

## 令和6年度JRA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

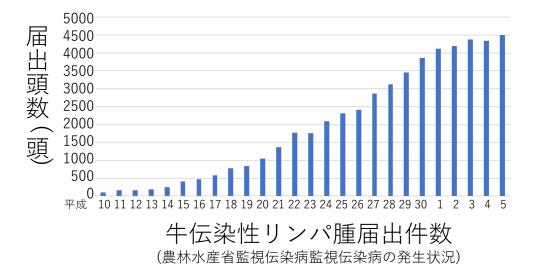
~生産現場での効果的な対策に向けて~

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)



●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よいのか? 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

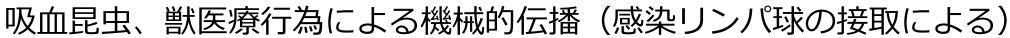


一般的な酪農家のほとんどに BLV陽性牛がいる

## 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



●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 是野県畜産広報

## 家畜衛生情報



しあわせ伽信り

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。

付象農場

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

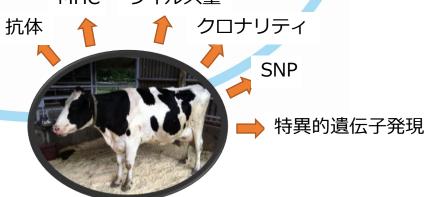
農場での活用方法の提案、防除計画立案、情報発信

# (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

MHC ウイルス量



## 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

#### 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

# 評価結果のフィードバック

#### 共同実施機関

所属:宮城大学 食産業学群

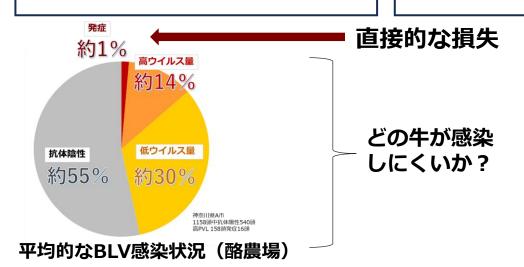
成果の共有

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



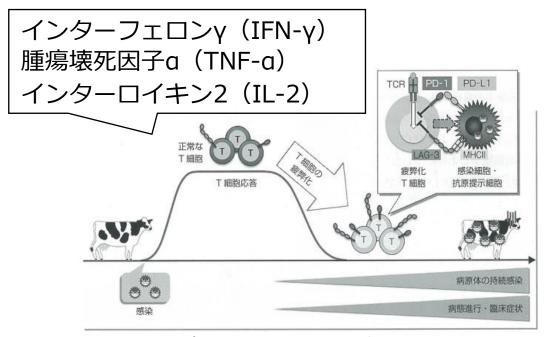
## 感染しにくい牛を知りたい(感染抵抗性指標の確立)

■背景:汚染農場で長期飼養されているにも関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



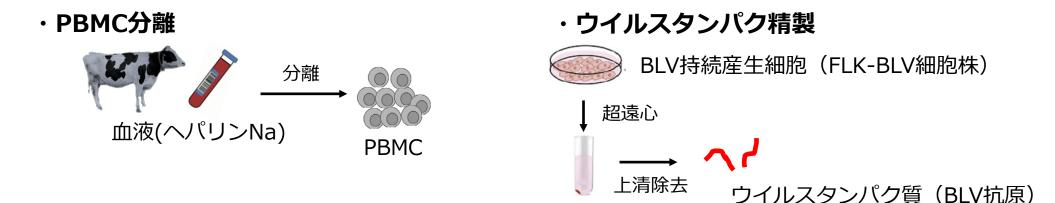
慢性感染症の病態進行とT細胞の疲弊化 引用・改変:岡川朋弘(2022).臨床医学.緑書房

