

東京農業大学

学位論文

牛伝染性リンパ腫ウイルスの系統進化学的研究

Phylogenetic and Evolutionary Analysis of
Bovine Leukemia Virus

2022年

東京農業大学大学院 農学研究科

西角 光平

目 次

第一章	緒言	1
第二章	日本における牛伝染性リンパ腫ウイルスの発生と拡散の歴史	12
	Ⅰ. 序論	13
	Ⅱ. 材料および方法	15
	Ⅲ. 結果	20
	Ⅳ. 考察	25
	Ⅴ. 図表	32
第三章	PCR-RFLP 法を用いた 牛伝染性リンパ腫ウイルスの遺伝子型判別手法の検討	44
	Ⅰ. 序論	45
	Ⅱ. 材料および方法	48
	Ⅲ. 結果	52
	Ⅳ. 考察	55
	Ⅴ. 図表	57
第四章	総括	61
	Summary	66
	謝辞	71
	引用文献	74

第一章

緒言

第一章 緒言

牛伝染性リンパ腫（Enzootic Bovine Leukosis：EBL）は牛伝染性リンパ腫ウイルス（Bovine Leukemia Virus：BLV）感染に起因する牛の疾病で、B細胞の異常増殖と悪性リンパ腫を主徴とする¹⁾。本疾病の発症率は数%程度と低いですが、BLV感染牛の多さから、EBLの発生頭数は日本で年間4,300頭（2021年）を超えている。EBL発症に伴う予後不良や生産性の低下により、日本の畜産業に大きな被害をもたらす。1998年に家畜伝染病予防法における監視伝染病（届出伝染病）に指定された本疾病は、届出伝染病に指定されている牛のウイルス性疾病の中では、死亡数・発生数ともに最も多く、家畜衛生上の重要な疾病の一つである²⁾。日本のように詳細な発生数が把握されていないものの、EBLは国際獣疫事務局（OIE）によって国際貿易上重要性の高い疾病のリストに指定されていることから、世界的にも無視できない疾病と位置づけられている^{3,4)}。ヨーロッパの多くの国では、国家的プロジェクトとして感染牛の積極的な淘汰事業により清浄化を達成しているが、その他地域においては依然として発生が相次いでおり、さらなる被害が懸念される。

BLVはレトロウイルス科オルソレトロウイルス亜科デルタレトロウイルスに属しており、ヒトT細胞白血病ウイルス（Human T cell Leukemia Virus：HTLV）と近縁のウイルスである⁵⁾。約8,720 bpのプロウイルスゲノムを持つ一本鎖RNAウイルスであり、エンベロープを有するウイルス粒子の直径は100~120 nmで、正十二面体構造をとる^{6,7)}。BLVのプロウイルスゲノムの両

端には long terminal repeat (LTR) 領域を有し、構造タンパク質や酵素をコードする遺伝子 (*gag*: コアタンパク質、*pro*: 酵素類、*pol*: 逆転写酵素および *env*: エンベロープ)、少なくとも 4 つの制御タンパク質をコードする遺伝子 (Tax, Rex, R3 および G4) で構成されており、さらに miRNA およびアンチセンス RNA (AS1 および AS2) もコードしている⁸⁾ (図 1)。この BLV をはじめとするレトロウイルスには、感染細胞のゲノムにウイルス自身のゲノムを挿入する特有の機構がある。BLV が宿主細胞へ侵入すると、逆転写酵素 (*pol*) を利用して自身のゲノム RNA を二本鎖 DNA (プロウイルス) に変換し、その後、感染細胞のゲノムに組み込まれる⁹⁾。一度感染するとウイルスは体内から生涯排除されないため、BLV に感染した牛は、常に感染状態にある持続感染牛となる。BLV 感染牛はその後いくつかの病態をとることが知られている。

BLV に感染した牛のほとんどは、臨床症状を示さない無症状キャリアーとして生涯を終える¹⁰⁾。無症状キャリアーは生産性にほとんど影響をきたさない。次に、感染牛の約 30% がリンパ球数の増加による持続性リンパ増多症を呈する。無症状キャリアー同様に臨床症状はあまり示さないが、血液中のプロウイルス量が多く、無症状キャリアーに比べて他の牛に感染させる状態にあるため、農場内においては常に重要な感染源となる^{10,11,12)}。一方、数年の潜伏期間を経た後に、感染牛の数%において全身のリンパ節や臓器が腫瘍性に増大する EBL を発症する¹⁰⁾。EBL 発症牛は、主に眼球突出、削瘦、元気消失、各臓器・組織のリンパ腫形成などの症状を呈し、予後不良で死に至る^{5,10)}。EBL 発症牛のほとんどは、出荷された際にと畜場において発見され、と畜場法および

食品衛生法に基づき、と体は全部廃棄となる。また、EBL 発症牛は繁殖障害や、免疫力の低下に伴う他の疾病を罹患する可能性が高まるため、畜産農家における経済的損失の要因となり、大きな問題となっている。

BLV は、ウイルスに感染したリンパ球を含む血液、体液および乳汁によって伝播され、非感染牛にそれらが移入することによって感染が成立する¹³⁾。主な感染源として、除角・耳標装着・去勢・削蹄・直腸検査・注射などの出血を伴う処置で使用した器具の使い回し、アブやサシバエなどの吸血昆虫による媒介が知られている¹⁴⁾。また、初乳および子宮内・産道を介して感染することも報告されており、BLV の重要な感染経路の一つである¹⁵⁾。現在、本疾病に対する効果的なワクチンおよび治療法は存在しないことから、BLV 感染防止対策は一般的には「牛白血病^注に関する衛生ガイドライン」（注：本疾病の旧名称）に従って、飼養者および家畜保健衛生所などの関係者が一体となり取り組んでいる。有効な対策としては主に、定期的な抗体検査、感染牛の早期更新、感染牛の隔離、防虫ネット、初乳の加温・凍結などが挙げられる¹⁶⁾。しかし、対策にかかるコスト・労力は農家にとって大きな負担となり、さらに対策効果が目に見えて表れるには長期を有するため、対策に苦慮している農家は多い。EBL 発生件数は年々増加傾向を示していることから、BLV 感染拡大を防ぐことは容易でないことがわかる。

EBL の最も古い記録は、今から約 150 年前の 1871 年のドイツの文献において、ドイツ北部および東プロイセンのメーメル地方（現リトアニア・クライペダ）の牛に、脾腫を伴う黄変結節病変がみられた、という記載である¹⁷⁾。次いで、1873 年および 1876 年にもドイツにおいて EBL と思われる詳細な症例報

告があった^{18,19)}。当時は発生地域が限られており、地方病的な様相をみせていたことから、地方病型牛白血病と呼ばれるようになった。その後 1900 年代初頭に東欧から北欧、ついにはヨーロッパ全域から発生が報告されるようになった²⁰⁾。そして、現在までにアジア、アフリカ、北アメリカ、南アメリカおよびオセアニアの全ての地域から EBL の発生報告がされている²¹⁾ (図 2)。しかしながら、ヨーロッパの一部およびオセアニアでは、BLV 感染牛が比較的少ない時点において抗体検査による定期的な BLV 感染検査を実施し、国主導の積極的な淘汰事業をおこなったことにより、現在では EBL 発生がほとんどない²²⁾。一方、北アメリカ、南アメリカおよびアジアにおいては、BLV 感染牛の割合が高いため、感染牛の淘汰といった方策をとることはあまりにも大きな経済的損失になると想定されるため難しく、BLV 感染牛および EBL 発生数は現在も増加し続けている²²⁾

日本における EBL の初報告は 1927 年にまで遡る。岩手県においてカナダから輸入したホルスタイン種雄牛がリンパ節の腫脹を示し、死亡したことが「淋巴肉腫の一例」という報告に記されている²³⁾。その後、東北地方を中心に発生の報告が相次ぎ、1970 年代以降には本州東北以南や九州でも確認されるようになった^{24,25,26)}。1980 年には家畜衛生試験場により、初めての大規模な全国調査が行われた²⁷⁾。この調査では、陽性牛のいる農家を中心に検査対象としたため、全国的な感染率としては正確性を欠いている部分もあると考えられるが、全国平均の抗体陽性率は乳牛で約 4%、肉用牛で約 6%と報告された。この調査では 41 都道府県で陽性牛が報告されたことから、1980 年には全国的に BLV の拡散が起こったと考えられる。発生数の増加を受けて、EBL は 1998

年に家畜伝染病予防法において届出伝染病に指定され、毎年の発生頭数が国に報告されるようになった。届出件数は、1998年に99頭であったが、2012年には約20倍に、2021年には約40倍にあたる4,368頭にまで増加しており、全ての都道府県で発生が報告されている²⁾(図3)。2010年には、動物衛生研究所により、30年ぶりに大規模な血清疫学調査が行われた²⁸⁾。この調査では全国の家畜保健衛生所管内の農場から統計的背景を考慮して検体を抽出し、全国の感染率を算出している。その結果、全国平均では乳牛で40.9%、肉牛で28.7%が抗体陽性であることが報告され、国内においてBLVが拡大傾向にあることが明らかとなった。

BLVにはこれまでの系統解析および疫学的研究において、遺伝子配列の違いによりいくつかの遺伝子型が存在することがわかっている。これらの研究では*env*遺伝子、特に*env-gp51*領域に着目している。*env*遺伝子には、BLV粒子の表面に局在している表面糖タンパク質gp51と膜貫通タンパク質であるgp30の2つの糖タンパク質がある。脂質2重層からなるウイルス膜を有するBLVは、宿主細胞へ侵入する際に、ウイルス膜と宿主細胞膜との膜融合の過程を必要とし、特にgp51はウイルスレセプターの認識および免疫回避を担当する領域で、BLVのライフサイクルにおいて重要な役割を担っている。多様性に富むため、BLVに系統学的分類の指標として一般的に利用されている。この*env-gp51*を用いたこれまでの疫学的研究では、少なくとも1-10型のBLV遺伝子型が報告されている。疫学調査が進むに伴い新しい遺伝子型が同定されており、近年では南米やアジアにおいて新しい遺伝子型が次々と確認されている^{29,30)}。1型は最も一般的であり、世界的に分布している。その他の遺伝子型に

は地理的特異性がみられ、2 および 9 型は南米、4,7,8 型は主にヨーロッパ、6 および 10 型はアジアと南米で確認されている。日本では世界中で流行している 1 型と、アメリカおよび韓国で検出される 3 型の 2 つの遺伝子型が分布していることがわかっている²¹⁾。BLV の感染には感染リンパ球などの物理的接触が必要であるため、遺伝子型の地域特異性と BLV 感染牛の移動・貿易には関係性があると考えられている。

近年、遺伝子配列解析技術と系統進化学的手法の著しい発展により、ウイルスのゲノム情報からその進化過程と拡散経路を解析する分子疫学的研究が進んでいる。家畜に大きな被害を与えるウイルスとして口蹄疫ウイルス、豚熱ウイルス、鳥インフルエンザウイルスおよびブルータングウイルスなどが、ヒトに感染するウイルスとしてヒト免疫不全ウイルス、インフルエンザウイルスおよびエボラウイルスなどがよく研究されており、これらのウイルスの起源、進化過程（分岐年代）および拡散経路などが明らかにされている³¹⁻⁴³⁾。これらの研究から、ウイルスの拡散はヒト・家畜・野生動物の移動と深く関与していることが示された。このような研究はウイルス学だけでなく、ヒトの集団構造、民族学および社会・政治学的にも非常に重要な知見となる。実際に、種々のウイルスのゲノム情報は、地域・年・宿主などの情報と共にデータベースに蓄積されており、過去の流行や進化過程、そして将来的な流行予測に活用されている⁴⁴⁻⁴⁶⁾。

感染症の流行に対策を講じる際に、まず初めに「どんな病原体」が「いつから」どういった「経路」で感染を広げているのかを解明することが重要である⁴⁹⁾。家畜感染症の原因ウイルスの地理的分布、拡散時期・経路、集団動態が明

らかとなれば、ウイルス・家畜の移動および病原性などの重要な知見を得られ、動物防疫や効果的な防除方法開発などの発展に大きく貢献することが期待される。

前述の通り、BLV においては遺伝子型が地域特異性を示していることは明らかとなっているが、拡散経路や進化などの議論はあまりされていない。一方、日本国内で EBL に次いで発生数の多い牛ウイルス性下痢症の原因である牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) や、BLV と同じレトロウイルスで主に緬羊に被害を与える小型反芻獣レンチウイルス (SRLV) において、系統進化的解析が実施されたことにより詳細な拡散時期や経路が近年明らかとなっている^{47,48)}。近年の国際流通の活発化によって、感染症は急速な国際化をみせており、畜産業だけでなく公衆衛生的にも大きな問題に発展している。そのため、BLV においても、詳細な拡散時期や経路を解析し、その背景を理解することは、今後の対策に向けて大きな知見になると考えられる。

そこで本研究では、BLV のゲノム情報と疫学情報 (採取年・採取場所) を用いた系統進化的解析を行うことにより、BLV の時間尺度 (分岐年代) を推定し、どのようにして世界および日本へ拡散したのかを明らかにすることを目的とした。第一章では、1972 年から 2000 年に作製されたホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本から得られた BLV ゲノムと、データベースに登録されている BLV ゲノム情報を用いた *phylodynamic* 解析により、BLV の分岐年代および日本国内における BLV 動態の歴史的変動を明らかにした。第二章では、迅速かつ正確に、BLV の遺伝子型の疫学情報を提供するために、遺伝子配列の決定を必要としない新規の PCR-RFLP 法の検討を行った。ゲノム情報を

用いた BLV の系統進化学的解析結果を、EBL の発生記録や近代畜産の発展などの背景と合わせて、EBL の発生と拡散の歴史について考察した。

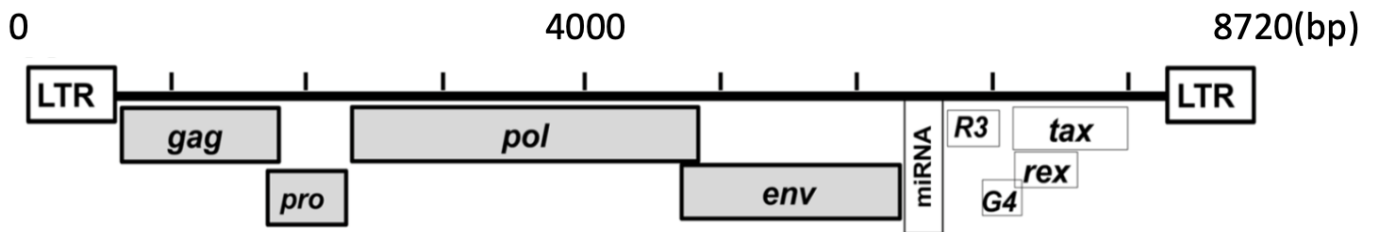
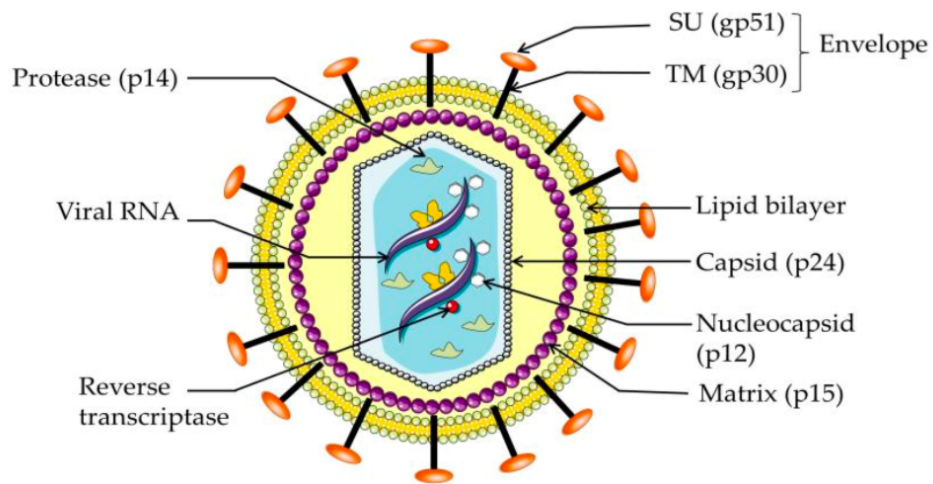


