

9 定量的 PCR を用いた牛白血病の診断と牛白血病ウイルス 伝播リスク評価

中央家畜保健衛生所

○曾田 泰史、多勢 景人、平野 晃司、
北島 絵理子、荒井 理恵、畠中 優唯
熊谷家畜保健衛生所

宮田 基、佐竹 吉人

I はじめに

地方病性牛白血病 (EBL) は、レトロウイルス科デルタレトロウイルス属に属する牛白血病ウイルス (BLV) により引き起こされる全身性のリンパ腫を主徴とする疾病である¹⁾。国内における BLV の浸潤は年々拡大しており、BLV に感染したことを示す BLV 抗体陽性率は、平成 23 年度に実施された全国サーベイランスによると乳用牛で 40.9%、肉用繁殖牛で 28.7%まで上昇している²⁾。また、EBL 発症頭数も増加し、年度ごとの発症頭数は平成 10 年には 99 頭であったが、平成 25 年度は 2310 頭まで増加した³⁾。EBL は BLV に感染後、数ヶ月から数年の無症状期を経て発症するが、治療はなく、と畜場において摘発される場合は全廃棄処分となるため、BLV 感染個体を EBL 発症前に早期摘発、淘汰することが重要とされている¹⁾。

EBL の確定診断は病理学的検査によるが⁴⁾、本県では、BLV 感染牛の早期摘発を目的として、ELISA 法や寒天ゲル内沈降反応による血清学的検査、BLV 特異的定性 PCR 法 (BLV cPCR 法) による遺伝子検査⁵⁾、および血液検査を補助検査として実施してきた。その結果から、BLV 感染が認められた個体を淘汰するように指導してきたが、BLV が広く浸潤した農家では全頭淘汰は農場経営の大きな負担となる。そこで、本県では近年開発された TaqMan プローブを用いた BLV 定量的 PCR 法 (BLV qPCR 法)⁶⁾ を病理組織学的診断の補助検査法として導入した。BLV qPCR 法は血液または組織中の BLV 遺伝子量を定量することが可能で、BLV 感染牛の摘発ならびに EBL の診断法として有用とされている⁶⁾。本例では、県内の一農家で BLV qPCR 法を利用した EBL 診断を実施した。また、農場内 BLV 浸潤状況調査を行い、BLV 感染が確認された個体について、血液中 BLV 遺伝子量に基づき、BLV 感染を農場内の BLV 非感染牛に広げる可能性 (BLV 伝播リスク) を評価し、農場内 BLV 清浄化に向けた対策を実施したので報告する。

II 発生概要

1 農場概要

成牛 28 頭、育成牛 4 頭、子牛 8 頭を飼養するフリーストール形式の和牛繁殖農家。
飼養する個体は北海道から導入した 1 頭、県内農家から導入した 1 頭を除き、自家産牛

であった。また、当該農場においては過去に EBL 発症例はなく、BLV 検査は未実施で浸潤状況は不明であった。

2 発症経過と病性鑑定実施経過

平成 26 年 7 月末より 6 歳齢繁殖雌牛 1 頭（発症牛）が 2 週間に及ぶ黄色水様性下痢を呈し、食欲低下と顕著な消瘦が認められた。治療の効果がみられなかったため、8 月 12 日に病性鑑定を実施した。この病性鑑定で実施した血液学的検査およびウイルス学的検査結果から、EBL 発症が強く疑われたため、8 月 25 日に鑑定殺を実施した。農場内で飼養する他個体に異常は認められなかったが、BLV 浸潤状況の把握を目的として、9 月 2 日に同居牛の BLV 検査を実施した。

III 材料と方法

1 材料

(1) 発症牛の病性鑑定

発症牛から採取した糞便、EDTA 加血液、血清および鑑定殺を実施した生体各 1 検体を病性鑑定材料とした。

(2) 農場内 BLV 浸潤状況調査

同居牛 30 頭から EDTA 加血液および血清を採取し、病性鑑定材料とした。

2 方法

(1) 発症牛の病性鑑定

ア 血液学的検査

EDTA 加血液 1 検体を用いて、定法に従い赤血球数（個/ml）、白血球数（個/ml）、白血球百分率（%）、ヘマトクリット値（%）およびフィブリノーゲン値（mg/dl）を計測した。

