

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850175

研究課題名(和文)牛白血病ウイルスの垂直伝播と発症リスクに関する研究

研究課題名(英文)Studies on the risk of perinatal transmission of bovine leukemia virus and pathogenic mechanism of enzootic bovine leukosis

研究代表者

目堅 博久 (MEKATA, Hirohisa)

宮崎大学・テニュアトラック推進機構・助教

研究者番号：90633264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：畜産の生産性を向上させるためには、慢性感染症対策が欠かせない。牛白血病ウイルスの感染を原因とする牛白血病は、現在、日本の畜産現場で最も被害が大きい慢性感染症の1つであるが、ワクチン、治療薬がなく、感染および発症を防ぐには地道な対策が必要となる。本研究では、牛白血病ウイルスの垂直感染に着目した。垂直感染は感染期間が長くなるため、牛白血病の発症との関連が疑われる。本研究の結果、400 copies/10 ngを超える牛では、有意に垂直感染の確率が高いことを明らかにした。本研究の結果、垂直感染を防ぐためには、感染ウイルス量を測定し、感染ウイルス量の多い牛を可能な限り、繁殖に用いないことが重要である。

研究成果の概要(英文)：The perinatal transmission of bovine leukemia virus (BLV) plays a critical role in the spread and persistence of BLV infection in cattle herds. The purpose of this study was to examine the frequency of perinatal infections and to investigate some risk factors associated with infection. 18.6% were infected with BLV. Maternal viral load was significantly correlated with the frequency of perinatal infection, and more than 40% of newborn calves born to dams with high viral loads were infected with BLV. The results of this study could contribute towards developing effective eradication programmes by providing necessary data for replacement of breeding cow in the field.

研究分野：獣医感染症学

キーワード：BLV 牛白血病 垂直感染 感染ウイルス量

1. 研究開始当初の背景

牛白血病は、牛白血病ウイルス(Bovine leukemia virus: BLV)の感染を原因と牛の疾病である。BLV 感染牛の多くは健康であるが、約 5%が感染から数年後に牛白血病を発症する。牛白血病は、リンパ球の異常増加や全身性の悪性リンパ腫を主徴とし、予後不良のうえに食品への利用が禁止されている。そのため、畜産業に多大な被害をもたらす。近年、発症牛の増加とともに発症時期の若齢化が大きな問題となっている。これまで、牛白血病の発症は 4-5 歳以上とされ、30 ヶ月齢前後で出荷される肥育牛での発症は想定されていなかった。しかし、と場や産業動物獣医師の間では 3 歳未満の発症を診断する事は決して珍しくなくなっている。

2. 研究の目的

申請者は、発症牛の増加および発症時期の若齢化が BLV の垂直感染増加に伴う感染時期の早期化によるものと考えている。しかし、BLV の垂直伝播については、その確率や成立要因など不明な点も多い。

本研究では、共同研究先のメガファームを中心に、BLV 感染母牛、およびその新生子牛を用いて、垂直伝播成立の確率、伝播に関わるリスク因子の解明を行い、制御法開発につながる基礎研究を行う。これらの研究成果は、畜産業界の発展に貢献できる。

3. 研究の方法

BLV が胎盤や産道で母牛から仔牛に伝播する確率を明らかにする。BLV 感染母牛から生まれた子牛から、生後 1 日および 31 日に採血を行なう。ゲノム DNA を抽出後、nested PCR 法で BLV 遺伝子を検出する。200 を超える検体数を確保することで、データの信頼性を上げるとともに、母牛の感染ウイルス量を Real-time PCR 法で測定し、垂直伝播のリスク因子であるのかを検討する。その他にも、

品種や年齢、胎仔の大きさなど牧場が管理しているデータを利用し、垂直伝播に関わるリスク因子について解析する。

4. 研究成果

牛白血病ウイルスに感染していた母牛 129 頭から生まれた子牛のうち、14 頭(10.8%)で胎盤感染が、10 頭(7.7%)で産道感染が認められた。計 18.6%で子牛への胎盤および産道感染が起きたことになり、これは 4~6%で垂直伝播するとした過去の報告と比べても高い値となっている。その原因として、検出方法の違いが考えられる。過去の報告で用いたゲル内沈降反応法と本研究で用いた nested PCR 法では検出感度が異なる。新生子牛では免疫系の発達が未熟なこと、感染からの日数が十分に経過していないことから、ウイルスに対する抗体産生が十分に行われず、ゲル内沈降反応法で検出可能なレベルまで抗体価が上昇していない可能性がある。いっぽう、nested PCR 法ではウイルス遺伝子を検出するため、新生子牛の抗体産生能に検査結果が影響されない。新生子牛では良好な発育のために、出産後できるだけ早くに初乳を与える必要がある。これまでの報告によると、移行抗体は最長 9 ヶ月齢まで持続するため、9 ヶ月齢未満の子牛の牛白血病ウイルス検査は PCR 法が適切である。本研究では、出産直後と 31~45 日齢において nested PCR 法による検査を実施した。6 頭の新生子牛で、出産後 24 時間以内の検査で陽性かつ 31-45 日齢の検査で陰性であった。これと同様の報告は、以前にも行われている。この 6 頭に共通する点として、single PCR 法による 40 サイクルの増幅反応ではウイルス遺伝子を検出できなかった。このことから、母親由来のウイルスゲノムなどの混入が影響していると思われる。以上から、PCR 法による子牛の検査は 1 ヶ月齢以降に行うことがより適切と考えられる。

