

## 論文の内容の要旨

獣医学専攻  
平成 29 年度博士課程入学

氏名: 岡本 麻里

指導教員名: 芳賀 猛

### 論文題目:

## 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

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、宿主の DNA に組み込まれ、プロウイルスの形をとる。レトロウイルス科は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病気は悪性腫瘍、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。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、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。

日本において、監視伝染病の対象として定められており、昨今問題となっているレトロウイルスの感染症のひとつに、牛伝染性リンパ腫（旧：牛白血病）がある。牛の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 2-3% では EBL を発症するが、感染から発症までには数年の潜伏期間が存在するとされていた。しかし、近年では若齢子牛における EBL も報告されており、早期感染・早期発症についての関心が高まっている。ウイルス側の要因が調べられている一方で、発症やプロウイルス量（PVL: Proviral load）について、宿主側の要因についてもその関与が示唆されている。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、クラス IIa 領域に存在する *BoLA-DRB3* 遺伝子アレルが BLV の PVL や BLV 誘導性のリンパ腫/白血病に関係していると考えられているが、*BoLA-DRB3* 遺伝子アレルと母子感染の関係性は調査されていないため、宿主要因と母子感染、母子感染後の動態については論じられてこなかった。

BLV と同じレトロウイルス科であるスプーマウイルス亜科に分類されるフォーミーウイルス (FV: Foamy virus) は魚類から哺乳類まで幅広く存在しており、単独での病原性がいまだ未解

明だが、長期間持続感染する。牛フォーミーウイルス (BFV: Bovine foamy virus) は、欧米諸国や中国で分離されており、日本でも、2018 年に神奈川県ではじめて No.43 株が分離されたが、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 の疫学やゲノムの特徴は明らかにされていない。また、培養細胞における高い細胞障害性の一方で宿主動物では非病原性であるその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。

そこで本研究では、BLV および BFV の感染や病原性に影響する因子の解明を目的として BLV の母子感染における感染動態、BFV の分子疫学や BLV との関連、また BFV の生体内および試験管内の動態を解析した。

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 関連因子の動態を調査した。BLV 関連因子として *pol* 領域をターゲットにした定量リアルタイム PCR で PVL、市販の ELISA キットで抗体価 (S/P 値)、自動血球計数装置でリンパ球数を測定した。その結果、分娩前後では PVL およびリンパ球数に大きな変動は見られず、分娩によるストレスは BLV 伝播リスクには影響しないことが示された。また、分娩時と比べて分娩 1 ヶ月後の S/P 値が有意に高かったが、分娩時の生理的な抗体の減少によるものと考えられた。母子感染を起こした牛群では母子感染を起こさなかった牛群を比較すると、分娩時の PVL、リンパ球数が有意に高かった。さらに、調査した母牛の 68% は、宿主因子である *BoLA-DRB3* アレルに基づく分類で、高 PVL 牛に多くみられるとされる感受性アレルを有していたが、感受性アレルを持つ母牛では、感受性アレルを持たない母牛と比べて有意に高い確率で母子感染が見られた。また、抵抗性型の母牛では PVL にかかわらず母子感染が起こらなかった。1 歳齢以上で BLV に水平感染した陽転群と子宮内感染を含め、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。本章から、*BoLA-DRB3* アレルは水平感染だけでなく母子感染にも影響を及ぼすことが示唆された。

第 2 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* 領域をターゲットとした 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: Baby hamster kidney) 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。BFV と BLV との相関を調べるために上記全血サンプルを用いて *pol* 領域をターゲットとした定量リアルタイム PCR で BLV の感染の有無と定量を行った。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 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、鹿児島株、神奈川県由来の No.43 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。BLV と BFV では感染の有無や PVL に相関は見られな

かったが、どちらも年齢の増加とともに感染率が上がっていた。本章から、日本では BFV が広い地域に分布し、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。

第 3 章では、3 頭の BFV 陽性牛とその分離株について BFV の動態を解析した。BFV の検出法として従来用いられてきたゲル内沈降反応 (AGID: Agarose gel immunodiffusion) 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。その結果、各検査の高い特異性と本研究で構築された定量リアルタイム PCR の高い感度が示された。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 は低い値で維持されていた。培養細胞では BHK21 細胞の継代の過程で PVL の増加が見られ、CPE の出現に対応し、*env* から *bel-1* の一部領域の欠失が観察されたが、牛腎由来株化 (MDBK) 細胞と牛胎仔筋肉 (BFM) 細胞では CPE は見られなかった。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から、免疫抑制により生体内でも病原性を示す可能性が考えられる。また、非自然宿主であるハムスターの細胞で 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 の種を越えた感染の可能性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。

以上の実験成績から、BLV 動態として、妊娠や分娩によるストレスは BLV の伝播に影響を及ぼさないが、母子感染の頻度には、母牛の 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が示唆された。また、BLV と同じレトロウイルスである BFV については、BLV との相関は見られなかったが、BLV に加え BFV も、日本において広く存在していることが証明された。国内の BFV ではゲノムにバリエーションが見られ、様々なルートで侵入・浸潤していると考えられる。BFV は牛の生体内で安定し、低い値で維持されているが、BFV の種を越えた感染や病原性の可能性も示唆された。これらのレトロウイルスに関する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り、予防やレトロウイルスの病原性のメカニズム解明に寄与すると考えられる。