

牛伝染性リンパ腫ウイルスのクローナリティ解析の有用性評価

八町 慶史^a, 貞升 健志^b, 長島 真美^b, 片岡 辰一朗^a

牛伝染性リンパ腫ウイルス（BLV）感染初期の感染細胞はポリクローナルな集団から構成されているが、病態の進行に伴いオリゴクローナル、もしくはモノクローナルな増殖を示し腫瘍を形成する。今回、プロウイルス挿入部位の網羅的増幅法（RAISING法）によるクローナリティ解析を実施し、牛伝染性リンパ腫（EBL）の確定診断及びEBL発症前診断に有効であるかを評価した。確定診断の評価では、過去に病性鑑定を行いEBLと診断した3頭と陰性対照1頭の全血及び腫瘍化組織に対しRAISING法を実施し、クローナリティ値（Cv）を求めた。また、各検体は定量PCR法によりBLVプロウイルス量（PVL）を求めた。その結果、EBLと診断した牛全検体のCvは高値となり、陰性対照のCvは低値であった。また、PVLは全検体で高値とはならなかった。さらに、生前診断の評価では、EBLと診断した5頭の生前の全血に対しCv及びPVLを求めた結果、5頭の発症前の検体のCvは高値に至らなかったが、うち1頭は発症3年前の時点でCvが少し上昇した。以上より、RAISING法は確定診断を強力に補強するツールであることが明らかとなった。一方で、生前診断への活用については、一部の牛ではCvが上昇しRAISING法の有用性が示唆されたが、今後もデータを収集し精度を高めていく必要がある。

キーワード：牛伝染性リンパ腫, クローナリティ解析, RAISING法, プロウイルス量, クローナル増殖

はじめに

牛伝染性リンパ腫（EBL）の原因病原体である Bovine leukemia virus (BLV) は、デルタレトロウイルス属、オルソレトロウイルス亜科、レトロウイルス科の一員である。多くのBLV感染牛は寿命全体で無症候性（非白血病性; AL）であるが、BLV感染牛の約30%は持続性リンパ球増多症（PL）を発症し、BLV感染B細胞の異常な増殖が見られる。また、BLV感染牛の1%から5%がEBLを発症し、典型的な例ではリンパ節や他の様々な臓器でB細胞性悪性リンパ腫が発生した後、予後不良で死に至る。BLVは牛のB細胞に感染し、逆転写反応によって二本鎖DNAが合成され、牛のゲノムDNAにランダムに組み込まれる（プロウイルス化）。BLV感染の初期は、プロウイルスの挿入部位が異なるBLV感染B細胞が観察されるが（ポリクローナル）、病態の進行に伴って特定のBLV感染B細胞が単独で増殖（モノクローナル）、もしくは複数種増殖（オリゴクローナル）により腫瘍を形成する。

令和5年度の東京都におけるBLV陽性農家の割合は68.9%であり、BLV陽性牛の割合は36.7%であった。BLV陽性農家の割合に大きな変化はないが、BLV陽性牛の割合は年々微増傾向であり、農場やと畜場で都内飼養牛のEBL発症を認めることも多い。その一方で、EBL発症の明確な基準がない中で診断に苦慮するケースが散見されており、EBLの確定診断を補助する検査法が期待される。また、EBL発症リスクの高い牛が事前に判明すると、EBL発症による経済的負担を回避できることや、EBL対策の一環とし

ての積極的なBLV感染牛淘汰への参考情報にできることなどメリットは多く、EBL生前診断の確立も期待される。

飼養牛で発生する腫瘍のうち、リンパ腫の診断ではクローナリティ検査は診断補助ツールとして利用されている¹⁻⁴⁾。クローナリティ検査は、検体中に含まれる細胞集団のクローン比率を解析する手法であり、腫瘍細胞を多く含む検体では特定の細胞クローン（腫瘍化した細胞）が大きな割合を占めるため、これを指標として腫瘍診断に活用することが可能である。近年、岡川らが報告したRAISING法⁵⁾は、細胞集団のクローン比率や細胞集団のクローン増殖様式を導き出すことができ、より詳細なEBLの病態解明に活用できるクローナリティ検査法である。また、RAISING法では細胞集団のクローン比率を数値化するため、BLV感染牛のクローン比率の変動を定期的にモニタリングすることでEBLの生前診断に活用できる可能性がある。

そこで今回、過去に東京都家畜保健衛生所でEBL関連の病性鑑定として採材した全血および組織を用いたRAISING法を実施し、EBLの確定診断と生前診断への活用について評価を行った。

