

博士論文

牛個体識別番号を利用した疫学調査に基づく  
牛白血病発症に関する遺伝学的研究

稲垣靖子

# 目 次

序 章	1
図表	8
第一章 牛個体識別番号を利用した牛白血病発症に関する疫学的解析	13
序論	14
材料と方法	15
結果	20
考察	24
小括	29
図表	30
第二章 牛白血病発症に関する統計遺伝学的解析	41
序論	42
材料と方法	43
結果	46
考察	49
小括	52
図表	53
第三章 牛白血病発症に関連する遺伝子の探索	60
序論	61
材料と方法	62
結果	66
考察	69
小括	72
図表	73
総括	83
略語表	86
参考文献	87
謝辞	96

# 序 章

## 序 章

畜産の生産性に関わる要因は、家畜の生来もっている遺伝的能力と、その他の環境要因に大別される。家畜育種学は、その遺伝的能力の改良に関する問題を扱う応用科学である。本学の家畜育種学講座の系譜は、駒場農学校、さらにその前身である内藤新宿の農事修学場まで遡ることができる。その伝統は、現在の獣医繁殖育種学研究室や附属牧場に引き継がれ、1870年から今日まで、約150年の長きにわたり、家畜の遺伝的改良、日本の畜産学および畜産業の発展に大きく寄与してきた。

この間、個体の選抜育種により、乳牛の生産性は著しく向上した。1960年代、凍結精液利用技術の進展により、種雄牛の精液の広域利用が可能となり、種雄牛の選抜が牛群全体に大きな影響を与えるようになった。そのため、種雄牛の遺伝的能力を、娘牛群の産乳成績から推定する「後代検定」が開始され、優秀な検定済種雄牛が選抜されるようになった。このような統計遺伝学を応用した家畜育種学的手法により乳牛の泌乳能力は飛躍的に向上した。しかし、疾病抵抗性や繁殖性については遺伝的改良が難しく、依然として酪農家の生産性を大きく損なっている。その重要な問題の一つが、近年、発生が増加している牛白血病である。

牛白血病は全身性の悪性リンパ腫を主徴とする疾病で、日本では1998年に、家畜伝染病予防法における監視伝染病に指定された（図 序-1）。牛白血病は、ウイルス性の地方病性牛白血病（EBL）と、非ウイルス性の散発性白血

病（SBL）に大別されるが、現在、問題となっているのは、牛白血病ウイルス（BLV）に起因する EBL である。

牛白血病に関する報告は古く、19世紀末のヨーロッパまで遡ることができる。1871年に Leisering により末梢血の白血化を呈した牛の脾臓に特徴的な黄色結節を認めたとされるものが、最初の報告とされている（Leisering, 1871: cited by Rodriguez *et al.*, 2011）。同様の症例が、特定の地域に偏在して認められたことから、Enzootic bovine leukosis（地方病性牛白血病）と名付けられた。その後、ヨーロッパ産の牛の移動とともに、EBL は世界中に広がり、日本でも 1927 年に岩手県で輸入ホルスタイン種雄牛における症例（窪田, 1927）が報告されている。

多くの疫学情報から、EBL は何らかの病原体に起因する感染症であると疑われていたが、その病因が特定されたのは比較的新しい。最終的には、腫瘍病変から分離されたウイルス様粒子が本病の病原体であることが特定され、牛白血病ウイルス（BLV）と命名された（Miller *et al.*, 1969）。BLV は、レトロウイルス科オルソレトロウイルス亜科デルタウイルス属に属する oncogenic B-lymphocytotropic retrovirus で、成人 T 細胞白血病（Adult T-cell leukemia; ATL）の病因であるヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型（Human T-cell leukemia virus type 1; HTLV1）と近縁とされている。BLV は、一本鎖の RNA ウイルスで、プロウイルスゲノムに約 8,700 の塩基を持ち（Sagata *et al.*, 1985）、ウイルス粒子の直径は 100~120 nm でレトロウイルス特有のエンベロープを有し、正二十面体構造をもつ（Gillet *et al.*, 2007、図 序-2）。BLV 粒子中には RNA が二量体として存在し、主要な構造タンパク質としてカプシドを構成する CA タンパク質（calcium-binding proteins; CBP, p24）、

ヌクレオカプシドを構成する NC (nucleocapsid; p12) があり、このうち、p24 は、感染牛に対して強い免疫原性を示す。

BLV の自然宿主は、ウシ、水牛に限られる。BLV の感染は、世界的に広がっており、日本や北米では、約 80% の酪農場に浸潤しているといわれている (Murakami *et al.*, 2013; NAHMS, 2008) 。一度、BLV に感染すると、ウイルスは宿主の体内から生涯排除されることなく持続感染するが、感染した牛の多くでは、プロウイルス量は低く保たれ、臨床症状を示さない無症状キャリアとなる (Gillet *et al.*, 2007) 。感染牛のうち、ごく一部が長い潜伏期間ののち、EBL を発症する。EBL の発症には、宿主側の遺伝的要因が関与しているとされ (Aida *et al.*, 2013) 、その一つとして、細胞膜表面の主要組織適合性複合体 (MHC) 上に特定のアレルを保有する牛は、発症抵抗性あるいは感受性を示すと報告されている (Lewin *et al.*, 1988; Nagaoka *et al.*, 1999; Takeshima & Aida, 2006) 。

EBL の発症は主に 4 歳以上の成牛でみられ、眼球突出、削瘦、体表リンパ節の腫大等の症状を呈し、死に至ると報告されている (Rodriguez *et al.*, 2011) 。ただし、病態は個体によって大きく異なり、臨床症状を示さず、と畜後の検査ではじめて発見される場合も多いとも報告されている (小西, 2015) 。と畜検査で摘発された場合は、と体は全部廃棄処分とされ、農家に直接的な経済的損害を与えている。さらに、病態の進行に伴い、乳量の減少、繁殖成績の低下 (Erskine *et al.*, 2012; Nekouei *et al.*, 2016) を招くとされ、免疫機能が低下して他の疾病の誘因となる (Kabeya *et al.*, 2001) と考えられているため、潜在的な生産性阻害要因としても問題となっている。

このように EBL は、経済的に重要な家畜伝染病として位置付けられており、OIE-Listed diseases (OIE, 2006) や、日本の家畜伝染病予防法の監視伝染病に指定され、感染症としての対策が講じられている。すなわち、感染牛の全淘汰による清浄化、摘発淘汰、隔離、衛生管理による伝播リスクの軽減と感染拡大の防止である。実際、デンマークをはじめ EU 諸国では、国家的プロジェクトとして感染牛の定期的かつ綿密な検査が実施され、感染農場の飼養牛の全淘汰により清浄化を達成している (EFSA, 2015)。OIE による世界の EBL 発生状況 (図 序-3) では、2018 年 6 月現在、西欧、北欧、アフリカ、インドなどでは清浄化され、オーストラリア、ニュージーランドは限局的発生とされている。

一方、北米、南米、ロシア、日本を含む東アジアなどでは EBL の発生が報告されている。「EBL (地方病性牛白血病)の現状と対策」(図 序-4、農林水産省, 2017) によると、BLV 抗体陽性率は、乳用牛 40.9%、肉用牛 28.7%と、感染は全国に広がり、牛白血病の届出件数は、監視伝染病に指定された平成 10 年(1998 年)には年間 99 頭であったが、平成 28 年(2016 年)には 3,125 頭と著しく増加している。現在、本病に対する有効なワクチン、治療法はなく、農林水産省は、BLV の感染拡大防止対策として、「牛白血病に関する衛生対策ガイドライン」(農林水産省, 2015) を示し、関係者一体となって取り組んでいるが、牛白血病発生の増加には歯止めがかかっていない。

さて、私は、1980 年から 35 年間にわたり、神奈川県職員として、畜産に関する試験研究や、家畜衛生業務に従事してきた。その間、県内酪農家の牛群検定成績 (稲垣靖子ら, 1981) や、フィールドにおける家畜衛生に関する検査成

績をとりまとめ、日本の畜産学や畜産業の発展に役立てようと努めてきた（稲垣靖子, 2007）。牛白血病についても、定期的に管内の BLV 浸潤状況を調査し、その結果に基づいて地域の酪農家とともに、BLV 感染の拡大を防止するためさまざまな衛生対策を講じてきた（高山ら, 2010; 細字ら, 2013）。しかし、日常の衛生管理によって BLV 感染の拡大を防ぐことは容易ではなく、特に、感染牛の摘発淘汰は畜産農家への経済的負担が極めて大きいため、対応に苦慮してきた。また、実態として、EBL 発症牛のうち、生前、臨床症状を呈する例はきわめて稀で、大多数がと畜後の検査で発見されることから、農場段階における BLV 感染情報と、と畜検査における EBL 発症情報を関連づけ、感染から発症まで一貫した疫学調査が必要と考えた。

ところで、日本では、2004 年からは、BSE を契機として、EU をモデルとした「牛トレーサビリティ制度」が施行された（図 序-5）。本制度の導入に伴い、国内すべての牛に 10 桁の牛個体識別番号（ID）が付与され、出生からと畜までの異動歴がデータベース化された。現在では約 2,000 万頭分の情報が（独）家畜改良センターの「牛の個体識別情報検索サービス」により、Web で公開されている（家畜改良センター, 2017）。牛のトレーサビリティ制度は、「食の安全・安心」を確保するために制度化されたもので、EU やアメリカでは、その適用範囲は食肉生産に限定され、種畜改良のための血統登録制度とは一線を画している。これに対して、日本では、家畜改良センターが牛個体識別情報の管理運営を担っており、食肉生産だけでなく、国内の牛の個体に関するすべての情報、すなわち、行政機関の行う各種調査、家畜共済事業、家畜衛生検査やと畜検査における牛の

個体情報が、すべてこの ID で一元管理されており、家畜改良に関わるホルスタイン種乳牛の血統登録番号も、この ID に統合されている（元村聡, 2013）。これは、日本のトレーサビリティ制度の大きな特徴であり、この制度を利用すれば、各個体の ID を追跡することによって、農場段階における BLV 感染状況と、廃用後のと畜検査における EBL 発症の有無を関連づけることができ、出生からと畜まで一貫した牛白血病に関する疫学調査が可能となる。そこで、ID を利用して、牛白血病に関する疫学調査を行い、さらに、その結果をホルスタイン血統情報と関連づけて、統計遺伝学解析を行うことにより、「家畜育種学的手法を応用した、牛白血病の発症制御に関する遺伝的改良が可能である」と仮説を立てた。

現在、日本では年間 3,000 件を超える牛白血病が発生し、畜産業界に多大な損害を与えている。神奈川県においても、全国と同様、牛白血病の発生が年々増加している。そこで、今回、神奈川県をモデルとし、ID を活用することによって、神奈川県内の酪農場で飼養されているホルスタイン種乳牛の出生からと畜まで追跡し、農場段階における BLV 感染情報、と畜段階における EBL 発症情報、さらにホルスタイン血統情報を関連づけ、新たな牛白血病対策として、家畜育種学的手法の応用による「牛白血病の発症制御に関する遺伝的改良」の可能性を検証した。



**A EBL 発症牛（臨床症状）**

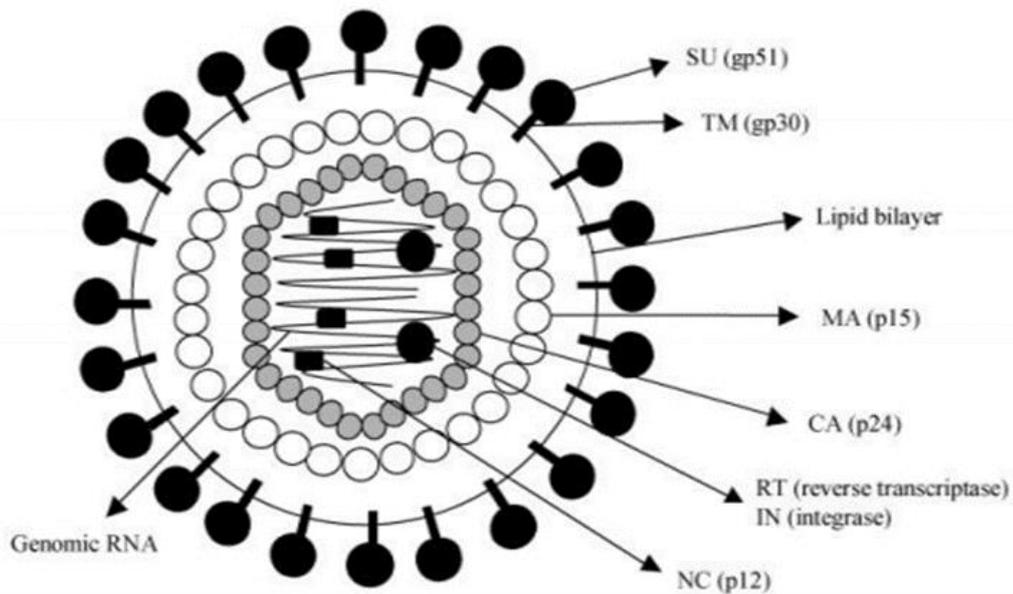


**B EBL 発症牛（腫瘍病変）**

#### 図 序-1 牛白血病とは

牛白血病は悪性リンパ腫を主徴とする疾病で、地方病性牛白血病（EBL）と散发性白血病に大別され、家畜伝染病予防法で監視伝染病に指定されている。

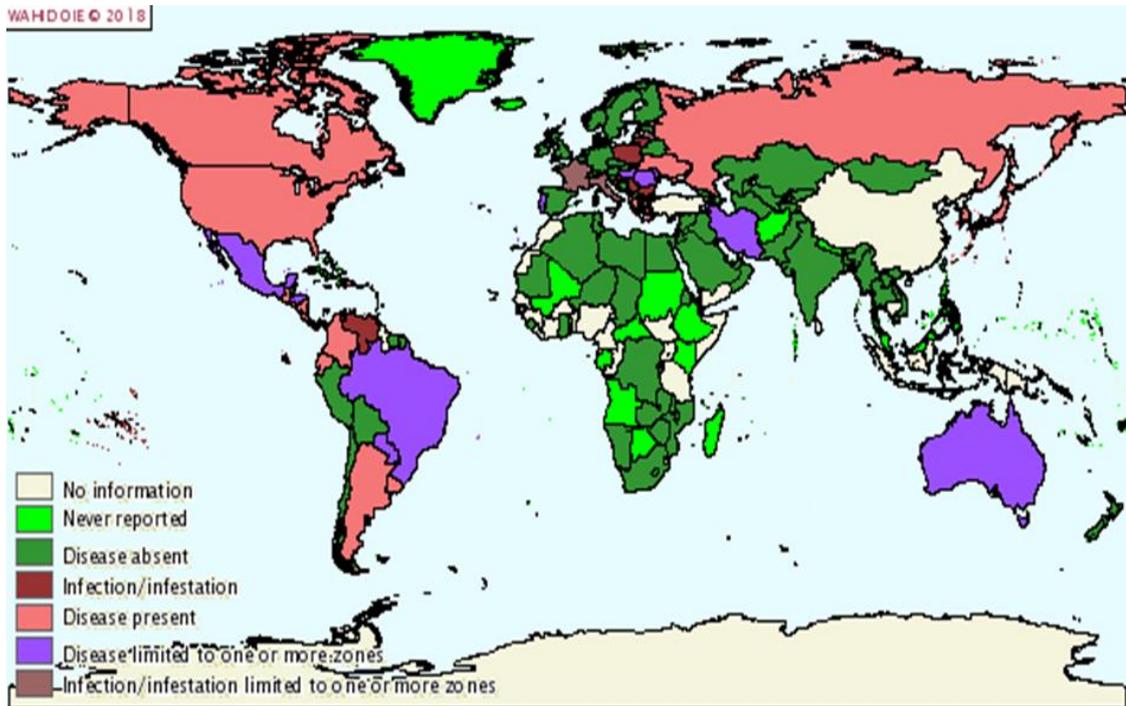
EBL は牛白血病ウイルス（BLV）に起因する感染症であり、主に成牛が発症し、眼球突出、体表リンパ節の腫大等を示す（A）。一方、臨床症状を示さずと畜後の検査で、内臓やリンパ節に特徴的な腫瘍病変が検出される場合も多い（B）。



Gillet *et al.* (2007) より引用

## 図 序-2 Bovine leukemia virus の粒子構造 (模式図)

BLV 粒子の直径は 100~120 nm で、レトロウイルスに特有のエンベロープを有し、正二十面体構造をもつ。粒子中には RNA が二量体として存在し、主要な構造タンパク質として calcium-binding proteins (p24)、nucleocapsid (p12) が存在する。カプシド内には、逆転写やインテグレーションに関与する酵素タンパク質 (RT and IN) をコードする遺伝子を有する。カプシドとエンベロープの間には、matrix protein MA (p15) があり、エンベロープ内には、a complex of viral proteins (gp51 SU and gp30 TM) が含まれている。

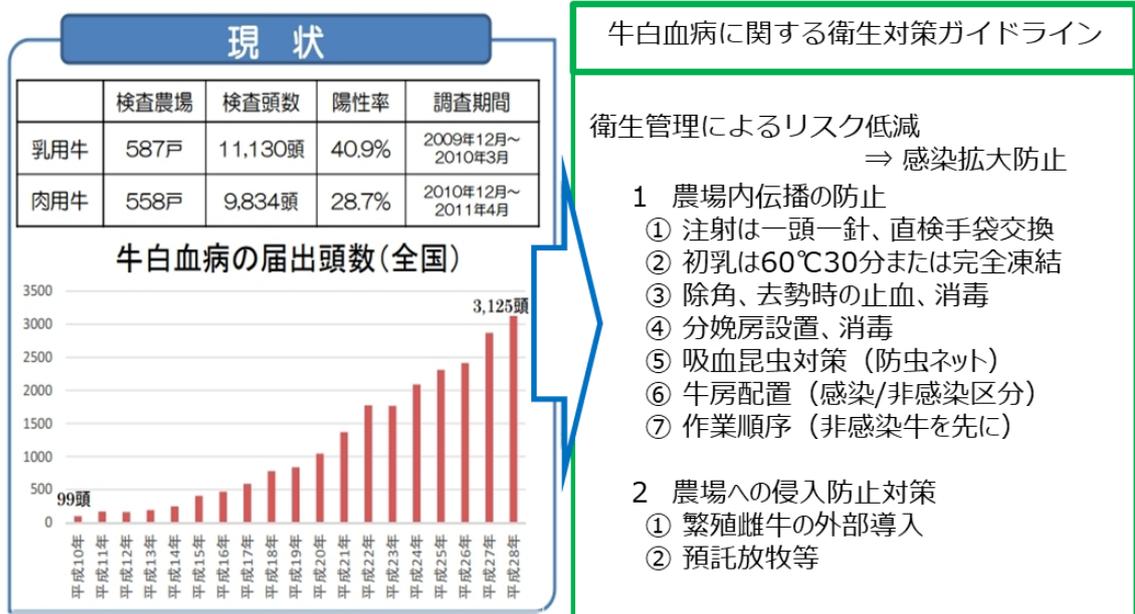


World Animal Health Information Database (WAHIS Interface) より引用

### 図 序-3 世界の EBL 発生状況

World Organization for Animal Health (OIE) は、EBL を社会的・経済的及び公衆衛生上重要で、家畜・畜産物の国際防疫にとって重要な疾病として指定し、その発生状況を公開している。2018 年 6 月現在、西欧、北欧、アフリカ、インドなどは清浄国とされ(■)、オーストラリア、ニュージーランドは限局的発生(■)である。一方、東欧では BLV 感染が (■)、北米、南米、ロシア、日本を含む東アジアなどでは EBL の発生が報告されている (■)。

## EBL (地方病性牛白血病) の現状と対策



農林水産省（2017）より引用改変

### 図 序-4 日本の牛白血病の現状と対策

BLV 抗体陽性率は、2009～2011 年の全国調査で乳用牛 40.9%、肉用牛 28.7% であった。牛白血病の届出頭数は、監視伝染病に指定された平成 10 年（1998）は 99 頭だったが、年々増加し平成 28 年（2016）には 3,125 頭となった。

農林水産省は「牛白血病に関する衛生対策ガイドライン」（2015）を示し、適正な衛生管理により感染リスクを低減するとして、関係者一体となって BLV 感染拡大の防止対策に取り組んでいる。



<http://www.meat-c.co.jp/safety/traceability/>より引用

図 序-5 日本の牛トレーサビリティ制度について

日本では、2004年からBSEを契機として食の安全・安心を確保するため、EUをモデルに「牛トレーサビリティ制度」が施行された。本制度導入に伴い、国内すべての牛に10桁の牛個体識別番号(ID)が付与され、出生からと畜までの異動歴がデータベース化されて(独)家畜改良センターの「牛の個体識別情報検索サービス」で公開されている。

# 第一章

## 牛個体識別番号を利用した 牛白血病発症に関する疫学的解析

## 第一章 牛個体識別番号を利用した牛白血病発症に関する疫学的解析

牛白血病は、家畜伝染病予防法の監視伝染病に指定されており、これまでBLV感染については全国的な浸潤状況調査（Murakami *et al.*, 2013）や、感染リスクに関する詳細な疫学的調査が実施され（Kobayashi *et al.*, 2014）、現在、関係者一体となって「牛白血病に関する衛生対策ガイドライン」（農林水産省, 2015）に基づく感染拡大防止対策が講じられている。しかし、EBL発症に関しては、病態が多様で、臨床症状を示さず、と畜後の検査で発見されることも多い（小西, 2015）ことから、野外における感染から発症にいたる牛白血病の実態については不明な点が多かった（図 1-1）。

一方、日本では2004年にトレーサビリティ制度が施行され、すべての牛に個体識別番号（ID）が付与されたことから、出生からと畜までの異動歴が追跡可能となった。さらに、日本のトレーサビリティ制度の特徴として、家畜検査やと畜検査、ホルスタインの血統情報など、すべての牛の個体情報がIDに統合され、一元的に管理されている。そこで、神奈川県において、このIDを利用して、牛白血病に関する牛個体情報を統合し、野外における感染から発症に至る牛白血病の実態を明らかにするため、疫学的解析を行った（図 1-2）。

## 材料および方法

### 1 牛白血病関連情報の収集

#### (1) 牛白血病の発生状況

全国および神奈川県牛白血病発生状況は、農林水産省のホームページ（農林水産省, 2017）から情報を入手した。「監視伝染病の発生状況」の「監視伝染病発生年報」および「監視伝染病発生状況の累年比較」における家畜伝染病予防法に基づく「牛白血病の届出件数」を、それぞれの発生件数とした。

神奈川県食肉衛生検査所における牛白血病検出状況については、「平成 16 年度～平成 28 年度 神奈川県食肉衛生検査所事業概要」（神奈川県食肉衛生検査所, 2004 - 2017）の「精密検査事業 精密検査業務 病理学的検査業務 牛の腫瘍検出状況」における「牛白血病」と検出件数を年次別に集計した。

