

### 3 野外における牛白血病ウイルスの感染動態と分離飼育による感染予防効果の検証

県央家畜保健衛生所  
 濱谷景祐、齋藤俊哉、芝田周平  
 県北家畜保健衛生所  
 米山州二

はじめに

牛白血病は、体表リンパ節及び体腔内リンパ節の腫大などの異常を示す疾病で、地方病性（成牛型）牛白血病（EBL）と散発型牛白血病に分類される。散発型の発生原因は未だ不明であるが、EBLは牛白血病ウイルス（BLV）の感染により引き起こされる腫瘍性疾病である<sup>1)</sup>。1998年以降、届出が義務付けられたため、近年の急激な発生増加が明らかになっている（図1）。

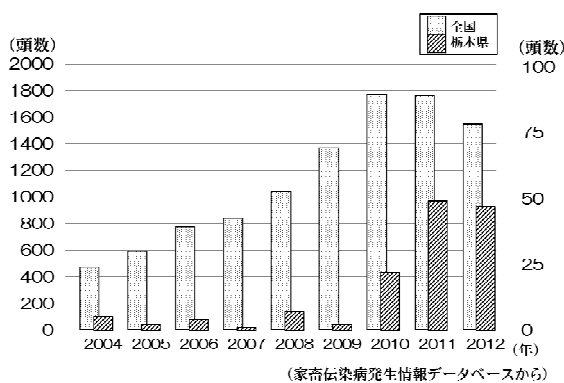


図1 近年の牛白血病届出頭数の推移

我が国における1980年代の全国調査では、寒天ゲル内沈降反応（AGID）による抗体陽性率は、1980年及び1982年にそれぞれ、乳牛で3.7%及び4.2%、肉牛では7.4%及び6.0%であった<sup>2)</sup>。Murakamiら<sup>3)</sup>が2007年に全国の7県、約200農場を対象に抗体調査を行ったところ、平均抗体陽性率は28%であり、乳用

牛は35%、肉用牛は12%であった。また、近年全国的にBLV抗体の陽性率が高い農家が存在している。栃木県でも、阿部ら<sup>4)</sup>の報告で、19戸2031頭の抗体検査を実施したところ、BLVの平均抗体陽性率は68.9%であり、60%以上の高い陽性率の農場が、14戸あったことが報告されている。このような高度汚染農場では、感染牛の更新は経済的にも困難であり、BLV清浄化の見通しが立たない現状がある。よって、現実的かつ効果的なBLV清浄化対策の提示が求められている。

今回、2酪農家において、感染牛更新の優先順位付けと、より効果的かつ農家の経営実態に合わせた水平感染の予防を目的とし、末梢血中のプロウイルス遺伝子量に着目したBLVの感染動態を調査するとともに、BLV感染牛を同一の牛舎内で一部分離飼育することによるBLV感染予防効果を検証したので、その概要を報告する。

#### 材料と方法

当所管内酪農家の中から、つなぎ牛舎で、搾乳牛約30頭を飼養し、BLV抗体陽性率が約50%のA及びB農場を選定した。調査は、平成23年2月から平成24年11月までの2年間実施した。採材は、年に3回（2～3月：冬、6～7月：夏、10～11月：秋）、飼養牛の血液を採取した。得られた血清は、牛白血病

ELISA キット (JNC) による BLV 抗体の検出に用いた。また、EDTA 添加血液は、白血球数及びリンパ球数を測定後、末梢血単核球を塩化アンモニウム法により単離し、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) により DNA を抽出した。抽出 DNA は、まず nested-PCR (Cristopher, J et al) を行い、ELISA 検査陰性牛及び BLV 抗体陽性牛の BLV 遺伝子の有無を調べた。また、ELISA 検査陽性牛については、抽出 DNA の遺伝子量を Nano-drop により測定後、20ng/ul となるよう希釈調整し、BLV 検出キット (TAKARA) を用いたリアルタイム PCR (rPCR) を行い、それぞれの血中プロウイルス遺伝子量 (/10ngDNA) を測定した。

検査の結果、BLV 抗体陽性かつ nested-PCR 陽性の個体を感染牛とし、さらに rPCR により血中プロウイルス遺伝子量が 1,000 コピー /10ngDNA 以上を示した個体を高コピー牛と定義した。

なお、平成 23 年は対照期間とし、農場の感染動態を把握するため、通常飼育の状態のまま、各農場の牛舎内における感染状況を調査した。さらに、翌年の試験期間 (平成 24 年) は、BLV 感染予防対策として、A 農場では非感染牛と高コピー牛のみを隣接させないように配置させ、B 農場では同一牛舎内で感染牛と非感染牛を分離して飼育することで、各農場における感染予防対策の効果を検証した。

