

## 10. 高病原性鳥インフルエンザ発生を想定した農場の防疫計画作成状況

鹿行家畜保健衛生所

○加藤佳子 菅原 徹  
佐藤祐子 菊池理之

高病原性鳥インフルエンザ（以下、HPAI）は特定家畜伝染病であり、万が一、農場で発生してしまった場合には、原則として24時間以内の殺処分完了といった迅速な防疫措置をとることが求められており、日頃から発生時に備えた準備をしておく必要がある。今回、当所でのHPAI発生時に備えた農場毎の防疫計画の整備状況について報告するとともに、管内3農場において防疫計画書を農場主に提示して内容について協議したところ、いくつか意見が寄せられ改善点等が明らかになったので、あわせて報告する。

### 防疫計画の整備状況

#### 1 防疫支援センター

防疫作業者の集合場所となる防疫支援センターの候補地として、管内の体育館や公民館等の公共施設を21か所選定し、市担当者の協力を得て、シャワー室やトイレ、更衣室、手洗い場等の設備、体育館や駐車場の広さを調査した（写真1）。その結果、補修工事中の施設や十分な広さが確保できずに利用困難と思われる施設等を除き、15か所を防疫支援センター候補地とした。

さらに、農場毎に利用する防疫支援センターの第一候補地として、農場所在地の市内の施設で農場からの距離が近く、作業動員人数に対して十分な収容人数を有していることを条件として8か所を選定した。

#### 2 消毒ポイント

平成27年度までに管内の消毒ポイント候補地を253か所選定し、大型トラックの通行の可否、水源の有無等について現地確認を実施した。その後、平成29年度及び30年度に、各消毒ポイントの現地再確認・再評価と、消毒ポイントが不足と思われる地域での候補地の追加を行った。その結果、以前は空き地であったが、新たに太陽光発電施設の建設等、利用困難となった場所を除外し、平成31年1月現在で120か所が候補地となっている。

さらに、家畜防疫マップシステム（以下、防疫マップ）を利用し、各農場を中心に半径1km、3km、10kmの距離付近で飼料運搬車等の畜産関係車両の通行が予想される幹線道路沿いの候補地を抽出し、農場毎の消毒ポイントとした。

### 3 周辺農場・養鶏関連施設

防疫マップを利用し、各農場を中心に半径 3km の移動制限区域、10km の搬出制限区域の円を描き、円に含まれる農場および養鶏関連施設（GP センター、ふ卵場、食鳥処理場、液卵製造施設）をリストアップした。

### 4 焼却場

本県は、HPAI 発生時には原則として焼却処分するため、焼却場の調査も実施した。管内には公営 3 か所、民間 1 か所の焼却場があるが、立入調査の結果、公営 1 か所で焼却炉老朽化のため利用が困難であることが判明した。残りの 3 施設での 1 日の焼却可能羽数は 9,000 羽程度であり、大規模養鶏場で発生した場合、管内焼却場のみでは焼却完了まで時間を要するため、管外の焼却場も利用することを想定した。

### 5 通行制限・サポート拠点

農場周辺の衛星写真を用いて、各農場周辺の車両の通行制限場所とサポート拠点の設置場所を検討した。さらに、農場立入の際に現地を確認し、不適切と判断した場合は、再検討した（写真 2）。

### 6 農場内の作業動線

農場の衛星写真を用いて、鶏舎周辺の死体の段ボール箱詰め作業場所、箱詰め死体の保管場所、ホイールローダーの動線、搬出トラックの動線等を検討した（写真 3）。

### 7 鶏舎内の作業動線

茨城県の特定家畜伝染病防疫作業マニュアルを参考に、鶏舎内模式図を用いて、捕鳥係、運搬係、ガス注入係等を配置し、鶏舎内での作業員の動線を検討した（図 1）。

## 防疫計画の協議

これまで机上で検証してきたことが実際に実行可能なのか、その作業性、効率性について、農場主の視点での意見を計画に反映させるため、A、B、C の 3 農場について防疫計画書案を作成し、農場主と協議した。その結果、3 農場とも防疫計画書の内容については概ね同意したものの、いくつか意見・修正点もあった。

A 農場はウインドウレス 4 鶏舎 3 万羽飼養の肉用鶏農場で、周辺の道路状況から近隣の青果場の大型トラック通行が不可能となるため、当初想定した付近の通行止めができず、消毒ポイントを設置することで通行できるよう計画を修正した

(写真4)。鶏舎内作業については、作業者の技術不足を不安視して捕鳥および殺処分にかかなりの時間を要するとの見解で、増員すべきとの意見があった。また、通常の出荷時のように、鶏を運搬用の籠に入れ、レールを使用し搬出する方法や、鶏舎内を暗くし鶏をおとなしくして作業する方法等、様々な提案を受けた。

B農場はセミウインドウレス1鶏舎で採卵鶏7,000羽を飼養する農場で、農場の向かい側に道路を共有する運送業者があり、他に迂回路がないため、運送業者敷地の出入口に消毒ポイントを設置することとした。

C農場は4段ひな壇ケージのウインドウレス鶏舎で採卵鶏3万羽を飼養しており、現地を確認したところ、農場敷地内にサポート拠点を設定できる十分なスペースがなかった。そこで現地で農場主に打診したところ道路向かいにある神社の敷地がサポート拠点として利用可能とわかった(写真5)。またA農場と同様、普段鶏に触れる機会のない作業者による10羽ずつの捕鳥及び殺処分という鶏舎内作業工程について、効率の悪さを不安視しており、捕鳥人員の増員、2鶏舎同時作業の提案を受けた。

## まとめ

HPAI発生に備えた事前の防疫計画作成は、迅速な防疫対応のためには不可欠であり、消毒ポイントや防疫支援センターは、定期的に現状を確認して情報を更新していく必要があると思われた。また農場主と計画内容を協議することで、当所の計画に修正が必要ということも判明した。さらに、普段の搬出作業をもとに、迅速な作業方法について提案を受け、大変参考となるなど、農場主と協議することで、家畜保健衛生所との認識の摺合せができ、より具体的な防疫計画を作成することが可能となった。また、防疫計画について感想を伺うと、その必要性や重要性について肯定的な意見であり、協議の有用性が示された(図2)。自農場で発生した場合の制限区域内に入る周辺農場数を知り、それらの農場に多大な迷惑をかける一方、周辺農場で発生した際は自分の農場も制限区域に入ってしまうと改めて認識され、より一層の衛生対策の重要性について意識の向上につながったと思われた。

