

原 著

牛白血病ウイルス感染搾乳牛における
末梢血白血球ポピュレーション柿沼清市^{1)†} 大塚浩通²⁾ 大前佳穂里¹⁾ 綾部杏子¹⁾柿沼元治¹⁾ 今内 覚³⁾ 及川正明²⁾

1) 埼玉県 開業 (柿沼獣医科医院: 〒367-0212 本庄市児玉町児玉200-1)

2) 北里大学獣医学部 (〒034-8628 十和田市東二十三番町35-1)

3) 北海道大学大学院獣医学研究科 (〒060-0818 札幌市北区北18条西9丁目)

(2010年4月5日受付・2010年12月2日受理)

要 約

牛白血病ウイルス (BLV) 感染牛群における免疫状態を明らかにするため、BLV 高率感染農場における疾病発生を調査し、BLV 感染牛群の白血球ポピュレーションを解析した。牛群の80%以上がBLV 遺伝子検査 (Nested-PCR法) にて陽性のBLV 高率感染農場は、すべてが陰性の未感染農場に比べて、消化器、代謝疾患の発生件数と、その診療回数が多かった。分娩後240日以内の経産牛のうち、BLV 遺伝子検査にて陽性のBLV 感染牛18頭 (A群) と、陰性の未感染牛23頭 (B群) の白血球ポピュレーションを解析した。A群のMHCクラスII⁺CD14⁻B細胞数、CD14⁺単球数、WC1-N1⁺γδ T細胞数は、B群に比べて有意に多かった。CD335⁺NK細胞数は、B群に比べて低い傾向がみられた。BLV 感染牛群は、免疫異常状態を示し、消化器、代謝疾患の発生に対するリスクが高まる可能性がある。

——キーワード: 免疫異常状態, 牛白血病ウイルス, 白血球ポピュレーション。

----- 日獣会誌 64, 375~380 (2011)

牛白血病ウイルス (BLV) は、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) やヒトT細胞白血病ウイルス (HTLV) と同じレトロウイルス科に属し、BLV 感染牛は、病態の進行とともに末梢血液中にB細胞が増加する持続性リンパ球増多症 (PL) や、腫瘍形成して地方病性牛白血病 (enzootic bovine leukosis: EBL) を呈することが知られている [1-3]。わが国ではBLV 抗体陽性牛は、EBL を発症しないかぎり淘汰の対象にならず、単なるBLV 感染だけでは深刻な病状には至らないため臨床的には軽視される傾向があり、BLV 清浄化対策は非常に困難なものとなっている。

免疫学的検査は乳用牛の分娩前後の免疫状態を知る手段として有用であるとされており [4]、乳房炎の多発牛群に対する白血球ポピュレーションを中心とした牛群単位での泌乳期間による免疫状態の解析の結果、牛群全体にT細胞やB細胞数の減少が観察され、牛群単位での免疫機能の低下の存在が指摘されている [5]。BLV 感染

牛は、未感染牛に比べて免疫機能が低下しているため、他の感染症に罹患しやすいとされていることから [6]、BLV の高率感染牛群において牛群単位での免疫異常が存在する可能性も示唆されている。しかし、BLV 高率感染農場において免疫状態を評価した報告はなく、これらの泌乳期間による免疫状態は明らかにされていない。

本研究では、BLV 感染牛群における牛群単位での免疫状態を明らかにする目的で、BLV 高率感染農場における疾病発生を調査し、BLV 感染が認められるが臨床的に健常なホルスタイン種乳用牛群の白血球ポピュレーションを解析した。

材 料 お よ び 方 法

供試農場: 飼養条件が類似するホルスタイン種乳用牛群の2戸の農場において、BLV 抗体検査 (AGID) にて70%以上、およびBLV 遺伝子検査 (Nested-PCR法) [7] にて80%以上が陽性を示した農場を高率感染農場

† 連絡責任者: 柿沼清市 (柿沼獣医科医院)

