

(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①当所では、BLV 感染牛でも常に血中ウイルス量が低い個体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の低減を試みた。A 農場では、BLV 感染牛の血中ウイルス量とリンパ球数の推移から低リスク牛を選定し、非感染牛及び低リスク牛のみの飼養区画を設けたところ、感染頻度の高い夏季を過ぎても新規感染は認められず、感染率は 82%から 76%に改善した。B 農場では、(国研)理化学研究所との共同研究により、血中ウイルス量に加えて牛側の遺伝子を解析し、BLV への抵抗性を調査した。その上で、牛舎内の感染牛と非感染牛を分離し、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配置した。その結果、人為的感染を強く疑う 1 頭を除き、新規感染は確認されず、感染率は 58.6%から 57.1%を維持した。以上のことから、低リスク牛を生物学的防壁として利用することで BLV の感染率低減は可能と考えられた。

②手技が煩雑で長時間を要する EBL の遺伝子検査並びにその前処理法の簡便化を試みた。キャノンメディカルシステムズ(株)との共同研究では、新たな遺伝子検査として蛍光 LAMP 法の検証を行い、大幅な反応時間の短縮を目指している。野外 200 検体を用いた検証では、従来の遺伝子検査による成績との全体一致率は 95%であった。さらに、遺伝子検査の新たな前処理法としてバフィーコート熱処理法を考案した。牛 12 頭の血液による検証の結果、既存の方法と完全に成績が一致した。本法は従来法と比べ検査時間が約 1 時間短縮され、かつ試薬費が不要であり多検体の処理に有用と考えられた。

③感染牛をとう汰・更新する際の判断材料の一部とするため、感染牛由来の鼻汁・唾液・糞便中のウイルス量を経時的に調査している。まず、これらの材料から効率的にウイルスを検出できる採材方法と核酸抽出法を確立した。今後、血中ウイルス量と組み合わせた伝播リスクの評価が可能かを検証していく。

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、人獣共通感染症、薬剤耐性菌等の観点からも、家畜衛生分野及び公衆衛生分野において重要な細菌性疾病である。H28 の調査で県内分離株を調査したところ、県内でのフルオロキノロン※1 耐性大

腸菌の増加が確認されたことから、その耐性獲得機序の解明を試みた。

内容：一濃度ディスク法でフルオロキノロンの一種のシプロフロキサシンに対し耐性を示した9戸15株の耐性獲得機序を調査した。その結果、7戸12株は細菌染色体上のQRDR※2の変異により耐性化していた。残りの2戸3株では、PMQR※3獲得による耐性化が認められ、PMQRによる耐性上昇は、2-32倍以上であった。

PMQRは、細菌のキノロン高度耐性化や耐性の異菌種間伝播に関与することから注目される薬剤耐性因子であるが、国内での調査は殆ど行われていない。今回、県内分離株におけるPMQRの保有及び耐性上昇が認められ、改めてPMQRの浸潤実態やリスクの解明の必要性が示唆された。

※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われる重要な薬剤。耐性菌の出現が特に問題視される。

※2 QRDR キノロン耐性決定領域。従来から知られている耐性獲得機序

※3 PMQR プラスミド伝達性キノロン耐性因子。近年発見された耐性獲得機序

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。

結果：過去に、末梢血中の腫瘍化したBリンパ球を分類する手法として、末梢血から単核細胞を回収し、塗抹標本作製後、免疫組織化学的染色（免疫染色）を実施する手法についての報告はされておらず、本試験研究で新たにこの手法を開発し、プロトコルを確立した。

平成29年度は、Bリンパ球細胞マーカー（CD21、CD79 α ）、Tリンパ球細胞マーカー（CD3、CD4、CD5、CD8、WC1）、骨髄単球系細胞マーカー（CD14）及び細胞増殖マーカー（Ki67）の各種抗体を用いた免疫染色を17頭（感染10頭、非感染7頭）で実施したところ、Tリンパ球、Bリンパ球及び細胞増殖期のリンパ球の分類が可能であった。