

5 飼養衛生管理基準指導のためのコミュニケーションスキル研修

中部家畜保健衛生所
○ 柴田 正志、齊藤 妙子

要 約

家畜保健衛生所職員が農場を訪問し指導する際、農家との信頼関係と円滑なコミュニケーションが重要である。新規採用職員への事前調査では、専門用語の理解不足や飼養技術知識の不足による説明困難に加え、意思疎通や信頼構築の難しさが課題として挙げられた。

これらを解決するため、新規採用職員にピア・ロールプレイ演習を導入し、実践的なコミュニケーションスキル向上を目的とした研修を行った。

アンケート結果から、全参加者が研修を有益と感じ、特にピア・ロールプレイ演習がコミュニケーション能力向上に有効と評価された。ピア・ロールプレイ演習の効果として、農家とのやりとりを想定したイメージトレーニングが可能となり、実践的なコミュニケーションスキルの向上が期待される。また、ロールプレイ後にフィードバックを受けることで自己の課題を客観的に把握し、改善につなげる機会となった。

今後はマニュアルの配布、シナリオの充実と研修の拡充を図り、職員が自主的に演習できる環境を整えることで、継続的なスキル向上を目指す。

はじめに

家畜保健衛生所（以下、家保）職員が農場を訪問し、農家から情報を聞きとり、指導する際には、農家と信頼関係を構築し、良好なコミュニケーションを取ることが重要となる。新たに家保に勤務する職員（以下、新採職員）を対象に事前調査を行ったところ、農場における飼養衛生管理基準等の指導において、「専門用語がわからない」、「飼養技術などの話が十分にできない」といったテクニカルスキルの課題に加え、「農家との意思疎通が困難」、「伝えたいことが伝わったか不安」、「信頼関係の構築が難しい」などコミュニケーションスキルに関する課題があった。

そこで、新規職員家畜衛生研修会（以下、新採研修）において、実践的なコミュニケーションスキルの向上と農家との信頼関係構築の促進を目的に、ピア・ロールプレイを取り入れたコミュニケーション研修を実施したので、その概要を報告する。

材料と方法

新採研修は、毎年家保に初めて配属された職員（以下、新採職員）を対象に、病性鑑定技術向上を目的として実施される5日間の研修会である。令和6年度新採研修は、4名の職員を対象に令和6年7月に開催された。こ

のうち、90分間を実践的なコミュニケーションスキルの向上並びに農家との信頼関係構築促進のための研修に充てた。

1) 研修方法

研修は、3部構成とし、コミュニケーションスキルの講義、獣医師と農家のデモンストレーション、ピア・ロールプレイ演習を行った

a. コミュニケーションスキルの講義

本講義では、相手の話をしっかり聞く「傾聴の重要性」、農家の立場を理解する「共感と寄り添い」、専門用語をわかりやすく説明するなど「明確な伝達」、話す時の態度など、「ノンバーバル（非言語）コミュニケーション」の重要性等について講義を行った。

b. 獣医師と農家のデモンストレーション

榎戸[1]は、獣医師が農家に共感しながら会話する重要性を示している。本研修では、これを参考に、ある養豚場で起きた病気に対する、2通りの獣医師の対応を実演し、コミュニケーションの課題を考察した。

デモンストレーションでは、養豚農家が、豚の呼吸器症状に困り獣医師の診療を受けるシーンで、農家は獣医師の診断とは別の病気を疑っていた。いずれの場合も獣医師は同じ診断をし、同じ対処の指示をしたが、伝え方が異なっていた。

獣医師 A は、農家の言葉を否定し、一方的な意見を押し付けた。一方、獣医師 B は、農家の考えに共感したうえで、自身の診断内容をわかりやすく伝えた。いずれも、同じ診断、同じ対応を指示した。

受講者は、2通りの獣医師の対応を比較し、どのような点が良いのか、また悪い対応には、どのような課題があるかなどを考察した。

c. ピア・ロールプレイ演習

ピア・ロールプレイとは、職員同士が役割を分担しロールプレイを行うもので、会議室等で、実際の業務場面を模擬体験する(図1)もので、家保役と農家役に分かれ「飼養衛生管理基準の確認」をテーマに、設定されたシナリオに基づいて演習を実施した。(表1)

なお、観察者には、受講生外の職員2名も加わった。

今回、酪農場及び養鶏場における飼養衛生管理基準の確認に関する2つのシナリオを用いて実施した。

表1 ピア・ロールプレイ演習の実施方法

- ① 役割分担：家保職員役、農家役、観察者
- ② シナリオの読み込み
- ③ ピア・ロールプレイの実施（約7分）
- ④ フィードバックと意見交換



図1 ピア・ロールプレイ演習

シナリオは、家保役、農家役、観察者全てに配布される共通事項(農場情報等)に加え、農家役のシナリオには、「1か月ほど前に、外

国の飼料会社関係者が農場を訪問し、試供品のサプリメントが提供され、試しに使ってみた・・・」など秘密の内容が記載されている。

なお、ピア・ロールプレイ演習については、後日、家保経験3年目以上の経験職員2名についても実施した。経験職員のピア・ロールプレイ時には観察者は受講生以外の職員のみ2名が参加した。

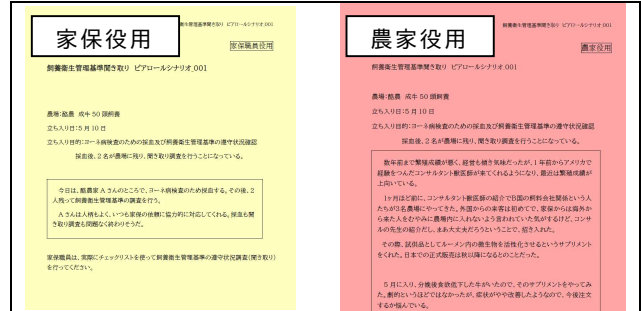


図2 ピア・ロールプレイ演習シナリオ

2) 評価方法

研修の評価は、新採研修受講生4名を対象に、研修の理解度、満足度、今後の研修継続の必要性について、アンケートを実施した。

また、ピア・ロールプレイ演習の評価は、新採研修受講生4名、経験職員2名に加え、観察者役の職員2名を含め、農家役及び観察者から、家保役へのフィードバックを行った。

あわせて、ピア・ロール演習に参加した職員に、ピア・ロールプレイ演習に関するアンケートを実施した。

結果と考察

1) 研修全体の評価

新採研修に対するアンケートの結果、理解度、満足度は、全員が「概ね理解した」、「大変満足した」と回答した。実施時間については、「適切だった」が3名、「もっと長い方が良い」が1名だった。今後の実施については、全員が「是非やるべき」と回答し、また、新採職員以外への本研修の実施については、「是非やるべき」が2名、「やってもよい」が2名だった。

2) ピア・ロールプレイ演習の評価

a. 農家役、観察者からのフィードバック

新採研修でのピア・ロールプレイ演習後、農家役から家保役へのフィードバックでは、話しやすい雰囲気、分かりやすい丁寧な言葉遣い、農家に対するねぎらいがあった等のコメントがあった。観察者からは、あいづち、

復唱、笑顔、アイコンタクトができていた、ねぎらいの言葉があった等に加え、わからないことをわからないと伝えていた、曖昧な答えについては聞き直し明確化していた等さらに客観的なコメントがあった。

一方、改善点として、農家役から、質問の意図が示されると答えやすい、迷っている様子がうかがわれる等があり、観察者からは、質問が連続すると、追いつまれている感じがするので多少の雑談が入ってもよいというアドバイスがあった。

経験職員の演習では、農家役から、とても話しやすかった、質問が簡潔でスムーズだった、観察者から、丁寧な言葉遣い、農家に対する労いの言葉、専門用語を分かりやすい言葉に変換していた、なぜ対策が必要なのかの説明があった、病性鑑定への誘導ができていた等のフィードバックがあった。

改善点については、農家役から、会話がやや業務的だった、言いたくないことを隠し通すことができた。観察者からは、少し迷っている様子だった等だった。

農家役、観察者から家保役へのフィードバックの要点をまとめると、新採職員では、親しみやすいコミュニケーション、わかりやすい伝え方、積極的な情報収集と指導という評価だった。経験職員には、明確で効果的な伝達、的確な指示と問題解決への誘導という評価だった。

b. ピアロールプレイ演習アンケート

新採職員4名及び経験職員2名に対する、ピア・ロールプレイ演習評価のためのアンケートでは、飼養衛生管理基準遵守状況の確認において、ピア・ロールプレイの体験効果は、「大いに役立つ」5名、「役立つこともある」1名で、「役立たない」と回答した人はいなかった。

ピア・ロールプレイ演習の効果(表2)として、農家とのやりとりイメージトレーニングができる、コミュニケーションスキルの向上につながる、農家に寄り添うことの気づきがある、他人からフィードバックが得られること等であった。

木村[2]は、ピア・ロールプレイ演習を取り入れることで、獣医学教育における、コミュニケーション能力向上のための手段としている。さらに、柴田[3]は、農家保におけるピア・ロールプレイ演習の成果として、農家役を演

じた際に、こんな聴き方をされたら答えたくなくなるとか、こんな風に聞かれれば答えだだろうと気づくことと述べている。本研修においても、農家とのやりとりイメージトレーニングができる、農家に寄り添うことの気づきがある等、同様な効果が得られると考えられた。

