

## 原 著

## 岡山県内で流行している牛白血病ウイルスの遺伝子解析

葛谷光隆<sup>1)†</sup>橋本英典<sup>1)</sup>難波泰治<sup>2)</sup>

1) 岡山県食肉衛生検査所 (〒708-0843 津山市国分寺120-1)

2) 岡山県保健福祉部生活衛生課 (〒700-8570 岡山市北区内山下2-4-6)

(2016年3月24日受付・2016年7月26日受理)

## 要 約

岡山県の牛白血病ウイルス (BLV) 流行状況を明らかにするため、2009～2015年に所管と畜場で発見された県内産の牛白血病罹患牛59頭について、BLV遺伝子検出及び遺伝子型別を行った。その結果、全例がBLV陽性であり、また型別の結果、1型が45件と最も多く、次いで3型(8件)、5型(2件)、6型(2件)の順で、混合感染が2件認められた。1型及び3型は県内に広く分布していたのに対し、5型は県北部地域に、また6型は県北部のM町のみ分布していた。牛の品種と遺伝子型との関係では、黒毛和種で3型の検出率が有意に高かった。国内3例目の検出となる6型BLV株について、遺伝子系統解析を行ったところ、これらの株が独立したクラスターを形成すること、既知の6型株とは遺伝的に異なり、1型株または3型株に近縁であることがわかった。

——キーワード：牛白血病ウイルス、遺伝子解析、遺伝子型分布、岡山県。

-----日獣会誌 69, 617～621 (2016)

牛白血病は体表及び体腔内リンパ節の腫大や、各種臓器における腫瘍形成等の異常を示す疾病で、大きく地方病性(成牛型)と散发型に分類される[1]。地方病性牛白血病(enzoootic bovine leukosis: EBL)は、牛白血病ウイルス(bovine leukemia virus: BLV)の感染により引き起こされ、近年全国的にその発生が増加傾向にある[1]。牛白血病は届出伝染病に指定されていることから、と畜場において本疾病と診断された場合には全部廃棄処分となるため、畜産農家等にとって経済的損失は大きい。

BLVの分子疫学的解析手法としてPCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)法が広く用いられている。本法は、BLVのエンベロープ遺伝子領域における制限酵素切断部位の違いに基づいて遺伝子型別を行うもので、1～6型の存在が確認されている[2, 3]。これまでに、多くの都道府県においてBLV遺伝子型が調べられているが[2-5]、岡山県の場合については不明である。そこで、岡山県産(最長飼養地が岡山県)の牛白血病罹患牛(白血病牛)からBLV遺伝子の検出を試みるとともに、遺伝子型別を実施し、県内におけるBLVの流行状況に加え、遺伝子型と発症牛の品

種等との関連性について調査を行った。

## 材料及び方法

**検査対象：**2009年4月～2015年3月に、当所所管と畜場において牛白血病と診断された岡山県産牛のうち、末梢血または腫瘍臓器等が保存されていた59頭(ホルスタイン種41頭、黒毛和種17頭及び交雑種1頭)を対象とした。なお対象牛は、県南部～県北部の12市町村にある計44カ所の農場で飼育されていた。また牛白血病の診断基準は、解体時等にリンパ節や各種臓器に腫瘍塊が認められ、さらに血液塗抹または腫瘍組織スタンブ標本等で、異型リンパ球が多数観察された場合とした。検体については、凍結保存されていたものが29件(腫瘍組織15件、末梢血14件)、ホルマリン固定後にパラフィン包埋した状態で保存されていたものが30件であった。

**BLVの検出及び遺伝子型別：**検体からのDNA抽出は、市販キット(NucleoSpin® Tissue, タカラバイオ株、滋賀)を用いてマニュアルに従い実施した。抽出したDNAについて、BLVのエンベロープ遺伝子を標的としたnested PCR法[6]により、プロウイルス遺伝子

† 連絡責任者：葛谷光隆(岡山県食肉衛生検査所)

