

## 12. 牛白血病ウイルスの県内感染率推定及び遺伝子学的解析

大分家畜保健衛生所・<sup>1)</sup> 豊後大野家畜保健衛生所

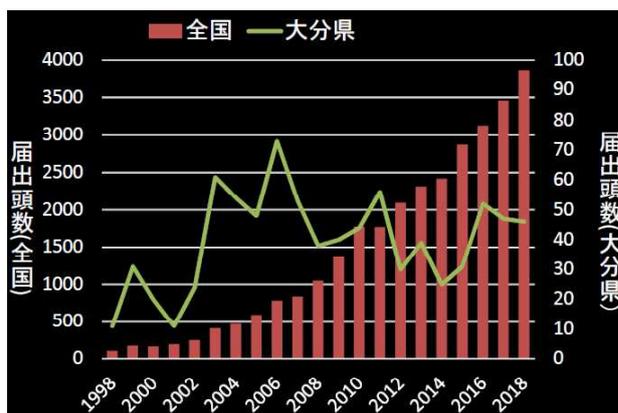
・<sup>2)</sup> 玖珠家畜保健衛生所・<sup>3)</sup> 宇佐家畜保健衛生所

○病鑑 中出圭祐・野々下雅彦・林拓己<sup>1)</sup>・池堂智信<sup>2)</sup>・安達聡<sup>3)</sup>

### 1 背景と目的

#### (1) 牛白血病ウイルス (BLV) の県内感染率の推定

地方病性牛白血病は届出頭数が年々増加し、全国では直近 10 年間で 3 倍以上にもなっている。一方、大分県の地方病性牛白血病の届出頭数は直近 10 年間は 30 ～ 50 頭程度で推移しており、横ばいの状態が続いている (グラフ 1)。また、牛白血病ウイルス (以下、BLV) の感染率は 2009 ～ 2011 年に全国調査されて以来、一度も調査されておらず、現在の感染率は不明である (図表 1)。大分県では生産者や臨床獣医師から「牛白血病が増えた」との声が多く聞かれるが、県内で牛白血病が増えているデータはないというのが実情である。しかしながら、我々家保職員も陽性率が上がっているとの実感があり、今後の牛白血病対策に活用するため、肉用牛繁殖雌牛の感染率を明らかにしたいと考えた。



(グラフ 1: 全国及び大分県の牛白血病届出頭数)

地域	肉用牛繁殖雌牛	
	検査頭数	抗体陽性率
北海道	676	16.8%
東北	1,329	39.9%
関東	1,376	23.7%
北陸・中部	2,023	22.4%
近畿	499	20.6%
中国	1,073	27.7%
四国	623	10.8%
<b>九州・沖縄</b>	<b>2,123</b>	<b>42.4%</b>
		<b>(40.3～44.5)</b>
合計	9,722	28.7%

(図表 1: 既報 2009-2011 年抗体陽性率)

#### (2) BLV のプロウイルス量の測定

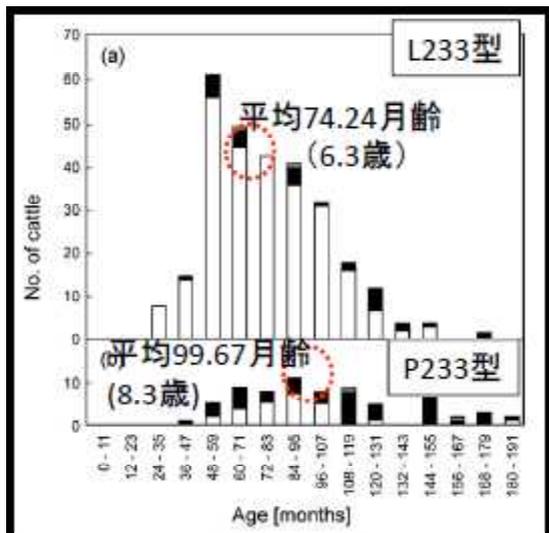
近年、生産現場では飼養牛の末梢血中の BLV プロウイルス量を測定し、陽性群と陰性群を分けることに加え、BLV プロウイルス量の高い牛を 1 カ所に集め、防虫ネットなどで分離飼育するという対策が注目されている (図表 2)。BLV プロウイルス量の測定ができるようになる前は、抗体検査や NestedPCR により陽性群と陰性群に分けて飼育する農場はあったが、陽性率の高さなどが原因で BLV 感染牛のとう汰は進んでいなかった。特に肉用牛農場では血統などの理由から、陽性牛でも簡単にとう汰はできなかったが、この方法により感染牛の中でもより伝播リスクが高いと考えられている高リスク牛を摘発することが可能になった。



