

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450420

研究課題名(和文) 新しく見出した牛ウイルス性下痢ウイルス関連疾患の病態解明と新規関連病態の探索

研究課題名(英文) Pathological studies on newly recognized diseases associated with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and retrospective survey for new BVDV-associated disease states

研究代表者

古林 与志安 (Kobayashi, Yoshiyasu)

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号：20301971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：牛ウイルス性下痢症ウイルス(BVDV)は、感染個体に消化器疾患を惹起する。BVDVが免疫系の確立していない胎子に感染すると持続感染が成立し、様々な病態に関与することが知られている。本研究では、新たに見出したBVDV持続感染関連疾患である中枢神経白質でのグリオシスと髄鞘低形成を特徴とする中枢神経白質異栄養症と全身の細小血管が糸球体様を呈する糸球体様血管症の病態を明らかにした。また、BVDV感染個体での特徴病変の1つである血管傷害を伴う病態や神経疾患など、複数の未解明疾患について、BVDV感染関与の可能性を検討したが、BVDV感染が関与する新たな病態の発見には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection is one of the most important causative agent for digestive tract disease. Intrauterine infection to the fetus without effective immune response causes persistent infection and this state related to various pathologic states. This research revealed the precise pathobiology of newly recognized diseases associated with BVDV persistent infection: 1) leukodystrophy characterized by severe gliosis and hypomyelination, and 2) systemic glomeruloid angiopathy characterized by intramural proliferation of vascular endothelial cells and smooth muscle cells. In the present research, we also examined whether BVDV persistent infection relate to other uncleared disease conditions, including vascular diseases with fibrinoid change which is one of the characteristic finding for BVDV infection, and central nervous system diseases. Unfortunately, however, we could not find new BVDV persistent infection-related disease.

研究分野：獣医病理学

キーワード：病理・病態 牛ウイルス性下痢症ウイルス 持続感染 ウイルス遺伝子 PCR 神経疾患 血管

## 1. 研究開始当初の背景

出生直後の子牛や若成牛では、原因不明の疾患が多く存在する。牛ウイルス性下痢 (Bovine Viral Diarrhea: BVD)・粘膜病は、BVD ウイルス (BVDV) 感染に起因する消化器粘膜の潰瘍を伴う疾病である。BVDV が妊娠牛に初感染すると経胎盤感染が起こり、感染時の胎齢により、胎子死、奇形 (特に神経系)、免疫寛容 (持続感染) といった様々な病態が誘発される。持続感染牛は、臨床症状を呈することなくウイルスを生体排出して汚染源となる。また、持続感染が、様々な病態に関与していることも疑われているが、不明な点が多い。

BVDV には生物型 (CPE-と CPE+)、遺伝子型 (I 型と II 型)、および多くの血清型が存在する。I 型 BVDV は、従来から知られているウイルスであるが、II 型 BVDV は、1980 年代後半にアメリカで牛に激しい血小板減少症とそれに起因する多発性出血性病変を引き起こす急性感染症の原因ウイルスとして報告され、1993 年にはカナダの子牛で大きな流行が報告されている。また、日本でも 1989 年から II 型 BVDV の存在が確認されており、十勝管内でも少なくとも 1991 年には II 型 BVDV が侵入していたことが確認されている。しかしながら、II 型 BVDV の病原性に関しては不明な点が多く、北米では重篤な急性感染症が惹起されているのに対して、日本ではそのような感染病態は認められておらず、I 型 BVDV 感染と同様の症状を呈する症例で偶発的に分離されているに過ぎない。また、BVDV に関する研究は、上述のように、持続感染牛は、臨床症状を呈することなくウイルスを生体排出して汚染源となり、一度牧場にウイルスが侵入すると経済的被害が大きいことから、ウイルス学的な見地や家畜衛生学的な見地から行われている研究が大半を占めており、その対象疾患は従来から知られている BVDV 関連疾患に概ね限られている。つまり、一定期間に同一、あるいは近郊の牧場で複数頭が罹患しなければ、ウイルス学的な検討もなされないことが多い。このように、BVDV の持続感染が、様々な病態に関与していることも疑われているものの、現状では BVDV (持続) 感染に起因する新規疾患 (病態) の探索は、ほとんど実施されていないのが実情である。

