

牛白血病ウイルス遺伝子量を指標とした  
地方病性牛白血病の診断法に関する研究

2015 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科  
(東京農工大学)

宗村 佳子

## 目次

緒言	1
図表	9
第一章 東京都のと畜牛における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	14
序論	14
材料および方法	15
1 EBL 発生状況	15
2 EBL 牛	15
3 病理学的検査	16
4 白血球数算定およびリンパ球比率の測定	16
5 血液およびリンパ節からの DNA 抽出	16
6 リアルタイム PCR 検査	16
7 抗体検査	17
8 と畜牛の抗 BLV 抗体保有調査	17
結 果	18
1 EBL 発生状況	18
2 EBL 牛の病理学的・臨床病理学的所見	18
3 EBL 牛の BLV 遺伝子保有状況	19
4 EBL 牛の抗 BLV 抗体保有状況	19
5 と畜牛の抗 BLV 抗体保有状況	19

考察	20
図表	25
第二章 地方病性牛白血病発症牛と牛白血病ウイルス感染牛の リンパ節中の牛白血病ウイルス量の比較	33
序論	33
材料および方法	34
1 対象牛および抗体検査	34
2 血液，リンパ節および脾臓からの DNA 抽出	35
3 定量リアルタイム PCR 検査	36
4 統計処理	36
結果	37
1 EBL 牛と BLV 感染牛の BLV 遺伝子コピー数の比較	37
2 EBL 牛の各リンパ節間の BLV 遺伝子コピー数の比較	37
3 胸腺型牛白血病牛における BLV 遺伝子コピー数	38
考察	39
図表	42
総括	47
謝辞	50
引用文献	51

## 略語一覧

AGID	ゲル内沈降反応 (agar gel immunodiffusion)
BLV	牛白血病ウイルス (bovine leukemia virus)
EBL	地方病性牛白血病 (enzootic bovine leukosis)
EDTA	エチレンジアミン四酢酸 (ethylene-diamine-tetra-acetic acid)
ELISA	エライサ (enzyme-linked immune sorbent assay)
HE	ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin-Eosin)
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction)
PHA	受身赤血球凝集反応 (passive hemagglutination)
qPCR	定量 PCR (quantitative polymerase chain reaction)

## 緒 言

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(44)。

牛白血病に関しての初めての学術的な所見記録は 1871 年まで遡る。

Leisering(54)は末梢血の白血化を起こした牛の脾臓に黄色結節が認められたと記載している。しかし、牛白血病の病因論についての研究が活発化したのは 20 世紀半ばになってからであった。1950 年代以降、ヨーロッパにおいて牛白血病の発生報告が相次ぎ(6, 32, 78), 1966 年には Bendixen(8)が長年にわたるデンマークでの発生状況調査から、牛白血病の多くは地方病的に発生するものであり、それとは別に、子牛型や皮膚型といったものが散発的に発生していると報告している。さらに Bendixen(8)は、地方病的に発生する牛白血病には、血統あるいは飼養管理面での違いは影響していないこと、繁殖牛売買に伴う移動により本疾病が拡がることなどを示し、牛白血病の原因としてウイルスなどの感染性因子を強く推察していたが、これは証明に至らなかった。その後、1969 年に Miller ら(60)は牛のリンパ肉腫由来リンパ球およびそれを接種した牛などから C-type virus に似たウイルス様粒子を回収し、1972 年にはこのウイルス様粒子を接種した牛において同様の粒子が回収されることおよび持続性リンパ球増多が起こることを確認し、EBL の原因がウイルスであることを証明した(61)。

BLV はレトロウイルス科オルソレトロウイルス亜科デルタレトロウイルス属に属する一本鎖 RNA ウイルスで、プロウイルスゲノムに約 8,700 の塩基を持つ(91)。粒子の直径は 100~120 nm でエンベロープを有し、正二十面

体構造をとる(図 1)。BLV はゲノム構造，プロウイルスの塩基配列などからヒト T リンパ球向性ウイルス 1 型 (Human T-lymphotropic virus type1, HTLV-1) ，同 2 型 (Human T-lymphotropic virus type2, HTLV-2) およびサルリンパ球向性ウイルス 1 型 (Simian T-lymphotropic virus type1, STLV-1) と近縁とされる(20, 24)。BLV 遺伝子の両端には long terminal repeat (LTR) 領域があり，遺伝子中にはウイルス合成に必須である gag, pol, env の 3 種類の遺伝子を持つ (21, 89, 90) (図 2)。gag 遺伝子はコアタンパク質を，pol 遺伝子は逆転写酵素を，env 遺伝子はウイルスエンベロープをそれぞれコードする(24)。また，エンベロープ領域と 3'LTR の間には X 領域があり，ここには Tax, Rex, R3 および G4 の非構造タンパク質をコードする領域がある。

BLV 粒子中には RNA が二量体として存在し，主要な構造タンパク質としてカプシドを構成する CA タンパク質 (p24) ，ヌクレオカプシドを構成する NC(p12) があり(図 1)，このうち p24 は感染牛に対して強い免疫原性を示す(19)。また，逆転写に関与する RT およびウイルスゲノムのインテグレーションに関与する IN といった酵素タンパク質がカプシド中に存在する。マトリックスタンパク質 MA(p15) はカプシドとエンベロープの脂質層の間であり，エンベロープ中には SU(gp51) および TM(gp30) の二種類の糖たんぱく質が見いだされている。gp51 は宿主に強い免疫を誘導することから診断に有用である。X 領域に存在する遺伝子のうち Tax および Rex は同一の RNA の異なるフレームにコードされており，Tax はウイルス遺伝子の転写活性を有し，Rex は転写後の調整因子である(24, 113)。

本ウイルスは宿主のリンパ球，単球・マクロファージ系の細胞に感染し(111)，感染した動物では，ウイルスは排除されることなく生涯持続感染

を続ける。牛は本ウイルスの自然宿主であるが(31), 羊, 水牛においても感染が起こる(11, 56)。また, 実験的には山羊(79), 豚(55), ウサギ(80, 112), チンパンジー(105)など多くの動物種において感染が認められている。BLVがHTLV-1およびHTLV-2と近縁であること(20, 24), ヒトの血清中にBLVに対する抗体が高率に見つかったとの報告(10)があることから, ヒトへの本ウイルスの感染について危惧する意見もあるが, 現在までにBLVがヒトに感染するという証明はなされていない。

牛では, 本ウイルスに感染しても約70%は臨床上症状を示さない無症状キャリアーとなる(88)。感染牛の約3分の1程度が持続性リンパ球増多症

(Persistent lymphocytosis, PL)となるが, PL牛でも末梢血のBリンパ球が増加すること以外には臨床的な異常を示すことはない。ごく一部の牛が年余を経てEBLを発症する。EBLが成牛型牛白血病と称されることもあるように, 好発年齢は4~5歳(11, 27)あるいは5~8歳(81)とされる。発症前にPLを示していたものは3分の2程度であり, EBL発症にPLは必ずしも必要な条件ではない(11, 94)。また, BLV感染牛のうちどの程度の割合の個体がEBLまで進行するかについては, 1%以下(66), 5~10%(87), 5%未満(114)などとされ, 文献により多少の差があるが, いずれにせよ発症に至る牛は数%程度と考えられる。

BLVは, ウイルスに感染したリンパ球を含む血液や乳汁を介して水平伝播する(44)。このため, 除角, 直腸検査, 注射針など器具の使い回しといった人為的な処置や吸血昆虫が感染源となりうる(35, 75, 84)。また, 垂直伝播もあるが, 子宮内感染が起こる確率は4~18%程度である(25, 53, 85)。しかし, 母牛がPL牛である場合は感染リスクが高まる(2)。精液や卵子を介した感染も考えられているが, 大橋ら(82)は, BLV感染牛の卵巣から回収

した卵子および BLV 感染妊娠牛の胎子血液からの BLV 遺伝子の検出を試みたが、いずれからも検出されなかったことから、卵子を介しての垂直感染の可能性は低いと考えられる。また、ウイルスに汚染された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が(35)、Ferrer ら(26, 28, 29)は BLV 感染母牛からの乳給与を行うグループと行わないグループについて子牛の BLV 感染率を比較した結果、乳汁感染の可能性は接触感染に比較し少ないとしている。初乳中の移行抗体の存在は、摂取子牛の感染に対して予防的に働くとされる(52, 106)。BLV 感染に関与する様々な飼養要因が考えられているが、近年の日本においては、「つなぎ飼いではない」こと、「除角を実施する」こと、「夏季にアブが非常に多い」ことが感染伝播リスク要因であり、反対に「初乳給与」は感染率を抑える要因であることが示唆されている(46)。

BLV 感染牛は臨床的な著変を示さないが、乳牛では泌乳量の減少、乳脂肪率の低下などを引き起こすとされ(9, 17)、BLV 感染によりもたらされた経済損失は米国において年間 4,200 万ドル(17)あるいは 5 億 2,500 万ドルと見積もられている(83)。一方で、BLV 感染と非感染牛の間に乳量や乳脂肪率の違いはないとする報告(34, 36, 39)および PL 牛では乳量が増加するという報告もある(110)。このように、BLV 感染による乳牛の生産性の低下については結論が出ていないが、予防プログラム導入や感染牛の淘汰や更新回数増加、商取引上の制限などから、BLV 感染は生産者側に経済的な負担をもたらす。Rhodes ら(87)は、100 頭規模の乳牛農場で BLV 陽性率が 50%の場合では、感染予防のコストに年間 6,406 ドル、検査や飼養管理などに必要な費用として 1,765 ドルがかかると見積もっている。また、BLV 高率感染農場では、消化器、代謝性疾患の発生件数が増えることも示されている(41)。



BLV の起源はヨーロッパ、より限定的にはバルト海沿岸の現在のリトアニア付近とされ(93)、牛の輸出の活発化により、過去 500 年の間にヨーロッパから世界各国に広まった(20)。ヨーロッパにおいては、かつて EBL の発生報告が相次いでいたものの、摘発淘汰を主体とする政府主導のコントロール策が成功し清浄化に成功した国も多い(1, 45, 72)。欧州委員会は、2013 年 12 月 31 日現在、西欧および北欧の大多数は EBL 清浄国であると宣言している(図 3)(23)。しかし、イタリアの一部地域や東欧の多くの国は未だ EBL 清浄国とはなっていない。

アメリカでは、1996 年の調査では 89.0%の乳牛農場が BLV に汚染されており、2007 年では 83.9%が BLV 陽性とされ、高い BLV 汚染率が続いている(104)(表 1)。カナダにおける BLV 陽性率は、乳牛で 20.8%(107)あるいは 26.9%(95)との報告がある。南米でも BLV の陽性率は高く、アルゼンチンでは 15 の乳牛農場を調べた結果、抗体陽性率はいずれの農場も 66%以上であったという報告や(33)、84%の農場が陽性であり個体レベルでは 32.85%が陽性であるという報告がある(103)。また、ウルグアイにおいては乳牛の 50%以上が BLV に感染しているとされる(86)。エジプトでは、1996 年に EBL の発生が初めて報告されたが、発生農場はアメリカ輸入牛を起源とした牛群であり、牛群内での 2 歳以上の抗体陽性率は 72.8%であった(115)。しかし、その他のアフリカ地域での BLV 浸潤状況についての報告は極めて少ないものとなっている。中東地域に関しては、トルコの乳牛で 59.6%(42)、イランでは 29.9%(63)あるいは 81.9%(65)、また、シリアでは 62.9~69.2%(50)が抗体陽性であったとの報告があり、概して高い陽性率と考えられる。パキスタンでは水牛で 0.3%、牛においては 0%との報告がある(57)。韓国では、乳牛で 28.3%、韓国土着牛で 2.4%(14)、台湾では 1985 年で 8.4%、1986 年

で 5.6% (108), また, カンボジアでは牛で 5.3%, 水牛では 0% (58)との報告があるが, いずれも調査年代が古く, また, 調査頭数も少なく, 日本以外のアジアでの近年の BLV 感染率は不明な点が多い状況となっている。

日本における牛白血病の初報告は 1927 年であり, 岩手県に輸入された種雄牛での発生であった (49)。その後, 国内でも 1976 年には EBL 症例から BLV が分離され(73), 1980 年には農林水産省家畜衛生試験場により初めての全国的な BLV 浸潤状況調査が実施された(38)。1998 年に牛白血病は家畜伝染病予防法に基づく届出伝染病に指定されたが, その年の届出数は 99 頭であったものが, 漸増を続け, 10 年後の 2008 年には 1,040 頭と 10 倍以上となり, 2013 年には 2,310 頭となった (71)(図 4)。

伊藤(38)による調査では, 国内牛の BLV 陽性率は 1980 年には乳用牛で 5.8%, 肉用牛で 11.3%であった。その 2 年後, 再び同様の調査が実施されたが, その際には, 乳用牛および肉用牛でそれぞれ 4.2%および 6.0%であった(38)。全国的な BLV 浸潤状況調査はその後 25 年間実施されていなかったが, 2007 年に 209 農場 5,420 頭を対象にした調査の結果, 乳用牛で 34.7%, 肉用牛で 11.9%が BLV 陽性となり, 特に乳用牛での BLV 感染率が高まっていることが示された (69)。さらに, 2010~2011 年に行われた全国調査においては乳用牛で 40.9%, 肉用繁殖牛で 28.7%となり, BLV 感染率が更なる上昇を見せていることが明らかになった (70)。

と畜検査では, 家畜伝染病予防法に規定する家畜伝染病および届出伝染病も検査対象疾病となっており, 牛白血病は, と畜検査により摘発されればと畜禁止あるいは全部廃棄処分となる重要な疾病である。平成 23 年に全国で見つかった牛白血病発症牛 1,731 頭のうち, 66.5%にあたる 1,151 頭がと畜場で見つかっており, しかもその 70%以上(820 頭)は生体検査においては異

常を呈していなかったとされる(47)。このことは、と畜検査における牛白血病診断の重要性の高まりを示している。全国の食肉衛生検査所から報告される牛白血病症例も増加しているが(43, 51, 92, 101), これら牛白血病発症牛について品種や年齢などの詳細を示す基礎的なデータはない。特に、生後2年半から3年程度でと畜される肥育牛については、乳牛と比較して国内症例報告も少なく(98, 99, 100, 102), と畜検査における疾病排除に支障をきたしている。

現在、と畜検査において本疾病が疑われる場合は、生体所見、剖見所見、血液所見および病理組織所見等を総合して診断し、検査の合否を判断している(116)が、症例の中には診断に苦慮するものもある。抗BLV抗体検査やPCRによるBLV遺伝子検出などのウイルス学的検索ではBLV感染の有無は診断できても、発症と未発症を区別することはできないことから、病理組織検査を補助する新たな病原学的な検査法の開発が求められている。

