

牛白血病ウイルス感染母牛における子宮内感染の発生状況

千葉由純 鈴木千尋 小笠原房恵 村井知恵

要 約

牛白血病ウイルス (BLV) 感染母牛のECの鍵による分類及びBLV遺伝子量と産子への子宮内感染との関連を調査した。BLV抗体陽性母牛67頭をリンパ球数に基づきECの鍵により分類し、白血球中BLV遺伝子コピー数をリアルタイムPCRにより測定した。それらの産子67頭から12時間以内に採血し、nestedまたはリアルタイムPCRによりBLV遺伝子検査を実施した。子宮内感染率は、母牛のECの鍵による分類別に、陽性・疑陽性群が正常群に比べて有意に高率だった。感染産子の母牛のBLV遺伝子コピー数は、非感染産子の母牛のそれと比べて有意に多かった。リンパ球数およびBLV遺伝子量が多い母牛は子宮内感染のリスクが高いことが示唆された。

キーワード：牛白血病, BLV, 子宮内感染, リアルタイムPCR, ECの鍵

緒 言

地方病性牛白血病は、レトロウイルス科デルタレトロウイルス属に属するBovine Leukemia Virus (BLV) の感染によって引き起こされる。BLVの伝播経路として、吸血昆虫や人為的感染等による水平感染のほか、感染母牛から胎子への子宮内感染、産道及び乳汁感染を含めた垂直感染が知られている [1-3]。未発症BLV感染母牛における子宮内感染の発生率は10%未満と考えられている [1] が、その中でも持続性リンパ球増多症 (PL) 及びリンパ肉腫発症の母牛においては確率が高いことが報告されている [4, 5]。現在、本病の防疫対策として、主に水平感染の防除対策が行われているが、垂直感染による若齢感染牛の存在は、農場における清浄化を遅らせる要因となると考えられる。しかし、国内における子宮内感染の実態についての報告は少ない。本病の清浄化対策に資するため、BLV感染母牛のリンパ球数及びBLV遺伝子量とその産子への子宮内感染発生率について関連を調査した。

材料及び方法

平成22年7月～平成25年11月に採血した4農場のBLV抗体陽性母牛67頭 (1～13歳齢, ホルスタイン種46頭, 黒毛和種21頭) 及びその産子67頭の血液を調査に供した。

母牛の血液は、分娩35日前から分娩日の間に採血した。リンパ球数を、白血球数測定 (セルタックMEK-5200, 日本光電) 及び血液塗抹のヘモグラムにより計測し、その成績からECの鍵に基づき、陽性・疑陽性・正常に分類した (表1)。また、全血は0.2%食塩水により赤血球を溶血させ、遠心分離して得た白血球からDNAを抽出 (QIAamp DNA Mini Kit, (株)キアゲン) し、分光吸光度計 (レシオビームU-1800, (株)日立ハイテクサイエンス) により波長260nmで濃度を定量後、リアルタイムPCR (CycleavePCR[®] ウシ白血病ウイルス検出キット, タカラバイオ(株)) を用い、DNA 100ngあたりのBLV遺伝子コピー数を測定した。得られたBLV遺伝子コピー数は、DNA 10ngあたりの値に

表1 ECの鍵に基づく年齢及びリンパ球数 ($\times 10^3$ 個/ μ l) の対比表

年 齢	0～1	～2	～3	～4	～5	～6	7～
陽 性	13<	12<	10.5<	9.5<	8.5<	8<	7.5
疑陽性	11～13	10～12	8.5～10.5	7.5～9.5	6.5～8.5	6～8	5.5～7.5
正 常	<11	<10	<8.5	<7.5	<6.5	<6	<5.5

標準化し、BLV遺伝子量とした。

産子の血液は、出生後12時間以内に採血し、初乳摂取の有無は聴き取り調査及び血清GGT活性値の測定（富士ドライケム、富士フィルムメディカル株）により判断（100 IU/L以上を初乳摂取）した。BLV遺伝子検査は、母牛のそれと同様のリアルタイムPCR又はnestedPCRで行った。NestedPCRは、Licursiら [6] のプライマー及び増幅条件方法により、AmpliTaq Gold 360 Master Mix（アプライドバイオシステムズ株）を用い実施した。BLV遺伝子陽性の産子をBLV感染と判定した。抗体検査はELISA法（牛白血病ELISAキット、JNC株）により実施した。出生時にBLV遺伝子が検出された3頭は、1カ月後又は3カ月後に再度検査を実施した。

