



---

---

# あたらしい 農業技術

---

---

No.630

## 牛乳頭腫症（イボ）の 予防・治療技術

平成 28 年度



## 要 旨

### 1 技術、情報の内容及び特徴

- ・ 簡便な遺伝子解析法（PCR-RFLP 法）を用いたウイルス型の型別法を開発し、簡易にウシパピローマウイルスの分布状況の確認が可能となった。
- ・ 県内において、治療の困難な牛乳頭腫症の原因となるウシパピローマウイルス 9 型が分布していることが明らかになった。
- ・ ピレスロイド系忌避剤に流動パラフィンを混合したものを塗布することで、効果的に牛乳頭腫症を抑制できることが確認された。
- ・ 新規治療液（木酢酸、酢酸、イソジンの混合液）を乳頭に形成されたイボに塗付することで、従来法より効率的に治療可能であることが明らかになった。

### 2 技術、情報の適用効果

- ・ ウシパピローマウイルス遺伝子型の分布を把握することで、本ウイルスの種類に応じたより効果的な対策を行うことができる。
- ・ 牛乳頭腫症の発症を低減することで、治療にかかる労力や時間を低減することができる。
- ・ 効果的な治療法を行うことで、イボによる乳用牛の搾乳障害の発生を防ぐことができる。

### 3 適用範囲

- ・ 県内全域の家畜保健衛生所、臨床獣医師、公共育成牧場及び乳用牛飼育農家

### 4 普及上の留意点

- ・ 忌避剤の効果が得られる期間は 1 ～ 2 週間が限度であり、適宜塗布を繰り返す必要がある。
- ・ 治療液の調製は“調剤”行為にあたるため、獣医師自身が使用するか、または獣医師の指示下で使用する。
- ・ 乳への混入を避けるため、治療液は原則として育成牛および乾乳牛に使用すること。
- ・ 治療液の塗布頻度は、牛の皮膚の状態をみて加減すること。

## 目次

はじめに	1
1 PCR-RFLP 法による簡易的な BPV 型別法の構築	1
(1) PCR-RFLP 法の仕組み	1
(2) 方法	1
(3) 従来法との一致率	2
2 静岡県内における BPV 浸潤状況の疫学調査	2
(1) 材料と方法	2
(2) 調査結果	3
3 昆虫忌避剤の塗布による牛乳頭腫症予防試験	3
(1) 材料と方法	3
(2) 結果	3
4 木酢酸を含んだ治療液による乳頭腫治療試験	4
(1) 材料と方法	4
(2) 結果	5
5 治療液の乳頭腫に対する影響の解明	5
(1) 材料と方法	5
(2) 結果	5
おわりに	6
参考文献	6
用語解説	7

## はじめに

牛乳頭腫症は牛パピローマウイルス (BPV) が原因となって発症する感染症です。乳頭へ重度感染が起これると搾乳困難に陥ることから、特に乳牛で問題となっています。本疾病は放牧病として知られており、本県を含む全国の公共育成牧場で問題となっています。BPV は 13 の遺伝子型に分類され、遺伝子型により好発部位、症状が異なっています[1), 3)]。中でも BPV9 型は乳頭に難治性の乳頭腫 (以下、イボ) を形成し、予後が悪いことから問題となっています[2), 4)]。現在、県内における BPV の分布は明らかになっておらず、これを明らかにすることが牛乳頭腫症を防除する上での課題となっていました。しかし、従来のダイレクトシーケンシング法による遺伝子型別法は、多検体の型別に向いておらず、より簡易な遺伝子型別法が求められていました。

また、BPV の予防のためには吸血昆虫の駆除が推奨されています。しかし、広大な放牧地では実施が困難であるという問題があります。そこで、昆虫忌避剤を直接牛体に塗布して、吸血昆虫による刺咬を防ぐことで牛乳頭腫症を低減できるか試験を実施しました。

現在、公共育成牧場における牛乳頭腫症の治療は、外科的切除や、再感染の防止及び自然治癒を期待して乳頭の消毒が行われています。しかし、労力および有効性の点から改善が必要でした。そこで、ウイルス不活化作用のある木酢酸を含む治療液を用いた牛乳頭腫症の治療試験を実施し、治癒のメカニズムを解析しました。

