

研 究

リンパ球増多を伴わない地方病性牛白血病への
遺伝子検査法からの一考察

高森 広典¹⁾・曾地雄一郎¹⁾・千葉 直幸¹⁾
高野 泰司²⁾・竹田百合子¹⁾・西 清志¹⁾

1) 宮城県仙台家畜保健衛生所 2) 宮城県北部家畜保健衛生所

要 約

臨床的に牛白血病を疑わない黒毛和種繁殖雌牛を病理解剖したところ、末梢血中に異型リンパ球は認められなかったが、心臓及び結腸リンパ節に局限したBリンパ球由来腫瘍細胞の増殖が認められ、地方病性牛白血病(EBL)と診断された。当該牛について、リアルタイムPCRを用いた牛白血病ウイルス(BLV)遺伝子検査法の有用性を検討した。当該牛のパラフィン切片と当該牛、EBL発症牛3頭及びBLV感染牛34頭の白血球について、BLV遺伝子を定量した。パラフィン切片から検出されたBLV遺伝子量は、腫瘍組織：2,622～11,439 copies/ 10^5 cells、非腫瘍組織：0～505 copies/ 10^5 cellsと腫瘍組織で高値を示した。一方、白血球中のBLV遺伝子量は、当該牛：9,847 copies/ 10^5 cells、発症牛：58,238～116,170 copies/ 10^5 cells、BLV感染牛：0～39,081 copies/ 10^5 cellsであり、当該牛のBLV遺伝子量はBLV感染牛と同程度であった。以上の結果から、当該牛は、全身臓器及び末梢血中にBLV感染リンパ球が高度に浸潤していなかったと推察され、同様な症例では、末梢血中のBLV遺伝子量のみで生前診断は困難であり、病理学的検索と併せて実施する必要があると考えられた。

I はじめに

地方病性牛白血病(EBL)は牛白血病ウイルス(BLV)感染によりリンパ球が腫瘍化する疾病で、典型的所見として、体表リンパ節の腫脹及びリンパ球の増加が認められる¹⁾。しかし、これらの典型的所見が得られず、解剖後初めてEBLと診断されることもある^{2,3)}。このような症例では生前診断が困難となるため、生産現場で診断可能な診断法の開発が望まれている。一方、リアルタイムPCRを用いたBLVプロウイルスの定量法が本症の発症予知の手法として注目されている^{4,5)}。独立行政法人理化学研究所で開発されたBLV-CoCoMo-qPCRは、BLVのLTR領域をターゲットにしてプロウイルスとして組み込まれた全変異株のBLVを定量可能なリアルタイム

PCRである⁶⁾。同時にウシ細胞の標的遺伝子(DRA)の増幅を行い、サンプル中の細胞数を推定して標準化することで、安定的にプロウイルスを定量することが可能である。今回、宮城県内において典型的な症状が認められないEBL発症牛に遭遇し、BLV-CoCoMo-qPCRを用いた遺伝子検査法の有用性を検討したので報告する。

II 材料と方法

1 病性鑑定

(1) 発生農場及び症例の概要

発生農場は繁殖雌牛9頭を飼養する和牛繁殖農場であった。黒毛和種64ヶ月齢の繁殖雌牛が、平成24年2月下旬に起立不能を呈し、診療獣医師に

腰痠と診断された。原因究明のために当所に搬入されたため、病理解剖に供した。搬入時、体表リンパ節の腫大等、EBLを疑う症状は認められなかった。

(2) 病理組織学的検査

当該牛を病理解剖し、主要臓器を採材して10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。常法によりパラフィン包埋後、薄切した組織切片にHE染色を実施した。また、腫瘍細胞が認められた組織切片には、抗CD79 α 及び抗CD3抗体（ダコ・ジャパン株式会社、東京）を用いた免疫組織化学的染色を実施した。

(3) ウイルス学的検査

当該牛の血清について、寒天ゲル内沈降反応（AGP）によるBLV抗体検査を実施した。

(4) 血液検査

剖検時に採材した血液について、血液一般検査（血球計数検査、白血球百分比）及び血液生化学検査を実施した。

2 当該牛のパラフィン切片におけるBLV遺伝子量の比較

当該牛について、腫瘍組織5検体すなわち心臓腫瘍部（右心耳2検体、左心房1検体）、結腸リンパ節（LN）2検体及び非腫瘍組織9検体すなわち心臓正常部（中隔、右心）、肝臓、脾臓、腎臓、浅頸LN、腸骨下LN、回盲LN、腸間膜LNの組織切片計14検体を用いた。

