

平成24年度 成績概要書

研究課題コード： 6102-644521（公募型研究）

1. 研究成果

- 1) **研究成果名**：乳房内注入による牛白血病ウイルスの感染
（予算課題名：乳汁による牛白血病ウイルス伝播経路の解明）
- 2) **キーワード**：牛白血病ウイルス（BLV） 乳房 注入
- 3) **成果の要約**：乾乳牛の乳頭槽内に牛白血病ウイルス（BLV）を遺伝子量として43コピー/1回注入することにより3頭中2頭が感染した。また、泌乳牛でも 2.4×10^4 コピー/3回の乳頭槽内注入により1頭が感染した。このことから、BLVの乳房内侵入による感染の危険性を明らかにした。

2. 研究機関名

- 1) **担当機関・部・グループ・担当者名**：畜産試験場・基盤研究部・家畜衛生G・桜井由絵
- 2) **共同研究機関（協力機関）**

3. **研究期間**：2010～2012年度（平成22～24年度）

4. 研究概要

1) 研究の背景

牛白血病は家畜伝染病予防法における届出伝染病の1つであり、近年、全国的に発症頭数が増加している。牛白血病ウイルス（BLV）は血液および乳汁中の感染リンパ球が非感染牛に侵入することで伝播する。伝播経路として注射針の使いまわしや吸血昆虫による媒介、感染牛の初乳給与などが知られている。その一方で、搾乳作業による感染の危険性については明らかにされていない。

2) 研究の目的

BLVの乳房内および乳頭皮膚からの侵入による感染の有無について感染試験により明らかにする。

5. 研究方法

1) 乳房内へのBLV注入試験

ねらい：BLVを含む乳汁の乳房内注入による感染の有無を明らかにする。

(1) 乾乳牛への注入試験

試験項目等：BLVを遺伝子量として 2.5×10^7 および 6.9×10^5 コピー/3回、各々3頭の乳房内深部に（試験1-1および1-2）、43コピー/1回を3頭の乳頭槽内に注入した（試験1-3）。注入後、毎週採血しリアルタイムPCRで血中BLV遺伝子の検出を行った。陰性対照牛は同一牛舎内で実験牛から1.3m以上離して飼育していた牛とし、ELISA法によりBLVに対する血清中抗体を測定した（以下同様）。

(2) 泌乳牛への注入試験

試験項目等：BLV 2.6×10^5 コピー/3回を2頭の乳頭槽内に注入し、注入後2時間以上経過してから搾乳した（試験1-4）。また、 1.7×10^5 、平均 3.1×10^4 (2.4×10^4 , 3.9×10^4) および平均525 (450, 600) コピー/3回を各々1, 3および2頭の乳頭槽内に注入し、その直後に搾乳した（試験1-5, 1-6および1-7）。血中BLV遺伝子の検出は(1)と同様に行った。

2) 乳頭皮膚へのBLV暴露試験

ねらい：BLVを含む乳汁の乳頭皮膚暴露による感染の有無を明らかにする。

試験項目等：BLV 1.8×10^5 および49コピー/mlの暴露材料を用いて、各々乳頭皮膚に創傷のある乾乳牛1および3頭の乳頭に浸漬させた（試験2-1および2-2）。血中BLV遺伝子の検出は1)(1)と同様に行った。

6. 研究の成果

- 1) (1)試験1-1および1-2では全頭が注入後3週までに、試験1-3では3頭中2頭が注入後4週で血中BLV遺伝子が検出され、感染が確認された（表1, 図1左）。このことから、乾乳牛では少なくともBLV43コピー/1回の乳頭槽内注入で感染することが示された。陰性対照牛は試験期間中抗体陰性を維持し、試験処理以外の原因によるBLV感染がないことを確認した（以下同様）。
- 1) (2)試験1-4および1-5では全頭が、試験1-6では3頭中1頭 (2.4×10^4 コピー/3回注入) が注入後4週までに血中BLV遺伝子が検出され、感染が確認された（表2, 図1右）。試験1-7では注入後8週までに血中BLV遺伝子は検出されず感染は確認されなかった（表2）。このことから、泌乳牛では乳頭槽内注入後直ちに搾乳する条件下では、少なくともBLV 2.4×10^4 コピー/3回で感染することが示された。
- 2) 試験2-1および2-2ともに全ての供試牛で暴露後8週までに血中BLV遺伝子は検出されず、感染は確認されなかった（表3）。

