

## 山形県で流行している Bovine Leukemia Virus の 遺伝子型別及び病理学的検索

須藤重寿佳<sup>1)</sup> 岩田竜治<sup>2)</sup> 朴 天鎬<sup>2)†</sup>

1) 山形県内陸食肉衛生検査所 (〒990-0892 山形市大字中野字的場827)

2) 北里大学獣医学部獣医病理学研究室 (〒034-8628 十和田市東23番町35-1)

(2012年3月20日受付・2012年8月10日受理)

### 要 約

2009年から2011年まで、山形県で発症した牛白血病の腫瘍組織から抽出した牛白血病ウイルスのプロウイルスDNAを用いてPCR-RFLP法による遺伝子型別を調べた。次に、腫瘍細胞の由来について、免疫組織化学的検索を実施した。その結果、山形県の牛白血病発症牛では1型もしくは3型の牛白血病ウイルスが感染しており、13例中12例の腫瘍細胞がB細胞由来であることが判明した。以上より、山形県では1型もしくは3型の牛白血病ウイルスが地方病性白血病の発症に関与している可能性が示唆された。——キーワード：牛白血病ウイルス、遺伝子型、PCR-RFLP法。

----- 日獣会誌 65, 883～887 (2012)

牛白血病は、bovine leukemia virus (以下「BLV」)により引き起こされる地方病性牛白血病 (enzootic bovine leukosis, 以下「EBL」)と散発型(子牛型、胸腺型、皮膚型)に大別される。現在のところ、本疾患に対する有効な予防法や治療法は存在せず、と畜場に搬入され牛白血病と診断された場合は全部廃棄となるため、畜産農家や酪農家にとって経済的損失は甚大である。

本邦ではEBLの発生率が増加傾向にあり [1], EBLの診断と疫学的解析が重要である。PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)法はEBLの遺伝子型別の解析に有効な手段であり、近年各都道府県で本法を利用した遺伝子型別の解析が進んでいる。これまで、多くの都道府県で流行しているBLVの遺伝子型が1型あるいは3型であることが明らかになっている [2, 3]。しかしながら、山形県内で流行しているBLVの遺伝子型については、いまだ調査されておらず、他の都道府県のBLVの遺伝子型との疫学的関連性についてもわかっていない。そこで、本研究では、PCR-RFLP法を用いて近年山形県で流行しているBLVの遺伝子型を調査し、遺伝子型と発症牛の飼養履歴、遺伝子型と腫瘍発生部位との相関性並びに腫瘍細胞の由来について調べた。

### 材料及び方法

**症例：**検索対象は2009年4月～2011年12月まで、当所所管と畜場に搬入され、牛白血病と診断された13頭(雌12頭、去勢雄1頭)である。月齢は21～177カ月齢、13頭中8頭は牛白血病以外に諸疾患を併発していた(表1)。

**一般検査：**発症牛13頭の末梢血及び腫瘍組織の塗抹標本についてギムザ染色を施した。また、寒天ゲル内沈降反応及びnested-PCR法を用いてBLVの感染の有無を調べた。

**PCR-RFLP法によるBLVの遺伝子型別：**発症牛13頭中9頭については、腫瘍組織から抽出したDNAを用いたPCR-RFLP法を実施し、残り4頭についてはパラフィン包埋切片からDNAの抽出を試みた。市販のDNA抽出キット(QIAamp DNA mini Kit, 株式会社キアゲン, 東京)を用い、説明書に従い全DNAを抽出した。また、パラフィン包埋切片からのDNAの抽出は市販の抽出剤(Takara DEXPAT, タカラバイオ株式会社, 滋賀)とHuijismansら [5]の方法を併用して実施した。抽出したDNAはFencherら [4]のプライマー設計に基づいて、95℃ 5分 (1回), 94℃ 30秒 (35回), 52℃ 30秒 (35

† 連絡責任者：朴 天鎬 (北里大学獣医学部獣医病理学研究室)

