

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04597

研究課題名(和文) 新たに出現したトリレトロウイルス性骨髄性白血病の疫学と病理

研究課題名(英文) The etiology and pathology on avian myeloid leukemia-like lesions recently observed in Japan

研究代表者

御領 政信 (Goryo, Masanobu)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：80153774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：沖縄のブロイラーに骨髄性白血病(ML)疑似例が発生した。そこで、トリ白血病ウイルス(ALV)との関連を明らかにするために同居鶏を検索した。諸臓器で骨髄球の集簇が認められたものの、ALVは分離されなかったことから、この骨髄球増殖は高度の髄外造血と考えられた。次に、岐阜県の卵肉兼用種に発生した骨化石症と間葉系腫瘍を検索した。罹患鶏は神経膠腫を併発していた。腫瘍からはALVs(GifN株)4株が分離された。GifN株は新たに出現した組換えウイルスで、感染実験により神経病原性を持つことが明らかになった。GifN株は骨化石症と関連する初めての神経病原性ALVsである。

研究成果の概要(英文)：Recently, avian myeloid leukemia (ML)-like lesions have been observed in broilers in Okinawa, Japan. The birds kept with the affected broilers were examined to clarify the relationship between avian leukemia viruses (ALVs). Although there was accumulation of myelocytes in the livers of examined birds, ALV was not isolated from these livers. The ML-like lesions are considered as severe hepatic extramedullary hematopoiesis in broilers. Secondly, mesenchymal neoplasms and osteopetrosis in a dual purpose breed for meat and eggs were examined. These birds were currently affected with fowl glioma. Nucleotide sequencing of the env gene suggests that four ALV isolates (GifN strains) are novel recombinant viruses. In addition, experimental infection using an isolate, GifN\_001 strain, demonstrated that this strain has oncogenicity in the central nervous system in chickens. GifN strains are the first neuropathogenic ALVs isolated from chickens affected with osteoporosis in chickens.

研究分野：獣医病理学

キーワード：トリ白血病 トリレトロウイルス 骨化石症 粘液肉腫 神経膠腫

## 1. 研究開始当初の背景

トリ白血ウイルス (ALV) は *Retroviridae*, *Alpharetrovirus* に属する RNA ウイルスで、鶏に腫瘍を誘発する。本ウイルスはウイルス学的ならびに血清学的には外来性ウイルス (A, B, C, D, J 亜群) と内在性ウイルス (E, F, G, H, I 亜群) に分類され、これらのうち、鶏では主に外来性ウイルスの A, B および J 亜群が腫瘍を引き起こす。ALVs は様々な腫瘍を誘発するが、ALV-A または B は主にリンパ性白血病 (lymphoid leukosis; LL) を、ALV-J はリンパ球よりも骨髓球および単球に親和性をもち、骨髓性白血病 (Myeloid leucosis; ML または骨髓球腫症) を誘発する。ALV-J は外来性 ALV が遺伝子組換えにより内在性レトロウイルスを取り込んで出現した新興ウイルスで、1988 年にイギリスで初めて分離された。その後、諸外国に ALV-J の感染が拡大し、隣国の中国では現在もなお ML が発生しており、養鶏業界に大きな打撃をもたらしている。また、中国の肉用鶏では新興性 ALV-K が出現したと報告されている。

国内では LL が現在も散発的に発生している。一方、ML は国内で 1990 年代後半から認められたが、現在は概ね終息したと考えられている。ところが、沖縄で 2013 年から肉用鶏、採卵鶏を問わず ML 様病変が複数発見された。しかし、沖縄の ML 様の病鶏からは J 亜群以外の ALV しか分離されず、ML 様病変と ALV との因果関係や病態の詳細は不明のままである。また、本州では ALV との関連が知られている疾患、腎芽腫や骨化石症が卵肉兼用種で複数発生し、一部にグリオーマが併発していたことから、これまでと異なる ALV 株の出現が強く疑われた。

## 2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本課題では (1) 沖縄の ML 罹患鶏の病理学および免疫組織学的解析、(2) 東海地方で発生した骨化石症や腎芽腫の病理学および免疫組織学的解析、(3) 分離ウイルスのシーケンス解析、(4) 分離ウイルスを用いた感染実験による病原性解析、これら 4 項目の解析を通して現在国内で発生している ML 様病変や骨化石症の原因と出現経緯を解明するとともに、本疾病の制圧・予防策を速やかに提示することを目的に研究を実施した。

