

目 次

I 業務の概要

1	沿 革	1
2	所 在 地	1
3	施 設	1
4	組 織 機 構	2
5	業 務 内 容	2
6	職員事務分掌	2
7	主 要 備 品	3
8	家畜衛生技術研修実施状況	5
9	病性鑑定事業成績	6
10	牛海綿状脳症（B S E）サーベイランス検査成績	8
11	高病原性鳥インフルエンザモニタリング検査成績	8
12	家畜伝染病抗体等調査事業成績	9
13	家畜衛生対策事業成績	10
14	ビタミン依頼検査	11
15	試験研究課題	12
16	職員発表題目一覧	14

II 調査研究成績

1	つなぎ飼い酪農家における牛伝染性リンパ腫ウイルスの清浄化事例	17
2	<i>Mycoplasma bovis</i> の迅速診断と定量分析を目的としたリアルタイム PCR 法の検証	25
3	3年間の預託牧場での BRDC 発生状況と体表温センサによる発熱検知について	31

I 業務の概要

1 沿革

昭和24年7月

栃木県家畜衛生試験所及び宇都宮家畜保健所（後に衛生所）を宇都宮市塙田町に設置

昭和26年3月

宇都宮家畜保健衛生所と栃木県家畜衛生試験所を合併、中央家畜保健衛生所と改称

昭和39年4月

中央家畜保健衛生所の新築移転に伴い、宇都宮市戸祭に家畜衛生研究所を併設

昭和45年4月

宇都宮（昭和41年に中央から改称）家畜保健衛生所の新築移転により単独公所となる。

昭和46年2月及び昭和48年3月

ウイルス部門の病性鑑定施設及び生化学部門の病性鑑定施設を整備

昭和51年4月

組織機構の改編により、微生物部と病理部の2部制となる。

平成11年1月12日

宇都宮市平出工業団地内に新築移転（宇都宮家畜保健衛生所と同一建物内）

平成12年4月1日

農務部の組織改編により、県央家畜保健衛生所家畜衛生研究部となる。

令和2年3月

県央家畜保健衛生所構内に野生いのしし検査棟を設置

2 所在地

〒321-0905 栃木県宇都宮市平出工業団地6-8

TEL 028-689-1274 FAX 028-689-1279

利用交通機関

(1) JR岡本駅（JR宇都宮線）下車

ア 徒歩：15分

イ 関東バス：JR宇都宮駅 行き（3分）三菱製鋼 下車 徒歩5分

(2) JR宇都宮駅下車

ア 関東バス：JR岡本駅 行き（11分）三菱製鋼 下車 徒歩5分

3 施設

敷地面積 5,483.0㎡

建物 本館 1,842.0㎡

《内訳》1階 977.0㎡

2階 775.0㎡（家畜衛生研究部）

《家畜衛生研究部内訳》ウイルス検査室 102.3㎡

細胞培養室 28.1㎡

病理検査室 90.0㎡

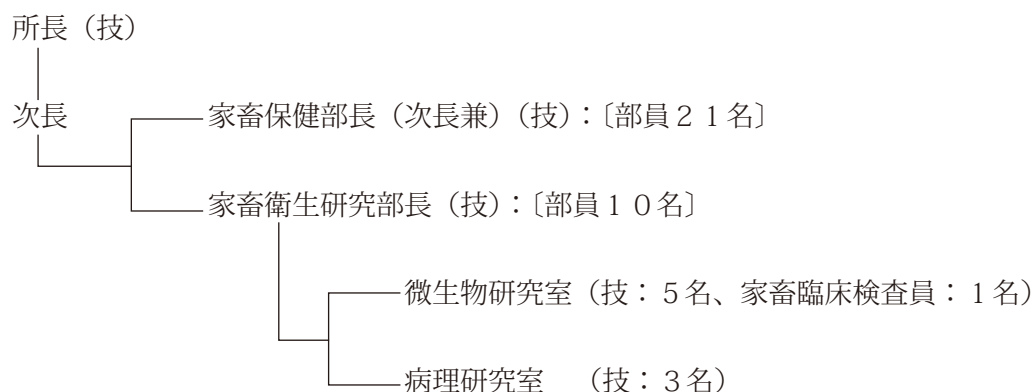
生化学検査室 120.0㎡

免疫遺伝検査室 41.7㎡

付属建物 実験動物舎 50.0㎡

野生いのしし検査棟 55.0㎡

4 組織機構



5 業務内容

- (1) 精密病性鑑定に関すること
- (2) 試験研究に関すること
- (3) 家畜伝染病抗体等調査に関すること
- (4) 牛海綿状脳症（BSE）サーベイランス検査に関すること
- (5) 家畜衛生対策事業に関すること
- (6) 技術指導（研修等）に関すること
- (7) その他家畜衛生に関する調査・研究に関すること

6 職員事務分掌

所長 田島 和彦
 次長 高橋 孝志
 部長 山口 修

令和2年4月1日現在

室名・職名	氏名	分掌事務
微生物研究室		
主任 研究員	米山 州二	1 精密病性鑑定に関すること
主 任	齊藤かおり	2 ウイルス学的・細菌学的検査及びその調査研究に関すること
技 師	小笠原 悠	3 免疫学的・血清学的検査及びその調査研究に関すること
技 師	加藤貴誉湖	4 牛海綿状脳症（BSE）サーベイランス検査に関すること
技 師	土合 理美	5 畜産物の安全性確保に係る調査研究に関すること
家畜臨床検査員	船生 幸枝	6 防疫課が行う試験及び検査の技術的指導に関すること
病理研究室		
主任 研究員	平野 佳世	1 精密病性鑑定に関すること
主任 研究員	戸崎 香織	2 疫学的な調査研究に関すること
主 任	安西真奈美	3 病理学的検査及びその調査研究に関すること
		4 生化学的検査及びその調査研究に関すること
		5 調査研究の企画調整及び成果の普及に関すること

7 主要備品

品名	規格	数量
落射式蛍光顕微鏡	オリンパス AX-70	1
遺伝子情報解析診断システム	バイオラット XAチラー解析システム	1
PCR装置	Applied Biosystems Gene Amp PCR System9700	1
〃	Applied Biosystems 2720 サーマルサイクラー	1
〃	Applied Biosystems SimpliAmp	4
リアルタイムPCR装置	Applied Biosystems 7500	1
〃	タカラバイオThermalCyclerDiceRealtimeSystemTP800	1
〃	Quantstudio5 リアルタイムPCRシステム	1
PCR泳動装置	MUPID / MUPIDクーラー各2	4
クビトフルオロメーター(核酸濃度測定装置)	Qubit 2.0 Fluorometer	1
アルミブロック恒温槽	DTU-IB	3
ハイブリダイゼーションオープン	MHS-301	1
ハンドシェーカー	SHK-COCK	1
真空乾燥機	エッペンドルフ コンセントレーター 5301	1
プレート洗浄機	バイオラッド モデル1575	1
マイクロプレートインキュベーター	イワキ MPI-100	1
倒立型システム顕微鏡	オリンパス IX-70-PM	1
倒立型顕微鏡	オリンパス CK	1
〃	ニコンMF A20100	1
〃	オリンパス CK40	1
顕微鏡画像撮影装置	デジタルカメラ:フジHC-300Z, パソコン:NEC MATENX	1
回転培養装置	ヒラサワ HDR-12-T	2
超低温冷蔵庫	サンヨー MDF-792AT	1
〃	サンヨー MDF-592AT	1
〃	サンヨー MDF-493AT	1
超低温フリーザー	パナソニック MDF-374-PJ	1
〃	サンヨー vMPR-411FR	1
メディカルフリーザー	サンヨー MDF-U536D	1
〃	サンヨー MDF-U536	1
〃	サンヨー MDF-U235	1
メディカル冷蔵庫	パナソニック MPR-414F-PJ	1
小型冷蔵ショーケース	SSB-C1	1
破砕機	Fast Prep FP120	1
高速冷却遠心機	トミー RX-200	1
超高速遠心分離機	ベックマン 70EAS型	1
多用途小型冷却遠心機	CF7D2	1
微量高速冷却遠心機	日立 CF15RN	2
冷却遠心機	トミー LX-120	1
CO ₂ インキュベーター	池本理化 10-0212	1
〃	サンヨー MCO-96 / MCO-185	2
フラン器(鶏)	昭和フランキ PP-03 / PP-05	2

品名	規格	数量
オートクレーブ	MCB3032S	1
〃	トミーSD-321	1
カラムクロマトグラフ	CONSEPLC100-01	1
電子天秤	Mettler AB104-S	1
超音波破碎器	タイテック VP-30S	1
安全キャビネット	日立 SCV1905EC	1
〃	日立 SCV1904EC	2
〃	日立 SCV1304EC	2
クリーンベンチ	日立 PCV1305BNG	1
〃	日立 PCV1915BNG	1
乾熱滅菌器	ヤマト SH600	1
低温インキュベーター	ヤマト IL600	1
高速破碎機	安井器械 Multi-Beads shocker	1
温度調整付き動物飼育装置	エアテック TAI-851	1
蒸留水製造装置	アドバンテック アクエリアスRFD342NA	1
超純水製造装置	ミリポアMili-Q Advantage	1
生物顕微鏡	ニコン ECLIPSE E600	1
超広視野生物顕微鏡	オリンパス BX-50-54	1
顕微鏡画像撮影装置	デジタルカメラ フジHC-2500, パソコン富士通FMV	1
顕微鏡用デジカメシステム	キャノン MN NY-X5 スーパーシステム	1
凍結切片作製装置	ライカ CM1100	1
ロータリーマイクロトーム	カールツァイス HM360	1
滑走式マイクロトーム	リトラトーム REM-710・SUF240W	1
密閉式自動固定包埋器	サクラTissue-Tek VIP 5 ジュニア	1
プレパラート自動染色装置	白井松器械 HISTAINER TSC-120W	1
原子吸光光度計	日立 Z-5000	1
高速液体クロマトグラフ	日立 L-7000シリーズ	1
分光光度計	日本分光 V-550	1
自記デンシトメーター	ADVANTEC DM303型	1
ロータリーエバポレーターシステム	EYELA N-3N(×2)、DPE2100、CA-1110ほか	1
吹付式試験管濃縮装置	EYELA MGS-2100 / MG2200	2
マッフル炉	ISUZU AT-SI3	1
振とう機	TAITEC SR-2W	1
ケルダール窒素分解装置	KJ-SEX	1
PHメーター	HORIBA LAQUA F-71	1
CO ₂ インキュベーター	Panasonic MCO-170AICUVH-PJ	1
暗視野顕微鏡	OLYMPUS BX51	1
自動核酸抽出装置	キアゲン QIAcubePREMIUM	1
蛍光分光光度計	日立ハイテクノロジー F-2700	1
ゲル泳動装置	アトー社 AE-6125	1
冷却水循環装置	EYELA CA-1114	2
マイクロプレートリーダー	コロナ電気 SH-1300	2
電動12チャンネルピペット	エッペンドルフ Xplorer Plus 12ch	1

品名	規格	数量
乾熱滅菌器	ヤマトSK801	1
ジェット式洗浄機	Miele PG8583	1
高速液体クロマトグラフ	日立 Chromaster5000シリーズ	1
落射式蛍光顕微鏡	オリンパス BX-53 / U-HGLGPS	1
顕微鏡画像撮影装置	オリンパス DP74	1
紫外線ゲル撮影・分析装置	バイオラッド Gel Doc Ez Imager	2
生物顕微鏡	オリンパス BX53	1
顕微鏡画像撮影装置	カメラ:オリンパスDP74, パソコン:eizo, hp	1
プレパラート自動封入機	白井松器械 RCM-900-II	1
パラフィン包埋ブロック作製装置	サクラTissue-Tek TEC6 エンベディング・モジュール	1
パラフィン包埋ブロック作製装置	サクラTissue-Tek TECプラス クライオ・コンソール	1
アルミブロック恒温槽	TAITEC DTU-1BN	2
PCR泳動装置	Mupid-2plus	4
プレート洗浄機	バイオラッド ImmunoWash1575	1
凍結切片作製装置	ライカ CM1520	1
安全キャビネット	日立 SCV-100 8EC2A2	1
薬用冷蔵ショーケース	PHC MPR-514R-PJ	1
超低温フリーザー	PHC MDF-DC200V-PJ	1
冷凍機付きインキュベーター	PHC MIR-154S-PJ	1
卓上小型遠心機	himac CT15RE	1
卓上多本架遠心機	TOMY LCX-200	1
12チャンネルピペット	サーモサイエンティフィック FINNPIPETTE F1	1
薬用保冷庫	PHC MPR-N450FH-PJ	1
全自動製氷機	ホシザキ FM-120K	1
オートクレーブ	TOMY LSX-500	1
蒸留水製造装置	ADVANTEC RFD343 NC	1
殺菌線消毒ロッカー	ナビス AS1-G	1
DNAシークエンサー	Applied Biosystems Seqstudio Genetic Analyzer	1

8 家畜衛生技術研修実施状況

名称	実施時期	受講者	講師	内容
令和2年度 病性鑑定担当者 打合せ会議	R2. 7. 30	畜産振興課職員 県央・県南・県北 家畜保健衛生所 職員 17名	当部職員	病性鑑定の迅速・的確化のため の留意点等 鶏の病性鑑定時の採材の進め 方について（実習）
栃木県慢性疾病 診断技術(PCR) 研修	R2. 5. 19 5. 22 6. 12	県央・県南・県北 家畜保健衛生所 職員 6名	当部職員	遺伝子検査(PCR)の方法（実 習）

