

原 著

## 岩手県内飼養牛における牛伝染性リンパ腫抵抗性遺伝子の保因状況

福成和博<sup>1)</sup>, 千葉由純<sup>1)</sup>

### 要 約

県内飼養牛における牛伝染性リンパ腫 (EBL) の病態に抵抗性を示す *DRB3\*009:02* 対立遺伝子の保因状況を調査した。EBL 未発症牛 7 市町 46 戸 1,062 頭のうち 7 市町 16 戸 32 頭にヘテロ保因が確認され、32 頭中 7 組 14 頭に血縁関係が認められた。本調査の保因率 (3.0%) は林らの報告 (6.9%) と比べて有意に低く、品種別では黒毛和種 (1.6%) がホルスタイン種 (4.7%) より有意に低かった。牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV) 感染の有無による保因率の差は認められなかった。一方、EBL 発症牛 42 頭全てに保因は確認されなかった。BLV 感染保因牛 11 頭のプロウイルス量 (PVL) は極めて低値であり、11 頭中 10 頭の経時的な PVL の定量により、長期間低値の維持を確認した。県内では低率に *DRB3\*009:02* が牛群内で維持されており、そのヘテロ保因による抵抗性が再確認された。BLV 感染保因牛を生物学的防壁として活用した BLV 感染及び非感染牛群の分離飼育並びに保因牛から子牛を生産し、BLV 非感染後継牛を確保することで、本病対策の一助となることを期待する。

キーワード : *DRB3\*009:02*, 抵抗性遺伝子, 牛伝染性リンパ腫, 低プロウイルス量

牛伝染性リンパ腫 (EBL) は、レトロウイルス科に属する牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV) の感染により引き起こされる腫瘍性疾患である [1, 2]。本病の国内発生は年々増加しており、岩手県においても令和 2 年度の発生は過去最多の 229 頭であった。全国的には肉用繁殖牛に比べて乳用牛の EBL 発生率や BVL 抗体陽性率が高い傾向が認められるが [3, 4]、本県では黒毛和種 (JB) の発生が約 7 割を占め、その発生頭数はホルスタイン種 (Hol) と異なり年々増加していることから、経済的損失が非常に大きくなっている。

EBL 発生農場では、BLV 感染牛及び非感染牛群の分離飼育による水平感染の防止を柱に BLV 感染経路を遮断する取組が行われている [4]。本県においても多くの農場で分離飼育を実施しているが、飼養頭数や牛舎の構造等の制限により感染牛群と非感染牛群の間に防虫ネットや空房を設けることが困難な農場も存

在し、オーダーメイドの対策が求められる場合もある。一方、BLV の垂直感染は 10% 以下と考えられていたが、EBL 発生の増加に伴い BLV プロウイルス量 (PVL) の多い「高リスク牛」も増加していると考えられ、さらに同牛の垂直感染率は 48.2% と高いことから、本病対策の長期化が危惧されている [5]。

EBL の病態 (EBL 発症及び PVL) とウシ主要組織適合抗原クラス II *DRB3* (*BoLA-DRB3*) 対立遺伝子との相関性が知られているが、*BoLA-DRB3* 対立遺伝子のうち EBL の病態に強力な抵抗性を示す *DRB3\*009:02* が近年注目されている。*DRB3\*009:02* は、JB 及び Hol に共通で、ホモ保因のみならずヘテロ保因においても EBL を発症し難く、BLV に感染しても PVL を低値に維持することが報告されているが [6-8]、県内飼養牛の保因状況は不明である。

本報告では、県内飼養牛における *DRB3\*009:02* の保因状況を調査し、本病対策への保因牛の活用につい

1) 岩手支会 岩手県中央家畜保健衛生所 〒020-0605 滝沢市砂込 390-5  
連絡担当者 (E-mail) : 福成和博 (k-fukunari@pref.iwate.jp)

て検討したので、その概要を述べる。

### 材料と方法

EBL 未発症牛の保因状況調査：2019 年から 2022 年にかけて本病発生及び未発生農場で採血された EBL 未発症牛 7 市町村 46 戸 1,062 頭 (JB:568 頭, Hol:494 頭) の血液由来 DNA を用いて *DRB3\*009:02* を特異的に検出するリアルタイム PCR を実施し [9], 同遺伝子が検出された場合は、既報 [10] の PCR-PFLP によりホモ又はヘテロ接合の確認を行った。本調査により保因が確認された牛の血縁関係を確認し、その保因率について、林らの報告 [6], 品種別及び BLV 感染別ごとに Fisher の正確確率検定を行い、危険率 1% 未満を有意差ありとした。BLV の感染の有無は ELISA (牛伝染性リンパ腫エライザキット, (株)ニッポンジーン) 又はリアルタイム PCR [11] で判定した。

