

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻

平成 27 年度博士課程入学

氏名 稲垣 靖子

指導教員名 今川 和彦

論文題目

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

要 旨

はじめに

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大きく寄与してきた。

乳牛の遺伝的改良については、長年、国際的な協力のもと血統情報、牛群検定が蓄積されており、乳量などの生産に関わる形質については統計遺伝学的手法を応用した改良がすすめられてきた。しかし、疾病抵抗性や繁殖性については、依然として畜産農家の生産性を大きく損なっている。その一つが、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、我が国では 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。その発生届出頭数は、年々増加し、2016 年には 3,125 頭と牛監視伝染病の届出頭数の 70%を占め、畜産業界に多大な経済的損害を与えている。牛白血病は、地方病性牛白血病 (EBL) と、散发性白血病 (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。

BLV はレトロウイルスの一種で、ヒト T リンパ好性ウイルス 1 型 (HTLV1) と近縁とされている。その感染は世界に広がっており、日本や北米では約 80%の酪農場に BLV が浸潤している。BLV に感染した牛は生涯持続感染するが、その多くは発症することはない。ごく一部の感染牛が長い潜伏期間ののちに EBL を発症するが、その病態は多様で、「と畜」後に発見される場合も多く、その「と体」は全部廃棄処分とされるため、畜産農家に大きな直接的損害を与えている。また、発症牛は農場内の感染リスク要因となり、繁殖成績や免疫機能の低下がみられる場合があるなど潜在的な生産性阻害要因としても問題となっている。このように牛白血病は経済的に重要な疾病であるが、BLV 感染については多くの報告がある一方、EBL 発症に関しては、発症までの経過が長く、病態も多様であるため、その実態は明らかになっていない。

ところで、我が国では、2004 年からは、牛トレーサビリティ制度が施行され、国内すべての牛に個体識別番号（ID）が付与され、出生からと畜（死亡）までの情報が記録され、公開されている。本制度は、BSE を契機に食の安全を確保するため導入されたものであるが、我が国では、食肉生産だけでなく、家畜検査、と畜検査、血統情報などの牛個体情報が、すべてこの ID で一元管理されている。これは、我が国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、我々は、農場段階における BLV の感染情報、と畜段階における EBL の発症情報と、血統情報を ID によって関連づければ、家畜育種学的手法の応用により、「牛白血病発症に関する遺伝的改良」の可能性が開けると考えた。

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

2006 年から 2015 年までに、神奈川県で血統登録されたホルスタイン種雌牛 10,138 頭（235 戸）の ID を用いて「出生」から「と畜」まで追跡調査し、BLV 感染、プロウイルス量（BLV-PVL）、EBL 発症の有無を特定し、疫学的解析を行った。その結果、EBL を発症していたものは 1%で、と畜段階で 99%が非発症であることをはじめて示した。

神奈川県における白血病届出件数は年々増加し、BLV 感染率は 40%で、87%の農場に浸潤していた。また、廃用年齢は感染、発症の有無に関わらず 6 歳前後であった。これらの結果は、全国や北米における報告と同様で、今回の疫学調査が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を示唆している。

異動歴と疫学情報を関連づけた結果、BLV 感染率は加齢により上昇する傾向が認められ、3 歳未満の育成牛は 23%、成牛は 52%で、両者に差があったが、成牛間で年齢による差はなかった。また、感染牛の BLV-PVL に年齢による差はなく、1 copy / cell 付近にプラトーがあり、50%の牛で 0.5 copies / cell 以下に保たれていた。また、「農場間移動」「農場内発症牛」がある方が BLV 感染率は高かった。

その飼養履歴と疫学情報を関連づけることで、清浄農場の未感染牛が 21%、感染農場で飼養され長期間 BLV に曝露されても感染しない牛（暴露非感染牛）が 39%、感染しても PVL が低い牛（LPV）が 20%、PVL が比較的高くても発症しない（HPV）が 20%と推定され、前 4 者は非発症で、HPV のうちごく一部が発症に至るが、その発症率は全体の 1 % であることが示唆された。このように、疫学情報と異動歴を関連づけることで多くの知見が得られ、ID を利用した疫学調査の有用性が示唆された。

