

Bovine leukemia virus 定量 PCR 法
の評価およびプロウイルス量を指標
とした高度感染酪農場における清浄
化対策に関する研究

2023 年 9 月

岩手大学大学院

獣医学研究科

米山 州二

目 次

緒言	1
第 1 章 国内で市販されている異なった BLV プロウイルス遺伝子領域を 標的とした定量リアルタイム PCR 法の比較	15
序論	16
材料および方法	18
1 動物	18
2 qPCR 法と ELISA 法	18
3 DNA シークエンス	20
4 統計解析	20
結果	22
1 qPCR 法の感度の比較	22
2 qPCR 法による全血中の PVL および BLV 感染細胞の割合の比較	23
3 qPCR 法による腫瘍組織中の PVL および BLV 感染細胞の割合の比較	23
4 腫瘍組織中の BLV プロウイルスの塩基配列	25
考察	26
図表	31
第 2 章 血液中 BLV プロウイルス量を指標とした高度感染酪農場における 清浄化対策に関する研究	43

序論	44
材料および方法	45
1 農場の概要	45
2 材料および検査方法	45
3 実証試験	46
結果	48
考察	51
図表	56
結論	69
謝辞	73
文献	74

緒 言

牛白血症 (Bovine leukosis ; BL) は、牛の体表リンパ節および体腔内リンパ節の腫大などの異常を示す疾病であり、1871年に Leisering により牛の肥大した脾臓にわずかに存在した黄色結節として初めて報告された [Burng, 1980]。腫瘍形成に伴う脾臓組織の破壊は同病の特徴的な病変であり、腫瘍化した細胞は、肝臓、心臓、眼球、皮膚、肺、リンパ節など他の組織にも浸潤する。我が国の家畜伝染病予防法上の「牛伝染性リンパ腫」は、病因的に牛伝染性リンパ腫 (enzootic bovine leukosis : EBL) と散発性牛リンパ腫 (sporadic bovine leukosis : SBL) に区分され、SBL は発症年齢と腫瘍の発生分布から、皮膚型、胸腺型および子牛型に定義されるが、その発生原因は未だに不明である [Aida et al., 2013, Gillet et al., 2007]。一方、EBL は Bovine Leukemia Virus (BLV) の感染に起因することが証明されている腫瘍性疾病であり、通常、1~8年の長い潜伏期間の後、発症に至ると子宮、腸間膜、後胸骨、心臓、第四胃、脾臓、肺、腎臓、尿路、脊椎および腸骨下リンパ節等に CD5⁺ IgM⁺ B細胞のモノクローナルまたはポリクローナルな感染細胞の蓄積に由来する悪性腫瘍が形成される [Alvarez et al., 2013, Schwartz and Lévy, 1994]。EBL の臨床症状は腫瘍が形成された臓器に応じた徴候を示すが、食欲不振、消化不良、乳量減少、慢性鼓脹、第四胃変位、下痢、便秘、体表リンパ節の腫脹、跛行、麻痺、体重減少、衰弱および神経症状を示すことがある [Polat et al., 2015]。臨床症状の発現後、数週間から数ヶ月で死亡し、治療法は未だに確立されていない [Sparling, 2000]。BLV 感染牛のうち EBL を発症するのは 1~5%と言われ、約 30%が臨床症状は示さないものの Bリンパ球のポリクローナルな増殖を特徴とする持続性リンパ球増多

症 (PL) を呈し、残る 70%は無症状キャリアとなる [Aida et al., 2013, Gillet et al., 2007, Marawan et al., 2021]。

原因である BLV はレトロウイルス科デルタレトロウイルス属のウイルスで、ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型および 2 型 (HTLV-1, HTLV-2) や、サル T 細胞白血病ウイルス (STLV) と近縁である [Marawan et al., 2021, Stoye et al., 2011]。BLV は直径 100~120 nm, 正 20 面体の球状粒子で脂質 2 重膜のエンベロープに覆われ、1 本鎖 2 倍体の RNA を保有し、その遺伝子全長は 8,714 塩基で構成されている [Marawan et al., 2021, Sagata et al., 1984] (図 1)。BLV が宿主に感染するとウイルスゲノムにコードされた逆転写酵素およびインテグラーゼの働きによりウイルス RNA は DNA に逆転写され、環状二本鎖 DNA と変換されたウイルス DNA は宿主 DNA に組み込まれ、プロウイルスとなる [Kashmiri et al., 1983]。BLV ゲノム (図 2) にはあらゆるレトロウイルスのゲノム構造として、ウイルス粒子生成に重要な遺伝子である *gag*, *pro*, *pol* および *env* がコードされており、その 5' 末端および 3' 末端には同じ塩基配列が繰り返される Long Terminal Repeat (LTR) 領域が存在している [Stoye et al., 2011]。 *env* と 3' -LTR との間には、*pX* と呼ばれる独特な配列を保有した領域が存在し、制御系遺伝子がコードされている。BLV の *pX* 領域には転写調節因子として *tax*, *rex*, *R3* および *G4* がコードされている。

5' -LTR および 3' -LTR には Tax タンパク質を機能させる転写プロモーターが含まれ、U3, R および U5 の主要な 3 つの領域から構成されおり、5' 末端と 3' 末端の LTR は宿主 DNA への挿入時には同一配列である [Derse, 1987]。LTR の長さは 530 bp で、U3 および U5 はそれぞれ 211 bp, 91 bp で、R は 228 bp である。LTR の両端には 6 bp の逆向き反復配列 (IR) があり、宿主 DNA の挿入部

位には 6 bp の同方向反復配列 (DR) が認められる。U3 領域には、転写プロモーターである CAT box と TATA box が存在し、さらに 5' -LTR の U3 領域に主に存在する別の一連の部位がウイルス転写を制御している [Katoh et al., 1989, Willems et al., 1993]。LTR の重要な制御要素は、その配列の中央にほぼ完全に保存された E box モチーフと重複する cAMP 応答配列 (CRE) を持つ TxRE と呼ばれる 21 bp の配列の 3 重コピーである。LTR 領域の mRNA の転写や翻訳の制御因子に係る配列に変異があると BLV の粒子合成が加速され、この加速によって牛の免疫反応がより強くなることが報告されている [Blazhko et al., 2019]。

gag は高度に保存されており、前駆体 Pr44^{gag} をコードする 1,178 bp の塩基配列で構成される。Pr44^{gag} はその後、BLV プロテアーゼによってウイルス粒子に主要な 3 つの非グリコシル化タンパク質 (p12 スクレオカプシド, p24 カプシドおよび p15 マトリックス) に切断される [Katoh et al., 1991, Mamoun et al., 1990]。この翻訳後の成熟は、*gag* と *pol* の間に位置する領域にコードされるウイルスプロテアーゼ p14 (*pro*) によって行われる [Llames et al., 2001]。自然感染牛では *gag* がコードする p12 , p24 , p15 タンパク質に対する抗体がいずれも検出されるが、p24 に対する抗体が量的に最も多く、宿主免疫応答の主要な標的であると考えられている [Deshayes et al., 1980, Mager et al., 1994, Willems et al., 1997]。

pol は、逆転写酵素とインテグラーゼをコードしている。*pol* はフレームシフト後に翻訳されて逆転写酵素が生成される。

env はポリペプチド前駆体 gPr72 をコードしており、この前駆体は表面タンパク質である gp51 と、膜貫通タンパク質である gp30 の 2 つに切断される [Mamoun et al., 1990]。これらの糖タンパク質はウイルスの侵入に必要な認識

部位を持ち、細胞融合を媒介することから、ウイルスのライフサイクルに重要な役割を担っている [de Brogniez et al., 2015]。 *env* は遺伝学的多様性に富み、BLV の系統学的解析および地理的分類に有用と考えられている [Rola-Luszczak et al., 2021]。

BLV プロウイルスには、*env* と 3' -LTR 領域との間に *pX* 領域という 1,817 bp の領域が存在する [Rice et al., 1984, Sagata et al., 1985]。この領域の遺伝子うち、*tax* がコードしている Tax タンパク質は、BLV プロウイルスの転写調節因子として働き、細胞増殖の障害と DNA 修復の阻害により宿主細胞を悪性化する [Lawson et al., 2018]。また、*tax* の多型は BLV 感染後の病態の発現状況を決定する上でも重要である。Tax タンパク質の 233 位のアミノ酸はロイシン (233L-Tax) またはプロリン (233P-Tax) であるが、233P-Tax 遺伝子を持つ BLV の感染では 233L-Tax 遺伝子を保有する場合より EBL 発症までの潜伏期間が著しく長くなること [Inoue et al., 2013]、国内の飼養牛を用いた調査では 233L-Tax 遺伝子を保有する BLV の浸潤率がより高いこと [Mori et al., 2019]、ホルスタイン種の調査では、233L-Tax 遺伝子を持つ BLV に感染した牛の血中プロウイルス遺伝子量 (PVL) は、233P-Tax 遺伝子を保有する BLV よりも高いこと [Ochiai et al., 2020] が報告されている。

BLV の DNA 合成はウイルス RNA の 5' 末端近くに結合した tRNA をプライマーとして開始され、マイナス鎖の DNA が合成され、このマイナス鎖 DNA を鋳型としてプラス鎖の直鎖状 DNA が合成される。このウイルス DNA の末端には LTR 配列が存在し、最終的に環状二本鎖 DNA へ変換される。インテグラーゼは逆転写反応により環状二本鎖 DNA に変換されたウイルス DNA の両末端に作用し、各 3' 末端の 2 つのヌクレオチドを切断除去する (プロセッシング反応)。プロセッシ

ング反応を終えたウイルス DNA は核内に移動し、ウイルス DNA 3' 末端-OH 基の求核反応により宿主 DNA を切断すると同時に DNA の 5' リン酸基とエステル結合する (ストランドトランスファー反応)。インテグラーゼはこれらプロセッシング反応とストランドトランスファー反応に直接関与し、その結果、プロウイルスが宿主ゲノムに組み込まれ、宿主は生涯にわたり感染を持続することとなる [Gillet et al., 2007, Marawan et al., 2021]。

pX 領域の遺伝子には *tax* のほかに *rex* , *R3* および *G4* が存在している。*rex* がコードしている Rex タンパク質は構造遺伝子の合成に必要なウイルス発現の転写後制御因子であり、*in vivo* での感染に必須である [Marawan et al., 2021]。R3 および G4 タンパク質は高い PVL を維持することに寄与し、G4 タンパク質はラット胎子の繊維芽細胞を不死化させるため、部分的にリンパ腫発症の誘発に関連すると考えられている [Kerkhofs et al., 1998]

海外での EBL の発生は当初北欧に限局していたが、BLV は 20 世紀前半に北米に侵入したものと考えられている。その後、北米からの牛の流通が活発になるにつれ、世界各国で EBL が報告されるようになった [Johnson and Kaneene, 1993]。ヨーロッパのいくつかの国では、1960 年代から主に血清反応を用いた摘発および淘汰と組織的な防疫対応を展開した結果、現在ではイギリス、フランス、ドイツ、スペイン、ベルギー、デンマーク、スウェーデン、スイス、ポーランドなどの国々が BLV 清浄化を達成している [Bartlett et al., 2014, Marawan et al., 2021]。米国での直近の有病率については、2018 年の報告によると全米 11 州 103 群の計 4,120 頭の乳用牛を対象に抗体調査を実施した結果、94.2%の牛群で少なくとも 1 頭の抗体陽性牛が検出され、個体ベースでは 46.5%の抗体陽性率を示し、1996 年の調査時の 40.8%から確実に上昇していることが示唆されている [LaDron

ka et al., 2018]。その他の国の乳用牛における有病率は、カナダの牛群で 78% [Nekouei et al., 2015], アルゼンチンの牛群で 84% [Trono et al., 2001], 中国では個体ベースで 49% [Yang et al., 2016] と報告されており, BLV 侵入を防止するため, 多くの国や地域で貿易制限を強化するなどの措置がとられている [Bartlett et al., 2020]。

日本では 1927 年, 岩手県におけるカナダからの輸入種雄牛での報告が初発であり [窪田五郎, 1927], 以来, 全国でその発生が認められた。その後, 1998 年には家畜伝染病予防法の改正に伴い, 国への発生報告が義務付けられたことから, 経時的な発生状況が明らかになっている。報告が開始された 1998 年から 2001 年にかけての EBL の発生数は年間 200 頭以下で推移していたが, 2003 年には 407 頭と急増し, 2008 年に 1,000 頭を超えた後も増加の一途をたどり, 2022 年は 4,334 頭と, 過去 20 年で 10 倍以上の数となっている (https://www.maff.go.jp/j/sy-ouan/douei/kansi_densen/kansi_densen.html)。これらに関連して食肉処理場での摘発数も増加し, 2012 年度の発生数は 1997~2004 年度の平均発生数の約 14 倍となったことが報告されている [Somura et al., 2013]。日本における BLV の有病率については, 1980 年代に初めて全国規模の抗体調査が実施され, 抗体陽性率は 1980 年および 1982 年にそれぞれ乳用牛で 3.7% および 4.2%, 肉用牛で 7.4% および 6.0% であった [伊藤全, 1987]。しかし, 2009~2010 年にかけて実施された全国調査では, 全都道府県の乳用牛 11,113 頭および肉用牛 9,722 頭の抗体検査を実施した結果, 抗体陽性率は乳用牛で 40.9%, 肉用牛で 28.7% を示し, 約 20 年間で急速に国内牛群に BLV が浸潤したことが示唆された [Murakami et al., 2013]。

かつて BLV 感染に伴う経済的損失は, リンパ腫による枝肉廃棄が唯一知られ

ているものだった[Bartlett et al., 2020]。したがって、本病の不顕性を考慮すると、枝肉廃棄による直接的損害を被る肉用牛農家と比較して酪農場における BLV 防除への意識は低い傾向にある[Frie and Coussens, 2015, LaDronka et al., 2018]。近年、EBL 発症までの潜伏期であっても BLV 感染牛の免疫機能が広範囲に障害され、健康や生産性に悪影響を及ぼすことが示唆されている[Frie and Coussens, 2015]。BLV 感染の生産性への負の影響については、生乳生産量[Emanuelson et al., 1992, Erskine et al., 2012, LaDronka et al., 2018, Nekouei et al., 2016, Norby et al., 2016, Ott et al., 2003, Yang et al., 2016], 繁殖性[Vanleeuwen et al., 2010], ワクチン効果の減退や乳房炎, 下痢, 肺炎などが報告されており[Emanuelson et al., 1992, Frie et al., 2016, Jaworski et al., 2018, Puentes et al., 2016], 生乳生産量への影響だけを考慮しても米国における年間の経済的損失は 5 億 2,500 万ドルと見積もられている[Ott et al., 2003]。興味深いことに、血中 PVL と生産性の影響の関連性も指摘されており、BLV 感染牛のうち高 PVL 牛の平均枝肉重量は、非感染牛と比較して有意な減少を認め[Nakada et al., 2022], さらに高 PVL 牛は低 PVL 牛に比べて乳腺の免疫機能が低下することが報告されている[Watanabe et al., 2019]。また、BLV 感染牛は非感染牛と比較して生産寿命が短縮されることが示されており[Bartlett et al., 2013, Emanuelson et al., 1992, Nekouei et al., 2016, Pollari et al., 1992, Rhodes et al., 2003], その背景にはこれら生産性や免疫機能の低下が影響している可能性がある。

BLV の感染拡大防止には、感染源である感染牛を摘発するための効率的かつ簡便な検査方法が必須となる。BLV 感染牛の一部が PL を示すことは知られており、血液像の異常は欧州では早期から注目されていた。特に EBL が多発していたデ

ンマークでは、リンパ球数の正常値の幅を年齢別に定め、この基準以上の数値を示した牛を異常と判断し、これを「Bendixen の鍵」として BLV 感染牛の血液診断指標としてきた [Bendixen, 1963, Bendixen, 1965]。その後、欧州では「Bendixen の鍵」を若干緩和した「EC の鍵」を採用し、異常を示す牛を淘汰することで清浄化対策を進めてきた [Levy et al., 1977]。しかし、EBL 発症牛でもリンパ球数の増加がみられない症例も散見されるため [Ohshima et al., 1980]、このような臨床血液学的所見のみで清浄化を達成させることは困難であった。

BLV は感染後、宿主の DNA にプロウイルスとして組み込まれることから、感染は生涯継続し、血液中の BLV 抗体価は常に高値を示す。したがって、高度な技術や高価な機器を必要としない血清学的検査は牛群におけるスクリーニング検査法として有用である。抗 BLV 抗体を標的とした血清学的検査法としては、寒天ゲル内沈降反応 (AGID) , enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) , ラジオイムノアッセイ, および受身赤血球凝集反応が知られているが [Marawan et al., 2021], WOAH の診断マニュアルでは、ELISA 法および AGID 法が推奨されている [WOAH, 2019]。なお、血清学的検査では BLV 感染から抗体価上昇まで 2~8 週間を要すること [Gillet et al., 2013, Heeney et al., 1992, Naif et al., 1992], 移行抗体を保有する子牛での検査では感染抗体と識別ができないことに留意する必要がある。

1990 年代に入り、polymerase chain reaction (PCR) 法を応用した BLV 遺伝子を高感度でより特異的に検出する手法が開発された [Murakami et al., 1994]。PCR は感染抗体が上昇していない感染初期でも感染リンパ球から BLV プロウイルス遺伝子を検出することが可能であり、移行抗体を保有する若齢牛での早期摘発も可能となったことから、BLV 感染牛の診断は飛躍的に向上した。また、近年

ではリアルタイム PCR の普及が進み、PVL の測定が可能となった。その結果、血中 PVL が野外の感染伝播リスクの高い牛の指標として使われるようになり [Juliarena et al., 2007, Mekata et al., 2015], 農場清浄化のため感染牛の更新や分離飼育の優先順位を設定する上で有用となっている。現在、日本では BLV プロウイルスの標的遺伝子や反応原理が異なる 3 種の定量 PCR (qPCR) キットが市販されており、*tax*, *pol* および LTR 領域をそれぞれ標的遺伝子としている。*pol* は *gag*, *env* と比較して最も検出感度が高く、診断目的の標的領域として最適と報告されている [Heenemann et al., 2012, Juliarena et al., 2007, Lew et al., 2004, Rola-Luszczak et al., 2013]。これは異なる地域でのウイルス株間での *pol* 塩基配列の保存性が高いことが一因とされているが、一方で *pol* と *tax* の比較では *tax* 領域の塩基配列の多様性は *pol* よりも低いことが報告されている [Jaworski et al., 2018]。LTR 領域を標的とした qPCR キットは、LTR 領域に未知および既知のプロウイルスを増幅可能な縮重プライマーを設計し、幅広いウイルス株を増幅可能としていることを特徴とする。なお、牛血液による LTR 領域と *tax* 領域を標的とした国内市販キットの比較検証では、前者がより感度と再現性が高いことが示されているが、牛腫瘍組織による検証は実施されていない [Jimba et al., 2012]。BLV 遺伝子領域にはそれぞれ異なる機能があること、感染から腫瘍発生までにおいて標的部位に遺伝子配列の変異、欠損等も起こりうるため、それら qPCR を BLV 清浄化対策のツールに用いるためにはそれぞれの検査法の特徴を明らかにする必要がある。さらに、国内市販キットのうち、2 種は TaqMan プローブを、*tax* 領域を標的とする 1 種はキメラプローブを採用していることから、それら反応原理の違いが測定結果に与える影響も考慮することが必要となる。

主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) は、ほぼすべての脊椎動物が保有する細胞膜表面の糖タンパク質で、生体内で MHC が抗原提示を行うことで自己・非自己を判断し、ウイルス等の病原体の排除、臓器移植の際の拒絶反応等に関与するなど、免疫にとって極めて重要な機能を有する。牛の MHC は Bovine Leukocyte Antigen (BoLA) と呼称され、その遺伝子領域は第 23 番染色体に位置し、クラス I、クラス II およびクラス III の遺伝子領域に分類される [Andersson et al., 1988, Fries et al., 1993]。BoLA クラス II 分子は B 細胞、マクロファージ樹状細胞および活性化 T 細胞で発現し、獲得免疫全般を制御する CD4⁺ T 細胞へ抗原を提示する [Miyasaka et al., 2013]。BoLA クラス II 遺伝子群の中で *BoLA-DRB3* は極めて多型性に富み、機能的にも重要な遺伝子とされる [Gelhaus et al., 1999]。BLV 感染と *BoLA-DRB3* との関係性については、PL に対する耐性と感受性に関係するとされ [Xu et al., 1993]、その後、BLV 遺伝子を検出する qPCR の開発に伴い、BLV 感染後の PVL の高低の制御に関与する宿主因子としての関与が示され、BLV 対策への有用性が注目されている [Carignano et al., 2017, Forletti et al., 2020, Hayashi et al., 2017, Juliarena et al., 2016, Juliarena et al., 2008, Lo et al., 2020]。