## 1 PCR-RFLP 法による簡易的な BPV 型別法の構築

### (1) PCR-RFLP 法の仕組み

BPV の遺伝子型に共通した遺伝子を増幅する PCR 法[1), 3)] で遺伝子を増幅すると、どの BPV 遺伝子型でも同じ長さの遺伝子が増幅されます。これを、特定の遺伝子配列を切断する「制限酵素」という酵素を反応させると、遺伝子型ごとに異なる長さに切断されます。この切断パターンで遺伝子型別をする方法を PCR-RFLP 法と呼びます。PCR で増幅した BPV 遺伝子を 1 種類の制限酵素で反応させることで、すべての BPV の遺伝子型別ができる方法を開発しました[5)]。

### (2) 方法

#### 1) 検体の調製

イボを乳鉢中で 10 % 乳剤となるように 10 mM Tris-EDTA 緩衝液 (pH 8.0) と混和し、乳棒ですり潰したのち、その乳剤 300  $\mu$ l を検体として用いました。検体から、市販のキット (MasterPure<sup>TM</sup> DNA Purification Kit for Blood Version II, エア・ブラウン (株), 東京) を用いて DNA を抽出しました。

#### 2) PCR 反応

Hatama らが作製した BPV 1、2 及び 5 型を標的とするプライマーセット subAup (5' -CCAGAYTAYYTM AAAATGGC-3') /subAdw (5' -ATAAMKGCTAGCTTATATTC-3') 並びに BPV 3、4、6、9、10 及び 11 型を標的とする subBup (5' -TWYAATAGGCCCTTTGGAT-3') /subBdw (5' -TTMCGCCTACGCTTTGGCGC-3') を PCR 反応に使用しました。抽出した DNA 1  $\mu$ l に 10 $\times$ Ex taq buffer 5  $\mu$ l、dNTP mixture 4  $\mu$ l、Takara Ex Taq HS 1.25 U (TaKaRa Bio)、各プライマー 0.5  $\mu$ M (最終濃度) 及び滅菌蒸留水を加え、50  $\mu$ l 容量としました。PCR 反応は

94℃ 1 分間の後、94℃45 秒間、55℃30 秒間、72 度 1 分間を 35 サイクル行い、最後に 72℃ 1 分間反応を行いました。

### 3) PCR-RFLP 法

上述の PCR 反応により得られた PCR 産物 6 µl に 10×T buffer (Takara Bio) 2 µl、0.1 % BSA 2 µl、Afa I 制限酵素 (Takara Bio) 10 U 及び滅菌蒸留水を加え、20 µl 容量とし、37℃ で 1 時間反応させました。反応液 20 µl を 3%アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイドを用いて UV トランスイルミネーター上で可視化し、増幅産物の切断パターンから判定を行いました。予測される切断パターンを表 1 に示します。

表 1 制限酵素 *Afa* I により推定される切断パターン

プライマーセット	標的 BPV	GenBank ID	増幅部位 (5'-3')	断片長 (bp)
subAup/dw	BPV1	X02346	6,289-6,725	110,327
	BPV2	M20219	6,282-6,718	437
	BPV5	AF457465	6,243-6,676	61,149,224
subBup/dw	BPV3	AF486184	6,266-6,867	9,90,181,322
	BPV4	X05817	6,517-7,109	29,90,474
	BPV6	AJ620208	6,541-7,130	157,186,247
	BPV9	AB331650	6,558-7,147	90,247,253
	BPV10	AB331651	6,406-6,995	590
	BPV11	AB543507	6,501-7,093	90,503

### (3) 従来法との一致率

静岡県の公共育成牧場で採取されたイボを用いて、ダイレクトシーケンスによる従来法と今回開発された PCR-RFLP 法の一一致率を比較しました。その結果、従来法と PCR-RFLP 法はほぼ同じ一致率で BPV 遺伝子型を型別できることが明らかになりました (表 2)。

表 2 各型別法による BPV 検出状況

	PCR-RFLP 法			一致率 (%)	
	BPV 6 型	BPV 9 型	BPV10 型		
従来法	BPV6 型	56	0	0	100
	BPV9 型	0	19	0	100
	BPV10 型	0	0	7	100