第二章 牛白血病発症に関する統計遺伝学的解析

次に、BLV 感染／EBL 発症情報と血統情報を関連付け、統計遺伝学的解析を行った。種雄牛 1,397 頭の凍結精液が神奈川県ホルスタイン種雌牛 10,138 頭に供用されており、種雄牛別娘牛数には神奈川県と全国で有意の相関が認められた。このうち、1,940 頭 (98 戸) について、感染／発症の有無を表型値とし、生時年、検査時年齢、農場感染レベルを母数効果として、サイアモデルを用いた Gibbs sampling 法により牛白血病発症に関する遺伝率を推定した。その結果、遺伝率は 0.19 と推定され、牛白血病発症制御に関する遺伝的改良の可能性が示唆された。これは「感染／発症」と「血統情報」を関連づけ、最新の統計遺伝学的手法を用いることで、はじめて可能となったものである。

さらに血統情報を遡ったところ、父方祖父は国際評価の高い特定の種雄牛に集中していた。そのなかに多数の子孫牛すべて非発症の種雄牛があり、ホルスタイン種の特定の血統は牛白血病発症制御に関して高い遺伝的能力を保有していることが示唆された。

第三章 牛白血病発症に関連する遺伝子の探索

ホルスタイン種経産牛を、感染／発症の有無から、次の 5 群 (清浄・非感染・LPV・HPV・発症) に分け、血液から RNA を抽出し、10 の候補遺伝子について、リアルタイム PCR により発現量を定量し、それぞれ、どのような遺伝子 (群) が発現しているのかを検証した。

その結果、各群で、それぞれ異なる遺伝子の発現が亢進、あるいは抑制されていた。特に、発症群では、EIF3E、CDKL4、MS4A1、CDKL4 など、タンパク質合成や細胞増殖に関連する複数の遺伝子や、免疫抑制に関わる PDCD1 が亢進している一方、細胞接着にかかわる TGFBI が抑制されているなど、他の 4 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。とくに、EIF3E は、他の 4 群すべてより有意に高く、今後、発症の遺伝子マーカーとして、利用できる可能性が考えられた。

また、発症群では免疫抑制に関連する PDCD1 の発現量も増加しており、これまでの病態の進行に伴い PDCD1 が亢進し免疫疲弊に陥るという報告と一致した。

しかし、感染していても、健康状態にある LPV、HPV 群では PDCD1 の発現量は低く、BLV 増殖に対し一定の制御機構が機能していると考えられた。また、感染牛では CDKL4、MS4A1、CXCL10 など細胞増殖やタンパク質合成に関連する遺伝子の発現が亢進していた。

一方、免疫に関連する CFD、CD4 については、LPV、HPV、発症の順に発現量が低くなり、感染牛においては血中 PVL と負の関係にあった。ただし、感染農場において BLV に長期間曝露されていた非感染群では、個体差はあるものの、清浄群よりも高値を示した。

ヒトにおける HIV 曝露非感染者ではウイルス抗原による感作が「感染防御」免疫応答の誘導につながっている例が報告されているが、ウシにおいても BLV 曝露非感染牛が存在し、CFD などの免疫機能の亢進が認められることは興味深い。

以上のように、牛白血病に関して、BLV 感染、感染細胞の増殖、腫瘍化の各段階で、それぞれ異なる複数の遺伝子（群）が発現し、恒常性が維持され、発症が制御されていることが示唆された。

総 括

本研究では、ホルスタイン血統登録牛 1 万頭の ID を利用し、10 年間にわたり「出生」から「と畜」まで追跡調査した結果、EBL 発症率は 1%と低いことをはじめて明らかにした。また、疫学情報と飼養情報を関連づけ、曝露されても感染しない「非感染」、PVL 量の低い「HPV」、高 PVL に関わらず非発症の「HPV」が存在し、「非感染」、「LPV」は発症に至らず、「HPV」であってもほとんどは非発症であったことを明らかにした。

また、疫学情報と血統情報を関連付け、統計遺伝学的解析を行うことで、ホルスタイン種における「牛白血病発症制御に関する遺伝率」を 0.19 と推定し、遺伝的改良の可能性を示した。また多数の子孫牛がすべて非発症の種雄牛を特定し、牛白血病発症制御に関して高い遺伝的能力を保有している血統が存在することを示した。

さらに、定量リアルタイム PCR 法により、非感染、LPV、HPV、発症の各段階で、異なる遺伝子が発現し、とくに発症群と健康群では顕著な差があることを明らかにした。

今後、これらの知見を活用し、家畜育種学的手法を応用により牛白血病発症の制御に関して高い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ことが期待できる。