#### (2) EBL 発症牛の特定

2005 年 4 月から 2015 年 3 月までに、神奈川県食肉衛生検査所が検出した牛白血病牛 294 頭について、各牛の ID や精密検査成績など、牛白血病に関連する牛個体情報について提供を受けた。その後、2017 年 3 月まで牛白血病牛が検出された場合は、随時、牛個体情報の提供を受けた。なお、本研究において入手した牛の個体情報は、それぞれの機関の情報提供制度に基づき提供を受けたもので、飼養者名等の個人情報を含んでいない。牛白血病牛の精密検査成績をもとに EBL 発症牛を特定した。ここでは、剖検所見で複数の臓器あるいはリンパ節に腫瘍を認め、ウイルス学的検査で BLV 抗体検査陽性、病理組織学的検査で病変部に特

微的なリンパ球様腫瘍細胞の増殖を認め、牛白血病と診断されたものを EBL と分類した。BLV 抗体検査は「牛白血病抗体アッセイキット」（受身赤血球凝集反応、日生研株式会社、東京）を用い、凝集価 16 倍以上を陽性とした。病理組織学的検査は、凍結切片および 10%中性緩衝ホルマリン固定パラフィン切片を作成した後、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行い、原則として、腫瘍病変部に複数の核小体を持ち、核形が不整の中型から大型の特徴的なリンパ球様細胞のびまん性増殖が認められたものを EBL と分類した。なお、必要に応じて免疫染色を実施し、T 細胞由来腫瘍細胞が増殖していたものは胸腺型として SBL に分類した。

### （3）BLV 感染牛の特定

2005 年 4 月から 2015 年 12 月に神奈川県湘南家畜保健衛生所で BLV 抗体検査を実施した延 140 戸、延 4,114 頭について、各牛の ID、農家コード、BLV 抗体検査成績など、牛白血病に関する牛個体情報の提供をうけた。検査対象牛は、高山ら（2010）の方法により、湘南地域の酪農場で飼育されていた 6 ヶ月以上の健康な乳用牛および乳用育成牛から無作為に抽出した。BLV 抗体検査は、2014 年度までは「牛白血病抗体アッセイキット」（受身赤血球凝集反応、日生研株式会社、東京）により実施し、凝集価 16 倍以上を陽性とした。2015 年度以降は「牛白血病エライザキット」（JNC 株式会社、東京）を用い、S/P 値（指示陽性血清の吸光度に対する被検血清の吸光度の比）0.3 以上を陽性とし、BLV 抗体陽性牛を BLV 感染牛とした。

#### (4) 血液中 BLV-プロウイルス量の測定

血液中 BLV プロウイルス量については、東京農業大学家畜衛生学研究室 小林朋子博士より情報提供を受けた。血液中の BLV プロウイルス量の測定は、湘南家畜保健衛生所が BLV 抗体検査を実施した牛のうち、2015 年に検査した A 市 27 戸 866 頭中 BLV 抗体陽性の 405 頭について実施した。

BLV プロウイルス量測定用血液は、牛尾根部から EDTA 加真空採血管で採取し、末梢血単核細胞 (Peripheral Blood Mononuclear Cells; PBMC) 中の Genomic DNA を、DNA 抽出用キット (DNeasy Blood & Tissue Kit: Quiagen, Hiden, Germany) を用いて抽出した。BLV プロウイルス量は、CoCoMo-BLV Preimer/Probe (RIKEN GENESIS Co., Ltd., Kanagawa, Japan) を使用して、Jimba ら (2010) の方法に準じて、TaqMan Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用い、定量 PCR 法により測定した (Jimba *et al.*, 2010; Takeshima *et al.*, 2015)。血液中 BLV プロウイルス量は、PBMC10 万細胞中の BLV コピー数として表した。

#### (5) MHC 上の特定アレルの型別

MHC 上の特定アレル (BoLA-DRB3 Allele) の型別については、東京農業大学家畜衛生学研究室 小林朋子博士より情報提供をうけた。特定アレルの型別は、血液中 BLV プロウイルス量を測定した感染牛の血液サンプルのうち 78 頭について、Takeshima & Aida の方法 (2006) に準じて実施した。

## 2 牛個体識別番号を利用した牛白血病関連情報の統合

### (1) 供試牛と牛個体識別番号の特定

以上の牛白血病に関する牛個体情報を、ID を利用して統合し、疫学的解析を行った。本研究においては、血統情報および飼養履歴が明らかな血統登録済みのホルスタイン種乳牛の ID を利用した。ホルスタイン血統登録牛の血縁情報と ID は(一社)日本ホルスタイン登録協会から提供を受けた。2004～2016年度内に、最終所有者が神奈川県内酪農家であった牛を本牛として、3代遡った血縁データを手し、(独)家畜改良センターの「牛個体識別情報サービス」を利用して異動歴を検索し、2006年4月～2015年3月に神奈川県内の酪農場235戸で飼養履歴のあったホルスタイン種乳牛10,138頭を特定し、K-Holとした。

### (2) K-Hol における EBL 発症牛と非発症牛の特定

K-Hol の異動歴を検索し、2006年4月～2015年12月に地域の食肉センターでと畜され、神奈川県食肉衛生検査所のと畜検査をうけた牛6,763頭を特定し、「と畜検査成績」および「牛白血病牛の精密検査成績」と照合して、EBL発症牛と非発症牛に分類した。なお、家畜伝染病予防法に基づく「牛白血病の届出情報」と照合した結果、K-Holのうち牛白血病の病畜として届出のあった牛はすべて、神奈川県食肉衛生検査所のと畜検査で検出された牛であった。

全国のホルスタイン種雌牛のと畜情報については、(独)家畜改良センター「牛個体識別全国データベース」「全国及び都道府県別の牛の種別・性別のと畜頭数」のデータを利用し、全国で2006～2015年にと畜されたホルスタイン種雌牛1,921,058頭の平均年齢を計算した。

### (3) K-Hol における BLV 感染牛と非感染牛の特定

K-Hol の ID を利用して、異動歴と BLV 抗体検査成績と照合し、検査時年齢と BLV 抗体の有無を特定した。K-Hol のうち 98 戸 1,940 頭が BLV 抗体検査をうけており、抗体陽性の牛を BLV 感染牛、抗体陰性の牛を非感染牛とした。なお、複数回検査していた牛については、最終回の検査をその牛の検査成績とした。

### (4) 感染牛の血液中 BLV プロウイルス量と MHC 上の特定アレルの型別

K-Hol のうち、2015 年に BLV 抗体検査を実施し、抗体陽性であった 196 頭について、血液中 BLV プロウイルスを測定した。このうち 63 頭について MHC 上の特定アレルの型別を行った。

## 3 統計解析

データの集計については、表計算ソフト「Microsoft Excel」(Microsoft Corporation, USA) を用いた。統計解析は、IBM SPSS 統計解析ソフト Ver.23 (IBM Corporation, USA) を用いた。全国と神奈川県に関連性については、ピアソン積率相関係数により検定した。発症や感染の有無による平均廃用年齢の差の検定には Student-t 検定を用い、農場間移動や農場内の発症牛の有無による BLV 感染率の差については、 $\chi^2$  二乗検定で解析した。

## 結 果

### 1 神奈川県における牛白血病発生状況

#### (1) 牛白血病届出件数の推移

神奈川県での牛白血病届出件数は、全国と同様年々増加し(農林水産省, 2017)、両者は極めて高い相関を示した ( $r=0.96$ 、 $P<0.01$ 、図 1-3)。このうち、神奈川県食肉衛生検査所のと畜検査で検出されたもの(神奈川県食肉衛生検査所, 2006-2017)が 85%を占め、農場段階で臨床症状を示し、牛白血病と診断された事例は少なかった。

#### (2) と畜検査における牛白血病検出状況

神奈川県食肉衛生検査所では、2006～2015 年度の 10 年間に、67,182 頭のと畜検査を実施し、牛白血病の検出頭数は 294 頭で、牛の全部廃棄理由のトップであった。牛白血病牛 294 頭の精密検査成績から、EBL が 289 頭 (98.3%)、SBL が 5 頭 (1.7%) と分類された(表 1-1)。品種別では、乳用牛 28,502 頭中 EBL が 256 頭、SBL が 3 頭で、すべてホルスタイン種であり、肉用牛 38,497 頭中、EBL は 33 頭、SBL が 2 頭で、EBL はすべて黒毛和種であった。なお、子牛は 183 頭、と畜されていたが、発症牛はゼロであった。

EBL 発症牛の腫瘍病変は、心臓、内臓リンパ節、第四胃等に高率に認められた。EBL 発症牛の受身赤血球凝集反応による BLV 抗体価は平均 256 倍と高かったが、検査時年齢、腫瘍病変の数や重篤度と、BLV 抗体価との関連性は認められなかった。

## 2 牛個体識別番号を利用した牛白血病に関する疫学的解析結果

### (1) K-Hol における EBL 発症率と廃用年齢との関連性

K-Hol 10,138 頭の異動歴を検索した結果、2006 年 4 月～2015 年 12 月に 6,763 頭が地域の食肉センターに出荷され、神奈川県食肉衛生検査所のと畜検査をうけていた。他は生存中か、他の食肉センターへ出荷、あるいは農場内で死亡していた。このうち 70 頭が牛白血病と診断され、その精密検査成績からすべて EBL と分類された。残りの 6,693 頭に牛白血病を疑う所見は認められなかった。なお、K-Hol のうち牛白血病として届出があった牛は、すべて神奈川県食肉衛生検査所の検査で検出されたもので、農場段階で牛白血病と診断された牛はいなかった。このことから、K-Hol における EBL 発症率は 1.0%と算定され、99%のホルスタイン種乳牛は、廃用段階において EBL を発症していなかった。

廃用年齢と EBL 発症との関連性では、EBL 発症牛の平均廃用年齢  $6.1 \pm 1.8$  (mean  $\pm$  SD) 歳、非発症牛  $5.7 \pm 2.5$  歳で、両者に有意の差はなく、全国のホルスタイン種雌牛 1,921,058 頭の平均と畜年齢  $5.9 \pm 2.5$  歳とも差は認められなかった (図 1-4)。また、廃用年齢別 EBL 発症率はほぼ一定で、年齢による有意差はなかった。

### (2) K-Hol における BLV 感染率と年齢との関連性

K-Hol の BLV 感染率は 39.9%、農場陽性率は 86.7%であった。検査時年齢別 BLV 感染率 (図 1-5) は、3 歳未満の育成牛と 3 歳以上の成牛間に差 ( $P < 0.01$ ) があつたが、育成牛間、あるいは成牛間で年齢による差はなく、6 歳以上でも 40%が BLV 抗体陰性であった。また、BLV 感染と廃用年齢との関連性では、BLV

感染牛の平均廃用年齢  $6.2 \pm 1.9$  歳、非感染牛  $5.9 \pm 1.8$  歳で、両者に差はなかった。

### (3) 感染牛の血液中 BLV プロウイルス量と年齢との関連性

感染牛における血液中の BLV プロウイルス量と年齢との関連性は認められなかった (図 1-6 A)。感染牛の血液中 BLV プロウイルス量は、PBMC 10 万細胞中 0 ~ 374,025 コピーに分布し、Median は 50,400 コピーで、累積度数分布曲線は 10 万コピー付近でプラトーを示した。閾値は変曲点から 126,000 コピーと推定され、検査牛の 94%は閾値以下であった (図 1-6 B)。

その後、検査した牛のうち 65 頭が廃用され、3 頭がと畜検査で EBL と診断された。EBL 発症牛の血液中 BLV プロウイルス量は、Median 88,909 コピーと比較的高かったが、同程度の多くの牛が非発症であり、血液中 BLV プロウイルス量と EBL 発症との関連性は認められなかった。

また、MHC 上の特定アレルの型別の結果、EBL 発症抵抗性とされる特定アレル (0902 ; 14011) 保有牛の血液中プロウイルス量は他の型より低い傾向を示したが、これらの型の特定アレルの保有率は 11.1%と低かった (表 1-2)。

### (4) 飼養履歴と EBL 発症率、BLV 感染率との関連性

BLV 抗体検査結果と飼養履歴を関連づけた結果、清浄農場の飼養牛 (未感染牛) が 21%、感染農場で飼養されていた牛のうち、BLV 抗体陰性牛 (非感染牛) が 39%。BLV 抗体陽性牛 (感染牛) が 40%で、うち血液中プロウイルス量の低い牛 (LPV) が 20%、比較的高い牛 (HPV) が 20%であった (図 1-7)。また、BLV 抗体検査結果と異動歴を関連づけた結果、他農場からの導入や、育成牛預

託など複数の農場間を移動した牛（移動あり）の方が、出生からと畜まで同一農場で飼養されていた牛（移動なし）より、BLV 感染率が高かった（表 1-3、 $P < 0.01$ ）。さらに、飼養農場における発症牛の有無と、BLV 感染率の関連性を調べたところ、過去 10 年間に発症牛が検出された農場（発症牛あり）で飼養されていた牛の方が、BLV 感染牛のみで発症牛のいなかった農場（発症牛なし）で飼養されていた牛より、BLV 感染率が高かった（表 1-4、 $P < 0.01$ ）。

## 考 察

今回、ホルスタイン種乳牛約1万頭を10年間、IDを利用して追跡調査した結果、EBL発症牛はすべてと畜後の検査で発見されたものであり、その発症率は1%と低かった。さらに、農場段階における疫学調査の結果、成牛ではBLV感染率、血液中BLVプロウイルス量、EBL発症率に加齢による差は認められず、感染農場において長期間BLVに曝露されていても感染しない非感染牛が存在していることが明らかとなった。この成績は、神奈川県という一地域のものであるが、牛白血病発生の年次推移（農林水産省, 2017）、農場および個体のBLV抗体陽性率（Murakami *et al.*, 2013）、ホルスタイン種乳牛の廃用年齢（家畜改良センター, 2017）は、いずれも全国における報告と相関性が高く（ $P < 0.01$ ）、国内だけでなく、アメリカ（NAHMS, 2008; White & Moore, 2009）や、カナダ（Nekouei *et al.*, 2016）のBLV感染率やEBL発症率に関する調査報告とも同様であった。以上から、今回の疫学調査が日本のみならず、北米のホルスタイン種乳牛の実態を反映し、十分な信頼性をもっていることが示唆された。

これまで、フィールドにおけるEBL発症の実態は不明な点が多く、BLV感染牛のうち、どのくらいがEBLを発症するのかについても、0.1~10%（OIE, 2012）、1%以下（Motton & Beuhring, 2003）、5~10%（Rhodes *et al.*, 2003）と報告によって異なり、約100倍の開きがあった。今回、10年間にわたり1万頭のホルスタイン種乳牛を出生からと畜まで追跡することにより、はじめてEBL発症率が1%と極めて低く、99%の牛が生涯EBLを発症しないことが明らかとなった。

EBL の発症は主に 4 歳以上の成牛でみられ、眼球突出、削瘦、体表リンパ節の腫大等の症状を呈し、死に至るといわれていたが (Rodriguez *et al.*, 2011)、その病態は多様で個体によっては臨床症状を示さない例もあり (OIE, 2012)、最近では、と畜後の検査ではじめて発見される事例が多い (小西, 2015) と報告されている。神奈川県における牛白血病届出件数の 85% が神奈川県食肉衛生検査所のと畜検査で検出されたもので、腫瘍病変の主な検出部位は、体表リンパ節ではなく、心臓、内臓リンパ節等であった。また、今回、1 万頭のホルスタイン種乳牛を 10 年間追跡調査した結果、EBL 発症牛は、すべて農場段階では臨床症状を示さず、と畜後の検査で検出されていた。さらに、発症牛と非発症牛の生前の BLV 抗体価や血液中 BLV プロウイルス量に差がなかったことから、農場段階において、臨床症状や血液性状から EBL と診断できる事例は極めて稀であることがわかった。これまで BLV 感染や EBL 発症が廃用を早め、生産性を低下させる (Erskine *et al.*, 2012; Nekouei *et al.*, 2016) という報告が多かったが、今回の成績では、BLV 感染や EBL 発症の有無で廃用年齢に差はなかった。これは、BLV 感染牛や EBL 発症牛が臨床症状を示さず、BLV 感染率、血液中 BLV プロウイルス量、EBL 発症率に年齢による差はないという事実と符合した。

これまで一時点の調査から、加齢とともに BLV 感染率が上昇 (Murakami *et al.*, 2013) すると考えられていた。しかしながら、今回の調査では感染率は 2 歳から 3 歳にかけて大幅に上昇するが、2 歳までの牛群や 3 歳以上の牛群では加齢とともに BLV 感染率が上昇することはなかった。わが国のホルスタイン種乳牛の平均初産月齢は 25 カ月と報告されている (家畜改良事業団, 2016)。2 歳から 3 歳

までの間に大多数の乳牛が初めて分娩することを考慮すると、この間の BLV 感染率の上昇には、妊娠や分娩による免疫力の低下、出血による感染リスクの増大等が影響している可能性が考えられた。Merlini ら (2016) も、酪農場においては、初産までに BLV 感染が成立すると報告しており、今回の結果と一致した。また、「農場間移動の有無」では、他農場からの導入牛や、預託歴のある牛など、農場間移動歴のある牛の BLV 感染率は、生涯同一農場に飼養されていた牛より高かった。Kobayashi ら (2015) は、全国的な感染リスク要因の調査から「牛の外部導入」、「育成牛の預託」が感染リスク要因の一つとなると報告しており、今回の結果と一致した。ただし、K-Hol においては 3 歳以上の年齢別感染率に差はなく、6 歳以上でも 40% の牛が抗体陰性であった。87% の農場に BLV 感染が浸潤していることを考え合わせると、これらの高年齢の抗体陰性牛は長年 BLV に曝露されていても感染しなかった牛（非感染牛）であり、BLV 感染を阻止する自然抵抗性を有していると考えられた。

これまで、BLV 感染牛では、病態の進行に伴い血液中 BLV プロウイルス量が増加すると考えられていた (Jimba *et al.*, 2010)。しかし、今回の調査では、年齢による血液中 BLV プロウイルス量の増加は認められず、大多数の感染牛では閾値以下に制御されていた。これらの結果は、BLV 感染牛が長期間無症状で推移する事実や、無症状感染牛においては血液中 BLV プロウイルス量は低いというこれまでの報告 (Kettmann *et al.*, 1982; Gillet *et al.*, 2007; Aida *et al.*, 2013; Merlini *et al.*, 2016) と一致した。このことから、無症状感染牛では何らかの遺伝子 (群) が BLV プロウイルス量を低く制御している可能性が考えられた。

最近、血液中 BLV プロウイルス量の低い牛は感染源となるリスクが低いと報告されている (Mekata *et al.*, 2015; Juliarena *et al.*, 2016)。K-Hol においても、感染牛の半数は血液中 BLV プロウイルス量が 5 万コピー以下と低く (LPV)、これらの牛の農場内における感染リスクは低いものと考えられた。なお、生前の血液中 BLV プロウイルス量に関わらず、ほとんどの牛が廃用後のと畜検査で非発症と確認されており、BLV プロウイルス量と EBL 発症に直接的な関連性は認められなかった。ただし、今回、EBL 発症牛の生前の BLV プロウイルス量は比較的高く、「発症牛の検出された農場」における BLV 感染率は、「発症牛のいない農場」より高かった。このことは、Somura ら (2015) の、と畜検査における EBL 発症牛の血液や腫瘍病変部には、多くの BLV プロウイルスが検出されるという報告や、Kobayashi ら (2014) の、EBL 発症牛は農場内感染源としてリスクが高いという報告と一致し、EBL 発症牛は農場内の感染リスクを高めることが示唆された。

これまで、牛白血病の発症と制御に関する遺伝的因子としては、MHC 上の特定のアレルが関与しているとの報告があり (Lewin *et al.*, 1988; Nagaoka *et al.*, 1999; Takeshima & Aida, 2006)、今回、K-Hol においても抵抗性アレルの保有牛では BLV プロウイルス量は低い傾向を示した。しかし、抵抗性アレルの保有率は、わずか 11%にすぎず、99%のホルスタイン種乳牛が非発症であったことから、牛白血病発症の制御には MHC 上の特定アレルだけではなく、他の複数の遺伝子 (群) が関与していることが示唆された。

ところで、ヒトのエイズ研究では、広範な疫学調査から「HIV 曝露非感染者」、  
「長期未発症者」などの自然抵抗性を示すグループが特定され、それぞれ遺伝的  
因子（群）が関与していることが報告されている（宮澤ら, 2008）。今回、認め  
られた「非感染牛」と「感染非発症牛」は、まさに、これらのヒトのエイズにお  
ける自然抵抗性グループに相当する。このことから、牛白血病においても、ウイ  
ルス感染、感染ウイルスの増殖、腫瘍化（発症）の各段階で、それぞれ、宿主側  
の何らかの遺伝子（群）が働き、発症を制御しているものと考えられた。

## 小 括

ホルスタイン種乳牛 1 万頭の ID を利用して、過去 10 年間、出生からと畜まで追跡し、牛白血病に関連する個体情報を統合し、疫学的解析を行った。その結果、EBL はすべてと畜後の検査で発見され、その発症率は 1% と低く、99% のホルスタイン種乳牛は生涯 EBL を発症していなかった。

また、BLV 感染、EBL 発症の有無で廃用年齢に差は認められなかった。年齢との関連性では、2 歳未満の育成牛と 3 歳以上の成牛で BLV 感染率に差があるが、成牛間では BLV 感染率、血液中 BLV プロウイルス量、EBL 発症率に年齢による差は認められなかった。感染農場において長期間飼養され、BLV に曝露されていても感染しない牛（非感染牛）、感染しても BLV プロウイルス量が低い牛（LPV 牛）、BLV プロウイルス量が比較的高くても無症状の牛（HPV）の牛が存在することが明らかとなった。

これらの知見は、感染から発症に関する牛白血病情報を ID によって関連付け、総合的に解析することで、はじめて明らかとなったものであり、ID による疫学調査の有用性が示された。

と畜検査における畜種別牛白血病の検出状況

と畜検査	畜種	計	乳用牛	肉用牛	子牛	
		と畜頭数	67,182	28,502	38,497	183
	牛白血病頭数	294	259	35	0	
内訳	品種	計	ホルスタイン	黒毛和種	交雑種	子牛
	牛白血病頭数	294	259	34	1	0
	EBL	289	256	33	0	0
	SBL	5	3	1	1	0

表 1-1 神奈川県食肉衛生検査所における牛白血病の検出状況

平成 18 年～27 年度の 10 年間に、神奈川県食肉衛生検査所によると畜検査で牛白血病と診断された牛 294 頭について、精密検査成績から地方病性牛白血病（EBL）と散発性白血病（SBL）に分類した。ウイルス学的検査で BLV 抗体陽性、内臓検査で複数の臓器、リンパ節に特徴的な腫瘍を認め。病変部の病理組織学的検査でリンパ球様腫瘍細胞のびまん性浸潤を認めたものを EBL とした。

