牛白血病ウイルス感染症の検査法とその特徴

目堅博久^{1,2)†}

1) 宮崎大学テニュアトラック推進機構産業動物防疫学分野

2) 宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター

(2015年12月25日受付・2016年1月31日受理)

要 約 牛白血病ウイルス (bovine leukemia virus: BLV) は届出伝染病である地方病性牛白血病の原因ウイルスである。近年、牛白血病発症の届出数およびBLV感染率がともに増加しており、農場でのBLV感染対策の実施が求められている。BLVは感染後にプロウイルスとして宿主染色体に組み込まれるため、一度の感染が生涯持続する。感染や発症を防ぐワクチンや治療法もないために新たな感染を防ぐこと、感染農場であれば感染牛を経済的に可能な範囲で非感染牛に更新していく以外に実施可能な対策はない。対策を成功させるにはBLV感染牛の正確な診断と把握が必要となる。BLV感染症の診断法は主に抗BLV抗体の検出とBLV遺伝子の検出に分けられる。抗BLV抗体の検出では、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法、受身赤血球凝集反応法、寒天ゲル内沈降反応法が、BLV遺伝子の検出では、real-time polymerase chain reaction (PCR) 法とnested PCR法が主に国内で使用されている。これらの検査法は検出するターゲットや感度、特異度が異なるために必ずしも結果が一致しない。また、それぞれの検査法にメリットやデメリットがあるため、目的にあった検査法を選択することが重要である。特に注意しなくてはならないのは、それぞれの検査法に固有なウインドウ期 (ウイルス感染後、陽性と判定できるまでの期間) と適用可能な月齢があることである。さらに大動物臨床の採血現場では患者の取り扱いがしばしば起こる。検査結果の適切な解釈とウインドウ期、採血の取り扱いへの対応を含めた検査計画が農場での効果的なBLV感染症対策につながる。本稿では主に国内で用いられているBLV感染症診断法を紹介し、そのメリットとデメリット、適用可能な時期や検査結果の解釈について概説する。

——キーワード：牛白血病, BLV, 抗体検査, PCR法, ウインドウ期

.....産業動物臨床医誌 6 (増刊号): 221-226, 2016

全国的に牛白血病の届出数が増加している。地方病性牛白血病 (enzootic bovine leukosis: EBL) の原因ウイルスである牛白血病ウイルス (bovine leukemia virus: BLV) の国内における感染率も増加している。未発症感染牛の一部においても免疫抑制傾向が報告され、早急なBLV感染症対策の実施が必要である。BLVの感染や牛白血病の発症を防ぐワクチンおよび治療法がないため、農場で行えるBLV感染症対策は、新たな感染を防ぐこと、感染牛を経済的に可能な範囲で非感染牛に更新して農場の感染率を下げることである。そこで、感染状態の正確な把握はBLV感染症対策を行うにあたって非常に重要となる。本稿では、BLV感染症の制御に欠か

せないBLV感染症の診断法を紹介し、診断結果の解釈や注意すべき点を概説する。

1. BLV感染症

BLVはレトロウイルス科デルタレトロウイルス属 (*Retroviridae Deltaretrovirus*) に分類されるEBLの原因ウイルスである [1]。牛白血病には、EBLの他に、感染性物質が原因でない散发型牛白血病 (sporadic bovine leukosis: SBL) がある [2]。国内における牛白血病の届出数は、本病が届出伝染病に指定された1998年以降の約15年間で20倍以上に増加している (農林水産省ホームページ、監視伝染病発生状況より)。この背景には、畜

† 連絡責任者：目堅博久 (宮崎大学テニュアトラック推進機構産業動物防疫学分野, 宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター)
〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西1-1 ☎/FAX 0985-58-7881
E-mail: mekata@cc.miyazaki-u.ac.jp

産関係者の牛白血病への認識拡大と合わせて、BLVの感染拡大が推察される。1980年代は5%前後であったBLVの感染率が、2009～11年に行われた全国規模の調査で約35%に増加していたことが明らかとなった[3, 4]。

