

総説

革新的技術で牛白血病ウイルスから牛を守る

間 陽子

国立研究開発法人理化学研究所 分子ウイルス学特別研究ユニット

〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1

TEL: 048-462-4408 FAX: 048-462-4399

E-mail: aida@riken.jp

【要約】

牛白血病ウイルス (BLV) は悪性Bリンパ腫である地方病性牛白血病 (EBL) を惹起するレトロウイルスである。近年、国内外でのBLV感染率は増加しており、畜産界に甚大な被害を与えている。我々はCoordination of Common Motif (CoCoMo) アルゴリズムを用いて設計した縮重プライマーセットにより、未知を含めた全てのBLV変異株を検出可能であり、ウシ細胞の*BoLA-DRA* 遺伝子の増幅により正確にプロウイルス量を定量可能なBLV-CoCoMo-qPCR法を確立し、プロウイルス量が病態進行の指標となることを示した。また、本法により測定した末梢血中のプロウイルス量が14,000コピー/10⁵細胞を超過した個体から鼻汁・唾液中にプロウイルスが検出され始める事から、このような個体はウイルスを体外に放出し感染源となり易い「BLV伝播高リスク牛」であり、逆にそれ以下を示した個体は感染源となり難い「BLV伝播低リスク牛」として考えられた。さらに我々は、発症し易く、プロウイルス量が上昇し易い、感受性ウシ主要組織適合遺伝子 (BoLA) クラスII対立遺伝子を有する「発症感受性・BLV伝播高リスク牛」と逆に発症し難く、プロウイルス量も上昇しない「発症抵抗性・BLV伝播低リスク牛」を同定した。また、感受性対立遺伝子は肉質等の経済形質に影響しないことも示した。そこで、経済的損失を最小源に抑えながらEBLの清浄化を進めてゆくためには、BoLAクラスII対立遺伝子とプロウイルス量を指標として、発症感受性・BLV伝播高リスク牛から優先的に淘汰し、BLV伝播低リスク牛、特に、生涯に渡ってBLVプロウイルス量が低いまま維持される抵抗性対立遺伝子を有する発症抵抗性・BLV伝播低リスク牛を増加させ、農場の感染率を低下させる隔離戦略を提唱したい。加えて発症抵抗性対立遺伝子を指標として牛白血病を発症し難い、さらにプロウイルス量が上昇しないウシ集団を作出するという育種戦略、あるいは発症感受性牛を標的としたワクチン開発、がEBLの制圧戦略として有効であると考えられる。

キーワード: 牛白血病ウイルス、プロウイルス量、ウシ主要組織適合遺伝子、育種戦略、ワクチン

【はじめに】

牛白血病ウイルス (BLV) は悪性Bリンパ腫である地方病性牛白血病 (EBL) を誘発する [1-3]。BLVは感染後、プロウイルスとして染色体

の中に組みこまれるため、BLV抗体が陽転してもウイルスは体内から排除されずに持続感染する。EBLには有効な治療法はなく、一度発症すると必ず死の転帰をとることから畜産界に与える打撃は深刻である。さらに最近、発症に至らないBLV感染牛において、免疫機能の低下をきたし他の感染症に対しても易感染性になるこ

受理: 2016年5月2日

と、乳量・産肉および繁殖能力が著しく低下すること、使用可能期間の短縮および空胎期間の延長などをきたすこと、が明らかになってきており、その経済的損失は計り知れない。

平成21～23年度に行われた全国調査によると、抗体陽性率は6ヶ月齢以上の乳用牛で40.9%、肉用繁殖牛で28.7%に達し [15]、BLVの感染および発症率は全国的に上昇の一途をたどっており被害は拡大する一方である。さらに、BLVは我が国だけでなく、世界的レベルで拡大していることが明らかとなっており [20, 21]、現在、EBLは国際獣疫事務局 (OIE) のリスト疾病の一つに挙げられている [6]。一方、諸外国、特に欧州連合 (EU) 加盟国では国家レベルの組織的な清浄化に取り組み、BLV感染牛の“摘発・淘汰”の結果としてBLV-freeを実現している国が増加しており [6]、そのような国では将来的なBLV汚染牛肉の輸入が厳しく制限され、BLV発生国からの輸出に深刻な影響がでることが懸念されている。そのため、我が国における一刻も早いEBL対策が切望されている。しかし、既にBLVが広く蔓延し、8割以上のウシがBLVに汚染されている農場も珍しくなくなった我が国において、摘発・淘汰を実施した場合に費用が膨大になるため、単純に抗体陽性牛を淘汰するという戦略は機能しなくなっている。

本総説では、このような状況下の我が国において、我々のこれまでの研究の成果に基づいた新しい白血病抑制戦略を用いて、「BLVから牛をどのように守るか」について紹介したい。

【BLVの伝播と発症機構】

BLVは、細胞フリーのウイルス粒子単独では感染しにくく、感染牛の血液、体液、乳汁中に存在する感染リンパ球の移入により伝播 (cell to cell感染) する [1, 5, 7]。BLV感染の主な経路として、汚染注射針や直検手袋の再使用、出血を伴う外科処理、たとえば除角、断尾、去勢、耳標や鼻環の装着による人為的伝播、感染牛からの輸血、吸血昆虫による媒介伝播がある。加えて、乳汁を介する伝播、BLV感染母牛の子宮内あるいは産道感染などの垂直感染も考えられる。

上記のような様式で感染したウシは、BLV抗体が陽転してもウイルスは体内から排除され

ずに持続感染する。BLV感染牛は大きく三つの病態を示す [1, 5-7]。1) 感染牛のおよそ70%は長期間、全く臨床症状を示さない無症状キャリアー、2) 30%はB細胞が増加する持続性リンパ球増多症 (PL)、そして、3) 感染牛の約5%は5年から10年の潜伏期間を経てEBLを発症する。このように、BLVは低い発症率で白血病を発症する。しかも三つの病態の全てを通じて、感染個体内でBLVの発現は著しく低く抑えられている。以上のことは、BLVによる癌化にはウイルス側要因に加えて、宿主側要因の関与が重要であることを示唆している [5-7]。