## 3. 研究の方法

(1) 沖縄の ML 罹患鶏の同居鶏を対象に ALV の疫学調査を行った。淘汰鶏は全身諸臓器を病理学的に解析した。ウイルス検索材料には肝臓、脾臓、脳、クロアカ拭い液および羽髄を用い、ALV の有無を PCR で解析した。

(2) 上記 (1) と同様に、本州で見つかったトリ白血ウイルス感染症疑似例を病理学

的ならびにウイルス学的に解析した。また、九州で維持されている日本鶏群にはグリオーマ誘発性 ALV が存在するため、これら鶏についても同様に解析した。

(3) 分離した ALV のウイルスゲノムのうち、亜型および腫瘍原性を規定する *env* 遺伝子について塩基配列を決定し、既知のウイルスのそれと比較した。

(4) 分離ウイルスの病原性を解析するため、分離した代表的なウイルスを Line M 系 SPF 鶏有精卵に接種して孵化後、70 日齢まで観察し、その後、剖検、病理組織学的解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 沖縄県のブロイラーに ML 疑似例が多数発見された。そこで、同居鶏 20 羽の全身諸臓器および 50 羽の脳を組織学的に検索した。組織学的には諸臓器で髄外造血性の骨髓球の集簇が認められ、70 羽中 49 羽の脳に星状膠細胞の増殖、囲管性細胞浸潤からなる非化膿性脳炎が認められた。次に、これらの脳および ML 疑似例発生時に採取された凍結生材料から ALV の分離を試みた。しかしながら、これら生材料からは ALV は分離されなかった。また、脳から抽出した DNA を用いて ALV の *env*SU 領域のシーケンス解析を行った結果、検出領域は内在性ウイルス *Gallus gallus endogenous virus Avian leukosis virus ALVE-NSAC-1* (FJ793550) と 99% の相同性を示した。以上のように、今回の検索では複製能を持つ外来性 ALV の感染を示唆する成績は得られなかった。上記の成績とともに、骨髓球の集簇が諸臓器に認められたものの、いずれも周囲組織を破壊することがなかったことを踏まえると、ML 様病変は高度の髄外造血である可能性が示唆された。

(2) 岐阜県の 2 農場の卵肉兼用種の鶏から粘液肉腫 2 例、横紋筋肉腫 1 例および骨化石症 5 例が発見された。また、骨化石症罹患鶏 5 例すべての脳に非化膿性脳炎が存在し、これらのうち 2 例にグリオーマが認められた。上記の症例の病理学的特徴は以下の通りである。

粘液肉腫 2 例はいずれも星芒状から紡錘形の線維芽細胞の増殖と粘液に富む細胞外基質からなり、細胞外基質にはアルシアン青染色陽性、トルイジン青染色一部陽性および PAS 染色陰性の酸性ムコ多糖類が豊富に含まれていた。横紋筋肉腫は 1 例の皮下に腫瘤を形成していた。腫瘤は豊富な強好酸性顆粒状の細胞質を有する、大型円形～多角形細胞から構成されていた。大型の異型核を有する巨細胞と紡錘形細胞が混在し、一部で豊富な細胞外基質を伴っていた。また、これらの腫瘍細胞は Desmin に陽性を示した。骨化石症 5 例に共通する変化は中足骨の肥大で、この病変は

外骨膜性異常造骨から構成されていた。異常造骨は拡大したハヴァース管を囲む成熟した層板と、これらハヴァース系の間に存在する未熟な介在層板からなっていた。異常造骨の最外層には線維芽細胞が増殖し、不規則な骨梁が増殖していた。

さらに、上記の腫瘍あるいは骨化石症罹患例 8 羽中 2 羽の中樞神経系に 10 個以上の異型星状膠細胞の増殖からなる結節（神経膠腫）とグリオーシスが認められ、別の 2 羽にはグリオーシスがみられた。結節性病変は線維型あるいは原形質型星状膠細胞から構成され、しばしば好酸性に強く染まる Rosenthal fiber 様線維を有していた。また、結節内にはときおり軽度の囲管性リンパ球浸潤を伴う毛細血管の増殖と小膠細胞の浸潤が認められた。免疫染色ではこれら病巣内の星状膠細胞は抗 GFAP 抗体、および抗 RAV-2 抗体に陽性を示した。これら所見に加え、検索した 7 羽中 5 羽の心筋細胞内に、ALV 感染時に出現する基質封入体が観察された。

