

牛白血病ウイルスのプロウイルス単クローン性組込みが証明された 21カ月齢黒毛和種肥育牛の地方病性牛白血病

前澤誠希¹⁾ 嘉陽静香¹⁾ 三浦沙織^{1)*} 小熊圭祐²⁾ 泉對 博²⁾
堀内雅之¹⁾ 古林与志安¹⁾ 古岡秀文¹⁾ 猪熊 壽^{1)†}

1) 帯広畜産大学 臨床獣医学研究部門 2) 日本大学 生物資源科学部

*：現：岩手県NOSAI 東南部地域センター

(2015年12月28日受付・2016年2月22日受理)

要 約 21カ月齢黒毛和種肥育牛が下顎と耳下の腫瘤を主訴に受診した。臨床検査により体表リンパ節腫大が見られ、耳下腺リンパ節の細針吸引による細胞診で、中・大型異型リンパ球が約90%認められた。血液および血液生化学検査では著しいリンパ球増多、乳酸脱水素酵素および血清チミジンキナーゼ活性の高値が認められた。牛白血病ウイルス (Bovine leukemia virus : BLV) 抗体およびBLV遺伝子を検索したところ、どちらも陽性を呈した。病理学的検査では全身のリンパ節腫大が認められ、また組織学的検査で、B細胞型の牛白血病と確定診断された。さらに、inverse-polymerase chain reaction (PCR) 法により、BLVプロウイルス単クローン性組込みが確認され、本症例は地方病型牛白血病 (Enzootic bovine leukosis : EBL) であると診断された。これらの結果より、EBLは3歳未満でも発症することが証明された。

——キーワード：BLVプロウイルス単クローン性組込み、地方病性牛白血病、21カ月齢

.....産業動物臨床医誌 6(4): 161-164, 2016

1. はじめに

地方病性牛白血病 (Enzootic bovine leukosis : EBL) は牛白血病ウイルス (Bovine leukemia virus : BLV) 感染に起因する家畜伝染病であり、BLV感染牛のうち約30%が持続性リンパ球増多症 (Persistent lymphocytosis : PL) を呈し、そのうち2～3%が3年以上の潜伏期を経てEBLを発症するといわれている [1]。近年、長い潜伏期というこれまでの概念を破るように、3歳未満のBLV感染若齢牛における牛白血病発症が報告されている [2]。しかし、これらの若齢牛における牛白血病発症がBLV感染によるEBLであるか、あるいはBLVが関与しない型の牛白血病にたまたまBLVが感染しているだけなのかは明らかにされていない。BLVに近縁のヒトT細胞白血病ウイルス1型 (Human T-cell leukemia virus type I : HTLV-1) による成人T細胞白血病 (Adult T-cell leukemia : ATL) の診断においては、HTLV-1プ

ロウイルスの単クローン性組込みを証明することが必要条件となっている [3]。今回、BLV陽性の21カ月齢黒毛和種肥育牛で牛白血病を発症した症例に遭遇し、inverse-polymerase chain reaction (PCR) 法でBLVプロウイルスの単クローン性組込みを証明したので、その概要を報告する。

2. 材料および方法

症例：症例は21カ月齢の黒毛和種去勢牛で、下顎と耳下の腫瘤を主訴に受診し、牛白血病が疑われたため、病性鑑定のため帯広畜産大学に搬入された。

搬入時、症例は体温39.3℃、心拍数108/分、呼吸数40/分で食欲は減退し、眼球はやや突出し、心音聴取が困難で、頸静脈の怒張を認めた。耳下腺リンパ節 (9×8×3 cm)、下顎リンパ節 (7×7×6 cm)、および左右浅頸リンパ節 (左：6×5×2 cm、右：6×3×1 cm)

† 連絡責任者：猪熊 壽 (帯広畜産大学畜産学部 臨床獣医学研究部門)
〒080-8555 帯広市稲田町西2線11 ☎/FAX 0155-49-5370
E-mail : inokuma@obihiro.ac.jp

