

日本における牛白血病ウイルスの
浸潤状況と伝播に関する疫学的研究

2015 年

岐阜大学大学院 連合獣医学研究科

小林 創太

日本における牛白血病ウイルスの
浸潤状況と伝播に関する疫学的研究

小林 創太

目 次

緒 言	1
第一章	
日本における牛白血病ウイルスの浸潤状況を 把握するための全国抗体調査	8
序論	9
材料および方法	10
1. 調査手順	10
2. 採材および実験室内検査	11
3. 統計学的解析	12
結果	13
1. 牛白血病ウイルスの浸潤状況	13
2. 地域別抗体陽性率	13
3. 年齢別抗体陽性率	14
考察	14
小括	19
図表	20
第二章	
混合ロジスティック回帰モデルを用いた 牛白血病ウイルスの酪農場内伝播に関するリスク要因の解析	32
序論	33
材料および方法	34

1. 分析に供したデータ	34
2. 抗体検査	35
3. 調査票を用いた聞き取り調査	35
4. 解析対象農場の選定	36
5. 統計学的解析	36
結果	40
1. 記述的解析	40
2. 単変量解析	41
3. 多変量解析	42
考察	43
小括	47
図表	49

第三章

ゼロ強調負の二項分布モデルを用いた牛白血病ウイルスの 農場内および農場間伝播に関するリスク要因の解析	53
序論	54
材料および方法	55
1. 調査票を用いた聞き取り調査	55
2. 解析対象農場の選定	55
3. 農場内有病率の分布	56
4. 統計学的解析	56
結果	60
1. 記述的解析	60
2. 単変量解析	61

3. 多変量解析	62
考察	63
小括	68
図表	70
総括	84
謝辞	87
引用文献	88

略語一覧

AIC : Akaike's information criterion, 赤池の情報基準

BLV : bovine leukemia virus, 牛白血病ウイルス

EBL : enzootic bovine leucosis, 地方病性牛白血病

OIE : Office International des Epizooties (英名 : World Organization for Animal Health), 国際獣疫事務局

PL : perisistent lymphocytosis, 持続性リンパ球増多症

SBL : sporadic bovine leukosis, 散発性牛白血病

ZINB モデル : zero-inflated negative binomial モデル, ゼロ強調負の二項分布モデル

緒 言

牛白血病は、体表および体腔リンパ節の腫大などを主徴とする疾病で、牛白血病ウイルス（bovine leukemia virus: BLV）を原因とする地方病性牛白血病（enzootic bovine leukosis : EBL）と、原因不明の散发性牛白血病（sporadic bovine leukosis : SBL）の総称である。日本において本病は届出伝染病に指定されており、と畜場に出荷された牛が牛白血病と診断された場合、と畜場法および食品衛生法に基づき、と畜体は全廃棄となる。農林水産省の家畜衛生統計(72)によれば、牛白血病の摘発頭数は1998年には全国で99頭であったが、毎年この数は増え続け、2008年には1,000頭、2012年には2,000頭を超える数を記録し、法定伝染病と届出伝染病を合わせた牛の監視伝染病の中では、近年最多の発生頭数となっている。さらに、近年の調査では、我が国で発生のみられる牛白血病のほとんどはEBLであることが示唆されている(91)。

EBLは国際獣疫事務局(OIE)によってリスト疾病に指定されている(76)。日本のように発生数の把握はなされていないものの、米国の乳用牛では地域によっても異なるが44～68%(12, 96)が、肉用牛では全国的には約10%(12, 97)が、カナダアルバータ州(89)では27%の乳用牛がBLVに感染していると推定されている。一方、欧州ではデンマーク、フィンランド、オランダ、英国、リトアニア等、EBLを清浄化した国もある(2, 14, 74, 75, 76)。また、ニュージーランドにおいては、1997年から酪農生産者団体主導でEBL対策が行われており、2006年から2011年には毎年国内牛群の約半数が抗体検査を受けてきた。その結果、2008年以降は1群もBLV感染群が見つかっていない(65)。豪州では、1990年代中ごろから民間の自発的なプログラムとして始まったEBL対策は、2008年に官民共同で進める国家プ

ログラムとなり、集中的なサーベイランスの結果、清浄化を達成しつつある(23)。

EBLの原因となるBLVは、レトロウイルス科デルタレトロウイルス属に属し、ウイルス粒子は80~100nmの球形で、中心に40~90nmのコアを持ち、エンベロープを有している。BLVのゲノムは一本鎖RNAであるが、本ウイルスはこのゲノムをDNAに変換する逆転写酵素を持ち、感染細胞の染色体に二本鎖DNA(プロウイルス)として組み込まれ、感染細胞の分裂と共に増殖する(46)。本ウイルスはMillerら(64)により、白血病を発症した牛、および後述する持続性リンパ球増多症を呈した牛の末梢血リンパ球から、1969年に初めて分離された。現在、レトロウイルスはデルタレトロウイルス属を含めて5属に分けられており、デルタレトロウイルス属にはヒトT細胞白血病ウイルスなどが含まれる(49)。

牛へのBLV感染は終生持続するが(11, 49)、いくつかの転帰をとることが知られている。感染牛の約70%は、体内でリンパ球数が増えることも、臨床的に発症することもなくその生涯を終える(11, 49)。ただし、発症しない場合であってもBLVのキャリア、すなわち感染源としてのリスクを持ち続ける。一方、感染牛の30%程度にはポリクローナルなBリンパ球数の増加による持続性リンパ球増多症(persistent lymphocytosis: PL)が認められる(11, 24, 25)。PL牛ではBリンパ球とTリンパ球の比(B/T比)が逆転するものの、臨床症状は示さない。

BLV感染牛の最終転帰は致死性のリンパ腫、あるいはリンパ肉腫の発症である。この段階にいたるのは主として4~5歳以上の感染牛で、感染牛全体の5%以下と考えられている(11, 26)。発症牛のおよそ2/3は末梢血リンパ球が増加する白血性のリンパ腫を呈する(10, 11)。発症時のBリンパ球の増殖はモノクローナルないしオリゴクローナルであり、各種臓器・組織

にリンパ腫が形成され、その結果、病変が形成された臓器は機能不全を起こし、感染牛を死に至らしめる(10, 11, 39, 46-48)。この段階での臨床所見は、食欲不振あるいは廃絶による消瘦や元気消失といった一般的な臨床症状の他、EBLに特徴的なものとしては、体表リンパ節の腫脹、直腸検査時に触診可能な子宮をはじめとする臓器の腫大・硬結、眼球の突出などがある(11, 25)。なお、EBLを発症した個体を含め、BLV感染牛に対する治療の試みは、免疫学的な抵抗性(3)や、エピジェネティクスの応用可能性(4)を示唆した報告などがあるものの、未だ確立されたものはない。同様に、感染あるいは発症を防御するワクチン等の開発も試みられている(7, 13, 28, 45, 76)が、実用化にはいたっていない。

EBL発症以前のBLV感染牛による生産性への影響については、諸外国でこれまで多くの研究がなされてきた。Emanuelssonら(20)やOttら(79)は、BLV抗体陰性牛に比べて抗体陽性牛の産乳量は2~3%低いことを報告した。また、Erskineら(22)は、農場内のBLV有病率が高い群ほど産乳量は低いと報告している。さらに、VanLeeuwenら(100)は、抗体陽性牛は抗体陰性牛よりも受胎率が7%低いと報告し、Brennerら(8)は、抗体陽性牛は抗体陰性牛よりも淘汰率が高く、乳房炎や下痢症にかかりやすいと報告している。一方、BLVに感染しているだけでは、生産性には影響しないとした報告もある。Sorgeら(90)やTiwariら(94)の調査によれば、BLV感染牛と非感染牛の間に産乳量および乳質の差は認められなかった。Huberら(36)もBLV感染の有無と生産性や繁殖成績、さらに臨床型乳房炎の発生リスクとの間には関連がないと報告をしている。

このように、BLV非感染牛と感染未発症牛の生産性の差や、感染未発症牛の他の疾病への感受性については議論が分かれているものの、EBL発症牛の治療法がないこと、また、発症牛のと畜場における全廃棄は農場経営

に大きな経済的損失を与えることから、少なくとも日本においては適切な EBL 対策が必要と考えられる。前記のとおり国内の牛白血病の発症・摘発頭数が継続的に増加していること、BLV 感染牛のうち EBL を発症するのはごく一部であるといった現状に鑑みると、現在日本国内には相当数の BLV 感染牛が存在することが推察できる。したがって、BLV 感染牛を減らす対策を確立することが、EBL 対策の根幹になると考えられる。そのためには、現在国内において BLV がどの程度浸潤しているのかを把握することが必須である。しかしながら、1980 年代初頭に全国調査(37)がなされて以来、現在まで BLV の国内浸潤状況は明らかにされていない。

家畜衛生における感染症対策の基本は、発生の早期摘発と感染個体の淘汰、および非感染個体への更新である。これに加えて、BLV は日本国内に常在化していることから、浸潤をこれ以上進行させないための対策、すなわち BLV 伝播を阻止するための対策も重要となる。ここで、疾病等の健康上の問題に対してその発生確率を高める要因、すなわちリスク要因(63)を特定し、それを排除することによって疾病等の発生を予防し、健康増進に寄与することは、疫学の目標そのものであり(80)、BLV 対策においてもこの考え方は適用できる。

BLV の伝播は、感染牛に保有される感染リンパ球が非感染牛に伝達されることによって成立する。例えば、注射針や直腸検査手袋などの複数回使用は、BLV の医原性の伝播経路として知られている(33-35)。また、吸血昆虫、特にアブは、BLV の機械的ベクターとして知られている(5, 58, 77)。このような水平感染に加え、BLV は垂直感染することも知られており、子宮内感染および分娩中の産道感染が報告されている(99)。また、BLV 感染牛の初乳や常乳には BLV が含まれており、それらを介して伝播することも知られている(27, 35)。しかしながら、BLV 伝播経路をすべてリスク要因ととら

え、これらすべてに対して同等に注力しながら対策を実施することは容易ではない。むしろBLVの浸潤状況を把握した上で、多くのBLVの伝播経路の中から、現在の日本においてより伝播に寄与するものを特定し、それらについて優先的に対策を検討していく方が、対策全体の効果の面からも、さらに、対策に投じることができる資源の有限性に鑑みても重要と考えられる。

一方、野外での疾病対策を検証する際、一般的に評価対象とする要因以外の条件がすべての農場で揃うことは稀であり、これらを考慮する必要がある。すなわち、疾病の発生とは直接関係ない要因が、分析対象である興味のある要因、および疾病発生の有無と強い統計学的関連を持つ場合、興味のある要因の効果は正しく推定できないことがある。このように、健康上望ましくないアウトカム、例えばある要因のBLV伝播確率への影響が、それ以外の要因によって歪められることを交絡と呼ぶ(83)。また、疾病発生に関して興味のある要因が複数ある場合、個々の要因が疾病発生に与える効果は、要因間で調整した値を用いて解釈する必要もある。したがって、異なる農場を対象にリスク要因の検証を行うには、興味の有無に関わらず複数の要因と疾病発生との関連を調整できるような分析方法を採用する必要がある。この、統計解析上変量や変数と呼ばれる要因を複数考慮して分析することは、多変量解析と総称される(84)。

多変量解析を用いたリスク要因の解析は、家畜衛生における疫学研究でしばしば用いられてきた手法である。Kobayashiら(51)は日本国内におけるヨーネ病発生農場の疫学情報を分析し、発生農場に対して実施されるモニタリング中に継続的に摘発が起こる農場の特徴は、初摘発個体が臨床症状を示している、初摘発時に2頭以上摘発される、および牛舎形態がつなぎ飼いでないことを明らかにした。また、Nishiguchiら(71)は2005年茨城県

下における低病原性（当時の定義では高病原性の弱毒タイプ）鳥インフルエンザの発生に際し、H5N2 ウイルスの農場侵入に関するリスク要因を、廃鶏の導入、農場機材の他農場との共用、農場来訪者に対する消毒の不徹底、および最も近い養鶏場までの距離の短さであったと特定した。これらの先行研究では、多変量解析の一つである二値ロジスティック回帰分析が用いられた。さらに、2010年の宮崎県下で発生した口蹄疫の際には、Hayamaら(31)が口蹄疫ウイルスの近隣伝播を起こしやすかった農場の特徴を、混合二値ロジスティック回帰モデルを用いて分析し、豚の感染農場は牛の感染農場よりも近隣伝播を起こしやすく、さらに牛農場では飼養規模が大きいほど近隣伝播をさせやすかったことを明らかにした。また、Murogaら(68)は口蹄疫の農場間伝播に関するリスク要因を二値ロジスティック回帰分析によって評価し、移動制限下の牛農場では、農場機材の他農場との共用が、搬出制限下においては飼料運搬車や家畜関連会社の関係者の訪問がリスク要因であったとしている。このように多変量解析は活用例の多い手法ではあるものの、BLVに関する対策の検討という観点からの本手法を用いたリスク要因の評価事例は、国際的にみても非常に少ない(21)。

そこで本研究では、近年の日本国内におけるBLV浸潤状況を把握し、その伝播に関わる要因を明らかにし、効率的なBLV対策を提言するため、以下の研究を行った。第一章では、乳用牛と肉用牛について、全国血清疫学調査を実施し、抗体陽性率を指標として国内のBLV浸潤状況を推定し、その疫学的特徴を明らかにした。第二章では、農場レベルの対策検討に資するため、国内7県由来のBLV感染酪農場の疫学調査データを用いて、農場内伝播に関連するリスク要因を明らかにした。第三章ではリスク要因の評価対象地域を全国に、さらに対象農場を酪農場および肉用繁殖農場に拡張し、農場内伝播に関連するリスク要因に加え、農場間伝播に関連するリス

ク要因を明らかにした。また，第二章および第三章では，データの特徴を踏まえて異なる統計解析手法を適用し，それらの意義ならびに有用性も評価した。

第一章

日本における牛白血病ウイルスの浸潤状況を
把握するための全国抗体調査

序論

感染症においては、その疫学的特徴を考慮して対策を実施することが重要である。口蹄疫や高病原性鳥インフルエンザ等、通常は国内に存在せず、伝播力が強い疾病の場合、発生を早期摘発し、できるだけ早く終息させることが優先される。したがって、このような感染症の発生に際し、原因病原体の浸潤状況を把握することの妥当性は低い。仮に浸潤状況を推定するにしても、有病期間や発生期間が短い疾病の場合は、調査時期によって疾病の発生を見逃す可能性が高いことから、意味のある浸潤状況の推定は困難である(42)。一方、日本における BLV のように、常在化しており、かつ感染が終生持続するような病原体については、浸潤状況をできるだけ正確に把握し、対策の検討に役立てることが重要である。このことにより、国レベルで対策を実施すべきか否か、仮にそうする場合は、対策の方向性やそれに必要な期間や費用等について検討することなどが可能となる。また、現在の浸潤状況の情報は、対策実施後の効果を評価する際にも、基準となるため把握しておくことが必須である。

ここで、病原体の浸潤状況把握のため、一時点における罹患個体の観察対象集団内に占める割合を指標として、疾病の頻度を調査する手法を横断研究と呼ぶ(82)。本手法は、一時点での疾病浸潤状況を把握するための唯一の手法である。その他の疫学的研究手法、例えば、症例対照研究は実施者自らが症例群と対照群の数を恣意的に設定するため、あるいはコホート研究では、興味のある要因を持っている群(曝露群)と持っていない群(非曝露群)を一定期間観察することによりイベントの発生の頻度を比較するため、集団における一時点の有病割合は算出できない(42)。

過去、日本における BLV の浸潤状況を把握するための横断研究として、

1980年と1982年に乳用牛と肉用牛の全国抗体調査が実施されている。その結果、乳用牛の抗体陽性率は4～6%程度、同じく肉用牛では6～10%程度と推定された(37)。ただし、家畜伝染病予防法の改正により牛白血病の報告義務が生じた1998年の99頭から、2008年の1,045頭、さらに2012年には2,090頭へと摘発頭数が急増していることに鑑みると、現在の日本のBLV浸潤状況が1980年代当時のまま推移しているとは考えにくい。そこでMurakamiら(67)は、2007年に国内7県を対象としたBLVの抗体調査を実施した。その結果、搾乳牛(n=3,966)、肉用牛繁殖牛(n=1,454)および肥育牛(n=657)の抗体陽性率はそれぞれ35、12および8%と推定され、上記の調査結果(37)と比較すると、日本国内のBLV浸潤が進行していることが伺われた。しかしながら、このMurakamiらの報告(67)では、日本国内の広い地域を対象としたと言及しているものの、7県のみが対象であり、全国的な状況を反映していない可能性がある。全国レベルのBLV対策の検討を行うためには、全国を対象にした浸潤状況の評価を実施する必要がある。

そこで本章では、近年の全国レベルでのBLVの浸潤状況を把握することを目的として、抗体検査を用いた横断研究を実施し、乳用牛および肉用牛の抗体陽性率を推定するとともに、その疫学的特徴を分析した。

材料および方法

1. 調査手順

本調査は、農林水産省が実施主体であるレギュラトリーサイエンス新技術開発事業「緊急対応が必要なウイルス性疾病の診断・防除技術の高度化および監視体制の確立」の一部として、平成21年11月26日発出の農林水

産省消費・安全局動物衛生課から 47 都道府県の畜産部局（家畜保健衛生所）への事務連絡による協力依頼に基づき実施された。対象集団は全国の搾乳に供されている乳用牛，および繁殖に供されている肉用牛，また，それらの候補牛（ただし 6 ヶ月齢以上）とした。以下，これらはそれぞれ搾乳牛および肉用繁殖牛と呼ぶ。なお，搾乳牛の調査は 2009 年度，肉用繁殖牛の調査は 2010 年度にそれぞれ実施した。

対象個体の抽出に先立ち，まず各都道府県の家畜保健衛生所において，協力可能な酪農場と肉用繁殖農場を 4 戸ずつ選定した。ただし，都道府県内で牛の分布に偏りがある場合は，都道府県の裁量によって家畜保健衛生所間で戸数を増減させてもよいとした。これらの協力が得られた農場から，牛 20 頭をそれぞれ無作為抽出して検査対象とした。ただし，飼養頭数が 20 頭未満の農場については全頭抽出した。

抽出された牛については，各家畜保健衛生所の担当者が採材年月日・耳標番号・品種・生年月日・月齢・産歴等についての疫学情報を収集するとともに，後述の BLV の抗体検査キットを用いて，各県内で検査を実施した。

その結果，すべての都道府県から協力が得られ，搾乳牛については 149 家畜保健衛生所から 587 農場由来の 11,113 頭が対象となった。このうち，97.8%にあたる 10,865 頭がホルスタイン種であった。肉用繁殖農場については 147 家畜保健衛生所から 558 農場由来の 9,722 頭が対象となった。このうち 97.9%にあたる 9,519 頭が黒毛和種であった。国内地域別の協力戸数と検査頭数の内訳を表 1-1 に示した。

2. 採材および実験室内検査

常法にしたがい頸静脈あるいは尾静脈から採血し，血清を分離した後，抗体検査実施まで -20°C で冷凍保存した。抗体検査は BLV のエンベロープ

糖蛋白 gp51 に対する抗体を検出する間接 ELISA 法（「牛白血病エライザキット」, JNC 社, 東京, 日本）を用いた。本キットの使用指示書にしたがい、指示陽性血清の吸光度に対する被検血清の吸光度の比（*S/P*値）が 0.3 以上を抗体陽性、0.3 未満を抗体陰性と判定した。なお、本キットの検査対象は 6 ヶ月齢以上の牛とされている。