図 1. 牛伝染性リンパ腫ウイルスの粒子と構造

Barez *et al.* 2015 一部改変

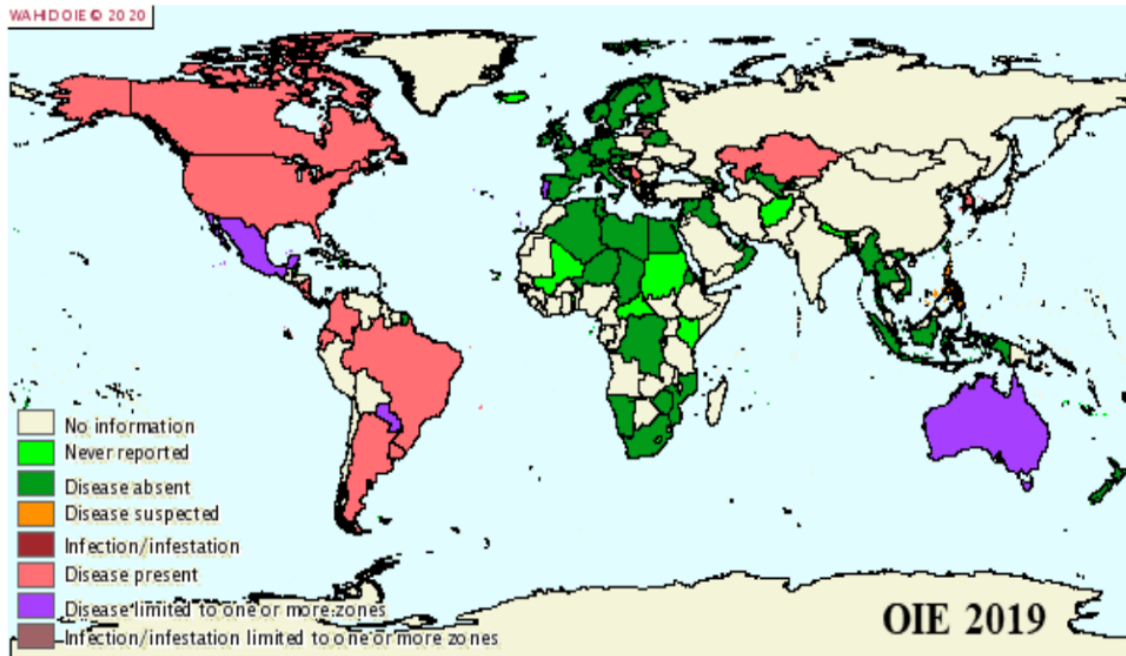


図 2. 世界の EBL 発生状況（2019 年）

OIE, World Animal Health Information Database より引用・改変

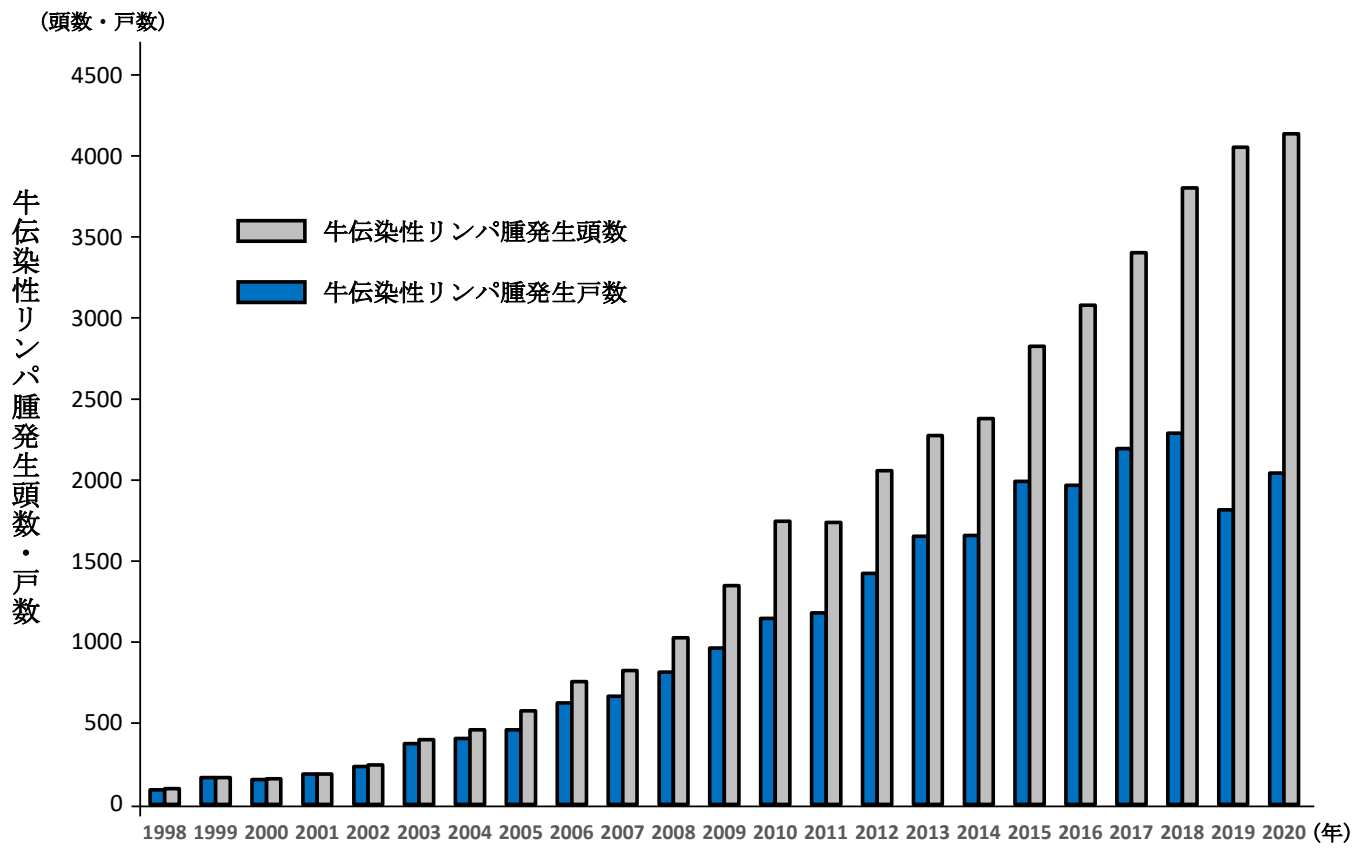


図 3. 日本における牛伝染性リンパ腫の届出数の推移（1998-2020 年）

農林水産省 監視伝染病の発生状況より引用

第二章

日本における牛伝染性リンパ腫ウイルスの 発生と拡散の歴史

第二章 日本における牛伝染性リンパ腫の発生と拡散の歴史

I. 序論

日本における牛伝染性リンパ腫の初報告は1927年にまで遡る。岩手県においてカナダから輸入したホルスタイン種雄牛がリンパ節の腫脹を示し、死亡したことが「淋巴肉腫の一例」という報告に記されている²³⁾。この種雄牛は、1917年生まれであり、7歳の時に日本に輸入され、9歳でEBLを発症し、翌年死亡したと記録されている。二例目の報告は、1933年に秋田県の乳牛がEBLを発症したというものである⁵⁰⁾。その後しばらくは発生報告はなく、三例目以降の報告は第二次世界大戦後となる。戦後の記録としては、1950年からの集計があり、1953年、1954年に2頭ずつ、その後も1957年から毎年のようにEBLの発生が報告されている⁵¹⁾。つまり、EBLの発生が多発するようになったのは岩手県における初報告から約30年後の1957年以降であるといえる。特に、岩手県では1970年代から年間10例を超えるようになり、1973年および1975年は年間20例以上と、顕著な増加傾向がみられた。岩手県以外にも、青森県十和田地方において1968年から1971年に21頭、神奈川県横浜市では1968年から1982年に22頭、さらに大分県では1970年代に年間13頭がEBLを発症したと報告されている²⁴⁻²⁶⁾。1980年に初めて実施された家畜衛生試験場による全国調査では、全国平均の抗体陽性率は乳牛で約4%、肉牛で約6%と報告された²⁷⁾。2010年の全国調査では、全国平均で乳牛で40.9%、肉牛で28.7%が抗体陽性であった²⁸⁾。さらに年間EBL発生件数は2021年には4,368頭にまで増加している²⁾ (図3)。これらの結果から、日本では戦後から

1980年代の間に全国的な EBL（つまりは原因となる BLV）の拡散が起こったと考えられるが、その詳細は明らかになっていない。

BLV の多様性を調べるために多くの研究において系統学的解析が行われているが、これらは遺伝子型を判別するためで、進化学的な解析や議論は全くされていない。系統進化学的解析による時間尺度（分岐年代）を推定する際には、**Coalescent theory**（合祖理論）に基づいて行うのが有用である。これは、現在の集団から得た系統樹を遡って、その集団がどのような進化（進化史）を経て形成されたものなのかを推定する手法である。ある程度多様性のある遺伝子配列を用いて推定を行うのが好ましいが、日本国内で報告されている中で最も古い遺伝子配列は 1985 年であり、その他の遺伝子配列はほとんどが 2000 年代以降に解析された比較的最近流行している BLV である。これらの遺伝子配列は相同性が非常に高いため、分子系統進化学的解析において過去の詳細な進化の道筋を辿るのは困難である。

そこで本研究では、1972 年から 2000 年の間に EBL と診断された牛のホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）標本に着目し、日本における流行初期の BLV 遺伝子配列の解読を試みた。また、データベースおよび FFPE 標本から得た BLV 配列情報（検体採取年代と採取地域）を用いて、BLV の分岐年代推定および日本における初期の BLV 発生に関するレトロスペクティブな分子系統進化学的解析を行い、BLV の発生と拡散の歴史について考察した。

II. 材料および方法

1. EBL 発症牛のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本

全国の家畜保健衛生所および食肉衛生検査所（北海道網走家畜保健衛生所、北海道根室家畜保健衛生所、千葉県中央家畜保健衛生所、千葉県東総食肉衛生検査所および岩手県中央家畜保健衛生所）に保管されている、EBL 発症牛 28 頭の FFPE（ホルマリン固定パラフィン包埋：Formalin Fixed Paraffin Embedded）標本を供試した（表 1）。これらの FFPE 標本は EBL と診断された牛のリンパ節や腫瘍組織に由来するものであり、1972 年～2000 年に作製され、室温で保管されていた（1970 年代：10 検体、1980 年代：8 検体、1990 年代：9 検体、2000 年：1 検体）。これらの検体がリンパ腫由来であることを確認するために、5 μm の厚さに薄切した切片を、45°C で 2 時間インキュベートした後、ヘマトキシリン・エオジン（HE）で染色した。

2. DNA 抽出

FFPE 標本のリンパ節・腫瘍組織部位を外科用メスブレードで薄切した後、キシレンおよびエタノールを用いた脱パラフィン処理とフェノール・クロロホルム法による DNA 抽出を行った。まず、1 mL のキシレンを加え、10,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上澄みを除去した。これらの手順をさらに 1 回繰り返した。続いて、100%エタノールを 1 mL 加えて 10,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上澄みを除去した。このステップをさらに 1 回繰り返し、ペレットを真空乾燥機で乾燥させた。次にタンパク質を除去するため、675 μL の TE

(pH9.0) 、75 μ L の 10% SDS、18.8 μ L の Proteinase K (20 mg/ μ L) を加え、48°C で 24-48 時間、振とう (800 rpm) しながらインキュベートした。その後、75 μ L の 10% SDS と 18.8 μ L の Proteinase K (20 mg/ μ L) を加え、24-48 時間、振とうしながらインキュベートした。500 μ L の TE 飽和フェノールを加え、3,000 rpm で遠心分離した後、ペレットを乱さずに上清を新たな 1.5 mL チューブに移した。これらの手順をさらに 1 回繰り返した。その後、500 μ L のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) を加え、3,000 rpm で 5 分間遠心分離した後、ペレットを乱さずに上清を 15 mL チューブに移し替える。この工程を 2 回繰り返した。その後、16 μ L の 5M NaCl と 1 mL の 100%エタノールを加え (上清 400 μ L に対して) 、室温で一晩インキュベートした。サンプルを 12,000 rpm で 30 分間遠心分離し、上澄み液を除去した。続いて、80%エタノール 1 mL を加え、12,000 rpm で 30 分間遠心分離し、乾燥させた。最後に 25 μ L の DW を加え、DNA と溶液を静かに混合した。

3. BLV プロウイルス (*env*-gp51 領域) の増幅と塩基配列決定

BLV のエンベロープ遺伝子 (*env*) のうち、可変領域である表面糖タンパク質 gp51 領域 (903bp) を標的とした PCR により、BLV プロウイルスゲノムを増幅した。BLV *env*-gp51 の保存領域にアニールするように設計した 8 つのオーバーラップする Primer set を用いた (図 4) 。PCR は、Expand High Fidelity PCR System (Roche, Basel, Switzerland) を用いて行った。Master Mix には、dNTP Mix (200 μ M) 、各プライマー (各 300 nM) 、Templete

DNA (<500 ng)、15 mM MgCl₂、Expand High Fidelity Enzyme Mix (1.9 U/反応) を混合した。反応条件は、まず 94°C 2 分の初期熱変性ステップを行い、続いて 94°C 15 秒、55°C 30 秒、72°C 45 秒を 1 サイクルとして 45 回サイクル実施し、その後 72°C 7 分の最終伸長を行った。PCR 反応後、増幅産物を 2 %アガロース S (ニッポンジーン、東京) ゲルで電気泳動し、BLV *env-gp51* (903bp) が増幅されていることを確認した。増幅を確認した PCR 産物は、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて精製し、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した (株式会社ファスマック、神奈川)。得られたシーケンスデータは Sequencer5.2.4 (Gene Codes, Ann Arbor, MI, USA) ソフトウェアを使用して、波形データの編集とアッセンブルを行い、最終的な塩基配列を得た。

4. 分子系統解析

採取年・採取場所の情報を有する BLV *env-gp51* (903 bp) 配列データを GenBank/EMBL/DDBJ データベースから合計 193 配列 (代表的な配列) 取得した (表 3)。これらの配列を MEGA7 に実装されている ClustalW により、本研究で得られた 8 つの FFPE 配列とアラインメントした。MEGA7 の Find best DNA/Protein models (ML) による Akaike 情報量基準 (AIC) に従って、最適な塩基置換モデルを選択した。選択された Kimura-2 parameter model plus gamma distribution (K2+G) モデルを用いて、最尤 (ML) 法により BLV *env-gp51* の系統樹を推定した⁵²⁾。系統樹の信頼性は、ノンパラメトリック・ブートストラップ解析により 1000 回のランダムサンプリングで推定し

た。本研究で用いた BLV *env-gp51* 配列の採取年と変異量に相関があるかどうかを検討するために、TempEst を用いて回帰分析 (Root-to-tip regression 解析) を行った⁵³⁾。

5. 分岐年代および集団動態の推定

ベイジアン MCMC 法に基づいた BEAST v2.4.8 を用いて、BLV の系統進化的解析を行った。分岐年代には最も近い共通祖先までの時間 (time of the most recent common ancestor : tMRCA) を、集団動態には Bayesian skyline analysis の Bayesian skyline plot (BSP) による有効集団サイズをそれぞれ推定した⁵⁴⁾。これらの Coalescent 理論に基づいており、ウイルスの流行の歴史を再構築するための系統学的手法として非常に有効で、起源、共通祖先の年代および個体群動態を推定することができる。tMRCA と有効集団サイズを推定するには、BEAST v2.4.8 に実装されている Relax model を用いて、Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) 法で解析を行った。ベイジアン MCMC の系統樹推定に最適な塩基置換モデルは、MEGA7 の BIC に基づいて選択した⁵²⁾。最適な BIC 値を示した Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) モデルを本解析に用いた。また、分子時計モデルでは 2 つの Relax model (Relax clock exponential と Relax clock log normal) と 4 つの統計モデル (2 つのパラメトリック事前分布 ; Coalescent constant population と Coalescent exponential population、2 つのノンパラメトリック事前分布 ; Coalescent extended skyline と Coalescent Bayesian skyline) の中から Tracer v1.5 を用いて、ベイズ因子 (BF) 検定と AICM (Akaike's information criterion for

MCMC) 値に基づいて、最適なモデルを選択した⁵⁵⁾。BF と AICM による分析の結果、Relax clock log normal よりも Relax clock exponential の方がデータに適した分子時計であることが分かった。Relax clock exponential のもとでは、BF および AICM 解析により、Coalescent exponential population が他の人口動態モデルよりもデータに適することが示された。以上より、Best fit model と判断された HKY + Relax clock exponential + Coalescent exponential population を本解析に選択した。今回の解析では、3 億回のベイジアン MCMC シミュレーションを行い、10,000 state ごとにサンプリングし、最初の 10% のサンプルを Burn-in として除いた。収束性の評価は、Tracer v1.5 を用いて、ベイジアン MCMC からサンプリングしたパラメータの有効サンプルサイズ (ESS) (200>) を推定することで行った⁵⁵⁾。また、BEAST v2.4.8 の結果出力ファイルを TreeAnnotator v1.8.0 により Maximum clade credibility (MCC) tree を構築した⁵⁶⁾。最後に、FigTree v1.4.4 を用いて MCC tree を描画した⁵⁷⁾。

BLV の集団動態は Bayesian skyline Analysis によって推測した。計算には BEAST v2.4.8 を用いて、Bayesian skyline plot (BSP) を生成した⁵⁴⁾。以下のパラメータを設定し、日本の BLV env-gp51 配列 48 個の有効集団サイズを推定した。Nucleotide substitution model; HKY model + empirical, Clock model; Strict clock, Prior; Coalescent Bayesian Skyline, with 300,000,000 states. BSP は Tracer v1.5 で可視化した⁵⁵⁾。

Ⅲ. 結果

1. FFPE 標本から得られた過去に流行した BLV プロウイルスゲノム

日本において 2000 年以前（1972 年-2000 年）に作製された FFPE 標本 28 検体から BLV プロウイルスゲノムを増幅し、配列決定することで過去に流行した BLV 配列の復元を試みた。検体の詳細情報および PCR による遺伝子増幅結果は表 1 に示している。その結果、1998 年に北海道で作製された FFPE 標本 1 検体を除き、その他 27 検体において BLV プロウイルスを増幅することができた。プロウイルスを増幅できた FFPE 標本において、使用した Primer set によって検出率が大きく異なっており、すべての検体から *env-gp51* の完全長配列（903bp）を得ることは困難であった。使用した Primer set A-H のうち、Primer set D が最も多くの検体の BLV プロウイルスを増幅することができ、28 検体中 27 検体（96%）から BLV *env-gp51* の部分配列が検出された（Amplicon size 148bp）。さらに、5 検体の BLV *env-gp51* の完全長（903bp）と 3 検体のほぼ完全長（862bp）の配列を再構築することができた（903bp : Hokkaido-1995、Hokkaido-2000、Iwate-1974、Chiba-1974、Chiba-1984。862bp : Chiba-1995、Chiba-1996、Chiba-1997）。Primer set D（Amplicon size 148bp）が最も検出率が高い一方で、Amplicon size の大きい上位 2 つの Primer set（G : 327bp、C : 249bp）における検出率は低く、それぞれ 32.1%（9/28）および 39.2%（11/28）だったことから、FFPE 標本における遺伝子増幅は Amplicon size に依存する傾向がみられた。年代別においては、1970 年代、1980 年、1990 年代および 2000 年代において増幅結

果に大きな違いは認められなかった。年代に比例して長期保管における DNA 損傷とそれに伴う PCR 阻害がみられると予想していたが、本研究においてはその傾向はみられなかった。品種および臓器においても遺伝子検出に顕著な違いはみられなかった。家畜保健衛生所に保管されていた FFPE 標本、特に 1974 年に流行していた BLV の遺伝子配列 (Iwate-1974 および Chiba-1974) を復元できたことから、40 年間以上にわたる長期保管をしてもウイルスのゲノム情報を取得できることが明らかとなった。

2. 分子系統解析

PCR により BLV *env*-gp51 配列の完全長およびほぼ完全長 (862-903bp) の配列を決定することのできた FFPE 8 検体において、データベースに登録されている 192 配列を用いて分子系統解析を行った。ML 系統樹により、FFPE 配列は全て遺伝子型 1 型に分類された (図 5)。FFPE 8 配列のうち、最も古い検体が 1974 年 (Iwate-1974 および Chiba-1974) であるため、1974 年にはすでに日本で 1 型が流行していたことが示唆された。さらに、Iwate-1974 および Chiba-1974 はそれぞれ黒毛和種およびホルスタイン由来の FFPE 標本であることから、1970 年代にはすでに両品種間で BLV が広がっていたと考えられる。完全長およびほぼ完全長を得ることのできなかつた FFPE 20 検体の *env*-gp51 配列を用いて分子系統解析した結果、すべて 1 型と推測される配列であることがわかった (Data not shown)。なお、BLV の遺伝子型を分類するには BLV *env*-gp51 領域 444 bp (EF6006960 FLK-BLV:nt5099-5542) が少なくとも必要であるため、この領域をカバーしていない FFPE 20 検体の系統解

