牛白血病ウイルス感染による持続性リンパ球増多症牛の B リンパ球クローナリティー解析

坂口加奈¹⁾ 前澤誠希^{1, 2)} 猪熊 壽^{3)†}

1) 帯広畜産大学獣医学研究部門 臨床獣医学分野

2) 岐阜大学大学院連合獣医学研究科 臨床獣医学連合講座

3) 東京大学大学院農学生命科学研究科 動物医療センター

(2019 年 10 月 3 日受付・2019 年 12 月 27 日受理)

要 約 持続性リンパ球増多症 (Persistent lymphocytosis : PL) を呈する牛白血病ウイルス (Bovine leukemia virus : BLV) 感染牛の末梢血 B リンパ球のクローナリティーを、Inverse PCR およびマイクロチップ型電気泳動装置を用いて解析した。解析の結果、EBL 発症牛 3 検体では全て単一のピークが認められ、陰性対照 10 検体では一切ピークがみられなかったのに対し、PL 牛 36 検体中 5 検体では複数のピークが検出された。EBL 発症牛では B リンパ球がモノクローナルに増殖し腫瘍化しているが、PL 牛の中には B リンパ球がオリゴクローナルに増殖し、既に腫瘍化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、持続性リンパ球増多症、オリゴクローナル、腫瘍化

産業動物臨床医誌 11(1): 1-4, 2020

はじめに

地方病性牛白血病 (Enzootic bovine leucosis : EBL) は牛白血病ウイルス (Bovine leukemia virus : BLV) 感染によりリンパ系組織が腫瘍化する疾患である [1, 2]。BLV 感染牛の約 30% は持続性リンパ球増多症 (Persistent lymphocytosis : PL) となり、BLV 感染牛の 2 ~ 3 % が EBL を発症する [2]。EBL 発症牛の B リンパ球はモノクローナルに増殖して腫瘍化しているが、PL 牛は臨床症状を示さず、増殖した B リンパ球はポリクローナルであり、腫瘍化ではないとされている [3, 4]。一方、BLV に近縁な T 細胞白血病ウイルス 1 型 (Human T-cell leukemia virus type- I : HTLV-1) 感染によって発症する成人 T 細胞白血病 (Adult T-cell leukemia-lymphoma : ATL) の臨床病型は、くすぶり型、慢性型、リンパ腫型、急性型に分類されている [5]。次世代シーケンサーによる T リンパ球クローナリティー解析の結果、ATL の慢性型を含む全ての病型において、モノクローナルまたは複数種のクローンで構成されるオリゴクローナルな増殖が確認されている [6]。このことは、

ATL の慢性型に相当する病期を含む BLV 感染の PL 牛においても、B リンパ球がオリゴクローナルに増殖している、すなわち腫瘍化していることを示唆する。

そこで本研究では、inverse PCR およびマイクロチップ型電気泳動装置を用いて、BLV 感染 PL 牛の B リンパ球クローナリティー状態の解析を行った。

材料と方法

動物：BLV 抗体陽性の PL 牛で 3 歳齢以上の 36 頭、陰性対照として 3 歳齢以上の 10 頭 (BLV 抗体陽性でリンパ球増多症を呈さない牛 4 頭、BLV 抗体陰性の牛 6 頭) の EDTA 末梢血を材料とした。陽性対照として BLV 陽性で病理学的にリンパ腫と確定診断された EBL 発症牛 3 頭のリンパ節を材料とした。なお、BLV 感染は牛白血病エライザキット (JNC, Tokyo) により検出した。PL は EC の鍵に基づき、末梢血リンパ球数から判定した [7]。

DNA 抽出：末梢血およびリンパ節より QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Germany) を用いて DNA を抽出

† 連絡責任者：猪熊 壽 (東京大学大学院農学生命科学研究科 動物医療センター)