## 2 静岡県内における BPV 浸潤状況の疫学調査

県内の放牧利用農家を中心に BPV 遺伝子型の浸潤調査を実施しました。

### (1) 材料と方法

平成 24 年から 25 年にかけて、牛乳頭腫症を発症したホルスタイン種雌牛 (静岡県畜産技

術研究所 41 頭、県内公共育成牧場 11 頭、非放牧農家 1 戸 4 頭) から、乳頭のイボ 121 検体、体表のイボ 13 検体を採取し、上記の PCR-RFLP 法を実施しました。

## (2) 調査結果

乳頭のイボの BPV 遺伝子型分布は、BPV 6 型が 58% (25/43)、BPV 9 型が 14% (6/43)、BPV10 型が 12% (5/43)、BPV 6 型、9 型、10 型の複合感染が 7% (3/43)、不明が 9% (4/43) でした (図 1)。

体表のイボの BPV 遺伝子型分布は、BPV 2 型が 92% (12/13)、BPV 1 型が 8% (1/13) でした (図 2)。

非放牧農家からは、BPV1 型と BPV6 型が検出されました。

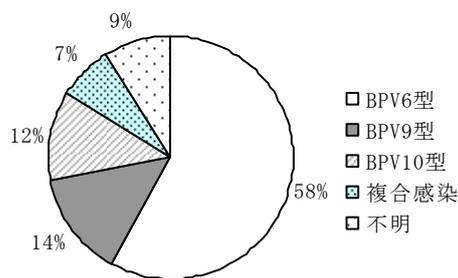


図 1 乳頭のイボの遺伝子型分布

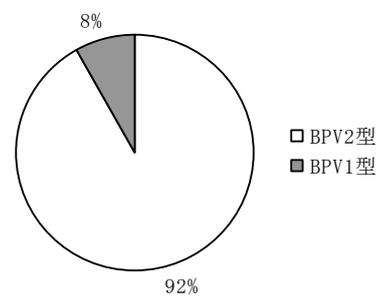


図 2 体表のイボの遺伝子型分布

今回の調査で、難治性の BPV 9 型が静岡県内に分布していることが明らかになりました。この遺伝子型によるイボは重症化した場合、有効な治療法がないため、早期治療が必要となります。また、非放牧農家のイボから検出された BPV 1 型と 6 型は、吸血昆虫だけではなく、搾乳機器からの伝播が指摘されており、伝播を防ぐために衛生的な搾乳手順の遵守が必要となります。

## 3 昆虫忌避剤の塗布による牛乳頭腫症予防試験

牛乳頭腫症の発症を低減するために、昆虫忌避剤の塗布試験を実施しました。

### (1) 材料と方法

#### 1) 供試牛

当所で飼養するホルスタイン種放牧育成牛 38 頭の乳房 132 分房を用いました。

#### 2) 試験方法

試験区 (n=20) に対し、ピレスロイド系忌避剤 (ETB 乳剤、金蝶) と流動パラフィン を 1:200 で混合した液体を、2 週間隔で 3 か月間、直検用手袋を用いて各分房に塗布しました。対照区 (n=112) は従来より吸血抑制の目的で用いられているタール剤 (モクタール、関東化学) を同様に塗布しました。塗布開始から塗布終了 2 か月後までの計 5 か月間のイボの発生を分房ごとに計測して発症率を算出し、試験区と対照区で比較しました。

### (2) 結果

発症率を試験区と対照区と比較したところ、試験区の発症率は 10.0% (2/20)、対照区は 39.3% (44/112) と、試験区は対照区と比較して低い発症率を示しました (表 3、 $p < 0.05$ )。ピレスロイド系の薬剤は揮発することによって昆虫防除効果を示します。今回、薬剤の効果を持続させるために不揮発性の流動パラフィンに混合して揮発の速度を遅らせる処置は有効であったと考えられます。

