5　牛白血病ウイルス感染牛の血中プロウイルス遺伝子量とリンパ球数の変動

県央家畜保健衛生所
米山　州二、大竹　祥紘
県南家畜保健衛生所
濱谷　景祐

はじめに

地方病性牛白血病 (EBL) は、牛白血病ウイルス (BLV) 感染を原因とする疾病で、感染牛は長い潜伏期間を経た後、1.2～1.4%が致死性の悪性腫瘍に進行する[1)]。近年、我が国における牛白血病の発生数は増加の一途にあり、特に食肉センターでの摘発率の上昇から、枝肉廃棄による経済損失は深刻な状況である[2)]。2009～2011 年に行われた全国サーベイランスでは、BLV 抗体陽性率は 35.2%と、BLV は既に国内牛群に幅広くまん延していることが判明し[3)]、飼養牛の感染率が 50%以上の農場も少なくない[4、5)]。こうした状況の中、短期間に感染牛の摘発とう汰のみで農場清浄化を進めることは経済的負担が大きく、可能な限り農場内での感染を抑えながら、中長期的に感染牛を減少させていく手法が求められている。

従来から BLV 感染牛のうち、周囲にウイルスを伝播させやすい牛が存在することが知られている。こうした高い伝播リスクを有する牛を特定する指標として、末梢血中のリンパ球数が頻繁に活用されてきた。既報によると、吸血昆虫を介した水平感染や胎内感染の頻度は、無症状キャリアの感染牛よりも持続性リンパ球増多症 (PL) を呈した感染牛において有意に高いとされている[6、7)]。さらに、近年、BLV プロウイルス遺伝子量 (PVL)を測定可能なリアルタイム PCR 法が確立され[8、9)]、末梢血中の PVL は、当該感染牛の伝播リスクに強く関連することが示唆されている[4、10-13)]。したがって、現在では農場の BLV 感染率を着実に低減させるアプローチとして、これら指標値を用いて感染牛の伝播リスクを推定し、効率的な感染防除や感染牛の更新に活用することが最も有効と期待されている。

しかし、感染牛における PVL やリンパ球数に関する変動傾向について、感染実験による成績は報告されているが[14-18)]、野外感染牛での長期的な観察例の報告はない。農場の EBL 対策は中長期的な取組を要することが想定され、今後の対策に欠かすことのできないリスク評価の根拠となる指標値については、長期的な変動傾向を把握しておくことが必須である。そこで、今回、過去 8 年間にわたり野外感染牛から得た成績をもとに、PVL 及びリンパ球数の長期的な変動を調査、分析したので概要を報告する。

材料及び方法

1. 調査対象

対象農場は 3 戸の酪農場で、いずれもつなぎ牛舎に搾乳牛 30～40 頭を飼養していた。3 農場ともにパドック等への放牧は実施していなかった。対象牛は、ホルスタイン種の搾乳牛のうち、2011～2018 年に 3 回以上の調査を行った BLV 感染牛 99 頭を選抜し、これらから経時的に採取した 566 検体の末梢血 (EDTA

血）を用いた。なお、99 頭のうち、調査期間中に感染（陽転）を認めた個体は 32 頭であり、これらの牛における非感染時の PVL は成績に含めていない。調査対象牛のうち、検査回数の最多は 11 回（平均 5.7 回）、観察期間は最長で 1,411 日間（平均 719 日間）であった（表 1）。

表 1　検査対象牛の検査回数及び観察期間

検査回数	頭数	%	観察期間（日）	頭数	%
3	16	16.2	239 - 300	6	6.1
4	17	17.2	301 - 400	16	16.2
5	21	21.2	401 - 500	8	8.1
6	14	14.1	501 - 600	14	14.1
7	9	9.1	601 - 700	14	14.1
8	8	8.1	701 - 800	5	5.1
9	8	8.1	801 - 900	5	5.1
10	4	4.0	901 - 1,000	8	8.1
11	2	2.0	1,001 - 1,411	23	23.2

