



令和4年12月22日

報道機関 各位

熊本大学
東京農業大学
東海大学
国立感染症研究所

牛伝染性リンパ腫の高精度な検査技術を開発 ～血液による発症検査が可能に～

(ポイント)

- 大規模な次世代シーケンサーを用いた解析により、牛伝染性リンパ腫ウイルス^{*1}感染牛では、リンパ腫発症時に特定の感染細胞クローン^{*2}が急激に上昇することを見出しました。
- 既存技術を応用し、牛伝染性リンパ腫ウイルスの組込み部位を簡易な方法にて解析し、感染細胞のクローナリティを定量化する技術を開発しました。
- この技術により、血液を用いて、従来よりも網羅的かつ高精度に牛伝染性リンパ腫^{*3}発症を検査することが可能となりました。
- 本検査法は高度な機器や特殊な試薬を必要とせず、結果判定まで最短半日、費用対効果も高いことから、牛伝染性リンパ腫発症にかかる損失の低減につながると期待されます。

(概要説明)

牛伝染性リンパ腫は、近年発生数が増加している乳牛および肉牛の疾病であり、そのほとんどが牛伝染性リンパ腫ウイルス (bovine leukemia virus : BLV) の感染に起因します。この疾病は特徴的な症状が現れにくく、これまでの検査では高精度で牛伝染性リンパ腫を検出することは、簡単ではありませんでした。熊本大学ヒトレトロウイルス学共同研究センターの佐藤賢文教授、東京農業大学農学部動物科学科の小林朋子准教授、東海大学総合農学研究所の今川和彦教授、東海大学農学部動物科学科の稲永敏明講師、国立感染症研究所の斎藤益満主任研究官らの共同研究グループは、病態進行に伴い BLV 感染細胞がクローン性に増えることに着目し、2021 年に開発した次世代シーケンサーによる BLV の組込部位解析法「BLV-capture-seq 法」を用いて、ウシの体内における感染細胞のクローナリティの動態を経時的に解析しました。

その結果、発症牛では、発症直前に急激にクローナリティが上昇することを見出しました。また、この急激なクローナリティの変動を検出するために、共同研究グループの斎藤益満主任研究官らが開発した、簡易かつ高精度にヒトT細胞白血病ウイルス感染細胞のウイルス遺伝子挿入部位を検出する技術（Rapid Amplification of the Integration Site: RAIS法）を改良し、BLV感染細胞のクローナリティを特異的に定量解析可能な検査法（BLV-RAIS法）を開発しました。

この検査法は、感染牛の血液中に存在するBLVと宿主遺伝子のつなぎ目配列をPCR法により増幅し、シーケンス解析により、BLV組込部位の多様性（＝感染細胞のクローナリティ）を解析します。本検査技術により、血液検査によってわずか半日で従来法よりも高い感度と特異度により牛伝染性リンパ腫発症の有無を検査することが可能です。また、高度な機器や特殊な試薬を必要とせず、費用対効果も高いことから、牛伝染性リンパ腫発症にかかる損失の低減につながると期待されます。

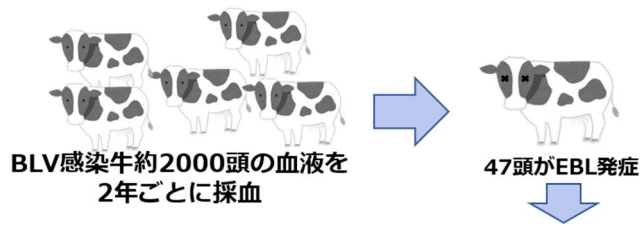
本研究成果は、2022年12月19日に米国微生物学会のウイルス学専門誌「Journal of Virology」に掲載されました。

（説明）

[研究の背景]

牛伝染性リンパ腫（enzootic bovine leukosis: EBL）は、近年増加傾向にある牛の病気で、令和3年度には4,000件以上もの発症が報告されています。EBLのほとんどは牛伝染性リンパ腫ウイルス（bovine leukemia virus: BLV）の感染が原因です。BLV感染牛のうちEBLを発症するウシは数%ですが、近年BLV感染牛が増加していることや、EBLには治療法がなく予後不良であることから、畜産業界に経済的損失をもたらしています。この疾病は特異的な症状が出にくく、これまでの検査では高精度でEBL発症の有無を検査することは、簡単ではありませんでした。

