

7 短期間で著しい血液所見の変化がみられた地方病性牛白血病事例

中央家畜保健衛生所

○平野 晃司・曾田 泰史・春山 優唯

I はじめに

地方病性牛白血病 (EBL) は牛白血病ウイルス (BLV) によるウイルス性疾患である¹⁾。EBL は平成 10 年に家畜伝染病予防法において、届出伝染病に指定され、その届出頭数は年々増加している²⁾。本疾病は、全身性のリンパ腫を引き起こし、と畜場で全部廃棄の対象となるため、特に肥育農家において経済的損失が大きく、発症牛の早期摘発及び淘汰が重要である。平成 28 年、県内の肉用牛肥育農場で、肥育牛に眼球突出がみられたため病性鑑定を実施したが、EBL を強く疑うことができなかった。その後、同一個体が短期間の間に著しい血液所見の変化を認め、EBL と診断された。今回、その概要を報告する。

II 発生概要

1 農場概要

当該農家は、家畜市場から 8~10 か月齢の肥育素牛 (黒毛和種) を導入し、出荷している。同一市内 3 農場で約 2,300 頭を飼養し、そのうち発症がみられた農場は、導入から約 20 か月齢までの肥育牛を約 1,500 頭飼育していた。牛舎構造はフリーバーン牛舎で、牛舎内を区画し、1 枠内に 5 頭前後を飼養していた。当該農場では平成 27 年 1 月、同一枠内で飼養する 6 頭に *Moraxella bovoculi* による伝染性角結膜炎が発生し、その後も同疾病の散発が続いていた。

2 発症経過

当該牛は雄の黒毛和種であり、平成 27 年 11 月 21 日に 8 か月齢で家畜市場から導入された。その後、平成 28 年 1 月中旬に右眼第三眼瞼に脂肪腫様腫瘤が認められ、翌 2 月中旬に右眼に結膜炎がみられた。翌 3 月、右眼第三眼瞼に腫脹がみられ、さらに左眼には、第三眼瞼の腫脹及び結膜の腫脹、眼球突出が認められたことから、3 月 8 日、1 回目の病性鑑定 (病鑑①) を実施した。翌 4 月には元気消失及び食欲不振を呈し、右眼にも眼球突出がみられたため、予後不良と判断し、4 月 27 日、鑑定殺による 2 回目の病性鑑定 (病鑑②) を実施した。病鑑①からは 50 日経過し、月齢は 13 か月齢であった。

III 材料及び方法

病鑑①では当該牛の左右の眼瞼スワブ、EDTA 加血液及び血清を採材し、検査に供した。

病鑑②では同様に左右の眼瞼スワブ、EDTA 加血液及び血清を採材後、鑑定殺を行い、生体 1 頭を検査に供した。

1 血液一般検査

病鑑①、②ともにヘマトクリット (Ht) 値、赤血球 (RBC) 数、白血球 (WBC) 数、WBC 百分率及びフィブリノーゲン値を測定した。また、採材時の年齢及びリンパ球数から、EC の鍵³⁾ (表 1) 及び Bendixen の鍵⁴⁾ (表 2) を用いて、EBL 発症のリスク評価を実施した。

表 1 EC の鍵

年齢	リンパ球絶対数/μl		
	正常	疑症	真症
0-1	<11000	11000-13000	>13000
1-2	<10000	10000-12000	>12000
2-3	<8500	8500-10500	>10500
3-4	<7500	7500-9500	>9500
4-5	<6500	6500-8500	>8500
5-6	<6000	6000-8000	>8000
>6	<5500	5500-7500	>7500

表 2 Bendixen の鍵

年齢	陽性	疑似	正常
	高リスク	中リスク	低リスク
0~1	>12000	9000-12000	<9000
1~2	>11000	8000-11000	<8000
2~3	>9500	7500-9500	<7500
3~4	>8500	6500-8500	<6500
4~	>7000	5500-7000	<5500

(リンパ球数/μ L)

