

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450468

研究課題名(和文)牛白血病ウイルス感染症における免疫学的研究

研究課題名(英文)Immunological study on bovine leukemia virus infection

研究代表者

乗峰 潤三(Norimine, Junzo)

宮崎大学・産業動物リサーチセンター・教授

研究者番号：30627667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：牛白血病ウイルス感染牛の約7割が無症状のまま一生を終えることから、本ウイルス感染に対する抵抗性遺伝子の存在が考えられてきたが、当該研究で、和牛および乳牛におけるこの遺伝子の存在を確認した。抵抗性遺伝子を持つ牛を伝播防御の壁として利用した感染防御の実験にも成功した。また、世界初の牛の免疫学的「テトラマー」という免疫解析試薬の開発に成功し、それを利用した本遺伝子による抵抗性メカニズムの研究に取り組んでいる。

研究成果の概要(英文)：Because approximately 70% of cattle infected with bovine leukemia virus remain healthy for their lives, it has been thought that there exist resistant genes exist against this disease. This study confirmed one of the resistant genes in both dairy and Japanese black cattle. The field study has demonstrated that cattle with the resistant gene could be utilized as a protective wall for the infection. The investigator also developed the first immunological analytic tool, a bovine immunological "tetramer", and is currently studying the resistant mechanisms using the tool.

研究分野：動物感染症学

キーワード：牛白血病 牛白血病ウイルス 抵抗性遺伝子 テトラマー CD4T細胞

1. 研究開始当初の背景

- (1) 牛白血病ウイルス(BLV)感染症は、日本で毎年増加の一途をたどっており、畜産業の経済的損失が年々大きくなっているため、清浄化が望まれる()。
- (2) 牛の MHC class II, DRB3 の多形性解析により、ある特定の DRB3 を持つ牛が、BLV 感染による持続性リンパ球増多症に対して抵抗性を示す事が示されている。しかしながら、その抵抗性メカニズムは不明である。
- (3) MHC class II 分子は CD4⁺T 細胞 (ヘルパーT細胞) に抗原を提示し、細胞性免疫を誘導する。このヘルパー機能は感染症防御免疫に極めて重要な役割を担う。
- (4) 本研究は、牛の MHC class II, DRB3 の対立遺伝子型 DRB3*0902 が提示するエピトープは BLV 感染に対して強い防御免疫を担うという仮説を立てて行う研究である。
- (5) 独自で牛 MHC class II テトラマーを開発()しており、蛍光色素標識したテトラマーを使った抗原特異的 CD4⁺T 細胞をフローサイトメトリーにより解析できる。

2. 研究の目的

MHC class II DRB3*0902 対立遺伝子型を持つ牛は、牛白血病ウイルスの感染による持続性リンパ球増多症に対して抵抗性を示す事が1993年に報告されたが、私の感染予備実験でもそれを裏付けるような結果が出ている。一方私は、牛の DRB3 及び DQ 分子のテトラマーを作製し、そのテトラマーを使って末梢血の抗原特異的 CD4⁺T 細胞の頻度を解析し、これらのテトラマーがワクチン接種効果の解析、または病原体感染後の抗原特異的 CD4⁺T 細胞動態の解析に非常に有用であることを明らかにした。これらの事から、まず持続性リンパ球増多症に対する抵抗性を持つ DRB3*0902 が提示する BLV 抗原エピトープを同定し、その情報を基にテトラマーを作製し、いかにこの抗原提示が有意に防御免疫機構に関与しているかを解析する。さらに、宿主体内のウイルス増殖、サイトカイン、特異抗体の変化、抗原特異的 CD4⁺T 細胞表面抗原の変化等を総合的に解析することにより、持続性リンパ球増多症に対する抵抗性及び持続感染の機序を免疫学的手法で研究する。

3. 研究の方法

- (1) 蔓延している BLV 株の全塩基配列の決定する。宮崎県内で近年感染が拡大している BLV の株における CD4⁺T 細胞エピトープを同定するため、まず BLV 感染が蔓延している農家の複数の感染牛か

ら血液を採取し、その PBMC ゲノム DNA からウイルスの全塩基配列を決定する。その全塩基配列から予想される構造蛋白及び無構造蛋白のアミノ酸配列を、既に報告されているアミノ酸配列と比較し、抗原蛋白として保存された部位あるいは変異部位等を特定する。

