

6. 簡便インバース PCR を用いた肉用牛黒毛和種の

牛伝染性リンパ腫診断

大分家畜保健衛生所

○病鑑 林拓己・病鑑 岡田彰三

【はじめに】牛伝染性リンパ腫は、全身性の悪性リンパ腫を主徴とする牛の疾病で牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV) 感染による地方病性 (EBL) と原因不明の散発性 (SBL) に分けられる (図 1)。

病型	好発年齢	好発部位	BLV関与	腫瘍細胞	
地方病性 (EBL)	3才<	リンパ節、脾臓、 心臓、腎臓、 消化器、子宮	あり	Bリンパ球	
散発性 (SBL)	子牛型	<6カ月	リンパ節、肝臓、 骨髄	なし	TおよびB
	胸腺型	<2才	胸腺、リンパ節	なし	Tリンパ球
	皮膚型	2~4才	皮膚	なし	Tリンパ球

図 1 牛伝染性リンパ腫ウイルスの分類

EBLは、プロウイルスが挿入された感染細胞が何らかの原因で形質転換し、無秩序に増殖する腫瘍細胞に変化した状態と考えられているが、腫瘍細胞のBLV感染の有無を従来の方法で評価することは非常に難しいため、診断には臨床・病理所見や各種検査法の結果に基づく総合的な判断、病原診断が求められる。EBLの病原診断として、遺伝子検査、ウイルス量の測定と抗体検査を行っているが、EBL発症個体では、血液中やリンパ節などの腫瘍形成部においてプロウイルス量の増加が認められる⁽¹⁾との報告がある一方、抗体検査ではその個体のBLV感染の有無は判断できても、腫瘍細胞自体の感染は評価できないことから、抗体陽性という結果が必ずしもEBLの診断に直結するわけではない。また、ウイルスタンパクを標的とした場合、慢性期のBLV感染細胞はウイルス抗原をほとんど発現しないため⁽²⁾、免疫組織化学染色法などを用いて腫瘍細胞がBLVに感染しているか否かを評価することは非常に難しいということもあり、従来の検査法のみでは、明確な診断根拠に乏しく、診断に苦慮する症例がしば

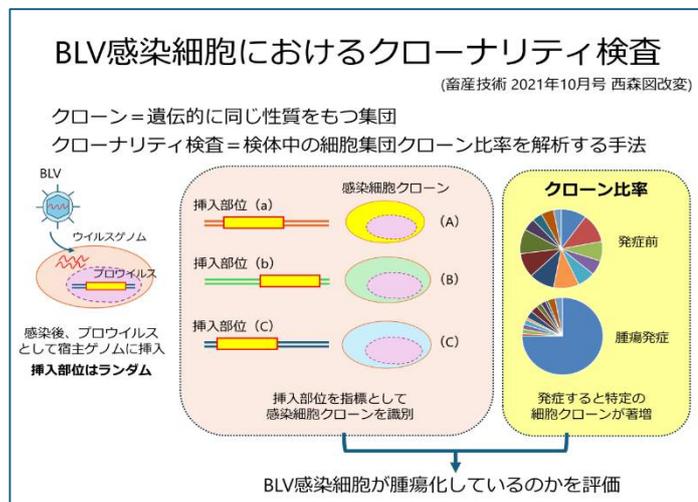


図 2 BLV 感染細胞のクローナリティ検査

しは認められる。そこで今回、EBL では遺伝子的に同じ性質を持つ特定の B 細胞クローンが増殖している状態であることを利用して、感染細胞クローンを簡易的に識別できる手法として確立されたインバース PCR (IPCR) (図 2, 11) を⁽³⁾肉用牛黒毛和種の牛伝染性リンパ腫事例において実施し、EBL と診断したのでその概要を報告する。

【発生概要】当該農場は肉用牛繁殖農場で当該牛は 2024 年 3 月 10 日生の黒毛和種。2024 年 9 月頃から食欲不振、消瘦を認め、11 月 25 日に血液検査を実施したところ、白血球数の顕著な増加 ($6,314 \times 10^2/\mu l$)、GOT、GGT、CPK、LDH、異型リンパ球の増加、軽度貧血と T-CHO の減少、BLV 抗体陽性を認めた。外貌および触診ではリンパ節の目立った腫脹は認められなかったため、その他腫瘍を疑い、12 月 4 日に鑑定殺、病性鑑定を実施した (図 3)。



