

## 1 1 . 豚流行性下痢発症豚における迅速固定法を用いた免疫組織化学的染色の検討

県北家畜保健衛生所  
○矢口 裕司 高橋 覚志

平成 25 年 10 月以降、我が国では豚流行性下痢（以下、PED）が流行し、拡大防止には早急な対応が必要であり迅速診断が求められている。病性鑑定マニュアルによると PED の診断には免疫組織化学的染色（以下、免疫染色）が必須であるが、定法の固定方法では診断までに時間を要する。電子レンジを用いたマイクロウェーブ（以下、MW）処理等による迅速固定法は知られているが、加温処理等によるホルマリン固定条件が PED の免疫染色の結果にどのように影響を及ぼすかは報告されていない。

今回、PED の迅速な診断を可能とするため、迅速固定法を用いた免疫染色について検討したのでその概要を報告する。

### 材料と方法

#### 1 検査材料

PED 発生農場において下痢を呈した 2 日齢の生体 1 頭を検査材料として病性鑑定を実施した。

剖検所見では、胃は凝固乳滞留により膨満しており、空腸中部から回腸にかけて腸壁は菲薄化し、腸内容は未消化凝固物を含み水様であったことから、PED 発症豚である可能性が高いと判断した。

そこで、固定条件と PED 免疫染色の染色性について比較するため、空腸の上部、中部及び下部の 3 ヶ所についてそれぞれ約 2-3mm 幅に切り出し、以下の方法で固定を実施した。なお、腸壁の厚さは上部が 1.83mm、中部が 0.75mm、下部が 0.75mm であった（図 1）。

#### 2 固定方法

固定液は 10% 中性緩衝ホルマリン液を用い、室温 24 時間の固定（以下、通常固定）の他に、以下の方法により加温等の処理を実施した。

##### （1）インキュベーター

40℃に設定し、30 分、1 時間、2 時間、3 時間固定した。

##### （2）ウォーターバス

60℃及び 80℃に設定し、それぞれ 10 分、30 分、1 時間固定した。

##### （3）電子レンジ（図 2）

500W で 30 秒間照射後、10～15 秒間照射を 5 回実施した。

#### (4) 湯煎による煮沸処理 (図 3)

ホルマリンと検体を入れた容器を密封し、水を入れた鍋で煮沸し、沸騰したら火を止め、約 5 分後に再び火を付ける作業を 3 回繰り返した。

### 3 病理組織学的検索

#### (1) ヘマトキシリンエオジン染色 (以下, HE 染色)

定法に従って HE 染色を実施した。

#### (2) PED の免疫染色

切片は 0.3% 過酸化水素水加メタノールで 10 分間反応後、37℃ の 0.1% アクチナーゼ E で 30 分間処理した。一次抗体には抗 PED ウイルス家兔血清 (動物衛生研究所) を用いて抗体希釈用緩衝液 (DAKO) で 50 倍に希釈し室温で 60 分間反応させた。二次抗体にはヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (MULTI) (ニチレイバイオサイエンス) を、発色基質にはシンプルステイン AEC 溶液 (ニチレイバイオサイエンス) を使用し、マイヤーヘマトキシリンで対比染色を実施した。

#### (3) 免疫染色の結果の評価

免疫染色の結果について、染色強度、陽性箇所を評価した。

染色強度は、通常の固定と同等の強度を示したものを A とし、微弱であったものを C とし、その中間のものを B とした (図 4)。

陽性箇所を評価は、陽性反応を示した部位が 10 か所未満を (+), 10 か所以上 30 か所未満を (++) , 30 か所以上を (+++) と判定した。

### 4 PED の免疫染色における抗原賦活化法の検討

下痢の症例に対して PED の免疫染色を実施する際には、同時に伝染性胃腸炎 (以下, TGE) の免疫染色も実施する必要がある。しかしながら、PED と TGE の免疫染色では推奨される抗原賦活化法は異なるため、作業が煩雑となりやすい。そこで、陽性コントロールを用いて TGE の免疫染色で推奨される MW 処理をはじめとした抗原賦活化法について以下のとおり検討した。

#### (1) MW 処理

抗原賦活用クエン酸緩衝液 pH 6 (DAKO) を用いて、緩衝液のみ 2 分間照射した後に、切片を入れ 500W で 5 分間照射を 2 回実施した。

#### (2) オートクレーブ処理

抗原賦活用クエン酸緩衝液 pH 6 (DAKO) を用いて、120℃ 10 分間実施した。

## 結果

### 1 病理組織学的検査

## (1) HE 染色

空腸の中部，下部及び回腸で絨毛萎縮を認めた。その他の主要臓器では著変はみられなかった。いずれの検体でも固定不良はみられなかった。

## (2) 免疫染色の評価 (表 1, 図 5)

通常固定では，陽性箇所分布は上部では (+++)，中部では (++)，下部では (+) であった。

インキュベーター40℃において，2 及び 3 時間固定では通常固定と同じ強度と分布を示した。1 時間固定では，強度は同じだが，中部における分布は減少した。30 分固定では，強度は低下し，上部と中部における分布は減少した。

ウォーターバス 60℃において，1 時間固定では，強度と分布は通常固定と同じであった。30 分固定では強度は低下し，中部における分布は減少した。10 分固定では，強度は低下し，分布は全体的に減少して下部で陰性となった。ウォーターバス 80℃において，10 分固定では，強度は低下し，分布も減少し下部で陰性を示した。30 分及び 1 時間固定では，すべて陰性を示した。

MW 処理と煮沸処理では，共に強度は低下し，分布も全体的に減少し，煮沸処理においては下部で陰性を示した。

## 2 PED の免疫染色における抗原賦活化法の検討 (図 6)

推奨される抗原賦活化法であるアクチナーゼ E による酵素処理と比較して，MW 処理ではアクチナーゼ E よりも染色強度が上がっていた。オートクレーブ処理では病変部においては MW 処理と同等の強度を示していたが，組織全体に共染 (非特異的反応) を示していた。

## 考察

ホルマリンの固定時間については，1 時間の固定で組織 1mm に浸透することが知られている<sup>1)</sup>。今回の検討において，実施した固定条件での固定不良はみられなかった。哺乳豚の腸管が菲薄化していたことと，腸管は内腔側からもホルマリン浸透が可能のため固定速度が速いと考えられた。また，ホルマリンの固定の時間が短く不十分な場合でも包埋過程のアルコールによって固定が進んだと考えられた。

