

牛白血病の診断方法の検討とまん延防止対策

名部美琴¹⁾ 佐織徳彦¹⁾ 木伏雅彦²⁾ 野間進¹⁾

¹⁾和田山家畜保健衛生所 ²⁾洲本家畜保健衛生所

【はじめに】

牛白血病の摘発頭数は、全国的に増加し県内でも増加傾向にあり、感染拡大が懸念されている。乳用牛約 40 頭(うち育成牛 7 頭)、繁殖和牛約 10 頭を飼養する管内の乳肉複合経営農場で、牛白血病ウイルス(BLV)抗体陽性牛が確認された。そこで感染伝播の危険性の高い牛(高リスク牛)を確実に摘発するための診断方法の比較検討を目的として、抗体検査ならびに遺伝子検査を経時的に実施した。また、当該農場の抗体陽性牛を用いて BLV 伝播防止方法について調査した。

【診断方法の検討】

平成 21 年 9 月から 12 月まで毎月 1 回全頭を対象に、抗体検査として寒天ゲル内沈降反応(AGID)、定量受身赤血球凝集反応(PHA)、ELISA を行い、遺伝子検査として Nested PCR(PCR)を実施した。いずれかで陽性となった個体については定量リアルタイム PCR(rPCR)で遺伝子量を測定し、各結果を比較した。

育成牛と繁殖和牛は抗体・遺伝子検査ともに全頭陰性で、乳用牛では 24 頭(実頭数)がいずれかの検査で陽性となった。期間をとおして PHA と ELISA の陽性率が高くなった(表 1)。また、個体ごとにすべての検査結果の推移を調べると、期間をとおして PHA と ELISA が陽性でも、遺伝子が検出されない個体が 8%(2/24 頭)存在した(表 2: 赤枠)。

遺伝子量の多い検体では ELISA 値も高くなる傾向にあったが、遺伝子が検出されず ELISA のみ陽性となる検体が 11 検体あり、そのうち 8 検体は、抗体陽性で遺伝子検査陰性の個体(表 2: 赤枠)の検体であった(図 1)。AGID 陽性となるものは遺伝子量と ELISA 値が高いことから、AGID は特異性が高いと考えられた。PHA は ELISA とほぼ同じ結果となった。

今回行った検査の感度、特異性、コスト、実際の作業時間と判定までの所要時間を比較し、効果的な活用方法を検討した。AGID は感度が低いものの、特異性が高く、低コストで多検体処理が可能であることから、浸潤状況を広い範囲で調査するサーベイランスに適していると考えられた。ELISA は高感度で陽性牛を確実に摘発でき、PHA より多検体を短時間で処理できた。しかし、ELISA 陽性でも遺伝子が検出されない個体があったことから、淘汰牛の選定や高リスク牛の評価には PCR や rPCR を組み合わせることが必要と考えられた。

【高リスク牛評価】

BLV 遺伝子量とリンパ球数に注目して高リスク牛を評価した。同一個体の遺伝子量とリンパ球数は 9 月から 12 月までほぼ変動がなかったため 12 月の測定値を用いた。遺伝子量は rPCR で測定し、リンパ球数は Bendixen の鍵で判定した。遺伝子量の多い個体(10^2 コピー/ng DNA 以上)は、Bendixen の鍵でも陽性となったことから、遺伝子量の多い個体のなかで更新順位を判断する際に Bendixen の鍵は有効であると考えられた(表 3)。

【感染伝播要因の検討】

近年携帯型の超音波診断装置が普及しており、当所にも導入されている。そこで今回、エコープローブに付着した便から BLV の伝播の可能性の有無を検討した。調査には AGID 抗体陽性牛 7 頭を用いた。直腸検査後の手袋に付着した便 7 検体、カバーをかけていないプローブに付着した便 7 検体(内、血液の付着した便は 5 検体)そのプローブを水洗いして消毒し、綿棒で拭き取ったもの 7 検体を材料とし、

それぞれ PCR と rPCR を行った。結果、直検手袋付着便からは BLV 遺伝子は検出されなかったが、使用後のプローブに付着した便 4 検体 (PCR : 2/7、rPCR : 4/7)、プローブ消毒後の拭き取り材料 1 検体 (PCR : 1/7、rPCR : 0/7) から BLV 遺伝子が検出された。消毒後の拭き取り検体から遺伝子が検出された原因として、プローブとコードの接続部分に入った糞便が洗浄・消毒作業で取りきれなかったことが考えられた。遺伝子が検出されてもウイルスの感染性を示すものではないが、プローブからコードまでカバーすることで、感染の危険性を減らすことができると考えられる (図 2)。

【まとめ】

今回の調査から、それぞれの検査特性をふまえた牛白血病対策を考えた (図 3)。まず AGID でサーベイランスを実施し、陽性牛のいる農家に対して ELISA で全頭検査し、陽性牛を摘発する。さらに陽性牛について rPCR で高リスク牛を選定、更新順位を決定する。当該農家については、最初の全頭検査で AGID 陽性 9 頭、その後の ELISA で 24 頭摘発し、うち 9 頭は更新済みである。今後も半年ごとに ELISA で陽性牛を確認後、rPCR で高リスク牛を選定し、更新していく予定である。