2. リンパ球数の測定

リンパ球数は、EDTA 血を検体として、全自動血球計数機（Celltac Alpha MEK-6450; Nihon-Kohden, Tokyo, Japan）により測定した。

3. DNA の抽出及び PVL の測定

EDTA 血から 0.83%塩化アンモニウム溶液を用いて末梢血単核球（PBMC)を分離し、PBMC からの DNA 抽出は市販キット（DNeasy Blood & Tissue kit; QIAGEN, Hilden, Germany）を用いて定法のとおり実施した。抽出 DNA は、蛍光測定装置（Qubit®2.0 fluorometers; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）及び市販キット（Qubit™ dsDNA BR Assay kit; Thermo Scientific）により濃度を測定し、検査に供するまで－20℃にて保存した。

PVL の測定は Konishi ら[19]の報告に準じ、BLV *tax* 遺伝子を標的としたプライマー/プローブによるリアルタイム qPCR（ABI7500 リアルタイム PCR システム, Thermo Fisher Scientific）を実施した。なお、テンプレートには、各 DNA を DW で 20ng/μL に希釈調整したものを 5μL 添加した。得られた成績は DNA10ng あたりのコピー数に換算し、定量値とした。

結果

1. 個体毎の平均値分布と両指標の相関性

各個体において PVL 及びリンパ球数の各平均値の成績に応じた頭数分布を示した（図 1)。また、個体毎の平均値を比較したところ、PVL とリンパ球数に強い正の相関（r=0.731）が認められた（図 2）。

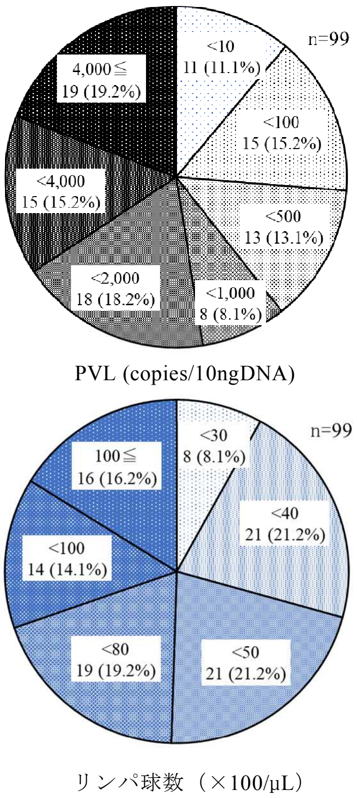


図 1　PVL 及びリンパ球数の平均値の分布

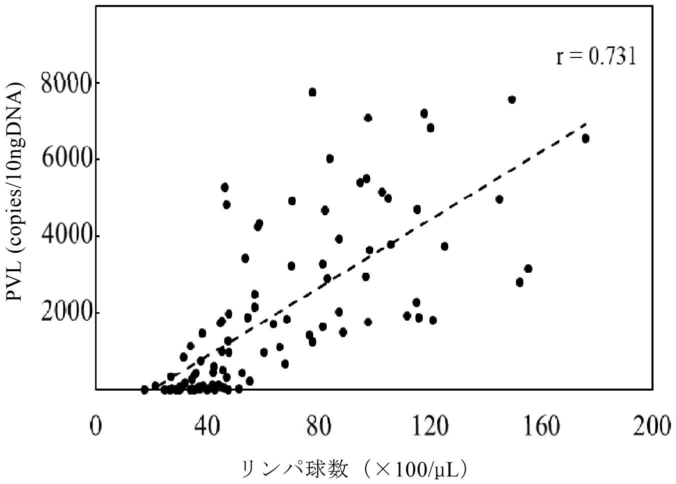


図 2　PVL 及びリンパ球数の相関（n=99）

2．変動係数（CV）を用いた比較

全ての感染牛における両指標値の平均 CV を算出したところ、PVL では 0.830 に対し、リンパ球数は 0.201 であった。感染牛を陽転牛とそれ以外の牛の 2 つに区分すると、陽転牛の CV は PVL 1.192、リンパ球数 0.262 に対し、それ以外の牛では PVL 0.657、リンパ球数 0.171 となり、いずれの指標においても陽転牛の CV が有意に高かった（PVL:$p<0.001$、リンパ球数：$p<0.05$）（図 3）。

