

13. 牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛における耳片を用いた抗原エライザの活用

県北家畜保健衛生所

○矢口 裕司 中村 拓也
鹿島 悠幹 大谷 芳子

昨年度の本発表会において、牛ウイルス性下痢ウイルス（以下、BVDV）持続感染牛（以下、PI牛）・急性感染牛・陰性対照牛の皮膚を用いた免疫組織学的検査を検討したところ、PI牛の皮膚のみで抗原が検出されたことから、皮膚を材料とした抗原検査によりPI牛と急性感染牛を区別可能と発表した。

また、IDEXX BVDV Ag エリーザキット（以下、抗原エライザ）は、これまで血清を材料として検査することになっていたが、平成30年10月10日から耳片を用いた抗原検査も可能となった。そこで、PI牛の耳片等について、抗原エライザの結果を比較するとともに、実際の農場において導入牛等の検査に利活用したので、その概要を報告する。

耳片を用いた抗原エライザの検討

PI牛及び陰性対照牛の血清及び耳片を用いて抗原エライザを実施し、S-N値（以下、エライザ値）について比較することで、耳片による抗原エライザ検査の有用性を検討した。

1 材料と方法

PI牛15頭、陰性対照牛9頭の血清及び耳片を材料とした。耳片の採取はTSUドライキット（フジタ製薬）を用いて採取した（図1）。

採取した耳片はセラムチューブに移して、抗原エライザ付属の溶出液 200 μ l に浸漬し、4℃で一晩静置した。血清及び耳片溶出液を検体として、抗原エライザを実施した。

2 結果

PI牛の耳片はすべて陽性を示し中央値は3.30であった。一方、陰性対照牛の耳片はすべて陰性であった（図2）。また、PI牛の血清はすべて陽性を示し、中央値は3.93であった。陰性対照牛の血清はすべて陰性であった（図3）。

エライザ値の比較では、PI牛の耳片エライザ値の中央値は3.300であり、血清と同等に高値を示していた。

毛根を用いた抗原エライザの検討

耳片に加えて、毛根についても抗原エライザを試み、耳片のエライザ値との比較を行った。

1 材料と方法

PI牛15頭、急性感染牛2頭、陰性対照牛9頭の毛根を材料とした。毛根の採取は尾根部及び保存した耳片から3つまみ程度採取した(図4)。

採取した毛根はセラムチューブに移して、抗原エライザ付属の溶出液300 μ lに浸漬し、4 $^{\circ}$ Cで一晩静置した。その溶出液を検体として、抗原エライザを実施した。

2 結果

PI牛の毛根はすべて陽性を示し、中央値は2.82であった。一方、急性感染牛及び陰性対照牛の毛根はすべて陰性を示した(図5)。

エライザ値の比較では、PI牛の毛根のエライザ値(中央値:2.82)はPI牛の耳片エライザ値(中央値:3.30)と比較して、減少傾向を示した。

耳片を用いた抗原エライザの活用

耳片材料による抗原エライザで、PI牛のエライザ値が血清と同等であり、PI牛の摘発に有用と考えられたことから、過去にPI牛を摘発した農場や、PI牛の侵入リスクの高い農場におけるBVDV検査に耳片を用いた抗原エライザを積極的に活用した。

1 事例 I

A農場は、1か月齢の肉用牛を導入して哺育育成する農場であり、過去に発熱や呼吸器症状が多発した時期に、BVDV中和抗体検査を民間検査機関で実施し高い抗体価が確認されたため、当該機関から農場内にPI牛が存在する可能性を示唆されていた。そのため、管理獣医師は導入子牛のBVDV検査を実施したいと考えていたが、採血にかかる労力や検査費用が多大にかかることを踏まえると積極的な検査に二の足を踏んでいた。そこで、BVDV検査について当所に相談があった。当所からは、採材が簡便で、移行抗体の影響を受けない耳片を用いたBVDV検査を提案し、農場側の理解と採材時の協力へも快諾が得られた。BVDV検査は1か月齢の導入牛全頭を対象として、前週に導入した個体の耳片の採材を翌週の月曜日に毎週実施した。1回の検査で約60頭程度採材し、当所において検体処理後速やかに抗原エライザを実施した。平成30年12月~31年2月までに547頭を検査したが、全頭陰性であり、PI牛は摘発されず全頭BVDVフリーであることが確認できた(表1)。

2 事例 II

BVD検査に耳片を積極的に活用することを目的として、県内のA酪農組合の

臨床獣医師に協力を得て、県外導入牛や県外放牧場からの退牧牛が分娩した子牛を中心に耳片の採材を行った。当初、平成31年1月中旬までの試験的な取り組みとして期限を設けていたが、臨床獣医師の希望により検査を継続することとなった。

A酪農組合では、診療の際にTSUドライキット（フジタ製薬）を携帯し、農家の要望や臨床獣医師の判断で新生子牛等の耳片を採取し、診療所で冷蔵保管した。検体は概ね1週間単位で当所が保管検体を回収し、抗原エライザを実施した。平成30年12月～31年2月までに25頭を検査した結果、全頭陰性であり、検査牛清浄性が確認された。

考察

今回、抗原エライザの仕様が変更となったことをきっかけに、耳片を用いた抗原エライザを検討したところ、PI牛の摘発に非常に有用であることが分かった。

BVDVが農場へ侵入する経路は、導入元あるいは預託先でBVDVに感染した成牛が導入後にPI牛を娩出するケースが最も多い¹⁾。農場で娩出されたPI牛はその後、農場内で感染源になり、さらに異常産や子牛の事故が増加するばかりでなく次々とPI牛が生まれるリスクが増大する（図7）。そのため、導入牛及び預託先から帰ってきた成牛が産んだ新生子牛は、農場へのBVDV侵入の重要な感染源である可能性があり、早期の検査によって速やかにPI牛を摘発し感染拡大を防止することがBVDV対策として重要である。

耳片の検査では、血清と異なり新生子牛でも移行抗体の影響を受けることなく、PI牛を摘発できることから、新生子牛の検査に最も適している（図6）。また、現行の「牛ウイルス性下痢・粘膜病に関する防疫対策ガイドライン」では、PI牛の診断には2回の抗原検査が必須となっており、血清による検査がスタンダードになっているが、血液が採取できない死亡例においても、皮膚の抗原検査によりPI牛診断が可能となる。また、今回、毛根の抗原エライザ検査も試みたところ、耳片と比較してエライザ値の低下がみられたものの、PI牛はすべて陽性であった。そのため、耳片採取キットが無い場合でも毛根を用いることでPI牛か否か推察可能となる。

また、耳片検査では採材が血液を採材するよりも容易であることも、検査を普及する上での大きなメリットと考える。耳片を実際に現場で採取したところ、簡単な保定で数秒程度で可能であったため、採取にかかる労力や時間は採血よりも優れている。さらに、耳片採取は獣医師でなくても行えることから、導入牛をトラックから降ろす際、あるいは農場独自の耳標を装着する際など、日常の飼養管理作業の中に無理なく組み込みやすい手技である。また、採取後の検体は1～2週間程度は冷蔵保存が可能であり、まとめて抗原エライザ検査を実施できるため

多検体処理にも適している。

BVDVの酪農場におけるサーベイランス検査には、5条検査の余剰血清やバルク乳による抗原及び抗体検査が有用である²⁾。ある程度サーベイランス検査を行うことで農場内のPI牛は摘発が可能であるが、導入に伴うBVDV侵入リスクはサーベイランス検査では排除することは出来ない。

