

# 牛白血病ウイルスに感染した黒毛和種牛の臨床例における免疫状態

伊澤智宏<sup>1)</sup> 田中健一郎<sup>2)</sup> 柿沼清市<sup>3)</sup> 杉山由夏<sup>4)</sup> 松田敬一<sup>5)</sup>  
小比類卷正幸<sup>1)</sup> 今内 覚<sup>6)</sup> 大塚浩通<sup>2)†</sup>

- 1) 小比類巻家畜診療サービス (〒039-2683 東北町大平63-3)
- 2) 北里大学獣医学部 (〒034-8628 十和田市東二十三番町35-1)
- 3) 柿沼獣医科医院 (〒367-0212 本庄市児玉町児玉200-1)
- 4) 胆江地域農業共済組合 (〒023-0023 奥州市水沢区字八反町52番地1)
- 5) 宮城県農業共済組合連合会中央家畜診療センター (〒989-6251 大崎市古川小野字嵐山26-1)
- 6) 北海道大学大学院獣医学研究科 (〒060-0818 札幌市北区北18条西9丁目)

(2013年6月3日受付・2014年1月24日受理)

## 要 約

牛白血病ウイルス (BLV) に感染した黒毛和種雌牛における免疫状態を明らかにするため末梢血白血球ポピュレーションと単核球のサイトカイン並びに免疫関連因子を解析した。供試牛は黒毛和種成牛32頭で、BLV抗体陽性で地方病性牛白血病 (EBL) を発症した発症群 (N = 9)、BLV抗体陽性であるが臨床異常の認められなかった保因群 (N = 13) とBLV抗体陰性で臨床的に健康であった非保因群 (N = 10) である。供試牛の末梢血を採取し、白血球表面抗原を解析するとともに、サイトカイン並びにT細胞の細胞傷害因子であるパーフォリン (perforin : Pf) 及びグランジュライシン (granulysin : Gl) 並びに抗ウイルス物質MX-1とMX-2のmRNA発現量を解析した。発症群のWC1-N1<sup>+</sup>T細胞数は非保因群に比べ有意に低く、CD14<sup>+</sup>細胞数並びにMHC class-II<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>細胞は有意に高値であった。また発症群のPf並びにMX-2 mRNA発現量は非保因群と比べて有意な低値を示した。このことから、EBLであった黒毛和種牛では $\gamma\delta$ T細胞の減少と細胞傷害及び抗ウイルス因子の遺伝子発現が低下していることが示唆された。

—キーワード：牛白血病ウイルス，サイトカイン，免疫関連物質，黒毛和種牛，白血球ポピュレーション。

----- 日獣会誌 67, 328～332 (2014)

牛白血病ウイルス (BLV) の感染では病態の進行にともない、リンパ節や末梢血中にB細胞が増多して、リンパ節の腫脹や諸臓器へのリンパ球の浸潤とそれともなう機能傷害を誘発し、地方病性牛白血病 (EBL) を発症すると淘汰対象となる。牛への実験的なBLV感染では末梢血中のB細胞割合の上昇にともなってT細胞割合が低下する [1]。またBLV高率感染牧場において無作為に選出した搾乳牛の末梢血B細胞が増多、NK細胞数が減少していることが報告されている [2]。BLV感染した牛では単核球のIL-10遺伝子発現が低下するが [3]、リンパ球増多症の症例ではそうではない症例に比べて単

核球のインターロイキン (IL)-12 p40やインターフェロン (IFN)- $\gamma$ 等のサイトカイン遺伝子発現が低下する [4]。さらにBLV感染牛では、免疫応答の抑制的制御を司るFoxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞とリンパ球数並びにBLVウイルス量とに正の相関性があり、BLV感染牛のIFN- $\gamma$ 遺伝子発現が低下していることが報告されている [5]。これらのことから、牛へのBLVの感染後のEBL発症にIFN- $\gamma$ やIL-12の低下により細胞性免疫機能の低下が関与していることが示唆されるが、EBLを発症した臨床例での末梢血の免疫状態に関する報告は見当たらない。

† 連絡責任者：大塚浩通 (北里大学獣医学部)