### 結果

農場陽性率の推移を見ると、対照期間中は、両農場ともに陽性率が上昇し続けた。また、試験期間中は、始めは両農場ともに陽性率が低下したが、A 農場では 5 頭の陽転牛が確認された秋に陽性率が上昇し、B 農場では緩やかに低下し続けた (図 2)。

対照期間中に確認された陽転牛は、A 農場で夏 1 頭、秋 2 頭 (陽転率 9.8%)、B 農場で秋 2 頭 (陽転率 22.2%) であった。前述の陽転牛 5 頭のうち 4 頭 (90%) は、高コピー牛に隣接していた。一方、試験期間中の陽転率は、A 農場では 35.7% (秋 5 頭) と対照期間よりも上昇したが、B 農場では、11.5% (夏 2 頭、秋 1 頭) と低下した (図 3)。

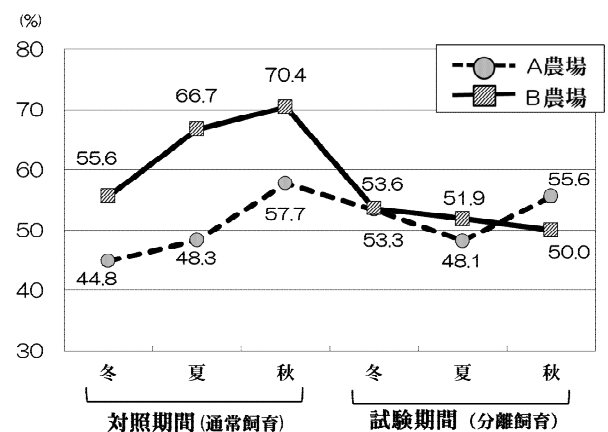


図 2 農場陽性率の推移

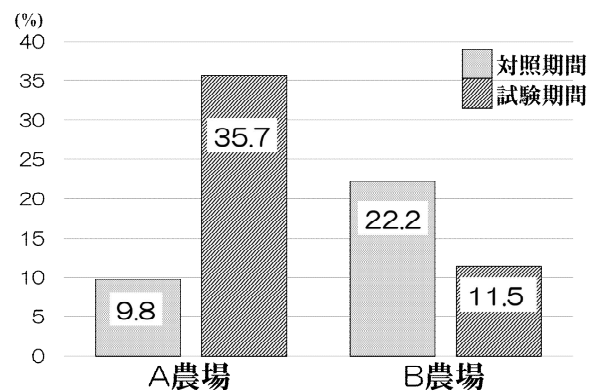


図 3 農場ごとの陽転率

なお、対照期間及び試験期間をとおして、両農場での冬季採材では、陽転牛は確認されなかった。また、陽転牛が確認された際の農場内における牛の配置については以下のとおりであった (図 4、5)。

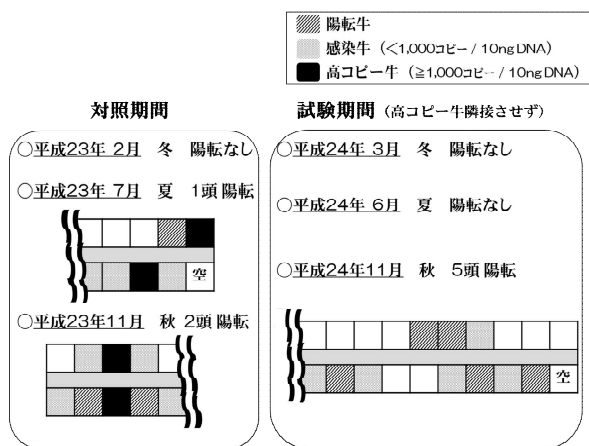


図4 牛の配置図 (A農場)

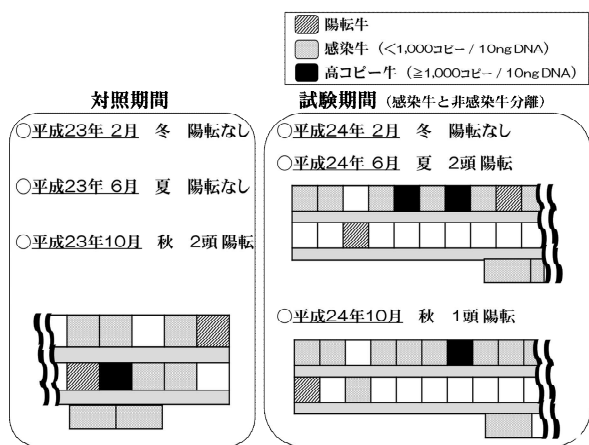


図5 牛の配置図 (B農場)