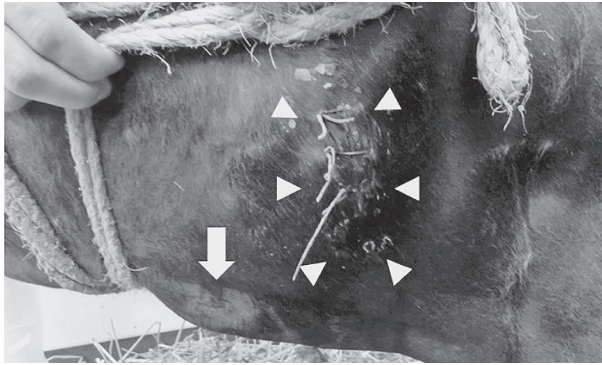


図1. 下顎リンパ節(矢印)および耳下リンパ節(矢頭)の腫大が見られた。

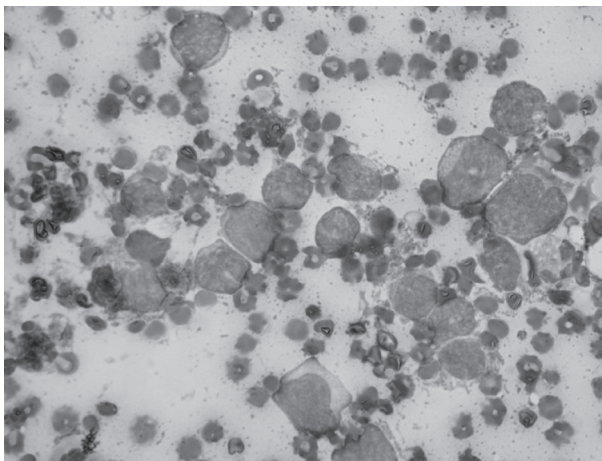


図2. 耳下腺リンパ節FNA所見：大小不同の類円形核をもつリンパ球が主体で、中・大リンパ球が90%を占めていた。細胞核にはクロマチンの凝集がみられた(ギムザ染色, x1000)。

の腫大を認めた(図1)。また、直腸検査により硬結感を有する直径約2cmに腫大した右外腸骨リンパ節が触知された。耳下腺リンパ節に対して、細針吸引(Fine needle aspiration: FNA)による細胞診を実施したところ、採取された細胞は大小不同の類円形核をもつリンパ球が主体で、中・大型異型リンパ球が90%を占めた(図2)。また、核にはクロマチンの明瞭な凝集がみられ、分裂像が散見された。尿検査ではケトンが160mg/dl以上と高値を示し、pH 6.5と低値であった。血液検査では著しいリンパ球増多と血小板減少症が認められた(表1)。さらに、AST, ALP, γ -GTP, CPK, T.Chol, LDH, 血清チミジンキナーゼ活性などの高値がみられた(表1)。病原学的検査として、牛白血病エライザキット(JNC, 東京)を用いてBLV抗体の検出を試みたところ陽性を示した。また、ウシ白血病ウイルス検出キット(Takara Bio, Shiga)を用いたreal-time PCRによりBLV特異遺伝子を検索したところ、陽性であった。

病理学的検査所見：搬入7日後に病理解剖を実施し

表1. 血液および血液生化学検査所見

| | | | |
|----------|-------------------------------|------------------|----------|
| RBC | 953×10 ⁴ / μ l | AST | 267 U/l |
| HGB | 13.9 g/dl | ALP | 159 U/l |
| HCT | 41 % | γ -GTP | 39 U/l |
| WBC | 46,200 / μ l | CPK | 543 U/l |
| Seg | 2,310 / μ l | LDH | 3370 U/l |
| Lym | 43,890 / μ l | Thymidine Kinase | 35.1 U/l |
| Platelet | 8.6×10 ⁴ / μ l | | |
| TP | 6.5 g/dl | | |
| Albumin | 3.78 g/dl | | |
| A/G | 1.39 | | |
| BUN | 16.8 mg/dl | | |
| CRE | 1.33 mg/dl | | |
| T.Chol | 233 mg/dl | | |

た。左右耳下腺リンパ節、左右浅頸リンパ節、左右下顎リンパ節に加えて、左右膝窩リンパ節、内腸骨リンパ節および肝門リンパ節が腫大していた。心臓はやや円形心を呈し、右心耳の下部に3×2×1cmの腫瘤が認められた。その他、大網、左右耳下腺、左大腿骨に腫瘍の浸潤がみられた。腫大リンパ節の組織学的検査において、異型度の高い円形細胞を多数認め、本症例は牛白血病と診断された。なお、腫大リンパ節に認められたリンパ球様細胞は、B細胞マーカーである抗BLA-36抗体(Biogenesis, CA)に陽性を呈した。

