

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06426

研究課題名(和文) ボルナウイルス持続感染動物における性ホルモン分泌動態の解明

研究課題名(英文) Elucidation of sex hormone secretion dynamics in Borna disease virus-1 persistently infected animals

研究代表者

萩原 克郎 (Hagiwara, Katsuro)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号：50295896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ボルナ病ウイルス(BoDV-1)持続感染は、視床下部におけるキスペプチン及びそのレセプター発現が異常となり下垂体GnRHの発現にも影響することが判明した。よって、視床下部にBoDV-1が持続感染するとGnRH発現が低下し下垂体からの正常な性腺刺激ホルモンFSH及びLHの分泌が制御され、生殖器の発達に異常をきたすと共に性周期も延長する事が明らかとなった。ラットモデルで確認されたこのGnRH発現低下による性周期異常は、BoDV-1持続感染牛では、黄体のプロジェステロン産生細胞が少なく分泌しない細胞が多く構成されていることが示唆され、生理的なGnRHの刺激応答が十分では無いことが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ボルナ病ウイルス感染は、家畜の中樞神経に感染し、乳牛では不受胎と関係することが示唆され、生産性に潜在的な損失をもたらす事が懸念される。感染個体は、臨床的観察から受胎～妊娠初期の維持に必要なホルモンが正常に維持できない可能性が推測された。よって、感染ラットモデルによる脳内神経ペプチドの発現と性ホルモンの動態を調査した。その結果、視床下部-下垂体-性腺軸で重要な脳視床下部のキスペプチン産生異常に起因する性ホルモン分泌低下による繁殖障害であると結論づけられた。ボルナ病ウイルス持続感染における要因が明確となったことから、この知見を基に感染個体の繁殖対策として臨床応用が可能となる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Borna disease virus (BoDV-1) persistent infection was found to cause abnormal kisspeptin and its receptor expression in the hypothalamus and to affect pituitary GnRH expression. Thus, persistent infection of the hypothalamus with BoDV-1 reduces GnRH expression and regulates the secretion of the normal gonadotropic hormones FSH and LH from the pituitary gland, resulting in abnormal reproductive organ development and prolonged sexual cycle. The abnormal sexual cycle due to decreased GnRH expression observed in the rat model suggests that the BoDV-1 persistently infected cows consist of few progesterone-producing cells in the corpus luteum and many non-secreting cells, confirming that the physiological GnRH stimulation response is not sufficient.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ボルナ病ウイルス 視床下部 キスペプチン GnRH 卵巣 性周期 子宮

1 . 研究開始当初の背景

ボルナ病ウイルス (BoDV-1) 感染は、家畜の中枢神経に感染し神経症状を伴う疾患として報告され、その後ヒトを含めさまざまな動物でその感染が確認されている。主に家畜等に感染する *Orthobornavirus* は、神経症状を伴う症例も散見されるが、神経症状を伴わない不顕性感染が多い。一方で、それら不顕性感染の乳牛を調査すると乳牛の不受胎と関係することが判明し、経済動物の生産性に潜在的な損失をもたらす事が懸念された。北海道の乳牛を対象とした繁殖状況の調査比較において、持続感染牛の平均授精回数と分娩間隔が非感染牛と比較し有意に増加・延長することが判明した。これらの個体は、受胎～妊娠初期の維持に必要なホルモンが正常に維持できない可能性が推測された。BoDV-1 に自然感染した個体を調べると、ウイルスは主に脳内から検出されることから、BoDV 感染による中枢神経系の異常を原因とする繁殖障害であると推測した。

2 . 研究の目的

BoDV-1 持続感染による繁殖障害について、BoDV-1 の脳内持続感染による影響を詳細に調べる目的で、持続感染ラットモデルを用いて神経ペプチドの発現や性ホルモンの動態を調査した。視床下部-下垂体-性腺 (HPG) 軸は、正常な繁殖機能を維持する上で重要な役割を果たす。性周期および妊娠維持に関する視床下部で重要な役割を担っている視床下部を中心として神経ペプチド (Kisspeptin) の発現をラット発育ステージ毎にその変化を比較した。

