

第 65 回 獣医疫学会学術集会シンポジウム
牛伝染性リンパ腫に対する新たな取り組みについて
講演 1

牛主要組織適合性複合体と EBL の感染，発症と予防

間 陽子*

東京大学大学院農学生命科学研究科 地球規模感染症制御学講座

Impact of Bovine Major Histocompatibility Complex on Infection, Symptom Onset and Prevention of Enzootic Bovine Leukosis

Yoko AIDA*

Laboratory of Global Infectious Diseases Control Science, Graduate School of
Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

Summary

Enzootic bovine leukosis (EBL) is a malignant B-lymphoma caused by bovine leukemia virus (BLV) and causes serious problems for the cattle industry. EBL is a typical multifactorial disease in cattle, and host, viral, and environmental factors are thought to determine susceptibility. One of the most important host factors is the polymorphism of the major histocompatibility complex (MHC) (BoLA). Several studies have identified genetic variations in *BoLA-DRB3*, a functionally important locus and the most highly polymorphic BoLA class II locus in cattle. To date, 386 *BoLA-DRB3* alleles have been registered in the Immuno Polymorphism Database- MHC database. Importantly, the *BoLA-DRB3* polymorphism influences susceptibility to BLV-induced lymphoma, and to proviral load (PVL) which is an important risk factor of virus-associated disease prediction.

In Japan, where BLV is widespread, we have proposed three new methods of EBL prevention using *BoLA-DRB3* polymorphism as a marker, adding a new perspective of “individual differences in disease susceptibility” to conventional EBL control measures to promote BLV eradication while minimizing economic losses. (1) “Innovative and integrated BLV eradication strategies” to prevent new infection by resistant cattle with resistant *BoLA-DRB3* alleles that place between the BLV-positive and BLV-negative cattle, and actively eliminate susceptible cattle with susceptible *BoLA-DRB3* alleles in addition to conventional BLV eradication strategies. (2) “Breeding strategy” to create a population of cattle that are resistant to the disease onset and low provirus levels, and (3) “Vaccine development” targeting susceptible cattle to decrease proviral load and BLV disease progression, thereby suppressing transmission and reducing the infection rate. This presentation will introduce a new strategy to control EBL using *BoLA-DRB3* polymorphism as a marker.

【はじめに】

牛伝染性リンパ腫（EBL）は，牛伝染性リンパ腫ウイル

ス（BLV）によって惹起される悪性 B リンパ腫であり，畜産業に甚大な経済的被害をもたらしている。しかし，有効な治療法やワクチンが存在しないため，BLV の感染率と発症率は増加の一途をたどっている。

EBL はウイルス側の要因に加えて，宿主側の遺伝的要因と環境要因が複雑に絡み合って発症する“多因子性疾患”であるため，BLV による癌化には複数の宿主要因の関与が想定される。その一つとして，主要組織適合性複合体（MHC）が挙げられる。MHC は魚類から哺乳類まで，脊椎動物で広く認められている分子であり，ヒト MHC は

連絡先：間 陽子*

東京大学大学院農学生命科学研究科農学国際専攻
地球規模感染症制御学講座
〒153-0041 東京都目黒区駒場 4-6-1 東京大学 駒
場Ⅱキャンパス 生産研内 駒場オープンラボラト
リー 205 号室
Tel : 03-5452-5762 ; Fax : 03-5452-5738
E-mail : yoko-aida@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

Human leukocyte antigen (HLA), ウシは Bovine leukocyte antigen (BoLA) と呼称される。MHC の最大の特徴は、他には類をみない高度な多型性を持つ点であり、結果として免疫応答と疾患感受性の個体差をもたらす。ヒトでは自己免疫疾患を初めとする 100 にも及ぶ疾患、ウシでは乳房炎、EBL、タイレリアおよびウイルス性下痢症等の発症と MHC との相関性が報告されている。最近我々は、BoLA クラス II 領域の中で最も多型に富み、386 種類のアレルが報告されている *BoLA-DRB3* 遺伝子を標的として、プロウイルス量が低値を示し発症し難い“抵抗性牛”と、反対の“感受性牛”の存在を発見した。

