

兵庫県中部でみられたホルスタイン種における 牛白血病の病態及び発症要因の検討

富田啓介^{1)†} 中条正樹¹⁾ 加茂前優花¹⁾ 矢島和枝¹⁾

浦本京也¹⁾ 竹嶋伸之輔²⁾ 間 陽子²⁾

1) 兵庫県姫路家畜保健衛生所 (〒670-0081 姫路市田寺東2-10-16)

2) 独理化学研究所 (〒351-0198 和光市広沢2-1)

(2012年2月16日受付・2012年9月24日受理)

要 約

2009年7～11月に、牛白血病を発症したホルスタイン種18戸18例の病態及び発症要因を調査した。発症牛の外貌異常は22%、血液中の異型リンパ球出現は56%、腫瘍の形態は全例び慢性大細胞リンパ肉腫、29月齢の1例はT細胞由来で牛白血病ウイルス (BLV) 陰性、45月齢以上の17例はB細胞由来ですべてBLV I型陽性であった。免疫染色でのP53蛋白の検出は、発症牛で29%陽性、未発症牛の0%に対し有意に高かった。牛免疫不全ウイルス (BIV) 検出PCRはすべて陰性であった。牛主要組織適合抗原 (BoLA)-DRB3 1501の遺伝子を保有する牛の割合は発症牛で75%であった。その対立遺伝子頻度は発症牛で41%と、BLV感染未発症高齢牛の22%に対し有意に高かった。以上より、発症牛の94%がBLV I型による地方病性牛白血病 (EBL) であった。また、BLV発症にはBIV感染は必ずしも必要でないこと、P53蛋白とBoLA-DRB3遺伝子型が、発症に関与する可能性が示唆された。

——キーワード：牛免疫不全ウイルス、牛白血病ウイルス、牛主要組織適合抗原、地方病性牛白血病、P53。

----- 日獣会誌 66, 109～114 (2013)

ここ数年、牛白血病の届出頭数が増加しており、その多くが牛白血病ウイルス (BLV) 感染によるB細胞性リンパ肉腫いわゆる地方病性牛白血病 (EBL) と考えられている [1, 2]。加えて、その発見場所は農場段階でなく食肉検査段階であることも少なくない。そこで、兵庫県中部における現状の把握を目的に、牛白血病の病態調査を行った。さらに対策の一助に資するために、発症要因調査として、癌抑制遺伝子の核内蛋白として知られ多くの腫瘍で変異を認めるP53の関与 [3-6]、抗病性の低下を招くとされる牛免疫不全ウイルス (BIV) 感染の有無 [7-9]、発症に関与すると考えられる牛主要組織適合抗原 (BoLA) DRB3座の遺伝子型別 [10-12] を実施した。

材料及び方法

臨床及び一般血液検査：2009年7～11月に兵庫県中

部で白血病を発症したホルスタイン種 (29～140月齢) 18戸18例 (No. 1, 2：農場発見, No. 3-18：食肉検査センター発見, 確定診断は病理組織学的検査による) について、体表リンパ節の腫大等の外貌検査及び血液中の白血球数、異型リンパ球の有無を検査した。

病理学的検査：発症牛18例の腫瘍化した臓器について10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定、常法により組織学的検査を行った。HE染色で形態分類を、さらに以下の免疫染色を実施した。B細胞マーカーとして抗CD79 α 抗体 (HM57, 株ニチレイ, 東京), T細胞マーカーとして抗CD3抗体 (PS1, 株ニチレイ, 東京) を用い、SAB法 (ヒストファインSAB-PO, 株ニチレイ, 東京) にて腫瘍細胞の由来を分類した。P53蛋白の検出は、抗P53抗体 (DO-7, 株ニチレイ, 東京) を用い、対照としてホルスタイン種 (59～129月齢) の非腫瘍化リンパ節22戸22例 (No. 19-40) について、同様に

† 連絡責任者(現所属)：富田啓介 (内閣府食品安全委員会事務局)