パラフィン切片から市販キット（DEXPAT、タカラバイオ株式会社、滋賀）でDNAを抽出後、BLV-CoCoMo-qPCRによりBLV遺伝子を定量した。検出したBLV遺伝子量について、各切片間で比較検討した。

3 BLV感染牛における病態別の白血球中BLV遺伝子量

当該牛、過去に典型的所見が認められてEBLと診断された発症牛3頭、BLVの感染が確認された非発症牛（BLV感染牛）34頭の計38頭について検索した。BLV感染牛はリンパ球数を算出後、ECの鍵⁷⁾により持続性リンパ球増多（PL）牛及び不

顕性感染牛に分類した。

当該牛及び発症牛は、それぞれの血液から常法により白血球を分離し、分離した白血球から市販キット（QIAamp DNA Mini kit, QIAGEN, U.S.A.）を用いてDNAを抽出した。BLV感染牛は市販キット（Wizard Genomic DNA Purification kit、プロメガ株式会社、東京）を用いてDNAを抽出した。当該牛、発症牛及びBLV感染牛のDNAからBLV-CoCoMo-qPCRによりBLV遺伝子を定量し、各群の遺伝子量を比較検討した。

III 結 果

1 病性鑑定

(1) 剖検及び病理組織学的検査

右心耳、右心房壁及び左心房壁に小指からうずら卵大の腫瘍が認められた（図1）。結腸リンパ節はうずら卵大に腫大していた。その他の臓器に腫瘍は認められなかった。病理組織学的には、右心耳の心筋線維間及び結腸リンパ節にリンパ球様腫瘍細胞の高度な浸潤が認められた（図2）。免疫組織化学的染色により、腫瘍細胞は抗CD79 α 抗体に陽性を示し、Bリンパ球由来であることが確認された（図3）。

(2) ウイルス学的検査及び血液検査

AGPによるBLV抗体検査は陽性であった。白血球数は8,500/ μ l、リンパ球数は2,975/ μ lと正常範囲内であった。末梢血中への異型リンパ球の出現は認められなかった。LDHは1,540IU/Lとわずかに増加が認められた。