表2 ピア・ロールプレイ演習の効果

-
- ・農家とのやりとりイメージトレーニング
 - ・コミュニケーションスキルの向上
 - ・農家に寄り添うことの気づき
 - ・他人からフィードバック
-

3) 課題

本研修の課題として、ピア・ロール演習をはじめ、コミュニケーション研修では、専門知識の強化等テクニカルスキルの向上には直接つながらない。そのため、技術研修とあわせて実施することが必要となる。

また、1年間に90分間、1回のみという時間の制約があること、現時点では、ピア・ロール演習用のシナリオが2つと少ないため研修の限界がある。

4) 今後の展望

現時点では2つしかシナリオがないが、今後は、多様なシナリオを作成するとともに、新採研修以外にも対応できる研修プログラムの充実を図っていきたい。また、新採研修内のみでは限界があるため、ピアロール演習用のマニュアル及びシナリオを配布し、いつでもどこでも演習可能とし、同時に新たなシナリオを提案してもらい、演習の機会を増やす等フォローアップ体制の構築をしていく必要がある。

5) 結論

新採研修におけるコミュニケーション研修は、農場における円滑なコミュニケーションを促進し、飼養衛生管理基準指導等業務に有効と考えられた。

今後も、職員のテクニカルスキルの向上と同時にコミュニケーションスキルの向上を図っていく。

参考文献

- [1] 榎戸利恵: 共感 ～自発的な行動を生み出すあり方とは～, 臨床獣医, 27, 7, 54-55 (2009)
- [2] 木村祐哉: ピア・ロールプレイによる獣医学生の診療コミュニケーション実習, 北海道獣医師会雑誌 53, 5, 10, -13 (2009)
- [3] 柴田正志: 家畜保健衛生所の業務で必要となるコミュニケーションスキル, 日獣会誌, 75, 4, 150-153 (2022)

6 農場における消石灰による消毒効果の確認及び効果の持続方法の検討

(第2報)

東部家畜保健衛生所

○杉山 愛実、田島 朋世

要 約

消石灰は、安価で、有機物が存在する中でも消毒効果が低下しにくい利点を持つ、汎用性の高い消毒薬である。昨年(令和5年)の第1報の結果から、消石灰表層は環境の影響を受けやすく、鳥インフルエンザウイルスに対して消毒効果のある pH11 以上を維持できる期間は、7日間より短いと考えられた[1]。そこで今回、管内養鶏場及び養豚場で季節、消石灰の形状の違いによる消毒効果持続時間を調査し、同時に消石灰の使用方法のアンケート調査を実施した。消毒効果持続時間は、3試験区の消石灰表層 pH 指示薬による呈色確認及び全層 pH 測定結果を比較した。消石灰と飛散防止消石灰との比較では飛散防止消石灰の方が、表層及び全層 pH の持続時間が長く、待ち受け消毒として有用と考えられた。アンケート調査は、77戸に実施し、農家が予想する消毒効果持続時間は本試験の結果と差はない4日から7日程度が最も多かったが、実際に散布している頻度は1か月に1回である農家が最も多かった。今後、消石灰の消毒効果が持続する散布方法の周知や消石灰表層の消毒効果の確認ができるよう促すことで消石灰の散布頻度を上げ、農家自らが農場を守り、高病原性鳥インフルエンザや豚熱等の伝染病の発生リスクの低減に繋がると考えられる。

はじめに

消石灰は、安価で、有機物が存在する中でも消毒効果が低下しにくい利点を持つ、汎用性の高い消毒薬である。消石灰の主成分である水酸化 Ca は pH12 以上の強アルカリ性を示すが、雨や時間経過とともに二酸化炭素と反応することで pH8 程度である弱アルカリ性の炭酸 Ca へと変化する[2]。対象とする病原体の種類によって有効 pH は異なるが、鳥インフルエンザウイルスは pH11 程度で失活するとの報告があるため、養鶏場で使用する場合は強アルカリ性を維持する必要がある[3]。

豚熱ウイルスについても pH に対しては抵抗性で pH5~10 では比較的安定であるが、酸性や強アルカリ域では不安定である。養豚場で消石灰を使用する場合も強アルカリ性を維持する必要がある[4]。

昨年(令和5年)の第1報の結果から、消石灰表層は環境の影響を受けやすく、鳥インフルエンザウイルスに対して消毒効果のある pH11 以上を維持できる期間は、7日間より短いと考えられた[1]。今回、管内 A 養鶏場及び B 養豚場において、季節、消石灰の形状の違いにより

持続時間に変化があるか調査した。また、養鶏場及び養豚場における消石灰散布方法の実態を知るため、アンケート調査したので報告する。

材料と方法

消石灰の消毒効果持続時間の検証は、散布時期、消石灰の形状が異なる3試験区で行い、アンケート調査は、養鶏場及び養豚場に対し、pH 指示薬のサンプル配布と併せて、調査した。

1) 試験区の設定

各試験区に散布する量は、 $1\text{kg}/\text{m}^2$ とし、試験区の面積、形状は 20m^2 の長方形とした。さらに、試験区内に $50\text{cm}\times 50\text{cm}$ (2500cm^2) の区画を作成し、試験区内の消石灰が均一になるよう、散布機で散布した。

消石灰の変化を異なる季節で比較するために試験区 1(A 養鶏場)及び 2(B 養豚場)を設定し、消石灰の種類による変化を同一期間で比較するために、試験区 2 及び 3(B 養豚場)を設定した。

試験期間は試験区 1 では令和 6 年 2 月 27

日から14日間とし、試験区2及び3では、令和6年10月10日から14日間とした。

各試験区の気象環境は、A養鶏場とB養豚場付近の測候所のデータを参考とした。試験区1は降水量の合計が14mm、平均気温が4℃、平均湿度が14%であった。試験区2及び3は降水量の合計が77mm、平均気温が20度、平均湿度が75%であった。なお、気象データは気象庁ホームページを参考とした。散布した消石灰は、試験区1及び2は消毒用として汎用されている消石灰、試験区3は消石灰より粒子が小さく、比重の重い、飛散防止消石灰をそれぞれ散布した。(表1)

表1 試験区の設定

試験区	1	2	3
農場	養鶏場	養豚場	養豚場
平均気温	4℃	20℃	20℃
消石灰種類	消石灰	消石灰	飛散防止消石灰
粒子大きさ	大	大	小
比重	軽	軽	重

2) 表層の評価

pH指示薬はpH11を境に呈色が変わるもの(青: >pH11、黄: pH9~11、赤: <pH9)を用い、呈色の確認した。呈色の結果に応じて、表層の有効性をスコア4~0の5段階で評価した(表2)。

表2 pH指示薬によるスコア判定基準

スコア	4	3	2	1	0
pH	>11		11~9		<9
呈色	青	青・黄混在	黄	黄・赤混在	赤

測定は、1日1回、日中に実施した。試験期間中、滴下する場所が重複しないよう、異なる区画で測定した。作成した区画に、1試験区につき、ランダムに3区画へ試薬を3回滴下し、呈色を確認した(写真1)。

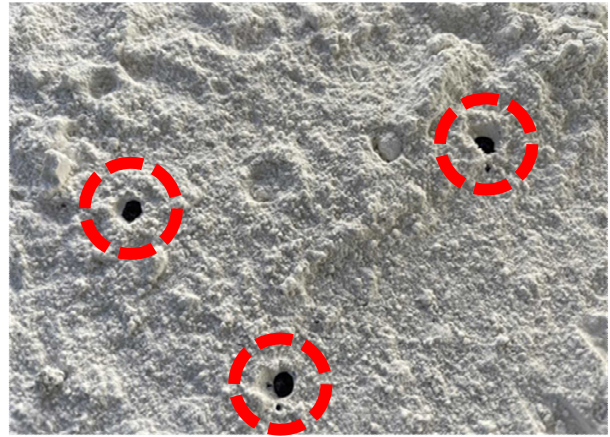


写真1 pH指示薬による消石灰表層のpH測定

全層の評価

消石灰全層のpH測定は、消石灰表層のpH指示薬による呈色を確認した区画と同じ区画の消石灰を全層を採取した。採取量は一区画10cm³、3区画から採取した。採取した消石灰は、混和後、精製水に溶かし、1%懸濁液を作成した。pH測定器で2回測定し、数値の平均を試験区ごとに比較した(図1)。

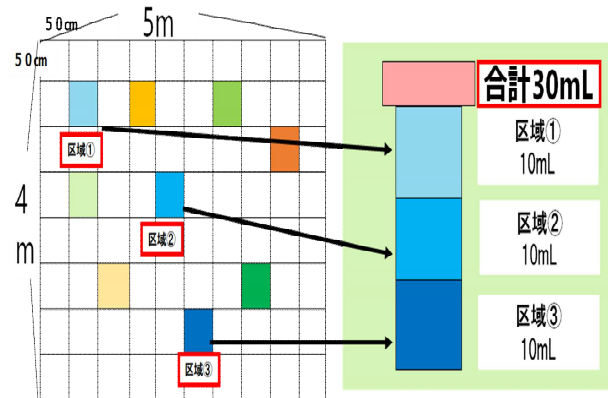


図1 全層の評価

4) アンケート調査

アンケート調査は、管内養鶏場及び養豚場計77戸に対し、本試験で使用したpH指示薬のサンプル配布と併せて、散布の有無、散布頻度、降雨がないと仮定した場合の消毒効果持続時間予想を調査した。