9 病性鑑定事業成績

(1) 依頼者内訳

依頼者 区分 畜種	民間 獣医師	飼養者	農協等 団体	市町村	県機関	その他	計
乳用牛	17	17	1	0	3	0	38
	158	62	1	0	37	0	258
肉用牛	43	37	0	0	5	0	85
	57	103	0	0	10	0	170
馬	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
豚	0	21	0	0	1	0	22
	0	100	0	0	7	0	107
めん羊 山羊	6	5	0	0	0	0	11
	18	5	0	0	0	0	23
鶏	1	6	0	0	0	0	7
	2	55	0	0	0	0	57
その他	4	3	0	0	0	0	7
	13	32	0	0	0	0	45
計	71	89	1	0	9	0	170
	248	357	1	0	54	0	660

上段：件数、下段：頭羽数

件数は依頼された回数

同時に異なる目的（動機）を持って依頼された病性鑑定にあたっては、それぞれ1件とした。

頭羽数は実頭羽数

(2) 項目別実施状況

区分		ウイルス	病理	生化学	細菌	寄生虫	その他	計
乳用牛	件数	24	17	1	5	0	0	47
	頭数	126	19	1	126	0	0	272
肉用牛	件数	41	51	4	19	0	0	115
	頭数	121	53	7	27	0	0	208
馬	件数	0	0	0	0	0	0	0
	頭数	0	0	0	0	0	0	0
豚	件数	19	17	1	7	0	0	44
	頭数	101	28	3	14	0	0	146
めん羊 山羊	件数	4	9	0	2	0	0	15
	頭数	13	10	0	3	0	0	26
鶏	件数	6	7	0	2	0	0	15
	羽数	55	31	0	5	0	0	91
その他	件数	5	4	0	1	0	0	10
	頭羽数	35	10	0	3	0	0	48
計	件数	99	105	6	36	0	0	246
	頭羽数	451	151	11	178	0	0	791

※細菌の頭羽数は菌株を含む

(3) 処理状況

区 分		全取扱数 A+C	施設内処理				他への検査依頼			
			処理数	A/ (A+C)	診断実績	B/ (A+C)	処理数	C/ (A+C)	診断実績	D/ (A+C)
			A	(%)	B	(%)	C	(%)	D	(%)
乳用牛	件数	38	38	100.0	21	55.3	0	0.0	0	0.0
	頭数	258	258	100.0	159	61.6	0	0.0	0	0.0
肉用牛	件数	85	85	100.0	40	47.1	0	0.0	0	0.0
	頭数	170	170	100.0	83	48.8	0	0.0	0	0.0
馬	件数	0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	頭数	0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
豚	件数	22	21	95.5	6	27.3	1	4.5	1	4.5
	頭数	107	102	95.3	30	28.0	5	4.7	5	4.7
めん羊 山羊	件数	11	11	100.0	8	72.7	0	0.0	0	0.0
	頭数	23	23	100.0	15	65.2	0	0.0	0	0.0
鶏	件数	7	6	85.7	6	85.7	1	14.3	1	14.3
	羽数	57	44	77.2	44	77.2	13	22.8	13	22.8
その他	件数	7	6	85.7	4	57.1	1	14.3	1	14.3
	頭羽数	45	41	91.1	15	33.3	4	8.9	4	8.9
計	件数	170	167	98.2	85	50.0	3	1.8	3	1.8
	頭羽数	660	638	96.7	346	52.4	22	3.3	22	3.3

10 牛海綿状脳症（BSE）サーベイランス検査成績

家保名	検査受入頭数								検査成績	
	96か月齢以上死亡牛	48～95か月齢の起立不能牛	BSE疑似患畜・関連牛	ヨーネ病患畜牛	と畜場牛(拒否・死亡等)	平成8年生まれ牛	その他	陽性頭数	陰性頭数	
県 央	164	161	0	0	2	0	0	1	0	164
県 南	48	47	1	0	0	0	0	0	0	48
県 北	364	352	3	0	5	0	0	4	0	364
合 計	576	560	4	0	7	0	0	5	0	576

11 高病原性鳥インフルエンザモニタリング検査成績

「高病原性鳥インフルエンザ及び低病原性鳥インフルエンザに関する特定家畜伝染病防疫指針」に基づき、発生予察のためのモニタリング検査を実施。

(1) 定点モニタリング検査

家保名	市 町	検査戸数	検査羽数 (10羽/月)	ウイルス分離検査 (スワブ)		抗体検査 血清※	検査成績 (羽数)	
				気管	クロアカ		陽性	陰性
県央	鹿沼市	1	110	110	110	1	0	110
	日光市	1	120	120	120		0	120
	高根沢町	1	120	120	120		0	120
県南	栃木市	2	240	240	240	1	0	240
	佐野市	1	120	120	120		0	120
県北	大田原市	1	110	110	110	1	0	110
	那須塩原市	1	120	120	120		0	120
	那須烏山市	1	120	120	120		0	120
	那須町	1	10	10	10		0	10
合計	9	10	1,070	1,070	1,070	3	0	1,070

※血清は、各家保が行うスクリーニング検査で、抗体陽性を示した検体の精密検査

(2) 強化モニタリング検査（家きん 100 羽以上飼養する農場の抗体検査）

家畜伝染病予防法第 5 条第 1 項に基づき、各家保が行う強化モニタリングの ELISA 検査で、抗体陽性を示した検体の精密検査

家保名	検査戸数	検査羽数	抗体検査	検査成績（羽数）	
			血清	陽性	陰性
県央	0	0	0	0	0
県南	0	0	0	0	0
県北	0	0	0	0	0
合計	0	0	0	0	0

12 家畜伝染病抗体等調査事業成績

(1) 牛流行熱等抗体調査

家畜伝染病予防法第5条第1項に基づき、県内20戸（14市町）の未越夏牛等について、経時的に採血し、アカバネ病、牛流行熱、イバラキ病、アイノウイルス感染症及びチュウザン病の流行状況調査を実施。また、令和元年10月に県内でブルータングの発生を確認したことから、当該疾病についても調査

家保名	実施地区	疾病名	陽性頭数／検査頭数			
			R2年6月	8月	9月	11月
県央	鹿沼市 日光市 真岡市 上三川町 芳賀町 塩谷町	アカバネ病	4 / 27	1 / 27	0 / 27	0 / 27
		牛流行熱	0 / 27	0 / 27	0 / 27	0 / 27
		イバラキ病	0 / 27	0 / 27	0 / 27	0 / 27
		アイノウイルス感染症	0 / 27	0 / 27	0 / 27	0 / 27
		チュウザン病	0 / 27	0 / 27	0 / 27	0 / 27
		ブルータング	0 / 27	0 / 27	3 / 19	9 / 27
県南	栃木市 佐野市 下野市	アカバネ病	0 / 9	0 / 9	0 / 9	0 / 7
		牛流行熱	0 / 9	0 / 9	0 / 9	0 / 7
		イバラキ病	0 / 9	0 / 9	0 / 9	0 / 7
		アイノウイルス感染症	0 / 9	0 / 9	0 / 9	0 / 7
		チュウザン病	0 / 9	0 / 9	0 / 9	0 / 7
		ブルータング	0 / 9	0 / 9		0 / 7
県北	大田原市 那須塩原市 那須烏山市 那須町 那珂川町	アカバネ病	8 / 27	1 / 27	0 / 27	0 / 27
		牛流行熱	0 / 27	0 / 27	0 / 27	0 / 27
		イバラキ病	0 / 27	0 / 27	0 / 27	0 / 27
		アイノウイルス感染症	0 / 27	0 / 27	0 / 27	0 / 27
		チュウザン病	0 / 27	0 / 27	0 / 27	0 / 27
		ブルータング	1 / 27	0 / 27	0 / 12	6 / 26
合 計		アカバネ病	12 / 63	2 / 63	0 / 63	0 / 61
		牛流行熱	0 / 63	0 / 63	0 / 63	0 / 61
		イバラキ病	0 / 63	0 / 63	0 / 63	0 / 61
		アイノウイルス感染症	0 / 63	0 / 63	0 / 63	0 / 61
		チュウザン病	0 / 63	0 / 63	0 / 63	0 / 61
		ブルータング	1 / 63	0 / 63	3 / 31	15 / 60

検査方法：中和試験、ただしブルータングはゲル内沈降反応

(2) 各種抗体等調査

検査疾病名 (検査方法)		検査戸数	検査頭数	陽性戸数	陽性頭数
牛ウイルス性下痢 [BVD]	ウイルス分離	80	596	29	39
	遺伝子検査 (PCR法) ※1	785	15,220	34	45
	抗体調査 (中和試験)	44	257	33	173
豚熱 [CSF]	抗体検査 (ELISA法)	194	6,266	193	5,828
	抗体検査 (中和試験)	23	339	22	285
豚流行性下痢 [PED]	抗体検査 (中和試験)	19	184	3	22
豚伝染性胃腸炎 [TGE]	抗体検査 (中和試験)	18	180	6	50

※1 県外預託に係る依頼検査を含む

(3) 野生いのししの調査成績

「豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針」及び「アフリカ豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針」に基づき、県内で死亡又は捕獲された野生いのししにおける豚熱及びアフリカ豚熱の感染状況を調査

捕獲 (発見) 市町	豚熱 [CSF]				アフリカ豚熱 [ASF]	
	遺伝子検査 (PCR法)		抗体検査 (ELISA法)		遺伝子検査 (PCR法)	
	検査頭数	陽性頭数	検査頭数	陽性頭数	検査頭数	陽性頭数
足利市、栃木市、佐野市、鹿沼市、日光市、小山市、真岡市、大田原市、矢板市、那須塩原市、那須烏山市、益子町、茂木町、市貝町、野木町、高根沢町、那珂川町	483 (39)	9 (5)	478 (34)	20 (2)	483 (39)	0 (0)

() 内は死亡いのしし

13 家畜衛生対策事業成績

畜産物安全性確保対策事業

ア 動物用医薬品危機管理対策

(ア) 動物用医薬品の品質確保検査

検査品目	収去品名	検査項目	結果
ビタミン剤＋肝臓疾患用剤	ビタミンK1注	フィトナジオン	適合
無機質製剤＋糖類・血液代用剤	等張糖加リンゲル液「KS」	塩化カルシウム塩素	適合

(イ) 薬剤耐性菌の発現状況調査（対象菌種：サルモネラ、黄色ブドウ球菌）
 県内分離株の薬剤感受性成績

薬剤名	菌種	阻止円の判定基準(mm)			耐性率(%)※1	
		感受性	中間	耐性	栃木県	参考：全国※2 平成30年度
					Sal 2株 SA 8株	Sal 143株 SA 248株
アンピシリン	サルモネラ	≥17	14-16	≤13	0.0	37.8
ベンジルペニシリン	黄色ブドウ球菌	≥29	—	≤28	0.0	—
セファゾリン	サルモネラ	≥23	20-22	≤19	0.0	5.6
	黄色ブドウ球菌	—	—	—	—	—
セフォタキシム	サルモネラ	≥26	23-25	≤22	0.0	0.0
	黄色ブドウ球菌	—	—	—	—	—
セフォキシチン	黄色ブドウ球菌	≥22	—	≤21	0.0	—
ストレプトマイシン	サルモネラ	≥15	12-14	≤11	0.0	54.5
	黄色ブドウ球菌	—	—	—	—	—
ゲンタマイシン	サルモネラ	≥15	13-14	≤12	0.0	2.8
	黄色ブドウ球菌				0.0	2.4
カナマイシン	サルモネラ	≥18	14-17	≤13	0.0	11.9
	黄色ブドウ球菌	—	—	—	—	—
エリスロマイシン	黄色ブドウ球菌	≥23	14-22	≤13	25.0	14.5
アジスロマイシン	黄色ブドウ球菌	≥18	14-17	≤13	0.0	—
テトラサイクリン	サルモネラ	≥15	12-14	≤11	0.0	47.6
	黄色ブドウ球菌	≥19	15-18	≤14	0.0	14.9
ナリジクス酸	サルモネラ	≥19	14-18	≤13	0.0	9.8
シプロフロキサシン	サルモネラ	≥31	21-30	≤20	50.0	2.8
	黄色ブドウ球菌	≥21	16-20	≤15	0.0	8.1
クロラムフェニコール	サルモネラ	≥18	13-17	≤12	0.0	11.2
	黄色ブドウ球菌				0.0	9.7
ST合剤	サルモネラ	≥16	11-15	≤10	0.0	15.4
コリスチン	サルモネラ	—	—	—	—	5.6

※1 判定基準が中間及び耐性の株を含む

※2 微量液体希釈法による検査成績

14 ビタミン依頼検査

検査項目	依頼所属名	区分	検査頭数 (延べ)	備考
ビタミンA ビタミンE β-カロチン	県央家畜保健衛生所	肥育牛	126	
	県北家畜保健衛生所	肥育牛	405	
計			531	

15 試験研究課題

(1) 地方病性牛伝染性リンパ腫（EBL）の感染率低減を目指した清浄化プログラムの確立

(H29-R 2年度)

目的： 牛伝染性リンパ腫ウイルス（BLV）感染に誘発される EBL の発生数は全国的に増加の一途をたどっている。EBL は低い発症率ながらも、と畜場で摘発された場合には枝肉が全部廃棄になるなど、経済的損失の大きい疾病の一つである。県内では感染率が 50% を超える牛飼養農家も多く、効果的な感染防除対策の構築が求められている。そこで、本県の EBL 対策がより推進されるべく、農場での実証試験を通じて BLV の効果的な感染率低減対策の確立と検査方法の効率化を目指し、家保職員向けの清浄化プログラム及び指導マニュアルを作成する。