## 感染抵抗性指標の確立

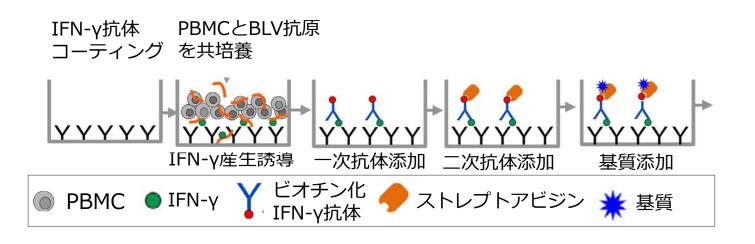
## ELISpot法

#### 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



#### · ELISpot法



## 感染抵抗性指標の確立

## 材料・方法

#### 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

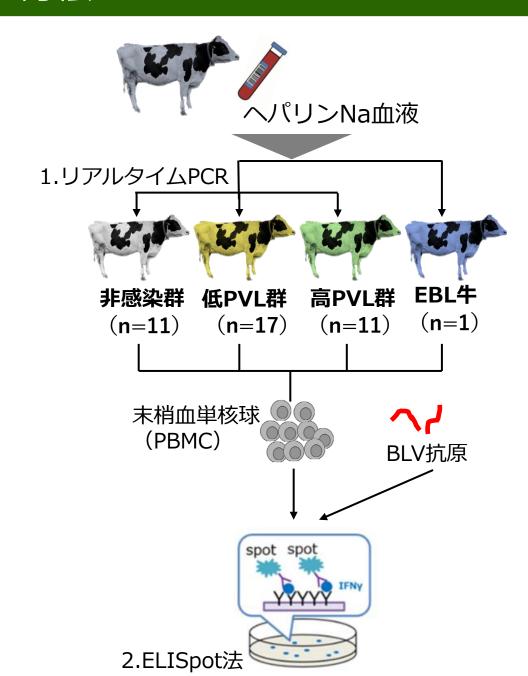
#### ELISpot法

- ・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

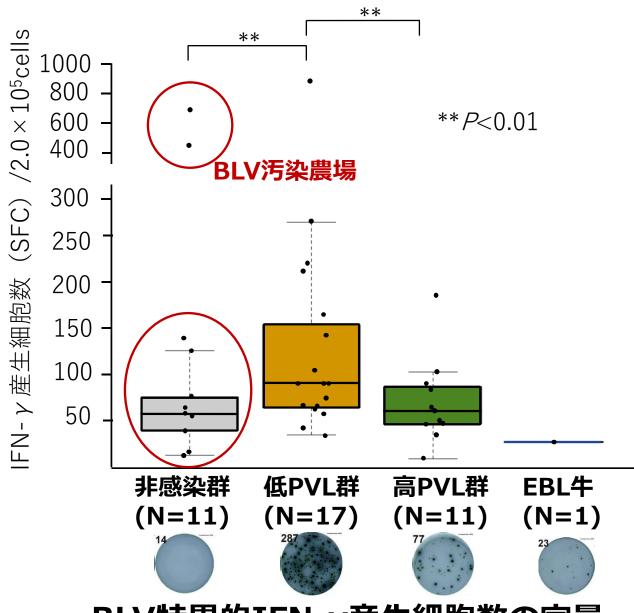
IFN-γ産生細胞数の統計解析

Mann-Whitney U 検定



## 感染抵抗性指標の確立

## BLV特異的T細胞免疫応答解析



#### 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

## BLV特異的IFN-γ産生細胞数の定量

(SFC: Spot Forming Cells)

## 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

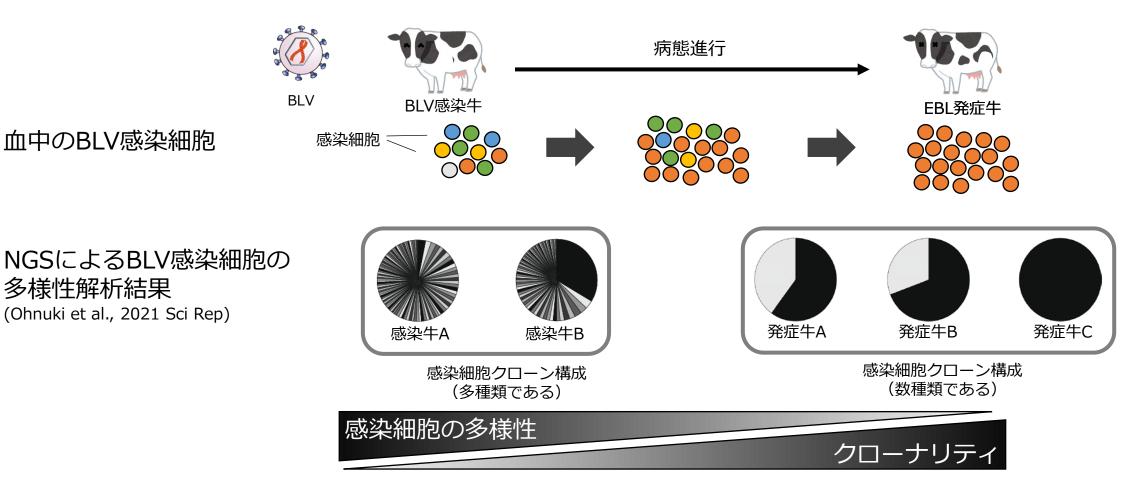
(Watari et al. BMC Vet Res. 2019)