成績

消石灰表層のpH指示薬による呈色は、消石灰散布後、試験区1は2日目、試験区2は4日目、試験区3は8日目までスコア4の青色

を維持した(図2)。消石灰全層の pH の推移は試験区 1 は 11 日目、試験区 2 は 10 日目、試験区 3 は 13 日目まで pH11 以上を維持した(図3)。

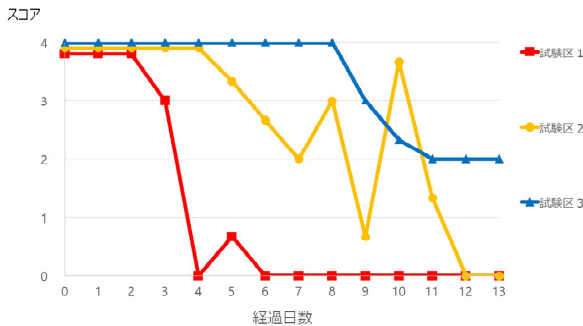


図2 消石灰表層スコアの推移

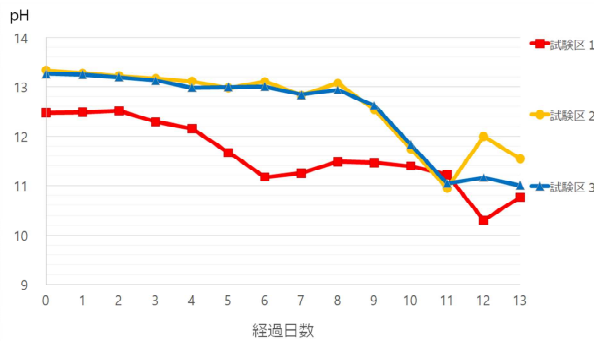


図3 消石灰全層の pH の推移

試験区 1 及び 2 は、異なる季節で調査を行ったが、表層の青色を呈した日数の差は 2 日間、全層が pH11 以上を示した持続時間の差は 1 日間のみであった。試験区 2 及び 3 は、異なる種類の消石灰を散布し、同じ農場、同じ期間に調査を行なったが、飛散防止消石灰は、表層の青色を呈した日数が 4 日間長く、全層の pH の持続時間が 3 日間長い結果となった。

アンケート調査では、対象農家の 57 戸 (74%) から回答を得た。消石灰の散布頻度は 1 か月に 1 度散布する農家が 57 戸中 14 戸 (27%) あり最も多かった(図4)。消石灰の消毒効果持続時間は 4 日～7 日程度であると予想する農家が 57 戸中 30 戸 (59%) あり、最も多い結果となった(図5)。

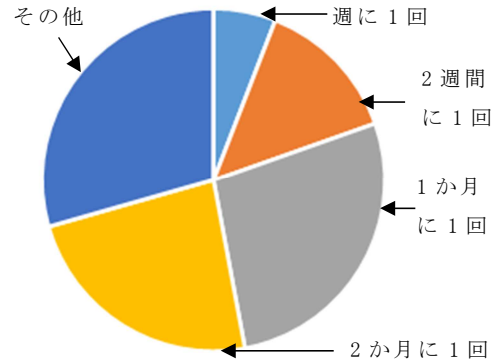


図4 消石灰の散布頻度

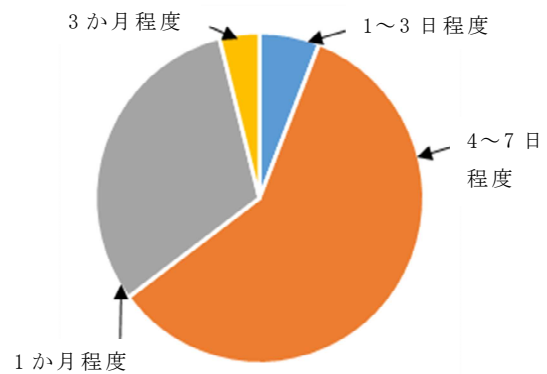


図5 消石灰散布後、降雨がないと仮定した場合の効果持続日数予測

考 察

消石灰では季節が消石灰表層に及ぼす影響は少ないこと、飛散防止消石灰の方が、表層の pH が高いことで効果を発揮する待ち受け消毒として有用である可能性が考えられた。

アンケート調査から、農家が予想する消毒効果持続時間は本試験の結果と乖離はないが、実際に散布している頻度は本試験との乖離があった。この原因として、1kg/m²の条件で消石灰の散布を実施した場合の作業負担の高さや、本県の農場での高病原性鳥インフルエンザや豚熱の発生が今までなかったことで、農家の警戒感が低下していると思われる。

今後、消石灰の消毒効果が持続する散布頻度、消石灰の種類を農家へ周知すること、消石灰の消毒効果持続時間は農家の考える通り 7 日以内であることを農場に伝達する。

また、農家が実際の消石灰散布場所で、消石灰表層の呈色により消毒効果が維持できているかを検証し、効果的、効率的な消石灰散布を実施することができるよう促すことで、

消石灰の散布頻度を上げ、農家自らが農場を守り、高病原性鳥インフルエンザや豚熱等の伝染病の発生リスクの低減に繋がると考えられる。

参考文献

- [1] 渡部志歩、田崎常義：養鶏場における消石灰による消毒効果の確認及び効果の持続方法の検討, 第 65 回静岡県家畜保健衛生所業績発表会集録(2), 6-8(2023)
- [2] 大久保喜美, 東條秀徳：消石灰による「待ち受け消毒」効果の検証, 鶏病研究会報, 45 巻 2 号, 84-90 (2019)
- [3] Muhammad Akbar Shahid, Muhammad Abubakar , Sajid Hamed , Shamsul Hassan : Avian influenza virus (H5N1);effects of physico-chemical factors on its survival , Virology Journal, 6:38 (2009)
- [4] Blome S, Staubach C, Henke J, Carlson J, Beer M : Classical Swine Fever — An Updated Review, Viruses 9:86(2017)

7 管内酪農場で発生した牛ボツリヌス症

東部家畜保健衛生所
○久保山 雪子、柴田 有紀美

要 約

令和6年7月、管内A酪農場において、突然の起立不能と呼吸麻痺を呈し急死する牛が多発し、発症から12日間で飼養牛98頭中74頭（全体の76%）が死亡した。当初、熱中症を疑うが、発生状況から、県内初の牛ボツリヌス症発生の疑いが強まったため、病性鑑定を実施した。毒素検査と同時並行で農場全体の消毒、牛ボツリヌス症に関する講習会を企画した。検査の結果、牛床敷料、直腸便及びオガコからボツリヌス菌D型毒素遺伝子を検出した。更に、マウス接種法により、ボツリヌスD型菌による牛ボツリヌス症と診断された。また、農場消毒効果をみる環境調査の結果、消毒実施場所から毒素遺伝子は検出されなかった。死亡牛の発生状況から、TMR飼料汚染による食中毒型の牛ボツリヌス症と推察されたが、汚染原因は特定できなかった。発生直後の講習会により、地域における本症の周知及びワクチン接種等対策が促進された。本症は、起立不能から死亡への転帰が早く、自給飼料を作る農場は集団発生するリスクを関係者が再認識した事例となった。草地型酪農が盛んな本地域では、地域全体で発生防止対策を継続することが重要と考察した。

はじめに

ボツリヌス症は、ボツリヌス菌（*Clostridium botulinum*）が産生するボツリヌス神経毒素によって起こる、神経麻痺性の疾病である。本菌は、芽胞を形成するグラム陽性偏性嫌気性桿菌で、抗原性の違いにより、A～G型までの7型が知られている[1]。また、芽胞の形で自然界に広く分布し、酸素があると発育できないが、条件が整うと増殖して毒素を産生する[2]。牛ボツリヌス症は、主としてC及びD型菌により起こり、毒素に汚染された変敗サイレージや芽胞を含む小動物の死骸などが混入した餌を牛が摂取することによって発症する[2, 3]。経口摂取した牛は、後軀麻痺、起立不能などの弛緩性麻痺を起こし、呼吸困難に陥り死亡する[4]。

今回、県内初の牛ボツリヌス症が発生、A酪農場にて突然の起立不能を呈し、急死する牛が多発した。発症からわずか12日間で飼養牛98頭中74頭（全体の76%）が死亡するという、甚大な被害が発生したので報告する。

材料と方法

1) 発生の経緯

発生農場は、搾乳牛53頭、乾乳・育成牛等45頭、計98頭を飼養していた(図1)。給与飼料は、自家製TMR飼料で、濃厚飼料、自

家製サイレージ、ビール粕、おから、ビートパルプ、添加剤で構成されていた。飼料は、毎日夕方に調整し、当日の夕方と翌朝に給与していた。

令和6年7月26日、管理獣医師から、熱中症と疑われる症状で死亡牛増加の通報があったため、病性鑑定を実施した。立入時、発症牛は搾乳牛舎に限局して発生、起立不能を呈し、一部の牛では腹式呼吸が認められた(写真1)。管理獣医師の熱中症の対症療法に反応を示さず、また、畜主は牛体を水で濡らし、冷却を試みていたが、起立不能を呈する牛が増加していった。

