総説 Review

黒毛和種牛の赤血球膜蛋白異常症に関する 病態生理学および遺伝学的研究

伴 顕*

山形県農業共済組合連合会 最上家畜診療所

Studies on pathobiology and Genetics of Red
Cell Membrane Protein Deficiency in Japanese Black Cattle.

Akira Ban*

Yamagata Prefecture Federation of Agricultural Mutual Aid Association

要 約 1991～1993年に、溶血性貧血の黒毛和種新生子牛6例に遭遇した。症例は、虚弱で起立不能であった。血液像は赤血球の central pallor の消失した球状赤血球が多数観察され赤血球脆弱性が亢進していた。症例の赤血球の異常について、自己免疫性疾患、赤血球内酵素、膜蛋白質について検討を行った。その結果、赤血球膜蛋白質 (Band-3) の欠損による「赤血球膜蛋白質異常症」であることが分かった。赤血球膜蛋白質異常の疾患は、ヒトでは常染色体優性遺伝での発症が知られている。本症の遺伝性を検討するために、母牛6頭と非血縁牛15頭について、臨床検査、血液・生化学的検査、赤血球形態、赤血球脆弱性、赤血球膜蛋白質の分析を行った。母牛6頭は非血縁牛より球状赤血球の出現率が高く、赤血球脆弱性も母牛では非血縁牛に比べ軽度亢進していた。新鮮血および24時間解置血による食塩水濃度0.5%溶血度は、非血縁牛に比べ母牛で有意 ($p < 0.01$) に高かった。バンド-3と4.2の割合について検討を行った結果、母牛は、症例と非血縁牛の中間型であった。この結果から、遺伝子型と症例のようにバンド-3が完全欠損した個体を (AA)、母牛のように中間型を (Aa)、非血縁牛のように100%の発現を (aa) と仮定した遺伝様式の検討では、全家系で「常染色体不完全優性遺伝」によって発症する仮説が成立した。したがって本症は「遺伝性赤血球膜蛋白質異常症」と分かった。本症は、赤血球脆弱性試験で遺伝子型の推定が可能のため、A牧場において繁殖牛の遺伝子型診断を行い、全母牛に因子を保有しないと推定した種雄牛の交配を計画した。コントロール前後の出生子牛の遺伝子型頻度を比較した結果、出生子牛にホモ接合体は出現せず、ヘテロ接合体の遺伝子型頻度もコントロール前後で54%から22%へ減少した。以上のことから、臨床現場において遺伝的コントロールが可能であることが証明された。

ABSTRACT Six newborn Japanese Black calves with severe hemolytic anemia were noted from 1991 to 1993. All calves showed typical spherocytosis in which most of the cells were microcytic spherocytes deprived of the central pallor, and it was also clear that osmotic fragility of their red cells was significantly increased. Autoimmune disorder, enzymopathies disorder, red cell membrane protein were examined, to

キーワード：遺伝性球状赤血球、牛、溶血性貧血、バンド-3

Key Words: band-3, cow, hemolytic anemia, hereditary spherocytosis

*Correspondence to: Miyauchi 276, Itsukamachi, Shinjo 996, Japan

(〒996 新庄市五日町宮内276 Tel. 0233-22-2644)

investigate abnormalities of Red cells. In consequence it was made clear that 6 cases were "Red blood cell membrane protein abnormality" with band-3 deficiency. It was clear that, hereditary spherocytosis in human was occurred in autosomal dominant transmission. Red cell membrane protein deficiency in Japanese black cattle. To reveal that these cases were occurred in hereditary, clinical test, blood and biochemical examinations, shape of red cells, osmotic fragility test and analysis of membrane proteins were performed in 6 dams and 15 non-consanguinity calves. There was significantly higher number of spherocyte in the 6 dams as compared to the non-consanguinity calves. There was significantly mild increased osmotic fragility in the 6 dams compared to the non-consanguinity calves. Osmotic fragility of dams were significantly higher than that of non-consanguinity normal cattle in a rate of hemolysis in 0.5% NaCl at fresh and 24 hour incubated blood ($p<0.01$). Particularly, to compare the existent ratio of band-3 and 4.2 in each groups, existent ratio of band-3 and 4.2 in dams showed 63%, 80% respectively. It was made clear that those of dams developed middle value between affected calves and non-consanguinity calves. Based on their findings, mode of hereditary was examined. It 6 affected calves (band-3 deficiency) were Homotype (AA), dams and a part of siblings (middle values of band-3) were Hetrotype (Aa), non-consanguinity calves (complete development of band-3) were non-carrier type (aa), these cases were determined as "Autosomal incomplete dominant transmission" in all cases. According to assum genotype used by osmotic fragility test, cows for production in A fame were diagnosed genotype and all cows were mated with bulls assumed non-carrier after control. The effect of these control were observed, according with comparison of genotype of newborn calves during pre-control (1991~1992) and post-control (1993~1994). Frequency of genotype changed form 54% to 22% before and after control. When genotype of cows and bulls were diagnosed respectively, possibility of hereditary control was proved in clinical field.