以上のデータは、前述の協力依頼により得られた検査結果を収集して解析されているため、動物衛生研究所動物実験委員会の承認は必要ないと判断された。

3. 統計学的解析

各都道府県から送付された、前記の個体ごとの疫学情報と検査結果は、表計算ソフトウェア（Microsoft Excel 2003）によってデータベース化し、以下の分析に供した。

まず、抗体陽性率を以下のように定義した。

$$\text{抗体陽性率 (\%)} = 100 \times \frac{\text{抗体検査陽性頭数}}{\text{抗体検査実施頭数}}$$

検査対象個体全体の抗体陽性率を算出するとともに、各個体の疫学情報から、用途別（搾乳牛と肉用繁殖牛）、地域別、ならびに年齢ごとに抗体陽性率を算出した。また、抗体陽性牛が 1 頭以上摘発された農場を感染農場と定義した上で、農場レベルの有病率（農場有病率）を以下のように定義し、全体および用途別に算出した。

$$\text{農場有病率 (\%)} = 100 \times \frac{\text{感染農場戸数}}{\text{抗体調査参加農場戸数}}$$

用途別抗体陽性率および農場有病率、また、年齢別抗体陽性率について、統計学的に評価するため、カイ二乗検定を実施した。地域別の抗体陽性率

は算出された結果を定性的に評価した。統計学的解析にはソフトウェア「R」のバージョン 2.6.1 (86)を用いた。

結果

1. 牛白血病ウイルスの浸潤状況

抗体検査を実施した計 20,835 頭のうち、7,339 頭が陽性反応を示し、抗体陽性率とその 95%信頼区間は 35.2% (34.9, 35.6) であった。牛の用途別の抗体陽性頭数は搾乳牛で 4,546 頭、肉用繁殖牛で 2,793 頭であり、抗体陽性率とその 95%信頼区間はそれぞれ 40.9% (40.0, 41.8) および 28.7% (27.8, 29.6) であった。カイ二乗検定の結果、搾乳牛は肉用繁殖牛に比較して抗体陽性率が有意 ($P<0.01$) に高かった (表 1-2)。

調査対象となった全農場 1,145 戸のうち、824 戸が感染農場と判定され、農場有病率とその 95%信頼区間は 72.0% (69.4, 74.6) であった。酪農場および肉用繁殖農場の感染農場はそれぞれ 452 戸および 372 戸であり、農場有病率とその 95%信頼区間はそれぞれ 77.0% (73.6, 80.4) および 66.7% (62.8, 70.6) であった。カイ二乗検定の結果、酪農場は肉用繁殖農場に比較して農場有病率が有意 ($P<0.01$) に高かった (表 1-3)。

2. 地域別抗体陽性率

地域別の抗体陽性結果を、搾乳牛については表 1-4 に、肉用繁殖牛については表 1-5 に示した。また、これらを図 1-1 に取りまとめた。全国的にみると、北日本から南日本へ南下するほど抗体陽性率は高い傾向を示し、特に牛の用途に関わらず九州／沖縄が最も高かった (搾乳牛および肉用繁

殖牛でそれぞれ 64.6%および 42.4%)。ただし、搾乳牛では関東、肉用繁殖牛では東北も高く（それぞれ 41.9%，39.9%），四国については，搾乳牛，肉用繁殖牛ともに低かった（それぞれ 22.0%，10.8%）。

3. 年齢別抗体陽性率

年齢別の抗体検査結果を，搾乳牛については表 1-6，肉用繁殖牛については表 1-7 に示した。搾乳牛は 21.2%および肉用繁殖牛は 13.7%が 0 歳時点で感染していた。その後，搾乳牛は 4 歳まで加齢にともなって高くなり，4 歳以降は 45%程度で一定であった。肉用繁殖牛は 3 歳まで加齢にともなって高くなり，3 歳以降は 30%程度で一定であった（図 1-2）。また，各個体の年齢を育成・初妊までを想定した若齢牛の 2 歳未満と，成牛を想定した 2 歳以上で区分したところ，搾乳牛の 2 歳未満の抗体陽性率は 24.1%，2 歳以上で 42.2%であった（表 1-8）。同様に肉用繁殖牛ではそれぞれ 15.2%，および 30.6%であった（表 1-9）。カイ二乗検定の結果，ともに 2 歳以上の牛の抗体陽性率が有意（ともに $P<0.01$ ）に高かった。これらを図 1-3 にまとめた。

考察

本章では，約 25 年ぶりに BLV の全国浸潤状況を調査した。抗体検査の結果，搾乳牛の約 40%，肉用繁殖牛の約 30%が BLV に感染していると推定された。

Ito ら(37)による調査では，47 都道府県から約 3,600 戸（1980 年）および約 2,900 戸（1982 年）の酪農場から，12 ヶ月齢以上の個体が約 14,000 頭

(1980年) および約 10,000 頭 (1982年) が検査に供された。同様に、肉用牛農場では約 1,900 戸 (1980年) および約 1,500 戸 (1982年) から約 5,000 頭 (1980年) および約 3,600 頭 (1982年) が検査された。したがって、1 戸あたりの検査頭数は、本調査に比べて明らかに少ない。検査法については、寒天ゲル内沈降反応が用いられている。その結果、抗体陽性率は乳用牛で 5.8% (1980年) および 4.2% (1982年)、肉用牛では 11.3% (1980年) および 6.0% (1982年) と推定された。検査戸数や 1 戸あたりの検査頭数、また、検査法が異なっているため、本章で得られた結果と詳細に比較することはできないが、少なくとも BLV はこの四半世紀の間に国内で広くまん延したと考えられた。さらに、農場有病率は酪農場で 80%弱、肉用繁殖農場で 70%弱と推定されたことから、現在の日本において BLV が多くの農場に侵入していることが示された。

個体レベルの抗体陽性率では、肉用繁殖牛よりも搾乳牛が、また、農場有病率では肉用繁殖農場よりも酪農場の方が高かったという結果は、BLV が高度に浸潤している米国の調査結果(12, 96-97)とも一致した。これらの報告によれば、搾乳牛および肉用牛(繁殖・肥育の別は明記されていない)の有病率は 43.5% および 10.3%、また、酪農場および肉牛農場の農場有病率は 89% および 38.7% と推定されている。この日米両国に共通して認められた差については、搾乳という毎日の集合作業がある酪農場と、それが無い肉牛の農場という牛同士の接触あるいは接近頻度が違うこと、それにもなう基本的な飼養管理方法が異なっていることが影響していると考えられ、BLV 伝播に関するリスク要因の分析については、牛の用途別に検討する必要があることが示唆された。

地域別にみると、全国的には北海道で抗体陽性率が低く、南日本へ南下していくにしたがって高いという傾向が認められ、特に九州／沖縄の抗体

陽性率が高く、搾乳牛では 60%以上、肉用繁殖牛では 40%以上となっていた。この理由の一つとして、BLV の機械的ベクターである吸血昆虫、特にアブ(5, 58, 77)の影響が考えられた。一般的にアブの成虫の活性や幼虫の成長は気温の影響が大きく、気温が高いほど活発に活動し、早く成長する。そのため、気温が高い地域ではアブはより早く出現し、その活動期間も長くなる(50)。このことは、日本国内で比較的温暖な地域である九州／沖縄での抗体陽性率が高かった理由の一つと推察された。

ただし、南日本に近づくほど抗体陽性率が高いという傾向には、関東の搾乳牛、東北の肉用繁殖牛が高い、あるいは四国においては搾乳牛、肉用繁殖牛ともに低いという例外も認められた。この理由については、現在の地域別の牛の飼養規模、近年の全国レベルでの 1 戸あたりの飼養頭数の増大傾向、そして牛の移動が関連している可能性が考えられた。

農林水産省による畜産統計(73)によれば、2009 年の関東においては搾乳牛が約 4,200 戸に 195,000 頭飼養されており、これは国内農業地域別にみると北海道の約 7,900 戸、約 823,000 頭に次ぐ第 2 位である。一般的に、1 戸あたりの搾乳牛頭数を増やして生産量を高めたいが、牛舎の拡張が経営的に容易ではない農場においては、育成牛を預託に出し、より多くの搾乳牛のためのスペースを確保することが必要になる。預託牛は不特定農場由来の牛と一定期間同居することから、BLV に曝露されやすいと推察され、預託終了後、感染個体は農場内の感染源となってしまう。自家育成ができない農場は本州の他の地域でも多く存在するはずであるが、関東では飼養規模が相対的に大きいことと、その結果として預託頭数も多くなることが推察される。その結果として、関東における搾乳牛の抗体陽性率の例外的な高さにつながっていると考えられた。

同様に、本調査の肉用繁殖牛に該当する子取り用めす牛の 2010 年の東

北での飼養規模は、九州／沖縄の約 35,000 戸，約 380,000 頭に次ぐ第 2 位の約 21,000 戸，約 118,000 頭であり，酪農場同様，1 戸あたりの飼養頭数は全国的に増加している(73)。南九州各県は伝統的に国内各地域への繁殖候補牛の供給元となっている地域であり，牛肉生産が盛んな東北へも相当数の牛が移動していると考えられる。今回の調査で明らかになったように，南九州を含む九州／沖縄は最も抗体陽性率が高い地域であることと合わせて考えると，これらによって東北での例外的な抗体陽性率の高さにつながったと推察された。

一方，四国は最も牛の飼養規模が小さい地域であり，搾乳牛は約 630 戸に約 26,000 頭が，肉用繁殖牛については 1,100 戸に 6,500 頭が飼養されている。したがって，他地域に比べると，地域外からの感染牛を含む牛の移入が相対的に少ない可能性があり，結果として抗体陽性率の低さにつながっていると推察された。

なお，これらの仮説は，独立行政法人家畜改良センターが運営している「牛の個体識別情報検索サービス」(44)に含まれる牛の移動データを分析して国内の牛の移動の実態を把握し，本調査の結果と比較することによってより正確に検証できると思われた。いずれにしても，抗体陽性率に地域間で違いが認められていることから，日本全体のリスク要因の解析にあたっては，これを考慮した分析を検討する必要がある。

年齢別にみると，0 歳齢での抗体陽性率は，搾乳牛では 20%以上，肉用繁殖牛では 15%弱であった。Thurmond ら(93)は，BLV 感染母牛の子宮内または産道を介しての子牛への感染は 6%程度と報告しているが，これを今回の調査結果に外挿して差し引いたとしても，若齢期に多くの BLV 伝播が起きていることが推察され，この時期の水平感染対策が重要と考えられた。その後，搾乳牛では 4 歳まで，肉用繁殖牛では 3 歳までは高齢牛ほど抗体

陽性率が高く、成牛は若齢牛よりも有意に抗体陽性率が高かった。このように、BLVへの曝露期間が相対的に長い高齢牛の抗体陽性率が高かったことは、BLVの水平伝播はいずれの年齢層でも起こりうることを示しており、効率的な対策を検討するために、BLV伝播のリスク要因を明らかにする必要性が示された。

一方、搾乳牛の5歳以上は4歳と比べて、また、肉用繁殖牛の4歳以上は3歳と比べて、抗体陽性率が段階的に高くなると想定されたが、今回の調査結果からはそのような傾向は認められなかった。ここで、BLV感染乳牛はその理由に関わらず非感染牛よりも早く淘汰されるという先行研究(8)がある。BLV伝播がどの年齢においても起こるとすると、感染牛頭数自体は増えていくことから、ある年代から抗体陽性率が一定となるためには、感染牛は非感染牛よりもより高い確率で淘汰されなければならない。したがって、今回得られた観察結果は、上記の先行研究結果を支持するものと思われた。実際、日本の搾乳牛の平均除籍産次は3.5産程度、除籍年齢は5.8歳と推定されていることから(1)、6歳前後での淘汰圧が最も大きいと考えられる。このことは、この年代から抗体陽性率が一定になることに関連している可能性がある。一方、肉用繁殖牛の生存性とBLV感染の関連性についての先行研究は見当たらない。ただし、日本の黒毛和種については、5産までに52%が、8産までに83.0%が淘汰され、平均最終産年齢が8.2歳と推定されている(78)。したがって、肉用繁殖牛については、搾乳牛と全く同等の解釈はできないが、今後飼養管理方法等のその他の要因も検討していくことによって、BLVのまん延の理由がさらに明らかになると期待された。

小括

BLV の全国血清抗体調査の結果、搾乳牛および肉用繁殖牛の抗体陽性率は、それぞれ 40.9% (4,546/11,113) および 28.7% (2,793/9,722)、また、農場有病率は、酪農場で 77.0% (452/587)、肉用繁殖農場で 66.6% (372/558) となり、1980 年代と比較すると、BLV は広く国内にまん延したと考えられた。

抗体陽性率には地域差が認められ、牛の用途に関わらず、九州／沖縄が最も高く、北日本ほど低い傾向が認められた。そのため、全国レベルでのリスク要因の検討の際には、地域差を考慮する必要があると考えられた。年齢別の抗体陽性率は、高齢牛ほど高かった。したがって、BLV への曝露は農場での飼養期間が長いほど頻繁に起きることが示唆され、農場レベルの水平感染対策に資するリスク要因を明らかにする必要性が示された。

図表

表 1-1 BLV 全国抗体調査における分析対象集団の地域別内訳

地域	酪農場		肉用繁殖農場		合計	
	検査農場	検査個体	検査農場	検査個体	検査農場	検査個体
	(戸)	(頭)	(戸)	(頭)		
北海道	30	592	36	676	66	1,268
		(592)		(676)		
東北	72	1,284	78	1,329	150	2,613
		(1,192)		(1,306)		
関東	88	1,658	82	1,376	170	3,034
		(1,641)		(1,376)		
北陸／	122	2,333	120	2,023	242	4,356
中部		(2,322)		(1,973)		
近畿	52	980	30	499	82	1,479
		(955)		(499)		
中国	72	1,383	63	1,073	135	2,456
		(1,383)		(1,073)		
四国	36	654	36	623	72	1,277
		(595)		(546)		
九州／	115	2,229	113	2,123	228	4,352
沖縄		(2,185)		(2,070)		
合計	587	11,113	558	9,722	1,145	20,835
		(10,865)		(9,519)		

検査個体のカッコ内は、搾乳牛ではホルスタイン種、肉用繁殖牛では黒毛和種の内数を示す

表 1-2 搾乳牛および肉用繁殖牛における BLV 抗体検査結果と抗体陽性率

	ELISA 陽性 (頭)	ELISA 陰性 (頭)	合計 (頭)	抗体陽性率 (%) (その 95%信頼区間)
搾乳牛	4,546	6,567	11,113	40.9 (40.0, 41.8)
肉用繁殖牛	2,793	6,929	9,722	28.7 (27.8, 29.6)
合計	7,339	13,496	20,835	35.2 (34.6, 35.9)

カイ二乗値 = 336.5, 自由度 = 1, $P < 2.2e - 16$

表 1-3 酪農場および肉用繁殖農場における BLV 感染判定結果と農場有病率

	感染農場 (戸)	非感染農場 (戸)	合計 (戸)	農場有病率 (%) (その 95%信頼区間)
酪農場	452	135	587	77.0 (73.6, 80.4)
肉用繁殖農場	372	186	558	66.7 (62.8, 70.6)
合計	824	321	1,145	72.0 (69.4, 74.6)

カイ二乗値 = 14.8, 自由度 = 1, P = 0.0001

表 1-4 国内地域別の BLV 抗体検査結果と抗体陽性率（搾乳牛）

	ELISA 陽性 (頭)	ELISA 陰性 (頭)	合計 (頭)	抗体陽性率 (%) (その 95%信頼区間)
北海道	68	524	592	11.5 (8.9, 14.1)
東北	306	978	1,284	23.8 (21.5, 26.1)
関東	695	963	1,658	41.9 (39.5, 44.3)
北陸／中部	745	1,588	2,333	31.9 (30.0, 33.8)
近畿	365	615	980	37.2 (34.2, 40.3)
中国	782	601	1,383	56.5 (53.9, 59.2)
四国	144	510	654	22.0 (19.8, 24.3)
九州／沖縄	1,441	788	2,229	64.6 (62.7, 66.6)
合計	4,546	6,567	11,113	40.9 (40.0, 41.8)

表 1-5 国内地域別の BLV 抗体検査結果と抗体陽性率（肉用繁殖牛）

	ELISA 陽性 (頭)	ELISA 陰性 (頭)	合計 (頭)	抗体陽性率 (%) (その 95%信頼区間)
北海道	114	562	676	16.8 (14.0, 19.7)
東北	530	799	1,329	39.9 (37.5, 42.5)
関東	326	1,050	1,376	23.7 (21.5, 25.9)
北陸／中部	454	1,569	2,023	22.4 (20.6, 24.3)
近畿	103	396	499	20.6 (18.8, 22.5)
中国	298	775	1,073	27.7 (25.1, 30.5)
四国	67	556	623	10.8 (8.9, 12.7)
九州／沖縄	901	1,222	2,123	42.4 (40.3, 44.5)
合計	2,793	6,929	9,722	28.7 (27.8, 29.6)

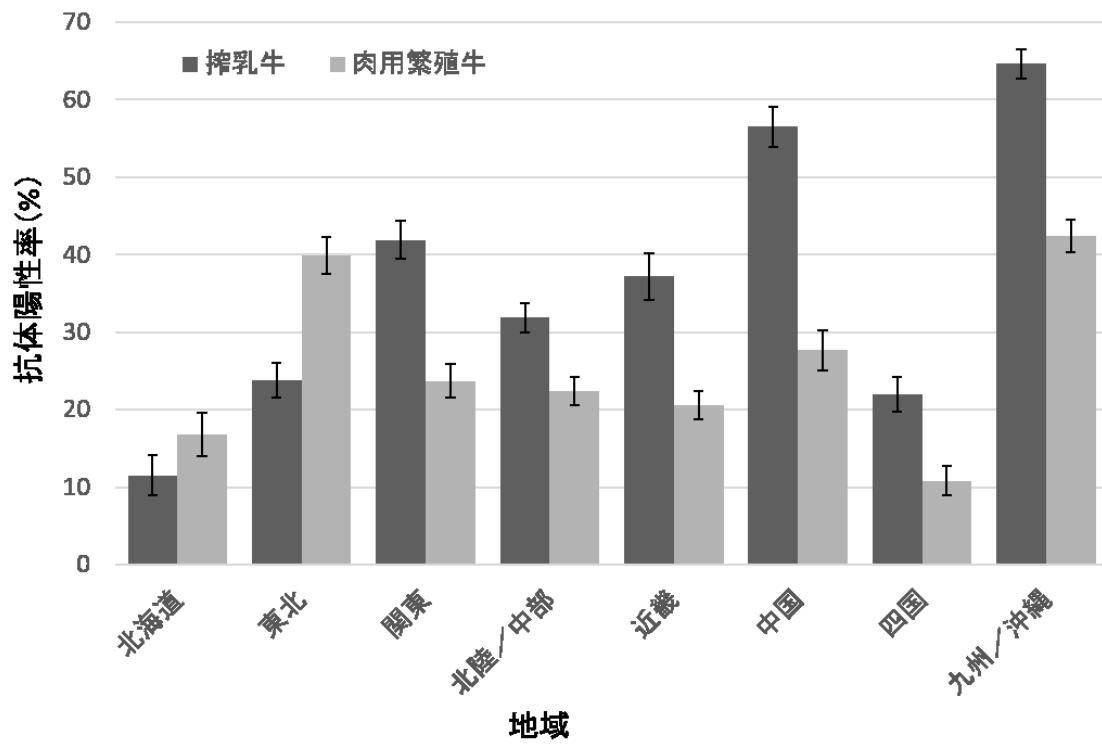


図 1-1 国内地域別の BLV 抗体陽性率 (エラーバーは 95%信頼区間を示す)