BLV 感染は、BLV 感染細胞が非感染動物の体内に移入することでのみ成立する [WOAH, 2019]。しかし、牛飼養環境下においてその感染経路は多岐にわたり、注射針、除角器具や直腸検査手袋などを介した人為感染 [村上賢二 et al., 2009]、アブやサシバエなどの吸血昆虫を介した機械的ベクター感染 [Buxton et al., 1985, Ohshima et al., 1981, Ooshiro et al., 2013]、牛同士の体液を介した接触感染 [Kobayashi et al., 2015, Mekata et al., 2015]、さらには感染母牛の胎内や産道での感染や初乳を介した子牛への感染などがあげられる [Mekata et

al., 2015, 村上賢二 et al., 2009]。BLV 清浄化を達成するためには、検査による摘発・淘汰と感染を拡大させないための農場での適正管理が必要となる。BLV の有病率が低い欧州のいくつかの国や地域では、すべての家畜を検査し、陽性と判定された個体を淘汰する政策を成功させているが、有病率の高い地域では検査および淘汰が経済的に実施可能な状況まで有病率を下げるのが必須となる。しかし、国内の感染農場の中には有病率が 50%を超える農場も多く[Mekata et al., 2015, Ohno et al., 2015], このような高度感染農場での清浄化達成は困難な状況にある。2012 年、農林水産省は BLV 対策の基本的事項を盛り込んだ「牛白血病に関する衛生対策ガイドライン (ガイドライン)」を公表し(2023 年 6 月現在)(URL: https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/pdf/eb1_guide.pdf), 家畜の飼養者, 臨床獣医師, 家畜衛生保健所等の関係機関が一体となって各農場での清浄化対策を進める方針を明確化した。ガイドラインでは, 高度感染農場においては, 感染牛の分娩時の隔離, 分娩場所の適切な消毒, 出生子牛の早期母子分離, 非感染牛由来の初乳または市販初乳製剤もしくは適切に熱処理または凍結させた感染牛由来の初乳を給与させること, 防虫ネット設置など吸血昆虫対策, 感染牛群と非感染牛群の分離飼育, 搾乳などの作業順の変更を実施することが望ましいとしている。これら多種多様な対策について, BLV 感染率のみならず経営形態および牛舎構造の違いや日々の作業の流れ等を勘案して実行可能な対策を行うべきとしているが, これらの取組を同時に展開できる農場は少なく, 高度感染農場の清浄化達成までの長期的戦略について, 対策の重点項目や優先順位と併せて明らかにする必要がある。

以上のことから, 本研究の第 1 章では, 市販されている qPCR を用いて野外感染牛の血液および EBL 発症牛の腫瘍組織から得られた DNA を検査して得られた

PVL を比較検証し、各検査系の特性を明らかにした。また、第 2 章では国内の EBL 対策を推進させることを目的として、BLV の高度感染酪農場において、qPCR を用いて得られた PVL を指標に感染牛からのウイルス感染リスクを検討するとともに、BLV 感受性に関与する牛の *BoLA-DRB3* タイピングを指標に、感染低リスク牛を活用した清浄化を試み、その効果を検証した。

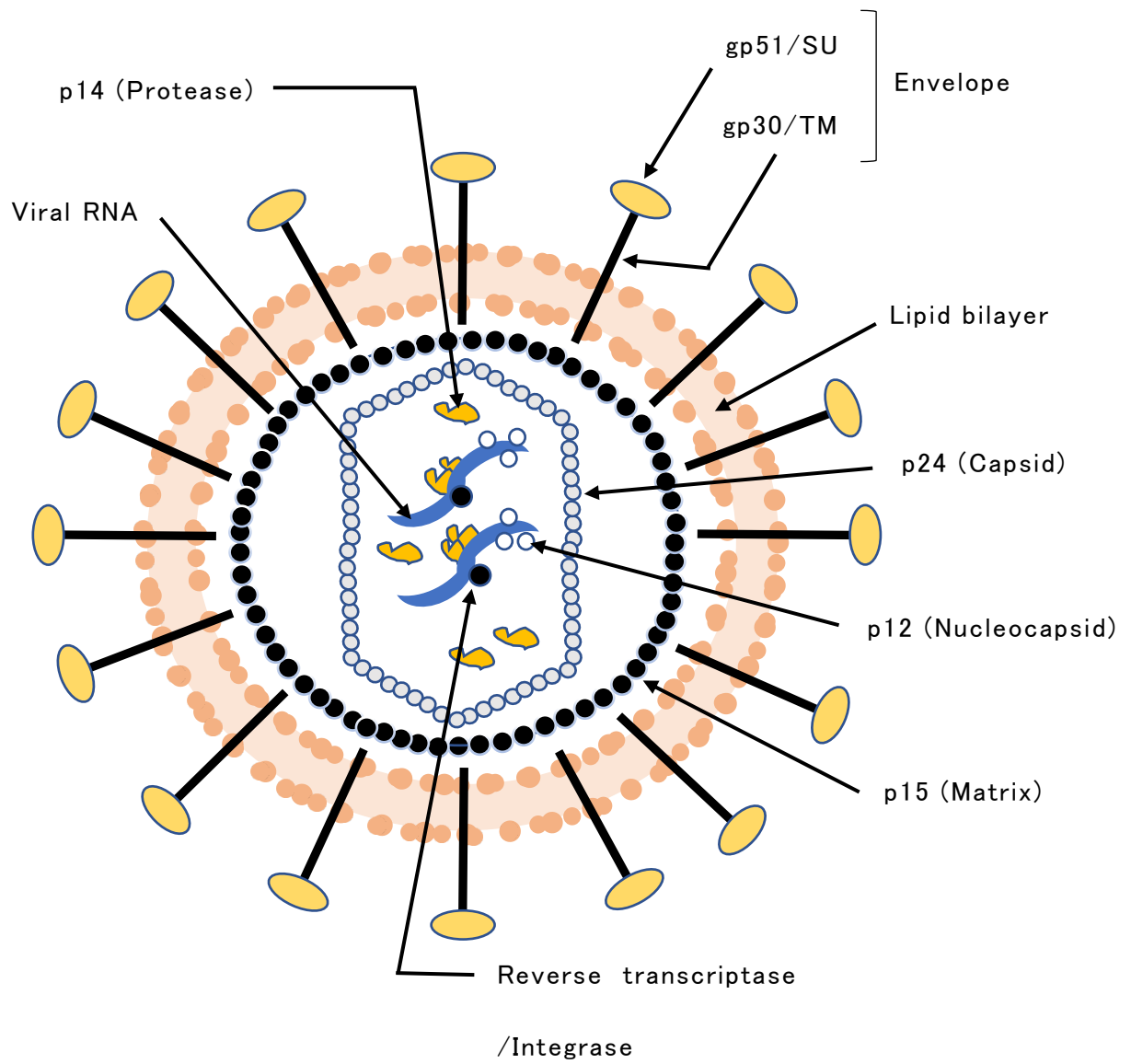


図1 Bovine leukemia virus の模式図

Marawan et al. 2021 から改変引用

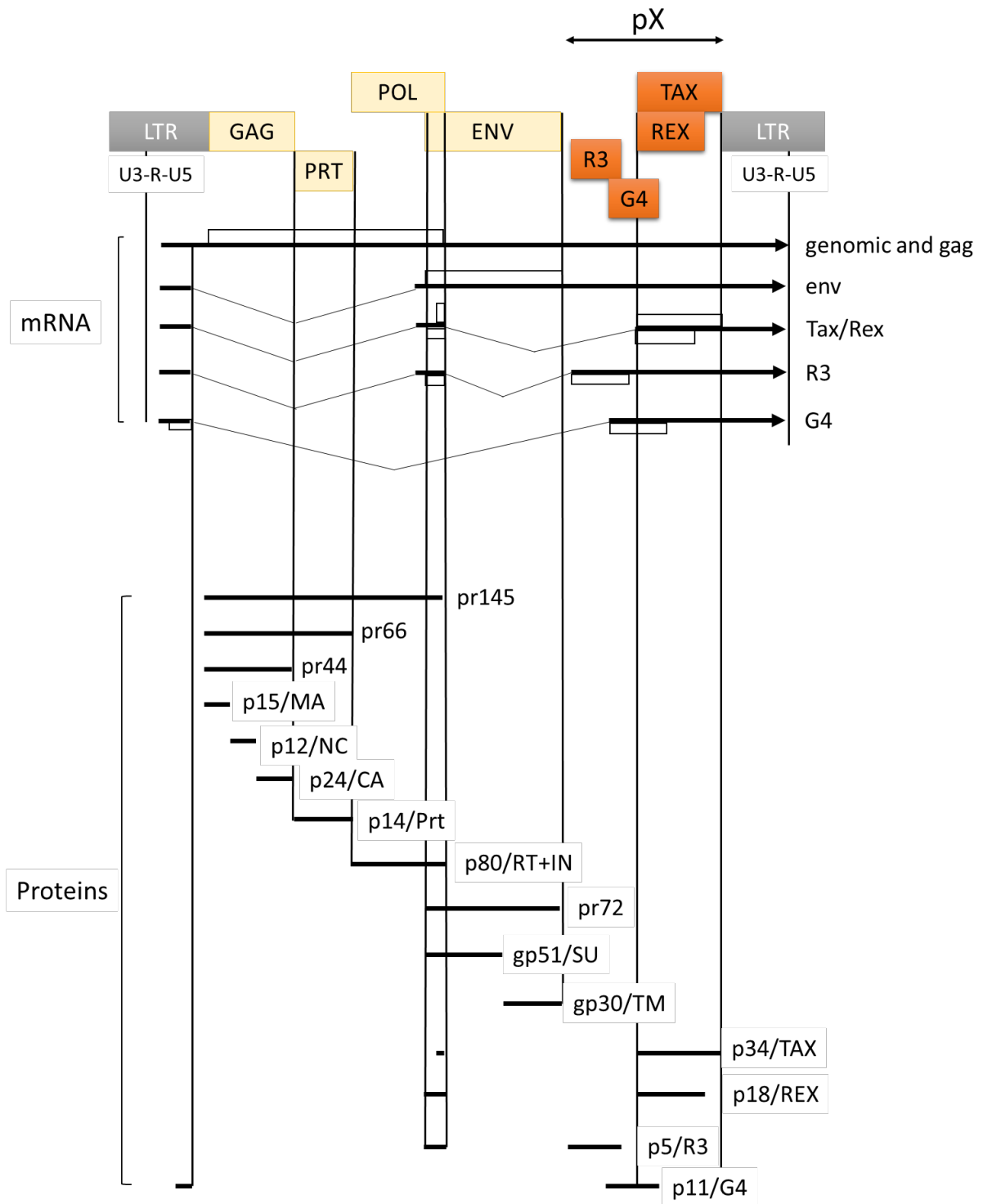


図2 Bovine leukemia virus の遺伝子構造

Gillet et al. 2007 から改変引用

第 1 章

国内で市販されている異なった BLV プロウイルス遺伝子領域を
標的とした定量リアルタイム PCR 法の比較

序 論

BLV プロウイルスゲノムを検出する PCR 法は、BLV 感染牛を迅速かつ高感度に特定するため、世界的に広く用いられており [WOAH, 2019]、近年では、プロウイルス遺伝子量 (PVL) を測定可能な定量リアルタイム PCR (qPCR) 法が使用されている。血液中の PVL は水平および垂直感染リスクと相関があり、BLV 感染牛の更新順位に対する指標に用いられるなど、農場での BLV まん延防止対策に広く利用されている [Juliarena et al., 2007, Mekata et al., 2015, Miyasaka et al., 2015, Sajiki et al., 2017]。また、生体組織診断で採取したリンパ節中の PVL は EBL 発症を予測する診断指標としても活用することができる [Somura et al., 2014]。HTLV-1 感染では、末梢血単核細胞 (PBMC) 中の PVL が成人 T 細胞白血病 (ATL) の重症度と強い相関を示すことが確認されている [Hodson et al., 2013, Iwanaga et al., 2010]。したがって、BLV 感染においても血液中の PVL および感染細胞の割合が、EBL の病態進行の指標として活用できる可能性がある。

BLV 感染は生涯にわたって持続的な抗体応答を引き起こすため、ELISA 法など血清学的試験は簡易なスクリーニング検査として有用であるが [WOAH, 2019]、母牛からの移行抗体と感染抗体を識別することはできない。また、BLV に感染した牛では BLV プロウイルス検出よりも確実に遅れて抗体上昇が認められるため、抗体検査のみでは感染初期の状況を見落とす可能性が高い。したがって、BLV 感染は PCR 法による BLV プロウイルスの検出により把握することが確実である。現在、世界的に BLV プロウイルス検出を目的としたいくつかの qPCR 法が使用されている [Heenemann et al., 2012, Jimba et al., 2010, Kuckleburg et al.,

2003, Rola-Luszczak et al., 2013]。WOAH の Terrestrial Manual に記載されている qPCR 法は *env* 領域と *pol* 領域を対象としており、これらの領域を標的とした検出系は多くの国で採用されている [Jaworski et al., 2018, WOH, 2019]。我が国では、標的遺伝子、化学反応および反応条件のそれぞれが異なる 3 つの qPCR キットが市販されており、日常的に使用されている。CY415 (タカラバイオ, 滋賀) は *tax* 領域を標的としたサイクリングプローブ法を [Duck et al., 1990], RC202 (タカラバイオ, 滋賀) は *pol* 領域を標的とした TaqMan プローブ法を [Holland et al., 1991], CoCoMo [Jimba et al., 2010] (理研ジェネシス, 東京) は、LTR 領域を標的とした TaqMan プローブ法をそれぞれ採用している。第 1 章では我が国で使用されているこれら 3 種の qPCR 法によって測定された PVL を比較・検討するため、BLV の野外感染牛の血液およびと畜された腫瘍組織検体を用いて CY415, RC202 および CoCoMo qPCR の感度ならびに PVL 測定値をそれぞれ比較検証した。

材料および方法

1 動物

2016～2019年にかけて東北地方の農場で飼育された317頭のBLVの野外感染牛（ホルスタイン種（HF）15農場165頭，黒毛和種（JB）10農場152頭）から全血および血清を採取した。いずれも東北地区の各農業共済組合（NOSAI）の担当獣医師が，臨床症状，血液検査，血液塗抹検査およびELISA法によりBLV感染を確認したもので，NOSAIにおけるEBL清浄化プログラムへ任意で参加した農場を対象に，担当獣医師からの説明の上，農場主から同意を得た検体である。

また，岩手県紫波郡矢巾町にある岩手県食肉衛生検査所にて，2018～2020年にかけて32頭の牛から腫瘍組織検体を採取した。28頭は食肉衛生検査所の獣医師により病理組織学的検査にてBLと診断され（正確にEBLとSBLは区別されなかった），4頭は岩手大学で実施したPCR，ELISA法および病理組織学的検査成績ならびにB細胞のクローナリティPCR検査成績を総合的に判断し，EBLと診断された（表1）。

2 qPCR法とELISA法

EDTA処理した全血について，magLEAD[®]12GC（プレシジョン・システム・サイエンス，千葉）によりゲノムDNAを抽出した。腫瘍組織のゲノムDNAは，DNeasy Blood & Tissue kit（QIAGEN，Hilden，Germany）を用いて定法に従い抽出した。得られたDNA濃度は，Nano Drop One（Thermo Fisher Scientific K.K.，東京）により260 nmの吸光度を測定することで算出した。

BLVのPVLは3種類の市販qPCRキットで測定した。*tax*領域を標的とした

CY415（タカラバイオ，滋賀），*pol* 領域を標的とした RC202（タカラバイオ，滋賀）および LTR 領域を標的とした CoCoMo（理研ジェネシス，東京）の 3 種類の市販 qPCR キットを用いて BLV の PVL を測定した。CY415 と RC202 はメーカーの定法に従って実施した。CoCoMo はキットに DNA 増幅試薬が付属していないため，Premix Ex Taq（Probe qPCR；タカラバイオ，滋賀）を増幅試薬として採用し，定法に従って実施した。qPCR 法のリアルタイム PCR 機器は Quantstudio™3（Thermo Fisher Scientific K.K.，東京）を用いた。定量のための標準曲線は，それぞれのキットに含まれる標準プラスミドを 10 倍階段希釈し，各キットに対応した PCR プライマーで増幅して作成した。スタンダードは 10^0 から 10^5 copies/reaction の 5 点で 2 ウェルずつ測定を行った。PVL は DNA 10 ng あたりの BLV プロウイルスコピー数で示した。なお，LTR は BLV プロウイルスあたり 2 コピー存在するため，CoCoMo については算出されたコピー数を 1/2 とすることで BLV プロウイルスコピー数とした。BLV 感染細胞の割合は，以下の計算式により算出した。リボヌクレアーゼ（RNase）P 遺伝子のコピー数は，RNase P および BLV *pol* 遺伝子を増幅する duplex qPCR 法である RC202 を用いて測定した。なお，RNase P 遺伝子は 1 細胞あたり 2 コピー存在するため，算出されたコピー数を 1/2 とすることで細胞数とした。

$$\text{BLV 感染細胞の割合} = (\text{BLV プロウイルスコピー数}) \div (\text{RNase P コピー数} \div 2) \times 100$$

抗 BLV 抗体の測定は，メーカーの定法に従って ELISA 法（ニッポンジーン，東京）により実施した。

3 DNA シーケンス

CY415, RC202 と比較して CoCoMo の PVL が低値となった腫瘍検体 L1, L5 および L7 について, 標的である LTR 領域の変異等の有無を調査するため, 腫瘍検体中のプロウイルス塩基配列を決定した。ライブラリーは NEBNext[®] Ultra DNA Library Prep kit for Illumina (Cat No. E7370, New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) により調整した。調整したライブラリーは, Qubit 2.0 fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) による濃度測定, Agilent2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) による分子長測定を行い, qPCR 法に供した。全ゲノム配列決定は, レリクサ (東京, 日本) が Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, San Diego, CA, USA) により実施した。アダプター配列と低品質配列は, cutadapt version 1.18 [Martin, 2011] と Trimmomatic version 0.36 [Bolger et al., 2014] によりそれぞれフィルタリングした。すべての明瞭なリードは AbySS v2.3.3 を用いて κ 値 0.96 で de novo アセンブリーを実施した [Jackman et al., 2017]。BLV プロウイルスの配列は CLC genomic workbench software ver.12 (QIAGEN, 東京) により解析した。

4 統計解析

異なる qPCR 法 (CY415, RC202, CoCoMo) の BLV の PVL 測定値の比較は, 各方法で得られた値を, Friedmann 検定後に Bonferroni の方法で多重比較検定を実施して評価した。品種間 (HF と JB) で得られた PVL および BLV 感染細胞の割合の差は, Mann-Whitney U 検定を実施して評価した。また, 異なる検出法によるこれらの PVL 間の相関は Spearman の相関係数により評価した。さらに, 各 qPCR で得られた PVL と BLV 感染細胞の割合の相関も同様に解析した。これらのデー

タ解析はフリーソフトの R (R Core Team, 2020. URL <https://www.R-project.org/>) を用い, 統計的な有意性を $p < 0.05$ とした。

結 果

1 qPCR 法の感度の比較

ELISA 法では全 317 検体の血清が抗 BLV 抗体陽性であった（データは示さない）。ELISA 法での抗 BLV 抗体陽性を基準とした場合の BLV プロウイルスの検出感度は、CY415 で 98.4% (312/317), RC202 で 99.4% (315/317) , CoCoMo では 99.4% (315/317) であった。HF の全血 2 検体 (No. 7 および 136) はいずれの qPCR 法も、HF の全血 3 検体 (No. 138, 283 および 293) は CY415 でのみ PVL が検出されなかった。

2 qPCR 法による全血中の PVL および BLV 感染細胞割合の比較

全血中 PVL の対数値の検定の結果、いずれの qPCR の PVL の成績も正規分布しているといえなかった ($p < 0.05$, Shapiro-Wilk 正規性検定) (表 2 および図 1 A)。CY415, RC202 および CoCoMo で測定した PVL の中央値 (25 および 75 パーセンタイル値) は、それぞれ 119.3 コピー/10 ng (15.9 コピー/10 ng, 347.0 コピー/10 ng) , 372.2 コピー/10 ng (55.1 コピー/10 ng, 1037.6 コピー/10 ng) および 658.4 コピー/10 ng (124.1 コピー/10 ng, 1681.5 コピー/10 ng) であり、これらの差は統計的に有意であった ($p < 0.05$, Friedmann 検定)。CoCoMo により測定された PVL は、CY415 または RC202 により測定されたものより有意に高く、RC202 により測定された PVL は、CY415 の測定値より有意に高かった ($p < 0.01$, Bonferroni' s 多重比較)。また、それぞれの qPCR 法による PVL の相関係数は 0.8 以上を示し、強い相関関係が認められた (Spearman の相関係数, $p < 0.001$) (図 1B~D)。

全血中の BLV 感染細胞の割合について検定の結果、いずれの qPCR の成績も正規分布しているとはいえなかった ($p < 0.05$, Shapiro-Wilk 正規性検定) (表 2 および図 2A)。CY415, RC202 および CoCoMo で決定された BLV 感染細胞の割合の中央値 (25 および 75 パーセンタイル値) は、それぞれ 3.1% (0.5%, 8.2%), 9.9% (2.1%, 26.5%), 16.9% (4.7%, 43.5%) であり、これらの差は統計的に有意であった ($p < 0.05$, Friedmann 検定)。CoCoMo で決定された BLV 感染細胞の割合は、CY415 または RC202 により決定されたものより有意に高く、RC202 により決定した BLV 感染細胞の割合は、CY415 により決定されたものより有意に高かった ($p < 0.01$, Bonferroni の多重比較)。また、それぞれの qPCR 法により測定された PVL と BLV 感染細胞の割合の相関係数は 0.95 以上を示し、強い相関関係が認められた (Spearman の相関係数, $p < 0.05$) (図 2B~D)。BLV 感染細胞の割合が 100%以上を示した検体数は、CY415 では確認されず、RC202 で 2 検体 (0.6%), CoCoMo で 14 検体 (4.4%)であった。

