

## 【短報】

### 3 カ月齢の黒毛和種子牛にみられた地方病性牛白血病の 1 症例

石井圭子<sup>1)</sup>, 銘苅裕二<sup>1)</sup>, 高木和香子<sup>2)</sup>, 荒木美穂<sup>3)</sup> ほか

1) 家畜衛生試験場 2) 畜産課 3) 中央家畜保健衛生所

#### 【はじめに】

地方病性牛白血病 (EBL) は牛白血病ウイルス (BLV) の感染に起因し, B 細胞性の白血病やリンパ腫を主徴とする届出伝染病である. EBL の原因は牛白血病ウイルス (BLV) で, ウイルスは B リンパ球を標的とし, 細胞の DNA に組み込まれプロウイルスとして存在する. ウイルスは直腸検査・去勢・断尾等の人為的作業やアブなどの吸血昆虫の媒介で起こる水平感染, 子宮内・産道・乳汁を介して起こる垂直感染など, 血液や体液によって伝播される. 病態として, 無症状, 持続性リンパ球増多症, 致死性リンパ肉腫が挙げられる. EBL は通常 2~3 歳齢以上の成牛で発症するとされているが, 近年, 発症牛の若齢化がみられ生産現場で問題となっている. 今回, 本県において, 3 カ月齢の黒毛和種子牛の EBL を確認したので, その概要を報告する.

#### 【農場概要と発生状況】

農場は沖縄本島南部の

黒毛和種繁殖農場で, 計 30 頭 (母牛 18, 育成 4, 子牛 8) を飼養していた. 母牛は繋ぎ飼い, 子牛は牛房内で他の母牛と接触可能な状態で放飼され (図 1), 牛白血病対策は未実施だった.

2019 年 5 月 20 日に畜主が約 3 ヶ月齢の子牛において後肢付け根の腫脹を発見した. 5 月 23 日に活力低下, 脱水, 眼球やや陥没, 両側の浅頸および腸骨下リンパ節のミカン大腫脹を診療獣医師が確認し, 家保へ BLV 関連検査依頼があり, その後 6 月 7 日に予後不良と判断され, 病性鑑定解剖を実施した.

#### 【材料と方法】

当該子牛について以下に示す検査を行った. なお, 遺伝子検査と抗体検査は BLV 浸潤状況調査として農場で飼養する母牛についても実施した.

1. 血球成分測定, 塗抹検査: 当該子牛の EDTA 加血液を用いて全自動血球計数器による血球計

算とギムザ染色による鏡検を実施した.

2. LDH 検査: 当該子牛の血清を用いてドライケミストリー法による総活性値測定とアガロースゲル電気泳動法によるアイソザイム測定を実施した.

3. 剖検: 定法に従って実施した.

4. 一般細菌検査: 当該子牛の 6 臓器 (脳, 心臓, 肺, 肝臓, 脾臓, 腎臓) を用いて血液寒天培地にて好気培養を実施した.

5. BLV 抗体検査: 当該子牛および母牛 18 頭 (当該子牛の母牛を含む) の血清を用いて ELISA 抗体検査を実施した.

6. BLV 遺伝子検査: 当該子牛および母牛 18 頭 (当該子牛の母牛を含む) の EDTA 加血液および当該子牛の臓器から抽出した DNA を用い Nested-PCR (env 領域), リアルタイム PCR (tax, LTR 領域), B 細胞クローナリティ解析, 遺伝子解析 (系統樹解析, env 遺伝子欠損の有無) を実施した.

7. 病理組織学的検査: 当該子牛の 6 臓器 (前述のとおり) と全身リンパ節を用いて HE 染色, および CD3, CD5, CD 20 による免疫組織化学的染色 (IHC) を実施した.