2 血液生化学的検査

病鑑①、②ともに Glu、TP、Alb、A/G、ALP、総 LDH、T-Cho、AST (GOT)、T-Bil、BUN、Cre、Ca、iP、Mg、Na、K 及び Cl の血清中濃度をドライケム法 (アークレイ社: SP-4410) にて測定した。

3 病理学的検査

病理解剖を実施し、主要臓器等を採材後、10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬した。その後、常法により病理切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を実施した。また腫瘍、心臓、第二胃及び盲腸について、抗ヒト CD3 マウスモノクローナル抗体 (Dako 社) 及び抗ヒト CD20 ウサギポリクローナル抗体 (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて、ストレプトアビジン・ビオチン (SAB) 法にて免疫組織化学的検査を実施した。

4 細菌学的検査

病鑑①では、左右の眼瞼スワブについて、5%羊血液加寒天培地 (CO₂ 培養、48 時間) 及び DHL 寒天培地 (好気培養、24 時間) を用いた細菌分離を実施した。また病鑑②では、左右の眼瞼スワブのほか、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、脳及び腫瘍 (肺門リンパ節周囲と左側頭部皮下) を用いて、同手法により細菌分離を実施した。

5 ウイルス学的検査

病鑑①、②の末梢血 WBC 及び左右眼瞼スワブから DNeasy Blood&Tissue kit (QIAGEN 社) を用いて DNA を抽出した。病鑑①、②の末梢血 WBC はウシ白血病ウイルス検出用 Probe/Primer/Positive control 及び Cycleave®PCR Reaction Mix (Takara 社) を用いて BLV 定量遺伝子検査⁵⁾ を実施した。さらに病鑑①の左右の眼瞼スワブを用いて、牛伝染性鼻気管炎ウイルス (IBRV) 遺伝子検査⁶⁾ を実施した。

IV 成績

1 血液一般検査

各検査数値は以下のとおり(表3)。WBC 数は病鑑①では 7,375 個/mm³ と正常値内であったものの、病鑑②では 110,550 個/mm³ と著しい増加が認められた。そのため、病鑑①では、EC の鍵及び Bendixen の鍵ともに正常であったのに対し、病鑑②では EC の鍵真症、Bendixen の鍵陽性を示した。また、血液塗抹像では、病鑑①と比較して、病鑑②では異型リンパ球割合が増加し、図 1 の矢印で示したような分裂像も多く認められた。

表 3 血液一般検査成績

	Ht (%)	RBC (個/mm ³)	WBC (個/mm ³)	白血球百分率 (%)											フィブリノーゲン (mg/dl)	
				Eo	Baso	Neu	Seg				Ly	Mo				
							2	3	4	5						
病鑑①	29	869万	7,375	1.5	0	11.5	0	1.5	1	4	3.5	1.5	82.5	1.5	3	400
病鑑②	21	569万	110,550	0	0	19	0	0	0	3	15.5	0.5	53.5	24	3.5	500
正常値 ⁷⁾	34~40	500万~ 800万	5,000~ 12,000	2~12	0~2			1~6			15~45		45~75		2~7	200~500