析結果は参考データとなるが、データベースから得た配列を各 Primer set の Anpricon size で系統解析した結果、正確に遺伝子型を分けることができた。このことから 1 型が古くから日本で流行していたことがわかる。

回帰分析 (Root-to-tip regression 解析) の結果、遺伝子の変異数とサンプリング時期には正の相関があり、FFPE 8 配列を含む 200 配列の相関係数は FFPE 配列を含まない (192 配列) の場合よりもわずかに高かった ($R^2 = 0.399$) (図 6)。これらの結果から、FFPE 配列データは BEAST での分子進化的解析に適していると認められた。過去に流行した BLV は、年代を推定する際の重要な校正点となることを示している。

3. BLV の進化速度および分岐年代推定 (時間尺度)

BLV における進化の時間尺度を解析するために、ベイジアン MCMC 法に基づいた BEAST v2.4.8 を用いて、BLV *env*gp51 における進化速度の算出と tMRCA を推定した。BLV の進化速度は平均 1.55×10^{-4} nucleotide substitutions/site/year であることがわかった。この進化速度は同じレトロウイルス科で比較すると、HIV (平均 1.5×10^{-3} (*env*) と平均 1×10^{-4} (*gag*) nucleotide substitutions/site/year) と同程度の高変異性であり、最も近縁な HTLV (平均 $2.5-6.7 \times 10^{-7}$ nucleotide substitutions/site/year) よりも速い。

BLV の分岐年代推定の結果、BLV の進化的な起源 (root) となる共通祖先が 1853 年 (95%HPD:1750-1919) に存在することが推定された (図 7)。

BLV は、共通祖先と考えられる近縁の集団から分岐し、この時期に発生したと考えられる。その後、ヨーロッパ集団 (遺伝子型 4, 7 型)、アジア・南米集団

(6, 10 型) および 1, 2, 3, 8, 9 型で構成される集団の大きく 3 つの Clade に分岐していることがわかった。ヨーロッパ集団は、ヨーロッパに分布している 4 型および 7 型で構成されており、tMRCA は 1913 年 (95%HPD:1840-1961) であると推定された。また、アジア・南米集団は、アジアと一部南米に分布している 6 型および 10 型で構成されており、tMRCA は 1917 年 (95%HPD:1832-1972) と推定された。一方、1, 2, 3, 8, 9 型で構成される集団はグローバルな展開を示しており、世界各国 (アメリカ、ブラジル、オーストラリア、日本、韓国、メキシコ、ミャンマー、タイ、パラグアイなど) に分布し、パンデミックの様相を呈している 1 型の tMRCA は 1922 年 (95%HPD:1872-1954) と推定された。その後、2 型 (南米)、3 型 (アメリカ・日本・韓国)、8 型 (ヨーロッパ) および 9 型 (ボリビア) にそれぞれ 1965 年 (95%HPD:1928-1988)、1970 年 (95%HPD:1954-1990)、1986 年 (95%HPD:1941-2005) および 1994 年 (95%HPD:1967-2006) に分岐していることが明らかとなった。

日本の BLV 配列は 1 型と 3 型に分類された。本研究で得た FFPE 8 配列は、1 型において 3 つの Micro crade (MC1-MC3) を構成していることがわかった (図 8、9)。MC1 には、1970 年代に採取された FFPE の配列 (Iwate-1974、Chiba-1974) が含まれていたが、他の日本の配列は含まれておらず、パラグアイやメキシコといった中南米由来 BLV で構成されていた。MC2 と MC3 には、それぞれ 1980 年代 (Chiba-1984、Chiba-1987) と 1990 年代から 2000 年 (Hokkaido-1995、Chiba-1996、Chiba-1997、Hokkaido-2000) に採取された FFPE 配列が含まれていた。MC2 は日本、韓国、メキシコ、南ア

フリカの4カ国の配列が確認された。MC3については、MC2と同様に日本、韓国、メキシコが確認されたが、コスタリカ、タイ、ベトナムも含まれていた（図8）。これらのMCのtMRCAは、MC1では1950年、MC2では1962年、MC2では1967年と推定された。以上のことから、FFPEは作製された年代ごとにMCが異なる傾向を示した。複数回、異なる国からBLVが日本に持ち込まれたことが示唆される。

4. 有効集団サイズの推定

日本から得られた塩基配列を用いてBSP解析を行い、集団動態を推定した。その結果、日本では1970年代からBLVの有効集団サイズが増加し始めていることがわかった（図10）。1900年代中頃は牛の輸出入が世界的に活発化された時期で、特に日本は1970年代以降にアメリカを含む多くの国から牛を輸入していたことから、BLVの流行と牛の動き（貿易などによる輸出入）が一致する結果となった。

IV. 考察

1. EBL および獣医・畜産研究における FFPE 標本の有用性

本研究の解析結果から、FFPE 標本から 40 年以上前に流行していた BLV 遺伝子配列を復元し、BLV の進化過程（時間尺度）、拡散経路および集団動態の推定に用いることができた。FFPE 標本は、BLV におけるレトロスペクティブな分子疫学研究に貴重な情報を提供することが可能である。しかし、長期保存による酸化やホルマリン固定などの影響により、DNA の断片化、化学修飾および酵素反応の阻害が起こるため、FFPE 標本から DNA を抽出し、PCR 増幅を行うのは著しく困難である⁵⁸⁻⁶⁰。先行研究では、約 15 年間保存した後、50%以上の検体で DNA の増幅が不可能であるという結果だった⁶¹。BLV の解析に関しては、保存期間 3 年以内の FFPE 検体を用いた EBL 発症牛の分子遺伝学的解析が報告されているが、保存期間のが 4 年以上の FFPE 検体を解析した報告はない（宮城県食肉衛生検査所および島根県食肉検査所未発表データ）。本研究では、FFPE 検体から DNA を抽出するために、フェノール・クロロホルム法を用いた。現在、FFPE 標本から DNA を抽出するための多くの市販キットが販売されている⁶²。しかし、本研究の予備的な解析では、比較的新しい FFPE 標本（2010 年代）はこれらのキットを用いて BLV プロウイルスを増幅することができたが、2010 年以前の FFPE 標本から増幅産物を得ることができなかった。一方、フェノール・クロロホルム抽出法では、本研究結果の通り、40 年以上前に作製された FFPE 標本からも増幅産物を得ることがで

きたことから、PCR 反応を阻害するタンパク質の分解および架橋を乖離し、高品質な DNA の精製に適していることが示唆された。

また、増幅産物が得られるかどうかは、Primer set によって有意な差があった。比較的短い配列を増幅するように設計した Primer set D および E (149 bp と 135 bp) を用いた場合、BLV プロウイルスゲノムの増幅に成功したのは、それぞれ 27 (96%) と 25 (89%) 検体であった (表 1)。しかし、長い増幅鎖長 (249 bp および 327 bp) の Primer set C および G を用いた場合、BLV プロウイルスゲノムは、それぞれ 9 (32%) および 10 (36%) の検体でしか増幅されなかった。これは FFPE の断片化によるもので、ショートリードでの解析が有効であることがわかった。さらに、BLV プロウイルスゲノムの検出は、保存期間よりも保存条件に依存していた。本研究では 1970 年代、1980 年代、1990 年代および 2000 年代の FFPE 標本から、いずれもプロウイルス DNA が検出されたことから、保存期間によるプロウイルス検出の差はみられなかった。しかし、保存状態においては、本研究で使用した FFPE 検体はすべて室温で保存されていたが、日本では地域によって室温や湿度が異なるため、保存条件も施設ごとに異なることが考えられる。さらに、FFPE 作製の試薬や手順も施設ごとに異なる可能性がある。これらの検体のうち、20%ホルマリンで迅速に固定した FFPE 標本 (Chiba-1996、Chiba-1997) では、抽出された DNA の純度が高く、すべての PCR amplicon を得ることができた。一方、損傷の激しい FFPE 標本では、抽出された DNA の純度が低かった。これらの検体は、FFPE 作製時の脱水やパラフィンの浸透が不完全であったために損傷したと考えられる。脱水やパラフィン透過が不完全だと、水中の残留ホルマリン

が DNA の断片化やプロテアーゼ K の阻害を引き起こすため、PCR による遺伝子増幅が困難になる。これらの結果から、高純度の DNA を得るためには、迅速な固定、十分な脱水およびパラフィンの透過が重要であると考えられる。以上の結果から、40 年以上前に保存された標本からも BLV プロウイルスゲノムを十分に検出できることがわかった。これは EBL 研究に限らず、他の家畜感染症のレトロスペクティブ研究に FFPE 標本が利用できることを示す。ヒトの FFPE 標本を用いた解析は盛んに行われており、ゲノム診断やバイオマーカーの探索などに利用されている。一方、獣医・畜産領域での利用はまだ限定的である。家畜保健衛生所や食肉衛生検査所は、多種多様な動物種の過去の FFPE 標本を大量に保有しているため、新興の動物由来感染症が問題となっている現在、それらの標本が多く感染症のレトロスペクティブな解析において有益なバイオリソースとなりうる。

2. EBL 発生と拡散の歴史

本研究では、系統進化学的解析により、初めて BLV の分岐年代（時間尺度）を推定することができた。tMRCA を推定した結果、BLV は 1800 年代に発生し、ヨーロッパ集団（G4 と G7）に分岐していたことから、まず初めにヨーロッパ内で流行したことが示唆された。EBL は 1871 年の東プロイセン（現リトアニア）において初めての発生報告があり、その後 1900 年代初頭にかけてヨーロッパに拡大したという発生の記録と大きな矛盾がない結果となった。1700 年代後半から 1800 年代にかけて、ヨーロッパでは農業革命が起こり、牛の品種改良が盛んに行われるようになった。ヨーロッパには元々ヨーロッパ系

家畜牛 (*Bos taurus*) と呼ばれる牛が古くから飼養されており、生産性に優れた特性を持っていたことから、品種改良により、乳量・乳質・産肉量・肉質などの生産性のさらなる向上に向けて多くの品種が作出された。また、農業革命および産業革命の中で人口は急速に増加し、それに伴う食糧需要の高まりから品種改良の重要性が増したこと、そして育種のノウハウや鉄道の普及がヨーロッパにおける活発な品種改良の大きな要因となった。ヨーロッパの多くの国で、多種多様な品種が掛け合わされていたことから、感染症の流行が頻発しており、実際には牛疫、口蹄疫などの感染症が大流行した記録がある。以上のことから、EBL が発生し、まず初めにヨーロッパで拡散されたことは、系統解析、EBL 発生記録、そして近代畜産発展の歴史的観点からも、十分に考えることである。さらに系統解析から、1900 年代中頃から後半にかけて、1 型が世界的に大きく拡散していることがわかった。1965 年から 2 型 (南米), 3 型 (アメリカ・日本・韓国), 8 型 (ヨーロッパ), 9 型 (ボリビア) の遺伝子型が 1 型から分岐していた。南北アメリカには 1 万年も前から人が居住していたが、ウシは生息しておらず、初めてウシが持ち込まれたのは 1492 年にコロンブスがアメリカを発見して以降であった。先住民は持ち込まれたウシに興味を示さず、長い間それほど活用はされてこなかったが、1800 年代後半から 1900 年代初頭にかけて、アメリカでも農業革命が起こり、乳牛や肉牛の品種改良が積極的に行われるようになる。科学技術の先進的なアメリカでは品種改良の技術も大きく発展していき、品種改良の中心地がヨーロッパからアメリカに移ることとなる。第二次世界大戦後に、世界的に乳の需要の高まりを受けて、アメリカで品種改良された乳牛が世界各国に輸出されている。BLV の系統解析結果

から、ヨーロッパ集団に始まり、次いでアメリカ大陸の集団が発生していたことは、過程・年代ともに上記の史実と一致する。同様に、BLVの世界的拡散は、第二次世界大戦後の乳重要が増したことに伴うウシの輸出入が大きな要因の一つであると史実からも考えられる。本研究で示されたヨーロッパ、アメリカ、そして世界各国に広がっていったというBLV拡散経路は、牛の品種改良・貿易の発展の歴史と一致することから、BLVの流行は牛の品種改良・貿易に伴うものであることを明らかにした。

3. 日本における EBL 発生と拡散の歴史

8種類のプライマーを用いて増幅した結果、5つの完全長(903 bp)と3つのほぼ完全長(862 bp)のBLVgp51の配列を再構築することができた。系統解析の結果、これらの配列は遺伝子型1型に型別された(図6)。これまでの研究では、遺伝子型1型は世界的に最も広い地域に分布しており、北米、南米、アフリカ、アジアなどの主要なBLV感染国で報告されている²¹⁾。今回の結果から、日本では1970年代からすでに遺伝子型1型が流行していたことが分かった。また、アメリカでは2000年以前に収集された配列(EF065644, EF065656など)があり、遺伝子型1型が流行していることを示す初期の証拠となった。さらに、MCC treeでは、MC1の配列は外国株の配列と近縁で、日本と外国株のBLV配列の関係が近いことを示している(図7、8)。これらの結果は、海外からの家畜を導入することが、日本に感染症を蔓延させるリスクになりうることを示している。

以前の研究では、感染率は低かったものの、1980年にはすでに BLV が日本全国に広がっていたと報告されている²⁷⁾。1970年代、日本の動物検疫所の統計によると、海外から日本に輸入される牛の生体数が著しく増加し、特に米国、カナダ、韓国からの輸入が多かった。日本から輸入された BLV *env*-gp51 の塩基配列を BSP で解析すると、1970年代から BLV の有効集団サイズが増加し始めたことが分かった (図 9)。また、1970年から1980年の間に作製された FFPE 標本の 4 配列は、日本での流行初期におけるウイルス配列であり、疫学的に重要な情報源となった。1974年に作成された最も古い検体 (Iwate-1974、Chiba-1974) を含むいくつかの FFPE 配列は、現在日本で流行していない MC (MC1) に属していた。MC2 の FFPE 配列 (Chiba-1984、Chiba-1987) は、他のクレードとは異なる導入イベントで日本に広まったと考えられる。また、MC3 の FFPE 配列は外国からの配列と比較的新しい tMRCA を共有しているため、これらの配列はより最近になって日本に導入されたものである (図 8)。

BLV は、19世紀にヨーロッパで流行し、20世紀にはアメリカ大陸にも拡大した。その後、北米からの牛の輸出に伴い、1900年代半ばから BLV は全世界に拡大したと言われている⁶³⁾。実際に、1と3型は20世紀に入ってから出現し、アメリカやブラジルから世界的に広がった後、1900年代半ばに日本に持ち込まれており、これは系統解析や過去の疫学報告と一致している。以上から、現在日本において流行している BLV は1970年代以降に海外から持ち込まれたものと推定され、岩手県にて初報告された EBL の原因となった BLV を起源としているわけではない。また、現在日本で検出される BLV は、北米およ

び南米の BLV と祖先を同じくすることから、1970 年代以降、これらの国から BLV の侵入が度々あり、日本に広がったことが示唆された。これらの結果は、過去の EBL 発生報告やウシの輸入歴などの情報とも矛盾はなかった。

EBL および BLV の拡大は、畜産の発展や、政治的、社会的背景と深く関係していることが示唆された。症状を呈さないうちに感染を拡大させる BLV が、いかに宿主の移動とともに分布域を拡大させていくかを示している。

V. 図表

表1. 検体情報およびPCRによるBLV env-gp51の増幅結果

Location		Collection date	Breed	Organ	PCR amplification								Detection of the BLV proviral genome	Daseignated name	
Prefecture	City				A	B	C	D	E	F	G	H			
Hokkaido (n=9)															
	Nemuro	1987	Dairy cattle	Heart	+	-	+	+	+	-	-	-	+		
	Nemuro	1988	Holstein	Lymph nodes ^a	-	-	-	+	+	-	-	+	+		
	Nemuro	1989	ND	Lymph nodes ^a	+	-	-	+	+	-	-	-	+		
	Nemuro	1990	ND	Lymph nodes ^a	-	-	-	+	+	-	-	-	+		
	Nemuro	1993	Holstein	Lymph nodes ^a	-	-	-	+	+	-	-	+	+		
	Abashiri	1995	Holstein	Lymph nodes ^a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Hokkaido-1995	
	Shiribeshi	1998	Beaf cattle	UnKnown	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	Nenuro	1999	ND	UnKnown	-	+	+	+	+	-	-	+	+		
	Abashiri	2000	ND	Heart	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Hokkaido-2000	
Iwate (n=8)															
	Kuji	1972	Japanese shot horn	Anterior lymph nodes	-	-	-	+	-	-	-	-	+		
	Hachimantai	1973	Holstein	Stomach	-	-	-	+	+	+	-	+	+		
	Hachimantai	1974	Holstein	Lymph nodes ^a	-	-	-	+	+	-	-	+	+		
	Sumita	1974	Japanese black cattle	Heart	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Iwate-1974	
	Sumita	1975	Japanese black cattle	Abomasum	-	+	-	+	+	-	-	-	+		
	Kuji	1975	Japanese shot horn	Intestine	-	+	-	+	+	-	-	+	+		
	ND ^b	1975	Japanese black cattle	UnKnown	-	+	-	+	+	+	-	+	+		
	Kamaishi	1978	Japanese black cattle	Intestine	-	+	-	+	+	-	-	+	+		
Chiba(n=11)															
	Mutsuzawa	1974	Cross breed	Anterior lymph nodes	-	-	-	+	+	-	-	-	+		
	Ichihara	1974	Holstein	Lymph nodes ^a	-	+	+	+	+	+	+	+	+	Chiba-1974	
	Ichihara	1981	Holstein	Iliac lymph nodes	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	Misaki	1984	Holstein	Heart	-	-	-	+	-	-	-	-	+		
	ND	1984	ND	UnKnown	-	+	+	+	+	+	+	+	+	Chiba-1984	
	ND	1987	ND	UnKnown	-	+	+	+	+	+	+	+	+	Chiba-1987	
	Sodegaura	1989	Holstein	Lymph nodes ^a	-	-	-	+	+	-	-	-	+		
	Kisarazu	1991	Holstein	Heart	-	-	-	+	+	+	-	-	+		
	Yamada	1992	Holstein	Lymph nodes ^a	-	-	-	+	-	-	-	-	+		
	ND	1996	Dairy cattle	Lymph nodes ^a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Chiba-1996	
	ND	1997	Dairy cattle	Lymph nodes ^a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Chiba-1997	

