

4 家畜共同育成場における繁殖指導体制の構築

東部家畜保健衛生所

○齊藤 瑠人、鈴木 拓人

要 約

県営の家畜共同育成場（以下、育成場）では、近年、発育遅延牛が増加傾向にあり、今年度の平均分娩月齢は本県の家畜及び鶏の改良増殖計画の乳牛目標値に満たない成績となっている。原因として、近年の預託頭数の急増や、当所と育成場での発育・繁殖成績の共有及びチームでの繁殖指導が不十分であることが考えられた。そこで、預託牛の発育・繁殖データについて分析し、データの可視化等を含めた指導体制の構築を試みた。過去のデータを分析した結果、人工授精開始月齢である13ヶ月齢時の体重が減少傾向で、初回人工授精が遅延している牛が増加しており放牧前から発育が悪い傾向にあることが判明した。次に、分析したデータを参考に現状を可視化した成績シートを作成し、毎回の検診終了後、成績シートを活用した打ち合わせを実施した。以上の取り組みにより育成場と情報共有する体制が整備され、いくつかの対策を育成場が開始することができた。これにより、育成場は継続かつ安定性のある発育・繁殖管理に取り組むことができると考察される。今後も育成場と情報共有しつつ、対策の検討・実施を継続する。

はじめに

管内にある当該育成場は、伊豆市と西伊豆町をまたがるように位置する県営の公共預託牧場であり、県内の酪農家から雌の子牛を預かり哺育・育成を行っている。現在、指定管理者である静岡県畜産協会が管理・運営している。預託される牛は、入牧の時点で発育状況によるランク付けをされ、基準の体重をクリアした子牛のみ入牧している。入牧した牛は、まず哺乳場で哺育される。その後8ヶ月齢程度で育成牛舎へ移動し、放牧が開始され、繁殖可能月齢になると繁殖供用が開始される。受胎確認後、分娩2ヶ月前の時点で、各農家へ帰牧する。これら預託牛の繁殖検診を当所が毎月実施している。令和元年度以降、育成場では、平均体重が減少傾向にあり（図1）、さらに、今年度の平均分娩月齢は24.9ヶ月齢と静岡県の家畜及び鶏の改良増殖計画の乳牛目標値である24.0ヶ月齢に満たない成績となっている。これまで、発育・繁殖成績は当所と育成場で十分な共有がされておらず、また、検診実施者個人が繁殖検診の結果報告と合わせ治療指示を実施しており、チームでの指導が行われていなかった。これらの課題を解決するため、データの可視化等を含めた指導体制の構築を試みた。

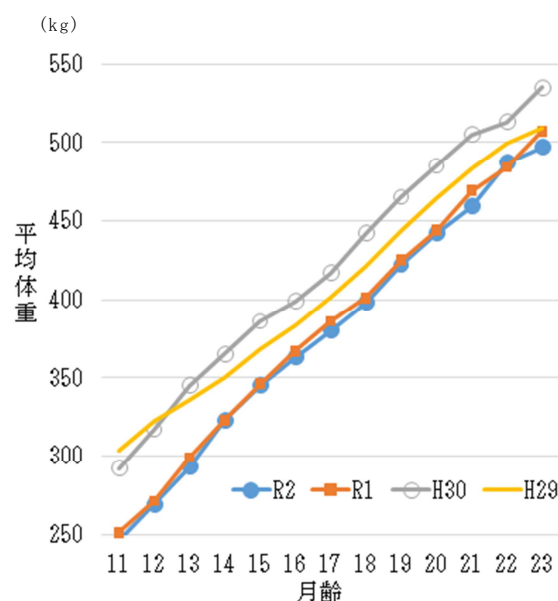


図1 H29～R2年度の預託牛の月齢毎の平均体重

材料と方法

1) 過去3年間のデータの分析

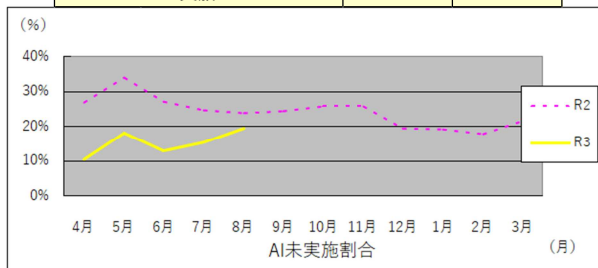
平成30年度から令和2年度の過去3年間の預託牛の発育・繁殖データから、月齢毎体重分布、初回人工授精月齢、初回受精月齢などの発育・繁殖成績を年度毎に算出した。

2) 現状の可視化・打ち合わせの実施

1) で算出した成績を参考に、グラフや表

により現状を可視化した成績シートをエクセルで作成した。①繁殖成績（平均初回人工授精月齢、人工授精未実施の牛の割合や月齢分布など）（図2）、②受胎が大幅に遅延している牛や卵巣の発育不全など繁殖障害を引き起こしている牛の個体毎の病状や治療指示（図3）、③発育成績（1日平均増体重、放牧開始時の8ヶ月齢及び繁殖供用開始前の12ヶ月齢の平均体重）（図4）、④月ごとの放牧飼養頭数等の項目を作成し、検診毎に更新した。成績シートを活用した打ち合わせを毎回の検診終了後に育成場と実施した（写真1）。

項目	今月	先月
平均初回受精月齢	14.8	14.8
平均分娩月齢	24.9	24.6
平均妊娠日数	138.0	113.8
JMR	23.8	15.4
ステージ（頭数）	今月	先月
育成	156	190
AI未実施	41	30
AI済	49	32
受胎	119	131



人工授精未実施牛群月齢構成（頭数）

月齢	今月	先月
12	4	5
13	21	15
14	8	2
15	1	6
16	5	2
17	2	0
18	0	0
19	0	0
20以上	0	0

図2 繁殖成績の記録

耳番	分類	月齢	体重	コメント・措置
Y459	不受胎	21	437	子宮異常(1本)、12/14流産確認 12/30AI
Y492	不受胎	20	442	12/2AI/10まき牛
Y634	不受胎	19	465	11/10流産 12/7AI 1/16AI
Y458	不受胎	19	456	12/18AI 1/6AI
Y507	不受胎	19	397	1/4AI
Y549	不受胎	18	447	1/11流産 12/24AI
Y490	不受胎	18	442	1/8AI
Y581	未種付	17	235	子宮極細、卵巣未成熟、hCG処置及び増飼指示
Y566	未種付	16	280	12/15hCG処置したが効果無し、2週間確認し変化がない場合CIDRsync

図3 繁殖障害の牛の病状、治療の記録

項目	今月	先月
DG(350kg以下)	0.58	0.53
平均8ヶ月齢体重	196.9	190.7
平均12ヶ月齢体重	295.0	286.2

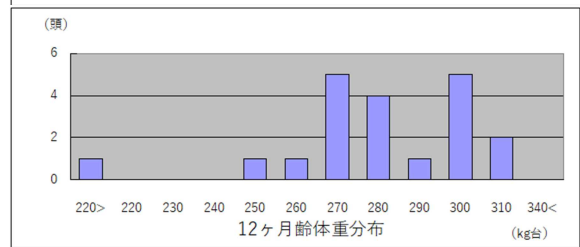
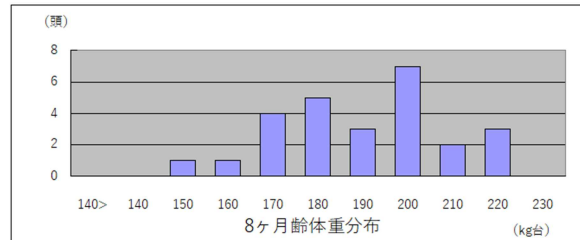