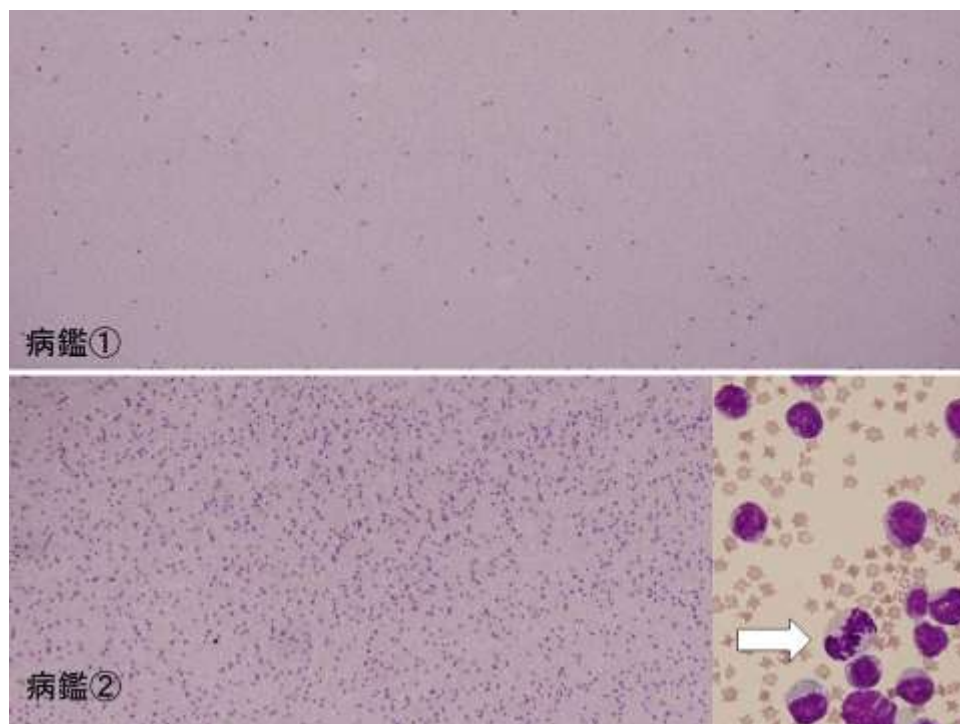


図 1 血液塗抹像

2 血液生化学的検査

病鑑①と比較し、病鑑②では総 LDH、AST 及び CPK の顕著な上昇が認められた(表 4)。また、病鑑①、②に共通して、A/G 比の増加がみられた。

表 4 生化学的検査成績

	Glu (mg/dl)	TP (g/dl)	Alb (g/dl)	A/G	ALP (IU/L)	総LDH (IU/L)	T-Cho (mg/dl)	AST(GOT) (IU/L)	T-Bil (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Cre (mg/dl)
病鑑①	70	4.8	3.4	4.37	251	967	131	21	0.4	12	1.2
病鑑②	<20	4.9	4.2	6	173	>2,000	213	422	0.9	29	1.3
肥育期正常値 ⁸⁾	35-55	6.55-7.65	3.15-3.85	0.79-1.21	15-150	876-1,408	78-142	22.5-48.1	0.2-1.0	10~20	1.0-2.0

	GGT (IU/l)	CPK (IU/l)	Ca (mg/dl)	iP (mg/dl)	Mg (mg/dl)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Cl (mEq/l)
病鑑①	24	105	8.3	8.8	1.9	142	4.8	104
病鑑②	36	>2,000	8.7	10.3	2	137	5	102
肥育期正常値 ⁸⁾	11~25	<100	8.5-12.0	4.0-8.0	1.8-3.2	138-148	3.9-5.3	96-110

3 病理学的検査

(1) 外貌所見

病鑑①では、左眼は突出及び結膜炎を呈していたが、右眼は正常であった(図 2 左)。しかし、病鑑②では、両側の眼球に突出がみられた(図 2 右)。左眼の結膜炎は治癒していたが、図 2 の矢印で示した側頭部の皮下に軽度の腫脹が認められた。また、元気消失及び軽度消瘦がみられた。



図2 外貌の比較

(2) 剖検所見 (図3)

病鑑②において、外貌所見で腫脹がみられた側頭部の皮下には、拳大の白色腫瘍が認められた。両側の眼窩ではクルミ大の白色腫瘍が認められ、物理的に眼球を外側へ突出させていた。また下顎リンパ節及び外腸骨リンパ節の腫大もみられた。胸腔及び腹腔においても、クルミ大から小児頭大の同様の腫瘍が多発していた。心臓でも筋層に米粒大の白色結節が多数認められた。また、脾臓に軽度の腫脹が認められた。

