

4. 乳用牛飼養農場での牛白血病対策

玖珠家畜保健衛生所

○ (病鑑) 矢崎竜 木下正徳 佐伯美穂

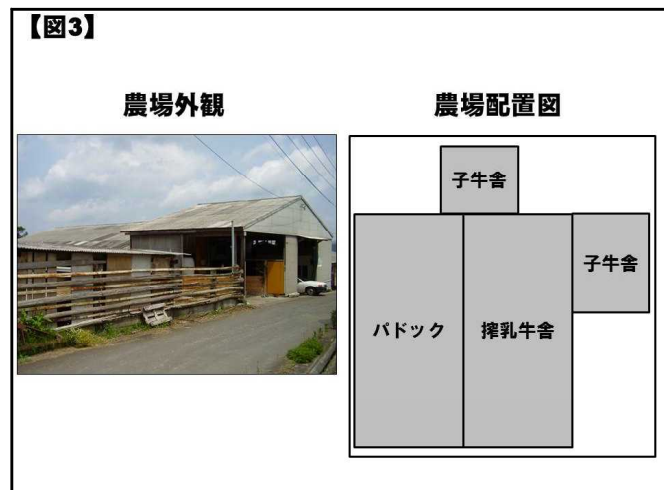
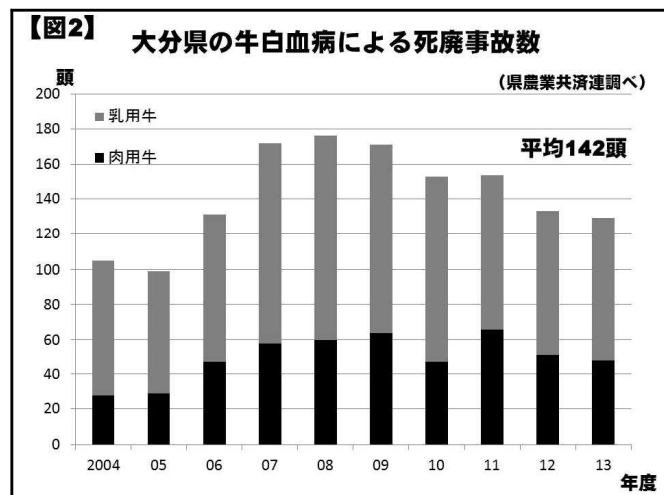
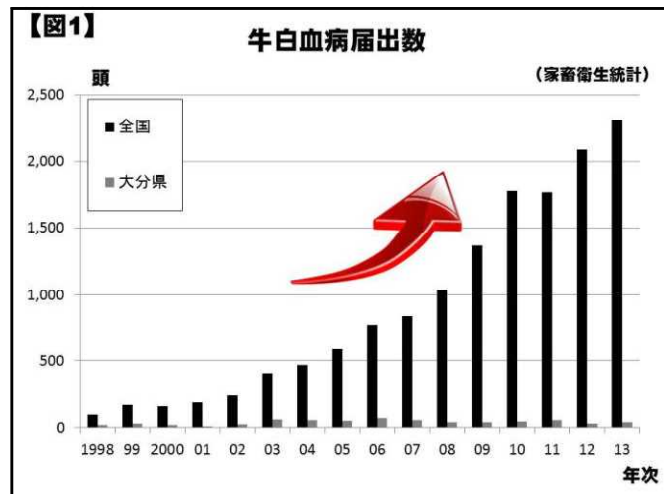
【はじめに】

牛白血病の発生状況は、図1に示すとおり年々増加し、2013年に全国で2,310頭の発生報告(届出)があり、2003年の約5.7倍と急増している。本県でも牛白血病対策を継続して実施しているところであり、2013年に39頭の発生が認められたが、2006年の73頭をピークにやや減少傾向にある。ただ、若齢での発生は継続して年5頭程度の発生を認めており、と畜場で一般畜として出荷された肥育牛での発生が大きな問題となっている。

本県の農業共済の牛白血病による死廃事故頭数を図2に示す。最近10年間で年度平均142頭と高い水準で推移している。直近の2013年度は129頭とやや減少傾向にあるものの、全体の死廃事故頭数の6.7%を占めるほど大きな問題となっている。

今回、2012年度に牛白血病の発生があった酪農経営農場で、牛白血病対策を実施したいとの希望により継続して対策を実施したところ、一定の効果を果たしたのでその概要を報告する。