表 1-6 年齢別の BLV 抗体検査結果と抗体陽性率（搾乳牛）

	ELISA 陽性 (頭)	ELISA 陰性 (頭)	合計 (頭)	抗体陽性率 (%) (その 95%信頼区間)
0 歳	28	104	132	21.2 (14.2, 28.2)
1 歳	165	504	669	24.7 (21.4, 27.9)
2 歳	685	1,419	2,104	32.6 (30.6, 34.6)
3 歳	994	1,397	2,391	41.6 (40.0, 43.5)
4 歳	853	1,021	1,874	45.5 (43.3, 47.8)
5 歳	661	782	1,443	45.8 (43.2, 48.4)
6 歳以上	1,160	1,340	2,500	46.4 (44.4, 48.4)
合計	4,546	6,567	11,113	40.9 (39.9, 41.8)

表 1-7 年齢別の BLV 抗体検査結果と抗体陽性率（肉用繁殖牛）

	ELISA 陽性 (頭)	ELISA 陰性 (頭)	合計 (頭)	抗体陽性率 (%) (その 95%信頼区間)
0 歳	31	195	226	13.7 (9.2, 18.2)
1 歳	149	808	957	15.6 (13.3, 17.9)
2 歳	291	935	1,226	23.7 (21.4, 26.1)
3 歳	392	844	1,236	31.7 (29.1, 34.3)
4 歳	342	710	1,052	32.5 (29.7, 35.3)
5 歳	302	656	958	31.5 (28.6, 34.5)
6 歳以上	1,286	2,781	4,067	31.6 (30.2, 33.0)
合計	2,793	6,929	9,722	28.7 (27.8, 29.6)

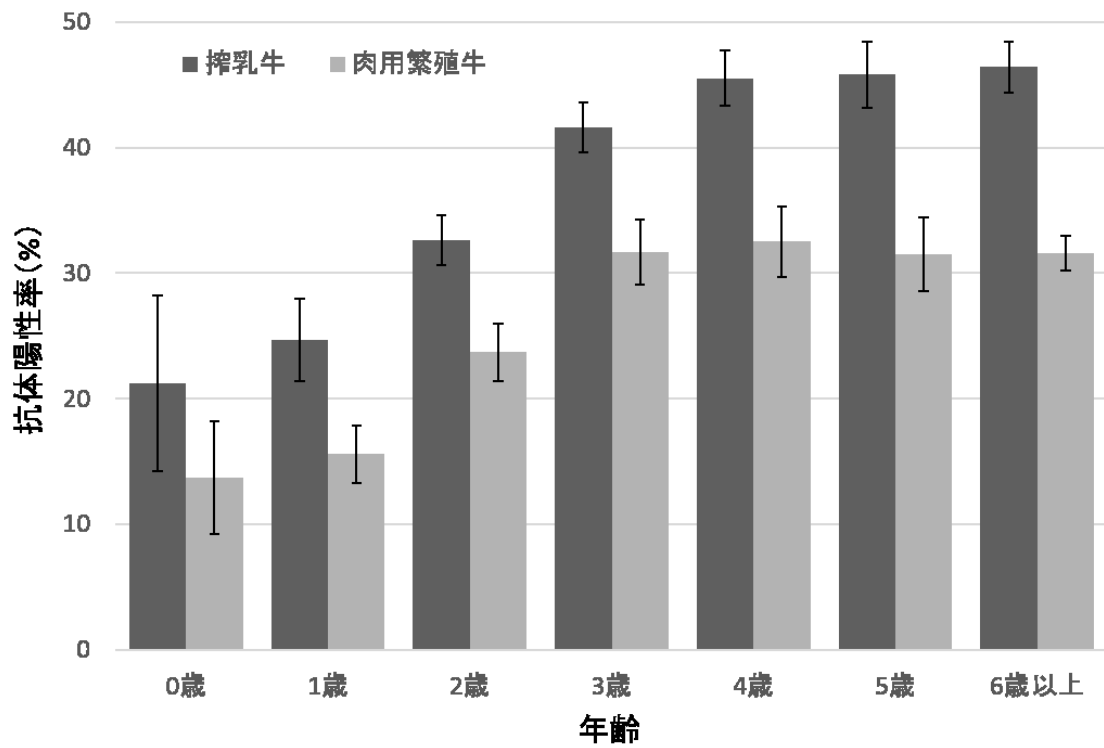


図 1-2 年齢別の BLV 抗体陽性率 (エラーバーは 95%信頼区間を示す)

表 1-8 年齢別の BLV 抗体検査結果と抗体陽性率：

2 歳未満と 2 歳以上の比較（搾乳牛）

	ELISA 陽性 (頭)	ELISA 陰性 (頭)	合計 (頭)	抗体陽性率 (%) (その 95%信頼区間)
2 歳未満	193	608	801	24.1 (21.1, 27.1)
2 歳以上	4,353	5,959	10,312	42.2 (41.3, 43.2)
合計	4,546	6,567	11,113	40.9 (40.0, 41.8)

カイ二乗値=100.2, 自由度=1, $P<2.2e-16$

表 1-9 年齢別の BLV 抗体検査結果と抗体陽性率：

2 歳未満と 2 歳以上の比較（肉用繁殖牛）

	ELISA 陽性 (頭)	ELISA 陰性 (頭)	合計 (頭)	抗体陽性率 (%) (その 95%信頼区間)
2 歳未満	180	1,003	1,183	15.2 (13.2, 17.3)
2 歳以上	2,613	5,926	8,539	30.6 (29.6, 31.6)
合計	2,793	6,929	9,722	28.7 (27.8, 29.6)

カイ二乗値=119.4, 自由度=1, $P < 2.2e-16$

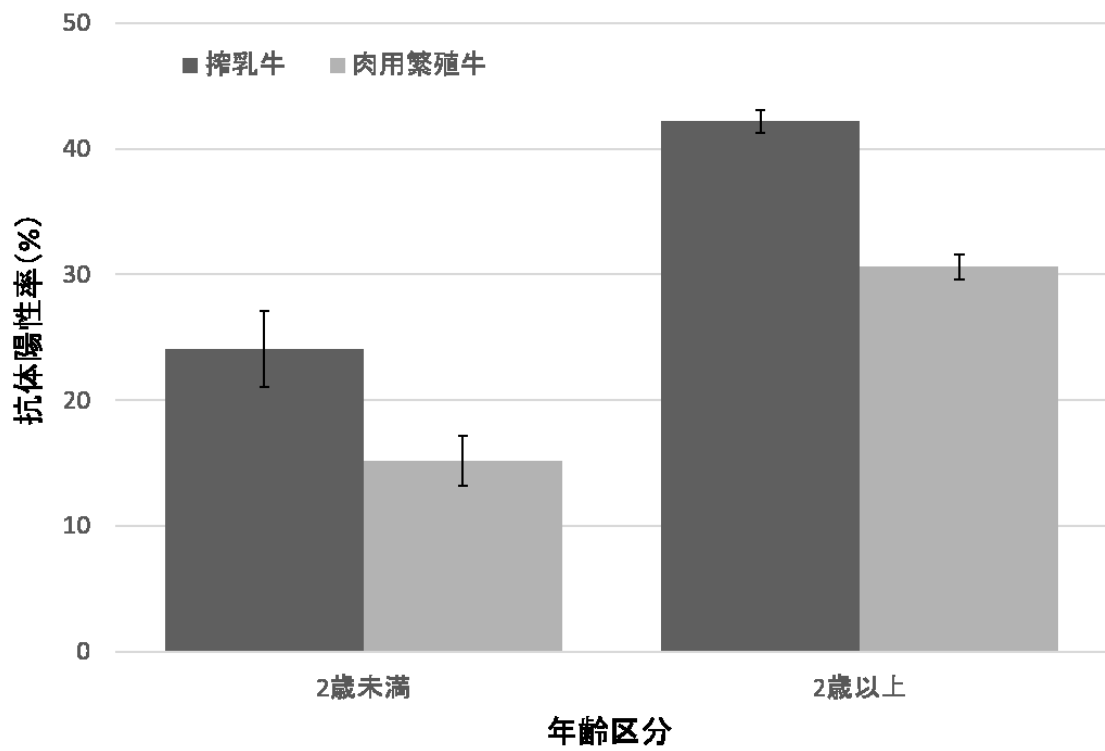


図 1-3 育成・初妊までを想定した若齢牛の 2 歳未満と，成牛を想定した 2 歳以上で区分した際の BLV 抗体陽性率（エラーバーは 95%信頼区間を示す）

第二章

混合ロジスティック回帰モデルを用いた
牛白血病ウイルスの
酪農場内伝播に関するリスク要因の解析

序論

第一章では、現在の日本における BLV の浸潤状況を明らかにした。緒言で述べたとおり、BLV 感染は終生持続し、抗体を産生し続けることから(11, 49)、第一章で明らかになった乳用牛の約 40%、肉用繁殖牛の約 30%という高い抗体陽性率の現状は、これらの感染牛が感染を更に広げる可能性を示唆しており、また、近年の EBL 摘発数の増加の理由の一つと強く推察される。したがって、BLV の国内浸潤を低減させるために適切な対策を検討する必要がある。

日本における BLV 清浄化対策は、感染牛の摘発・淘汰が基本になる。しかしながら、多くの BLV 感染農場の畜主はそのような対策には積極的に取り組めていない。その理由として、BLV 感染牛が家畜伝染病予防法上の補償対象外であること、さらに農場においては EBL が発症するまでは臨床上非感染牛と変わりがなく、同等の生産性を維持していることなどが考えられる。さらに、そもそも飼養牛の BLV 検査自体が実施されていない農場も多い。この状況を放置することにより、BLV 感染農場では感染牛から非感染牛に BLV が伝播し、BLV が農場内でさらに拡大することが危惧されるとともに、これらの感染農場が非感染農場に対する BLV の供給源となってしまう可能性も考えられる。

BLV のまん延防止のためには、その伝播経路を効率的に遮断することが重要である。そのためには、緒言で述べたような、多くの BLV の伝播経路のうち、重要な役割を担っているものに対して重点的に対策を実施していくことが必要である。すなわち、実際の牛飼養農場において、客観的にリスク要因を評価した上で、それらを排除あるいは制御することができれば、より効率的な浸潤状況の低減が期待できる。

リスク要因の推定にあたっては、実際の農場環境において複数の要因が影響しあって BLV 伝播が起きていること、その他の条件が交絡となる可能性があることを考慮する必要がある。その手法の一つとして、多変量解析が挙げられる。そこで本章では、BLV の農場内伝播リスク要因を明らかにすることを目的として、2007 年に国内 7 県の BLV 感染酪農場から得られた BLV の抗体検査成績と疫学情報について、多変量解析を用いて分析した。

材料および方法

1. 分析に供したデータ

BLV の農場内浸潤がより進行している農場は、そうでない農場よりも BLV 伝播に関する有意なリスク要因があり、より多くの BLV 伝播が起きていると仮定した。この仮定に基づき、本章では想定される BLV の各伝播経路（要因）の有無と、農場内抗体陽性率（以降、農場内有病率とする）との関連を分析した。分析対象とした農場を選定するための調査の方法は以下のとおりであった。

2007 年度に、東北（1 県）、関東（1 県）、北陸／中部（2 県）、中国／四国（2 県）、および九州／沖縄（1 県）の地域から計 7 県の協力を得て実施した。各県において協力可能な酪農場を最大 20 戸、県の裁量のもと選定した。その結果、合計 139 戸の酪農場から協力が得られた。次いで、各農場から搾乳牛とその候補牛（ただし 6 ヶ月齢以上）30 頭を無作為抽出して農場内有病率推定のための検査対象とした。ただし、飼養頭数が 30 頭未満の農場については全頭抽出した。抽出個体から各県担当者が常法にしたがい

採血を実施し、血清を分離して動物衛生研究所に送付した。送付された検体の合計数は3,966頭となり、後述のBLVの抗体検査キットを用いて検査した。

なお、上記の血清は農林水産省の研究事業「人畜共通感染症等危機管理体制整備調査等委託事業」の一部として収集されたものであり、抗体検査結果はMurakamiら(67)により報告されているものを活用した。

2. 抗体検査

抗体検査はBLVのエンベロープ糖蛋白gp51に対する抗体を検出する間接ELISA法（「Bovine Leukosis Serum Screening ELISA」、Pourquier社、モンペリエ、フランス）を用いた。本キットの使用説明書にしたがい、指示陽性血清の吸光度に対する被検血清の吸光度の比（S/P値）が85%以下であれば陽性、85～115%は疑陽性、115%以上で陰性と判定した。疑陽性の検体については、Konoら(52)の手法に準拠したBLVのエンベロープ糖蛋白gp51を抗原とする寒天ゲル内沈降反応を用いて再検査に供し、確定した。

3. 調査票を用いた聞き取り調査

農場の基礎情報に加え、既報のBLVの農場内伝播経路に関する調査票を作成し、各農場での採材時に聞き取り調査を実施した。各農場で得られた疫学情報は、抗体検査結果（検査頭数および抗体陽性頭数）とともに表計算ソフトウェア（Microsoft Excel 2003）を用いてデータベース化し、リスク要因の解析に先立ち記述的分析を行った。

本調査に用いた調査票を図2-1に付した。

4. 解析対象農場の選定

本章では、農場内 BLV 伝播に関連する要因を検討することを目的とした。そのため、解析対象は感染農場のデータとなる。そこで、1 頭以上の抗体陽性牛が摘発された農場を感染農場と定義し、分析対象とすることにした。今回の疫学調査の結果、139 戸中 110 戸（79.1%）の農場で 1 頭以上の抗体陽性個体が摘発され、全検査個体が陰性であった 29 農場は分析対象から除外した。さらに、110 戸のうち聞き取り調査で全回答が得られなかった項目がある 20 戸についても分析対象から除外した。以上から、90 農場を分析の対象とした。

5. 統計学的解析

農場内有病率の整理と単変量解析

農場内有病率は以下のように定義した。

$$\text{農場内有病率 (\%)} = 100 \times \frac{\text{抗体検査陽性頭数}}{\text{抗体検査実施頭数}}$$

続いて、農場内有病率のヒストグラムを作成するとともに（図 2-2）、中央値と四分位範囲（25 パーセンタイル値および 75 パーセンタイル値）を算出して分布を視覚的および数値的に確認した。農場内有病率の中央値（四分位範囲）は 48.1%（17.1, 68.5）であったが、10%以下、10%より高く 20%以下、および 40%より高く 50%以下の農場数がそれぞれ 13 戸と、相対的に多かった。

続いて、農場内有病率（統計解析上、応答変数と呼ぶ）と各説明変数の関連について、単変量解析を実施した。すなわち、説明変数が 2 水準を持つ場合は Mann-Whitney の U 検定を、3 水準以上をもつ場合は Kruskal-Wallis 検定を用いて、農場内有病率を比較した。これらの結果、 $P < 0.15$ となった

説明変数を多変量解析に供した。

多変量解析

分析対象の 90 戸のうち、検査頭数が 30 頭に満たない農場が 26 戸あり、最小検査頭数は 8 頭であった。つまり、本解析における応答変数である農場内有病率には分母が異なるものを含んでいる。そこで多変量解析では、この分母の違いを考慮して分析することとした。すなわち、今回の応答変数は試行回数（検査頭数）に占める成功回数（抗体陽性頭数）として、二項分布にしたがうとみなすことができる。二項分布は、

$$p(y|N, q) = \binom{N}{y} q^y (1-q)^{N-y}$$

と定義される確率分布の一つである。今回の場合、 $p(y|N, q)$ は N 頭中の y 頭で抗体陽性となる確率を示している。また、 q は N 頭のそれぞれの個体が検査陽性となる確率、つまり農場内有病率であり、 $0 \leq q \leq 1$ である。 $\binom{N}{y}$ は N 頭の牛の中から y 頭の抗体陽性牛を選び出す場合の数である。この二項分布を仮定したデータの解析手法に、ロジスティック回帰モデルによる分析がある。ロジスティック回帰モデルは、上記の q に対して

$$\log \frac{q}{1-q}$$

で表されるロジット関数 ($\text{logit}(q)$) を設定する。ロジスティック回帰モデルは $\text{logit}(q)$ に対して、

$$\text{logit}(q) = \alpha + \beta_1 x_1 + \cdots + \beta_n x_n + e (= \alpha + \sum_{i=1}^n \beta_i x_i + e)$$

と定式化される。ただし、 α はモデルの切片（定数項）、 x_i は固定効果と呼ばれ、各説明変数を指し、 β_i はその係数、そして e は誤差項である。

さらに今回は、固定効果以外に農場内有病率のばらつきに影響を与えるもう一つの変数について考慮した。それは、調査計画をどれだけ綿密に立

ても、農場の立地条件や周囲の環境の違いなどは完全に特定・定量することはできないという、現実的に観察不可能な違いに基づく変数で、これをブロック差と呼ぶ(54)。ブロック差を考慮しないと、モデルが示す予測値と、データそのものが示す実測値とのあてはまり（フィッティング）が悪くなることがある。これをデータの過度なばらつき、すなわち過分散によるモデルのあてはまりの悪さと呼ぶ。今回は「1ブロックに1農場」というデータ構造をしているため、ブロック差と農場差を区別することができなかった。そこでこれらをまとめて「農場差」とした。この農場差は平均0で標準偏差sの正規分布にしたがうと仮定し、ランダム効果 γ としてロジスティック回帰分析のモデル式に加える。すなわち、上記のロジスティック回帰モデルは、

$$\text{logit}(q) = \alpha + \sum_{i=1}^n \beta_i x_i + \gamma + e$$

となる。平均0のランダム効果 γ を加えることにより、 $\text{logit}(q)$ の値そのものに影響を与えないが、モデル全体のばらつきを調整することができる。このように、説明変数である固定効果と、農場差であるランダム効果をともに含むモデルを、混合モデルと総称する。今回の場合は複数の固定効果をモデルに含めるため、最終的には混合ロジスティック回帰モデルによる多変量解析、ということができる。

今回の解析の目標は、このモデルを用いて、対象とした7県の酪農場に共通した農場内有病率を高めるリスク要因を推定することである。ここで、単変量解析の結果、多変量解析へ投入することとなったすべての説明変数を含むモデル（フルモデル）は、今回得られた応答変数に限ってはあてはまりが良い。しかしながら、そのようなモデルは、飽くまで今回の90戸から得られたデータセットに対しては有効であるが、将来得られる異なるデ