BLV が蔓延している我が国において、経済的損失を最小限に抑えながら BLV の清浄化を進めてゆくためには、これまでの EBL 対策に“疾患感受性の個体差”という新たな視点を加えて、*BoLA-DRB3* をマーカーにした 3 つの新しい EBL 制圧戦略を提唱している。(1) 抵抗性牛を生物学的防壁として活用する陽転阻止と感受性牛の特定による BLV 伝播高リスク牛の排除を同時に進めることで、感染牛と非感染牛を混合飼育しながらでも BLV 陽転率を最大限に抑制可能なより広範な農家で実施できる「革新的清浄化対策」、(2) 抵抗性アレルを活用することで、より発症し難い、さらにプロウイルス量が上昇しない牛集団を作出する「育種戦略」、あるいは (3) プロウイルス量の低下による伝播の抑制や感染率の低下を可能とする感受性牛を標的とした「ワクチン開発」である。本総説では、この BoLA をマーカーとした EBL の新しい制圧戦略について紹介する。

【リンパ腫発症に対する抵抗性牛と感受性牛の同定】

BLV は主に医原性や吸血昆虫による感染牛の血液を介した水平感染や、子宮・胎盤・産道・乳汁を介した垂直感染等で感染が拡大する。BLV 感染牛は大きく三つの病態を示す。(1) 感染牛の約 70% は長期間臨床症状を示さない無症候キャリアー、(2) 30% は B 細胞が増加する持続性リンパ球増多症 (PL)、そして、(3) 約 2-5% のみが B 細胞性の白血病/リンパ腫を発症する。しかし、この個体差の原因は長い間不明であった。そこで、BoLA の最大の特徴である高度な多型性が様々な疾患の感受性を規定している点に着目し、BoLA クラス II 遺伝子領域で最も多型に富む *BoLA-DRB3* 遺伝子のタイピング法の確立し、全国から収集した大量の BLV 感染材料を解析した結果、リンパ腫発症に対して感受性と抵抗性に作用する *BoLA-DRB3* アレルを発見した¹⁾。さらに、ヒツジ感染・発症モデルを用いた BLV 感染実験に成功し、抵抗性アレルを有する個体はウイルスに対する高い免疫反応の結果として、ウイルス増殖が著しく抑制されるためリンパ腫発症に至らないとい

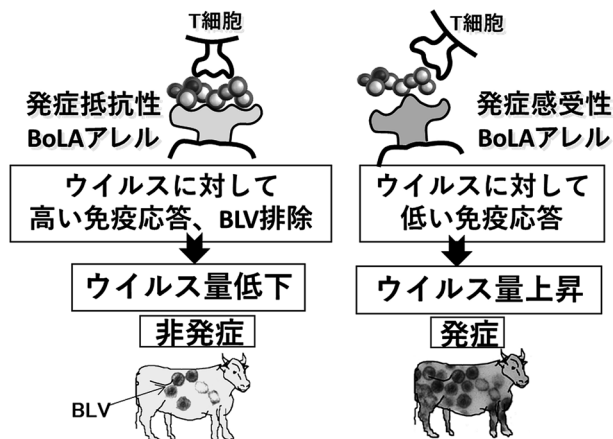


図 1 牛伝染性リンパ腫発症を規定する *BoLA-DRB3* アレルの発見とその機序の解明。感染・発症ヒツジモデルを用いた BLV 感染実験に成功し、さらにウシの感染実験の結果を加えて、抵抗性アレルを有する個体はウイルスに対する高い免疫反応の結果として、ウイルスが排除されるためリンパ腫発症に至らないという機序を解明し、*BoLA-DRB3* の多型性が BLV 発症を規定する事実を検証した。

