

神経病原性を示すトリレトロウイルスの分子系統解析

学位論文内容の要旨

トリの神経膠腫 (fowl glioma) は非化膿性髄膜脳炎を背景に星状膠細胞が多発性結節性に増殖する鶏の疾患で、国内では 1995 年に動物園で飼育されていた日本鶏に初発例が発見された。その後、罹患鶏の脳乳剤を接種された鶏に同様の脳病変が再現され、これら罹患脳からトリ白血病毒 (avian leukosis virus; ALV) が分離された。この分離ウイルスは干渉試験およびウイルスゲノムの塩基配列の解析により、これまでに知られていない ALV A 亜群 (ALV-A) の一株であることが明らかになり、トリの神経膠腫誘発ウイルス (fowl glioma-inducing virus; FGV) として報告された。FGV は神経系に病原性を示すトリレトロウイルスであることから、FGV の持つ神経病原性規定因子の解明はヒトを含めた動物のレトロウイルス性神経疾患の理解に有用と考えられる。これまでの知見から、トリ白血病では ALV のプロウイルスが持つ long terminal repeat (LTR) により *c-myc* の転写が促進され、B リンパ球が腫瘍化すると考えられている。また、ALV の *env* は亜群による各組織への腫瘍原性を規定しうることが推察されている。こうした ALV の発癌機序を考慮すると、FGV ゲノムの *env* 内 SU コード領域および LTR は ALV-A 標準株のそれと大きく異なることから、FGV の *env* および LTR の両者あるいはその一方が神経系への病原性に関与すると推察される。一方、最近になって採卵鶏の頭頸部皮下に間葉系腫瘍が多発し、この原因として ALV-A 感染が疑われている。その後、これら皮下腫瘍罹患鶏の中から神経膠腫併発例が見出されたが、採卵鶏に発生した神経膠腫の形態学的特徴ならびに病原因子についてはいまだ十分に解明されていないままである。以上の背景を踏まえ、本研究では FGV の拡散状況および採卵鶏の神経膠腫の病原因子を明らかにするために、polymerase chain reaction (PCR) を応用した FGV の生前診断法の確立、国内初発例を生産した A 動物園とこの動物園から日本鶏を分与された動物園 3 ヲ所の鶏の FGV 感染状況、PCR 陽性鶏から分離された ALV の分子系統解析、ならびに皮下腫瘍罹患採卵鶏に発生した神経膠腫の病理学的解析および分離ウイルスの分子生物学的解析を実施した。

第 I 章では 3' 非翻訳領域 (untranslated region; UTR) 内の FGV 特異配列を増幅するプライマーを設計して nested PCR および reverse transcription (RT)-nested PCR を用いた生前診断法を確立した。これらと市販の ELISA キットを併用し、本疾患の国内初発例の供給元である A 動物園の日本鶏 131 羽の FGV 感染率を

調査した。検索した鶏の 52 羽 (39.7%) が nested PCR 陽性であった。これら PCR 陽性鶏のうち調査後に死亡した 9 羽の脳を病理組織学的に検索したところ、9 羽全てが神経膠腫と診断され、脳組織を用いた nested PCR でも陽性が確認された。さらに、陽性となった鶏のうち 4 羽について PCR 検出領域の塩基配列を解析した結果、FGV と高い相同性 (92 ~ 94%) を示した。以上の成績から、羽髄を用いた PCR による FGV の検出法はトリの神経膠腫の疫学的研究に有用であることが示唆された。

A 動物園は設立当時から日本鶏の系統維持に取り組み、他の動物園へ日本鶏を供給していることから、これら動物園に FGV が拡散していることが推察された。そこで、第Ⅱ章では有精卵または個体を分与された国内 3カ所の動物園の鶏計 129 羽について nested PCR, RT-nested PCR および ELISA を用いて FGV の感染率を調査した。動物園別に見ると 26 ~ 56% の鶏が nested PCR 陽性となった。さらに、検索した個体から分離されたウイルス 14 株の塩基配列解析を行った。その結果、3' UTR に含まれる PCR 検出領域の塩基配列は FGV と 92 ~ 93% 相同で、FGV と近縁であることが明らかになった。一方、分離株のうち 3 株の *env* には変異や欠失が頻繁に生じていることがわかった。これらの成績から、国内の動物園に FGV 変異株が蔓延していることが示唆された。