(図表 2 : BLV プロウイルス量を活用した BLV 感染対策)

### (3) BLVtax 遺伝子の型別

BLV の tax 遺伝子の 233 番目のアミノ酸がロイシンの場合 (以下 L233 型)、プロリンの場合 (以下 P233 型) に比べて発症年齢が早くなると報告されている。同報告では、L233 型が感染した牛の発症年齢は 6.3 歳、P233 型が感染した牛の発症年齢は 8.3 歳とされている (グラフ 3)。しかしながら、生産現場での P233 型及び L233 型の浸潤度は不明であり、今回、初めて調査を行った。なお、データベース上の tax 遺伝子のアミノ酸配列はすべてプロリンかロイシンであり、他のアミノ酸は見つかっていない。



(グラフ 2 : 既報 BLVtax 遺伝子の発症月齢の頻度分布)

## 2 材料と方法

### (1) 牛白血病ウイルス (BLV) の県内感染率の推定

従来より各家保で農場の感染率は調べていたが、以下のような問題があった。

- ・検査対象が繁殖雌牛、子牛、直接検定候補牛と統一されていない。
- ・同じ牛を何度も検査している農場や過去に陽性となった牛は検査していない農場が混在している
- ・牛の出荷や導入に伴い、農場内の陽性率が変動している

そのため、県内感染率を推定するためには上記の情報を精査する必要があり、県内感

感染率を推定するにあたって、定義を「直近 3 年間で飼養牛すべてを検査した肉用牛農場で、2018 年 2 月 1 日時点で飼養されている繁殖雌牛を対象」とした。つまり、毎年行っている 2 月 1 日の頭数調査のときに飼養されている繁殖雌牛のうち、何頭が感染しているのか精査し、全体の感染率を推定した。なお、検査は市販の ELISA キットで抗体検査を実施した。

検査対象を精査した結果、67 戸 2,356 頭が対象となり、県内肉用牛繁殖農家 1090 戸、頭数 13,780 頭からの集落無作為抽出として県内感染率を推定した。

## (2) BLV のプロウイルス量の測定

### ① 検査対象を以下のとおりとした

- ・牛白血病対策を未実施の農場の飼養牛 (BLV の農場浸潤度調査)
- ・牛白血病対策を実施中の農場の陽性牛群 (個体別のリスク度判定)
- ・牛白血病対策を実施中の農場で陰性牛群 (清浄性確認)

### ② 検査頭数 : 1,310 頭

### ③ 検査材料・方法

i 全血から抽出した DNA を材料とし、tax 領域をターゲットとしたリアルタイム PCR を実施

ii 分光光度計で i で抽出した DNA 量を計測し、DNA50ng 当たりの BLV プロウイルス量を測定し、以下のとおり判定した

>2,000copies/50ng	高リスク
501 ~ 2,000copies/50ng	中リスク
101 ~ 500copies/50ng	低リスク
1 ~ 100copies/50ng	超低リスク
0copies/50n	陰性

## (3) BLVtax 遺伝子の型別

① 検査対象及び検査頭数は、(2) で検査対象とした農場のうち、飼養繁殖雌牛全頭を検査した 27 戸の抗体陽性牛 626 頭とした。

### ② 検査材料・方法

i 626 頭の全血から抽出した DNA を材料とし、Inoue らの方法により multiplex-PCR を実施。

ii PCR 産物を 4 %アガロースゲル電気泳動によって、120bp のバンドが確認されたものを L233 型、100bp のバンドが確認されたものを P233 型と判定した。