では、BLVはどのようにして癌化するのであろうか？無症状キャリアーの患畜の末梢血単核球では、BLVプロウイルスはCD5陽性B細胞、CD5陰性B細胞、CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞からも検出される [19] が、病態が白血病に進展すると、CD5陽性B細胞の著しい増加が観察される [2]。BLVはレトロウイルスに共通する *gag*、*pol*、*env* 遺伝子に加えて *env* と3'側の long terminal repeat (LTR) の間に pX 領域が存在する。前癌状態である PL 牛の CD5 陽性 B 細胞では、pX にコードされる転写活性化因子 Tax が自身の LTR に作用して、ウイルス遺伝子の転写を活性化すると同時に細胞側にも作用して BLV 感染細胞を不死化してポリクローナル増殖を誘発する。しかし、癌化に進展させるためにはさらなる宿主因子の作用が必要である。一部の宿主因子しか同定されていないが、その候補として癌抑制遺伝子 p53 の変異 [23, 24]、腫瘍壊死因子 (TNF) の多型 [12]、主要組織適合抗原 (MHC) の多型 [3, 4] が挙げられる。発症牛では、CD5 陽性 B 細胞が宿主因子の作用によってトランスフォーメーションを起こして、モノクローナルあるいはオリゴクローナルに増殖を起こして、転移を経てリンパ腫に至るプロセスが示唆されている [5-7]。従って、BLV が誘発する白血病発症において個体差が生ずるのは、宿主因子によると考えられる。

【EBL 発症の感受性と抵抗性を規定する BoLA-DRB3 対立遺伝子】

前章でお話ししてきたように、BLV は三つの異なる病態を誘発する。この個体差の要因の一つがウシ MHC (BoLA) の多型にある。MHC

の最大の特徴は、他には類をみない高度な多型性を持つ点であり、結果として免疫応答と疾患感受性の個体差をもたらす。ヒトでは自己免疫疾患を初めとする100にも及ぶ疾患と、またウシでは乳房炎、牛白血病、タイレリアおよびウイルス性下痢症等の発症とMHCとの相関性が報告されている [8, 26-29]。

*BoLA*領域は第23番染色体の4 Mbに渡る領域に位置し、疾患発症に相関性を示し、かつ免疫応答の誘導に関与するMHCクラスIならびにクラスII遺伝子、および疾患関連遺伝子を始めとする多数の非MHC遺伝子が密に連鎖して存在している [8, 26]。この*BoLA*クラスII領域の中で最も機能的で多型に富むのが*BoLA-DRB3*遺伝子であり、131種類の対立遺伝子が報告されている。そこで我々は、*BoLA-DRB3*対立遺伝子を塩基配列レベルで決定できるPCR-sequence-based typing (SBT) 法を世界に先駆けて開発し [25, 30]、EBLの発症と*BoLA-DRB3*の多型性との相関性について解析した。まず、白血病発症に抵抗性を付与する*BoLA-DRB3*対立遺伝子を同定するために、BLV感染非発症牛の中から、平均BLV発症好発年齢5～7歳を超えた9歳以上でリンパ球数・臨床所見が健康な黒毛和種53頭を発症抵抗性牛とした。一方、白血病発症の感受性を規定する対立遺伝子を同定するために、BLV感染発症牛69頭のサンプルを収集し、各群の*BoLA-DRB3*対立遺伝子をタイピングし、そのアレル頻度を比較した [3-6, 27-29]。その結果、*DRB3*0701*、*DRB3*0902*、*DRB3*2703*および*DRB3*14011*は健康牛に有意に多く検出されたことから抵抗性対立遺伝子、一方*DRB3*1601*は発症牛に有意に高頻度に検出されたことから感受性対立遺伝子の可能性が示唆された。次に、遺伝子型頻度を解析した結果、発症牛では感受性対立遺伝子*DRB3*1601*をホモで有する個体の頻度のみ有意に高かった。以上の結果から、*DRB3*1601/*1601*を有する個体が白血病を発症しやすいことが示唆された。

次に、上記の*BoLA-DRB3*対立遺伝子が発症を規定するという事実を、短期間でBLV誘発性白血病を発症するEBLのモデル動物ヒツジを用いた感染防御実験によって検証した。その結果、白血病発症に対して抵抗性対立遺伝子を有

するヒツジはBLV感染後、感受性対立遺伝子を持つ個体と異なり、強い免疫応答が誘導され、ウイルス増殖が抑えられ、最終的に白血病を発症しないという興味深い知見を得た [11, 16]。

続いて、白血病発症のしやすさに加えて、BLVプロウイルス量と*BoLA-DRB3*対立遺伝子との関連性を明らかにするために、複数の牧場からの牛材料を用いて*BoLA-DRB3*タイピングと次の章において説明するBLVプロウイルス量を定量するBLV-CoCoMo-qPCR法を行った。BLVプロウイルスロードは*DRB3*1601*対立遺伝子をホモで有する個体、ヘテロで有する個体および持たない個体の順に有意に高かった [14]。その事実をウシを用いたBLV感染実験により検証した。即ち、BLVを黒毛和種に接種すると、抵抗性対立遺伝子を有する抵抗性牛ではBLVプロウイルス量の上昇は低く抑えられたが、感受性対立遺伝子を有する感受性牛では同じ量のBLVを接種してもBLVプロウイルス量は上昇した。