そのため、マンパワーには限りがあるが、導入牛及びその新生子牛について耳片の抗原エライザを活用したBVDV検査を活用することで、PI牛の早期摘発とウイルス侵入リスク低減が図れ、サーベイランス検査より一段高いレベルのBVDVフリーの状況を担保することができる(図8)。

参考文献

- 1) 赤上正貴ら，茨城県内の酪農場で摘発された牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛の疫学的特徴，平成29年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会要旨，201
- 2) 赤上正貴ら，バルク乳中の牛ウイルス性下痢ウイルス特異遺伝子及びELISA抗体検出によるサーベイランス検制の検討，平成28年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会要旨，246



図1 耳片採取の様子

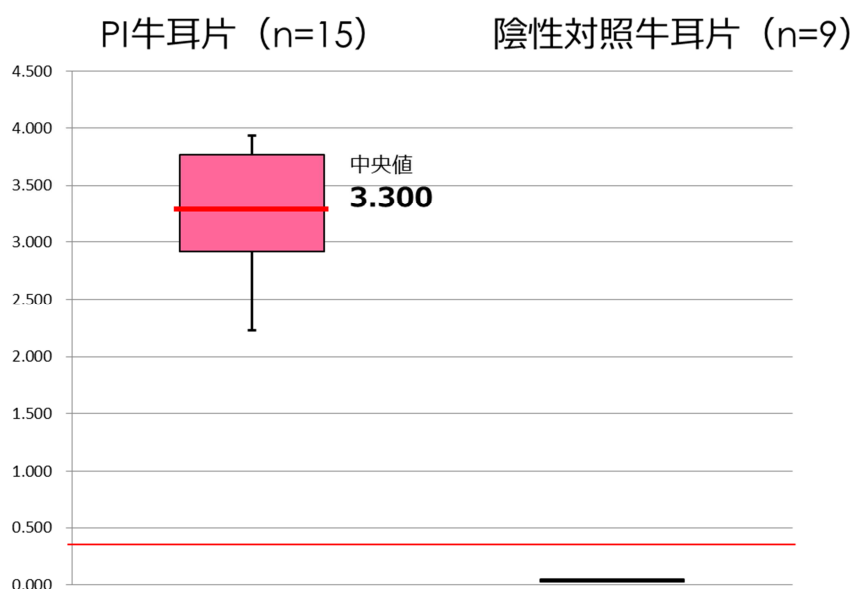


図2 PI牛と陰性対照牛における耳片エライザ値の比較

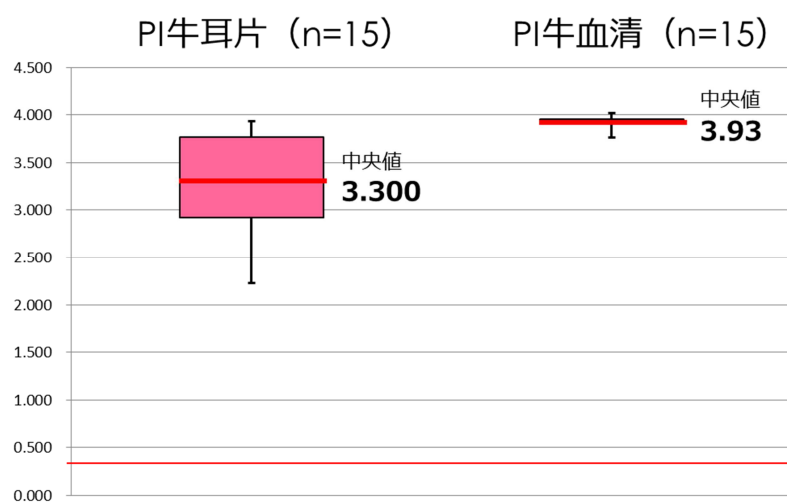


図3 PI牛における耳片エライザ値と血清エライザ値の比較



図4 毛根採取の様子

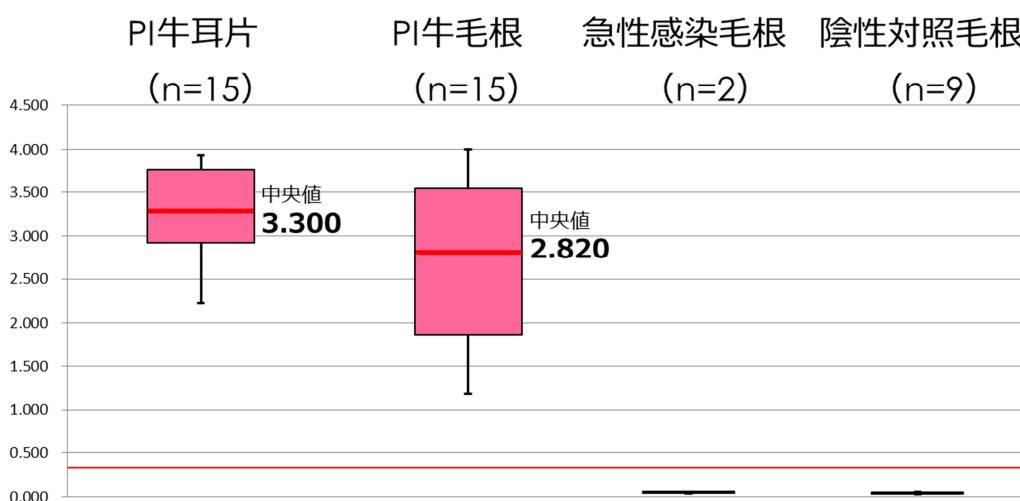


図5 PI牛・急性感染牛・陰性対照牛の毛根エライザ値の比較

表1 耳片を用いたBVD検査の活用事例の検査結果

	対象牛	検体数	陽性数
事例1	導入子牛	547	0
事例2	新生子牛	25	0

- 新生子牛のBVD検査の問題点
 - 血清：抗原検出困難（移行抗体の影響）
 - 耳片：抗原検出可能

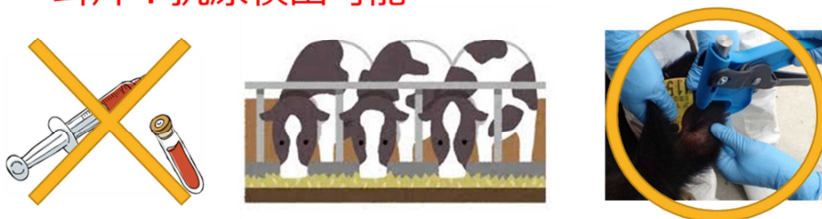


図6 新生子牛のBVD検査の問題点

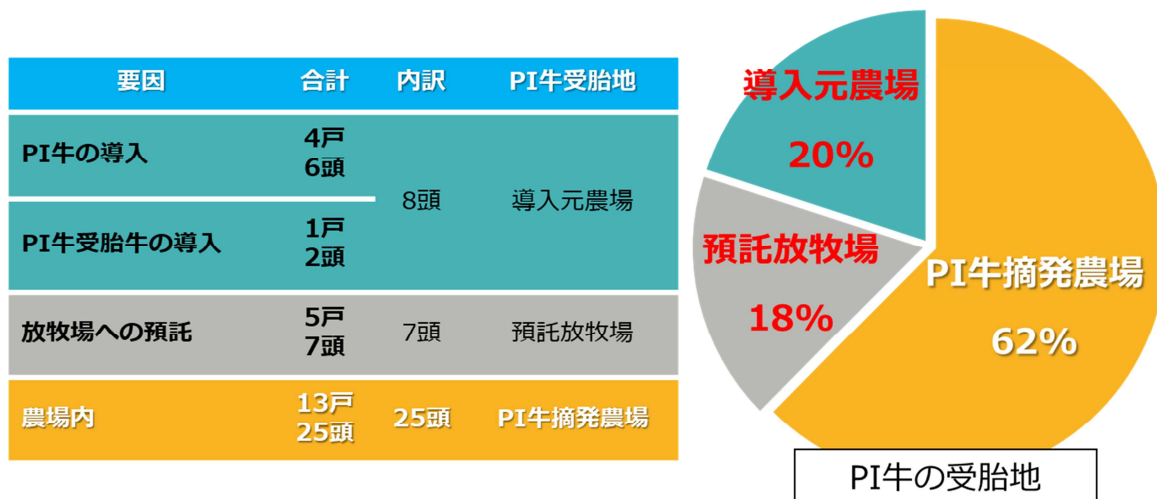


図7 PI農場へのウイルス侵入要因の疫学解析結果（文献1より引用）



図8 耳片の抗原エライザの活用イメージ

1 4. 地方病性牛白血病確定診断のための検査法の検討

県北家畜保健衛生所

○中村 拓也 鹿島 悠幹
矢口 裕司 大谷 芳子

牛白血病は、牛白血病ウイルス（以下、BLV）による地方病性牛白血病（以下、EBL）と原因不明の散発型牛白血病（以下、SBL）に大別される。現在、牛白血病は一部の検査機関を除いては、EBLとSBLの区分をすることなく混在した形で診断が行われ、家畜保健衛生所へ届出がなされている。

当所では、牛白血病の診断は、HE染色と免疫組織化学的染色（以下、免疫染色）の所見で、B細胞性リンパ腫を確認し実施している。しかし、動物の悪性腫瘍は人と比べると多形成や異形成がより強いため組織学的診断が難しい。一方で、EBL関連の研究は目覚しく進展しており、B細胞クローナリティ検査（以下、クローナリティ検査）や *in situ* ハイブリダイゼーション（以下、ISH）等の新たな検査手技が開発されている。

今回、当所において過去に牛白血病と診断した6症例について、免疫染色に加え、新たな検査手法としてクローナリティ検査及びISHを取り入れた回顧的検索を実施し、EBL診断への有用性について検討したので、その概要を報告する。

症例の概要

2016年から2018年に牛白血病と診断した6症例について、HE染色、免疫染色、クローナリティ検査、ISHを実施した（表1）。

牛白血病と診断した6症例は、HE染色において複数のリンパ節でリンパ球様細胞の浸潤および腫瘍性増殖がみられ、一部の症例では脾臓や心臓などにも同様の所見が認められた。いずれの症例においても腫瘍組織のリンパ球様細胞は多形性と異形性を特徴とし、核は大小不同で、不整な形態を示すリンパ腫であった。また、浸潤細胞の中には核分裂像も散見された。

免疫染色

材料には、各症例の腫瘍組織を用いた。材料は10%中性緩衝ホルマリンで固定し、定法に従いパラフィン包埋、薄切後、切片（以下、パラフィン切片）を作成した。パラフィン切片は3%過酸化水素加メタノールで10分間反応させ、緩衝液に浸漬してマイクロウェーブ処理（500W，5min×2回）による抗原賦活化を実施後、室温に30分以上静置した。一次抗体にはT細胞のマーカーであるCD3，T細胞とB1細胞のマーカーであるCD5，B細胞のマーカーであるCD20及び未熟リ