**表 3 忌避剤塗布による乳頭腫発症率の変化**

	乳頭腫発生		発症率 (%)
	有り	無し	
試験区 (n=20)	2	18	10.0 <sup>a</sup>
対照区 (n=112)	44	68	39.3 <sup>b</sup>

a-b:  $p < 0.05$

#### 4 木酢酸を含んだ治療液による乳頭腫治療試験

##### (1) 材料と方法

###### 1) 供試検体

当所で飼養するホルスタイン種放牧育成牛に発生したイボ 180 個 (乳頭 79 個、体表 101 個) を用いました。

###### 2) 使用した薬剤

治療液として、木酢酸、酢酸、10%ポピドンヨード (イソジン、Meiji Seika ファルマ) を等量配合した試験用治療液と、消毒液として塩化ジデシルジメチルアンモニウム製剤 (クリアキル<sup>®</sup>-100、田村製薬) を使用しました。

###### 3) 試験区と対照区

乳頭と体表それぞれに試験区および対照区を設定しました、それぞれの区に施した処置を表 4、表 5 に示します。

**表 4 乳頭のイボの処置方法**

試験区 (n=59)	対照区 (n=20)
1000 倍希釈消毒液 + 試験用治療液	1000 倍希釈消毒液 のみ

**表 5 体表のイボの処置方法**

試験区 (n=49)	対照区 (n=52)
消毒液原液 + 試験用治療液	消毒液原液のみ

##### 4) 治療スケジュール

乳頭のイボに対しては電動の動力噴霧器、体表のイボに対しては刷毛を用いて消毒液を塗

布しました。その後、霧吹きを用いて試験用治療液を塗布しました。以上の処置を2週間隔で行いました。

## 5) 検査項目

乳頭のイボについては治療開始後2週目および4週目、体表のイボは2、4、6、8週目の治癒率を算出して、試験区と対照区で比較しました。

### (2) 結果

乳頭のイボの治癒率を2週間隔で試験区と対照区で比較したところ、試験区の治癒率は治療開始後2週目で16.9% (16/59)、4週目で61.0% (36/59)、対照区は2週目で0.0% (0/20)、4週目で20.0% (4/20) と、試験区は対照区と比較して高い治癒率を示しました (表6、 $p < 0.05$ )。一方、体表のイボの治癒率は、試験区が2週目で32.7% (16/49)、4週目で73.5% (36/49)、6週目で85.7% (42/49)、8週目で87.8% (43/49)、対照区が2週目で32.7% (17/52)、4週目で75.0% (39/52)、6週目で88.5% (46/52)、8週目で94.2% (49/52) であり、試験区と対照区で差はありませんでした (表7)。以上のことから、今回使用した試験用治療液は乳頭のイボに対して有効であることが示唆されました。

表6 乳頭のイボの治癒率比較

	治癒率 (%)	
	2週目	4週目
試験区 (n=59)	16.9	61.0 <sup>a</sup>
対照区 (n=20)	0.0	20.0 <sup>b</sup>

a-b:  $p < 0.05$

表7 体表のイボの治癒率比較

	治癒率 (%)			
	2週目	4週目	6週目	8週目
試験区 (n=49)	32.7	73.5	85.7	87.8
対照区 (n=52)	32.7	75.0	88.5	94.2

## 5 治療液の乳頭腫に対する影響の解明

### (1) 材料と方法

当所飼養育成牛に発生した乳頭のイボ26個を用いました。試験用治療液塗布前(0日)、塗布後1、7日に検体を外科的に採取し、定法に従って切片を作成後、HE染色して鏡検しました。

### (2) 結果

病理組織学検査を実施した結果、治療液塗布1日後に上皮組織の顆粒層が消失している像が確認されました (図3、図4)。顆粒層の消失は皮膚の角化が亢進していることを示唆しており、また、BPVは皮膚の顆粒層と粘膜固有層に感染していることから、本治療液はウイルスが感染している皮膚の角化を亢進し、角化した感染細胞が脱落することによって治癒していることが示唆されました。治療薬塗布後7日経つと、治療液の効果がなくなったため、一