当所ではこれまで主に机上で防疫計画を整備してきたが、さらに詳細でより有用性の高い防疫計画にしていくため、今後も管内全農場で農場主との協議及び防疫計画の修正を実施し、HPAI発生時に迅速な対応ができるよう備えていく予定である。



写真1 防疫支援センター現地調査

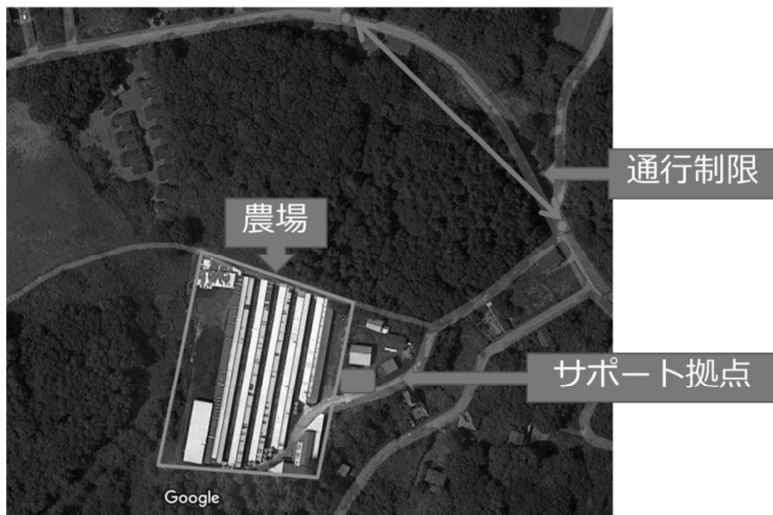


写真2 通行制限・サポート拠点

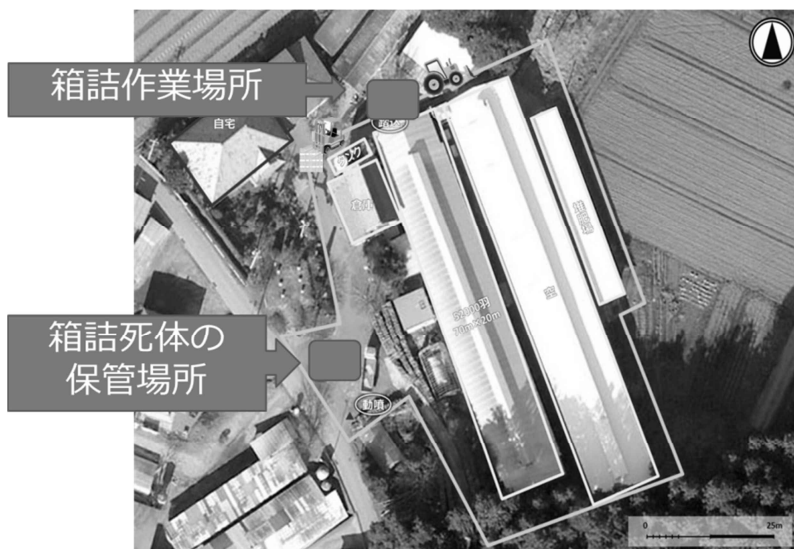


写真3 農場内作業動線

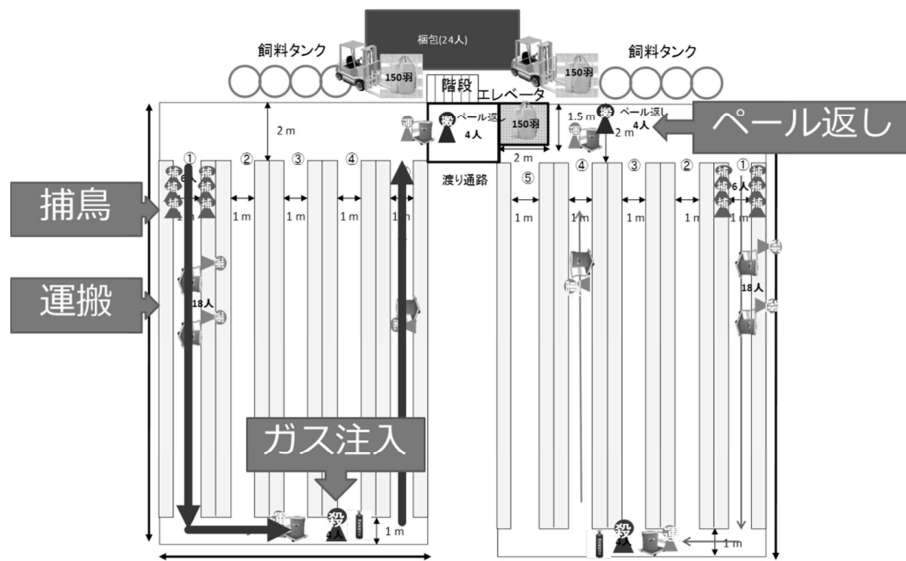


図1 鶏舎内作業動線



写真4 A 農場の通行制限

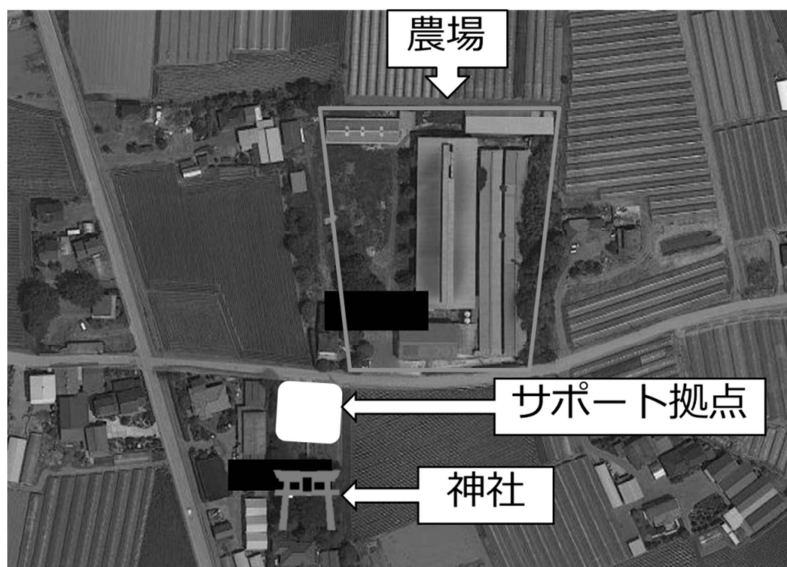


写真5 C 農場のサポート拠点



楽しい話じゃないけど、準備しておかないといけないよね。

自分の農場で発生した場合に、どんな作業状況になるのか、知ることができてよかった。

いざという時のために必要なことだから、他の農場でもやったほうがいいよ。

これだけの周辺農場に迷惑がかかる。周辺農場での発生時には自分も制限区域に入る。

図2 防疫計画書についての感想

## 第 二 部

家畜保健衛生所における家畜保健衛生に関する試験・調査成績

## 1 1. 牛白血病発症抵抗性遺伝子の検索と利活用法の検討

県北家畜保健衛生所

○鹿島 悠幹 大矢 祥子  
都筑 智子 根本 聡実

牛主要組織適合抗原（BoLA）-DRB3 の遺伝子多型には、牛白血病ウイルス（BLV）に感染してもプロウイルスが増殖しにくく、産子や同居牛への感染源になりにくい遺伝子型が存在する。特に、牛白血病（BL）発症抵抗性遺伝子型の一つである BoLA-DRB3\*0902（以下、抵抗性遺伝子）は、黒毛和種とホルスタイン種に共通の抵抗性遺伝子で、ヘテロで保有していても発症に抵抗すると報告されている。

本県の和牛繁殖農場と酪農場において BLV 検査を進めていく中で、抵抗性遺伝子保有牛（以下、抵抗性牛）を調査した結果、その血統に特徴があることが明らかになった。今回、抵抗性遺伝子保有状況の概要と、その利活用による BL 対策を提案する。

### BLV リスク分類

血中 BLV プロウイルス量（以下、プロウイルス量）を定量し、宮崎大学目堅らのプロウイルス量による感染リスク分類を参考に、当所で新たに考案した分類（表 1）により、感染リスク分類を行った。

### 抵抗性遺伝子保有状況調査

#### 1 検査材料

平成28年11月から平成30年12月に採材した、管内の和牛繁殖農場 144 戸2,072 頭（黒毛和種2,029頭、交雑種43頭）の和牛繁殖に供する又はその見込みのある牛（以下、繁殖牛）及び平成30年4月から12月までに採材した酪農場 8 戸 594 頭の搾乳に供する又はその見込みのある牛（以下、搾乳牛）の血清及び EDTA 血液を検査に供した。

