

(7) 家畜衛生研究部の試験研究課題

ア 地方病性牛白血病 (EBL) の感染率低減を目指した清浄化プログラムの確立

(平成 29～32 年度)

目的：EBL は牛白血病ウイルス (BLV) を原因とする悪性リンパ腫であり、発生数は年々増加の一途を辿っている。BLV に感染した牛はウイルスを保有・排泄し続け、発症率は低いながらも致死率は 100%を示し、経済的損失の大きい疾病の 1 つである。そこで、本県の EBL 対策がより一層推進されることを目的に、農場での BLV 感染率の効果的な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技術マニュアルを作成する。

内容：BLV 感染牛を長期的 (2011～2018 年) に追跡調査することで、感染牛の中でも常に血中ウイルス量が低い牛が存在することを明らかにした。このような感染牛は他の牛へウイルスを伝播させにくい低リスク牛と考えられ、管内 2 農場でこの低リスク牛を活用した感染率低減対策の実証試験を行った。A 農場の搾乳牛舎では、非感染牛区画を設け、隣接する牛房には低リスク牛を防波堤として配置した結果、29 年度には新規感染が認められなかったが、30 年度の夏季に 2 頭の陽転牛が確認され、感染率は 76.0%から 77.8%と横ばい。通路を挟んで反対側、約 2m離れた牛房に飼養されていた高リスク牛からの感染と推測され、31 年度は通路に防虫ネット等を設置予定。B 農場では、(国研) 理化学研究所との共同研究により、全飼養牛の牛側の遺伝子を解析し、BLV への抵抗性を調査。その上で、搾乳牛舎内の感染牛と非感染牛を完全に分離し、その境界に血中ウイルス量が低くかつ BLV への抵抗性遺伝子を保有する牛を防波堤として配置。その結果、人為的感染を疑う 1 頭を除き、29～30 年度の 2 年間に新規感染は認められず、感染率は 57.1%から 30.8%まで低下。以上のことから、低リスク牛の活用による BLV 感染率の低減は可能であり、非感染牛と中～高リスク牛の完全分離を併用することで牛舎内の感染を完全に遮断できるものと推測。

イ 家畜の消化器系疾病に関する細菌学的研究 (平成 28～30 年度)

目的：『病原性大腸菌』や『サルモネラ』は、家畜の消化器系疾病の原因菌であり、慢性的な生産性の低下により農場に大きな経済的損失をもたらす。また、その一部は人獣共通感染症の原因菌としても知られており、家畜衛生分野のみならず公衆衛生分野においても重要な病原体である。これまでの調査で、県内で多剤耐性の新興株が流行しており、一部の株は PMQR※2 に起因するフルオロキノロン※1 耐性が認められた。そこで、県内飼養豚を対象に PMQR の浸潤実態の解明を試みた。

内容：県内養豚場 14 農場の飼養豚 141 頭の糞便を材料に、PCR 法により PMQR8 種の保有状況を調べた。PCR 陽性の糞便検体は PMQR 保有細菌の分離、特定を試みた。その結果、14 戸中 11 戸 (79%)、141 頭中 53 頭 (38%) と高率な PMQR が確認され、PMQR は、大腸菌や緑膿菌等の腸内の常在菌に保有されていた。既報では、病原細菌を中心とした PMQR 保有調査が行われているが、今回の調査では、既報にない高率な PMQR の浸潤実態が明らかになり、さらに、PMQR の保有菌種として、一般に病原性を持たない常在菌が重要な役割を果たしていることが示唆された。

※1 フルオロキノロン

殺菌効果が高く、家畜衛生分野だけでなく人の医療分野でもよく使用される薬剤。耐性菌の出現が特に問題視される。

※2 PMQR

菌種を越えて伝播可能な薬剤耐性因子。様々な菌種におけるキノロン耐性化や高度耐性化の原因になることが危惧されている。

ウ リンパ球動態を指標とした地方病性牛白血病の生前診断法の確立（H29～31年度）

目的：地方病性牛白血病は、牛白血病ウイルスの感染により起こる家畜の伝染病である。発症率は5%未満と低いものの、いったん発症するとBリンパ球が腫瘍化し、根本的な治療法や予防法がなく、県内でも発生頭数が多く問題となっている。

そこで、血液を用いて、病理組織学的診断で行われる免疫組織化学的検査法による血液中リンパ球の分類手法を確立し、生前診断へと応用する。本法の確立により、牛白血病の発症牛を早ければ1日で生前診断することができ、農場内で本病をまん延させるリスクの高いとされる発症牛の早期摘発が図られることから、本病清浄化対策のより一層の推進及び生産現場における将来的な経済的損失の低減への一助とする。

内容：平成29年度に、末梢血中の単核細胞（PBMC）を用いて免疫組織化学的染色（IHC）を応用した手法を検討し、プロトコールを確立した。そこで今年度は、EBL非発症牛43頭（BLV感染牛30頭）及び臨床的にEBL発症が疑われた牛4頭の全血、と畜場で牛白血病と診断された発症牛5頭の心残血を材料とし、PBMCを分離後、牛胎子血清に浮遊しスライドに塗抹したリンパ球標本を作製した。作製したリンパ球標本について、B細胞マーカー（CD21及びCD79 α ）、T細胞マーカー（CD3、CD4、CD5、CD8及びWC1）、骨髄単球系細胞マーカー（CD14）、細胞増殖期マーカー（Ki67）の各種抗体を用いたIHCを実施し、血球100個中の陽性細胞数を計測した。各種抗体毎の計測結果は、CD3では、発症疑い牛及び発症牛で非発症牛よりも少ない傾向が認められた。CD5及びCD79 α では、発症疑い牛及び発症牛で非発症牛よりも多い傾向が認められた。Ki67では、発症疑い牛及び発症牛で非発症牛よりも多い傾向が認められた。その他の抗体（CD4、CD8、CD14、CD21及びWC1）では、差は認められなかった。なお、末梢血中リンパ球の形態観察も併せて実施したところ、非発症牛では全頭の末梢血中に異常リンパ球は認められず、発症疑い牛及び発症牛では全頭の末梢血中に異常リンパ球が認められた。また、発症牛5頭については、リンパ節及び臓器を採材し、病理組織学的検査（ヘマトキシリン・エオジン染色、免疫染色（CD3、CD20及びKi67））を併せて実施した。HE染色では、5頭全ての検査した全臓器及びリンパ節でリンパ球様腫瘍細胞のびまん性浸潤、増殖が認められ、IHCではこれらの腫瘍細胞はCD3に陰性、CD79 α 及びKi67に陽性反応が認められた。以上のことから、リンパ球標本と病理組織標本の免疫染色結果はほぼ同等であり、これら4種の抗体（CD3、CD5、CD79 α 及びki67）を併用することで、T細胞、B細胞及び腫瘍性増殖との識別が可能であり、本手法により腫瘍化したB細胞を間接的に識別することが可能であると考えられた。よって、本手法は、血液のみを用いてEBLの発症を生前に判定できる診断方法として活用可能であり、本手法を通常実施している血液検査に追加することで、EBLの発症を客観的に判断できる診断方法として期待できるものと考えられた。