Inverse-PCR: Miyasakaらの報告[4, 5]により、Inverse-PCRを実施した。すなわち、まず末梢血よりQIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN, Hilden)を用いてDNAを抽出した。次に抽出DNA 1 μ gを制限酵素*Pst*Iで処理し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System(QIAGEN)を用い精製した。DNA Ligation Kit <Mighty Mix>(Takara Bio)を用いて、セルフライゲーションした後、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System(Promega, Madison)を用い精製した。PCRはBLVの5'LTR領域を標的としたプライマー iPCR-Pst-F (GGG TTC GCA AGT ATG GAT AC) /iPCR-Pst-R (ATT GAG CCT TTG CGC GCT TT)を用いて実施した。反応は、Go Taq Master Mix (Promega)を用い、94 $^{\circ}$ C 2分、次に94 $^{\circ}$ C 1分/61 $^{\circ}$ C 1分/72 $^{\circ}$ C 3分を50サイクル、最後に72 $^{\circ}$ Cで7分の条件で実施した。陽性対照として12歳齢の典型的EBL症例(BLV遺伝子陽性、WBC 390,400/ μ l、末梢血中に大型の異型リンパ球99%)、陰性対照として純水を用いた。PCR産物は2%アガロースゲルで電気泳動し結果を観察した。

遺伝子解析: PCRの結果を確認するために、電気泳動で認められた陽性単一バンドをPCR産物としてアガロー

スゲルから切り出し、PCR Gel extraction kit (QIAGEN) を用いて精製後、以前に報告されたダイレクトシーケンス法にて遺伝子配列を解析した [6]。得られた遺伝子配列はBLAST プログラム (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) を用いてGenBankに登録されている遺伝子との相同性を検索した。

3. 結果および考察

本症例は、臨床的および病理学的に牛白血病と診断された。本症例は21カ月齢であり、BLV抗体および遺伝子が陽性の牛白血病であったが、一般にEBLは3歳齢、多くは5～8歳齢で発症するとされているため [1]、EBLと確定できなかった。EBL発症牛では腫瘍リンパ球は単クローン性に増殖しており、リンパ球ゲノムへのBLVプロウイルスの組み込みは1ないし複数個所の特定部位に集中している [4, 5, 7-10]。このBLVの単クローン性増殖の証明にはこれまでサザンプロット法が用いられてきたが [5, 7-10]、時間と手間がかかる点が欠点であった。近年、より簡便なinverse-PCR法によるBLVの単クローン性増殖の証明が報告されている [4, 5]。すなわち、EBL発症牛ゲノムには、特定部位にBLVプロウイルスが組み込まれているため、制限酵素により断片化され、DNAリガーゼによりセルフライゲーションした環状DNAをテンプレートにinverse-PCRを行うと、一定の長さのPCR産物が形成され、電気泳動により明瞭なバンドがみられる。一方、EBL非発症牛ではBLVプロウイルスのリンパ球への組み込み部位が様々であるため、inverse-PCR産物はスメア状となる。

本症例ではInverse-PCRにより500bp付近に明瞭な単一バンドが認められた (図3)。このPCR産物を遺伝子解析したところ、一部はBLVの遺伝子配列 (Accession No. LC 005616) との相同性が最も高く (99%)、また、残りの部分は牛第17番染色体の遺伝子配列 (Accession No. NC 007315) と99%の相同性を示した。これらのこ

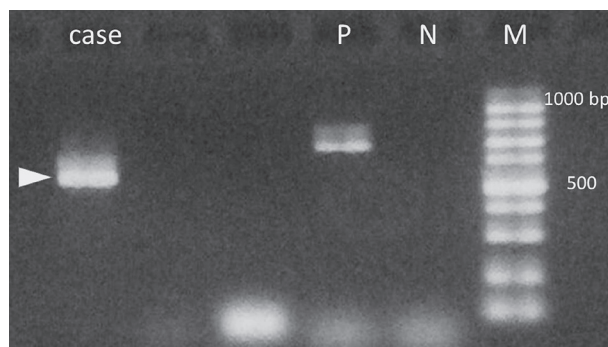


図3. Inverse-PCRの結果：本症例は500bp付近に単一バンドが観察された。
P:典型的EBL症例 N:純水 M:100 bp DNA Laadder

とは本症例の末梢血腫瘍細胞ゲノム (第17番染色体) にBLVプロウイルスが単クローン性に組み込まれていたことを示しており、本症例がBLV感染による牛白血病、すなわちEBLであることを支持する。つまり、今回の結果は21カ月齢の牛でもEBLを発症したことを証明したものである。近年、3歳未満のBLV感染若齢牛における牛白血病が散発しているが、これらもEBLの可能性があると考えられる。今回は末梢血でのみinverse-PCRと遺伝子解析を実施したのみであるが、腫大リンパ節などの複数の腫瘍組織でBLVプロウイルスの単クローン性組み込みを証明できれば、より診断が確実なものになったと思われる。

