

令和6年度 J R A畜産振興事業に関する調査研究発表会

牛伝染性リンパ腫の検査法開発とその活用

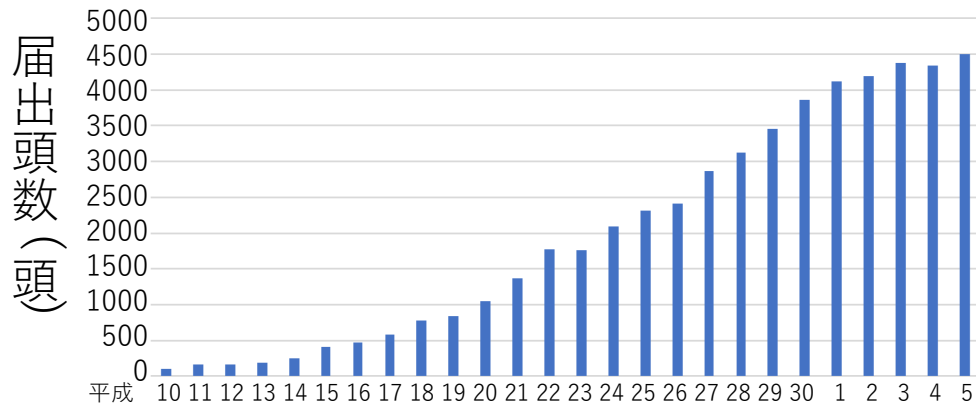
～生産現場での効果的な対策に向けて～

牛伝染性リンパ腫の損失低減技術開発事業

東京農業大学 農学部 動物科学科 動物衛生学研究室
准教授 小林 朋子

牛伝染性リンパ腫とは

- 全身に腫瘍ができるウシの疾病
- Bovine leukemia virus (BLV) の感染が原因
- 全国的にリンパ腫発症牛が増加 (年間約4,500頭が発症)



牛伝染性リンパ腫届出件数
(農林水産省監視伝染病監視伝染病の発生状況)

- 発症牛は、と畜場法により枝肉が全部廃棄となる



牛白血病検査マニュアル 岐阜県中央食肉衛生検査所

どうやって対策すればいいのか？
感染牛が増えすぎて対策できない・・・

牛伝染性リンパ腫ウイルス（BLV）とは

牛伝染性リンパ腫ウイルス（BLV）は

- 主にリンパ球（B細胞）に感染
- 日本全国の平均感染率⁽²⁰¹³⁾は、乳牛40%、肉用牛30%程度
- 感染しても臨床症状はほとんどない
→感染の有無は検査をしないと分からない
- 感染牛の約5%が、牛伝染性リンパ腫を発症



一般的な酪農家のほとんどに
BLV陽性牛がいる

感染経路

同居牛からの水平感染と、母牛からの垂直感染

- 水平感染

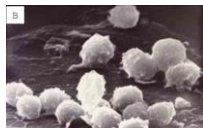
吸血昆虫、獣医療行為による機械的伝播（感染リンパ球の接取による）

- 垂直感染

感染母牛からの子宮内感染、初乳による感染



ニッポンシロアブ



口器に付着した
リンパ球

（社団法人中央畜産会）

牛伝染性リンパ腫に関連する国内状況の変化

牛伝染性リンパ腫はほとんどの都道府県において、牛の監視伝染病のうち最も発生数が多い。

抗体陰性を公表した競りの導入

雌子牛の牛伝染性リンパ腫、陰性公表し競り 宮崎県内全7家畜市場、クリーンPR

2024年9月19日

2010年に本県で発生した口蹄疫を機に「特定疾病のない地域づくり」として児湯地域で始まった、地域ぐるみの雌子牛の牛伝染性リンパ腫（BL）検査が全県に広がっている。今年5月にはBL陰性の雌子牛を競り市で公表する取り組みの導入が県内全7家畜市場で完了。関係者は「クリーンな宮崎の牛をPRし、販売向上につなげたい」と意気込む。



（全文は朝刊または携帯サイトで）

【写真】宮崎中央家畜市場のつなぎ場に掲げられた、BL陰性の雌子牛を示す「次世代雌牛」プレート。「他県よりも安心して買える」と、購買者から好評だ。宮崎市

宮崎日日新聞

長野県畜産広報

家畜衛生情報



しあわせ信州

令和6年7月3日
（通算第669号）
問い合わせ先
長野県庁園芸畜産課
026-235-7232

長野県中央家畜市場へ上場する和牛雌牛（子牛、成牛）の抗体検査について

牛伝染性リンパ腫対策として、以下の対象農場①又は②から長野県中央家畜市場へ上場する和牛雌牛（子牛、成牛）の抗体検査を衛生対策事業の対象とします。

- 対象農場**
- ①令和4年度以降に親牛全ての抗体検査を実施し、全頭陰性が確認されている農場
 - ②令和4年度以降に親牛全ての抗体検査を実施し、抗体陽性牛の割合が10%未満かつ、農場内感染拡大防止対策を講じている農場

実施期間 令和7年3月末まで

留意事項

- 検査に係る費用は発生しません。
- 市場開催日2週間前までの検査申込みに御協力をお願いします。
- 抗体検査陰性牛は、上場にあたり陰性札の表示をお願いします。

様々な指標を用いた実用的な対策の実現



→これまで困難だった

- ・病態進行を高精度に把握
- ・予後指標に基づいた防除を実現



(1) 評価手法の確立

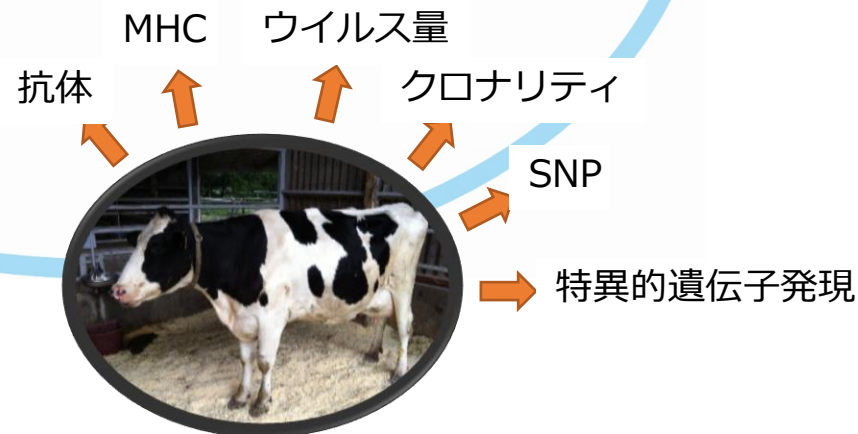
	検出対象	検査法
感染抵抗性	特異的免疫応答	ELISpot法
感染抵抗性	SNP	CycleavePCR法
発症指標	SNP	シーケンス法
発症指標	特異的遺伝子発現	LAMP法
発症指標	クローナリティ	RAIS法

農場での活用方法の提案、
防除計画立案、情報発信

(3) モデル農場における 各種指標の評価



(2) 複数の指標を総合的に評価する手法確立



牛伝染性リンパ腫による損失低減事業（R3-R6年度）

実施主体 学校法人東京農業大学

総括責任者

所属：東京農業大学 農学部
氏名：小林朋子（准教授）
専門領域：家畜衛生学、ウイルス学、獣医学

成果の共有
評価結果のフィードバック

共同実施機関

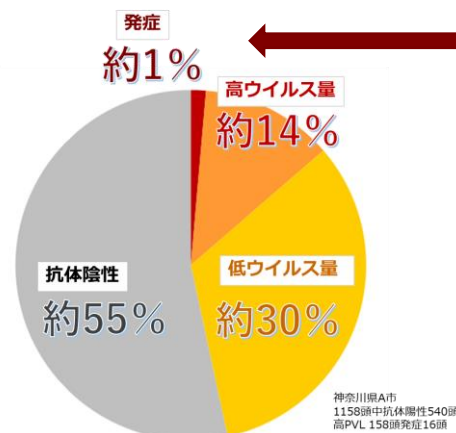
所属：東海大学総合農学研究所
氏名：今川和彦 教授

共同実施機関

所属：宮城大学 食産業学群
氏名：須田義人 教授

共同実施機関

所属：東京薬科大学
氏名：草間和哉 講師



平均的なBLV感染状況（酪農場）

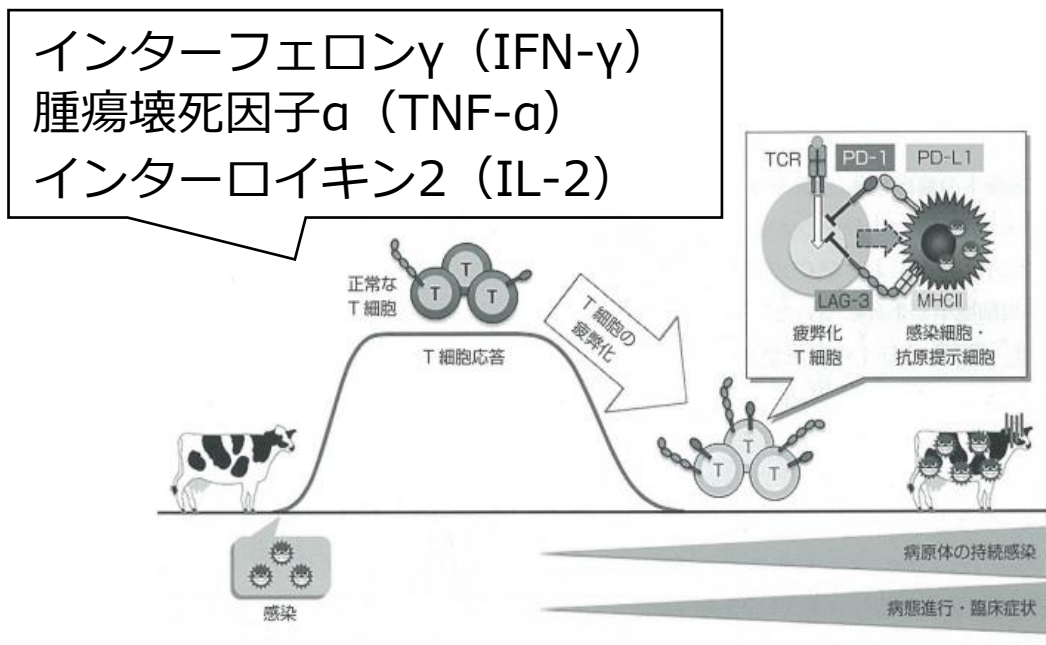
直接的な損失

どの牛が感染しにくい？

感染しにくい牛を知りたい (感染抵抗性指標の確立)