〒113-8658 東京都文京区弥生 1-1-1 ☎ 03-5841-5421 FAX 03-5841-8012

E-mail : ainokuma@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

した。DNA は PCR を行うまで -30℃ で保存した。

Inverse PCR 法：DNA を制限酵素 *Pst*I (Takara Bio, Shiga) で断片化し、DNA Ligation Kit (Mighty Mix: Takara Bio) を用いて環状化した後、BLV の 5' LTR を標的としたプライマー Pst-F: 5'-GGGTTCGCAAGTATGGATAC-3' /Pst-R: 5'-ATTGAGCCTTTTGCG CGCTTT-3' を用いて PCR を行った [8, 9]。2% アガロースゲルを用いて PCR 産物の電気泳動を行った。

マイクロチップ型電気泳動装置による PCR 産物の解析：PCR 産物は、マイクロチップ型電気泳動装置 Agilent2100 バイオアナライザ (Agilent2100: Agilent Technologies, California) を用いた。電気泳動用チップは DNA 7500

LabChip kit (Agilent Technologies) を用いて解析を行った。

統計解析：PL 牛のうち、単一または複数のピークを示す個体群と、ピークを示さない個体群の年齢と末梢血リンパ球数の比較にはマン・ホイットニーの U 検定 (Excel 統計) を用い、有意水準は 0.05 とした。

結 果

ゲル電気泳動の結果、全ての陽性対照 EBL 発症牛 3 検体ではいずれも単一バンドが検出された。PL 検体 36 検体ではバンドが確認できない、あるいはスメア状に観察された。陰性対照 10 検体ではいずれもバンドが確認

図 1. マイクロチップ型電気泳動装置解析による泳動パターンの例。

- (A) EBL 検体ではモノクローナルなピーク (矢頭) がみられた。
 - (B,C) PL 検体では、複数のピークが認められ、オリゴクローナルと考えられたものが 5 検体あり、そのうち 2 検体を例示する。
 - (B) 972 および 1142 bp にピークが認められる。
 - (C) 778, 840, 867, 941 および 1526 bp にピークが認められる。
 - (D) また、残りの 31 検体では、なだらかで幅の広い山が示されポリクローナルと考えられた。
 - (E,F) さらに、BLV 抗体陽性の PL 陰性検体では山もピークもみられなかった。
- すべての検体で 50 および 10380 bp のところにみられるピークは DNA 分子量マーカー。

されなかった。

マイクロチップ型電気泳動装置を用いた解析の結果、陽性対照 EBL 発症牛 3 検体では全て単一のピークが認められた (図 1A)。PL 牛 36 検体中 5 検体では複数のピークが検出されたが (図 1B, C)、残り 31 検体では幅の広い山がみられ、ピークは検出されなかった (図 1D)。さらに、陰性対照 10 検体ではピークも山もみられなかった (図 1E, F)。

複数のピークが検出された PL 牛 5 頭の年齢の中央値は 5.0 歳 (範囲 4 ~ 5 歳)、末梢血リンパ球数の中央値は $9,020/\mu\ell$ (範囲: $6,536 \sim 12,502/\mu\ell$) であった。一方、ピークが検出されなかった PL 牛 31 頭の年齢の中央値は 5.0 歳 (範囲 3 ~ 11 歳)、末梢血リンパ球数の中央値は $8,627/\mu\ell$ (範囲: $5,520 \sim 19,126/\mu\ell$) であり、両群の年齢および末梢血リンパ球数に有意差はみられなかった。

考 察

Inverse PCR の増幅産物の解析の結果、EBL 発症牛ではいずれの症例も単一ピークが検出され、BLV 感染 B リンパ球はモノクローナルに増殖して腫瘍化していると判断された。一方、陰性対照ではいずれの検体も全くピークを伴わず、BLV 抗体陰性牛および PL を伴わない BLV 抗体陰性牛の B リンパ球はポリクローナルであると判断された。特に BLV 陰性検体はゲル電気泳動でも波形が認められなかったが、これは BLV の 5' LTR 領域を標的としたプライマーが結合する領域がなかったためと考えられる。

PL 検体では 36 検体中 5 検体で、幅の広いあるいは複数のピークが検出されたが、このことは PL 牛の中には B リンパ球がオリゴクローナルに増殖し、既に腫瘍化していることが示唆された。