BLVに感染した牛の多くは臨床症状を示さない。約30%の感染牛は恒常的にリンパ球数が多い状態の持続性リンパ球増多症（persistent lymphocytosis: PL）となる[5]。未発症感染牛でも経済的な損失を伴うという報告は以前からあったが[6]、近年、PLの牛でリンパ球の機能が抑制されていることが複数の研究で明らかになった[7-11]。約5%の感染牛は感染から数年後にEBLを発症して予後不良となる。また、と畜場で牛白血病と診断された牛は、と畜場法によって全廃棄処分となるために畜産業にとって大きな損害となる。

農場でできるBLV感染症対策は、感染牛から非感染牛へのウイルスの伝播を防ぎつつ、感染牛を経済的に可能な範囲で非感染牛に更新し、農場の感染率を下げることである。そのためには、診断法の特徴や欠点を理解し、正確にBLVの感染診断を行う必要がある。

2. BLV感染症の診断法

BLV感染症の診断法は大きく2つに分けられる。BLVに感染後、感染宿主体内で産生される抗BLV抗体を検出する方法と、宿主の染色体にプロウイルスの形で組み込まれたBLV遺伝子を検出する方法である。抗BLV抗体を検出する方法は主に寒天ゲル内沈降反応法と受身赤血球凝集反応法、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法が用いられている。BLV遺伝子を検出する方法は主にreal-time polymerase chain reaction (PCR) 法とnested PCR法が用いられている。検出するターゲットや感度が異なるため、必ずしも結果が一致するわけではない。また、検査方法によってウインドウ期や特異度は異なる。これらを考慮に入れたうえで、農場における感染対策に活用する必要がある。

3. 抗BLV抗体を検出する検査法

BLVは感染後、染色体にプロウイルスの形で組み込まれるために感染は生涯持続する。そのため、抗体価は生涯にわたって高い値を維持する。抗BLV抗体を検出する検査法で注意しなくてはならないのは、ウインドウ期と移行抗体の影響である。

ウインドウ期とは、BLVに感染してから各検査法で抗BLV抗体を検出できるようになるまでに要する空白期間のことである。ウインドウ期があるために、一度の検査では不十分であり、ウインドウ期以上の間隔を空けて2度の検査が必要となる。ウインドウ期の長さは宿主の免疫状態、暴露されたウイルス量、感染経路や感染

部位など複数の要因に依存する。牛を用いた実験感染では、抗体価が上昇するまでに2～8週間程度を要することが報告されている[12-14]。静脈中に多くのウイルスを接種する実験感染では、農場における感染と比較して抗体価があがりやすいことが想定される[15]。自然感染では実験感染よりウインドウ期が長く、筆者が関わった農場での事例をふまえると、2カ月前後は要すると推測される。

移行抗体は9カ月齢で完全に消失するという報告がある[16]。6カ月齢以降の子牛の多くは移行抗体が検査結果に影響しない水準まで消失しているため、抗体検査は可能である。以上をふまえて抗BLV抗体検査における、陽性、陰性の解釈を表1にまとめた。

抗BLV抗体の検出に使用する抗原には、ウイルス全粒子、ウイルスRNAを取り囲むカプシドを構成するp24、ウイルス粒子の最も外側に位置するエンベロープを構成するgp51のそれぞれの精製物、もしくは組換え体が多く用いられている。このうち、非特異反応が少なく感度が高いgp51を検出する系が国内では主に使用されている。

抗BLV抗体を検出する方法は主に3つある（表2）。ELISA法のメリットは感度が高いこと、比較的操作が簡便であること、多検体の検査に要する時間が他の方法と比較して短いことがあげられる。そのため、農場における全頭検査などで用いられる。デメリットは測定にマイクロプレートリーダーが必要なために検査できる機関が限られること、少頭数の検査では1頭あたりの検査コストが高くなることである。