- **背景** : 汚染農場で長期飼養されているにもかかわらず感染しない牛が存在する
- **免疫応答** : BLV感染牛の病態進行には宿主の免疫応答が関連
ウイルス感染細胞に対する抗原特異的T細胞応答が関連

Th1サイトカイン



慢性感染症の病態進行とT細胞の疲弊化

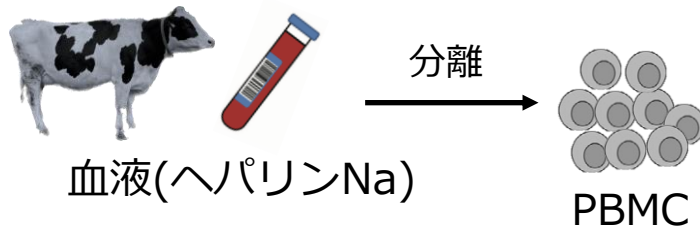
引用・改変：岡川朋弘(2022).臨床医学.緑書房

特にIFN- γ はBLV感染牛の免疫応答を評価する指標となるサイトカイン

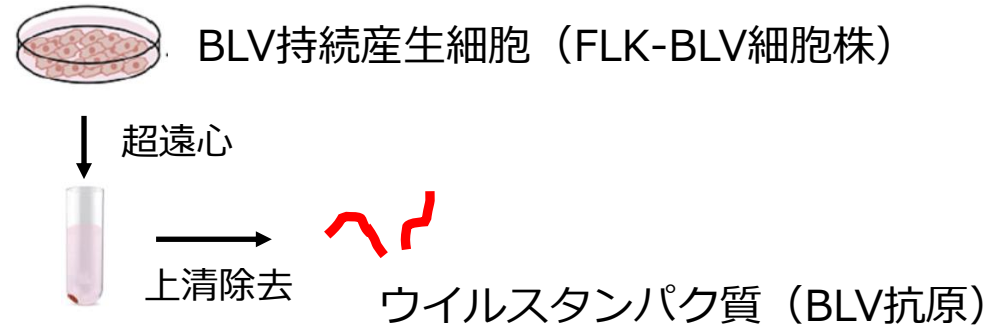
ELISpot (Enzyme-Linked ImmunoSpot) 法

- 抗原特異的免疫応答を評価・定量できる手法
- 末梢血単核球 (PBMC) 中の免疫細胞から産生されるサイトカインを単一細胞レベルで検出可能

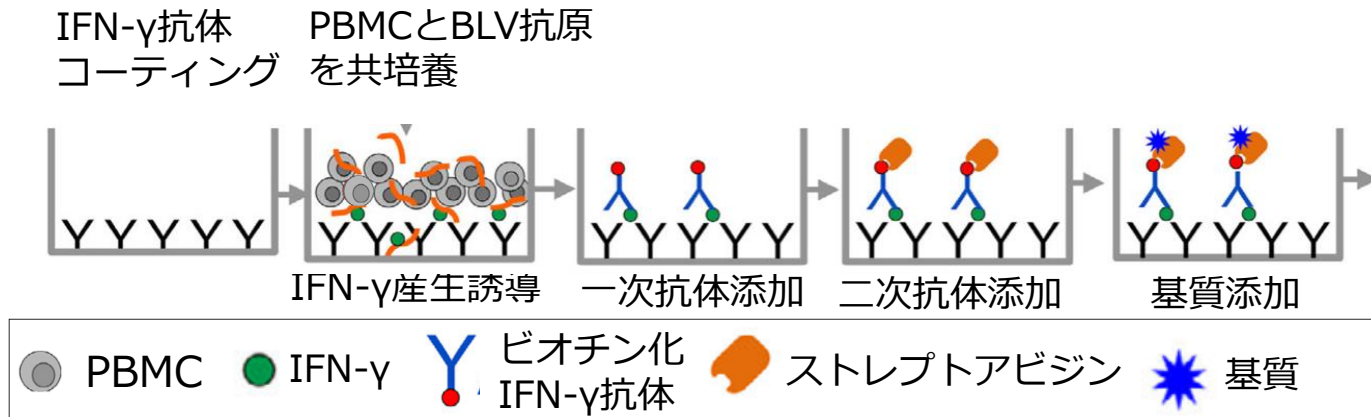
・ PBMC分離



・ ウイルスタンパク精製



・ ELISpot法



スポット検出画像例



材料 ヘパリンNa血液

2022年3月-2023年3月に採取した牛血液40検体
(神奈川県9農場・東京農業大学富士農場
・東京都芝浦と場・熊本県1農場)

方法1 リアルタイムPCR法による BLVプロウイルス量 (PVL) の定量

PVLに従い、以下の3群 + EBL牛に分ける

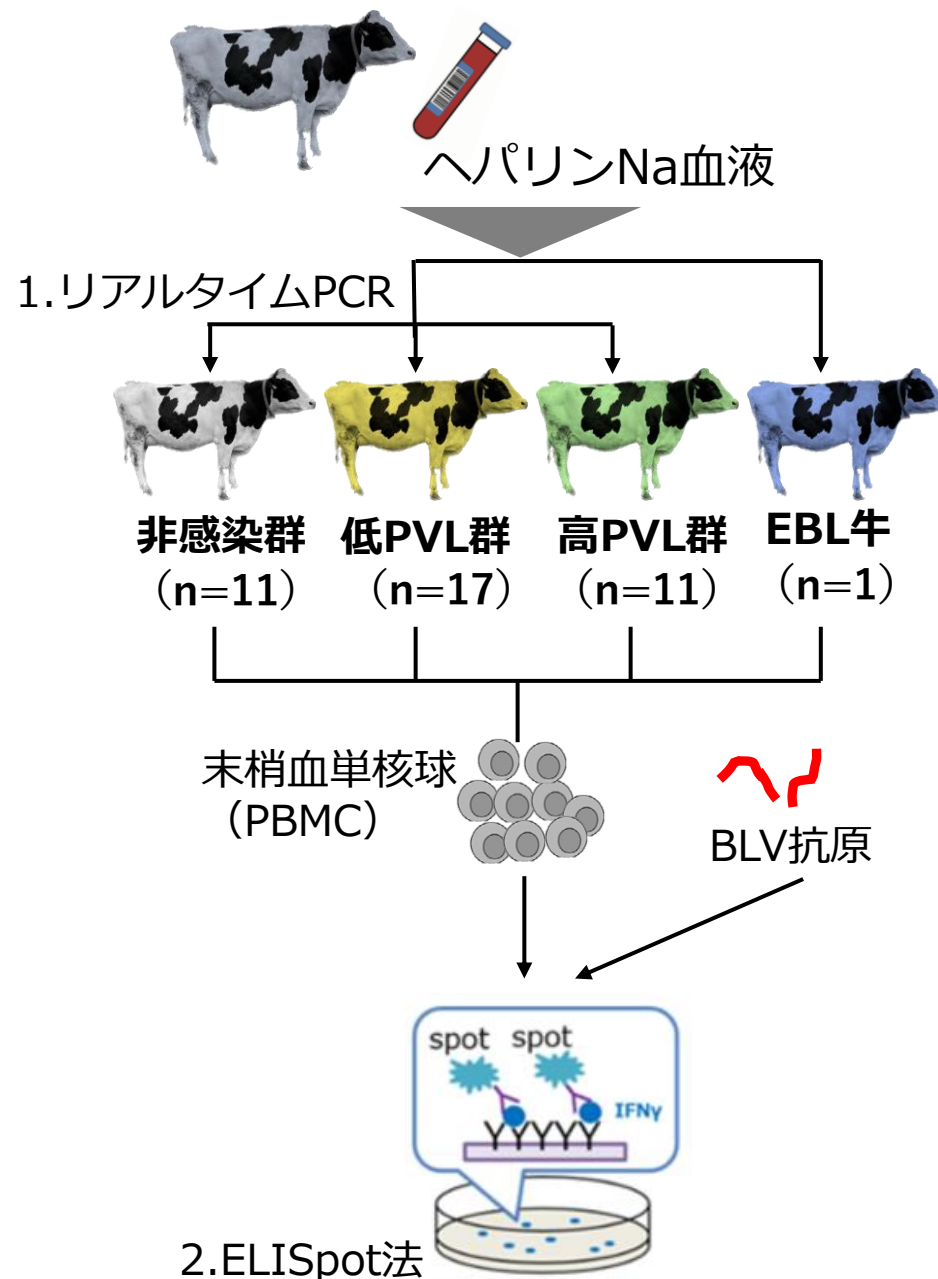
- ①非感染牛群
 - ②低PVL群(50,000copies/10⁵cells未満)
 - ③高PVL群(50,000copies/10⁵cells以上)
- +
- ④EBL牛

