

### 13. ヨーネ病スクリーニング遺伝子検査における交差プール法の有効性の検討

県北家畜保健衛生所

○藤井 勇紀 都筑 智子  
前田 育子 飯島 知一

ヨーネ病の診断は現在、個別検体の定量判定リアルタイム PCR（以下、個別法）によって実施されているが、平成 28 年 4 月に販売が開始された定性判定リアルタイム PCR 試薬を用いたプール糞便法（以下、P 法）により、多検体処理による効率的なスクリーニング遺伝子検査が可能となった<sup>1)</sup>。しかし陽性数が多い農場では、P 法実施後に個別検査をする検体数が多くなるため、場合によっては非効率な検査法になりえる欠点があった。そこで、より効率的に検体数を削減できる交差プール法（以下、交差 P 法）に着目した。交差 P 法はこれまで、農場規模や発生頭数などのケース別に、その有用性が数値で示された報告はなく、ヨーネ病への応用もされていない。今回、検査頭数や陽性数の異なるケース別に、国内のヨーネ病検査における交差 P 法の有効性と、今後の活用法についての検討を行ったので、その概要を報告する。

#### P 法と交差 P 法の概要と検査数の算出例

##### 1 P 法

10 検体以下の個別の糞便上清をプールした検体について、抽出と PCR（以下、初回検査）を実施する。陽性だったプール検体については、それを構成する個別の糞便上清に立ち返った抽出と PCR（以下、追加検査）を実施する。

例：検査頭数 49（No.1～49）、陽性数を 2（No.5, No.27）と設定し、10 検体プールを 4 組（P1～P4）と 9 検体プールを 1 組（P5）作成した場合、初回検査で P1, P3 が陽性となる。P1 を構成する No.1～10 と P3 を構成する No.21～30 に追加検査を行うと No.5 と No.27 が陽性となる。この場合、初回検査と追加検査の合計数（以下、検査数）は 25 となる（図 1）。

##### 2 交差 P 法

個別の糞便上清を行と列ができる限り同数になるように配置し、行と列でそれぞれプールを作成後、初回検査を実施する。陽性となった行と列の交点の検体を陽性疑いとし、追加検査を実施する。

例：検査頭数 49（No.1～49）、陽性数を 2（No.17, No.33）と設定し、7 検体プールを行（P1～P7）と列（P8～P14）でそれぞれ作成した場合、14 検体の初回検査を行い、P17, P19, P31, P33 が陽性疑いとなる。この 4 検体の追加検査を行うと No.17 と No.33 が陽性となる。この場合、検査数は 18 となる（図 2）。

## 解析方法

### 1 ケース毎の検査数の算出

検査頭数は、100頭未満の農場を対象として、偏りなく抽出した9, 16, 25, 36, 49, 64, 81, 100の8通り、一方、陽性数は0~9検体の10通りとし、これらを掛け合わせて計80(8×10)のケースを仮定した。80ケースについて、「個別法」「P法」「交差P法」の3種の検査方法を対象とし、それぞれの追加検査の有無を確認するとともに、検査数を算出した。なお検査数は起こり得る最大値を採用した。算出例を図3に示した。

### 2 最小検査法の選択表作成

検査数の算出結果(表1)から、ケース毎に検査数が最小である検査方法(以下、最小検査法)の選択表を作成した。なお検査数が同数である場合は、追加検査が不要な方を選択した。検査数が検査頭数を上回るケースは、すべて個別法を選択し、また「検査数>検査頭数」に切り替わった時点の陽性率についても算出した。

### 3 各検査法の平均検査数

P法または交差P法が最小検査法だったケースについて、個別法、P法、交差P法の平均検査数を算出し比較した。またP法と比較した交差P法の検査数の削減率(以下、削減率)を算出することで、交差P法の有効性を評価した。

## 結果

### 1 ケース毎の検査数の算出(表1)

個別法では陽性数に関わらず追加検査は不要であった。陽性数が0の時はP法、交差P法ともに追加検査は不要であった。陽性数が1の時はP法で追加検査が必要となったが、交差P法では不要であった。陽性数が2以上の時は、P法、交差P法ともに追加検査が必要であった。

### 2 最小検査法の選択表作成(表1, 図4)

陽性数0においては、全てのケースでP法が選択された。陽性数1においては、全てのケースで検査数が少なく、かつ追加検査が不要な交差P法が選択された。陽性数2以上のケースでは、検査数が検査頭数を超えるケースで個別法が選択され、それ以外では交差P法が選択された。「検査数>検査頭数」に切り替わった時点の陽性率(表2)は9.0~22.2%と、検査頭数により若干の幅があったが、平均値は11.6%であった。

### 3 各検査法の平均検査数(図5)

平均検査数は、陽性数0ではP法が最も少なかった。陽性数1以降は交差P法が最も少なく、削減率は16.1%→29.1%→33.2%と上昇し、陽性数3の時に最大と

なった。それ以降は 30.8%→24.6%→20.2%→15.3%→6.7%と低下していった。

## 考察

最小検査法の選択と削減率の算出の結果から、まず陽性数が 0 においては、全てのケースで P 法が最小検査法であり、最も効率的な検査法であることが示された。次に陽性数が 1 においては、全てのケースで交差 P 法が最小検査法であり、削減率は 16.1%、かつ追加検査を行う必要がなく、最も効率的な検査法であることが示された。陽性数 2 以上では、陽性率が一定値（平均 11.6%）を超えると、検査数が検査頭数を上回るため、初めから個別法を選択することが最も効率が高く、一方、陽性率が一定値以下であれば、交差 P 法が最小検査法に選択され、最も効率的な検査法であることが示された。また、交差 P 法は陽性数 3 前後で 30% 近くの高い削減率を示すなど、陽性数が 1~5 程度の農場において特に効率の良い検査法であることも判明した。そこで国内の乳用牛における飼養頭数別の戸数分布（図 6）とヨーネ病発生状況（表 2）をみると、ヨーネ病発生農場の多くは 100 頭以下の飼養規模で、陽性数が 1~3 頭であるケースが多く、これは交差 P 法が効果的である条件と一致していた。このことから、国内のヨーネ病発生農場におけるスクリーニング遺伝子検査において、交差 P 法は強力なツールとなることが示唆された。また、ケース毎に最小検査法の選択表を作成したことで、農場ケースに合わせた最も効率のよい検査法を速やかに選択することが可能となった。