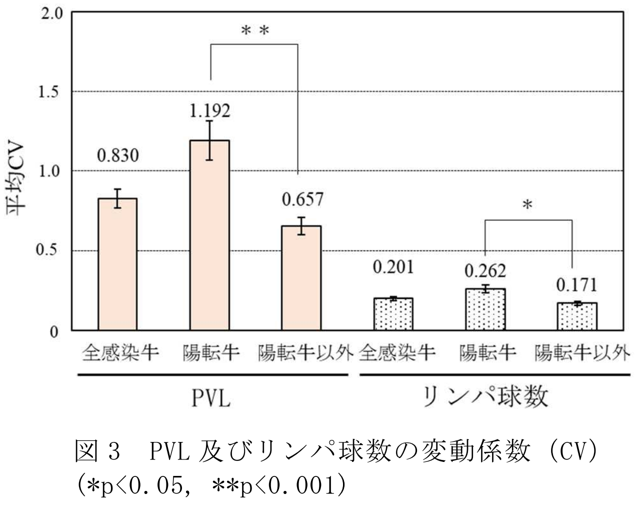


図 3　PVL 及びリンパ球数の変動係数（CV）
(*$p<0.05$, **$p<0.001$)

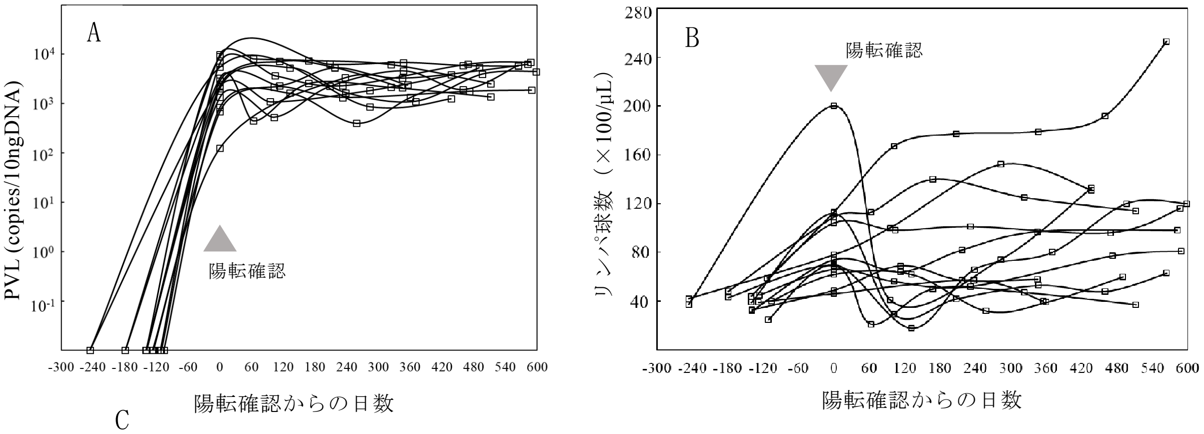
3．陽転牛における変動

調査期間中に陽転を確認した 32 頭のうち、15 頭の PVL は、感染初期から 10^2copies 以上の高値を示し、その後は大きな変動もなく、推移した（図 4-A,C）。同様の 15 頭におけるリンパ球数の動態は、感染前よりも大幅にリンパ球数が増加する傾向が見られ、その後、そのまま推移するもの、感染前の水準に回復するもの、一定期間を経て再び増加するものに大別された（図 4-B,C）。