〒034-8628 十和田市東23番町35-1 ☎0176-24-9433 FAX 0176-23-8160  
E-mail: baku@vmas.kitasato-u.ac.jp

表1 調査に供した13頭の品種、性別、月齢、出生地、飼育地及び諸疾患名

Nos.	品種	性別	月齢	出生地	飼育地	区分	病名
1	JB	雌	31	宮城県	山形県	病畜	股関節脱臼
2	JB	雄 (去勢)	21	山形県	山形県	病畜	腰椎骨折
3	JB	雌	177	不明	山形県	一般	
4	JB	雌	30	沖縄県	山形県	一般	
5	JB	雌	104	不明	山形県	病畜	肺炎
6	JB	雌	37	宮城県	山形県	病畜	肝炎
7	Hol	雌	136	不明	山形県	病畜	第4胃潰瘍
8	JB	雌	33	栃木県	山形県	一般	
9	F1	雌	33	北海道	北海道	一般	
10	JB	雌	79	栃木県	山形県	病畜	腸閉塞
11	F1	雌	35	北海道	北海道	一般	
12	Hol	雌	77	山形県	山形県	病畜	創傷性心内膜炎
13	Hol	雌	65	北海道	山形県	病畜	放線菌症

JB：黒毛和種，Hol：ホルスタイン，F1：交雑種，  
病名：白血病以外の諸疾患名を表す。

表2 発症牛13頭の腫瘍形成部位、腫瘍細胞の由来及び遺伝子型の一覧

Nos.	品種	腫瘍形成部位	腫瘍由来	遺伝子型
1	JB	リンパ節(体表, 内臓, 体幹), 心臓, 第4胃, 後肢筋肉	B細胞	1型
2	JB	リンパ節(体表, 内臓, 体幹), 胸膜, 心臓, 腎臓, 第1, 3, 4胃, 大腸, 腹膜, 大網, 子宮, 膀胱	B細胞	NT
3	JB	リンパ節(体表, 内臓, 体幹), 胸膜, 心臓, 第3, 4胃, 小腸, 腰椎椎間板	B細胞	1型
4	JB	リンパ節(体表, 体幹), 第4胃, 子宮, 膀胱, 副腎	B細胞	NT
5	JB	リンパ節(体表, 内臓, 体幹), 頸部筋肉, 横隔膜, 第1~4胃, 小腸, 大腸, 副腎	B細胞	NT
6	JB	リンパ節(体表, 内臓, 体幹), 心臓, 肝臓, 脾臓, 子宮	B細胞	3型
7	Hol	リンパ節(内臓), 心臓, 肝臓, 第4胃, 大網	B細胞	NT
8	JB	リンパ節(体表, 体幹)	T細胞	1型
9	F1	リンパ節(体表, 内臓), 腎臓	B細胞	1型
10	JB	リンパ節(体表, 内臓, 体幹), 心臓, 脾臓, 第1~4胃, 小腸, 大腸, 子宮, 膀胱	B細胞	3型
11	F1	リンパ節(体幹), 子宮	B細胞	1型
12	Hol	リンパ節(体表, 内臓, 体幹), 心臓, 第4胃, 子宮, 膀胱	B細胞	1型
13	Hol	リンパ節(体表, 内臓, 体幹), 頸部筋肉, 横隔膜, 心臓, 腹膜, 腎臓, 第4胃, 膀胱	B細胞	1型