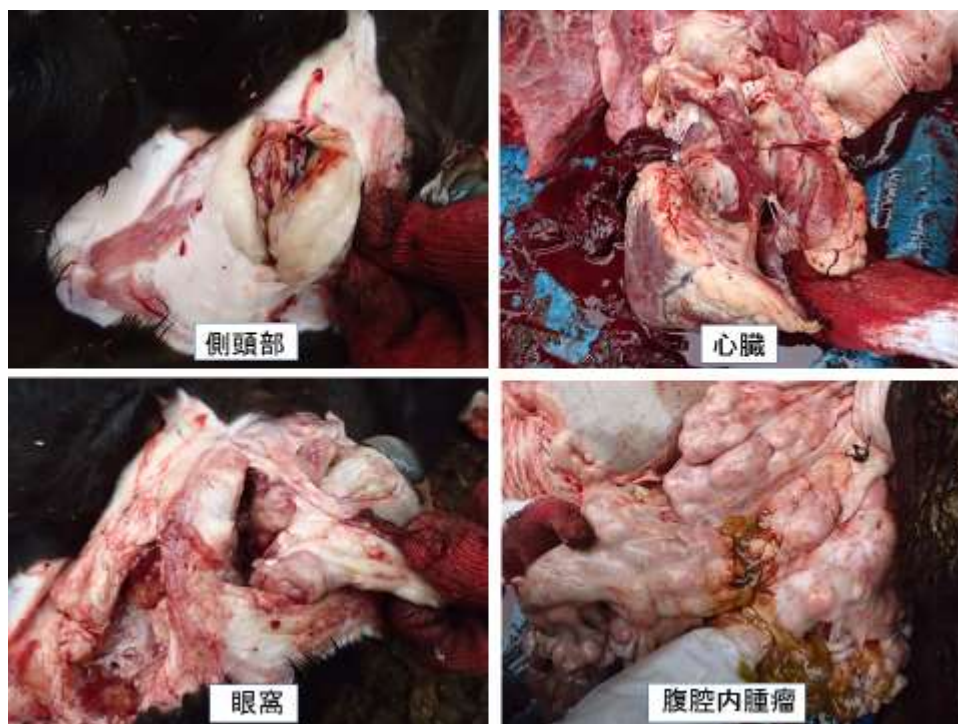


図3 剖検所見(病鑑②)

(3) 病理組織学的所見

各所にみられた白色腫瘍ではリンパ球様腫瘍細胞の重度浸潤が認められた(図4)。下顎リンパ節、外腸骨リンパ節等では、一様の腫瘍細胞の浸潤により、リンパ節の固有構造の消失が認められた。その他、心臓では心筋線維間に、第二胃及び盲腸では筋層に腫瘍細胞の重度浸潤が認められた。腫瘍細胞の大きさは中型で、核分裂像も多く認められた(図4矢印)。これら腫瘍細胞は免疫組織化学的検査により、CD20 ウサギポリクローナル抗体陽性、CD3 マウスモノクローナル抗体陰性を示した。以上の組織所見から、B細胞性リンパ腫と診断した。肝臓では小葉中心性に肝細胞の脂肪変性が見られた。また、眼瞼も含め、その他の臓器に著変は認められなかった。