検査の結果、発症牛の体温及びヘマトクリット値は正常範囲内、血液検査も共通した異状所見は認められなかった。臨床所見や発生場所に規則性がなかったことから、監視伝染病の疑いがないと判断、経過観察を指示した。

その後、搾乳牛で起立不能に続く死亡が相次ぎ、牛ボツリヌス症が強く疑われたため、7月29日、再度病性鑑定のため立入した(表1)。

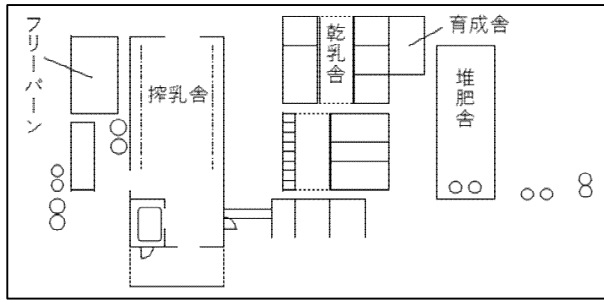


図1 農場全体図

表1 対応の経緯

月 日	死亡牛	稟告	家保判断
7・25	搾乳牛 4頭	熱中症疑い	—
7.26 (通報)	7頭	・40℃の発熱 ・起立不能 ・腹式呼吸	病性鑑定① →経過観察指示
7・27	累計 20頭 以上	起立不能に 続く死亡	ボツリヌス症疑い →対策指示
7・29			病性鑑定②



写真1 発症牛(7月26日撮影)

2) 病性鑑定

発生前53頭いた搾乳牛は、3日後には生存牛5頭のみとなり、うち4頭が起立不能、腹式呼吸、流涎を呈していた(写真2,3)。生存牛5頭すべての体温測定、血液及び直腸便を採取した。また、発症牛1頭を解剖、細菌学的検査・病理組織学的検査に供した。毒素検査のため、飼料、牛床敷料等についても採取し、直腸便3検体及びTMR飼料1検体を大阪公立大学大学院に送付、マウス接種法による確定診断を依頼した。

また、類似疾病として、集団突然死の原因となる硝酸塩中毒の検査を目的に、TMR飼料及びサイレージを材料として、硝酸態窒素濃度を測定した。



写真2 搾乳舎の様子(左:7月26日、右:7月29日)



写真3 発症牛・死亡牛(7月29日撮影)

3) まん延防止策

a. 農場消毒

続発防止のため確定診断前に、7月31日及び8月2日の2日間で農場全体の緊急消毒を実施した。消毒薬は、比較的有機物による効力低下が少なく、芽胞菌に有効なアルデヒド系消毒薬を使用した。

また、消毒効果をみるため、8月15日、農場環境の拭取り検査を実施した。検査材料は、牛床敷料(オガコ)、TMR飼料構成材料、TMRミキサー、各牛舎の飼槽、水槽、牛床、壁、飼料タンク等、計58検体とした。更に、8月28日、2回目の農場消毒を行った。

b. サイレージの調整・管理

聞き取りから、飼料中のサイレージは、シカの腐敗死体があった草地から採取したロットへ、7月半ばから切替え途中であったことがわかったため、当該草地から採取されたサイレージは、焼却処分するよう指導した(写真4)。

また、サイレージ2検体を畜産技術研究所に送付、pHや水分含量の測定を依頼し、結果を元にサイレージの調製方法について、助言を仰いだ。



写真4 汚染疑いサイレージと焼却処分

c. 講習会開催

管内農家から本症に対する問合せが多く寄せられていたことから、発生農家の風評被害防止や地域一体となった対策を目的として、確定診断3日後の8月8日、牛ボツリヌス症の概要（原因菌、症状、予防法）、本事例の発生状況や農場で実施した対策及び飼養衛生管理上の対策について、講習会を開催した。

更に、12月13日には、外部機関から講師を招いて、本症の発生状況及び草地管理について、2回目の講習会を開催した。

成 績

1) 病性鑑定結果

a. 臨床検査

病性鑑定の結果、発症牛4頭から採取した血液所見に異常はなく、起立不能に起因すると思われるアスパラギン酸トランスアミナーゼ(GOT)の値のみ上昇した(表2, 3)。

表2 血液検査結果

検体番号	体温(°C)	WBC(×102/ μ l)	RBC(×104/ μ l)	HCT(%)	LYM(%)
1	39.1	289	819	37.9	66.4
2	38.5	99	777	37.2	30.4
3	39.5	95	959	50.8	71.0
4	39.8	90	589	31.6	28.5
5	38	396	596	29.4	87

表3 血液生化学検査結果

検体番号	BUN(mg/dl)	ALB(g/dl)	GOT(U/L)	IP(mg/dl)
1	15.4	4.0	236	7.9
2	18.5	3.9	104	3.7
3	12.5	4.4	980	6.4
4	6.6	3.7	648	5.7
5	20.0	3.7	68	7.0

b. 病理組織学的検査及び細菌学的検査

解剖所見では、臓器に異常を認めず、病理組織においても著変は認められなかった。

また、全ての臓器から有意菌は分離されず、突然死を引き起こす牛クロストリジウム・パーフリンジェンス感染症は否定された。

c. 毒素検査・毒素型別

直腸便、牛床敷料及びオガコからボツリヌス菌D型毒素遺伝子が検出された。

マウス接種法により、直腸便2検体の増菌培養液を腹腔内に接種したマウスは発症して6時間以内に死亡したことから、ボツリヌス毒素陽性と判定された。更に、毒素中和法により、ボツリヌス抗D型抗毒素で毒素が完全に中和したことから、8月5日、ボツリヌスD型菌による牛ボツリヌス症と診断された(表4)。

表4 毒素型別(毒素中和法)結果

材料	試験区分	結果
直腸便1	コントロール	死亡
	C型	発症
	D型	生存
直腸便3	コントロール	死亡
	C型	死亡
	D型	生存

d. 飼料分析結果(硝酸態窒素濃度)

TMR飼料及びサイレージの硝酸態窒素濃度を調べたところ、乾物換算で、TMR飼料が95ppm、サイレージが79ppmとなり、異常が認められなかったため、硝酸塩中毒は否定された。

2) まん延防止策

a. 農場消毒

農場環境拭取り検査の結果、58検体中、搾乳舎脇のカート内に残っていたオガコのみからボツリヌス菌D型毒素遺伝子が検出されたが、未使用のオガコからは検出されなかった。その他、消毒実施場所からボツリヌス菌遺伝子は検出されなかった(写真5, 表5)。



写真5 左：採材の様子、右：カート

表5 農場環境拭取り検査結果
(ボツリヌス菌D型毒素遺伝子の検出)

採材場所	検査結果
牛床敷料 オガコ(カート内)	+
オガコ(未使用)	-
TMR 飼料構成材料	-
TMR ミキサ-	-
飼槽	-
水槽	-
牛床	-
壁	-
飼料タンク	-

※計 58 検体

b. サイレージの調整・管理

分析の結果、サイレージは、pH5.0を越えており、水分含量も低いため、発酵が促進し難い状態であった。これは、予乾により水分が低くなり、乳酸菌の活性が低下し、pHが下がらなかったことが原因と思われた(表6)。

これを受け、畜産技術研究所からは、ロールの調整時に土壌を拾わないよう高刈りをする事、pHを下げるために乳酸菌等調整剤を添加するよう助言があった。

表6 サイレージの分析結果

検体	水分(%)	pH
サイレージ1	37.1	5.4
サイレージ2	16.4	6.0
適正值	60%以上	4.6以下

c. 講習会開催

一回目の講習会は、農家を中心に畜産関係者73名が参加し、活発な質疑応答がなされた(写真6)。また、講習会終了後、市役所から、ワクチン接種助成の案内があった。

その後、発生地域のボツリヌスワクチンの接種率が高まった(表7)。

2回目の講習会では、発生地域での効果的なワクチン接種事例及びサイレージ作りの注意点について紹介があった。



写真6 講習会の風景

表7 ボツリヌスワクチン接種実績※

月	戸数(戸)	頭数(頭)
8月	28	1,398
9月	22	704

※市役所提供

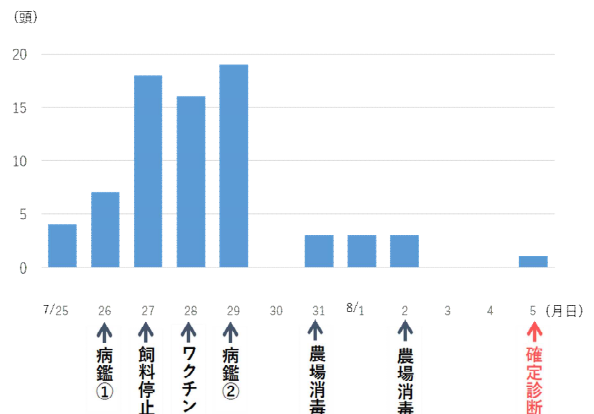


図2 死亡牛発生頭数の推移

考 察

近年、牛ボツリヌス症は、全国的に集団発生が相次ぎ、注目されているが、本県ではこれまで病性鑑定事例として対応したことがなかった。通報当時、連日外気温が35度を超える猛暑が続き、発症牛が発熱していたと連絡を受けたことから、当初は熱中症を強く疑っていた。今回の事例から、本症は、起立不能から死亡する転帰が早く、自給飼料を作る農場では集団発生するリスクがあり、ひとたび発生すれば甚大な被害をもたらす疾病であると、関係者が再認識する大きな転機となった(図2)。