図 3 当該牛 (外貌) と血液検査結果

【材料と方法】定法に従い剖検を実施。病理組織学的検査は主要臓器、脳、消化管、リンパ節 (浅頸、腸骨下、内腸骨)、骨髓 (胸骨、大腿骨骨幹部) について HE 染色、免疫組織化学染色 (IHC) を実施した。細菌学的検査は定法に従い細菌分離を行い、ウイルス学的検査では ELISA 法による抗体検査、主要臓器、脳、全血を材料として qPCR 法による BLV プロウイルス量 (PVL) 測定、後述の IPCR の他、病変のみられた肺について病原検索を実施した (図 4)。

材料と方法

病理学的検査：
 材料：主要臓器・脳・消化管・胸腺・リンパ節・大腿骨骨髓・胸骨
 方法：HE染色
 免疫組織化学染色
 ・マウス抗ヒトCD79αモノクローナル抗体 (ニチレイ)
 ・ウサギ抗ヒトCD20ポリクローナル抗体 (abcam)
 ・マウス抗ヒトCD3モノクローナル抗体 (DAKO)

細菌学的検査：
 材料：主要臓器・脳
 方法：血液寒天培地(炭酸ガス・嫌気培養)、DHL寒天培地で培養

ウイルス学的検査
 材料：血清、主要臓器、脳、全血
 方法：ELISA法【牛伝染性リンパ腫ウイルスエライザキット (ニッポンジーン)】
 qPCR法によるプロウイルス量 (PVL) 測定【BLVのtax領域】
 インバースPCR (IPCR) によるB細胞クローナリティ検査
 その他、病原検索

図 4 病性鑑定材料と方法

【結果】剖検では、全身の体表および体腔内リンパ節で1~5 cm程度の腫脹を確認、断面は白色であった。脾臓は著しく腫大（100×40×6 cm程度）、辺縁は鈍で、断面は膨隆し、2~5 mm大の乳白色結節がびまん性に密発していた。肺は右前葉全体の表面は不整で硬結感がみられた。その他主要臓器に腫瘤等は確認されなかった（図5, 6, 7）。

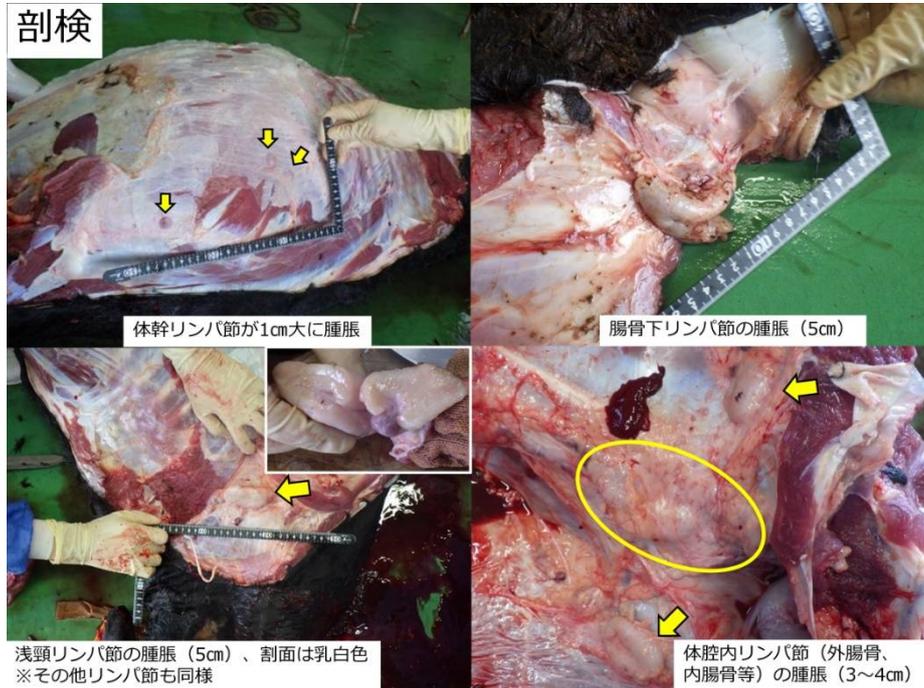
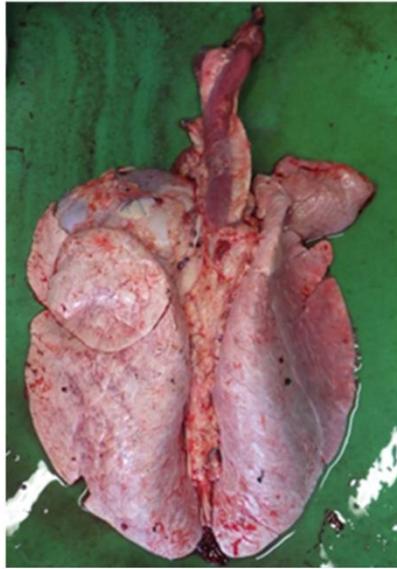