ータに対してはせい弱で，予測能力に欠けることが多い。このように，モデルがデータに過度にあてはまっている状況をオーバーフィッティングと呼ぶ(85)。また，そもそも統計解析の目標は，複雑なデータセットからより単純で理解しやすく，かつ意味のある結果を導出することである。したがって，モデルは可能な限り少ない説明変数で表現されることが望まれ，かつそのようなモデルは，新たなデータが得られた際にも相対的に正確な予測が可能となる(17)。ただし，複雑なモデルを単純化してより最良なものを選択するには，統計学的な指標が必要となる。そこで，今回は赤池の情報基準（Akaike's Information Criterion：AIC）を用いた。AICは，

$$AIC = -2\ln L + 2k$$

と定義される。ここで， $\ln L$ はあるモデルが持つデータへのあてはまりの良さを示す指標の最大値（最大尤度 L ）の自然対数値， k は説明変数の数である。AICは相対的な指標であり，これを用いてモデルを評価する際には，異なる説明変数を含む複数のモデルを構築し，それぞれに対してAICを算出し比較する。そして，AICが小さいモデルほどデータをより良く説明できると判定する。

そこで今回，まず単変量解析にて $P < 0.15$ を示した説明変数すべてを含めたフルモデルのAICを算出した。続いて任意の説明変数を除きながら，すべてのモデルのAICを算出し，それが最小となるモデルを探索していくステップワイズ法によって最良モデルを選択した。ただし，稀に最良モデルに含まれる説明変数同士に有意な関連を持つものが含まれることがある。そのため，通常はAICによるモデル選択の過程で，より少なく，かつ有意な関連がない説明変数のみが最良モデルに残されることになるものの，今回は得られた最良モデルの説明変数間の関係も分析し，有意性が認められる場合は，適宜モデルから除外することにより，さらにモデルを単純化し

た。また、ある説明変数のある水準の応答変数に対する効果が、その他の説明変数の特定の水準との組み合わせの際に、それぞれの変数の各水準のみの効果よりも過大、過小あるいは正反対になることがある。これを交互作用といい(81)、交互作用項がある場合は、その項をモデルに含めて最終モデルとした。そして最終モデルに残された説明変数の係数が正值の場合は農場内有病率が高いことに関連するリスク要因、負値の場合は農場内有病率が低いことに関連する防御要因と判定した。

以上の統計学的解析はすべてソフトウェア「R」のバージョン 2.6.1 (86)を用いた。特に混合ロジスティック回帰モデルについては、パッケージ `glmmML` (9)を用いた。

結果

1. 記述的解析

調査票による聞き取り調査結果を、表 2-1 に示した。量的変数である飼養頭数については、90 戸の搾乳牛頭数の中央値である 36 頭を目安に、30 頭未満、30 頭以上 50 頭未満、および 50 頭以上の 3 水準に分類した。その結果、それぞれ 38.9% (35 戸)、27.8% (25 戸)、および 33.3% (30 戸) に分類された。搾乳牛の外部導入については、約半数の農場が行っていた。牛舎形態については 75.6% (68 戸) がつなぎ飼いであった。運動場等の舎外設備を保有していたのは 27.8% (25 戸) であった。夏季のアブの出現については、調査票では「見ない」、「めったに見ない」、「たまに見る」、「よく見る」、および「非常に多い」の 5 水準を設定したが、「見ない」と「非常に多い」のデータ数がともに 6 戸ずつと少なかったため、「見ない」は

「めったに見ない」へ、「非常に多い」は「よく見る」へ含めた。その結果、見ない～めったに見ない（以下，低頻度），たまに見る（以下，中頻度），よく見る～非常に多い（以下，高頻度）でそれぞれ 31.1%（28 戸），32.2%（29 戸），および 36.7%（33 戸）と，およそ均等の農場数の分布となった。除角については 64.4%（58 戸）で実施していた。直腸検査時の手袋交換については 81.1%（73 戸）の農場で，ワクチン接種時の注射針の交換についてはほぼすべての農場で 1 頭 1 枚ないし 1 頭 1 針が遵守されていた。初乳給与については，90%以上の農場で給与されていたが，このうち母牛由来のみの初乳を給与している農場が全体の 70.0%（63 戸）と多くを占め，ブール初乳を給与しているのは 22.2%（20 戸）であった。

2. 単変量解析

農場内有病率と各変数との単変量解析の結果を表2-1に示す。

Mann-WhitneyのU検定の結果，牛舎形態について，つなぎ飼いでない農場はつなぎ飼いの農場に比較して農場内有病率が高く，それぞれの中央値（以下同様）は65.0%および41.9%であった（ $P=0.001$ ）。また，運動場または放牧場がある農場は，これらがない農場よりも農場内有病率が高く，それぞれ52.2%および43.3%であった（ $P=0.048$ ）。除角を実施している農場は，していない農場よりも農場内有病率が高く，それぞれ60.0%および20.0%であった（ $P<0.001$ ）。直腸検査の手袋の1頭1枚を遵守していない農場は，している農場よりも農場内有病率が高く，それぞれ60.0%および43.3%であった（ $P=0.012$ ）。ワクチン接種時の1頭1針を遵守していない農場は，している農場よりも農場内有病率が高く，それぞれ64.4%および46.7%であった（ $P=0.100$ ）。

Kruscal-Wallis検定の結果，夏季のアブの出現については，低頻度，中頻

度、および高頻度の農場の農場内有病率はそれぞれ26.7%、47.6%、および63.3%であり、出現頻度が高いほど高かった（ $P=0.002$ ）。初乳給与形態については、母牛由来のもののみを給与している農場の農場内有病率が最も低く42.1%で、プール初乳を給与している農場、および初乳給与をしていない農場の農場内有病率はそれぞれ50.0%および76.7%であった（ $P=0.003$ ）。

以上の7変数は $P<0.15$ を示しているため、混合ロジスティック回帰モデルによる多変量解析へ適用することとした。一方、群サイズと1年以内の搾乳牛の追加については、農場内有病率の中央値に差は認められなかった（それぞれ $P=0.514$, 0.286 ）。

3. 多変量解析

単変量解析にて $P<0.15$ を示した 7 つの説明変数を混合ロジスティック回帰モデルによって分析した結果、牛舎形態、除角の実施の有無、夏季のアブの出現、初乳給与の 4 変数を含むモデルで AIC が最小となった（表 2-2）。また、これら 4 変数については有意な交互作用項は認められなかった（すべて $P>0.05$ ）。したがってこのモデルを最終モデルと判断した。各変数の参照水準に対する他の水準の P 値および係数の符号から、リスク要因および防御要因を以下のように判定した。「牛舎形態がつなぎ飼いでないこと」、「除角を実施すること」、「高頻度にアブが観察されること」は、農場内有病率が高いことと有意に関連しており、それぞれ参照水準に対する係数は 0.71, 1.11, および 0.82 であった（ $P=0.03$, <0.001 , および $=0.01$ ）。したがって、これらは BLV の農場内伝播を助長するリスク要因と判定した。一方、初乳給与については、初乳を給与しないことを参照水準として、「母牛由来のみの初乳を給与すること」は農場内有病率が低いことと有意に関連しており、その係数が -1.11 であったことから、防御要因と判定した

($P=0.03$)。

考察

本章では 7 県由来の 90 戸の BLV 感染酪農場における、BLV の農場内伝播に関するリスク要因について検討した。結果から得られる解釈の信頼性を確保するためには、可能な限り収集したデータの情報量を損失しない解析手法を選択することが重要である。その点において、二項分布を活用した混合ロジスティック回帰分析による多変量解析を用いて分析したことにより、農場内有病率と各説明変数の単変量解析のみでは除外できない交絡や、調整すべき要因の影響を排除した結果が得られ、評価の信頼性を高めることができた。

解析の結果、「つなぎ飼いでない牛舎形態」の採用はリスク要因と判定された。フリーストールやフリーバーン等の牛舎では、感染牛と非感染牛が自由に動くことができるので、直接接触による BLV 伝播の機会が増えると考えられた。先行研究によれば、傷口等を介した直接接触による BLV 伝播も確認されている(53, 57)。さらに、つなぎ飼いでない牛舎においては、妊娠鑑定やワクチネーションなどの飼養管理作業を複数個体に対してまとめて実施する場合、その順番がつなぎ飼いの牛舎に比べてその都度変わりやすい。そこに万一医原性のリスク要因がある場合は、BLV 伝播が助長されると思われた。一方、つなぎ飼いでない各種の牛舎は、1 戸あたりの飼養頭数の多頭化の流れで導入されたものと考えられ、それを BLV 伝播防止目的のみのためにつなぎ飼いに戻すという対策は現実的には困難である。さらに、このような農場は自家産牛のみでは群サイズの維持が困難で、導入

牛に頼らざるを得ない可能性もあると思われる。この状況下で、もし導入牛が BLV に感染していると、農場間の伝播の結果として、農場内の汚染がさらに進行してしまうと思われた。少なくともこの結果は、対策を重点的に実施する農場の選択基準として用いることができると思われた。農場内有病率を低減させることを目標とした対策としては、つなぎ飼い牛舎以上に感染牛の特定とそれらの優先的更新、更新牛を非感染牛とすることが重要となる。また、農場内有病率をそれ以上高めないことを目標として、感染牛房と非感染牛房を分ける等の工夫をすることも効果的であると思われた。

人為的なリスク要因として、本分析においては「除角を実施する」ことがリスク要因とされた。この結果は、除角を行った子牛は、行わなかった子牛と比べて感染リスクが高かったという先行研究とも一致した(15, 16, 56)。除角自体は牛の気性を和らげて争いを避けるとともに、飼養管理者の作業上の安全確保のために実施される重要な処置である。ただし、BLV 伝播防止のためにはその実施方法に注意する必要がある。除角は出血をともないやすい作業であるが、臨床現場ではしばしば出血を放置したまま自然な止血を待つこともある。つまり感染牛にとって、除角部位は BLV 感染リンパ球が露出することから感染巣となる。一方、非感染牛にとっては除角部位に血管が露出されることとなり、BLV に曝露された際に感染するリスクが高くなる。また、除角を複数頭同時に実施する際の器具消毒の不備は、人為的な感染を引き起こす可能性がある。したがって、確実な止血に加えて、器具の消毒をより確実に行うことも重要と考えられた。

「アブを夏季に高頻度で認める」農場では、より BLV 伝播リスクが高いことが示された。アブは BLV 伝播の機械的ベクターであり(5, 58, 77)、この結果は妥当であると考えられる。BLV の浸潤の程度に対する吸血昆虫の

関与は第一章でも示唆されたが、本章の統計学的解析の結果からもその対策を実施することが重要と思われた。通常、アブの発生源は牛舎外であることから、その発生を完全に抑制することは実質的に不可能であるが、牛舎内に侵入する数をネット等によって減少させる、あるいは侵入したアブに吸血をさせないために薬剤等を用いて制御する手法を検討する必要があると考えられた。

一方、初乳給与に関する結果の解釈には注意が必要である。今回、初乳給与をしない農場に比較して、「子牛へ母牛からのみの初乳を給与」している農場の係数は有意な負値を示し、防御要因と判定した。感染牛の初乳にはBLV感染リンパ球を含む(27)が、同時にその抗体も含まれていることから、哺乳期の感染リスクを低減させるという報告(55, 69, 98)がある。初乳を給与しない農場に対して初乳給与をしている農場の農場内有病率が低いという本研究の結果はこれらの報告を支持するものである。ただし、初乳の量や免疫グロブリン濃度は母牛の健康状態に加え、品種、産歴、乾乳期間等によって影響される(66, 88)ことが知られている。したがって、感染母牛の初乳は常に確実な感染防御効果を持つと理解するべきではない。すなわち、初乳を介したBLV伝播防止対策として、普段から感染牛を特定しておき、感染牛の子牛へ初乳を与える際には、凍結や加温による前処理を実施し、ウイルスへの曝露を減らしつつ抗体を賦与することが重要と思われた。加熱については、通常の殺菌目的の温度では免疫グロブリン濃度が低下してしまう(6, 62)ので、より低温の処理が必要である。60℃で30分の加熱処理が免疫グロブリン濃度を維持して細菌数を減らす効果が示されている(19)。また、感染牛由来の初乳を-25℃で一晩凍結することによって、BLVが不活化され、これを解凍して給与すると感染が成立しないことが実験的に示されている(43)。さらに-18℃から-25℃での凍結保存では1年間

は品質が保たれ、50℃以下の湯せんによる解凍であれば免疫グロブリンを含むタンパク質の性質に影響は与えないという報告がある(40)。このような知見を応用し、適切な初乳対策を検討し、実施していくことが重要であると思われた。

その他、単変量解析では統計学的有意性が示唆されたものの、最終モデルに残されなかったものもある。運動場や放牧場がある農場での農場内有病率が高かった(表 2-1)ことは、牛が自由に接触できる機会が増え、農場内有病率が高くなると考えられることから、妥当性が高い結果と思われた。ただし、データを精査すると牛舎形態と運動場の有無に関しては有意な関連が認められた。すなわち、つなぎ飼いとそうでない農場における運動場等の保有割合は、それぞれ 22.0% (68 戸中 15 戸) および 54.5% (22 戸中 10 戸) で、つなぎ飼いでない農場の方が有意 ($P=0.05$) に高かった。このような有意性があるということは、牛舎形態という説明変数について、任意の農場がつなぎ飼いか否かのいずれかに分類された時点で、運動場の有無についても、確率論的にはある程度決まってしまうことを意味する。したがって、AIC を基準としたモデルの単純化という観点からは、これらの変数から牛舎形態のみが残されたと思われた。このような精査は野外での複雑な事象を単純なモデルとしてとらえる際に重要な留意点であり、今回多変量解析を用いたことの利点を示すこととなった。一方、直腸検査手袋や注射針の 1 頭ごとの交換についても、これらを遵守していない農場の方がより高い農場内有病率を示し(表 2-1)、既知の BLV 伝播経路という点では妥当性が高いが、多変量解析の結果、最終モデルには残されなかった。これは、遵守していない農場数が少なく、統計学的な差として検出できなかったためとも考えられた。

以上の結果と解釈に関し注意すべき点は、データが横断研究によって得

られていることである。本章で推定されたリスク要因の保有と農場内有病率の高さの因果関係を証明するのであれば、厳密にはそういった要因を確認した（原因）上で農場内有病率が高まること（結果）を経時的に確認しなければならない。これを因果関係の判定項目における時間性と呼ぶ(41)。しかしながら、今回の結果から得られた解釈については、いずれも生物学的に妥当と考えられたことから、対象とした7県の酪農場においては、つなぎ飼いでない農場に対しては BLV 伝播に関してより重点的な注意喚起を行い、分離飼育を励行する、除角時の確実な止血や、複数頭実施する際の器具の確実な洗浄や消毒を推奨する、アブの牛舎内侵入あるいは吸血阻止のための対策を検討する、および初乳については凍結や加温後に給与するといったことを積極的に実施することによって、農場内の BLV まん延を効率的に防止できると考えられた。

小括

国内7県の90酪農場を対象に、BLVの農場内伝播について、混合ロジスティック回帰モデルによる多変量解析を用いて、変数間の調整をした上でリスク要因を特定した。「つなぎ飼いでないこと（係数 1.11, $P=0.03$ ）」、「除角を実施すること（係数 1.11, $P<0.001$ ）」、「夏季にアブを高頻度に認めること（係数 0.82, $P=0.01$ ）」は農場内有病率が高いことと関連しており、BLVの農場内伝播のリスク要因であると判定した。また、初乳給与については、初乳を給与しないことを参照水準として、「母牛由来のみの初乳を給与すること」は農場内有病率が低いことと有意（ $P=0.03$ ）に関連しており、その係数が -1.11 であったことから、防御要因と判定した。そのため、つ

なぎ飼いでない農場に対しては、BLV 伝播に関してより重点的な注意喚起を行い、分離飼育を励行する、除角時の確実な止血や、複数頭実施する際の器具の確実な洗浄や消毒を推奨する、アブの牛舎内侵入あるいは吸血阻止のための対策を検討する、そして加熱や凍結済みの初乳を給与することなどが、本調査で対象とした7県の酪農場でのBLVの伝播防止対策上、重要であると考えられた。

図表

図 2-1 聞き取り調査で用いた調査票

平成 年 月 日 県 家畜保健衛生所								
牛白血病ウイルス疫学調査票								
1. 住 所 所有者氏名								
2. 品 種・飼養頭数 ホルスタイン ホルスタイン以外の乳用種 ()								
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 30%;">哺 乳</td> <td style="width: 20%;">頭</td> <td style="width: 30%;">肥 育</td> <td style="width: 20%;">頭</td> </tr> <tr> <td>育 成</td> <td>頭</td> <td>繁 殖 (搾 乳)</td> <td>頭</td> </tr> </table>	哺 乳	頭	肥 育	頭	育 成	頭	繁 殖 (搾 乳)	頭
哺 乳	頭	肥 育	頭					
育 成	頭	繁 殖 (搾 乳)	頭					
3. 過去 1 年間の繁殖牛の更新状況 転 出 頭 / 転 入 頭 (自家産・導入含む)								
4. 牛舎形態 つなぎ / つなぎでない / 混 合								
5. 自前の放牧場の有無 あり (他群との共有: あり / なし) なし								
6. 夏にアブを農場内で見たことがあるか? 見ない / めったに見ない / たまに見る / よく見る / 非常に多い								
7. 除角をしているか? している / していない 除角している場合は、除角用器具は一頭ごとに消毒しているか? している / していない								
8. 出入りの獣医師は直腸検査の際に手袋を 1 頭毎に替えているか。 知らない / 替えていない / 1 頭毎に替えている / 替えていないが 1 頭毎に消毒している								
9. ワクチン接種の時に注射の針を替えているか? 知らない / 替えていない / 1 頭毎に替えている								
10. 初乳を与えているか。 ① <u>与えている</u> ② 与えていない								
* <u>初乳を与えている場合</u> 、プールした初乳を与えているか? 与えている / 与えていない								

