

1 3. 県内酪農場における牛ウイルス性下痢ウイルスサーベイランスによる持続感染牛の摘発状況

県北家畜保健衛生所

○赤上 正貴 大矢 祥子

鹿島 悠幹 都筑 智子

牛ウイルス性下痢ウイルス（以下、BVDV）は、繁殖障害や乳量減少を引き起こす慢性疾病で、妊娠牛が本ウイルスに感染すると胎子に持続感染（以下、PI）することがある。PI牛は牛群のBVDV感染源となるため、早期の発見及びとう汰が最も重要な対策である。本県では、BVDV遺伝子検査及び抗体検査を併用したバルク乳検査によるサーベイランスを実施し、PI牛を摘発したので報告する。

BVDVサーベイランス体制の構築

本県でこれまでに摘発されたPI牛の内訳は、経産牛よりも未経産牛の方が多く、疫学調査の結果、感染源となるPI牛の導入をきっかけに農場内にBVDVの感染が広がり、PI牛が生まれるケースが多いことが分かっている。そのため、導入牛や放牧場に預託されていた牛の産子を対象としたPI牛の摘発が最も効果的であるが、農場での個体検査は多大な労力を要する。そこで、集乳車合乳のBVDV遺伝子及び農場バルク乳のELISA抗体検出による効率的なBVDVサーベイランスを年1回実施することが本県の現状にあったBVDV検査体制であると第58回本発表会において報告し（図1）、今年度、県内酪農場を対象に実施した。

BVDVサーベイランスによるPI牛摘発状況

1 集乳車合乳のBVDV遺伝子検査

（1）材料及び方法

県内2か所のクーラーステーション（以下、CS）で、集乳車合乳79検体を採取した。体細胞の回収は、合乳を3,000rpm・10分間遠心分離後、上清を除去して体細胞層をPBSで2回洗浄し、1mlの体細胞浮遊液とした。体細胞浮遊液200μlからRNAを抽出し、Vilcekらのプライマー(324と326)を用いたRT-PCR法によりペスチウイルス特異遺伝子を検出した。集乳車合乳がBVDV遺伝子陽性となった場合、農場バルク乳を個別に遺伝子検査し、BVDV遺伝子陽性農場と特定をした。

（2）結果（表1）

集乳車合乳79検体中5検体がBVDV遺伝子陽性で、当該集乳車の最大積載量は3.2t、4.2t及び11.5tであった。BVDV遺伝子陽性の集乳車合乳に含まれる農場バ

ルク乳18検体の遺伝子検査を実施したところ、3戸の農場バルク乳からBVDV遺伝子が検出された。

2 農場バルク乳のBVDV抗体検査

(1) 材料及び方法

県内2か所のCSで農場バルク乳348戸分を採取した。遠心分離により得られた農場バルク乳の脱脂乳を検査材料とし、E2タンパクを固層化した競合ELISAキットにより抗体検査を実施した。

(2) 結果

農場バルク乳は348戸中12戸がBVDV抗体陽性であった(表1)。その中には、BVDV遺伝子陽性農場2戸、PI牛飼養歴のある農場2戸及び廃業1戸が含まれていたため、PI牛の特定が必要なBVDV抗体陽性農場は7戸であった(表3)。

3 PI牛の摘発状況

(1) BVDV遺伝子陽性農場

3戸のBVDV遺伝子陽性農場で飼養牛の遺伝子検査又は抗原検査を実施したところ、3戸とも泌乳期のPI牛が各1頭、そのうちの1戸で育成期のPI牛が1頭の合計4頭が摘発された(表2)。

(2) BVDV抗体陽性農場

BVDV抗体陽性農場は、改めて当該農場で採材した農場バルク乳の抗体検査及び遺伝子検査を実施した。その際、農場に乾乳牛及び育成牛が同居している場合は採血し、血清について遺伝子検査又はELISA法による抗原検査を実施した。

農場バルク乳では、7戸中6戸がBVDV抗体陽性であったが、BVDV遺伝子は全戸で陰性であった(表3)。乾乳牛及び育成牛の血清では、7戸中1戸で育成期のPI牛2頭を摘発した。さらに、当該農場でPI牛摘発後に生まれた子牛のBVDV抗原検査で1頭のPI子牛を摘発した(表2, 3)。

BVDVサーベイランス体制の課題と検証

集乳車合乳を遺伝子検査に活用することで検体数が大幅に削減でき、さらに個別の農場バルク乳のBVDV遺伝子検査により搾乳牛群のPI牛を特定できることが分かったが、確実にPI牛を摘発するには、PI牛の乳汁を含む農場バルク乳からBVDV遺伝子が検出できる希釈限界を確認する必要がある。

また、バルク乳の遺伝子検査では摘発できない泌乳期以外のPI牛は、ELISAによりバルク乳中のBVDV抗体を検出することで間接的に搾乳牛以外にPI牛が飼養される農場を特定することができた。しかし、ELISAによる評価をより確かなものにするため、PI牛の同居が農場バルク乳の抗体に与える影響やワクチン接種地域でも応用できるかどうか検証する必要がある。

1 PI牛の乳汁希釈によるBVDV遺伝子検出感度

(1) 材料及び方法

PI牛2頭の乳汁を材料に供した。BVDV 遺伝子検出感度は、乳汁をPBSで10倍、100倍、200倍、400倍、800倍及び1,600倍に階段希釈し、集乳車合乳のBVDV 遺伝子検査と同様の方法で実施した。

(2) 結果

2検体とも1,600倍まで希釈した乳汁から回収した体細胞層からBVDV 特異遺伝子が検出された(図2)。

2 PI牛の同居牛における乳汁中ELISA抗体の変動

(1) 材料及び方法

PI牛摘発農場の同居牛120頭について採血及び採乳を実施し、血清及び乳汁を検査に供した。また、乳汁からBVDV抗体が検出された牛19頭について、2か月後に採乳を実施した。遠心分離により得られた血清及び脱脂乳を検査材料とし、農場バルク乳のBVDV抗体検査と同様の方法でBVDV抗体を検出した。

(2) 結果

PI牛摘発農場の同居牛120頭の血清のBVDV抗体陽性率は100%(120/120)、うち乳汁がBVDV抗体陽性であったのは21頭(21.6%)であり、S/N値は、血清が乳汁よりも高かった。また、乳汁中BVDV抗体は2か月後に19頭中11頭(65.2%)が陰性に転じ、BVDV感染牛の一部では乳汁中にBVDV抗体が検出されるが、経時的に検出されなくなることが確認された(図3)。

3 BVDV不活化ワクチン接種牛における乳汁中ELISA抗体の変動

(1) 材料及び方法

搾乳牛14頭にBVDV不活化ワクチンを4週間間隔で2回接種し、8か月後に不活化ワクチンの追加接種を実施した。採血及び採乳は、接種前、接種後8週、接種後8か月及び接種後10か月目に実施した。

(2) 結果

不活化ワクチン2回接種後の血清及び乳汁中のELISA抗体の推移を図4に示した。血清ELISA抗体は、全頭からワクチン接種後2か月以降に検出し、接種後10か月まで持続していた。一方、乳汁ELISA抗体は、ワクチン接種後2か月目に12頭中4頭、8か月目に14頭中4頭、10か月目に12頭中3頭から検出した。また、当該乳汁を均等混和したプール乳からは、いずれのプール検体からもELISA抗体は検出されなかった。

