

一酪農場における牛白血病ウイルスの伝播様式

京都府丹後家畜保健衛生所

○田中義信、黒田洋二郎*

* 現 京都府農林水産部食の安心安全推進課

1. はじめに：牛白血病は全国的に発生が増加している伝染病の一つであり(図 1)、未発症感染牛、リンパ球増多症、悪性リンパ腫を経て、発症するまでに長い経過を辿ることが知られている。臨床症状は顕著な消瘦、乳房硬結、起立困難、持続的な軟便等を呈し、慢性経過を辿るために治療経過が長く、不治であることから農家の経済損失が過大となることが報告されている¹⁾。

牛白血病の伝播には水平と垂直がある。牛白血病の水平伝播としては吸血昆虫による媒介、注射器および直検手袋の連続使用などによる医原性伝播が知られている。牛白血病ウイルス(BLV)抗体陽性牛から吸血途中のアブを抗体陰性牛に吸血させたところ2~4週間で抗体陽転することが知られている²⁾。ハエ、アブ等の吸血昆虫が牛白血病の伝播上重要な媒介動物であることが知られているが、吸血昆虫がBLVを媒介する報告の多くでは、試験前のBLV陰性の確認は抗体検査のみであり、PCRによるプロウイルスの検査はされていない。そのため、吸血昆虫の媒介による牛白血病の伝播が全ての伝播様式のうち、どのくらいの割合を占めているかは報告により見解が異なる。

また、牛白血病の垂直伝播として初乳を介する伝播³⁾と胎盤を介する伝播が知られている¹¹⁾¹²⁾¹³⁾。BLVの経口感染は以下のとおりである。BLV感染牛の初乳中にBLVが含まれていることは知られている⁴⁾。①新生子牛の第四胃の塩酸分泌は未発達(pH5以上)である⁵⁾⁶⁾ため、初乳を飲んだ新生子牛の第四胃内のBLVは不活化されず、そのままBLVは小腸に達し、②小腸上皮のM細胞から取り込まれ⁷⁾⁸⁾、③BLVプロウイルスを含んだリンパ球は小腸からリンパ濾胞へ移入する⁹⁾¹⁰⁾。さらに、これらを裏付けるものとして小腸上皮のM細胞が欠損したマウスではレトロウイルスには経口感染しないことが報告されている⁸⁾。このように初乳中のBLVが新生子牛の体内に侵入することが知られている。

牛胎子にBLV抗体が検出される報告¹¹⁾や初乳給与前の新生子牛にBLVプロウイルスが検出されている報告¹²⁾から胎盤を介する伝播もわずかな割合だが起こっていると考えられている。さらにBLVと牛免疫不全ウイルス(BIV)による混合感染により胎盤感染することもある¹³⁾。

牛白血病の蔓延防止対策として、吸血昆虫に対しアブトラップ、初乳感染に対し凍結又は低加温処理乳の給与、BLV抗体陽性高齢牛の淘汰などが行われており、これらを徹底することにより、蔓延低減効果が図れることは広く知られている。

牛白血病について10年間にわたりその蔓延について追跡調査した報告は少なく、また、数年にわたりBLVの感染状況と母子関係について調査した報告はない。そこで、管内の一酪農場において牛白血病の蔓延拡大の原因と感染様式を明らかにすることにより、酪農場に合致した蔓延防止の一助とするために調査を実施した。

2. 材料および方法：

(1) 調査農場

ホルスタイン種牛約 70 頭を飼養し、全て自家育成している一酪農場において調査を実施した。当該農場では 2002 年 5 月 29 日に牛白血病（悪性リンパ腫）が発生した。

(2) BLV 抗体検査

1997 年から 2007 年まで 270 頭（延べ 374 頭）に対し採血を行い、血清を分離し、BLV に対する抗体についてゲル内沈降反応（Kitasato institute, Saitama, Japan）もしくは受身赤血球凝集反応（Nisseiken Co. Ltd., Tokyo, Japan）の検査を実施し判定した。さらに、併せて BLV 抗体陽転月齢と母娘関係についても調査を行った。

