

## 9 肉用牛農家における牛白血病対策事例

上北地域県民局地域農林水産部 十和田家畜保健衛生所

○富山 美奈子 小田桐 千鶴恵  
太田 智恵子 白戸 明  
佐藤 公伸 中島 聡

### 1 はじめに

地方病性牛白血病（以下、EBL）は牛白血病ウイルス（BLV）による感染症である。感染経路は、アブやサシバエ等の吸血昆虫の口器、または出血を伴う除角、削蹄に使用した器具に付着した BLV 感染新鮮血液を介した水平感染や、母体内で子牛への BLV 感染が成立する子宮内感染、娩出過程で感染する産道感染、乳汁を介して感染する乳汁感染などの垂直感染がある[1]。

EBL は家畜伝染病予防法において平成 10 年に届け出が義務づけられて以降、発生頭数は増加している。発生頭数の増加は当所管内でも同様であり、当所では、数年前から管内農家向けに EBL 対策パンフレットを作成配布し、また EBL 講習会を毎年実施している。平成 28 年 EBL 講習会后、参加農家 71 戸に EBL についてアンケートを実施した結果、98%の農家が抗体検査や分離飼育等の対策を実施したいという意向があることがわかった。このような中、過去に EBL が発生した一肉用牛繁殖農家が増頭するにあたり、EBL 対策実施に強い要望があったことから、EBL 重点指導農家として選定し、BLV 感染状況調査および指導を実施した。また、今回、抗原検出方法として現地家保でも実

施が可能である遺伝子検査法についても検討したので、その概要を併せて報告する。

### 2 重点指導農家概要および検査対象

#### （1）飼養頭数及び形態

当該農家は繁殖雌牛 20 頭、子牛 13 頭の黒毛和種を飼養する繁殖肉牛農家であり、牛舎 1 棟で牛を飼養している。繁殖雌牛はつなぎ飼いであり、子牛は 1 房あたり 3～4 頭の群飼を行っている。また、分娩を控えた繁殖牛は、分娩房に入り、分娩後、子つきの状態で 1～2 か月間牛房で飼養される。

#### （2）検査対象

BLV 感染状況調査は、EBL 対策実施前の平成 28 年 7 月に繁殖雌牛 20 頭、EBL 対策後の平成 28 年 11 月に繁殖雌牛 20 頭および繁殖候補牛 5 頭を検査対象とした。

### 3 材料及び方法

#### （1）血液一般検査

検査対象牛の EDTA 血液を材料として白血球数計測及び常法に従いギムザ染色の血液塗抹を作成し、白血球百分比からリンパ球数を算出した。これに Bendixen の牛白血病診断基準（以下、EC の鍵）を用い、リンパ球数と年齢からリスクを陽性、疑陽性、

陰性と3段階に分類した。

(2) 抗体検査

検査対象牛の血清を用い BLV 抗体検査 (以下、ELISA) を実施した。

(3) 遺伝子検査

(ア) リアルタイム PCR 検査 (以下、qPCR)

検査対象牛の EDTA 血液から常法に従い塩化アンモニウム溶液を用いて白血球を抽出し、市販キットを用いて DNA を抽出した。白血球抽出 DNA の濃度を分光光度計で測定し、20ng/μl 以下になるよう希釈し、市販の BLV 検出キット (Takara) を用い qPCR を実施した。

(イ) Nested PCR 検査 (以下、Nested)

検査対象牛 (一部) の白血球抽出 DNA を用い、Fechner らによる Nested[2] を実施した。

(ウ) LAMP 法 (以下、LAMP)

検査対象牛 (一部) の白血球抽出 DNA を用い、Komiyama らによる LAMP[3] を実施した。

#### 4 EBL 対策および検査成績

(1) EBL 対策前の検査成績

表1 対策前の検査成績

	qPCR		(頭)
	+	-	
ELISA	+	6	0
	-	0	14

繁殖牛 20 頭のうち 6 頭に ELISA 陽性が認められ、同じ 6 頭が qPCR 陽性であった (表 1)。EC の鍵では 1 頭が疑陽性、19 頭

が陰性であった。

(2) EBL 対策

(ア) 牛舎内配置の変更

牛舎東側に分娩房があり、分娩した牛は子つきで約 2 か月過ごし、牛舎南側は繁殖雌牛をつなぎ飼いで収容していた (図 1)。

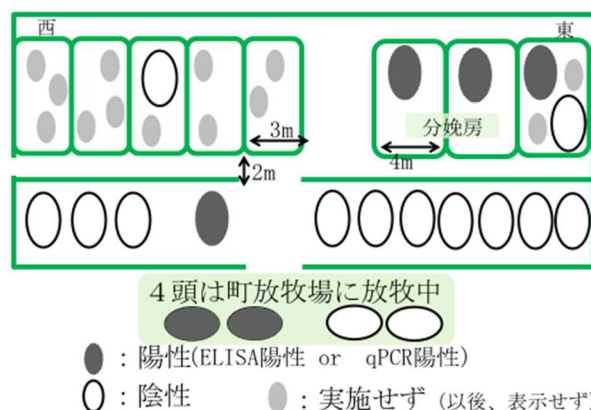


図1 対策前の牛舎配置および感染状況

EBL 対策として ELISA 陽性、qPCR 陽性の牛を牛舎南西側に集めてつなぎ飼いとし、BLV 陽性牛と陰性牛を分離した。分娩房については 2 房のみのため、陽性牛と陰性牛が混在して出入りする形となった (図 2)。

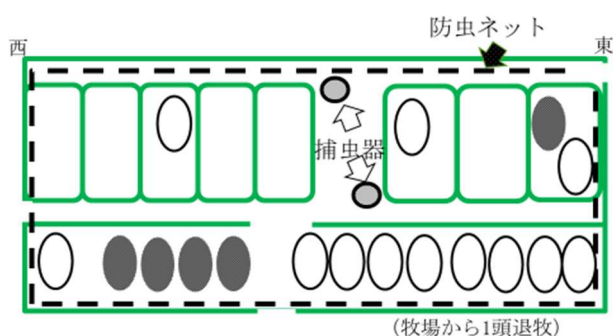


図2 対策後の牛舎内配置と感染状況

(イ) 吸血昆虫対策

牛舎周囲の壁および、開口部に殺虫効果のある防虫ネットを設置した。また、捕虫器 2 台を牛舎中央部に設置し、9 月中旬まで稼働した。この 2 つについては、設置・稼働することで、牛舎内の昆虫が減ったという農家の声が聞かれた (図 3)。



防虫ネット 捕虫器  
図3 吸血昆虫対策

(3) EBL 対策後の検査成績

ELISA では 10 頭に陽性が認められた。うち 6 頭は EBL 対策前から陽性であり、3 頭は対策期間中に新たに陽性となった。1 頭は 2 か月齢の繁殖候補牛であった。

また、ELISA 陰性の牛においても、qPCR で 5 頭が陽性であった。新たに陽性が認められた牛は平成 28 年の放牧は実施していなかった (表 2、図 4)。

EC の鍵では、対策前の疑陽性の牛のみ対策後も変わらず、他の 24 頭は陰性であった。

表2 対策後の検査成績

	ELISA	qPCR	
		+	-
	+	9*	1**
	-	5	10

(頭)

\* : うち6頭は対策前から陽性  
\*\* : 繁殖候補牛 (2か月齢)

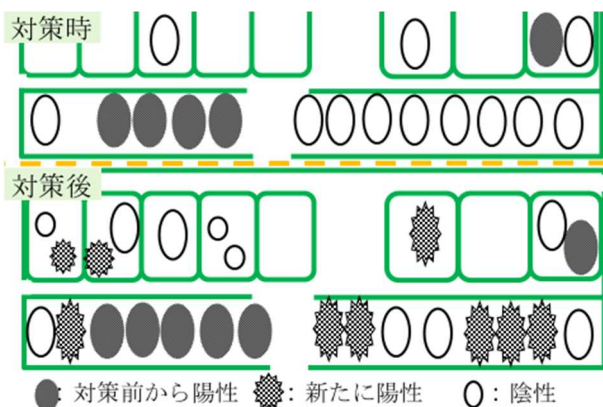
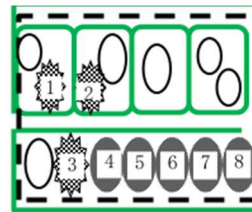


図4 感染状況の比較

5 検討

(1) 分離飼育



- No.1は母牛 (No.7) からの移行抗体によるELISA陽性であり感染していない
- 通路に防虫ネットはなく陽性牛群から水平感染した可能性

牛No.	NT:検査せず ND:非検出							
	1*	2**	3	4	5	6	7	8
ELISA 対策後	+	-	+	+	+	+	+	+
qPCR (copies /10ng) 対策前	NT	NT	ND	380.9	147.4	244.9	373.3	103.1
対策後	ND	0.29	0.25	409.2	202.7	529.5	400.2	171.4

\*:2か月齢、初乳給与あり    \*\*:10か月齢、初乳給与なし

図5 牛舎西側

牛舎西側の No. 1 は陽性牛の娘牛であり、移行抗体による ELISA 陽性は認められたが、qPCR 陰性であり BLV 感染は認められなかった。初乳摂取していなかった No. 2 では ELISA 陰性だったが qPCR 陽性であり、No. 2 は BLV 感染が認められた。防虫ネットのない通路を挟んだ南側には BLV 陽性牛が集約されていたため、ここからの感染、または一時的に収容された陽性分娩牛からの感染であったと考えられた (図 5)。



- 分娩房には対策期間中8頭 (うち4頭陽性) が出入りし、1頭 (No.9) のみ新たに陽性
- No.11~15は対策期間中移動せず、分娩房の陽性牛から感染と推測

牛No.	9	10	11	12	13	14	15
ELISA 対策後	+	+	+	-	+	-	-
qPCR (copies /10ng) 対策前	ND	0.35	ND	ND	ND	ND	ND
対策後	145.3	2.12	25.8	32.0	194.6	6.08	0.12

図6 牛舎東側

牛舎東側において、分娩房では対策期間中に No. 9 を含む 8 頭の牛の移動があり、うち 4 頭が BLV 陽性であった。BLV 陰性の 3 頭は対策前後でも感染は認められず、No. 9 のみ新たに BLV 陽性となった。牛舎南側か

ら No. 9 が採材直前時期に分娩房に入った以外は大きな移動はなく、No. 11～15 は通路越しの水平感染が疑われた。また、No. 12、14、15 については、感染後抗体が産生される前に採材したためと考えられた (図 6)。

## (2) LAMP の検討

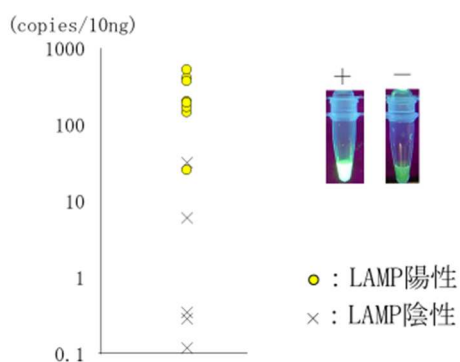


図7 qPCR遺伝子量とLAMPの比較

qPCR による遺伝子量と LAMP の結果との比較を行ったところ、図 7 のとおりとなった。 $10^1 \sim 10^2$  copies/10ng で LAMP 陽性と陰性が混在して認められたため、本検討では、これ以上の遺伝子量であれば検出可能であった (図 7)。

表3 LAMP、qPCR、Nestedの比較

		LAMP	
		+	-
qPCR	+	8	6
	-	0	11
Nested	+	0	0
	-	0	6*
NT		8	11

(頭)

\* : ELISA陰性・qPCR陽性5頭 + 移行抗体1頭

LAMP の検査成績を、qPCR および Nested の検査成績と比較したところ、qPCR 陽性だった 14 頭中 6 頭は LAMP 陰性であり、これは Nested においても実施した検体と同一であったため、本検体では LAMP と Nested は同等の陽性数であった。なお、Nested は ELISA

陰性かつ qPCR 陽性の 5 頭および移行抗体検出の 1 頭の計 6 頭のみ実施したため、残り 19 検体は実施していない (表 3)。

最後に、各遺伝子検査方法について、検出感度、施設、コストについて比較を実施した。qPCR は検出感度が良いが、コストもかかり専用機器も必要である。Nested も専用機器が必要であるが、コストは低い検査法であった。今回検証を行った LAMP は qPCR、Nested よりも所要時間は短く、コストは qPCR よりも少なかった。一定温度を保てる器具があれば実施可能であり、Nested と同感度でもあったため、専用機械をもたない現地家保でも十分利用できる方法であると考えられた (表 4)。

表4 各遺伝子検査法の比較

	qPCR	Nested	LAMP
検出感度	◎	○	○
所要時間	△	×	○
コスト	×	○	△
施設、機械	×	×	○

## 5 考察およびまとめ

今回、指導を行った農家では、8 頭について対策期間中の感染が認められ、これらは期間中放牧していなかったため、牛舎内での水平感染であったと考えられた。また、8 頭のうち 5 頭は、ELISA 陰性であったことから、BLV 初期感染牛であると考えられた。BLV 感染の高リスク牛である PL 牛は今回疑陽性の 1 頭しか認められておらず、また遺伝子量においても高コピーにあたる牛は存在せず、本状況下でも BLV 感染成立が認められた。今回の事例では牛舎内に入る昆虫

数を減少させたにも関わらず、BLV 感染の可能性があることが示唆され、通路等にも防虫ネットが必要と考えられた。

また、今回は捕虫器内の捕虫種を確認していなかったため、要因となった昆虫の特定には至らなかった。

抗原を検出する遺伝子検査の検証では、感度は LAMP と Nested は同程度であったため、今後検体数を増やす予定である。農場では ELISA で感染状況を把握するとともに、LAMP を含む遺伝子検査は清浄化を図る農家が陰性の繁殖候補牛を選定する方法として有効と考えられた。

本事例については、今後、水平感染対策として、陽性牛を東側に集約し、さらに陰性牛専用の分娩房の増築を検討している。当該農家は感染拡大には落胆したが、増頭、増築の意向はあるため、来シーズンも対策を希望しており、引き続き浸潤調査を行う必要がある。このような EBL 対策においては、農家の BLV 清浄化を達成したいという意欲が無い限り、継続した対策を行うことは難しく、それには検査や指導などの家保によるサポートが今後も不可欠と考えられた。

## 参考文献

[1]今内覚, 牛白血病 最近の知見と対策について, 北海道大学院獣医研究科, 2017年1月11日取得

[2] Fechner, H., et al.: Virology. 237, 261-269 (1997)

[3] Komiyama, C., et al.: Journal of virological methods, 157(2), 175-179 (2009)