enforcement of biosecurity on animal farms

研究代表者

竹原 一明 (Takehara, Kazuaki)

東京農工大学・農学研究院・教授

研究者番号：40171665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：子牛の下痢の原因となりえるウシA群ロタウイルス(GAR)、ウシトロウイルス(BToV)、ウシエンテロウイルス(BEV)、ウシコロナウイルス(BCV)を同時に検出できるOne step multiplex RT-PCRを確立した。次いで、そのRT-PCRを用いて、48農場の子牛糞便、計322検体を調べ、農場の「汚染指標病原体」となり得るウイルス性病原体、GARとBEVを特定した。さらに1農場について、長靴交換と適切な踏込消毒槽の利用により衛生対策を強化し、強化前(560検体)と強化後(400検体)の2年間の糞便を調べたところ、4つのウイルスの検出率が有意に低下した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「飼養衛生管理基準」は、家畜伝染病予防法に定められており、各農場で遵守せねばならないが、基準には具体的な衛生対策強化法は定められていない。2018年12月20日に飼養衛生管理基準のチェック表が公表され、消毒剤の種類や希釈倍数などが調査されているが、具体的な方法は示されていない。また、消毒剤等の利用法については、多くの畜産農場や行政当局で誤解がある。そこで、肉牛農場の汚染指標病原体となりえるウイルスを調べるとともに、農場における適切な消毒剤等の利用によるバイオセキュリティ強化を試み、指標病原体の低減を示すことで、適正な衛生対策強化法等を世の中に広める必要がある。

研究成果の概要(英文)：In order to monitor bovine farm biosecurity level, one-step multiplex reverse transcription (RT)-PCR for simultaneous detection of group A rotavirus (GAR), bovine torovirus (BToV), bovine enterovirus (BEV) and bovine coronavirus (BCV) was designed, with the aim of configuring candidates for "viral pathogen indicators". By screening of a total of 322 samples from 48 farm calf feces, GAR and BEV were identified as viral pathogen indicators. Furthermore, at one farm, enhancement of biosecurity by exchange boots and appropriate usage of a footbath at the entrance of calf sheds could reduce index viruses. The comparison of the virus detection by RT-PCR, prevalence of all 4 viruses was significantly decreased in calves except BCV of more than 3 week-old.

研究分野：動物衛生学

キーワード：バイオセキュリティ 汚染指標病原体 RT-PCR ウイルス 消毒剤 踏込消毒槽

1. 研究開始当初の背景

- (1) 口蹄疫、高病原性鳥インフルエンザ、サルモネラ、豚流行性下痢など、畜産農場には通常は存在せず、これらの病原体が居ないことをもって「衛生状態が良い」とは言い切れない。衛生状態を評価できる「汚染指標病原体」となり得るウイルス性病原体の特定や、それらの病原体の迅速で容易な検出系の確立が求められている。
- (2) 畜産農場における危害要因分析・必須管理点（HACCP）の考え方を採り入れた飼養衛生管理（農場HACCP）や「日本の畜産における農業生産工程管理（JGAP家畜・畜産物）」を実施するためには、飼養衛生管理基準の遵守は必須である。しかしながら、個々の農場の立地条件や飼養家畜・家禽が異なることから、飼養衛生管理基準には、具体的な消毒方法については、指示されていない。農場の立地条件や家畜の飼養状況等から判断し、現場に対して、よりの確・具体的な消毒方法や衛生対策（バイオセキュリティ強化方法）を探る必要があり、現場を想定した消毒資材の評価方法を確立する必要がある。
- (3) 上記バイオセキュリティ強化対策が効果的に実行できているかを確認するため、汚染指標病原体の動態や生産性を指標に効果を検証し、正しいバイオセキュリティ強化方法について、他の農場へ普及させる必要がある。

2. 研究の目的

- (1) 既存の消毒薬を含むバイオセキュリティ強化候補資材を実際の現場利用を想定して、有機物存在下や低温環境下において、各種資材の病原体不活化能を調べる。
- (2) 飼養衛生管理基準を遵守するだけでなく、具体的な衛生管理を徹底させるため、汚染指標病原体を特定し、その病原体の動態を基に、どのような衛生対策を実施すれば、バイオセキュリティ強化ができるかを調べる。
- (3) 効果の認められたバイオセキュリティ強化資材を実際の現場に応用し、汚染指標病原体の動態から、それぞれの資材の効果的な利用法を提案する。