リンパ球のマーカーである TdT を用い、4℃で一晩（12時間以上）反応させた。抗原賦活化の緩衝液は、CD3、CD5及びCD20ではpH6.0の緩衝液、TdTではpH9.0の緩衝液を用いた。二次抗体にはヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (MULTI) を、発色基質にはシンプルステインAEC溶液を使用し、マイヤーヘマトキシリンで対比染色を実施した。その結果、No.1はCD3とCD5で陽性反応が確認され、CD20とTdTは陰性であった。No.2、3、4、5ではCD5とCD20で陽性反応が認められ、CD3とTdTは陰性であった（図2）。No.6はCD20で陽性反応が観察され、CD5、CD3及びTdTは陰性であった（表1）。

クローナリティ検査

材料には、検体の血液または腫瘍組織を用い、陰性対照として健康牛の血液を用いた。市販の抽出キットを用いて材料からDNAを抽出し、nested PCRを実施した。First PCRにはVH primerとJH primerを用い、2ndPCRにはCDR3 fw2 primerとJH primerを用いた（図3）。また、一部の検体は（独）農研機構動物衛生研究部門に検査を依頼した。その結果、No.2、3、5、6では100 bpから300 bpの範囲内に単一のバンドが確認された。No.1はバンドがみられず、No.4は複数のバンドが観察された（図4）。

ISH

材料は、免疫染色と同部位のパラフィン切片を用いた。ISHはBLVのAS1領域の塩基配列を参考に設計されたプローブを用い、RNAscope 2.5HD Reagent Kitの手順に従って反応させた。プローブのハイブリダイズは40℃で2時間で行い、増幅試薬でシグナルを増幅後に発色させた。その結果、No.1、2、5は陰性であり、No.3、4、6は腫瘍組織で陽性反応が認められた。陽性反応は腫瘍組織中のリンパ球様細胞の核でみられた（図5）。

考察

EBLは、BLVが感染したB細胞がモノクローナルに腫瘍化しB細胞性リンパ腫を発症する。BLVによるリンパ腫は、腫瘍性増殖している細胞がB細胞由来であることが診断の必須条件になっている。免疫染色の結果では、6症例中5症例をB細胞性リンパ腫、1症例をT細胞性リンパ腫と判定した。しかし、リンパ腫は時に短時間で悪性度が増す症例もあり、マーカーの脱落が起こることが知られており、由来細胞の判定には注意が必要である。

クローナリティ検査は、Bリンパ球の抗体重鎖の可変部であるVDJ領域をnested PCR法により増幅させることで、単一のB細胞由来であるかを判定することができる。EBLの多くは、腫瘍性に増殖したB細胞がモノクローナルな増殖を

していることが分かっているため、BLVによるB細胞性リンパ腫であれば、単一バンドが確認できる。クローナリティ検査の結果、B細胞性リンパ腫と判定した5症例中4症例で、モノクローナルな腫瘍性増殖と判定した。一方、BLVの関与を確実に診断できるinverse-PCRによりEBLと診断された症例で、クローナリティ検査が陰性となる事例が報告されている²⁾。そのため、クローナリティ検査で陽性の症例はB細胞の単一細胞が腫瘍性に増殖したものであることからEBLと診断できるが、陰性の症例は他の検査でEBLの診断をする必要がある。

BLVのAS1領域は、BLVに感染後の無症候期、持続性リンパ球増多症及びEBLが発症している全てのステージで確認できることが報告されており¹⁾、BLV由来のAS1領域をターゲットにしたプローブを用いることで腫瘍組織がBLV感染由来であるか判定することができる。そのため、EBLによるリンパ腫では、腫瘍部を中心にBLV感染細胞で陽性反応が確認できる。しかし、今回のISHでは、B細胞性リンパ腫5症例中3症例が陽性、2症例が陰性であった。これらの症例からは遺伝子検査でBLVプロウイルスが検出され、BLV感染が確認できた症例のため、検査条件や手技が正しければ5症例でISHの陽性反応が確認できなければならない。今回、ISHに使用した材料は、10%中性緩衝ホルマリンで固定された臓器で、過固定によるマーカーの脱落やBLVプロウイルスの遺伝子の欠損などにより陽性反応がみられなかった³⁾可能性もあることから、ISHの検査材料、保存状態、プローブの設計などについて再検討を行う必要がある。