また、当該農家を含め、陽性農家については畜主や診療獣医師と協力のもと、一般的にいわれている分離飼育、初乳給与、衛生管理、高リスク牛からの更新といったまん延防止対策に努めていく。

表 1 各検査の陽性頭数

搾乳牛	9月	10月	11月	12月	計
AGID	9(25%)	11(32%)	11(34%)	12(38%)	43(32%)
ELISA	20(56%)	19(56%)	20(63%)	20(63%)	79(59%)
PHA	19(53%)	22(65%)	20(63%)	19(59%)	80(60%)
PCR	14(39%)	15(44%)	16(50%)	16(50%)	61(46%)
検査数	36	34	32	32	134

()は陽性率

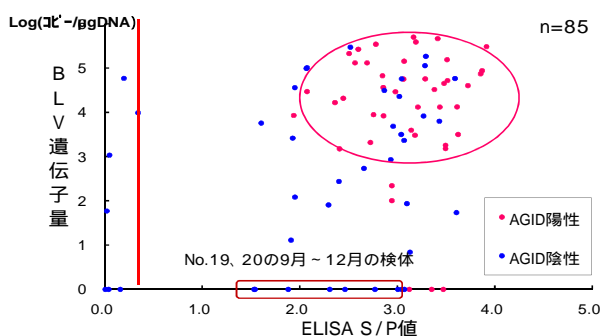


図 1 . AGID、ELISA値と遺伝子量の関係

表 2 個体ごとの結果の推移

個体No.	9月	10月	11月	12月	9月	10月	11月	12月	9月	10月	11月	12月					
1	AGID	+	+	+	+	11	AGID	-	-	-	-	17	AGID	-	-	-	+
	PHA	+	+	+	+		PHA	+	+	+	+		PHA	-	-	+	+
	ELISA	+	+	+	+		ELISA	+	+	+	+		ELISA	-	-	+	+
	PCR	+	+	+	+		PCR	+	+	+	+		PCR	-	-	+	+
	rPCR	+	+	+	+		rPCR	+	+	+	+		rPCR	-	-	+	+
6	AGID	-	-	+	+	12	AGID	-	-	-	-	18	AGID	-	-	-	-
	PHA	+	+	+	+		PHA	+	+	+	+		PHA	-	+	+	+
	ELISA	+	+	+	+		ELISA	+	+	+	+		ELISA	-	-	+	+
	PCR	+	+	+	+		PCR	-	-	+	+		PCR	-	-	+	+
	rPCR	+	+	+	+		rPCR	+	+	+	+		rPCR	-	+	+	+
7	AGID	-	+	+	+	13	AGID	-	-	-	-	19	AGID	-	-	-	-
	PHA	+	+	+	+		PHA	+	+	+	+		PHA	+	+	+	+
	ELISA	+	+	+	+		ELISA	+	+	+	+		ELISA	+	+	+	+
	PCR	+	+	+	+		PCR	-	-	+	+		PCR	-	-	-	-
	rPCR	+	+	+	+		rPCR	+	+	+	+		rPCR	-	-	-	-
8	AGID	-	+	+	+	14	AGID	-	+	+	+	20	AGID	-	-	-	-
	PHA	+	+	+	+		PHA	+	+	+	+		PHA	-	+	+	+
	ELISA	+	+	+	+		ELISA	+	+	+	+		ELISA	+	+	+	+
	PCR	+	+	+	+		PCR	-	-	+	+		PCR	-	-	-	-
	rPCR	+	+	+	+		rPCR	+	+	-	+		rPCR	-	-	-	-
9	AGID	+	+	-	+	15	AGID	-	+	+	-	20	AGID	-	-	-	-
	PHA	+	+	+	+		PHA	+	+	+	+		PHA	-	+	+	+
	ELISA	+	+	+	+		ELISA	+	+	+	+		ELISA	+	+	+	+
	PCR	+	+	+	+		PCR	-	-	-	-		PCR	-	-	-	-
	rPCR	+	+	+	+		rPCR	+	-	-	+		rPCR	-	-	-	-
10	AGID	-	-	+	+	16	AGID	-	-	-	-	20	AGID	-	-	-	-
	PHA	-	+	+	+		PHA	+	+	+	+		PHA	-	+	+	+
	ELISA	-	-	+	+		ELISA	+	+	+	+		ELISA	+	+	+	+
	PCR	-	+	+	+		PCR	-	-	-	-		PCR	-	-	-	-
	rPCR	+	+	+	+		rPCR	+	-	+	+		rPCR	-	-	-	-

表3 高リスク牛の評価

評価対象牛: rPCRで陽性の18頭

BLV遺伝子量 (コピ- / ngDNA)	頭数	Bendixenの鍵		
		陽性	疑陽性	正常
10 ² ~ 10 ³	5	2	2	1
10 ~ 10 ²	7	0	0	7
0 ~ 10	6	0	1	5

遺伝子量 + Bendixenの鍵 = 高リスク牛
 + 個体の能力、疾病状況 ⇨ 更新順位決定

図2. 各検体のBLV遺伝子検出頭数



プローブからコードまでカバーする



図3. 検査特性を踏まえた牛白血病対策