PVL および BLV 感染細胞の割合について、HF および JB 間で比較したところ、CY415 による全血中の PVL は HF, JB 間で有意な差は認められなかった ($p = 0.0857$, Mann-Whitney U 検定)。一方、RC202 または CoCoMo を用いた場合、HF の全血中の PVL は JB のそれより有意に高かった (それぞれ $p < 0.0001$, Mann-Whitney U 検定) (図 3A)。また、HF の全血中の BLV 感染細胞の割合は、3 種類の qPCR 法のいずれかを用いた場合、RC202 および CoCoMo でのみ JB の全血試料の割合よりも有意に高かった (CY415 : $p = 0.114$, RC202 : $p < 0.0001$, CoCoMo : $p < 0.0001$; Mann-Whitney U 検定) (図 3B)。

3 qPCR 法による腫瘍組織中の PVL および BLV 感染細胞割合の比較

腫瘍組織中の PVL の対数値の検定の結果、いずれの qPCR の PVL の成績も正規分布しているといえなかった ($p < 0.05$, Shapiro-Wilk 正規性検定) (表 3 および図 4A)。CY415, RC202 および CoCoMo による PVL の中央値 (25 および 75 パーセンタイル値) は、それぞれ 1016.2 コピー/10 ng (345.6 コピー/10 ng, 2152.8 コピー/10 ng), 2255.7 コピー/10 ng (712.2 コピー/10 ng, 4362.7 コピー/10 ng) および 2793.1 コピー/10 ng (501.6 コピー/10 ng, 6817.5 コピー/10 ng) となり、これらの差は統計的に有意であった ($p < 0.05$, Friedmann 検定)。また、RC202 または CoCoMo で測定された PVL は、CY415 によるものより有意に高かった ($p < 0.01$, Bonferroni's 多重比較)。それぞれの qPCR 法で測定された PVL 間の相関係数は 0.8 以上を示し、強い相関関係が認められたが (Spearman の相関係数, $p < 0.05$)、CY415 で測定された L17 および L26 の PVL については他の 2 種の qPCR 法と比較して用量反応関係は認められなかった (図 4B~D)。

腫瘍組織中の BLV 感染細胞の割合を検定した結果、いずれの qPCR の成績も正規分布しているといえなかった ($p < 0.05$, Shapiro-Wilk 正規性検定) (表 3 および図 5A)。CY415, RC202 および CoCoMo による BLV 感染細胞の割合の中央値 (25 および 75 パーセンタイル値) は、それぞれ 45.0% (30.4%, 76.8%), 99.0% (67.6%, 147.3%) および 122.4% (48.8%, 202.7%) であり、これらの差は統計的に有意であった ($p < 0.05$, Friedmann 検定)。CoCoMo または RC202 により決定された BLV 感染細胞の割合は、CY415 によって決定されたものより有意に高かった ($p < 0.01$, Bonferroni の多重比較)。各 qPCR 法で得られた PVL と BLV 感染細胞の割合の相関係数は 0.3691~0.8288 を示し、CY415 および RC202 では弱い相関関係、CoCoMo では強い相関関係が認められた (Spearman の相関係数, $p < 0.05$) (図 5B~D)。BLV 感染細胞の割合が 100%以上を示した検体数は、CY415

で 5 検体 (15.6%), RC202 で 16 検体 (50.0%), CoCoMo で 19 検体 (59.4%)であった。腫瘍組織 32 検体中, リンパ節組織由来は計 7 検体 (L8, L21, L27, L29-32) であり, うち 5 検体 (71.4%) がいずれの qPCR 法でも 1,000 コピー/10 ng 以上を示した (表 1, 表 4)。

4 腫瘍組織中の BLV プロウイルスの塩基配列

上述のように, RC202 または CoCoMo により測定された PVL は, C415 によるものより有意に高かった。腫瘍組織 L17 および L26 では, CY415 は他の 2 種の qPCR 法に比べ, より低い値を示した (表 4)。一方, 対照的に腫瘍組織 L1, L5 および L7 では, CoCoMo は他の 2 種の qPCR 法に比べて低い値を示した (表 4)。プライマーおよびプローブの塩基配列が公表されている CoCoMo に対して低値を示した原因を追及するため, これらの腫瘍組織中の BLV プロウイルス塩基配列を決定した。その結果, L1 および L7 では 5' -LTR の全部欠損が認められ, L5 では LTR 領域の CoCoMo リバースプライマーの 3' 末端を含む結合部位に計 8 塩基の変異が確認された (データは示さない)。

考 察

BLV の野外感染牛の全血および腫瘍組織を用いて、我が国で使用されている 3 種の市販キット、すなわち *tax* 領域を標的とするキメラプローブを採用した CY415、TaqMan プローブを採用した *pol* 領域を標的とした RC202 および LTR 領域を標的とした CoCoMo について比較した。ELISA 法の成績を基準とした感度は各 qPCR 法とも約 99%であったが、これらの qPCR 法を BLV 感染や予後の診断に使用する際には留意する点があると考えられた。

全血から抽出した DNA を用いて各 qPCR 法を実施したところ、RC202 または CoCoMo により測定された PVL は、CY415 のそれよりも有意に高く、CoCoMo で測定した PVL は、RC202 よりも有意に高いことが判明し、BLV 感染細胞の割合についても同様の成績であった。これらの違いの原因については明らかではないが、各 qPCR 法における化学物質が関係している可能性がある。Holland ら [Holland et al., 1991] によってはじめて報告された TaqMan プローブ法は、Taq DNA ポリメラーゼの 5' -ヌクレアーゼ活性を利用する。2 つの PCR プライマー間に特異的に結合する蛍光プローブは、5' 末端に蛍光色素であるレポーターが結合し、3' 末端には蛍光を消光するクエンチャーが結合している。ポリメラーゼがプローブまで伸長するとプローブが加水分解され、レポーターとクエンチャーの物理的距離が離れることでクエンチャーによるレポーターの消光が排除される。したがって、標的遺伝子の増幅は蛍光シグナルの増加として検出される。一方、Duck ら [Duck et al., 1990] によって最初に報告されたサイクリングプローブ法の重要な要素は、相補的な標的 DNA 配列にハイブリダイズする配列特異的な DNA-RNA キメラプローブである。キメラプローブが特定の標的配列に正常にハイブリダイ

ズすると、RNA-DNA ハイブリッドの RNA 鎖は RNase H によって分解され、プローブは蛍光を発する。配列特異的なプローブ設計が比較的容易であるため、この技術は一塩基多型の検出に有用であるが、配列特異性が高いがゆえに特にキメラプローブの RNA 鎖付近に変異を生じた検体を供した場合、TaqMan プローブを採用する qPCR 法よりも感度が低下する可能性がある。したがって、本研究の全血を用いた qPCR 法で CY415 により得られた PVL が他の 2 種と比較して低値を示す検体が認められた要因にはキメラプローブの配列特異性の高さが関与したことが考えられたが、究明には至らなかった。また、CoCoMo と比較して同様の TaqMan プローブを採用している RC202 の PVL が低値となる傾向が認められたが、その原因究明には至らなかった。

全血から抽出した DNA を用いた場合、各 qPCR 法で得られた PVL と BLV の感染細胞の割合に強い相関関係があることを明らかにした。したがって、感染リスク評価の指標として感染牛血中の BLV の感染細胞の割合も十分に活用可能と考えられた。ヒトにおける HTLV-1 感染では、PBMC 中の PVL は ATL の重症度と強い相関があることが証明されており、PBMC 100 個あたりの PVL、すなわち HTLV-1 の感染細胞の割合は、ATL の予後のバイオマーカーとして利用されている [Hodson et al., 2013, Iwanaga et al., 2010]。ATL については、HTLV-1 に感染した患者のうち、4.2~28.6 コピー/100 PBMC (感染細胞の割合が 4.2~28.6%) の PVL を有する患者は ATL を発症したが、PVL が約 4 コピー/100 PBMC 未満 (感染細胞の割合が 4%未満) の患者は発症しなかったことが報告されている [Iwanaga et al., 2010]。末梢血中の BLV 感染細胞の割合と EBL 発症との関係を明らかにするためにも同様の研究が必要であるが、このような調査には感度の高い RC202 または CoCoMo を採用することが有効と思われた。

今回の調査では、CY415 を使用した場合、全血中の PVL については HF および JB 間で有意差は認められなかった。対照的に、RC202 または CoCoMo を使用した場合、HF からの全血中の PVL は JB から得られた PVL よりも有意に高かった。これらの結果は、qPCR 法の選択が BLV 感染牛における PVL 分析の結果に影響を与える可能性を示している。なお、HF から得られた PVL が JB の PVL よりも高い傾向であった原因は不明であるが、Ohno ら [Ohno et al., 2015]によると CoCoMo により HF 968 頭および JB（日本短角種を含む）289 頭の PVL を比較した結果、PVL の中央値はそれぞれ 1,971 コピー/ μ L および 630 コピー/ μ L であったと報告されている。したがって、JB よりも HF では BLV 感染後に高 PVL を示す傾向が強い可能性がある。

腫瘍組織から抽出した DNA を用いた場合、3つの qPCR 法で得られた PVL はそれぞれ強い相関関係が認められた（図 4B~D）。過去の CY415 を用いた研究では、EBL と診断された 70%以上の症例で DNA 10 ng あたり 1,000 コピー以上の PVL がリンパ節組織から検出されたと報告されており [Somura et al., 2014]、今回の研究でも 71.4%が 1,000 コピー/10 ng を示し、同様の成績であった（表 1, 表 4）。BLV 感染細胞の割合の平均値および標準偏差は、CY415 では $53 \pm 36\%$ で、RC202 では $117 \pm 78\%$ 、CoCoMo では $139 \pm 104\%$ であった。興味深いことに、ATL 発症患者の HTLV-1 感染細胞の割合は $117 \pm 51\%$ と報告されており [Akbarin et al., 2013]、特に RC202 を使用した場合、ATL で研究された成績と非常に近かった。今後、EBL でも感染細胞の割合などの診断マーカーを追加することで、より正確な発症診断が可能となることが期待される。今回の研究では、全血および腫瘍組織由来の DNA いずれからも BLV 感染細胞の割合が 100%以上となる検体が認められた。BLV 感染細胞の割合が 100%を超えた原因は言及できないが、腫瘍組織由来

の DNA でより高率に確認された要因については、腫瘍形成の過程で RNase P 領域にミスマッチが生じ、本来の細胞数よりも低値を示した可能性がある。なお、本研究では BLV 感染細胞の割合は RC202 を用いて内部標準遺伝子である RNase P 遺伝子コピー数から検体中の細胞数を測定し、解析した。メーカーの定法によると、CY415 は内部標準遺伝子を用いた相対定量は想定せず、CoCoMo では内部標準遺伝子に *BoLA-DRA* 遺伝子を採用している。RNase P 遺伝子、*BoLA-DRA* 遺伝子ともに 1 細胞あたり 2 コピー存在し、特に RNase P 遺伝子は変異が少なく、HTLV-1 を含めた各種疾病検査の内部標準遺伝子に採用されていることから、各 qPCR の特性を比較した本研究への影響は限定的と考えられる。

腫瘍組織 32 検体中 3 検体 (L1, L5, L7) では他の qPCR 法と比較して CoCoMo で得られた PVL が低い結果となり、いずれの検体でも BLV プロウイルスの 5' -LTR の全部欠損または LTR 領域のリバースプライマーの 3' 末端を含む結合部位に変異が認められた。一般的にプライマーの 3' 末端は PCR における伸長反応の起点になることから、当部位のミスマッチは PCR 反応の低下を起こすとされる。また、ヒトの HTLV-1 感染では、急性型 ATL 患者の約 40%、慢性型 ATL 患者の約 6%で 5' -LTR 領域の欠損が認められており、5' -LTR 欠損を有する HTLV-1 感染患者は白血病を発症しやすいことが報告されている [Tamiya et al., 1996]。BLV 感染羊の腫瘍細胞においても LTR 領域の欠損が認められており [Willems et al., 1995]、本研究の成績から、少なくとも BLV 感染牛の腫瘍組織の検査では LTR 領域の欠損や変異が PVL 分析の支障となる可能性が示された。2つの腫瘍組織 (L17 および L26) では、CY415 で得られた PVL は、他の qPCR 法による PVL よりもはるかに低く、用量反応関係も認められなかった (表 4, 図 4)。CY415 は TaqMan プローブ法と異なり、DNA ポリメラーゼ反応に依存することなく、キメラプローブ

ブが標的遺伝子にハイブリダイズすることで RNA 鎖が RNase H により分解され、蛍光が発せられる。したがって、これら 2 検体で見られた現象は、キメラプローブの RNA 鎖結合部における変異によるものと疑われたが、CY415 プローブの塩基配列は非公表であり、この仮説の証明は困難である。HTLV-1 に感染した白血病細胞株や新鮮な ATL 細胞の *tax* 領域においてはナンセンス変異や欠損がしばしば認められている [Takeda et al., 2004]。しかし、EBL 発症牛の腫瘍細胞については、BLV プロウイルスのどの領域にどのような変異または欠損が存在しているのかはほとんど不明であり、今後の研究が期待される。なお、本研究における各 qPCR 法の標準曲線は標的領域が異なることから同一ではないものの、検査ごとの決定係数 (R^2) はすべて 0.99 以上であることを確認しており、定量の再現性は高く、解析結果に標準曲線の不安定性は影響していないものと判断した。

結論として、今回の研究では、将来的に BLV 感染牛の PVL 分析を行う上で、TaqMan プローブを採用した RC202 または CoCoMo がキメラプローブを採用した CY415 よりも検出感度が高いことが示唆された。*pol* 領域は WOH によって qPCR 法の標的として推奨されており、世界中で使用されているため [Jaworski et al., 2018, Rola-Luszczak et al., 2013]、現時点では RC202 は 国内外への牛流通に伴う確認検査では有用と思われた。今後、牛における BLV 感染や予後の診断に適した qPCR 法を選択するため、EBL 発症牛の腫瘍組織において BLV プロウイルスのどの領域が最も変異や欠損が少ないかを調査するなど、さらなる研究が必要となる。

图 表

表 1 収集した腫瘍組織の由来，腫瘍形成部位および診断名

No.	品種 * 1	腫瘍部位	診断
L1	JB	子宮	EBL
L2	JB	腎臓	EBL
L3	H	腎臓	BLV 感染 * 2
L4	H	心臓 (心耳)	EBL
L5	H	横隔膜	EBL
L6	JB	直腸周囲	EBL
L7	H	子宮頸部	EBL
L8	JB	腸間膜リンパ節	EBL
L9	JB	第二胃	EBL
L10	JB	腸間膜	EBL
L11	H	第四胃	BLV 感染 * 2
L12	JB	直腸周囲	EBL
L13	JB	第一胃漿膜上	EBL
L14	H	第四胃周囲	EBL
L15	H	第四胃	EBL
L16	H	心臓 (心耳)	EBL
L17	JB	子宮	EBL
L18	JB	第四胃	EBL
L19	UN	横隔膜	EBL
L20	JB	子宮	EBL
L21	JB	腸間膜リンパ節	EBL
L22	JB	胸腔内	EBL
L23	JB	子宮	EBL
L24	JB	第四胃	EBL
L25	JB	第四胃	EBL

L26	JB	心臓（心耳）	EBL
L27	F1	肝門リンパ節	EBL
L28	H	膀胱	EBL
L29	JB	縦隔リンパ節	EBL
L30	JB	浅頸リンパ節	EBL
L31	JB	腸骨下リンパ節	EBL
L32	JB	腸間膜リンパ節	EBL

*1 H; ホルスタイン種, JB; 黒毛和種, F1; 交雑種, UN; 不明

*2 BLV に感染しているが, 腫瘍形成の原因ではない可能性がある

表 2 3 種類の qPCR 法を用いて測定した PVL および BLV 感染細胞の割合の記述統計量 (血液 312 検体)

検査系	パーセンタイル値					Shapiro-Wilk 正規性検定 <i>p</i>
	0	25	50	75	100	
BLV PVL						
tax (CY415)	0.1	15.9	119.3	347.0	2343.7	<0.05
pol (RC202)	0.2	55.1	372.3	1037.6	5943.2	<0.05
LTR (CoCoMo)	0.2	124.1	658.4	1681.5	10713.0	<0.05
BLV 感染細胞の割合 (%)						
tax (CY415)	<0.001	0.5	3.1	8.2	47.4	<0.05
pol (RC202)	0.004	2.1	9.9	26.5	128.5	<0.05
LTR (CoCoMo)	0.003	4.7	16.9	43.5	280.4	<0.05

BLV PVL : DNA10ng あたりの BLV プロウイルスコピー数

表 3 3 種類の qPCR 法を用いて測定した PVL および BLV 感染細胞の割合の記述統計量 (腫瘍組織計 32 検体)

検査系	パーセンタイル値					Shapiro-Wilk 正規性検定 <i>p</i>
	0	25	50	75	100	
BLV PVL						
tax (CY415)	0.18	345.6	1016.2	2152.8	3511.6	<0.05
pol (RC202)	10.1	712.2	2255.7	4362.7	8338.9	<0.05
LTR (CoCoMo)	6.8	501.6	2793.1	6817.5	13845.1	<0.05
BLV 感染細胞の割合 (%)						
tax (CY415)	0.006	30.4	45.0	76.8	127.5	<0.05
pol (RC202)	0.3	67.6	99.0	147.3	331.2	<0.05
LTR (CoCoMo)	0.2	48.8	122.4	202.7	394.8	<0.05

PVL : DNA10ng あたりの BLV プロウイルスコピー数

表 4 3 種類の qPCR 法による腫瘍組織中の PVL および BLV 感染細胞の割合

No.	品 種 * 1	RNase P /10ng * 2	tax(CY415)		pol(RC202)		LTR(CoCoMo)		備考
			コ ピ ー 数 * 3	感 染 細 胞 割 合 (%) * 4	コ ピ ー 数	感 染 細 胞 割 合 (%)	コ ピ ー 数	感 染 細 胞 割 合 (%)	
L1	JB	491	104	42.150	169	68.717	72	29.313	5'-LTR 全部欠損
L2	JB	11,671	3,182	54.525	7,497	128.472	11,656	199.743	
L3	H	7,809	4	0.102	10	0.258	7	0.175	
L4	H	8,487	1,186	27.949	2,722	64.138	8,972	211.447	
L5	H	13,098	3,463	52.872	5,894	90.000	1,470	22.439	LTR プライマー 結合部位変異
L6	JB	7,819	2,350	60.112	4,181	106.955	13,541	346.352	
L7	H	391	217	111.191	598	306.226	22	11.287	5'-LTR 全部欠損
L8	JB	5,144	1,176	45.711	2,266	88.122	1,129	43.881	
L9	JB	5,204	2,437	93.669	4,139	159.088	9,082	349.037	
L10	JB	3,079	1,160	75.383	2,032	132.000	1,660	107.851	
L11	H	7,178	125	3.484	270	7.512	287	8.002	
L12	JB	7,109	1,018	28.646	2,728	76.751	3,740	105.213	
L13	JB	7,228	1,726	47.748	3,378	93.483	4,814	133.202	
L14	H	10,023	957	19.095	2,144	42.780	4,816	96.102	
L15	H	1,728	977	113.167	1,121	129.748	1,970	228.082	
L16	H	4,977	809	32.497	2,015	80.993	2,337	93.917	
L17	JB	631	0.2	0.060	424	134.334	297	94.052	Tax プライマープローブ 結合部位変異か
L18	JB	5,158	2,095	81.237	4,907	190.254	6,187	239.899	
L19	UN	3,116	482	30.926	885	56.781	773	49.586	

L20	JB	4,127	2,326	112.703	6,834	331.168	5,210	252.454	
L21	JB	2,597	431	33.193	638	49.088	310	23.871	
L22	JB	624	358	114.701	556	178.211	411	131.783	
L23	JB	5,437	1,194	43.909	2,839	104.432	4,099	150.774	
L24	JB	3,387	1,013	59.836	2,603	153.697	3,094	182.721	
L25	JB	358	79	44.213	158	88.198	157	87.863	
L26	JB	7,006	0.2	0.006	2,245	64.086	3,962	113.101	Tax プライマープローブ 結合部位変異か
L27	F1	750	309	82.471	752	200.385	532	141.782	
L28	H	5,387	3,434	127.509	7,027	260.901	10,633	394.770	
L29	JB	9,982	2,010	40.264	5,715	114.511	8,710	174.500	
L30	JB	11,489	3,512	61.128	8,339	145.159	13,845	241.009	
L31	JB	10,701	1,014	18.955	1,154	21.574	2,492	46.574	
L32	JB	14,283	2,586	36.206	5,715	80.027	10,598	148.403	