内容： 過去の調査により一生涯にわたり血中ウイルス量が少ない感染牛が存在することが明らかとなった。また、農場内での感染状況を長期的に調査した結果、このような感染牛は周囲の牛へウイルスを伝播させにくい低リスク牛と推定された。そこで、この低リスク牛について、感染牛から感染拡大を防ぐ防壁としての機能を有するかを検証するため、平成 29 年春から管内 2 農場（つなぎ牛舎）にて感染牛と非感染牛の境界に低リスク牛を配置し、牛舎内での感染状況を観察した。4 年間の調査の結果、2 農場（A、B 農場）における感染率は A 農場では 82.1% から 64.3% に低下し、B 農場では 58.6% から 0% と EBL 清浄化を達成した。これらの成績から、低リスク牛を防波堤とした感染防除は有効であることが示され、簡便かつ効率的に牛舎内の感染を防除できると考えられた。本対策に加え、感染牛の計画的な更新、子牛～育成牛への感染防除対策並びに搾乳順の変更（感染牛を最後に搾乳）等を組み合わせることで、つなぎ牛舎での EBL 早期清浄化は十分に可能と考えられた。なお、これまで得られた知見を整理し、現在、清浄化及び指導マニュアルを作成中である。

(2) 多検体処理を可能とするウイルス性疾患の遺伝子検査法の確立（R 元～2 年度）

目的： ウイルス遺伝子を検出する検査は、検体の前処理（核酸の抽出等）、標的遺伝子の増幅及び電気泳動による結果判定と 3 段階の工程が必要となり、多検体処理を必要とする状況下では要する手間やコストが格段に大きくなる。そこで、現場で特に問題となっている慢性疾病（BVD、PRRS、EBL）を対象に、簡便かつ低コストで多検体処理が可能な遺伝子検査の確立を目指し、各家畜保健衛生所への普及を図り、汎用化を目指す。

内容： 豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス（PRRSV）を標的としたインターカレーター法リアルタイム PCR を検討した。既報の 3 種類のプライマーセット（A、B、C）を検証したところ、ORF7 領域を標的とした A セットは非特異増幅がほとんど生じず、ワクチン株を用いた検証では現行の Nested-PCR 法と感度も遜色ないことが判明した。そこで、A セットについて Nested-PCR 法を実施済みの野外検体 187 検体を用いて両法の成績を比較した結果、全体一致率 92.0%、陰性一致率（特異度）95.2%、陽性一致率（感度）66.6% となり、陽性一致率では良好な成績が得られなかったものの、Nested-PCR 法で陰性と判定されてもリアルタイム PCR では明瞭に増幅される検体も散見され、いずれの手法でも全ての PRRSV 遺伝子を検出することはできないことが推定された。したがって、今回確立したリアルタイム PCR 法は PRRSV 遺伝子を検出するスクリーニング法として有用と考えられ、現行の Nested-PCR と比較して検査時間の大幅な短縮（約 5 時間→約 1 時間）かつ低コスト化（1 検体あたり 320 円→150 円）が図られ、現場での PRRS 対策が一層推進されることが期待された。

(3) 家畜の呼吸器系疾病に関する細菌学的研究（R元～3年度）

目的： マイコプラズマ・ボビス（Mb）は、主に子牛に肺炎、中耳炎等を引き起こす病原細菌である。Mbは、感染力が強く農場内に急速にまん延しうるため、迅速診断が求められるが、現行では分離培養により定性的に行われているため、判定までに時間を要する。また、検査材料（鼻腔スワブ）の培養のみでは、健康保菌牛と肺炎発症牛の区別がつかず、正確に病態を反映することが困難である。そこで、迅速かつ定量的に Mb の検査が可能なりアルタイム PCR の定量解析系を確立し、定量値（菌数）をもって、肺炎発症の指標となるか検証する。

内容： 材料は、農場で採材した牛の鼻腔スワブ（33農場 110検体）及び病理解剖に供した牛の鼻腔スワブ及び肺（各 90 検体）を用いた。材料全 290 検体について分離培養及び qPCR を実施し、分離培養と qPCR 成績を比較した。また、Mb 遺伝子量と農場の感染状況との関連性（農場採材材料）及び肺炎発症との関連性（病理解剖材料）を検証した。分離培養と qPCR 成績の比較では、qPCR は分離培養より感度が高いことが判明した。農場の感染状況との関連性では、Mb 遺伝子陽性率 50% 以上の農場は、50% 未満の農場より平均遺伝子量が高く、遺伝子量 10^5 以上の検体が必ず存在した。肺炎発症との関連性では、qPCR 陽性 18 頭のうち、Mb 肺炎牛 11 頭は Mb 肺炎ではない 7 頭より鼻腔スワブの平均遺伝子量が有意に高く、 10^6 以上の場合、有意に高い確率で Mb 肺炎牛であったことが判明した。以上から、鼻腔スワブ遺伝子量 10^5 以上の牛が存在する農場は Mb が広範に浸潤している可能性があり、 10^6 以上の牛は肺炎を発症している危険性があると推測された。現行法である分離培養のおおよその所要時間は 3 日～8 日であるが、本検査系の場合、鼻腔スワブからの遺伝子抽出とリアルタイム PCR の所要時間は約 2 時間半であり、分離培養より迅速であり、かつ Mb 肺炎発症の有無を推定可能と思われる。

(4) 豚大腸菌症の診断に有用な採材部位の比較検討（R 2～4 年度）

目的： 豚大腸菌症は、病原性大腸菌により下痢を呈する疾病であり、新生豚では死亡率が高く、離乳豚では死亡率は低いものの回復後も発育が遅延するため経済的被害が大きい。診断は、細菌学的検査が中心となるが、大腸菌は常在菌であり、腸管は死後変化の影響を受けやすい部位であるため、菌量での判断や病理組織学的検査での診断が困難である。また、病理検査材料や小腸内容物の詳細な採材部位が限定されていないため、一律な診断指標がない。そこで、病原性大腸菌の関与が疑われる死亡豚等を用いて病理組織学的検査及び細菌学的検査を実施し、効率的かつ適切に診断可能な採材部位を検討し診断精度向上を図るとともに、農場へのより適切な指導へとつなげる。

内容： 病性鑑定に供した豚 10 頭について、腸管 5 か所（十二指腸、空腸上部、空腸下部、回腸及び結腸）の腸内容物を採取し、細菌学的検査（細菌培養試験、毒素検査及び定着因子の検査）を実施し、同部位の病理組織学的検査を実施した。部位毎に大腸菌群数を測定したところ、空腸上部、空腸下部及び回腸で菌数が多い傾向がみられ、病原性大腸菌（ β 溶血性を示す大腸菌）は空腸下部及び回腸で多い傾向がみられた。結腸では大腸菌群数は豚大腸菌症の診断基準値以下であったものの、病原性大腸菌が多数を占めていた。また、各部位から分離された 56 菌株について、遺伝子検査により毒素因子（LT、ST 及び Stx2e）及び定着因子（F18、F4、F5、F6、F41 及び eae）の保有状況を検査した結果、Stx2e（21/56 株）、F18（43/56 株）を保有していた。病理組織学的検査では、豚大腸菌症との診断には至らなかった。今後は症例数を重ねて検証するとともに、免疫組織化学的手法を活用した診断についても検討する。

(5) 牛呼吸器病バイオマーカーによる病勢評価の確立（H 30～R 2年度）

目的： 牛の呼吸器病症候群（BRDC）は、様々な病原微生物の混合感染やストレスによる免疫状態の低下により発生する複合感染症で、大きな経済的損失を引き起こすことが大きな問題となっている。BRDC 発生時には、被害低減のために早期発見・早期治療が重要であることから、呼吸器病の病態を迅速かつ的確に示す指標が求められている。平成 26～28 年度の試験成績から炎症の指標であるハプトグロビン、ウイルス感染の指標である Mx タンパク、肺特異的炎症の指標である肺サーファクタントプロテイン A が BRDC の早期診断指標として有用であることを示した。早期診断後に、必要な処置を的確に判断するためには、病気に対する抗病力や免疫状態等を含めた病勢を評価することが必要であることから、新たにバイオマーカーを追加し、総合的に病勢の評価について検討し、対策の一助とする。

内容： これまでに、病勢に関連するバイオマーカーとして NK リシンを選定し、病性鑑定時の肺を用いて遺伝子発現量の調査を行い、正常肺と比較して化膿性気管支肺炎を呈する個体で NK リシン遺伝子発現量が高いこと、免疫が低下した個体で遺伝子発現量が低いことを報告した。令和 2 年度は、生体から末梢血単核球（PBMC）を分離し、NK リシン遺伝子量の測定を試みた。BRDC が多発する冬季に、預託牧場に導入された子牛の PBMC 中 NK リシン遺伝子発現量を経時的に測定したところ、導入時に両群に差は認められなかったが、呼吸器症状に対して治療を行った治療群で増加が認められた。そこで、個体ごとの NK リシン遺伝子発現量の最大値を調べたところ、治療群（ 2523.3 ± 950 ）は、健康群（ 1155.2 ± 227.3 ）よりも高い遺伝子発現量を示した。また、一般農場で健康畜の NK リシン遺伝子量を測定したところ、胸腺の発達が未熟で免疫が低下していると推測された子牛で低値（ 5.3 ± 1.3 ）を認めた。以上、NK リシンは呼吸器病の病勢や免疫状態に応じて変動することから、要治療個体の判断に有用であり、早期に治療等の対策をすることにより BRDC による生産性低下の抑制が期待できると考えられた。

16 職員発表題目一覧

発表題目	発表者	発表学会・雑誌等
兎出血病ウイルス 2 型感染による兎出血病の発生事例	戸崎 香織	第 8 回日本獣医病理学専門家協会学術集会
スフェロイド培養法による牛糞便からのロタウイルス C の分離	大竹 祥紘	日本獣医師会雑誌 第 73 号 P443-448

II 調查研究成績

1 つなぎ飼い酪農家における牛伝染性リンパ腫ウイルスの清浄化事例

県央家畜保健衛生所

米山 州二、齊藤 かおり、小笠原 悠、山口 修

はじめに

牛伝染性リンパ腫（BL）は、牛伝染性リンパ腫ウイルス（BLV）感染を起因とする地方病性牛伝染性リンパ腫（EBL）と散発性牛リンパ腫（SBL）に大別される¹⁾。家畜伝染病予防法において監視伝染病に指定されているBLの発生数は年々増加傾向にあり、1年あたりの発生数は1999年の169頭から2019年の4,113頭と、直近20年で20倍以上に増加し²⁾、そのほとんどがEBLによるものと考えられている。これらEBL発生数急増の要因にはBLV感染牛の増加があげられ、過去の全国的な感染状況調査における抗体陽性率は、1980年から1982年の調査では乳用牛4.0%、肉用牛6.7%であったのに対し、2009年から2011年の調査では乳用牛40.9%、肉用牛28.7%まで上昇していたことが報告されている³⁾。本県においても家畜伝染病予防法第5条に基づくヨーネ病検査等の残余血清を用いてBLVの浸潤状況調査を実施しており、2016年から2018年に採取した611戸18,636検体の検査では、乳用牛53.5%、肉用牛29.7%が抗体陽性を示した。さらに、抗体陽性牛が確認された農場は、酪農家94.0%、繁殖和牛農家53.2%で、そのうち陽性率60%を超える農場は酪農家50.6%、繁殖和牛農家20.6%と、特に酪農経営における浸潤度が高い傾向が認められた。このような高度汚染農場では感染牛を全て更新することは不可能で、農林水産省から示された「牛白血病に関する衛生対策ガイドライン（以下、ガイドライン）」⁴⁾に基づく感染防除対策も多岐にわたる上、取組を長期的に継続する必要がある、清浄化達成は容易ではない。この様な状況の中、県内のBLV清浄化対

策を推進させていくためには、高度汚染農場に対して経済的負担が少なく早期清浄化が可能な取組方法や清浄化モデルを提示することが重要である。そこで、今回、搾乳牛の80%以上が感染牛と判定されたつなぎ飼い酪農家において、約4年半にわたる取組の結果、BLV清浄化を達成したのでその概要を報告する。

材料及び方法

1 農場の概要

搾乳牛30頭、子牛及び育成牛20頭程度を飼養する酪農経営で、搾乳牛は対頭式つなぎ牛舎、子牛は子牛ペン、育成牛は育成舎で飼養されていた（図1）。また、農場内にはパドックがあり、搾乳牛は毎日夕刻に放牧していた。当該農場では2014年11月の検査で一部の搾乳牛10頭のうち7頭が抗体陽性を示したことからBLV対策について当所に相談があり、年2回程度の全頭検査を行いつつ、清浄化を目指すこととなった。

2 検査方法及び伝播リスクの評価方法

2015年7月から2020年5月にかけて、97頭延べ396検体の血液を採取し、これらについてKonishiら⁵⁾による報告に準じて血中プロウイルス遺伝子量（PVL）を測定し、DNA100ngあたりのコピー数を算出した。また、抗体検査は市販エライザキット（牛白血病エライザキット、（株）ニッポンジーン、東京）を用いて実施し、血球計算は全自動血球計数機（Celltac Alpha MEK-6450、日本光電工業（株）、東京）により行った。なお、当該農場における感染牛の伝播リスクは経時的なPVLの平均値か

