

原 著

東京都におけると畜牛の地方病性牛白血病発生状況と
牛白血病ウイルス浸潤状況宗村佳子^{1),2),4)†} 小川 仁²⁾ 杉山恵美^{2),3)} 藤川 浩^{4),5)} 村上賢二^{4),6)}

- 1) 東京都健康安全研究センター (〒169-0073 新宿区百人町3-24-1)
- 2) 東京都芝浦食肉衛生検査所 (〒108-0075 港区港南2-7-19)
- 3) 東京都市場衛生検査所 (〒104-0045 中央区築地5-2-1)
- 4) 岐阜大学大学院連合獣医学研究科 (〒501-1193 岐阜市柳戸1-1)
- 5) 東京農工大学農学部 (〒183-8509 府中市幸町3-5-8)
- 6) 岩手大学農学部 (〒020-8550 盛岡市上田3-18-8)

(2013年11月11日受付・2014年2月5日受理)

要 約

1997～2012年度の東京都におけると畜牛の地方病性牛白血病 (EBL) の発生状況を調査した結果、1997年度のEBL発生率は0.003%であったが、2005年度から増加し、2012年度は0.03%となった。EBL牛163頭のうち、生体所見で異常があったものは14.6%にすぎず、19.8%では白血球が7,500個/μl未満であり、牛白血病ウイルス (BLV) 抗体検査で陰性が1.85%認められた。一方、リアルタイムPCR法では全例からBLV遺伝子を検出したことから、本法はEBL診断に有効と考えられた。また、と畜牛のBLV抗体調査を行ったところ、陽性率は2005～2007年度には肥育用乳用種で23.8%、肥育用肉用種で19.8%であった。2012年度には肥育用肉用種のみを調査したが、12.7%に低下した。交雑種の陽性率は黒毛和種に比較して2回の調査ともに有意に高かった。

——キーワード：牛白血病ウイルス，地方病性牛白血病，肥育牛，と畜検査。

-----日獣会誌 67, 523～528 (2014)

牛白血病は、牛白血病ウイルス (bovine leukemia virus : BLV) の関与する地方病性牛白血病 (enzootic bovine leukosis : EBL) とBLVの関与しない散発性牛白血病に大別される [1]。近年、国内においてBLVの感染は拡大傾向にあり [2-4]、これに伴い牛白血病の発生は急増し2012年には2,000頭を超えた。と畜検査で牛白血病により廃棄される牛の数も増加しており、経済損失は深刻となっている。乳用牛のEBLの発生に関する調査報告は比較的多く見られるが [5-7]、肥育牛に関するEBL発生状況などの基礎的なデータは少ない。本研究では、BLV感染予防、と畜検査による病畜の適切な排除、安全な食肉の流通に寄与するため、肥育牛の検査頭数が国内最大規模である東京都芝浦食肉衛生検査所において2005～2012年度までのEBL発生状況を調査した。また、あわせて、と畜牛を対象としてBLV浸

潤状況調査を行った。

材料及び方法

EBL発生状況：1997～2012年度 (1997年4月～2013年3月) の東京都芝浦食肉衛生検査所における牛の検査頭数、全部廃棄数、EBLによる全部廃棄数から、EBLの発生率、全部廃棄頭数に占めるEBLによる全部廃棄数の割合を算出した。

EBL発症牛の材料：2005～2012年度に、と畜検査された牛743,974頭のうち、EBLで全部廃棄となった163頭について、病理学的検査、白血球数算定 (96頭のみ)、BLV遺伝子検査及び抗BLV抗体検査を実施した。

病理学的検査及び白血球数算定：血液塗抹標本及び病変部のスタンプ標本を作製した後、ディフ・クイック染

† 連絡責任者：宗村佳子 (東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科)

〒169-0073 新宿区百人町3-24-1

☎03-3363-3231 FAX 03-3363-3263

E-mail : Yoshiko_Soumura@member.metro.tokyo.jp

色を行い観察に供した。また、10%中性緩衝ホルマリン固定パラフィン切片を作製した後、ヘマトキシリン・エオジン染色（HE）を行い観察に供した。白血球数は血球算定板あるいは自動血球計数装置（pocH-100iV, シスメックス株, 兵庫）により算定した。