受身赤血球凝集反応法のメリットは特別な機器を必要としないこと、抗体価を測定できること、少頭数の検査に有用なことである。p24に対する抗体価と感染ウイルス量に相関があることが報告されている[17]。しかし、ウイルス全粒子やgp51を抗原として用いた場合、抗体価と感染ウイルス量の間に相関は認められていない。本法は、と畜場や農場においてEBLを疑う牛の診断補助として有用であり、陰性だった場合にEBLは否定される。

寒天ゲル内沈降反応法のメリットは特別な機器を必要としないこと、操作が簡便なことがあげられる。本法は少頭数だけでなく、多頭数の検査にも用いられてきた。デメリットはELISA法と比較して感度が低いこと

表1. 抗BLV抗体検査における検査結果の解釈

検査対象	抗体検査結果	
	陽性	陰性
6カ月齢未満	感染, 移行抗体	非感染, ウインドウ期 (約2カ月)
6カ月齢以降	感染	非感染, ウインドウ期 (約2カ月)

表2. 抗BLV抗体を検出する方法

検査法	商品名	国内における販売会社	メリット	デメリット	適用
ELISA法	牛白血病エライザキット	JNC株式会社	感度が高い 操作が簡便 多検体の検査に向く	高額な機器が必要 少数検体の検査に向かない	農場における全頭検査
受身赤血球凝集 反応法	牛白血病抗体アッセイキット 「日生研」	日生研株式会社	操作が簡便 特殊な機器を必要としない 抗体価の測定ができる 少検体の検査に向く		EBLを疑う牛の診断補助 少頭数の検査
ゲル内沈降反応法 (販売停止)	牛白血病診断用抗原 「北研」	北里第一三共ワクチン 株式会社	操作が簡便 特殊な機器を必要としない	感度がやや低い	農場における全頭検査 EBLを疑う牛の診断補助 少頭数の検査

[18], 多頭数の検査ではELISA法と比べて作業時間を要することである。そのため、近年はELISA法によって代わられている。

上記の検査法では、まれに擬陽性反応が出る。その場合は、数カ月の間隔を空けて同じ方法で再検査を行うか、PCR法による検査結果を判断材料に加えることが有効である。

4. BLV遺伝子を検出する検査法

BLVは主にB細胞に感染し、2本鎖DNAの形で染色体に組み込まれる。HIVなどのレトロウイルスと異なり、細胞外に放出されたウイルス粒子は非常に不安定なため[19]、血漿や血清中にウイルスRNAはほとんど存在しない。そのため、全血中の白血球からDNAを抽出し、プロウイルスを検出する。DNA抽出の効率や純度など、抽出の巧拙が検出感度に大きく影響する。検査の質を保証するためにも内部標準遺伝子の検出や分光光度計を用いてDNA濃度や純度を測定することを強く薦める。

抗BLV抗体の産生までに要する時間に比べて短いものの、PCR法にもウインドウ期は存在する。ウインドウ期

の長さは暴露されたウイルス量や感染部位などに依存する。実験感染では、ウインドウ期は2週間程度であるが[13, 14]、野外ではそれより長い時間を要すると考えられる。BLV遺伝子を検出する検査法のメリットは、移行抗体の影響を受けないことである。移行抗体の影響を受けないため、初乳を与えた新生子牛の検査も可能ではあるが、感染リスクが高い分娩時がウインドウ期に該当するため、1カ月齢以降に検査することを推奨する[20]。

PCR法の検出感度はPCR反応の鋳型となるゲノムの抽出効率や純度、量、PCR反応のサイクル数、使用するプライマーや酵素など複数の要因に影響を受ける。そのため、検査結果を安定させるためにも同一の方法で検査することが望ましい。農場においてBLVの感染拡大を防ぐためには感染ウイルス量が多い個体を把握し、非感染牛から離すことが重要である。つまり、多少の検出感度の違いに関わらず、常にPCR検査で陽性となる個体を検出することが重要である。以上をふまえたBLV遺伝子検査における、陽性、陰性の解釈を表3にまとめた。