以上の結果から、*BoLA-DRB3*対立遺伝子は白血病発症とBLVプロウイルス量を制御していることが示された。

【現行のEBLの診断方法とBLV-CoCoMo-qPCR法】

古くから血液塗沫標本による末梢血リンパ球の増加と異型リンパ球の検出によりEBLを診断してきたが、最近では寒天ゲル内沈降試験 (AGID; 平成26年より生産中止で入手不能となっている)、受身間接赤血球凝集反応 (PHA) および酵素抗体法 (ELISA) の市販のキットを用いた血清学的診断法が汎用されている (表1)。しかし、感染母牛から生まれた子牛は母牛から初乳を通じてBLV抗体を摂取するため、移行抗体が消失するまでの5～6ヶ月間は抗体検査では感染の有無は判定できない。また、感染が成立しても抗体の産生が不十分な個体も多く認められる。このように、抗体検査では感染の有無を正確に判定することは困難である。それを補うために感染リンパ球からBLVプロウイルス遺伝子を検出するポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法として、Nested PCR法 [22]、Real time PCR法 [13] およびDirect PCR法 [17, 32] が開発された (表1)。最近我々は、BLVのLTR領域にCoordination of Common Motifs

(CoCoMo) アルゴリズムにより未知を含めた全てのBLV変異株を検出可能な縮重プライマーを設計し、特異的を高めるために保存領域を標的とするTaqManプローブを用い、さらに宿主側*BoLA-DRA*遺伝子を同時に検出することで、BLVプロウイルス量を正確に定量することが可能な”BLV-CoCoMo-qPCR”を開発した[9, 10, 31] (図1)。本方法は、*BoLA-DRA*遺伝子を対照として置くことで、ゲノムDNAの品質の違いを吸収できるため、様々な条件で抽出したゲノム同士や異なる機関で得られた測定値が比較可能であり、BLV清浄化対策におけるプロウイルス量による基準を作成しやすい。また、本方法は未知を含めた全てのBLV変異株に適応した縮重プライマーを用いているため、実際にNested PCR法で検出できなかった南米やフィリピンのBLV株を検出することに成功している[6, 9, 20]。さらに、本方法により抗BLV抗体が陰性の検体からもプロウイルスを検出できたことから、抗体価が陽転していなくても本方法によりBLV感染の診断が可能であることが明らかとなった。

[感染源になりやすいBLV伝播高リスク牛となりにくいBLV伝播低リスク牛の診断システムの構築]

続いて、BLV-CoCoMo-qPCR法を用いて

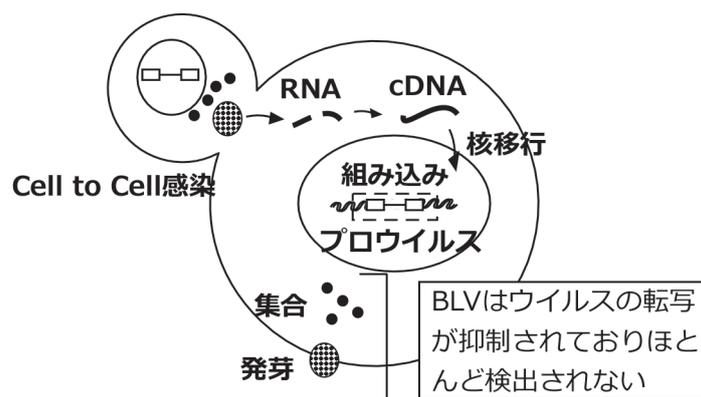
BLVプロウイルス量と病態進行との関連性を解析したところ、BLVプロウイルス量は病態が無症状キャリアー、PL、そして発症へと進行することに伴って増加することが明らかとなった[9]。さらに、BLV浸潤率60%以上の農場、54カ所から計848検体を用いた全国レベルの調査からも、BLVプロウイルス量はリンパ球数の増加に伴い有意に上昇することが証明されたことから、プロウイルス量が病態進行の指標となることが示された[18]。さらに、BLVプロウイルス量が高い農場は、感染率が高い傾向にあることが示された。このように、BLVプロウイルス量を低く抑える戦略によって、感染率と病態進行を抑えることができることが明確になった。

では、BLVプロウイルス量をどのくらいまで低下させれば、感染率の低下に繋がるのだろうか？この疑問に答えるために、(株)理研ジェネシスとの共同研究によって、末梢血に加えて、鼻汁および唾液からもウイルスを検出可能な技術を確認し、これまで不可能だった鼻汁および唾液からプロウイルスを検出することに成功した[33]。興味深いことに、BLV-CoCoMo-qPCR法により測定した時の末梢血中のBLVプロウイルス量が $14,000$ コピー/ 10^5 細胞を超過した個体から鼻汁・唾液にプロウイル

表1 現在使用されているEBLの診断

検査法	開発/販売	標的	サンプル
<u>臨床所見, 触診および直検による腫瘤の確認</u>			
<u>血液学的診断</u>			
1. ECの鍵によるリンパ球の増加の判定			
2. 血液塗抹標本による異型細胞の検出			
<u>血清学的診断</u>			
1. 酵素抗体法 (ELISA)	JNC	gp51	血清
2. 受身間接赤血球凝集反応 (PHA)	日生研		血清
3. 寒天ゲル内沈降反応 (AGID)	北里研究所	gp51, p24	血清
<u>ウイルス学的診断法</u>			
1. シンシチウム法		ウイルス	白血球
2. Nested PCR法		<i>env</i> , LTR	ゲノムDNA
3. リアルタイムPCR法	タカラバイオ	<i>tax</i>	ゲノムDNA
	理研ジェネシス	LTR	ゲノムDNA
	Lewら	<i>pol</i>	ゲノムDNA
4. Direct PCR法	北大 理研 東京農大	intron LTR <i>gag</i>	血液 血液 血液