現在、ヨーネ病のスクリーニング検査に用いられる抗体検査は、抗体価の上昇が糞便への排菌開始から約 1 年後と遅く、また非特異反応も多くみられることから、その検出感度と特異度の低さが課題となっている。これに対する改善策として、P 法、さらに今回有効性が示された交差 P 法を組み合わせたスクリーニング遺伝子検査を行うことで、より早い段階での感染牛摘発が可能となり、国内のヨーネ病清浄化に向けて大きな前進が期待できる。遺伝子検査をスクリーニングに用いるにあたり、採材方法が採血から採糞へ変わる負担や検査人員の配置などを考慮すると、乗り越えるべき課題は多いものの、すでに本県では、過去にヨーネ病の発生が見られた 100 頭規模の酪農場で、定期的な全頭検査を交差 P 法によるスクリーニング遺伝子検査で実施し、良好な結果が得られている。今後はさらに、牛のヨーネ病防疫対策要領<sup>2)</sup>に基づく発生農場での同居牛検査においても、交差 P 法の活用を検討し、今回作成した最小検査法の選択表に基づき、農場の現状に合わせた効率的かつ正確な検査を行うことで、発生農場の早期清浄化を目指したい。

## 参考文献

- 1) 動物衛生研究部門, プール糞便を用いたヨーネ病スクリーニング遺伝子検査法,  
[http://www.naro.affrc.go.jp/niah/disease/files/NIAH\\_yone\\_poolscr\\_160401.pdf](http://www.naro.affrc.go.jp/niah/disease/files/NIAH_yone_poolscr_160401.pdf)
- 2) 牛のヨーネ病防疫対策要領 (平成 25 年 4 月 1 日 24 消安第 5999 号)  
[https://www.naro.affrc.go.jp/niah/disease/files/boeki\\_taisaku\\_yoko\\_130401.pdf](https://www.naro.affrc.go.jp/niah/disease/files/boeki_taisaku_yoko_130401.pdf)



陽性数と 検査方法	0			1			2			3			4			5			6			7			8			9					
	個	P	交	個	P	交	個	P	交	個	P	交	個	P	交	個	P	交	個	P	交	個	P	交	個	P	交	個	P	交			
9				9	10	6																											
16				16	12	8	16	18	12																								
25				25	13	10	25	23	14	25	28	18																					
36				36	14	12	36	24	16	36	34	21	36	40	28																		
49				49	15	14	49	25	18	49	35	23	49	45	30	49	54	39															
64				64	17	16	64	27	20	64	37	25	64	47	32	64	57	41	64	67	52												
81				81	19	18	81	29	22	81	39	27	81	49	34	81	59	43	81	69	54	81	79	67									
100				100	20	20	100	30	24	100	40	29	100	50	36	100	60	45	100	70	56	100	80	69	100	90	84						
平均検査数				48	15	13	53	25	18	59	36	24	66	46	32	74	58	42	82	69	54	91	80	68	100	90	84						

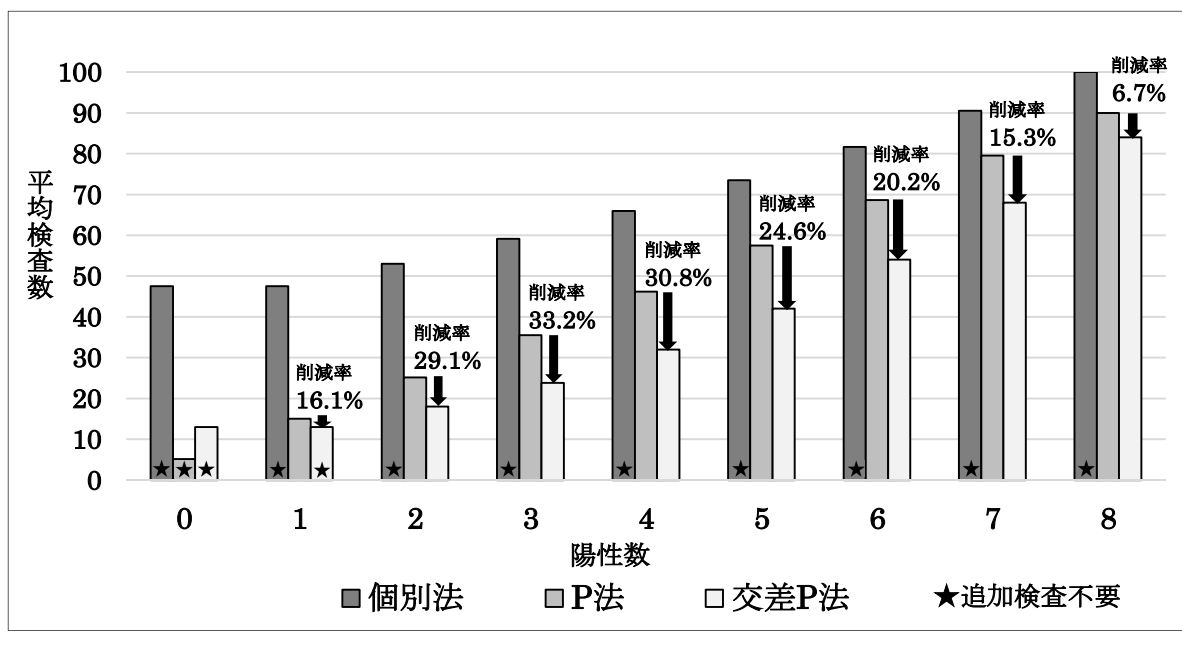


図5 検査法別の平均検査数と削減率

表2 「検査数>検査頭数」に切り替わる陽性率

検査頭数	9	16	25	36	49	64	81	100	平均
陽性数	2	3	4	5	6	7	8	9	5.5
陽性率(%)	22.2	18.8	16.0	13.9	12.2	10.9	9.9	9.0	11.6