EBL 発症牛の保有状況調査：2020 年から 2022 年にかけて県内と畜場で EBL と診断された牛 15 市町村 37 戸 42 頭 (JB:29 頭, Hol:13 頭) の血液由来 DNA を用いて上述した方法により *DRB3\*009:02* の保因の有無を確認した。

BLV 感染保因牛の PVL 追跡調査：上記の調査対象牛のうち *DRB3\*009:02* の保因が確認された BLV 感染牛 (BLV 感染保因牛) 及び対照牛として同対立遺伝子を保因しない BLV 感染牛 27 頭の血液由来 DNA を用いて BLV の tax 領域を検出する定量リアルタイム PCR (qPCR, ウシ白血病毒検出用 Probe/Primer/Positive control, タカラバイオ(株)) により PVL を定量した。BLV 感染保因牛及び対照牛は、EC 又は JB-Key [12, 13] に基づき、陽性・疑陽性・正常に区分した。qPCR で初回に定量した各区分の

牛の平均 PVL について、Tukey 法により多重比較し、危険率 5% 未満を有意差ありとした。追跡調査のための採血は約 6 か月毎に 1 頭当たり 2~4 回実施した。

### 成 績

EBL 未発症牛の保因状況：EBL 未発症牛 7 市町村 16 戸 (34.8%) 32 頭 (3.0%) にヘテロ保因が確認され、32 頭中 7 組 14 頭に血縁関係 (親子 6 組, 姉妹 1 組) が認められた (表 1)。県内飼養牛の保因率 (3.0%) は、林らの報告 (6.8%) と比べて有意に低値であった ( $P < 0.01$ )。品種別の保因率は JB (1.6%) が Hol (4.7%) と比べて有意に低値であった ( $P < 0.01$ )。BLV 感染の有無による保因率の差は認められなかった。

EBL 発症牛の保有状況：EBL 発症牛 15 市町村 37 戸 42 頭全てに保因は確認されなかった。

BLV 感染保因牛の PVL：本調査により BLV 感染保因牛 11 頭が確認され、PVL 追跡調査対象とした。qPCR により定量した 11 頭の PVL を表 2 に示す。多くの牛が qPCR の検出限界以下であり、検出されても極めて低い値 (0.5~41copies/10ng) であった。

BLV 感染保因牛 11 頭は EC 又は JB-Key に基づき全て正常に区分された。対照牛 27 頭は陽性 9 頭, 疑陽性 8 頭, 正常 10 頭に区分された。BLV 感染保因牛 11 頭の平均 PVL (3.9copies/10ng) は陽性 (1,100copies/10ng) 及び疑陽性 (294copies/10ng) に区分された牛より有意に低値であった ( $P < 0.05$ ) (図 1)。

BLV 感染保因牛 11 頭のうち 2 回以上採血が実施できた 10 頭の平均 PVL を経時的に定量した結果、6~18 か月の間低値を維持していた (図 2)。一方、対照牛 27 頭のうち陽性及び疑陽性に区分された牛の平均 PVL は高値を維持していた。

表 1. 県内の EBL 未発症牛における *DRB3\*009:02* の保因状況

| 市町村数 | 経営形態 | 品種  | 調査戸数 | 保因戸数 | 戸数別保因率 | 調査頭数  | 保因頭数 | 頭数別保因率            | BLV 感染別保因率 |         | 血縁関係             |
|------|------|-----|------|------|--------|-------|------|-------------------|------------|---------|------------------|
|      |      |     |      |      |        |       |      |                   | 有 (11頭)    | 無 (21頭) |                  |
| 3    | 肉用繁殖 | JB  | 7    | 4    | 57.1%  | 492   | 6    | 1.2%              | 1.5%       | 0.9%    | 2 組 4 頭 (親子)     |
| 1    | 肉用預託 |     | 14   | 1    | 7.1%   | 76    | 3    | 3.9%              | 0.0%       | 4.3%    | 1 組 2 頭 (姉妹)     |
| 4    | 小計   |     | 21   | 5    | 23.8%  | 568   | 9    | 1.6% <sup>a</sup> | 1.4%       | 1.7%    | 3 組 6 頭 (親子・姉妹)  |
| 3    | 酪農   | Hol | 5    | 3    | 60.0%  | 236   | 9    | 3.8%              | 4.4%       | 3.4%    | 2 組 4 頭 (親子)     |
| 1    | 乳用預託 |     | 20   | 8    | 40.0%  | 256   | 14   | 5.5%              | 10.3%      | 4.8%    | 2 組 4 頭 (親子)     |
| 4    | 小計   |     | 25   | 11   | 44.0%  | 492   | 23   | 4.7% <sup>a</sup> | 5.8%       | 4.3%    | 4 組 8 頭 (親子)     |
| 7    | 合計   |     | 46   | 16   | 34.8%  | 1,060 | 32   | 3.0% <sup>*</sup> | 2.7%       | 3.2%    | 7 組 14 頭 (親子・姉妹) |