対象農場の飼養頭数は、搾乳牛30頭、育成牛10頭で、搾乳牛は繋ぎ、育成牛及び乾乳牛はパドックで群飼育されている。農場外観と畜舎の配置図を図3に示す。



【材料と方法】

2012年6月から2014年7月まで定期的に年2回ずつ計5回の採血を実施した

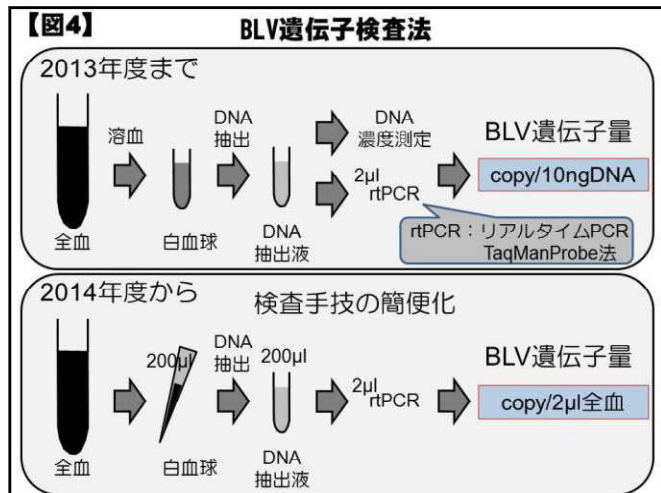
(表1)。2013年11月の4回目の検査からは全頭を検査対象とした。血液検査は自動血球計数装置により白血球数を測定し、血液塗抹標本によりリンパ球百分比を計測しリンパ球数を算出した。牛白血病ウイルス (BLV) 抗体検査は逆受け身赤血球凝集反応により抗体価16倍以上を陽性判定とした。2回目の検査からリンパ球数8,000個/ μ l以上の

個体については、リアルタイムPCR法により白血球中のBLV遺伝子のコピー数の測定を実施した。4回目の検査からは子牛を含めた全頭について同様の検査を実施した。

遺伝子検査の方法は、2013年度までの4回目の検査までは、次の方法で行った (図4)。

1. 全血に8.3%塩化アンモニウムを2倍量加え溶血
2. PBSで白血球を洗浄 (3回)
3. PBS500 μ lを加え、そのうち200 μ lからDNA抽出
4. DNA抽出は、「QIAamp DNA Mini Kit」を使用
5. サンプル抽出液の吸光度 (260nm) から、DNA濃度測定
6. TaqMan Probe法を用いたリアルタイムPCRによりサンプル中のBLV遺伝子コピー数を測定
7. 10ngDNAあたりのBLV遺伝子コピー数を算出

年	採材月	材料	回数
2012	6月	搾乳牛の血清 (5条検査)	1回目
	11月	搾乳牛の血清及び全血	2回目
2013	7月	搾乳牛の血清及び全血	3回目
	11月	全頭の血清及び全血	4回目
2014	7月	全頭の血清及び全血	5回目



2014年度から、遺伝子検査の簡便化を図るため、いくつかの手順を見直し次の方法で行った。

1. 全血200 μ lからDNA抽出
2. DNA抽出は、「QIAamp DNA Mini Kit」を使用 (最終200 μ l)
3. リアルタイムPCRによりサンプル2 μ l中のBLV遺伝子コピー数を測定
4. 3を全血2 μ lあたりのBLV遺伝子コピー数とした

ここで、この2つの方法で算出したBLV遺伝子コピー数の比較が可能かどうかについての予備試験を実施した。材料は、BLV抗体陽性で、BLV遺伝子コピー数が0~3,500となる牛全血10検体を用いた。結果は表2に示すとおりで、横軸に全血2μlあたり、縦軸に10ngDNA量あたりのBLV遺伝子コピー数をプロットしたところ、傾きは約1で、R²は0.93とほぼ2つの方法でほぼ同様の数値が得られ、今回はこの2つの方法で算出したBLV遺伝子量を絶対量として比較することとした。

検査結果について農場と協議し2013年度から、図5のように、抗体陽性牛と陰性牛の区分飼育、直検手袋の1頭毎交換、耳標装着及び除角等出血を伴う処置時の器具消毒、抗体陽性母牛の初乳給与中止、初乳製剤の利用及びハイリスク牛の早期廃用等、実施可能な牛白血病対策を開始した。

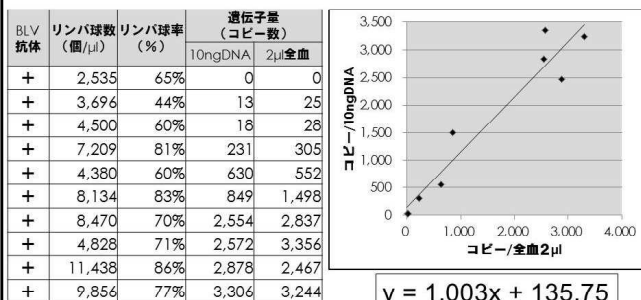
なお本県では、これまでの検査成績等から、BLV抗体陽性、リンパ球数1万個以上、リンパ球割合60%以上、BLV遺伝子量の高い順にハイリスク牛の選定を行っている。