I. はじめに

1991~1993年の間、強度の溶血性貧血と黄疸を伴う黒毛和種新生子牛6例に遭遇した。家畜において溶血性貧血の原因については、赤血球外と、赤血球内の異常が知られている〔11, 15〕。赤血球外の異常としては細菌、ウイルス、血液寄生虫などの感染や同種、自己免疫性疾患の抗体依存性による血球破壊、化学物質や動植物性毒、機械的または物理的要因が挙げられる〔3, 11, 16〕。赤血球内の異常としては、赤血球内酵素異常、細胞膜の異常、ヘモグロビンの異常などである〔11, 15〕。今回の6例について赤血球外の異常としては、抗体依存性が最も疑われた。また赤血球内の異常としては赤血球内酵素異常が考えられ、それぞれについて検討したところ、抗体依存性および赤血球内酵素異常は否定され、赤血球膜異常が原因として示唆された。ヒトでの同様な疾患では、遺伝性球形赤血球症〔1, 4, 5, 6, 7-10, 13, 17, 18〕、遺伝性楕円赤血球症〔4, 13, 17, 18〕が知られている。家畜では、シロアシネズミの遺伝性球形赤血球症〔14〕、犬の遺伝性楕円赤血球症〔16〕などが知られているが、牛での報告例はない。そこで、6症例について、臨床症状、血液・生化学的検査、赤血球脆弱性試験、光学のお

よび走査型・透過型電子顕微鏡により赤血球の形態観察を行い、さらに赤血球膜蛋白質について検討を加えた。また、母牛、同胞牛についても同様な検査を行い遺伝性について検討し、臨床現場の遺伝的コントロールの可能性について試みた。

II. 検査項目・方法

1) 臨床検査

検査項目は、一般的臨床検査を実施した。また、出生時体重、哺乳状況および初診までの状態について聞き取り調査をした。

2) 血液検査および血液生化学的検査

採血は頸静脈より行い、抗凝固剤は、EDTAを用いた。初診時、全症例について採血を行い、採血後直ちに全症例について定法に従い赤血球数、白血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量、赤血球指数 (MCV, MCH, MCHC) について実施した。生化学的検査は、血清総蛋白量、総胆汁酸濃度、総ビリルビン濃度、抱合型ビリルビン濃度、血糖値、総コレステロール値、血清リン脂質濃度について測定した。

3) 光学顕微鏡による赤血球形態の観察

全症例について血液塗抹標本、新鮮血未固定標本による形態観察を行った。塗抹標本は、マイ・ギムザ染色を行い、形態観察を行った。また、未固定の状態で新鮮血を位相差顕微鏡を用いて観察した。

4) 電子顕微鏡による赤血球形態観察

採血後、血液を0.1モル磷酸緩衝液 (pH7.4) にグルタルアルデヒド液を0.5%になるように加えた液で固定した。その後、定法にしたがい、走査型電子顕微鏡 (走査型; 日立S-2300) で観察を行った。また透過型電子顕微鏡 (透過型; 日立H-600) による観察も行った。

5) 赤血球脆弱性試験

赤血球脆弱性を調べる目的で、Parpart法を用いpH 7.4に調整した0.20から0.90%の食塩水 5 mlに新鮮血50 μ lを加え各濃度の完全溶血の時点をも100%として表現した。

6) 免疫性疾患と赤血球内酵素について

a) 抗グロブリン試験

試薬にIgG, IgA, IgMを含む抗ウシグロブリン血清を用い、直接抗グロブリン試験に供した。症例赤血球を生理食塩水で3回洗浄後2%血球浮遊液を作成し被検液とした。別の試験管に抗ウシグロブリン血清と被検液を等量数滴混合し直ちに1000rpm, 1~2 min遠心分離後肉眼的に凝集の有無を確認した。対照として健康子牛赤血球についても同様に行った。間接抗グロブリン試験には、症例赤血球の2~5%血球浮遊液を作成し、症例の血清に等量混合したのち、37℃30~60分加温した。これを生理食塩水で3~4回遠心洗浄したのち2%血液浮遊液を作成した。以下直接法と同じ操作を行い判定した。

b) 赤血球内酵素の判定

赤血球内酵素の測定は、グルコース 6 リン酸 (G-6-PD) およびピルビン酸キナーゼ (PK) について実施した。

G-6-PD: 血液を採取し赤血球数をあらかじめ測定した。試薬にG6PD HUVテストを用い、赤血球1個あたりの活性値を求めた。

PK: PKはADPとMg, Kイオンの存在下において反応しピルベートとATPを生成する事に基づく、蛍光を用いた定性分析により判定した。

7) 赤血球膜蛋白質の検討

全例の坑凝固血液を遠心分離後生理食塩水を加え洗浄{(3000rpm, 5 min) $\times$ 3}、パフィーコートと上清をアスピレートする。その後10mM Tris-HCl pH7.4を加え溶血後、15,000rpm, 20min 遠心分離を行い上清をアスピレートし、ヘモグロビンが消失するまで続けサン