図 5 剖検（体表リンパ節）



図 6 剖検（脾臓）

剖検



肺は左前葉後部で一部無気肺領域



右前葉全体で表面が不整で硬結感あり

断面では気管支を中心とした白色部位

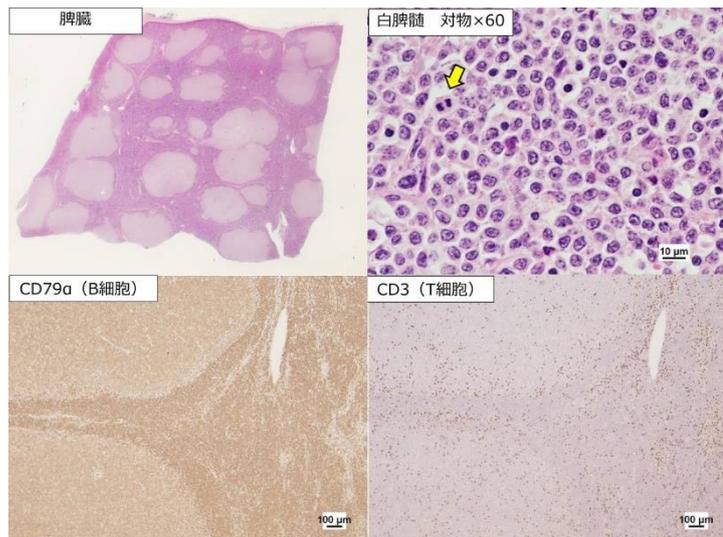
図 7 剖検 (肺)

病理組織学的検査の結果、脾臓、リンパ節では濾胞形成を特徴としたリンパ球様細胞の重度浸潤、その他臓器には軽度～重度にリンパ球様細胞が浸潤し、諸臓器の血管内にリンパ球様細胞が充満していた。肺では化膿性線維素性気管支肺炎を認めた。免疫組織化学染色の結果、諸臓器に浸潤しているリンパ球様細胞はB細胞が主体であったが、肺、胸腺、リンパ節ではT細胞の増加（切片全体の30～50%程度）を認めた（図8,9,10）。

【図8】脾臓では、赤脾髄との境界が明瞭な白脾髄領域の顕著な拡張がびまん性にみられたが、脾柱等の正常構造の残存が確認された。

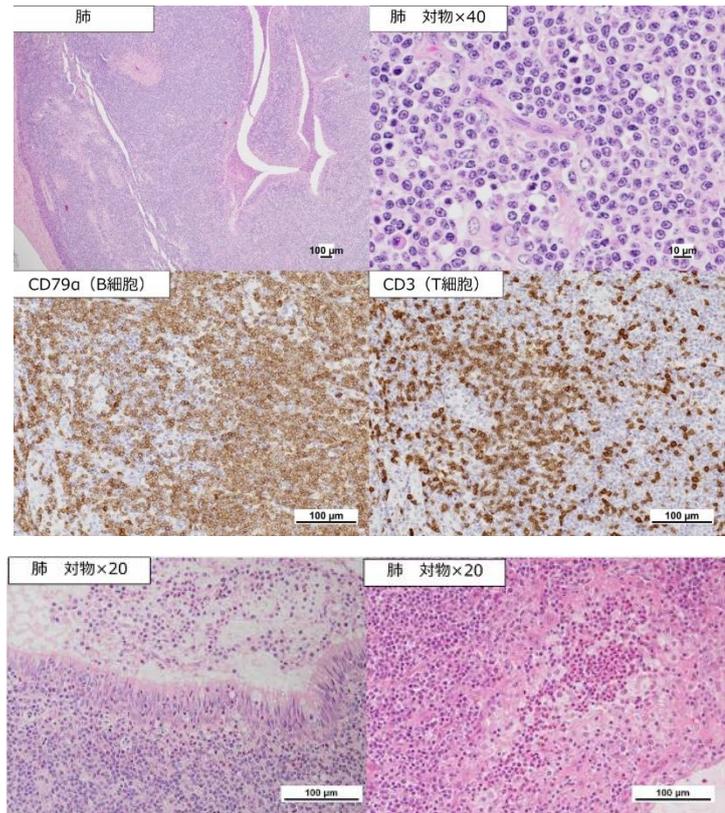
白脾髄領域ではリンパ球様の腫瘍細胞のシート状増殖がみられ、大小不同や有糸分裂像（黄色矢印）を示す腫瘍細胞がみられた。