a: Unspecified

b: No data

Nishikaku *et al.* 2022

表2. FFPEからBLV env-gp51を増幅するために設計したPrimer

Fragment	Size of amplicon (bp)	Location at FLK-BLV ^a	Location at BLVgp51	Orientation ^b	Sequence (5' to 3')
A	174	4715 - 4734	-110 - -91	F	CARTCGTCGGTGGCTAGGAC
		4864 - 4888	39 - 63	R	AGTGAGACTTACCCATCTGATGATC
B	196	4864 - 4888	39 - 63	F	GATCATCAGATGGGTAAGTCTCACT
		5038 - 5059	213 - 234	R	GTATCTGGGAGACTTGGCACAG
C	249	5038 - 5057	213 - 232	F	CTGTGCCAAGTCTCCCAGAT
		5266 - 5286	441 - 461	R	CCATGACACTGTTTGAGATGC
D	149	5266 - 5286	441 - 461	F	GCATCTCAAACAGTGCATGG
		5394 - 5414	569 - 589	R	ATCTGACAGAGGGAACCCAGT
E	135	5280 - 5304	455 - 479	F	GTCATGGAATTTTCACTYTAACCTG
		5394 - 5414	569 - 589	R	ATCTGACAGAGGGAACCCAGT
F	213	5394 - 5414	569 - 589	F	ACTGGGTYCCCTCTGTCAGAT
		5586 - 5606	761 - 781	R	AYCCTTGGGTGGTGTAAACG
G	327	5280 - 5304	455 - 479	F	GTCATGGAATTTTCACTYTAACCTG
		5586 - 5606	761 - 781	R	AYCCTTGGGTGGTGTAAACG
H	236	5591 - 5610	766 - 785	F	AACACCACCCAAGGATGGCA
		5804 - 5826	979 - 1001	R	GAGGTGAGTCTCTGATGGCTAAG

a: EF600696.1 Bovine leukemia virus cell-line FLK-BLV subclone pBLV913, complete genome

b: F, forward; R, reverse

Nishikaku *et al.* 2022

表 3. 系統解析に用いた BLV *env*gp51 配列

Collection date	Country	Isolate	Accession No.
1975	USA	USIA	EF065644.1
1976	USA	USPA	EF065656.1
1984	Belgium	U ^a	K02251.1
1985	Japan	U	K02120.1
1990	Australia	U	D00647.1
1990	France	LB59	M35238.1
1990	USA	VdM	M35239.1
1990	Belgium	LB285	M35240.1
1990	USA	U	M35242.1
1991	USA	USWI	EF065642.1
1993	Belgium	U	AF503581.1
1994	USA	USID	EF065641.1
1996	Argentina	Arg41	FJ914764.1
1997	USA	USCA-1	EF065647.1
1997	USA	USCA-2	EF065648.1
1997	USA	USCA-3	EF065649.1
1998	Poland	U	AF067081.1
2000	Argentina	B19	AF257515.1
2001	Brazil	30	AF399703.3
2001	Brazil	384	AF399704.3
2002	Brazil	141	AF547184.2
2002	USA	U	AY078387.1
2002	Brazil	485	AY151262.2
2002	Brazil	151	AY185360.2
2003	CostaRica	CRAS-3	EF065637.1
2003	Belgium	BG	EF065638.1
2003	CostaRica	CRAG-2	EF065640.1
2003	CostaRica	CRLC-1	EF065655.1
2004	Japan	JPFU	EF065650.1
2004	Japan	JPAI-2	EF065651.1
2004	Japan	JPEH-2	EF065653.1
2004	Japan	JPAI-1	EF065657.1
2004	Japan	JPKA-1	EF065658.1
2004	Japan	JPKA-2	EF065659.1
2004	Japan	JPMI-1	EF065660.1
2004	Japan	JPMI-2	EF065661.1
2004	Japan	JPMI-3	EF065662.1
2007	Paraguay	asun1	LC080651.1
2007	Paraguay	asun5	LC080652.1
2007	Paraguay	par7	LC080653.1
2007	Paraguay	par17	LC080655.1
2007	Paraguay	par62	LC080656.1
2007	Paraguay	par89	LC080657.1
2007	Paraguay	par91	LC080658.1
2008	Russia	MKC5233	JQ675758.1
2008	Russia	MC19	JQ686089.1
2008	Russia	KA6	JQ686096.1
2008	Peru	lima40	LC080654.1
2008	Bolivia	mon1	LC080659.1
2008	Bolivia	mon17	LC080660.1
2008	Bolivia	mon41	LC080663.1
2008	Bolivia	por84	LC080672.1
2008	Bolivia	por93	LC080674.1
2009	Russia	MKC3877	JQ675756.1
2009	Russia	MKC2137	JQ675759.1
2009	Russia	MKC3511	JQ675760.1
2009	Russia	KE136	JQ686095.1
2009	Russia	MS3569	JQ686098.1
2009	Russia	R5164	JQ686106.1
2010	Russia	15V	JN695881.1
2010	Russia	NV13	JQ686111.1
2010	Russia	NV3	JQ686112.1
2010	Russia	NK17	JQ686120.1
2012	Moldova	13MD	KF801457.1

a: U; unspecified

Nishikaku *et al.* 2022

表 3. 系統解析に用いた BLV *env-gp51* 配列 (続き)

Collection date	Country	Isolate	Accession No.
2012	Moldova	16MD	KF801458.1
2012	Moldova	8MD	KF801459.2
2012	Moldova	15MD	KF801461.2
2012	Moldova	14MD	KF801464.2
2012	Moldova	1MD	KF801467.2
2012	Moldova	3MD	KF801468.2
2012	Moldova	7MD	KF801470.2
2013	Japan	U	AB934282.1
2013	Thailand	Ch7-F2	KU233528.1
2013	Thailand	Ch17-F4	KU233530.1
2013	Thailand	Lo19-E1	KU233534.1
2013	Thailand	Pa53-A4	KU233548.1
2013	Thailand	Pr67-C5	KU233555.1
2013	Japan	73-T69	LC007977.1
2013	Japan	877-K100	LC007978.1
2013	Japan	384-T83	LC007980.1
2013	Japan	76-T69	LC007982.1
2013	Japan	781-T99	LC007984.1
2013	Japan	488-T42	LC007985.1
2013	Japan	646-T61	LC007986.1
2013	Japan	545-K94	LC007988.1
2013	Japan	477-T42	LC007989.1
2013	Japan	865-T99	LC007991.1
2013	Japan	366-K29	LC007993.1
2014	SouthKorea	GBGS-3	KP201460.1
2014	SouthKorea	GBGS-6	KP201461.1
2014	SouthKorea	GBGS-2	KP201463.1
2014	SouthKorea	GBGS-12	KP201465.1
2014	SouthKorea	GBGS-1	KP201466.1
2014	SouthKorea	GBGS-8	KP201469.1
2014	SouthKorea	GBGS-9	KP201470.1
2014	SouthKorea	GBGS-5	KP201471.1
2014	SouthKorea	GNCN-7	KP201473.1
2014	SouthKorea	GNCN-4	KP201476.1
2014	SouthKorea	GNCN-5	KP201477.1
2014	SouthKorea	GNCN-8	KP201481.1
2014	SouthKorea	GNCN-11	KP201482.1
2014	Thailand	Ns12-D2	KU233542.1
2014	Thailand	Ns94-D4	KU233544.1
2014	Thailand	Pkk12-J1	KU233551.1
2014	Thailand	Pt1-G1	KU233556.1
2014	Thailand	Pt12-G4	KU233559.1
2014	Thailand	Sk8-I2	KU233564.1
2014	Japan	53-K110	LC007983.1
2014	Myanmar	L2	LC154064.1
2014	Myanmar	S5	LC154065.1
2014	Myanmar	L1	LC154066.1
2014	Myanmar	S3	LC154067
2014	Myanmar	L1	LC154848.1
2014	Myanmar	S3	LC154849.1
2015	Japan	K01	LC361248.1
2015	Japan	K02	LC361249.1
2015	Japan	K03	LC361250.1
2015	Japan	K04	LC361251.1
2015	Japan	K05	LC361252.1
2015	Japan	K06	LC361253.1
2015	Japan	K07	LC361254.1
2015	VietNam	VP02-05	LC512452.1
2016	Japan	K08	LC361255.1
2016	Japan	K09	LC361256.1
2016	Japan	K10	LC361257.1
2016	Japan	K11	LC361258.1
2016	Japan	K12	LC361259.1
2016	Japan	K15	LC361262.1

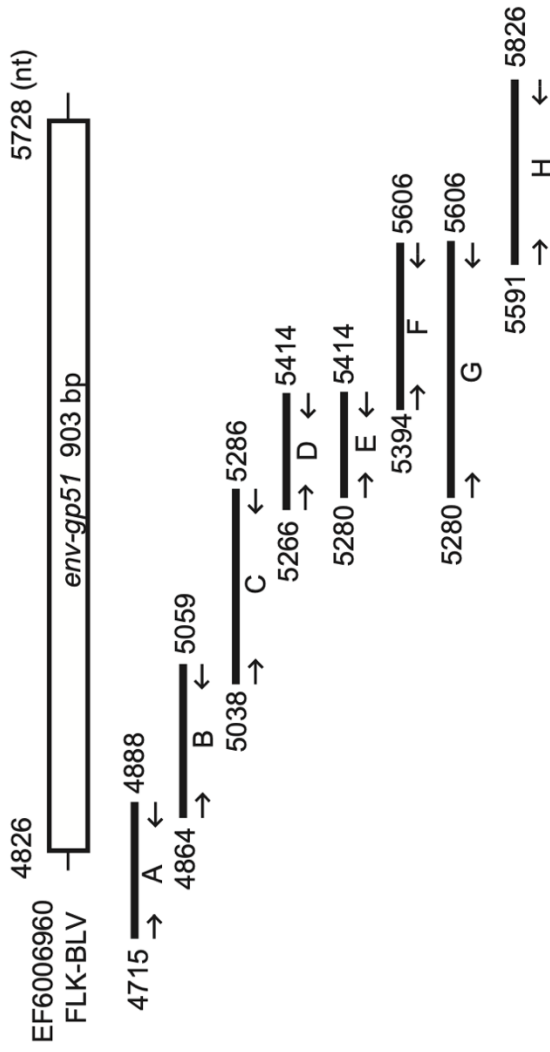
U:unspecified

表 3. 系統解析に用いた BLV *env-gp51* 配列 (続き)

Collection date	Country	Isolate	Accession No.
2016	Japan	K17	LC361264.1
2016	Japan	K18	LC361265.1
2016	Japan	K19	LC361266.1
2016	Japan	K20	LC361267.1
2016	China	GS1	MF574053.1
2016	China	GS2	MF574054.1
2016	China	GS3	MF574055.1
2016	China	GS4	MF574056.1
2016	China	QH1	MF574057.1
2016	China	SC1	MF574059.1
2016	China	SC2	MF574060.1
2016	China	GS5	MF574061.1
2016	China	GS6	MF574062.1
2016	China	GS7	MF574063.1
2016	China	GS8	MF574064.1
2016	China	QH3	MF574065.1
2016	China	QH4	MF574066.1
2016	China	GS9	MF574067.1
2016	China	QH5	MF574068.1
2016	China	SC1	MF580990.1
2016	China	GS1	MF580991.1
2016	China	QH1	MF580992.1
2016	China	GS2	MF580993.1
2016	China	GS3	MF580994.1
2016	China	QH2	MF580995.1
2016	Mexico	MX-GUA-3L	MG678760.1
2016	Mexico	MX-HID-20L	MG678763.1
2016	Mexico	MX-TLA-7L	MG678766.1
2016	Mexico	MX-AGU-5A	MG678769.1
2016	Mexico	MX-AGU-8A	MG678770.1
2016	Mexico	MX-HID-16A	MG678775.1
2016	Mexico	MX-HID-29A	MG678776.1
2016	Mexico	MX-TLA-8A	MG678779.1
2016	Mexico	MX-HEART-2	MG678782.1
2016	Mexico	MX-HEART-5	MG678784.1
2016	Mexico	MX-AGU-5032L	MG678790.1
2016	India	Ind_UK_251	MH341516.1
2016	India	Ind_UK_258	MH341519.1
2016	India	Ind_UK_285	MH341525.1
2017	VietNam	VT-S6	MF817716.1
2017	VietNam	CH-V50	MF817724.1
2017	Mexico	MX-HEART-6	MG678785.1
2017	China	CHI-DQ	MG800834.1
2017	VietNam	S6F15	MH170028.1
2017	VietNam	S9F16	MH170029.1
2017	VietNam	S38F21	MH170030.1
2018	VietNam	TM02-10	LC512446.1
2018	VietNam	TM02-15	LC512447.1
2018	VietNam	BN09	LC512448.1
2018	SouthAfrica	Afrivet:K1170	MN966688.1
2018	SouthAfrica	Afrivet:K1194	MN966689.1
2018	SouthAfrica	Afrivet:L3401	MN966690.1
2018	SouthAfrica	Afrivet:M1878	MN966691.1
2018	SouthAfrica	Afrivet:M2746	MN966692.1
2018	SouthAfrica	Afrivet:P2152	MN966693.1
2018	SouthAfrica	Afrivet:P2677	MN966694.1
2019	Russia	R6077	JQ686107.1
2019	China	B3008	MK820044.1
2019	China	B3026	MK840875.1
2019	China	B3054	MK840876.1
2019	China	B3064	MK840877.1
2019	China	B3065	MK840878.1
2019	China	B3071	MK840879.1
2019	China	B3103	MK840880.1

a: U; unspecified

A



B

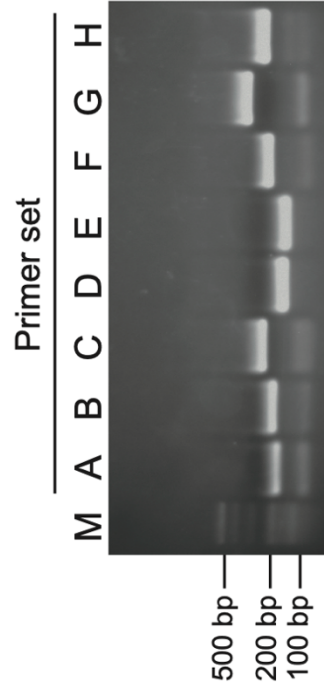


図 4. FFPE 標本による BLV *env-gp51* 増幅戦略と電気泳動の例

(A) FFPE 標本の DNA は 400bp 以下に断片化されているため、BLV *env-gp51* (903bp) をカバーするように、それぞれがオーバーラップした 8 つの短い PCR Amplicon を得る Primer set を設計した。A 上図は BLV プロウイルスゲノム (*env-gp51*) 示し、A 下図は Primer の設計位置を示している。(B) FFPE 標本 (Hokaido:1995) の DNA を用いて、設計した Primer set で BLV *env-gp51* を領域を増幅した電気泳動の例。Primer set A~H は表 2 を参照。M:100 bp

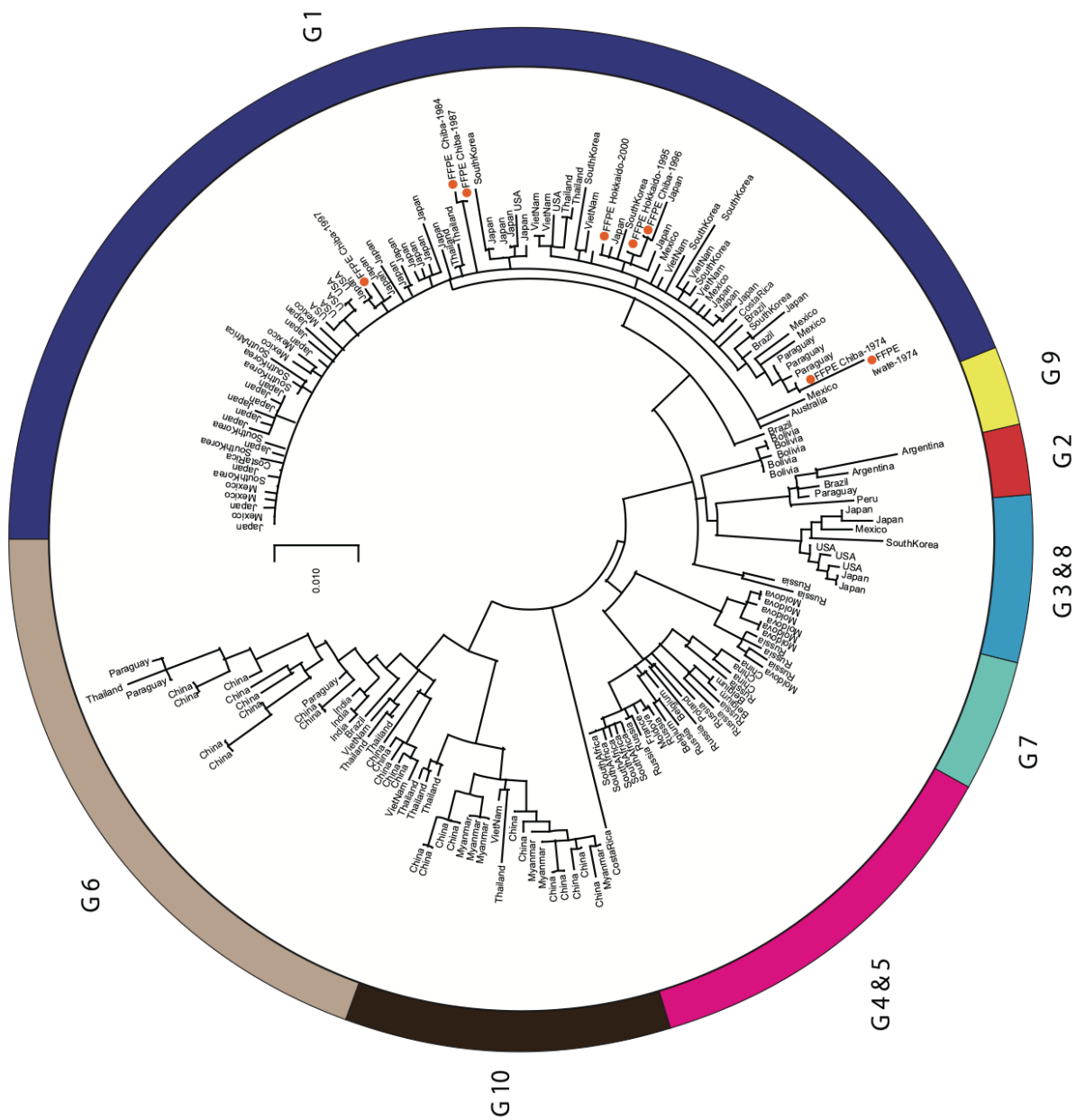


図5. BLV *env-gp51* (903bp) に基づいた最尤系統樹
 FFPE 標本から得ることのできた 8 配列 (862bp および 903bp) およびデータベースに登録され
 ている代表的な BLV192 配列を用いて、ML 法により分子系統樹を推定した (n=200)。●は
 FFPE 標本由来 BLV を、G1-G10 は遺伝子型をそれぞれ示している。