免疫染色を実施する際に注意すべき点として，ホルマリン固定された組織では，ホルマリンのアルデヒド基と蛋白のアミノ基による架橋結合等により，抗体が結合できないように覆われた状態となる<sup>2,3)</sup>。そのため，抗体のエピトープの分子構造を露出させるため，それぞれの抗体に合った適正な抗原賦活化を選択することが重要となる。今回，時間が短い固定または 80℃の高温での固定では染色強度と分布が低下しており，特に 80℃固定においては陰性を示していた。これは，高温

による熱変性によってエピトープの分子構造が強く修飾され、通常の抗原賦活化法では抗原を露出できなかつたためと考えられる。また、ホルマリン固定時間が不足した場合は、包埋過程のアルコール固定によって、ホルマリンとは異なる機序で蛋白凝固を起こす。そのため、今回実施した抗原賦活化法では十分に抗原を露出できなかつたと考えられた。

今回の結果から、PED の診断する上での最短時間の固定条件は、MW 処理や 40℃及び 60℃の 30 分固定で十分であったが、いずれも染色強度が低下していた。そのため、通常固定と強度及び分布がほぼ同じであった 40℃及び 60℃の 1 時間の固定が最も適していると考えられた。

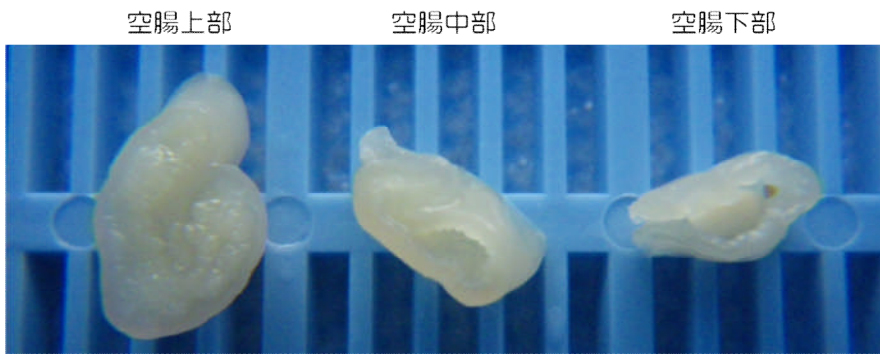
また、PED 免疫染色における抗原賦活化法を検討した結果、TGE の免疫染色で推奨される MW 処理で、より良好な結果を得ることが出来た。このことで、下痢の症例に対して、PED と TGE の免疫染色を実施する際には一次抗体以外のプロトコールを同一で行えるため、作業負担を大きく減らすことが出来る（表 2）。

当所における通常の病理検査では、解剖日を含めて 3 日目にパラフィン切片を作製して、病変の有無を確認後、4 日目に免疫染色を実施している。今回の結果を踏まえて作業スケジュールを変更したところ、2 日目に免疫染色の結果を示すことが可能となった（表 3）。本県では、3 例目以降はこの方法を用いて解剖した翌日に PED と診断している（表 4）。それにより、PED ウイルスの拡散防止対策を速やかに実施することが出来た。今回の報告が今後の PED 診断の一助となることを期待する。

稿を終えるにあたり、ご助言を頂いた、独立行政法人農業・食品産業技術研究機構 動物衛生研究所 病態研究領域 川畷健司先生に深謝致します。

## 参考文献

- 1) 病理技術研究会：病理標本の作り方，1992
- 2) 「病理と臨床」常任編集委員会：診断に役立つ免疫組織化学，病理と臨床 臨時増刊号，25，2007
- 3) 藤田 浩司，免疫組織化学染色における抗原賦活の原理について考える，免疫染色玉手箱 (<http://www.nichirei.co.jp/bio/tamatebako/>)