#### 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-

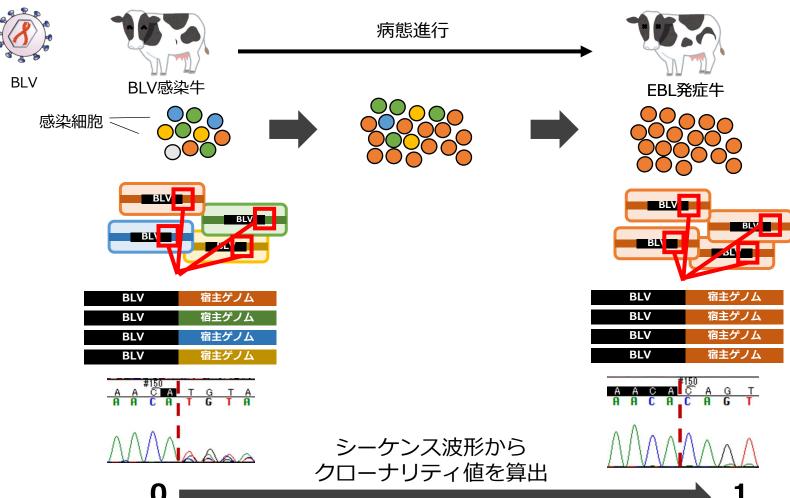
感染初期:宿主ゲノムの多様な位置にBLVが組み込まれた、多様な感染細胞が存在

EBL発症:組み込み位置が同じ感染細胞が増加している

血中のBLV感染細胞

BLV感染細胞の多様性と

近接するゲノム配列



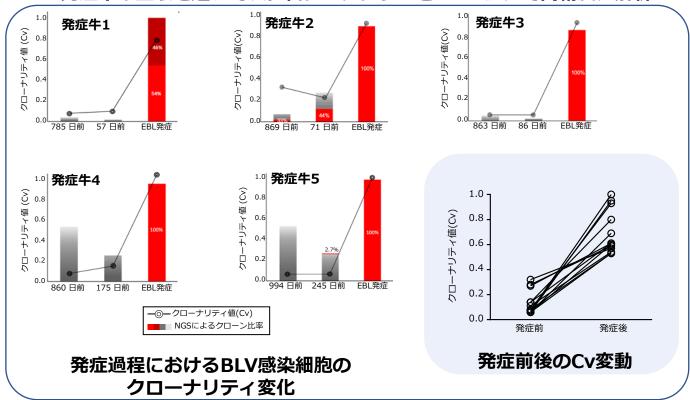
BLVに近接する宿主遺伝子配列を利用したクローナリティ解析法 (Rapid Amplification of the Integration Site: RAIS 法)を確立した

## 発症検査法の確立 -研究成果など-



神奈川県の2市約2000頭の乳牛 隔年検査

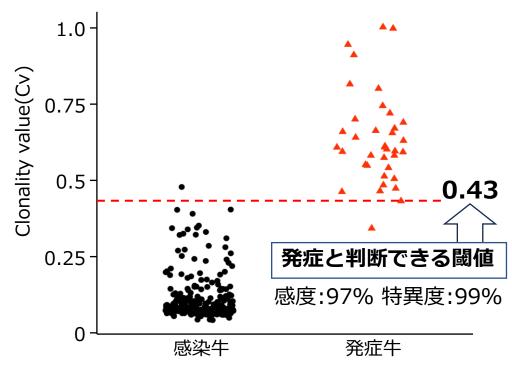
#### EBL発症牛の血液を遡って次世代シーケンサーとRAIS法にて高精度に解析



