

中央卸売市場第二市場（京都市と畜場）搬入牛における地方病性牛白血病の感染状況

伊東大輔*, 村北佳史*, 田村和義*, 小野耕介**,
泉千加*, 田邊輝雄*, 多田二郎*, 男成良之***The situation about the infection of EBL (enzootic bovine leukemia)
in beef cattle carried in the second central wholesale market of Kyoto City
(the Kyoto City Slaughter House)****Daisuke ITO, Yoshihumi MURAKITA, Kazuyoshi TAMURA, Kosuke ONO,
Chika IZUMI, Teruo TANABE, Jiro TADA, Yoshiyuki ONARI****Abstract**

In 2006, our section investigated infection of EBL (enzootic bovine leukosis) about 75 beef cattle carried in the second central wholesale market of Kyoto City (the Kyoto City Slaughter House). As a result, in an examination for PCR (polymerase chain reaction) test and PHA (passive hemagglutination reaction) test, both were 15% of infection rates each.

In the period from April, 2011 to March, 2013, our section investigated 196 beef cattle in the same way again. The infection rate was approximately 30% and became the numerical value of approximately 2 times in comparison with the last findings.

Key Words

bovine leukosis (BL) 牛白血病, enzootic bovine leukosis (EBL) 地方病性牛白血病, bovine leukemia virus (BLV) 牛白血病ウイルス, 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 緒言

牛白血病は牛白血病ウイルス (bovine leukemia virus ; BLV) を原因とする地方病性 (成牛型) 牛白血病と発生原因不明の散発性の子牛型, 胸腺型及び皮膚型牛白血病に分類されるが, 現在, 国内で発生している牛白血病のほとんどが地方病性牛白血病 (enzootic bovine leukosis ; EBL) である¹⁾。

地方病性牛白血病に感染しても多くが不顕性であるが, 発症した場合, 治療はなく, と畜検査において牛白血病と判定された場合, 枝肉, 内臓の全てが廃棄となる疾病であるため, 生産者の経済的損失は大きい。

平成17年度において, 京都市中央卸売市場第二市場 (京都市と畜場) 搬入牛の感染状況調査を衛生公害研究所病理部門 (現在は衛生環境研究所食肉検査部門に名称変更) が実施し, PCRによるプロウイルスDNA陽性率が約15%, 受身赤血球凝集反応 (passive hemagglutination ; PHA) においても陽性率は約15%であった²⁾。他自治体等においても同様の調査が実施されており, 当時の当部門の調査結果より高い感染率を示した調査結果も存在している^{3), 4)}。

前回の調査より5年以上経過しており, 現在のBLV感染実態把握するにあたり, PCRによるプロウイルスの検出個体と牛白血病ウイルス抗体陽性個体が一致していない事例²⁾もあり, 牛白血病ウイルスの感染実態をより確実に把握するために, 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, その結果について報告する。

2 検査材料及び方法

2011年4月から2013年3月の期間において, 京都市中央卸売市場第二市場に搬入された牛で, かつ牛白血病の症状を呈していない牛196頭について調査を実施した。これら牛は, 31の出荷者から搬入された和牛166頭, 和牛ホルスタイン種交雑牛 (以後F1とする) 15頭, ホルスタイン牛15頭で, そのうち和牛36頭, ホルスタイン牛1頭は病畜として搬入された牛であった。平均月齢は36.3ヶ月齢で, 調査牛の各月齢の分布は表1のとおりである。

検査材料は血液とし, と殺時の放血を血清分離剤入りチューブ (セパラピッドチューブS) 及びEDTA入りチューブ (BDバキュティナ採血管) にて採取した。

* 京都市衛生環境研究所 食肉検査部門

** 中京区役所保健部

セパラピッドチューブSに採取した血液は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-10℃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)によるPHA法を行い, 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, EDTA入りチューブにより採取した血液を全血とし, InstaGene™ Matrix (BIO-RAD)を用いてDNAを抽出し, Fechnerら⁵⁾が設計したプライマーを用いてnested PCRを実施し, BLVプロウイルスDNAの検出を試みた。1st PCRは, 94℃で4分インキュベート後, 95℃で30秒, 62℃で30秒, 72℃で60秒を35サイクル行い, 最後に72℃で5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。