〒367-0212 本庄市児玉町児玉200-1

☎0495-72-0171 FAX 0495-72-8244

E-mail: fwid6390@mb.infoweb.ne.jp

表1 各農場における飼養頭数、および疾病発生の比較

	高率感染農場	未感染農場
採血時の全飼養頭数(未經産牛も含む)	62	76
年間の分娩頭数	31	32
周産期に診療した頭数(%)	20(64.5)	21(65.6)
疾病発生件数	60	47
感染症の発生件数(%)	29(48.3)	27(57.4)
消化器, 代謝疾患の発生件数(%)	27(45.0)	15(31.9)
総診療回数	241	160
診療延べ頭数(受診件数)	49	42
診療頭数	24	26
2件以上受診した個体の頭数(%)	14(58.3)	8(30.8)
1頭あたりの診療回数	10.0±1.7	6.2±1.1
死廃事故頭数	3	2
平均±標準誤差		
採血前1年間の臨床記録より調査		

とし [8], 飼養牛すべてが陰性を示した農場を未感染農場とした. 材料採取時の高率感染農場の全飼養頭数は62頭, 経産牛頭数37頭であり, 経産牛のうち32頭(86.5%), 未經産牛のうち19頭(76.0%)がBLV遺伝子検査により陽性を示した. いっぽう, 未感染農場は全飼養頭数が76頭であり, 経産牛頭数が42頭であった(表1).

疾病発生記録調査: 診療記録簿より, 2戸の農場における経産牛の繁殖障害を除く過去1年間の疾病発生件数, 総診療回数, 診療延べ頭数(受診件数), 診療頭数, 死廃頭数, および周産期に診療した頭数と年間の分娩頭数の比を調査した.

供試牛: 分娩後240日以内の臨床的に健常な経産牛のうち, 高率感染農場の18頭をA群, および未感染農場のBLV未感染牛23頭をB群とした. なお, A群のすべてがBLV遺伝子検査にて陽性と診断された. 供試牛の分娩後日数により分娩後120日以内(A群:6頭, B群:9頭), 121から180日(A群:6頭, B群:6頭), 181から240日(A群:6頭, B群:8頭)の3期間にある個体を対象とした. 各群の年齢は, A群:5.13±0.40歳に対して, B群:5.12±0.38歳で, 2群間に差は認められず, 各期間にある個体の年齢にも有意差は認められなかった(表2).

白血球ポピュレーションの解析: 供試牛の尾静脈または頸静脈から採血し, EDTA-2K添加真空採血管に分注して供試した. 白血球, 単核球および顆粒球の数は, 自動血球計算装置(Celltac・MEK-6358, 日本光電株, 東京)により測定した. 白血球表面抗原の解析は, 定法に従い実施し [4, 9], CD3 (MMIA, VMRD, U.S.A.), CD4 (CACT183A, VMRD, U.S.A.), CD8 (BAT82A, VMRD, U.S.A.), WC1-N1 (B7A1, VMRD, U.S.A.),

表2 各群の年齢およびポピュレーション解析結果

	分娩後日数	A群(n=18)	B群(n=23)	群間の差
年 齢	0~120	5.28±0.51	5.45±0.68	
	121~180	6.24±0.87	4.83±0.89	
	181~240	3.88±0.23	4.98±0.49	
	全 体	5.13±0.40	5.12±0.38	
白血球 (10 ² /μl)	0~120	100.67±9.21	68.33±6.70	*
	121~180	119.50±5.83	63.33±2.30	**
	181~240	112.17±8.67	78.75±4.05	*
	全 体	110.78±4.75	70.65±3.21	**
単核球 (10 ² /μl)	0~120	53.15±10.50	29.79±4.81	*
	121~180	74.87±7.56	26.31±1.33	**
	181~240	65.87±6.30	26.59±1.82	**
	全 体	64.63±5.00	27.77±1.97	**
顆粒球 (10 ² /μl)	0~120	47.52±6.29	38.54±4.58	
	121~180	44.63±6.11	37.03±1.95	
	181~240	46.29±5.71	52.16±2.99	
	全 体	46.15±3.29	42.88±2.51	

平均±標準誤差

* : A群とB群の有意差 (P<0.05)

** : A群とB群の有意差 (P<0.01)

A群: 分娩後0~120日(n=6), 121~180日(n=6), 181~240日(n=6)

B群: 分娩後0~120日(n=9), 121~180日(n=6), 181~240日(n=8)

CD335 (MCA2365, AbD Serotec, U.K.), MHCクラスII (CAT82A, VMRD, U.S.A.) およびCD14 (MY-4, ベックマンコールター株, 東京) に対する抗体を用いた. なお, 各細胞の数値はフローサイトメーター(FACScan, Becton Dickinson, U.S.A.)により解析した比率と白血球数から算出した実数値によって数を求めた.