表3 H23~H27のヨーネ病摘発状況

	①延べ戸数	②発生頭数	①/②
北海道	1047	2301	2.2
都府県	441	766	1.7
茨城県	21	34	1.6

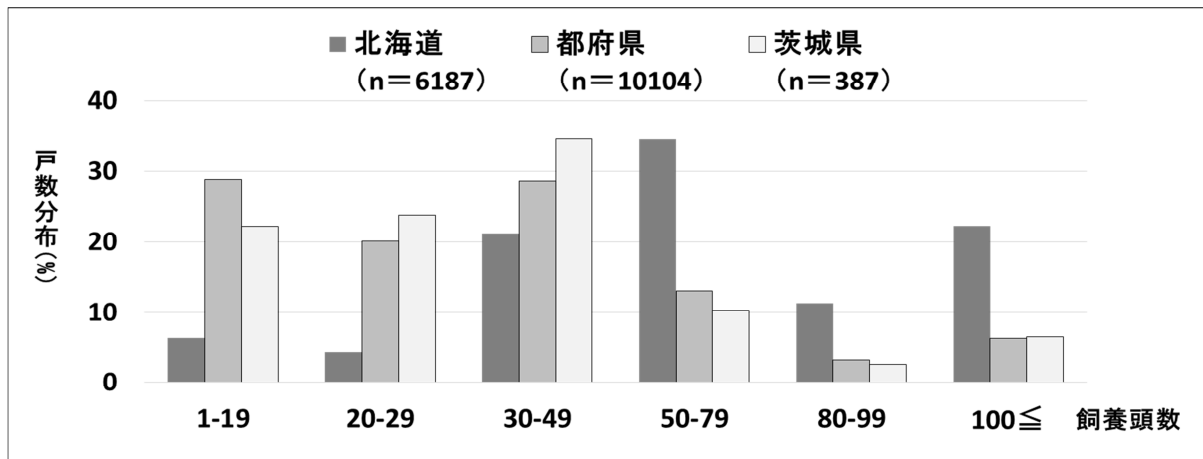


図6 飼養頭数別の乳用牛飼養戸数分布 (%)

## 1 4. 牛白血病抗体陽性率の高い和牛繁殖農場における牛白血病対策

県北家畜保健衛生所

○高安 真理子 山下 薫  
赤上 正貴 大谷 芳子

地方病型牛白血病は、牛白血病ウイルス（以下、BLV）の感染により引き起こされる。牛白血病（以下、BL）は、平成10年の家畜伝染病予防法の改正に伴い、届出伝染病に指定されて以降増加の一途をたどっている。近年、本県では、肉用牛のと畜場での摘発が増加し、特に、黒毛和種肥育牛で摘発された場合は生産者の経済的損失は大きく、経営上の問題となっている。また、和牛繁殖農家では血統を重視する傾向があり、BLV感染母牛の早期更新は進まない。そして、家畜市場で販売した子牛が肥育後と畜場でBLと診断された場合、家畜市場や繁殖農家が肥育農家からその損害の補てんを求められる事例が起こっている。

今回、BLV抗体陽性率が極めて高い和牛繁殖農場2戸において、母子感染リスクに着目して母牛とその産子の調査を行ったので、その概要を報告する。

### 和牛繁殖農場の概要（表1）

A農場は、黒毛和種の母牛18頭と産子を繁殖牛舎2棟、育成牛舎1棟の計3棟と自農場の放牧場（分離放牧未実施）で飼養し、一部の妊娠牛は町営の共同牧場（分離放牧実施）に預けている。母牛のBLV抗体陽性率は平成28年現在94%（17頭）である。また、出荷子牛がBLV抗体陽性で肥育農家からクレームがあり、平成28年から子牛の飼養方法を自然哺育から人工哺育へ変更している。

B農場は、黒毛和種の母牛40頭と産子を繁殖牛舎1棟、子牛舎2棟、育成牛舎1棟の計4棟で飼養している。母牛のBLV抗体陽性率は平成28年現在85%（34頭）で、母牛は妊娠鑑定後、公共牧場（分離放牧未実施）に放牧し、省力的な管理を行っている。また、過去に出荷子牛がと畜場でBLと診断されたことを契機に、平成20年から子牛に初乳と人工初乳を併用し早期離乳を行っている。

両農場の母牛は、自家育成による更新が主体で、外部導入する際、BLV抗体の有無は確認していなかった。一方、1頭ごとに注射針や直検手袋などの交換を行うなど、人為的な伝播防止対策は徹底して実施されていた。

### 材料及び方法

#### 1 検査材料

A農場は、BLV感染母牛とその産子16ペアの血液、B農場は、母牛40頭とBLV感染母牛から生まれた子牛15頭の血液を検査材料とした。



## 2 検査方法

### (1) リンパ球数測定

EDTA 血液について、自動血球計数装置でリンパ球数を測定した。

### (2) 抗体検査

血清について、市販の牛白血病エライザキットを用いて実施した。

### (3) 遺伝子検査

塩化アンモニウム法により EDTA 血液から分離した白血球について、市販のキットを用いて DNA を抽出し、リアルタイム PCR を実施した。なお、一部の検体については nested PCR を実施した。

### (4) 統計処理

年齢、リンパ球数、BLV 遺伝子量は、Microsoft Excel を用いて回帰分析を行った。相関係数（以下、R）の絶対値の評価は表 2 とし、併せてマン・ホイットニーの U 検定を行った。

## 調査方法及び結果

### 1 BLV 感染状況

#### (1) BLV 感染母牛の産子の感染状況（表 3）

A 農場は、BLV 感染母牛の産子 16 頭のうち 7 頭が BLV 遺伝子陽性で、感染率は 44%であった。そして、9 頭が BLV 未感染子牛であった。

B 農場は、BLV 感染母牛の産子 15 頭のうち 3 頭が BLV 遺伝子陽性で、感染率は 20%であった。そして、12 頭が BLV 未感染子牛であった。

#### (2) 給与初乳の違いによる産子の BLV 感染状況（表 4）

BLV の母子感染ルートを、大きく 4 つに分けた場合(図 1), そのうち胎子感染、産道感染は、畜主による感染予防対策を講じることができない。そこで、予防対策を講じることができる初乳を介しての感染について人工初乳給与の効果をも A 農場で調査した。BLV 感染母牛から生まれた子牛を人工初乳給与群 6 頭、対照として BLV 感染母牛の初乳給与群 6 頭に区分し、生後 0 から 82 日目にリアルタイム PCR を行った。その結果、各区分とも 3 頭（感染率 50%）から BLV 遺伝子が検出され、BLV 感染母牛の初乳給与による感染率に差がなかった。なお、この調査は、吸血昆虫による水平感染の影響を除くため、吸血昆虫の影響を受けにくい時期（11 月～6 月）に生まれた子牛を対象として実施した。

#### (3) 吸血昆虫の感染リスク

A 農場で未越夏の BLV 未感染子牛 7 頭について、6 月下旬、8 月初旬、10 月上旬の 3 回、抗体検査を行い、吸血昆虫による水平感染の影響を調査した。その結果、10 月上旬に 1 頭が BLV 抗体陽性になり、抗体陽転率は 14%であった。