#### 2 検査方法

##### （1）抵抗性牛の検索

##### ア 抗体検査

全ての血清について、gp51 を抗原とした市販の牛白血病エライザキット（JNC 株式会社）を用いて ELISA を実施した。

##### イ 遺伝子検査

##### （ア）プロウイルス定量 PCR 法



EDTA 血液について、自動核酸抽出機でDNAを抽出しBLVの*tax*遺伝子をターゲットとしたリアルタイムPCR法でDNA10ngあたりのプロウイルスを定量した。

#### (イ) 抵抗性遺伝子PCR-RFLP法

無視できるリスクのうち、抗体陰性牛及びプロウイルス量 1copies/10ngDNA 未満の抗体陽性牛のDNAについて、国立大学法人宮崎大学 林らの方法<sup>1)</sup>に準じてPCR法でBoLA-DRB3 exon2領域を増幅後、制限酵素 *BstY I* で切断し、その切断のパターンから抵抗性遺伝子の検出を行った。

#### (2) 抵抗性牛の個体調査

繁殖牛については父・母父・母母父（以下、3代祖）と年齢、搾乳牛については父・母父と年齢の調査を行った。

### 3 検査結果

繁殖牛では、高リスク 7%、中リスク 16%、低リスクが 10%、無視できるリスクが 67%であった（図1）。搾乳牛では、高リスク 23%、中リスク 21%、低リスク 10%、無視できるリスク 46%であった（図2）。この結果を踏まえ、無視できるリスクのうち抗体陰性とプロウイルス量 1copies/10ngDNA 未満の繁殖牛1,241頭及び搾乳牛 216 頭について抵抗性遺伝子を検索し、繁殖牛では31戸53頭、搾乳牛では5戸21頭が抵抗性遺伝子を保有していた。保有率は、繁殖牛で2.6%、搾乳牛は3.5%であった。 $\chi^2$ 検定により繁殖牛と搾乳牛の間に抵抗性遺伝子保有率に差はなかった。繁殖牛の抗体陽性率は51%、そのうち抵抗性牛の抗体陽性率は50%、搾乳牛の抗体陽性率は78%、そのうち抵抗性牛の抗体陽性率は71%であった。抵抗性牛のプロウイルス量は繁殖牛 0-0.4copies/10ngDNA、搾乳牛 0 ~0.4 copies/10ngDNAであった。

繁殖牛の抵抗性牛の年齢の中央値 8.2 歳で、抵抗性遺伝子を保有していない牛の年齢の中央値は 5.0 歳であり、U検定により抵抗性牛の方が有意に高かった（ $p<0.05$ ）。搾乳牛で同様の検定を行ったところ、有意差は認められなかった（図3）。抵抗性牛の血縁関係は、繁殖牛で親 9 頭から11頭の産子が抵抗性遺伝子を受け継いでおり、異父兄弟で抵抗性遺伝子を保有していたのは2組4頭だった。また、血統を調査した結果、繁殖牛、乳用牛でそれぞれ1頭、抵抗性牛の可能性のある種雄牛を特定することができた（図3）。

