

# 11 採卵鶏の空腸絨毛に著しい萎縮が認められた一病性鑑定事例における病理学的考察

中部家畜保健衛生所

○金森 健太

## 要 約

鶏では感染症による絨毛の萎縮は稀で、萎縮が認められた際は詳細な検討が必要だと考えられる。今回、採卵鶏農場の鶏において、空腸絨毛が著しく萎縮していた症例があり、その原因について病理学的考察を行ったので、その概要を報告する。230,000羽を飼養する採卵鶏農場の一鶏舎において死亡羽数の増加が認められ、生鶏2羽(No.1、2)及び死亡鶏2羽(No.3、4)を用いて病性鑑定を実施した。剖検では4羽にガスを含んだ小腸の膨満と菲薄化が認められた。細菌学的検査では、No.1から $4.8 \times 10^5$  CFU/gの*Clostridium perfringens* (Cp)A型菌が分離された。寄生虫学的検査は、No.1で209、No.2で17,328、No.3は未検出、No.4は800PGのコクシジウムオーシストが検出された。HE染色では全羽で空腸における粘膜上皮細胞の壊死、脱落と絨毛の重度の萎縮が認められ、陰窩は異型を呈し、一部の粘膜上皮細胞は扁平化していた。粘膜固有層には黄褐色顆粒を貪食したマクロファージの沈着が認められ、これはセロイドと判定された。また、局所性に好酸性退廃物に線維素析出と細胞退廃物を伴う壊死及び壊死部周囲の線維化が認められ、グラム陽性大桿菌及びグラム陰性桿菌が多数認められた。コクシジウムの寄生は認められなかった。本症例では、剖検時の腸管の膨満、診断基準以下ではあるが生鶏の小腸からCpが分離され、グラム陽性大桿菌が病変部に存在していたことや、抗生剤による加療の後に病性鑑定を行い、慢性経過を示唆する病理所見からも、鶏クロストリジウム・パーフリンゲンス感染症の耐過鶏で、崩壊した組織が回復途中であったことから絨毛の萎縮が見られたと考えられた。セロイドの沈着も、慢性経過を示す一つの所見だったと考えられる。本症の発生原因は複雑で、原因に即した対応が必要になるが、今回の症例では慢性経過を示していたことから、本症を引き起こした原因の究明には至らなかった。このことから、病性鑑定を行う際は症状を示した初期の個体を検査し、正確な診断とそれに準じた対策が必要であると考えられた。

## はじめに

鶏の腸絨毛は、小腸から大腸にかけて認められ、他の家畜と比較しても著しく長いことが知られている[1]。また、腸絨毛は腸管管腔面の吸収面積を増大させるために、粘膜固有層の一部が管腔に突出した長い隆起として存在し、牛や豚では種々の感染症等の影響により萎縮する。しかし、鶏で重度の絨毛萎縮を引き起こす疾病は知られておらず、萎縮が認められた際は詳細な検討が必要だと考えられる。今回、採卵鶏農場で実施した一病性鑑定事例において、鶏の腸絨毛の著しい萎縮が認められ、その原因究明のために病理学的考察を行ったことから、その概要について報告する。

## 材料と方法

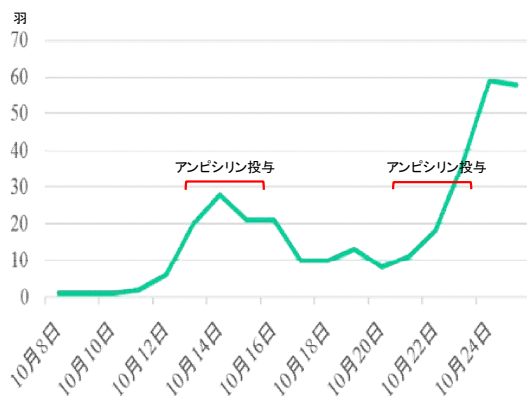
### 1) 発生農場及び発生概要

発生農場は、約230,000羽のジュリアライトを飼養している採卵鶏農場で、ウインドレス鶏舎4棟(1~4、7~10号鶏舎)とセミウインドレス鶏舎1棟(5、6号鶏舎)で飼養している。導入は県外から大雛で導入し、本農場では過去に鶏クロストリジウム・パーフリンゲンス感染症(鶏*Clostridium perfringens*(Cp)感染症)を疑う死亡羽数増加事例が発生していた。

本農場で2021年10月14日、大雛約50,000羽を収容している7号鶏舎で死亡羽数が約30羽まで増加した(表1)。鶏Cp感染症の可能性を疑い、アンピシリンを投与したところ死亡羽数は減少傾向になった。しかし、同月21日頃から再度死亡羽数が増加し、アンピシリンを投与しても死亡羽数が減少しなかったことから、

同月 25 日に病性鑑定を実施した。なお、その他の鶏舎に異常は認められなかった。

表 1 死亡羽数の推移



## 2) 病性鑑定

147 日齢の衰弱していた生鶏 2 羽 (No. 1、2) と死亡鶏 2 羽 (No. 3、4) について病性鑑定を行い、主要臓器及び十二指腸内容物を供試した。

### a. 病理学的検査

病理解剖を行った後、全身諸臓器を採材し、臓器は 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した後、パラフィンに包埋した。薄切された切片については、HE 染色を行い、病変が認められた腸管についてはグラム染色、ベルリン・ブルー染色、シュモール反応、PAS 反応及びチール・ネルゼン (Z. N) 染色を実施した。

