

第 11 回家畜感染症学会学術集会（一般口演）

（発表 10 分、質疑 3 分）

演題 1～3

1. 子牛難治性下痢症に対する糞便微生物移植（FMT）治療効果に寄与する因子の探索
2. マイコプラズマ関節炎における病態形成メカニズムの解明
3. 伝播高リスク牛とおとり牛を用いた、親子放牧における BLV 伝播阻止コンセプトの実証

座長：松田敬一（NOSAI 宮城）

- 大谷夏輝（NOSAI 千葉）ら
- 橘紅李（酪農大）ら
- 芳賀聡（農研機構畜産研）ら

演題 4～5

4. ホルスタイン種乳牛における日本初の選択的乾乳期治療法の確立
5. 分娩前後の血中 AMH 濃度の変動と SAA 濃度との関連性およびその後の繁殖成績に与える影響

座長：高垣勝仁（北海道 NOSAI）

- 高橋俊彦（酪農大）ら
- 大川洋明（(株) Guardian）ら

演題 6～8

6. 黒毛和種新生子牛に対する他家由来活性化リンパ球投与がワクチン反応に与える影響
7. 乳酸菌調整剤を添加したイネ科サイレージの給餌が早期ワクチン接種の効果に及ぼす影響
8. 管内一肥育部会における AMR 対策を考慮した導入牛呼吸器病予防対策の効果

座長：野地智法（東北大）

- 小比類巻正幸（(有) 小比類巻家畜診療サービス）ら
- 森一紗（酪農大）ら
- 松田敬一（NOSAI 宮城）

演題 9～11

9. 健康牛における乳汁マクロファージの免疫関連因子と乳成分の関連性
10. MEL-B の構成因子に着目した黄色ブドウ球菌の抗菌活性に関する作用機序解明
11. シクロフィリン A 誘発乳房炎により変化する乳中タンパク質の解析

座長：樋口豪紀（酪農大）

- 呉俊佑（酪農大）ら
- 山内清哉（東北大院農）ら
- 秋元宏介（東北大院農）ら

演題 12～14

12. 子豚へのサーコウイルス 2 型ワクチンと豚丹毒不活化ワクチンの混合接種試験
13. 豚における経穴（GV1, GV14）ワクチン接種法の検討
14. 診断が困難な症例におけるホールゲノムシーケンスの応用－黒子産多発養豚場での検討－

座長：遠矢良平（NOSAI 宮崎）

- 辻厚史（NOSAI 宮崎）ら
- 蓮田安信（(独) 家畜改良センター）ら
- 塚原隆充（栄養病理研）ら

子牛難治性下痢症に対する糞便微生物移植 (FMT) 治療効果 に寄与する因子の探索

○大谷夏輝¹⁾、杉山顕太郎¹⁾、五島可祥¹⁾、島田亘¹⁾、清水優¹⁾、田中秀和¹⁾、Jahidul Islam²⁾、野地智法²⁾

1) NOSAI 千葉、2) 東北大・農

【はじめに】

子牛難治性下痢症に対する糞便微生物移植(FMT)治療効果に寄与する因子を探索するためにメタゲノム (MG)、メタボローム (MB) 解析を行った。また、ドナー便を細菌叢と代謝産物に分離し移植することで、どちらがより高い有効性を示すか検討した。

【材料および方法】

調査 1: FMT 供試子牛および健康子牛・下痢性子牛糞便の MG・MB 解析

調査期間: 2019 年 9 月~2020 年 2 月

供試牛: FMT ドナー、レシピエント子牛(7~234 日齢)、健康子牛・下痢性子牛(2~83 日齢)

解析方法: MG (β 多様性、Randomforest model)、MB (MetaboanalystR) 解析およびプロクラステス解析。

調査 2: 分離移植試験

調査期間: 2020 年 11 月~2021 年 2 月

供試牛: ドナーは BLV、BVDV、*Salmonella* 陰性の正常便子牛(21~105 日齢)でレシピエントはドナーと同居する難治性下痢性子牛(5~84 日齢)。

調査項目・治癒判定: レシピエント糞便中病原微生物を細菌培養検査や検査キットを用いて検索した。移植当日 (D0)、翌日 (D1)、7 日後(D7)にレシピエントから採材し、糞中水分含量の測定と血液検査を実施した。D7 に糞便スコアが改善したものを治癒とした。

移植方法: ドナー便をホモジナイズし濾過後、Nycodenz に重層し、比重遠心後、細菌叢と代謝産物に分離し凍結保存した。それぞれを移植直前に融解し移植した。

【成 績】

調査 1 では有用細菌として *Sporobacter* 属、有用代謝産物としてアミノ酸、脂質・脂肪酸などが抽出された。また FMT 有効群のレシピエント腸内細菌叢と代謝産物は強い相関を保ちながらドナー組成に近似した。調査 2 では細菌叢移植群が代謝産物移植群より高い治癒率を示し、糞中水分含量も有意に低下した。