〒708-0843 津山市国分寺120-1

☎ 0868-26-0202 FAX 0868-26-6459

E-mail: mitsutaka\_kuzuya@pref.okayama.lg.jp

表 BLV 遺伝子検出及び遺伝子型別結果

年度	BLV 遺伝子検出結果	BLV 遺伝子型別結果					
		1型	3型	5型	6型	1+3型	1+5型
2009	4/4*	3					1
2010	3/3	3					
2011	9/9	5	2	1		1	
2012	12/12	10	2				
2013	16/16	13		1	2		
2014	15/15	11	4				
合計	59/59	45	8	2	2	1	1

\*陽性数/検査数

の検出を行った。すなわち、PCR用酵素として TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ(株), 滋賀) を使用し、Outer primer (*env5032* 及び *env5608r*) を用いた 1st PCR が 95°C 30 秒, 62°C 30 秒, 72°C 1 分 を 40 回, Inner primer (*env5099* 及び *env5521r*) を用いた 2nd PCR が 95°C 30 秒, 70°C 30 秒, 72°C 1 分を 40 回それぞれ実施し、2%アガロースゲル電気泳動により特異増幅産物 (1st PCR: 598 塩基対, 2nd PCR: 444 塩基対) の有無を確認した。次に、PCR法により増幅された 2nd PCR 産物を、制限酵素 *Bcl* I, *Hae* III 及び *Pvu* II (いずれもタカラバイオ(株), 滋賀) で 37°C, 2 時間処理後、2%アガロースゲル電気泳動により切断パターンを確認した。得られたパターンに基づき、Licursi ら [2] の報告に従い遺伝子型を同定した。

**病理学的検索:** 6 型 BLV 感染牛の腫瘍組織について、定法に従いホルマリン固定及びパラフィン包埋後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色切片を作製し、病理組織学的検索に使用した。また、抗ヒト CD3 (ダコ・ジャパン(株), 東京), 抗ヒト CD79 $\alpha$  (ダコ・ジャパン(株), 東京) 及び抗ヒト TdT (株ニチレイバイオサイエンス, 東京) 抗体を一次抗体として使用した免疫組織化学検査を実施した。

**遺伝子解析:** 遺伝子型別で 6 型と同定されたものについて、2nd PCR 産物を精製後、前述の Inner primer を用い、ダイレクトシーケンシングにより塩基配列を決定した。得られた配列について、W 系統解析フリーソフト (Clustal W, DNA Data Bank of Japan, 静岡) を用いて遺伝子系統解析を実施した。なお、同様の解析を 1,000 回繰り返した場合に、同一結果が得られる回数 (ブートストラップ値) で系統解析の信頼性を評価した。今回得られた塩基配列は、データベースに登録済みである (アクセッション番号: OKL65 株: LC132962, OKL85 株: LC132963)。