度の塗布で直らない場合は治療液の塗布を繰り返し実施することが望ましいと考えられます。

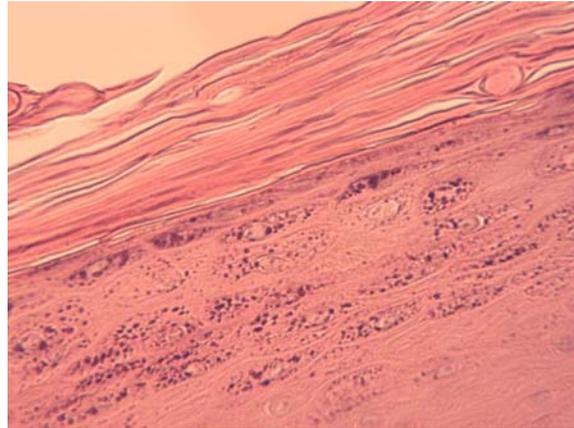


図3 治療液塗布前の上皮組織像

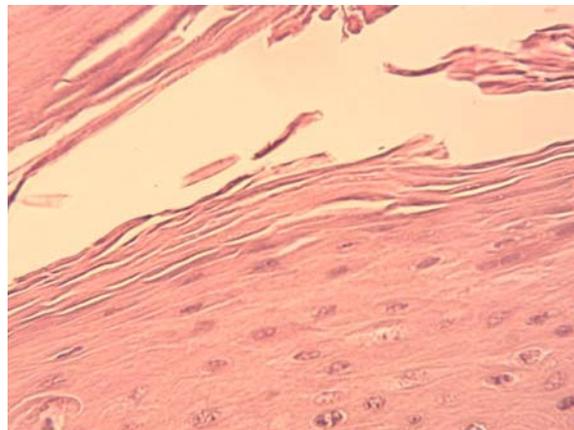


図4 治療液塗布1日後の上皮組織像

### おわりに

牛乳頭腫症を含む放牧病は、牛の健康な発育に悪影響を与え、その結果、生産者が公共育成牧場を利用する妨げとなります。牛乳頭腫症は分娩後の搾乳にも悪影響を与えるため、対策が必要です。本試験の結果から、牛乳頭腫症の発症を効率的に防除し、かつ、発症した乳頭腫に対する効率的な治療法が構築できました。この結果を公共育成牧場の管理に利用することで、牛乳頭腫症による被害を軽減できることが期待されます。また、本試験の結果は自家育成牛の牛乳頭腫症対策にも応用可能です。

### 参考文献

- 1) Hatama S, Nobumoto K and Kannno T, 2008. Genomic and phylogenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, BPV-9 and BPV-10, J.Gen.Virol., 89, 158-163
- 2) Hatama S, Nishida T, Kadota K, Uchida I, Kanno T, 2009. Bovine papillomavirus type 9 induces epithelial papillomas on the teat skin of heifers, Vet.Microbiol., 136, 347-351
- 3) Hatama S, Ishihara R Kanno T, Uchida I, 2011. Detection of a novel bovine

papillomavirus type 11 (BPV-11) using xipapillomavirus consensus polymerase chain reaction primers, Arch. Virol., 156, 1281-1285

- 4) 長内利佳、日野正浩、高野泰司、小寺文、建入茂樹、横山亮一、佐々木和夫, 2008. 放牧牛に集団発生した新型パピローマウイルスによる牛乳頭腫症と偽牛痘の混合感染例, 獣医畜産新報, 61, 841-844
- 5) 鶴飼典佳、土屋貴幸、瀬戸隆弘、齋藤美英, 2013. 静岡県における BPV9 の発生及び BPV の簡易型別法の開発, 日獣誌, 66, 617-620

## 用語解説

### 1) PCR 法

ある検体から、特定の遺伝子を増幅する方法。検体中に含まれる遺伝子の量はきわめて微量であり、検出可能な量に増やすためこの方法がとられる。

### 2) 制限酵素

遺伝子の特定の領域を切断する酵素。

### 3) DNA

遺伝子の構成物質。

### 4) プライマー

上述の PCR 法で特定の遺伝子を増幅するために必要な試薬。

### 5) 電気泳動

前述の PCR 法で増幅した遺伝子を検出する方法。

### 6) エチジウムブロマイド

DNA を染色する色素。染色された DNA は紫外線下で発光する。

### 7) 皮膚の顆粒層と粘膜固有層

皮膚の上層（上皮組織）を構成する細胞の層。

畜産技術研究所 酪農科 主任研究員 瀬戸隆弘



発行年月：平成29年3月

編集発行：静岡県経済産業部産業革新局研究開発課

〒420-8601

静岡市葵区追手町9番6号

TEL 054-221-3643

この情報は下記のホームページからご覧になれます。

<http://www.pref.shizuoka.jp/sangyou/sa-130a/>

