

令和元年6月16日現在

機関番号：32701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15385

研究課題名(和文)牛白血病ウイルスの病原性解析

研究課題名(英文)Pathogenicity analysis of bovine leukemia virus

研究代表者

村上 裕信(Murakami, Hironobu)

麻布大学・獣医学部・助教

研究者番号：60620929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：牛白血病ウイルス(BLV)の遺伝的多様性がウイルス性状に影響をもたらすか調べるため、最初にウイルスゲノム全長の解析を行った。その結果、国内のBLV野生株が3つのグループに分類され、それぞれグループは異なるウイルス産生能力を示した。さらに、上記で高いウイルス産生能力を有するグループの株が、農場での感染拡大に寄与することが明らかになった。また、株により病原性が異なり、ウイルスゲノムの欠損変異を有するウイルス株や低いウイルス産生量でも病原性を保持していることが明らかになった。これらことから、病原性と伝播性は異なる遺伝的素因により支配されていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、BLVの遺伝的多様性がウイルス性状を変化させ、異なるウイルス産生能力や形質転換能力を示させることが明らかとなった。さらに、これらウイルス性状の変化は伝播性や病原性と関連することが示唆された。これらことから、特定の株で高伝播性や高病原性となるため、株により経済的損失リスクが異なることが考えられた。したがって、本研究結果は、BLV感染拡大およびEBL発症リスクを評価することによる新たなBLV制御対策へ応用可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To research whether a genetic variation affects viral properties, phylogenetic analysis was performed using whole BLV genome and revealed to be classified three group in BLV wild-type strains. In addition, the groups were associated with virus productivity. The one of three group strains classified in this study showed high virus productivity and had an advantage for transmissibility in field. Moreover, pathogenesis was different among wild-type strains, but some strains harbored deletion mutation and showing low viral production had high pathogenesis. Taken together, transmissibility and pathogenesis would be independently decided by different genetic factors.

研究分野：分子ウイルス学

キーワード：牛白血病ウイルス 地方病性牛白血病 分子クローン 病原性 伝播性

## 1. 研究開始当初の背景

我が国における牛白血病の発生件数は届出伝染病に指定された平成 10 年と比較すると約 30 倍に激増しており、平成 29 年は 3,453 頭の牛が廃棄処分となっている。この牛白血病の大部分は、牛白血病ウイルス(BLV)感染に起因する地方病性牛白血病(EBL)である。さらに、国内の BLV 感染牛の割合は全飼養牛の 30~40%(120~160 万頭)にのぼり、経済的損失が今後も増加し続けることが懸念されている。BLV は一度感染すると染色体にプロウイルスとして組込まれ、体内から排除することが不可能なウイルスであるため、経済的損失を軽減させるためには BLV の感染を拡大させないことが必要である。そのためには、BLV 感染牛の摘発淘汰や分離飼育が有効であるが、感染率が高く、狭い飼育面積の農場が多い我が国では、隔離や BLV 感染牛の全淘汰は物理的・経済的に困難である。そのため、我が国において実行可能で効果的な対策の確立が望まれている。

## 2. 研究の目的

BLV の遺伝的多様性と病原性を評価することにより、BLV 野生株の病原性に違いがあるかを評価する。この事により、病原性が高い強毒株と低い弱毒株を分けることが可能となり、感染拡大や EBL 発症に寄与し、多くの経済的損失をもたらす株を農場から優先的に排除することが可能となる。さらに、病原性に関連する変異やゲノム領域が明らかとなれば、強毒株と弱毒株を区別する診断システムの構築が可能となり、経済的損失を軽減するための BLV 対策への応用が期待される。

## 3. 研究の方法

### (1)感染性分子クローン作出

EBL 発症牛の血液または腫瘍塊から DNA 抽出後、全ゲノムの塩基配列を決定しウイルス株を同定した。次に、全ゲノムを PCR により増幅し、感染性分子クローンを作出後、感染している株と同一の配列であるか否かを確認した。さらに、各遺伝子領域を組換えることにより、キメラウイルスをコードする感染性分子クローンも作出した。

### (2) ウイルスの生物学的特性(ウイルス性状)評価

作製した分子クローンを 293T 細胞に導入し、293T 細胞から産生されるウイルス量を測定した。また、作製した分子クローンを株化細胞 NMuMG に導入し、マトリゲルを用いた 3 次元(3D)培養を行い、コロニーの形態が球形のものを形質転換陰性、不整形のものを形質転換陽性とし、病原性の評価を行った。