## 4 結果・分析

### (1) 牛白血病ウイルス (BLV) の県内感染率の推定

県内肉用繁殖雌牛 67 戸 2,356 頭中 1,377 頭が陽性となり、感染率は 58.4 %となった (図表 3)。また、信頼区間を計算したところ、7.5 %の絶対誤差、つまり県内感染率は 58.4 % ± 7.5 %、50.9 % ~ 66.0 % と推定した (図表 4)。

番号	農家名	飼養頭数 (繁殖雌牛)	抗体検査	
			陽性	陰性
1	A	33	31	2
2	B	6	6	0
3	C	43	31	12
4	D	32	28	4
5	E	18	17	1
6	F	6	4	2
7	G	4	3	1
8	H	10	9	1
9	I	11	10	1
10	J	25	17	8
11	K	16	6	10
12	L	61	8	53
13	M	5	5	0
14	N	1	0	1
15	O	10	9	1
16	P	4	0	4
17	Q	44	10	34
18	R	26	0	26
19	S	102	96	6
20	T	50	39	11
21	U	25	20	5
22	V	9	0	9
23	W	111	52	59
24	X	9	2	7
25	Y	54	48	6
26	Z	3	1	2
27	a	19	0	19
28	b	30	20	10
29	c	6	5	1
30	d	33	3	30
31	e	23	5	18
32	f	49	23	26
33	g	22	18	4
34	h	49	25	24
35	i	21	13	8
36	j	18	10	8
37	k	18	14	4
38	l	32	29	3
39	m	35	19	16
40	n	54	39	15
41	o	46	26	20
42	p	31	25	6
43	q	75	63	12
44	r	108	80	28
45	s	3	0	3
46	t	39	28	11
47	u	29	0	29
48	v	22	1	21
49	w	60	19	41
50	x	42	33	9
51	y	115	92	23
52	z	15	13	2
53	ア	16	16	0
54	イ	17	12	5
55	ウ	27	17	10
56	エ	174	100	74
57	オ	98	43	55
58	カ	46	15	31
59	キ	54	4	50
60	ク	118	48	70
61	ケ	5	2	3
62	コ	5	4	1
63	サ	43	28	15
64	シ	6	3	3
65	ス	4	2	2
66	セ	17	14	3
67	ソ	14	14	0
合計		2356	1377	979

(図表3 農場別 BLV 抗体検査結果)

肉用牛繁殖農場のELISA検査結果			
No.	農家名	飼養頭数(n)	陽性(m)
1	A	33	31
2	B	6	6
	⋮		
66	セ	17	14
67	ソ	14	14
合計	67戸(c)	2,356頭(T)	1,377頭

陽性頭数(1377頭)  
飼養頭数(2356頭)  
=感染率 58.4% ( $\hat{P}$ )

信頼区間:  

$$\hat{P} \pm 1.96 \left\{ \frac{c}{T} \sqrt{\frac{\hat{P}^2 (\sum n^2) - 2\hat{P} (\sum nm) + (\sum m^2)}{c(c-1)}} \right\} = 0.584 \pm 0.075$$

(図表 4 : BLV 県内感染率及び信頼区間の計算)

(2) BLV のプロウイルス量の測定

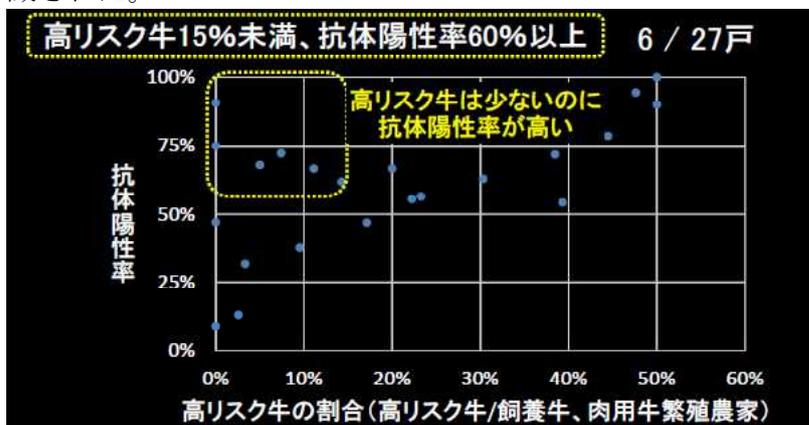
① 県内飼養牛 1310 頭の BLV のプロウイルス量は以下のとおりとなった。