表1 乾乳牛における乳房内への BLV 注入試験

試験	注入材料中の BLV 感染血液量 ($\mu\text{L}/\text{頭}/\text{日}$)	注入材料量 (ml/乳頭)	注入回数	注入した総コピー数 (コピー数/頭)	注入方法	注入部位	感染頭数/供試頭数
1-1	8000	4.0	3	2.5×10^7	30cmカテーテル	乳房内深部	3/3
1-2	800	4.0	3	6.9×10^5	30cmカテーテル	乳房内深部	3/3
1-3	0.5	0.5	1	43	^{3.5cm} カニューレノズル	乳頭槽内	2/3*

*:感染した1頭は未経産牛

表2 泌乳牛における乳房内への BLV 注入試験

試験	注入材料中の BLV 遺伝子コピー数 (コピー数/頭/日)	注入材料量 (ml/乳頭)	注入回数	注入した総コピー数 (コピー数/頭)	注入方法	注入部位	感染頭数/供試頭数
1-4	8.5×10^4	4.0	3	2.6×10^5	^{3.5cm} カニューレノズル	乳頭槽内	2/2
1-5	5.6×10^4	4.0	3	1.7×10^5	^{3.5cm} カニューレノズル	乳頭槽内	1/1
1-6	平均 1.0×10^4 ($7.9 \times 10^3, 1.3 \times 10^4$)	1.0	3	平均 3.1×10^4 ($2.4 \times 10^4, 3.9 \times 10^4$)	^{3.5cm} カニューレノズル	乳頭槽内	1/3
1-7	平均 175 (150,200)	1.0	3	平均 525 (450,600)	^{3.5cm} カニューレノズル	乳頭槽内	0/2

・搾乳は試験 1-4 では注入後 2 時間以上経過後に実施、その他は注入直後に実施した。

表3 乳頭皮膚への BLV 暴露試験

試験	暴露材料中の BLV 感染血液濃度 ($\mu\text{L}/\text{ml}$)	暴露材料量 (ml)	暴露回数	BLV 遺伝子コピー数濃度 (コピー/ml)	暴露方法	乳頭の状態	感染頭数/供試頭数
2-1	500	10	1	1.8×10^5	浸漬 (1分間)	わずかな出血あり (乳頭腫を鈍性除去)	0/1
2-2	0.7	30	1	49	浸漬 (1分間)	出血あり (メスで約1cm切開)	0/3

・試験 2-1 は 3 本乳頭を処理、試験 2-2 は 1 本乳頭を切開

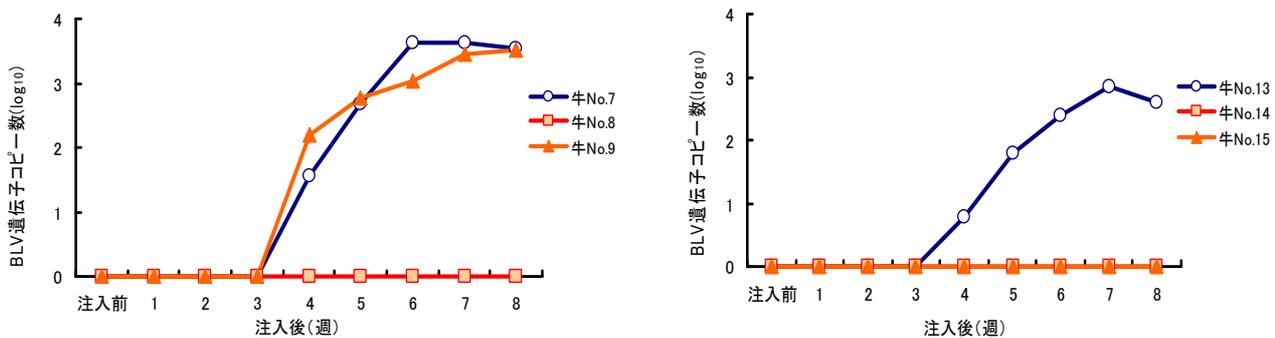


図1 注入後の BLV 遺伝子量 (コピー数/10ngDNA) の推移

左: 試験 1-3 (乾乳牛) 注入した BLV 遺伝子量: 43 コピー/1 回/頭

右: 試験 1-6 (泌乳牛) 注入した BLV 遺伝子量: 2.4×10^4 コピー/3 回/頭 (牛 No. 13)

3.9×10^4 コピー/3 回/頭 (牛 No. 14, 15)

7. 成果の活用策

1) 成果の活用面と留意点

- (1) 本試験の成果は酪農場における BLV まん延防止のための研究に活用される。
- (2) 本試験は、農林水産省レギュラトリーサイエンス新技術開発事業「牛白血病ウイルス (BLV) の感染拡大防止のための総合的衛生管理手法の確立」により実施したものである。

2) 残された問題とその対応