\* 林らの報告 (6.8%) と比べて有意差あり ( $P < 0.01$ )

\*\* 同符号間で有意差あり ( $P < 0.01$ )

表 2. *DRB3\*009:02* 保因牛の個体別 PVL

| No.    | 農場     | 品種  | 初回   | PVL (copies/10ng) |        |        |
|--------|--------|-----|------|-------------------|--------|--------|
|        |        |     |      | 6 か月後             | 12 か月後 | 18 か月後 |
| 1      | 肉用繁殖 A | JB  | 0.0  | NT                | 0.0    | 0.0    |
| 2      | 肉用繁殖 B | JB  | 1.6  | 0.9               | 0.0    | 0.0    |
| 3      | 肉用繁殖 C | JB  | 0.0  | 0.0               | 0.0    | NT     |
| 4      | 肉用繁殖 D | JB  | 0.0  | NT                | 0.0    | NT     |
| 5      | 酪農 A   | Hol | 41.0 | 0.0               | NT     | NT     |
| 6      | 酪農 B   | Hol | 0.0  | 0.0               | NT     | NT     |
| 7      | 酪農 C   | Hol | 0.0  | 0.0               | 0.0    | 0.0    |
| 8      | 酪農 D   | Hol | 0.0  | 0.0               | 0.0    | NT     |
| 9      | 酪農 E   | Hol | 0.0  | 0.0               | NT     | NT     |
| 10     | 酪農 F   | Hol | 0.0  | 0.5               | NT     | NT     |
| 11     | 酪農 G   | Hol | 0.0  | NT                | NT     | NT     |
| 平均 PVL |        |     | 3.9  | 0.2               | 0.0    | 0.0    |