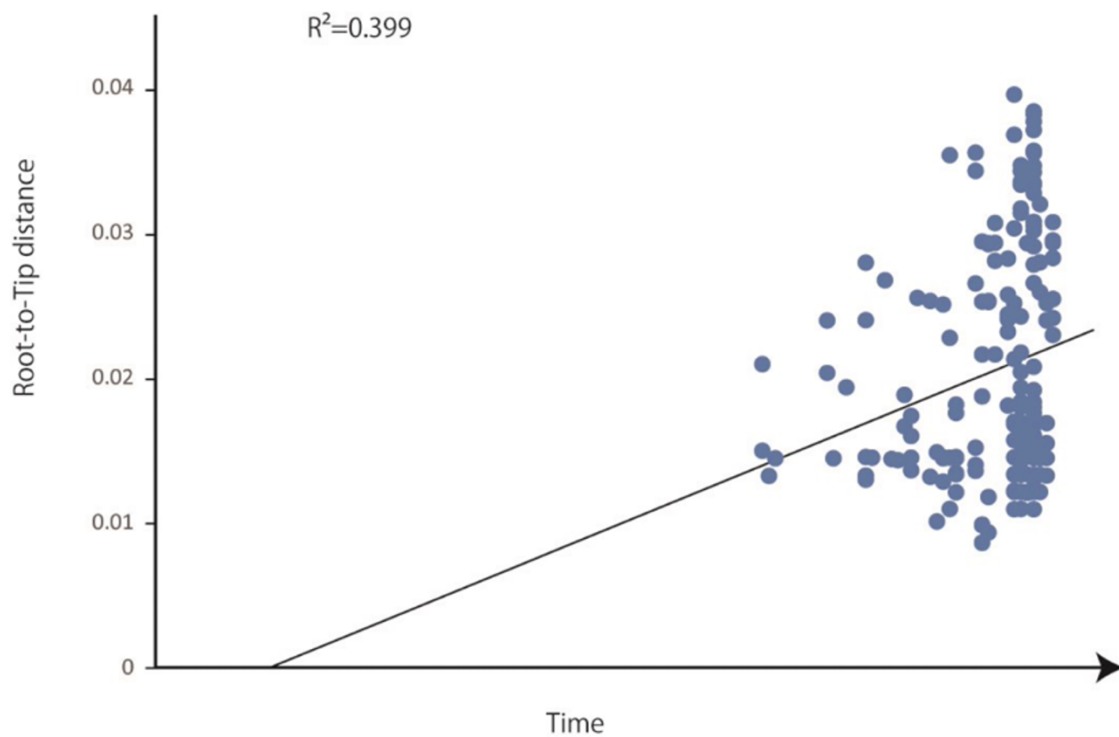


図 6. Root-to-tip regression 解析

BLV 配列の採取年 (Collection date) と変異の蓄積量の相関を検定するために TempEst を用いて、回帰分析を行った。Y 軸は root から txa までの遺伝距離 (ML 系統樹から算出)、X 軸は採取年を示している。近似線は $R^2=0.399$

Nishikaku *et al.* 2022

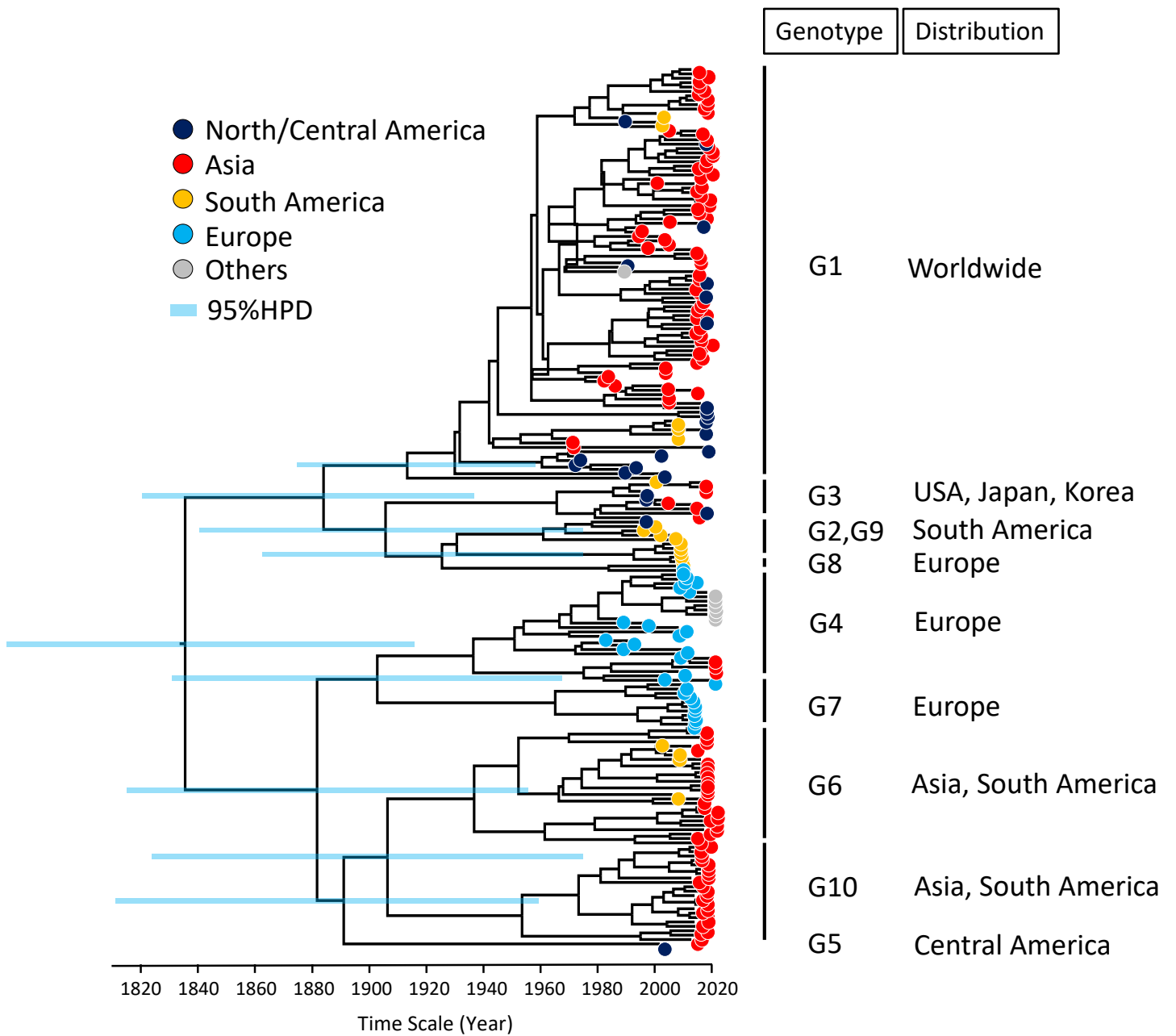


図 7. *env-gp51* (903bp) に基づく BLV の分岐年代推定

BLV の *env-gp51* に基づく分岐年代推定 (Maximum clade credibility tree : MCC tee) 。○は BLV の採取地域を示している。水平の■棒は tMRCA の 95%信頼区間を、G1-G10 は遺伝子型をそれぞれ示している。下の time scale は西暦を表している。

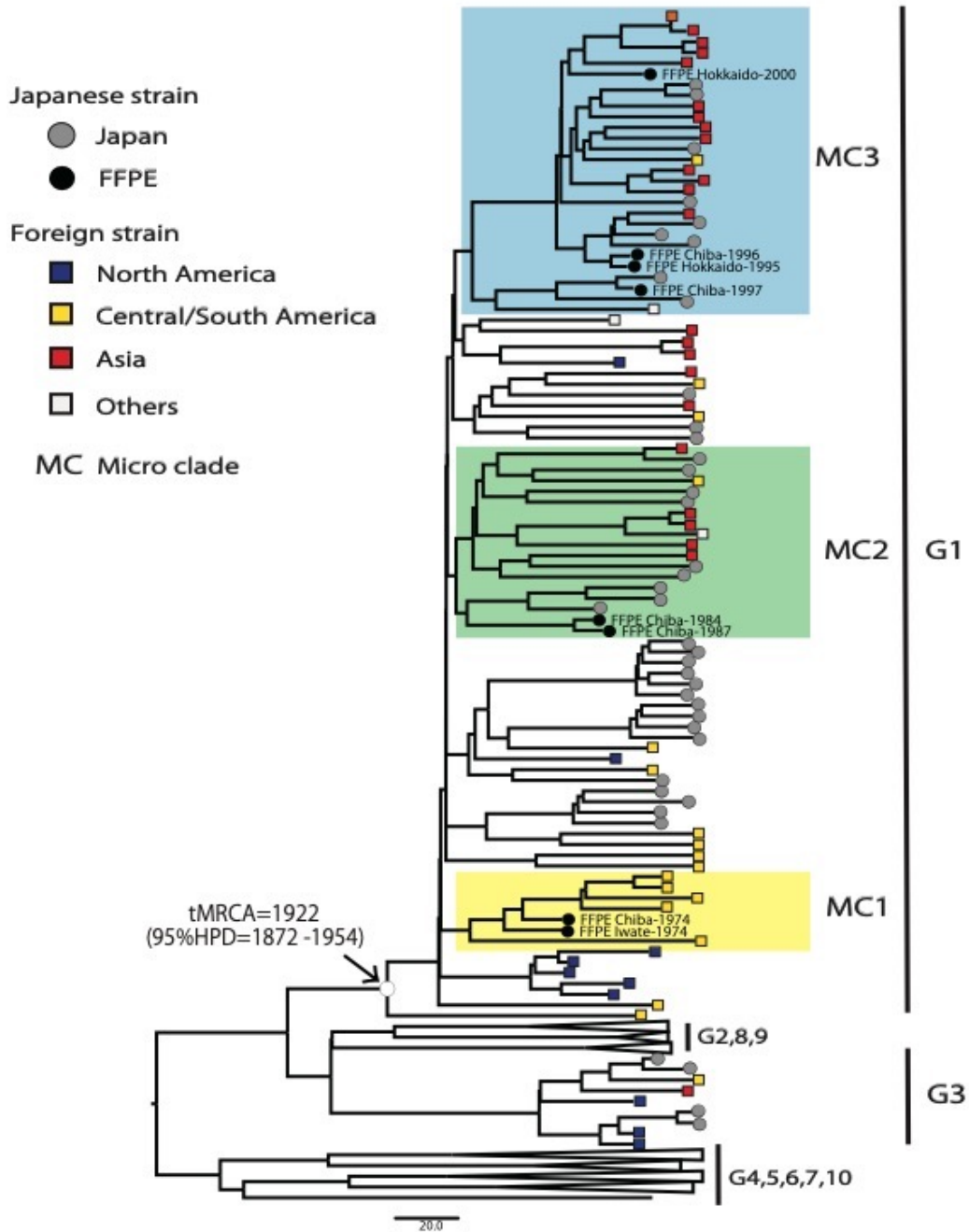


図 8. *env-gp51* (903bp) に基づく BLV の分岐年代推定 (1 型と 3 型の詳細図)

図 7 の分岐年代推定を行った MCC tree より、1 型と 3 型の詳細を示した系統樹。その他の遺伝子型は Collapse している。1 型の root について、tMRCA が存在したと推定された年を示している。●は FFPE 配列、●は日本由来 BLV、□は国外由来 BLV および MC は Micro Clade をそれぞれ示す。

Nishikaku *et al.* 2022

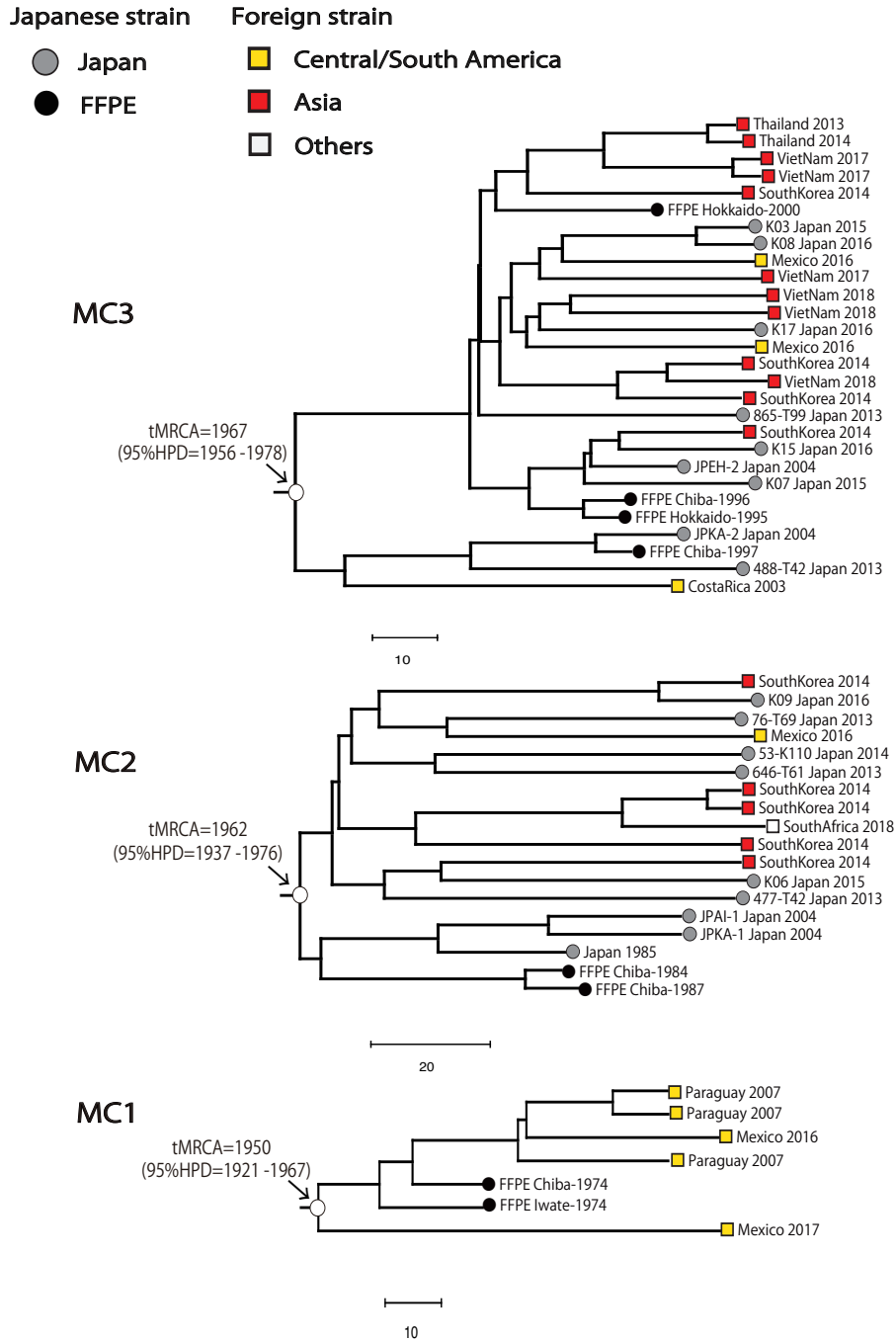


図 9. Micro Clade 1-3 の詳細を示した MCC tree

図 7 の分岐年代推定を行った MCC tree を用いて、図 8 で示した MC1-3 を詳細にした系統樹。MC1-3 の root について、tMRCA が存在したと推定された年を示している。●は FFPE 配列、●は日本由来 BLV、□は国外由来 BLV および MC は Micro Clade をそれぞれ示す。

Nishikaku *et al.* 2022

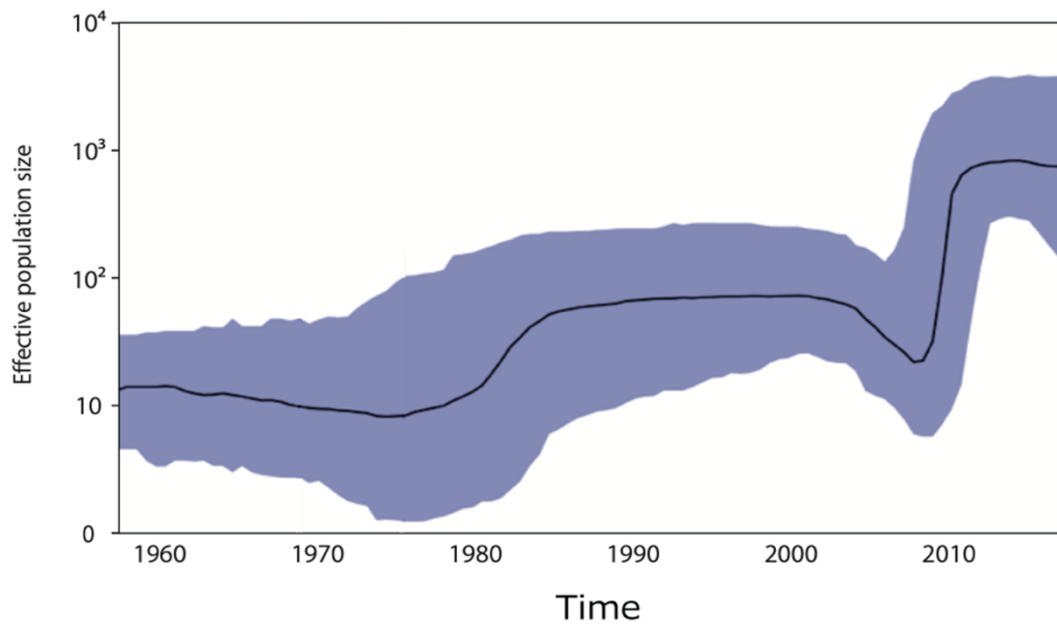


図 10. 日本における BLV の集団動態

日本の BLV 配列 (n=48) を用いて、日本における BLV の集団動態を Bayesian skyline Analysis によって推測した。計算には BEAST v2.4.8 を用いて Bayesian skyline plot (BSP) を生成し、有効集団サイズを推定した。事後確率中央値は黒い線、青い部分は 95%HPD を示す。X 軸は時間 (年)、Y 軸は有効集団サイズ (N_e) を示している。

