

# ウシ生体内におけるウシ白血病ウイルス感染初期応答の解析

(国研) 農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門ウイルス・疫学研究領域・研究員 西森 朝美

## ■ 目的

ウシ白血病ウイルス(BLV)は現在国内で広く蔓延しているレトロウイルスで、一部の感染牛に致死的な白血病を引き起こす。BLVに感染すると生涯ウイルスを保有するキャリアとなるため、農場でのBLV対策では新規感染の防止が重要であり、感染個体の早期発見が求められる。しかし、現行の検査法ではBLVが感染成立してから検査陽性となるまでにウィンドウ期と呼ばれる長いタイムラグがあり、農場における陰性確認検査に時間を要する、BLV陽性牛の発見が遅れるといった問題が生じている。この問題を解決するため、本課題ではBLVが感染初期に盛んに複製され新規感染を起こすことに着目し、実験感染牛において感染からより早期に検出できるウイルス因子(ウイルス由来RNA)の探索を行い、ウィンドウ期を短縮できる検査手法の確立を試みる。

## ■ 方法

ホルスタイン牛3頭にBLV感染細胞を $1 \times 10^5$ 細胞/頭で皮下接種し、経時的に採血してウイルス関連因子の検出時期を評価した。血液より分離した末梢血単核球からゲノムDNAを抽出し、BLV検出リアルタイムPCRキットでプロウイルス量を測定した。血清を分離し、ELISAキットを用いて抗BLV抗体の検出を行った。循環血液中の感染細胞におけるウイルスRNAの発現を評価するため、採血直後の血液検体から白血球分離・RNA抽出を行い、RT-nested PCR法によりウイルスRNAを検出した。また、ウイルスRNAの発現を誘導した状態での発現量を評価するため、全血培養法による刺激培養を実施した。血液を $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 、LPS存在下または非存在下で24時間培養し、白血球分離・RNA抽出を行ってウイルスRNAの発現量をRTリアルタイムPCR法により定量した。また、比較対照として血液を $4^\circ\text{C}$ に静置した非培養条件を設定し解析を行った。

## ■ 結果および考察

現行の検査法であるBLVプロウイルスおよび抗BLV抗体の検出時期を評価したところ、プロウイルスは感染21日目または28日目から検出可能となり、感染42日目～49日目にピークとなった後にコピー数が緩やかに減少する個体(2頭)と維持される個体(1頭)に分かれた。一方、抗BLV抗体の産生時期に関しては個体差が大きく、感染49日目、63日目、および84日目にそれぞれ陽性となった。

採血直後の白血球から抽出したRNAを鋳型としてウイルス遺伝子の発現を解析したところ、循環血液中の感染細胞では感染初期においてもほとんどウイルスRNAを発現していないことが明らかになった。検出感度の向上を目的に全血培養法による刺激培養を行った結果、非培養条件と比較してウイルスRNAの発現は十分に増強されたものの、検出時期としては現行法であるプロウイルスDNAと同程度(感染21日目)であり早期検出には至らなかった。BLVをはじめとするデルタレトロウイルス属のウイルスでは、感染初期においてウイルスRNAの複製を伴う新規感染によって感染拡大を起こし、慢性期には感染細胞の分裂による拡大に移行することが報告されている。しかし本研究の結果から、BLVは血液中で検出可能となる時点ですでに強い潜伏状態を確立していることが示唆された。

## ■ 結語

本課題で得られた結果は、BLV感染症における複雑な感染拡大様式を解明するための手がかりになると考えられる。今後さらに研究を進め、感染初期におけるウイルス動態を詳細に解析するとともに、農場でのBLV対策に応用できる技術を確立していく必要がある。