次に ALV の分離を試みたところ、4 株のウイルスが分離された。粘液肉腫 2 例からはそれぞれ、ALV、GifN\_001 株と GifN\_005 株が分離された。骨化石症 2 例からは GifN\_002 株と GifN\_004 株が分離された。これら分離株の *envSU* 領域は 4 株間で 97~98% の相同性を示し、トリ肉腫ウイルス B 亜群の RSV\_SR-B 株と最も高い相同性を示した。また、分子系統樹では、分離株 4 株は既知のグリオーマ誘発 ALV 株とは異なるクラスターに分類された。

以上の成績から、今回検索した骨化石症や間葉系腫瘍はグリオーマ誘発能を持つ ALV と関連して発生していること、分離株は既知のトリのグリオーマ誘発ウイルス株とは異なることが明らかとなった。検索した卵肉兼用種は従来から品種改良に利用されてきた地鶏から作出されたものである。本成績はわが国の代表的な地鶏に新たなグリオーマ誘発ウイルスが出現した可能性を示唆するものといえる。

(3) 福島県のプロイラーに ML とは異なる造血器系腫瘍の発生が確認されたため、これら罹患鶏から ALV の分離を試みたが、いずれからもウイルスは分離されなかった。

(4) 岐阜県の卵肉兼用種には ALV が拡散し、この ALV 株によって骨化石症や粘液肉腫、トリのグリオーマが引き起こされていることが推察された。そこで、岐阜県を含む東海地方の卵肉兼用種から摘発された腫瘍性疾患を病理学的に解析した。岐阜県および長野県の 6 養鶏場から合計 21 羽の腫瘍性疾患が見つかった。腫瘍性病変の大半は骨化石症が占め、ほかに腎芽腫、粘液肉腫および肝細胞腺腫が発生していた。また、これら罹患鶏のうち 6 例の脳にグリオーマが併発していた。さらに、19 例中 11 羽の心筋線維の筋形質内に ALV 感染時に出現する基質封入体が認められた。ま

た、疫学調査の結果、これら罹患鶏の種鶏は GifN 株が分離された鶏のそれらと同一であることがわかった。以上の成績から、GifN 株またはこの近縁株がこれら鶏群に拡散していることが浮き彫りとなった。

(5) 青森県および岩手県で発生した皮下または腹腔内腫瘍 5 例を検索した。これら腫瘍は形態学的にはマレック病あるいはリンパ性白血病とは異なる病態と組織像を示し、免疫組織学的検索により 2 例は T 細胞性リンパ腫、ほかの 3 例は B 細胞性リンパ腫であることがわかった。これら 5 例の神経系には星状膠細胞の増殖やリンパ球浸潤は認められず、また、心筋線維には基質封入体は認められなかった。次に、これら 5 例から ALV の分離を試みたが、いずれの症例からも ALV は分離されなかった。T リンパ腫に関してはさらに検討する必要があるが、上記の成績により、ALV とは関連のない B リンパ腫が存在する可能性が示唆された。

(6) 岐阜県で発生した骨化石症や粘液肉腫例から分離された ALV、GifN 株は既知の ALV ではないことが分子系統樹解析により判明した。そこで、分離株の中樞神経系に対する病原性を明らかにするために、GifN\_001 株を用いて感染実験を行った。GifN\_001 株を孵卵 6 日目の Line-M 系 SPF 白色レグホンの有精卵に卵黄嚢内接種し、孵化後 34 または 75 日齢まで観察した。その後、実験鶏は剖検に供され、病理学的に検索された。対象群および実験群、いずれの鶏も肉眼的にはとくに異常は認められなかった。

