

原著論文

黒毛和種親子放牧における 牛伝染性リンパ腫ウイルス伝播阻止コンセプトの有用性 — 伝播高リスク牛とおとり牛を用いた検証 —

芳賀 聡^{1,2†} 石崎 宏^{1,3}

¹ 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産研究部門
草地利用研究領域放牧家畜ユニット 栃木県那須塩原市千本松 768
現所属

² 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産研究部門
畜産飼料作研究領域 省力肉牛生産グループ 栃木県那須塩原市千本松 768

³ 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産研究部門
研究推進部研究推進室 茨城県つくば市池の台 2

† 連絡担当者：芳賀聡

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産研究部門
畜産飼料作研究領域 省力肉牛生産グループ

住所：栃木県那須塩原市千本松 768

電話：0287-37-7239 FAX：0287-36-6629 E-mail：hagatiku@affrc.go.jp

【要 約】

牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV) 感染に起因する牛伝染性リンパ腫の発生数は増え続けている。BLV は微量の血液からでも感染するため、特に吸血昆虫を介する放牧牛の伝播リスクが深刻である。そこで本研究では、BLV 伝播阻止を目指した放牧対策コンセプトを立案し、その有用性を科学的に検証することを目的とした。実証モデル試験地において黒毛和種親子放牧を、2019 および 2020 年の各 4-11 月に実施した。牧区は、感染牧区 (感染源として BLV 陽性母牛 3 頭、おとり牛として陰性母牛 2 頭およびそれらの産子 5 頭) と対策牧区 (陰性母牛 2 頭と産子 2 頭) に区分した。陽性母牛の条件は BLV プロウイルス量 1000 copies/50 ng of gDNA 以上の伝播高リスク牛とした。本コンセプトの内容は、①牧区間に 5m 幅の分離帯と②分離帯内にアプトラップの設置および③耳標型外部寄生虫駆除剤を少頭数の対策牧区の牛に装着とした。また、前提条件として人為的感染を防ぐため作業順序や器具洗浄等を徹底した。定期採血してリアルタイム PCR 法による血中プロウイルス定量を行い、陽転発生を調査した。また、トラップにより捕虫したアブ、サシバエの個体数を計数した。2 シーズンを総じて、感染牧区では、アブの捕虫ピークのあった 8 月末におとり牛の母牛 2 頭、そして 11 月中旬に子牛 1 頭の水平感染が確認された。さらに子牛 1 頭の垂直感染も確認された。一方、対策牧区では感染は一切確認されなかった。以上より、本伝播阻止放牧コンセプトの有用性が示された。

キーワード：吸血昆虫、BLV、牛伝染性リンパ腫対策、プロウイルス量、分離放牧

【緒論】

受付：2021 年 8 月 26 日

受理：2021 年 11 月 25 日

国内における肉用牛生産の実態は、大規模化

が進んで1戸当たりの飼養頭数が増加している一方、主に零細農家の廃業等により直近5年間では平均約2,000戸/年の飼養戸数減少となっており（参考：農林水産省畜産統計20210330公開情報）、生産基盤の脆弱化が危惧されている。持続的な国内生産基盤の強化には、特に肥育素牛の安定供給の要となる肉用牛繁殖農家における新たな担い手の確保と育成が喫緊の課題である。新規就農の促進には、初期投資が少なく軽労化による労働生産性の向上が可能な超低コスト型の肉用牛繁殖経営モデルが必要であり、耕作放棄地等を活用した省力効果が高い周年親子放牧による高収益可能な繁殖経営の普及が進められている [28, 31, 32]。

一方、国内における牛リンパ腫の発生状況は年々深刻さを増している。届出伝染病に指定された1998年は発生頭数が99頭であったが、2011年には1,765頭、2020年では4,197頭と増加の一途をたどっている（参考：農林水産省監視伝染病の発生状況20210622更新情報）。特にその多くを占める牛伝染性リンパ腫（enzootic bovine leukosis: EBL）は、牛白血病ウイルス（bovine leukemia virus: BLV）感染が原因である。国内の肉用牛のBLV浸潤状況について、2010年度に行われた調査では感染率がすでに28.7%であったが [20]、その後のEBL発生数増加傾向から、BLV感染率はさらに悪化していると予想される。家畜感染症学会が2018年に実施した、牛の感染症に関する全国の獣医師アンケート（全体の84.2%がNOSAI勤務）の報告 [23] によれば、清浄化を積極的に進めている感染症第1位がEBLであり、さらに「農家および地域における清浄化」および「個体および群における予防法」について回答者の関心が特に高かった。海外で清浄化方策として有効であった全感染牛の摘発淘汰は [1, 22]、BLV感染率が極めて高い日本においては経済的に実施困難であり、清浄化に向けて、国内の現場事情に応じた現実的かつ戦略的な技術が求められている [15]。

BLV感染は感染リンパ球を介し、微量の血液でも伝播が成立する [4]。主な経路として、アブ・サシバエといった吸血昆虫 [2, 12, 25]、人為的作業 [8] および接触（同居） [11] を要因とする水平感染と、母子間の垂直感染 [15,

16, 26] がある。BLV陽性繁殖牛に子牛を産ませなければ垂直感染リスクは回避でき、人為的作業要因による水平感染は、飼養者、獣医師、家畜人工授精師および削蹄師等がBLV感染機序を正しく理解して「牛白血病（牛伝染性リンパ腫）に関する衛生対策ガイドライン（農林水産省）」に沿った各作業手順を徹底することで防止可能である。BLV陽性牛の唾液や鼻汁を介した感染リスクを明確に示す科学的知見はないものの、近年、唾液や鼻汁中にもBLVプロウイルスが検出されている [33]。現在、接触感染要因としてこれらを完全には否定できない上、怪我等による出血時の接触伝播リスクも含めて、BLV陽性牛と陰性牛の物理的な分離飼養が重要となる。一方、吸血昆虫を介した機械的な水平感染は単純な分離飼養だけでは防除できない。吸血昆虫によるBLV伝播は、陽性牛から陰性牛へと連続した吸血行動により、口器に付着した新鮮な感染血液が陰性牛の体内に入ることによって感染が成立する。しかし、昆虫体内で凝血した血液や口器で乾燥した血液中の感染リンパ球は変性して感染力を失うとされており [5]、これまでに牛舎内飼養において、吸血昆虫による伝播を防ぐ防虫ネットの設置 [9] や、口器に付着した感染血液を乾固させる時間を確保するため約4-5m程度の物理的距離を設けた分離飼育 [13, 24] が検討され、一定の有効性が示唆されている。一方、野外環境にある放牧飼養管理では、吸血昆虫の伝播リスクはより深刻である。これに対して、数mから数百mの分離放牧やアブ防除ジャケットの着用等の対策により、牧場陽性率の低減に成功した有益な現場実証事例が各家畜保健衛生所やNOSAIの獣医師等からも報告されている。しかし、BLV陽性農家への介入による対策実証では、対策前の対照期間と対策後の期間の比較に限定されるケースや、調査対象となる牛の遺伝的要因（EBL抵抗性・感受性アレル [6, 18]）やBLVプロウイルス量 [15, 17] といった感染リスクに関する情報が不足したり、十分な頻度の採材や遺伝子検査の実施が困難であったり（感染初期の見逃し）、農場主の対策失宜や意思決定（検査拒否等）がバイアスになる等、効果を検証する上で様々な精度的制約が生じやすい。実際に、対策を講じた陰性牛の陽転を防げなかった事例

も報告されているが、その要因については対策技術の実証条件も含めて科学的な議論の余地がある。そこで我々は、清浄化に向けた有効性の高い放牧対策技術の開発に資するため、これまでの知見を参考に、放牧飼養管理において陽性牛群と陰性牛群の牧区間に5m程度の距離を設け、アブトラップ等を活用し、吸血昆虫伝播リスク低減に特化した分離放牧コンセプトを実施すればBLV伝播を阻止できる、という仮説を立て、考案した実証モデル試験により本仮説を科学的に検証することを目的とした。

【材料と方法】

本研究は、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構（農研機構）畜産研究部門動物実験委員会の事前計画承認を受け、「畜産研究部門動物実験等実施要領」に従って実施された（承認番号1911B039および20B051NILGS）。