図4 発育成績の記録



写真1 成績シートを活用した打ち合わせ

成績

1) 過去3年間のデータの分析

預託牛の月齢毎の平均体重を算出したところ、令和元年度から令和2年度の2年間の13ヶ月齢時（人工授精開始月齢）の平均体重は、平成30年度よりも14%低値であった（図5）。次に、平均初回人工授精月齢の分布を算出したところ、R1年度と比較しR2年度では初回の人工授精が遅くなった牛が増加傾向にあった（図6）。初回授精が16ヶ月齢以降となると分娩月齢が目標値より遅い25ヶ月齢以降となるため、初回人工授精が16ヶ月齢以降となった牛に注目し、これらの牛の放牧直前の8ヶ月齢時の体重分布を算出した。結果、64%の牛が日本飼養標準で採用されている発育値である211kgよりも低値であった（図7）。こ

の結果をもとに育成場と相談し、哺乳場の収容頭数制限などを勘案し8ヶ月齢時点で180kg未満の牛については放牧延期を指導した。

2) 現状の可視化・打ち合わせの実施

成績シートを活用した育成場との打ち合わせでは、発育・繁殖成績を可視化し、繁殖問題牛について1頭ずつ病状とそれに対する措置を記録することで、現状の課題を情報共有する体制が整備された。発育状況による放牧制限の設定、初回繁殖検診の早期化、発育遅延牛のより確実な摘発・隔離など、いくつかの対策を牧場が立案し実行することができた。

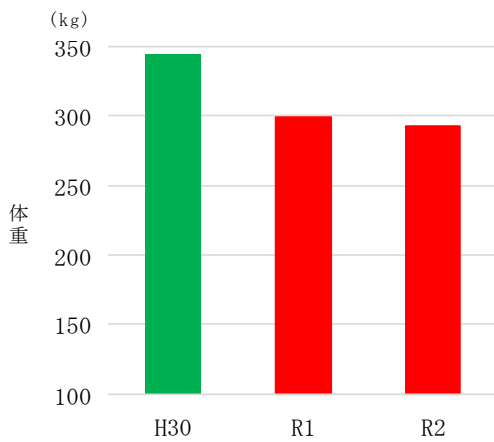


図5 13ヶ月齢時の平均体重

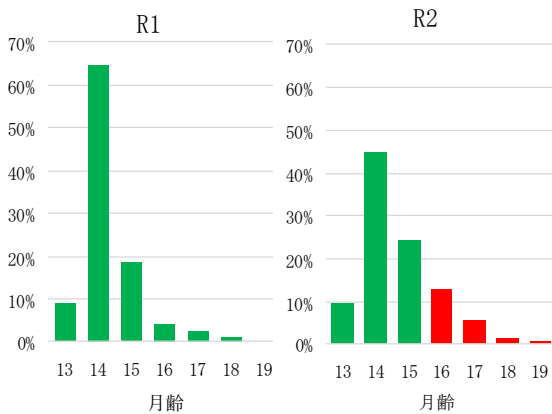


図6 平均初回人工授精月齢の分布

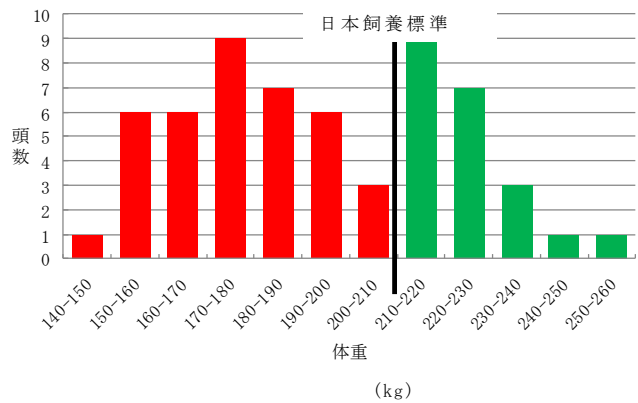


図7 初回人工授精が16ヶ月齢以降となった牛の8ヶ月齢時の体重分布

考察

発育・繁殖成績の悪化の起因として、近年の預託頭数急増（図8）に伴う飼養管理の悪化、収容頭数を超えた預託頭数による冬期放牧の開始の影響などが考えられたが、対策が遅れていた。成績シートを活用した打ち合わせを実施することで、情報共有し、育成場が理解した上で対策を立案・実行しやすい体制を構築することができた。これにより、育成場は継続かつ安定性のある発育・繁殖管理に取り組むことができると考察される。今後、発育・繁殖成績の変化について引き続きモニタリングし、情報共有しつつ、小型ピロプラズマ症、放牧開始基準の調整、飼養管理の見直し、預託頭数制限などの対策を指導していく。

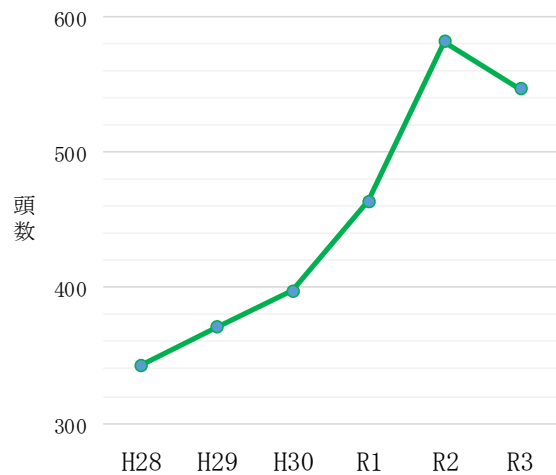


図8 預託頭数の推移

5 養豚場での衛生対策指導によって生産成績が改善した一例

西部家畜保健衛生所

○上村 耕一郎、松井 繁幸

要 約

令和2年5月、管内の一貫経営養豚場で実施した病性鑑定において豚胸膜肺炎及びサルモネラ症と診断したのをきっかけに、当該農場の衛生レベルの向上と生産成績の改善を目的とした衛生対策指導を実施した。環境中のサルモネラ検査と飼養管理方法の聞き取り結果から、根本的な衛生管理方法の見直しが必要であると判断し、農場、管理獣医師、養豚コンサルタント、家保の四者で衛生管理の改善を図った。衛生管理の見直しの結果、空き豚房の洗浄・消毒・乾燥の習慣を確立、全豚舎に専用長靴の設置と作業着の頻回の着替え、豚舎内の豚群の整理と密飼い状態の改善、従業員の作業動線ルールの作成、飼養管理に関する記録の作成などの項目を改善することができた。その結果、離乳後事故率の減少や出荷日齢の短縮など、生産成績の改善が認められた。今回の衛生対策指導では農場とその関係者で問題点を共有し、共に改善方法を検討することで、畜主が行う対策に主体性が生まれ、実効性のある対策が実施できた。当該農場では今後も継続して衛生対策指導を実施していく。

はじめに

令和2年5月、管内の養豚場において病性鑑定を実施し、豚胸膜肺炎及びサルモネラ症と診断した。当該農場では設備の老朽化や労働力不足、非効率的な飼養管理といった要因から、衛生管理がおろそかになり、その結果、疾病の発生と低い生産成績につながっていたと考えられた。そこで、農場の衛生状態を把握し、衛生管理レベルを向上させ、生産成績を改善させることを目的に、衛生対策指導を実施した。