IHCでは、白脾髄および赤脾髄でCD79 α の陽性細胞が確認され、CD3の陽性細胞は全体に散見される程度であった。



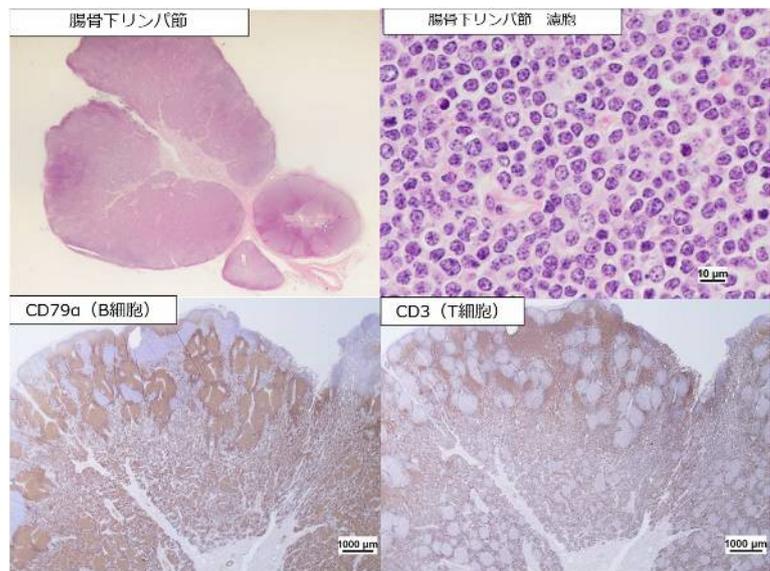
【図9】肺では、細気管支周囲を中心としたリンパ球様細胞の重度浸潤により、一部細気管支腔の狭窄や肺胞領域の圧排がみられ、強拡大では、脾臓等でみられた腫瘍細胞の浸潤と核分裂像が認められた。IHCでは、CD79 α が優位であったが、CD3陽性細胞も多く認められた（上図）。

細気管支腔内には炎症細胞、細胞残渣の中程度貯留、細気管支上皮および粘膜固有層には炎症細胞の軽度浸潤、肺胞領域でも炎症細胞の浸潤がみられた（下図）。



【図10】腸骨下リンパ節。濾胞内で脾臓の白脾髄と同様の腫瘍細胞の増殖がみられ、核分裂像等も確認。

濾胞内にはCD3陽性細胞が少なく、その他領域ではCD3とCD79 α 陽性細胞が混在、または、ほとんどがCD3陽性の領域もみられた。



細菌学的検査の結果、有意菌の分離は陰性であった。ウイルス学的検査の結果、抗BLV抗体陽性、qPCR法の結果、全ての材料からBLV特異遺伝子を検出（全血：10,228コピー、脳：652コピー、心臓：4,001コピー、肺：781コピー、肝臓：475コピー、腎臓：215コピー、脾臓：328コピー、単位：コピー数/DNA 50ng）。また、肺からはアデノウイルス特異遺伝子が検出された。

EBL診断にかかる検査の結果、当該牛は8か月齢で全血、心臓のプロウイルス量は高値、抗体も陽性、病理組織検査の結果、主要臓器、胸腺、リンパ節ではB細胞の増加が主体であったものの、T細胞も認められており、特に肺、胸腺、リンパ節ではT細胞が30～50%を占

