

リアルタイム PCR を用い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 ○中川涼子、小澤克典

はじめに

牛白血病ウイルス(以下、BLV)によっておこる地方病性牛白血病(以下、EBL)は、近年増加傾向にあり、重要視される疾病の一つとなっている。

BLV 感染牛は、長期間無症候キャリアとなるが、感染牛の約 30%は持続性リンパ球増多症(以下、PL)となる。また、感染牛の数%は数か月から数年後に、B 細胞性の白血病/リンパ腫を発症するといわれている。⁽¹⁾

EBL 発症牛では、量的な差はあるが、末梢血液中に異形リンパ球の出現がみられる。また、腫瘍形成は、全身リンパ節を中心に諸臓器に広く認められるが、特に心臓、第四胃、子宮に顕著である。

BLV 感染牛の摘発には、受身赤血球凝集反応(PHA)等の抗 BLV 抗体検査に加え、近年では病原体遺伝子の定量を目的としたリアルタイム PCR も補助的診断として用いられるようになり、疾病診断の迅速化や検査精度の向上が図られるようになってきた。抗 BLV 抗体検査および血液中の BLV 遺伝子数から、発症と未発症を区別することは難しいが、リンパ節を検体とした場合、発症を診断するのに有効であることが報告されている。⁽²⁾

今回、BLV 抗体陰性牛、抗体陽性牛、PL 牛、EBL 発症牛に対して、リアルタイム PCRによる遺伝子の検出を試み、若干の知見を得たので、その概要を報告する。

材料及び方法

材料は、平成 25 年 12 月から平成 26 年 7 月に当所と畜検査された牛、BLV 抗体陰性牛 2 頭、抗体陽性牛(リンパ球数正常)2 頭、PL 牛 6 頭、EBL 発症牛 9 頭の血液、脾臓、リンパ節、心臓、第四胃および子宮を検体とした。リンパ節は、EBL 発症牛では、EBL に典型的な病変のあるリンパ節を、他の牛では、内腸骨リンパ節を検体とした。「EC の鍵」⁽³⁾陽性または擬陽性かつ抗体陽性牛を PL 牛とした。

「DNeasy Blood&Tissue Kit(QIAGEN)」を用いて DNA 抽出を行い、「ウシ白血病ウイルス検出用 Probe/Primer/Positive control(TaKaRa)」を使用し、リアルタイム PCR(Thermal Cycler Dice Real Time System Lite TaKaRa)を行った。また、抗体価の測定は、「牛白血病抗体アッセイキット(日生研)」を用いた。

成績

抗体陰性牛では血液及び各臓器において、全ての検体で BLV 遺伝子は検出されなかった。抗体陽性牛では、比較的低い値ではあるが、BLV 遺伝子は検出された。血液中の BLV 遺伝子量は、EBL 発症牛と PL 牛で有意な差はみられなかった。(図1)PL 牛では、子宮 1 検体を除く検体で BLV 遺伝子が検出された。EBL 発症牛では、全ての検体で BLV 遺伝子が検出された。また、EBL に典型的な病変のみられた検体の遺伝子量は、より高い傾向がみられた。(図

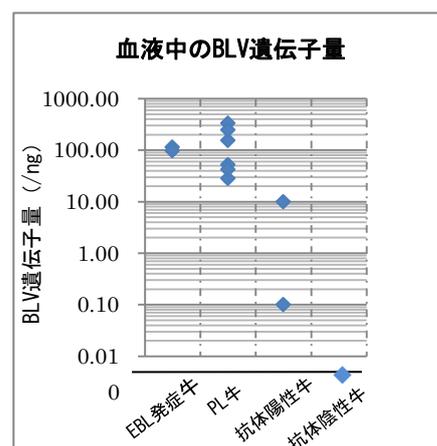


図1 血液中の BLV 遺伝子量

2)リンパ節におけるBLV 遺伝子量は、EBL 発症牛とPL 牛でt 検定を行うと有意な差が認められた。(p<0.05)(図3)