実験方法

1. 供試材料

供試材料は、都内牛飼養者が飼育していたホルスタイン種の搾乳牛のうち、EBLと診断された個体6頭（牛1-3、および牛5-6）に加え、EBLを否定した個体1頭（牛4）を陰性対照として供試した（表1）。また、EBL確定診断への

^a 東京都家畜保健衛生所
190-0182 東京都西多摩郡日の出町大字平井2759番地

^b 東京都健康安全研究センター微生物部
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

表1. EBL確定診断の評価

No.*	材料	転機
牛1	全血、腫瘍	剖検しEBL診断
牛2	全血、腫瘍、リンパ節	剖検しEBL診断
牛3	全血、心臓、リンパ節	剖検しEBL診断
牛4 (陰性対照)	全血、腎臓、リンパ節	剖検しEBLを否定

*牛1～3: 当所で剖検しEBLと診断した牛、牛4: 当所で剖検しEBLを否定した牛。
なお、牛1, 2は確定診断の評価及び生前診断の評価を実施

表2. EBL牛の生前採血と転機

No.*	材料	生前採血	転機
牛1	血液	2回	剖検しEBL診断
牛2	血液	5回	剖検しEBL診断
牛5	血液	2回	と畜場でEBL診断
牛6	血液	2回	家畜共済でEBL廃用認定
牛7	血液	1回	家畜共済でEBL廃用認定

*牛5: と畜場でEBLと診断された牛、牛6, 7: 家畜共済でEBL廃用認定となった牛。

活用評価では、剖検を実施した4頭の全血及び腫瘍化組織を材料とし、EBL生前診断への活用評価ではEBL発症牛5頭の全血（生前採血）を材料とした（表2）。なお、各牛のBLV感染日齢推測では、過年度の家畜伝染病予防法第5条検査（5条検査）の残余血清を用いた。

2. 測定及び解析

1) BLV抗体検査

5条検査の残余血清を用いて、牛伝染性リンパ腫エライザキット（株式会社ニッポンジーン）による抗体検査を実施し、陽転日齢を確認した。

2) 核酸抽出

DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN) を用いて核酸を抽出した。全血では、EDTA血1mlを塩化アンモニウムで処理し赤血球を溶血し、遠心分離により沈殿した白血球を材料とし、腫瘍化組織では組織25 mg を材料とした。抽出した核酸は、260nmでの吸光度から核酸濃度を算出した。

3) RAISING法

抽出した核酸を用いてプロウイルス3'末端領域とホストゲノムの挿入部位を増幅し、ダイレクトシーケンシングを行った^{5,6)}。次いで、BLV感染B細胞の増殖様式（ポリクローナル、およびモノクローナル）をホストゲノム領域シグナルのシーケンス波形により確認した。波形確認ではクローナリティ解析ソフトウェア（CLOVA）を使用し、シーケンス波形のデータ化と波形下のエリア面積を算出した後、クローナリティ値（Cv）をCv=ホストゲノム 5'末端 20bpのシグナルピークエリアの総和/BLV 3'末端 20bpのシグナルピークエリアの総和で算出した。Cvは、0.01-0.16を低値、0.17-0.39を中程度、0.40-1.00を高値と判定した。

4) 定量PCR法

抽出した核酸について Bovine Leukemia Virus qPCR Detection Kit (with ROX Reference Dye)（タカラバイオ株式

会社）によるpol遺伝子領域を標的とした定量リアルタイムPCR法を行い、BLVのプロウイルス量（PVL、コピー/ng）を求めた。血中のPVLが50以上⁷⁾、組織中のPVLが100以上を高値と判定した⁸⁾。

結 果

1. BLV抗体検査

抗体検査によりBLV感染日齢を推定した結果、牛2では1年程度、その他6試料（牛1および牛3-7）では約2年間の開きをもった結果を得た（表3）。

2. 牛1～4のEBL確定診断と評価

牛1（推定 BLV 感染時期：429-939 日齢、解剖実施日：1,843 日齢）について RAISING 法より Cv を確認した結果、供試したすべての検体で高値となり、定量リアルタイム PCR 法による PVL は全検体で高値とはならなかった