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

令和4年12月22日

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY VIROLOGY®

TRANSFORMATION AND ONCOGENESIS



## Clone Dynamics and Its Application for the Diagnosis of Enzootic Bovine Leukosis

Md Belal Hossain, <sup>ab</sup> Tomoko Kobayashi,<sup>c</sup> Sakurako Makimoto,<sup>c</sup> Misaki Matsuo,<sup>a</sup> Kohei Nishikaku,<sup>c</sup> Benjy Jek Yang Tan,<sup>a</sup> Akhinur Rahman,<sup>b</sup> Samiul Alam Rajib,<sup>b</sup> Kenji Sugata,<sup>a</sup> Nagaki Ohnuki,<sup>c</sup> Masumichi Saito,<sup>a,c</sup> Toshiaki Inenaga,<sup>f</sup> Kazuhiko Imakawa,<sup>g</sup> <sup>©</sup> Yorifumi Satou<sup>a</sup>

Division of Genomics and Transcriptomics, Joint Research Center for Human Retrovirus Infection, Kumamoto University, Kumamoto, Japan

Department of Food Microbiology, Faculty of Nutrition and Food Science, Patuakhali Science and Technology University, Dumki, Patuakhali, Bangladesh

'Laboratory of Animal Health, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture, Atsugi, Kanagawa, Japan

Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

\*Center for Emergency Preparedness and Response, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

'Laboratory of Animal Management Science, Department of Animal Science, School of Agriculture, Tokai University, Kumamoto, Japan

PLaboratory of Molecular Reproduction, Research Institute of Agriculture, Tokai University, Kumamoto, Japan

**ABSTRACT** Bovine leukemia virus (BLV) infection results in polyclonal expansion of infected B lymphocytes, and ~5% of infected cattle develop enzootic bovine leukosis (EBL). Since BLV is a retrovirus, each individual clone can be identified by using

20221219 Journal of Virology 報道機関 各位

熊本大学 東京農業大学 東海大学 国立感染症研究所

牛伝染性リンパ腫の高精度な検査技術を開発 ~血液による発症検査が可能に~

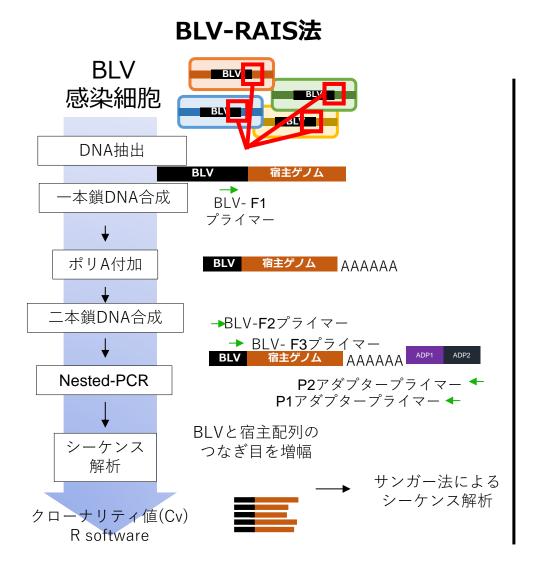
#### (ポイント)

- 大規模な次世代シーケンサーを用いた解析により、牛伝染性リンパ腫ウイルス\*1感染牛では、リンパ腫発症時に特定の感染細胞クローン\*2が急激に上昇することを見出しました。
- 既存技術を応用し、牛伝染性リンパ腫ウイルスの組込み部位を簡易な方法 にて解析し、感染細胞のクローナリティを定量化する技術を開発しました。
- この技術により、血液を用いて、従来よりも網羅的かつ高精度に牛伝染性 リンパ腫\*3発症を検査することが可能となりました。
- 本検査法は高度な機器や特殊な試薬を必要とせず、結果判定まで最短半日、 費用対効果も高いことから、牛伝染性リンパ腫発症にかかる損失の低減 につながると期待されます。