A) BLVの生活環



B) CoCoMo-BLVリアルタイムPCR法 によるプロウイルスの定量

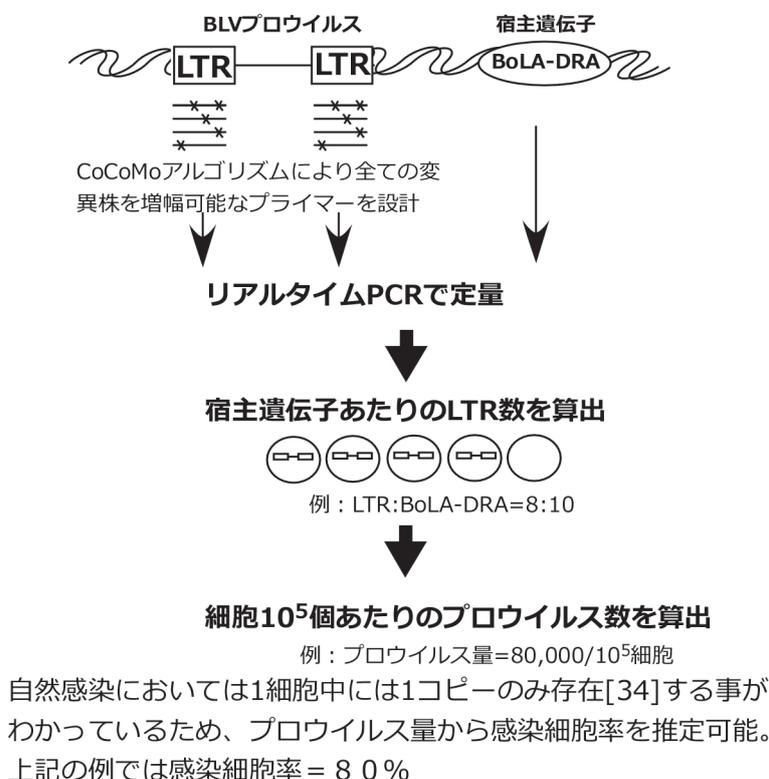


図1 BLV-CoCoMo-qPCR法によるプロウイルスの定量

- (A) BLVの生活環。BLVは感染細胞から主にCell to Cellにより移入され、ウイルスゲノムRNAがcDNAに逆転写された後核移行し、3'および5'にLTR配列をもつプロウイルスとして宿主ゲノムに組み込まれる。その後、ウイルス遺伝子の転写が起こり、ウイルスタンパク質とRNAが集合した後発芽するが、BLVの場合、ウイルスの転写は強く抑制されており、抗原の発現はほとんど見られない。
- (B) BLV-CoCoMo-qPCR法によるプロウイルスの定量。プロウイルスは2つのLTR領域を有する。LTR遺伝子配列の変異により定量性が得られなくなることを防ぐために、CoCoMoアルゴリズムにより、既知および将来変異する可能性のある配列を全て増幅可能な縮重プライマーを設計し、リアルタイムPCRによるBLV-LTR定量法を確立した。LTR数と1宿主ゲノムに1コピーのみ存在するBoLA-DRA遺伝子数を両方同時に定量し、 10^5 細胞あたりに存在するプロウイルス数を正確に定量可能な方法を確立した。

スが検出されたことから、このような個体はウイルスを広く体外に放出し牛群の感染源になりやすいが、逆にそれ以下を示した低プロウイルス量の個体は他のウシへの水平伝播させる可能性が低いことが考えられた。現在、鼻汁・唾液に実際に感染力を有するウイルスが含まれているかどうかを調査中である。

次に、水平伝播を起こす要因の一つである別個体との接触経験の有無とBLVプロウイルス量との相関性について、BLV浸潤率60%以上の農場からの検体を用いて調べた。この場合の接触とは、牛舎内でフリーストール、フリーバーンや区画飼（少なくとも3頭）において飼育されている状況を指す。その結果、接触経験のある牛群では経験のない牛群に比べ、BLV陽性率もBLVプロウイルス量とも有意に高い結果となった[18]。以上から、鼻汁や唾液等を介する接触は農場内でのBLV感染拡大に影響を及ぼすことが示唆された。

以上の成果から、BLV-CoCoMo-qPCR法に

より測定した血中のBLVプロウイルス量が、試験法の誤差範囲を考慮して10,000コピー/10⁵細胞以上の高BLVプロウイルス量を持つウシを「BLV伝播高リスク牛」、それ以下の低BLVプロウイルス量を持つ牛を「BLV伝播低リスク牛」と定義した。

[MHCをマーカーとした新しい牛白血病制圧戦略]

BLV感染が蔓延している我が国において、経済的損失を最小に抑えながら白血病の清浄化対策を成功させるためには、BLV伝播高リスク牛を淘汰し、BLV伝播低リスク牛を増加させ、感染率を徐々に低下させる戦略が有効である。表1の上段に示す従来の一般的なEBL対策に加えて、最近我々が見出した白血病発症を規定する*BoLA-DRB3*遺伝子をマーカーにした新しいEBL制圧戦略として、(1) BLV伝播高リスク牛・低リスク牛の診断システムに基づく革新的隔離戦略、(2) 発症抵抗性種雄牛を選別して残し、発症しがたく、BLVプロウイルス量を低

表2 EBL制圧戦略

従来のEBL制圧戦略(農林水産省牛白血病に関する衛生対策ガイドラインとり抜粋)

- I. 本病の農場内感染拡大防止対策(農場内伝播の防止)
 1. 本病の浸潤状況にかかわらず実施する対策:
 - ① 注射針の確実な交換
 - ② 直腸検査及び人工授精時に使用する直検手袋の確実な交換
 - ③ 除角、去勢、削蹄、耳標装着等の出血を伴う処置への対応
 2. 本病の浸潤農場における対策:
 - ① 分娩・ほ乳時等の作業による感染ルートの遮断
 - ② 吸血昆虫対策
 - ③ 農場における牛の配置
 - ④ 日常作業における順序
 3. 本病の農場内清浄化に向けた取組:
- II. 本病の農場への侵入防止対策(農場間伝播の防止)
 1. 繁殖雌牛の外部導入
 2. 預託放牧等