## 4. 研究成果

### (1)BLV 野生株の遺伝的多様性とウイルス性状

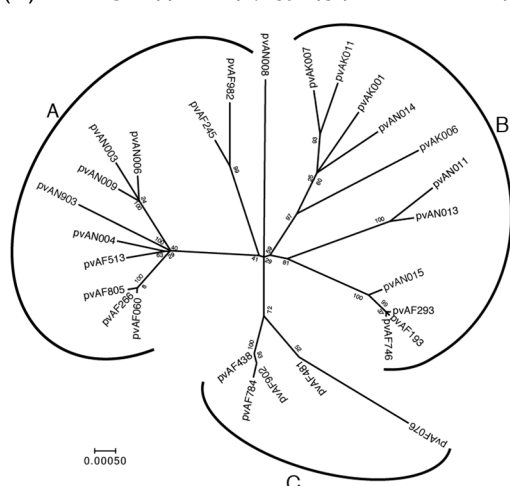


図 1. BLV 野生株の系統発生解析

A に属する株に感染している牛では、プロウイルス量(PVL)が高値で推移する一方、他のグループに属する株では低値で推移することが明らかとなった。これらのことから、BLV の遺伝的多様性はウイルス性状を変化させ、病原性に影響をもたらすことが示唆された。

### (2)農場における BLV 野生株の遺伝的多様性と伝播性への影響

ウイルス産生量や PVL の推移が遺伝的多様性に影響を受けることから、高いウイルス産生能力を示す株が、伝播

BLV 野生株の遺伝的多様性がウイルス性状に影響をもたらすか調べるため、国内の複数の地域から EBL 発症牛を含めた 28 頭のサンプルからウイルスの遺伝的多様性を調べた。その結果、すべての株は、日本やアメリカなどで一般的に検出される Genotype 1 に属する株であることが明らかとなった。更に、この 28 株のウイルスゲノム全長を最尤法による系統発生解析を行った結果、3 つのクラスター(グループ A, B, C)を形成することが明らかとなった(図 1)。次に、これらの株のウイルス性状を解析するために、感染性分子クローンを作出し、ウイルス産生量を調べた結果、各グループのウイルス産生能力が有意に異なっていることが明らかとなった(図 2)。また、各グループの株が感染している牛を追跡調査した結果、グループ

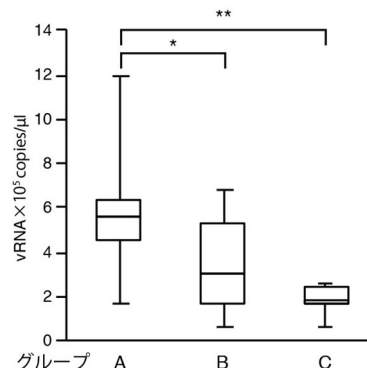


図 2. 各グループのウイルス産生量

能力に寄与するか調べるため、国内の1農場でどのような株が蔓延しているか解析した。最初に、国内の1農場で飼養されているすべての牛から採血し、BLV感染牛を調べた。その結果、34頭が陽性であったため、それらに感染しているBLVゲノム全長配列を決定後、上記28株と合わせて系統樹を作成した。その結果、グループAおよびCに分類される株が26および8株であり、グループAの株が農場に蔓延していることが明らかとなった。次に、これらの株に感染していることによって、白血球数やPVLが変化するか調べた。白血球数はBLV感染により有意に上昇することが明らかとなったが、株の違いによる変化は認められなかった。また、PVLにおいても、感染株による変化は認められなかった。次に、これらの株の特徴を調べるため、34株の分子クローンを作成し、ウイルス産生量をqPCRにより測定した。その結果、グループA株はC株と比較して有意にウイルス産生量が高いことが明らかとなった。このことから、伝播性がウイルス産生量に影響する遺伝学的特徴と関連することが示唆された。