BoLA-DRB3 Allele

Type	n	%	Proviral load in PBMC	
			Median	Max
0902	4	3.2%	5	1815
14011	10	7.9%	19983	87124
0101	26	20.6%	56089	143226
0601	1	0.8%		50890
1001	8	6.3%	81064	88909
1101	18	14.3%	29916	90774
1401	1	0.8%		24001
1701	1	0.8%		24
1801	1	0.8%		82
2703	7	5.6%	51167	68539
1501	33	26.2%	61296	143226
1201	10	7.9%	81675	117272
Total	63	100.0%	50212	143226

表 1-2 K-Hol の MHC 上の特定アレルの型別結果

K-Hol のうち 2015 年に BLV 抗体検査を実施し抗体陽性であった 63 頭について BoLA-DRB3 Allele の型別および末梢血単核細胞中の BLV プロウイルス量を測定した。EBL 発症抵抗性とされる特定の BoLA アレル (0902; 14011) を保有している牛 (■) の血液中 BLV プロウイルス量は比較的低かったが、その保有率は 11% と低かった。

農場間移動の有無とBLV感染率

農場間移動	BLV抗体検査結果			
	計	陰性	陽性	感染率
移動なし	717	469	248	34.6%
移動あり	1,223	697	526	43.0% **
計	1,940	1,166	774	39.9%

\*\* 移動の有無で有意差あり ( $P < 0.01$ )

表 1-3 農場間移動の有無と BLV 感染率

牛個体識別番号 (ID) を利用して K-Hol の異動歴を検索し、農場間移動の有無と BLV 抗体検査成績を関連づけた。その結果、他農場からの導入や預託など農場間移動歴のあった牛 (移動あり) の BLV 感染率は、出生からと畜まで同一農場で飼養されていた牛 (移動なし) より高かった ( $P < 0.01$ )。

農場内発症牛の有無とBLV感染率

農場	戸数	BLV抗体検査結果			
		検査頭数	陰性	陽性	感染率
清浄	12	93	93	0	0.0%
発症牛なし	46	729	454	275	37.7%
発症牛あり	40	1,118	619	499	44.6% **
計	98	1,940	1,166	774	39.9%

\*\* 発症牛の有無で有意差あり ( $P < 0.01$ )

表 1-4 農場内発症牛の有無と BLV 感染率

K-Hol の異動歴から飼養農場における発症牛の有無と BLV 抗体検査成績を関連づけた。調査した 10 年間に於いて発症牛が検出された農場（発症牛あり）で飼養されていた牛の BLV 感染率は、感染牛だけで発症牛が検出されなかった農場（発症牛なし）で飼養されていた牛より高かった ( $P < 0.01$ )

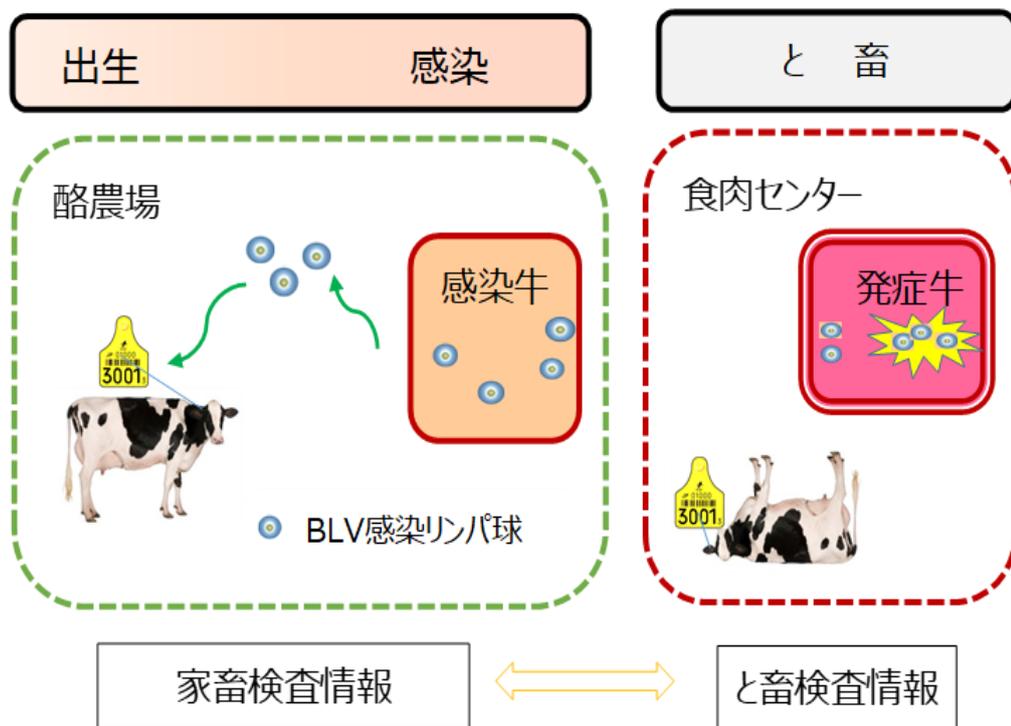


図 1-1 牛白血病の感染/発症の実態

BLV 感染は全国に広がっているが、ほとんどの感染牛は臨床症状を示さず、と畜後の検査で牛白血病と診断される例が多く、農場段階の BLV 感染情報とと畜段階の EBL 発症情報を関連づけることが困難であった。トレーサビリティ制度の導入により、すべての牛に牛個体識別番号 (ID) が付与され、出生からと畜までの異動歴がデータベース化された。さらに日本では家畜検査情報、と畜検査情報など各牛の個体情報が ID で一元管理され、感染から発症まで一貫した疫学調査が可能となった。

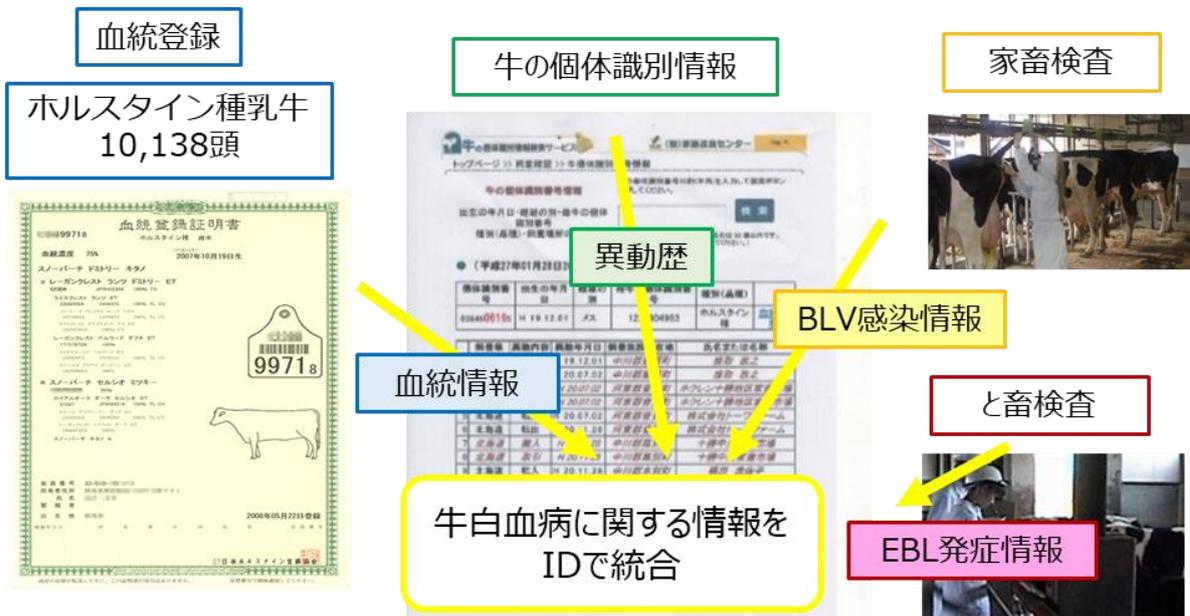


図 1-2 牛個体識別番号 (ID) を利用した疫学調査の方法

2005年から2015年までに神奈川県内235戸の酪農場で飼養され、血統登録されたホルスタイン種乳牛10,138頭(K-Hol)のIDを用いて、(独)家畜改良センターの「牛の個体識別情報検索サービス」で出生からと畜までの異動歴を検索し、各牛の「家畜検査情報」、「と畜検査情報」、「血統情報」について、IDを鍵に統合した。

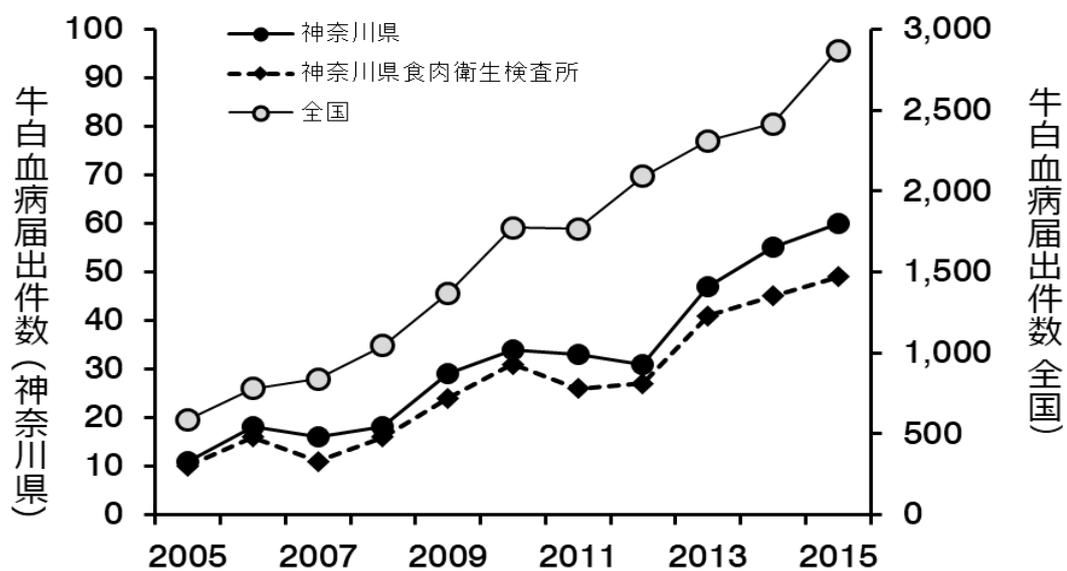


図 1-3 神奈川県における牛白血病届出件数の年次推移

家畜伝染病予防法に基づく牛白血病届出件数(神奈川県●、全国●)は、年々増加し、両者の増加割合は高い相関を示した ( $r=0.96$ 、 $P<0.01$ )。また、神奈川県における牛白血病届出件数のうち神奈川県食肉衛生検査所のと畜検査で検出されたもの(◆)が85%を占めていた。

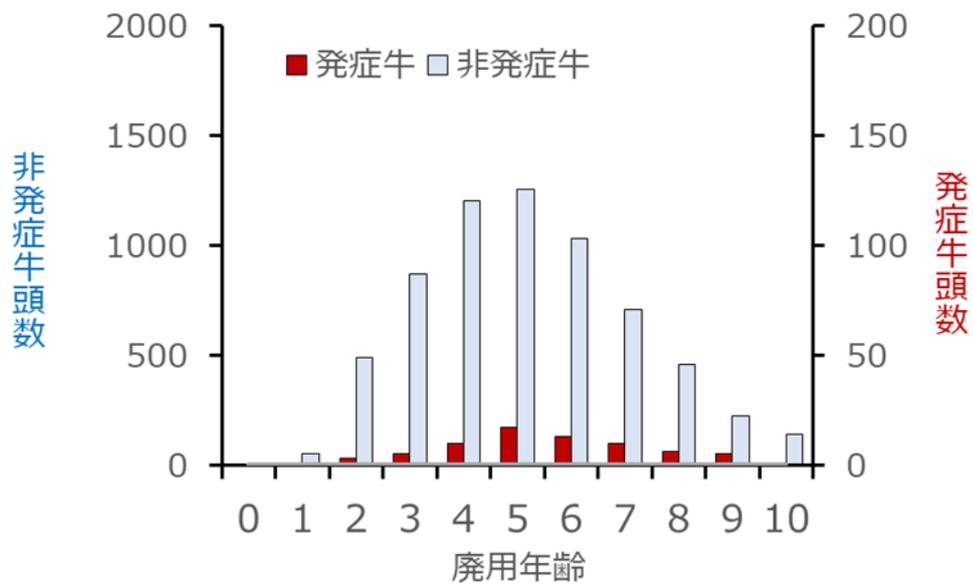


図 1-4 EBL 発症と年齢との関連性

ホルスタイン種乳牛 10,138 頭 (K-Hol) のうち、廃用後 6,763 頭が神奈川県食肉衛生検査所のと畜検査をうけており。精密検査の結果から 70 頭が EBL、6,693 頭は非発症と分類された。EBL 発症率は 1%で、EBL 発症牛 (■) と非発症牛 (■) の廃用年齢分布に差は認められなかった。

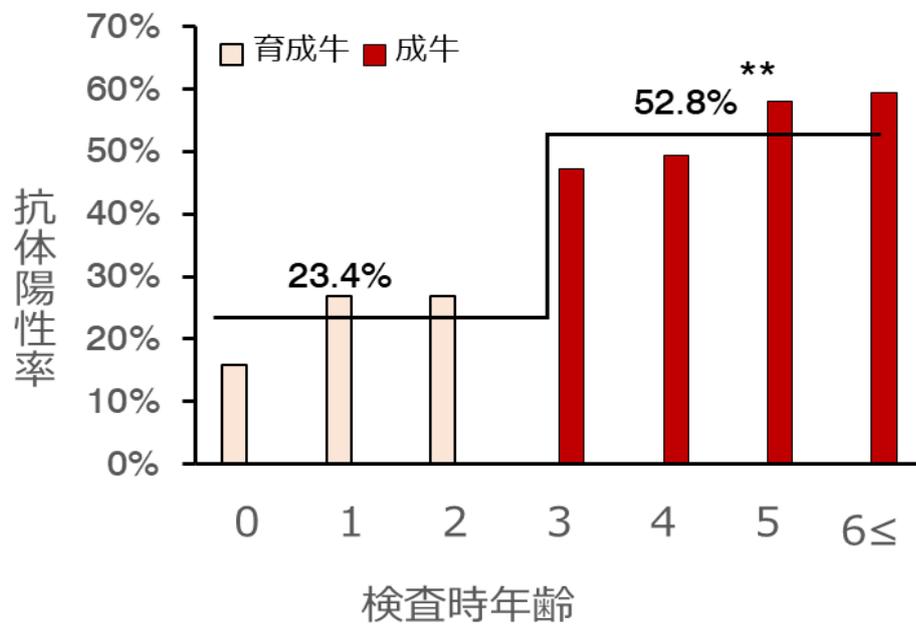


図 1-5 BLV 感染率と年齢との関連性

K-Hol の ID により、BLV 抗体検査成績と検査時年齢を関連付けたところ、BLV 感染率は 3 歳未満の育成牛と 3 歳以上の成牛で差があった ( $P < 0.01$ )。

一方、育成牛間、成牛間では BLV 感染率に年齢による差はなく、6 歳以上でも 40%の牛は BLV 抗体陰性であった。

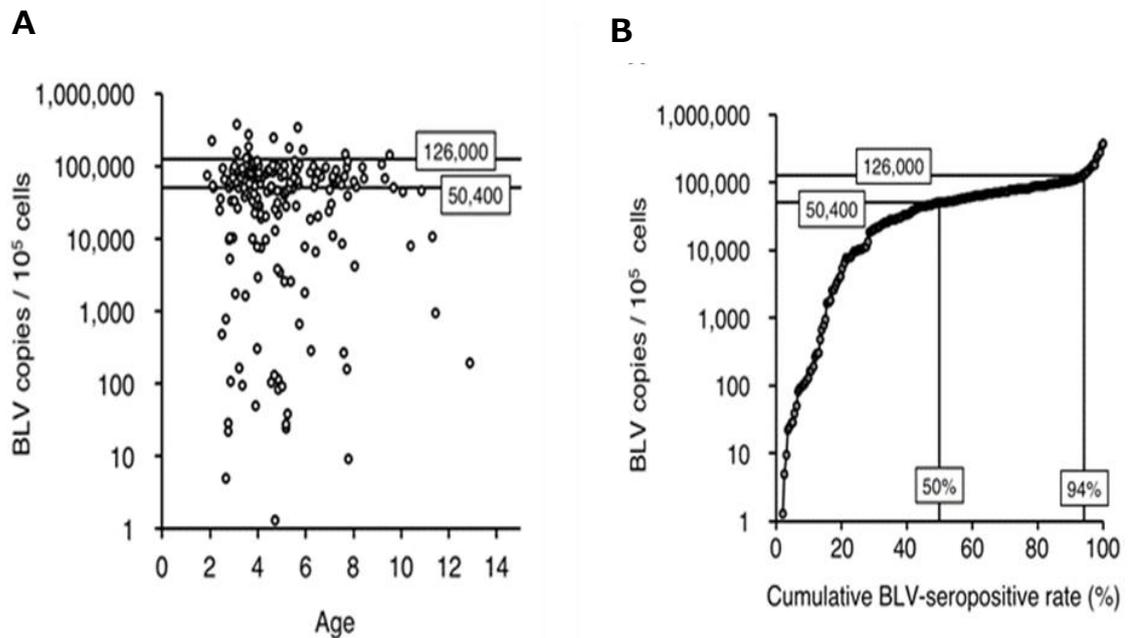


図 1-6 感染牛の血液中 BLV プロウイルス量

血液中 BLV プロウイルス量は CoCoMo-BLV Preimer/Probe を用い定量 PCR 法により測定し、末梢血単核細胞 10 万細胞中の BLV コピー数で表示した。

#### A 血液中 BLV プロウイルス量と検査時年齢との関連性

血液中 BLV プロウイルス量と年齢との関連性は認められなかった。

#### B 感染牛の血液中 BLV プロウイルス量度数分布

感染牛の BLV プロウイルス量は 0~374,025 コピーに分布し、Median 50,400 コピーで、累積度数分布曲線は 10 万コピー付近にプラトーを示した。閾値は変曲点から 126,000 コピーと推定され、感染牛の 94% が閾値以下であった。

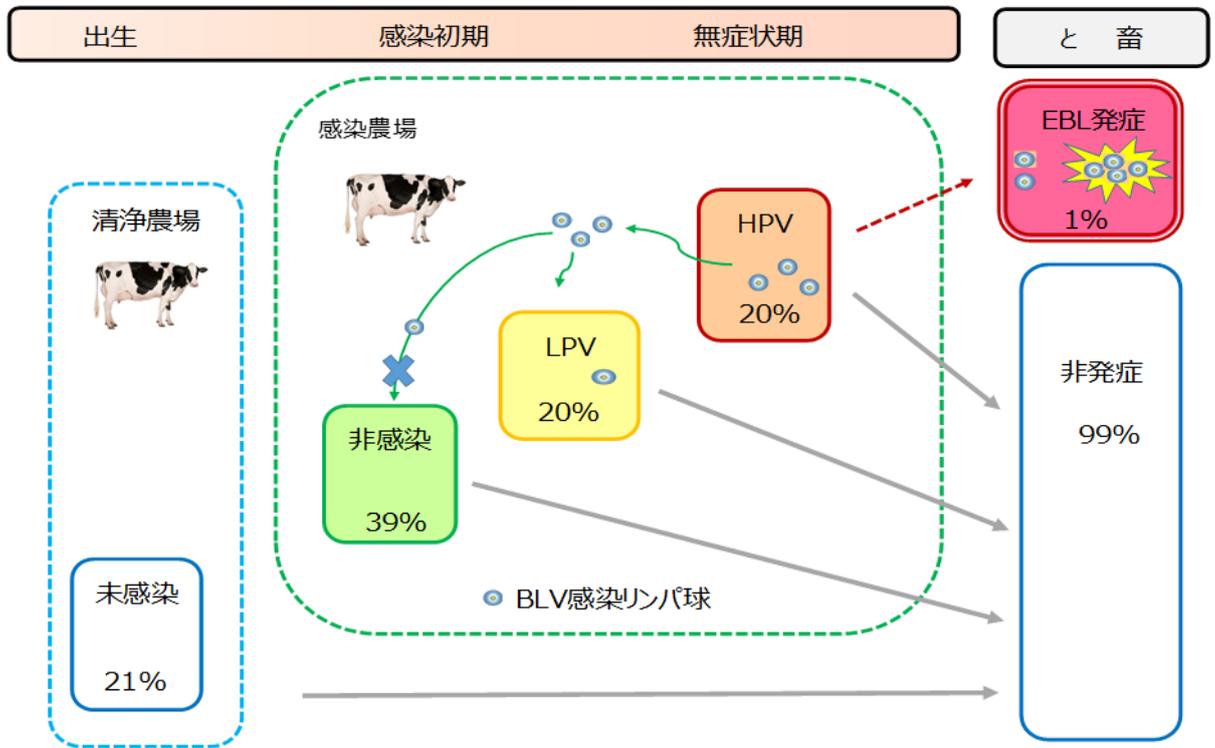


図 1-7 まとめ

K-Hol の ID を利用して出生からと畜まで異動歴を検索し、農場段階における BLV 感染、血液中 BLV プロウイルス量、と畜段階における EBL 発症を関連づけた。EBL 発症牛 (■) はすべてと畜検査で検出され発症率は 1% と低く、99% は非発症 (□) であった。感染農場には、BLV に曝露されていても抗体陰性の牛 (非感染牛■)、感染しても BLV プロウイルス量が低い牛 (LPV 牛■)、BLV プロウイルス量が比較的高くても無症状の牛 (HPV 牛■) が存在した。

## 第二章

### 牛白血病発症に関する統計遺伝学的解析

## 第二章 牛白血病発症に関する統計遺伝学的解析

統計遺伝学を応用した個体の選抜育種により、乳牛の遺伝的改良が進み、その泌乳能力は飛躍的に向上した（図 2-1）。種雄牛の遺伝的能力は、統計遺伝学を応用して、国際基準に基づき、娘牛群の検定成績から評価され、公表されている（家畜改良センター, 2016）。この個体の選抜育種のもととなるのが、血統登録制度である（図 2-2）。日本のホルスタイン血統登録制度は 1911 年から、現在まで連綿と続いており、その膨大なデータは「家畜改良データバンク」に蓄積されている。この「家畜改良データバンク」の情報は広く公開されており（日本ホルスタイン協会, 2017）、種雄牛情報として、国内外の種雄牛の登録番号、父牛、娘牛群数が提供されている。また、トレーサビリティ制度導入に伴い、ホルスタイン種乳牛の「血統登録番号」が ID に統合されたことから、ID を利用することで、父、父方祖父と血統を遡ることが可能となった。