### b. 細菌学的検査

剖検した 4 羽の主要臓器について定法に従い検査を実施し、生鶏 2 羽の十二指腸内容物を用いて *Clostridium perfringens* (Cp) の定量培養を実施した。分離された Cp は、毒素遺伝子を検出する PCR 検査 ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$ 、 $\iota$ 、CPE、NetB) を実施した。

### c. 寄生虫学的検査

十二指腸内容物を用いて、シヨ糖遠心浮遊法を実施した。

### d. ウイルス学的検査

農場立ち入り時に、剖検した鶏を含む死亡鶏 11 羽及び生鶏 2 羽について鳥インフルエンザ簡易キットによる検査を実施した。

## 成績

### 1) 病理学的検査結果

外貌所見では、病理解剖を行った 4 羽全てが消瘦しており、剖検所見では小腸の膨満と粘膜の菲薄化が全羽に認められた (図 1)。HE 染色で

は空腸における粘膜上皮細胞の壊死、脱落と重度の絨毛の萎縮が認められ、陰窩は異型を呈し、一部の粘膜上皮細胞は扁平化していた (図 2)。粘膜固有層には黄褐色顆粒を貪食したマクロファージが認められ、これはベルリンブルー染色陰性、シュモール反応陽性、PAS 染色陽性、Z. N 染色陰性の結果からセロイドと判定された (図 3)。また、軽度の出血や、局所性に線維素析出と細胞退廃物を伴う壊死や、壊死部周囲の線維化が認められた。炎症産物にはグラム陽性大桿菌及びグラム陰性桿菌が多数認められた (図 4)。なお、コクシジウムの寄生は認められなかった。肝臓では 4 羽に共通して肝細胞やクッパー細胞にセロイドの沈着が認められたが、その他の臓器に著変は認められなかった (表 2)。



図 1 小腸の膨満と粘膜の菲薄化

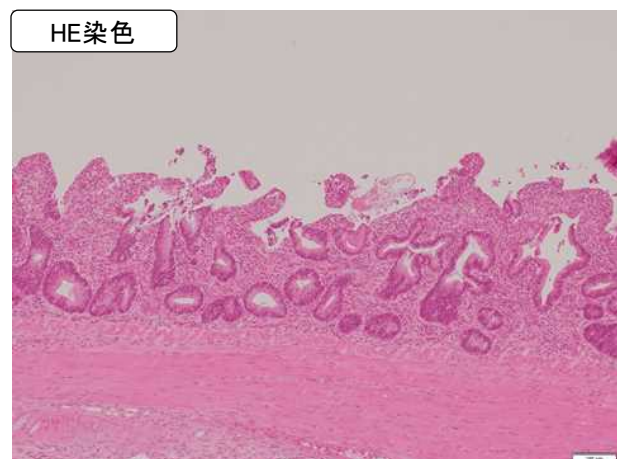


図 2 絨毛の萎縮

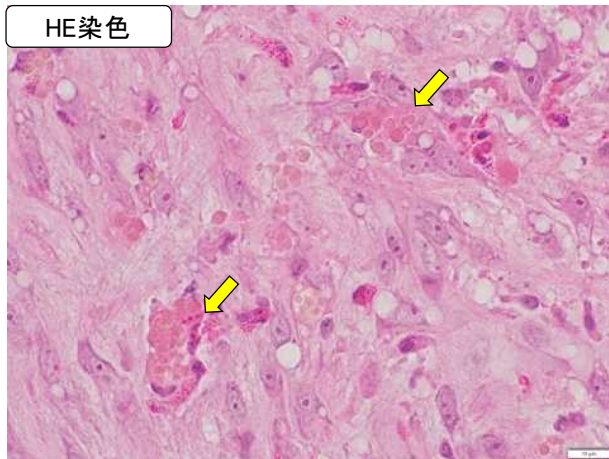


図3 セロイドの沈着

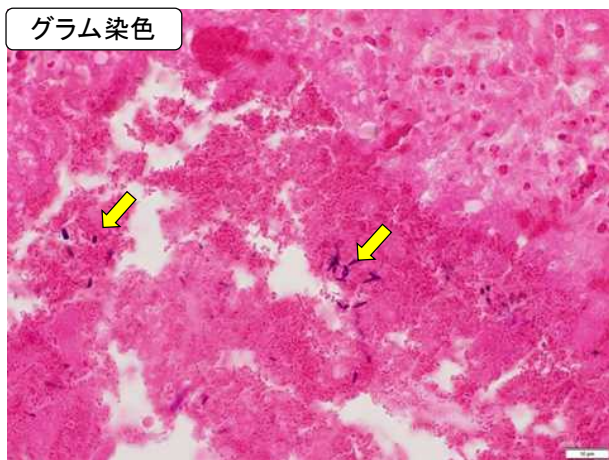


図4 病変部に認められたグラム陽性大桿菌

表2 病理学的検査結果

		No. 1	No. 2	No. 3	No. 4
空腸上部		+	-	+	+
空腸下部	絨毛萎縮	+	+	+	+
小腸	セロイド沈着	+	+	+	+
	線維索性壊死性炎	+	+	+	-
	コクシジウム寄生	-	-	-	-
肝臓	セロイド沈着	+	+	+	+

## 2) 細菌学的検査結果

主要臓器から有意菌は検出されなかった。定量培養では No. 1 から  $4.8 \times 10^5$  CFU/g の Cp が分離され、遺伝子検査の結果、 $\alpha$  毒素のみ検出されたことから A 型菌と判定された。