## 種雄牛における抵抗性遺伝子の検索

### 1 材料と方法

抵抗性牛の可能性のある種雄牛から精液を入手できた黒毛和種種雄牛（以下、黒種雄牛）AA、及び母父に黒種雄牛AAを持つ黒種雄牛AB並びにホルスタイン種種雄牛（以下、乳種雄牛）XX及びXXの血統を引き継いだ乳種雄牛XZの凍結精液を用いて、抵抗性遺伝子PCR-RFLP法を行った。

## 2 検査結果

黒種雄牛 AA 並びに乳種雄牛 XX 及び XZ は抵抗性遺伝子をヘテロで保有していたが、黒種雄牛 AB は抵抗性遺伝子を保有していなかった。

### 抵抗性遺伝子を保有する種雄牛後代の抵抗性遺伝子保有状況調査

#### 1 方法

繁殖牛1,339頭の血統を調査し、黒種雄牛 AA を3代祖のいずれかに持つ牛について抵抗性遺伝子の保有状況を調査した。

#### 2 結果

抵抗性遺伝子を持つ牛は黒種雄牛 AA を父に持つ場合は100% ( 7/7 頭 ), 母父に持つ場合は 87.5% ( 7/8 頭 ), 母母父に持つ場合は40% ( 2/5 頭 ) であった (表3)。

### 抵抗性遺伝子保有種雄牛を用いた農場シミュレーション

ヘテロで抵抗性遺伝子を保有する種雄牛 (以下, 保有種雄牛) の活用を検討するため, 乳用牛 121 頭を飼養, 抗体陽性率 90%, リスク分類 (図4) が既知の酪農場をモデルとして, 高リスク牛に保有種雄牛を交配した場合のシミュレーションを行った。高リスク牛等が胎盤・産道感染する確率は, 目堅らの報告を参考に高リスク牛 50% (≒ 48.6%) と仮定した。

#### 1 シミュレーション方法

この酪農場の高リスク牛37頭 (31%) で全てに保有種雄牛を交配して分娩したと仮定し, 雌雄の別, 及び産子が抵抗性遺伝子を保有する確率を 50% とした。抵抗性遺伝子を保有していた場合のリスク分類は, 無視できるリスクとした。シミュレーションは, それぞれの項目ごとに乱数表を用いて無作為に決定した。また, 対照として通常の種雄牛を交配した場合についてシミュレーションを行った。産子が胎盤・産道感染した場合, この農場の抗体陽性牛のリスク分類に準じた比率で産子のリスク分類を行った。

#### 2 結果

産子の雌牛は37頭中19頭, そのうちBLV感染牛が10頭であり, 保有種雄牛を交配した場合, 抵抗性遺伝子は11頭に引き継がれ, 感染リスク分類は高リスクが1頭, 中リスクが1頭, 無視できるリスクが17頭となった。通常の種雄牛を交配した場合は, 高リスクが4頭, 中リスクが2頭, 低リスクが1頭, 無視できるリスクが12頭となった (図5)。

## 考察

今回, 県内の繁殖牛及び搾乳牛について, 抵抗性牛の検索をした結果, 繁殖牛

で31戸53頭、搾乳牛で5戸21頭が抵抗性遺伝子をヘテロで保有していた。抵抗性牛は、既報のとおり感染率はそれ以外の牛と比較しても差はみられないが、プロウイルス量は著しく低値であり、BLV対策に有効に活用できることが示唆された。しかし、県内で飼養されている繁殖牛の抵抗性牛は、年齢約8歳（中央値）と高齢化が進んでいた。BLV感染牛のうちプロウイルス量の多い牛は、免疫担当細胞が疲弊化し、免疫反応や繁殖性の低下や疾病に罹患しやすいとの報告がある。そのため、抵抗性遺伝子を保有しない牛は、早期に死産事故に遭遇し、一方で、抵抗性牛は免疫細胞が健全なため、長寿命化する傾向があるのではないかと推察している。

抵抗性遺伝子は異父兄弟や産子へ受け継がれており、また血統調査から抵抗性遺伝子を保有している可能性がある種雄牛を特定することができた。保有種雄牛を特定することができれば、胎盤・産道感染に対して対策が可能となり、抗体陽性率が高い農場や、高リスク牛を多く飼養する農場でBLV対策への活用が期待できる。特定された種雄牛の検索を行った結果、黒種雄牛1頭、乳種雄牛2頭がヘテロで抵抗性遺伝子を保有していることが明らかになった。そこで、抗体陽性率・高リスク率がともに高い農場で、高リスク牛へ保有種雄牛を交配したシミュレーションを行ったところ、胎盤・産道感染のリスクを著しく低減させることができた。そのため、抗体陽性率が高い農場で、高リスク牛に保有種雄牛を交配する対策は、今後の現場実践による効果検証が期待される。

また、BLV対策では吸血昆虫対策が重要であり、その一つとして抗体陽性牛の分離飼育がある。しかし、分離飼育には4m以上の距離を取る必要があり、農場では本来飼養できるスペースを空けなければならない。一方、防壁として抵抗性牛を陽性牛と陰性牛の間に配置する活用方法は、分離飼育と同様の効果が期待でき、生産性を低下することなく、経済的なメリットも大きい。今回抵抗性牛と特定できた黒種雄牛AAの精液は生産が終了し、現時点では市場に流通していないため、農家などに保存されていた場合は貴重な遺伝資源となる。今後、BLV対策を強化するために、これらの牛の後代を生産し、抵抗性遺伝子を保有していた場合には、積極的に活用することが重要であると考えられる。

BLV清浄化を達成するためには数年単位の対策の継続が必要だが、抵抗性牛はBLV対策の強力なツールになる。高リスク牛の早期更新、吸血昆虫を柱にした水平感染対策、抵抗性牛の活用による垂直感染対策の3本の矢で折れないBLV対策を継続的に行い、BLV清浄化を目指したい。