近年、病原体の微量検出法として、定量リアルタイムPCR法(qPCR法)が用いられるようになってきた(13, 15)。リアルタイムPCRでは、増幅産物量に比例して得られる蛍光強度を、目的遺伝子の量が既知である標準物質の蛍光強度と比較することで遺伝子の定量が可能となる。EBLを発症している牛ではBLV感染牛に比較しBLV遺伝子量が有意に高いことが示され、本方法のEBL診断への応用が期待されている(96)。

そこで本研究では、最初に、と畜場に搬入された肥育牛におけるEBL発生状況ならびにと畜検査の過程で発見されたEBL牛についての病理学的検査、白血球数算定、BLV遺伝子検査および抗BLV抗体検査を実施し、その結果について考察した。さらに、肥育牛についてのBLV浸潤状況に関する情報が乏しいことから(69, 70), 搬入された肥育牛を対象として抗BLV抗

体保有状況調査を行い、年度および品種間での差異について比較検討を行った。次に、qPCR法のEBL診断への応用の可能性を検討するため、EBL牛とBLV感染牛の血液、リンパ節および脾臓中のBLV遺伝子量をqPCR法により比較し考察を加えた。

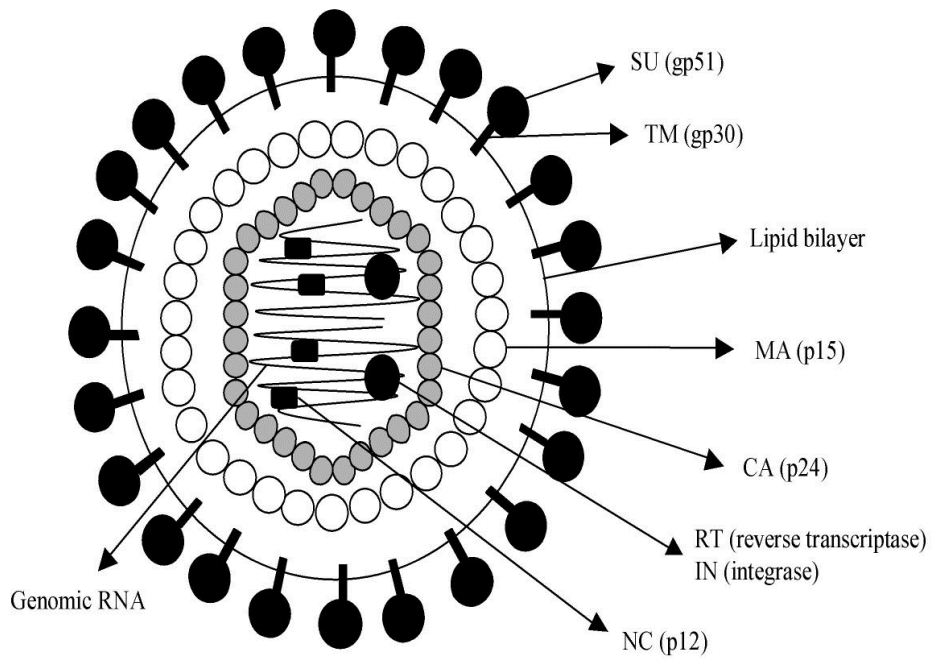


図1 牛白血病ウイルスの模式図  
(文献番号31より改変引用)

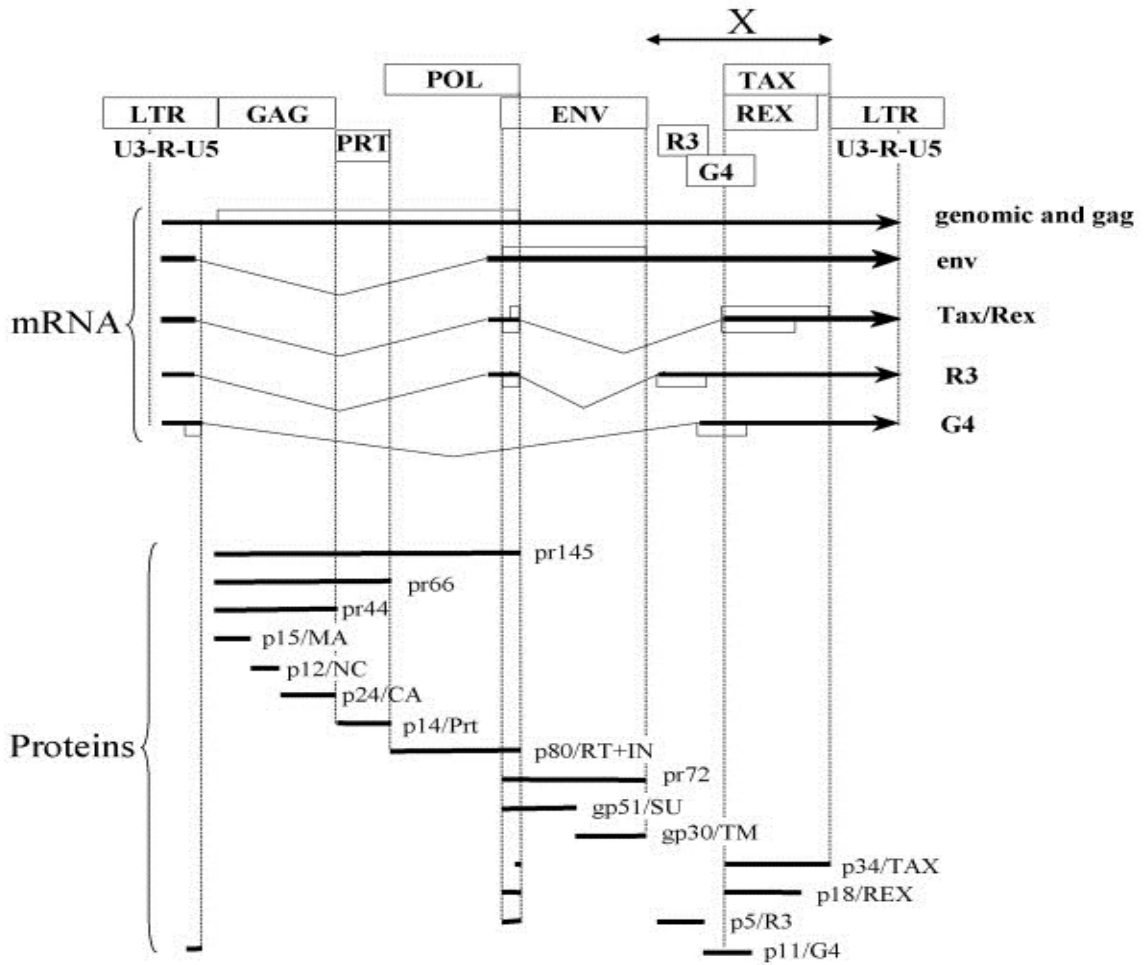


図2 牛白血病ウイルスの遺伝子構造  
(文献番号31より改変引用)

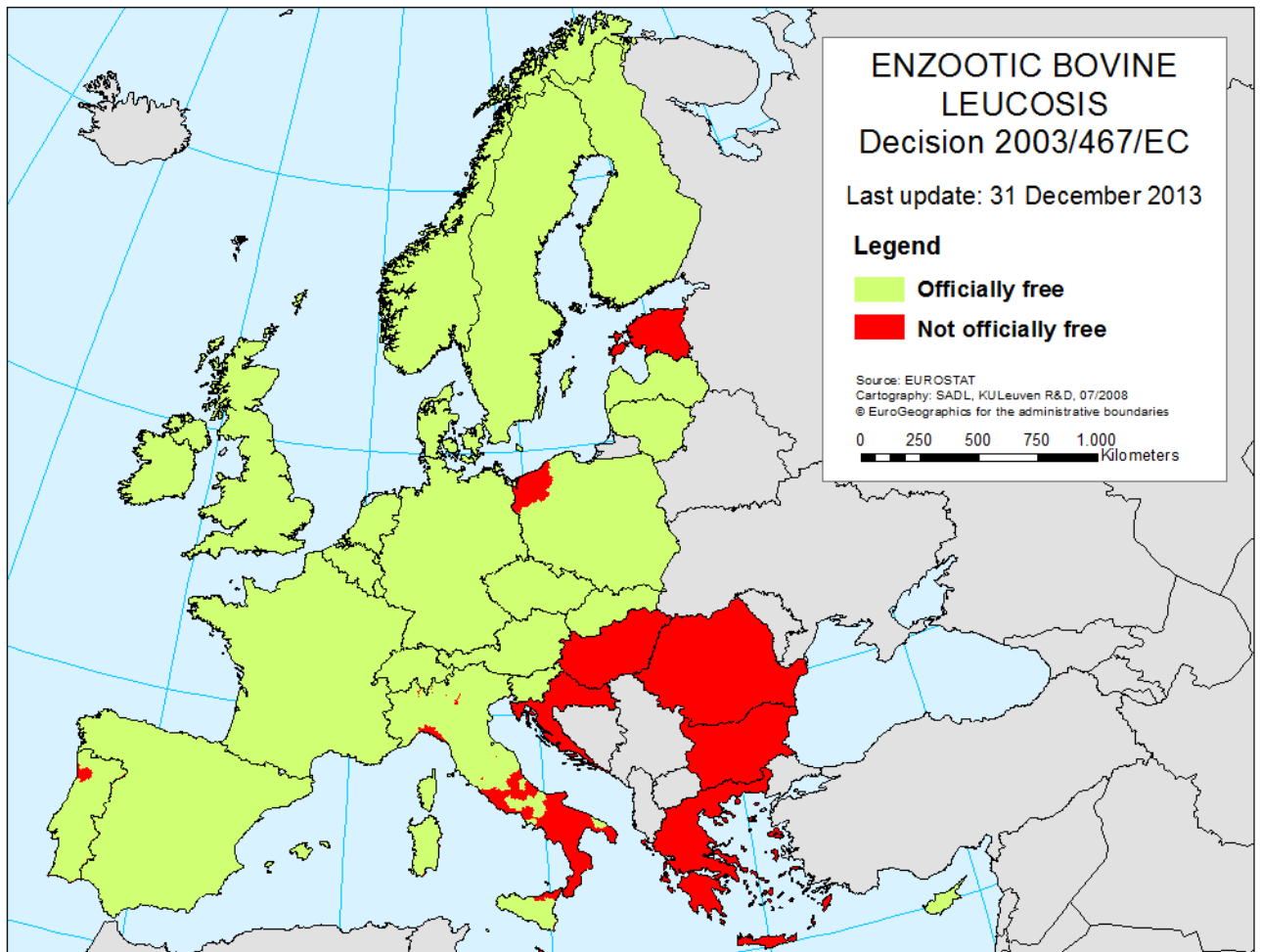


図3 ヨーロッパにおける地方病性牛白血病の清浄化状況  
 (文献番号23より改変引用)

表1 諸外国における抗BLV抗体陽性率

地域	国	調査対象	陽性率	調査頭数	調査法	調査年	文献番号
北米	カナダ	乳牛	20.8%	900	ELISA <sup>3)</sup>	(2001) <sup>5)</sup>	107
		乳牛	26.9%	2,814	ELISA	(2006)	95
	アメリカ	乳牛農場	89.0%	1006 <sup>1)</sup>	AGID <sup>4)</sup>	1996	104
		バルク乳	83.9%	534 <sup>2)</sup>	ELISA	2007	104
南米	アルゼンチン	乳牛	66.0～99.0%	15 <sup>1)</sup>	ELISA	(2012)	33
		乳牛農場	32.85%	363 <sup>1)</sup>	ELISA	1999	103
中東	トルコ	乳牛	59.6%	109	ELISA	2002～2005	42
	イラン	乳牛	29.9%	137	ELISA	2010～2011	63
		乳牛	81.9%	403	ELISA	(2012)	65
	シリア	乳牛	69.2%	237	ELISA	1999	50
アジア	パキスタン	牛	0%	76	AGID	(2000)	57
		水牛	0.3%	370	AGID	(2000)	57
	カンボジア	牛	5.3%	544	AGID	(2000)	58
		水牛	0%	42	AGID	(2000)	58
	韓国	乳牛	28.3%	106	AGID	1981	14
		土着牛	2.4%	699	AGID	1981	14
	台湾	乳牛	8.4%	4,459	AGID	1985	108
		乳牛	5.6%	22,190	AGID	1986	108
		黄牛	0%	142	AGID	1985～1986	108
		水牛	0%	134	AGID	1985～1986	108

1) 農場数

2) バルク数

3) エライサ (enzyme-Linked immuno sorbent assay)

4) ゲル内沈降反応 (agar gel immunodiffusion)

5) ( ) は調査年が不明のため、報告年を記載したことを表す。



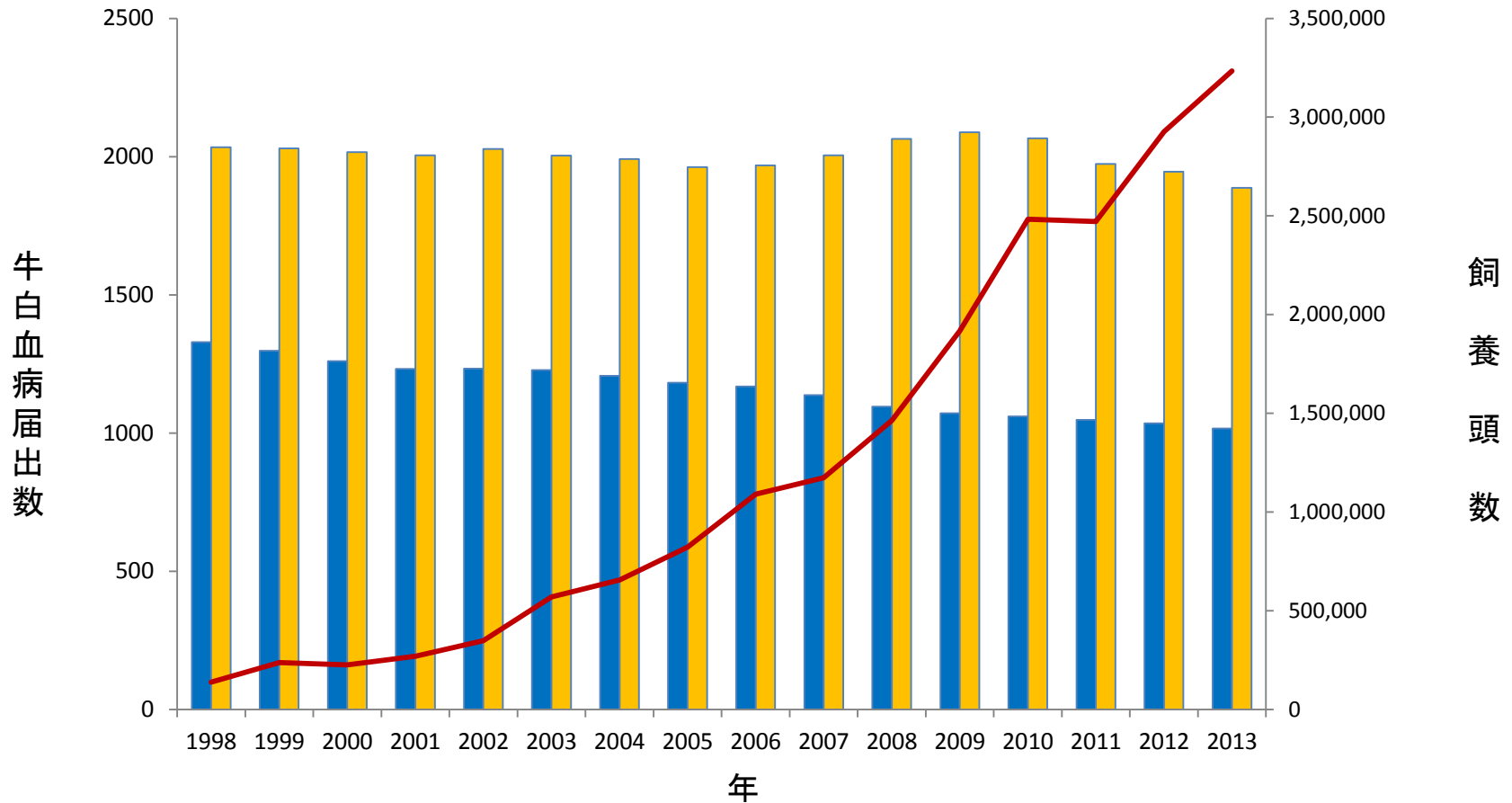


図4 我が国における牛白血病届出数と牛の飼養頭数の推移（1998年～2013年）

■ 乳用牛飼養頭数 ■ 肉用牛飼養頭数 — 届出数

総務省統計局畜産統計調査（<http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=00000111508>）および農林水産省消費安全局監視伝染病発生状況の累年比較[http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi\\_densen/pdf/h25\\_ruinenn\\_todokede.pdf](http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/pdf/h25_ruinenn_todokede.pdf)）をもとに作成