（図1）。また、ホストゲノム領域のシグナル（HGS）は右眼と横隔膜で同様の波形を示し、同一の感染細胞が浸潤していたと推定された。牛2（推定 BLV 感染時期：876-1,120 日齢、解剖実施日：2,692 日齢）では、Cv は全検体で高値、PVL は検体によってバラバラであった（図2）。また、HGS は全検体が同様の配列を示し、同一の感染細胞が浸潤していたことが明らかとなった。牛3（推定 BLV 感染時期：667-1,427 日齢、解剖実施日：2267 日齢）は、Cv が全検体で高値、PVL は全検体で高値であった（図3）。また、HGS は全検体が同様の配列を示し、同一の感染細胞が浸潤していたことが明らかとなった。

牛4（推定BLV感染時期：639-1,427日齢、解剖実施日：1,430日齢）は、頸部リンパ節等の腫大を認めたが第四胃炎及び腹膜炎と診断し、EBLを否定した陰性対照の牛である。本個体から採取した試料では、Cvは全血及び組織において低値から中程度、PVLは全検体で高値とはならなかった（図4）。また、HGSは全検体の波形が異なり挿入部位は一致しなかった。

3. Cv及びPVLの生前診断法としての評価

牛1, 2, 5, 6, 7のCv及びPVLを表4にまとめた。生前診断の評価を実施した牛1および2について、牛1では解剖13日前の1,830日齢におけるCvは低値であったが、解剖時の1,843日齢には高値となり、解剖時まで循環血液中から腫瘍細胞を検出できなかった。また、牛2ではCvは1,647日齢まで低値を推移し、解剖直前の2,688日齢及び解剖時の2,692日齢で高値を示し、BLV感染B細胞の腫瘍性増殖が確認された。

表3. 供試材料の推定BLV感染日齢

牛1	牛2	牛3	牛4	牛5	牛6	牛7
429～939	876～1120	667～1427	639～1427	724～1220	0～686	671～1334

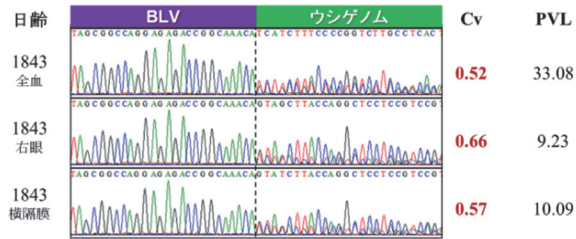


図1. 牛1の解析結果

Cvは高値, PVLは高値ではなかった. 陰性対象(図4)と比較しホストゲノム領域の波形は確認できるが, 牛2より波形は小さい.

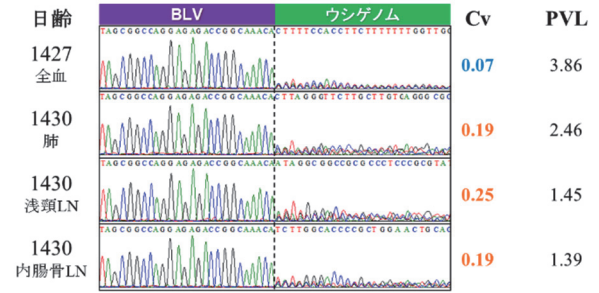


図4. 牛4(陰性対照)の解析結果

Cvは低値もしくは中程度, PVLは高値ではなかった. ホストゲノム領域でベースコールされた配列は, 全検体で異なっていた.

表4. EBL生前診断の評価結果

		生前採血					転帰	
		1回目	2回目	3回目	解剖直前	解剖時	日齢	理由
牛1	日齢	NT	NT	NT	1830	1843	1843	剖検しEBL診断
	PVL				34.46	33.08		
	Cv				0.1	0.52		
牛2	日齢	1325	1437	1647	2688	2692	2692	剖検しEBL診断
	PVL	30.33	27.33	27	14.69	15.35		
	Cv	0.07	0.08	0.07	0.47	0.45		
牛5	日齢	1748	NT	NT	1868	NT	1881	と畜場でEBL診断
	PVL	5.06			12.2			
	Cv	0.09			0.4			
牛6	日齢	875	1197	NT	NT	NT	2539	共済でEBL認定
	PVL	20.59	23.9					
	Cv	0.2	0.31					
牛7	日齢	1338	NT	NT	NT	NT	1614	共済でEBL認定
	PVL	33.31						
	Cv	0.06						