イ 細菌学的検査

糞便 1 検体を材料として、ヨーネ病リアルタイム PCR 検査⁷⁾を実施した。さらに、DHL 寒天培地を用いた直接塗抹および Rappaport-Vassiliadis 培地を用いた増菌培養により、サルモネラ検査を行った。

ウ ウイルス学的検査

EDTA 加血液 1 検体を材料として、検体 2ml と 0.2% NaCl 水溶液 8ml を混合、2000rpm で 5 分間遠心し、白血球を沈殿させた。上清を除去し、さらに 0.2% NaCl 水溶液 10ml を加え、再度 2000rpm で 5 分間遠心した。同様の処理を再度行い、最終的に沈殿した白血球を PBS(-) 2 ml で浮遊させ、-20℃で凍結、その後解凍し、白血球乳剤とした。また、糞便 1 検体を抗生物質添加 Eagle's MEM（日水製薬（株））を用いて糞便乳剤とした。白血球乳剤からは DNeasy Blood & Tissue Kit（QIAGEN）を用いて DNA を抽出し、BLV 遺伝子検査（Fechner らの方法⁵⁾によ

る BLV cPCR 法および宗村らの方法⁶⁾による BLV qPCR 法)を実施した。BLV qPCR 法は、Cycleave[®]PCR Reaction Mix SP およびウシ白血球ウイルス検出用 Probe / Primer / Positive control (TaKaRa) を使用した。また、牛下痢症関連ウイルスの遺伝子検索を目的として、白血球乳剤および糞便乳剤から High Pure Viral RNA Kit (Roche) を用いて RNA を抽出した。白血球乳剤から抽出した RNA を検体として、Vilcek らの方法⁸⁾によるペスチウイルス特異的 RT-PCR 法を実施し、糞便乳剤から抽出した RNA を検体として、Fukuda らの方法⁹⁾による下痢症関連 5 種ウイルスマルチプレックス RT-PCR 法を実施した。その他、白血球乳剤を検体として、MDBK-SY 細胞を用いたウイルス分離 (2 代 7 日間) を実施した。

エ 寄生虫学的検査

糞便 1 検体を材料として、シヨ糖浮遊法にて虫卵検査を実施した。

オ 病理学的検査

剖検した生体 1 検体から主要臓器等を採材し、10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬後、定法に従い病理組織標本を作成し、一般染色としてヘマトキシリン・エオジン染色を実施した。また、心臓および子宮を材料として、抗ヒト CD79 α マウスモノクローナル抗体と抗ヒト CD3 マウスモノクローナル抗体を使用した免疫組織化学的検査を実施した。

(2) 農場内 BLV 浸潤状況調査

ア 血液学的検査

EDTA 加血液 30 検体を用いて、定法に従い白血球数 (個/ml) と白血球中リンパ球割合 (%) を計測した。

イ ウイルス学的検査

(1) ウと同様の方法で EDTA 加血液 30 検体から白血球乳剤を作製、DNA を抽出し、BLV cPCR 法および BLV qPCR 法を実施した。また、血清 30 検体を材料として、牛白血球エライザキット (JNC (株)) を用いて BLV 抗体検査 (ELISA 法) を実施した。

ウ 検査結果の相関の検討

全 30 頭の検査結果について、BLV qPCR 法により定量した BLV 遺伝子量と ELISA 値 (S/P 値)、白血球数 (個/ml) および白血球中リンパ球割合 (%) の相関係数 (r) をピアソンの積率相関係数に基づいて算出した。

IV 成績

1 発症牛の病性鑑定

(1) 血液学的検査

赤血球数減少 (356 万個/ml)、白血球数増加 (105833 個/ml)、白血球中リンパ球割合増加 (93.5%)、ヘマトクリット値低下 (21%) およびフィブリノーゲン値増加

(700mg/dl) が認められた。また、末梢血中に異型リンパ球（巨大リンパ球、核辺縁不正、核分裂像）の出現（2.5%）が認められた。

(2) 細菌学的検査

ヨーネ病リアルタイム PCR 検査およびサルモネラ検査はいずれも陰性であった。

(3) ウイルス学的検査

ア BLV 遺伝子検査成績

BLV cPCR 法により BLV 遺伝子が検出され、BLV qPCR 法を実施した結果、BLV 遺伝子量は 1395.6 copies/ng DNA と定量された。