〒034-8628 十和田市東二十三番町35-1

☎0176-23-4371 FAX 0176-23-8703

E-mail : otsuka@vmass.kitasato-u.ac.jp

表1 real-time PCRで利用したプライマーデザイン

Gene	Accession Number	Product Length	Primer Designation	Sequence (5'-3')
$\beta$ -actin	NM_173979.3	76	Forward	CCCAGATCATGTTCGAGACC
			Reverse	GAGGCATACAGGGACAGCAC
IFN- $\gamma$	NM_174086	108	Forward	TCAAATTCGGGTGGATGATCT
			Reverse	CTTCTCTCCGCTTTCTGAGG
IL-12	NM_174356.1	123	Forward	GGACATCATCAAACCAGACCC
			Reverse	AGGGAGAAGTAGGAATGCGG
GI	NM_001075143.1	136	Forward	GAGATCAGCCCGATGAGAATAC
			Reverse	TTTCCAGCTACGATGTCCTCA
Pf	NM_001143735.1	105	Forward	ACTCCGAGGATGCCAACTTC
			Reverse	TGTGCACCAGGTGAAAACCTGTA
MX-1	NM_173940.2	116	Forward	AGGATCACGCACATTTTCAGG
			Reverse	CAACAGGGCAGAGTTTACAA
MX-2	NM_173941.2	80	Forward	CCTACAAGTGCACAGGTGACAAAC
			Reverse	CTCTACGCTTCCACGGGAGA

パーフォリン (perforin : Pf) やグラニューライシン (granulysin : GI) は、ナチュラルキラー (natural killer : NK) 細胞、細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T cell : CTL) が産生する細胞傷害性因子で、ウイルス感染細胞や腫瘍細胞に対して放出され、アポトーシスを誘導する [6, 7]. 人のウイルス性 T 細胞白血病 (HTLV-1) 発症患者では保因者に比べて、抗 HTLV-1CD8<sup>+</sup>T 細胞の細胞内 Pf 発現が低下していると報告されている [8]. またウイルス抵抗性遺伝子 (MX) は IFN によって活性化され RNA ウイルスの増殖を抑制する物質であり、ウイルス感染症において産生誘導される [9]. これらのことから、ウイルス感染性腫瘍性疾患である地方病性牛白血病ではサイトカイン以外にも抗腫瘍や抗ウイルス作用の異常が発症に関与する可能性がある。しかし現在までの BLV 感染牛における免疫動態として、免疫細胞数やサイトカインに関する報告はあるものの、EBL 牛における抗腫瘍因子や抗ウイルス因子に関しては明らかにされていない。特に黒毛和種牛における BLV 感染例に関しては病理学的な報告はあるものの [10], 免疫動態に関してはほとんど知られていない。そこで、EBL を発症した黒毛和種牛の免疫状態の特徴を明らかにするため、臨床例を対象に末梢血白血球ポピュレーション及び細胞傷害因子、抗ウイルス因子を解析した。

#### 材料及び方法

**供試牛：**宮城、岩手、青森県内の牧場で飼育されていた黒毛和種成牛の雌 31 頭を用いた。このうち寒天ゲル内免疫沈降反応 (AGID) 検査にて陽性であり EBL であった症例を発症群 (n = 9), AGID 検査陽性であるが臨床的な異常の認められなかった個体を保因群 (n = 12), 並びに AGID 検査陰性で臨床的に健康であった個体を非保因群 (n = 10) とした。なお、EBL 群では、沈衰、食

欲廃絶、起立難渋あるいは起立不能であり、可視粘膜の蒼白、体表または腹腔内リンパ節の硬結・腫脹など、EBL の典型的所見が観察された。

**採血と血球の測定：**供試牛の血液は頸静脈または尾静脈から採血し、白血球表面抗原及びサイトカイン並びに細胞傷害因子、抗ウイルス因子の mRNA 発現量の解析に供した。白血球数の測定は全自動血球計数器 (MEK-6450, セルタック  $\alpha$ , 日本光電工業株, 東京) により実施した。

**末梢血白血球ポピュレーションの解析：**白血球表面抗原の解析は間接蛍光抗体法にて牛の白血球に対する抗体 (VMRD, U.S.A.) を使用して実施した。抗 CD3 (MM1A), 抗 CD4 (CACT138A), 抗 CD8 (BAQ111A), 抗 WC1-N1 (B7A1) 及び抗 MHC class-II (CAT82A), 抗 CD335 (MCA2365) (AbD Serotec, U.K.) 及び抗ヒト CD14 (MY-4, ベックマン・コールター株, 東京) を反応後、PBS で洗浄し、二次抗体として (FITC 標識抗マウス IgM 抗体, ICN Biomedicals, U.S.A.) 及び (PE 標識抗マウス IgG1 抗体, ICN Biomedicals, U.S.A.) を加え、4℃で 30 分間反応させ、細胞解析装置 (Cytomics FC500, Beckman Coulter, U.S.A.) で測定した。成績はこれまでの方法 [11] に準じて単核球と顆粒球を区分、計算して実数値を示した。