牛では、原因不明の疾患 (病態) が出生直後の子牛や若成牛で多く存在し、申請者もそのような疾患に興味を持ち、これまでに積極的に原因を追求してきた。その中で、(1) 中枢神経白質の高度のグリオーシスと髄鞘低形成を特徴とする中枢神経白質異栄養症 (硬化症) を示す子牛 3 頭と、(2) 臨床的には貧血・多発性出血で、病理組織学的には全身の細小血管の糸球体様変化によって特徴づけられる糸球体様血管症を示す若成牛 2 頭について病理学的に検索する

機会を得、いずれもこれまでに報告をみない新規病態であることを発見した。そこで、これら疾患の病理発生機序を解明する手掛かりとして、保存血清からの BVDV 遺伝子の検出を試みたところ、いずれの病態症例からも BVDV 遺伝子が検出された。このことは、上述のように、従来知られている以外の病態が BVDV 感染で惹起され得ることを示すものである。また最近、前述の中枢神経白質異栄養症 (硬化症) と同様の病態を同一農場の複数の子牛で経験した。

乳牛 (成牛) の持続感染牛では、乳汁中にもウイルスが排出されるため、バルク乳検査で、持続感染の有無を牛群毎に推定できるが、子牛や若成牛の病態を対象とする場合、全頭に対して BVDV の持続感染の有無を検査することは非現実的である。そこで、自然発生疾患を多く扱っており、それら症例の血清を常時保管している我々のような研究室で、原因不明疾患に対して BVDV 感染関与の有無を調査・研究し、BVDV 関連疾患を把握することが急務であると考えた。

また、BVDV の (持続) 感染が病態 (病変) に関与していることを示すには、病変部にウイルスが存在することを証明する必要がある。しかしながら、日本国内ではパラフィンブロック切片に利用できる抗 BVDV 抗体の入手が困難である。そこで、前記病態の詳細な解析と新規病態探索、および特異性の高い簡便な診断法の開発を含めた本研究課題を着想した。

## 2. 研究の目的

本研究では、未だに不明な点が多い、BVDV 感染、特に BVDV 持続感染に起因する病態の全容を解明する手掛かりとして、(1) 中枢神経白質異栄養症 (硬化症) および糸球体様血管症の病態・病理発生機序を解明すること、(2) 日常の病理検索の中で保存している血清を用いて、原因不明の神経疾患群 (生時より神経症状がみられるものの、明瞭な形態変化がみられない脳症など) や血管壁のフィブリノイド変化や血管炎などの BVDV の特徴所見の 1 つが認められる疾患群などを対象として、BVDV 持続感染関与の有無を検索し、新規 BVDV 関連病態の探索を行うこと、および (3) パラフィン切片に応用できる、*in situ* Hybridization (ISH) 法を含めた特異性の高い簡便な BVDV 診断法の開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 新しく見出した BVDV の持続感染の関与が疑われる病態・病理発生機序解明

① 中枢神経白質異栄養症 (硬化症) の病態・病理発生機序の解明

中枢神経白質異栄養症 (硬化症) の病態と病理発生機序を明らかにするため、1 農場で集団発生した中枢神経白質異栄養症 (硬化症) 症例について、詳細な病理学的

検索を行った。また、原因ウイルスの系統樹解析を行った。

## ②糸球体様血管症の病態・病理発生機序の解明

糸球体様血管症症例の血管病変の病理発生機序を推察するため、超微形態学的検索を含めた詳細な病理学的検索を行った。

### (2) 保存血清を用いた新規病態の探索

日常の病理検索の中で保存している血清を用いて、原因不明の神経疾患群（生時より神経症状がみられるものの、明瞭な形態変化がみられない脳症など）や血管壁のフィブリノイド変化や血管炎などの BVDV の特徴所見の 1 つが認められる疾患群などを対象として、汎用 BVDV 検出プラマー（forward primer 103/reverse primer 372）を用いた RT-PCR 法により、BVDV 持続感染関与の有無を検索し、新規 BVDV 関連病態の探索を行った。