まとめ及び考察

県内のPI牛の有病率を低減するためには、主にPI牛の導入等で農場内に侵入したBVDVを農場内でまん延する前に確実に摘発し、感染源であるPI牛をとう汰することが重要である。今年度、県内酪農場で実施したBVDVサーベイランスでは、

348 戸中 4 戸（1.1 %）で 7 頭の PI 牛を摘発し、全てとう汰することができた。また、本サーベイランスでは検査材料を集乳車合乳及び農場バルク乳としたことで、農場毎の個別採血に比べ採材は非常に効率的で手間がかからない。一方で、バルク乳の遺伝子検査では搾乳期の PI 牛侵入をモニタリングできるが、乾乳期や育成期の PI 牛を摘発できないため、PI 牛のサーベイランス体制構築のために、バルク乳中の BVDV 遺伝子検出と抗体検出を組合せた検査の有効性を検証した。

集乳車合乳からの BVDV 遺伝子検出では、348 戸の農場バルク乳を 79 検体の集乳車合乳に集約し、11.5t、4.2t 及び 3.2t 集乳の合乳から搾乳期の PI 牛を飼養する農場 3 戸を特定した。乳汁中の体細胞数は乳質と乳量に依存するが、検証の結果、1,600 倍希釈の乳汁から BVDV 遺伝子が検出されたことから PI 牛が少なくとも 10 kg / 日の乳量が得られれば 16t（=10kg × 1,600 倍）の合乳からも BVDV 遺伝子の検出が可能である。県内の集乳車の最大積載量は 13.5t であることから、集乳車合乳の遺伝子検査は信頼性が高く、農場ごとの検査に比べ検査数を 1/4 に集約できる効率的な検査といえる。

ELISA による農場バルク乳の抗体検査は、バルク乳中に BVDV 抗体を検出した農場において BVDV 感染がある可能性を示すため、BVD 清浄化で成果をあげているヨーロッパ諸国では BVDV の清浄性確認に活用されている。そこで、PI 牛の同居が農場バルク乳の抗体に与える影響について検証したところ、PI 牛が同居することで牛群内で BVDV 感染が拡大し乳汁から抗体が検出されるが、2 か月後には漸減していくことが分かった。今回の BVDV サーベイランスでは、農場バルク乳の BVDV 抗体陽性農場 10 戸中 1 戸で育成期の PI 牛を摘発した。一方、疫学調査から 4 戸では PI 牛飼養履歴があり、それ以外の 5 戸では全頭の抗原検査でも PI 牛は認められなかった。検証結果から推察すると、既に出荷又は死亡した PI 牛が感染源となって牛群の抗体が上昇し、バルク乳中から抗体が検出されたと考えられた。また、今回のサーベイランスで抗原も抗体も検出されなかった農場は、335 戸（96.6 %）あり、県内の BVDV 清浄度は高いことが示唆された。

BVDV ワクチン接種が乳汁抗体に与える影響は、搾乳牛群に一般的に行われる BVDV 不活化ワクチン 2 回接種牛群の乳汁から BVDV 抗体が検出されることは極めて低いことが分かった。本県のように BVDV ワクチン接種率の低い地域だけでなく、ワクチン接種による BVDV コントロールを実施している農場及び地域においてもバルク乳からの抗体検出は有効と考えられた。

今回、集乳車合乳を活用することで遺伝子検査数を削減でき、さらに遺伝子検査の欠点を抗体検査により補完することで、バルク乳検査で育成期の PI 牛を摘発できた。今後とも、県内酪農場における BVDV コントロールの手法として、バルク乳の遺伝子検査及び抗体検査を併用したサーベイランスを継続し、徹底した PI 牛とう汰による BVDV 対策を定着させていきたい。

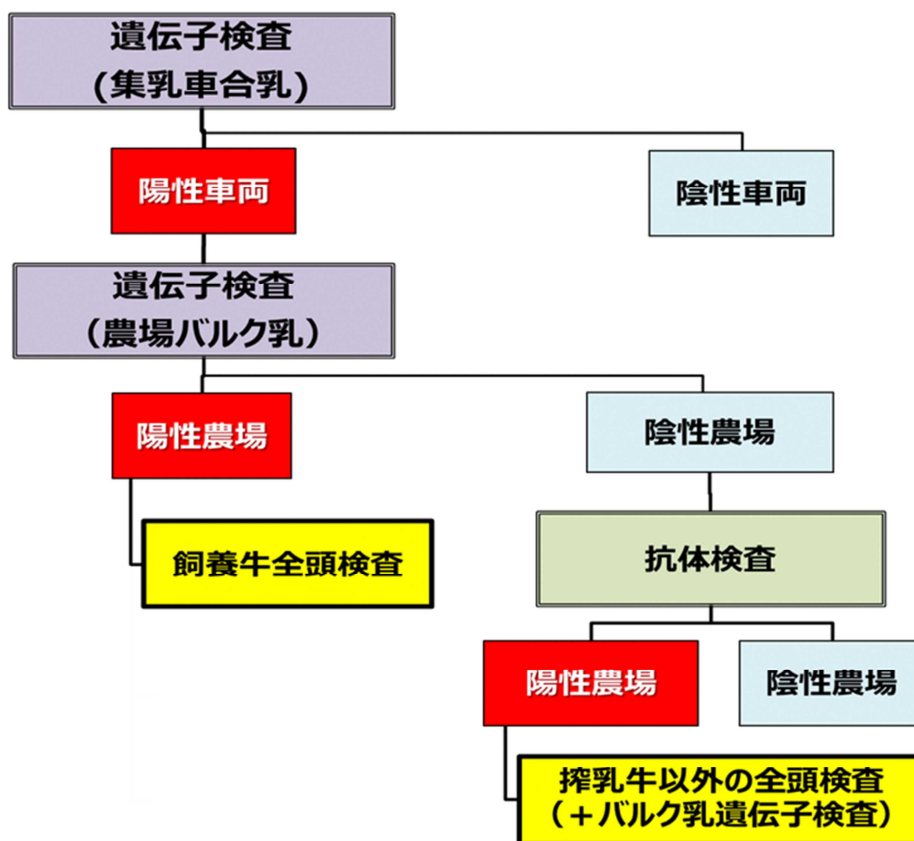


図1 集乳車合乳を活用したBVDVサーベイランス体制

表1 バルク乳におけるBVDV遺伝子検査及び抗体検査結果

CS	遺伝子検査				抗体検査				
	集乳車 検体数	陽性 検体数	個別 検査数	陽性 農場	検体数	陽性 検体数	農場数	陽性農場	
県西	24	2	8	2	103	4	102	3	(4)
県央	55	3	10	1	260	11	246	7	(8)
合計	79	5	18	3	363	15	348	10	(12)

() 内は抗体陽性農場のうち遺伝子陽性農場を含む戸数

表2 BVDV遺伝子検査及び抗体検査陽性農場におけるPI牛摘発結果

陽性区分	対象農場	摘発農場	摘発頭数	(経産牛 未経産牛)	
遺伝子検査	3	3	4	3	1
抗体検査	10	1	3	0	3
合計	13	4	7	3	4

表 3 バルク乳中の ELISA 抗体陽性農場における追跡調査結果

農場 No.	CS	BVDV 抗体検査		BVDV 遺伝子・抗原検査		PI 牛摘発
		1 回目	再検査	バルク乳	乾乳・育成牛	
1	県西	+	+	-	+	2 頭
2	県西	+	+	-	-	0 頭
3	県西	+	+	-	-	0 頭
4	県央	+	+	-	-	0 頭
5	県央	+	+	-	-	0 頭
6	県央	+	+	-	-	0 頭
7	県央	+	-	-	-	0 頭
8	県西	+	+	+	+	2 頭
9	県央	+	+	+	未実施	1 頭
10	県西	+	経過観察			PI 牛摘発歴あり
11	県央	+	経過観察			PI 牛摘発歴あり
12	県央	+	未実施			廃業