BLV遺伝子を検出する検査法として、主にreal-time PCR法とnested PCR法が用いられている(表4)。real-time PCR法のメリットは感染ウイルス量の測定ができる点である。感染ウイルス量は農場において感染源リスクとなる牛の指標となるため[19, 21, 22]、感染率の高い農場では更新や隔離の優先順位付けに使用できる。また、感染ウイルス量は発症リスクに関わることを示唆されているため、農場やと畜場におけるEBLの診断補助に用いることが期待されている[23]。BLVに感染後、数

表3. BLV遺伝子検査における検査結果の解釈

検査対象	遺伝子検査結果	
	陽性	陰性
全年齢	感染	非感染, ウインドウ期(約1カ月), 検出限界以下

表4. BLV遺伝子を検出する方法

検査法	国内における販売会社	メリット	デメリット	適用
real-time PCR法	タカラバイオ株式会社 理研ジェネティクス	感染ウイルス量の測定ができる 移行抗体の影響を受けない	高額な機器が必要 多数検体の検査に向かない	農場における全頭検査 高感染農場での検査 子牛の検査 EBLを疑う牛の診断補助
nested PCR法	該当なし	検出感度が高い 移行抗体の影響を受けない	高額な機器が必要 煩雑な作業を要する	子牛の検査 農場における全頭検査

週間はウイルス血症を起こすため、全ての感染牛で感染ウイルス量が高くなることには注意する必要がある

[19]. nested PCR法はsingle PCRの増幅産物を再度、鋳型に用いてPCR反応を行う方法である。BLVの標的遺伝子としては、envやlong terminal repeatなどが用いられている [24-26]。メリットはreal-time PCR法と比べて検出感度が高いことであり、デメリットは作業が煩雑であること、コンタミネーションのリスクが高いため、一定の作業技術を要することである。

5. 結果の解釈について

遺伝子陽性かつ抗体陰性のケースの多くは、十分に抗体価が上昇していない感染直後の個体である。遺伝子陰性かつ抗体陽性のケースの多くは、遺伝子検査の感度が高くなく、かつ感染ウイルス量が極端に抑えこまれているケースである。感染ウイルス量はウイルス側の要因や宿主側の要因に影響されるが [27, 28]、感染ウイルス量が少ないために遺伝子陰性かつ抗体陽性の牛は、感染源となるリスクが低い [21]。また、使用したプライマーの標的部位がウイルスの遺伝子と一致していない可能性もありえる。

検査結果が陰転したという相談を受けることがあるが、牛のDNA鑑定などの結果から、そのほとんどは患者の取り違いや識別番号の記載間違いが原因であった。点呼による採血者の確認が可能なヒトの臨床現場でも採血の取り違いはしばしば起こる。大動物臨床における採血環境を考えると、十分な注意を払うとともに採血の取り違いが起こることを想定し、間隔をあけて2度検査するなどの対策をとることが必要である。

6. 宮崎大学の取り組み

宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター (Center for Animal Disease Control: CADIC) では、宮崎県を中心に九州に位置する家畜保健衛生所やNOSAI、地域JA、畜産協会、役場、大規模牧場との共同研究によって、モデル農場や地域レベルでのBLV感染症対策に取り組んでいる。CADICではELISA法 (JNC社) でスクリーニングを行い、Real-time PCR法 (タカラバイオ社) で確定検査および感染ウイルス量の測定を行っている。感染ウイルス量によって感染牛を4つのクラスに分類し、特に注意すべき牛を明確にしている。その後、畜主、従業員、現場を担当している臨床獣医師等と協議を行い、牛の配置を提案する。また、ウインドウ期や採血時の個体識別に対応するとともに農場での対策の検証を兼ねて、6カ月後に2度目の検査を行うことを推奨している。

7. 最後に

BLV感染症の清浄化は寒天ゲル内沈降反応法、ELISA法、あるいはPCR法いずれの検査法を用いても農場、地域、国レベルで達成されている [29-33]。重要な点は目的にあった検査法を選択し、その方法のウインドウ期とともに個体とサンプルの取り違いの可能性も考慮して一定の間隔を空けて2度検査を行うことである。