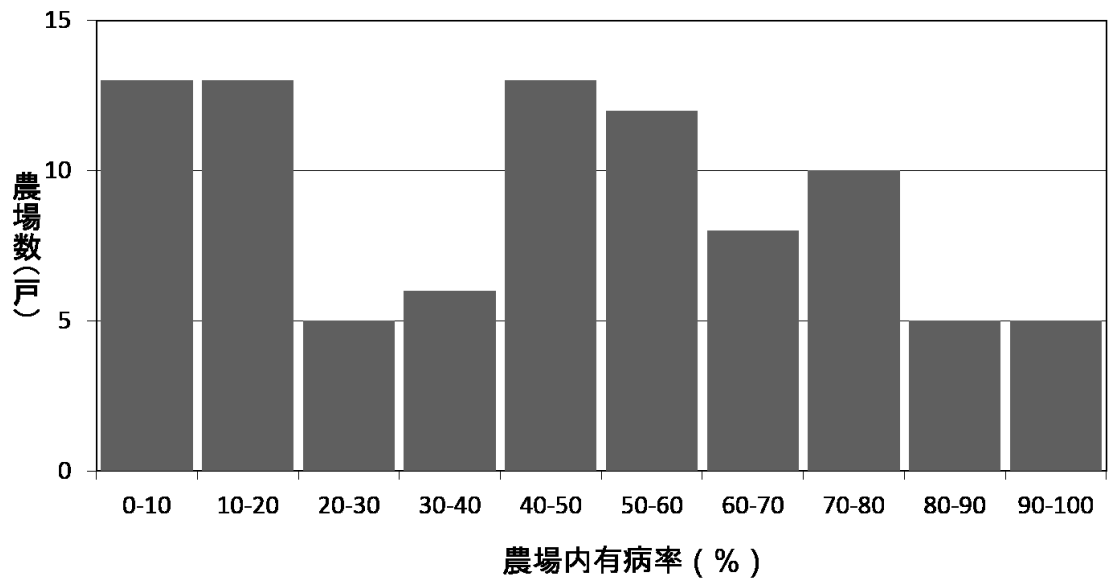


図 2-2 国内 7 県由来 90 戸の酪農場の農場内有病率の分布

表 2-1 国内 7 県 90 農場における聞き取り調査のまとめと農場内有病率に関する単変量解析結果

変数	水準	聞き取り調査結果		単変量解析結果		P 値 ¹
		農場数	割合 (%)	農場内有病率 (%) の中央値 (四分位範囲)		
群サイズ	≤30 頭	35	38.9	43.3 (13.3, 60.0)		0.514
	30~49 頭	25	27.8	53.3 (16.7, 63.3)		
	≥50 頭	30	33.3	50.0 (26.7, 73.3)		
1 年以内の成牛の追加	なし	11	12.2	46.7 (27.3, 60.0)		0.286
	自家産牛のみ	33	36.7	52.2 (25.0, 78.0)		
	外部導入あり	46	51.1	45.0 (13.3, 65.0)		
牛舎形態はつなぎ飼い	はい	68	75.6	41.9 (13.3, 62.5)		0.001*
	いいえ	22	24.4	65.0 (52.2, 78.3)		
運動場または放牧場の有無	あり	25	27.8	52.2 (33.6, 78.0)		0.048*
	なし	65	72.2	43.3 (13.8, 63.3)		
夏季のアブの出現	低頻度	28	31.1	26.7 (13.3, 51.8)		0.002*
	中頻度	29	32.2	47.6 (15.8, 65.0)		
	高頻度	33	36.7	63.3 (44.4, 83.0)		
除角実施	あり	58	64.4	60.0 (39.2, 73.3)		<0.001*
	なし	32	35.6	20.0 (8.8, 43.3)		
直腸検査の手袋	1 頭ごと遵守	73	81.1	43.3 (14.5, 68.3)		0.012*
	2 頭以上に使用	17	18.9	60.0 (47.8, 75.0)		
注射針交換	1 頭ごと遵守	86	95.6	46.7 (16.7, 65.5)		0.100*
	2 頭以上に使用	4	4.4	64.4 (50.5, 91.7)		
初乳給与	なし	7	7.8	76.7 (60.0, 95.7)		0.003*
	母牛初乳のみ	63	70.0	42.1 (13.3, 60.0)		
	プール初乳	20	22.2	50.0 (36.7, 75.8)		
全体				48.1 (17.1, 68.5)		

1: 水準が 2 つの変数は Mann-Whitney の U 検定, 3 つの変数は Kruskal-Wallis 検定
P 値に*を付した変数は, 多変量解析へ投入した

表 2-2 国内 7 県 90 農場における農場内有病率に関する多変量解析結果
 (応答変数に二項分布を仮定した混合ロジスティック回帰モデル)

変数	水準	係数	係数の 標準誤差	z 値	z 値の P 値
牛舎形態は	はい	参照			
つなぎ飼い	いいえ	0.71	0.32	2.23	0.03
夏季のアブ の出現	低頻度	参照			
	中頻度	-0.24	0.34	-0.70	0.49
	高頻度	0.82	0.32	2.56	0.01
除角実施	しない	参照			
	する	1.11	0.30	3.66	0.0002
初乳給与	なし	参照			
	母牛初乳のみ	-1.11	0.52	-2.13	0.03
	プール初乳	-0.90	0.55	-1.65	0.10
定数項		-0.36	0.59	-0.62	0.54

第三章

ゼロ強調負の二項分布モデルを用いた
牛白血病ウイルスの
農場内および農場間伝播に関するリスク要因の解析

序論

第二章においては、国内7県の酪農場を対象に、農場内でのBLVの感染拡大に関与している要因を明らかにした。その過程で、多変量解析を用いることによって説明変数間の関連も留意して結果を解釈することの意義も示すことができた。しかしながら、研究対象が酪農場のみであり、第二章で示したとおり、地域について北海道が含まれていないなど、得られた結果が国内の牛飼養農場全体の特徴を示しているかどうかの判断は難しい。BLV伝播のリスク要因について国全体で対策を実施するためには、全国レベルでの評価が必要である。また、BLVの伝播要因については、農場内のみならず、農場間の伝播リスクの評価も必要である。このことによってBLVの農場内伝播防止のみならず、農場への侵入防止対策を検討することが可能になる。さらに、第一章で示されたように、搾乳牛（酪農場）と肉用繁殖牛（肉用繁殖農場）ではBLVの浸潤状況が異なり、また、飼養形態も異なるため、それぞれの伝播において異なるリスク要因が関与していることが考えられる。そのため、これらを個別に評価することにより、酪農場および肉用繁殖農場の比較検討が可能となり、また、それぞれに有効な対策を検討することが可能になると考えられる。

そこで第三章では、全国の酪農場および肉用繁殖農場それぞれにおけるBLV伝播のリスク要因を明らかにすることを目的に、第一章で対象とした農場を再度対象として、抗体検査結果と農場の疫学情報についての解析を行った。解析にあたっては、第二章で着目した感染農場の農場内有病率を指標としたBLVの農場内伝播に関するリスク要因の解析を拡張し、農場間伝播に関するリスク要因についても検討した。そのため、農場の感染の有無に関連する要因についても解析することとした。すなわち、感染農場は

非感染農場よりも農場間伝播に関与するリスク要因が存在していると仮定した。また、これらの異なるリスク要因を同時に扱うことができる多変量解析手法についても検討した。

材料および方法

1. 調査票を用いた聞き取り調査

本調査は、第一章での全国調査と同時に、酪農場においては 2009 年度に、肉用繁殖農場においては 2010 年度に実施した。調査目的は、BLV の農場内および農場間伝播に関するリスク要因を推定することである。そこで、調査項目は第二章で使用した項目に加え、農場間伝播に関する項目も加えた。各農場で得られた疫学情報は、各農場での抗体検査結果（検査頭数および抗体陽性頭数）とともに表計算ソフトウェア（Microsoft Excel 2010）を用いてデータベース化し、リスク要因の解析に先立ち集計を行い、記述的に取りまとめた。

本調査で用いた調査票を図 3-1-1 および図 3-1-2 に付した。

2. 解析対象農場の選定

第一章の調査での協力農場（酪農場 587 戸および肉用繁殖農場 558 戸）のうち、解析の対象にしたのはそれぞれ 563 戸（96%）および 490 戸（88%）の情報であった。すなわち、飼養頭数が 10 頭未満の 23 戸の酪農場および 66 戸の肉用繁殖農場は、感染牛の特定ができれば対策は比較的实施しやすいこと、また、統計解析を進めるにあたり、分散を小さくするために対象から除外した。一方、飼養頭数が 500 頭以上であった 1 戸の酪農場および

2 戸の肉用繁殖農場も，飼養管理方法が他と大きく異なる可能性があるため除外した。

3. 農場内有病率の分布

分析対象農場の農場内有病率を，第一章の抗体検査データを基に 10%ごとの階級に分けてヒストグラムで示した（図 3-2）。酪農場も肉用繁殖農場も，最も頻度が高かったのは非感染農場，すなわち農場内有病率 0%の農場であり，酪農場では 563 戸中 122 戸（22%），肉用繁殖農場では 490 戸中 153 戸（31%）であった。次いで農場内有病率 10%以下の農場が多かった。その他の階級の頻度については，大きな差は認められなかった。

なお，第一章で述べたように，各農場での検査頭数は無作為抽出された 20頭である。ここで，第二章の対象酪農場の農場内有病率は四分位範囲で 17～70%であったことから，用途に限らず日本における典型的な BLV 感染農場の農場内有病率は 15%以上であると仮定した。有病率 15%の群から最低 1頭の感染個体を 95%の精度で摘発するためには，統計学上 18頭を検査する必要がある(59)。このことから，本研究における農場ごとの検査頭数である 20頭は国内の典型的な BLV 感染農場を摘発するためには，十分な頭数と考えられる。

4. 統計学的解析

まず，酪農場と肉用繁殖農場における農場内有病率を Mann-Whitney の U 検定によって比較した。

本章では，抗体陽性牛の有無，すなわち農場内の抗体陽性牛が 0頭か 1頭以上か，さらに 1頭以上ならその多さに注目する。すなわち，前者によって農場間の，後者によって農場内の BLV 伝播に関するリスク要因を評価する

こととなる。ここで、対象農場における平均値および不偏分散は、酪農場でそれぞれ8.0頭および49.1、肉用繁殖農場で5.3頭および33.5であり、分散が平均値よりも過度に大きかった。さらに、図3-2のとおり、今回のデータでは酪農場の約20%、肉用繁殖農場の約30%において抗体陽性頭数0頭（非感染農場）であった。この状況を統計学的にゼロ過剰（zero-inflated）状態と呼ぶ。このように、分散が平均値よりも大きく、かつゼロ過剰な応答変数を持つデータへの対応として、Greene (30)によって提案されたゼロ過剰負の二項分布モデル（zero-inflated negative binomial model：以下、ZINBモデル）の活用を検討した。ZINBモデルの概要は以下のとおりである。

今回の分析対象農場で抗体陽性数が0頭となるのは、その農場全体で本当に感染牛がない場合（すなわち、真の0頭）に加え、20頭に限定した抽出検査による感染牛の見逃し（すなわち、見逃しの0頭）に起因する場合の二つの可能性が考えられる。ZINBモデルでは、真の0頭および見逃しの0頭と、1頭以上の計数データを、別々の要素で表現する。すなわち、 $f(y_i)$ を農場*i*における感染個体数*y*を示す確率関数とすると、ZINBモデルは以下のよう表される。

$$f(y_i = 0) = \pi_i + (1 - \pi_i) \times \left(\frac{k}{\mu_i + k}\right)^k \dots\dots\dots(1)$$

$$f(y_i | y_i > 0) = (1 - \pi_i) \times f_{NB}(y) \dots\dots\dots(2)$$

農場*i*で得られた抗体陽性数が0頭の時は、式(1)を用いる。 π_i は見逃しによる0頭が得られる確率で、二項分布にしたがうと仮定する。すると、 $(1 - \pi_i)$ は見逃しによる0頭以外の値が得られる確率、つまり真の0頭が得られる確率と、1頭以上の抗体陽性牛が得られる確率の和となる。式(1)は0頭となる確率を示す式であるため、 $(1 - \pi_i)$ のうち、真の0頭となる部分のみを表現する必要がある。そこで、 $(1 - \pi_i)$ に負の二項分布で0が得られる確率を示す項 $\left(\frac{k}{\mu_i + k}\right)^k$ を乗ずる。ここで、 μ_i は負の二項過程における平均値で、 k は分

散パラメータである。一方，1頭以上の抗体陽性牛が摘発された場合，式(2)を用いる。すなわち，真の0頭が得られる確率と，1頭以上の抗体陽性牛が得られる確率の和である $(1 - \pi_i)$ に，1頭以上の陽性頭数が得られる確率を表す負の二項関数 $f_{NB}(y)$ を乗じた積となる(102)。

ZINBモデルの長所は，上記のように，真の0頭と見逃しによる0頭をあらかじめ解析に織り込んでいることに加え，2つの要素についての解析結果が同時に得られることである。その一つはcount component（以下，カウント要素）と呼ばれ，count ratio（以下，カウント比）を指標とする。カウント比はある説明変数における参照水準に対する任意の水準の抗体陽性頭数の期待値である。例えば，「除角」という説明変数において，「実施していない」を参照水準に設定した際，「実施している」という水準のカウント比が有意な正值を示せば，除角を行う農場は，していない農場よりも多くの抗体陽性牛が存在すると判断し，除角の実施は農場内伝播を助長するリスク要因であると解釈する。もう一つの要素は，logistic component（以下，ロジスティック要素）と呼ばれ，odds ratio（以下，オッズ比）を指標とする。ただし，ZINBモデルで算出されるオッズ比は農場内の抗体陽性牛の「不在」のもっともらしさを示す指標である。つまり，ZINBモデルにおいてオッズ比が有意に1よりも大きい場合，その農場がより抗体陽性牛不在の確率が高い，すなわち非感染農場である確率が高いと判定する。そのため本章においては，解釈のしやすさを考慮し，ZINBモデルで得られたオッズ比の逆数を計算し，これをオッズ比として表示することとした。例えば，「外部導入」という説明変数において，「しない」を参照水準に設定した場合，「する」という水準のオッズ比が有意に1以上であれば，抗体陽性牛が存在する確率が高い，すなわち感染農場であると判断し，BLVの農場間伝播のリスク要因であると解釈する。

なお、本解析における応答変数は抗体陽性頭数という計数データであるが、第二章同様に農場ごとに検査頭数が異なっている場合がある。そのため本解析においては、検査頭数の影響を調整して解析する必要がある。このような、応答変数そのものではないが、それに影響する前提条件（この場合は異なる検査頭数）となる項をオフセット項と呼ぶが、すべての解析において、検査頭数をオフセット項としてZINBモデルに含めることとした。また、第一章の結果のとおり、BLVの浸潤状況が地域別に異なっていたことから、地域性も調整する必要がある。そこで、北海道と東北からなる「北日本」、関東、北陸、および中部からなる「東日本」、近畿、中国、および四国からなる「西日本」、そして九州と沖縄からなる「南日本」の4水準を持つ地域項をZINBモデルへ強制投入した上で、最良のモデルを探索した。具体的な手順は以下のとおりとした。

酪農場と肉用繁殖農場それぞれについて、各説明変数についてZINBモデルによる単変量解析を実施した。その結果、 $P < 0.15$ となった説明変数をZINBモデルによる多変量解析に供した。第二章同様、最適なモデルの選択はAICを指標としたステップワイズ法を採用した。AICが最小値を示したモデルについては、第二章同様に有意な交互作用項の有無を確認した上で最終モデルを確定した。さらに、ZINBモデルを用いたことの妥当性を確認するため、この最終モデルと同じ説明変数を含む（通常の）負の二項分布モデルを作成した。そして、ZINBモデルおよび負の二項分布モデルのデータへのあてはまりの良さを相対的に比較するため、Vuong検定(101)を行った。

以上の統計学的解析はすべてソフトウェア「R」のバージョン2.13.1(87)を用いた。特にZINBモデルについては、パッケージpsclの関数zeroinfl(38)を用いた。

結果

1. 記述的解析

酪農場および肉用繁殖農場の農場内有病率の中央値（四分位範囲）は、それぞれ35.0（5.0，75.0）%および20.0（0，55.0）%であり，Mann-Whitney検定の結果，酪農場の方が有意（ $P<0.001$ ）に高かった。

調査協力農場の基礎情報についての調査結果を表3-1-1に示した。成牛頭数の飼養規模は中央値で酪農場および肉用繁殖農場でそれぞれ35頭および28頭であった。そこで群サイズの水準を，酪農場では24頭以下を「小規模」（150戸），25～54頭を「中規模」（274戸），および55頭以上を「大規模」（139戸）に区分した。同様に肉用繁殖農場では，20頭以下を「小規模」（157戸），21～50頭を「中規模」（217戸），および51頭以上を「大規模」（116戸）に区分した。成牛の年間更新割合についても中央値を基準に，酪農場では20%未満を「低い」（316戸）および20%以上を「高い」（247戸）に区分した。肉用繁殖農場については，10%未満を「低い」（313戸）および10%以上を「高い」（177戸）に区分した。

牛の外部導入は酪農場の78.0%，肉用繁殖農場の58.3%で実施されており，酪農場の実施割合が有意（ $P<0.01$ ）に高かった（カイ二乗検定，以下同じ。）。つなぎ飼い牛舎は酪農場の79.2%，肉用繁殖農場の40.2%で採用されており，酪農場の割合が割合有意（ $P<0.01$ ）に高かった。

同様に，牛群の管理方法に関する項目の調査結果について，表3-1-2に示した。子牛を出生後母牛から直ちに分離することは，酪農場の44.4%，肉用繁殖農場の6.5%で実施されており，酪農場の割合が有意（ $P<0.01$ ）に高かった。プール初乳の給与は酪農場の39.4%，肉用繁殖農場の10.8%で給与さ

れており、酪農場の割合が有意 ($P<0.01$) に高かった。育成牛の預託は酪農場の30.0%、肉用繁殖農場の9.6%で実施されており、酪農場の実施割合が有意 ($P<0.01$) に高かった。一方、子牛同士の接触は酪農場の64.3%、肉用繁殖農場の80.8%で可能であり、肉用繁殖農場の割合が有意 ($P<0.01$) に高かった。子牛とその母牛以外の接触は酪農場の15.6%、肉用繁殖農場の59.0%で可能であり、肉用繁殖農場の割合が有意 ($P<0.01$) に高かった。

出血をともなう衛生関連項目についての調査結果は表3-1-3に示した。除角については、酪農場の79.0%、肉用繁殖農場の65.9%が実施しており、酪農場の実施割合が有意 ($P<0.01$) に高かった。鼻環の装着は酪農場の31.6%、肉用繁殖農場の76.7%で実施しており、肉用繁殖農場の割合が有意 ($P<0.01$) に高かった。断尾は酪農場の4.3%、肉用繁殖農場の0.6%とわずかに実施されていたが、統計学的にはこの差は有意 ($P<0.01$) となった。直腸検査に用いる手袋の1頭1枚使用については、酪農場の80.3%、肉用繁殖牛の93.5%で遵守されており、肉用繁殖牛の割合が高かった ($P<0.01$)。

以上のように、酪農場と肉用繁殖農場では、聞き取り調査の多くの項目で違いが認められた。これによって、第一章でも示唆されたBLV伝播に関するリスク要因についての統計学的解析は、牛の用途別に実施する必要性が確認された。

2. 単変量解析

酪農場と肉用繁殖農場それぞれの ZINB モデルを用いた単変量解析の結果について、農場内有病率（農場内伝播要因）に関するものを表 3-2-1、3-2-2 および 3-2-3 に、農場における感染牛の有無（農場間伝播要因）に関するものを表 3-3 に示した。

酪農場では、ZINB モデルにおけるカウント要素において $P<0.15$ のカウ

ント比を示した変数は、牛の外部導入 ($P=0.02$)、牛舎形態 ($P=0.003$)、5年以内の牛白血病の発症摘発 ($P<0.0001$)、プール初乳の給与 ($P=0.03$)、および夏季の吸血昆虫 ($P=0.0006$ および <0.0001) であった。これらは農場内伝播に関与するリスク要因の候補として多変量解析へ供することとした。また、ZINB モデルにおけるロジスティック要素で $P<0.15$ を示した変数は、牛の外部導入 ($P<0.0001$) および育成牛の預託 ($P=0.001$) であった。これらは BLV の農場間伝播助長するリスク要因候補として、ZINB モデルでの多変量解析へ供することとした。

同様に、肉用繁殖農場においては、牛の外部導入 ($P=0.13$)、5年以内の牛白血病の発症摘発 ($P=0.0003$)、子牛の母牛以外の成牛との接触 ($P=0.04$)、夏季の吸血昆虫 ($P<0.0001$ 、および <0.0001)、および鼻環の装着 ($P=0.04$) を農場内伝播の、また、牛の外部導入 ($P=0.0006$) を農場間伝播のリスク要因候補として多変量解析で評価することとした。

