

## 7. 地方病性牛白血病（EBL）農場清浄化を目指した 牛白血病ウイルス（BLV）対策（第一報）

大分家畜保健衛生所

病鑑 ○長岡 健朗 病鑑 御手洗 善郎

【はじめに】牛白血病のうち牛白血病ウイルス（以下 BLV）により引き起こされる地方病性牛白血病（以下、EBL）は、近年、我が国での発生が増加しており、生産現場での被害も増加傾向にある。また、近年では若齢牛での発症も問題となっている。

平成 27 年 4 月に発表された「牛白血病に関する衛生対策ガイドライン」でも BLV の農場内での感染拡大防止及び農場への侵入防止のために有効と考えられる衛生対策を行い、BLV の浸潤率を低下させ、最終的には農場の清浄化につなげていくことを謳っている。また、同ガイドラインでは本病の衛生対策を行うのは、繁殖牛を優先的な対象とすることが現実的な対応となるとしてあり、肉用繁殖農場が多い我が県においては本病の対策は喫緊の課題であると考えられる。

本県では特定疾病リスク低減対策事業としてハイリスク牛の摘発を中心とした EBL 対策を行ってきたが、平成 26 年からは全頭遺伝子検査による農場清浄化を目指すこととした。BLV 遺伝子検査陽転を防ぐことにより、年月をかけて陰性群の頭数を増やし、最終的に清浄化を目指すこの取り組みについての現状と展望を報告する。

【清浄化へのスキーム】清浄化へのスキームを図 1 に示した。対象農場については、まず、全頭 PCR による遺伝子検査（全頭検査）を行い、陰性群と陽性群に区別する。子牛または導入牛を陰性群に入れる場合は移動前検査を行う。移動前検査で摘発できなかった陽性牛を排除するため定期的に陰性群全頭検査（陰性群清浄性確認検査）を行い、陰性を維持する。全頭検査では低コスト性・低労力性を重視して遺伝子抽出を行わない方法（参考文献 1）で PCR を行う。一方、移動前検査および陰性群清浄性確認検査では全血から DNA を抽出後 NestedPCR を行う。陰性群清浄性確認全頭検査は労力・コストがかかることから、確実な移動時検査により、なるべく陰性群清浄性確認全頭検査を行う頻度を少なくする必要がある。確実な移動時検査のためには、移動前検査では摘発できなかった感染牛摘発のための移動後フォロー検査法を確立する。また、今後、陰性群の頭数が増大すると遺伝子抽出を行っての NestedPCR では労力・コストに問題が生じると予想されるので、陰性群清浄性確認全頭検査の適正な検査間隔と検出感度を検討する。

陽性牛については基本的には積極的な淘汰は行わず、出荷や廃用により農場からいなくなるまで飼養する。



【検査成績および考察】表1に平成26年度の全頭遺伝子検査に移行した以降、平成27年10月時点までに全頭検査を行った12農場(B～M農場)および以前よりBLV清浄化の取り組みを行っていた1農場(A農場)の概要を示した。表2には遺伝子検査の成績とその受身赤血球凝集反応(PHA)による抗体検査との一致率を示した。農場ごとの遺伝子検査の陽性率は0%～80.5%であった。PCRとPHAの一致率は農場によって大きく異なりPCR陽性/PHA陰性による不一致は0～16.2%、PCR陰性/PHA陽性による不一致は0～45.9%だった。

**表1 BLV清浄化取り組み農場**

農場名	品種	飼養規模	取り組み開始年度
A	黒毛和種	繁殖雌牛100頭	H25年度
B	黒毛和種	繁殖雌牛30頭	H26年度
C	ホルスタイン	搾乳牛100頭	
D	ホルスタイン	搾乳牛50頭	
E	黒毛和種	繁殖雌牛60頭	
F	黒毛和種	繁殖雌牛30頭	
G	黒毛和種	繁殖雌牛35頭	
H	黒毛和種	繁殖雌牛30頭	
I	黒毛和種	繁殖雌牛50頭	
J	黒毛和種	繁殖雌牛80頭	
K	黒毛和種	繁殖雌牛35頭	
L	黒毛和種	繁殖雌牛15頭	
M	黒毛和種	繁殖雌牛50頭	