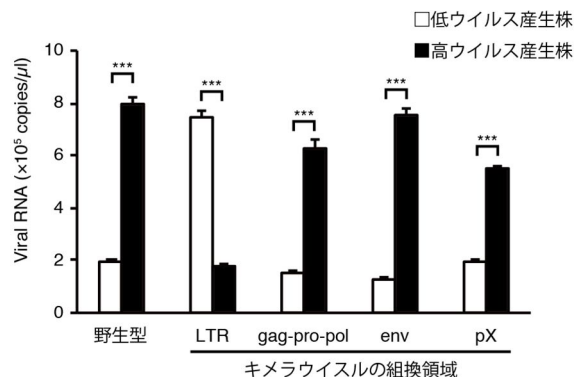


図3. 各グループ株感染牛におけるPVLの推移

さらに、ウイルス産生量に影響する領域を調べるため、グループA株とC株のLTR, gag-pro-pol, env, pX領域をそれぞれ組換えたキメラウイルスを作成した。それらのキメラウイルスのウイルス産生量を測定した結果、LTR領域を組換えることにより、ウイルス産生量が有意に変化することが明らかとなった(図3)。このことから、LTRの変異がウイルス産生量に影響をもたらす、伝播性に関与することが示唆された。

### (3) BLV野生株の遺伝的多様性と病原性への影響

BLVの遺伝的多様性がウイルス産生量に影響をもたらすことから、ウイルス産生量と病原性が関連するかどうかを調べた。最初に、国内で飼養されているEBL未発症牛51頭およびEBL発症牛37頭の血液または腫瘍塊を収集した。それらから抽出したゲノムDNAから感染性分子クローンを作成し、癌誘導能力を3D培養による形質転換の有無により評価した。その結果、株によって形質転換を誘導する株とそうでない株が存在することが明らかとなった(図4)。さらにそれら形質転換の有無と病態の関連性を調べた結果、EBL未発症牛ではEBL発症牛と比較して形質転換を有意に多く引き起こすことが明らかとなった。さらに、若齢EBL発症牛由来株の88.9%が形質転換を誘導することが明らかとなった。次に、これら病原性の違いとウイルス産生量の関連性を調べるため、ウイルス産生量を調べ、形質転換の有無と関連するか調べた。その結果、形質転換の有無とウイルス産生量は関連性が無いことが明らかとなった。また、上記野生株でウイルスゲノムが欠損しており、ウイルス産生能力も失われている株の形質転換能力を調べた結果、形質転換能力を保持していることも明らかとなった。これらのことから、ウイルス産生能力と形質転換能力は独立した遺伝的素因により決定されることが明らかとなった。したがって、ウイルスの伝播性と病原性は独立した遺伝的要因により決定され、高伝播性株でも強毒株と弱毒株が、低伝播性株においても強毒株と弱毒株が存在することが明らかとなった。今後、伝播性および病原性を決定する遺伝的特徴を明らかとなれば、伝播予測およびEBL発症予測へ応用可能となり、BLVによる経済的損失を未然に防ぐ新たな対策の確立へ応用可能であると考えられる。

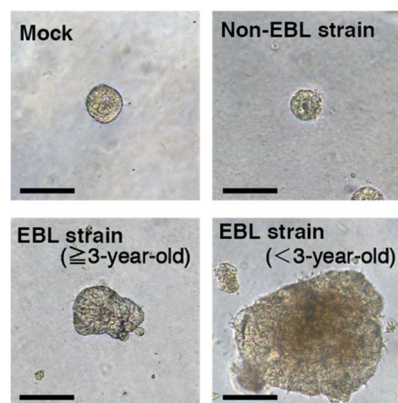


図4. 各病態由来株の3D培養像

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計12件)

Furuyama, Y., Takahashi, Y., Noguchi, K., Murakami, H., Sakaguchi, M., Hisamatsu, S., Usui, T., Yamaguchi, T., Ito, T., Tsukamoto, K., 2018. Subpopulation Primers Essential for Exhaustive Detection of Diverse Hemagglutinin Genes of H5 Subtype Avian Influenza Viruses by Loop-Mediated Isothermal Amplification Method. *J Clin Microbiol* 56. DOI: 10.1128/JCM.00985-18.

村上裕信, 牛白血病ウイルスの伝播性・病原性解析, 2018, 電気泳動, 62(2), 49-54,

DOI:<https://doi.org/10.2198/electroph.62.49>

Murakami, H., Uchiyama, J., Suzuki, C., Nikaido, S., Shibuya, K., Sato, R., Maeda, Y., Tomioka, M., Takeshima, S.N., Kato, H., Sakaguchi, M., Sentsui, H., Aida, Y., Tsukamoto, K., 2018. Variations in the viral genome and biological properties of bovine leukemia virus wild-type strains. *Virus research* 253, 103-111. DOI: 10.1016/j.virusres.2018.06.005.