〒107-6122 港区赤坂5-2-20 赤坂パークビル22F

☎03-6234-1100 FAX 03-3584-7391

E-mail : keisuke.tomita@cao.go.jp

表1 発症牛の病理検査成績

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
発見場所	農場	農場	食検	食検	食検	食検	食検	食検	食検	食検	食検	食検	食検	食検	食検	食検	食検	食検
月 齢	29	45	50	51	62	67	68	78	82	82	82	83	84	90	98	117	128	140
一般増殖性*	び漫	び漫	び漫	び漫	び漫	び漫	び漫	び漫	び漫	び漫	び漫	び漫	び漫	び漫	び漫	び漫	び漫	び漫
染色大きさ**	大	大	大	大	大	大	大	大	大	大	大	大	大	大	大	大	大	大
免疫染色																		
CD3 (T-cell)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD79 (B-cell)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P53***	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-

*：び漫性とは、病変部分が限定されず広い範囲に浸潤・増殖している様相。

**：腫瘍性に増殖しているリンパ球の大きさにより、大中小の3段階で区分した。

***：発症牛28% (5/18) 陽性，対照 (No. 19-40) すべて陰性 (0/22) で有意差あり (P<0.05)。

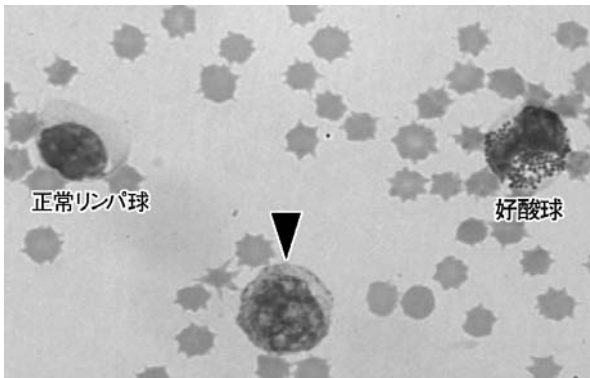


図1 発症牛の血液塗抹像 (症例10)

N/C比の高く、核及び細胞質辺縁が不正な異型リンパ球 (矢頭) がみられる (ヘマカラー染色 ×1000)。

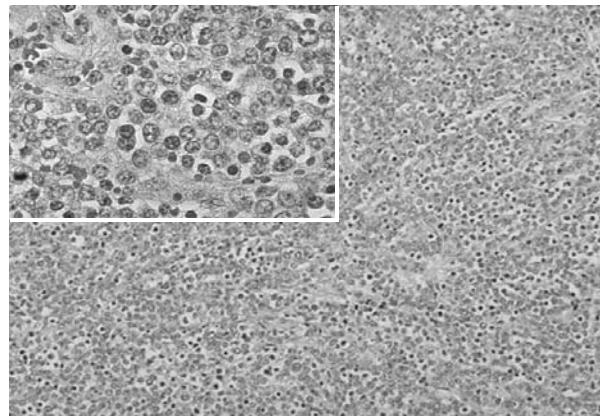


図2 発症牛のリンパ節病変 (症例16)

び漫性増殖がみられる。挿入図では、大型リンパ細胞が主体を占める。(HE染色 ×200 挿入図：×1000)

免疫染色を実施した。

ウイルス学的検査：抗BLV抗体検査は、発症牛18戸18例及びBoLA遺伝子型別の対照としたホルスタイン種未発症BLV感染高齢牛 (107～153月齢) の血液9戸39例 (No. 41-79) について、BLVのゲル内沈降反応 (AGID)・受身赤血球凝集反応 (PHA) を実施した。

BLV検出PCRは、発症牛17戸17例 (No. 1-8, 10-18) 及びBoLA遺伝子型別の対照牛9戸39例 (No. 41-79) の白血球について、市販キット (QIAamp DNA Blood Mini Kit, QIAGEN, U.S.A.) にてDNAを抽出後、BLVのenv遺伝子gp51を標的としたプライマーにて [13]，市販キット (PureTaq Ready-to-Go PCR Beads, GE Healthcare, U.K.) を用い実施した。BLV遺伝子型別は、得られたPCR産物を3種の制限酵素 (Bcl I, Pvu II, Hae III) を用い、RFLP法により実施した [14]。

BIV検出PCRは、同様にDNAを抽出後、pol遺伝子を標的としたプライマーにて [7] 実施した。

BoLA遺伝子型：発症牛16戸16例 (No. 1-8, 11-18)，対照としてホルスタイン種のBLV感染未発症高齢牛 (107～153月齢) の9戸39例 (No. 41-79) の白血球にて同様にDNAを抽出，BoLA DRB3遺伝子に対す