【結果】

抗体陽性率は、対策前後とも約60%で推移したが、抗体陰性牛を多数廃用としたことや全頭を検査対象としたことで逆に抗体陽性率は上昇した。しかし、抗体陽転頭数は減少傾向、移行抗体消失による抗体陰転頭数は増加傾向が認められた（表3）。

【表2】

BLV遺伝子検査法の比較

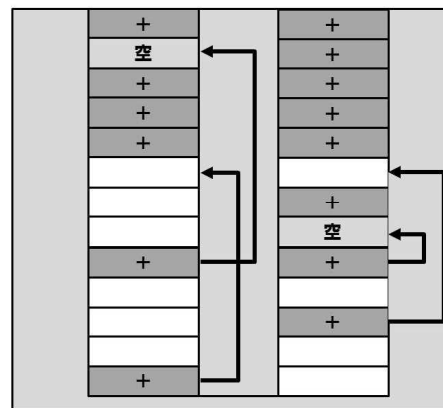


$$y = 1.003x + 135.75$$

$$R^2 = 0.9289$$

【図5】

区分飼育指導



【表3】

抗体検査及び遺伝子検査結果

回	実施日	頭数	抗体		遺伝子※		陽転数	陰転数
			陽性数	%	陽性数	%		
1	2012.7月	26	10	38.5	-	-	-	-
2	2012.11月	32	20	62.5	9	45.0	4	0
BLV対策開始								
3	2013.7月	34	20	58.8	6	30.0	1	1
4	2013.11月	43	27	62.8	9	33.3	2	1
5	2014.7月	38	24	63.2	7	29.2	1	4

※BLV遺伝子量
1,000コピー以上

次に、すべての検査成績から、母子関係のわかる結果のみを抽出したところ、抗体及び遺伝子陽性である14頭の母牛から出生した子牛でBLV非感染6頭、BLV感染8頭が認められた。BLV感染が認められた個体のうち、半数の4頭では出生後間もないことと人工初乳を給与されていたことから垂直感染が強く疑われた。また、抗体陰性の母牛9頭から出生した子牛はほとんどが陰性のまま推移したが、1頭で出生後のBLV感染が認められた（表4）。

【表4】

母子のBLV感染状況

	頭数	子牛	
		抗体- 遺伝子-	抗体+ 遺伝子+
母牛 抗体+ 遺伝子+	14	6	8 ※1
抗体-	9	8	1 ※2

※1 うち4頭
生後すぐの採材
初乳製剤給与 ➡ 垂直感染の疑い

※2 移行抗体消失後の陽転 ➡ 新たな感染

これまでの検査結果のうち、抗体陽性の91検体のリンパ球数及びその割合を表5に示す。リンパ球割合60%以上、リンパ球数1万個/ μ 1に合致するものがハイリスクとしてこれまで廃用基準とされてきた。表中、括弧内にBLV遺伝子が1,000コピー以上を示した検体の内数を示すが、これまでの基準内に収まる検体のほとんどはBLV遺伝子が1,000コピー以上となったが、BLV遺伝子が1,000コピー以上を示した30検体のうち、約半数程度しか廃用基準に合致しなかった。

【表5】

抗体陽性牛のリンパ球数及び割合の分布

		リンパ球数 (×100/ μ 1)						合計	
		<59	60 ~79	80 ~99	100 ~119	120 ~139	140 ~159		160<
リンパ球割合 (%)	40 ~ 49	7						7	
	50 ~ 59	10 ₍₁₎	5 ₍₃₎					15	
	60 ~ 69	15	3	6 ₍₅₎	1 ₍₁₎	1		26	
	70 ~ 79	5 ₍₁₎	4	8 ₍₅₎	3 ₍₃₎	2 ₍₂₎	2 ₍₂₎	24	
	80 ~ 89	3	4	2 ₍₁₎	2 ₍₂₎		2 ₍₂₎	1 ₍₁₎	14
	90 ~ 99		1	1	1		1	1 ₍₁₎	5
合計	40	17	17	7	3	5	2	91	

()内の数値：遺伝子1,000コピー以上の内数

表6に「ECの鍵」を示す。これは、牛の年齢と末梢血単核細胞数から牛白血病のリスク評価を行うもので、以前からこの基準を基にBLV対策を実施した報告も多数あるが、今回の結果とどのようにリンクしているかを確認した。これまでの検査でBLV遺伝子量が1,000コピー以上を基準値としてこれを超える検体について年齢別に並べ、それぞれECの鍵による基準と照合し、擬陽性以上及び陽性の判定となった場合一致と

