

(8) 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～令和 2 年度)

目的：牛白血病ウイルス (BLV) 感染に誘発される地方病性牛白血病 (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：BLV 感染牛を長期的 (平成 23～30 年) に追跡調査し、感染牛の中でも一生涯にわたり血中ウイルス量が低値で推移する牛が存在することを明らかにした。また、これまでの農場内での感染状況を調査した結果、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た。そこで、管内 2 農場 (いずれもつなぎ牛舎) にて、平成 29 年春からこの低リスク牛を生物学的防壁として感染牛と非感染牛の境界に配置し、牛舎内における感染防除の効果を検証した。

A 農場の搾乳牛舎では非感染牛区画を設け、区画に隣接する牛房に低リスク牛 (血中ウイルス量がほぼ 0 で推移) を配置した。その結果、平成 30 年度は 2 頭が陽転したものの、平成 29 年及び令和元年の夏期は感染を完全に遮断し、感染率は 82.1% から 70.4% まで改善した。B 農場では、血中ウイルス量に加え (国研) 理化学研究所との共同研究により牛側の遺伝子型から BLV への抵抗性を調査し、その上で、搾乳牛舎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配置した。その結果、期間中の新規感染は 2 頭のみで、感染牛の積極的な淘汰も進んだことから、感染率は 58.6% から 4.5% まで低下した。なお、両農場での陽転牛については搾乳ミルカーを介した伝播も疑われた。

以上のことから、低リスク牛を防波堤とした感染防除は有用であり、感染牛の計画的な更新、搾乳順の変更 (感染牛を最後に搾乳)、子牛～育成牛への感染防除対策を併用することで、酪農つなぎ牛舎での EBL 早期清浄化は可能と考えられた。

イ 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 (令和元～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・MD、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：牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) を標的としたリアルタイム PCR 法を検討した。既報のプローブ法で用いられるプライマーセットをインターカレーター法として採用し、BVDV 標準株や野外検体を用いて最適な試薬や反応条件を設定した。新検査法は遺伝子型 1a、1b、1c、2a ウイルスを全て高感度に検出し、野外 100 検体を用いた検証では既存法 (コンベンショナル RT-PCR 法) と成績が完全に一致し、偽陽性反応も全く認められなかった。また、大規模農場 2 件 (1, 276 頭及び 953 頭) における全頭検査では、およそ 100 頭分の血清をプール検体として遺伝子検査に供したところ、既存法と新検査法の成績は完全に一致し、最終的に 2 頭の BVDV 持続感染 (PI) 牛を摘発した。以上のことから、既

存法と同等以上の検出感度を保持しつつ、判定時間を大幅に短縮可能（3.5時間→2時間：陽性判定なら最短1時間30分）、かつ低コスト（1検体あたり638円→431円）な検査法を確立した。令和元年度の夏期からBVDV検査に新検査法を採用したことで遺伝子検査の効率が飛躍的に向上し、平成30年度実績が2,372頭に対して、令和元年度は延べ17,264頭を検査し、計31頭のPI牛（疑い含む）と1頭の急性感染牛を摘発した。また、新検査法はウイルスの増幅産物を電気泳動することなく閉鎖系で判定することが可能であり、同じペスチウイルス属の豚熱（CSF）検査へのコンタミネーション防止の観点からも有益と考えられた。

イ 家畜の呼吸器系疾病に関する細菌学的研究（令和元～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、迅速診断は必須であるが、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の検査が可能なリアルタイム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：MbのリアルタイムPCRに適したプライマー、酵素、反応条件及び判定基準について、既報を参考に設定し、検量線のためのポジティブコントロールを作成した。また、Mb以外のマイコプラズマ属菌及び牛の鼻腔に常在する菌に対して、非特異的な反応がないことを確認した。野外材料として、呼吸器症状を呈した牛の鼻腔スワブ及び呼吸症状の有無に関係なく、解剖に供した牛の鼻腔スワブ及び肺を用いた。遺伝子抽出には、簡便で短時間でDNA抽出が可能な市販キットを使用し、Mbの遺伝子が検出可能であることを確認した。平成31年度は鼻腔スワブ190検体、肺69検体を採材し、遺伝子検査陽性はそれぞれ31、13検体、分離陽性はそれぞれ14、10検体だった。遺伝子及び分離陽性検体について定量値と分離成績を比較したところ、定量値が多いほど分離率が高く、特に、Mb肺炎を発症していた牛では、鼻腔スワブの定量値は高い傾向がみられた。現行法である分離培養とコンベンショナルPCRのおおよその所要時間は、それぞれ3日～8日、3時間半であるが、設定した反応系の場合、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、Mbの迅速な判定が可能であると思われる。