プルを作成した。SDS-PAGEは、Bio Rad社製「レディーゲルJ」7.5%を使用した。電気泳動は200Vで約45分間実施し、Coomassie Brilliant Blueによる染色を行った。また、染色したゲルで、デンシトメトリーを行った。

8) 遺伝性に関する検討

a) 症例の母牛および非発症牛の赤血球に関する検討

遺伝性の検討を症例の母牛6例および非発症牛の血液・生化学検査、光学および電子顕微鏡による赤血球形態の観察、赤血球脆弱性試験、赤血球膜蛋白質の分析を行った。

b) 遺伝子型と遺伝様式の検討

症例および父母の遺伝子型を確認するために家系調査を行った。供試牛は、症例6頭、症例の母牛6頭および症例の同胞牛12頭を用いた。供試牛全例について赤血球脆弱性試験を指標に症例(AA)、保因牛(Aa)、正常牛(aa)の遺伝子型を診断した。さらに全頭の血統について調査を行い、家系図を作成し検査結果に基づいて家系図上に記載し、症例に関わった種雄牛、母牛および同胞牛の遺伝子型、遺伝様式について検討した。

9) 遺伝的コントロールに関する検討

調査期間は、1991年から1994年の4年間で、遺伝的コントロール前(1991~1992)と、コントロール後(1993~1994)に分けた。供試牛は本症発症農家であるA農場で飼育されている母牛7頭と、これら母牛より生産された子牛22頭(雄: 1頭、雌: 21頭)である。コントロール前では使用する種雄牛の選択は調査対象農家の自主的判断により行われた。生産された子牛について血統調査を行い、臨床的観察ならびに赤血球脆弱性試験を実施するとともに、赤血球形態を観察し、前述の方法に基づいて本症の保因状況を調査した。調査対象牛群の遺伝子頻度ならびに遺伝子型頻度を求めた。遺伝的コントロールは、該当母牛が分娩した後、コントロール前に行った本症の保因状況の調査に基づき、次回人工授精時にヘテロ接合体同士の交配を避ける形で実施された。この交配により生産された子牛について、出生した時点で臨床的観察ならびに赤血球脆弱性試験を実施するとともに、赤血球の形態を観察し、前述の方法に基づき本症の保因状況を調査した。

III. 成績および結果

1) 臨床検査成績

全症例で出生直後は起立不能であった。性別は、雄4頭、雌2頭であり出生時体重は、19~27kgであった。出

表1. 症例の概要

症例	1	2	3	4	5	6
性別	♂	♂	♂	♀	♀	♂
生時体重(kg)	27	25	20	22	19	20
生存期間(日)*700<*700<	90	5	5	2		

*生存したが発育不良であった

表2. 症例の臨床所見

症例	1	2	3	4	5	6
食欲不振	+	+	+	+	+	+
呼吸速拍	+	+	+	+	+	+
心悸亢進	+	+	+	+	+	+
貧血	+	+	+	+	+	+
黄疸	+	+	+	+	+	+
血色素尿	+	+	+	+	ND	ND
起立不能	+	+	+	+	+	+

ND; 測定不能

生時の臨床症状は、表1と2の通りである。全症例で呼吸の速迫、心拍数の増加と可視粘膜の著名な黄疸、蒼白が認められた。

2) 血液・生化学的検査成績

全症例で、赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量の低値が著明に認められた(表3)。分離された血清は、全症例で高度の溶血を示し、総胆汁酸、T.Bilの増加、なかでも非抱合型Bilの著しい上昇が認められた(表4)。

3) 光学顕微鏡による赤血球形態観察成績

各症例とも小球性で、赤血球中心部の陥凹に一致したcentral pallorが消失した赤血球が観察された(図1)。新鮮血末固定標本の位相差顕微鏡の観察では、症例赤血球は、大小不同が著しく、辺縁が不規則な球状として観察された(図2)。

4) 走査型・透過型電子顕微鏡による赤血球形態観察成績

症例1～3について赤血球の形態を検討した。赤血球

表3. 症例の血液検査成績

症例	1	2	3	4	5	6
RBC($10^4/\mu l$)	446	255	323	401	—	325
WBC($/\mu l$)	11500	11300	11300	8600	—	25900
Ht(%)	18	13	15	15	—	17
Hb(g/dl)	3.6	4.4	5.6	4.7	—	5.5
MCV(fl)	40.4	51.0	46.4	37.4	—	52.3
MCH(pg)	8.1	17.3	17.3	11.7	—	16.9
MCHC(%)	20.0	33.8	37.3	31.3	—	32.4

