

3. 牛白血病清浄化への取り組み

玖珠家畜保健衛生所 大分家畜保健衛生所¹⁾

○羽田野昭、(病鑑) 吉武理、病鑑 首藤洋三¹⁾

【はじめに】

近年、地方病型牛白血病（EBL）は全国的に増加傾向にあり、EBLの発生要因の特定及びまん延防止対策により、EBLの発生防止を図ることが喫緊の課題である。

このような状況を踏まえ、本県では、昨年度より牛白血病まん延防止対策事業を実施しているが、当家保でまん延防止対策を実施している3農場で、EBL浸潤状況調査を実施した結果、EBLのハイリスク牛とされている牛白血病ウイルス（以下BLV）抗体陽性で、「ECの鍵」の淘汰基準であるリンパ球数12,000個/u1以上の牛、いわゆる持続性リンパ球増多症牛（以下PL牛）基準について、再検討が必要であると考えたので、その概要を報告する。

【重点指導農場の概要】

2009年度の牛白血病まん延防止対策事業における3戸の重点指導農場は、A農場：母牛61頭飼養、舎飼でフリーストール、B農場：母牛72頭飼養、舎飼で繋ぎ、C農場：母牛111頭飼養、放牧実施で牛舎はフリーストールで、何れも黒毛和種繁殖農場である。

【重点指導農場のEBL浸潤状況調査結果】

各農場の平均白血球数は、A農場7,200個/u1、B農場7,690個/u1、C農場14,110個/u1、BLV抗体陽性率は、A農場63.9%、B農場37.5%、C農場82.0%、PL牛率は、A農場0%、B農場1.4%、C農場23.4%であり、平均白血球数、抗体陽性率、PL牛率ともに放牧を実施しているC農場で高い傾向がみられた（表-1）。

表-1 重点指導農場のEBL浸潤状況調査結果

農場名	平均白血球数 (個/u1)	BLV抗体		PL牛
		陽性頭数	(陽性率)	頭数 (率)
A農場	7,200	39/ 61	(63.9%)	0 (0%)
B農場	7,690	27/ 72	(37.5%)	1 (1.4%)
C農場	14,110 ↑	91/111	(82.0%) ↑	26 (23.4%) ↑

*PL牛基準：BLV抗体陽性かつ血液中リンパ球数12,000個/u1以上の牛

【まん延防止対策】

重点指導農場のEBL浸潤状況調査結果を受け、まん延防止対策を各農場側と協議し、下記のとおり実施することとした。

人為的感染防止項目としては、直腸検査、各種注射、耳標装着、鼻かん装着、除角及び削蹄等の血液を伴う作業とし、人為的感染防止対策は、人為的感染防止項目における消毒等の徹底を実施することとした。

表-2 まん延防止対策

	A農場	B農場	C農場
1. 人為的感染			
1) 直腸検査	○	○	○
2) 各種注射	○	○	○
3) 耳標装着	○	○	○
4) 鼻かん装着	○	○	○
5) 除角	○	○	○
6) 削蹄	○	○	○
消毒液使用	○	○	○
2. 吸血昆虫感染			
1) 牛舎内外に網設置	×	×	×
2) 抗体陽性牛と陰性牛を分離飼育	○ (別牛舎分離)	×	×
3) 抗体陽性牛と陰性牛を分離放牧	×	×	×
3. 導入・自家保留牛抗体検査			
1) 導入・保留予定牛の抗体検査	○	○	○
4. 抗体陽性牛の淘汰			
1) 抗体陽性牛の一括淘汰	×	×	×
2) 抗体陽性牛淘汰順位優先	×	○ (実施可能)	×
3) PL牛の淘汰	△ (血統等勘案)	△ (血統等勘案)	△ (検射)

↑
PL牛分析を実施

吸血昆虫感染項目としては、牛舎内外への網設置、抗体陽性牛と抗体陰性牛の分離飼育及び抗体陽性牛と抗体陰性牛の分離放牧とし、吸血昆虫感染対策は、A農場で別牛舎での分離飼育を実施する以外は、牛舎構造上や共同牧場等により現状では実施困難との結果となった。

導入牛、自家保留予定牛の抗体検査は、3農場ともに実施することとした。

抗体陽性牛の淘汰項目としては、抗体陽性牛の一括淘汰、抗体陽性牛淘汰順位優先及びPL牛の淘汰とし、抗体陽性牛の一括淘汰は、経営上の理由により各農場とも困難とのことであった。抗体陽性牛の淘汰順位優先については、B農場で実施することとし、A、C農場は抗体陽性牛が多いため実施困難とのことであった。PL牛の淘汰については、各農場ともに血統等を勘案し実施していく方向となったが、C農場では、PL牛が多いことからPL牛を分析して、淘汰を検討することとした（表－2）。

