

	よねやま しゅうじ
氏 名	米 山 州 二
本籍（国籍）	栃木県
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	獣博第 12 号
学位授与年月日	令和5年9月25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	Bovine Leukemia virus 定量 PCR 法の評価およびプロウイルス量を指標とした高度感染酪農場における清浄化対策に関する研究
学位審査委員	主査 教 授 山 本 健 久 副査 准 教 授 大 松 勉 副査 教 授 一 條 俊 浩 副査 教 授 筒 井 俊 之 副査 教 授 村 上 賢 二

論文の内容の要旨

牛伝染性リンパ腫（EBL）は、bovine leukemia virus（BLV）感染を起因とした悪性リンパ腫であり、発症に至ると数週間から数ヶ月で死亡し、治療法は未だに確立されていない。我が国では1927年に初めて本病が報告され、1998年の家畜伝染病予防法改正に伴い、国への発生報告が義務付けられた。その後、1998年から2001年にかけて発生数は年間200頭以下で推移していたが、2003年には407頭と急増し、2022年には4,334頭と、過去20年で10倍以上の発生数となった。その背景には国内牛群におけるBLV感染牛の増加が関連していると考えられ、被害軽減には国内全域でBLV感染防止対策を推進することが重要である。近年ではリアルタイム定量PCR（qPCR）の開発が進み、血中プロウイルス遺伝子量（PVL）が野外の感染伝播リスクの高い牛の指標として使われるようになり、感染防止対策を進める上で必須の手法となりつつある。現在、国内では3種のqPCRが普及しているが、いずれも異なるBLV遺伝子領域を標的としているため、PVLを根拠とした取組を全国一律で展開するためには、これらqPCRの性質を精査する必要がある。2012年、農林水産省から「牛白血病に関する衛生対策ガイドライン」が公表され、EBL対策の基本的方針として各地域で清浄化対策が進められている。しかし、国内には有病率50%を超える農場も多く、このような高度感染農場でのBLV清浄化は困難な状況にある。そこで、本研究では国内で使用されている3種のqPCRを比較検証することで各検査系の特性を明らかにし、高度感染酪農場においてPVLを指標としたBLV感染伝播リスクの区分けを行い、さらにBLV感受性に関与する牛の主要組織適合抗原クラスII遺伝子（BoLA）型を組み合わせた新たなEBL清浄化対策モデルを開発し、その効果を検証した。

第1章ではBLV感染牛の血液 および EBL 発症牛の腫瘍組織から抽出した DNA を材料として3種のqPCR（BLVの*tax*領域を標的としたCY415および*pol*領域を標的としたRC202ならびに

LTR 領域を標的とした CoCoMo) から得られた PVL と BLV 感染細胞割合を比較し、それぞれの手法の違いを評価した。BLV 野外感染牛 317 頭 から採取した全血試料から DNA を抽出し各種 qPCR を用いて PVL を測定したところ、3 種の qPCR 間でいずれも強い相関が見られたが、CY415 のみ他の 2 種と比較して低 PVL となる検体が散見され、その要因には CY415 が採用するサイクリングプローブ法の配列特異性の高さが影響しているものと推測された。また、各 qPCR で得られた BLV 感染細胞の割合は PVL と強い相関関係があり、感染伝播リスクの指標として活用可能であることを明らかにした。また、RC202 で得られた PVL および BLV 感染細胞の割合は CY415 より有意に高く、CoCoMo で得られた PVL および BLV 感染細胞の割合は RC202 より有意に高いことが明らかになった。と畜場でリンパ腫と診断された腫瘍組織 32 検体中の PVL を測定したところ、CoCoMo では 32 検体中 3 検体、CY415 では 2 検体で他 2 種と比較して低 PVL の検体が確認され、塩基配列解析の結果、CoCoMo では 5' -LTR 領域の全部欠損またはリバースプライマー結合部位の変異と判明した。これらの結果から、血中 PVL 測定に用いる qPCR 法としては RC202 または CoCoMo が、腫瘍組織の PVL 測定には RC202 が適しているものと考えられた。

第 2 章では 30 頭の搾乳牛を飼養する高度感染酪農場 (2015 年 10 月の搾乳牛有病率 82.8%) で対策に取り組んだ。まず、qPCR 法による血中 PVL に加え、主要組織適合抗原である *BoLA-DRB3* アリルを決定後、全 BLV 感染牛の感染伝播リスクを推定し、感染高リスク牛を優先的に淘汰した。と畜場への出荷頭数は 2015 年 10 月～2020 年 5 月にかけて非感染牛 13 頭に対して感染牛 33 頭であった。原則、後継牛は非感染牛に雌の性選別精液を人工授精し、吸血昆虫対策として搾乳牛舎周囲に防虫ネットを設置し農場内パドックでの放牧を中止、搾乳牛舎内の感染牛の飼養区域を完全分離し、感染牛と非感染牛との境界には *BoLA* 型による感染低リスク牛を配置した。その結果、搾乳牛舎における陽転率は年 0～7.7%となり、分離飼育前の 33.3～42.9%と比較して大きく低減した。感染母牛から出生した子牛 11 頭のうち 5 頭が感染牛であり、4 頭の高度感染牛 (1,000 コピー/10 ngDNA 以上) から 3 頭と高頻度に感染子牛が娩出された。また PVL が低値に維持されることに関連するとされる *DRB3*009:02* を保有した BLV 感染牛 1 頭はきわめて低い PVL で推移し、PVL を高値での維持に関連するとされる *DRB3*012:01* または *DRB3*015:01* を保有した感染牛 7 頭は高い PVL を維持した。以上の清浄化対策の結果、当該農場では 4 年半で BLV 清浄化を達成することができた。