ボツリヌス菌は土壌中に広く分布し、牛はごく微量の毒素でも発症するため、土壌中の本菌が飼料とともに摂取、あるいはカラスなどの野鳥により牛舎内に持ち込まれて牛が摂取して発症することが報告されている[4]。また、欧州ではサイレージの中に混入し斃死した小動物が毒素源になって発生した事例や、サイレージの発酵不全により産生された毒素による中毒が報告されている[3]。

本事例の発生要因として、搾乳舎全体で死亡牛が偏りなく発生したことから、共通で摂取している TMR 飼料に混入したボツリヌス菌が毒素を産生し、集団発生した、食中毒型の事例であると考えられた。

発生後、農場への聞き取りから、TMR 飼料を構成している自家製サイレージが野生動物の死骸による汚染を受けた可能性や、夏場に TMR 飼料を 2 日分程度まとめて作成し、細菌の増殖に有利な環境下にあったこと、また、今年に入ってラップフィルムの素材を変更し、接着不良など不具合を感じていたことが確認された。一方、農場環境拭取り検査では、消毒実施場所の他、TMR の各構成材料及び牛床敷料に使用するオガコ等、牛が直接接触する資材についても検査した。その結果、カート内のオガコからのみボツリヌス菌 D 型毒素遺伝子が検出された。これは、搾乳舎内の通路をカートが何度も往来した過程で、オガコが牛の糞便からの汚染を受けたことが原因と思われる、今回の事例において、明確な汚染経路は特定できなかった。

汚染経路は不明であったものの、本症の発生を防ぐため、自家製サイレージを取り扱う場合には、土が混入しないように高刈りする、pH を下げるために乳酸菌等を添加する、野生動物の死骸や糞便の混入防止に留意する必要がある。聞き取りや飼料分析の結果から、当該農場においても本症を意識した調整を行う必要があると考えられた。

発生直後の講習会開催により、地域農場への本症の周知及び農場でのワクチン接種等、対策意識が向上したと思われた。特に、市役所のワクチン接種助成はワクチン接種率向上の後押しになったと考えられた。

本症は、特定家畜伝染病と異なり、手当金が支払われず、収入が絶たれた上に死亡牛の輸送費等の損害をそのまま被ることになったため、発生農場の経済的・精神的な被害は凶

り知れないものであった。

このような悲劇を二度と繰り返さないため、農場に汚染を持ち込ませないため、飼養衛生管理基準の遵守に加え、草地型酪農が盛んな地域では、地域全体で適正なサイレージの調整及びワクチン接種等対策を継続することを推進し、本症の発生予防に努めていきたい。

参考文献

- [1] ボツリヌス症, 国立感染症研究所 (<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/botulism121207.pdf>)
- [2] 大崎慎人, ボツリヌス症, 家畜疾病図鑑 Web
- [3] 小崎俊司: 23. ボツリヌス症, 牛病学, 第三版, 293-294 (2013)
- [4] 函城悦司: MP アグロジャーナル, No. 6, 12-19 (2011)

8 牛ボツリヌス症と診断した1事例と検査体制の検討

中部家畜保健衛生所
○熊谷 大史郎

要 約

牛ボツリヌス症は、*Clostridium botulinum*が産生するC型及びD型ボツリヌス毒素による疾病である。毒素による神経麻痺により短時間で牛の大量死を引き起こすことがあり、発症牛への有効な治療方法がなく、被害拡大防止のため、迅速診断及び対応が必要となる。しかし、微量の毒素で発症するため、診断に必要な発症牛からの毒素や毒素遺伝子検出自体が難しい。今年度、牛ボツリヌス症と診断できた1事例について検査概要を報告するとともに、検査精度向上のため、今回の事例を基に検査材料や方法について整理し、検査体制を検討した。材料は解剖した発症牛1頭の消化管内容物、発症牛の直腸便、飼料及び敷料を用いた。方法は、検体を前処理後、前処理液を卵黄加GAM寒天培地で培養し、性状の異なるコロニーすべてからDNAを抽出した。また、前処理液を強化クックドミート培地に接種、培養し、培養液をブレインハートインフュージョン培地に継代し培養、培養液からDNAを抽出した。これらを用いて、PCRによるC型及びD型毒素遺伝子検査を実施した。マウス投与による毒素試験および毒素中和試験は大阪公立大学に依頼した。結果は、直接分離培養した牛床敷料、増菌培養した直腸便及び備蓄敷料から、D型ボツリヌス毒素遺伝子が検出され、マウス投与試験では、直腸便からD型毒素が検出されたことから、D型ボツリヌス毒素による牛ボツリヌス症と診断された。また、今回実施した検査を基に検査材料や当所で実施する検査内容を整理し、所内検査プロトコルを作成するとともに、毒素試験及び毒素中和試験を外部機関へ迅速に依頼できるよう、依頼方法について確認し整理した。これらにより、検査精度向上につながり、細菌担当者不在の際も他の職員が検査対応可能となり、迅速診断につながることを期待された。

はじめに

牛ボツリヌス症は、グラム陽性偏性嫌気性の有芽胞桿菌であるボツリヌス菌(*Clostridium botulinum*, 以下Cb)から産生される神経毒素により発症する。Cbは産生する毒素の抗原構造により、A型からG型に分類され、牛は主としてC型及びD型に高感受性である[1]。微量の毒素により発症することから、菌分離、毒素及び毒素遺伝子検出が難しい。症状は、毒素による神経麻痺によって、起立不能、腹式呼吸、突然死などが引き起こされる。短時間で大量死した事例もあり[2]、加えて治療方法がないことから、迅速な診断及び対応が必要となる。

細菌学的検査は、細菌培養、毒素遺伝子検出PCRによる遺伝子検査、マウス投与による毒素試験及び毒素中和試験がある。Cbには毒素遺伝子を保有していても、毒素を産生しない株が存在することから、毒素遺伝子検出のみで確定診断をすることはできないが、検体

が多い場合やマウス投与が困難な場合のスクリーニングとして遺伝子検査は実用的とされている[3]。

今年度、牛ボツリヌス症と診断できた1事例について検査概要を報告するとともに、検査精度向上のため、今回の事例を基に検査材料や方法について整理し、検査体制を検討した。

材料と方法

1) 病性鑑定事例

材料として、臨床症状から牛ボツリヌス症が疑われた乳用牛死亡事例において、解剖した8歳齢のホルスタイン種搾乳牛1頭の消化管内容物(第一胃、第二胃、第三胃、第四胃、空腸、回腸、盲腸)、異なる2日間に採材した起立不能牛5頭の直腸便、飼料(サイレージ2検体、TMRミキサー拭き取り3か所)、オガコ敷料(搾乳牛舎、備蓄各5検体)を用いた。なお、発症までに給与されていた飼料は

すでに廃棄されていたため、検査することができなかった。敷料については、発症牛が多くいた搾乳牛舎内のオガコと、備蓄してあったオガコを検査に用いた。

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門のC型及びD型ボツリヌス症診断プロトコール（以下、動衛研プロトコール）[3]を参考に、以下a～fのとおり検査を実施した。

a. 検体の前処理

材料を乳剤化し、懸濁液を回収した。遠心分離後の上清を再度遠心分離後、沈査を懸濁した。それぞれを表1のとおりプールし、培養した。

表1 材料と培養方法

	材料	培養方法	
		直接	増菌
解剖牛	第一胃内容		
	第二胃内容		
	第三胃内容		P
	第四胃内容		
	空腸内容		
	回腸内容		
	盲腸内容		
起立不能牛	直腸便7/27採材（5頭）	P	P
	直腸便7/29採材（5頭）	P	P
飼料	ラップサイレージ1		P
	ラップサイレージ2		
	TMRミキサー拭取り1		
	TMRミキサー拭取り2		P
	TMRミキサー拭取り3		
敷料	搾乳牛舎オガコ1～5	P	P
	備蓄オガコ1～5	P	P

※P:プール

b. 直接分離培養

前処理液を卵黄加GAM寒天培地に接種し、37℃、2日間嫌気培養後、性状の異なるコロニー26株からDNAを抽出した。

c. 増菌培養

前処理液1検体につき2本の強化クックドミート培地に接種し、うち1本を75℃15分間加熱処理（加熱処理検体）し、残りの加熱していないもの（非加熱処理検体）とともに37℃で4日間の嫌気培養をした。そ

の後、培養上清をブレインハートインフュージョン培地に継代し、37℃、2日間嫌気培養した培養液から、DNAを抽出した。

d. 毒素遺伝子検出

プライマーは、C型、D型ボツリヌス毒素遺伝子検出用プライマー（タカラバイオ）を使用し、PCR試薬はTakara Ex Taq（タカラバイオ）を用いた。なお、PCR反応は、94℃60秒、55℃60秒、72℃60秒を35サイクルで実施した。

e. 病理学的検査

解剖牛の各臓器を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した後、定法に従いパラフィン切片を作製後、ヘマトキシリン・エオジン染色し鏡検した。

f. 毒素試験及び毒素中和試験

毒素試験及び毒素中和試験は大阪公立大学獣医感染症学教室に依頼した。

2) 検査体制の検討

検査に供する検体について、採材部位や採材箇所について検討した。検査内容について、当所で実施する項目と、外部機関に依頼する項目を選別した。当所で実施する検査方法について、動衛研プロトコール[3]を基に、当所で所有している検査機器及び資材を用いたプロトコールを検討した。