め、Bリンパ球主体のEBLとは条件に合致しなかった。そこで、BLV感染細胞クローンを識別するため、IPCRを実施することとした。

IPCRは、古くからレトロウイルスなどの挿入部位の解析に使用されている手法で、今回の方法は、同定済みのBLVプロウイルスの配列を利用して、隣り合う未同定の宿主ゲノム配列を増幅することを目的としたものである。実施手順として、①制限酵素によるDNAの切断、②配列断片の環状化、③通常とは逆方向(inverse)のPCR反応を行い、出来上がったPCR産物は両端にBLV配列、中央に宿主ゲノム由来の配列を有し、その長さは感染細胞クローンによって異なる長さとなる。電気泳動で検体間に同一のバンド、PCR産物が認められた場合、同一のBLV感染細胞の腫瘍性増殖によるものと判断され、EBLと診断することが可能となる。当検体についてIPCRを実施した結果では、脳、肺、全血で同一の増幅産物が確認されたため、病理組織学的検査と併せてEBLと診断した(図11)。

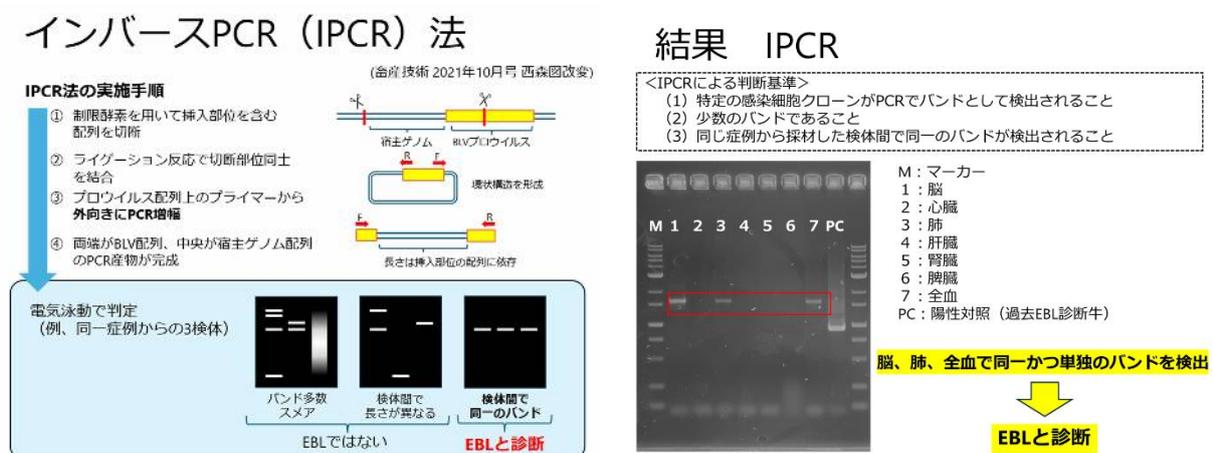


図 11 インバース PCR と本症例の結果

【考察およびまとめ】病理組織学的検査の結果に加え、PVLが高値かつIPCRで複数の臓器、材料から感染B細胞クローンの特徴である同一の増幅産物が認められたことから、EBLと診断した。本症例は腫瘍性B細胞による濾胞形成が顕著であり、化膿性線維素性気管支肺炎もみられたため、濾胞外における正常組織のT細胞の残存や炎症に対する反応性T細胞の増多が生じ、T細胞が多くみられたと推察された。EBLの病態は様々であり、従来の検査法では判断が難しい症例には今回のIPCRのみならず、新規検査手法も取り入れ今後の病態解明に努めていきたい。

【参考文献】

(1) Somura, Y. et al. (2014) Comparison of the copy numbers of bovine leukemia virus in the lymph nodes of cattle with enzootic bovine leukosis and cattle with latent infection. Arch Virol. 159 (10) :2693-2697.

(2) Gillet, N. et al. (2007) Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. Retrovirology. 4:18

- (3) 西森朝美ら (2021) 牛伝染性リンパ腫の診断に有用な簡便インバース PCR 法の確立：畜産技術. 2021 年 10 月号.