これらの結果から、B細胞性リンパ腫のBLVプロウイルスを検出したクローナリティ検査で腫瘍性増殖がみられた4症例をEBLと確定診断した。EBLを正確に診断するためには、BLVに感染した成熟B細胞が腫瘍性増殖により腫瘍組織を形成していることを確認する必要がある。今回、新たな検査法としてクローナリティ検査とISHの有用性について検討を行ったが、現時点ではクローナリティ検査の陰性の判断やISHの条件検討などが課題となり、すぐに現場へ応用することは難しかった。今後、症例数を増やし、これらの検査が正確なEBLの診断に活用できるよう検討を続けていきたい。

BLVウイルスは、現在、乳用牛、肉用牛ともに広く浸潤しており、農場によっては飼養牛全てがBLVに感染している農場も少なくない。このような状況下において、牛でリンパ腫が発生した場合、通常、病理学的な検査の前に、遺伝子検査や抗体検査が行われBLV感染の有無を確認しているが、検査結果でBLV感染を認めてもその腫瘍の原因がウイルスとは断定できない⁴⁾。しかし、現在の牛白血病の診断は、前述したように、EBLとSBLが混在したまま診断されており、牛白血病の発生数は、家畜保健衛生所への届出や家畜衛生統計で読み取れるが、BLVによるEBLの発生数を正確に反映していない。

一方、実際に生産現場では牛白血病の発生による経済的損失も増加傾向にある。

そのため、農林水産省は個々の農場において清浄化達成を目指すことを基本に、「牛白血病に関する衛生対策ガイドライン」を定めた。牛白血病対策は、本県のように家畜保健衛生所を中心とした地域ぐるみで取組みや、共済組合や臨床獣医師の指導による取組、農家独自の取組など、全国的に様々な取組が開始されており、BLVは浸潤・拡大のベクトルから清浄化へのベクトルに大きな舵が切られた。今後、BLVの清浄化が進んでいく中、牛で発病したリンパ腫を牛白血病と診断するのではなく、EBLかSBLかを正確に診断することが重要となってくる。

牛、特に繁殖和牛のライフサイクルを踏まえるとBLV清浄化には長期間を要することが容易に想定されるが、清浄化を達成するためには牛白血病の正確な診断が必須になる。現在、牛白血病の大多数を診断している家畜保健衛生所や食肉衛生検査所は、BLV清浄化に向かうために、EBLを確実に診断できるスキルを身に着ける必要がある。

参考文献

- 1) Keith Durkin et al., *Retrovirology*,13,33,2016
- 2) 前澤ら，若齢牛における地方病性牛白血病の簡易診断法の検討，第160回日本獣医学会学術集会，2017
- 3) 門田耕一，牛白血病の病理診断，平成27年度獣医学術学会年次大会，2015
- 4) 萩原ら，牛白血病ウイルス感染牛におけるリンパ系腫瘍の組織学的検討，日本獣医師会雑誌，2013

表1 検体の詳細と病変分布

	品種		月齢	BLVプロウイルス コピー数 [copies/10 ng]	腫瘍形成部位
1	黒毛和種	生体	11か月	5.9(脾臓)	右股関節周囲の筋肉、全身リンパ節
2	黒毛和種	死体	36か月	372(Lym)	肝臓、脾臓、心臓、全身リンパ節
3	黒毛和種	死体	27か月	319(Lym)	脾臓、全身リンパ節
4	ホルスタイン	生体	76か月	396(血液)	心臓、全身リンパ節
5	交雑種	生体	8か月	1,000(血液)	肝臓、脾臓、心臓、全身リンパ節
6	黒毛和種	死体	15か月	1,355(血液)	肝臓、脾臓、腎臓、心臓、第四胃、全身リンパ節

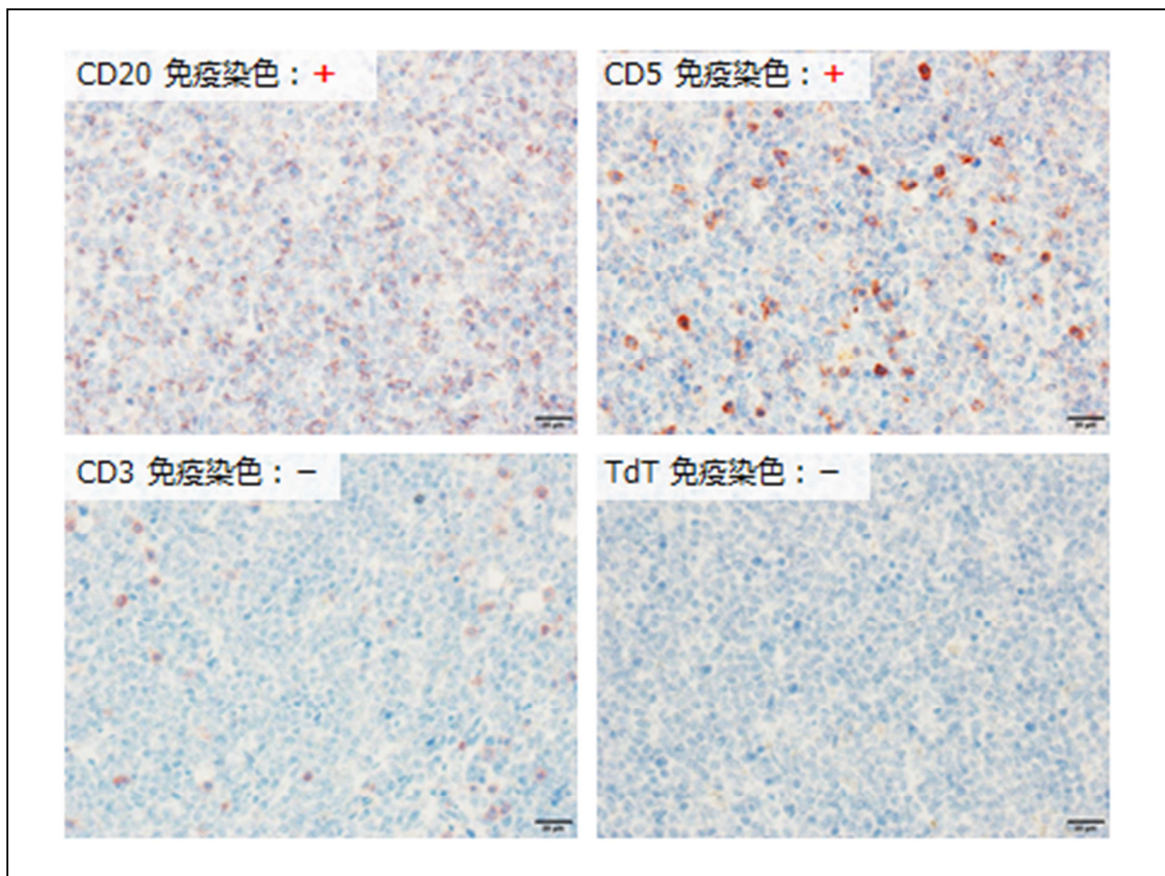


図2 免疫染色の結果 (No.3)

表 2 免疫染色の結果

検体 番号	免疫染色				組織学的診断
	CD20	CD5	CD3	TdT	
1	-	+	+	-	T細胞性リンパ腫
2	+	+	-	-	B細胞性リンパ腫
3	+	+	-	-	B細胞性リンパ腫
4	+	+	-	-	B細胞性リンパ腫
5	+	+	-	-	B細胞性リンパ腫
6	+	-	-	-	B細胞性リンパ腫