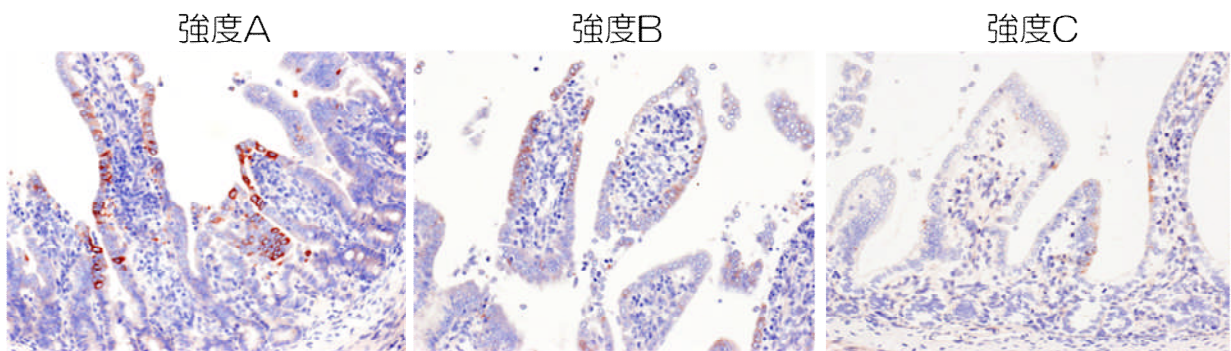
**図 1** 空腸の切り出し時の写真  
中部と下部の腸壁は菲薄化していた。



**図 2** 電子レンジによる迅速固定



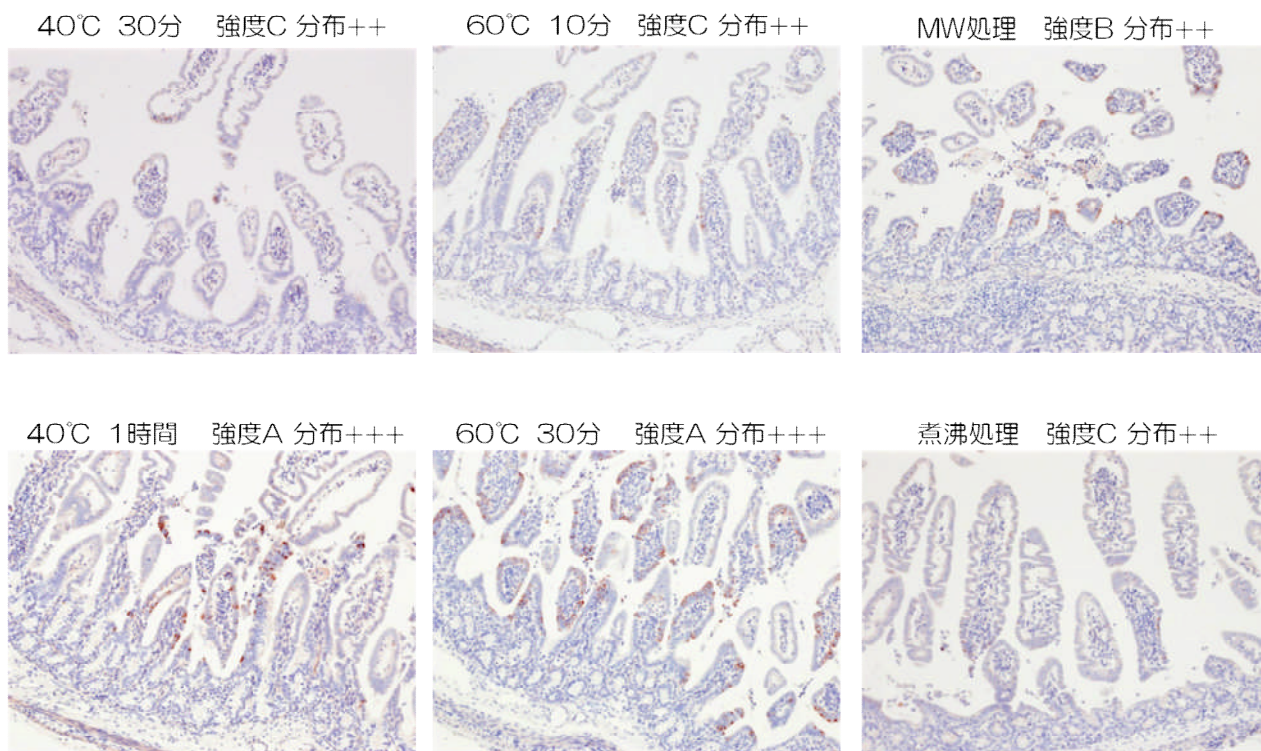
**図 3** 湯煎による迅速固定



**図 4** 免疫染色結果の強度の評価基準

**表 1** 迅速固定を用いた PED 免疫染色結果の評価

固定方法			空腸上部		空腸中部		空腸下部		総合評価
			強度	分布	強度	分布	強度	分布	
通常固定	25℃	24hr	A	+++	A	++	A	+	△
		30min	C	++	C	+	C	+	
インキュベーター	40℃	1hr	A	+++	A	+	A	+	○
		2hr	A	+++	A	++	A	+	◎
		3hr	A	+++	A	++	A	+	◎
		10min	C	++	C	+	-	-	×
ウォーターバス	60℃	30min	B	+++	A	+	A	+	△
		1hr	A	+++	A	++	A	+	◎
		10min	B	++	B	+	-	-	×
	80℃	30min	-	-	-	-	-	-	×
		1hr	-	-	-	-	-	-	×
MW 500W	30sec×1回 → 10-15sec×5回		B	++	B	+	B	+	△
煮沸	沸騰一火を止める (3回 繰り返す)		C	++	C	+	-	-	×



**図 5** PED 免疫染色の結果

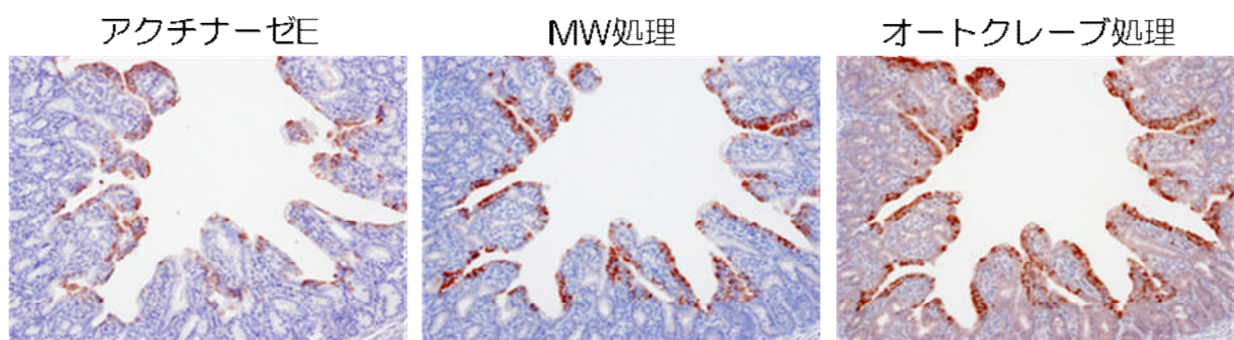


図6 PED 免疫染色における抗原賦活化法の比較

表2 下痢症例に対する PED 及び TGE 免疫染色プロトコール

- 1 脱パラフィン, 洗浄, 風乾
- 2 0.3%過酸化水素水加メタノール 10分
- 3 洗浄 (PBS)
- 4 MW処理 500W 5分×2回
- 5 洗浄 (PBS)
- 6 ブロッキング処理 (正常ヤギ血清) 15分
- 7 一次抗体 室温 60分
- 8 洗浄 (PBS)
- 9 シンプルステインMAX-PO (MULTI) 室温 30分
- 10 洗浄 (PBS)
- 11 発色基質 (AEC) 室温 5分
- 12 流水洗 5分
- 13 対比染色 (ヘマトキシリン) 室温 2分
- 14 洗浄, 封入

表3 迅速固定を用いた PED 免疫染色の作業工程

当日	
14:00	解剖
15:00	切り出し
15:30	迅速固定
	〔 40°Cインキュベーター 1時間 〕
16:30	水洗
17:00	包埋装置スタート
翌日	
8:30	パラフィンブロック作製
9:00	薄切
10:00	免疫染色スタート
14:00	結果判定

表4 固定方法と PED 診断時間の比較

固定方法	ホルマリン固定時間	PED診断までの時間
迅速固定法	1時間	2日
一般的な固定法	24時間	4日

## 1 2. 茨城県内における豚流行性下痢のウイルス動態調査

県北家畜保健衛生所

○山下 薫 都筑智子  
大谷 芳子

平成 25 年 10 月、7 年ぶりに国内で豚流行性下痢（以下、PED）の発生があり、茨城県でも平成 25 年 11 月から平成 26 年 11 月までに 8 件の発生が確認された。今回、発生後の PED ウイルスの動態をみるため、発生農場における定期的な抗体検査や抗原検索（以下、モニタリング検査）を行った。また、県内におけるウイルスの浸潤状況を調査するため、県内全域の養豚場を対象とした抗体検査（以下、サーベイランス検査）を行ったので、その概要を報告する。

### 材料及び方法

#### 1 モニタリング検査

同時期に PED の発生があった 2 農場について、モニタリング検査を行った。

##### （1）農場 A

繁殖母豚 150 頭規模の一貫経営農場で、畜舎は、肥育舎 2 棟、分娩房と育成豚房及びストールが混在する豚舎 1 棟、ストール 1 棟、ストールと連続した群飼豚房を備える豚舎 1 棟であった。畜主の稟告による発症日は平成 25 年 11 月 9 日で、分娩舎の繁殖母豚及び哺乳豚で下痢、嘔吐がみられた。その後、約 10 日間で哺乳豚 165 頭が発症、うち 131 頭（79.3%）が死亡した。哺乳豚の死亡は約 20 日後に終息し、下痢などの症状は発生から約 2 か月後には認められなくなった。なお、PED ワクチンは発症約一週間後に繁殖母豚全頭に一斉接種し、その後も接種を継続している。