【C農場のPL牛分析】

C農場のPL牛分析内容は、BLV抗体陽性牛・陰性牛別の平均白血球数（n:111）及び白血球数12,000個/u1以上牛のリンパ球数（n:60）の2項目とした。

平均白血球数は、抗体陽性牛平均で14,470個/u1（n:91）、抗体陰性牛平均で12,460個/u1（n:20）と高く、平均白血球数は、BLV抗体の有無に関わらず高値であった

（表－3）。

また、白血球数12,000個/u1以上牛のリンパ球数は、抗体陽性牛平均で13,460個/u1

（n:53）、抗体陰性牛平均で11,710個/u1

（n:7）であり、抗体陽性牛群でPL牛基準値を超え、抗体陰性牛群においても、PL牛基準値に近い値であった（表－4）。また、表－4記載の抗体＋は抗体陽性牛、抗体－は抗体陰性牛、PL＋はリンパ球数が12,000個/u1以上の牛、PL－は、リンパ球数が12,000個/u1未満の牛を示しており、抗体陰性牛群のうち

3頭がPL牛基準値を超えていたことなどから、放牧牛のリンパ球数はBLV抗体の有無に関わらず、PL牛基準値を超える牛が多数存在する可能性が示唆された。

【C農場のリンパ球数再検査及びBLV遺伝子量測定試験】

C農場では、白血球数、リンパ球数において高い傾向がみられ、PL牛対象牛に矛盾がある可能性が出てきたため、リンパ球数の再検査及びBLV遺伝子量測定試験を実施した。

1. 材料及び方法

表－3 BLV抗体陽性牛・陰性牛別平均白血球数（n:111）

	平均白血球数（個/u1）	
	抗体陽性牛（頭数）	抗体陰性牛（頭数）
C農場	14,470（n:91）	12,460（n:20）

表－4 白血球数12,000個/u1以上牛のリンパ球数（n:60）

	平均リンパ球数（個/u1）	
抗体陽性牛	13,460	（n:53）
抗体陰性牛	11,710	（n:7）
抗体＋、PL＋	18,030	（n:26）
抗体＋、PL－	9,050	（n:27）
抗体－、PL＋	16,770	（n:3）
抗体－、PL－	7,910	（n:4）

*PL＋とは、リンパ球数12,000個/u1以上の牛

リンパ球数の再検査は、2009.8月の浸潤状況調査時血液検査データ及び、2009.10月に試験用に採材した血液検査データを用いて、リンパ球数の比較を実施した。

また、BLV遺伝子量測定試験は、試験用に採材したヘパリン血のBLV遺伝子量を、リアルタイムPCRで測定した。遺伝子量は、10ng当たりのDNA量をもとに標準化した。

試験のグループはリンパ球数及び抗体の有無によりI～IVの4グループとし、グループIは、リンパ球数12,000個/u1未満、抗体陰性牛 (n:3)、グループIIは、リンパ球数12,000個/u1以上、抗体陰性牛 (n:2)、グループIII-1は、リンパ球数10,000個/u1未満、抗体陽性牛 (n:4)、グループIII-2は、リンパ球数10,000個/u1～11,999個/u1、抗体陽性牛 (n:9)、グループIVは、「ECの鍵」でのPL牛グループで、リンパ球数12,000個/u1以上、抗体陽性牛 (n:23)。(表-5)

2, リンパ球数検査結果

リンパ球数検査結果より、グループIVで2009.8月の浸潤状況調査時にリンパ球数でPL牛と判定した牛のうち、6頭が非PL牛に、グループIII-2で、2頭が非PL牛からPL牛に移動した (表-6)。

3, BLV遺伝子量測定結果

遺伝子量測定結果で、グループIIの2頭のBLV遺伝子は未検出で、リンパ球数12,000個/u1以上の原因はBLVによるものではなかった。

また、グループIII-1の遺伝子量は平均89.8 (コピー数/10ngDNA)、最小19、最大156、グループIII-2は平均911.6、最小33、最大1,950、グループIVは平均2,611.6、最小120、最大5,180で、グループIII-1とグループIVの平均値の差は29.1倍にも及んだ (表-7)。

4, BLV遺伝子量によるPL牛判定基準の設定及びPL牛判定

BLV遺伝子量によるPL牛判定基準を以下のように設定した。遺伝子量1,000 (コピー数/10ngDNA) 以上牛は、感染源になり易い牛との報告があることから、遺伝子量1,000以上牛8頭における2回の遺伝子量測定結果を比較した結果、遺伝子量1,000台の牛は、遺伝子量の極端な減少があったことに対し、遺伝子量2,000以上牛は2回の測定結果ともに遺伝子量2,000以上と安定し、さらに遺伝子量2,000以上牛であれば、明らかにウイルス量を大量に