国内では寒天ゲル内沈降反応法に用いる試薬の販売停止により、BLV検査を行うには高額な機器が必要となっている。そのため、家畜保健衛生所や大学、民間の検査会社と臨床獣医師や畜産団体等、関連団体との連携がBLV感染症による畜産業の損失拡大を抑えるのに重要となっている。

8. 謝 辞

本稿の推敲をしていただいた宮崎大学の関口敏博士、堀井洋一郎博士に厚く御礼申し上げます。

9. 参考文献

1. Barez PY, et al. : Recent advances in BLV research, *Viruses*, 7, 6080-6088 (2015)
2. Mammerickx M, et al. : The diagnosis of enzootic bovine leukosis, *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 8, 305-309 (1985)
3. Murakami K, et al. : The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among Japanese cattle, *Vet Microbiol*, 148, 84-88 (2011)
4. Murakami K, et al. : 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 (2013)
5. Schwartz I, Lévy D : Pathobiology of bovine leukemia virus, *Vet Res*, 25, 521-536 (1994)
6. Ott S, et al. : Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms, *Prev Vet Med*, 61, 249-262 (2003)
7. Ikebuchi R, et al. : Increase of cells expressing PD-L1 in bovine leukemia virus infection and enhancement of anti-viral immune responses *in vitro* via PD-L1 blockade, *Vet Res*, 42, 103 (2011)
8. Della Libera AMMP, et al. : Effects of bovine leukemia virus infection on milk neutrophil function and the milk lymphocyte profile, *Vet Res*, 46, 2 (2015)
9. Frie MC, Coussens PM : Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle. *Vet Immunol Immunopathol*, 163, 1-12 (2014)
10. Okagawa T, et al. : Increased bovine Tim-3 and

- its ligand expressions during bovine leukemia virus infection, *Vet Res*, 43, 45 (2012)
11. Suzuki S, et al. : Expression analysis of Foxp3 in T cells from bovine leukemia virus infected cattle, *Microbiol Immunol*, 57, 600-604 (2013)
 12. Heeney JL, et al. : Evidence for bovine leukemia virus infection of peripheral blood monocytes and limited antigen expression in bovine lymphoid tissue, *Lab Invest*, 66, 608-617 (1992)
 13. Gillet NA, et al. : Massive depletion of bovine leukemia virus proviral clones located in genomic transcriptionally active sites during primary infection, *PLoS Pathog*, 9, e1003687 (2013)
 14. Naif HM, et al. : 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 (1992)
 15. Kohara J, et al. : Experimental transmission of bovine leukemia virus in cattle via rectal palpation, *Jpn J Vet Res*, 54, 25-30 (2006)
 16. Gutiérrez G, et al. : Natural progression of bovine leukemia virus infection in Argentinean dairy cattle, *Vet Microbiol*, 151, 255-263 (2011)
 17. Gutiérrez G, et al. : Bovine leukemia virus p24 antibodies reflect blood proviral load, *BMC Vet Res*, 8, 187 (2012)
 18. Trono KG, et al. : Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods, *Vet Microbiol*, 83, 235-248 (2001)
 19. Rodríguez SM, et al. : Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV, *Viruses*, 3, 1210-1248 (2011)
 20. Mekata H, et al. : Evaluation of the natural perinatal transmission of bovine leukaemia virus, *Vet Rec*, 176, 254 (2015)
 21. Mekata H, et al. : Horizontal transmission and phylogenetic analysis of bovine leukemia virus in two districts of Miyazaki, Japan, *J Vet Med Sci*, 77, 1115-1120, (2015)
 22. Juliarena MA, et al. : Determination of proviral load in bovine leukemia virus-infected cattle with and without lymphocytosis, *Am J Vet Res*, 68, 1220-1225, (2007)
 23. Somura Y, et al. : 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 (2014)
 24. Asfaw Y, et al. : Distribution and superinfection of bovine leukemia virus genotypes in Japan, *Arch Virol*, 150, 493-505 (2005)
 25. Tajima S, et al. : Complete bovine leukemia virus (BLV) provirus is conserved in BLV-infected cattle throughout the course of B-cell lymphosarcoma development, *J Virol*, 72, 7569-7576 (1998)
 26. Tajima S, et al. : A mutant form of the tax protein of bovine leukemia virus (BLV), with enhanced transactivation activity, increases expression and propagation of BLV *in vitro* but not *in vivo*, *J Virol*, 77, 1894-1903 (2003)
 27. Xu A, et al. : Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus, *J Immunol*, 151, 6977-6985 (1993)
 28. Mirsky ML, et al. : Reduced bovine leukaemia virus proviral load in genetically resistant cattle, *Anim Genet*, 29, 245-252 (1998)
 29. Maresca C, et al. : Enzootic bovine leukosis: report of eradication and surveillance measures in Italy over an 8-year period (2005-2012), *Prev Vet Med*, 119, 222-226 (2015)
 30. Shettigara PT, et al. : Control of bovine leukemia virus infection in dairy herds by agar gel immunodiffusion test and segregation of reactors, *Can J Vet Res*, 53, 108-110 (1989)
 31. Acaite J, et al. : The eradication experience of enzootic bovine leukosis from Lithuania, *Prev Vet Med*, 82, 83-89 (2007)
 32. Klintevall K, et al. : Evaluation of an indirect ELISA for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus in milk and serum, *J Virol Methods*, 33, 319-333 (1991)
 33. Nuotio L, et al. : Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland, *Prev Vet Med*, 59, 43-49 (2003)