イ 牛下痢症関連ウイルス遺伝子検査成績

ペスチウイルス、牛コロナウイルス、A 群ロタウイルス、牛 B 群ロタウイルス、C 群ロタウイルスおよび牛トロウイルス特異遺伝子は検出されなかった。

ウ ウイルス分離成績

ウイルス分離は陰性であった。

(4) 寄生虫学的検査成績

糞便中に寄生虫卵等は認められなかった。

(5) 病理学的検査

ア 剖検所見

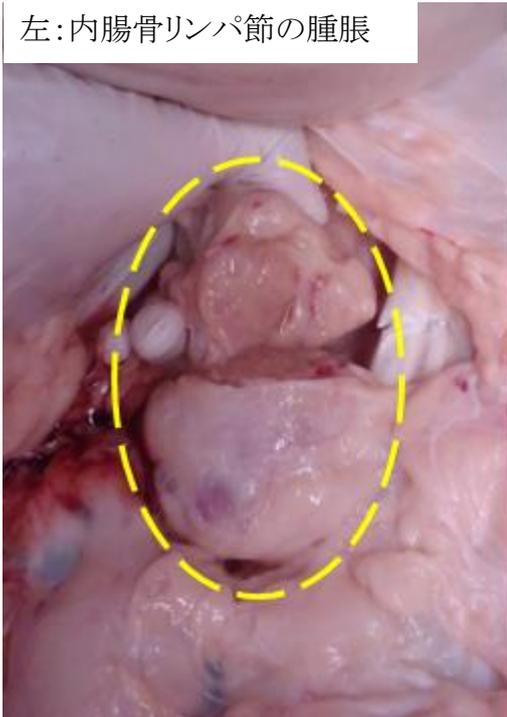
外貌は顕著な消瘦が認められたものの、眼球の突出や体表リンパ節の腫脹による体表部の膨隆等の EBL の際に特徴的な所見¹⁾は認められなかった(図 1)。剖検時、内腸骨リンパ節が手拳大に腫脹し(図 2 左)、下顎リンパ節、浅そ径リンパ節および腸骨下リンパ節に軽度腫脹(ピンポン玉大)がみられた。消化器系においては、第四胃漿膜に手拳大の白色腫瘤、十二指腸漿膜にクルミ大の白色結節、腸間膜リンパ節の腫脹(ピンポン玉大)(図 2 右)が認められた。心臓および腎臓には米粒大から大豆大の白色結節がみられた。特に、心臓では左右心耳、右心房壁および左心室壁に白色結節が密発していた(図 3 左)。また、子宮全体に渡り、子宮壁の硬結と肥厚がみられた(図 3 右)。

外貌(顕著な消瘦)



