

氏名	にしうら はやて 西浦 颯
本籍（国籍）	日本
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	獣博第11号
学位授与年月日	令和5年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当 課程博士
研究科及び専攻	獣医学研究科 共同獣医学専攻
学位論文題目	神経病原性鳥白血病ウイルスとその分子クローンの 分子生物学的ならびに病理学的解析
学位審査委員	主査 教授 村上 賢二 副査 教授 落合 謙爾 副査 特任教授 畑井 仁 副査 准教授 吉田 敏則 副査 准教授 村上 智亮

## 論文の内容の要旨

鳥白血病ウイルス (avian leukosis virus; ALV) はレトロウイルス科に分類され、鶏にリンパ性白血病などの造血器系腫瘍を主に誘発するほか、間葉系腫瘍、骨化石症、免疫抑制といった様々な病態を引き起こす。ALV A 亜群 (ALV-A) に属する鶏の神経膠腫誘発ウイルス fowl glioma-inducing virus (FGV) は神経系および心筋細胞に病原性を示し、FGV を鶏胚6日目に接種すると、孵化後35日 (接種して50日) で神経膠腫や小脳低形成、心筋異常、心臓横紋筋腫を誘発する。これら短期間に形成される病変は既知のALV発がんの分子機構 (プロウイルス挿入変異) では説明できず、異なる分子機構が存在すると考えられる。そこで本研究では、ALVの多様な腫瘍原性の分子基盤の解明を目指し、神経膠腫と間葉系腫瘍 (粘液肉腫、心臓横紋筋腫) の両方を誘発するFGVの分子生物学的ならびに病理学的解析を実施した。なお、これまでに多数のFGV変異株が分離されていることから、本稿では国内初発例の同居鶏から分離されたALV株をFGV prototype (FGVp)、その後分離された株をFGV変異株、両者を合わせてFGVと記述する。

第I章では、神経膠腫の国内初発例と血縁のない岐阜の実用鶏に発生した神経膠腫と骨化石症・皮下腫瘍の併発例を検索した。骨化石症は古くからALVとの関連が示唆されているが、神経膠腫との併発例の前例はない。罹患鶏から分離されたALV4株 (GifN\_001, 002, 004, 005) は、ウイルス粒子の表面に存在するエンベロープタンパクをコードするenvSU (高度可変領域を含む) に基づいた分子系統樹解析の結果、既知の3つのクラスター (MAV-1, FGVp, Km/Oki) には属さず、Rous sarcoma virus strain Schmidt-Ruppin B と高い相同性 (94.9~95.9%) を示した。一方で、GifN\_001のenvTMは、FGVpのそれと高い相同性 (94.5%) を示したことから、GifN\_株はFGVpとその他の外来性ALVの組換えにより出現したと考えられる。さらに実験感染によって、GifN\_001は神経膠腫と小脳低

形成を誘発することが証明された。

第Ⅱ章では、神経膠腫と心筋異常を誘発する Km\_5666 株の感染状況を明らかにするため、2017~2020 年にかけて熊本の肥後ちやぼを対象に疫学調査を実施した。その結果、4 羽 (5.6%) に心筋異常が確認された。しかし、これらの罹患鶏では同一個体内に複数の ALV 株が混在していることがわかった。また、Km\_5666 のストックでもわずかながら複数の ALV 株が混在していることが判明した。そこで、感染性分子クローン作製法を確立し、野外例から KmN\_77\_clone\_A, KmN\_77\_clone\_B を作出し、Km\_5666 ストックから Km\_5666\_clone を作出した。ゲノム解析の結果、KmN\_77\_clone\_A と KmN\_77\_clone\_B の *envSU* 以外の領域はいずれも内在性ウイルス *ev-1* に由来する ALV 株、Km\_6249 と近縁なゲノム構造を持っていた。しかし、*envSU* の塩基配列をみると、KmN\_77\_clone\_B の *envSU* が Km\_6249 のそれと高い相同性 (>99.2%) を示したのに対し、KmN\_77\_clone\_A の *envSU* は Km\_5666 のそれと高い相同性 (94.1%) を示した。また、実験感染により Km\_5666\_clone は神経膠腫と心筋の異常の両者を誘発することが証明された。以上の成績から、Km\_5666 の *envSU* およびそれと類似した *envSU* が心臓病原性に関与することが示唆された。本研究で確立した分子クローンの作製法は、複数の ALV が共感染する罹患鶏を対象とした病原性解析に有用な手法と考えられる。

第Ⅲ章では、野外例に感染している心臓病原性 ALV 株をさらに探索するとともに、リアルタイム PCR 法により心筋異常とプロウイルス量との関連を解析した。これまでの研究から ALV による心筋異常の出現頻度と心臓内ウイルス量との相関性が疑われている。そこで、罹患鶏の心臓と脳のコリネ核 1 個当たりの proviral load (プロウイルス量) と神経膠腫および心筋異常の発生頻度を比較した。病理学的に検索した 22 羽中 4 羽 (18.2%) に神経膠腫と心筋異常の併発が確認された。さらにこれら個体の心臓では、心臓病変のない個体の心臓 ( $0.4 \pm 0.4$  コピー/核) に比べて高い proviral load ( $10.3 \pm 2.7$  コピー/核) を示したことから、心臓における proviral load は心筋異常の頻度と相関していることが示唆された。これは proviral load が心臓病原性規定因子となりうることを示している。したがって、本章ではレトロウイルス性心疾患の病理発生を解明する上で有用なプロウイルス定量法を確立することができた。