さらに、BoDV-1 感染乳牛における卵巣状態の超音波画像解析とプロゲステロン値の推移を非感染牛と比較しラット持続感染モデルの知見と比較考察することを目的とした。また、GnRH を試験投与し卵巣所見と妊娠との関係性を調べた。

3 . 研究の方法

BoDV-1 持続感染ラット：新生 Lewis ラットに BoDV-1 を脳内感染させることで持続感染ラットを作出した。持続感染ラットは、滅菌処理した水と餌を不断給餌により飼育観察した。このラットの性成熟までの発育過程 (3、6、9、16 週齢) における春機発情、性周期視床下部キスペプチン発現、及び 16 週齢時の血清中 FSH と卵巣中エストロゲン (E2) は ELISA 法により測定し非感染ラットと比較した。一方で、剖検したラット脳の HE 染色組織における病理所見並びにウイルス抗原及びキスペプチン発現について免疫組織学的な検索を実施した。

乳牛：北海道内の乳牛を対象に BoDV-1 持続感染牛の疫学的調査を実施した。調査方法は、BoDV-1 の N 抗原を用いた ELISA によるスクリーニングを実施し、カットオフ以上の個体に対し WB 法によりウイルス抗原と反応する個体の確定診断を実施した。その中で、飼養牛群 233 頭で抗体陽性率が 24% の農場が確認された。本農場は、陽性個体が一定数存在し、同一農場内で個体管理ができていることから調査対象農場として選定し、農場所有者に調

査実施の承諾を得た。当該農場のホルスタイン乳用牛 46 頭の成牛（平均産時数 2.5）を供試牛とし、人工授精(AI) 11 日後に GnRH(酢酸フェルチレリン製剤 100 μ g)筋肉内投与を実施し、超音波診断装置による卵巣の超音波画像撮影と採血を AI 時、AI 後 7 日、11 日、14 日、21 日および妊娠鑑定時(37.5 日)に実施した。測定時に、採血を実施し血清中プロジェステロン(P4)を CLIA 法により測定した。超音波画像解析は、黄体断面積(CA)を測定し P4 値との比較検討を実施した。統計処理は、R ソフト(Ver.4.0.4)を用い $P < 0.05$ で有意性を検討した。

4. 研究成果

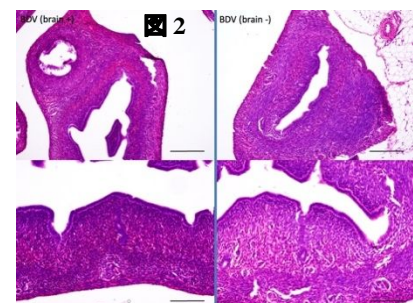
持続感染ラットモデル: 持続感染ラットにおいて、神経症状を示す個体は確認されなかったが、体重の有意な減少が生後 3 週齢以降測定された。3 週齢での非感染群に対する持続感染群の有意差は $p = 0.03$ であり、4 週齢以降は $p < 0.001$ を示した。16 週齢では、非感染群に対し、約 50.5%の体重差が認められた。

BoDV-1 持続感染は、春機発動に影響するのかを調べる目的で、二次性徴の指標となる膣開口(VO)までに要した日数を持続感染ラット($n = 9$)とコントロールラット($n = 10$)で比較した結果、非感染ラットの 36.7 ± 1.4 Day (d)に対し、持続感染ラットは 70 ± 18.4 d となり有意に日数が延長した。よって、BoDV-1 持続感染は、神経症状など臨床所見は示さないが、発育抑制を伴う春機発動の遅延が特徴的であることが確認された。次に、発情周期への影響を調べる目的で、膣スミア検査による発情周期の観察を行った。非感染ラットでは、4-5 日で発情周期が一順するのに対し、持続感染ラットでは、休止期が大きく延長することで発情周期が停滞していた。また、16 週齢まで観察した 7 匹の持続感染ラットのうち、3 匹は VO 後も発情期が確認されなかった。