材料と方法

当該農場は管内にある母豚約250頭、総飼養頭数約2,500頭の一貫経営の養豚農家である。豚舎はストール舎1棟、分娩舎3棟、子豚舎2棟、肉豚舎4棟の合計10豚舎から成る。

1) 農場内の衛生状態の把握

農場のサルモネラによる浸潤状況を調べるためサルモネラ検査を実施した。また、併せて農場の飼養衛生管理状況の聞き取りを実施し、農場の衛生状態を把握した。

a. サルモネラ浸潤状況調査

ア. 検査時期

農場全体を2回に分け、令和2年7月及び8月に実施した。

イ. 材料

(ア)農場の全10豚舎の環境中の拭き取り検体(通路、豚房床、飼槽)、計70検

体を検査に供した。

(イ)水、餌、敷料の計6検体を検査に供した。

ウ. 検査方法

ペプトン水で37℃24時間の前増菌培養、ハーナテトラチオン酸塩培地で42℃24時間増菌培養した後、DHL寒天培地に接種して選択分離培養した。検出されたコロニーはTSI及びLIM培地で生化学性状を確認するとともに、サルモネラ免疫血清を用いて血清型を同定した。

b. 衛生管理方法の聞き取り

農場の衛生管理を項目に分け、それぞれの管理状況について聞き取りを行った。聞き取り項目は①ピッグフロー、②洗浄・消毒、③長靴・作業着、④飼育密度、⑤野生動物侵入防止対策、⑥作業動線、⑦記録の7項目とした。

2) 衛生管理方法の見直し

サルモネラの検査結果と聞き取った衛生管理状況をもとに挙げられた農場の問題点を共有し、農場、管理獣医師、養豚コンサルタント、家保の四者で協議して衛生管理方法の見直しを実施した(図1)。この際に、家保や獣医師から一方的に指導するという形ではなく、対策を農場と一緒に考えながら協議を行った。衛生管理方法の見直しは、「重要度」とすぐに取り組むことができるかの「実

行可能性」という2つの観点から対策を整理し、優先順位の高い項目から順に対策を実行した。

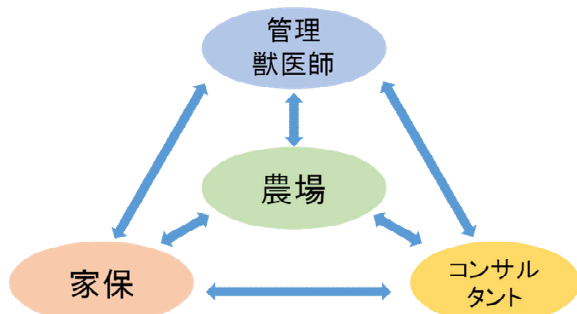


図 1 衛生管理方法の見直し体制

3) 生産成績の評価

衛生管理の改善後、離乳頭数、出荷頭数、離乳後の死亡数などの記録から離乳後事故率、出荷時日齢、枝肉重量について評価した。

成 績

1) 農場の衛生状態の把握

a. サルモネラ浸潤状況調査

サルモネラ検査の結果、農場の10豚舎のうち子豚舎1棟、分娩舎1棟、肉豚舎3棟の環境中からサルモネラが検出された。検出されたのは分娩舎①の通路、子豚舎①の飼槽、肉豚舎①の通路、肉豚舎②の豚房床と通路、肉豚舎③の豚房床と通路の計7検体である。検出されたサルモネラはすべて非定型 *Salmonella* Typhimurium と同定した。この結果から、農場全体にサルモネラが浸潤していることが明らかとなった。

b. 衛生管理方法の聞き取り

衛生管理方法の聞き取りの結果、以下の管理上の問題点が挙げられた。

①ピッグフロー：豚を空いた豚房に順次収容し、豚群の整理ができていなかったため、その後の豚の移動や給餌などの作業が非効率な状態だった。

②洗浄・消毒：豚房の洗浄は、分娩舎と子豚舎では水洗後、逆性石けんで消毒し、3日間乾燥させていたが、肉豚舎は水洗のみを実施していた。

③長靴・作業着：豚舎ごとの長靴の履き替えや作業着の着替えは実施しておらず、農場全体で共通のものを使用していた。

④飼育密度：豚の頭数に対して収容する豚房は足りず、密飼いの状態だった。豚を収容す

るところがないため、豚の流れが滞り、子豚舎から肉豚舎への移動は約110日齢まで遅れ、さらに発育が遅れるという悪循環になっていた。

⑤野生動物侵入防止対策：豚舎や堆肥舎に野生動物侵入防止のための防鳥ネットは設置されていなかった。

⑥作業動線：従業員の作業動線にルールがなかった。

⑦記録：生産成績などの飼養管理に関する記録は残しておらず、畜主も農場の状態を把握できていなかった。

2) 衛生管理方法の見直し

1) で判明した農場の問題点を農場の関係者で共有し、衛生管理方法の見直しを行った。対策は畜主の判断で重要度と実行可能性の2つの観点から分類し、図2のように整理した。

重要度低・実行可能 ・野生動物 (ねずみ対策の継続)	重要度高・実行可能 ①ピッグフローの整理 ②洗浄・消毒 ③長靴・作業着 ⑤野生動物(防鳥ネット) ⑦記録
重要度低・すぐにはできない ・ピッグフローの変更	重要度高・すぐにはできない ④飼育密度 ⑥作業動線 ・オールイン・オールアウト

図 2 衛生管理に関する対策案の整理

図2のうち、重要度と実行可能性が高かった右上の項目から優先的に対策を実行した。家保は月に2度、農場を訪問し、対策の進捗状況を確認するとともに、改善方法の助言を行った。その結果、現在までに改善された項目をまとめると表1のようになった。

①ピッグフロー：豚群の整理ができ、豚舎内で同一のロットをまとめて収容できるようになったことで、作業効率が向上した。

②洗浄・消毒：すべての豚舎で水洗、3日間乾燥、消毒、3日間乾燥という習慣を確立した(写真1)。消毒にはグルタルアルデヒド製剤を使用するよう変更した。

③長靴・作業着：長靴は全豚舎で専用のものを設置し(写真2)、作業内容ごとに頻繁に作業着の着替えをするようになった。

④飼育密度：豚群を整理したことで豚の移動に滞りがなくなり、約90日齢で子豚舎から

肉豚舎への移動することができるようになり、豚房への収容頭数も減らすことができた。

⑤野生動物侵入防止対策：防鳥ネットを全ての豚舎と堆肥舎に設置した。

⑥作業動線：分娩舎、子豚舎、肉豚舎で作業者を分け、作業順のルールを作成した。

⑦記録：生産成績の記録をまとめて、農場の状態を客観的な数字として把握できるようになった。

表 1 衛生管理方法の改善状況

項目	改善前	改善後
① ビッグフロー	空いた豚房に順次収容 豚舎内で豚群がバラバラ	同一ロットがまとめて収容 →作業効率の向上
② 洗浄・消毒	肉豚舎は水洗のみ	水洗→乾燥3日→消毒→乾燥3日 全豚舎で習慣化
③ 長靴・作業着	豚舎専用長靴なし 作業着の着替えなし	全豚舎で専用長靴の設置 作業ごとの着替え
④ 飼育密度	肉豚舎への移動：約110日齢 子豚舎①：2.83頭/m ² 子豚舎②：3.47頭/m ²	肉豚舎への移動：約90日齢 子豚舎①：2.55頭/m ² 子豚舎②：2.89頭/m ²
⑤ 野生動物	防鳥ネット未設置	防鳥ネットを設置
⑥ 作業動線	未設定	各豚舎毎に作業者の分担 作業順のルールを作成
⑦ 記録	なし	生産成績などの記録あり