**表2 全頭検査におけるPHAおよびPCR検査成績**

農場名	品種	検査頭数	PCR陽性	PHA/PCR			
				+/+	+/-	-/+	-/-
B	黒毛和種	26	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	26 100.0%
C	ホルスタイン	118	96 81.4%	95 80.5%	10 8.5%	0 0.8%	12 10.2%
D	ホルスタイン	63	44 69.8%	44 69.8%	11 17.5%	0 0.0%	8 12.7%
E	黒毛和種	53	29 54.7%	29 54.7%	3 5.7%	0 0.0%	21 39.8%
F	黒毛和種	30	24 80.0%	24 80.0%	1 3.3%	0 0.0%	5 16.7%
G	黒毛和種	34	3 8.8%	3 8.8%	2 5.9%	0 0.0%	29 85.3%
H	黒毛和種	27	13 48.1%	13 48.1%	6 22.2%	0 0.0%	8 29.6%
I	黒毛和種	37	18 48.6%	12 32.4%	17 45.9%	6 16.2%	2 5.4%
J	黒毛和種	73	55 75.3%	54 74.0%	4 5.5%	1 1.4%	14 19.2%
K	黒毛和種	46	34 73.9%	31 67.4%	0 0.0%	3 6.5%	12 26.1%
L	黒毛和種	16	5 31.3%	5 31.3%	4 25.0%	0 0.0%	7 43.8%
M	黒毛和種	60	38 63.3%	37 61.7%	9 15.0%	1 1.7%	13 21.7%

※：移行抗体の影響を受ける6か月齢未満を除外

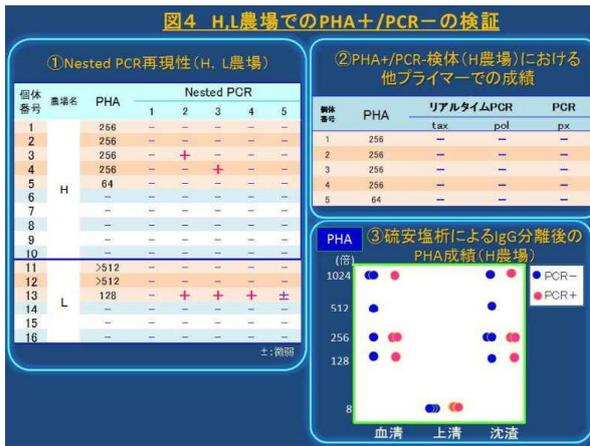
これら13農場のうち3農場は清浄化を断念、現在、10農場で清浄化を継続中である。

このうち、最初の検査で遺伝子検査も抗体検査もすべて陰性であったB農場の概要を図2に示した。B農場は肉用繁殖牛約25頭を飼養しており、H26年度からBLV清浄化取り組みを始めた。平成26年9月の全頭検査ではすべて陰性、さらに平成27年1月の検査でも、遺伝子検査、抗体検査すべて陰性であった。このことから、ひとたび清浄化した農場は外部から陽性牛を入れない限り、陰性は維持されるものと考えられた。本取り組みでは図3写真左のように、独立した陰性牛用の牛舎を持ち、独立した農場同様に隔離されていると期待できることや、中央のようなネットで隔離しているところ、右のように通路だけで隔離しているところ等が含まれている。これら異なった方法の隔離効果が検証できると、今後他の農場で清浄化を行う際のノウハウになると考えられた。



PHA 陽性 PCR 陰性での不一致が20%以上でかつ逆での不一致はなかった H および L 農場でさらに調査を行い、その原因の解明を試みた。図4中表①はこれら農場由来の PHA 陽性・PCR 陰性の検体と、PHA、PCR とともに陰性の検体について、遺伝子抽出からやりなおして Nested PCR を5回ずつ行ったものである。PHA 陽性・PCR 陰性の検体では NestedPCR を繰り返して行くと陽性となったものが見られたが、PHA、PCR とともに陰性の検体では NestedPCR を繰り返してもすべて陰性であった。このことから、PHA 陽性・PCR 陰性のものには、感染はしているが、まだ PCR の検出限界に達していないものが少なからずあるものと考えられた。図4中表②には、PCR で検出できないのは、プライマー部位の変異によるものではないかと疑い、他のプライマーで PCR を行った成績を示した。他のプライマーを使用してもすべて陰性であり、PCR が陰性になるのはプライマー部位の変化ではなく、検出限界によるものと考えられた。図4中表③は硫酸塩析により分離した IgG 分画と上清の PHA 価を調べたもので、PHA は IgG 分画と反応しており、PHA は少なくとも抗原抗体反応によるものであると考えられた。