るPCR-sequence based typing法 [15] にて実施した。

統計解析：P53蛋白の発現の有無並びにBoLA遺伝子型について、発症牛群と未発症牛群の成績をフィッシャーの正確確立検定を用い解析，P<0.05を有意な差とした。

成 績

臨床及び一般血液検査：発症牛では体表リンパ節の腫大等の外貌異常が22% (4/18)，白血球増加 (13,000/ μ l以上) が検査可能であった56% (9/16) (No. 1-8, 10-15, 17, 18) (13,400～1,181,000/ μ l) 血液中の異型リンパ球の出現が検査可能であった57% (8/14) (No. 1-3, 6-8, 10-13, 15-18) (図1) でみられた。また，血液中に異型リンパ球のみられた個体の白血球百分比では，リンパ球の割合は68～99%，リンパ球中の異型リンパ球の割合は12～92%であった。

病理学的検査：HE染色では全例 (18/18) び漫性大細胞リンパ肉腫に分類された (表1，図2)。免疫染色では，CD3陽性のT細胞性リンパ肉腫が6% (1/18) (29月齢)，CD79 α 陽性のB細胞性リンパ肉腫が94% (17/18)

表2 ウイルス検査成績

No.	1	2~18	41~79
月齢	29	45~140	107~153
腫瘍由来	T	B (17/17)	-
BLV抗体検査			
AGID陽性率	0% (0/1)	100% (15/15)	56% (22/39)
PHA陽性率	NT	100% (16/16)	74% (29/39)
BLV抗原検査			
PCR陽性率	0% (0/1)	100% (16/16)	100% (39/39)
遺伝子I型	NT	100% (16/16)	100% (38/38)
BIV抗原検査			
PCR陽性率	0% (0/1)	0% (0/16)	0% (0/39)

NT：未実施

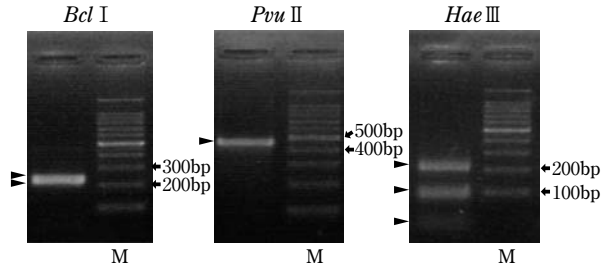


図3 BLVのRFLP解析結果(症例4)

Bcl Iにより225bp, 220bp(非常に近い分子量のため重なって見える), *Pvu* IIにより444bp, *Hae* IIIにより220bp, 100bp及び85bpに切断されI型に分類される。

表3 発症牛並びにBLV感染未発症高齢牛の個体別のBoLA-DRB3遺伝子型成績

白血病発症牛					BLV感染未発症高齢牛				BLV感染未発症高齢牛			
No.	腫瘍由来	月齢	遺伝子型		No.	月齢	遺伝子型		No.	月齢	遺伝子型	
1	T	29	1501	0101	41	110	1501	2703	61	109	1501	0101
2	B	45	14011	0101	42	127	1501	1501	62	107	1201	1101
3	B	50	1501	0101	43	112	1001	14011	63	108	0101	0101
4	B	51	251	1501	44	115	14011	1501	64	135	2703	0101
5	B	62	1501	1501	45	114	0201	2703	65	116	14011	0101
6	B	67	1101	1501	46	115	0701	0101	66	135	1201	1501
7	B	68	1101	1501	47	116	1101	2703	67	127	1001	0201
8	B	78	1501	2703	48	116	0701	20012	68	114	1101	1501
9	B	82	NT		49	119	1101	1501	69	107	1101	1501
10	B	82	*		50	129	0201	2703	70	131	2703	0101
11	B	82	1201	1501	51	134	1201	2703	71	124	1001	1801
12	B	83	1501	101	52	131	1201	1501	72	124	1101	14011
13	B	84	1501	2703	53	134	0902	1701	73	118	0201	1501
14	B	90	14011	2703	54	135	1201	2703	74	111	1201	1101
15	B	98	1001	14011	55	153	0601	902	75	109	0902	1501
16	B	117	1501	2703	56	114	0101	0101	76	107	1001	1501
17	B	128	1001	1001	57	141	1201	1501	77	122	1501	1501
18	B	140	1101	1501	58	122	1201	1101	78	108	1101	2703
					59	124	1101	0101	79	124	1101	1501
					60	144	1201	0101				