(3) 熱処理初乳給与と BLV-プロウイルス検査

2006 年 7 月から 2008 年 2 月まで新生子牛 12 頭に対し、出生後、母牛から速やかに隔離し、生後 3 日間、熱処理初乳給与（60℃ 30 分で加温後、-30℃で保存）を行い、0.5 ヶ月齢から 15 ヶ月齢まで調査を行った。12 頭の子牛から EDTA 管で採血し、リンパ球分離液 $d=1.077$ （Nacalai tesque Inc, Kyoto, Japan）を用いて遠心（400×g 30 分）により末梢血リンパ球を分離した。末梢血リンパ球より Sepa Gene（Sepa Gene, Sako Junyaku Co. Ltd., Tokyo, Japan）を用いて DNA を抽出した。抽出された DNA は第 1 増幅に対するテンプレートとして用いた。第 2 増幅は DNA テンプレートの第 1 増幅産物のうち 1 μ L を用いて行った。最終 PCR 産物は 1.5%アガロースゲルで電気泳動により視覚化した。

BLV プロウイルスは Murakami ら¹⁴⁾及び BIV プロウイルスは Meas ら¹⁵⁾の方法に準じて Nested-PCR により検出した。PCR で使用したプライマーは表 1 で示した。

3. 結 果：

牛群の BLV 抗体陽性率（検査年）は 19.7%（1997）から 82.9%（2007）に増加した（図 2）。特に 2003 年から急激な増加傾向がみられた。

平均抗体陽転月齢（出生年）は 1998 年を除き、1997 年から 2002 年まで 42.6～45.8 か月齢の範囲であった。2003 年（33.6 か月齢）から平均陽転月齢の短縮がみられた。46.1 か月齢（2000）から 16.6 か月齢（2005）に有意に短縮した（図 3）。

母娘間の抗体保有状況を精査したところ、母娘（++）26 組、母娘（+-）12 組、母娘（-+）0 組、母娘（--）4 組であった（表 2）。2005 から 2007 年の調査で母娘（-+）は 1 組もなかった（表 4）。

表1 Nested-PCR で用いた BLV と BIV のプライマー

ウイルス	プライマー	領域
BLV 1st	CAGACACCAGGGGAGCCATA	7781-7800 <i>tax</i>
	CTGCTAGCAACCAATTCGGA	8083-8102 <i>tax</i>
BLV 2nd	AGCCATACGTTATCTCTCCA	7802-7821 <i>tax</i>
	CAGGTTAGCGTAGGGTCATG	8062-8081 <i>tax</i>
BIV 1st	GTATCAGGCTCTTAAGGAAA	2129-2148 <i>pol</i>
	TAATCTTCTGGGTGGTAGTC	2554-2522 <i>pol</i>
BIV 2nd	TCCGAAGCTGCTTGGGATAA	2181-2220 <i>pol</i>
	TCCACTGGAACCTCTCTAT	2479-2460 <i>pol</i>

BLV-primer (Sagata et al., 1985)¹⁹⁾

BIV-primer (Garvey et al., 1990)²⁰⁾

表2 BLV 抗体保有状況と母娘関係

母牛	+	+	—	—
娘牛	+	+	+	—
組数	26	12	0	4

表3 熱処理初乳給与された牛の末梢血リンパ球中 BLV プロウイルス

母牛	子牛 No.	月齢		
		<1	2	15
+	#1401	—		—
+	#1402	ND		+
+	#1403	ND		+
+	#1404	+		+
+	#1419	—	—	
+	#1420	—	—	
+	#1421	—	—	
+	#1422	—	—	
+	#1423	—		
+	#1424	—		
+	#1432	—		
+	#1433	—		

ND: No data

表 4 母系別 BLV 抗体保有状況

2005. 6. 7		2006. 3. 16		2007. 11. 2*	
7050	-0440	7050	-0447 -1364	7050	-0447 0332 -1364 -0332
				7051	-1371
				7005	-8663 0316 -1403
0750	-1366	0750	-1366	0750	-1366
0745	-1363	0745	-1363	0745	-1363
7053	-7129	7053	-7129	7053	-7129
	-7016 -1367		-7016 -1367		-7016 -1367 -7639 -0334
7071	-0443	7071	-0443	7071	-0443
7039	-1375	7039	-1375	7039	-1375
0755	-1381	0755	-1381	0755	-1381
				7051	-1371
0756	-1376	0756	-1376 -7177	0756	-1376 -7177
7102	-1383	7102	-1383	7102	-1383
		7075	-1378	7075	-1378
7108	-1390	7108	-1390	7108	-1390
				7109	-1397 -7649
		7105	-1371	7105	-1371
		7119	-1505	7119	-1505
					-7637
		7002	-1504	7002	-1504 -0330
		7027	-0433	7027	-0433
		0746	-1502	0746	-1502
		7029	-1377	7029	-1377
				1381	-7659