BOLD体は高値を示す

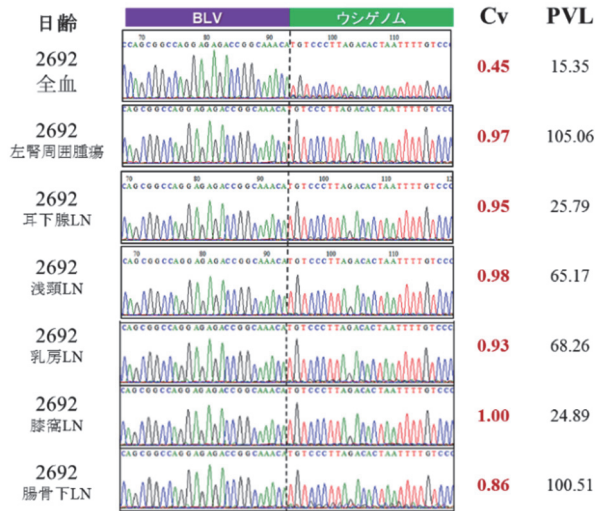


図2 牛2の解析結果

Cvは全て高値(全血はやや低い), PVLは左腎周囲腫瘍, 腸骨下LNで高値であった. 全血以外のホストゲノム領域の波形がはっきりと確認できる.

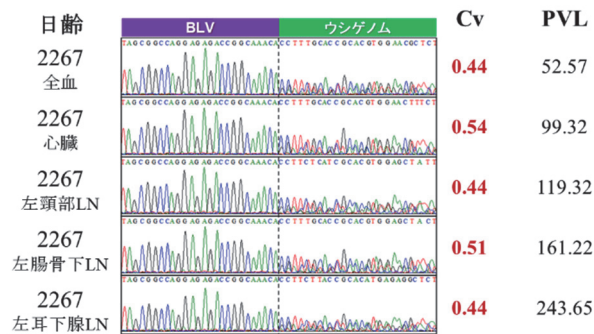


図3. 牛3の解析結果

Cvは全て高値, PVLも全て高値であった. ホストゲノム領域では複数の波形が重なっており, ベースコールされた配列は検体間で数塩基ずつ異なるが, 全検体で同様の波形が検出された.

同様に, 牛5では1,748日齢のCvが低値であり, と畜13日前の1,868日齢で高値となったが, 牛6ではCvが875日齢から1,197日齢で上昇したが高値とはならなかった. また, 牛7の廃用276日前の1,338日齢のCvは低値であった.

PVLは, いずれの牛でも顕著な増加を示すことなく一定値を維持している個体が多く, 個体間及び発症に至るまでの期間に有意な差は認めなかった.

なお, 抗体検査の結果と合わせてBLVの感染時期を推定した結果, 牛6を除き12-24か月齢以降に感染したことが推察された. また, BLV感染からEBLの発症診断までの期間は, 牛1は904-1,414日, 牛2は1,572-1,816日, 牛3は840-1,600日, 牛5は661-1,157日, 牛6は1,853-2,539日, 牛7は280-943日経過していた.

4. CvとPVLの相関関係

陰性対照である牛4を除き, 牛1, 2, 3, 5, 6, 7の全血(n=13)及び腫瘍化組織(n=12)のCvとPVLの相関関係を示した(図5). 両者とも相関関係があるとはいえず(全血: $R^2=7E-06$, 腫瘍化組織: $R^2=0.2615$), Cvが高値であってもPVLが低い検体を複数認めた.

5. クローン性増殖様式の違い

今回検証を行った検体では, 様々なホストゲノム領域の波形パターンを認めたため, そこから例として3検体の結果を示す(図6). 牛4では, ホストゲノムの波形が複数

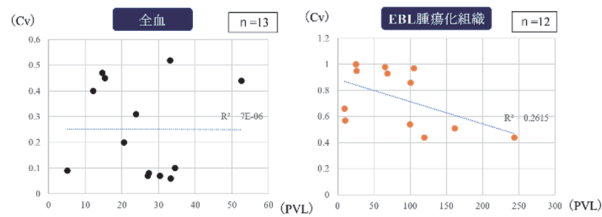


図5. CvとPVLの相関関係

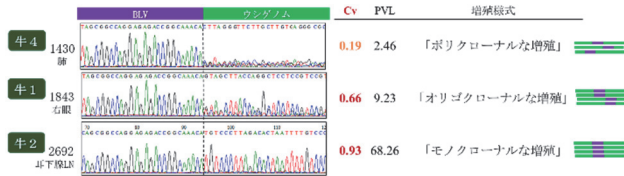


図6. 増殖様式の違い

認められ、Cvが高値でないことから、ポリクローナルな増殖といえる。牛1では、ホストゲノムの波形が複数認められ、Cvが高値なため、オリゴクローナルな増殖といえる。牛2では、ホストゲノムの波形が単一で、Cvが高値なため、モノクローナルな増殖といえる。