# 第一章 東京都のと畜牛における地方病性牛白血病 発生状況と牛白血病ウイルス浸潤状況

## 序 論

牛白血病の多くは、牛白血病ウイルス（bovine leukemia virus, BLV）の感染による地方病性牛白血病（enzootic bovine leukosis, EBL）である。牛白血病は 1998 年に家畜伝染病予防法における届出伝染病に指定されたが、その年の届出数は約 100 頭であったものが漸増を続け、2013 年には 2,310 頭となった(71)。我が国においては、と畜場法に基づき、食用になる家畜をと畜する際には、一頭毎にと畜検査を経なければならないが、と畜検査では、家畜伝染病予防法に規定する家畜伝染病および届出伝染病も検査対象疾病となっており、牛白血病は、と畜禁止あるいは全部廃棄処分となる重要な疾病である。

近年、全国の食肉衛生検査所から報告される牛白血病症例も増加している(43, 51, 92)。富田(102)は、牛白血病発症牛のうち、生前に外貌異常を呈していたものは 22%、異型リンパ球の出現が認められたものは 57%であったことを報告し、臨床検査で異常を示さなかったため生前診断が困難であった例がと畜検査段階で見つかりと推察している。牛白血病が国内において増加し続ける中、と畜検査における牛白血病診断の重要性はますます高まると思われるが、と畜牛における EBL の発生率の推移や、発症牛の品種や年齢などの詳細に関する全国的なデータはないため(48)、と畜検査における EBL の迅速な診断や EBL 牛の排除に支障をきたしているのが現状である。そこで本研究では、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

における 1997 年度から 2012 年度までの 16 年間の牛白血病発生状況について回顧的調査を実施した。また，と畜検査の過程で発見された EBL 牛についての病理学的検査，白血球数算定，BLV 遺伝子検査および抗 BLV 抗体検査の結果について考察した。さらに，と畜場搬入牛における BLV 浸潤状況を知るため，搬入された肥育牛を対象として抗 BLV 抗体保有状況調査を行い，年度および品種間での差異を比較した。

## 材料および方法

### 1 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。

### 2 EBL 牛

2005～2012 年度に，東京都芝浦食肉衛生検査所にてと畜検査された牛 743,974 頭のうち，EBL と診断されて全部廃棄となった 163 頭を供試材料とした。血液は枝肉の腕頭静脈より ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA) またはヘパリンを含む採血管に採取し，このうち約 5ml を 3,000 回転 15 分遠心後，分離した血清を抗体検査に用いた。リンパ節は浅頸リンパ節，内側腸骨リンパ節，膝窩リンパ節などの体幹リンパ節または空腸リンパ節，縦隔リンパ節などの臓器附属リンパ節を採材した。検体は採材直後または凍結保存（血液および血清は  $-27^{\circ}\text{C}$ ，リンパ節は  $-80^{\circ}\text{C}$ ）した後，試験に

供した。

### 3 病理学的検査

血液塗抹標本およ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（HE）染色を行い観察に供した。

### 4 白血球数算定およびリンパ球比率の測定

EBL牛163頭のうち、96頭について実施した。白血球数は血球算定板あるいは自動血球算定装置「pocH-100iV」（シスメックス㈱，兵庫）により算定した。血液塗抹標本において白血球の分類を行い、リンパ球比率を求めた。

### 5 血液およびリンパ節からのDNA抽出

血液は50  $\mu$ lを、リンパ節は25 mgを秤量し、DNA抽出キット「DNeasy Blood & Tissue Kit」（㈱キアゲン，東京）あるいは自動核酸抽出器「PNE-2080」（㈱マルコム，東京）を用いてDNAを抽出した。抽出したDNAは直ちに使用するか、または使用まで $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。抽出されたDNAの濃度は分光光度計ND-1000（NanoDrop technologies, Wilmington DE, USA）にてOD260およびOD280を測定し、DNA100 ngを試験に供した。

### 6 リアルタイムPCR検査

「CycleavePCR ウシ白血病ウイルス（BLV）検出キット」（タカラバイオ㈱，滋賀）を使用して反応液を調整し、リアルタイムPCR装置「ABI Prism

7900HT Sequence Detection System」 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて PCR 反応を実施した(図 1-1)。反応条件は「CycleavePCR ウシ白血病ウイルス (BLV) 検出キット」の仕様書に準じた。得られた結果は Sequence Detection System ソフトウェア (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて解析を行った。

## 7 抗体検査

牛白血病診断キット(牛白血病アッセイキット「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。同キットの仕様書に従い, 階段希釈した血清を用いて定性試験を行い 16 倍以上となったものについて定量試験および阻止試験を実施した。定量試験の凝集終末価が 16 倍以上でかつ阻止試験の凝集終末価が定量試験のそれより低いときに陽性と判定し、定量試験の凝集終末価をもって抗体価とした。

## 8 と畜牛の抗 BLV 抗体保有調査

2005～2007 年度に搬入された肥育牛 297 頭 (黒毛和種 132 頭, 黒毛和種とホルスタイン種の交雑種 (交雑種) 60 頭, ホルスタイン種 99 頭, ジャージー種 6 頭)および 2012 年度に搬入された肥育牛 300 頭(黒毛和種 194 頭, 交雑種 106 頭)を対象とし前述の牛白血病診断キットを用いて PHA を行った。(表 1-1)。

抗 BLV 抗体陽性率の有意差検定はカイ二乗検定 (エクセル統計 2010) により行い  $p < 0.05$  のとき有意差ありとした。

## 結 果

### 1 EBL 発生状況

1997～2004 年度は牛白血病の型別を行っていなかったため、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 0.002%であった(表 1-2)。しかし、2005 年度には EBL 発生数は 11 頭と増加し、2012 年度には 30 頭となり、同年の EBL の発生率は 0.03%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 牛の月齢は 18～38 ヶ月齢に分布し、中央値は 30 ヶ月齢であった。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 の発生率にすると、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。

### 2 EBL 牛の病理学的・臨床病理学的所見

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 1-3)。最も多かった所見は体表の腫脹・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、削瘦およ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、その大きさは様々であり、正常よりやや大きい程度から人頭大まで認められた(図 1-2-1 および図 1-2-2)。82 例について最大の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%)、空腸リンパ節が 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

のリンパ球のびまん性増殖が確認された（図 1-3-1 および 1-3-2）。白血球数を算定した 96 例の白血球数は 2,000～451,600 個/ $\mu$ l に分布し、中央値は 15,050 個/ $\mu$ l であった。EC の鍵の正常値を下回ったものは 18 頭(18.8%)であった(表 1-4)。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。

### 3 EBL 牛の BLV 遺伝子保有状況

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、全てのリンパ節検体から BLV 遺伝子が検出された。

### 4 EBL 牛の抗 BLV 抗体保有状況

抗 BLV 抗体は 3 例では検出されなかった（1 例は未実施）。PHA 抗体価は 16 倍から 2,048 倍以上の広い範囲に分布し中央値は 512 倍であった。

### 5 と畜牛の抗 BLV 抗体保有状況

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 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。PHA 抗体価の中央値は肉用種および乳用種いずれも 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%となり交雑種のほうが有意に高かった(図 1-4)。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、1 回目の調査と同様に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

国内では年間約 120 万頭の牛がと畜されているが(18)、食肉衛生検査により見つかる牛白血病数の推移や、EBL 牛の品種や年齢などの詳細に関する全国的な統計資料はないため(48)、と畜場での発生状況については不明な点が多い。今回調査を行った東京都芝浦食肉衛生検査所管轄のと畜場は国内最大規模であり、年間約 9 万頭前後の牛が搬入されている。搬入牛のほとんどが 30 ヶ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。従って、東京都芝浦食肉衛生検査所における EBL 発生状況を調査することは、国内肥育牛における EBL 発生動向を明らかにすることに寄与できると考えられることから、本研究では過去 16 年間の牛白血病発生状況について回顧的調査を実施した。その結果、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 倍となっていたが、今回の調査の中で増加の原因を明らかにすることはできなかった。

東京都芝浦食肉衛生検査所では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(43, 51, 92)、そのような条件下において近年 EBL として摘発される牛は増加し続けている。EBL の好発年齢は 4～5 歳(11, 27)あるいは 5～8 歳(81)といわれているが、近年、3 歳未満での発症例も報告されている(98, 99, 100, 102)。本研究でみられ



た発症牛のうち最も若齢のものは18ヶ月齢であった。BLV感染から発症までは3~4年あるいはそれ以上かかるとされる(44)。胎児期を含めて早い時期に感染した個体では発病に至る期間が短いとされ(68)、本研究対象とした2~3歳のEBL発症個体は、胎子あるいは幼齢期にBLVに感染した可能性が考えられた。

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(99, 100)。富田(102)は、牛白血病発症牛のうち、外貌異常は22%にしか認められず、そのような牛では、生前診断が困難であるため食肉衛生検査段階で初めて見つかるかと推察している。本研究においても、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。

Burtonら(12)は、牛白血病牛の10.4%にのみ末梢血の白血化が認められ、また、いわゆるBendixenの鍵(7, 30)によるリンパ球増多は25%にしか認められなかったと報告している。また、血液中への異型リンパ球の出現は57%との報告(102)もある。このように、腫瘍性病変とリンパ球の増数や異型リンパ球の出現といった血液変化は一致しないとされるが、本研究においても、EBLを発症していても白血球数は正常値を示す例も18.8%でみられた。抗体検査において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、血液検査や抗体検査は、BLV感染牛の発見には有用な検査法であるが、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っているが(116)、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。本研究ではリアルタイム 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。したがって本検査法は EBL 診断の有効な手段となることが示唆された。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た。

Murakami ら(70)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、対象および規模に違いはあるものの、今回行った調査において肉用肥育牛の抗体陽性率は 2012 年度で 12.7%となり、全国調査の成績に近い値を示した。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(69, 70)もあり、今回の調査における 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、芝浦食肉衛生検査所における調査結果は BLV 感染率に関して全国調査と同様の傾向があることが明らかになり、と畜場搬入牛の定期的な抗体調査は国内の BLV 感染状況の把握に寄与できる可能性が示された。

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(69, 70)。本研究でも、乳用種の抗体保有率は肉用種に対し高く、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挙げられる(35)。また、乳汁を介した母子感染もあり、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(35)。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 (59, 106), 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(46)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挙げている。Murakami ら(69, 70)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, 初乳および常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, 母牛から母乳を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およ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, 本研究で認められた黒毛和種と交雑種間の BLV 感染率の違いは, 母牛の品種の違いおよび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(3)。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(62)。今回の調査により 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 の品種ごとの発生率は和種 0.0238%, 交雑種 0.0173%, ホルスタイン種 0.0138%となった。すなわち, 和種が最も高い結果となり, 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。

以上, と畜場に搬入された肥育牛について回顧的調査を試み, 2005 年度より EBL が増加していることを示した。また, 従来報告されているよりも若齢で EBL が認められること, 発症牛の中には外貌上健康であるものや血液に異

常所見を示さないものもあるなど非典型的な症例もあることを明らかにした。さらに、と畜場搬入肥育牛での BLV 浸潤状況を調査し、和種に比較し交雑種において抗体陽性率が高いことを示した。これら実態の解明は、と畜検査における EBL 発症牛の適切な排除のために、非常に有用かつ重要な知見を与えてくれるものと考ええる。

従来、飼養期間が 2 年半から 3 年程度の肥育牛については、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 発症例の詳細の把握、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。

① 反応液量 (1 反応あたり)

2 × CycleavePCR Reaction Mix SP1	12.5 μl
Probe/Primer Mix for BLV (5 ×)	5 μl
検体サンプル(DNA100ng に調整)	5 μl
ROX Reference Dye II	0.5 μl
RNase Free dH2O	2 μl
<hr/>	
Total	25 μl

② 反応条件

Stage 1 : 初期変性 (Hold)

Reps : 1, 95°C 10 秒

↓

Stage 2 : 2step PCR

Reps : 40, 95°C 5 秒 → 64°C 30 秒

Reporter は FAM, Quencher は None, Passive Reference は ROX で設定した。

図 1-1 Cycleave®PCR Reaction Mix SP  
によるリアルタイム PCR 検査フローチャート

表1-1 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
		黒毛和種	交雑種	(ホルスタイン種および ジャージー種)
		29ヶ月齢 <sup>1)</sup> (26-40)	27ヶ月齢 (23-32)	23ヶ月齢 (16-35)
2005～2007	297	132	60	105
2012	300	194	106	0
合計	597	326	166	105

1) 月齢の中央値, ( ) はその範囲

表1-2 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 <sup>4)</sup>	散発性牛白 血病発生頭 数
			全部廃棄数 <sup>1)</sup> (%) <sup>2)</sup>	発生率(%) <sup>3)</sup>			
1997	88,212	29	3 (10.3)	0.0034	NT <sup>5)</sup>	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) NTは未検査

