

自己評価報告書

平成23年4月18日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20405039

研究課題名（和文） 神経疾患を引き起こすレトロウイルスの起原とゲノム多様性

研究課題名（英文） The origin and genome diversity of retroviruses causing neurological disorders

研究代表者

落合 謙爾（OCHIAI KENJI）

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号：80214162

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学，応用獣医学

キーワード：トリのグリオーマ，中枢神経系腫瘍，分子系統進化，トリ白血病ウイルス，レトロウイルス

1. 研究計画の概要

いわゆるトリのグリオーマ so-called fowl glioma は1930～60年代に主にヨーロッパで発生していた原因不明の疾患であった。研究代表者らは国内初発例を発見し、本疾患がA型トリ白血病ウイルス（ALV-A）感染症であることを明らかにした。本疾患は研究代表者の知る限り、自然界で発生する動物の脳腫瘍の中でウイルスとの因果関係が実験的に証明された初めてのグリオーマと思われる。その後、ゲノム解析によって原因ウイルスであるトリのグリオーマ誘発ウイルス fowl glioma-inducing virus (FGV) は既知のALVではなく組み換えによって神経病原性を獲得したものと推察された。また、FGVはグリオーマのほか、小脳低形成、非化膿性脳炎・心筋炎、神経周膜腫を引き起こすことが明らかになった。一方、国内で発生した採卵鶏のグリオーマの検索から、本疾患はFGVとは異なるALV、TymS_90によっても誘発されることを明らかにした。しかし、FGVが国内の日本鶏群の中で新たに出現したウイルスなのか、FGVが古くから日本鶏に蔓延していたものなのかは明らかにされていない。また、ALVは主に造血器系腫瘍を誘発するが、その一株であるFGVやTymS_90がどのように中枢神経系への腫瘍原性を獲得したかについても不明のままである。

これまでの本疾患の疫学的知見に基づいて考察すると、FGVはヨーロッパの在来鶏を介して日本鶏に蔓延したか、逆に持ち出された可能性が高い。一方、FGVとは異なる経緯を辿り別個に神経系への腫瘍原性を獲得したと思われるTymS_90の出現により、これらALVは組み換えや変異により容易にある

いは偶然に神経系への腫瘍原性を獲得し得るゲノム構造を持ち、日本国内で出現した可能性も考えられる。これら2つの可能性を検証し、神経系に病原性を持つALVの出現経緯とゲノム多様性を明らかにするには、ヨーロッパ産の鶏とこれと関連をもつ日本鶏から収集したALVとFGVやTymS_90を分子生物学的に比較する必要がある。以上の背景を踏まえ、本課題では神経病原性ALV出現の経緯とゲノム多様性を明らかにするため、ヨーロッパ産の系統（内種）およびこれらと関連をもつ鶏を対象に神経病原性レトロウイルスの疫学調査を実施した。

2. 研究の進捗状況

(1) ドイツで飼育されていた在来鶏10羽の中枢神経系を組織学的に検索したが、グリオーマは見出されなかった。次に上記の10羽の羽髄と脳とともに、ドイツ家禽連盟養鶏研究所（Wissenschaftlicher Geflügelhof des Bundes Deutscher Rassegeflügelzüchter, Sinsteden）で系統維持されている鶏8系統、計32羽の羽髄をFGV特異的 nested PCRで検索したが、FGVは検出されなかった。現在、クロアカ拭い液からALVの分離を試みている。

(2) 熊本地方には伝統的に維持されている大冠種の日本鶏（チャボ）が存在する。これらは江戸時代初期に渡来し、一時は関西～九州地方で飼養されていたが、戦後は熊本地方にだけ残った系統である。しかし、その特徴的な容姿から一部はドイツをはじめヨーロッパ諸国に輸出されたことがあった。また、この地方には江戸時代にヨーロッパから輸入された久連子鶏も飼育されている。①この地方の鶏計115羽の羽髄をFGV特異的

