HOKKAIDO UNIVERSITY

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_review.pdf, 審査の要旨



Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：　西　森　朝　美

審査委員

主査　教授　　大　橋　和　彦
副査　教授　　鈴　木　定　彦
副査　講師　　長　谷　部　理　絵
副査　准教授　　今　内　覚

学位論文題名

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、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、多くの国々で BLV 感染症の蔓延と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や治療法はなく、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。そして、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、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) とそのリガンド 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。

第一章では、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。従来法の 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。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。

第二章では、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若齢牛における EBL など、非定型的な EBL の存在が示された。また、B 細胞性リンパ腫である 3 つのグループ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判明した。以上より、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貢献できると考えられた。

第三章では、バイオ医薬品の開発を目的として、まずウシ 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換えタンパク質(PD-L2-Ig) の免疫賦活効果を検討した。PD-L2-Ig はウシ PD-1 発現細胞に結合し、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。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、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。第二のバイオ医薬品候補物質として、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、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 結合能や PD-1/PD-L1 結合の阻害能を有し、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した。そして BLV を実験感染させた子牛に Boch4G12 を静脈内投与すると、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した。以上の結果より、本研究で作製したバイオ医薬品候補物質は新たな BLV 制御法として応用できると思われた。

本研究では、BLV 感染症の予防・治療における 3 つの戦略として、1) BLV 感染牛の早期発見・排除を目的とした感染初期段階での迅速診断法を用いた定期的なスクリーニング、2) 腫瘍検体の表現型解析による白血病を疑うウシの正確な分類・診断を行うための基盤情報の提供、そして 3) バイオ医薬品を用いた高泌乳牛や種雄牛など価値の高い個体での病態進行リスクの低減のための新たな選択肢の確立、を提示した。

本研究は、近年、その発生が増加し、畜産業において大きな問題となっている BLV 感染症の迅速診断や新規防除法の確立に向けて、有用な知見を提供している。よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者西森朝美氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第６条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。