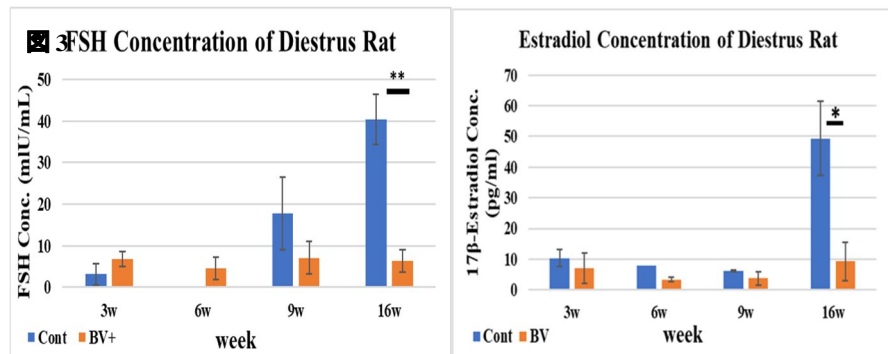
さらに、16 週齢の休止期におけるコントロールラットと持続感染ラットの卵巣 1 個あたりの重量を比較したところ、非感染ラット($n = 3$)のは平均卵巣重量 43.4 mgに対し、持続感染ラット($n = 5$)では平均 18.4 mgと有意な組織重量減少が確認された($p = 0.0062$)。

16 週齢の休止期における子宮の肉眼所見をコントロールラットと持続感染ラットともに図 1 に示した。非感染ラットの子宮に対し、持続感染ラットの子宮は、子宮に低形成を認め、それは子宮筋層と子宮粘膜の菲薄化及び粘膜固有層の子宮腺も低形成を認めた(図 2)。



ラット視床下部と下垂体における遺伝子の発現: HPG 軸の重要な神経ペプチドである Kisspeptin 遺伝子 *Kiss1* とそのレセプター遺伝子 *Kiss1r*、さらに *GnRH* について各週齢ラットの視床下部における発現を qPCR により比較定量した。視床下部において、持続感染

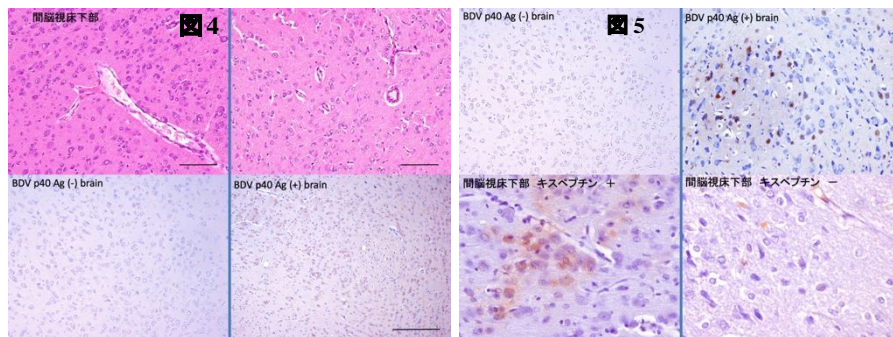
ラットの3, 6, 9週齢で有意な Kiss1 の発現上昇(それぞれ $p=0.03$, $p=0.04$, $p=0.04$)がみられた。しかし、同部位の WB 法によるタンパク検出においてキस्पペチンは低く遺伝子発現と異なった。Kiss1r の発現は、持続感染ラットの6週齢において有意に減少($p=0.048$)した。視床下部における *Gnrh* の発現は、非感染ラットでは3-6週齢で発現活性がみられるが、持続感染ラットでは低値を推移し6週齢では有意な減少を示した($p=0.0002$)。血清中の LH、FSH 及び E2 濃度は、持続感染ラットでは低値を維持しており、16週齢で有意な低下($p=0.003$)が認められた。コントロールラットでは16週齢休止期において血清中 E2 濃度は大きく上昇した