## 3) 寄生虫学的検査結果

コクシジウムのオーシストが、No. 1 から 2090PG、No. 2 から 17, 3280PG、No. 3 は未検出、

No. 4 からは 800PG 検出された。

## 4) ウイルス学的検査結果

鳥インフルエンザ簡易キットは全ての検体で陰性だった。

## 考 察

一般的に鶏 Cp 感染症は、CpA 型、C 型及び G 型菌によって発症する。また、病変は小腸に限局して認められ、腸管はガスにより膨隆し、血様内容物を含む。また、組織病変は絨毛の萎縮ではなく、小腸における壊死性、線維索性の炎症を起こすことが知られている[2]。一方、本症例では、主な所見が絨毛の萎縮ではあったが、限局性にグラム陽性大桿菌を伴う線維索性壊死性腸炎が確認されており、No. 1 の生鶏からは、病性鑑定指針による鶏 Cp 感染症診断の規定量以下ではあるが、小腸から  $4.8 \times 10^5$  CFU/g の CpA 型菌が分離されているなど、Cp 感染症と類似した所見も確認された。さらに、小腸絨毛の萎縮は複数箇所採材された空腸で全周性に認められ、これは空腸全域に病変があったことが伺える結果だった。また、抗生剤で治療した後に病性鑑定を実施しており、小腸粘膜で認められた肉芽組織の増生や、組織の再生像と考えられる上皮の扁平化及び陰窩の異型など慢性経過を示唆する所見も確認されていたことや、組織中にコクシジウム等原虫の寄生が一切認められず、病変への関与はなかったことから、本症例は鶏 Cp 感染症発症鶏が抗生剤の治療で回復しきれず、慢性経過を示した後に死亡に至った症例だと考えられた。本症例では、本来鶏 Cp 感染症の特徴所見ではない絨毛の萎縮が主な病変として確認できているが、これは崩壊した組織が再生傾向であったことから、絨毛の萎縮として組織に現れていたと考えられた。

粘膜固有層等で認められた黄褐色顆粒は、特殊染色の結果、リポフスチンの性状と一致した[3]。リポフスチンとセロイドは類似した性状で、組織中で異物貪食によりマクロファージ内に形成された生体内色素をセロイドと判定し、リポフスチンと区別されている[4]。本症例においても、マクロファージ内に黄褐色顆粒が確認されていることからセロイドと判定された。なお、セロイドは炎症や循環障害等による細胞及び組織の崩壊後の組織中に出現し、慢性損耗性疾患等に伴い肝細胞やクッパー細胞に現れることが知られている[5]。このため、今回認められたセロイドの沈着も慢性経過を示す一

つの所見であったと考えられる。

本症例では、農場内で短期間に二回死亡羽数の増加が認められており、一回目の死亡羽数の増加は鶏 Cp 感染症が原因で起きたと推察された。二回目の死亡羽数の増加後に実施した病性鑑定では、4羽に共通して絨毛の著しい萎縮が認められており、絨毛が萎縮した影響により栄養吸収が十分行えず、栄養状態不良に陥り、消瘦及び死亡羽数増加に至ったと考えられた。また、本来鶏 Cp 感染症は、腸粘膜が障害を受けたり、免疫機能が低下したときに発生すると言われている [6]。しかし、今回実施した病性鑑定では、これらの要因を確認することができず、最終的な原因究明には至らなかった。死亡羽数の増加が認められてすぐに病性鑑定を実施していれば、鶏 Cp 感染症の発症要因を特定できた可能性があることから、病性鑑定を実施する際は、早期に症状の示している個体を正確に選別し、正確な診断とそれに準じた正確な対策を行うことが重要だと考えられた。

#### 参考文献

- [1] 山内高圓：獣医組織学、家禽の組織学、日本獣医解剖学会編、第三版、271、学窓社、東京(2007)
- [2] 末吉益雄：腸炎、動物病理学各論、日本獣医病理学会編、第2版、183-185、文永堂出版、東京(2010)
- [3] 篠田宏：シュモール反応、新染色法のすべて、50-51、医歯薬出版株式会社、東京(1999)
- [4] 森田剛仁：色素代謝障害(色素代謝異常)、動物病理学総論、日本獣医病理学専門家協会編、第3版、37-41、文永堂出版、東京(2015)
- [5] 渋谷淳：変性、動物病理学各論、日本獣医病理学会編、第2版、207-212、文永堂出版、東京(2010)
- [6] 鈴木達郎：クロストリジウム病、家禽疾病学、鶏病研究会編、第一版、118-119、鶏病研究会、茨城(2015)



## 12 新たな遺伝的能力評価手法を用いた優良和牛子牛の効率的生産

畜産技術研究所

○森谷 美咲

### 要 約

枝肉成績に関連する6種類の遺伝子解析結果およびゲノミック評価を利用して供卵牛の選抜および種雄牛の選定を行い、和牛受精卵を生産した。その受精卵を移植して得られた子牛の遺伝子解析結果から枝肉成績を予測し、肥育後の実際の枝肉成績と比較した。その結果、6種遺伝子による予測値と比較して、6種遺伝子と両親のゲノミック評価を組み合わせた予測値およびゲノミック評価単独による予測値の方が推定精度が高かった。本研究における取組みを通じて令和2年3月に静岡県和牛改良推進協議会が設立され、県内で遺伝的に優良な受精卵から優良な和牛を生産する体制が確立された。

### はじめに

近年、肥育用和牛子牛は慢性的に不足しており、ホルスタイン種への和牛受精卵移植による子牛生産が各地で行われている。和牛の需要が世界的に高まる中、安価な輸入牛肉と差別化するためには和牛の安定した高品質・付加価値化が求められる。