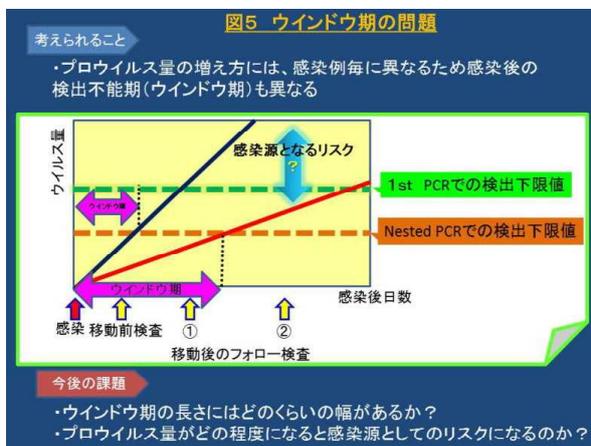
次に C および D 農場で、最初の検査で PHA 陽性 PCR 陰性だった個体について、経時的に検査を行い、PCR の成績の変化を調べた(表3)。ほぼ4ヶ月の間隔で検査したところ、赤で囲ったもののように、前回は NestedPCR でも陰性だったものが次の検査では 1stPCR でも陽性になっている例や、緑で囲ったもののように NestedPCR でのみ検出された後、次回検査では 1stPCR でも検出されたもの、青で囲ったもののように NestedPCR のみでの検出が続いたものが見られ、プロウイルス量の増え方も急速なものや緩慢なものがあることが分かった。



**表3 C, D農場でのPHA陽性検体のPCRの推移**

農場	個体番号	月齢	2014年12月			2015年4月			2015年9月		
			PHA	1st PCR	Nested PCR	PHA	1st PCR	Nested PCR	PHA	1st PCR	Nested PCR
C	1	37.4	16	-	-	128	-	-	64	-	-
	2	25.8	128	-	+	128	-	-	64	-	-
	3	49.1	16	-	-	128	-	-	32	-	-
	4	46.3	128	-	-	≥256	-	-	16	-	-
	5	40.8	≥256	-	+	128	-	-	16	-	-
	6	59.6	32	-	-	32	-	-	NT	NT	NT
	7	41.6	≥256	-	-	≥256	-	-	32	-	-
	8	31.8	128	-	-	≥256	+	+	128	+	+
	9	75.2	≥256	-	-	≥256	-	-	128	-	-
	10	7.8	128	-	-	≥256	-	+	16	-	+
D	11	31.5	≥256	-	-	128	-	-	NT	NT	NT
	12	49	128	-	-	128	-	+	NT	NT	NT
	13	36.7	128	-	-	32	-	-	NT	NT	NT
	14	34.8	≥256	-	-	32	-	-	NT	NT	NT
	15	58	≥256	-	+	≥256	-	+	NT	NT	NT
	16	54	≥256	-	-	16	-	-	NT	NT	NT
	17	26.9	≥256	-	-	64	-	-	NT	NT	NT
	18	27.3	128	-	+	64	+	+	NT	NT	NT
	19	46.9	≥256	-	-	≥256	+	+	NT	NT	NT
	20	61	128	-	-	32	-	-	NT	NT	NT
	21	19.4	≥256	-	-	32	-	-	NT	NT	NT