### 2 母牛のリンパ球数と他のパラメーターの感染リスク（表 5）

### (1) リンパ球数

A 農場では、BLV 感染子牛の母牛の平均リンパ球数は 7,629/ $\mu$ l(中央値 7,752), BLV 未感染子牛の母牛の平均リンパ球数は 4,588/ $\mu$ l (中央値 4,050) であった。B 農場では、BLV 感染子牛の母牛の平均リンパ球数は 6,400/ $\mu$ l (中央値 6,200), BLV 未感染子牛の母牛の平均リンパ球数は 3,717/ $\mu$ l (中央値 3,550) であった。感染子牛の母牛のリンパ球数は、A, B 農場ともに未感染子牛の母牛より高く、特に A 農場は、中央値で U 検定を行ったところ、感染子牛の母牛が有意に高かった (図 2, A 農場  $p=0.02$ , B 農場  $p=0.63$ )。

### (2) 年齢とリンパ球数

A 農場では、BLV 感染子牛の母牛の平均年齢は 5.6 歳 (中央値 5.1), BLV 未感染子牛の母牛の平均年齢は 9.5 歳 (中央値 9.0) であった。B 農場では、BLV 感染子牛の母牛の平均年齢は 9.5 歳 (中央値 8.0), BLV 未感染子牛の母牛の平均年齢は 12.1 歳 (中央値 12.3) であった。農場ごとにリンパ球数と年齢を比較した結果、A 農場では負の相関 ( $R=0.52$ ,  $p=0.04$ ) が、B 農場では強い負の相関 ( $R=0.77$ ,  $p=0.02$ ) が認められた (図 3)。このことから、母牛の BLV 抗体陽性率が高い農場では、年齢が若くリンパ球数が多い母牛ほど感染子牛を娩出する傾向があった。

### (3) BLV 遺伝子量とリンパ球数

A 農場では、BLV 感染子牛の母牛の平均 BLV 遺伝子量は 175copies/10ngDNA(中央値 134), BLV 未感染子牛の母牛の平均 BLV 遺伝子量は 133copies/10ngDNA (中央値 80) であった。B 農場では、BLV 感染子牛の母牛の平均 BLV 遺伝子量は 360copies/10ngDNA (中央値 325), BLV 未感染子牛の母牛の平均 BLV 遺伝子量は 22copies/10ngDNA (中央値 1) であった。農場ごとにリンパ球数と BLV 遺伝子量を比較した結果、A 農場では正の相関 ( $R=0.53$ ,  $p=0.03$ ) が、B 農場では強い正の相関 ( $R=0.82$ ,  $p=0.007$ ) が認められた (図 4)。そのため、母牛の BLV 抗体陽性率が高い農場では、リンパ球数が多い母牛ほど BLV 遺伝子量が多く、産子や同居牛への感染源となる可能性が示唆された。感染子牛の母牛の BLV 遺伝子量は、A, B 農場ともに未感染子牛の母牛より高く、特に B 農場は、中央値で U 検定を行ったところ、感染子牛の母牛が有意に高かった (図 5, A 農場  $p=0.35$ , B 農場  $p=0.03$ )。

また、A 及び B 農場の母牛全体の BLV 遺伝子量は、平均値は A 農場 142copies/10ngDNA, B 農場 114copies/10ngDNA で差が認められなかったが、中央値は A 農場 85copies/10ngDNA, B 農場 8copies/10ngDNA で B 農場が著しく低かった (表 6)。次に、個体別に BLV 感染の有無と BLV 遺伝子量の関係を見ると、A 農場では BLV 抗体陽性の個体は全てリアルタイム PCR で BLV 遺伝子が検出されたが、B 農場では BLV 抗体陽性であっても BLV 遺伝子が検出されない個体が 7 頭いた。この 7 頭について nested PCR で BLV 遺伝子の有無を検査した結果、全て

の個体が BLV 遺伝子を保有していないことを確認した。さらに、過去に実施した BLV 検査の結果を検索すると、5 頭が BLV 抗体陽性でありながら、BLV 遺伝子が検出されていなかった。

## 考察

管内の和牛繁殖農家 92 戸の BLV 抗体陽性率は、戸数ベースで 70%、頭数ベースで 50%であった（平成 28 年 3 月～9 月）。また、農場ごとの BLV 抗体陽性率は、50%を超える高い農場が 50%（46 戸）あり、BLV が高度にまん延していることが分かっている。そこで、BLV 抗体陽性率が高い 2 農場の協力を得て、母牛とその産子について母子感染リスクの調査を行った。

BLV 母子感染率は、これまで 4%程度と考えられていたが、ウイルス保有量が多い BLV 感染母牛の産子では 40%以上との報告もある。今回の調査で、母子感染率 40%以上の農場では、産子は出生時点で既に BLV に感染しているため、初乳対策などのまん延防止対策を徹底しても、結果に結びつかないことが分かった。

BLV 感染母牛から BLV 感染子牛が生まれる要因について、リンパ球数、年齢、BLV 遺伝子量に着目して母牛側のリスク分析を行った。その結果、年齢が若くリンパ球数が多い母牛、特にリンパ球数が多く BLV 遺伝子量が多い母牛から、BLV 感染子牛が生まれる可能性が高いことが示唆された。

また、BLV 遺伝子量は、個体によってバラツキが大きいため、母子感染のリスクを BLV 遺伝子量のみで判断すると見誤る可能性がある。そのため、BLV 抗体陽性率が高い農場では、リンパ球数と BLV 遺伝子量を組み合わせて指標とし、母子感染リスクの高い牛と低い牛を振り分け、自農場の後継牛を作出するための繁殖基幹牛を決めていくことが BLV 対策の第 1 歩と考える。

BLV の感染ルートの中で人為的なコントロールが難しい吸血昆虫による感染は、当所が管内 12 農場 117 頭について 5 年間調査した結果、夏季陽転率（いわゆる吸血昆虫による感染率）は、平均 11%（4～25%）であった。今回、A 農場の夏季陽転率は 14%、母子感染率は 44%で、吸血昆虫による水平感染リスクは垂直感染リスクより低いことから、BLV 抗体陽性率が高い農場の BLV 対策は、母子感染に重きを置いた対策が重要であることが分かった。

さらに、今回、B 農場に BLV 抗体陽性で BLV 遺伝子が検出されない牛が 7 頭飼養されていた。近年、BL 発症に関連する抵抗性遺伝子を保有する牛の存在が明らかになっている。抵抗性遺伝子をホモ又はヘテロで保有する牛は、BLV に感染しても抗体は保有するが BLV が増殖することなく発症を回避でき、産子や同居牛への感染源にならない。今後、B 農場で、BLV 抗体陽性率が高いにもかかわらず母子感染率が低い要因を、抵抗性遺伝子に着目して関連性を明らかにしていきたい。