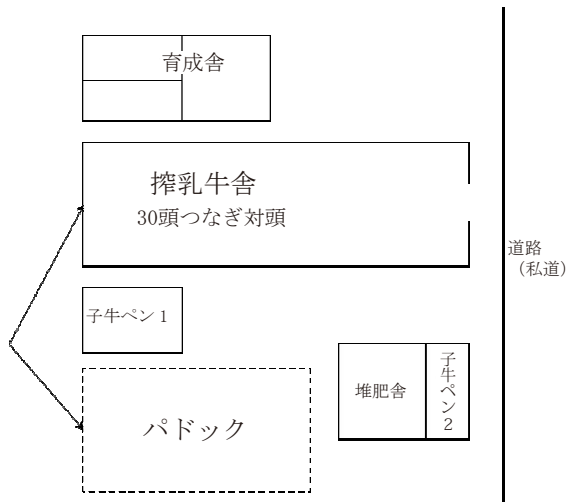


図1 農場全体図



図2 吸血昆虫対策

ら推定し、10,000コピー以上を高リスク、500コピー未満を低リスク、それ以外を中リスクと評価し、畜主へ検査成績を報告する際には高リスク牛を赤、中リスク牛を黄、低リスク牛を青で示し、視覚的に判別できるよう配慮した。さらに、2017年から飼養牛計77頭についてPCR-Sequence based typing法により*BoLA-DRB3*遺伝子の対立遺伝子（アレル）を決定し、ホルスタイン種の抵抗性アレルと推定される*0902又は*14011を保有し⁶⁾、かつPVLが500コピー未満の牛をより信頼性の高い低リスク牛として抵抗性牛と定義した。

3 取組の概要

(1) 感染牛の更新

経営的に無理の生じないよう、高リスク牛だけを優先せず、供用年数や生産性を考慮しながら定期的に感染牛を更新することに努めた。

(2) 非感染後継牛の確保

感染母牛における胎盤感染の頻度を低減させることを目的として、非感染又は高リスク牛以外の牛を対象に雌の性選別精液による人工授精を実施し、多くの非感染後継牛を早期に確保することに努めた。2017年からは非感染牛のみから後継牛を確保する方針とした。

(3) 子牛での感染防止対策

初乳は未処理給与から市販製剤の給与に切り替え、非感染子牛の飼養区画を新設し（図1における子牛ペン2）、さらに全ての非感染子牛はBLV抗体陰性が入牧条件である県内公共牧場に預託した。

(4) 搾乳牛での感染防止対策

2017年春から農場内パドックでの搾乳牛の放牧を完全に中止し、さらに5月からは搾乳牛舎で感染牛と非感染牛を完全分離飼育し、その境界には抵抗性牛を防壁として配置した。また、抵抗性牛を全て出荷した後の対策として、抵抗性アレルを保有した非感染牛を防壁として活用した。

(5) 吸血昆虫対策

夏季（6～10月末）に入口を除く搾乳牛舎周囲に防虫ネット（網目2～4mm）を設置し、ネットには定期的にペルメトリン製剤希釈液を動力噴霧器で噴霧した。また、サンバエ対策として捕獲装置（モウ安心、有限会社サンパック、鳥取）を搾乳牛舎内及びカーフペン付近に設置した（図2）。

結果

2015年10月から2020年5月の出荷頭数は、非感染牛13頭に対して感染牛33頭で、特に2016年から2019年の4年間に感染牛31頭が

表1 出荷頭数と更新率及び事故率の推移

感染牛/非感染牛	出荷/死亡	年					計	
		2015*	2016	2017	2018	2019		2020
感染牛 (頭数)	出荷	1	7	9	7	8	1	33
	死亡	2	3	0	2	0	0	7
非感染牛 (頭数)	出荷	0	0	0	1	4	8	13
	死亡	0	0	1	1	1	0	3
更新率 (%)		—	22.6	31.0	29.6	41.4	39.1	—
事故率 (%)		—	9.7	3.4	11.1	3.4	0	—

*10月から

表2 母牛のPVLとその子牛検査成績

No.	母牛の平均PVL (/100ngDNA)	子牛	
		検査日齢	感染状況
1	53,236	35	+
2	48,667	51	+
3	17,247	34	—
4	11,568	56	+
5	6,172	4	—
6	4,440	31	+
7	4,440	17	—
8	1,703	24	—
9	240	44	+
10	240	3	—
11	9	10	—

表3 感染牛のBoLA-DRB3アレル出現傾向

BoLA-DRB3アレル	出現数	出現率 (%)	上段 下段	平均PVL (/100ngDNA) (最小値-最大値)	平均リンパ球数 (×100/μl)
*0902	1	3.8	—	9	38.7
*1001	6	23.1	—	17,381 (1,703-53,236)	61.0
*2703	4	15.4	—	19,028 (6,172-41,484)	50.2
*14011	6	23.1	—	24,542 (9-53,236)	50.3
*1101	11	42.3	—	26,988 (1,703-63,365)	65.6
*0101	11	42.3	—	36,822 (240-88,352)	71.4
*1201	2	7.7	—	59,589 (48,667-70,511)	79.0
*1501	5	19.2	—	64,980 (17,247-87,312)	93.5

*感染牛29頭のうち、PVLを複数回測定した26頭の成績

出荷された。搾乳牛の年間更新率は2017年に30%を超え、2019年には41.4%と最高値を示した(表1)。

子牛検査では、計45頭中5頭(11.1%)が感染牛と判定された。そのうち、非感染母牛から出生した34頭は全て非感染牛であったのに対し、感染母牛から出生した11頭では5頭

(45.5%)が感染牛と判定された。また、平均PVLが10,000コピーを超える高リスクの母牛から出生した子牛の感染は4頭中3頭(75.0%)で、より高頻度に認められた(表2)。なお、2018年以降に出生した子牛で胎盤感染を疑う個体は確認されなかった。

2017年から実施したBoLA-DRB3タイピングでは、感染牛29頭のアレルを決定し、そのうち、PVL測定を複数回実施した26頭における各アレルの出現傾向を表3に示したが、特に*0902を保有する個体ではPVLは著しく低値に抑制され、リンパ球数も低い傾向となった。一方、BLV感染を受けるとPVLが高値となる傾向とされる感受性アレル*1201及び*1501を保有する個体は全て10,000コピー以上の高リスク牛及び持続性リンパ球増多症であった。

搾乳牛舎では、2015年夏季に3頭の陽転牛が確認され、搾乳牛の感染率は82.8%と最高値となった(図3)。陽転牛①は感染牛Aから、陽転牛②は感染牛Bから、陽転牛③は感染牛C(2015年8月まで牛③と隣接)又は陽転牛②から感染を受けたと考えられ、いずれも高リスク牛と隣接歴のある牛であった(図3)。

2016年夏季にも3頭の陽転牛が認められたが、感染牛の更新が進み、感染率は70.4%まで低下した(図4)。陽転牛④は感染牛D、陽転牛⑤は感染牛E(2016年9月まで牛⑤と隣接)と、いずれも高リスク牛から感染を受けたと推

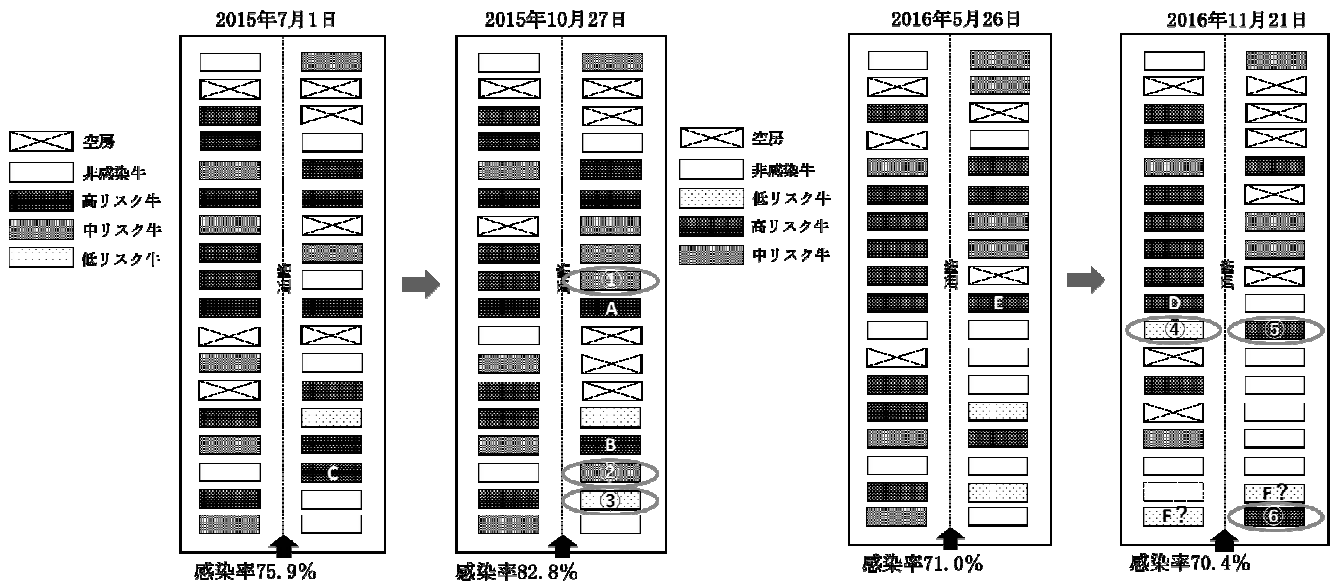


図3 2015年における搾乳牛舎の感染動態

図4 2016年における搾乳牛舎の感染動態

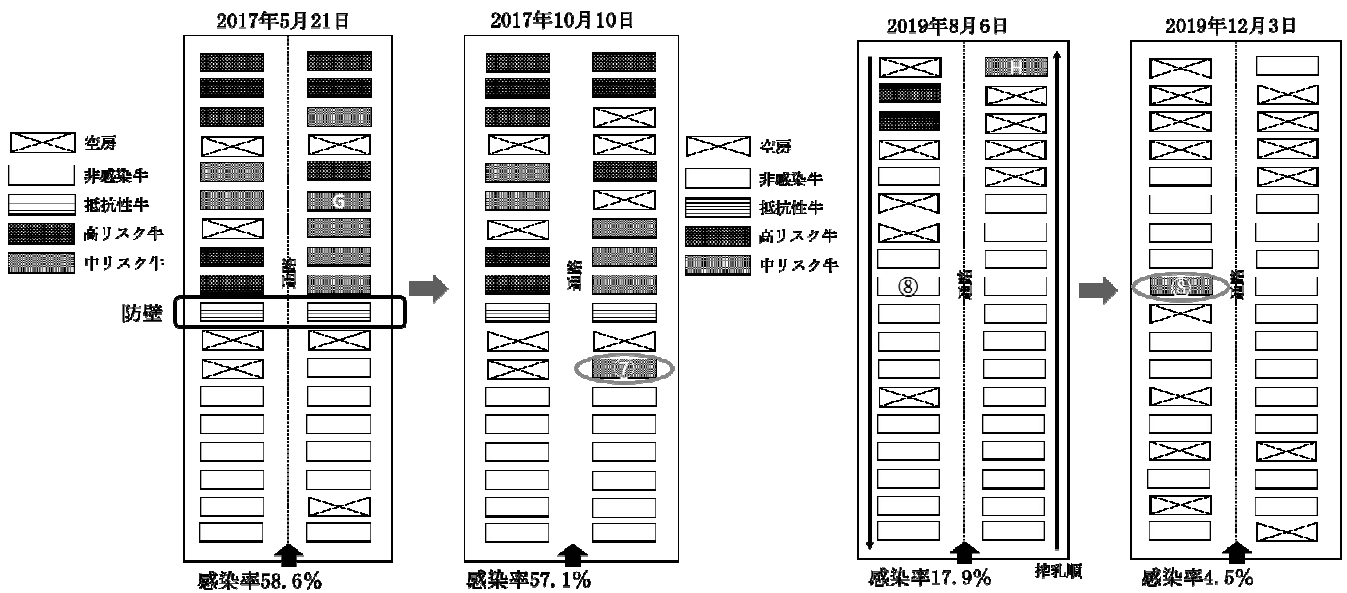


図5 2017年における搾乳牛舎の感染動態

図6 2019年における搾乳牛舎の感染動態

定されたが、陽転牛⑥は高リスク牛との隣接歴はなく、低リスクの感染牛Fから感染あるいはパドック内での感染が疑われた(図4)。

2017年夏季は、感染牛と非感染牛を完全分離飼育し、その境界に防壁として抵抗性牛を配置したにもかかわらず、1頭の陽転牛を認めた(図5)。陽転牛⑦の10月10日時点における検査成績はPCR法陽性及びELISA法陰性であり、少なくとも1か月以内に感染を受けたことが推定された。聞き取り調査の結果、感染牛Gは起立困難を呈したことから、出荷までに完全に起立不能となることを避けるため、9月28日から

10月4日にかけて牛舎内で放し飼いをしていたことが判明した。この感染牛Gは頻繁に非感染牛区画に立ち入り、陽転牛⑦に隣接した空房に侵入していたことが目撃されていた。したがって、陽転牛⑦は感染牛Gから感染を受けたものと判断し、陽転牛⑦は10月11日に感染牛区画へ移動した(図5)。2018年には陽転牛は認められず、感染率は30.8%まで低下した。