2003 年以降、国内の採卵鶏に多発している頭頸部皮下の間葉系腫瘍の原因は ALV-A と推察されている。その後、これら皮下腫瘍罹患鶏の中に神経膠腫併発例が発見された。そこで、第Ⅲ章では採卵鶏に見出された神経膠腫の病理組織学的特徴とこれらの病原ウイルスを明らかにするため、皮下腫瘍罹患鶏 18 羽と同居鶏 222 羽の脳を検索した。検索した鶏 240 羽のうち 103 羽で非化膿性脳炎、4 羽で瀰漫性あるいは小結節性の星状膠細胞の増殖が認められた。皮下腫瘍を形成していた 11 羽と同居鶏 3 羽に神経膠腫が認められ、これらのうち 2 羽に過去の報告例とは異なる小型円形細胞の増殖が観察された。しかし、nested PCR では神経膠腫罹患脳から FGV は検出されなかった。そこで、これら罹患脳から 10 株の ALV を分離し、*env* と 3' UTR の塩基配列を解析した。分離株の *env* 内 SU コード領域は Myeloblastosis associated virus-like virus と最も相同性 (99%) が高かったが、TM 領域は内因性レトロウイルスである *ev* locus との相同性 (95%) が最も高かった。また、3' UTR は ALV-J との相同性 (93 ~ 94%) が最も高かった。分離株の一つである TymS_90 のゲノム全長を解析した結果、TymS_90 はトリ白血病・肉腫ウイルスに由来する遺伝子領域を 4 つ持っていたが、これら以外の多くの部分は *ev* locus により構成されていた。以上の成績から、FGV のほかにも神経膠腫を誘発するリコンビナント ALV, TymS_90 が存在し、国内の採卵鶏に拡散していることが明らかとなった。

以上の成績から、本研究によって国内の動物園で飼育されている鶏に FGV およびその変異株が蔓延していることが明らかになった。また、これら FGV 変異株により誘発される脳病変は FGV によるものと同質であったことから、これらのゲノムの共通部分に神経病原性を規定する領域が存在すると推察された。さらに、採卵鶏に発生した神経膠腫は病理組織学的に FGV による神経膠腫とは異な

る小型円形細胞の増殖が認められること、分子生物学的には FGV とは起源の異なるリコンビナント ALV, TymS_90 が関与することが明らかとなり、神経膠腫の原因 ALV は複数存在することが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 梅 村 孝 司
副 査 教 授 高 島 郁 夫
副 査 准教授 大 橋 和 彦
副 査 准教授 落 合 謙 爾

学 位 論 文 題 名

神経病原性を示すトリレトロウイルスの分子系統解析

トリの神経膠腫は星状膠細胞が多発性結節性に増殖する鶏の疾患で、A 型トリ白血病ウイルス (ALV-A) に属するトリの神経膠腫誘発ウイルス (FGV) に起因する。FGV は神経系に病原性を示すことから、FGV の持つ神経病原性規定因子の解明はレトロウイルス性神経疾患の理解に有用と考えられる。一方、最近になって採卵鶏の頭頸部皮下に間葉系腫瘍が多発しており、これら皮下腫瘍罹患鶏の中から神経膠腫併発例が見出された。以上の背景を踏まえ、申請者は FGV の拡散状況および採卵鶏の神経膠腫の病原因子を明らかにするために、polymerase chain reaction (PCR) を応用した FGV の生前診断法の確立、国内初発例を供給した A 動物園とこの動物園から日本鶏を分与された動物園 3カ所の鶏の FGV 感染状況、PCR 陽性鶏から分離された ALV の分子系統解析、ならびに採卵鶏に発生した神経膠腫の病理学的解析および分離ウイルスの分子生物学的解析を行った。

