

平成29年3月31日

安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究委託事業
研究成果報告書

課題番号：RS2605

「簡便かつ頻回採取が可能な検体を用いた家畜疾病の検査方法の開発」

研究期間：平成26年度～平成28年度（3年間）

研究総括者名：内田 郁夫

試験研究機関名：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
畜産研究部門

JNC株式会社

アイデックス ラボラトリーズ株式会社

（株）微生物化学研究所

共立製薬株式会社

1. 研究目的

家畜伝染病を早期に摘発し、そのまん延防止を図るためには、サーベイランスの頻度を増やすことで摘発率を高めることが効果的である。

しかしながら、サーベイランスの検体として血液（血清）を採取する際、獣医師・農家の労力及び金銭的コストの負担、家畜へのストレス等による生産性低下等の問題があり、サーベイランスの頻度を増やす場合には、これらの問題を改善することが切望されている。

このため、ブルセラ病、牛白血病、ヨーネ病、オーエスキー病のそれぞれの診断薬として承認を受けているエライザキットについて、乳汁または唾液を検体とするものの可能性を検証し、その実用化のために薬事法上の承認申請に必要なデータを収集する。

2. 研究内容

(1) 中課題1：乳汁を検体としたブルセラ抗体検査法の開発

ブルセラ病の診断薬として承認を受けている市販エライザキットを用いて、乳汁を検体とするものの可能性を検証し、感度・特異度など薬事法上の事項変更承認申請に必要なデータを収集する。

1) 小課題1：検査方法の検討【農研機構 動物衛生研究部門】

国内で収集した乳にブルセラ抗体陽性血清を添加したものについて、診断薬として市販されているエライザキットを用いて検体の適合性及び前処理の必要性などを検討する。

2) 小課題2：血清エライザとの比較解析【農研機構 動物衛生研究部門】

我が国はブルセラ病清浄国であるため患者からの検体収集は不可能である。そのため、本病の発生が続く他国の機関に協力を依頼して検体（血清及び乳）の収集を行い、乳を検体とした場合の感度・特異度の解析等を行いカットオフ値の検討を行う。

相手国への協力打診等の連絡調整は本課題開始と共に着手する予定。なお、ブルセラ発生国からの乳の国内持ち込みは困難であることから、本内容は海外に出張して実施することが必須となる。

(2) 中課題2：乳汁を検体とした牛白血病抗体検査法の開発

1) 小課題1：検体採取条件の検討【農研機構 畜産研究部門】

前搾りは異常乳のチェックや射乳反応の促進等の目的で必ず行われる唯一の手搾り工程であることから、前搾り乳は採材のし易さの点で最も適している。しかし、乳成分や体細胞は一回の搾乳時間内や一日数回行われる搾乳サンプル間でも大きく変動し、また前搾り乳には夾雑物も多く含まれることから、検査サンプル

としての適性を評価することが重要である。そこで、牛白血病ウイルス (BLV) 自然感染牛群を用いて、一回の搾乳時間内や日内における抗 BLV 抗体の変動を評価し、前搾り乳の本抗体検査材料としての有用性を検証する。

2) 小課題 2 : 乳中抗体検出法の精度検証【農研機構 動物衛生研究・畜産研究部門】

乳汁中の抗 BLV 抗体が、搾乳時期に依らず市販の血中抗体検出法 ELISA キット (以下血清 ELISA) で検出可能か否かを検証する。

具体的な実施予定内容は以下の通り

- ① 牛の乳汁を用いて血清 ELISA を実施する際、非特異的もしくは阻害反応が生じないように、乳汁の前処理方法の検討を行う。
- ② BLV 感染牛の血液および乳汁を分娩直後から乾乳期に入るまで定期的に採取し、血清 ELISA による検出結果を比較する。
- ③ あらかじめ血清抗体検査により感染の有無が明らかな搾乳牛の乳汁を血清 ELISA 法で検査し、血清を用いた場合と同等の感度・特異度を有しているか否かを検証する。

(3) 中課題 3 : 乳汁を検体としたブルセラ病及び牛白血病抗体検査法の野外臨床試験

1) 小課題 1 : 野外臨床試験 (JNC 株式会社)

(1) 及び (2) の成績に基づき、乳汁を用いる検査の実用化に当たって必要な薬事法上の承認申請に必要となる臨床試験等のデータを収集する。

(4) 中課題 4 : 口腔液を用いた抗オーエスキー病抗体検査方法の開発

1) 小課題 1 : 使用方法の最適化【アイデックス ラボラトリーズ株式会社】

口腔液検体 (以下、OF という。) の採取法、サンプリングサイズ、保存方法、前処理、希釈倍率、判定基準等の検討と最適化を行う。

2) 小課題 2 : 性能及び臨床試験【アイデックス ラボラトリーズ株式会社】

既存の測定法である血清検体と OF との比較試験等を行い、OF を用いる検査の実用化に当たって薬事法の承認申請に必要となるデータを収集する。

3) 小課題 3 : 抗体応答試験【アイデックス ラボラトリーズ株式会社】

1) 及び 2) の試験結果により、必要に応じて実験感染又はワクチン接種による抗体応答試験を行う。

(5) 中課題 5 : 「ヨーネスクリーニング・ブルキエ」を用いた新たな検査方法の検証

簡便かつ頻回採取が可能な乳汁を検体とする検査方法を確立し、薬事法上の承認申請に必要な成績を収得する。具体的には乳汁と血清について、感度と特異度、カット

トオフ値についての比較検討し、臨床試験等の成績を取得し、研究期間終了後に速やかな事項変更承認申請を行う。

1) 小課題1：検体及び室内試験データの収集【株式会社 微生物化学研究所】

ヨーネ病検査が終了し、ヨーネ病陰性または陽性であることが確定している牛の血清と乳汁を収集する。法定伝染病である野外ヨーネ病感染牛由来検体入手については、行政的な混乱を招かない収集ルートの構築が必要である。

収集した検体について「ヨーネスクリーニング・プルキエ」を用いて抗体測定を行い、乳汁を検体とすることの可能性を検証する。

2) 小課題2：室内試験データ解析【株式会社 微生物化学研究所】

乳汁を検体とした場合の感度と特異度を調査し、血清を用いた場合との比較、及びカットオフ値について検討する。

3) 小課題3：臨床試験等の実施【株式会社 微生物化学研究所】

乳汁を用いる検査の実用化に当たって薬事法上の承認申請に必要な、臨床試験等のデータを収集する。

(6) 中課題6：「ヨーネライザ・スクリーニング KS」を用いた新たな診断法の開発

1) 小課題1：ヨーネ病感染牛由来材料の収集ルートの構築【共立製薬株式会社】

法定伝染病である野外ヨーネ病感染牛由来検体入手については、行政的な混乱を招かない収集ルートの構築が必要である。

2) 小課題2：検査材料の検討【共立製薬株式会社】

乳汁の検体材料としての適合性と前処理の必要性について検討する。

3) 小課題3：用法・用量の設定【共立製薬株式会社】

検査材料について非特異反応の出現等について検討し、用法・用量の設定を行う。

4) 小課題4：性能に関する試験【共立製薬株式会社】

実験感染牛又は野外感染牛を対象として、乳汁等の簡便に採取可能な検体について感度・特異性等を検討する。

5) 小課題5：判定基準の設定【共立製薬株式会社】

血清を用いた場合との比較データ解析により、本エライザキットの判定基準の設定を行う。

6) 小課題6：乳汁等を用いる検査方法の実用化【共立製薬株式会社】

収集したデータを基に薬事法上の承認申請に必要なデータ整理を行う。

(2) 年次計画

| 研究課題 | 26年度 | 27年度 | 28年度 |
|-----------------------------------|----------------------|-------------------|---------|
| 1 乳汁を検体としたブルセラ抗体検査法の開発 | | | |
| (1) 検査方法の検討 | 農研機構 動物衛生研究部門 | | |
| (2) 血清エライザとの比較解析 | 農研機構 動物衛生研究部門 | | |
| 2 乳汁を検体とした牛白血病抗体検査法の開発 | | | |
| (1) 検体採取条件の検討 | 農研機構 畜産研究部門 | | |
| (2) 乳中抗体検出法の精度検証 | 農研機構 動物衛生研究部門、畜産研究部門 | | |
| 3 乳汁を検体としたブルセラ病及び牛白血病抗体検査法の野外臨床試験 | | | |
| (1) 野外臨床試験 | | | JNC株式会社 |
| 4 口腔液を用いた抗オーエスキー病抗体検査方法の検討 | | | |
| (1) 使用方法の最適化 | アイデックスラボラトリーズ株式会社 | | |
| (2) 性能及び臨床試験 | アイデックスラボラトリーズ株式会社 | | |
| (3) 抗体応答試験（必要に応じて） | | アイデックスラボラトリーズ株式会社 | |

| | | | |
|--|---|---|---------------------------------|
| <p>5 「ヨーネスクリーニング・プルキエ」を用いた新たな検査方法の検証</p> <p>(1) 検体及び室内試験データの収集</p> <p>(2) 室内試験データ解析</p> <p>(3) 臨床試験等の実施</p> | | <p>微生物化学研究所</p> <p>微生物化学研究所</p> <p>微生物化学研究所</p> | |
| <p>6 「ヨーネライザ・スクリーニングKS」を用いた新たな診断法の検証</p> <p>(1) ヨーネ病感染牛由来材料の収集ルート構築</p> <p>(2) 検査材料の検討</p> <p>(3) 用法・用量の設定</p> <p>(4) 性能に関する試験</p> <p>(5) 判定基準の設定</p> <p>(6) 乳汁等を用いる検査方法の実用化</p> | <p>共立製薬株式会社</p> <p>共立製薬株式会社</p> <p>共立製薬株式会社</p> <p>共立製薬株式会社</p> | | <p>共立製薬株式会社</p> <p>共立製薬株式会社</p> |
| <p>所要経費（合計）</p> | <p>10,772 千円</p> | <p>11,984 千円</p> | <p>11,252 千円</p> |

(3) 実施体制

(中課題担当者には○、小課題担当者には△を付している)

| 項目 | 担当研究機関 | 研究担当者 | エフォート (%) |
|----------------------------|----------------------|---|---------------------------------|
| 研究総括者 | 国研) 農研機構 動物衛生研究部門 | 内田 郁夫 | 5% |
| 1 乳汁を検体としたブル セラ抗体検査法の開発 | 国研) 農研機構 動物衛生研究部門 | ○ 大崎 慎人 (平成 26 年 6 月～平成 27 年 3 月) 内田 郁夫 (平成 27 年 7 月～平成 28 年 3 月) 大崎慎人 (平成 28 年 4 月～) | 15% |
| (1) 検査方法の検討 | 国研) 農研機構 動物衛生研究部門 | △ 大崎 慎人 (平成 26 年 6 月～平 成 27 年 3 月) | 15% |
| (2) 血清エライザとの比 較解析 | 国研) 農研機構 動物衛生研究部門 | △ 内田 郁夫 (平成 27 年 7 月～平 成 28 年 3 月) △ 大崎慎人 (平成 28 年 4 月～) 勝田 賢 上野 勇一 江口 正浩 | 前出 15% 5% 5% 5% |
| 2 乳汁を検体とした牛白 血病抗体検査法の開発 | 国研) 農研機構 動物衛生研究部門 | ○ 小西美佐子 | 15% |
| (1) 検体採取条件の検討 | 国研) 農研機構 畜産研究部門 | △ 石崎 宏 | 10% |

| | | | | |
|---|---------------------------------|---|---|----------------------|
| (2) 乳中抗体検出法の精度検証 | 国研) 農研機構 動物衛生研究部 門・畜産研究部門 | △ | 小西美佐子 小林 創太 川 嵩 健 司 (平成28 年12月~) 石崎 宏 | 前出 5% 5% 前出 |
| 3 乳汁を検体としたブル セラ病及び牛白血病抗体 検査法の野外臨床試験 | JNC 株式会社 | ○ | 若本 裕晶 | 10% |
| (1) 野外臨床試験 | JNC 株式会社 | △ | 若本 裕晶 | 前出 |
| 4 口腔液を用いた抗オー エスキー病抗体検査方法 の開発 | アイデックス ラボラトリーズ 株式会社 | ○ | 漆島 隆喜 | 2% |
| (1) 使用方法の最適化 | アイデックス ラボラトリーズ 株式会社 | △ | 漆島 隆喜 (平成26年 6月~平成 27年7月) 末久 裕仁 (平成27年 8月~) 堀江 美紀 (平成26年 6月~平成 27年7月) 日下部博子 (平成27年 8月~) 渡辺 千鶴 (平成26年 6月~平成 27年7月) 池田 恵子 (平成26年 6月~平成 27年7月) 相澤 早苗 平成26年6 月~平成27 年7月) | 前出 5% 10% |
| (2) 性能及び臨床試験 | アイデックス ラボラトリーズ | △ | 漆島 隆喜 (平成26年 | 前出 |

| | | | | |
|------------|---------------------------|---|--|----------------------------------|
| | 株式会社 | | 6 月～平成 27 年 7 月) 未久 裕仁 (平成 27 年 8 月～) 堀江 美紀 (平成 26 年 6 月～平成 27 年 7 月) 日下部博子 (平成 27 年 8 月～) 渡辺 千鶴 (平成 26 年 6 月～平成 27 年 7 月) 池田 恵子 (平成 26 年 6 月～平成 27 年 7 月) 相澤 早苗 平成 26 年 6 月～平成 27 年 7 月) | 前出 前出 前出 前出 前出 前出 |
| (3) 抗体応答試験 | アイデックス ラボラトリー ズ株式会社 | △ | 漆島 隆喜 (平成 26 年 6 月～平成 27 年 7 月) 未久 裕仁 (平成 27 年 8 月～) 堀江 美紀 (平成 26 年 6 月～平成 27 年 7 月) 日下部博子 (平成 27 年 8 月～) 渡辺 千鶴 (平成 26 年 6 月～平成 27 年 7 月) | 前出 前出 前出 前出 前出 |

| | | | | |
|--|------------------|---|--|---------------------------|
| | | | 池田 恵子 (平成 26 年 6 月～平成 27 年 7 月) 相澤 早苗 平成 26 年 6 月～平成 27 年 7 月) | 前出 前出 |
| 5 「ヨーネスクリーニン グ・プルキエ」を用いた 新たな検査方法の検証 | 株式会社微生物 化学研究所 | ○ | 大石 英司 | 5% |
| (1) 検体及び室内試験デ ータの収集 | 株式会社微生物 化学研究所 | △ | 野呂 太一 (平成 26 年 6 月～平成 29 年 1 月) 長田 秀和 (平成 26 年 6 月～平成 28 年 3 月) 今泉 好能 (平成 26 年 6 月～) | 10% 10% 10% |
| (2) 室内試験データ解析 | 株式会社微生物 化学研究所 | △ | 長田 秀和 (平成 26 年 6 月～平成 28 年 3 月) 野呂 太一 (平成 26 年 6 月～平成 29 年 1 月) 網本 勝彦 (平成 29 年 2 月～) | 前出 前出 5% |
| (3) 臨床試験等の実施 | 株式会社微生物 化学研究所 | △ | 今泉 好能 野呂 太一 長田 秀和 | 前出 前出 前出 |
| 6 「ヨーネライザ・スク リーニング KS」を用いた 新たな診断法の検証 | 共立製薬株式会 社 | ○ | 土屋 明宏 | 10% |

| | | | | |
|-------------------------|----------|---|--|----|
| (1) ヨーネ病感染牛由来材料の収集ルート構築 | 共立製薬株式会社 | △ | 谷中 匡(平成26年6月～平成28年9月) | 5% |
| (2) 検査材料の検討 | 共立製薬株式会社 | △ | 土屋 明宏 | 前出 |
| (3) 用法・用量の設定 | 共立製薬株式会社 | △ | 土屋 明宏 | 前出 |
| (4) 性能に関する試験 | 共立製薬株式会社 | △ | 土屋 明宏 | 前出 |
| (5) 判定基準の設定 | 共立製薬株式会社 | △ | 谷中 匡(平成26年6月～平成28年9月) 土屋 明宏(平成28年4月～) | 前出 |
| (6) 乳汁等を用いる検査方法の実用化 | 共立製薬株式会社 | △ | 土屋 明宏 | 前出 |

3 研究推進会議の開催状況

別紙の（１）のとおり

4 研究成果の概要

I 主要な成果

(1) 成果の内容（別紙の（2）参照）

1) 乳汁を検体としたブルセラ抗体検査法の開発

JNC 社牛ブルセラエライザキットで乳汁を検体としてエライザを行うための検査方法を確立し、本法の感度・特異度が従来の血清エライザと同等であることを示し、またスクリーニング目的でのカットオフ値の設定も行うことができた（p14）。

2) 乳汁を検体とした牛白血病抗体検査法の開発

JNC 社牛白血病エライザキットを用いた乳汁エライザ法実施において必要なサンプルの採材条件および処理方法を確立したほか、乳汁エライザ法が血清エライザ法と同等の精度を有していることを確認できた（p26）。

(2) 成果の活用（別紙の（2）参照）

1) キットの製造販売企業と協力して、今後薬事における事項変更の承認申請を行うことで、行政が活用できる検査法として実用化を目指す予定である。

2) キットの製造販売企業と協力して、今後薬事における事項変更の承認申請を行うことで、行政が活用できる検査法として実用化を目指す予定である。

謝辞

本研究課題を実施するにあたり協力頂いた国内外機関の関係者の皆様に深謝いたします。

特に、北海道庁には中課題5，中課題6のためにヨーネ病患畜由来の提供を、独立行政法人 家畜改良センターには、中課題1，中課題5，中課題6のために、ヨーネ病陰性牛検体・ブルセラ病陰性牛検体の提供を頂き、課題推進のために大きな協力を頂きました。

また、北海道庁 立花 智先生、鹿児島県庁 上村美由紀先生には、実施機関を通じて課題推進のために意義深いご助言を頂きました。

II 各研究課題の成果

(1) 中課題1：乳汁を検体としたブルセラ抗体検査法の開発

1) 工程管理及び成果目標

| 工程表 |
|---|
| ①乳汁の検体としての適合性や前処理の必要性をスパイク試験により検証（小課題1 関連）。海外協力機関への依頼と連絡調整（小課題2 関連）（平成26年度） |
| ↓ |
| ②海外における陽性検体の収集。乳汁検体と血清検体の抗体価の相関の解析。（小課題2 関連）。（平成27年度・28年度）※1 |
| ↓ |
| ③乳汁を検体とした場合の感度・特異度や判定基準などの検討。（平成28年度） |
| 成果目標： 抗体検査の薬事法上の承認申請に必要なデータ（検体の乳汁と血清について、感度と特異度や検査の精度についての比較）を取得し、検査方法を確立する。 |

2) 各工程の進捗状況及び成果

【工程表の①】

(1) 小課題1：検査方法の検討

国内で収集した乳にブルセラ抗体陽性血清を添加したものについて、診断薬として市販されているエライザキットを用いて検体の適合性及び前処理の必要性などを検討した。

スパイク試験の成績から乳汁を検体とする場合は前処理（乳清化※）が必要であり、また乳清は希釈せずとも検査が可能と判明した。（平成26年度）

※ 乳清（whey）：ここでは全乳を3000 rpm, 4°C, 20 min 遠心し、脂肪分と沈殿を含まない中間層を採取したもの

表1 市販ノンホモ牛乳を用いた添加試験のエライザ (%P) 値*

| 希釈倍率** | 全乳 | 乳清 | 血清 |
|--------|------|-------------|-------------|
| 1000 | 23.2 | 76.0 | 80.6 |
| 1500 | 21.8 | 65.4 | 63.5 |
| 2000 | 4.0 | 42.2 | 51.4 |
| 2500 | 4.3 | 30.3 | 43.2 |
| 3000 | 5.1 | 22.6 | 31.2 |