>2,000copies/50ng	高リスク	306 頭
501 ~ 2,000copies/50ng	中リスク	150 頭
101 ~ 500copies/50ng	低リスク	100 頭
1 ~ 100copies/50ng	超低リスク	150 頭
0copies/50n	陰性	604 頭

② 高リスク牛の割合と抗体陽性率の相関 (グラフ 3)

①で BLV プロウイルス量を測定した 1310 頭のうち、農場内のすべての飼養繁殖雌牛の BLV プロウイルス量を測定した 27 戸 1056 頭について、高リスク牛の割合と抗体陽性率の相関を調べた。その結果、相関係数は 0.578 となり、高リスク牛の割合と抗体陽性率は正の相関があり、高リスク牛が伝播リスク要因になっていると考えられた。

また、この相関図の中には高リスク牛が 15 %未満、抗体陽性率 60 %以上、つまり高リスク牛は少ないのに抗体陽性率が高い農場が 27 戸中 6 戸あり、高リスク牛の割合が低い農場であっても、飼養環境等により農場内で感染が広がっているという実態が明らかになり、分離飼育や導入時検査などの飼養管理の重要性が再認識された。

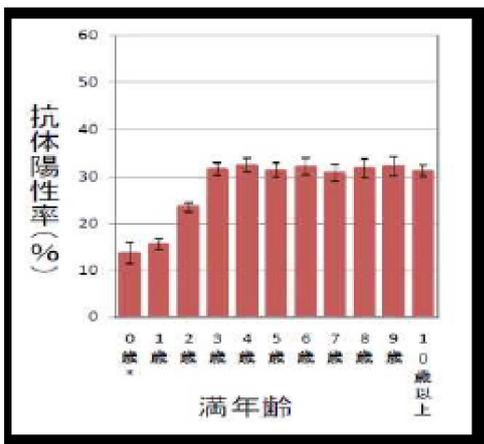


(グラフ 3 : 抗体陽性率と高リスク牛の割合の相関)

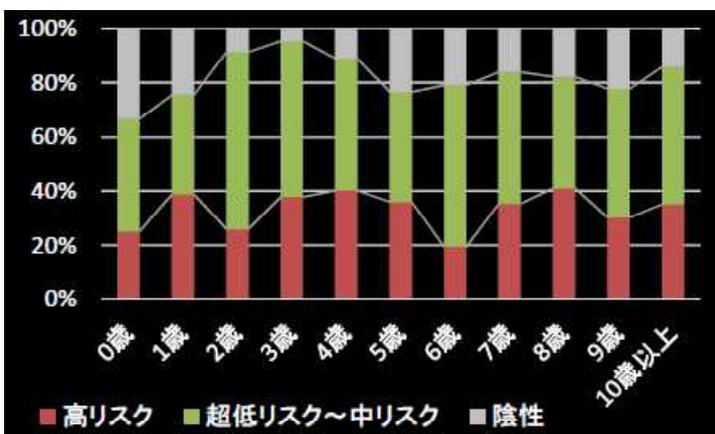
### ③ 高リスク牛及び陰性牛の割合と年齢の相関

既報（グラフ 4）では 1 歳から 3 歳まで抗体陽性率は増加していることや老齢の方が発症しやすいといったイメージによって、「子牛の方が伝播リスクが低い、老齢牛は高リスク牛が多く、導入するのは危ない」など、世間では噂されることがあるため、伝播リスクは、年齢に応じて増加するのか分析した。