**real-time PCR 解析：**real-time PCR 解析はこれまでの方法 [12] と同様に行った。ヘパリン血から細胞分離用試薬 (リンホセパール I, 株免疫生物研究所, 群馬) を用いて単核球を分離し、 $5 \times 10^6$  個/ml の細胞浮遊液を  $10 \mu\text{g/ml}$  の phytohemagglutinin-P (PHA, SIGMA CHEMICAL Co., U.S.A.) を添加した 10% FCS 加 RPMI Medium 1640 にて 37℃, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で 12 時間培養した。培養後、分離用試薬 (TRIzol Reagent, インビトロジェン株, 東京) を用いて総

表2 末梢血免疫細胞数の比較

項目	発症群	保因群	非保因群
単核球	97.20 ± 53.08 <sup>a</sup>	36.31 ± 18.02	37.08 ± 6.68 <sup>b</sup>
顆粒球	31.79 ± 14.59	63.11 ± 21.22	44.52 ± 20.19
CD3 <sup>+</sup>	16.28 ± 8.27	9.21 ± 5.74	13.30 ± 2.50
CD4 <sup>+</sup>	5.81 ± 3.52	4.94 ± 3.25	7.90 ± 1.28
CD8 <sup>+</sup>	6.44 ± 2.97	20.00 ± 1.16	4.27 ± 1.28
CD14 <sup>+</sup>	17.76 ± 6.41 <sup>a</sup>	7.00 ± 2.25 <sup>a</sup>	2.85 ± 1.94 <sup>b</sup>
CD335 <sup>+</sup>	2.06 ± 1.99	1.38 ± 1.12	0.94 ± 0.49
WC1-N1 <sup>+</sup>	2.10 ± 0.80 <sup>a</sup>	2.53 ± 1.12	3.03 ± 0.81 <sup>b</sup>
MHC class-II <sup>+</sup>	60.68 ± 56.35 <sup>a</sup>	23.22 ± 21.65	13.13 ± 5.08 <sup>b</sup>
CD14 <sup>-</sup>			

平均 ± 標準偏差

異符号間に5%未満の有意差あり

単位は×10<sup>2</sup>/μl

表3 末梢血単核球のPHA刺激による各免疫関連因子の遺伝子発現量の比較

項目	発症群	保因群	非保因群
IL-12	1.65 ± 1.50	4.17 ± 3.74	2.04 ± 1.36
IFN-γ	23.36 ± 23.64	119.38 ± 74.39	192.56 ± 217.50
G1	1.85 ± 1.45	1.88 ± 0.71	3.21 ± 2.14
Pf	0.76 ± 0.44 <sup>a</sup>	0.85 ± 0.48	1.76 ± 1.11 <sup>b</sup>
MX-1	1.74 ± 2.54	0.74 ± 0.53	1.08 ± 1.05
MX-2	1.01 ± 1.66 <sup>a</sup>	1.35 ± 1.08	4.74 ± 3.75 <sup>b</sup>

平均 ± 標準誤差

異符号間に5%未満の有意差あり

単位は遺伝子発現量の相対値

mRNAを抽出し、キット (GoScript™ Reverse Transcriptase, Promega Corp, U.S.A.) を用いて逆転写反応を行った。合成したcDNAをReal-time PCR試薬 (SYBR® Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, U.S.A.) を用いて定量PCRに供した。使用したプライマーのデザインは表1に示した。PCR (Step One Plus™ Real Time PCR System, Applied Biosystems, U.S.A.) により得られた測定値は以下の計算式を用いて標準化したのち、各解析項目ごとにすべての数値の最小値を用いて除し、Log変換による補正を行った。

サイトカイン mRNA 発現量 =

$$2^{-\Delta(\text{対象 mRNA の } \Delta\text{CT 値} - \beta \text{ actin の } \Delta\text{CT 値})}$$