当所では、先行研究において6種類の遺伝子型を解析し、それらが枝肉成績に関連することを確認した[1]。これにより遺伝子型から枝肉成績を推定し、遺伝的に優良な受精卵生産が可能となったが、枝肉成績の推定精度に改善の余地があった。

本研究では、遺伝子解析技術を利用して和牛受精卵を生産し、その受精卵を移植して得られた子牛（移植産子）の遺伝子型と枝肉成績を比較することにより、枝肉成績の推定精度を向上させる方法について検討した。

### 材料と方法

1) 遺伝子解析技術を用いた優良和牛受精卵生産

当所で飼養する黒毛和種繁殖雌牛の毛根細胞および種雄牛の市販凍結ストロー精液を用い、枝肉成績に関連する6種類の遺伝子（表1）について遺伝子型の解析を実施した。雌牛については、家畜改良事業団が実施する網羅的SNP解析（ゲノミック評価）の結果も加味し、遺伝的に優良な供卵牛を選抜した。

選抜した供卵牛に対して過剰排卵処置を実施し、子の遺伝子型が好ましい組合せとなるような種雄牛を用いて優良受精卵を生産した。

表1 枝肉成績に影響を及ぼす遺伝子

遺伝子名 (組合せ)	遺伝子の効果
EDG1 (GG/GT/TT)	G 皮下脂肪が薄い
FASN① (GG/GC/CC)	G 枝肉重量・脂肪交雑に優れる
FASN② (AA/AG/GG)	A 脂肪交雑に優れる G 枝肉重量に優れ、皮下脂肪が薄い
NCAPG (GG/GT/TT)	G 枝肉重量・ロース芯面積・ バラ厚に優れ、皮下脂肪が薄い
SCD (VV/VA/AA)	A 枝肉重量・ロース芯面積・ バラ厚に優れ、皮下脂肪が薄い
SREBP1 (LL/LS/SS)	L 枝肉重量に優れる S バラ厚に優れる

2) 肥育成績推定手法の実効性の検証

生産した受精卵を静岡県経済農業協同組合連合会（JA 静岡経済連）に試験供給し、移植産子を得た。その移植産子の毛根細胞を用いて6種遺伝子解析を実施、その結果を重回帰分析し、枝肉成績（枝肉重量、ロース芯面積、脂肪交雑、バラ厚、皮下脂肪厚、歩留基準値）の予測式を作成した。移植産子を約30ヶ月齢まで肥育し、出荷後の枝肉成績を調査して予測式から算出される枝肉成績（予測値）と実際の枝肉成績（実測値）を比較した。

## 成績

### 1) 遺伝子解析技術を用いた優良和牛受精卵生産

繁殖雌牛 76 頭の遺伝子型解析および 55 頭のゲノミック評価を実施し、その結果から遺伝的に優良な 32 頭の供卵牛を選抜した。また、種雄牛 145 頭の遺伝子型解析を実施し、その情報をデータベース化した。

これらの結果を元に令和 3 年度末までに延べ 108 回の受精卵採取を行い、外部供給可能な優良受精卵 642 個を生産した(表 2)。このうち 221 個が JA 静岡経済連に試験供給され、県内ホルスタイン種等に移植された。

表 2 優良受精卵採取成績

年度	頭数	延べ回数	回収卵数	正常卵数	A・B卵数*
H29	9	24	296	201	168
H30	8	20	226	133	105
R1	8	24	304	208	147
R2	18	22	206	135	111
R3	18	18	195	136	111
計	61	108	1227	813	642

※ 凍結保存して外部供給できる品質の受精卵

### 2) 肥育成績推定手法の実効性の検証

試験供給した受精卵 221 個の移植により、67 頭の出生を確認した。そのうち 56 頭の毛根細胞を採取、遺伝子解析を行い、52 頭で両親との間に遺伝法則上の齟齬が無いことを確認した。このうち、肥育期間を終えて出荷された 19 頭の枝肉成績を取得し、分析を行った。

先行研究で遺伝子解析を行った肥育牛 2529 頭と本研究で得られた移植産子 19 頭の 6 種遺伝子解析結果から予測値を算出し、実測値と比較したところ、全ての項目において予測値と実測値の相関は認められなかった。

次に、6 種遺伝子による予測値を両親(種雄牛および供卵牛)のゲノミック評価を用いて補正した値を実測値と比較すると、相関係数は向上した。

また、両親のゲノミック評価のみによる予測値と実測値を比較すると、両親のゲノミック評価で補正した場合と同等もしくは同等以上の相関が認められ、特に枝肉重量について

は強い相関が認められた(表 3)。

表 3 予測値と実測値の相関係数

予測方法	枝肉重量	脂肪交雑	ロース芯面積
6 種遺伝子 (n=19)	0.28	0.11	0.12
6 種遺伝子+ゲノミック評価 (n=9)	0.82*	0.73*	0.73*
ゲノミック評価 (n=9)	0.92*	0.70*	0.76*

\* p<0.01

## 考察

6 種遺伝子単体による予測値と実測値に相関が見られなかった原因について、遺伝的要因以外の要因(環境要因等)の影響や 6 種遺伝子以外に枝肉形質に影響する遺伝子が存在する可能性が考えられた。このため、1 頭あたり 5 万箇所以上の DNA の SNP について解析しているゲノミック評価を用いて補正することで、6 種遺伝子による予測精度を向上させることができたと考えられた。