3. 多変量解析

ZINB モデルによる多変量解析によって得られた最終モデルの概要を、酪農場については表 3-4-1 および表 3-4-2 に、肉用繁殖農場については表 3-5-1 および表 3-5-2 にそれぞれ示した。酪農場、肉用繁殖農場ともに最終モデルの説明変数間に有意な交互作用項は認められなかった ($P>0.05$)。また、Vuong 検定の結果から、酪農場、肉用繁殖農場ともに、負の二項分布モデルよりも ZINB モデルのあてはまりが有意 ($P<0.0001$) によいことが確認された。

最終モデルに含まれる説明変数のカウント比およびオッズ比より、酪農場においては、「つなぎ飼いでない牛舎であること (カウント比=1.19, $P=0.03$)」、「過去に牛白血病の発症摘発あったこと (カウント比=1.39,

P<0.0001)」、**「プール初乳を給与すること (カウント比=1.14, P=0.05)」、および夏季の吸血昆虫に関し、「不在を参照水準とした際、少しいること (カウント比=1.95, P=0.004)、および多くいること (カウント比=2.27, P=0.0004)」**が、BLVの農場内伝播に関与するリスク要因と判定した。また、「牛の外部導入をすること (オッズ比=6.25, P<0.0001)」および「育成牛の預託をすること (オッズ比=2.56, P=0.003)」がBLVの農場間伝播に関与するリスク要因と判定した。

同様に肉用繁殖農場においては、「過去の牛白血病発症牛の摘発 (カウント比=1.45, P=0.0003)」、**「子牛のその母牛以外の成牛と接触ができること (カウント比=1.23, P=0.03)」、および夏季の吸血昆虫に関し、「不在に対して少しいること (カウント比=5.21, P=0.0002)、および多いこと (カウント比=14.44, P=0.0002)」**が農場内伝播に、「牛の外部導入をすること (オッズ比=2.27, P=0.002)」が、農場間伝播に関するリスク要因と判定した。

考察

本章では47都道府県の協力によって得られた疫学情報と抗体検査結果に基づき、酪農場および肉用繁殖農場それぞれについて、BLVの農場内ならびに農場間伝播に関するリスク要因を解析した。AICを基準にして選択したデータに最もあてはまるZINBモデルは、Young検定によって負の二項分布モデルよりもデータへのあてはまりがよいことが示され、統計学的にもZINBモデルを用いたことの妥当性が示された。

ZINBモデルは、これまで様々な分野で用いられてきた統計解析手法である。近年でも青年期におけるう歯の発生およびその本数に関する社会的

要因に関する分析(60), 交通事故の発生の有無およびその数に関係する道路環境要因の評価(18), 市街地におけるドブネズミ駆除の効果測定のための捕獲の有無とその数に関係する要因の解析(32)などの報告がある。その他, 人医分野をはじめ, 生態学, あるいは社会学や心理学といった人文分野でも多く活用されている。平均値に比べて分散が大きい計数データを応答変数とし, かつそれに過剰なゼロデータが含まれる状況は, 獣医学領域のデータでも多く起こりうると思われる。本研究ではこれまでZINBモデルの活用事例が少ない獣医学領域の中で, その有効性を提示することができた。

解析の結果, 酪農場においては, 農場内伝播のリスク要因として「過去の発症牛の存在」, 「つなぎ飼いでない牛舎の採用」, 「プール初乳の給与」, および「吸血昆虫の存在」が, また, 農場間伝播のリスク要因として「外部導入」および「育成牛の預託」が示された。同様に肉用繁殖農場においては, 農場内伝播のリスク要因として「過去の発症牛の存在」, 「子牛とその母牛以外の成牛の接触」が可能であること, および「吸血昆虫の存在」が, また, 農場間伝播のリスク要因として牛の「外部導入」が示された。

「発症牛の存在」は酪農場, 肉用繁殖農場共通のリスク要因であった。白血病発症個体は, 未発症感染牛よりも多くのBLVのプロウイルスを保有しており(92), 感染源としてはよりリスクが高いため, 農場内伝播の原因となることは容易に想定できる。ただし, 発症した摘発牛は既に農場にはいない。したがって, 過去に発症牛が摘発されたという情報は, 農場内でBLVが広く浸潤していることの指標として有用であり, より重点的な対策が必要な農場の判断基準として用いることができる。対策としては, 感染牛の積極的な更新とその過程での感染牛と非感染牛の分離飼育が必要と考

えられた。

もう一つの酪農場と肉用繁殖農場で共通するリスク要因は、「夏季の吸血昆虫の存在」であった。これは第一章の結果を受けての考察、さらに第二章で得られた結果とも一致しており、さらに今回は酪農場、肉用繁殖農場ともに吸血昆虫がいないと回答した農場と比較して、「少ない」、「多い」の順にカウント比が有意に高かった。このことは、アブの飛来数が多いBLV感染農場ほど、農場内有病率が高いことを示唆しており、日本においてBLV浸潤を低減するためには、アブをはじめとする吸血昆虫対策を重点的に検討していく必要性が明らかになった。その際、第二章の考察でも述べたとおり、アブの牛舎内侵入防止のためのネット設置や、侵入したアブの吸血機会を減少させるための薬剤等の適切な使用方法などについても検証が必要である。本研究の結果から全国レベルでも吸血昆虫に留意すべきことが明らかになったことは、家畜衛生関係者にとって有用な知見となるとともに、これらの対策を推進することの動機付けにもなると思われた。

酪農場における「つなぎ飼いでない牛舎の採用」についても、第二章の結果と一致し、BLVの農場内伝播に関与する要因と判定された。したがって、第二章で述べたとおり、このような農場では、より積極的な対策が必要であり、BLV感染牛の特定と更新、そしてその分離飼育を推奨していくことが重要であると思われた。

一方、肉用繁殖農場では「子牛とその母牛以外の接触が可能であること」が農場内伝播リスク要因と判定された。これが成牛から子牛への感染によるものなのか、子牛から成牛への感染なのか、本調査で厳密に検証することはできないが、生物学的に考えても、さらに子牛同士が接触できることがリスク要因になっていない（ $P=0.77$ ）という状況証拠から推察すると、成牛から子牛への感染が主であるものと考えられた。いずれにしても、牛

舎形態と同様に，本リスク要因は不特定の牛との接触によるBLV伝播が助長されていると解釈することができる。したがって，年齢を問わず感染牛と非感染牛の分離飼育の重要性が示唆された。ここで，子牛の健康状態を良好に保つという観点から，母子分離を早期に行い，以降は初乳製剤等を用いた人工哺育に切り替える技術が注目されている(61)。早期の母子分離によって，子牛の下痢症の予防効果を示した報告もある(95)。母牛からのBLV曝露機会を減らすという観点においては，この手法は有用である可能性がある。しかしながら，肉用繁殖農場において早期母子分離を実施している農場は6.5%に留まっており（表3-1-2），実際のところ国内的にはほぼ実施されていない現状も考慮しなければならない。したがって，このリスク要因への対策としては，子牛とその母牛以外の成牛が接触できないような牛舎構造の工夫を検討すべきと考えられた。

本章では酪農場における「プール初乳の給与」がリスク要因として判定された。本調査の結果，約40%の酪農場でプール初乳が給与されていた現状（表3-1-2）から，給与中止を推進していくべきと思われた。プール初乳については既に由来の異なる初乳の希釈によって生じる質の低下や，ヨーネ病の原因菌であるヨーネ菌（*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*）等、他の病原体の伝播を助長するリスクが指摘されている(29, 70)。したがって，BLVに限らず，全般的に病原体伝播のリスク低減の観点から，プール初乳給与の中止は重要と考えられた。

BLVの農場間伝播に関与する共通のリスク要因は，牛の外部導入であった。一般的に，家畜の移動は伝染病の農場間伝播の重要なリスク要因の一つであり，この結果は妥当性が高いと思われた。酪農場の約80%，肉用繁殖農場の約60%が外部導入をしていることから（表3-1-1），BLV対策として導入時の着地検査の重要性が示唆された。預託のリスクは酪農場で有意

に高いことが示され、第一章での考察を補強する結果となった。預託先となる公共牧場等においては、入牧前の遺伝子検査によって預託牛を感染牛と非感染牛に区分し、これらを分けて飼育する分離放牧などが必要と考えられた。さらに、入牧時の非感染牛についてはこれらの退牧時に再検査を実施し、確実に非感染の状況を確認した上で由来農場へ返すことによって、預託によるBLV伝播のリスクをさらに減らすことができると思われた。一方、預託という自農場外での育成を飼養システムの一部として組み込んでいる農場において、これを中止させることは現実的ではない。したがって、預託実施農場については、預託先の候補となる農場に分離放牧等のBLV対策が行われている農場かどうか事前に確認し、対策が実施されている農場を選ぶようにすることも重要と思われた。

第二章と同様、既知のBLV伝播経路であるにも関わらず、有意な関連が認められなかった要因にも注意が必要である。例えば、直腸検査手袋の1頭1枚、注射針の1頭1針の遵守については、当然のこととして重要であるが、これらの要因については、遵守状況が非常に高かったことにより、応答変数に対する統計学的な有意性が特定できなかつたと考えられる。むしろ、本調査によって全国レベルでこれらの遵守率の高さが確認されたことの意義の方が大きい。一方、第二章同様、本研究は横断研究であることにも注意が必要である。しかしながら、得られた結果に対する解釈は生物学的にも妥当と考えられ、本章の結論としては、全国レベルでBLV対策の重点化が必要な数々の要因が明らかになり、その対策の一端を提言することができた。

小括

全国 47 都道府県の酪農場 563 戸，肉用繁殖農場 490 戸を対象に，農場ごとの抗体陽性頭数の分布の特徴を考慮し，ゼロ強調負の二項分布モデルによる多変量解析を用いて BLV の農場内伝播および農場間伝播に関与するリスク要因を評価した。結果として，酪農場では「つなぎ飼いでない牛舎であること（カウント比=1.19, P=0.03）」，「過去に牛白血病の発症牛の摘発があったこと（カウント比=1.39, P<0.0001）」，「プール初乳を給与すること（カウント比=1.14, P=0.05）」，および夏季の吸血昆虫に関し，「不在を参照水準とした際，少しいること（カウント比=1.95, P=0.004）」，および多くいること（カウント比=2.27, P=0.0004）」が，BLV の農場内伝播に関与するリスク要因と判定した。また，「牛の外部導入をすること（オッズ比=6.25, P<0.0001）」および「育成牛の預託をすること（オッズ比=2.56, P=0.003）」が BLV の農場間伝播に関与するリスク要因と判定した。

同様に肉用繁殖農場においては，「過去の牛白血病発症牛の摘発（カウント比=1.45, P=0.0003）」，「子牛のその母牛以外の成牛と接触ができること（カウント比=1.23, P=0.03）」，および夏季の吸血昆虫に関し，「不在に対して少しいること（カウント比=5.21, P=0.0002）」，および多いこと（カウント比=14.44, P=0.0002）」が農場内伝播に，「牛の外部導入をすること（オッズ比=2.27, P=0.002）」が，農場間伝播に関するリスク要因と判定した。

これらのことから，以下の対策が提言できる。すなわち，酪農場，肉用繁殖農場ともに発症牛が摘発された農場については，より積極的な対策を行う必要がある農場として，感染牛の早期更新および分離飼育を励行する，ネットや薬剤による吸血昆虫の侵入あるいは吸血防止を図る，さらに導入牛の導入前の遺伝子検査を実施することにより，万一感染牛であっても非

感染牛とは分けて飼育するようにすることによってBLVのまん延が効率的に防止できると思われた。これらに加えて，酪農場においてはプール初乳の給与を中止することが重要と思われた。預託が必要な農場においては，預託先としてBLV対策が組み込まれている農場を選び，預託先となる公共牧場などでは，感染牛と非感染牛を分離放牧するなどの対策を実施することにより，BLV伝播リスクを下げられる可能性がある。肉用繁殖農場においては，子牛は母牛以外に接触できないように牛舎の構造を工夫すると，よりBLV伝播リスクが下げられると考えられた。

以上から，本研究によって日本の酪農場および肉用繁殖農場それぞれにおけるBLV伝播に関するリスク要因が明らかにされ，効率的なBLVのまん延防止を図るための対策を提言することが可能となった。

図表

図 3-1-1 聞き取り調査で用いた調査票（おもて）

EBL全国調査農場情報	
牛白血病全国調査農場情報調査票	
県 _____ 家畜保健衛生所(担当: _____) 農場通し番号: _____	
農場住所(番地まで)	
飼養頭数	哺乳牛合計: _____頭 育成(離乳後～未経産)牛合計: _____頭(うち乳用牛♀: _____頭) 成牛合計: _____頭 その他(種類と頭数): _____
繁殖(搾乳)牛の更新方法	自家産のみ / 外部導入する (例年の年間導入頭数: _____頭)
農場全体の繁殖(搾乳)牛の例年の年間更新頭数と最頻廃用年齢	_____頭 _____歳
哺乳牛の預託	する / しない する場合、例年の年間預託頭数: _____頭
育成牛の預託	する / しない する場合、例年の年間預託頭数: _____頭
主たる牛舎方式	つなぎ飼い / つなぎ飼いでない / その他: _____
夏の牛周囲のアブ	多い / 少ない / いない <small>(目安) 多い: 普段牛体に留まっているのを確認できる状態、あるいはそれ以上 少ない: 牛周囲で飛んでいるのを時折目撃する程度</small>
夏～秋の牛周囲のサシバエ	多い / 少ない / いない (目安) 上記参照
除角	する / しない する場合、以下の項目も回答して下さい。 主たる方法(器具): _____ 器具の消毒 する / しない 牛の止血処置 する / しない
耳標装着時、牛の止血処置	する / しない
鼻環装着	する / しない する場合、牛の止血処置 する / しない
断尾	する / しない する場合、以下の項目も回答して下さい。 器具の消毒 する / しない 牛の止血処置 する / しない
獣医師等が複数頭直腸検査をする際の手袋	1頭1枚を順守 していると思う / していないと思う
獣医師等が複数頭注射をする際の注射器	1頭1針を順守 していると思う / していないと思う 1頭1筒を順守 していると思う / していないと思う
裏面へつづく	

図 3-1-2 聞き取り調査で用いた調査票（うら）

牛白血病全国調査農場情報調査票（つづき）	
新生牛とその母牛の同居期間	通常生後_____時間／日／月（単位を一つ選び数値記入）まで
初乳の給与について	
初乳を給与する【1】	はい / いいえ 「はい」の場合、以下の項目も回答して下さい。
給与前に処理を行う【2】	はい / いいえ
具体的処理内容(複数選択可):	加熱 / 凍結 / その他: _____
1頭の新生子牛に対して、複数頭からの初乳を給与することがある	はい / いいえ
<small>【1】:人工初乳のみ給与している場合は「いいえ」とする。 【2】:ウイルスを不活化させる目的に行う加熱や凍結など、単なる冷蔵、あるいは保乳の加温のための湯せんなどは含まない。また、新生子牛自身による母牛から直接給与する場合は「いいえ」に含める。</small>	
出生～哺育期間中、子牛は他の子牛に接触	できる / できない
出生～哺育期間中、子牛は成牛に接触	できる / できない
この農場での牛白血病の直近の発症年	西暦_____年 / 発症牛これまでなし
出荷された牛のと畜場における直近の牛白血病の摘発	西暦_____年 / 摘発牛これまでなし

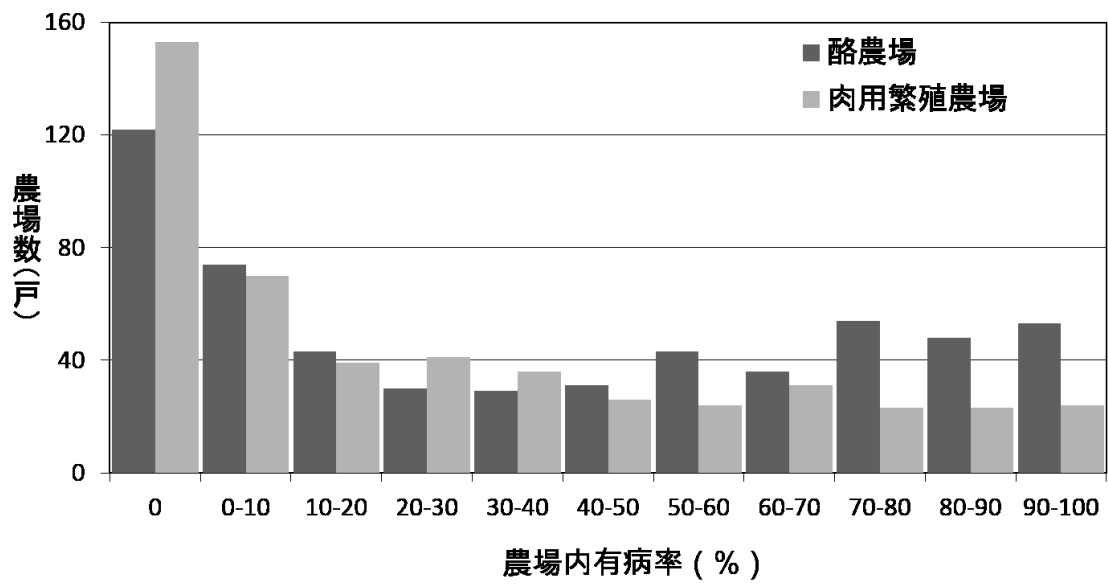


図 3-2 全国の酪農場 (n=563) と肉用繁殖農場 (n=490) の農場内有病率の分布

表 3-1-1 全国 47 都道府県の酪農場と肉用繁殖農場における飼養管理に関する聞き取り調査結果：農場の基本情報

調査項目	水準	酪農場		肉用繁殖農場	
		農場 (戸)	割合 (%)	農場 (戸)	割合 (%)
群サイズ*	小規模	150	26.6	157	32.0
	中規模	274	48.7	217	44.3
	大規模	139	24.7	116	23.7
成牛の年間更新割合**	低い	316	56.1	313	63.9
	高い	247	43.9	177	36.1
牛の外部導入	しない	235	22.0	108	41.7
	する	328	78.0	382	58.3
牛舎形態はつなぎ飼い	はい	446	79.2	197	40.2
	いいえ	117	20.8	293	59.8
過去 5 年以内の牛白血病 の発症摘発	なし	471	83.7	394	80.4
	あり	92	16.3	96	19.6
合計		563	-	490	-

*成牛頭数の中央値を考慮して設定した

酪農場：24 頭以下を「小規模」、25～54 頭を「中規模」、および 55 頭以上を「大規模」とした

肉用繁殖農場：20 頭以下を小規模、21～50 頭を「中規模」、および 51 頭以上を「大規模」とした

**更新割合の中央値を考慮して設定した

酪農場：20%未満を「低い」および 20%以上を「高い」とした

肉用繁殖農場：10%未満を「低い」および 10%以上を「高い」とした

表 3-1-2 全国 47 都道府県の酪農場と肉用繁殖農場における飼養管理に関する聞き取り調査結果：牛群の管理に関する項目

調査項目	水準	酪農場		肉用繁殖農場	
		農場 (戸)	割合 (%)	農場 (戸)	割合 (%)
子牛の誕生後早期分離	する	250	44.4	32	6.5
	しない	313	55.6	458	93.5
プール初乳給与	しない	341	60.6	437	89.2
	する	222	39.4	53	10.8
子牛同士の接触	不可	201	35.7	94	19.2
	可	362	64.3	396	80.8
子牛のその母牛以外の成 牛との接触	不可	475	84.4	201	41.0
	可	88	15.6	289	59.0
育成牛の預託	しない	394	70.0	456	93.1
	する	169	30.0	34	6.9
合計		563	-	490	-