症例5; 測定不能

表4. 症例の血液生化学的検査成績

症例	1	2	3	4	5	6
TP(g/dl)	8.1	5.1	5.7	6.2	5.1	6.0
T.BA($\mu m/dl$)	76	56	58	419	232	25
T.Bil(mg/dl)	1.9	7.9	1.2	16.9	11.6	5.1
U.Bil(mg/dl)	1.0	6.5	0.4	3.7	9.9	4.2
T.Chol(mg/dl)	52	81	46	11	19	18

T.BA: 総胆汁酸, U.Bil: 非抱合型ビリルビン

辺縁は不整で、90%以上が、有口、あるいは球状を呈していた。また赤血球膜表面は粗造でピンホールが多数観察された。さらに、涙滴状の小球形を呈する鋭に突出部を持つ赤血球も観察された。透過型電子顕微鏡での観察では、赤血球内に1から数個の大小の空胞を持つ赤血球が観察された(図3、4)。

5) 赤血球脆弱性試験成績

全症例の新鮮血の赤血球浸透圧脆弱性試験を実施したところ、全例で正常範囲を著しく逸脱していた。各食塩水濃度における溶血度について、16頭の正常な子牛と全症例の値を比較すると、症例では0.5%以上の食塩水濃度において、赤血球膜脆弱性の亢進が認められた(表5、図6)。

6) 自己免疫性疾患、赤血球内酵素の検査成績

直接・間接クー姆斯試験を実施したが、異常は認められなかった。また赤血球内酵素系はG-6-PDは対照牛と

症例2

正常子牛

図1. 血液塗抹の光学顕微鏡による観察、症例2ではセントラルパーラの消失した赤血球がほとんどである。

症例 3

正常子牛

図 2. 新鮮血の位相差顕微鏡による観察、症例 3 の赤血球はほとんどが球状赤血球で占めていた。

表 5. 症例新鮮血の脆弱性試験成績

		各食塩水濃度の溶血度（％）							
症	例	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
	1	100	100	97.5	100	96.7	94.4	75.6	75.1
	2	100	100	100	100	99.8	83.0	30.6	1.0
	3	100	100	100	99.5	97.2	82.6	24.4	14.1
	4	100	100	100	100	94.1	85.4	34.0	0
	5	100	100	100	98.5	96.0	92.0	71.0	30.2
	6	100	100	100	98.5	98.5	98.5	75.5	41.3
平	均	100	100	99.6	99.4	97.0	89.3	51.8	27.0
標準偏差		0	0	0.9	0.7	1.8	6.0	22.4	26.2
正	常 ¹⁾	100	99.1	92.4	69.3	15.0	1.0	0.2	0.1
(n =16)		0	1.8	8.3	24.6	8.8	0.6	0.2	0.1

¹⁾ 平均±標準偏差

図 3. すべての赤血球は細胞表面に多数の小孔をともなった球状赤血球であった (SEM; 症例 2)。

図 5. 赤血球細胞の内部に数個の小さな空胞が認められた (TEM; 症例 1)。

図 4. 赤血球細胞の表面には涙滴状突起もつ赤血球も存在した (SEM; 症例 1)。

差が見られなかった。ピルビン酸キナーゼ定性試験は、陽性であった (表 6、7)。

7) 赤血球膜蛋白質の検査成績

全例で構造蛋白質群の一つである、バンド-3の完全欠損が確認された。さらにバンド-4,1を1.00として、その他の各バンドの発現割合を算出し正常な子牛と比較したところ、症例牛のバンド-4,2は痕跡程度の発現であった。また、スペクトリン、アクチン、アンキリンの発現は正常な子牛のおよそ50%程度であった。(表 8、図 7)。

8) 遺伝性に関する検討成績

図6. 症例の新鮮血脆弱性試験成績
* ; 編み目は正常範囲

表6. 症例の免疫学的検査成績

症例	1	2	3	4	5	6
直接クームス試験	—	—	—	—	—	—
間接クームス試験	—	—	—	—	—	—

表7. 3 症例の赤血球内酵素の検査成績

症例	1	2	3	正常牛(n=6)
G-6-PD ¹⁾ (IU/10 ¹² RBC)	176	152	136	157±56
ビルビン酸キナーゼ	+	+	+	+

¹⁾G-6-PD ; グリコース 6 リン酸

表8. 症例子牛における各膜蛋白bandの濃度割合

バンド	症例子牛 (n=3)	正常子牛 (n=5)
1	2.90±0.74	5.60±1.01
2	2.20±0.33	4.59±0.79
3	—	5.10±0.60
4.1	1.00	1.00
4.2	—	1.05±0.12
5	0.63±0.29	1.30±0.15
6	0.21±0.11	0.70±0.16
7	0.78±0.13	0.35±0.11
8	0.65±0.29	0.23±0.05
Hb	1.20±0.54	1.46±0.42