2019年12月には、これまで確認された感染牛の出荷が全て終了し、清浄化を目前にした検査にて1頭の陽転牛が確認された(図6)。当該農場はパイプラインミルクユニット5機で搾

表4 搾乳牛舎における陽転率の推移

年	分離飼育なし		完全分離飼育		
	2015	2016	2017	2018	2019
搾乳牛舎の陽転率 (%)	42.9	33.3	7.7	0	4.3

乳しており、8月から10月頃にかけて陽転牛⑧を搾乳するユニットは直前に感染牛Hを搾乳していた。さらには、当時、感染牛Hは生乳中に凝固物が生じており、乳房炎を疑う症状を呈していたことが分かった。人為的な感染は疑われず、陽転牛⑧は感染牛との隣接歴が全くないことから、陽転牛⑧はミルクカーを介して感染牛Hから感染を受けたものと推定した。その後、陽転牛⑧は速やかに最も奥の空房に移動させ、搾乳順を最後とした(図6)。

搾乳牛の完全分離飼育を開始した2017年以降、搾乳牛舎における陽転率は0～7.7%で推移し、分離飼育前の33.3～42.9%と比較して大きく低減された(表4)。従来からの感染牛の計画的な更新に加え、非感染牛からの後継牛確保やパドック放牧中止等の取組が強化された2017年以降、感染率は顕著に低下し続け、子牛及び育成牛では2018年11月に感染育成牛を相対取引にて売却処分して感染牛は0頭となり、搾乳牛においても2020年5月に最後の感染牛の出荷が終了し、同月27日の全頭検査にて清浄化達成を確認した(図7)。

まとめ及び考察

当該農場における特徴的な取組として、早期から胎盤感染による感染子牛の出生を危惧し、雌の性選別精液を活用して可能な限り非感染牛から後継牛を確保する方針としたことがあげられる。非感染母牛の増加により2017年には非感染牛のみから後継牛を確保する体制が整い、2018年以降に出生した子牛では胎盤感染を疑う事例は認められなかった。Mekataら⁷⁾は、母牛のPVLが高いほど胎盤感染又は産道感染の頻度が増し、発生率はDNA100ngあたり4,000コ

ピー未満の母牛で9.4%、4,000コピー以上の母牛では48.2%と報告している。当該農場でも感染母牛から出生した子牛の45.5%が感染牛と判定されたものの、子牛全体での感染率は11%程度であり、当初における母牛の感染率を考慮すると、効果的に胎内感染の発生を低減できたと考えられた。長田ら⁸⁾が2014年に実施した県内酪農家255戸に対するアンケート調査では、40.8%の農場が性選別精液の利用経験があると回答しており、現在では一般的な技術として確立されている。性選別精液の主な用途は、近年の乳用初妊牛や肉用素牛の価格高騰を受けた後継牛の導入経費削減や肉用子牛の市場出荷による高収益化であるが、BLV清浄化対策においても、高度汚染農場での少ない非感染牛から効率的に多くの非感染後継牛を生産できる有用な技術と思われた。

また、子牛への対策として、感染子牛と非感染子牛を飼養する区画を完全に分け、さらには全ての非感染子牛は6～8か月齢で県内公共牧場に預託することで子牛間の感染を遮断でき、搾乳牛舎における取組に集中することができた。ガイドラインでは育成パドックでも区画を分けて感染牛を分離飼育することを推奨しているが、労力や経費を考慮すると、非感染牛と感染牛の分離放牧や入牧前後にBLV検査を実施するなど、徹底した対策を講じている公共牧場等に非感染牛又は感染牛を全て預託することも選択肢の一つと考えられた。

感染牛の更新は、水平感染のみならず、胎盤感染の機会を低減させる上でも有効であったと考えられた。当該農場では2016年から積極的に感染牛の出荷を継続し、計33頭を更新したが、搾乳牛更新率は2016年の22.6%から30%以上で推移し、2019年には40%を超えた。全国的な平均更新率はおおよそ24%と想定され⁹⁾、感染牛の更新が農場経営に影響を与えていた可能性は否定できない。しかし、当該農場では、国の家畜生産農場衛生対策事業による感染牛とう汰に係る助成を計8頭で受けており、経営被

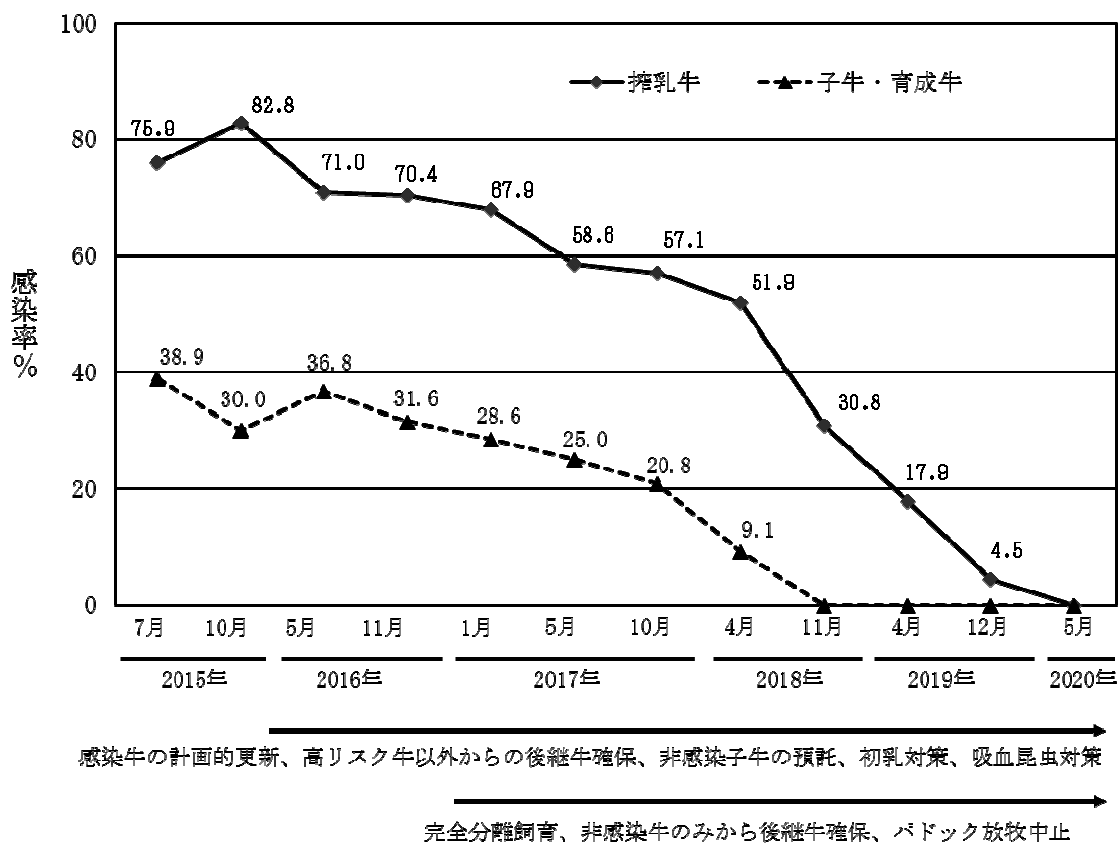


図7 搾乳牛及び子牛・育成牛における感染率の推移

害は少なからず軽減されていると思われた。

BLV感染牛のPVLレベルを制御する宿主因子として、ウシMHC (BoLA) クラスII 遺伝子型の関与が提言されている。これまでにBoLA-DRB3遺伝子は136種のアリルが報告されており、中でも*0902アリルを有する牛は、BLVに感染してもPVLが低値に抑制されることが報告されている¹⁰⁻¹⁴⁾。当該農場の感染牛で*0902アリルの発現を認めたのは1頭のみであったが、既報のとおり極めて低いPVLで推移した。同様にTakeshimaら⁶⁾がPVLを高値に制御する感受性アリルと報告している*1201又は*1501を発現した全感染牛のPVLは高値のまま推移した。感染牛の伝播リスクはPVL測定のみでも評価可能であるが、BoLA-DRB3タイピングの特長として非感染牛の感染後の伝播リスクを推定できることがあげられる。すなわち、非感染牛のBoLA-DRB3タイピングにより*0902を有する牛は感染を受けたとしても伝播リスクは極めて低いと想定され、当該農場における対応策と同

様、抵抗性牛が存在しない場合には感染牛との防壁として代替可能であり、感受性アリルを有する牛に対しては、最優先に感染防除することで高リスク牛の増加を防止することができる。また、胎盤感染を受けた出生直後の子牛のPVLは低値を示す傾向で、約1か月後にPVLが約10倍に上昇した個体が報告されており⁷⁾、新生子牛でのPVLによる伝播リスクの評価は困難である。一方で、新生子牛であってもBoLA-DRB3タイピングを実施することで伝播リスクを正確に推定することが可能と思われた。以上のことから、BoLA-DRB3タイピングはBLV清浄化対策に有用と考えられ、今後は家畜保健衛生所でも検査法の導入を検討していきたい。

吸血昆虫対策として牛舎等に防虫ネットやサシバエ捕獲装置を設置した効果については、設置前の陽転率が不明であることから言及できなかった。2015年の夏季にはガイドラインで示されているサシバエに効果のある網目2mmの防虫ネットを使用したところ、牛舎内温度が上昇

し、暑熱被害の恐れもあることから翌年から網目4mmのネットに変更した。網目が大きくなったため、牛舎内へのサシバエの侵入も確認されたが、サシバエ捕獲装置を設置することで十分に対応可能であった。

搾乳牛舎における抵抗性牛を利用した完全分離飼育については、非感染牛と感染牛の境界には空房も設けたことから、防壁としての抵抗性牛の効果判定は困難であった。しかし、感染牛の放し飼いや搾乳ミルカーを介した陽転は発生したものの、分離飼育期間中の陽転率は実施前と比較して著しく低下し、分離飼育の効果は極めて大きいことが改めて確認され、早期清浄化を達成するために必須の措置と思われた。

当該農場では2015年10月に搾乳牛の感染率が82.8%となり、約4年半にわたる取組を展開した結果、BLV清浄化を達成することができた。比較的早期に清浄化に至った要因として、農家の清浄化へのモチベーションを維持できたことが大きいと考えられた。早期から胎盤感染や子牛・育成牛の水平感染に着目したことで多くの非感染後継牛を確保でき、その結果、農場主の清浄化への自信が高まり、労力が大きく作業効率も低下する可能性がある搾乳牛の完全分離飼育やパドック利用の中止という大きな決断を引き出した。また、可能な限り陽転の原因を特定することに努めることで、失敗例から新たな対策を早急かつ円滑に展開することができた。

母牛の感染率が高い農場では、感染牛が妊娠する限り完全な防除が不可能である胎盤感染の発生が清浄化を長期化させる要因として大きいと推測される。したがって、高度汚染農場においては、胎盤感染が高頻度に発生する高リスク牛からの後継牛確保を避けることから着手し、徐々に非感染母牛のみから後継牛をとることが効果的と考えられた。また、高リスク牛の定期的な更新は水平感染のみならず、胎盤感染防止の観点からも重要であり、いずれの取組も早期から積極的に取り組むべきである。今回の報告

はつなぎ飼いや牛舎によるものであるが、これらの取組や公共牧場を活用した子牛間での感染防止対策はフリーストールやフリーバーンなどの飼養形態でも十分に応用可能と考えられた。吸血昆虫対策や搾乳牛舎での感染牛の完全分離飼育は上記の取組と同時期あるいは非感染後継牛の確保が進んだ段階で開始し、分離飼育後は可能な限り搾乳順の変更も検討するべきと考えられた。

以上のことから、つなぎ飼いや酪農家では高濃度汚染農場でも早期清浄化が十分に可能であることを示すことができた。今後は本事例をモデルとしてフリーストール牛舎の酪農経営や和牛繁殖農家など様々な飼養形態における清浄化対策事例を蓄積しつつ、得られた成果を農家、臨床獣医師及び関係機関・団体と共有することが重要である。

謝辞

本発表の一部は革新的技術開発・緊急展開事業（うち地域戦略プロジェクト）で得られた成果によるものです。BoLA-DRB3タイピングの実施や御助言を賜りました国立研究開発法人理化学研究所の間陽子先生、陸拾七先生をはじめとした研究員の方々に深謝します。

引用文献

- 1) Gillet N et al. *Retrovirology*. 4:18 (2007)
- 2) 農林水産省. 監視伝染病の発生状況. [cited 2021 Feb 1]. Available from https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/kansi_densen.html
- 3) Murakami K et al. *J Vet Med Sci*. 75 (8) : 1123-1126 (2013)
- 4) 農林水産省. 牛白血病に関する衛生対策ガイドライン. [cited 2021 Feb 1]. Available from https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/pdf/ebl_guide.pdf
- 5) Konishi M et al. *BMC Vet Res*. 14:419 (2018)
- 6) Takeshima S et al. *Retrovirology*. 16:14

(2019)

- 7) Mekata H et al. *Vet Rec.* 7. 176 (10) :254
- 8) 長田雅宏ら. 農業経営研究. 54 (4) :72-77
- 9) 中央畜産会. 平成30年度 家畜生産性向上対策事業 ー生産技術成績の集計結果と指導現場での技術指導内容ー. [cited 2020 Feb 2]. Available from http://jlia.lin.gr.jp/data/2019/shien/seisansei/h30_zenkoku_chosa.pdf
- 10) Carignano HA et al. *Anim Genet.* 48:420-430 (2017)
- 11) Hayashi T et al. *J Vet Med Sci.* 79:1552-1555 (2017)
- 12) Juliarena MA et al. *Anim Genet.* 39:432-438 (2008)
- 13) Juliarena MA et al. *J Dairy Sci.* 99:4586-4589 (2016)
- 14) Miyasaka T et al. *Tissue Antigens.* 81:72-82 (2013)