表-5 材料及び方法

リンパ球数再検査
H21.8浸潤状況調査時血液検査データ及びH21.10採材血液検査データを用いて、下記I～IVグループのリンパ球数を比較。

BLV遺伝子量測定試験
H21.10採材ヘパリン血を用いて、下記I～IVグループのBLV遺伝子量をリアルタイムPCRで測定。

試験データ内訳 (H21.8浸潤調査時血液検査データによる分類)

グループI	: リンパ球数12,000個/u1未満、	BLV抗体陰性牛 (n: 3)
グループII	: リンパ球数12,000個/u1以上、	BLV抗体陰性牛 (n: 2)
グループIII-1	: リンパ球数10,000個/u1未満、	BLV抗体陽性牛 (n: 4)
グループIII-2	: リンパ球数10,000～11,999個/u1、	BLV抗体陽性牛 (n: 9)
グループIV	: リンパ球数12,000個/u1以上、	BLV抗体陽性牛 (n: 23)

表-6 リンパ球数検査結果

グループ	平均リンパ球数 (個/u1)			
	H21. 8 (n)	H21.10 (n)	非PL→PL (n)	PL→非PL (n)
I	N.T	N.T		
II	18,892 (2)	15,809 (2)		
III-1	8,016 (4)	7,174 (4)		
III-2	10,709 (9)	8,995 (7)	13,036 (2)	
IV	17,676 (23)	17,837 (17)		9,610 (6)

表-7 BLV遺伝子量測定結果

グループ	平均BLV遺伝子量 (コピー数/10ngDNA)	(頭数)	最小値	最大値
I	未検出	(3)	-	-
II	未検出	(2)	-	-
III-1	89.8	(4)	19	156
III-2	911.6	(7)	33	1,950
IV	2,611.6	(17)	120	5,180

* III-2:2頭、IV:6頭はリンパ球数変動により除外

保有したハイリスク牛と判断し、遺伝子量2,000以上牛をPL牛として設定した。

(表-8)

この基準を用いて、グループIVのPL牛判定をしたところ、「ECの鍵」でいうリンパ球数12,000個/u1以上牛で、遺伝子量2,000以上牛は12頭、遺伝子量2,000未満牛は5頭で、また、リンパ球数12,000個/u1未満牛のうち、3頭が遺伝子量2,000以上となり、遺伝子量でのPL牛は、合計15頭と推察、8頭を非PL牛と推察した(表-9)。

5, BLV遺伝子量2,000以上牛のリンパ球数の状況

PL牛の再検討データとして、BLV遺伝子量2,000以上牛のリンパ球数の状況を調査をしたところ、2009.8月の浸潤状況調査時採材データ及び2009.10月採材データの2回の平均リンパ球数は最高で36,399個/u1、最低で11,363個/u1となり、最低値において12,000個/u1を下回っていた(表-10)。

6, リンパ球数検査によるPL牛摘発方法の検討

リンパ球数検査によるPL牛摘発方法の検討を行った。摘発方法は、リンパ球数12,000個/u1以上牛の1回検査(「ECの鍵」によるPL牛摘発方法)と、10,000個/u1以上牛を選抜し、2ヶ月後に選抜牛の再検査を行い、2回の平均値が10,000個/u1以上牛を選抜する方法で、この2つの方法によりPL牛選抜率及び摘発率を比較したところ、PL牛選抜率は方法1がやや高かったものの、PL牛摘発率は方法2がやや高く、方法2がPL牛摘発方法に良好と思われた(表-11)。

7, PL牛摘発手順

実際のPL牛摘発手順としては、「ECの鍵」による摘発方法が、1回の検査で抗体陽性かつリンパ球数12,000個/u1以上牛をPL牛と疑

表-8 BLV遺伝子量によるPL牛判定基準の設定

No	BLV遺伝子量 (cp ⁺ -数/10ngDNA)	
	H21.10	H21.12
1	1,010 →	902
2	1,480 →	36
3	2,040 →	3,670
4	2,450 →	4,667
5	3,090 →	2,173
6	4,380 →	3,220
7	4,970 →	4,050
8	5,180 →	5,562

← 遺伝子量の極端な減少。
初回遺伝子量2,000以上牛6頭すべて、2回目も2,000以上であった。

表-9 BLV遺伝子量によるPL牛判定 (グループIV)

リンパ球数	平均BLV遺伝子量 (cp ⁺ -数/10ngDNA)	
	2,000以上頭数	2,000未満頭数
12,000個/u1以上	12	5
12,000個/u1未満	3	3
合計	15	8

↑ PL牛と推察 ↑ 非PL牛と推察

表-10 BLV遺伝子量2,000以上牛のリンパ球数の状況 (n:15)