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細胞が腫瘍化し、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：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。EBL非発症牛97頭（うちBLV感染牛66頭）、臨床的にEBL発症が疑われた牛5頭、と畜場で牛白血病と診断された発症牛5頭、計107頭の全血を材料とし、PBMCを分離後、牛胎子血清に浮遊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について、非発症牛 (抗体陰性牛、抗体陽性牛および持続性リンパ球増多症 (PL 牛))、発症疑い牛および発症牛の 4 つに分けて比較した。CD3 では、発症疑い牛および発症牛で非発症牛よりも少ない傾向が認められた。CD5 および CD79 α では、発症疑い牛および発症牛で非発症牛よりも多く、PL 牛でもやや多い傾向が認められた。Ki67 では、発症疑い牛および発症牛で非発症牛よりも多い傾向が認められた。その他の抗体では、差は認められなかった。また、発症疑い牛 1 頭及び発症牛 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、IHC (CD3、CD20 及び Ki67)) を併せて実施した。6 頭全ての検査した全臓器及びリンパ節において、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。さらに、10 頭の血液 (感染牛 9 頭 (うち PL 牛 5 頭)、非感染牛 1 頭) について動物衛生研究部門に依頼し、5 種の抗体 (CD4、CD5、CD8、CD21 及び ki67) を用いたフローサイトメトリー解析を実施した結果、PL 牛の CD5 及び ki67 陽性細胞数が多い傾向が認められ、同個体の PBMC を用いた IHC でも同様の結果が得られた。

以上のことから、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。

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

目的: 子牛の呼吸器病症候群 (BRDC) は、様々な病原体や環境要因、宿主要因が複雑に関連して引き起こされる複合感染症で、大きな経済損失を引き起こすことが問題となっている。その被害を低減するためには、ワクチンによる予防対策や換気の改善等の環境対策が有効とされる。宿主要因に対する対策としては、発生時の早期発見・早期治療が重要であり、これまでに BRDC の早期診断指標としてハプトグロビン (炎症の指標) と Mx 蛋白 (ウイルス感染の指標) の有用性について報告した (平成 26~28 年度の試験成績)。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、その変動から総合的に BRDC の病勢の評価が可能か検討する。

内容: 感染初期に重要な役割を果たす自然免疫の一端を担う抗菌ペプチドの中で、特に BRDC の原因菌である *Histophilus somni* や *Mycoplasma bovis* に対して抗菌活性を示すものとして NK リシンが報告されている。平成 30 年度は、死亡畜の臓器 (肺、脳等) と生体の末梢血単核球 (PBMC) から mRNA を抽出し、NK リシンの遺伝子発現量の測定系を確立した。本年度は、肺局所における病勢評価を目的として、平成 30~令和元年度に病性鑑定依頼のあった牛の病理解剖した臓器 (肺、脳) を用いて遺伝子量を測定し、病理組織学的所見との関連を調べた。病理組織学的に正常、化膿性気管支肺炎およびその他肺疾患 (間質性肺炎、肺水腫) に分類し、脳を基準とした肺の NK リシン遺伝子の発現比を算出したところ、化膿性気管支肺炎を呈した個体の肺は、正常個体の肺と比較して高い発現が認められたが (正常: 269.6 \pm 88.0 倍、化膿性気管支肺炎: 1915.6 \pm 702.0 倍)、その他肺疾患では遺伝

子発現量の増加は認められなかった。（その他肺疾患： 132.9 ± 63.1 倍）。また、リンパ系の免疫細胞の分化・成熟を担う胸腺に萎縮を認めた個体の肺では、病理組織学的に胸腺が正常に発達した個体の正常肺と比較して低い値を示した（ 44.0 ± 21.8 倍）。

NK リシンは、非感染性の疾病である間質性肺炎や肺水腫では遺伝子量が上昇せず、感染性の炎症を示す化膿性気管支肺炎で遺伝子量が上昇を認めたことから、微生物に対する生体の防御反応として遺伝子発現量が上昇するものと考えられた。一方で、胸腺が萎縮し、免疫不全状態であったと考えられる個体では、肺局所での遺伝子発現量も低下していることから、このことが肺炎の病勢を悪化させる要因の一つとなっていると考えられた。以上、肺組織におけるNK リシンの遺伝子発現量は、肺における抗病力や免疫状態を反映していると考えられた。今後は、さらに生体のPBMC中の遺伝子発現量の変動から総合的な病勢の評価が可能か検討する。