

# 16 牛白血病感染リスク評価に向けたリンパ球数簡易測定法の検討

東青地域県民局地域農林水産部青森家畜保健衛生所

○齋藤 豪 林 敏展  
相馬 亜耶 水島 亮  
菅原 健 太田 智恵子  
中村 成宗 中島 聡  
盛田 淳三

## 1 はじめに

地方病性牛白血病は牛白血病ウイルス（以下、BLV）を原因とした疾病で、主にアブなどによる水平感染で伝播する。発症牛では眼球突出、リンパ節の腫大やリンパ腫、臨床症状が見られないBLV感染牛でも持続性リンパ球増多症などの症状が見られる。しかし、半数以上のBLV感染牛は発症せずに無症状キャリアーとなることから摘発・淘汰が進まず、地方病性牛白血病の発生報告は増加している。

そのため牛白血病対策のためにリンパ球数を測定しECの鍵などにより感染リスク評価が行われるが、多検体のリンパ球数の測定には時間と労力が必要となる。

そこで今回短時間、容易に多検体のリンパ球数を測定できる簡易法（以下、簡易法）を検討したので、その概要を報告する。

## 2 簡易法について

従来のリンパ球数の測定方法（以下、従来法）は、自動血球計数装置により白血球数を測定後、血液塗抹標本を作成し固定、染色、鏡検を行い、白血球百分比からリンパ球数を算出する方法である。これに対し、簡易法では血液等をチューブに分注し、遠心、分離さ

れたリンパ球を自動血球計数装置で測定するため、従来法より省力化される。

リンパ球の分離方法を図1に示す。仕切り板のついたヒト用リンパ球分離チューブに血球分離溶液と抗凝固処理血液を入れ1000G、15分遠心すると、比重の差によりリンパ球とその他の血球成分の間に分離溶液が入り込み、リンパ球が分離される。

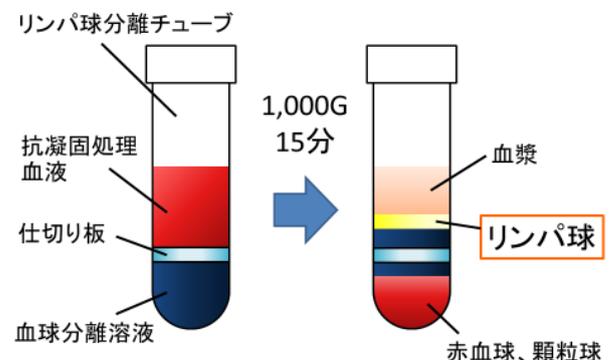


図1 リンパ球の分離方法

しかし、リンパ球分離チューブの使用方法通りに、供試血液を6mL添加し遠心したところ、リンパ球以外の血球成分が仕切り板を越えてしまいリンパ球数を測定することができなかった。そのため、血球分離溶液と分離チューブを牛血液に用いるための検討が必要と考えられ、最適血液量の検討、次に従来法と簡易法とで測定したリンパ球数等の比較を行

った。

### 3 材料

#### (1) 供試血液最適量の検討

抗凝固処理した牛血液、市販のヒト用血球分離溶液、ヒト用リンパ球分離チューブを材料として用いた。

#### (2) リンパ球数等の比較

BLV 抗体陽性牛、陰性牛が同居する農家全頭の血液46検体を材料として用いた。

### 4 方法

#### (1) 供試血液最適量の検討

分離溶液を 3mL と牛血液それぞれ 1mL、2mL、3mL、4mL を分離チューブに入れ 1000G、15分で遠心し、リンパ球のみ分離できる最適血液量を検討した。

#### (2) リンパ球数等の比較

従来法と簡易法で測定したリンパ球数、所要時間、塗抹標本を比較した。

### 5 結果

#### (1) 最適血液量の検討

遠心後の分離チューブを図2に示した。リンパ球以外の血球成分が仕切り板を超えず、分離溶液がリンパ球とその他の血球成分の間に入り込んでいたのは、供試血液量が 2mL の場合であった。

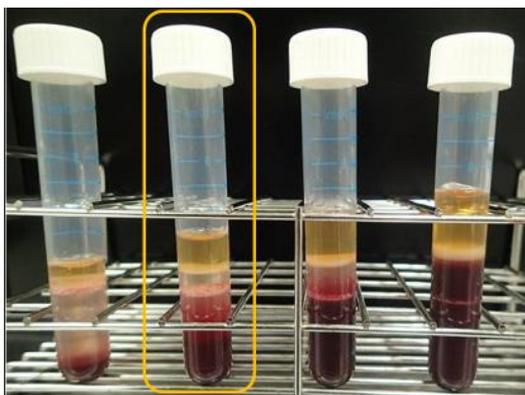


図2 遠心後（左から 1mL ~ 4mL）

#### (2) リンパ球数等の比較

従来法と簡易法で測定されたリンパ球数を図3に示した。リンパ球数を比較したところ、相関係数が0.96、危険率は0.01未満であり強い相関が有意に認められた。

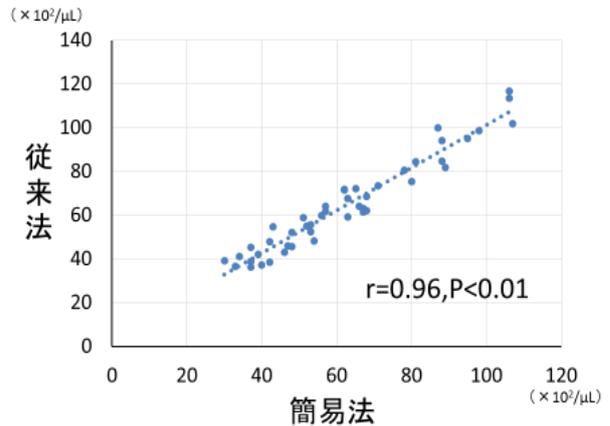


図3 測定されたリンパ球数の比較

次に検体数が 1 検体、10 検体、50 検体の場合の所要時間について比較した結果を表1に示した。1 検体の場合、簡易法は従来法より 54分早くリンパ球数が測定された。同様に10 検体、50 検体の場合の所要時間の差は95分、250 分となり、簡易法は検体数が多いほど短時間でリンパ球数が測定された。

