

	とみた けいすけ
<b>氏 名</b>	<b>富 田 啓 介</b>
本籍（国籍）	兵 庫 県
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	獣博第3号
学位授与年月日	令和4年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当 課程博士
研究科及び専攻	獣医学研究科 共同獣医学専攻
<b>学位論文題目</b>	<b>牛白血病ウイルス感染に対する黒毛和種子牛における初乳中抗体と乳汁感染防除に関する研究</b>
学位審査委員	主査 岩手大学教授 岡田 啓司 副査 東京農工大学准教授 吉田 敏則 副査 農研機構動物衛生研究部門長 筒井 俊之 副査 岩手大学客員教授 山本 健久 副査 岩手大学教授 村上 賢二

## 論文の内容の要旨

牛白血病ウイルス（BLV）は、牛伝染性リンパ腫（EBL）の原因ウイルスであり、感染牛の約30%が持続性リンパ球増多症（PL）となり、その0.1～5%がBLV感染後3～4年あるいはそれ以上経過して、EBLを発症する。我が国では、1927年に岩手県で初めて発生が報告されて以来、全国で発生が認められている。牛リンパ腫（BL）は1997年まで届出の義務が無かったため、全国的な発生状況を知ることは出来なかったが、1998年の家畜伝染病予防法の改正により届出が義務づけられ、近年の急激な増加が明らかになっている。報告されたBLの年間発生件数は1998年にはわずか99頭、2004年度までは500頭以下で推移していたが、2008年度に1,040頭、2012年度に2,090頭、2020年度は4,197頭と急速に増加している。BLVは、感染細胞を通じて水平および垂直感染する。水平感染は、牛同士の血液などの体液を介した接触感染、アブなどの吸血昆虫を介した自然感染、医療機器、除角器具などを介した人為感染、出生後の初乳と常乳を介した感染がある。垂直感染は、周産期の子宮内・産道感染がある。水平感染のなかでは、吸血昆虫対策、人為的な医原性感染については対策が取られているが、乳汁感染については未だ対策が十分とは言えない。また、垂直感染については実態が不明な部分が多く、実態把握が急務である。これらの背景を元に、本研究では乳汁感染を中心として乳汁中抗体が感染を防御する時期を推定することにより、黒毛和種牛の典型的な飼養形態において安全な母子分離時期を提案すること、また、現在我が国で導入が進んでいる人工哺乳システムの乳汁前処理としての農場オンサイト型大型高温短時間加温（HTST）装置の有効性を検討した。

第一章では黒毛和種牛飼養農場における母乳感染防除可能な母子分離時期推定

のため、初乳と初乳製剤を給与された黒毛和種子牛の BLV 抗体とプロウイルス量の推移について調査した。BLV 感染状況を確認するため、母牛の血液サンプルを、分娩前後 2 週間以内に、子牛の血液サンプルを、1~14 日齢, 15~29 日齢, 30~59 日齢, 60~79 日齢, 80~105 日齢, および 165 日齢以上で頸静脈から採血した。BLV 遺伝子検査として定量 PCR (qPCR), BLV 抗体検査として ELISA 法を用いた。その結果、子牛の初乳製剤由来の BLV 抗体は 1~3 ヶ月間持続したのに対し、BLV 感染母牛由来の移行抗体は 6 ヶ月間持続すること、BLV 感染母牛からの産子 5 頭のうち 2 頭 (40%) は子宮内で既に感染がみられ、1 頭 (20%) は乳汁または産道感染の可能性が示された。

第二章では、乳汁中の BLV 感染細胞の不活性化について農場オンサイト型大型高温短時間加温 (HTST) 装置の有効性を検討した。HTST 試験のために市販の牛乳 13 L に  $6.7 \times 10^7$  BLV 感染末梢血単核細胞 (PBMC) を添加した。調整した乳汁は、通過型大型加温装置により  $72^{\circ}\text{C}$  で 15 秒 (完全な HTST 処理), または  $72^{\circ}\text{C}$  未満の状態 で 15 秒 (不完全な HTST 処理) の加温処理を行った。対照として、 $1.75 \times 10^8$  PBMC を含む 13L の牛乳は、加熱せずに大型加温装置を通過させた (HTST なし)。また、現在、小規模農場を中心に一般的に用いられている低温加温殺菌 (LTLT) 装置を使用した。LTLT 試験では、各サンプルについて、プラスチック製管に 30 ml の乳汁を入れ、そこに  $3.4 \times 10^7$  BLV 感染 PBMC を加え、LTLT 加温装置で  $60^{\circ}\text{C}$  で 30 分間 LTLT 処理したものと、不活化されていない陽性対照 (LTLT なし; 室温で 30 分間保持) とした。乳汁試験サンプルを羊の腹腔内に接種し、毎日の観察と、17 週間まで週に 1 回頸静脈から採材し、qPCR および ELISA によって BLV プロウイルスおよび BLV 抗体を検査した。その結果、農場オンサイト型の大型 HTST 装置は、乳汁中の BLV 感染細胞を効果的に不活化できた。LTLT 装置についても同様に、BLV 感染細胞を効果的に不活化することが確認された。近年、大規模牛飼養農場において省力化のために乳汁の自動給餌システムの導入が進められており、その前処理として農場において HTST 処理を実行することにより、集団飼育する子牛を BLV 感染から保護するとともに、細菌等の不活化も可能なことから大規模農場で飼養される子牛の健康増進が期待される。