考 察

本研究で解析に供した牛1~7は、牛6を除き、12-24か月齢以降にBLVに感染したと推察された。また、BLV感染からEBL発症と診断するまでの期間は、最短で1年未満(牛7:280-943日)、最長で7年程度(牛6:1,853-2,539日)が経過していると推定された。EBL発症までの期間は5-10年(平均7年)との報告⁹⁾と比べ、平均より短い5年以内の発症個体が多い結果が得られた。

RAISING法のEBL確定診断への活用の評価では、EBLと診断した牛1, 2, 3の全血及び腫瘍化組織全検体のCvが高値を示した一方で、陰性対照の牛4では全検体のCvが低値もしくは中程度となった。以上より、Cv値を目安にすることによりEBL判定ができると考えられ、EBL確定診断における補助診断として、RAISING法が活用可能であることが示唆された。また、ホストゲノム領域の配列がBLV感染牛でほぼ同一になったことは、同一の感染細胞が増殖・浸潤していることを示しており、このこともRAISING法の確定診断への適用を補強すると考える。また、いずれの牛においても、全血のCvは腫瘍化組織のCvより低値となった。この結果から、腫瘍化Bリンパ球に由来する波形が正常Bリンパ球の影響により希釈を受けていると推定され、全血を用いたRAISING法によるEBL確定診断を行う際、注意を要する点と考えられた。

RAISING法をEBL生前診断へ活用するには、経時的にBLV陽性牛から採血を実施し、Cvが上昇するタイミングを明らかにする必要がある。一方、既報ではその点が明らかにされていなかったことから、本研究ではその日数を明らかにするための検証を実施した。結果として、生前採血

のCvに高値を認めてからEBL診断に至るまでの期間は、牛1では0日(解剖時)、牛2では14日、牛5では13日となり、牛6および7では生前にCvが高値に至らなかった。牛2および5は、解剖直前の採血時にCvが高値となったが、当所では飼養者よりリンパ節腫大等の稟告を受けた際に採材をした後、数日を経ってから解剖を行っていた。このため、解剖直前の採血時には既にEBLを発症していた可能性が高く、今回の検証でCvが高値となった検体についても、検査に供試した時点でEBLを発症していた可能性が高い。これらの結果から、全血のCvは確定診断の一助としての利用は十分可能だが、生前診断への利用については、本研究では明らかにできなかった。一方で、牛6のように高値には至らなかったが発症3年前の875日齢から1,197日齢にかけてCvの上昇を認めた検体もあり、RAISING法がEBL生前診断に有用である可能性も示唆された。また、牛1は解剖直前でもCvが低値を示したが、岡川らの報告⁹⁾でも末梢血中に腫瘍形成を認めない検体が一定数存在することを言及されている。このような牛を摘発するために、RAISING法を含めた多角的な生前診断体制の構築が必要であろう。

CvとPVLの関係について、EBL発症牛の各検体のCvは高値を示した一方で、PVLは牛の個体及び組織によってばらつきを認めた。結果として、全血及び腫瘍化組織でCvとPVLの相関関係は認めなかった。PVLはEBL発症診断のマーカーとして有用⁹⁾であるとの報告があるが、PVLをEBL確定診断及びEBL生前診断に用いる場合には留意が必要と考えられる。

RAISING法は、Cvおよびホストゲノム領域の波形により検体のクローン性増殖様式を識別することができ、EBL診断への重要な情報を提供する。具体的には、陰性対照の牛4で認めたポリクローナルな増殖ではEBLを否定し、オリゴクローナルもしくはモノクローナルな増殖を認めた場合はEBLを疑う材料となる。一方、今回の研究ではEBL発症牛と診断した牛2(モノクローナル増殖)と牛1および3(オリゴクローナル増殖)において、両者のPVLや発症日齢、感染から発症に至るまでの期間に、明確な差を認めなかった。

当所では、これまでEBLの確定診断を病理検査の結果をもって判定してきたところであるが、今回、RAISING法の有用性を確認し、今後、本法を導入することでEBLのより正確な診断体制の確保が期待できる。これに加え、RAISING法ではCvやプロウイルス挿入部位の推定、形成された腫瘍の由来やBLV感染B細胞の増殖様式など、その他のクローナリティ解析と比較すると得られる情報が多く、今後EBLの病態解明をするうえで重要な情報となりうると考える。