2 *Mycoplasma bovis* の迅速診断と定量分析を目的としたリアルタイム PCR 法の検証

県央家畜保健衛生所

加藤貴誉湖、戸崎香織、米山州二、小池新平
県北家畜保健衛生所

赤間俊輔

畜産振興課

小島浩一

はじめに

牛マイコプラズマ肺炎は、鼻腔等に常在する *Mycoplasma bovis* (以下Mb)、*M. dispar*、*M. bovigenitalium* 等のマイコプラズマが¹⁾、他の病原因子やストレスにより肺に移行し、カタル性炎や気管支間質性肺炎を引き起こす牛の伝染性疾患である²⁾。特にMbは病原性が強く、単独感染であっても肺炎病巣を形成することから³⁾、Mbによる肺炎を発症した場合、子牛では死亡もしくは発育不全に陥る。また、搾乳牛では回復困難な乳房炎を発症するため⁴⁾、農場内でMbがまん延した場合の経済的損失は大きく⁵⁾、まん延防止のためには発症牛の早期隔離、テトラサイクリン系又はマクロライド系等の有効薬剤による早期治療が重要である。

農場内でMbによる呼吸器病発生を疑う場合、現行の診断法では、鼻腔スワブを材料としてマイコプラズマの分離培養を実施しMbの関与を推定している。しかし、分離培養は菌種同定に6~12日間を要するため、早期に感染牛を特定できない。さらに肺炎発症牛と健康保菌牛を区別することが困難なため、適切な治療が選択できず、Mbの早期対策を妨げている。

そこで今回、Mbを標的としたリアルタイム定量PCR法 (qPCR) を確立し、分離培養よりも迅速にMb感染を判定することを目指し、加えて、鼻腔スワブ中のMb遺伝子量から肺炎発症の有無を推定可能かを検証したので、その概要を報告する。

材料及び方法

1 供試材料

各試験に供試した鼻腔スワブは、約30cmの綿棒を用いて牛の鼻腔の奥まで挿入して粘膜を拭い、滅菌PBS 2mLに浸漬した。

(1) 農場採材

33農場で採取した110検体の鼻腔スワブを供試した。これらは、呼吸器症状を呈した牛だけでなく、農場によっては呼吸器症状を呈さない同居牛も採取対象とした。

(2) 病理解剖

呼吸器症状の有無に関わらず病理解剖を実施した、90農場90頭の鼻腔スワブ及び肺の計180検体を供試した。肺については、病変部があった場合、病変部位と正常部位との境界を供試材料とした。

2 方法

(1) 鼻腔スワブ及び肺からのDNA抽出及びqPCRの反応条件

鼻腔スワブ及び肺からのDNA抽出は、市販の抽出キット (DNeasy Blood&Tissue Kit, QIAGEN) を用い、キット付属のプロトコールに従い実施した。

また、遺伝子定量のための検量線に用いるスタンダードDNAは、以下のとおり作製した。

Mb (基準株 PG45) をNK液体培地に接種し、37℃、好気条件下で培養、カラーチェンジ後にNK寒天培地にて72時間、5%CO₂下で培養してMbの菌量を測定し、培養後のNK液体培地

(菌液)が 10^8 CFU/mLとなるよう調整した。調整した菌液について、抽出キットを用いてDNAを抽出し、抽出物をスタンダードDNA原液(10^8 CFU/mL)として 10^4 まで階段希釈し、検量線とした。

qPCRのプライマーには、MbのoppD遺伝子の3'末端領域を標的とする既報のもの(Forward: 5'-TCAAGGAACCCACCAGAT-3', Reverse: 5'-AGGCAAAGTCATTTCTAGGTGCAA-3')^{6),7)}を用いた。qPCRの反応液はTB Green Premix ExtaqII (TaKaRa)を12.5 μ L、10 μ Mのプライマー各1 μ L、テンプレートDNAを2 μ L、総量を25 μ Lとした。また、検量線と各検体は1穴のみの反応とした。PCR装置にはThermal Cycler Dice® Real Time System TP800 (TaKaRa)を使用し、反応条件はPremix ExtaqIIのシャトルPCR標準プロトコール(初期変性:95°C 30秒、PCR反応:95°C 5秒、60°C 30秒 40サイクル、融解曲線分析)どおりとした。

qPCR成立条件は、決定係数(R^2)が0.9以上、PCR効率が80~120%、スタンダードDNA原液のスレッシュホールド・サイクル(Ct)値が20 \pm 3とし、解離温度(T_m 値)が78.3~79.5の範囲の検体をMb遺伝子検出(=qPCR陽性)とした。遺伝子量はPCR装置の自動解析により算出し、単位はCFU/mLとした。検体からのDNA抽出からqPCRによる遺伝子量測定までの所要時間は、2時間30分であった。

また、表1に示した呼吸器病に関与する各種細菌やウイルスを材料とした抽出DNAについてqPCRを実施し、本検査系の特異性を評価した。

(2) 分離培養

各材料300 μ L(肺はPBS10%乳剤上清)をNK液体培地にて好気条件下で37°C、72~120時間培養後、NK寒天培地に接種して37°C、5%CO₂下で72~120時間培養し、分離したマイコプラズマをNK液体培地でカラーチェンジするまで培養した。培養液について、シカジーニアスDNA抽出試薬(関東化学)を用いて遺伝子抽出

表1 特異性を評価した細菌及びウイルス

微生物名
<i>M. bovis</i>
<i>M. bovirhinis</i>
<i>M. bovisgenitalium</i>
<i>M. alkalescens</i>
<i>M. dispar</i>
<i>Acholeplasma laidlawii</i>
<i>Mannheimia haemolytica</i>
<i>Mannheimia varigena</i>
<i>Pasteurella multocida</i>
<i>Histophilus somni</i>
<i>Trueperella pyogenes</i>
<i>Escherichia coli</i>
<i>Salmonella</i> Typhimurium
ブドウ球菌
レンサ球菌
牛アデノウイルス

後、コンベンショナルPCRを実施し⁸⁾、Mb遺伝子の特異的増幅がみられた場合、分離陽性とした。

(3) 病理組織学的検査

肺について、20%中性緩衝ホルマリンで固定後、常法に従いパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を実施した。

また、牛マイコプラズマ肺炎を疑う病変が存在した場合、グラム染色及び市販の免疫組織化学的検査キット(ニチレイ)を用いて抗Mb免疫家兎血清(動衛研)による免疫組織化学的検査を実施した。

3 検証内容

(1) qPCRと分離培養成績の比較

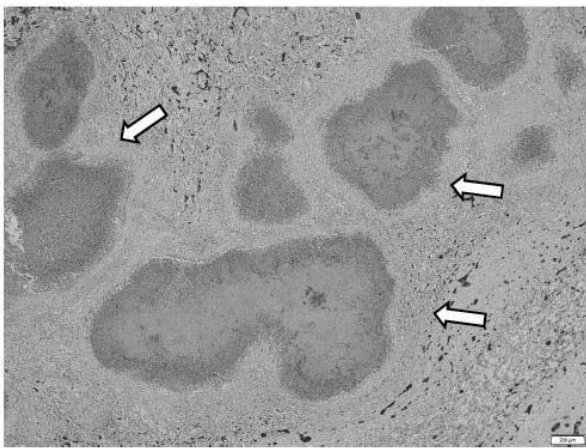
供試材料全290検体(鼻腔スワブ200検体、肺90検体)について、qPCRと分離培養を実施し、その成績を比較した。

(2) 農場の感染状況との関連性

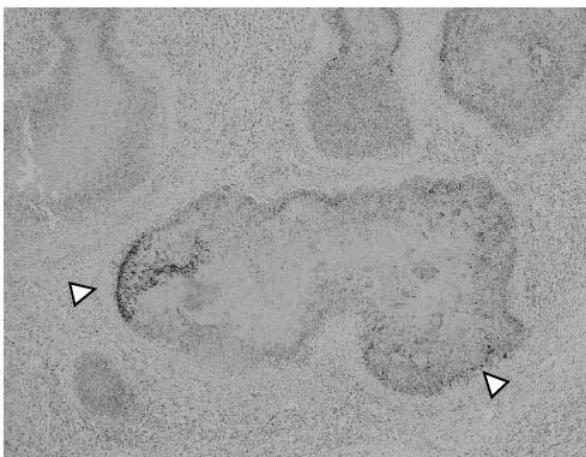
農場採材材料について、qPCR陽性個体が存在した農場におけるqPCR陽性率と鼻腔スワブ遺伝子量の関連性を調査した。

(3) 肺炎発症との関連性

病理解剖材料について、鼻腔スワブもしくは肺においてqPCR陽性、かつ肺にMbによる牛マイコプラズマ肺炎の特徴病変(図1)がみられた牛を、Mbによる牛マイコプラズマ肺炎(Mb肺炎)発症牛と定義し、鼻腔スワブ遺伝子量との関連性を解析した。



A



B

A: 肺 HE染色像

(矢印: 細気管支の凝固壊死巣)

B: 肺 抗Mb免疫染色像 (矢頭: Mb抗原陽性)

図1 Mb肺炎の特徴病変例

4 統計解析

病理解剖材料の鼻腔スワブから得られた遺伝子量に関して実施した。平均遺伝子量の比較ではMann-WhitneyのU検定を行った。また、遺伝子量毎に分類した3群におけるMb肺炎と判定した割合の比較では、Fisherの正確検定を行い、多重比較には、Bonferroni法を用いた。

結果

qPCRの特異性の評価では、Mbについて、Tm値が79.02~79.31の範囲で増幅が認められた。また、Mb以外の細菌及びウイルスについては、増幅が認められなかったか、もしくは、Tm値が76.63~76.79の範囲での増幅が認められた。

1 qPCRと分離培養成績の比較

分離陽性32検体中31検体がqPCR陽性となり、陽性一致率は96.9%であった。また、分離陰性258検体中234検体がqPCR陰性で、陰性一致率は90.7%であった(表2)。qPCR陽性を示

表2 qPCR及び分離培養成績

qPCR/分離培養	分離培養		計
	+	-	
qPCR +	31	24	55
qPCR -	1	234	235
計	32	258	290

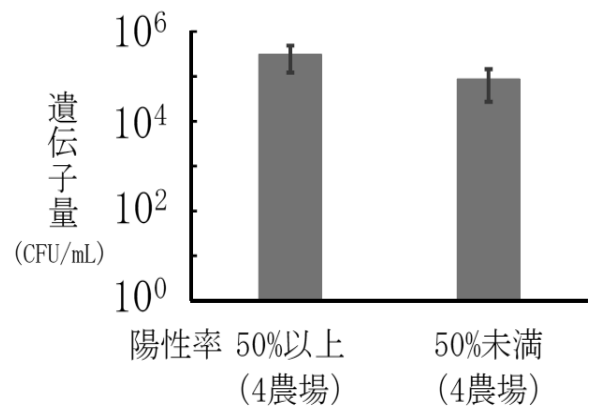


図2 複数検体検査8農場のqPCR陽性率と鼻腔スワブ平均遺伝子量

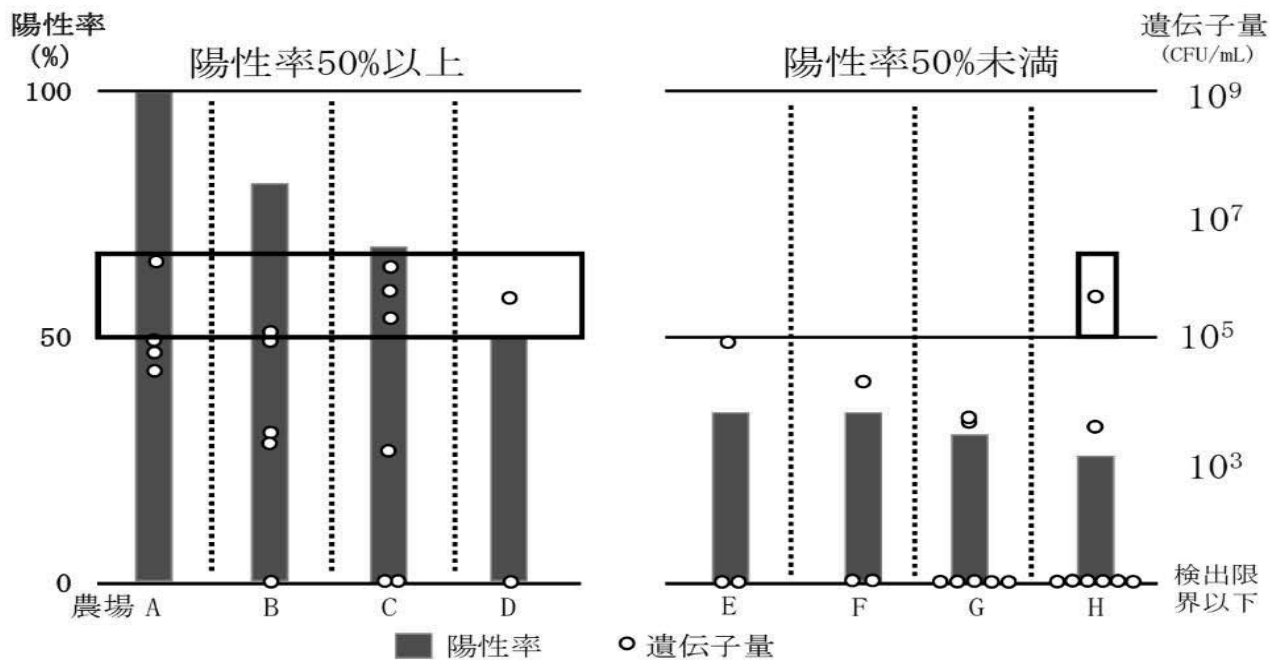


図3 複数検体検査8農場のqPCR陽性率と鼻腔スワブ遺伝子量の分布

した55検体のうち、遺伝子量 10^4 未満では11検体中10検体（90.9%）、 10^4 以上では44検体中14検体（31.8%）が分離陰性となった。

2 農場の感染状況との関連性

33農場110検体の鼻腔スワブのうち、qPCR陽性を示したのは13農場24検体で、その遺伝子量は $1.3 \times 10^3 \sim 1.4 \times 10^6$ に分布し、平均遺伝子量は 2.1×10^5 であった。また、qPCR陽性13農場のうち、複数検体を検査した8農場における平均遺伝子量は、陽性率50%未満の4農場の 8.6×10^4 に対し、陽性率50%以上の4農場では 3.0×10^5 と高い傾向を示した（図2）。