が、持続感染ラットでは低濃度のままで、有意な差が得られた(図3) ($p=0.015$)。

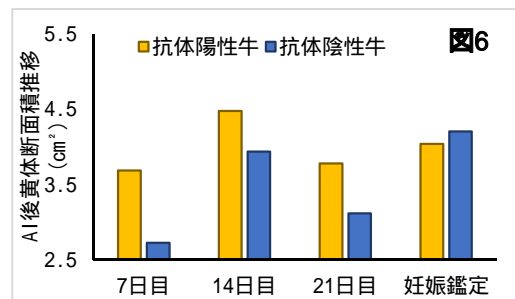
病理学的所見:

視床下部における BoDV 陽性細胞は海馬と同様にび漫性に増数し、神経細胞の減数およびグリオシスを呈する(図4)。キस्पペチンは BoDV 抗原陰性の視床下部間脳では稀に陽性細胞を認めるが、抗原陽性の視床下部間脳では陽性を認めなかった(図5)。



BoDV-1 持続感染牛における繁殖・生殖器所見:

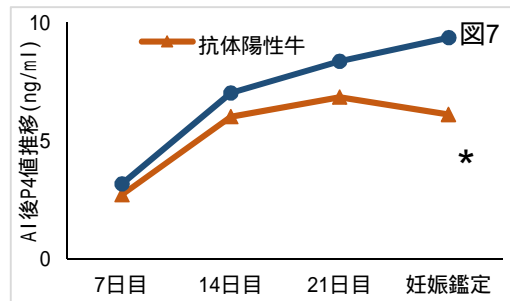
BoDV-1 持続感染乳牛における卵巣状態の超音波画像解析とプロゲステロン(P4)値の推移を抗体陰性牛と比較した。人工授精(AI)した日を起点に経過的な卵巣状態と P4 値の変化を中心に調べた。その結果、抗体陽性の有無に関わらず AI 後に卵巣の黄体断面積が増加し P4 値も増加した。しかし、抗体陽性牛は陰性牛と比べ P4 値が妊娠鑑定時まで低く推移した。しかし一方で黄体断面積は陰性牛より高く推移した。そのため黄体を構成する細胞の中でも P4 産生細胞の低形成あるいは機能不完全な構成細胞が多くを占め、機能が低下していることが推察された。妊娠初期における黄体形成と妊娠維持に影響を及ぼす臨床所見として、AI 後の黄体断面積は



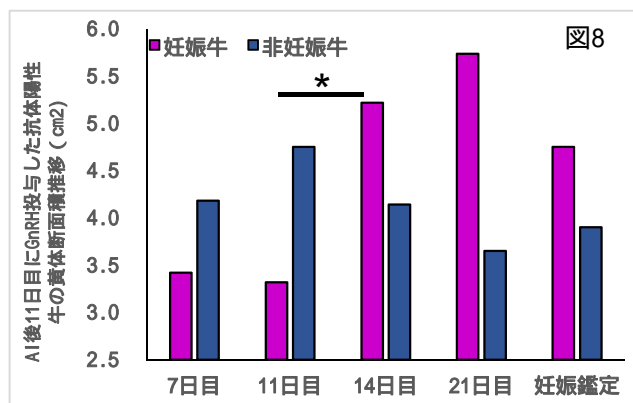
は

妊娠鑑定時を除き、有意差は見られなかったものの基本的に抗体陽性牛が陰性牛より高い推移となった。(図6)。P4値は、いずれの時点においても抗体陽性牛が陰性牛より低い推移となった。妊娠鑑定時に陽性牛が陰性牛間より有意に高かった ($P < 0.05$) (図7)。

GnRH投与試験は、AI後11日目にGnRHを投与し、副黄体形成による黄体機能増強を目的とした試験として実施した。これにより抗体陽性牛のうち妊娠した牛は、非妊娠牛と比べAI後11日目から14日目にかけての黄体面積が有意に増加した。 ($P < 0.05$) (図8)。



