

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06418

研究課題名(和文) 白血病ウイルスの新規病原性基盤についての病理学的研究

研究課題名(英文) Pathological study on the basis of novel pathogenesis of leukemia virus

研究代表者

寸田 祐嗣 (Sunden, Yuji)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：20451403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：白血病ウイルスはヒトや動物に感染して様々な疾患を引き起こす。名前の通りに白血病、すなわち血液の癌・悪性腫瘍が主であるが、それ以外にも様々な病態に關与する。本研究では猫白血病ウイルス(Feline leukemia virus, FeLV)が感染したことによって生じる皮膚、特に顔面の口吻部(口や鼻のまわり)の変化を解析することによって、白血病ウイルスの新たな病原性について研究した。その結果、FeLVは口吻部の様々な細胞に豊富に存在しており、唾液などの体液中にウイルスが排出されている可能性、洞毛(いわゆるヒゲ)に外見上の変化を引き起こす可能性が明らかになり、本ウイルスが持つ多様な病原性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

猫は一般的な愛玩動物(ペット)であり、多様化する社会においてはヒトの大切なパートナーとなっている。一方で、猫は屋外での活動を好み、集団内や屋外で様々な病気が蔓延することも懸念される。また、家猫以外に、野生や動物園等にも様々な猫科動物が存在するため、ウイルス感染症の制圧は重要な課題のひとつである。FeLV感染症もその代表例であるが、本病は緩慢に進行する慢性疾患であり、診断・摘発が容易ではない。洞毛の変化について着目して調査・研究したものは、本研究者が知る限りでは本研究がはじめてのものであり、本成果はヒトや他の動物に感染する白血病ウイルスの病原性を解明する上で有益な基礎的知見となる。

研究成果の概要(英文)：Leukemia viruses infect humans and various animals, induce a variety of diseases. As the name suggests, leukemia, malignant neoplasia of the blood cells, is the main disease caused by this viruses, however, they are also involved in a variety of other disease conditions.

In this study, we focused on feline leukemia virus (FeLV) and investigated the pathogenicity of the pathological changes in the skin, especially in the proboscis area (around the mouth and nose) of the face, caused by infection with FeLV.

The results revealed that FeLV is abundant in many cells in the proboscis, that FeLV may shed the virus into saliva and other body fluids, and that FeLV may cause unique appearance changes in sinus hairs.

研究分野：獣医病理学

キーワード：獣医病理学 白血病 猫白血病ウイルス 洞毛

1. 研究開始当初の背景

波状変化を伴う洞毛(いわゆるヒゲ)をもった猫に注目すると、これらの猫は統計的に有意な感度と特異性をもって、猫白血病ウイルス (Feline Leukemia Virus, FeLV) に感染していることが明らかになっていった(平成 25 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会)。FeLV に関する近年の研究報告は国内外いずれにおいても、免疫不全に続発した感染症(二次感染)に関する症例報告、血清疫学調査、宿主ゲノムへのウイルス遺伝子の取り込みに関するものが大多数を占めており、ウイルスの病原性に関する新しい知見は報告されていなかった。FeLV の感染と皮膚病変については報告があったが(*Vet Dermatol.* 16, 2005)、その内容は多核細胞の出現を特徴とする潰瘍性皮膚炎についての症例報告であった。

猫は屋外での活動を好み、不適切に繁殖することも多く、その集団内では様々な病気が蔓延することが懸念される。その代表例のひとつが FeLV 感染症であるが、本病は緩慢に進行する慢性疾患であり、診断・摘発が容易ではない。また、動物やヒトには多種類の白血病ウイルスが存在しており、白血病以外にも様々な病気に関与する。以上のような背景を踏まえて、FeLV をひとつのモデルとして、白血病ウイルスの新たな病原性を解明できないかと考えた。

2. 研究の目的

特徴的な外貌変化である洞毛の波状化(図 1)は FeLV によって生じるのか、なぜウイルスに感染した猫の洞毛は波状変化を起こすのか、を明らかにすることが本研究の大きな目的である。ウイルス感染と洞毛の形態変化に関する研究はこれまでに国内外で報告がなく独自性があるものであり、また特殊感覚(触覚)器である洞毛の機能に与える影響やウイルスの伝播拡散への寄与等についても応用性・発展性を秘めているものと思われた。