10^5 以上の遺伝子量を示した検体は、陽性率50%未満の農場では1検体のみであったが、陽性率50%以上の農場では計6検体で確認され、各農場に1検体以上存在していた（図3）。

3 肺炎発症との関連性

肺もしくは鼻腔スワブでqPCR陽性を示したのは90頭中18頭であり、そのうち、Mb肺炎と判定されたのは11頭、Mb肺炎なしとされたのは7頭で、鼻腔スワブの平均遺伝子量は、それ

ぞれ 1.9×10^7 、 3.9×10^5 となり（図4）、Mb肺炎の方が有意に高かった（ $p < 0.05$ ）。また、Mb肺炎なしと判定された検体では、鼻腔スワブの遺伝子量が 10^6 を超えた検体が7頭中1頭のみであったことから、Mb肺炎と判定される境界は 10^6 付近と推定された。

そこで、qPCR陽性を示した18検体について鼻腔スワブの遺伝子量毎に、 10^4 未満、 10^4 以上 10^6 未満及び 10^6 以上の3つに分類し、Mb肺炎と判定された割合に差があるかを比較したところ（表3）、Mb肺炎と判定された割合は、 10^4 未満（16.7%）と比較して、 10^4 以上 10^6 未満は80%、 10^6 以上は85.7%と高く、特に 10^6 以上でMb肺炎と判定された割合が有意に高かった（ $p < 0.05$ ）。

まとめ及び考察

qPCRの特異性の評価では、Mb以外の病原体について特異的な増幅がみられなかったため、本検査系はMbを特異的に検出することが可能であった。

qPCRと分離培養成績の比較では、分離陽性であれば、qPCRでほぼすべての検体からMbの

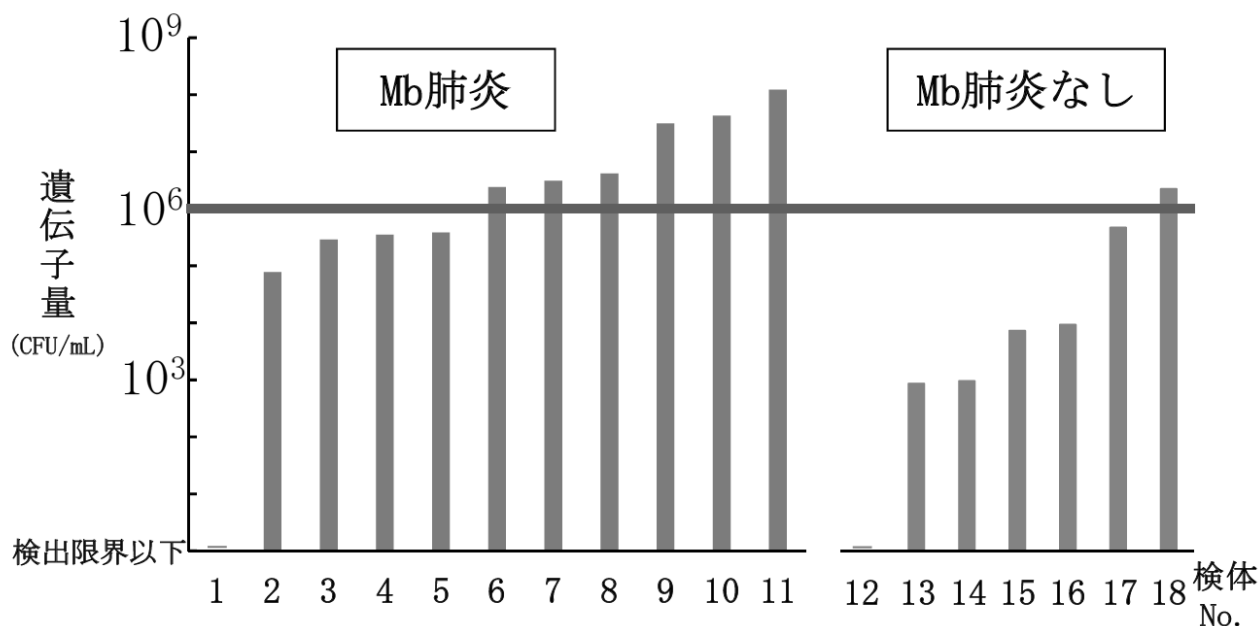


図4 Mb肺炎の有無と鼻腔スワブ遺伝子量

表3 鼻腔スワブ遺伝子量とMb肺炎の割合

鼻腔スワブ遺伝子量 (CFU/mL)	Mb肺炎 (頭数)		Mb肺炎の割合 (%)
	あり	なし	
10 ⁴ 未満	1	5	16.7
10 ⁴ 以上10 ⁶ 未満	4	1	80.0
10 ⁶ 以上	6	1	85.7

遺伝子を検出可能であると推定された。また、qPCR陽性検体の半数以上が分離陰性で、特に遺伝子量10⁴未満の場合、90%以上が分離陰性となったことから、qPCRは分離培養より感度が高く、遺伝子量から推定した分離培養の検出限界は10³付近と考えられた。以上のことから、今回確立したqPCRの検査系は、分離培養より高感度かつ迅速にMb感染を判定可能であり、農場内のMb感染状況を把握するスクリーニング検査として有用と思われた。なお、分離陽性でqPCR陰性となった検体が1検体存在したこと、qPCRは死菌を検出する可能性もあることから、牛マイコプラズマ肺炎の確定診断には現行の診断法である分離培養を併用することが必要と考えられた。

農場の感染状況と鼻腔スワブ遺伝子量の関連

性では、遺伝子量の分布及び平均鼻腔スワブ遺伝子量から、10⁴以上の個体でMbが呼吸器症状に關与していると思われた。したがって、10⁴以上の遺伝子が検出された牛に対しては、早期にMbに有効な薬剤による治療を実施することで、農場内でのまん延防止に寄与するものと考えられた。加えて、鼻腔スワブ遺伝子量は、陽性率が高い農場で高い傾向にあり、陽性率50%を超える農場では遺伝子量が10⁵以上を示す検体が必ず確認された。このことから、10⁵以上の遺伝子量を示す個体は、農場内にMbが広く浸潤する目安と推定され、無症状の同居牛についてもqPCRを実施することで感染状況を早期に把握し、必要に応じて群単位での薬剤による治療や隔離を行うことも検討すべきと思われた。

また、肺炎発症と鼻腔スワブ遺伝子量の関連性では、Mb肺炎と判定された牛はMb肺炎ではない牛よりも鼻腔スワブの遺伝子量が有意に高く、10⁶以上がMb肺炎発症の目安と推定された。以上のことから、本検査系は鼻腔スワブの分離培養では不可能であったMb肺炎発症の有無を推定可能であることが期待され、鼻腔スワブから得られた遺伝子量は適切な治療方針の指

標となり得るものと思われた。今後はさらに成績を蓄積していくことに加え、肺炎発症の目安以上の遺伝子量を検出する個体について、鼻腔スワブ遺伝子量の経時的な推移を調査し、臨床症状を含めた長期的な経過観察により、Mb肺炎を発症する基準値の精度を一層向上させていきたい。

今回確立したqPCR検査系は、分離培養より迅速かつ高感度にMb感染を判定し、鼻腔スワブの遺伝子量により、呼吸器症状や肺炎発症へのMbの関与を推定することが可能と考えられた。今後の病性鑑定でも分離培養とともに本検査を実施し、早期に適切な治療を指導し、Mbによる被害の軽減に努めたい。

引用文献

- 1) 上村涼子ら：日本国内における牛の呼吸器感染性*Mycoplasma* の浸潤状況調査、日獣会誌, 65, 871-875 (2012)
- 2) 明石博臣ら：動物の感染症 第三版, 近代出版, p.133
- 3) 工藤竜大ら：*Mycoplasma alkalescens* と *Mycoplasma bovis* が分離された牛の肺炎例, 日獣会誌, 47, 311-314 (1994)
- 4) Satoshi Gondaira, et al.: Immunosuppression in Cows following Intramammary Infusion of *Mycoplasma bovis*, Inf. And Immunity, Volume 88, Issue 3 (2020)
- 5) F.P. Maunsell, et al.: *Mycoplasma bovis* Infections in Cattle, J. Vet. Intern. Med., 25, 772-783 (2011)
- 6) Mai KISHIMOTO, et al.: Development of a one-run real-time PCR detection system for pathogens associated with bovine respiratory disease complex, J. Vet. Med. Sci., 79 (3) , 517-523 (2017)
- 7) Konard Sache, et al.: Use of a novel real-time PCR technique to monitor and quantitate *Mycoplasma bovis* infection in cattle herds with mastitis and respiratory disease, Vet. J., 186, 299-303 (2010)
- 8) Chávez González YR, et al.: In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR, Vet. Microbiol., 47. 183-190. (1995)

3 3年間の預託牧場でのBRDC発生状況と体表温センサによる発熱検知について

県央家畜保健衛生所

安西 真奈美、加藤 貴誉湖、米山 州二

はじめに

牛呼吸器複合感染症（BRDC）は、様々な病原体やストレスによる免疫低下等の複合的な要因により発生する経済損失の大きな疾病として知られている^{1,2)}。平成29年度家畜共済統計表によると、全国の年間の呼吸器病の死産事故頭数は17,286頭で全体の8.2%、病傷事故頭数は、518,539頭で全体の21.5%を占め、年々増加傾向にあるため対策が急務である^{3,4)}。その対策として、種々のワクチン接種や飼養衛生管理の改善、環境対策等が行われるが、発見の遅れや治療が適切なタイミングで行われない場合は重症化する症例も少なくない。呼吸器病の早期発見のためには、呼吸器症状や発熱、呼吸促拍、心拍数増加等の初期症状を捉えることが重要であることから、これらの臨床所見をモニタリングするセンサの活用が期待されている。

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門では、体温を常時モニタリングする体表温センサの開発を進めている。我々は、この体表温センサの実証試験に参加する機会を得て、平成（H）29年から県内預託牧場で試験を実施してきた。昨年度は、体表温センサによる発熱検知回数が5回以上であると有意に個体治療実施率が高くなること、牛舎内環境の最大風速が治療頭数増加の一因になると考えられたことから、防風設備を強化するよう牧場側に提案したことを報告した。本年度は、3年間の試験の総括として、体表温センサによる発熱検知頭数の推移と微生物感染動向との関連を精査し、本牧場に導入された子牛のBRDC感染動向を明らかにすることを試みた。また、体表温センサによる飼養管理の省力化・

効率化について検証を行ったので報告する。

材料及び方法

1 体表温センサ

体表温センサは、ウェアラブルタイプで、子牛の尾根部腹側に専用のベルトを用いて装着した⁵⁾。センサから得られたデータは10分間隔でクラウドに転送され、クラウドからダウンロードしてPC上で解析を行い、得られた体表温データから直腸温の推定値である補正体表温を算出した。また、興奮などによる一時的な体温の上昇を除外するために、1日の発熱量を示す新たな指標として、発熱積算値（AF: accumulated fever）を算出した。AFは、発熱の基準とした39.7℃とそれを越えた補正体表温との差を24時間分積算した値とした。また、本試験では、算出したAFが1以上を示した個体を発熱検知とした。

2 調査方法

試験期間は、H29年、H30年及び令和（R）元年12月の各々21～22日間で、預託牧場に導入された4～6か月齢のホルスタイン種を供試した。導入日に、H29年は40頭、H30年は39頭、R元年は25頭の子牛に体表温センサを装着し、体表温データを試験期間中24時間連続で採取した。また、体表温センサを装着した牛から、H29年に6頭、H30年に10頭、R元年に6頭を選定し、群導入日を採材日を0日目として定期的に鼻腔スワブ及び血液を採取した（表1）。