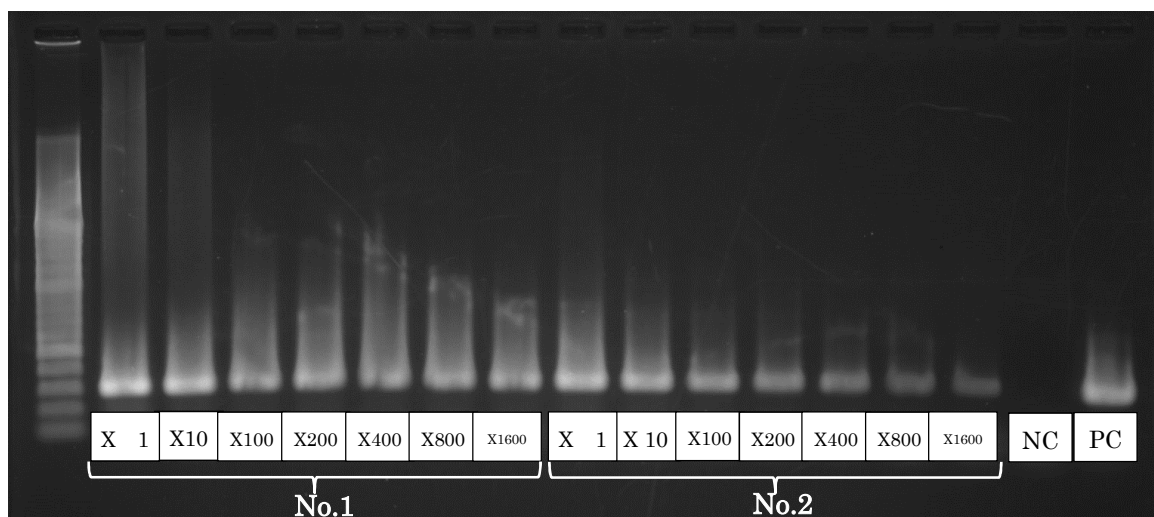


図 2 希釈した乳汁におけるペスチウイルス特異遺伝子検査結果

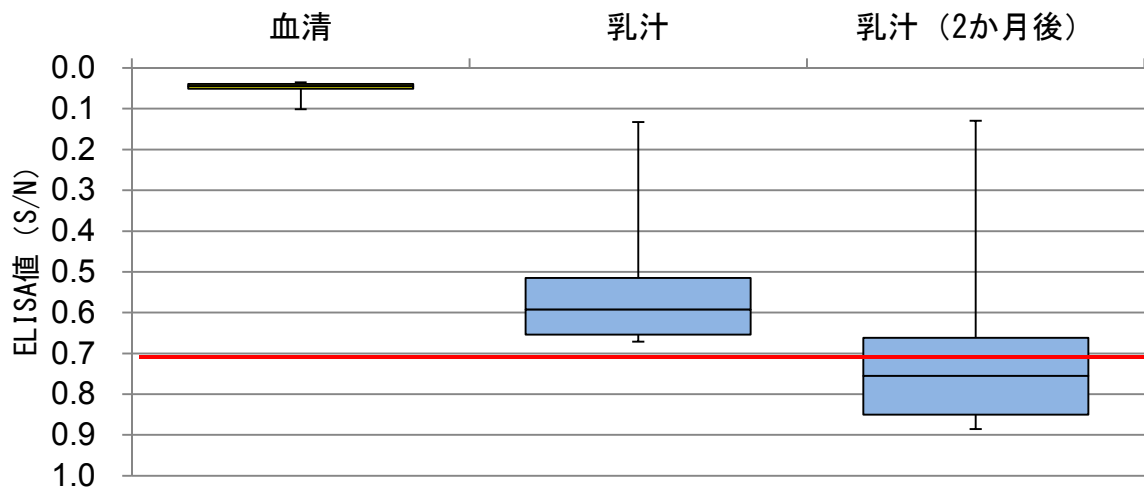


図3 PI牛の同居牛における血清及び乳汁中のBVDV抗体の推移

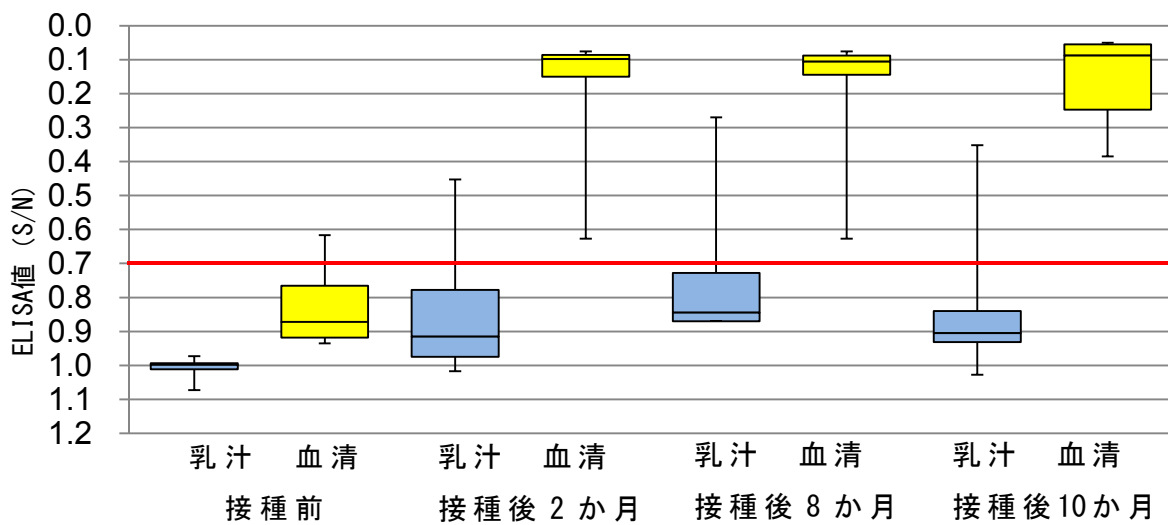


図4 不活化ワクチン接種牛における血清及び乳汁中からのBVDV抗体検出

1 4. 牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛における免疫組織化学的検査及び *In situ* hybridization の検証

県北家畜保健衛生所

○矢口 裕司 鈴木 篤実
赤上 正貴 大谷 芳子

本県では、積極的なサーベイランス検査により、平成26年4月から平成29年12月までに39頭の牛ウイルス性下痢ウイルス（以下、BVDV）持続感染牛（以下、PI牛）を摘発している。BVDV感染牛の免疫組織化学的検査（以下、免疫染色）によるBVDV抗原検出に関しては、海外では多くの報告があるものの^{1,2,3,4,5,6}、国内における報告は少なく^{7,8}、診断に活用されていない。そこで、PI牛の皮膚組織を用いて、病理学的手法による2つの抗原検出法を検証したので、その概要を報告する。

BVDV 免疫染色の検証

1 ホルマリン固定パラフィン包埋切片（以下、パラフィン切片）の免疫染色

予備試験として当所で入手できた9種のBVDV抗原に対する一次抗体について条件検討を実施した。陽性対照パラフィンブロックは、BVDVを接種したMDBK-SY細胞をセルブロックにして、ホルマリン固定したものから作製した。その結果、46/1（北海道大学より分与）と348（VMRD社）の抗体を使用した免疫染色で良好な染色結果が得られた（図1）。その2種の一次抗体を用いて、PI牛31頭、急性感染牛2頭、陰性対照牛10頭の耳介皮膚のホルマリン固定材料について、以下のプロトコールで免疫染色を実施した（表1）。