表1-3 EBL牛163頭に見られた生体所見

異常所見		頭数(%) <sup>1)</sup>
有		24 (14.7)
(内訳)	体表の腫脹・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 <sup>2)</sup>	1 (0.6)
	姿勢異常	1 (0.6)
	元気消失	1 (0.6)
	眼瞼部外傷	1 (0.6)
	切歯の脱落	1 (0.6)
無		139 (85.3)

1) 複数の所見を持つ例もあるため内訳の合計は163頭より多い。

2) 40.0℃以上





図 1-2-1 EBL 牛のリンパ節  
(雌 黒毛和種 25 ヶ月齢 空腸リンパ節)



図 1-2-2 EBL 牛のリンパ節  
(去勢 黒毛和種 31 ヶ月齢 内側腸骨リンパ節)

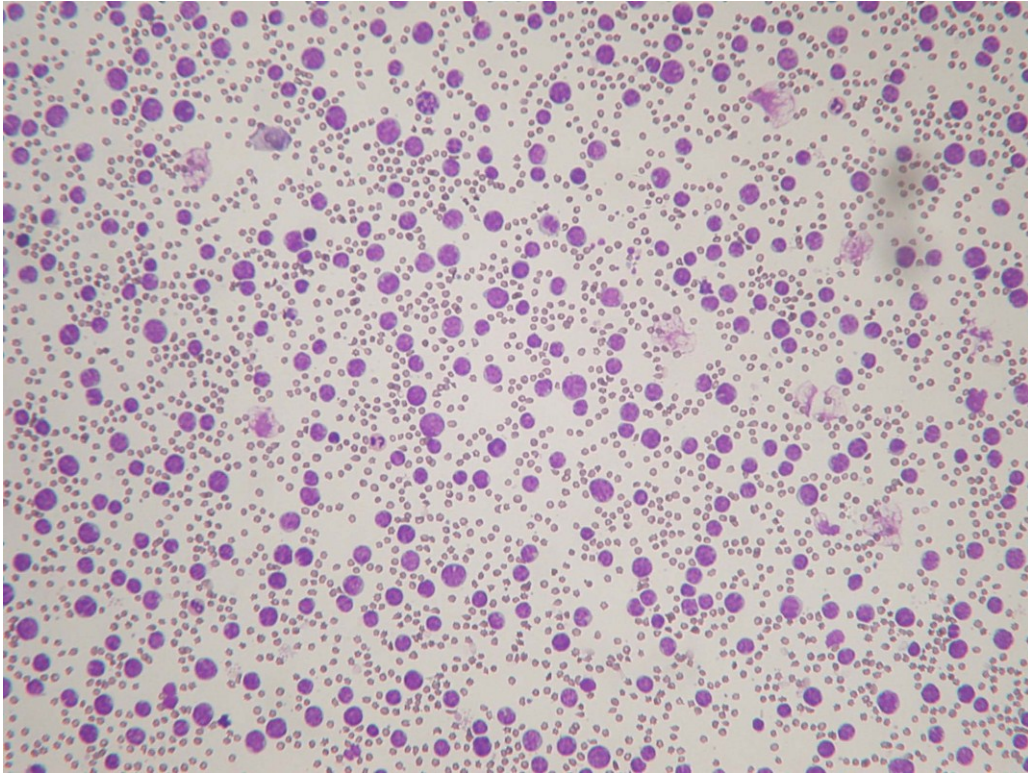


図 1-3-1 EBL 牛の末梢血 (ディフクイック染色)

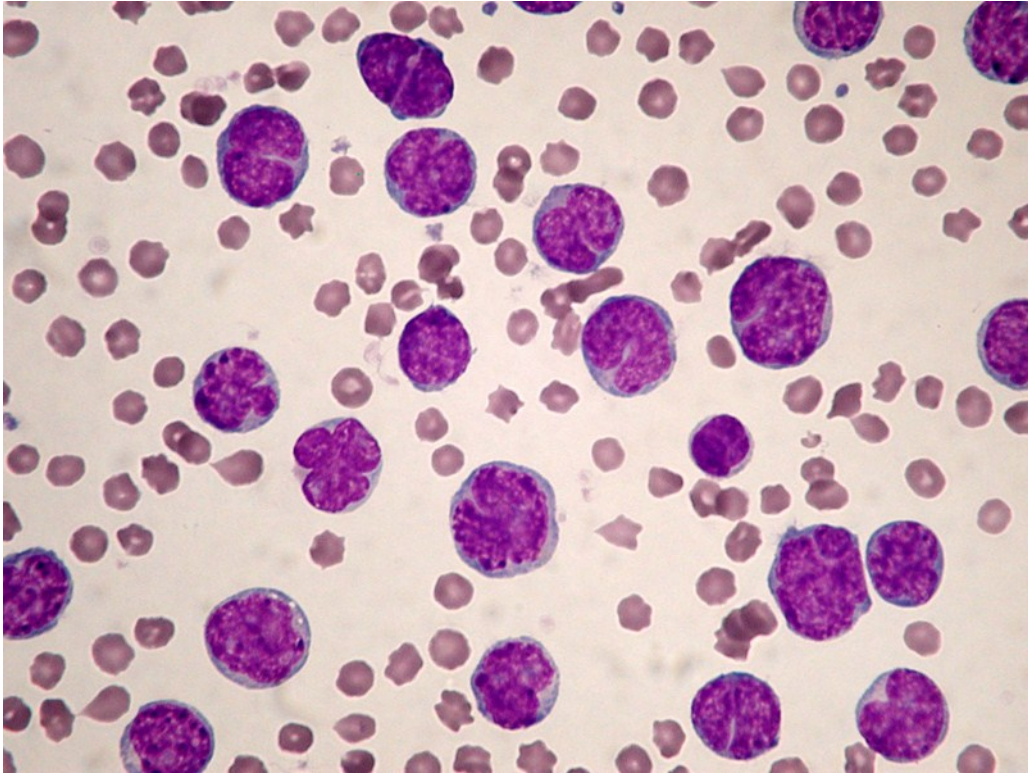


図 1-3-2 EBL 牛の末梢血中に見られた異型リンパ球  
(ディフクイック染色)

表1-4 EBL牛の白血球数とリンパ球比率

分類 <sup>1)</sup>	頭数(%)	リンパ球比率 <sup>2)</sup>						
		50未満	50～60	60～70	70～80	80～90	90以上	未測定
正常	18(18.8)	1	2	3	4	4	4	0
偽陽性	11(11.5)	0	0	0	5	1	5	0
陽性	67(69.8)	1	2	0	8	15	40	1
合計	96(100)	2	4	3	17	20	49	1

1)ECの鍵による分類に従った。1歳以上2歳未満で正常値は<9,000, 擬陽性は10,000～12,000, 陽性は12,000<,2歳以上3歳未満で正常値は<7,500, 擬陽性は7,500～9,500, 陽性は9,500<,3歳以上4歳未満で正常値は<6,500, 擬陽性は6,500～8,500, 陽性は8,500<である(単位個/μl)。

2)白血球数に占めるリンパ球比率(%)

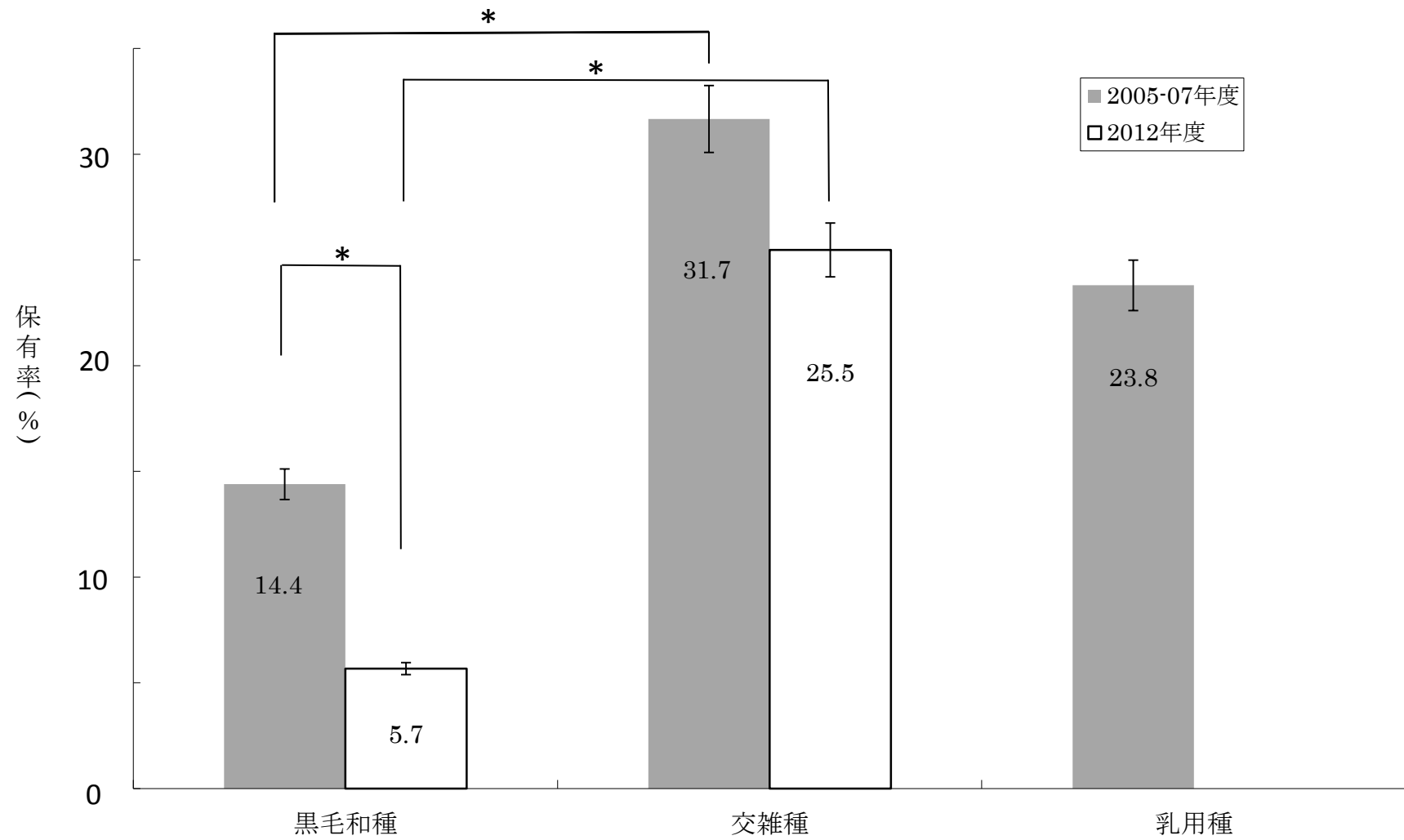


図1-4 と畜牛の抗BLV抗体保有率 (\* $p < 0.05$ )

## 第二章 地方病性牛白血病発症牛と牛白血病ウイルス感染牛のリンパ節中の牛白血病ウイルス量の比較

### 序 論

第一章において、と畜検査の段階において摘発される EBL が 2005 年以降増加傾向にあることを明らかにした。また外貌異常を示さない例が 85.3%、白血球数が正常値であるものが 18.8%認められたことやリンパ節の腫脹の程度には差異があり診断に苦慮する症例も多いことを示した。

出荷した牛が全部廃棄となることは、生産者にとって大きな経済的損失となるため、と畜検査において、牛白血病が疑われる例では慎重に検査しなくてはならない。また、と畜検査における合否判断は生鮮流通が基本となる食肉生産に直結するため、迅速であることも求められる。BLV 感染牛のスクリーニングにはゲル内沈降反応 (AGID) やエライザ法 (ELISA) といった抗体検査法が用いられる (77)。しかしながら、抗体検査では、抗体量が少ない個体や感染初期の抗体上昇以前の個体では陰性となる場合もある (16, 22)。従って、BLV 感染診断には PCR 法により宿主細胞内に蓄積された BLV プロウイルス遺伝子を検出することが一般的である (4, 64, 112)。しかし、抗体検査や PCR 法では感染の有無は判定できても発症と未発症を区別することはできないため、と畜検査における EBL 牛の診断に応用することはできない。現在、と畜検査において本疾病が疑われる場合は、生体所見、剖見所見、血液所見および病理組織所見等を総合して診断し、検査の合否を判断している (116)。脂肪壊死症あるいは好酸球性筋炎、心嚢炎などの炎症性疾患との類症鑑別が必要とされるが (116)、中には診断に苦慮する症例もあり、また、病理

検査では標本作成等に時間がかかることや技術的習熟が必要なことから、病理検査を補助する病原学的な検査法の開発が求められていた。

近年、病原体の微量検出法として、定量リアルタイム PCR 法(qPCR 法)が用いられるようになり、疾病診断の迅速化や検査精度の向上が図られるようになってきた(13, 15)。Cycleave PCR 法は、サイクリングプローブ法を使用したリアルタイム PCR であるが、RNA と DNA からなるキメラプローブと RNase H の組み合わせによる検出法で、増幅中や増幅後の遺伝子断片の特定配列を効率良く検出することができる(5,67)。

そこで、本章では qPCR 法が牛白血病診断法の一つとして有効であるかを検証するため、Cycleave PCR 法を用いた qPCR 法により EBL 牛と BLV 感染牛および健康牛の血液細胞および組織における BLV 遺伝子量を定量比較した。

## 材料および方法

### 1 対象牛および抗体検査

東京都芝浦食肉衛生検査所において解体後の肉眼所見、病理組織所見および血液所見などを総合し EBL と診断された牛(EBL 牛)102 頭から得られた血液 90 検体、リンパ節 144 検体、脾臓 35 検体および BLV 感染牛 37 頭から得られた血液 37 検体、リンパ節 39 検体(空腸リンパ節 36 検体、内側腸骨リンパ節 3 検体)、脾臓 12 検体を材料とした(表 2-1)。EBL 牛のリンパ節の部位および数の内訳は浅頸リンパ節 38 検体、膝窩リンパ節 13 検体、内側腸骨リンパ節 47 検体、空腸リンパ節 25 検体、縦隔リンパ節 15 検体、第一肋

間リンパ節 2 検体，腸骨下リンパ節 3 検体および耳下リンパ節 1 検体であった(表 2-1)。EBL 牛は，と畜解体後検査においてリンパ節の腫脹，脾腫肝腫あるいは臓器における黄白色腫瘤形成など牛白血病を疑う所見が認められたもので，病理検査においては病変部に中型から大型で複数の核小体を持つ異型リンパ球のびまん性増殖が確認され，牛白血病診断キット(牛白血病アッセイキット「日生研」，日生研(株)，東京)を用いた受身赤血球凝集反応 (PHA) による抗体検査により BLV 抗体陽性であったものを対象とした。