【表6】

「ECの鍵」末梢血単核細胞数による判定

	末梢血単核細胞数 (全血1 μ あたり)		
	正常	擬陽性	陽性
0~1歳	<10,000	10,000 ~ 12,000	12,000<
1~2歳	<9,000	9,000 ~ 11,000	11,000<
2~3歳	<7,500	7,500 ~ 9,500	9,500<
3~4歳	<6,500	6,500 ~ 8,500	8,500<
4歳以上	<5,000	5,000 ~ 7,000	7,000<

「ECの鍵」判定とBLV遺伝子量による一致率

	0~1歳	1歳~2歳	2歳~3歳	3歳~4歳	4歳~
遺伝子基準値以上	0	2	12	12	5
うち擬陽性以上	0	0	11	10	5
うち陽性以上	0	0	7	7	5
「ECの鍵」擬陽性以上一致率	0%	0%	92%	83%	100%
「ECの鍵」陽性一致率	0%	0%	58%	58%	100%

遺伝子基準値1,000コピー以上

し、その率を求めた。4歳以上ではほぼ100%の一致率で、リンパ球のみで十分リスク評価できるが、若齢になると、ECの鍵の範囲を逸脱する個体が多く出現するといった結果になった。

【新たな廃用基準】

これまでのBLVの廃用基準では、一致しない個体が多く認められ、遺伝子検査をリンパ球数8,000個/ μ 1以上のみの個体だけで実施する場合など、見過ごされてしまう個体が多数出てしまうことが大きな問題であり、リンパ球割合やリンパ球数のみではBLVのリスク評価は困難であることが今回の試験結果から示唆された。そのため、表7に示すように、これまでのBLVの廃用基準を見直すこととし、BLV抗体、リンパ球割合、リンパ球数及びBLV遺伝子量の検査値を点数化し新たな基準を設けた。表8にそれぞれのBLV点数の対応基準を示す。5点以上を廃用基準とし、5点が「廃用推奨」、6点が「速やかに廃用」、7点が「直ちに廃用」とした。

同じく、表8に、2014年3月に採材した検体の各検査値から表7の基準値を求め合計値を年齢別に集計したものを示す。5点が4頭、7点が1頭となり、廃用基準を5頭が上回った。年齢別に見ると、高齢牛の点数が高い訳ではなく、各年齢に分散していた。

【表7】

項目	基準値				最大値
	陰性	陽性			
BLV抗体	0	1			1
リンパ球割合	<70%	70% \leq			1
リンパ球数	<10,000	<12,000	12,000 \leq		2
遺伝子量 (コピー数)	<1,000	<2,000	<3,000	3,000 \leq	3
合計					7

【表8】

BLV点数	基準	頭数	2歳	3歳	4歳	5歳	6歳	7歳	8歳
7	直ちに廃用	1			1				
6	速やかに廃用	0							
5	廃用推奨	4		1	1	1	1		
4	廃用候補Lv.4	2				1			1
3	廃用候補Lv.3	1				1			
2	廃用候補Lv.2	4		2	1	1			
1	廃用候補Lv.1	12		1	5	3	2		
合計		24							

(2014年7月採材検体)

【考 察】

農場のBLV清浄化は、感染牛を順次廃用し、非感染の育成牛と入れ替えていく必要があるが、酪農の場合、乳房炎や繁殖障害の方が優先され、短期間での抗体陽性率の低減が困難であった。

また、今回のデータから、BLV遺伝子量の多い母牛からは垂直感染が高率に起きていることが示唆され、対策の一つに育成牛の造成を抗体陰性牛に限定することを加え、分離飼育の徹底を図り抗体陽転を防ぐことで感染牛は確実に減少に転じていくと思われた。ただし、分離飼育は繋ぎ飼育の農場では有効であるが、それ以外の農場では実施が非常に困難であり、効果的な対策が取りづらい。今後、この部分への検討が必要であると思われる。

廃用基準については、個体毎に点数化することでリスク判定がより明確となり指導が容易になり、畜主の認識も高まった。今回設定したBLV点数表の妥当性についてさらに対象農場数を拡大し、検証していく必要があると思われる。

BLV検査費用は、抗体検査から遺伝子検査まで含めて1頭1回800円程度かかることから、多頭飼育の農場で対策を実施する場合は、高額な検査費用が必要となる。今後はより低コストな検査手法についても検討し、継続して牛白血病の清浄化へ向けて取り組みたい。