一方、陽転牛 32 頭のうち、17 頭の PVL は、感染初期に高値を示したものの、陽転確認から 180 日後までに急激に低下し、その後は 10^2copies 以内に収束した。同様の 17 頭におけるリンパ球数は、感染初期に若干の増加が認められたが、PVL と同じく陽転確認 180 日後までに減少し、感染前の水準に回復する傾向であった（図 4-D,E,F）。

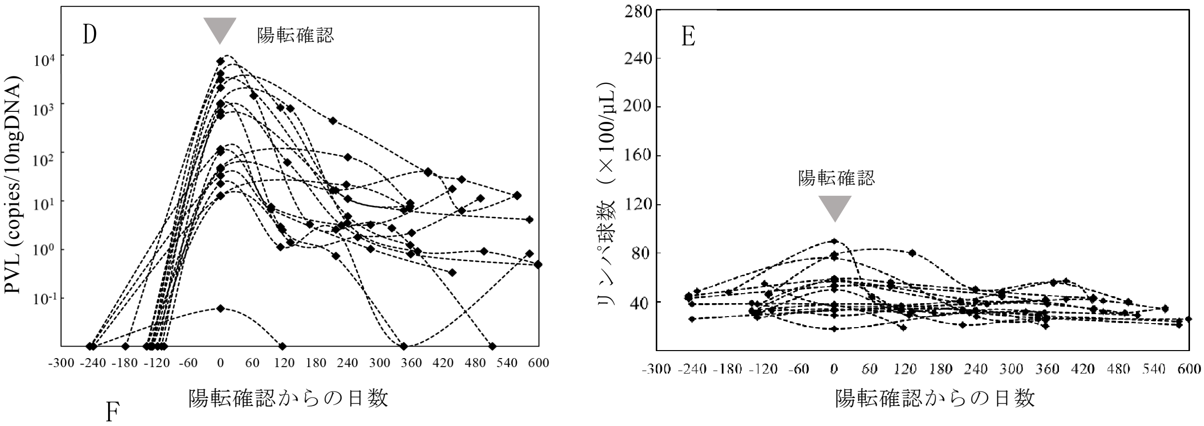
4．陽転牛以外の感染牛における変動

陽転牛を除く感染牛 67 頭のうち、10^2copies 未満でのみ推移した 12 頭の PVL は、いずれも低値を維持したまま、最長 1,324 日にわたり安定していた。特に 2 回以上で 10^1copies 以下を示した 10 頭では、最大でも 22.3copies に留まり、低値に収束する傾向が見られた（図 5）。一方、それ以外の 55 頭では、10^2～10^4copies の範囲を上下する傾向が見られたが、10^2copies 以下へ低下したものは 5 頭のみで、10^1copies を下回った個体は 1 頭(#206)のみであった（図 6）。また、大きな変動を示した#206 では、PVL が 1434.4copies から 0.9copies まで低下すると同時に、リンパ球数も 1,000/μL まで減少していた（データ未掲載）。さらに、著しく低い PVL で推移した個体（1 回でも計測不能となった 9 頭）を除く計 58 頭について、検査間の PVL の変動傾向を対数変化率（Log（copies / 前回の copies））で示した（図 7）。58 頭中 50 頭



