

## 「ECの鍵」を活用した牛白血病高リスク牛選定の検討

紀北家畜保健衛生所  
○山田陽子 鳩谷珠希  
黒田順史 豊吉久美

### 【背景と目的】

近年の牛白血病ウイルス（BLV）感染牛の増加に伴い、牛白血病清浄化の推進には、経済的損失が少ない計画的な牛の更新が重要である。それには感染源としてのリスクが高いと思われるBLV遺伝子数が多い牛（感染伝播高リスク牛）から優先的に更新することが有効とされている。通常BLV遺伝子量は検体DNA100ngあたりのBLV遺伝子のコピー数を算出することによって比較する（コピー数/DNA100ng）。しかし本県ではリアルタイムPCR（r-PCR）によってBLV遺伝子のコピー数は検出できるが、検体DNA濃度測定が行える微量測定分光光度計がないため、BLV遺伝子量の正確な算出ができず、BLV遺伝子の定性検査に限られている。

一方で最終的な牛白血病の生前診断（家畜共済の事務取扱処理要領での基準）（表1）は、遺伝子検査ではなく、臨床症状、触診、細胞診、血液所見（リンパ球増多、異型リンパ球出現）、BLV抗体の有無で判断している。

和歌山県では、これまでも消費・安全対策交付金事業により県内のBLVの遺伝子定性検査および抗体検査を実施してきたが、これまで県内牛のリンパ球数の大規模調査は未実施であった。そこで今回初めて末梢血単核細胞（＝リンパ球＋単球、以下PBMC）数による判定（「ECの鍵」）（表2）を従来法に併せて実施した。このことにより、正確な遺伝子定量比較ができなくても牛白血病高リスク牛の選定が可能か比較検討したので報告する。

### 【材料と方法】

県内7戸（A～G農場）の肉用牛計157頭について、EDTA血および血清を採取し、検査材料とした（表3）。抗体検査として血清について寒天ゲル内沈降反応（ゲル沈）およびELISAを実施、遺伝子定性検査としてEDTA血についてr-PCRを実施した。PBMC数は自動血球計算機による白血球数の測定を行うと共に、血液塗抹標本から白血球中PBMCの百分比を算出することにより、その数を算出した。ECの鍵の判定基準を用いて、PBMC数と年齢から陽性、擬陽性、正常の3段階に分類した。

### 【結果】

ゲル沈、ELISAおよびr-PCR陽性はそれぞれ14頭、23頭、21頭で、それら3検査が全て陽性は2戸の10頭（A農場8頭、B農場2頭）であっ

た。一方、検査牛全頭が3検査全て陰性の農場は2戸（CおよびD農場）であった（表4）。A農場のように3検査とも陽性が多い農場ではこれらの結果のみで高リスク牛の選定順位を決めるのが困難である。

ECの鍵の判定結果（表5）は19頭が陽性、24頭が擬陽性、114頭が正常に分類された。ECの鍵陽性牛のうち、3検査全て陽性はA農場の4頭であり、8頭の中の4頭の高リスク牛の絞り込みが可能となった。

一方、ECの鍵陽性であるが3検査全て陰性は14頭（C農場12頭、D農場1頭、E農場1頭）であった。C農場はBLV浸潤レベルが抗体・遺伝子検査でゼロにもかかわらず、検査牛の内、1頭を除く全てがECの鍵判定で擬陽性、陽性であった。C農場の検査牛の平均年齢が7.3歳と、最も高いにもかかわらず、平均PBMC数が最も高値であった（表6）。C農場では、BLV以外の何らかの要因により農場全体のPBMC数が高いことが考えられた。放牧農場では白血球数が高くなるという報告もあることから、C農場の放牧飼養による影響の可能性が示唆された。しかし、同じく放牧飼養であるB農場ではそのような傾向が認められず、はっきりとした要因は不明である。

ECの鍵判定別の各種検査の陽性率（図1）では、PBMC数に対するBLVの関与が薄いと考えられるC農場を除いた6農場のデータで比較した。ECの鍵判定で陽性であった個体はゲル沈、ELISA、r-PCRの各検査において、50%以上が陽性であり、ECの鍵判定の有用性が示された。

C農場の個体を除いた各種検査結果パターンの内訳（表7）では、太枠内に示す、ゲル沈抗体が陰性であるが遺伝子陽性の牛は10頭おり、早期摘発にはゲル沈だけでは困難と考えられた。しかし、点線枠内に示す、ゲル沈が陽性であればELISA抗体とBLV遺伝子はほぼ陽性であり、ゲル沈の特異性の高さが今回のデータから証明された。また、環境要因の強いC農場を除いたデータであっても、灰色で示す、ECの鍵判定のみが陽性または擬陽性の牛は10頭いた。よってECの鍵判定は他の検査の補足検査として用いることが前提であり、更に白血球数は採血毎に多少の変動があるため、複数回採血による判定が、より確実であると考えられる。

#### 【考察】

PBMCの算出によるECの鍵判定は、低コストで容易にできる検査ではあるが、農場の飼養条件等により、BLVの浸潤と関係なくPBMC数が高くなることがあるため、ECの鍵判定のみで高リスク牛の選定を行うべきでないと考えられた。しかし、BLV高浸潤と判明した農場においては、高リスク牛の選定の際、抗体・遺伝子検査に加えて、淘汰の優先順位付けのためにECの鍵の判定が有用であると考えられた。

以上の結果から、今後の牛白血病高リスク牛選定法についてはまずはじめに、低コストで、簡易、特異性が高く、各家保で実施可能なゲル沈で抗体検査を行い、陽性牛は基本的に淘汰更新対象牛とする。抗体検査は基本的に移行抗体の消える6ヶ月齢以上の血清で行う。更に、ゲル沈抗体陽性牛の多いBLV高浸潤農場では、複数回採血によるECの鍵判定、高コストであるが高感度のELISAやr-PCRを実施することで、非特異反応の見落とし防止、高リスク牛の絞り込みが可能と考えられる。

今後も新しい検査法や発症機序の解明による有効な対策の出現が予想されるが、牛白血病の蔓延防止に向け、検討を重ねていきたい。

#### 【参考文献】

- ・村上賢二：牛白血病の診断法、平成21年度動物衛生研究所家畜衛生講習会（牛疾病特殊講習会）講義資料
- ・農林水産省：家畜共済の事務取扱要領及び事務処理要領について、平成23年6月改正
- ・村上賢二ら：我が国の地方病性牛白血病の発生動向と対策－その現状と課題－、日獣会誌、第62号、499-02（2009）
- ・羽田野昭ら：牛白血病清浄化への取り組み、平成21年度大分県家畜衛生業績発表
- ・猪熊壽：牛白血病臨床診断のピットフォールと発症牛早期診断の試み、家畜診療、第57巻3号、137-143（2010）