妊娠維持に黄体が非感染牛より大きくなる傾向は、BoDV-1持続感染牛の観察結果から黄体構成細胞におけるプロジェステロン産生細胞の絶対数が少なく、産生細胞が十分になるまで細胞増加した可能性が指摘される。よって、BoDV-1持続感染牛は、黄体を構成する卵巣細胞並びに機能が陰性牛と異なっている



ことが推察される。また、BoDV-1感染の有無がAI後11日目のGnRH処置により妊娠するか相対リスクを算出したところ、99%信頼区間で非保有牛は3.0倍となるのに対し抗体陽性牛では3.15倍となった。即ち、感染牛はGnRH放出並びに応答が減弱していることから、GnRH投与処置により受胎と妊娠維持が保たれる事が示唆された。BoDV-1持続感染した乳牛の観察知見から、BoDV-1抗体陽性牛は黄体断面面積に対しP4値が低いこと、また陰性牛よりもAI後GnRH投与により黄体機能に影響を受けやすいことが推察された。BoDV-1持続感染牛は、P4産生細胞の黄体細胞構成あるいはその機能低下による繁殖性の低下が起きていると考察された。

まとめ：

BoDV-1持続感染は、視床下部におけるキスペプチン及びそのレセプター発現に異常をきたし、GnRHの発現に異常をきたす事が明らかとなった。GnRH発現低下が発育時期に重なると正常な性腺刺激ホルモンFSH及びLHの発現が制御され、正常な生殖器の発達に異常をきたす。ラットモデルで確認されたGnRH発現低下による性周期異常は、持続感染牛にGnRHを投与した乳牛の卵巣反応の観察結果からも裏付けられた。また、キスペプチン及びそのレセプターに起因する下位のホルモン産生応答は、子宮の低形成要因となった。本研究により、視床下部のBoDV-1持続感染は、キスペプチン産生低下を伴う視床下部からのGnRH分泌の低下さらには、下垂体からのFSH, LH分泌低下を伴う生殖機能障害の要因となることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 渡辺 菜、萩原克郎、安藤達哉	4. 巻 73
2. 論文標題 ボルナ病発症乳牛群におけるボルナ病ウイルス抗体保有率と垂直伝播相対リスクの血清疫学的分析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the Japan Veterinary Medical Association	6. 最初と最後の頁 501-505
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12935/jvma.73.501	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sukmak M, Okamoto M, Ando T, Hagiwara K	4. 巻 83
2. 論文標題 Genetic stability of the open reading frame 2 (ORF2) of borna disease virus 1 (BoDV-1) distributed in cattle in Hokkaido.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Vet Med Sci.	6. 最初と最後の頁 1526-1533
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.21-0155	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 萩原 克郎、安藤達也、岡本実
2. 発表標題 BoDV持続感染と繁殖性
3. 学会等名 日本獣医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡部 菜、萩原克郎、安藤達哉
2. 発表標題 牛ボルナ病発症農場におけるボルナ病ウイルス感染状況と垂直伝播相対リスクの検討
3. 学会等名 北海道地区学会日本産業動物獣医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福留 茉優、柴野 早苗、古守 温、松山 樹生、新里 実子、園田 一輝、温品 彰一郎、鍋山 恵美、萩原 克郎、安藤 達哉.
2. 発表標題 乳牛におけるBoDV-1抗体保有と黄体機能及びAI後GnRH投与との関連性
3. 学会等名 日本獣医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sayuri Maeda, Saya Taharaguchi, Minoru Okamoto, Katsuro Hagiwara
2. 発表標題 Reproductive disorders of Borna disease virus 1 persistent infected rat.
3. 学会等名 第68 回日本ウイルス学会学術会
4. 発表年 2021年

〔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 分担者	安藤 達哉 (Ando Tatsuya) (00826993)	酪農学園大学・獣医学群・准教授 (30109)	臨床的解析分担
研究 分担者	岡本 実 (Okamoto Minoru) (60372877)	酪農学園大学・獣医学群・准教授 (30109)	病理学的解析分担

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
---------	---------