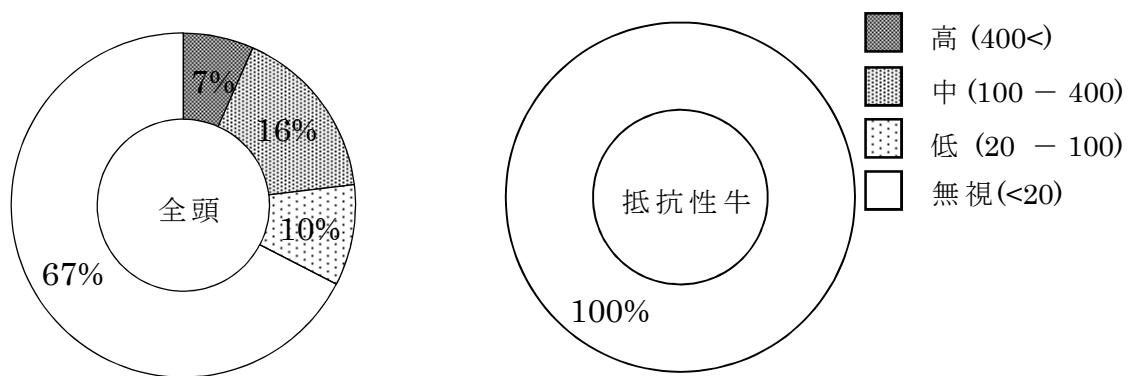
## 参考文献

1. Takumi H., *et al.* Cattle with the BoLA class II DRB3\*0902 allele have significantly lower bovine leukemia proviral loads. *J. Vet. Med. Sci.* 79(9):1552-1555, 2017

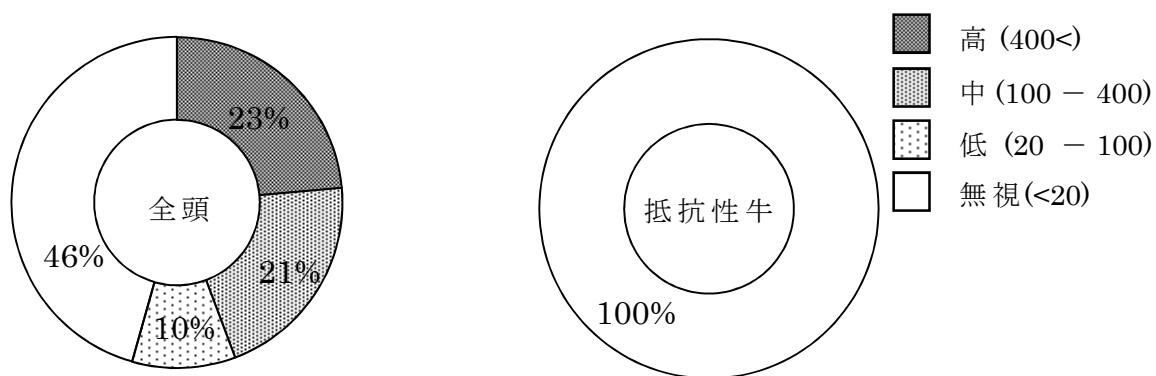
**表 1** プロウイルス量に基づいた感染リスク分類

	伝播リスク		BLV 抗体	プロウイ ルス量※	当所で新たに考案 したリスク分類
	水平感染	垂直感染			
Very high	高	高	陽性	>400	高リスク
High	中	低 - 高		100-400	中リスク
Low	低	低		20-100	低リスク
Very low	なし	低		<20	無視できる リスク
—	なし	なし	陰性	—	

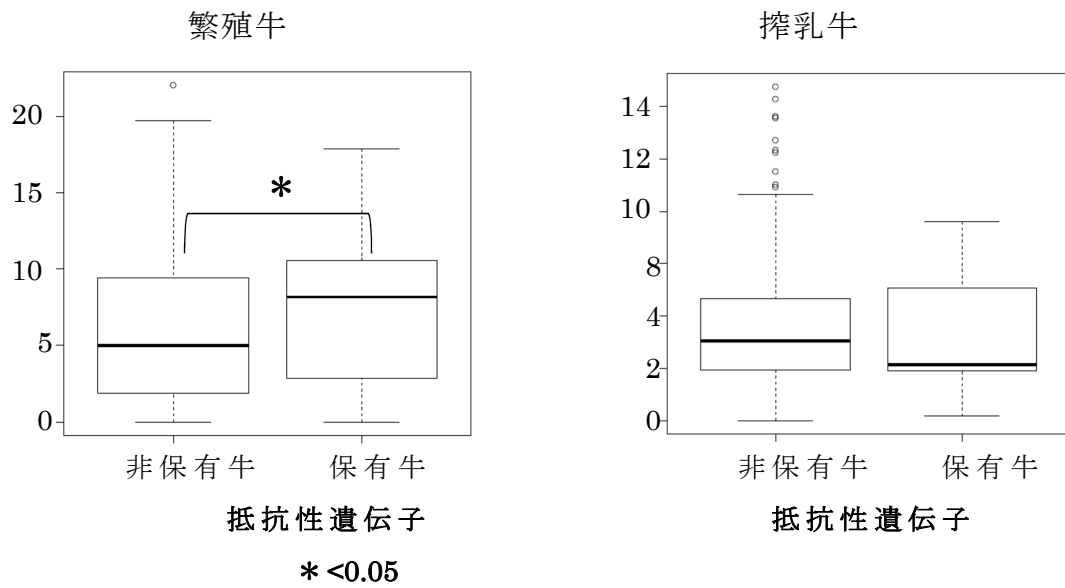
※ copies/10ngDNA



**図 1** 繁殖牛のリスク分類



**図 2** 搾乳牛のリスク分類



**図3** 抵抗性牛と抵抗性遺伝子非保有牛の年齢比較

**表2** 抵抗性牛の血縁関係と血統調査結果

分類	血縁関係	血統 (頭数 / 抵抗性牛全頭数)		
		父 : AA	母父 : AA	母母父 : AA
繁殖牛	親 9 頭 → 子 11 頭 異父兄弟 : 2 組 4 頭	8/53 頭 ( 1 頭交雑種)	7/53 頭	2/53 頭
搾乳牛	ND	父 : XX 3/21 頭	ND	ND