C

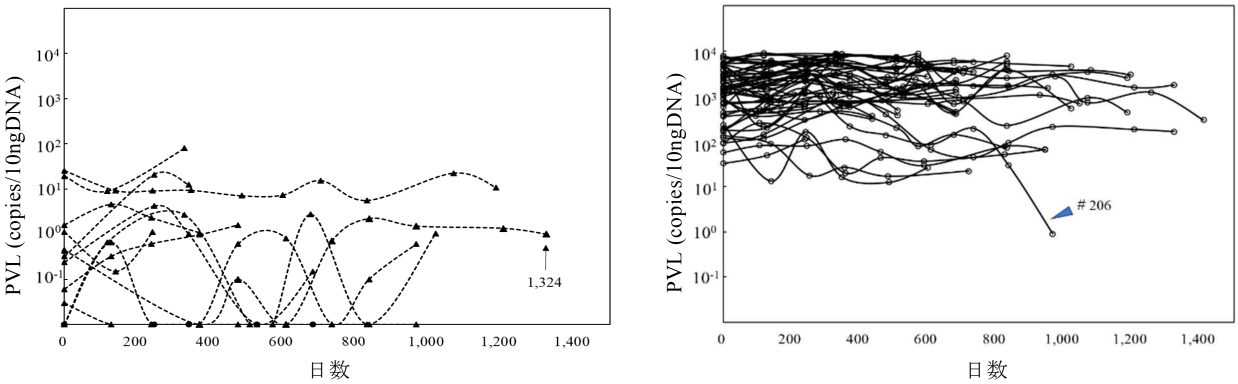
n=15	陽転確認からの日数					
	感染前	0	1−180	181−360	361−600	600−
PVL (copies/10ngDNA)	–	3,273.8	3,326.2	3,148.1	3,903.5	3,329.1
リンパ球数 (×100/μL)	40.5	86.5	74.3	80.5	107.0	107.7



F

n=17	陽転確認からの日数					
	感染前	0	1−180	181−360	361−600	600−
PVL (copies/10ngDNA)	–	1,199.7	261.0	26.7	10.8	58.1
リンパ球数 (×100/μL)	38.4	49.4	40.7	34.3	36.3	37.8

A： 陽転確認後、PVL が高値で推移した群 (n=15)， B： A のリンパ球数の推移 (n=15)
C： A B の 15 頭における PVL 及びリンパ球数の経時的推移
D： 陽点確認後、PVL の減少を確認した群(n=17)， E： D のリンパ球数の推移 (n=17)
F： D E の 17 頭における PVL 及びリンパ球数の経時的推移
図 4 陽転牛の PVL 及びリンパ球数の変動