Nishikaku *et al.* 2022

第三章

PCR-RFLP 法を用いた牛伝染性リンパ腫ウイルスの 遺伝子型判別手法の検討

第三章 PCR-RFLP 法を用いた牛伝染性リンパ腫ウイルスの 遺伝子型判別手法の検討

I. 序論

前章では、BLV の分岐年代推定と伝播経路を明らかにした。この研究により、EBL および BLV の拡大は、畜産の発展や、政治的、社会的背景と深く関係していることが示唆された。症状を呈さないうちに感染を拡大させる BLV が、いかに宿主の移動とともに分布域を拡大させていくかを示している。また、BLV の *env* 遺伝子の表面糖タンパク質 (gp51) 領域の進化速度と変異の蓄積は、地域性をよく表す指標となるため、進化過程、流行および拡散経路を把握する疫学的解析手法の重要な情報と考えられる。実際に、ヒトに被害を与えるウイルスの遺伝子型を調べることは、流行の把握、病原性 (強毒株) の監視、伝播経路の推定などの知見を得るために実施されている。BLV において、遺伝子型による病原性の違いは現在のところ明らかになっていないが、我々の調査から日本国内の農場で検出される遺伝子型の大半は 1 型であるが、EBL 発症牛から比較的多く 3 型が検出されている。感染症の国際化が急速に進むなか、BLV の流行の把握および伝播経路などに関する新しい知見を得るために、遺伝子型を利用した疫学調査は非常に重要である。

第一章の緒言で述べた通り、BLV は日本だけでなく、カナダ、アメリカ、東欧、南米およびアジアの多くの国で依然として流行している^{21,22)}。BLV は *env* 遺伝子の塩基配列の違いから、少なくとも 10 型の遺伝子型が存在することが

報告されている²²⁾。BLVの遺伝子型には地域特異性がみられ、1型は世界中に分布しており、2および9型は南米、4, 7, 8型は主にヨーロッパ、6および10型はアジアと南米に存在している。日本では世界中で流行している1型と、アメリカおよび韓国で検出される3型の2種類が分布していることがわかっている。BLVの感染には感染リンパ球などの物理的接触が必要であるため、遺伝子型の地域特異性とBLV感染牛の移動・貿易には関係性があると考えられている。

PCR-制限酵素断片長多型 (PCR-RFLP) 解析は、遺伝子配列決定を必要としない、比較的簡単な解析手法であることから、従来からBLVの遺伝子型判別手法として広く用いられている⁶⁴⁻⁶⁹⁾。先行研究では、BLV *env* 遺伝子の部分増幅 (nt5099-5542) 444 bp を、5種類の制限酵素 (*BamH I*, *Bcl I*, *Bgl I*, *Hae III*, *Pvu II*) の組み合わせにより、その切断パターンからBLV遺伝子型の識別に適したマーカーであると示されている⁶⁵⁾。また、別の研究では、5種類の制限酵素のうち3種類 (*Bcl I*, *Hae III*, *Pvu II*) を用いたRFLPがBLVの遺伝子型判別に十分であることが示された⁶⁷⁾。この2つのPCR-RFLP法による遺伝子型判別の一致率は78.96%で精度が低いにも関わらず、現在では3つの制限酵素によるプロトコルがBLVの疫学分野で広く使用されている。この方法を用いた日本のBLV感染牛の遺伝子型を判別した疫学研究では、1-6型の6種類の遺伝子型が同定されている⁷⁰⁾。しかし、これまでの研究では、日本国内で配列決定されたBLVは系統解析により1型と3型に分類されることから、不正確な疫学情報を提供していることになる。

そこで本研究では、PCR-RFLP に基づく遺伝子型判別と配列に基づく分子系統解析の間の矛盾を解決するために、BLV*env* 遺伝子（444 bp）を用いた PCR-RFLP に基づく新しいプロトコルを検討し、現在報告されている 10 型の BLV 遺伝子型判別を行った。

II. 材料および方法

1. サンプル

2015年に、と畜場（神奈川県食肉衛生検査所および千葉県南総食肉衛生検査所）により EBL と診断された牛の腫瘍組織検体（20 農場、n=20）を供試した。

2. DNA 抽出

組織を 15 g を秤量し、DNA 抽出キット「QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN)」を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA はただちに使用するか、または使用まで-20°Cで凍結保存した。抽出した DNA は微量吸光スペクトロメーター e-spect（ビーエム機器株式会社、東京）にて濃度を測定した。

3. 配列取得および分子系統解析

GenBank/EMBL/DDBJ データベースからの BLV*env*-gp51 の部分配列（444 bp）396 配列 を取得し、MEGA7 ソフトウェアによってアラインメントした。BLV*env*の部分配列（444 bp）の系統樹推定には、MEGA7による最尤法（ML法）で行った。MEGA7の Find best DNA/Protein models（ML）による Akaike 情報量基準（AIC）に従い、最適な塩基置換モデルである Kimura-2 parameter model plus gamma distribution（K2+G）を選択した。系統樹の信頼性は、ノンパラメトリック・ブートストラップ解析により 1000 回のランダムサンプリングを行った。系統解析によって遺伝子型判別さ

れたこれらの配列は、*in silico* 解析による 10 型の遺伝子型に型別可能な制限酵素の選択を行う際に用いた。

4. *in silico* 解析による PCR-RFLP 法に適した制限酵素の選択

BLV *env*-gp51 (444 bp) 領域を制限酵素による切断パターンによって、10 型の遺伝子型に型別することが可能な制限酵素の選択を行う。まず、タカラバイオ、東洋紡および New England Biolabs (Ipswich, USA) から市販されている 229 種類の制限酵素を BLV の PCR-RFLP 法の対象とした。Genetyx 5.1 ソフトウェアを用いて、制限酵素 229 種類による BLV *env*-gp51 (444 bp) 396 配列の切断パターンを解析し、遺伝子型判別を行った。

5. *env* 遺伝子 (444 bp) 増幅 PCR

組織から抽出した DNA から、BLV *env* 遺伝子の可変領域である 444 bp を、Ex Taq (タカラバイオ、滋賀) を用いて、以下のプライマーで nested PCR により増幅した。Forward *env*5032 (5'-TCTGTGCCAAGTCTCCAGATA-3') および Reverse *env*5608 (5'-AACAAACAACCTCTGGAAGGT-3') を 1st PCR に、Forward PCR *env*5099 (5'-CCCACAAGGGCGGCGCCGGTTT-3') and Reverse *env*5521 (5'-GCGAGGCCGGGTCCAGCTGG-3') を 2nd PCR に用いた⁷¹⁾。1st PCR および 2nd PCR のアンプリコンサイズはそれぞれ 598 bp および 444 bp である。PCR の反応条件は、95°C 30 秒の熱変性、58°C 30 秒のアニーリング、72°C 1 分の伸長を 1 サイクルとし、30 サイクルで行った。

TAE Buffer に 1% の Agarose S (ニッポンジーン) を溶解しゲルを作製した。電気泳動槽に 1×TAE Buffer を注ぎ、Ethidium Bromide Solution 10mg/mL (promega、Wisconsin、USA) 25 μL を加えた後にゲルをセットした。PCR 産物 25 μL と 10×Loading Buffer (タカラバイオ) 3 μL を混和させ、全量をウェルに入れた。100 bp DNA Ladder (タカラバイオ) 5 μL をウェルに入れた後、100 V 30 分で電気泳動した。泳動後は UV を照射し、DNA の増幅産物の有無を確認した。444 bp 付近にバンドが確認できたもののみ、ゲルからバンドを切り出し、QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN) の手順書に従って DNA を精製した。

6. PCR-RFLP

PCR により BLV *env*gp51 (444 bp) を増幅した組織由来 DNA 20 検体の精製 DNA を用いて RFLP による遺伝子型判別を行う。同様に、遺伝子型 6、9 および 10 型のプラスミド DNA (理化学研究所 間陽子先生より供試) を用いて RFLP を行った。RFLP 反応液 (20 μL) には、精製した PCR 産物 2.5 μL、*Bmr I*、*Alw I* および *Hph I* (New England Biolabs) を 15 U、*Taq I*、*Pvu II*、*BamH I*、*Mse I* (タカラバイオ) を 20 U、および各制限酵素に適した Buffer により制限酵素処理を行った。制限酵素処理は、それぞれ 37°C で 2 時間 (*Bmr I*、*Hph I*、*Pvu II*、*Alw I*)、30°C で 2 時間 (*BamH I*)、60°C で 2 時間 (*Mse I*)、65°C で 2 時間 (*Taq I*) で実施した。RFLP 処理産物は、20 bp の DNA ラダーおよび 100 bp の DNA ラダー (タカラバイオ) とと

もに、3%TAE アガロースゲル (Agarose S、ニッポンジーン) で 100V、40 分間電気泳動で分離した。

III. 結果

1. *in silico*における RFLP 解析

BLV の 10 種類の遺伝子型を RFLP で型別するために、系統解析で遺伝子型を決定した BLV *env-gp51* (444 bp) の 396 配列において、229 種類の制限酵素を用いて *in silico* で遺伝子型判別を行った。各遺伝子型に特異的な RFLP プロファイルを作成した (表 4、表 5、図 11)。50 bp 以下の断片はアガロースゲル上で明確に確認できないため、このような小さな断片は遺伝子型の判別に考慮しなかった。

データベース中の大部分の配列は 1 型に分類されているため、まず 1 型と他の遺伝子型を識別するための PCR-RFLP 法を検討した (表 5)。*Bmr I* により 5 種類の RFLP パターンが得られ、1 型の配列の 97.9% (143/146) が表 1 で定義したプロファイル B1 に該当し、ロシアからの 7 型が 1 配列あった (JQ353638)。このグループの中で、次に *Hph I* を用いた制限酵素処理で、1 型と 7 型を型別することができた。1 型では、*Hph I* は 3 つの非常に類似した切断パターンを示した : profile H1 (Fragment size: 224 and 220 bp), profile H2 (217, 196 and 31 bp) and profile H3 (217, 181 and 46 bp) (表 4、表 5)。一方、7 型では、3 つの切断パターンであったが、目視でわかりやすいフラグメントサイズを示した : profile H4 (217, 137 and 90 bp)。このことから、*Bmr I* と *Hph I* は、7 型と 1 型の型別に使用することができる。*BamH I* と *Pvu II* では、2 型から 10 型を型別するのに有効であった。*BamH I* と *Pvu II* 消化の組み合わせによる RFLP プロファイルの 4 つのうち 3 つ、すなわち

Ba1- P1、 Ba1- P2、 Ba2- P2 が 2 つ以上の遺伝子型を含んでいたため、*Hph* I、 *Taq* I、 *Alw* I および *Mse* I などの 2 つ以上の制限酵素による連続の処理が必要であると判断された。2-5 種類の制限酵素を用いた RFLP 解析の結果、90.4% (358/396) の BLV 配列が ML tree に対応した遺伝子型を示した (表 5、図 11)。提案した PCR-RFLP 法を検証するために、本システムを次のように適用した。

2. *in vivo* における実証解析

EBL 発症牛 20 検体から得られた BLV *env*-gp51 (444 bp) 配列を用いてデータベースに登録されている 396 配列を用いて ML tree を推定した。これまでの研究結果と同様に、系統樹は BLV を 1-10 型の遺伝子型に型別する結果となった。EBL 発症牛由来の 20 配列のうち、18 配列は 1 型 (DDBJ : accession no.LC361248-LC361258, LC361260-LC361266) に型別され、2 配列は 3 型 (DDBJ : accession no.LC361259, LC361267) に型別された。系統解析と PCR-RFLP 法の結果が一致し、近年報告された 9 型および 10 型を含めて型別可能な新規 PCR-RFLP 法であるかどうかを検証した。

PCR-RFLP の結果、EBL 発症牛 18 検体はすべて 1 型に型別され、他の 2 検体は 3 型に型別された (図 12)。これらは ML tree で解析した遺伝子型と一致する結果となった。さらに、9 および 10 型の BLV プラスミドを用いた結果、PCR-RFLP 法と ML tree の両方で一致する結果となった。一方、6 型の BLV プラスミドを用いた解析の結果、ML tree で 6 型としてクラスタリングされ、切断パターンの類似性から本 PCR-RFLP 法で区別できない 3 つの遺伝子

型を含むプロファイル（プロファイル A3；遺伝子型 1、6 または 8）に分類されることが判明した。

また、この PCR-RFLP 法を用いて、神奈川県 7 農場 15 頭の BLV 抗体陽性の乳牛の血液検体で同様の解析を行ったところ、すべて 1 型に型別され、日本に分布する BLV の遺伝子型を正確にスクリーニングできる手法であることがわかった（Data not shown）。

IV. 考察

本研究では、BLV *env*-gp51 (444 bp) を用いた PCR-RFLP により、BLV の遺伝子型を 10 型まで型別できる方法を確立した。DNA 塩基配列に基づく系統解析は、遺伝子型を決定する上で最も信頼性の高い解析であるが、時間やコストがかかり、高額精密機器が必要である。そのため、家畜保健衛生所などの現場での応用には限界がある。そこで、短時間で比較的安価、そして従来法よりも正確かつ広範囲に適用した本方法は、大量の疫学検体をスクリーニングし、正しい情報を提供することが可能である。

これまでの研究では、PCR-RFLP 法は BLV の遺伝子型判別するために一般的に利用される技術である。しかし、近年の分子系統学的解析の結果から、PCR-RFLP 法で型別されたいくつかの遺伝子型は、分子系統樹で決定された遺伝子型と矛盾する可能性があることが示された。例えば、AY185360 の BLV *env* 配列について、*Bcl I*、*Hae III*、*Pvu II* の 3 種類の制限酵素を用いて予測した RFLP の切断パターンから、この BLV 配列は 1 型に型別された。一方、本研究や他の先行研究による系統解析では、この配列は 6 型に型別されることが示された^{29,30,72})。このような誤認があるにもかかわらず、世界各地で現在も疫学調査が行われており、誤った情報が提供されている可能性がある。

本方法は 1-10 型を分けることができ、さらに系統解析との一致率も 92% であるが、分類できない配列もあるため (プロフィール A3 ; 遺伝子型 1、6 または 8) 、さらなる検討が必要である (図 10) 。

PCR-RFLP を用いたこれまでの研究で、日本では遺伝子型 1-6 が流行していることが示されている⁷⁰⁾。しかし、データベースで公開されている 444 bp の BLVenv-gp51 (444 bp) 配列のうち、日本からの配列は 1 型または 3 型に型別され、そのうち 99% が 1 型であった。本方法は、わずか 2 種類の制限酵素で最も一般的な 1 型を容易に検出することができ、BLV の遺伝子型判別手法としては非常に有効であり、BLV の疫学において重要なツールとなることが期待される。

V. 図表

表 4. PCR-RFLP による BLV *env*-gp51 (444bp) 切断パターン
のプロファイル

Restriction endonuclease	RFLP profile type	Restriction fragment size (bp)
<i>Bmr</i> I	B1	162, 143, 109, 30
	B2	173, 162, 109
	B3	301, 143
	B4	192, 143, 109
	B5	335, 109
<i>Hph</i> I	H1	224, 220
	H2	217, 196, 31
	H3	217, 181, 46
	H4	217, 137, 90
	H5	220, 196, 28
	H6	220, 153, 71
	H7	437, 7
	H8	224, 171, 49
	H9	444
<i>Bam</i> H I	Ba1	316, 128
	Ba2	444
<i>Pvu</i> II	P1	280,164
	P2	444
<i>Taq</i> I	T1	357, 82, 5
	T2	357, 58, 29
	T3	324, 87, 33
	T4	303, 87, 54
	T5	357, 87
<i>Mse</i> I	M1	326, 118
	M2	168, 118, 113, 45
<i>Alw</i> I	A1	321, 123
	A2	196, 125, 123
	A3	196, 123, 89, 36

Nishikaku *et al.* 2019

表 5. *in silico* 解析による PCR-RFLP 法の遺伝子型判別結果、使用した制限酵素およびその切断パターン (図 11 参照)

<i>Bmr</i> I	<i>Hph</i> I	<i>Bam</i> HI	<i>Pvu</i> II	<i>Hph</i> I	<i>Taq</i> I	<i>Alw</i> I	<i>Mse</i> I	Geno-type ^{a)}	No ^{b)}	A/N ^{c)}	Country of isolation
B1	H1	-	-	-	-	-	-	G1	141/146		
B1	H2	-	-	-	-	-	-	G1	1/146	LC075548	Peru
B1	H3	-	-	-	-	-	-	G1	1/146	M35239	U.S.A.
B1	H4	-	-	-	-	-	-	G7	1/51	JQ353638	Russia
B2	H1	-	-	-	-	-	-	G1	1/146	KP201467	Korea
B3	H5	-	-	-	-	-	-	G1	1/146	EU266062	Iran
B4 or B5	-	Ba1	P1	H1	-	-	-	G2	24/24		
B4 or B5	-	Ba1	P1	H3	-	-	-	G5	8/8		
B4 or B5	-	Ba1	P1	H4	-	-	-	G7	3/51		
B4 or B5	-	Ba1	P2	-	T1	-	-	G6	1/28	AY185360	Brazil
B4 or B5	-	Ba1	P2	-	T2	-	-	G6	1/28	LC075574	Bolivia
B4 or B5	H4	Ba1	P2	-	T3	-	-	G7	1/51	JQ353656	Russia
B4 or B5	H8	Ba1	P2	-	T3	-	-	G9	19/22		
B4 or B5	-	Ba1	P2	-	T4	-	-	G3	10/10		
B4 or B5	-	Ba1	P2	-	T5	A1	-	G7	1/51	JF720352	Russia
B4 or B5	-	Ba1	P2	-	T5	A2	-	G7	44/51		
B4 or B5	-	Ba1	P2	-	T5	A3	-	<u>G1</u>	1/146	AY151262	Brazil
B4 or B5	-	Ba1	P2	-	T5	A3	-	<u>G6</u>	26/28		
B4 or B5	-	Ba1	P2	-	T5	A3	-	<u>G8</u>	6/6		
B4 or B5	-	Ba2	P1	-	-	-	-	G4	73/75		
B4 or B5	-	Ba2	P2	H1	-	-	M1	<u>G4</u>	2/75		
B4 or B5	-	Ba2	P2	H1	-	-	M1	G7	1/51	JQ353649	Russia
B4 or B5	-	Ba2	P2	H1	-	-	M2	G10	26/26		
B4 or B5	-	Ba2	P2	H8	-	-	-	G9	3/22		

a) BLV genotyping according to the phylogenetic classification, b) The number of analyzed BLV sequences with the respective restriction endonuclease/total number of the sequence of respective genotype. c) The database accession number of each sequence. -: Non-relevant profile. Underlined BLV genotypes indicate that these sequences are indistinguishable by this method.