【考 察】

FMT 治療効果に寄与する因子として *Sporobacter* 属やアミノ酸、脂質・脂肪酸代謝産物等が抽出された。また細菌叢移植群が、より高い有効性を示したことから、FMT 治癒機序の上位にはドナー由来の *Sporobacter* 属などの有用細菌がレシピエントの腸内環境へ作用することで、有用細菌が有する直接的および、それら微生物および宿主細胞由来の代謝物を介した間接的効果が FMT の有効性に関わるものと考えられた。

マイコプラズマ関節炎における病態形成メカニズムの解明

○橋 紅李¹⁾、西 航司^{1, 4)}、江口亜矢子¹⁾、松田一哉²⁾、佐藤綾乃³⁾、加藤敏英³⁾、権平 智¹⁾、樋口豪紀¹⁾

1) 酪農大・獣医衛生、2) 酪農大・獣医病理、3) 酪農大・生産動物医療、4) NOSAI オホーツク

【はじめに】

Mycoplasma bovis (*M. bovis*)によって引き起こされるマイコプラズマ関節炎に罹患した子牛では、激しい炎症反応により骨融解や跛行、起立困難などの症状が認められ、抗生物質による治療が奏功せず難治性となる症例が多い。有効な治療および予防技術の確立のためにも、病態メカニズムの解明が求められている。*M. bovis*は宿主免疫や抗生物質から回避する機構の一つとして、クラスリン依存性エンドサイトーシスにより滑膜細胞へ侵入することが報告されている。しかし、細胞内侵入後の細胞内動態の詳細なメカニズムは明らかにされていない。本研究では、エンドソームマーカーを指標とし、ウシ滑膜細胞における*M. bovis*の細胞内動態の解明を試みた。

【材料および方法】

①滑膜細胞：ホルスタイン種子牛の手根関節から分離。②菌株：*M. bovis* PG45株を使用。③免疫染色：滑膜細胞に*M. bovis*を添加し、初期エンドソームマーカー (EEA1・Rab5A)、後期エンドソームマーカー (Rab7A)、リサイクリングエンドソームマーカー (Rab11A)、リソソームマーカー (LAMP2) を染色。蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡により局在を観察。④ノックダウン：siRNAを使用し、エンドソームマーカーの発現を抑制。⑤細胞内侵入：ゲンタマイシンアッセイにより、細胞内に侵入した*M. bovis*の数を測定。

【成績】

①滑膜細胞において、初期、後期およびリサイクリングエンドソームマーカー、また、リソソームマーカーにおいて*M. bovis*との共局在が認められた。②siRNAによる早期エンドソームマーカー (Rab5A・EEA1) のノックダウンにより、対照と比較して、有意 ($p < 0.05$) に細胞内に侵入する*M. bovis*が減少した。

【考察】

*M. bovis*は滑膜細胞に侵入した後、初期、後期およびリサイクリングエンドソーム、また、リソソーム経路を利用することが示唆された。特に、初期エンドソームへの依存度が高く、*M. bovis*の細胞内動態において重要な役割を担っていること、また細胞から脱出する際にはリサイクリングエンドソームを利用していることが示唆された。

伝播高リスク牛とおとり牛を用いた、親子放牧における BLV 伝播阻止コンセプトの実証

○芳賀聡¹⁾、石崎宏¹⁾

1) 農研機構・畜産研

【はじめに】

和牛生産基盤の強化には繁殖牛の省力生産による素牛増頭が必要であり、周年親子放牧等の普及が進められている。一方、BLV 感染に起因する牛伝染性リンパ腫の発生数は増え続け、感染牛の生産性低下も報告されている。放牧地では吸血昆虫による BLV 伝播リスクが高く、対策として分離放牧等の取り組み事例もあるがエビデンスは十分ではない。そこで本研究では、有効性の高い対策技術の開発と普及に資するため、BLV 伝播阻止放牧コンセプトを立案し、伝播高リスク牛とおとり牛を用いた親子放牧実証モデル試験により、その有用性を科学的に検証することを目的とした。

【材料および方法】

栃木県北地域の試験地において黒毛和種親子放牧を 2019 および 2020 年の各 4～11 月に実施した。牧区は、感染区《伝播高リスク母牛 3 頭（感染源）、おとり牛として陰性母牛 2 頭およびそれらの産子 5 頭》と対策区《陰性母牛 2 頭と産子 2 頭》とした。伝播高リスク母牛の条件は BLV プロウイルス量 1000 コピー/50ng of gDNA 以上とした。実施コンセプトは、以下 3 策①牧区間に 5m 幅分離帯と②分離帯内にアブトラップの設置、③耳標型外部寄生虫駆除剤を少頭数の対策区牛に装着とした。人為的感染要因を排除するため作業順や器具洗浄等を徹底した飼養管理ルールを順守した。2 週間隔で採血を行い qPCR 法による血中プロウイルス定量から陽転をモニタリングした。また、トラップ等により捕虫したアブ、サシバエの個体数を計数して飛来動向の季節変動を調査し、一部の虫体サンプルから qPCR 法によるプロウイルス保有状況を調べた。