3. 研究の方法

- (1) 各種消毒薬やバイオセキュリティ強化候補資材の評価系の作出と評価
各種消毒薬やバイオセキュリティ強化候補資材を、異なる温度（室温と2℃）で有機物存在の有無、水に浮いた状態の病原体と物質に固着した病原体等を用い、その病原体不活化能を調べた。さらに、単独利用の場合と複数の消毒資材を組み合わせた際の病原体不活化能を調べた。
- (2) 汚染指標病原体検出系の開発
子牛の下痢の原因となりえるウシA群ロタウイルス（GAR）、ウシトロウイルス（BToV）、ウシエンテロウイルス（BEV）、ウシコロナウイルス（BCV）を同時に検出できるOne step multiplex RT-PCRを確立した。各ウイルスの増幅産物をプラスミドにクローニングし、配列決定で既知配列と比較し、そのプラスミドを用いて、PCRの特異性を確認した。
- (3) 汚染指標病原体の畜産農場スクリーニング
肉牛農場から3か月齢未満の子牛直腸便について、個体を特定して経時的に収集、あるいは特に個体を固定せずにランダムに採取し、RNA抽出して、上記RT-PCRにかけて、ウイルスの動態を調べた。
- (4) 農場バイオセキュリティ強化の評価
協力農場において、実施可能なバイオセキュリティ強化対策を採り、強化前と強化後での、汚染指標病原体の動態を比較した。

4. 研究成果

- (1) 各種消毒薬やバイオセキュリティ強化候補資材の評価系の作出と評価
食品添加物規格水酸化カルシウム（ $\text{FdCa}(\text{OH})_2$ ）による糞便中のマウスノロウイルスの不活化
農場現場を想定し、糞便中の病原体を不活化できるかどうか、 $\text{FdCa}(\text{OH})_2$ 粉体をマウスノロウイルスを含む糞便に添加し、経時的にウイルスを回収して不活化

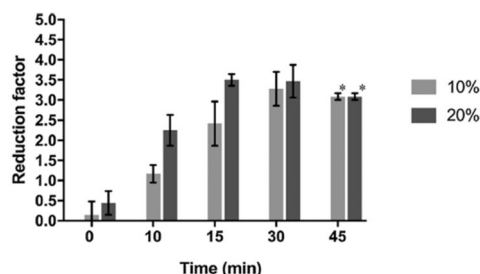


Fig. 1. Inactivation of murine norovirus in mouse feces by 10% or 20% $\text{FdCa}(\text{OH})_2$ powder.

The concentrations of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ indicated are based on weight/weight in feces and litter. Data represent mean \pm standard deviation of three individual reactions. Asterisk (*) shows the virus was inactivated to undetectable level ($2.5 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$).

されたかどうかを調べた。Fig. 1に示すように、45分間で検出限界にまで不活化できた。

逆性石けん (QAC) と FdCa(OH)₂の混合による病原体不活化効果における相乗効果

長靴、プラスチック容器、車両を想定し、ゴム板、プラスチック板、スチール板に病原体を塗布し、QACとFdCa(OH)₂の混合液で不活化を試みた。混合液では、単独の消毒薬と比較し、短時間で検出限界未満にまでウイルスを不活化できた (Table 1)。

Table 1. Virucidal efficacies of the tested solutions toward AIV and NDV on rubber carrier.

Tested Solution	Name of the virus	Temp. (°C)	Viral titer [\log_{10} (TCID ₅₀ /ml)] at different contact times.				
			dW ₂ control	3 min	5 min	10 min	20 min
FdCa(OH) ₂ ^a	AIV	25	6.13 ± 0.13 ^d	NT ^e	3.50 ± 0.25	2.88 ± 0.38*	2.00 ± 0.25*
QACx500 ^b			NT	4.38 ± 0.38	3.63 ± 0.32	2.13 ± 0.63*	
Mix500 ^c			2.00 ± 0.50*	<1.50 ± 0.00	NT	NT	
FdCa(OH) ₂	2	25	6.00 ± 0.25	4.58 ± 0.22	4.08 ± 0.08	3.25 ± 0.14	2.58 ± 0.08*
QACx500			NT	5.25 ± 0.14	4.33 ± 0.22	3.17 ± 0.22	
Mix500			4.00 ± 0.29	2.83 ± 0.17*	<1.50 ± 0.00	NT	
FdCa(OH) ₂	NDV	25	7.00 ± 0.00	4.13 ± 0.38	3.00 ± 0.50*	<1.50 ± 0.00	NT
QACx500			5.13 ± 0.13	4.75 ± 0.25	2.88 ± 0.13*	≤1.50 ± 0.00	
Mix500			1.88 ± 0.35*	<1.50 ± 0.00	NT	NT	
FdCa(OH) ₂	2	25	7.17 ± 0.08	4.33 ± 0.08	3.42 ± 0.46*	2.25 ± 0.14*	<1.50 ± 0.00
QACx500			6.08 ± 0.08	5.00 ± 0.00	4.25 ± 0.14	2.17 ± 0.17*	
Mix500			3.83 ± 0.22*	2.00 ± 0.29*	<1.50 ± 0.00	NT	