写真 1 洗浄後の豚房



写真 2 豚舎専用長靴への履き替え

3) 生産成績の評価

衛生管理の改善の結果、以下のとおり生産成績の改善が認められた。

a. 離乳後事故率

各月に離乳した豚群を1ロットとし、それぞれのロットが出荷までに死亡した頭数から、ロットごとの離乳後事故率を計算し比較した(図3)。離乳後事故率は減少傾向が認められた。

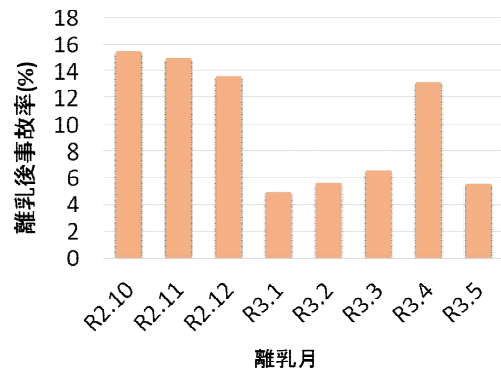


図 3 離乳後事故率の推移

b. 出荷時日齢

出荷時の日齢について、対策以前の令和2年5月は180~190日齢であったが、衛生管理方法を改善し豚の発育がよくなったことで、令和3年11月には160~170日齢程度に早まった。

c. 枝肉重量

出荷時の枝肉重量について、令和3年1月に出荷した豚群は枝肉重量が揃っていなかったが、令和3年9月に出荷した豚群は出荷に適した重量に揃えて出荷ができた(図4)。

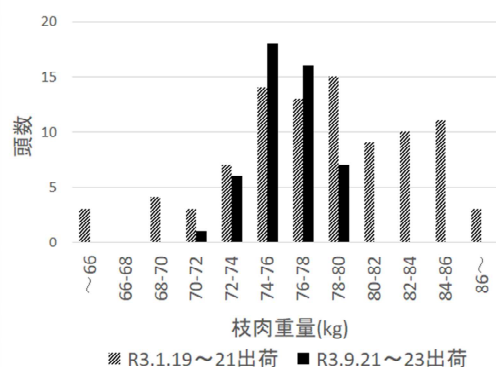


図 4 枝肉重量の分布

考 察

今回の衛生管理方法の見直しは、獣医師から指導するという形ではなく、畜主と中立の立場で改善策を一緒に考えるという形で実施した。家保はサルモネラ検査と聞き取りの結果から衛生管理に関する課題を挙げ、いくつかの改善案を提案した。その改善案を畜主が重要度と実行可能性という観点から、図を用いて視覚的に整理し、最終的な対策の実行の判断も畜主が行った。改善策を一緒に考える機会を設けて以降は、畜主が普段の作業の中で気づいた点について、家保や獣医師に相談して改善を図ろうとする主体的な姿勢を伺うことができた。このように、畜主が主体的に改善方法を考えたことが、実効性のある対策を継続して実施することでき、生産成績の改善につながった要因と考えられた。さらに、以前は飼養管理に関する記録を残していなかったが、対策以後は、生産成績の記録をまとめ、客観的な数値として農場の状態を把握することができるようになり、畜主の意欲向上につながったと考えられた。

農場が抱える課題の解決には、畜主が主体となって対策を実行し、改善結果を客観的な記録として把握して意欲向上につなげることが重要である[1]。当農場では現在も衛生管理の改善中であり、サルモネラの清浄化を達成できていないことから、今後も継続して衛生対策指導を実施していく。

参考文献

- [1] 島村剛：獣医疫学雑誌、14(1)、10-14(2010)

6 県内で発生した牛のヨーネ病に関する病理組織学的解析を用いた調査

中部家畜保健衛生所
○金森 健太

要 約

牛のヨーネ病は、肉芽腫性腸炎の形成が特徴で、組織中の菌量や形態から複数の病型に分類されている。今回、平成 25 年 4 月から令和 3 年 6 月までに、県内 10 戸の酪農場から摘発されたヨーネ病の患畜 26 頭及び自主淘汰牛 9 頭について、病型分類を実施した。分類方法は谷口らの報告を参照し、無病変型(N型)、類結核型(T型)、菌量が少ない混合型(T/L-型)と多い混合型(T/L+型)及びらい腫型(L型)の 5 つの病型に分類した。病型分類は、患畜で N 型が 1 検体、T 型が 18 検体、L 型が 2 検体、T/L-型が 3 検体、T/L+型が 2 検体だった。自主淘汰牛では、N 型が 7 検体、T 型が 2 検体だった。病型の強さと遺伝子量には相関が認められ($r=0.7309$)、T 型の病型を示す定性陽性牛も 2 頭確認された。既報どおり、本県のヨーネ病患畜及び自主淘汰牛においても、N 型から L 型へと病変が強くなるにつれて、直腸便中のヨーネ菌遺伝子量が増加し、患畜の排菌量は病変形成の程度を反映している結果となった。また、本県では菌量が少ない N、T、T/L-型が 88.6%を占め、これらの牛が農場内で排菌等による周囲への影響は比較的少なかったと考えられた。今回の結果で定性陽性牛でもヨーネ病発症疑いの牛が存在していたことから、定性陽性牛についても、より積極的な淘汰が必要だと考えられた。家保への伝達に病変の有無だけでなく、病型分類結果も併記することで、農家へ正確な情報を伝達可能だと考えられた。

はじめに

ヨーネ病とは、ヨーネ菌の経口感染で惹起され、回腸に特徴的なワラジ状病変(肉芽腫性腸炎)を形成し、持続性の下痢を呈した後、死亡に至る疾病である[1]。ヨーネ病の診断については、平成 25 年 3 月 31 日まで、エライザ検査を 2 回行うことで、患畜の決定がなされてきた。

しかし、平成 25 年 4 月 1 日の家畜伝染病予防法施行規則(施行規則)の改正により、検査にリアルタイム PCR が導入され、0.001pg/25 μ l 以上の牛を定量陽性牛として一定量のヨーネ菌が確認されたことから患畜と診断されるようになり、それ以下の値の牛はヨーネ菌の存在が確認されているが、菌量は一定量以下であった定性陽性牛として、自主淘汰の対象となった。

施行規則改正後、静岡県内では令和 3 年 6 月までに、東部 8 戸 32 頭、西部 2 戸 5 頭の計 10 戸 37 頭のヨーネ病患畜及び自主淘汰牛が摘発されており、これら摘発牛は病理組織学的に様々な病態を示していた。ヨーネ病は組織学的形態や菌量から、様々な病型に分けられることが知られていることから[3]、今回、県内で発生したヨーネ病患畜及び自主淘汰牛について、病理組織学的手法を用いた病型分類を行い、様々なデータと比較検討した。