### ①原因不明の神経疾患への BVDV 持続感染関与の有無の検討

(a) 生時より神経症状がみられ、中枢神経組織内に壊死性病変が認められる病態（大脳皮質壊死(1例)、両側対称性脳軟化(2例)、および脳室周囲白質軟化(1例))について、BVDV 持続感染関与の有無を検討した。

(b) 生時より神経症状がみられるものの、病理組織検索にて、明らかな病変を検出できない症例群(6例)について、BVDV 持続感染関与の有無を検討した。

(c) 黒毛和種牛の視覚路変性(6例)について、BVDV 持続感染関与の有無を検討した。

### ②原因不明の血管病変への BVDV 持続感染関与の有無の検討

(a) 血管壁への硝子様物質の沈着あるいは血管壁のフィブリノイド変性が認められる症例群(17例)について、BVDV 持続感染関与の有無を検討した。

(b) 糸球体係蹄壁への硝子様物質沈着がみられる原因不明の糸球体疾患(4例)について、BVDV 持続感染関与の有無を検討した。

### (3) パラフィン切片に応用できる、*in situ* Hybridization (ISH) 法を含めた特異性の高い簡便な BVDV 診断法の開発

汎用 BVDV 検出プラマーを用いて PCR ラベリングプローブを作製し、タイラマイド増感 DNA-ISH 法にて染色する高感度 DNA-ISH 法を考案し、BVDV 遺伝子の検出に利用できるか否かを検討した。検討には、前述した中枢神経白質異栄養症(硬化症)症例の病変部パラフィンブロックを使用した。また、検索に先立ち、パラフィン切片からの BVDV 遺伝子検出を行い、パラフィン切片上に BVDV 遺伝子が存在することを確認した。

DNA-ISH 法で得られる陽性反応の特異性を確認するため、培養細胞系や凍結切片での有用性が示されている日本でも入手可能

な市販抗体(3種)について、それら抗体がホルマリン固定パラフィン切片に応用できるかどうかについても併せて検討した。

## 4. 研究成果

(1) 新しく見出した BVDV の持続感染の関与が疑われる病態・病理発生機序解明

### ①中枢神経白質異栄養症(硬化症)の病態・病理発生機序の解明

#### (a) 中枢神経白質異栄養症(硬化症)

症例は同一の農場で飼養されていた、4~12日齢のホルスタイン牛6例であり、全例で BVDV 持続感染が確認された(図1)。

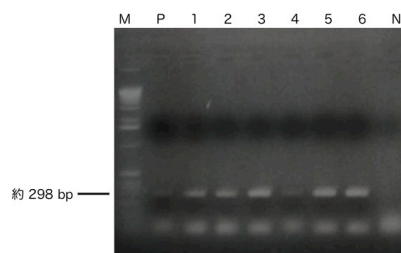


図1 中枢神経白質異栄養症(硬化症)症例の血清からの BVDV 遺伝子の検出

(M: 分子量マーカー, P: 陽性対照, 1~6: 症例1~6, N: 陰性対照)

病理解剖では、これらの症例の中枢神経白質の硬度は増していた。病理組織検索では、全症例の中枢神経白質において、広範囲にわたるグリオーシスおよび髄鞘形成不全を特徴とする病変が認められた。臨床症状の程度と、中枢神経病変の分布および程度との間には、明確な関連性は認められなかった。また、全症例の血清から得られた原因ウイルスの 5' 非翻訳領域の塩基配列は同一であり、系統的検索から既存の BVDV I b 型株と 98% の相同性が示された。BVDV I b 型ウイルスは過去にも中枢神経白質異栄養症の一つである髄鞘形成不全の子牛から分離されていることから、中枢神経白質異栄養症の発生は、ウイルス株の遺伝子型に依存している可能性が指摘された。

#### (b) 糸球体様血管症

症例は、1歳および3歳の雌のホルスタイン牛で、いずれの症例も BVDV 持続感染牛であった。両例に共通する変化として、高度の貧血と全身の細小血管での内皮細胞が血管腔内に乳頭状に増殖する像(図2)、

