

称号及び氏名 博士（獣医学） 西池 公男

学位授与の日付 平成28年2月29日

論文名 牛白血病のモニタリングに関する研究

論文審査委員 主査 向本 雅郁

副査 三宅 眞実

副査 山崎 伸二

論文要旨

緒論

牛白血病は、ウイルス感染による地方病性白血病（EBL）とウイルス感染の関与が確認されていない散発性白血病（SBL）に分類される。EBLは、レトロウイルス科（Retroviridae）、オルソレトロウイルス亜科（Orthoretrovirinae）、デルタレトロウイルス（deltaretrovirus）に属する牛白血病ウイルス（bovine leukemia virus: BLV）に起因する。一方、SBLは子牛型、胸腺型、皮膚型に分類されるが、発生は稀なため、牛白血病は一般的にEBLを指すことが多い。

特徴病変は全身性のリンパ腫であり、体表リンパ節や直腸検査による骨盤腔内の腫瘤の触知などにより診断することが可能である。BLV感染牛の全てが発症するわけではなく、BLV感染牛の60～70%は無症状キャリアーとなり、その約30%は持続性リンパ球増多症（PL）を呈するが、臨床的には正常とされ、数ヶ月～数年の無症状期を経て、数%の感染牛はBリンパ球性白血病・リンパ腫を発症する。我が国では、牛白血病は1998年より家畜伝染病予防法による届出伝染病として発生報告が義務づけられ、発生状況は1998

年に 99 頭であったが、年々増加し、2013 年には 2,310 頭に達している。本研究では、本病の低コストなスクリーニング検査手法の開発を実施するため、第 1 章では、大阪府内の乳用牛に対して BLV の ELISA 抗体検査及びリアルタイム PCR 検査を行い、BLV 感染の実態を把握するとともに、白血球数およびリンパ球数並びに年齢との関連について調査した。第 2 章では、多変量統計解析法を用いて白血球数等の数値により BLV 感染度の分類を行った。

これらの結果から、本研究では、末梢血リンパ球数等の血液所見による牛白血病の診断基準の確立を目的とした。

第 1 章 血清抗体および遺伝子検査による BLV 感染の実態

12 歳までの 774 頭の乳用牛について、年齢別に BLV に対する抗体陽性率を比較した。4 歳から陽性率の上昇がみられ、年齢とともに陽性率が上昇し 6~8 歳では 69%になり、8 歳以上では 54%に低下した。また、農家別では、飼養規模別では明らかな特徴はみられなかったが、陽性率 60%を超える高い農家と 9 および 15%の低い農家に大別された。同じ検体についてリアルタイム PCR を実施し、抗体と同様に年齢における BLV の遺伝子量を比較した。なお、遺伝子量については、測定値の常用対数の整数値(0 以下のものは 0 と設定)をもって指数で表した。年齢とともに遺伝子を保有する牛が増加し遺伝子量も増加したが、4 歳以上になると、遺伝子量の保有状況には大きな変化は見られなかった。

農家別では抗体と同様に、遺伝子の保有頭数が多いグループと少ないグループに分かれるが、遺伝子量については各農家とも、遺伝子指数 2 以上の感染牛が見られた。また、リアルタイム PCR と抗体検査との比較では、遺伝子が確認されない抗体陽性牛が 7%みられた。抗体陽性牛群と陰性牛群の年齢と白血球数およびリンパ球数の牛群平均を比較したところ、年齢では抗体陽性群の平均年齢が高い傾向がみられた。また未経産牛の陽性率が 18%(14 頭/80 頭)と低いことから、分娩が感染の経緯となっていることが推察される。白血球数とリンパ球数とも陽性牛群で高値を示し、特に白血球数は正常範囲を超えていた。

遺伝子検査については、遺伝子が検出されない牛群と遺伝子指数ごとの牛群に分類して、各群の年齢と白血球数およびリンパ球数の平均を比較した。年齢については、遺伝子指数により分類された牛群間では有意差はなく、遺伝子が検出されない牛群は有意に年齢が低い傾向がみられた。白血球数とリンパ球数については、遺伝子指数 2 及び 3 の牛群は、遺伝子指数 0 および 1 並びに遺伝子が検出されない牛群に比較して有意に多い傾向がみられ、正常値を超えていた。また、遺伝子量の少ない指数 0 および 1 の牛群と遺伝子が検出されない牛群間には、有意差はなくほぼ正常範囲内であった。