*用いた血清エライザキットの既定カットオフ値は 30

**陽性血清を全乳または乳清、陰性血清で 10 倍希釈したものを、血清希釈液で希釈した。

乳清では 2500 倍までエライザ値陽性となったが、全乳では 1000 倍でも陰性を示し、全乳では乳脂肪等が反応を阻害しているものと考えられた。

表2 希釈媒体（乳清または血清希釈液）間のエライザ (%P) 値の比較

| 希釈倍率* | 乳清 | 血清希釈液 |
|-------|-------------|-------------|
| 1000 | 80.6 | 71.0 |
| 1500 | 63.5 | 55.6 |
| 2000 | 51.4 | 41.7 |
| 2500 | 43.2 | 34.4 |
| 3000 | 32.2 | 27.6 |

*陽性血清を乳清で 200 倍希釈したものを、各溶媒で希釈した

血清添加乳清を添付希釈液で希釈した場合も、乳清で希釈した場合も同様のエライザ値を示したことから、希釈無しの乳清を直接検体とすることは可能と考えられた。また、凍結による検査結果への影響も少ないと考えられた。

【工程表の②】

(2) 小課題 2：血清エライザとの比較解析

1. 血清エライザとの比較解析（平成 27 年度、28 年度）

タイ国立家畜衛生研究所の協力の下、タイにおけるブルセラ発生農場由来 190 頭分とタイのブルセラ非発生農場由来 106 頭分の血清・乳汁検体を収集し解析に用いた。発生農場由来血清検体については補体結合反応（CF）を実施し、個体のステータスを確認した（図 1）。またブータン王国国立家畜衛生センターと協力関係を構築し、同センターの職員を農研機構動物衛生部門に招へいし検体収集方法、試験方法のトレーニングを行い、ブータンにおける発生農場由来 44 頭分の検体を収集し、解析を行った。さらに国内の非発生農場由来検体として、独）家畜改良センターの協力を得て 252 頭分の検体を、また別途 81 頭分の検体を収集し解析に用いた。

タイ検体を用いた予備試験から披験乳清の希釈条件はキット添付希釈液で 2 倍希釈と決定し、カットオフ値を 30%、20%、15%に変化させて表 3 上段に示したタイ及び国内の計 629 個体由来の検体の解析を行ったところ、乳清を用いた成績と血清エライザの成績の一致度（Kappa 係数）は、それぞれ Kappa=0.89（30%）、0.90（20%）、0.90（15%）とほぼ同等であり、乳清を用いた ELISA のカットオフ値は既定の血清 ELISA のカットオフ値と同じ%P≥30として問題ないと考えられた（図 2、3）。

上記の希釈条件、カットオフ値を用いて血清と乳清のエライザ値の比較をした結果、乳清エライザと血清エライザの診断結果の一致度は kappa=0.89 と有意に良好で、ブルセラ病血清診断のゴールドスタンダードとされる CF 検査の診断結果とも良好な一致を示し、JNC 社エライザキットによる乳清エライザは従来の血清エライザと同等の診断性能があると考えられた（表 3）。

ブータンの発生農場由来 44 頭分の検体を用いて同様に試験を実施した結果、何らかの理由で陽性コントロールの吸光度が低くなり、成績は採用できないものの、乳清エライザと血清エライザのエライザ値は良好な相関を示すことを確認できた（図 4）。

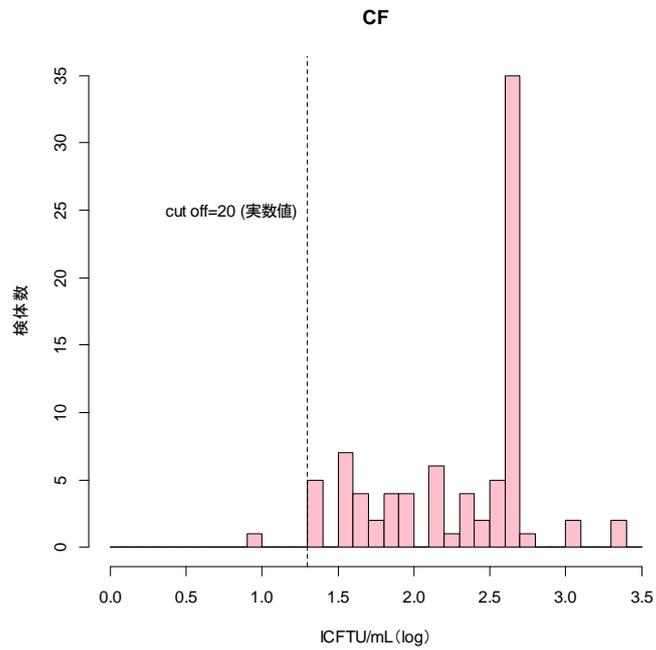


図1 タイ発生農場個体の血清 CF 試験成績の分布

ICFTU/ml: 国際的な CF 成績の表記法、 $ICFTU/ml \geq 20$ の個体は陽性とみなす。横軸を対数としたため陰性個体 ($ICFTU/ml=0$) は示していない。

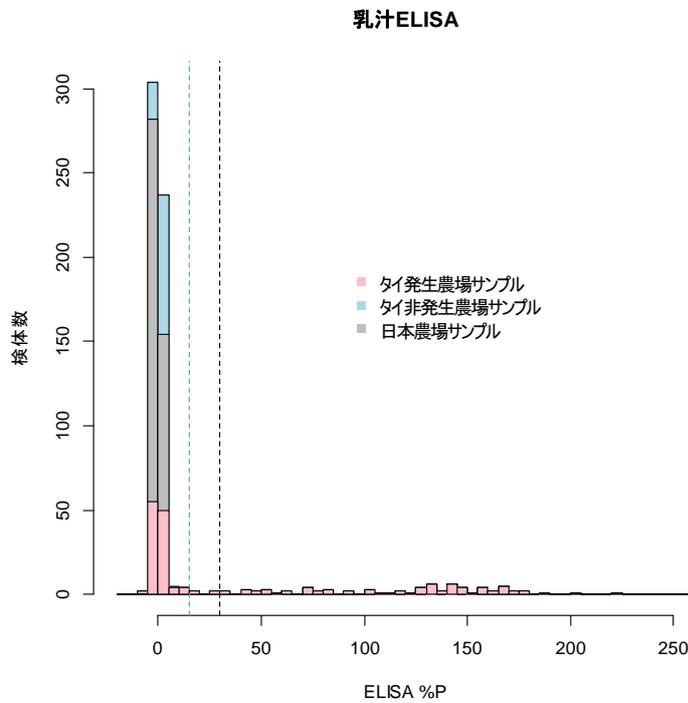
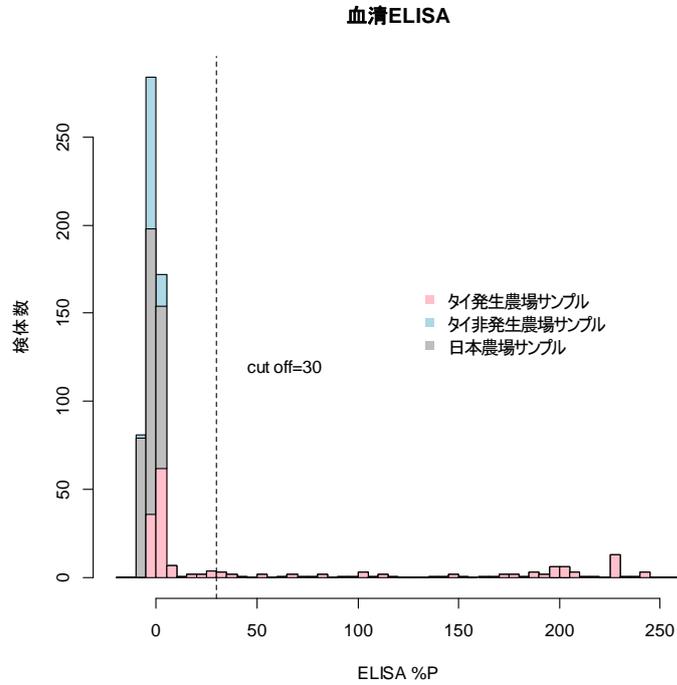


図2 JNC社エライザキットを用いた血清検体（上）と乳清検体（下）のヒストグラム
（黒破線は ELISA 値=30, 緑破線は ELISA 値=15）

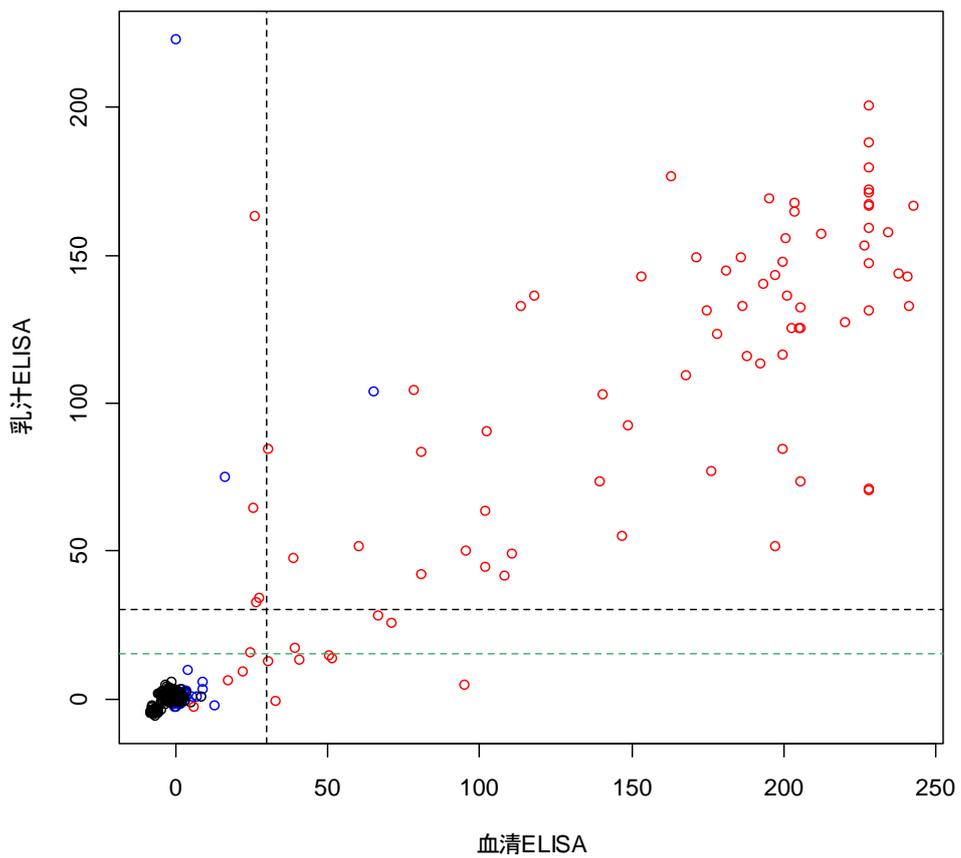


図3 JNC社エライザキットを用いた血清検体（横軸）と乳清検体（縦軸）エライザ値の散布図

黒破線：ELISA 値=30、緑破線：ELISA 値=15、赤丸：CF 試験陽性、青丸：CF 試験陰性、黒丸：CF 試験未実施

表3 各検査方法による診断結果のクロス集計表と統計解析の成績

| 乳汁ELISA vs 血清ELISA | | 血清ELISA | | 計 |
|--------------------|----|---------|-----|-----|
| | | 陽性 | 陰性 | |
| 乳汁ELISA | 陽性 | 67 | 6 | 73 |
| | 陰性 | 9 | 547 | 556 |
| 計 | | 76 | 553 | 629 |

Kappa=0.89, Fisher の正確確率検定 : p<0.01

| 乳汁ELISA vs CF | | CF | | 計 |
|---------------|----|----|-----|-----|
| | | 陽性 | 陰性 | |
| 乳汁ELISA | 陽性 | 70 | 3 | 73 |
| | 陰性 | 14 | 99 | 113 |
| 計 | | 84 | 102 | 186 |

Kappa=0.81 Fisher の正確確率検定 : p<0.01

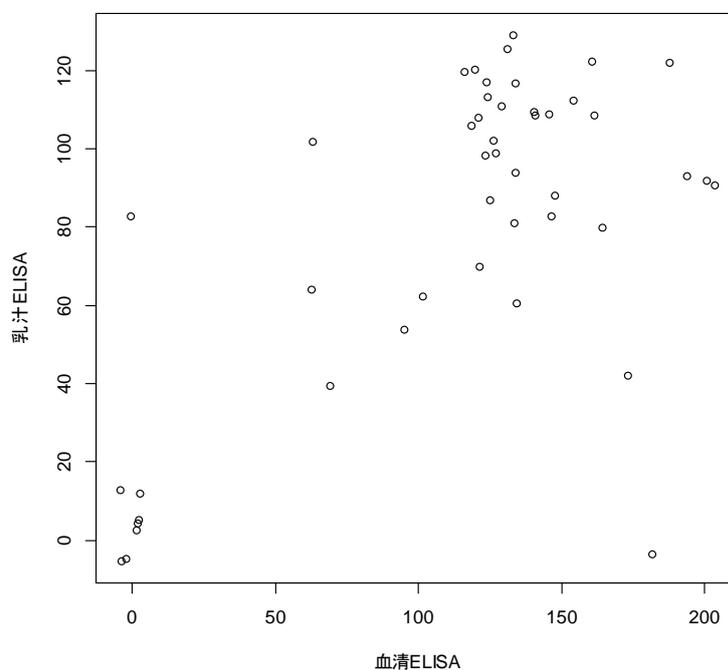


図4 ブータン検体における血清エライザ値（横軸）と乳汁エライザ値（縦軸）の散布図（参考成績）

2. 海外市販乳汁エライザキットとの性能比較（平成 27 年度、28 年度）

JNC 社キットと海外で市販されているミルクエライザキット（IDEXX Brucellosis Milk x2 ELISA test kit）との性能比較を目的として、タイ農場由来乳清検体 202 検体（うち 186 検体は血清の CF 検査成績が明らかな個体由来）の ELISA 成績を比較した。また、本中課題で開発した乳汁エライザをスクリーニング用途で用いる場合、疑い例と思われる個体をより摘発しやすい判定基準を設定することも重要であることから、比較においては JNC 社キットのカットオフ値を変化させた場合の結果の関連性についても解析を行った。

陽性カットオフである JNC 社キット $\%P \geq 30$ 、IDEXX 社キット $S/P\% \geq 30$ では、CF 検査成績との陽性/陰性の一致度は JNC 社キットで $\kappa = 0.81$ 、IDEXX 社キット $\kappa = 0.75$ といずれも有意に良好であった。また、両社のキットの判定の一致度は $\kappa = 0.69$ であり、JNC 社キットを用いた乳清エライザの性能は海外市販キットと同等と考えられた。一方、CF 検査の判定を基準とした感度・特異度は、IDEXX 社キットではそれぞれ 95.4%及び 80.8%、JNC 社キットでは 87.4%及び 95.9%であり、JNC 社キットの感度がやや低く特異度はやや高いことが明らかになった（表 3 下段、表 4、図 5）。なお、JNC 社キットでは陰性（ $\%P < 30$ ）を示した検体のいくつかは IDEXX 社キットで高い ELISA 値を示し、この差はキット中の二次抗体の違い（JNC: 抗ウシ IgG1 MAb、IDEXX: ProteinG）または陽性/陰性コントロールの違いに起因する可能性が考えられる。

そこでより感度の高いスクリーニング用判定基準を設定するために、上記 186 検体について JNC 社キットのカットオフ値を $\%P = 20$ または 15 のそれぞれに変化させた場合の成績を CF 検査の成績と比較したところ、 $\%P = 20$ での一致度は $\kappa = 0.84$ であり $\%P = 15$ では更に向上し $\kappa = 0.86$ となった（表 4）。また JNC 社キット $\%P = 15$ とした場合の CF 検査との一致度は $\kappa = 0.87$ と良好であり、CF 検査の判定を基準とした感度・特異度はそれぞれ 89.0%及び 96.0%であることから、スクリーニング用の判定基準にはカットオフ値を $\%P = 15$ に設定することが妥当と考えられた（表 4、図 5）。

表4 JNC社キット及びIDEXX社キットの乳汁エライザ性能の比較

CF検査成績との比較

JNC社キット (%P \geq 30) で陽性、CF (ICFTU $>$ 20) で陽性 (表3下段と同一)

| 乳汁 (cutoff=30) vs CF | | CF | | 計 |
|----------------------|----|----|-----|-----|
| | | 陽性 | 陰性 | |
| 乳汁 | 陽性 | 70 | 3 | 73 |
| | 陰性 | 14 | 99 | 113 |
| 計 | | 84 | 102 | 186 |

Kappa=0.81 Fisherの正確確率検定：p $<$ 0.01

IDEXX社キット (S/P% \geq 30)

| IDEXX vs CF | | CF | | 計 |
|-------------|----|----|-----|-----|
| | | 陽性 | 陰性 | |
| IDEXX | 陽性 | 80 | 19 | 99 |
| | 陰性 | 4 | 83 | 87 |
| 計 | | 84 | 102 | 186 |

Kappa=0.75 Fisherの正確確率検定：p $<$ 0.01

JNC社キットとIDEXX社キットの比較

| IDEXX vs CF | | CF | | 計 |
|-------------|----|----|-----|-----|
| | | 陽性 | 陰性 | |
| IDEXX | 陽性 | 80 | 19 | 99 |
| | 陰性 | 4 | 83 | 87 |
| 計 | | 84 | 102 | 186 |

Kappa=0.69 Fisherの正確確率検定：p $<$ 0.01

表4 JNC社キット乳清エライザのカットオフ値を変化させた場合の結果の関連性

カットオフ%P=15の成績とCF検査成績との比較

| 乳汁 (cutoff=15) vs CF | | CF | | 計 |
|----------------------|----|----|-----|-----|
| | | 陽性 | 陰性 | |
| 乳汁 | 陽性 | 74 | 3 | 77 |
| | 陰性 | 10 | 99 | 109 |
| 計 | | 84 | 102 | 186 |

Kappa=0.86, Fisherの正確確率検定 $p < 0.01$

カットオフ%P=20の成績とCF検査成績との比較

| 乳汁 (cutoff=20) vs CF | | CF | | 計 |
|----------------------|----|----|-----|-----|
| | | 陽性 | 陰性 | |
| 乳汁 | 陽性 | 72 | 3 | 75 |
| | 陰性 | 12 | 99 | 111 |
| 計 | | 84 | 102 | 186 |

Kappa=0.84, Fisherの正確確率検定 $p < 0.01$

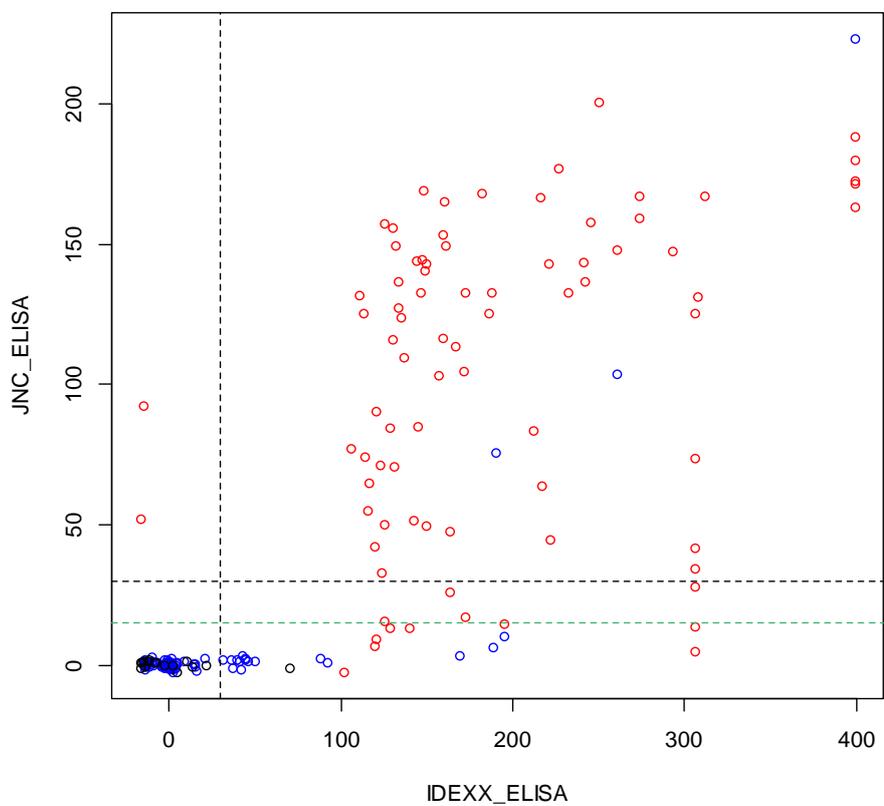


図5 JNC社キット及びIDEXX社キットの乳清エライザ値の散布図

黒破線：陽性カットオフ値（JNC=30、IDEXX=30）、緑破線：スクリーニング用カットオフ値（JNC=15）、赤丸：CF試験陽性、青丸：CF試験陰性、黒丸：CF試験未実施