NT：未実施 *：遺伝子増幅されず

(45~108月齢)であった(表1)。P53蛋白は、B細胞性リンパ肉腫の29%(5/17)で検出、対照の未発症牛の0%(0/22)に対し有意差を認めた($P < 0.05$, フィッシャーの正確確立検定)(表1)。

ウイルス学的検査：BLV抗体検査は、T細胞性リンパ肉腫の1例(No. 1)はAGID試験陰性であったが、B細胞性リンパ肉腫は検査が可能であった全例でAGID試験(15/15)(No. 2-8, 10-15, 17, 18), PHA試験(16/16)(No. 3-18)陽性であった。BLV検出PCRは、T細胞性リンパ肉腫の1例は陰性であったが、B細胞性

リンパ肉腫は検査が可能であった全例(16/16)(No. 2-8, 10-18)陽性、遺伝子型は、全例(16/16)I型だった(表2, 図3)。BoLA遺伝子型別の対照とした、未発症高齢牛は、BLV検出PCRは、全例(39/39)陽性、遺伝子型は、判定のできなかった1例(No. 69)を除き全例(38/38)(No. 41-68, 70-79)I型であった(表2)。BIV検出PCRは発症牛(0/18)及びBLV感染未発症高齢牛(0/39)ともにすべて陰性であった(表2)。

BoLA遺伝子型：発症牛では、結果の得られた75%(12/16)が1501対立遺伝子をホモかヘテロの組み合わせ

表4 発症牛と未発症牛のBoLA-DRB3対立遺伝子ごとの出現頻度の比較

遺伝子型	出現頻度(%)		Fisher検定	
	発症牛 n=32 (16頭×2)	未発症牛 n=78 (39頭×2)	両側	片側
0101	12.5	14.1	n.s.	n.s.
1101	9.4	14.1	n.s.	n.s.
1201	3.1	11.5	n.s.	n.s.
1501	40.6	21.8	n.s.	*
2703	12.5	9.0	n.s.	n.s.
その他11	21.9	29.5	n.s.	n.s.

n.s.: 非有意 *P<0.05

せで保有していた(表3)。発症牛と未発症牛のBoLA-DRB3対立遺伝子ごとの出現頻度の比較では、発症牛での1501の出現頻度は41%と、BLV感染未発症高齢牛の22%に対し有意に高かった(P<0.05, フィッシャーの正確確立検定)(表4)。

考 察

兵庫県中部における牛白血病の病態調査では、発症牛の外貌異常は22%、血液中の異型リンパ球の出現は57%と、臨床検査では異常を示さない例が存在した。血中リンパ球増多症を示さない非白血性白血病の存在や[16]、体表リンパ節の腫大や血液検査異常を認めない例があるとの報告に合致し[17]、生前診断が困難な例が、食肉検査段階で摘発されているものと推察された。生前診断の一助として、坂本ら[18]は発症牛において血清チミジンキナーゼ値の上昇を応用している。また、宗村ら[19]は、BLV感染牛の血液では、EBL発症牛と比較し、リアルタイムPCRを用いたBLV遺伝子のコピー数に有意差は認めなかったものの、中央値はEBL発症牛のもの比べて低い傾向が認められたとしている。今後、本研究においても、これらについても検討が必要である。

腫瘍の形態は、T細胞性リンパ肉腫が29月齢の1例でBLV陰性、B細胞性リンパ肉腫が45~140月齢の17例ですべてBLV陽性であった。これより今回の牛白血病の94%がEBLであることが判明した。

BLVの遺伝子型はすべてI型であった。Asfawら[20]は、日本ではI型が48.3%、III型が32.7%、南ら[21]は石川県ではI型が86.5%III型が4.1%と報告している。当地域も石川県同様、I型が主流であることが明らかになった。今回の成績では全例がI型であったため、BLV遺伝子型による発症差の比較はできなかった。