パラフィン切片は0.3%過酸化水素水加メタノールで10分間反応させ、緩衝液に浸漬してマイクロウェーブ処理（700W, 5min×2回）による抗原賦活化を実施後、室温に30分以上静置した。一次抗体には46/1を1,000倍希釈したものと、348を100倍希釈したものをそれぞれ用いて、37℃で60分間反応させた。抗原賦活化の緩衝液は、46/1ではpH9.0の緩衝液（DAKO又はニチレイ）、348ではpH6.0の緩衝液（DAKO）を用いた。二次抗体にはヒストファイン シンプルステイン MAX-PO（MULTI）（ニチレイバイオサイエンス）を、発色基質にはシンプルステインAEC溶液（ニチレイバイオサイエンス）を使用し、マイヤーヘマトキシリンで対比染色を実施した。

その結果、46/1ではPI牛31頭すべて陽性を示し、急性感染牛及び陰性対照牛はすべて陰性であった。また、348ではPI牛31頭中21頭が陽性を示し、急性感染牛及び陰性対照牛はすべて陰性であった（図2、表1）。陽性反応は46/1、348と

もに、表皮の有棘細胞及び毛根・毛包上皮に認められた。

2 凍結切片の免疫染色

材料には、PI牛16頭、陰性対照牛10頭の耳介皮膚を用いて以下の手順で凍結切片を作製した（表1）。

凍結ブロックは、約2mm幅に切り出した耳介皮膚材料を、凍結組織切片作製用包埋皿（ティッシュ・テック クリオモルド3号、サクラファインテックジャパン）に入れて、凍結組織切片作製用包埋剤（O.C.T. コンパウンド、サクラファインテックジャパン）に浸し、-80℃に冷却した冷却溶剤（ヒスト・テック ハイフロイド、サクラファインテックジャパン）に約30秒浸漬して凍結包埋後、-20℃のクリオスタット内で乾燥させて作製した。凍結切片は凍結ブロックをクリオスタットで6μmに薄切し、切片をスライドガラスに張り付けた後で、室温で約30分間風乾した。凍結切片はホルマリンメタノール（1：1）で5分間固定し、流水洗後、乾燥させた。BVDVの免疫染色は、一次抗体に46/1を用いたパラフィン切片の免疫染色と同様に実施した。

その結果、PI牛は16頭すべて陽性、陰性対照牛はすべて陰性であった。また、その陽性反応は同一個体のパラフィン切片の免疫染色の結果と比較して、染色強度及び分布ともに強く認められた（図2，表1）。

in situ hybridization

免疫染色の染色結果の妥当性を評価するために、より感度の高い手法である *in situ* hybridization（以下、ISH）を試みた。

材料には、PI牛5頭、急性感染牛2頭、陰性対照牛5頭の皮膚のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた（表1）。

ISHはRNA scope 2.5HD Reagent Kit（Advanced Cell Diagnostics）を用いて実施し、プローブはBVDV-1a No.12株の5'-UTR領域の288bp塩基配列を参考に設計した。ISHはキットの手順に従って実施し、プローブのハイブリダイズは40℃、2時間で行い、増幅試薬でシグナルを増幅後、発色させた。

その結果、PI牛はすべて陽性を示し、急性感染牛及び陰性対照牛はすべて陰性であった（図2，表1）。PI牛では、BVDV抗原の陽性反応は表皮細胞質及び毛根・毛包上皮に認められた。これらの陽性反応は46/1を用いた免疫染色よりは分布が少なかったが、陽性箇所は免疫染色の結果と一致していた。

考察

今回、PI牛の皮膚組織について1次抗体に46/1及び348を用いて免疫染色の有用性を検証したところ、明瞭な陽性反応を示すとともに、ウイルス抗原の局在は、皮膚の有棘細胞及び毛包上皮などに認められた。また、同材料を用いてパラフィ

ン切片上のBVDV遺伝子をターゲットとしたISHを実施したところ、免疫染色と同部位に陽性反応が認められた。これらの結果は、過去におけるPI牛の免疫染色の報告と一致していたことから、BVDVの免疫染色ではPI牛の皮膚組織におけるBVDV抗原を確実に検出していることが裏付けられた。

また、免疫染色及びISHとも、皮膚組織における免疫染色で陽性を示すのはPI牛だけであり、急性感染牛及び陰性対象牛は陰性であったことから、免疫染色がPI牛の摘発に有用な検査法であることが確認できた。

一方、平成28年度に本発表会で、本来であれば皮膚組織を用いるIDEXX SNAP BVDVtest（以下、簡易キット）に毛根を使用しても陽性反応の結果が得られ、毛根によるPI牛摘発への可能性を報告した（図3）。今回の免疫染色で毛根にウイルスが局在することが病理学的に裏付けられ、毛根を用いた簡易キットの有用性が証明された。

現在、農林水産省による「牛ウイルス性下痢・粘膜病に関する防疫対策ガイドライン」に従い、血液による抗原検査が陽性となった牛について3週間の間隔をあけて再度抗原検査を実施し、PI牛の判定を行っている。その際には当該牛が他の牛に接触しないようにまん延防止対策を講じることとなっているが、PI牛であれば大量のBVDVが排泄されるため、畜主や臨床獣医師から早期診断が望まれている。

パラフィン切片を用いた免疫染色は、切片作製の過程で、結果を示すまでに3～4日を要するが、凍結切片は解剖後数時間で切片が作製可能であることから、当日中に免疫染色の結果を示すことができる。そこで、1次抗体に46/1を用いたパラフィン切片の免疫染色を、ホルンリン固定の影響を受けない凍結切片の免疫染色に応用したところ、パラフィン切片よりも明瞭な陽性反応が認められた。凍結切片は材料採材後、約5時間で結果を示すことが可能であり、迅速性に優れる上に明瞭な陽性反応が確認できることから、非常に有用なPI牛診断手法であった。

皮膚組織のサンプリングは、生体でも耳刻器などで簡易に採取が可能な耳介皮膚が最も材料採取に適した部位であり、免疫染色で陽性であればPI牛として3週間を待たずしてウイルス拡散防止のための対策を取るための判断材料となる。また、当該牛が斃死したり、過去の病性鑑定事例など血液が採取できない事例でも、皮膚材料があれば免疫染色によってPI牛の判定が可能である。

今後は、免疫染色によるPI牛の判定事例の検証を重ねるとともに、今回確立した免疫染色及びISHのプロトコールを活用してPI牛と急性感染牛のウイルス抗原分布を比較し、BVDVの体内における病態を解明していきたい。

稿を終えるにあたり、免疫染色の一次抗体（46/1）を分与いただいた北海道大学の迫田義博先生、ISHのプローブ作製にご助言いただいた日本獣医生命科学大学の青木博史先生、急性感染牛のサンプルを提供いただいた（国研）農研機構

動物衛生研究部門の川畠健司先生に深謝致します。

参考文献

- 1) Brad L Njaa et al., J Vet Diagn Invest, 12, 393-399, 2000.
- 2) Todd E Cornish et al., J Vet Diagn Invest 17, 110-117, 2005.
- 3) D M Haines et al., Vet pathol, 29, 27-32, 1992.
- 4) Kuldeep Singh et al., J Vet Sci, 12, 295-297, 2011.
- 5) Margaret E Collins et al., Virology, 259, 85-98, 1999.
- 6) JF Ridpath et al., J Vet Diagn Invest, 14, 303-307, 2002.
- 7) 佐藤ら, 牛ウイルス性下痢ウイルス感染牛における免疫組織化学的及び病理組織学的検索, 大分県業績発表会, 2000.
- 8) 福成ら, 毛根を用いた牛ウイルス性下痢ウイルスの簡易検査法の確立, 全国業績発表会, 2015.