Black box: BLV 抗体陽性

Number: 個体番号

※: 採血日

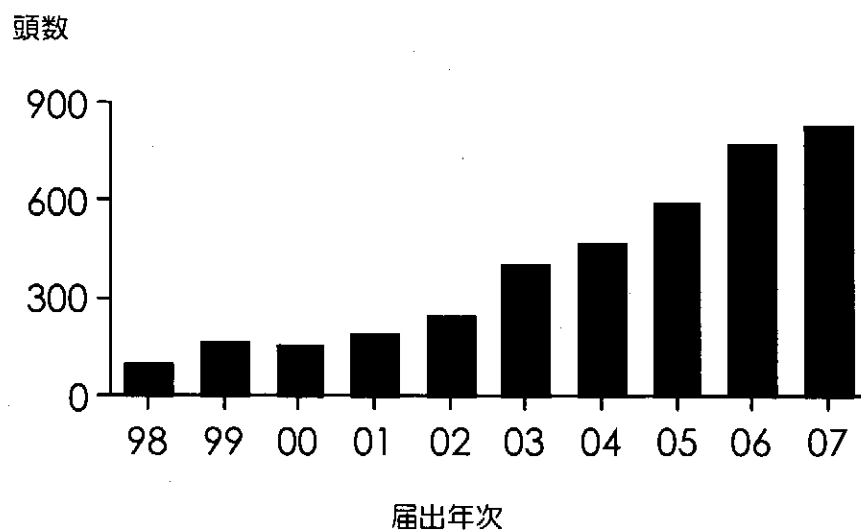


図1 国内における牛白血病届出状況

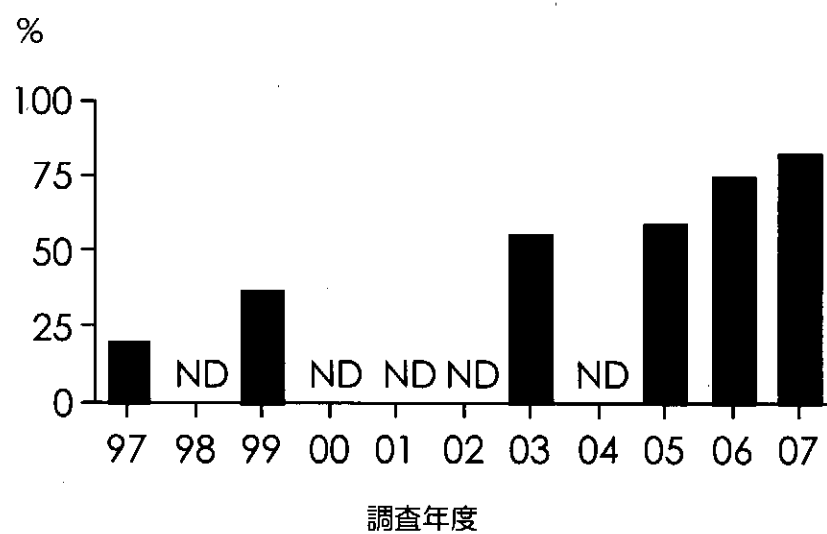


図2 調査農場における牛白血病ウイルス抗体陽性率

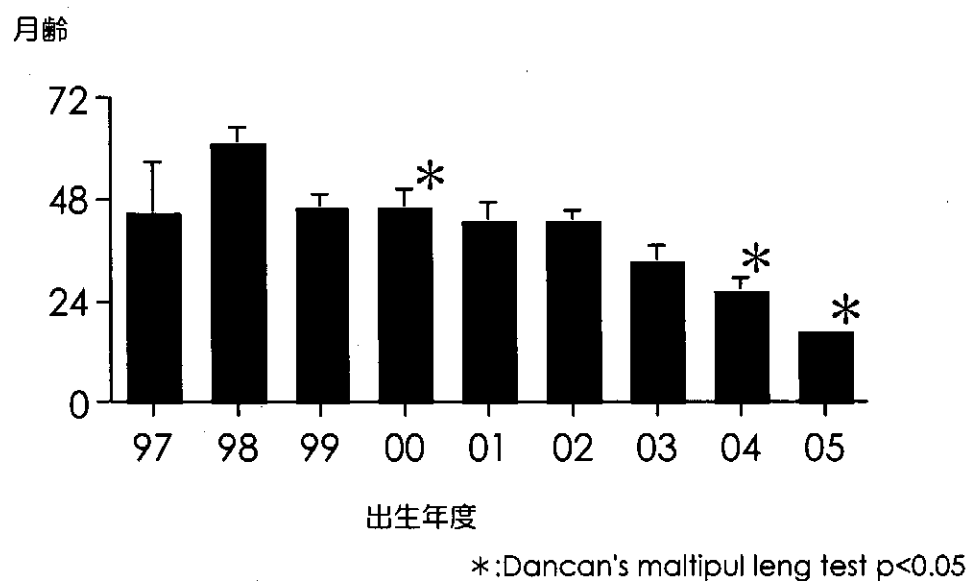


図3 調査農場における牛白血病ウイルス抗体陽転月齢

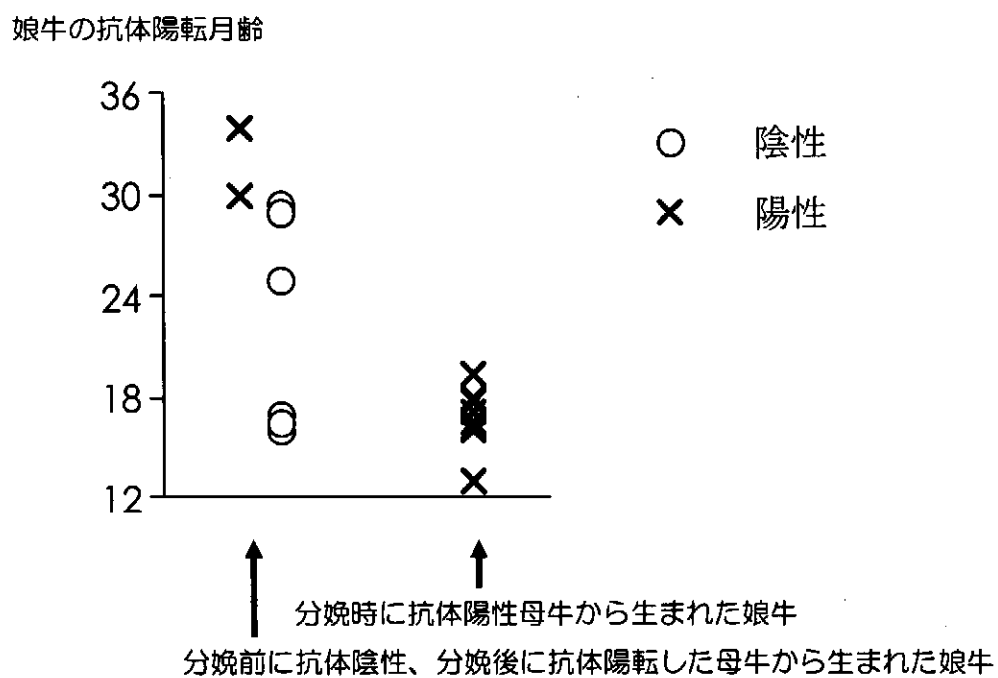


図4 分娩時における母牛の牛白血病抗体保有状況と娘牛の抗体陽転月齢

表5 熱処理初乳給与された牛の末梢血リンパ球中 BLV プロウイルス

母牛	子牛 No.	月齢	
		<1	15
—	#1401	—	—
—	#1402	ND	—
—	#1403	ND	—
—	#1404	—	—

ND: No data

分娩前に BLV 抗体陽性の母牛から生まれた娘牛 8 頭は 13～19 か月齢で 8 頭全てすでに抗体陽性であったのに対し、分娩前に抗体陰性で、分娩後に抗体陽性になった母牛から生まれた娘牛 8 頭は 16～29 か月齢まで陰性であり、そのうち 2 頭は 30 および 34 か月齢で陽転した（図 4）。

熱処理初乳を給与した新生子牛 10 頭について末梢血中のリンパ球の BLV プロウイルスを検査したところ、1 か月齢未満で 1 頭は陽性（0.5 か月齢）、9 頭は陰性であった。2 か月齢では 5 頭が陰性であり、15 か月齢まで 1 頭が陰性であった（表 3）。