3. バルク乳への適合性の評価（平成 28 年度）

行政部局からの要望が高い乳汁エライザ法のバルク乳への適合性を評価するため、タイの陽性乳清検体を陰性乳清で段階希釈し解析を行った（図 6）。乳清エライザ値が 100 を超える検体では 8 倍希釈まではカットオフ値=30 で陽性となるものの、乳清エライザ値がカットオフ値近辺の検体では 2 倍希釈でも陰性となり、この成績から 10 頭以上の規模で搾乳している農場のバルク乳を本乳汁エライザで検査することは困難であると考えられた。

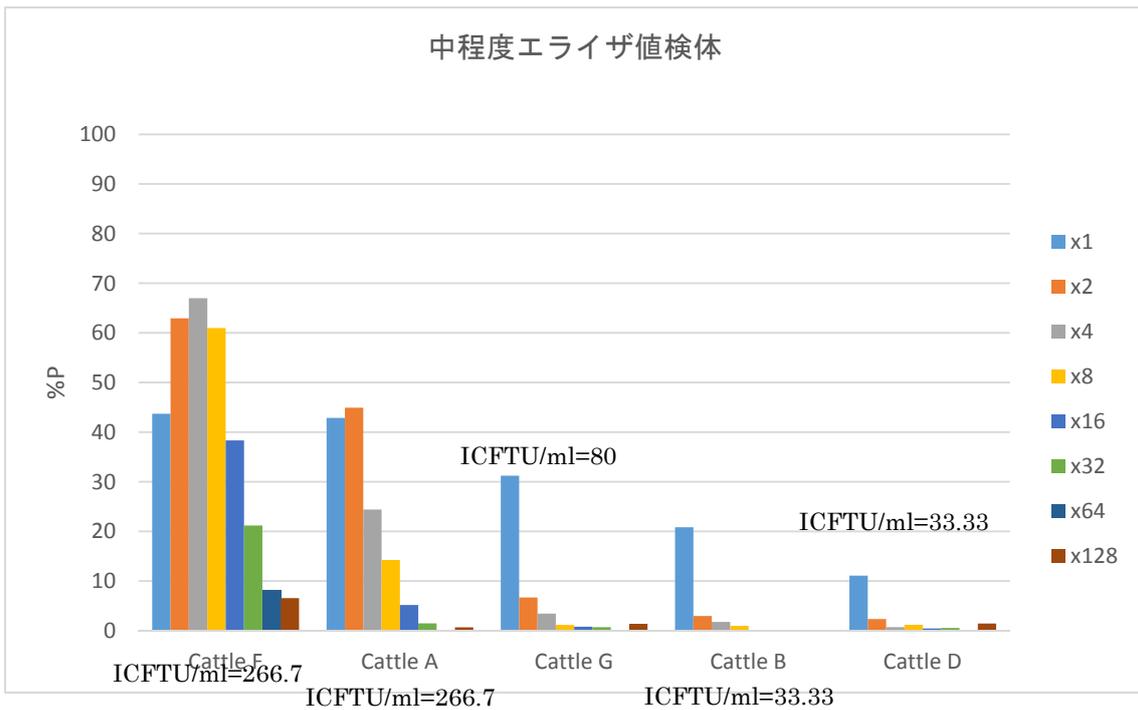
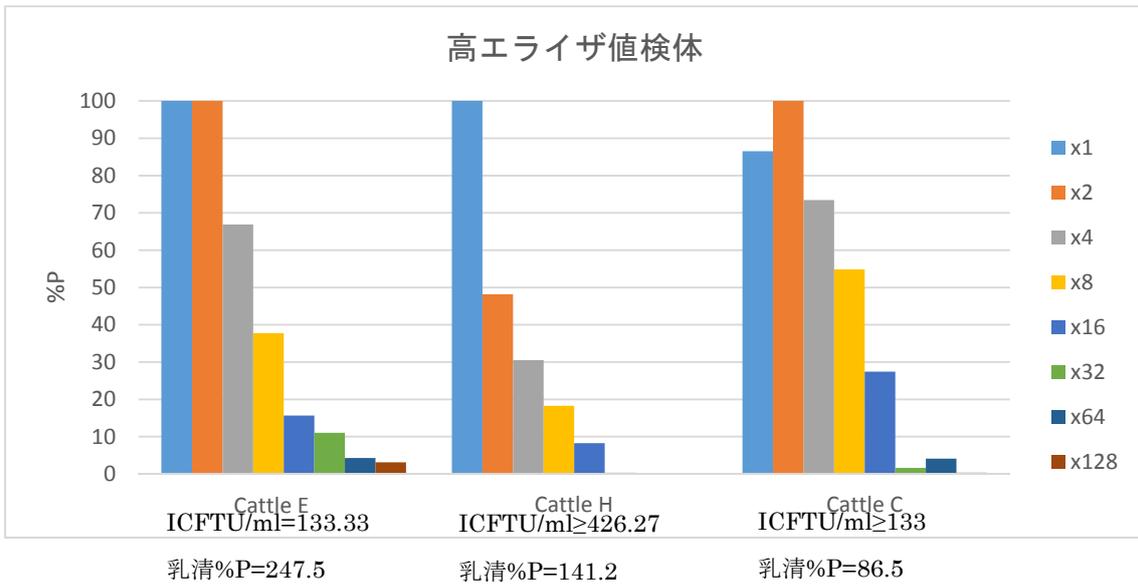


図6 乳汁エライザ陽性検体の希釈実験成績
 乳汁エライザ陽性となったタイの検体を陰性検体で希釈し、JNC 社エライザキットで測定した。ICFTU/ml：個体の血清 CF 検査結果

3) 成果目標に対する達成状況

JNC 社エライザキットで乳汁エライザを行うための検査方法を確立し、本法の感度・特異度が従来の血清エライザと同等であることを示し、またスクリーニング目的でのカットオフ値の設定も行ったことにより、成果目標を達成したと考える。なお、行政部局からの要望に基づき、当初の目標になかった本法のバルク乳検査への応用について試験を追加実施した結果、現行キットを用いた手法では困難であることが確認できた。

(2) 中課題2 (乳汁を検体とした牛白血病抗体検査法の開発) の研究成果

1) 工程管理及び成果目標

| 工程表 |
|---|
| ①定期検査対象牛の選定のため、BLV 感染状況を把握。搾乳工程内の採取時期、搾乳時刻の違いの影響 (小課題 1 関連)、および前処理方法を検討。(小課題 2 関連) (平成 26 年度) |
| ↓ |
| ②スクリーニング法としての利用拡大の可能性を探るため、バルク乳によるエライザ法の精度を検証。(小課題 1 関連) 前年度に選出した BLV 感染牛について分娩直後から乾乳直前まで、定期的に血液および乳汁を採取し、それぞれの抗体量変動の有無をモニタリング。乳汁を用いたエライザ法の精度の検証に用いる牛群の選定を開始。(小課題 2 関連) (平成 27 年度) |
| ↓ |
| ③バルク乳によるエライザ法の精度検証を継続。(小課題 1 関連)。血清エライザに対する乳汁エライザ法の精度を検証するため、BLV 感染状況が未知の農場より収集した血清および乳汁を用いた血清エライザおよび乳汁エライザの結果を比較。(小課題 2 関連) (平成 28 年度) |
| 成果目標：既存の血清エライザキットを活用した、乳汁中抗 BLV 抗体検出法の有用性を検証する。 |

2) 各工程の進捗状況及び成果

【工程表の①】

(1) 乳汁の前処理条件検討

採取時期 (前搾りと本搾り)、遠心分離の有無 (原乳と乳清)、希釈濃度 (原液～200 倍希釈)、凍結保存の有無 (新鮮乳と凍結乳) ならびに季節 (6 月と 12 月) による差が検査成績に及ぼす影響を調査した。その結果、原液の乳汁であれば、いずれの条件でも乳汁エライザによって同じ結果が得られることが判明した (表 1)。(小課題 2 関連、平成 26 年度) ※ 1

(2) 乳汁の採取条件の検討

乳汁の採取条件を調査し、搾乳工程内の採取時期や搾乳時刻の違いによる差がないことを確認した。前搾り乳清と血清との間、また朝・夕それぞれの前搾り乳清との間に正の相関があることを明らかにした (図 1)。(小課題 1 関連、平成 26 年度) ※ 2

(3) 定期検査対象牛の選定

泌乳期による乳汁エライザの検出感度の差の有無を調べるため、年内出産予定牛について血清エライザによる抗体検査および PCR によるウイルス遺伝子を実施し、BLV 感染牛 6 頭ならびに非感染牛 4 頭を定期検査対象牛に選定した。各対象牛より出産 1 ヶ月前に採血し、出産直後から定期的に乳汁、プレイン血および EDTA 血を採材した（小課題 2 関連、平成 26 年度）。

※1 乳汁エライザは、血清エライザのマニュアルに従って実施し、血清エライザの結果と比較した。

表 1 乳汁エライザ、血清エライザ*の結果比較（一部）

| 牛No. | 乳汁 希釈倍率 | 乳汁ELISA | | | | 血清 エライザ |
|------|------------|---------|----|-----|----|------------|
| | | 前搾り | | 本搾り | | |
| | | 無処理 | 乳清 | 無処理 | 乳清 | |
| 705 | ×1 | + | + | + | + | + |
| | ×50 | + | + | + | + | |
| | ×100 | - | - | + | + | |
| | ×200 | - | - | - | - | |
| 932 | ×1 | - | - | - | - | - |
| | ×50 | - | - | - | - | |
| | ×100 | - | - | - | - | |
| | ×200 | - | - | - | - | |
| 721 | ×1 | + | + | + | + | + |
| | ×50 | + | + | - | + | |
| | ×100 | - | - | - | - | |
| | ×200 | - | - | - | - | |
| 541 | ×1 | + | + | + | + | + |
| | ×50 | + | + | + | + | |
| | ×100 | + | + | + | + | |
| | ×200 | + | + | + | + | |

*血清エライザのプロトコールに従って 50 倍希釈で実施

※2 6月（16頭）と12月（28頭）に、乳汁（夕および翌朝の前搾り乳、本搾り乳、後搾り乳；6サンプル／頭）および血清（乳汁採取の一両日以内；1サンプル／頭）を採取した。乳清と血清は凍結保存し、原液で乳清を用いた以外は血清エライザのプロトコールに準じて実施した。

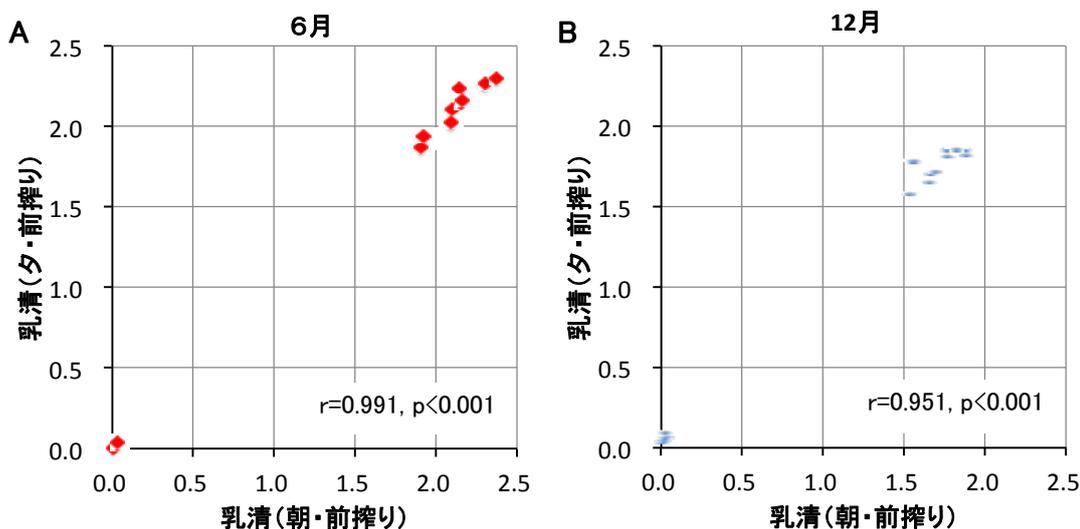


図1 乳汁エライザにおける朝・夕の前搾り乳サンプル成績間の比較

A) 6月、B) 12月、 r : Spearman の順位相関係数

【工程表②】

(1) バルク乳の精度検討

BLV 感染率が高い1農場で得たサンプルを用いて、乳清および血清エライザ値とプロウイルス量との関係性を比較検討した。その結果、同一個体ではサンプル間の判定結果に相違はなく、さらにバルク乳でも陽性を示した。また、陽性検体の検出限界を調べた結果（表2）、陽性個体が数頭しか存在せず、そのすべてが低乳量且つ弱陽性を示すような低浸潤農場では、バルク乳検査により検出できない可能性が示唆された。（小課題1関連、平成27年度）※3

(2) 定期採材した牛の乳汁および血清エライザの結果比較

分娩直後から乾乳まで定期的に採材した BLV 感染牛6頭および非感染牛4頭の乳汁、血清、末梢血 WBC の DNA を用い、乳清エライザ、血清エライザならびに PCR を実施したところ、各検査の結果はすべて一致した（表3）。（小課題2関連、平成27年度）※4

(3) 乳汁エライザの精度検証に用いる野外サンプルの収集

平成28年度に実施予定の乳汁エライザの精度検証に用いる野外サンプルを取

集するため、3県3農場に材料提供を依頼し、各農場で実施する牛群検定で分取する乳汁と血液を収集した。(小課題2 関連、平成27年度)

※3 バルク乳検査による精度を検証するため、BLV 感染率が高かった1農場で、集乳前のバルク乳(1日分)と、生産牛全頭から毎搾乳時の個体乳(17頭×2搾乳; 前搾り)、およびバルク乳採取日直前に血液を採取し、乳清・血清エライザ値とプロウイルス量との関係性を比較検討した。同一個体ではサンプル間の判定結果は相違なく、またバルク乳も陽性(採材時生産牛群感染率57.1%、陽性乳希釈率1.4倍)を示した。陽性乳検体の検出限界を調べるため、強陽性(乳汁エライザ値2.5以上)および弱陽性(同値1程度)を示した各乳清検体を陰性プール乳清と合乳し、それぞれを段階希釈して乳汁エライザを実施した。その結果、強陽性検体を含む乳汁の検出限界は100倍希釈、弱陽性乳検体では2倍希釈と判明した。

表2 陽性乳汁検体の検出限界

| 牛No. | 上段:血清S/P値 (乳清S/P値*) 下段:ウイルス遺伝子量 (コピー数/100ng DNA) | 乳清希釈倍率 | | | | | | | | | | | | | |
|------|---|--------|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| | | x1 | x2 | x4 | x8 | x16 | x32 | x64 | x10 | x50 | x100 | x200 | x300 | x400 | x500 |
| 0727 | 1.03 (1.059) 41 | + | + | - | - | - | - | - | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| 0722 | 2.86 (2.823) 1174 | + | NT | NT | NT | NT | NT | NT | + | + | + | - | - | - | - |

NT:未実施
*朝夕の平均値

※4 分娩後日数経過による乳汁中IgG含有量の低下が乳汁エライザの結果に与える影響の有無を確認するため実施した（乳清は冷凍保存したものをエライザに供試）。その結果、分娩後日数によらず、BLV感染牛の乳汁エライザの結果は陽性であり、血清エライザおよびPCRの結果とすべて一致した。なお、非感染牛で新たに陽転した個体はなく、調査期間中、いずれの検査においても非特異反応は認められなかった。

表3 分娩後日数によるエライザおよびPCRの結果比較

| 牛No. | 検査法 | 分娩後日数* | | | | | | | | | | | BLV感染 | | | |
|------|--------|--------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-------|-----|--|---|
| | | -1M | 6d | 1M | 2M | 3M | 4M | 5M | 6M | 7M | 8M | 9M | | 10M | | |
| 305 | 乳汁エライザ | | + | + | + | + | + | + | + | | | | | | | |
| | 血清エライザ | + | | + | + | + | + | + | + | | | | | | | + |
| | PCR | + | | + | + | + | + | + | + | | | | | | | |
| 454 | 乳汁エライザ | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | | | |
| | 血清エライザ | + | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | | | + |
| | PCR | + | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | | | |
| 502 | 乳汁エライザ | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | | | | |
| | 血清エライザ | + | | + | + | + | + | + | + | + | + | | | | | + |
| | PCR | + | | + | + | + | + | + | + | + | + | | | | | |
| 806 | 乳汁エライザ | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | NT | + | | | |
| | 血清エライザ | + | | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | | + |
| | PCR | + | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | | |
| 861 | 乳汁エライザ | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | | | |
| | 血清エライザ | + | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | | | + |
| | PCR | + | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | | | |
| 871 | 乳汁エライザ | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | | | |
| | 血清エライザ | + | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | | | + |
| | PCR | + | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | | | |
| 747 | 乳汁エライザ | | - | - | - | - | - | - | - | | | | | | | |
| | 血清エライザ | - | | - | - | - | - | - | - | | | | | | | - |
| | PCR | - | | - | - | - | - | - | - | | | | | | | |
| 797 | 乳汁エライザ | | - | - | - | - | - | - | - | | | | | | | |
| | 血清エライザ | - | | - | - | - | - | - | - | | | | | | | - |
| | PCR | - | | - | - | - | - | - | - | | | | | | | |
| 983 | 乳汁エライザ | | - | - | - | - | - | - | - | | | | | | | |
| | 血清エライザ | - | | - | - | - | - | - | - | | | | | | | - |
| | PCR | - | | - | - | - | - | - | - | | | | | | | |
| 991 | 乳汁エライザ | | - | - | - | - | - | - | - | | | | | | | |
| | 血清エライザ | - | | - | - | - | - | - | - | | | | | | | - |
| | PCR | - | | - | - | - | - | - | - | | | | | | | |

*分娩後日数：d：日、M：月

【工程表③】

(1) バルク乳の精度検討

陽性8農場から採取した個体乳汁とバルク乳について乳汁エライザを実施した。乳脂率が5%を超える検体も含め、原乳と乳清の結果はすべて一致し、いずれの農場でもバルク乳は陽性と判定された（表4）※5。また、乳汁エライザ値は、乳成分値と相関がないことが確認されたことから、乳成分が乳汁エライザ成績に及ぼす影響は少ないと推察された（表5）。

陰性農場からバルク乳を入手できなかったことから、陽性1農場において陰性と診断された6個体について、それぞれバケツ搾乳で全量採取し、各検体の

1/100 量を合乳して得た乳汁について、陰性判定されるか検討したところ、4 反復実施したすべての調査で陰性と判定されることを確認した。(小課題 1、2 関連、平成 27、28 年度)

(2) 野外サンプルを用いた乳汁および血清エライザ法の結果比較

4 県 4 農場から収集した搾乳牛 130 頭の血清および乳汁、ならびにそのうち 100 頭の EDTA 血を用いて血清および乳汁エライザならびに PCR を実施したところ、乳汁エライザ、血清エライザおよび PCR の結果はすべて一致したことから、乳汁エライザ法は野外でも活用可能であることが示された。(小課題 2 関連、平成 28 年度)