【結果】

2 シーズンを総じて、感染区では、アブの捕虫ピークのあった 8 月末におとり牛の母牛 2 頭、そして 11 月中旬に子牛 1 頭の水平感染が確認され、子牛 1 頭の垂直感染も確認された。11 月に感染区および分離帯で採取したサシバエ虫体からもプロウイルスが検出された。一方、対策区では感染は 1 頭も確認されなかった。以上より、本伝播阻止放牧コンセプトの有用性が科学的に実証された。

ホルスタイン種乳牛における日本初の選択的乾乳期治療法の確立

北野菜奈^{1,2)}、菊佳男¹⁾、○高橋俊彦¹⁾

1) 酪農大、2) (株) 共立製薬

【はじめに】

長く、乳房炎治療および予防を目的とした乾乳導入時の全頭全分房への抗生物質治療 (BDCT) が実施されているが、AMR に対する国際的な問題意識の高まりにより、BDCT から乾乳軟膏を牛個体や乳房の感染状況に応じて処方する選択的乾乳期治療 (SDCT) の考え方が欧州を中心に広まり始め、日本においても SDCT を導入するべきと考えた。本研究では日本におけるホルスタイン種乳牛の日本型選択的乾乳期治療 (SDCT) の確立を目指した。

【試験①】

乾乳期療法における乾乳軟膏不要判断基準の作成

選択的乾乳期療法の構築を模索するため、全頭全乳房への抗生物質治療の BDCT 群と無処置群を用いた。乳汁は乾乳処理の 2 週前、乾乳直前、分娩後 1 週、2 週、3 週、4 週に採取した。乾乳処理は BDCT 群において全頭全分房に乾乳軟膏を使用し、無処置群と比較した。BDCT 群の全分房と無処置群の健康分房において体細胞数は低値であり、群間で大きな変化はなかった。両群とも、体細胞数において乾乳前 2 週間と乾乳時、分娩 2-4 週において大きな変化はなかった。また、細菌数も BDCT 群と無処置群は低値であり、大きな差はなかった。無処置群の健康牛において乾乳前に体細胞数が 150 千 cell/mL 未満、細菌数が 100cfu/mL 未満だと分娩後に臨床型乳房炎を発症しなかったため、これを乾乳軟膏不要判断基準とした。

【試験②】

日本型選択的乾乳期治療法の構築

試験①の乾乳軟膏不要判断基準を基にした SDCT 群と BDCT 群を用いた。乾乳軟膏を使用しない乾乳期処方としてディッピング剤を用い、乾乳日から 10 日間行った。

BDCT 群は臨床型乳房炎を発症する分房はなく、乳汁中体細胞数、細菌数が低値を示していたことから、乾乳軟膏を全頭全分房に投与することが有効であることが確認された。SDCT 群の 57% が基準により乾乳軟膏無投与であった。SDCT 群においては、分娩後に 1 分房 (4%) 臨床型乳房炎を発症したが、それ以外の分房は臨床型乳房炎を発症しなかった。

SDCT 群において乾乳軟膏を乾乳時に投与する必要がない分房は、約半数存在することが明らかになった。乾乳軟膏不要判断基準を用いて SDCT 群の効果について調査し、BDCT と同様の効果が得られた。

【まとめ】

本研究より、日本で初めて選択的乾乳期治療法が確立された。乾乳軟膏不要判断基準を用いて日本型選択的乾乳期治療を普及することにより、不要な乾乳軟膏の使用を防ぎ、薬剤耐性問題に貢献できると考えられた。

分娩前後の血中 AMH 濃度の変動と SAA 濃度との関連性およびその後の繁殖成績に与える影響

○大川洋明¹⁾、溝上ちひろ²⁾、藤倉篤史²⁾、高野敏宏²⁾、佐藤聡子³⁾、新屋麗³⁾、川島千帆⁴⁾、大和 修⁵⁾、伏見康生¹⁾、谷口雅康⁶⁾、高木光博⁶⁾

1) (株) Guardian、2) ふくおか県酪協、3) かごしま NOSAI、4) 帯畜大・畜産、5) 鹿児島大・共同獣医、6) 山口大・共同獣医

【目的】

抗ミュラー管ホルモン (AMH) は、乳牛の卵巣機能における信頼性の高いバイオマーカーとして知られている。しかし、周産期における AMH 値の変化と様々なパラメーターとの関連性については明確に評価されていない。本研究の目的は、周産期における血清 AMH の変化と、血液プロファイル、インスリン様成長因子 1 (IGF-1)、生殖器官の回復、その後の繁殖成績などとの関係性を評価、検証することであった。

【材料と方法】

分娩 2 週間前 (W-2) および分娩 4 週間後 (W4) にホルスタイン種乳牛 (n=43) から血液を採取し、AMH、IGF-1、血清アミロイド A (SAA) を含む生化学パラメーターを測定した。W4 では、子宮の炎症の程度を評価するために、膣排泄液スコア (VDS) と子宮内膜サンプルの多形核白血球率 (PMNL%) を評価した。乳汁中の体細胞数 (SCC) は W9 までに 2 回測定し平均値を算出した。W-2 から W4 までの周産期における AMH 濃度の変化 (AMH 比: W4/W-2) に基づいて、供試牛を四分位 (Q1、Q2、Q3、Q4) に分類した。Q1、Q4 をそれぞれ高 AMH 群 (n=11)、低 AMH 群 (n=11) とした。

