

牛白血病ウイルス遺伝子量を指標とした地方病性牛白血病の診断について

四日市市保健所食品衛生検査所 ○奥山 ありさ、近藤 るり
竹本浩平*、茂木啓陽、林和秀
(*現 衛生指導課)

はじめに

地方病性牛白血病(以下、EBL)は、牛白血病ウイルス(以下、BLV)によっておこる感染症であり、と畜検査において発見されれば全部廃棄となるため、重要視される感染症である。

当所では EBL の診断に際し、肉眼検査、血清学的検査および病理組織学的検査を実施している。しかし、血清学的検査による発症診断は困難であり、病理組織学的検査では診断に苦慮する症例もあることから、これらを補完するウイルス学的検査法が求められている。

近年、EBL 発症牛は未発症牛と比較して、リンパ節中の BLV 遺伝子量が有意に高いという報告がされ、リアルタイム PCR の EBL 診断への活用が期待されている[1]。しかし、発症牛の中には、腫大しているリンパ節数が少ない症例やリンパ節の腫大が軽度の症例もあり、腫大が軽度のリンパ節では、BLV 遺伝子量が低値であるとの報告もある[2]。したがって、こういった症例でのリンパ節中の BLV 遺伝子量による発症診断は困難である。

そこで、当所において EBL と診断した牛(以下、発症牛とする)および BLV 抗体陽性牛の病変部をはじめとした諸臓器を用いて、BLV 遺伝子量を指標とした EBL 発症診断の有効性について検討したので、その概要を報告する。

材料及び方法

① 病理組織学的検査

材料：発症牛の病変部 40 検体(12 頭)

発症牛の非病変部 10 検体(6 頭)

方法：パラフィン切片標本または凍結切片標本を作製後、H-E 染色を行い、観察に供した。

② リアルタイム PCR

材料：発症牛の病変部 40 検体(12 頭)

発症牛の非病変部 10 検体(6 頭)

抗体陽性牛の右心耳 5 検体および脾臓 7 検体(7 頭)

方法：DNeasy Blood&Tissue kit(QIAGEN)により DNA を抽出し、ウシ白血球ウイルス検出用 Probe/Primer/Positive control(TaKaRa)にて反応液を調整し、Thermal Cycler Dice Real Time System Lite(TaKaRa)により BLV 遺伝子量を定量した。

成績

病理組織学的検査では、発症牛の病変部 40 検体のうち 37 検体でリンパ球様腫瘍細胞を確認した。

腫瘍細胞を確認した 37 検体の BLV 遺伝子量は、3.5 コピー/ng~744.7 コピー/ng(中央値 153.5 コピー/ng)であり、30 検体が 100 コピー/ng を上回っていた。100 コピー/ng を下回った 7 検体は脾臓 3 検体、心臓 2 検体、腎臓 1 検体、子宮 1 検体であり、脾臓 1 検体と腎臓は同一個体から、それ以外の臓器は別個体から採材したものであった。また、同一個体から採材した脾臓と腎臓は、腫瘍細胞の浸潤が軽度であったが、37 検体の中で腫瘍細胞の浸潤が軽度であったのは、この 2 検体のみであった。さらに、脾臓は 3 検体ともリンパ濾胞が残存していた。

腫瘍細胞が確認できなかった 3 検体は、肝臓 2 検体および膀胱 1 検体であり、肉眼所見は腫大、モザイク状出血および粘膜肥厚などであった。また、BLV 遺伝子量は、2.3 コピー/ng~32.8 コピー/ng(中央値 21.6 コピー/ng)であった。

発症牛の非病変部では腫瘍細胞は確認できず、BLV 遺伝子量は 1.1 コピー/ng~49.6 コピー/ng(中央値 10.25 コピー/ng)であった。

t 検定の結果、腫瘍細胞が確認できた検体と確認できなかった検体では、BLV 遺伝子量に有意差が認められた(図 1)。

抗体陽性牛では、右心耳 1 検体、脾臓 5 検体から BLV 遺伝子を検出し、遺伝子量は右心耳が 0.3 コピー/ng、脾臓が 0.1 コピー/ng~8.4 コピー/ng(中央値 0.4 コピー/ng)であった。また、発症牛と抗体陽性牛の心臓および脾臓の BLV 遺伝子量を比較すると、心臓では有意差が認められたが、脾臓では有意差が認められなかった(図 2、図 3)。