20221222 プレスリリース

20230118 農業共済新聞

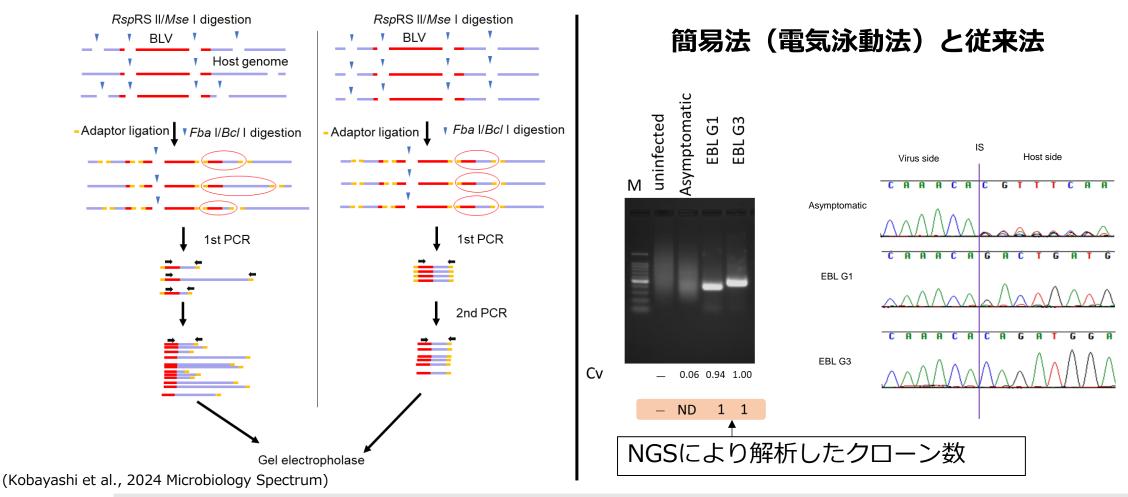
## 発症検査法の確立 -さらなる簡易法の検討-



## 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

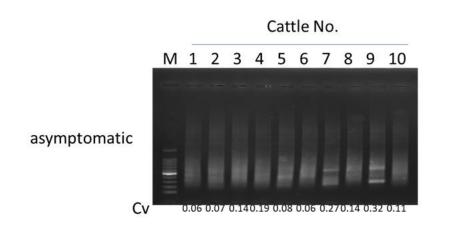
制限酵素により断片化し、アダプター付加後PCR→電気泳動により解析

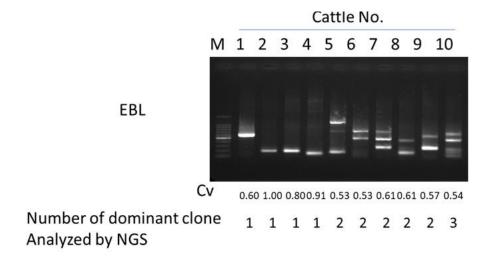


増幅制限酵素断片長多型(Amplified fragment length polymorphism: AFLP)法 により感染細胞のクローナリティを解析可能

## 発症検査法の確立 -実際の発症検体での検討-

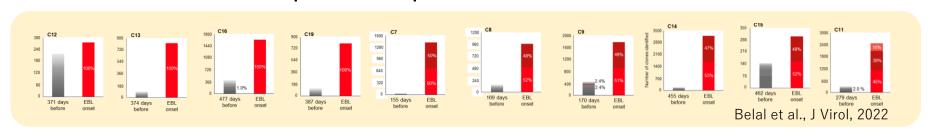
#### 発症前の血液と、発症後の腫瘍を用いて、クローナリティ解析を行った





(Kobayashi et al., 2024 Microbiology Spectrum)