う機序を解明し²⁾、BoLA クラス II 遺伝子の多型性が BLV 発症を規定する事実を検証した (図 1)。

【プロウイルス量に対する抵抗性牛と感受性牛の同定】

BLV は感染後、プロウイルスとして一生体内に存在し続ける。プロウイルスのコピー数は、プロウイルス量 (PVL) と呼称され、BLV の病態進行や感染性と相関していることが知られている。我々は既知と未知の全ての BLV 株の PVL を定量可能な日本初の遺伝子診断薬となったリアルタイム PCR 法 (BLV-CoCoMo-qPCR 法) を開発し³⁾、大量の野外サンプルを解析した。その結果、PVL は BLV の感染性・伝播性、体内分布、病態進行やリンパ球数の増加と相関していることが明らかとなった³⁻⁵⁾。農水省が打ち出した「牛白血病に関する衛生対策ガイドライン」では、PVL を指標とした隔離・淘汰の順位付けを推奨しているが、PVL は変動しやすいために、検査時点で一過性に PVL が上昇しただけの個体から更新してしまう危険性がある。そこで我々は *BoLA-DRB3* タイピングを行い、感受性牛と抵抗性牛を特定して PVL と遺伝的素因と総合的に判断することで、その危険性を低下させることができると考え、発症に続いて、PVL を制御する *BoLA-DRB3* アレルを同定した^{1,3)}。

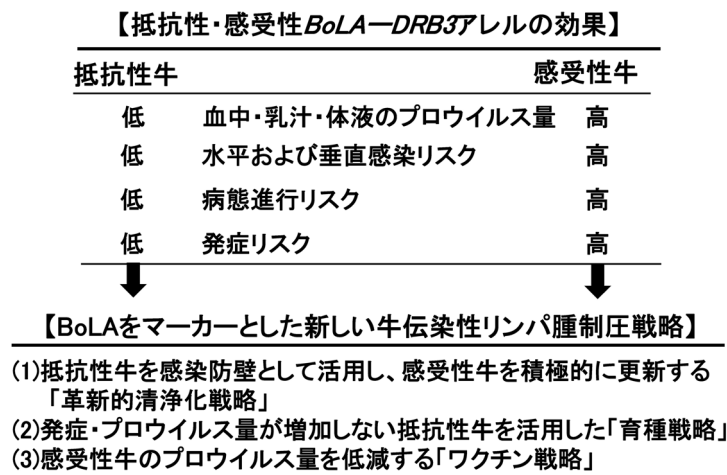


図 2 抵抗性・感受性 *BoLA-DRB3* アレルの効果（上段）とそれをマーカーとした新しい牛伝染性リンパ腫制圧戦略（下段）

【抵抗性牛と感受性牛の特徴】

BoLA-DRB3 多型に基づく発症とプロウイルス量に対する抵抗性牛と感受性牛の特徴を明確にするために、野外牛の全国規模での解析を進めた。興味深いことに、抵抗性アレルを有する抵抗性牛は発症リスク、病態進行、血中と乳汁のウイルス量、BLV の体内分布、感染力価、水平および垂直感染リスクが低く抑えられ、感受性アレルを有する感受性牛はその反対に作用するという特質を世界で初めて明確にすることができた（図 2）。本章では、一部のデータについて紹介する。

(1) 水平感染における抵抗性牛と感受性牛の相違

関東地方 5 農場の全頭検査を実施することで、水平感染における *BoLA-DRB3* 多型が及ぼす影響を明らかにした。抵抗性アレル保有牛の PVL は感受性アレル保有牛に比較して有意に低値を示した⁶⁾。さらに、179 頭の追跡調査を 2017 年から 2019 年の 3 年間にわたり実施し BLV の感染性を評価した⁶⁾。感受性牛は抵抗性牛および中立性牛よりも強い BLV 感染性を示し、その強さは感受性牛 > 中立性牛 > 抵抗性牛の順であった。さらに、BLV 感染力は血中 PVL と強い正の相関を示し、BLV に感染した感受性牛は感染力が強く水平伝播のリスクが高いが、BLV に感染した抵抗性牛は感染力が弱く BLV 伝播のリスクは低いことを立証できた。このように、*BoLA-DRB3* 多型は BLV の水平感染リスクと深く関与していることを立証できた。

次に、BLV 感染実験を実施したところ、抵抗性アレルを有する個体は少なくとも 196 日間までプロウイルス量が上昇しなかったが、感受性アレルを有する個体は高いプロウイルス量を維持するという結果を得た。