成績

1) 病性鑑定結果

直接分離培養した搾乳牛舎オガコ、増菌培養した起立不能牛の直腸便と備蓄オガコから、それぞれD型ボツリヌス毒素遺伝子が検出された。なお、C型ボツリヌス毒素遺伝子は検出されなかった(表2)。毒素試験及び毒素中和試験では、7月29日に採材した直腸便からD型ボツリヌス毒素が検出された。病理学的検査では、肉眼および組織所見に著変は認められなかった。以上のことから、本症例を牛ボツリヌス症と診断した。

表2 遺伝子検査

材料	培養方法			
	直接	増菌		
		非加熱	加熱	
起立不能牛	直腸便7/27採材（5頭）	-	-	-
	直腸便7/29採材（5頭）	-	-	+
敷料	搾乳牛舎オガコ1～5	+	-	-
	備蓄オガコ1～5	-	+	-

2) 検査体制の検討結果

検査に供する材料について、牛ボツリヌス症は経口摂取したCbから消化管内で放出された毒素や、毒素を直接経口摂取したことで発症することから、解剖牛の各消化管内容物、発症牛の直腸便に加え、発症時に給与されていた飼料や水も採材すると設定し、必要量は約50gとした。この他、Cb保菌カラスの糞便が原因と考えられる事例[4、5]もあることから、農場内の野鳥糞便もあれば採材することとした(表3)。

表3 材料一覧

○検査材料(各50g)

解剖牛	各消化管内容物
発症牛	直腸便
飼料、水	発症時に給与されていたもの
その他	野鳥糞便(特にカラス)

※50gでなくてよい

※採材後は冷蔵保存

ボツリヌス症の診断に係る細菌学的検査項目は大きく分けると、細菌培養、毒素遺伝子検出、毒素試験、毒素中和試験の4項目ある。このうち当所で実施する検査を、細菌培養と毒素遺伝子検出とした。毒素試験及び毒素中和試験を外部機関へ依頼するように設定し、依頼者や検体送付方法といった依頼方法を整理した。

以上、整理した検査材料と検査項目について、検査プロトコル(図1)を作成した。プロトコルには写真を入れ、実際の手技をイメージしやすく、わかりやすい様にした。

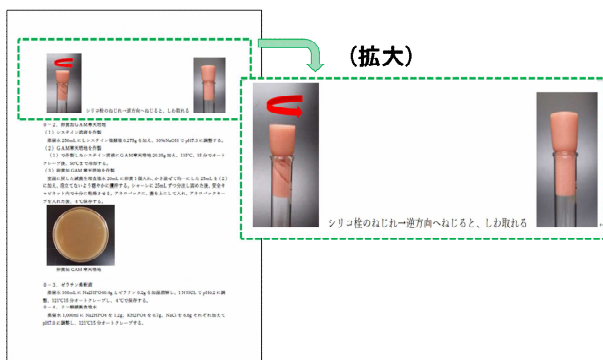


図1 検査プロトコル

また、工程漏れが起きないように、実際の検査時に使用することを想定した工程ごとのチェックリストも合わせて作成した(図2)。

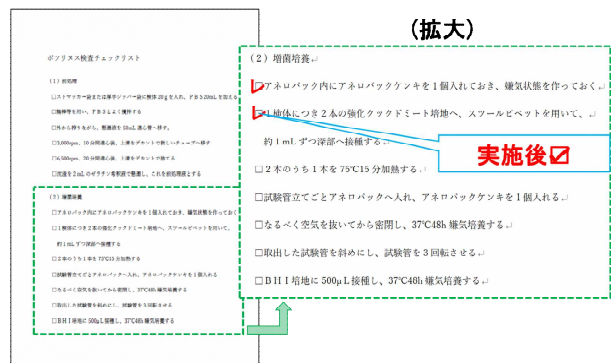


図2 チェックリスト

考察

通常、夾雑菌が多いため、Cbの直接分離は極めて困難と言われている[3]が、今回、直接分離培養したコロニーから毒素遺伝子を検出することができた。これは、検体処理数は増えるが、寒天培地に乳光反応が認められたコロニーすべてを検査したことが要因として考えられた。

増菌培養では、非加熱より加熱処理の方が毒素遺伝子が検出されやすいとされている[3]。今回、備蓄オガコでは、非加熱から検出され、加熱処理検体で検出されなかった。Cbは偏性嫌気性細菌の中でも、酸素への抵抗性が低いことから、強化クックドミート培地に前処理液を接種する際、もしくはブレインハートインフュージョン培地に培養液を接種する際に入ってしまった気泡の影響が考えられた。

検査体制について、今回の牛ボツリヌス症と診断できた事例で実施した検査を基に、所内での検査機器や資材を使用した写真付き検査プロトコル及びチェックリストを作成し、外部機関への検査依頼方法を整理した。所内で実施する検査項目が明確化され、検査手技が明解になったことで、細菌担当職員が不在の場合でも、担当以外の職員が迅速に検査対応可能となった。加えて、検査工程の漏れ防止につながり、検査精度の向上と迅速な対応につながることを期待された。今後は、都度プロトコルを見直し、より良い内容になるように改定してゆく。

謝 辞

ボツリヌス毒素試験及び毒素中和試験を実施していただいた大阪公立大学獣医感染症学教室の幸田知子先生に深謝いたします。

参考文献

- [1] 久保周一郎：ボツリヌス神経毒素の構造と機能，日獣会誌，43，5-11（1990）
- [2] 門脇文生，村上千里，小笠原剛士，河野信嗣，山里比呂志，井上真寛，中村耕太郎：牛ボツリヌス症の集団発生について，日本家畜臨床感染症研究会誌，5，103-108（2010）
- [3] 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 ボツリヌス症診断プロトコール，http://www.naro.affrc.go.jp/niah/disease/bacteria_man/botulinus/index.html
- [4] 田原鈴子，澤田勝志：2009～2014年に岡山県で流行した牛ボツリヌス症の解析と対策，日獣会誌，68，629-633（2015）
- [5] 中尾聡子，奥村尚子，荒木美穂，青木雄也，岩垣つぐみ，上江洲浩一：D/Cモザイク型毒素を産生する *Clostridium botulinum*による牛ボツリヌス症の1例，日獣会誌，76，237-242（2023）

9 牛伝染性リンパ腫ウイルス量測定における核酸抽出省力化の検討

中部家畜保健衛生所
○西島 典子

要 約

牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV) のプロウイルス量 (PVL) 測定において、従来法のスピ
ンカラム法 (カラム法) による核酸抽出の代替として、磁気ビーズを用いた自動核酸抽出法
(ビーズ法) 及び簡易核酸抽出法 (粗抽出法) を検討した。伝播リスクが超低～高に分類さ
れる BLV 陽性牛の EDTA 血を用いて、カラム法の PVL を基準とし、ビーズ法及び粗抽出法の
PVL 測定結果を比較した。また、粗抽出核酸の保存性検証のため、粗抽出当日の PVL を基準と
し、4℃及び-20℃で 37 日目まで保存した際の PVL 測定結果を比較した。検出率はビーズ法が
89.5%、粗抽出法が 91.1%であり、伝播リスク分類の一致率はビーズ法が 87.7%、粗抽出法
が 88.4%であった。カラム法との相関係数は両方法で 0.95 以上となり、強い正の相関が認め
られた。作業時間及び検査費用は粗抽出法で大幅に削減された。また、全ての保存条件の粗
抽出核酸で PVL が検出され、伝播リスク分類の一致率は 37 日目の 4℃条件で 87.5%、-20℃条
件で 100.0%であった。カラム法の代替としてビーズ法及び粗抽出法が有用であり、特に粗抽
出法がより実用的であると考えられた。また、粗抽出核酸の長期保存による PVL の大きな変
化は認められず、少なくとも 1ヶ月程度は冷蔵及び冷凍での保存が可能だと考えられた。

はじめに

地方病性牛伝染性リンパ腫 (EBL) とは、牛伝
染性リンパ腫ウイルス (BLV) の感染によって起
こるリンパ系組織の腫瘍性疾患である [1]。水平
及び垂直伝播により感染が拡大され、特に体内
の BLV プロウイルス量 (PVL) が多い牛ほど伝播
リスクが高いとされる [2-4]。農場での EBL 清浄
化及びまん延防止のためには、陰性牛の確保や
陽転防止が必要である。そのため、PVL に基づ
いて飼養牛の伝播リスクを分類し、PVL が多く
伝播リスクが高い牛 (高リスク牛) を繁殖供用
せずに優先的に淘汰したり、陰性牛から隔離ま
たは間を空けて配置したりすることが推奨され
ている [3-6]。