上記により得られたPCR産物は, 1.5%アガロースゲルにて電気泳動を行い, 特異的なバンドが認められたものを陽性と判定した。

性を比較したところ, 図2のとおりであった。なお, 各出荷者から採取した検体数は表2のとおりである。

平成17年度において陽性率が0%であった4出荷者C, F, I, Jが, 本調査では16.7%~54.5%の陽性率を示し, 出荷者Hにおいては陽性率の上昇が認められた。

一方, E, Gの2出荷者については, 平成17年度調査において高い陽性率を示していたが, 本調査では陽性率が低下し, 牛白血病ウイルス汚染状況の改善が示唆された。

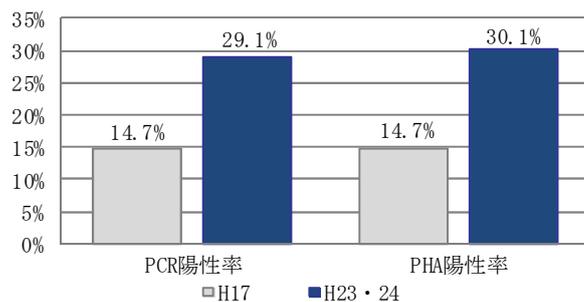


図1 陽性率の比較

表1 調査牛の月齢

月齢	調査頭数		
	和牛	F1	ホルスタイン
24未満	18 (13)	0	12 (1)
24以上 48未満	122 (23)	14	3
48以上 72未満	13	1	0
72以上 96未満	4	0	0
96以上 120未満	1	0	0
120以上	8	0	0
合計	166 (36)	15	15 (1)

() 内は各調査牛のうち病畜頭数

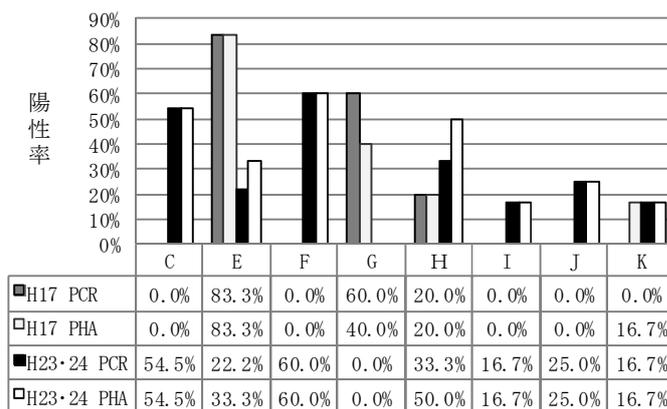


図2 平成17年度に調査した各出荷者における陽性率の比較

3 結果

(1) 牛白血病ウイルス感染率及びPCR・PHA陽性率の比較

今回の調査において, PCR及びPHAの両者, またはいずれか一方が陽性となった牛の割合を感染率とすると, 196頭中64頭で32.7%であった。

PCRとPHAの両者, またはいずれか一方が陽性となった頭数を感染頭数とすると, PCR陽性頭数と感染頭数の一致率は89.1%, 同様にPHAの一致率は92.2%であった。

本調査結果と前回調査結果と比較すると, 本調査におけるPCR陽性率は29.1%, PHA陽性率は30.1%であり, 2倍程度の陽性率を示した(図1)。

前回調査した17出荷者A~Lのうち, 8出荷者C, E, F, G, H, I, J, Kについては再調査できたので, PCR及びPHA陽

表2 前回調査出荷者における各検体数

出荷者	検体数	
	H23・24年度	H18年度
C	11	8
E	9	6
F	15	5
G	7	5
H	12	5
I	24	5
J	4	5
K	12	6
合計	94	45

(2) 月齢別感染率の比較

一定の月齢区分別に感染率を比較すると図3のとおりとなった。なお、各月齢範囲の調査頭数及び調査出荷者数は表3のとおりである。

月齢が高くなるほど感染率が高くなる傾向が示唆され、特に36ヶ月齢以上48ヶ月齢未満の区分から感染率が急増していた。

なお、この36ヶ月齢以上48ヶ月齢未満の区分から、各月齢区分における調査牛中の経産牛が占める割合が高くなってきているため、36ヶ月齢以上の牛における経産・非経産牛の感染率を比較したところ、表4のとおりとなった。

