



Title	Research for the development of novel control methods for bovine leukemia virus infection [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	西森, 朝美
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第12845号
Issue Date	2017-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67862
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Asami_NISHIMORI_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨
Abstract of the dissertation

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：西森 朝美

Name

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

Research for the development of novel control methods
for bovine leukemia virus infection

（牛白血病ウイルス感染症に対する新規制御法開発のための研究）

牛白血病ウイルス (BLV) はレトロウイルス科に属し、ウシの B 細胞に持続感染して、長い潜伏期間の後に B 細胞性リンパ腫 (地方病型牛白血病: EBL) を引き起こす。ヨーロッパ諸国の一部では、BLV の清浄化を達成し EBL の発生を抑えているが、多くの国々において BLV 感染症の蔓延とそれに伴う畜産業への影響が問題となっている。現在、BLV 感染症に対する有効なワクチンおよび治療法はなく、新たな制御法の開発が強く望まれている。そこで本研究では、BLV 感染症の制御を目的として 3 つの観点から研究を行った。最初に、BLV 感染牛を早期に発見・排除してウイルスの蔓延を防止するため、新たな迅速簡易診断法の樹立を行った。続いて、日本国内で発生している牛白血病発症牛を対象として表現型解析を行い、その免疫学的特徴と現在の発生状況を明らかにした。最後に、これまでの研究から BLV の病態進行への関与が明らかになっている免疫抑制因子、Programmed death-1 (PD-1) およびそのリガンド PD-ligand 1 (PD-L1) または 2 (PD-L2) を標的として、ウシの新規バイオ医薬品を開発して、その有効性を検討した。

第一章：BLV 感染症の迅速簡易診断法として、DNA 試料の抽出を行わず、末梢血検体から直接ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法を行う血液ダイレクト PCR 法(PCR-DB 法) を樹立した。一定量の BLV 感染細胞株を混入させたウシ血液を用いて従来法である nested PCR 法と比較すると、PCR-DB 法は感度こそ従来法に劣るものの高い特異性と再現性を示した。また臨床検体を用いた比較では、PCR-DB 法の感度は 75.5%、特異度は 100%であり、PCR-DB 法で検出されなかった偽陰性検体は全て BLV プロウイルス量が低い感染初期の検体であった。さらに、PCR-DB 法を用いた腫瘍組織検体における BLV 遺伝子の検出に成功し、樹立した PCR-DB 法が多検体のスクリーニングや食肉衛生検査所等での迅速診断に有効であることが示された。

第二章：国内で発生している EBL の実態を調査するために、牛白血病発症牛由来の検体を用いて免疫学的な表現型解析を行った。得られた検体からリンパ球を単離して、細胞表面マーカーの発現、B 細胞クローナリティおよび BLV プロウイルス量を測定して、発症牛を 5 つのグ

グループに分類した。この解析により、これまで明らかでなかった非定型的な EBL、例えばポリクローナルな B 細胞からなるリンパ腫や、若齢牛における EBL の存在が明確に示された。また、5 つのグループのうち B 細胞性リンパ腫である 3 つについて細胞表面マーカーの発現を比較すると、これらの検体では健常牛由来の検体とは異なる特徴的な発現パターンを示すことが分かった。以上から、本研究で示された牛白血病の分類は、国内外における EBL の発生状況の評価、さらには BLV 感染症における腫瘍発生メカニズムの解明に大きく貢献できると考えられる。

第三章：バイオ医薬品として最初に、ウシ PD-L2 の細胞外領域に抗体の Fc 領域を結合させて調製した組み換えタンパク質 (PD-L2-Ig) の免疫賦活効果を検討した。まずウシ PD-L2 の遺伝子配列を同定し、その情報をもとにウシ PD-L2-Ig を作製した。PD-L2-Ig はウシ PD-1 発現細胞に結合性を示し、またこの結合は可溶性 PD-1 によって濃度依存的に阻害されたことから PD-1 特異的であると考えられた。さらに、BLV 感染牛から分離したリンパ球に PD-L2-Ig を添加して培養すると、IFN- γ 産生量や CD3⁺ T 細胞の増殖が促進され、さらに IFN- γ 産生は抗ウシ PD-1 抗体により増強されることが示された。次に、第二のバイオ医薬品として、ラット由来の抗ウシ PD-L1 モノクローナル抗体を改変して、ウシ生体内での安定性を有し長期的な効果が望めるラット-ウシキメラ抗体 (Boch4G12) を作製した。Boch4G12 は改変前の抗体と同様にウシ PD-1 への結合能を有し、PD-1/PD-L1 結合の阻害能も示し、さらに PD-L1 発現細胞との共培養により低下したウシ T 細胞の応答を再活性化できることを確認した。そして Boch4G12 の生体内での抗ウイルス効果を検討するため、BLV を実験感染させた子牛に Boch4G12 を静脈内投与し、BLV 抗原に対する応答やプロウイルス量を評価した。その結果、抗体投与後から BLV 抗原に応答する CD4⁺ T 細胞の割合が有意に上昇し、また BLV プロウイルス量が有意に減少することが示された。以上の結果より、本研究で作製したバイオ医薬品は新たな BLV 制御法として応用できると思われる。

本研究では、BLV 感染症の予防あるいは治療を行うための 3 つの戦略を提示した。感染初期の段階では、迅速診断法を用いた定期的なスクリーニングを行うことで、BLV 感染牛を早期に発見・排除して蔓延を防ぐことができる。腫瘍検体の表現型解析の結果は、白血病を疑うウシが発見された場合に正確な分類・診断を行うための基盤情報を提供しただけでなく、今後、BLV による腫瘍発生の分子機構を解明するうえで有用であると考えられる。またバイオ医薬品の開発は、高泌乳牛や種牛など価値の高い個体に BLV 感染が起こった場合に、病態進行リスクを低減する新たな選択肢としての可能性を示している。今後、さらなる研究により、BLV 蔓延地域におけるウイルス伝播の制御および EBL 根絶の実現が期待される。