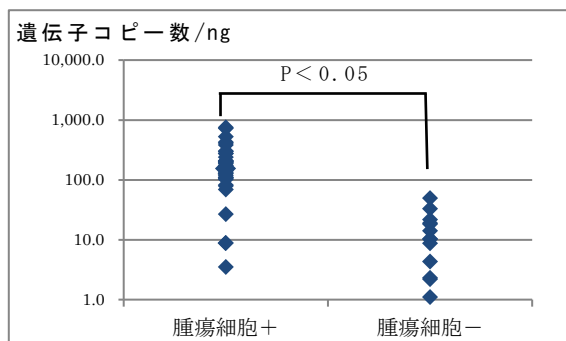


図 1. 発症牛における BLV 遺伝子量

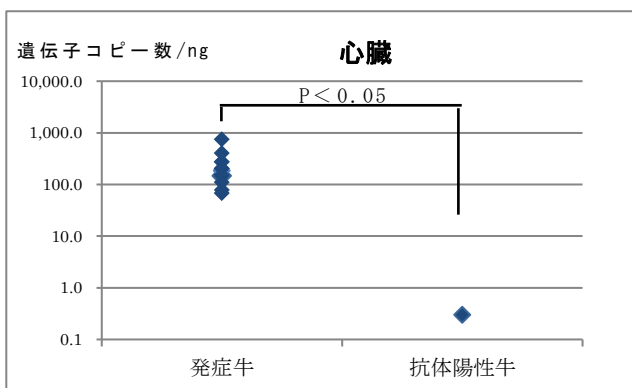


図 2. 心臓における BLV 遺伝子量

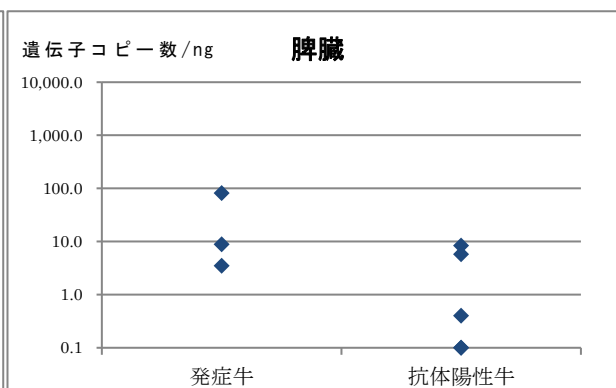


図 3. 脾臓における BLV 遺伝子量

考察

病理組織学的検査にて腫瘍細胞を確認した検体は、腫瘍細胞が確認できなかった検体と比較して、BLV 遺伝子量が有意に高かったこと、腫瘍細胞の浸潤が軽度であった検体は、BLV 遺伝子量が低かったことから、病理組織所見と遺伝子量はおおむね相関すると考えられた。また、腫瘍細胞を確認した検体の約 81%が BLV 遺伝子量 100 コピー/ng 以上であり、腫瘍細胞が確認できなかった検体は全て BLV 遺伝子量 100 コピー/ng 以下であったことから、病変部の BLV 遺伝子量が 100 コピー/ng 以上であれば、EBL を発症している可能性が高いと考えられた。

発症牛の心臓の病変部では、その全てで腫瘍細胞の中程度～高度の浸潤が見られ、BLV 遺伝子量は抗体陽性牛よりも有意に高かった。BLV 発症牛ではリンパ節をはじめとした諸臓器に病変が認められるが、中でも心臓の病変に遭遇する機会が多い。したがって、リンパ節中の BLV 遺伝子量による発症診断が難しい症例でも、心臓の病変部の BLV 遺伝子量を定量することによって、より正確な診断ができると考えられた。

発症牛と抗体陽性牛の脾臓における BLV 遺伝子量には、有意差が認められるとの報告があるが[3]、今回、定量した両者の BLV 遺伝子量には、有意差は認められなかった。Ohshima らは、EBL の発症初期には正常リンパ濾胞の過形成が見られるが、異形リンパ球の増殖に伴って、リンパ組織の固有構造の破壊が進むことを明らかにしている[4]。今回、材料とした発症牛の脾臓は、全て正常リンパ濾胞が残存していたことから、発症の初期段階だったと推測され、このために遺伝子量が低かった可能性が考えられる。

今回、BLV 遺伝子量 100 コピー/ng を指標として、病変部での EBL 発症診断が可能であることが確認できた。一方、発症牛の病変部であっても、腫瘍細胞の浸潤の程度によっては BLV 遺伝子量が低値となる可能性があることから、遺伝子量が低値であるからといって発症を否定するのではなく、病理組織学的検査と併せて総合的に判断する必要があると考えられた。

引用文献

- [1] 中川涼子他：平成 26 年度食肉衛生技術研修会・衛生発表会資料, 146-148 (2015)
- [2] 宗村佳子：臨床獣医, vol26, 28-33 (2008)
- [3] 杉山恵美他：平成 24 年度関東甲信越ブロック食肉衛生検査所協議会資料, 1-3 (2012)
- [4] Kanichi OHSHIMA, Shigeru SATO, Kosuke OKADA : A Pathologic Study on Initial Lesions of Enzootic Bovine Leukosis, Jpn. J. Vet. Sci 44, 249-257 (1982)