* バンド4.1に対する各蛋白濃度比較

a) 症例の母牛および非発症牛 (正常牛) の赤血球に関する検討成績

血液・生化学検査成績

症例の母牛6例ならびに対照とした健康な母牛8例について血液・生化学的検査を実施した。症例母牛と対照の間には有意な差は認められなかった (表9)。

赤血球の形態観察成績

塗抹、未固定標本による赤血球形態の観察を行い、球状赤血球の出現頻度について検討したところ、未固定標本による観察では、正常牛13.0±7.2%、症例母牛46.8±14.8%が球状であり、症例母牛で有意に頻度が高かった (表10)。

赤血球脆弱性試験成績

新鮮血、24時間孵置血について赤血球脆弱性試験を症

図7. 症例の赤血球膜蛋白SDS-PAGE電気泳動像

表9. 正常牛と6症例ならびに症例母牛の血液・生化学的検査成績

	症例牛(n=6)	症例の母牛(a:n=6)	正常牛(b:n=8)
RBC($10^4/\mu\text{l}$)	350 $\pm$ 67 ^{a:*, b:*}	768 $\pm$ 110 ^{b: NS}	759 $\pm$ 115
WBC($/\mu\text{l}$)	13720 $\pm$ 6183 ^{a, b: NS}	8250 $\pm$ 2933 ^{b: NS}	8125 $\pm$ 164
Ht(%)	15.6 $\pm$ 1.7 ^{a:***, b:***}	36.5 $\pm$ 3.5 ^{b: NS}	34.0 $\pm$ 3.7
Hb(g/dl)	4.7 $\pm$ 0.7 ^{a:***, b:***}	14.1 $\pm$ 2.8 ^{b: NS}	12.5 $\pm$ 1.4
MCV(fl)	45.5 $\pm$ 5.8 ^{a, b: NS}	47.8 $\pm$ 2.8 ^{b: NS}	46.8 $\pm$ 4.1
MCH(pg)	14.5 $\pm$ 3.7 ^{a, b: NS}	18.5 $\pm$ 3.6 ^{b: NS}	16.8 $\pm$ 1.3
MCHC(%)	30.9 $\pm$ 5.8 ^{a, b: NS}	38.6 $\pm$ 6.9 ^{b: NS}	36.1 $\pm$ 0.9
TP(g/dl)	6.0 $\pm$ 1.0 ^{a, b: NS}	7.2 $\pm$ 0.4 ^{b: NS}	7.6 $\pm$ 0.6
T.BA($\mu\text{m/dl}$)	144 $\pm$ 139 ^{a, b: NS}	37.5 $\pm$ 18.5 ^{b: NS}	25.2 $\pm$ 12.6
T.Bil(mg/dl)	7.4 $\pm$ 5.5 ^{a:*, b:***}	0.12 $\pm$ 0.02 ^{b: NS}	0.12 $\pm$ 0.02
U.Bil(mg/dl)	4.3 $\pm$ 3.5 ^{a:*, b:*}	0.04 $\pm$ 0.01 ^{b: NS}	0.04 $\pm$ 0.02
T.Chol(mg/dl)	37.8 $\pm$ 24.5 ^{a:*, b:***}	145.0 $\pm$ 12.7 ^{b: NS}	77.8 $\pm$ 6.5

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. NS:有意差を認めず

表10. 位相差顕微鏡観察での症例と症例の母牛ならびに正常牛における球状赤血球の出現頻度

	球状赤血球の出現率(%)
症 例(a:n=6)	96.4 $\pm$ 1.3 ^{b:****, c:****}
母 牛(b:n=6)	46.3 $\pm$ 14.8 ^{c:****}
正常牛(c:n=9)	13.0 $\pm$ 7.2

: $p<0.001$, *: $p<0.0001$

例母牛と正常牛および同胞牛で比較した。新鮮血で食塩水濃度0.5%の溶血度は母牛群95.9 $\pm$ 5.5%、正常牛58.0 $\pm$ 21.8%であった。また正常牛24時間孵置血の溶血度は、食塩水濃度0.5%から0.7%の間で症例の母牛の溶血度より有意($p<0.01$)に低値であった。症例の同胞牛(12