以上の成績より、神経膠腫の病理発生は、古典的な ALV 関連疾患と異なること、および *envSU* に依存しないことが示唆された。一方で、心筋異常の病理発生は *envSU* が関与すること、および心臓の proviral load が病変形成に関与していることが示唆された。本研究により得られた成果は ALV の多様な病原性と分子進化を理解する上で有用な知見を提供するものである。

## 論文審査の結果の要旨

鳥白血病ウイルス (ALV) はレトロウイルス科に分類され、鶏にリンパ性白血病のほか、様々な病態を引き起こす。ALV A 亜群に属する鶏の神経膠腫誘発ウイルス (FGV) は神経系と心筋細胞に病原性を示し、鶏胚に接種すると約 50 日で神経膠腫や小脳低形成、心筋異常、心臓横紋筋腫を誘発する。これら短期間に形成される病変は既知の ALV 発がん機構 (プロウイルス挿入変異) では説明できない。そこで本研究では、ALV の多様な腫瘍原性の分子基盤解明を目指し、FGV の分子生物学的ならびに病理学的解析を実施した。なお、本研究では国内初発例の同居鶏由来 ALV 株を FGV prototype (FGVp), その後の分離株を FGV 変異株、両者を合わせて FGV と記述する。

第 I 章では、神経膠腫国内初発例とは血縁のない岐阜の実用鶏に発生した神経膠腫と骨化石症・皮下腫瘍の併発例を検索した。骨化石症が神経膠腫と併発した例はこれまでにない。罹患鶏から分離された ALV 4 株 (GifN\_001, 2, 4, 5) は、*envSU* に基づく分子系統樹解析により既知のクラスターには属さず、Rous sarcoma virus strain Schmidt-Ruppin B と高い相同性 (94.9~95.9%) を示した。一方で、*envTM* は FGVp のそれと高い相同性 (94.5%) を示したことから、GifN\_株は FGVp とその他の外来性 ALV の組換えにより出現したと考えられる。さらに実験感染で GifN\_001 の神経病原性が証明された。

第 II 章では、神経膠腫と心筋異常を誘発する FGV 変異株 Km\_5666 の感染状況を明らかにするため、2017~20 年に熊本の肥後ちゃぼを対象に疫学調査を実施した。その結果、4 羽 (5.6%) に心筋異常が確認され、これらの罹患鶏では同一個体内に複数の ALV 株が混在していることがわかった。また、Km\_5666 のストックでもわずかながら複数の ALV 株が混在していた。そこで、感染性分子クローン作製法を確立し、野外例由来 KmN\_77\_clone\_A, KmN\_77\_clone\_B, および Km\_5666\_clone を作出した。これらのゲノム解析と Km\_5666\_clone の実験感染の結果、Km\_5666 の *envSU* およびそれと類似した *envSU* が ALV の心臓病原性に関与することが示唆された。本研究で確立した分子クローン作製法は ALV が共感染した鶏の解析に有用な手法と思われる。

第 III 章では、リアルタイム PCR 法により FGV 誘発心筋異常とプロウイルス量との関連を解析した。罹患鶏の心臓と脳の核 1 個当たりのプロウイルス量と心筋異常および神経膠腫の発生頻度を比較した結果、心筋異常の頻度と心臓内プロウイルス量は相関することが示唆された。本プロウイルス定量法はレトロウイルス性心疾患の解析に有用と思われる。

以上の成績より、神経膠腫の病理発生は既知の ALV 発がん機序と異なり、*envSU* のみに依存しないこと、一方、ALV による心筋異常の形成には *envSU* と心臓内プロウイルス量が関与することが示唆された。本研究により得られた成果は、ALV の多様な病原性と分子進化を理解する上で有用な知見を提供するものである。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岩手大学大学院獣医学研究科共同獣医学専攻の学位論文として十分価値があると認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Neuropathogenicity of newly isolated avian leukosis viruses from chickens with osteopetrosis and mesenchymal neoplasms  
著 者 名 : Nishiura, H., Kubota, I., Kondo, Y., Kachi, M., Hatai, H., Sasaki, J., Goryo, M. and Ochiai, K.  
学術雑誌名 : Avian Pathology  
巻・号・頁・発行年 : 49 (5) : 440-447, 2020

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Yersinia infection in two captive guereza colobus monkeys (Colobus guereza)  
著 者 名 : Nishiura, H., Yamazaki, A., Wakakuri, K., Sasaki, J., Terashima, J. and Ochiai, K.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年 : 81 (8) : 1201-1204, 2019
- 2) 題 目 : Calving-related intradural avulsion injuries of the thoracolumbar spinal nerve roots in a calf  
著 者 名 : Nishiura, H., Jou, S., Ogata, T., Kondo, H., Ichijo, T., Sasaki and Ochiai, K.  
学術雑誌名 : Journal of Veterinary Diagnostic Investigation  
巻・号・頁・発行年 : 32 (6) : 968-971, 2020