図 1

左:内腸骨リンパ節の腫脹



右:腸間膜リンパ節の腫脹

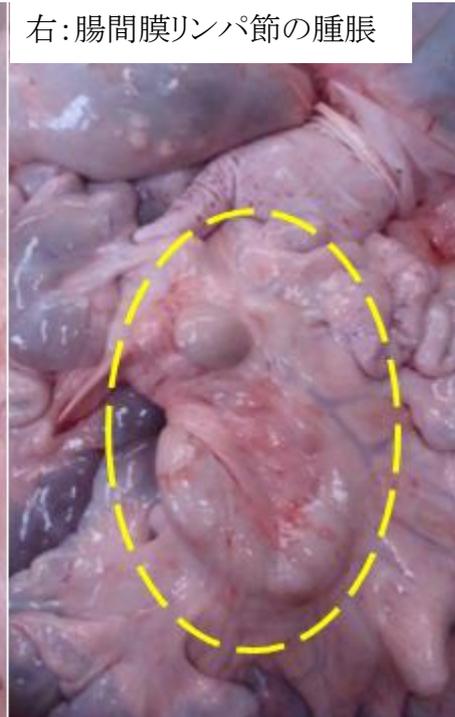


図 2

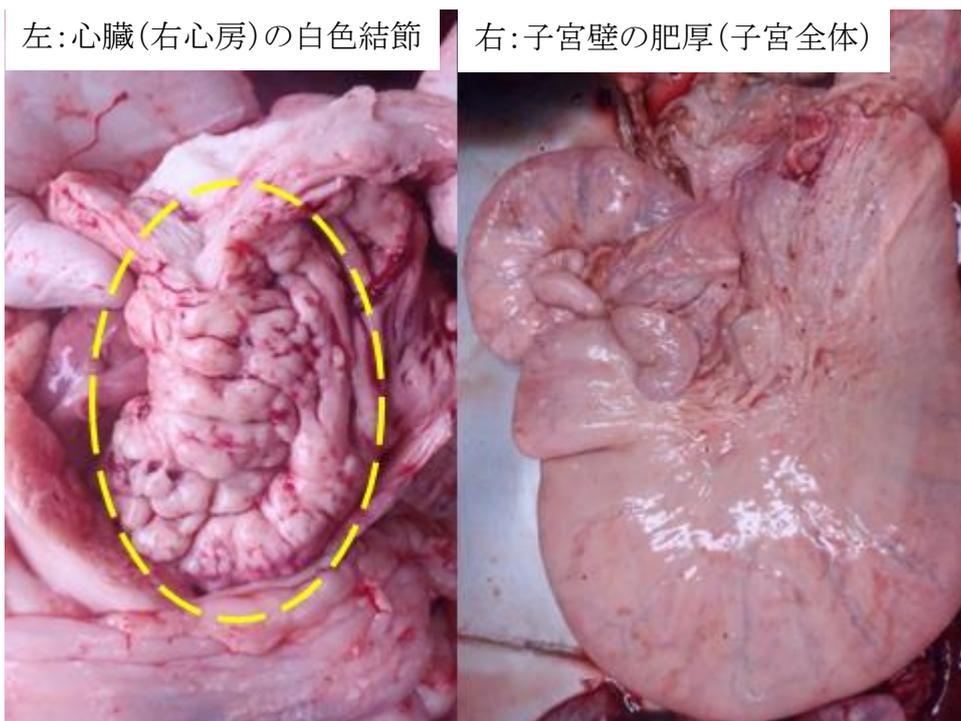


図 3

イ 組織所見

剖検時、白色結節が認められた心臓および腎臓、壁の肥厚および硬結の認められた子宮、腫大したリンパ節および腹腔内に認められた腫瘤では、腫瘍性リンパ球の重度浸潤が認められた(図 4 左)。腫瘍性リンパ球の浸潤は第四胃や消化管でも認められた。腫瘍性リンパ球の浸潤の著しかった心臓および子宮を用いて実施した免疫組織化学的検査では、腫瘍性リンパ球は抗ヒト CD79 α マウスモノクローナル抗体陽性(図 4 右上)、抗ヒト CD3 マウスモノクローナル抗体陰性(図 4 右下)を示したため、B 細胞性腫瘍と判定された。