MHCをマーカーにした新しいEBL制圧戦略

1. BLV伝播高リスク牛・低リスク牛の診断システムに基づく革新的隔離戦略:
 - ① プロウイルス量によるBLV伝播高リスク牛・低リスク牛の同定
 - ② *BoLA-DRB3*遺伝子型による発症感受性・BLV伝播高リスク牛と発症抵抗性・BLV伝播低リスク牛の同定
 - ③ 生物学的防壁の構築と隔離
BLV伝播低リスク牛群を生物学的な防壁として、高リスク牛群と未感染牛群の間に配置する分離飼育
絞り込んだ発症抵抗性・BLV伝播低リスク牛を低リスク牛群と未感染牛群の接点に配置
 - ④ 淘汰と陰性牛の導入
発症感受性・BLV伝播高リスク牛の優先的な淘汰と低リスク牛の導入
2. 育種:
発症抵抗性・BLV伝播低リスク種雄牛を選別し、発症しがたく、プロウイルス量が上昇しない育種集団の造成
3. ワクチン:
発症感受性・BLV伝播高リスク牛を標的とした細胞性免疫を誘導可能なワクチンによるプロウイルス量の低減によるBLV感染率の低下

下させる育種集団の造成、および(3)発症感受性牛を標的としたワクチン戦略、が挙げられる。

1) BLV伝播高リスク牛・低リスク牛の診断システムに基づく革新的隔離戦略

BLV伝播低リスク牛群を牛舎における生物学的防壁として利用する隔離戦略を最初に提案したい(図2)。前章で述べたBLV-CoCoMo-qPCR法により測定した血中のBLVプロウイルス量を指標にして分類したBLV伝播高リスク

牛とBLV伝播高リスク牛の分布を黒毛和種およびホルスタイン種ごとに解析したところ、BLV浸潤率60%以上の農場において、感染牛の約半数(牛群の約30%)ずつを占めている事が判明した。そこで、鼻汁や唾液中にBLVが排出されにくいBLV伝播低リスク牛群を、BLV伝播高リスク牛群と陰性牛群の間に生物学的な防壁として配置する第一の隔離プログラムはどうか。