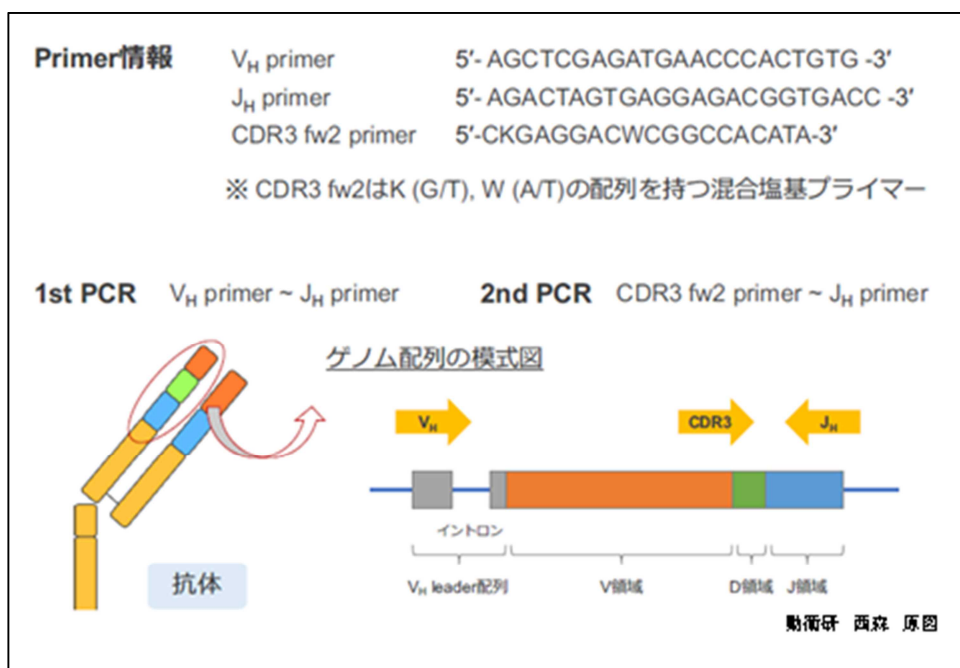


図 3 B細胞クローナリティ検査のプライマー情報

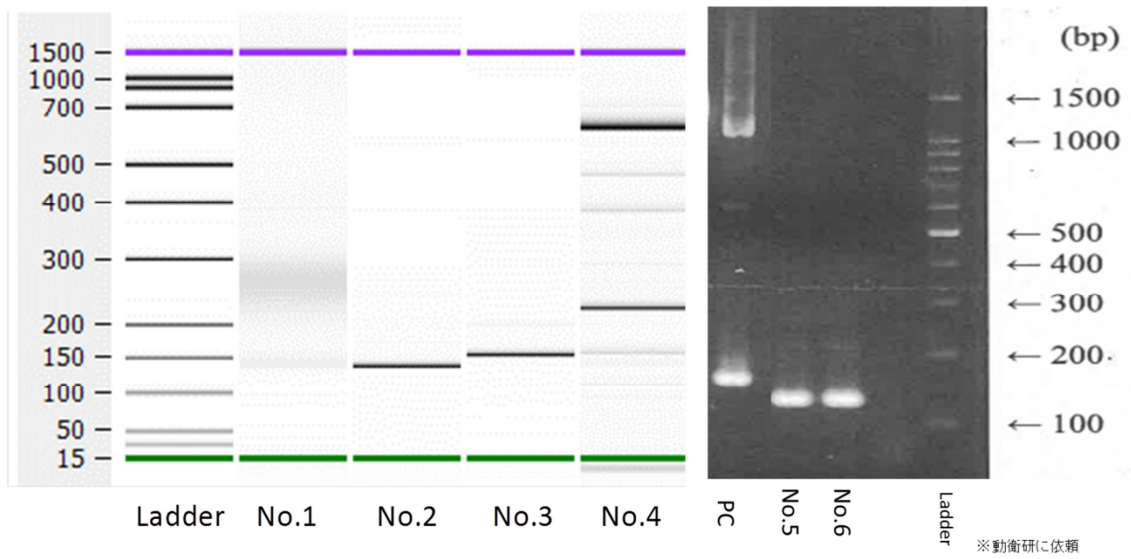


図4 B細胞クローナリティ検査結果

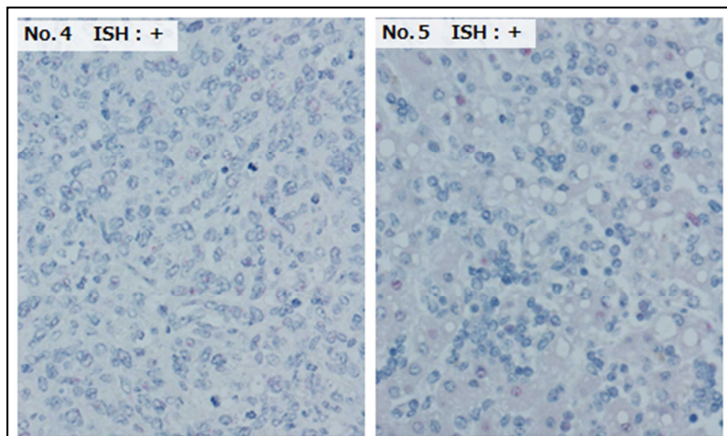


図5 ISHの結果 (No.4 , 5)

表3 免疫染色, B細胞クローナリティ検査及びISHの結果

	免疫染色	B細胞 クローナリティ検査	ISH
1	T細胞性リンパ腫	-	-
2	B細胞性リンパ腫	+	-
3	B細胞性リンパ腫	+	+
4	B細胞性リンパ腫	-	+
5	B細胞性リンパ腫	+	+
6	B細胞性リンパ腫	+	-

15. 次世代シーケンサーを用いた豚腸内細菌叢の16SrRNAメタゲノム解析

県北家畜保健衛生所

○藤井 勇紀 鹿島 悠幹
都筑 智子 川上 純子

16S rRNA 遺伝子は保存領域と V1 ~ V9 までの固有可変領域が交互に現れる構造をしているため、従来からキャピラリーシーケンサーを用いた配列データの解析により、単一細菌種の同定に広く利用されてきた。また、近年は次世代シーケンサーと情報解析技術の進歩により、腸内細菌の分離困難菌などを含めた大規模な配列データの取得と、膨大なデータの解析が可能となったため、糞便、鼻汁、血液、土壌等のサンプル中に、どの細菌が何%存在しているかを知ることが出来る 16S rRNA メタゲノム解析による研究が進んできた。

今回、次世代シーケンサー Miseq を使用し、豚糞便サンプルの 16S rRNA メタゲノム解析を実施し、腸内細菌構成の類似度をステージ別、農場別に比較したので、その概要について報告する。

材料（表1）

管内養豚場から採材した離乳期、肥育後期、繁殖母豚の3ステージの健康豚糞便（7農場116検体）と、病性鑑定の際に採材した25~50日齢の大腸菌症発症豚の糞便（9農場21検体）を供試した。

方法

材料の糞便から抽出した DNA から、16SrRNA 遺伝子の V3-V4 領域の PCR 増幅を行った後、ライブラリー調整を行った試料について、次世代シーケンサー MiSeq (Illumina 社) を用いた塩基配列の決定を行った。解析は Metagenome@kin (ワールドフュージョン社) を用い、各試料に存在する構成細菌とその比率について、ステージ間、農場間、農場内個体間での比較を行った。また大腸菌症発症豚と健康豚（離乳期）の比較も同様に行った。

比較解析は、バーチャート分析、主座標分析、階層型クラスタリング解析を用いた。

結果

1 ステージ間での比較

バーチャート分析（図1）での主要細菌の平均構成率は、離乳期→肥育後期→繁殖母豚の順に、*Prevotella*属菌で 13.5% →6.4%→2.0%、*Lactobacillus*属菌で 16.7%