母牛の品種、ECの鍵に基づく分類及び産子の初乳摂取と産子感染の有無との関係はフィッシャーの正確確率検定により、母牛のBLV遺伝子量のLog10対数値と産子感染の有無及び母牛のECの鍵に基づく分類との関係はマン・ホイットニーのU検定により統計処理した。

成績

BLV感染母牛の産子67頭中13頭（19.4%）からBLV遺伝子が検出された。

母牛はECの鍵により、陽性11頭、疑陽性8頭、正常48頭に分類された。その産子の感染頭数（感染率）

表2 母牛のECの鍵による分類別の産子のBLV感染頭数及び感染率

母牛		産子BLV感染		
ECの鍵	頭数	陽性	陰性	感染率
陽性	11	7	4	63.6% ^a
疑陽性	8	3	5	37.5% ^b
正常	48	3	45	6.3% ^{a, b}
合計	67	13	54	19.4%

同符号間に有意差あり（a：p<0.001 b：p<0.05）

表3 初乳摂取の有無とBLV感染産子の出生直後の抗体保有状況

抗体	初乳摂取		計
	なし	あり	
陽性	3	6	9
陰性	2	2	4
計	5	8	13

は、各々7頭（63.6%）、3頭（37.5%）及び3頭（6.3%）であり、陽性及び疑陽性群は、正常群と比較して産子の感染率が有意に高かった（陽性：p<0.001、疑陽性：p<0.05）（表2）。また、各群の平均BLV遺伝子量は、陽性 3.3×10^3 、疑陽性 2.4×10^3 及び正常 5.4×10^2 であり、陽性群及び疑陽性群が正常群と比較して有意（p<0.01）に多かった（図1）。母牛のリンパ球数とBLV遺伝子量との間には、正の相関（R=0.60）が認められた（図2）。品種及び産子の初乳摂取と産子感染との間に、有意差は認められなかった。

母牛のBLV遺伝子量と産子の感染との関連の比較において、産子に感染が認められた母牛のBLV平均遺伝子量は 3.5×10^3 であり、産子に感染が認められなかった母牛の 6.6×10^2 と比較して有意に多かった（p<0.001）。産子に感染が認められなかった母牛には遺伝子量の多い個体も認められたが、65%は感染が認められた母牛の最小値よりも低い値であった（図3）。

BLV感染産子13頭中9頭が抗体を保有していた。そのうち3頭は、初乳未摂取であったにもかかわらず抗体が検出されたことから、子宮内感染抗体と判定された。他の6頭は、初乳摂取後のため、感染抗体と移行抗体との判別は不能であった（表3）。

出生時にBLV遺伝子陽性であった13頭のうち3頭の再検査では、全頭にBLV遺伝子量の増加が認められ、そのうち出生時に抗体陰性であった1頭が抗体陽転した（表4）。

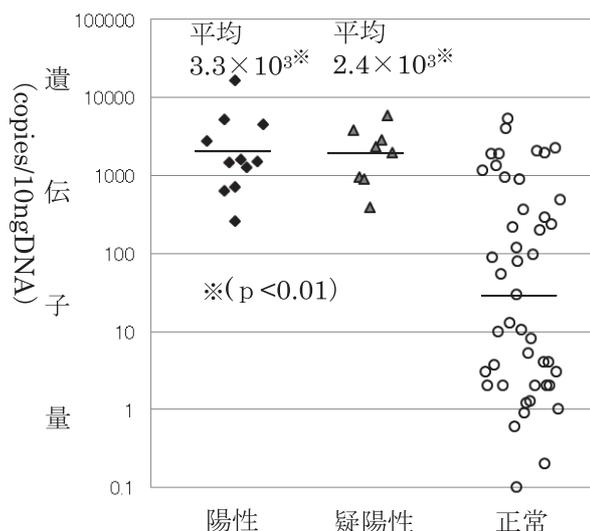


図1 母牛のECの鍵による分類別BLV遺伝子量

表4 出生時BLV遺伝子陽性産子の追跡調査結果

産子	BLV遺伝子量 (copies/10ngDNA)		抗体	
	出生時	2回目*	出生時	2回目*
A	1.0×10^0	3.4×10^1	-	+
B	7×10^{-1}	2.9×10^1	+	+
C	4.3×10^0	3.4×10^1	+	+