**表 1** 農場の概要

農場	飼養頭数	BLV 抗体陽性頭数 (陽性率)	畜舎構造	放牧
A	黒毛和種 18 頭	17 頭(94%)	繁殖牛舎 2 棟, 育成牛舎 1 棟	自農場 (分離未実施)
				町営共同牧場 (分離実施)
B	黒毛和種 40 頭	34 頭(85%)	繁殖牛舎 1 棟, 子牛舎 2 棟, 育成牛舎 1 棟	公共牧場 (分離未実施)

**表 2** 相関係数の評価

R (絶対値)	評価
$0 \leq R < 0.2$	相関はほとんどない
$0.2 \leq R < 0.4$	弱い相関関係がある
$0.4 \leq R < 0.7$	相関関係がある
$0.7 \leq R < 0.9$	強い相関関係がある
$0.9 \leq R < 1.0$	極めて強い相関関係がある

**表 3** 遺伝子検査での BLV 感染母牛の産子の BLV 感染率

農場	検査頭数	感染	未感染	感染率
A	16 頭	7 頭	9 頭	44%
B	15 頭	3 頭	12 頭	20%
合計	31 頭	10 頭	21 頭	32%

**表 4** 給与初乳の違いによる産子の BLV 感染状況

初乳区分	検査頭数	感染	未感染	感染率
人工初乳	6 頭	3 頭	3 頭	50%
母牛の初乳	6 頭	3 頭	3 頭	50%

**表 5** A 農場及び B 農場のリンパ球数, 年齢, BLV 遺伝子量の結果

農場	母牛区分	リンパ球数 ( $\mu\text{l}$ )			年齢 (歳)			遺伝子量 (copies/10ngDNA)		
		平均値	$\pm\text{SD}$	中央値	平均値	$\pm\text{SD}$	中央値	平均値	$\pm\text{SD}$	中央値
A	感染子牛の母牛 (n=7)	7,629	1,856	7,752	5.6	1.9	5.1	175	156	134
	未感染子牛の母牛 (n=9)	4,588	1,798	4,050	9.5	2.1	9.0	133	199	80
B	感染子牛の母牛 (n=3)	6,400	2,606	6,200	9.5	4.8	8.0	360	108	325
	未感染子牛の母牛 (n=6)	3,717	1,314	3,550	12.1	3.6	12.3	22	33	1