Diagnosing bovine leukemia virus infection

H. Mekata^{1, 2) †}

1) *Field of Animal Disease Control, Organization for Promotion of Tenure Track, University of Miyazaki*

2) *Division of Research and Inspection for Infectious Diseases, Center for Animal Disease Control, University of Miyazaki*

ABSTRACT Bovine leukemia virus (BLV) is the etiological agent of enzootic bovine leukosis (EBL), which is a notifiable infectious disease of cattle in Japan. The number of EBL notifications and the rate of BLV infections have increased in recent years. BLV causes lifelong infection due to integration of the provirus into the host chromosome. There is no effective vaccine or treatment for BLV infection or EBL development. Therefore, on-farm BLV control programs primarily center on quarantine and replacement of infected cattle. Accurate diagnosis is important to maximize the effectiveness of these eradication programs. Diagnostic methods for BLV infection can be divided into two groups: those that detect the BLV antibody and those that detect proviral DNA. In Japan, enzyme-linked immunosorbent assays, passive hemagglutination tests and agar gel immunodiffusion tests are the most common methods used for detection of the BLV antibody. Real-time polymerase chain reaction (PCR) and nested PCR are the primary techniques employed for detection of proviral DNA. Each method has a different sensitivity, specificity and window period. Therefore, choosing the appropriate diagnostic method is important. Furthermore, blood-sampling mistakes can occur in large animal clinical facilities. Well-planned testing, which includes accurate interpretation of the diagnostic outcome and addressing blood-sampling mistakes, leads to effective BLV countermeasures. In this article, methods for diagnosing BLV infection and interpretation of each result are reviewed.

—**Key Words** : antibody detection, bovine leukemia virus, enzootic bovine leukosis, polymerase chain reaction, window period

† Correspondence to : Hirohisa Mekata (*Field of Animal Disease Control, Organization for Promotion of Tenure Track and Division of Research and Inspection for Infectious Diseases, Center for Animal Disease Control, University of Miyazaki*)
1-1 Gakuen Konohanadai-Nishi, Miyazaki 889-2192, JAPAN
TEL/FAX : 0985-58-7881 Email : mekata@cc.miyazaki-u.ac.jp

.....Jpn. J. Large Anim. Clin. 6 (supple) : 221-226, 2016