そこで、今回、ID を利用して牛白血病に関する疫学情報と血統情報を関連付ければ、家畜育種学的手法により「娘牛群の牛白血病に関する成績から、牛白血病発症制御に関して高い遺伝的能力をもつ種雄牛を選抜できる」と仮説を立て、血統登録されたホルスタイン種乳牛の ID を利用して、各個体の牛白血病に関する感染／発症情報と血統情報を関連づけ、統計遺伝学的解析を行った。

## 材料および方法

### 1 ID を利用した BLV 感染情報、EBL 発症情報と血統情報の統合

ID を利用して、各個体の BLV 感染情報、EBL 発症情報と血統情報を関連づけた (図 2-3)。神奈川県内で血統登録されたホルスタイン種乳牛 10,138 頭 (K-Hol) の ID を利用し、BLV 感染／非感染牛、EBL 発症／非発症牛を特定した後、「家畜改良データバンク」の「血統情報」(日本ホルスタイン登録協会, 2017) からその父となる種雄牛を検索した。種雄牛別に娘牛群の BLV 感染率および EBL 発症率を集計し、各種雄牛の娘牛群のデータを統計遺伝学的に解析した。

### 2 全国と神奈川県における種雄牛の供用状況の比較

ホルスタイン種雄牛の情報は、「家畜改良データバンク」の「種雄牛情報」(日本ホルスタイン登録協会, 2017) から入手した。K-Hol に供用されていた 1,397 頭の種雄牛について、1999 年から 2011 年までに日本ホルスタイン協会に血統登録された娘牛数を検索し、種雄牛別娘牛数、その父牛別の父方孫頭数を集計した。

### 3 牛白血病に関する遺伝率の推定

「牛白血病の感染／発症に関する父からの遺伝率」は次のように推定した。供試牛群は BLV 感染／非感染、EBL 発症／非発症が特定されたホルスタイン種乳牛 1,940 頭 (農場 98 戸、供用種雄牛 518 頭) とし、以下のモデルを使用した。

$$y = X\beta + Z\alpha + e$$

ここで、 $y$  は表型値のベクトル、 $\beta$  は母数効果のベクトルとし、表型値は①BLV 非感染、②BLV 感染 EBL 非発症、③EBL 発症の 3 レベルとした。母数効果は、娘牛の生まれた年（17 レベル）、検査時の年齢（13 レベル）、農場の感染レベル（3 レベル：清浄農場、感染農場、発症農場）とした。 $\alpha$  は相加的遺伝効果（育種価）、 $e$  は誤差のベクトルを表し、 $X$  は母数効果の計画行列、 $Z$  は変量効果の計画行列である。計算は、Misztal ら（2002）が開発した「blupf90」のプログラム群を使用し、サイアモデルを用いた Gibbs sampling 法によりベイズ推定した。プログラムを利用する前に、「renumf90」を用いて、データファイル、血統ファイル、パラメータファイルを作成した。次に「THRGIBBS1F90 software program」（Misztal *et al.*, 2009）により、閾値モデルによる遺伝的パラメータおよび育種価を推定した。全反復回数は 100,000 回、burn-in 数を 50,000 回とした。その後、「POSTGIBBSF90 software program」（Misztal *et al.*, 2002）を用い、遺伝分散（ $\sigma_a^2$ ）、残差分散（ $\sigma_e^2$ ）の推定値を次の式に代入して、遺伝率（ $h^2$ ）を計算した。

$$\text{遺伝率 } h^2 = \sigma_a^2 / (\sigma_a^2 + \sigma_e^2)$$

また「BLV 感染に関する遺伝率」について次の条件で推定した。調査対象は、清浄農場の飼養牛と娘牛 1 頭のみを種雄牛を除き、感染農場（86 戸）で飼養され、複数の娘をもつ種雄牛（244 頭）の娘牛 1,524 頭とした。表型値は、①BLV 抗体陰性、②抗体陽性の 2 レベル、母数効果として、娘牛の生まれた年（15 レベル）、検査時の年齢（13 レベル）として、「牛白血病の感染／発症に関する遺伝率」と同様の閾値モデルで推定した。

#### 4 血統による BLV 感染率、プロウイルス量、EBL 発症率の比較

「家畜改良データバンク」の「血統情報」から、K-Hol に供用されていた 1,397 頭の種雄牛の血統を検索し、父、父方祖父を特定して父系の血統図を作成した。

父方孫数の多かった上位種雄牛 4 頭の血統図から、子、孫となる種雄牛の娘牛群における BLV 感染率、血液中プロウイルス量、EBL 発症率を集計し、血統による差を検証した。

#### 5 統計解析

データの集計については、表計算ソフト「Microsoft Excel」(Microsoft Corporation, USA) を用いた。また、統計解析は、IBM SPSS 統計解析ソフト Ver. 23 (IBM Corporation, USA) を用いた。全国と神奈川県における種雄牛別娘牛数の比較については、ピアソン積率相関係数により検定した。種雄牛別の娘牛群における抗体陽性率は一般線形モデルを用いて決定係数 ( $R^2$ ) を求め、種雄牛による子孫牛群中の BLV 感染率、EBL 発症率の差は  $\chi$  二乗検定により解析した。血統による血液中 BLV プロウイルス量は、一元配置の分散分析により検定した。

## 結 果

### 1 種雄牛の供用状況

「家畜改良データバンク」を利用し、ホルスタイン血統登録雌牛 10,138 頭中の血統情報を検索した結果、父として 1,397 頭の種雄牛の凍結精液が供用されていた。種雄牛の国別内訳（表 2-1）は日本 58%、アメリカ 30%、カナダ 9%の順、娘牛頭数はアメリカ 43%、日本 35%、カナダ 20%の順で、種雄牛 1 頭あたりの娘牛数はカナダ 16.2 頭、アメリカ 10.3 頭に対し、日本は 4.4 頭と少なかった。交配種雄牛の精液の選択にあたっては、世界的に国際評価の高い特定に種雄牛に集中する傾向が強く、神奈川県と全国の種雄牛別の娘牛頭数には、有意の相関が認められた（ $r = 0.51$ 、 $P < 0.01$ 、図 2-4 A）。

### 2 各種雄牛の娘牛群における BLV 感染率と EBL 発症率

種雄牛別に、各娘牛群における BLV 感染率および EBL 発症率を比較した。

その結果、各種雄牛の娘牛群中の BLV 抗体陽性牛頭数は高い直線性（ $R^2 = 0.822$ 、 $P < 0.01$ 、図 2-4B）を示し、種雄牛による娘牛群中の BLV 感染率に差は認められなかった。一方、各種雄牛別娘牛群中の EBL 発症牛については、種雄牛によって違いがあり、娘牛群中に発症牛のいる種雄牛と、発症牛のいない種雄牛に分かれた（図 2-4C）。

### 3 牛白血病発症に関する遺伝率の推定

各種雄牛の娘牛群における BLV 感染および EBL 発症のデータセットを用い、「牛白血病の感染／発症に関する父からの遺伝率」を推定した。①BLV 抗体陰性、②BLV 抗体陽性 EBL 非発症、③EBL 発症を表型値とし、生まれ年、検査時年齢、農場の感染レベルを母数効果として Mistal ら（2002 ; 2009）のプログラムを用いて、サイアモデルにより推定した。その結果、「牛白血病感染および発症に関する遺伝率」は、0.19 と推定された。

また、感染農場における BLV 抗体の有無を表型値とし、生まれ年、検査時年齢を母数効果として、同様のプログラムを用いて推定した結果、「BLV 感染に関する遺伝率」は、0.08 と推定された。

### 4 EBL 発症率の低い血統の特定

さらに、血統を遡り、父方祖父牛を特定したところ 367 頭の種雄牛が利用されていた。種雄牛の父方孫牛頭数は、神奈川県と全国で高い相関が認められ ( $r = 0.78$ 、 $P < 0.01$ 、図 2-5 A)、特定の種雄牛に集中し、上位種雄牛 4 頭の父方孫牛がホルスタイン種乳牛全体の 2 割を占めていた。各種雄牛の父方孫牛群中の BLV 抗体陽性牛頭数は高い直線性を示し ( $R^2 = 0.95$ 、 $P < 0.01$ 、図 2-5 B)、種雄牛による差は認められなかった。一方、各種雄牛の父方孫牛群中の EBL 発症率では、発症牛のいる牛と、いない牛に分かれ、上位 4 頭の種雄牛のうち Sire B と Sire D の父方孫牛群中には EBL 発症牛がいたが、Sire A と Sire C に発症牛はいなかった (図 2-5 C)。

これらの上位 4 頭の種雄牛の子孫牛群における血液中 BLV プロウイルス量をプロットしたところ、血統による差は認められなかった (図 2-6 A)。一方、血統別に EBL 発症状況を比較したところ (図 2-6 B)、Sire B と D の子孫牛群中にはそれぞれ 392 頭中 5 頭、227 頭中 6 頭の EBL 発症牛が検出されたのに対し、Sire A と C の子孫牛、それぞれ 372 頭、326 頭中 EBL 発症牛はゼロで、両者の子孫牛群中の EBL 発症率には有意の差があった ( $P < 0.01$ )。以上のように、Sire A や C の子孫牛は、EBL 発症に関して高い制御能力を保有し、世代を超えて継承されていた。

## 考 察

今回、ホルスタイン種乳牛の牛白血病に関する疫学情報と血統情報を関連づけ、娘牛群の成績から種雄牛の牛白血病発症制御に関する遺伝的能力を検証した。その結果、BLV 感染だけでなく EBL 発症の有無を加えて遺伝率を推定したところ「牛白血病の感染／発症に関する父からの遺伝率」は 0.19 と推定された。この数値は、疾病に関する遺伝率としては高く、遺伝的改良の可能性が示された。さらに多用されている種雄牛において、子孫牛中に EBL 発症牛がいない血統が特定され、この血統では牛白血病発症制御に関する高い遺伝的能力が世代を超えて継承されていた。これまで、ホルスタイン種乳牛の改良は、農家段階における娘牛群の成績を統計遺伝学的に解析し、種雄牛の評価、選抜に応用することで飛躍的に進んできた。しかし、EBL は発症率が低く、と畜後に発見されることが多いため、日本の牛トレーサビリティ制度なくしては、娘牛群における EBL 発症情報を血統情報と関連づけることは事実上不可能であった。すなわち、本研究は、娘牛群における EBL 発症情報を統計遺伝学的に解析することにより、種雄牛の遺伝的制御能力を検証し、「牛白血病発症の制御に関する遺伝的改良の可能性」を示した世界で最初の報告である。

さて、遺伝率は、実際の記録に基づき推定されるため、牛群の大きさや推定方法で異なる。Mistal ら (2002) はギブスサンプリングを用いたベイズ推定による手法を提唱し、感染や発症の有無のようなカテゴリ量も取り扱うことができる「閾値モデル」 (Mistal *et al.*, 2009) を公開している。今回、このモデルを用いて推

定した「牛白血病の感染／発症に関する父からの遺伝率」は 0.19 と比較的高かったのに対し、「牛白血病の感染に関する父からの遺伝率」は 0.08 と低かった。このことは、「子孫牛群の BLV 感染率について種雄牛による差はない」という事実と一致し、Abdalla ら (2013) のアメリカのホルスタイン種乳牛の牛群検定における乳汁中の BLV 抗体の有無から推定した遺伝率 0.08 と同様の値であった。

ホルスタインの種雄牛については、国際的に評価の高い特定の牛に集中する傾向が強く、全国と神奈川では、種雄牛の選択に違いは見られなかった。これらの少数の選ばれた種雄牛の遺伝的能力が、乳牛の遺伝的改良に及ぼす影響がますます大きくなっている (VanRaden *et al.*, 2004; Battagin *et al.*, 2012)。今回、娘牛群の EBL 発症情報と血統情報を関連づけ、多用されている上位種雄牛 4 頭のうち 2 頭が「牛白血病発症制御に関する高い遺伝的能力」を保有していることを示唆した。牛群検定事業は継続しており、今後、牛白血病に関する情報を関連づけ、例数を重ねることができれば、さらに多くの牛白血病制御能力の高い種雄牛や血統が特定できる。

ただ、今回のような後代検定の手法を「牛白血病の発症制御能力の遺伝的改良」に応用する場合、種雄牛が供用されるまでに数年、さらに娘牛群における EBL 発症の有無が明らかになるまで十年以上を要する。今回の上位種雄牛は、いずれも 1990 年代に供用されていた牛であり、彼らの凍結精液はすでに流通しておらず、今回の知見を直接種雄牛の選抜に結びつけることは難しい。さて、最近、家畜育種の分野でも、最新の遺伝子情報を利用したゲノム育種が導入され、泌乳能

力だけではなく、疾病や繁殖性に関する形質の遺伝的改良にも応用されはじめて  
いる (VanRanden *et al.*, 2011; Sugimoto *et al.*, 2013)。今回特定された種雄牛はす  
でにないが、牛白血病発症に関する高い制御能力は彼らの子孫牛に継承されてい  
る。その牛白血病の制御に関する遺伝子(群)を特定することができれば、それ  
をマーカーとしてゲノム育種も可能である。

## 小 括

牛個体識別番号 (ID) を利用して、K-Hol の血統と EBL 発症情報を関連づけ、統計遺伝学的解析により娘牛の成績から種雄牛の牛白血病制御に関する遺伝的能力を検証した。これまで、EBL は農場段階では臨床症状を示さず、と畜後に発見されること、発症率が 1% と極めて低いことから、発症情報を血統情報と関連づけることは事実上不可能であったが、本研究では、トレーサビリティ制度を利用し、牛白血病に関する疫学情報と血統情報を統合し、子孫牛群中の BLV 感染率、血液中 BLV プロウイルス量、EBL 発症率から牛白血病発症制御に関する種雄牛の遺伝的能力の検証を試みた。

その結果、「牛白血病感染および発症に関する遺伝率」は 0.19 と推定され、発症制御に関する遺伝的改良の可能性が示された。さらに、血統を遡ると、父方祖父となる種雄牛は特定の牛に集中し、全国と神奈川県の種類雄牛別父方孫牛頭数は高い相関を示した。多用されている種雄牛のなかに、EBL 発症牛のいない血統を特定し、高い発症制御能力が子孫牛に継承されていることを示した。

K-Hol に供用されていた種雄牛の国別内訳

	計	日本	アメリカ	カナダ	EUほか
父となる種雄牛数 (頭)	1,397	809	421	124	43
	100%	58%	30%	9%	3%
娘牛数 (頭)	10,138	3,578	4,353	2,012	195
	100%	35%	43%	20%	2%
種雄牛 1 頭あたりの娘牛数	7.3	4.4	10.3	16.2	4.5

表 2-1 K-Hol に供用されていた種雄牛の国別内訳

神奈川県ホルスタイン種登録雌牛 (K-Hol) 10,138 頭の血統情報を検索し、父となる種雄牛を特定し、国別種雄牛頭数、その娘牛頭数、種雄牛 1 頭当たりの娘牛頭数を比較した。

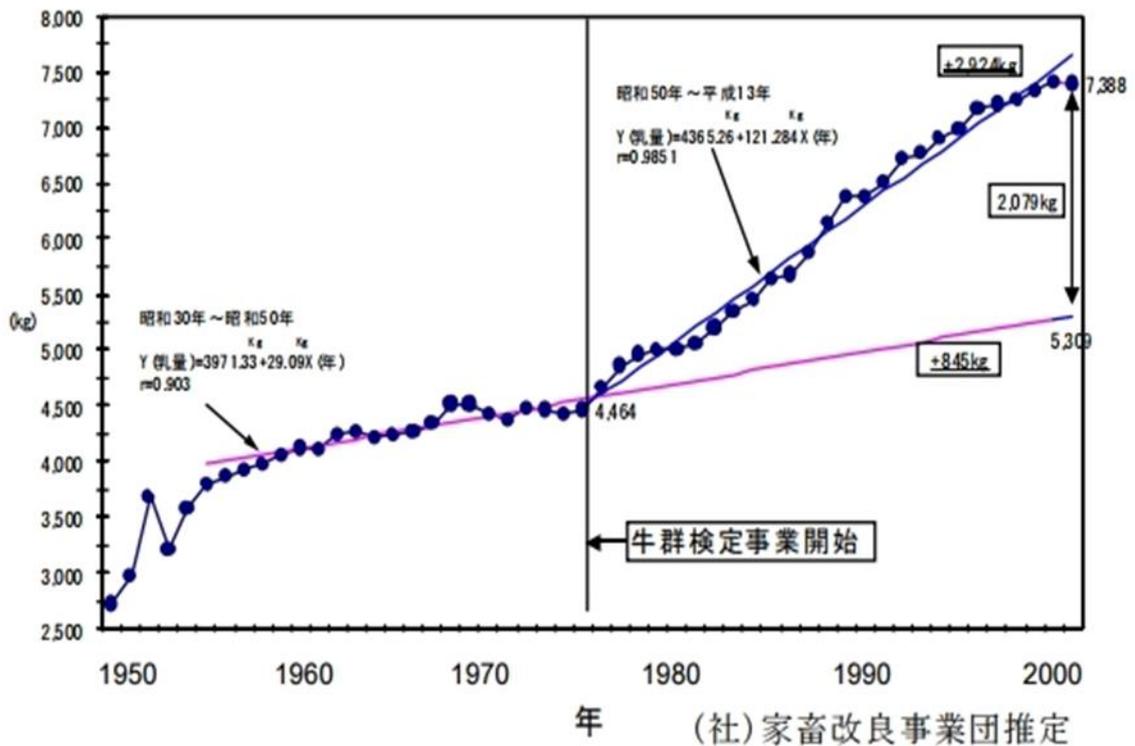


図 2-1 ホルスタイン種乳牛における遺伝的改良の推移

わが国におけるホルスタイン種乳牛の305日乳量の年次推移を示した。1950年には3,000kgに満たなかった305日乳量が、2000年には7,000kgを超えており、ホルスタイン種乳牛の泌乳能力は飛躍的に向上している。1980年代から牛群検定事業が開始され、娘牛群の成績から、種雄牛の遺伝的能力を統計遺伝学を応用して評価し、国際基準に基づき優秀な種雄牛を選抜することで乳牛の遺伝的改良は著しく進んだ。

## A 種雄牛情報

## B 血統情報

The image shows two screenshots from the Japanese Holstein Registration System website. The left screenshot displays a table of sire information with columns for registration number, sire name, sire's sire, and daughter count for the years 2016, 2015, and 2014. The right screenshot shows a pedigree search interface with fields for sire ID, sire name, and sire's sire, along with a search button.

種雄牛登録番号	父登録番号	登録娘牛頭数
45205 H252	45156	123713
45779 H245	USA1381022	90413
48065 H333	USA122245	56405
48121 H479	USA182908	48621
51116 JP3H03479	USA2124351	46131
62412 H815	CAN281130	43121
66272 T1	USA1829351	39715
68469 H8110	CAN332295	37746
69314 H0088	USA1928410	36801
83284 JP3H03584	CAN8820964	34192
42156 H116	CAN288295	32484
83998 JP3H03998	USA182908	30818
83999 JP3H03999	CAN351961	28985
20828 JP4H09188	USA210221	27363
83655 JP3H03655	USA182908	26328
46153 H853	CAN315961	26021
44529 H187	USA1438144	25286
45270 H843	USA1491002	24603
81388 JP4H01388	USA2160458	23519

(一社) 日本ホルスタイン登録協会 2017 より引用

図 2-2 血統登録制度と家畜改良データバンク

ホルスタイン血統登録制度は 1911 年から現在まで続いており、その情報は「家畜改良データバンク」として蓄積され、一般に公開されている。

**A 種雄牛情報** 国内外の種雄牛の娘牛数や父の血統登録番号が検索できる。

**B 血統情報** 登録番号を利用し国内外の登録牛の血統情報が検索できる。

トレーサビリティ制度導入に伴い、ホルスタイン種乳牛の血統登録番号は ID に統合され、ID を鍵とした血統情報の検索が可能となった。

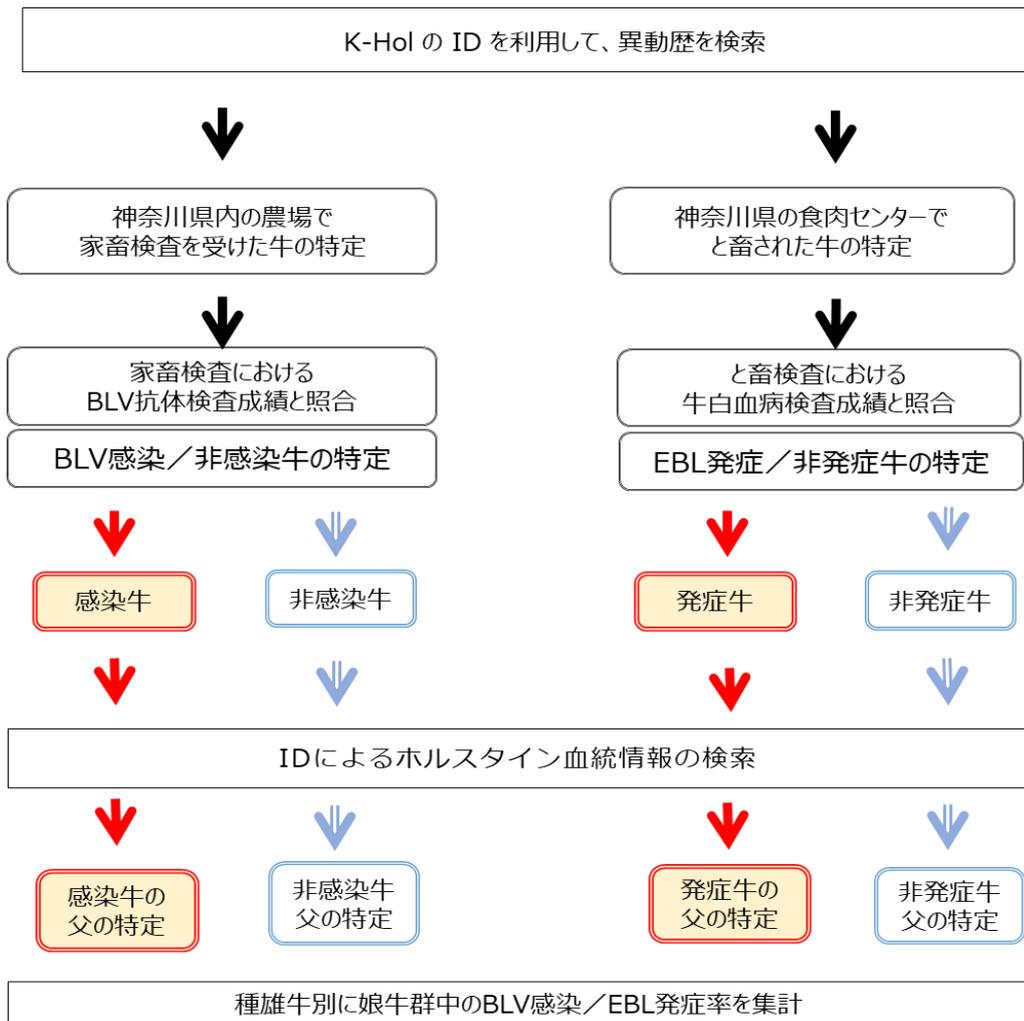
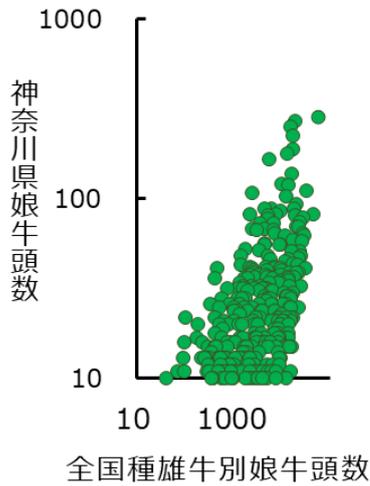