以上の結果から、感受性牛は、抵抗性牛とは反対に、強い感染性と高プロウイルス量を持っており、次への感染源となる危険性が高く、農場の感染率を上昇させ続ける一因となることが強く示された（図 2）。

(2) 垂直感染における抵抗性牛と感受性牛の相違

垂直感染における *BoLA-DRB3* 多型が及ぼす影響を 5 酪農場 120 組の母子ペアの *BoLA-DRB3* 多型を特定し調査した。BLV 陽性母個体 96 頭中 29 頭（30%）が BLV に感染した子を出産したが、抵抗性アレルを持つ子個体はすべて BLV に感染していなかったのに対し、感受性アレルを持つ子は 30% が感染していた（ $p=0.016$ ）⁷⁾。また、BLV 感染母牛が陽性子牛を出産する割合は、感受性母牛では 38% であったが、抵抗性母牛では 19% であり、より低いことが明らかとなった⁷⁾。このことは、感受性牛の垂直感染率が抵抗性牛に比べて高いことを明確に示している（図 2）。

(3) 鼻汁・唾液・乳汁等の体液中のプロウイルス量における抵抗性牛と感受性牛の相違

続いて、農場内での感染個体との接触において汚染源となる危険性が高い鼻汁および唾液といった体液からプロウイルスを検出できる技術を確認し、これまで不可能だった鼻汁および唾液の PVL を定量することに成功した。興味深いことに、血中 PVL が $18,000$ コピー/ 10^5 細胞および $14,000$ コピー/ 10^5 細胞を超過した個体から鼻汁および唾液にプロウイルスが検出され始めたことから、このような個体はウイルスを体外に排出し牛群の感染源になりやすいが、逆にそれ以下を示した低 PVL の個体は他の牛へ水平伝播させる可能性が低いことが考えられた⁴⁾。

また、体液の一つであり垂直感染の原因ともなる乳汁中

のブrouウイルス検出率およびPVLについても *BoLA-DRB3* 多型が影響を与えるのかを評価した。乳汁中のブrouウイルス検出率およびPVLについて、感受性牛（検出率 60.8% および平均 PVL62 コピー/ 10^5 細胞）は抵抗性牛（検出率 19.0% および平均 PVL7 コピー/ 10^5 細胞）より有意に高いことが分かった⁸⁾。さらに、感受性アレルをホモで持つウシは最も乳汁中PVLが高く（平均 PVL128 コピー/ 10^5 細胞）、抗性アレルをホモで持つウシは最も乳汁中PVLが低かった（平均 PVL0 コピー/ 10^5 細胞）⁸⁾。同一個体の乳汁中PVLを3年間にわたり経時的に解析したところ、少なくとも2回の検査においてブrouウイルスが検出された個体は、感受性牛の乳汁では12/13（92.3%）と高く、抵抗性牛の乳汁では1/5（20.0%）と低いことが分かった⁸⁾。また、血中と乳汁中のPVLは強い相関を示し、血中PVLが11,000 コピー/ 10^5 細胞以上の個体では乳汁中にブrouウイルスが検出され始めるが、逆に11,000 コピー/ 10^5 細胞以下の個体では検出されなかった⁸⁾。次に、*BoLA-DRB3* 多型が乳汁の感染性についても影響を与えるのかをTax応答性レポーター細胞を用いた蛍光発光シンシチウム法（LuSIA）により、感受性牛9頭および抵抗性牛6頭の乳汁細胞を用いて評価した。感受性牛の乳汁においてBLV特異的な蛍光シンシチウムが確認され、乳汁中の細胞に感染性があることが世界で初めて明らかとなった⁸⁾。さらに、感受性牛では9頭中5頭（56%）が陽性で、抵抗性牛で7頭すべてが陰性（0%）となり、感受性牛の乳汁は抵抗性のそれに比較して、感染性リスクが高いことが明らかになった（図2）。

【BoLAをマーカーとした新しい牛伝染性リンパ腫制圧戦略】

我が国において、経済的損失を最小に抑えながら清浄化を成功させるための戦略として、農林水産省のEBLに関する衛生対策ガイドラインに加えて、図3にまとめた抵抗性牛と感受性牛の特質を生かした3つの新しい予防対策を提唱している。この3つ戦略を同時に行うことで、ブrouウイルス量の低下により感染率が低下し、最終的にBLVの清浄化が実現可能であると考えている。