本研究成果は、黒毛和種牛を飼養する農場において BLV 感染母牛から産出される子牛の母子分離時期の指標を示すとともに、我が国においてこれから導入が進むことが推察される人工哺乳システムのための前処理として、農場オンサイト HTST 装置の活用による衛生的な集団哺乳の実施により、労働力の省力化とともに、BLV 清浄化対策に寄与するための有用な情報になることが期待できる。

## 論文審査の結果の要旨

牛白血病ウイルス (BLV) は、牛伝染性リンパ腫 (EBL) の原因ウイルスであり、感染牛の約 30% が持続性リンパ球増多症 (PL) となり、その数% が BLV 感染後 3~4 年あるいはそれ以上経過して EBL を発症する。BLV は、感染細胞を通じて水

平および垂直感染する。水平感染について、吸血昆虫、医原性感染については対策が取られているが、乳汁感染については未だ対策が十分とは言えない。また、垂直感染については実態が不明な部分が多く、実態把握が急務である。本研究では乳汁感染を中心として乳汁中抗体が感染を防御する時期を推定することにより、黒毛和種牛の典型的な飼養形態において安全な母子分離時期を提案すること、また、現在我が国で導入が進んでいる人工哺乳システムの乳汁前処理としての農場オンサイト型大型高温短時間加温 (HTST)装置の有効性を検討した。

第一章では黒毛和種牛飼養農場における母乳感染防除可能な母子分離時期推定のため、初乳と初乳製剤を給与された黒毛和種子牛の BLV 抗体とプロウイルス量の推移について調査した。BLV 感染状況を確認するため、母牛の血液サンプルを分娩前後 2 週間以内に、また子牛から経時的に採血し、定量 PCR (qPCR)および ELISA 法を用いてプロウイルスならびに抗体の有無を検査した。その結果、子牛の初乳製剤由来の BLV 抗体は 1~3 ヶ月間持続したのに対し、BLV 感染母牛由来の移行抗体は 6 ヶ月間持続することを示し、また BLV 感染母牛からの産子 5 頭のうち 1 頭 (20%) は乳汁または産道感染であること、2 頭 (40%) は子宮内感染であることを示し、垂直感染のリスクの高さを明らかにした。

第二章では、乳汁中 BLV 感染細胞の不活性化について農場オンサイト型大型高温短時間加温 (HTST) 装置の有効性を検討した。HTST 試験のために市販牛乳 13 L に  $6.7 \times 10^7$  個の BLV 感染末梢血単核細胞 (PBMC) を添加し、通過型大型加温装置により 72°C 15 秒 (完全な HTST 処理)、または 72°C 未満の状態でも 15 秒 (不完全な HTST 処理) の加温処理を行った。対照として、加熱しない大型加温装置 (HTST なし)、および小型低温加温殺菌 (LTLT) 装置を使用した。乳汁試験サンプルを羊の腹腔内に接種し、週に 1 回採血し、BLV プロウイルスおよび BLV 抗体を検査した。その結果、大型 HTST 装置は、乳汁中の BLV 感染細胞を効果的に不活化することを示した。対照の LTLT 装置についても BLV 感染細胞を効果的に不活化することを確認した。

以上のように本研究では、黒毛和種牛を飼養する農場において BLV 感染母牛から産出される子牛の母子分離時期の指標を示すとともに、我が国において今後導入が進むと推察される人工哺乳システムのための前処理として、農場オンサイト型 HTST 装置の活用による衛生的な集団哺乳の実施により、労働力の省力化とともに、BLV 清浄化対策に寄与するための有用な情報になることが期待できる。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岩手大学大学院獣医学研究科共同獣医学専攻の学位論文として十分価値があると認めた。

#### 学位論文の基礎となる学術論文

- 1) 著 者 名 Tomita, K., Miyauchi, S., Katagiri, Y., Yoneyama, S.,  
Dongze, L., Chiba, Y. Hirata, T-I., Ichijo, T, Yasuda, H.A,  
Hikono, H., Murakami, K.  
発 行 年 2020 年  
題 目 Effectiveness of on-farm continuous flow high-temperature  
short-time pasteurization for inactivation of bovine

leukemia virus in milk  
学術雑誌名 Animal Science Journal  
(巻・号・頁) 91・ ・e13495