しかし、BLV伝播低リスク牛群の中には、検査時点ではBLVプロウイルス量が低くても後

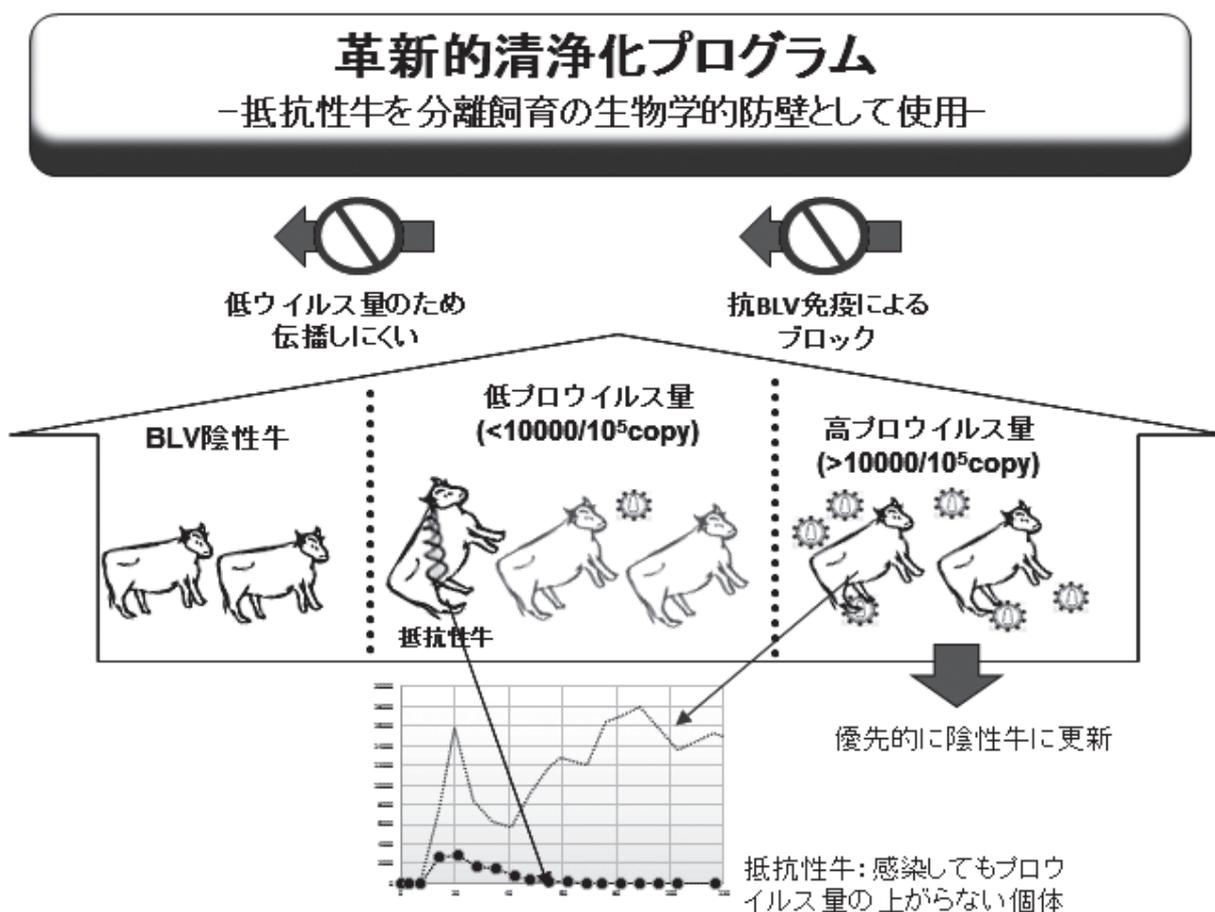


図2 BLV伝播高リスク牛・低リスク牛の診断システムに基づく革新的隔離戦略

BLV-CoCoMo-qPCR法により測定した血中プロウイルス量が10,000コピー/10⁵細胞以下のBLV伝播低リスク牛はウイルス放出が著しく低レベルであるため、未感染牛にBLVを伝播させるリスクは低い。これらの牛群を10,000コピー/10⁵細胞以上のBLV伝播高リスク牛群と未感染牛群の間に生物学的な防壁として配置して分離飼育することで、ウイルス伝播リスクを低減させる。さらに、BLV伝播低リスク牛群の中から、生涯に渡ってプロウイルス量が低いまま維持される抵抗性*BoLA-DRB3*対立遺伝子を有する「BLV伝播・発症低リスク牛」を特定し、BLV伝播低リスク牛群と未感染牛群の接点に配置させれば、BLV伝播高リスク牛からのBLV伝播をより効果的に抑制できる。一方、BLV伝播高リスク牛群の中から、EBLを発症しやすく、プロウイルス量が特に高いまま維持される感受性*BoLA-DRB3*対立遺伝子を有する「BLV伝播・発症高リスク牛」を絞り込み、優先的に淘汰し、BLV陰性牛と更新することにより、農場の感染率を低下させる。

に上昇し汚染源になる恐れがあるウシが含まれている。そのような危険性を避け清浄化対策の効率化を計るために、牛群の*BoLA-DRB3*タイピングを行い、第二章で述べたEBLが発症しにくいというえに、生涯に渡ってBLVプロウイルス量が低いまま維持される抵抗性*BoLA-DRB3*対立遺伝子を有する抵抗性牛を特定し、それを「発症抵抗性・BLV拡散低リスク牛」として、BLV伝播低リスク牛群と陰性牛群の接点に配置させる第二の隔離プログラムを提唱したい。

第三の隔離プログラムとして、牛群の約30%を占めるBLV伝播高リスク牛群の中から、白血病発症しやすく、BLVプロウイルス量が特に高いまま維持される感受性*BoLA-DRB3*対立遺伝子を有する感受性牛を特定し、それを「発症感受性・BLV伝播高リスク牛」として、優先的に淘汰して、BLV陰性牛と更新することにより、さらに効率的に農場の感染率を低下させる事が可能であると考えられる。

2) 発症抵抗性種雄牛を選別して残し、発症しがたく、BLVプロウイルス量を低下させる育種集団の造成

大分県農林水産研究センター畜産試験場の藤田達夫博士らは、大分県の種雄牛50頭の*BoLA-DRB3*の対立遺伝子型と経済形質との関連性を解析し、感受性対立遺伝子は肉質等の経済形質に影響を及ぼさないことを示し、発症感受性遺伝子を排除しても問題ないとの判断により、現在、理研との共同研究で発症抵抗性*BoLA-DRB3*対立遺伝子を有する発症抵抗性・BLV伝播低リスク種雄牛を選別して残し、抵抗性アレルの頻度を増加させることにより、発症し難い、さらにプロウイルス量が上昇しない育種集団を造成に取り組んでいる。このような育種集団が確立されれば、EBL発症が抑制できる事が期待させるのみならず、1)で提案したような、抵抗性遺伝子を有するウシ個体を用いた隔離戦略に使用可能なウシの市場への提供源としても有用であると考えられる。

3) ワクチンによるBLVプロウイルス量の激減によるBLV感染率の低下

これまでに、感染を予防するためのワクチン開発が行われてきた。不活化ワクチン、サブユ

ニットワクチン、組換えワクシニアウイルスワクチン、ペプチドワクチン、DNAワクチン、弱毒化ワクチンなど様々な観点から牛白血病ワクチンの作成が試みられている [1, 5]。これらのワクチンはマウスやラット、ウサギ、ヒツジそしてウシなどを用いて検証されており、液性免疫や細胞性免疫の誘導およびBLVの感染阻止などの効果が得られているものも存在する。しかしながら、ワクチン効果の持続性の問題や、*BoLA*多型による個体差やワクチンの効果判定の基準が感染防御であったことから、実用化には大きな壁が存在しており、未だ牛白血病ワクチンの開発には成功していない。

そこで我々は、ワクチンが実用化されない原因の一つである個体差に着目し、ワクチンの効果の得られにくい感受性*BoLA-DRB3*対立遺伝子を有する発症感受性・BLV伝播高リスク牛に細胞性免疫を誘導可能なワクチン開発に挑戦している。目的のワクチンが開発できれば、EBLの治療や病態の進行を制御すること、BLVプロウイルス量の激減によるBLV感染率を低下させること、が可能となる。我々は感受性*BoLA*クラスII分子に対するエピトープを同定し、そのペプチドを*in silico*解析により、より感受性*BoLA*クラスII分子に結合しやすくなるように最適化を図った後に、ナノ粒子にカプセル化して抗原提示細胞にデリバリーすることにより細胞性免疫を誘導可能なワクチンを創製し、卵移植で作成した感受性*BoLA-DRB3*対立遺伝子を有する感受性牛に接種し、PBS接種群に比較して、有意にプロウイルスが低下させることことに成功した。この改変型ペプチドワクチンは、感染防御を可能とするだけでなく体内ウイルス量の低下によるBLVの感染拡大の抑制および病態進行の抑制をも可能にすることが考えられる。しかし、このペプチドワクチンは単鎖であるため効果が低く実用化ができないという問題があるため、現在、ウイルス様粒子(VLP)や抗原蛋白質全長を使用する不活化ワクチンの開発に取り組んでいる。