**表3** 保有種雄牛後代の抵抗性遺伝子保有状況

黒種雄牛AA	抵抗性遺伝子保有率
父	100% ( 7/7 )
母父	88% ( 7/8 )
母母父	40% ( 2/5 )

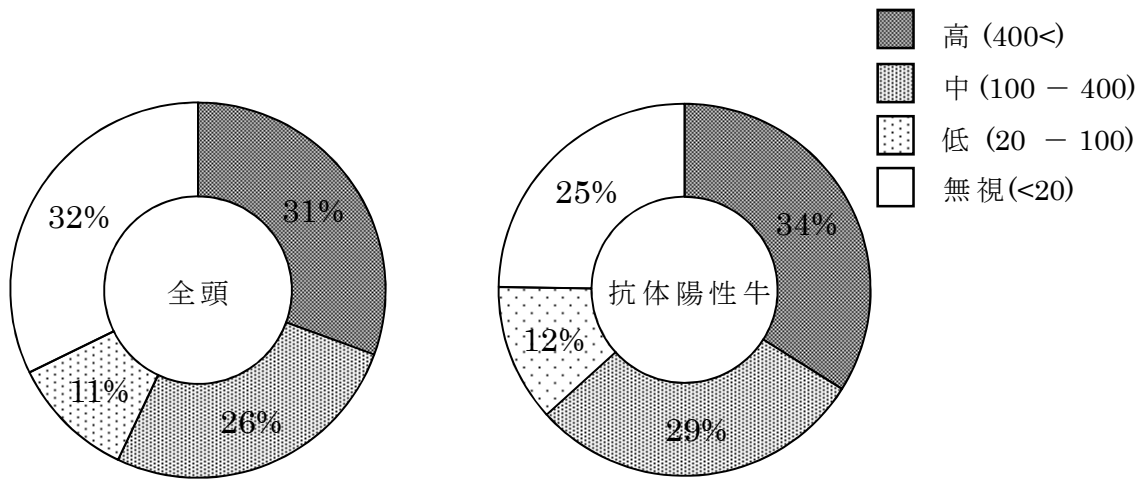


図4 酪農場のリスク分類

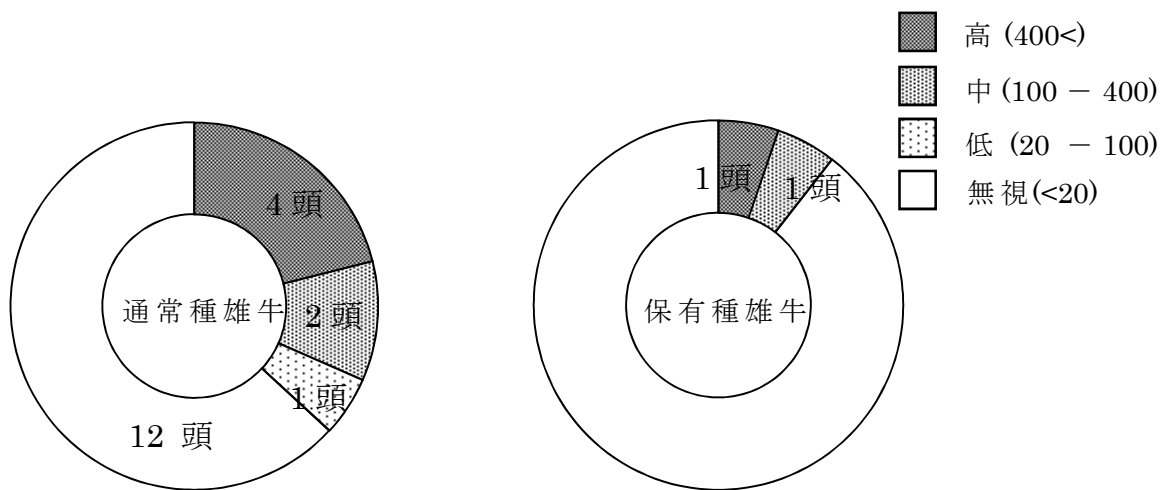


図5 通常の種雄牛と保有種雄牛を交配した場合の産子のリスク分類

## 12. バルク乳を用いたマイコプラズマ性乳房炎スクリーニング検査と最適な検査方法の検討

県北家畜保健衛生所

○高安真理子 藤井 勇紀  
都筑 智子 川上 純子

牛マイコプラズマ性乳房炎の主要な原因菌種は *Mycoplasma bovis* (以下, *M. bovis*) であり, 一般の抗生物質による治療効果は低く, 難治性で, 廃用率が高く, 甚大な経済的損失を招き易い。昨年度, 県内で初のマイコプラズマ性乳房炎の発生があったことから, マイコプラズマの浸潤状況把握のため, クーラーステーション (以下, CS) 保管の農場バルク乳を用いたスクリーニング検査が実施可能か検証をした。また, 効率的なスクリーニング検査を確立するため, 分離培養法と遺伝子迅速検査法 (以下, 迅速検査法) を比較したので報告する。

### CS 保管乳を用いたバルク乳スクリーニング検査

本県では平成 29 年度から, CS 保管集乳車合乳および農場バルク乳を用いた BVDV サーベイランスを年 1 回実施している。BVDV 検査用の農場バルク乳でスクリーニング検査が可能であれば, 採材の手間を大幅に削減できるため, 試験的に検査を実施した。

#### 1 検査材料

CS で 3 日間冷蔵保存された管内 3 市 77 農場 87 検体の農場バルク乳を材料とした。

#### 2 検査方法

バルク乳 100 $\mu$ L を 3mL の液体培地 (マイコプラズマ NK 液体培地, 関東化学株) に接種し, 37 $^{\circ}$ C48 時間培養後, 増菌液 10 $\mu$ L を変法 Hayflick 寒天平板培地で 5%CO<sub>2</sub> 下 14 日間培養した。発育したマイコプラズマ様コロニーは, 液体培地に継代し, DNA 抽出試薬 (シカジーニアス R DNA 抽出試薬, 関東化学株) を用いて DNA を抽出し, 菌種別 PCR (*M. bovis*, *M. californicum*, *M. bovigenitalium*) で同定を行った。液体培地は, 14 日間培養を行い, カラーチェンジが起こった検体について DNA を抽出し, 菌種別 PCR で同定を行った。