そこで今回、共同研究グループは、病態進行に伴いBLV感染細胞がクローン性に増えることに着目し、2021年に開発した次世代シーケンサーによるBLVの組込部位解析法「BLV-capture-seq法」を用いて、ウシの体内における感染細胞のクローナリティを経時的に解析しました。64農場において飼養されているBLV感染牛2,179頭を2年ごとに検査し、47頭の発症牛について、過去に遡って感染細胞のクローナリティを詳細に解析した結果、従来報告されているヒツジの感染実験の結果とは異なり、ウシにおいては、感染細胞のクローナリティがEBL発症直前に急激に上昇することが分かりました。また、発症牛の血液中の感染細胞のクローナリティは、体内に形成されたリンパ腫のクローナリティを極めて高く反映していること、さらには、体内の複数の部位の腫瘍において感染細胞の構成はほとんど同じことが分かりました(図1)。つまり、血液中の感染細胞のクローナリティをモニタリングすることにより、EBLの早期発見が可能であることが示されました。



EBL発症牛の血液を遡って次世代シーケンサーにて高精度に解析

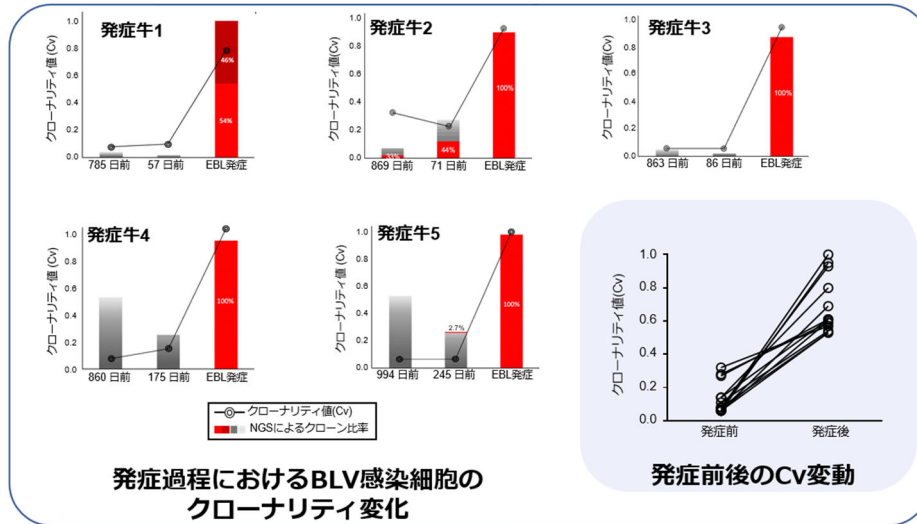


図1 クローナリティは発症時に特異的に上昇していた
RAIS法による解析でもCvが同じ傾向を示した

[発症検査法の開発]

これまでに、EBL発症は、触知できるリンパ節の腫脹、血液中のBLV遺伝子量の増加、血清中のLDHアイソザイム分画の変化などにより、診断が行われてきました。しかし、これらの項目はEBL発症以外でも変動することがあり、精度が低いという課題がありました。一方、本研究において見出された発症時の急激なクローナリティ上昇は、BLV感染細胞の腫瘍化の病態そのものであり、特異性の高い指標となります。

そこで、共同研究グループの斎藤益満主任研究官らが2022年に開発した、簡易かつ高精度にヒトT細胞白血病ウイルス感染細胞のウイルス遺伝子挿入部位を検出する技術（Rapid Amplification of the Integration Site: RAIS法）を改良し、EBL発症検査のための、BLV感染細胞のクローナリティ定量法（BLV-RAIS法）を開発しました。この検査法では、感染牛の血液中に存在するBLVと宿主であるウシ遺伝子のつなぎ目配列をPCR法により増幅し、シーケンス解析により、BLV組込部位の多様性（＝感染細胞のクローナリティ）を解析します（図2）。本検査法を開発するには、PCRによる遺伝子増幅の際に特定のクローンのみが増幅され、結果にバイアスがかかることや、BLV遺伝子が多様であり特異性と反応性を兼ね備えたプライマー設計が難しいという課題がありました。共同研究グループは、これまでのレトロウイルス研究に関する豊富な研究実績と、配列多様性解析技術を基に、BLV感染細胞に特化した特異性の高い増幅プロトコールと、これまでに報告されているほぼ全てのBLV配列を網羅するプライマーを用いることにより、従来法よりも高精度の発症検査法の開発に成功しました。

この技術により算出された感染細胞のクローナリティ値(Cv)は、次世代シーケンサーを用いた高精度な解析結果と極めて高く相関しました(相関係数R=0.99)。さらに、本検査法により発症牛と非発症牛の末梢血を用いてCvを算出したところ、発症牛のCvは非発症牛のそれらと比較すると有意に高く、この技術を用いた発症検査法により感度93.8%、特異度100%の極めて高い精度でEBLを検査できることが分かりました(図3)。