中和検査は、平成 25 年 9 月 27 日に採材した肉豚（肥育ステージごとに離乳豚、育成豚、肥育豚に分類）の血清 19 検体、繁殖母豚の血清 15 検体（以下、pre 血清 A）、11 月 15 日に採材した肉豚の血清 30 検体、繁殖母豚の血清 25 検体（以下、post 血清 A）、発生から 1 か月後及び発生から 2 か月おきに採材した肉豚の肥育ステージ別血清約 30 検体、繁殖母豚及び発症豚群の血清各 10 検体前後について行った。また、同時に採材した肉豚及び発症豚群の直腸スワブについて、RT-PCR による抗原検索を行った。

##### （2）農場 B

繁殖母豚 200 頭規模の一貫経営農場で、畜舎は、肥育舎 1 棟、育成舎 2 棟、離乳舎 1 棟、分娩舎 1 棟、候補豚舎 1 棟、繁殖豚舎 1 棟であった。畜主の稟告による発症日は平成 25 年 11 月 24 日で、哺乳豚の下痢があった。発症後約 5 日間で哺



乳豚 180 頭が発症，うち 103 頭（53.2%）が死亡したが，繁殖母豚の症状は比較的軽度であった。哺乳豚の死亡は約 10 日後に終息した。PED ワクチンは，発症約 1 週間前の 11 月 17 日に，繁殖母豚に一斉接種しており，その後も接種を継続している。

中和検査は平成 25 年 9 月 26 日の肉豚の血清 25 検体，繁殖母豚の血清 16 検体（以下，pre 血清 B），平成 25 年 11 月 29 日に採材した肉豚の血清 5 検体（以下，post 血清 B），発生から約 4 か月後の肉豚の血清 27 検体，繁殖母豚の血清 14 検体，約 8 か月後の肉豚の日齢別血清 25 検体，繁殖母豚の血清 10 検体，10 か月後に採材した肉豚の日齢別血清 25 検体及び繁殖母豚の血清 6 検体について行った。いずれの時期においても下痢などの症状は認められなかった。

## 2 サーベイランス検査

発生農場以外を対象として，平成 25 年 9 月から平成 26 年 9 月まで 1～3 か月ごとに採材した，のべ 236 戸 2,110 頭の血清を用いて中和試験による抗体検査を行った。抗体陽性率が高かった農場について，抗体価の追跡調査を行った。

## 3 方法

中和検査は，Vero KY-5 細胞及び PEDV NK94P6Tr(-)株を使用して実施した。RT-PCR のプライマーには，PEDV P1，PEDV P2(Kim SY(2001) J Vet Diagn Invest.13(6):516-20)を用いた。

# 結果

## 1 モニタリング検査

### (1) 農場 A（表 1，表 2）

pre 血清 A の中和抗体価は，肉豚 1 頭で 4 倍，繁殖母豚 1 頭で 2 倍であり，その他は 2 倍以下であった。post 血清 A の中和抗体価は肉豚で 2 倍以下であったのに対し，繁殖母豚 18 頭が 2 倍から 128 倍の抗体を保有していた（GM 値 6.2 倍）。繁殖母豚の抗体保有率は発生 1 か月後から発生 1 年後まで 90%以上であった。繁殖母豚の中和抗体価の GM 値は 9.8～26.9 倍と採材時期によって異なっていたが，発生から 6 か月以降 20 倍から 25 倍でほぼ横ばいとなった。肉豚の抗体保有率は発生 1 か月後には 87%（GM 値 4.5 倍）となり，発生 2 か月後には全ての肉豚が抗体を保有していた（GM 値 10.3 倍）。発生 4 か月後には抗体保有率は 53%（GM 値 2.2 倍）と低下したが，発生 6 か後に 87%（GM 値 4.7 倍）と再び上昇した。発生 8 ヶ月後には 67%（GM 値 2.6 倍），発生 10 か月後には 27%（GM 値 1.3 倍）と低下し，発生 1 年後には 17%（GM 値 1.2 倍）となった。発症豚群では，発生 1 か月後に抗体保有率 80%（GM 値 4.0 倍），発生 2 か月後には抗体保有率 90%（GM 値 7.5 倍），発生 4 か月後には抗体保有率 50%（GM 値 1.9 倍），発生 6 か月後には 67%（GM 値 2.2 倍）であった。抗原は，発生 1 か月後の肉豚 6 頭，発症豚群 4

頭の直腸スワブ及び発生から2か月後の肉豚4頭、発症豚群2頭の直腸スワブから検出された。発生から4か月以降はいずれの日齢の豚からも抗原は検出されなかった。

## (2) 農場 B (表 2)

pre 血清 B の中和抗体価は、繁殖母豚1頭で2倍であり、その他はいずれも2倍以下であった。post 血清 B の中和抗体価はいずれも2倍以下であった。発生4か月後には繁殖母豚の抗体保有率は93% (GM 値 5.1 倍) 肉豚の抗体保有率は33% (GM 値 1.6 倍) であり、発生8か月後では繁殖母豚の抗体保有率は80% (GM 値 6.5 倍) , 肉豚の抗体保有率は32% (GM 値 1.4 倍) , 発生10か月後では繁殖母豚の抗体保有率は67% (GM 値 3.2 倍) , 肉豚の抗体保有率は44% (GM 値 2.0 倍) であった。

## 2 サーベイランス検査

地域別 (表 3) では、県北・県央地域の検査対象農場 58 戸中 6 戸 (10.3%) で2倍以上の中和抗体価がみられた。鹿行地域は 53 戸中 13 戸 (24.5%) , 県南地域では 60 戸中 7 戸 (11.7%) , 県西地域では 65 戸中 12 戸 (18.5%) が抗体陽性であった。調査時期別 (表 4) には、平成 25 年 9 月～平成 26 年 3 月まで抗体陽性農場は全体の 11～18% であり、検査対象豚の抗体保有率が 50% を超える農場はなかった。しかし、検査対象豚の抗体保有率が 50% を超える農場が、4～5 月に 1 戸 (農場 C : 抗体保有率 100% , GM 値 16 倍) , 6～7 月に 1 戸 (農場 D : 抗体保有率 90% , GM 値 7.5 倍) , 8～9 月に 1 戸 (農場 E : 抗体保有率 60% , GM 値 3 倍) あった。これらの農場はいずれも一貫経営農場であり、立入検査を行ったところ飼養豚に臨床症状は認められず、稟告からも PED を疑う症状はなかった。農場 D で約 3 か月後に抗体検査を行ったところ、繁殖母豚では全頭に 16 倍以上の抗体価が、肥育豚に 2～8 倍の抗体価が確認された (表 5) 。