- (2) 牛 MHC class II の型判別をする。塩基配列を決定した BLV 株が採取された宿主牛及び同じ農家で飼われている他の牛の MHC class II の型を決定する。また宮崎大学附属牧場の肥育牛(約 50 頭)、乳牛(約 20 頭)、繁殖牛(約 20 頭)の MHC class II の型を決定する(この牧場の牛は、過去の検査では BLV フリーであった)。それぞれの牛の末梢血からゲノム DNA を抽出し、PCR-RFLP(PCR-restriction fragment length polymorphism)法()により DRB3 の型を決定すると同時に、そのエクソン 2 の PCR 産物の塩基配列を確認する。MHC class II DQ についても、その塩基配列を確認していく(方法については、)。完了後、さらに他の農場についても、常に MHC class II の型を決定し、県内における牛の MHC 型の傾向と BLV の感染状況を調査する。
- (3) リアルタイム PCR による感染ウイルス量の測定をおこなう。感染牛については、末梢血ゲノム DNA を鋳型としてリアルタイム PCR によって感染ウイルス量を測定する。リアルタイム PCR は cycleavePCR ウシ白血病ウイルス (BLV) 検出キット (TaKaRa) を使用する。このキットは既にその有用性を確認している。
- (4) BLV の構造蛋白の組換え蛋白を作製する。得られた BLV 塩基配列のデータを基に、*env* と *gag* 遺伝子を PCR 増幅し、発現ベクター (pBAD202 Directional TOPO Expressions Kit, Invitrogen) にクローニングする。組換え蛋白はその C 末端 His タグを使って、HiTrap TALON カラム (GE) で分離精製する。また無構造蛋白についても、同様の方法で、組換え蛋白を作製し抗原性の有無を検査する。抗原性が確認された場合、*env* や *gag* と同様に、その精製蛋白からエピトープの同定へと進む。
- (5) CD4⁺T 細胞エピトープを含む領域を決定する。この組換え蛋白を利用して CD4⁺T 細胞反応性を測定し、CD4⁺T 細胞エピトープを含む領域を決定する。まず感染牛の PBMC を全 BLV 蛋白 (5-10 μ g/ml) で 1 週間培養し、増殖した細胞をさらにマイトマイシン C 処理した自

己 PBMC と一緒に培養し（抗原無しで休ませる）この2週間培養細胞をエプトープ反応細胞として使う。CD4⁺T 細胞の反応である事を確認するため、PBMCからの $\gamma\delta$ T 細胞、CD8⁺T 細胞の除去、または抗原特異的 CD4⁺T 細胞のクローン化についても適時検討していく。

- (6) 合成ペプチドをデザインし作製する。同定された CD4⁺T 細胞エプトープを含む領域のアミノ酸配列（ENV 蛋白は Leader を含めて約 300 アミノ酸、GAG 蛋白(p15 及び p24)は約 400 アミノ酸）に基づいて、20 アミノ酸の合成オリゴペプチドを、10 アミノ酸オーバーラップするように連続的にデザインし、作製する。それぞれのオリゴペプチドを抗原として、前述した2週間培養細胞を使った T 細胞増殖アッセイを繰り返す。また必要に応じて新しい合成オリゴペプチドを作製し、最少の CD4⁺T 細胞エプトープを決定する。
- (7) エプトープを提示する MHC class II 分子の決定する。決定されたそれぞれの CD4⁺T 細胞エプトープについて、293 細胞に牛 MHC class II と CD80（あるいは CD86）を発現させた人工の抗原提示細胞を使って、エプトープを提示している MHC class II 分子を同定する。すなわち、293 細胞に MHC class II □鎖、□鎖、そして CD80 をコトランスフェクションした細胞をマイトマイシン C 処理して抗原提示細胞として使う。また MHC class II タイピングの過程で、新しい MHC class II が見つかる事が十分に考えられるので、その都度その MHC class II をクローニングし、発現ベクターのレパートリーを増やしていく。MHC class II 発現の有無は、特異モノクローナル抗体を使ってフローサイトメトリーで確認する。

4. 研究成果

- (1) 宮崎県北西部の西臼杵郡では、古くから牛の閉鎖的導入（郡内導入）を行っており、特に BLV 清浄化対策をしていないにもかかわらず、極めて低い BLV 感染率（約 1%）を保っていたことから、導入システムの進歩による導入源範囲の拡大が他の地域における感染を広げたことが示唆された。県内拡大している BLV ゲノムを解析した結果、若齢牛発症例において、BLV env 遺伝子が約 500bp 欠損している株が見られたが、未発症感染牛では、県内の株は主にゲノタイプ 1 で、稀にタイプ 3 であることがわかった。すなわち、海外からの新しい株の侵入は見られなかった（表、Page 2 右）