検定: 白血球ポピュレーションの検査成績は, Studentのt検定を行い, 2群間の成績を比較した. また, 同じ牛群の3期間にある個体の白血球ポピュレーションは, 一元配置分散分析を行い, 検査成績を比較した. 5%以下の危険率で有意差とした.

成 績

年間の疾病発生件数は高率感染農場が60件, 未感染農場は47件であった. そのうち感染症の発生件数は, 高率感染農場が29件(48.3%)であったのに対し, 未感染農場は27件(57.4%)であった. 感染症のなかでは, 乳房炎が最も多く, 高率感染農場においては23件, 未感染農場においては20件であった. 分娩後の子宮炎は, 2戸の農場ともに4件ずつ発生し, その他, 高率感染農場では肺炎が2件, 未感染農場では, 肺炎, 関節炎, および腸炎が1件ずつ発生した. 感染症以外の疾病では, 第四胃変位, ケトン症などの消化器および代謝疾患が, 高率感染農場においては60件中27件(45.0%),

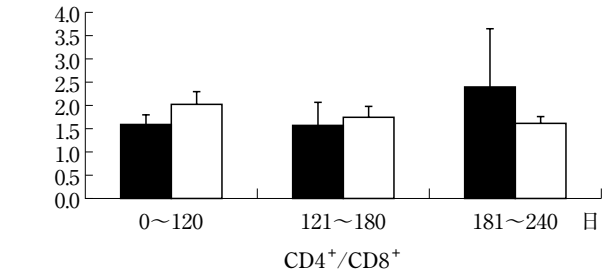
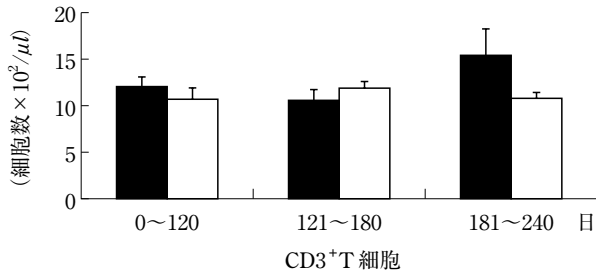
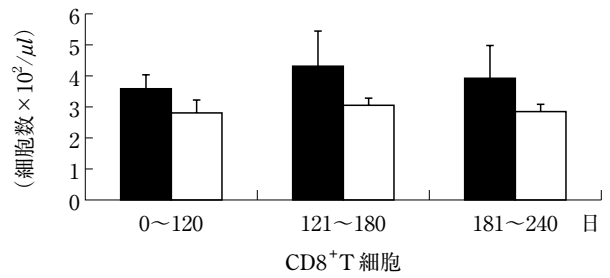
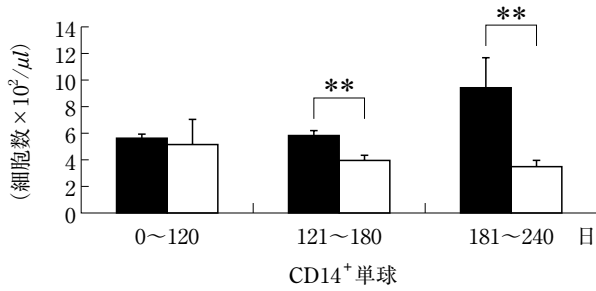
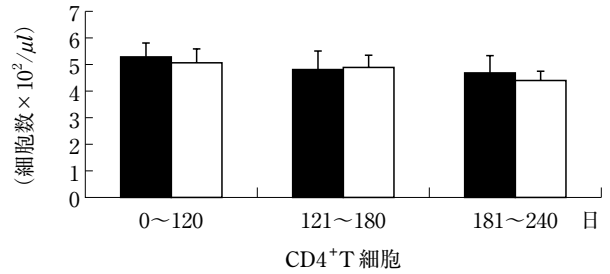
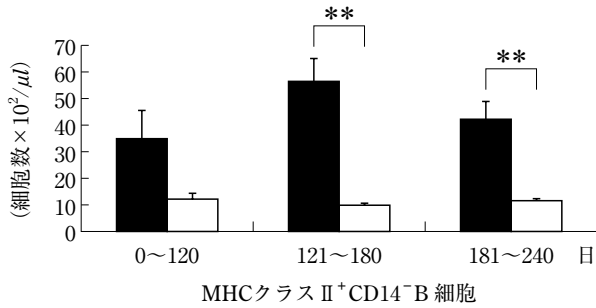