1、BLV伝播阻止コンセプトおよび実証モデル放牧地のレイアウト

5m分離放牧を基軸とした「BLV伝播阻止コンセプト」を以下のように立案した（図1）。

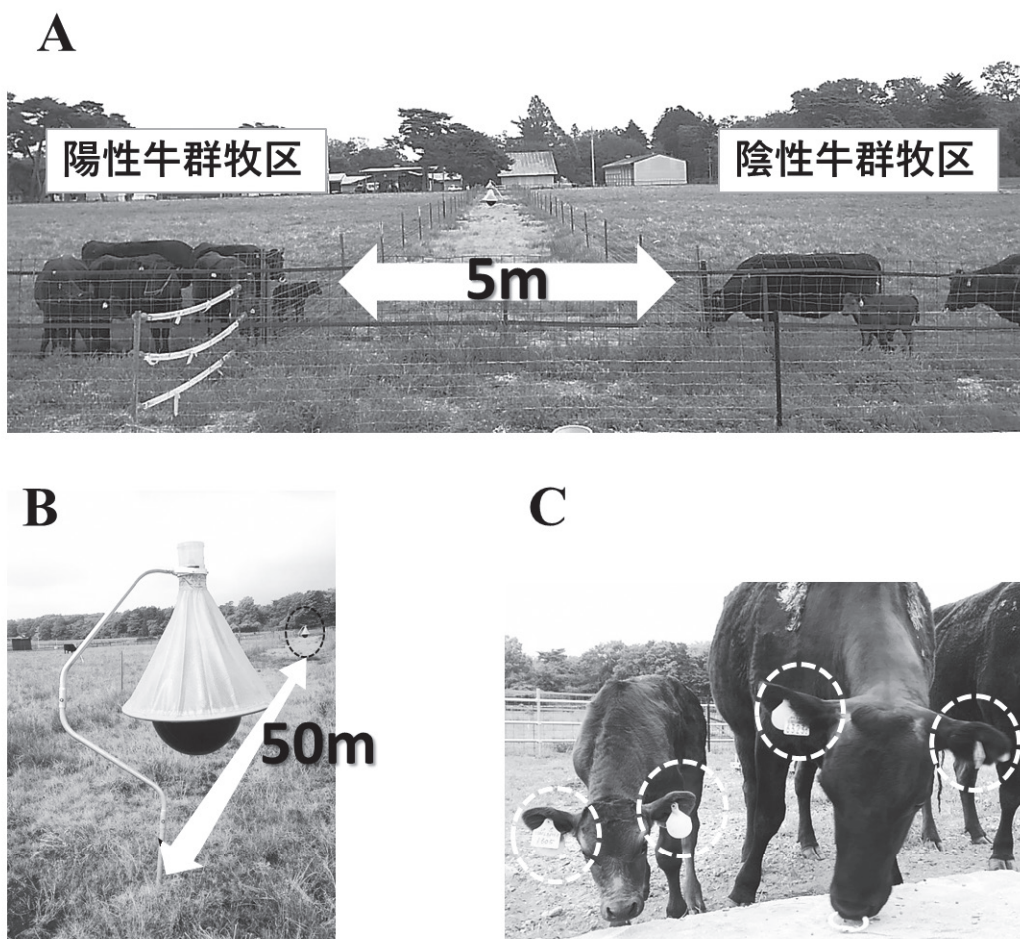


図1 牛伝染性リンパ腫ウイルス（BLV）伝播阻止コンセプト。

A) アブ・サシバエの口器に付いた新鮮な感染血液の乾固時間確保のため、BLV陽性牛群牧区と陰性牛群牧区の間5m幅の分離帯を設置。B) 放牧地に飛来するアブ・サシバエの捕獲と共に牧区間の飛翔移動を阻害するため、分離帯に約50m間隔でアブトラップを設置（本試験ではファームエイジ製のアブキャップTMを使用）。C) BLVを媒介するアブ・サシバエの牧区間飛翔のリスクを低コストで低減するため、頭数が少ない牧区の牛に耳標型外部寄生虫駆除剤を装着（本試験では住化エンバイロメンタルサイエンス製のペルタグを使用）。本コンセプトは、「牛白血病（牛伝染性リンパ腫）に関する衛生対策ガイドライン」に準拠した人為的感染要因の確実な排除（各作業手順の徹底）が前提条件。

1) アブ・サシバエの口器に付いた新鮮な BLV 感染血液の乾固時間を確保するため、BLV 陽性牛がいる牧区と陰性牛のみがいる牧区の間、5m 幅の分離帯を設ける。2) 放牧地に飛来するアブ・サシバエの捕獲と共に、牧区間の飛翔移動を阻害するため、分離帯に約 50m 間隔でアブトラップを設置する。3) アブ・サシバエにとって飛来しやすい牧区と飛来しにくい牧区に区分し、BLV を伝播するアブ・サシバエの牧区間の吸血行動リスクを低減するため、片方の牧区の牛のみに耳標型外部寄生虫駆除剤を装着する。この際、コストや労力を低減するため、駆除剤を装着する牧区は陽性牧区と陰性牧区の内、頭数が少ない牧区の牛のみに装着することとする（本試験では頭数の少ない対策牧区の牛に装着）。なお、本試験において使用したアブトラップおよび耳標型外部寄生虫駆除剤はそれぞれ市販されているアブキャップ™（ファームエイジ、北海道）およびペルタッグ（住化エンバイロメンタルサイエンス、大阪）とした。下草が繁茂してアブキャップの誘引効果が低下しないように、分離帯は定期的に除草または草刈りを実施した。また、本コンセプトにおいて、「牛白血病（牛伝染性リンパ腫）に関する衛生対策ガイドライン」に準拠した人為的感染要因の確実な排除を前提とした。ただし分娩に関しては、省力的な親子放牧条件として牧区内において隔離等を行わずに産ませ、後産は発見できた場合は持ち出し廃棄したが、分娩場所の洗浄および消毒は行わなかった。さらに初乳も制限なく母牛から飲ませ、その後も一貫して自然哺育とした。

本コンセプトの効果を科学的に検証するため、実証モデル放牧地をレイアウトした（図 2）。具体的には目撃らの報告に従い [15, 17]、確実な感染源として、血中プロウイルス量に基づいて BLV 感染高リスク以上に分類される黒毛和種母牛 3 頭を感染牧区に配置した。さらに感染高リスク牛を配置したことで感染リスクが高い放牧飼養環境になったことを証明するため、感染牧区に BLV 陰性の黒毛和種母牛 2 頭をおとり牛（陽転コントロール）として混牧した。これに対して、本コンセプトを実践した対策牧区には BLV 陰性の黒毛和種母牛 2 頭を配置した。また、フィールド試験として飛来昆虫や気候等

の自然環境要因を制御できない点を考慮し、本実証モデル試験では、2019（1 年目）および 2020 年（2 年目）の 2 年間（2 シーズン）、同等条件の試験を反復実施することで検証精度の向上を図った。以上より、春から秋までの放牧期間中に、「おとり牛の陽転」かつ「対策牧区の陰性牛の陰性維持（陽転ゼロ）」という結果の再現が 2 年間得られれば、本コンセプトの有用性を示す科学的根拠になると考えた。

2. 供試牛の選定

BLV 陰性の黒毛和種母牛について、長野県内にある、牛の外部導入が一切ない BLV 清浄牧場において、事前に採血を行い、リアルタイム PCR 法による血中 BLV プロウイルス量の定量およびサンガー法を用いたシーケンシングによる Bovine Leukocyte Antigen (*BoLA*) -*DRB3* 遺伝子タイピング法に基づく EBL 抵抗性・感受性アレル検査 [29, 30]（検査委託機関：ジェノダイブファーマ、神奈川）を基に、BLV 陰性が証明され、かつ EBL 抵抗性アレルを保有しない春分娩予定の妊娠牛を選定した（表 1）。EBL 抵抗性アレル非保有を選定条件としたのは、抵抗性アレル保有牛が BLV に感染した場合、BLV プロウイルス量が上昇しにくいこと [18]、本試験においておとり牛および対策牛が陽転した際の検出感度が低下する可能性を回避するためである。選定した陰性母牛は、吸血昆虫が出現しない冬季に（1 年目は 2019 年 1 月に 4 頭、2 年目は 2020 年 2 月に 4 頭）、それぞれ実証モデル試験地のある栃木県那須塩原市の牧場に導入した。導入後は、他牛の飼養場所から隔離された専用牛舎内にて、4 月の放牧試験開始まで隔離飼養管理を行った。放牧試験開始前に再度リアルタイム PCR 検査を行い、試験開始時に BLV 陰性であることを再確認の上、供試した。

感染源とする BLV 陽性の黒毛和種母牛について、実証モデル試験地のある栃木県那須塩原市の牧場において飼養されている牛から事前に採血を実施し、BLV プロウイルス量の定量および EBL 抵抗性・感受性アレルの判定検査を行い、1 年目および 2 年目において以下の供試牛をそれぞれ選定した。1 年目は、EBL 感受性アレル *BoLA-DRB3*1601* [18] を保有し、かつ