## まとめ及び考察

農場 A では、pre 血清と比較して post 血清で分娩舎の繁殖母豚のみ抗体保有率及び GM 値が上昇していたことから、感染は分娩舎から広がったと考えられた。発生後 2 か月で下痢などの臨床症状を認めなくなり、発生後 4 か月で肥育豚の抗体保有率及び抗体価の低下がみられ、抗原も検出されなくなった。発生後 6 か月で再び抗体価の上昇がみられたが、その後低下し、発生から約 1 年後には肉豚の抗体保有率、GM 値ともに低値を示した。これらのことから、農場 A では発生後 1 年の時点では PED ウイルスの動きは沈静化していると考えられた。一方、農場 B では、発生後 4 か月で肉豚の抗体保有率及び GM 値は比較的低く、抗体保有豚は一部のステージに限定されていた。これは、早期のワクチン接種によって哺乳豚の症状が抑えられたこと及び豚舎が肥育ステージ別になっており分娩舎内への

ウイルスの再侵入を防ぐことができたためと考えられた。2 農場のモニタリング結果から、農場 A のように同一豚舎内に分娩房と育成豚房及びストールが混在し PED ウイルスが農場内に残りやすい豚舎構造の場合、抗体をすべての肥育ステージで比較的長く保有する傾向にあるなど、PED ウイルスの動態は飼養状況の違いによって発生農場間でも差異があることがわかった。そのため、発生農場の PED ウイルスの動きの沈静化のためには、農場個別の対策を講じる必要がある。農場内の PED ウイルスの感染環を遮断し、ウイルス量を減らすことが PED の被害を軽減するために大切である。

県内サーベイランス検査の結果、236 戸中 38 戸で抗体陽性豚が認められた。このうち 35 戸では抗体保有豚は 1 戸に 1~2 頭であり、抗体価は 2~8 倍と低く、PED ウイルスがまん延していると考えられる農場はなかった。一方、抗体保有率が高かった 3 戸では、飼養豚に臨床症状は認められなかったが、農場 D で追加検査を行ったところ繁殖母豚では全頭に、肥育豚に 2~8 倍の抗体価が確認された。一般的に肥育豚では臨床症状が軽度であることを考慮すると、農場内にウイルスが侵入した可能性は否定できないため、今後も検証が必要と考えられる。一方、モニタリング対象農場 A における肥育豚の抗体保有率は、発生から 10 か月後には 20% と低下していたことから、採材時期によっては PED 発生農場であっても抗体保有率が低くなる可能性がある。そのため、サーベイランス検査等における中和抗体価の解釈についてはデータを蓄積した上で慎重に行う必要があり、今後もサーベイランス検査を継続予定である。

稿を終えるにあたり、ご助言いただいた独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所の山川睦先生、宮崎綾子先生、鈴木亨先生に深謝いたします。

表1 農場Aのモニタリング検査結果

		発生後1か月	発生後2か月	発生後4か月	発生後6か月	発生後8か月	発生後10か月	発生後1年
繁殖母豚	症状の有無	有			なし			
	抗体保有率(%)	100	100	100	100	100	91	100
	GM値	14.9	24.3	9.8	22.6	26.9	20.6	21.9
	PCR結果	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
肉豚	症状の有無	有			なし			
	抗体保有率(%)	87	100	53	87	67	27	17
	GM値	4.5	10.3	2.2	4.7	2.6	1.3	1.2
	PCR結果	+	+	-	-	-	-	-
離乳豚	症状の有無	有			なし			
	抗体保有率(%)	100	100	40	100	60	0	60
	GM値	7.0	24.3	1.3	6.1	2.3	1.0	1.7
	PCR結果	-	+	-	-	-	-	-
育成豚	症状の有無	有			なし			
	抗体保有率(%)	80	100	50	80	80	50	10
	GM値	3.0	9.8	1.7	5.7	4.9	1.7	1.1
	PCR結果	+	+	-	-	-	-	-
肥育豚	症状の有無				なし			
	抗体保有率(%)	87	100	60	87	60	20	7
	GM値	5.0	8.0	3.0	3.8	1.7	1.2	1.2
	PCR結果	+	+	-	-	-	-	-
発症豚群	症状の有無	有		なし				
	抗体保有率(%)	80	90	50	67	NT	NT	NT
	GM値	4.0	7.5	1.9	2.2	NT	NT	NT
	PCR結果	+	+	-	-	NT	NT	NT

表2 農場Aと農場Bの肥育ステージ別抗体保有率及びGM値

		発生後4か月		発生後8か月		発生後10か月	
		農場A	農場B	農場A	農場B	農場A	農場B
繁殖母豚	抗体保有率(%)	100	93	100	80	91	67
	GM値	9.8	5.1	26.9	6.5	20.6	3.2
肉豚	抗体保有率(%)	54	33	67	32	27	44
	GM値	5.1	1.6	2.6	1.4	1.3	2.0
離乳豚	抗体保有率(%)	40	0	60	80	0	60
	GM値	1.3	1.0	2.3	2.5	1.0	2.0
育成豚	抗体保有率(%)	50	50	80	0	50	0
	GM値	1.7	2.2	4.9	1.0	1.7	1.0
肥育豚	抗体保有率(%)	60	40	60	0	20	53
	GM値	3.0	1.7	1.7	1.0	1.2	2.5

表3 地域別サーベイランス検査結果

	農場数	飼養頭数	検査戸数 (のべ)	検査頭数 (のべ)	陽性戸数	陽性率 (%)	陽性頭数	陽性率 (%)	抗体価								
									<2	×2	×4	×8	×16	×32	×64	64<	
県北・県央地域	91	118,900	58	528	6	10.3	7	1.3	521	4	3						
鹿行地域	102	210,800	53	470	13	24.5	18	3.8	452	11	3	3	1				
県南地域	88	96,100	60	537	7	11.7	16	3.0	521	4	3	3	3	1	2		
県西地域	135	152,900	65	575	12	18.5	22	3.8	553	11	3	4	1	3			
全県	416	578,700	236	2110	38	16.1	63	3.0	2047	30	12	10	5	4	2		