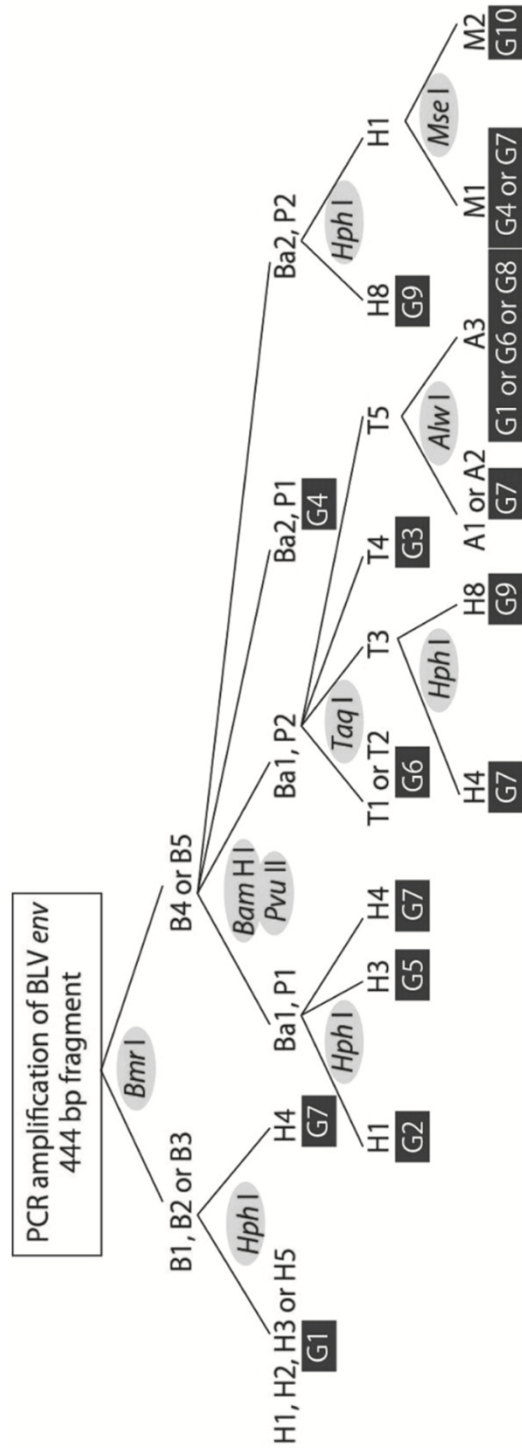


図 11. PCR-RFLP 法による BLV 遺伝子型判別のフローチャート
 左上の *Bmr I* から始まり、切断パターンによって次に使用する制限酵素および判別できる遺伝子型をフローチャートで示している。使用する制限酵素は●で、判別された遺伝子型は■で示している。切断パターン（例：B1、B2 および B3）は表 5 を参照。

Nishikaku *et al.* 2019

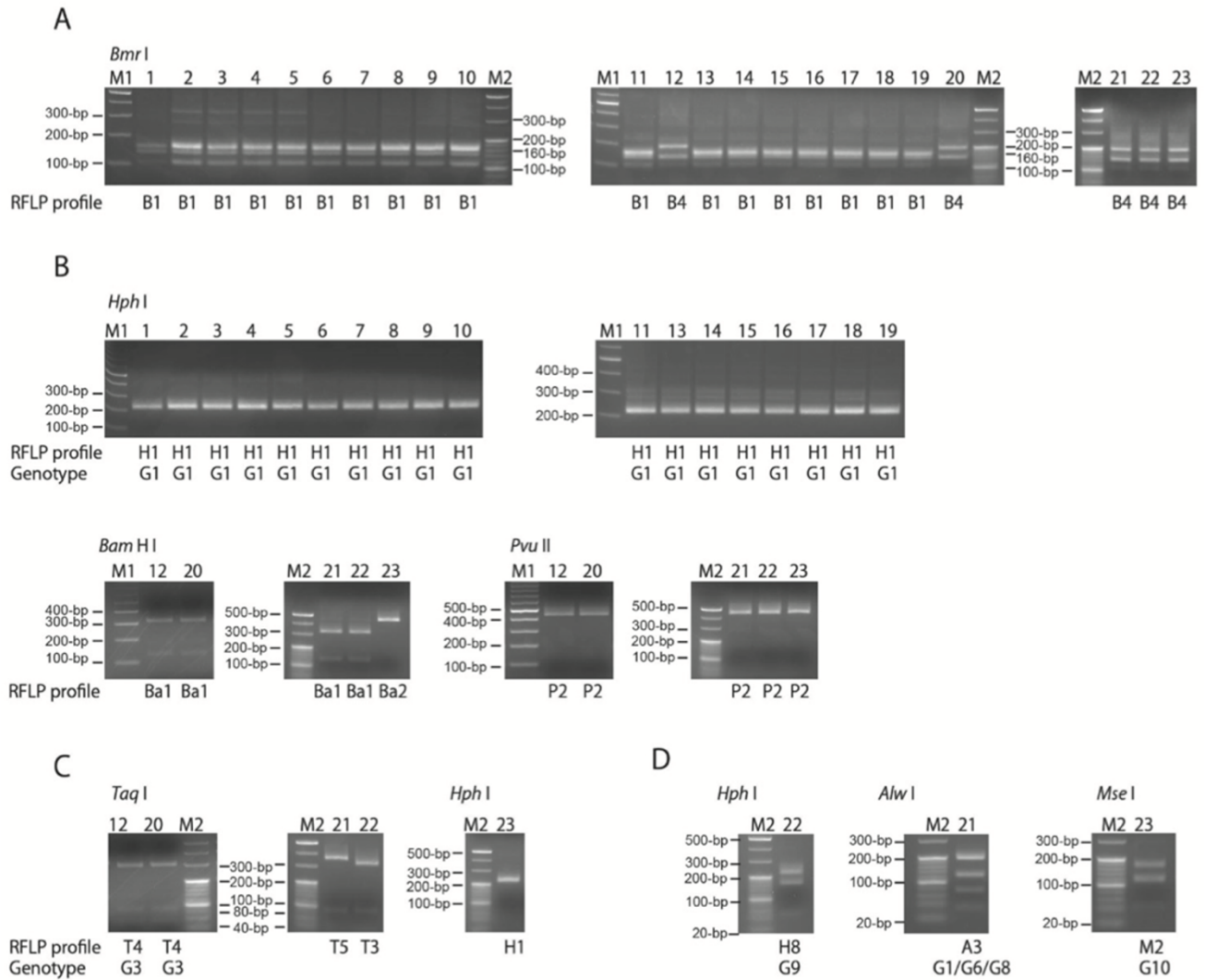


図 12. *in vivo* による PCR-RFLP 法の検証

EBL 腫瘍サンプル (サンプル 1-20) と遺伝子型 6・9・10 型の BLV プラスミド (サンプル 21-23) を用いた PCR-RFLP 法による遺伝子型判別結果。(A) - (D) は BLV *env-gp51* の PCR-RFLP プロファイル (表 4、表 5、図 11) に従い、PCR 増幅産物を制限酵素処理により遺伝子型を型別した。(A) *Bmr I* (B) *Hph I*, *BamHI* および *Pvu II* (C) *Taq I* および *Hph I* (D) *Hph I*, *Alw I* および *Mse I*
M1 : 100bp Ladder、M2 : 20bp Ladder

Nishikaku *et al.* 2019

第四章

総括

1. 牛伝染性リンパ腫の世界的流行と背景となる近代畜産の発展

牛伝染性リンパ腫がヨーロッパに初めて報告され、約 150 年を経て世界中に拡大したことの背景には、近代畜産の発展が大きく関与している。1700 年代から 1800 年代のヨーロッパは、酪農や肉牛生産の大規模化や近代化といった畜産発展の中心地であったと共に、様々な地域の在来牛を交雑させて生産性のより高い品種を作出する品種改良の中心地であったからである。さらに、産業革命や蒸気機関の発明により、多くの牛を効率的に輸送することのできるようになった。これらの背景により、地方病的に存在していた EBL 発症牛および無症状の BLV 感染牛はヨーロッパ全土へ輸送され、各国での EBL 発生へと至ったと考えられる。さらには、獣医学の発展も BLV 流行の拡大少なからず影響を与えたと考えられる。というのも、牛への侵襲的な獣医療行為の機会が増加し、BLV の重要な感染経路のひとつである機械的伝播（注射針や直腸検査に使用する手袋の使い回しや、輸血など）の機会が増加したと考えられるからである。実際、デンマークにおける急速な感染拡大に関し、放牧地でのバベシア症およびアナプラズマ症予防のために感染歴のある牛の血液を輸血していたことが原因であると記述している文献も存在する。1800 年代後半から品種改良の中心地はヨーロッパからアメリカへと移った。食肉産業の発展によりアメリカ在来牛とインドやメキシコ産牛を掛け合わせたブラーマン種などの肉用牛が作出された他、イギリス原産のショートホーン種、ヘレフォード種、アバディーンアンガス種などの導入と改良も行われた。また、乳用牛についても、ヨーロッパからホルスタイン種やブラウンスイス種を導入し、品種改良により高泌乳牛の作出を行った。さらに、第二次世界大戦後に世界的に乳の需要が増した

ことや、遺伝的能力が育種価により尺度化され、その向上によってさらに品種改良が加速化した。その後、アメリカで改良された肉牛や乳牛は世界各国に輸出され、多くの牛が大陸間を移動するに伴い、EBL も世界的に浸潤していったと考えられる。

2. 日本における牛伝染性リンパ腫の流行と背景となる近代畜産の発展

日本では、弥生土器の層から牛の骨や歯が出土した記録があることから、やむを得ず時代ごろにはすでに牛が存在していたということが示唆されている。当時の牛は農耕や運搬などの役用としての役割が中心であったと考えられる。鎌倉時代には、但馬牛、丹波牛、大和牛などの日本各地に様々な在来牛が存在していたことが、河東牧童寧直麿により「国牛十図」という図説に記されている。これらの在来牛は小型であり、肉用には向いていなかったとされるが、外国から輸入された多くの外国種（ショートホーン種、デボン種、シンメンタール種、ブラウンスイス種、エアシャー種など）との交雑が行われ、役用から肉用へと大きく変わっていった。具体的には、明治33年（1900）年から明治政府主導により外国種と在来種を掛け合わせた雑種牛生産が進められた。その後、民間主導による登録事業が進められ、それぞれの都道府県において様々な品種と交雑が行われた大正9年（1919年）以降、鳥取県における因幡種、兵庫県における但馬種、島根県における島根種、広島県における広島種といった独自の品種が整理された。このように約50年間にわたって様々な品種との交雑が行われたが、1944年に黒毛和種、褐毛和種および無各和種、1954年に日本短角種がそれぞれ和牛として認められ、全国和牛登録協会主導の育種改良が始まって

以降は、登録牛の産子以外は登録制度から排除する閉鎖式登録制度に変更され、外国種との交雑はなくなった⁷⁸⁾。

一方、酪農に関しては、乳の文化が 500 年代に日本に伝わり、日本最古の乳製品である酪・蘇・醍醐などの利用が始まるなど、歴史こそは古いが、その後発展することはほぼなかった。しかし、明治以降に乳の需要が高まりを受けて大きく発展し、飼養する牛の品種も大きく変遷した。1889 年に札幌農学校がホルスタイン種を輸入したことに始まり、各種の外国産乳用牛品種が輸入された。その後、1900 年代に入るとほとんど全国の大都市に搾乳業者が出現し、牛乳が広く普及し始めた。第二次世界大戦による飼料不足・食料不足のために乳牛の飼養頭数は一時的に減少したが、戦後は、再度増加に転じた。国外からの輸入に関しても積極的に行われ、1947 年に 25 頭のホルスタイン種が輸入されたのを皮切りに、北海道、福島県、静岡県、千葉県、兵庫県などが意欲的に外国産の乳用種雄牛を輸入してきた。また、1963 年ごろには乳用雌牛の輸入も盛んに行われるようになった。特に、1967 年には酪農振興特別助成事業により 420 頭、1968 年に 895 頭が輸入され、北海道、長野県、兵庫県、岡山県、徳島県、香川県に導入された⁷⁹⁾。その後、口蹄疫や狂牛病（BSE）の発生により輸入元の国が変遷しているが、2020 年まで継続的に海外から乳用牛の輸入を続けている。

このように、明治以降日本には様々な国から肉牛や乳牛が輸入され、それらを在来牛と交雑させたり、日本の気候や風土に合うように改良を加えることにより、日本の畜産業は大きく発展してきた。一方で、海外から牛の生体を輸入することにより、EBL だけでなく、牛伝染性鼻気管炎、ヨーネ病、伝染性角膜

炎などといった、従来日本に存在しなかった様々な感染症の原因となる病原体が日本に持ち込まれたことも、家畜衛生上、重要な事実である⁸⁰⁾。

本研究により、**EBL**の拡大は畜産の発展や、政治的および社会的背景と深く関与していることが示唆された。また、系統進化学的手法により、**EBL**の拡散経路を推定した結果、日本に拡散した**BLV**は複数の国由来のものであり、牛の輸入と共に日本に持ち込まれたことが配列データからも裏付けされた。これらの結果は、病原体がいかに宿主の移動と共に分布域を拡大させていくのかを深く理解することができる。家畜を輸入するということは、常に感染症を日本に持ち込むリスクとなりうることから、防疫の重要性を改めて示す。現在の畜産を考える上で、牛の移動は不可避であるため、**EBL**およびその他感染症の拡大を防ぐには、継続的なサーベイランスと感染牛の把握が必要である。

Summary

Phylogenetic and Evolutionary Analysis of Bovine Leukemia Virus

Kohei Nishikaku

Department of Animal Science, Graduate School of Agriculture,
Tokyo University of Agriculture

Bovine leukemia virus (BLV) is a causative agent of enzootic bovine leukosis (EBL), is currently one of the most important pathogens. EBL affects cattle health and productivity, therefore dairy and beef cattle industries severely damaged. EBL was first described in Germany (East Prussia) in 1871. The number of EBL reports had been increased in the early 20th century in European countries and North America. Today, EBL have spread to more than 60 countries around the world. The EBL epidemic is also serious in Japan. It was first reported in Japan in 1927, and now of 40.9% of dairy and 28.7% of beef cattle are infected with BLV. In this study, I reveal the early spread and epidemic history of EBL in the world and Japan using phylogenetic and molecular evolutionary analyses, in association with the global epidemiological information of the prevalence of EBL/BLV, development of modern cattle industries.

The increase in the number of EBL is due to the increase in the number of BLV infected cattle. While many studies have employed a phylogenetic study to examine BLV diversity, the results of these studies came from the analysis of viral gene sequences collected in the first two decades of the 21st century. First, we performed PCR and sequencing analysis to characterize BLV *env*-gp51 sequences from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) specimens made from 1972 to 2000 in Japan. We conducted a retrospective molecular study of the early BLV outbreak in Japan using the information on sample collection years. Moreover, the phylodynamic analysis was conducted to infer viral epidemiology, with the identification of the historical fluctuations in population dynamics.

The major historical development of dairy and beef cattle breed occurred in Europe, then move to North America in the late 1800s. EBL have been reported from these countries along with development of cattle industry. In Japan, beef cattle were introduced from Europe and North America in the late 1800s, while dairy cattle were introduced mainly from the USA in the mid-1900s. The rapid increase of EBL outbreaks in Japan in the mid-1900s seems to be related to the history of dairy cattle introduction. Phylogenetic and evolutionary analysis using BLV genome sequences from database and FFPE indicated that BLV first occurred in Europe at the late 1800s, expanded to North and South America in the 1900s, and spread worldwide, including Japan, from the mid-1900s from USA. The population dynamics

(Bayesian Skyline Plot analysis) of BLV indicated that the effective population size started to increase from the 1970s in Japan. Taken together, the EBL epidemic in the world and Japan are significantly associated with live cattle trade for development of modern cattle industries. These results further indicate that the introduction of livestock from overseas poses a risk of spreading infectious diseases into Japan.

At least 10 BLV genotypes have been identified through sequencing and phylogenetic analysis of the partial and full-length *env-gp51*. Genotype 1 is the most prevalent genotype, Genotypes 2, 5, 6 and 9 have been found in South America, while Genotypes 4, 7 and 8 have been found in Russia and Europe. Genotype 10 is prevalent in relatively restricted areas such as Thailand and Myanmar. Genotype 3 has been reported in the US, Japan and Korea. The origin of this geographical distribution would probably be linked to the cattle trade routes in the past. Since BLV sequences are genetically stable, the low sequence variations of BLV can be used as a molecular tool for tracking the migration of infected cattle populations as well as for gaining new insights into the origin, evolution, and mode of transmission of BLV and its hosts.

In this study, I developed a simple and generally applicable PCR restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method to identify BLV genotypes. While the genotyping results obtained by previously described PCR-RFLP methods matched only 78.96% to the results of

phylogenetic analysis, we demonstrated that our PCR-RFLP method can identify 90.4% of the sequences available in the database in silico.

Furthermore, the ability to all 1-10 genotypes allows for a wide range of applications. This technique can be used as a reliable system for screening a large number of epidemiological samples.

These analysis suggests that the BLV genotype 1 is predominantly distributed worldwide as a pandemic genotype, and its source location is USA. The global dispersal of genotype 1 appears to have occurred in two steps, starting with the widespread export of the virus from South America via the USA to the rest of the world around 1950, followed by local diffusion within the countries where it was introduced to . The initial step coincided with the worldwide distribution of the established commercial breeds to many other countries, and the second step coincided with the cross breeding with local populations. The phylogenetic analysis also demonstrates that the significant increase in genetic diversity observed during the late-1900s, coincided with the increase of international animal trade activities. This increase in genetic diversity, which occurred worldwide, may be explained by the adaptation of BLV to the local cattle that presented diverse genetic background. The increase was then followed by a notable decline, which was associated with the successful eradication programs adopted in European countries.

These results suggests that the BLV genotype 1 is predominantly distributed worldwide as a pandemic genotype, while another genotyopes are local diffusion within the countries. Thsesse results also demonstrates that the significant increase in genetic diversity observed during the late-1900s, correspond with the increase of international livestock trade activities. The results of this study may provide information that contributes to quarantine.