No	BLV遺伝子量 (cp ⁺ -数/10ngDNA)	リンパ球数 (個/u1)		
		H21.8	H21.10	平均
1	5,180	14,130	16,268	15,199
2	4,970	13,680	14,848	14,264
3	4,810	40,376	32,422	36,399 ← 最高値
4	4,380	16,318	12,243	14,281
5	3,460	12,765	12,580	12,673
6	3,180	37,152	29,580	33,366
7	3,090	21,150	12,348	16,749
8	2,900	13,176	10,374	11,775
9	2,560	12,320	14,696	13,508
10	2,450	14,080	13,293	13,687
11	2,290	13,940	11,232	12,586
12	2,280	18,404	17,748	18,076
13	2,240	18,480	17,688	18,084
14	2,040	12,028	13,464	12,746
15	2,040	14,118	8,607	11,363 ← 最低値

表-11 PL牛摘発方法の概要

- 1: リンパ球数12,000個/u1以上牛を選抜 (検査1回) ← 「ECの鍵」方法
- 2: リンパ球数10,000個/u1以上牛を選抜し、再検査を実施、2回の平均値10,000個/u1以上牛を選抜 (検査2回)

方法	リンパ球数 (個/u1)		PL牛選抜頭数 (%)		PL牛摘発率 (%)	
	1回目	2回の平均	H21.8	H21.10	H21.8	H21.10
1	≥12,000		15/23 (65.2%)	12/19 (63.2%)	100%	80%
2	≥10,000	≥10,000	15/32 (46.9%)	14/23 (60.9%)	100%	93%

うものに対し、今回の検討結果に基づく摘発方法は、抗体陽性かつリンパ球数10,000個/u1以上牛を選抜し、2ヶ月後に選抜牛のリンパ球数再検査を実施し、2回の平均リンパ球数が10,000個/u1以上牛をPL牛と疑い、必要に応じて遺伝子量測定を実施し、PL牛判定を行うというもので、PL牛選抜率は「ECの鍵」による方法がやや良好だが、PL牛摘発率は今回の方法が良好であり、PL牛の漏れがほぼ無くなると思われ、また、遺伝子量測定の実施で選抜牛の中から高率にPL牛を摘発可能と推察（表－12）。

PL牛摘発方法の比較		
摘発方法	PL牛選抜率	PL牛摘発率
「ECの鍵」摘発方法	63.2%～65.2%	80%～100%
今回の摘発方法	46.9%～60.9%	93%～100%

【まとめ及び考察】

今回の重点指導農場のEBL浸潤状況調査結果では、舎飼農場に比べ、放牧農場の白血球数、抗体陽性率及びPL牛率に高い傾向がみられた。

重点指導農場のまん延防止対策では、牛舎構造、作業効率、血統、年齢等を考慮し、主に人為的感染防止及び導入・自家保留牛の抗体検査を実施することとした。

C農場のPL牛分析結果より、放牧牛では、環境要因等によるリンパ球数の増加により、BLV抗体の有無に関わらずPL牛基準値を超える牛の存在が示唆され、PL牛基準値の再検討が必要と思われた。

リンパ球数検査結果では、リンパ球数の変動を考慮し、PL牛検査の複数回実施が必要と思われ、遺伝子量測定結果では、リンパ球数12,000個/u1以上牛をEBLのハイリスク牛として再認識するも、遺伝子量2,000以上牛をPL牛と設定し、遺伝子量によるPL牛判定を実施した結果、「ECの鍵」のPL牛基準では、PL牛判定が困難と推察。判定基準に遺伝子量測定結果も考慮する必要があると思われた。

また、PL牛摘発方法検討結果では、抗体陽性かつリンパ球数10,000個/u1以上牛の2回検査を実施し、その平均値が10,000個/u1以上牛をPL牛と疑い、必要に応じて遺伝子量測定の併用により、PL牛を高率に摘発可能と推察した。

今回の結果は、白血球数及びリンパ球数の高い放牧実施農場の結果であり、リンパ球数の高い牛群にもかかわらず、PL牛の摘発には、「ECの鍵」のPL牛基準であるリンパ球数12,000個/u1以上牛より低い、リンパ球数10,000個/u1以上牛の選抜が良好であったことから、通常の舎飼農場等では、リンパ球数がさらに低いレベルにPL牛が存在する可能性があり、データ蓄積による更なる分析が必要と思われた。

今後は、今回の結果を考慮し、PL牛の摘発方法は、従来の「ECの鍵」による方法を、抗体陽性かつリンパ球数10,000個/u1以上牛及びBLV遺伝子量測定での摘発方法に変更し、各種まん延防止対策と平行して実施しつつ、さらに各感染リスクの分析を行い、EBL清浄化を図る予定。