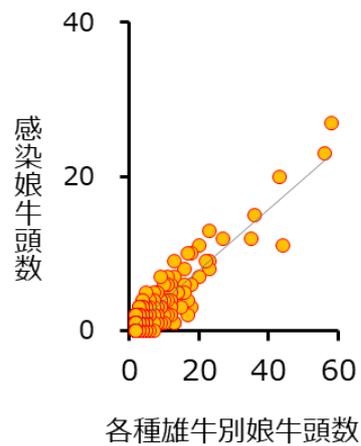
図 2-3 牛个体識別番号を利用した疫学情報と血統情報の統合

ホルスタイン種乳牛 10,138 頭 (K-Hol) の ID を利用して、異動歴、家畜検査成績、と畜検査成績を関連づけ、BLV 感染／非感染牛、EBL 発症／非発症牛を特定した。さらに、「家畜改良データバンク」から「血統情報」を検索し、それぞれの父牛を特定し、種雄牛別に集計して娘牛群の成績から、BLV 感染および EBL 発症制御に関する種雄牛の遺伝的能力を検証した。

A 神奈川県と全国の種雄牛供用状況



B 娘牛群におけるBLV感染率



C 娘牛群におけるEBL発症率

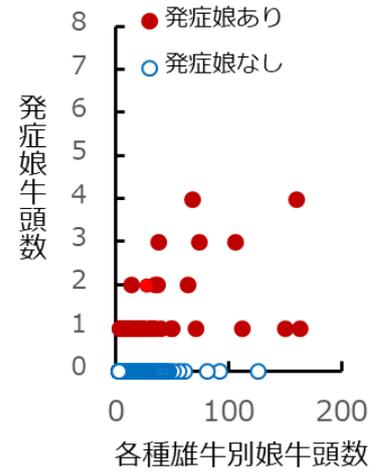


図 2-4 種雄牛別の娘牛群中の BLV 感染率、EBL 発症率

A 全国と神奈川県の種雄牛供用状況の比較

全国と神奈川の種雄牛別娘牛数に相関があった ( $r = 0.51$ 、 $P < 0.01$ )。

B 種雄牛別の娘牛群における BLV 感染率

各種雄牛の娘牛群中 BLV 感染率に差はなかった ( $R^2 = 0.822$ 、 $P < 0.01$ )。

C 種雄牛別の娘牛群における EBL 発症率

娘牛群中に発症娘がいる牛 (●) と発症娘のいない牛 (○) に分かれた。

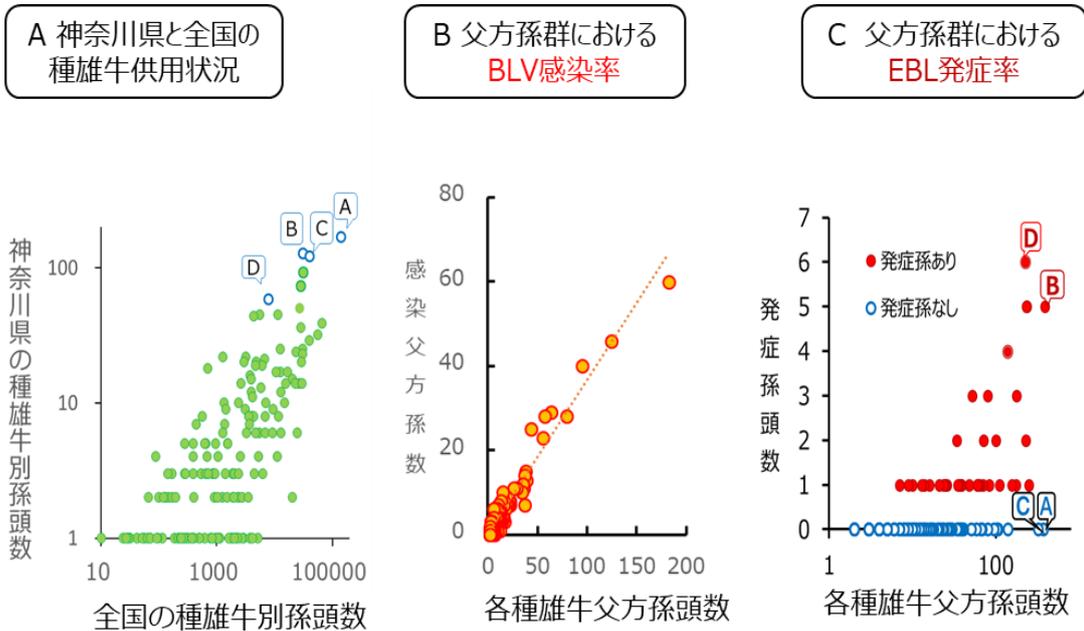


図 2-5 種雄牛別の父方孫牛群中の BLV 感染率、EBL 発症率

**A 全国と神奈川県の種雄牛供用状況の比較**

全国と神奈川の種雄牛別父方孫数に高い相関があった ( $r = 0.78$ 、 $P < 0.01$ )。

**B 種雄牛別の父方孫牛群における BLV 感染率**

各種雄牛の孫牛群中 BLV 感染率に差はなかった ( $R^2 = 0.947$ 、 $P < 0.01$ )。

**C 種雄牛別の父方孫牛群における EBL 発症率**

孫牛群中に発症孫がいる牛 (●) と発症孫のいない牛 (○) に分かれた。

### A 子孫牛の血液中BLVプロウイルス量

### B 子孫牛のEBL発症率

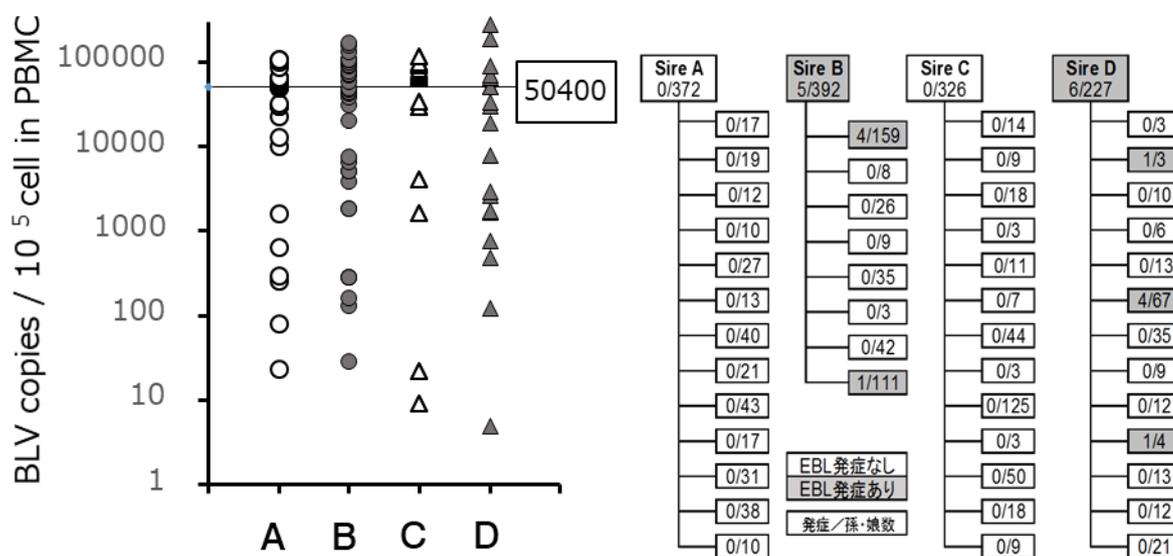


図 2-6 上位種雄牛 4 頭の子孫牛群における BLV プロウイルス量と EBL 発症率

#### A 子孫牛の血液中 BLV プロウイルス量

血液中 BLV プロウイルス量は CoCoMo-BLV Preimer/Probe を用い、定量 PCR 法により測定し、末梢血単核細胞 10 万細胞中 BLV コピー数で表した。上位種雄牛 4 頭 (A - D) の子孫牛群中 BLV プロウイルス量に差はなかった。

#### B 子孫牛の EBL 発症率

上位種雄牛 4 頭の血統別 EBL 発症状況を示した。上の□が Sire A - D の父方孫牛群中発症牛数を、その下の□が各息子 (娘 ≥ 3 頭) の娘牛群中発症牛数を表し、発症子孫のいた種雄牛は■で示した。Sire B と D の血統には発症牛がいたが、Sire A と C の血統に発症牛はゼロ、後者の発症率は有意に低かった ( $P < 0.01$ )。

## 第三章

### 牛白血病発症に関連する遺伝子の探索

### 第三章 牛白血病発症に関連する遺伝子の探索

今回、トレーサビリティ制度を利用し、1万頭のホルスタイン種乳牛を10年間、追跡調査した結果、EBL発症牛は農場段階では臨床症状を示さず、と畜後の検査で発見され、その発症率は1%と低かった。すなわち、99%のホルスタイン種乳牛は生涯発症せず、牛白血病発症に関して高い自然抵抗性を示した。さらに、農場段階における疫学調査の結果、成牛では、BLV感染率、血液中BLVプロウイルス量、EBL発症率に加齢による差は認められず、感染農場において長期間BLVに曝露されていても感染しない非感染牛が存在したことから、「非感染牛」や「感染非発症牛」では、宿主側の何らかの遺伝子（群）が働き、BLV感染やEBL発症を制御しているものと考えられた。

そこで、第三章では、これまでの疫学調査の結果をもとに感染／発症状況の異なる5つの牛群を特定し、最新の細胞遺伝学的手法を応用して、牛白血病の感染／発症に関連する遺伝子の探索を行った。

## 材料および方法

### 1 牛白血病発症に関連する遺伝子探索の流れ

牛白血病の感染／発症にどのような遺伝子（群）が関連しているのか、細胞遺伝学的手法を応用して探索を試みた（図 3-1）。

まず、感染／発症状況の異なる 5 群のホルスタイン種乳牛から血液を採取し、RNA を抽出した。次に、抽出 RNA について次世代シーケンサを用いて RNA-seq を行い、各牛群において発現している遺伝子および発現量について、網羅的遺伝子解析を行った。発現変動の認められた遺伝子の抽出と解析を行い、感染／発症に関連すると考えられる候補遺伝子を選定し、リアルタイム PCR 法によって、各牛群における発現量を比較解析した。最後に、その結果をもとに、発現変動遺伝子の Pathway 解析を行った。

### 2 農場および供試牛の選定

RNA-seq およびリアルタイム PCR 解析に供試する血液は、飼養記録、繁殖記録、血統情報が明らかな牛群検定参加農家のなかから、清浄農場、感染農場各 1 戸を選定し、その飼養牛から採取した。

清浄農場は過去に EBL 発症牛が検出されておらず、1 年以内の BLV 抗体検査で飼養牛全頭の BLV 抗体陰性が確認されている農場とし、感染農場は過去 10 年間で複数の EBL 発症牛が検出され、全頭検査で BLV 抗体陽性率が高い農場を選定した。

両農場で飼養されていた3歳以上のホルスタイン種乳牛を、飼養農場、BLV抗体検査、血液中プロウイルス量から、以下の①未感染、②非感染、③LPV、④HPVに分類した。今回、供試した4牛群の内訳は次のとおりである。

- ① 未感染（清浄農場）：BLV抗体陰性、BLVプロウイルス量ゼロ
- ② 非感染（感染農場）：BLV抗体陰性 BLVプロウイルス量ゼロ
- ③ LPV（感染農場）：BLV抗体陽性、BLVプロウイルス量<50,000 コピー
- ④ HPV（感染農場）：BLV抗体陽性、BLVプロウイルス量 $\geq$ 50,000 コピー

なお、未経産牛、分娩後1カ月以内の牛や分娩予定2カ月以内の牛、乾乳牛、白血球数の多い（2万以上/ml）牛は除き、各牛群4頭の血液からRNAを抽出し、リアルタイムPCRおよびRNA-seqの検体とした。

### 3 EBL発症牛の採材

EBL発症牛の血液は、神奈川県食肉衛生検査所に病畜として搬入されたホルスタイン種乳牛からRNA抽出用血液を採取し、と畜後の精密検査でEBLと診断された牛についてRNAを抽出し、供試した。

また、東北地方の臨床獣医師の協力により、牛白血病の疑いのあるホルスタイン種乳牛からRNA抽出用採血管で採血し、臨床検査（直腸検査における腹腔内腫瘍等）、血液検査（リンパ球増数、異型リンパ球の出現）、ウイルス学的検査（BLV抗体検査、血液中BLVプロウイルス量）、剖検所見でEBLと確定診断された牛について血液中のRNAを抽出し、供試した。

#### 4 血液中 RNA の抽出方法

RNA 抽出用血液サンプルは、検査牛の尾根部から EDTA 加採血管で採取し、直ちにパクスジーン RNA 採血管（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）に分注し、10 回以上転倒混和した後、約 2 時間、室温の静置後、-30°C で冷凍保存した。血液中 RNA は、PAXgene® Blood RNA Kit（Quagen, Venlo, Netherlands）を用いて抽出し、抽出後は-30°C で冷凍保存した。

#### 5 RNA-seq による網羅的遺伝子解析

各群のホルスタイン種乳牛の血液から抽出した RNA（RNA Integrity Number; RIN 値、8.0 以上）について、東京農業大学ゲノムセンターに委託し、RNA-seq 解析を行った。RNA-seq 解析は、NextSeq500（illumina Inc., USA）を用い、リード数:4000 万クラスター ペアエンドで行った。データ解析は、Kusama ら（2017）の方法により行った。次世代シーケンサから出力された FASTQ ファイルは、Bovine genome として bosTau 8 (Bos\_taurus\_UMD\_3.1.1)、USCS genome browser (<http://genome.ucsc.edu>) の reference annotation を用い、the basis of the TopHat/Cufflinks pipeline によりマッピングした。遺伝子発現量の解析は、gene-level FPKM (Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments) で正規化し、発現量が > 10 FPKM で、各群における発現量の比が 2 倍以上の遺伝子について、the Functional Annotation Tool of the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) を用いて、gene annotation および pathway 解析を行った。

## 6 リアルタイム PCR 解析

各牛群の血液から抽出した RNA について、ReverTra Ace qPCR RT Kit (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて、cDNA に変換した後、Thunderbird SYBT qPCR Mix Kit (Toyobo) で、表 3-1 に示したプライマーを使用し、リアルタイム PCR (q-PCR) 解析を行った。RT-qPCR 反応は Step One Plus real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて 95°C で 10 秒間の変性反応、60°C で 30 秒間のアニーリング反応と伸長反応を 45 サイクル行った。各サンプル中の mRNA 発現量は、Comparative C<sub>T</sub> 法で解析した。すなわち、ある一定の蛍光強度を示したサイクル数を閾値 (C<sub>T</sub>) とし、目的遺伝子の C<sub>T</sub> と内部標準である GAPDH の C<sub>T</sub> より、以下の計算式でサンプル間の発現量の比を求めた。

$$\text{発現量} = 2^{- (\Delta\Delta C_T)}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ サンプルA}} - \Delta C_{T \text{ サンプル基準}}$$

$$\Delta C_{T \text{ サンプルA}} = \Delta C_{T \text{ 目的遺伝子サンプルA}} - \Delta C_{T \text{ GAPDH サンプルA}}$$

$$\Delta C_{T \text{ サンプル基準}} = C_{T \text{ 目的遺伝子サンプル基準}} - C_{T \text{ GAPDH サンプル基準}}$$

## 7 統計解析

リアルタイム PCR 解析による各候補遺伝子における感染／発症ステージ別の発現量について、IBM SPSS 統計解析ソフト Ver.23 (IBM Corporation, USA) を用い、一元配置の分散分析と多重比較を行い、 $P < 0.05$  を有意とした。

## 結 果

### 1 感染／非感染における RNA-seq による遺伝子発現量解析

非感染牛群と感染牛群の血液中 RNA について、RNA-seq 解析を行った結果、感染牛群の発現量が 2 倍以上高かった遺伝子は 699 genes (表 3-2) で、これらを解析した結果、主に細胞増殖やタンパク質合成に関する Pathway において、多くの高発現遺伝子が認められた (表 3-3)。

一方、非感染牛群の発現量が 2 倍以上高かった遺伝子は 877 genes (表 3-4) で免疫に関与する Pathway において多くの高発現遺伝子が認められた (表 3-5)。

### 2 感染／発症ステージ別のリアルタイム PCR による遺伝子発現量解析

非感染牛群と感染牛群における RNA-seq の結果を解析し、細胞増殖やタンパク質合成に関連している遺伝子や、免疫に関連している遺伝子など、牛白血病の感染／発症に関連していると考えられる 10 遺伝子 (候補遺伝子) を選択した (表 3-6)。この 10 の候補遺伝子について、感染／発症状況の異なる各牛群の血液中 RNA における発現量をリアルタイム PCR 法により解析した。その結果、各牛群で血液中 RNA における発現遺伝子・発現量に差が認められ、10 の候補遺伝子は次の 4 グループに大別された (図 3-2)。

#### A : 発症牛群で亢進

EIF3E と PDCD1 は、発症牛群で高値を示した。EIF3E は、細胞増殖に関連する遺伝子の一つで、他の健康牛群すべてと比較し有意に高かった ( $P < 0.01$ )。

PDCD1 は免疫抑制に関連する遺伝子で、健康牛では非感染、LPV、HPV 牛群の順に発現量が低くなっていたのに対し、発症牛群では高値を示した。

#### **B : 発症・感染牛群で亢進**

CDKL4、MS4A1、CXCL10 は発症牛群と感染牛群で高値を示した。いずれも、タンパク質合成に関連する遺伝子で、非感染、LPV、HPV、発症牛群の順に高くなり、非感染牛群に対し CDKL4 は HPV 牛群及び発症牛群で有意に高く ( $P < 0.01$ )、MS4A1 と CXCL10 は発症牛群で有意に高かった ( $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ )。

#### **C : 非感染牛群で亢進、感染・発症牛群で抑制**

TGFBI、CFD、CD4 は、非感染、LPV、HPV、発症牛群の順に、発現量が少なくなっていた。これらは、いずれも免疫に関連する遺伝子で、RNA-seq の結果と同様、非感染牛群が感染牛群より高いという傾向が認められた。特に、TGFBI は非感染群牛と発症牛群の間に有意の差があった ( $P < 0.05$ )。

#### **D : 変化なし**

ANXA2、CD28 については、各牛群で差は認められなかった。

### **3 非感染牛で亢進していた遺伝子の Pathway 解析**

リアルタイム PCR 解析の結果、非感染牛群では感染牛群、発症牛群より免疫系に関連する遺伝子群の発現量が高かったことから、RNA-seq 解析において、非感染牛群で感染牛群より 2 倍以上の高発現していた遺伝子について Pathway 解析をおこなった。その結果、T cell や補体など自然免疫に関わる Pathway において、多くの高発現遺伝子が認められた (図 3-3)。

#### 4 牛白血病の感染／発症に関連する遺伝子の探索

これまでの疫学的調査結果と、上記の候補遺伝子の発現量を関連付けた結果、各牛群で異なる遺伝子の発現が亢進あるいは抑制されていた（図 3-4）。発症牛群では、細胞増殖に関連する EIF3E や、タンパク質合成に関連する CDKL4、MS4A1、CXCL10 などの発現量が著しく高値を示していた。また、免疫抑制に関わる PDCD1 の発現量が高く、TGFBI など免疫に関連する遺伝子の発現量が低くなっており、他の 4 牛群すなわち農場段階における健康牛と明確に区分された。

一方、非感染牛群はリアルタイム PCR 解析では免疫に関連する TGFBI、CD4、CFD の発現量が感染牛群や発症牛群より高く、RNA-seq 解析では T-cell や補体など自然免疫系の Pathway において、多くの高発現遺伝子が認められた。

## 考 察

第三章では、最新の細胞遺伝学の手法を応用して牛白血病発症に関連する遺伝子の探索を行った。その結果、非感染牛、感染牛、発症牛群の間で、複数の遺伝子群の発現量に変動が認められた。非感染牛群では免疫に関わる遺伝子の発現が亢進しているのに対し、発症牛群では細胞増殖やタンパク質合成に関連する遺伝子が亢進し、免疫関連遺伝子の発現が抑制されており、他の健康牛群と明確に区分された。これは、疫学的解析結果に基づき、感染／発症状況の異なる牛群を特定し、最新の細胞遺伝学の手法により網羅的な解析を行ったことで、世界ではじめて得られた知見である。

今回、非感染牛と感染牛について、RNA-seq による網羅的遺伝子解析を行った結果、両者には臨床的に全く差がないにも関わらず、発現遺伝子、その発現量には大きな差が認められ、非感染牛では、自然免疫に関わる多くの遺伝子群の発現が亢進していた。リアルタイム PCR の結果からも、非感染牛、感染牛、発症牛群の間で、発現遺伝子やその発現量に違いが認められ、非感染牛では、自然免疫に関わる多くの遺伝子群の発現が亢進していることを明らかにした。最近、Brym & Kaminski (2017) は、高度汚染農場における非感染牛群と感染牛群の血液中 RNA のマイクロアレイ解析から非感染牛群の方が TGFBI と CFD の発現量が有意に高かったと報告しており、今回と同様の結果であった。また、ヒトにおける HIV 曝露非感染者では HIV 抗原による感作が「感染防御」「免疫応答」の誘導につながっている例があると報告されており (Shearer & Clerici, 1996; Miyazawa *et al.*,

2008)、今回、ホルスタイン種乳牛群において BLV に長期間曝露されていても感染しない非感染牛が存在し、免疫に関連する多くの遺伝子の発現が亢進しており、同様の傾向が認められた。