**統計:** 各測定値の統計・推計学的比較は、平均値及び標準偏差で表示し、Bonferroni法により多重比較を行い、5%以下の危険率で有意な差とした。

## 成 績

発症群の単核球数は非保因群に比べて有意に高かった。単核球、CD3<sup>+</sup>細胞数、CD4<sup>+</sup>細胞数、CD8<sup>+</sup>細胞数及びCD335<sup>+</sup>細胞数には3群間において有意な差は見られなかった。CD14<sup>+</sup>細胞数は発症群、保因群、非保因群の順に高い傾向にあり、発症群と保因群との間には有意な差が認められた。発症群のWC1-N1<sup>+</sup>T細胞は非保因群に比べ有意に少なかった。発症群のMHC class-II<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>細胞数は非保因群に比べ有意に高かった。

発症群のIFN-γ mRNA発現量は保因群並びに非保因群に比べ低い傾向にあったものの有意差は認められなかった。発症群のPf並びにMX-2 mRNA発現量は非保因群と比較し有意に低かった。IL-12、G1並びにMX-1 mRNA発現量においては各群間に有意な差を認めなかった。

## 考 察

EBLでは末梢血やリンパ節等にB細胞性の腫瘍性増殖がみられ [13]、本研究でも発症群のMHC class-II<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>B細胞数が非保因群に比べて高く、黒毛和種においてこれまでの黒毛和種以外でのEBLの報告と同様にB細胞の増殖が示された。また発症群ではγδT細胞であるWC1-N1<sup>+</sup>T細胞が非保因群に比べて低かった。γδT細胞はウイルスの初期感染防御を担うとされ [14, 15]、Lundbergら [16] は、無症状のBLV感染牛では、γδT細胞がBLVエンベロープを発現している標的細胞に対して特異的に細胞傷害性の免疫応答を誘導することを報告している。BLV感染しリンパ肉腫を発症した羊では、相対的に末梢血γδT細胞の割合が低下する [17]。本研究の発症群における低γδT細胞数はEBLにともなった変化であったものと唆された。一方、EBL群並びに保因群では単球であるCD14<sup>+</sup>細胞数が非保因群に比べて有意に高かった。これまでAGID検査陽性の臨床健康なホルスタイン種乳牛においてCD14<sup>+</sup>細胞数の上昇が観察されており [17]、本研究ではこの報告と類似した成績であった。BLVはB細胞だけでなく単球にも感染するとされているが [18]、BLVの転写はB細胞にのみ見られることが報告されているため [19]、本研究におけるCD14<sup>+</sup>細胞数の上昇における詳細は不明であり、今後の研究が必要である。

BLV感染牛への組み換えIFN-γの投与により末梢γδT細胞の増加とIgM<sup>+</sup>細胞の減少が観察されており [20]、本研究において発症群のIFN-γ mRNA発現反応が他の2群に比べ低下傾向にあったことは、低γδT細胞数や高MHC class-II<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>細胞数に影響した可能性がある。またリンパ球増多にあるBLV感染牛では増多のない個体に比べてIFN-γやIL-12 mRNA発現が低いことが明らかにされているが [3]、これらのサイトカインは保因群に比べリンパ球増多にあったEBL群にお

いて低い傾向にあり，発症群の免疫状態はこれまでの報告に類似した成績であった。

本研究では発症群における単核球の Pf mRNA 発現が非保因群に比べて有意に低かった。同じレトロウイルスに属するヒト T 細胞白血病ウイルス感染症においては，NK 細胞の細胞傷害活性が低下する [21]。IFN- $\gamma$  はキラー T 細胞や NK 細胞を活性化して Pf や G1 などの細胞傷害因子の産生を誘導する [22, 23]。また MX1 は核に局在し MX2 は細胞内に存在するウイルス増殖抑制物質である [24, 25]。本研究では発症群の MX2 遺伝子発現量が非保因群に比べ低下していたが，レトロウイルスは細胞質にて転写・複製を行って増殖するため，発症群ではウイルスが増殖しやすい状態であったかもしれない。しかし BLV 感染における MX 蛋白の動態に関しては報告が無く，発症群の MX2 遺伝子発現量だけが有意に低下したメカニズムは不明であり，詳細な研究が必要である。

本研究では EBL に至った黒毛和種牛において細胞性免疫機能の低下にあることが示唆され，これまでの BLV 感染における報告と類似した。一方，本研究では黒毛和種の EBL 牛では Pf 並びに MX2 遺伝子量が低下していることが明らかとなり，病態の進行に細胞傷害機能並びに抗ウイルス機能の低下が関与する可能性があった。