材料と方法

1) 検査材料

10 戸の酪農場から摘発された患畜 26 頭、自主淘汰牛 9 頭の計 35 頭を用いた。

2) ヨーネ菌遺伝子量の測定

直腸便を用いて、施行規則別表第一に定める検査方法に基づき実施した。DNA 抽出にはヨースピン ver2 及びヨーネ・ピュアスピン(共にファスマック)を用い、リアルタイム PCR はヨーネジーン・KS(共立製薬)を用いて実施した。

3) 病理組織学的検査

摘発牛の回盲末端部から 10、30、50、100cm 離れた回腸と空腸及び空、回、回盲、乳房上リンパ節を採材し、採材した臓器については、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、病変が認められた個体についてはチール・ネルゼン(Z.N)染色を実施した。

4) 細菌学的検査

摘発牛の回盲部粘膜、リンパ節及び腸内容物を用いてマイコバクチン添加ハロルド培地を用いた培養検査を実施した。

5) 病型分類について

病型分類は谷口らの報告を改変し、5 段階の分類を実施した。病変の認められない無病変型

をN型、組織中のヨーネ菌が少数である類結核型のT型、T型とらい腫型(L型)の両所見があり、菌量の少ない混合型をT/L-型、菌量の多い混合型をT/L+型と分類した。そしてヨーネ菌が組織中に多数認められる病型をL型とし、5つの病型に分類した(表1)。

表1 ヨーネ病の病型分類

病型	抗酸菌の有無	菌量	主な病変	病変
無病変型(N型)	×	少	無	弱
類結核型(T型)	△	↓	多核巨細胞の浸潤	↓
混合型-(T/L-型)	△	↓	多核巨細胞と類上皮細胞の浸潤	↓
混合型+(T/L+型)	○	↓	多核巨細胞と類上皮細胞の浸潤	↓
らい腫型(L型)	◎	多	類上皮細胞の浸潤	強

結果

1) 病型分類結果

病型分類の結果は、本県で摘発された牛ではT型が最も多く(図1)、次いでN型、T/L-型の順で、T/L+とL型は同数になった。全体の88.6%の牛が組織上でほとんど抗酸菌を確認できない型別に分類された。マイコバクチン要求性遅発型抗酸菌は、T型以上の病型を示すほとんどすべての牛から分離された(図2)。

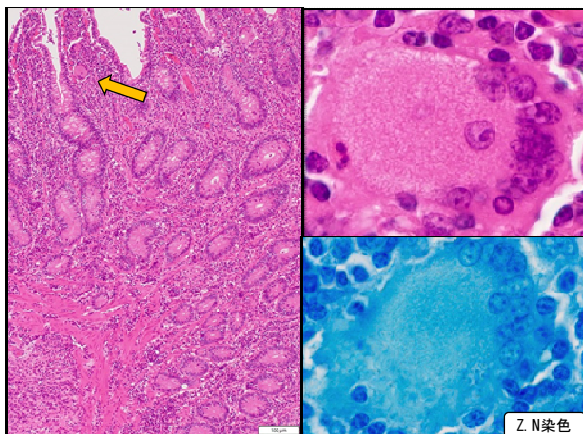


図1 類結核型(T型)の組織所見

2) リアルタイムPCR結果

摘発牛のリアルタイムPCRの結果については、最小 1.0×10^{-7} pg/25 μ l、最大 69.91 pg/25 μ l

だった。図中の赤点線はリアルタイムPCRのポジティブコントロール(PC)の値で、一番濃いPC(1.0 pg/25 μ l)よりも遺伝子量が多い牛が6頭確認された(図3)。

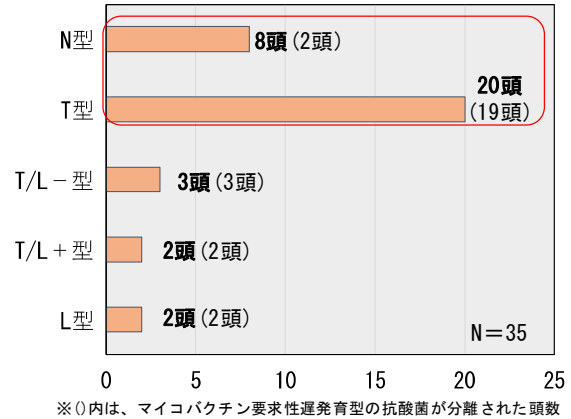


図2 病型分類結果の内訳

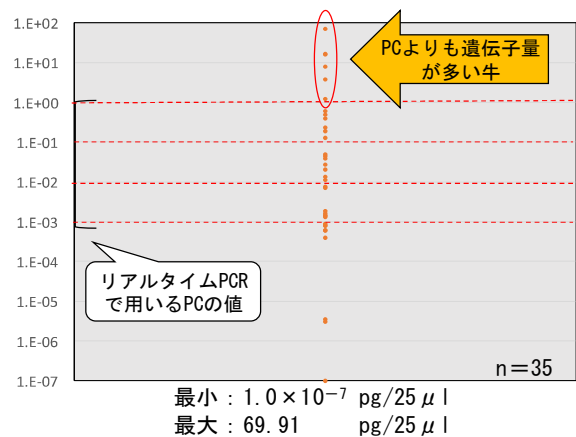


図3 リアルタイムPCR結果

2) 病型分類と遺伝子量について

病型分類結果と遺伝子量について相関図を作成したところ、特に遺伝子量の多い牛ほど病変が強い病型に分類され、相関も認められた($r=0.7309$)。既報どおり直腸便中のヨーネ菌遺伝子量が多い牛ほど病変の程度は強いという結果になった(図4)。

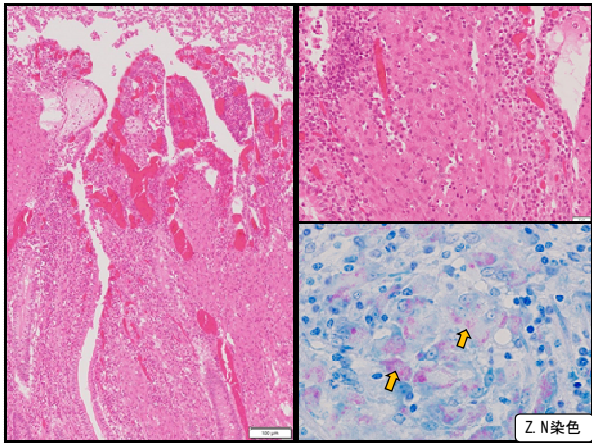


図4 L型の病変を示す牛の組織所見(遺伝子量: 69.91pg/25 μ l)

また、PCよりも高い値を示した牛の6頭中4頭は図中赤枠で示すようにL型とT/L+型の強い病変を示す病型に分類された(図5)。一方で一番低いPCの値よりも下の値を示す定性陽性牛と分類される牛の中にも、図中矢印で示すようにT型の病態を示す牛が2頭確認された(図5)。これらは、粘膜固有層に多核巨細胞の浸潤が確認されたことからT型と分類されている(図6)。