- * 1 H: ホルスタイン種, JB: 黒毛和種, F1: 交雑種, UN: 不明
- * 2 RNase P 遺伝子量は RC202 キットで測定した
- * 3 BLV のコピー数は DNA 10 ng あたりの測定値とした
- * 4 BLV 感染細胞の割合 (%) は, RC202 キットで測定した RNase P 遺伝子量から算出した

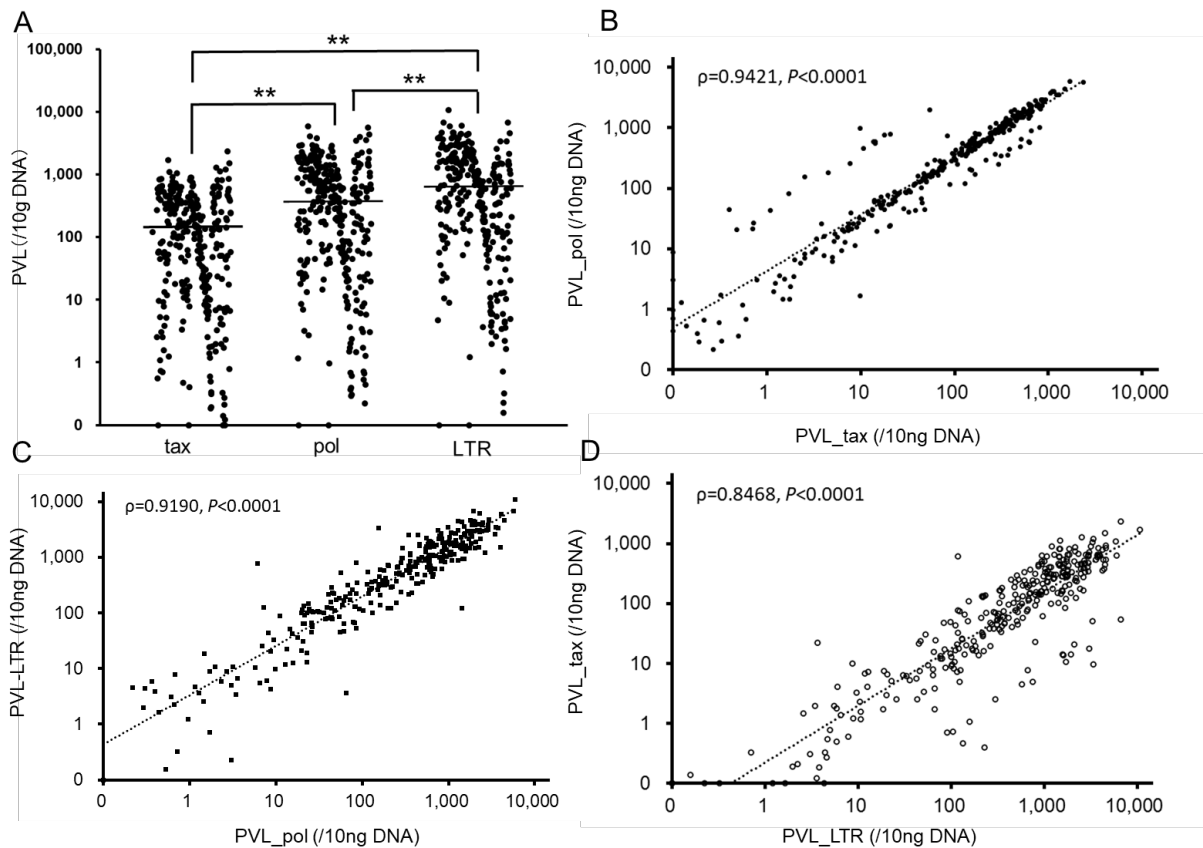


図 1 3種の qPCR 法で測定した PVL の比較（全血検体）

(A) BLV の PVL 。得られた PVL の差は、Friedmann 検定後に Bonferroni の方法で多重比較検定を実施することで評価した。グラフ中の横棒は中央値を示す (*; $p < 0.01$, **; $p < 0.005$)。

(B-D) 各 qPCR 法で得られた PVL 間の相関。グラフ中に Spearman の相関係数 (ρ) およびその値に関する有意水準 (P) を示した。グラフ中に回帰直線を示す。

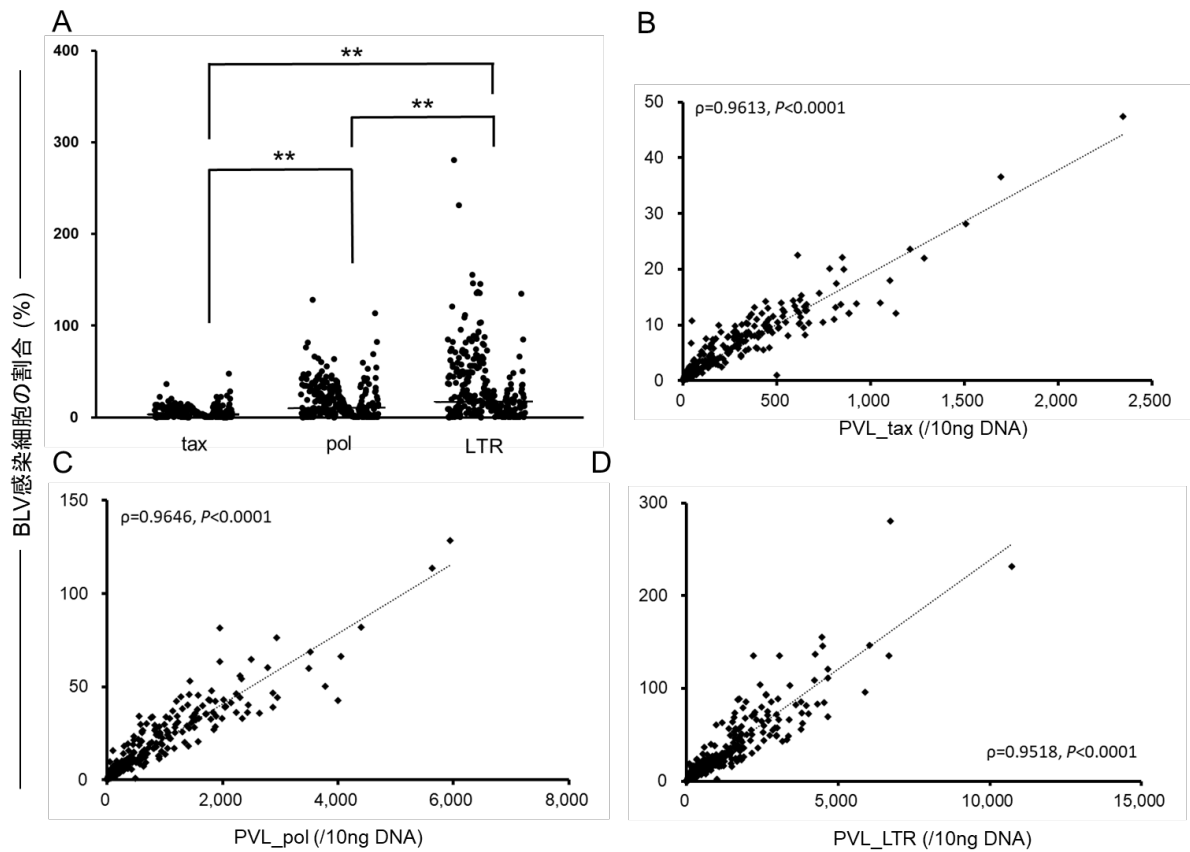


図2 3種のqPCR法で得られたBLV感染細胞の割合の比較（全血検体）

(A) BLV感染細胞の割合。得られたPVLの差は、Friedmann検定後にBonferroniの方法で多重比較検定を実施することで評価した。グラフ中の横棒は中央値を示す（*； $p<0.01$ ，**； $p<0.005$ ）。

(B-D) 各qPCR法で得られたPVLとBLV感染細胞の割合の相関。グラフ中にSpearmanの相関係数（ ρ ）およびその値に関する有意水準（P）を示した。グラフ中に回帰直線を示す。

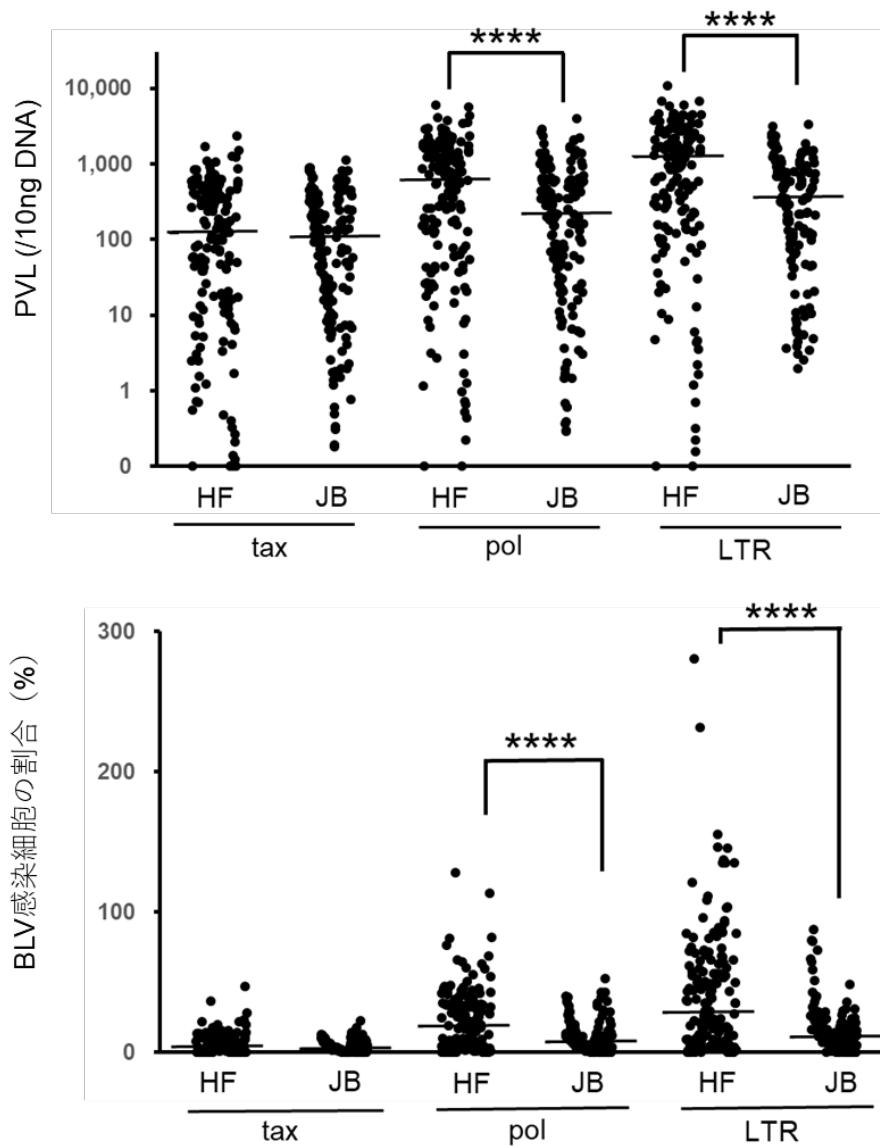


図3 ホルスタイン種 (HF) 牛と黒毛和種 (JB) 牛の PVL および BLV 感染細胞の割合の比較 (全血検体)

(A) 3種の qPCR 法で測定した BLV の PVL。 (B) 3種の qPCR 法で測定した BLV 感染細胞の割合。それぞれ品種間で得られた値の差は、Mann-Whitney U 検定を用いて評価した (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$, ****; $p < 0.0001$)。グラフ中の横棒は中央値を示す。

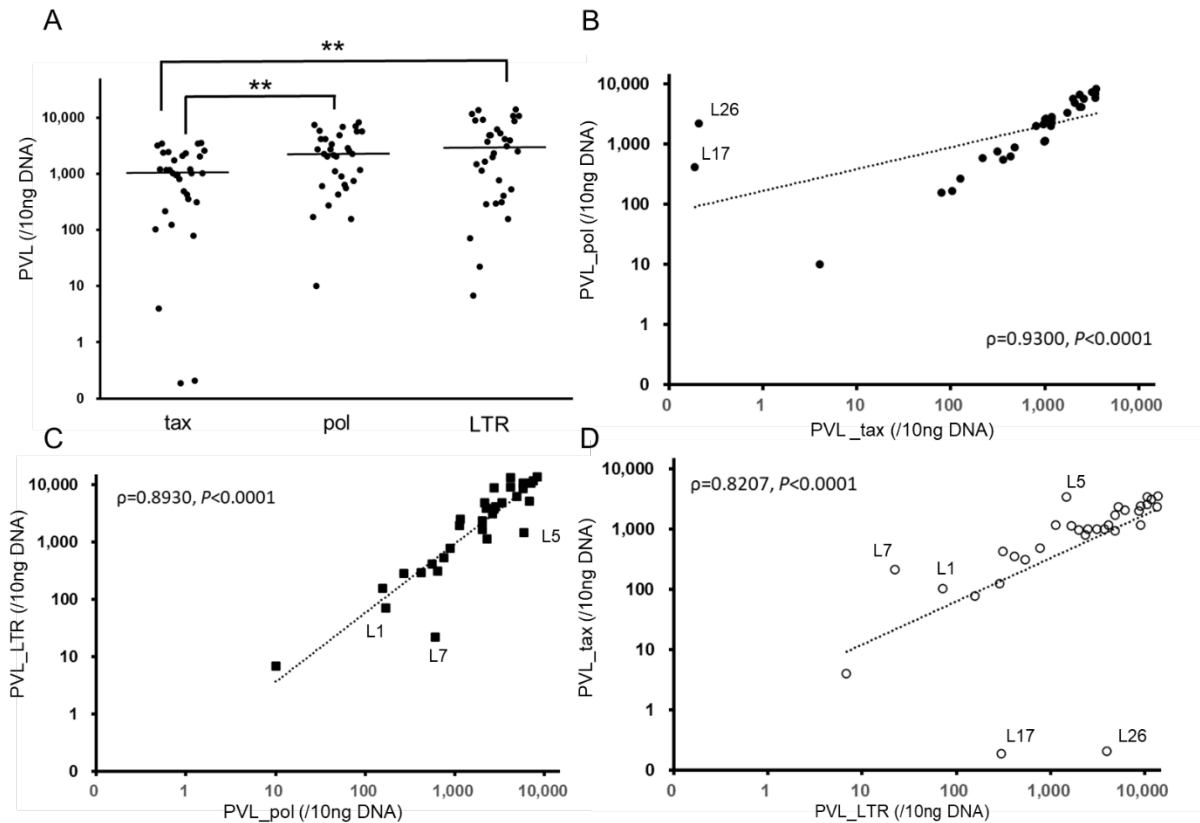


図 4 3種の qPCR 法で測定した PVL の比較（腫瘍組織）

(A) BLV の PVL 。得られた PVL の差は、Friedmann 検定後に Bonferroni の方法で多重比較検定を実施することで評価した。グラフ中の横棒は中央値を示す (*; $p < 0.01$, **; $p < 0.005$)。

(B-D) 各 qPCR 法で得られた PVL 間の相関。グラフには Spearman の相関係数 (ρ) およびその値に関する有意水準 (P) を示した。グラフ中に回帰直線を示す。L1, L5, L7 は他の 2 種と比較して CoCoMo で低値となり、L17 および L26 は他の 2 種と比較して CY415 で低値となった検体番号を示す。

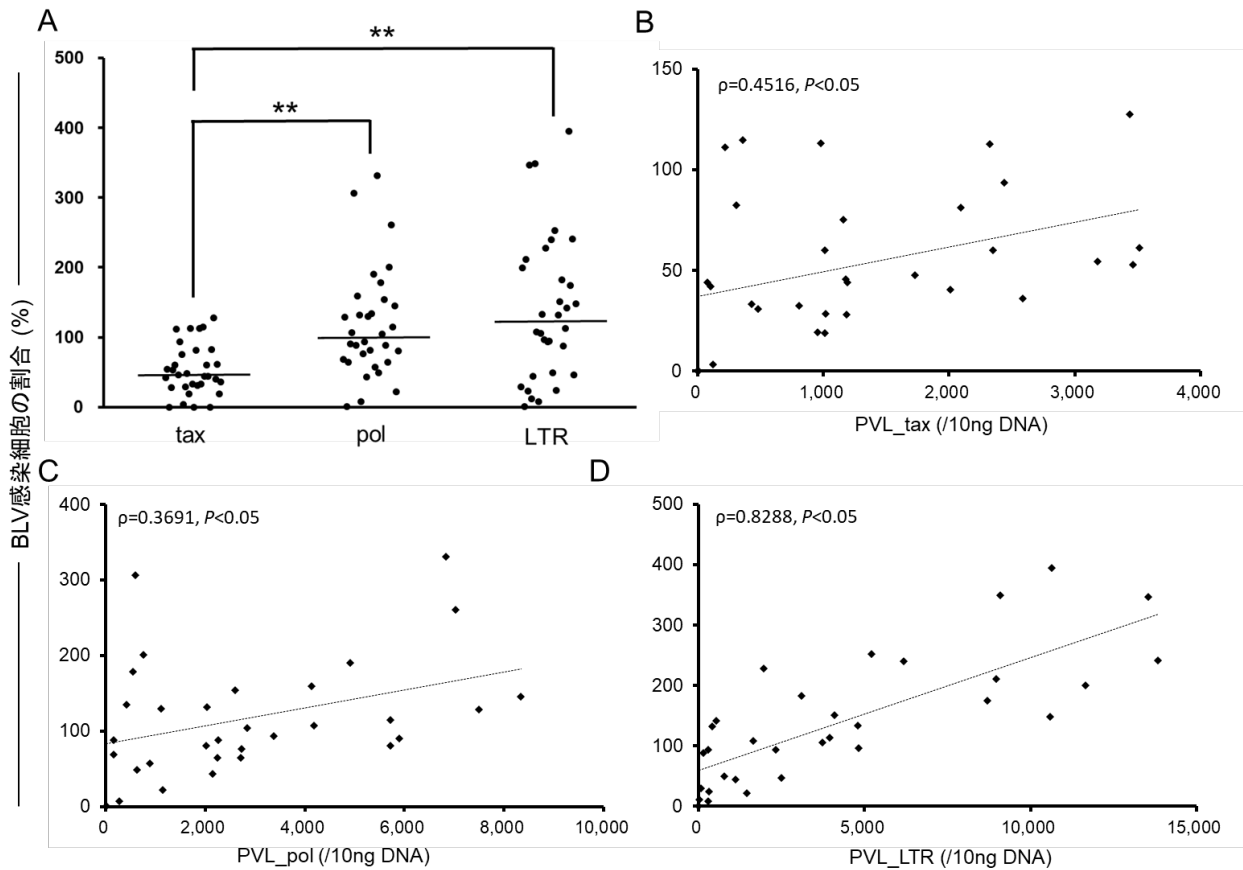


図5 3種のqPCR法で得られたBLV感染細胞の割合の比較（腫瘍組織）

(A) BLV感染細胞の割合。得られた値間の差は、Friedmann検定後にBonferroniの方法で多重比較検定を実施することで評価した。グラフ中の横棒は中央値を示す(*; $p < 0.01$, **; $p < 0.005$)。

(B-D) 各qPCR法で得られたPVLとBLVの感染細胞の割合との相関関係。Spearmanの相関係数(ρ)およびその値に関する有意水準(P)をグラフに示した。グラフ中に回帰直線を示す。

第 2 章

血液中 BLV プロウイルス量を指標とした高度感染酪農場における
BLV 清浄化対策に関する研究

序 論

我が国でも EBL の清浄化を達成した農場は数が少ないながらも報告されている。中でも Oshima ら [Ohshima et al., 1988] の報告では搾乳牛 500 頭を飼養する酪農経営において、BLV 感染率 84.1% から 5 年後に清浄化を達成している。当該農場では、約 1.5 km 離れた牛舎に抗体陰性牛を集約させ、感染牛と非感染牛を完全分離したことで早期清浄化に成功した例であり、現状、すべての農場で同様の対策を実施することは現実的ではない。また、国が公表している畜産統計調査（2022 年 2 月現在）（URL：<https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tikusan/>）によると、全国の酪農経営の約 13,000 戸のうち、飼養頭数 50 頭未満の農場が占める割合は約 54% であり、その大多数が小規模のつなぎ飼い牛舎と推定される。したがって、国内の BLV 対策を一層推進させるためにはこれら小規模酪農経営での効率的な清浄化モデルを構築することが求められている。そこで、つなぎ牛舎で飼養する搾乳牛の 82.8% が感染牛と判定された高度感染農場である酪農経営において、qPCR 法と *BoLA-DRB3* タイピングを活用して全感染牛の BLV 伝播リスクを推定し、各種感染防止対策を展開することで効率的かつ経済的負担の少ない清浄化プログラムの構築を目指した。

材料および方法

1 農場の概要

当該農場は、栃木県東部にて搾乳牛 30 頭，子牛および育成牛 20 頭程度を飼養する酪農経営で，搾乳牛は対頭式つなぎ牛舎，子牛は子牛ペン，育成牛は育成舎で飼養されていた（図 1）。また，農場内にはパドックがあり，搾乳牛を毎日夕刻に放牧していた。当該農場では 2014 年 11 月の検査で一部の搾乳牛 10 頭のうち，7 頭が抗体陽性を示したことから，農場主と協議し，年 2～3 回の全頭検査を行いながら清浄化を目指すこととした。