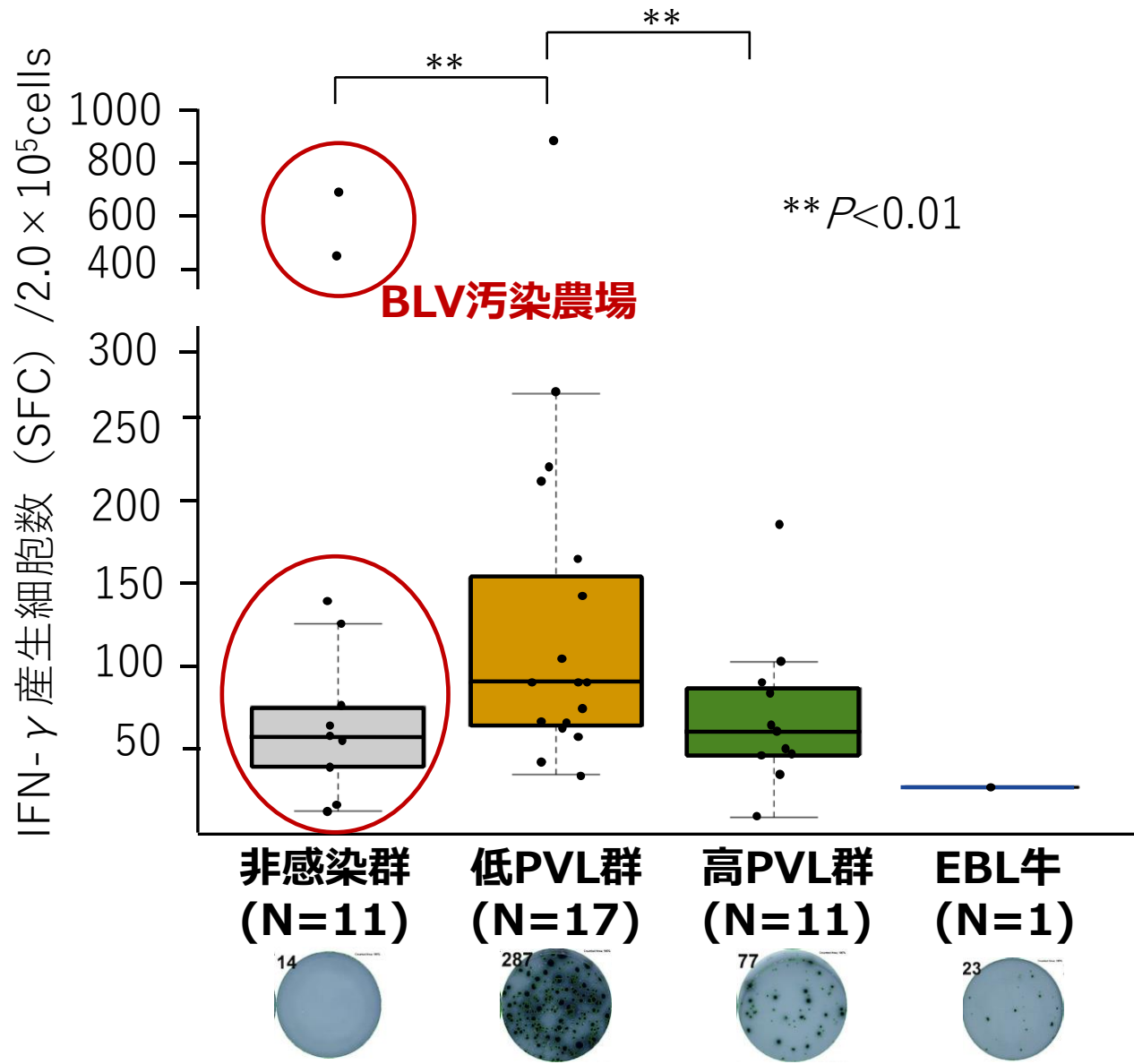
方法2 ELISpot法

- ・ヘパリンNa血液からPBMCを分離
- ・ウイルスタンパク質の精製 (BLV抗原)
- ・ELISpot法

方法3 IFN- γ 産生細胞数の統計解析

Mann-Whitney U 検定





BLV特異的IFN- γ 産生細胞数の定量

(SFC : Spot Forming Cells)

BLV感染牛のSFC

- ・ SFC中央値は低PVL群が最も高かった
低PVL群 > 高PVL群 > EBL

BLV非感染牛のSFC

- ・ SFC中央値は感染牛より低い
- ・ 2頭のみ非常に高い値を示した



この2頭はBLV汚染農場で飼養されていた



非感染ではあるが、BLV特異的免疫により感染を防いでいる可能性がある

感染しにくい牛を知りたい (感染抵抗性指標の確立) まとめ

■ 低PVL、高PVL、EBLの順にBLV特異的IFN- γ 産生細胞数が増加

・感染初期におけるBLVプロウイルス量増加に対する防御にIFN- γ が重要な役割
(Usui et al. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007)

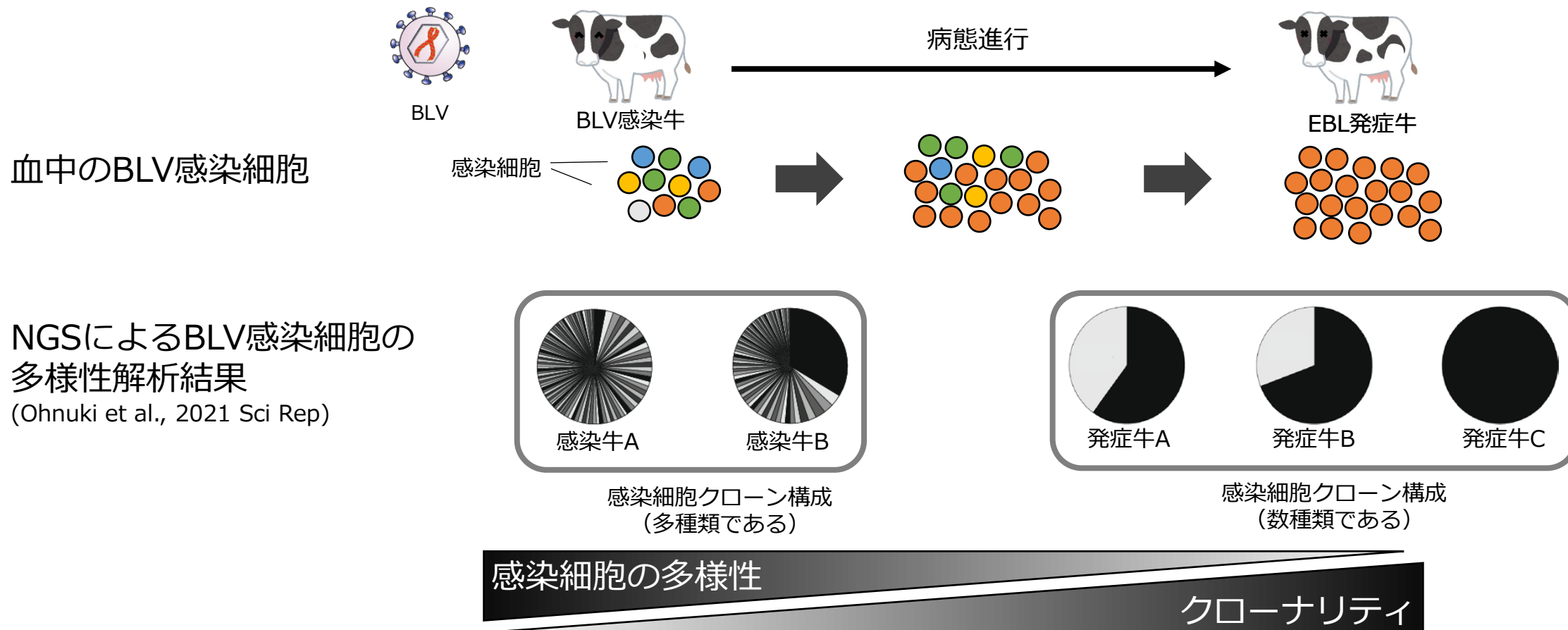
・病態進行に伴い免疫抑制因子 (PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4など) が過剰発現し、IFN- γ をはじめとするT細胞免疫応答を抑制
(Watari et al. *BMC Vet Res.* 2019)

ELISpot法を用いてBLV特異的T細胞免疫応答を解析可能

- **BLV非感染牛の中に、BLV特異的IFN- γ 産生細胞数が高値の個体が存在**
 - BLV汚染農場に50ヶ月以上飼養されているがBLVに感染していない
 - 活性化されたT細胞免疫応答により、BLV感染を防御している可能性