今回解析に利用した電気泳動用チップは試料や緩衝液を入れるウェルと流路から成り、各ウェルに挿入された電極によって試料が分離、泳動され、レーザー光の照射により検出される [10]。マイクロチップ型電気泳動装置は、ゲル電気泳動と同様に試料の塩基長を検出するが、蛍光度を波形で出力するためゲル電気泳動よりも客観的に試料の塩基長を解析できる利点があるが、塩基長以外の情報はえられない [10]。今後、詳細なクローナリティー解析のためには、塩基配列によってクローンサイズを確定する次世代シーケンサーによる解析が必要である。

BLV 感染牛の病型分類は現在のところ、無症状キャリア、PL、EBL のみである [1, 2]。また、従来 PL はポリクローナルであるとされていたが [3, 4]、今回の結果からは、PL においても一部では既に腫瘍が発生してオリゴクローナルな状態になっていることが示唆された。なお、オリゴクローナルな状態の 5 頭とポリクローナルな 31 頭について、年齢を加味して末梢血リンパ球数を比較したが有意な差はみられず、PL の程度とクローナリティーには関係がないものと思われた。

本研究の一部は JSPS 科研費 16K15044 の助成を受けたものです。

引用文献

1. 田島 誉士: 獣医内科学大動物編 第 2 版, 日本獣医内科学アカデミー編, 256-258, 文永堂, 東京 (2014)
2. 小沼 操: 牛白血病, 動物の感染症 第 3 版, 明石博臣ら 編集, 98-99, 近代出版, 東京 (2011)
3. Agresti A, et al.: Use of polymerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infection in calves at birth, *Am J Vet Res*, 54, 373-378 (1993)
4. Miura S, et al.: Detection of monoclonal integration of bovine leukemia virus proviral DNA as a malignant marker in two enzootic bovine leucosis cases with difficult diagnosis, *J Vet Med Sci*, 77, 883-887 (2015)
5. Shimoyama M, et al.: Diagnostic criteria and classification clinical subtypes of adult T-cell leukemia-lymphoma, *Br J Haematol*, 79, 428-37 (1991)
6. Frouzi S, et al.: Clonality of HTLV-1-infected T cells as a risk indicator for development and progression of adult T-cell leukemia, *Blood Advances*, 15, 1195-1205 (2017)
7. Bendixen HJ: Preventive measures in cattle leukemia: leukosis enzootica bovis, *Ann N Y Acad Sci*, 108, 1241-1267 (1963)
8. Maezawa M, et al.: A clinical case of enzootic bovine leucosis in a 13-month-old Holstein heifer, *Jpn J Vet Res*, 66, 209-213 (2018)
9. Murakami H, et al.: Bovine leukemia virus integration site selection in cattle that develop leukemia, *Virus Res*, 156, 107-112 (2011)
10. 馬場嘉信: マイクロチップ電気泳動法によるゲノム多型解析とプロテオーム解析, *Electrochemistry*, 69, 706-711 (2001)

B-cell clonality in cattle with persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus infection

K. Sakaguchi¹⁾, M. Maezawa^{1, 2)}, H. Inokuma^{3) †}

1) *Division of Clinical Veterinary Medicine, Department of Veterinary Medicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine*

2) *United Graduate School of Veterinary Sciences, Gifu University*

3) *Veterinary Medical Center, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo*

ABSTRACT The clonality of peripheral blood B lymphocytes in cows with persistent lymphocytosis (PL) due to bovine leukemia virus infection was analyzed by using inverse polymerase chain reaction and microchip electrophoresis. As a result, a single peak was observed in all 3 cows with enzootic bovine leukemia (EBL), whereas no peaks were observed in 10 negative control animals. In 5 of 36 PL cows, on the other hand, multiple peaks were detected. These results indicate that B lymphocytes multiplied monoclonally to form tumors in EBL cattle, whereas proliferation was oligoclonal in PL cattle suggesting that lymphocytes were already tumorous before onset of EBL.

—**Key Words** : bovine leukemia virus, persistent lymphocytosis, oligoclonal proliferation, tumorous

† Correspondence to : Hisashi Inokuma (Veterinary Medical Center, Graduate School of Agricultural and Life Science, The University of Tokyo)
1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan
E-mail : ainokuma@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

.....Jpn. J. Large Anim. Clin. 11(1): 1-4, 2020