【結果】

AMH 比は、高 AMH 群が 1.83 ± 0.12 、低 AMH 群が 0.83 ± 0.05 であった。SAA および γ -globulin 濃度は、W4 において低 AMH 群で有意に高かった (SAA: 22.4 ± 7.3 vs. 3.3 ± 0.8 ; $p = 0.02$, γ -globulin: 2.62 ± 0.27 vs. 1.95 ± 0.13 ; $p = 0.04$)。IGF-1 レベル、VDS、PMNL%、SCC には両群間で有意な差はなかった。分娩後 200 日以内の受胎率は、高 AMH 群が低 AMH 群よりも高く (9/11 vs. 4/11; $p = 0.081$)、淘汰率は低かった (1/11 vs. 6/11; $p = 0.064$)。

【考察とまとめ】

本研究において初めて分娩後の AMH レベルは急性反応蛋白である SAA と負の相関にあることを確認し、炎症の存在が AMH レベルを低下させる可能性が明らかになった。低 AMH 群の繁殖成績にもその影響が認められ、ストレス (炎症) をかけない周産期管理の重要性を示すものであった。一方で子宮局所の炎症や SCC との関連は明らかではなかった。分娩後早期の炎症の存在は AMH 値を低下させ、その結果、繁殖予後を低下させる可能性があることが明らかになった。

黒毛和種新生子牛に対する他家由来活性化リンパ球投与がワクチン反応に与える影響

○小比類巻正幸¹⁾、山口智宏²⁾、向井真知子¹⁾、黒澤徳子¹⁾、久保田高慶¹⁾、大塚浩通³⁾

1) (有) 小比類巻家畜診療サービス、2) (株) ケーナインラボ 3) 酪農学園大学

【はじめに】

虚弱や難産により出生した子牛では、免疫成分の移行が不十分となり、易感染性となることが知られている。今回、黒毛和種新生子牛に対し、免疫機能の向上を目的に他家由来活性化リンパ球（特許取得済み：特許第 5006992 号、免疫機能の強化剤）を静脈内投与し、その後のワクチン反応、疾病の発生状況、発育状況を調査したので報告する。

【材料および方法】

青森県の 1 繁殖農場で出生した黒毛和種子牛 17 頭を試験に供した。供試牛は、出生後直ちに母子を分離し、粉末初乳製剤を 2 から 3 回給与したのち市販の子牛用ミルクに切り替えた。活性化リンパ球を投与した LAK 群は、他家由来活性化リンパ球浮遊液を出生後 24 時間以内に静脈内に投与した。投与群、対照群共に生後 1 週間後ならびに 1 ヶ月後にキャトルバクト 3（京都微研（株））を、生後 2 ヶ月後に牛 5 種混合生ワクチン（京都微研（株））を、また生後 3 ヶ月後にキャトルウイン 6（京都微研（株））をそれぞれ接種した。採血はキャトルバクトの 1 回目の接種直前と接種後 1 週間に、それ以外は各ワクチン接種直前と接種後 2 週間に実施し、抗体価の測定に供した。さらに出生から市場出荷までの間における発育状況および疾病の発生状況と治療に要した日数を調査した。

【結果】

牛 5 種混合生ワクチンの投与後 2 週間における BVD1、BVD2、IP3 の抗体価は、対照群と比較し LAK 群で有意に高値を示した。消化器疾患（腸炎）による治療回数は、対照群が 1.75 ± 0.25 回に対し LAK 群で 1.38 ± 0.38 回、点滴を必要とした日数は対照群で 3.50 ± 1.49 日、LAK 群で 2.25 ± 0.80 日と LAK 群で低く抑えられた。対照群及び LAK 群の DG は、去勢で 0.96 ± 0.03 、 1.03 ± 0.07 、メスで 0.85 ± 0.01 、 0.90 ± 0.04 であり、対照群と比較して LAK 群で高い増体率を示した。

【考察】

黒毛和種子牛への活性化リンパ球の出生後投与は、ワクチン接種に対する反応性を高めることが示唆された。現在、臨床応用に向けて凍結他家由来活性化リンパ球を用いた投与試験を実施中である。