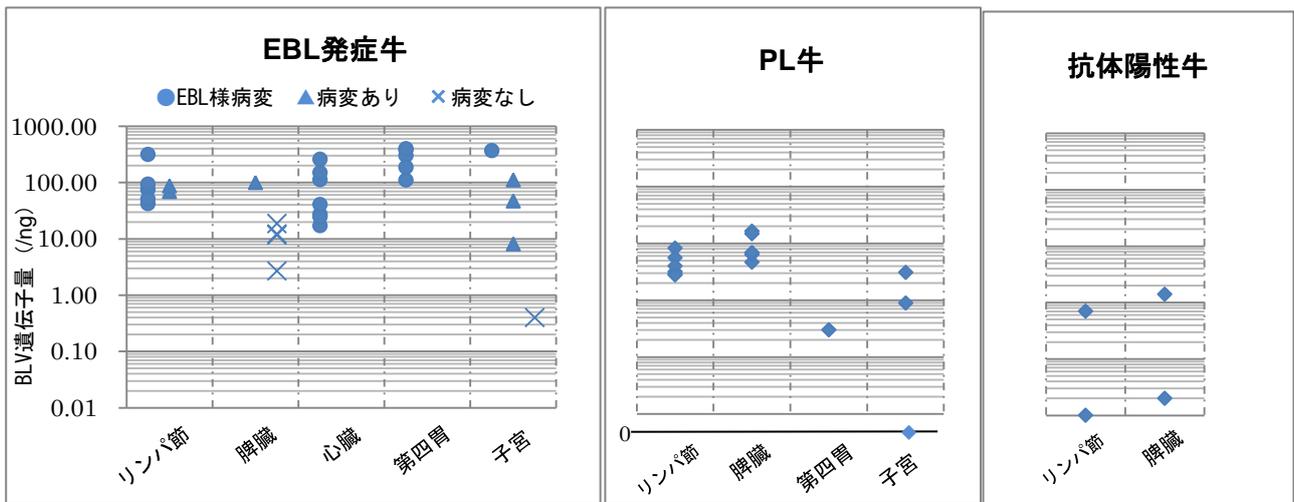


図2 各臓器のBLV 遺伝子量

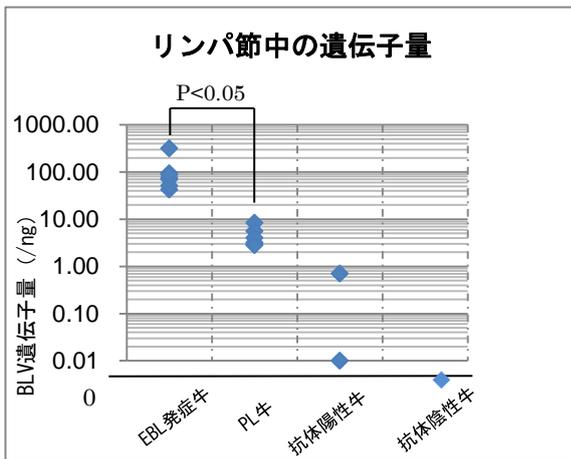


図3 リンパ節中のBLV 遺伝子量

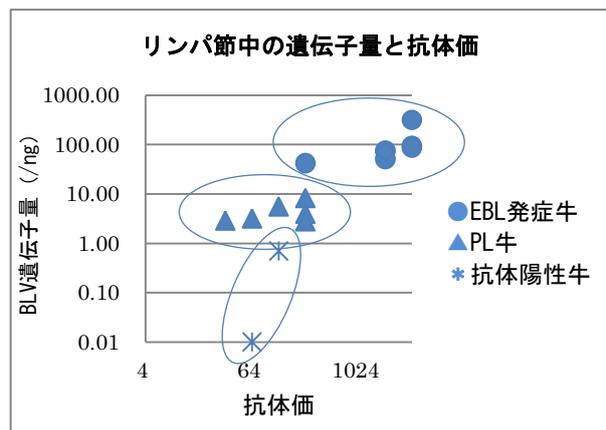


図4 リンパ節中の遺伝子量と抗体価

抗体価およびリンパ節中のBLV 遺伝子量は、EBL 発症牛で、PL 牛、抗体陽性牛と比較すると、どちらも高い傾向がみられた。また、PL 牛は抗体陽性牛よりも遺伝子量が高い傾向がみられた。(図4)

考察

EBL の診断には、肉眼所見や血液検査、スタンプ標本による細胞診、抗体検査など行っているが、症例の中には病変が少ないものもあり、判定に苦慮するケースもある。

今回、EBL 非感染牛のモデルとしてBLV 抗体陰性牛、感染後の各ステージのモデルとして抗体陽性牛、PL 牛、EBL 発症牛で、それぞれ血液と好発部位を検体とし、遺伝子の検出を試みた。

BLV 抗体陰性牛では、血液、リンパ節ともにBLV 遺伝子は検出されなかった。抗体陽性牛、PL 牛、EBL 発症牛では、全ての血液検体でBLV 遺伝子がみられた。それぞれの臓器においては、BLV 遺伝子量はEBL 発症牛で、PL 牛、抗体陽性牛と比較して高い傾向がみられた。また、EBL に典型的な病変のある検体の遺伝子量は高いことがわかった。これらのことから、EBL を発症すると高いBLV 遺伝子量が見られることがわかった。

一方、PL の状態であっても血液中のみならず各臓器でも遺伝子を保有していることがわかった。脾臓における BLV 遺伝子量は、EBL 発症牛と PL 牛では差はみられなかった。このことから、PL の状態から発症へつながる可能性も示唆され、EBL の発症診断が重要であると考えられた。

リンパ節における BLV 遺伝子量は、EBL 発症牛で PL 牛より有意に高いことがわかった。また、抗体価、リンパ節中の遺伝子量を比較すると、EBL 発症牛では PL 牛より高く、かつ PL 牛は抗体陽性牛より高い傾向がみられた。これらを総合して、発症診断につながるのではないかと考えられた。

今回、リンパ節における BLV 遺伝子量が、発症の診断の一つとして有効なことがわかった。今後、症例数を増やし、迅速かつ精度の高い診断法の検討を行っていきたい。

引用文献

- (1)村上賢二、小林創太、筒井俊之：日獣会誌,62,499—502(2009)
- (2)宗村佳子、赤瀬悟、黒野博之、村上賢二：JVM,vol.60,No.12,1005—1011(2007)
- (3)安田純夫、村上大蔵：新版獣医内科学,618—621,文永堂出版(1986)