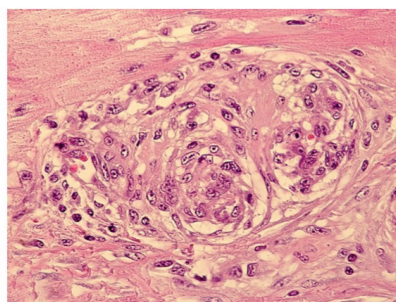


図2 糸球体様血管症の組織像(心臓内血管)

あるいは内皮細胞および平滑筋細胞が血栓形成を伴って叢状あるいは糸球体様に増殖する像が観察された。免疫組織化学的および超微形態学的検索により、増殖細胞間に線維素および血小板が介在性に存在していることが明らかとなった。本結果より、本変の発生病序に血栓の形成が深く関与していることが疑われた。

## (2) 保存血清を用いた新規病態の探索

### ①原因不明の神経疾患への BVDV 持続感染関与の有無の検討

本研究で検索対象として扱った病態・疾患では、BVDV 持続感染の関与は証明されなかった。今後更に、対象疾患を拡げて検討する予定である。

### ②原因不明の血管病変への BVDV 持続感染関与の有無の検討

血管壁への硝子様物質の沈着あるいは血管壁のフィブリノイド変性が認められる症例群 (17 例) について、BVDV 持続感染関与の有無を検討したところ、4 例で BVDV の持続感染が確認された。また、血管病変の程度について持続感染症例と非持続感染症例で比較した結果、血管病変は BVDV 持続感染症例でより重篤であった。

糸球体係蹄壁への硝子様物質沈着がみられる原因不明の糸球体疾患 (4 例) について、BVDV 持続感染関与の有無を検討したところ、1 例でのみ BVDV の持続感染が確認された。

血管病変と BVDV 持続感染との関係について、今後更に症例数を増やして検討する予定である。

### (3)パラフィン切片に応用できる、*in situ* Hybridization (ISH) 法を含めた特異性の高い簡便な BVDV 診断法の開発

中枢神経白質異栄養症 (硬化症) 症例の病変部パラフィン切片からの BVDV 遺伝子検出では、パラフィン切片上に BVDV 遺伝子が存在することを確認した (図 3)。

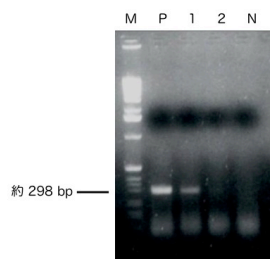


図3 中枢神経白質異栄養症 (硬化症) 症例のパラフィン切片からの BVDV 遺伝子の検出  
(M: 分子量マーカー, P: 陽性対照, 1: 症例, 2: 陰性対照, N: 蒸留水)

汎用 BVDV 検出 プラマーを用いて PCR ラベリングしたプローブを用い、タイラミド増感 DNA-ISH 法にて前述した中枢神経白質異栄養症 (硬化症) 症例の病変部パラフィンブロックを染色したところ、全ての症例

の中枢神経組織内で点状～細胞質全体が染まる染色性が得られた (図 4)。しかしながら、対照例を用いた染色においても、中枢神経組織のごく一部の領域で程度がかなり弱い染色性が得られてしまった。

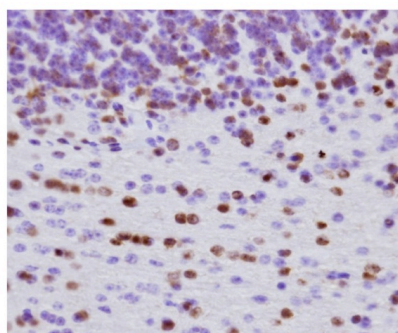


図4 タイラミド増感 DNA-ISH 法による BVDV 遺伝子の検出

DNA-ISH 法で得られた染色結果の特異性を確認するため、培養細胞系や凍結切片での有用性が示されている日本でも入手可能な市販抗体について、それら抗体がホルマリン固定パラフィン切片に応用できるかどうかについても検討したが、有用な結果は得られなかった。