図 1 BLV 母子感染ルート

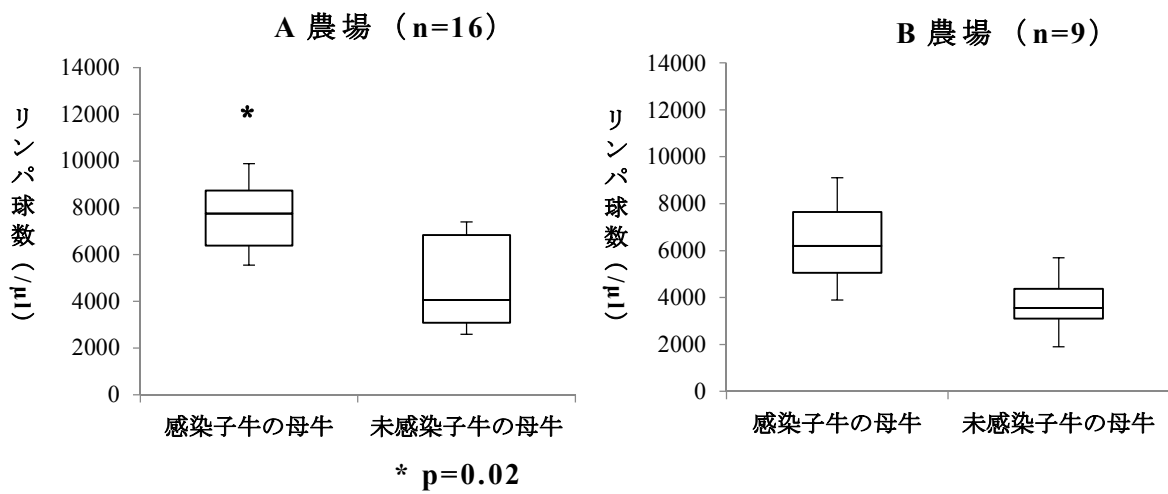


図 2 A 農場及び B 農場のリンパ球数の比較

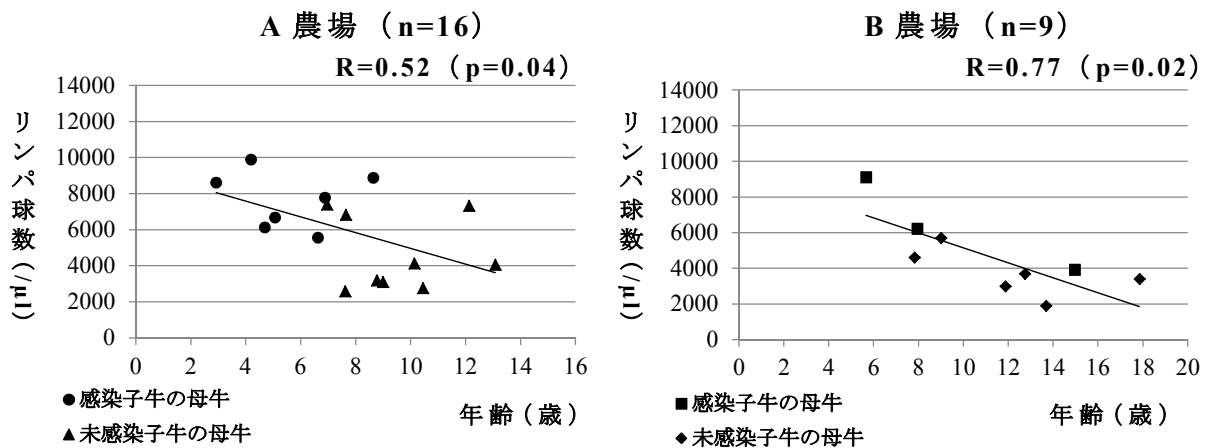


図 3 A 農場及び B 農場のリンパ球数と年齢の相関関係

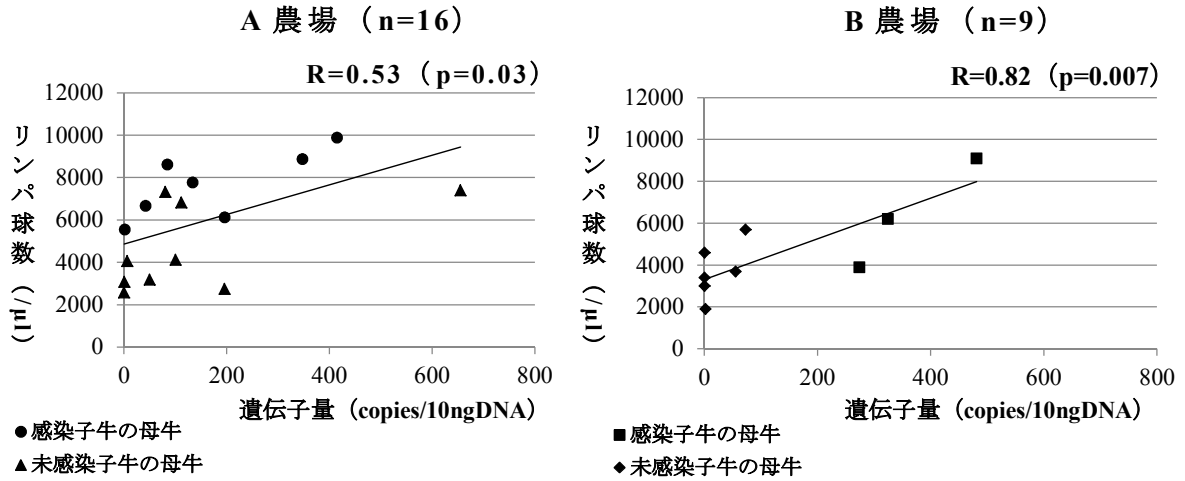


図 4 A 農場及び B 農場のリンパ球数と BLV 遺伝子量の相関関係

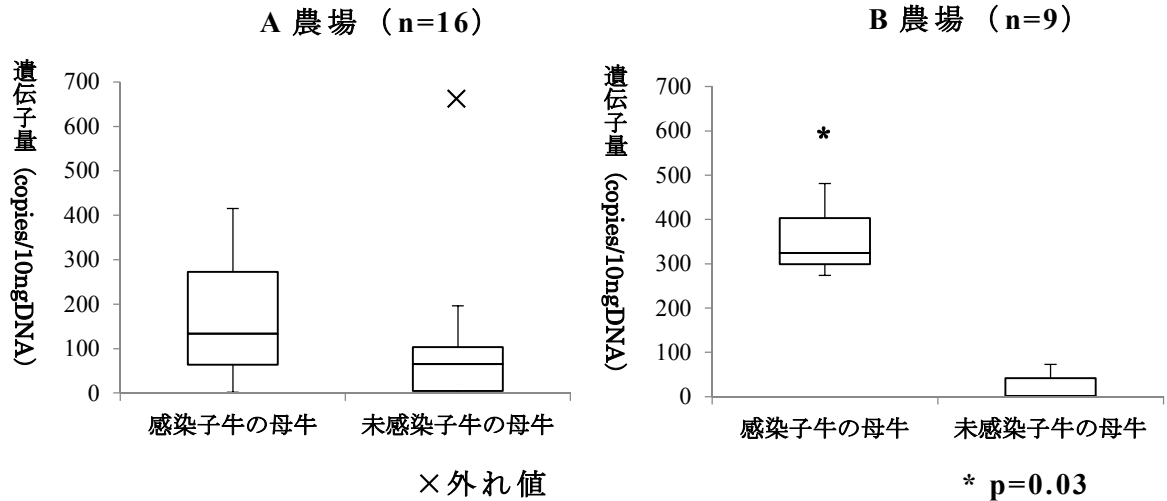


図 5 A 農場及び B 農場の BLV 遺伝子量の比較

表 6 A 農場及び B 農場の母牛全体のリンパ球数及び BLV 遺伝子量の比較

農場	リンパ球数 (/μl)			遺伝子量 (copies/10ngDNA)		
	平均値	±SD	中央値	平均値	±SD	中央値
A	5,742	2,404	6,104	142	179	85
B	4,479	1,641	4,250	114	168	8

p=0.31

p=0.19

## 15. 管内放牧場での牛白血病対策の現状と牛乳頭腫の集団発生について

県北家畜保健衛生所

○鈴木 篤実 赤上 正貴  
矢口 裕司 都筑 智子

放牧場での牛白血病ウイルス（以下、BLV）の水平感染対策は、農林水産省の「牛白血病に関する衛生対策ガイドライン」では、BLV抗体陰性牛（以下、陰性牛）とBLV抗体陽性牛（以下、陽性牛）を分ける分離放牧が有用とされている。

管内の分離放牧を実践する放牧場で、BLV抗体の保有状況を経時的に調査し、BLV対策としての分離放牧の効果を検証したので、その概要を報告する。また、当該放牧場で牛乳頭腫の集団発生があったため、その概要も併せて報告する。

### 放牧場の概要

当該放牧場は、公共放牧場で、近隣市町で飼養されている乳用種育成牛（以下、乳用牛）、黒毛和種繁殖牛（以下、肉用牛）が通年で預託されている。管理者は3人で、放牧期間は4～11月で、12月～3月は牛舎に移して飼養している。放牧は、16牧区を利用し、従来から乳用牛と肉用牛を群分けして放牧を実施していた。また、平成27年度からは、抗体陽性牛と陰性牛の分離放牧をしている。一方、牛舎は2区画のフリーバーンと別に独房が3つあるが、舎飼いになる冬季や病牛が増える夏場には、牛舎内での陽性牛と陰性牛の分離飼育ができていない。

平成28年度は放牧期間中に肉用牛40頭、乳用牛23頭、合計63頭が預託され、陽性牛群4群、陰性牛群4群の併せて8群に区分し分離放牧した。放牧期間中は、毎月、ピロプラズマ症の検査を行う放牧衛生検査（以下、放牧検査）と陰性牛のBLV抗体検査（以下、抗体検査）を実施し、治療が必要な牛は牛舎へ、抗体検査で抗体の陽転が認められた牛（以下、陽転牛）は、速やかに陽性牛群へ移動した。

また、平成28年7月から体表に腫瘤のある牛が確認され、10月までに10頭が罹患した。局所に軟膏を塗布するなど治療していたが、罹患牛が増えていったため当所で対策を検討した。

### 平成28年度における放牧場の衛生検査

#### 1 牛白血病対策

##### （1）材料と方法

抗体検査は、入牧牛及び放牧期間中の毎月の陰性牛血清について、市販の牛白血病エライザキット（JNC株式会社）を用いて実施した。また、11月の検査時には、全自動血球計算機を用いてリンパ球数の測定を行った。