体表リンパ節：浅頸，耳下，咽頭，腸骨下，下顎，乳房，鼠径リンパ節のいずれかが腫瘍化。

内臓リンパ節：縦隔，気管支，胃，腸間膜，パイエル板，肝門，腎門リンパ節のいずれかが腫瘍化。

体幹リンパ節：内外腸骨，肋間，膝窩，腋窩，前・後胸骨リンパ節のいずれかが腫瘍化。

NT：実施せず。

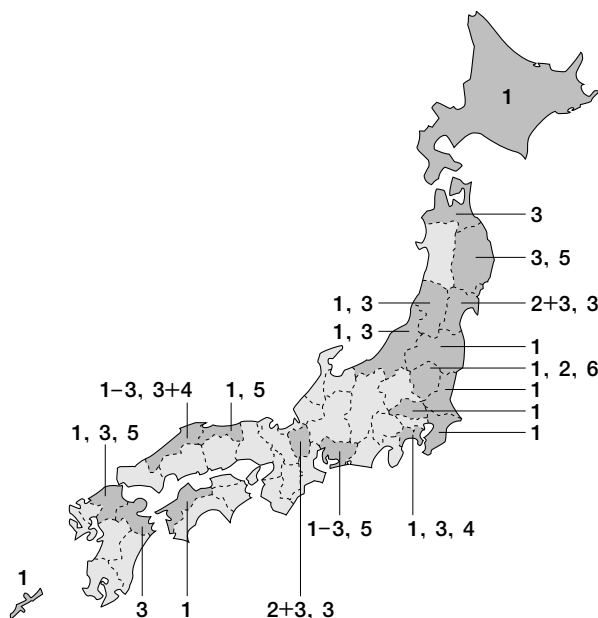


図1 本邦におけるBLVの遺伝子型の地域分布図  
全国的に1型及び3型の流行が最も多く認められる。

回)，72℃ 1分（35回），72℃ 7分（1回）の反応条件でEBLのプロウイルスを検出するnested-PCRを行った。次に，プロウイルスのenv遺伝子gp51領域の一部である444bpの増幅産物を得た後，増幅産物を制限酵素Bcl I，Hae III，Pvu II（Roche Diagnostics, Germany）で37℃，1晩反応させた。制限酵素処理後，ポリアクリルアミドゲル（e-PAGEL，E-T12.5L，アトー株，東京）を用いて切断パターンを電気泳動で確認した。最後に，Licursiら[3]の報告に従って遺伝子型を決定した。

**遺伝子型と飼育履歴：**発症牛の飼育管理簿から，出生地及び飼育地を確認し，その地域で流行しているBLVの遺伝子型を調査した。また，各都道府県で明らかになっているBLV遺伝子型と地域特異性について確認した。

**遺伝子型と腫瘍形成部位：**と畜検査記録を基に，発症牛における腫瘍形成部位と遺伝子型との相関性について調べた。

**病理学的検索：**発症牛13頭の腫瘍組織の一部を用いて，定法に従いパラフィン包埋後ヘマトキシリン・エオジン染色切片を作製し，病理組織学的検索に供した。さらに，連続切片を用いて免疫組織化学的手法を用いて腫瘍細胞の由来について検討した。一次抗体として，抗CD3（T細胞マーカー，ダコ・ジャパン株，東京），抗CD20（B細胞マーカー，Spring Bioscience, Fremont, U.S.A.）及び抗CD79α（B細胞マーカー，Thermo, U.S.A.）抗体を使用した。