飼養牛の PVL 測定は、血液から核酸を抽出し、
定量リアルタイム PCR (qPCR) により算出する
方法が一般的である。当所ではスピカラム法
(カラム法) の抽出キットを用いて全血から抽
出しているが、試薬の添加やカラムチューブの
遠心を繰り返す必要があり、作業が煩雑である。
現在、年間約 600 頭の PVL 測定を実施している
ため、現行の核酸抽出方法では検査者の負担が
非常に大きい。一方、近年は各メーカーから自
動核酸抽出装置や簡易核酸抽出試薬が販売され
ており、どちらも獣医療を含む様々な分野で広
く使用されている。自動核酸抽出は検体の前処

理が必要な場合もあるが、基本的に試薬や資材
を装置にセットするだけで自動的に抽出が完了
する。簡易核酸抽出は豚熱の診断にも利用され
ており [7]、試薬と検体を混合後に静置または加
熱や遠心を加えることで抽出が完了する。全て
手作業で実施するカラム法と比較すると、どち
らの方法でも作業時間の短縮や簡便化が可能で
ある。そこで、核酸抽出の省力化を目的として、
磁気ビーズを用いた自動核酸抽出法 (ビーズ法)
及び簡易核酸抽出法 (粗抽出法) を利用した PVL
測定について検討した。

材料と方法

1) 核酸抽出方法の比較

令和 5 年 5~12 月に県内 6 農場から採材した
牛の EDTA 加血液 573 検体を用いて、カラム法
の抽出キット (QIAamp DNA Mini Kit、キアゲン)
により全血 200 μ l から核酸を抽出し、BLV の
PVL を測定した。PVL 測定は、*pol* 遺伝子を標的
とした検査キット (Bovine Leukemia Virus
qPCR Detection Kit (with ROX Reference Dye)、
タカラバイオ) を用いて、農研機構動物衛生研
究部門から配布された qPCR マニュアル [8] に準
じて実施した。BLV 遺伝子と宿主遺伝子を定量
し、10 万細胞あたりの BLV コピー数
(copies/ 10^5 cells) として PVL を算出した。

qPCR 装置は Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)、解析ソフトは 7500 Software v2.3 を使用した。西森らの報告[9]に準じて伝播リスクを分類し(表 1)、BLV 抗体陽性かつ BLV 遺伝子が検出限界以下(非検出)の 14 検体、伝播リスクが超低の 34 検体(2.5 ~ 598.3 copies/10⁵cells)、低の 20 検体(690.1 ~ 2969.3 copies/10⁵cells)、中の 33 検体(3040.1 ~ 11962.5 copies/10⁵cells)、高の 37 検体(12195.5 ~ 66938.9 copies/10⁵cells)、計 138 検体を選出した。選出した検体は全て 12 ヶ月齢以上のホルスタイン種で、ELISA(牛伝染性リンパ腫エライザキット、ニッポンジーン)にて BLV 抗体陽性を確認した。

表 1 血中 PVL を基にした伝播リスク分類

標的遺伝子	BLV	<i>pol</i>
	宿主	<i>RPPH1</i>
プロウイルス量の計算方法	細胞数で補正	
伝播リスク分類 (copies/10 ⁵ cells)	高	12000 <
	中	3000 ≤ < 12000
	低	600 ≤ < 3000
	超低	< 600

選出した検体からビーズ法及び粗抽出法により核酸を抽出し、上記と同様に PVL を測定した。ビーズ法では、全血 100 μl を滅菌 PBS (-) で 2 倍希釈し、自動核酸抽出装置(KingFisher Duo Prime、Thermo Fisher Scientific)及び抽出試薬(MagMax CORE Nucleic Acid Purification Kit、Thermo Fisher Scientific)により抽出した。粗抽出法では、全血 2 μl を用いて BLV 抵抗性遺伝子検出キット(BLV Resistant Marker Gene Detection Kit、タカラバイオ)の粗抽出試薬(Lysis Buffer R、タカラバイオ)により抽出した。検体は採材から核酸抽出まで -80℃ で保存し、カラム法を含む全ての抽出方法で凍結融解は 1 回のみで統一した。

カラム法による PVL 結果を基準とし、ビーズ法及び粗抽出法の検出率、伝播リスク分類の一致率、相関関係を比較した。また、24 検体から核酸を抽出すると仮定し、その際の作業時間及び検査費用を各抽出方法で比較した。検査費用は試薬費及び資材費の合計として算出した。

2) 粗抽出核酸の保存性検証

令和 6 年 5 月に県内 4 農場から採材した牛の EDTA 加血液 214 検体を用いて、上記 1 と同様にカラム法により核酸を抽出し、BLV の PVL を算出した。検体の伝播リスクを分類し、超低の 2 検体(No. 1, 2: 108.6 ~ 435.6 copies/10⁵cells)、低の 2 検体(No. 3, 4: 1144.7 ~ 2591.6 copies/10⁵cells)、中の 2 検体(No. 5, 6: 5446.1 ~ 10296.6 copies/10⁵cells)、高の 2 検体(No. 7, 8: 15193.5 ~ 20709.8 copies/10⁵cells)、計 8 検体を選出した。

選出した検体から粗抽出法により核酸を抽出し、抽出後の核酸を 4℃ で 3 日、10 日、22 日、37 日間、-20℃ で 3 日、37 日間保存し、各保存条件の PVL を測定した。核酸抽出及び PVL 測定は、上記 1 と同様の試薬及び機器を用いて実施した。粗抽出当日の PVL 測定結果を基準とし、各保存条件の検出率、伝播リスク分類の一致率を比較した。

成績

1) 核酸抽出方法の比較

カラム法の結果を基準とした PVL の検出率は、ビーズ法が 89.5% (111/124 検体)、粗抽出法が 91.1% (113/124 検体)となった。ビーズ法では PVL が 2.5 ~ 67.6 copies/10⁵cells の 13 検体、粗抽出法では PVL が 2.5 ~ 54.8 copies/10⁵cells の 11 検体で非検出となったが、両方法ともに 68 copies/10⁵cells 以上の検体は全て検出された。なお、カラム法で非検出だった 14 検体は、両方法においても同様に非検出であった。

カラム法との伝播リスク分類の一致率は、ビーズ法では伝播リスク超低が 95.8% (46/48 検体、非検出の検体も含む)、低が 75.0% (15/20 検体)、中が 75.8% (25/33 検体)、高が 94.6% (35/37 検体)、全体では 87.7% (121/138 検体)となった(図 1)。粗抽出法では伝播リスク超低が 95.8% (46/48 検体、非検出の検体も含む)、低が 75.0% (15/20 検体)、中が 75.8% (25/33 検体)、高が 97.3% (36/37 検体)、全体では 88.4% (122/138 検体)となった(図 2)。

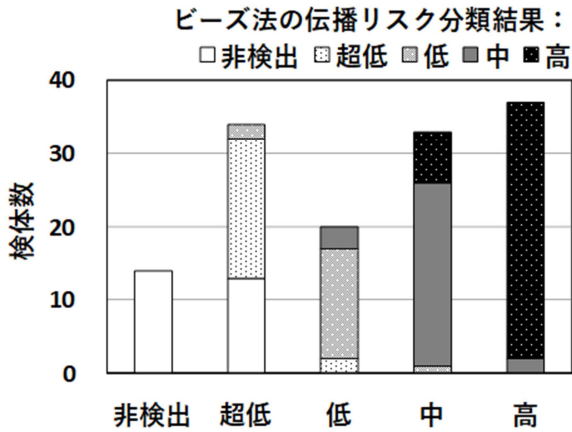


図1 カラム法を基準としたビーズ法の伝播リスク分類結果

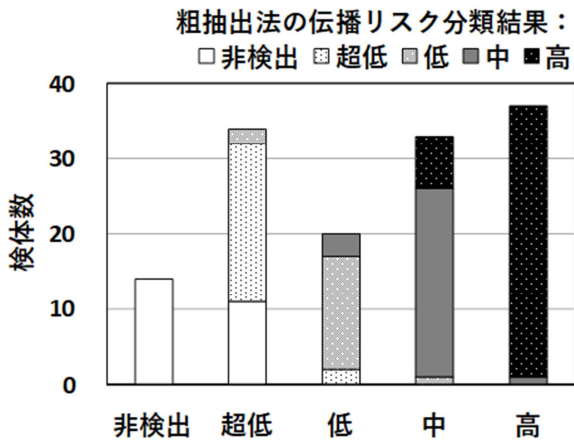


図2 カラム法を基準とした粗抽出法の伝播リスク分類結果

カラム法との相関関係について、各方法のPVLの散布図を(図3)及び(図4)に示した。相関係数(r)はビーズ法で0.957、粗抽出法で0.960となり、両方法で強い正の相関が認められた。