\* PVL 0.0copies/10ng は qPCR の検出限界以下を示す（非検出）

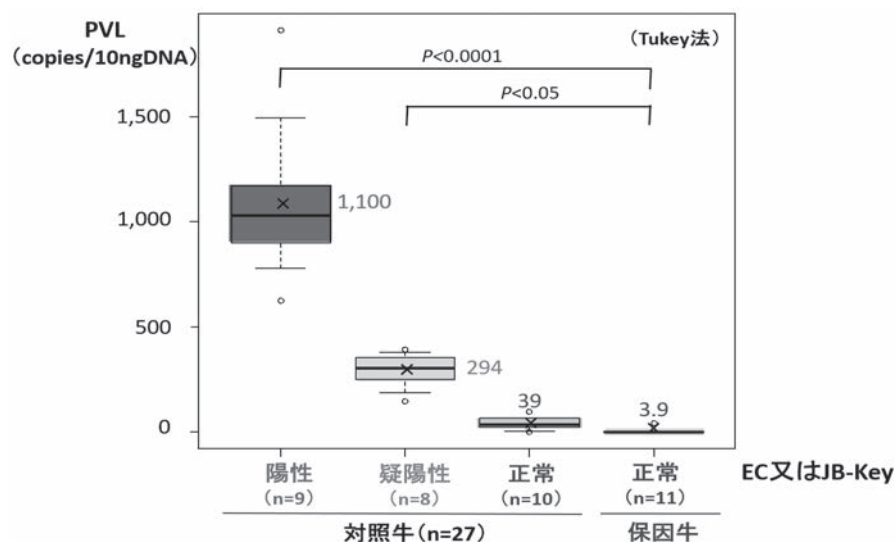


図 1 *DRB3\*009:02* 保因牛と対照牛の平均 PVL（初回）の比較

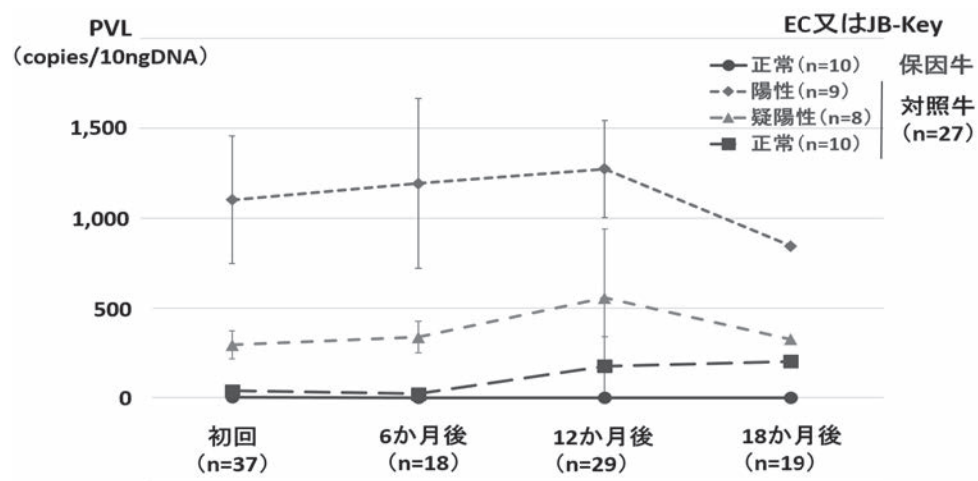


図 2 *DRB3\*009:02* 保因牛と対照牛の経時的に定量した平均 PVL

## 考 察

本県の EBL 未発症牛における *DRB3\*009:02* の保因率 (3.0%) は、林ら [6] が報告した宮崎県及び大分県の飼養牛における保因率 (6.8%) と比べて有意に低く、確認された保因牛 32 頭は全てヘテロ保因であり、種雄牛の保因を示唆する結果が得られなかったことから、県内では低率に牛群内で母系を中心に維持されていることが判明した。同保因率については、九州地域の飼養牛で 10.6% [14]、鳥取県の酪農場で 5.6% [15] との報告もあり、全国的に保因牛は少数と推察される。本県の JB の保因率 (1.6%) がさらに低かったことは、本県で JB の EBL 発生が多い要因の一つと推察された。EBL の発症に関しては、感受性遺伝子の一つである *DRB3\*016:01* をホモで保因する牛の EBL 発生率は有意に高いとの報告 [8] があることから、同対立遺伝子等の保因状況を調査することでより詳細な要因が明らかになると思われた。一方、本県の EBL 発症牛に *DRB3\*009:02* の保因は認められず、保因牛が EBL を発症する可能性は低いと推察されたが、発症牛についても感受性遺伝子の調査が必要である。

BLV 感染保因牛 11 頭の平均 PVL (3.9copies/10ng) は EC 又は JB-Key 陽性及び疑陽性の牛より有意に低く、既報 [16] と同様に長期間低値を維持していることが確認された。Mekata ら [17] は、PVL が 20 copies/10ng 未満の BLV 感染牛を超低リスク牛 (垂直感染リスクなし、垂直感染リスク低) に分類しており、*DRB3\*009:02* をヘテロで保因する牛から BLV の感染が生じるリスクは極めて低いことが示唆された。

本病対策は農林水産省の衛生対策ガイドラインを指標に実施されているが、本病清浄化のためには BLV 感染牛の積極的な更新と感染牛及び非感染牛群の分離飼育による水平感染の防止が必須となる。BLV 感染率の高い農場において、感染牛の積極的更新は難しく、分離飼育においては、飼養頭数や牛舎の構造によるスペースの制限がある場合には感染牛群と非感染牛群の間に防虫ネットや空房を設置することが難しい。*DRB3\*009:02* を保因している牛は、BLV の感染源とならないことが報告 [18] されていることから、保因牛を感染牛群と非感染牛群の間に配置する生物学的防壁や保因牛が両群内を移動することによる群編成時の調整に利用できると思われる。また、*DRB3\*009:02* を保因した母牛及び子牛の垂直感染リスクは低いことから [14]、保因牛への人工授精又は保因牛の受精卵を他牛に移植することにより BLV 非感染後継牛の確