胎盤・産道感染におけるリスク因子を明らかにするため、母牛の感染ウイルス量、分娩介助の有無、子牛の品種、母牛の出産回数と胎盤・産道感染の相関を比較した。これらの要因をリスク因子の候補と考えた理由として、胎盤・産道感染のリスクは新生子牛への暴露ウイルス量および暴露時間が影響すると考えたからである。つまり、母牛の感染ウイルス量は新生子牛への暴露ウイルス量に、分娩介助、子牛の品種、母牛の出産回数は分娩の困難さに影響するため、子牛の産道に位置する時間の違い、つまりウイルスに暴露される時間に影響すると考えた。はじめに、母牛の感染ウイルス量と胎盤・産道感染の相関を比較したところ、感染ウイルス量の増加に比例して、胎盤・産道感染の確率は増加した。また、10 ng の抽出ゲノム中、牛白血病ウイルスの感染コピー数が 400 copies 未満の群では胎盤・産道感染の起こる確率が 9.4%(9/95)であったのに対し、それ以上の群では 48.2%(14/29)であった($P<0.01$)。このことから、母牛の感染ウイルス量が産道・胎盤感染の重要なリスク因子であることが明らかとなった。続いて、分娩介助の有無と胎盤・産道感染の相関を比較した。分娩介助ありの群では産道感染が 20.0%(2/10)と介助なしの群の 6.1%(7/114)と比較して高い値となったが、これらの間に有意な違いはなかった($P=0.15$)。また、胎盤・産道感染と子牛の品種を比較すると、F1 種で 21.8%(14/64)、黒毛和種で 16.6%(9/54)、ホルスタイン種とブラウンスイス種で合わせて 9.1%(1/11)であった(Table 1)。子牛の品種と胎盤・産道感染の間に有意な違いはなく($P=0.68$)、産子が母体に比べて小さいために分娩が比較的容易である F1 群で最も高い感染率となった。胎盤・産道感染と母牛の出産回数を比較したところ、産道感染群の平均出産回数は 4.87 回、胎盤感染群は 5.30 回、感染なしの群は 4.92 回であり、それらの間に有意な違いはなかつ

た($P=0.37$)。分娩介助ありの群で高い感染率が認められたものの、子牛の品種、出産回数と胎盤・産道感染の間に相関する結果が認められなかったことから、分娩の困難さが感染のリスクであるかについてはさらなる解析が必要である。

本研究から、牛白血病ウイルス感染母牛から生まれた子牛の 18.6%で胎盤・産道感染することが明らかとなった。また、母牛の感染ウイルス量が重要なリスク因子であり、400 copies/10 ng を超える高ウイルス量の感染母牛に限ると、48.2%の新生子牛が牛白血病ウイルスに感染して生まれることが明らかとなった。牛白血病ウイルスは主に水平感染で伝播する。そのため、感染牛の隔離、衛生対策が農場内での感染を防ぐために重要である。いっぽうで、感染率を下げるためには、非感染牛を増やす必要がある。繁殖母牛の感染ウイルス量を把握し、感染ウイルス量に基づいた更新計画、分娩計画を立てることが、非感染牛の増加につながる。受精卵移植において、ドナーとなる母牛の感染状態は出産する子牛に影響しないことが明らかとなっている。そのため、感染ウイルス量の多い母牛より受精卵を採り、BLV 非感染牛に移植することで、BLV の感染リスクをゼロに抑えながら、感染ウイルス量の多い母牛の血統を維持することも可能である。

多くのレトロウイルス感染症では、感染期間が発症の重要なリスク因子である。そのため、垂直感染の制御は感染牛の減少だけでなく、発症牛の減少にもつながる可能性がある。このことから、牛白血病ウイルス感染対策は水平感染だけでなく、垂直感染対策も並行して行う必要がある。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