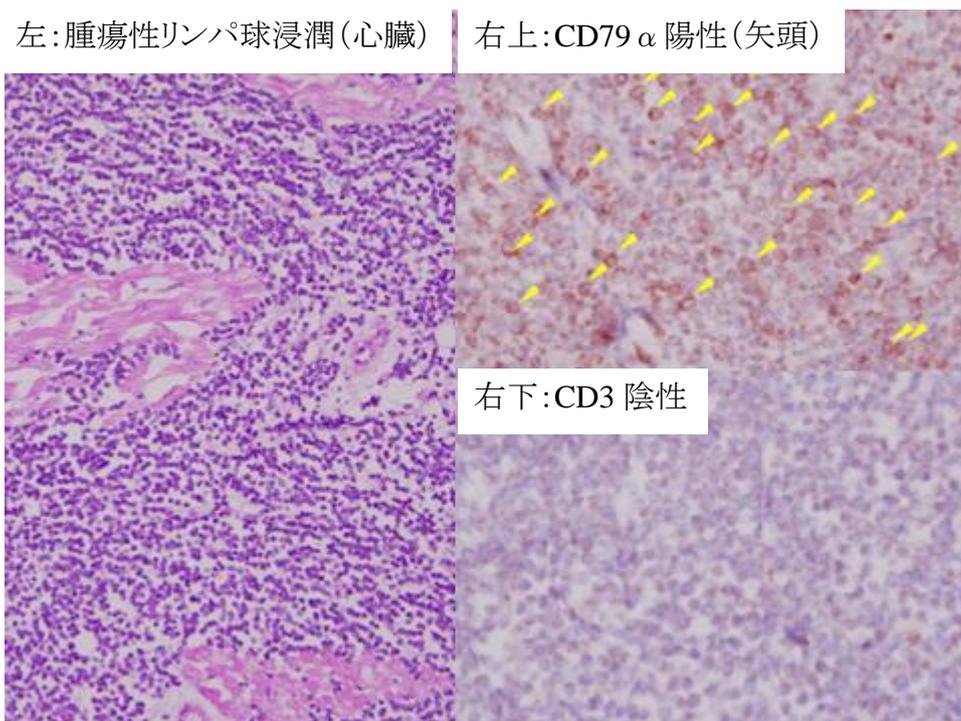


図 4

血液学的検査で白血球数の増加および白血球中リンパ球割合の増加が認められたこと、ウイルス学的検査で BLV 特異遺伝子が検出されたことから、発症牛は EBL が疑われた。特に、BLV qPCR 法で検出された BLV 遺伝子量について、BLV 感染牛における EBL 発症牛と非発症牛の血液中 BLV 遺伝子量を比較した報告¹⁰⁾と照らし合わせた結果、発症牛は EBL が強く疑われた。そして、病理学的検査成績から、発症牛は EBL と確定診断された。

2 農場内 BLV 浸潤状況調査

(1) 血液学的検査成績

30 頭中 1 頭で白血球数の増加 (12000 個/ml 以上) が認められ、11 頭で白血球中リンパ球割合の増加 (75%以上) が認められた。また、1 頭に末梢血中に異型リンパ球 (巨大リンパ球、核辺縁不正、核分裂像) の増加 (5.5%) が認められた。

(2) ウイルス学的検査成績

ア BLV 遺伝子検査成績

30 頭中 8 頭が BLV cPCR 法陽性であり、qPCR 法では、8 頭から 0.3~114.9 copies/ng DNA の BLV 特異遺伝子が検出された。また、qPCR 法で BLV 特異遺伝子が検出された 8 頭中、2 頭の BLV 遺伝子量が有意に多かった ($p < 0.05$)。

イ BLV 抗体検査成績 (ELISA 法)

30 頭中 11 頭が陽性 (S/P 値 \geq 0.3) であった。

BLV 感染を示す成績 (BLV 特異遺伝子が検出、または BLV 抗体検査陽性) が得られた 12

頭を No. 1～12 とし、その検査結果を表 1 に示す。

表 1

No.	年齢	BLV cPCR	BLV qPCR (copies /ng DNA)	BLV ELISA (S/P値)	白血球数 (個/ml)	リンパ球 割合 (%)	異型 リンパ球
1	2	+	114.9*	2.174	11250	67.0	—
2	3	+	74.0*	1.773	16450	82.5	—
3	5	+	24.5	2.143	7625	71.5	—
4	7	+	18.0	2.07	8925	64.0	—
5	3	+	8.7	2.004	11450	57.0	—
6	5	+	4.8	2.17	7650	61.0	—
7	4	+	1.0	2.169	6325	77.0	—
8	3	+	0.3	0.01	6075	61.0	—
9	5	—	0.0	2.079	5425	54.0	—
10	6	—	0.0	2.002	7750	78.0	—
11	8	—	0.0	1.962	6925	79.0	—
12	4	—	0.0	1.922	5825	71.5	—

(*:p<0.05)

黄色背景:陽性、または増加

ウ 検査結果の相関の検討

BLV 遺伝子量と ELISA 値 (r=0.65) および白血球数 (r=0.43) との間に中間の強さの相関が認められた。白血球中リンパ球割合 (r=0.05) との間に相関は認められなかった。

以上の検査結果から、今回の検査に供した 30 頭中 12 頭 (40%) に BLV 感染が認められ、当該農場における BLV 浸潤が確認された。しかし、EBL の特徴所見¹⁾ が認められないこと、検出された BLV 遺伝子量が三村らの報告¹⁰⁾ と比較して少ないことから、当該農場に EBL 発症を疑う個体はいないと判定した。

V BLV 伝播リスク評価と農場内 BLV 清浄化対策

BLV 感染を示す成績 (BLV 特異遺伝子が検出、または BLV ELISA 陽性) が得られた 12 頭について、上記のとおり EBL 発症は疑われないが、BLV 伝播リスクがあると判定した。そこで、12 頭を BLV 伝播高リスク、中程度リスク、低リスクの 3 つに分類し、リスク別の対策を実施した。まず、遺伝子量が有意に多い 2 頭 (No. 1、2) を高リスクとし、優先淘汰対象とした。次に、遺伝子が検出された他の 6 頭 (No. 3～8) を中程度リスクとし、他の個体とは分離飼育するように指導、高リスク牛 2 頭の淘汰後の淘汰対象とした。そして、遺伝子は検出されなかったものの、ELISA 陽性であった 4 頭 (No. 9～12) を現時点では低リスクと判断、今後、リスクが高まる可能性を考慮し、定期的な BLV 検査を推奨した。なお、農場全体についても、BLV 浸潤の推移を把握するため、定期的な検査を推奨した。