現在のところ、特異性の高い簡便な BVDV 診断法の開発については、有用な結果が得られていないことから、非増感法を適用してみるなど、更なる検討を行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 24 件)

- ① Koyama, K., Fujita, R., Maezawa, M., Fukumoto, N., Horiuchi, N., Inokuma, H., Kobayashi, Y. 2016. Periventricular leukomalacia in a neonatal calf. J Vet Med Sci, in press. DOI: org/10.1292/jvms.16-0034 (査読有)
- ② Horiuchi, N., Kumagai, D., Matsumoto, K., Inokuma, H., Furuoka, H. and Kobayashi, Y. 2015. Detection of the nonsense mutation of OPA3 gene in Holstein Friesian cattle with dilated cardiomyopathy in Japan. J Vet Med Sci, 77(10), 1281-1283. DOI: org/10.1292/jvms.15-0150 (査読有)
- ③ Miura, S., Horiuchi, N., Matsumoto, K., Kobayashi, Y., Kawazu, S. I. and Inokuma, H. 2015. Detection of monoclonal integration of bovine leukemia virus proviral DNA as a malignant marker in two enzootic bovine leukosis cases with difficult clinical diagnosis. J Vet Med Sci, 77(7), 883-887. DOI: org/10.1292/jvms.14-0591 (査読有)



- ④Horiuchi, N., Komagata, M., Shitamura, K., Chiba, C., Matsumoto, K., Inokuma, H., Matsui, T. and Kobayashi, Y. 2015. Glomus tumor of the liver in a cow. J Vet Med Sci, 77(6), 729-732. DOI: org/10.1292/jvms.14-0327 (査読有)
- ⑤ Kojima, Y., Chiba, S., Horiuchi, N., Kobayashi, Y. and Inokuma, H. 2015. Evaluation of S100B in cerebrospinal fluid as a potential biomarker for neurological diseases in calves. J Vet Med Sci, 77(5), 605-607. DOI: org/10.1292/jvms.14-0578 (査読有)
- ⑥ Chiba, S., Funato, S., Horiuchi, N., Matsumoto, K., Inokuma, H., Furuoka, H. and Kobayashi, Y. 2015. Optic pathway degeneration in Japanese black cattle. J Vet Med Sci, 77(2), 147-154. DOI: org/10.1292/jvms.14-0299 (査読有)
- ⑦Tawfeeq, M. M., Miura, S. Horiuchi, N., Kobayashi, Y., Furuoka, H. and Inokuma, H. 2013. Utility of serum thymidine kinase activity measurements for cases of bovine leukosis with difficult clinical diagnoses. J Vet Med Sci, 75(9), 1167-1172. DOI: org/10.1292/jvms.12-0572 (査読有)
- ⑧ 猪熊壽, 小嶋由夏, 千葉史織, 古林与志安, 高垣勝仁. 2013. 牛ウイルス性下痢ウイルス感染に関連するミエリン形成不全により先天性小脳症状を呈したホルスタイン種子牛の5症例. 産業動物臨床医誌. 4(1), 25-29. DOI: org/10.4190/jjlac.4.25 (査読有)
- ⑨ Tawfeeq, M. M., Horiuchi, N., Kobayashi, Y., Furuoka, H. and Inokuma, H. 2013. Evaluation of gene expression in peripheral blood cells as a potential biomarker for enzootic bovine leukosis. J Vet Med Sci, 75(9), 1213-1217. DOI: org/10.1292/jvms.13-0109 (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 古林与志安、牛の疾病：牛のアミロイド症と子牛の神経疾患の病理学、平成 25 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会、2014 年 2 月 22 日、幕張メッセ (千葉県・千葉市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古林 与志安 (KOBAYASHI, Yoshiyasu)  
 帯広畜産大学・畜産学部・教授  
 研究者番号：20301971

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

松本 高太郎 (MATSUMOTO, Kotaro)  
 帯広畜産大学・畜産学部・准教授  
 研究者番号：90455709