

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月11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

研究成果の概要（和文）：トリ白血病ウイルスに属すトリのグリオーマ誘発ウイルス（FGV）の出現経緯を明らかにするため、国内外の在来鶏を対象に疫学調査および分離ウイルスの分子系統解析を行った。本研究によって、FGV は過去に海外で発生した本疾患の原因とは関連せず、国内で出現した可能性が高いこと、ならびに FGV とこの変異体はこれらと内在性・外来性レトロウイルス間との組換えを基盤としてゲノム多様性を示しながら今もなお日本鶏の中で拡散していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Fowl glioma is caused by fowl glioma-inducing virus (FGV), belonging to subgroup A of avian leucosis virus (ALV-A). To clarify how and where FGV emerged, the prevalence of FGV in European, Asian and Japanese native chickens were examined and the viral genome of the isolates were analyzed. The results suggest that FGV is likely to have appeared in Japanese fowls in Japan without a relationship to the past fowl glioma found in Western countries, and that FGV and FGV variants still spread in Japanese fowls, showing genome diversity mainly based on the recombination between these strains and avian endogenous/exogenous viruses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
総計	8,500,000	2,550,000	11,050,000

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：グリオーマ，鶏，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. 研究開始当初の背景

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（Vet. Rec. 145:79-81, 1999），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（Avian Pathol. 31:193-199, 2002）。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; GenBank accession number No. AB112960) 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 (J. Gen. Virol. 85:647-652, 2004)。また、FGV はグリオーマ (Avian Pathol. 32:617-624, 2003) のほか、小脳低形成 (Vet. Pathol. 43:294-301, 2006)、非化膿性脳炎・心筋炎 (J. Vet. Med. Sci. 64:395-399, 2002)、神経周膜腫 (Vet. Pathol. 42:176-183, 2005) を引き起こすことが明らかになった。一方、国内の採卵鶏に発生した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が明らかとなった (Avian Pathol. 37:127-137, 2008)。しかし、FGV が国内の日本鶏群の中でどのようにして出現したのか、その詳細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国内に侵入し日本鶏に蔓延した可能性が考えられる。また、その一方で、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 の出現によって、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。そこで、これら2つの可能性を検証し、神経系に病原性を持つ ALV の出現経緯と分子生物学的特徴を明らかにしようと考えた。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究課題では1990年代に日本に出現した FGV の起原を明らかにするとともに、神経病原性を獲得した ALV のゲノム多様性を解析することを目的に、海外、特に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、これら鶏から収集した ALV 株と国内で分離された FGV や TymS_90 を分子生物学的ならびに病理学的に比較した。

3. 研究の方法

研究材料には本研究課題実施期間に収集したヨーロッパ在来種7品種 (内種)、欧米産実験用鶏17系統、産業用鶏10品種、ならびに日本鶏22品種の羽髄およびクロアカ拭い液に加え、これまでに収集したインドネシア、フィリピン、または韓国のアジア在来種5品種とセキショクヤケイの羽髄、クロアカ

拭い液を用いた。検索総羽数は470羽である。これら材料を ALV あるいは FGV 特異的 nested polymerase chain reaction (PCR) で検索後、ALV の分離を試み、分離ウイルスのゲノム構造を解析した。上記の鶏の一部はドイツ家禽連盟養鶏研究所 (Wissenschaftlicher Geflügelhof des Bundes Deutscher Rassegeflügelzüchter, Sinstdeden) あるいは名古屋大学で維持されている海外産の実験用鶏である。なお、実験動物の取り扱いには本学あるいは各施設の定めるガイドラインに則って実施された。また、国外の鶏から採取した材料は家畜伝染病予防法に基づき農林水産大臣より禁止品の輸入許可を得た後、日本に輸入され、研究代表者により管理された。

ウイルスゲノムの解析方法を簡単に述べると、ウイルスから RNA を抽出後リバーシトランスクリプションを行って cDNA を作成、これを鋳型にして既知の ALV の塩基配列を参考に作成したプライマーで PCR を行い、PCR 産物の塩基配列を解析した。病理学的解析は常法にしたがって組織標本作製し、鏡検した。

4. 研究成果

(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で系統維持されているヨーロッパ産の鶏8系統、計42羽の FGV 感染率を FGV 特異的 nested PCR により検索した。42羽中37羽 (88%) が FGV 特異的 nested PCR 陽性を示したが、これら陽性鶏のいずれからも ALV は分離されなかった。

(2) 名古屋大学で系統維持されている欧米産実験用鶏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 で検索したところ、24羽 (49%) が陽性を示したが、いずれの鶏からも ALV は分離されなかった。

(3) インドネシア、フィリピン、または韓国で収集した鶏5品種、計121羽中9羽 (7%) が FGV 特異的 nested PCR 陽性を示したが、陽性鶏のいずれからも ALV は分離されなかった。