免疫染色によるP53蛋白の検出は、EBL発症牛で29%(5/17)陽性、未発症牛に対し有意差を認めた。P53蛋白には、野生型と変異型があり、変異型のみ核内

に長期に蓄積されるため、免疫染色では、変異型P53蛋白を検出することになる[5]。BLV性リンパ肉腫細胞において、P53遺伝子の変異が50~66%でみられ、これが発症に関与しているとの報告[3,4]がある。今回は変異型P53蛋白の検出であるが、これらの報告を裏付けるものであった。さらにヒトでは血液中P53抗体の検出は、変異型P53蛋白の検出に有効とされており[6]、同様に牛白血病の発症の生前診断に応用可能と思われる。

BIV検出PCRはすべて(0/18)陰性であった。BIV感染による免疫系変化による抗病性の低下や[8]、BLV発症農家でのBIV感染例[9]の報告があるが、BLVの発症には必ずしもBIVの感染は必要でないことが確認できた。

BoLA遺伝子型は、発症牛の75%(12/16)で1501を保有、その出現頻度は40.6%と、BLV感染未発症高齢牛に対し有意に高かった(P<0.05)。BoLA遺伝子型が白血病発症に関わっているとの報告や[10-12]、BoLA1501型は有意に高くプロウイルス量の増加へ導くとの[12]報告がある。一方、未発症牛でのBoLA1501型の割合は21.8%、ホモで持ちながら129月齢まで健康に生存している例もある。今後はより精度を増すために、サンプリングの地域を広げ、さらに例数を増やした調査が必要である。

以上より、今回の発症例の94%はBLVI型によるEBLであった。また、BLVの発症には必ずしもBIVの感染は必要でないこと、P53蛋白の変異とBoLA遺伝子型の相違が、発症に何らかの役割を担っている可能性が示唆された。

EBL対策の第一選択肢は、BLVの清浄化である。一方、BoLA遺伝子型情報などを活用した発症リスク低減策も活用したいと考える。

採材にご協力いただいた兵庫県食肉衛生検査センター・西播磨食肉衛生検査所の塚本洋氏、柴折浩幸氏、岡畑一幸氏に感謝する。

本研究は科学研究費補助金・基盤研究(A・B)及び生研センター・イノベーション創出基礎研究推進事業の支援を受けて行われた。

引用文献

- [1] 小倉弘明: 牛白血病の発生動向と対応, 日獣会誌, 60, 318-319 (2007)
- [2] 小沼操: 牛白血病, 牛病学, 221-215 (1988)
- [3] Ishiguro N, Furuoka H, Matsui T, Horiuchi M, Shinagawa M, Asahina M, Okada K: p53 mutation as a potential cellular factor for tumor development in enzootic bovine leukosis, Vet Immunol Immunopathol, 55, 351-358 (1997)
- [4] Tajima S, Zhuang WZ, Kato MV, Okada K, Ikawa Y, Aida Y: Function and conformation of wild-type p53