#### 引用文献

- [1] Klintevall K, Fuxler L, Fossum C : Bovine leukemia virus: early reflections in blood after an experimental infection of calves, *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 20, 119-130 (1997)
- [2] 柿沼清市, 大塚浩通, 大前佳穂里, 綾部杏子, 柿沼元治, 今内 覚, 及川正明 : 牛白血病ウイルス感染搾乳牛における末梢白血球ポピュレーション, *日獣会誌*, 64, 375-380 (2011)
- [3] Yakobson B, Brenner J, Ungar-Waron H, Trainin Z : Cellular immune response cytokine expression during the initial stage of bovine leukemia virus (BLV) infection determines the disease progression to persistent lymphocytosis, *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 23, 197-208 (2000)
- [4] Konnai S, Usui T, Ohashi K, Onuma M : The rapid quantitative analysis of bovine cytokine genes by real-time RT-PCR, *Vet Microbiol*, 94, 283-294 (2003)
- [5] Suzuki S, Konnai S, Okagawa T, Ikebuchi R, Shirai T, Sunden Y, Mingala CN, Murata S, Ohashi K : Expression analysis of Foxp3 in T cells from bovine leukemia virus infected cattle, *Microbiol Immunol*, 57, 600-604 (2013)
- [6] Sekiguchi N, Asano N, Ito T, Momose K, Momose M, Ishida F : Elevated serum granulysin and its clinical relevance in mature NK-cell neoplasms, *Int J Hematol*, 96, 461-468 (2012)
- [7] Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, Ganz T, Thoma-Uszynsky S, Melian A, Bogdan C, Porcelli SA, Bloom BR, Krensky AM, Modlin RL : An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin, *Science*, 282, 121-125 (1998)
- [8] Kozako T, Arima N, Toji S, Masamoto I, Akimoto M, Hamada H, Che XF, Fujiwara H, Matsushita K, Tokunaga M, Haraguchi K, Uozumi K, Suzuki S, Takezaki T, Sonoda S : Reduced frequency, diversity, and function of human T cell leukemia virus type 1-specific CD8<sup>+</sup> T cell in adult T cell leukemia patients, *J Immunol*, 177, 5718-5726 (2006)
- [9] Pletneva LM, Haller O, Porter DD, Prince GA, Blanco JC : Interferon-inducible Mx gene expression in cotton rats: cloning, characterization, and expression during influenza viral infection, *J Interferon Cytokine Res*, 26, 914-921 (2006)
- [10] Ishihara K, Ohtani T, Kitagawa H, Onuma M : Clinical studies on bovine leukemia in Japanese black cattle, IV. Serum immunoglobulin concentrations in leukemic cattle and those with negative and positive serum antibodies to bovine leukemia virus, *Nihon Juigaku Zasshi*, 42, 427-434 (1980)
- [11] Ohtsuka H, Kohiruimaki M, Hayashi T, Katsuda K, Matsuda K, Masui M, Abe R, Kawamura S : Relationship between leukocyte population and nutritive conditions in dairy herds with frequency appearing mastitis, *J Vet Med Sci*, 68, 113-118 (2006)
- [12] Maeda Y, Ohtsuka H, Tomioka M, Oikawa M : Effect of progesterone on Th1/Th2/Th17 and regulatory T cell-related genes in peripheral blood mononuclear cells during pregnancy in cows, *Vet Res Commun*, 37, 43-49 (2013)
- [13] Esteban EN, Thorn RM, Ferrer JF : Characterization of the blood lymphocyte population in cattle infected with the bovine leukemia virus, *Cancer Res*, 45, 3225-3230 (1985)
- [14] Amadori M, Archetti IL, Verardi R, Berneri C : Role of a distinct population of bovine gamma delta T cells in the immune response to viral agents, *Viral Immunol*, 8, 81-91 (1995)
- [15] Silflow RM, Degel PM, Harmsen AG : Bronchoalveolar immune defense in cattle exposed to primary and secondary challenge with bovine viral diarrhea virus, *Vet Immunol Immunopathol*, 103, 129-139 (2005)
- [16] Lundberg P, Splitter GA : Gammadelta(+) T-Lymphocyte cytotoxicity against envelope-expressing target cells is unique to the alymphocytic state of bovine leukemia virus infection in the natural host, *J Virol*, 74, 8299-8306 (2000)
- [17] Murakami K, Okada K, Amanuma H, Aida Y : The gamma delta T cell population in sheep experimentally infected with bovine leukemia virus, *Vet Pathol*, 31, 103-105 (1994)
- [18] Schwartz I, Bensaid A, Polack B, Perrin B, Berthelemy M, Levy D : In  *vivo* leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle, *J Virol*, 68, 4589-4596 (1994)
- [19] Wu D, Murakami K, Morooka A, Jin H, Inoshima Y,