このうち 6 個体は，リンパ節の腫脹の程度および病理組織所見と BLV 遺伝子量を比較する目的で複数のリンパ節を検体とし，その腫脹の程度を－から 3+までの 4 段階で評価した上で，病理組織切片上の腫瘍細胞浸潤の程度と BLV 遺伝子コピー数を比較した。BLV 感染牛は PHA による抗体検査により BLV 抗体陽性であり，かつ，と畜検査においてはリンパ節の腫脹，脾腫肝腫あるいは臓器に黄白色腫瘤の形成などの牛白血病の症状が認められなかったものを対象とした。また，BLV 抗体陰性牛 76 頭から得られた血液 76 検体，リンパ節 128 検体 (空腸リンパ節 76 検体，内側腸骨リンパ節 52 検体)，脾臓 52 検体を陰性コントロールとした。さらに，胸腺に大型腫瘤が認められ，病変部の病理組織検査においては大型の異型リンパ球のびまん性増殖が確認され免疫組織学的検査において CD3 陽性であったことから胸腺型牛白血病牛と診断した 3 頭から得られた血液 2 検体，リンパ節 2 検体，脾臓 1 検体についても対象としたが，このうち 1 検体は BLV 抗体陽性であった。

## 2 血液，リンパ節および脾臓からの DNA 抽出

血液は 50  $\mu$ l を，リンパ節および脾臓は 25 mg を秤量し，DNA 抽出キット「DNeasy 血液 & Tissue Kit」(株キアゲン，東京)あるいは自動核酸抽出

器「PNE-2080」(株マルコム, 東京) を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA は直ちに使用するか, または使用まで  $-20^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。抽出された DNA は分光光度計 ND-1000 (NanoDrop technologies, Wilmington DE, USA) にて OD260 および OD280 を測定し, DNA 100 ng を試験に供した。

### 3 定量リアルタイム PCR 検査

「CycleavePCR ウシ白血病ウイルス (BLV) 検出キット」(タカラバイオ(株), 滋賀) を使用して反応液を調整し, リアルタイム PCR 装置「ABI Prism 7900HT Sequence Detection System」(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて PCR 反応を実施した。反応条件は「Cycleave PCR ウシ白血病ウイルス (BLV) 検出キット」の仕様書に準じた(図 1-1)。定量的ための検量線の作成は同キット仕様書に準じ, 付属の Positive Control を希釈して作成し, 各検体の抽出 DNA 10ng あたりの BLV 遺伝子コピー数を算出した。得られた結果は Sequence Detection System ソフトウェア (Applied Biosystems) を用いて解析を行った。

### 4 統計処理

EBL 牛および BLV 感染牛の血液, リンパ節および脾臓の BLV コピー数の比較および EBL 牛の各リンパ節間の BLV コピー数の比較には, 統計ソフト JMP (Version 5.0, SAS Institute, Tokyo, Japan) を用いた Wilcoxon/Kruskal-Wallis test (rank sum test) を実施し,  $p < 0.05$  のとき有意差ありとした。



## 結 果

### 1 EBL牛とBLV感染牛のBLV遺伝子コピー数の比較

血液およびリンパ節，脾臓のいずれにおいても，EBL牛のBLV遺伝子コピー数は，BLV感染牛に比較し有意に高かった ( $p < 0.0001$ ，図 2-1)。

血液中のBLV遺伝子コピー数は抽出DNA 10 ngあたりEBL牛では $25 \sim 2.3 \times 10^4$ コピーの間に分布し，中央値は1,700コピーとなった。一方，BLV感染牛のBLV遺伝子コピー数は $0 \sim 2,600$ コピーに分布し，中央値は110コピーであった。血液では，EBL牛の65.6%が1,000コピーを超えていたが，BLV感染牛では1,000コピーを超えたものは10.8%であった。

リンパ節中のBLVコピー数を比較すると，EBL牛では $32 \sim 1.7 \times 10^4$ コピーの間に分布し，中央値は1,900コピーであったのに対し，BLV感染牛では $0 \sim 2.3 \times 10^2$ コピーとなり中央値は6.8コピーであった。また，EBL牛では，70.1%が1,000コピーを超えていたが，BLV感染牛では1,000コピーを超えたものはなかった。

脾臓では，EBL牛のBLVコピー数は $1.1 \sim 1.1 \times 10^4$ コピー数に分布し，中央値は2,200コピーとなり，BLV感染牛では $0 \sim 5,200$ コピーに分布し中央値は61コピーとなった。EBL牛の脾臓では65.7%が1,000コピーを超えていたが，BLV感染牛では全ての検体が1,000コピー未満であった。

### 2 EBL牛の各リンパ節間のBLV遺伝子コピー数の比較

EBL牛の各リンパ節間のコピー数には有意差は認められなかったが，1,000コピーを超えたものの割合は以下の順で高くなった：浅頸リンパ節

(76.3%) > 空腸リンパ節 (76.0%) > 内側腸骨リンパ節 (70.2%) > 縦隔リンパ節 (66.6%) > 膝窩リンパ節 (61.5%) > その他のリンパ節(33.3%)(表 2-1)。

また、EBL牛ごとに BLV 遺伝子コピー数をみると、採取したリンパ節が 1 か所であった 56 頭では 47 頭(83.9%)が 1,000 コピーを超えた。採取したリンパ節が複数であったもののうち、いずれかが 1,000 コピーを超えた個体の割合を見ると、2 か所では 75.9%(22/29)、3 か所では 66.7%(2/3)と 1,000 コピーを上回る個体の割合は低下したが、4 あるいは 5 か所であった個体ではいずれかの部位で 1,000 コピーを超えていた (表 2-2 および 2-3)。

複数個のリンパ節を採取した 6 個体 17 リンパ節について、リンパ節の腫脹の程度を評価し、BLV 遺伝子コピー数を比較したところ、腫脹の程度が顕著なリンパ節 (2+ないし 3+) は 90%(9/10)が 1,000 コピー以上となったのに対し、腫脹が軽度(+)であった場合は 5 か所のうち 1 リンパ節でのみ 1,000 コピーを超えた。腫脹が認められなかった 2 つのリンパ節はいずれも 100 コピー以下となった。これら腫脹が認められず低コピー数を示したリンパ節では、病理組織検査において腫瘍細胞の浸潤増殖は認められず、正常な細胞構造が維持されていた。

### 3 胸腺型牛白血病牛における BLV 遺伝子コピー数

胸腺型牛白血病の牛 3 頭のうち、BLV 抗体陽性であった 1 頭からは BLV 遺伝子も検出された。しかし、血液およびリンパ節の BLV 遺伝子コピー数はそれぞれ 5.2 および 9.3 コピーと僅かであった(表 2-1)。

## 考 察

EBL 牛と BLV 感染牛の血液，リンパ節および脾臓の BLV 遺伝子コピー数には有意差が認められたことから，EBL 牛と BLV 感染牛を BLV 遺伝子コピー数により区別することが可能であると考えられた。三部位のうち，中央値が最も大きな差異を示したものはリンパ節であった。また，1,000 コピーを超えたものが 70.1%と最も多かったものもリンパ節であった。よって，発症診断のための検体として最も適しているものは，リンパ節であると考えられる。EBL の本態は悪性リンパ腫であり，多くの場合原発部位はリンパ節となり，腫瘍細胞の急激な増殖はリンパ節で起こっている可能性が考えられている(96)が，今回の結果はそれを裏付けている。

同一個体においてもリンパ節の腫脹および腫瘍細胞の浸潤の程度が異なることは知られている(76, 97)。本研究において，EBL 牛の各リンパ節間の BLV 遺伝子コピー数には有意差が認められなかったが，腫脹の程度といった肉眼所見観察結果と病理組織学的所見は BLV 遺伝子コピー数と相関する傾向にあることが示された。よって，検体として用いるリンパ節は部位で選定するのではなく，腫脹の程度を勘案して採材するべきと考えられる。EBL 牛では BLV コピー数が 1,000 を超えたリンパ節は全てにおいて腫瘍性腫大が認められた。しかし，十分な腫脹が認められたにも関わらず，1,000 コピーに満たないものも 17 検体中 1 検体とわずかながら認められた。また，BLV 感染牛においても 200 コピー数程度を示すものもみられた。したがって，リンパ節に腫瘍性の腫大が認められ，かつ BLV 遺伝子コピー数が 1,000 を超えるものは EBL と診断できるが，一方で，BLV コピー数が 1,000 未満ものにつ

いては本法で EBL と診断することは難しく、病理組織検査結果と併せての総合的な診断が必要となると考えられる。

以上の結果、qPCR 法によるリンパ節の BLV 遺伝子量の定量結果は EBL 診断の根拠の一つとなると考えられ、1,000 コピーが診断をする際の基準となると結論づけられる。

EBL においては末梢血リンパ球の増加が認められる白血型と認められない非白血型が存在するが(12, 74, 99)、これら両者の違いを起す発生機序は明らかにされていない。非白血型 EBL では脾臓において腫瘍細胞の浸潤が認められないと報告されている(74)。このため、脾臓では BLV が 1,000 コピーを超えていたものが 65.7%とリンパ節に次いで多かったが、非白血型例では、脾臓は診断材料としての価値はより低いと考えられる。

BLV 感染牛の中には、持続性リンパ球増多症を示さなくても末梢血中の BLV 遺伝子量が多い個体が存在すること(40)、BLV 感染牛の白血球数と BLV 遺伝子コピー数の間には強い相関がないこと(37)など、BLV 感染牛の血液中の BLV 遺伝子量には差異が大きいことが示されている。本研究において BLV 感染牛のリンパ節および脾臓では 1,000 コピーを超えたものは見いだせなかったが、血液では BLV 感染牛においても 10.8%にあたる個体で 1,000 コピーを超え、また、最大値は  $2.6 \times 10^3$  コピーと発症牛の中央値を上回った。従って、末梢血液での BLV 量を指標として EBL 牛と BLV 感染を区別することは難しく、発症診断材料としては不適當であると考えられる。

須藤(98)は、BLV を保有していても EBL ではない牛白血病を発症する可能性があることを示している。今回の研究においても、胸腺型牛白血病 3 頭の材料を用いて qPCR 法を実施したところ、1 頭から BLV 遺伝子が検出されたが、リンパ節における BLV 遺伝子コピー数は BLV 感染牛と同様のレベル

であり、本例では、BLVに感染していた牛が感染とは関係なく胸腺型牛白血病を発症したものと考えられた。qPCR法によるBLV遺伝子量の定量結果は、EBLと散発型牛白血病両者の鑑別を容易にする可能性が示された。

我が国が西欧諸国のようにBLV清浄化を目指すためには、農場において感染伝播リスクが高い個体すなわち血中BLVプロウイルス量の多い個体から優先的に淘汰していくことが効率的である(68)。そのためには、高感度で簡易な診断法が重要であり、ELISAによる抗体検査とqPCR法を組み合わせた方法が提唱されている(68)。今回の調査から未発症牛の中に血中BLVコピー数が発症個体と同等あるいはそれ以上に高い個体がいることが明らかになり、本法による血中BLV遺伝子量の測定が感染伝播リスクの高い個体の検出に有効であることが確認できた。さらに、本研究ではと畜検査におけるqPCR法の応用について検討したが、穿刺技術により得られたリンパ生検材料を用いれば、家畜臨床分野でのEBL発症診断への応用も期待できる(109)。

これまで、BLVに対するワクチン開発の試みが続けられているが、未だ成功していない(88)。牛白血病届出数は増加しており、今後もと畜検査において遭遇するEBL症例が増加し続ける可能性が考えられる。EBLの病態はバリエーションに富み、発症牛の中には、白血化を伴わない症例(74)や、体表リンパ節の腫大を伴わない症例(97, 99, 100)など、典型的でない症例も見受けられる。本研究において検討したqPCR法はBLVの関与といった病理検査では得られない結果を示すことができる。また、操作が簡便であり、診断までの時間が短縮され省力化および迅速化が期待できる。よって、今後、と畜検査において導入が図られるべきである。

表2-1 EBL牛，BLV感染牛，健康牛ならびに胸腺型牛白血病発症牛の血液，脾臓およびリンパ節におけるBLV遺伝子コピー数

牛	血液	脾臓	リンパ節					
			浅頸	膝窩	内側腸骨	空腸	縦隔	その他 <sup>1)</sup>
EBL牛								
検体数	90	35	38	13	47	25	15	6
平均値	$2.8 \times 10^{3^{2)}$	$2.8 \times 10^3$	$2.2 \times 10^3$	$1.9 \times 10^3$	$2.6 \times 10^3$	$3.8 \times 10^3$	$2.1 \times 10^3$	$1.3 \times 10^3$
中央値	$1.7 \times 10^3$	$2.2 \times 10^3$	$2.0 \times 10^3$	$2.0 \times 10^3$	$2.2 \times 10^3$	$2.7 \times 10^3$	$1.5 \times 10^3$	$8.0 \times 10^2$
最小値	$2.5 \times 10^1$	$1.1 \times 10^0$	$3.8 \times 10^1$	$1.1 \times 10^2$	$3.2 \times 10^1$	$7.9 \times 10^1$	$3.4 \times 10^2$	$3.1 \times 10^2$
最大値	$2.3 \times 10^4$	$1.1 \times 10^4$	$6.8 \times 10^3$	$4.1 \times 10^3$	$1.0 \times 10^4$	$1.7 \times 10^4$	$9.3 \times 10^3$	$3.4 \times 10^3$
$10^3$ コピー以上( <sup>3)</sup> )	65.6	65.7	76.3	61.5	70.2	76.0	66.6	33.3
BLV感染牛								
検体数	37	12	0	0	3	36	0	0
平均値	$3.3 \times 10^2$	$1.4 \times 10^2$	-	-	$9.2 \times 10^1$	$3.2 \times 10^1$	-	-
中央値	$1.1 \times 10^2$	$6.1 \times 10^1$	-	-	$2.1 \times 10^1$	$7.4 \times 10^0$	-	-
最小値	0	0	-	-	$2.1 \times 10^1$	0	-	-
最大値	$2.6 \times 10^3$	$5.2 \times 10^2$	-	-	$2.3 \times 10^2$	$2.2 \times 10^2$	-	-
$10^3$ コピー以上( <sup>3)</sup> )	10.8	0	-	-	0	0	-	-
健康牛								
検体数	76	52	0	0	52	76	0	0
平均値	0	0	-	-	0	0	-	-
中央値	0	0	-	-	0	0	-	-
最小値	0	0	-	-	0	0	-	-
最大値	0	0	-	-	0	0	-	-
$10^3$ コピー以上( <sup>3)</sup> )	0	0	-	-	0	0	-	-
胸腺型牛白血病牛								
検体数	2	1	0	0	1	1	0	0
平均値	2.6	0	-	-	9.3	0	-	-
中央値	2.6	0	-	-	9.3	0	-	-
最小値	0	0	-	-	9.3	0	-	-
最大値	5.2	0	-	-	9.3	0	-	-
$10^3$ コピー以上( <sup>3)</sup> )	0	0	-	-	0	0	-	-