## (2) 検査結果

平成28年度は、入牧時検査では63頭中31頭（49%）が抗体陽性であった。陰性牛32頭のうち、放牧期間中に15頭（46%）で抗体の陽転が認められた。陽転が認められた期間は8～10月であった（図1）。

また、11月に採材した陽性牛28頭を、年齢別のリンパ球数を指標としたBLVリスク判定に用いられる「Bendixenの鍵」を用い、リンパ球数を正常値か正常値以上に分類したところ、リンパ球数が12,000/ $\mu$ lを超えるリンパ球増多症（PL牛）の乳用牛が1頭いた（表1）。当該牛は、導入時から抗体陽性で、かつ、虚弱で発育不良のため、放牧期間中、常に牛舎で飼養されていた。

## (3) まとめ

平成28年度は、放牧期間中に陰性牛の約半数で8月から10月にかけて抗体陽転が認められたため、アブなどの吸血昆虫による水平感染が主な要因と考えられた。当該放牧場では、①輪換放牧の際に陽性牛群と陰性牛群の牧区が隣り合っ牛同士が接触する場所があること、②放牧検査時に陽性牛と陰性牛が混在する時間があること、③入牧頭数が増えると分離放牧ができなくなり、一時的に混在する時期があること、④病畜が増えると牛舎内で分離飼育ができないことなど、分離放牧を行う上で飼養管理の問題点があり、陽性牛群から陰性牛群へBLVが感染する機会が複数内在していた（図2、表2）。そのような中、平成27年度は陽転率5.6%と分離放牧の効果が認められたが、平成28年度のBLV陽転率は、46%と非常に高かったことから、BLV陽転率の上昇は飼養管理以外にも原因があると考えられた。そのため、リンパ球数の測定結果と牛の飼養状況からその原因を検討したところ、陽性牛との同居歴がある陰性牛で陽転牛が多いことが分かり、陽性牛との同居が感染拡大に大きく関与していることが推察された。そして、陽性牛群の中にPL牛がいれば、短時間の接触であっても、高い確率で水平感染が起きる。そのため、平成28年度の分離放牧は、牧区や牛舎内での分離が昨年度に比べて不完全であったことに加え、PL牛が飼養されていたことが、陽転率の増加の要因となっていることが推察された。

## 2 牛乳頭腫の集団発生

### (1) 材料と方法

#### ア 病理組織学的検査

症状を示す牛10頭中6頭から採材した腫瘍7検体について、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、定法に従いパラフィン包埋、薄切後、切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を実施した。また、抗ウシパピローマウイルス（以下、BPV）抗体を用いた免疫染色を（国研）農研機構 動物衛生研究部門（以下、動衛研）に依頼した。



## イ ウイルス検査

症状を示す牛10頭中 8 頭から採材した腫瘍10検体について、BPVを検出するプライマー（Subgroup A,B, PV unibersal）を用いてPCR及び遺伝子解析を動衛研に依頼した。

### （2）結果

#### ア 臨床検査所見

発症した10頭についての腫瘍の発生部位は概ね共通しており、下腹部、乳房、乳頭、外陰部周囲、目の周囲、口の周囲、耳など複数個所にみられた。また、被毛の少ない正中線上や外陰部での腫瘍の発生が特徴的であった（写真1，2）。

#### イ 病理組織学的検査所見

全ての検体で、真皮における線維性増殖を特徴とする線維性乳頭腫が認められた。また、No.2，6，7では、表皮の有棘層の過形成及び角質層の過角化に加え、顆粒層及び有棘層に核内封入体が認められた。また、BPVに対する免疫染色では、核内封入体と一致して、No.2，6，7で陽性反応が認められた。

#### ウ ウイルス検査

全ての検体からBPVの特異遺伝子が検出され、遺伝子解析の結果、すべて既報のBPV1型の塩基配列と一致した（表3）。

### （3）まとめ

全ての検体からBPV1型が検出され、免疫染色で陽性が確認できない例もあったが、組織診断では全て線維性乳頭腫で、複数の牛で多発したことから、BPV1型による牛乳頭腫の集団発生と診断した。管理者からの聞き取りでは、4月に体表に腫瘍のある乳用牛1頭を入牧させていたことが判明したが、当該牛は6月末にピロプラズマ症を発症し死亡していた。調査の結果、牛乳頭腫の発症牛は、当該牛と同居歴のある乳用牛を中心に発症していること、全ての発症牛から同一のウイルスが検出されたことから、当該牛が集団発生の感染源であり、群の再編成等により感染した牛が別な牛群に組み分けられて、感染を拡大させたと考えられた。また、牛乳頭腫は、7月～10月にかけて多発していること、被毛が少なく、また皮膚が比較的柔らかいダニの好刺咬部位に腫瘍が発生していることから、ダニの刺咬傷から体表に付着したウイルスが侵入し、数か月の潜伏期間を経て、発症に至った可能性ある。牛乳頭腫は、一般的に牛の成長に伴って自然治癒することが多いが、治癒には数か月から1年を要すると言われている。本発生では、10月～11月に腫瘍の脱落や退縮が認められており、発症から3～4か月間の経過を経て、症状改善の兆しがみられた。

## 今後の放牧衛生対策

### 1 牛白血病対策

平成28年度のBLV陽転率は非常に高いため、今後も分離放牧を継続するには飼養管理を見直す必要があった。そこで、管理者が抗体検査により摘発したBLV陽性牛を分離し忘れないように、また分離放牧の意識を向上させるために、陽性牛を識別しやすくするタグなどの目印の装着を検討する必要がある。その上で、吸血昆虫に対して持続的に効果がある薬剤（ペルメトリン製剤を含んだイヤータグ）により水平感染リスクの低減を図ることや、牧野のアブの生息数を減らすため、アブトラップを適切に設置するなどの感染防除対策の強化を図ることを併せて実施しなければならない。また、これまでの知見で、BLVの感染初期は、抗体検査でBLV陽性牛を摘発できないことがある。また、BLV感染牛の早期摘発には、遺伝子検査が有効であることが分かっている。そのため、入牧検査時には、遺伝子検査とリンパ球の測定を行い、陽性牛の確実な摘発とBLV遺伝子量やリンパ球数を指標としたBLV感染源となるリスクの高い牛を確実に群分けする必要がある。