2 材料および検査方法

2015 年 7 月～2020 年 5 月にかけて，実頭数 97 頭延べ 396 検体の血液を採取し，これらについて Konishi ら [Konishi et al., 2018] の報告に準じて BLV プロウイルスの *tax* 領域を標的とした qPCR 法を実施し，血中 PVL を DNA 10 ng あたりのコピー数として算出した。また，抗体検査は ELISA 法（ニッポンジーン，東京）により実施し，血球計算は全自動血球計数機（Celltac Alpha MEK-6450，日本光電工業，東京）により行った。調査期間中，前回の検査成績で非感染牛と判定された牛のうち，プロウイルス遺伝子または BLV 抗体が新たに検出された個体を陽転と判定した。また，感染牛の BLV 伝播リスクは PVL に基づき，DNA 10 ng あたり 1,000 コピー以上の個体を感染高リスク牛，50 コピー未満を感染低リスク牛，それ以外を感染中リスク牛と定義した。さらに，2017 年以降の全飼養牛計 77 頭について，PCR-Sequence based typing 法により *BoLA-DRB3* 対立遺伝子（アレル）を決定し [Takeshima et al., 2011]，ホルスタイン種の PVL を低

下させると報告されている *DRB3*009:02* または *DRB3*014:01:01* [Bai et al., 2021, Lo et al., 2020, Takeshima et al., 2019]を保有している感染低リスク牛を抵抗性牛と定義した。搾乳牛の年間更新率は、毎年1月1日時点の搾乳牛頭数に対して1年間で廃用とした搾乳牛頭数の割合 (%) として算出した。搾乳牛の完全分離飼育を開始した2017年前後における農場の陽転率と感染率の推移を比較した。また、新生子牛の検査で感染子牛または非感染子牛と判定された各群の検査日齢の差および各群の母牛の平均PVLの差についてはMann-Whitney U検定を実施し、評価した。

3 実証試験

感染高リスク牛を優先しつつ、供用年数や生産性を考慮しながら定期的に感染牛を更新することとした。また、自家産子牛により牛群規模を維持しつつ、BLVの子宮内感染による農場内まん延防止を目的として、後継牛は原則として非感染牛に対する雌の性選別精液を用いた人工授精によって得ることとし、2017年以降は完全にこの手法に移行した。子牛への感染防止対策として、未処理の初乳から市販製剤の給与に切り替え、感染子牛は新設した飼養区画（子牛ペン2）にて飼養した（図1）。すべての非感染子牛は、BLV抗体陰性が入牧条件である公共牧場に預託した。搾乳牛での感染防止対策として、2017年春から農場内パドックでの搾乳牛の放牧を完全に中止するとともに、搾乳牛舎内では感染牛区域と非感染牛区域を設定し、その境界には抵抗性牛を配置した。感染牛の更新が進み、抵抗性牛が不在となって以降は、抵抗性アリル *DRB3*009:02* を保有した非感染牛を境界に配置した。吸血昆虫対策では、6～10月末に出入口を除く搾乳牛舎周囲に防虫ネット（網目2～4mm）を設置し、ネットには定期的にピレスロイド系殺虫剤

(ペルメトリン乳剤「フジタ」，フジタ製薬，東京) の 400 倍希釈液を動力噴霧器で噴霧した。さらに，サシバエ捕獲装置（モウ安心，サンパック，鳥取）を搾乳牛舎内およびカーフペン付近に設置した。

結 果

2015年10月～2020年5月にかけて、食肉処理場への出荷頭数は、非感染牛13頭に対して感染牛33頭で、特に2016～2019年の4年間に感染牛31頭を更新した。2015年7月に感染高リスクと判定された12頭のうち、8頭は2016年末までに優先的に更新し、3頭は出荷前に死亡した。搾乳牛の年間更新率は2017年に30%を超え、2019年は41.4%であった（表1）。なお、調査期間中にEBL発症牛は認められなかった。

子牛の検査では、2015年10月から2020年1月にかけて45頭中5頭（11.1%）が感染牛と判定された。そのうち、非感染母牛から出生した34頭はすべて非感染牛であったのに対し、感染母牛から出生した11頭では5頭（45.5%）が感染牛と判定された（表2）。感染子牛と非感染子牛を娩出した母牛の平均PVLを比較したところ、平均PVLはそれぞれ2363.2コピー、496.8コピーを示したが、両者間に有意差は認められなかった（図2A）。一方、感染子牛と非感染子牛で検査時の日齢を比較したところ、感染牛では検査時の日齢が高い傾向が認められた（図2B）。なお、非感染母牛が増加したため、2017年以降は非感染牛のみから後継牛を作出した結果、2018年以降に出生した子牛で子宮内感染や産道感染を疑う個体は確認されず、2017年からの3年間で計25頭の非感染後継牛を確保した。

2017年から実施した*BoLA-DRB3* タイピングでは、感染牛29頭のアリルを決定し、そのうち、複数回PVL測定を実施した26頭における各アリルの検出状況を表3に示した。特に抵抗性アリルとして知られる*DRB3*009:02*を保有する1個体ではPVLは著しく低く、リンパ球数も低い傾向であった。同じく抵抗性アリルと

される *DRB3*014:01:01* を保有する 6 個体では平均 PVL が 5,000 以上の個体も確認された。一方, *DRB3*012:01*, *DRB3*015:01* を保有するすべての個体の平均 PVL は 1,000 コピー以上を示した (表 3)。

搾乳牛舎では, 2015 年の越夏後の 10 月の検査で 3 頭の陽転牛が確認され, 搾乳牛の感染率は 82.8%となった。陽転牛 a は感染高リスク牛 A, 陽転牛 b は感染高リスク牛 B と隣接しており, 陽転牛 c は 2015 年 8 月まで感染高リスク牛 C と, その後は陽転牛 b と隣接していた (図 3)。2016 年の越夏後の 11 月の検査では 3 頭の陽転牛が認められたが, 感染牛の更新が進み, 感染率は 70.4%まで低下した。陽転牛 d は感染高リスク牛 D, 陽転牛 f は感染低リスク牛 F と隣接し, 陽転牛 e は 2016 年 9 月まで感染高リスク牛 E と, その後は非感染牛と隣接していた (図 4)。2017 年の 5 月に搾乳牛舎内で感染牛と非感染牛の飼養区域を完全に分離するとともに, その境界に抵抗性牛 (*DRB3*009:02* を保有する BLV 感染牛) を配置したところ, 越夏後の 10 月に感染牛 1 頭を確認した (図 5)。陽転牛 g の検査成績は, qPCR 法で BLV プロウイルスが検出され, ELISA 法は陰性であった。聞き取り調査の結果, 感染牛 G は起立困難となり, 出荷までに起立不能になることを避けるため, 9 月 28 日~10 月 4 日にかけて牛舎内で放し飼いしていたことが判明した。また, この感染牛 G は頻繁に非感染牛区域に侵入し, 陽転牛 g に隣接した空房に侵入していたことが目撃されていた。2018 年には陽転は認められず, 感染率は 30.8%まで低下した (図 6)。2019 年 12 月には, これまで確認された感染牛の出荷がすべて終了し, 清浄化を目前にした検査にて 1 頭の陽転が確認された (図 7)。当該農場はパイプラインミルクユニット 5 機で搾乳しており, 8~10 月にかけて陽転牛 h を搾乳するユニットは直前に感染牛 H を搾乳していた。同ユニットは他に 3 頭の乳用牛を搾乳していたが, いずれも非感染牛であった。

また、当時、感染牛 H は生乳中に凝固物が生じており、乳房炎を疑う症状を呈していた。なお、同時期に乳房炎を治療中または乳房炎を疑う搾乳牛は確認されていない。

2015 年 11 月から 2020 年 1 月にかけて非感染子牛 44 頭を BLV 抗体陰性が入牧条件である公共牧場に預託し、預託終了後の遺伝子検査ですべて非感染牛であることを確認した。

搾乳牛の完全分離飼育を開始した 2017 年以降、搾乳牛舎における陽転率は 0～7.7%で推移し、分離飼育前の 33.3～42.9%と比較して大きく低減した（表 4）。従来からの感染牛の計画的な更新に加え、非感染牛からの後継牛確保やパドック放牧中止等、取組が強化された 2017 年以降、感染率はさらに顕著に低下し続け、子牛および育成牛では 2018 年 11 月に感染育成牛を処分して感染牛は 0 頭となり、搾乳牛においても 2020 年 5 月に最後の感染牛の出荷が終了し、同月 27 日の全頭検査にて清浄化達成を確認した（図 8）。

考 察

当該農場では 2015 年 10 月に搾乳牛の BLV 感染率が 82.8%を示したが、約 4 年半にわたる対策の結果、清浄化を達成した。その要因の一つとして、夏季の陽転を示唆する越夏後の検査で判明した各新規感染の原因の早期特定により、新たな対策を早急に展開したことが挙げられる。例えば、2015 年および 2016 年に陽転した計 6 頭の搾乳牛のうち、5 頭は感染高リスク牛との隣接歴があったが、2016 年に陽転した 1 頭は感染低リスク牛のみに隣接しており、パドック放牧時の感染が疑われ、2017 年春に放牧中止を決定した。また、2017 年、搾乳牛舎で感染牛と非感染牛の飼養区域を完全に分離し、境界に抵抗性牛を配置したにも関わらず、陽転した 1 頭は牛舎内で 1 週間程度放し飼いした感染牛から感染を受けたものと推測され、以降は感染牛の非感染牛区域への侵入禁止を徹底した。さらに、2018 年には搾乳ミルカーを介した感染が疑われたことから、速やかに感染牛の搾乳順を最後とする方針とした。なお、搾乳ミルカーを介した感染は、ライナースリップや過搾乳による乳頭損傷が原因で発生すると考えられているが、野外における感染成立の実証例はない。今回の症例では 2017 年以降は感染牛の移動禁止を徹底しており、牛舎内の感染牛の配置や感染時期における搾乳順から、搾乳ミルカーを介した感染が最も疑われると判断した。

当該農場では取組初期から子宮内感染による感染子牛の増加を危惧し、雌の性選別精液を活用することで、原則として非感染牛から後継牛を確保する方針とした。2017 年 12 月までに感染母牛から出生した子牛の 45.5%が感染牛と判定され、感染子牛を娩出した母牛は PVL が高値である傾向が認められた。しかし、感染子牛の検査は 31～55 日齢で実施しており、非感染子牛の検査日齢よりも有意に高

いことから、生年月日の近い感染子牛から水平感染を受けた可能性は否定できない。なお、当該農場では生後 0 日齢で母子分離を実施しており、非感染母牛から出生した子牛 34 頭はその後の検査でも感染は認められていない。子宮内感染や産道感染の頻度は感染母牛の PVL と関連があるとされ[Mekata et al., 2015], 感染母牛の PVL が DNA 10 ng あたり 400 コピー未満で 9.4%, 400 コピー以上で 48.2%と報告されている。したがって、複数頭の高 PVL 牛が存在する高度感染農場では、感染母牛の子宮内もしくは産道で感染した子牛が清浄化対策を長期化させる大きな要因となる。2017 年以降、当該農場では非感染牛のみから後継牛を作出しており、2018 年以降の出生子牛に子宮内感染および産道感染を疑う例は確認されず、2017～2019 年の 3 年間に多くの非感染後継牛を確保することができた。

また、感染子牛と非感染子牛を飼養する区画を完全に分け、すべての非感染子牛については 6～8 ヶ月齢で非感染牛のみ飼養される牧場に預託することで子牛の感染を防ぐことができた。農林水産省が公表したガイドラインでは育成パドックでも感染牛を分離飼育することを推奨しているが、労力や経費を考慮すると、入牧前後に BLV 検査を実施するなど、徹底した対策を実施している公共牧場等に子牛を預託することも有用と思われた。非感染後継牛を確保したこれらの取組効果を明示することにより、搾乳牛の完全分離飼育やパドック利用の中止等、労力が大きく作業効率も低下する対策の導入が促進されたものと考えられた。

当該農場では 2016～2020 年にかけて計 33 頭の感染牛を淘汰し、特に 2016 年末までに感染高リスクと判定された牛 8 頭を優先的に更新した。このことは、搾乳牛舎内における陽転率の低減だけでなく、着実な非感染後継牛の確保にも寄与したものと考えられた。なお、2018 年以降に淘汰した感染牛 16 頭のうち 8 頭については農林水産省の補助（家畜生産農場衛生対策事業）を受けて更新した。

BLV 感染牛更新に伴う経済的負担を軽減させるため、今後も公共の経済的支援を継続していくことが重要と考えられた。

吸血昆虫対策では、2015 年夏季からサシバエの侵入防止のため網目 2 mm の防虫ネットを設置したが、牛舎内気温が上昇し、暑熱被害の恐れもあることから、翌年から網目 4 mm のネットに変更した。網目が大きくなったため、牛舎内へのサシバエ侵入も確認されたが、2016 年夏季から市販の捕獲装置を設置したところ、搾乳牛のサシバエの忌避行動である挙脚回数が減少し、捕獲装置の設置も効果があると考えられた。

つなぎ飼育牛舎では感染牛に隣接した牛の新規感染リスクが有意に高いことが報告されており [Kobayashi et al., 2015]、高または中程度の感染牛が存在する牛群での感染率を低減させるには、感染牛と非感染牛を分離飼育することが有効と考えられている。今回の調査でも高 PVL 牛に隣接した牛で新規感染が頻発した。感染牛の放し飼いや搾乳ミルカーを介したと考えられる新規感染例を除き、感染牛と隣接していない牛の陽転は認められなかったことから、少なくとも分離飼育は早期清浄化に有効な手法と思われた。

BLV 感染牛の PVL を制御する宿主因子として、BoLA クラス II 遺伝子型の関与が提言され、これまでに *BoLA-DRB3* 遺伝子には 384 種のアリルが報告されている [Bai et al., 2021]。PVL が低値に維持されることに関連するとされる抵抗性アリル *DRB3*009:02* および *DRB3*014:01:01* [Bai et al., 2021, Borjigin et al., 2021, Carignano et al., 2017, Hayashi et al., 2017, Juliarena et al., 2016, Juliarena et al., 2008, Lo et al., 2020, Miyasaka et al., 2013] のうち、*DRB3*009:02* を保有する感染牛は今回 1 頭のみ同定され、既報のとおりきわめて低い PVL で推移した。一方、*DRB3*014:01:01* を保有する 6 頭の感

染牛では平均 PVL が 5,000 コピーを超える個体も確認され、抵抗性アリルとしての強度は *DRB3*009:02* よりも低いものと思われた。また、PVL の高値での維持に関連するとされる *DRB3*012:01* または *DRB3*015:01* [Takeshima et al., 2019], すなわち感受性アリルを保有していた 7 頭の感染牛は、いずれも高い PVL で推移した。BLV の感染伝播リスクは感染牛の PVL 測定のみでも推定可能である。ただし、PVL が低い感染牛であっても、*BoLA-DRB3* の感受性アリルを保有している場合、将来高値に移行する可能性がある。したがって、PVL が高くない感染牛の感受性アリル保有状況の把握は、将来的な感染高リスク牛の見逃しの低減につながる可能性がある。一方、非感染牛についても *BoLA-DRB3* タイピングを把握し、感受性アリルを保有する牛に対しては感染防御対策を強化することにより、その後の感染高リスク牛の出現機会を低減できる可能性がある。

今回、吸血昆虫対策として牛舎等に防虫ネットやサシバエ捕獲装置を設置した効果は、設置前の陽転率が不明であることからその有効性は検証できなかった。また、搾乳牛舎における抵抗性牛の生物学的防壁としての評価についても、感染牛と非感染牛の境界には同時に空房を設けたことから、防壁としての強度や有効性は評価困難であった。

BLV 清浄化を達成するには、農林水産省のガイドラインで示されているとおり、飼養形態や経営状況に応じて中長期的な視点に立って計画的に対策を講じていく必要がある。今回の研究から、BLV の高度感染農場であるつなぎ飼い牛舎では、子宮内感染あるいは産道感染が高頻度に発生する高 PVL 牛から後継牛確保を避けること、徐々に非感染母牛のみから後継牛をとる方針へ移行すること、感染牛と非感染牛の隣接を避けること、子牛の育成を非感染牛のみの預託農場で行うこと、吸血昆虫対策などを総合的に実施することにより本病の清浄化は十分に可能

と考えられた。

图 表

表1 当該農場の出荷および死亡頭数並びに更新率の推移

感染牛/ 非感染牛	出荷/死亡	年					計	
		2015*	2016	2017	2018	2019		2020
感染牛	出荷頭数	1(1)	7(7)	9(3)	7(2)	8(3)	1(0)	33
	死亡頭数	2(0)	3(2)	0	2(2)	0	0	7
非感染牛	出荷頭数	0	0	0	1	4	8	13
	死亡頭数	0	0	1	1	1	0	3
更新率(%)		—	22.6	31.0	29.6	41.4	39.1	—

* 2015年は10月1日以降の実績 ()内は感染高リスク牛の頭数を示す

表 2 BLV 感染母牛から出生した子牛の感染状況

No.	母牛の平均 PVL (/10 ng DNA)	子牛		
		生年月日	検査日齢	感染状況
1	170	2015/10/3	24	—
2	444	2015/10/10	17	—
3	24	2016/1/3	3	—
4	617	2016/11/17	4	—
5	1, 157	2016/11/28	56	+
6	24	2017/1/20	39	+
7	1, 725	2017/1/25	34	—
8	444	2017/1/28	31	+
9	1	2017/4/28	10	—
10	4, 867	2017/11/28	51	+
11	5, 324	2017/12/14	35	+

表 3 感染牛*の *BoLA-DRB3* アリル検出状況と PVL およびリンパ球数の傾向

<i>BoLA-DRB3</i> アリル	保有頭数	保有率 (%)	上段 下段 (最小値~最大値)	平均 PVL 平均リンパ球数 (×100/μl)
009:02	1	3.8	1	38.7
010:01	6	23.1	1,738 (170~5,324)	61.0
027:03	4	15.4	1,903 (617~4,148)	50.2
014:01:01	6	23.1	2,454 (1~5,324)	50.3
011:01	11	42.3	2,699 (170~6,337)	65.6
001:01	11	42.3	3,682 (24~8,835)	71.4
012:01	2	7.7	5,959 (4,867~7,051)	79.0
015:01	5	19.2	6,498 (1,725~8,731)	93.5

* 感染牛 29 頭のうち、PVL を 2 回以上測定した 26 頭

表 4 搾乳牛舎での陽転率の推移

	搾乳牛舎での完全分離飼育の実施				
	×	×	○	○	○
年	2015	2016	2017	2018	2019
陽転率 (%)	42.9	33.3	7.7	0	4.3