※5 牛群検定個体別成績を入手できた 7 農場について取りまとめた。

表 4 バルク乳および個体乳検査成績の概要

| 農場 | 検査頭数 ¹ | 採取月 | 陽性乳 | | | | バルク乳 | | 陽性率 (陽性頭数/検査頭数) |
|----|-------------------|-------|------|-------|------|------|------|-----------------|--------------------|
| | | | 最小値 | | 最大値 | | 乳清 | 原乳 | |
| | | | 乳清 | 原乳 | 乳清 | 原乳 | | | |
| A | 17 | H27.9 | 1.15 | | 2.93 | | + | 76.5 (13/17) | |
| B | 22 | H28.8 | 1.76 | 1.77 | 2.06 | 2.13 | + | + | 63.6 (14/22) |
| C | 13 | H28.7 | 2.49 | 2.44 | 2.62 | 2.77 | + | + | 42.9 (6/14) |
| D | 28 | H28.7 | 2.43 | 1.68 | 2.55 | 2.73 | + | + | 64.3 (18/28) |
| E | 21 | H29.1 | 1.87 | 1.72 | 2.42 | 2.57 | + | + | 76.2 (16/21) |
| F | 27 | H29.1 | 0.91 | 0.95* | 3.36 | 2.55 | + | + | 77.8 (21/27) |
| G | 48 | H29.1 | 0.58 | 0.76* | 1.71 | 2.49 | + | + | 70.8 (34/48) |

¹採材日における搾乳頭数

*乳汁(原乳)エライザ値<1.0を弱陽性とした
n=176

表 5 乳汁エライザ値と乳量・乳成分値との相関係数

| | 乳清S/P値 | 原乳S/P値 | 日乳量 | 乳脂率 | 乳蛋白質率 | 無脂固形分率 | 体細胞数 |
|--------|--------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|
| 乳清S/P値 | - | 0.957** | -0.164* | 0.159* | -0.014 | -0.043 | -0.015 |
| 原乳S/P値 | | - | -0.102 | 0.138 | -0.04 | -0.029 | 0.024 |

n=155, **p<0.001, *p<0.05

日乳量と乳成分値は採材日直近の牛群検定成績または自主検査成績を使用した

3) 成果目標に対する達成状況

乳汁エライザ法実施において必要なサンプルの採材条件および処理方法を確立したほか、乳汁エライザ法が血清エライザ法と同等の精度を有していることを確認したことで、成果目標はすべて達成された。なお、測定する際の注意事項として、特に原乳を用いる場合には、検体の十分な攪拌が必須であり、夾雑物が多く含まれる検体ではセルストレーナー等を使用し夾雑物を除去することが推奨される。実用化に向けた今後の課題としては、海外市販キットとの性能比較が必要と考えられた。

(3) 中課題3 (乳汁を検体としたブルセラ病及び牛白血病抗体検査法の野外臨床試験)の研究成果

1) 工程管理及び成果目標

| 工程表 |
|--|
| ①中課題1及び2の試験成績に基づき、乳汁を用いる検査の実用化に当たって必要な薬事法上の承認申請に必要な臨床試験等のデータを収集する。 (平成28年度) |
| 成果目標：乳汁を用いる検査の実用化に当たって必要な薬事法上の承認申請に必要な臨床試験等のデータを収集する。 |

2) 各工程の進捗状況及び成果

【工程表①】

a. 乳汁を検体としたブルセラ病抗体検査法の野外臨床試験

長野県松本家畜保健衛生所の管轄農場3箇所(A農場、B農場、C農場)について、計139頭について採血と採乳を実施した(採材時期 2016年5月23日～2016年11月19日)。

採材当日に血液は血清とし、乳汁は動衛研が指定する方法により乳清として、ELISA測定日(2016年12月12日)までいずれも-20℃で凍結保存した。

なお、乳汁採取は、A農場 後搾り、B農場 前搾り、C農場 前搾り、であった。

また、ブレディッピングは、A農場 あり、B農場 なし、C農場 あり、であった。

b. 試験方法

キットの用法用量に従った。ただし、乳清については希釈しないでそのまま供試した。

c. 結果 (表1,2,3,4)

(平成28年度)

a. 乳汁を検体とした牛白血病抗体検査法の野外臨床試験

長野県松本家畜保健衛生所の管轄農場3箇所(A農場、B農場、C農場)について、計139頭について採血と採乳を実施した。(採材時期 2016年5月23日～2016年11月19日)

採材当日に血液は血清とし、乳汁は動衛研が指定する方法により乳清として、ELISA測定日(2016年12月12日)までいずれも-20℃で凍結保存した。

b. 試験方法

キットの用法用量に従った。ただし、乳清については希釈しないでそのまま供試した。

c. 結果 (表5,6,7,8) (図1) 陽性 (S/P>0.3) は赤字で示した。
(平成28年度)

(表1) A農場における乳清・血清中のブルセラ抗体価

| A農場 | 採材:2016年11月10日 | | 種別 | 生年月日 |
|---------|----------------|------|--------|-------------|
| 番号 | %P | | | |
| 28V392- | 乳清 | 血清 | | |
| 1 | -0.4 | 0.3 | 乳用種 | 2014年7月22日 |
| 2 | -0.5 | 0.1 | 乳用種 | 2014年6月1日 |
| 3 | -0.7 | -0.3 | 乳用種 | 2014年7月23日 |
| 4 | -0.7 | -0.1 | ホルスタイン | 2008年11月24日 |
| 5 | -0.1 | -0.1 | ホルスタイン | 2009年7月30日 |
| 6 | -0.3 | 0.3 | ホルスタイン | 2009年7月6日 |
| 7 | -0.3 | -0.2 | ホルスタイン | 2010年5月5日 |
| 8 | -0.7 | -0.2 | ホルスタイン | 2010年6月8日 |
| 9 | 1.8 | 2.9 | ホルスタイン | 2010年10月14日 |
| 10 | 0.0 | -0.1 | ホルスタイン | 2010年10月31日 |
| 11 | -0.5 | 0.1 | ホルスタイン | 2010年11月27日 |
| 12 | -0.4 | 0.4 | ホルスタイン | 2010年11月18日 |
| 13 | -0.1 | 0.1 | ホルスタイン | 2011年3月15日 |
| 14 | -0.1 | 0.1 | ホルスタイン | 2011年5月26日 |
| 15 | -0.6 | 0.1 | ホルスタイン | 2011年5月14日 |
| 16 | -0.5 | -0.1 | ホルスタイン | 2011年7月31日 |
| 17 | -0.5 | 0.1 | ホルスタイン | 2011年9月6日 |
| 18 | -0.6 | 0.0 | ホルスタイン | 2011年9月9日 |
| 19 | -0.5 | 0.3 | ホルスタイン | 2011年10月1日 |
| 20 | -0.6 | -0.1 | ホルスタイン | 2011年10月13日 |
| 21 | -0.1 | 0.1 | ホルスタイン | 2011年11月8日 |
| 22 | -0.4 | 0.0 | ホルスタイン | 2011年10月11日 |
| 23 | -0.6 | 0.1 | ホルスタイン | 2011年12月21日 |
| 24 | -0.7 | 0.2 | ホルスタイン | 2012年2月3日 |
| 25 | -0.5 | 0.5 | ホルスタイン | 2011年10月24日 |
| 26 | -0.5 | 0.1 | ホルスタイン | 2012年4月15日 |
| 27 | -0.6 | 0.1 | ホルスタイン | 2012年4月5日 |
| 28 | -0.7 | 0.0 | ホルスタイン | 2012年5月5日 |

| | | | | |
|----|------|------|--------|-------------|
| 29 | -0.5 | 0.2 | ホルスタイン | 2012年3月7日 |
| 30 | -0.5 | 0.0 | ホルスタイン | 2012年5月2日 |
| 31 | -0.6 | -0.1 | ホルスタイン | 2012年4月19日 |
| 32 | -0.2 | -0.1 | ホルスタイン | 2011年7月29日 |
| 33 | -0.5 | 0.2 | ホルスタイン | 2012年5月16日 |
| 34 | -0.5 | 0.1 | ホルスタイン | 2012年6月26日 |
| 35 | -0.6 | 0.1 | ホルスタイン | 2012年7月6日 |
| 36 | -0.5 | 0.3 | ホルスタイン | 2012年5月28日 |
| 37 | -0.2 | 0.6 | ホルスタイン | 2012年7月6日 |
| 38 | -0.5 | -0.1 | ホルスタイン | 2012年7月30日 |
| 39 | -0.1 | 0.6 | ホルスタイン | 2012年9月3日 |
| 40 | -0.3 | -0.1 | ホルスタイン | 2012年9月4日 |
| 41 | -0.3 | 0.5 | ホルスタイン | 2012年10月19日 |
| 42 | -0.6 | -0.2 | ホルスタイン | 2012年7月29日 |
| 43 | -0.8 | 0.1 | ホルスタイン | 2012年8月30日 |
| 44 | -0.5 | 0.1 | ホルスタイン | 2012年10月25日 |
| 45 | -0.1 | 0.1 | ホルスタイン | 2013年1月8日 |
| 46 | -0.6 | 0.3 | ホルスタイン | 2013年1月20日 |
| 47 | 2.0 | 3.6 | ホルスタイン | 2013年1月31日 |
| 48 | -0.3 | -0.1 | ホルスタイン | 2013年4月3日 |
| 49 | -0.3 | 0.4 | ホルスタイン | 2013年2月13日 |
| 50 | -0.5 | -0.1 | ホルスタイン | 2013年2月18日 |
| 51 | -0.3 | 0.3 | ホルスタイン | 2013年4月9日 |
| 52 | -0.5 | -0.2 | ホルスタイン | 2013年3月31日 |
| 53 | -0.2 | 0.3 | ホルスタイン | 2013年5月23日 |
| 54 | -0.5 | 0.3 | ホルスタイン | 2013年6月1日 |
| 55 | -0.3 | 0.2 | ホルスタイン | 2013年7月30日 |
| 56 | -0.6 | -0.3 | ホルスタイン | 2013年5月31日 |
| 57 | -0.6 | 0.5 | ホルスタイン | 2013年8月1日 |
| 58 | -0.4 | -0.2 | ホルスタイン | 2013年7月29日 |
| 59 | -0.6 | 0.1 | ホルスタイン | 2013年1月7日 |
| 60 | -0.5 | 0.8 | ホルスタイン | 2013年7月7日 |
| 61 | 0.1 | 0.3 | ホルスタイン | 2013年8月30日 |
| 62 | -0.7 | 0.0 | ホルスタイン | 2013年10月3日 |
| 63 | -0.6 | -0.1 | ホルスタイン | 2013年10月21日 |

| | | | | |
|----|------|------|--------|-------------|
| 64 | -0.6 | -0.2 | ホルスタイン | 2013年6月5日 |
| 65 | -0.5 | 0.6 | ホルスタイン | 2013年11月1日 |
| 66 | -0.6 | -0.2 | ホルスタイン | 2013年11月12日 |
| 67 | -0.6 | 0.0 | ホルスタイン | 2013年11月16日 |
| 68 | 0.6 | 3.7 | ホルスタイン | 2013年11月16日 |
| 69 | -0.2 | 0.0 | ホルスタイン | 2013年12月28日 |
| 70 | -0.5 | -0.1 | ホルスタイン | 2013年8月8日 |
| 71 | -0.4 | -0.1 | ホルスタイン | 2014年2月21日 |
| 72 | -0.7 | -0.3 | ホルスタイン | 2013年11月17日 |
| 73 | -0.4 | 0.5 | ホルスタイン | 2014年2月5日 |
| 74 | 0.0 | 0.3 | ホルスタイン | 2014年2月15日 |
| 75 | -0.7 | 0.1 | ホルスタイン | 2014年4月9日 |
| 76 | -0.4 | 0.1 | ホルスタイン | 2014年4月8日 |
| 77 | 0.3 | 0.1 | ホルスタイン | 2014年5月1日 |
| 78 | -0.4 | 0.1 | ホルスタイン | 2014年5月1日 |
| 79 | -0.6 | -0.1 | ホルスタイン | 2014年4月28日 |
| 80 | -0.8 | -0.2 | ホルスタイン | 2014年5月1日 |
| 81 | -0.6 | 0.5 | ホルスタイン | 2014年5月17日 |
| 82 | -0.5 | -0.1 | ホルスタイン | 2014年5月17日 |
| 83 | -0.6 | 0.4 | ホルスタイン | 2014年6月29日 |
| 84 | -0.7 | 0.7 | ホルスタイン | 2014年6月22日 |
| 85 | 0.1 | 0.3 | ホルスタイン | 2014年7月27日 |
| 86 | -0.2 | 0.4 | ホルスタイン | 2014年7月31日 |
| 87 | -0.2 | 0.0 | ホルスタイン | 2014年8月5日 |
| 88 | -0.1 | 0.5 | ホルスタイン | 2014年7月9日 |
| 89 | -0.5 | -0.3 | ホルスタイン | 2014年8月2日 |
| 90 | 6.1 | 5.9 | ホルスタイン | 2014年9月23日 |
| 91 | 0.1 | 0.2 | ホルスタイン | 2014年9月7日 |
| 92 | 0.7 | 0.3 | ホルスタイン | 2014年10月11日 |
| 93 | 0.1 | -0.3 | ホルスタイン | 2014年8月2日 |

(表2) B農場における乳清・血清中のブルセラ抗体価

| B農場 | 採材:2016年11月9日 | | 種別 | 生年月日 |
|---------|---------------|------|--------|-------------|
| 番号 | %P | | | |
| 28v391- | 乳清 | 血清 | | |
| 4 | 1.8 | 0.6 | ホルスタイン | 2011年6月30日 |
| 5 | 0.0 | -0.1 | ホルスタイン | 2006年7月5日 |
| 6 | -0.4 | -0.2 | ホルスタイン | 2012年4月22日 |
| 8 | 1.1 | -0.2 | ホルスタイン | 2012年12月22日 |
| 9 | 1.0 | -0.2 | ホルスタイン | 2010年3月30日 |
| 10 | 0.7 | -0.4 | ホルスタイン | 2010年7月15日 |
| 11 | -0.1 | -0.1 | ホルスタイン | 2012年5月16日 |
| 12 | -0.2 | 0.1 | ホルスタイン | 2013年7月5日 |
| 13 | -0.4 | -0.3 | ホルスタイン | 2009年11月25日 |
| 14 | -0.1 | -0.1 | ホルスタイン | 2009年11月25日 |
| 18 | -0.5 | -0.5 | ホルスタイン | 2014年5月6日 |
| 19 | 0.4 | -0.5 | ホルスタイン | 2013年4月19日 |
| 21 | 1.8 | -0.5 | ホルスタイン | 2013年8月30日 |
| 22 | -0.4 | -0.3 | ホルスタイン | 2013年1月14日 |
| 23 | -0.2 | -0.3 | ホルスタイン | 2014年2月17日 |
| 24 | 0.1 | -0.2 | ホルスタイン | 2011年7月13日 |
| 25 | -0.2 | 0.0 | ホルスタイン | 2011年5月12日 |
| 26 | -0.5 | -0.4 | ホルスタイン | 2011年1月12日 |
| 27 | -0.5 | -0.5 | ホルスタイン | 2014年8月7日 |
| 28 | 0.2 | 0.1 | ホルスタイン | 2012年1月20日 |
| 29 | -0.2 | -0.3 | ホルスタイン | 2014年1月2日 |
| 30 | -0.2 | -0.2 | ホルスタイン | 2011年5月9日 |

(表3) C農場における乳清・血清中のブルセラ抗体価

| C農場 | 採材:2016年5月24日 | | 種別 | 生年月日 |
|-----|---------------|------|--------|------------|
| 番号 | %P | | | |
| | 乳清 | 血清 | | |
| 5 | -0.3 | 1.4 | ホルスタイン | 2013年7月31日 |
| 6 | -0.2 | 0.1 | ホルスタイン | 2013年7月31日 |
| 10 | -0.1 | -0.1 | ホルスタイン | 2013年7月19日 |
| 11 | 0.4 | -0.1 | ホルスタイン | 2013年8月12日 |

| | | | | |
|----|------|------|--------|-------------|
| 12 | -0.2 | -0.3 | ホルスタイン | 2014年1月20日 |
| 13 | 0.4 | 0.1 | ホルスタイン | 2014年4月30日 |
| 14 | -0.3 | 0.1 | ホルスタイン | 2007年9月1日 |
| 16 | -0.2 | 0.3 | ホルスタイン | 2005年12月26日 |
| 17 | 2.3 | 0.2 | ホルスタイン | 2008年4月28日 |
| 18 | -0.2 | -0.2 | ホルスタイン | 2008年7月17日 |
| 19 | -0.1 | -0.3 | ホルスタイン | 2009年2月13日 |
| 20 | -0.2 | -0.1 | ホルスタイン | 2009年1月29日 |
| 22 | -0.4 | 1.1 | ホルスタイン | 2010年3月23日 |
| 23 | 0.6 | -0.1 | ホルスタイン | 2009年12月18日 |
| 26 | 0.0 | 1.0 | ホルスタイン | 2010年12月30日 |
| 27 | 0.0 | 0.3 | ホルスタイン | 2011年1月25日 |
| 31 | -0.4 | -0.2 | ホルスタイン | 2011年9月12日 |
| 32 | 0.9 | 0.2 | ホルスタイン | 2011年9月11日 |
| 33 | -0.2 | 0.8 | ホルスタイン | 2011年9月13日 |
| 34 | 0.8 | 0.3 | ホルスタイン | 2014年1月25日 |
| 35 | 0.5 | -0.1 | ホルスタイン | 2011年12月30日 |
| 38 | 0.1 | 0.7 | ホルスタイン | 2012年4月25日 |
| 39 | -0.2 | 0.7 | ホルスタイン | 2012年10月9日 |
| 41 | -0.5 | -0.2 | ホルスタイン | 2012年8月9日 |

まとめ（表4）

A 農場 93 検体

| | 乳清 | 血清 |
|------|------|------|
| 平均%P | -0.3 | 0.3 |
| 最大値 | 6.1 | 5.9 |
| 最小値 | -0.8 | -0.3 |

B 農場 22 検体

| | 乳清 | 血清 |
|------|------|------|
| 平均%P | 0.1 | -0.2 |
| 最大値 | 1.8 | 0.6 |
| 最小値 | -0.5 | -0.5 |

C 農場 24 検体

| | 乳清 | 血清 |
|------|------|------|
| 平均%P | 0.1 | 0.2 |
| 最大値 | 2.3 | 1.4 |
| 最小値 | -0.5 | -0.3 |