### 考察

BLV の伝播様式は、水平伝播が主であり、夏季放牧期間中に伝播が多いこと、感染牛との物理的接近が必要なこと、1 $\mu$ l の血液で感染が成立することなどの条件から、吸血昆虫による機械的伝播が証明されている<sup>5)</sup>。今回、両農場における陽転牛は夏及び秋の採材時のみに認められたことから、牛舎内でも吸血昆虫を介したBLVの伝播が高率に発生していることが推測された。また、竹田ら<sup>6)</sup>は、舎飼牛舎において、冬季を挟んだ陽転率の方が夏季を挟んだ陽転率より高かったと報告し、その原因について、機械的伝播や接触感染によ

る可能性を示唆している。しかし、本試験では冬季の陽転が認められなかった。この理由として、対象農場がつなぎ飼い牛舎であり、接触感染を抑制できたためではないかと推察した。

さらに、高コピー牛については、5頭中4頭の陽転牛に隣接した位置で飼育されており、感染源としてリスクが高いことが示唆され、血中プロウイルス遺伝子量は清浄化に向けた優先的とう汰基準として有用と考えられた。三村ら<sup>7)</sup>の報告では、BLV発症牛のコピー数は、未発症の感染牛より有意に高かったことから、遺伝子量と発症の関連の可能性を述べている。今後、遺伝子量と発症との関連性が証明され、感染リスクに加えて発症リスクも高いことが判明すれば、rPCRによる検査はより現場で有用なものになると思われる。現状では、rPCRは検査コスト面での負担が大きいため、リンパ球に着目した診断指標の一つである「Bendixenの鍵」<sup>8)</sup>や、ELISAによる抗体検査等も含めて、農場ごとに有効な方法を模索する必要がある。

また、対照期間に両農場で上昇し続けた陽性率は、分離飼育を実施後、A農場では上昇したものの、B農場では低下し続けたことや、陽転率も抑えられたことから、今回リスクが高いと示唆された高コピー牛を分離飼育するだけではなく、全ての感染牛を分離飼育することが、本病の感染予防に効果がある可能性がある。

両農場は、BLV抗体陽性率が50%と高い状況であったが、BLV対策に意欲的で、注射針1頭1針使用の原則、直腸検査用手袋の1頭ごとの交換、除角器の1頭ごとの消毒、初乳対策の実施などの基本的なBLV感染予防対策に積極的に取り組んでいた。それぞれ実施し

ている対策の効果として、感染母牛から子牛を守ることができていることも本調査で判明している。Kobayashi ら<sup>9)</sup>の BLV の群内抗体陽性率に關与する飼養要因の多変量解析結果によると、つなぎ飼いでない、除角を実施する、夏季のアブが非常に多いという3つの要因が危険因子と評価されている。両農場では、非感染育成牛が搾乳牛群に入った後に、感染が成立するケースが主であるので、まずは關与が推測された吸血昆虫の発生状況調査を行うことが重要であると考えている。また、すでに吸血昆虫対策として有効な方法も報告されていることから<sup>10)</sup>、その対策等の併用についても検討する予定である。今後も、感染動態調査を継続しながら、分離飼育による BLV 感染予防効果を引き続き検証し、野外における BLV 清浄化モデルの確立を目指したい。(本発表は農林水産省の委託事業である、平成 22 年度レギュラトリーサイエンス新技術開発事業の研究成果である。)

#### 参考文献

- 1) 村上賢二ら. (2009) 日獣会誌, 62:499～502. 我が国の地方病性牛白血病の発生動向と対策
- 2) 伊藤全. (1987) 牛白血病ウイルス抗体保有状況全国調査. 家畜衛試研究報告, 90:35～60.
- 3) Murakami K. et al. (2011) *Veterinary Microbiology*, 148: 84-88
- 4) 阿部ら. (2011) 第 53 回栃木県家畜保健衛生業績発表会集録, 演題 7. 33～37
- 5) 小山弘之ら. (2004) 動物の感染症. 清水悠紀臣他編. 2 刷. 115-117. 近代出版.
- 6) 竹田博ら. (2008) 第 56 回北海道家畜保健衛生業績発表会集録. 演題 1. 牛白血病発生農場における疫学調査に基づく清浄化対策の検討について
- 7) 三村純一郎ら. (2012) 食品衛生監視員・と畜食鳥検査員・狂犬病予防員研究発表会. リアルタイム PCR を用いた血中における BLV 遺伝子の定量とその考察
- 8) Bendixen, H. J. (1960) Untersuchungen ber die Rinderleukose in D nemark. II .Pathogenese und Enzootologie. Dtsch. tier Arztl. Wschr 67:57～63
- 9) Kobayashi et al. (2010) *BMC Veterinary Research*, 6:1
- 10) 平田統一ら. (2011) 日本畜産学会大会講演要旨. 114. 196 ETB 剤噴霧による吸血昆虫媒介性牛白血病ウイルス伝搬防除の効果—パドック牛との比較—