乳酸菌調整剤を添加したイネ科サイレージの給餌が早期ワクチン接種の効果に及ぼす影響

○森一紗^{1,2)}、福原知謹¹⁾、小千田圭吾¹⁾、大塚浩通¹⁾

1) 酪農大・獣医、2) ラレマンドバイオテック（株）

【はじめに】

本試験の目的は哺乳子牛への乳酸菌調整剤を添加したイネ科サイレージの給餌が、子牛の栄養状態と早期ワクチン接種後の抗体反応にもたらす影響を調査することである。

【材料および方法】

北海道内一農場の黒毛和種子牛を用いた。*Lentilactobacillus* 属菌、*Pediococcus* 属菌を含む市販の乳酸菌製剤を添加してチモシー主体ラップサイレージを調整し、乳酸菌添加ラップ群（n = 11）に3週齢から約3.5ヶ月齢の離乳まで飽食給餌した。対照群（n = 12）には無添加で調整したチモシー主体ラップサイレージを飽食給餌した。ラップサイレージは水分25%程度、乾物中NDF60%程度で、15cm程度に切断して給餌し、残飼は適宜廃棄した。官能評価では両群のラップサイレージとも明黄緑色であり、さらっとして清潔であり、芳香な快甘酸臭（乳酸菌添加）または甘酸臭（対照群）があった。両群共通して離乳1ヶ月前からチモシー主体乾草を少量給餌し、離乳後は同乾草を飽食給餌した。全ての子牛には *H. somni*、*P. multocida*、*M. haemolytica* 混合（アジュバント加）不活化ワクチンを生後1ヶ月未満に1.0 ml 接種し、1ヶ月齢に同量をブースター接種した。採血は0ヶ月齢から1ヶ月毎に実施し、栄養状態と抗体価を調査した。

【結果】

乳酸菌添加ラップ群の子牛は対照群の子牛と比較して、2、4ヶ月齢での血清アルブミン値、3ヶ月齢での血清総コレステロール値、HDLコレステロール値が有意に（ $p < 0.05$ ）高く、3ヶ月齢での血清BHB値が有意に低かった。さらに、乳酸菌添加ラップ群では2~4ヶ月齢での *M. haemolytica* 抗体価が有意に高く、2ヶ月齢での *M. haemolytica* 抗体価が陽性限界値以上となる個体が多い傾向にあった。

【考察】

乳酸菌調整剤を添加したイネ科サイレージの給餌によって子牛の栄養状態と早期ワクチン接種後の *M. haemolytica* 抗体反応が向上した。嗜好性に優れる粗飼料の給餌とそれに伴う血清アルブミン値の上昇は、免疫機能が未熟な哺乳子牛において早期ワクチン接種後の抗体反応を高める可能性がある。

管内一肥育部会における AMR 対策を考慮した 導入牛呼吸器病予防対策の効果

○松田敬一

NOSAI 宮城

【はじめに】

肥育素牛の導入後は呼吸器病が多発するため、抗菌剤投与やワクチン接種等の予防対策が行われている。一方で、抗菌剤の使用は細菌の AMR 化を引き起こすリスクとなるため慎重使用が求められている。管内の肥育部会で、導入後の呼吸器病対策として、導入約 1 週間後に抗菌剤（マイシリン：MC）、および牛ウイルス性呼吸器病対策不活化ワクチン（ストックガード：SG）の 1 回投与を行っていた。抗菌剤使用に対する意義調査の結果、慣習、脳炎対策、および呼吸器病対策との回答が多く、総じて注射を止めたくないとの事であった。そこで、AMR 対策を考慮した新たな導入牛呼吸器病予防対策を考案実施し、その効果を検討した。

【材料および方法】

原状把握として、平成 30 年度に呼吸器病に罹患した牛から検出された *Pasteurella multocida* (Pm) 41 株の薬剤感受性試験（PCG、ABPC、CEZ、SM、KM、OTC、FF、ERFX、MAR）を行った。SG 投与時に MC に変えて総合ビタミン製剤（デュファフルマルチ：DM）0.04ml/kg を投与した牛（投与群 6 頭）と、SG のみを投与した牛（対照群 6 頭）の RS ウイルス中和抗体価増加率の推移を比較した。新たな対策（家畜市場での TSV-2 接種、導入 7 日後に SG および DM の投与）を提案し、肥育部会総会での承認をへて変更した。対策変更前と変更後で、導入後 2 週間以内に発症した呼吸器病発症数と平均治療費を比較した。

【結果】

耐性（R）率は、SM で 85%であった。中間性（I）率は、PCG で 7.5%、ABPC で 2.5%、SM で 2.5%、KM で 15%、および ERFX で 5%であった。RS 中和抗体価増加率は、2 群間で有意な相互作用が認められ、投与 14 日後で投与群が対照群に比べ有意な高値を示した。呼吸器病発症数および平均治療費は、投与前で 29 頭および 14,754 円、投与後で 12 頭および 11,667 円であった。

【考察】

肥育部会員の農場では SM で AMR 化が進んでいると考えられ、変更前の対策で使用していた MC（PCG と SM の合剤）の影響が示唆された。SG 投与時に DM を投与すると、ワクチン株に対する生体の反応性が高まるものと考えられた。対策変更後で、抗菌剤投与をやめたのにもかかわらず、呼吸器病の発症数が減り治療費が減少したことから、新たな対策は有効と考えられた。現在 Pm の SM に対する感受性は回復してきている。効果的な AMR 対策には、地域を巻き込んだ対策が必要と考えられた。

健康牛における乳汁マクロファージの免疫関連因子と乳成分の関連性

○呉俊佑¹⁾、福原知親¹⁾、林智人²⁾、長澤裕哉²⁾、田島右副³⁾、小千田圭吾¹⁾、大塚浩通¹⁾

1) 酪農大・獣医、2) 動衛研、3) 理科研

【はじめに】

乳房炎の発症には乳房内免疫が密接にかかわる。マクロファージは、乳房内自然免疫において重要な役割を担う。乳牛の栄養状態は免疫細胞の機能と密接に関わっているが、健康牛の乳房内マクロファージ機能と乳成分との関係について十分に報告されていない。そこで、健康牛の乳成分および免疫関連因子の遺伝子発現量を測定し、関係性を検討した。