1) 第一肋間リンパ節 (2検体)，腸骨下リンパ節 (3検体)，耳下リンパ節(1検体)

2) BLV copeis / 10 ng DNA

3) 1,000コピー以上となった検体数が全検体数に占める割合を示す。

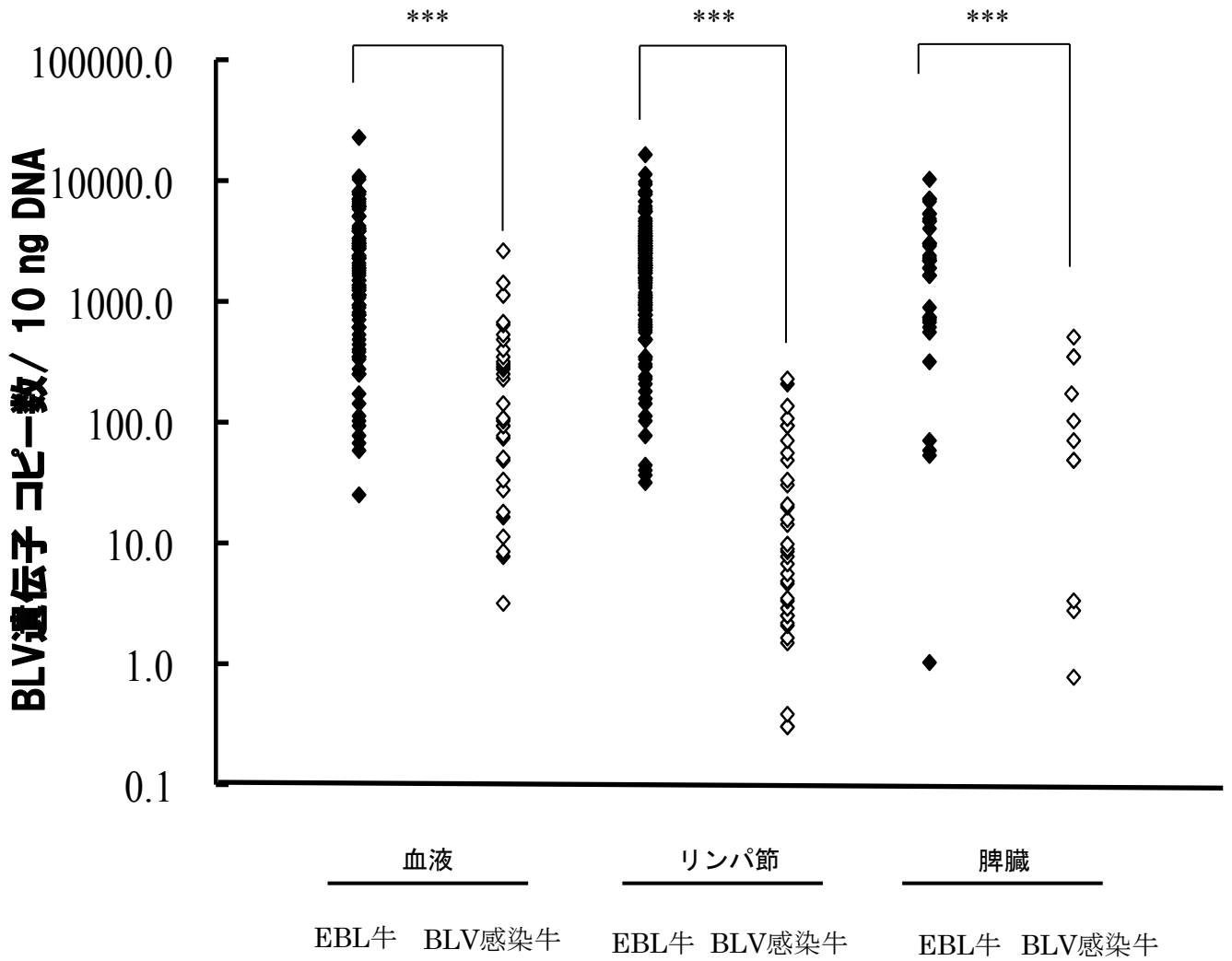


図2-1 EBL牛とBLV感染牛の血液、リンパ節および脾臓におけるBLVプロウイルス量の比較 \*\*\*  $p < 0.0001$

◆ EBL牛  
◇ BLV感染牛

表2-2 EBL牛の血液，脾臓およびリンパ節のBLV遺伝子コピー数(n=102)

個体番号	血液	脾臓	リンパ節					採取リンパ節数	備考
			浅頸	膝窩	内側腸骨	腸間膜	縦隔		
1					$10^3 \leq$ <sup>1)</sup>			1	
2				$10^3 \leq$				1	
3		$<10^3$			$<10^3$			1	* <sup>2)</sup>
4	$<10^3$					$10^3 \leq$		1	
5	$10^3 \leq$			$<10^3$			$<10^3$	2	*
6		$<10^3$	$<10^3$				$<10^3$	2	*
7			$10^3 \leq$					1	
8					$10^3 \leq$			1	
9	$<10^3$							0	
10						$10^3 \leq$		1	
11				$10^3 \leq$				1	
12				$10^3 \leq$				1	
13					$10^3 \leq$			1	
14	$10^3 \leq$	$10^3 \leq$	$10^3 \leq$	$<10^3$	$10^3 \leq$	$<10^3$	$10^3 \leq$	5	
15	$10^3 \leq$		$10^3 \leq$	$<10^3$	$<10^3$		$<10^3$	4	
16	$<10^3$					$<10^3$	$10^3 \leq$	2	
17	$<10^3$							0	
18	$10^3 \leq$	$10^3 \leq$				$10^3 \leq$		1	
19	$10^3 \leq$							0	
20	$10^3 \leq$	$10^3 \leq$				$10^3 \leq$		1	
21	$<10^3$							0	
22	$10^3 \leq$							0	
23	$10^3 \leq$	$<10^3$				$10^3 \leq$		1	
24	$10^3 \leq$	$10^3 \leq$			$<10^3$	$10^3 \leq$		2	
25	$10^3 \leq$						$10^3 \leq$	1	
26	$<10^3$	$<10^3$	$10^3 \leq$		$10^3 \leq$	$<10^3$	$<10^3$	4	
27	$10^3 \leq$	$10^3 \leq$						0	
28	$10^3 \leq$							0	
29	$10^3 \leq$	$10^3 \leq$				$10^3 \leq$	$10^3 \leq$	2	
30	$10^3 \leq$	$10^3 \leq$						0	
31	$10^3 \leq$	$10^3 \leq$			$10^3 \leq$	$10^3 \leq$		2	
32	$<10^3$	$10^3 \leq$					$10^3 \leq$	1	
33	$<10^3$						$<10^3$	1	*
34	$10^3 \leq$	$<10^3$				$10^3 \leq$		1	
35	$10^3 \leq$	$10^3 \leq$					$10^3 \leq$	1	
36	$<10^3$							0	
37	$10^3 \leq$		$10^3 \leq$	$10^3 \leq$	$<10^3$		$10^3 \leq$	4	
38	$10^3 \leq$	$<10^3$			$<10^3$	$<10^3$	$10^3 \leq$	3	
39	$<10^3$	$<10^3$			$10^3 \leq$	$10^3 \leq$	$10^3 \leq$	3	
40	$<10^3$		$10^3 \leq$	$<10^3$				2	
41	$<10^3$	$<10^3$			$<10^3$	$<10^3$	$<10^3$	3	*
42	$<10^3$				$<10^3$			1	*
43	$10^3 \leq$	$<10^3$	$<10^3$		$10^3 \leq$	$10^3 \leq$	$10^3 \leq$	4	
44	$10^3 \leq$	$10^3 \leq$			$10^3 \leq$			1	
45	$<10^3$		$<10^3$		$<10^3$			2	*
46	$<10^3$		$10^3 \leq$		$10^3 \leq$			2	
47	$10^3 \leq$				$10^3 \leq$			1	
48	$10^3 \leq$	$10^3 \leq$			$10^3 \leq$			1	
49	$10^3 \leq$	$<10^3$			$<10^3$	$10^3 \leq$		2	
50	$<10^3$						$10^3 \leq$	1	
51	$<10^3$			$<10^3$				1	*
52	$10^3 \leq$			$10^3 \leq$	$10^3 \leq$			2	
53	$<10^3$		$10^3 \leq$		$10^3 \leq$			2	
54	$10^3 \leq$		$10^3 \leq$			$10^3 \leq$		2	



55	<10 <sup>3</sup>		10 <sup>3</sup> ≦			1	
56	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦		10 <sup>3</sup> ≦		2	
57	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦			10 <sup>3</sup> ≦	2	
58	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦		10 <sup>3</sup> ≦		2	
59	<10 <sup>3</sup>	<10 <sup>3</sup>		10 <sup>3</sup> ≦		2	
60	<10 <sup>3</sup>			10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦	2	
61	10 <sup>3</sup> ≦			<10 <sup>3</sup>		1	*
62	<10 <sup>3</sup>	<10 <sup>3</sup>		10 <sup>3</sup> ≦		2	
63	10 <sup>3</sup> ≦			10 <sup>3</sup> ≦		1	
64	10 <sup>3</sup> ≦			10 <sup>3</sup> ≦		1	
65	10 <sup>3</sup> ≦	<10 <sup>3</sup>				1	*
66	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦		10 <sup>3</sup> ≦		2	
67	10 <sup>3</sup> ≦			10 <sup>3</sup> ≦		1	
68	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦			1	
69	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦				1	
70	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦		2	
71	<10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> ≦		10 <sup>3</sup> ≦		2	
72	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦			2	
73	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦			1	
74	<10 <sup>3</sup>			<10 <sup>3</sup>	<10 <sup>3</sup>	2	*
75	10 <sup>3</sup> ≦	<10 <sup>3</sup>		<10 <sup>3</sup>		2	*
76	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦			1	
77	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦			1	
78	<10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> ≦				1	
79	<10 <sup>3</sup>	<10 <sup>3</sup>				1	*
80	10 <sup>3</sup> ≦			10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦	2	
81	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦		10 <sup>3</sup> ≦		1	
82	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦			1	
83	<10 <sup>3</sup>	<10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> ≦			1	
84	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦		10 <sup>3</sup> ≦		1	
85	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦			1	
86	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦			1	
87	<10 <sup>3</sup>				<10 <sup>3</sup>	2	*
88	<10 <sup>3</sup>				<10 <sup>3</sup>	1	*
89	<10 <sup>3</sup>	<10 <sup>3</sup>				1	*
90	10 <sup>3</sup> ≦			10 <sup>3</sup> ≦		1	
91	10 <sup>3</sup> ≦			<10 <sup>3</sup>	<10 <sup>3</sup>	2	*
92	<10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> ≦			10 <sup>3</sup> ≦	1	
93	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦				1	
94	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦			10 <sup>3</sup> ≦	1	
95	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦		2	
96	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦			1	
97	10 <sup>3</sup> ≦			10 <sup>3</sup> ≦		1	
98	10 <sup>3</sup> ≦	<10 <sup>3</sup>		10 <sup>3</sup> ≦		1	
99	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦	10 <sup>3</sup> ≦			1	
100	10 <sup>3</sup> ≦				10 <sup>3</sup> ≦	1	
101				10 <sup>3</sup> ≦		1	
102				10 <sup>3</sup> ≦		1	

- 1) 10<sup>3</sup> ≦ は1,000コピー以上, <10<sup>3</sup>は1,000コピー未満  
2) リンパ節におけるBLV遺伝子コピー数が個体として1,000 / 10ng DNA 未満であった個体を示す。

表2-3 採取リンパ節数とBLV遺伝子コピー数 (EBL牛, n=93)

採取リンパ節数	検査頭数	1,000コピー以上頭数 <sup>1)</sup> (%)
1	56	47 (83.9)
2	29	22 (75.9)
3	3	2 (66.7)
4	4	4 (100)
5	1	1 (100)
合計	93	76 (81.7)

1) 抽出DNA10ngあたり1,000コピー以上となった個体の数を示す  
(複数のリンパ節を採取しているものではいずれかのリンパ節)。

## 総 括

牛白血病は、地方病性牛白血病（EBL）および散発性牛白血病に分類されるが、その多くは牛白血病ウイルス（BLV）の感染を原因とする EBL である。1998 年に牛白血病が家畜伝染病予防法の届出伝染病に指定されたことから、全国規模でその発生が把握できるようになった。当時は 100～200 頭の発生であったが、以降増加を続け 2013 年には 2,000 頭を超えた。牛白血病は、と畜場法においてと畜禁止や全部廃棄といった行政措置がとられる疾患であることから、EBL の増加は家畜衛生上の問題であるだけでなく、公衆衛生上の課題でもある。

EBL の好発年齢は 4～8 歳であることから、成牛でのデータは多いが 3 歳未満の肥育牛に関しては発生状況などの基礎的データはない。また、と畜検査では EBL が疑われる牛が発見された場合、生体所見、剖見所見、血液所見および病理組織所見等を総合して診断し、検査の合否を判断しているが類症鑑別に苦慮する症例もあり、診断の向上のためには、新たな検査法の開発が求められていた。

本研究では、第一章で国内における EBL 発生状況の一端を明らかにするために、1997～2012 年までの過去 16 年間にと畜場に搬入された肥育牛における EBL 発生状況の回顧的調査を実施した。その結果、1997～2004 年度までは、牛白血病の発生率は 0～0.005%（平均 0.002%）で推移していたが、2005 年度にはその発生率は 0.01%となり、この年度を境に増加傾向に転じた。その後発生率はさらに上昇を続け、2012 年度には 0.03%に達したことが明らかになった。また、2005～2012 年度に摘発された EBL 症例の品種ごとの発生率は和種 0.024%、交雑種 0.017%、ホルスタイン種 0.014%と和種が最も高くなり、品種により発生率に差異がある可能性が示唆された。さらに、EBL を発症していた牛（EBL 牛）の約 85%は搬入時の生体検査において症状を示していなかったこと、約 19%の例では EC の鍵で淘汰の基準とされる白血球数を下回っていたこと、リンパ節の腫脹の

程度には差異があることを明らかにし、症例の中には解剖所見や血液検査、病理検査では診断には苦慮する場合もあることを示した。さらに、EBL増加の背景を探る目的で、と畜場に搬入された肥育牛の抗BLV抗体保有状況を調査し、2005～2007年度では21.2%、2012年度では12.7%が陽性であったことを示した。また、EBL発生率に品種間での差異があったことから、和種、乳用種および交雑種のBLV抗体保有率を比較したところ、肉用種に比較し乳用種の方が高かった。さらに、肉用種においては、交雑種の方が黒毛和種に比較して抗体陽性率が有意に高いことが明らかとなった。