### 成 績

**BLV 検出結果及び遺伝子型別結果:** PCR 法及び遺伝

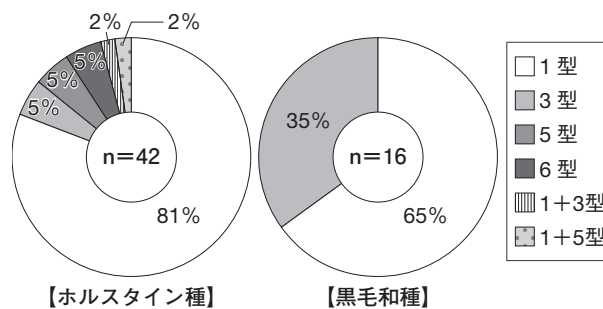


図1 品種別の遺伝子型検出割合

交雑種は1頭のみ(1型検出)のため図には加えていない。

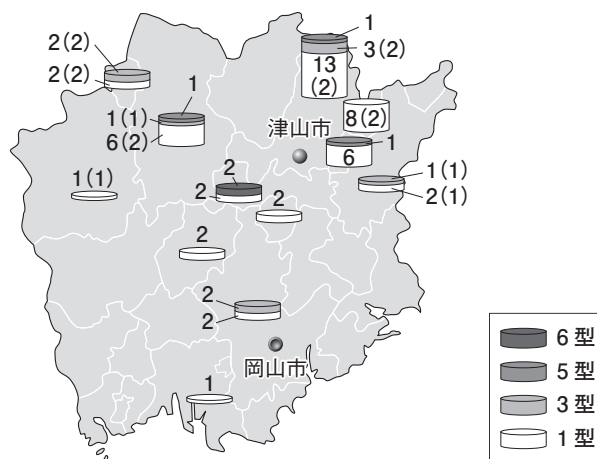


図2 BLV 遺伝子型の市町村別分布状況

カラム中の数字は検出頭数を示す(括弧内に黒毛和種の頭数を再掲)。混合検出例については、各型がそれぞれ1例ずつ検出されたものとした。

子型別の結果は表に示すとおり、59 検体すべてから BLV 遺伝子が検出され、型別の結果、1 型が 45 件、3 型が 8 件、5 型が 2 件、6 型が 2 件、1 型と 3 型混合及び 1 型と 5 型混合がそれぞれ 1 件であった。年度別では、1 型はすべての年度で検出されたのに対し、3 型及び 5 型はそれぞれ 3 つの年度において、また 6 型は 2013 年度のみ検出された(表)。次に、白血病牛の品種と検出遺伝子型の関係については図 1 に示すとおり、ホルスタイン種では 4 種類の遺伝子型が検出されたものの、その 81% を 1 型が占めていた。一方、黒毛和種では 1 型と 3 型の 2 種類のみが検出され、1 型が 65%、3 型が 35% を占めていた。なお、 $\chi^2$  検定の結果、黒毛和種の 3 型検出率がホルスタイン種のものに比べ有意に高い ( $P < 0.01$ ) ことがわかった。

**遺伝子型の地理的分布:** 白血病牛の飼育農場の所在地情報をもとに、市町村別の遺伝子型分布状況を調べた。結果は図 2 に示すとおり、1 型については白血病牛が飼育されていた 12 市町村すべてに分布していた。一方、3 型については県南部及び県北部の 5 市町村で、5 型は