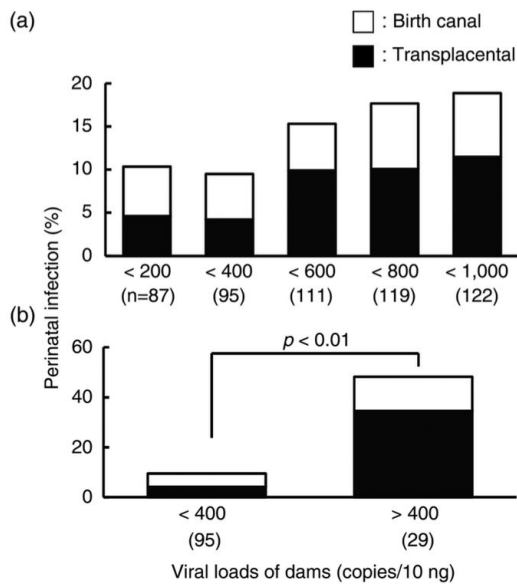
- (2) 宮崎県内で飼育されている牛の MHC class II, DRB3 対立遺伝子には様々な型が見られ多様性が保たれていることがわかった。これにより、本研究ができるフィールド環境が確認できた。また DRB3*0902 遺伝子を持つ牛で BLV に感染している個体をこれまで約 60 確認した。これらの牛は、BLV に感染しても極めて低いウイルス量を維持することがわかった。本成果は、論文投稿中である。
- (3) DRB3*0902 遺伝子を持つ牛は、BLV に感染しても極めて低いウイルス量を維持することから、感染源になりにくいと考えられたため、本牛を感染率が 90% の農場に導入し、陽性牛と数少ない陰性牛に配置した結果、陽転がなくなり陽性率を 60% に下げること成功した。また、BLV に感染した妊娠母牛から生まれた子牛は、妊娠母牛のウイルス量が高い程感染して生まれて来る確率が高いことがわかった。（図 1、Page 3 左）
- (4) MHC class II DRB3*0902 テトラマーを作製し、BLV env 蛋白をカバーするペプチドを合成した。これにより BLV 抗原特異的 CD4⁺T 細胞の動態を解析することが可能となった。
- (5) 農家の牛を使用するため、出荷などの農家の都合で一定期間安定的に特定の牛の材料を確保するのに工夫が必要ながわかった。現在、農家および現場獣医師との細かい情報の交換により、採材予定の可視化ができるようになり、感染牛の BLV 抗原特異的 CD4⁺T 細胞動態の解析をする牛を確保できる。今後、本研究で作製した免疫学的ツールを使って抵抗性のメカニズムを解明したい。

表： Mekata et al., 2015

Table 2. The seroprevalence and genotype of BLV in infected farms

Farm ID	BLV seroprevalence (infected /examined)	BLV genotype	Subgenotype (Accession No.)
T99	2.1% (4/195)	I	I-6 (LC007981) I-9 (LC007984) I-16 (LC007991)
K110	3.7% (1/27)	I	I-8 (LC007983)
K8	4.0% (1/25)	I	I-3 (LC007995)
T49	4.5% (1/22)	-	-
T61	10.0% (1/10)	I	I-11 (LC007986)
T53	14.3% (1/7)	I	I-15 (LC007990)
T83	20.0% (1/5)	I	I-5 (LC007980)
K29	21.4% (3/14)	III	- (LC007993)
T69	34.9% (29/83)	I	I-1 (LC007977) I-4 (LC007979) I-7 (LC007982)
T118	52.0% (13/25)	I	I-7 (LC007982) I-17 (LC007992)
K94	52.6% (10/19)	I	I-1 (LC007977) I-13 (LC007994)
K100	52.9% (9/17)	I	I-2 (LC007978)
T42	58.3% (7/12)	I	I-10 (LC007985) I-14 (LC007989)
K18	100% (7/7)	I	I-12 (LC007987)

図 1



Mekata et al., 2015b

<引用文献>

Murakami et al., 2013. Nationwide survey of bovine leukemia virus infection among dairy and beef breeding cattle in Japan from 2009-2011. *J. Vet. Med. Sci.* 75:1123-1126.

Norimine et al., 2006. Quantitation of *Anaplasma marginale* major surface protein (MSP)1a and MSP2 epitope-specific CD4+ T lymphocyte using bovine DRB3*1101 and DRB3*1201 tetramers. *Immunogenetics.* 58:726-739.

van Eijk et al., 1992. Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Anim. Genet.* 23:483-496.