経産牛は非経産牛と比較して、高い感染率を示したが、経産牛は非経産牛より平均月齢は高くなっている。

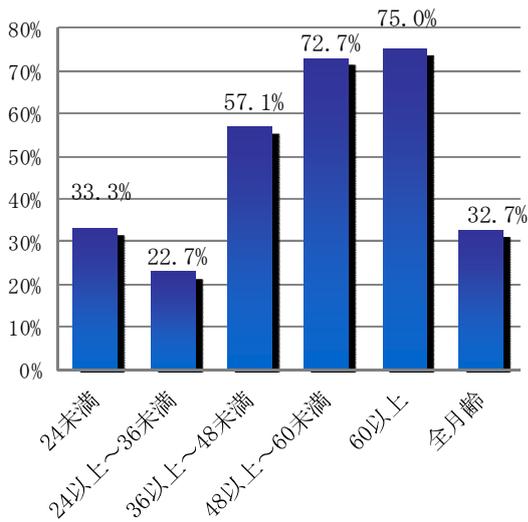


図3 月齢別感染率の比較

表3 各月齢区分の調査頭数及び調査出荷者数

月齢区分	調査頭数 () : うち経産牛数	調査 出荷者数
24未満	30 (1)	9
24以上~36未満	132 (0)	23
36以上~48未満	7 (2)	6
48以上~60未満	11 (6)	8
60以上	16 (14)	8
合計	196 (23)	—

表4 36ヶ月齢以上の牛における経産・非経産牛の感染率

	調査頭数	感染頭数	感染率	平均月齢
経産	22	17	77.3%	94.8
非経産	12	7	58.3%	52.4

(3) 各出荷者における感染状況

各出荷者における感染状況を比較するため、1出荷者あたり5検体以上採取できた16出荷者166頭を対象に感染率について比較したところ、図4のとおりとなった。

感染率が0%となった出荷者は、16出荷者中4出荷者であり、その他12出荷者は14.3%~73.3%の感染率を示した。

感染率の平均値32.7%以上を示した出荷者は、出荷者2, 出荷者3, 出荷者4, 出荷者5, 出荷者8, 出荷者20, 出荷者29であり、各出荷者の出荷牛月齢層、牛種等は表5に示した。

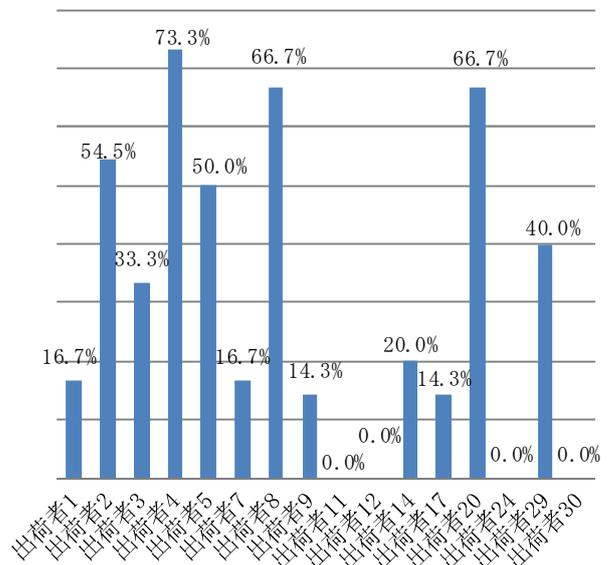


図4 各出荷者における感染率

表5 平均値以上の感染率を示した出荷者における感染状況

出荷者 (): 調査頭数	牛区分	牛種別調査頭数			月齢 範囲	経産 頭数
		和牛	F1	ホルス タイン		
出荷者2 (11)	感染	6	—	—	58~ 154:4頭	4
	非感染	5	—	—	26, 37: 2頭	—
出荷者3 (9)	感染	—	3	—	27~29	—
	非感染	—	6	—	27~28	—
出荷者4 (15)	感染	—	4	7	19~30	—
	非感染	—	1	3	19~25	—
出荷者5 (12)	感染	6	—	—	22~37: 5頭 176:1頭	1 (176 ヶ月)
	非感染	6	—	—	17~31	—
出荷者8 (6)	感染	4	—	—	27~29	—
	非感染	2	—	—	28, 29	—
出荷者20 (6)	感染牛	4	—	—	44:1頭 136~ 137:3頭	4
	非感染	2	—	—	22, 51	1 (51 ヶ月)
出荷者29 (10)	感染牛	4	—	—	13~30	—
	非感染	6	—	—	20~37	—