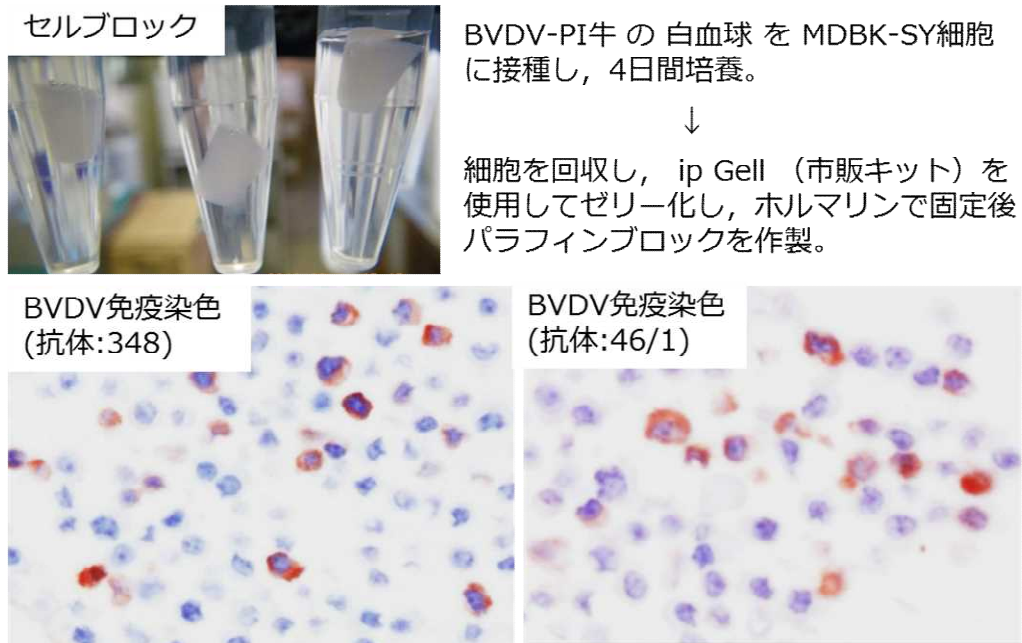


図1 セルブロック作製方法と免疫染色結果

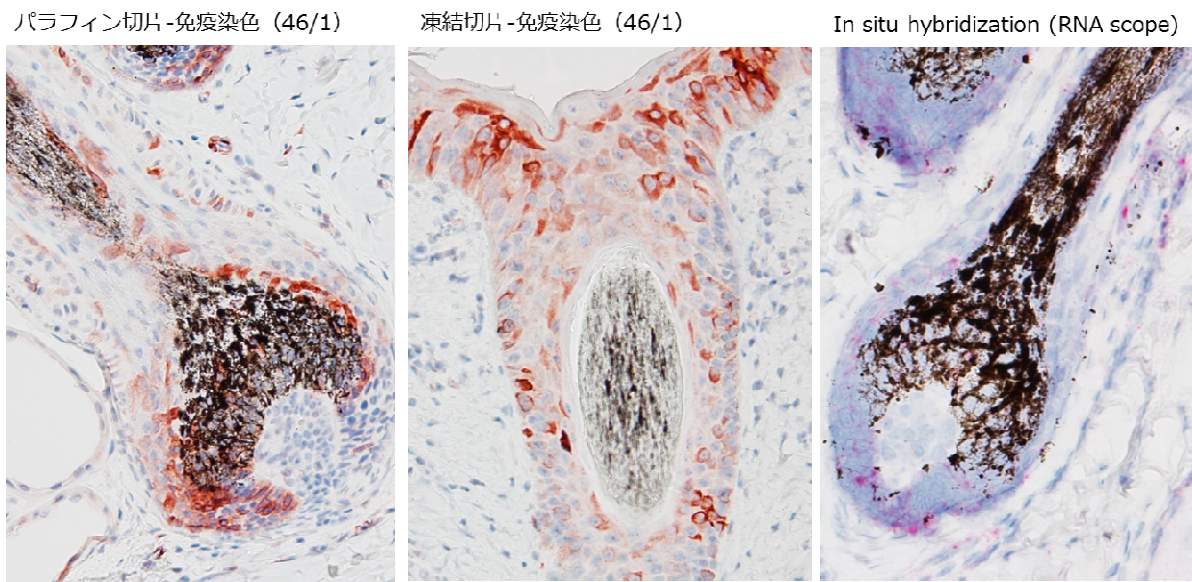


図2 PI牛の耳介組織における免疫染色及び ISH 結果

表 1 免疫染色， ISH 及び簡易キットの検証結果

	PI牛		急性感染牛		陰性対象牛		
	検体数	陽性数 (陽性率)	検体数	陽性数	検体数	陽性数	
免疫染色	ホルマリン固定 (抗体：46/1)	31	31 (100%)	2	0	10	0
	ホルマリン固定 (抗体：348)	31	21 (68%)	2	0	10	0
	凍結切片 (抗体：46/1)	16	16 (100%)	0	0	5	0
in situ ハイブリダイゼーション (RNA scope)	5*	5 (100%)	2	0	2	0	
簡易キット (SNAP BVDV test)	5	5 (100%)	4	0	5	0	

*すべてBVDV1型

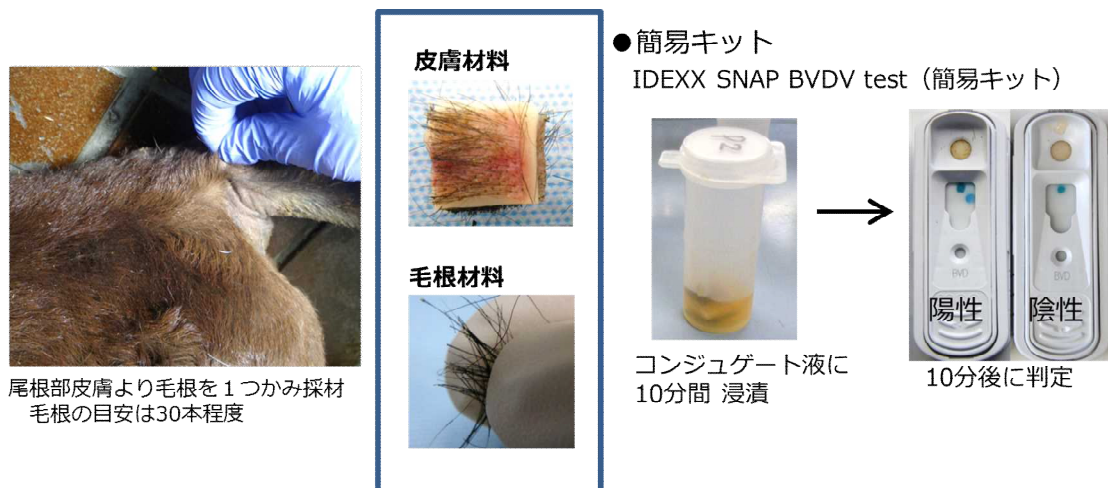


図 3 BVDV 簡易キットの材料と方法

1 5 . 茨城県の地方病性牛白血病清浄化に向けた具体的戦略

県北家畜保健衛生所

○大矢 祥子 高安真理子
赤上 正貴 都筑 智子

牛白血病の発生は平成10年に家畜伝染病予防法の届出伝染病に指定されて以降、増加の一途を辿っているが、その多くは牛白血病ウイルス（以下、BLV）により引き起こされる地方病性牛白血病である。平成27～28年度に当所管内で実施した繁殖和牛のBLV抗体検査では、頭数ベースの抗体陽性率は50%に及び、そのなかには飼養牛全頭がBLV抗体を保有している農場もあり、対策指導に苦慮している。