図1 各群のMHCクラスII⁺CD14⁻B細胞数、CD14⁺単球数およびCD3⁺T細胞数
A群 (■) B群 (□)
* : P < 0.05 ** : P < 0.01

図2 各群のCD4⁺T細胞数、CD8⁺T細胞数およびCD4⁺/CD8⁺比
A群 (■) B群 (□)

未感染農場においては47件中15件(31.9%)であった。総診療回数、診療延べ頭数(受診件数)、1頭あたりの診療回数は、高率感染農場が未感染農場に比べて多く認められた。診療頭数は、高率感染農場が24頭、未感染農場は26頭であったが、そのうち、同一疾病の再発、または異なる疾病の発生により、2件以上受診した病歴のある個体数は、高率感染農場において14頭(58.3%)であったのに対し、未感染農場においては8頭(30.8%)と、高率感染農場が未感染農場に比べて多く認められた(表1)。

白血球数および単核球数は、すべての期間において、A群がB群に比べて有意に多かった。顆粒球数は、すべての期間において2群間に有意差はなかった(表2)。

B細胞(MHCクラスII⁺CD14⁻細胞)数は、すべての期間において、A群がB群に比べて多い傾向が認められた。A群では、分娩後121から180日の期間にある個体が最も高値を示し、いっぽうB群では、どの期間にある個体もほぼ同様の値を示した。分娩後121から180日、181から240日の2期間において有意差が認められ

た。単球(CD14⁺細胞)数は、すべての期間において、A群がB群に比べて多い傾向が認められた。A群では、分娩後181から240日の期間において、最も多く認められ、分娩後121から180日、181から240日の2期間において、有意差が認められた。CD3⁺T細胞数は、すべての期間において2群間に有意差はなかった(図1)。

CD8⁺T細胞数は、すべての期間において、A群がB群に比べて多い傾向が認められた。CD4⁺T細胞数およびCD4⁺/CD8⁺比は、すべての期間において2群間に有意差はなかった(図2)。

γδ T細胞(WC1-N1⁺細胞)数は、すべての期間において、A群がB群に比べて多い傾向が認められた。分娩後0から120日後と181から240日後の2期間において有意差が認められた(図3)。NK細胞(CD335⁺細胞)数は、すべての期間において、A群がB群に比べて低い傾向が認められた(図3)。