近年ゲノミック評価の普及が進み、遺伝的に優良な繁殖雌牛を選抜することが可能となった。県内においても令和 2 年 3 月に静岡県和牛改良推進協議会が設立され、県内で優良受精卵から優良な和牛を生産する体制が確立された。当所では令和 2 年度から優良受精卵生産を事業化し受精卵の販売を始め、令和 4 年 12 月末までに 394 個を販売した。協議会は県内の肉牛生産および食肉流通に関わる団体から構成され、マーケットインの改良方針のもとに優良受精卵から市場ニーズに合った和牛を生産することを目的としており、県内肥育農家の成績底上げおよび経営支援の一助になると考えられる。

## 参考文献

- [1] 野田準一, 小林幸恵, 齋藤美英: 肉質等に関与する遺伝子の相互作用の解明(第 1 報), 静岡畜技研研報, 9, 11-14 (2016)



## 13 養豚廃水処理施設に自生する窒素を除去するアナモックス菌

畜産技術研究所中小家畜研究センター  
○石本 史子

### 要 約

廃水の窒素を除去する低コスト・低エネルギープロセスとして、アナモックス菌を利用するアナモックス(Anaerobic Ammonium Oxidation)法が注目されている。そこで、畜産技術研究所中小家畜研究センター(以下、当センター)の養豚廃水処理施設に集積しているアナモックス菌の集積要因及び特徴について調査を行った。その結果、曝気槽内の溶存酸素濃度、pH、アナモックス反応の基質の存在などの要因が集積を可能にしたと判断した。アナモックス菌が低温下で増殖し高い活性を示すことにより、年間を通して安定した窒素除去が行われる可能性が示された。県内の2つの養豚廃水処理施設から当センターと共通するアナモックス菌の集積が確認され、アナモックスプロセスの養豚廃水への普及の可能性が示された。

### はじめに

畜産廃水は窒素濃度が高いことから、令和4年現在、水質汚濁防止法における硝酸性窒素等(アンモニア、アンモニウム化合物、亜硝酸化合物、硝酸化合物の合計)の排水基準には牛300 mg/L、豚400 mg/Lの暫定基準が設けられている。しかし、基準値は3年ごとの改正のたびに引き下げられており、いずれは一般基準100 mg/Lの適用が想定されることから、畜産廃水の窒素低減対策が求められている。廃水の窒素除去法として従来から行われている硝化脱窒法は、廃水中のアンモニウム( $\text{NH}_4\text{-N}$ )を曝気により亜硝酸( $\text{NO}_2\text{-N}$ )や硝酸( $\text{NO}_3\text{-N}$ )に酸化した後、従属栄養脱窒菌により窒素ガスとして除去するプロセスである。畜産廃水では高濃度の $\text{NH}_4\text{-N}$ の酸化に大量の曝気が必要であり、また、炭素窒素比が低い廃水が多いことから従属栄養脱窒に必要な炭素源(メタノールなど)の添加を必要とするため、廃水処理にかかる経費は増大する。一方で、 $\text{NH}_4\text{-N}$ と $\text{NO}_2\text{-N}$ から窒素ガスを産生するアナモックス菌を利用する窒素除去法は、 $\text{NH}_4\text{-N}$ の一部を $\text{NO}_2\text{-N}$ に酸化するだけの曝気量でよく、有機物資材の添加も必要としない[1]。従って、硝化脱窒法より低コストでの運用が可能であり、畜産廃水処理への利用が期待される。

アナモックス菌を利用した窒素除去プロセスでは菌を集積する必要があるが、アナモックス菌の倍加速度は9-11日と遅く[2]、システムの立ち上げに長期間を要することが課題の一つであった。しかし、近年、畜産技術研究所中小家畜研究センター(以下、当センター)の施

設を含む国内の複数の養豚廃水処理施設において、アナモックス菌の自然集積が確認されており、これを利用した窒素の高度処理の可能性が示されている[3]。また、屋外にある曝気槽は季節により水温が変動し、低温下では細菌の活性は低下するが、当センターの施設では冬～春季にアナモックス菌の塊(グラニュール)の浮上が観察される。これはアナモックス反応で発生した窒素ガスによるものと考えられ[4]、低温期にアナモックス菌が高い活性を持っている可能性が考えられた。

そこで、養豚廃水処理施設におけるアナモックス菌の集積要因や菌の特徴について、センター施設及び県内養豚廃水処理施設の調査を行い、自生アナモックス菌を用いた窒素除去プロセス構築の可能性について検討した。

### 材料と方法

#### 1) アナモックス菌集積要因の検討

当センターの養豚廃水処理施設は、曝気槽(容積47 m<sup>3</sup>)、第1沈殿槽(8.1 m<sup>3</sup>)、接触酸化槽(14.6 m<sup>3</sup>)及び第2沈殿槽(7.5 m<sup>3</sup>)で構成される連続式活性汚泥法の施設である。豚舎からの汚水(日量11-14m<sup>3</sup>)は原水槽に入り、固液分離スクリーンで篩渣を除去した後、調整槽に貯留され、水量調整の分水枡を経て曝気槽に連続投入される。アナモックス菌はこの曝気槽の水面下の壁面に赤色のバイオフィルムとして存在が確認された。

この施設の曝気槽内環境と廃水処理状況を確認する目的で、2016年4月から2018年3月までの2年間にわたり、表1に示す方法により、



週 1 回、同時に曝気槽内の水温及び溶存酸素濃度 (DO) の測定を行うとともに、流入汚水、曝気槽内及び処理水について、pH、無機態窒素濃度及び全窒素濃度を測定した。流入水および処理水については、生物化学的酸素消費量 (BOD) を月 1 回測定した。また、曝気槽内に存在する活性汚泥量と引き抜き汚泥量から汚泥滞留時間 (SRT) を計算により算出した。