農場 H、L および農場 C、D の事例から、今回調べた検体では、PHA は IgG による抗原抗体反応であり、非特異反応ではないと考えられ、PHA 陽性 PCR 陰性となるのは、プロウイルスの遺伝子量が少なく、PCR の検出限界以下であったためと考えられた。また、プロウイルス量の増え方には、感染例毎に異なり、増え方が緩慢なものでは、PCR ではまだ検出限界以下の時点でも先に PHA が陽性になっているものと思われた。従って、プロウイルス量の増え方が緩慢な個体が多い農場では PHA 陽性 PCR 陰性の比率が高くなるものと思われた。検査には必ず感染してから検出可能になるまでの期間、ウインドウ期がある。移動前検査で陰性でも、その個体がウインドウ期であれば、移動後に陽性になる。プロウイルス量の増え方の緩慢なものとは急速なものではウインドウ期の長さも相応に変わってくるものと思われる。図5のグラフでは、プロウイルス量の増え方が単純な1次直線になると仮定して、プロウイルス量の増え方とウインドウ期の関係を示したもので、急速なものを青い線で、緩慢なもの赤い線で示した。どちらも、移動前検査時には、検出できないため、それをカバーするために移動後フォロー検査を行う必要がある。①のところで移動後フォロー検査を行うと急速なものは検出できるが、緩慢なものはまだ検出できない。一方、②のところで検査すると緩慢なものも検出できるが、急速のものはプロウイルス量がかなり増えることになる。どの程度のプロウイルス量なら感染源としてのリスクにならないのかも、適正な移動後フォロー検査策定の上での今後の検討課題である。



【今後の取り組み】牛白血病清浄化推進・モデル農家を絞り込み、頻回（月1回～数ヶ月に1回）陰性群清浄性確認検査を行い、そこで得られるデータよりウインドウ期の長さの範囲や感染源としてのリスクが上がるプロウイルス量を調べる。それに基づいて陰性群への移動後のウインドウ期をカバーするためのフォロー検査法を確立する。農場毎にウイルス量の増え方の緩急に違いがあるため、フォロー検査法策定にあたってはそれらの要素についても加味する。また、ウイルス量の増え方の緩急の違いに農場内に存在する BLV の性状（envRFLP 型、tax 遺伝子型、pol 遺伝子変異等）が影響するかどうか調べ、農場毎のオーダーメイドの検査法が適用できるか検討する。また、PHA の方が先に陽性になる場合もあるので PHA フォロー検査法の策定にあたっては PHA の適切な組み合わせ法を検討する。

牛白血病清浄化推進・モデル農家には陰性群・陽性群の分離方法（別牛舎、物理的障壁、通路のみ等）が異なる農場を設定し、分離方法の有効性を検証する。

農場清浄化に至るには長い年月を要するので、担当家保、本課、病性鑑定部が共通の認識を持って取り組む必要がある。農場主の清浄化への意欲を維持するためにも、取り組みへの補助が望まれる。表4にはその例を示した。

表4 牛白血病清浄化推進・モデル農家育成事業(案)	
○対象農家	飼養牛全頭のBLV抗体検査・遺伝子検査を実施し、陰性牛と陽性牛の分離飼育を実施する農家
1 受精卵移植活用・自家保留推進型	受精卵移植技術を活用し、BLV陰性(抗体・遺伝子)後継牛を確保する場合 通常分娩により、自家保留牛として後継牛を育成する場合 (1)優良受精卵確保に関する補助 採卵経費に対する助成 受胎牛(仮腹)借り上げに係る助成 (2)早期離乳を行うための育成経費の補助 初乳粉末製剤等の購入助成
2 BLV陰性子牛育成施設整備型	育成期間中、BLV遺伝子陰性が確認された子牛の陰性を維持するため、育成施設を新築、改造する場合 (1)個別飼育施設の新設に対する補助 (2)BLV伝播を阻止するための牛舎改造等に係る補助 牛舎改造に関する助成 吸血昆虫対策に係る助成(防虫ネット、イヤークラップ(忌避耳標)、殺虫剤の購入 など)

県内では BLV が高度に浸潤している農場が多く、清浄化は現実的ではないという声があり、これまでもハイリスク牛の摘発と言った対策で済ませてきた。一方、近年の EBL 発生増加に伴い、積極的に清浄化に取り組みたいという生産者も少なくない。今回の取り組みは農場清浄化に向けた第一歩である。現時点での陽性率や畜舎の構造等で実現可能な農場からでも早期に清浄化を達成する必要がある。そして、その課程で得られたノウハウの蓄積により、より難易度の高い農場での清浄化を達成し、現場のニーズに応えられるようになることが期待される。さらに、徐々にハードルの高い目標をクリアしていくことが、ともすれば義務的な業務に追われがちな家畜衛生担当者にも達成感のある業務になるものと思われる。

#### 参考文献

(1) 第64回大分県畜産職域業績発表会集録10. 地方病性牛白血病 (EBL) の清浄化を目指した簡便なリアルタイム PCR (RT-PCR) 法の検討