#### NGSによるBLV-capture-seqの結果との比較



非発症検体ではCv値に応じて、スメ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

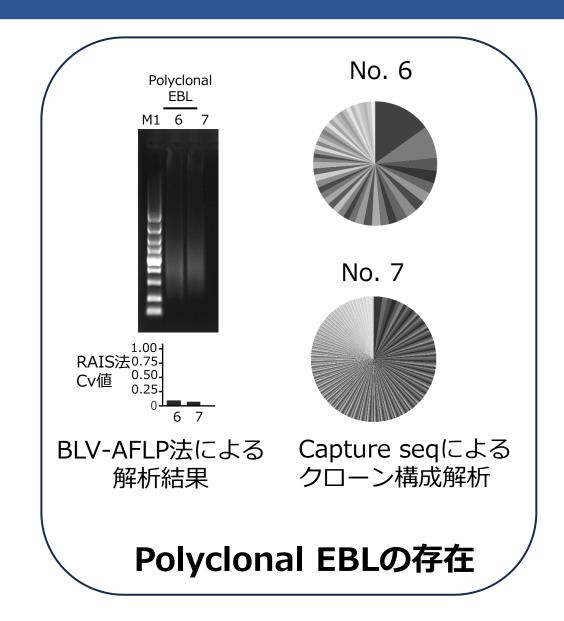
## 発症検査法の確立 -まとめと考察 -

#### 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

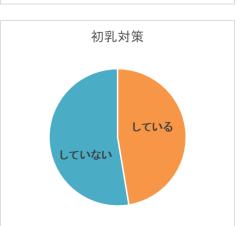
- ・polyclonal EBL、散発性リンパ腫は検出できない
  - →どの程度の頻度で認められるのか、データが必要
- ・血液中のクローナリティと腫瘍のクローナリティが 一致するとは限らない
  - →どの程度の不一致がみられるのが、検証が必要

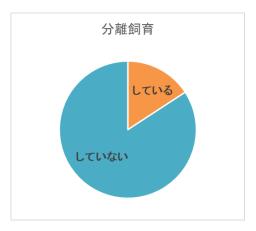


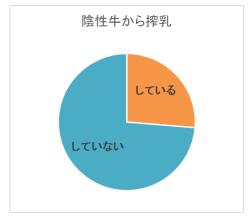
## 農場での実用的な対策法の提案 -現状把握-

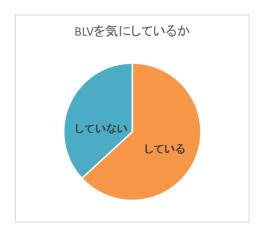
#### どのような対策がどの程度実施されているか?