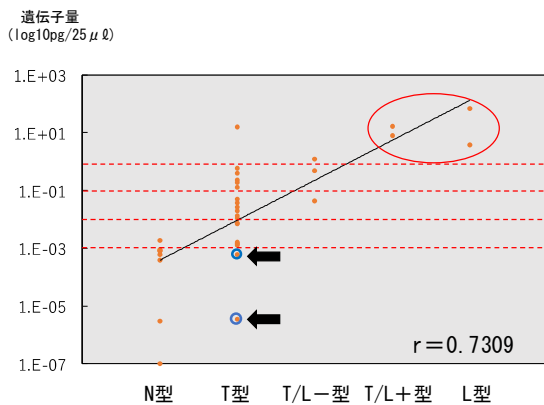


図5 病型分類結果と遺伝子量の関係

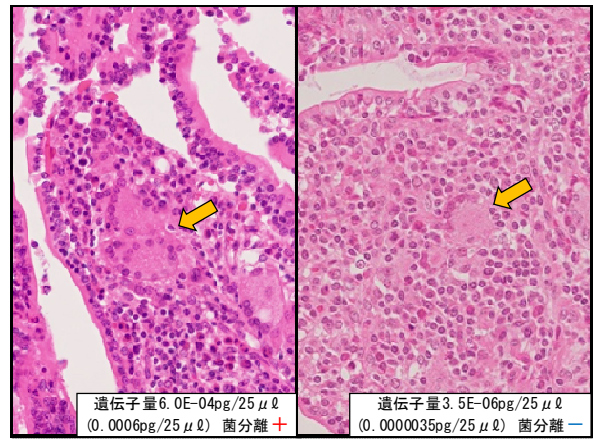


図6 定性陽性牛の組織所見

3) 病型分類と摘発月齢について

病型分類と摘発月齢との関連性については、ある程度相関が認められているものの($r=0.5203$)、図中黄枠で示すように、幅広い月齢でT型、T/L-型及びT/L+型が確認された。また、図中青枠で示すようにN型では低い月齢の個体が多く、逆に赤枠で示すようにL型は月齢が高い牛のみから検出された(図7)。

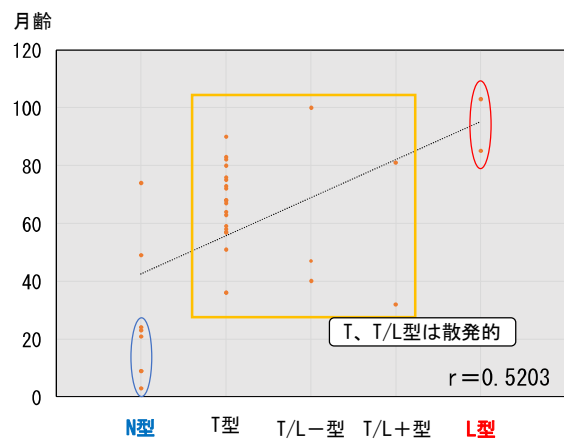


図7 病型分類と摘発月齢の相関

ヨーネ病は生後6か月以内にヨーネ菌に感染した牛が将来ヨーネ病を発症しやすいとされ、特に生後1週間以内にヨーネ菌に感染しやすいとも報告されている[1, 2]。そこで生後6か月の牛の所在地を調査したところ、35頭中27頭(77.1%)の牛が県外の特定の地域で飼育されていた。

考 察

今回、病型分類を行い遺伝子量との関係を確認したところ、既報どおり本県でも糞便中のヨ

一ネ菌遺伝子量が多い牛ほどN型からL型へと病変が強くなる相関が確認された。また、本県で摘発されたヨーネ病患畜及び自主淘汰牛は、組織上で菌量が少ないN、T、T/L型の病態を示す牛が大半を占めており、このことから本県で摘発された牛は病変が軽度な牛が多く、これらの牛が農場内で排菌等により周囲へ与えていた影響は比較的少なかったものと考えられた。また、定性陽性牛からもT型のヨーネ病発症疑い牛が確認された。基本的に、本県ではこのような牛は自主淘汰が行われてきているが、定性陽性牛の中には今回の検査結果のとおりヨーネ病発症疑いの牛が紛れている可能性もある。このことから、定性陽性牛であってもより積極的な淘汰が必要で、もし自主淘汰に応じない農家がいた場合には継続した調査を行っていくなどの対応が必要だと考えられた。ヨーネ病は若齢で感染し、長い不顕性感染期を経て発症することが多いとされている[2]。今回の病型分類と摘発月齢の相関からも若齢牛は未発症もしくはごく軽度の病変を呈し、年齢を重ねることで病態が進行していることを確認することができた。

本県で摘発されたヨーネ病の患畜及び疑似患畜は、77.1%がヨーネ菌に感染しやすい6か月齢未満時に、県外の特定の地域で飼育されており、このことから本県で摘発された牛は、県外で感染し、導入後に発症していたケースが多いことが伺えた。このことから、導入や預託についてはヨーネ病発生のリスクを伴うことを改めて認識したうえで行っていかなければならないと考えられた。

今回、病型分類の解析を行ったことで、本県で発生したヨーネ病の発生傾向を把握することができた。また、ただ病変の有無について家保職員へ結果を伝えるだけでなく、今後は病型分類の結果も併記して伝えることで、より病気の進行具合をわかりやすく伝達でき、農家へより正確な情報を伝えられると考えられた。

参考文献

- [1]後藤義孝：獣医感染症カラーアトラス、三上彪、第2版、218-220、文永堂出版、東京(2006)
- [2]森康行：動物の感染症、小沼操ら、第二版、125-126、近代出版、東京(2006)
- [3]Taniguchi Y et al:J.Vet.Med.Sci. 82(5): 541-545(2020)

7 牛伝染性リンパ腫ウイルス遺伝子検査におけるダイレクトリアルタイム

PCR法の検討

中部家畜保健衛生所

○齊藤 妙子

要 約

牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV) 対策において、BLV 陽性牛の把握は重要であるが 6 ヶ月齢未満の子牛の場合、ELISA 検査では移行抗体の影響を受けることやウインドウ期が長いこと等から遺伝子検査を実施することが望ましい。しかし遺伝子検査は、多検体を扱う際には手技が非常に煩雑となり費用も高額となる。そのため、今回、簡便かつ迅速に検査可能な遺伝子検査法として、DNA 抽出を行わず牛の血液を直接テンプレートとして用いるダイレクトリアルタイム (dr)PCR 法について検討した。(1) drPCR 法の確立: pol 遺伝子を標的としたプライマーペア及び、PC はプライマー領域を挟む 120bp の DNA 断片を人工合成したものを用い、SYBR 法による drPCR の系で条件を検討したところ、増幅曲線、融解曲線共に良好で PC の融解温度 (T_m 値) は約 83.5°C となった。また PC 検出限界は 10^{-3} コピー/ μ l オーダーとなった。(2) 野外検体の検出及び従来からの遺伝子検査法との比較: R2~R3 年に採材した 9 戸 554 頭分の牛 EDTA 血を用い、従来から用いている遺伝子検査法の①ウシ白血球ウイルス検出キット (タカラバイオ) による rPCR 法、②病性鑑定マニュアルのプライマーを用いた nested-PCR 法及び③drPCR 法の検査結果と比較した。陽性率は①28.0% (155/554 頭)、②26.4% (146/554 頭)、③24.0% (133/554 頭) となり、drPCR 法で検出可能であった検体のうち最小 BLV 遺伝子量は 0.36 コピー/10ngDNA で、1.4 コピー/10ngDNA 以上の検体は全て陽性となった。(3) 検査時間とコストの比較: 1 検体あたりの作業開始から判定までの所要時間は、①130 分、②205 分に対し、③は 185 分であったが、実質作業時間は①55 分②80 分に対し③では 15 分と大幅に短縮された。検査コストも 1 検体あたり①1,690 円②550 円に対し③は 140 円と低コストであった。drPCR 法は検出感度の面では従来法には劣るものの、BLV 遺伝子量 1.4 コピー/10ngDNA 以上の微量の検体で検出できており、BLV 対策において注視すべき水平感染及び垂直感染リスクの高い牛 (400 コピー以上/10ngDNA) については十分摘発可能と考えられた。また、水平感染の可能性があるとされる牛 (20 コピー以上/10ngDNA) も摘発可能と考えられた。drPCR 法は、DNA 抽出を行わず、全血を直接 PCR に用いることが可能で且つ 1μ l の微量検体で検査可能であること、また泳動が不必要でコンタミネーションのリスクが低減すること、作業時間を大幅に短縮できることから、検査負担軽減と効率化が見込まれた。