【材料および方法】

分娩後日数 22～505 日までの臨床的に健康なホルスタイン種搾乳牛延べ 87 頭を供試牛とした。各個体の C 乳房からカテーテルを用いて 100ml 採乳した。乳成分の濃度は Foss 社 MilkScanTM により測定した。乳汁から体細胞を分離、RNA を抽出して cDNA を合成後、免疫関連因子の遺伝子発現量は Real-Time PCR 法により測定した。各項目の相関性は Spearman の順位相関係数を用いた。1 産、2 産および 3 産以上の 3 群として各群の各遺伝子発現量について差を求めめるために、Kruskal-Wallis 検定および Steel-Dwass 検定を用いた。これら検定で $p < 0.05$ を有意水準とした。

【成績】

IL-1、IL-6、IL-8、Arginase、Batf、PTX、CCL1、CXCL13、TLR4 との間に各々正の相関が確認され、IL-10、TGF、MAPK、CCL5、CCL14、TLR2 との間に各々正の相関が確認された。SCC と IL-10、MARK、PAOX、CCL5 および CCL14 との間に負の相関が確認された。各遺伝子の発現量において、産次、分娩後日数による有意差はそれぞれ認められず、統計的に明らかな関係性は認められなかった。

【考察】

本結果から、M1 型マクロファージの関連因子として IL-1、IL-6、IL-8、Arginase、Batf、PTX、CCL1、CXCL13 ならびに TLR4、また M2 型マクロファージの関連因子として IL-10、TGF、MAPK、CCL5 ならびに CCL14 とに分類できた。TLR2 は一部の M2 マーカーと相関が得られたことから、グラム陽性細菌の動向と乳房内の M2 マクロファージとに関係している可能性がある。現在、乳中の細菌との関係を調査中である。

MEL-B の構成因子に着目した黄色ブドウ球菌の抗菌活性に関する作用機序解明

○山内清哉¹⁾、川原顕生²⁾、菅原知宏²⁾、山本周平²⁾、北林雅夫²⁾、曾我部敦²⁾、秦英司³⁾、
麻生 久¹⁾、米山 裕¹⁾、古川睦実¹⁾、野地智法¹⁾

1) 東北大院農、2) 東洋紡、3) NARO 動物衛生研究部門

【背景・目的】

家畜生産現場において甚大な経済損失をもたらす牛乳房炎を治療する際に、主に抗生物質が使用されるが、抗生物質の多用による薬剤耐性菌の出現が大きな問題となっている。MEL-B

(Mannosylerythritol lipid-B) は、*Pseudozyma tsukubaensis* を植物油脂などと共に培養することで得られるバイオサーファクタントであり、糖に二本の脂肪酸が結合した構造を特徴としている。MEL-B はグラム陽性菌に対する抗菌活性を有するが、牛の乳房炎を引き起こす黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性およびその作用機序に関する知見は少ない。本研究では、抗生物質非依存的に黄色ブドウ球菌性の牛乳房炎を防除するための学術基盤を形成すべく、新規消毒剤としての MEL-B の抗菌活性を実証することに加え、その作用機序を解明することを目的とした。

【材料・方法】

乳牛を用いた *in vivo* 感染試験を通して、乳房炎起因菌として実証されている黄色ブドウ球菌

(BM1006 株) および、大腸菌 (JM109 株) に対する MEL-B の抗菌活性を、CFU count 法により評価した。また、蛍光物質の一つである nitrobenzoxadiazole (NBD) を標識した MEL-B を用いることで、BM1006 株および JM109 株に対する MEL-B の結合性をフローサイトメトリー解析により解析した。加えて、MEL-B の作用機序を明らかにすべく、アルカリ処理により MEL-B 内のエステル結合を解離し、Mannosylerythritol (ME) と二本の脂肪酸 (カプリル酸およびミリストレイン酸) にしたもの、あるいはそれら単体を単に混合したものをを用いて BM1006 株を処理した後、その増殖を CFU count 法により評価した。

【結果・考察】

10 ppm (=0.015 mM) 以上の MEL-B を BM1006 株に処理することで、その増殖は有意に抑制され、その効果は、特に培養開始数時間後に顕著に認められた。一方で、そのような増殖阻害効果は、JM109 株に対しては認められなかった。NBD 標識 MEL-B を用いた試験から、各菌株に対する MEL-B は増殖阻害効果の有無に関わらず、MEL-B は BM1006 株および JM109 株の双方に結合した。また、MEL-B の構成因子である ME には抗菌活性は認められなかったが、カプリル酸およびミリストレイン酸は、それぞれ 10 mM もしくは 1 mM 以上の濃度で培地中に添加することで抗菌活性が認められた。BM1006 株に対する MEL-B の有用性は、ME にカプリル酸およびミリストレイン酸がエステル結合で連結していることが必須であり、事実、その結合を解離した場合、抗菌活性は著しく低下することが示された。これらの結果から、カプリル酸やミリストレイン酸といった抗菌活性を有した脂肪酸が、ME と連結することで効率よく微生物表層に運搬された後、JM109 株に対しては認められない BM1006 株に対する特有の反応が生じることが、MEL-B が有する BM1006 株に対する抗菌活性に重要であることが示唆された。