今回、ヨーネ病定期検査対象の繁殖和牛のBLV調査として、BLV抗体検査、リンパ球数測定、BLV遺伝子検査を実施し、BLVの浸潤状況の詳細な調査を実施するとともに、清浄化に向けた具体的な戦略を立てたので、その概要を報告する。

材料及び方法

平成29年度ヨーネ病定期検査対象3地区（A，B，C地区）における48戸653頭の繁殖和牛の血清，全血（EDTA血）を材料に供した。BLV抗体検査は，血清を用いて市販のエライザキットにより行った。リンパ球数は，全血を用いて自動血球計算機により測定した。BLV遺伝子検査は，全血から抽出したDNAを用いてリアルタイムPCR法によりDNA10ng当たりのBLVプロウイルス量の測定を行った。なお，BLV遺伝子検査はBLV抗体陽性の検体について実施した。

BLV抗体検査

BLV抗体は，48戸653頭中34戸398頭が陽性であった（図1）。陽性率は戸数ベースで71%，頭数ベースで61%であった。その内，飼養牛全頭がBLV抗体陰性の農場（以下，清浄農場）は29%（14/48），飼養牛全頭がBLV抗体陽性である陽性率100%農場（以下，陽性率100%農場）は15%（7/48）であった。

地区別では，A地区18戸246頭中14戸189頭，B地区19戸171頭中13戸104頭，C地区11戸236頭中7戸105頭が陽性であった。陽性率は戸数ベースで各々78%，68%，64%，頭数ベースで77%，61%，44%で，頭数ベースの陽性率は各地区間で有意差があった（ $P<0.05$ ，テューキーのWSD法）。清浄農場は，22%（4/18），32%（6/19），36%（4/11），陽性率100%農場は，28%（5/18），11%（2/19），0%（0/11）であった。

抗体陽性率と年齢の関係は，全体の年齢別BLV抗体陽性率に大きな差は無かったが，地区別では，A地区は全ての年齢で陽性率はほぼ一定，B地区は2歳で陽

性率は低いですが3～4歳にかけて陽性率が上昇，C地区は6歳以下で陽性率が低い傾向であり，地区ごとに特色がみられた（図2）。

リンパ球数とBLV抗体検査

BLV抗体陽性牛398頭のリンパ球数分布は中央値が5,000/μl（5%タイル値-95%タイル値：2,300-10,600）であったのに対し，BLV抗体陰性牛255頭のリンパ球数分布の中央値は3,580/μl（5%タイル値-95%タイル値：2,000-6,500）であり（図3），BLV抗体陽性牛のリンパ球数はBLV抗体陰性牛よりも有意に高値だった（ $P<0.01$ ，マンホイットニーのU検定）。

地区別でも，全体の結果と同様にBLV抗体陽性牛のリンパ球数はBLV抗体陰性牛のリンパ球数よりも有意に高値（ $P<0.01$ ，マンホイットニーのU検定）であり，地区別の特徴は無かった。

BLV遺伝子検査

BLV抗体陽性牛398頭について，DNA10ng当たりのBLVプロウイルス量の測定を行った。測定したプロウイルス量は，宮崎大学目堅らの感染リスク分類に準じて区分した（表1）。

BLV抗体陽性牛398頭中，BLVプロウイルス量が400copies/10ngDNAより多いVery highリスクは17%，100～400copies/10ngDNAのHighリスクは36%，20～100copies/10ngDNAのLowリスクは16%，20copies/10ngDNA未満のVery lowリスクは31%であった（表2）。

地区別では，Very highリスクは各々18%，13%，18%，Highリスクは36%，39%，32%，Lowリスクは14%，14%，23%，Very lowリスクは32%，33%，27%であった。

当所のBLV感染リスク分類とBLV検査

前述した目堅らの分類では，牛が保有するBLVプロウイルス量と水平感染・垂直感染の伝播リスクから，表1のとおり4段階のリスク分類をしている。目堅らのリスク分類と今回の検査結果を組み合わせると，当所独自の牛個体ごとのBLV感染リスク分類を作成し，評価をした（図4）。

保有しているBLVプロウイルス量が400copies/10ngDNAより多い高リスクは653頭中67頭（10%）であった一方，100copies/10ngDNA未満の低リスクは443頭（68%）で，低リスクの中でも20copies/10ngDNA未満とBLV抗体陰性の無視できるリスクは377頭（58%）であった。

地区別では，高リスクはA地区14%，B地区8%，C地区8%であった。低リスクは各々59%，68%，78%で，各群間に有意差があった（ $P<0.05$ ，テューキー

の WSD 法)。また無視できるリスクは48%，59%，67%であり，B 地区，C 地区の無視できるリスクの割合はA 地区よりも有意に高かった（ $P<0.05$ ，テューキーの WSD 法）。

考察

平成27年度以降，当所が行ったBLV抗体検査の結果では，管内の繁殖和牛のBLV抗体陽性率は54%であり，平成21～23年度の全国調査の29%と比較しても著しく高いことが明らかになった。特に，飼養牛全頭がBLV抗体陽性の農場が15%あり，清浄化を急速に進めることが難しいと改めて窺い知ることができた。

今年度，BLV調査をした3地区の比較では，BLVの浸潤状況に地域差や特徴があった。その違いは，放牧利用などの飼養管理やBLVを媒介する吸血昆虫の生息状況の違いによると推察できるが，BLV感染動態は解明されていない事も多く，今後の研究進展が望まれる。

今回の結果から，BLV抗体陽性牛のリンパ球数はBLV抗体陰性牛のリンパ球数より明らかに高く，抗体陽性牛のBLVプロウイルス量は0～2,133copies/10ngDNAまで幅があることが判明した。これらを活用すれば，農場内に飼養されている牛の感染リスクの振り分けが可能であり，今後，農場ごとの清浄化を進めるための有効な検査方法であることが分かった。

今回，目堅らの分類を応用した独自のBLV感染リスク分類を考案した。この分類では，抗体検査だけではなくBLVプロウイルス量の結果を加味して，牛個体ごとの感染リスクが分かりやすいように工夫し，高，中，低の3つに区分した。その結果，高リスク10%，中リスク22%，低リスク68%となり，BLV抗体陽性牛すべてが高リスクではないことが明らかとなった。さらに，低リスクの中でも，無視できるリスクの20copies/10ngDNA未満とBLV抗体陰性が58%を占めていることから，BLV対策は残りの42%の牛に対して集中的に取ればよいことになる。この分類のように，感染リスクを明確にすることでBLV抗体陽性牛の中でも対策を取るべき牛が細分化されるため，農家ごとのBLV浸潤状況の詳細が把握でき，対策がより現実的，効果的となることが期待された。