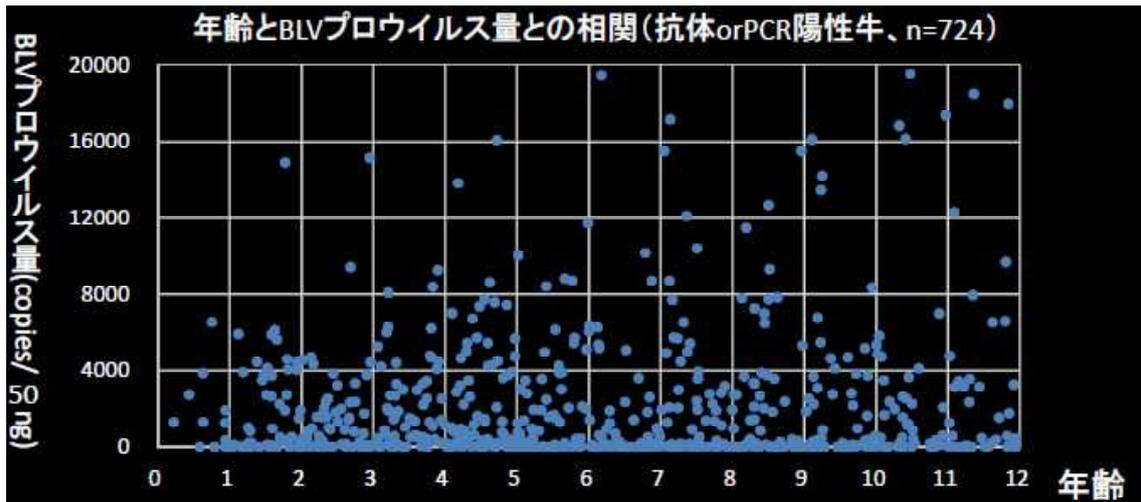
年齢別の高リスク牛及び陰性牛の割合では年齢による傾向は確認できなかった（グラフ 5）。また、BLV プロウイルス量と年齢の相関係数は 0.050 となり相関は認められなかった（グラフ 6）。



（グラフ 4：既報 満年齢別の抗体陽性率）



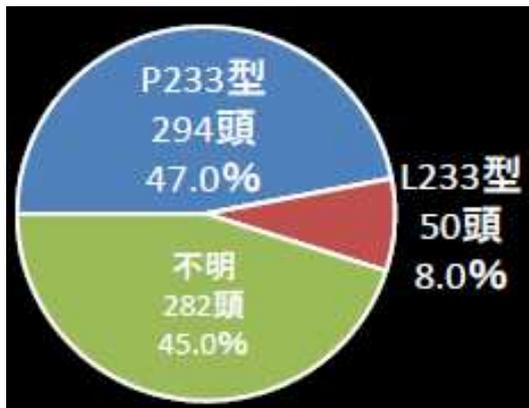
（グラフ 5：満年齢別の各リスク牛の割合、n=724、各リスク牛/抗体 orPCR 陽性牛）



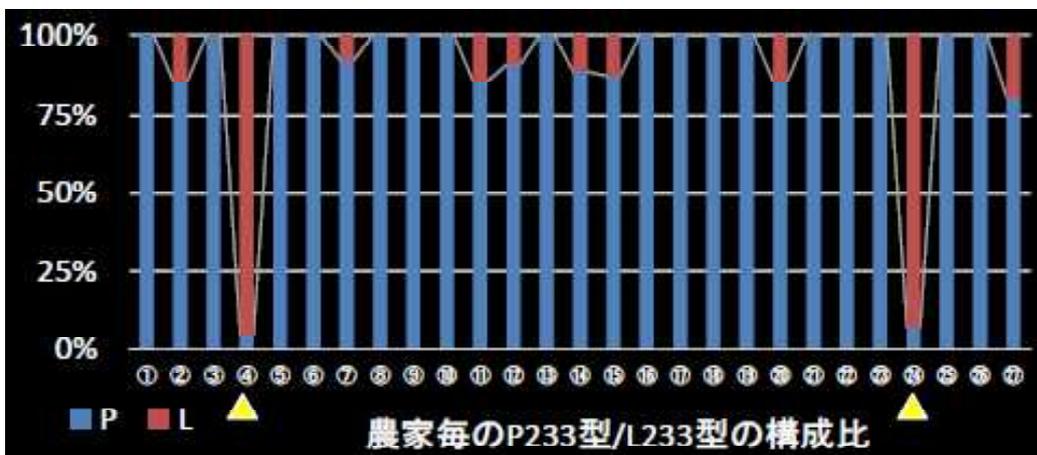
(グラフ 6 : 年齢と BLV プロウイルス量との相関、n=724)