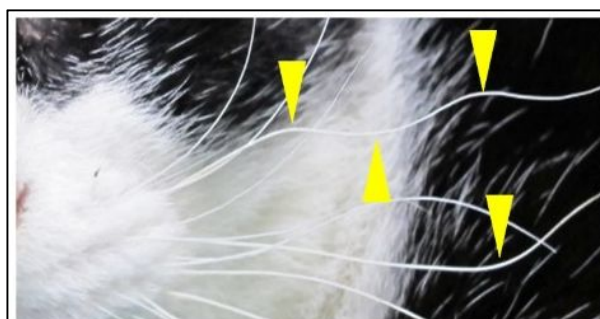


図 1. 洞毛の波状変化の例。矢頭は屈曲部を示す。

3. 研究の方法

(1) 症例の回顧的解析、統計解析

合計 300 例以上の症例についてカイニ乗検定を実施して、洞毛変化と FeLV の関連について再検討した。波状洞毛は 2 箇所以上の屈曲部を有するものとし(図 1)それが 2 本以上確認できた個体を選定した。さらに血液検査データを含む合計 12 項目(PCV、BUN 等)について、多変量解析を行った。

表 1 血中 FeLV 検出と有意に関連する因子の検索

	odds	95% confidence interval	P value	GVIF
WSH	193	42.2-883	1.16E-11 **	1.524867
Anorexia, lethargy	6.43	1.02-40.7	4.80E-02	1.461441
FIV positive	1.54	0.335-7.03	5.81E-01	1.228234
Castrated male (vs intact male)	0.197	0.037-1.04	5.62E-02	2.137209
Intact female (vs intact male)	0.212	0.0305-1.48	1.17E-01	
Spayed female (vs intact male)	0.602	0.141-2.58	4.94E-01	
BW	1.56	1.02-2.38	4.12E-02	1.493116
Age	0.923	0.787-1.08	3.23E-01	1.641185
PCV	0.919	0.864-0.978	7.63E-03 *	1.405404
WBC	1	1	7.63E-01	1.157596
TP	0.916	0.464-1.81	8.00E-01	1.634495
ALT	1	0.996-1	8.29E-01	1.106538
Glu	0.998	0.986-1.01	7.86E-01	1.131883
BUN	0.99	0.964-1.02	4.64E-01	1.478275

WSH: wavy sinus hair (波状洞毛). GVIF, generalized variance inflation factor.
* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

(2) 洞毛および口吻部組織の病理学的検索

血液中の FeLV 検出の有無、洞毛の波状変化の有無に分類して、定法に従いホルマリン固定・パラフィン包埋標本を作成して、病理組織学的に病変の有無を観察した。次に、FeLV のウイルス蛋白質である p27、gp70、p15E に対する免疫組織化学的検索を実施した。炎症性変化が認めら

れたものについては浸潤細胞を明らかにするための免疫組織化学検索も実施した。また洞毛そのものの変化についても正立顕微鏡下で観察した。

(3) ウイルスタンパク質発現の影響

FelVの病原性に重要であることが報告(*J Clin Microbiol.* 2014; *J Vet Diagn Invest.* 2017) されているコア蛋白質 p27 遺伝子をクローニングして、発現ベクターを作成、上皮系培養細胞にトランスフェクション(遺伝子導入)して、細胞への影響を調べた。特に発現後の生細胞数の変化を測定し、ケラチンの発現量の変化をウエスタンブロットティングにより検討した。