牛白血病清浄化のための具体的な戦略

農林水産省が平成27年に示した「牛白血病に関する衛生対策ガイドライン」では，この疾病に有効な治療法やワクチンがないため，中長期的な視点に立って計画的な対策を講じることになっている。また，本病の清浄化を効率的，効果的に進めるためには，生産段階の上流にある繁殖農場のBLV浸潤状況を把握し，対策を取ることが現実的な対応である。しかし，これまでBLV浸潤状況の把握は，検査の簡便さから一般的に抗体検査で行われており，煩雑なBLVプロウイルス量測

定は少数の特定農場でのみで行われていた。抗体検査では牛個体の感染の有無は判別できるものの、感染リスクが分からないため、抗体陽性率が高い農場では有効な対策を立てることができず、清浄化にふみ出せない農場がほとんどであった。

繁殖和牛のライフサイクルを考慮すると、牛白血病の清浄化には長い年月を必要とする。そのため、本県ではまず中期的目標として「和牛子牛出荷時のBLV抗体陰性」を目指し、牛白血病の定期的な検査をヨーネ病定期検査時に併せて実施していく予定である（図5）。検査は、BLV抗体検査で感染の有無を確認するとともに、リンパ球数の測定を実施する。併せて、BLV抗体陽性牛はBLVプロウイルス量を測定し、前述したBLV感染リスク分類を行う。これらの検査結果は、農場毎の効果的なBLV対策の一助とするためのデータと考えている。一方、BLV抗体陰性牛や清浄農場についても、毎年、BLV抗体検査を実施し、清浄性の維持を確認していく予定である。

これらの検査とあわせて、畜主の清浄化へのモチベーションを上げるために、農場ステータスを設定し、農場ごとのBVL浸潤状況の「見える化」を検討している（表3）。Step0はBLV検査未実施農場、Step1は高リスクを飼養している農場、Step2は中・低リスクを飼養している農場、Step3は低リスクのみを飼養している農場、Step4は無視できるリスクのみを飼養している農場、Step5は抗体陰性農場とし、今回作成した当所のBLV感染リスク分類を基準に6区分し、各ステータスにおける重点対策とステップアップのための検証方法を明確にした。この取組みは、単純に清浄化を目指すのではなく、農場内の感染リスクに着目し、新たな感染牛を作らないことに重点を置いたものである。そのため、まず、水平感染・垂直感染ともにリスクの高い牛にターゲットを絞り、早期の出荷、又は徹底した隔離をすることで、効率的なまん延防止対策を進める。さらに、吸血昆虫対策などの水平感染対策は、農場の飼養管理方法や飼養環境に合ったオーダーメイドで実施するとともに、水平感染のリスクになり得る20copies/10ngDNA以上の牛は段階的に減らしていく。この方法であれば、抗体陽性率の高い農場でも徐々に農場ステータスのステップアップが可能となり、「和牛子牛の出荷時BLV抗体陰性」を目指すことができると考える。今後は、検査農場のステータスを設定し、検証を行いながら管内の地方病性牛白血病清浄化のスタートを切りたい。