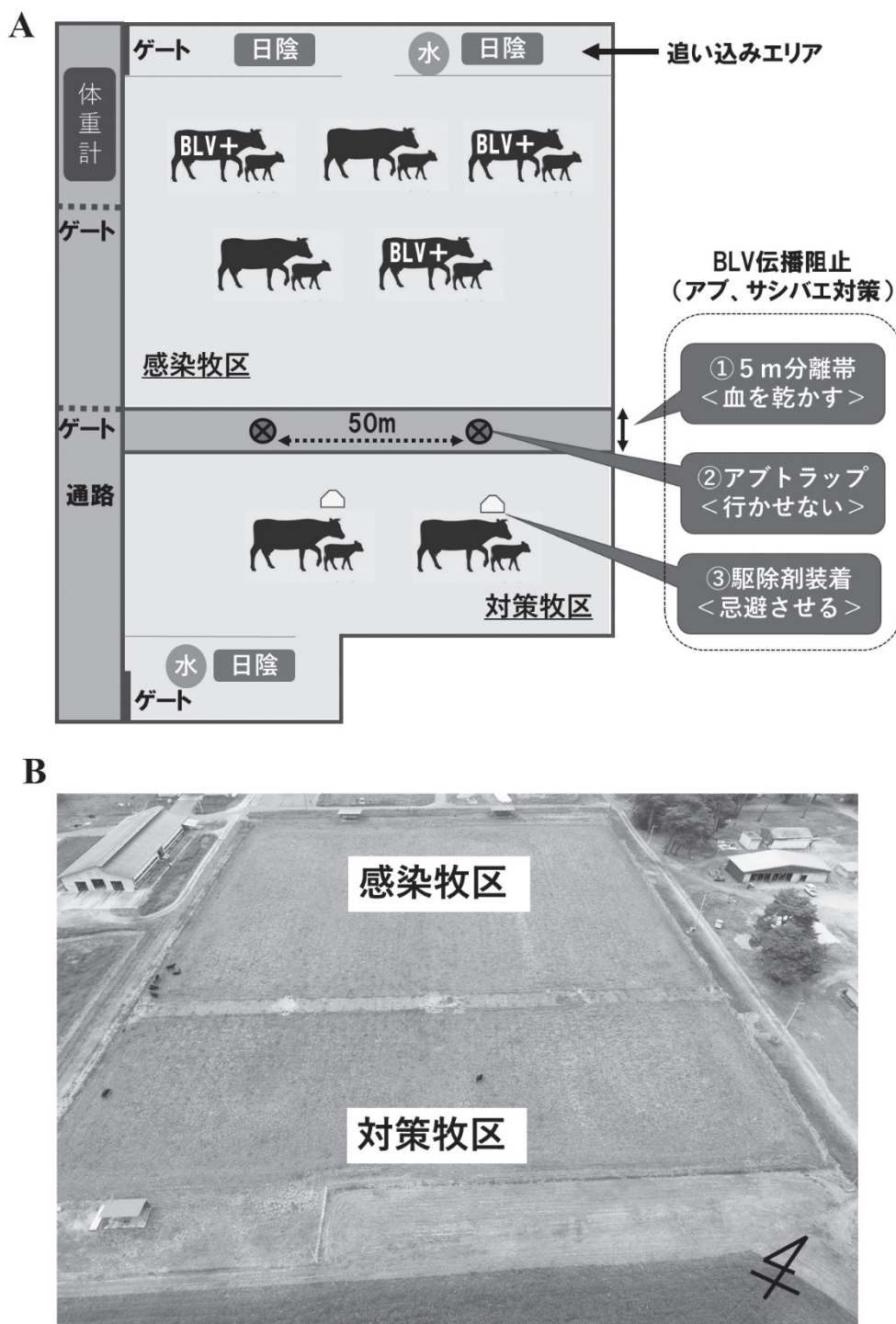


図2 実証モデル放牧地のレイアウト.

A) 確実な感染源として、血中プロウイルス量を指標とした牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV) 感染リスクが高リスク分類される母牛3頭 (表記: BLV+) を感染牧区に配置. 感染高リスク牛を配置したことで感染リスクが高い環境になったことを証明するために、感染牧区にBLV陰性母牛2頭をおとり牛 (陽転コントロール) として混牧. これに対して、BLV伝播阻止コンセプトを実践した対策牧区にBLV陰性母牛2頭を配置. ゲート、通路および追い込みエリアを利用して、両牛群を常に5m以上分離した状態で、体重計設置枠場において、体重測定、採血、投薬、人工授精、妊娠鑑定、鼻紋採取、去勢および除角作業等を実施. 各牧区に水槽、鉍塩 (イラスト無し)、庇陰舎 (クリープフィーディング設備付) および秋季補助飼料用のグラスロール草架 (イラスト無し) を両牧区のほぼ対極位置に設置. B) 実際の実証モデル放牧地のドローン空撮写真.

BLV プロウイルス量が 1,000 copies/50 ng of gDNA 以上の感染高リスク (1 頭) および超高リスク (2 頭) に分類される [15, 17]、春分娩予定の妊娠牛 3 頭を選定した(表 1)。2 年目は、EBL 感受性アレル *BoLA-DRB3*1601* または非抵抗性・非感受性アレルを保有し、かつ BLV プロウイルス量が 1,000 copies/50 ng of gDNA 以上の高リスク (1 頭) および超高リスク (2 頭) に分類される春分娩予定の妊娠牛 3 頭とした(表 1)。この内、1 頭は 2 年間反復して供試した。いずれの母牛も EBL 抵抗性アレルを保有せず、BLV プロウイルス量が感染源として十分高いことから、1 年目と 2 年目の間で EBL 感受性アレル保有頭数が異なる点に関しては 2 年間の反復試験条件には影響しないと判断した。

3、放牧・衛生管理および各作業手順

1) 試験期間. 各年共に 4 月中旬から放牧試験

を開始し、吸血昆虫の飛来がほとんど確認できなくなる 11 月中旬まで実施し、さらに放牧試験完了後、PCR 検出における感染ウィンドウ期 [14] を考慮して、退牧先のパドックにて 4 週間後の 12 月中旬まで調査を継続した。

2) 母牛および子牛の放牧飼養管理. 供試母牛は全て春分娩予定 (4-5 月) の妊娠牛であり、放牧開始直前に隔離牛舎で分娩した 1 頭 (No. 対策 1A) を除き、全て放牧試験中に放牧地で分娩させ、子牛は自然哺育条件で親子共に供試した。子牛の雌雄、EBL 抵抗性・感受性アレル情報は表 1 に示した。実証モデル試験地はケンタッキーブルーグラス主体放牧地約 2ha であり (図 2)、放牧地の割当面積は親子 1 組当たり約 0.28ha とし、試験期間を通じて自由飲水および鉍塩 (鉍塩セレニクス TZ、日本全薬工業、福島) を自由摂取とした。各牧区に水槽、鉍塩、庇陰舎 (クリープフィーディング設備付)

表 1 実証モデル放牧試験の処理区および供試牛の牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV) 感染に関する情報

2019年 (1年目)									
処理区	母牛No.	試験開始時 BLVプロウイルス量 (copies/50ng 全血gDNA)	リスク分類 ^a	保有アレル ^b	アレル判定	子牛 雌雄	子牛保有 アレル	子牛 アレル判定	
感染牧区	感染源1A	1396	高	*1201 *1601	感受性	オス	*1601	—	感受性
	感染源1B	2003	超高	*1201 *1601	感受性	オス	*1001 *1201	—	非抵抗性、非感受性
	感染源1C	2002	超高	*1601	—	オス	*0502 *1601	—	感受性
	おとり1A	ND ^c	—	*0503 *1601	—	メス	*0503 *1601	—	感受性
	おとり1B	ND	—	*0503 *1001	非抵抗性、非感受性	メス	*0201 *0503	—	非抵抗性、非感受性
対策牧区	対策1A	ND	—	*0201 *0502	非抵抗性、非感受性	メス	*0502 *1601	—	感受性
	対策1B	ND	—	*0101 *1601	感受性	メス	*14011 *1601	—	感受性

2020年 (2年目)									
処理区	母牛No.	試験開始時 BLVプロウイルス量 (copies/50ng 全血gDNA)	リスク分類	保有アレル	アレル判定	子牛 雌雄	子牛保有 アレル	子牛 アレル判定	
感染牧区	感染源2A	1186	高	*0502 *1201	非抵抗性、非感受性	メス	*0502 *1601	—	感受性
	感染源2B	2963	超高	*1201 *1601	感受性	メス	*1001 *1201	—	非抵抗性、非感受性
	感染源2C	2420	超高	*1001 *1201	非抵抗性、非感受性	メス	*1001 *1601	—	感受性
	おとり2A	ND	—	*0503 *1501	非抵抗性、非感受性	オス	*0503 *1601	—	感受性
	おとり2B	ND	—	*0101 *1601	感受性	オス	*14011 *1601	—	感受性
対策牧区	対策2A	ND	—	*0502 *0503	非抵抗性、非感受性	オス	*0101 *0503	—	非抵抗性、非感受性
	対策2B	ND	—	*1001 *1601	感受性	オス	*0201 *1001	—	非抵抗性、非感受性

^a 全血中 BLV プロウイルス量に基づく感染リスク (低、中、高、超高) 分類 [15,17].