一方、発症牛群では、細胞増殖やタンパク質合成に関連する遺伝子が亢進し、免疫関連遺伝子の発現が抑制されており、特に、EIF3E は他の健康牛群より発現量が著しく高くなっていた。この EIF3E は細胞増殖に関連する遺伝子であり、EBL 発症牛では腫瘍病変部でリンパ球様細胞の著しい増殖が認められることと符合し、細胞増殖に関する調節機能の破綻を反映しているものと推察された。これまで、農場段階における EBL 発症の生前診断、すなわち腫瘍病変の有無を臨床症状や血液性状から診断することは難しく、実態として牛白血病牛の多くがと畜後に発見され、そのと体は全部廃棄されるため大きな経済的損害を与えている。今回、EIF3E の高発現が発症牛群で特異的に認められたことから、今後、発症牛のマーカーとして利用できる可能性が示された。また、発症牛群では免疫抑制に関与するとされる PDCD1 は発現量が亢進し、TGFBI、CFD、CD4 など免疫関連遺伝子の発現が抑制されていた。このことは、Ikebuchi ら (2013) の報告と一致し、発症牛では免疫疲弊がおこり、免疫機能が低下していることが伺われた。

今回、感染牛群ではタンパク質合成に関連する遺伝子の発現量が高く、Pathway 解析でも Ribosome 合成に関連する遺伝子群の亢進が認められた。BLV 感染による産乳成績への影響については諸説あり、Erskine ら (2012) や Nekouei ら (2016) は、BLV 感染牛群においては、産乳成績が低下すると報告している。一方、Wu ら (1989) は、同一農場で飼養されている能力の高い牛群では、BLV 感染牛の

方が乳量が多かったと報告しており、Motton & Buehring (2003) は BLV genome を培養乳腺上皮細胞に組み込んだところ、細胞増殖能が高まり、細胞寿命が延びたと報告している。さらに最近、Abdalla ら (2016) が、ゲノムワイド解析とパスウェイ解析による網羅的遺伝子解析を行い、BLV 感染と乳量には正の相関があると報告している。これらの報告は、今回、感染牛群において非感染牛群よりタンパク質合成機能に関わる遺伝子の発現が亢進していたことと矛盾せず、BLV 感染がカゼイン合成などの泌乳機能を活性化している可能性も考えられた。

ところで、2009 年にウシゲノムが解読され、ゲノム上に多数存在する single-nucleotide polymorphisms (SNP) 型値と関連がある SNP を同定する「全ゲノム関連解析」がウシにおいても可能となった。ホルスタイン種においては、不妊に関連する SNP が第 1,5,8 番染色体に発見され、主要な種雄牛のなかにキャリアが発見された (VanRanden *et al.*, 2011)。また Sugimoto ら (2013) は、ホルスタイン受胎率関連 SNP を探索し、CTTNMP2NL などに存在する SNP がウシ受胎率と関連することを報告している。このように、家畜育種の分野では、最新の遺伝子情報を利用したゲノム育種が導入され、泌乳能力だけではなく、疾病や繁殖性に関する形質の遺伝的改良にも応用されはじめている。今回得られた知見を、今後、ゲノム育種に応用し、牛白血病の感染や発症制御に関する遺伝的改良がすすめば、新たな牛白血病として画期的なものとなる。

## 小 括

感染農場における非感染牛と感染牛群間の RNA-seq による網羅的遺伝子解析の結果、感染牛群においては細胞増殖やタンパク質合成に関連する多く遺伝子の発現量が亢進し、非感染牛群では免疫に関連するより多くの遺伝子の発現が亢進していた。RNA-seq の結果をもとに、牛白血病の感染／発症に関連すると考えられる 10 の候補遺伝子を選定し、未感染、非感染、LPV、HPV、発症の 5 牛群について、血液中 RNA における発現遺伝子および発現量をリアルタイム PCR 解析により検証した。

その結果、非感染、感染、発症各牛群の血液中 RNA における発現遺伝子・発現量に差が認められ、10 の候補遺伝子は、次の 4 グループに大別された。

- A : 発症牛群で亢進      EIF3E、PDCD1
- B : 発症・感染牛群で亢進      CDKL4、MS4A1、CXCL10
- C : 非感染牛群で亢進、感染・発症牛群で抑制      TGFBI、CFD、CD4
- D : 変化なし      CD28、ANXA2

さらに、RNA-seq において非感染牛群で亢進していた遺伝子群に着目し、Pathway 解析を行った結果、T cell receptor signaling pathway や Complement cascades など自然免疫に関連する Pathway で高発現遺伝子が多く認められることが判明した。

Gene symbol	Name		5' - sequence - 3'
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	F	GCATCCCTGAGACAAGATGGTG
		R	CATTGATGGCAACGATGTCCAC
ANXA2	annexin A2	F	TACGGGTCAGTCAAAGCGTAC
		R	TCTGTTCATTGCTGCGGTTG
CD28	CD28 molecule	F	TCCTGGCTCTCAACTTCTTCC
		R	TCGTTTACCACAAGCATGGG
CD4	CD4 molecule	F	TGGACAAGAAGACGCTCGAG
		R	AGGGACTCTCCACAAGTCAAGG
CDKL4	cyclin dependent kinase like 4	F	GCACGAATTCTGATTCCAGGAG
		R	AACCAGTAGCCCATATGTCGAC
CFD	complement factor D	F	TGCACCTGGTGGTCTGATC
		R	CCCCTGCTCTGCTATCAGG
CXCL10	C-X-C motif chemokine ligand 10	F	AGTACCTTCAGTTGCAGCAC
		R	AGCGTGTATTCTTAGAGAGAGG
EIF3E	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	F	GCAAATGCAGTCAACCAGGG
		R	CGTTGCTGGAACCAACTC
MS4A1	membrane spanning 4-domains A1	F	AACGAGCTGGTGAGGTGAAC
		R	TGTCGTCATTTCACCCTCAGAC
PDCD1	programmed cell death 1	F	AGATCAACGAGAGCCACAGC
		R	ATGACCAGGCTCTGCATCTG
TGFB1	transforming growth factor beta induced	F	AGCTCATTGGGACCAACAAG
		R	ACCTTCTCATATCCAGGACAGC

表 3-1 リアルタイム PCR に用いた 10 候補遺伝子のプライマー配列

感染／発症状況の異なる 5 牛群の血液から抽出した RNA について、cDNA に変換した後、Thunderbird SYBT qPCR Mix Kit (Toyobo) で、10 候補遺伝子についてリアルタイム PCR 解析を行った。使用した各遺伝子のプライマー配列を表に示した。各サンプル中の mRNA 発現量は、内部標準として、GAPDH を用い、Comparative C<sub>T</sub>法で解析した。

Table The list of top 20 up-regulated genes in BLV-infected cattle in comparison to BLV-uninfected group

Gene symbol	Name	Fold change	p_value
GALNT14	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14	4.851	2.25E-03
KRT17	keratin 17	4.542	2.00E-04
CDKL4	cyclin dependent kinase like 4	4.112	5.00E-05
MGARP	mitochondria localized glutamic acid rich protein	3.913	5.00E-05
WSCD1	WSC domain containing 1	3.737	5.00E-05
MFAP2	microfibrillar associated protein 2	3.620	2.40E-03
MGC137030	uncharacterized protein MGC137030	3.432	8.45E-03
DPYSL3	dihydropyrimidinase like 3	3.369	5.00E-05
TSKU	tsukushi, small leucine rich proteoglycan	3.104	7.50E-04
DSB	MHC class II antigen DS beta	3.000	5.00E-05
UGT8	UDP glycosyltransferase 8	2.942	2.65E-03
FA2H	fatty acid 2-hydroxylase	2.938	4.00E-04
C14H8orf59	chromosome 14 open reading frame, human C8orf59	2.823	4.55E-03
EMP2	epithelial membrane protein 2	2.791	1.75E-03
AK7	adenylate kinase 7	2.790	3.00E-04
HBB	hemoglobin, beta	2.674	5.00E-05
CISD1	CDGSH iron sulfur domain 1	2.673	5.00E-05
H2AFY2	H2A histone family, member Y2	2.643	5.00E-05
COX8B	cytochrome c oxidase subunit VIII-H (heart/muscle)	2.635	3.60E-03
KLF5	Kruppel like factor 5	2.634	5.00E-05
HBM	hemoglobin subunit mu	2.604	1.05E-03

Fold change:RNA-seqにおける感染:非感染のLog<sub>2</sub> fold change

### 表 3-2 RNA-seq による遺伝子解析結果 (感染牛>非感染牛)

感染農場における健康なホルスタイン種乳牛のうち、感染牛および非感染牛の末梢血から RNA を抽出し、RNA-seq による網羅的遺伝子解析を行った。両者には臨床的に違いがなかったが、血液中 RNA における発現遺伝子、発現量には大きな違いが認められた。感染牛で 2 倍以上高発現していた 699 遺伝子のうち変動量の大きかった上位 20 遺伝子を示した。

Up regulation		
KEGG Term	P Value	Genes
Ribosome	1.73E-42	RPL17, RPL36A, RPL14, RPS27L, RPL22L1, RPS3A, RPL11, RPL12, RPS27A, MRPL35, RPL35A, MRPL1, RPS4X, MRPS18C, RPS17, MRPS17, MRPS14, RPL27A, RPS15A, RPL37, RPL39, MRPL20, RPS25, RPS26, MRPL13, RPL30, RPS27, MRPL15, RPS29, RPL32, RPL7, RPL6, RPL9, RPL34, RPL3, MRPL19, RPL5, RSL24D1, RPL4, RPS20, RPS21, RPS23, RPS24, RPL26, RPL27, MRPS21, RPL24, RPS6, MRPL30, RPS8, RPS7, MRPL24, MRPL22, RPL23, RPL21, RPL37A
Oxidative phosphorylation	2.36E-10	NDUFB3, NDUFB4, ATP5E, NDUFB5, NDUFB8, COX7B, MGC148714, UQCRCQ, NDUFS5, NDUFS4, COX6B1, ATP5O, ATP5I, COX17, ATP5H, NDUFA5, COX7A2, COX8B, NDUFA6, ATP5F1, NDUFC1, NDUFA1, NDUFA12, PPA2, ATP5C1, ATP6V0A2
Parkinson's disease	3.44E-08	NDUFB3, ATP5E, NDUFA5, NDUFB4, NDUFB5, COX7A2, COX8B, NDUFB8, NDUFA6, COX7B, MGC148714, CYCS, ATP5F1, NDUFC1, NDUFA1, UQCRCQ, NDUFA12, PARK7, NDUFS5, NDUFS4, ATP5C1, COX6B1, ATP5O, ATP5H
Alzheimer's disease	1.65E-07	NDUFB3, NDUFB4, ATP5E, NDUFB5, NDUFB8, COX7B, MGC148714, UQCRCQ, NDUFS5, NDUFS4, COX6B1, ATP5O, ATP5H, NDUFA5, COX7A2, COX8B, NDUFA6, CYCS, ATP5F1, NDUFC1, NDUFA1, NDUFA12, NAE1, ATP5C1, CALM2
Huntington's disease	1.32E-06	NDUFB3, NDUFB4, ATP5E, NDUFB5, NDUFB8, COX7B, MGC148714, UQCRCQ, NDUFS5, NDUFS4, COX6B1, ATP5O, ATP5H, NDUFA5, COX7A2, COX8B, TAF4B, NDUFA6, CYCS, ATP5F1, NDUFC1, NDUFA1, NDUFA12, HDAC2, ATP5C1
Ribosome biogenesis in eukaryotes	2.62E-06	RPP38, UTP18, GARI, RAN, FCF1, NOP10, WDR75, NOP58, WDR3, RPP30, NOP56, POP5, UTP14A, WDR43, NMD3
RNA transport	5.43E-06	RPP38, NCBP2, NUP160, RAN, MAGOH, EIF2S3, SUMO2, SUMO1, EIF4E, EIF2S1, EIF3E, EIF1AX, EIF4A2, THOC7, RPP30, MAGOHB, NUP37, GEMIN6, POP5, EIF2B3, NMD3
Non-alcoholic fatty liver disease	2.16E-05	NDUFB3, NDUFA5, NDUFB4, NDUFB5, COX7A2, COX8B, NDUFB8, NDUFA6, COX7B, MGC148714, CYCS, NDUFC1, UQCRCQ, NDUFA1, NDUFA12, NDUFS5, NDUFS4, EIF2S1, COX6B1, PIK3CA
Pyrimidine metabolism	1.94E-04	DCTD, NUDT2, NT5C3B, PNPT1, CTPS1, PRIM1, POLE2, NME1, RRM2, RRM1, POLD2, PRIM2, UCK2, DUT
Spliceosome	0.0002	NCBP2, BCAS2, LSM8, MAGOH, SNRPB2, SNRPD1, SNRPD2, SF3B6, SF3B5, SMNDC1, PPIH, MAGOHB, LSM3, SNRPF, SNRPE, SNRPG
DNA replication	0.0005	PRIM1, RFC3, SSBP1, POLE2, POLD2, PRIM2, MCM6, RPA3
Cell cycle	0.0015	CDK1, ANAPC13, DBF4, CHEK1, CDC26, ATM, SMC3, MCM6, CCNE1, HDAC2, MAD2L1, ORC4, BUB1B, MYC
Mismatch repair	0.0019	RFC3, SSBP1, MSH3, MSH2, POLD2, RPA3
Proteasome	0.0022	PSMA2, PSMB7, PSMB6, PSMA4, SHFM1, PSMA3, POMP
Metabolic pathways	0.0029	ATP5E, NT5C3B, EHHADH, UQCRCQ, PRIM1, MTHFD2, PIGK, NDUFS5, AGPAT5, NDUFS4, PRIM2, PHOSPHO2, ATP5O, ATP5I, HADH, ATP5H, COX17, ACADM, CYCS, NDUFC1, GMPs, NDUFA12, NME1, RRM2, ADK, RRM1, DLD, ATP5C1, INPP4A, MDH1, NDUFB3, CYP2U1, NDUFB4, NDUFB5, NDUFB8, MGC148714, COX7B, ADH5, CTPS1, EXTL1, ACAT1, PPAT, CERS1, POLE2, COX6B1, HAAO, UCK2, UGT8, B4GALT6, DNMT3B, GALNT14, FH, DCTD, NDUFA5, COX8B, NDUFA6, ATP5F1, EPRS, AK7, NDUFA1, DHFR, POLD2, DPM1, CYP2R1, APIP, PSAT1, PAICS, ATP6V0A2, DUT
RNA degradation	0.0033	EXOSC8, EXOSC9, LSM8, WDR61, PNPT1, LSM3, HSPD1, LSM1, ZCCHC7, HSPA9
Purine metabolism	0.0049	NUDT2, NT5C3B, PNPT1, PDE4C, AK7, GMPs, PPAT, PRIM1, POLE2, NME1, ADK, RRM2, RRM1, POLD2, PRIM2, PAICS
Basal transcription factors	0.0071	MNAT1, TAF12, TAF5, TAF4B, GTF2A2, TAF9, GTF2H2
Fatty acid metabolism	0.0121	ACADM, ELOVL5, EHHADH, FADS2, ELOVL6, HADH, ACAT1
Homologous recombination	0.0312	SSBP1, SHFM1, POLD2, RAD50, RPA3
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	0.0338	RARS2, DARS, NARS2, RARS, FARSB, EPRS
Nucleotide excision repair	0.0338	MNAT1, RFC3, POLE2, POLD2, GTF2H2, RPA3

表 3-3 RNA-seq による遺伝子解析結果（感染牛>非感染牛）

RNA-seq において、感染牛群で非感染牛群より 2 倍以上高発現していた遺伝子について KEGG pathway 解析を行った結果、細胞増殖やタンパク質合成に関連する Pathway（■）で多くの高発現遺伝子が認められた。

Table The list of top 20 down-regulated genes in BLV-infected cattle in comparison to BLV-uninfected group

Gene symbol	Name	Fold change	p_value
CHRND	cholinergic receptor nicotinic delta subunit	-3.152	1.28E-02
CRTAC1	cartilage acidic protein 1	-3.152	5.00E-05
GCGR	glucagon receptor	-3.133	7.85E-03
LIMS2	LIM zinc finger domain containing 2	-3.089	1.00E-04
BACE2	beta-site APP-cleaving enzyme 2	-2.928	1.08E-02
B3GAT1	beta-1,3-galactosyltransferase 1	-2.885	5.50E-03
EXOC3L4	exocyst complex component 3 like 4	-2.848	5.00E-05
FGF13	fibroblast growth factor 13	-2.818	2.95E-03
HES2	hes family bHLH transcription factor 2	-2.761	4.60E-03
ENHO	energy homeostasis associated	-2.751	5.00E-05
KANK2	KN motif and ankyrin repeat domains 2	-2.689	5.00E-05
RAMP3	receptor activity modifying protein 3	-2.668	9.00E-04
ATP4B	ATPase H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting beta subunit	-2.646	5.00E-05
CD209	CD209 molecule	-2.623	9.00E-03
AOC3	amine oxidase, copper containing 3	-2.605	1.55E-03
C1QC	complement C1q C chain	-2.495	5.00E-05
IL1RL1	interleukin 1 receptor like 1	-2.484	1.02E-02
RORC	RAR related orphan receptor C	-2.469	1.00E-04
FAM149A	family with sequence similarity 149, member A	-2.456	3.70E-03
C1QA	complement C1q A chain	-2.443	5.00E-05

Fold change:RNA-seqにおける感染>非感染のLog<sub>2</sub> fold change

**表 3-4 RNA-seq による遺伝子解析結果（感染牛<非感染牛）**

RNA-seq の結果、非感染牛群で感染牛群より 2 倍以上高発現していた 877 遺伝子のうち、変動量の多い上位 20 遺伝子を示した。

Down regulation		
KEGG Term	P Value	Genes
Hematopoietic cell lineage	1.675E-10	IL1R2, IL1R1, LOC100138951, CD8A, CD3D, CD8B, CD3E, CSF1, ITGA3, ITGA4, IL6R, IL7R, CD1E, CD9, ITGA6, CD44, ITGA5, IL4R, CD59, CD2, CD4, CD14
Cytokine-cytokine receptor interaction	1.483E-09	IL1R2, IL1R1, PDGFB, CSF1, CCR1, IL21R, BMPR2, TGFB3, CXCR1, TNFSF14, CXCR2, PF4, TNFSF13, CXCR3, TNFSF12, IL7R, TNFSF1A, TNFSF1B
Cell adhesion molecules (CAMs)	1.995E-09	ITGAL, CD8A, CADM1, CD8B, L1CAM, CDH1, PDCD1, SDC3, PVRL1, ITGB7, ICOS, CD2, CD4, CNTNAP1, LOC509513, SELPLG, SPN, CD38, ICAM1, F11R
T cell receptor signaling pathway	1.306E-07	ITK, CD3D, CD8A, CD3E, CD8B, PIK3CD, PDCD1, PAK6, CBL, NCK2, LAT, PLCG1, CD40LG, FYN, MAPK13, ICOS, LCK, ZAP70, CD4, LOC509513
Complement and coagulation cascades	1.421E-05	C3AR1, A2M, CSAR1, C3, F13A1, C1QC, PLAUR, C1QA, VWF, C1QB, F5, CD59, SERPINE1, CFD, CPB2, F2R
Rap1 signaling pathway	2.985E-05	F2RL3, ITGAL, PRKCZ, RAP1GAP, PDGFB, GNAI1, MRAS, CSF1, CTNND1, LPAR2, FGF13, CDH1, IGF1R, P2RY1, LOC509513, THBS1, RAPGEF2, CSF1R
MAPK signaling pathway	5.563E-05	IL1R2, IL1R1, PDGFB, MRAS, GNAI2, MAPKAPK3, TGFB3, DUSP10, HSPA1A, CACNB3, FGF13, TNFSF1A, MAP3K6, RAPGEF2, PTPN7, PRKCG, TAB1
Chemokine signaling pathway	1.264E-04	ITK, PRKCZ, LOC508666, FGR, GNAI1, NCF1, CCR1, PIK3CD, CXCR1, CXCR2, PF4, CXCR3, CCR7, CCR6, ARRB2, CCR5, CCR4, CXCR4, CCR3
Leukocyte transendothelial migration	1.272E-04	ITGAL, ICAM1, F11R, ITK, NCF1, GNAI1, MMP9, PIK3CD, ACTN1, CTNND1, CD99, PRKCG, ITGA4, MYL9, PLCG1, CXCR4, MAPK13, TXK, JAMB
Primary immunodeficiency	1.402E-04	CD8A, CD3D, CD40LG, CD8B, CD3E, ICOS, LCK, ZAP70, CD4, IL7R
Chagas disease	2.325E-04	GNAI5, GNAO1, CD3D, GNAI1, CD3E, C3, GNAI1, PIK3CD, TGFB3, TLR4, C1QC, C1QA, TNFSF1A, C1QB, ACE, MAPK13, SERPINE1, LOC509513
Staphylococcus aureus infection	4.290E-04	C1QA, C1QB, ITGAL, ICAM1, C3AR1, SELP, CSAR1, C3, CFD, LOC509513, SELPLG, C1QC
Arrhythmic right ventricular cardiomyopathy	4.644E-04	ITGA9, TCF7, ITGA6, ITGA5, PKP2, ITGB7, ACTN1, LEF1, ITGB5, ITGA3, CACNB3, ITGA4, ITGA2B
Platelet activation	8.407E-04	F2RL3, PRKCZ, TBXA51, GNAI1, PIK3CD, VWF, P2RX1, FYN, MAPK13, P2RY1, FCER1G, GUCY1B3, COL11A2, PLA2G4B, MYLK, LCP2, F2R, ITGA2B
Natural killer cell mediated cytotoxicity	9.385E-04	ITGAL, ICAM1, PRF1, CD244, PIK3CD, PRKCG, GZMB, NCR1, HCST, LAT, PLCG1, FYN, LCK, ZAP70, FCER1G, TYROBP, LCP2
Intestinal immune network for IgA production	9.550E-04	CCR9, CD40LG, CXCR4, ICOS, ITGB7, CCR10, TNFSF13, PI3R, ITGA4, LOC509513, CD28
Lysosome	2.076E-03	LAPTM4B, GSH, LIPA, GMA2, ARSG, PSAP, LGAMN, PPT2, CD63, CTSW, SLC11A1, CD68, NAGA, SMPD1, CTSB, ATP6V0A1, CTSB
Toxoplasmosis	3.576E-03	GNAO1, LDLR, GNAI1, PIK3CD, TGFB3, TLR4, HSPA1A, TAB1, TNFSF1A, ITGA6, CCR5, CD40LG, MAPK13, IL10RA, ALOX5
Focal adhesion	3.674E-03	PDGFB, PIK3CD, ACTN1, ITGB5, ITGA3, PRKCG, ITGA4, FLNB, MYL9, PAK6, VWF, ITGA9, IGF1R, ITGA6, ITGA5, FYN, ITGB7, ZYX, COL11A2, THBS1
Osteoclast differentiation	3.891E-03	IL1R1, NCF1, CSF1, PIK3CD, MITF, FHL2, TAB1, SIRPA, SIRPB1, TNFSF1A, MAPK13, FYN, LCK, TREM2, TYROBP, LCP2, CSF1R
Axon guidance	4.875E-03	NRP1, LIMK2, GNAI1, EFNB1, NTNG2, L1CAM, FES, PAK6, SEMA4G, CXCR4, FYN, RGS3, SEMA7A, SEMA4C, SEMA4D, SEMA4A
NF-kappa B signaling pathway	5.339E-03	TNFSF1A, ICAM1, LAT, IL1R1, PLCG1, CD40LG, LCK, ZAP70, TNFSF14, TLR4, LOC509513, TAB1, CD14
Hypertrophic cardiomyopathy	5.465E-03	ITGA9, ACE, ITGA6, ITGA5, ITGB7, TGFB3, ITGB5, CACNB3, ITGA3, ITGA4, TPM1, ITGA2B
TNF signaling pathway	8.267E-03	ICAM1, CREB3, MMP9, CSF1, PIK3CD, IFI47, TAB1, TNFSF1A, NOD2, TNFSF1B, MAPK13, CREB3L2, CREB3L1, ITCH
Regulation of actin cytoskeleton	9.896E-03	ITGAL, LIMK2, PDGFB, MRAS, PIK3CD, GNAI2, ACTN1, ITGB5, ITGA3, FGF13, ITGA4, MYL9, PAK6, ITGA9, ITGA6, ITGA5, GSN, ITGB7, CD14, MYLK
ECM-receptor interaction	1.022E-02	VWF, ITGA9, ITGA6, CD44, ITGA5, ITGB7, ITGB5, ITGA3, ITGA4, COL11A2, THBS1, ITGA2B
Transcriptional misregulation in cancer	1.023E-02	MAF, CEBPB, IL1R2, ERG, CEBPE, MMP9, ELANE, TSPAN7, GZMB, IGF1R, CCR7, ITGB7, MPO, LOC509513, ETV5, HPDG, CD14, CSF1R, MLLT3
Amoebiasis	1.110E-02	IL1R2, RAB7B, GNAI5, IL1R1, GNAI1, PIK3CD, TGFB3, ACTN1, TLR4, PRKCG, SERPINE1, HSPB1, COL11A2, CD14
Aldosterone synthesis and secretion	1.391E-02	DAGLA, PDE2A, CREB3, LDLR, GNAI1, CREB3L2, CAMK1, CREB3L1, PRKCG, DAGLB, LIPE
Inflammatory bowel disease (IBD)	1.742E-02	MAF, STAT4, NOD2, IL4R, IL21R, TGFB3, RORC, TLR4, LOC509513, FOXP3
Dilated cardiomyopathy	2.405E-02	ITGA9, ITGA6, ITGA5, ITGB7, TGFB3, ITGB5, CACNB3, ITGA3, ITGA4, TPM1, ITGA2B
PI3K-Akt signaling pathway	2.413E-02	PDGFB, CSF1, ITGB5, FGF13, TLR4, LPAR2, IL7R, IGF1R, PKN3, IL4R, ITGB7, CREB3L2, GYS1, CREB3L1, COL11A2, THBS1, CSF1R, SGK1, CREB3
cAMP-PKG signaling pathway	2.869E-02	SLC8A1, ADORA3, TRPC6, CREB3, GNAI1, GNAI1, PIK3CD, GNAI2, MYL9, ATP1B2, ADRB2, ATP1B4, PDE2A, CREB3L2, CREB3L1, GUCY1B3, MYLK
Malaria	2.991E-02	ITGAL, ICAM1, SELP, CD40LG, TGFB3, TLR4, LOC509513, THBS1
Sphingolipid signaling pathway	4.069E-02	PRKCZ, ADORA3, GNAI1, PIK3CD, GNAI2, PRKCG, S1PR2, TNFSF1A, MAPK13, FYN, SMPD1, FCER1G, CTSB
Phagosome	4.133E-02	RAB7B, MSR1, OLR1, NCF1, C3, MRC2, ITGB5, TLR4, ITGA5, CD209, MPO, ATP6V0A1, TUBB6, TUBB1, THBS1, CD14
Proteoglycans in cancer	4.141E-02	MMP9, MRAS, PIK3CD, ITGB5, TLR4, PRKCG, CD63, TIMP3, FLNB, PLAUR, CBL, IGF1R, PLCG1, CD44, ITGA5, MAPK13, GAB1, THBS1, TWIST2
TGF-beta signaling pathway	4.622E-02	BMP4, ACVR2B, LTBP1, SMAD7, SMAD6, FST, BMPR2, TGFB3, THBS1, ACVR1
Pathways in cancer	4.875E-02	F2RL3, PDGFB, GNAI1, GNAI1, MMP9, MITF, GNAI2, TGFB3, LPAR2, FGF13, CDH1, IGF1R, CXCR4, AXIN2, CSF1R, BMP4, CEBPB, TCF7, RET, EPAS1
Long-term depression	4.959E-02	IGF1R, GNAO1, GNAI1, GNAI2, GUCY1B3, PRKCG, PLA2G4B
VEGF signaling pathway	4.959E-02	SH2D2A, PLCG1, MAPK13, PIK3CD, MAPKAPK3, HSPB1, PRKCG, PLA2G4B