表 1 槽内環境等の測定方法

測定項目	測定方法
DO	蛍光式溶存酸素計
水温、pH	携帯型 pH メーター
無機態窒素	イオンクロマトグラフ
全窒素	多項目迅速水質分析計
BOD	20℃、5 日培養後の DO 消費量を測定し、計算

## 2) 季節変動にともなうアナモックス菌グラニューールの活性及び菌叢の変化

当センター施設において、2019 年 1 月から四半期ごとにグラニューールを採取して試験に供した。1 月及び 4 月 (低温期) は第 1 沈殿槽に浮上したグラニューールを採取し、7 月及び 10 月 (高温期) はグラニューールの浮上が少ないため、曝気槽内に浮遊するグラニューールを採取した。試験期間中は、前項と同様の内容で曝気槽内の環境及び水質の測定を行った。

採取したグラニューールは乳鉢ですり潰し、均一化して培地に懸濁し、窒素の同位体 ( $^{15}\text{N}$ ) で標識した  $\text{NO}_2\text{-N}$  を用いたトレース法により、培養温度を 10-35℃ の範囲で 5℃ 刻みに設定してアナモックス活性を測定した (図 1)。また、アナモックス菌の 16SrRNA 遺伝子をターゲットとしたリアルタイム PCR 法により、グラニューールに含まれるアナモックス菌 DNA 量を測定するとともに、細菌の 16SrRNA 遺伝子をターゲットとしたアンプリコンシーケンス解析により、グラニューールの菌叢解析及びアナモックス菌の同定を行った。

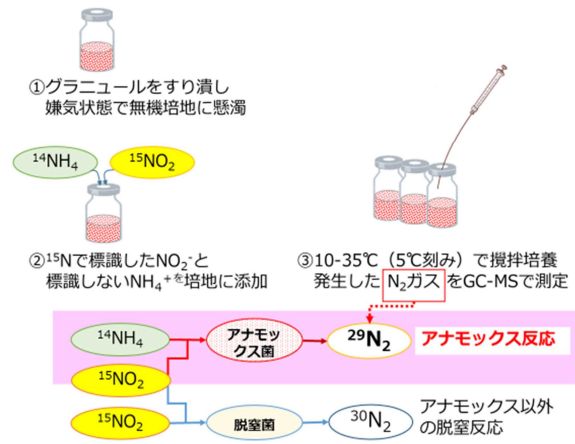


図 1 アナモックス活性測定方法

## 3) 県内養豚廃水処理施設におけるアナモックス菌集積調査

2018 年の 5-7 月に、県内の 6 戸の連続式活性汚泥法による養豚廃水処理施設において、曝気槽の活性汚泥及び水面下の壁面に付着した汚泥を採取し、リアルタイム PCR 法によりアナモックス菌の有無を測定するとともに、前項で示した方法により、槽内環境及び水質を測定した。アナモックス菌の集積が確認されたサンプルについては、アンプリコンシーケンス解析により菌叢解析及びアナモックス菌の同定を行った。なお、本来は年間各 3 回の調査を行う計画であったが、この年に発生した豚熱の防疫対策により、調査は 1 回のみとなった。

## 成 績

### 1) 曝気槽内環境の測定結果

曝気槽の DO (平均値 ± S.D.) は 0.31 ± 0.39 mg/L で、突発的な上昇時 (最大 2.0 mg/L) を除いてはおおむね 0.3 mg/L 以下で推移した。pH は 7.4 ± 0.5 であった。無機態窒素濃度は  $\text{NH}_4\text{-N}$  が 91 ± 66 mg/L、 $\text{NO}_2\text{-N}$  が 42 ± 56 mg/L、 $\text{NO}_3\text{-N}$  が 13 ± 29 mg/L で、 $\text{NH}_4\text{-N}$  と  $\text{NO}_2\text{-N}$  が同時に検出されることが多かった。無機態窒素除去率は 68 ± 17% で、処理水の無機態窒素濃度は 80 ± 60 mg/L とおおむね一般排水基準をクリアしていた。しかし、曝気槽の DO が上昇し、pH が 6.7 以下に低下したときは曝気槽内の  $\text{NO}_2\text{-N}$  又は  $\text{NO}_3\text{-N}$  の蓄積が認められ、窒素除去率は低下した。また、DO が 0.3 mg/L 以下であっても pH が 8.0 以上に上昇したときは  $\text{NH}_4\text{-N}$  の蓄積が認められ、このときも窒素除去率は低下

した。

SRTは25日以上あり、アナモックス菌の倍加速度より長く維持されていた。BOD除去率は95 ± 4%と高く、汚水の処理は良好に行われていた。水温は22.8 ± 6.7℃で、7-9月を除いてはフルスケールのアナモックス処理プラントの至適温度とされる30-35℃[5]より低かった。

## 2) 四半期別グラニューールのアナモックス活性及び菌量の推移

アナモックス活性は4月に採取したグラニューールが最大であった(図2)。低温期のグラニューールは30℃で最大の活性を示したのに対し、高温期のグラニューールは35℃と、最大活性を示す温度帯は異なった。最大活性がほぼ等しかった1月と7月のグラニューールで比較すると、1月のグラニューールは12-25℃の温度域で7月のグラニューールより活性が高く推移した。