→ 11.1% → 5.7%, *Megasphaera* 属菌で 5.0% → 3.6% → 0.6% と減少し, *Turicibacter* 属菌で 0.4% → 1.2% → 5.8%, *Clostridium* 属菌で 6.6% → 13.8% → 22.6%, *Terrisporobacter* 属菌で 1.5% → 4.1% → 6.6%, *Romboutsia* 属菌で 0.2% → 0.9% → 3.4% と増加していた。

主座標分析 (図 2) では, ステージごとに集団が固まる傾向にあり, 特に繁殖母豚では分布領域が狭かった。

2 農場間, 農場内個体間での比較

(1) 離乳期

バーチャート分析 (図 1) での主要細菌の平均構成率は, A, B, C, D, E の順に, *Prevotella* 属菌で 17.7%, 14.8%, 9.1%, 19.5%, 7.6%, *Lactobacillus* 属菌で 32.0%, 6.6%, 21.2%, 6.1%, 15.4%, *Clostridium* 属菌で 0.8%, 5.1%, 2.6%, 15.7%, 10.7% であった。

主座標分析 (図 3) では, 農場内個体は集団が固まる傾向にあり, 農場間で集団の固まる領域は異なっていた。

階層型クラスタリング分析 (図 4) では, 農場内個体は数検体を除き, 概ね近縁に位置し, 農場ごとのクラスターに分かれた。

(2) 肥育後期

バーチャート分析 (図 1) での主要細菌の平均構成率は, A, B, C, D, E, F, G の順に, *Prevotella* 属菌で, 2.6%, 6.0%, 5.9%, 11.7%, 5.6%, 7.4%, 5.9%, *Lactobacillus* 属菌で 5.3%, 17.1%, 6.7%, 0.5%, 12.3%, 12.0%, 23.9%, *Clostridium* 属菌で, 13.4%, 21.1%, 21.4%, 11.4%, 9.3%, 7.7%, 12.4%, *Streptococcus* 属菌で 3.6%, 1.3%, 2.1%, 0.1%, 17.5%, 7.8%, 0.2% であった。

主座標分析 (図 5) では, 農場内個体は集団が固まる傾向にあったが, 農場間では D-E や A-F など菌叢が完全に分かれる農場と, B-C や E-F など境域が重なって類似度の高い農場があった。

階層型クラスタリング分析 (図 6) においても D-E のように完全にクラスターが分かれる農場とともに, E-F, F-G のように農場ごとのクラスターが入り交じり, 類似度の高い農場も確認された。

(3) 繁殖母豚

バーチャート分析 (図 1) での主要細菌の平均構成率は, A, B, C, D, E の順に *Prevotella* 属菌で 0.1%, 0.4%, 0.6%, 7.4%, 2.2%, *Lactobacillus* 属菌で 5.6%, 2.4%, 4.2%, 4.5%, 10.2%, *Clostridium* 属菌 28.7%, 21.0%, 15.9%, 22.0%, 24.5%, *Terrisporobacter* 属菌 8.8%, 8.1%, 6.1%, 4.0%, 5.9%, *Turicibacter* 属菌 7.7%, 8.1%, 6.0%, 5.8%, 2.2% であった。

主座標分析 (図 7) では, 農場内個体は集団として固まる傾向があり, 農場間では A-C など, 菌叢が完全に分かれる農場と, B-C など, 類似度の高い農場が確

認められたが、その他ステージと比較して、繁殖母豚全体が近距離に固まる傾向にあった。

階層型クラスタリング分析（図8）においてはCやEのように農場内でクラスターを形成する農場もあったが、多くは独立したクラスターを形成しなかった。

3 大腸菌発症豚と健康豚の比較

バーチャート分析（図9）では*Prevotella*属菌が大腸菌症発症豚で1.4%、離乳期健康豚で13.5%であり大きな差が見られた。

各ステージの*Escherichia*属菌の構成率の分布（図10）では、大腸菌症発症豚の*Escherichia*属菌構成率が有意に高く（U検定， $P < 0.01$ ），平均構成率は大腸菌症発症豚で3.03%、離乳期で0.03%、肥育後期で0.01%、繁殖母豚で0.08%であった。

主座標分析（図11）では、大腸菌症発症豚と離乳期健康豚がそれぞれ別の領域に集団を形成した。

考察

ステージ間では、*Prevotella*属菌、*Lactobacillus*属菌、*Megasphaera*属菌では離乳期から繁殖母豚にかけて減少する一方、*Turicibacter*属菌、*Clostridium*属菌、*Terrisporobacter*属菌、*Romboutsia*属菌では増加していたこと、また主座標分析でステージごとに集団が固まってプロットされていたことから、ステージ間で菌叢パターンは異なっていた。また繁殖母豚ではプロットの分布領域が狭く、ステージごとにその多様性の範囲も異なることが明らかとなった。

離乳期では、*Prevotella*属菌がD農場で19.5%である一方、E農場では7.6%であり、また*Lactobacillus*属菌でもA農場で32.0%、D農場である一方、D農場で6.1%であるなど、農場間で構成率に大きな差の認められる菌属が確認された。主座標分析（図3）、階層型クラスタリング分析（図4）の結果からも、離乳期の菌叢は、農場内個体間は類似している一方、農場間では、農場固有の菌叢パターンがあることが示唆された。

肥育後期でも、*Lactobacillus*属菌がD農場で0.5%である一方、G農場では23.9%であり、また*Streptococcus*属菌でも、D農場で0.1%である一方、E農場で17.5%であるなど、農場間で構成率に大きな差の認められる菌属が確認された。こちらも、主座標分析（図5）、階層型クラスタリング分析（図6）の結果とあわせて、離乳期と同様に肥育後期の菌叢も、農場内個体間は類似しているが、農場間では、農場固有の菌叢パターンがあることが示唆された。

繁殖母豚では、離乳期や肥育後期ほど農場間で存在率に大きな差を認める菌属はおらず、階層型クラスタリング分析（図8）においても、独立したクラスターを形成する農場が少なかった。そのため、繁殖母豚では農場間で似通った菌叢パ

ターンを示したが、主座標分析では、距離は近いものの、プロット領域が分かれる農場も確認されているため、離乳期や肥育後期と比べて多様性は低い、農場固有の菌叢パターンがあることが示唆された。

Escherichia 属菌の構成率は、健康豚では離乳期、肥育後期、繁殖母豚の各ステージで0.1%以下と、非常に低いことが明らかとなった。また、大腸菌症発症豚では *Escherichia* 属菌構成率は 3% 程度まで上昇していたが、加えて、*Prevolla* 属菌の大幅な減少（13.5% → 1.4%）も確認され、大腸菌症の発症では *Escherichia* 属菌の増加だけでなく、その他菌種の存在率にまで影響が及んでいることが明らかとなった。主座標分析（図11）においても、2 群間はそれぞれ別領域に集団を形成し、大腸菌発症豚は健康豚と比較して、明らかに分析パターンの変化を起こしていることが伺える。

今回の調査から、菌叢パターンは農場内個体間では概ね類似している一方、ステージ間では異なり、また、同一ステージであっても農場ごとに固有のパターンを有していることが分かった。加えて、離乳期、肥育後期では菌叢パターンの多様性が大きく、繁殖母豚では小さいことも明らかとなった。また、大腸菌症では *Escherichia* 属菌が有意に増加し、菌叢パターン自体も大きく変化するなど、疾病発症時の菌叢パターンに変化があることを確認ができた。