(1) 感受性・抵抗性牛を利用した「革新的清浄化対策」

農場内でのBLV感染拡大の大きな要因となる感染個体との直接接触を減らすために、感染牛と非感染牛の「分離飼育」や「空房を設けた配置転換」が推奨され、一定の成果が得られている。しかし、小規模な農家ではスペースを確保できないところが多く、その解決策として、抵抗性の遺伝的素因を有するウイルス遺伝子量が一生にわたって上昇しない“抵抗性牛”を、図3に示すように陰性牛とBLV感染牛の間に配置して、新たな陽転を防ぐ生物学的な防壁として活用することで、感染牛からBLV陰性牛

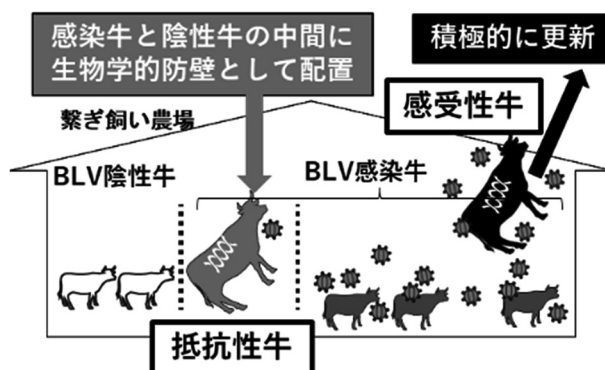


図3 感受性・抵抗性牛活用した「革新的清浄化対策」。抵抗性牛を防壁として活用する新規陽転阻止と感受性牛の優先的更新を同時に進めることで、感染牛と非感染牛を混合飼育しながらでもBLV陽転率を最大限に抑制可能な対策。

へのBLV新規陽転を限りなくゼロに近づける戦略である。これは、抵抗性アレルである *BoLA-DRB3*009:02* を保有する低いブrouウイルス量を持った抵抗性牛を、BLV陰性牛群の中に加えて20ヶ月間に渡って飼育しても、陰性牛を一頭も陽転させなかったというアルゼンチンの実験⁹⁾や低PVLを示す個体からはアブによる水平伝播が起らないという岩手大学の村上らの報告から裏付けられる。一方、感受性 *BoLA-DRB3* アレルを有し、継続的に高PVLを示し続ける感受性牛を選定し、優先的な更新を同時に進めることで、感染率の低減効率を最大化する戦略である。このように、抵抗性牛の活用による陽転の阻止と感受性牛の特定による継続的なBLV伝播高リスク牛の排除を同時に進めることで、感染牛と非感染牛を混合飼育しながらでもBLV陽転率を最大限に抑制可能な戦略は、BLVの清浄化対策を多くの農場に広く普及させると考えられる。

上述の仮説を証明するために、関東地方の5つ農場を対象にして、2017年から2019年の3年間に渡って、抵抗性牛をBLV感染牛と陰性牛の間に配置して新規陽転を防ぐ防壁として活用し、一方、感受性牛を積極的に淘汰更新する革新的清浄化戦略を実行した。5農場の中の4農場で感染率とブrouウイルス量の低減効果に成功し、さらに様々なBLV対策を講じても効果が見られなかった5農場中2農場で清浄化を達成した。結果として、5農場で約824万円の被害低減効果が推定され、全国で290億円の経済効果が予測された¹⁰⁾。

(2) 抵抗性牛を活用した「育種戦略」

抵抗性アレルを有する個体は、リンパ腫発症に至らないという事実は、抗病性品種確立のための分子基盤を提供した。そこで、大分県農水指導センター藤田達男博士らとの

共同研究で雌牛のアレルに関わらず次世代に抵抗性アレルを引き継ぐ抵抗性アレル型種雄牛の作出に成功した。2015年8月26日に、牛白血病（当時の疾病名）に抵抗性ということで、「白帝隆（はくていりゅう）」が誕生した（図4）。これにより、抵抗性アレルの頻度を増加させることにより、発症し難い、さらにプロウイルス量が上昇しない育種集団が確立されれば、EBL 発症と BLV 伝播の抑制ができる事が期待されるのみならず、(1) で提案したような、抵抗性アレルを有する個体を用いた清浄化戦略に使用可能な抵抗性牛の市場への提供源としても有用であると考えら