頭)の検査成績では7例において母牛と同様な検査成績が得られた。以上の結果から症例の母牛全例と同胞牛の7頭で赤血球脆弱性が亢進していると診断された(図8、9)。

赤血球膜蛋白質に関する検査成績

正常牛、症例母牛、症例について比較検討したところ、正常牛と症例母牛のSDS-PAGE電気泳動像では、バンド4.1を1としてデンストメトリー法により、バンド-3、バンド-4.2の出現割合について検討したところ、症例母牛では正常牛に比べバンド-3ならびにバンド-4.2の量的減少が認められた(表11、図10)。

b) 遺伝子型と遺伝様式の検討成績

図8. 症例母牛6頭の24時間孵置血脆弱性試験成績
編み目の範囲は正常牛の範囲

図9. 症例同胞牛12頭の24時間孵置血脆弱性試験成績

図10. 症例と母牛ならびに正常牛における赤血球膜蛋白のSDS-PAGE検査成績

表11. バンド4.1に対する症例と母牛ならびに正常牛それぞれのバンド発現量の比較

バンド	症例(n=3)	母牛(n=5)	正常牛(n=5)
1	2.90±0.74	4.46±0.51	5.60±1.01
2	2.20±0.33	3.51±0.19	4.59±0.79
3	—	3.21±0.53	5.10±0.60
4.1	1.00	1.00	1.00
4.2	—	0.84±0.10	1.05±0.12
5	0.63±0.29	1.08±0.17	1.30±0.15
6	0.21±0.11	0.75±0.17	0.70±0.16
7	0.78±0.13	0.46±0.12	0.35±0.11
8	0.65±0.29	0.14±0.04	0.23±0.05
Hb	1.20±0.54	0.79±0.37	1.46±0.42

溶血性貧血、球状赤血球、赤血球脆弱性、バンド-3欠損に注目し、症例ならびに症例の母牛と同胞牛について表12のように遺伝子型を仮定し、家系図を作成したところ図11の如くなった。症例No.2の父牛は、ホモ接合体とヘテロ接合体を生産していた。また、症例3～6の父牛は、ヘテロ接合体と仮定された母牛との交配の結果、ホモ接合体を生産していた。6頭のホモ接合体と仮定された症例は、雄4頭、雌2頭であった。

9) 遺伝的コントロールに関する成績

a) コントロール前の遺伝子頻度および遺伝子型頻度

調査の対象の母牛は、7頭で、このうち4頭が脆弱性試験で保因牛と診断された。その他は非保因牛と診断された(表13)。そして、これら母牛に交配された種雄牛は、同一家系の種雄牛が複数使用された。その結果、生産された子牛は合計で12頭であった。調査結果から生産された子牛の遺伝子型はAA:2頭、Aa:9頭、aa:1頭である(図12)。この結果から、対立遺伝子(A:a)の頻度をpおよびqとすると $p=0.54$ 、 $q=0.46$ の結果が得られた。この集団での遺伝子型頻度の推定を $(p+q)^2$ で求めると $p^2=0.29$ 、 $2pq=0.49$ 、 $q^2=0.21$ 、 $(p^2+2pq+q^2=1)$ の結果が得られた。すなわちコントロール前のこの集団では、本症の発現にあずかる優性対立遺伝子(A)の拡散は54%であり、理論的には100頭中29頭の発症牛(AA)ならびに臨床的には異常はないものの49頭の保因牛(Aa)が生産されると推測された。

b) コントロール後の遺伝子頻度および遺伝子型頻度

表12. 赤血球膜蛋白異常症の特徴と遺伝子型の仮定

検査項目	症例牛	母 牛		同胞牛		正常牛
		(n = 7)		(n = 5)		
溶血性貧血	+++	—	—	—	—	
球状赤血球	+++	++	ND	—	—	
赤血球脆弱性	+++	++	++	—	—	
バンド3欠損	+++	++	ND	—	—	
遺伝子型	ホモ (AA)	ヘテロ (Aa)		非保因牛 (aa)		

ND：検査実施せず

○：正常雌牛，○：ヘテロ雌牛，●：ホモ雌牛
□：正常雄牛，□：ヘテロ雄牛，■：ホモ雄牛
＊：検査実施せず

図11. 赤血球膜蛋白異常症 6 症例家系図

調査対象となった母牛はコントロール前に供した同一個体である。人工授精に用いた種雄牛は遺伝様式から非保因牛と推定された 6 頭であった。調査対象母牛より生産された子牛は合計で 9 頭であった。臨床的観察では全頭に異常は認められなかったが 4 頭の子牛ではヘテロと診断された。調査結果より生産された子牛の遺伝子型は AA：0 頭、Aa：4 頭、aa：5 頭となった (図13)。対立遺伝子の頻度 p および q は、 $p=0.22$ 、 $q=0.78$ となった。コントロール後の集団では、本症の発現にあずかる優性対立遺伝子 (A) の拡散は 22% であり、100 頭中 5 頭の発症牛 (AA) ならびに臨床的には異常はないものの 34 頭の保因牛 (Aa) が生産されると推定された。

VI. まとめ

溶血性貧血を主徴とする黒毛和種の新生子牛 6 例に遭遇した。臨床症状として、呼吸速迫、心拍数の増加、可視粘膜の蒼白または黄疸および起立不能状態が共通していた。血液検査では、赤血球数、Ht 値、Hb 量の著しい減少と生化学的には非抱合型ビリルビン濃度の上昇から溶血性貧血が裏づけられた。赤血球塗抹像では小球性で central pallor の消失した球状赤血球が多数観察され