熱処理初乳を給与した新生子牛 4 頭および、その母牛 4 頭について末梢血中のリンパ球の BLV プロウイルスを調査したところ、全て陰性であった（表 5）。

4. 考 察：

調査農場において BLV 抗体陽性率は、全国牛白血病届出状況と同様に 2003 年から急激に増加する傾向がみられた。2003 年以降の BLV の全国的な蔓延は、温暖化による吸血昆虫の発生数の増加が媒介頻度の増加を引き起こしたことによるもの、もしくは牛群の陽性率が増加したために蔓延速度が増加したとも考えられる。しかし、調査農場で吸血昆虫に類するものが急に増加したわけではないことから、水平伝播だけでなく垂直伝播による陽性率の増加も関与していると考えられる。

結果には示していないが、他の一酪農場において母娘間の抗体保有状況を精査したところ、母娘（++）5 組、母娘（+-）5 組、母娘（-+）12 組、母娘（--）21 組であった。この農場では母娘関係を遵守せず、初乳を給与していた。それに対し、調査農場では母娘関係を遵守し、初乳給与を行っており、BLV の伝播に母娘関係が認められた。さらに、調査農場で 3 年間、母娘の抗体保有状況の調査でも母娘（-+）が 1 組もみられなかった。このことから、調査農場では BLV について水平感染の可能性が低く、垂直感染が主体である可能性が示唆された。

図 4 より、母牛の分娩前後の BLV 抗体保有状況が娘牛の BLV 抗体陽転月齢に影響する可能性が示唆された。娘牛は出生直後に母牛から隔離されることから、母牛からの接触

伝播や昆虫媒介による水平感染の可能性は低いと考えられる。BLV 抗体が陽転した娘牛の母および祖母は全て抗体陽性となっていたことから、分娩前から BLV 抗体が陽性であると、母牛の体内で BLV が増加し続けており、その娘牛は母牛から BLV を高い割合で初乳を介して感染している可能性があり、娘牛は早期に抗体陽性となりうる。結果には示していないが、姉妹間で BLV 抗体陽転月齢を比較すると、姉より妹のほうが陽転月齢の短縮がみられた。このことと前述したことは一致する。一方、分娩前に抗体陰性、分娩後に陽転した母牛は、分娩前に BLV 抗体陰性感染牛（BLV プロウイルス陽性）であったと推察した。分娩前に BLV 抗体陰性感染母牛から娘牛へ低い割合で初乳を介して感染している可能性がある。そのため、分娩前に抗体陰性母牛から生まれた娘牛の抗体陽転月齢は、分娩前に抗体陽性母牛から生まれた娘牛の抗体陽転月齢と比較して延長したと推察した。以上のことから、母牛が分娩前から BLV 抗体陽性であると、娘牛の陽転月齢の若齢化が起こり、さらに陽転月齢の若齢化は分娩前から BLV 抗体陽性母牛を生み出すことになる。このことから抗体陽転月齢の若齢化のサイクルが BLV 蔓延拡大の原因の一つであると推察した。

Nagyら¹⁴⁾の報告によるとBLV抗体陽性牛の初乳を飲んだ子牛のBLV感染率は、初乳中の抗体により下がるという。しかしながら、Nagyらは84日齢までしか追跡調査していない。吸血昆虫および感染血液による接種試験で接種2〜4週間後、抗体およびPCRが陽性となる²¹⁾ことをもとに判定したと考えられる。しかし、初乳経口感染では小腸のリンパ濾胞に入ってから感染するため時間がかかる可能性がある。それは、初乳給与により子牛のBリンパ球の分裂増殖およびIgG産生が抑制されていること¹⁸⁾と母牛からの移行抗体により4〜6か月齢までウイルス粒子は血液中に出芽して増殖しにくいからである。

熱処理初乳を給与しても0.5か月齢（1頭）でBLVの感染が認められたことから、初乳だけではなく胎盤を介する可能性も示唆された。さらに、熱処理初乳を給与しても15か月齢でBLVの感染が認められた3頭と陰性1頭についてBIVプロウイルスについて調査したところ母牛および娘牛の全て陰性であったことから、Measらの報告¹³⁾と異なり、BLVとBIVの共感染による胎盤感染は調査農場において起こっている可能性は低いと考えられる。

5.今後の方針：

それぞれの農場に合致した BLV 蔓延防止対策を模索するため、子牛の BLV プロウイルス陽転月齢を調査する予定である。また、子牛への熱処理初乳給与を継続するとともに胎盤感染した BLV 陽性母牛の積極的な淘汰を指導していく予定である。