調査農場 19農場

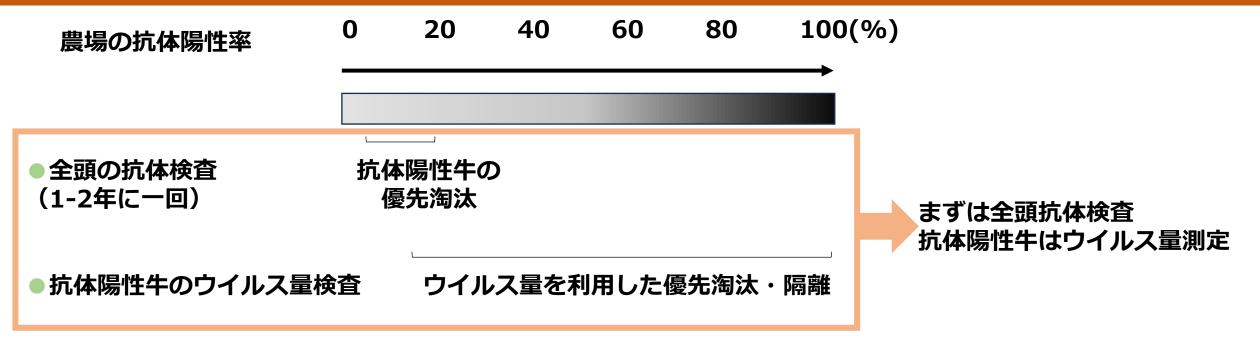
調査農場飼養頭数合計 549頭



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

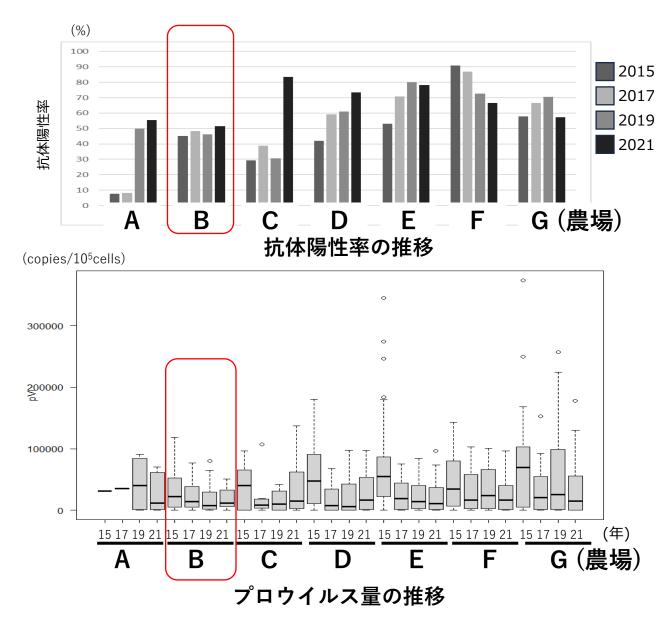
- ●半数以上の農家で、BLV感染のことを気にしている、という結果
- ●対策は、初乳の加温や代用乳の使用などが多い
- ●分離飼育や搾乳順序を変えている農家は少ない (つなぎ、小規模では難しい)

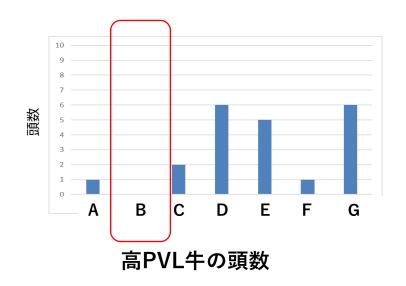
## 農場での実用的な対策法の提案 -既存の指標と組合わせた活用法-



## 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。



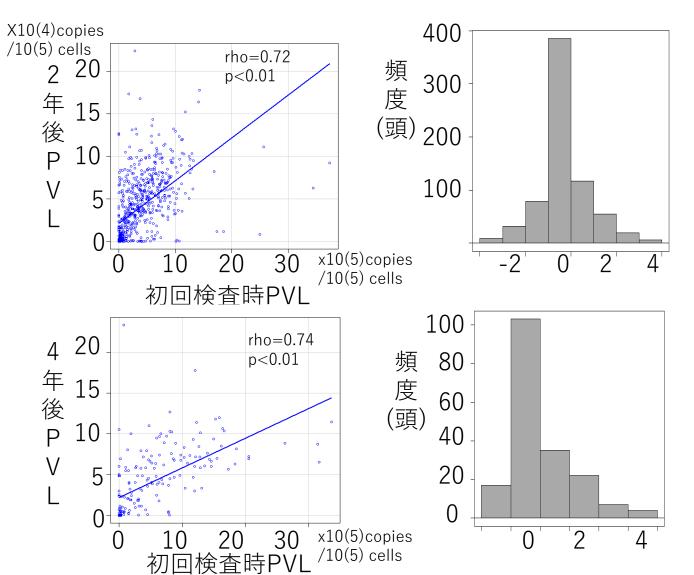


B農場は、高PVL牛がいない 抗体陽性率は変化がないが、対策は効果を あげていることが分かる

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-

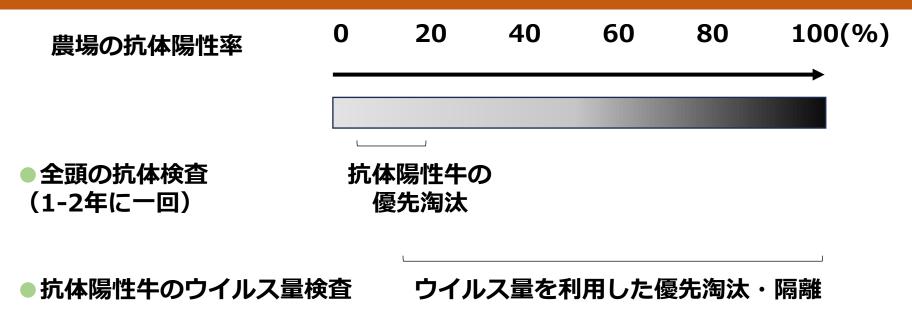
## 初回検査時と2年後、4年後のPVLは関連するか? Spearman順位相関解析