成 績

**一般検査：**発症牛の末梢血及び腫瘍組織のギムザ染色



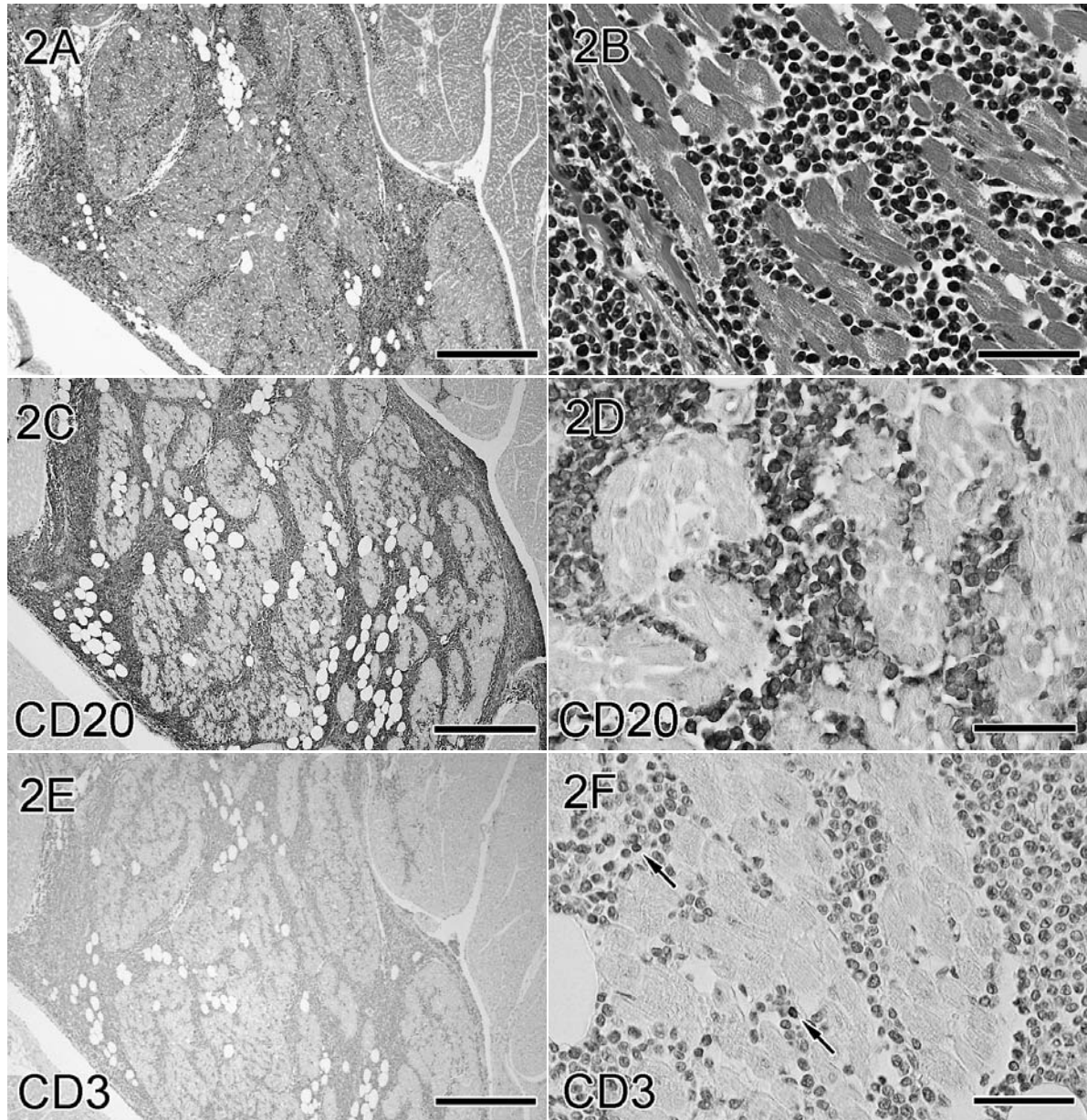


図2 心臓 (No. 10)

- 2A : 心筋線維の間に好塩基性の腫瘍細胞が多数浸潤増殖している。(HE染色 Bar = 500 $\mu$ m)  
 2B : 腫瘍細胞は単調なリンパ球から構成され, 大小不同の類円形核と僅かな細胞質を有する。(HE染色 Bar = 50 $\mu$ m)  
 2C : 心筋線維の間に抗CD20抗体陽性細胞がび慢性に観察される。(免疫染色 CD20 Bar = 500 $\mu$ m)  
 2D : 腫瘍細胞の細胞質が強陽性を示す。(免疫染色 CD20 Bar = 50 $\mu$ m)  
 2E : 腫瘍細胞は抗CD3抗体ではほとんど陰性を示す。(免疫染色 CD3 Bar = 500 $\mu$ m)  
 2F : 僅かな腫瘍細胞が抗CD3抗体陽性(矢印)を示す。(免疫染色 CD3 Bar = 50 $\mu$ m)

では, 異型リンパ球が多数観察された. 寒天ゲル内沈降反応では抗BLV抗体陽性を示し, nested-PCR法ではBLVの遺伝子が検出された. この時点で発症牛のすべてがBLVに罹患していることが判明した.