第二章では、と畜検査におけるEBL診断への応用を目的としてサイクリングプローブを用いた定量リアルタイムPCR法(qPCR法)を検討した。第一章にて得られたEBL牛102頭およびBLVに感染しているが未発症である牛(BLV感染牛)37頭を供試材料とし、血液、リンパ節、脾臓のそれぞれにおけるBLVプロウイルス量を比較した。その結果、いずれの部位においてもEBL牛のBLV遺伝子コピー数は、BLV感染牛に比較し有意に高かったが、3部位のうち、両者の中央値の差が最も大きかったものはリンパ節であり、また、1,000コピーを超えた個体の割合が最も多かったものもリンパ節であった。BLV感染牛のリンパ節でBLV遺伝子数が1,000コピー/DNA 10 ngを超えたものはなく、EBL牛では70%以上の症例で1,000コピーを上回っていたことから、EBLを疑う症例において、そのリンパ節のBLV遺伝子コピー数が1,000コピー以上であったものはEBLと診断できると考えられた。qPCR法の導入は、と畜検査におけるEBL診断の迅速化、省力化ならびに診断技術の向上につながると期待できる。また、胸腺型牛白血病3頭についてもBLV遺伝子量を測定したところ、1頭からBLV遺伝子が検出されたが、BLV遺伝子コピー数はBLV感染牛と同様のレベルであり、本例では、BLVに感染していた牛が感染とは関係なく胸腺型牛白血病を発症したものと考えられ、qPCR法はEBLと散発性牛白血病の鑑別を容易にすると考えられた。今後、我が

国が西欧諸国のように BLV 清浄化を目指すためには、農場において血中 BLV プロウイルス量の多い個体を検出するための高感度で簡易な診断法の開発が重要であるが、今回の調査から未発症牛の中に血中 BLV 遺伝子コピー数が発症個体と同等あるいはそれ以上に高い個体がいることが明らかになり、qPCR 法による血中 BLV 遺伝子量の測定が感染伝播リスクの高い個体の検出にも有効であることが確認できた。

以上、本研究によりと畜牛における EBL の発生状況および BLV 浸潤状況の一端が明らかとなった。また、EBL 診断法の一つとして qPCR 法の有用性を示した。本研究により得られた知見は、病畜を適切に排除するというと畜検査の目的において有益な情報を提供できると結論した。

## 謝 辞

本研究において、ご指導を賜った主指導教官である東京農工大学農学部共同獣医学科藤川浩教授に深謝いたします。また、終始懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜った岩手大学農学部共同獣医学科村上賢二教授に深甚なる謝意を表します。

本論文草稿にあたり、有益なご助言とご高閲を賜った東京農工大学農学部共同獣医学科白井淳資教授、岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科福士秀人教授、帯広畜産大学臨床獣医学研究部門猪熊壽教授、岩手大学農学部共同獣医学科佐藤繁教授、元岩手大学農学部共同獣医学科古濱和久教授、東京都健康安全研究センター微生物部甲斐明美博士、林志直博士に厚くお礼申し上げます。

さらに、本研究へ多大なるご協力を賜った東京都芝浦食肉衛生検査所中村重信検査課長、宮尾陽子主事、黒野博之主事、杉山恵美主事、小川 仁主事、赤瀬悟主事、内谷友美主事、(いずれも当時の所属)をはじめ、ご支援、ご理解を賜った東京都芝浦食肉衛生検査所ならびに東京都健康安全研究センターウイルス研究科の皆様感謝の意を表します。

## 引用文献

- (1) Acaite, J., Tamosiunas, V., Lukauskas, K., Milius, J. and Pieskus, J. (2007). The eradication experience of enzootic bovine leukosis from Lithuania. *Prev. Vet. Med.* 82, 83~89.
- (2) Agresti, A., Ponti, W., Rocchi, M., Meneveri, R., Marozzi, A., Cavalleri, D., Peri, E., Poli, G. and Ginelli, E. (1993). Use of polymerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infection in calves at birth. *Am. J. Vet. Res.* 54, 373~378.
- (3) 間陽子,竹嶋伸之輔(2011).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.
- (4) Asfaw, Y., Tsuduku, S., Konishi, M., Murakami, K., Tsuboi, T., Wu, D. and Sentsui, H. (2005). Distribution and superinfection of bovine leukemia virus genotypes in Japan. *Arch. Virol.* 150, 493~505.
- (5) Bekkaoui, F., Poisson, I., Crosby, W., Cloney, L. and Duck, P. (1996). Cycling probe technology with RNase H attached to an oligonucleotide. *Biotechniques.* 20, 240~249.
- (6) Bendixen, H. J. (1960). Untersuchungen über die Rinderleukose in Dänemark. II. Pathogenese und Enzootilogie der übertragbaren Rinderleukose. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 67, 57~63.
- (7) Bendixen, H. J. (1965). Bovine enzootic leukosis. *Adv. Vet. Sci.* 10, 129~204.
- (8) Bendixen, H. J. (1966). Epidemiological Studies of Bovine Leukosis in Denmark, *Proceedings of Royal Society of medicine.* 59, 657~660.

- (9) Brenner, J., Van-Haam, M., Savir, D. and Trainin, Z. (1989). The implication of BLV infection in the productivity, reproductive capacity and survival rate of a dairy cow. *Vet. Immunol.* 3, 299~305.
- (10) Buehring, G.C., Philpott, S.M., Choi, K.Y. (2003). Humans have antibodies reactive with Bovine leukemia virus. *AIDS. Res. Hum. Retroviruses.* 19, 1105~1113.
- (11) Burny, A., Cleuter, Y., Kettmann, R., Mammerickx, M., Marbaix, G., Portetelle, D., van den Broeke, A., Willems, L. and Thomas, R. (1988). Bovine leukaemia: Facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Vet. Microbiol.* 17, 197~218.
- (12) Burton, A.J., Nydam, D. V., Long, E.D. and Divers, T.J. (2010). 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.
- (13) Ceccarelli, M., Galluzzi, L., Sisti, D., Bianchi, B. and Magnani, M. (2014). Application of qPCR in conjunctival swab samples for the evaluation of canine leishmaniasis in borderline cases or disease relapse and correlation with clinical parameters. *Parasit Vectors.* 7, 460~471.
- (14) Choi, W.P. (1982). Survey for antibodies to bovine leukemia virus in dairy cattle and Korean native cattle. *Korean. J. Vet. Res.* 22, 23-26.
- (15) Ciulli, S., Pinheiro, A.C., Volpe, E., Moscato, M., Jung, T.S., Galeotti, M., Stellino, S., Farneti, R. and Prosperi, S. (2015). Development and application of a real-time PCR assay for the



- detection and quantitation of lymphocystis disease virus. *J. Virol. Methods.* 213, 164~173.
- (16) Cockerell, G.L and Rovnak, J. (1988). The correlation between the direct and indirect detection of bovine leukemia virus infection in cattle. *Leuk. Res.* 12, 465~469.
- (17) Da, Y., Shanks, R.D., Stewart, J.A. and Lewin, H.A. (1993). Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus-infected Holstein cattle with persistent lymphocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 6538~6541.
- (18) 大臣官房統計部生産流通消費統計課消費統計室. 畜産物流通統計. 平成25年畜産物流通統計. available from <http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001126788> (2015年4月24日現在)
- (19) Deshayes, L., Levy, D., Parodi, A.L. and Levy, J.P. (1980). Spontaneous immune response of bovine leukemia-virus-infected cattle against five different viral proteins. *Int. J. Cancer.* 25, 503~508.
- (20) Deshayes L, Dube, S., Bachman, S., Spicer, T., Love, J., Choi, D., Esteban, E., Ferrer, J.F. and Poiesz, B.J. (1997). Degenerate and specific PCR assays for the detection of bovine leukaemia virus and primate T cell leukaemia/lymphoma virus pol DNA and RNA: phylogenetic comparisons of amplified sequences from cattle and primates from around the world. *J. Gen. Virol.* 78, 1389~1398.
- (21) Dube, S., Bachman, S., Spicer, T., Love, J., Choi, D., Esteban, E.,

- Ferrer, J.F. and Poiesz, B.J.(1997).Degenerate and specific PCR assays for the detection of bovine leukaemia virus and primate T cell leukaemia/lymphoma virus pol DNA and RNA: phylogenetic comparisons of amplified sequences from cattle and primates from around the world. *J. Gen. Virol.* 78, 1389~98.
- (22) Eaves, F.W., Molloy, J.B., Dimmock, C.K. and Eaves, L.E. (1994). A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle. *Vet. Microbiol.* 39, 313~321.
- (23) European Commission. Bovine and swine diseases 2013 Annual report. available from [http://ec.europa.eu/food/animal/liveanimals/bovine/docs/final\\_report\\_2013\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/animal/liveanimals/bovine/docs/final_report_2013_en.pdf)(2015年4月24日現在)
- (24) Fauquet C. M. (2005). Retroviridae. Fauquet C. M., Mayo M. A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L. A. *Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. In: Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* pp.371~440. Elsevier/Academic Press, San Diego.
- (25) Ferrer, J.F., Piper, C.E., Abt, D.A., Marshak, R.R. and Bhatt, D.M. (1975). Natural mode of transmission of the bovine C type leukemia virus (BLV). *Bibl. Haematol.* 43, 235~237.
- (26) Ferrer, J.F. and Piper, C.E. (1978).An evaluation of the role of milk in the natural transmission of BLV. *Ann. Rech. Vet.* 9, 803~807.
- (27) Ferrer, J.F. (1980). Bovine lymphosarcoma. *Adv. Vet. Sci. Comp.*

Med. 24, 1~68.

- (28) Ferrer, J.F., Kenyon, S.J. and Gupta, P. (1981). Milk of dairy cows frequently contains a leukemogenic virus. *Science*. 213, 1014~1016.
- (29) Ferrer, J.F. and Piper, C.E.(1981).Role of colostrum and milk in the natural transmission of the bovine leukemia virus. *Cancer Res.* 41, 4906~4909.
- (30) George, J.W. (2007). Bovine lymphocyte counts key to disease recognition and control. *Vet. Clin. Pathol.* 36, 220~222.
- (31) Gillet, N., Florins, A., Boxus, M., Burteau, C., Nigro, A., Vandermeers, F., Balon, H., Bouzar, A.B., Defoiche, J. and Burny, A. (2007). Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*. 4, 18.
- (32) Götze, R., Rosenberger, G. and Ziegenhagen, G. (1954).Leucosis in cattle. Haematological and clinical diagnosis. *Monatsh. Veterinaermed.* 9, 517~526.
- (33) Gutiérrez, G., Carignano, H., Alvarez, I., Martínez, C., Porta, N., Politzki, R., Gammella, M., Lomonaco, M., Fondevila, N., Poli, M. and Trono K. (2012).Bovine leukemia virus p24 antibodies reflect blood proviral load. *BMC Vet. Res.* 8, 187.
- (34) Heald, M.T.S, Waltner-Toews,D.,Jacobsb,R.M and McNabc, W. B. (1992). The prevalence of anti-bovine leukemia virus antibodies in dairy cows and associations with farm management practices, production and culling in Ontario. *Prev. Vet. Med.* 14, 45~55.

- (35) Hopkins, S.G. and DiGiacomo, R.F. (1997). Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 13, 107~128.
- (36) Huber, N.L., DiGiacomo, R.F., Evermann, J.F. and Studer, E. (1981). Bovine leukemia virus infection in a large Holstein herd: prospective comparison of production and reproductive performance in antibody-negative and antibody-positive cows. *Am. J. Vet. Res.* 42, 1477~1481.
- (37) 池上良、谷洋之、若本裕晶、村上賢二(2010).リアルタイム PCR による牛白血病ウイルス (BLV) 遺伝子量を参照とした BLV 抗体検査法の評価. *獣医畜産新報* 63, 391~395.
- (38) 伊藤全(1987).牛白血病ウイルス抗体保有状況全国調査.家畜衛試研究報告 90, 35~60.
- (39) Jacobs, R.M., Heeney, J.L., Godkin, M.A., Leslie, K.E., Taylor, J.A., Davies, C. and Valli, V.E.(1991).Production and related variables in bovine leukaemia virus-infected cows. *Vet. Res. Commun.* 15, 463~474.
- (40) Juliarena, M.A., Gutierrez, S.E. and Ceriani, C. (2007) Determination of proviral load in bovine leukemia virus-infected cattle with and without lymphocytosis. *Am. J. Vet. Res.* 68, 1220~1225.
- (41) 柿沼清市, 大塚浩通, 大前佳穂里, 綾部杏子, 柿沼元治, 今内 覚, 及川正明. (2011) 牛白血病ウイルス感染搾乳牛における末梢血白血球ポピュレーション. *日獣会誌* 64, 375~380.
- (42) Kale, M., Bulut, O., Yapkic, O., Gulay, M.S., Pehlivanoglu, F., Ata,

- A., Yavru, S. (2007). Effects of subclinical bovine leukemia virus infection on some production parameters in a dairy farm in southern Turkey. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 78, 130~132.
- (43) 神奈川県食肉衛生検査所事業概要.<http://www.pref.kanagawa.jp/cnt/f661/p7915.html>(2015年6月22日現在)
- (44) Kettmann, R., Burny, A., Callebaut, I., Droogmans, L., Mammerickx, M., Willems, L. and Portetelle, D. (1994). Bovine leukemia virus. *In: Levy J. [ed], The Retroviridae Vol. 3.* pp.39~81, Plenum Press, NewYork.
- (45) Knapen, K., Kerkhofs, P., and Mammerickx, M. (1993). Eradication of enzootic bovine leukosis in Belgium: Results of the mass detection on the national cattle population in 1989, 1990 and 1991. *Ann. Med. Vet.* 137, 197~201.
- (46) Kobayashi, S., Tsutsui, T., Yamamoto, T., Hayama, Y., Kameyama, K., Konishi, M. and Murakami, K. (2010). Risk factors associated with within-herd transmission of bovine leukemia virus on dairy farms in Japan. *BMC Vet. Res.* 6.
- (47) 小西美佐子(2015).—最新の家畜疾病情報(IV)—地方病性牛白血病(EBL).*日獣会誌* 68, 352~354.
- (48) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課.(2015).平成25年度乳肉関係統計資料.*食品衛生研究* 65, 82~93.
- (49) 窪田五郎(1927). 淋巴肉腫の一例.*中央獣医誌* 40, 375~378.
- (50) Kurdi, A., Blankenstein, P., Marquardt, O. and Ebner, D.

