

## 牛白血病の細胞遺伝学的研究

誌名	畜産試験場研究報告 = Bulletin of the National Institute of Animal Industry
ISSN	0077488X
巻/号	47
掲載ページ	p. 15-22
発行年月	1988年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 牛白血病の細胞遺伝学的研究

榊田博司・沼宮内茂\*・大島寛一\*

### 要 約

成牛型白血病発症雌牛25頭について、血液培養による白血病細胞の細胞遺伝学的検査を行った。検査した発症牛の中で、細胞の分裂頻度が高く十分な分析のできた症例の多くでは、高2倍性でX染色体を1本欠き、MC型、SMC型などの構造異常染色体をもつクローンが観察された。この結果は、本症の診断に末梢血液培養による染色体異常の検査が有効であることを示唆している。

### 緒 言

牛白血病は従来、主として北東北地域に多く発生していたことから、地方病的に扱われていた。しかし、最近では東北地域に限らず北陸、西日本、九州などにおいても散発或いは集団発生<sup>1)</sup>があり、牛白血病は全国的に大きな問題となっている。本病には成牛型、子牛型、胸腺型及び皮膚型があり、成牛型は牛白血病ウイルスが原因といわれているが、ウイルスに感染しても必ずしも発病しないことから感染方法、発病誘因や腫瘍化の機序など不明な部分が多い。

牛白血病に関する研究は、主として病理学、ウイルス学の面から進められており、細胞遺伝学的な面からの研究は極めて少ない。人の白血病に関しては、細胞遺伝学的研究が広く行われており、その知見は診断や発病機序の解明に大きく寄与している。特に慢性骨髄性白血病患者では、本症特有の *ph1* 染色体<sup>2)</sup>が見いだされており、発病との関連性などについて研究が進められている。

この研究は、牛白血病発症牛の末梢血液培養による細胞遺伝学的検討を行い、牛白血病の診断、あるいは発病機序の解明等に関する資料を得ることを目的とした。

### 材料および方法

1980年4月から1983年3月までの3年間に、主として岩手県下で発症し、岩手大学に搬入された白血病発症雌牛の内の25例を材料とした。いずれの病牛も、血液所見、臨床所見および病理解剖所見によって、白血病であることが確認された。血液はヘパリン入り真空採血管を

用いて病牛の頸静脈から採取し、アイスボックス(5°C前後)に入れて、盛岡から当場まで宅急便で輸送された。血液はいずれも採血日の翌日に届いた。到着後直ちに、1頭当たり2本の培養ビンにそれぞれヘパリン血1~1.5 ml, McCoy's 5a 培地5~7 ml およびペニシリン5,000 I.U./ml とストレプトマイシン5 mg/ml の混液0.1 ml を入れて37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下で18~24時間培養を行った。培養終了の2~3時間前にコルヒチン(4×10<sup>-5</sup> M液)0.1 ml を添加し、常法に従って染色体観察用標本を作成した。染色体の検査は、1個体当たり少くとも2枚以上の標本について、光学顕微鏡下で適度な染色体の広がりを示す中期核板を選び、染色体の数および構造異常の型と頻度を分析した。

### 結 果

血液培養による染色体検査の結果(既報<sup>1)</sup>の11例を含む)を表1に、染色体異常の認められた中期核板の代表例を図1~3に示した。

25例の分裂中期像には、各症例とも正常、異常の両方の核型を示す細胞が混在しており、異常細胞の出現頻度は14~100%の範囲に及び、著しい個体差が認められた。

染色体異常のうち、数的異常はいずれの個体にも認められ、それらの大部分は2n=60を上まわる61~78の高2倍性の細胞であった。数的異常に関連して、25例中20例に共通して認められた現象は、X染色体の1本が欠落していたことであった。

染色体の数的異常に加えて明瞭に認められた異常は、染色体の構造的異常であった。図1~3に示したように、正常ではみられない大型のメタセントリック型(以下「MC型」と略記)とサブメタセントリック型(以下「SMC型」と略記)の染色体がみられた。これらの異常染色体の出現様式は同一個体内ではほぼ一定の傾向を示した場合が多いが、個体間では著しい差異がみられた。すなわち、一つの核板内にMC型あるいはSMC型のいずれか一方を保有する症例、SMC型とMC型の両者を1個ずつ保有する症例、あるいはSMC型とMC型の両者をそれぞれ複数で保有する症例など様々であった。大型のMC型を含む核板が見いだされた症例は18例で、SMC型を含む核板が見いだされた症例は11例で

昭和62年9月25日受付

\* 岩手大学農学部

Table 1. Chromosome analyses of cells prepared from cultured leukocytes in 25 cases of bovine lymphosarcoma

Leukemic cow			Numbers of blood cells		Number of cells analysed	Number of abnormal cells (%)	Abnormal Karyotypes
No.	Breed	Years	R.B.C. ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	W.B.C. ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )			
1402	JB	6	461	7.6	28	17( 60.7)	60, XO+MC, 76~78, XO
1403	JB	—	462	11.5	80	11( 13.8)	60, XO, 61, XO
1404	JB	1	468	16.0	37	5( 13.5)	60, XX+F
1405	JB	5	305	38.0	74	74(100)	62~69, XX or XO+MC
1406	JB	12	536	10.5	58	51( 88.0)	60~71, XO+SMC+MC
1421	H	5	679	35.5	85	85(100)	61~64, XO or OO+SMC
1422	H	—	703	11.6	30	18( 60.0)	62, XO, 72~74, XX
1423	—	5	500	9.1	53	53(100)	64~67, XX or XO+SMC+MC
1424	JB	5	430	4.1	39	33( 85.0)	61~64, XX or XO+SMC+MC
1425	JB	5	624	35.5	54	54(100)	63~70, XX or XO+SMC+MC
1431	H	5	560	20.1	49	49(100)	67~134, XO+SMC+MC
1433	JS	—	443	23.7	31	31(100)	61~64, XX or XO+SMC+MC
1435	H	3	322	8.5	20	13( 65.0)	63~65, XO, 58~122, +SMC
1436	JS	—	464	30.4	26	26(100)	63~65, XO+MC
1437	JB	8	685	17.2	23	21( 91.3)	65~73, XO, 65, XO+MC+SMC
1547	JB	—	607	22.6	2	2(100)	61, XX
1595	JS	13	242	22.5	25	17( 68.0)	59, XX+MC, 61, XO+MC
1597	JS	14	536	7.9	26	26(100)	60~63, XO+MC
1674	JB	5	564	12.4	5	5(100)	61, XX, 63, XO, 65, XO+MC
1675	H	6	425	30.8	5	4( 80.0)	60, XO+MC, 61, XX
1676	JB	6	1,031	124.5	10	4( 40.0)	60, XX+MC, 61~63, XX+MC
K-2	H	3	—	—	42	28( 67.0)	61~62, XX, 63, XX+SMC
C-1	H	5	—	—	24	11( 46.0)	59~60, XX+MC, 59, XO+MC
C-2	H	4	—	—	35	11( 31.0)	64, XO+MC+SMC
K-3	JB	2	—	—	56	54( 96.4)	59~61, XO

JB : Japanese Black, H : Holstein, JS : Japanese Shorthorn,

SMC : Submetacentric chromosome, MC : Metacentric chromosome, F : Fragment.

あった。

## 考 察

これまでに報告された牛白血病発症牛の細胞遺伝学的観察では、リンパ節の組織細胞に明らかに染色体異常が認められても、末梢血培養法では異常が認められなかった例が多い。HARE<sup>3)</sup>は7例の白血病発症牛について、リンパ節組織細胞の直接検査法および末梢血培養法を平行して行い、直接法では6例に染色体異常細胞を認めたのに、末梢血培養法では6例中の1例に異常を認めたに過ぎなかった。MARTIN と FLANAGAN<sup>4)</sup>は末梢血培養法のみにより5例中1例のみに染色体異常を認め、他はすべて正常な染色体像を認めた。このように、従来の血液培養法で十分な分析結果が得られなかった原因として、

PHA に対する白血病細胞の反応性や培養時間などがあげられている。この研究では、PHA を添加せず、しかも培養時間を18~24時に短縮して、白血病細胞のみを分裂させる方法で行ったので、全例において白血病細胞の分析が可能であった。

分裂頻度が著しく低かった症例が数例あり、分析結果は症例ごとに異なる点が多かった。しかし、ほとんどの症例に共通してみられた特徴の一つは、高2倍性で、X染色体を巻き込んだ核型の異常を示す細胞集団が観察されたことである。特に、2本のX染色体のうちの1本が欠落している例が多くみられた。このような現象は、人の白血病<sup>5,6)</sup>においても頻繁に起ることが知られているし、牛白血病<sup>3,7,8)</sup>の報告例とも一致している。

数的異常に加えて、正常核型にはみられない MC 型

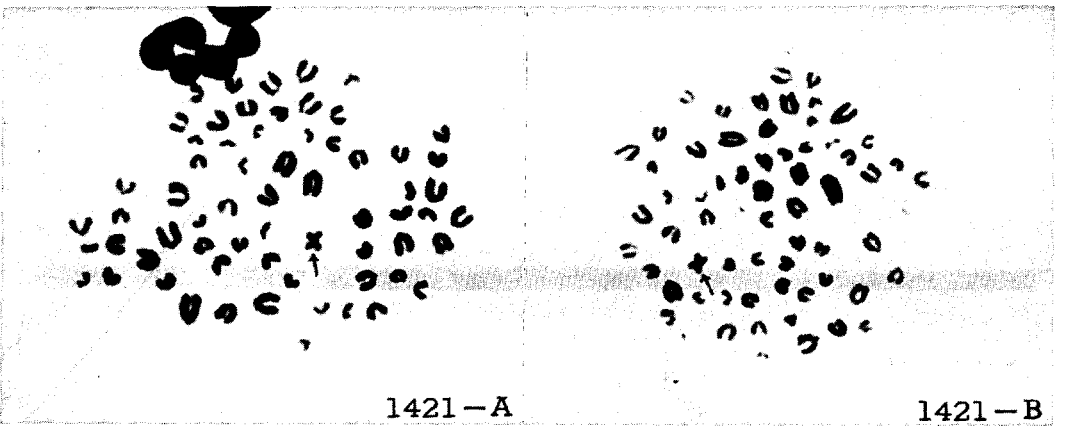
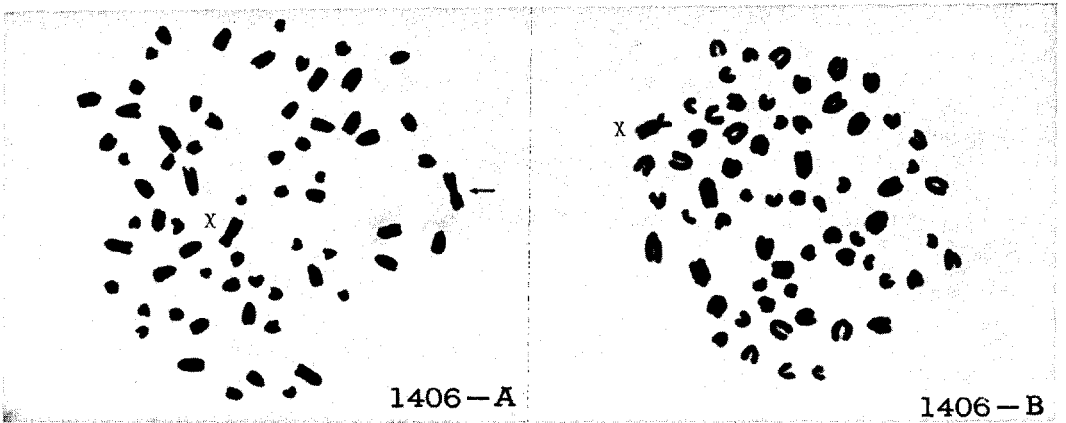
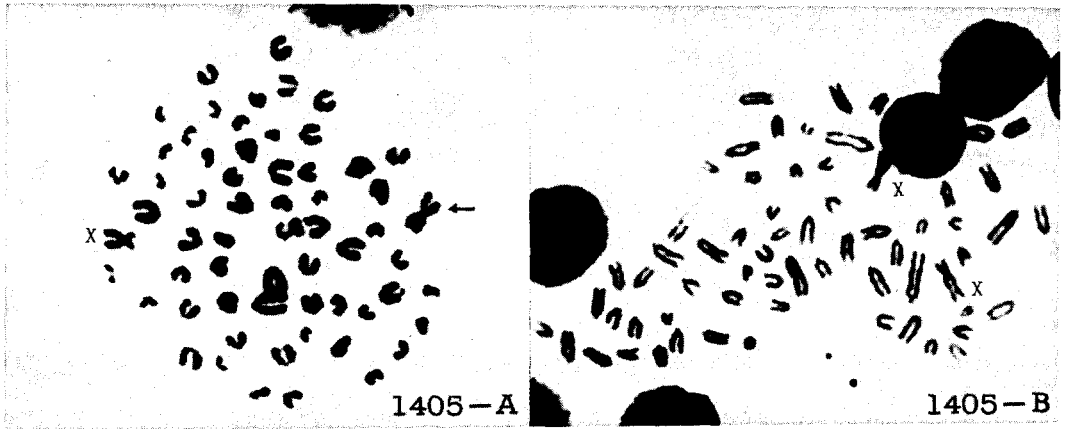
や SMC 型などの構造異常染色体の出現がみられた。これらの異常染色体が牛白血病細胞でみられることは、欧米諸国の発症牛の報告<sup>3,4,7,9,10)</sup> や日本の報告<sup>8)</sup> でも明らかである。MC 型, SMC 型のそれぞれの複数出現は endoreduplication と呼ばれる現象によると考えられ、病気の長期化または悪化が起因していると推察される。MC 型は25例中の18例 (72%) にみられ、牛白血病に特徴的な異常染色体と考えられる。

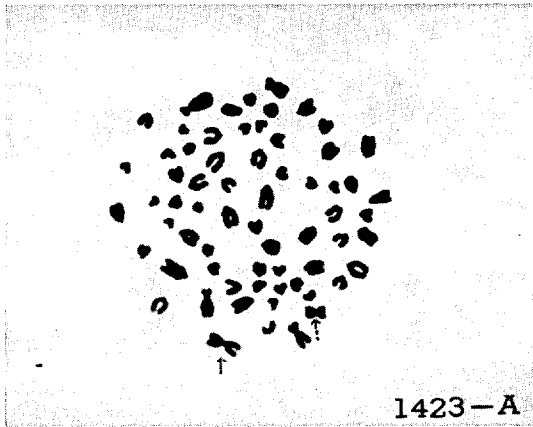
以上、成牛型白血病発症牛にみられた細胞遺伝学的特徴は、大部分の発症例に共通性がみられるので、本症の診断に細胞遺伝学的検査が有力な手段のひとつとなり得るといえよう。

この研究は、昭和55年度から58年度までの4ヵ年にわたり実施された特別研究「牛白血病の診断及び予防技術の開発」の分担研究として行われたものである。

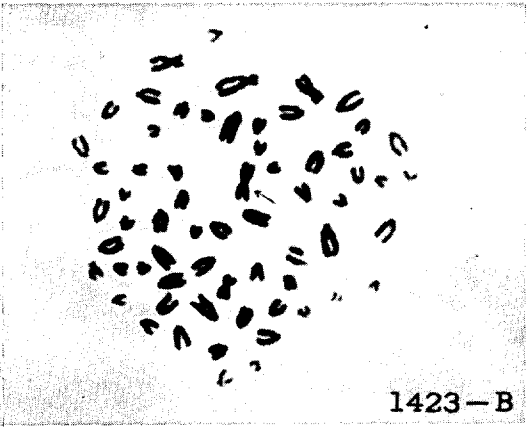
Fig. 1, 2, 3. Metaphase plates representative of a cell line in cows with pathologically confirmed lymphosarcoma.

Case No. 1405 A :  $2n=62$ , additional large metacentric chromosome( $\uparrow$ ), missing of one X chromosome, No. 1405 B :  $2n=64$ , No. 1406 A :  $2n=66$ , additional large metacentric chromosome( $\uparrow$ ), missing of one X chromosome, No. 1406 B :  $2n=64$ , one of the sex chromosomes is missing, No. 1421 A and B :  $2n=64$ , sex chromosomes are missing. Additional small metacentric chromosome( $\uparrow$ ), No. 1423 A :  $2n=65$ , No. 1423 B :  $2n=64$ , a large metacentric( $\uparrow$ ), a small metacentric chromosome( $\dagger$ ), and some submetacentric chromosomes, No. 1425 A :  $2n=69$ , No. 1425 B :  $2n=68$ , a large metacentric chromosome( $\uparrow$ ), No. 1431 A :  $4n=121$ , No. 1431 B :  $4n=146$ , additional some submetacentric chromosomes, metacentric chromosomes, No. 1433 :  $2n=64$ , metacentric chromosome( $\uparrow$ ), No. 1437 :  $2n=65$ , metacentric chromosome( $\uparrow$ ), No. 1436 :  $2n=64$ , metacentric chromosome( $\uparrow$ ), missing of one sex chromosome, No. 1675 :  $2n=60$ , metacentric chromosome( $\uparrow$ ), one of the sex chromosomes is missing, No. 1597 A :  $2n=60$ , two large metacentric chromosomes. One of the sex chromosomes is missing, No. 1597 B :  $2n=63$ , two large metacentric chromosomes, one of the sex chromosomes is missing.