^b Bovine Leukocyte Antigen (*BoLA*) -*DRB3* 遺伝子タイピング法に基づく牛伝染性リンパ腫 (EBL) 抵抗性・感受性アレル. 黒毛和種牛では、*1601 が EBL 感受性アレル、*0902 および *1101 が EBL 抵抗性アレルであり、その他のアレルは非感受性・非抵抗性を示す. 抵抗性アレルと感受性アレルを 1 つずつ持っているヘテロ接合体の牛は抵抗性牛とみなす [18]. 子牛のアレル判定は 3 カ月齢以降の採血サンプルにて実施.

^c PCR 増幅が確認されなかったため陰性と定義.

1 年目の No. 感染源 1B と 2 年目の No. 感染源 2B は同一個体.

および秋季補助飼料用のグラスロール草架を両牧区のはぼ対極に設置した(図2)。牛の集畜学習および健康状態の確認のため、平日は毎日、朝と夕、約200g/母牛1頭程度の濃厚飼料を呼び餌として牧区毎に庇陰舎に誘導して給与した。子牛が2カ月齢程度となる7月からは離乳に向けてクリープフィーディングを行った。9月以降は放牧地の草量が不足するため、約1週間に1回、各牧区にイタリアンライグラスロールを草架に投入し補助飼料として給与し、11月中旬まで放牧飼養を継続した。

3) 母牛および子牛の衛生管理。 子牛は出生後すぐに現地にて生時体重を人用体重計にて測定し、母牛からの初乳摂取を確認した。数日以内にイベルメクチン注射薬(アイボメック注メリアル、ベーリンガーインゲルハイムアニマルヘルスジャパン、東京)を0.02mL/kg BW用量にて皮下注射し、トルトラズリル製剤(バイコックス、エランコジャパン、東京)を0.3mL/kg BW用量にて経口投与した。また生後1週間程度を目安に登録耳標を装着し、対策牧区の子牛については耳標と合わせてペルタグも装着した。放牧衛生管理の基本スペックとして、供試牛全頭に放牧開始時から試験終了まで約2週間隔で、体重測定の上、フルメトリン外部寄生虫駆除剤(バイチコール、エランコジャパン)を10mL/100kg BW用量(100kg BW未満の子牛には10mL用量)でプアオン法により鼻部から尾根部までの皮膚に滴下投与した。投与間隔は、我々が公表した牧場管理効率化マニュアル—放牧馴致とマダニ対策編—(農研機構畜産研究部門技術リポート17号、2017年)に準じた。さらに放牧開始時、6月、9月さらに11月の試験完了退牧時に、内外寄生虫駆除剤(アイボメックトピカルまたはエプリネクストピカル、ベーリンガーインゲルハイムアニマルヘルスジャパン)を10mL/100kg BW用量(100kg BW未満の子牛には10mL用量)でプアオン法により滴下投与した。

4) 作業手順。 人為的感染リスクを伴う、親子放牧飼養および試験実施に必要な作業は、「牛白血病(牛伝染性リンパ腫)に関する衛生対策ガイドライン」に準拠した手順に従い実施した。具体的には、各作業(体重測定、試験採血、定期投薬、登録用鼻紋採取、耳標装着、鼻環装着、

除角(約2か月齢時)、去勢(約3-4か月齢時)、同期化ホルモン注射、人工授精(AI)、妊娠鑑定、削蹄等)は図2で示した体重計枡場で行い、作業順序(対策牧区→感染牧区)を徹底した。はじめに感染牧区の牛群を追い込みエリアに集畜して体重計枡場から距離をとって隔離した上で、対策牧区の牛群をゲートと通路を利用して体重計枡場に誘導した。作業完了後は、逆ルートで対策牧区に牛群を戻した後、追い込みエリアから感染牧区の牛群を体重計枡場に誘導して作業を行った。これにより、両牛群が近接することなく、吸血昆虫が牛群間で媒介できない距離と時間を確保した。保定用ロープ、採血器具および除角・去勢のための鎮静薬投与や定時AIのためのホルモン投与に使用する注射器具等は全て1頭ずつ用意して使用した。使い回しが必要な耳標装着器、除角用ハサミ、削蹄刃、腔内留置型黄体ホルモン製剤(CIDR、イージーブリード、家畜改良事業団、東京)装着器および捻転式去勢器(243式、富士平工業、東京)は1頭ごとにバケツに入れた水道水で洗浄後、別のバケツに入れた逆性石けん希釈液(オスバンS、日本製薬、東京)で消毒してから使用した。除角に用いた電気焼烙器に付着した血液は高温で焼き、完全に乾固していることを確認してから鑊で焦げ付きを除去して使用した。AIおよび妊娠鑑定の際(実施は1年目のみ)は1頭ごとに作業手袋を交換し、AI器具も1頭ごとに用意して使用した。妊娠鑑定時は直検手袋を利用して超音波プローブをカバーして糞等で本体が汚染されないように注意して取り扱い、1頭ごとに交換して使用した。

4. 採血および捕虫採材および吸血昆虫種の同定

体重測定および投薬に加え、親子牛問わず陰性牛は陽転調査のため、約2週間隔で21G採血針およびEDTA-2Na真空採血管(テルモ、東京)を用いて頸静脈から採血を行った。感染母牛3頭および陽転が確定した牛は約4週間隔で採血した。子牛は、子宮内垂直感染を調べるために出生数日以内に採血を行い、さらに産道・初乳経路の垂直感染を調べるために約30日齢前後にも採血を行った[16]。放牧試験完了時点で陰性だった個体は、感染ウィンドウ期[14]を考慮して、2および4週間後にも採血を行っ

た。採血サンプルを用いて全血 DNA 抽出後、リアルタイム PCR 法にてプロウイルスの検出および定量により陰性牛の陽転をモニタリングした。また採血に合わせて、2 基のアブトラップに捕虫された吸血昆虫を回収し、顕微鏡観察により形態学的にアブおよびサシバエを同定し、計数記録した。評価値として、捕虫数を期間日数で除した 1 日当たり捕虫数 (匹/日) を算出した。さらに 2 年目の 9、10 および 11 月の計 3 回、アブおよびサシバエの BLV プロウイルス保有状況について調査を行った。具体的には、分離帯のアブトラップに捕虫されたアブ・サシバエに加え、感染牧区および対策牧区の各牛群周囲に飛来していたアブ・サシバエを虫網振りにより捕獲した。サシバエ 3-8 匹またはアブ 1-4 匹毎にプールして 1 サンプルとし、-20℃にて冷凍保管した。

5、ウシ全血中およびアブ・サシバエ口器のゲノム DNA 精製および BLV プロウイルス定量

血液サンプル処理の手順は全て、対策牧区の陰性牛サンプル、感染牧区の陰性牛サンプルそして感染牧区の陽性牛サンプルの順に取り扱い、クロスコンタミのリスクを排除して実施した。シリカメンブレン DNA 精製キット (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Germany) を用いて、操作手順書に従い全血サンプルからゲノム DNA を精製した後、分光光度計 (Nano Drop ND-1000, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて DNA 溶液の純度確認 (A260/A280 値の範囲: 1.70 - 2.25) と濃度測定を行い、PCR 定量まで -80℃にて冷凍保管した。解凍した DNA サンプル 50 ng、BLV 検出用 Probe/Primer/Positive control (CY415, タカラバイオ, 滋賀)、酵素試薬 (Cycleave PCR Reaction Mix SP, CY510, タカラバイオ) およびリアルタイム PCR 装置 (StepOnePlus Real Time PCR System, Life Technologies) を用いて定法に従い、*tax* 遺伝子をターゲットとした絶対定量 PCR を行った。BLV Positive Control と希釈液 (EASY Dilution for Real Time PCR, タカラバイオ) を用いた 5 段階スタンダード (10 倍希釈系列: 5 - 50,000 copies) から検量線を作成した。PCR 反応条件として、95℃ 10 sec

の初期変性後、95℃ 5 sec、64℃ 30 sec の変性・伸長・検出サイクルを 40 cycle 行った。専用ソフトウェア (StepOne Software v2.1, Life Technologies) を用いて解析を行い、Negative control に増幅がないこと、検量線による R² 値が 1 近傍であること、PCR 効率が 95% 以上であることを確認し、各サンプルの BLV プロウイルス量 (copies/50 ng of gDNA) を算出した。本研究では PCR 増幅が認められないサンプルは BLV 陰性牛由来と定義した。

虫体サンプル処理の手順は、対策牧区、分離帯そして感染牧区由来の順に取り扱った。アブまたはサシバエのプール虫体サンプルから口器を摘出し、虫体ゲノム DNA 精製キット (NucleoSpin DNA Insect, 740470.50, タカラバイオ) を用いて、操作手順書に従いゲノム DNA を精製した。精製後の DNA サンプルは血液由来 DNA サンプルと同様に取り扱い、ウシ白血球ウイルス検出キット (with ROX Reference Dye) (RC202A, タカラバイオ) および StepOnePlus Real Time PCR System (Life Technologies) を用いて定法 (PCR 反応条件: 95℃ 30 sec 初期変性、95℃ 5 sec、60℃ 30 sec 変性・伸長・検出サイクル 45 cycle) に従い、BLV (*pol*) 遺伝子とウシゲノム *RPPHI* 遺伝子について増幅曲線を基に検出した。両遺伝子が検出された虫体サンプルを、陽性牛吸血に由来した BLV 保有サンプルと定義した。