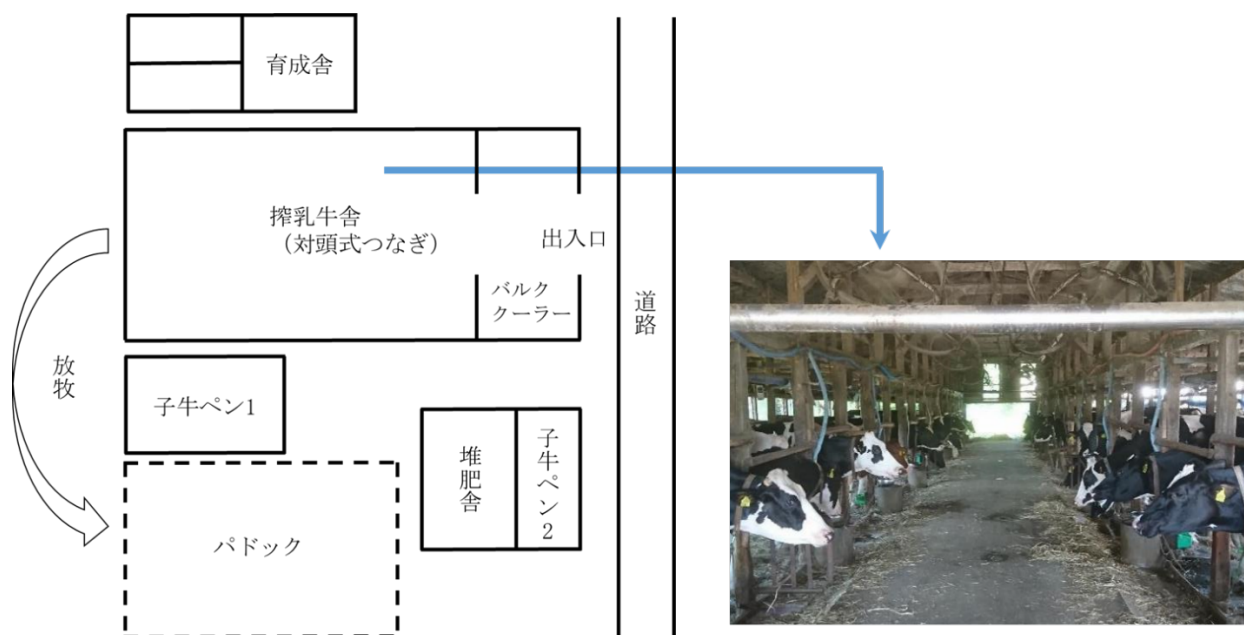


図1 農場の概要

感染子牛はすべて子牛ペン2にて飼養し、非感染子牛との接触を防止した。

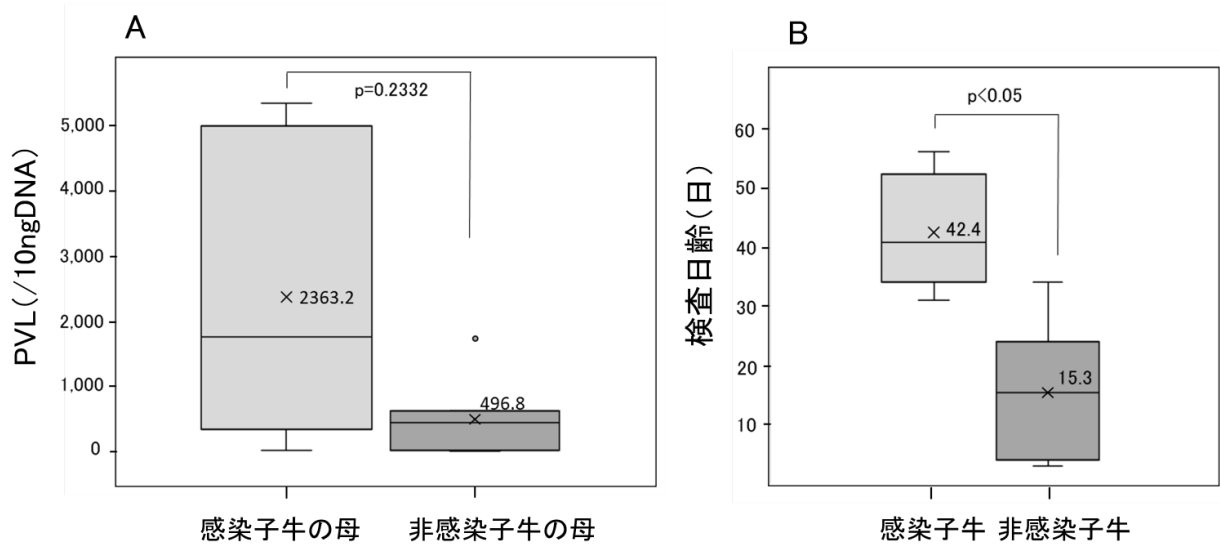
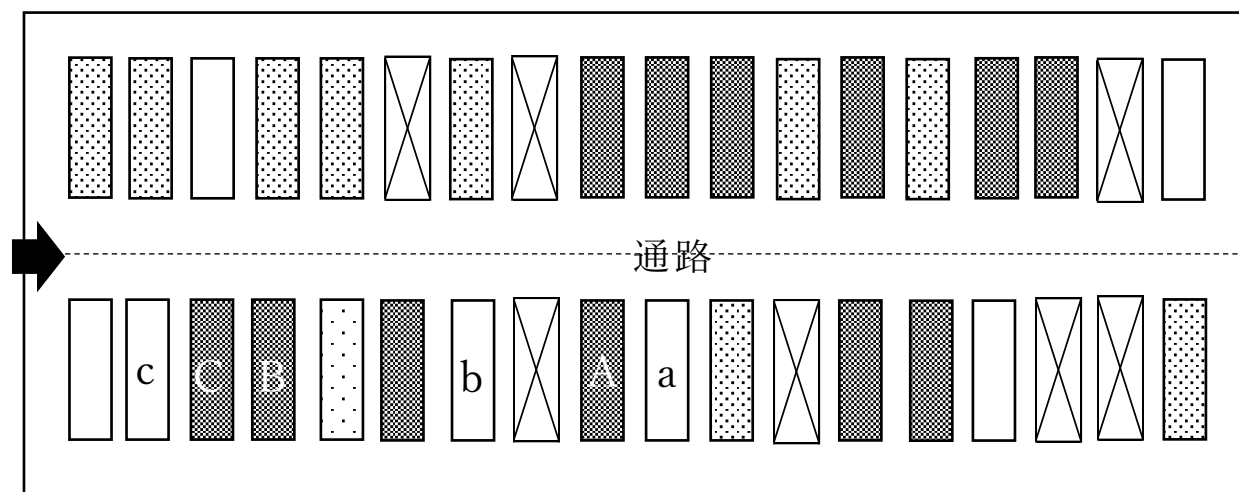


図 2 出生子牛検査成績

- (A) Mann-Whitney U 検定により感染子牛の母牛と非感染子牛の母牛における PVL の差を評価した ($p = 0.2332$)。
- (B) Mann-Whitney U 検定により感染子牛と非感染子牛の検査日齢の差を評価した ($p < 0.05$)。

(A) 2015/7/1



(B) 2015/10/27

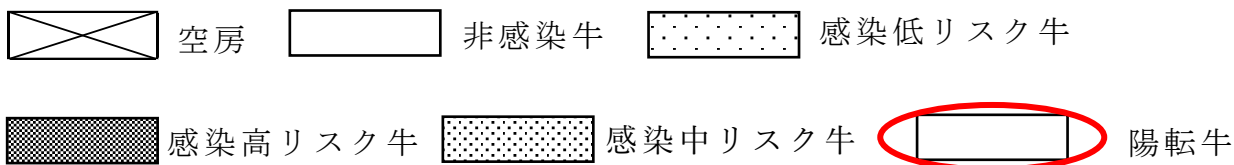
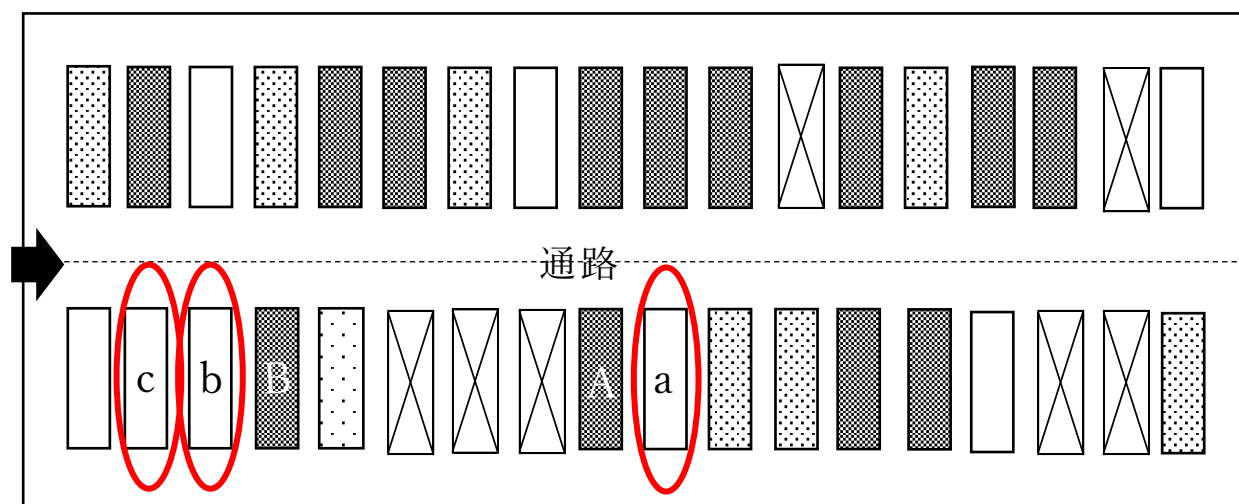
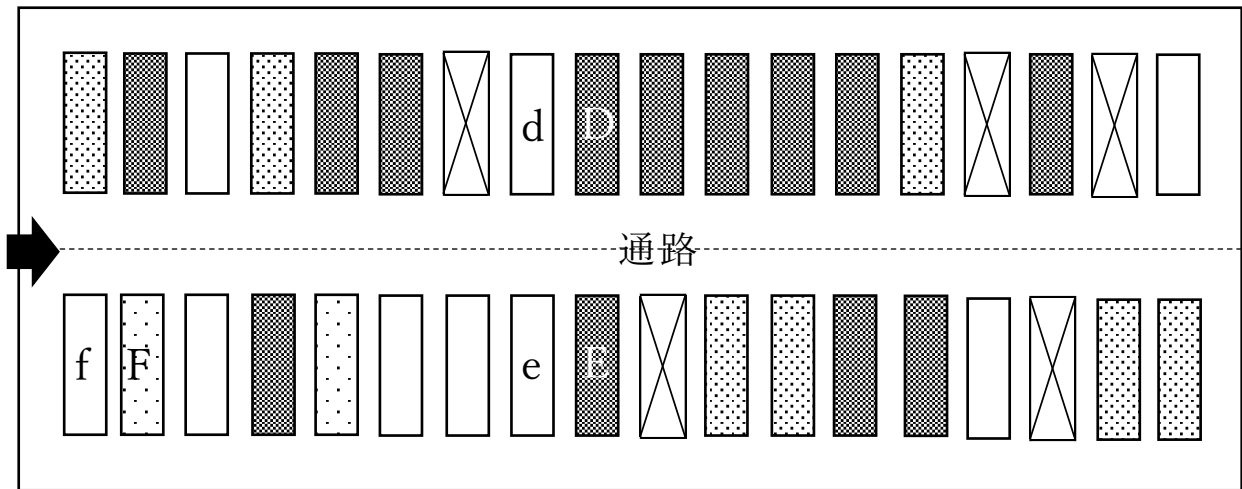


図 3 2015 年における搾乳牛の感染動態

陽転牛 3 頭 (a~c) はいずれも感染高リスク牛 (A~C) に隣接していた。

(A) 2016/5/26



(B) 2016/11/21

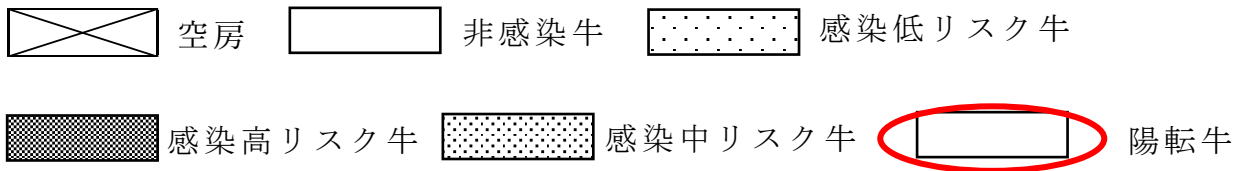
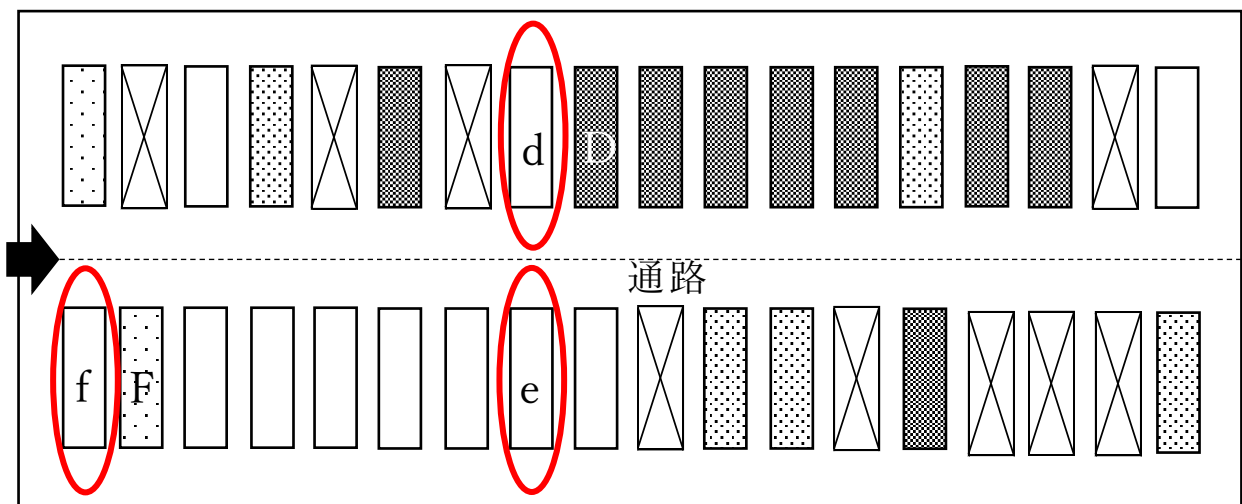
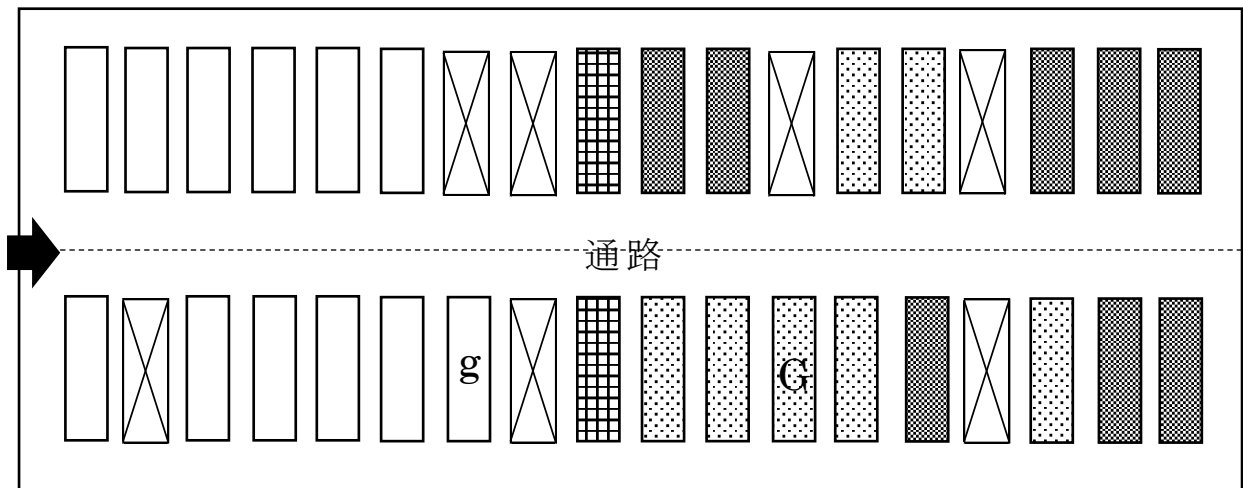


図 4 2016 年における搾乳牛の感染動態

陽転牛 2 頭 (d, e) はいずれも感染高リスク牛 (D, E) に隣接していた。陽転牛 f は、感染低リスク牛 (F) のみと隣接歴があり、パドック内感染が疑われた。

(A) 2017/5/21



(B) 2017/10/10

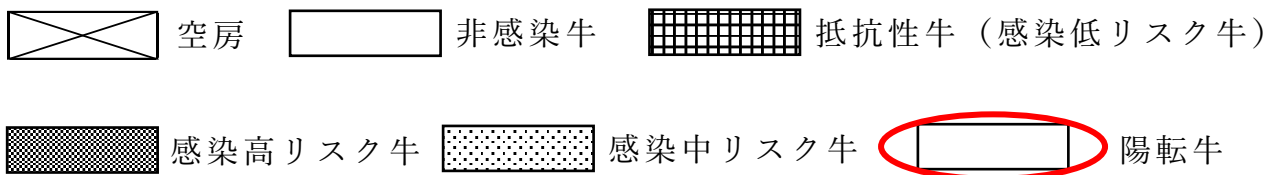
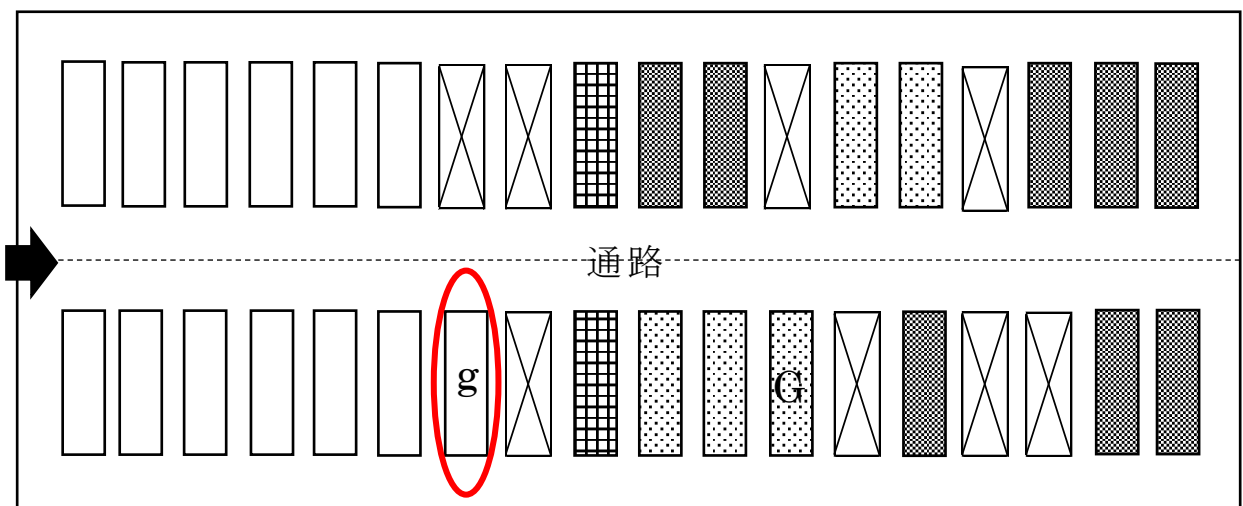
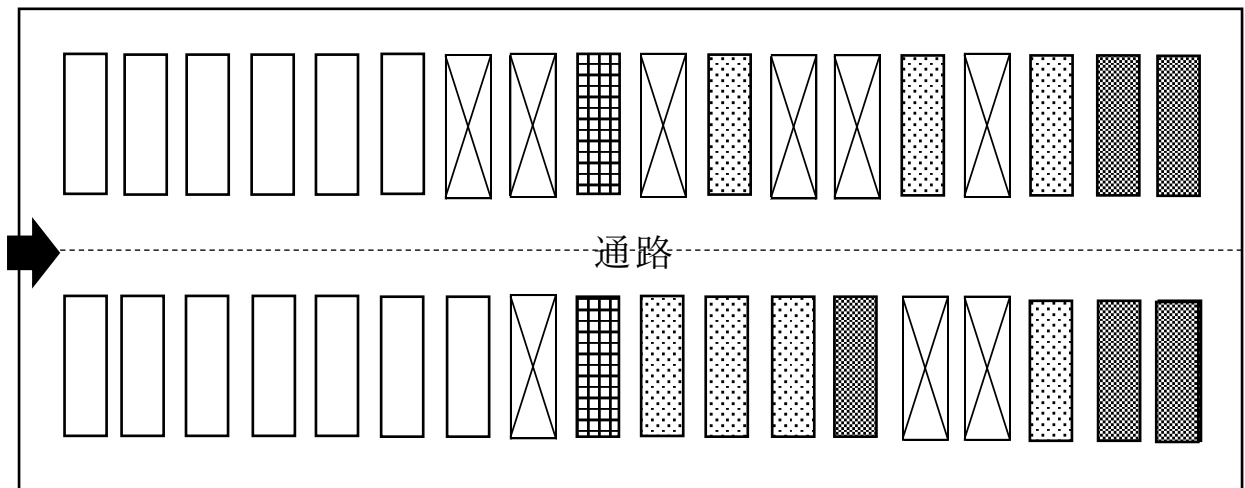