図 1 当該農場の飼養状況

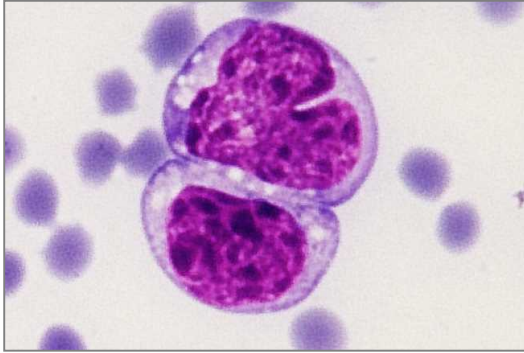


図2 血液塗抹所見

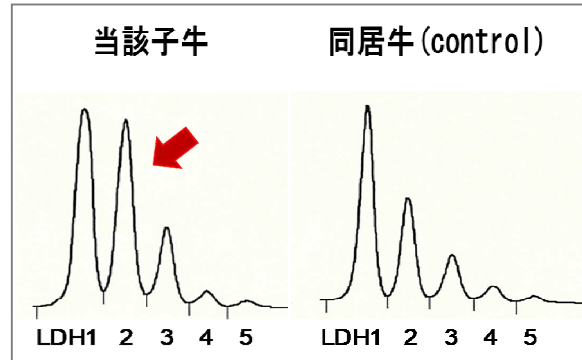


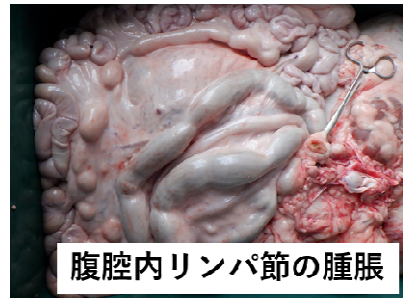
図3 LDH アイソザイム検査結果



体表リンパ節の腫脹



頭部リンパ節の腫脹



腹腔内リンパ節の腫脹

図4-1 剖検所見：リンパ節の腫脹



肝臓、脾臓の腫大

図4-2 剖検所見：肝臓、腎臓の腫大

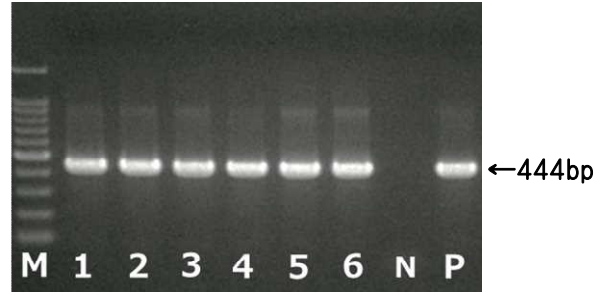


図5 当該子牛 BLV Nested-PCR 結果 (env 領域)

1:心臓 2:肝臓 3:脾臓 4:腎臓

5, 6: EDTA 加血液

N: 陰性 control P: 陽性 control

### 【病性鑑定結果】

1. 血球成分測定, 塗抹検査; 白血球 43,600 個/ $\mu\text{L}$  と高値を示し, リンパ球百分比は 95% でそのうち異型性を示すものは 20% であった (図2).
2. LDH 総活性値, LDH アイソザイム測定; LDH 総活性値は 5,435 IU/L と高値を示し, LDH アイソザイム分画 2 の上昇がみられた (図3).
3. 剖検; 全身リンパ節の腫脹と肝臓および脾臓

の腫大が特徴的であった (図4).

4. 一般細菌検査; 有意菌分離陰性であった.
5. BLV 抗体検査; 当該子牛は抗体陽性で, S/P 値は 4.468 で, 農場で飼養される母牛 18 頭のうち 13 頭が陽性であった (陽性率 72%).
6. BLV 遺伝子検査; 当該子牛の EDTA 加血液, 心臓, 肝臓, 脾臓, 腎臓において, Nested-PCR (env 領域) にて BLV 特異遺伝子が検出された (図5).

表1 当該子牛 BLV リアルタイム PCR 結果  
(tax 領域)

材料	遺伝子量 (copies/10ng DNA)
末梢血	1308
心臓	86
肝臓	130
脾臓	147
腎臓	10

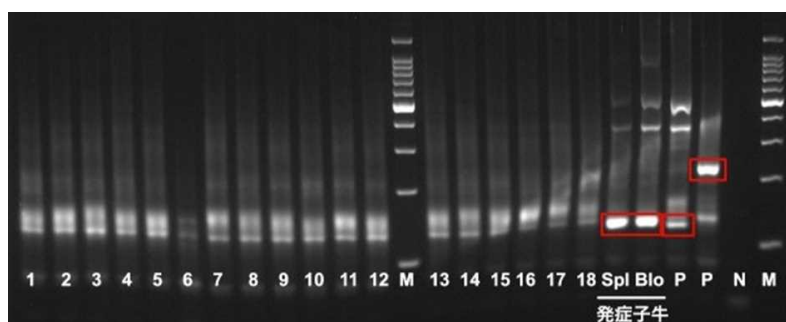
表2 母牛の BLV リアルタイム PCR 結果  
(tax 領域) と BLV 伝播リスク

	遺伝子量 (copies/ 10ng DNA)	伝播 リスク
No.1	202	高
No.2	133	高
No.3	<2	超低
No.4	417	超高
No.5	234	高
No.6(当該母牛)	24	低
No.7	<2	超低
No.8	5	超低
No.9	<2	超低
No.10	170	高
No.11	—	—
No.12	302	高
No.13	61	低
No.14	—	—
No.15	—	—
No.16	178	高
No.17	—	—
No.18	<2	超低

また、リアルタイム PCR(tax 領域)の結果、遺伝子量はそれぞれ 1308, 86, 130, 147, 10 copies/10ngDNA となり、とくに末梢血中のウイルス量が高値を示した (表1)。