【結果】

1、アブトラップ捕虫数の季節変動

1 年目の調査 (図 3A) では、アブの捕虫数が 6 月から増え始め、特に 7 月末 - 8 月末にかけてピークとなった。その後減少し、10 月以降はアブの捕虫は確認されなかった。アブの分類では、6 月 - 7 月末はニッポンシロフアブ (*Tabanus nipponicus*) が捕虫の優占種であったが、7 月末 - 8 月末はフタスジアブ (*Ochrops bivittatus*) が優占し、9 月末まではニッポンシロフアブとフタスジアブが同程度捕虫された。サシバエ (*Stomoxys calcitrans*) は放牧試験期間中、常に飛来が確認され、特に捕虫ピークは 8 月頭 - 9 月末でありアブのピークとは一致しなかった。気温が低下した 11 月中旬においてもサシバエが捕虫された。2 年目の調査 (図 3B)

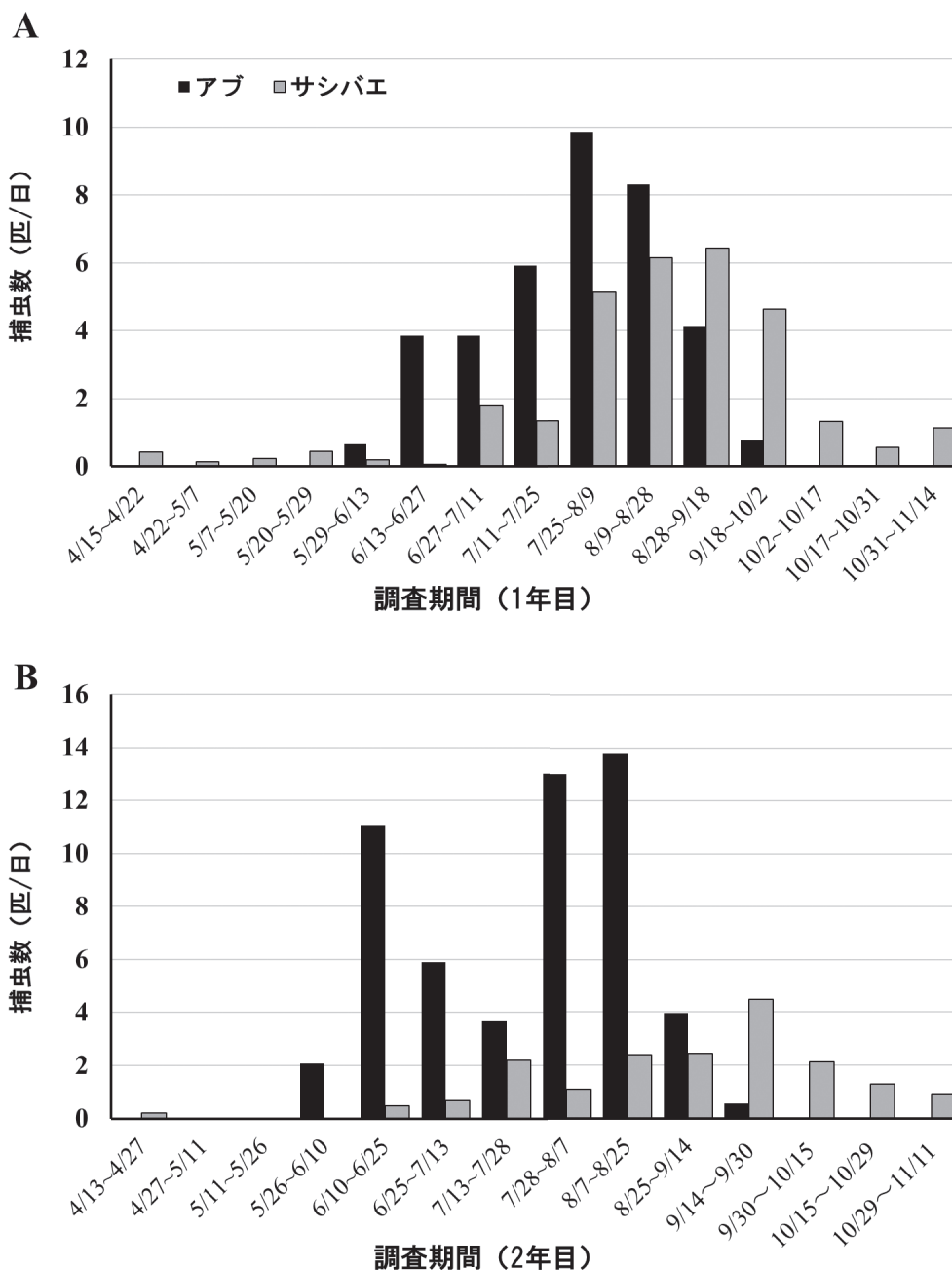


図3 分離帯に配置したアブトラップに捕虫されたアブ・サシバエ数の季節変動。
分離帯に約50m間隔でアブトラップを設置（本試験ではファームエイジ製のアブキャップ™を2基配置）。放牧試験開始後、2週間隔の採血に併せて、2基のアブトラップに捕虫された吸血昆虫を回収し、顕微鏡観察により形態学的にアブおよびサシバエを同定し、計数記録した。評価値として、捕獲数を期間日数で除した1日当たり捕虫数（匹/日）を算出。A) 1年目（2019年）およびB) 2年目（2020年）の季節変動。

では、アブの捕虫が5月末から確認され、6月中旬に一過性の捕虫ピークがあった（約11匹/日）。その後、7月末-8月末にかけて再びピークとなった（約13匹/日）。その後減少し、10月以降、アブの捕虫は確認されなくなった。アブの分類では、7月末-8月末は前年同様、フ

タスジアブが優占種であった。サシバエは試験期間を通して飛来が確認され、特に9月中旬から末にかけて捕虫ピーク（約4.5匹/日）があり、アブのピークとは一致しなかった。気温が低下した11月中旬においてもサシバエが捕虫された。

2、プロウイルス定量による BLV 感染モニタリング

1 年目において、感染母牛の放牧試験期間中のプロウイルス量には変動が見られ、No. 感染源 1A、B および C の期間平均プロウイルス量はそれぞれ 2,024、2,670 および 3,430 copies/50 ng gDNA であり、3 頭共に試験開始時の保有量 (表 1) より高かった。出生直後および生後 1 か月の調査から、感染母牛から子牛への垂直感染は確認されなかった (データ省略)。感染牧区において、8 月末に No. おとり 1A の陽転が確認され (103 copies/50 ng gDNA)、その後プロウイルス量が著しく増加して 9 - 11 月の平均プロウイルス量は 4,915 copies/50 ng gDNA であった。さらに、放牧試験終了時の 11 月中旬に、感染源 1C の子牛 1 頭の陽転が確認され (344.5 copies/50 ng gDNA)、2 週間後の追跡調査ではプロウイルス量が 2,954 copies/50 ng gDNA まで著増していた。一方、

対策牧区では母牛および子牛共に陽転は一切確認されなかった。以上より、試験期間を通した陽転率は、感染牧区のおとり母牛 50% および子牛 20%、対策牧区の母牛および子牛共に 0% であった (表 2)。

2 年目では、7 月 21 日朝、感染牧区の No. おとり 2A の突然死が発生した。前日夕方の観察では特段の兆候は確認されず、翌朝の見回りの際にへい死体で発見された。原因は特定できなかったが、死体から採血を実施し BLV プロウイルス定量を行った結果、陰性であったことを確認した。また、No. おとり 2A の子牛は自然哺育段階にあったが、2 か月齢となっておりクリープフィーディングによる濃厚飼料摂取量も多い個体であったため、そのまま離乳させ放牧試験への供試を継続した。結果として離乳による一時的な発育停滞はあったものの 11 月には日増体 0.85kg と十分な発育を示したため、供試継続は適当範囲であったと判断した。感染母

表2 各年、牧区および陰性母牛・子牛別の牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV) 陽転判明時期と陽転率

