

11. EBL発症診断におけるチミジンキナーゼ活性値の検討

大分県宇佐家畜保健衛生所

○長谷部恵理・安達聡・榮徳千尋・芦刈美穂

【はじめに】

地方病性牛白血病（以下EBL）の診断は、末梢血リンパ球の増加や末梢血への異形リンパ球の出現が乏しい場合困難となる。細胞増殖におけるDNA複製に関与する酵素であるチミジンキナーゼ（以下TK）は、細胞増殖を伴う腫瘍性疾患であるEBL発症時にも活性が上昇することが報告されている [1,2]。

今回、TK活性値を測定し、診断の有効値について検討した。また、牛白血病ウイルス（BLV）抗体陽性牛の更新基準として活用できないか検討した。

【材料及び方法】

TK活性値測定検討は以下の血清を用いた。①保存血清：2018年5～10月にBLVを疑い血液検査依頼のあった33頭33検体。②食肉衛生検査所血清：2018年9～10月に病畜搬入され、と畜後にEBLと診断された3頭3検体。③清浄化取組農場血清：BLV清浄化に取り組む1農場のBLV抗体陽性牛21頭21検体。

①、②の血清は、BLV抗体陰性群と陽性群に分け、抗体陽性群は更に血液検査でEBLを否定した群、強く疑われた群、と畜後に診断された群及びEBL発症の判定ができず経過観察とした群に分類した。

病理解剖は上記、BLVを疑い血液検査依頼があった33頭の内、血液検査所見により経過観察とした牛1頭について実施した（図-1）。

血清TK活性値測定は、TK活性測定キット(DiViTum V2 BIOVICA)を用いて測定、得られたELISA値をTK-REアッセイ値(U/l)に換算し10倍したものをTK活性値（×10¹U/l）とした。

血液検査、病理解剖は定法に従って実施した（図-2）。

図-1 材料

- 保存血清及び食肉衛生検査所血清
 - 2018年5～10月に血液検査依頼のあった33頭
 - 2018年9～10月に病畜搬入され、と畜後にEBLと診断された3頭

BLV抗体保有状況	症状	診断	頭数
抗体陰性群	無	健康	5
		病畜(起立不能、尿毒症、呼吸器等)	10
抗体陽性群	有	EBL否定	5
		EBL発症を強く疑う(血液検査)	7
		EBL発症診断(と畜後)	3
		経過観察(EBL発症判断できず)	6

- 病理解剖牛
 - BLV抗体陽性でEBLと判断できず経過観察とした牛
 - 12歳の黒毛和種繁殖牛1頭 眼球突出を呈す
- 清浄化取組農場血清
 - BLV抗体陽性牛21頭

図-2 方法

- 血清TK活性値測定
 - TK活性測定キット(ヒト用)(DiViTum V2 BIOVICA)を用いて測定
 - 得られたELISA値をTK-REアッセイ値(U/l)に換算したものを10倍しTK活性値とした
 - 測定可能範囲は 2.8～563.8
- 血液検査
 - 血球数:多項目自動血球計算機
 - リンパ球割合
 - 異型リンパ球割合 } 血液塗抹標本
 - LDH測定:富士ドライケム7000V
- 病理解剖
 - 剖検
 - 病理組織検査:HE染色

TK活性値 = (ELISA値 / 71) × 10

【検討内容及び結果】

検討1：はじめに、BLV抗体陰性群及び陽性群の各群についてEBL未発症牛と発症牛の示

すTK活性値の比較を行った。

TK活性値の測定結果の検討にあたっては、坂本らのEBL発症牛の約95%以上はTK活性値 $54.0 \times 10^{-1} \text{U/l}$ よりも高い値を示すという報告から、 $54.0 \times 10^{-1} \text{U/l}$ を基準値と設定し比較検討を行った [3]。

抗体保有状況にかかわらず、EBL未発症では全頭が基準値以下を示し、EBL発症牛では全頭が基準値以上を示すことが確認された (表-1)。

検討2：次に、経過観察とした牛について、得られたTK活性値測定結果による診断が実際の診断と一致するか追跡調査を行った。

経過観察とした6頭のTK活性値は、基準値以上を示したものは3頭、基準値以下を示したものが3頭であった。

基準値以上を示した3頭の内、1頭 (表-2 No. 1) は、再検査によりEBLを疑い、病理解剖によりEBLと診断した。1頭 (表-2 No. 2) は、血液検査後に病畜として食肉出荷され、