表4 時期別サーベイランス検査結果

全県	検査戸数 (のべ)	検査頭数 (のべ)	陽性 戸数	陽性率 (%)	陽性 頭数	陽性率 (%)	抗体価										
							<2	×2	×4	×8	×16	×32	×64	64<			
H25.9~12月	40	200	7	17.5	8	4.0	192	6	2								
1月	41	396	6	14.6	6	1.5	390	6									
2~3月	35	351	4	11.4	6	1.7	345	3	2	1							
4月~5月	37	366	3	8.1	3	0.8	363	3									
4月~5月 農場C	1	10	1	100	10	100			1	3	3	1	2				
6月~7月	41	380	6	14.6	7	1.8	373	5	2								
6月~7月 農場D	1	10	1	100	9	90	1	2	1	2	1	3					
8月~9月	39	387	9	23.1	8	2.1	379	4	3	1							
8月~9月 農場E	1	10	1	100	6	60	4	1	1	3	1						
合計	236	2110	38	16.1	63	3.0	2047	30	12	10	5	4	2				

表5 農場Dの追加検査結果

	抗体保有率 (%)	GM値	抗体価								
			<2	×2	×4	×8	×16	×32	×64	×128	×256<
繁殖母豚	100	57.7					3	3	9	4	1
肥育豚	35	1.5	13	4	2	1					
60日齢	0	1.0	5								
90日齢	0	1.0	5								
120日齢	60	1.7	2	2	1						
150日齢	80	2.6	1	2	1	1					

### 13. 牛ウイルス性下痢粘膜病持続感染牛摘発農場に認められた繁殖障害事例

県北家畜保健衛生所

○神谷 朝咲 赤上 正貴

田中 信明 飯島 知一

牛ウイルス性下痢粘膜病（以下、BVD・MD）は牛ウイルス性下痢ウイルス（以下、BVDV）に起因するウイルス性疾病であり、BVDV はフラビウイルス科ペスチウイルスに属する。BVDV の伝播は、間接伝播もあるものの、ウイルスを排泄している動物からの直接伝播が主である。特に、抗体陰性の妊娠牛が妊娠初期（胎齢 80 ～ 100 日齢）に BVDV に感染し、免疫寛容状態の持続感染牛（以下、PI 牛）が生まれた場合、生涯ウイルスを排出する汚染源となる。本病は病名に表されている症状（下痢、粘膜病）だけではなく、一過性の発熱や呼吸器症状、胎盤感染による流産や異常産などきわめて多様な病態を呈する。

今回、PI 牛が 2 頭摘発された農場において繁殖成績への影響について統計学的に分析したので報告する。

#### PI牛摘発農家

当該農場では、ホルスタイン種 14 頭を飼養する酪農場で、畜主が人工授精（以下、AI）又は受精卵移植（以下、ET）を行っている。平成 26 年度家畜伝染病予防法第 5 条による検査（以下、牛定期検査）時に採取した血清を用い、BVDV・ag エリーザキット（IDEXX 社）による BVDV 抗原検査を行ったところ、2 頭から BVDV 抗原を検出した。3 週間後 PI 牛確認のため再度採血を実施し、抗原検査を実施したところ陽性であった。BVD-ELISAKit（Bio-X 社）による抗体検査で陰性であり、PCR 検査でも BVDV 特異遺伝子が検出されたため、この 2 頭を PI 牛と診断した。PI 牛 2 頭以外の同居牛は BVDV 抗体陽性だった。なお、平成 23 年 2 月の牛定期検査保存血清においては、自家育成牛 6 頭は BVDV 抗原、抗体とも陰性であった。

また、牛定期検査時に行った畜主への聞き取り調査では、2 年ほど前から妊娠初期の死流産が増えているという稟告を得たため、PI 牛の存在が同居牛に何らかの影響を与えている可能性が考えられた。そこで、畜主が記録していた繁殖管理台帳を元に、繁殖成績について分析を行った。

なお、本県は、特別電源所在県科学技術振興事業として偶蹄類飼養農場におけるペスチウイルスの空間疫学及び血清疫学的研究を行っており、当該農場に対する検査はその一環として実施した。

## PI牛の概要

摘発された PI 牛 2 頭 (No.1, No.2) 及びそれぞれの母牛の移動歴を調査した。

No.1 の母牛は北海道で平成 22 年に出生し、平成 24 年 2 月に当該農場に導入され、平成 24 年 4 月 12 日に No.1 の PI 牛を分娩している。当該牛は No.1 の胎齢 100 日前後の平成 23 年 10 月頃には、北海道での大規模草地に放牧されていたことから、北海道での放牧中に BVDV に感染したことが疑われた。

No.1 は当該農場にて出生後、9 回目の人工授精で妊娠するも流産し、結局分娩しないまま 30 か月齢で死亡した。

No.2 の母牛は、平成 20 年に県内の農場から当該農場に導入され平成 21, 23 年に正常分娩後、平成 24 年 11 月に No.2 の PI 牛を分娩した。平成 23 年 2 月の牛定期検査時保存血清では BVDV 抗原、抗体とも陰性であった。No.2 の胎齢 100 日前後の平成 24 年 5 月頃には、No.1 がすでに出生していたことから、この時期に No.2 の母牛は No.1 が排泄する BVDV に水平感染したことが疑われた。

No.2 は、当該農場にて出生後、3 回目の人工授精で妊娠するも流産した。

PI 牛は、BVDV の感染源となることから、畜主の同意のもと、No.2 について当所で病性鑑定を行った。

No.2 は、体高 123.6cm、体長 134.4cm、胸囲 173cm、推定体重 399kg であり、同月齢のホルスタイン標準発育体重 496 ~ 584kg と比較して発育不良を示していた (写真 1)。解剖所見では、特に著変は見られなかった。

## 繁殖成績の分析結果

No.1 の PI 牛出生は平成 24 年 4 月であり、平成 24 年 3 月 31 日以前までを prePI、平成 24 年 4 月 1 日以降を postPI と定義し、平成 24 年 4 月 1 日前後それぞれ、およそ 2 年半の記録について、AI 又は ET の結果について分析を行った。

受胎率は、prePI が 44.1%に対し、postPI は 17.6%で、カイ二乗検定を実施したところ、PI 牛の出生前後で受胎率に有意差が認められた ( $p < 0.05$ ) (図 1)。

流産等発生率については、prePI が 15.4%に対し、postPI は 41.7%で、カイ二乗検定により、PI 牛の侵入前後で流産等発生率に有意差が認められた ( $p < 0.05$ ) (図 2)。

AI と ET の実施総数については、prePI が牛 1 頭につき平均 3 回 (総数 59 回)、postPI が平均 8 回 (総数 136 回) で、t 検定を実施したところ、PI 牛の出生前後で交配回数に有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。