2019年 (1年目)												
母牛		4月15日	...	8月9日	8月28日	9月18日	10月2日	10月17日	10月31日	11月14日	12月2日	12月16日
感染牧区	陽転率% (陽性数/対象数)	0% (0/2)		0% (0/2)	50% ^a (1/2)	50% (1/2)	50% (1/2)	50% (1/2)	50% (1/2)	50% (1/2)	50% (1/2)	50% (1/2)
対策牧区	陽転率% (陽性数/対象数)	0% (0/2)		0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)
子牛		4月15日	...	8月9日	8月28日	9月18日	10月2日	10月17日	10月31日	11月14日	12月2日	12月16日
感染牧区	陽転率% (陽性数/対象数)	0% (0/5)		0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/5)	20% ^b (1/5)	20% (1/5)	20% (1/5)
対策牧区	陽転率% (陽性数/対象数)	0% (0/2)		0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)
2020年 (2年目)												
母牛		4月13日	...	8月7日	8月25日	9月14日	9月30日	10月15日	10月29日	11月11日	11月30日	12月15日
感染牧区	陽転率% (陽性数/対象数) ^b	0% (0/2)		0% (0/1)	100% ^a (1/1)	100% (1/1)	100% (1/1)	100% (1/1)	100% (1/1)	100% (1/1)	100% (1/1)	100% (1/1)
対策牧区	陽転率% (陽性数/対象数)	0% (0/2)		0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)
子牛		5月26日	...	8月7日	8月25日	9月14日	9月30日	10月15日	10月29日	11月11日	11月30日	12月15日
感染牧区	陽転率% (陽性数/対象数)	20% ^c (1/5)		20% (1/5)	20% (1/5)	20% (1/5)	20% (1/5)	20% (1/5)	20% (1/5)	20% (1/5)	20% (1/5)	20% (1/5)
対策牧区	陽転率% (陽性数/対象数)	0% (0/2)		0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)

BLV プロウイルスの検出は *tax* 遺伝子を標的としたリアルタイム PCR 法を用いた。矢印は陽転の発見を示す。

^a 1 および 2 年目共に、母牛に関しては 4 月中旬の放牧開始から 7 月末まで、子牛に関しては出生が揃ってから 7 月末まで、それぞれ BLV 水平感染が生じなかったため記載を省略。

^b 7 月 21 日に感染牧区の No. おとり 2A が突然死したため (死亡時 BLV 陰性確認)、以降のおとり対象数は 1 とした。

^c 2 年目の BLV 陽性子牛は垂直感染によるもの。

1 年目の 12 月 2 日、16 日および 2 年目の 11 月 30 日、12 月 15 日は感染ウィンドウ期を考慮した放牧試験終了後の追跡調査。

牛の放牧試験期間中のプロウイルス量には変動が見られ、No. 感染源 2A、B および C の放牧試験期間の平均プロウイルス量はそれぞれ 2,076、3,967 および 2,873 copies/50 ng gDNA であり、3 頭共に試験開始時の保有量（表 1）を上回った。No. 感染源 2A の子牛において出生 1 日後の採血サンプルから、27 copies/50 ng gDNA のプロウイルスが検出され、その後も平均 690 copies/50 ng gDNA のプロウイルス保有が確認された。さらに感染牧区において、8 月末に No. おとり 2B の陽転が確認され（255 copies/50 ng gDNA）、その後プロウイルス量が倍増して 9 - 11 月の平均プロウイルス量は 462 copies/50 ng gDNA であった。一方、対策牧区では母牛および子牛共に陽転は一切確認されなかった。以上より、2 年目の試験期間を通して、垂直感染経路も含む陽転率は感染牧区のおとり母牛 100%（母数から突然死した No. おとり 2A を除く）および子牛 20%、対して、対策牧区の母牛および子牛共に 0% であった

（表 2）。

3. 捕虫場所および時期の違いにおけるアブおよびサシバエの BLV プロウイルス保有状況

2 年目の 9、10 および 11 月の計 3 回行った、アブおよびサシバエの BLV プロウイルス保有（口器付着）状況調査の結果を図 4 に示した。感染牧区由来のサシバエサンプルから BLV プロウイルスが高頻度（71%）かつ 3 か月全ての時期で検出された。分離帯由来のサシバエサンプルからは 20% の頻度で検出され、9 月に加え 11 月にも検出された一方、対策牧区由来のサシバエサンプルからは 9 月に 1 サンプルのみ検出された（頻度として 14%）。また、全てのアブサンプルから BLV プロウイルスは検出されなかった。

【考察】

我々は、BLV 陽性牛牧区と陰性牛牧区の間を 5m 分離して、さらにアブトラップを分離帯



図4 捕虫場所および時期の違いにおけるアブおよびサシバエの BLV プロウイルス保有状況。

2年目の9、10および11月の計3回、アブおよびサシバエの BLV プロウイルス保有状況を感染牧区、分離帯および対策牧区に分けて調査。分離帯のアブトラップに捕虫されたアブ・サシバエに加え、感染牧区および対策牧区の各牛群周囲に飛来していたアブ・サシバエを虫網振りにより捕獲。サシバエ 3-8 匹およびアブ 1-4 匹毎にプールしてそれぞれ 1 サンプル (n = 1) とした。虫体から口器を摘出、DNA を精製し、BLV (*pol*) 遺伝子とウシゲノム *RPPHI* 遺伝子について検出。両遺伝子が検出された虫体サンプルを、陽性牛吸血に由来した BLV 保有サンプルと定義。9 月以降の調査のため、アブの飛来は少なく（図 3 参照）、サンプルのほとんどがサシバエであった。

に設置し、耳標型外部寄生虫駆除剤を頭数の少ない牧区の牛のみに装着させる、という吸血昆虫対策に特化したコンセプトの実践により放牧飼養条件下における BLV 伝播を阻止できる、という仮説を立てた。そして、感染高リスク牛とおとり牛を用いた2年間の黒毛和種の親子放牧実証モデル試験を行うことにより科学的な検証を試みた。その結果、2シーズンを通して、感染牧区では母牛・子牛の水平感染および子牛の垂直感染が確認された一方、対策牧区における陽転は一切確認されなかったことから、本 BLV 伝播阻止コンセプトの有用性が科学的に示されたものである。

本研究では、1年目および2年目共に、おとり牛の陽転が8月末に確認された。この陽転の発見時期は感染母牛の分娩から少なくとも3ヵ月以上経過しており（感染ウィンドウ期としては長期）、また、多くの牛が分娩時は群から離脱して分娩する習性を示したことから、おとり牛が感染母牛の分娩由来の後産や分娩箇所の新鮮な血液や体液に接触して陽転に至った可能性は低いと考える。1年目では、感染源 1A に取り付けた頭絡擦れにより、6月13日および7月11日にそれぞれ鼻上部と顎の一部から少量の出血が確認されたため、これに接触したことによる水平感染の可能性は否定できないものの、2年目においては感染牛の怪我等による出血事例は全くなかった。一方、アブ・サシバエの捕虫数の動態は2年間で一致はしていなかったものの、7月末から8月末にかけてフタスジアブを優占とする捕虫ピークがあった点は共通していた。さらに毎日の観察から、両年共に、夏季の暑熱が増した7月末から、牛が日中、庇陰舎に集まり休息をとる様子が頻繁に確認されており、加えてこの時に、牛群の周囲にはアブが多数飛来していた。この状況では、感染母牛から吸血していたアブが途中で追われて近くにいるおとり牛に付くことで、新鮮 BLV 感染血液が付着した口器によるおとり牛への吸血が起きやすかったと考える。感染牧区のこのような状況が陽転リスクとなり、両年、おとり牛の8月末の陽転を引き起こした可能性が示唆された。また1年目には、感染牧区の子牛の陽転が11月中旬に確認されるという非常に興味深い結果も得た。7月以降、感染母牛の怪我等の出

血は確認されておらず、吸血昆虫に関しては、陽転確認の2ヵ月前である9月中旬以降は捕虫数の減少したサシバエの飛来しかなかった。アブ・サシバエの消長から、7-9月の感染リスクが高いことは想定していたが [7]、本結果および2年目調査において9-11月のサシバエが BLV プロウイルスを保有していることが明らかとなったことから、少数のサシバエが飛来しているに過ぎない秋季においても BLV 伝播が起きる可能性があることが判明した。次に、2年間の感染牧区の水平感染率において、おとり母牛（3頭中2頭が陽転）と子牛（垂直感染した子牛を除く9頭中1頭が陽転）を比較した場合、子牛の水平感染リスクが低い結果となった。要因の一つには、垂直感染した子牛を除き、感染母牛の子牛（5頭）には移行抗体があり、BLV の水平感染が防除されていた可能性がある。また、日常観察に基づく推察となるが、子牛は生後から体毛が比較的長く身体を覆っていた一方、母牛は夏季に非常に短い夏毛となるため、アブ・サシバエの吸血アプローチが母牛の方が容易であったためリスクが高かった可能性が考えられる。親子放牧において子牛の新規感染を防止することが重要であり、今回の陽転率の差異に関する因果は今後も検討していく必要がある。