発症牛を早期に知りたい（発症検査法の確立）

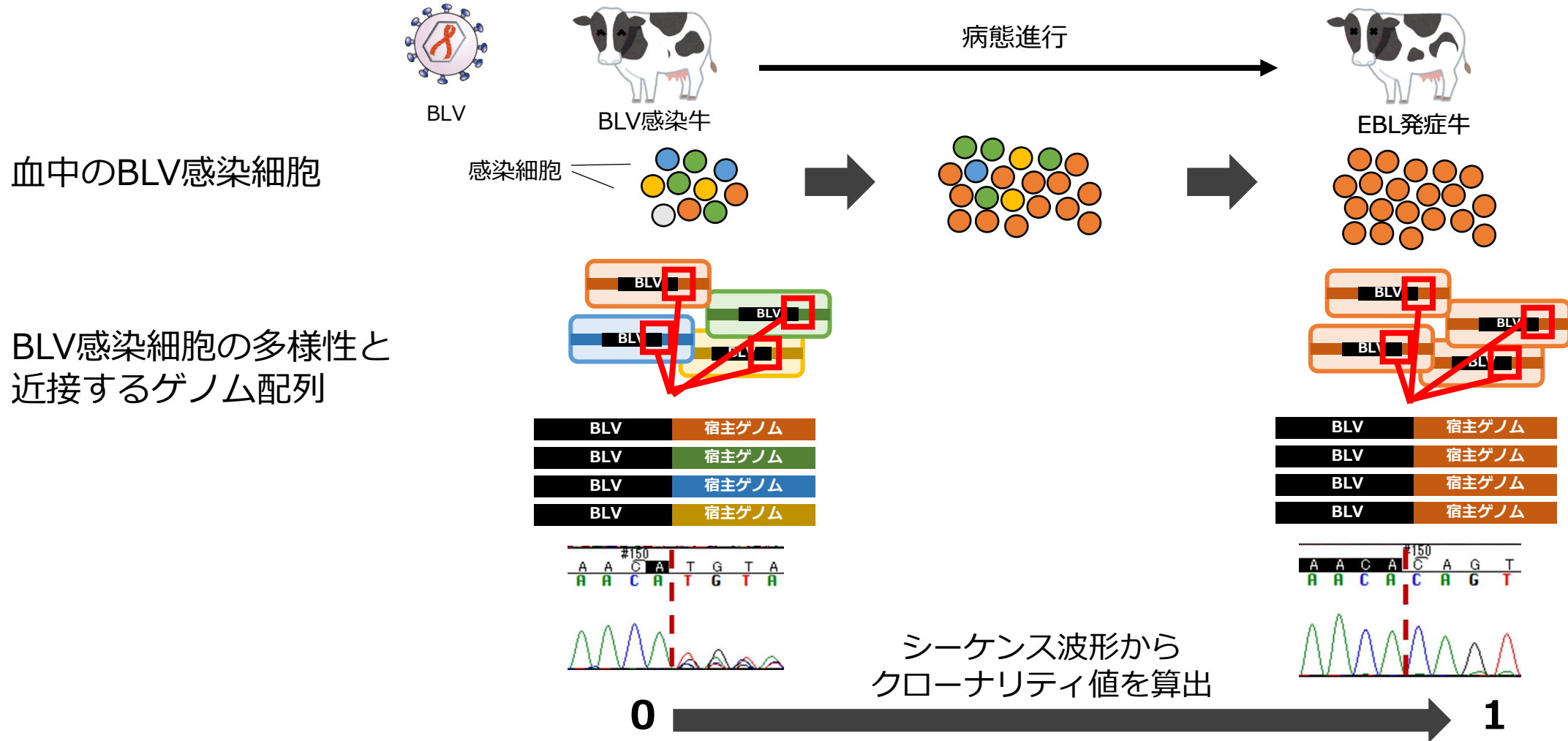
背景：病態進行と共に、感染細胞の多様性が減少し、クローナリティが高くなる



目的：NGSを用いずに簡便にクローナリティを解析する手法の確立

発症牛を早期に知りたい（発症検査法の確立） -クローナリティ-

感染初期：宿主ゲノムの多様な位置にBLVが組み込まれた、多様な感染細胞が存在
EBL発症：組み込み位置が同じ感染細胞が増加している

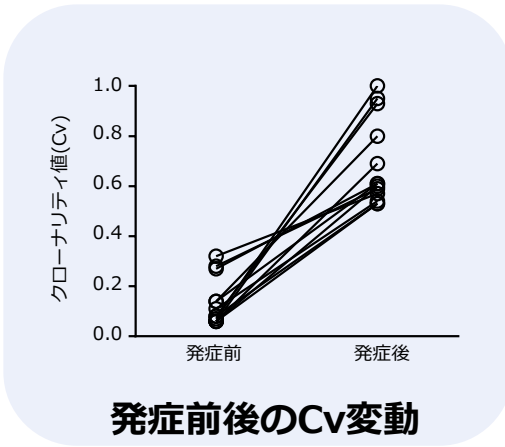
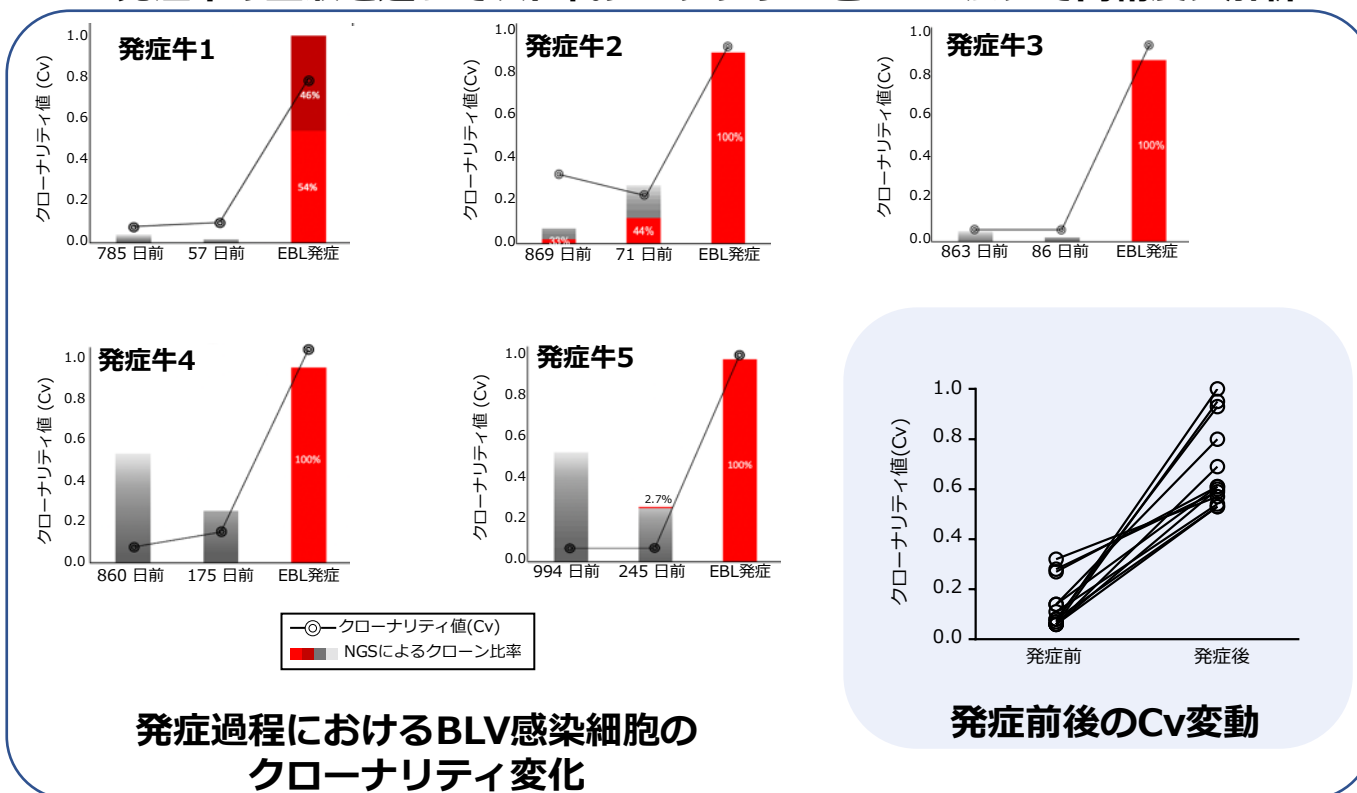