# 25,000コピー毎にカテゴリー分類 +1 +3 A: 0-2.5 B: 2.5 -5.0 C: 5.0 -7.5 D: 7.5 -10.0 E: 10.0 x10(4)copies /10(5) cells

- 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-



●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

## 農場での実用的な対策法の提案 -抵抗性/感受性・発症検査結果-

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

<u> </u>	抗体検査			ウイルス量		クロナリティ		RB		
	2017	2019	2021	2019	2021	2021	2021			
1		湯性	2019陽性	57932	116065	0.06	14011	1001	▼ BoLA DRB 見方	
2 陰性	生	易性	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	ŧ F	湯性	2019陽性	124121	100248	0.09	1501	1201		1401
5		<b>食性</b>	陽性		54115	0.07		1201	感受性アリル	1201
6 陰性		易性	2019陽性	51213	69405		1505	2703	75.55.133	1501
7		場性	2019陽性	60554	80152	0.17		1001	非抵抗性・非感受性アリ	
8	1	<i>///</i> 1 <u></u>	陽性	00001	86391	0.08		1501	列 热抗压 升 心又压/ //	. ( , ,
9			陽性		64621	0.06		1501		
0			陽性		28902	0.00		0101		
1			陽性		64404	0.07		1001		
2	E	<b>急性</b>	陽性		205	0.07	1001	1001		
3		云江	陽性		106308	0.17		1201		
	+		陽性			0.17		1501		
4	17	%.ht-			18967					
5	ļ.	<u> </u>	陽性		143908	0.06		1201		
6	ri.	NO A SET IN	陽性	05000	2512		1001	1001		
7 陽性	E 2	2017陽性	2017陽性	25992	1049		14011	1001	_	
8			陽性		761		0101	0101	_	
9			陰性							
0 陽性	± 2	2017陽性	2017陽性	113067	119906	0.08		1001		
1			陽性		279		1001	1501		
2			陽性		89924	0.07	1201	1501		
3			陽性		38197	0.1	0101	0701		
4			陽性		51353	0.2	1201	6402		
5 陰性	‡.   [F	<b>湯性</b>	2019陽性	45844	81925	0.07	0101	0702		
6		易性	2019陽性	60716	67936	0. 07	1001	2703		
7		易性	2019陽性	14681	33091	0.08	0701	1001		
8		//114	陽性	11001	12567		10502	1101		
9			陽性		96221	0.04		1001		
0	K	湯性	2019陽性	1029	655	0.01	1001	1001		
1	li li	<i>///</i> 1 1 1 L	陽性	1023	102500	0, 06	1101	1501		
2	R	湯性	2019陽性	43031	38427	0.00		1501		
3	E	加工	陽性	49091	2443	0.00	1001	1001		
4	I.	湯性	2019陽性	36002	68431	0. 19	0101	1105	-	
5		<u> </u>	2019 <u>陽性</u> 陰性	30002	00431	0.19	0101	1100		
6	P	会1生	陰性							
	+							_		
7			陰性		2021		1001	1001		
8			陽性		2864		1001	1601		
9 陽性			2017陽性	70500	58564		14011	1501		
		体陽性率	89. 7			※0.43以上で	発症して	いる可能性		
		平均PVL		copies/10	(5) cell					
		の発症牛	0							
抵	抗性ア	リル保有	3	頭						
		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は多い

## まとめ



BLV陽性農家

約90%

ウイルス検査

非発症

約7%

抗体陽性

約45%

抗体陰性 約55%

高ウイルス量 約30% 低ウイルス量

約93%

発症 → 全部廃棄

牛伝染性リンパ腫



感染しやすい/しにくい牛 を知りたい

→感染リスク指標 SNP解析、ELISPOT解析



約70%

発症ハイリスク牛を 知りたい

→発症リスク指標 特異的遺伝子発現解析



病態進行

生前に転帰を 知りたい

→発症を早期に診断する指標 RAIS法・簡易RAIS法

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

神奈川食肉衛生検査所 神奈川農業共済組合 神奈川県央家畜保健衛生所 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 覚史先生 野口 龍生先生

<u>博士研究員</u> 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。