同じ群の3泌乳期間にある個体の白血球ポピュレーションは、両群ともに有意差はみられなかった。

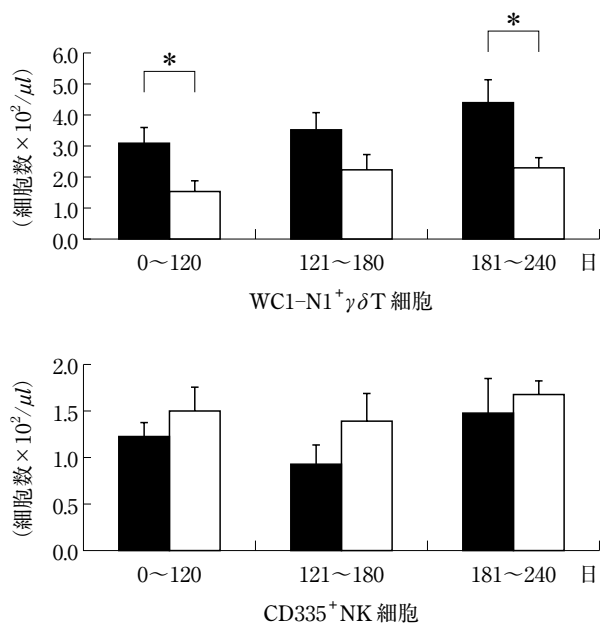


図3 各群の $\gamma\delta$ T細胞数(WC1⁺), NK細胞数(CD335⁺)
A群(■) B群(□) *: $P < 0.05$

考 察

本研究では、BLV感染牛群における牛群単位での免疫状態を明らかにする目的で、それらの存在するBLV高率感染農場における疾病発生を調査し、臨床的に健常と観察される感染ホルスタイン種乳用牛群の白血球ポピュレーションを解析した。

BLVは牛のB細胞の他、T細胞、単球といった免疫担当細胞にも感染し[10, 11], BLV感染牛では病態進行に伴って循環血液中のB細胞数が増加する持続性リンパ球増多症[12]を経た後、モノクローナルな感染細胞による腫瘍を発症する[6, 11, 13]. 本研究では、いくつかの泌乳期においてA群の白血球、単核球およびB細胞数がB群に比べて有意に多く、BLV感染牛群ではこれまでの報告[3, 14-18]と同様に末梢血液中のB細胞数が著しく増加していることが示された。一方で、BLV感染牛は、B細胞とIgM分泌の減少がみられることもあり、免疫機能が低下しているため、真菌症等に罹患しやすいとされる[6]. 本研究のBLV感染牛のB細胞数は増多し、高率感染農場において発生したBLV以外の疾患では、感染症よりも消化器、代謝疾患の発生が多く認められる傾向があった。1年間の治療歴の比較では、高率感染農場は未感染農場に比べて1泌乳期において同一疾病の再発、または異なる疾病の発生により、2件以上受診した個体数が多かった。また、同じ群の3泌乳期間にある個体の白血球ポピュレーションは、両群ともに有意差はみられなかったが、A群の白血球ポピュレーションにはB群とは異なる点が多く認められた。これらのことから、A群では泌乳期に関係なく免疫異常状態を呈し

ていたことが示唆され、BLV感染牛群は外見上健常であっても未感染牛群に比べて、消化器、代謝疾患の発生に対してのリスクが高い可能性がある。

BLV感染細胞や腫瘍細胞に対する免疫応答として細胞障害能を持つCD8⁺T細胞や $\gamma\delta$ T細胞の機能は重要な役割をもつと考えられている。CD8⁺T細胞は細胞傷害機能を発揮し感染細胞を除去するとされ[19], また $\gamma\delta$ T細胞は、無症状キャリアー期(AL)で、BLVエンベロープを発現している標的細胞に対して、特異的に細胞傷害性の免疫応答をするとの報告もある[20]. 本研究において、A群のCD8⁺T細胞数および $\gamma\delta$ T細胞数が、すべての泌乳期においてB群に比べて多い傾向を示していたことは、これらのT細胞がBLV感染細胞に対して免疫応答していた可能性がある。BLVはマクロファージ(単球)の免疫機能を変化させ、貪食能を低下させる可能性も指摘されている[10]. 本研究では、CD14⁺単球の貪食能低下を明らかにすることはできなかったが、A群の単球数はB群に比べて多い傾向を示した。

A群のNK細胞数はすべての期間においてB群に比べて少ない傾向が認められた。NK細胞は早期誘導免疫を担い、非特異的にウイルス感染細胞や腫瘍細胞を認識して、細胞障害性やサイトカイン産生によって、強い細胞障害作用を持つとされる[21]. BLVと同じレトロウイルスに属するHTLV感染症においては、NK細胞の活性が低下するとされている[22]. このことから、BLV感染牛群は、未感染牛群に比べて、NK細胞が関与する非特異的な免疫機能は劣っていた可能性がある。