- Sentsui H : In vivo transcription of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency-like virus, *Virus Res*, 97, 81–87 (2003)
- [20] Murakami K, Sentsui H, Inoshima Y, Inumaru S : Increase in gammadelta T cells in the blood of cattle persistently infected with bovine leukemia virus following administration of recombinant bovine IFN-gamma, *Vet Immunol Immunopathol*, 101, 61–71 (2004)
- [21] Masuda A, Matsuyama T, Yokoyama MM, Nozoe S, Tei C : Psychobehavioral and immunological characteristics of HTLV-1 carriers and non-carriers with persistently low natural killer cell activity, *Intern Med*, 39, 885–890 (2000)
- [22] Topham DJ, Tripp RA, Doherty PC : CD8<sup>+</sup> T cells clear influenza virus by perforin or Fas-dependent processes, *J Immunol*, 159, 5197–5200 (1997)
- [23] Russell JH, Ley TJ : Lymphocyte-mediated cytotoxicity, *Annu Rev Immunol*, 20, 323–370 (2002)
- [24] MacMicking JD : Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity, *Nature Rev Immunol*, 12, 367–382 (2012)
- [25] Horisberger MA : The action of recombinant bovine interferons on influenza virus replication correlates with the induction of two Mx-related proteins in bovine cells, *Virology*, 162, 181–186 (1988)

### Immune Status of Japanese Black Cattle in Clinical Cases of Bovine Leukemia Virus Infection

Tomohiro IZAWA<sup>1)</sup>, Ken-ichiro TANAKA<sup>2)</sup>, Sei-ichi KAKINUMA<sup>3)</sup>, Yuka SUGIYAMA<sup>4)</sup>,  
Kei-ichi MATSUDA<sup>5)</sup>, Masayuki KOHIRUIMAKI<sup>1)</sup>, Satoru KON-NAI<sup>6)</sup>  
and Hiromichi OHTSUKA<sup>2)</sup>†

- 1) *Kohiruimaki Animal Medical Service, 63-3 Ohdaira, Tohoku, 039-2683, Japan*
- 2) *School of Veterinary Medicine, Kitasato University, Higashi 23-35-1, Towada, 034-8628, Japan*
- 3) *Kakinuma Veterinary Hospital, 200-1 Kodama, Kodama-chou, Honjou, 367-0212, Japan*
- 4) *Tanko Agricultural Mutual Relief Association, 52-1 Hattan-machi, Mizusawa-ku, Oshu, 023-0023, Japan*
- 5) *Miyagi Prefectural Federated Agricultural Mutual Aid Association, 26-1 Arashiyama, Hurukawakono, Osaki, 989-6251, Japan*
- 6) *Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Kita 18, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo, 060-0818, Japan*

#### SUMMARY

To clarify the immune status of Japanese Black (JB) cattle infected with bovine leukemia virus (BLV), the peripheral leukocyte population and immune-related factors were analyzed. Thirty-two JB cattle were used for this investigation, and these cattle were divided into three groups: cattle with enzootic bovine leucosis (EBL) (EBL group, N=9), clinically healthy cattle infected with BLV (Carrier group, N=13), and clinically healthy cattle not infected with BLV (non-Carrier group, N=10). Leukocytes were analyzed for cell surface antigens as well as mRNA expressions of cytokines, perforin, granulysin, MX1 and MX2. The number of WC1-N1<sup>+</sup>T cells in the EBL group was significantly lower than in the non-Carrier group, but the number of CD14<sup>+</sup> cells and MHC class-II<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup> cells in the EBL group was significantly higher than in the non-Carrier group. The levels of perforin and MX-2 mRNA in the EBL group were significantly lower than in the non-Carrier group. These results suggest that there are decreased peripheral  $\gamma\delta$  T cells in terms of number, and cytotoxic and antiviral functions might be reduced in JB cattle with EBL.

— Key words : bovine leukemia virus, cytokines, immune-related factors, Japanese Black cattle, leukocyte population.

† Correspondence to : Hiromichi OHTSUKA (School of Veterinary Medicine, Kitasato University)

35-1 Higashi, Niju-san-ban-cho, Towada, 034-8628, Japan

TEL 0176-23-4371 FAX 0176-23-8703 E-mail : otsuka@vmas.kitasato-u.ac.jp

—J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 67, 328 ~ 332 (2014)