図 5 2017 年における搾乳牛の感染動態

陽転牛 g は、陽転確認直前に感染牛 G を放し飼いにしたことによる陽転と推測された。

(A) 2018/4/17



(B) 2018/11/12

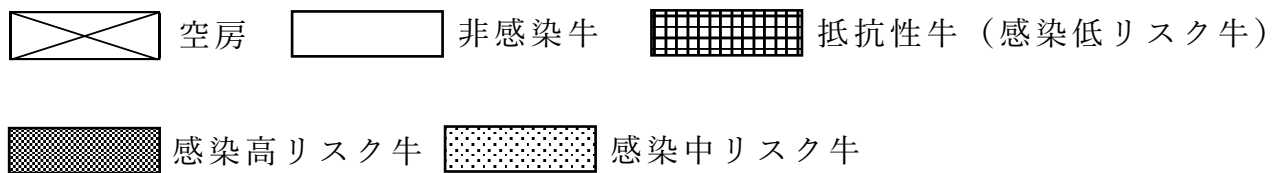
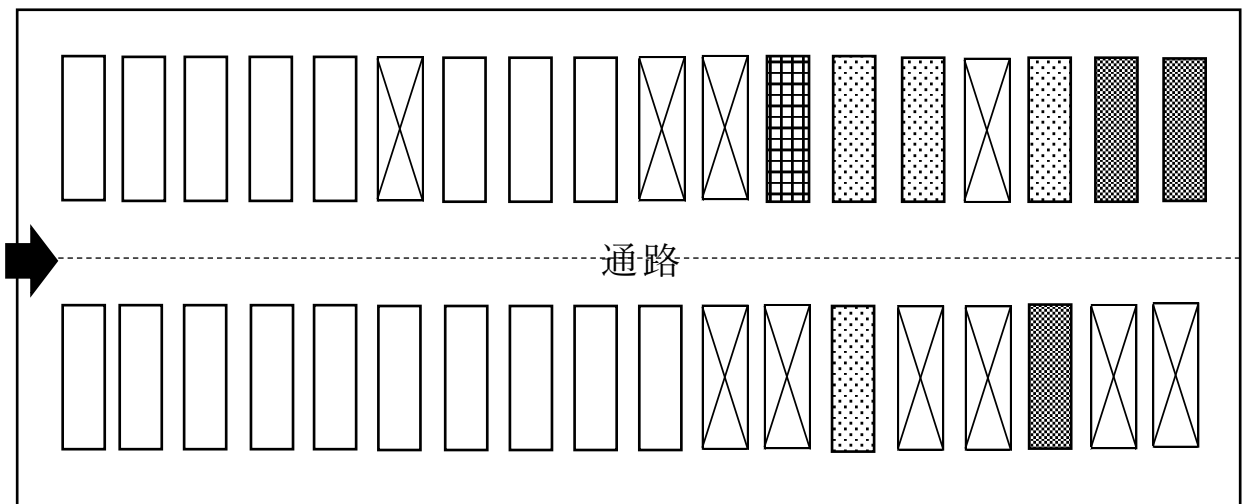
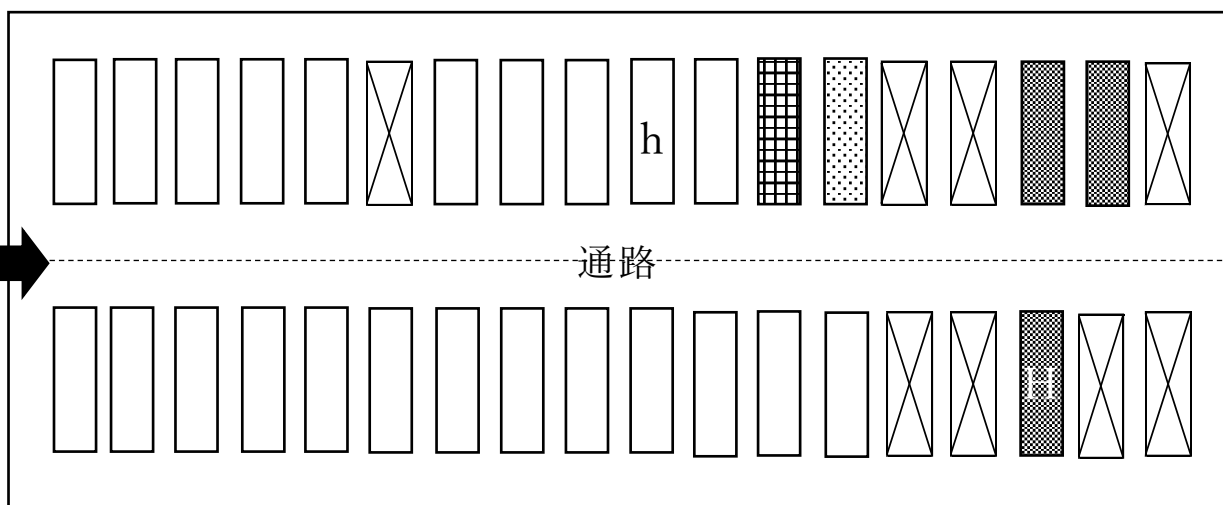


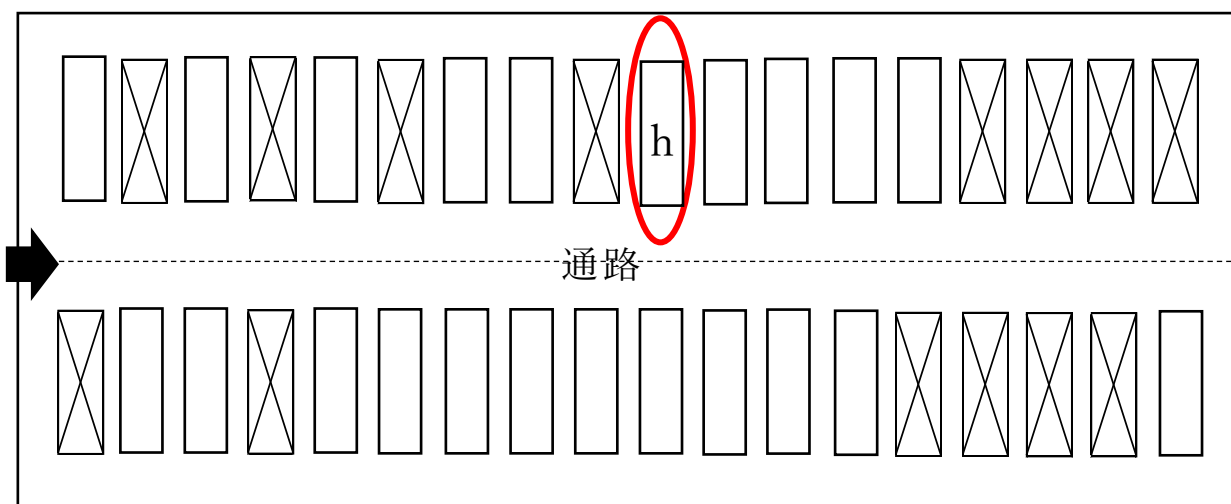
図 6 2018 年における搾乳牛の感染動態

2018 年には新規感染牛は確認されなかった。

(A) 2019/4/22



(B) 2019/12/3



-
-

図 7 2019 年における搾乳牛の感染動態

陽転牛 h は搾乳ミルカーを介して感染牛 H から感染したと推測された

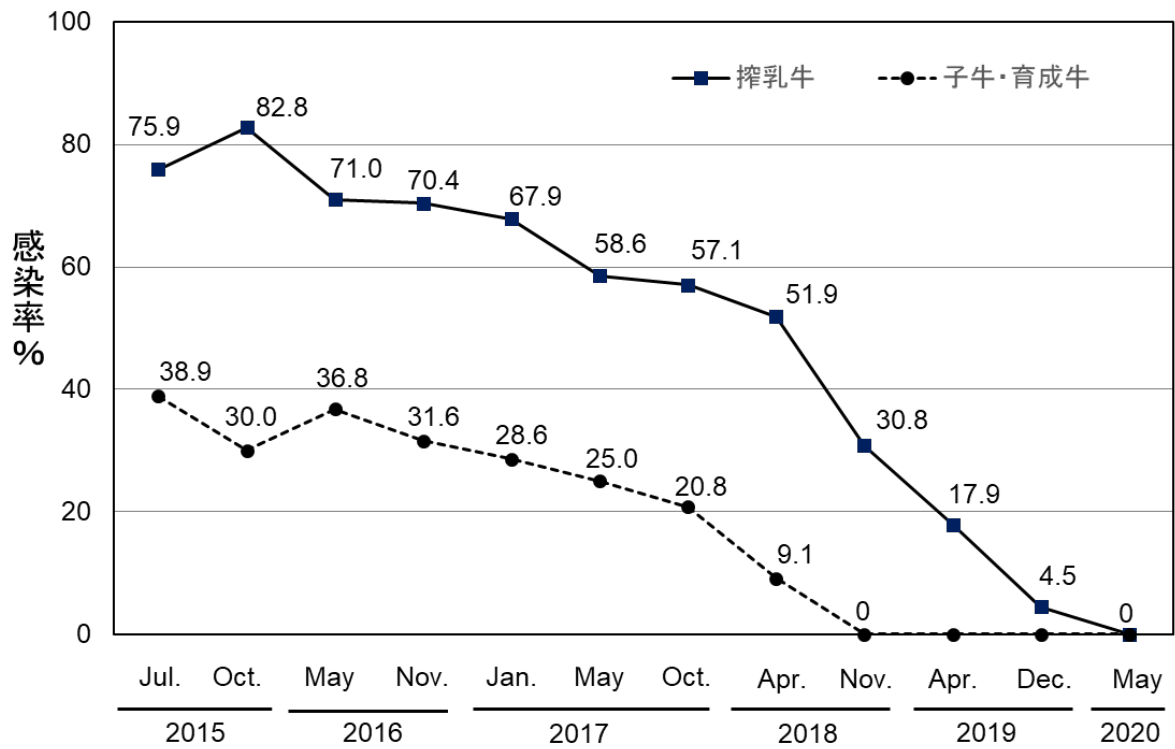


図 8 2015～2020 年における搾乳牛および子牛・育成牛の感染率の推移

結 論

我が国において牛伝染性リンパ腫（EBL）は1998年に家畜伝染病予防法の改正により国への発生報告が義務付けられた。1998～2001年の発生数は年間200頭以下であったものが2003年以降は年々増加し続け、2022年には4,334頭と近年でも増加傾向にある。その背景には国内牛群のBLV感染牛の増加が関連していると考えられている。国への届出の大部分が食肉処理場における摘発例であることから、BLV清浄化への意識は枝肉全廃棄の直接的な損害が生じる肉用牛農家と比較して酪農家では低い傾向にある。しかし、BLV感染による潜在的な乳汁および繁殖生産性など負の影響を示唆する報告も多く、さらに国内牛群でのBLV浸潤率はいずれの酪農場で肉用農家より深刻であること、さらに、近年の円安による輸入飼料費や燃料費の高騰による影響が長期化することを考慮しても、BLVの浸潤は酪農経営における阻害要因となり得ることから農場におけるBLVの清浄化は喫緊の課題といえる。

近年、BLVプロウイルスを標的としたリアルタイムPCR（qPCR）法が普及し、プロウイルス遺伝子量（PVL）をBLV感染牛の更新順位ならびに感染伝播リスクを想定した牛舎内での並び替えに応用するなど、農場におけるBLVの清浄化対策に広く利用されている。現在、国内において3種類のqPCRキットが市販されているが、それらは異なる3つのBLV遺伝子領域を標的としているため、実際の清浄化対策を実施する上では3種類のqPCRの有用性を精査する必要がある。本研究の第1章ではBLV感染牛の血液およびEBL発症牛の腫瘍組織から抽出したDNAを対象に、3種のqPCRキット（サイクリングプローブ法を採用したBLVの*tax*領域を標的としたCY415およびTaqManプローブ法を採用したBLVの*pol*

領域を標的とした RC202 ならびに BLV の LTR 領域を標的とした CoCoMo) により得られた PVL と BLV 感染細胞の割合について比較検証を行い、それぞれの手法の違いを評価した。BLV 野外感染牛 317 頭 (ホルスタイン種 165 頭, 黒毛和種 152 頭) から採取した全血試料について qPCR 法を用いて PVL を測定したところ、3 種のキット間で強い相関関係が見られた。PVL ならびに BLV 感染細胞の割合は、CY415 よりも RC202 が有意に高く、RC202 よりも CoCoMo が有意に高かった。RC202 および CoCoMo と比較して CY415 が低い PVL となる傾向についてはサイクリングプローブ法特有の配列特異性の高さが関与していると考えられたが、CoCoMo と比較して同じ TaqMan プローブ法を採用している RC202 の PVL が低値となる原因については究明に至らなかった。また、それぞれの qPCR 法により得られた PVL と BLV 感染細胞の割合にも強い相関関係が認められ、BLV 感染細胞の割合についても感染伝播リスク評価に活用可能と考えられた。CY415 により得られた PVL はホルスタイン種および黒毛和種の品種間で有意な差は認められなかったが、RC202 または CoCoMo で測定した PVL は、黒毛和種と比較してホルスタイン種で有意に高かった。リンパ腫発症牛 32 頭 (ホルスタイン種 9 頭, 黒毛和種 21 頭, 交雑種 1 頭, 不明 1 頭) 由来の腫瘍組織から DNA を抽出し、腫瘍組織中の PVL を測定したところ、3 種のキット間で強い相関関係が認められた。腫瘍組織においても PVL ならびに BLV 感染細胞の割合は、CY415 よりも RC202 および CoCoMo で得られた数値が有意に高かった。他の qPCR 法との比較では、回帰曲線から外れ、PVL が低値を示す検体が CoCoMo で 32 検体 3 検体、CY415 で 2 検体認められた。CoCoMo で低 PVL となった腫瘍組織中の BLV プロウイルスの塩基配列を決定したところ、5' -LTR 領域の全部欠損または LTR 領域のリバースプライマー結合部位の変異が見られ、これにより CoCoMo の PVL のみ低値を示したものと推

測された。なお、CY415 で低値を示した検体は *tax* 領域の変異によりキメラプロ
ーブの RNA 鎖の結合部位にミスマッチを生じたものと推測されたが究明に至らな
かった。これらの結果から、血中 PVL 測定に用いる qPCR 法としては RC202 また
は CoCoMo が、腫瘍組織の PVL 測定には RC202 が適しているものと考えられた。

第 2 章では PVL を指標とした清浄化対策モデル作成のために、搾乳牛を 30 頭
飼養する高度感染酪農場について対策に取り組んだ。まず、qPCR 法による血中
PVL および塩基配列の解析により主要組織適合抗原である *BoLA-DRB3* アリルを
決定後、全 BLV 感染牛の感染伝播リスクを推定し、感染高リスク牛を優先的に淘
汰した。食肉処理場への出荷頭数は 2015 年 10 月～2020 年 5 月にかけて非感染
牛 13 頭に対して感染牛 33 頭で、特に 2016 年末までに計 8 頭の感染高リスク牛
を更新した。また、原則、後継牛は非感染牛に雌の性選別精液を人工授精し、吸
血昆虫対策として搾乳牛舎周囲に防虫ネットを設置し、農場内パドックでの放牧
を中止、搾乳牛舎内の感染牛の飼養区域を完全分離し、感染牛と非感染牛との境
界には BoLA 型によって判定された感染低リスク牛を配置した。その結果、搾乳
牛舎における陽転率は年 0～7.7%となり、分離飼育前の 33.3～42.9%と比較して
大きく低減した。以上の清浄化対策の結果、2015 年 10 月には搾乳牛のうち 82.8%
が感染牛であったが、3 年後の 2108 年 11 月には感染率 30.8%と半数以下となり、
2020 年 5 月に BLV 清浄化を達成した。調査期間中、感染母牛から出生した子牛
11 頭のうち 5 頭が感染牛と判定され、特に 4 頭の高度感染牛 (1,000 コピー/10
ng DNA 以上)からは 3 頭と高頻度に感染子牛が娩出された。今回の取組みから、
BLV のつなぎ飼い高度感染農場における経済的負担の少ない清浄化対策として、
早期から高 PVL 牛の更新は早期から積極的に取り組むこと、子宮内感染または
産道感染が高頻度に発生する高 PVL 牛への種付けを避け、徐々に非感染母牛のみ

から後継牛を確保する方針へ移行すること，非感染後継牛の確保体制を確立させ，搾乳牛の完全分離飼育を行うことを提案したい。今後，フリーストールやフリーバーンなど，つなぎ飼い牛舎ではない農場においても今回の清浄化モデル農場に準じた実証を行っていきたい。

以上，本研究により国内で市販される3種のqPCR法の特徴や利用する際の留意点を明らかにするとともに，BLV高度感染酪農場においてqPCRを用いたPVLを指標とした効果的な清浄化モデルを作成することができた。本研究で得られた知見は，今後BLV清浄化を進める全国の家畜保健衛生所および産業動物臨床獣医師など，BLV清浄化対策関係者へ有益な情報を提供できるものと期待される。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究のご指導およびご鞭撻を賜った主指導教官である岩手大学大学院獣医学研究科 村上 賢二 教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本論文の執筆にあたり、ご指導・ご校閲を賜りました岩手大学大学院 獣医学研究科（農研機構・動物衛生研究部門） 山本 健久 教授，東京農工大学 農学部 大松 勉 准教授，岩手大学大学院 獣医学研究科 一條 俊浩 教授，立命館大学 食マネジメント学部 筒井 俊之 教授に深謝いたします。

本研究に際し検体供与にご協力いただきました NOSAI 東北家畜臨床研修センター 鈴木 一教 獣医師他の皆様，岩手県紫波食肉衛生検査所の皆様，ならびに BoLA クラス II 型別解析に多大なるご協力いただきました理化学研究所 間 陽子 博士（現 東京大学大学院農学生命科学研究科）および陸 拾七 博士（現 岡山理科大学獣医学部）に深謝いたします。

最後に、本研究にご協力を賜った栃木県県央家畜保健衛生所の皆様，特に芝田 周平 獣医師，大竹 祥紘 獣医師（現 日本ハム（株）中央研究所）および齊藤 かおり 獣医師に心よりお礼申し上げます。

文 献

- Aida Y, Murakami H, Takahashi M and Takeshima SN (2013). Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Front Microbiol* **4**: 328.
- Akbarin MM, Rahimi H, Hassannia T, Shoja Razavi G, Sabet F and Shirdel A (2013). Comparison of HTLV-I Proviral Load in Adult T Cell Leukemia/Lymphoma (ATL), HTLV-I-Associated Myelopathy (HAM-TSP) and Healthy Carriers. *Iran J Basic Med Sci* **16**: 208-212.
- Alvarez I, Gutiérrez G, Gammella M, Martínez C, Politzki R, González C, Caviglia L, Carignano H, Fondevila N, Poli M and Trono K (2013). Evaluation of total white blood cell count as a marker for proviral load of bovine leukemia virus in dairy cattle from herds with a high seroprevalence of antibodies against bovine leukemia virus. *Am. J. Vet. Res.* **74**: 744-749.
- Andersson L, Lundén A, Sigurdardottir S, Davies CJ and Rask L (1988). Linkage relationships in the bovine MHC region. High recombination frequency between class II subregions. *Immunogenetics* **27**: 273-280.
- Bai L, Borjigin L, Sato H, Takeshima SN, Asaji S, Ishizaki H, Kawashima K, Obuchi Y, Sunaga S, Ando A, Inoko H, Wada S and Aida Y (2021). Kinetic Study of BLV Infectivity in BLV Susceptible and Resistant Cattle in Japan from 2017 to 2019. *Pathogens* **10**.
- Bartlett PC, Norby B, Byrem TM, Parmelee A, Ledergerber JT and Erskine RJ (2013). Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds. *J. Dairy Sci.* **96**:

1591-1597.

Bartlett PC, Ruggiero VJ, Hutchinson HC, Droscha CJ, Norby B, Sporer KRB and Taxis TM (2020). Current Developments in the Epidemiology and Control of Enzootic Bovine Leukosis as Caused by Bovine Leukemia Virus. *Pathogens* **9**.

Bartlett PC, Sordillo LM, Byrem TM, Norby B, Grooms DL, Swenson CL, Zalucha J and Erskine RJ (2014). Options for the control of bovine leukemia virus in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **244**: 914-922.

Bendixen HJ (1963). Preventive measures in cattle leukemia: leukosis enzootica bovis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **108**: 1241-1267.

Bendixen HJ (1965). Bovine enzootic leukosis. *Adv Vet Sci* **10**: 129-204.

Blazhko NV, Vyshegurov SK, Donchenko AS, Shatokhin KS, Krytsyna TI and Ryabinina VA (2019). Association of haplotypes for SNPs in the LTR regions of bovine leukemia virus with hematological indices of cattle. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding* **23**: 262-269.

Bolger AM, Lohse M and Usadel B (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**: 2114-2120.

Borjigin L, Yoneyama S, Saito S, Polat M, Inokuma M, Shinozaki Y, Tanaka N, Yamanaka R, Yasui A, Mimura M, Murakami H, Takeshima SN and Aida Y (2021). A novel real time PCR assay for bovine leukemia virus detection using mixed probes and degenerate primers targeting novel BLV strains. *J Virol Methods* **297**: 114264.

Burng A (1980). Bovine Leukemia Virus: Molecular biology and epidemiology. *Viral Oncol*: 231-289.