【謝辞】

本稿の執筆に当たりご助力を頂いた理化学研究所・分子ウイルス学特別研究ユニット竹嶋伸之輔研究員に厚く御礼を申し上げます。また、

本稿で述べた実験結果は、多くの共同研究者との共同研究により得られたものであり、心から厚く深謝致します。なお、本研究は科学研究費補助金・基盤研究（A）および生研センター・イノベーション創出基礎研究推進事業、農林水産省家畜伝染病早期診断体制整備委託事業（牛白血病診断用試薬の配布）および農林水産省革新的技術創造促進事業（異分野融合共同研究）の支援を受けて行われたものであり、この場を借りて深謝致します。

【引用文献】

- 1) 間陽子、大石和恵、井川洋二. 1993. HTLV-1 のモデルとしての BLV 実験感染羊の白血病発症とワクチン開発. AIDS と ATL - 分子レベルから予防・治療まで -. 実験医学. 増刊. 11: 547-557.
- 2) Aida, Y., Okada, K., and Amanuma, H. 1993. Phenotype and ontogeny of cells carrying a tumor-associated antigen that is expressed on bovine leukemia virus-induced lymphosarcoma. Cancer Res. 53: 429-437.
- 3) 間陽子. 2004. 牛白血病ウイルスの潜伏化と白血病発症. [特集: 見えてきたウイルス発癌]. 獣医畜産新報. 57: 591-593.
- 4) 間陽子、竹嶋伸之輔. 2007. 白血病と乳房炎感受性と牛主要組織適合 (BoLA) の遺伝的多様性. [特集: 主要組織適合抗原 (MHC) と疾患解析の最前線—臨床応用への展望]. 獣医畜産新報. 60: 925-927.
- 5) 間陽子、竹嶋伸之輔. 2011. 牛白血病ワクチンの開発と新しい疾病防御戦略. 獣医畜産新報. 29: 23-29.
- 6) 間陽子、竹嶋伸之輔. 2011. 牛白血病の世界における感染拡大の現状と防御対策. 獣医畜産新報. 64: 115-120.
- 7) Aida, Y., Murakami, H., Takahashi, M., and Takeshima, S-n. 2013. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. Front. Microbiol. 4: 328.
- 8) Aida, Y., Takeshima, S-n., Baldwin, C. L., and Kaushik, A. K. 2014. Bovine Immunogenetics, THE GENETICS OF CATTLE. 2nd ed. CAB International. Boston. 153-191.
- 9) Jimba, M., Takeshima, S-n., Matoba, K., Endoh, D., and Aida, Y. 2010. BLV-CoCoMo-qPCR: Quantitation of bovine leukemia virus proviral load using the CoCoMo algorithm. Retrovirology. 7: 91.
- 10) Jimba, M., Takeshima, S-n., Kohara, J., Kobayashi, N., Matsushashi, T., Omori, T., Nunoya, T. and Aida, Y. 2012. BLV-CoCoMo-qPCR: a useful tool for evaluating bovine leukemia virus infection status. BMC Vet. Res. 8: 167.
- 11) Konnai, S., Takeshima, S-n., Tajima, S., Yin, S. A., Okada, K., Onuma, M., and Aida, Y. 2003. The influence of ovine MHC class II *DRB1* alleles on immune response in bovine leukemia virus infection. Microbiol. Immunol. 47: 223-232.
- 12) Konnai, S., Usui, T., Ikeda, M., Kohara, J., Hirata, T., Okada, K., Ohashi, K., and Onuma, M. 2006. Tumor necrosis factor-alpha genetic polymorphism may contribute to progression of bovine leukemia virus-infection. Microbes Infect. 8: 2163-2171
- 13) Lew, AE., Bock, RE., Molloy, JB., Minchin, CM., Robinson, SJ., and Steer, P. 2004. Sensitive and specific detection of proviral bovine leukemia virus by 5' Taq nuclease PCR using a 3' minor groove binder fluorogenic probe. Journal of virological methods. 115: 167-175.
- 14) Miyasaka T., Takeshima S-n., Jimba M., Kobayashi N., Matsushashi T., Matsumoto Y., Sentsui H., and Aida Y. 2013. Identification of bovine leukocyte antigen class II haplotypes associated with variations in bovine leukemia virus proviral load in Japanese Black cattle. Tissue Antigens. 81: 72-82.
- 15) Murakami, K., Kobayashi, S., Konishi M., Kameyama, K., and Tsutsui, T. 2011. 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.
- 16) Nagaoka, Y., Kabeya, H., Onuma, M., Kasai, N., Okada, K., and Aida, Y. 1999. Ovine MHC class II *DRB1* alleles associated with resistance or susceptibility to development of bovine leukemia virus-induced ovine lymphoma. Cancer Res. 59: 975-981.
- 17) Nishimori, A., Konnai, S., Ikebuchi, R., Okagawa, T., Nakahara, A., Murata, S., Ohashi, K. 2016. Direct polymerase chain reaction from blood and tissue samples for rapid diagnosis of bovine leukemia virus infection. J. Vet. Med. Sci. in press.
- 18) Ohno, A., Takeshima, S-n., Matsumoto, and Aida, Y. 2015. Risk factors associated with increased bovine leukemia virus proviral load in infected cattle in Japan from 2012 to 2014. Virus Res., 210: 283-290.
- 19) Panei, C. J., Takeshima, S-n., Omori, T., Nunoya,