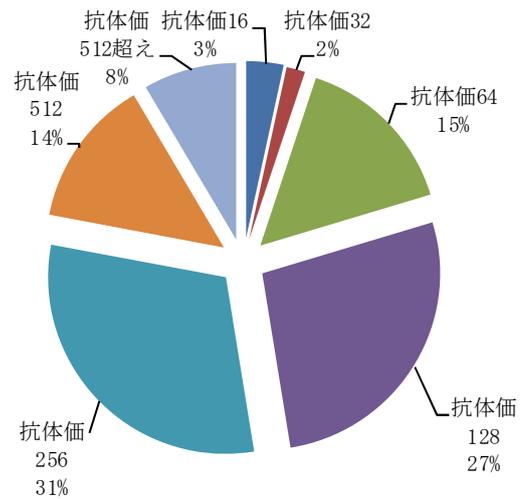


図5 PHA陽性牛の抗体価

(5) PHA陽性個体の月齢層と平均抗体価

地方病性牛白血病発症好発月齢とされる60~96ヶ月齢⁶⁾を中心に当該月齢範囲内もしくは範囲外の牛血清における平均抗体価を図6に示した(nは各月齢層の検体数)。その結果、調査検体数が6検体で少数ではあるが、発症好発月齢の平均抗体価が最も高い数値416.0を示した。

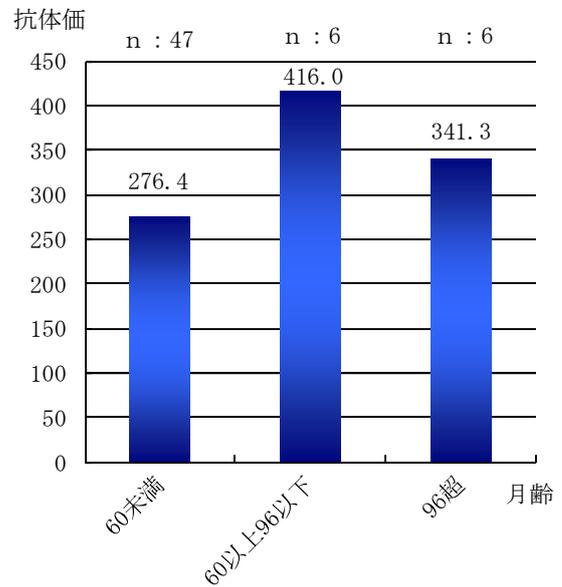


図6 PHA陽性牛の月齢と抗体価

(4) PHAにおける抗体価の分布

PHA陽性個体59検体の抗体値の分布については、図5のとおりとなった。平均値は約297倍、中央値は256倍であり、平成17年度調査と同等の結果となった。

4 考察

平成17年度調査と比較して、2出荷者に牛白血病ウイルス汚染の改善傾向が認められたものの、新たに4出荷者に牛白血病ウイルスの感染牛が確認され、図1のとおりPCR

及びPHA陽性率において、本調査では約2倍の結果となったことから、京都中央卸売市場第二市場搬入牛において、牛白血病ウイルス感染は拡大していると考えられる。

図4の各出荷者の感染状況として、感染率は0%~73.3%と各出荷者において差異が認められたが、感染率が平均値以上となった表5中の出荷者において、感染牛がF1及びホルスタイン種、または感染牛が高齢牛・経産牛である傾向の出荷者が認められた。