(表5) A 農場における乳清・血清中の牛白血病抗体価

| A 農場 | 採材:2016年11月10日 | | 種別 | 生年月日 |
|---------|----------------|-------|--------|-------------|
| 番号 | S/P | | | |
| 28V392- | 乳清 | 血清 | | |
| 1 | 0.01 | 0.018 | 乳用種 | 2014年7月22日 |
| 2 | 0.028 | 0.041 | 乳用種 | 2014年6月1日 |
| 3 | 0.016 | 0.021 | 乳用種 | 2014年7月23日 |
| 4 | 0.022 | 0.027 | ホルスタイン | 2008年11月24日 |
| 5 | 0.028 | 0.052 | ホルスタイン | 2009年7月30日 |
| 6 | 0.039 | 0.031 | ホルスタイン | 2009年7月6日 |
| 7 | 0.016 | 0.037 | ホルスタイン | 2010年5月5日 |
| 8 | 0.012 | 0.013 | ホルスタイン | 2010年6月8日 |
| 9 | 0.019 | 0.024 | ホルスタイン | 2010年10月14日 |
| 10 | 0.030 | 0.021 | ホルスタイン | 2010年10月31日 |
| 11 | 0.023 | 0.017 | ホルスタイン | 2010年11月27日 |
| 12 | 4.000 | 4.000 | ホルスタイン | 2010年11月18日 |
| 13 | 0.019 | 0.020 | ホルスタイン | 2011年3月15日 |
| 14 | 0.093 | 0.109 | ホルスタイン | 2011年5月26日 |
| 15 | 0.016 | 0.053 | ホルスタイン | 2011年5月14日 |
| 16 | 0.023 | 0.044 | ホルスタイン | 2011年7月31日 |
| 17 | 0.015 | 0.026 | ホルスタイン | 2011年9月6日 |
| 18 | 0.019 | 0.020 | ホルスタイン | 2011年9月9日 |
| 19 | 0.027 | 0.067 | ホルスタイン | 2011年10月1日 |
| 20 | 0.015 | 0.030 | ホルスタイン | 2011年10月13日 |
| 21 | 0.020 | 0.037 | ホルスタイン | 2011年11月8日 |
| 22 | 0.025 | 0.049 | ホルスタイン | 2011年10月11日 |
| 23 | 0.026 | 0.050 | ホルスタイン | 2011年12月21日 |
| 24 | 0.031 | 0.034 | ホルスタイン | 2012年2月3日 |

| | | | | |
|----|-------|-------|--------|-------------|
| 25 | 1.744 | 1.249 | ホルスタイン | 2011年10月24日 |
| 26 | 0.143 | 0.075 | ホルスタイン | 2012年4月15日 |
| 27 | 0.016 | 0.026 | ホルスタイン | 2012年4月5日 |
| 28 | 0.016 | 0.017 | ホルスタイン | 2012年5月5日 |
| 29 | 0.017 | 0.034 | ホルスタイン | 2012年3月7日 |
| 30 | 0.012 | 0.019 | ホルスタイン | 2012年5月2日 |
| 31 | 0.015 | 0.017 | ホルスタイン | 2012年4月19日 |
| 32 | 0.053 | 0.059 | ホルスタイン | 2011年7月29日 |
| 33 | 0.013 | 0.007 | ホルスタイン | 2012年5月16日 |
| 34 | 0.018 | 0.024 | ホルスタイン | 2012年6月26日 |
| 35 | 0.022 | 0.027 | ホルスタイン | 2012年7月6日 |
| 36 | 0.013 | 0.016 | ホルスタイン | 2012年5月28日 |
| 37 | 0.017 | 0.021 | ホルスタイン | 2012年7月6日 |
| 38 | 0.016 | 0.013 | ホルスタイン | 2012年7月30日 |
| 39 | 0.020 | 0.023 | ホルスタイン | 2012年9月3日 |
| 40 | 0.014 | 0.014 | ホルスタイン | 2012年9月4日 |
| 41 | 0.016 | 0.017 | ホルスタイン | 2012年10月19日 |
| 42 | 0.013 | 0.042 | ホルスタイン | 2012年7月29日 |
| 43 | 0.021 | 0.023 | ホルスタイン | 2012年8月30日 |
| 44 | 0.013 | 0.016 | ホルスタイン | 2012年10月25日 |
| 45 | 0.011 | 0.013 | ホルスタイン | 2013年1月8日 |
| 46 | 0.015 | 0.016 | ホルスタイン | 2013年1月20日 |
| 47 | 0.014 | 0.018 | ホルスタイン | 2013年1月31日 |
| 48 | 0.014 | 0.016 | ホルスタイン | 2013年4月3日 |
| 49 | 0.013 | 0.013 | ホルスタイン | 2013年2月13日 |
| 50 | 0.010 | 0.012 | ホルスタイン | 2013年2月18日 |
| 51 | 0.011 | 0.017 | ホルスタイン | 2013年4月9日 |
| 52 | 0.016 | 0.027 | ホルスタイン | 2013年3月31日 |
| 53 | 0.031 | 0.049 | ホルスタイン | 2013年5月23日 |
| 54 | 1.734 | 1.688 | ホルスタイン | 2013年6月1日 |
| 55 | 0.016 | 0.019 | ホルスタイン | 2013年7月30日 |
| 56 | 0.013 | 0.013 | ホルスタイン | 2013年5月31日 |
| 57 | 0.015 | 0.019 | ホルスタイン | 2013年8月1日 |
| 58 | 0.034 | 0.034 | ホルスタイン | 2013年7月29日 |
| 59 | 0.015 | 0.019 | ホルスタイン | 2013年1月7日 |

| | | | | |
|----|-------|-------|--------|-------------|
| 60 | 0.015 | 0.052 | ホルスタイン | 2013年7月7日 |
| 61 | 0.014 | 0.027 | ホルスタイン | 2013年8月30日 |
| 62 | 0.009 | 0.016 | ホルスタイン | 2013年10月3日 |
| 63 | 0.016 | 0.036 | ホルスタイン | 2013年10月21日 |
| 64 | 0.012 | 0.018 | ホルスタイン | 2013年6月5日 |
| 65 | 0.017 | 0.035 | ホルスタイン | 2013年11月1日 |
| 66 | 0.050 | 0.053 | ホルスタイン | 2013年11月12日 |
| 67 | 0.022 | 0.062 | ホルスタイン | 2013年11月16日 |
| 68 | 0.013 | 0.021 | ホルスタイン | 2013年11月16日 |
| 69 | 0.015 | 0.035 | ホルスタイン | 2013年12月28日 |
| 70 | 0.013 | 0.023 | ホルスタイン | 2013年8月8日 |
| 71 | 0.014 | 0.017 | ホルスタイン | 2014年2月21日 |
| 72 | 0.017 | 0.045 | ホルスタイン | 2013年11月17日 |
| 73 | 0.010 | 0.021 | ホルスタイン | 2014年2月5日 |
| 74 | 0.024 | 0.069 | ホルスタイン | 2014年2月15日 |
| 75 | 0.013 | 0.034 | ホルスタイン | 2014年4月9日 |
| 76 | 0.012 | 0.021 | ホルスタイン | 2014年4月8日 |
| 77 | 0.009 | 0.022 | ホルスタイン | 2014年5月1日 |
| 78 | 0.015 | 0.017 | ホルスタイン | 2014年5月1日 |
| 79 | 0.015 | 0.032 | ホルスタイン | 2014年4月28日 |
| 80 | 0.015 | 0.030 | ホルスタイン | 2014年5月1日 |
| 81 | 0.009 | 0.015 | ホルスタイン | 2014年5月17日 |
| 82 | 0.012 | 0.016 | ホルスタイン | 2014年5月17日 |
| 83 | 0.012 | 0.022 | ホルスタイン | 2014年6月29日 |
| 84 | 0.014 | 0.067 | ホルスタイン | 2014年6月22日 |
| 85 | 0.026 | 0.022 | ホルスタイン | 2014年7月27日 |
| 86 | 0.015 | 0.020 | ホルスタイン | 2014年7月31日 |
| 87 | 0.056 | 0.075 | ホルスタイン | 2014年8月5日 |
| 88 | 0.014 | 0.020 | ホルスタイン | 2014年7月9日 |
| 89 | 0.110 | 0.054 | ホルスタイン | 2014年8月2日 |
| 90 | 0.374 | 0.048 | ホルスタイン | 2014年9月23日 |
| 91 | 0.017 | 0.022 | ホルスタイン | 2014年9月7日 |
| 92 | 0.206 | 0.045 | ホルスタイン | 2014年10月11日 |
| 93 | 0.031 | 0.027 | ホルスタイン | 2014年8月2日 |

(表6) B農場における乳清・血清中の牛白血病抗体価

| B農場 | 採材:2016年11月9日 | | 種別 | 生年月日 |
|---------|---------------|-------|--------|-------------|
| 番号 | S/P | | | |
| 28v391- | 乳清 | 血清 | | |
| 4 | 1.613 | 1.483 | ホルスタイン | 2011年6月30日 |
| 5 | 1.630 | 1.471 | ホルスタイン | 2006年7月5日 |
| 6 | 1.590 | 1.457 | ホルスタイン | 2012年4月22日 |
| 8 | 1.586 | 1.449 | ホルスタイン | 2012年12月22日 |
| 9 | 1.629 | 1.447 | ホルスタイン | 2010年3月30日 |
| 10 | 1.615 | 1.448 | ホルスタイン | 2010年7月15日 |
| 11 | 1.587 | 1.411 | ホルスタイン | 2012年5月16日 |
| 12 | 1.600 | 1.473 | ホルスタイン | 2013年7月5日 |
| 13 | 1.586 | 1.469 | ホルスタイン | 2009年11月25日 |
| 14 | 1.582 | 1.465 | ホルスタイン | 2009年11月25日 |
| 18 | 0.015 | 0.013 | ホルスタイン | 2014年5月6日 |
| 19 | 1.500 | 1.330 | ホルスタイン | 2013年4月19日 |
| 21 | 1.636 | 1.256 | ホルスタイン | 2013年8月30日 |
| 22 | 0.046 | 0.014 | ホルスタイン | 2013年1月14日 |
| 23 | 0.016 | 0.012 | ホルスタイン | 2014年2月17日 |
| 24 | 0.076 | 0.016 | ホルスタイン | 2011年7月13日 |
| 25 | 0.106 | 0.074 | ホルスタイン | 2011年5月12日 |
| 26 | 0.126 | 0.018 | ホルスタイン | 2011年1月12日 |
| 27 | 0.013 | 0.013 | ホルスタイン | 2014年8月7日 |
| 28 | 0.005 | 0.006 | ホルスタイン | 2012年1月20日 |
| 29 | 0.011 | 0.011 | ホルスタイン | 2014年1月2日 |
| 30 | 0.015 | 0.015 | ホルスタイン | 2011年5月9日 |

(表7) C農場における乳清・血清中の牛白血病抗体価

| C農場 | 採材:2016年5月24日 | | 種別 | 生年月日 |
|-----|---------------|-------|--------|------------|
| 番号 | S/P | | | |
| | 乳清 | 血清 | | |
| 5 | 0.027 | 0.013 | ホルスタイン | 2013年7月31日 |
| 6 | 0.019 | 0.009 | ホルスタイン | 2013年7月31日 |
| 10 | 0.010 | 0.011 | ホルスタイン | 2013年7月19日 |

| | | | | |
|----|-------|-------|--------|-------------|
| 11 | 0.074 | 0.016 | ホルスタイン | 2013年8月12日 |
| 12 | 0.023 | 0.013 | ホルスタイン | 2014年1月20日 |
| 13 | 0.021 | 0.013 | ホルスタイン | 2014年4月30日 |
| 14 | 0.022 | 0.011 | ホルスタイン | 2007年9月1日 |
| 16 | 0.010 | 0.010 | ホルスタイン | 2005年12月26日 |
| 17 | 0.269 | 0.014 | ホルスタイン | 2008年4月28日 |
| 18 | 0.010 | 0.012 | ホルスタイン | 2008年7月17日 |
| 19 | 0.022 | 0.011 | ホルスタイン | 2009年2月13日 |
| 20 | 0.017 | 0.019 | ホルスタイン | 2009年1月29日 |
| 22 | 0.013 | 0.011 | ホルスタイン | 2010年3月23日 |
| 23 | 0.025 | 0.020 | ホルスタイン | 2009年12月18日 |
| 26 | 0.018 | 0.013 | ホルスタイン | 2010年12月30日 |
| 27 | 0.017 | 0.013 | ホルスタイン | 2011年1月25日 |
| 31 | 0.015 | 0.011 | ホルスタイン | 2011年9月12日 |
| 32 | 0.016 | 0.016 | ホルスタイン | 2011年9月11日 |
| 33 | 0.010 | 0.011 | ホルスタイン | 2011年9月13日 |
| 34 | 0.013 | 0.013 | ホルスタイン | 2014年1月25日 |
| 35 | 0.013 | 0.014 | ホルスタイン | 2011年12月30日 |
| 38 | 0.016 | 0.012 | ホルスタイン | 2012年4月25日 |
| 39 | 0.011 | 0.016 | ホルスタイン | 2012年10月9日 |
| 41 | 0.015 | 0.011 | ホルスタイン | 2012年8月9日 |

まとめ (表8)

A 農場 93 検体

| | 乳清 | 血清 |
|--------|-------|-------|
| 平均 S/P | 0.107 | 0.104 |
| 最大値 | >4 | >4 |
| 最小値 | 0.009 | 0.007 |

B 農場 22 検体

| | 乳清 | 血清 |
|--------|-------|-------|
| 平均 S/P | 0.890 | 0.789 |
| 最大値 | 1.636 | 1.483 |
| 最小値 | 0.005 | 0.006 |

C 農場 24 検体

| | 乳清 | 血清 |
|--------|-------|-------|
| 平均 S/P | 0.029 | 0.013 |
| 最大値 | 0.269 | 0.020 |
| 最小値 | 0.010 | 0.009 |

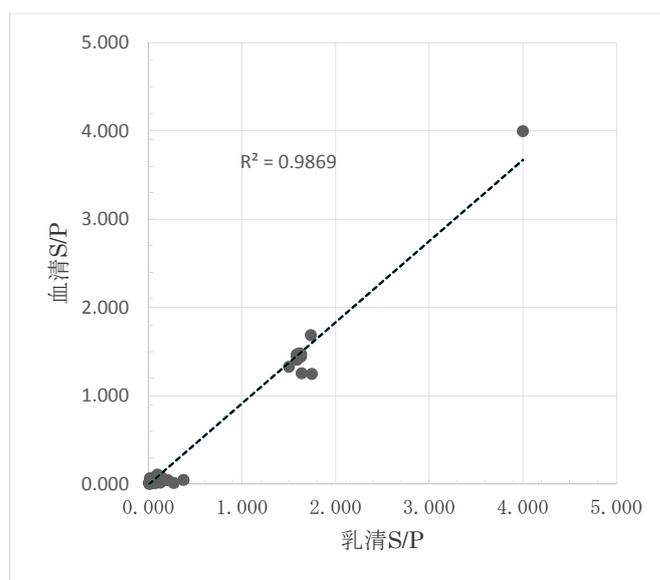


図1 A,B,C農場における乳清と血清の牛白血病 ELISA の S/P 値分布

3) 成果目標に対する達成状況

野外臨床試験で求められる 2 箇所以上、60 頭以上の個体について乳汁および血清を用いる検査を実施したことで、目標は達成できた。得られた成績をまとめると以下の通りである。

- a. 長野県松本家畜保健衛生所の管内 3 農場で計 139 頭の乳牛についてブルセラ、牛白血病について野外試験を実施した。
- b. ブルセラは乳清、血清ともにすべて %P が 30 未満、最大でも 6.1% であり、十分な陰性領域であったため、3 農場とも清浄性が証明された。
- c. 牛白血病は以前から発生が認められていた A, B 農場において乳清、血清ともに抗体陽性牛が認められた。乳清抗体と血清抗体は高い相関が認められたが ($r^2=0.9869$)、A 農場 90 番の個体が乳清で弱陽性 (S/P=0.374) で、血清では陰性 (S/P=0.048) となった。原因は不明である。

(1) 中課題 4（口腔液を用いた抗オーエスキー病抗体検査方法の開発）の研究成果

1) 工程管理及び成果目標

| 工程表 |
|--|
| ①口腔液検体（以下 OF という）の採取法、サンプリングサイズ、保存方法、前処理、希釈倍率、判定基準等の検討と最適化を行う。（小課題 1 関連）（平成 26 年度、平成 27 年度） |
| ↓ |
| ②決定した OF 採取方法、検体の前処理方法を行った上で、既存の検査法である血清検体と OF との比較を行い、OF を用いる検査の実用化にあたり、各種性能試験や臨床試験を実施する。（小課題 2 関連）。（平成 27 年度、平成 28 年度） |
| ↓ |
| ③必要に応じて OF 検体を用いて実験感染またはワクチン接種による抗体応答試験を実施する（小課題 3 関連）。（平成 28 年度） |
| 成果目標：既存のエライザキットについて口腔液を検体とすることの可能性を検証し、その実用化のための薬事法上の承認申請に必要なデータを収集する。 |

2) 各工程の進捗状況及び成果

【工程表の①】

・口腔液検体が ADV(S)エリーザキットの検体として適切であるか、プレ試験（オーエスキー病ウイルス感染攻撃試験）をアメリカ本社サポート、タイで実施。オーエスキー病ウイルス（ADV）を感染後 14 日目で全ての検体(n=6)で 100%陽性として検出された（表 1）。ADV(S)エリーザキットの検体として口腔液の有用性が示唆された。（平成 27 年度）

表 1) オーエスキー病ウイルス感染攻撃試験の結果

| DPI | n | OD値 | S/P比 | 陽性率* |
|-----|----|-----------|-----------|------|
| 0 | 10 | 0.08±0.01 | 0.04±0.04 | 0 |
| 7 | 6 | 0.11±0.04 | 0.13±0.03 | 0 |
| 10 | 4 | 0.12±0.02 | 0.11±0.05 | 0 |
| 14 | 6 | 0.65±0.28 | 1.47±0.72 | 100 |

*S/P 比： 陽性 \geq 0.4 陰性 $<$ 0.4

・OF 採取方法の妥当性の検討：既に確立している豚繁殖・呼吸障害症候群（PRRS）の OF 採取方法に準じて試験を実施し、陽性検体 10 頭分、陰性検体 10 頭分が採取できた。（平成 27 年度）

・口腔液検体の前処理の検討：口腔液内には土や飼料等の不純物が含まれており、検査値に影響を与える可能性がある。前処理として、口腔液を前処理なし、遠心分離（500g \sim 3000g, 5min \sim 1000min）を行い、OD 値のばらつきを評価した。その結果、陽性検体において 1000g \times 5min, 3000g \times 5 \sim 10min の遠心を実施した陽性検体で OD 値変動係数 14% \sim 21%とばらつきが小さく（表 2）、また陰性検体についても変動係数の範囲が 52% \sim 60%で 10%範囲内に収まっていた（表 3）。よって、口腔液検体の前

処理として、1000g×5min,3000g×5~10minの遠心分離を行う必要性が確認された。しかしながらオーバーナイトインキュベーション（4℃、16h）を行うと指示血清のOD値が高くなり、検査不成立となるため、陰性、陽性の判定が不可能であった（表4）。（平成27年度）

表2) 各遠心分離パラメーターにおける不純物除去された抗ADV抗体陽性検体（n=5）のOD値の平均、標準偏差及び変動係数

| | フィルター | 遠心なし | 500g × 5min | 500g × 10min | 1000g × 5min | 1000g × 10min | 3000g × 5min | 3000g × 10min |
|------|-------|-------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|
| 平均 | 405nm | 0.833 | 0.915 | 0.946 | 0.942 | 0.985 | 0.950 | 1.010 |
| | 410nm | 0.855 | 0.937 | 0.971 | 0.967 | 1.008 | 0.977 | 1.033 |
| | 415nm | 0.862 | 0.946 | 0.980 | 0.974 | 1.017 | 0.982 | 1.044 |
| 標準偏差 | 405nm | 0.327 | 0.299 | 0.250 | 0.242 | 0.148 | 0.201 | 0.154 |
| | 410nm | 0.334 | 0.304 | 0.255 | 0.244 | 0.148 | 0.202 | 0.155 |
| | 415nm | 0.042 | 0.037 | 0.027 | 0.029 | 0.040 | 0.045 | 0.050 |
| 変動係数 | 405nm | 39% | 33% | 26% | 26% | 15% | 21% | 15% |
| | 410nm | 39% | 32% | 26% | 25% | 15% | 21% | 15% |
| | 415nm | 39% | 32% | 26% | 25% | 14% | 20% | 15% |

表3) 各遠心分離パラメーターにおける不純物除去された抗ADV抗体陰性検体（n=5）のOD値の平均、標準偏差及び変動係数

| | フィルター | 遠心なし | 500g × 5min | 500g × 10min | 1000g × 5min | 1000g × 10min | 3000g × 5min | 3000g × 10min |
|------|-------|-------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|
| 平均 | 405nm | 0.096 | 0.084 | 0.062 | 0.073 | 0.074 | 0.081 | 0.083 |
| | 410nm | 0.096 | 0.085 | 0.062 | 0.074 | 0.074 | 0.081 | 0.082 |
| | 415nm | 0.099 | 0.087 | 0.064 | 0.075 | 0.076 | 0.083 | 0.085 |
| 標準偏差 | 405nm | 0.413 | 0.415 | 0.415 | 0.385 | 0.529 | 0.525 | 0.568 |
| | 410nm | 0.431 | 0.434 | 0.437 | 0.405 | 0.548 | 0.537 | 0.602 |
| | 415nm | 0.042 | 0.037 | 0.027 | 0.029 | 0.040 | 0.045 | 0.050 |
| 変動係数 | 405nm | 41% | 42% | 42% | 39% | 53% | 52% | 57% |
| | 410nm | 43% | 43% | 44% | 40% | 55% | 54% | 60% |
| | 415nm | 42% | 43% | 43% | 39% | 54% | 54% | 58% |