**PCR-RFLP法による遺伝子型別:** パラフィン包埋切片からDNAの抽出を試みた4頭では, nested-PCR法で遺伝子の増幅が認められなかったため, これ以降の遺伝子型別は実施できなかった. 遺伝子型別が実施された9頭中7頭では, *Bcl I* 制限酵素にて225bpと220bp,

*Hae III* で220bp, 100bp及び85bp領域で切断されたが, *Pvu II* では切断されなかった. このことより, 7頭がBLV1型に感染していると判断した. 残り2頭では, *Bcl I* で220bp, 120bp, 105bp, *Hae III* で285bp及び95bp領域で切断されたが, *Pvu II* では切断されなかったため, この2頭はBLV3型に感染していると判断された(表2).

**飼育履歴と遺伝子型:** 発症牛の中で6頭は, 若齢(10~11カ月齢)で北海道, 宮城県, 栃木県及び沖縄県か



ら山形県に導入されていた (表1)。これらの地域では過去に1型 (北海道, 栃木県, 沖縄県), 2型 (宮城県, 栃木県), 3型 (宮城県), 6型 (栃木県) の遺伝子型がそれぞれ報告されている (図1) が, 遺伝子型と地域特異性は見出せなかった。

**遺伝子型と腫瘍形成部位:** 腫瘍は体幹リンパ装置と子宮に局限するものから, 全身諸臓器に多発性に分布するものまで多様であったが, 浅頸リンパ節, 腸間膜リンパ節, 内・外腸骨リンパ節, 心臓, 第3胃及び第4胃が好発部位であった (表2)。なお, 遺伝子型と腫瘍形成部位との相関性は認められなかった。

**病理学的検索:** いずれの腫瘍も単調なリンパ球から構成されていた。腫瘍細胞は大小不同, 核膜不整な異型核と僅かな細胞質を有し, 時折核分裂像が観察された。免疫組織学的検索では, 13頭中12頭の腫瘍細胞がB細胞のマーカー (CD20, CD79 $\alpha$ ) にび漫性に陽性 (図2, 表2) を示し, 残り1頭はT細胞のマーカー (CD3) にび漫性に陽性 (図3) を示した。

### 考 察

今回の調査の結果, 山形県におけるEBL発症牛の大半がBLV1型もしくは3型に感染しており, これらのウイルスがEBL発症のおもな原因になっている可能性が示された。しかしながら, BLVの山形県内への侵入経路や地域特異性については特定できなかった。その理由として, 県外から導入された発症牛は移行抗体が消失した時期に導入されていること, また発症牛の多くが少なくとも1年以上にわたって県内で飼育されていることがあげられる。今後, BLVの侵入経路を明らかにするためには, PCR-RFLP法に比較し, より解析感度の高い塩基配列を基にした系統樹解析 [6-9] などが必要と思われる。

本邦におけるBLVの遺伝子型は地域によって異なるが, これまで1型もしくは3型が最も多く, 次に2型, 4型, 5型が報告されている [2, 3]。また, 複数の遺伝子型が同じ地域で混在する場合も存在する。今回の山形県の調査では, 1型が大半を占めており, 同じ遺伝子型であっても腫瘍形成部位は一致しなかった。このことから, BLVの遺伝子型の違いが腫瘍の形成部位を規定する可能性は低いと思われる。この点については, 今後症例数を増やしさらなる検証が必要と思われる。また, 腫瘍の好発部位については, 過去のEBLの報告例と類似し, リンパ装置を始め, 心臓, 第3胃, 第4胃, 子宮など多臓器性に形成されていた。しかし, 1例 (No. 8) では体表及び体幹リンパ節に局限していた。この症例の腫瘍細胞は他の12例とは異なり, T細胞由来であることが判明した。このことから, 比較的若齢牛では, BLV1型を保因していてもEBLを発症しない可能性が示唆さ