はじめに

牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV) は、デルタレトロウイルス属に属し、一度感染すると、プロウイルスとして宿主細胞の染色体に組み込まれる特徴がある [8]。BLV 感染により、一部の牛がリンパ腫を発症し、発症すると治療法はないため致命的となる [3]。また、発症牛はと畜場において全廃となり経済的損失も大きく、近年では感染しているだけでも乳量や繁殖成績の低下、獣医療コストの増加、寿命の短縮をもたらすとも言われており [9]、各農

場でも BLV 対策が意識されるようになってきている。なお、血中ウイルス量が多い牛は水平感染 [6] や垂直感染のリスクが高く [5]、唾液や鼻汁中にもウイルスを排出すると言われており [12]、BLV 対策ではこのような牛の管理が重要となる。つまり、BLV 感染予防には、1 頭毎の感染の有無を定期的かつ迅速に把握することが非常に重要となる。

検査方法には、ELISA 検査や遺伝子検査があるが、問題点として、ELISA 検査は移行抗体の影響する若齢子牛の検査ができないこと

や、感染してから検査で陽性となるまでの期間（ウインドウ期）が約2カ月と長いことがあげられる[5]。一方遺伝子検査では、手技が非常に煩雑で試薬が高価なため、定期的な検査をするのはかなりの負担となるが、移行抗体の影響を受けずに出生直後から検査可能でウインドウ期も短いことから早期診断が可能となる。

従来の遺伝子検査は、リアルタイム PCR (rPCR) とコンベンショナル PCR (cPCR) の方法があるが、どちらも全血 200 μ l 以上必要で DNA 抽出操作が必須となる。この抽出操作は、検査工程の中で一番煩雑で多検体になるほど作業時間、コンタミネーションリスクも増加する。また、DNA 抽出をせず直接全血を用いて行う cPCR についてはいくつか研究報告があるが[4, 10, 13]、cPCR では、PCR 産物を泳動する必要があり、やはり多検体では、作業時間やコンタミネーションリスクが増加する原因となる。そのため今回、簡便、迅速、安価に検査可能な遺伝子検査法の確立を目的として、全血 1 μ l から DNA 抽出を行わず直接検査可能で泳動作業も必要ない、ダイレクト rPCR (drPCR) 法を試みた。

材料と方法

1) drPCR 法の系の確立

drPCR 法の系は、汎用性の高く安価に検査可能な SYBR 法で、プライマーは複数のプライマーセットを検討した結果、Gillet らの報告 [2] した *pol13994-4016F* 及び *pol14043-4060R* を用い、rPCR 試薬には、ampdirect plus (島津製作所) 及び SYBR I (invitrogen) を使用した。陽性対照 (PC) は、プライマー領域を挟む 120bp の DNA 断片を人工合成 (Eulofin) したものを EASY dilution (タカラバイオ) で 10 倍階段希釈し用いた。試薬の調整は表 1 のとおり行った。なお、rPCR 機器は ABI7500Fast (Thermo Fisher Scientific) を使用し、95°C 10 分の熱変性の後、94°C 30 秒、62°C 30 秒、72°C 30 秒の 3 ステップを 50 サイクル行った後、融解曲線分析を実施した。

また、drPCR 法の条件設定を threshold line を 50,000、base line を 3-15 に設定し、検体は T_m 値が PC 温度の $\pm 1.5^\circ\text{C}$ で、2well 中 2well とも検出された場合、陽性と判定した。

表 1 drPCR 法の試薬調整

試薬	1 検体 (μ l)
Ampdirect Plus (2 \times Amp)	10.0
BIOTAQ	0.1
F primer	1.0
R primer	1.0
125 \times SYBR I	0.4
water	6.5
template(※)	1.0
total	20.0

(※) 陽性対照は合成 DNA を、検体や血液はそのまま用いた。

2) 野外検体での drPCR 法の検証及び従来法 (rPCR・cPCR) との比較

野外検体として令和 2~3 年に採材した 9 戸 554 頭分の牛 EDTA 血を用いた。drPCR 法には牛 EDTA 血を 1 μ l そのまま用いた。また従来法として、牛 EDTA 血 200 μ l から QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA 抽出を行った後 NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific) で DNA 濃度を測定後、①ウシ白血病ウイルス検出キット (タカラバイオ) による rPCR、②病性鑑定マニュアル[11]に記載されている Fechner らのプライマー[1] を用いた nested-PCR 法の系を実施した。cPCR 装置は Veriri (Thermo Fisher Scientific) を、PCR 試薬は KOD FX Neo (東洋紡) を使用し、反応条件は 1st、2ndPCR 共に 94°C 2 分の熱変性の後、98°C 10 秒、68°C 30 秒の 2step を 35 サイクルで行った。なお、従来法の①rPCR により、各検体の 10ngDNA あたりの BLV 遺伝子量を算出した。

3) drPCR 法と従来法 (rPCR・cPCR) の検査時間及びコスト比較

それぞれの検査方法について、1 検体あたりにかかる検査時間及び費用を比較した。

成績

1) drPCR 法の系の確立

陽性対照を階段希釈し drPCR に用いたところ増幅曲線、解離曲線は共に良好で解離温度は約 83.5°C となった (図 1)。また、検量線及び、算出した陽性対照の BLV 量と C_t 値は図 2 のとおりになった。陽性対照の検出限界は 10^{-3} コピー/ μ l オーダーであった。

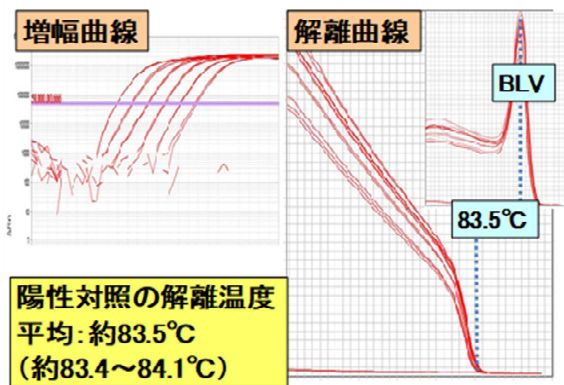


図1 drPCR法の増幅曲線及び解離曲線

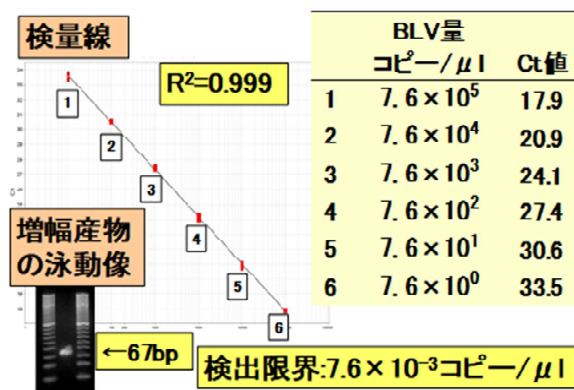


図2 drPCR法の検量線と陽性対照の定量

2) 野外検体での drPCR 法の検証及び従来法 (rPCR・cPCR) との比較

各検査法での陽性率は、①従来法の rPCR が 28.2% (155/554 頭)、②従来法の cPCR が 26.4% (146/554 頭) に対し、drPCR 法では 24.0% (133/554 頭) となり、drPCR 法で検出可能であった検体のうち最も少ない BLV 遺伝子量は 0.36 コピー/10ngDNA で 1.4 コピー/10ngDNA 以上の検体はすべて陽性となった (図 3)。