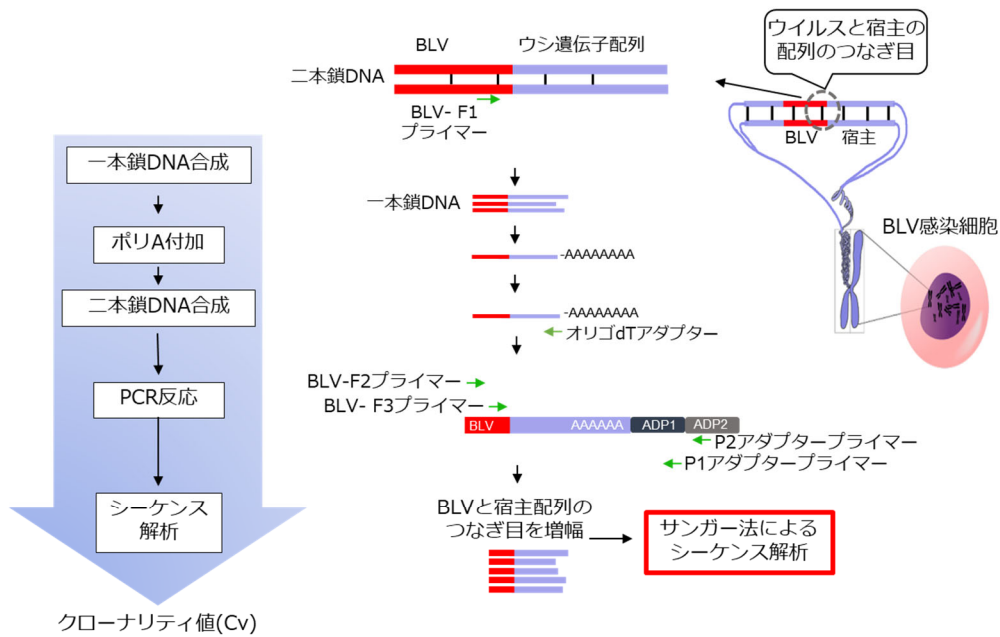


図2 RAIS法による牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV) 感染細胞のクローナリティ解析

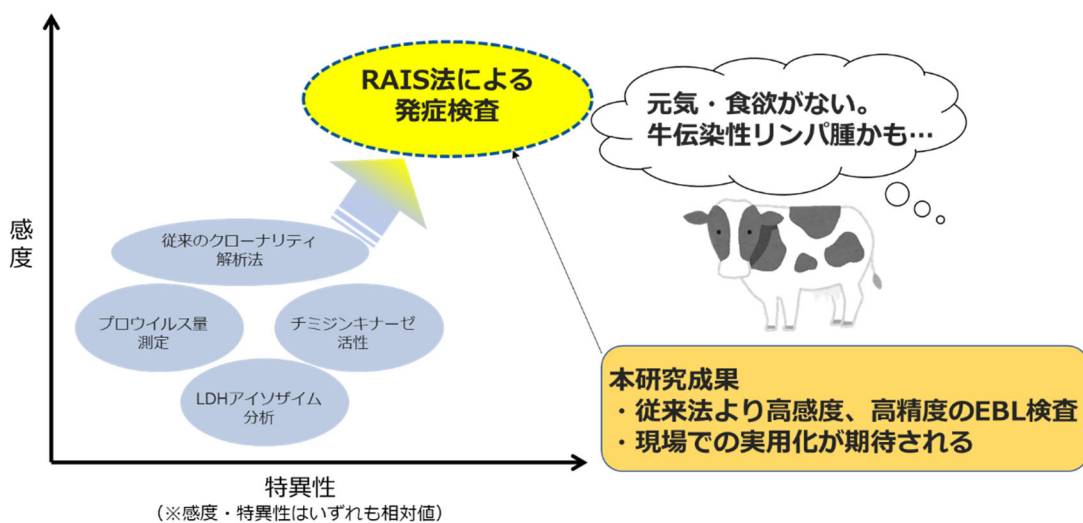


図3 RAIS法によるEBL検査

[社会に対する成果の還元、今後の展望]