表4) 同一キット内指示血清（通常法とオーバーナイト:4℃、16h）のOD値

| | 血清（通常法） | | | | 口腔液（オーバーナイト） | | | |
|--|---------|------|-------|------|--------------|------|-------|------|
| | 405nm | 検査成立 | 415nm | 検査成立 | 405nm | 検査成立 | 415nm | 検査成立 |
| SP平均 | 1.213 | | 1.213 | | 1.115 | | 1.115 | |
| WP平均 | 0.470 | | 0.470 | | 0.890 | | 0.890 | |
| N平均 | 0.059 | ○ | 0.059 | ○ | 0.136 | × | 0.136 | × |
| WP平均-N平均 | 0.411 | ○ | 0.411 | ○ | 0.754 | ○ | 0.754 | ○ |
| SP平均/WP平均 | 2.583 | ○ | 2.583 | ○ | 1.253 | × | 1.253 | × |
| SP：指示強陽性血清、WP：指示弱陽性血清、N：指示陰性血清 | | | | | | | | |
| 検査成立条件：N平均 ≤ 0.1、WP平均 - N平均 ≥ 0.15、SP平均/WP平均 ≥ 2.0 | | | | | | | | |

・希釈法による指示血清の最適化：オーバーナイトインキュベーションを行うと指示血清のOD値が高くなる（前述）。オーバーナイトインキュベーションの指示血清OD

値が通常法 OD 値と近似値になるよう希釈法を用いて指示血清を調整した。ADV(S) エリーザキットに同封されている希釈液を用いて 4 倍希釈した指示血清は、指示陰性血清 (N) : 平均 OD 値=0.078、指示弱陽性血清 (WP) : 平均 OD 値=0.423、指示強陽性血清 (SP) : 平均 OD 値=1.171、WP-N=0.345、SP/WP=2.766 と検査成立条件を満たした (表 5)。よって指示血清を 4 倍希釈することが適切であることが確認できた。(平成 27 年度)

表 5) 希釈法による指示血清の OD 値

| 指示血清 | | インキュベーション4℃ 16h | | | | 通常法 | 検査成立条件 |
|------|-------|-----------------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 希釈倍率 | 血清 | OD値 | | | 平均値 | | |
| | N | 0.187 | 0.185 | 0.194 | 0.188 | 0.042 | 0.1以下 |
| 2 | N | 0.125 | 0.121 | 0.135 | 0.127 | | |
| 4 | N | 0.078 | 0.079 | 0.079 | 0.078 | | |
| | WP | 0.933 | 0.936 | 0.890 | 0.919 | 0.372 | |
| 2 | WP | 0.665 | 0.660 | 0.654 | 0.659 | | |
| 4 | WP | 0.422 | 0.424 | 0.425 | 0.423 | | |
| | SP | 1.266 | 1.285 | | 1.275 | 1.137 | |
| 2 | SP | 1.233 | 1.267 | | 1.250 | | |
| 4 | SP | 1.131 | 1.211 | | 1.171 | | |
| | WP-N | | | | 0.731 | 0.330 | 0.15以上 |
| 2 | WP-N | | | | 0.533 | | |
| 4 | WP-N | | | | 0.345 | | |
| | SP/WP | | | | 1.387 | 3.061 | 2.0以上 |
| 2 | SP/WP | | | | 1.896 | | |
| 4 | SP/WP | | | | 2.766 | | |

N:指示陰性血清、WP:指示弱陽性血清、SP:指示強陽性血清

【工程表②】

・同一個体から採取した口腔液検体と血清検体の陽性・陰性一致率の検討：口腔液原液(陽性 n=5、陰性 n=5)及び 4 倍希釈した指示血清をオーバーナイトインキュベーションした S/P 比と通常法(血清)の S/P 比を比較した。その結果、口腔液検体と血清検体との陽性・陰性一致率は 100%であった (表 6)。(平成 27 年度)

表 6) 同一個体から採取した口腔液検体と血清検体の OD 値、S/P 比及び S/N 比

| 検体番号 | ADV(S)口腔液 | | | ADV(S)血清 | | ADV(g I)血清 | |
|------|-----------|-------|----|----------|----|------------|------|
| | OD値 | S/P比 | 判定 | S/P比 | 判定 | S/N比 | 判定 |
| 陽性-1 | 1.16 | 3.14 | 陽性 | 3.52 | 陽性 | 0.06 | 陽性 |
| 陽性-2 | 1.21 | 3.28 | 陽性 | 3.71 | 陽性 | 0.12 | 陽性 |
| 陽性-3 | 0.97 | 2.59 | 陽性 | 3.47 | 陽性 | 0.05 | 陽性 |
| 陽性-4 | 0.29 | 0.62 | 陽性 | 2.48 | 陽性 | 0.65 | 判定保留 |
| 陽性-5 | 1.27 | 3.45 | 陽性 | 3.53 | 陽性 | 0.10 | 陽性 |
| 陰性-1 | 0.03 | -0.13 | 陰性 | -0.02 | 陰性 | 1.01 | 陰性 |
| 陰性-2 | 0.05 | -0.08 | 陰性 | 0.01 | 陰性 | 0.98 | 陰性 |
| 陰性-3 | 0.04 | -0.12 | 陰性 | 0.03 | 陰性 | 1.10 | 陰性 |
| 陰性-4 | 0.08 | 0.01 | 陰性 | -0.03 | 陰性 | 0.95 | 陰性 |
| 陰性-5 | 0.06 | -0.06 | 陰性 | 0.05 | 陰性 | 1.02 | 陰性 |

S/P比 陰性<0.4, 陽性≥0.4
S/N比: 陰性>0.7, 0.6<判定保留 ≤0.7, 陽性≤0.6

・異なるロット間における検査成立条件の比較：オーバーナイトインキュベーション法において、ロット FM368 及び HM584 では指示血清を 8 倍に希釈した場合に、両ロットともに検査成立条件が満たされた（表 7）。（平成 28 年度）

表 7) ロット FM368 及び HM584 における検査成立の可否

| 希釈倍率 | 項目 | 平均OD値または平均値 | | 両ロットともに 検査成立 |
|------|-------|-------------|-------|-----------------|
| | | FM368 | HM584 | |
| 1 | N | 0.209 | 0.250 | × |
| 2 | N | 0.154 | 0.162 | × |
| 4 | N | 0.099 | 0.110 | × |
| 6 | N | 0.077 | 0.108 | × |
| 8 | N | 0.065 | 0.081 | ○ |
| 1 | WP | 0.705 | 0.930 | / |
| 2 | WP | 0.566 | 0.708 | |
| 4 | WP | 0.389 | 0.467 | |
| 6 | WP | 0.312 | 0.357 | |
| 8 | WP | 0.256 | 0.305 | |
| 1 | SP | 1.404 | 1.303 | / |
| 2 | SP | 1.743 | 1.282 | |
| 4 | SP | 2.461 | 1.207 | |
| 6 | SP | 3.006 | 1.119 | |
| 8 | SP | 3.625 | 1.099 | |
| 1 | WP-N | 0.705 | 0.680 | ○ |
| 2 | WP-N | 0.566 | 0.545 | ○ |
| 4 | WP-N | 0.389 | 0.357 | ○ |
| 6 | WP-N | 0.312 | 0.249 | ○ |
| 8 | WP-N | 0.256 | 0.224 | ○ |
| 1 | SP/WP | 1.404 | 1.401 | × |
| 2 | SP/WP | 1.743 | 1.811 | × |
| 4 | SP/WP | 2.461 | 2.586 | ○ |
| 6 | SP/WP | 3.006 | 3.136 | ○ |
| 8 | SP/WP | 3.625 | 3.609 | ○ |

N：指示陰性血清、SP：指示弱陽性血清、WP：指示強陽性血清
 検査成立条件：N \leq 0.1、WP-N \geq 0.15、SP/WP \geq 2.0

・同一個体から採取した口腔液検体の異なるロット間における陽性一致率の評価：検査成立要件を満たした8倍希釈指示血清を用いた場合、FM368とHM584の両ロット間における口腔液検体の陽性一致率は100%であった（表8）。なお、全ての検体は血清を用いたADV(S)エリーザキットの通常法の検査により陽性と判定されている。（平成28年度）

表8) 8倍希釈指示血清を用いた場合のロットFM368及びHM584におけるADV陽性個体口腔液の陽性及び陰性検体数

| 8倍希釈指示血清 を用いた場合 | | HM584 | | |
|--------------------|----|-------|----|----|
| | | 陽性 | 陰性 | 合計 |
| FM368 | 陽性 | 18 | 0 | 18 |
| | 陰性 | 0 | 0 | 0 |
| | 合計 | 18 | 0 | |

・ADV陰性群にて採取した口腔液検体の異なるロット間における陰性一致率の評価：検査成立要件を満たした8倍希釈指示血清を用いた場合、FM368とHM584の両ロット間における口腔液検体の陰性一致率は50%であった（表9）。口腔液検体はADV陰性農場の豚房別に群ごとに採取しており、1検体につき10頭以上のADV陰性豚の口腔液が含まれている。なお、各豚房別に代表豚1頭より血液を採取しており、当該豚の血清はADV(S)エリーザキットの通常法の検査により陰性と判定されている。（平成28年度）

表9) 8倍希釈指示血清を用いた場合のロットFM368及びHM584におけるADV陰性群口腔液の陽性及び陰性検体数

| 8倍希釈指示血清 を用いた場合 | | HM584 | | |
|--------------------|----|-------|----|----|
| | | 陽性 | 陰性 | 合計 |
| FM368 | 陽性 | 2 | 0 | 2 |
| | 陰性 | 3 | 5 | 8 |
| | 合計 | 5 | 5 | |

【工程表③】

検査キットのロット間での検査結果の差異の原因及び改善方法についてさらに検証する必要があることが判明したため、免疫応答試験は実施していない。

3) 成果目標に対する達成状況

平成27年度に実施した研究により、口腔液検体の前処理方法及びオーバーナイトインキュベーション（4℃、16h）での条件下における指示血清調整方法を最適化することができた。また、口腔液検体と血清検体における陽性及び陰性結果の一致率は各々100%であり、口腔液がADV(S)エリーザキットの検体として利用できる可能性が高いことが示唆された。

平成 28 年度に実施した研究により、口腔液検体を用いた異なるロット間での陽性及び陰性結果の一致率は、陽性一致率 100%、陰性一致率 50%であることが判明した。ロットによる検査結果の差異及び改善方法についてさらに検証する必要があるものの、口腔液が ADV のモニタリング検査の検体として有用である可能性が示された。

以上の成績から、目標のうち、口腔液を検体として用いる可能性を検証し、ADV(S)エラーキットに新たな検体を利用することの有用性を確認するという点は達成できた。しかしながら、実用化に向けた薬事法上の承認申請に必要なデータを取得するためには、さらに多検体での検証及び検査方法の改善が必要である。また、免疫応答試験も実施する必要があると考えられる。

(5) 中課題 5 (「ヨーネスクリーニング・プルキエ」を用いた新たな検査方法の検証) の
研究成果

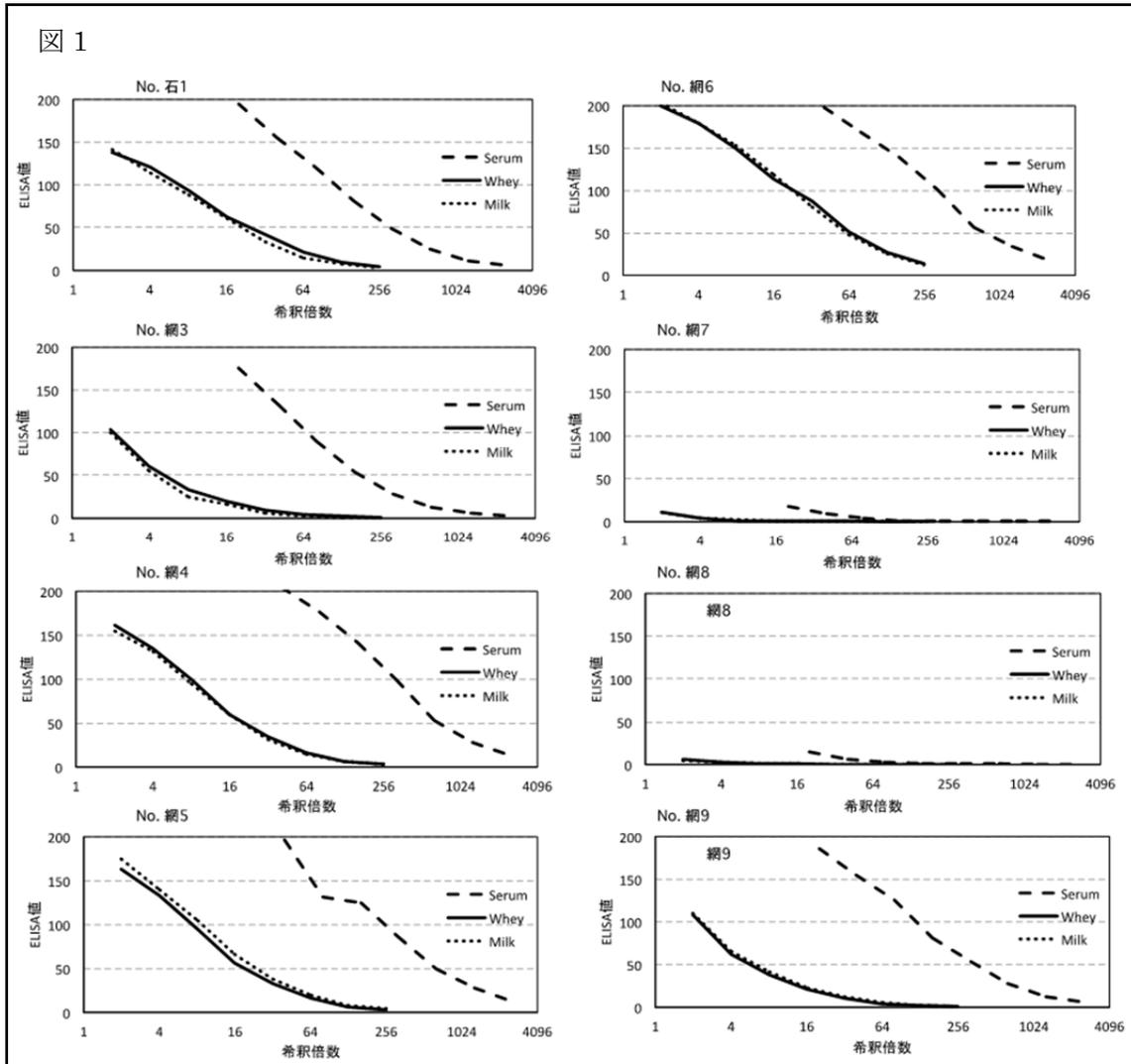
1) 工程管理及び成果目標

| 工程表 |
|--|
| ① 収集した検体について試験を実施し、得られた試験成績から、乳汁を検体とすることの可能性を検証する (小課題 1 関連)。(平成 26 年度) |
| ↓ |
| ② 乳汁を検体とした場合の感度と特異度を検討し、血清を用いた場合との比較、及びカットオフ値について検討する (小課題 2 関連)。(平成 27、28 年度) |
| ↓ |
| ③ 乳汁を用いる検査の実用化にあたって必要となる臨床試験等の試験成績を収集する (小課題 3 関連)。(平成 28 年度) |
| 成果目標：既存の検査方法の改良による牛ヨーネ病の迅速・簡易な検査法を確立し、薬事法上の事項変更承認申請に必要な試験成績を収集する。 |

2) 各工程の進捗状況及び成果

【工程表①】

農林水産省および都道府県に協力を要請し、検査材料と検査成績の収集を開始した。8 検体のヨーネ病抗原陽性検体が収集され、「ヨーネスクリーニング・プルキエ」を用いた抗体測定を行った結果、血清で抗体陽性が確認された 6 個体の乳汁または乳清において希釈倍数に比例した ELISA 値が測定された。また、乳汁と乳清の ELISA 値はほぼ同一の値を示した (図 1)。以上より、乳汁を検体とした測定法を確立できる可能性が十分にあることが確認された。(平成 26 年度)



【工程表②】

ヨーネ病抗原陽性サンプル 65 検体について「ヨーネスクリーニング・プルキエ」を用いた抗体測定を行い、乳汁と乳清の ELISA 値が高い正の相関を示すことを確認した ($r=0.98$, $p<0.001$)。ヨーネ病抗原陽性サンプル及び陰性サンプル計 91 検体について抗体測定を行い、血清と乳汁の ELISA 値においても高い正の相関が示された ($r=0.86$, $p<0.001$) (図 2)。また両者の一致率は、乳汁 ELISA のカットオフ値を 20 とした場合に最も高い値を示した (表 1)。(平成 27 年度)

ヨーネ病抗原陽性サンプル (113 検体) 及び陰性サンプル (582 検体) 計 695 検体について抗体測定を行った結果、高感度及び高特異度を両立する乳汁 ELISA の条件としては、カットオフ値を 20 から 30 の間に定めることが適当だと考えられた (表 2)。また、血清と乳汁の ELISA 値に高い正の相関が示され ($r=0.85$, $p<0.001$)、両者の一致率

は、乳汁 ELISA のカットオフ値を 25 とした場合に最も高い値を示した (図 3)。(平成 28 年度)

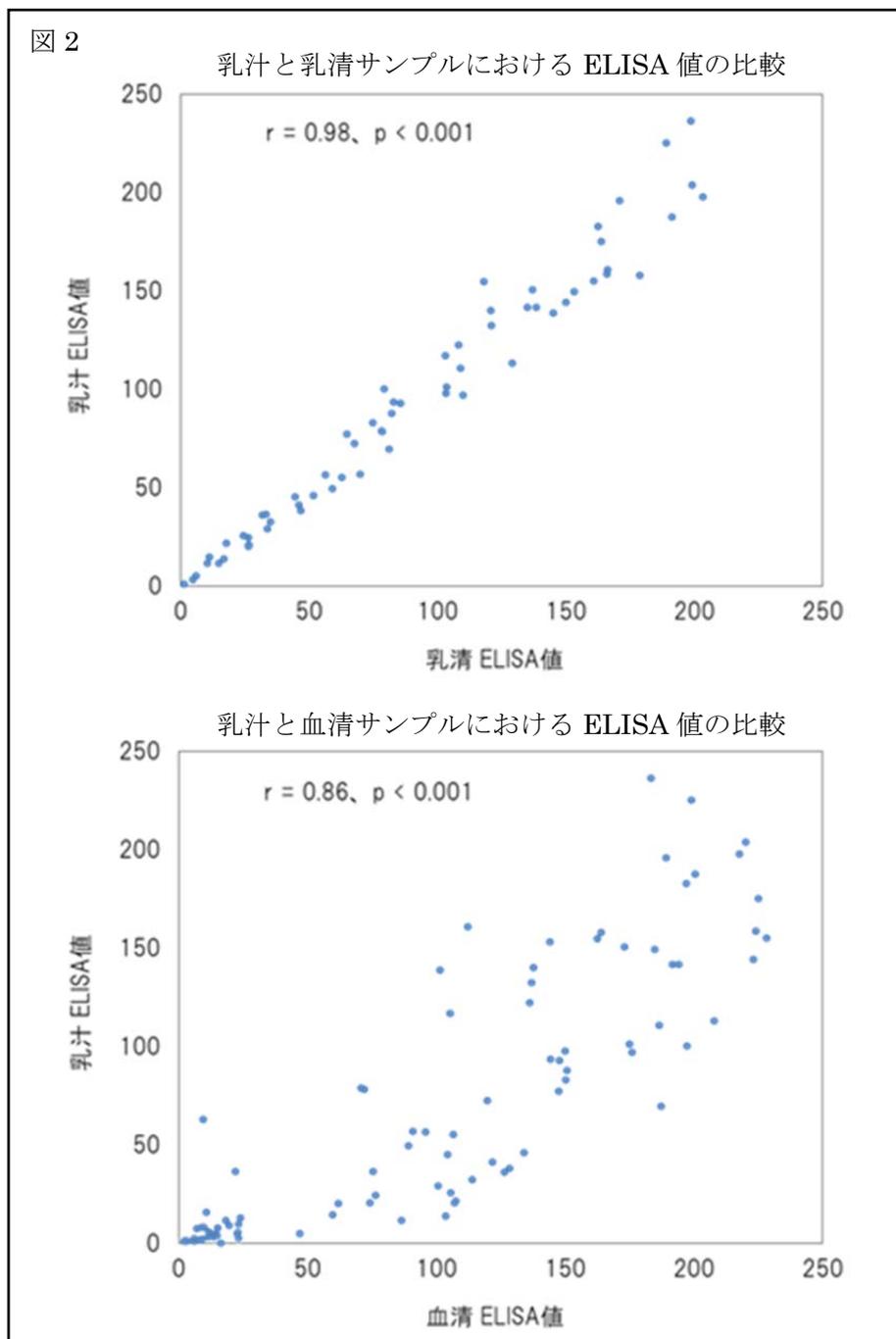


表 1

| | | | |
|-----------------------|------|------|------|
| 血清 ELISA カットオフ値 | 60 | 60 | 60 |
| 乳汁 ELISA カットオフ値 | 20 | 25 | 30 |
| 一致率 ¹⁾ (%) | 95.6 | 90.1 | 87.9 |