**BLVに近接する宿主遺伝子配列を利用したクローナリティ解析法
(Rapid Amplification of the Integration Site: RAIS 法) を確立した**

発症検査法の確立 –研究成果など–



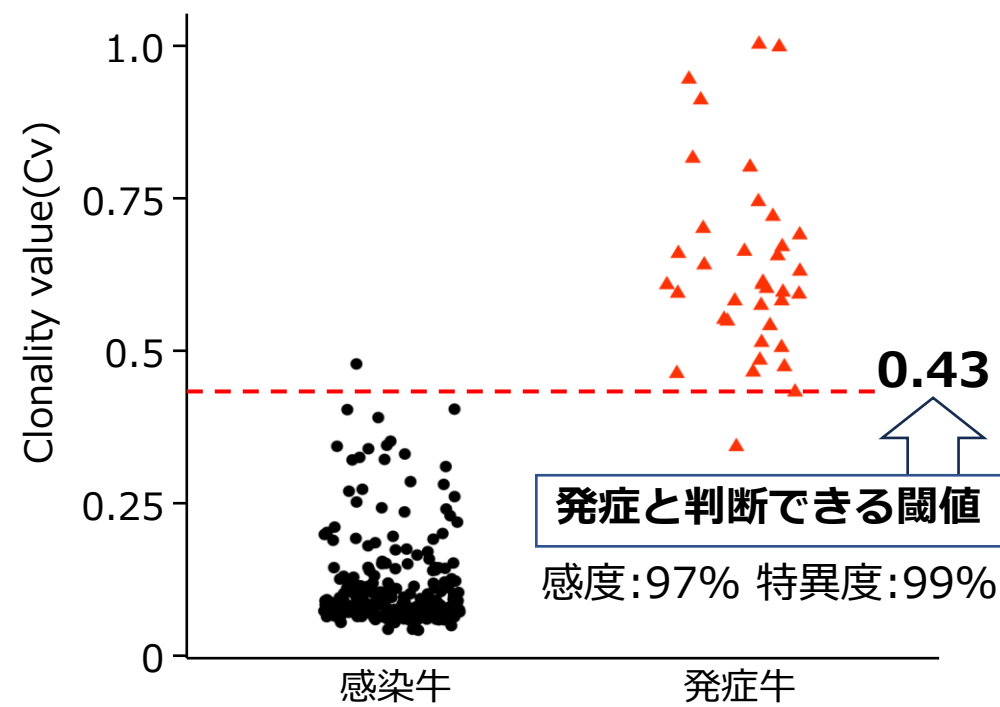
EBL発症牛の血液を遡って次世代シーケンサーとRAIS法にて高精度に解析



クローナリティは発症時に特異的に上昇していた

感染牛と発症牛におけるCvの比較

感染牛 (n=250) と発症牛 (n=37) においてCvを算出して比較した。

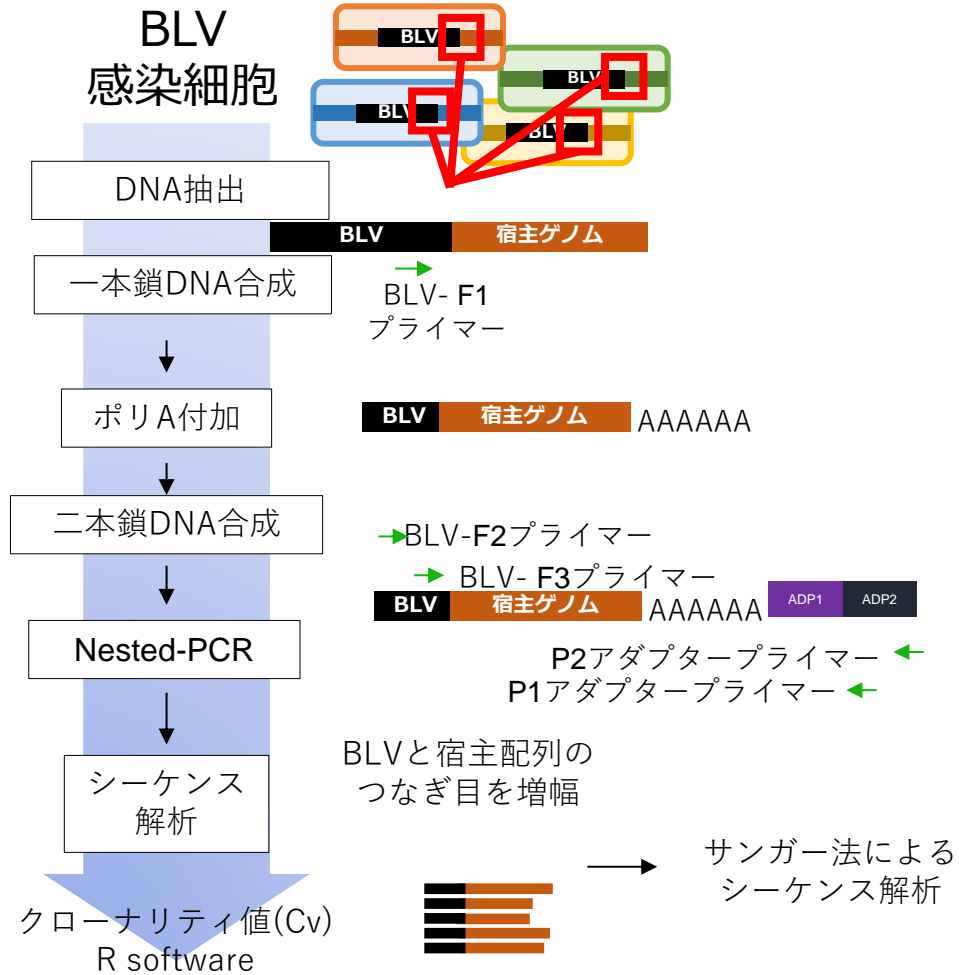


感染牛と発症牛におけるCvの比較

算出された閾値を使って、精度の高い発症検査を行うことができる

発症検査法の確立 -さらなる簡易法の検討-

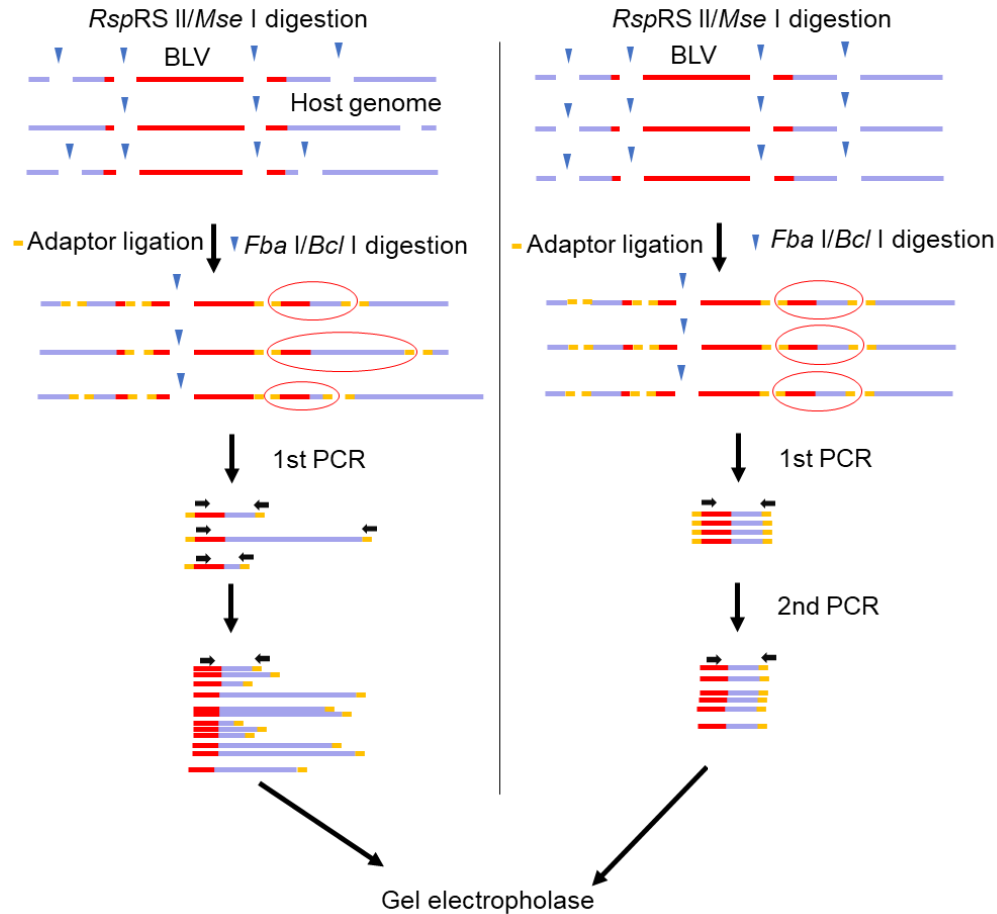
BLV-RAIS法



発症検査法の確立 –さらなる簡易法の検討–

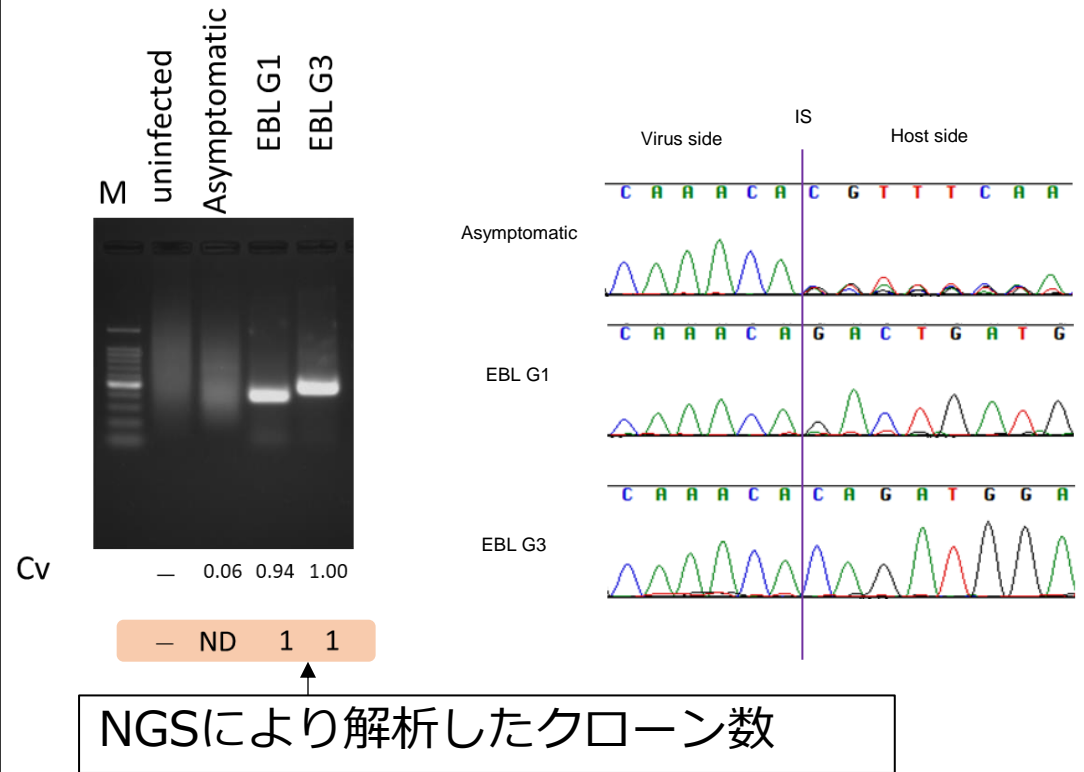
サンガーシーケンス法、ソフトウェア解析を用いない、ゲル電気泳動によるクローナリティ解析

制限酵素により断片化し、アダプター付加後PCR→電気泳動により解析



(Kobayashi et al., 2024 Microbiology Spectrum)