本検査技術により、血液検査によってわずか半日で従来法よりも高い感度と特異度でEBL発症の有無を検査することが可能となります。また、最低限必要な機器は一般汎用機器であるサーマルサイクラーのみであり、特殊な試薬も必要としないため、高度な検査施設に限らず、小規模な診療施設でも簡単に検査が可能です。EBLは発症しても特徴的な症状に乏しく、畜産現場において予後不良のEBLと、治療可能なそれ以外の疾病との類症鑑別は極めて困難です。本検査法が普及し、手軽にEBL発症を検査することができるようになれば、発症牛については、早期淘汰により病畜の長期飼養や治療費による損失を低減すること、非発症牛については、と畜という選択肢を考えずともEBLの可能性を否定でき、安心して飼養を続けられるような判断の一助とすることが可能です。今後は、本技術の改良を重ね、より簡易的な検査手法を提案して実用性を向上させていきます。

本研究は、日本中央競馬会畜産振興事業の一環として実施されました。また、神奈川県湘南家畜保健衛生所、神奈川県農業共済組合、熊本県および神奈川県の食肉衛生検査所の協力により実施されました。

(用語解説)

※1 牛伝染性リンパ腫ウイルス (bovine leukemia virus:BLV) :

日本の乳牛・肉牛に広く感染が蔓延している、病原性のあるウイルスです。主にアブなどの吸血昆虫により媒介されます。レトロウイルス科に属し、細胞に感染すると、逆転写されたウイルス遺伝子が宿主遺伝子に組み込まれることから、感染牛は生涯ウイルスを持ち続け、感染源となります。

※2 クローナリティ (クローン性) :

一般的にがんには、もともと1個の細胞クローンが過剰に増殖した、異常な細胞集団という意味合いがあります(がん細胞のクローン性増殖)。BLV感染牛の体内には、多種多様な感染クローンが存在しており、クローンの多様性のことをクローナリティと呼びます。EBLを発症するとがん細胞クローンが感染細胞の大部分を占めるようになります。

※3 牛伝染性リンパ腫 (enzootic bovine leukosis: EBL) :

牛伝染性リンパ腫ウイルス (bovine leukemia virus: BLV) の感染が原因となる牛の疾病。感染牛の大部分は無症状であるが、一部が発症しリンパ節の腫脹、削瘦、元気消失、食欲不振、眼球突出、乳量減少、下痢などを示し、死の転帰をたどります。

※4 LDH アイソザイム分画

乳酸脱水素酵素 (Lactate dehydrogenase: LDH) は4つのサブユニットの組みあわせにより5種のアイソザイムが存在し、特徴的な電気泳動パターンを示します。ウシでは、LDHアイソザイム分画2と3がEBL発症マーカーとして有用であることが報告されています。

(論文情報)

掲載誌：米国微生物学会のウイルス学専門誌 Journal of Virology 誌
論文名：Clone dynamics and its application for the diagnosis in
Enzootic Bovine Leukosis

著者：Md Belal Hossain, Tomoko Kobayashi#, Sakurako Makimoto, Misaki
Matsuo, Kohei Nishikaku, Benjy Jek Yang Tan, Akhinur Rahman, Samiul
Alam Rajib, Kenji Sugata, Nagaki Ohnuki, Masumichi Saito, Toshiaki
Inenaga, Kazuhiko Imakawa and Yorifumi Satou#

doi : <https://doi.org/10.1128/jvi.01542-22>

URL : <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jvi.01542-22>

○問い合わせ先

(研究に関すること)

・ヒトレトロウイルス学共同研究センター熊本大学キャンパス
ゲノミクス・トランスクリプトミクス分野

教授 佐藤 賢文 (さとう よりふみ)

Tel : 096-373-6830

E-mail : y-satou "AT" kumamoto-u.ac.jp

・東京農業大学農学部動物科学科動物衛生学研究室
准教授 小林 朋子 (こばやし ともこ)

Tel : 046-270-6597

E-mail : tk205370 "AT" nodai.ac.jp

・東海大学総合農学研究所
教授 今川和彦 (いまかわ かずひこ)

E-mail : ik459102 "AT" tsc.u-tokai.ac.jp

(報道に関すること)

・熊本大学総務部総務課広報戦略室

Tel : 096-342-3271 Fax : 096-342-3110

E-mail : sos-koho "AT" jim.u.kumamoto-u.ac.jp

・東京農業大学経営企画部

Tel : 03-5477-2300 Fax : 03-5477-2707

E-mail : koho "AT" nodai.ac.jp

・東海大学広報担当

Tel : 0463-63-4670 (直通)

E-mail : pr "AT" tsc.u-tokai.ac.jp

・国立感染症研究所 総務部調整課

E-mail : info "AT" nih.go.jp

※E-mail は上記アドレス "AT" の部分を@に変えてください。