- protein are influenced by mutations in bovine leukemia virus-induced B-cell lymphosarcoma, *Virology*, 243, 235-246 (1998)
- [5] 片岡正文, 岡林孝弘, 中島 明, 中谷 紳, 上平裕樹, 武田 晃, 折田薫三, 能見貴人, 金沢 浩: 大腸がん, 胃がん, 肺がん症例における p53 の免疫組織化学的検討および SSCP 法による点突然変異検出: 日消外会誌, 27, 71-77 (1994)
- [6] 島田英昭: 血清 p53 抗体測定法の開発と臨床的意義, *モダンメディア*, 54, 11-15 (2008)
- [7] Meas S, Kabeya H, Yoshihara S, Ohashi K, Matsuki S, Mikami Y, Sugimoto C, Onuma M: Seroprevalence and field isolation of bovine immunodeficiency virus, *J Vet Med Sci*, 60, 1195-1202 (1998)
- [8] Snider TG, Hoyt PG, Jenny BF, Coats KS, Luther DG, Storts RW, Battles JK, Gonda MA: Natural and experimental bovine immunodeficiency virus infection in cattle, *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 13, 151-176 (1997)
- [9] Usui T, Meas S, Konnai S, Ohashi K, Onuma M: Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in dairy and beef cattle in Hokkaido, *J Vet Med Sci*, 65, 287-289 (2003)
- [10] Mirsky ML, Olmstead C, Da Y, Lewin HA: Reduced bovine leukaemia virus proviral load in genetically resistant cattle, *Anim Genet*, 29, 245-252 (1998)
- [11] 間 陽子, 竹嶋伸之輔: 白血病と乳房炎感受性と牛主要組織適合抗原複合体 (BoLA) の遺伝的多型性, *獣医畜産新報* 60, 925-927 (2007)
- [12] Juliarena MA, Poli M, Sala L, Ceriani C, Gutierrez S, Dolcini G, Rodríguez EM, Marino B, Rodríguez-Dubra C, Esteban EN: Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3. 2 gene. *Anim Genet*, 39, 432-438 (2008)
- [13] Fechner H, Blankenstein P, Looman AC, Elwert J, 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)
- [14] 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 Res*, 86, 101-110 (2002)
- [15] Takeshima S, Ikegami M, Morita M, Nakai Y, Aida Y: Identification of new cattle BoLA-DRB3 alleles by sequence-based typing, *Immunogenetics*, 53, 74-81 (2001)
- [16] Ohshima K, Ozai Y, Okada K, Numakunai S: Pathological studies on aleukemic case of bovine leukosis, *Jpn J Vet Sci* 42, 297-309 (1980)
- [17] 田川直人, 下田 嵩, 富樫義彦, 渡辺由紀, 古林与志安, 古岡秀文, 石井三都夫, 猪熊 壽: 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, 5, 936-940 (2008)
- [18] 坂本礼央, 大林 哲, 古林与志安, 杉本高太郎, 石井三都夫, 猪熊 壽: 血清チミジンキナーゼ活性の測定により早期摘発した地方病性牛白血病罹患牛の一例, *日獣会誌*, 63, 191-193 (2010)
- [19] 宗村佳子, 赤瀬 悟, 星野博之, 村上賢二: リアルタイム PCR による牛白血病診断法の検討, *獣医畜産新報*, 60, 1005-1012 (2007)
- [20] 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)
- [21] 南 藤子, 長井 誠, 堀 登, 長門正志, 林 みち子, 小前博文: 遺伝子検査を応用した牛白血病ウイルスの疫学的解析, *獣医畜産新報*, 59, 743-747 (2006)

Investigation into the Conditions and Factors Associated with the Onset
of Bovine Leukosis in Holstein Cows in Middle Hyogo Prefecture

Keisuke TOMITA*[†], Masaki CYUZYU, Yuka KAMOMAE, Kazue YAZIMA,
Kyoya URAMOTO, Shinnosuke TAKESHIMA and Yoko AIDA

* *Himeji Livestock Hygiene Service Center of Hyogo Prefecture, 2-10-16 Taderahigashi, Himeji,
670-0081, Japan*

SUMMARY

We investigated the conditions and factors associated with the onset of bovine leukosis in 18 Holstein cows from July to November 2009. Physical examinations revealed abnormalities in 22% cows, while blood tests revealed abnormal lymphocytes in the peripheral blood of 57% cows. Histological examinations revealed diffuse, large cell lymphosarcoma in all cows. T-cell lymphoma was detected in a 29-month-old cow without bovine leukemia virus (BLV) infection, while B-cell lymphoma was observed in the remaining 17 cows aged ≥ 45 months with BLV genotype I. Immunohistochemical examinations detected p53 proteins in 29% of leukemic cows with a significant difference compared with that in the control. PCR analysis did not detect bovine immunodeficiency virus (BIV) in any cow. Bovine leukocyte antigen (BoLA) DRB3 allele 1501 was detected in 75% of leukemic cows; allelic frequency was 41% and there was a significant difference compared with that in the control. These findings suggest that nearly all cases of bovine leukosis in this study were enzootic bovine leukosis with BLV genotype I, that onset of bovine leukosis does not necessarily require BIV infection, and that p53 and BoLA-DRB3 alleles play some role in the onset of bovine leukosis.

— Key words : Bovine immunodeficiency virus, Bovine leukemia virus, Bovine leukocyte antigen, Enzootic bovine leukosis, p53.

[†] *Correspondence to : Keisuke TOMITA (Cabinet Office Government of Japan, Food Safety Commission)*

Akasaka Park Bld., 22nd F., 5-2-20 Akasaka, Minato-ku, 107-6122, Japan

TEL 03-6234-1100 FAX 03-3584-7391 E-mail : keisuke.tomita@cao.go.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 66, 109 ~ 114 (2013)