nested PCR で検索した結果、36羽 (31%) が PCR 陽性となった。②久連子鶏 13羽はすべて陰性であった。③剖検した陽性鶏 20羽中 17羽の脳には上衣肉芽、囲管性リンパ球浸潤がみられ、4羽にグリオーマが認められた。④グリオーマ関連病変をもつ鶏から ALV 9株が分離された。PCR 検出領域の塩基配列を解析すると、4株は FGV 変異株であった。しかし、残りの ALV には FGV 特異配列の相同性が 50% 以下の 2株 (Km_5843, 5844) と FGV 特異配列を欠く 2株 (Km_5666, 5845) が存在した。⑤ Km_5666, Km_5843, Km_5845 のウイルスゲノム全長の塩基配列を解析した結果、これら 3株のゲノム構造はほとんどの領域が内在性レトロウイルス ALV *ev-1* に高い相同性を示し、Km_5666 の *env* のみ FGV に高い相同性 (95%) を示すことがわかった。以上の成績から、熊本の日本鶏には FGV 変異株と *ev-1* に由来する ALV が感染しており、これらがグリオーマを引き起こしている と推察される。

(3) 熊本地方の日本鶏から新たに神経周膜腫が発見され、FGV とは異なる ALV が分離された。神経周膜腫の野外例から ALV が分離されたのは世界で初めてのことである。

(4) 熊本地方の日本鶏からグリオーマとこれまでに報告のない心筋の形態異常を併発する例が 3羽発見され、FGV や TymS_90 とは異なる ALV の関与が示唆された。

(5) TymS_90 の *env* と高い相同性を示す MAV-1 近縁株の病原性を感染実験により解析したが、この ALV 株には神経系への病原性は認められなかった。

(6) 名古屋大学で系統維持されている鶏 17系統 (各々 1959-2006 年に導入後閉鎖集団として飼育)、計 49羽の羽髄を FGV 特異的 nested PCR で検索したが、いずれの鶏からも FGV は検出されなかった。

(7) 以上のほか、脚弱と内臓腫瘍が多発した名古屋の採卵鶏、骨髓脂肪腫・アミロイドーシスと骨化生を示したサカヅラガン、リンパ腫様腸疾患を示したスズメについて ALV の関与を疑い検索したが、いずれも ALV との関連は見出されなかった。

3. 現在までの達成度

① 当初の計画以上に進展している。

戦後熊本地方にだけ残った日本鶏由来 ALV の解析によりきわめて重要な成績が得られた。すなわち、これら日本鶏に FGV 変異株や ALV *ev-1* に由来する神経病原性 ALV が感染していたこと、ならびにこれらの中に FGV と *ev-1* の遺伝子の一部をもつ ALV が見出され本鶏群内で ALV 間の組換えが起こっていたことから、これら ALV がヨーロッパに持ち出された可能性が浮き彫りとなった。また、久連子鶏、ドイツの在来鶏や名古屋

大学の各系統から FGV が検出されなかったことはこれを支持する成績と思われる。さらに神経周膜腫由来 ALV を世界で初めて分離できたことや ALV が関与する未報告の心筋異常を発見できたことは、ALV のゲノム多様性と病原性を解明するうえで新たな展開が期待できる成果といえる。これら成績は現在投稿準備中である。以上のように、本課題のおよそ 8割はすでに達成できたため、当初の計画以上に進展していると判断した。

4. 今後の研究の推進方策

上記成績を検証するためにドイツの在来鶏からの ALV 分離を継続するとともに分離した残りの ALV のゲノムと病原性を解析する。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 2件)

① Hatai, H., Ochiai, K. *et al.*, 他 6名, 2番目, Hepatic myelolipoma and amyloidosis with osseous metaplasia in a Swan Goose (*Anser cygnoides*), 査読有, J. Comp. Pathol. 141(4):260-264, 2009

② Hatai, H., Ochiai, K. *et al.*, 他 1名, 2番目, Detection of avian leucosis virus genome by a nested polymerase chain reaction using DNA and RNA from dried feather shafts, 査読有, J. Vet. Diagn. Invest. 21(4):519-522, 2009

[学会発表] (計 4件)

① 越智章仁ら, 九州地方の一日本鶏群で見つかった神経病原性レトロウイルス, 第 149 回日本獣医学会学術集会, 2010年 3月 27日, 日本獣医生命科学大学, 東京

② 中村小百合ら, 新たに分離された神経膠腫誘発レトロウイルスの分子系統解析と神経病原性の比較, 第 149 回日本獣医学会学術集会, 2010年 3月 27日, 日本獣医生命科学大学, 東京

③ 森真依子ら, アトキソプラズマ症の病態解析, 第 146 回日本獣医学会学術集会, 2008年 9月 24日, ワールドコンベンションセンターサミット (シーガイア), 宮崎

[その他]

<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/comp-pathol/daimoku-gli1.html>