次に、当該子牛の母牛を含む農場で飼養される母牛の EDTA 加血液について検査したところ、18 頭中 14 頭で BLV 特異遺伝子が検出され、陽性率は 78%であった。当該子牛の母牛の遺伝子量は 24 copies/10ng DNA で、BLV 伝播リスクは低かったが、BLV 伝播リスクが高いと考えられる 100 copies/10ng DNA 以上の母牛が農場内に 7 頭存在していることが判明した (表2)。

続いて、当該子牛の EDTA 加血液および脾臓と母牛 18 頭の EDTA 加血液から得られた DNA を用いて B 細胞クローナリティ解析を行った。本法は B 細胞の免疫グロブリン重鎖遺伝子の再構成を検索することによって、体内で B 細胞の腫瘍性のモノクローナルな増殖が起きているかを確認する方法である。正常の場合 (未発症) は多様性のある B 細胞が存在することから画像はスメア状となるが、単一の B 細胞の腫瘍性増殖が起きている場合は明瞭なバンドとして検出される。本症例では、当該子牛の脾臓および血液においてクローナリティ陽性を示し、単一の B 細胞が腫瘍性に増殖していることが確認された (図6)。



**正常** 陰性 ; スメア状

多様性のある B 細胞

**腫瘍** 陽性 ; バンド検出

単一の B 細胞集団

図6 B 細胞クローナリティ解析結果

1~18 : 母牛 EDTA 加血液

Spl : 当該子牛の脾臓

Blo : 当該子牛の EDTA 加血液

N : 陰性 control P : 陽性 control



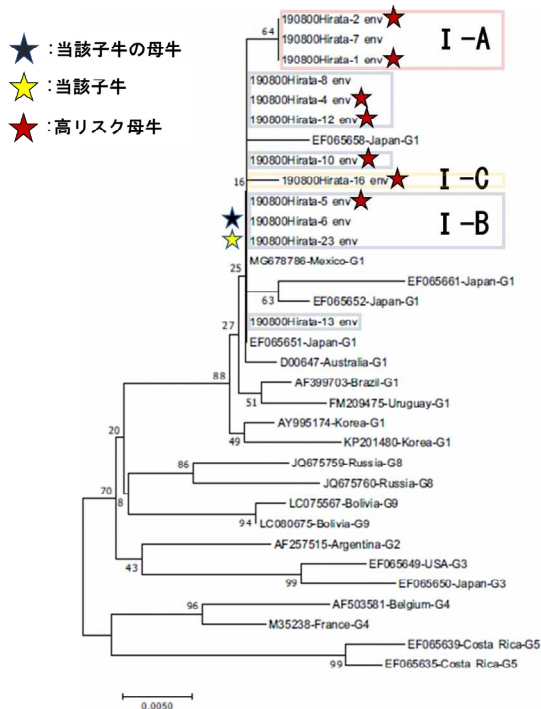


図7 BLV env 領域の系統樹解析

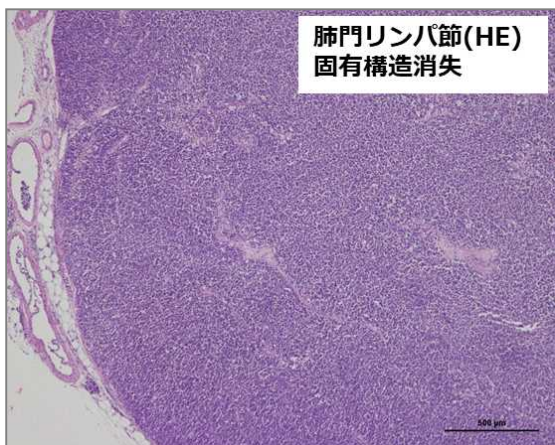


図8 リンパ節の病理組織所見 (HE 染色)

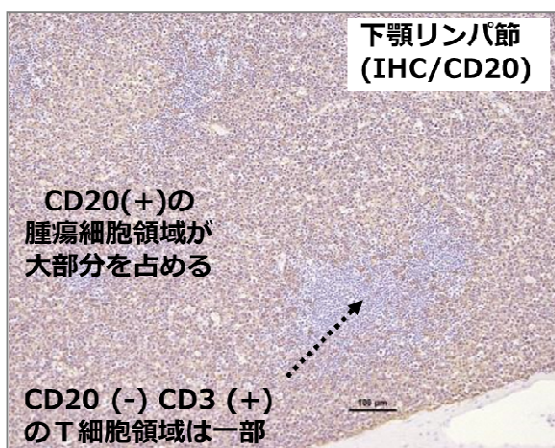


図9 リンパ節の病理組織所見 (IHC/CD20)