表 3-5 RNA-seq による遺伝子解析結果 (感染牛<非感染牛)

RNA-seq の結果、非感染牛群で感染牛群より 2 倍以上発現量が高かった遺伝子について、KEGG pathway 解析を行った結果、免疫に関連する Pathway (■) で多くの高発現遺伝子が認められた。

Gene symbol	Name	Fold change
CDKL4	Cyclin Dependent Kinase Like 4	4.110
CXCL10	C-X-C Motif Chemokine Ligand 10	2.100
EIF3E	Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 Subunit E	1.920
MS4A1	Membrane Spanning 4-Domains A1	1.370
ANXA2	Annexin A2	-1.480
PDCD1	Programmed Cell Death 1	-1.560
TGFBI	Transforming Growth Factor Beta Induced	-1.630
CD28	CD28 Molecule	-1.630
CFD	Complement Factor D	-1.700
CD4	CD4 Molecule	-1.770

old change:RNA-seq における感染牛>非感染牛の Log<sub>2</sub> fold change

### 表 3-6 牛白血病に関連する候補遺伝子の選定

感染／非感染牛における RNA-seq 解析の結果から、牛白血病感染／発症に関連すると考えられる 10 遺伝子（候補遺伝子）を選択し、感染／発症状況の異なる 5 群のホルスタイン種経産牛の血液から抽出した RNA における発現遺伝子、発現量についてリアルタイム PCR 解析を行った。赤字は細胞増殖やタンパク質合成に関連する遺伝子、青字は免疫に関連する遺伝子、紫字は免疫抑制に関連する遺伝子を示した。

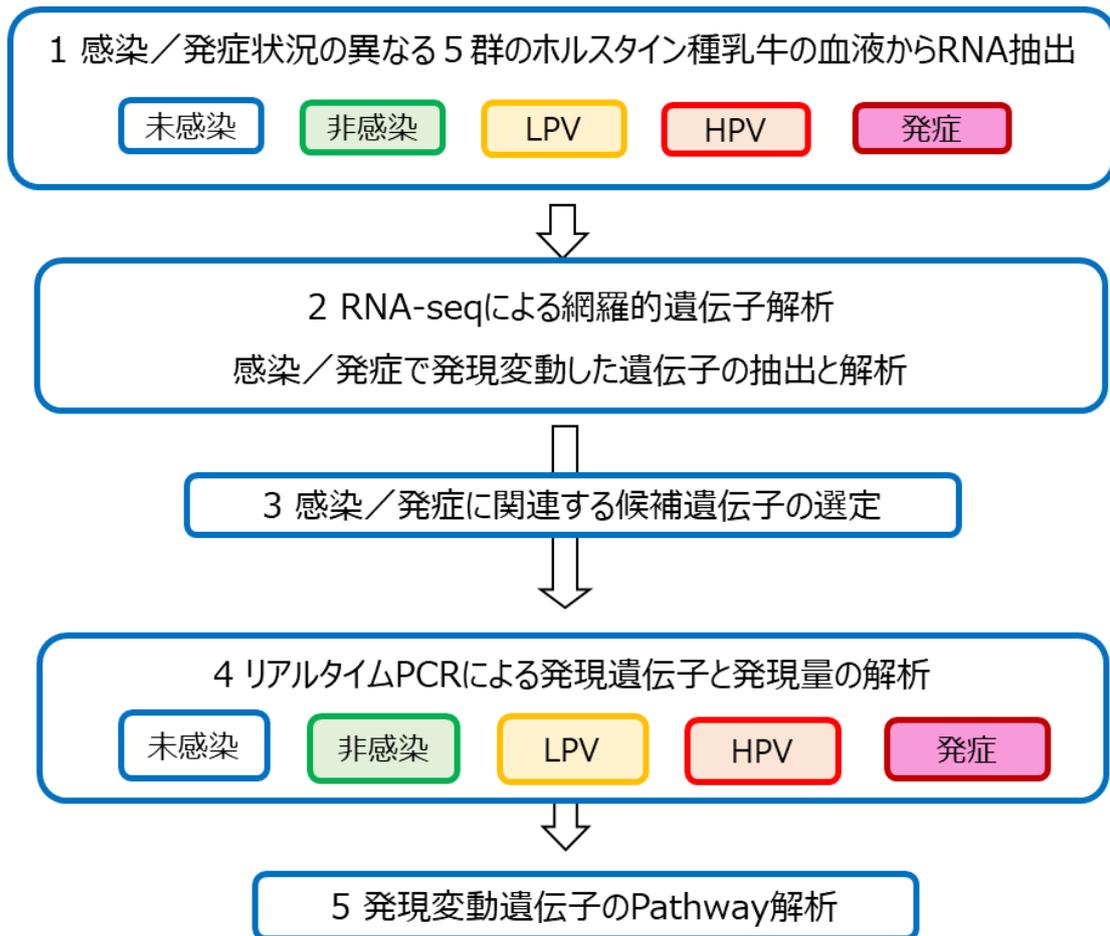


図 3-1 牛白血病関連遺伝子の探索の流れ

牛白血病関連遺伝子の探索は次の手順で実施した。まず、健康なホルスタイン種乳牛4群 ①未感染：清浄農場の未感染牛 ②非感染：感染農場の非感染牛 ③LPV：低プロウイルス量感染牛 ④HPV：高プロウイルス量感染牛および⑤EBL発症牛の5牛群から採血し、血液中RNAを抽出した。この抽出RNAについてRNA-seqによる網羅的遺伝子解析を行い、その結果に基づき、候補遺伝子を選定した。次に、リアルタイムPCRにより各牛群における発現遺伝子、発現量を解析し、発現量に変動していた遺伝子（群）についてPathway解析を行った。

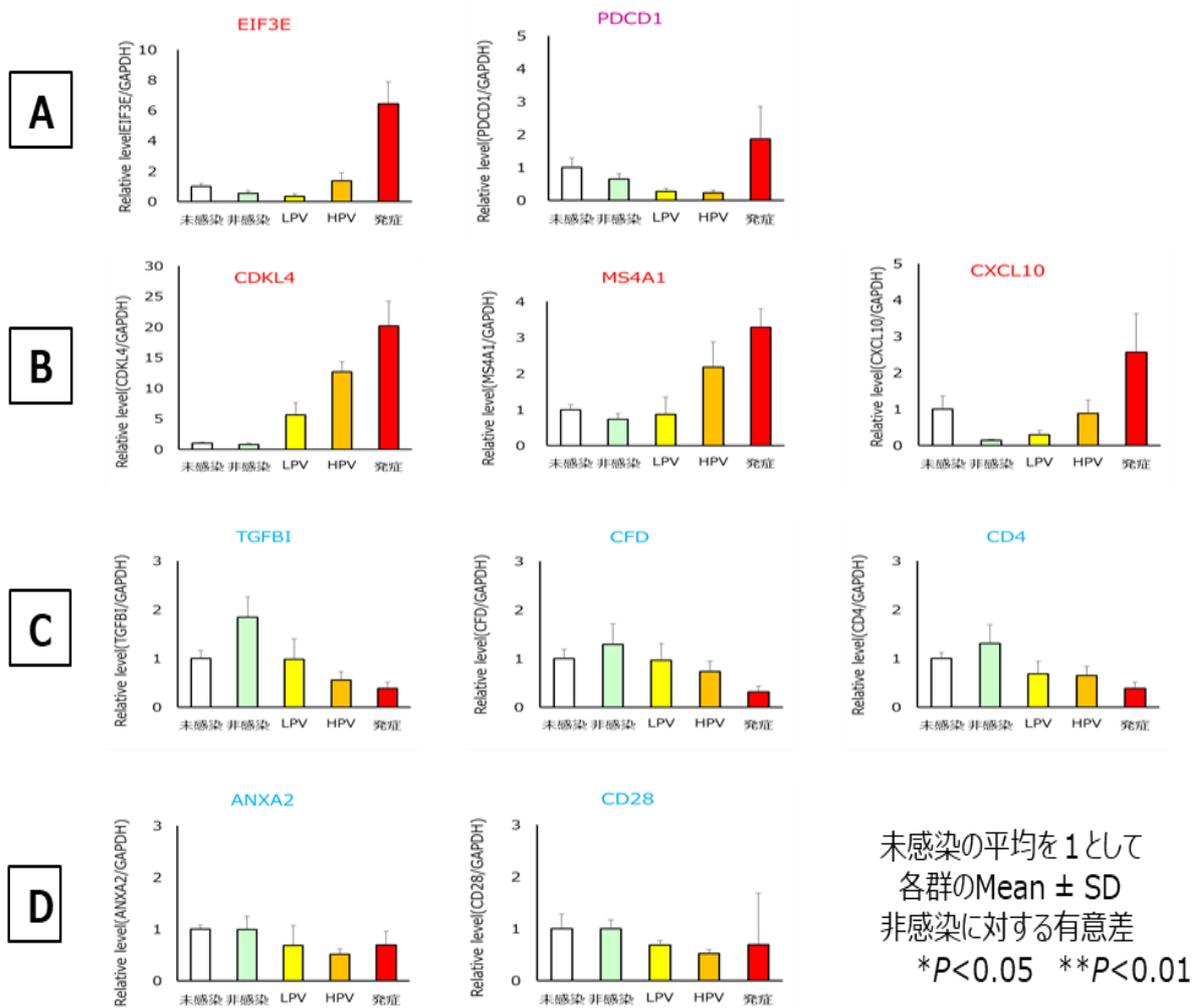


図 3-2 各候補遺伝子の感染/発症状況の異なる5牛群における発現量比較  
10の候補遺伝子(赤:細胞増殖、タンパク質合成、青:免疫、紫:免疫抑制)を選定し、①未感染□②非感染■③LPV■④HPV■⑤発症■の5牛群の血液から抽出RNAにおけるそれぞれの発現量についてリアルタイムPCR解析を行った。発現量は未感染牛群平均値を1としてその比で表し、非感染牛群との間で有意差の認められたものに\*を付した。その結果、10の候補遺伝子は次の4グループに大別された。A:発症牛群で亢進(EIF3E、PDCD1) B:発症・感染牛群で亢進(CDKL4、MS4A1、CXCL10)、C:非感染牛群で亢進、感染・発症牛群で抑制(TGFB1、CFD、CD4)、D:変化なし(CD28、ANXA2)

A: T cell receptor signaling pathway    B: Complement cascades

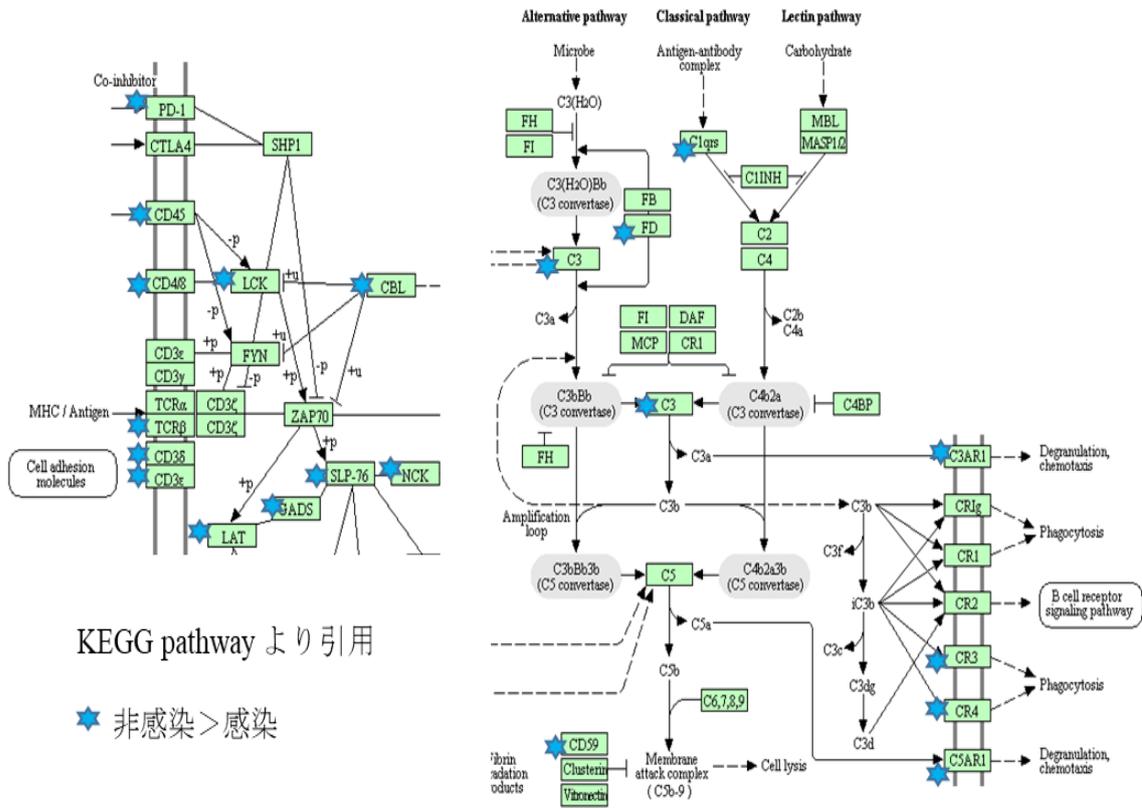


図 3-3 非感染牛で亢進していた遺伝子の Pathway 解析

感染／非感染牛群における RNA-seq の結果、非感染群で 2 倍以上発現量が高かった 877genes (★) について Pathway 解析を実施した。

その結果、**A:** T cell receptor signaling pathway や、 **B:** Complement cascade など自然免疫に関連する Pathway において、多くの高発現遺伝子が認められた。

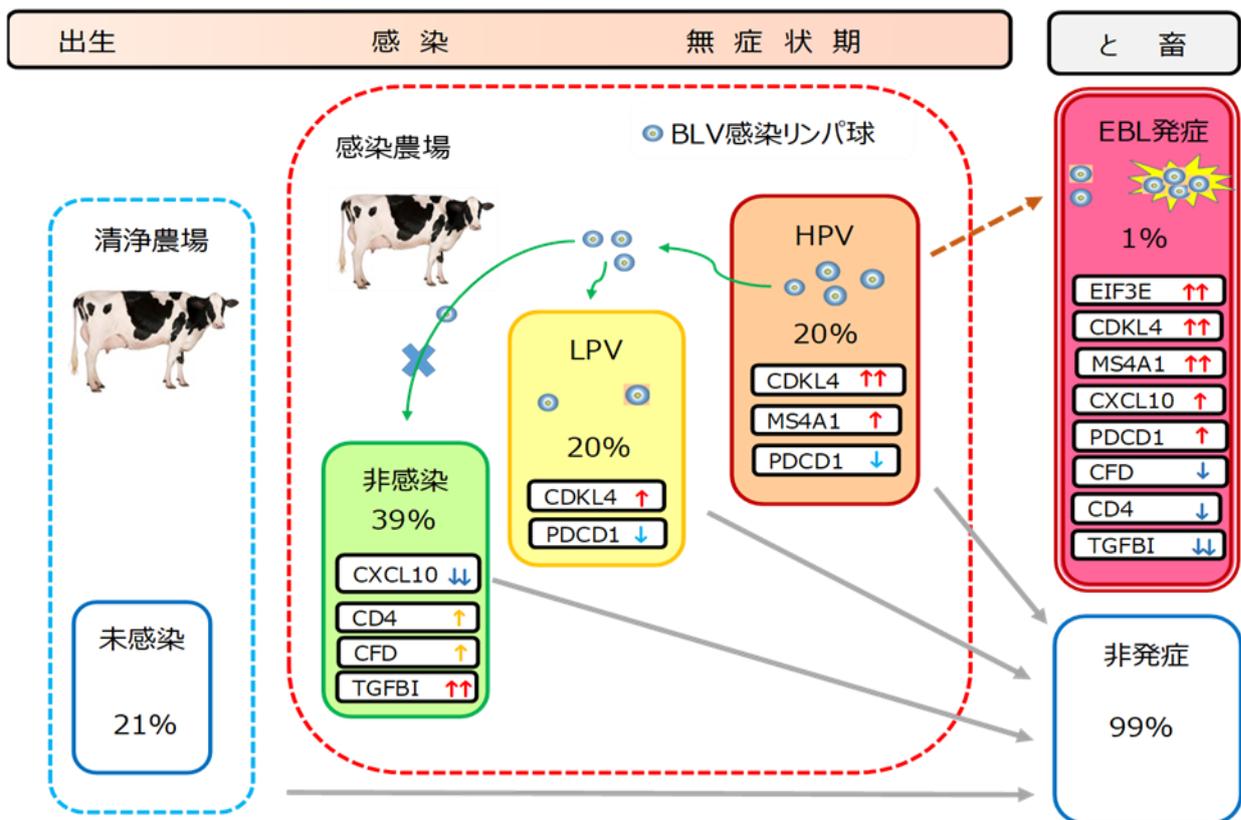


図 3-4 まとめ

牛白血病に関連する遺伝子を細胞遺伝学的手法を用いて探索したところ、非感染牛、感染牛、発症牛群の間で、発現遺伝子やその発現量に違いが認められた。

発症牛群では、細胞増殖やタンパク質合成に関連する遺伝子が亢進している一方、免疫関連遺伝子の発現が抑制され、他の健康群と明確に区分された。非感染牛では、T細胞や補体系遺伝子群などの免疫に関連する遺伝子群が高値を示し、Pathway解析では自然免疫に関わる多くの遺伝子群の発現が亢進していることが明らかとなった。

## 総 括

本研究は、2004年に施行された牛個体識別番号（ID）を基に、10年間にわたり、1万頭のホルスタイン種乳牛を出生からと畜まで追跡し、牛白血病に関する疫学調査情報、血統情報と関連づけ、さらに最新の統計遺伝学的解析と細胞遺伝学的解析を組み合わせたものである。