1. Marawan MA, Mekata H et al, Phylogenetic analysis of env gene of bovine leukemia virus strains spread in Miyazaki prefecture, Japan. J Vet Med Sci, in press. 査読あり
2. 目堅博久、牛白血病ウイルス感染症と農場における感染対策、山口獣医学雑誌、43 13-20 2016 査読なし
3. 目堅博久、牛白血病ウイルス感染症の検査法とその特徴、産業動物臨床医学雑誌 6(増刊号) 221-226 2016 査読なし
4. Mekata H et al, Horizontal transmission and phylogenetic analysis of bovine leukemia virus in two districts of Miyazaki, Japan. J Vet Med Sci, 77(9) 1115-1120, 2015. 査読あり
5. Mekata H et al, Evaluation of the natural perinatal transmission of bovine leukaemia virus. Vet Rec, 176, 254, 2015. 査読あり
6. 目堅博久、牛白血病ウイルスの伝播経路と地域、農場における感染対策、産業動物臨床医学雑誌 6(3) 133-140 2015 査読なし
7. 目堅博久、他、感染症清浄化と畜産新生-牛白血病ウイルス対策を通して、日本草地学会誌 61 35-38 2015 査読あり

[学会発表](計 15 件)

1. 目堅博久、農場および放牧地での牛白血病対策、平成 28 年度大分県自給飼料増産セミナー、大分銀行ドーム会議室(大分県、大分市)、2017 年 2 月 28 日
2. 目堅博久、牛白血病の現状と農場での予防対策、平成 28 年度三重県和牛繁殖協議会研修会、三重県勤労福祉会館(三重県、津市)、2017 年 1 月 24 日
3. 目堅博久、農場における牛白血病ウイルス感染症対策、野生動物由来の人畜共通感染症並びに牛白血病感染症対策講習会、大分県林業会館(大分県、大分市)、2017 年 1

月 20 日

4. 目堅博久、牛白血病の予防対策、平成 28 年度山口県獣医師会産業動物講習会、山口県獣医師会館(山口県、山口市)、2016 年 11 月 19 日
5. 目堅博久、牛白血病ウイルス感染症対策、平成 28 年度三重県畜産技術研修会、三重県勤労福祉会館(三重県、津市)、2016 年 8 月 4 日
6. 目堅博久、牛白血病ウイルスの伝播と地域および農場における感染対策、平成 28 年度福岡県獣医師会産業動物部会特別講演、福岡県獣医畜産会館(福岡県、福岡市)、2016 年 5 月 13 日
7. 目堅博久、牛白血病ウイルス感染症 ~農場や地域における対策の実例を交えて~、平成 27 年度佐賀県獣医師会産業動物部会研修会、グランデはがくれ(佐賀県、佐賀市)、2016 年 2 月 19 日
8. 目堅博久、牛白血病ウイルスの伝播経路と地域、農場における感染対策、大動物臨床研究会 第 6 回東京シンポジウム、東京大学農学部(東京都文京区)、2016 年 2 月 13 日
9. 目堅博久、牛白血病ウイルスの伝播と農場における感染対策、NOSAI 宮崎診療所長会議研修会、NOSAI みやざき本所(宮崎県、宮崎市)、2016 年 1 月 22 日
10. 目堅博久、牛白血病ウイルスの伝播経路と地域、農場における感染対策、第 39 回 大動物臨床研究会シンポジウム、酪農学園大学(北海道、江別市)、2015 年 11 月 7 日
11. 桐野有美、目堅博久、他、ピレスロイド系防虫成分含有ネットによる吸血昆虫忌避効果の検証、平成 27 年度獣医学術九州地区学会、メルパルク熊本(熊本県、熊本市)、2015 年 10 月 16 日
12. 目堅博久、他、牛白血病ウイルスの感染量と予後の関係、第 158 回日本獣医学会学術集会、北里大学(青森県、十和田市)、2015

年9月7日

13. 目堅博久、牛白血病ウイルスの感染経路について～農場における実例を交えながら～、2015年度牛臨床寄生虫研究会九州研究集会・九州沖縄産業動物臨床研究会第3回研究集会合同研究集会、もと湯の宿黒田や(大分県、別府市)、2015年7月12日
14. 目堅博久、他、妊娠期および分娩時の牛白血病ウイルス垂直感染リスクの解析、平成26年度獣医学術九州地区学会、かごしま県民交流センター(鹿児島県、鹿児島市)、2014年10月4日
15. 目堅博久、他、若齢の白血病発症牛で認められた牛白血病ウイルスのenv領域188アミノ酸の脱落、第157回日本獣医学会学術集会、北海道大学(北海道、札幌市)、2015年9月12日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

目堅 博久 (MEKATA Hirohisa)

宮崎大学・テニュアトラック推進機構・助教

研究者番号：90633264