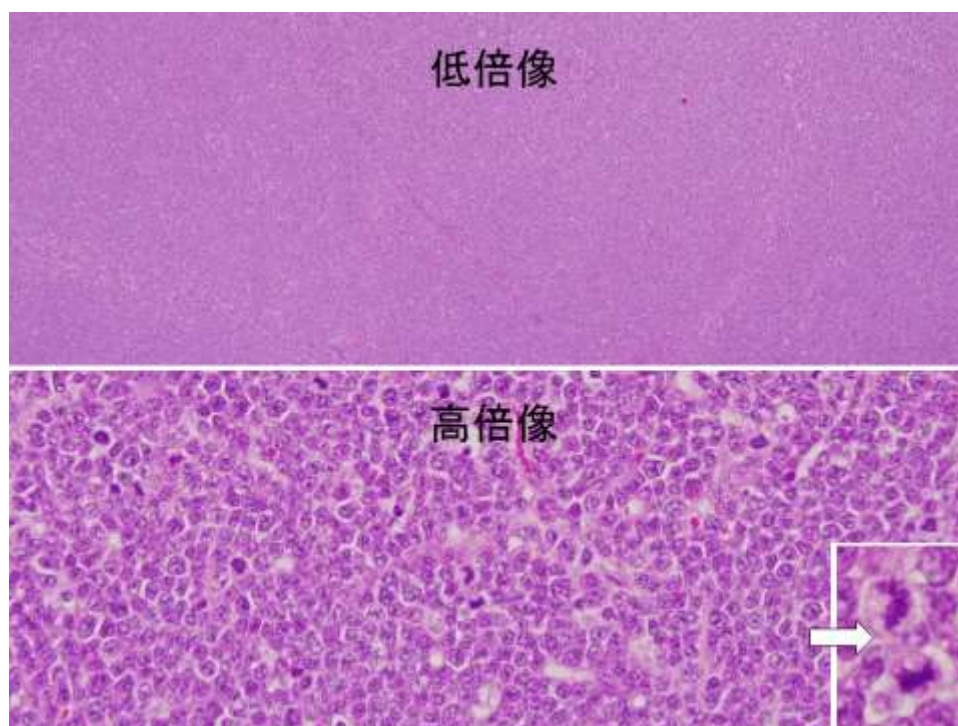


図 4 皮下腫瘍の HE 染色像

4 細菌学的検査

病鑑①では、外貌所見で結膜炎を呈していた左側の眼瞼スワブから、*M. bovoculi* が分離された。病鑑②では、両側の眼瞼スワブから、同菌が分離された。また、病鑑②では諸臓器及び腫瘍から菌は分離されなかった。

5 ウイルス学的検査

病鑑①、②いずれにおいても末梢血 WBC から BLV 特異遺伝子が検出され、遺伝子量は病鑑①では 16.2 copies/ng DNA であり、病鑑②では 58.4 copies/ng DNA であった。その他、左右の眼瞼スワブから IBRV 特異遺伝子は検出されなかった。

V まとめと考察

本症例では、病鑑①の時点で結膜炎を呈した眼瞼のスワブから *M. bovoculi* が分離されたことから、*M. bovoculi* による伝染性角結膜炎と診断した。EBL を疑う外貌所見があったが、血液所見で著変を認めなかったことから、眼病変は伝染性角結膜炎によるものと考え、摘発・淘汰に至らなかった。病鑑②では、病理組織学的検査を主体に、BLV 遺伝子検査、血液一般検査及び血液生化学的検査により、EBL と診断した。また病鑑②では、左右の眼瞼スワブから *M. bovoculi* が分離されたものの、眼瞼の外貌所見及び病理組織学的検査において著変を認めなかったことから、保菌状態であったと考察した。

本症例では、病鑑①で EBL と診断されなかった個体が、50 日後に実施した病鑑②において EBL と診断された。病鑑①時点では左眼の突出のみであったが、病鑑②では右側眼窩内

でも新たに腫瘍が腫大化したことにより、両側の眼球に突出がみられ、この期間に体内では腫瘍の多発化、腫大化等、病態が急速に進行した可能性が示唆された。また、病態との相関については明らかにされていないものの、血液一般検査での WBC 数の顕著な増加、末梢血 WBC の BLV 遺伝子量の増加についても病態の進行による影響が考えられた。血液生化学的検査では、総 LDH、AST 及び CPK の値に顕著な上昇を認めた。総 LDH については、牛白血病発症牛で上昇することが知られている^{9,10)}。また、AST や CPK は心筋に多く含まれている酵素であり、本症例では心臓に重度の病変が形成されていたことが高値の原因と考えられた。その他、グロブリンが低値であったが原因は不明であった。

国内の BLV 抗体保有率は 6 か月齢以上の乳用牛で 40.9%、肉用繁殖牛で 28.7%であり¹¹⁾、肉用牛農場においても、高い割合でウイルスのまん延が認められている。また、BLV 感染母牛からの出生子牛は、約 3%が BLV に垂直感染していると報告されている^{12,13)}。3 歳齢以上での発症が多いとされる EBL において¹⁾、本症例は 13 か月齢と若齢での診断であった。導入時及び発症時の月齢から、当該牛は母牛からの垂直感染や、生後まもなくの水平感染等の早期感染があったと考えられた。12 か月齢の黒毛和種で EBL の発症がみられた過去の報告¹⁴⁾では、早期感染により早期の発症に至ったと考察しており、本症例における急激な病態の変化についても、早期感染による影響が疑われた。