(3) BLVtax 遺伝子の型別

抗体陽性牛 626 頭の BLVtax 遺伝子は、P233 型が 294 頭 (47.0%)、L233 型が 50 頭 (8.0%)、陰性となり型別不明なのが 282 頭 (45.0%) となった (グラフ 7)。また、農場別では、25 戸では P233 型多かったのにも関わらず、④と⑭の 2 戸だけが L233 型が多くなっていて (グラフ 8)。



(グラフ 7 : 県内の P233 型及び L233 型の頭数)



(グラフ 8 : 農家毎の P233 型及び L233 型の構成比)

## 5 考察

### (1) 牛白血病ウイルス (BLV) の県内感染率の推定

BLV の県内感染率を 50.9 ～ 66.0%と推定し、前回調査が行われた 2009 ～ 2011 年より中央値で 16.0 ポイント上昇しており、牛白血病の届出頭数に変化がない大分県でも BLV の感染が広がっていることが明らかになった。

### (2) BLV のプロウイルス量の測定

抗体陽性率と高リスク牛の割合には正の相関があり、高リスク牛が農場内で伝播リスク要因となっている一方で、高リスク牛の割合が低くても、飼養環境等により感染が広がっている農場が一部あると考えられた。

また、子牛や若齢牛は BLV に感染している確率は比較的低いものの、感染していれば子牛でも若齢でも老齢でも年齢によって伝播リスクは変わらないことが推測された。このため、導入時には比較的簡単に検査でき、かつ感度も高い抗体検査を年齢に関係なく実施し、必要に応じて分離飼育することが重要であると考えられた。

### (3) BLVtax 遺伝子の型別

BLVtax 遺伝子の型別では県内では P233 型が多く、大半の農場では P233 型が多いものの、L233 型が多い農場もごくわずかにあることが判明した。BLVtax 遺伝子の型別については、報告がまだ少ないが、本県とは逆に L233 型の方が多いという県もあり、今後の他県の浸潤状況調査や tax 遺伝子に関する研究に注視していく必要があると考えられた。

## 【参考文献】

- 1) E Inoue, K Matsumura, N Soma, S Hirasawa, Mayuko Wakimoto, Y Arakaki, T Yoshida, Y Osawa, K Okazaki. L233P mutation of the Tax protein strongly correlated with leukemogenicity of bovine leukemia virus. *Vet Microbiol.* 167: 364-371 (2013)
- 2) J Kohara, S Konna, M Onuma. Experimental transmission of Bovine leukemia virus in cattle via rectal palpation. *Jpn. J. Vet. Res.* 54:25-30 (2006)
- 3) Murakami K, et al. : Nationwide survey of bovine leukemia virus infection among dairy and beef breeding cattle in Japan from 2009-2011, *J Vet Med Sci*, 75,1123-1126 (2013)
- 4) Mekata H, et al. : Evaluation of the natural perinatal transmission of bovine leukaemia virus, *Vet Rec*, 176, 254 (2015)
- 5) 岡崎克則 : 獣医畜産新報 66 : 667-671 (2013)
- 6) 平成 23 年度農林水産省レギュラトリーサイエンス新技術開発事業報告書
- 7) 牛白血病に関する衛生対策ガイドライン