また、白血球数とリンパ球数と遺伝子保有牛を対象に遺伝子量との相関をみたところ、各々相関係数 0.558 と 0.604 で正の相関が認められた。

第2章 主成分分析による BLV 血清抗体と遺伝子量の分類

774 頭の乳用牛の年齢と白血球数およびリンパ球数について、各変量を用いた主成分分析を行った。その結果、第2主成分までの累積寄与率が **0.974** と高い値を得たので、第1および第2主成分の固有ベクトルを用い、各牛の総合的指標となる主成分得点値を算出の上、第1主成分を水平のX軸に、第2主成分を垂直のY軸として直交する平面図に各牛の主成分得点を示した。平面図において、領域1($X \geq 0, Y \geq 0$)、領域2($X \geq 0, Y < 0$)、領域3($X < 0, Y \geq 0$)、領域4($X < 0, Y < 0$)の4つの領域にわけて抗体保有状態と遺伝子指数の分布状況を見た。領域1に遺伝子指数の高い牛が集中していた。各領域の抗体陽性率は領域1が**98%**で他の領域より有意に高い傾向が見られたが、他の領域においても抗体陽性率は**30%~50%**であった。

各領域での遺伝子指数の分布割合は、領域1では指数3と2で合わせて**90%**を占め、遺伝子を保有しない牛は**4%**にすぎなかった。他の領域では半数以上、遺伝子が検出されない牛が占めていた。各領域の牛群の平均年齢については、領域1および3は**6歳**前後の高齢であり、領域2および4は**1歳から3歳**と低年齢に分かれていた。

平均白血球数については、領域1が**14,990**と最多で、次いで領域2が**11,680**であり正常範囲を超えていた。領域3と4では有意差がなく**7,400**、**7,660**であり正常範囲内であり、リンパ球数についても、白血球数と同じ傾向がみられた。

抗体陽性牛**349**頭の年齢と白血球数およびリンパ球数について、主成分分析を行い全調査牛と同様に平面図において4つの領域にわけて遺伝子指数の分布をみたところ、領域1および2に遺伝子指数の高い牛が集中していた。各領域での遺伝子指数の分布割合をみると、領域1では、指数3が**49%**、指数2が**50%**で併せて**99%**を占め、領域2では、指数3が**19%**、指数2が**69%**と併せて**88%**の分布であった。領域3および4では、指数0と1を合わせて**57%**と**73%**を占めていたが、指数3については**4%**と**1%**で、両領域においてほとんど見られなかった。

各領域の牛群の平均年齢については、領域1および3は各々**6.4歳**、**7.1歳**と高く、領域2および4は**2.7歳**と**3.9歳**で低かった。平均白血球数については、領域1が**15,860**と最多で、次いで領域2が**14,410**で正常範囲を超えていた。領域3と4では有意差がなく**8,100**、**8,300**であり正常範囲内であった。リンパ球数については、白血球数と同じ傾向であった。

全調査牛および BLV 抗体陽性牛を対象に、主成分分析により区分された領域について、判別分析を用いて解析し年齢および白血球、リンパ球の測定値から各領域を区分する線形判別関数を作成した。

関数の精度については、全調査牛対象の関数では、誤って区分された誤差率は領域 1 で 11.9%、領域 2 で 5.5%、領域 3 で 13.2%、領域 4 で 2%であり全体で 7.7%であった。また、BLV 陽性牛対象の関数では、誤差率は領域 1 で 9%、領域 2 で 6%、領域 3 で 3.5%、領域 4 で 0.9%であり全体で 4.6%であった。

まとめ

1. BLV 抗体陽性牛群と陰性牛群について、年齢と白血球数およびリンパ球数を比較すると、各牛群平均値において陽性牛群で高い傾向がみられた。BLV 遺伝子量についても、遺伝子が検出されない牛群と遺伝子指数ごとの牛群に分類して、各群の年齢と白血球数およびリンパ球数の平均を比較すると同様の傾向が見られた。
2. 調査対象全牛と抗体陽性牛について、年齢と白血球数およびリンパ球数の各変量を用いた主成分分析を行った。年齢と白血球数およびリンパ球数による主成分得点値を平面図に表すことで、BLV 抗体や遺伝子の有無、遺伝子量の分布図を作成し、各牛の感染状態を 4 つの領域に分類した。
3. 全検査牛を対象にした領域の分類では、一つの領域に抗体陽性牛および遺伝子量の多い牛が集中する傾向がみられ、抗体検査が未実施の牛群を想定した場合の本病感染の危険度を示すと考えられた。
4. 抗体陽性牛を対象とした領域の分類では、各領域によって遺伝子量の特徴的な分布がみられ、牛白血病の診断に資するものと考えられた。
5. 年齢と白血球数とリンパ球数の測定値から、判別分析により得られた線形判別関数を用いて各領域の分類ができ、BLV 感染牛淘汰の血液学的な基準として有効と考えられた。

審査結果の要旨

牛白血病は、ウイルス感染による地方病性白血病 (EBL) とウイルス感染の関与が確認されていない散発性白血病 (SBL) に分類される。SBL は発生が稀なため、牛白血病は一般的に EBL を指すことが多い。EBL は、レトロウイルス科 (Retroviridae)、オルソレトロウイルス亜科 (Orthoretrovirinae)、デルタレトロウイルス (deltaretrovirus) に属する牛白血病ウイルス (bovine leukemia virus: BLV) に起因する。特徴病変は全身性のリンパ腫であり、体表リンパ