表13. 供試母牛 7 頭の 24 時間孵置血脆弱性試験成績 (遺伝的コントロール前)

母 牛	各食塩水濃度の溶血度 (%)								
	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	
1 ^{a)}	100	99.5	99.4	97.5	90.3	26.3	0	0	
2	100	100	100	36.5	2.8	0	0	0	
3	100	100	100	57.9	6.6	1.3	0.7	0	
4 ^{b)}	100	100	85.1	84.8	82.1	23.2	4.0	1.0	
5 ^{c)}	100	100	100	100	65.9	10.1	4.3	3.4	
6	100	100	92.9	53.5	4.8	0.75	0.4	0	
7 ^{d)}	100	100	100	100	66.8	15.0	2.2	0	
正 常 牛 n = 15)	100 ±0	99.3 ±1.7	97.1 ±3.7	73.6 ±20.2	12.2 ±9.3	1.1 ±1.0	0.3 ±0.4	0.03 ±0.01	

1)；平均±標準偏差 (n = 15)
a)，b)，c)，d)；ヘテロタイプの母牛

n=12. AA; 2. Aa; 9. aa; 1

$p = \{2(AA) + (Aa)\} / 2n$ $q = \{2(aa) + (Aa)\} / 2n$

p=0.54 q=0.46 (p+q=1)

○: 非保因雌牛, ○: 保因雌牛(ヘテロ接合型), ●: 発症牛(ホモ接合型)

□: 非保因雄牛, □: 保因雄牛(ヘテロ接合型), *: 検査実施せず

図12. 遺伝的コントロール前の母牛より生産された子牛の遺伝子型 (1991~1992)

n=9. AA; 0. Aa; 4. aa; 5

$p = \{2(AA) + (Aa)\} / 2n$ $q = \{2(aa) + (Aa)\} / 2n$

p=0.22 q=0.78 (p+q=1)

○: 非保因雌牛, ○: 保因雌牛(ヘテロ接合型), ●: 発症牛(ホモ接合型)

□: 非保因雄牛, □: 保因雄牛(ヘテロ接合型), *: 検査実施せず

図13. 遺伝的コントロール後の母牛より生産された子牛の遺伝子型 (1993~1994)

た。全症例で、赤血球脆弱性は著しい亢進がみられた。このことから本症例は赤血球の球状化という形態異常とそれに基づく赤血球膜脆弱性の著しい亢進および血管内・血管外溶血に特徴づけられる黒毛和種子牛に発症する特異的な溶血性貧血性疾患であることが明らかになった。赤血球の形態について走査型電子顕微鏡を用い観察を行った。症例では、有口あるいは球状を呈した赤血球がほとんどであった。赤血球の辺縁は不整で欠損孔が確認され、また突出物を持つ涙滴状の赤血球も観察された。免疫性疾患、赤血球内酵素の検査からはいずれも異常は認められず、赤血球膜異常が示唆された。そこで赤血球膜を構成している膜蛋白質をSDS-PAGEにより解析したところ、すべての症例で陰イオン交換輸送体であるバンド-3の完全欠損が確認された。さらに、その他の赤血球膜構成蛋白質も量的に減少していた。その結果、赤血球膜の安定性と変形能が著しく低下し、赤血球の球状化と形態異常が生じたものと考えられた。以上のことから本症にみられた赤血球の球状化と形態異常、赤血球脆弱性の亢進は、赤血球膜主要蛋白質であるバンド-3の完全欠損とその他の蛋白質の減少に起因した「赤血球膜蛋白質異常症」と診断できた。このような赤血球膜蛋白質異常に起因した球状赤血球症は、ヒトでは常染色体優性遺伝で発症することが知られている。そこで本症の遺伝性について

検討するため、母牛6頭と非血縁牛15頭について臨床診断、血液・血液化学検査、赤血球の形態的観察、赤血球脆弱性試験、赤血球膜蛋白質の分析を実施した。臨症的検査、血液・生化学検査結果からは、母牛と正常牛との間に著変は認められなかった。赤血球の形態観察を行ったところ、母牛は血縁関係にない正常牛より、球状赤血球の出現率が明らかに高かった。赤血球脆弱性試験の結果も母牛では正常牛に比較し明らかな亢進を認めた。赤血球膜蛋白質に関しては症例6頭、母牛6頭および正常牛5頭の発現割合について検討を加えた。バンド-4.1の発現量を1.0としてバンド-3の発現割合について比較すると、母牛では63%の発現を認めた。これらの検査結果から、母牛が症例と正常牛の間型の発現をしていることが明らかになった。これらの結果にもとづき、症例の遺伝子型を(AA)、母牛および一部の同胞牛を(Aa)、また、非血縁牛を(aa)と仮定して家系図上で、遺伝様式について検討したところ、全家系において「常染色体不完全優性遺伝様式」によって発症すると確認された。したがって本症は「遺伝性赤血球膜蛋白質異常症」であることが明らかになった。このことから、臨床現場で遺伝的コントロールを実施することが可能になった。ホモ接合体の発生を回避するためには、ヘテロ接合体同士の交配を避けることである。本症は、赤血球膜脆弱性試験を