白帝隆 2015.8.26誕生

図 4 感受性・抵抗性牛を活用した「育種戦略」。雌牛のアレルに関わらず次世代に抵抗性アレルを引き継ぐことが可能な抵抗性アレル型種雄牛の改良生産に成功。

れる。

(3) 感受性牛を標的にした「ワクチン戦略」

これまでに多くの試みがなされてきたが、ウシ自体の遺伝的な抵抗性や感受性によりワクチン効果が大きく異なり、ワクチンの効果を示さないウシが多く存在することから、未だ BLV ワクチンの開発は成功していない。そこで、ワクチンが実用化されない原因の一つである個体差に着目し、ワクチンの効果の得られにくい感受性 *BoLA-DRB3* アレルを有する感受性牛に細胞性免疫を誘導可能なワクチン開発に挑戦してきた²⁾。本稿で述べてきたように、感受性牛は発症率が高く、高プロウイルス量のため感染源にもなりやすいことから、感受性牛にターゲットを絞ったワクチン開発は、EBL の治療や病態の進行を制御すること、PVL の激減による BLV 感染率を低下させることが可能となる。事実、これまでに我々は、インシリコ分子設計とナノ技術を駆使した牛白血病ペプチドワクチンの開発により感受性牛の PVL の上昇を激減させることに成功した¹⁰⁾（図5）。さらに、感受性牛に加えて抵抗性と中立牛のエピトープを含む新規ウイルス様粒子ワクチンを開発し、感受性牛の PVL の低減効果に加えて、感受性・抵抗性・中立性牛の全てに対して抗体の誘導にも成功した¹⁰⁾。

【おわりに】

この *BoLA* をマーカーとした戦略が広く汎用されるためには、抵抗性と感受性 *BoLA-DRB3* 遺伝子の経済形質への影響と他の感染症に対する疾患感受性を明らかにすること

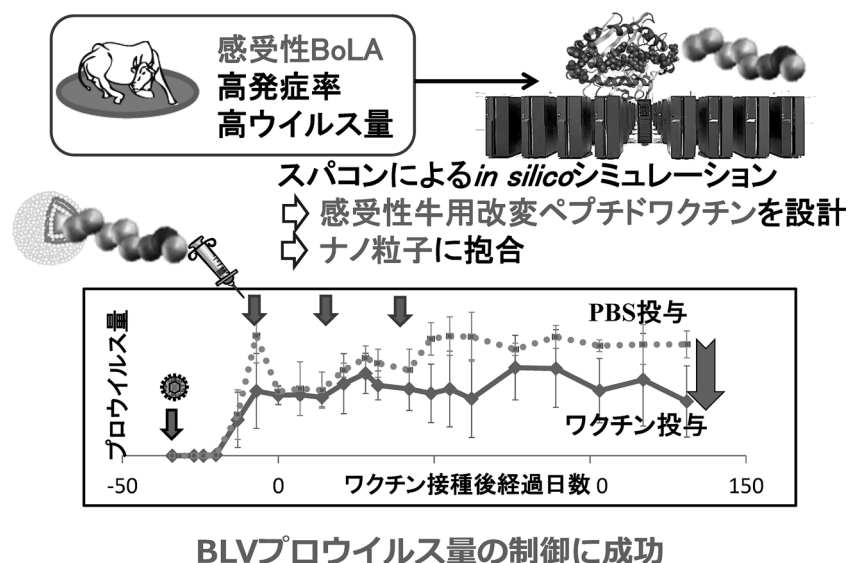


図 5 感受性・抵抗性牛の BLV 対策への応用。革新的清浄化対策 (A) 感受性 *BoLA-DRB3* アレルを持つ感受性牛に強い細胞性免疫を引き起こすワクチンを開発することで、プロウイルス量の抑制による感染拡大の防止、病態進行の阻止や感染防御が可能。