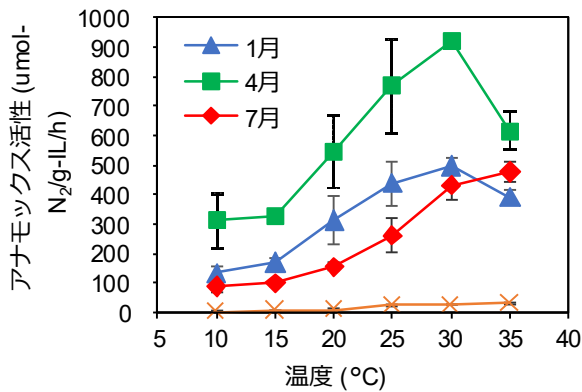


図2 四半期別アナモックス活性測定結果  
※参考文献[6]の図を一部改変。

グラニューールの強熱減量(IL)中のアナモックス菌量は、1月が $6.1 \times 10^{10}$  copies/g-IL、4月が $4.5 \times 10^{11}$  copies/g-IL、7月が $6.9 \times 10^{10}$  copies/g-IL、10月が $2.0 \times 10^{10}$  copies/g-ILで、低温期の1月から4月に増加した。また、活性と菌量は比例する関係にあった。アンプリコンシーケンス解析により、集積されたアナモックス菌の89-99%は*Candidatus* (*Ca.*) *Jettenia asiatica*であり、低温期ほどその比率が高いことが確認された。

試験期間中における四半期毎の平均水温は低温期と高温期では有意差を認めたと平均窒素除去速度は水温の変動に関係なく、年間を通して一定であった(図3)。

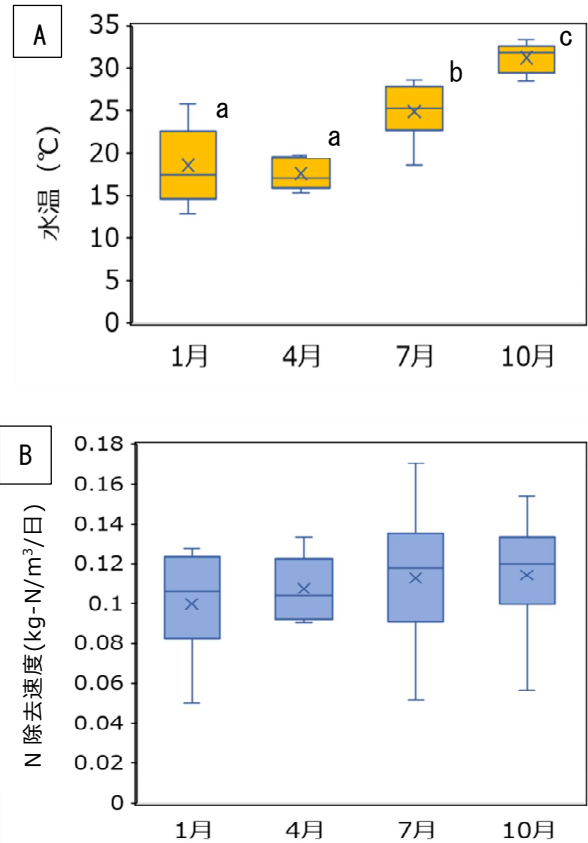


図3 四半期別水温(A)及び窒素除去速度(B)の比較  
※異符号間で有意差あり(p<0.05)

## 3) 県内養豚廃水処理施設の調査成績

調査を実施したすべての施設の活性汚泥中から $1.5 \times 10^4$ - $1.0 \times 10^7$  copies/g-ILの濃度でアナモックス菌DNAが検出され、濃度の高かった上位2施設の壁面汚泥からは赤色バイオフィルムの集積が確認された(表2)。

窒素除去率には差が認められたが、BODの除去率はいずれの施設も良好であった。曝気槽のDOは集積が確認された施設Cを含め、当センターより高めの施設が半数を占めた。pHについてはNH<sub>4</sub>-Nが蓄積していた施設Fを除き、6.7-8.0の中性域にあった。

表2 県内養豚廃水処理施設の調査結果

施設名	除去率 (%)		赤色 BF*	曝気槽環境**	
	BOD	窒素		DO	pH
A	92	34	×	高	○
B	99	87	○	○	○
C	100	86	○	高	○
D	99	97	×	○	○
E	98	74	×	高	○
F	99	51	×	○	高

※ BF=バイオフィーム

※※ DO ≤ 0.3 mg/L、pH 6.7-8.0 を○とした

当センター及び施設 B、C で集積された赤色バイオフィームのアンプリコンシーケンス解析では、いずれのバイオフィームにおいても、アナモックス菌は *Ca. Jettenia* が最優占種であり、*Ca. Brocadia* も共通する菌種として認められた(図4)。