と畜後にEBLと診断された。1頭 (表-2 No. 3) は、検査の3日後に死亡し究明には至らなかったが、TK活性値が高かったことからEBLを発症していたものと思われた。

基準値以下を示した3頭では、2頭 (表-2 No. 5, 6) は、現在も生存が確認されEBLは未発症であった。一方で、1頭 (表-2 No. 4) は、検査の11日後に状態が悪化し病理解剖を実施したところ、腫瘍病変が確認されEBLと診断した。この牛の初診時と解剖時の血液検査の比較を行ったところ、初診時には、異形リンパ球の出現は乏しくかったが、解剖時には多く出現していた。また、TK活性値は初診時 $13.2 \times 10^{-1} \text{U/l}$ 、解剖時 $25.3 \times 10^{-1} \text{U/l}$ と上昇していたが、いずれの値も基準値以下を示していた (表-3)。

また、病理解剖においては、初診時に見られた軽度眼球突出は重度となり眼球は破裂し、眼球裏のリンパ球は拳大に腫大しているのが確認されたが、その他の腫瘍病変は、腹腔内に5cm大に腫大したリンパ節が数個、心臓心耳部及び第四胃底部壁の一部のみに限局されていた。したがって、このような発症例ではTK活性値の上昇はわずかなものであると考えられた (図-4)。

以上より、基準値以下を示した経過観察牛においても、EBL診断牛が存在することが確

表-1 1. EBL発症牛・未発症牛のTK活性値の比較

区分	TK活性値 ($\times 10^{-1} \text{U/l}$)		
	基準値 54.0		
抗体陰性群	<2.8~9.5		未発症
抗体陽性群	<2.8~37.7		発症
EBL診断	125.4~563.4<		発症
EBL疑う	218.7~563.4<		発症
経過観察	5.9	357.3	

※坂本らの既報からEBL発症牛の約95%はTK活性値**54.0**よりも高い値を示す

表-2 2. 経過観察牛の追跡調査①
経過観察牛の血液検査及び追跡調査結果まとめ

No.	白血球数 (個/ μl)	リンパ球数 (個/ μl)	異型率(%) (異型リンパ球/ リンパ球)	LDH (IU/ μl)	TK活性値 ($\times 10^{-1} \text{U/l}$)	予後
1	15,600	14,976	1.0	1,277	357.3	再検査? EBL疑う 病理解剖 → EBL診断
2	7,200	2,376	12.1	1,870	234.3	食肉出荷 → EBL診断
3	4,800	2,496	3.8	3,908	230.1	3日後に死亡
4	4,200	3,276	2.6	1,582	13.2	病理解剖 → EBL診断
5	8,800	5,544	4.8	1,398	5.9	生存 → 未発症
6	4,300	1,935	4.4	819	5.9	生存 → 未発症

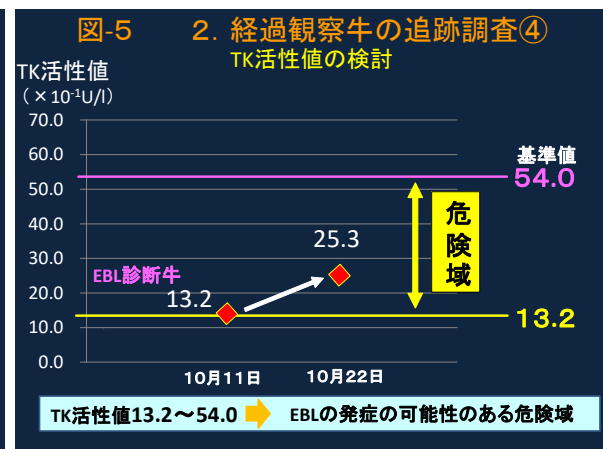
TK基準値: 54.0

表-3 2. 経過観察牛(No.4)の追跡調査②
TK活性値が低く解剖後にEBL診断牛の血液検査結果の比較

項目	初診時	解剖時(11日後)
白血球数 (個/ μl)	4,200	3,400
末梢リンパ球数 (個/ μl)	3,276	2,142
異型率(%) (異型リンパ球/ リンパ球)	2.6	17.5
LDH (IU/ μl)	1,582	2,084
TK活性値 ($\times 10^{-1} \text{U/l}$)	13.2	25.3