今回の研究は、神奈川県という比較的狭い一地域を対象に実施したものであるが、牛白血病発生の年次推移、農場および個体のBLV抗体陽性率、と畜検査における牛白血病検出率、ホルスタイン種乳牛の廃用年齢、種雄牛の供用状況は、いずれも全国における報告と相同性が高く（ $P < 0.01$ ）、全国のホルスタイン種乳牛の実態を反映していた。

これまで、EBL発症牛は眼球突出や体表リンパ節の腫脹などの臨床症状を呈し、死に至るといわれていたが、実態としては、生前に臨床症状や血液性状からEBL発症すなわち腫瘍病変の有無を診断することは難しく、と畜後にはじめて発見されるケースがほとんどであった。さらに、今回、ホルスタイン種乳牛を10年間、追跡調査した結果、EBL発症牛はすべてと畜後の検査で発見されたものであり、その発症率は1%と低かった。すなわち、99%のホルスタイン種乳牛は生涯発症せず、牛白血病発症制御に関して高い自然抵抗性を保有することを示した。さらに、農場段階における疫学調査の結果、成牛では、BLV感染率、血液中BLVプロウイルス量、EBL発症率に加齢による差は認められず、感染農場において、長期間BLVに曝露されても感染しない非感染牛が存在していた。

今回、非感染牛と感染牛について、RNA-seq による網羅的遺伝子解析を行った結果、両者には臨床的に全く差が認められないにも関わらず、発現遺伝子、その発現量には大きな差が認められ、非感染牛では、自然免疫に関わる多くの遺伝子群の発現が亢進していることを明らかとした。またリアルタイム PCR の結果からも、非感染牛、感染牛、発症牛群の間で、発現遺伝子やその発現量に違いが認められ、非感染牛では、自然免疫に関わる多くの遺伝子群の発現が亢進していた。

一方、発症牛群では、細胞増殖やタンパク質合成に関連する遺伝子が亢進し、免疫関連遺伝子の発現が抑制されており、他の健康群と明確に区分された。特に、EIF3E は他の健康群より発現量が著しく高くなっていた。この EIF3E は細胞増殖に関連する遺伝子であり、EBL 発症牛では腫瘍病変部でリンパ球様細胞の著しい増殖が認められることと符合し、細胞増殖に関する調節機能の破綻を反映しているものと推察された。今回、EIF3E の高発現は、発症牛群で特異的に認められたことから、今後、発症牛のマーカーとして利用できる可能性が示された。また、免疫抑制に関与するとされる PDCD1 は発現量が亢進し、TGFB1、CFD、CD4 など免疫関連遺伝子の発現が抑制されていた。このことは、Ikebuchi ら (2013) の報告と一致し、発症牛では免疫疲弊がおこり、免疫機能が低下していることが伺われた。

これまで一時点の調査から、加齢とともに BLV 感染率が上昇 (Murakami *et al.*, 2013) すること、病態が進行して血液中プロウイルス量が増加する (Jimba *et al.*, 2010) と考えられていた。しかしながら 10 年間にわたり 1 万頭の牛群を追跡し、各個体の年齢と疫学検査成績を統合したところ、感染率は 2 歳から 3 歳にかけ

て大幅に上昇するが、2歳までの牛群や3歳以上の牛群では加齢とともに BLV 感染率が上昇することはなかった。また、病態の進行とともに血液中プロウイルス量が増加することも認められなかった。

さて、今回、ホルスタイン種乳牛の血統と EBL 発症情報を関連づけ、娘牛群の成績から種雄牛の牛白血病制御に関する遺伝的能力を検証した。その結果、牛白血病の感染／発症に関する遺伝率を 0.19 と推定するとともに、多用されている種雄牛に発症子孫牛のいない血統を特定し、牛白血病発症に関する高い制御能力が世代を超えて継承されていることを示した。血統登録制度、牛群検定は現在も継続しており、フィールドの成績が蓄積されている。今後、牛白血病発症に関する情報を関連づけ、例数を重ねることができれば、より多くの牛白血病制御能力をもつ種雄牛を特定することが可能であると考えられる。その高い遺伝的能力は子孫牛に継承されており、上記のような細胞遺伝学的手法を応用して、牛白血病の制御に関する遺伝子（群）を特定しゲノム育種につなげることが期待できる。

今後、これらの知見を活用し、牛白血病発症の制御に関して高い遺伝的能力を持つ血統を選抜し、遺伝的改良をすすめることができれば、新たな牛白血病対策として画期的なものとなる。

## 略 語 表

Item	Term
ANXA2	annexin A2
ATL	adult T-cell leukemia
BLUP	best linear unbiased prediction
BLV	bovine leukemia virus
BoLA	bovine leucocyte antigens
BSE	bovine spongiform encephalopathy
CBP	calcium-binding proteins
CD28	CD28 molecule
CD4	CD4 molecule
CDKL4	cyclin dependent kinase like 4
cDNA	complementary DNA
CFD	complement factor D
CXCL10	C-X-C motif chemokine ligand 10
DAVID	The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
EBL	enzootic bovine leukosis
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EIF3E	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E
ELISA	enzyme-linked immunoSorbent assay
EU	European Union
FPKM	Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HIV	human immunodeficiency virus
HPV	Holstein cow with high BLV-proviral load
HTLV1	human T-lymphotropic virus type 1
ID	identification number
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LPV	Holstein cow with low BLV-proviral load
MHC	major histocompatibility complex
MS4A1	membrane spanning 4-domains A1
NC	nucleocapsid
OIE	World Organisation for Animal Health
<i>P</i>	probability
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PCR	polymerase chain reaction
PDCD1	programmed cell death 1
PGD	paternal granddaughter
PL	persistent lymphocytosis
PVL	proviral load
<i>r</i>	simple correlation coefficient
RIN	RNA Integrity Number
$R^2$	multiple coefficient of determination
SBL	sporadic bovine leukosis
SD	standard deviation (sample)
SNP	single nucleotide polymorphism
TGFBI	transforming growth factor beta induced

## 参 考 文 献

- Abdalla EA., Rosa GJI, Weigel KA and Byrem TM. 2013. Genetic analysis of leukosis incidence in United States Holstein and Jersey populations. *J. Dairy Sci.* 96: 6022-6029.
- Abdalla EA, Peñagaricano F, Byrem TM, Weigel KA and Rosa GJ1. 2016. Genome-wide association mapping and pathway analysis of leukosis incidence in a US Holstein cattle population. *Anim Genet.* 47: 395-40
- Aida Y, Murakami H, Takahashi M and Takeshima SN. 2013. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Front Microbiol.* 4: 328.
- Battagin M, Forabosco F, Jakobsen JH, Penasa M, Lawlor TJ and Cassandro M. 2012. International genetic evaluation of Holstein bulls for overall type traits and body condition score. *Journal of Dairy Science* 95: 4721-4731.
- Erskine RJ, Bartlett PC, Byrem TM, Render CL, Febvay C, and Houseman JT. 2012. Association between bovine leukemia virus, production, and population age in Michigan dairy herds. *Journal of Dairy Science* 95: 727-734.
- Brym P and Kamiński S. 2017. Microarray analysis of differential gene expression profiles in blood cells of naturally BLV-infected and uninfected Holstein-Friesian cows. *Mol Biol Rep.* 44: 109-127
- Cohen OJ, Kinter A and Fauci AS. 1997. Host factors in the pathogenesis of HIV disease. *Immunol Rev.* 159: 31-48.
- EFSA AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare), 2015. Scientific opinion on enzootic bovine leukosis. *EFSA Journal* 13: 4188, 63  
<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4188>[Cited 31 October 2017]

Gillet N, Florins A, Boxus M, Burteau C, Nigro A, Vandermeers F, Balon H, Bouzar AB, 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: 18.

(一社) 日本ホルスタイン登録協会 家畜改良データベース  
<http://www.rg.liaj.jp/hol/j1.do?fn=init> [Cited 31 October 2017]

細字晴仁, 仲澤浩江, 駒井圭, 岩永佳子, 荒木尚登, 福岡静男, 稲垣 靖子. 2013. 管内一酪農家における牛白血病対策. 平成 25 年度神奈川県家畜保健衛発表会集録 <http://www.pref.kanagawa.jp/uploaded/attachment/707638.pdf> [Cited 31 October 2017]

Ikebuchi R, Konnai S, Sunden Y, Onuma M and Ohashi K. 2010. Molecular cloning and expression analysis of bovine programmed death-1. *Microbiol Immunol.* 54: 291-298.

Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S and Ohashi K. 2013. Blockade of bovine PD-1 increases T cell function and inhibits bovine leukemia virus expression in B cells in vitro. *Vet Res.* 22: 59.

稲垣靖子. 2007. 科学としての「畜産学」と地域の「畜産業」の間で. *畜産の研究* 61: 1293-1298

稲垣靖子, 倉田直亮, 江川寿夫, 町田建一. 1983. 県内乳牛群検定成績の解析  
給与飼料構造の把握と解析による無脂固形分率向上のための飼料構成の検討  
. *神奈川県畜産試験場研究報告* 73: 1-6

Jimba M, Takeshima SN, 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.

Juliarena MA, Barrios CN, Ceriani MC and Esteban EN. 2016. Hot topic: Bovine leukemia virus (BLV) - infected cows with low proviral load are not a source of infection for BLV-free cattle. *J. Dairy Sci.* 99: 4586-4589.

Kabeya H, Ohashi K and Onuma M. 2001. Host immune responses in the course of bovine leukemia virus infection. *J. Vet. Med. Sci.* 63: 703-708.

(一社) 家畜改良事業団. 2016. 平成 27 年度乳用牛群能力検定成績のまとめ  
<http://liaj.lin.gr.jp/japanese/newmilkset.html>. [Cited 31 October 2017]

(独) 家畜改良センター. 2004. 国際化時代における乳用牛改良事業の必要性と効率的実施について. 乳用牛改良体制検討会 本報告書  
<http://www.nlbc.go.jp/kachikukairyu/kairyozoshoku/040831houkoku.pdf>  
[Cited 31 October 2017]

(独) 家畜改良センター. 2016. 乳用牛評価報告 36 号  
<http://www.nlbc.go.jp/kachikukairyu/iden/nyuyogyu/hokoku.html>  
[Cited 31 October 2017]

(独) 家畜改良センター 牛個体識別情報検索サービス  
<https://www.id.nlbc.go.jp/top.html> [Cited 31 October 2017]

神奈川県食肉衛生検査所事業概要

<http://www.pref.kanagawa.jp/cnt/f661/>[Cited 31 October 2017]

Kataoka K, Nagata Y, Kitanaka A, Shiraishi Y, Shimamura T, Yasunaga J, Totoki Y, Chiba K, Sato-Otsubo A, Nagae G, Ishii R, Muto S, Kotani S, Watatani Y, Takeda J, Sanada M, Tanaka H, Suzuki H, Sato Y, Shiozawa Y, Yoshizato T, Yoshida K, Makishima H, Iwanaga M, Ma G, Nosaka K, Hishizawa M, Itonaga H, Imaizumi Y, Munakata W, Ogasawara H, Sato T, Sasai K, Muramoto K, Penova M, Kawaguchi T, Nakamura H, Hama N, Shide K, Kubuki Y, Hidaka T, Kameda T, Nakamaki T, Ishiyama K, Miyawaki S, Yoon SS, Tobinai K, Miyazaki Y, Takaori-Kondo A,

Matsuda F, Takeuchi K, Nureki O, Aburatani H, Watanabe T, Shibata T, Matsuoka M, Miyano S, Shimoda K and Ogawa S. 2015. Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. *Nat Genet.* 47: 1304-1315.

Kettmann R, Deschamps J, Cleuter Y, Couez D, Burny A and Marbaix G. 1982. Leukemogenesis by bovine leukemia virus: proviral DNA integration and lack of RNA expression of viral long terminal repeat and 3' proximate cellular sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 79: 2465-2469.

Kobayashi S, Hidano A, Tsutsui T, Yamamoto T, Hayama Y, Nishida T, Muroga N, Konishi M, Kameyama K and Murakami K. 2014. Analysis of risk factors associated with bovine leukemia virus seropositivity within dairy and beef breeding farms in Japan: a nationwide survey. *Res Vet Sci.* 96: 47-53

小西 美佐子. 2015. 最新の家畜疾病情報 (6) 地方病性牛白血病 (EBL). *日本獣医師会雑誌* 68: 352-354.

Konnai S1, Suzuki S, Shirai T, Ikebuchi R, Okagawa T, Sunden Y, Mingala CN, Onuma M, Murata S and Ohashi K. 2012. Enhanced expression of LAG-3 on lymphocyte subpopulations from persistently lymphocytotic cattle infected with bovine leukemia virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 36: 63-69.

窪田五郎. 1927. 淋巴肉腫の一例, *中央獣医誌*, 40: 375-378

国枝哲夫. 2014. 遺伝的改良の基礎 in 国枝哲夫, 今川和彦, 鈴木勝士 (ed.) *獣医遺伝育種学*, 第1版, 第4章: 57-60, 朝倉書店, 東京,

Kusama K, Bai R, Nakamura K, Okada S, Yasuda J and Imakawa K. 2017. Endometrial factors similarly induced by IFNT2 and IFNTc1 through transcription factor FOXS1. *PLoS One.* 12: e0171858.

- Lewin HA, Wu MC, Stewart JA and Nolan TJ. 1988. Association between BoLA and subclinical bovine leukemia virus infection in a herd of Holstein-Friesian cows. *Immunogenetics* 27: 338-344.
- Konnai S, Usui T, Ohashi K and Onuma M. 2003. The rapid quantitative analysis of bovine cytokine genes by real-time RT-PCR. *Vet. Microbiol.* 30: 283-294
- Loffredo JT, Maxwell J, Qi Y, Glidden CE, Borchardt GJ, Soma T, Bean AT, Beal DR, Wilson NA, Rehrauer WM, Lifson JD, Carrington M and Watkins DI. 2007. Mamu-B\*08-positive macaques control simian immunodeficiency virus replication. *J. Virol.* 81: 8827-8832.
- Mekata, H, Sekiguchi S, Konnai S, Kirino Y, Horii Y and Norimine J. 2015. Horizontal transmission and phylogenetic analysis of bovine leukemia virus in two districts of Miyazaki, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 77: 1115-1120.
- Merlini R, Gutiérrez G, Alvarez I, Jaworski JP, Carignano H, Poli M, Willems L and Trono K. 2016. Bovine leukemia virus becomes established in dairy herds before the first lactation. *Arch. Virol.* 161: 3215-3217.
- Miller JM, Miller LD, Olson C and Gillette KG. 1969. Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 43: 1297-1305.
- Misztal I, Tsuruta S, Strabel T, Auvray B, Druet T and Lee DH. 2002. BLUPF90 and related programs (BGF90). Commun. No. 28-07 in 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Montpellier, France.
- Misztal I, Legarra A and Aguilar I, 2009. Computing procedures for genetic evaluation including phenotypic, full pedigree, and genomic information. *Journal of Dairy Science* 92, 4648-4655. Miyazawa M, Lopalco L, Mazzotta F, Lo Caputo S, Veas F,

Clerici M; ESN Study Group. 2009. The 'immunologic advantage' of HIV-exposed seronegative individuals. *AIDS*. 14: 161-175.

Miyasaka T, Takeshima SN, Matsumoto Y, Kobayashi N, Matsushashi T, Miyazaki Y, Tanabe Y, Ishibashi K, Sentsui H and Aida Y. 2011. The diversity of bovine MHC class II DRB3 and DQA1 alleles in different herds of Japanese Black and Holstein cattle in Japan. *Gene*. 472: 42-49.

宮澤正顯, 河原佐智代, 金成安慶, 武田英里, 坂本真由美, 阿部弘之, 木下さおり, 湯浅貴恵, 梶原栄二, 馬野奈津子. 2008. レトロウイルス感染と宿主因子: エイズ制圧を目指して. *近畿大学医学雑誌* 33: 209-238

元村聡. 2013. 牛トレーサビリティ制度の活用について. 畜産の情報  
<http://lin.alic.go.jp/alic/month/domefore/2013/jul/wadai.htm>[Cited 31 October 2017].

Motton DD and Buehring GC. 2003. Bovine leukemia virus alters growth properties and casein synthesis in mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* 86: 2826-2838.

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: 1123-1126.

Nagaoka Y, Kabeya H, Onuma M, Kasai N, Okada K and Aida Y. 1999. Ovine MHC class II DRB1 alleles associated with resistance or susceptibility to development of bovine leukemia virus-induced ovine lymphoma. *Cancer Research* 59: 975-981.

National Animal Health Monitoring System - United States Department of Agriculture 2008. Bovine Leukosis Virus on U.S. Dairy Operations, 2007.  
[http://www.aphis.usda.gov/animal\\_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/](http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/)  
[Cited 31 May 2017]

Nekouei O, VanLeeuwen J, Stryhn H, Kelton D and Keefe G. 2016. Lifetime effects of infection with bovine leukemia virus on longevity and milk production of dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 133: 1-9

農林水産省. 2017. 監視伝染病の発生状況

[http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi\\_densen/kansi\\_densen.html](http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/kansi_densen.html)

[Cited 31 October 2017]

農林水産省. 2015. 牛白血病に関する衛生対策ガイドライン.

[http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/pdf/eb1\\_guide.pdf](http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/pdf/eb1_guide.pdf) [Cited 31 October 2017]

OIE. 2006. List of diseases in force in 2006. <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2006/> [Cited 31 October 2017]

OIE. 2012. ENZOOTIC BOVINE LEUKOSIS. Terrestrial Manual. CHAPTER 2.4.11. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2012  
[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2008/pdf/](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2008/pdf/)  
[Cited 31 October 2017]

Ranki A, Mattinen S, Yarchoan R, Broder S, Ghayeb J, Lähdevirta J and Krohn K. 1989. T-cell response towards HIV in infected individuals with and without zidovudine therapy, and in HIV-exposed sexual partners. *AIDS.* 3: 63-69.

Rodríguez SM, Florins A, Gillet N, de Brogniez A, Sánchez-Alcaraz MT, Boxus M, Boulanger F, Gutiérrez G, Trono K, Alvarez I, Vagnoni L and Willems I. 2011. Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. *Viruses* 3: 1210-1248.

Rhodes JK, Pelzer KD and Johnson YJ. 2003. Economic implications of bovine leukemia virus infection in mid-Atlantic dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 223: 346-52.

- Sagata N, Yasunaga T, Tsuzuku-Kawamura J, Ohishi K, Ogawa Y and Ikawa Y. 1985. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 82: 677-681.
- Shearer GM and Clerici M. 1996. Protective immunity against HIV infection: has nature done the experiment for us? *Immunol Today.* 17: 21-24
- Somura Y, Sugiyama E, Fujikawa H and 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
- Sugimoto M, Sasaki S, Gotoh Y, Nakamura Y, Aoyagi Y, Kawahara T and Sugimoto Y. 2013. Genetic variants related to gap junctions and hormone secretion influence conception rates in cows. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 26: 19495-19500.
- 高山環, 仲澤浩江, 福岡静男, 稲垣靖子. 2010. 牛白血病抗体陽性率の推移とその対策. 平成 22 年度神奈川県家畜保健衛生業績発表会集録.  
[http://www.pref.kanagawa.jp/uploaded/attachment/\[Cited 31 October 2017\]](http://www.pref.kanagawa.jp/uploaded/attachment/[Cited 31 October 2017])
- Takeshima SN and Aida Y. 2006. Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *Anim.Sci.J.* 77: 138–150.
- Takeshima SN, Kitamura-Muramatsu Y, Yuan Y, Polat M, Saito S and Aida Y. 2015. BLV-CoCoMo-qPCR-2: improvements to the BLV-CoCoMo-qPCR assay for bovine leukemia virus by reducing primer degeneracy and constructing an optimal standard curve. *Archives of Virology* 160: 1325-1332.
- VanRaden P, Wiggans G and Tooker M. 2004. Pedigree Completeness and Inbreeding of Foreign Bulls. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service Animal Improvement Program. SUPPLEMENTAL REPORT (11-04)  
[https://www.aipl.arsusda.gov/reference/foreign\\_inbreeding.htm](https://www.aipl.arsusda.gov/reference/foreign_inbreeding.htm) [Cited 31 May 2017].

VanRaden PM, Olson KM, Null DJ and Hutchison JL. 2011. Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. *J Dairy Sci.* 94: 6153-6161.

White TL and Moore DA. 2009. Reasons for whole carcass condemnations of cattle in the United States and implications for producer education and veterinary intervention. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 235: 937-941.

Wu MC, Shanks RD and Lewin HA. 1989. Milk and fat production in dairy cattle influenced by advanced subclinical bovine leukemia virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86: 993-996

横浜市食肉衛生検査所年報. 2017.

<http://www.city.yokohama.lg.jp/kenko/niku/nenpou.html> [Cited 31 October 2017]

## 謝 辞

このたび、社会人大学院生として研究をはじめるとにあたり、現場の一技術者に過ぎなかった私を、高い先見性、豊かな見識、類まれな行動力をもって、熱く指導し、サイエンスの世界へ導いて下さった東京大学大学院農学生命科学研究科 今川和彦教授に、篤い敬意とともに深甚なる感謝の意を表します。また、実験の遂行や論文の作成にあたり懇切丁寧なご指導と温かい励ましを下さいました草間和哉博士、白汝嵐博士、中村圭吾さん、英文校閲をしてくださった Mr. Robert Moriarty に、心からお礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、統計遺伝学の分野において多大なるご指導を下さいました宮城大学食産業学部動物遺伝育種学研究室 須田義人教授、家畜衛生学の分野からさまざまなご指導とご協力をいただきました東京農業大学農学部 小林朋子博士ならびに村上覚史教授、貴重な検体の提供をいただきました浜田昌伯獣医師に心から感謝申し上げます。

さらに、ホルスタインの改良に関するさまざまなご助言やご協力を頂きました（一社）日本ホルスタイン登録協会の渥美正部長、牛白血病に関するご指導、ご協力を下さいました神奈川県食肉衛生検査所 梶木富美恵所長、鹿嶋傳博士、神奈川県湘南家畜保健衛生所 福岡静男所長をはじめとする獣医師職員の皆様に、深く感謝の意を表します。

今回、還暦を過ぎて、再び、東京大学において研究を志した私を、温かく受け入れてくださいました故前多敬一郎教授、立川君子さん、獣医繁殖育種学研究室の皆様に深く感謝申し上げます。さらに職務と研究の両立を認め、様々なご協力をくださいました竹本佳正所長をはじめとする神奈川県畜産技術センターの皆様、終始温かく励まして下さった小島信男氏に厚くお礼申し上げます。また、つねに向上心を持ち自立した女性としての生き方を示してくれた母と、心の支えになってくれた娘たちに心から感謝したいと思います。

最後に、若かりし日の私を、家畜の生来もっている能力を生かすという家畜育種学研究的の道にいざなってくださいました故正田陽一東京大学名誉教授、河本馨東京大学教授に、あらためて敬意を表し、深く感謝申し上げます。