

牛白血病の感染状況

病理部門

The incidence of the bovine leukemia

Division of Pathology

Abstract

Recently, the incidence of the bovine leukemia (BL) rises. Most of BL are enzootic bovine leukemia (EBL) caused by bovine leukemia virus (BLV). In this study, to recognize BLV infection state of affairs, the prevalence of BLV antibody and BLV proviral DNA were investigated. In specimens from 27% of the farms, antibody or proviral DNA was detected. With feedback of the obtained data to the farmers and the livestock hygiene service center, we are able to contribute to prevention of BLV spread.

Key Words : bovine leukemia (BL) 牛白血病, bovine leukemia virus (BLV) 牛白血病ウイルス, BLV antibody 牛白血病ウイルス抗体, BLV proviral DNA 牛白血病ウイルスプロウイルス DNA, passive hemagglutination reaction (PHA) 受身赤血球凝集反応, polymerase chain reaction (PCR) ポリメラーゼ連鎖反応

1 はじめに

牛白血病は地方病性の成牛型牛白血病と散発性の子牛型、胸腺型及び皮膚型牛白血病に分類され、そのほとんどが地方病型牛白血 (enzootic bovine leukemia ; EBL) である。地方病型牛白血病は牛白血病ウイルス (bovine leukemia virus ; BLV) を原因とする疾病で、その多くは不顕性感染である。しかし、発病すると治療法は無く、と畜検査においては全部廃棄の対象疾病であるため、生産者の経済的損失は大きい。近年、牛白血病の発生数は増加しており、と畜検査で発見される症例が今後増加すると考えられる。今回、BLV 感染実態を把握するため、BLV 抗体保有状況及び BLV プロウイルス DNA 保有状況を調査したのでその概要を報告する。

2 材料及び方法

2006年4月から2007年3月に京都市と畜場に搬入された牛75頭について、放血時に採血を行った。採血は京都市と畜場への搬入頭数が多い生産者12戸から64頭、生体所見で削瘦や発育不良の見られた11頭について行い、血清分離剤入りチューブ (セパラピッドSチューブ) 及び EDTA 入りチューブ (インセパック II-D) に採取した。セパラピッドSチューブに採取した血液を3,000rpm, 15分遠心分離し、得られた血清を検体として、使用時まで-80℃で保存した。血清は牛白血病抗体アッセイキット「日生研」(日生研) を用い、受身赤血球凝集反応法 (passive hemagglutination reaction ; PHA) を行い、BLV 抗体の定性試験を行った。定性試験陽性の個

体は、同キットを用いて定量試験を行った。また、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) もしくはインスタジーンマトリックス (BIO-RAD) を用い、全血から DNA を抽出し、Fechnerら⁽¹⁾が設計したプライマーを用い、nested PCR を行い、BLV プロウイルス DNA の検出を試みた。1st PCR は、94℃で5分インキュベート後、94℃で30秒、62℃で30秒、72℃で60秒を40サイクル行い、最後に72℃で4分間伸長反応を行った。2nd PCR はアニーリング温度を70℃に変更し1st PCR と同様に行った。

3 結果

BLV 抗体及び BLV プロウイルス DNA の保有状況を表1に示した。BLV 抗体陽性率は15%、BLV プロウイルス遺伝子の保有率は15%であった。抗体陽性個体の抗体価は64倍から512倍であり、平均値及び中央値はそれぞれ297倍及び256倍であった (表2)。PHA 陽性・PCR 陰性個体は1頭、PHA 陰性・PCR 陽性個体は1頭認められた (表3)。

6農場 (27%) において陽性個体が認められ、2農場においては50%以上の陽性率であった。

4 考察

BLV に感染すると、Bリンパ球中にプロウイルスとして組み込まれ、この状態が感染牛の生涯を通じて継続し、BLV 感染牛は感染源となりつづける。BLV の清浄化には、感染牛の隔離や淘汰が必要となり、農場の BLV 汚染率が高くなると、農場の清浄化は経済的損失が大きく、困難となる。そのため、BLV が浸潤した場合は早期に、対応する必要がある。牛白血病の好発年齢は4-8歳であるの