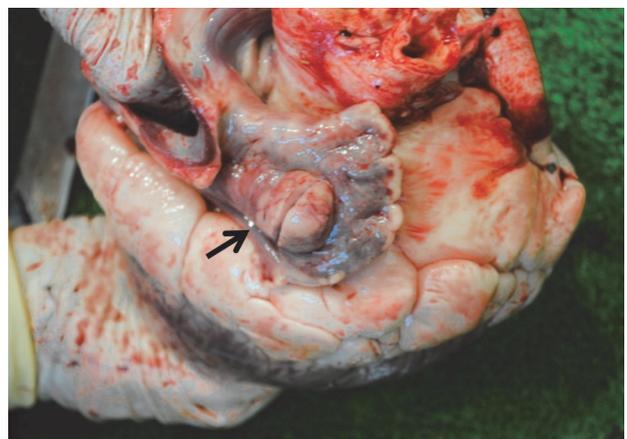


図1 右心耳に認められた母指頭大、灰白色の腫瘍（矢印）

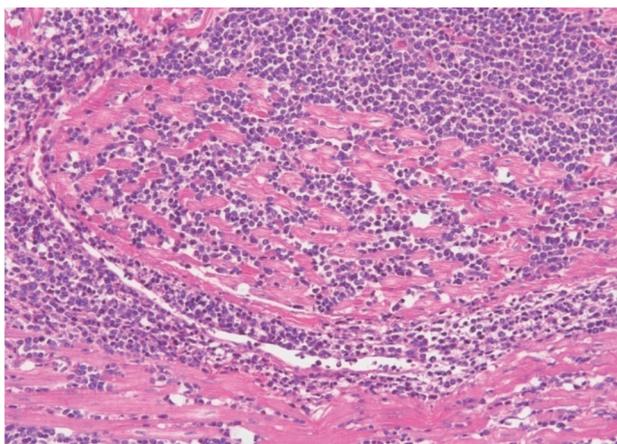


図2 右心耳の腫瘍 (HE染色 中拡大)
リンパ球様腫瘍細胞が心筋線維間に高度に浸潤

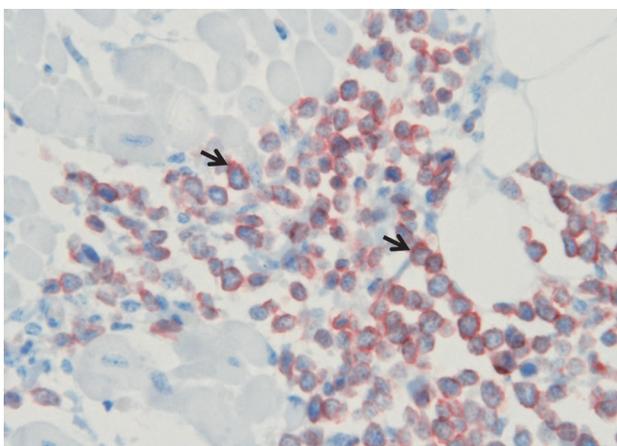


図3 抗CD79α抗体を用いた免疫組織化学的染色(強拡大)
腫瘍細胞はCD79α抗体に陽性を示す(矢印)

2 当該牛のパラフィン切片におけるBLV遺伝子量の比較

パラフィン切片から検出されたBLV遺伝子量は、腫瘍組織では2,622~11,439copies/10⁵cells、非腫瘍組織では0~505copies/10⁵cellsであり、腫瘍組織で高値を示した(表1)。特に、心臓の腫瘍部からは、右心耳腫瘍:2,622copies/10⁵cells、5,593copies/10⁵cells、左心房腫瘍:6,752copies/10⁵cellsと多量のBLV遺伝子が検出されたが、正常部からは、中隔:不検出、右心:17copies/10⁵cellsと僅かに検出されたのみであった。

表1 当該牛のパラフィン切片から検出されたBLV遺伝子量と腫瘍細胞の有無

| 部位 | | BLV遺伝子量 (copies / 10 ⁵ cells) | 腫瘍細胞 |
|-------|------------|---|------|
| 腫瘍組織 | 心臓腫瘍部 3 検体 | 2,622 ~ 6,752 | + |
| | 結腸LN 2 検体 | 5,576 ~ 11,439 | + |
| 非腫瘍組織 | 心臓 中隔 | 0 | - |
| | 心臓 右心 | 17 | - |
| | 肝臓 | 16 | - |
| | 脾臓 | 505 | - |
| | 腎臓 | 16 | - |
| | 浅頸LN | 205 | - |
| | 腸骨下LN | 398 | - |
| | 回盲部LN | 146 | - |
| 腸間膜LN | 1 | - | |

3 BLV感染牛における病態別の白血球中BLV遺伝子量

リンパ球数を算出した結果、感染牛34頭はPL牛7頭、不顕性感染牛27頭に分類された。

白血球から検出されたBLV遺伝子量は、当該牛:9,847copies/10⁵cells、発症牛:58,238~116,170(中央値67,564)copies/10⁵cells、PL牛:4,339~39,081(中央値15,768)copies/10⁵cells、不顕性感染牛:0~19,305(中央値2,085)copies/10⁵cellsであり、当該牛のBLV遺伝子量は発症牛より低値を示し、PL牛及び不顕性感染牛と同程度であった。

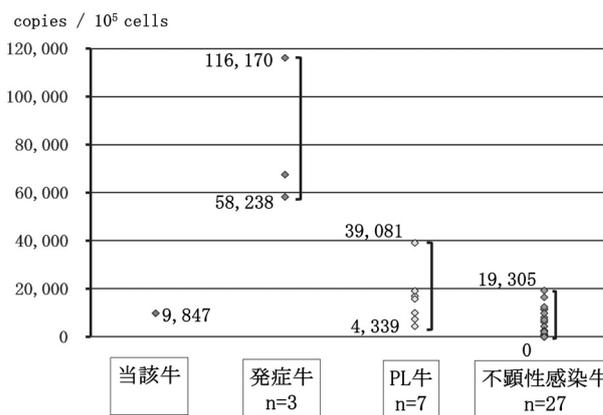


図4 BLV感染牛における病態別の白血球中BLV遺伝子量

IV 考察及びまとめ

本症例は、EBLの典型的な臨床症状が認められず、生前に腰痠と診断された。しかし、病理解剖の結果、Bリンパ球由来腫瘍細胞の増殖及びBLV感染が認められたことから、EBLと診断された。大島らは、EBLと診断された94症例中11症例（11.7%）でリンパ球増多を示さなかったと報告している⁸⁾。EBLは典型的所見が得られない場合があることを念頭におき、原因不明の疾病についてはEBLも鑑別診断の一つに加えて、身体検査の徹底を行う必要があると考えられた。