流産等発生数を月別に分類すると、prePI では、4 月と 7 月に 1 回、11 月に 2 回、postPI では 1 月、3 月、5 月、7 月、8 月、11 月、12 月に 1 回、6 月に 2 回となり、季節性は見られなかった (図 3)。

流産等発生胎齢の分布は、prePI では、胎齢 40 日以下が 1 回、40 ~ 80 日齢が 2

回、240～280日齢が1回であった。postPIでは、胎齢40日以下が3回、40～80日齢が4回、80～120日齢が2回、200～240日齢が1回であり、PI牛出生後の流産等発生率は妊娠前期に集中していた（図4）。

産歴における繁殖成績を比較すると、prePIでは3産目で流産等が多く、postPIでは1～3産目での流産等が多く、低い産歴で流産等発生率が高い傾向にあった（図5、6）。

なお、生乳損失試算のために胎齢合計を計算したが、prePIでは計4回の流産等がありその胎齢合計は416日、postPIでは計10回の流産等がありその胎齢合計は710日であった。

## 経済被害

今回、PI牛が摘発された農場で、prePIとpostPIの各2年半でどの程度の経済的損失が起こったのかを算出し比較した。

まず、AIとETの実施総数は、prePIで総計59回、postPIで総計136回であったことから人工授精の費用を、一本当たりの人工授精ストロー（性判別 Sort<sup>90</sup>）単価を5千円とすると、prePIは5千円×59回＝29万5千円の支出に対しpostPIでは5千円×136回＝68万円となり、その差は約38万円であった。

次に流産等により生乳出荷が不可能であった期間の生乳損失を試算すると、prePIの胎齢合計は416日、postPIでは710日であったことから、その差294日となり、1日1頭30kgの生乳を出荷し、乳価が95円/kgとすると294日×30kg×95円＝83万7900円となる。

以上をまとめると、postPIにおいてはprePIと比較し約120万円の経済被害があったと試算される。

## 考察

今回調査したPI牛摘発農場において、PI牛No.1の出生後に繁殖成績の低下が認められた。具体的には、受胎率の低下、流産等に季節性がないこと、流産等発生胎齢が妊娠前期に集中していたこと、低い産歴で流産等が多いことがあげられる。

繁殖障害を引き起こす原因としては様々な要因が考えられるが、当該農場では流産等発生に季節性がないことから、ヒートストレスやアルボウイルス感染症は考えにくい。また、流産等発生胎齢が前期に集中していたことから、妊娠後期に好発するレプトスピラ症や妊娠中期に好発するネオスポラ症は考えにくく、産歴が低いほど流産等が起こっていたことから、牛群の加齢に伴うものとも考えにくい。また、定期検査時にブルセラ病は否定されており、牛群自体に繁殖障害以外の臨床症状は見られなかった。その他にも、硝酸塩中毒、セレン欠乏、甲状腺機



能低下症，牛伝染性鼻気管炎，細菌性流産など，鑑別診断は多岐にわたるが決定的な原因には結びつかない。今回，流産胎児の病性鑑定を実施していないため診断には至っていないが，繁殖成績の解析の結果 prePI と比較して postPI で有意に繁殖成績が低下していたことから，当該農場での PI 牛の出生がその要因として推測された。

当該農場では畜主が BVD・MD について認識しておらず，PI 牛の存在にももちろん気づいていなかった。また，繁殖成績についても獣医師などに相談するほど深刻な事態とはとらえていなかった。もし，PI 牛（No.2）の飼養を続けていれば，さらなる PI 牛が産出され，繁殖成績の低下が続いて，経済的損失がますます大きくなる可能性があったことは否定できない。今回，PI 牛を摘発でき，畜主に本病による影響が少なからずあったことを気づいてもらうことができた。

BVD・MD は，近年各地で対策が強化されつつある疾病であるが，管内での認知度はまだまだ高くない。当所としては今後，日常的な農家指導において今回の症例をふまえて BVD・MD の繁殖障害による経済的損失を説明し，BVD・MD 指導の重要性について普及啓蒙を図ると共に，異常産などがあったときに早期通報をもらうような信頼関係を構築し，PI 牛の早期発見，早期淘汰を行って BVD・MD 対策を推進していきたい。

稿を終えるにあたり，ご助言を頂いた，独立行政法人動物衛生研究所 ウイルス・疫学研究領域 主任研究員 小林創太先生に深謝致します。

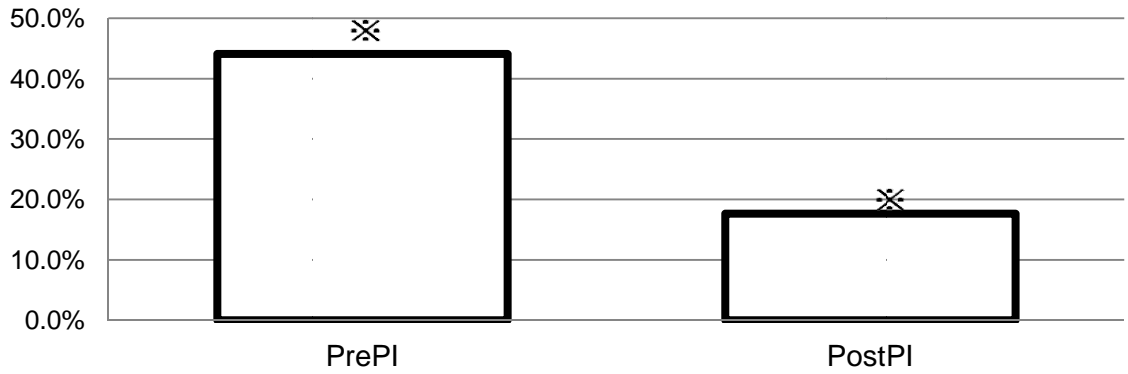


図1 受胎率 (%) ※有意差有り (P<0.05)

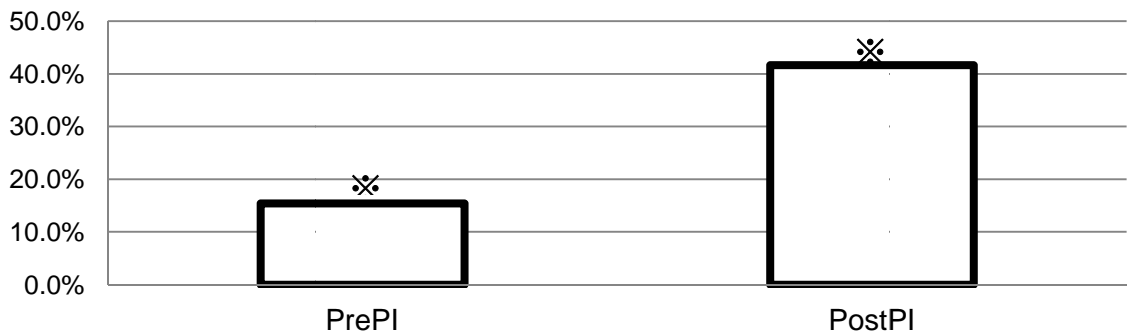


図2 流産等率 (%) ※有意差有り (P<0.05)