※産子A及びC：3カ月後，産子B：1カ月後

考 察

BLV抗体陽性母牛約19%の産子からBLV遺伝子が検出された。それは、産子の抗体検査成績を指標とした既報 [5, 8, 9] のそれ (4~7%) と比較して高かった。BLV実験感染において、ウイルス接種後、PCR法でBLV遺伝子が検出され始めた時期は接種後2週間後以降であったとの報告があり [7]、本調査では、出生後12時間以内に採取した白血球を用いたことから、産子は、産道又は乳汁を介した感染ではなく、子宮内感染を示すものと考えられた。さらに、初乳未摂取のBLV感染産子5頭中3頭が出生直後に感染抗体を保有していたことも、これを裏付けていた。

BLV抗体の産生には、感染から4~14週間を有する [2, 10] ことから、出生直後産子については、抗体検査のみでは感染を正確に把握できないことが知られている。本調査のBLV感染産子のうち、初乳未摂取の5頭中2頭は、出生直後には抗体陰性であったが、3か月後に再検査を実施した1頭は陽転が確認された。Agresti らは、PCR法により感染が確認された産子5頭中2頭が、出生時には抗体が検出されず、6か月齢時には陽転したことを報告している [4]。これらのことから、産子の感染の把握には、遺伝子検査が必要であり、本調査で得られた成績はより正確に産子の感染状況を把握したと考えられた。

産子の感染率は、母牛のECの鍵が陽性及び疑陽性の場合に、正常群よりも有意に高く、リンパ球数が増加したPL牛において高い成績を示した既報 [4, 5] と同様の成績であった。さらに母牛のBLV遺伝子量は、産子に感染が認められた場合に有意に多い結果が得られるとともに、母牛のBLV遺伝子量と母牛のリンパ球数との間には正の相関が認められた。これらの成績から、産子のBLV感染率は母牛の感染状況に大きく影響されると考えられ、ECの鍵に基づくリンパ球数の評価に加え、リアルタイムPCRによるBLV遺伝子量の測定は、PL牛等の子宮内感染の可能性が高い母牛の特定に有用であると考えられた。

本研究により、PL牛及びウイルス量の多い感染ハイリスク牛の割合が高い農場では、子宮内感染の発生率が高いことが示唆されたことから、これらの把握及

びその産子の感染状況を確認することは、本病清浄化対策の一助となると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本調査に御助言頂いた岩手大学農学部共同獣医学科の村上賢二先生に深謝いたします。

引用文献

- [1] 村上賢二, 小林創太, 筒井俊之: 日獣会誌, 62, 499-502 (2009)
- [2] O. M. Radostits: Veterinary Medicine, Vol. 10, 1209~1221, Saunders, (2007)
- [3] 小沼操, メアスソティ: 家畜診療, 47, 163-173 (2000)
- [4] Agresti A, Ponti W, Rocchi M et al.: Am J Vet Res, 54, 373-378 (1993)
- [5] Lassauzet ML, Thurmond MC, Johnson WO et al.: Can J Vet Res, 55, 264-268, (1991)
- [6] Licursi M. et al.: Virus Res, 86, 101-110 (2002)
- [7] Dusty W. Nagy et al.: Am J Vet Res, 68, 72-75 (2007)
- [8] Thurmond MC, Cater RL, Puhr DM et al.: Can J Comp Med, 47, 316-319 (1983)
- [9] Van der Maaten MJ, Miller JM, Schmerr MJ et al.: Am J Vet Res, 42, 1052-1054 (1981)
- [10] Burr ridge MJ, Thurmond MC, Miller JM et al.: Can J Comp Med, 46, 270-271 (1982)