表 3-1-3 全国 47 都道府県の酪農場と肉用繁殖農場における飼養管理に関する聞き取り調査結果：出血をとまなう衛生関連項目

調査項目	水準	酪農場		肉用繁殖農場	
		農場 (戸)	割合 (%)	農場 (戸)	割合 (%)
夏季の吸血昆虫	少ない	19	3.4	12	2.4
	中程度	243	43.2	200	40.8
	多い	301	53.5	278	56.7
除角	しない	118	21.0	167	34.1
	する	445	79.0	323	65.9
耳標装着時の消毒	する	42	7.5	40	8.2
	しない	512	92.5	450	91.8
鼻環の装着	しない	385	68.4	114	23.3
	する	178	31.6	376	76.7
断尾	しない	539	95.7	487	99.4
	する	24	4.3	3	0.6
直腸検査手袋の 1 頭 1 枚	する	452	80.3	458	93.5
遵守	しない	111	19.7	32	6.5
注射針の 1 頭 1 針遵守	する	549	97.5	473	96.5
	しない	14	2.5	17	3.5
合計		563	-	490	-

表 3-2-1 全国 47 都道府県の酪農場 (n=563) と肉用繁殖農場 (n=490) における
 ゼロ強調負の二項分布モデルによる単変量解析結果：カウント要素の変数 (その 1)

変数	水準	酪農場		肉用繁殖農場	
		カウント比	P 値	カウント比	P 値
群サイズ	小規模	参照		参照	
	中規模	1.03	0.71	0.83	0.09
	大規模	1.11	0.33	0.90	0.42
成牛の年間更新割合	低い	参照		参照	
	高い	0.99	0.94	1.03	0.78
牛の外部導入	しない	参照		参照	
	する	1.20	0.02*	1.21	0.13*
牛舎形態はつなぎ飼い	はい	参照		参照	
	いいえ	1.28	0.003*	0.95	0.61
過去 5 年以内の牛白血	なし	参照		参照	
病の発症摘発	あり	1.43	<0.0001*	1.48	0.0003*
子牛の誕生後早期分離	する	参照		参照	
	しない	1.02	0.77	1.25	0.29
プール初乳給与	しない	参照		参照	
	する	1.17	0.03*	0.96	0.81
子牛同士の接触	不可	参照		参照	
	可	1.07	0.38	0.96	0.77

各農場の検査頭数をオフセット項，地域を調整要因として強制投入して解析した

各解析の定数項は省略した

*が付された変数は多変量解析へ投入した

表 3-2-2 全国 47 都道府県の酪農場 (n=563) と肉用繁殖農場 (n=490) における
 ゼロ強調負の二項分布モデルによる単変量解析結果：カウント要素の変数 (その 2)

変数	水準	酪農場		肉用繁殖農場	
		カウント比	P 値	カウント比	P 値
子牛のその母牛以外の	不可	参照		参照	
成牛との接触	可	1	0.97	1.22	0.04*
育成牛の預託	しない	参照		参照	
	する	0.90	0.19	0.89	0.52
夏季の吸血昆虫	少ない	参照		参照	
	中程度	2.25	0.0006*	6.30	<0.0001*
	多い	2.59	<0.0001*	6.76	<0.0001*
除角	しない	参照		参照	
	する	0.99	0.88	0.98	0.88
耳標装着時の消毒	する	参照		参照	
	しない	0.90	0.43	1.07	0.71
鼻環の装着	しない	参照		参照	
	する	0.98	0.75	1.28	0.04*

各農場の検査頭数をオフセット項，地域を調整要因として強制投入して解析した

各解析の定数項は省略した

*が付された変数は多変量解析へ投入した

表 3-2-3 全国 47 都道府県の酪農場 (n=563) と肉用繁殖農場 (n=490) における
 ゼロ強調負の二項分布モデルによる単変量解析結果：カウント要素の変数 (その 3)

変数	水準	酪農場		肉用繁殖農場	
		カウント比	P 値	カウント比	P 値
断尾	しない	参照		参照	
	する	0.97	0.86	1.58	0.47
直腸検査手袋の 1 頭	する	参照		参照	
1 枚遵守	しない	0.96	0.66	1.27	0.19
注射針の 1 頭 1 針遵	する	参照		参照	
守	しない	0.86	0.51	1.05	0.86

各農場の検査頭数をオフセット項，地域を調整要因として強制投入して解析した

各解析の定数項は省略した

*が付された変数は多変量解析へ投入した

表 3-3 全国 47 都道府県の酪農場 (n=563) と肉用繁殖農場 (n=490) における

ゼロ強調負の二項分布モデルによる単変量解析結果：ロジスティック要素の変数

変数	水準	酪農場		肉用繁殖農場	
		オッズ比	P 値	オッズ比	P 値
牛の外部導入	なし	参照		参照	
	あり	5.58	<0.0001*	2.44	0.0006*
育成牛の預託	低い	参照		参照	
	高い	2.63	0.001*	0.98	0.97

各農場の検査頭数をオフセット項，地域を調整要因として強制投入して解析した

オッズ比はモデルから算出された値の逆数をとって表示した

各解析の定数項は省略した

*が付された変数は多変量解析へ投入した

表 3-4-1 全国 47 都道府県の酪農場 (n=563) におけるゼロ強調負の二項分布モデル

による多変量解析を用いた, BLV の農場内伝播に関与するリスク要因

カウント要素の変数

変数	水準	カウント比	カウント比の 95%信頼区間	P 値
牛舎形態はつなぎ飼い	はい	参照		
	いいえ	1.19	1.01, 1.39	0.03
過去 5 年以内の牛白血病 の発症摘発	なし	参照		
	あり	1.39	1.19, 1.63	<0.0001
プール初乳給与	しない	参照		
	する	1.14	0.99, 1.31	0.05
夏季の吸血昆虫の存在	いない	参照		
	少ない	1.95	1.25, 3.07	0.004
	多い	2.27	1.45, 3.56	0.0004
定数項		0.14	0.09, 0.22	<0.0001

各農場の検査頭数をオフセット項, 地域を調整要因として強制投入して解析した

表 3-4-2 全国 47 都道府県の酪農場 (n=563) におけるゼロ強調負の二項分布モデルによる多変量解析を用いた, BLV の農場間伝播に関与するリスク要因
ロジスティック要素の変数

変数	水準	オッズ比	オッズ比の 95%信頼区間	P 値
牛の外部導入	しない	参照		
	する	6.25	3.45, 11.11	<0.0001
育成牛の預託	しない	参照		
	する	2.56	1.39, 4.76	0.003
定数項		0.76	0.44, 1.28	0.300

各農場の検査頭数をオフセット項, 地域を調整要因として強制投入して解析した

オッズ比はモデルから算出された値の逆数をとって表示した

表 3-5-1 全国 47 都道府県の肉用繁殖農場 (n=490) におけるゼロ強調負の二項分布モデル

による多変量解析を用いた, BLV の農場内伝播に関与するリスク要因

カウント要素の変数

変数	水準	カウント比	カウント比の 95%信頼区間	P 値
過去 5 年以内の牛白血病 の発症摘発	なし	参照		
	あり	1.45	1.19, 1.76	0.0003
子牛のその母牛以外の成 牛との接触	不可	参照		
	可能	1.23	1.01, 1.50	0.03
夏季の吸血昆虫の存在	いない	参照		
	少ない	5.21	1.26, 12.58	0.0002
	多い	14.44	5.98, 34.88	0.0002
定数項		0.07	0.03, 0.16	P<0.0001

各農場の検査頭数をオフセット項, 地域を調整要因として強制投入して解析した

表 3-5-2 全国 47 都道府県の肉用繁殖農場 (n=490) におけるゼロ強調負の二項分布モデルによる多変量解析を用いた, BLV の農場間伝播に関与するリスク要因
ロジスティック要素の変数

変数	水準	オッズ比	オッズ比の 95%信頼区間	P 値
牛の外部導入	しない	参照		
	する	2.27	1.35, 3.85	0.002
定数項		1.74	0.92, 3.23	0.100

各農場の検査頭数をオフセット項, 地域を調整要因として強制投入して解析した

オッズ比はモデルから算出された値の逆数をとって表示した

総 括

牛白血病ウイルス（bovine leukemia virus, BLV）は、牛の体表および体腔内リンパ節の腫大、リンパ肉腫などを引き起こす地方病性牛白血病の原因ウイルスである。日本において地方病性牛白血病と原因不明の散発性白血病と合わせた牛白血病の発生頭数は 2012 年に 2,000 頭を超えており、農場経営への経済損失となることが大きな問題となっている。牛白血病のほとんどは地方病性牛白血病であると示唆されていることから、牛白血病発生数の減少のためには、BLV の浸潤状況を把握するとともに、感染拡大のリスク要因を明らかにし、それを踏まえた対策を実施していくことが重要である。そこで BLV の国内浸潤低減化のための対策立案に資するため、以下の研究を実施した。

第一章では、BLV の国内浸潤状況を把握することを目的として、全国血清疫学調査を実施した。搾乳牛および肉用繁殖牛の BLV の抗体陽性率はそれぞれ 40.9%および 28.7%と推定され、1980 年代と比べて BLV の国内感染が大幅にまん延したことを明らかにした。さらに、地域別および年齢別に評価すると、抗体陽性率は搾乳牛、肉用繁殖牛ともに北海道が最も低く、日本列島を南下するほど高い傾向を示し、高齢牛ほど高い傾向になることを明らかにした。以上から、国内で広くまん延した BLV 汚染を低減させるためには、効率的な農場レベルの対策を検討する必要があることが示された。

第二章では、BLV 農場内伝播に関与するリスク要因を明らかにすることを目的に、BLV 感染酪農場から得られたデータを分析した。これまで BLV 伝播に関する研究は、実験的環境での評価が主であったが、本研究では実際の生産農場データを複数の要因、交絡、農場差を考慮した混合ロジステ

ック回帰モデルによる多変量解析に供した。その結果，つなぎ飼いでないこと，夏季の吸血昆虫の存在，除角をすることがリスク要因，また，子牛に初乳を給与しないことに対して，母牛のみからの初乳を給与することが防御要因であることを示した。これらの結果から，つなぎ飼いでない農場に対しては BLV 伝播に関してより重点的な注意喚起を行い，分離飼育を励行する，除角時の確実な止血や，複数頭実施する際の器具の確実な洗浄や消毒を推奨する，アブの牛舎内侵入あるいは吸血阻止のための対策を検討する，そして加熱や凍結済みの初乳を給与することなどが，本調査で対象とした 7 県の酪農場での BLV まん延防止対策として重要であると考えられた。

第三章では，全国の BLV の農場内および農場間伝播に関与するリスク要因明らかにすることを目的に，第一章で対象とした酪農場および肉用繁殖農場の抗体検査結果と疫学情報を，第二章の解析手法を拡張して分析した。いずれの用途の農場も抗体陽性頭数の分散が平均値よりも大きく，かつ抗体陽性頭数が 0 頭の農場が最多であったため，ゼロ強調負の二項分布モデルによる多変量解析を実施した。その結果，農場内伝播に関与するリスク要因は，酪農場および肉用繁殖農場共通のものとして，過去に地方病性白血病の発症摘発があったこと，および夏季に吸血昆虫の存在であることを示した。さらに酪農場ではつなぎ飼いでないことおよびプール初乳の給与が，肉用繁殖農場では子牛とその母牛以外との自由な接触ができることもリスク要因であることを示した。農場間伝播に関与するリスク要因は，酪農場および肉用繁殖農場共通のものとして牛の外部導入が，さらに酪農場では育成牛の預託もリスク要因となっていた。これらのことから，酪農場，肉用繁殖農場ともに発症牛が摘発された農場についてはより積極的な対策を行う農場として認識し，分離飼育を励行する，ネットや薬剤による吸血昆

虫の侵入あるいは吸血防止を図る，また，導入牛に関しては導入前の検査を実施することにより，万一感染牛であっても非感染牛と分けて飼育することによって，BLVのまん延が効率的に防止できると考えられた。これらに加え，酪農場においてはプール初乳の給与を中止することが重要と思われた。預託が必要な農場においては，預託先としてBLV対策が実施されている農場を選び，預託先として牛を受け入れる公共牧場等では，感染牛と非感染牛を分離放牧するなどの対策を実施することが重要と考えられた。肉用繁殖農場においては，子牛は母牛以外に接触できないように牛舎の構造を工夫することも重要と思われた。

本研究によって，日本における搾乳牛と肉用繁殖牛のBLVのまん延の実態を明らかにするとともに，データ構造を考慮した各種多変量解析を用いることによって，BLV伝播に関与する農場内および農場間のリスク要因を明らかにすることができた。また，これらの結果から，日本におけるBLV浸潤の低減を効率的に推進するための対策を提言することができた。本研究成果は，日本の家畜衛生関係者が今後BLVのまん延防止対策の立案時に，有用な情報として活用することができる。今後，提言した各対策の効果に関して検証を加え，有効性を示すことによって，全国的なBLV対策がより推進されると期待できる。

謝 辞

本論文を終えるにあたり，内容に対するご校閲とご指導を賜りました国立大学法人岩手大学農学部共同獣医学科獣医微生物学研究室村上賢二教授，国立大学法人帯広畜産大学臨床獣医学研究部門予防獣医療学分野猪熊壽教授，国立大学法人岩手大学農学部共同獣医学科産業動物内科学研究室佐藤繁教授，国立大学法人東京農工大学農学部共同獣医学科獣医衛生学研究室竹原一明教授，国立大学法人岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科応用獣医学講座食品環境衛生学研究室猪島康雄准教授に深甚の謝意を表します。

また，本研究を遂行するにあたり，常に親身なご助言を賜りました国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所ウイルス・疫学研究領域長筒井俊之博士，同主任研究員山本健久博士をはじめとする先輩および同僚諸氏に謹んで感謝の意を表します。

最後に，本研究におけるそれぞれの疫学調査の実施に際し，研究プロジェクトを企画された農林水産省，調査にご協力された都道府県，そして情報提供にご同意いただいた農場の皆様に深謝いたします。

引用文献

- 1) 阿部亮. (2014). 畜産ファクトデータとその考察～酪農・乳牛の2牛乳の生産性と繁殖成績. 畜産の研究 68, 1097-1101.
- 2) Acaite, J., Tamosiunas, V., Lukauskas, K., Milius, J. and Pieskus, J. (2003). The eradication experience of enzootic bovine leukosis from Lithuania. *Prev. Vet. Med.* 82, 83-89.
- 3) Achachi, A., Florins, A., Gillet, N., Debaq, C., Urbain, P., Foutsop, G. M., Vandermeers, F., Jasik, A., Reichert, M., Kerkhofs, P., Lagneaux, L., Burny, A., Kettman, R. and Willems, L. (2005). Valproate activates bovine leukemia virus geneexpression, triggers apoptosis, and induces leukemia/lymphoma regression *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102, 10309–10314.
- 4) Bacon, L. D. (1987). Influence of the major histocompatibility complex on disease resistance and productivity. *Poult. Sci.* 66, 802-811.
- 5) Bech-Nielsen, S., Piper, C. E. and Ferrer, J. F. (1978). Natural mode of transmission of the bovine leukemia virus: role of bloodsucking insects. *Am. J. Vet. Res.* 39, 1089-1092.
- 6) Besser, T. E., Gay, C. C. and Pritchett, L. (1991). Comparison of three methods of feeding colostrum to dairy calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 198, 419-442.
- 7) Boris-Lawrie, K. and Temin, H. M. (1995). Genetically simpler bovine leukemia virus derivatives can replicate independently of Tax and Rex. *J. Virol.* 69, 1920-1924.
- 8) Brenner, J., Van-Haam, M., Savir, D. and Trainin, Z. (1989). The

- implication of BLV infection in the productivity, reproductive capacity and survival rate of a dairy cow. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 22, 299-305.
- 9) Broström, G. (2005). The gmmML Package. [Online]
<http://phase.hpcc.jp/mirrors/stat/R/CRAN/doc/packages/glmmML.pdf>
(Accessed Aug. 26, 2014)
- 10) Burny, A., Bruck, C., Cleuter, Y., Couez, D., Deschamps, J., Gregoire, D., Ghysdael, J., Kettmann, R., Mammerickx, M. and Marbaix, G. (1985). Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 52, 133-144.
- 11) Burny, A., Cleuter, Y., Kettmann, R., Mammerickx, M., Marbaix, G., Portetelle, D., van den Broeke, A., Willems, L. and Thomas, R. (1988). Bovine leukaemia: Facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Vet. Microbiol.* 17, 197-218.
- 12) Center for Epidemiology and Animal Health. (2008). APHIS Info Sheet. Bovine Leukosis Virus (BLV) on U.S. Dairy Operations, 2007. [Online]
http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07_is_BLV.pdf
(Accessed Apr. 25, 2014)
- 13) Debaq, C., Sanchez Alcaraz, M. T., Mortreux, F., Kerkhofs, P., Kettmann, R. and Willems, L. (2004). Reduced proviral loads during primo-infection of sheep by Bovine Leukemia virus attenuated mutants. *Retrovirology* 1, 31.
- 14) Department for Environment, Food & Rural Affairs. (2014). Summary Profile for enzootic bovine leucosis (EBL). [Online]

<http://archive.defra.gov.uk/foodfarm/farmanimal/diseases/vetsurveillance/profiles/documents/sp-eb1.pdf>

(Accessed 25.Apr, 2014)

- 15) DiGiacomo, R. F., Darlington, R. L. and Evermann, J. F. (1985). Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy calves by dehorning. *Can. J. Comp. Med.* 49, 340-342.
- 16) DiGiacomo, R. F., Hopkins, S. G., Darlington, R. L. and Evermann, J. F. (1987). Control of bovine leukosis virus in a dairy herd by a change in dehorning. *Can. J. Vet. Res.* 51, 542-544.
- 17) Dohoo, I., Martine, W. and Stryhn, H. (2012). Model-Building Strategies. *In: Methods in Epidemiologic Research.* pp. 401-428, VER Inc., Charlottetown.
- 18) Dong, C., Clarke, D. B., Yan, X., Khattak, A. and Huang, B. (2014). Multivariate random-parameters zero-inflated negative binomial regression model: an application to estimate crash frequencies at intersections. *Accid. Anal. Prev.* 70, 320-329.
- 19) Elizondo-Salazar, J. A. and Heinrichs, A. J. (2009). Feeding heat-treated colostrum to neonatal dairy heifers: Effects on growth characteristics and blood parameters. *J. Dairy Sci.* 92, 3265-3273.
- 20) Emanuelsson, U., Scherling, K. and Pettersson, H. (1992). Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 12, 121-131.
- 21) Erskine, R. J., Bartlett, P. C., Byrem, T. M., Render, C. L., Febvay, C. and Houseman, J. T. (2012). Herd-level determinants of bovine

- leukaemia virus prevalence in dairy farms. *J. Dairy Res.* 79, 445-450.
- 22) Erskine, R. J., Bartlett, P. C., Byrem, T. M., Render, C. L., Febvay, C. and Houseman, J. T. (2012). Association between bovine leukemia virus, production, and population age in Michigan dairy herds. *J. Dairy Sci.* 95, 727-734.
- 23) Farm biosecurity. (2011). Australia's dairy herd close to EBL eradication. [Online]
<http://www.farmbiosecurity.com.au/files/2011/05/Australia%E2%80%99s-dairy-herdclose-to-EBL-eradication.pdf>
(Accessed 25. Apr, 2012)
- 24) Ferrer, J. F., Marshak, R. R., Abt, D. A. and Kenyon, S. J. (1978). Persistent lymphocytosis in cattle: Its cause, nature and relation to lymphosarcoma. *Ann. Rech. Vet.* 9, 851-857.
- 25) Ferrer, J. F., Marshak, R. R., Abt, D. A. and Kenyon, S. J. (1979). Relationship between lymphosarcoma and persistent lymphocytosis in cattle: A review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 175, 705-708.
- 26) Ferrer, J. F. (1980). Bovine lymphosarcoma. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 24, 1-68.
- 27) Ferrer, J. F., Kenyon, S. J. and Gupta, P. (1981). Milk of dairy cows frequently contains a leukemogenic virus. *Science* 213, 1014-1016.
- 28) Gillet, N., Florins, A., Boxus, M., Burteau, C., Nigro, A., Vandermeers, F., Balon, H., Bouzar, A. B., Defoiche, J., Burny, A., Reichert, M., Kettman, R. and Willems L. (2007). Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: Prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology* 4, 18.