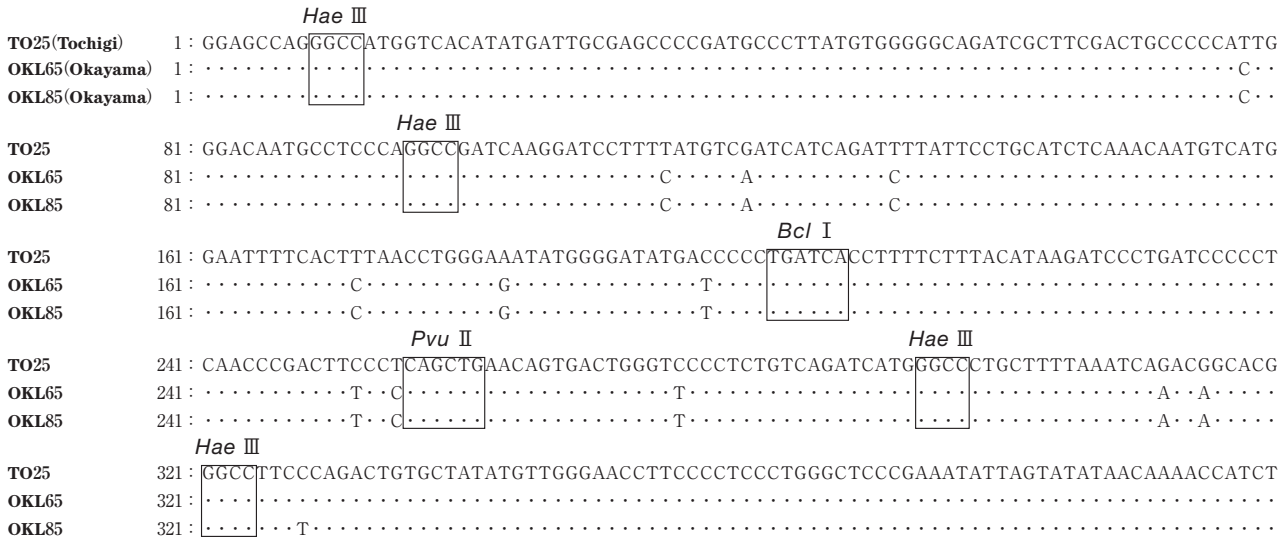


図3 6型BLV株のエンベロープ遺伝子アライメント結果

TO25株と同一塩基をドットで示し、株名の括弧内に検出県名を示した。制限酵素認識配列を四角で囲み、酵素名を上部に記した。

県北部の3市町でそれぞれ分布が認められたが、6型については、その分布が県北部のM町のみ限定されていた。

**6型BLV感染牛の臨床所見及び各種検査所見：**6型BLV感染による牛白血病は、全国的にもその報告がまれである。そこで、今回確認された6型感染の2症例(症例25-1及び25-18)について、さらに詳しい調査を行った。白血病牛は、2013年4月18日及び2014年1月7日に病畜(診断名は皮下血腫及び肝炎)として搬入された110カ月齢及び46カ月齢のホルスタイン種の雌で、同一町内の直線距離で約7kmと近距離にある農場からそれぞれ出荷されていた(出荷農場以外での飼育歴なし)。搬入時において体温等に異常は認められなかったが、いずれも消瘦が顕著であった。剖検所見では、体表リンパ節及び内臓付属リンパ節の髄様腫脹が認められたほか、症例25-1では心臓、肝臓実質内及び筋肉内に、症例25-18では心臓、肝臓実質内及び腎臓実質内にそれぞれ剖面が髄様の腫瘍病変が認められた。なお両症例とも、心臓以外では多数の腫瘍塊が播種性に散在していたが、このような所見は今回調べたほかの白血病牛には認められなかった。一方、実験室内検査においては、血液塗抹標本で多数の異型リンパ球が観察され、また肝臓実質、腎臓実質及び筋肉内の各腫瘍組織の病理組織学的検査においても異型リンパ球の高度浸潤像が認められ、さらに免疫組織化学検査により、異型リンパ球がB細胞に由来することがわかった。

**6型BLV株の遺伝子解析結果：**今回検出された6型株(OKL65株及びOKL85株と命名)のエンベロープ遺伝子配列(2nd PCR産物のプライマー部分を除く400塩基対)について、わが国で検出された6型BLV

のうち、唯一その配列が明らかにされている栃木県由来のTO25株[7]と比較したところ(図3)、すべての株で6型に特徴的な制限酵素切断部位(*Bcl* I 1カ所、*Hae* III 4カ所、*Pvu* II 1カ所)が確認された。塩基置換部位については、OKL65株とOKL85株との間では1カ所のみ(同一性99.7%)であったのに対し、OKL65株とTO25株及びOKL85株とTO25株の間では、それぞれ13カ所(同一性96.7%)及び12カ所(同一性97.0%)に認められた。次に、岡山県由来株の塩基配列について、Zhaoら[8]が報告している1型、3型、5型及び6型株の配列とともに、近隣結合法による系統解析を実施した(図4)。その結果、岡山県由来株は高いブートストラップ値(94.4%)をもって独立した系統樹に位置付けられ、また既知の6型株とは遺伝的に異なり、むしろ1型株または3型株に近縁であることがわかった。一方でTO25株は、ほぼ同年に南米で検出された6型株に類似していた。

## 考 察

岡山県南部～県北部にある44カ所の農場で飼育された計59頭の白血病牛について、BLV検出を行ったところ、全例が陽性であったことから、これらの牛がいずれもEBLである可能性が示唆されるとともに、BLVが県内で広く流行していることがわかった。農林水産省の監視伝染病発生年報(平成10年～平成26年分)([http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi\\_densen/kansi\\_densen.html](http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/kansi_densen.html))によると、牛白血病は、1998年に届出伝染病に指定されて以降、2001年までは全国の年間報告数がおおむね200頭以下であったが、2003年頃から急増しはじめ、2012年には年間2,000頭を超え、