#### 3 検査結果

農場バルク乳 87 検体中 2 検体が *M. bovis* 陽性で, 陽性率は 2.2% だった。農家別では, 77 戸中 1 戸が陽性で, 陽性率は 1.3% だった。

### 分離培養法と迅速検査法の比較

CS 保管乳でバルク乳スクリーニング検査が実施可能であることが分かったが、バルク乳のように菌数が少ないと予想される検体の多検体処理における最適な検査法を検討する必要がある。

## 1 検査材料

*M. bovis* 陽性バルク乳 2 検体 (No.1~2), *M. bovis* 陽性個体乳 3 検体 (No.3~5) を用いた。

## 2 検査方法

### (1) 分離培養法

増菌培養 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 時間の増菌液 10 $\mu$ L を変法 Hayflick 寒天平板培地に塗抹し, 5%CO<sub>2</sub> 下で 14 日間培養し, コロニーの発育を確認した。

### (2) 迅速検査法

増菌培養 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 時間の増菌液から DNA を抽出し, 遺伝子検査試薬 (牛マイコプラズマハイスクリーニングプラスキット, 関東化学 (株)) によるスクリーニング (以下, スクリーニング PCR) 後, 菌種別 PCR を実施した。

### (3) 生菌数測定

増菌前の乳汁, 増菌培養後 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 時間の増菌液を段階希釈し, 変法 Hayflick 寒天平板培地で生菌数測定を行い, 増殖曲線を作成した。増菌液は, PCR 実施時期の指標とされているカラーチェンジが起こった時間を記録した。マイコプラズマ以外の細菌の混入について, 5%羊血液寒天培地及び DHL 寒天培地に塗抹し確認した。

## 3 検査結果

### (1) 増菌培養時間 (表 1)

#### ア 分離培養法

5 検体中 4 検体は, 24 時間培養の増菌液でコロニーが確認され, 48, 72, 96, 120, 144, 168 時間培養の増菌液で全検体のコロニーが確認できた。全検体のコロニーが検出できた最短の増菌時間は 48 時間だった。

#### イ 迅速検査法

スクリーニング PCR は, 5 検体中 4 検体は, 24 時間培養の増菌液で陽性になり, 全検体が 96, 120, 144, 168 時間培養の増菌液で陽性となった。菌種別 PCR は, 5 検体中 3 検体は, 24 時間培養の増菌液で陽性になった。No.2 は 48 時間培養の増菌液で陽性になり, 全検体が 96, 120, 144, 168 時間培養の増菌液で陽性となった。スクリーニング PCR 及び菌種別 PCR (以下, 両 PCR) が全検体で陽性になった最短の増菌時間は 96 時間だった。

増菌液のカラーチェンジは, No.4, 5 が 24 時間培養, No.2, 3 が 48 時間培養, No.1 が 144 時間培養で起こった。



## (2) 増殖曲線と最少検出生菌数 (図 1)

No.1~4 は、マイコプラズマ以外の細菌の混入があったが、マイコプラズマの増殖に影響はなかった。

増菌前の乳汁は、5 検体中 4 検体が寒天平板にコロニーの生育を確認できたが、No.1 は寒天平板に生育しなかったため生菌数を測定できなかった。増菌前の乳汁中の生菌数は、No.2 は  $2.0 \times 10^4$  CFU/mL、No.3 は  $6.0 \times 10^4$  CFU/mL、No.4 は  $2.0 \times 10^6$  CFU/mL、No.5 は  $1.3 \times 10^6$  CFU/mL だった。5 検体中 4 検体は、増菌 48 時間までで対数期、48 時間から 144 時間で定常期、144 時間以降に死滅期に移行し、同様の増殖曲線になった。No.1 は、乳汁中の生菌数が少ないため他の検体よりも発育が遅延し、増菌 168 時間までで対数期に移行した。

検査法別の最少検出生菌数は、分離培養法は  $7.0 \times 10^2$  CFU/mL、スクリーニング PCR は  $3.0 \times 10^4$  CFU/mL、菌種別 PCR は  $4.0 \times 10^5$  CFU/mL で、最も検出感度が優れていたのは分離培養法だった。5 検体中 4 検体は、 $10^7 \sim 10^8$  CFU/mL でカラーチェンジが起こり、No.1 は  $10^9$  CFU/mL でカラーチェンジが起こった。カラーチェンジ後は、分離培養法、迅速検査法の両方で検出可能であった。

## 考察

マイコプラズマ性乳房炎の浸潤状況の把握には、バルク乳スクリーニング検査が用いられており、酪農家における浸潤率は、日本（北海道）で 1.29%、米国で 10.48%、デンマークで 10.2% との報告がある。バルク乳スクリーニング検査は、概ね 1 バルク当たり 200 頭~300 頭に 1 頭の罹患牛を摘発するとされているが、これは病勢やステージによる排菌数に大きく依存するため、感染初期等、菌数が低い場合には検出感度も低くなる。今回、BVDV サーベイランス用に採取した乳汁で、*M. bovis* 陽性検体を検出することができ、管内 3 市酪農家の浸潤率は 1.3% (1/77 戸) であった。

家畜衛生分野でのマイコプラズマの検出は、一般的に分離培養法及び迅速検査法によって行われている。分離培養法は、液体培地で増菌培養した後、平板培地に塗抹し、37°C の微好気で培養する。実体顕微鏡下で特徴的な目玉焼き状のコロニーの形成を確認後、継代し、PCR で同定を行う。マイコプラズマの分離培地には、マイコプラズマのコロニーによく似た、病原性がないとされているアコレプラズマも発育するため、識別には注意を要する。迅速検査法は、液体培地で一定期間増菌培養後、PCR により同定を行う。PCR を実施する増菌期間の指標は、カラーチェンジとしているが、マイコプラズマ以外の夾雑菌の増殖によっても培地の pH が低下し培地色が変化するため、カラーチェンジした検体はその都度 PCR で確認する必要がある。