リアルタイムPCR検査：と体から得られた血液及びリンパ節からDNA抽出キット（DNeasy Blood & Tissue Kit, 株キアゲン, 東京）を用いてDNAを抽出し、既報に準じBLV遺伝子を検出した [8]。

抗体検査：牛白血病診断キット（牛白血病抗体アッセイキット「日生研」, 日生研株, 東京）を用いて受身赤血球凝集反応（PHA）を行った。

と畜牛の抗BLV抗体保有調査：2005～2007年度及び2012年度に搬入された肥育牛597頭（黒毛和種326頭, 交雑種166頭, ホルスタイン種99頭, ジャージー種6頭）を対象として抗BLV抗体検査を行った（表1）。

表1 抗BLV抗体保有調査対象としたと畜牛の内訳

年 度	検査数	肉用種		乳用種 23カ月齢 (16-35)
		黒毛和種 29カ月齢* (26-40)	交雑種 27カ月齢 (23-32)	
2005～2007	297	132	60	105
2012	300	194	106	0
合 計	597	326	166	105

*：月齢の中央値、() はその範囲

抗BLV抗体陽性率の有意差検定はカイ二乗検定により行い $P < 0.05$ のとき有意差ありとした。

成 績

発生状況：1997～2004年度は、牛白血病の型別を行っていないため、EBL単独での発生率は不明であるが、この間の牛白血病の発生数は年間0～4頭の範囲で推移し大きな変動はなく、8年間の牛白血病発生率の平均は0.0022%であった（表2）。しかし、2005年度にはEBL発生数は11頭と増加傾向に転じ、2012年度には30頭となり、EBLの発生率は0.0318%と著しく増加した。2005～2012年度に発見されたEBLは163例であったが、これらEBL発症牛の月齢は18～38カ月齢に分布し、中央値は30カ月齢であった。また、品種別では、黒毛和種127例, 交雑種35例, ホルスタイン種1例であった。EBL発生率にすると和種0.0238%, 交雑種0.0173%, ホルスタイン種0.0138%となり和種が最も高かった。

EBL症例の所見：生体検査において、何らかの異常所見が認められたものは163例中24例（14.7%）であった（表3）。最も多かった所見は腫脹・腫瘤であり10例で認められた。また、起立不能が7例, 眼球突出が6例, 削瘦及び呼吸速拍がそれぞれ3例であった。解体後にはリンパ節の腫大が全例で認められたが、その大きさはさまざまであり、正常よりやや大きい程度から人頭大

表2 地方病性牛白血病（EBL）の発生状況（1997～2012年度）

年 度	検査数	全 部 廃棄数	EBL			BLV遺伝子 検出頭数*4	散発性牛白血病 発生頭数
			全部廃棄数*1	(%) *2	発生率(%) *3		
1997	88,212	29	3	(10.3)	0.0034	NT*5	NT
1998	87,637	25	1	(4.0)	0.0011	NT	NT
1999	86,472	19	0	(0)	0	0	0
2000	85,403	26	2	(7.7)	0.0023	NT	NT
2001	73,011	15	1	(6.7)	0.0014	NT	NT
2002	78,959	14	1	(7.1)	0.0013	NT	NT
2003	84,688	35	4	(11.4)	0.0047	NT	NT
2004	83,215	53	3	(5.7)	0.0036	NT	NT
2005	94,383	55	11	(20.0)	0.0117	11	1 (胸腺型)
2006	94,078	41	19	(46.3)	0.0202	19	1 (胸腺型)
2007	93,965	43	22	(51.2)	0.0234	22	0
2008	92,564	44	20	(45.5)	0.0216	20	1 (胸腺型)
2009	90,741	34	14	(41.2)	0.0154	14	0
2010	94,758	40	23	(57.5)	0.0243	23	1 (胸腺型)
2011	89,162	47	24	(51.1)	0.0269	24	0
2012	94,323	44	30	(68.2)	0.0318	30	1 (胸腺型)
合 計	1,411,571	564	178	(31.6)	0.0126	163	

* 1：1997～2004年度の全部廃棄数は牛白血病全数

* 2：全部廃棄数に占めるEBLによる全部廃棄の割合（1997～2004年度は牛白血病による全部廃棄の割合）

* 3：検査数に対するEBLによる全部廃棄の割合（1997～2004年度は牛白血病による全部廃棄の割合）

* 4：リアルタイムPCR検査によりリンパ節から検出された頭数

* 5：未検査

表3 EBL発症牛にみられた生体所見 (2005～2012年度)