黒毛和種に比べ、F1及びホルスタイン種の方が感染陽性率は高いという報告³⁾があり、本調査でも黒毛和種の感染率が28.9%に対し、F1牛3出荷者15頭中8頭（各出荷者調査頭数:9頭, 5頭, 1頭で3出荷者全てに感染牛あり, 24~30ヶ月齢:14頭, 59ヶ月齢経産:1頭）の感染率が53.3%, ホルスタイン種4出荷者15頭中8頭（各出荷者調査数:10頭, 2頭, 2頭, 1頭でうち2出荷者が感染牛あり, 全て19~30ヶ月齢）の感染率も53.3%であり、特定の出荷者が中心となった調査群ではあるものの、本調査結果も広島市の調査と同様の傾向にあると考えられた。

経産牛において、9出荷者23頭中17頭（感染率73.9%）にウイルス感染が認められたが、本調査の経産牛は平均月齢が91.6ヶ月と高齢牛が主であった。

図3において、月齢が上がるほど感染率が高くなる傾向が認められたが、本調査では調査牛の月齢が高くなると共に経産牛が占める割合が高くなっている。

表4においては、36ヶ月以上の牛における経産・非経産牛の感染率を比較したところ、経産牛の方が高い感染率を示したが、非経産牛より経産牛の方が平均月齢も高くなっており、高い感染率を示した要因が経産、月齢のいずれによるものかは明らかにできなかった。

従って、このグループの牛が高い感染率を示した原因として、出産に至るまでの何らかの過程か、またはアブ等吸血昆虫等⁵⁾による長期のウイルス暴露期間のいずれか、もしくは両者が原因と考える。

地方病性牛白血病発症好発年齢は3歳以上、特に5~8歳といわれており⁶⁾、本調査における3歳以上の牛は、13出荷者（各出荷者において1~6頭調査）34頭調査中24頭に牛白血病ウイルスの感染（70.6%）が認められ、そのうち33頭がメスで感染率は72.7%、6出荷者11頭の非経産牛の感染率が63.6%、8出荷者22頭の経産牛の感染率は77.3%であった。

3歳以上の繁殖用雌牛の牛白血病ウイルス感染は、その牛の牛白血病の発症及び水平感染の感染源となる恐れが

あるだけでなく、感染牛から子牛への垂直感染、特に発症牛の胎仔への感染率は約30%⁵⁾といわれており、牛白血病対策において、牛白血病ウイルス感染繁殖用雌牛の対策は重要であると考えられる。

また、表5において、非経産の和牛で、感染牛と非感染牛の年齢層において差異が認められない出荷者もあった。

牛白血病ウイルスは、水平感染だけではなく垂直感染も成立し、様々な感染経路が考えられることから、牛の搬入出が頻繁な農場であるならば、牛白血病ウイルスの遺伝子型別により感染経路を特定することも有用な方法となりうると思われる⁷⁾。

京都市中央卸売市場第二市場に搬入される牛は30ヶ月程度程度の牛が主であり、牛白血病として枝肉等の全部廃棄事例は過去5年間で毎年1~4例程度であるが、感染が拡大すれば、と畜場搬入牛において牛白血病発症牛が発見される可能性が高くなっていく。

今回の調査結果を踏まえ、今後も畜産現場等にフィードバックし、地方病性牛白血病対策の一助となるよう出荷者への啓発をしていかなければならないと考える。

5 参考文献

- 1) 小山弘之：獣医伝染病学，第三版，104~106，近代出版，東京（1989）
- 2) 病理部門：牛白血病の感染状況．京都市衛生公害研究所年報，第73号（平成18年度）
- 3) 大川育之，阿倍恵子他：広島市と畜場における地方病性牛白血病の抗体保有状況とその発生．広島県獣医学会雑誌，No. 22（2007）
- 4) 市村有理，伊藤由美他：牛白血病ウイルス浸潤状況調査と清浄化対策の推進．平成21年度新潟県家畜保健衛生所，業績発表会集録，27-29
- 5) Fechner H., Blankenstein P., Ebner D., et al. : Virology, 237, 261-269 (1997)
- 6) 村上賢二，小林創太他：我が国の地方病性牛白血病の発生動向と対策，日獣会誌，62, 499~502（2009）
- 7) 清水佑也，竹田雅一他：管内と畜場の牛白血病浸潤状況について．平成23年度千葉県獣医学会（第36回）