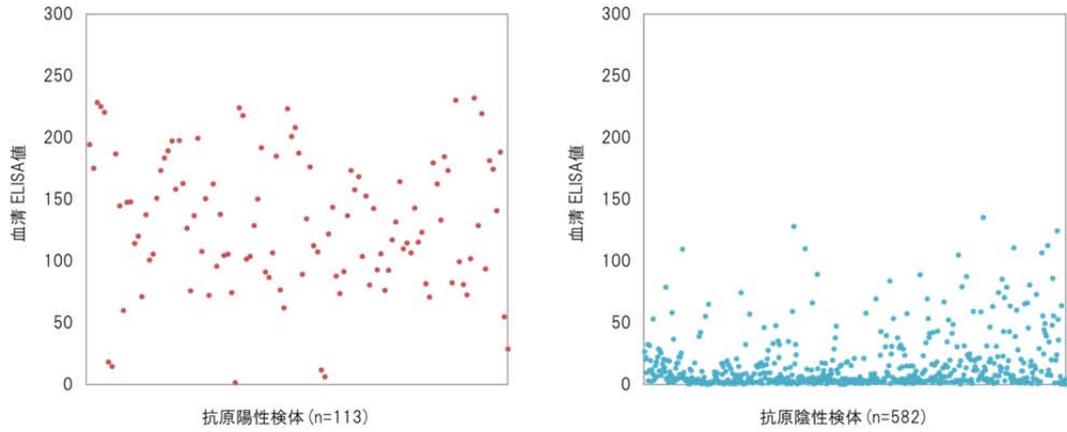
1): 全ての検体のうち、血清と乳汁サンプルにおける ELISA の判定がともに陽性又は陰性となったものの百分率

表 2

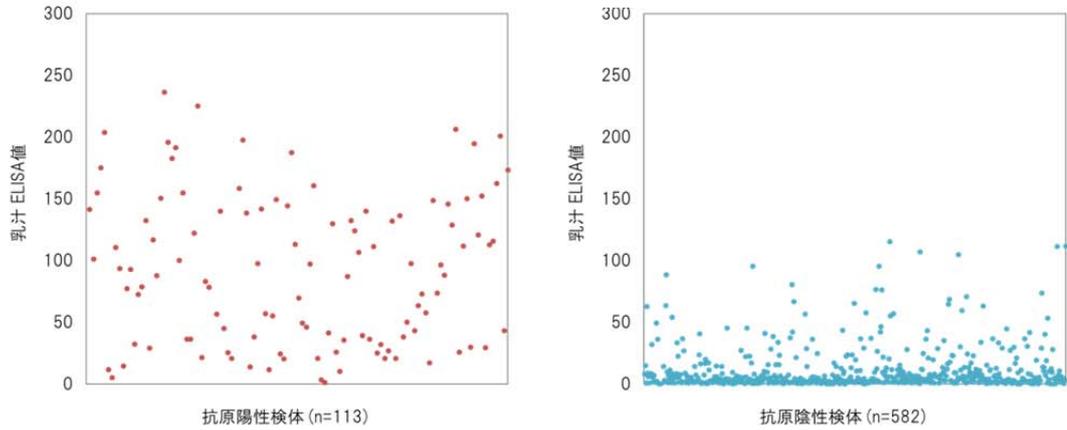
| サンプル | カットオフ値 | 感度 | 特異度 |
|------|--------|------|------|
| 血清 | 60 | 92.9 | 94.2 |
| | 20 | 90.3 | 84.4 |
| 乳汁 | 25 | 84.1 | 87.8 |
| | 30 | 77.0 | 90.0 |

図 3

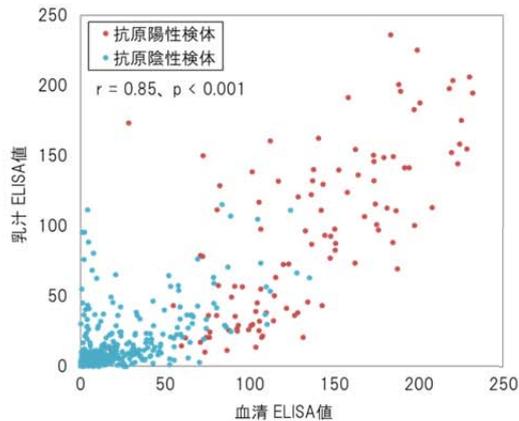
血清サンプルにおける個体別 ELISA 値



乳汁サンプルにおける個体別 ELISA 値



乳汁と血清サンプルにおける ELISA 値の比較



| | | | |
|-----------------------|------|------|------|
| 血清 ELISA カットオフ値 | 60 | 60 | 60 |
| 乳汁 ELISA カットオフ値 | 20 | 25 | 30 |
| 一致率 ¹⁾ (%) | 89.8 | 91.1 | 90.3 |

1): 全ての検体のうち、血清と乳汁サンプルにおける ELISA の判定がともに陽性又は陰性となったものの百分率

【工程表③】

乳汁エライザでは非特異反応が散見することが明らかになり、実用化のためには更なる性能の改善又は判定基準の検討が必要であることが判明したため、当初予定していた野外臨床試験は実施していない。

3) 成果目標に対する達成状況

「ヨーネスクリーニング・プルキエ」を用いた新たな検査方法として、頻回採取が可能な乳を検査材料とすることの可能性を検証した。まず、乳汁及び乳清のいずれにおいても検査材料とすることが可能であることが示された。また、乳汁を検査材料とした場合（乳汁 ELISA）、希釈倍率を 2 倍とするほかは現行（血清 ELISA）の方法を準用して検査することが可能であることが示された。乳汁 ELISA のカットオフ値を 25 とすることで、血清 ELISA の結果と最も高い一致率を得ることができたため、実用化には本基準が適当であることが示唆された。しかし、血清 ELISA よりも乳汁 ELISA で多くの非特異反応が散見されたため、実用化に当たっては性能の改善又は判定基準の検討が必要であると考えられた。

なお、事項変更承認申請には、今回得られた結果を踏まえ、臨床試験を実施する必要がある。

(1) 中課題 6 (「ヨーネライザ・スクリーニング KS」を用いた新たな診断法の開発) の研究成果

- 1) 小課題 1 : ヨーネ病感染牛由来材料の収集ルートの構築【共立製薬株式会社】
法定伝染病である野外ヨーネ病感染牛由来検体入手については、行政的な混乱を招かない収集ルートの構築が必要である。
- 2) 小課題 2 : 検査材料の検討【共立製薬株式会社】
乳汁の検体材料としての適合性と前処理の必要性について検討する。
- 3) 小課題 3 : 用法・用量の設定【共立製薬株式会社】
検査材料について非特異反応の出現等について検討し、用法・用量の設定を行う。
- 4) 小課題 4 : 性能に関する試験【共立製薬株式会社】
実験感染牛又は野外感染牛を対象として、乳汁等の簡便に採取可能な検体について感度・特異性等を検討する。
- 5) 小課題 5 : 判定基準の設定【共立製薬株式会社】
血清を用いた場合との比較データ解析により、本エライザキットの判定基準の設定を行う。
- 6) 小課題 6 : 乳汁等を用いる検査方法の実用化【共立製薬株式会社】
収集したデータを基に薬事法上の承認申請に必要なデータ整理を行う。

1) 工程管理及び成果目標

| 工程表 |
|---|
| ①-1 検査用の材料を確保するため、ヨーネ病感染牛由来材料の収集ルートを構築する。(小課題 1 関連) (平成 26 年度) |
| ↓ |
| ①-2 陰性検体については、動物衛生研究部門、京都微研及び共立製薬で共有し使用する材料として、出生日・最終分娩日・体細胞数・糞便ヨーネ菌 DNA 量等のデータが得られる農場を選定し収集する。(小課題 1 関連) (平成 27,28 年度) |
| ↓ |
| ②-1 陰性牛検体を含め収集した検体の中で最も適した検査材料を選出する。(小課題 2 関連) (平成 26,27 年度) |
| ↓ |
| ②-2 陰性検体 (76 検体) の一部については、体細胞数との関連について血清及び原乳 (希釈濃度別) を用い検討した。(小課題 2 関連) (平成 27 年度) |
| 更に陰性検体 (252 検体) を追加し、体細胞数との関連について血清及び原乳 (希釈濃度別) を用い検討した。(小課題 2 関連) (平成 28 年度) |
| ↓ |

③-1 選出した検査材料を用いて、用法・用量の設定を行う。(小課題 3 関連) (平成 26 年度)



③-2 平成 27 年度に収集した陽性牛検体及び陰性牛検体の原乳と乳清の測定結果を加え、カットオフ値設定の検討を行った。(小課題 3 関連) (平成 26,27 年度)



④-1 実験感染牛又は野外感染牛等から採取した検査材料を用いて、感度・特異性等を検討する。(小課題 4 関連) (平成 28 年度)



⑤-1 血清を用いた場合と比較し判定基準の設定を行う。(小課題 5 関連) (平成 28 年度)



⑥-1 収集したデータを基に薬事法上の承認に必要なデータ整理を行う。また、本検査方法の実用化に必要な臨床試験を実施した。(小課題 6 関連) (平成 26,27,28 年度)

成果目標： ヨーネ病の野外におけるスクリーニング検査は、エライザ法による抗体検査で実施されている。エライザ法は、一度に多検体の検査が可能な検査法であるが、本検査法の検体は血液（血清）であり、検体を採取には労力、コスト及び生産性低下等の問題がある。本事業では、簡便かつ頻回採取が可能な材料を検体とする検査方法を確立する。また、その実用化のため、薬事上の承認に必要なデータの収集を行う。

2) 各工程の進捗状況及び成果

【工程表①：小課題 1 関連】

陽性牛検体については、北海道庁（畜産第 1757 号）の承認を得て、ヨーネ病感染牛由来材料の収集ルートを構築した。(平成 26 年度)

また、陰性検体については、家畜改良センターと「研究用試料等の提供に関する契約」を締結し、誕生日・最終分娩日・体細胞数及び糞便ヨーネ菌 DNA 量等のデータが得られる乳用牛約 500 頭分の血清と原乳を収集する。(平成 27 年度)

平成 26～28 年度の 3 年間で収集（表.1）したヨーネ病感染牛由来材料は、113 頭分を収集した。また、陰性検体については、最終年度に実施した臨床試験の 2 農場を含む 5 農場約 300 頭分（血清は一部除く）及び家畜改良センター527 頭分の原乳と血清を収集した。(小課題 1 関連) (平成 28 年度) * 1

* 1：収集した検査材料の数量等について表.1 に示す。

表.1 平成 26～28 年度で収集した陽性・陰性検体数量

| 検体 | 農場等 | 地域 | 原乳 | 血液 |
|----|-------|------|-----|-----|
| 陽性 | 6ヶ所 | 北海道 | 113 | 113 |
| 陰性 | A農場 | 関東 | 30 | |
| | B農場 | 関東 | 30 | |
| | C農場 | 北海道 | 80 | 80 |
| | D農場 | 北海道 | 40 | |
| | E農場 | 九州 | 91 | |
| | センター* | 東北 | 527 | 527 |
| | | 陰性合計 | 798 | 607 |

*：家畜改良センター

【工程表②-1：小課題 2 関連】

陰性牛検体での前絞り乳と後絞り乳の ELISA 値は、同等な値（乳汁及び乳清とも）を示した。（平成 26 年度）

平成 27 年度までに収集した陽性牛検体及び陰性牛検体の原乳及び乳清については、ヨーネライザ スクリーニング・KS（本キット）を用いて ELISA 値を測定し比較した。その結果、陽性及び陰性検体ともに原乳と乳清の ELISA 値に有意差は認められず高い相関性が認められた。（小課題 2 関連）（平成 27 年度）* 2

* 2：陽性検体 40 検体及び陰性検体 201 検体の原乳と乳清の測定結果を累積ヒストグラムで示した。

陽性検体の原乳と乳清については、本キット添付のサンプル希釈液で 2 倍（図.1）及び 4 倍（図.2）希釈し測定した結果、0.3 以下を示す検体は、原乳及び乳清ともに 2 倍希釈で 8 検体、4 倍希釈で 15 検体であった。また、原乳と乳清の測定値に有意差 ($P < 0.05$) は認められず、高い相関性（2 倍： $r = 0.995$ ，4 倍： $r = 0.997$ ）が認められた。

陰性検体の原乳と乳清については、陽性検体と同様にサンプル希釈液で 0 倍希釈（原液：図.3）及び 2 倍希釈（図.4）し測定した結果、0 倍希釈の原乳及び乳清の ELISA 値は、-0.018～0.969 及び-0.038～0.939 と広く分布した。一方、2 倍希釈での ELISA 値は、1 検体を除きともに 0.3 以下に分布した。また、陰性検体も陽性検体と同様に原乳と乳清の測定値に有意差 ($P < 0.05$) は認められず、高い相関性（未希釈： $r = 0.981$ ，2 倍： $r = 0.975$ ）が認められた。

以上のことより、陽性及び陰性検体ともに原乳と乳清の ELISA 値に有意差は認められず高い相関性が認められ、原乳を測定材料として用いる測定法を確立できる可能性が確認されたため、薬事法上の承認申請に必要なデータは、原乳を測定材料としてデータを収集することとした。

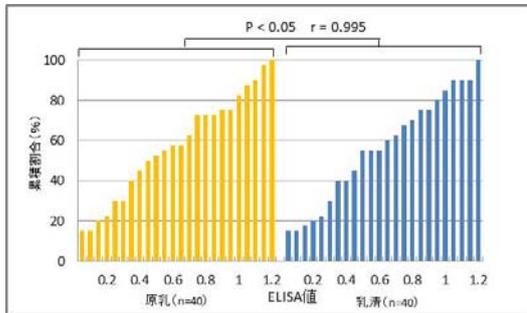


図.1 陽性検体の原乳及び乳清
(2倍希釈)における測定結果
(累積ヒストグラム)

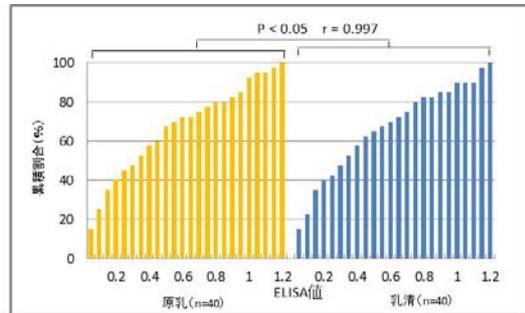


図.2 陽性検体の原乳及び乳清
(4倍希釈)における測定結果
(累積ヒストグラム)

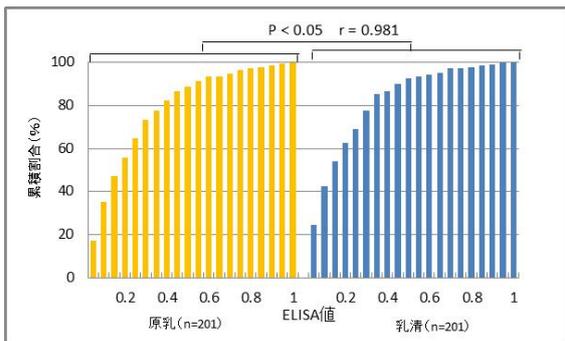


図.3 陰性検体の原乳及び乳清
(0倍希釈)における測定結果
(累積ヒストグラム)

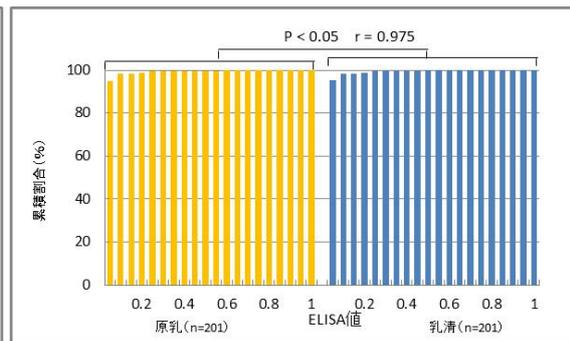


図.4 陰性検体の原乳及び乳清
(2倍希釈)における測定結果
(累積ヒストグラム)

【工程表②-2：小課題2関連】

体細胞数 0.6~975 万/mL の陰性牛検体 (328 検体) の血清及び原乳を用いて、体細胞数との関連について検討した。(小課題2関連) (平成 27,28 年度) * 3

* 3 : 体細胞数 0.6~975 万/mL の陰性牛検体 (328 検体) の原乳及び血清を用い検討した。

原乳及び血清は、添付のサンプル希釈液で 2 倍及び 50 倍希釈し測定した。

その結果、原乳では 328 検体中 322 検体 (98.2%) が ELISA 値 0.1 以下に分布し、

0.1以上のELISA値を示した検体は6検体であった。また、血清では328検体中327検体(99.7%)がELISA値0.1以下に分布した。なお、図中では示せなかったが、原乳2検体及び血清1検体ではELISA値0.3以上を示した。

以上の結果は、健康牛から採取した検査材料であるため、実用化には乳房炎発症牛由来等の検査材料での検討も必要であると考えられる。

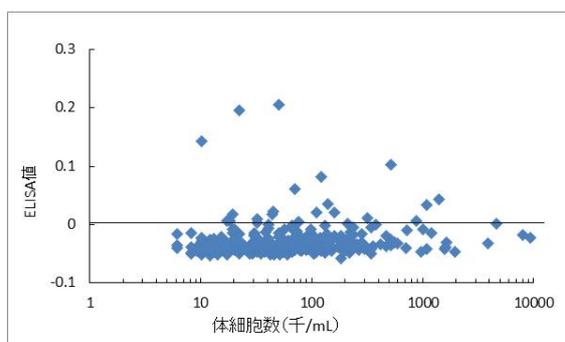


図.5 陰性検体における体細胞数と原乳ELISA値(分布図:328検体)

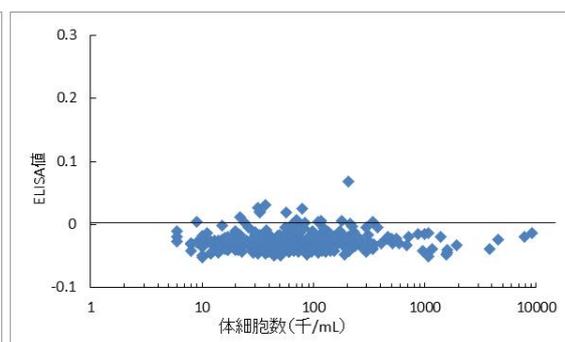


図.6 陰性検体における体細胞数と血清ELISA値(分布図:328検体)

【工程表③:小課題3関連】

収集した陽性牛検体(8検体)及び陰性牛検体(110検体)の原乳と乳清について、それぞれELISAキット添付のサンプル希釈液で0、2、3、4及び5倍希釈し測定した結果、カットオフ値を既値であるELISA値0.3に設定した場合、4倍希釈が最適であった。(平成26年度)

陽性牛検体(40検体)では各カットオフ値におけるPCRとの陽性一致率、陰性牛検体(201検体)では各カットオフ値におけるELISA陽性率を算出してデータ解析を行った。その結果、最適なカットオフ値の設定については、次年度、更に陽性牛検体等の材料を増やして再解析が必要であると判断した。(平成27年度)