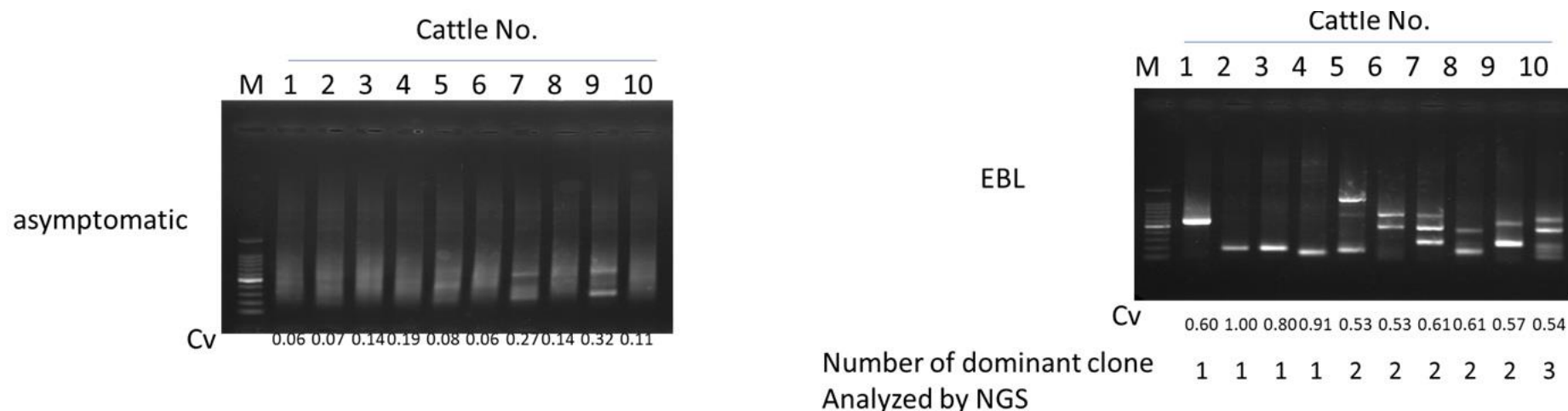
簡易法（電気泳動法）と従来法



増幅制限酵素断片長多型(Amplified fragment length polymorphism : AFLP)法により感染細胞のクローナリティを解析可能

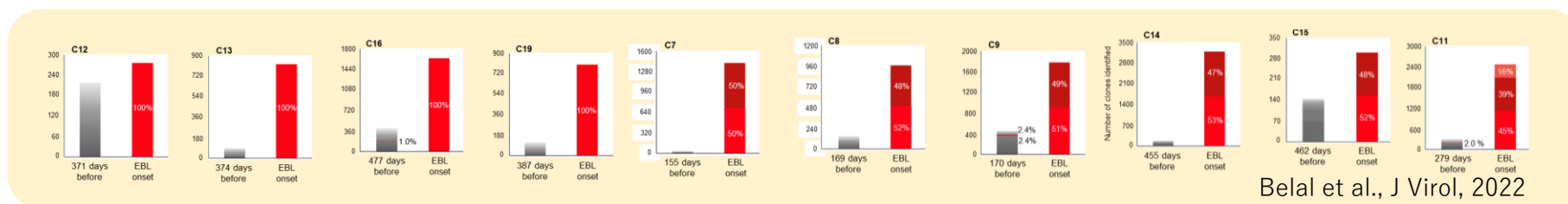
発症検査法の確立 – 実際の発症検体での検討 –

発症前の血液と、発症後の腫瘍を用いて、クローナリティ解析を行った



(Kobayashi et al., 2024 Microbiology Spectrum)

NGSによるBLV-capture-seqの結果との比較



Belal et al., J Virol, 2022

非発症検体ではCv値に応じて、スミアや若干の特異的増幅、
発症では、NGSの結果と一致する明瞭なバンドがみられた

発症検査法の確立 –まとめと考察–

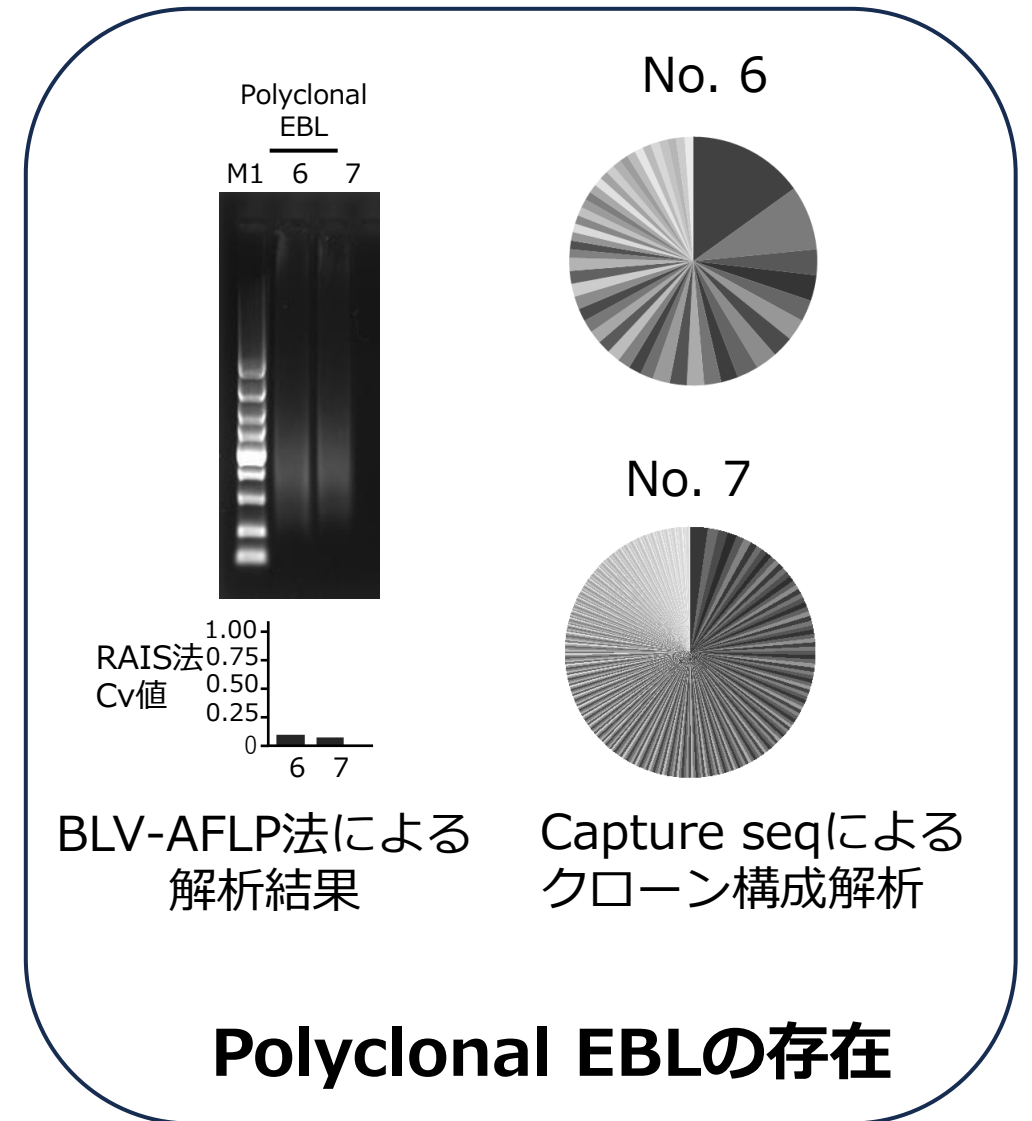
RAIS法、BLV-AFLP法

- ・簡易的にクローナリティ解析が可能
- ・PCR機器、電気泳動関連の機器があれば解析可能

⇒発症疑いのEBL牛に対して、補助的に実施

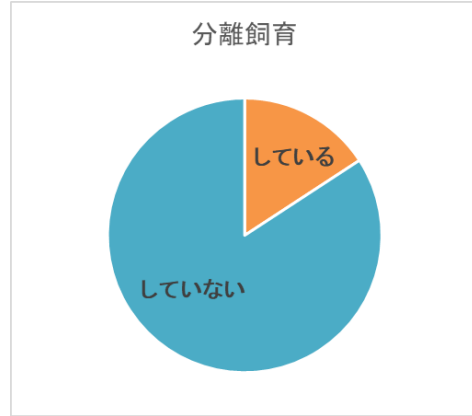
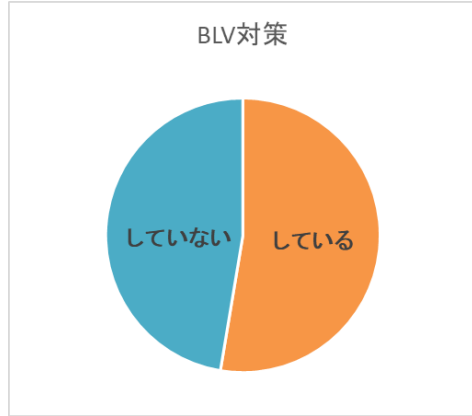
問題点

- ・ polyclonal EBL、散発性リンパ腫は検出できない
→どの程度の頻度で認められるのか、データが必要
- ・ 血液中のクローナリティと腫瘍のクローナリティが一致するとは限らない
→どの程度の不一致がみられるのか、検証が必要



農場での実用的な対策法の提案 -現状把握-

どのような対策がどの程度実施されているか？



調査農場
19農場

調査農場飼養頭数合計
549頭



調査地のほとんどの農場が
つなぎ飼育、平均40頭程度の規模

- 半数以上の農家で、BLV感染のことを気にしている、という結果
- 対策は、初乳の加温や代用乳の使用などが多い
- 分離飼育や搾乳順序を変えている農家は少ない
(つなぎ、小規模では難しい)

農場での実用的な対策法の提案

-既存の指標と組合わせた活用法-

農場の抗体陽性率 0 20 40 60 80 100(%)



- 全頭の抗体検査 (1-2年に一回)