謝辞

本研究を進めるにあたり、時には温かい目で見守り、時には何事においても至らない私に幾度となく叱咤激励をかけていただき、熱心なご指導を賜りました東京農業大学農学部動物科学科動物衛生学研究室 鳥居恭司教授に深甚なる感謝の意を表します。

加えて、牛伝染性リンパ腫という大変興味深い研究テーマを提案していただき、さらに本研究の実験の遂行・論文の作成にあたり、終始懇切丁寧で熱心なご指導とご助言を賜りました同研究室 小林朋子准教授に心から感謝申し上げます。学部生からの7年間で貴重な経験を本当に多く積ませていただき、研究者としての基礎の基礎を叩き込んでいただいたことは、今後の大切な財産となります。両先生のご指導により、研究を行うにあたり必要な知識・技術、そして真摯な研究姿勢を学ぶことができました。改めて、深く感謝の意を申し上げます。

また、東京農業大学富士農場 野口龍生准教授、同研究室 村上寛史元教授には本研究の遂行にあたり、温かいご指導と適切なお助言をいただいただけでなく、検体収集に多大なるご尽力をいただきました。この場を借りて深く感謝の意を申し上げます。同研究室 加田日出美教授にも、多くの助言をいただき、厚くお礼申し上げます。

系統進化学的解析を実施するにあたり、系統解析手法、分岐年代推定および家畜の起源や集団に関して多大なご協力とご指導を賜りました、東京農業大学農学部動物科学科動物遺伝学研究室の米澤隆弘准教授に深く感謝の意を申し上げます。

本研究を進めるにあたり、貴重なアドバイスと温かい励ましをくださいました東海大学総合農学研究所 今川和彦教授、熊本大学ヒトレトロウイルス学共同研究センター 佐藤賢文教授および松尾美沙希博士、東京大学大学院農学生命科学研究科 堀正敏教授、東京薬科大学薬学部 草間和哉助教、東京農業大学元客員研究員 故稲垣靖子博士、東京農業大学学術情報課程 黒澤弥悦教授に心から感謝申し上げます。

さらに、貴重な検体の提供をいただきました神奈川県湘南家畜保健衛生所のみなさま、千葉県中央家畜保健衛生所のみなさま、千葉県東部家畜保健衛生所のみなさま、岩手県中央家畜保健衛生所のみなさま、北海道網走家畜保健衛生所のみなさま、北海道根室家畜保健衛生所のみなさま、神奈川県および千葉県の食肉衛生検査所のみなさま、理化学研究所・東京大学大学院 間陽子先生に深く感謝の意を申し上げます。

これまで東京農業大学には学部1年から博士課程3年までの計9年間在籍し、その中で動物衛生学研究室には7年間というとても長くて短い日々を過ごしました。動物衛生学研究室で学べたことを心から幸せに感じております。とても充実した研究生生活を送ることをできたのも、諸氏により日々有益なご助言とご

協力をいただいた他なりません。研究室員、院生、卒業生、友人の皆様に心から感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多くの研究者と意見を交わし、多くのご教示をいただきましたことに深謝申し上げます。

引用文献

- 1) Kanapen K, Kerkhofs P, and Mannerickx M. 1993. Eradication of enzootic bovine leukosis in Belgium: Results of the mass detection on the national cattle population in 1989, 1990 and 1991. *Ann. Med. Vet.* 137:197-201.
- 2) 農林水産省 . 2021. 監視伝染病の発生状況 . [Online] https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/attach/pdf/kansi_densen-10.pdf.
- 3) OIE. The 117 OIE-Listed diseases. [Online] <https://www.oie.int/en/what-we-do/animal-health-and-welfare/animal-diseases/old-classification-of-diseases-notifiable-to-the-oie-list-b/>.
- 4) OIE. 2021. Terrestrial Animal Health Code: Chapter 1.3. DISEASES, INFECTIONS AND INFESTATIONS LISTED BY THE OIE. [Online] https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_oie_listed_disease.pdf.
- 5) Rodriguez SM, Florins A, Gillet N, de Brogniez A, Sanchez-Alcaraz MT, Boxus M, Boulanger F, Gutierrez G, Trono K, Alvarez I, Vagnoni L and Willems L. 2011. Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. *Viruses*. 3:1210-1248.
- 6) Sagata N, Yasunaga T, Tsuzuku-Kawamura J, Ohishi K, Ogawa Y and Ikawa Y. 1985. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82:677-681.
- 7) Gillet N, Florins A, Boxus M, Burteau C, Nigro A, Vandermeers F, Balon H, Bouzar AB, Defoiche J, Burny A, Reichert M, Kettmann R and Willems L. 2007. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia

virus: Prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology* 4:18.

- 8) Barez PY, Brognies AD, Carpentier A, Gazon H, Gillet N, Gutierrez G, Hamaidia M, Jacques JR, Perike S, Sriramareddy SN, Renotte N, Staumont B, Reichert M, Trono K and Willems L. 2015. Recent Advances in BLV Research. *Viruses*. 7:6080-6088.
- 9) Kattmann R, Meunier-Rotival M, Cortadas J, Cuny G, Ghysdael J, Mammerickx M, Burny A and Bernardi G. 1979. Integration of bovine leukemia virus DNA in the bovine genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76: 4822-4826.
- 10) Burny A, Cleuter Y, Kettmann R, Mammerickx M, Marbaix G, Portetelle D, van den Broeke A, Willems L and Thomas R. 1988. Bovine leukaemia: Facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Vet. Microbiol.* 17:197-218.
- 11) Ferrer JF, Marshak RR, Abt DA and Kenyon SJ. 1978. Persistent lymphocytosis in cattle: Its cause, nature and relation to lymphosarcoma. *Ann. Rech. Vet.* 9:851-857.
- 12) Ferrer JF, Marshak RR, Abt DA and Kenyon SJ. 1979. Relationship between lymphosarcoma and persistent lymphocytosis in cattle: A review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 175:705-708.
- 13) Kettmann R, Burny A, Callebaut I, Droogmans L, Mammerickx M, Willems L and Portetelle D. 1994. Bovine leukemia virus. In: Levy J. [ed] *The Retroviridae* Vol. 3. pp.39-81, Plenum Press. NewYork.
- 14) Hopkins SG and DiGiacomo RF. 1997. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 13:107-128.

- 15) van der Maaten MJ, Miller JM and Schmerr MJ. 1981. In utero transmission of bovine leukemia virus. *Am. J. Vet. Res.* 42:1052-1054.
- 16) 農林水産省. 2015. 牛白血病に関する衛生対策ガイドライン [Online] https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/pdf/ebl_guide.pdf.
- 17) Leisering A. 1871. Hypertrophy der Malpighischen Körperchen der Milz. *Berl. Vet. West. Kgr. Sachsen* 16:15-16.
- 18) Bollinger, O (1874) Über Leukämie bei den Haustieren. *Virchows Arch.* 59:341-349.
- 19) Siedamgrotzky O, Hofmeister V (1876) Anleitung zur mikroskopischen und chemischen Diagnostik der Krankheiten der Haustiere : für Thierärzte und Landwirthe. Schönfeld 192.
- 20) EFSA Panel on Animal Health and Welfare. 2015. Scientific opinion on enzootic bovine leukosis. *EFSA J.* [Online] [10.2903/j.efsa.2015.4188](https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/102903/full).
- 21) Marawan MA, Alouffi A, Tokhy S EI, Badawy S, Shirani I, Dawood A, Guo A, Almutairi MM, Alshammari FA and Selim A. 2021. Bovine Leukemia Virus: Current Epidemiological Circumstance and Future Prospective. *Viruses.* 13:2167.
- 22) Polat M, Takeshima S and Aida Y. 2017. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukosis virus. *Virology J.* 14:209.
- 23) 窪田五郎. 1927. 淋巴肉腫の一例. 40: 375-378, 中央獣医誌.

- 24)吉川堯ら. 1971. 牛白血病の十和田地方における集中発生. 第72回日本獣医学会記事.
- 25)岩間公男ら. 1983. と畜検査からみた家畜腫瘍の検出状況について. 11:21-28. 獣医科学と統計利用.
- 26)森泰良ら. 1976. 大分県における牛白血病の発生/ 73:27-36. 農林水産省家畜衛生試験場研究報告.
- 27)Ito T. 1987. Statistics on regional prevalence of gp antibody against bovine leukosis virus in Japan. Bull. Natl. Inst. Anim. Health 90:35-60.
- 28)Murakami K, Kobayashi S, Konishi M, Kameyama K, Tsutui T. 2013. Nationwide survey of bovine leukemia virus infection among dairy and beef breeding cattle in Japan from 2010-2011. J. Vet. Med. Sci. 75:1123-1126.
- 29)Polat M, Takeshima SN, Hosomichi K, Kim J, Miyasaka T, Yamada K, Arainga M, Murakami T, Matsumoto Y, de la Barra Diaz V, Panei CJ, Gonzalez ET, Kanemaki M, Onuma M, Giovambattista G and Aida Y. 2016. A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. Retrovirology. 13:4.
- 30)Lee E, Kim EJ, Ratthanophart J, Vitoonpong R, Kim BH, Cho IS, Song JS, Lee KK and Shin YK. 2016. Molecular epidemiological and serological studies of bovine leukemia virus (BLV) infection in Thailand cattle. Infect. Genet. Evol. 41:245-254.
- 31)Aiewsakun P, Pamornchainavakul N and Inchaisri C. 2020. Early origin and global colonization of foot-and-mouth disease virus. Sci. Rep. 10:15268.

- 32) Rios L, Coronado L, Naranjo-Feliciano, Martinez-Perez O, Perera CL, Hernandez-Alvarez L, de Arce HD, Nunez JI, Ganges L and Perez LJ. 2017. Deciphering the emergence, genetic diversity and evolution of classical swine fever virus. *Sci. Rep.* 7:17887.
- 33) Kwon T, Yoon SH, Kim KW, Caetano-Anolles K, Cho S and Kim H. 2015. Time-Calibrated Phylogenomics of the Classical Swine Fever Viruses: Genome-Wide Bayesian Coalescent Approach. *PLOS ONE.* 10(3):e0121578.
- 34) Kilpatrick AM, Chmura AA, Gibbons DW, Fleischer RC, Marra PP and Daszak P. 2006. Predicting the global spread of H5N1 avian influenza. *PNAS.* 103:19368-19373.
- 35) Lee DH, Bertran K, Kwon JH and Swayne DE. 2017. Evolution, global spread, and pathogenicity of highly pathogenic avian influenza H5Nx clade 2.3.4.4. *J. Vet.* 18:269-280.
- 36) Lycett SJ, Duchatel F, Digard P. 2019. A brief history of bird flu. *Phil. Trans. R. Soc. B* 374: 20180257.
- 37) Alkhamis MA, Aguilar-Vega C, Fountain-Jones NMLin K, Perez AM and Sanchez-Vizcaino JM. 2020. Global emergence and evolutionary dynamics of bluetongue virus. *Sci. Rep.* 10:21677.
- 38) Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Lapedes A, Hahn BH, Wolinsky S and Bhattachaya T. 2000. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strain. *Science.* 288:1789-1796.
- 39) Worobey M, Gemmel M, Teuwen DE, Haselkorn T, Kunstman K, Bunce M, Muyembe JJ, Kabonbo JMM, Kalengayi RM, Marck EV, Gilbert MTP

- and Wolinsky SM. 2008. Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature*. 455:661-664.
- 40) Worobey M, Watts TD, McKay RA, Suchard MA, Granade T, Teuwen DE, Koblin BA, Heneine W, Lemey P and Jaffe H. 2016. 1970s and 'Patient 0' HIV-1 genomes illuminate early HIV/AIDS history in North America. *Nature*. 539:98-101.
- 41) Lemey P, Pybus OG, Wang B, Saksena NK, Salemi M and Vandamme AM. 2003. Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *PNAS*. 100:6588-6592.
- 42) Bahl J, Krauss S, Kuhnert D, Fourment M, Raven G, Pryor SP, Niles LJ, Danner A, Walker D, Mendenhall IH, Su YC, Dugan VG, Halpin RA, Stockwell TB, Webby RJ, Wentworth DE, Drummond AJ, Smith GJ and Wabster RG. 2013. Influenza A virus migration and persistence in North American wild birds. *PLOS pathog*. 9:e1003570.
- 43) Holmes EC, Dudas G, Rambaut A and Andersen KG. 2016. The Evolution of Ebola virus: Insights from the 2013-2016 Epidemic. *Nature*. 538:193-200.
- 44) Chao DL, Halloran ME and Longini Jr. IM. 2010. School opening dates predict pandemic influenza A (H1N1) epidemics in the USA. *J. Infect. Dis*. 202:877-880.
- 45) Brenner B, Wainberg MA and Roger M. 2013. Phylogenetic inferences on HIV-1 transmission: implications for the design of prevention and treatment interventions. *AIDS*. 27:1045-1057.
- 46) Hayati M, Biller Priscila and Colijn C. 2020. Predicting the short-term success of human influenza virus variants with machine learning. *Proc. R. Soc*. 287:20200319.

- 47) Weber MN, Wolf JM, da Silva MS, Mosenca ACS, Budaszewski RF, Lunge VR and Canal CW. 2021. Insight into the origin and diversification of bovine viral diarrhoea virus 1 subtypes. *Arch. Virol.* 166:607-611.
- 48) Molaee V, Bazzucchi M, De Mia GM, Otarod V, Adbollahi D, Rosati S and Luhken G. 2020. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses in Germany and Iran suggests their expansion with domestic sheep. *Sci. Rep.* 10:2243.
- 49) 椎野禎一郎、杉浦互. 2014. 大規模ウイルス遺伝子配列解析からみた本邦の HIV-1 流行動態. *J. AIDS Res.* 16:137-142.
- 50) 三浦定夫. 1978. 牛の白血病. I 一般概念:3-9. 三浦定夫教授定年退官記念事業会.
- 51) 家畜衛生 30 年の歩み. 1980. 第 1 章:139-145. 岩手県家畜保健衛生 30 周年記念事業実行委員会.
- 52) Kumar S, Stecher G and Tamura K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33:1870-1874.
- 53) Rambaut A, Lam TT, Max Carvalho L and Pybus OG. 2016. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evol.* 2:vew007.
- 54) Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, Vaughan T, Wu CH, Xie D, Suchard MA, Rambaut A and Drummond AJ. 2014. BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLOS Comput. Biol.* 10:e1003537.
- 55) Rambaut A and Drummond A. 2009. Tracer v1.5. [online] available at <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.

- 56) Rambaut A and Drummond A. 2016. TreeAnnotator version 1.8.0. [online] available at <http://beast.bio.ed.ac.uk>.
- 57) Rambaut A. 2019. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology: Figtree v1.4.4.[online] available at <http://beast.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- 58) Dedhia P, Tarale S, Dhongde G, Khadapkar R and Das B. 2007. Evaluation of DNA extraction methods and real time PCR optimization on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 8:55-59.
- 59) Dietrich D, Uhl B, Sailer V, Holmes EE, Jung M, Meller S and Kristiansen G. 2013. Improved PCR performance using template DNA from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues by overcoming PCR inhibition. *PLoS One* 8:e77771.
- 60) Feldman MY. 1973. Reactions of nucleic acids and nucleoproteins with formaldehyde. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 13:1-49.
- 61) Bolognesi C, Forcato C, Buson G, Fontana F, Mangano C, Doffini A, Sero V, Lanzellotto R, Signorini G, Calanca A, Sergio M, Romano R, Gianni S, Medoro G, Giorgini G, Morreau H, Barberis M, Corver WE and Manaresi N. 2016. Digital sorting of pure cell populations enables unambiguous genetic analysis of heterogeneous formalin-fixed paraffin-embedded tumors by next generation sequencing. *Sci. Rep.* 6:20944.
- 62) Kocjan BJ, Hošnjak L and Poljak M. 2015. Commercially available kits for manual and automatic extraction of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues. *Acta Dermatovenerol. Alp. Panonica Adriat.* 24:47-53.

- 63) Johnson R and Kaneene JB. 1992. Bovine leukemia virus and enzootic bovine leukosis. *Vet. Bull.* 62:287-312.
- 64) Coulston J, Naif H, Brandon R, Kumar S, Khan S, Daniel RC and Lavin MF. 1990. Molecular cloning and sequencing of an Australian isolate of proviral bovine leukaemia virus DNA: comparison with other isolates. *J. Gen. Virol.* 71:1737-1746.
- 65) Fechner H, Blankenstein P, Looman AC, Elwert J, Geue L, Albrecht C, Kurg A, Beier D, Marquardt O and Ebner D. 1997. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virology* 237:261-269.
- 66) Kettmann R, Couez D and Burny A. 1981. Restriction endonuclease mapping of linear unintegrated proviral DNA of bovine leukemia virus. *J. Virol.* 38:27-33.
- 67) Licursi M, Inoshima Y, Wu D, Yokoyama T, González ET. and Sentsui H. 2002. Genetic heterogeneity among bovine leukemia virus genotypes and its relation to humoral responses in hosts. *Virus Res.* 86:101-110.
- 68) Mamoun RZ, Morisson M, Rebeyrotte N, Busetta B, Couez D, Kettmann R, Hospital M and Guillemain B. 1990. Sequence variability of bovine leukemia virus env gene and its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins. *J. Virol.* 64:4180-4188.
- 69) Sahashi Y, Oshima M, Yamagishi J, Muramatsu C, Shimizu K and Inoshima Y. 2021. Bovine leukemia virus genotype surveillance in cattle at a slaughterhouse in Aichi Prefecture, Japan, in 2019 using polymerase chain reaction combined with restriction fragment length polymorphism. *J. Vet. Med. Sci.* 83:1730-1734
- 70) Suto A, Iwata R and Park CH. 2012. Genotyping of Bovine Leukemia

- Virus Circulating in Yamagata Prefecture. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* 65:883-887.
- 71) Fechner H, Blankenstein P, Looman AC, Elwert J, Geue L, Albrecht C, Kurg A, Beier D, Marquardt O and Ebner D. 1997. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virology* 237:261-269.
- 72) Yang Y, Kelly PJ, Bai J, Zhang R and Wang C. 2016. First molecular characterization of bovine leukemia virus infections in the Caribbean. *PLoS One* 11:e0168379.
- 73) Nishikaku K, Noguchi T, Murakami S, Torii Y and Kobayashi T. 2022. Molecular analysis of bovine leukemia virus in early epidemic phase in Japan using archived formalin fixed paraffin embedded histopathological specimens. *J. Vet. Med. Sci.* 84:350-357.
- 74) Nishikaku K, Ishiukura R, Ohnuki N, Polat M, Aida Y, Murakami S and Kobayashi T. 2019. Broadly applicable PCR restriction fragment length polymorphism method for genotyping bovine leukemia virus. *J. Vet. Med. Sci.* 81:1157-1161.
- 75) 西角光平、小林朋子. 2020. 日本における牛白血病の発生と拡散の歴史. *日本獣医史学雑誌*. 58:12-19.
- 76) Tamura G. 2004. *Pathology and Clinical Medicine*. pp. 371–375. vol. 22 an extra ed. Bunkodo. Tokyo.
- 77) Ohnuki N, Kobayashi T, Matsuo M, Nishikaku K, Kusama K, Torii Y, Inagaki Y, Horii M, Imakawa K and Satou Y. 2021. A target enrichment high throughput sequencing system for characterization of BLV whole genome sequence, integration sites, clonality and host SNP. *Sci. Rep.* 11:4521.

78)和牛育種改良の軌跡. 1995. 農業研究 8 号.

79)広瀬可恒. 1971. 酪農バンドブック. 第 1 版. 養賢堂. 東京.

80)明石博臣ら. 2004. 動物の感染症. 第 2 版. 近代出版. 東京.