表1 所要時間の比較

検体数	1		10		50	
	従来法	簡易法	従来法	簡易法	従来法	簡易法
作業: 所要時間 (分)	測定:0.5	分注:1	測定:5	分注:5	測定:25	分注:50
	塗抹・固定:5	遠心:15	塗抹・固定:5	遠心:15	塗抹・固定:5	遠心:15
	染色:60	測定:0.5	染色:60	測定:5	染色:60	測定:25
	鏡検:5		鏡検:50		鏡検:250	
計	70.5分	16.5分	120分	25分	340分	90分
差	54分		95分		250分	

血液塗抹標本の観察像は図4及び図5のとおりである。血液塗抹標本を比較すると、従来法の塗抹ではリンパ球以外にも赤血球、好中球、好酸球などが観察されるが、簡易法の

塗抹ではリンパ球のみが観察された。

さらに牛白血病と診断された牛の血液塗抹を比較したところ、簡易法では異型リンパ球が従来法に比べて容易に観察され、正常、異型どちらのリンパ球も分離されていた。

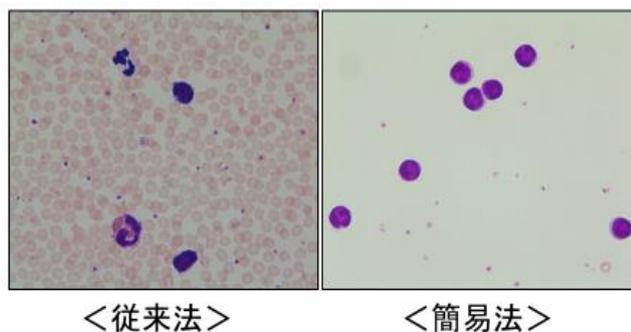


図4 血液塗抹標本の比較

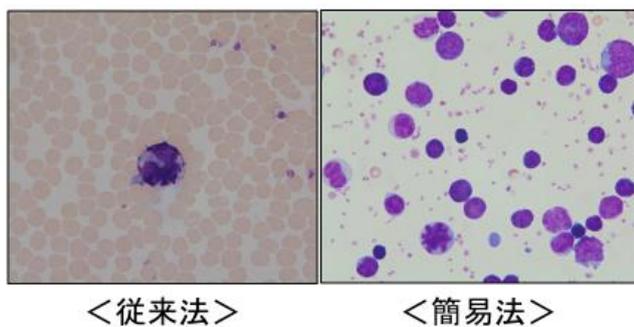


図5 牛白血病と診断された牛の血液塗抹標本

## 6 リンパ球数と BLV 遺伝子量の比較

リンパ球数と BLV 遺伝子量に相関関係があるという報告<sup>1)</sup>から、リンパ球数と BLV 遺伝子量の相関性を確認した。

### (1) 材料

BLV 遺伝子陽性の牛血液12検体を材料とした。

### (2) 方法

全血から市販キットで抽出された DNA について、市販のウシ白血病ウイルス検出キット (TaKaRa) を用いてリアルタイム PCR を実施し、BLV 遺伝子量を測定した。また、リンパ球数を簡易法により測定した。

## (3) 結果

測定されたリンパ球数と BLV 遺伝子量を図6に示した。相関係数は0.11、危険率は0.05未満であり今回は相関がみられなかった。

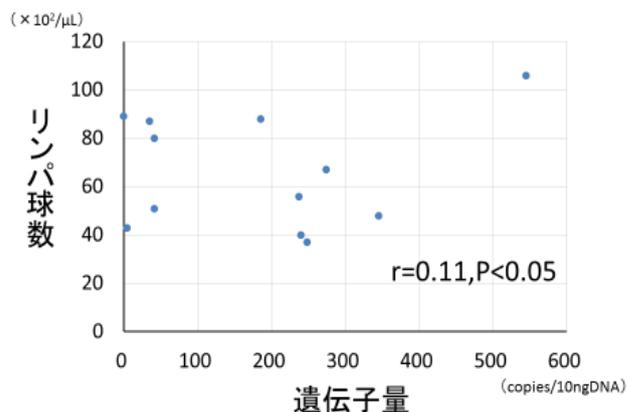


図6 リンパ球数と BLV 遺伝子量の比較

## 7 まとめ

以上の結果から簡易法における最適血液量は2mlであり、測定されたリンパ球数では従来法と高い相関がみられたため、簡易法は従来法と同等の測定方法であった。また、多検体を短時間に測定することができたことから、簡易法を用いることで効率的にECの鍵などによる感染リスク評価を行うことができ、牛白血病対策へ有用であると考えられた。

さらに分離リンパ球の塗抹標本ではリンパ球のみを鏡検することが可能なため、異型リンパ球が容易に観察され、牛白血病の診断へ利用できる可能性が示唆された。

なお、今回はリンパ球数と BLV 遺伝子量に相関がみられなかったが、標本数などの要因を考慮しデータを積み重ね、今後も検討する必要があると考えられる。

## 参考文献

- 1) 稲垣 華絵ら：末梢血リンパ球数を指標とした牛白血病伝播リスク牛の選別と感染防止対策への応用，第58回家畜保健衛生業績発表会集録（2010）