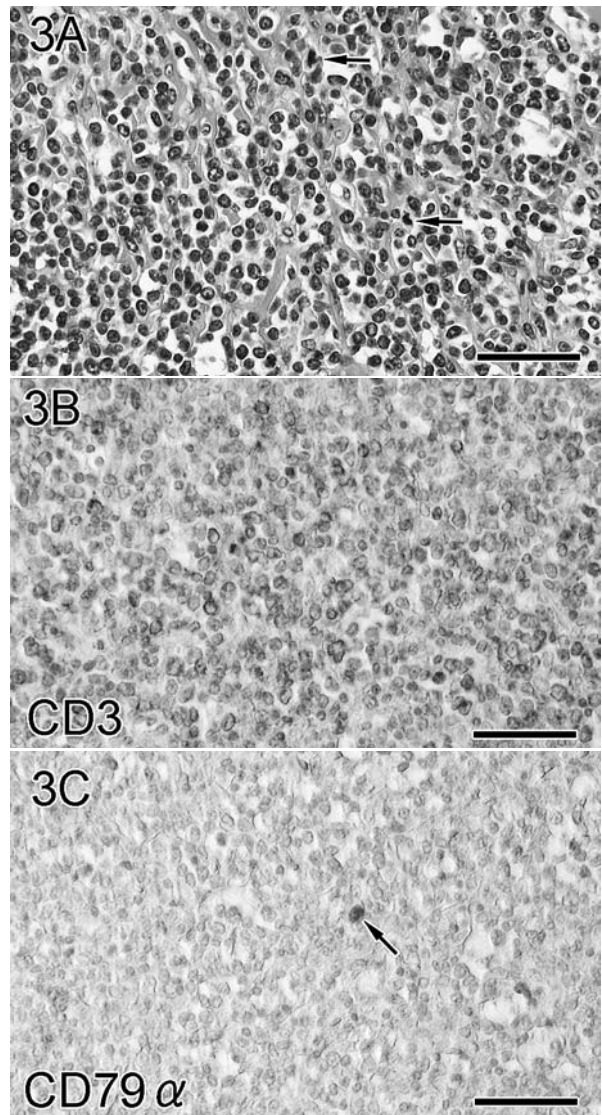


図3 浅頸リンパ節 (No. 8)

- 3A: 腫瘍細胞は単調なリンパ球から構成され, 大小不同の類円形核と僅かな細胞質を有し, 時折核分裂像 (矢印) が観察される。  
(HE染色 Bar = 50 $\mu$ m)
- 3B: 腫瘍細胞は抗CD3抗体にび漫性に陽性を示す。  
(免疫染色 CD3 Bar = 50 $\mu$ m)
- 3C: 一方, 抗CD79 $\alpha$ 抗体には少数の細胞が陽性 (矢印) を示す。  
(免疫染色 CD79 $\alpha$  Bar = 50 $\mu$ m)

れた。また, EBL以外の散発型牛白血病には, 子牛型, 胸腺型, 皮膚型が含まれるが, この症例はいずれの分類にも該当しない非定型牛白血病である可能性が疑われた。本事例の検索結果より, EBLを最終診断するためには, 遺伝子型別の検索の他に, 腫瘍細胞のマーカーを用いた免疫組織学的手法の併用が必要と思われる。