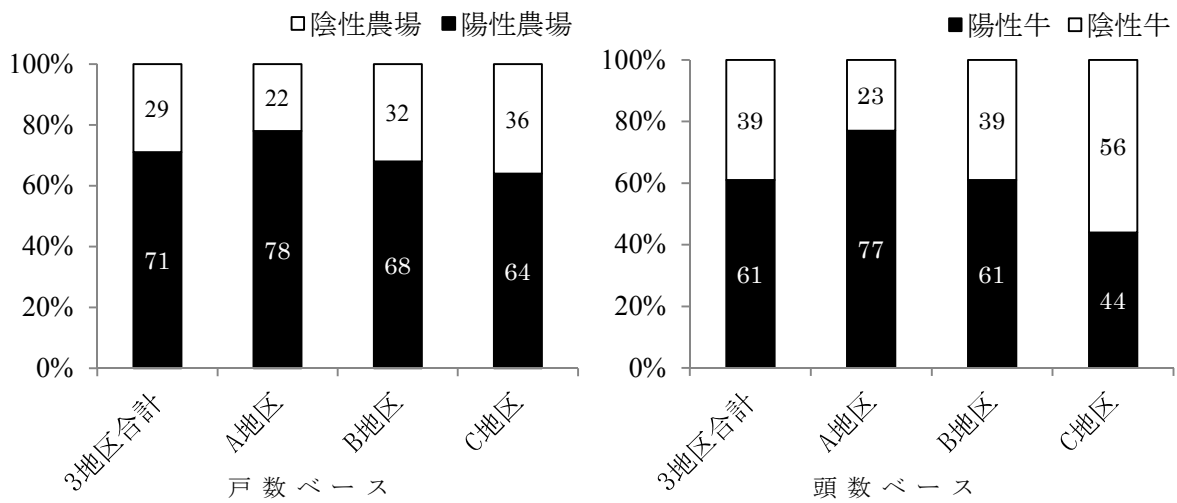


図 1 地区別 BLV 抗体陽性率

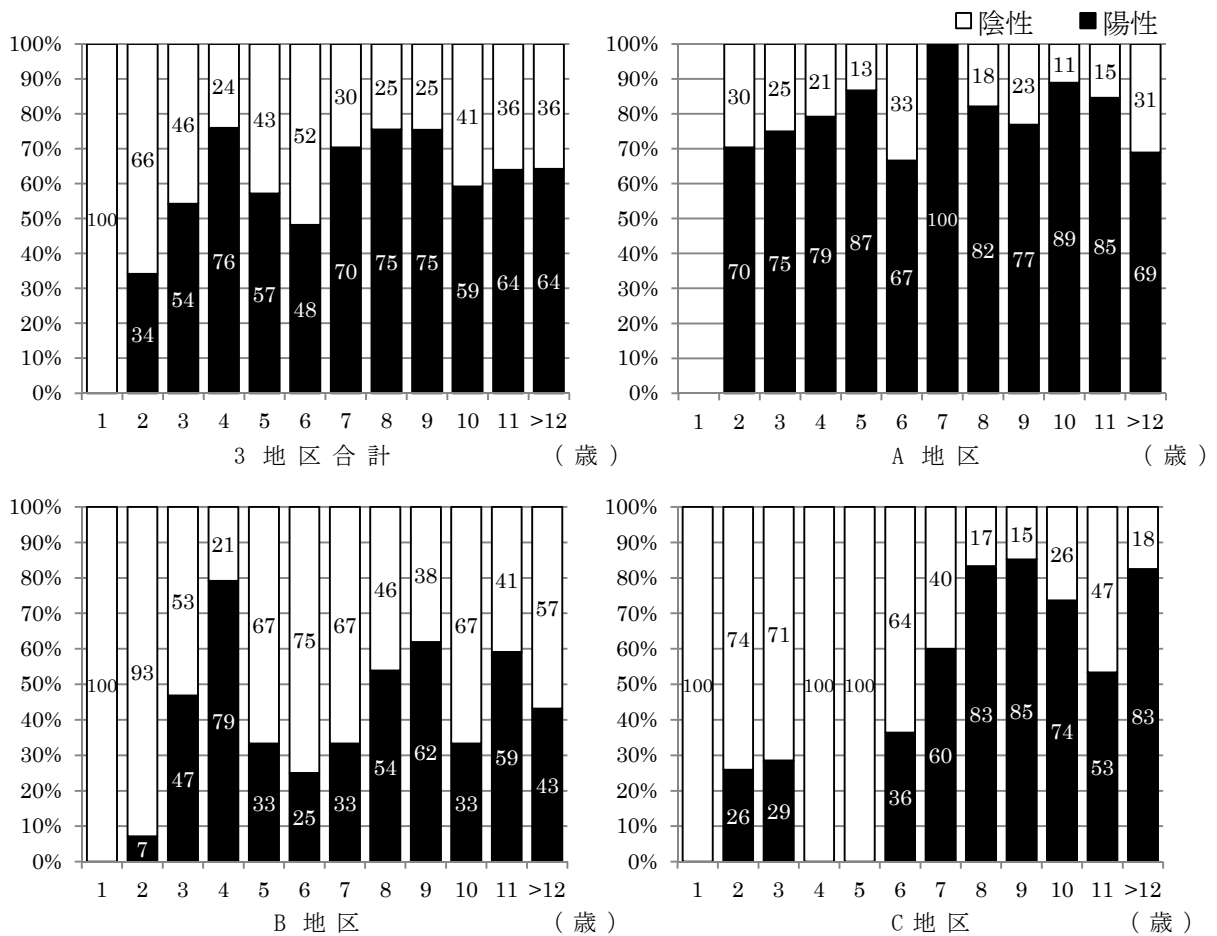


図 2 年齢別 BLV 抗体陽性率

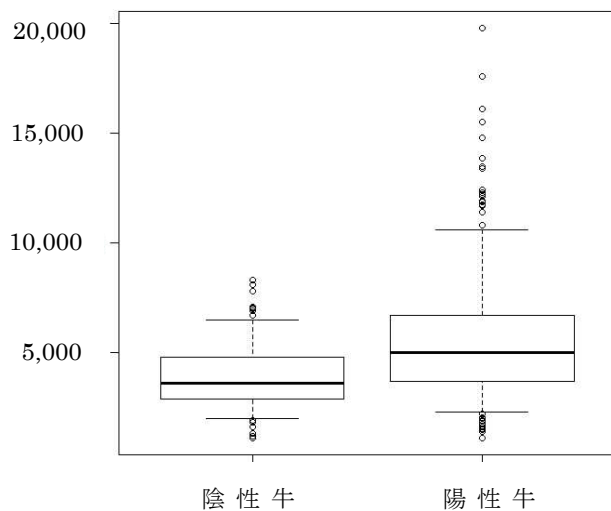


図 3 BLV 抗体陽性牛及び陰性牛のリンパ球数の分布

表 1 BLV プロウイルス量に基づく目撃らの分類と当所の感染リスク分類

目撃らの リスク分類	伝播リスク		BLV抗体	プロウイルス量※	当所の リスク分類
	水平感染	垂直感染			
Very high	高	高	陽性	>400	高リスク
High	中	低～高		100～400	中リスク
Low	低	低		20～100	低リスク
Very low	なし	低		<20	無視できる リスク
-	なし	なし	陰性	—	

※ copies/10ngDNA

表 2 目撃らの分類による地区別の各リスク頭数 単位：頭（％）

目撃らのリスク分類	3地区合計	A地区	B地区	C地区
Very high	67(17)	34(18)	14(14)	19(18)
High	143(36)	68(36)	41(39)	34(32)
Low	66(16)	27(14)	15(14)	24(23)
Very low	122(31)	60(32)	34(33)	28(27)
合計	398(100)	189(100)	104(100)	105(100)

表 3 当所の分類による地区別の各リスク頭数 単位：頭（％）

当所のリスク分類	3地区合計	A地区	B地区	C地区
高リスク	67(10)	34(14)	14(8)	19(8)
中リスク	143(22)	68(28)	41(24)	34(14)
低リスク	443(68)	144(58)	116(68)	183(78)
無視できるリスク	377(58)	117(48)	101(59)	159(67)
合計	653(100)	246(100)	171(100)	236(100)

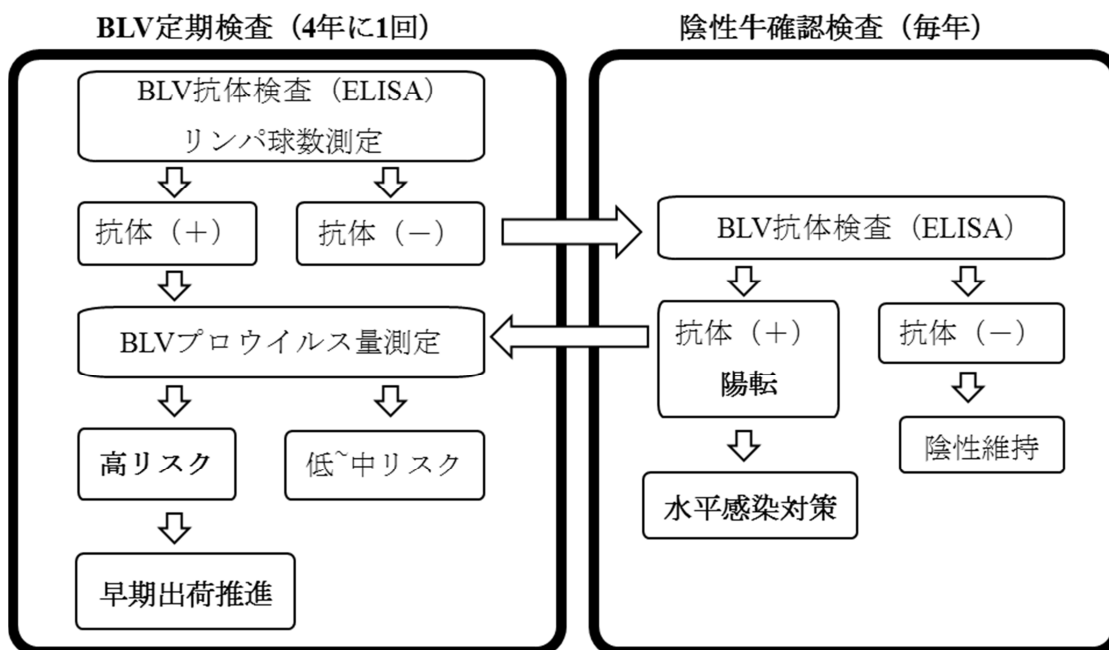


図 4 今後の BLV 検査計画

表 4 農場ステータス

農場ステータス	リスク分類 (プロウイルス量※ または抗体)	主な対策	検証方法
Step0	不明	・BLV検査の実施	—
Step1	高リスク (>400)	・400copies/10ngDNA以上を保有する牛の早期出荷(徹底した隔離飼育) ・100copies/10ngDNA以上を保有する牛の分離飼育 ・垂直感染対策(分娩介助,初乳) ・水平感染対策(吸血昆虫,分離飼育)	・母子感染率の把握 ・夏季陽転率の把握
Step2	中リスク (100~400)	・100copies/10ngDNA以上を保有する牛の分離飼育 ・垂直感染対策(分娩介助,初乳) ・水平感染対策(吸血昆虫,分離飼育)	・母子感染率の把握 ・夏季陽転率の把握 ・(出荷子牛の抗体検査)
Step3	低リスク (20~100)	・垂直感染対策(分娩介助,初乳) ・水平感染対策(吸血昆虫,分離飼育) ・導入牛,後継牛対策(BLV検査)	・出荷子牛の抗体検査 ・母子感染率の把握 ・夏季陽転率の把握
Step4	無視できるリスク (<20)	・導入牛,後継牛対策(BLV検査)	・導入牛,後継牛の検査 ・定期的なBLV検査
Step5	無視できるリスク (抗体陰性)	・導入牛対策(BLV検査)	・導入牛の検査 ・定期的なBLV検査

※ copies/10ngDNA