岡山県内で流行している牛白血病ウイルスの遺伝子解析

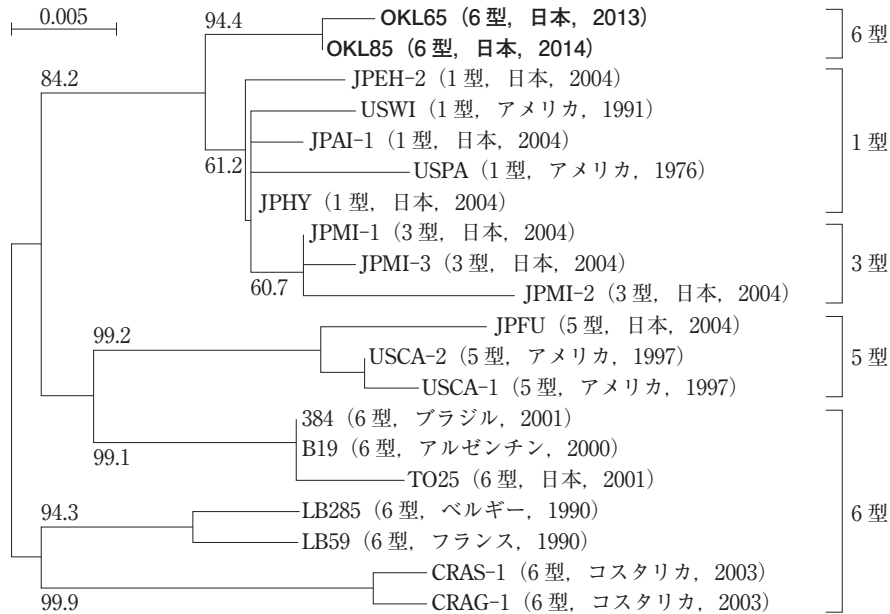


図4 BLV株の遺伝子系統解析結果

岡山県由来株及び既知の遺伝子型株の配列（400塩基対）について、近隣結合法による系統解析（ブートストラップ1,000回）を実施した。ブートストラップ値60%以上を系統樹上に示し、スケールバーを左上に示した。各株名の括弧内に遺伝子型、検出国及び検出年を示す。岡山県由来株を太字で示した。

その後も増加し続けている。岡山県でも、2005年までは年間報告数が数頭にとどまっていたが、2007年以降は徐々に増加し、2013年には年間75頭に達した。今回の結果から、県内で発生する牛白血病のほとんどがBLV感染によるものと考えられることから、本県においてもBLVのまん延対策が急がれる。

岡山県内で流行しているBLVは1型が最も多く、次いで3型、5型、6型の順であることが今回初めて明らかになった。全国的なBLVの遺伝子型分布状況については、Licursiら[2]及びAsfawら[3]によって調べられており、地域によって違いはあるものの、1型及び3型が最も多く、次いで5型、2型、4型、6型の順であることが報告されている。中四国地方では、鳥取県で1型及び5型が、島根県で1型～4型が、愛媛県で1型がそれぞれ検出されている[3]。今回明らかになった岡山県の分布状況は、全国や近隣県とほぼ類似した傾向であったが、6型が検出されたのは、栃木県[2]、鹿児島県[4]に次いで、全国で3例目である。

市町村別の遺伝子型分布状況から、6型についてはM町という限定された地域だけに分布していることがわかった。この理由として、6型が2013年度に初めて検出されたこと、感染牛の飼育農場がきわめて近距離にあること、さらにウイルス遺伝子が高度に保存されていたことなどから、本型が近年になって牛の導入等により県内に持ち込まれたものの、その流行が限られた地域にとどまっている可能性が考えられた。今後、県内における

6型BLVの流行の広がりを監視するためにも、県内産白血病牛に加え、近隣農家の飼育牛についてもウイルス保有調査を行う必要があると思われる。

白血病牛の品種と検出遺伝子型との関係を調べたところ、ホルスタイン種では1型が8割近くを占める一方で、黒毛和種では、ホルスタイン種に比べて3型の検出率が有意に高いなど、品種により遺伝子型分布に違いが認められた。この原因を探るため、今回調査したホルスタイン種41頭及び黒毛和種17頭について、耳票検索により飼育履歴を調べた。その結果、黒毛和種に県外飼育歴は認められなかったが、ホルスタイン種では19頭に県外飼育歴があり、そのいずれもが北海道で出生・飼育後に県内へ導入されたか、県内で出生後に北海道へ預託に出されたものであった。なお、これら19頭のホルスタイン種からは、すべて1型が検出されていた。Asfawら[3]の全国調査において、北海道では1型のみが流行が確認されていること、また、ホルスタイン種と黒毛和種とは一般に混合して飼育されないことなどから、県内のホルスタイン種では、北海道などから継続的に持ち込まれる1型が次第に優勢型となり、その一方で黒毛和種では、県内に以前から存在した3型の流行が維持されていたのではないかと考えられた。