^aFood additive grade calcium hydroxide powder (200 mg) was prepared in 100 ml of redistilled water (FdCa(OH)₂).

^bA quaternary ammonium compound (QAC) diluted by 1: 500 in redistilled water (QACx500). ^cFdCa(OH)₂ powder (200mg) was prepared in 100 ml of QACx500 (Mix500). ^dViral titer (\log_{10} TCID₅₀/ml). ^enot tested.

* Single asterisk indicates effective viral reduction ($>3 \log_{10}$ TCID₅₀/ml). Viral titer $<1.50 \log_{10}$ TCID₅₀/ml indicates the virus was inactivated to undetectable level. Both effective and undetectable level viral reductions are significantly different ($p < 0.05$) from dW₂ control titer.

(2) 汚染指標病原体検出系の開発

One step multiplex RT-PCRを実施した。推定の増幅産物が得られた (Fig. 2)。プラスミドにクローニング後、既知の配列と88%以上の相動性を確認した。One step multiplex RT-PCRを汚染指標病原体のスクリーニングに用いることとした。

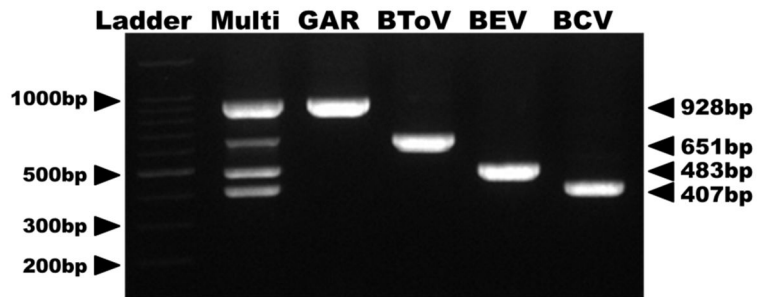


Fig. 2. Multiplex RT-PCR and single RT-PCR.

(3) 汚染指標病原体の畜産農場スクリーニング

各農場から得られた子牛直腸糞便からRNAを抽出し、上記RT-PCRで調べたところ、ウイルス遺伝子を検出できた。同一検体から複数のウイルス遺伝子が検出される個体も認められた (Fig. 3)。



Fig. 3. Detection of viral RNA by one step multiplex RT-PCR.

Lanes 1, 2, 4, 6, 7, 10, 11, 14, 15, and 17 are BEV (483 bp) positive. Lanes 4 was BCV (407 bp) and BEV positive. Lane 11 is BToV (651 bp) and BEV positive.

農場Aの20頭の子牛について、個体を特定し、1～12週齢まで、毎週糞便を採取した際のウイルス検出状況をTable 2に示す。GARは、同一個体からは1度だけの検出だったが、BEVやBCVは、連続して最大5週間検出された。なお、GARは主に3週齢以下の子牛から、BEVは3週齢以上の子牛から検出された。

Table 2. Virus detection pattern at farm A.

Calf No.	Age by weeks											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1		R		C			E	E	E	E	E	
2	R	C		C		E	E	E	E	E		
3			C			C	C	E	E	E		
4					R		C	E	E	E	E	
5	R							C			C	
6							C	E	C		E	E
7							C	C	C	C	E	E
8							C	C			E	
9								E		E	E	
10						C	C	C	E	E		
11		R			C	C		C	E	E	T	
13			R	C		E	E	E	E	E		
14								E	E	E	E	
15								E	E	E	E	T
17		R				C	E	E		E		
18			R					E			C	
19							E	E				
20				C			E	E				

At farm A, located in Ibaraki prefecture, 20 calves were numbered and sampled every 5 to 10 days, for up to 12 week-old (total 184 samples). Calves No. 12 and 16 died at the age of 2 and 4 week-old, respectively, and no virus was detected in them. R: GAR, E: BEV, C: BCV, T: BToV.