(10^2copies/10ngDNA 未満で推移 n=12)
図 5 陽転牛以外の感染牛の PVL 変動

(10^2copies/10ngDNA 以上で推移 n=55)
図 6 陽転牛以外の感染牛の PVL 変動

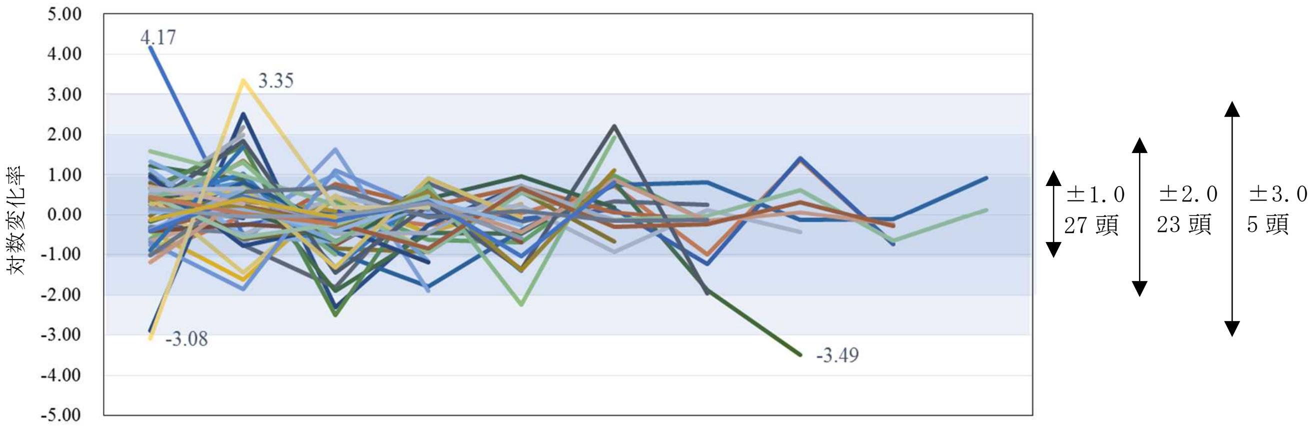


図 7　個体別の検査間における対数変化率の推移（n=58）

(86%）は対数変化率±2.0 の範囲内で増減を繰り返しており、±3.0 を超える大きな変動は 4 検査間でのみ認められた。

考察

計 99 頭の平均 PVL は幅広く分布し、特に平均 10copies 未満を示した牛が 11 頭確認された。これらの牛はリアルタイム qPCR の検出限界付近を推移し、計測不能 となることも多かった。BLV 感染牛の PVL の高低を制御する宿主因子として、ウシ MHC （BoLA） クラスⅡ遺伝子型の関与が提言されており、中でも *DRB3*0902* 対立遺伝子を有する牛は、著しく低い PVL に抑制される傾向が報告されている[20-24]。既報では野外の牛の約 7%が *DRB3＊0902* を保有していたと報告されており[21]、今回の調査における低い平均 PVL を示した 11 頭(11.1%)も何らかの抵抗遺伝子の保有牛だった可能性がある。平均リンパ球数については、明らかに搾乳牛の正常値を超える 8,000/µL 以上を示した個体は 30 頭（30.3%）認められ、これらは PL を呈していたものと考えられた。また、平均 PVL は平均リンパ球数に対して強い相関が認められ、既報と同様であった[5]。この成績から、PVL とリンパ球数を組み合わせてリスク評価を行うことが可能と考えられた。なお、少ないリンパ球数でも高い PVL を示す個体も存在したため、リンパ球数のみでの評価の際には注意が必要である。

測定値の変動傾向を CV で示したところ、リンパ球数より PVL が大きく、感染牛を陽転牛とそれ以外の感染牛に区分すると、いずれも陽転牛の CV が有意に高い成績が得られた。この要因には、陽転牛における感染初期の PVL とリンパ球数の大幅な変動が影響していた。特に PVL については、32 頭中 17 頭が陽転確認時にのみ一過性に高値を示し、約 180 日かけて減少した後、以降は大きな変動はなく、低値で推移していた。つまり、何らかの抵抗因子を保有し、PVL が低値で維持されるような個体においても、感染初期（感染から 180 日程度)では高値を示す可能性が示唆された。なお、既報でも同様に、5 頭の牛による感染実験を行った結果、BLV 接種後、30～68 日に PVL のピークを迎え、2 頭は高値のまま推移し、3 頭は接種 252 日後にかけて低値に減少していったと報告されている[16]。一方、リンパ球数でも、PVL が低値に収束した 17 頭において、一過性に 8,000/µL を超えた個体が存在しており、1 回のみの検査で PL を判定するこ

とは困難と考えられた。また、PVL が高値で推移した15頭においても､感染初期をピークにリンパ球数が減少する個体が存在した。興味深いことに、PVL 及びリンパ球数ともに一過性に上昇したピーク値からの減少期間は180 日間程度と共通していた。何らかの影響でBLVプロウイルスとリンパ球が連動して減少したと考えられるが、本調査でその要因を言及することはできなかった。なお、Gilletら[16]は、宿主の免疫能の惹起により、BLV増殖がCell to Cell感染から、モノクローナル増殖へ変換されるため、後者を効率良く排除できる個体では、低いPVLに抑制されると報告している。