抗体陽性牛の
優先淘汰

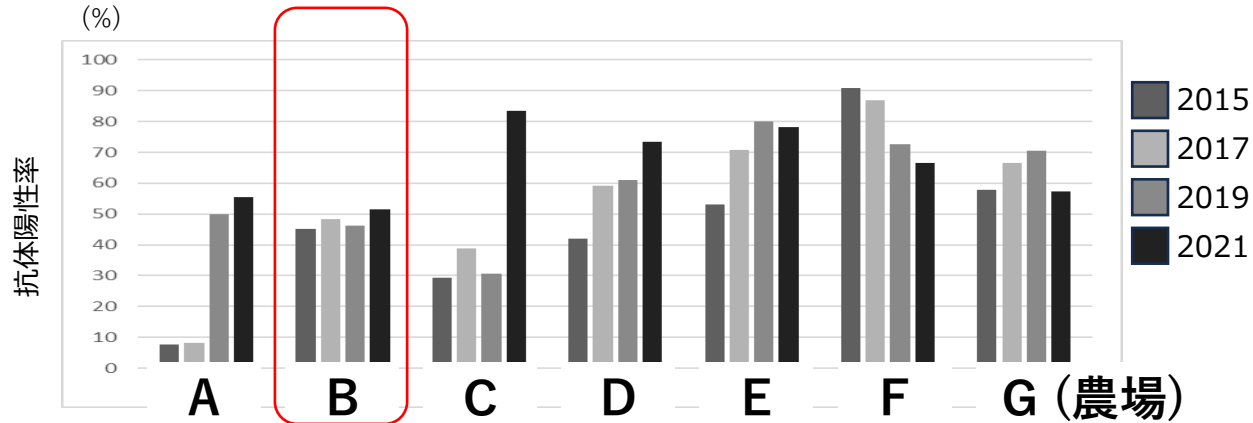
- 抗体陽性牛のウイルス量検査

ウイルス量を利用した優先淘汰・隔離

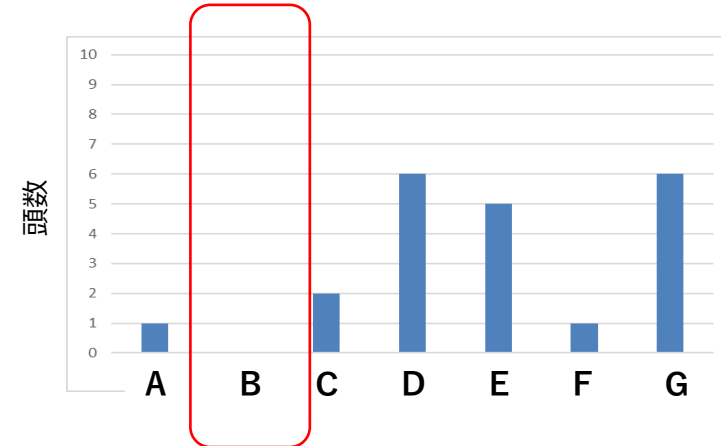
まずは全頭抗体検査
抗体陽性牛はウイルス量測定

農場での実用的な対策法の提案 -ウイルス量による淘汰順位付け-

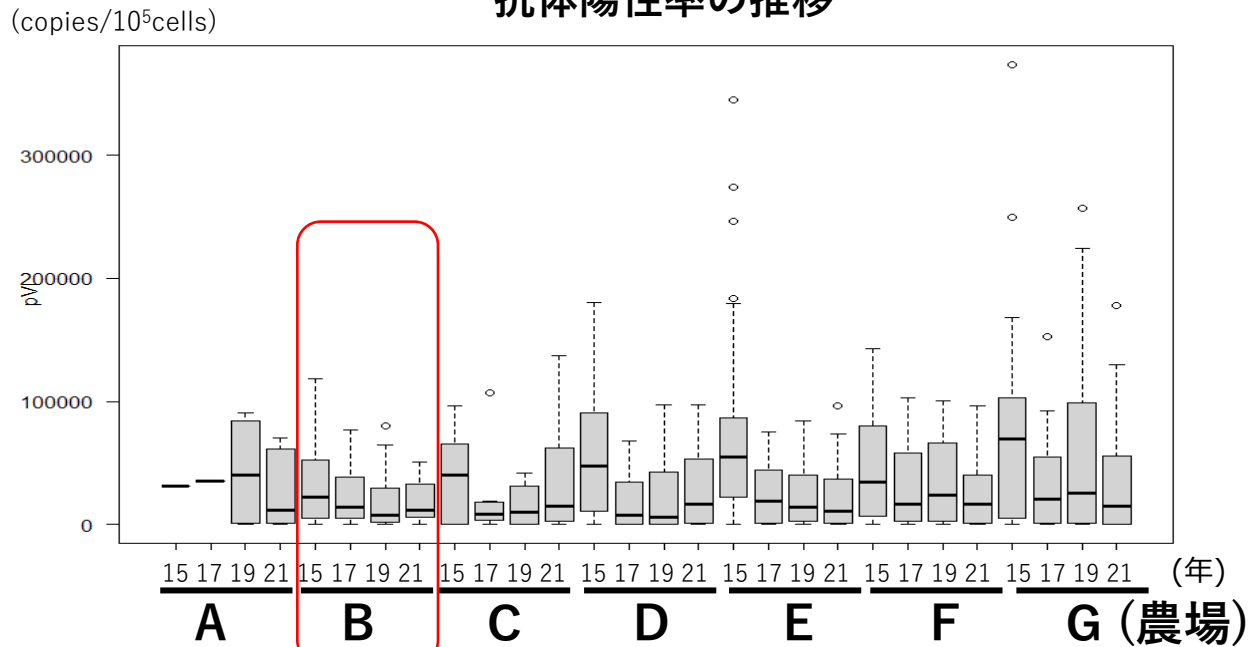
各農場において、全頭の抗体検査、抗体陽性牛のウイルス量測定を行い、結果をお知らせした。



抗体陽性率の推移



高PVL牛の頭数



プロウイルス量の推移

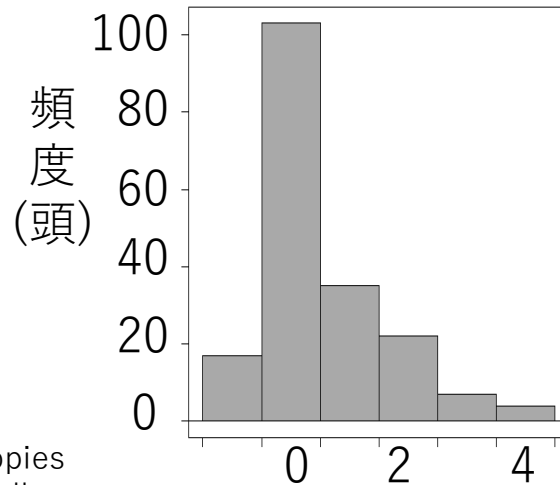
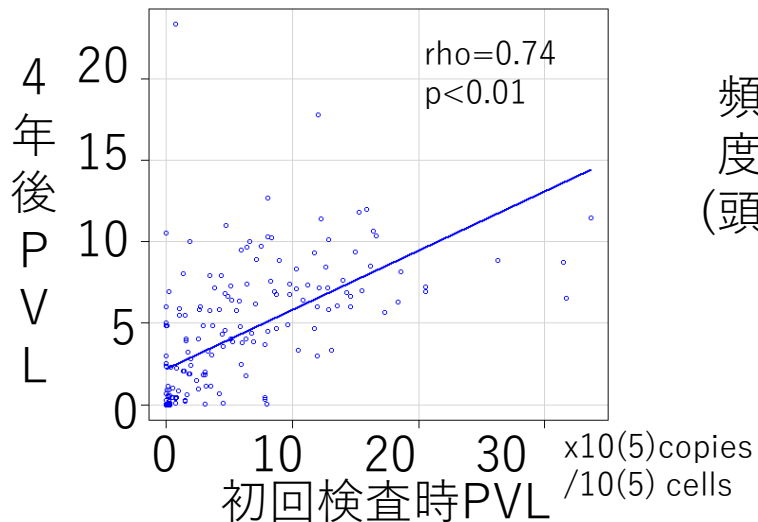
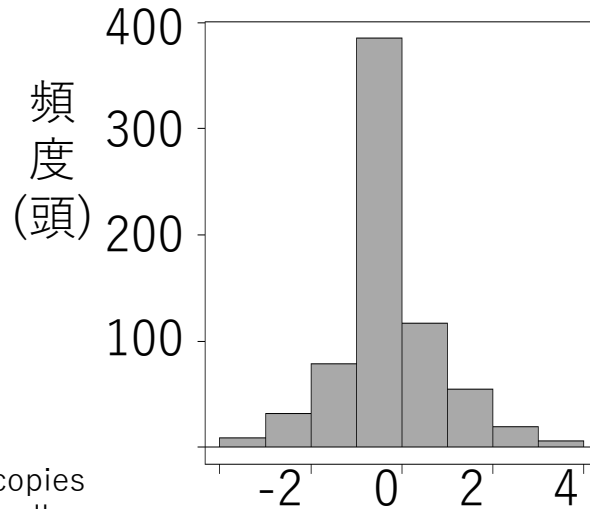
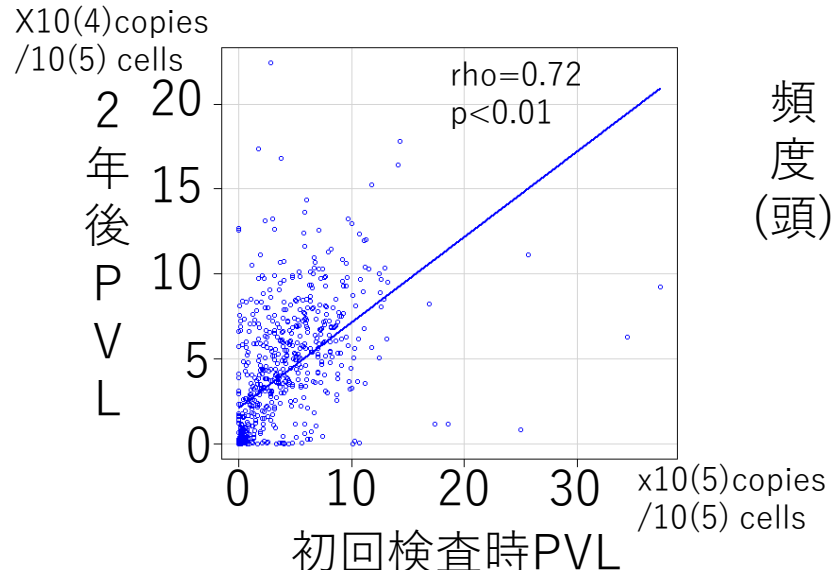
B農場は、高PVL牛がいない
抗体陽性率は変化がないが、対策は効果をあげていることが分かる