EBLの典型的所見が得られなかった当該牛のパラフィン切片から検出したBLV遺伝子量は、非腫瘍組織と比較して腫瘍組織で高値を示した。腫瘍が認められた心臓では、正常部より腫瘍部で多量のBLV遺伝子が検出された。また、当該牛の白血球中BLV遺伝子量は、典型的所見の得られた発症牛より大きく下回り、PL牛、不顕性感染牛と同程度であった。これらの結果から、当該牛は腫瘍組織が限局しており、発症初期の病態であったと考えられ、全身臓器及び末梢血中にBLV感染リンパ球が高度に浸潤していなかったと推察された。

BLV-CoCoMo-qPCRにより得られるBLV遺伝子量は、EBLの病態が進むにつれて増加する傾向があることが確かめられている⁶⁾。このため、BLV遺伝子の定量法がEBLの発症診断に応用可能と思われた。一方、EBL発症牛とBLV感染牛には、末梢血中のBLV遺伝子量の差が認められなかったとの報告もある⁹⁾。本調査の結果から、典型的所見の得られない症例では、末梢血中にBLV感染リンパ球が高度に浸潤していないため、既存の血液所見による診断基準のみならず、末梢血中のBLV遺伝子量からもBLV感染牛と鑑別が不能となり、生前診断を行うことが困難であることが示された。従って、病理診断が本症に最も重要と考えられ、臨床症状及び血液所見でEBLと判断ができない場合は、病理学的検索と遺伝子検査を積極的に実施していく必要があると思われた。

一方、腫瘍組織中のBLV遺伝子量は、非腫瘍組織と比較して高値を示した。このことから、発症初

期の症例であっても、バイオプシー等により腫大した体表リンパ節または腫瘍部位の採材が可能であれば、これらの材料を用いてBLV遺伝子を定量することで生前診断へ応用できる可能性が示唆された。本調査では、パラフィン切片から腫瘍組織中のBLV遺伝子を定量したが、パラフィン切片を材料とした場合、組織中の遺伝子量が大きく減少したとの報告がある¹⁰⁾。今後は生材料を用いたデータの蓄積が必要と考えられた。

V 謝 辞

CoCoMo-qPCRについて、検査キットの提供及び助言をいただいた独立行政法人理化学研究所分子ウイルス学特別研究ユニットの方々に深謝する。

引用文献

- 1) 田島誉士 (2002) 白血病. 新版主要症状を基礎にした牛の臨床 (前出吉光、小岩政輝監修). 614-618、デーリマン社、札幌
- 2) 田川道人、下田崇、富樫義彦他 (2008) 非典型的牛白血病のホルスタイン種乳牛3症例. 日獣会誌、61、936-940
- 3) 木野内久美、瀧奥健吾、大塚浩通他 (2010) 白血球増多と体表リンパ節の腫大を示さない成牛型白血病の黒毛和種2症例. 日家畜臨感染症研会誌、5、21-27
- 4) 猪熊壽 (2010) 牛白血病臨床診断のピットフォールと発症牛早期診断の試み. 家畜診療、57、137-143
- 5) 今内覚、田島誉士、小沼操他 (2010) 診療・生産現場からの声に対して. 家畜診療、57、201-207
- 6) Jimba M., Takeshima S., Matoba K., et al. (2010) BLV-CoCoMo-qPCR: Quantitation of bovine leukemia virus proviral load using the CoCoMo algorithm. *Retrovirology*, 7-91
- 7) 吉川堯 (1986) 地方病性牛白血病の臨床的診断. 牛白血病診断便覧 (日本獣医師会編). 34-46、信陽堂印刷、東京
- 8) Ohshima K., Ozai Y., Okada K., et al. (1980) Pathological studies on aleukemic case of bovine leukosis. *Jpn J Vet Sci*, 42, 297-309
- 9) 宗村佳子、赤瀬悟、黒野博之他 (2007) リアルタイムPCRによる牛白血病診断法の検討. 獣畜新報、60、1005-1011
- 10) 小桜利恵、宮本剛志、池上良他 (2009) 凍結組織およびパラフィン包埋切片からのリアルタイムPCRによる牛白血病診断法の検討. 平成21年度富山県家畜保健衛生業績発表会集録、38-43