6.参考文献

- 1) Trainin Z, Brenner J 2005. The direct and indirect economic impact of bovine leukemia virus infection on dairy cattle. *Israel J Vet Med* 60(4):94-105, 2005
- 2) Ohshima K, Okada K, Numakunai S, Yoneyama Y, Sato S, Takahashi K. Evidence on horizontal transmission of bovine leukemia virus due to blood-sucking Tabanid flies. *Jpn J Vet Sci* 43:79-81, 1981
- 3) Miller JM, van der Maaten MJ. Bovine leukosis--its importance to the dairy industry in the United States. *J Dairy Sci* 65 2194-2203, 1982 reference No.67
- 4) Christopher JK, Christopher CC, Eric AN, Salvatore AEM, Matthew AD, Jane CH, Detection of bovine leukemia virus in blood and milk by nested and real-time polymerase chain reactions. *J Vet Diagn Invest* 15:72-76, 2003,
- 5) Warner RG, MT Brownstein. Factors affecting the immune response in calves and its relationship to subsequent performance. *Cornell Nutr Conf.* p46, 1976
- 6) LeHuerou I, I Luron; P Guilloteau, PC Wicker, JA Chayvialle, J Burton, A Mouats, R Toullec, A Puigserver. Gastric and pancreatic enzyme activities and their relationship with some gut regulatory peptides during postnatal development and weaning in calves. *J Nutr.* 122: 1434-1445, 1992
- 7) Siebers A, Finlay BB. M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. *Trends Microbiol.* 4(1):22-29, 1996
- 8) Golovkina TV, Shlomchik M, Hannum L, Chervonsky A. Organogenic role of B lymphocytes in mucosal immunity. *Science* 286(5446):1965-8, 1999
- 9) Tuboly S, Bernáth S. Intestinal absorption of colostral lymphoid cells in newborn animals. *Adv Exp Med Biol.* 503:107-114, 2002
- 10) Reber AJ, Hippen AR, Hurley DJ. Effects of the ingestion of whole colostrum or cell-free colostrum on the capacity of leukocytes in newborn calves to stimulate or respond in one-way mixed leukocyte cultures. *Am J Vet Res.* Nov;66(11):1854-60, 2005
- 11) Ohshima K, Takahashi K, Okada K, Numakunai S, Kagawa Y, Minamino K. A pathologic study on fetuses and placentas from cows affected with enzootic bovine leukosis with reference to transplacental infection of bovine leukemia virus. *Jpn J Vet Sci* 44:479-488, 1982
- 12) Agresti A, Ponti W, Rocchi M, Meneveri R, Marozzi A, Cavalleri D, Peri E, Poli G, Ginelli E. Use of polymerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infection in calves at birth. *Am J Vet Res* 54(3):373-378, 1993
- 13) Meas S, Usui T, Ohashi K, Sugimoto C, Onuma M. Vertical transmission of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency virus in dairy cattle herds. *Veterinary*

Microbiology 84: 275–282, 2002

- 14) Murakami K, Okada K, Ikawa Y, Aida Y. Bovine leukemia virus induces CD5⁺ B cell lymphoma in sheep despite temporarily increasing CD5⁺ B cells in asymptomatic stage. *Virology* 202(1):458–65, 1994
- 15) Meas S, Kabeya H, Yoshihara S, Ohashi K, Matsuki S, Mikami Y, Sugimoto C, Onuma M. Seroprevalence and field isolation of bovine immunodeficiency virus. *J Vet Med Sci* 60(11):1195–1202, 1998
- 16) Nagy DW, Tyler JW, Kleiboeker SB. Decreased periparturient transmission of BLV in colostrum-fed calves. *J. Vet. Intern. Med.* 21(5) 1104–7, 2007
- 17) Nagy DW, Tyler JW, Kleiboeker SB. Timing of seroconversion and acquisition of positive polymerase chain reaction assay results in calves experimentally infected with bovine leukemia virus. *Am J Vet Res.* 68(1):72–75, 2007
- 18) Aldridge BM, McGuirk SM, Lunn DP. Effect of colostrum ingestion on immunoglobulin-positive cells in calves. *Vet Immunol Immunopathol.* 62(1):51–64, 1998
- 19) Sagata N, Yasunaga T, Tsuzuki-Kawamura J, Ohishi K, Ogawa Y, Ikawa Y. Complete nucleotide sequence of the genome of the bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. *Proc Natl Acad Sci. USA* 82:677–681, 1985
- 20) Garvey KJ, Oberste MS, Elser JE, Braun MJ, Gonda MA. Nucleotide sequence and genome organization of biologically active proviruses of the bovine immunodeficiency-like virus. *Virology.* 175(2):391–409, 1990