今回の調査はEBL発症牛のみであるが, 今後は現在飼育されている未発症牛を対象にBLVの感染状況を調査し, 感染牛を順次淘汰していくことがEBLの発生拡

大防止に最も有効な手段であると思われる。これには食肉衛生検査所のみならず、他の行政機関や産業界との連携が必須であり、EBLの清浄化に向けて各機関のさらなる協力態勢が肝要であると考ええる。

最後に、本調査の実施に当たり、ご理解とご協力をいただいた山形県内陸食肉衛生検査所の所員の皆様と関係各位に深謝する。

### 引用文献

[1] 村上健二, 小林創太, 筒井俊之: わが国の地方病性白血病の発生動向と対策, 日獣会誌, 62, 499-502 (2009)

[2] Asfaw Y, Tsuduku S, Konishi M, Murakami K, Tsuboi T, Wu D, Sentsui H: Distribution and superinfection of bovine leukemia virus genotypes in Japan, Arch Virol, 150, 493-505 (2005)

[3] Licursi M, Inoshima Y, Wu D, Yokoyama T, González ET, Sentsui H: Genetic heterogeneity among bovine leukemia virus genotypes and its relation to humoral responses in hosts, Virus Research, 86, 101-110 (2002)

[4] Fechner H, Blankenstein P, Looman AC, Elwert, Geue L, Albrecht C, Kurg A, Beier D, Marquardt O, Ebner D: Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle, Virology, 237, 261-269

(1997)

[5] Huijsmans CJ, Damen J, Linden JC, Savelkoul PH, Hermans MH: Comparative analysis of four methods to extract DNA from paraffin-embedded tissues: effect on downstream molecular applications, BMC Research Notes, 3, 239 (2010)

[6] Felmer R, Muñoz G, Zúñiga J, Recabal M: Molecular analysis of a 444bp fragment of the bovine leukemia virus gp51 *env* gene reveals a high frequency of non-silent point mutations and suggests the presence of two subgroups of BLV in Chile, Vet Microbiol, 108, 39-47 (2005)

[7] Licursi M, Inoshima Y, Wu D, Yokoyama T, González ET, Sentsui H: Provirus variants of bovine leukemia virus in naturally infected cattle from Argentina and Japan, Vet Microbiol, 96, 17-23 (2003)

[8] Rodriguez SM, Golemba MD, Campos RH, Trono K, Jones LR: Bovine leukemia virus can be classified into seven genotypes: evidence for the existence of two novel clades, J Gen Virol, 90, 2788-2797 (2009)

[9] Matsumura K, Inoue E, Osawa Y, Okazaki K: Molecular epidemiology of bovine leukemia virus associated with enzootic bovine leukosis in Japan, Virus Research, 155, 343-348 (2011)

## Genotyping of Bovine Leukemia Virus Circulating in Yamagata Prefecture and Pathological Study

Asuka SUTO\*, Ryuji IWATA and Chun-Ho PARK†

\* *Nairiku Meet Inspection Center, 827 Matoba, Nakano, Yamagata, 990-0892, Japan*

### SUMMARY

From 2009 to 2011, we genotyped the proviral DNA of bovine leukemia virus (BLV) extracted from the tumor tissue of bovine leukemia (BL) cases in Yamagata prefecture using the PCR-RFLP method. We also confirmed the origin of tumor cells by immunohistochemistry. The results of these studies indicate that most BL cases featured BLV genotypes 1 or 3, and that the tumors of 12 of 13 cases originated from B cells. Based on the present study, it is suggested that BLV genotype 1 or 3 is linked to enzootic bovine leukosis in Yamagata prefecture. — Key words: Bovine leukemia virus, genotype, PCR-RFLP.

† *Correspondence to: Chun-Ho PARK (Department of Veterinary Pathology, School of Veterinary Medicine, Kitasato University)*

*35-1 Higashi 23 Ban-cho, Towada, 034-8628, Japan*

*TEL 0176-24-9433 FAX 0176-23-8160 E-mail: baku@vmas.kitasato-u.ac.jp*

*J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 65, 883 ~ 887 (2012)*