2年間の試験において、1,000 copies/50 ng of gDNA 以上の高プロウイルス量を保有する感染母牛計6頭の産子中、垂直感染発生は1頭であった（感染率16.7%）。出生1日後の採血サンプルからプロウイルスが検出されたことから、感染ウィンドウ期を考慮すると [16]、出生前の子宮内感染が起きていたものと推察した。感染母牛全体を母数とする垂直感染率については、Mekata ら [16] の報告にある黒毛和種牛の子宮内および産道経路の感染率16.6%と概ね一致した。さらに、母牛のプロウイルス量に着目した場合、分娩時に2,000 copies/50 ng gDNA を超える母牛から産まれた子牛の子宮内感染率は34.4%と高いことが報告されており [15,16]、本試験においても25%（該当4頭中1頭）と高い感染率を示した。なお、垂直感染した子牛も、その後のプロウイルス保有量の増加により [16]、放牧地における新たな感染源となることが本結果でも示唆されたため、親子放

牧において牛群の中で2,000 copies/50 ng gDNAを超える母牛に分娩させるリスクが改めて確認された。

本試験ではコンセプトを構成する3つの対策について個別の検討はしていないため、それぞれの効果について明確に論じることはできない。しかし、我々の狙い通りに3つの対策が相乗的に作用し、対策牧区において陽転ゼロを達成できたものとする。具体的には、2年目の吸血昆虫のBLVプロウイルス保有状況の調査データから、BLV感染血液を持った吸血昆虫の牧区間飛翔が分離帯のアブトラップや耳標型外部寄生虫駆虫剤により阻害され、飛来リスクが低減されたこと、そして完全には感染牧区から対策牧区への飛来を阻害できなくても、5m分離により口器附着血液の乾固時間を稼ぐことでさらに伝播抑制効果を発揮したため、と推察された。ただし、吸血昆虫のBLVプロウイルス保有状況の調査については時期、頻度が限定され、特にアブに関するデータ数が少なかったこと、そして本モデル放牧試験では、試験地面積や条件設定した供試牛の頭数確保に限界があったため、放牧規模が小さかったことや、設計上、牧区間で頭数の違いがあり吸血昆虫の飛来に偏りが生じたかもしれない可能性については考察に注意が必要かもしれない。また、BLVには遺伝的特徴として、伝播性に関与する産生能力が高い株と低い株の存在が認められているが[19]、本研究ではBLVの遺伝的特徴までは明らかにしておらず、より複合的なBLV伝播リスクの解明が今後の検証課題である。

Mekataら[17]は、500 copies/50 ng of gDNA以下のプロウイルス量の牛は、他の牛にBLVを水平および垂直伝播するリスクが低い「低リスク牛」に分類されることを明らかにしている。すなわち、感染源となるのは、500 copies/50 ng of gDNA以上の「高リスク牛」であり、これらの牛に対して、本コンセプトを適用すれば効果的かつ効率的な対策が可能となる。本結果を踏まえれば、過去の5m以上の分離対策において陽転牛が生じた事例の中には、入牧や群編成段階のスクリーニングにおいて、抗体検査による感染初期の検出漏れがあり、分離効果が適切に得られなかったケースもあったのではないかと推察する。松田ら[13]や

Koharaら[8]も、スクリーニング検査の時点から、高感度かつ感染ウィンドウ期の短いリアルタイムPCR法やnested PCR法によるウイルス遺伝子の検出を行う必要性を示している。また近年、Sajikiら[27]は、プロスタグランジンE2産生および免疫チェックポイント因子(PD-L1)発現を同時に阻害する投薬により、高リスク牛のウイルス量を減少させることに成功したと報告している。今後は、よりプロウイルス量を指標にした感染リスクの評価および対策が重要視されるべきであり、加えて、ジャケット着用やシマウマ柄ペイント[10]といった吸血昆虫対策の技術開発も進んできている。これらの技術と本コンセプトを組み合わせることが、国内におけるEBL清浄化と生産基盤の強化の両立に向けた飼養技術の高度化につながると期待される。

BLV感染牛のEBL発症だけでなく、発症に至らずともBLV感染が牛の免疫機能や生産性へ悪影響を及ぼす可能性も報告されており[3, 21]、潜在的な経営被害も無視できない。BLV非感染牛の市場価値についてアンケート調査した報告では(参考:関口, 2019, 畜産の情報, 8:56-67)、60%以上の回答者が非感染牛に対して、付加価値として1頭当たり数万円の支払意思額を示した。一部の家畜市場でもすでに、BLV陰性牛が通常相場より数万円高値で取引されている。本コンセプトでは、5m幅の分離帯に道路等を利用するなど、追加コストをかけない工夫が可能である。アブトラップや駆虫薬等の活用は、放牧牛の衛生対策、ストレス低減およびアニマルウェルフェア対応という観点から放牧飼養管理上の基本スペックであり、特段BLV対策としてコストが発生するものではない。以上から、経営的観点からも本コンセプトは繁殖農家の利益につながることが期待される。

結論として、感染高リスク牛とおとり牛を用いた2年間の反復試験において、感染牧区では母牛・子牛の水平感染および子牛の垂直感染が確認された一方、対策牧区における陽転は一切確認されなかったため、本BLV伝播阻止コンセプトの有用性が科学的に示された。本研究の検証結果が、清浄化に向けた有効性の高い放牧対策技術の開発に資し、BLV対策として分離放牧導入を図る際の現場の理解向上に役立つこ

とを強く期待する。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、研究協力を頂きました手島茂樹氏、阪谷美樹氏、中尾誠司氏（農研機構畜産研究部門）および木戸恭子氏（農研機構本部）に深謝致します。吸血昆虫の分類同定を御指導頂きました白石昭彦氏（農研機構本部）に深謝致します。技術サポートを頂きました管理本部技術支援部中央技術支援センター那須業務科諸氏ならびにつくば第7業務科御代田技術チーム諸氏、さらに試験牛に深謝致します。会誌投稿規定により引用文献として掲載しておりませんが、本研究は全国各地域の家畜保健衛生所やNOSAIが取り組まれている清浄化対策の報告や公共牧場の取り組みを参考にさせて頂いたものです。皆様の日頃からの挑戦と努力そして産業動物臨床にかける熱意に敬意を表します。

【付記】

本論文に関して、開示すべき利益相反関連事項はない。また、英文については専門的校正（Editage、www.editage.com）を受けて記述している。

【引用文献】

- [1] Acaite, J., Tamosiunas, V., Lukauskas, K., Milius, J., Pieskus, J. 2007. The eradication experience of enzootic bovine leukosis from Lithuania. *Prev. Vet. Med.* 82:83-89.
- [2] Bech-Nielsen, S., Piper, C.E., and Ferrer, J.F. 1978. Natural mode of transmission of the bovine leukemia virus: role of bloodsucking insects. *Am. J. Vet. Res.* 39:1089-1092.
- [3] Emanuelson, U., Scherling, K., Pettersson, H. 1992. Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 12:121-131.
- [4] Evermann, J.F., DiGiacomo, R.F., Ferrer, J.F., Parish, S.M. 1986. Transmission of bovine leucosis virus by blood inoculation. *Am. J. Vet. Res.* 47:1885-1887.
- [5] 石田秀史, 若林光伸, 本間裕一, 樋口良平, 渡辺大成, 鍋谷政広, 鳥屋雄司. 1997. 抗体陽性牛を吸血したアブからの牛白血病ウイルスの分離. *日獣会誌*. 50:519-522.

- [6] Juliarena, MA, Poli, M., Sala, L., Ceriani, C., Gutierrez, S., Dolcini, G., Rodríguez, EM, Mariño, B., Rodríguez-Dubra, C., Esteban, EN. 2008. Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene. *Anim. Genet.* 39:432-438.
- [7] Kobayashi, S., Tsutsui, T., Yamamoto, T., Hayama, Y., Kameyama, K., Konishi, M., Murakami, K. 2010. Risk factors associated with within-herd transmission of bovine leukemia virus on dairy farms in Japan. *BMC Vet. Res.* 6:1.
- [8] Kohara, J., Konnai, S., Onuma, M. 2006. Experimental transmission of Bovine leukemia virus in cattle via rectal palpation. *Jpn. J. Vet. Res.* 54:25-30.
- [9] Kohara, J., Takeuchi, M., Hirano, Y., Sakurai, Y., Toshihiko Takahashi, T. 2018. Vector control efficacy of fly nets on preventing bovine leukemia virus transmission. *J. Vet. Med. Sci.* 80(10):1524-1527.
- [10] Kojima, T., Oishi, K., Matsubara, Y., Uchiyama, Y., Fukushima, Y., Aoki, N., Sato, S., Masuda, T., Ueda, J., Hirooka, H., Kino, K. 2019. Cows painted with zebra-like striping can avoid biting fly attack. *PLoS ONE.* 14(10): e0223447.
- [11] Kono, Y., Sentsui, H., Arai, K., Ishida, H. and Irishio, W. 1983. Contact transmission of bovine leukemia virus under insect-free conditions. *Jpn. J. Vet. Sci.* 45:799-802.
- [12] Manet, G., Guilbert, X., Roux, A., Vuillaume, A., Parodi, A.L., 1989. Natural mode of horizontal transmission of bovine leukemia virus (BLV): the potential role of tabanids (*Tabanus* spp.). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 22:255-263.
- [13] 松田敬一, 佐藤真由美, 大橋さやか, 遠藤祥子, 村松良永, 小井田有美, 鈴木一教. 2018. 臨床現場での牛白血病清浄化対策と問題点. *家畜感染症学会誌*. 7 (4) : 153-162.
- [14] 目堅博久. 2016. 牛白血病ウイルス感染症の検査法とその特徴. *産業動物臨床医誌*. 6 : 221-226.
- [15] 目堅博久. 2018. プロウイルス量に基づいた牛白血病対策ノススメ. *家畜感染症学会誌*. 7 (4) : 163-168.
- [16] Mekata, H., Sekiguchi, S., Hayashi, T., Konnai, S., Kirino, Y., Honkawa, K., Nonaka, N., Horii, Y., Norimine, J. 2015. Evaluation of the natural perinatal transmission of bovine leukaemia virus. *Vet. Rec.* 176(10):254.
- [17] Mekata, H., Yamamoto, M., Hayashi, T., Kirino, Y., Sekiguchi, S., Konnai, S., Horii, Y., Norimine, J. 2018. Cattle with a low bovine leukemia virus proviral load are rarely an infectious source. *Jpn. J.*