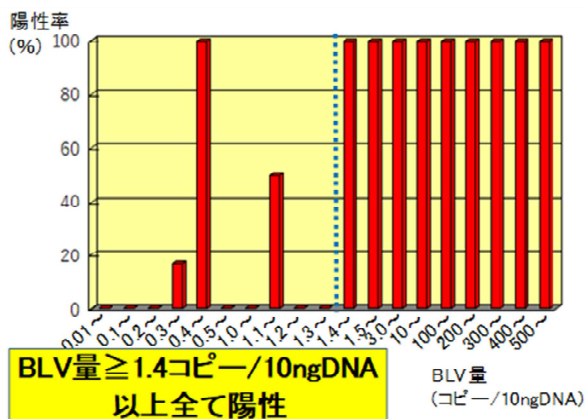


図3 drPCR法の陽性率と BLV 遺伝子量

3) drPCR 法と従来法 (rPCR・cPCR) の検査時間及びコスト比較

1 検体あたりの作業開始から判定までの所要時間は、従来法の①rPCR 130分、②cPCR 205分に対し、drPCR 法は 185分だったが、検査に係る実質作業時間は、従来法の①rPCR 55分、②cPCR 80分に対し、drPCR 法は 15分と大幅に短縮された。また、検査コストも従来法の①rPCR 1,690円、②cPCR 550円に対し、drPCR 法は 140円と最も安価となった (表 2)。

表2 各検査法の作業時間及びコスト

検査法	①rPCR	②cPCR	drPCR
所要時間 (分)	130	205	185
実質作業時間 (分)	55	80	15
検査コスト (円)	1,690	550	140

考 察

目撃らの報告[7]によると、血中 BLV 遺伝子量が 400 コピー/10ngDNA 以上の牛は水平感染及び垂直感染リスクが共に高いとされ、さらに、水平感染は血中 BLV 遺伝子量が 20 コピー/10ngDNA 以上でリスクがあるとされている (表 3)。

表3 血中 BLV 遺伝子量と伝播リスクの関係

BLV 遺伝子量 (/10ngDNA)	伝播リスク		その他リスク
	水平感染	垂直感染	
≥ 400	高	高	鼻汁・唾液中に BLV 排出
100~400	中	低-高	なし
20~100	低	低	なし
< 20	なし	低	なし

今回検討した drPCR 法は、検出感度は従来法に劣るものの、BLV 量が 1.4 コピー/10ngDNA 以上の検体で確実に検出できた。

このことから、drPCR 法では、血中 BLV 量が 400 コピー/10ngDNA 以上の水平感染、垂直感染共にリスクが高い牛は確実に摘発可能であり、また、水平感染の可能性があるとされる 20 コピー以上/10ngDNA の牛も十分摘発可

能であることがわかった。

また、従来法と比較して、一番煩雑であるDNA抽出をする必要がないために、簡便で作業時間が大幅に短縮できた。さらに、全血を直接テンプレートとしてrPCRに用いることで、検査に必要な血液量はわずか1 μ lと微量な量で済み、加えて、rPCRの系であるため泳動が不要なことから、コンタミネーションリスクの低減が期待でき、検査コストについても従来法よりも安価となり、検査に係る作業負担軽減と効率化が見込まれた。

今回検討したdrPCR法の活用機会として、公共牧場に入牧予定牛の預託前検査が考えられる。県内に唯一ある公共牧場では、現在、預託前検査として、牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)の検査をする為に入牧前に各農場で採血をし、BVDV遺伝子検査を実施、陰性牛のみ入牧させている。公共牧場では、1~2ヵ月齢で入牧し、その後6ヵ月齢まで、哺乳育成舎で飼育されており、その間BLV対策として、BLVのELISA検査を5ヵ月齢及び6ヵ月齢の2回実施し、陰性牛のみ放牧場へ移動している。

現行の方法では、入牧してからELISA検査結果判明まで哺乳育成舎でBLV陽性牛と陰性牛が混在して飼育されている可能性がある為、水平感染のリスクがある。また、5ヵ月齢及び6ヵ月齢の1ヵ月間隔で2回のELISA検査では、検査間隔が短いことや移行抗体の影響等により真の陽性牛を逃す可能性も考えられる。そのため、入牧後5ヵ月齢で行っている1回目のELISA検査に替えて、入牧前のBVDV検査と同時にdrPCR法を実施し、陰性牛のみ入牧させ、入牧後は放牧場へ移動する前(6ヵ月齢)にELISA検査を1回実施することで、現行よりもBLV伝播リスクの軽減が期待できると思われた(図4)。

今後は、drPCR法を活用し、BLV対策に貢献していきたい。

参考文献

- [1] Fechner H, Blankenstein Pet al: Virology, 202, 261-269(1997)
- [2] Gillet NA, Hamaidia M et al: PLoS Pathog., 12, e1005588 (2016)
- [3] 芳賀猛: 牛病学、明石博臣ら編、第3版、227-230、近代出版(2013)
- [4] 小林朋子、綿貫園子ほか: 山口獣医学雑誌、43、21-27(2016)
- [5] 目堅博久: 産業動物臨床医誌、6、221-226(2016)
- [6] Mekata H, Sekiguchi S et al: J. Vet. Med. Sci., 77(9), 1115-1120(2015)
- [7] Mekata H, Sekioguchi S et al: Vet. Rec., 176(10), 254(2015)
- [8] Murakami H, Yamada T et al: Virus Res., 156(1-2), 107-112(2011)
- [9] Nekouei O, VanLeeuwen J et al: Prev. Vet. Med., 133, 1-9(2016)
- [10] Nishimori A, Konnai S et al: J. Vet. Med. Sci., 78(5), 791-796(2016)
- [11] 農林水産省消費安全局: 病性鑑定マニュアル、第4版、76-77、全国家畜衛生職員会(2016)
- [12] 竹嶋伸之輔、綿貫園子ほか: 臨床獣医、34、30-35(2016)
- [13] 渡邊勉、横田司: 島根県家畜病性鑑定室報、18、17-20(2021)

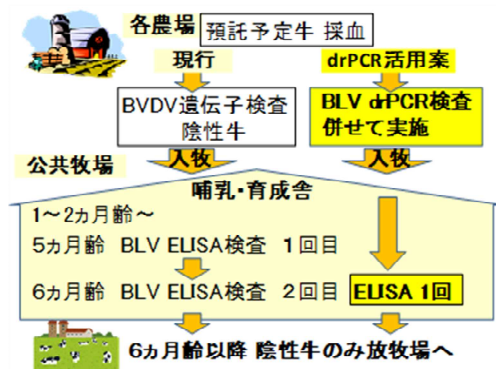


図4 公共牧場における検査の流れ