今後、本症例のBLVプロウイルスの宿主リンパ球ゲノムの組み込み部位の解析を行うとともに、inverse-PCRを用いて、発生が報告されている3歳未満のBLV感染牛における牛白血病がEBLであるのか確認をする必要があると考えられた。

4. 引用文献

1. 小沼 操：牛白血病，動物の感染症 第3版，明石博臣・大橋和彦・小沼 操・菊地直哉・後藤義孝・高井伸二・宝達 勉編，98-99，近代出版，東京 (2011)
2. 宗村佳子，他：東京都におけると畜牛の地方病性牛白血病発生状況と牛白血病ウイルス浸潤状況，日獣会誌 67, 523-528 (2014)
3. Yamaguchi K：Human T-lymphotropic virus type I in Japan, Lancet 343, 213-216 (1994)
4. Miyasaka T, et al.：Distribution and characteristics of bovine leukemia virus integration sites in the host genome at three different clinical stages of infection, Arch Virol. 160, 39-46 (2015)
5. Murakami H, et al.：Bovine leukemia virus integration site selection in cattle that develop leukemia, Virus Res 156, 107-112 (2011)
6. Inokuma H, et al.：Analysis of the 16S rRNA gene sequence of *Anaplasma centrale* and its phylogenetic relatedness to other *Ehrlichiae*. Clin Diag Lab Immunol, 8, 241-244 (2001)
7. Kettmann R, et al.：Genomic integration of bovine leukemia provirus: comparison of persistent lymphocytosis with lymph node tumor form of enzootic, Proc Natl Acad Sci USA, 77, 2577-2581 (1980)
8. Onuma M, et al.：Integration of Bovine Leukemia Virus DNA in the Genomes of Bovine Lymphosarcoma Cells, Microbiol Immunol, 26, 813-820 (1982)
9. Coulston J, et al.：Provirus Variants of the Bovine Leukemia Virus and Their Relation to the Serological

Status of Naturally Infected Cattle, Arch Virol, 199, 13-23 (1991)

10. Miura S, et al. : Detection of monoclonal integration of bovine leukemia virus proviral DNA as a malignant

marker in two enzootic bovine leukosis cases with difficult clinical diagnosis, J Vet Med Sci. 77, 883-887 (2015)

A clinical case of enzootic bovine leukosis with BLV-provirus monoclonal integration in 21-month-old Japanese Black beef cattle

M. Maezawa¹⁾, S. Kayou¹⁾, S. Miura^{1)*}, K. Oguma²⁾, H. Sentsui²⁾,
N. Horiuchi¹⁾, Y. Kobayashi¹⁾, H. Furuoka¹⁾, H. Inokuma^{1)†}

1) *Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine*

2) *Nihon University*

* : *Present affiliation: Iwate Agricultural Mutual Aid Association*

ABSTRACT A 21 month old Japanese Black fattening steer was presented with a chief complaint of mandibular and parotid masses. Physical examination revealed enlarged superficial lymph nodes. By fine needle aspiration cytology of a parotid lymph node, approximately 90% of cells were medium or large atypical lymphoid cells. Hematology and serum biochemical findings included significantly elevated lymphocytes, lactate dehydrogenase activity and thymidine kinase activity. Antibody against bovine leukemia virus (BLV) and polymerase chain reaction (PCR) for BLV provirus were both positive. Generalized lymphadenopathy was observed during necropsy, and histopathological examination confirmed bovine leukosis. Moreover, inverse PCR demonstrated monoclonal integration of BLV proviral DNA in the host genome. These findings suggest that enzootic bovine leukosis could occur in cattle less than 3 years old.

—**Key Words** : BLV provirus monoclonal integration, enzootic bovine leukosis, 21 month old

† *Correspondence to : Hisashi Inokuma (Department of Clinical Veterinary Medicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)
Inada, Obihiro, Hokkaido, 080-8555, JAPAN)
TEL/FAX 0155-49-5370 E-mail : inokuma@obihiro.ac.jp*

.....Jpn. J. Large Anim. Clin. 6(4): 161-164, 2016