シクロフィリン A 誘発乳房炎により変化する乳中タンパク質の解析

○秋元 宏介、大崎 雄介、野地 智法、北澤 春樹、麻生 久、白川 仁

東北大院農

【はじめに】

乳房炎は乳腺に病原性微生物が侵入し、乳腺上皮細胞から炎症誘起因子が分泌され、白血球が遊走して乳汁中の体細胞数が増加して起きる。乳房炎発症時に上皮細胞から分泌される炎症誘起因子を検索したところ、シクロフィリン A (CyPA) が炎症に伴い増加していた。CyPA は肺炎や動脈瘤の炎症誘起、白血球の遊走や炎症関連分子の活性化誘導を示す。組換え CyPA をウシの乳頭孔から投与すると、新たな CyPA が乳汁中に分泌されるとともに、乳汁中の体細胞数の増加が観察され、CyPA は乳房炎を誘起することが判明した。本研究はウシ乳腺に対する CyPA 誘発乳房炎の機構を解明する目的で研究を行った。

【方法】

組換え CyPA(0.1、1、10 mg)、および PBS(コントロール)をウシ乳房の乳頭孔から、夕方投与した。翌朝、搾乳した乳汁の体細胞数を計測し、乳房炎が誘起された個体の乳汁を脱脂し乳清サンプルを得た。それらのサンプルを Tandem Mass Tag (TMT) 標識法を用いた LC-MS/MS 分析を行って、乳汁中のタンパク質を網羅的に解析した。変化が見られたタンパク質について、遺伝子オントロジー (GO) エンリッチメント解析、KEGG パスウェイ解析を行った。

【結果と考察】

LC-MS/MS 解析によって、300 種のタンパク質を同定した。コントロールと比べ、CyPA 投与により 2 倍以上に増加したタンパク質は 72 種 (10 mg 投与) 存在し、そのうち 56 種が好中球由来と推定された。それらの中には CyPA も含まれ、CyPA の乳腺刺激は新たな CyPA を乳汁中に分泌するという結果が裏付けられた。また、乳汁中の体細胞数と比較すると、発現量に大きな差があるタンパク質は、遊走された白血球の量に起因している可能性が考えられた。一方、乳房炎時に乳腺上皮細胞で発現が増加すると考えられている血清アミロイド A (SAA) は CyPA 投与により増加したが、投与量との相関が見られなかった。以上のことから、乳腺上皮細胞に対する CyPA 刺激は好中球などの白血球を遊走させタンパク質の放出を促し、乳腺上皮細胞から SAA を分泌させる可能性が考えられた。

子豚へのサーコウイルス 2 型ワクチンと豚丹毒不活化ワクチンの混合接種試験

○辻 厚史、出口祐一郎

宮崎農業共済組合

【はじめに】

養豚場の感染症をコントロールするうえでワクチンは有効な手段である反面、接種にかかわる作業負担は無視できない。そこで今回、仕様書では混合接種が不可とされるサーコウイルス 2 型 (PCV2) ワクチンと豚丹毒不活化ワクチンを混合接種することで省力化を図ったので、その検証結果を報告する。

【材料および方法】

母豚 1000 頭一貫経営の養豚場で、過去の疾病発生状況から PCV2 ワクチンと豚丹毒ワクチンの継続接種が不可欠であった。接種方法は仕様書に従い、従来接種群では PCV2 ワクチンを 35 日齢で 1 回、豚丹毒ワクチンを 42 日齢と 63 日齢の 2 回の合計 3 回接種していたが、混合接種群では規定量の半量を混合したワクチンを 35 日齢と 63 日齢の 2 回接種とした。両群について、60 日齢および 150 日齢で両疾病の抗体検査およびサーコウイルスの PCR 検査で効果を比較した。

【成績】

PCV2 の ELISA 値 (平均±標準偏差) は、60 日齢において従来接種群で 10.9 ± 4.3 、混合接種群で 9.4 ± 3.4 、150 日齢ではそれぞれ 10.0 ± 2.7 、 12.0 ± 2.5 であった。PCR 検査では両群、両日齢ともすべて陰性であった。豚丹毒の抗体価 (生菌凝集反応) は両群とも 8 倍以上で発症例は認められなかった。また副反応は、規定通り接種するよりも混合接種で顕著に軽減した。

【考察】

ワクチンは感染症を制御するうえで有効な手段であるが、接種にかかわる労力とコスト、豚へのストレスや接種に伴う人為的な感染誘発のリスクなど、接種に伴うデメリットも考慮しなければならない。今回の混合接種試験において、規定通りの接種法と同等の効果を得られたうえに、副反応が 0.5D 混合接種で顕著に軽減したことも有意義であった。