Norimine and Brown, 2005. Intrahaplotype and interhaplotype pairing of bovine leukocyte antigen DQA and DQB molecules generate functional DQ molecules important for priming CD4(+)T-lymphocyte responses. *Immunogenetics.* 57:750-762.

Mekata et al., 2015a. Evaluation of the natural perinatal transmission of bovine leukemia virus. *Vet. Rec.* 176:254.

Mekata et al., 2015b. Horizontal transmission and phylogenetic analysis of bovine leukemia virus in two districts of Miyazaki, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 77:1115-1120.

Norimine et al., 2006. Quantitation of *Anaplasma marginale* major surface protein (MSP)1a and MSP2 epitope-specific CD4+ T lymphocytes using bovine DRB3*1101 and DRB3*1201 tetramers. *Immunogenetics* 58:729-739.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Mekata H., S. Sekiguchi, S. Konnai, Y. Kirino, Y. Horii, and J. Norimine. 2015. Horizontal transmission and phylogenetics analysis of bovine leukemia virus in two districts of Miyazaki, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 査読有、77:1115-1120. doi: 10.1292/jvms.14-0624

Mekata H., S. Sekiguchi, S. Konnai, Y. Kirino, K. Honkawa, N. Nonaka, Y. Horii, and J. Norimine. 2015. Evaluation of the natural perinatal transmission of bovine leukemia virus. *Vet. Rec.* 査読有 176:254. doi: 10.1136/vr.102464

目堅 博久、関口 敏、桐野 由美、堀井 洋一郎、乗峰 潤三 2015 感染症清浄化と畜産新生 —牛白血病ウイルス対策を通して— 日草誌、査読有、61:35-38.

〔学会発表〕(計7件)

14th International Symposium for Veterinary Epidemiology and Economics (Merida, Mexico) 2015. November 7th. Eradication of bovine leukemia virus infection at a regional level in Kyushu, Japan: Scenario tree modelling of the surveillance system. Yumi Kirino, Takashi Taniguchi, Sayaka Ueno, Hiroshi Kudoh, Hirohisa Mekata, Nariaki Nonaka, Yoichiro Horii, Junzo Norimine, Satoshi Sekiguchi.

平成 26 年度 第 158 回日本獣医学会学術集会(北里大、青森県十和田市)2015、平成 26 年 9 月 8 日牛白血病ウイルスの感染ウイルス量と予後の関係 目堅 博久、関口 敏、今内 覚、堀井 洋一郎、乗峰 潤三

平成 26 年度 日本獣医師会学会(岡山コンベンションセンター、岡山県岡山市)2015、平成 27 年 2 月 13 日、妊娠期および分娩時の牛白血病ウイルス垂直感染リスクの解析 目堅 博久、関口 敏、本川 和幸、今内 覚、堀井 洋一郎、乗峰 潤三

平成 26 年度 第 157 回日本獣医学会学術集会(北海道大学、北海道札幌市)2014、平成 26 年 9 月 12 日、若齢の白血病発症牛で認められた牛白血病ウイルスの env 領域 188 アミノ酸の脱落 目堅 博久、保田 昌宏、張 維東、今内 覚、関口 敏、乗峰 潤三

平成 26 年度 第 63 回九州地区獣医師会大会(鹿児島県民交流センター、鹿児島県鹿児島

市)2014、平成 26 年 9 月 15 日、 妊娠期および分娩時の牛白血病ウイルス垂直感染リスクの解析

目堅 博久、関口 敏、本川 和幸、桐野 有美、野中 成晃、今内 覚、堀井 洋一郎、乗峰 潤三

研究者番号：

平成 25 年度 日本産業動物獣医学会（千葉市幕張メッセ、千葉県千葉市）2013、平成 26 年 2 月 22 日、牛白血病ウイルス感染に関する定性的リスク評価 高木 信乃、目堅 博久、桐野 有美、堀井 洋一郎、乗峰 潤三、関口 敏

平成 25 年度 日本獣医師会学会（千葉市幕張メッセ、千葉県千葉市）2013、平成 26 年 2 月 22 日、地域レベルでの牛白血病ウイルス清浄化対策から明らかになったこと 目堅 博久、関口 敏、桐野 有美、今内 覚、堀井 洋一郎、乗峰 潤三

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

乗峰 潤三 (NORIMINE Junzo)

宮崎大学・産業動物防疫リサーチセンター・教授

研究者番号：30627667

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()