TK基準値54.0
※初診時、解剖時ともにTK活性値は基準値以下を示す

認められた。このため、基準値以下を示した場合でも、診断牛が初診時に示したTK活性値 $13.2 \times 10^{-1}U/1$ から $54.0 \times 10^{-1}U/1$ の間はEBLの発症の可能性のある危険域として考え、複数回の検査が必要であるものと思われた（図-5）。



検討3：検討1、検討2で得られた結果をもとに、BLV抗体陽性牛の新たな更新基準への活用について陽性牛のTK活性値の測定を行い新たな更新基準として活用できるか検討を行った。

今回、検討を行った農場では、黒毛和牛繁殖母牛を145頭飼養。平成25年度よりBLV清浄化の取組開始し、BLV陽性群と陰性群を直線距離は1.4km離れた牛舎で分離飼育を実施している。対策としては、①自家保留牛確保対策、②初乳感染防止対策、③抗体陰性牛陰性維持対策及び④ハイリスク牛・準ハイリスク牛及びBLV陽性子牛連続娩出母牛早期淘汰指導を実施していたが、毎年BLV発症または疑い事例が発生することから、新たな更新基準としてこれらの牛を早期発見し更新できないか検討を行った。

BLV抗体陽性牛21頭について、TK活性値を測定したところ基準値54.0より高い値を示す個体は摘発できなかったが、TK活性値 $39.7 \times 10^{-1}U/1$ 、 $29.7 \times 10^{-1}U/1$ と上記で設定した危険域以上を示す個体が2頭確認できた（図-6）。

これら2頭の血液検査結果では、2頭ともに異形リンパ球の出現はわずかであったが、1頭でリンパ球増多症となっていた（表-4）。

今後これら2頭については追跡調査を実施し、TK活性値の上昇等が確認されれば更新牛とする予定である。

【まとめ及び考察】

今回、TK活性値を測定しEBL発症診断への有効性が確認された。検討に用いた血清において、EBLと診断または血液検査で強く疑われた群ではTK活性値が基準値 $54.0 \times 10^{-1}U/1$ よりも高い値を示し、EBLを否定した群及びBLV抗体陰性群ではTK活性値が基準値 $54.0 \times 10^{-1}U/1$ よりも低い値を示した。このことから、TK活性値が基準値 $54.0 \times 10^{-1}U/1$ 以上を示した場合、臨床症状、末梢リンパ球増多、異形リンパ球の出限、LDH値等と総合的に判断することにより、EBLの発症診断は可能と思われた。

一方で、血液検査でEBL発症の判定ができず経過観察とした群の6頭の内1頭で、TK活性値は基準値以下の $13.2 \times 10^{-1}U/1$ であったにもかかわらず、病理解剖によりEBLと診断された。このため、TK活性値が基準値以下を示した場合でも、 $13.2 \sim 54.0 \times 10^{-1}U/1$ を示した場合はEBL発症の可能性があり否定は困難であると思われた。

次に、TK活性値の新たなBLV抗体陽性牛の更新基準への応用について、BLV清浄化に取り組む農場において検討を行った結果、基準値よりも高いTK活性値の個体は確認できなかったが、危険域と設定したTK活性値 13.2×10^4 U/1以上を示した個体が2頭確認された。この2頭については、今後追跡調査を行い更に検討することとした。

今後、調査件数を重ね検討することにより、EBLの早期発症診断や更新基準の応用につながるものとする。

【参考文献】

- 1.中川己津英 他、チミジンキナーゼ活性値を用いた牛白血病の診断法、家畜診療 64、219-226(2017.4)
- 2.猪熊 壽 他、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、13-16 (2013)
- 3.坂本 礼央 他、血清チミジンキナーゼ活性測定により早期摘発した地方病性牛白血病罹 患牛の1例、日獣会誌 63、191-193 (2010)