節や直腸検査による骨盤腔内の腫瘍の触知などにより診断することが可能である。BLV 感染牛の全てが発症するわけではなく、BLV 感染牛の 60~70%は無症状キャリアーとなり、その約 30%は持続性リンパ球増多症 (PL) を呈するが、臨床的には正常とされ、数ヶ月~数年の無症状期を経て、数%の感染牛は B リンパ球性白血病・リンパ腫を発症する。我が国では、その発生が年々増加し、2013 年には 2,310 頭に達している。本研究では、本病の低コストなスクリーニング検査手法を開発し、末梢血リンパ球数等の血液所見による牛白血病の診断基準の確立を目的とし、以下の成果を得た。

第 1 章では、大阪府内の乳用牛に対して BLV の ELISA 抗体検査およびリアルタイム PCR 検査を行い、BLV 感染の実態を把握するとともに、白血球数およびリンパ球数並びに年齢との関連について調査した。年齢別の BLV に対する抗体陽性率は 4 歳から上昇がみられ、6~8 歳で最大となり、8 歳以上では低下した。農家別では、飼養規模で明らかな特徴はみられなかったが、陽性率 60%を超える高い農家と低い農家に大別された。同じ検体についてリアルタイム PCR を実施したところ、年齢とともに BLV 遺伝子を保有する牛が増加し遺伝子量も増加したが、4 歳以上では遺伝子量の保有状況に大きな変化は見られなかった。リアルタイム PCR と抗体検査との比較では、遺伝子が確認されない抗体陽性牛が 7%みられた。抗体陽性牛群と陰性牛群の年齢と白血球数およびリンパ球数の牛群平均を比較したところ、年齢では抗体陽性群の平均年齢が高い傾向がみられた。また未経産牛の陽性率が低いことから、分娩が感染の経緯となっていることが推察された。白血球数とリンパ球数とも抗体陽性牛群で高値を示し、特に白血球数は正常範囲を超えていた。遺伝子が検出されない牛群および遺伝子量ごとの牛群に分類し、各群の年齢と白血球数およびリンパ球数の平均を比較したところ、遺伝子が検出されない牛群は有意に年齢が低い傾向がみられた。遺伝子量の多い牛群は、遺伝子量が少ないあるいは検出されない牛群と比較して有意に白血球数とリンパ球数が多い傾向がみられ、正常値を超えていた。また、遺伝子量の少ない牛群と遺伝子が検出されない牛群間には、有意差はなくほぼ正常範囲内であった。白血球数およびリンパ球数と遺伝子保有牛を対象に遺伝子量との相関をみたところ、各々正の相関が認められた。

第 2 章では多変量統計解析法を用いて白血球数等の数値により BLV 感染度の分類を行った。774 頭の調査対象乳用牛と抗体陽性牛について、年齢と白血球数およびリンパ球数の各変量を用いた主成分分析を行った。年齢と白血球数およびリンパ球数による主成分得点値を平面図に表すことで、BLV 抗体や遺伝子の有無、遺伝子量の分布図を作成し、各牛の感染状態を 4 つの領域に分類した。全検査牛を対象にした領域の分類では、一つの領域に抗体陽性牛および遺伝子量の多い牛が集中する傾向がみられ、抗体検査が未実施の牛群を想定した場合の本病感染の危険度を示すと考えられた。抗体陽性牛を対象とした領域の分類では、各領域によって遺伝子量の特徴的な分布がみられ、牛白血病の診断に資するものと考えられた。年齢および白血球数とリンパ球数の測定値から、判別分析により得られた線形判別関数を用いて各領域の分類ができ、BLV 感染牛淘汰の血液学的な基準としての有効性が示された。

以上、本研究により大阪府内の酪農場のうち、約 90%の農場で BLV 抗体陽性牛が確認され、牛白血病の感染が進んでいることが明らかとなった。また、農場の飼養規模にかかわらず、本病の感染源となる BLV 遺伝子量が多い牛が飼養されているが、抗体陽性率が低い農場もあり、飼養衛生管理や感染牛の淘汰による予防対策が効果を示している事例もみられ、定期的な検査による感染牛の摘発淘汰が重要な課題であることが明らかとなった。多変量統計解析法による感染度の分類は遺伝子量を予測できることから、牛白血病感染牛の淘汰の血液学的な基準としての有効性が示された。乳用牛の血液採取は、他の疾病検査にも欠かせないものであり、また血球計算は一般的に実施される検査であることから、本研究による白血球数等による診断は、牛白血病の低コストなスクリーニング検査として活用が期待され、本病感染牛の淘汰だけでなく、感染経路も含めて監視を行う各農場の感染防御対策の作成に資するものであり、獣医学、畜産学の発展に貢献するものである。本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。