4. 研究成果

(1) 波状洞毛を有した 56 例を含む合計 364 例について、「洞毛の波状変化の有無」と FelV、FIV (Feline immunodeficiency virus) それぞれの感染有無についての関連性を調べるために、カイ二乗検定を行った。その結果、「洞毛の波状変化」と「FelV 陽性」には有意な相関があることが判明した。具体な数としては、波状洞毛を有した 56 例のうち 50 例(89.3%)が FelV 陽性であった。ウイルス感染は血液にて、FelV 抗原あるいは抗 FIV 特異抗体をそれぞれ検査した。次に、「FelV の有無」と、利用可能であった 12 項目について、多変量解析(ロジスティック解析)を行った結果、「FelV の有無」と「洞毛変化(波状洞毛)」に、最も高い関連性があることが判明した(前ページ、表 1)。他に、PCV の低下も有意であったが、これは既知の病原性である貧血状態を反映しているものを推察された。以上より、波状洞毛を有する猫は、FelV に感染している(血中 FelV 抗原陽性である)可能性が高いと考え、感度、特異度、陽性的中率を計算したところ、それぞれ 68.4%、97.9%、89.3%であった。

(2) 洞毛そのものを光学顕微鏡下で観察したところ、波状変化部(屈曲部)にて、径の狭小化や不均一化、毛髄質の変性・断裂を認めた(図 2)。また、材料採取が可能であった合計 36 例の洞毛毛根部を含む口唇部組織の病理組織学的検査を行ったところ、血中 FelV 陽性例では、真皮内に少数の単核細胞の浸潤を認める傾向がみられたが、同部の組織(皮膚、洞毛・被毛の毛包、腺上皮など)に変性・壊死は観察されなかった。組織を用いて、FelV 抗原(p27, gp70, p15E)に対する免疫染色を実施したところ、血中 FelV 陽性例では、洞毛を



図2. 毛髄質の変(左)ならびに断裂(右).

構成する上皮細胞を含めて、口吻部の様々な上皮細胞(表皮、粘膜上皮、被毛の毛包、汗腺、皮脂腺)に抗原陽性像が検出された(図 3)。3 種類の中で p27 が最も検出率が高く(次ページ、表 2)、血中 FelV 陽性症例の上皮細胞内に高頻度に検出された。また、骨格筋内にも少量のウイルス抗原が認められた。さらに、全身検索可能であった症例では、腎臓、肺、脾臓、腸管の各種上皮細胞内にも p27 陽性像が観察された。

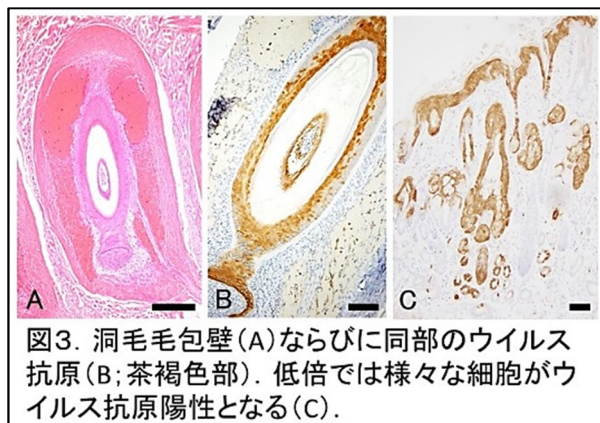


図3. 洞毛毛包壁(A)ならびに同部のウイルス抗原(B; 茶褐色部). 低倍では様々な細胞がウイルス抗原陽性となる(C).

(3) EGFP 融合 FelV p27 発現遺伝子を猫腎由来株化細胞 CRFK に導入したところ、約 20%の細胞に緑色蛍光(EGFP)が観察された。これらの蛍光は細胞質内に分布し、ときおり細胞辺縁部の細胞膜直下に強く集積するように観察された(図 4)。遺伝子導入 4 日目まで細胞数を計数した

が、コントロールと比較して有意な差異は認められなかった。また、p27 発現細胞ではサイトケラチン (CK) の減少傾向が観察された (図 5)。一方で、いくつかのサイトケラチン種の発現状況を口吻部組織にて検索したが、有意な変化は認めず、FeLV 感染と CK 変動の関連の詳細については不明である。

<考察など>

ウイルス感染と洞毛に注目したものととして、狂犬病罹患動物の洞毛毛包壁に狂犬病ウイルスが検出された報告がある (*J Virol Methods* 237;40-46,2016)。狂犬病ウイルスは洞毛壁のメルケル細胞 (特殊な感覚受容細胞) 内に観察されており、同細胞への緻密な神経分布が関与しているものと考えられている。また、マウス白血病ウイルスが皮膚の毛包壁で増殖することが報告されているが (*J Virol* 73;2509-2516,1999.) 新生マウスの皮下への実験的ウイルス接種による成績であり、その意義は不明である。よって、洞毛そのものの変化について着目して調査・研究したものは、本研究がはじめてのものである。