これらのことから、臨床的に健康と考えられたBLV感染牛群の免疫状態としてCD8⁺T細胞や $\gamma\delta$ T細胞などのT細胞やCD14⁺単球を中心とした免疫応答が示唆された。またBLV感染では、病態の進行に伴ってB細胞の増加とCD4⁺T細胞の減少が顕著になり[6], EBLを発症するとCD3⁺T細胞が減少する[17]. このことから今回調査対象とした、BLV感染搾乳牛群の白血球ポピュレーションはEBL未発症牛における特徴であったと考えられる。B細胞数、単球数、 $\gamma\delta$ T細胞数が、2群間の限られた泌乳期間において有意差が認められたことと、消化器、代謝疾患との関連性については、今後引き続き検討していきたい。

以上から、BLV感染牛は、外見上健常であっても、B細胞の増多を主とした免疫異常状態を呈しているため、他の疾病発生に対してのリスクも高まっている可能性がある。EBL以外の疾病発生を軽減させるためにも、BLVの感染を拡大させないことが望ましい。

本研究の実施にあたり、協力いただいた埼玉県熊谷畜保健衛生所の関係者に感謝の意を示す。

引用文献

- [1] Konnai S, Usui T, Ikeda M, Kohara J, Hirata T, Okada K, Ohashi K, Onuma M : Tumor necrosis factor- α up-regulation in spontaneously proliferating cells derived from bovine leukemia virus-infected cattle, *Arch Virol*, 151, 347-360 (2005)
- [2] Konnai S, Usui T, Ikeda M, Kohara J, Hirata T, Okada K, Ohashi K, Onuma M : Tumor necrosis factor- α genetic polymorphism may contribute to progression of bovine leukemia virus-infection, *Micro Infect*, 8, 2163-2171 (2006)
- [3] Wu D, Takahashi K, Murakami K, Tani K, Koguchi A, Asahina M, Gryou M, Aida Y, Okada K : B-1a, B-1b and conventional B cell lymphoma from enzootic bovine leukosis, *Vet Immunol Immunopathol*, 55, 63-72 (1996)
- [4] 渡辺知香, 大塚浩通, 小比類卷正幸, 鶴田真弓, 寺澤早紀子, 安藤貴朗, 渡辺大作, 佐藤 繁 : 分娩前後における乳用牛群に対する免疫プロファイルテストの有用性, *日獣会誌*, 60, 709-714 (2007)
- [5] Ohtsuka H, Kohiruimaki M, Hayashi T, Katsuda K, Matsuda K, Masui M, Abe R, Kawamura S : Relationship between leukocyte population and nutritive conditions in dairy herds with frequency appearing mastitis, *J Vet Med Sci*, 68, 113-118 (2005)
- [6] Trainin Z, Brenner J, Meirum R, Ugar-Waron H : Detrimental effect of bovine leukemia virus (BLV) on the immunological state of cattle, *Vet Immunol Immunopathol*, 54, 293-302 (1996)
- [7] Konnai S, Usui I, Ikeda M, Kohara J, Hirata T, Okada K, Ohashi K, Onuma M : Imbalance of tumor necrosis factor receptors during progression in bovine leukemia virus infection, *Viology*, 339, 239-248 (2005)
- [8] Meas S, Kabeya H, Yoshimura S, Ohashi K, Matsuki S, Mikami Y, Sugimoto C, Onuma M : Seroprevalence and field isolation of bovine immunodeficiency virus, *J Vet Med Sci*, 60, 1195-1202 (1998)
- [9] Riollot C, Rainard P, Poutrel B : Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection, *J Dairy Sci*, 84, 1077-1084 (2001)
- [10] Werling D, Haward CJ, Niederer E, Straub OC, Saalmüller A, Langhans W : Analysis of phenotype and phagocytic activity of monocyte/macrophages from cattle infected with the bovine leukaemia virus, *Vet Immunol Immunopathol*, 62, 185-195 (1998)
- [11] Wu D, Murakami K, Morooka A, Jin H, Inoshima Y, Sentsui H : *In vivo* transcription of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency-like virus, *Vir Res*, 97, 81-87 (2003)
- [12] Isaacson JA, Flaming KP, Roth JA : Increased MHC class II and CD25 expression on lymphocytes in absence of persistent lymphocytosis in cattle experimentally infected with bovine leukemia virus, *Vet Immunol Immunopathol*, 64, 235-248 (1998)
- [13] Yamamoto S, Onuma M, Kodama H, Mikami T, Izawa H : Suppression of natural cytotoxic activity of lymphocytes from cattle and sheep during the progress of bovine leukosis, *Vet Microbiol*, 9, 105-111 (1984)
- [14] Esteban EN, Thom RM, Ferrer JF : Characterization of blood lymphocyte population in cattle infected with the bovine leukemia virus, *Cancer Res*, 45, 3225-3230 (1985)
- [15] Kenyon SJ, Pier CE : Properties density gradient-fractionated peripheral blood leukocytes from cattle infected with bovine leukemia virus, *Infect Immun*, 16, 898-903 (1977)
- [16] Lewin HA, Wu M, Nolan TJ, Stewart JA : Peripheral B Lymphocyte percentage as an indicator of subclinical progression of bovine leukemia virus infection, *J Dairy Sci*, 71, 2526-2534 (1988)
- [17] Wu D, Takahashi K, Liu N, Koguchi A, Makara M, Sasaki J, Goryo M, Okada K : Distribution of T-lymphocyte subpopulation in blood and spleen of normal cattle and cattle with enzootic bovine leukosis, *J Comp Pathol*, 120, 117-127 (1999)
- [18] Yakobson B, Brenner J, Ungar-Waron H, Trainin Z : Cellular immune response cytokine expression during the initial stage of bovine leukemia virus (BLV) infection determines the disease progression to persistent lymphocytosis, *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 23, 197-208 (2000)
- [19] Fulton BE Jr, Portella M, Radke K : Dissemination of bovine leukemia virus-infected cells from a newly infected sheep lymph node, *J Virol*, 80, 7873-7884 (2006)
- [20] Lundberg P, Splitter A : Gamma delta + T-lymphocyte cytotoxicity against envelope-expressing target cells is unique to the alymphocytic state of bovine leukemia virus infection in the natural host, *J Virol*, 74, 8299-8306 (2000)
- [21] Diefenbach A, Raullet DH : Innate immune recognition by stimulatory immunoreceptors, *Curr Opin Immunol*, 15, 37-44 (2003)
- [22] Masuda A, Matsuyama T, Yokoyama MM, Nozoe S, Tei C : Psychobehavioral and immunological characteristics of HTLV-1 carriers and non-carriers with persistently low natural killer cell activity, *Int Med*, 39, 885-890 (2000)