実施することで遺伝子型を推定できるため、A牧場を対象にして繁殖牛を中心とした遺伝子型の診断を行い、全ての母牛に対して、因子を保有しないと推定した種雄牛を用いた交配を実施した。コントロール前後の分娩頭数はそれぞれ12頭と9頭であった。コントロール前の出生子牛についてはホモ接合体が2頭、ヘテロ接合体が9頭、非保因牛が1頭であった。コントロール後ではホモ接合体は確認されず、ヘテロ接合体の遺伝子型頻度もコントロール前後で54%から22%へ減少した。以上のことから、臨床現場において母牛と種雄牛の遺伝子型を把握することにより、遺伝的コントロールが可能であることが証明された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導いただきました日本獣医畜産大学教授 鈴木勝士博士、同じく本好茂一博士に深甚なる謝意を表します。また、赤血球膜蛋白分析に対し貴重なご助言をいただいた北海道大学教授 前出吉光博士、東京大学助教授 稲葉 陸博士、電子顕微鏡による診断に対しご指導賜りました岩手大学教授 岡田幸助博士に謹んで感謝の意を表します。また、本研究に対しご協力いただいた山形県農業共済組合連合会最上家畜診療所、中央家畜診療所ならびに研修所、置賜家畜診療所の獣医師と検査技師の皆様は心から感謝申し上げます。

文 献

1. Agre, P., Casell, J. F., Zinkhan, W. H., et al. (1985) : Partial deficiency of erythrocyte spectrin in hereditary spherocytosis. *Nature* 314: 380-383.
2. Bannerman, R. M. and Renwick, J. H. (1962) : The hereditary elliptocytosis; Clinical and linkage data. *Ann. Hum. Genet.* 26: 23-34.
3. Benjamin, M. M. (1981) : Outline of Veterinary Clinical Pathology. 友田 勇監訳、獣医臨床病理学, pp.436, 学窓社, 東京.
4. 濱崎直孝 (1992) : 細胞pH調節系輸送蛋白質研究の進歩, 陰イオン交換輸送蛋白質 (バンド3蛋白質). *日本臨床* 50: 9.
5. 濱崎直孝 (1991) : 細胞膜の物質透過. *臨床病理特集* 91: 17-58.
6. 神崎暁郎、井上孝又、八幡義人 (1995) : 遺伝性球状赤血球症. *Annual Review 血液*. 高久史磨, 他編. pp.77-95, 中外医学社, 東京.
7. Lux, S. E. (1979) : Dissecting the red cell membrane skeleton. *Nature* 281: 426-429.
8. Lux, S. E. and Glader, B. E. (1981) : Disorder of the red cell membrane. *Hematology of Infancy and Childhood*, 2nd Ed., eds. D.G. Nathan and F.A. Oski, pp.456-565, W.B. Saunders Co., N.Y.
9. Lux, S. E. et al. (1990) : Deficiency of band-3 in dominant hereditary spherocytosis with normal spectrin content. *Clin. Res.* 38: 300A.
10. Lux, S. E., William, T. T. et al. (1990) : Hereditary spherocytosis associated with deletion of human erythrocyte ankyrin gene on chromosome 8. *Nature* 345: 736-739.
11. 前出吉光 (1993) : 牛の赤血球と血小板の異常. *家畜診療* 359: 33-39.
12. Palek, J. (1985) : Hereditary Elliptocytosis and Related Disorder. *Clinics in Haematology* 13: 45-87.
13. Palek, J. and Jaro, L. (1993) : Clinical Expression and Laboratory Detection of Red Blood Cell Membrane Protein Mutations. *Seminars in Haematology* 30: 249-283.
14. Russell, E. S. (1984) : Developmental studies of mouse hereditary anemias. *Am. J. Med. Genet.* 18: 621-642.
15. Schalm, O. W. (1975) : Veterinary Hematology, 其田三夫, 一条 茂監訳, pp.673, 医歯薬出版, 東京.
16. Smith, J. E., Moore, K., Arens, M., Rinderknecht, G. A. and Ledet, A. (1983) : Hereditary Elliptocytosis With Protein Band 4.1 Deficiency. *Blood* 61: 21.
17. 八幡義人 (1992) : 溶血性貧血、貧血・多血症. 山村雄一, 吉利和監修, 中山書店, 東京.
18. 山田治、八幡義人 (1990) : 赤血球形態からみた膜異常症の診断. *臨床病理. 特集* 91: 25-29.