BLVに感染したB細胞の増殖様式の違いが宿主に与える影響については、未だ不明な点が多い。この点はEBL発症や病態の進展に関連していると考えられることから、さらなる研究が望まれる。

ま と め

東京都家畜保健衛生所で EBL 関連の病性鑑定として採材した全血および組織を用いた RAISING 法を実施し、EBL の確定診断と生前診断への活用について評価を行った。

その結果、EBLの確定診断では、EBL発症個体において全検体のCvが高値を示し、RAISING法の適用が有用であることが示唆された。一方、生前診断の評価では十分な有用性を確認することができず、今後、さらにデータの蓄積を重ねる必要があると考えられた。

以上から、RAISING 法は確定診断を補強する強力なツールの1つであると考えられ、今後、データを収集し精度を高めていくことで、さらなる応用範囲の拡大が期待された。

謝辞

本検査にあたり、ご協力いただいた北海道大学大学院獣医学研究院 先端創薬分野 岡川朋弘特任助教に深謝いたします。

文 献

- 1) Gillet, NA. , Gutiérrez, G. , Rodriguez, SM. , et al. : *PLoS Pathog*, **9**, e1003687, 2013.
- 2) Rosewick, N. , Hahaut, V. , Durkin, K. , et al. : *Front Microbiol*, **11**, 587306, 2020.
- 3) Ohnuki, N. , Kobayashi, T. , Matsuo, M. , et al. : *Sci Rep*, **11**, 4521, 2021.
- 4) Nishimori, A. , Andoh, K. , Matsuura, Y. , et al. : *Arch Virol*, **166**, 841–851, 2021.
- 5) Okagawa, T. , Shimakura, H. , Konnai, S. , et al. : *Microbiol Spectr*, **10**, e0259522, 2022.
- 6) Wada, Y. , Sato, T. , Hasegawa, H. , et al. : *Commun Biol*, **5**, 535, 2022.
- 7) Nakada, S. , Fujimoto, Y. , Kohara, J. , et al. : *Prev Vet Med*, **198**, 105528, 2022.
- 8) Somura, Y. , Sugiyama, E. , Fujikawa, H. , et al. : *Arch Virol*, **159**, 2693–2697, 2014.
- 9) Tsutsui, T. , Kobayashi, S. , Hayama, Y. , et al. : *Prev Vet Med*, **124**, 96–101, 2016.

Evaluation of the Utility of Clonality Analysis for Bovine Leukemia Virus

Yoshihito HATCHO^a, Kenji SADAMASU^b, Mami NAGASHIMA^b, and Shinichiro KATAOKA^a

At the early stages of bovine leukemia virus (BLV) infection, the infected cells are a polyclonal population. However, as the disease progresses, the cells exhibit oligoclonal or monoclonal proliferation, leading to tumor formation. This study, conducted the clonality analysis using the Rapid Amplification of the Integration Site without Interference by Genomic DNA Contamination (RAISING) to evaluate its effectiveness for definitive diagnosis of enzootic bovine leukosis (EBL) and pre-onset diagnosis of EBL. To evaluate the definitive diagnosis, RAISING was applied to whole blood and tumor tissue specimens from three cows previously diagnosed with EBL and one negative control, determining the clonality value (Cv). Additionally, the BLV proviral load (PVL) was measured in each sample using quantitative PCR. The result revealed that in the definitive diagnosis evaluation, high Cv was detected in all samples from cows diagnosed with EBL, whereas that from the negative control was low. The PVL was not consistently high in all samples. To evaluate the pre-onset diagnosis, the Cv and the PVL were determined in the whole blood samples collected before the onset from five cows later diagnosed with EBL. The results indicated that the Cv in samples collected before the onset did not reach high values in four out of five cows, but slightly increased 3 years before the onset in one cow. Thus, this study demonstrates that RAISING is a powerful tool to reinforce a definitive diagnosis of EBL. Additionally, while the usefulness of RAISING in pre-onset diagnosis was suggested by the increased Cv in some cattle, further investigation is needed to improve its accuracy. Furthermore, RAISING can indicate whether the tumor cell proliferations is monoclonal or oligoclonal, making it a valuable tool for a deeper understanding of EBL.

Keywords: Bovine leukemia virus, clonality analysis, RAISING, proviral load, clonal proliferation

^a Tokyo Livestock Hygiene Service Center
2759, Hirai, Nishitama-gun Hinode-machi, Tokyo 190-0182, Japan

^b Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan