

博士論文

牛伝染性リンパ腫ウイルスと牛フォーミーウイルスの  
感染動態および分子疫学的解析

岡 本 麻 里

## 目 次

緒 言 .....	4
第 1 章 牛伝染性リンパ腫ウイルスの母子感染における性状解析	
1-1. 序文 .....	14
1-2. 材料と方法 .....	16
1-3. 結果 .....	19
(1) 母子感染の頻度	
(2) 母子感染と MHC class II- <i>BoLA-DRB3</i> アレルの関連	
(3) BLV-G4 領域の解析	
(4) 母牛の分娩前後の BLV 関連因子の動態	
(5) 子牛の BLV 関連因子の動態	
(6) 早期感染と陽転群における BLV 関連因子の動態比較	
1-4. 考察 .....	23
1-5. 要旨 .....	28
1-6. 表および図 .....	29
第 2 章 日本における牛フォーミーウイルスのゲノム解析および 牛伝染性リンパ腫との相関	
2-1. 序文 .....	39
2-2. 材料と方法 .....	41
2-3. 結果 .....	45
(1) BFV 感染率	
(2) BFV の分離	
(3) 相同性比較と系統樹解析	
(4) <i>env</i> 領域の系統樹解析	
(5) BFV と BLV の相関	

2-4. 考察	47
2-5. 要旨	50
2-6. 表および図	51
第3章 牛フォーミーウイルスの生体内および試験管内の動態解析	
3-1. 序文	60
3-2. 材料と方法	62
3-3. 結果	66
(1) BFV 定量リアルタイム PCR 条件検討	
(2) BFV 試験管内動態解析	
(3) <i>env-bel-1</i> 領域の欠失	
(4) 生体内 BFV 経時的動態解析	
3-4. 考察	68
3-5. 要旨	72
3-6. 表および図	73
総括	83
謝辞	88
参考文献	89

## 緒言

レトロウイルスは特有の逆転写酵素を持ち、宿主細胞の核内に侵入すると、宿主ゲノムに組み込まれ、プロウイルスの形をとり、生涯持続感染する（図 0-1）というユニークな感染様式のウイルスである。そのレトロウイルス科はさらに、オルトレトロウイルス亜科とスプーマレトロウイルス亜科に分類され、魚類から霊長類まで幅広く分布している。

レトロウイルスによる疾患は悪性腫瘍、免疫不全、自己免疫病、下位運動ニューロン疾患、組織障害を伴う急性疾患など多様である[94]。レトロウイルスが惹き起こす代表的な疾患として、ヒトではヒト免疫不全ウイルス 1 型（HIV-1: Human immunodeficiency virus type 1）による CD4+T 細胞の破壊に起因する後天性免疫不全症候群（AIDS : Acquired immunodeficiency syndrome）やヒト T 細胞性白血病ウイルス 1 型（HTLV-1: Human T-cell leukemia virus type 1）による CD4+T 細胞のモノクローナル増殖に起因する成人 T 細胞白血病/リンパ腫（ATLL: Adult T-cell leukemia/ lymphoma）がある。HIV-1 に対してはプロテアーゼ阻害剤と逆転写酵素阻害剤を併用した、多剤併用療法（HARRT : Highly active anti-retroviral therapy）による早期治療が性感染や臨床兆候の発生の減少[14]に寄与し、1995 年以降死亡率は減少している[32]。HTLV-1 に対しては、感染経路が主に経乳感染であることから、人工乳による代替で伝播を防ぐことができることが示唆された[108]。このように、ヒト分野のレトロウイルス感染動態や予防治療の研究が活発にされている一方で、獣医学領域、とりわけ大動物におけるレトロウイルス感染は、予防・治療法が確立されておらず、その感染動態や病態も解明されていない部分が多い。馬で問題となる馬伝染性貧血は、高熱と貧血を主徴とする致死的な疾病で、予防法および治療法はない。日本では家畜伝染病予防法施行規則第 9 条でその検査が義務付けられ、摘発・淘汰を推進した結果、2011 年を最後に発生は確認されておらず、2017 年に清浄化が確認された。

牛におけるレトロウイルスとして、牛伝染性リンパ腫（旧: 牛白血病）ウイルス（BLV: Bovine leukemia virus）、牛免疫不全ウイルス（BIV: Bovine immunodeficiency virus）、牛フォーミーウイルス（BFV: Bovine foamy virus）が国内でも確認されている。BIV はオルトレトロウイルス亜科レンチウイルス属

のウイルスであり、実験感染ではリンパ球増多症が認められたという報告[5, 12]があるが、自然感染での病原性は未だ不明となっている。国内では1996年の北海道でのウエスタンブロットを用いた抗体検査で9/120頭(7.5%)の感染が初めて確認[30]されて以降、抗体検査で北海道12農場に72/611頭(11.7%) [62]、北海道10地区の抗体検査で0%-25%の範囲で平均11%(43/390頭) [110]、北海道2地区と京都府のPCR検査で0.49%(2/407頭)のホルスタイン牛が感染していたという報告[101]があるが、検出は現在のところ北海道のみに限局されている。

BLVはオルトロトロウイルス亜科デルタトロウイルス属のウイルスで、ゲノムは構造タンパクと逆転写酵素をコードする領域、調節タンパク質やアクセサリータンパク質をコードする領域と、LTR(Long terminal repeat)を合わせた8,714 nt(塩基)から成る(図0-2)。構造タンパクと逆転写酵素をコードする領域には *gag*, *pro*, *pol*, *env*があり、ウイルスのライフサイクルや感染性、ビリオンの形成に重要な役割を持つ[21]。このうち、BLV抗体検査には、*env*遺伝子がコードし、ウイルスの外殻を構成するgp51に対する抗体が標的とされている。調節タンパク質のTax, Rex, アクセサリータンパク質のR3, G4は転写制御因子CREB(cAMP)の活性化や細胞増殖の調節に関与するHa-*ras*遺伝子との共作用を介して、ウイルスの複製や細胞の癌化に関与している[17, 49, 85, 112, 113]。このBLVが主要な原因である牛伝染性リンパ腫は、日本において、平成10年の家畜伝染病予防法の改正に伴い、届出伝染病に指定された。牛伝染性リンパ腫は、白血球増加や全身性の悪性リンパ腫/白血病を主徴とする疾病で、非ウイルス性の散発型とウイルス性の地方病性牛伝染性リンパ腫(EBL: Enzootic bovine leucosis)の二つに大別されるが、EBLがその大半を占めている。BLVは種々の末梢単核球に感染し、宿主細胞に組込まれ[82]、生涯持続感染するが、感染牛の大部分は無症状で、約30%がBLV-Taxと細胞増殖の調節に関与するHa-*ras*遺伝子との共作用やIL-2発現誘導によりB細胞の異常増殖を呈する持続性リンパ球増多症を惹き起こす[41, 85, 113]。さらに2-3%では病態が進行しEBLを発症する[24]。また、無症状期であっても、乳量の低下[16, 75, 80]や、淘汰率の上昇[10, 104]、他の感染性疾病の発生頻度が増加する[15, 106]などといった疫学研究が報告されており、経済的な損失の原因となっている。2009年から2011年にかけて行われた市販のELISAキットを使用した20,835頭の全国的な血清疫学調査によると、国内の牛の約35%が既にBLVに感染

しており、特に乳牛においては抗体陽性率が 40.9%にのぼっていた[70]。牛伝染性リンパ腫は現在、有効な治療法やワクチンがなく、ヨーロッパ諸国では国家が主導して摘発淘汰による根絶に取り組み、清浄化に成功している[1, 76]が、日本のように高い陽性率である現在、馬伝染性貧血の際に行ったような摘発淘汰での制御は現実的ではない。報告によると BLV のプロウイルス量(PVL: Proviral load)が病態や同居牛への伝播可能性に関与している[36, 64, 78, 96, 116]とされ、PVLによる淘汰順位の決定や隔離による制御が提案されてきている[31]。それにもかかわらず、日本では依然として BLV の届出件数が増加しており(図 0-3)、平成17年度以降、牛のウシの監視伝染病では最多の届出数(2019年: 4,113頭)を記録している(農林水産省消費・安全局動物衛生課 監視伝染病発生年報: [https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansu\\_densen/kansu\\_densen.html](https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansu_densen/kansu_densen.html))。BLV 感染制御が求められる中、ウイルスの動態を知り、伝播を防ぐことが重要となる。BLV の感染経路は大きく分けて接触・医原性・吸血昆虫を介した水平感染と、子宮内・産道・乳汁を介した母子感染があるが、前述の通り、伝播の頻度は PVL に依存しているとされている[64, 116]。PVL の他に、BLV の水平伝播にはウイルス側の要因として、G4 の関与が考えられている。非構造タンパクである G4 は、ウイルス複製や *Ha-ras* 遺伝子を介した細胞の不死化に関与するとされている[17, 49, 112]が、G4 遺伝子の変異によるウイルスの産生能力の減少が報告されており[69]、G4 遺伝子による伝播能力の影響が示唆されている。また、ウイルス側の因子に加えて、宿主側の因子も病態への感受性に関与しているとされ、そのひとつとして、bovine leukocyte antigen (*BoLA*) と呼称されるウシ主要組織適合性遺伝子複合体(MHC) が挙げられる。*BoLA* 領域はウシ第 23 染色体に存在し、外来抗原由来のペプチドを T 細胞に提示する働きがある class II 分子は、多型性に富み、疾患に対する免疫応答に関与する。特に class IIa 領域に存在する *BoLA-DRB3* 対立遺伝子(アレル)の 70-71 位の極性アミノ酸 Glu-Arg の存在がウイルスペプチドとの結合に影響を及ぼすとされ[115]、BLV のプロウイルス量[39, 55, 66, 103]や BLV 誘導性の悪性リンパ腫/白血病に関係している[55, 74]と考えられている。これらの高 PVL 牛や EBL 発症牛、低 PVL 牛のアレルの調査を基に、アレルの型によって、感受性(S)、抵抗性(R)、中性(N)と分類されている。ヒトの分野では HIV-1 において、ヒトにおける MHC、ヒト白血球抗原(*HLA*)について、母子の *HLA class*

II型の不一致が母子感染リスクを減少させるという報告がある[56]。また、BLVと同じデルタレトロウイルス属に属するHTLV-1では、BLVと同様、ほとんどの患者が臨床症状を呈さず、無症状キャリアーとなるが、1-5%でATLLを発症する[20]。ATLLの発症について、ATLL患者は母親から母子感染の経路でHTLV-1に感染しているという報告があり[9, 71]、母子感染が重要視されている。しかし、BLVの母子感染について、ウイルス要因や宿主因子が影響するか、母子感染や早期感染後の動態について解析は現在のところ行われていない。最近では若齢でのEBL発症の報告もされており[77]、母子感染を含む早期感染による影響に注目が集まっている。また、母子感染子牛・早期感染子牛はBLV感染後、長期間飼養されることが考えられるため、BLVの母子感染や早期感染の特性を知ることは、牛伝染性リンパ腫の制御の上で重要だと考えられる。

BLVと同じレトロウイルス科だが、スプーマウイルス亜科に分類される[43]フォーミーウイルス（FV: Foamy virus）で、ゲノムは構造タンパク質と逆転写酵素をコードする領域の *gag*, *pol*, *env* と、2つのアクセサリタンパク質をコードする領域が存在し、ゲノムサイズは約12 kbとなっている（図0-2）。5'LTRにはウイルスプロモーターが存在し、*gag*, *pol*, *env* の mRNA 転写を促進するが、それに加えてFVは内部プロモーター（IP）を有している。IPはアクセサリタンパク質のTasおよびBetをコードするRNAの転写を制御する。Tasは転写活性因子で、LTRやIPから開始する転写に必要となる[54, 83]。Betの機能は未だ明らかとなっていない部分も多いが、ヒトフォーミーウイルス（HFV: Human foamy virus）でBet発現により培養細胞での細胞障害性が失われたことからFV複製の負の調節に関わることが示唆された[92]が、ネコフォーミーウイルス（FFV: Feline foamy virus）においてBetの変異体はネコの腎臓細胞でウイルスの力価を約1,000分の1に低下させたという報告があり[6]、FFVの複製には必須となっている可能性がある。FVは魚類から哺乳類まで幅広く存在しており[4, 26, 27, 38, 57, 87, 89, 105, 114]、長期間持続感染する。また、多様な初代細胞や株化細胞に感染し[2, 51]、多核巨細胞を形成する[91]。FVは単独では非病原性だと考えられている[91]が、FVの病原性の可能性を示す報告がされている。プロトタイプFV（PFV: Prototype foamy virus）は、トランス活性化因子であるTasを介したLTRの活性化によって同じレトロウイルスである、HIV-1の転写を活性化したという報告が

ある[42]。FFV とネコ白血病ウイルス (FeLV: Feline leukemia virus) 感染の相関関係が報告されており、特に進行性の FeLV に感染した猫は FFV に感染しやすいとされる[13, 84]。また、FFV/FeLV に同時感染した猫の定量 PCR によって測定された FFV ウイルス量は、FFV 単一感染猫よりも高かった[13]。さらに、実験的に感染した猫は臨床的には正常に見えたが、腎臓では糸球体とボーマン嚢の癒着、腎細管の好酸球性のシンシチウム形成、肺では、リンパ球およびマクロファージの間質性浸潤、気道および主気管支への好酸球浸潤などの組織病理学的変化が観察された[19]。培養細胞における高い細胞障害性の一方、宿主動物で非病原性であるメカニズムは解明されておらず、FV の病原性やその特徴についてはまだ不明な点も多い。また、FV では種を越えた感染として、SFV のヒトへの感染が報告されている。SFV はサルが自然宿主とされているが、職業的に類人猿と接触したヒトからの SFV 抗体が検出された[29, 67, 68, 98, 99]。ヒトに対する病原性は報告されていないが、同じレトロウイルスである HIV-1 がチンパンジー由来の SIVcpz からヒトに馴化し、病原性を示した例もある[95]ため、非自然宿主での病原性については検討の余地がある。FV の中で牛を自然宿主とする BFV は、西欧諸国や中国で報告されている[11, 28, 34, 35, 86]。日本でも、2018 年にはじめて、臨床的に健康だが、BFV に感染した牛の末梢血リンパ球をウシ胎仔筋肉 (BFM: Bovine fetal muscle) 細胞と共培養し、BFV 株 No.43 が分離された[25]。しかし、No.43 株の全長ゲノム配列の解析は行われず、BFV の感染率に関する情報も限られているため、日本の BFV の疫学とゲノムの特徴は明らかにされていない。

このように、レトロウイルスは畜産衛生上、無視できない存在であるが、一方でそうした、宿主免疫からの回避、抑制、利用を行い、症状が顕在化せずに宿主 DNA に組み込まれ、生涯持続感染するといったユニークな特徴・動態のため、その病原性や特徴については未解明の部分も多い。そこで、著者はレトロウイルスの中で、治療予防法がなく、未解明な牛レトロウイルスに焦点を当てた。さらに、日本で現在も感染が確認されており、広く浸潤している可能性のある BLV と BFV について、感染経路や浸潤状況といった感染動態と、感染や病原性に影響を与える因子を究明することを目的として、BLV の主な伝播様式のひとつである母子感染における動態と BFV の関与、BFV の生体内および試験管内の両方でその動態を調査した。



本論文は次の3章から構成される。第1章では母子感染を介して自然に感染した牛および妊娠牛におけるBLV関連因子の動態を明らかにするために、妊娠牛およびその子牛についてBLV関連因子の経時的解析と*BoLA-DRB3*型を解析した。次に、第2章ではBFVの日本における浸潤状況の把握、侵入経路の推測、およびBFVの生物学的機能や病原性を考察するために、日本におけるBFV疫学とゲノム・系統樹解析を行い、生体内でのBLVとの相関について記載した。さらに第3章では、未解明のBFVの試験管内および生体内での動態、その非病原性のメカニズムや他のレトロウイルスとの相関の一端を明らかにするために、BFV陽性牛とその分離株について試験管内および生体内でのBFVの動態について検討した。

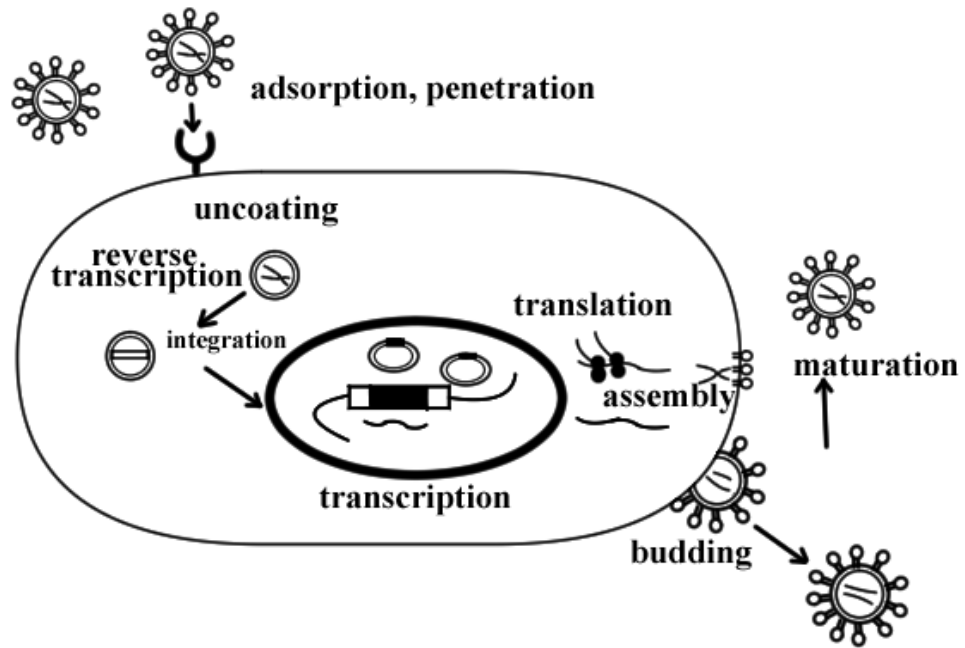


図 0-1 レトロウイルスの複製

細胞表面の特異的レセプターを介した細胞への吸着，脱殻と逆転写によるウイルス RNA からの DNA 合成をして，インテグラーゼの働きで宿主細胞の DNA に組み込まれる。この状態をプロウイルスという。プロウイルスは細胞の RNA ポリメラーゼを利用してウイルスゲノム RNA とウイルスタンパクを作る mRNA を転写する。mRNA から作られたウイルスタンパクとウイルス RNA は再集合し，出芽によって細胞から放出される [54, 83, 94]。

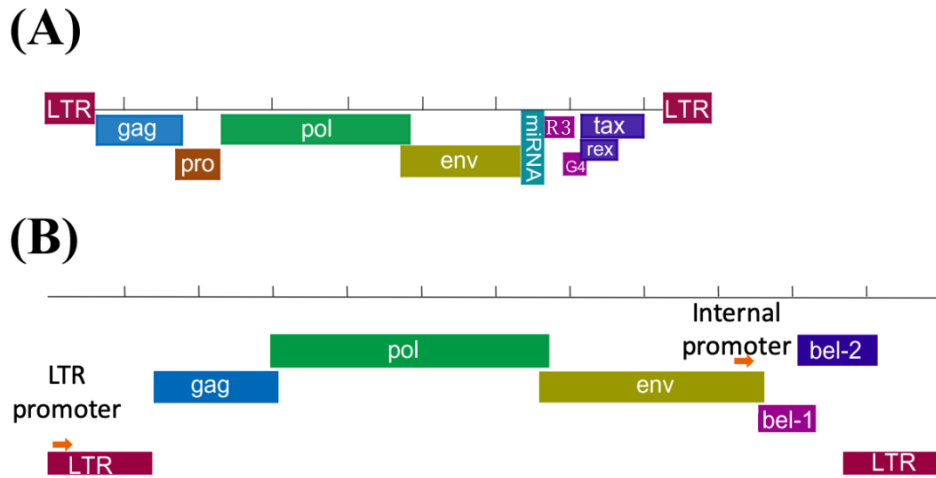


図 0-2 BLV および BFV のゲノム構造

(A) BLV はオルトレトロウイルス亜科デルタレトロウイルス属のウイルスで、ゲノムは構造タンパクと逆転写酵素をコードする領域、調節タンパク質やアクセサリタンパク質をコードする領域、LTR を合わせた 8,714 nt から成る。構造タンパクと逆転写酵素をコードする領域には *gag*, *pro*, *pol*, *env* があり、ウイルスのライフサイクルや感染性、ビリオンの形成に重要な役割を持つ。(B) FV はスプーマウイルス亜科に分類され[43]、ゲノムは構造タンパク質と逆転写酵素をコードする領域の *gag*, *pol*, *env* と、2つのアクセサリタンパク質をコードする領域が存在し、ゲノムサイズは約 12 kb となっている。

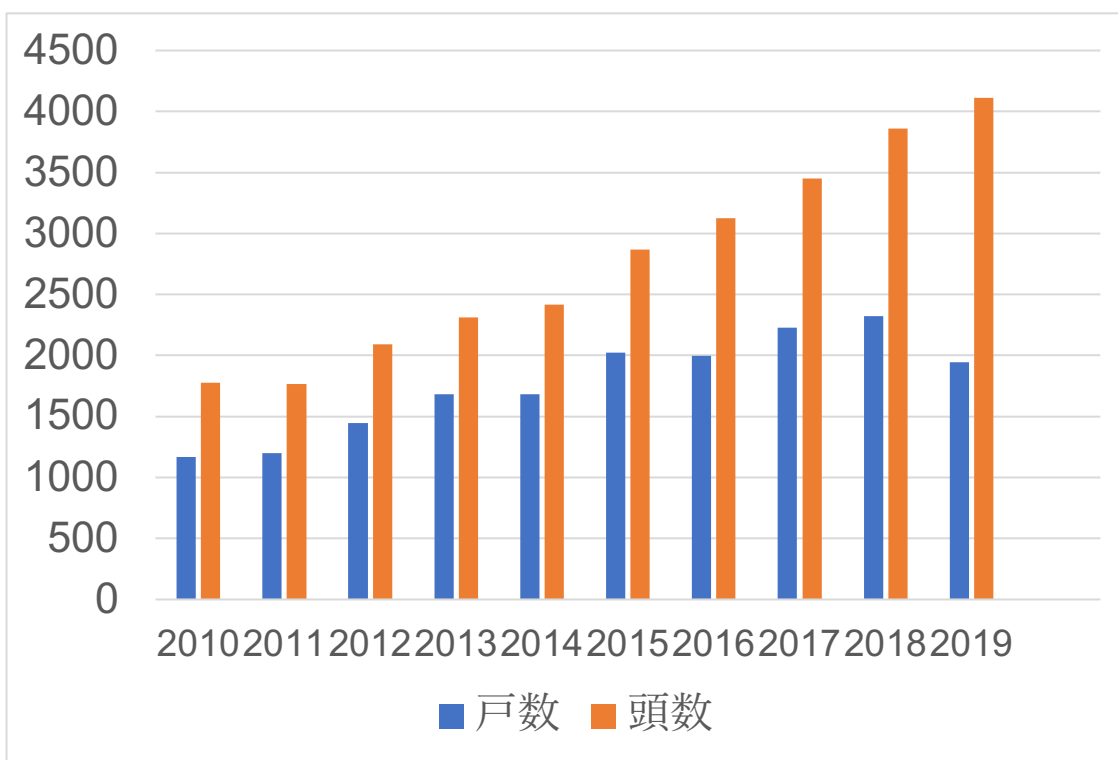


図 0-3 日本の牛伝染性リンパ腫届出戸数/頭数の推移

(農林水産省消費・安全局動物衛生課 監視伝染病発生年報：[https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi\\_densen/kansi\\_densen.html](https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/kansi_densen.html)) より作成。牛伝染性リンパ腫は、日本において、平成 10 年の家畜伝染病予防法の改正に伴い、届出伝染病に指定された。日本では依然として BLV の届出件数が増加しており、平成 17 年度以降、牛のウシの監視伝染病では最多の届出数（2019 年：4,113 頭）を記録している。

## 第 1 章

# 牛伝染性リンパ腫ウイルスの 母子感染における性状解析

## 1-1. 序文

BLV はレトロウイルス科デルタレトロウイルス属のウイルスで、悪性リンパ腫/白血病を示す EBL の原因となっている。ほとんどの感染牛は無症状のまま経過し、キャリアーとなるが、約 30%で BLV の Tax タンパク質と、細胞増殖の調節に関与する *Ha-ras* 遺伝子や前癌遺伝子 *c-fos* との共作用、IL-2 発現誘導により B 細胞の異常増殖を呈する持続性リンパ球増多症を惹き起こす[41, 85, 113]。さらに、1-5%の感染牛では病態が進行し、致死的な悪性リンパ腫/白血病となる[24]。また、最近の研究では、無症状期であっても、乳量の減少[16, 75, 80]，淘汰率の上昇[10, 104]，日和見感染症や乳房炎など他の感染症の自然治癒率の低下や重症化による経済的損失が示唆されており[15, 93, 106, 111]，BLV の制御は畜産を守る上で重要な課題となっている。

BLV は生涯持続感染し、有効なワクチンや治療薬が今までのところ存在しないため、フィンランド、リトアニア、イタリアなどヨーロッパ諸国では国による検査・隔離淘汰によって根絶が行われてきた[1, 76]。しかし、近年日本では乳牛での抗体陽性率が約 40%にのぼり[70]，EBL の発生は年々増加している。このような高い陽性率においては、摘発淘汰による撲滅は困難と考えられる。BLV 感染制御が求められる中、ウイルスの動態を知り、伝播を防ぐことが重要となる。BLV の感染経路は大きく分けて水平感染と垂直感染（母子感染）があり、伝播の頻度はウイルスロードに依存しているとされている。BLV は 14,000 コピー/10<sup>5</sup> 細胞以上のコピー数の牛で鼻汁や唾液に放出されるが、鼻汁や唾液等を介する接触は農場内での BLV 感染拡大に影響を及ぼすことが示唆され、水平感染伝播リスクに関与している可能性がある[116]。また、400 コピー/10 ng DNA 以上で母子感染頻度が有意に高いという報告がある[64]。このように、BLV 感染牛の体内ウイルス量である PVL が伝播リスクに関与していると考えられており、陽性率が高い日本においては、PVL を利用して隔離・淘汰順位を決定することによる対策が提案されている [31]。

BLV の水平伝播に関わるウイルス側の要因として、非構造タンパクである G4 がある。G4 は、ウイルス複製や *Ha-ras* 遺伝子を介した細胞の不死化に関与するとされている[17, 49, 112] が、その G4 遺伝子の変異によるウイルスの産生能力

の減少が報告されており [69], G4 遺伝子による伝播能力への影響が示唆されている。BLV の遺伝子変異頻度は低いとされている [58] が, こうしたわずかな変異が BLV の伝播に関与する可能性がある。ウイルス側の因子に加えて, 宿主側の因子も伝播や病態への感受性に関与しているとされ, そのひとつとして, bovine leukocyte antigen (*BoLA*) と呼称されるウシ主要組織適合性遺伝子複合体 (MHC) が挙げられる。*BoLA* 領域はウシ第 23 染色体に存在し, 外来抗原由来のペプチドを T 細胞に提示する働きがあるクラス II 分子で, 多型性に富み, 疾患に対する免疫応答に関与する。特にクラス IIa 領域に存在する *BoLA-DRB3* 遺伝子アレルが BLV のプロウイルス量 [39, 55, 66, 103] や BLV 誘導性の悪性リンパ腫/白血病に関係している [55, 74] と考えられ, アレルの型によって, 感受性 (*S*), 抵抗性 (*R*), 中性 (*N*) と分類されている [39, 55, 66, 103]。ヒトの分野ではヒトにおける MHC, ヒト白血球抗原 (*HLA*) が HIV-1 の母子感染にかかわるとされ, 母子の *HLA* class II 型の不一致が母子感染リスクを減少させるという報告がある [56]。また, BLV と同じデルタレトロウイルス属に属する HTLV-1 では, BLV と同様, ほとんどの患者が臨床症状を呈さず, 無症状キャリアーとなるが, 1-5% で ATLL を発症する [20]。ATLL の発症について, ATLL 患者は母親から母子感染の経路で HTLV-1 に感染しているという報告があり [9, 71], 母子感染が重要視されている。しかし一方で, BLV の母子感染については, ウイルス要因や宿主因子が影響するか, 母子感染や早期感染後の動態についての解析は現在のところ行われていない。最近では若齢での EBL 発症の報告もされており, 母子感染を含む早期感染による影響に注目が集まっていることや, 母子感染子牛・早期感染子牛は BLV 感染後, 長期間飼養されることが考えられることから, BLV の母子感染や早期感染の特性を知ることは, 牛伝染性リンパ腫の制御の上で重要だと考えられる。

そこで, 本章では, BLV 自然感染例における経時的観察を行い, BLV の母子感染・早期感染の特性や BLV 関連因子の動態を究明した。

## 1-2. 材料と方法

### 動物・サンプリング

茨城県 1 農場のホルスタインまたは交雑種 (F1) の牛 41 頭を使用した。母牛 18 頭から生まれた子牛 22 頭と、分娩をしておらず、観察途中で ELISA および定量リアルタイム PCR で BLV 陰性から陽転が確認された牛 1 頭が含まれた。サンプリングは 2017 年 8 月から 2020 年 9 月の期間で行い、基本的に毎月 1 回の採血を行った。分娩前後の動態を調べるために、出産時に母牛と子牛 11 頭の採血を行い、出産時に採血できなかった子牛 11 頭は 1 ヶ月以内に採血した。母牛が BLV 陽性の場合、生まれた子牛は速やかに母牛と分離し、BLV 感染リンパ球を破壊することで初乳からの感染を防ぐ [40] ため、凍結融解処理を施した初乳を与えた。全血は各牛の頸静脈あるいは尾静脈から採材し、EDTA 管を用いた。血清は同様に収集し、プレーン管を用いて 1,200 xg で 10 分間遠心を行った。全血および血清の採材は東京大学動物実験実施規則に基づき動物実験専門委員会の承認を受け (承認番号: P18-081)、東京大学動物実験実施マニュアルに従って行われた。

### BLV 関連因子の測定

収集した全血は、自動血球計数装置 pocH-100iV (Sysmex, Hyogo, Japan) を用いてリンパ球数を測定した。ゲノム DNA の抽出は全血から直接 DNA Mini kit (QUIAGEN, Hilden, Germany) を説明書通り用いて全頭について行い、抽出した DNA は Nano-Drop (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて濃度を測定した。BLV の定量は小熊らの方法 [77] で行い、BLV プロウイルスの *pol* 領域の一部と beta-actin (ACTB) の一部を当量含むスタンダードプラスミドを用いた。スタンダードプラスミドは EASY-Dilution (Takara Bio, Shiga, Japan) で 10 倍階段希釈を行った。Taqman probe 法を用いて、Applied Biosystems Step One Plus (Thermo Fisher Scientific), Thunderbird Probe qPCR Mix (TOYOBO, Osaka, Japan) を使用して行った。抗体検査は抗 BLV-gp51 抗体を測定する市販の牛白血病エライザキット (JNC, Tokyo, Japan) を説明書通り行い、S/P 値を以下の式で求め、0.3 以上を BLV 抗体陽性と判定した。



$$S/P = \{S (P) - S (N) \} / \{PC (P) - PC (N) \}$$

PC (P) : 抗原陽性ウェル中の指示陽性血清の平均吸光度

PC (N) : 抗原陰性ウェル中の指示陽性血清の平均吸光度

S (P) : 抗原陽性ウェル中の試料血清の吸光度

S (N) : 抗原陰性ウェル中の試料血清の吸光度

### *BoLA-DRB3* アレル解析

調査した母牛および子牛 32 頭の *BoLA-DRB3* アレルの型は竹嶋らの方法[102]を用いて nested-PCR とダイレクトシーケンスを行って決定した。DNA ポリメラーゼには KOD FX Neo (TOYOBO) を使用した。用いたプライマーおよびサイクル条件は表 1-1 に記載した。PCR 産物は 2%アガロースゲルで電気泳動を行い, NucleSpin Gel and PCR Clean up (Macherey-Nagel, Düren, Germany) で精製した。BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて, Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) によってシーケンスを行い, データの解析は MEGA software version 7.0[48]を用いて, IPD-MHC データベース上の *BoLA-DRB3* alleles library(<https://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/allele/list/?group=BoLA>) にある既報の 330 種の配列と比較した。

### BLV-G4 領域の塩基解析

G4 領域の 7,140 -7,251 nt の塩基欠失が, ウイルス複製に必要であるとされる G4 機能の喪失を惹き起こし, ウイルス産生能力を下げることで, 伝播を減弱させる可能性があるという報告[69]から, 定量リアルタイム PCR で BLV 陽性が確認された牛 20 頭について BLV-G4 領域の塩基解析を行った。まず, 全血から抽出した DNA をテンプレートとして, 6,530-7,521 nt の領域を PCR で増幅した。使用したプライマーは G4-992F 5' - AGATTGTCGCTTCTGCGTGT -3' および G4-992R 5' - GGCAGTTGATCCAGAGTCGT-3' で, PCR 条件は 94 °C 2 分の後, 98 °C 10 秒, 65.5 °C 30 秒, 68 °C 30 秒を 45 サイクル反復した。増幅産物は 2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い, 予想される増幅サイズである 992 bp のバンドを切り出し, NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL) で精製した。精製ができた 12 サンプルについて,

BigDyeTerminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) および Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) を使用してシーケンス解析した。得られた配列は MEGA software version 7.0[48]を用いて既報の配列 (GenBank 登録番号: AP018030) との比較を行い, 7,125 nt-7,166 nt の配列を確認した。

#### 統計解析

分娩前後1ヶ月の PVL, S/P 値, リンパ球数について, ウィルコクソンの符号順位和検定を行った。また, 分娩時の母子感染母牛群と非母子感染母牛群の PVL, リンパ球数比較について, シャピロ・ウィルクの正規性検定を行い, データの正規性が確認されなかった( $p < 0.05$ )ため, マンホイットニーの  $U$ 検定を行った。BLV 遺伝子陰性, 陽性子牛の S/P 値の比較には  $t$  検定を用いた。PVL および *BoLA-DRB3* 型に基づく母子感染頻度の比較はカイ自乗検定によって行った。いずれの検定も,  $p$  値 0.05 以下を有意と判断した。

### 1-3. 結果

#### 母子感染の頻度

出生から 13 日以内に採材した全血サンプルから BLV 遺伝子が検出され、子宮内感染が疑われた子牛が 22 頭中 9 頭存在し、母子感染の頻度は 41% (95%信頼区間[95%CI]: 23-62%) だった。また、陽性牛群と隔離して飼っていた子牛 1 頭について、出生 5 ヶ月で BLV 遺伝子が検出された。調査した 19 頭の母牛は、目堅らの分類[63, 65]を参考に分娩時のコピー数に基づき母子感染リスクで超ハイリスク群 (> 400 コピー/10 ng DNA) , ハイリスク群 (100-400 コピー/10 ng DNA) , 低リスク群 (20 コピー以上 100 コピー未満/10 ng DNA) , 超低リスク群 (< 20 コピー/10 ng DNA) の 4 つに分類した。超ハイリスク牛が 8 頭、ハイリスク牛が 5 頭、低リスク牛が 5 頭、超低リスク牛が 4 頭存在し、それぞれのカテゴリーにおける子牛への母子感染頻度は表 1-2 に示した。母子感染は、超ハイリスク群では 63%(95%CI: 30-86%) , ハイリスク群では 40% (95%CI: 12-78%) , 低リスク群では 20% (95%CI: 2-60%) , 超低リスク群では 25% (95%CI: 3-67%) の頻度で認められたが、超ハイリスク群・ハイリスク群と低リスク群・超低リスク群との間で有意差は認められなかった ( $p > 0.05$ )。

#### 母子感染と MHC class II- *BoLA-DRB3* アレルの関連

19 頭の母牛について、*BoLA-DRB3* アレルを調査した。PVL が高い (> 400 コピー/ 10 ng DNA) 群で有意に母子感染が見られたという報告[64]から、*BoLA-DRB3* アレル型が PVL を介して母子感染に影響を及ぼすことを考慮し、既報[39, 55, 66, 103]を参考に、高 PVL 牛で有意に見られる *BoLA-DRB3* \*15:01 と \*12:01 を感受性 (S) , 低 PVL 牛で有意に見られる *BoLA-DRB3* \*14:01:01, と \*11:01 を抵抗性 (R) , PVL の値に影響せず、S や R のアレルの影響を受けるとされる *BoLA-DRB3*\*01:01 と \*06:01 を中性 (N) とした。

さらに、調査した母牛を SS, NS, RS, NR の 4 つの遺伝子型に分類し、それぞれの *BoLA-DRB3* 型と PVL で各カテゴリーにおける個体数と母子感染を起こした個体数、母子感染頻度を表 1-3 に示した。調査した母牛 19 頭には、SS 型が 1 頭、NS 型が 4 頭、RS 型が 8 頭、NR 型が 6 頭存在した。SS, NS, RS, NR の 4 つの遺伝子

型のうち、*N*は*S*や*R*アレルの影響を受ける[39]ことから、*SS*と*NS*を1つのグループにまとめた (*SS/NS*)。さらに、PVLの値によって、HPVL ( $\geq 100$  コピー/10 ng DNA) と LPVL (< 100 コピー/10 ng DNA) の2つで分けた。母子感染は *SS/NS*群では 60% (95%CI: 22-88%)、*RS*群では 63% (95%CI: 30-86%)、*NR*群で 0% (95%CI: 0-35%) の頻度で認められた。*SS/NS*群、*RS*群では HPVL 群が LPVL 群より母子感染の頻度が高かったが、頻度の差に有意差は認められなかった ( $p > 0.05$ )。*NR*群では母牛の PVL 値にかかわらず、母子感染は認められなかった。さらに、感受性アレル (*S*) を有する *SS/NS*, *RS*群では 13 頭中 8 頭、62% (95%CI: 35-82%) の頻度で母子感染が認められたが、感受性アレルを持たない *NR*群と比較すると、感受性アレルを持つ群で母子感染頻度が有意に高かった ( $p < 0.05$ )。

また、子牛の *BoLA-DRB3* アレルで遺伝子型を *SS/NS*, *RS*, *NN*, *NR/RR* の4つに分類した場合の個体数と母子感染を起こした個体数、母子感染頻度を表 1-4 に示した。*SS/NS*群は 63% (95%CI: 30-86%)、*RS*群は 100% (95%CI: 37-100%)、*NN*群は 50% (95%CI: 9-91%)、*NR/RR*群は 33% (95%CI: 6-80%) の頻度で母子感染が認められた。*SS/NS* および *RS* 群と *NN* および *NR/RR* 群で頻度の比較を行なったが、両群の母子感染頻度に有意な差は認められなかった ( $p > 0.05$ )。

#### BLV-G4 領域の解析

解析した 12 頭の牛では、BLV-G4 領域 (7,140 -7,251 nt) の欠失は認められなかった (図 1-1)。このことから、今回調査した牛群に感染した BLV では G4 領域の欠失によるウイルスの伝播能力の違いは無いことが示唆された。また、G4 領域の配列は、7,145 番目の塩基が T、7,153 番目の塩基が A の個体、7,145 番目の塩基が G、7,153 番目の塩基が A の個体、7,145 番目の塩基が G、7,153 番目の塩基が T の個体の 3 パターンが存在した (図 1-1) ことから、茨城県 1 農場には異なる配列を持つ BLV が少なくとも 3 種存在すると考えられる。

#### 母牛の分娩前後の BLV 関連因子の動態

母牛の分娩前後の BLV 関連因子の動態を図 1-2 に示した。母子感染群、非母子感染群について、分娩を 0 として、前後 1 ヶ月における BLV の PVL, S/P 値, リ

リンパ球数の変動を示した。分娩前後で PVL およびリンパ球数に大きな変動はなかった ( $p > 0.05$ )。このことから、分娩前後で BLV 伝播リスクは変動しないと考えられる。S/P 値は母子感染牛群で分娩時と比較して分娩前後 1 ヶ月で有意に高く、非母子感染牛群で分娩後 1 ヶ月に有意に高かった ( $p < 0.01$ )。また、分娩時の母子感染群 (+) と非母子感染群 (-) の PVL およびリンパ球数を比較したところ、母子感染群と非母子感染群で PVL ( $p < 0.01$ ) およびリンパ球数 ( $p < 0.05$ ) に有意な差が見られ、PVL およびリンパ球数が高い母牛で、母子感染が起こることが示唆された。このため、母子感染の有無を目的変数、PVL およびリンパ球数を説明変数とするロジスティック回帰分析を試みたところ、PVL が 10 倍増えると母子感染のオッズは 19.1 (95%CI: 1.04-350.2) 倍となることが明らかとなった ( $P=0.047$ )。

#### 子牛の BLV 関連因子の動態

生まれた子牛で追跡調査ができた 8 頭のうち、出生時に BLV 遺伝子が検出され、子宮内感染と考えられるもの (No.7828) が 1 頭、5 ヶ月齢で BLV 遺伝子が検出され、早期感染したもの (No.7823) がそれぞれ 1 頭存在した。その他の 6 頭は観察した 11 ヶ月の期間中は BLV 遺伝子の検出は確認されず、陰性のままだった。4 頭については初乳摂取前と初乳摂取後の血清を用いて、初乳摂取前に ELISA で陰性判定 ( $S/P < 0.3$ ) だったが、初乳摂取後に抗体が上昇した ( $S/P > 1.4$ ) ことを確認した。血中の抗体 S/P 値は 6 ヶ月以降で陽性群と陰性群に有意な差 ( $p < 0.01$ ) が見られた (図 1-3)。また、8 ヶ月以降で陰性群は完全に ELISA キットのプロトコル上で陰性の判定となった。

#### 早期感染と陽転群における BLV 関連因子の動態比較

母子感染を含め、1 歳齢未満で BLV に感染 (早期感染) した牛 2 頭 (No.7828, 7823) と 1 歳 6 ヶ月齢以降で BLV に水平感染した (陽転) 牛 4 頭 (No.7796, 7803, 7800, 7819) で PVL, S/P 値, リンパ球数の変動を比較した。陽転群は、検出時に PVL が高かった (74 コピー/100 細胞以上) 群 (No.7796, 7803, 7819) と低かった牛 No.7800 (14 コピー/100 細胞以下) の 2 つに大別された (図 1-4A, B)。高 PVL 群はその後も高い PVL 量を維持し続け、低 PVL 牛は低い PVL 量を維持

し続けた。低 PVL 牛のリンパ球数は期間を通してあまり変動しなかった一方で、高 PVL 群のリンパ球数は増加した。いずれの群でも S/P 値は不規則に増減を繰り返していた。PVL の値は高 PVL の陽転群 3 頭，早期感染群 2 頭，低 PVL の陽転群 1 頭の順で高かった。さらに，早期感染群 2 頭と陽転群 4 頭の計 6 頭の牛について PVL の値と *BoLA-DRB3* 型の相関を調べたが，有意な差は認められなかった ( $p > 0.05$ )。また，早期感染群と陽転群で PVL の増加率を比較した結果を図 1-4C, D に示した。両群に有意な差は認められなかった ( $p > 0.05$ ) が，早期感染群では陽転群と比べて検出時より PVL 量が増加しており，早期感染群，陽転群の中でも *SS/NS* 群，*RS* 群のほうが *RR/NR* 群よりも増加率が高い傾向が見られた。

#### 1-4. 考察

##### 母子感染

生まれた子牛は出生時または出生から1ヶ月以内に行った定量リアルタイムPCRにおいて41% (95%CI: 23-62%) でBLV $pol$ 遺伝子の一部が検出された。母牛がBLV陽性の場合、出生後その子牛は母牛から分離し凍結融解処理を行った初乳を給与したが、分離までの間に母牛の初乳を摂取した可能性は否定できない。また、BLVの母子感染経路として子宮内感染の他に産道感染が考えられる。しかし、以前の報告で、牛8頭を使用した実験感染において、静脈内接種を行ってから血中にBLV遺伝子が検出されるまで、2週間程度かかったとされ[72] 自然感染では実験感染に比べ、曝露ウイルス量も少ないと推測されることから、1ヶ月程度の時間を要すると考えられている[63]。よって、出生から13日以内に採材した全血サンプルからBLV遺伝子が検出された9頭の子牛は、出生時の産道感染や経乳感染によるBLV感染の可能性は低く、妊娠後期に子宮内感染の経路で母牛からBLVに感染したと考えられる。また、9頭のうち追跡調査を行なったNo.7828については、初乳摂取前の抗体が陰性(S/P = 0.0761)であり、妊娠末期に感染したと示唆された。既報で、母子感染超ハイリスク群(PVL > 400 コピー/10 ng DNA)における子宮内感染の頻度が34.4%と報告されており[64]、今回は63% (95%CI: 30-86%) と、その数値を上回ったが、有意差は認められなかった( $p > 0.05$ )。有意差が見られなかった原因として、サンプルサイズが小さかった( $n = 22$ )ことが影響した可能性がある。既報との違いを検証するには、より多くのサンプルの収集が求められる。今回、超低リスク群においても25% (95%CI: 3-67%) で母子感染が確認されたことから、PVLによってある程度母子感染のリスクを評価することはできるが、超低リスク群であっても完全にBLVの母子感染を防ぐことはできないことが示された。

解析した12頭の牛では、いずれもBLV-G4領域(7,140-7,251 nt)の欠失は認められず、調査した牛群ではウイルス要因であるG4領域を介した伝播能力の違いは無いことが示唆されたことから、今回見られた母子感染の頻度には影響していないことが確認された。G4領域の配列から、茨城県1農場には配列の異なるBLV

が少なくとも3種存在すると考えられるが、母子感染頻度やPVLに影響を及ぼしていなかった（いずれも  $p > 0.05$ ）ことから、塩基の相違による影響は確認されなかった。

母子感染に影響を及ぼした要因として、宿主因子である *BoLA-DRB3* アレルが関連する可能性がある。調査した1農場において、感受性アレルを持つ牛が13/19頭、68%（95%CI: 46-85%）の割合で存在した。感受性型がより高PVLになりやすいとされており[39, 55, 66, 103]、今回の結果も *SS*群、*NS*群、*RS*群のHPVLの母牛ではLPVLよりも母子感染の頻度が高い傾向が見られたが、有意差は認められなかった。一方で、抵抗性型の *NR*群ではPVLの値に関わらずに母子感染が見られなかった。また、感受性アレル（*S*）を有する *SS/NS*、*RS*群では13頭中8頭、62%（95%CI: 35-82%）の頻度で母子感染が認められたが、感受性アレルを持たない *NR*群と比較すると、感受性アレルを持つ群で母子感染頻度が有意に高かった（ $p < 0.05$ ）。このことから、母子感染にはPVLだけでなく、母牛の *BoLA-DRB3* アレルが関係していることが示唆された。一方、子牛の *BoLA-DRB3* アレルで遺伝子型を分類した場合、*SS/NS*および *RS*群と *NN*および *NR/RR*群で両群の母子感染頻度に有意な差は認められなかった（ $p > 0.05$ ）ことから、今回の結果からは子牛の *BoLA-DRB3* アレルの母子感染への影響は認められなかった。BLVについて *BoLA-DRB3* アレルと母子感染の関連を調査した研究は知られていないが、ヒトの分野ではヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)において、ヒトにおけるMHC、ヒト白血球抗原（*HLA*）について、母子の *HLA* class II型の不一致が母子感染のリスクを減少させるという報告がある[56]。今回、母牛と子牛のアレルの一致が1頭のみであったため、詳細な解析は行わなかったが、母牛の *BoLA-DRB3* アレル分類において、抵抗性型で母子感染が見られなかったことや、感受性アレルを持つ群で感受性アレルを持たない群と比較してより高い頻度で母子感染が確認されたことから、農場での母子感染を防ぐ上で、母牛の *BoLA-DRB3* アレルに注目し、繁殖の際には母牛のPVLだけでなく、*BoLA-DRB3* アレルにも留意していくことが必要だと考えられる。水平感染の防除として、*BoLA-DRB3* アレルに基づき、BLV陰性牛と感受性型の牛群との間に緩衝材として抵抗性型の牛群を配置することが提案されている[3]が、それと平行して、抵抗性型の牛を繁殖に供することで、母子感染を防除することが可能だと考えられる。今回の結果から、農



場において、抵抗性型の牛の割合を増やしていくことは、BLV の水平感染および母子感染を防ぐ上で重要となることが示唆された。

また、陽性牛群と隔離して飼養していた子牛 1 頭 (No.7823) について出生 5 ヶ月で陽転が確認された。陽転の理由については、感染から血中のプロウイルス検出までが 1 ヶ月程度だと考えられている [63, 72] ことから、子宮内および産道感染による経路は除外可能だと考えられる。また、初乳を介した感染は、凍結融解処理を行なった初乳を用いることで防除されていたことを考慮すると、母子感染ではなく、出生後、早期に水平感染を起こした可能性がある。さらに、BLV 陽性群との隔離飼育により、接触感染の可能性が除外されると、考えられる経路としては、アブなどの吸血昆虫による機械的伝播がある。陽転した時期が日本では気温や湿度が高く、アブなどの吸血昆虫が活発に活動する 6 月だったことや、陽性牛群と陰性牛群の間が 1 空房しかなかったことから、直接の接触はなかったものの、吸血昆虫は容易にそれを越えられた可能性がある。夏季の吸血昆虫の存在は、BLV 伝播のリスク要因とされており [44]、農場での BLV 感染防御の観点から、吸血昆虫による水平感染を防ぐことも大切だと考えられる。

#### 母牛における分娩前後の BLV 動態

母子感染群と非母子感染群のいずれも、PVL の値は分娩時と分娩前後 1 ヶ月で大きな変動は見られなかった ( $p > 0.05$ )。PVL 値の増加は、鼻汁や唾液への BLV 放出、母子感染頻度の増加などによる水平・垂直伝播リスクの増加 [64, 116] や、病態の進行に関与しているとされる [36, 45, 78, 96] が、今回、分娩前後で PVL が増加しなかったことから、分娩時のストレスは PVL の増加による BLV 伝播および発症リスクに影響しないと考えられる。また、母子感染群の PVL 値およびリンパ球数は非母子感染群よりも有意に高かったことから、PVL およびリンパ球数が高い個体で母子感染が起きていると示唆され、ロジスティック回帰分析でも PVL が増加すると母子感染のリスクが高まることが確認された。既報においても、母牛の PVL 値が母子感染頻度に影響する [64] とされており、今回の結果はそれに一致していた。また、母子感染群および非母子感染群のいずれも、ELISA の S/P 値は分娩後 1 ヶ月で有意に高かったが、これは、牛において、分娩前にイムノグロブリン (Ig) が血液から選択的に乳腺に蓄積する [18, 46, 47] ことに起因している

と可能性があり、分娩時に一時的に減少した Ig が分娩後に回復したといった、生理的な増加と考えられる。今回の結果より、分娩は PVL 増加による BLV 発症リスクに影響しないことが示唆され、分娩によるストレスがトリガーとなって EBL を発症する可能性は低いことが明らかとなった。

#### 子牛の BLV 関連因子動態

BLV 遺伝子陰性子牛の血中抗体の S/P 値は 6 ヶ月で明らかに減衰し、8 ヶ月以降で完全に陰性の判定となった。これは既報[23]と一致しており、移行抗体の生理的な減少によるものだと考えられる。この結果から、ELISA のみを用いての BLV 陽性/陰性の判別は 8 ヶ月齢以降に可能であると示唆された。また、子宮内感染を起こした No.7828 と 5 ヶ月齢で陽性が確認された No.7823 はいずれも早期から、伝播高リスクであるとされる[116], 14,000 コピー/10<sup>5</sup>細胞 (14 コピー/100 細胞) の値を超えてため、若齢での感染は早期に BLV 感染源となることが示唆された。特に乳牛の場合、若齢の雌はその後出産・牛乳生産に供し、長期間農場に存在することが予想されるため、農場内または放牧時に BLV 陰性牛に伝播する機会が多いと考えられる。また、HTLV-1 では ATLL 発症または臨床症状の顕在化に母子感染が影響することが示唆されている[9, 71, 109]ため、子宮内感染を含む、早期の感染は、農場での BLV 感染制御の上で重要な要因となるだろう。

#### 早期感染と陽転群における BLV 関連因子の動態比較

今回の結果では実験感染例における感染後の PVL のピークや減少[22]は見られず、水平感染を起こしたと考えられる陽転群 3 頭および母子感染を含む早期感染群 2 頭で PVL 値は増加し続けた。陽転群は、検出時に PVL が高かった (74 コピー/100 細胞以上) 群 (No.7796, 7803, 7819) と低かった牛 No.7800 (14 コピー/100 細胞以下) の 2 つに大別されたが、牛での BLV 実験感染で接種 250 日後の 5 頭の PVL を比較すると、個体によって 100 細胞あたり 1 コピー未満の低 PVL の牛と 40-100 コピーの高 PVL に分かれたという報告[22]があることから、今回自然感染においても同じような挙動が見られたと考えられる。

さらに、PVL の値と *BoLA-DRB3* 型の相関を調べたが、有意な差は認められな

かった。また、いずれも両群に有意差は認められなかった ( $p > 0.05$ ) が、PVL の増加率は、早期感染群では陽転群と比べて高く、早期感染群、陽転群の中でも感受性アレルを持つ *SS/NS* 群、*RS* 群のほうが *RR/NR* 群よりも高い傾向が見られた。早期感染群と陽転群で PVL の増加率を比較した今回の結果は、感受性アレルを持つ牛で PVL が高く、抵抗性アレルを持つ牛で PVL が低いという報告 [39, 55, 66, 103] と一致する結果は得られなかったが、その要因としてまずサンプルサイズが影響した可能性がある。経時的に追跡可能だった早期感染牛が 2 頭、陽転牛が 4 頭のみであったため、アレルの違いによる PVL の差を検出するために、今後、より多くのサンプルの収集が求められる。もうひとつの要因としては、*BoLA-DRB3* 以外の宿主因子による影響が考えられる。*BoLA* 領域として、*DRB3* 以外に同じ MHC クラス IIa に属する *BoLA-DQA1* の多型が BLV 感受性に関連しているという報告があり [103]、今回解析を行わなかった *BoLA-DQA1* 領域について、PVL や増加率に影響を与えた可能性がある。

高 PVL は前述の通り [64] 水平感染のリスクだけでなく母子感染へのリスク要因にもなり、PVL の値は EBL 発症リスクに関わることが示唆されている [96]。BLV の母子感染について将来の発症との関連は知られていないが、HTLV-1 の母子感染が確認された 3 ケースのうち、症状を示さなかった 2 ケースが一定の PVL を示した一方で、リンパ節腫脹や脂漏性皮膚炎などの症状を示した 1 ケースで急激な PVL 上昇が見られたという報告がある [109]。BLV 感染制御の観点から、感染時期や感染経路、宿主因子と PVL の動態の関連について、より詳細な解析を行い、明らかにしていく必要があると考えられる。

以上より、母子感染や早期感染の例では水平感染と比べ、早期から持続的な感染源となり、PVL の増加を介して発症にも関与する可能性があることが考えられた。母子感染を含め、早期の感染には十分に注意を払うべきであると考えられる。また、母子感染の頻度は PVL やリンパ球数に関連しており、*BoLA-DRB3* アレルとの関与も示唆された。従来から知られていた PVL やリンパ球数の値を測定することによるリスク分類に加えて、*BoLA-DRB3* アレルに注目することが水平感染だけでなく母子感染を防除する意味でも重要になることが示唆された。今回の結果は農場での BLV 感染制御に寄与することが期待される。

## 1-5. 要旨

牛伝染性リンパ腫は BLV を主な原因とする代表的な牛レトロウイルスによる疾病で、日本では近年全国の乳牛における平均陽性率が 40%以上にのぼっている。日本での摘発淘汰による撲滅は困難であると考えられ、伝播の頻度や発症に関与するとされる PVL に基づいた隔離・淘汰順位付けによる対策が提案されている。近年、若齢での発症の報告もされており、母子感染を含む早期感染による影響に注目が集まっている。BLV の水平伝播にはウイルス側の要因として、ウイルス複製に関与する G4 遺伝子の変異、宿主側の因子として *BoLA* と呼称されるウシ主要組織適合性遺伝子複合体 (MHC) の影響が論じられている。特にクラス IIa 領域に存在する *BoLA-DRB3* 多型が、プロウイルス量 (PVL) の増加に関与するとされ、アレルの型によって、感受性 (S)、抵抗性 (R)、中性 (N) と分類されている。しかし、母子感染について、ウイルス要因や宿主因子が影響するか、母子感染や早期感染後の動態についての解析は現在のところ行われていない。母子感染子牛・早期感染子牛は BLV 感染後、長期間飼養されることが考えられるため、BLV の母子感染や早期感染の特性を知ることは、牛伝染性リンパ腫の制御の上で重要だと考えられる。本章では母子感染を介して自然に感染した牛における BLV 関連因子の動態を知る目的で茨城県の農場で飼育された 41 頭の牛について、BLV の PVL、抗 BLVgp51 抗体およびリンパ球数の経時的解析をした。感受性アレル (S) を持つ群で抵抗性アレル (R) を持つ群より有意に母子感染頻度が高かったことや、抵抗性型の母牛では PVL にかかわらず母子感染が見られなかったことから、*BoLA-DRB3* アレルは、水平感染だけでなく母子感染にも重要であることが示唆された。1 歳齢以上で BLV に水平感染した陽転群とそれ未満で感染した早期感染群で BLV の動態を調査し、PVL 値を比較したところ、有意差は見られなかったものの、早期感染群でより増加率が高く、感受性型、中間型で抵抗性型の牛より PVL 増加率が高い傾向だったことから、早期感染牛が BLV 感染源となる可能性が考えられた。本研究は BLV 母子感染において *BoLA-DRB3* の関与を示した最初の研究として、農場での BLV 感染制御への貢献が期待される。

## 1-6. 表および図

表1-1 *BoLA-DRB3*解析に用いたプライマーリストおよびサイクル条件

プライマー名	配列 (5'→3')	サイクル条件
ERB3N	GGAATTCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC	94°C、2分 98°C、10秒 65°C、30秒 68°C、15秒 反復35サイクル
HL031	TTTAAATTCGCGCTCACCTCGCCGCT	
	} 1st PCR	
ALL	TGTA AACGACGGCCAGTATTCCTCTCTCTGCAGCACATTCCTG	94°C、2分 98°C、10秒 65°C、30秒 68°C、15秒 反復30サイクル
DRB3B	CAGGAAACAGCTATGACCCGCCGCTGCACAGTGAAACTC	
	} 2nd PCR	

ERB3N: 1<sup>st</sup>PCR フォワードプライマー

HL031: 1<sup>st</sup>PCR リバースプライマー

ALL: 2<sup>nd</sup>PCR フォワードプライマー

DRB3B: 2<sup>nd</sup>PCR リバースプライマー

表1-2 母牛のBLVのプロウイルス量に基づくステータス分類と母子感染頻度

カテゴリー	頭数	母子感染頭数	頻度 (%)	95%信頼区間 [CI] (%)
超ハイリスク <sup>1)</sup>	8	5	63	30-86
ハイリスク <sup>2)</sup>	5	2	40	12-78
低リスク <sup>3)</sup>	5	1	20	2-60
超低リスク <sup>4)</sup>	4	1	25	3-67
合計	22	9	41	23-62

- 1) 全血中BLVプロウイルス量 > 400 コピー/ 10ng
- 2) 全血中BLVプロウイルス量 100-400 コピー/ 10ng
- 3) 全血中BLVプロウイルス量 20コピー以上100 コピー未満/ 10ng
- 4) 全血中 BLVプロウイルス量 < 20 コピー/ 10ng

表1-3 母牛の*BoLA-DRB3*アレル分類と母子感染頻度

<i>BoLA-DRB3</i> 遺伝子型 <sup>1)</sup>	BLV PVLステータス	母子感染頭数/ 母牛頭数	母子感染頻度 (%)	95%信頼区間 [CI] (%)
SS, NS	HPVL <sup>2)</sup>	2/3	67	20-94
	LPVL <sup>3)</sup>	1/2	50	9-91
RS	HPVL	4/6	67	30-91
	LPVL	1/2	50	9-91
NR	HPVL	0/2	0	0-84
	LPVL	0/4	0	0-60

1) 感受性アレルを*S*、抵抗性アレルを*R*、中性アレルを*N*とした分類

2) HPVL (High proviral load) : 全血中のプロウイルス量 100コピー/ 10 ng以上

3) LPVL (Low proviral load) : 全血中のプロウイルス量 100コピー/ 10 ng未満



表1-4 子牛の*BoLA-DRB3*アレル分類と母子感染頻度

<i>BoLA-DRB3</i> 遺伝子型 <sup>1)</sup>	母子感染頭数/ 子牛頭数	頻度 (%)	95%信頼区間[CI] (%)
<i>SS/NS</i>	5/8	63	30-86
<i>RS</i>	2/2	100	37-100
<i>NN</i>	1/2	50	9-91
<i>NR/RR</i>	1/3	33	6-80
合計	9/15	60	36-80

1) 感受性アレルを*S*、抵抗性アレルを*R*、中性アレルを*N*とした分類

BLVpvAN013 (AP018030.1)	C	T	T	C	C	G	T	T	T	C	C	A	C	A	A	C	G	G	C	T	T	C	C	T	C	T	G	C	A	T	C	T	T	C	T	A	T	T	T	C	C	A
7761	C	T	T	C	C	G	T	T	T	C	C	A	C	A	A	C	G	G	C	T	T	C	C	T	C	T	G	C	A	T	C	T	T	C	T	A	T	T	T	C	C	A
5266	C	T	T	C	C	G	T	T	T	C	C	A	C	A	A	C	G	G	C	T	T	C	C	T	C	T	G	C	T	T	C	T	T	C	T	A	T	T	T	C	C	A
7764	C	T	T	C	C	G	T	T	T	C	C	A	C	A	A	C	G	G	C	T	T	C	C	T	C	T	G	C	A	T	C	T	T	C	T	A	T	T	T	C	C	A
7767	C	T	T	C	C	G	T	T	T	C	C	A	C	A	A	C	G	G	C	T	T	C	C	T	C	T	G	C	A	T	C	T	T	C	T	A	T	T	T	C	C	A
7770	C	T	T	C	C	G	T	T	T	C	C	A	C	A	A	C	G	G	C	T	T	C	C	T	C	T	G	C	T	T	C	T	T	C	T	A	T	T	T	C	C	A
7777	C	T	T	C	C	G	T	T	T	C	C	A	C	A	A	C	G	G	C	T	T	C	C	T	C	T	G	C	T	T	C	T	T	C	T	A	T	T	T	C	C	A
7782	C	T	T	C	C	G	T	T	T	C	C	A	C	A	A	C	G	G	C	T	T	C	C	T	C	T	G	C	A	T	C	T	T	C	T	A	T	T	T	C	C	A
7784	C	T	T	C	C	G	T	T	T	C	C	A	C	A	A	C	G	G	C	T	T	C	C	T	C	T	G	C	A	T	C	T	T	C	T	A	T	T	T	C	C	A
7788	C	T	T	C	C	G	T	T	T	C	C	A	C	A	A	C	G	G	C	T	T	C	C	T	C	T	G	C	A	T	C	T	T	C	T	A	T	T	T	C	C	A
7796	C	T	T	C	C	G	T	T	T	C	C	A	C	A	A	C	G	G	C	T	T	C	C	T	C	T	G	C	A	T	C	T	T	C	T	A	T	T	T	C	C	A
7805	C	T	T	C	C	G	T	T	T	C	C	A	C	A	A	C	G	G	C	T	T	C	C	T	C	T	G	C	A	T	C	T	T	C	T	A	T	T	T	C	C	A
7828	C	T	T	C	C	G	T	T	T	C	C	A	C	A	A	C	G	G	C	T	T	C	C	T	C	T	G	C	A	T	C	T	T	C	T	A	T	T	T	C	C	A

図 1-1 G4 領域塩基解析

定量リアルタイム PCR で BLV 陽性が確認された 12 頭について BLV-G4 領域 (7,125nt-7,166nt) 塩基配列を既報の配列 (GenBank 登録番号: AP018030.1) と比較した。解析した 12 頭の牛では、BLV-G4 領域の欠失は認められなかった。G4 領域の配列は、7,145 番目の塩基が T、7,153 番目の塩基が A の個体、7,145 番目の塩基が G、7,153 番目の塩基が A の個体、7,145 番目の塩基が G、7,153 番目の塩基が T の個体の 3 パターンが存在した。

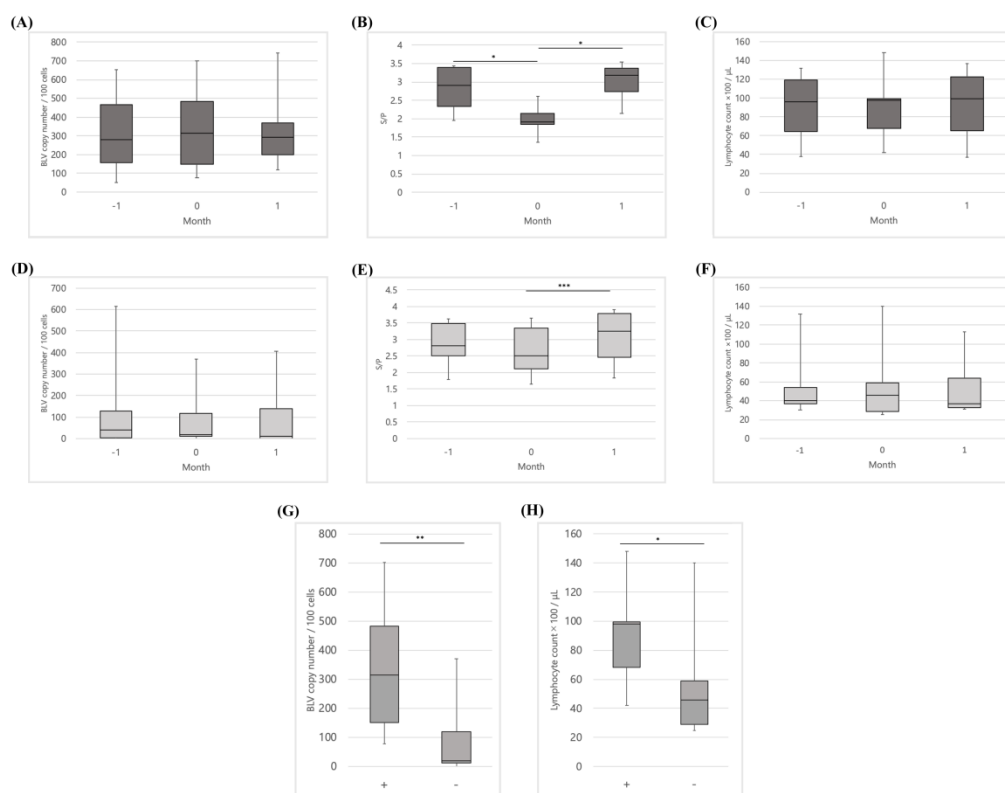


図 1-2 母牛の分娩後の BLV 関連因子動態

(A) - (F) 母子感染群 (n=9) の PVL (A), S/P 値 (B), 母リンパ球数 (C) と非母子感染群 (n=13) の PVL (D), S/P 値 (E), 非母子感染群リンパ球数 (F)。それぞれ分娩時 (day0) と分娩前 (-1) および後 (+1) の前後 1 ヶ月の比較を表す。(G) - (H) 分娩時の母子感染群 (+) と非母子感染群 (-) の PVL (G) およびリンパ球数 (H)。母子感染群および非母子感染群ともに分娩前後で PVL およびリンパ球数に大きな変動はなかった ( $p > 0.05$ )。S/P 値は母子感染牛群で分娩時と比較して分娩前後 1 ヶ月で有意に高く, 非母子感染牛群で分娩後 1 ヶ月に有意に高かった ( $p < 0.01$ )。分娩時の母子感染群 (+) と非母子感染群 (-) の PVL およびリンパ球数を比較したところ, 母子感染群と非母子感染群で PVL ( $p < 0.01$ ) およびリンパ球数 ( $p < 0.05$ ) に有意な差が見られた。

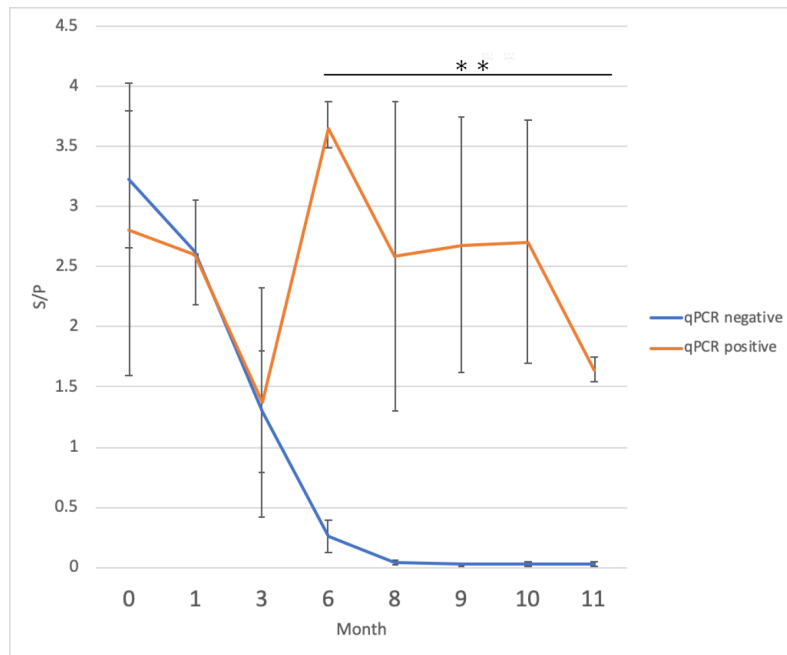


図 1-3 BLV 遺伝子陽性子牛と陰性子牛の抗体価（S/P 値）推移  
 生まれた子牛で追跡調査ができた 8 頭のうち，出生時に BLV 遺伝子が検出され，子宮内感染と考えられる 1 頭と，5 ヶ月齢で BLV 遺伝子が検出され，早期感染した 1 頭を qPCR-positive，観察した 11 ヶ月の期間中，BLV 遺伝子の検出が確認されず，陰性のまま 6 頭を qPCR-positive として分類した。4 頭については初乳摂取前と初乳摂取後の血清を用いて，初乳摂取前に ELISA で陰性判定（S/P < 0.3）だったが，初乳摂取後に抗体が上昇した（S/P > 1.4）ことを確認した。血中の抗体 S/P 値は 6 ヶ月以降で陽性群と陰性群に有意な差（ $p < 0.01$ ）が見られた。また，8 ヶ月以降で陰性群は完全に ELISA キットのプロトコル上で陰性の判定となった。

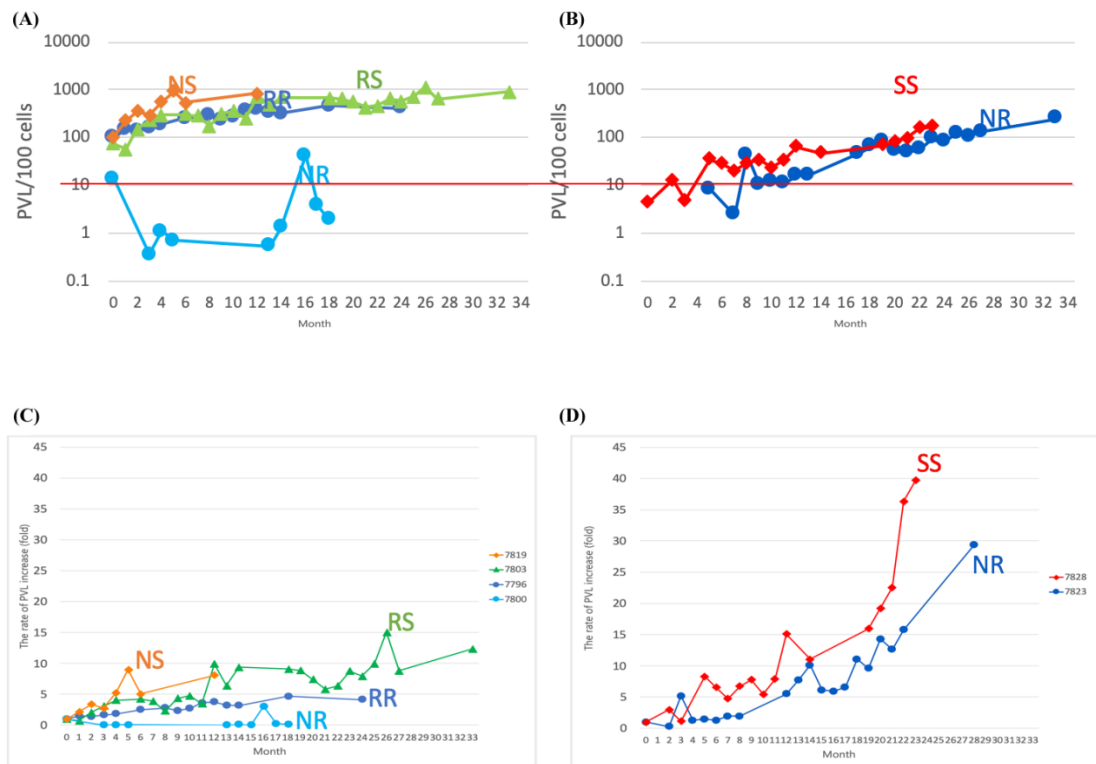


図 1-4 BLV 早期感染群と陽転群における PVL 推移

1歳6ヶ月齢以降でBLVに水平感染した(陽転)牛4頭(No.7796, 7803, 7800, 7819)のPVL (A) およびPVL増加率 (C) と1歳齢未満でBLVに感染(早期感染)した牛2頭(No.7828, 7823)のPVL (B) およびPVL増加率 (D)を表す。水平伝播高リスクの14コピー/100細胞を赤線で示した。陽転群は、検出時にPVLが高かった(74コピー/100細胞以上)群(No.7796, 7803, 7819)と低かった牛No.7800(14コピー/100細胞以下)の2つに大別された。高PVL群はその後高いPVL量を維持し続け、低PVL牛は低いPVL量を維持し続けた。早期感染群と陽転群についてPVLの値と*BoLA-DRB3*型の相関を調べたが、有意な差は認められなかった( $p > 0.05$ )。また、いずれも両群に有意差は認められなかった( $p > 0.05$ )が、PVLの増加率は、早期感染群では陽転群と比べて高く、早期感染群、陽転群の中でも感受性アレルを持つSS/NS群、RS群のほうがRR/NR群よりも高い傾向が見られた。

## 第 2 章

# 日本における牛フォーミーウイルスの ゲノム解析および牛伝染性リンパ腫との 相関

## 2-1. 序文

FV は BLV と同じレトロウイルス科に属しているが、その亜科はスプーマレトロウイルス亜科であり、ウイルスゲノムは約 12 kb の長さがある。FV は、1955 年にアカゲザルの腎臓細胞を使用して最初に分離および同定され[90]、哺乳類 [38, 57, 87, 105, 114]、両生類[4]、魚類[4, 26, 27, 89]を含む多くの脊椎動物で確認されている。FV は、多様な初代細胞と株化細胞に感染し、多核巨細胞を形成するが、その培養細胞を顕微鏡で観察することで泡末状の CPE を確認することができるため、FV の名の由来となった[91]。FV ゲノムは、3 つの構造遺伝子、*gag*, *pol*, *env*, および 2 つの非構造遺伝子 *bel-1* と *bel-2* をエンコードしており、*bel-1* 産物である Tas タンパク質はトランス活性化因子の役割があるが、*bel-2* 産物と *bel-1* 産物の一部の複合体である Bet タンパク質の機能は未だ明らかとなっていない部分も多いが、FFV の複製には必須となっている可能性がある[6, 92]。

BFV は西欧諸国と中国で報告されており[11, 28, 34, 35, 86]、広範囲に広がっていることが示唆されている。日本では 2018 年に神奈川県で臨床的に健康だが、BFV に感染した牛の末梢血リンパ球をウシ胎仔筋肉 (BFM) 細胞と共培養し、BFV No.43 株が分離された[25]。その報告によると、日本の BFV 感染率は神奈川県で 8.8% (57 頭中 5 頭) であり、LTR, *env* および *bel-1-bel-2* 配列の一部が報告された。最近の研究では、日本の関東地方 (神奈川県, 茨城県) の牛で BFV が検出され、平均の BFV 感染率は 16.7% (545 頭中 91 頭) だった[33]。しかし、No.43 株の全長ゲノム配列の解析は行われず、BFV 感染率に関する情報は関東地方のみに限定されているため、日本の BFV の疫学とゲノムの特徴は明らかにされていない。

FV は単独では非病原性だと考えられている[91]が、FV の病原性の可能性を示す報告がされている。PFV は、トランス活性化機能のある Tas タンパク質を介して LTR を活性化することによって同じレトロウイルスである、HIV-1 の転写を活性化したという報告がある[42]。また、FFV と FeLV 感染の相関関係が報告されており、特に進行性の FeLV に感染した猫は FFV に感染しやすいとされる [13, 84]。また、FFV/FeLV に同時感染した猫の定量 PCR によって測定された FFV ウイルス量は、FFV 単一感染猫よりも高かった[13]。さらに、実験的に感染した猫は

臨床的には正常に見えたが、腎臓では糸球体とボーマン嚢の癒着、腎細管の好酸球性のシンシチウム形成、肺では、リンパ球およびマクロファージの間質性浸潤、気道および主気管支への好酸球浸潤などの組織病理学的変化が観察された[19]。このように、FVの病原性についてはまだ不明な点も多い。BLVのTaxタンパク質は以前の研究で同じレトロウイルスであるHTLV-1転写を活性化することが示唆され[100]、BLV感染がBFV感染を変化させる可能性も考えられる。また、日本において、BLV血清陽性率は乳牛で約40%に達し[70]、農場におけるBLVの感染制御は日本で最大の関心事となっている。しかし、BFVとBLVの関係に焦点を当てた報告は少なく、その影響については未だ不明である。そこで第2章では、BFVの検出、分離、およびゲノム解析を実施し、日本におけるBFVの疫学とゲノムの特徴を明らかにするとともに、レトロウイルスであるFVが他のレトロウイルスとの疾患発現に影響を与える可能性を考慮して、BFV感染とBLVとの関係を調査した。



## 2-2. 材料と方法

### 動物

使用した全血サンプルは、2017年6月から2019年4月までの期間で、茨城県、鹿児島県、北海道、宮城県のそれぞれ1農場で飼育されている計181頭の10歳齢までのホルスタイン牛またはF1(交雑種)牛から採材した(表2-1)。全血はEDTAを含む採血管を用いて頸静脈または尾静脈採血を行った。全血に加えて、茨城県で飼育されている牛からは血清も採材した。全血および血清の採材は東京大学動物実験実施規則に基づき動物実験専門委員会の承認を受け(承認番号: P18-081)、東京大学動物実験実施マニュアルに従って行われた。

### BFV サーベイランス

茨城県、鹿児島県、北海道県、宮城県におけるBFVの感染率は、PCRによって決定した。ゲノムDNAは、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を使用して、マニュアル通り181頭の牛の血液サンプル(表2-1)から直接抽出された。BFV参照配列(GenBank登録番号: U94514)を基に、*pol*から*bel-1*領域までの6,781 bpを増幅するプライマー(8F, 8R)を設計してPCRを行った。プライマーの配列は表2-2に記載した。PCRは、KOD Fx Neo(TOYOBO)を使用し、PCR条件は、94°C 2分の熱変性の後、98°C 10秒、68°C 3.5分のサイクルを45回反復した。PCR産物を1%アガロースゲルで電気泳動し、6,781 bpのバンドの存在を確認した。

### BFV の分離

BFV感染を調べるために、茨城県の農場で採材した34頭の牛血清サンプルを用いて、以前報告された方法[25]に従ってゲル内沈降反応(AGID: Agarose gel immunodiffusion)を行った。AGIDに用いた陽性血清およびBFV抗原は、日本大学の泉對教授から分与されたものを用いた。AGID試験で明瞭な沈降線を示した茨城県の牛から3株(No.5266, 5270, 7800)を分離し、分離したウイルスの全ゲノム配列を決定した。BFV分離のために、AGID陽性を示した3頭からEDTA管を用いて採血し4°Cで保存、採血から24時間以内にLymphopep (Cosmo Bio, Tokyo, Japan)を用いて末梢血単核細胞(PBMC: Peripheral blood mononuclear

cell)を分離した。分離した PBMC を 6 ウェルプレートで 10% ウシ胎児血清(FBS: Fetal bovine serum) を加えたダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma-Aldrich Co., MO, USA) を用いて, HFV (Human foamy virus) で明瞭な細胞変性効果 (CPE: Cytopathic effect) を発現させるハムスター腎由来 (BHK21: Baby hamster kidney) 細胞と 37 °C で共培養した。48 時間後, 細胞を DMEM で洗浄し, 新鮮な無血清培地を加えた。2 日後, 細胞をトリプシン処理により剥離し, 新しいプレートに継代した。CPE が観察されるまで, 2 日または 3 日の間隔で盲継代を行った。陰性対照として, BHK21 細胞のみ, および BFV 陰性牛の PBMC と同様に共培養した BHK21 細胞を観察した。AGID 陽性の 3 サンプルに加えて, 泉對教授から提供された No.43 株を, BHK21 細胞と 5 代共培養し, BHK21 細胞に馴化させた。CPE が出現したウェルは, メタノールで固定した後, ギムザ染色して, 多核巨細胞を観察した。

#### ゲノム配列の分析

茨城県 1 農場の牛由来の BFV 感染 PBMC と 12 代共培養した BHK21 細胞, No.43 株を BHK21 細胞と 5 代共培養した BHK21 細胞から DNA を抽出した。DNA 抽出に際して, 細胞を PBS で 2 回洗浄した後, トリプシン-EDTA で剥離し PBS で懸濁した。懸濁液は, QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を使用して, 製造元の指示に従って DNA 抽出を行った。各遺伝子の検出には, 図 2-1 に記載されている 3 対のプライマーを使用した。すべてのプライマーは, BFV 参照配列 (GenBank 登録番号: U94514) を基に設計した。*gag* 領域から *pol* 領域にかけての 1,869 bp を増幅するために *gagpolF*, *gagpolR* プライマーを使用した。*pol*, *env*, および *bel-1* の一部領域までの 6,781 bp は, 8F, 8R プライマーを使用して増幅した。残りの 3,665 bp は, レトロウイルスがプロウイルスの形をとる前の中間体において環状 DNA の形態をとることを利用して 3'LTR に設計したプライマー (*ipcrF*) をフォワードプライマー, *gag* 領域に設計したプライマー (*ipcrR*) をリバースプライマーとしてインバース PCR 法を行った。*gagpolF/R* プライマーを使用した PCR の条件は, 94 °C 2 分の後, 98 °C 10 秒, 56 °C 30 秒, 68 °C で 1 分のサイクルを 45 回反復した。*bel-1* から *gag* 領域を増幅するための PCR サイクルは, 94 °C 2 分の後, 98 °C 10 秒, 68 °C 4.5 分を 45 サイクル反復した。8F/R プラ

イマーの PCR 条件は, BFV サーベイランスの項と同じプロトコルで行った。PCR 産物を 1% アガロースゲルで電気泳動し, NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL) を使用して精製した。茨城株の *pol* から *bel-1* 以外の領域と No.43 株の全配列をダイレクトシーケンスした。*pol* から *bel-1* (*env*) 領域に関して, 茨城株, BH47 (北海道) 株, および K7 (鹿児島) 株の精製 PCR 産物を, TOPO XL PCR クローニングキット (Thermo Fisher Scientific) または Zero Blunt TOPO PCR クローニングキット (Thermo Fisher Scientific) を使用してクローニングした。茨城株の *env* 領域のダイレクトシーケンスおよびクローンの配列の同一性が確認された。茨城株および No.43 株の *gag* から *pol* の領域および *bel-1* から *gag* 領域に対応する他の精製 PCR 産物は, TOPO XL PCR クローニングキット (Thermo Fisher Scientific) または Zero Blunt TOPO PCR クローニングキット (Thermo Fisher Scientific) を使用してクローニングした。配列は BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) および Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) を使用して解析し, 得られた配列は, 茨城株 (LC510606), No.43 株 (LC510607), K7 株 (LC510608), BH47 株 (LC510609) の登録番号で GenBank に登録した。

#### 系統樹解析

MEGA software version 7.0 の ClustalW を使用して, マルチプルアライメントと系統樹解析を行った [48]。各遺伝子またはゲノムの塩基配列に基づく系統樹は, *gag*, *pol*, *env* および全ゲノムについては長谷川-岸野-矢野モデル, *bel-1*, *bel-2* は木村の 2 パラメーターモデルに基づく最尤法で作成し, ブートストラップ法で 1000 回反復した。系統樹には GenBank に登録された参照株の BFVbta\_BSV11 (アメリカ, U94514) と, BFVbta\_100 (ポーランド, JX307861), BFVbta\_Riems (ドイツ, JX307862), および BFV3026 (中国, AY134750) の 4 株を含めた。

#### BLV の定量

定量リアルタイム PCR による BLV の定量は, 第 1 章で用いた小熊らの方法 [77] に従って行った。当量の分子比で BLV の *pol* とベータアクチン (ACTB) の両方を含むスタンダードプラスミドサンプルは, EASY Dilution (Takara Bio) を

使用して 10 倍段階希釈した。BLV プロウイルス量を定量化するために、Applied Biosystems Step One Plus (Thermo Fisher Scientific) および Thunderbird Probe qPCR Mix (TOYOBO) を使用した Taqman probe 法を行った。

BFV 定性 PCR と BLV 定量リアルタイム PCR で得たデータの統計学的解析

合計 153 頭分のサンプルから得たデータを統計学的解析した。BFV 感染と BLV 感染との関連を調査するためにピアソンのカイ二乗検定を行った。BFV 感染と BLV *pol* コピー数、BFV 感染または BLV 感染と年齢の相関はマンホイットニー *U* 検定を使用した。

## 2-3. 結果

### BFV の感染率

日本における BFV 感染率を表 2-1 に示した。各地点の感染率は茨城県で 11.8% (95%CI: 4.07-27.2%) , 鹿児島県で 13.8% (95%CI: 4.88-31.2%) , 北海道で 15.3% (95%CI: 9.39-23.8%) , 宮城県で 0.00% (95%CI: 0.00-16.8%) であり, 合計で 181 頭中 23 頭, 12.7% (95%CI: 8.56-18.4%) の牛が BFV に感染していた。

### BFV の分離

BHK21 細胞を BFV 感染 PBMC と共培養し, 12 代まで継代した。12 代目までに, 3 つの AGID 陽性牛サンプル (No.5266, 5270, 7800) から分離した PBMC と共培養した BHK21 細胞は, 多核巨細胞を示した。CPE は, BFV 陰性牛由来の PBMC と共培養した陰性対照ウェルでは観察されなかった (図 2-2)。

### 相同性比較と系統樹解析

PCR の結果は, 図 2-2 に示した増幅サイズを示す PCR 産物の電気泳動によって確認した。各分離株の全長配列の相同性は, NationalCenter for Biotechnology Information (NCBI) の BLASTN および MEGA software version 7.0 を使用して算出した[48]。茨城県牛由来分離株 (No.5266, 5270, 7800) は, BFV の参照配列 (GenBank 登録番号: U94514) と最も相同性が高く, 99.6% (11,949/12,001 nt) だった。同様に No.43 株 (LC510607) を参照配列と比較した場合の相同性は 99.5% (11,945/12,001 nt) だった。茨城県牛由来分離株 (No.5266, 5270, 7800) の中で, LTR (5'LTR で 1,099 nt, 3'LTR で 11,792 nt に相当する領域) または *gag* (1,699 nt) にある 3 つの塩基置換が見られたが, アミノ酸配列には影響を与えなかった。系統樹は, アメリカ株と中国株を含むクラスターとヨーロッパ株のクラスターの 2 つに大別された (図 2-3)。本研究で同定された分離株は, ウイルス構造遺伝子, *gag*, *pol*, および *env* が BFV 参照株, 非構造遺伝子は BFV3026 株と最も近縁だった。

### env領域の系統樹解析

日本の株は、牛 No.5266 に由来する「茨城株」、鹿児島で検出された「K7 株」、北海道で検出された「BH47 株」として図 2-3 に示した。全長 env シーケンスの系統解析では、茨城株, No.43 株, K7 株, 参照株 (U94514), および BFV3026 株 (AY134750) が同じクラスターに分類され, BH47 株がヨーロッパの分離株である BFVbta\_100 (ポーランド, JX307861), BFVbta\_Riems (ドイツ, JX307862) と同じクラスターに分類された。

### BFV と BLV の関係

検査をした 153 頭の牛のうち, 51 頭が BLV 陽性で, 感染率は 33.3% (95%CI: 26.3-41.1%) であることが判明した。BLV コピー数の範囲は, 100 細胞あたり 2,000-1,188 コピーだった。BFV と BLV の感染状態を表 2-3 にまとめた。ピアソンのカイ二乗検定では, 2 つのウイルス感染の間に相関関係はなかった ( $p > 0.05$ )。BFV 感染に関係なく, BLV コピー数に差はなかった ( $p = 0.597 > 0.05$ )。BFV と BLV の感染率に関しては, 年齢に有意差があり, 非感染牛は感染牛よりも若齢だった (図 2-5)。

## 2-4. 考察

### BFV の感染率

BFV 感染は地理的に離れた 3 地点で確認され、平均の感染率は 12.7% (95%CI: 8.56-18.4%) だった。今回、中部地方、近畿地方、中国・四国地方など、網羅することが出来なかったことから、日本の BFV の詳細な分布状況を知るためにはより広い範囲で調査を行なっていく必要があると考えられる。以前の報告では、BFV の血清陽性率は神奈川県で 8.8% [25]、関東地方で 16.7% であり、BFV 感染の割合は農場間で差があった [33]。日本における BFV の感染率は、ポーランド (41.5%) [88] およびカナダ (39.6%) [34] よりも有意に低かった (いずれも  $p < 0.05$ ) が、これは新生子牛に対する処置の違いによるものである可能性がある。調査したポーランドの農場では、母牛と子牛を隔離飼育することなく、母牛の初乳を子牛にそのまま給与していたとされ、母牛と子牛の接触による感染や、母乳を介した感染が起こった可能性が考えられる。また、BFV の主要な感染経路として経乳感染が考えられている [7, 34, 88] が、茨城県の農場では、あらかじめ凍結融解処理をした初乳を子牛に与えていた。BFV 感染は、BLV と同様に、細胞と密接に関連している [8] ことから、BLV の場合 [40] と同様に、初乳の凍結・融解は、初乳中に含まれる BFV 感染細胞の破壊により、初乳を介した BFV 感染のリスクを減らした可能性がある。さらに、北海道、茨城県の農場では、出生直後に新生子牛の母親からの分離を行っていたことから、母牛からの水平感染が防がれた可能性がある。今回、日本においても BFV 侵入・浸潤が確認されたことから、農場での畜産衛生を考える上で、分娩後の母牛と子牛の迅速な隔離や凍結融解処理をした初乳の供与など、母牛から子牛への感染を防ぐことは重要であると考えられる。

### 系統樹解析

一部および全長のシーケンスに基づく系統樹解析によって、明確な 2 つの BFV クラスターの存在が示された。この研究で同定された分離株は BFV 参照株に最も近く、茨城県の分離株 (No.5266, 5270, および 7800) は、*pol*, *env* および全長で比較した場合、アメリカ株に最も近縁だった。最近の分類法と命名法に関するレビューによると、*pol* および *env* 遺伝子の配列を FV 分類に使用することが

提案されたが[43], 今回の結果も, 全長, *pol* および *env* の系統樹が互いに類似しており, BFV *pol* および *env* 塩基配列に基づく解析は, BFV 全長の間係を反映していると考えられる。このことから, 今後, *pol* または *env* の塩基配列を基に BFV の系統分類を行うことが可能だと考えられる。

今回 *env* 遺伝子配列を使用し国内株について行なった系統樹解析では, 鹿児島 (K7) 株と No.43 株がアメリカと中国株を含むクラスターに分類され, 北海道 (BH47) 株がヨーロッパ株を含む別のクラスターに分類された。これらの結果は, BFV の日本への侵入にはいくつかの経路があることを示唆している。BFV は単独で臨床症状を示さないとされているため, 牛の輸入の際に海外から持ち込まれる可能性もあると考えられる。BFV が日本でどのように侵入・浸潤したかを評価するには, さらなる研究が必要だと考えられる。

茨城県で同定された BFV 分離株 3 株は, *gag* および LTR 領域に 3 つの塩基の相違を示したが, アミノ酸配列は同一だったことから, 農場単位の BFV 塩基配列が高度に保存されている可能性が高い。また, 本研究では, *gag* 領域 (96.0%) は *env* 領域 (94.6%) の相同性よりも高かったことから, 他のレトロウイルスと同様に, BFV の *env* 領域が *gag* 領域よりも変異しやすいことを示唆している。HTLV や BLV は変異頻度が極端に低いとされている [58] が, これらの結果から, BFV についてもその性質が当てはまる可能性がある。また, 各タンパク質のアミノ酸レベルの相同性に関して, Gag はウイルスタンパク質の中で最も保存されており (98.2%), Tas (94.8%) は最も少なかった。Gag はレトロウイルスで最も保存されているタンパク質であると報告されており [61, 88], それに一致していた。また, すべての FV は Tas-Bel2 融合タンパク質を産生するが [53], この研究では Tas の保存性が低いことがわかった。これらの置換がウイルス複製, 感染性および病原性に影響を与えるかどうかを調べるには, さらなる研究が必要だと考えられる。

#### BFV および BLV と年齢の関係

この研究では, 日本での以前の報告 [33] と同様, BFV に感染した牛の数は BLV に感染した牛よりも少なかった。BFV と BLV の感染の間に相関関係が見られなかったことから, BFV と BLV の感染経路が独立している可能性が考えられるが,



BFV 感染牛が 22 頭、BFV および BLV 感染牛が 6 頭のみであったため、より正確に相関を分析するためには、今後サンプルを増やして解析する必要がある。また、BFV 感染と BLV コピー数の間に相関は見られなかった ( $p = 0.597 > 0.05$ ) が、牛の年齢と BFV または BLV 感染との間に有意差が見られた。BFV または BLV 感染牛は非感染牛よりも高齢であり、両方のウイルスが水平感染で伝播していることを示唆している。以前の報告では、母牛から子牛への経乳感染や接触感染が BFV 感染の主な原因であるとされており [7, 34, 88]、BFV 感染は若齢牛で起こる [7]か、年齢に依存しない [88]と考えられていたが、今回の結果は、日本の BFV 感染が母牛からの感染より、水平感染によって牛群間に感染していることを示唆している。これは、出生直後の新生子牛の母親からの分離や初乳の凍結融解を行うことで、母牛からの感染が防がれていたことによる可能性がある。水平感染の経路としては、既報で、BFV が感染牛の唾液から検出されている [60]ことや、BFV 血清陽性牛に由来する唾液から BFV 陰性牛への咽頭への接種で陽転が確認された [37]ことから、唾液を介した感染が考えられる。

以上より、BFV は日本では地理的に離れた地点で検出され、各地域にはさまざまなゲノム特性があることが明らかとなり、日本において BFV は様々な経路で侵入・浸潤していることが示唆された。また、BFV と BLV 感染の間に明確な相関関係は示されなかったが、感染牛は非感染牛よりも高齢であり、両方のウイルスの伝播について、水平感染が重要な経路であることが考えられる。BFV の単独での病原性は未だ不明だが、宿主細胞に組み込まれ、生涯持続感染する性質上、畜産衛生を考えるうえで BFV 感染の感染状況を把握し、宿主への影響や性質を究明する必要がある。本研究は、日本における BFV ゲノム全長を明らかにした最初の研究であり、BFV ゲノム情報の蓄積と日本における BFV の特徴の解明に寄与することが期待される。

## 2-5. 要旨

BFV は広く世界の牛に分布しているウイルスで、BLV と同じレトロウイルス科に分類されている。生物学的な機能はよく知られていないが、他の微生物と共感染することによる病原性が示唆されている。日本では BFV が分離され、その存在が証明されたが、ゲノム情報や疫学についての情報は少ない。本章では、日本における BFV 疫学およびその塩基配列の特徴を調査し、BLV 感染状況との相関を解析した。茨城県、鹿児島県、北海道、宮城県の 4 農場で全血サンプルを採材し、*env* 領域の PCR で感染率を調査した。また、BFV 感染牛の末梢血単核細胞をハムスター腎由来 (BHK21) 細胞と共培養することで BFV を分離し、全長ゲノムの塩基配列を決定した。その結果、BFV は日本の地理的に離れた 3 地域の農場で検出され、個体レベルでの BFV 感染率は平均 12.7% だった。今回分離された茨城株および神奈川県由来の No.43 株の塩基配列を参照株と比較した場合の相同性は 99.6% だった。*env* 領域についての系統樹解析の結果、茨城株、No.43 株、鹿児島株はアメリカ株と中国株と同じクラスターに分類されたが、北海道株はヨーロッパ株を含む別のクラスターに分類された。これらの結果から、BFV の日本への侵入にはいくつかの経路があることが示唆された。BFV は単独で臨床症状を示さないとされているため、牛の輸入の際に海外から持ち込まれる可能性がある。BFV が日本でどのように侵入・浸潤したかを評価するには、さらなる研究が必要だと考えられる。また、BLV 感染および BFV の PVL と BFV 感染の相関は見られなかったが、どちらのウイルスも年齢の増加とともに感染率が上がっていたことから、日本の BFV 感染が母牛からの感染よりも、水平感染によって牛群間に感染していることが示唆された。本章から日本では BFV が地理的に離れた地点においても分布していることが明らかとなり、国内の BFV ゲノムにバリエーションが存在することが示された。本研究は、日本における BFV ゲノム全長を明らかにした最初の研究であり、BFV ゲノム情報の蓄積と日本における BFV の特徴の解明に寄与することが期待される。

## 2-6. 表および図

表2-1 サンプル情報

地域	品種	年齢 (歳)	陽性頭数/頭数	BFV陽性率 (%)	95%信頼区間[CI] (%)
茨城県	ホルスタイン牛/ 交雑種 (F1)	0-10	4/34	11.8	4.07-27.2
鹿児島県	ホルスタイン牛	0-2	4/29	13.8	4.88-31.2
北海道	ホルスタイン牛	0-6	15/98	15.3	9.39-23.8
宮城県	ホルスタイン牛	0-1	0/20	0.00	0.00-16.8
合計		0-10	23/181	12.7	8.56-18.4

表2-2 BFVサーベイランスおよびゲノム解析に用いたプライマーリスト

PCR	配列 (5' -> 3')	位置	増幅サイズ <sup>1)</sup>
ipcrF	GAACACCCGGACAGCATACACTC	<i>bel-1-gag</i>	3,665bp
ipcrR	CCATCGGAGCAGAGACCACT		
gagpolF	GGCAACCCTTGCCTATTCTT	<i>gag-pol</i>	1,869bp
gagpolR	CTCAATACGCCGATGTCCGA		
8F	AATACCAAGCTCTATGGCAATGTT	<i>pol-bel-1</i>	6,781bp
8R	ACCAGGGCTGTACTGGTTCT		
シーケンス	配列 (5' -> 3')	位置	
seqR2	CTTCAGCGGGGTTGATCTGCTGTATT	<i>bel-2-LTR</i>	
seq9f	TGCAAGTATCGCTTATGCTCA	<i>bel-2-LTR</i>	
seq9r	TGTTGCGGTTAACTTTCAAGCTCTT	<i>bel-2-LTR</i>	
11171F	TACTGGGGTTCGGAGGATGGCTCAT	LTR	
gpseqF	AAGCTGTTTCTCTAGCCGTTCAAGC	<i>gag-pol</i>	
gpseqf2	AAGTGGAAATCAAGGGCAAT	<i>pol</i>	
8F-1	TGTTCAAGTATATGTGGATGACG	<i>pol</i>	
8F-2	CTGGGAGGCCTAACCCCGAG	<i>pol</i>	
8F-3	AAATATCATCAACCGCAGTGTA	<i>pol-env</i>	
8F-5	TTCTGCATTTAGTTGATTGTC	<i>env</i>	
8F-7	TATTAAGAAGGTACTAAACGAACG	<i>pol-env</i>	
8F-8	TAGTAATAATGGTTCTAGATA	<i>env</i>	
8F-9	TGACTCGACTATGTGGGAAAT	<i>env</i>	
8F-11	AGTGGATCTCTCCTCCTTCTT	<i>bel-1-bel-2</i>	
8R-1	AAAATTGATAAGTCCCAAGATGCT	<i>pol</i>	
8R-2	GTTGTAATTTAATAGGAGTGCCGA	<i>pol</i>	
8R-3	CATTTTAGGGTTCATCTGTAAG	<i>pol-env</i>	
8R-4	GTGTACTCCATCCTTTTTCTCATA	<i>env</i>	
8R-5	CACTACTACAGTTCATAGGGGGGA	<i>env</i>	
env839R	CCCAAGTCGTGATCTCTGGCTC	<i>env-bel-1</i>	
T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA	8F/R clone	

1) BFVリファレンス配列(GenBank accession number: U94514)を参照したサイズ

表2-3 BFVおよびBLVの感染状況

		BLV <sup>1)</sup>		合計
		+	-	
BFV <sup>2)</sup>	+	6	16	22
	-	45	86	131
合計		51	102	153

1) *pol*遺伝子をターゲットとしたqPCRを用いた判定

2) *env*遺伝子をターゲットとしたPCRを用いた判定

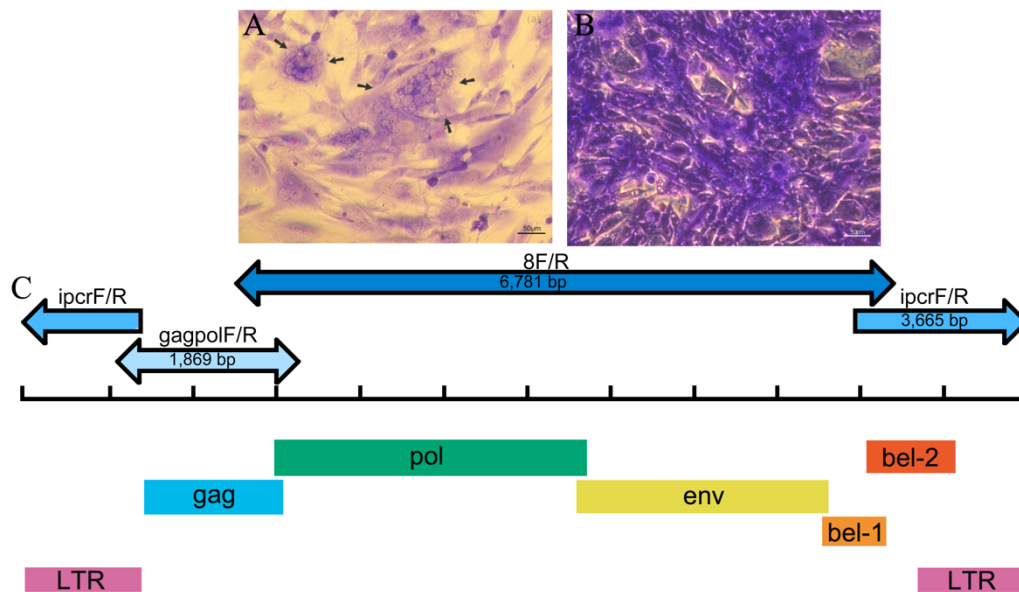


図 2-1 BFV 分離と全長解析用プライマー設計

(A) - (B) PBMC と BHK21 細胞を共培養，9 代盲継代をして，ギムザ染色を行った。BFV 感染牛 (No.5266) の PBMC と共培養したもの (A) で特徴的な多核巨細胞が形成された (矢印)。陰性対照の BHK21 細胞は，BFV 陰性牛の PBMC と共培養した (B)。(C) BFV ゲノム構造とプライマーターゲット。各プライマーターゲットの位置と，BFV 参照配列 (GenBank 登録番号：U94514) を参照した場合に予想される PCR 増幅産物サイズを示す。

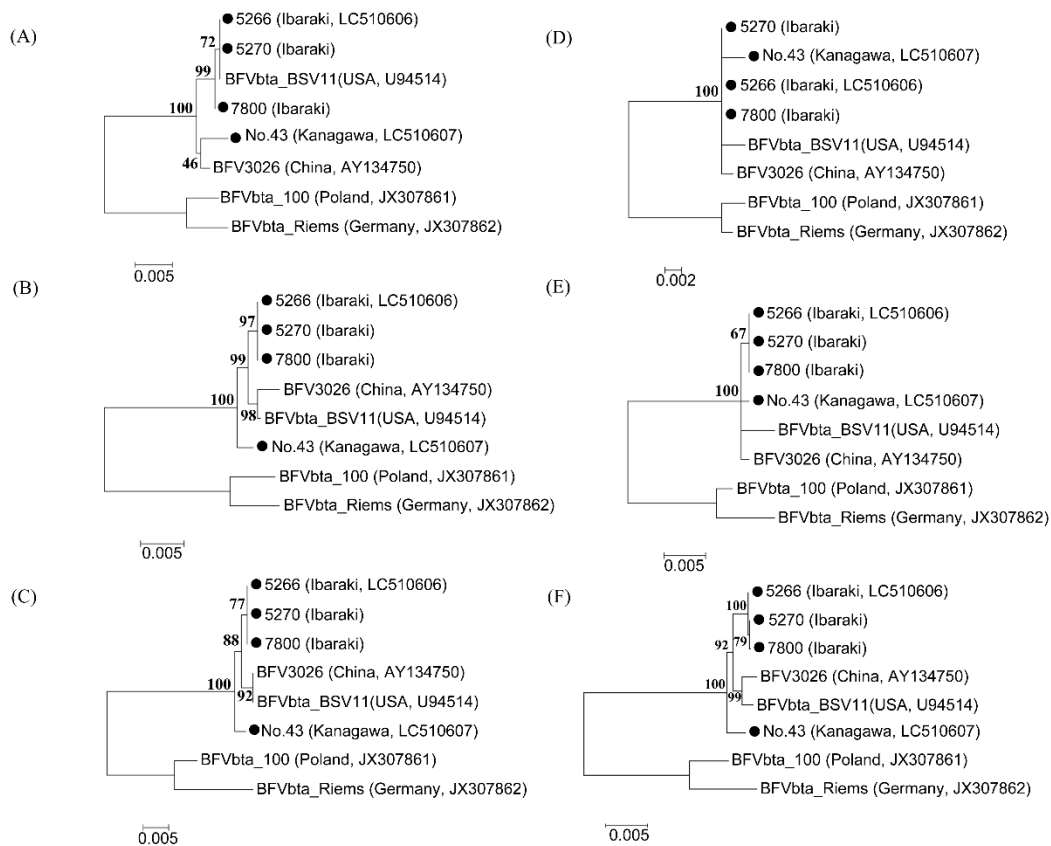


図 2-2 既報株と比較した分離株の各遺伝子および全長に基づく系統樹  
 本研究で特定した分離株を黒丸(●)で示す。系統樹は (A) *gag*, (B) *pol*, (C) *env*, (D) *bel-1*, (E) *bel-2*, (F) 全長に基づいて作成した。各領域および全長を基にした系統樹は明確な 2 つの BFV クラスターを示した。本研究で同定された分離株は全長配列で比較した場合、アメリカ由来の BFV 参照株に最も相関性が高く、茨城県牛由来分離株 (No.5266, 5270, 7800) は 99.6% (11,949/12,001 nt), No.43 株は 99.5% (11,945/12,001 nt) の相関性だった。茨城県牛由来分離株は、ウイルス構造遺伝子である *gag*, *pol*, および *env* が BFV 参照株、非構造遺伝子である *bel-1*, *bel-2* が中国由来の BFV3026 株に最も近縁だった。



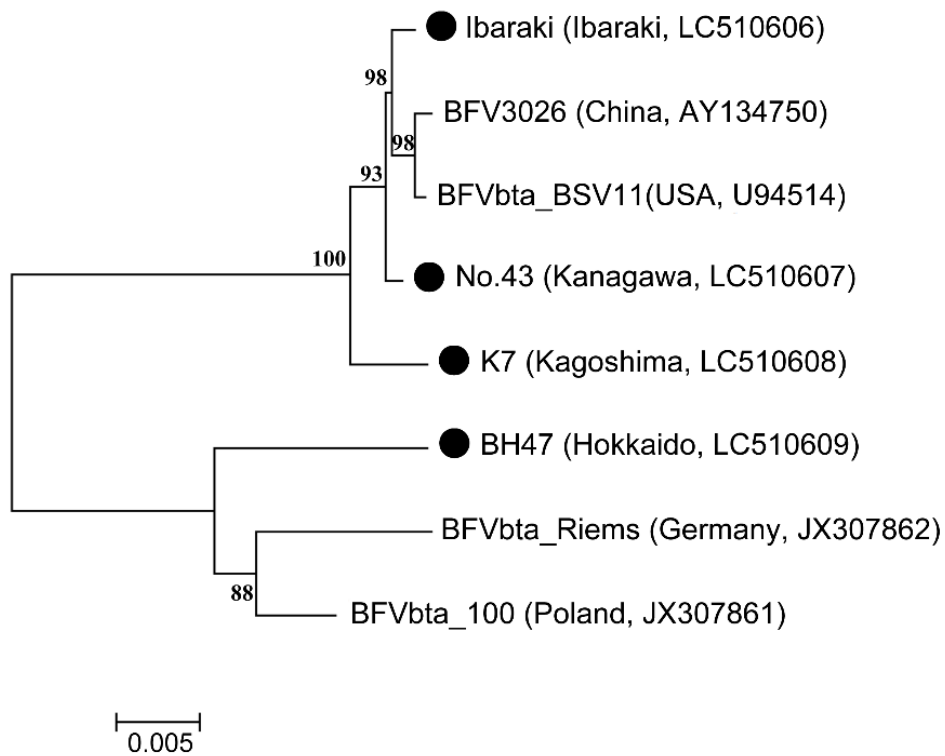


図 2-3 国内株を含む BFV の *env* 領域に基づく系統樹

系統樹は *env* 全長の塩基配列を基に作成した。本研究で特定した国内分離株は黒丸 (●) で示す。国内株は、神奈川県由来の No.43 株 (LC510607) の他に、茨城県の牛 No.5266 に由来する茨城株 (LC510606) , 鹿児島で検出された K7 株 (LC510608) , 北海道で検出された BH47 株 (LC510609) を使用した。全長 *env* 塩基配列に基づく系統樹では、茨城株, No.43 株, K7 株, 参照株 (U94514) , および BFV3026 株 (AY134750) が同じクラスターに分類され、BH47 株がヨーロッパの分離株である BFV100 株 (JX307861) ,BFV Riems 株 (JX307862) と同じクラスターに分類された。

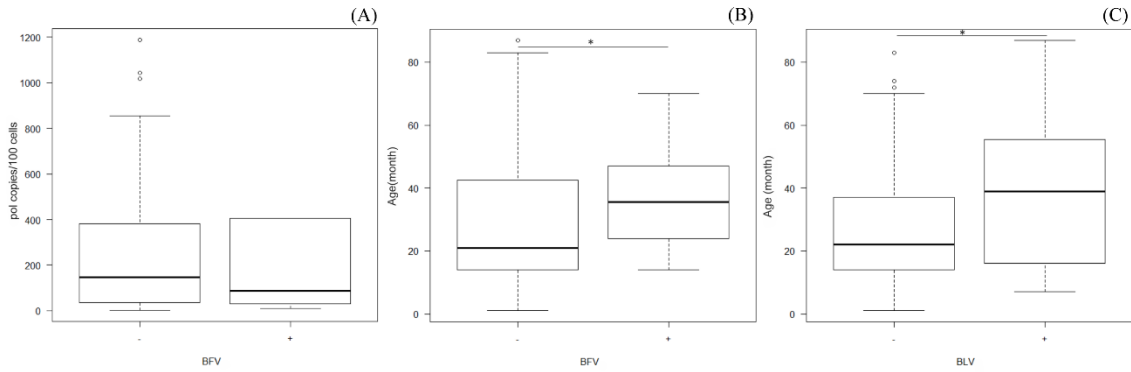


図 2-4 BFV 感染と BLV のコピー数および月齢との相関

(A) BFV 感染の有無 (+/-) と BLV *pol* コピー数。y 軸は、定量リアルタイム PCR 法で算出された 100 細胞あたりの BLV-*pol* コピー数を示す。(B) BFV 感染の有無 (+/-) と牛の月齢, (C) BLV 感染の有無と牛の月齢。y 軸は、牛の月齢を示す。BLV コピー数と BFV 感染の間に有意差はなかった ( $p > 0.05$ ) が, BLV 感染牛, BFV 感染牛はそれぞれ非感染牛と比較して有意に高齢だった ( $p < 0.05$ )。

## 第 3 章

# 牛フオーミーウイルスの生体内および 試験管内の動態解析

### 3-1. 序文

FV はレトロウイルス科スプーマレトロウイルス亜科に分類され、ゲノム構造は、*gag*, *pol*, *env*, *bel-1*, *bel-2*と両端に LTR がある (図 3-1)。サルの腎細胞から最初に分離され[90], 多くの哺乳類[38, 57, 87, 105, 114]や両生類[4], 魚類[4, 26, 27, 89]などで報告がされている。FV は細胞障害性が高く, 様々な細胞において特徴的な多核巨細胞を形成する[2, 51, 91]。細胞での障害性に対して, 生体においての単独の病原性はないと考えられている [91]。試験管内と生体内での障害性の違いがなぜ起こるのかについては明らかになっていない。一方で, いくつか FV の病原性を示唆する報告がある。チンパンジーを自然宿主とし, ヒトの鼻咽頭癌細胞から分離された PFV が試験管内において転写活性因子として働く Tax を介して HIV-1 の LTR を活性化したという報告[42]や, FeLV と共感染した猫で FFV の PVL がより高いという報告[13, 84], 実験感染で FFV を接種した猫は臨床的には正常に見えたが, 腎臓では糸球体とボーマン囊の癒着, 腎細管の好酸球性のシンシチウム形成, 肺では, リンパ球およびマクロファージの間質性浸潤, 気道および主気管支への好酸球浸潤などの組織病理学的変化が観察されたという報告[19]がされており, FV との共感染が他のウイルスに影響を与えることが示唆されている。近年, FV のベクターへの利用も考えられている[52, 73, 97, 107]ことから, 生体内での変動や培養細胞中の動態を知り, 病原性を究明することは重要であると考えられる。

BFV は欧米や, 中国などで報告されており[11, 28, 34, 35, 86], 広く存在していると考えられる。日本では 2018 年に, No.43 株がはじめて分離され, その存在が確認された[25]。日本の BFV 感染率は神奈川県 AGID を用いた牛 57 頭の抗体検査で 5 頭 (8.8%), AGID と PCR を用いた茨城県と神奈川県の調査で 91/545 頭 (16.7%), 筆者らが 2 章で調査した北海道, 宮城県, 茨城県, 鹿児島県の牛 181 頭の *pol-env* 領域の PCR で 23/181 頭 (12.7%) が報告されており[25, 33, 79], ポーランド[88]やカナダ[34]などの諸外国に比べて有意に低い値となっている ( $p < 0.05$ )。これらの疫学調査には AGID やプロウイルスをターゲットにした定性 PCR が使用されているが, 方法は調査によって異なり, その感度や特異度については論じられていない。

そこで、今後の疫学調査、BFV 研究の推進に貢献するために、SYBR Green 法を用いた高感度の定量リアルタイム PCR の構築を行い、BFV の試験管内および生体内の両側面における BFV の動態を究明した。

### 3-2. 材料と方法

#### スタンダードプラスミドの作製

2 章で使用した BFVNo.43 感染 BHK21 細胞を鋳型に, 今回設計した polenv531F/ polenv531R (表 3-1) を用いて *pol-env* 領域を増幅した。両プライマーは全長解析した際の No.43 株のシーケンス (GenBank 登録番号: LC510607) を基に設計した。PCR は KOD Fx Neo (TOYOBO) を用いて行い, サイクル条件は 94 °C 2 分, 98 °C 10 秒, 67 °C 30 秒, 68 °C 17 秒のステップを 45 サイクル反復した。PCR 産物は 2% アガロースゲルで電気泳動した。531 bp の明瞭なバンドを確認し, NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL) を用いて精製した。精製した PCR 産物は Zero Blunt TOPO PCR cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてクローニングし, 作製したプラスミドは NU531 とした。プラスミドの濃度を Nano-Drop (Thermo Fisher Scientific) で測定し, 推定されるコピー数を以下の式で計算した。

$$\text{コピー数} = [\text{DNA 濃度 (ng/}\mu\text{L)} \times 6.022 \times 10^{23}] / [\text{増幅産物の長さ} \times 1 \times 10^9 \times 650]$$

また, 内部標準として, 1 章-2 章で BLV 定量 PCR に使用した牛ベータアクチン (ACTB) を含むプラスミドを使用した。

#### 定量リアルタイム PCR 条件検討

定量リアルタイム PCR のプライマー濃度検討として, 最終濃度を 0.3  $\mu\text{M}$ , 0.6  $\mu\text{M}$ , 0.9  $\mu\text{M}$  に調製した。既報[81]の *pol* から *env* 領域をターゲットとしたプライマーで, 定性 PCR に用いられてきた Pol/Env-1 および Pol/Env-2 (表 3-1) のプライマーセットを用いた。テンプレートとして NU531 を 10 倍階段希釈し,  $10^1$ - $10^6$  コピーに調製したものを使用した。SYBR Green 法は Applied Biosystems Step One Plus (Thermo Fisher Scientific) と, Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて, 説明書通り行った。PCR 条件は, 95 °C 10 分の後, 95 °C 15 秒, 60 °C 1 分を 40 サイクル反復した。

## BFV 定量リアルタイム PCR の従来法との比較

構築した BFV 定量リアルタイム PCR について、検査法の精度を明らかにするために、BFV の検出に従来使用されてきた AGID および定性 PCR と比較した。2017 年 6 月から 2017 年 12 月の期間に茨城県 1 農場のホルスタイン牛 34 頭から採材した全血および血清サンプルを使用した。AGID は血清サンプルを用いて、2 章で行なった方法[25]に従って行った。陽性血清と繋がる明瞭な沈降線を示したものを陽性と判定した (図 3-2)。定性 PCR は Pol/Env-1, Pol/Env-2 (表 3-1) を用いて KOD Fx Neo (TOYOBO) によって全血から抽出した DNA を鋳型として行った。ネガティブコントロールにはサンプルの代わりに DW を加えたものを使用した。サイクル条件は 94 °C 2 分の熱変性の後、98 °C 10 秒, 63 °C 30 秒, 68 °C 7 秒の条件で 45 サイクル反復した。PCR 産物は 2%アガロースゲルで電気泳動し、明瞭な 210 bp のバンドを確認した (図 3-3)。さらに、定量リアルタイム PCR および定性 PCR については、その検出限界を調べるために、NU531 を EASY-Dilution (Takara Bio) で 10 倍階段希釈し、 $10^{-1}$ - $10^3$  コピー/ $\mu$ L に調整したものを PCR の鋳型として用いた。

## BFV 試験管内動態解析

細胞培養における BFV の動態を調べるために、2 章で用いた BHK21 細胞に加え、自然宿主である牛由来細胞の牛腎由来株化 (MDBK: Madin-Darby bovine kidney) 細胞と、初代細胞の牛胎子筋肉 (BFM: Bovine fetal muscle) 細胞を使用して継代を行なった (図 3-4)。AGID で BFV 血清陽性が確認された茨城県 1 農場のホルスタイン牛 3 頭の尾静脈から EDTA 管で採血を行い、採血から 24 時間以内に Lymphopep (Cosmo Bio) を用いて末梢血単核細胞 (PBMC) を分離した。分離した PBMC を 6 ウェルプレートにフルシートにした BHK21 細胞, MDBK 細胞, BFM 細胞に接種し、37 °C で 48 時間共培養した。その後細胞を培養液で洗浄し、1-2%FBS を加えた培養液を維持液として用いた。BHK21 細胞はその時点で細胞の剥離が見られたため新しい BHK21 細胞を添加した。5 日後、細胞をトリプシン処理により剥離し、新しいプレートに継代した。剥がれやすい BHK21 細胞は 3-6 日, MDBK 細胞および BFM 細胞は 5-7 日の間隔で盲継代を行った。陰性対照として、PBMC を接種せず継代を行なった細胞を同様に培養した。培養液は、

BHK21 細胞には 10%FBS 加 DMEM (Sigma-Aldrich Co.) , MDBK 細胞には 5%FBS, 10%Tryptose Phosphate Broth (TPB) 加イーグル最小必須培地 (Eagle's MEM: Eagle's minimal essential medium), BFM 細胞には 10%FBS 加えた Eagle's MEM を使用した。各継代 (Passage 1-10) について DNA Mini kit (QIAGEN) を用いて, DNA 抽出をした。抽出した DNA を鋳型として, BFV 定量リアルタイム PCR で各細胞の継代ごとの PVL を測定した。BHK21 細胞には牛ベータアクチンが含まれていないため, PVL 値の算出は, Nano-Drop (Thermo Fisher Scientific) で測定した鋳型 DNA の濃度を基に, 100 ng あたりのコピー数で求めた。

#### 継代細胞での欠失解析

2 章で継代細胞から抽出した BFV-DNA を基にした全長シーケンス解析でバリエーションが認められた *env* から *bel-1* にかけての 9,363-10,201 nt の領域の PCR を BHK21 細胞から抽出した DNA を鋳型として行った。使用したプライマーは env839F, env839R で, 両プライマーは 2 章で分離した茨城株 (GenBank 登録番号: LC510606) を基に設計した。PCR は KOD Fx Neo (TOYOBO) を用いて行い, サイクル条件は 94 °C 2 分, 98 °C 10 秒, 70.5 °C 30 秒, 68 °C 30 秒の反応を 45 サイクル反復した。PCR 産物は 3%アガロースゲルで電気泳動して, 目的バンドである 839 bp 付近の 3 箇所のバンドを切り出し, NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL) を用いて精製した。精製した PCR 産物は Zero Blunt TOPO PCR cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてクローニングした。クローニングしたサンプルは, M13 プライマーを用いてシーケンスを行い, 配列を決定した。BLAST を用いて以前行った全血からのサンプルで決定した, 欠失のない全長配列 (GenBank 登録番号: LC510606) と比較した。

#### 生体内 BFV 経時的解析

AGID で BFV 血清陽性, 1 章で行った BLV 定量リアルタイム PCR で BLV 陽性が確認された茨城県 1 農場のホルスタイン牛 3 頭について, 2017 年 12 月から 2020 年 9 月の期間, EDTA を含む採血管を用いて基本的に毎月 1 回の頸静脈または尾静脈採血を行なった。DNA は, QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を使用して, 全血から直接抽出された。抽出した DNA を鋳型に BFV 定量リアルタイム



PCR を行い, PVL を測定した。BFV プロウイルス量は以下の式で 100 細胞あたりの値に調整した。

$$[\text{BFV コピー数} / (\text{ACTB コピー数} / 2)] \times 100$$

#### 動物実験倫理

全血および血清の採材は東京大学動物実験実施規則に基づき動物実験専門委員会の承認を受け(承認番号: P18-081), 東京大学動物実験実施マニュアルに従って行われた。

### 3-3. 結果

#### BFV 定量リアルタイム PCR 条件検討

定量リアルタイム PCR のプライマー濃度検討として、Pol/Env-1 および Pol/Env-2 (表 3-1) のプライマーセットを用いて、最終濃度を 0.3  $\mu$ M, 0.6  $\mu$ M, 0.9  $\mu$ M に調製した結果、それぞれ、値が 1 に近いほど信頼性の高い検量線であることを示す相関係数 ( $R^2$ ) が 0.993, 0.999, 0.998 となった。また、PCR 増幅効率 (Eff %) は 92.3, 96.2, 105 %を示した。この結果から、 $R^2$  が最も 1 に近く、Eff % が最も 100%に近いプライマー濃度 0.6  $\mu$ M の条件を採用した。

#### 従来法と BFV 定量リアルタイム PCR の比較

牛 34 頭について行った AGID, 定性 PCR, リアルタイム PCR の結果を表 3-2 に示した。真の陽性の判定には定量リアルタイム PCR 増幅産物を 2%アガロースゲルで電気泳動し、明瞭な 210 bp のバンドを確認したものと、定性 PCR 産物を 2%アガロースゲルで電気泳動し、シークエンス解析によって BFV 遺伝子を確認したものを、合計 18 頭を真の陽性とした。感度は定量リアルタイム PCR (0.833), 定性 PCR (0.389), AGID (0.222) の順に高く、特異度は全て 1.00 だったことから、陽性と判定された場合の結果の正確性が示された。また、スタンダードプラスミドを 10 倍階段希釈し、定性 PCR の検出限界を求めた。 $10^{-1}$  - $10^3$  コピーのスタンダードプラスミドを用いて PCR を行い 2%アガロースゲルで電気泳動した結果、 $10^1$  コピーまで明瞭なバンドが確認された (図 3-2) 一方で、定量リアルタイム PCR では  $10^{-1}$  コピーまで検出された (図 3-5)。今回構築した定量リアルタイム PCR の特異度、感度がいずれも各検査の中で高く、より少ないコピー数でも検出することができたことから、従来法と比べて、定量リアルタイム PCR でより正確に BFV の検出が可能であることが示唆された。

#### BFV 試験管内動態解析

BHK21 細胞, MDBK 細胞, BFM 細胞の Passage 2-10 (継代 2 週目-6 週目) から抽出した DNA を用いて定量を行った結果を図 3-6 に示した。BFM 細胞においては 2 週目 (平均  $2.06 \times 10^5$  コピー/100 ng DNA) と比較して 6 週目 (平均 5.55

×10<sup>6</sup>/100 ng DNA) で PVL が有意に増加していた。MDBK 細胞, 2 週目 (平均 3.05×10<sup>4</sup>) と 6 週目 (平均 4.19×10<sup>6</sup>) と BHK21 細胞の 6 週目 (平均 1.57×10<sup>3</sup>/100 ng DNA) と 6 週目 (平均 4.12×10<sup>6</sup>/100 ng DNA) の PVL に有意差は見られなかったものの, 値の増加が見られたことから, どの細胞にも馴化したことが考えられる。BFV に特徴的な多核巨細胞は PVL が 10<sup>5</sup> コピー/100 ng DNA を超える BHK21 細胞の 3.5 週目以降 (cow 1: 3.5 週目, cow 2: 4 週目, cow 3: 5 週目) でのみ認められ, 牛由来細胞では見られなかった。また, 牛由来細胞である MDBK 細胞および BFM 細胞では陰性対照においても BFV-DNA が検出されたが, PVL はサンプル群と比べ, 低い値のまま維持されていた。

#### *env-bel-1* 領域の欠失

BHK21 細胞で継代した BFV について, 全長シーケンス解析でバリエーションが認められた *env* 領域から *bel-1* 領域にかけての 9,363-10,201 nt の領域について解析した結果, 全血, 2 代目 (継代 1 週目) では欠失が見られなかった一方で, CPE 出現が確認された時期となる 4 週目以降では 9,412-9,535 nt, 9,655-9,961nt の領域で欠失が見られた。

#### 生体内 BFV 経時的解析

BFV および BLV 陽性が確認された茨城県 1 農場の牛 3 頭について 29 ヶ月間の月ごとの BFV の経時的解析を行った。いずれの牛も BFV-PVL の値は 0.147-272 コピーで, 100 細胞あたりに換算すると, 0.060-22.0 コピーの範囲となり, 不規則に増減を繰り返していた (図 3-7)。BLV の PVL と比較すると BFV の PVL は低い傾向が見られたが有意差はなかった ( $p > 0.05$ )。B の牛で 15 ヶ月目に大きなピークが存在したが, すぐに減少し, 全体を通して変動も少ない傾向だった。

### 3-4. 考察

#### BFV 定量リアルタイム PCR

以前の研究で Taqman probe assay を用いた BFV の定量が報告されていた [50] が, Taqman probe 法は SYBR Green 法と比較してランニングコストが高く, BFV 特異的 MGB プローブが必要となる。また, 報告によると, その検出限界は 9 コピーとされている。別の研究で SYBR Green 法を用いた BFV の定量が報告されているが, その検出限界は 10 コピーだった [60]。今回牛を使っての生体サンプルでは全血の PVL は 0.147-272 コピーの範囲で, 10 コピーを下回る値が検出された。さらに, 報告によると, 牛乳や唾液で BFV の DNA が検出されなかった一方で, 共培養により BFV 分離がされた [60]。このことから, BFV は低いコピー数で血液中や分泌物に存在し, 従来の方法で検出されていなかった可能性が考えられる。

また, 日本ではこれまで 8.8% (神奈川), 16.7% (関東), と筆者が 2 章で報告した 12.7% (3 地点) の BFV 感染率が報告されているが [25, 33, 79], いずれも AGID または定性 PCR によって調査された。今回の研究において, 従来用いられてきた AGID, 定性 PCR では, 特異度は 1.00 であり, 陽性判定の信頼性は高いことが示唆された一方, 定性 PCR の検出限界は 10 コピーであり, ゲル内沈降反応では検出感度が定性 PCR (0.389) よりもさらに低い (0.222) ことが示された。このことから, AGID や定性 PCR が陰性であっても, 実際には BFV に感染している可能性がある。今回構築したリアルタイム PCR では, 特異度, 感度がいずれも各検査の中で高く, 検出限界が  $10^{-1}$  コピーであったことから, 従来法と比べて, 定量リアルタイム PCR でより正確に BFV の検出が可能であることが示唆された。本方法は, BFV 陽性でありながら検出されていなかった動物や, 唾液や牛乳などの分泌物中に微量に存在する BFV を調査するために有用であると考えられ, 今後, より正確な疫学調査や BFV 動態解析に寄与することが期待される。

#### BFV 試験管内動態解析

BFV は盲継代を行うことで特徴的な CPE が見られるが, その動態は詳細に研究されてこなかった。今回, 非自然宿主のハムスター由来の細胞として BHK21 細胞, 自然宿主である牛の細胞として MDBK 細胞と BFM 細胞を用いて BFV の細

胞培養における PVL を調査した。BFM 細胞においては 2 週目と比較して 6 週目で PVL が有意に増加しており、MDBK 細胞と BHK21 細胞において有意差は見られなかったものの、全ての細胞で PVL の増加が見られたことから、どの細胞にも馴化したことが考えられる。また、MDBK 細胞で、継代 3 週目から 4.5 週目にかけて PVL の減少が見られたことから、4.5 週目までは馴化することなく、ウイルスの複製もされなかったため、細胞の増殖に伴い、割合が減じた可能性がある。BFV に特徴的な多核巨細胞は PVL が  $10^5$  コピー/ 100 ng DNA を超える BHK21 細胞の 3.5 週目以降でのみ認められ、牛由来細胞では見られなかった。この結果から、自然宿主細胞への障害性が抑えられたことが示され、自然宿主への非病原性に関与している可能性がある。牛および羊における BFV の実験感染により、唾液腺、リンパ節、肝臓、肺、脾臓、筋肉、大脳皮質など全身の臓器で BFV-DNA が確認された一方、臨床症状や白血球数など血液性状に変化が見られなかったという報告がある [59] が、今回、培養細胞中で高 PVL であっても障害性が確認されなかったことが自然宿主への非病原性の要因のひとつであると考えられる。種々の細胞に馴化した一方、非自然宿主であるハムスターにおける病原性を示唆する結果だったことから、種を越えた感染での病原性についても考える必要がある。SFV はサルが自然宿主とされているが、職業的に類人猿と接触したヒトからの SFV 抗体が検出されている [29, 67, 68, 98, 99]。ヒトでの病原性は示されなかったが、FV は試験管内で自然宿主以外に、イヌ、ネコ、マウス、羊、ニワトリなど様々な由来の細胞にも馴化すると考えられている [51] ことから、種を越えた感染の可能性も考えられる。同じレトロウイルスである HIV-1 がチンパンジー由来の SIVcpz からヒトに馴化し、病原性を示した例もある [95] ため、非自然宿主での病原性については検討の余地がある。

また、牛由来細胞である MDBK 細胞および BFM 細胞では陰性対照においても BFV-DNA が検出されたが、PVL はサンプル群と比べ、低い値のまま維持されていた。PFV においては、細胞継代を続けると、ウイルス産生が減少し、CPE を示さなくなる、持続感染株への変異が知られている [92]。PFV 持続感染株においてはウイルス複製を抑制する Bet が過剰発現されるとされ、BFV の持続感染株については明らかになっていないが、同様のことが BFV でも起きている可能性があるため、より詳細な解析が求められる。

BFV に特徴的な多核巨細胞は BHK21 細胞の 3.5 週目以降でのみ認められたが、*env* 領域から *bel-1* 領域にかけての 9,363-10,201 nt の領域について解析した結果、全血、2 代目（継代 1 週目）では欠失が見られなかった一方で、CPE 出現が確認された時期となる 4 週目以降では 9,412-9,535 nt、9,655-9,961nt の領域で欠失が見られた。BFV100（GenBank 登録番号: JX307861.1）において、9,411-9,416 の領域が *env* スプライス供与部位、9,541-9,545 の領域が *env* スプライス受容部位、9,656-9,659 の領域が *bel-1* スプライス供与部位、9,967-9,976 の領域が *bel-1* スプライス受容部位であると報告されており、今回の欠失が *env*、*bel-1* スプライス供与部位に影響している可能性がある。Env、Bet 遺伝子領域ではないため、Env、Bet の構造変化には直接関与しないと考えられるが、既報で、細胞継代による *env* 領域のアミノ酸変異や *gag* 領域の欠失によって無細胞ウイルスの侵入効率や感染性が增強されるということが知られており [8, 117]、ウイルス動態に影響を及ぼすことが考えられる。詳細な解析は行わなかったが、BFV は種々の動物の細胞に適応し、増殖することができることから、今回見られた欠失は培養細胞への適応と関係している可能性があり、欠失が CPE 出現と一致したことからも、病原性への影響を考える必要がある。

#### 生体内 BFV 経時的解析

培養細胞中における高い PVL に対して、生体内における BFV の全血 PVL は BLV と比べて低い値 (< 22.0 コピー/100 細胞) のまま推移していた。血液中の BFV の PVL が低く抑えられていることは培養細胞中において細胞障害性が高い一方、生体内で病原性を示さないことと関係している可能性がある。このことから、免疫抑制により、ウイルスが増殖しやすい条件が揃えば、生体内でも BFV は増殖し、高 PVL になった場合、病原性を示す可能性は十分に考えられる。

以上より、本研究で構築した BFV 定量リアルタイム PCR による解析で、BFV は生体内で安定し、低い値で維持されているが、細胞への馴化により、急速に増殖し細胞を障害する能力を持ったこと、非自然宿主であるハムスター細胞で CPE とともに *env* から *bel-1* の一部領域の欠失が見られたことから、BFV の種を越えた感染や病原性の可能性が示唆された。今回得られた試験管内および生体内における BFV の動態についての知見は、今後の BFV の病原性の解析に貢献するこ

とが期待される。

### 3-5. 要旨

2章で分離および解析を行った BFV について, 3章では BFV 陽性牛とその分離株について BFV の動態を解析した。日本では一部の地域で BFV の分離と疫学が報告されているが, その検出方法は AGID や定性 PCR で, それぞれ異なっていた。そこで, BFV の検出法として従来用いられてきた AGID と定性 PCR に加え, 定量リアルタイム PCR の感度と特異性を確認した。従来用いられてきた AGID, 定性 PCR では, 特異度は 1.00 であり, 陽性判定の信頼性は高いことが示唆された一方, 定性 PCR の検出限界は 10 コピーであり, AGID では検出感度が定性 PCR (0.389) よりもさらに低い (0.222) ことが示された。このことから, AGID や定性 PCR が陰性であっても, 実際には BFV に感染している可能性が考えられる。今回構築したリアルタイム PCR では, 特異度, 感度がいずれも各検査の中で高く, 検出限界が  $10^{-1}$  コピーであったことから, 従来法と比べて, 定量リアルタイム PCR でより正確に BFV の検出が可能であることが示唆された。これを用いて BFV 陽性牛の末梢血中の BFV を定量した結果, 2年半に渡って PVL が低い値で維持されていた。一方, 牛由来の牛腎由来株化 (MDBK) 細胞と牛胎仔筋肉 (BFM) 細胞, 非自然宿主細胞であり HFV で特徴的な多核巨細胞を示すハムスター由来の BHK21 細胞との共培養では継代の過程で PVL の増加が見られた。また, 牛由来細胞である MDBK 細胞および BFM 細胞では陰性対照においても BFV-DNA が検出され, 持続感染株の存在が示唆された。さらに, BHK21 細胞では CPE の出現に対応し, *env* から *bel-1* 領域への欠失が観察されたが, MDBK 細胞と BFM 細胞では CPE は見られなかった。このように, BFV は細胞への馴化により, 急速に増殖し細胞を障害する能力を持ったこと, 非自然宿主であるハムスター細胞で CPE とともに *env* から *bel-1* の一部領域の欠失が見られたことから, BFV の種を越えた感染や病原性の可能性が示唆された。本研究で得られた BFV 定量による試験管内および生体内における BFV の動態についての知見は, 今後の BFV の病原性の解析に貢献することが期待される。



### 3-6. 表および図

表3-1 BFV解析に用いたプライマーリスト

プライマー名	配列(5' -> 3')	使用用途
polenv531F	GGCACACCAGAACTTGCAC	スタンダードプラスミド作製
polenv531R	TGGGACCTGGGCTCTCAATA	スタンダードプラスミド作製
Pol/Env-1	CAAATATCATCAACCGCAGTG	定性/定量PCR
Pol/Env-2	CACCCGGTGGATCAAAG	定性/定量PCR
env839F	CGGTTGGATCTCCACGAAGGAG	塩基解析
env839R	CCCAAGTCGTGATCTCTGGCTC	塩基解析
ACTB-F	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA	定量PCR標準化
ACTB-R	GGCAGACTTAGCCTCCAGTG	定量PCR標準化

表3-2 各検査の精度比較

	検査+/BFV感染+	検査+/BFV感染-	感度	特異度
AGID	4/18	0/16	0.222	1.00
定性PCR	7/18	0/16	0.389	1.00
定量リアルタイムPCR	15/18	0/16	0.833	1.00

定量リアルタイムPCRおよび定性PCR増幅産物のシーケンスにより判定した真のBFV陽性に基づき算出

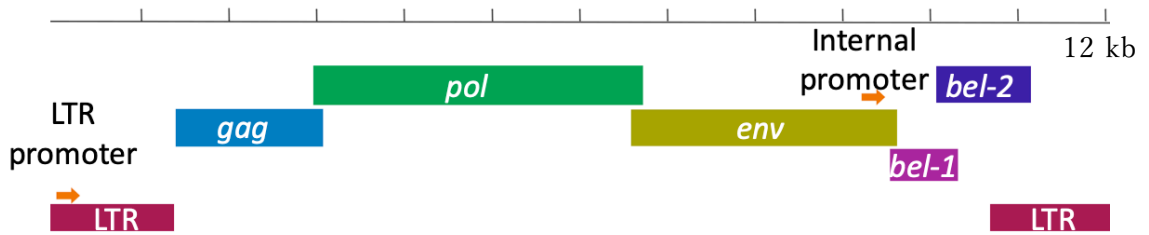


図 3-1 BFV のゲノム構造

各オープンリーディングフレーム（ORF）の位置と構造をボックスで示す。構造タンパクをコードする *gag*, *pol*, *env* と非構造タンパクをコードする *bel-1*, *bel-2* が存在する。

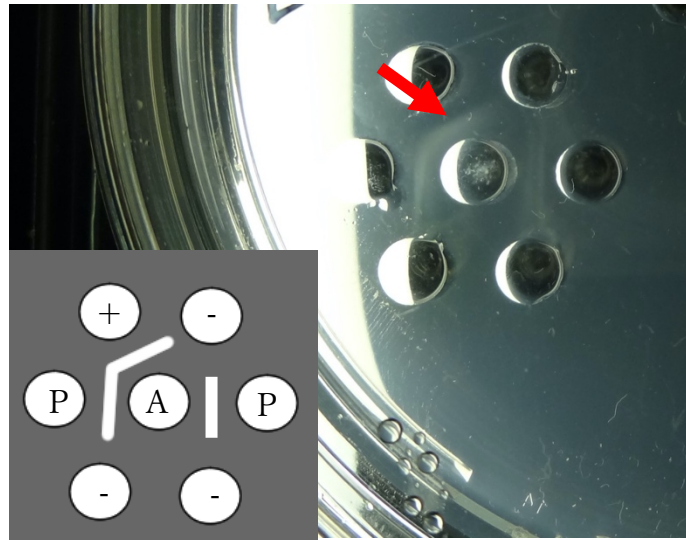


図 3-2 ゲル内沈降反応（AGID）

茨城県 1 農場のホルスタイン/F1 牛 34 頭から採材した血清について AGID を行なった。A: BFV 抗原. BFV 感染 MDBK 細胞を 0.1% triton X-100 含有 PBS に懸濁，超音波破碎し作製した。P: 陽性血清. 予め明瞭な沈降線を形成することが確認された牛血清。BFV 抗原および陽性血清は日本大学の泉對教授から分与された。AGID は以前報告された方法[25]で行った。中央のウェルに BFV 抗原，その左右に陽性血清，残りの 4 ウェルにサンプル血清を 50  $\mu$ L ずつ添加した。プレートは 2 日間室温で静置した。陽性血清が作る沈降線と繋がる明瞭な沈降線を描く（矢印）サンプルを陽性と判定した。

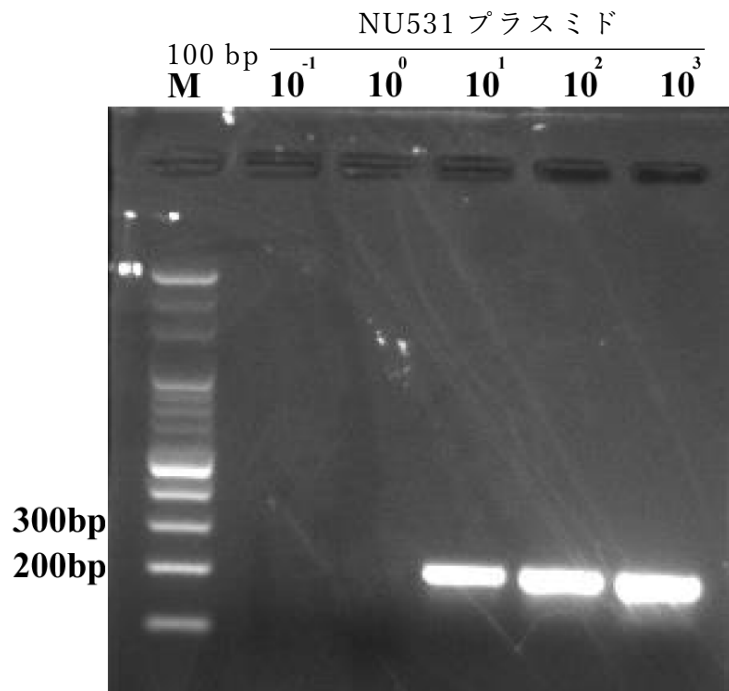
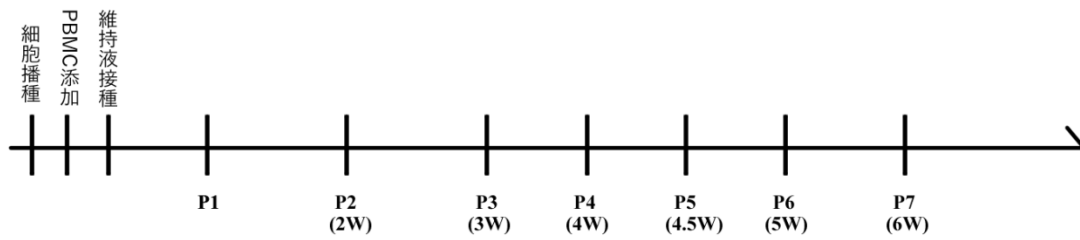


図 3-3 スタANDARD プラスミドの定性 PCR 増幅産物の電気泳動像

BFVNo.43 感染 BHK21 細胞を鋳型に, polenv531F/ polenv531R を用いて *pol-env* 領域を増幅し作製したプラスミドは NU531 とした。定性 PCR の検出限界を調べるために, NU531 を EASY-Dilution (Takara Bio) で 10 倍階段希釈し,  $10^{-1}$ - $10^3$  コピー/ $\mu$ L に調整したものを PCR の鋳型として用いて, Pol/Env-1, Pol/Env-2 のプライマーセットで増幅した。増幅産物を 2%アガロースゲルで電気泳動した結果, 210 bp 付近に明瞭なバンドが  $10^1$  コピーまで確認された。

## MDBK, BFM



## BHK21

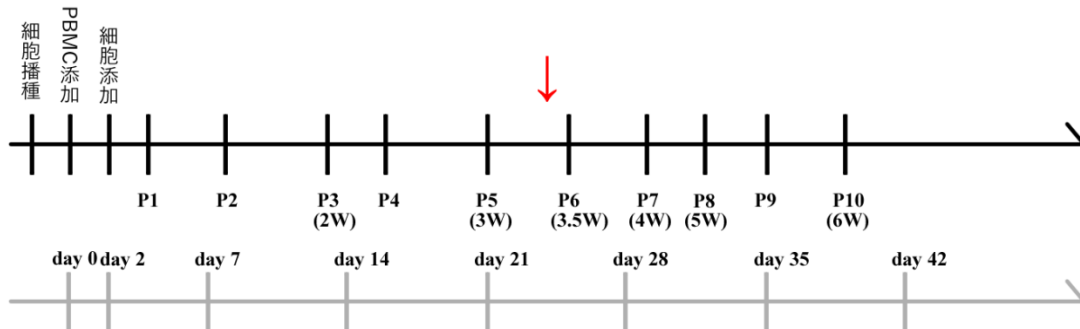


図 3-4 試験管内 BFV 解析タイムコース

PBMC 接種の 2 日前に細胞を  $2.20 \times 10^5$ - $3.00 \times 10^5$ /mL に調製し、6 ウェルプレートに接種した。AGID で BFV 血清陽性が確認された茨城県 1 農場のホルスタイン牛 3 頭の尾静脈から EDTA 管で採血を行い、採血から 24 時間以内に Lymphopep (Cosmo Bio) を用いて末梢血単核細胞 (PBMC) を分離した。分離した PBMC を 6 ウェルプレートにフルシートにした BHK21 細胞, MDBK 細胞, BFM 細胞に接種し、37 °C で 48 時間共培養した。その後細胞を培養液で洗浄し、1-2%FBS を加えた培養液を維持液として用いた。BHK21 細胞はその時点で新しい BHK21 細胞を添加した。5-6 日後、細胞をトリプシン処理により剥離し、新しいプレートに継代した。剥がれやすい BHK21 細胞は 2-5 日, MDBK 細胞および BFM 細胞は 5-7 日の間隔で盲継代を行った。BFV に特徴的な多核巨細胞は BHK21 細胞の 3.5 週目以降 (矢印) でのみ認められ、牛由来細胞では見られなかった。

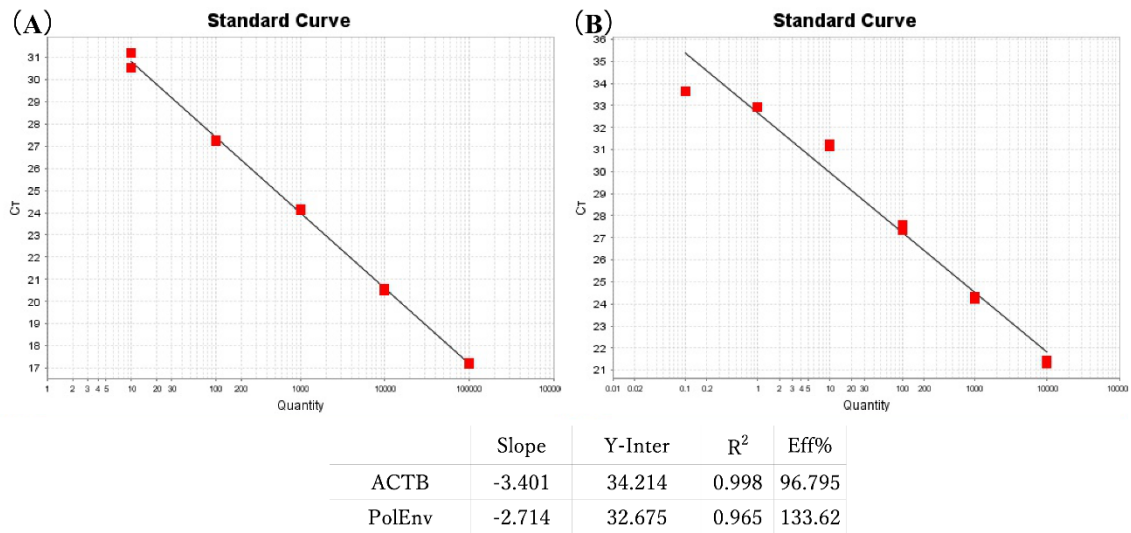


図 3-5 定量リアルタイム PCR 標準曲線

(A) 牛ベータアクチン (ACTB) , (B) BFV PolEnv プライマーを使用した定量リアルタイム PCR の標準曲線。ACTB は  $10^1$ - $10^5$  コピーの範囲, PolEnv は  $10^{-1}$ - $10^4$  コピーの範囲で標準曲線を作成した。



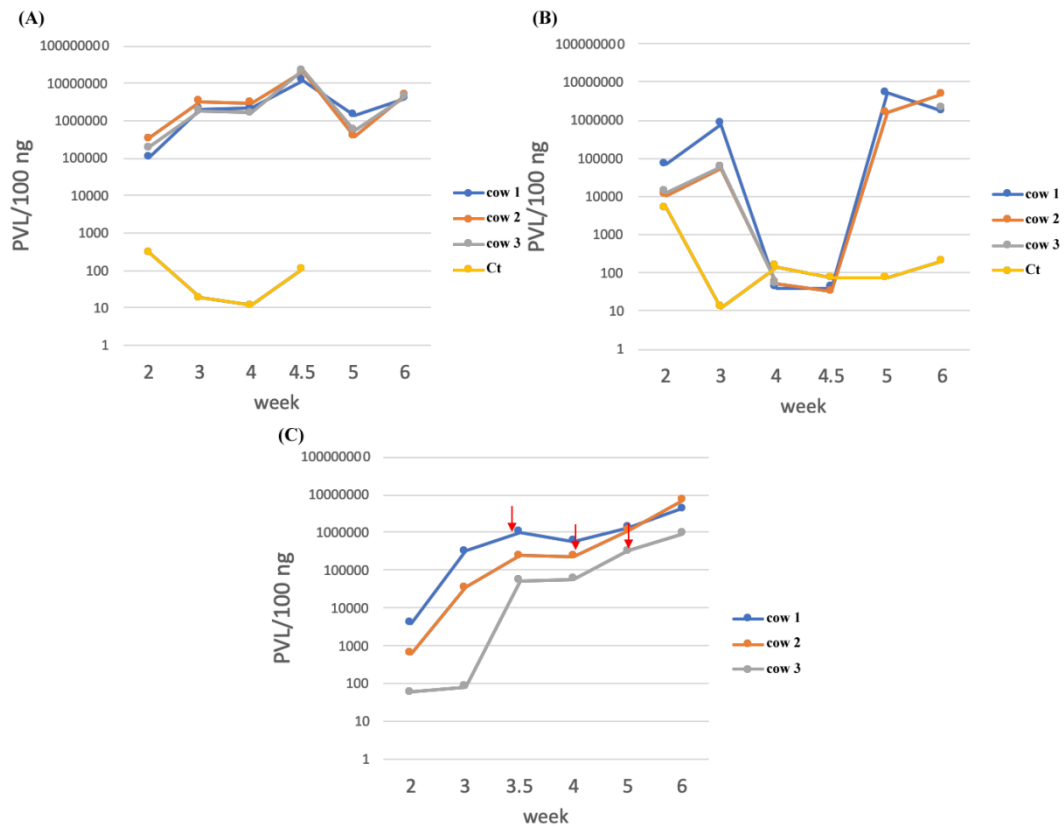


図 3-6 培養細胞における BFV PVL の推移

(A) BFM 細胞, (B) MDBK 細胞, (C) BHK21 細胞における BFV の動態。AGID で BFV 血清陽性が確認された茨城県 1 農場のホルスタイン牛 3 頭 (cow 1, 2, 3) の PBMC と共培養し盲継代を行った。陰性対照として, PBMC を接種せず継代を行なった細胞 (Ct) を同様に培養した。各継代 (Passage 1-10) について DNA 抽出をして, BFV 定量リアルタイム PCR で各細胞の継代ごとの PVL を測定した。PVL 値は, 100 ng あたりのコピー数で求めた。BFV に特徴的な多核巨細胞は PVL が  $10^5$  コピー/ 100 ng DNA を超える BHK21 細胞の 3.5 週目以降 (矢印) でのみ認められ, 牛由来細胞では見られなかった。また, 牛由来細胞である MDBK 細胞および BFM 細胞では陰性対照においても BFV-DNA が検出された。BHK21 細胞の Ct は検出限界以下となった。

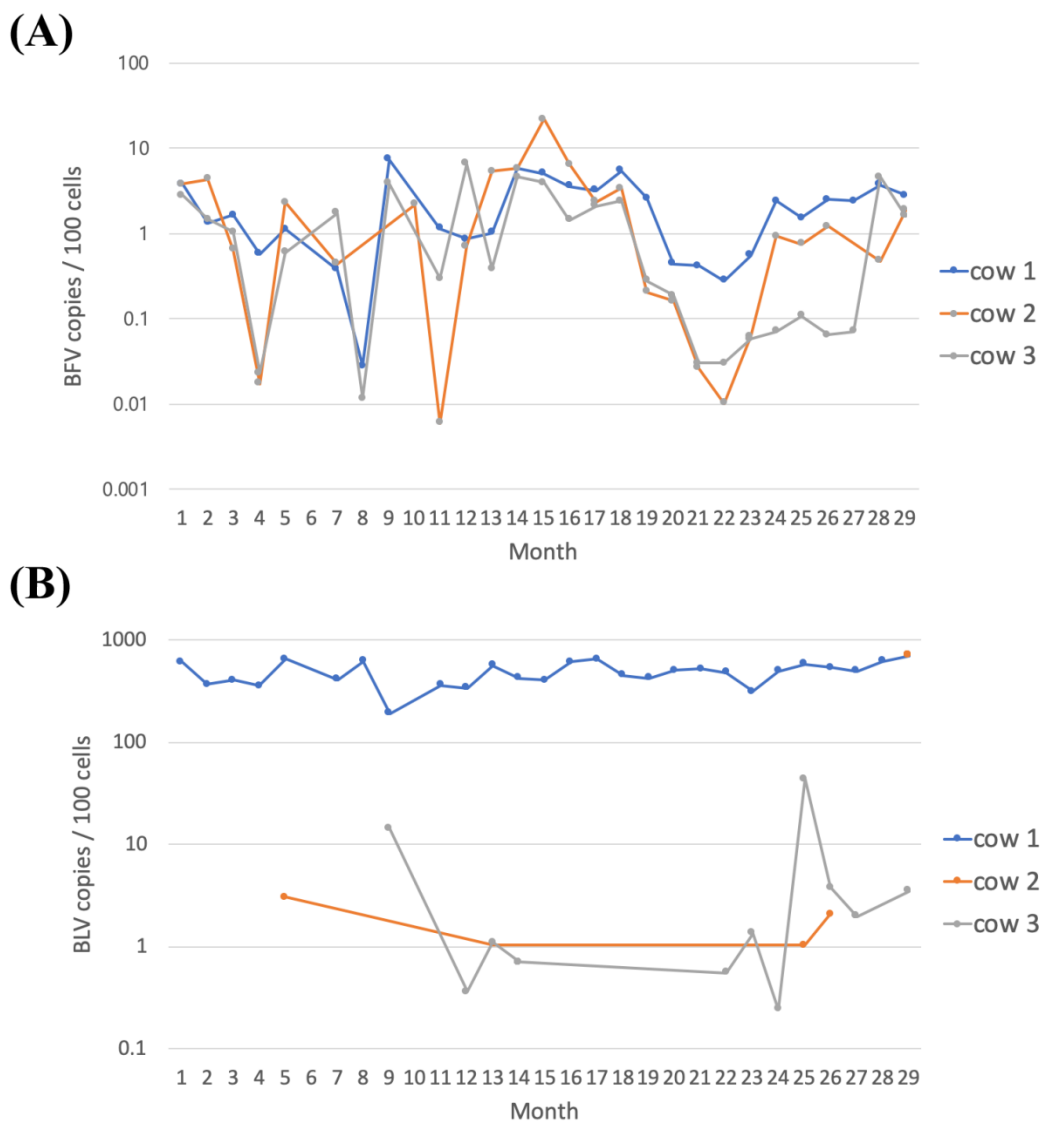


図 3-7 生体内における BFV/BLV の動態

BFV 陽性かつ BLV 陽性の茨城県 1 農場のホルスタイン牛 3 頭 (cow 1, 2, 3) における 29 ヶ月間の BFV (A) および BLV (B) の PVL 推移を示す。DNA は、全血から直接抽出され、抽出した DNA を鋳型に BFV 定量リアルタイム PCR を行い、PVL を測定した。BFV プロウイルス量は 100 細胞あたりの値に調整した。いずれの牛も BFV-PVL の値は 0.147-272 コピーで、100 細胞あたりに換算すると、0.060-22.0 コピーの範囲となり、不規則に増減を繰り返していた BLV の PVL と比較すると BFV の PVL は低い傾向が見られたが有意差はなかった ( $p > 0.05$ )。

## 総括

牛レトロウイルスの性状解析について、日本で現在も感染が確認されており、広く浸潤している可能性のある BLV と BFV について、その感染経路や浸潤状況といった感染動態を究明するとともに、感染や病原性に影響を与える因子について分子疫学的解析を行い、その特徴や動態について検討し、以下の結果を得た。

1. 母牛と子牛の BLV 関連因子を出産前後で測定し、BLV の母子感染の頻度に PVL、リンパ球数および *BoLA-DRB3* アレルの型が関与していることを明らかにした。母牛の *BoLA-DRB3* アレル分類において、抵抗性型で母子感染が見られなかったことや、感受性アレルを持つ群で感受性アレルを持たない群と比較してより高い頻度で母子感染が確認されたことから、農場での母子感染を防ぐ上で、母牛の *BoLA-DRB3* アレルに注目し、農場において、抵抗性型の牛の割合を増やしていくことは、BLV の水平感染および母子感染を防ぐ上で重要となることが示唆された。
2. 分娩前後で分娩は PVL 増加による BLV 発症リスクに影響しないことが示唆され、分娩によるストレスがトリガーとなって EBL を発症する可能性は低いことが明らかとなった。また、母子感染群の PVL 値およびリンパ球数は非母子感染群よりも有意に高かったことから、PVL およびリンパ球数が高い個体で母子感染が起きていると示唆された。
3. BLV 早期感染は子牛が持続的な BLV 感染源となることに加え、PVL 増加に伴う、将来の発症のリスクへの関与が示唆された。母子感染を含む BLV 早期感染牛について BLV 関連因子を経時的に測定すると、BLV 早期感染牛では早期から高い PVL であり、急速に増加した。特に乳牛の場合、若齢の雌はその後出産・牛乳生産に供し、長期間農場に存在することが予想されるため、農場内または放牧時に BLV 陰性牛に伝播する機会が多いと考えられる。また、早期感染子牛は持続した PVL 増加が見られたことから、増加に伴う発症へのリスクも考えられた。これらの結果から、子宮内感染を含む、早期の感染は、農場での BLV 感染制御の上で

重要な要因となることが明らかとなった。

3. 地理的に離れた4地点における *env*領域 PCR を基にした疫学調査によって日本の農場において BFV が広く存在していることが証明された。BFV 感染は地理的に離れた3地点で確認され、平均の感染率は 12.7% (95%CI: 8.56-18.4%) だった。今回、中部地方、近畿地方、中国・四国地方など、網羅することが出来なかったことから、日本の BFV の詳細な分布状況を知るためにはより広い範囲で調査を行なっていく必要があると考えられる。日本における BFV の感染率は、ポーランド (41.5%) およびカナダ (39.6%) よりも有意に低かったが、これは新生子牛に対する処置の違いによるものである可能性がある。茨城県の農場では、あらかじめ凍結融解処理をした初乳を子牛に与えていたことが、初乳を介した BFV 感染のリスクを減らした可能性がある。さらに、北海道、茨城県の農場では、出生直後に新生子牛の母親からの分離を行っていたことから、母牛からの水平感染が防がれた可能性がある。今回、日本においても BFV 侵入・浸潤が確認されたことから、農場での畜産衛生を考える上で、分娩後の母牛と子牛の迅速な隔離や凍結融解処理をした初乳の供与など、母牛から子牛への感染を防ぐことは重要であると考えられる。

4. 日本の BFV の *env* 全長についての系統樹解析の結果、茨城株、No.43 株 (神奈川県)、K7 株 (鹿児島県) が同じクラスターに分類された一方、BH47 株 (北海道) がヨーロッパ株を含む別のクラスターに分類されたことから、国内の BFV でゲノムにバリエーションが存在することが明らかになった。これらの結果は、BFV の日本への侵入にはいくつかの経路があることを示唆している。BFV は単独で臨床症状を示さないとされているため、牛の輸入の際に海外から持ち込まれる可能性もあると考えられる。

5. SYBR Green 系を利用した BFV 定量リアルタイム PCR の構築を行い、BFV の検出に従来用いられてきた定性 PCR と AGID と検査精度を比較し、定量リアルタイム PCR の高い感度と特異度を確認した。今回の研究において、従来用いられてきた AGID、定性 PCR では、特異度は 1.00 であり、陽性判定の信頼性は高いこ

とが示唆された一方、定性 PCR の検出限界は 10 コピーであり、ゲル内沈降反応では検出感度が定性 PCR (0.389) よりもさらに低い (0.222) ことが示された。このことから、AGID や定性 PCR が陰性であっても、実際には BFV に感染している可能性が考えられる。今回構築したリアルタイム PCR では、特異度、感度がいずれも各検査の中で高く、検出限界が  $10^{-1}$  コピーであったことから、従来法と比べて、定量リアルタイム PCR でより正確に BFV の検出が可能であることが示唆された。本方法は、BFV 陽性でありながら検出されていなかった動物や、唾液や牛乳などの分泌物中に微量に存在する BFV を調査するために有用であると考えられ、今後、より正確な疫学調査や BFV 動態解析に寄与することが期待される。

6. BFV 定量系を用いて牛由来細胞 (BFM 細胞, MDBK 細胞) とハムスター由来細胞 (BHK21 細胞) での BFV 試験管内動態を調査し、BFV の細胞指向性の広さと BFV の培養細胞中の持続感染成立が示唆された。BFM 細胞においては 2 週目と比較して 6 週目で PVL が有意に増加しており、MDBK 細胞と BHK21 細胞において有意差は見られなかったものの、全ての細胞で PVL の増加が見られたことから、どの細胞にも馴化したことが考えられた。また、牛由来細胞である MDBK 細胞および BFM 細胞では陰性対照においても BFV-DNA が検出されたが、PVL はサンプル群と比べ、低い値のまま維持されていた。PFV においては、持続感染株への変異が知られていることから、同様のことが BFV でも起きていることが示唆された。

7. BFV 試験管内動態から、自然宿主細胞への障害性が抑えられたことが示され、自然宿主への非病原性に関与していることが示唆された。培養細胞中での BFV に特徴的な多核巨細胞は PVL が  $10^5$  コピー/ 100 ng DNA を超える BHK21 細胞の 3.5 週目以降でのみ認められ、牛由来細胞では見られなかった。培養細胞中で高 PVL であっても障害性が確認されなかったことが自然宿主への非病原性の要因のひとつであると考えられる。種々の細胞に馴化した一方、非自然宿主であるハムスターにおける病原性を示唆する結果だったことから、種を越えた感染での病原性の可能性が明らかとなった。

8. BFV に特徴的な多核巨細胞は BHK21 細胞の 3.5 週目以降でのみ認められたが、*env* 領域から *bel-1* 領域にかけての 9,363-10,201 nt の領域について解析した結果、全血、2 代目（継代 1 週目）では欠失が見られなかった一方で、CPE 出現が確認された時期となる 4 週目以降では 9,412-9,535 nt、9,655-9,961nt の領域で欠失が見られた。今回の欠失が *env*、*bel-1* スプライシングに影響している可能性がある。BFV は種々の動物の細胞に適応し、増殖することができることから、今回見られた欠失は培養細胞への適応と関係している可能性があり、欠失が CPE 出現と一致したことからも、病原性に影響する可能性が示唆された。

9. BFV 定量系を用いて BFV に自然感染した 3 頭のホルスタイン牛の経時的観察を行うことで、自然宿主の血液中では低い値で維持されていることが明らかとなった。培養細胞中における高い PVL に対して、血液中の BFV の PVL が低く抑えられていることは培養細胞中において細胞障害性が高い一方、牛の生体内で病原性を示さないことと関係していることが示唆された。

以上より、第 1 章の BLV の宿主因子との関係、母子感染や早期感染の動態の調査から、母子感染や早期感染の例では水平感染と比べ、早期から持続的な感染源となり、PVL の増加を介して発症にも関与する可能性があることが考えられた。母子感染を含め、早期の感染には十分に注意を払うべきであると考えられる。また、母子感染の頻度は PVL やリンパ球数に関連しており、*BoLA-DRB3* アレルとの関与も示唆された。従来から知られていた PVL やリンパ球数の値を測定することによるリスク分類に加えて、*BoLA-DRB3* アレルに注目することが水平感染だけでなく母子感染を防除する意味でも重要になることが示唆された。今回の結果は農場での BLV 感染制御に寄与することが期待される。第 2 章の日本における BFV 分子疫学と感染動態の調査から、BFV は日本では地理的に離れた地点で検出され、各地域にはさまざまなゲノム特性があることが明らかとなり、日本において BFV は様々な経路で侵入・浸潤していることが示唆された。また、BFV と BLV 感染の間に明確な相関関係は示されなかったが、陽性牛は陰性牛よりも高齢であり、両方のウイルスの伝播について、水平感染が重要な経路であることが考えられる。BFV の単独での病原性は未だ不明だが、宿主細胞に組み込まれ、生涯持続

感染する性質上、畜産衛生を考えるうえで BFV 感染の感染状況を把握し、宿主への影響や性質を究明する必要がある。本研究は、日本における BFV ゲノム全長を明らかにした最初の研究であり、BFV ゲノム情報の蓄積と日本における BFV の特徴の解明に寄与することが期待される。第 3 章の本研究で構築した BFV 定量リアルタイム PCR による BFV の試験管内および生体内の動態解析により、BFV は牛の生体内で安定し、低い値で維持されているが、培養細胞中で細胞への馴化により、急速に増殖し細胞を障害する能力を持ったこと、非自然宿主であるハムスター細胞で CPE とともに env から bel-1 の一部領域の欠失が見られたことから、BFV の種を越えた感染や病原性の可能性が示唆された。今回得られた試験管内および生体内においての BFV の動態についての知見は、今後の BFV の病原性の解析に貢献することが期待される。これらのレトロウイルスの知見は、今後のレトロウイルス研究の推進とともに畜産衛生管理の観点から有用であると考えられる。

## 謝辞

本論文の御校閲と有益な御助言を賜った東京大学大学院農学生命科学研究科の芳賀猛教授に謝意を表します。また、本研究の遂行に当たり、御助力を賜った日本大学生物資源科学部獣医学科獣医伝染病学研究室泉對博博士、小熊圭祐准教授に心から深謝致します。多くのご助言及び御協力を賜った国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門ウイルス・疫学研究領域牛ウイルスユニット畠間真一博士、東京大学大学院農学生命科学研究科の猪熊壽教授、並びに研究材料の採材に当たり御協力を賜った岩手大学農学部共同獣医学科産業動物内科学研究室一條俊浩准教授、東京大学大学院農学生命科学研究科東京大学附属牧場遠藤麻衣子様へ深謝致します。



## 参考文献

1. Acaite, J., Tamosiunas, V., Lukauskas, K., Milius, J. and Pieskus, J. 2007. The eradication experience of enzootic bovine leukosis from Lithuania. *Prev. Vet. Med.* 82: 83-89.
2. Achong, B. G., Mansell, P. W., Epstein, M. A. and Clifford, P. 1971. An unusual virus in cultures from a human nasopharyngeal carcinoma. *J. Natl. Cancer. Inst.* 46: 299-307.
3. 間陽子. 2016. 革新的技術で牛白血病ウイルスから牛を守る. 家畜感染症学会誌 5(2): 43-53.
4. Aiweesakun, P. and Katzourakis, A. 2017. Marine origin of retroviruses in the early Palaeozoic Era. *Nat. Commun.* 8: 13954.
5. 明石博臣, 大橋和彦, 小沼操, 菊池直哉, 後藤義孝, 高井伸二, 宝達勉. 2011. 動物の感染症 第3版, 近代出版.
6. Alke, A., Schwantes, A., Kido, K., Flötenmeyer, M., Flügel, R. M. and Löchelt, M. 2001. The bet Gene of Feline Foamy Virus Is Required for Virus Replication. *Virology.* 287: 310-320.
7. Appleby, R. C. 1979. Antibodies to bovine syncytial virus in dairy cattle. *Vet. Rec.* 105: 80-81
8. Bao, Q., Hipp, M., Hugo, A., Lei, J., Liu, Y., Kehl, T., Hechler, T. and Löchelt, M. 2015. In vitro evolution of bovine foamy virus variants with enhanced cell-free virus titers and transmission. *Viruses.* 7: 5855-5874.
9. Bartholomew, C., Jack, N., Edwards, J., Charles, W., Corbin, D., Cleghorn, F.R. and Blattner, W.A. 1998. HTLV-I serostatus of mothers of patients with

adult T-cell leukemia and HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Hum Virol.* 1(4): 302-305.

10. Bartlett, P.C., Norby, B., Byrem, T.M., Parmelee, A., Ledergerber, J.T. and Erskine, R.J. 2013. Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds. *J. Dairy Sci.* 96: 1591–1597.

11. Bing, T., Yu, H., Li, Y., Sun, L., Tan, J., Geng, Y. and Qiao, W. 2014. Characterization of a full-length infectious clone of bovine foamy virus 3026. *Virol. Sin.* 29: 94–102.

12. Carpenter, S., Miller, L. D., Alexandersen, S., Whetstone, C. A., VanDerMaaten, M. J., Viuff, B., Wannemuehler, Y., Miller, J. M. and Roth, J. A. 1992. Characterization of early pathogenic effects after experimental infection of calves with bovine immunodeficiency-like virus. *J Virol.* 66: 1074–1083.

13. Cavalcante, L., Muniz, C. P., Jia, H., Augusto, A. M., Troccoli, F., Medeiros, S. O., Dias, C., Switzer, W. M., Soares, M. A. and Santos, A. F. 2018. Clinical and molecular features of feline foamy virus and feline leukemia virus co-infection in naturally-infected cats. *Viruses.* 10: 702.

14. Cohen, M. S., Chen, Y. Q., McCauley, M., Gamble, T., Hosseinipour, M. C., Kumarasamy, N., Hakim, J. G., Kumwenda, J., Grinsztejn, B., Pilotto, J. H. ., Godbole, S. V., Mehendale, S., Chariyalertsak, S., Santos, B. R., Mayer, K. H., Hoffman, I. F., Eshleman, S. H., Piwowar-Manning, E., Wang, L., Makhema, J., Mills, L. A., de Bruyn, G., Sanne, I., Eron, J., Gallant, J., Havlir, D., Swindells, S., Ribaud, H., Elharrar, V., Burns, D., Taha, T. E., Nielsen-Saines, K., Celentano, D., Essex, M. and Fleming, T. R. 2011. Prevention of HIV-1 Infection with Early Antiretroviral Therapy. *N Engl J Med.* 365: 493–505.

15. Coussens, P. M., Sipkovsky, S., Murphy, B., Roussey, J. and Colvin, C. J. 2012. Regulatory T cells in cattle and their potential role in bovine paratuberculosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 35: 233–239.
16. Erskine, R.J., Bartlett, P.C., Byrem, T.M., Render, C.L., Febvay, C. and Houseman, J.T. 2012. Association between bovine leukemia virus, production, and population age in Michigan dairy herds. *J. Dairy Sci.* 95: 727–734.
17. Florins, A., Gillet, N., Boxus, M., Kerkhofs, P., Kettmann, R. and Willems, L. 2007. Even Attenuated Bovine Leukemia Virus Proviruses Can Be Pathogenic in Sheep. *J Virol.* 81: 10195–10200.
18. Gapper, L., Copestake, D., Otter, D. and Indyk, H. 2007. Analysis of bovine immunoglobulin G in milk, colostrum and dietary supplements: a review. *Anal Bioanal Chem.* 389: 93–109.
19. German, A. C., Harbour, D. A., Helps, C. R. and Gruffydd-Jones, T. J. 2008. Is feline foamy virus really apathogenic? *Vet. Immunol. Immunopathol.* 123: 114–118.
20. Gessain, A. and Cassar, O. 2012. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol.* 3: 388.
21. Gillet, N., Florins, A., Boxus, M., Burteau, C., Nigro, A., Vandermeers, F., Balon, H., Bouzar, A. B., Defoiche, J., Burny, A., Reichert, M., Kettmann, R. and Willems, L. 2007. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology.* 4: doi: 10.1186/1742-4690-4-18
22. Gillet, N. A., Gutiérrez, G., Rodríguez, S. M., de Brogniez, A., Renotte,

N., Alvarez, I., Trono, K. and Willems, L. 2013. Massive Depletion of Bovine Leukemia Virus Proviral Clones Located in Genomic Transcriptionally Active Sites during Primary Infection. *PLoS Pathog.* 9: e1003687.