VI まとめと考察

本例は、本県で初めて BLV qPCR を病性鑑定に応用した事例となった。過去に EBL と診断した事例は、特徴病変（体表リンパ節の腫脹、眼球突出）¹⁾ から EBL を疑ったものや、鑑定殺、または死亡後の剖検で EBL を疑い、組織学的検査で診断されたものであった。また、これまで本県で実施していた EBL 生前検査（BLV cPCR 法、血清学的検査）では、BLV 感染の有無の判定のみで、発症の程度は判定できなかった。しかし、本例で EBL と診断された 1 頭の病性鑑定では、特徴病変を認めず、生前検査として実施した EDTA 加血液を材料とした病性鑑定で、BLV qPCR 法を用いて血液中の BLV 遺伝子量を定量することにより、EBL が強く疑われた。この点から、BLV qPCR 法が EBL 診断において、病理学的検査の補助検査法として有用であることが確認された。

農場内清浄化に向けた対策においても、これまでの BLV 検査法（BLV cPCR 法、血清学的検査）では感染と非感染を区別するのみで、感染牛を淘汰することを指導してきたが、農家の経済的負担が大きな問題であった。しかし、BLV qPCR 法を利用することで、本例のように伝播リスクを評価し、リスクが高い個体から優先順位をつけて淘汰していくことが可能であった。現在、全国的に BLV が浸潤しているため、本法は清浄化対策として非常に有用と考えられた。今後、当該農家では定期的に農場内 BLV 浸潤状況調査を実施して清浄化対策を進め、その効果を検討していきたい。

今後の課題として、まず、1 頭あたり 1500 円の検査料が、多検体の検査を実施すると農家に大きな経済的負担となる点があげられた。次に、EBL 発症や伝播リスクが高いと判定する基準が決定していないことが課題としてあげられた。前者については、今回相関がみられた ELISA 検査や血液検査をスクリーニング検査として実施、スクリーニング検査陽性となった検体について BLV qPCR 検査を実施することで、検体数を減らすことを検討している。後者に関しては、本例のように、農家ごとの浸潤状況に合わせた基準を設定することを対応策として考えている。本県では BLV qPCR の応用事例はまだ少ないので、今後、例数を増やし、県内の BLV 清浄化を進めていきたい。

引用文献

- 1) 見上ら監修：獣医微生物学 第 3 版，文永堂出版，272（2002）
- 2) Kobayashi et al. : Analysis of risk factors associated with bovine leukemia virus seropositivity within dairy and beef breeding farms in Japan: a nationwide survey, Res Vet Sci, 96(1) 47-53（2013）
- 3) 農林水産省：届出伝染病発生状況の累年比較(昭和 12 年～平成 25 年)，農林水産省 HP (http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/pdf/h25_ruinenn_todokede.pdf)（2013）
- 4) 農林水産省消費安全局監修：病性鑑定マニュアル 第 3 版，72-73（2008）
- 5) Fechner et al. : Provirus Variants of the Bovine Leukemia Virus and Their

- Relation to the Serological Status of Naturally Infected Cattle, *Virology*,
237(2), 261-269 (1997)
- 6) 宗村ら：リアルタイム PCR による牛白血病診断法の検討, 獣医畜産新報, vol. 60 No. 12,
1005-1011 (2007)
- 7) 独立行政法人 動物衛生研究所 ヨーネ病研究チーム：ヨーネ病検査マニュアル (2011
年 1 月 31 日版) (2011)
- 8) Vilcek et al. : Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be
allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and
restriction endonuclease analysis, *Arch Virol.* 136, 309-323 (1994)
- 9) Fukuda et al. : Development and application of one-step multiplex reverse
transcription PCR for simultaneous detection of five diarrheal viruses in
adult cattle, *Arch Virol.* 157(6), 1063-1069 (2012)
- 10) 三村ら：リアルタイム PCR を用いた血中における BLV 遺伝子の定量とその考察, 大分
県調査研究内容 (平成 23 年度), 大分県 HP
(http://www.pref.oita.jp/uploaded/life/270483_306572_misc.pdf) (2011)