また、遺伝子解析の結果、農場に浸潤していたBLVの遺伝子型はすべてI型で、少なくとも3つの株が流行していることが判明した。当該子牛と母牛の遺伝子型はI-B型で、I-B型のBLV伝播高リスク母牛も存在した(図7)。なお、env領域の遺伝子に欠損はみられなかった。

7. 病理組織学的検査；全身のリンパ節、脾臓、肝臓に腫瘍性の類円形細胞が多数浸潤していることが確認され、リンパ節は既存の固有構造が消失していた(図8)。類円形細胞の異形性は高く、有糸分裂像もみられた。増殖した細胞はIHCにてCD20陽性でB細胞であることが判明し(図9)、組織診断はB細胞性リンパ腫、疾病診断は牛白血病とした。

以上、これまでの検査結果を総合的に判断し、本症例は若齢牛のEBLと診断した。

#### 【まとめと考察】

本症例は、異形性を伴う末梢血リンパ球増多症があること、LDH総活性値およびLDH分画2の上昇があること、BLV感染があり保有するウイルス量が高値であること、全身性のリンパ腫を呈しB細胞のモノクローナルな増殖があることから、若齢子牛のEBLと診断した。

当該農場のBLV陽性率は78%で、BLV伝播高リスク母牛が多く存在し、それらの母牛と同居し牛房内で放飼されている当該子牛が大量のウイルスに暴露される可能性が高い状況であった。BLV感染経路として、最初に当該母牛からの子宮内または産道感染が疑われたが、当該子牛の母牛が保有するBLV遺伝子量は低いことから、他のBLV伝播高リスク母牛からの乳汁感染やアブなどの吸血昆虫を介した機械的伝搬による水平感染の可能性も否定できず、感染経路の特定には至らなかった。

近年、生産現場で問題となっているEBLの発症は、一般にBLVの早期感染と宿主側の要因が関与するとされているが、若齢牛におけるEBLの病態や発症要因については不明な点が多い。農場へのEBL対策(吸血昆虫対策、分離飼育等)の指導を行うとともに、今後も症例を蓄積し、若齢発症に関する解析を進めることで発症要因等の解明に向けての一助とし、その対策に繋げることが重要と考えられた。

## 【謝 辞】

本稿を作成するにあたり、ご協力・ご助言を賜りました宮崎大学の目堅博久先生、(国研)農研機構・動物衛生研究部門の新井鐘蔵先生に深謝します。

## 【参考文献】

- [1] 門田ら:牛 B 細胞性腫瘍の組織学的分類, Bull Natl Inst Anim Health, 123, 11-22(2017)
- [2] 小西美佐子:地方病性牛白血病(EBL), 日獣会誌, 68, 352-354(2015)
- [3] 今内覚:牛白血病—最近の知見と対策について—, 動薬研究 71, 1-11(2015)
- [4] 高橋ら: PCR 法を用いた免疫グロブリン重鎖(IgH)のクロナリティ検出法の検討, 函医誌, 30(1), 70-75(2006)
- [5] Nishimori A et al. : Identification of an atypical enzootic bovine leukosis in Japan by using a novel classification of bovine leukemia based on immunophenotypic analysis, Clin Vaccine Immunol, 24, e00067-17 (2017)
- [6] 萩原ら:牛白血病ウイルス感染牛におけるリンパ系腫瘍の組織学的検討, 日獣会誌, 67, 119-203(2014)
- [7] 前澤ら:牛白血病ウイルスのプロウイルス単クローン性組込みが証明された 21 カ月齢黒毛和種肥育牛の地方病性牛白血病, 産業動物臨床医誌, 6, 161-164(2016)
- [8] 三浦ら:地方病性牛白血病発症マーカーとしての乳酸脱水素酵素活性の評価, 産業動物臨床医誌, 6, 149-153(2016)
- [9] Mekata H et al. : Horizontal transmission and phylogenetic analysis of bovine leukemia virus in two districts of Miyazaki Japan, J Vet Med Sci, 77(9), 1115-1120 (2015)
- [10] Mekata H et al. : Evaluation of the natural perinatal transmission of bovine leukaemia virus, Vet Rec, 176(10), 254-254 (2015)
- [11] 目堅博久: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, 増刊号, 221-226(2016)
- [12] Mekata H et al. : Cattle with a low bovine leukemia virus proviral load are rarely an infectious source, J Vet Res, 66(3), 157-163(2018)
- [13] Mekata H et al. : New hematological key for bovine leukemia virus-infected Japanese Black cattle, J Vet Med Sci, 80(2), 316-319(2018)
- [14] 目堅ら:若齢の白血病発症牛で認められた牛白血病ウイルスの env 領域 188 アミノ酸の脱落, 第 157 回日本獣医学会学術集会抄録(2014)
- [15] 若槻ら:若齢牛において地方病性牛白血病と診断した 1 例, 日獣会誌, 72, 608-613(2019)