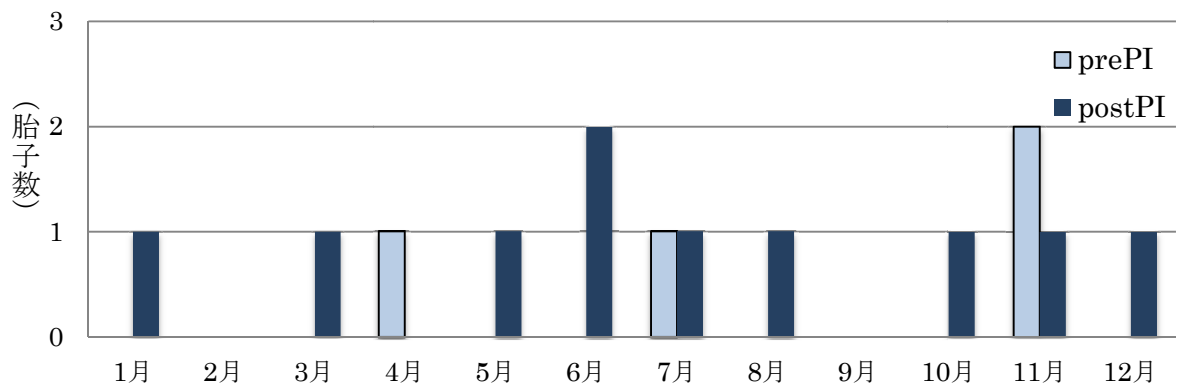


図3 月別流産等発生数

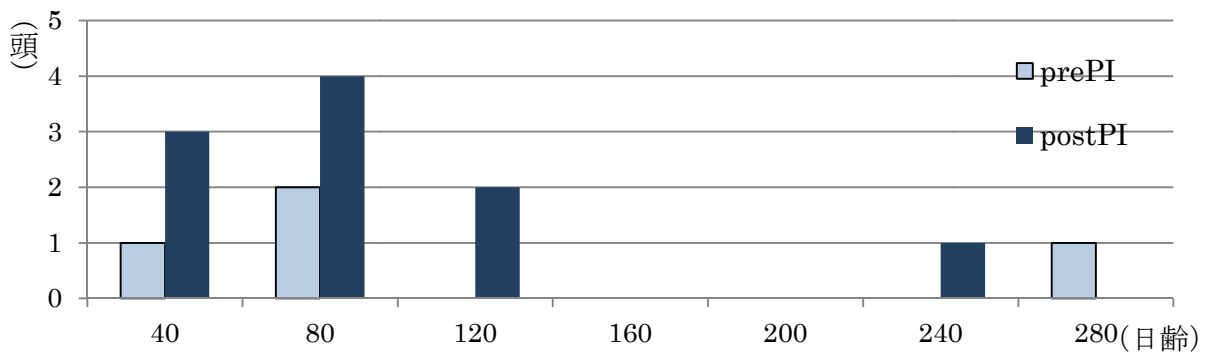


図4 流産等発生胎齢の分布

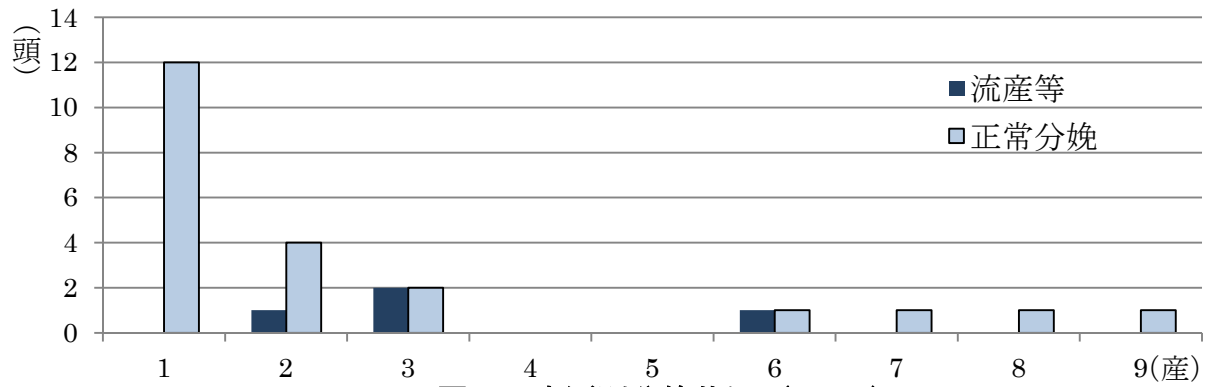


図5 産歴別分娩状況 (prePI)

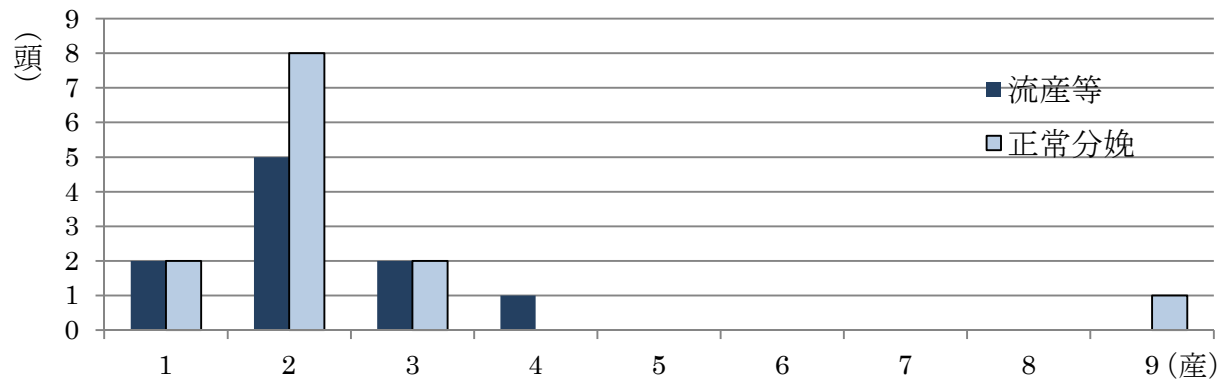


図6 産歴別分娩状況 (postPI)



写真1 No.2のPI牛の外貌