平成28年度では更に陽性・陰性の検体数を増加し、陽性検体(90検体)では各カットオフ値における陽性率、陰性牛検体(原乳材料:798検体)では各カットオフ値における陰性率を算出してデータ解析を行った。また、陰性牛検体については、血清と原乳の両検査材料が揃っている607検体を用いて、血清と原乳との比較検討を実施した。なお、陽性牛検体については、PCR陽性・当社キットELISA陽性検体(血清)を用いた。(小課題3関連)(平成28年度)*4

*4:カットオフ値を0.1~0.3に設定し、陽性牛検体では各カットオフ値における陽性率、陰性牛検体では各カットオフ値における陰性率を示した。また、陰性牛検体で血清と原乳の両検査材料が揃っている検体を用いて、血清と原乳の陰性率に

ついて比較検討を実施した。なお、被検血清についてはサンプル希釈液にて 50 倍希釈、被検原乳については同希釈液にて 2 倍及び 3 倍希釈して検査に供した。

陽性牛検体原乳（表.2：90 検体）では、2 倍希釈カットオフ値 0.1 で設定した場合に陽性率が 96.67%で最高値を示した。各カットオフ値での陽性率は、0.15 で 92.22%、0.2 で 82.22%、0.25 で 73.33%及び 0.3 で 72.22%になり、カットオフ値を高値に設定すると陽性率は低下する傾向であった。また、3 倍希釈でもカットオフ値を 0.1 に設定した場合が最高値で 88.9%あったが、2 倍希釈の陽性率に比べ 7.8%低値であり、各カットオフ値での陽性率は、2 倍希釈と同様にカットオフ値を高値に設定すると陽性率は低下した。なお、検査に供した陽性牛検体原乳と同一個体の血清の ELISA 値には、相関性（ $r = 0.729$ ）が認められた。

陰性牛検体（表.3：798 検体）の原乳では、カットオフ値を 0.1 に設定した場合の陰性率は、2 倍希釈で 98.37%と最低値を示したが、その他 2 倍希釈及び 3 倍希釈の各カットオフ値では、99%以上の陰性率であり高値を示した。なお、2 倍及び 3 倍希釈ともにカットオフ値を高値に設定すると陰性率は上昇する傾向であった。

陰性牛検体（表.4：607 検体）の血清では、各カットオフ値における陰性率は、全てのカットオフ値で 99.84%と高値であった。一方、原乳では 2 倍希釈でカットオフ値 0.1 に設定した場合に 98.35%と最低値を示したが、その他の各カットオフ値では、99%以上の陰性率であり高値を示した。原乳と血清の比較において、原乳の方が若干低い陰性率であるがその差は僅かであった。

以上、本事業で収集した野外の陽性牛及び陰性牛に由来する原乳、血清の測定成績から、原乳のカットオフ値については 2 倍希釈の ELISA 値 0.1 又は 0.15 に設定することが妥当と考えられた。

表.2 陽性牛検体での各カットオフ値における陽性率（90 検体）

| 検体 | 希釈倍数 | 各カットオフ値における陽性率(%) | | | | |
|----|------|-------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 |
| 原乳 | 2倍 | 96.67 | 92.22 | 82.22 | 73.33 | 72.22 |
| | 3倍 | 88.89 | 74.44 | 68.89 | 61.11 | 60.00 |

表.3 陰性牛検体での各カットオフ値における陰性率（798 検体）

| 検体 | 希釈倍数 | 各カットオフ値における陰性率(%) | | | | |
|----|------|-------------------|-------|-------|-------|--------|
| | | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 |
| 原乳 | 2倍 | 98.37 | 99.37 | 99.50 | 99.75 | 99.75 |
| | 3倍 | 99.75 | 99.75 | 99.75 | 99.27 | 100.00 |

表.4 陰性牛検体での各カットオフ値における陰性率の比較（607 検体）

| 検体 | 希釈倍数 | 各カットオフ値における陰性率(%) | | | | |
|----|------|-------------------|-------|-------|-------|--------|
| | | 0.10 | 0.15 | 0.20 | 0.25 | 0.30 |
| 血清 | 50倍 | 99.84 | 99.84 | 99.84 | 99.84 | 99.84 |
| 原乳 | 2倍 | 98.35 | 99.34 | 99.34 | 99.67 | 99.67 |
| | 3倍 | 99.67 | 99.67 | 99.67 | 99.84 | 100.00 |

【工程表④：小課題 4 関連】

実験感染牛由来の検査材料については、本事業期間中では入手不可であったため、実験感染牛における感度・特異性の検討は未着手である。

野外感染牛由来の検査材料については、上記の【工程表③：小課題 3 関連】に記載したとおり、陽性牛検体の原乳 2 倍希釈でカットオフ値を 0.1 及び 0.15 に設定した場合の陽性率は、96.7%及び 92.2%と高値を示しているため、高い陽性検出感度であると考えられる。また、陰性牛検体の原乳 2 倍希釈でカットオフ値を 0.1 及び 0.15 に設定した場合の陰性率は、98.37%及び 99.37%と高値を示しているため、高い特異性であると考えられることから、本測定方法は高い感度・特異性がある検査法であると考えられる。（小課題 4 関連）（平成 28 年度）

【工程表⑤：小課題 5 関連】

陽性牛及び陰性牛検体における血清と原乳について、各カットオフ値における陽性及び陰性一致率（表.5）を算出することにより、本検査方法の判定基準の検討を行った。（小課題 5 関連）（平成 28 年度）* 5

＊ 5：陽性牛及び陰性牛検体の各カットオフ値と血清現行基準との一致率

陽性牛検体については、上記の【工程表③：小課題 3 関連】に記載した各カットオフ値における陽性率と同一の値で、2 倍希釈のカットオフ値 0.1 で 96.67%、0.15 で 92.22%であり、その他の条件では 90%以下の一致率であった。

陰性牛検体での各カットオフ値における一致率は、2 倍希釈のカットオフ値 0.1 で 98.35%であり、その他の条件では 99%以上の一致率であった。

陽性牛及び陰性牛検体の血清との一致率を元に、各カットオフ値における不一致率を算出した結果、2 倍希釈のカットオフ値 0.1 で 4.98%、0.15 で 8.44%の不一致が発生することとなり、その他の条件では 10%以上の不一致が発生する。

本成績及び上記の【工程表③：小課題 3 関連】の成績を考慮しても、2 倍希釈の ELISA 値 0.1 又は 0.15 に設定することが妥当と考えられるが、本検査方法の再現性（変動係数）等についても考慮し、慎重に判定基準の設定をする必要があると考えられる。

表.5 各カットオフ値における血清との一致率（陽性・陰性）及び不一致率

| 項目 | 希釈倍数 | 各カットオフ値における血清との一致率(%) | | | | |
|------|------|-----------------------|-------|-------|-------|--------|
| | | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 |
| 陽性 | 2倍 | 96.67 | 92.22 | 82.22 | 73.33 | 72.22 |
| | 3倍 | 88.89 | 74.44 | 68.89 | 61.11 | 60.00 |
| 陰性 | 2倍 | 98.35 | 99.34 | 99.34 | 99.67 | 99.67 |
| | 3倍 | 99.67 | 99.67 | 99.67 | 99.84 | 100.00 |
| 不一致率 | 2倍 | 4.98 | 8.44 | 18.44 | 27.00 | 28.44 |
| | 3倍 | 11.43 | 25.88 | 31.43 | 39.04 | 40.00 |

【工程表⑥：小課題 6 関連】

本検査方法の実用化に必要な臨床試験として、2 施設（ヨーネ病陰性）70 頭の前乳を収集し、各施設の担当者と弊社の担当者 2 名で、本キットを用いて同一検体を同条件で測定することにより、検査施設あるいは検査実施者の違いによる測定結果への影響を評価した。（小課題 6 関連）（平成 28 年度）＊ 6

なお、これまで実施した試験のデータ等を蓄積しているが、本事業年度内では承認申請に必要なデータの収集・蓄積するまでには至らないため、不足している試験等の実施及びデータ解析が必要であると考えられる。

* 6 : 2 施設 (ヨーネ病陰性) 70 頭での臨床試験

ELISA 値の測定方法としては、各施設で収集した原乳をサンプル希釈液にて 2 倍及び 3 倍希釈し測定した。その測定した ELISA 値の分布及び相関性を比較検討することにより、測定結果への影響を評価した。

A 施設 (30 頭分) における測定結果を図.7,8 及び表.6 に示した。

測定者 3 名 (K1,K2,A1) の測定した ELISA 値は、2 倍希釈で-0.084~0.095、3 倍希釈で-0.069~0.027 であり、各測定者の ELISA 値は同様な分布を示した。また、相関性については、2 倍及び 3 倍希釈ともに全ての測定者間で高い相関性が認められた。

R 施設 (40 頭分) における測定結果を図.9,10 及び表.7 に示した。

測定者 3 名 (K1,K2,R1) の測定した ELISA 値は、2 倍希釈で-0.063~0.158、3 倍希釈で-0.058~0.115 であり、各測定者の ELISA 値は同様な分布を示した。また、相関性については、2 倍及び 3 倍希釈ともに全ての測定者間で高い相関性が認められた。

以上ことより、今回実施した 2 施設各 3 名の測定においては、施設及び測定者で測定結果にバラツキは無く、相関性が認められたことから、検査施設あるいは検査実施者の違いによる影響は少なく、安定した測定が可能であることが確認された。

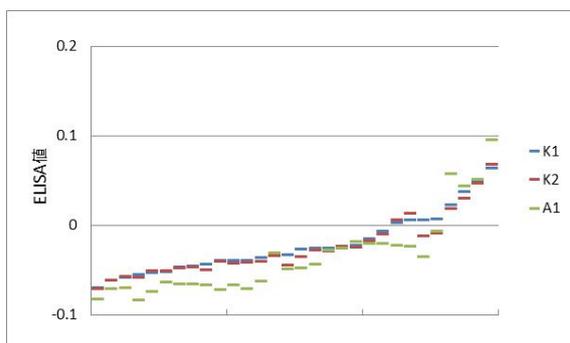


図.7 各測定者の ELISA 値 (2 倍希釈)
(分布図 : 30 検体)

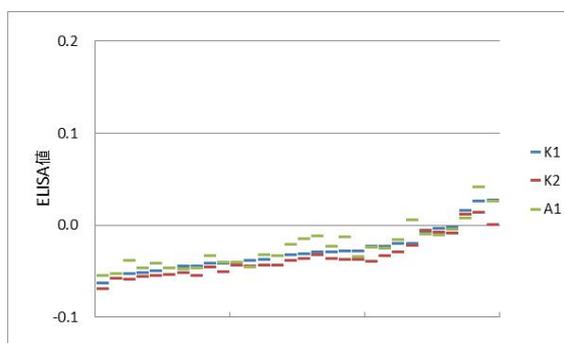


図.8 各測定者の ELISA 値 (3 倍希釈)
(分布図 : 30 検体)

表.6 各測定者間及び各希釈での相関係数

| 2倍希釈 | K1 | K2 | A1 | 3倍希釈 | K1 | K2 | A1 |
|------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
| K1 | | 0.987 | 0.945 | K1 | | 0.976 | 0.932 |
| K2 | 0.987 | | 0.947 | K2 | 0.976 | | 0.920 |
| A1 | 0.945 | 0.947 | | A1 | 0.932 | 0.920 | |

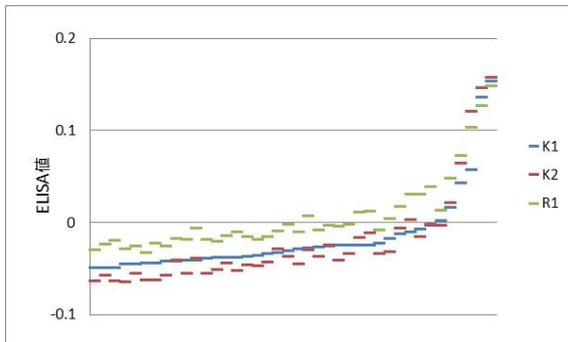


図.9 各測定者の ELISA 値 (2 倍希釈)
(分布図 : 40 検体)

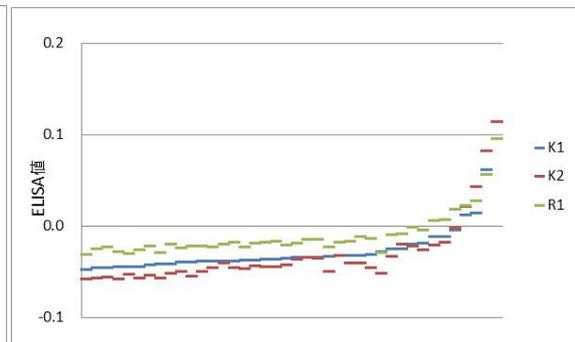


図.10 各測定者の ELISA 値 (3 倍希釈)
(分布図 : 40 検体)

表.7 各測定者間及び各希釈での相関係数

| 2倍希釈 | K1 | K2 | R1 | 3倍希釈 | K1 | K2 | R1 |
|------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
| K1 | | 0.972 | 0.968 | K1 | | 0.978 | 0.983 |
| K2 | 0.972 | | 0.987 | K2 | 0.978 | | 0.980 |
| R1 | 0.968 | 0.987 | | R1 | 0.983 | 0.980 | |

3) 成果目標に対する達成状況

本事業を遂行するためには、検査材料の確保が必須条件であり、最も困難なヨーネ病感染牛由来材料の確保については、北海道庁及び道内家保等の協力を得て、陽性牛検体計 113 頭分の検査材料を収集した。また、陰性牛検体は、家畜改良センター及び民間農場、臨床試験実施 2 施設を含む計 5 農場約 800 頭分の検査材料を収集した。

その検査材料を用いて各課題の試験等を実施することにより、本検査方法の測定用材料を決定し、本法で重要なカットオフ値についても、妥当であると考えられる値を設定した。また、薬事法上の承認申請に必要な臨床試験についても実施したため、各課題ともに概ね成果は得られていると考えている。

しかし、本検査方法の実用化に向けた承認申請には、更に特異性（乳房炎発症牛由来等）、再現性等について検討を重ね詳細なデータ収集・解析を実施し、判定基準を設定しなければならないと考えられる。また、本検査方法については、検査材料の採取方法、診断基準の整備及び市場性等の問題についても、クリアにする必要があると考えられる。

5 研究成果の発表（主要な論文、取得した（申請中）の特許等を記述）

別紙の（3）～（8）のとおり

6 目的の達成に当たっての現時点での問題点等

中課題1, 2, 3においては、特になし。

中課題4においては、目標である口腔液を検体として用いる可能性を検証し、ADV(S)エリザキットに新たな検体を利用することの有用性を確認できた。しかしながら、実用化に向けた薬事法上の承認申請に必要なデータを取得するためには、さらに多検体での検証及び検査方法の改善が必要である。また、免疫応答試験も実施する必要があると考えられる。

中課題5においては、ヨーネスクリーニング・プルキエを用いて乳汁・乳清を検体として抗体検査が可能であることを示し、血清エリザの結果と最も一致度が高いカットオフ値の設定を行った。しかし、研究を進める過程で乳汁エリザでは非特異反応が散見することが明らかになり、実用化のためには更なる性能の改善又は判定基準の検討が必要である。

中課題6においては、ヨーネスクリーニング KS を用いて乳清を検体として抗体検査を行う方法を確立できた。今後の実用化のためには更に特異性（乳房炎発症牛由来等）、再現性等について検討を行い、判定基準の検証が必要である。

研究推進会議の開催状況、研究成果の発表(論文、特許等)等

| | |
|---------|-------------------------------|
| 試験研究課題名 | 簡便かつ頻回採取が可能な検体を用いた家畜疾病の検査法の開発 |
|---------|-------------------------------|

| 課題番号 | (1) 研究推進会議等開催回数 | (2) 行政が活用しうる成果の有無 | (3) 学術論文数 | | (4) 口頭発表回数 | | (5) 出版図書数 | (6) 国内特許権等数 | | (7) 国際特許権等数 | | (8) 報道件数 | 物品購入の有無 |
|------|-----------------|-------------------|-----------|----|------------|----|-----------|-------------|----|-------------|----|----------|---------|
| | | | 和文 | 欧文 | 国内 | 国際 | | 出願 | 取得 | 出願 | 取得 | | |
| 2605 | 5 | 有 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 有 |

(1) 研究推進会議等の開催実績

区分: ①推進会議、②現地検討会、③その他

| 区分 | 推進会議の名称 | 年月日 | 開催場所 | 参加者数 | 消費・安全局担当官の出席有無 | 主な議題及び決定事項 |
|----|--|------------|-----------------------------|------|----------------|---|
| ① | 平成26年度レギュラトリーサイエンス新技術開発事業研究推進会議(キックオフ会議) | 平成26年6月10日 | 農林水産省消費・安全局第4、5会議室 | 16名 | 有 | 各研究課題の試験研究計画等について |
| ① | 平成26年度「レギュラトリーサイエンス新技術開発事業」第2回研究推進会議 | 平成27年3月12日 | TKP虎ノ門ビジネスセンターカンファレンスセンター3C | 21名 | 有 | 各研究課題の試験研究の進捗・成果報告等 |
| ③ | ヨーネ病検体収集ルート確立のための打合せ | 平成26年12月9日 | 動物衛生研究所細菌寄生虫病領域 打合せスペース | 4名 | 無 | 北海道での陽性サンプル収集・陰性サンプル収集・次年度予算・年度末の推進会議について |
| ① | 平成27年度レギュラトリーサイエンス新技術開発事業RS2605 研究推進会議 | 平成28年2月8日 | 農林水産省 消費安全局 第1会議室 | 24名 | 有 | 各研究課題の試験研究の進捗・成果報告等 |
| ③ | ヨーネ病陰性牛収集ルート確立のための打合せ | 平成27年12月8日 | 京都微研 | 5名 | 無 | 家畜改良センターでの陰性サンプル収集・次年度予算・年度末の推進会議について |
| ① | 平成28年度安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス委託事業(RS2605)研究推進会議 | 平成29年2月13日 | 農林水産省消費・安全局第4、5会議室 | 22名 | 有 | 各研究課題の成果報告および取りまとめの方向について |

(2) 行政が活用しうる成果

区分: ①行政がすでに活用した成果、②行政が活用する目途がたった成果

| 区分 | 成果の内容 | 主な利用場面 | 活用状況 | 機関名 |
|----|----------------------|-------------------|-----------------------------------|----------------------|
| ② | 乳汁を検体としたブルセラ抗体検査法の開発 | 都道府県における疾病サーベイランス | 活用のためには薬事における事項変更の承認申請・認可を得る必要がある | 農研機構 動物衛生研究部門 |
| ② | 乳汁を検体とした牛白血病抗体検査法の開発 | 都道府県における疾病サーベイランス | 活用のためには薬事における事項変更の承認申請・認可を得る必要がある | 農研機構 動物衛生研究部門、畜産研究部門 |
| | | | | |

(3) 学術論文

| タイトル、著者名、学会誌名、巻、ページ、発行年月 | 機関名 |
|--------------------------|-----|
| | |
| | |

(4) 口頭発表

| タイトル、発表者名、学会等名、発表年月 | 機関名 |
|---------------------|-----|
| | |
| | |

(5) 出版図書

区分: ①出版著書、②雑誌、③年報、④広報誌、⑤その他

| 区分 | 著書名、(タイトル)、著者名、出版社名、発行年月 | 機関名 |
|----|--------------------------|-----|
| | | |
| | | |

(6)国内特許権等

| 特許権等の名称 | 発明者 | 権利者 (出願人等) | 特許権等の種類 | 番号 | 出願年月日 | 取得年月日 | 機関名 |
|---------|-----|---------------|---------|----|-------|-------|-----|
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |

(7)国際特許権等

| 特許権等の名称 | 発明者 | 権利者 (出願人等) | 特許権等の種類 | 番号 | 出願年月日 | 取得年月日 | 機関名 |
|---------|-----|---------------|---------|----|-------|-------|-----|
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |

(8)報道件数

区分:①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映

| 区分 | 記事等の名称 | 掲載紙・放送社名 | 年月日 | 機関名 | 備考 |
|----|--------|----------|-----|-----|----|
| | | | | | |
| | | | | | |