Buxton BA, Hinkle NC and Schultz RD (1985). Role of insects in the transmission of

- bovine leukosis virus: potential for transmission by stable flies, horn flies, and tabanids. *Am. J. Vet. Res.* **46**: 123-126.
- Carignano HA, Beribe MJ, Caffaro ME, Amadio A, Nani JP, Gutierrez G, Alvarez I, Trono K, Miretti MM and Poli MA (2017). BOLA-DRB3 gene polymorphisms influence bovine leukaemia virus infection levels in Holstein and Holstein × Jersey crossbreed dairy cattle. *Anim. Genet.* **48**: 420-430.
- de Brogniez A, Bouzar AB, Jacques JR, Cosse JP, Gillet N, Callebaut I, Reichert M and Willems L (2015). Mutation of a Single Envelope N-Linked Glycosylation Site Enhances the Pathogenicity of Bovine Leukemia Virus. *J Virol* **89**: 8945-8956.
- Derse D (1987). Bovine Leukemia Virus Transcription Is Controlled by a Virus-Encoded trans-Acting Factor and by cis-Acting Response Elements. *J Virol* **61**: 2462-2471.
- Deshayes L, Levy D, Parodi AL and Levy JP (1980). Spontaneous immune response of bovine leukemia-virus-infected cattle against five different viral proteins. *Int. J. Cancer* **25**: 503-508.
- Duck P, Alvarado-Urbina G, Burdick B and Collier B (1990). Probe amplifier system based on chimeric cycling oligonucleotides. *BioTechniques* **9**: 142-148.
- Emanuelson U, Scherling K and Pettersson H (1992). Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. *Prev Veter Med* **12**: 121-131.
- Erskine RJ, Bartlett PC, Byrem TM, Render CL, Febvay C and Houseman JT (2012). Association between bovine leukemia virus, production, and population age in Michigan dairy herds. *J. Dairy Sci.* **95**: 727-734.
- Forletti A, Lützelshwab CM, Cepeda R, Esteban EN and Gutiérrez SE (2020). Early

- events following bovine leukaemia virus infection in calves with different alleles of the major histocompatibility complex DRB3 gene. *Vet. Res* **51**: 4.
- Frie MC and Coussens PM (2015). Bovine leukemia virus: a major silent threat to proper immune responses in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol* **163**: 103-114.
- Frie MC, Sporer KR, Wallace JC, Maes RK, Sordillo LM, Bartlett PC and Coussens PM (2016). Reduced humoral immunity and atypical cell-mediated immunity in response to vaccination in cows naturally infected with bovine leukemia virus. *Vet. Immunol. Immunopathol* **182**: 125-135.
- Fries R, Eggen A and Womack JE (1993). The bovine genome map. *Mamm. Genome* **4**: 405-428.
- Gelhaus A, Förster B and Horstmann RD (1999). Evidence for an additional cattle DQB locus. *Immunogenetics* **49**: 879-885.
- Gillet N, Florins A, Boxus M, Burteau C, Nigro A, Vandermeers F, Balon H, Bouzar AB, Defoiche J, Burny A, Reichert M, Kettmann R and Willems L (2007). Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology* **4**: 18.
- Gillet NA, Gutierrez G, Rodriguez SM, de Brogniez A, Renotte N, Alvarez I, Trono K and Willems L (2013). Massive depletion of bovine leukemia virus proviral clones located in genomic transcriptionally active sites during primary infection. *PLoS Pathog* **9**: e1003687.
- Hayashi T, Mekata H, Sekiguchi S, Kirino Y, Mitoma S, Honkawa K, Horii Y and Norimine J (2017). Cattle with the BoLA class II DRB3*0902 allele have significantly lower bovine leukemia proviral loads. *J. Vet. Med. Sci.* **79**: 1552-1555.

- Heenemann K, Lapp S, Teifke JP, Fichtner D, Mettenleiter TC and Vahlenkamp TW (2012). Development of a Bovine leukemia virus polymerase gene-based real-time polymerase chain reaction and comparison with an envelope gene-based assay. *J Vet Diagn Invest* **24**: 649-655.
- Heeney JL, Valli PJ, Jacobs RM and Valli VE (1992). Evidence for bovine leukemia virus infection of peripheral blood monocytes and limited antigen expression in bovine lymphoid tissue. *Lab Invest* **66**: 608-617.
- Hodson A, Laydon DJ, Bain BJ, Fields PA and Taylor GP (2013). Pre-morbid human T-lymphotropic virus type I proviral load, rather than percentage of abnormal lymphocytes, is associated with an increased risk of aggressive adult T-cell leukemia/lymphoma. *Haematologica* **98**: 385-388.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R and Gelfand DH (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci* **88**: 7276-7280.
- Inoue E, Matsumura K, Soma N, Hirasawa S, Wakimoto M, Arakaki Y, Yoshida T, Osawa Y and Okazaki K (2013). L233P mutation of the Tax protein strongly correlated with leukemogenicity of bovine leukemia virus. *Vet. Microbiol* **167**: 364-371.
- Iwanaga M, Watanabe T, Utsunomiya A, Okayama A, Uchimaru K, Koh KR, Ogata M, Kikuchi H, Sagara Y, Uozumi K, Mochizuki M, Tsukasaki K, Saburi Y, Yamamura M, Tanaka J, Moriuchi Y, Hino S, Kamihira S, Yamaguchi K and Joint Study on Predisposing Factors of ATLDi (2010). Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) proviral load and disease progression in asymptomatic HTLV-1 carriers: a nationwide prospective study in Japan. *Blood* **116**: 1211-1219.

- Jackman SD, Vandervalk BP, Mohamadi H, Chu J, Yeo S, Hammond SA, Jahesh G, Khan H, Coombe L, Warren RL and Birol I (2017). ABySS 2.0: resource-efficient assembly of large genomes using a Bloom filter. *Genome Res* **27**: 768-777.
- Jaworski JP, Pluta A, Rola-Łuszczak M, McGowan SL, Finnegan C, Heenemann K, Carignano HA, Alvarez I, Murakami K, Willems L, Vahlenkamp TW, Trono KG, Choudhury B and Kuźmak J (2018). Interlaboratory Comparison of Six Real-Time PCR Assays for Detection of Bovine Leukemia Virus Proviral DNA. *J. Clin. Microbiol.* **56**.
- Jaworski JP, Sala JM and Capozzo A (2018). Bovine leukemia virus infection in adult cows does not interfere with foot-and-mouth disease vaccination. *J. Dairy Sci.* **101**: 11247-11250.
- Jimba M, Takeshima SN, Matoba K, Endoh D and Aida Y (2010). BLV-CoCoMo-qPCR: Quantitation of bovine leukemia virus proviral load using the CoCoMo algorithm. *Retrovirology* **7**: 91.
- Jimba M, Takeshima SN, Murakami H, Kohara J, Kobayashi N, Matsushashi T, Ohmori T, Nunoya T and Aida Y (2012). BLV-CoCoMo-qPCR: a useful tool for evaluating bovine leukemia virus infection status. *BMC Vet Res* **8**: 167.
- Johnson R and Kaneene JB (1993). Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis. *Vet Bull* **62**.
- Juliarena MA, Barrios CN, Ceriani MC and Esteban EN (2016). 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.
- Juliarena MA, Gutierrez SE 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.
- Juliarena MA, Poli M, Sala L, Ceriani C, Gutierrez S, Dolcini G, Rodriguez EM, Marino B, Rodriguez-Dubra C and Esteban EN (2008). Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene. *Anim. Genet.* **39**: 432-438.
- Kashmiri SV, Mehdi R and Ferrer JF (1983). Detection, purification, and characterization of two species of covalently closed circular proviral DNA molecules of bovine leukemia virus. *J Virol* **45**: 1172-1176.
- Katoh I, Kyushiki H, Sakamoto Y, Ikawa Y and Yoshinaka Y (1991). Bovine leukemia virus matrix-associated protein MA(p15): further processing and formation of a specific complex with the dimer of the 5'-terminal genomic RNA fragment. *J Virol* **65**: 6845-6855.
- Katoh I, Yoshinaka Y and Ikawa Y (1989). Bovine leukemia virus trans-activator p38tax activates heterologous promoters with a common sequence known as a cAMP-responsive element or the binding site of a cellular transcription factor ATF. *EMBO J.* **8**: 497-503.
- Kerkhofs P, Heremans H, Burny A, Kettmann R and Willems L (1998). In vitro and in vivo oncogenic potential of bovine leukemia virus G4 protein. *J Virol* **72**: 2554-2559.
- Kobayashi S, Tsutsui T, Yamamoto T, Hayama Y, Muroga N, Konishi M, Kameyama K and Murakami K (2015). The role of neighboring infected cattle in bovine leukemia virus transmission risk. *J. Vet. Med. Sci.* **77**: 861-863.
- Konishi M, Ishizaki H, Kameyama KI, Murakami K and Yamamoto T (2018). The effectiveness of colostrum antibodies for preventing bovine leukemia virus (BLV)

infection in vitro. BMC Vet Res **14**: 419.

Kuckleburg CJ, Chase CC, Nelson EA, Marras SA, Dammen MA and Christopher-Hennings J (2003). Detection of bovine leukemia virus in blood and milk by nested and real-time polymerase chain reactions. J Vet Diagn Invest **15**: 72-76.

LaDronka RM, Ainsworth S, Wilkins MJ, Norby B, Byrem TM and Bartlett PC (2018). Prevalence of Bovine Leukemia Virus Antibodies in US Dairy Cattle. Vet Med Int **2018**: 5831278.

Lawson JS, Salmons B and Glenn WK (2018). Oncogenic Viruses and Breast Cancer: Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV), Bovine Leukemia Virus (BLV), Human Papilloma Virus (HPV), and Epstein-Barr Virus (EBV). Front Oncol **8**: 1.

Levy D, Deshayes L, Guillemain B and Parodi AL (1977). Bovine leukemia virus specific antibodies among French cattle. I. Comparison of complement fixation and hematological tests. Int. J. Cancer **19**: 822-827.

Lew AE, Bock RE, Molloy JB, Minchin CM, Robinson SJ and Steer P (2004). Sensitive and specific detection of proviral bovine leukemia virus by 5' Taq nuclease PCR using a 3' minor groove binder fluorogenic probe. J Virol Methods **115**: 167-175.

Llames L, Goyache J, Domenech A, Montan AV, Suarez G and Gomez-Lucia E (2001). Cellular distribution of bovine leukemia virus proteins gp51SU, Pr72env, and Pr66gag-pro in persistently infected cells. Virus Res **79**: 47-57.

Lo CW, Borjigin L, Saito S, Fukunaga K, Saitou E, Okazaki K, Mizutani T, Wada S, Takeshima SN and Aida Y (2020). BoLA-DRB3 Polymorphism is Associated with Differential Susceptibility to Bovine Leukemia Virus-Induced Lymphoma and Proviral Load. Viruses **12**.

- Mager A, Masengo R, Mammerickx M and Letesson JJ (1994). T cell proliferative response to bovine leukaemia virus (BLV): identification of T cell epitopes on the major core protein (p24) in BLV-infected cattle with normal haematological values. *J. Gen. Virol.* **75 (Pt 9)**: 2223-2231.
- Mamoun RZ, Morisson M, Rebeyrotte N, Busetta B, Couez D, Kettmann R, Hospital M and Guillemain B (1990). Sequence variability of bovine leukemia virus env gene and its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins. *J Virol* **64**: 4180-4188.
- Marawan MA, Alouffi A, El Tokhy S, Badawy S, Shirani I, Dawood A, Guo A, Almutairi MM, Alshammari FA and Selim A (2021). Bovine Leukaemia Virus: Current Epidemiological Circumstance and Future Prospective. *Viruses* **13**.
- Martin M (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet* **17**: 10-12.
- Mekata H, Sekiguchi S, Konnai S, Kirino Y, Honkawa K, Nonaka N, Horii Y and Norimine J (2015). Evaluation of the natural perinatal transmission of bovine leukaemia virus. *Vet. Rec* **176**: 254.
- Mekata H, Sekiguchi S, Konnai S, Kirino Y, Horii Y and Norimine J (2015). Horizontal transmission and phylogenetic analysis of bovine leukemia virus in two districts of Miyazaki, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **77**: 1115-1120.
- Miyasaka T, Oguma K and Sentsui H (2015). Distribution and characteristics of bovine leukemia virus integration sites in the host genome at three different clinical stages of infection. *Arch. Virol.* **160**: 39-46.
- Miyasaka T, Takeshima SN, Jimba M, Matsumoto Y, Kobayashi N, Matsuhashi T, Sentsui

- H and Aida Y (2013). Identification of bovine leukocyte antigen class II haplotypes associated with variations in bovine leukemia virus proviral load in Japanese Black cattle. *Tissue Antigens* **81**: 72-82.
- Mori H, Tomiyasu T, Nishiyama K, Matsumoto M, Osawa Y and Okazaki K (2019). L233P mutation in the bovine leukemia virus Tax protein depresses endothelial cell recruitment and tumorigenesis in athymic nude mice. *Arch. Virol.* **164**: 1343-1351.
- Murakami K, Kobayashi S, Konishi M, Kameyama K and Tsutsui T (2013). 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.
- Murakami K, Okada K, Ikawa Y and Aida Y (1994). Bovine leukemia virus induces CD5-B cell lymphoma in sheep despite temporarily increasing CD5+ B cells in asymptomatic stage. *Virology* **202**: 458-465.
- Naif HM, Daniel RC, Cogle WG and Lavin MF (1992). Early detection of bovine leukemia virus by using an enzyme-linked assay for polymerase chain reaction-amplified proviral DNA in experimentally infected cattle. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 675-679.
- Nakada S, Fujimoto Y, Kohara J, Adachi Y and Makita K (2022). Estimation of economic loss by carcass weight reduction of Japanese dairy cows due to infection with bovine leukemia virus. *Prev. Vet. Med* **198**: 105528.
- Nekouei O, VanLeeuwen J, Sanchez J, Kelton D, Tiwari A and Keefe G (2015). Herd-level risk factors for infection with bovine leukemia virus in Canadian dairy herds. *Prev. Vet. Med* **119**: 105-113.
- Nekouei O, VanLeeuwen J, Stryhn H, Kelton D and Keefe G (2016). Lifetime effects of

- infection with bovine leukemia virus on longevity and milk production of dairy cows. *Prev. Vet. Med* **133**: 1-9.
- Norby B, Bartlett PC, Byrem TM and Erskine RJ (2016). Effect of infection with bovine leukemia virus on milk production in Michigan dairy cows. *J. Dairy Sci.* **99**: 2043-2052.
- Ochiai C, Katagiri Y, Kobayashi S, Naitoh I, Yoneyama S, Tomita K, Dongze L, Hikono H and Murakami K (2020). Development of a microchip electrophoresis-based, high-throughput PCR-RFLP method to type Tax 233 variants of bovine leukemia virus in Japan. *Arch. Virol.* **165**: 2961-2966.
- Ohno A, Takeshima SN, Matsumoto Y and Aida Y (2015). Risk factors associated with increased bovine leukemia virus proviral load in infected cattle in Japan from 2012 to 2014. *Virus Res* **210**: 283-290.
- Ohshima K, Okada K, Numakunai S, Kayano H and Goto T (1988). An Eradication Program without Economic Loss in Herd Infected with Bovine Leukemia Virus (BLV). *Jpn. J. Vet. Sci.* **50**: 1074-1078.
- 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.
- Ohshima K, Ozai Y, Okada K and Numakunai S (1980). Pathological studies on aleukemic case of bovine leukosis. *Nihon Juigaku Zasshi* **42**: 297-309.
- Ooshiro M, Konnai S, Katagiri Y, Afuso M, Arakaki N, Tsuha O, Murata S and Ohashi K (2013). Horizontal transmission of bovine leukemia virus from lymphocytotic cattle, and beneficial effects of insect vector control. *Vet. Rec* **173**: 527.

- Ott SL, Johnson R and Wells SJ (2003). Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. *Prev. Vet. Med* **61**: 249-262.
- Polat M, Ohno A, Takeshima SN, Kim J, Kikuya M, Matsumoto Y, Mingala CN, Onuma M and Aida Y (2015). Detection and molecular characterization of bovine leukemia virus in Philippine cattle. *Arch. Virol.* **160**: 285-296.
- Pollari FL, Wangsuphachart VL, Digiacomio RF and Evermann JF (1992). Effects of bovine leukemia virus infection on production and reproduction in dairy cattle. *Can. J. Veter. Res* **56**: 289-295.
- Puentes R, De Brun L, Algorta A, Da Silva V, Mansilla F, Sacco G, Llambí S and Capozzo AV (2016). Evaluation of serological response to foot-and-mouth disease vaccination in BLV infected cows. *BMC Vet Res* **12**: 119.
- Rhodes JK, Pelzer KD and Johnson YJ (2003). Economic implications of bovine leukemia virus infection in mid-Atlantic dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **223**: 346-352.
- Rice NR, Stephens RM, Couez D, Deschamps J, Kettmann R, Burny A and Gilden RV (1984). The nucleotide sequence of the env gene and post-env region of bovine leukemia virus. *Virology* **138**: 82-93.
- Rola-Łuszczak M, Finnegan C, Olech M, Choudhury B and Kuźmak J (2013). Development of an improved real time PCR for the detection of bovine leukaemia provirus nucleic acid and its use in the clarification of inconclusive serological test results. *J Virol Methods* **189**: 258-264.
- Rola-Luszczak M, Sakhawat A, Pluta A, Rylo A, Bomba A, Bibi N and Kuzmak J (2021). Molecular Characterization of the env Gene of Bovine Leukemia Virus in Cattle

- from Pakistan with NGS-Based Evidence of Virus Heterogeneity. *Pathogens* **10**.
- Sagata N, Tsuzuku-Kawamura J, Nagayoshi-Aida M, Shimizu F, Imagawa K and Ikawa Y (1985). Identification and some biochemical properties of the major XBL gene product of bovine leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **82**: 7879-7883.
- 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.
- Sajiki Y, Konnai S, Nishimori A, Okagawa T, Maekawa N, Goto S, Nagano M, Kohara J, Kitano N, Takahashi T, Tajima M, Mekata H, Horii Y, Murata S and Ohashi K (2017). Intrauterine infection with bovine leukemia virus in pregnant dam with high viral load. *J. Vet. Med. Sci.* **79**: 2036-2039.
- Schwartz I and Lévy D (1994). Pathobiology of bovine leukemia virus. *Vet. Res* **25**: 521-536.
- Somura Y, Ogawa J, Sugiyama E, Fujikawa H and Murakami K (2013). Incidence of Enzootic Bovine Leukosis and Prevalence of Bovine Leukemia Virus in Slaughtered Cattle in Tokyo. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* **67**: 523-528.
- Somura Y, Sugiyama E, Fujikawa H and Murakami K (2014). Comparison of the copy numbers of bovine leukemia virus in the lymph nodes of cattle with enzootic bovine leukosis and cattle with latent infection. *Arch. Virol.* **159**: 2693-2697.
- Sparling AM (2000). An unusual presentation of enzootic bovine leukosis. *Can. Vet. J.* **41**: 315-316.
- Stoye JP, Blomberg J, Coffin JM, Fan H, Hahn B, Neil J, Quackenbush S, Rethwilm A and

- Tristem M. Family Retroviridae. 2011; pp. 477-495. In: Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, (King AM, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB Eds.) Elsevier, San Diego.
- Takeda S, Maeda M, Morikawa S, Taniguchi Y, Yasunaga J, Nosaka K, Tanaka Y and Matsuoka M (2004). Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. *Int. J. Cancer* **109**: 559-567.
- Takehima SN, Matsumoto Y, Miyasaka T, Arainga-Ramirez M, Saito H, Onuma M and Aida Y (2011). A new method for typing bovine major histocompatibility complex class II DRB3 alleles by combining two established PCR sequence-based techniques. *Tissue Antigens* **78**: 208-213.
- Takehima SN, Ohno A and Aida Y (2019). Bovine leukemia virus proviral load is more strongly associated with bovine major histocompatibility complex class II DRB3 polymorphism than with DQA1 polymorphism in Holstein cow in Japan. *Retrovirology* **16**: 14.
- Tamiya S, Matsuoka M, Etoh K, Watanabe T, Kamihira S, Yamaguchi K and Takatsuki K (1996). Two types of defective human T-lymphotropic virus type I provirus in adult T-cell leukemia. *Blood* **88**: 3065-3073.
- Trono KG, Pérez-Filgueira DM, Duffy S, Borca MV 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.
- Vanleeuwen JA, Haddad JP, Dohoo IR, Keefe GP, Tiwari A and Tremblay R (2010). Associations between reproductive performance and seropositivity for bovine

- leukemia virus, bovine viral-diarrhea virus, Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, and Neospora caninum in Canadian dairy cows. *Prev. Vet. Med* **94**: 54-64.
- Watanabe A, Murakami H, Kakinuma S, Murao K, Ohmae K, Isobe N, Akamatsu H, Seto T, Hashimura S, Konda K, Shinozuka Y and Kawai K (2019). Association between bovine leukemia virus proviral load and severity of clinical mastitis. *J. Vet. Med. Sci.* **81**: 1431-1437.
- Willems L, Kerkhofs P, Attenelle L, Burny A, Portetelle D and Kettmann R (1997). The major homology region of bovine leukaemia virus p24gag is required for virus infectivity in vivo. *J. Gen. Virol.* **78 (Pt 3)**: 637-640.
- Willems L, Kerkhofs P, Burny A, Mammerickx M and Kettmann R (1995). Lack of LTR and ENV genetic variation during bovine leukemia virus-induced leukemogenesis. *Virology* **206**: 769-772.
- Willems L, Kettmann R, Dequiedt F, Portetelle D, Vonèche V, Cornil I, Kerkhofs P, Burny A and Mammerickx M (1993). In vivo infection of sheep by bovine leukemia virus mutants. *J Virol* **67**: 4078-4085.
- WOAH, 2019. Enzootic bovine leukosis, In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. World Health Organization for Animal Health, Paris, France, pp. 1113-1124.
- Xu A, van Eijk MJ, Park C and Lewin HA (1993). Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. *J. Immunol.* **151**: 6977-6985.
- Yang Y, Fan W, Mao Y, Yang Z, Lu G, Zhang R, Zhang H, Szeto C and Wang C (2016).

Bovine leukemia virus infection in cattle of China: Association with reduced milk production and increased somatic cell score. *J. Dairy Sci.* **99**: 3688-3697.

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.

窪田五郎 (1927). 淋巴肉腫 の一例. *中央獣医誌* **40**: 375-378.

村上賢二, 小林創太 and 筒井俊之 (2009). 我が国の地方病性牛白血病の発生動向と対策. *日獣会誌* **62**: 499-502.