今後、健康豚についてはステージ間、農場間で菌叢パターンが異なる要因（抗菌剤、疾病発生状況、飼料など）を明らかにし、薬剤耐性菌対策や疾病発生低減につなげていければと考えている。具体的には、抗菌剤多用農場とそうでない農場との菌叢パターンの比較を行い、抗菌剤多用の影響について調査をする。さらに、大腸菌性下痢発生に際して、大腸菌の消長の理由などは明かになっていないことから、大腸菌症の発症がその他構成菌の存在率を変化させたのか、それとも元々の菌叢パターンに何らかの発症素因があつて大腸菌症の発症に至ったのかなど、今後は大腸菌性下痢の発症農場と非発症農場の健康豚の菌叢パターンを比較することで、疾病発症素因のある菌叢パターンの解明も行っていきたい。

表1 健康豚サンプル

農場	離乳期	肥育後期	繁殖母豚	計
A	5	10	5	20
B	5	10	3	18
C	5	10	5	20
D	4	10	4	18
E	5	10	5	20
F		10		10
G		10		10
計	24	70	22	116

表2 豚大腸菌症サンプル

農場	25~50日齢		計
	生	死	
H	2	1	3
I	3	0	3
J	1	2	3
K	1	1	2
L	2	0	2
M	1	0	1
N	3	0	3
O	0	2	2
P	0	2	2
計	13	8	21