Peripheral Blood Leukocyte Populations in Dairy Cows Infected
with Bovine Leukemia Virus

Seiichi KAKINUMA*[†], Hiromichi OHTSUKA, Kaori OHMAE, Kyouko AYABE,
Motoharu KAKINUMA, Satoru KONNAI and Masaaki OIKAWA

* *Kakinuma Veterinary Hospital, Honjou, 200-1 Kodama, Kodama-cho, Honjou, 367-0212, Japan*

SUMMARY

The aim of this study was to investigate the immune status of dairy cows infected with bovine leukemia virus (BLV). BLV infection was diagnosed by Nested-PCR assay to detect BLV proviral DNA. A farm with high incidence of BLV-positive cows (more than 80% of cows tested positive for BLV) required more frequent treatment of gastrointestinal and metabolic diseases compared to a farm with no BLV-positive cows. Blood samples were obtained from BLV-positive cows on a farm with high BLV incidence (Group A : n = 18) and BLV negative cows in a BLV negative farm (Group B : n = 23) within 240 days of calving. The number of MHC class III⁻ CD14⁻ B cells, CD14⁺ monocytes and WC1-N1⁺ γ δ T cells in Group A were significantly higher than those in Group B. The number of CD335⁺ NK cells in Group A was lower than that in Group B but the difference was not statistically significant. These results suggested that cows infected with BLV have abnormal immune status and are at higher risk of gastrointestinal and metabolic diseases.

— Key words : abnormal immune status, bovine leukemia virus, leukocytes population.

[†] *Correspondence to : Seiichi KAKINUMA (Kakinuma Veterinary Hospital)*

200-1 Kodama, Kodama-cho, Honjou, 367-0212, Japan

TEL 0495-72-0171 FAX 0495-72-8244 E-mail : fwid6390@mb.infoweb.ne.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 64, 375 ~ 380 (2011)