これまでにわが国で確認された6型感染例に関しては、腫瘍発生部位等の剖検所見や、実験室内検査結果等が明らかにされていない[2,4]。今回発見された6型感染例については、両症例とも典型的なEBLの諸所見



が認められたが、肝臓や腎臓の実質内や筋肉内に多数の腫瘍塊が播種性に散在するなど、今回調べたほかの白血病牛にはない所見もみられた。今後、6型感染例の特徴の有無を明らかにするため、他の遺伝子型による感染例との比較解析を行うとともに、さらに多くの白血病牛についてウイルス検索を行う予定である。

わが国で検出された6型株の遺伝子配列が明らかになったのは、TO25株[7]に次いで今回が2例目となる。系統解析の結果、岡山県で検出された2株については、TO25株を含む既知の6型株とは系統的に異なり、むしろ1型または3型株に近縁であることがわかった。したがってわが国では、少なくとも異なる2系統の6型株が流行していると考えられることから、6型が検出された場合には、必要に応じて塩基配列を決定し、系統解析等を行うことが望ましいと思われる。

最後に、本研究の実施に当たり多大なるご協力をいただいた、岡山県食肉衛生検査所の職員及び関係各位に深く感謝する。

### 引用文献

- [1] 村上賢二, 小林創太, 筒井俊之: わが国の地方病性牛白血病の発生動向と対策—その現状と課題—, 日獣会誌, 62, 499-502 (2009)
- [2] 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)
- [3] 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)
- [4] 藤元英樹, 下地なつ希, 井之上盛男: 管内と畜場で牛白血病が疑われた症例の検討, 平成23年度鹿児島県食肉衛生検査所業務概要, 62-65 (2011)
- [5] 須藤亜寿佳, 岩田竜治, 朴天鎬: 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, 日獣会誌, 65, 883-887 (2012)
- [6] 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)
- [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] Zhao X, Buehring GC : Natural genetic variations in bovine leukemia virus *envelope* gene: possible effects of selection and escape, *Virology*, 366, 150-165 (2007)

## Molecular Characterization of Bovine Leukemia Virus Prevalent in Okayama Prefecture

Mitsutaka KUZUYA<sup>1)†</sup>, Hidenori HASHIMOTO<sup>1)</sup> and Yasuharu NANBA<sup>2)</sup>

- 1) *Okayama Prefectural Meat Inspection Center, 120-1 Kokubunji, Tsuyama City, 708-0843, Japan*
- 2) *Hygiene Services Division, Department of Health and Social Welfare, Okayama Prefectural Government, 2-4-6 Uchisange, Kita-ku, Okayama City, 700-8570, Japan*

### SUMMARY

A survey was conducted of the bovine leukemia virus (BLV) prevalent in Okayama prefecture based on the 59 bovine leukosis cases found between 2009 and 2015. The presence of BLV proviral DNA in the tumor tissue samples for each case was detected using PCR and the BLV genotypes were determined using the RFLP method. All samples tested positive for BLV- and genotype 1 was the most predominant (45 samples), followed by genotype 3 (8 samples), genotype 5 (2 samples), and genotype 6 (2 samples). Cases of mixed infection were recognized in 2 samples. It is notable that this is the third case where genotype 6 has been identified in Japan. Genotypes 1 and 3 were distributed throughout the prefecture, while genotypes 5 and 6 were respectively distributed in the northern area and in limited areas. The detection rate of genotype 3 was significantly higher in Japanese Black cattle than Holstein cattle. Phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of the genotype 6 strains isolated in this study demonstrated that the strains were classified as an independent cluster and were more closely related to the strains in genotypes 1 and 3 than the known genotype 6 strains.

— Key words : bovine leukemia virus, genetic analysis, genotype distribution, Okayama prefecture.

† Correspondence to : Mitsutaka KUZUYA (Okayama Prefectural Meat Inspection Center)

120-1 Kokubunji, Tsuyama City, 708-0843, Japan

TEL 0868-26-0202 FAX 0868-26-6459 E-mail : mitsutaka\_kuzuya@pref.okayama.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 69, 617~621 (2016)