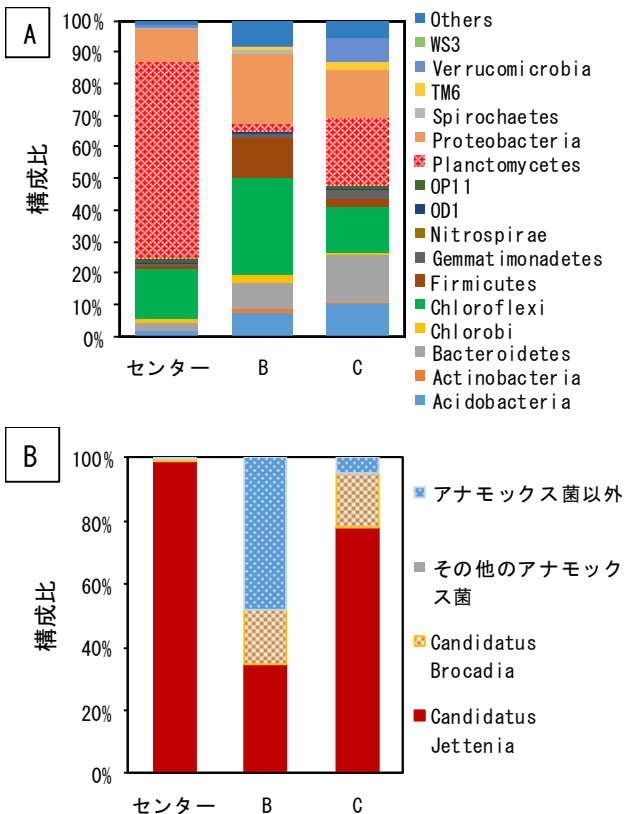


図4 バイオフィームの次世代シーケンス解析結果 (A)門レベル、(B)Planctomyces 門の百分比内訳

## 考 察

アナモックス菌は偏性嫌気性菌であるが、 $\text{NH}_4\text{-N}$  を  $\text{NO}_2\text{-N}$  に酸化してアナモックス反応の基質を提供するアンモニア酸化細菌などの好気性菌と共生し[7]、溶存酸素濃度 (DO) の低い環境下で増殖することができる。平均 DO は、 $\text{NH}_4\text{-N}$  の部分亜硝酸化とアナモックス反応を1つの槽内で行うプロセスの至適範囲[8]であり、また、pH もアナモックス菌の至適生育条件 (6.7-8.3) [9]の範囲内にあった。一般に曝気槽の DO は 1-3 mg/L での運転が推奨されている[10]が、1 mg/L 未満の低 DO 環境で運転した場合であっても、有機物の処理は良好に行われることが確認された。一方で、DO や pH が至適範囲を逸脱したときには窒素除去能の低下が確認されたことから、アナモックス菌を集積し、窒素除去を良好に行うための曝気槽の条件として、DO を  $\leq 0.3$  mg/L、pH を 6.7-8.0 となるよう曝気量を制御することが重要であると判断した。また、アナモックス反応の基質が存在するとともにアナモックス菌の増殖時間が確保されていること、有機物 (BOD) の処理が良好に行われていることも集積を可能とした要因であると考えられた。なお、集積が確認された県内の施設 C の DO はここに示す条件とは一致しなかったが、調査回数が1回のみであったことから、この施設の傾向をつかむには複数回の調査が必要と考えられた。また、DO が高く、アナモックス菌の集積を認めなかった施設においては、DO を低く制御することで活性汚泥中のアナモックス菌が増殖する可能性もあると考えられた。

赤色バイオフィームの集積が確認された3施設に共通して存在した *Ca. Jettenia* 及び *Ca. Brocadia* は国内の他の養豚廃水処理施設でも存在が確認されており[3]、養豚廃水に適応できるアナモックス菌と考えられた。なかでも、*Ca. Jettenia* は、低温に順応し、低温下で増殖して高い活性を示す可能性が示されたことから、季節により水温が変動する養豚廃水処理施設の環境に適応し、年間を通して安定した窒素除去に寄与できる可能性のあるアナモックス菌と考えられた。

以上のことから、養豚廃水処理施設では、曝気槽内の DO を低く維持して槽内環境をアナモックス菌の至適生育条件に合わせることで、季節の変動に対応したアナモックス菌が集積され、年間を通して安定した窒素除去に寄与する

可能性が示された。

本研究はイノベーション創出強化研究推進事業 28008AB により実施した。記して謝辞を表す。

#### 参考文献

- [1]和木美代子 畜産廃水のアナモックス処理  
-活性汚泥処理水への適用の可能性-、畜産  
の研究, 677, 751-756 (2013)
- [2] Strous M, Heijnen J.J, Kuenen J.G,  
Jetten M.S.M: Appl. Microbiol.  
Biotechnol., 50(5) 589-596 (1998)
- [3] Waki M, Ishimoto C, Suto R, Nagamine  
T, Matusmoto T, Uenishi H, Yasuda T,  
Fukumoto Y: Processes, 9(6), 1010  
(2021) DOI:10.3390/pr9061010
- [4] Chen J, Ji Q, Zheng P, Chen T, Wang C  
and Mahmood Q: Water Res., 44, 3321-  
3328 (2010)
- [5] Weralupitiya C, Wanigatunge R, Joseph  
S, Athapattu B.C.L, Lee T, Biswas J.K,  
Ginige M.P, Lam S.S, Kumar P.S and  
Vithanage M: Bioresour. Technol., 334,  
125240 (2021)  
DOI:810.1016/j.biortehc.2021.125240
- [6] Ishimoto C, Waki M, Soda S: Chemosphere,  
282, 131027 (2021)  
DOI:10.1017/j.chemosphere.2021.131027
- [7] Wang X.T, Yang H, Su Y, Liu X.Y and Wang  
J.W: Bioresour. Technol., 333, 125188  
(2021)  
DOI:10.1016/j.biortech.2021.125188
- [8] Kumar M, Lin J-G.: J. Hazard. Mater.  
178, 1-9 (2010).
- [9] Strous M, Kuenen J.G, Jetten M.S.M:  
Appl. Environ. Microbiol., 65, 3248-  
3250 (1999).
- [10]中村作次郎: 養豚場の廃水処理-浄化槽の  
設計・日常管理とトラブルシューティング,  
有限会社ベネット, 178 (2003)