PVL の長期的変動について、低値で推移する個体は長期間にわたり上昇することなく安定する傾向であったことから、少ない検査回数で伝播低リスクの評価の推定が可能であると考えられた。PVL が高値で推移する個体については、対数変化率を用いた結果から、検査間の変動幅は7.5倍あるいは1/7.5の範囲で増減しており、短期間でリスク評価が変化することはほとんどないものと思われた。しかし、リンパ球数の減少に伴ってPVLが急激に低下する個体も確認され、何からの基礎疾患等により、PVL が大きく変動してしまう可能性が示唆された。

今回の調査で、野外におけるBLV感染牛のPVL 及びリンパ球数の変動傾向を把握することができた。特に野外感染牛でも感染初期における特徴的な変動を確認したことは、今後のEBL対策を行う上で有益な情報となり得る。また、長期的な変動を確認した結果、10^1copies 未満で推移する個体では急激なPVL 上昇は認められないものと思われた。一方、10^2copies 以上の高値で推移していた場合、何らかの要因で低値に移行することはあり得るものと推測された。

感染牛の伝播リスク評価を行うことは農場のEBL清浄化対策の幅を広げ、その経済性と効率性を向上させる有効な手段である。また、今回の調査から、PVL 及びリンパ球数をリスク評価に活用する場合、信頼性を確保するため、2 回以上の検査を行うことが望ましいと考えられた。

謝辞

本研究の成果の一部は、レギュラトリーサイエンス新技術開発事業（平成22～24年度、平成25～27年度)により得られました。

多大なる御支援及び御助言をいただいた農林水産省 消費･安全局 食品安全政策課(元国立研究開発法人 農業･食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 ウイルス・疫学研究領域 疫学ユニット）の小林創太先生、国立大学法人 岩手大学 農学部 共同獣医学科の村上賢二教授に深謝します。

引用文献

1) Tsutsui T., et al.: *Prev Vet Med*, 124, 96-101 (2016)

2) Soumura Y., et al.: *J Jpn Vet Med Assoc*, 67, 523-528 (2014)

3) Murakami K., et al.: *J Vet Med Sci*, 75, 1123-1126 (2013)

4) Mekata H., et al.: *J Vet Med Sci*, 77, 1115-1120 (2015)

5) Ohno A., et al: *Virus Res*, 210, 283-290 (2015)

6) Foil LD., et al.: *J Med Entomol*, 25, 374-376 (1988)

7) Lassauzet ML., et al.: *Can J Vet Res*,

55, 264-268 (1991)
8) Jaworski JP., et al.: *J Clin Microbiol*, 56, pii: e00304-18 (2018)
9) Jimba M., et al.: *Retrovirology*, 2, 7 (2010)
10) Juliarena MA., et al.: *Am J Vet Res*, 68, 1220-1225 (2007)
11) Takeshima SN., et al.: *Retrovirology*, 14, 24 (2017)
12) Sajiki Y., et al.: *J Vet Med Sci*, 79, 2036-2039 (2017)
13) Yuan Y., et al.: *Virus Res*, 210, 248-254 (2015)
14) Ungar-Waron H., et al.: *Vet Immunol Immunopathol*, 67, 195-201 (1999)
15) Klintevall K., et al.: *Comp Immunol microbiol Infect Dis*, 20, 119-130 (1997)
16) Gillet NA., et al.: *PloS Pathog*, 9, e1003687 (2013)
17) Jimba M., et al.: *BMC Vet Res*, 21, 167 (2012)
18) Lützelschwab CM., et al.: *Res Vet Sci*, 109, 10-16 (2016)
19) Konishi M., et al.: *BMC Vet Res*, 14, 419 (2018)
20) Carignano HA., et al.: *Anim Genet*, 48, 420-430 (2017)
21) Hayashi T., et al.: *J Vet Med Sci*, 79, 1552-1555 (2017)
22) Juliarena MA., et al.: *Anim Genet*, 39, 432-438 (2008)
23) Juliarena MA., et al.: *J Dairy Sci*, 99, 4586-4589 (2016)
24) Miyasaka T., et al.: *Tissue Antigens*, 81, 72-82 (2013)