プロウイルス量による淘汰順位付けでも、ある程度対策は可能

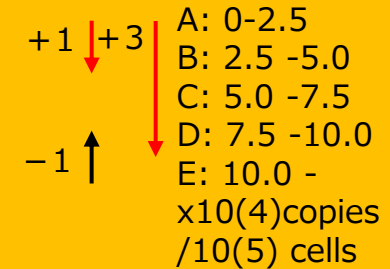
農場での実用的な対策法の提案 -複数年のPVLの相関関係-

初回検査時と2年後、4年後のPVLは関連するか？

Spearman順位相関解析



25,000コピー毎にカテゴリー分類



- 2年後、4年後のPVLは初回検査時PVLと強く相関する
- 全体的には、増加方向のカテゴリー遷移が多かった
- 変動幅は25,000コピー以内の牛が最も多かった

農場の抗体陽性率

0 20 40 60 80 100(%)



- 全頭の抗体検査
(1-2年に一回)

抗体陽性牛の
優先淘汰

- 抗体陽性牛のウイルス量検査

ウイルス量を利用した優先淘汰・隔離

- 抵抗性牛・感受性牛の把握

抵抗性牛の選抜、感受性牛の優先淘汰

- 発症牛の把握

必要に応じて、発症牛の把握のために発症検査

必要に応じて実施

各農場に抗体検査結果、ウイルス量に加えて、
クローナリティ解析の結果、抵抗性/感受性検査結果
について口頭で説明し、対策方法の提案を行った

	抗体検査			ウイルス量		クローナリティ	BoLA	DRB	見方	
	2017	2019	2021	2019	2021	2021	2021			
1		陽性	2019陽性	57932	116065	0.06	14011	1001	BoLA DRB	
2	陰性	陽性	2019陽性	7150	0		1101	2402	抵抗性アリル	0902
3			陽性		18552	0.07	1601	1101		0201
4	陰性	陽性	2019陽性	124121	100248	0.09	1501	1201		14011
5		陰性	陽性		54115	0.07	1501	1201	感受性アリル	1201
6	陰性	陽性	2019陽性	51213	69405	0.16	1505	2703		1501
7		陽性	2019陽性	60554	80152	0.17	1001	1001	非抵抗性・非感受性アリル	その他
8			陽性		86391	0.08	1501	1501		
9			陽性		64621	0.06	0701	1501		
10			陽性		28902	0.07	1201	0101		
11			陽性		64404	0.07	1001	1001		
12	陰性		陽性		205		1001	1001		
13			陽性		106308	0.17	1501	1201		
14			陽性		18967	0.08	1101	1501		
15	陰性		陽性		143908	0.06	1101	1201		
16			陽性		2512		1001	1001		
17	陽性	2017陽性	2017陽性	25992	1049		14011	1001		
18			陽性		761		0101	0101		
19		陰性	陰性							
20	陽性	2017陽性	2017陽性	113067	119906	0.08	0101	1001		
21			陽性		279		1001	1501		
22			陽性		89924	0.07	1201	1501		
23			陽性		38197	0.1	0101	0701		
24			陽性		51353	0.2	1201	6402		
25	陰性	陽性	2019陽性	45844	81925	0.07	0101	0702		
26		陽性	2019陽性	60716	67936	0.07	1001	2703		
27		陽性	2019陽性	14681	33091	0.08	0701	1001		
28			陽性		12567	0.06	10502	1101		
29			陽性		96221	0.04	1501	1001		
30		陽性	2019陽性	1029	655					
31			陽性		102500	0.06	1101	1501		
32		陽性	2019陽性	43031	38427	0.08	1001	1501		
33			陽性		2443					
34		陽性	2019陽性	36002	68431	0.19	0101	1105		
35		陰性	陰性							
36			陰性							
37			陰性							
38			陽性		2864		1001	1601		
39	陽性	2017陽性	2017陽性	70500	58564	0.07	14011	1501		
抗体陽性率			89.7%	※0.43以上で発症している可能性						
平均PVL			53584	copies/10(5) cell						
過去の発症牛			0							
抵抗性アリル保有			3頭							
感受性アリル保有			15頭							

● ウイルス量

ウイルス量の多い牛から優先淘汰をすすめる
ウイルス量の多い牛から子牛への感染には
非常に気を使っている（預託に出せないため）
→比較的取り組みやすい印象

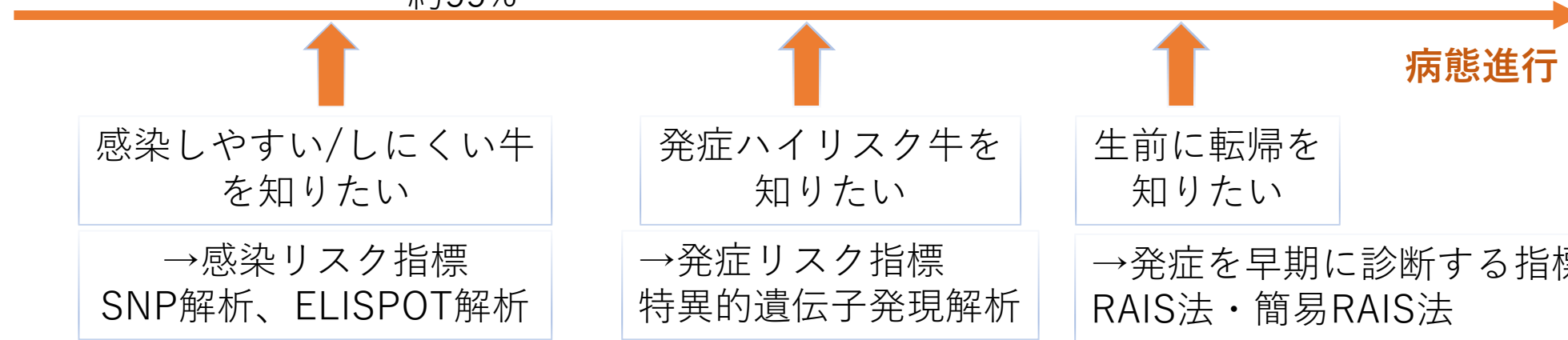
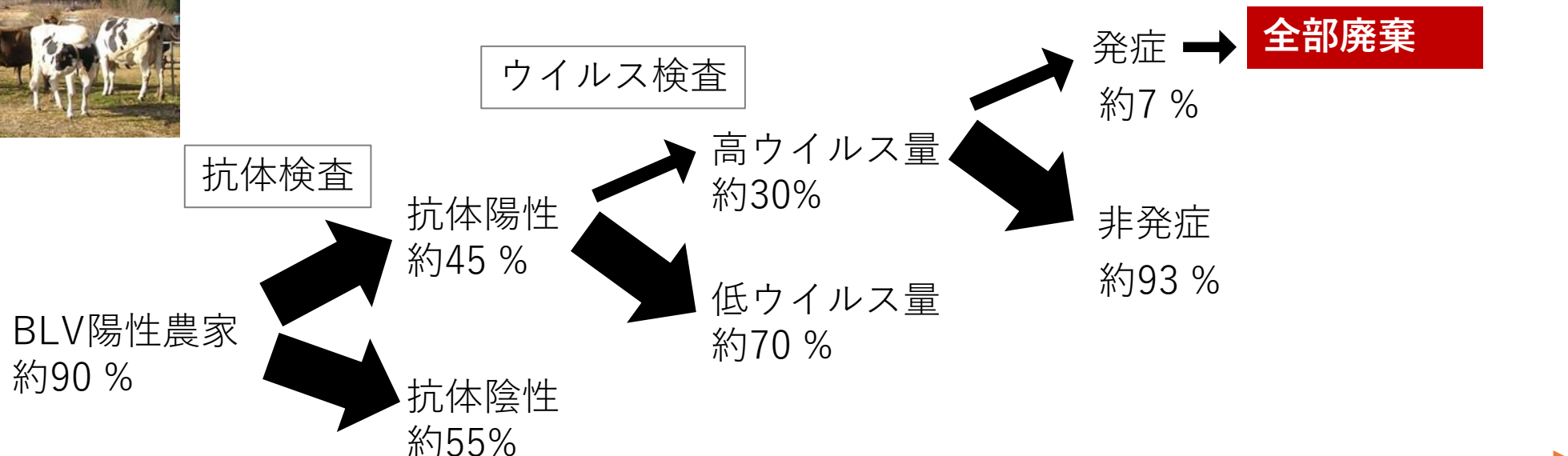
● 抵抗性、感受性

感染したら、という前提のため、説明が難しい
→そもそも感染しないように対策
→感受性牛が多すぎると、優先淘汰などは難しい
全頭検査するか、残したい牛だけ検査するか？

● クローナリティ

クローナリティが高い牛でも、症状がなければ
淘汰する理由がない
→要望があった時に、発症疑いの場合に検査する
発症の決め手がないので、調べてほしい、
という切羽詰まった要望を受ける機会が多い

まとめ



高陽性率の農場：2年に一回程度のPVL測定と抗体検査、高PVL牛と非感染牛を離して飼養
高PVL牛は、RAIS法によるクローナリティ検査

低陽性率の農場：抗体検査とPVL測定により現状把握、数年に一回程度の抗体検査

研究にご協力いただいた方々に感謝いたします

神奈川県食肉衛生検査所
神奈川県農業共済組合
神奈川県中央家畜保健衛生所
神奈川県湘南家畜保健衛生所
千葉県食肉衛生検査所
千葉県南総食肉センター
採材にご協力いただいた獣医師、農家の方々

熊本大学

佐藤賢文先生
Dr. Md Belal Hossain
Ms. M. Ishrat Jahan

東海大学

稲永 敏明 先生

東京農業大学

稲垣 靖子先生
村上 寛史先生
野口 龍生先生

博士研究員

西角 光平

大学院生

大貫 永輝
牧元 櫻子
佐々木 瞭

学部学生

恩田 智征

技術補佐員

鮎川 典子
眞島 千晶



東京農業大学 農学部 動物科学科
動物衛生学研究室 (小林朋子)
ホームページQRコードです。
研究内容などを紹介しています。