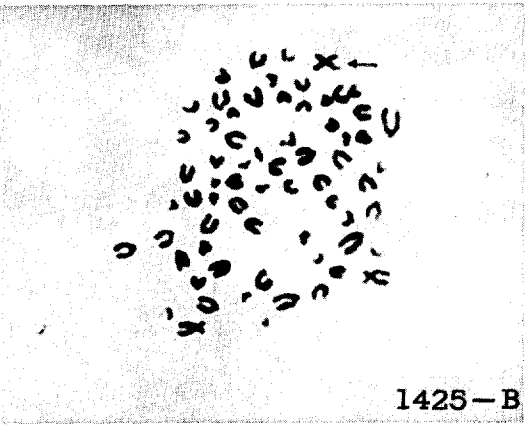
1423-A



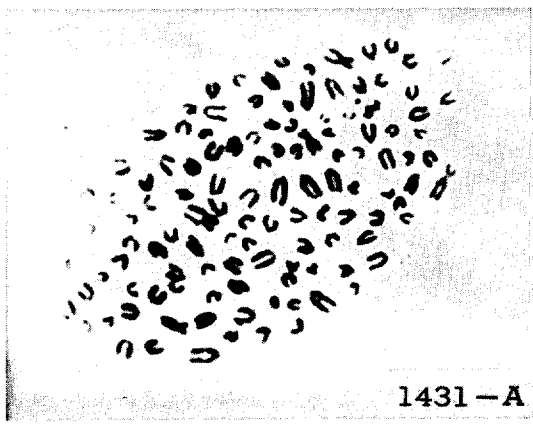
1423-B



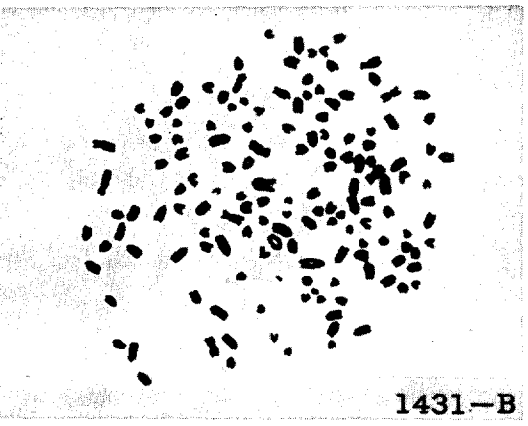
1425-A



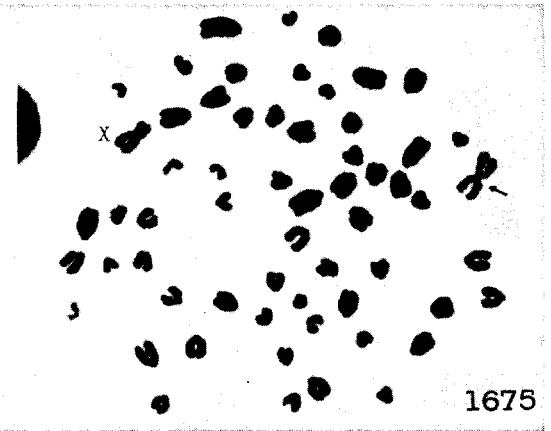
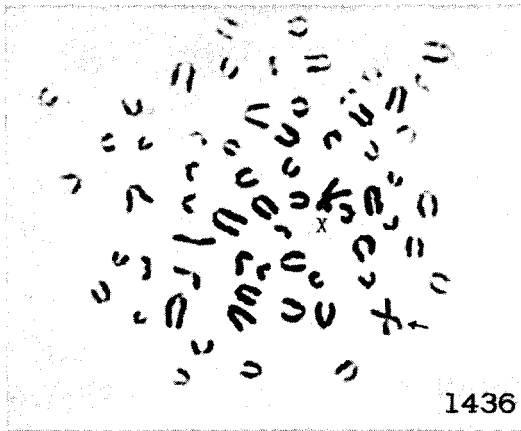
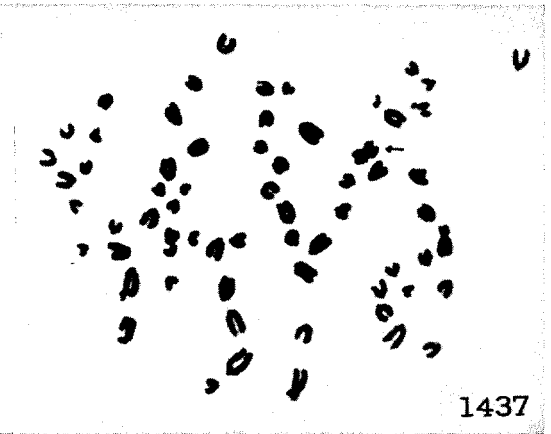
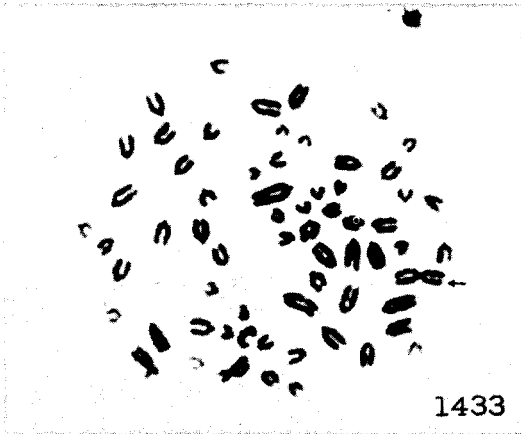
1425-B