表 1 BLV 抗体保有率及び BLV プロウイルス遺伝子保有率

生産者	検体数	PHA		PCR	
		陽性	陽性率 (%)	陽性	陽性率 (%)
A	5	1	20	1	20
B	4	0	0	0	0
C	8	0	0	0	0
D	5	0	0	0	0
E	6	5	83	5	83
F	5	0	0	0	0
G	5	2	40	3	60
H	5	1	20	1	20
I	5	0	0	0	0
J	5	0	0	0	0
K	6	1	17	0	0
L	5	0	0	0	0
異常所見	11	1	9	1	9
	75	11	15	11	15

表 2 PHA 陽性牛の抗体価

生産者	抗体価
A	256
E	256
	128
	512
	512
	128
G	256
	64
H	512
K	128
異常所見	512

表 3 PHA と PCR の感度及び特異性

		PHA	
		陽性	陰性
PCR	陽性	10	1
	陰性	1	63

に対し、肥育牛の多くは 36 ヶ月齢以下で出荷されるため、繁殖牛や乳用牛と比較し、BLV 検査は十分ではない。当所では、生体所見において異常の見られた牛については全頭、正常牛についても、定期的に血液生化学検査を行っている。これらの血液サンプルを用い、BLV 検査を行

うことにより、各生産者の BLV 浸潤状況を明かし、BLV 陰性農場における BLV 汚染を早期に察知し、浸潤状況のデータを生産者及び家畜保健衛生所に還元することで、BLV の清浄化に寄与できると考えられる。

BLV 抗体保有率調査においては、調査した出荷者のうち、27%の出荷者から陽性個体が検出された。しかし、調査頭数が少ないため、実際の農場への BLV 浸潤率はより高いと考えられる。調査個体全体の陽性率は 15%であり、正常牛及び異常所見牛の陽性率はそれぞれ 16%及び 9%で、削瘦や発育不良の有無による差はほとんど認められなかった。また、陽性率が 80%を超えている農場が見られることから、通常時の検査には、高度に汚染されている農場に注意する必要があると考えられた。BLV プロウイルス DNA 保有率調査においても、抗体調査と同様の傾向が見られた。

両者の比較では、PHA 陽性・PCR 陰性 1 頭及び PHA 陰性・PCR 陽性 1 頭、PCR の PHA に対する相対感度は 90.9%、相対特異性 98.4%及び一致率 97.3%であり、検出感度に差は認められなかった。BLV 感染時には、抗体陽性化よりも、早期にプロウイルス DNA の検出が可能になるため、PHA 陰性・PCR 陽性個体は感染初期であると考えられた。一方、PHA 陽性・PCR 陰性個体については詳細な原因については不明であるが、感染経過が長い個体の一部でみられたという報告があり、本事例も感染経過の長い個体である可能性が考えられた⁽²⁾。今回の調査では検出感度に差が認められなかったことから、どちらの方法をスクリーニングに採用してもよいと考えられたが、早期に感染を察知できるという利点から、手技は煩雑になるが PCR の方が適していると考えられた。また、当所では牛白血病は肉眼所見及び組織所見で判定し、補助的に抗体検査と遺伝子検査を行っている。しかし、牛白血病の組織形態は多彩であることから、牛白血病の増加に伴い、診断に苦慮する事例が見られる可能性が考えられる。そのため、今後、抗体検査及び遺伝子検査の重要性が増すと考えられる。

5 参考文献

- (1) Fechner H., Blankenstein P., Ebner D., et al.: Virology, **237**, 261-269 (1997)
- (2) 加地紀之他: JVM, **60**, 131-136 (2007)