初めに、3' 非翻訳領域 (UTR) 内の FGV 特異配列を増幅するプライマーを設計して nested PCR を用いた生前診断法を確立した。これらと市販の ELISA キットを併用し、A 動物園の日本鶏 131 羽の FGV 感染率を調査した。検索した鶏の 52 羽 (39.7%) が nested PCR 陽性であった。PCR 陽性鶏のうち調査後に死亡した 13 羽の脳を病理組織学的に検索したところ、12 羽に病変が認められ、脳組織を用いた nested PCR でも陽性が確認された。さらに、陽性例のうち 4 羽について PCR 検出領域の塩基配列を解析した結果、FGV と高い相同性 (92~94%) を示した。以上の成績から、羽髄を用いた PCR による FGV の検出法はトリの神経膠腫の疫学的研究に有用であることが示唆された。

次に、A 動物園から有精卵または個体を分与された国内 3カ所の動物園の鶏計 129 羽について上記の生前診断法および ELISA を用いて FGV の感染率を調査した。動物園別に見ると 26~56% の鶏が nested PCR 陽性となった。さらに、検索した個体から分離されたウイルス 14 株の塩基配列解析を行った。その結果、PCR 検出領域の塩基配列は FGV と 92~93% 相同で、FGV と近

縁であることが明らかになった。一方、分離株のうち 3 株の *env* には変異や欠失が頻繁に生じていた。これらの成績から、国内の動物園に FGV 変異株が蔓延していることが示唆された。

2003 年以降、国内の採卵鶏の皮下に間葉系腫瘍が多発した。これら皮下腫瘍罹患鶏の中に神経膠腫併発例が発見された。そこで、採卵鶏に見出された神経膠腫の病理組織学的特徴と病原因子を明らかにするため、皮下腫瘍罹患鶏 18 羽と同居鶏 222 羽の脳を検索した。103 羽で非化膿性脳炎、4 羽で瀰漫性あるいは小結節性の星状膠細胞の増殖が認められた。皮下腫瘍を形成していた 11 羽と同居鶏 3 羽に神経膠腫が認められ、これらのうち 2 羽に過去に報告のない小型円形細胞の増殖が観察された。しかし、nested PCR では神経膠腫罹患脳から FGV は検出されなかった。そこで、これら罹患脳から 10 株の ALV を分離し、*env* と 3' UTR の塩基配列を解析した。分離株の *env* 内 SU コード領域は Myeloblastosis associated virus-like virus と最も相同性 (99%) が高かったが、TM 領域は内因性レトロウイルスである *ev* locus との相同性 (95%) が最も高かった。また、3' UTR は ALV-J との相同性 (93 ~ 94%) が最も高かった。分離株の一つである TymS_90 のゲノム全長を解析した結果、トリ白血病・肉腫ウイルスに由来する遺伝子領域を 4 つ持っていたが、これら以外の部分は *ev* locus により構成されていた。以上の成績から、FGV のほかにも神経膠腫を誘発するリコンビナント ALV, TymS_90 が存在し、国内の採卵鶏に拡散していることが明らかとなった。

以上の成績から、国内の動物園に FGV およびその変異株が蔓延していることが明らかになった。また、変異株により誘発される脳病変は FGV によるものと同質であったことから、これらのゲノムの共通部分に神経病原性を規定する領域が存在すると推察された。さらに、採卵鶏に発生した神経膠腫では FGV 感染例とは異なり、小型円形細胞の増殖を伴うことがあったこと、FGV とは異なるリコンビナント ALV, TymS_90 が関与することが明らかとなり、神経膠腫の原因 ALV は複数存在することが示唆された。本研究成果は神経病原性を示すトリレトロウイルスの病原性規定因子に関する基礎的研究として有意義である。よって、審査員一同は、上記博士論文提出者畑井仁の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規定第 6 条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。