(4) 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。これら鶏の FGV 感染状況を調査した。

①熊本地方の鶏計 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 FGV 特異的 nested PCR 陰性であった。

③剖検した nested PCR 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。これらのうち 9 株の PCR 検出領域の塩基配列を比較すると、5 株は 3' UTR に FGV 特異配列を持つ FGV 変異株であった。一方、ほかの 4 株中 2 株 (Km_5843, 5844) は FGV 特異配列の相同性が 50% 以下で、残りの 2 株 (Km_5666, 5845) には FGV 特異配列は存在しなかった。

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 *er-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 変異株のほか、*er-1* などの内在性レトロウイルスと FGV の組換えにより出現したリコンビナントウイルスが感染しており、これらがグリオーマを引き起こしているかと推察される。

(5)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。

(6)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、この心筋異常には FGV や TymS_90 とは異なる ALV が関与することが示唆された。

(7)沖縄、静岡、北海道 (千歳) で飼育されている日本鶏から新たに FGV 変異株 6 株 (Oki_009, Shiz_001, CTS_016, CTS_042, CTS_045, CTS_053) が分離された。これらの変異株は FGV と内在性レトロウイルスまたは既知の ALV の両者、あるいはいずれか一方のゲノムからなるリコンビナントウイルスであることが示唆された。

(8)アメリカで分離された MAV-1 近縁株は日本で分離された採卵鶏由来グリオーマ誘発ウイルス TymS_90 の *env* と高い相同性を示すことがわかっている。そこで、MAV-1 近縁株の病原性を感染実験により解析した。その結果、MAV-1 近縁株は神経系に対して病原

性を示さないことがわかった。

(9)羽髄を検索材料に用いた FGV 特異的 nested PCR では国内外の鶏の中に陽性鶏が認められたが、これら多くの陽性鶏からは FGV を含む ALV が分離されなかった。そこで、国内外の陽性鶏のゲノムを解析した。その結果、これら鶏ゲノムから FGV 特異配列と 91~99% の相同性を示す nested PCR 産物が増幅された。一方、NCBI chicken genome BLAST による相同性解析では、鶏ゲノムに FGV 特異配列に類似する配列が存在しなかった。この成績から、鶏には FGV 特異配列を含む未知の内在性トリレトロウイルスが存在することが示唆された。いいかえると、羽髄から得た鶏ゲノムを材料に FGV 特異的 nested PCR を行うと上記の内在性レトロウイルスも検出してしまうことが明らかになった。このため、FGV の感染を判定するためにはウイルス分離およびこれらのゲノム解析が不可欠であることがわかった。

(10)疫学調査では通常、採取した鶏の羽髄およびクロアカ拭い液をすぐに冷蔵または冷凍保存し、輸送する必要があるが、保冷の手間を省くことができればより効率的な材料採取が可能となる。そこで、乾燥した状態の羽髄がどの程度の期間 nested PCR 用材料として使用可能かを検索した。その結果、室温 30 日間保存した乾燥材料でも nested PCR で FGV を検出できることがわかった。これにより材料採取法・運搬法が簡略化できるようになった。

(11)脚弱と内臓腫瘍が多発した名古屋の採卵鶏、骨髄脂肪腫・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。

(12)総括

ALV はリンパ腫や白血病など主に造血器系腫瘍を誘発するが、その一株である FGV は中枢神経系腫瘍であるグリオーマを誘発することがわかっている。しかし、FGV がどのように出現したのか、その出現経緯は明らかにされていない。また、過去に海外で発生したトリのグリオーマと FGV との関連も不明のままである。そこで、本研究課題では国内の日本鶏、アジア 3 カ国の在来鶏、過去にトリのグリオーマが発生していたヨーロッパの在来鶏から材料を収集し、FGV の感染状況を解析した。

日本を除くアジアおよびドイツの鶏 163 羽中 46 羽 (28%) が FGV 特異的 nested PCR に陽性を示したが、これらのいずれの鶏

からも FGV は分離されなかった。一方、国内の鶏 307 羽中 80 羽（陽性率 26%）が FGV 特異的 nested PCR に陽性を示し、FGV 変異株 11 株が分離された。また、これらに加えて、グリオーマと小脳低形成の両者またはその一方に罹患した熊本の日本鶏からは FGV 特異配列を持たない ALV 4 株が分離された。これら4株は既知の ALV 株とは異なるゲノム構造を持ち、内在性レトロウイルス *ev-1* に高い相同性を示したことから、FGV 変異株と内在性レトロウイルス間の組換えにより出現した外来性 ALV と推察される。また、沖縄、静岡、北海道で分離された FGV 変異株はこれまで分離された FGV 変異株と同様に FGV と内在性もしくは外来性 ALV 間の組換えにより出現したと推察される。以上の成績から、FGV 変異株ばかりでなく FGV 特異配列を持たない神経病原性 ALV 株が国内の日本鶏に拡散していること、海外の在来鶏には FGV の感染はみられないことが明らかとなった。