本研究により国内で市販される 3 種の qPCR 法の特徴や利用する際の留意点を明らかにするとともに、BLV 高度感染酪農場において qPCR を用いた PVL を指標とした効果的な清浄化モデルを作成することができた。本研究で得られた知見は、全国の家畜保健衛生所および産業動物臨床獣医師など、BLV 清浄化対策関係者へ有益な情報を提供できるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

牛伝染性リンパ腫 (EBL) は、bovine leukemia virus (BLV) 感染を起因とした悪性リンパ腫で、治療法は未だに確立されていない。我が国では 2021 年には 4,375 頭の発生となっており、その背景には国内牛群における感染牛増加が関連していると考えられる。近年、定量 PCR (qPCR) で得られた血中プロウイルス遺伝子量 (PVL) が感染伝播リスク牛の指標として活用されてきている。一方、現在、国内では 3 種の qPCR が普及しており、いずれも異なる BLV 遺伝子領域を標的としているため、PVL を活用した清浄化対策を進めるためには、これら qPCR の性質を精査する必要がある。全国で EBL の清浄化対策が進められているが、高度感染農場での

BLV 清浄化は困難な状況にある。そこで、本研究では現在使用されている 3 種の qPCR を比較検証しそれらの特性を明らかにするとともに、高度感染酪農場において PVL を指標とした感染伝播リスクの区分けや、BLV 感受性に関与する遺伝子型を組み合わせた新たな EBL 清浄化対策モデルを開発し、その効果を検証した。

第 1 章では 3 種の qPCR (BLV の標的遺伝子がそれぞれ *tax* 領域, *pol* 領域, LTR 領域) を用いて、野外感染牛 317 頭 から採取した全血 DNA, と畜場でリンパ腫と診断された 32 頭の腫瘍 DNA について PVL と感染細胞率を測定した。PVL については、3 種の qPCR 間で強い相関が見られた。また、*pol* および LTR qPCR で得られた PVL と感染細胞率は、*tax* qPCR より有意に高かった。腫瘍中の PVL において LTR qPCR では 32 検体中 3 検体で、*tax* qPCR では 2 検体で他と比較して低 PVL の検体が確認され、塩基配列解析の結果、それぞれの検査法のプライマー結合部位の変異を明らかにした。これらの結果、血中 PVL 測定 qPCR 法としては *pol* または LTR 領域が、腫瘍組織 PVL 測定には *pol* 領域が適していることを示した。

第 2 章では高度感染酪農場 (有病率 82.8%) をモデル農場として BLV 清浄化対策に取り組んだ。まず、血中 PVL を測定し感染伝播リスクを推定、感染伝播高リスク牛を優先的に淘汰するとともに、主要組織適合抗原である *BoLA-DRB3* アリルを調査し、原則、後継牛は非感染牛に人工授精、搾乳牛舎周囲に防虫ネットを設置し農場内パドック放牧を中止、搾乳牛舎内の感染牛の飼養区域を完全分離、感染牛と非感染牛との境界には BoLA 型による感染低リスク牛を配置した。試験期間中、非感染牛 13 頭、感染牛 33 頭をと畜場へ出荷した。その結果、陽転率は年 7.7%未満となり分離飼育前と比較して大きく低減し、4 年半で BLV 清浄化を達成できた。

本研究により国内で市販される 3 種の qPCR 法の特徴や利用する際の留意点を明らかにするとともに、BLV 高度感染酪農場において PVL を指標とした効果的な清浄化モデルを開発することができた。本研究で得られた知見は、全国の家畜保健衛生所および産業動物臨床獣医師など、BLV 清浄化対策関係者へ有益な情報を提供できるものと期待される。

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) 著者名 Yoneyama, S., Kobayashi, S., Matsunaga, T., Tonosaki, K., Leng, D., Sakai, Y., Yamada, S., Kimura, A., Ichijo, T., Hikono, H., Murakami, K.
発行年 2022 年
題目 Comparative evaluation of three commercial quantitative real-time PCR methods used in Japan for bovine leukemia virus
学術雑誌名 Viruses
(巻・号・頁) 14・ 1182