今回の検証では、分離培養法の最少検出生菌数が  $7.0 \times 10^2$  CFU/mL で、迅速検

査より検出感度が優れていた。分離培養法は生菌数が少ない検体でも有用であるが、最終判定までに日数を要するため、乳房炎牛の検査には向かない。一方、迅速検査法は、生菌数が多い検体であれば、最短2日で判定でき、分離培養法より検査日数を大幅に短縮できる。しかし、バルク乳検査を迅速検査法で行うと、カラーチェンジ前にPCR検出限界値未満で死滅期に入ってしまう検体を見逃す可能性がある。

マイコプラズマ性乳房炎は、明確な症状を示す臨床型と、示さない非臨床型がある。予防のためには、臨床型の随時検査と非臨床型を発見するための定期検査が重要となる。マイコプラズマは他の微生物よりも短期間でまん延するため、臨床型の検査は、迅速検査法により感染牛の目星をつけ、分離培養法、薬剤感受性試験の結果が出るまで搾乳器具の消毒と乳房炎発症牛の隔離等のまん延防止対策を行うことが後々のコントロールにおいて重要となる。一方、非臨床型の検査は、バルク乳検査で陽性が出た場合に、全頭検査を実施し、感染牛を特定する。バルク乳中の生菌数は少ないと予想されるため、検出感度の良い分離培養法が適している。

今回の検証結果を踏まえ、バルク乳や浸潤調査等の検査結果に確実性が求められる検体は分離培養法を軸に検査をし、乳房炎発症牛の個体検査等、迅速性が求められる検体は、迅速検査法を軸に検査する検査フローを整理した(図2)。バルク乳を用いた浸潤状況調査は、検出感度が優れている分離培養法で検査を実施し、寒天平板培地にマイコプラズマ様コロニーが生育した検体のみ、菌種同定をすることで、省力的に多検体の検査が実施可能となる。

近年、大規模酪農場を中心にマイコプラズマ性乳房炎が増加していると言われており、大規模酪農場では、一旦発生が起こると牛群内の感染率は中小規模農場よりも高くなり、完全清浄化が困難になる場合がある。感染が疑われる個体は、積極的に検査を行うとともに、定期的なバルク乳スクリーニング検査を行って、継続的にマイコプラズマの侵入を監視することで、マイコプラズマ乳房炎の防除に役立てたい。

表 1 検査法別の検出増菌時間と生菌数

検体 NO.	分離培養法		スクリーニングPCR		菌種別PCR		カラーチェンジ(PCR実施時期の指標)	
	増菌培養時間	生菌数 (CFU/mL)	増菌培養時間	生菌数 (CFU/mL)	増菌培養時間	生菌数 (CFU/mL)	増菌培養時間	生菌数 (CFU/mL)
1	48時間	$7.0 \times 10^2$	96時間	$4.0 \times 10^5$	96時間	$4.0 \times 10^5$	144時間	$1.1 \times 10^9$
2	24時間	$3.0 \times 10^4$	24時間	$3.0 \times 10^4$	48時間	$3.2 \times 10^7$	48時間	$3.2 \times 10^7$
3	24時間	$6.0 \times 10^5$	24時間	$6.0 \times 10^5$	24時間	$6.0 \times 10^5$	48時間	$3.0 \times 10^8$
4	24時間	$1.0 \times 10^7$	24時間	$1.0 \times 10^7$	24時間	$1.0 \times 10^7$	24時間	$1.0 \times 10^7$
5	24時間	$1.1 \times 10^8$	24時間	$1.1 \times 10^8$	24時間	$1.1 \times 10^8$	24時間	$1.1 \times 10^8$

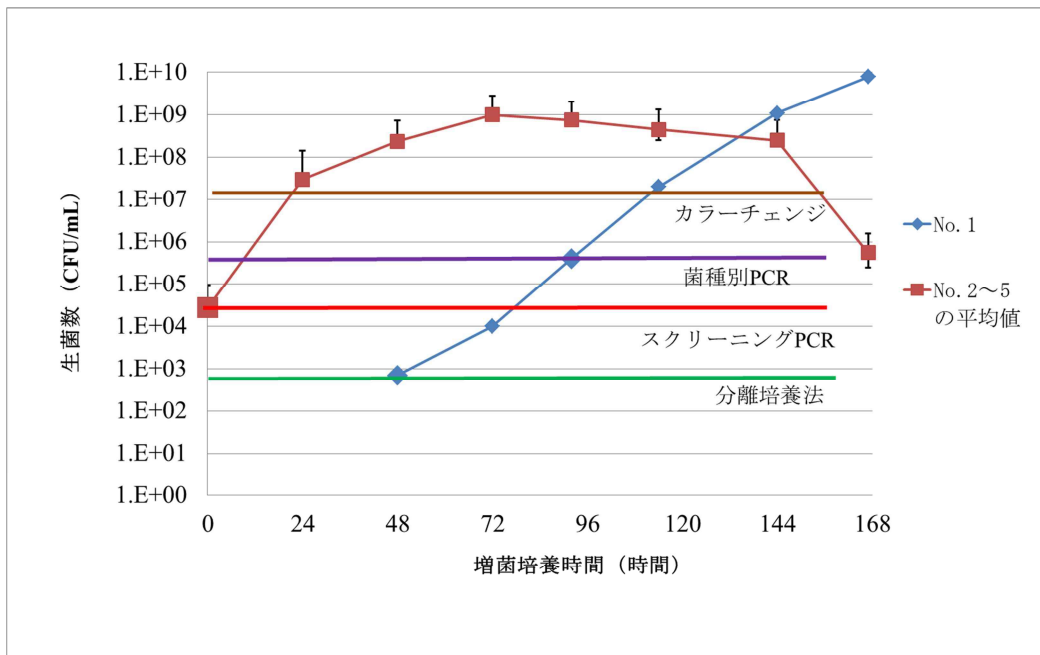


図 1 増殖曲線と各検査法の最少検出生菌数



図 2 分離培養法と迅速検査法を用いたマイコプラズマ検査法