23. Gutiérrez, G., Alvarez, I., Politzki, R., Lomónaco, M., Dus Santos, M. J., Rondelli, F., Fondevila, N. and Trono, K. 2011. Natural progression of Bovine Leukemia Virus infection in Argentinean dairy cattle. *Vet Microbiol.* 151: 255–263.

24. Gutiérrez, G., Rodríguez, S.M., de Brogniez, A., Gillet, N., Golime, R., Burny, A., Jaworski, J.P., Alvarez, I., Vagnoni, L., Trono, K., Willems, L., 2014. Vaccination against  $\delta$  - retroviruses: the bovine leukemia virus paradigm. *Viruses.* 6, 2416–2427.

25. Hachiya, Y., Kimura, K., Oguma, K., Ono, M., Horikita, T. and Sentsui, H. 2018. Isolation of bovine foamy virus in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 80: 1604–1609.

26. Han, G. Z. 2015. Extensive retroviral diversity in shark. *Retrovirology.* 12: 34.

27. Han, G. Z. and Worobey, M. 2012. An endogenous foamy-like viral element in the coelacanth genome. *PLoS Pathog.* 8: e1002790.

28. Hechler, T., Materniak, M., Kehl, T., Kuzmak, J. and Löchelt, M. 2012. Complete genome sequences of two novel European clade bovine foamy viruses from Germany and Poland. *J. Virol.* 86: 10905–10906.

29. Heneine, W., Switzer, W. M., Sandstrom, P., Brown, J., Vedapuri, S., Schable, C. A., Khan, A. S., Lerche, N. W., Schweizer, M., Neumann-Haefelin, D.,

- Chapman, L. E. and Folks, T. M. 1998. Identification of a human population infected with simian foamy viruses. *Nat Med.* 4 (4): 403–407.
30. Hirai, N., Kabeya, H., Ohashi, K., Sugimoto, C. and Onuma, M. 1996. Detection of antibodies against bovine immunodeficiency-like virus in dairy cattle in Hokkaido. *J Vet Med Sci.* 58: 455–457.
31. Igawa, S. 2015. Overview of “Guidelines for Biosecurity Measures of Enzootic Bovine Leukosis”. *J. Vet. Epidemiol.* 19 (2) 114-118.
32. Ikeda, K., Nadaoka, Y. and Kamiya, N. 2009. Study of the Number of HIV/AIDS-Related Deaths in the World. *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health,* 283–289.
33. Iwasaki, R., Nakagiri, Y., Yaguchi, Y., Oguma, K., Ono, M., Horikita, T. and Sentsui, H. 2020. Survey of bovine foamy virus infection among cattle in Japan and comparison with bovine leukemia virus infection. *J. Vet. Med. Sci.* 82: 615-618
34. Jacobs, R. M., Pollari, F. L., McNab, W. B. and Jefferson, B. 1995. A serological survey of bovine syncytial virus in Ontario: associations with bovine leukemia and immunodeficiency-like viruses, production records, and management practices. *Can. J. Vet. Res.* 59: 271–278.
35. Jacobs, R. M., Smith, H. E., Gregory, B., Valli, V. E. and Whetstone, C. A. 1992. Detection of multiple retroviral infections in cattle and cross-reactivity of bovine immunodeficiency-like virus and human immunodeficiency virus type 1 proteins using bovine and human sera in a western blot assay. *Can. J. Vet. Res.* 56: 353–359.

36. Jimba, M., Takeshima, S., Matoba, K., Endoh, D. and Aida, Y. 2010. BLV-CoCoMo-qPCR: Quantitation of bovine leukemia virus proviral load using the CoCoMo algorithm. *Retrovirology*. 7: 91.
37. Johnson, RH., De La Rosa, J., Abher, I., Kertanadnya, IG., Entwistle, KW., Fordyce, G. and Holroyd, RG. 1988. Epidemiological studies of bovine spumavirus. *Vet Microbiol*. 16: 25–33.
38. Johnston, P. B. 1961. A second immunological type of simian foamy virus: monkey throat infections and unmasking by both types. *J. Infect. Dis.* 109: 1–9.
39. Juliarena, M.A., Poli, M., Sala, L., Ceriani, C., Gutierrez, S., Dolcini, G., Rodríguez, E.M., Mariño, B., Rodríguez-Dubra, C., Esteban, E.N. 2008. Association of BLV infection profiles with alleles of the *BoLA-DRB3.2* gene. *Anim Genet*. 39 (4) :432-438.
40. Kanno, T., Ishihara, R., Hatama, S., Oue, Y., Edamatsu, H., Konno, Y., Tachibana, S. and Murakami, K. 2014. Effect of freezing treatment on colostrum to prevent the transmission of bovine leukemia virus. *J. Vet. Med. Sci.* 76: 255–257.
41. Keefe, R. G., Ferrick, D. A. and Stott, J. L. 1997. Cytokine transcription in lymph nodes of cattle in different stages of bovine leukemia virus infection. *Vet Immunol Immunopathol*. 159: 271–283.
42. Keller, A., Garrett, D. E. and Cullen, R. B. 1992. The Bel-1 protein of human foamy virus activates human immunodeficiency virus type 1 gene expression via a novel DNA target site. *J. Virol*. 66: 3946–3949.
43. Khan, A. S., Bodem, J., Buseyne, F., Gessain, A., Johnson, W., Kuhn, J. H.,

- Kuzmak, J., Lindemann, D., Linial, M. L., Löchelt, M., Materniak-Kornas, M., Soares, M. A. and Switzer, W. M. 2018. Spumaretroviruses: Updated taxonomy and nomenclature. *Virology*. 516: 158–164.
44. Kobayashi, S. 2017. Epidemiological Study on the Infestation and Transmission of Bovine Leukemia Virus in Japan. *Bull. Natl. Inst. Anim. Health* 123: 85–86.
45. Kobayashi, T., Inagaki, Y., Ohnuki, N., Sato, R., Murakami, S. and Imakawa, K. 2019. Increasing Bovine leukemia virus (BLV) proviral load is a risk factor for progression of Enzootic bovine leucosis: A prospective study in Japan. *Prev Vet Med*. doi: 10.1016/j.prevet med.2019.04.00 9.
46. Konishi, M., Ishizaki, H., Kameyama, K., Murakami, K. and Yamamoto, T. 2018. The effectiveness of colostral antibodies for preventing bovine leukemia virus (BLV) infection in vitro. *BMC Vet Res*. 14: 419.
47. Korhonen, H., Marnila, P. and Gill, H. S. 2000. Milk immunoglobulins and complement factors. *Br J Nutr*. 84: 75–80.
48. Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol*. 33: 1870–1874.
49. Lefèbvre, L., Vanderplasschen, A., Ciminale, V., Heremans, H., Dangoisse, O., Jauniaux, J.-C., Toussaint, J.-F., Zelnik, V., Burny, A., Kettmann, R. and Willems, L. 2002. Oncoviral Bovine Leukemia Virus G4 and Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 p13II Accessory Proteins Interact with Farnesyl Pyrophosphate Synthetase. *J Virol*. 76: 1400–1414.



50. Lew, A. E., Bock, R. E., Miles, J., Cuttell, L. B., Steer, P. and Nadin-Davis, S. A. 2004. Sensitive and specific detection of bovine immunodeficiency virus and bovine syncytial virus by 5' Taq nuclease assays with fluorescent 3' minor groove binder-DNA probes. *J Virol Methods*. 116: 1–9.
51. Liebermann, H. and Riebe, R. 1981. Cellular spectrum of bovine syncytial virus. *Arch Exp Veterinarmed* 35: 945–953.
52. Lindemann, D. and Rethwilm, A. 2011. Foamy virus biology and its application for vector development. *Viruses*. 3: 561–585.
53. Linial, M. L. 1999. Foamy viruses are unconventional retroviruses. *J Virol*. 73: 1747–1755.
54. Linial, M. 2000. Why aren't foamy viruses pathogenic? *Trends Microbiol*. 8: 284–289.
55. Lo, C.-W., Borjigin, L., Saito, S., Fukunaga, K., Saitou, E., Okazaki, K., Mizutani, T., Wada, S., Takeshima, S.-N. and Aida, Y. 2020. *BoLA-DRB3* polymorphism is associated with differential susceptibility to bovine leukemia virus-induced lymphoma and proviral load. *Viruses*. 12: 352.
56. Luo, M., Embree, J., Ramdahin, S., Bielawny, T., Laycock, T., Tuff, J., Haber, D., Plummer, M. and Plummer, F. A. 2015. *HLA* class II antigens and their interactive effect on perinatal mother-to-child HIV-1 transmission. *PLoS One*. 2015;10: e0126068.
57. Malmquist, W. A., Van der Maaten, M. J. and Boothe, A. D. 1969. Isolation, immunodiffusion, Immunofluorescence, and electron microscopy of a

syncytial virus of lymphosarcomatous and apparently normal cattle. *Cancer Res.* 29: 188–200.

58. Mansky, L. M. and Temin, H. M. 1994. Lower mutation rate of bovine leukemia virus relative to that of spleen necrosis virus. *J Virol.* 68: 494–499.

59. Materniak, M., Sieradzki, Z. and Kuzmak, J. 2010. Detection of bovine foamy virus in milk and saliva of BFV seropositive cattle. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 54: 461–465.

60. Materniak, M., Hechler, T., Löchelt, M. and Kuźmak, J. 2013. Similar Patterns of Infection with Bovine Foamy Virus in Experimentally Inoculated Calves and Sheep. *J Virol.* 87: 3516–3525.

61. Materniak-Kornas, M., Osiński, Z., Rudzki, M. and Kuźmak, J. 2017. Development of a recombinant protein-based ELISA for detection of antibodies against bovine foamy virus. *J. Vet. Res.* 61: 247–252.

62. Meas, S., Kabeya, H., Yoshihara, S., Ohashi, K., Matsuki, S., Mikami, Y., Sugimoto, C. and Onuma, M. 1998. Seroprevalence and Field Isolation of Bovine Immunodeficiency Virus. *Virology* 60: 1195–1202.

63. 目堅博久. 2016. 牛白血病ウイルス感染症の検査法とその特徴. 産業動物臨床医誌 6: 221–226.

64. Mekata, H., Sekiguchi, S., Konnai, S., Kirino, Y., Honkawa, K., Nonaka, N., Horii, Y., Norimine, J. 2015. Evaluation of the natural perinatal transmission of bovine leukaemia virus. *Vet. Rec.* 176 (10):254.

65. Mekata, H., Yamamoto, M., Kirino, Y., Sekiguchi, S., Konnai, S., Horii, Y.

and Norimine, J. 2018. New hematological key for bovine leukemia virus-infected Japanese Black cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 80: 316–319.

66. Miyasaka, T., Takeshima, S-n., Jimba, M., Matsumoto, Y., Kobayashi, N., Matsushashi, T., Sentsui, H. and Aida, Y. 2013. Identification of bovine leukocyte antigen class II haplotypes associated with variations in bovine leukemia virus proviral load in Japanese Black cattle. *Tissue Antigens.* 81: 72–82.

67. Mouinga-Ondémé, A., Betsem, E., Caron, M., Makuwa, M., Sallé, B., Renault, N., Saib, A., Telfer, P., Marx, P., Gessain, A. and Kazanji, M. 2010. Two distinct variants of simian foamy virus in naturally infected mandrills (*Mandrillus sphinx*) and cross-species transmission to humans. *Retrovirology* 7 doi: 10.1186.

68. Mouinga-Ondémé, A., Caron, M., Nkoghé, D., Telfer, P., Marx, P., Saïb, A., Leroy, E., Gonzalez, J.-P., Gessain, A. and Kazanji, M. 2012. Cross-Species Transmission of Simian Foamy Virus to Humans in Rural Gabon, Central Africa. *J Virol.* 86: 1255–1260.

69. Murakami, H. 2018. Analysis of transmissibility and pathogenesis in bovine leukemia virus. *Electrophoresis* 62 (2): 49–54.

70. Murakami, K., Kobayashi, S., Konishi, M., Kameyama, K. and Tsutsui, T. 2013. Nationwide Survey of Bovine Leukemia Virus Infection among Dairy and Beef Breeding Cattle in Japan from 2009-2011. *J. Vet. Med. Sci.* 75 (8): 1123–1126.

71. Murphy, E. L., Hanchard, B., Figueroa, J. P., Gibbs, W. N., Lofters, W. S., Campbell, M., Goedert, J. J. and Blattner, W. A. 1989. Modelling the risk of adult T-cell leukemia/lymphoma in persons infected with human T-lymphotropic virus type I. *Int J Cancer.* 43: 250–253.

72. Naif, H. M., Daniel, R. C., Cogle, W. G. and Lavin, M. F. 1992. Early detection of bovine leukemia virus by using an enzyme-linked assay for polymerase chain reaction-amplified proviral DNA in experimentally infected cattle. *J Clin Microbiol.* 30: 675–679.
73. Nalla, A. K. and Trobridge, G. D. 2016. Prospects for foamy viral vector anti-HIV gene therapy. *Biomedicines.* 4: 8.
74. Nikbakht Brujeni, G., Ghorbanpour, R. and Esmailnejad, A. 2016. Association of *BoLA-DRB3.2* alleles with BLV infection profiles (persistent lymphocytosis/lymphosarcoma) and lymphocyte subsets in Iranian Holstein cattle. *Biochem Genet.* 54: 194–207.
75. Norby, B., Bartlett, P.C., Byrem, T.M. and Erskine, R.J. 2016. Effect of infection with bovine leukemia virus on milk production in Michigan dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99: 2043–2052.
76. Nuotio, L., Rusanen, H., Sihvonen, L. and Neuvonen, E. 2003. Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland. *Prev. Vet. Med.* 59: 43–49.
77. Oguma, K., Suzuki, M. and Sentsui, H. 2017. Enzootic bovine leukosis in a two-month-old calf. *Virus Res.* 233: 120–124.
78. Ohno, A., Takeshima, S., Matsumoto, Y. and Aida, Y. 2015. Risk factors associated with increased bovine leukemia virus proviral load in infected cattle in Japan from 2012 to 2014. *Virus Res.* 210: 283–290.
79. Okamoto, M., Oguma, K., Yamashita-kawanishi, N., Ichijo, T., Hatama, S., Endo, M., Ishikawa, M. and Haga, T. 2020. Genomic characterization and

distribution of bovine foamy virus in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 82: 1607–1613.

80. Ott, S.L., Johnson, R. and Wells, S.J. 2003. Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. *Prev. Vet. Med.* 61: 249–262.

81. Pamba, R., Jeronimo, C. and Archambault, D. 1999. Detection of bovine retrospumavirus by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods.* 78: 199–208.

82. Panei, C., Takeshima, S., Omori, T., Nunoya, T., Davis, W. C., Ishizaki, H., Matoba, K. and Aida, Y. 2013. Estimation of bovine leukemia virus (BLV) proviral load harbored by lymphocyte subpopulations in BLV-infected cattle at the subclinical stage of enzootic bovine leucosis using BLV-CoCoMo-qPCR. *BMC Vet.* 9: 95.

83. Pinto-Santini, D. M., Stenbak, C. R. and Linial, M. L. 2017. Foamy virus zoonotic infections. *Retrovirology* 14(1): 55. doi: 10.1186/s12977-017-0379-9

84. Powers, J. A., Chiu, E. S., Kraberger, S. J., Roelke-Parker, M., Lowery, I., Erbeck, K., Troyer, R., Carver, S. and VandeWoude, S. 2018. Feline leukemia virus (FeLV) disease outcomes in a domestic cat breeding colony: Relationship to endogenous FeLV and other chronic viral infections. *J. Virol.* 92: e00649-18.

85. Pyeon, D., Diaz, F. J. and Splitter, G. A. 2000. Prostaglandin E (2) increases bovine leukemia virus tax and pol mRNA levels via cyclooxygenase 2: regulation by interleukin-2, interleukin-10, and bovine leukemia virus. *J Virol.* 74: 5740–5745.

86. Renshaw, R. W. and Casey, J. W. 1994. Transcriptional mapping of the 3' end of the bovine syncytial virus genome. *J. Virol.* 68: 1021–1028.

87. Riggs, J. L., Oshirls, Taylor, D. O. and Lennette, E. H. 1969. Syncytium-forming agent isolated from domestic cats. *Nature*. 222: 1190–1191.
88. Romen, F., Backes, P., Materniak, M., Sting, R., Vahlenkamp, T. W., Riebe, R., Pawlita, M., Kuzmak, J. and Löchelt, M. 2007. Serological detection systems for identification of cows shedding bovine foamy virus via milk. *Virology*. 364: 123–131.
89. Ruboyianes, R. and Worobey, M. 2016. Foamy-like endogenous retroviruses are extensive and abundant in teleosts. *Virus Evol.* 2: vew032.
90. Rustigian, R., Johnston, P. and Reihart, H. 1955. Infection of monkey kidney tissue cultures with virus-like agents. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 88: 8–16.
91. Saïb, A. 2003. Non-primate foamy viruses. pp. 197–212. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology 27*, Springer, Berlin.
92. Saïb, A., Koken, M. H., Spek, P. van der, Périès, J. and Thé, H. de 1995. Involvement of a spliced and defective human foamy virus in the establishment of chronic infection. *J Virol.* 69: 5261–5268.
93. Sandev, N., Koleva, M., Binev, R., Ilieva, D. 2004. Influence of enzootic bovine leukosis virus upon the incidence of subclinical mastitis in cows at a different stage of infection. *Vet. Arh.* 6: 411–416.
94. 関崎勉, 高井伸二, 堀本泰介, 望月雅美, 2011. 獣医微生物学 第 3 版, 見上彪監修, 文永堂出版.

95. Sharp, P. M. and Hahn, B. H. 2011. Origins of HIV and the AIDS Pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1 doi: 10.1101/cshperspect. a006841
96. Somura, Y., Sugiyama, E., Fujikawa, H., Murakami, K. 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.* 159:2693–2697.
97. Sweeney, N. P., Meng, J., Patterson, H., Morgan, J. E. and McClure, M. 2017. Delivery of large transgene cassettes by foamy virus vector. *Sci Rep.* 14; 7(1) :8085. doi: 10.1038/s41598-017-08312-3
98. Switzer, W. M., Bhullar, V., Shanmugam, V., Cong, M., Parekh, B., Lerche, N. W., Yee, J. L., Ely, J. J., Boneva, R., Chapman, L. E., Folks, T. M. and Heneine, W. 2004. Frequent Simian Foamy Virus Infection in Persons Occupationally Exposed to Nonhuman Primates. *Retrovirology* 78: 2780–2789.
99. Switzer, W. M., Tang, S., Ahuka-Mundeke, S., Shankar, A., Hanson, D. L., Zheng, H., Ayouba, A., Wolfe, N. D., LeBreton, M., Djoko, C. F., Tamoufe, U., Esteban, A., Heneine, W., Peeters, M., Wright, L. L., Muyembe-Tamfum, J. J., Wemakoy, E. O., Mulembakani, P., Hoff, N. A. and Rimoin, A. W. 2012. Novel simian foamy virus infections from multiple monkey species in women from the Democratic Republic of Congo. *Retrovirology* 9: 100. doi: 10.1186/1742-4690-9-100
100. Tajima, S. and Aida, Y. 2000. The Region between Amino Acids 245 and 265 of the Bovine Leukemia Virus (BLV) Tax Protein Restricts Transactivation Not Only via the BLV Enhancer but Also via Other Retrovirus Enhancers. *Journal of Virology* 74: 10939-10949.

101. Takahashi, T., Kitano, N. and Tajima, M. 2019. Invasion status of bovine immunodeficiency virus on a bovine leukemia-infested farm. *J. Rakuno Gakuen Univ.* 43(2): 69–72.
102. Takeshima, S.-N., Matsumoto, Y., Miyasaka, T., Arainga - Ramirez, M., Saito, H., Onuma, M. and Aida, Y. 2011. A new method for typing bovine major histocompatibility complex class II *DRB3* alleles by combining two established PCR sequence - based techniques. *Tissue Antigens.* 78: 208–213.
103. Takeshima, S.-N., Ohno, A. and Aida, Y. 2019. Bovine leukemia virus proviral load is more strongly associated with bovine major histocompatibility complex class II *DRB3* polymorphism than with *DQA1* polymorphism in Holstein cow in Japan. *Retrovirology.* 16: 14.
104. Thurmond, M.C., Maden, C.B., Carter, R.L. 1985. Cull rates of dairy cattle with antibodies to bovine leukemia virus. *Cancer Res.* 45(5): 1987-1989.
105. Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Neves, M., Guillemin, M. C., Lecellier, C. H., Puvion-Dutilleul, F., Gicquel, B., Zientara, S., Giron, M. L., de Thé, H. and Saïb, A. 2000. Isolation and characterization of an equine foamy virus. *J. Virol.* 74: 4064–4073.
106. Trainin, Z., Brenner, J., Meirom, R. and Ungar-Waron, H. 1996. Detrimental effect of bovine leukemia virus (BLV) on the immunological state of cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 154: 293–302.
107. Trobridge, G. D., Miller, D. G., Jacobs, M. A., Allen, J. M., Kiem, H.-P., Kaul, R. and Russell, D. W. 2006. Foamy virus vector integration sites in normal human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103: 1498–1503.



108. Tsuji, Y., Doi, H., Yamabe, T., Ishimaru, T., Miyamoto, T. and Hino, S. 1990. Prevention of mother-to-child transmission of human T-lymphotropic virus type-I. *Pediatrics*. 86: 11–17.
109. Umeki, K., Hisada, M., Maloney, E. M., Hanchard, B. and Okayama, A. 2009. Proviral Loads and Clonal Expansion of HTLV-1-Infected Cells following Vertical Transmission: A 10-Year Follow-Up of Children in Jamaica. *Intervirology*. 52: 115–122.
110. Usui, T., Meas, S., Konnai, S., Ohashi, K. and Onuma, M. 2003. Seroprevalence of Bovine Immunodeficiency Virus and Bovine Leukemia Virus in Dairy and Beef Cattle in Hokkaido. *Virology* 65: 287–289.
111. Watanabe, A., Murakami, H., Kakinuma, S., Murao, K., Ohmae, K., Isobe, N., Akamatsu, H., Seto, T., Hashimura, S., Konda, K., Shinozuka, Y. and Kawai, K. 2019. Association between bovine leukemia virus proviral load and severity of clinical mastitis. *J. Vet. Med. Sci.* 81: 1431–1437.
112. Willems, L., Kerkhofst, P., Dequiedt, F., Portetelle, D., Mammerickx, M., Burny, A. and Kettmann, R. 1994. Attenuation of bovine leukemia virus by deletion of R3 and G4 open reading frames. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 11532–115326.
113. Willems, L., Grimonpont, C., Adam, E., Lefebvre, L., Twizere, J-C., Heremans, H., Kettmann, R., Kerkhofs, P., Capiiau, C., Gheysen, D., Conrath, K., Roussef, R., Mamoun, R., Portetelle, D. and Burny, A. 1998. Phosphorylation of bovine leukemia virus Tax protein is required for in vitro transformation but not for transactivation. *Oncogene* 16: 2165–2176.
114. Wu, Z., Ren, X., Yang, L., Hu, Y., Yang, J., He, G., Zhang, J., Dong, J.,

- Sun, L., Du, J., Liu, L., Xue, Y., Wang, J., Yang, F., Zhang, S. and Jin, Q. 2012. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. *J. Virol.* 86: 10999–11012.
115. Xu, A., van Eijk, M. J., Park, C. and Lewin, H. A. 1993. Polymorphism in *BoLA-DRB3* exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. *J Immunol.* 151: 6977–6985.
116. Yuan, Y., Kitamura-Muramatsu, Y., Saito, S., Ishizaki, H., Nakano, M., Haga, S., Matoba, K., Ohno, A., Murakami, H., Takeshima, S. and Aida, Y. 2015. Detection of the BLV provirus from nasal secretion and saliva samples using BLV-CoCoMo-qPCR-2: Comparison with blood samples from the same cattle. *Virus Res.* 210: 248–254.
117. Zhang, S., Liu, X., Liang, Z., Bing, T., Qiao, W. and Tan, J. 2019. The Influence of Envelope C-Terminus Amino Acid Composition on the Ratio of Cell-Free to Cell-Cell Transmission for Bovine Foamy Virus. *Viruses.* 11: 130.