(4) 農場バイオセキュリティ強化の評価

上記の農場Aにおいて、子牛の牛舎に入る際、それぞれの牛舎専用の長靴に履き替え、牛舎内で利用した長靴をQACとFdCa(OH)₂の混合液で消毒するという、バイオセキュリティ強化を実施した。その結果、3週齢以下の子牛において、バイオセキュリティ強化前後で、4つの汚染指標病原体の検出率がいずれも、有意に低くなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Komura M, Suzuki M, Sangsriratanakul N, Itoh M, Takahashi S, Alam Md.S, Ono M, Daio C, Shoham D, Alam J, and Takehara K. (2019) Inhibitory effect of grapefruit seed extract (GSE) on avian pathogens. J. Vet. Med. Sci.81 (3):466-472. 査読あり

Alam Md.S, Takahashi S, Itoh M, Komura M, Ono M, Daio C, Sangsriratanakul N, Shoham D, Alam J, and Takehara K. (2018) Virucidal efficacy of a quaternary ammonium compound with food additive grade calcium hydroxide toward avian influenza virus and Newcastle disease virus on abiotic carriers. Avian Dis. 62(4): 355-363. 査読あり

Alam Md.S, Takahashi S, Itoh M, Komura M, Suzuki M, Sangsriratanakul N, Shoham D, and Takehara K. (2018) Bactericidal efficacy of a quaternary ammonium compound with food additive grade calcium hydroxide toward *Salmonella* Infantis and *Escherichia coli* on abiotic carriers. J. Vet. Med. Sci.80 (10):1482-1489. 査読あり

Sangsriratanakul N, Toyofuku C, Suzuki M, Komura M, Yamada M, Alam Md.S, Ruenphet S, Shoham D, Sakai K, and Takehara K. (2018). Virucidal efficacy of food additive grade calcium hydroxide against surrogate of human norovirus. J. Virol. Methods 251 (1): 83-87. 査読あり

〔学会発表〕(計8件)

竹原 一明. 畜産分野の消毒について 農場のバイオセキュリティ強化. 広島県獣医師会産業動物部会. 2019年1月10日. 広島県広島市

竹原 一明. 高病原性鳥インフルエンザ対策としての農場のバイオセキュリティ強化. 千葉県

平成30年度養鶏研修会. 2018年11月5日. 千葉県千葉市

竹原 一明. 「畜産分野の消毒ハンドブック」農場のバイオセキュリティ強化. 公益社団法人中央畜産会 臨床獣医師感染症等対策強化推進事業. 2018年11月から2019年1月. 岡山県岡山市、千葉県千葉市、北海道札幌市

Shahin Alam、高橋 学、伊藤 真理子、古村 みゆき、小野瑞季、大王千聖、Natthanan Sangsriratanakul、竹原 一明. Virucidal efficacy of a quaternary ammonium compound with food additive grade calcium hydroxide toward poultry viruses on abiotic carriers. 第161回日本獣医学会学術集会. 2018年9月13日茨城県つくば市

古村 みゆき、Natthanan Sangsriratanakul、Shahin Alam、伊藤 真理子、高橋 学、小野瑞季、大王千聖、竹原 一明. グレープフルーツ種抽出物の家禽病原体不活化試験. 第161回日本獣医学会学術集会. 2018年9月13日茨城県つくば市

高橋 学、古村 みゆき、伊藤 真理子、小野瑞季、大王千聖、Natthanan Sangsriratanakul、Shahin Alam、竹原 一明. 長靴交換・踏込消毒の徹底での衛生対策強化による子牛下痢の減少. 第161回日本獣医学会学術集会. 2018年9月12日茨城県つくば市

高橋 学、古村 みゆき、鈴木 真結子、伊藤 真理子、Natthanan Sangsriratanakul、Shahin Alam、竹原 一明. ある牛農場における牛下痢関連ウイルスの季節的・日齢的動態. 第160回日本獣医学会学術集会. 2017年9月15日鹿児島県鹿児島市

山田匡之、Hakimullah Hakim、NatthananSangsriratanakul、Shahin Alam、豊福千遥、古村 みゆき、鈴木真結子、Dany Shoham、竹原 一明. ウシの農場に存在する汚染指標ウイルスの One-step multiplex RT-PCR を用いた検出. 第 159 回日本獣医学会学術集会 2016/09/07 神奈川県藤沢市

〔図書〕（計1件）

竹原 一明. 公益社団法人中央畜産会. 畜産分野の消毒ハンドブック. 2019年2月. 46ページ

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

なし