今回の結果から、獣医師はワクチンを規定通りに接種することに固執するのではなく、その効果や弊害を確認したうえで、感染症をマネジメントするための最良の接種法を、各農場の状況に応じて模索することが必要であると感じた。

豚における経穴 (GV1, GV14) ワクチン接種法の検討

○蓮田安信¹⁾、高橋勇治¹⁾、江川紗智子¹⁾、瀧下梨英²⁾、平山祐理¹⁾

1) (独) 家畜改良センター、2) (独) 家畜改良センター・宮崎牧場

【はじめに】

イヌ、ラットなどにおいて督脈といわれる経穴 GV1 (尾根と肛門の間の窪み中央)、GV14 (背側正中線と交差する胸部と頸部の境界部位) に接種する方法は、ほかの部位に比べ免疫応答が良好で、牛において GV1 については接種負荷が少ないことが報告されている。一方、豚における経穴部位接種後の抗体反応の報告は、我々の知る限り豚熱ワクチンの GV1 への接種 (蓮田ら、福島県獣医畜産技術総合研究発表会、R3.7) のみである。そこで今回、豚パルボウイルス感染症不活化ワクチン、日本脳炎不活化ワクチンを用い経穴 GV1、GV14 および一般的接種部位の耳根部に接種した際の抗体反応および接種時の回避行動を観察し、比較したので報告する。

【材料および方法】

豚パルボウイルス感染症不活化ワクチンおよび日本脳炎不活化ワクチンについて、それぞれ育成雌豚計 44 頭、39 頭を対象に皮下接種した。GV1 接種群と耳根部接種群、GV14 接種群と耳根部接種群の HI 抗体価および変化率を比較した。回避行動については GV1 接種群と耳根部接種群、GV14 接種群と耳根部接種群で比較した。

【結果および考察】

豚パルボウイルス感染症不活化ワクチンおよび日本脳炎不活化ワクチンにおける GV1 接種群と GV14 接種群と耳根部接種群の接種後の HI 抗体価と HI 抗体価の変化率に有意差はなかった。この抗体応答の成績は、演者らの豚熱ワクチンにおける GV1 接種群と耳根部接種群の接種後の ELISA-SP 値に有意差はなかった報告と一致した。接種前後の回避行動の比較では GV1 接種群は耳根部接種群よりも回避行動が少なく、GV14 接種群の回避行動はほかの部位に比べ多かった ($P < 0.05$)。以上の結果から GV1 接種は一般的接種部位の耳根部接種や GV14 接種に比べ豚へのストレスが少なく、抗体価もほかの部位と同等の値であり、皮下接種可能なワクチンの接種部位として最適な箇所であると考えられた。即ち耳根部で豚が興奮した際の接種箇所の選択肢の一つとして獣医師が考慮すべき経穴部位と考えられた。

診断が困難な症例におけるホールゲノムシーケンスの応用－黒子産多発養豚場での検討－

○塚原隆充¹⁾, 水上佳大²⁾, 井上亮³⁾

1) 栄養病理研、2) あかばね動物クリニック、3) 摂南大・農

【はじめに】

家畜診療において、未知の異常に遭遇するケースがあるが、異常の原因が不明であるため対策を立てることは難しい。一方で、近年の遺伝子検査技術の向上により、長年未知であった「ブタ先天性痙攣症(ダンス病)」がペスチウイルス感染によるものであることが示されたことは記憶に新しい (Arruda et al. 2016)。本研究では、ある養豚場内で発生した黒子娩出多発例について、上記報告でも利用されたホールゲノムショットガンシーケンス法を用いてその原因探索を試みたので報告する。

【材料および方法】

愛知県下の養豚場で、黒子の娩出が多発したため、黒子 2 頭の提供を受けた。一方で、隣接する、上記異常が認められない農家 (2 農場は同一種豚場から種豚搬入、同メーカー飼料で飼養) から白子 2 頭の提供を受けた。上記の娩出直後の屠畜体は冷蔵下でクリニックに搬入し、肝臓及び腎臓を無菌的に採取した。なお、白子/黒子の剖検は別日に行った。採材した臓器は RNA-later に浸漬し、分析まで -80°C で凍結保存した。サンプルから RNA 抽出を行い、第 3 世代シーケンサー MinION (Oxford Nanopore) を用いてホールゲノムショットガンシーケンスを行った。得られたシーケンスデータからブタ由来の遺伝子を除外し、残余遺伝子配列について BLANTn データベースを用いて既知遺伝子との照合を行った。

【成績】

白子からはシトロバクター属菌及び大腸菌と相同する遺伝子が多く検出されたのに対し、黒子内では大腸菌の他に、*Aerococcus viridans* と相同する遺伝子が特徴的に検出された。

【考察】

A. viridans はヒトでは心内膜炎、尿路感染症、関節炎、髄膜炎と関連しているという報告があり、ブタでも通常は無菌である炎症部位 (関節、脳、肺) から単離されたという報告がある (Martin et al. 2007)。以上の結果から、当該農場での黒子娩出は、繁殖母豚への *A. viridans* 感染が関係していると推察された。