実験鶏の病理組織学的成績は以下の通りである。感染実験群には、グリオーシスが 34 日齢の 5 羽中 1 羽 (20%) および 75 日齢の 6 羽中 4 羽 (67%) に認められ、軽度の神経膠腫が 34 日齢の 5 羽中 1 羽 (20%)、75 日齢の 6 羽中 2 羽 (33%)、中等度の神経膠腫が 75 日齢の 6 羽中 2 羽 (33%) に認められた。神経膠腫およびグリオーシスは小脳皮質、特にプルキンエ細胞層から分子細胞層にかけて多病巣性に認められた。神経膠腫の腫瘍細胞は細胞質に乏しく、多数の線維性突起を有する線維性 (fibrillary) 星状膠細胞様の形態を示していた。増殖していた星状膠細胞は免疫組織学的に ALV 共通抗原および GFAP に陽性を示した。また、病巣周辺ではしばしば軽度の囲管性リンパ球浸潤を伴う毛細血管の増殖と小膠細胞の浸潤が認められた。また、小脳の軟膜直下に外顆粒細胞の遺残が 34 日齢の 5 羽中 2 羽 (40%)、75 日齢の 6 羽中 2 羽 (33%) に認められ、プルキンエ細胞の配列異常が 75 日齢の 6 羽中 2 羽 (33%) に認められた。外顆粒細胞の遺残とプルキンエ細胞の配列異常は、いずれも軽度ではあるものの、巣状あるいは多病巣性に認められた。免疫組織学的には遺残していた外顆粒細胞および内顆粒細胞は ALV 共通抗原に陽性を示した。

上記の変化に加え、34日齢の5羽中3羽(60%)と75日齢の6羽中3羽(50%)の心臓で非化膿性心筋炎が認められた。これら病巣は主に軽度から中等度のリンパ球浸潤と心筋の変性からなっていた。また、75日齢の6羽中4羽(67%)の心筋細胞内に基質封入体が形成されていた。接種群の他の臓器および対照群の全身諸臓器に特に異常は認められなかった。

次に、34日齢および75日齢の各1羽の脳からALVの分離を試みた。調整したcDNAを鋳型として用いALVのenvSU可変領域を検出するALV特異的RT-PCRを行った。さらに、増幅産物をシーケンス解析し、GifN\_001株の可変領域と比較した結果、相同性は99~100%であった。

以上の成績から、粘液肉腫と関連するALVが神経系にも病原性を示すことが実験的に証明された。envSUの塩基配列の相同性に基づく、GifN\_001株は骨化石症とグリオーマの併発例から分離されたGifN\_002, 004株と概ね同一のALVであると考えられる。したがって、今回検索した卵肉兼用種の鶏群には神経病原性を持つGifN株が蔓延していることが推察される。

(7) 結論として、本研究によって骨化石症や粘液肉腫を誘発するALV株の中にも神経病原性をもつ株が存在することが初めて明らかになった(投稿準備中)。また、少なくとも今回の成績からは国内で認められるML様病変はALVとの関連性は低く、高度の髄外造血と解釈するのが妥当と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計6件)

①近藤佑衣, 西浦颯, 可知正行, 佐々木淳, 御領政信, 落合謙爾(2018). 粘液肉腫由来トリ白血病ウイルスの神経系に対する病原性解析. 第5回日本獣医病理学専門家協会(JCVP)学術集会講演要旨集:44.

②近藤佑衣, 落合謙爾, 畑井仁, 齋藤美加, 佐々木淳, 御領政信(2017). 鶏の骨髄性白血病様肝病変と円形細胞肉腫に関する疫学的解析. 第160回日本獣医学会学術集会講演要旨集:324.

③可知正行, 落合謙爾, 近藤佑衣, 畑井仁, 奥村拓矢, 加藤樹夫, 佐々木淳, 御領政信(2017). 卵肉兼用種の鶏に発生したトリ白血病ウイルス関連腫瘍の病理学的検索. 第160回日本獣医学会学術集会講演要旨集:324.

④川島慎吾, 落合謙爾, 窪田郁子, 佐々木淳, 御領政信(2016). 最近発見された鶏のグリオーマの病理学的特徴. 岩手県鶏病研究会平成27年度鶏病技術研修会.

⑤窪田郁子, 落合謙爾, 川島慎吾, 佐々木淳, 御領政信(2016). 鶏の骨化石症に併発したグリオーマの病理学的解析. 第3回日本獣医病理学専門家協会(JCVP)学術集会講演要旨集:90.

⑥窪田郁子, 落合謙爾, 畑井仁, 阿佐美有右, 佐々木淳, 御領政信(2015). プロイラーで新たに見つかった神経病原性トリ白血病ウイルスの病理と疫学. 平成27年度獣医学術東北地区学会日本産業動物獣医学会(東北地区):50.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

御領 政信 (GORYO, Masanobu)  
岩手大学・農学部・教授  
研究者番号: 80153774

### (2) 研究分担者

畑井 仁 (HATAI, Hitoshi)  
鹿児島大学・共同獣医学部・准教授  
研究者番号: 40566535