が望まれる。また、EBLは病原体、宿主側の遺伝的要因と環境要因が複雑に絡み合って発症が規定される多因子性疾患であり、*BoLA-DRB3* 遺伝子だけでは、BLV感受性・抵抗性を100%の的中率で判別できない。そこで、我々は新技術を用いて様々な発症関連遺伝子の同定を進め、より精度の高い発症予測を可能とする牛伝染性リンパ腫の『総合的発症予知診断基準パネル』の策定・実用化を進めている。

最後に、本稿で述べた感受性・抵抗性牛を利用した「革新的清浄化対策」の有効性が実証された。さらに現在開発中のワクチンが完成した暁には、ワクチン、育種と清浄化対策の組み合わせによって、世界的に蔓延し、近年その経済的被害が次々に明らかになってきているBLVの清浄化が実現することを期待したい。

【謝 辞】

本稿で述べた実験結果は、多くの共同研究者との共同研究により得られたものであり、心から厚く深謝致します。なお、本研究は科学研究費補助金、農研機構生研支援センター「イノベーション創出基礎的研究推進事業」・「革新的技術開発・緊急展開事業（うち地域戦略プロジェクト）」・「革新的技術開発・緊急展開事業（うち経営体強化プロジェクト）」・「革新的技術創造促進事業（異分野融合共同研究）」、農林水産省戦略的監視診断体制整備推進事業（牛白血病診断用試薬の配布）、公益財団法人伊藤記念財団大型研究プロジェクト事業、および公益財団法人全国競馬・畜産振興会畜産振興事業の支援を受けて行われたものであり、この場を借りて深謝致します。

参考文献

- 1) 間 陽子ら：特集 牛白血病ウイルス (BLV) に対する理研の挑戦, BLV 抵抗性・感受性の診断技術と新しい牛白血病制圧戦略. 獣医畜産新報, **70** (12), 901–908, 2017.
- 2) 竹嶋伸之輔ら：特集牛白血病ウイルス (BLV) に対する理研の挑戦, BLV のワクチン開発. 獣医畜産新報, **70** (12), 909–916, 2017.
- 3) 竹嶋伸之輔ら：牛白血病対策の新技術に迫る (1) BLV-CoCoMo-qPCR 法による BLV の診断と BLV 伝播リスク因子の検索. 臨床獣医, **34** (11), 34–40, 2016.
- 4) 竹嶋伸之輔ら：牛白血病対策の新技術に迫る (2) BLV-CoCoMo-qPCR 法による BLV 伝播リスクの評価. 臨床獣医, **34** (12), 30–35, 2016.
- 5) 竹嶋伸之輔ら：牛白血病対策の新技術に迫る (最終回) 直接血液から BLV プロウイルスを検出できる BLV-CoCoMo-direct-PCR 法と新しい牛白血病制圧戦略. 臨床獣医, **35** (1), 45–53, 2017.
- 6) Bai L, *et al.* : Kinetic study of BLV infectivity in BLV susceptible and resistant cattle in Japan from 2017 to 2019. *Pathogens*, **10** (10), 1281, 2021.
- 7) Borjigin L, *et al.* : Risk assessment of bovine major histocompatibility complex class II DRB3 alleles for perinatal transmission of bovine leukemia virus. *Pathogens*, **10** (5), 502, 2021.
- 8) 中土亜由美, 間 陽子：ウシ主要組織適合性複合体が牛伝染性リンパ腫ウイルスの乳汁を介した感染に及ぼす影響と感染対策. 日本組織適合性学会誌, 印刷中, 2025.
- 9) Juliarena *et al.* : Hot topic: Bovine leukemia virus (BLV)-infected cows with low proviral load are not a source of infection for BLV-free cattle. *J. Dairy Sci.* **99**, 4586–458, 2016.
- 10) Borjigin, L. *et al.* : Effectiveness of integrated bovine leukemia virus eradication strategies utilizing cattle carrying resistant and susceptible histocompatibility complex class II DRB3 alleles. *J. Dairy Science*, **106**, 9393–9409. 2023.