保に貢献できると考えられた。特に垂直感染リスクの高い「高リスク牛」への受精卵移植は、本病対策の長期化を軽減する可能性があると思われた。

以上から、本病対策に *DRB3\*009:02* の保因牛を活用することは、BLV の水平感染及び垂直感染対策の一助となることが期待される。

## 引用文献

- [1] Ketmann R, Burny A, Callebaut I, et al. : Bovine leukemia virus, The Retroviridae, Levy J, ed, 3, 39-81, Plenum Press, New York (1994)
- [2] Kuczewski A, Orsel K, Barkema HW, et al. : Invited review : Bovine leukemia virus - Transmission, control, and eradication, J Dairy Sci, 104, 6358-6375 (2021)
- [3] Murakami K, Kobayashi S, Konishi M, et al. : Nationwide survey of bovine leukemia virus infection among dairy and beef breeding cattle in Japan from 2009-2011, J Vet Med Sci, 75, 1123-1126 (2013)
- [4] 村上賢二 : 地方病性牛白血病 - 近年の流行状況, 感染伝播様式, 防疫対策と牛白血病に関する衛生対策ガイドライン -, 岩獣会報, 43, 7-11 (2017)
- [5] Mekata H, Sekiguchi S, Konnai S, et al. : Evaluation of the natural perinatal transmission of bovine leukaemia virus, Vet Rec, 176, 254 (2015)
- [6] Hayashi T, Mekata H, Sekiguchi S, et al. : Cattle with the BoLA class II *DRB3\*0902* allele have significantly lower bovine leukemia proviral loads, J Vet Med Sci, 12, 79, 1552-1555 (2017)
- [7] Lo CW, Borjigin L, Saito S, et al. : BoLA-*DRB3* Polymorphism is Associated with Differential Susceptibility to Bovine Leukemia Virus-Induced Lymphoma and Proviral Load, Viruses, 12, 352 (2020)
- [8] Lo CW, Borjigin L, Saito S, et al. : Association of Bovine Leukemia Virus -Induced Lymphoma with BoLA -*DRB3* Polymorphisms at DNA, Amino Acid, and Binding Pocket Property Levels, Pathogens, 10, 437 (2021)
- [9] Forletti A, Juliarena MA, Ceriani C, et al. : Identification of cattle carrying alleles associated with resistance and susceptibility to the Bovine

- Leukemia Virus progression by real-time PCR, *Ret Vet Sci*, 95, 991-995 (2013)
- [10] van Eijk MJ, Stewart-Haynes JA, Lewin HA : Extensive polymorphism of the *BoLA-DRB3* gene distinguished by PCR-RFLP, *Animal Genetics*, 23, 483-496 (1992)
- [11] 宗村佳子, 赤瀬悟, 黒野博之, 村上賢二 : リアルタイム PCR による牛白血病診断法の検討, *獣医畜産新報*, 60, 1005-1012 (2007)
- [12] Bendixen HJ : Preventive measures in cattle leukemia: leukosis enzootica bovis, *Ann N Y Acad Sci*, 108, 1241-1267 (1963)
- [13] Mekata H, Yamamoto M, Kirino Y, et al. : New hematological key for bovine leukemia virus-infected Japanese Black cattle, *J Vet Med Sci*, 80, 316-3190 (2018)
- [14] Notsu K, El Daous H, Mitoma S, Norimine J, et al. : A pooled testing system to rapidly identify cattle carrying the elite controller *BoLA-DRB3\*00:902* haplotype against bovine leukemia virus infection, *HLA*, 99, 12-24 (2022)
- [15] 増田恒幸, 朱夏希, 黒田萌黄, 他 : 鳥取県内の1酪農場における牛伝染性リンパ腫対策と効果検証 *日獣会誌*, 74, 423-426 (2021)
- [16] Bai L, Borjigin L, Sato H, et al. : Kinetic Study of BLV Infectivity in BLV Susceptible and Resistant Cattle in Japan from 2017 to 2019, *Pathogens*, 10, 1281 (2021)
- [17] 目堅博久 : プロウイルス量に基づいた牛白血病対策ノススめ, *家畜感染症学会誌*, 7, 163-168 (2018)
- [18] Juliarena MA, Barrios CN, Ceriani MC, et al. : Hot topic: Bovine leukemia virus (BLV) infected cows with low proviral load are not a source of infection for BLV free cattle, *J Dairy Sci*, 99, 4586-4589 (2016)
- [19] Borjigin L, Lo CW, Bai L, Hamada R, et al. : Risk Assessment of Bovine Major Histocompatibility Complex Class II *DRB3* Alleles for Perinatal Transmission of Bovine Leukemia Virus, *Pathogens*, 10, 502 (2021)