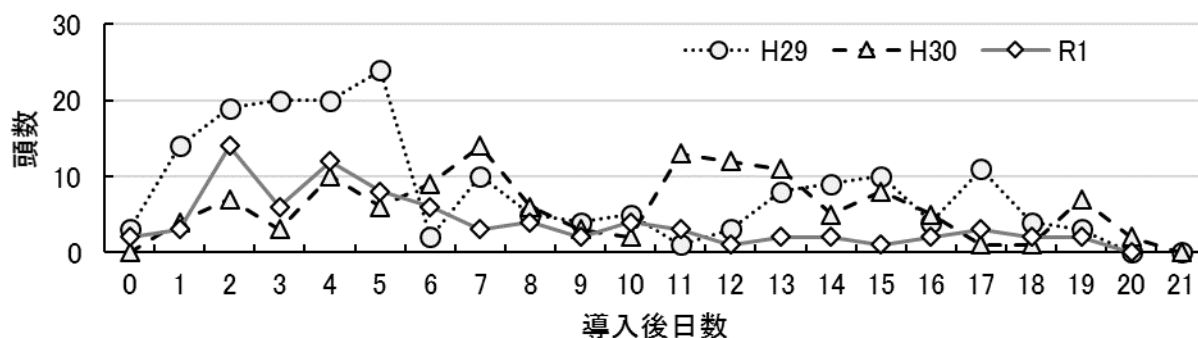


図1 発熱検知頭数の推移

表2 微生物学的検査結果（各種病原体の検出頭数）

		群導入後日数																					
H29		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
ウイルス検査 (n=6)	コロナウイルス	2		4					6		6			4	4								4
	<i>Mannheimia haemolytica</i>	0		0					0	0				0	0								0
細菌検査 (n=6)	<i>Pasteurella multocida</i>	5		4					4	3				4	4								4
	<i>Mycoplasma bovirhinis</i>	1		0					0	3				3	4								4
	<hr/>																						
H30		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
ウイルス検査 (n=5)	コロナウイルス	0					4			5				4	3								2
	<i>Mannheimia haemolytica</i>	0					0			2				6	4								7
細菌検査 (n=10)	<i>Pasteurella multocida</i>	0					0			1				0	2								3
	<i>Mycoplasma bovirhinis</i>	0					3			5				5	6								2
	<hr/>																						
R1		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
ウイルス検査 (n=6)	コロナウイルス	0							6						3								1
	<i>Mannheimia haemolytica</i>	0							0						2								1
細菌検査 (n=6)	<i>Pasteurella multocida</i>	1							0						1								3
	<i>Mycoplasma bovirhinis</i>	0							0						1								1

2 微生物学的検査結果（表2）

ウイルス検査で毎年検出されたのはBCVであった。群導入日の検出頭数は、H29年は2頭、H30年及びR元年は0頭と少なかったものの、H29年は7日目、H30年は8日目、R元年は6日目に全頭陽性が確認された。

細菌検査では、H29年は*Pasteurella multocida* (*P.multocida*) が持続的に検出され、*Mycoplasma bovirhinis* (*M.bovirhinis*) は9日目以降に検出される傾向が認められた。H30年及びR元年は、群導入日には細菌は殆ど検出されなかったものの、H30年は8日目以降に、R元年は13日目以降に*M.haemolytica*、

P.multocida、*M.bovirhinis*が検出される傾向が認められた。

3 鼻腔内BCV遺伝子量とMx1の推移

鼻腔内BCV遺伝子量は、H29年は7日目 ($14,652.2 \pm 1.4 \text{copies}/\mu\text{l}$)、H30年は8日目 ($49,559.4 \pm 3.9 \text{copies}/\mu\text{l}$)、R元年は6日目 ($18,060,784 \pm 7.3 \text{copies}/\mu\text{l}$) に最大となり、群導入日と比較して有意に高いコピー数を示した (図4、 $P < 0.05$)。Mx1は、H30年は5日目 (5.2 ± 0.4)、R元年は6日目 (2.5 ± 0.3) に群導入日と比較して有意な上昇を認めた (図5、 $P < 0.05$)。

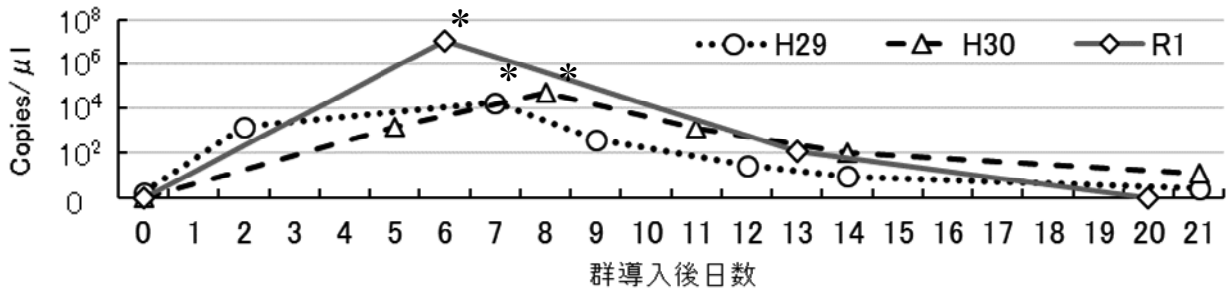


図4 鼻腔内コロナウイルス遺伝子量の推移

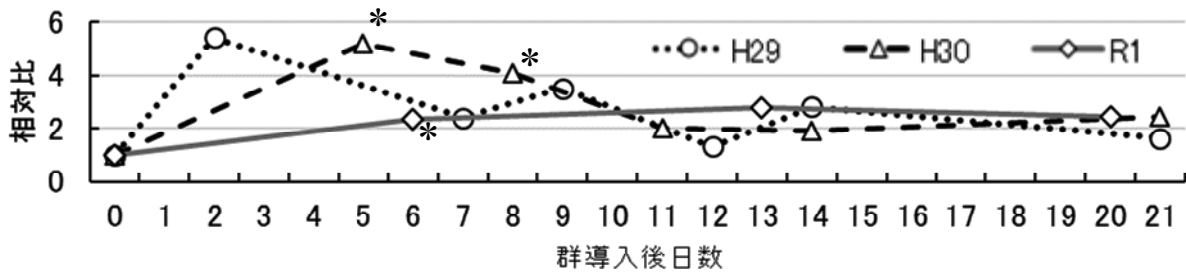


図5 Mx1タンパク遺伝子量の変動

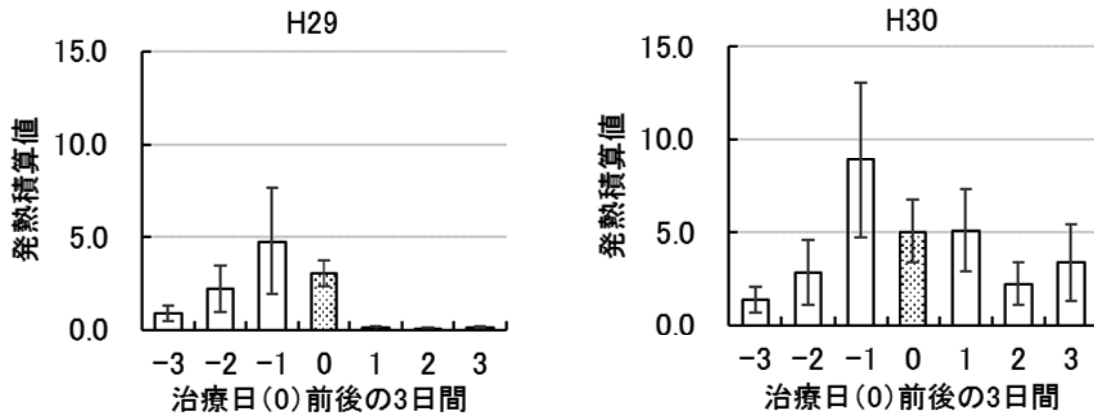


図6 治療日を基準とした発熱積算値の推移

4 第2の発熱期のハプトグロビン値の比較

11～15日目の平均AFが1以上の個体と1未満の個体に分類してハプトグロビン値を比較した。H29年及びH30年のAFが1以上を示した個体 ($569.1 \pm 325.3 \mu\text{g/ml}$ 、 $1367.8 \pm 690.1 \mu\text{g/ml}$) は、1未満の個体 ($215.6 \pm 94.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $281.7 \pm 155.5 \mu\text{g/ml}$) よりも高いハプトグロビン値を示す傾向が認められた (H29年は $P=0.067$)。R元年は、平均AFが1以上の個体は認められなかった。

5 治療個体のAFの推移 (図6)

治療個体の治療開始日を基準として前後3日間のAFの推移を比較したところ、H29年及びH30年は、治療日の2日程度前から平均AFの上昇が認められ、治療開始後は低下する傾向が認められた。R元年は、体表温センサ装着牛に治療個体は認められなかった。

6 治療回数とAFの関連

発熱検知の基準として、AFを4以上と設定す

ると、重相関係数0.8、補正重決定係数0.64と最も高い予測精度を示した。

7 環境データの比較

牛舎間の比較において平均最低気温は、新牛舎のR元年 ($1.0 \pm 0.6^\circ\text{C}$) は、旧牛舎のH29年 ($-2.2 \pm 0.4^\circ\text{C}$) 及びH30年 ($0.2 \pm 0.7^\circ\text{C}$) と比較して高い値を示す傾向が認められた。平均日較差については、新牛舎のR元年 ($5.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$) は、旧牛舎のH29年 ($13.8 \pm 0.5^\circ\text{C}$) 及びH30年 ($11.3 \pm 0.7^\circ\text{C}$) と比較して有意に小さい値を示した ($P < 0.05$)。平均最高気温は、各年度に差は認められなかった (H29年: $11.6 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、H30年: $11.5 \pm 0.6^\circ\text{C}$ 、R元年: $10.8 \pm 0.6^\circ\text{C}$)。

考察

当該牧場では、H29年とH30年の試験期間中に二峰性に発熱検知頭数の増加が認められた。最初の発熱はBCV感染の急性感染期に一致していたこと、同時期にMx1が上昇したことからBCV感染によるウイルス性の発熱と考えられた。第2の発熱は、11-15日目の平均AFが1以上の個体でハプトグロビンが上昇し、炎症が起こっていると推測されたことから、細菌の二次感染に起因する発熱を検知したと考えられた。BRDCは、ウイルス感染の後、細菌の二次感染により重症化することが報告されており²⁾、体表温センサは臨床症状の一つである発熱を検知することでBRDCの病態の推移を把握することが可能であると考えられた。また、R元年に11-15日目に発熱検知頭数の増加は認められず、この時期の平均AFも有意に低かったことから、R元年は第2の発熱が抑えられたものと考えられた。これは、H30年に防風設備を強化するよう提案したことが新牛舎に生かされ、環境改善により牛舎内温度の日較差が小さく抑えられたためと考えられた。

また、治療個体のAFの推移を調べたところ、治療日の2日程度前からAFが上昇する傾向を認

めたことから、要治療個体を早期に検知しているものと考えられた。そこで、発熱検知の基準とするAFごとに治療回数の予測精度を調べたところ、AFが4以上を高熱の指標とすることで効率よく要治療個体を発見できると考えられた。通常の農場管理では、農場作業員の健康観察の時間は限られており、健康畜の直腸温測定はまれであることから明らかな臨床症状を示すまで異状個体を発見することはできない。しかし、体表温センサにより常時、個体ごとの体温の変動をモニタリングすることで群全体の健康状態を把握することが可能となり、異状個体を早期に発見し、重症化する前に治療等の対策を立てることができると考えられた。

以上から、体表温センサは、BRDC感染による発熱を早期に検知可能であり、健康管理の一環として体表温センサを用いることは、飼養衛生管理の省力化及び効率化に有用であると考えられた。

謝辞

本試験は、革新的技術開発・緊急展開事業 (うち人工知能未来農業創造プロジェクト) 「AIを活用した呼吸器病・消化器病・周産期疾病の早期発見技術の開発」により行われた。多大なる御指導をいただいた農研機構 動物衛生研究部門 病態研究領域 生化学ユニットの山中典子先生、宗田吉広先生、尾澤知美先生、農研機構 本部の高橋雄治先生に深謝します。

引用文献

- 1) Ellis JA., et al. : Vet Clin North Ame Food Anim Practice, 17, 535-550 (2001)
- 2) Earley B., et al. : immunity and respiratory disease. Animal, 11, 486-492, (2017)
- 3) 農林水産省 平成29年度農業災害補償制度家畜共済統計表, 2-5-1, 死廃事故病名別頭数, (2017), (online), (accessed 2021-2-1)
- 4) 農林水産省 平成29年度農業災害補償制度家畜共済統計表, 2-5-2, 病傷事故病名別件数,

- (2017), (online), (accessed 2021-2-1)
- 5) Nogami H., et al.: *Sensors and Materials*, 26, 539-545 (2014)
 - 6) Decaro N., et al.: *J Cirol Methods*.151,167-171 (2008)
 - 7) Valarcher JF., et al.: *J Virol*. 74,10714-28 (2000)
 - 8) Kirisawa R., et al.: *J Rakuno Gakuen Univ*,19, 225-237 (1994)
 - 9) Vilcek S., et al.: *Arch Virol*,136,309-323 (1994)
 - 10) Motes CM., et al.: *Appl Environ Microbiol*, 70, 1448-54 (2004)
 - 11) Allard A., et al.: *J Clin Microbiol*, 28,2659-67 (1990)
 - 12) Katsuda K., et al.: *J Farm Animal in Infectious Disease*,5,92-97 (2016)
 - 13) González YRC., et al.: *Veterinary Microbiology*,47,183-190 (1995)
 - 14) Kobayashi H., et al.: *J Vet Med Sci*,60,1299-1303 (1998)
 - 15) Nakamura M., et al: *J Jpn Vet Med Assoc*, 65, 682-688, (2012)