- T., Davis, W. C., Ishizaki, H., Matoba, K., and Aida, Y. 2013. Estimation of bovine leukemia virus (BLV) proviral load harbored by lymphocyte subpopulations in BLV-infected cattle at the subclinical stage of enzootic bovine leucosis using BLV-CoCoMo-qPCR. *BMC Vet. Res.* 9: 95.
- 20) Polat, M., Ohno, A., Takeshima, S-n., Kim, J., Kikuya, M., Matsumoto, Y., Mingala, C. N., Onuma, M., and Aida, Y. 2015. Detection and molecular characterization of bovine leukemia virus in Philippine cattle. *Arch. Virol.* 160: 285-296.
- 21) Polat, M., Takeshima, S-n., Hosomichi, K., Kim, J., Miyasaka, T., Yamada, K., Arainga, M., Murakami, T., Matsumoto, Y., Diaz, V. D. L. B., Panei, C. J., González, E.T., Kanemaki, M., Onuma, M., Giovambattista, G., and Aida, Y. 2016. A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. *Retrovirology.* 13:4.
- 22) Tajima, S., Ikawa, Y., and Aida, Y. 1998. Complete bovine leukemia virus (BLV) provirus is conserved in BLV-infected cattle throughout the course of B-cell lymphosarcoma development. *J. Virol.* 72: 7569-7576.
- 23) Tajima, S., Zhuang, W., Kato, M. V., Okada, K., Ikawa, Y., and Aida, Y. 1998. Function and conformation of wild-type p53 protein are influenced by mutations in bovine leukemia virus-induced B-cell lymphosarcoma. *Virology.* 243: 235-246.
- 24) 田島茂、間陽子. 1999. 牛白血病ウイルス誘発性Bリンパ腫におけるウシ p53 遺伝子の変異. *動物遺伝研究会誌.* 27: 45-54.
- 25) Takeshima, S-n., Ikegami, M., Morita, M., Nakai, Y., and Aida, Y. 2001. Identification of new cattle *BoLA-DRB3* alleles by sequence-based typing. *Immunogenetics.* 53: 74-81
- 26) Takeshima S-n., and Aida Y. 2006. Structure, function, and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *Animal Science J.* 77: 138-250.
- 27) 竹嶋伸之輔、間陽子. 2007. 「ミニレビュー」ウシ主要組織適合遺伝子複合体 (BoLA) 領域の多様性と抗病性. *動物遺伝育種研究会誌.* 35: 51-64.
- 28) 竹嶋伸之輔、間陽子. 2007. ウシ主要組織適合遺伝子複合体 (BoLA) と疾患感受性. 「特集: 動物 MHC」*アニテクス.* 19: 18-26.
- 29) 竹嶋伸之輔、間陽子. 2007. ウシ主要組織適合遺伝子複合体 (BoLA) の構造・機能・進化と疾患感受性. [シリーズ: MHC の比較ゲノム]. *日本組織適合性学会誌.* 14: 9-22.
- 30) Takeshima, S-n., Matsumoto, Y. and Aida, Y. 2009. Establishment of a new PCR sequence-based typing method for genotyping cattle major histocompatibility complex cattle MHC class II DRB3. *J. Dairy Sci.* 92: 2965-2970.
- 31) Takeshima, S-n., Kitamura-Muramatsu, Y., Yuan, Y., Saito, S., and Aida, Y. 2015. BLV-CoCoMo-qPCR-2: Improvements to the BLV-CoCoMo-qPCR by reducing primer degeneracy and constructing an optimal standard curve. *Arch. Virol.* 160: 1325-1332.
- 32) Takeshima, S-n., Watanuki, S., Hiroshi Ishizaki, H., Matoba, K., and Aida, Y. 2016. Development of a direct blood-based PCR system to detect BLV provirus using CoCoMo primers, *Arch. Virol.*, in press.
- 33) Yuan, Y., Kitamura-Muramatsu, Y., Saito, S., Ishizaki, H., Nakano, M., Haga, S., Matoba, K., Ohno, A., Takeshima, S-n., and Aida, Y. 2015. Detection of the BLV provirus from nasal secretion and saliva samples using BLV-CoCoMo-qPCR-2: Comparison with blood samples from same cattle, *Virus Res.*, 210: 248-254.
- 34) Cook LB, Rowan AG, Melamed A, Taylor GP, Bangham CR. 2012. HTLV-1-infected T cells contain a single integrated provirus in natural infection. *Blood.* 120: 3488-3490.

New preventive strategies to protect cattle from bovine leukemia virus

Yoko Aida

Viral Infectious Diseases Unit, RIKEN
2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan
TEL : +81-48-462-4408 FAX : +81-48-462-4399

Abstract

Bovine leukemia virus (BLV) is associated with enzootic bovine leukosis, which is the most common neoplastic disease of cattle. BLV infects cattle worldwide, imposing a severe economic impact on the dairy cattle industry. Recently, we developed a new quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) method using Coordination of Common Motifs (CoCoMo) primers to measure the proviral load of known and novel BLV variants in BLV-infected animals. This BLV-CoCoMo-qPCR enabled us to detect in nasal secretion and saliva samples when the proviral load in the matched blood samples was $>14,000$ (copies/ 1×10^5 cells), indicating that cattle may be considered as a cattle with high risk for BLV transmission. In addition, we developed a high-throughput genotyping; a PCR sequence-based typing (PCR-SBT) method for the identification of alleles of *bovine major histocompatibility complex (BoLA)-DRB3* and identified the *BoLA-DRB3* alleles controlling BLV-induced leukemogenesis and the BLV proviral load. Here we propose new preventive strategies for EBL using methods of BLV-CoCoMo-qPCR to measure the proviral load and PCR-SBT method for identification the *BoLA-DRB3* alleles.

Key words: Bovine leukemia virus, Proviral load, Bovine major histocompatibility complex, Breeding strategy, Vaccine