Sato, H., Watanuki, S., Murakami, H., Sato, R., Ishizaki, H., Aida, Y., 2018. Development of a luminescence syncytium induction assay (LuSIA) for easily detecting and quantitatively measuring bovine leukemia virus infection. *Arch Virol* 163, 1519-1530. DOI: 10.1007/s00705-018-3744-7.

Uchiyama, J., Matsui, H., Murakami, H., Kato, S.I., Watanabe, N., Nasukawa, T., Mizukami, K., Ogata, M., Sakaguchi, M., Matsuzaki, S., Hanaki, H., 2018. Potential Application of Bacteriophages in Enrichment Culture for Improved Prenatal *Streptococcus agalactiae* Screening. *Viruses* 10. DOI: 10.3390/v10100552.

Uchiyama, J., Mizukami, K., Yahara, K., Kato, S.I., Murakami, H., Nasukawa, T., Ohara, N., Ogawa, M., Yamazaki, T., Matsuzaki, S., Sakaguchi, M., 2018. Genome Sequences of 12 Mycobacteriophages Recovered from Archival Stocks in Japan. *Genome Announc* 6. DOI: 10.1128/genomeA.00472-18.

Uchiyama, J., Shigehisa, R., Nasukawa, T., Mizukami, K., Takemura-Uchiyama, I., Ujihara, T., Murakami, H., Imanishi, I., Nishifuji, K., Sakaguchi, M., Matsuzaki, S., 2018. Piperacillin and ceftazidime produce the strongest synergistic phage-antibiotic effect in *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Virol* 163, 1941-1948. DOI: 10.1007/s00705-018-3811-0.

Ujihara, T., Uchiyama, J., Nasukawa, T., Ando, H., Murakami, H., Ohara, N., Ogawa, M., Yamazaki, T., Daibata, M., Sakaguchi, M., Matsuzaki, S., 2018. Recovery of mycobacteriophages from archival stocks stored for approximately 50 years in Japan. *Arch Virol* 163, 1915-1919. DOI: 10.1007/s00705-018-3788-8.

Uchiyama, J., Taniguchi, M., Kurokawa, K., Takemura-Uchiyama, I., Ujihara, T., Shimakura, H., Sakaguchi, Y., Murakami, H., Sakaguchi, M., Matsuzaki, S., 2017. Adsorption of Staphylococcus viruses S13' and S24-1 on Staphylococcus aureus strains with different glycosidic linkage patterns of wall teichoic acids. *The Journal of general virology* 98, 2171-2180. DOI: 10.1099/jgv.0.000865.

Murakami, H., Asano, S., Uchiyama, J., Sato, R., Sakaguchi, M., Tsukamoto, K., 2017. Bovine leukemia virus G4 enhances virus production. *Virus research* 238, 213-217. DOI: 10.1016/j.virusres.2017.07.005.

Nasukawa, T., Uchiyama, J., Taharaguchi, S., Ota, S., Ujihara, T., Matsuzaki, S., Murakami, H., Mizukami, K., Sakaguchi, M., 2017. Virus purification by CsCl density gradient using general centrifugation. *Arch Virol* 162, 3523-3528. DOI: 10.1007/s00705-017-3513-z.

Sato, R., Une, Y., Madarame, H., Hanami, H., Kanai, E., Murakami, H., Tsukamoto, A., Suzuki, T., Ochiai, H., Kikuchi, M., Tanaka, H., Onda, K., 2017. A nasal osteoma with an acute course in a Japanese Black heifer. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 79, 1220-1224. DOI: 10.1292/jvms.17-0041.

[学会発表](計 19 件)

村上舞琴,紙透伸治,塚本健司,村上裕信,牛白血病ウイルス複製阻害剤の探索,日本獣医師会獣

医学術学会年次大会,2019年

村上裕信,牛白血病ウイルス野生株の特徴と制御対策への活用,日本獣医師会獣医学術学会年次大会,2019年

田村一輝,山田一孝,村上裕信,園田朔,宇根有美,恩田賢,相原尚之,佐藤礼一郎,若齡子牛にみられた急性経過を辿った腹腔内胎児性癌の1例,日本獣医師会獣医学術学会年次大会,2019年

村上裕信,河合将克,佐藤礼一郎,前田洋佑,加藤肇,内山淳平,阪口雅弘,塚本健司,牛白血病ウイルス野外株の遺伝的多様性と病原性への影響,日本獣医学会学術集会,2018年