当所では、農場での過去の EBL 発生状況の疫学調査、体表リンパ節の腫脹等を確認する臨床検査、血液一般検査及び BLV 遺伝子検査成績の 4 項目を総合的に判断して、確定診断のための病理解剖の実施を検討している。しかし、上記 4 項目の検査成績で、一部の結果のみに異常が認められる個体や、各項目の異常所見が軽度な個体では、発症を強く疑うことができず、病理解剖を実施することは困難である。鑑定殺による病理解剖の実施は EBL と診断されなかった場合、農家にとって多大な損失を来すことになるため、経過観察となることが多く、発症牛の早期摘発・淘汰が遅れる可能性がある。本症例でも、眼球の突出がみられたため、病性鑑定を実施したものの、血液所見に異常を認めなかったことから、EBL を強く疑うことができず、早期淘汰に至らなかった。

肥育農場における EBL 発生で、経済的損失が最も多大となるのは、目立った臨床症状を示さず、飼料代等の生産コストをかけて出荷したが、と畜検査で摘発され、全部廃棄となる場合である。そのため、一日も早い摘発・淘汰が望ましい。EBL を疑う外貌所見が認められる個体については、初回の検査で EBL と診断されなかった場合でも、今回の事例のように短期間で急激な病態の進行を認めることがある。今後同様の事例が起きた際には、外貌の観察と定期的な検査により、早期摘発及び淘汰を実施していきたい。

VI 参考文献

- 1) 農林水産省 消費・安全局：病性鑑定マニュアル第 4 版, 76-77 (2015)
- 2) 小西美佐子：最新の家畜疾病情報 (IV) 地方病性牛白血病 (EBL), 日獣会誌 68, 352-354 (2015)

- 3) Ohshima K et al : Pathological studies on aleukemic case of bovine leukosis, Jpn. J. Vet. Sci., 42, 297-309 (1980)
- 4) Bendixen, H. J. : Bovine enzootic leukosis, Adv. Vet. Sci., 10, 129-204 (1965)
- 5) 宗村佳子ら : リアルタイム PCR による牛白血病診断法の検討, JVM vol. 60 No. 12, 1005-1011 (2007)
- 6) 村上賢二ら : 最近における動物衛生研究情報 (IV) 我が国における牛伝染性鼻気管炎の現行ワクチン株と野外ウイルス株を識別可能な PCR 法, 日獣会誌 63, 259-261 (2010)
- 7) 日本獣医内科学アカデミー : 獣医内科学 大動物編, 文永堂出版, 331-335 (2005)
- 8) 全国農業共済協会 : 家畜共済における臨床病理検査要領, 農林水産省経済局, 122-179 (1997)
- 9) Ishihara K et al : Clinical studies on bovine leukemia in Japanese black cattle. Serum lactate dehydrogenase activity and its isoenzyme pattern in groups of leukemic cattle and those negative or positive for antibody against bovine leukemia virus, Jpn J Vet Sci, 42, 289-295 (1980)
- 10) 猪熊壽ら : ホルスタイン乳牛に発生した地方病性牛白血病の 3 症例, 北獣会誌 57 (2013)
- 11) Murakami K et al : 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 (2013)
- 12) 村上賢二 : 総説 地方病性牛白血病の我が国における現状とその対策について, 山口獣医学雑誌 36, 5-30 (2009)
- 13) 村上賢二ら : 我が国の地方病性牛白血病の発生動向と対策 その現状と課題, 日獣会誌 62, 499-502 (2009)
- 14) 荒井眞弓ら : 12 か月齢の黒毛和種にみられた地方病性牛白血病, 平成 22 年度神奈川県家畜保健衛生所業績発表会, 66~73 (2009)