異常所見	所見の内訳	頭数 (%)*
有	腫脹・腫瘤	10 (6.1)
	起立不能	7 (4.3)
	眼球突出	6 (3.7)
	削 瘦	3 (1.8)
	呼吸速拍	3 (1.8)
	発 熱	1 (0.6)
	姿勢異常	1 (0.6)
	元氣消失	1 (0.6)
	眼瞼部外傷	1 (0.6)
	切歯の脱落	1 (0.6)
	無	
検査対象の合計		163 (100)

* : 複数の所見を持つ例もあるため所見内訳の合計は163頭より多い

表4 EBL発症牛の白血球数とリンパ球比率

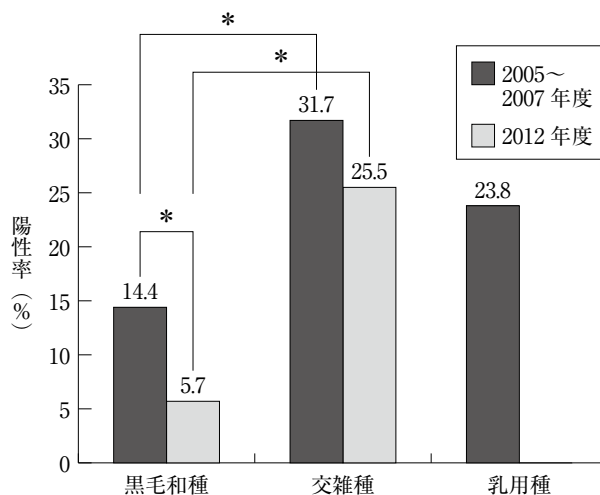
白血球数 (個/ μ l)	頭数 (%)	リンパ球比率*						未測定
		50 未満	50～ 60	60～ 70	70～ 80	80～ 90	90 以上	
7,500 未満	19 (19.8)	1	2	3	5	4	4	0
7,500～ 9,500	10 (10.4)	0	0	0	4	1	5	0
9,500 以上	67 (69.8)	1	2	0	8	15	40	1
合 計	96 (100)	2	4	3	17	20	49	1

* : 白血球数に占めるリンパ球比率 (%)

まで認められた。82例について最大リンパ節を検索したところ、内側腸骨リンパ節が42例(51.2%)と半数以上を占め、次いで浅頸リンパ節が16例(19.5%)、腸間膜リンパ節が10例(12.2%)であった。病理組織検査においては、複数の核小体を持ち、核形が不整の中型から大型のリンパ球のび慢性増殖が確認された。白血球数を算定した96例の白血球数は、2,000～451,600個/ μ lに分布し、中央値は15,050個/ μ lであった。ECの鍵[9]で2～3歳牛の正常値とされる7,500個/ μ lを下回ったものは19頭(19.8%)であった(表4)。また、これらのリンパ球比率は約半数の49頭で90%以上であったが、白血球数が多くなるに従ってリンパ球比率が高まる傾向にあった。

BLVの感染 : 1例を除き、EBLと診断された牛の血液からBLV遺伝子が検出された。血液で不検出であった例を含め、すべてのリンパ節検体からBLV遺伝子が検出された。この例を含めBLV抗体は3例では検出されなかった(1例は未実施)。BLV遺伝子が検出された牛のPHA抗体価の中央値は512倍であった。

と畜牛の抗体陽性率 : 2005～2007年度の抗BLV抗体陽性率は肥育用肉用種で19.8%、肥育用乳用種では



図と畜牛の抗BLV抗体保有率 (* : P < 0.05)

23.8%で、有意差は認められないものの乳用種の方が抗体陽性率は高かった(図)。PHA抗体価の中央値は肉用種及び乳用種いずれも128倍であった。肉用種のうち、黒毛和種の陽性率は14.4%、交雑種のそれは31.7%となり交雑種の方が有意に高かった。2012年度に肥育用肉用種のみ調査を行ったところ、陽性率は12.7%であり、PHA抗体価中央値は258倍であった。このうち黒毛和種の陽性率は5.7%、交雑種では25.5%となり、交雑種において有意に高かった。2012年度と2005～2007年度の黒毛和種と交雑種の抗体陽性率を比較すると、いずれも低下しており、特に黒毛和種においては2分の1以下と顕著な低下が認められた。

考 察

EBLは全国規模で増加しており、原因としてBLV感染の拡大があげられている。BLV抗体保有率は1980年代初頭には約5～6%であったが、2007年には28.6%、2010～2011年には35.2%と急激に増加している[2-4]。当所では、年間約9万頭前後の牛を検査しているが、検査対象のほとんどが30カ月齢前後の肥育牛であり、約7割を黒毛和種が占め、それらはほぼ全国から出荷されている。高齢牛の搬入はないことから、他の検査所に比較して遭遇するEBL症例も少ないと考えられるが、それでも近年増加し続けている。EBL発症牛の多くは5～8歳といわれているが[10]、国内のBLV感染率の上昇に伴い、3歳未満での発症例も増加していると考えられる。今回の発症牛のなかで、最も若齢のものは18カ月齢であった。当所におけるEBL検出率は2005年度から増加傾向に転じ2012年度には0.0318%と1997～2004年度の平均牛白血病発生率の約14倍となったが、増加の原因は明らかではない。

牛白血病は冒された臓器組織の部位により症状が異なるため、慎重な鑑別診断が求められる。臨床においては、

体表のリンパ節腫脹が認められないなど、当初 EBL が疑われない例も報告されている [5]。今回の調査においても、EBL 牛のうち、生体検査時に異常所見が得られたものは約 15% とわずかであり、しかもいずれも起立不能など非特異的な所見であった。これらの結果から、外貌から EBL と診断することは難しいと考えられる。さらに、EBL であってもリンパ球が増数する例は 25% 程度との報告もあるように [11]、腫瘍性病変と血液の変化は並行しないとされる。今回のわれわれの調査においても、EBL を発症していても白血球数は EC の鍵で正常値とされる 7,500 個/ μ l 未満にとどまる例も 19.8% でみられた。また、抗体検査では抗体価は広い範囲に分布し、3 例では陰性であった。よって、これらの検査は EBL 診断をする上での有用性は高いとは言い難い。EBL は腫瘍性病変であることから、と畜検査において病理検査は主たる検査法となるが、診断に苦慮する症例もあり補助的な検査方法が必要とされている。今回、リアルタイム PCR 法により BLV 遺伝子は全例で認められた。血液中から BLV 遺伝子が検出されなかった例が 1 例あったが、これは血液中に BLV 感染リンパ球が少なかったためと考えられる。リンパ節中には血液中に比べ、より多くのリンパ球が存在することから、EBL 診断のための検体はリンパ節が適切であると考えられる。また、われわれの研究により EBL を発症している牛と BLV に感染しているが未発症の牛の間にはウイルス遺伝子量に差異がある可能性が示唆され、本法は EBL の診断法の一つとして有効と思われる [8]。

Murakami ら [4] により 2010～2011 年に行われた全国抗体調査によれば 2 歳未満の繁殖用肉牛の抗 BLV 抗体陽性率は 15.2% であった。調査方法・対象・規模に違いはあるものの、今回われわれが行った肉用肥育牛の抗体陽性率は 2012 年度で 12.7% となり、全国の調査結果と近い値となった。また、2 歳未満の乳用種の陽性率は、2007 年で 19.3%、2010～2011 年で 24.1% との報告もあり [3, 4]、今回のわれわれの調査における 2005～2007 年度の乳用種の抗体陽性率の 23.8% はこれに近い値であった。これらのことから、当所の調査結果は BLV 感染率に関して全国と同様の傾向があることが明らかになり、今後抗体調査を定期的に行うことで、国内の BLV 感染状況並びに EBL 発生動向把握に大いに寄与できると思われる。

国内において BLV 感染率は肉用種に比較して乳用種が高いと報告されている [3, 4]。われわれの調査でも、乳用種の抗体保有率は肉用種に対し高かった。また、同じ肉用種でも、交雑種は黒毛和種に比較して有意に高かった。BLV の感染経路としては不衛生な処置や吸血昆虫を介しての血液による水平感染があげられる [12]。また、乳汁を介した母子感染も重要であり、BLV に対

する移行抗体を含まない代用乳やウイルスに汚染されたプール乳により感染が拡大する可能性があることが指摘されている [12]。一方、BLV 感染実験より初乳中の移行抗体が十分であれば感染防御が成立することが示されるなど [13]、垂直感染予防に果たす初乳の重要性が指摘されている。Kobayashi ら [14] も、牛群内での BLV 感染拡大を防御する因子として母牛からの初乳給与をあげている。Murakami ら [3, 4] は、乳用種において肉用種より高い BLV 感染率を示す原因は、初乳及び乳の給与方法にある可能性を指摘している。すなわち、乳用種は母牛から初乳や乳を直接摂取することはまれであり、プール乳などを給与される機会が多いことが感染を拡大させていることを示唆している。黒毛和種では初乳を含め、乳を母牛から直接摂取することが多い。一方、交雑種は、母牛にホルスタイン種を用いて産出されるため、プール乳を与えられる機会が黒毛和種に比較して多い。黒毛和種と交雑種では育成期及び肥育期における飼養状況に顕著な違いはないことから、今回の調査で認められた黒毛和種と交雑種間の BLV 感染率の違いは、哺乳期における初乳や乳の給与方法の差異に起因する可能性が考えられた。

EBL の発症に対して感受性・抵抗性を規定する牛主要組織適合性抗原 (BoLA) の対立遺伝子が同定されるなど、EBL 発症には宿主側要因が重要であることが示唆されている [15]。また、黒毛和種とホルスタイン種では BoLA のハプロタイプの分布が異なっていることが示されている [16]。われわれの調査で、BLV 感染率は黒毛和種では交雑種に比較して有意に低かったが、EBL 発生率は和種の方がやや高くなり、和種では発症感受性が高い可能性が考えられる。品種あるいは血統による感染率や発症率の差異が解明されることが待たれる。

EBL 発見例は依然増加の傾向にあるものの、2005～2007 年に比較し 2012 年度では BLV 抗体陽性率の低下がみられた。これには当所が、「安全・安心な食肉供給」の観点から積極的に推進している衛生指導、すなわち、定期的な搬入牛の抗 BLV 抗体調査やその結果に基づいた生産者への助言指導などの啓発事業が効果を表したとも考えられる。

従来、肥育牛については BLV 感染があまり問題にされてこなかったが、今後は肥育牛についても、EBL 発症の実態の把握、有効な予防プログラム確立、また、と畜検査で応用可能な診断法の開発が必要と考える。

引用文献

- [1] Kettmann R, Burny A, Callebaut I, Droogmans L, Mammerickx M, Willems L, Portetelle D : Bovine leukemia virus, The Retroviridae, Levy J, ed, 3, 39-81, Plenum Press, NewYork (1994)

- [2] Ito T : Statistics on regional prevalence of gp antibody against bovine leukosis virus in Japan, *Bull Natl Inst Anim Health*, 90, 35-60 (1987)
- [3] Murakami K, Kobayashi S, Konishi M, Kameyama K, Yamamoto T, Tsutui T : The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among Japanese cattle, *Vet Microbiol*, 148, 84-88 (2011)
- [4] Murakami K, Kobayashi S, Konishi M, Kameyama K, Tsutui T : Nationwide survey of bovine leukemia virus infection among dairy and beef breeding cattle in Japan from 2010-2011, *J Vet Med Sci*, 75, 1123-1126 (2013)
- [5] 田川道人, 下田 崇, 富樫義彦, 渡辺由紀, 古林与志安, 古岡秀文, 石井三都夫, 猪熊 壽 : 非典型的牛白血病のホルスタイン種乳牛3症例, *日獣会誌*, 61, 936-940 (2008)
- [6] 竹内俊彦, 吉本 薫, 駒形 良, 福中守人, 古林与志安, 松本高太郎, 猪熊 壽 : 慢性子宮内膜炎を呈したホルスタイン種雌牛にみられた牛白血病の1症例, *日獣会誌*, 64, 708-711 (2011)
- [7] 富田啓介, 中条正樹, 加茂前優花, 矢島和枝, 浦本京也, 竹嶋伸之輔, 間 陽子 : 兵庫県中部でみられたホルスタイン種における牛白血病の病態及び発症要因の検討, *日獣会誌*, 66, 109-114 (2013)
- [8] 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 (2005)
- [9] 吉川 堯 : 第5章地方病性牛白血病の臨床的診断, *牛白血病診断便覧*, 大島寛一, 高桑一雄, 水野善夫, 吉川 堯編, 34-46, 日本獣医師会, 東京 (1986)
- [10] 小沼 操 : 牛白血病, *動物の感染症*, 明石博臣, 大橋和彦, 小沼 操, 菊池直哉, 後藤義孝, 高井伸二, 宝達勉編, 第3版, 98-99, 近代出版, 東京 (2011)
- [11] Burton AJ, Nydam DV, Long ED, Divers TJ : Signalment and clinical complaints initiating hospital admission, methods of diagnosis, and pathological findings associated with bovine lymphosarcoma (112 cases), *J Vet Intern Med*, 24, 960-964 (2010)
- [12] Hopkins SG, DiGiacomo RF : Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle, *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 13, 107-128 (1997)
- [13] Van Der Maaten MJ, Miller JM, Schmerr MJ : Effect of colostrum antibody on bovine leukemia virus infection of neonatal calves, *Am J Vet Res*, 42, 1498-1500 (1981)
- [14] Kobayashi S, Tsutsui T, Yamamoto T, Hayama Y, Kameyama K, Konishi M, Murakami K : Risk factors associated with within-herd transmission of bovine leukemia virus on dairy farms in Japan, *BMC Vet Res*, 6 (2010)
- [15] 間 陽子, 竹嶋伸之輔 : 牛白血病の世界における感染拡大の現状と防御対策, *獣医畜産新報*, 64, 115-120 (2011)
- [16] Miyasaka T, Takeshima SN, Sentsui H, Aida Y : Identification and diversity of bovine major histocompatibility complex class II haplotypes in Japanese Black and Holstein cattle in Japan, *J Dairy Sci*, 95, 420-431 (2012)

Incidence of Enzootic Bovine Leukosis and Prevalence of Bovine Leukemia Virus
in Slaughtered Cattle in Tokyo

Yoshiko SOMURA^{1),2),4)†}, Jin OGAWA²⁾, Emi SUGIYAMA^{2),3)}, Hiroshi FUJIKAWA^{4),5)}
and Kenji MURAKAMI^{4),6)}

- 1) *Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, 3-24-1 Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, 169-0073, Japan*
- 2) *Shibaura Meat Sanitary Inspection Station, 2-7-19 Konan, Minato-ku, 108-0075, Japan*
- 3) *Tokyo Metropolitan Wholesale Market Sanitation Station, 5-2-1 Tsukiji, Chuo-ku, 104-0045, Japan*
- 4) *United Graduate School of Veterinary Sciences, Gifu University, 1-1 Yanagido, 501-1193, Japan*
- 5) *Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu-shi, 183-8509, Japan*
- 6) *Faculty of Agriculture, Iwate University, 3-18-8 Ueda, Morioka-shi, 020-8550, Japan*

SUMMARY

Incidence of enzootic bovine leukosis (EBL) in slaughtered cattle in Tokyo was investigated in 1997-2012. Incidence of EBL in fattened cattle in 2012 was 0.03%, which was approximately 14-times higher than the average for 1997-2004. Only 14.6% of 163 EBL cases had abnormal findings in terms of appearance. Namely, low white blood cell counts below 7,500 cells/ μ l were found in 19.8% of the cases. Furthermore, 1.85% of the cases were negative by passive hemagglutination antibody test for bovine leukemia virus (BLV). On the other hand, the BLV genome was detected in all cases by real-time PCR, suggesting usefulness of this method. BLV infection surveys in 2005-2007 and in 2012 showed that the prevalence ratios of BLV in slaughtered dairy cattle and beef cattle were 23.8% and 19.8%, respectively, in 2005-2007, while the ratio in beef cattle decreased to 12.7% in 2012, and that crossbreed cattle had a significantly higher prevalence than Japanese Black in those years.

— Key words : bovine leukemia virus, enzootic bovine leukosis, fattened cattle, meat inspection.

† Correspondence to : Yoshiko SOMURA (*Department of Microbiology, Division of Virology, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health*)

3-24-1 Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, 169-0073, Japan

TEL +81-3-3363-3231 FAX +81-3-3363-3263 E-mail : Yoshiko_Soumura@member.metro.tokyo.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 67, 523 ~ 528 (2014)