また、本研究成果の中で特筆すべき点は FGV の出現に大きく関与したと思われる未知の内在性レトロウイルスの存在が浮き彫りになったことである。上述の通り、羽髄では FGV 特異的 nested PCR 陽性を示しながら ALV が分離されない鶏、すなわち FGV 特異配列を持つ未知の内在性レトロウイルスをゲノム内に保有する鶏が国内外を問わず存在したことは、これら鶏の体内で FGV に類似した神経病原性 ALV が今後いつ出現してもおかしくないことを意味している。しかしながら、この内在性レトロウイルスの特定は今後の課題として残された。

FGV に関するこれまでの知見と本研究課題で得られた成績から考察すると、FGV は日本国内の日本鶏の中で未知の内在性レトロウイルスを取り込んで出現した可能性が高い。わが国では現在、鑑賞用鶏の輸出入は禁止されているが、戦前は諸外国との友好関係の象徴として日本鶏の輸出、譲渡が頻繁に行われており、これらは現在も多くで飼育されている。残念ながら本研究課題では海外の在来鶏に焦点を絞ったため、海外で維持されている日本鶏の FGV 感染状況については言及できなかった。今後、国内の日本鶏と隔絶されて維持されてきた海外の日本鶏に由来する ALV の分子系統進化が明らかになれば、FGV の出現時期ばかりでなく、神経病原性を規定するゲノム領域の特定や、これら成績に基づく予防・治療法の確立へと展開できる。こうした点に主眼を置いた ALV 研究は国内外を問わずほかに行われていないが、これら一連の研究はレトロウイルス一般の生物学的意義解明に寄与できるものである。とくに、ヒト医学分野では現在、エイズ脳症やヒトリンパ球指向性ウイルス関連脊髄症と

いったレトロウイルス性神経疾患が問題となっていることから、FGV 感染症の理解はこれらヒトの神経疾患を克服するうえで貴重な情報を提供できると思われる。

要約すると、本研究課題によって FGV は過去に海外で発生したトリのグリオーマとは関連せず、国内の日本鶏の中で出現した可能性が高く、FGV とこの変異体はこれらとほかのレトロウイルス間との組換えを基盤としてゲノム多様性を示しながら今もなお日本鶏の中で拡散していることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 6 件）

① Ochi, A., Ochiai, K. *et al.*, 他14名, 2 番目, Epidemiological study of fowl glioma-inducing virus in chickens in Asia and Germany, *Avian Pathol.*, 査読有, 41: in press, 2012

② Ochi, A., Ochiai, K. *et al.*, 他4名, 2 番目, Molecular characteristics and pathogenicity of an avian leukosis virus isolated from avian neurofibrosarcoma, *Avian Dis.*, 査読有, 56(1): 35-43, 2012, <http://www.bioone.org/doi/full/10.1637/9830-060711-Reg.1>

③ Nakamura, S., Ochiai, K. *et al.*, 他4名, 2番目, Pathogenicity of avian leukosis viruses related to fowl glioma-inducing virus, *Avian Pathol.*, 査読有, 40(5):499-505, 2012, <http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2011.605783>

④ 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*), *J. Comp. Pathol.*, 査読有, 141(4):260-264, 2009, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2009.05.005>

⑤ Hatai, H., Ochiai, K. *et al.*, 他 1 名, 2 番目, Detection of avian leukosis virus genome by a nested polymerase chain reaction using DNA and RNA from dried feather shafts, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 査読有, 21(4):519-522, 2009, doi:10.1177/104063870902100415

⑥ Hatai, H., Ochiai, K. *et al.* 他 6 名, 2 番目, Prevalence of fowl glioma-inducing virus in chickens of zoological gardens in Japan and nucleotide variation in the *env* gene, *J. Vet. Med. Sci.*, 査読有, 70(5):469-474, 2008, <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.70.469>

〔学会発表〕（計 7 件）

① 越智章仁ら, 神経病原性トリレトロウイルスの出現経緯, 第 153 回日本獣医学会学術

集会, 2012年3月29日, 大宮ソニックシティ, 大宮

② 中村小百合ら, 日本鶏におけるトリの神経膠腫誘発ウイルスの感染状況, 第153回日本獣医学会学術集会, 2012年3月29日, 大宮ソニックシティ, 大宮

③ 藪下広樹ら, トリレトロウイルス感染鶏に認められた心筋の形態異常, 第151回日本獣医学会学術集会, 2011年4月1日, 東京農工大学, 東京

④ 光廣直貴ら, 野外で発生した鶏の多発性神経周膜腫の病理学的ならびに疫学的検索, 第151回日本獣医学会学術集会, 2011年4月1日, 東京農工大学, 東京

⑤ 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

⑥ 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

⑦ 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

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

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

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

大橋 和彦 (OHASHI KAZUHIKO)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
研究者番号: 90250498