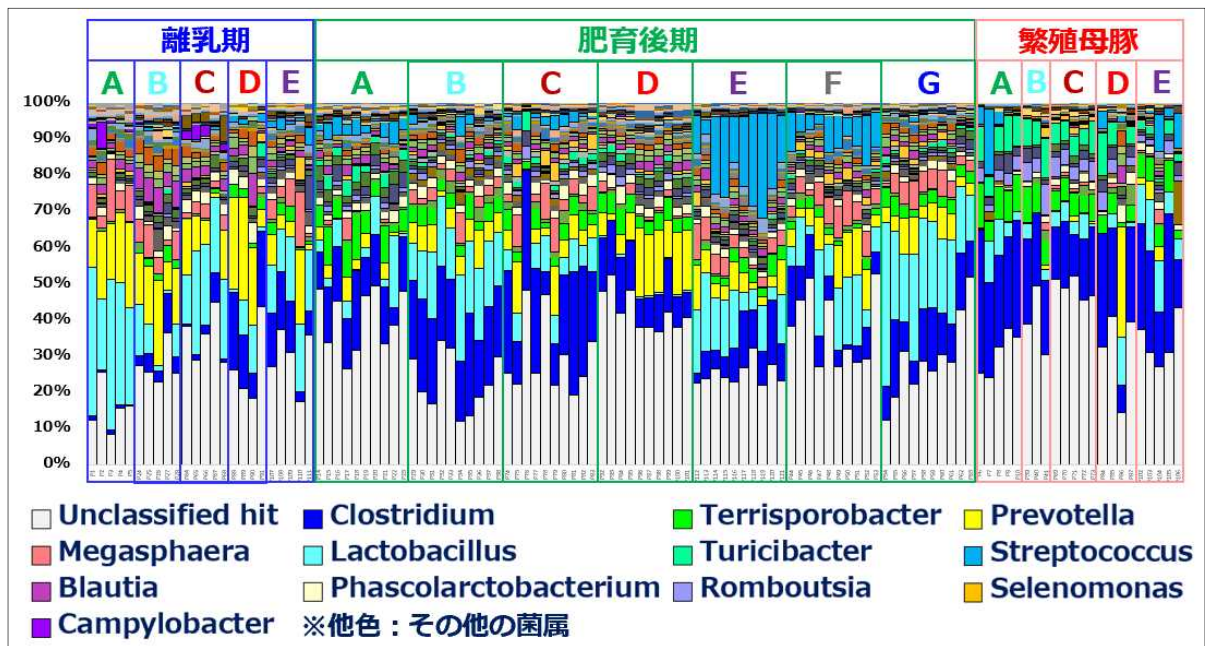


図1 全ステージのバーチャート分析

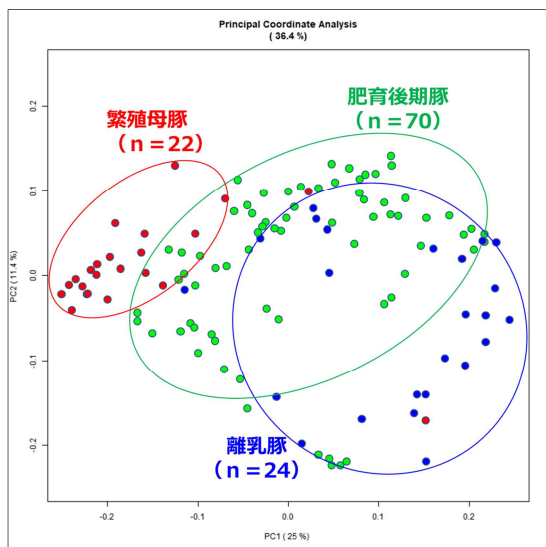


図2 全ステージの主座標分析

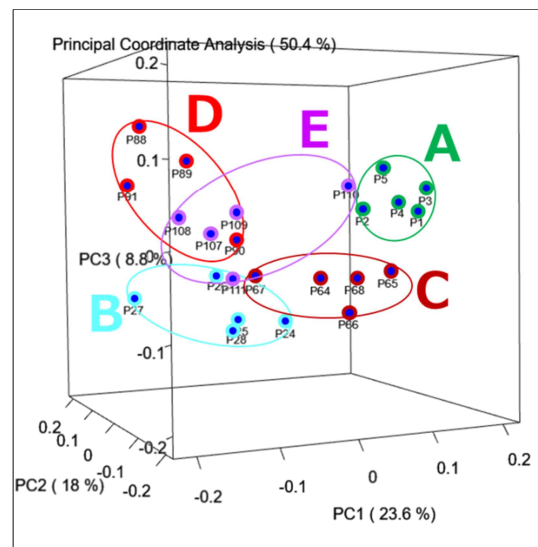


図3 離乳期の主座標分析

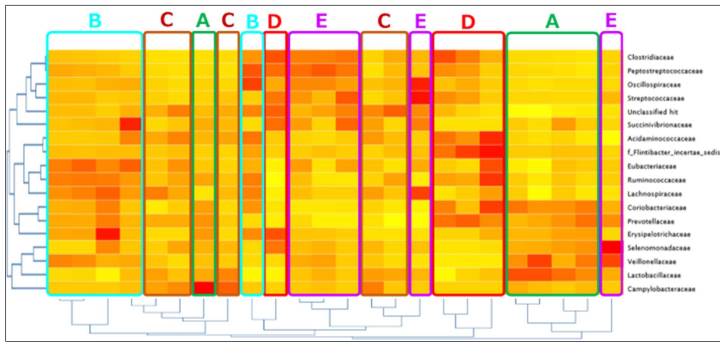


図4 離乳期の階層型クラスタリング分析

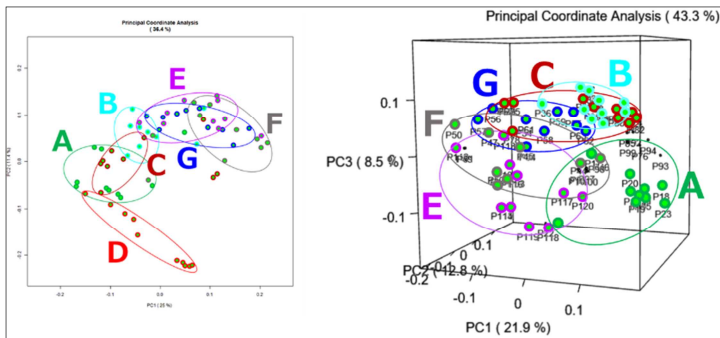


図5 肥育後期の主座標分析（左：2次元，右：3次元）

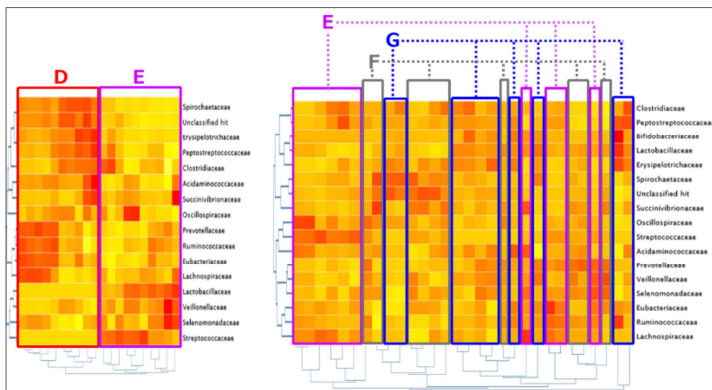


図6 肥育後期（D-E， E-F-G）の階層型クラスタリング分析

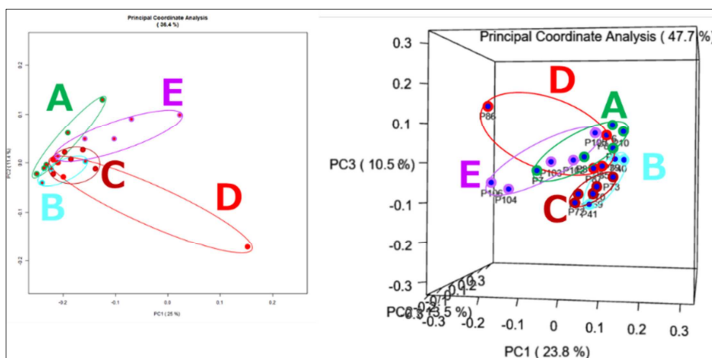


図7 繁殖母豚の主座標分析（左：2次元，右：3次元）

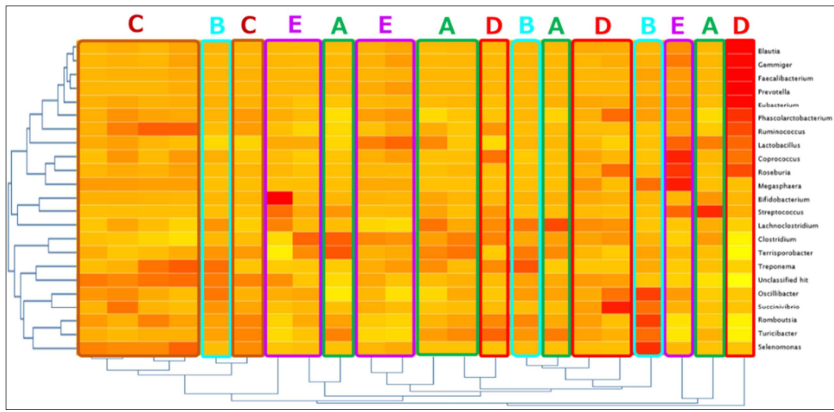


図8 繁殖母豚階層型クラスタリング分析（繁殖母豚）

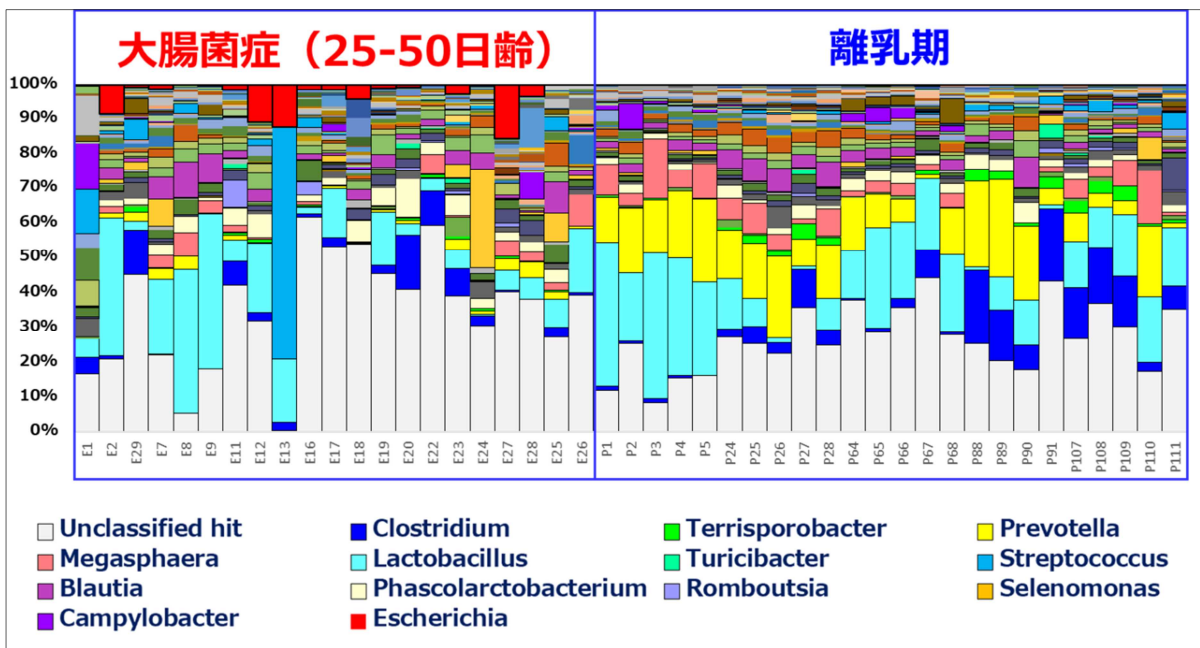


図9 バーチャート分析（大腸菌発症豚と健康豚離乳期の比較）

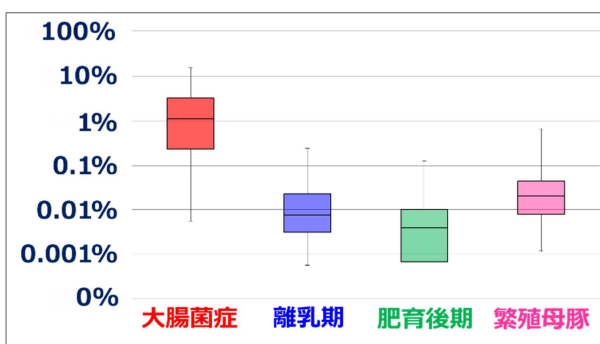


図10 *Escherichia* 属菌の存在率比較

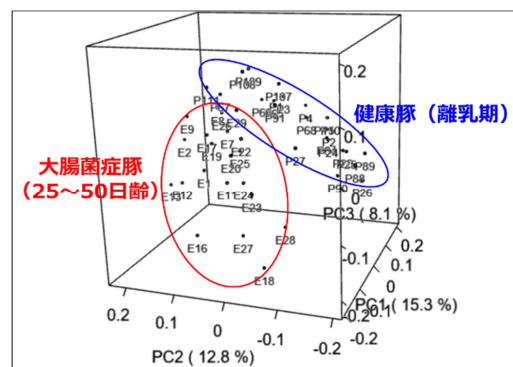


図11 大腸菌症発症豚と健康豚離乳期の主座標分析