- 29) Godden, S. (2008). Colostrum management for dairy calves. *Vet. Clin. N. Am.: Food Anim. Pract.* 24, 19-39.
- 30) Greene, W. H. (1994). Accounting for excess zeros and sample selection in poisson and negative binomial regression models. NYU Working Paper No. EC-94-10. [Online]
http://papers.ssrn.com/sol3/Delivery.cfm/2451_26263.pdf?abstractid=1293115&mirid=1
(Accessed 14 Sep, 2014)
- 31) Hayama, Y., Muroga, N., Nishida, T., Kobayashi, S. and Tsutsui, T. (2012). Risk factors for local spread of foot-and-mouth disease, 2010 epidemic in Japan. *Res. Vet. Sci.* 93, 631-635.
- 32) Himsworth, C. G., Parsons, K. L., Feng, A. Y., Kerr, T., Jardine, C. M. and Patrick, D. M. (2014). A mixed methods approach to exploring the relationship between Norway rat (*Rattus norvegicus*) abundance and features of the urban environment in an inner-city neighborhood of Vancouver, Canada. *PLoS One* 15, e97776.
- 33) Hopkins, S. G., Evermann, J. F. and DiGiacomo, R. F., Parish, S. M., Ferrer, J. F., Smith, S. and Bangert, R. L. (1988). Experimental transmission of bovine leukosis virus by simulated rectal palpation. *Vet. Rec.* 122, 389-391.
- 34) Hopkins, S. G., DiGiacomo, R. F., Evermann, J. F., Christensen, J. D., Deitelhoff, D. P. and Mickelsen, W. D. (1991). Rectal palpation and transmission of bovine leukemia virus in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199, 1035-1038.
- 35) Hopkins, S. G. and DiGiacomo, R. F. (1997). Natural transmission of

- bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 13, 107-128.
- 36) Huber, N. L., DiGiacomo, R. F., Evermann, J.F. and Studer, E. (1981). Bovine leukemia virus infection in a large Holstein herd: Prospective comparison of production and reproductive performance in antibody-negative and antibody-positive cows. *Am. J. Vet. Res.* 42, 1477-1481.
- 37) Ito, T. (1987). Statistics on regional prevalence of gp antibody against bovine leukosis virus in Japan. *Bull. Natl. Inst. Anim. Health.* 90, 35-60.
- 38) Jackman, S. (2012). Package pscl. [Online]
<http://cran.r-project.org/web/packages/pscl/pscl.pdf>
(Accessed Aug. 26, 2014)
- 39) Jacobs, R. M., Song, Z., Poon, H., Heeney, J. L., Taylor, J. A., Jefferson, B., Vernau, W. and Valli, V. E. (1992). Proviral detection and serology in bovine leukemia virus-exposed normal cattle and cattle with lymphoma. *Can. J. Vet. Res.* 56, 339-348.
- 40) Jones, L. R., Taylor, A. W. and Hines, H. C. (1987). Characteristics of frozen colostrum thawed in a microwave oven. *J. Dairy Sci.* 70, 1941-1945.
- 41) 獣医疫学会. (2011). 因果関係の判定. *In: 獣医疫学－基礎から応用まで－〈第二版〉*. pp. 66-67, 近代出版, 東京.
- 42) 獣医疫学会. (2011). 横断研究. *In: 獣医疫学－基礎から応用まで－〈第二版〉*. pp. 35-40, 近代出版, 東京.
- 43) Kanno, T., Ishihara, R., Hatama, S., Oue, Y., Edamatsu, H., Konno, Y., Tachibana, S. and Murakami, K. (2014). Effect of freezing treatment on

- colostrum to prevent the transmission of bovine leukemia virus. *J. Vet. Med. Sci.* 76, 255-257.
- 44) 家畜改良センター. (2015). 牛の個体識別情報検索サービス. [Online]
<https://www.id.nlbc.go.jp/top.html>
- 45) Kerkhofs, P., Gatot, J. S., Knapen, K., Mammerickx, M., Burny, A., Portetelle, D., Willems, L. and Kettmann, R. (2000). Long-term protection against bovine leukaemia virus replication in cattle and sheep. *J. Gen. Virol.* 81, 957-963.
- 46) Kettmann, R., Meunier-Rotival, M., Cortadas, J., Cuny, G., Ghysdael, J., Mammerickx, M., Burny, A. and Bernardi, G. (1979). Integration site of bovine leukemia virus DNA in the bovine genome [proceedings]. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 87, 818-819.
- 47) Kettmann, R., Meunier-Rotival, M., Cortadas, J., Cuny, G., Ghysdael, J., Mammerickx, M., Burny, A. and Bernardi, G. (1979). Integration of bovine leukemia virus DNA in the bovine genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4822-4826.
- 48) Kettmann, R., Cleuter, Y., Mammerickx, M., Meunier-Rotival, M., Bernardi, G., Burny, A. and Chantrenne, H. (1980). Genomic integration of bovine leukemia provirus: Comparison of persistent lymphocytosis with lymph node tumor form of enzootic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 2577-2581.
- 49) Kettmann, R., Burny, A., Callebaut, I., Droogmans, L., Mammerickx, M., Willems, L. and Portetelle, D. (1994). Bovine Leukemia Virus. *In: Levy, J.* [ed], *The Retroviridae*. pp. 39-81, Plenum Press, New York.

- 50) Kettle, D. S. *Tabanidae* (Horseflies, Deer Flies, Clegs). (1995). *In*: Kettle, D. S. [ed], *Medical and Veterinary Entomology* 2nd edition. pp. 211-224, CABI Publishing, Wallingford, Oxon.
- 51) Kobayashi, S., Tsutsui, T., Yamamoto, T. and Nishiguchi, A. (2007). Epidemiologic indicators associated with within-farm spread of Johne's disease in dairy farms in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 69, 1255-1258.
- 52) Kono, Y., Sentsui, H., Miyamoto, T., Morozumi, K. and Sakamoto, Y. (1982). Changes in antibody titers in cattle infected clinically and subclinically with bovine leukemia virus. *Int. J. Cancer* 30, 655-657.
- 53) Kono, Y., Sentsui, H., Arai, K., Ishida, H. and Irishio, W. (1983). Contact transmission of bovine leukemia virus under insect-free conditions. *Jpn. J. Vet. Sci.* 45, 79-82.
- 54) 久保拓弥. (2012). GLMの応用範囲を広げるーロジスティック回帰などー. *In*: データ解析のための統計モデリング入門. pp. 113-142, 岩波書店, 東京.
- 55) Lassauzet, M. L., Johnson, W. O., Thurmond, M. C. and Stevens, F. (1989). Protection of colostrum antibodies against bovine leukemia virus infection in calves on a California dairy. *Can. J. Vet. Res.* 53, 424-430.
- 56) Lassauzet, M. L., Thurmond, M. C., Johnson, W.O., Stevens, F. and Picanso, J. P. (1990). Effect of brucellosis vaccination and dehorning on transmission of bovine leukemia virus in heifers on a California dairy. *Can. J. Vet. Res.* 54, 184-189.
- 57) Lassauzet, M. L., Thurmond, M. C., Johnson, W.O., Stevens, F. and Picanso, J. P. (1991). Factors associated with transmission of bovine

- leukemia virus by contact in cows on a California dairy. *Am. J. Epidemiol.* 133, 164-176.
- 58) Manet, G., Guilbert, X., Roux, A., Vuillaume, A. and Parodi, A. L. (1989). Natural mode of horizontal transmission of bovine leukemia virus (BLV): the potential role of tabanids (*Tabanus* spp.). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 22, 255-263.
- 59) Martin, S. W., Meek, A. L. and Willeberg, R. (1987). Sampling Methods. *In: Martin, S. W., Meek, A. L. and Willeberg, R. [eds], Veterinary Epidemiology.* pp. 22-47, Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- 60) Mathur, M. R., Tsakos, G., Millett, C., Arora, M. and Watt, R. (2014). Socioeconomic inequalities in dental caries and their determinants in adolescents in New Delhi, India. *BMJ Open.* e006391.
- 61) 松田敬一. (2006). 黒毛和種子牛における下痢症の免疫学的な病態の解析と予防に関する研究. *日本家畜臨床学会誌* 29, 78-87.
- 62) Meylan, M., Rings, D. M., Shulaw, W. P., Kowalski, J. J., Bech-Nielsen, S. and Hoffsis, G. F. (1996). Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* and preservation of immunoglobulin G in bovine colostrum under experimental conditions simulating pasteurization. *Am. J. Vet. Res.* 57, 1580-1585.
- 63) Michel, P. and Vaillancourt, J. P. (1999). Risk factor. *In: Toma, B., Vaillancourt, J. P., Dufout, B., Eloit, M., Moutou, F., Marsh, W., Benet, J. J., Sanaa, M. and Michel, P. [eds], Dictionary of veterinary epidemiology.* p.229, Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- 64) Miller, J. M., Miller, L. D., Olson, C. and Gillette, K. G. (1969). Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures

- with reference to bovine lymphosarcoma. J. Natl. Cancer Inst. 43, 1297-1305.
- 65) Ministry of Agriculture and Forestry. (2011). Reports from industry surveillance and disease control programmes: New Zealand dairy enzootic bovine leukosis (EBL) control scheme. Surveillance 38, 37-38.
- 66) Muller, L. D. and Ellinger, D. K. (1981). Colostral immunoglobulin concentrations among breeds of dairy cattle. J. Dairy Sci. 64, 1727-1730.
- 67) Murakami, K., Kobayashi, S., Konishi, M., Kameyama, K., Yamamoto, T. and Tsutsui, T. (2011). The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among Japanese cattle. Vet. Microbiol. 148, 84-88.
- 68) Muroga, N., Kobayashi, S., Nishida, T., Hayama, Y., Kawano, T., Yamamoto, T. and Tsutsui, T. (2013). Risk factors for the transmission of foot-and-mouth disease during the 2010 outbreak in Japan: a case-control study. BMC Vet. Res. 9, 150.
- 69) Nagy, D. W., Tyler, J. W. and Kleiboeker, S. B. (2007). Decreased periparturient transmission of bovine leukosis virus in colostrum-fed calves. J. Vet. Intern. Med. 21, 1104-1107.
- 70) Nielsen, S. S., Bjerre, H. and Toft, N. (2008). Colostrum and milk as risk factors for infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle. J. Dairy Sci. 91, 4610-4615.
- 71) Nishiguchi, A., Kobayashi, S., Yamamoto, T., Ouchi, Y., Sugizaki, T. and Tsutsui, T. (2007). Risk factors for the introduction of avian influenza virus into commercial layer chicken farms during the outbreaks caused by a low-pathogenic H5N2 virus in Japan in 2005.

- Zoonoses Public Health 54, 337-343.
- 72) 農林水産省. (2014). 監視伝染病の発生状況. [Online]
http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/kansi_densen.html
(Accessed Aug. 26, 2014)
- 73) 農林水産省. (2015). 畜産統計調査. [Online]
<http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tikusan/>
(Accessed Apr. 17, 2015)
- 74) Nuotio, L., Rusanen, H., Sihvonen, L. and Neuvonen, E. (2003).
Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland. Prev. Vet. Med.
59, 43-49.
- 75) Office International des Epizootie (OIE, The World Organization for
Animal Health). (2001). Denmark. [Online]
ftp://ftp.oie.int/SAM/2001/DNK_A.pdf
(Accessed Aug. 26, 2014)
- 76) Office International des Epizooties (OIE, The World Organization for
Animal health) (2012). CHAPTER 2.4.11. Enzootic bovine leucosis.
Terrestrial Manual. [Online]
http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.04.11_EBL.pdf
(Accessed Aug. 26, 2014)
- 77) Ohshima, K., Okada, K., Numakunai, S., Yoneyama, Y., Sato, S. and
Takahashi, K. (1981). Evidence on horizontal transmission of bovine
leukemia virus due to blood-sucking tabanid flies. Jpn. J. Vet. Sci. 43,
79-81.
- 78) 岡野彰. (1994). 黒毛和種雌ウシにおける生涯子ウシ生産性ならび

- に胎子発育に関する研究. *J. Reprod. Dev.* 40, 117-129.
- 79) Ott S. L., Johnson, R. and Wells, S. J. (2003). Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herdlevel productivity on US dairy farms. *Prev. Vet. Med.*, 61, 249-262.
- 80) Porta, M. (2000). Epidemiology. *In: Porta, M. [ed] 日本疫学会 訳疫学辞典第5版*. pp. 106-107, 財団法人 日本公衆衛生協会, 東京.
- 81) Porta, M. (2000). Interaction. *In: Porta, M. [ed] 日本疫学会 訳疫学辞典第5版*. p. 171, 財団法人 日本公衆衛生協会, 東京.
- 82) Porta, M. (2000). Cross-sectional study. *In: Porta, M. [ed] 日本疫学会 訳疫学辞典第5版*. pp. 74-75, 財団法人 日本公衆衛生協会, 東京.
- 83) Porta, M. (2000). Confounding. *In: Porta, M. [ed] 日本疫学会 訳疫学辞典第5版*. p. 65, 財団法人 日本公衆衛生協会, 東京.
- 84) Porta, M. (2000). Multivariate analysis. *In: Porta, M. [ed] 日本疫学会 訳疫学辞典第5版*. p. 212, 財団法人 日本公衆衛生協会, 東京.
- 85) Porta, M. (2000). Overfitting. *In: Porta, M. [ed] 日本疫学会 訳疫学辞典第5版*. p. 230, 財団法人 日本公衆衛生協会, 東京.
- 86) R Core Team. (2007). R: A language and environment for statistical computing. [Online]
<http://www.R-project.org/>.
(Accessed Mar. 21, 2008)
- 87) R Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. [Online]
<http://www.R-project.org/>.
(Accessed Sep. 3, 2013)
- 88) Pritchett, L. C., Gay, C. C., Besser, T. E. and Hancock, D. D. (1991).

- Management and production factors influencing immunoglobulin G1 concentration in colostrum from Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 74, 2336-2341.
- 89) Scott, H. M., Sorensen, O., Wu, J. T., Chow, E. Y., Manninen, K. and VanLeeuwen, J. A. (2006). Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, *Neospora caninum*, bovine leukemia virus, and bovine viral diarrhea virus infection among dairy cattle and herds in Alberta and agroecological risk factors associated with seropositivity. *Can. Vet. J.* 47, 981-991.
- 90) Sorge, U. S., Lissemore, K., Cantin, R. and Kelton, D. F. (2011). Milk ELISA status for bovine leukosis virus infection is not associated with milk production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94, 5062-5064.
- 91) 宗村佳子, 小川仁, 杉山恵美, 藤川浩, 村上賢二. (2014). 東京都におけると畜牛の地方病性牛白血病発生状況と牛白血病ウイルス浸潤状況. *日獣会誌.* 67, 523-528.
- 92) Somura, Y., Sugiyama, E., Fujikawa, H. and Murakami, K. (2014). Comparison of the copy numbers of bovine leukemia virus in the lymph nodes of cattle with enzootic bovine leukosis and cattle with latent infection. *Arch. Virol.* 159, 2693-2497.
- 93) Thurmond, M. C., Carter, R. L., Puhr, D. M., Burr ridge, M. J., Miller, J. M., Schmerr, M. J. and van der Maaten, M. J. (1983). An epidemiological study of natural in utero infection with bovine leukemia virus. *Can. J. Comp. Med.* 47, 316-319.
- 94) Tiwari, A., VanLeeuwen, J. A., Dohoo, I. R., Stryhn, H., Keefe, G. P. and Haddad, J. P. (2005). Effects of seropositivity for bovine leukemia

- virus, bovine viral diarrhea virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* on culling in dairy cattle in four Canadian provinces. *Vet. Microbiol.* 109, 147-158.
- 95) 豊田洋治, 杉山美恵子, 藤本学, 宮本一, 山本栄子, 伊原晴喜, 久枝啓一. (1995). 黒毛和種の下痢症に対する人工哺乳の効果. *家畜診療* 390, 29-33.
- 96) USDA/APHIS/Veterinary Services. (1997). High prevalence of BLV in US dairy herds. [Online]
http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy96/Dairy96_is_BLV.pdf
(Accessed Aug. 26, 2014)
- 97) USDA/APHIS/Veterinary Services. (1999). Bovine leukosis virus (BLV) in US beef cattle. [Online]
http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/beefcowcalf/download/s/beef97/Beef97_is_BLV.pdf
(Accessed Aug. 26, 2014)
- 98) van der Maaten, M. J., Miller, J. M. and Schmerr, M. J. (1981). Effect of colostral antibody on bovine leukemia virus infection of neonatal calves. *Am. J. Vet. Res.* 42, 1498-1500.
- 99) van der Maaten, M. J., Miller, J. M. and Schmerr, M. J. (1981). In utero transmission of bovine leukemia virus. *Am. J. Vet. Res.* 42, 1052-1054.
- 100) Vanleeuwen, J. A., Haddad, J. P., Dohoo, I. R., Keefe, G. P., Tiwari, A. and Tremblay, R. (2010). Associations between reproductive performance and seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral diarrhea virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and

- Neospora caninum* in Canadian dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 94, 54-64.
- 101) Vuong, Q. (1989). Likelihood ratio tests for model selection and non-nested hypotheses. *Econometrica* 57, 307-333.
- 102) Zuur, A. F., Ieno, E. N., Walker, N. J., Saveliev, A. A. and Smith, G. M. (2009). Zero-Truncated and Zero-Inflated Models for Count Data. *In: Zuur, A. F., Ieno, E. N., Walker, N. J., Saveliev, A. A. and Smith, G. M. [eds]. Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R.* pp. 261-294, Springer, New York.