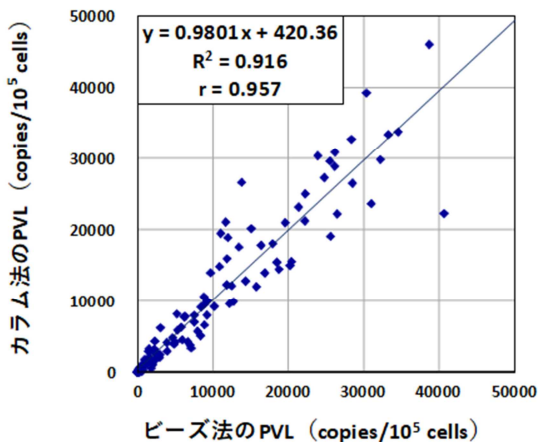


図3 カラム法及びビーズ法のPVL結果

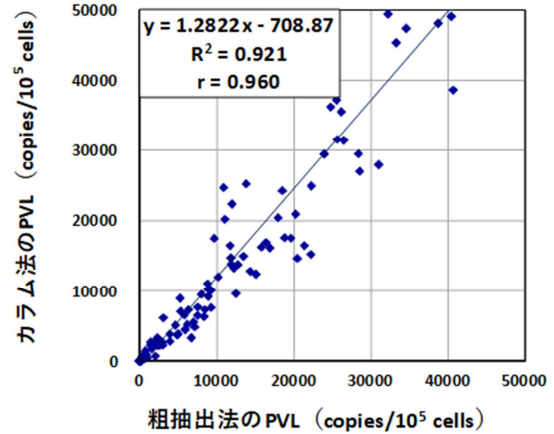


図4 カラム法及び粗抽出法のPVL結果

24 検体の処理における作業時間及び検査費用は、カラム法では約 2.0 時間で 16,714 円、ビーズ法では約 1.5 時間（実働 0.5 時間、待ち時間 1.0 時間）で 19,347 円、粗抽出法では約 0.5 時間で 5,655 円となった（表 2）。

表 2 作業時間及び検査費用の比較結果

	カラム法	ビーズ法	粗抽出法
作業時間(hr)			
実働時間	2.0	0.5	0.5
待ち時間	—	1.0	—
計	2.0	1.5	0.5
検査費用(円)			
試薬費	16,560	17,496	5,280
資材費	154	1,851	375
計	16,714	19,347	5,655

2) 粗抽出核酸の保存性検証

検体 No. 1~8 の PVL は、4℃及び-20℃の保存条件全てで検出された。各保存条件の PVL 推移を(図5)及び(図6)に示した。粗抽出当日とのリスク分類の一致率は、4℃の保存では、3日目が75.0% (6/8 検体)、10日目が62.5% (5/8 検体)、22日目及び37日目が87.5% (7/8 検体)となった。-20℃の保存では、3日目が87.5% (7/8 検体)、37日目が100.0% (8/8 検体)となった。

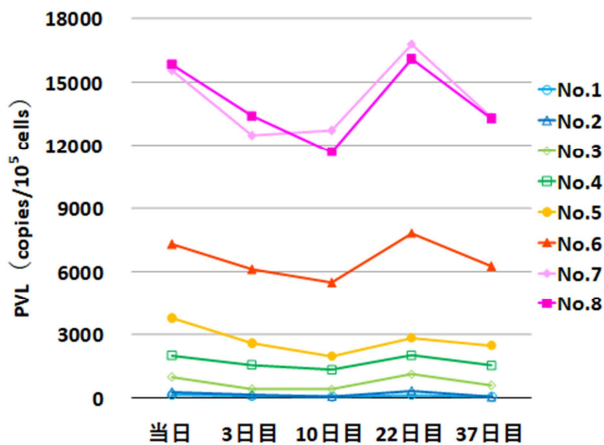


図5 4°Cで保存した際のPVL推移

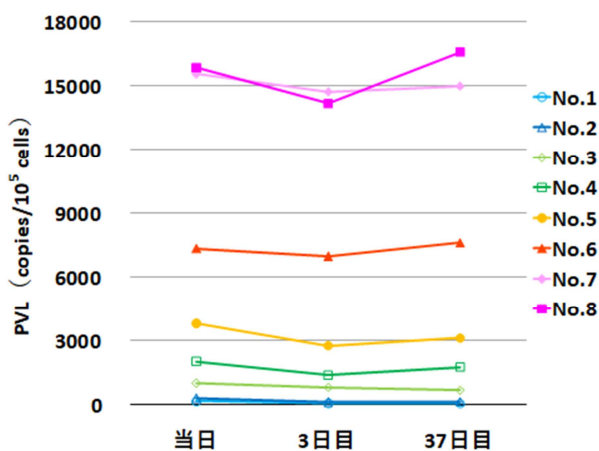


図6 -20°Cで保存した際のPVL推移

考察

農場でのBLV対策では高リスク牛の適切な管理が重要となるため、飼養牛のPVLを把握し、高リスク牛を確実に摘発することが必要となる。今回の検証では、ビーズ法及び粗抽出法ともに、PVLが600 copies/10⁵cells未満の伝播リスク超低に分類される68 copies/10⁵cells以上の検体は全て検出された。また、両方法の伝播リスク分類の結果はカラム法の結果と高率に一致しており、PVL結果にも強い正の相関が認められた。カラム法よりも若干検出率は低下するものの、伝播リスク超低の牛（超低リスク牛）から検出可能であり、高い精度でPVLの測定が可能であった。したがって、PVLが12000 copies/10⁵cells以上の高リスク牛を確実に摘発できるだけでなく、高リスク牛と陰性牛との間に配置することで生物学的な防壁として有効な超低リスク牛も把握できると考えられた。BLV対策を目的としたPVL測定では両方法の検出精度で十分対応可能であり、従来のカラム法に替

わる核酸抽出方法として有用であると考えられた。一方、PVLが非常に低値の検体は非検出となり、伝播リスク低～中の検体ではPVLのばらつきがやや大きくなったため、正確性が求められる場合はカラム法での核酸抽出が望ましいと考えられた。

実働の作業時間は両方法で減少したが、特に粗抽出法では検体と試薬を混合するだけで抽出が完了するため、大幅な省力化が可能であった。さらに、必要な血液量が2μlと微量であり、検査費用も最も低額となったため、当所ではビーズ法よりも粗抽出法が適していると考えられた。

粗抽出核酸の保存性検証では、4°C及び-20°Cの両方でPVLの大きな変化は認められなかった。値の変動はあるもののPVLの増減は全ての検体で連動していたため、経過日数によるDNA量の変化ではなく、PCR反応の増幅効率やThreshold Lineのわずかな差による影響だと推察された。粗抽出核酸の長期保存はメーカーで保証されていないが、少なくとも1ヶ月程度ならば冷蔵及び冷凍での保存が可能だと考えられた。長期保存が可能となることで、核酸抽出からqPCRまでの作業を分割でき、より柔軟に検査に対応可能だと考えられた。

飼養牛の伝播リスク分類の省力化については、希釈した全血を用いたダイレクトPCR法により高リスク牛を検出する方法や、アルカリ熱抽出法を用いることで核酸抽出工程を簡便化した方法など、様々な代替法が報告されている[10, 11]。今回検討した粗抽出法では、高い精度でのPVLの測定、大幅な省力化及び検査費用の削減が利点として挙げられる。また、市販のqPCRキットを使用するため既報の伝播リスク分類を適用可能であり、電気泳動の必要がないためコンタミネーションのリスクも低いと考えられた。検査者や農家の負担が軽減することで全頭検査などの多検体処理が容易になり、PVLを利用したBLV対策のさらなる普及に貢献することが期待された。

参考文献

- [1] 芳賀猛：牛病学，明石博臣ら編，第三版，227-230，近代出版，東京（2013）
- [2] Mekata H, Yamamoto M, Hayashi T, Kirino Y, Sekiguchi S, Konnai S, Horii Y, Norimine J: Cattle with a low bovine leukemia virus proviral load are rarely an infectious source, J Vet Res, 66(3),

- 157-163 (2018)
- [3] 間陽子：革新的技術で牛白血病ウイルスから牛を守る，家畜感染症学会誌，5巻2号，43-53 (2016)
- [4] 目堅博久：プロウイルス量に基づいた牛白血病対策ノススメ，家畜感染症学会誌，7巻4号，163-167 (2018)
- [5] 目堅博久：牛白血病ウイルス感染症の効果的な対策とは，臨床獣医，34(6)，8-13 (2016)
- [6] 米山州二，齊藤かおり，小笠原悠，陸拾七，間陽子：栃木県の牛伝染性リンパ腫ウイルス高度感染酪農場における清浄化事例，日獣会誌，75，e114-e121 (2022)
- [7] Nishi T, Okadera K, Fukai K, Yoshizaki M, Nakasuji A, Yoneyama S, Kokuho T: Establishment of a Direct PCR Assay for Simultaneous Differential Diagnosis of African Swine Fever and Classical Swine Fever Using Crude Tissue Samples, Viruses, 14, 498 (2022), (DOI:10.3390/v1403049)
- [8] 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 牛ウイルスユニット：牛白血病ウイルス (BLV) 検出リアルタイム PCR 法実施マニュアル (2020)
- [9] 西森朝美，小原潤子，安藤清彦，松浦裕一：牛伝染性リンパ腫ウイルス *pol* 遺伝子を標的としたプロウイルス量に基づく伝播リスク分類基準の設定，日獣会誌，77，e7-e13 (2024)
- [10] 宮本真智子，川内京子，榊原伸一，宮根和弘，目堅博久：ダイレクト PCR 法による牛伝染性リンパ腫感染源リスク牛の検出，日獣会誌，75，e46-e50 (2022)
- [11] 羽入さち子，佐藤圭介，小野里洋行，桐生直哉，福留静，會田恒彦，樋口良平：簡便に多検体処理が可能な牛伝染性リンパ腫ウイルス比較定量方法の検討，令和2年度新潟県家畜保健衛生業績発表会集録 (2021)