1431-A



1431-B



引用文献

- 1) 榊田博司・菊池武昭・和出 靖・大島寛一・沼宮内茂：東北地域に発生した白血病牛の染色体像について，東北農業研究，**29**，155—156，1981
- 2) NOWELL, P.C. and D.A. HUNGERFORD : Chromosome studies on normal and leukemic human Leukocytes, *J. Nat. Cancer Inst.*, **25**, 85—109, 1960
- 3) HARE, W.C.D., R.A. McFEELY, D.A. ABT and J.R. FEIERMAN : Chromosomal studies in bovine Lymphosarcoma, *J. Nat. Cancer Inst.*, **33**, 105—118, 1964
- 4) MARTIN, W.B. and FLANAGAN : Karyotype analysis of lueocytes from normal and lymphosarcomatous cattle (*Bos Taurus*) *Br. J. Cancer.*, **21**, 137—143, 1967
- 5) AWANO, I., F. TSUDA, S. TOSHIMA, and K. KOKUBUN : Research on the genetic mechanism of leukemogenesis (Chromosome in the human- and leukemic tissue), *Tohoku J. Exp. Med.*, **74**, 1—17, 1961
- 6) HUNGERFORD, D.A. : Chromosome studies in human leukemia, I, Acute leukemia in children, *J. Nat. Cancer Inst.*, **27**, 983—1011, 1961
- 7) HARE, W.C.D., TSU-JU YANG, and R.A. McFEELY : A survey of chromosome findings in 47 cases of bovine Lymphosarcoma (Leukemia), *J. Nat. Cancer Inst.*, **38**, 383—392, 1967
- 8) 榊田博司・英 強・和出 靖：リンパ肉腫（リンパ性白血病）の牛における染色体異常．日畜会報，**49**，802—807，1978
- 9) BASRUR, P.K., J.P.W. GILMAN and B.J. McSHERRY : Cytological observations on a bovine lymphosarcoma, *Nature*, **201**, 368—371, 1964
- 10) MARSHAK, R.R., W.C.D. HARE, R.M. DUTCHER, R.M. SCHWARTZMAN, J.W. SWITZER and K. HUBBEN (1966) Observations on a heifer with cutaneous lymphosarcoma, *Cancer*, **19**, 724—734, 1966



## Chromosomal Studies in Bovine Lymphosarcoma

Hiroshi MASUDA, Shigeru NUMAKUNAI\* and Kanichi OSHIMA\*

### Summary

Chromosomal studies on 25 pathologically confirmed cases of bovine lymphosarcoma were carried out on dividing cells obtained from cultures of peripheral blood leukocytes. Heparinised blood samples were transported from Iwate University, Morioka to National Institute of Animal Industry, Ibaraki by express transportation.

1—1.5 ml of heparinised whole blood was mixed with 5—7 ml McCoy's 5a medium (Gibco) and 0.1 ml antibiotics solution (Penicillin 11 in G potassium, 500 I.U., streptomycin sulfate 500  $\mu$ g/0.1 ml), and then cultured at 37°C for 18—24 hours. Colchicine was added before 2—3 hours for harvest.

In all cases, varying proportions of cells with changes in their chromosomal constitution were found. No constant pattern of aneuploidy of chromosomes was found among cows with lymphosarcoma, but in almost every cases hyperdiploid constitutions were found. One of the sex chromosomes was missing in 20 cases. Aberrant large metacentric chromosomes were found in 18 cases and the additional submetacentric chromosomes were found in 11 cases. These findings suggest that chromosome analyses from cultured leukocytes will be valuable for the diagnosis of bovine lymphosarcoma.

---

\* Department of Agriculture, Iwate University