- (1999).Study on the presence of BLV infection in a dairy herd in Syria by using serological and virological tests. Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift. 112, 18~23.
- (51) 熊本市 . 食肉衛生検査所事業概要 .  
[https://www.city.kumamoto.jp/hpKiji/pub/detail.aspx?c\\_id=5&id=1658  
&class\\_set\\_id=3&class\\_id=576](https://www.city.kumamoto.jp/hpKiji/pub/detail.aspx?c_id=5&id=1658&class_set_id=3&class_id=576)(2015年6月23日現在)
- (52) Lassauzet, M.L., Johnson, W.O., Thurmond, M.C and Stevens, F. (1989).Protection of colostral antibodies against bovine leukemia virus infection in calves on a California dairy. Can. J. Vet. Res.53, 424~430.
- (53) Lassauzet, M.L., Thurmond, M.C., Johnson, W.O. and Holmberg, C.A. (1991).Factors associated with in utero or periparturient transmission of bovine leukemia virus in calves on a California dairy. Can. J. Vet. Res. 55, 264~268.
- (54) Leisering, A. (1871). Hypertrophy der Malpighischen Körperchen der Milz. Berl. Vet. West. Kgr. Sachsen. 16, 15~16.
- (55) Mammerickx,M.,Portetelle,D.,Burny,A.(1981).Experimental cross-transmissions of bovine leukemia virus(BLV) between several animal species. Zentrabl Veterinarmed B. 28, 69~81.
- (56) Marin,C., de Lopez,.N., de Alvarez, L., Castanos, H.,España,W., Leon,A. and Bello,A. (1982). Humoral spontaneous response to bovine leukemia virus infection in zebu,sheep,buffalo and capybara. Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci. 15, 310~320.

- (57) Meas, S., Seto, J., Sugimoto, C., Bakhsh, M., Riaz, M., Sato, T., Naeem, K., Ohashi, K. and Onnuma, M. (2000). Infection of Bovine Immunodeficiency Virus and Bovine Leukemia Virus in Water Buffalo and Cattle Populations in Pakistan. *J. Vet. Med. Sci.* 62, 329~331.
- (58) Meas, S., Ohashi, K., Tum, S., CHHIN, M., Te, K., Miura, K., Sugimoto, C. and Onuma, M. (2000). Seroprevalence of Bovine Immunodeficiency Virus and Bovine Leukemia Virus in Draught Animals in Cambodia. *J. Vet. Med. Sci.* 62, 779~781.
- (59) Meas, S., Usui, T., Ohashi, K., Sugimoto, C. and Onuma, M. (2002). Vertical transmission of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency virus in dairy cattle herds. *Vet. Microbiol.* 23, 275~282.
- (60) Miller, J. M., Miller, L.D. Olson, C. and Gillette, K.G. (1969). Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 43, 1297~1305.
- (61) Miller, J. M. and Olson, C. (1972). Precipitating antibody to an internal antigen of C-type virus associated with bovine lymphosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 49, 1459.
- (62) Miyasaka, T., Takeshima, S. N., Sentsui, H. and Aida, Y (2012). 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.

- (63) Mohammadi, V., Atyabi, N., Nikbakht Brujeni, Gh., Lotfollahzadeh, S. and Mostafavi, E. (2011). Seroprevalence of Bovine Leukemia Virus in Some Dairy Farms in Iran. *Global Veterinaria*. 7, 305~309.
- (64) Monti, G.E. and Frankena, K. (2005). Survival analysis on aggregate data to assess time to sero-conversion after experimental infection with Bovine Leukemia virus. *Prev. Vet. Med.* 68, 241~262.
- (65) Morovati, H., Shirvani, E., Noaman, V., Lotfi, M., Kamalzadeh, M., Hatami, A., Bahreyari, M., Shahramyar, Z., Morovati, M.H., Azimi, M. and Sakhaei, D. (2012). Seroprevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection in dairy cattle in Isfahan Province, Iran. *Trop. Anim. Health. Prod.* 44, 1127~1129.
- (66) Motton, D. D. and Buehring, G. C. (2003). Bovine leukemia virus alters growth properties and casein synthesis in mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* 86, 2826~2838.
- (67) Mukai, H., Takeda, O., Usui, K., Asada, K. and Kato, I. (2008). SNP typing of aldehyde dehydrogenase2 gene with Cycleave ICAN. *Mol. Cell. Probes.* 22, 333~337.
- (68) 村上賢二(2009).地方病性牛白血病の我が国における現状とその対策について. *山口獣医学雑誌* 36, 5~30.
- (69) Murakami, K., Kobayashi, S., Konishi, M., Kameyama, K., Yamamoto, T. and Tsutui, T. (2011). The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among Japanese cattle. *Vet. Microbiol.* 148, 84~88.
- (70) Murakami, K., Kobayashi, S., Konishi, M., Kameyama, K. and



- Tsutui, T. (2013). 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.
- (71) 農林水産省消費安全局. 監視伝染病発生状況の累年比較 [http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi\\_densen/pdf/h25\\_ruinenn\\_todokede.pdf](http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/pdf/h25_ruinenn_todokede.pdf). (2015年4月24日現在).
- (72) Nuotio, L., Rusanen, H., Sihvonen, L. and Neuvonen, E. (2003). Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland. *Prev. Vet. Med.* 59, 43~49.
- (73) Ohshima, K., Miura, S., Numakunai, S., Yasuda, Y., Takahashi, K., Izawa, F., Ozai, Y. and Omi, K. (1978). Precipitating antibody against internal viral antigen from C-type bovine leukemia virus. *Jpn. J. Vet. Sci.* 40, 87~91.
- (74) Ohshima, K., Ozai, Y., Okada, K. and Numakunai, S. (1980). Pathological studies on aleukemic case of bovine leukosis. *Nihon Juigaku Zasshi.* 42, 297~309.
- (75) Ohshima, K., Okada, K., Numakunai, S., Yoneyama, Y., Sato, S. and Takahashi, K. (1981). Evidence on horizontal transmission of bovine leukemia virus due to blood-sucking tabanid flies. *Nihon Juigaku Zasshi.* 43, 79~81.
- (76) Ohshima, K., Sato S. and Okada, K. (1982). A pathologic study on initial lesions of enzootic bovine leukosis. *Jpn. J. Vet. Sci.* 44, 249-257.
- (77) OIE. (2012). Enzootic bovine leucosis. *In: Manual of Diagnostic*

Tests and Vaccines for terrestrial animals. pp.721~731. Paris.

- (78) Olson, H. (1961). Studien iiber das Auftreten und die verbreitung der Rinderleukose in Sweden. Acta. Vet. Scand. 2(supple 2).11~46.
- (79) Olson, C., Kettman, R., Burny, A. and Kaja, R. (1981). Goat lymphosarcoma from bovine leukemia virus. J. Natl. Cancer Inst. 67, 671~675.
- (80) Onuma, M., Wada, M., Yasutomi, Y., Yamamoto, M., Okada, H.M. and Kawakami, Y. (1990). Suppression of immunological responses in rabbits experimentally infected with bovine leukemia virus. Vet. Microbiol. 25, 131~41.
- (81) 小沼操 (2011).牛白血病. 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. 動物の感染症, 第3版, pp98~99, 近代出版, 東京
- (82) 大橋比奈子, 道下久美, 南澤昇, 吉原雅子, 高木裕, 村上賢二(2011). 食肉衛生検査における乳用牛を対象とした牛白血病ウイルス(BLV)保有状況調査及び卵巣組織からの BLV 遺伝子の検出. 獣医畜産新報 64, 569~573.
- (83) Ott, S.L., Johnson, R. and Wells, S.J.(2003). Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. Prev. Vet. Med. 61, 249~262.
- (84) Perino, L.J., Wright, R.E., Hoppe, K.L. and Fulton, R.W.( 1990). Bovine leukosis virus transmission with mouthparts from Tabanus abactor after interrupted feeding. Am. J. Vet. Res. 51, 1167~1169.
- (85) Piper, C.E., Ferrer, J.F., Abt, D.A. and Marshak, R.R. (1979).

- Postnatal and prenatal transmission of the bovine leukemia virus under natural conditions. *J. Natl. Cancer Inst.* 62, 165~168.
- (86) Rama, G., Moratorio, G., Greif, G., Obal, G., Bianchi, S., Tomé, L., Carrion, F., Meikle, A. and Pritsch, O. (2011). Development of a real time PCR assay using SYBR Green chemistry for bovine leukemia virus detection. *Retrovirology*. 8. A17.
- (87) Rhodes, J.K., Pelzer, K.D. and Johnson, Y.J. (2003). Economic implications of bovine leukemia virus infection in mid-Atlantic dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 223, 346~352.
- (88) Rodríguez, S.M., Florins, A., Gillet, N., De Brogniez, A., Sánchez-Alcaraz, M.T., Boxus, M., Boulanger, F., Gutiérrez, G., Trono, K. and Alvarez, I. (2011). Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. *Viruses*. 3, 1210~1248.
- (89) Sagata, N., Yasunaga, T., Ohishi, K., Tsuzuku-Kawamura, J., Onuma, M. and Ikawa, Y. (1984). Comparison of the entire genomes of bovine leukemia virus and human T-cell leukemia virus and characterization of their unidentified open reading frames. *EMBO J.* 3, 3231~3237.
- (90) Sagata, N., Yasunaga, T., Ogawa, Y., Tsuzuku-Kawamura, J. and Ikawa, Y. (1984). Bovine leukemia virus: unique structural features of its long terminal repeats and its evolutionary relationship to human T-cell leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 4741~4745.
- (91) Sagata, N., Yasunaga, T., Tsuzuku-Kawamura, J., Ohishi, K., Ogawa, Y. and Ikawa, Y. (1985). Complete nucleotide sequence of

- genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 677~681.
- (92) 埼玉県 . 食肉衛生検査センター事業年報  
<http://www.pref.saitama.lg.jp/b0717/shoken-ssjigyoyou/shoken-nenpo16-20.html>(2015年6月22日現在).
- (93) Schöttler, F., Schöttler, H., Über Ätiologie und Therapie der Aleukämischen Lymphadenose des Rindes. (1934). Berl. Muench. Tieratztl. Wochenschr. 50, 497~517.
- (94) Schwartz, I. and Levy, D.(1994). Pathobiology of bovine leukemia virus. Vet. Res. 25, 521~536.
- (95) Scott, H.M., Sorensen, O., Wu, J.T., Chow, E.Y., Manninen, K. and Van Leeuwen, J.A. (2006). Seroprevalence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, Neospora caninum, Bovine leukemia virus, and Bovine viral diarrhoea virus infection among dairy cattle and herds in Alberta and agroecological risk factors associated with seropositivity. Can. Vet. J. 47, 981~991.
- (96) 宗村佳子, 赤瀬悟, 黒野博之, 村上賢二 (2005). 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.
- (97) Sparling, A.M. (2000). An unusual presentation of enzootic bovine leukosis. Can. Vet. J. 41, 315.
- (98) 須藤亜寿佳, 岩田竜治, 朴天鎬(2012).山形県で流行している Bovine Leukemia Virus の遺伝子型別及び病理学的検索.日獣会誌 65, 883~887.
- (99) 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 (2008). 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.
- (100) 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.(2011). 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.
- (101) 東京都芝浦食肉衛生検査所. 芝浦食肉衛生検査所概要 <http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/sibaaura/>(2015 年 6 月 15 日現在).
- (102) 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(2013). 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.
- (103) Trono, K.G., Perez-Filgueira, D.M., Duffy, S., Borca, M.V. and Carrillo, C. (2001). Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. Vet. Microbiol. 83, 235~248.
- (104) United States Department of Agriculture, Animal and plants health inspection servise, Centers for Epidemiology and Animal Health. Bovine Leukosis Virus (BLV) on U.S. Dairy Operations 2007. available from [http://www.aphis.usda.gov/animal\\_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07\\_is\\_BLV.pdf](http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07_is_BLV.pdf).(2015 年 4 月 24 日現在)
- (105) Van Der Maaten, M.J. and Miller, J.M. (1976). Serological evidence of transmission of bovine leukemia virus to chimpanzees. Vet. Microbiol. 1, 351~357.

- (106) Van Der Maaten, M.J., Miller, J.M. and Schmerr, M.J.(1981). Effect of colostral antibody on bovine leukemia virus infection of neonatal calves. *Am. J. Vet. Res.* 42, 1498~1500.
- (107) Van Leeuwen, J. A., Keefe, G. P., Tremblay, R., Power, C. and Wichtel, J.J. (2001). Seroprevalence of infection with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, bovine leukemia virus and bovine viral diarrhoea virus in maritime Canada dairy cattle. *Can. Vet. J.* 42, 193~198.
- (108) Wang, C. T.(1991). Bovine Leukemia virus infection in Taiwan: epidemiology study. *J. Vet. Med. Sci.* 53, 395~398.
- (109) Washburn, K.E., Streeter, R.N., Lehenbauer, T.W., Snider, T.A., Rezabek, G.B., Ritchey, J.W., Meinkoth, J.H., Allison, R.W., Rizzi, T.E. and Boileau, M.J. (2007). Comparison of core needle biopsy and fine-needle aspiration of enlarged peripheral lymph nodes for antemortem diagnosis of enzootic bovine lymphosarcoma in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 230, 228~232.
- (110) Wu, M.C., Shanks, R.D. and Lewin, H.A. (1989). Milk and fat production in dairy cattle influenced by advanced subclinical bovine leukemia virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 993~996.
- (111) Wu, D., Murakami, K., Morooka, A., Jin, H., Inoshima, Y. and Sentsui, H. (2003). In vivo transcription of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency-like virus. *Virus Res.* 97, 81~87.
- (112) Wyatt, C.R., Wingett, D., White, J.S., Buck, C.D., Knowles, D., Reeves, R. and Magnuson, N.S.(1989). Persistent infection of

rabbits with bovine leukemia virus associated with development of immune dysfunction. *J. Virol.* 63, 4498~4506.

(113) Yin, M.J., and Gaynor, R.B.(1996).Complex formation between CREB and Tax enhances the binding affinity of CREB for the human T-cell leukemia virus type 1 21-base-pair repeats. *Mol. Cell. Biol.* 16, 3156~3168.

(114) 吉川堯(1986). 第5章 地方病性牛白血病の臨床的診断. 大島寛一, 高桑一雄, 水野善夫, 吉川堯. 牛白血病診断便覧, pp.34~46, 日本獣医師会, 東京.

(115) Zaghawa, A., Beier, D., Abd El-Rahim, I.H., Karim, I., El-ballal, S., Conraths, F.J. and Marquardt, O. (2002). An outbreak of enzootic bovine leukosis in upper Egypt: clinical, laboratory and molecular-epidemiological studies. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.* 49, 123~129.

(116) 全国食肉衛生検査所協議会 (2011).12 牛白血病. 全国食肉衛生検査所協議会. 新・食肉衛生検査マニュアル, p.171~177.中央法規, 東京.