本研究の結論は以下の 3 点にまとめられる。1. 特徴的な外部所見である洞毛の波状変化は、FeLV 感染と関連性が高いことを統計的に示した。2. 洞毛の毛包壁を構成する上皮細胞に FeLV が感染していることを病理組織学的に示した。3. FeLV 感染が洞毛に波状変化を起こす機序は、現時点では不明であるが、ユニークかつオリジナリティのある発見であり、FeLV の制圧やレトロウイルスの病原性を解明するうえで有益な基礎的知見になると考えられた。以上の成果について、学術論文としてまとめて投稿して審査を受けている。

表 2 免疫組織化学的検索 (IHC) のまとめ

FeLV detection (blood test)	WSH	FeLV antigen detection by IHC (upper: p27, middle: gp70, bottom: p15E)					
		Epi	Sw	Sb	Hf	Muc	Sm
Positive (n=13)	6 (46)	12 (92)	11 (85)	12 (92)	12 (92)	10 (91)*	5 (38)
		9 (69)	11 (85)	8 (62)	8 (62)	10 (100)**	0 (0)
		5 (38)	3 (13)	0 (0)	1 (8)	0 (0)*	0 (0)
Negative (n=12)	0 (0)	1 (8)	1 (8)	1 (8)	1 (8)	1 (8)	0 (0)
		0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (8)	1 (8)	0 (0)
		1 (8)	1 (8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Not tested (n=11)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

The number of cases those had wavy sinus hairs (WSH), FeLV antigens (p27, gp70 and p15E, respectively) in each region. The percentage is also listed in parenthesis. Epidermis (Epi), epithelium of sweat gland (Sw), sebaceous gland (Sb), hair follicules of both skin hair and sinus hair. Oral mucosa of upper lip (Muc) and skeretal muscles (Sm). Eleven*, ten** cases are tested.

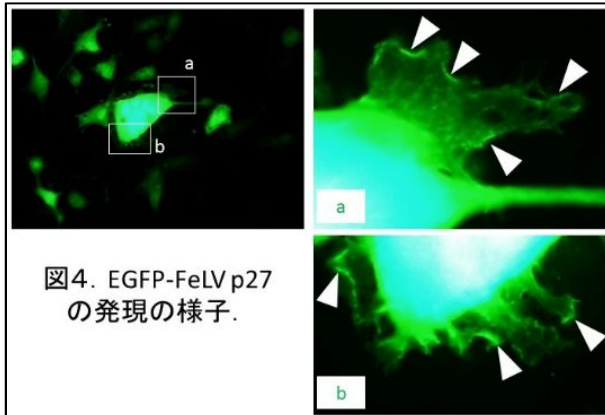


図 4. EGFP-FeLV p27 の発現の様子。

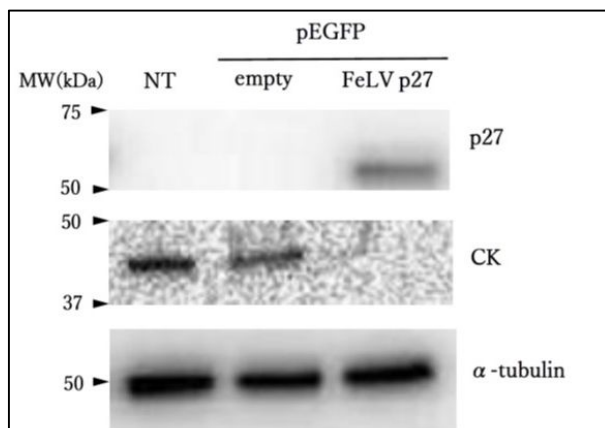


図 5. 上皮系培養細胞に FeLV p27 を強制発現時、CK (サイトケラチン) が減少傾向を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	森下 正隆 (Morishita Masataka)		
研究協力者	堀口 美咲 (Horiguchi Misaki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関