綿貫園子,竹嶋伸之輔,竹嶋伸之輔,佐藤洋隆,白らんらん,佐藤礼一郎,村上裕信,石崎宏,間陽子,乳汁中における牛白血病ウイルスの感染性評価とウシ主要組織適合抗原との関連性,日本獣医学会学術集会,2018年

原田清佑,鳥居英人,上野栄二,山崎秀俊,塚田正義,村上裕信,押田敏雄,押田敏雄,祐森誠司,植物発酵製品の給与が肥育豚の発育成績,血液成分,枝肉成績に及ぼす影響,日本養豚学会大会,2018年

村上舞琴,紙透伸治,長谷部文子,田畑裕二,塚本健司,村上裕信,牛白血病ウイルス感染阻害剤の探索,日本獣医師会獣医学術学会年次大会,2018年

村上裕信,前田洋佑,加藤肇,泉對博,間陽子,塚本健司,遺伝的変化がもたらす牛白血病ウイルスの伝播力への影響,日本獣医師会獣医学術学会年次大会,2018年

河合将克,加藤肇,前田洋祐,長谷部文子,泉對博,村上裕信,牛白血病ウイルス野外株の病原性解析,日本獣医師会獣医学術学会年次大会,2018年

村上裕信,牛白血病ウイルスの伝播性・病原性解析,第68回日本電気泳動学会シンポジウム,2018年

BAI Lanlan,綿貫園子,横山佳菜,村上裕信,佐藤礼一郎,竹嶋伸之輔,間陽子,牛白血病ウイルス抗体検出系 p24 ELISA の構築,日本獣医学会学術集会,2017年

野口きらら,高橋ゆきの,古山雄平,久松伸,坂口雅弘,村上裕信,塚本健司,H7亜型鳥インフルエンザを迅速かつ網羅的に検出する LAMP 法の開発,日本獣医学会学術集会,2017年

綿貫園子,竹嶋伸之輔,佐藤洋隆,BAI Lanlan,佐藤礼一郎,村上裕信,松本安喜,間陽子,搾乳牛の乳汁中における牛白血病ウイルスのプロウイルス定量法の開発および感染性評価,日本獣医学会学術集会,2017年

村上舞琴,紙透伸治,塚本健司,村上裕信,牛白血病ウイルスの感染阻害に関する化合物のスクリーニング,日本獣医学会学術集会,2017年

佐藤洋隆,綿貫園子,大附寛之,白らんらん,佐藤礼一郎,村上裕信,石崎宏,間陽子,高感度変異導入レポーター細胞を用いた Luminescence Syncytium Induction Assay(LuSIA)による牛白血病ウイルス感染性の検出,日本獣医学会学術集会,2017年

高橋ゆきの,野口きらら,古山雄平,久松伸,阪口雅弘,山口剛士,伊藤壽啓,村上裕信,塚本健司,H5亜型鳥インフルエンザウイルスを幅広く検出する RT-Lamp 法の開発,日本獣医学会学術集会,2017年

木田裕里恵,渡辺瑞季,多田達哉,村上裕信,塚本健司,鳥インフルエンザウイルスの遺伝子合成活性に及ぼす PB2 蛋白質の影響,日本獣医学会学術集会,2017年

綿貫園子,綿貫園子,竹嶋伸之輔,佐藤洋隆,BAI Lanlan,佐藤礼一郎,村上裕信,松本安喜,間陽子,乳汁中における牛白血病ウイルスの感染性評価,日本 HTLV 1 学会学術集会,2017年

佐藤洋隆,綿貫園子,佐藤礼一郎,村上裕信,石崎宏,間陽子,新規牛白血病ウイルス感染性定量法 Luminescence Syncytium Induction Assay の開発と応用,日本 HTLV 1 学会学術集会,2017年

〔図書〕(計1件)

村上裕信,新たなアプローチによる地方病性牛白血病の病態解釈,臨床獣医, 36(10)38-43, 2018年

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：佐藤 礼一郎

ローマ字氏名：Reiichiro Sato

研究協力者氏名：内山 淳平

ローマ字氏名：Jumpei Uchiyama

研究協力者氏名：前田 洋佑

ローマ字氏名：Maeda Yosuke

研究協力者氏名：加藤 肇

ローマ字氏名：Kato Hajime

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。