## 2 牛乳頭腫対策

牛乳頭腫の治療法は、結紮や切除による腫瘍の除去、ヒノキチオール製剤の塗布などの局所的な治療、ハトムギの給与、ヨクイニンやインターフェロン製剤などの薬物投与などが知られているが、何れも治癒までに時間がかかることから、卓効がある治療法はない。今回の発生でもヒノキチオール製剤による治療が施された牛もいたが、著しい効果はなかった。今回は、牛乳頭腫を発症している牛が感染源になったことから、入牧時の臨床検査を徹底することが重要と考える。また、牛に対する免疫の賦活に着目して、現在、レバミゾール、鼻粘膜ワクチン、ハトムギの投与を実施しており、治療効果の評価を検討しているところである。

## 総括

平成28年度のBLV陽転事例を経験して、BLVだけでなくBPVの感染を防ぐためには吸血昆虫対策が重要であることを痛感した。また、本事例の中で、牛舎で治療する牛が増えた結果、感染が拡大し、BLV感染や牛乳頭腫の発症を増加させたと考えられる個体があった。放牧場では、感染症のまん延を防止する上で、個体の状態に合わせた群管理や群編成が大切である。そのためにも、ピロプラズマ症をはじめとする疾病予防と牛の健康管理が重要である。今後は、放牧場関係者に対して説明会を開くなど、情報を共有し、次年度以降の総合的対策を検討する必要がある。

稿を終えるにあたり、免疫組織化学検査・DNA検出のPCRと塩基配列解析の実施、並びにご助言・ご指導を賜りました、動衛研 芝原友幸先生、渡辺聡子先生に深謝いたします。

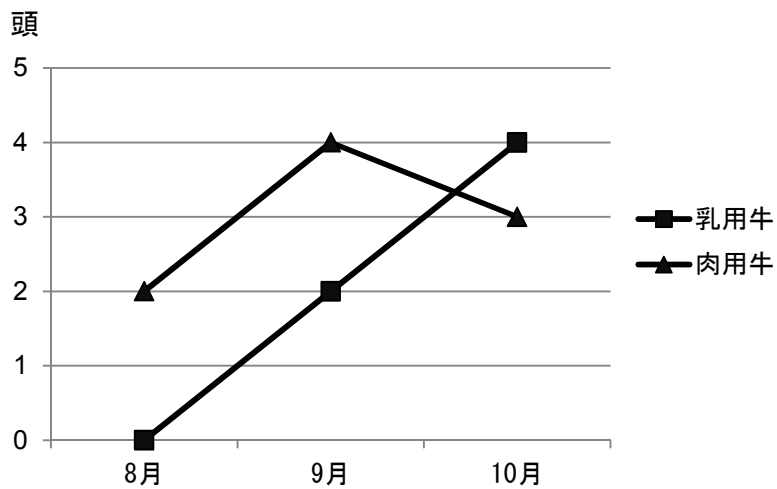


図1 平成28年度陽転頭数の推移

表1 リンパ球数を指標とした感染リスクの分類

	正常値	正常値以上
肉用育成牛	2	1
肉用成牛	8	6
乳用牛	7	4

単位：頭数

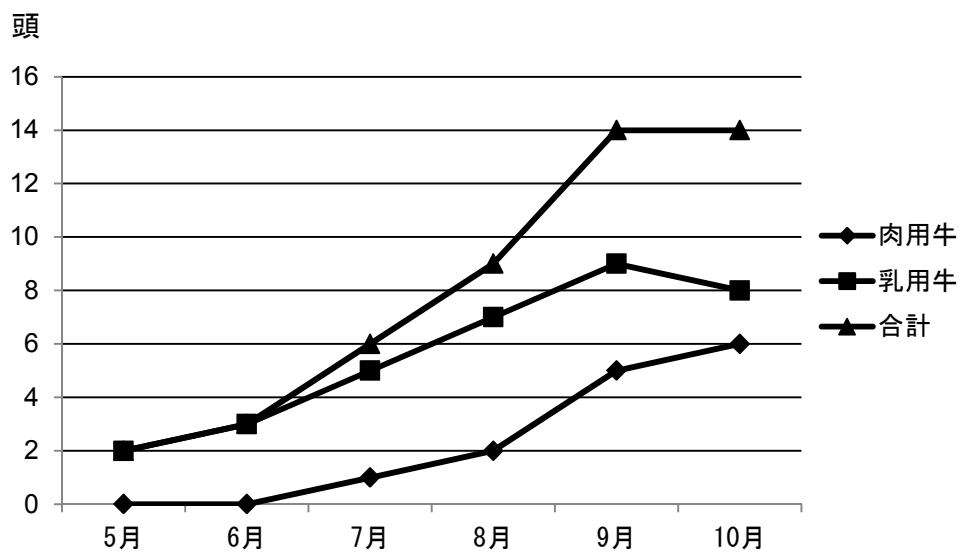


図2 月ごとの牛舎内での病畜数の推移

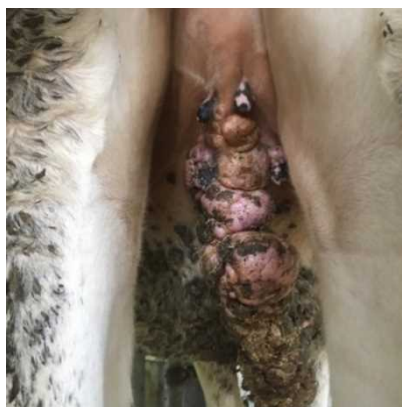
**表 2** 陽転牛における感染の機会と該当数

感染の機会		小計	合計
陽性牛との同居	牧区で陽性牛との同居	3	14
	牧区で陽転牛との同居	8	
	牛舎で飼養した期間がある	3	
牧区間	牧区間で陽性牛と接触した可能性	5	5
放牧検査	追い込み柵の使用（放牧検査時）	4	9
	パドックの使用（放牧検査時）	5	
入牧前	入牧元農場で水平感染した可能性	1	1

※項目に重複する牛あり



**写真 1** 陰部にできた腫瘍



**写真 2** 正中にできた腫瘍（尾側より撮影）

**表 3** 免疫染色と PCR 結果

品種	発症牛 No	採材部位	検査結果	
			免疫染色	PCR
黒毛和種	1	尾部	NT	1 型
ホルスタイン種	2	左頸部, 右下腹部	+	
	3	外陰部	-	
	4	右下腹部	-	
	5	口角	NT	
	6	左内眼角	+	
	8	左大腿部, 下腹部	+	
		眼瞼	NT	
	耳介	-		
	外陰部	-		

NT : 検査せず