- Vet. Res. 66:157-163.
- [18] Miyasaka, T., Takeshima, S., Jimba, M., Matsumoto, Y., Kobayashi, N., Matsuhashi, T., Sentsui, H., Aida, Y. 2013. Identification of bovine leukocyte antigen class II haplotypes associated with variations in bovine leukemia virus proviral load in Japanese Black cattle. *Tissue Antigens (HLA)*. 81:72-82.
- [19] Murakami, H., Todaka, H., Uchiyama, J., Sato, R., Sogawa, K., Sakaguchi, M., Tsukamoto, K. 2019. A point mutation to the long terminal repeat of bovine leukemia virus related to viral productivity and transmissibility. *Virology*. 537:45-52.
- [20] Murakami, K., Kobayashi, S., Konishi, M., Kameyama, K., Tsutsui, T. 2013. 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.
- [21] Notsu, K., Hashida, S., Mitoma, S., Kubo, M., Arikawa, G., Agah, AM., El-Khaiat, MH., Mai, NT., Nguyen, HT., Elhanafy, E., Daous, EH., Norimine, J., Sekiguchi, S. 2018. Assessment of Hematological Parameters and Carcass Weight in Bovine Leukemia Virus Infection in Slaughtered Beef Cattle. *J. Vet. Epidemiol.* 22(1):43-48.
- [22] Nuotio, L., Rusanen, H., Sihvonen, L., Neuvonen, E. 2003. Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland. *Prev. Vet. Med.* 59:43-49.
- [23] 小熊圭祐 . 2019. 第 2 回 牛の感染症に関する全国アンケート クロス集計報告 . 家畜感染症学会誌 . 8 (1) : 23-33.
- [24] 大島一郎 , 木山孝茂 , 松元里志 , 廣瀬潤 , 石井大介 , 片平清美 , 山口浩 , 主税裕樹 , 高山耕二 , 中西良孝 . 2014. 同一牛舎内隔離飼育が黒毛和種育成牛の牛白血病ウイルス伝播に及ぼす影響 . 日本暖地畜産学会報 . 57 (1) : 31-36.
- [25] Oshima, K., Okada, K., Numakunai, S., Yoneyama, Y., Sato, B., Takahashi, I. 1981. Evidence on horizontal transmission of bovine leukemia virus due to blood-sucking tabanid flies. *Jpn. J. Vet. Sci.* 43:79-81.
- [26] Sajiki, Y., Konnai, S., Nishimori, A., Okagawa, T., Maekawa, N., Goto, S., Nagano, M., Kohara, J., Kitano, N., Takahashi, T., Tajima, M., Mekata, H., Horii, Y., Murata, S., Ohashi, K. 2017. Intrauterine infection with bovine leukemia virus in pregnant dam with high viral load. *J. Vet. Med. Sci.* 78(12):2036-2039.
- [27] Sajiki, Y., Konnai, S., Okagawa, T., Nishimori, A., Maekawa, N., Goto, S., Watari, K., Minato, E., Kobayashi, A., Kohara, J., Yamada, S., Kaneko, KK., Kato, Y., Takahashi, H., Terasaki, N., Takeda, A., Yamamoto, K., Toda, M., Suzuki, Y., Murata, S., Ohashi, K. 2019. Prostaglandin E2-Induced Immune Exhaustion and Enhancement of Antiviral Effects by Anti-PD-L1 Antibody Combined with COX-2 Inhibitor in Bovine Leukemia Virus Infection. *J. Immunol.* 203(5):1313-1324.
- [28] 千田雅之 . 2016. 放牧方式等の相違による肉用牛繁殖経営の収益性比較 . 農業経営研究 . 54:91-96.
- [29] Takeshima, S., Ikegami, M., Morita, M., Nakai, Y., Aida, Y. 2001. Identification of new cattle BoLA-DRB3 alleles by sequence-based typing. *Immunogenetics.* 53(1):74-81.
- [30] Takeshima, S., Matsumoto, Y., Miyasaka, T., Arainga-Ramirez, M., Saito, H., Onuma, M., Aida, Y. 2011. A new method for typing bovine major histocompatibility complex class II DRB3 alleles by combining two established PCR sequence-based techniques. *Tissue Antigens (HLA)*. 78(3):208-213.
- [31] 山本嘉人 . 2018. 周年親子放牧による高収益繁殖経営 . 日草試 . 63 (4) : 210-212.
- [32] 山本嘉人 . 2020. 周年親子放牧の普及に向けた活動方向と課題 . 日草試 . 66 (3) : 184-189.
- [33] Yuan, Y., Kitamura-Muramatsu, Y., Saito, S., Ishizaki, H., Nakano, M., Haga, S., Matoba, K., Ohno, A., Murakami, H., Takeshima, S., Aida, Y. 2015. Detection of the BLV provirus from nasal secretion and saliva samples using BLV-CoCoMo-qPCR-2: Comparison with blood samples from the same cattle. *Virus Res.* 210: 248-254.

Usefulness of a Bovine leukemia virus (BLV) infection prevention concept during Japanese Black cow-calf grazing: Verification using high-risk BLV-infected cows and uninfected cows

Satoshi Haga^{1,2†} and Hiroshi Ishizaki^{1,3}

¹Grazing Animal Unit, Division of Grassland Farming, Institute of Livestock and Grassland Science, NARO, 768 Senbonmatsu, Nasushiobara, Tochigi, Japan

Present address

²Labor-saving Beef Cattle Husbandry Group, Division of Forage and Livestock Research, Institute of Livestock and Grassland Science, NARO, 768 Senbonmatsu, Nasushiobara, Tochigi, Japan

³Research Promotion Office, Department of Research Promotion, Institute of Livestock and Grassland Science, NARO, 2, Ikenodai, Tsukuba, Ibaraki, Japan

†Correspondence:

Satoshi Haga, Labor-saving Beef Cattle Husbandry Group, Division of Forage and Livestock Research, Institute of Livestock and Grassland Science, NARO, 768 Senbonmatsu, Nasushiobara, Tochigi 329-2793, Japan

Tel: +81 287 37 7239 Fax: +81 287 36 6629 Email: hagatiku@affrc.go.jp

[Abstract]

The incidence of enzootic Bovine leukosis, caused by the Bovine leukemia virus (BLV), is substantially increasing in Japan. Horizontal transmission of BLV via bloodsucking insects is crucial for the spread and persistence of BLV infections in grazing cattle. This study aimed to examine the usefulness of our concept to prevent BLV infection in grazing cattle. To verify the concept, we carried out repeated field experiments in 2019 and 2020, using a Japanese Black cow-calf grazing model, comprising high-risk BLV-infected and uninfected cows. We separated the pasture into two parts: the infection group area (three high-risk BLV-infected cows (viral loads: more than 1000 copies/50 ng of gDNA) and two uninfected cows and their calves) and the prevention group area (two uninfected cows and their calves). The concept was composed of three factors: a 5 m separation between the infected and uninfected group area, bloodsucking insect traps, and insecticide ear tags. Blood samples were taken from the cows and calves by jugular venipuncture every 2 weeks and analyzed for BLV proviral DNA using real-time PCR. We also counted the number of trapped insects. Horizontal transmission infected each uninfected cow and calf of the infection group with BLV in late August and in mid-November 2019, respectively, and another cow in late August 2020. Additionally, a calf of the infection group was infected via the transplacental route. On the other hand, no animal in the prevention group was infected throughout both years, confirming the usefulness of our proposal.

Keywords: bloodsucking insect, bovine leukemia virus, measures against enzootic Bovine leukosis, proviral load, separate grazing