

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06413

研究課題名（和文）牛白血病ウイルスの血中プロウイルス量と感染細胞数に関する研究

研究課題名（英文）Association of proviral load and the number of infected cell in bovine leukemia virus infection

研究代表者

関口 敏（Sekiguchi, Satoshi）

宮崎大学・産業動物防疫リサーチセンター・教授

研究者番号：10462780

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：牛伝染性リンパ腫ウイルス（BLV）は牛のリンパ球（B細胞）に感染し、宿主のDNA中にプロウイルスとして組み込まれる。そのため血中プロウイルス量は、感染細胞数に比例するといわれ、感染力を評価する指標として知られている。しかし、血中のプロウイルス量だけでは感染力を説明できない個体も少なくない。その理由の一つが、複数のプロウイルスが一つの細胞に感染するマルチプロウイルスである。そこで本研究では、感染力には感染細胞あたりのプロウイルスの挿入個数が影響しているという仮説に基づき、デジタルPCR技術を用いてプロウイルスを高精度に測定する絶対定量法を確立した。さらに、この技術を診断検査法として社会実装した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、デジタルPCR技術を用いて牛伝染性リンパ腫ウイルスの血中プロウイルスを絶対定量する技術を確立した。これにより、極微量の血中プロウイルスを検出できるようになったほか、検量線への依存性を取り除くことで、エラーを減らし、精度を上げることが可能となった。この技術はBLVだけでなく、様々な病原微生物の解析にも応用可能である。食料の安定供給に対する懸念や人獣共通感染症の発生が増加していることに加え、アニマルウェルフェアに対する取り組みが活発化している影響から、動物用検査の需要が増加している。動物感染症に対する検査技術の発展は、動物の健康障害の診断を支援し、感染症の流行の監視と制御に役立つ。

研究成果の概要（英文）：Bovine lymphoma virus (BLV) infects bovine lymphocytes (B cells) and is incorporated as a provirus in the host's DNA. The blood provirus level is therefore said to be proportional to the number of infected cells and is known as an indicator for assessing infectivity. However, the amount of provirus in the blood alone does not explain the infectivity of many individuals. One reason for this is the multiprovirus, in which several proviruses infect a single cell. Therefore, based on the hypothesis that the number of inserted proviruses per infected cell affects infectivity, this study established an absolute quantification method to measure proviruses with high accuracy using digital PCR technology. Furthermore, this technology was implemented in society as a diagnostic test method.

研究分野：獣疫疫学

キーワード：牛伝染性リンパ腫 デジタルPCR 検査 診断 プロウイルス

1. 研究開始当初の背景

牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV) は、レトロウイルス科に属する逆転写酵素をもった RNA ウィルスである。BLV は主に B 細胞に感染し、宿主の DNA 中にプロウイルスとして組み込まれ持続感染する。BLV 感染牛は病態が進行すると、感染牛の 2 ~ 3 % が B 細胞性のリンパ腫 (地方病性牛白血病: EBL) を発症する。BLV 感染の診断は ELISA による抗体検出の他、Nested PCR 法やリアルタイム PCR 法によるプロウイルス遺伝子の検出があり、リアルタイム PCR 法はプロウイルス量の定量も可能である。BLV に対するワクチンや治療法はなく、感染拡大を防ぐためには BLV 感染牛を摘発・淘汰または隔離飼育するしかない。しかし、米国や日本を含むアジア諸国では BLV の感染率が非常に高いため、全ての BLV 感染牛を淘汰することは難しい。そこでわが国では、BLV 感染牛のプロウイルス量に基づく対策が推奨されている。

2. 研究の目的

(1) ドロップレットデジタル PCR (ddPCR) を用いて、BLV プロウイルスのコピー数を絶対定量する技術を確立することを目的とする。

(2) ddPCR 法に簡易核酸抽出法を組み合わせ、簡易核酸抽出法の ddPCR 法への適応性を検証する。

3. 研究の方法

(1) ddPCR 法と既存のリアルタイム PCR 法との比較検証

宮崎県内の養牛農場で飼養されている BLV 感染牛 57 頭と非感染牛 53 頭 (計 110 頭) の血液から MagLEAD システムを用いて DNA を抽出・精製した。

BLV 遺伝子に対しては env、tax、pol 遺伝子を、牛のハウスキーピング遺伝子には RPP30 遺伝子を標的としたプライマー・プローブを設計した。

ddPCR 法と既存のリアルタイム PCR 法の相関性に関する分析はスピアマンの順位相関係数を、検査結果の一致度の評価にはカップ係数を用いた。

(2) ddPCR 法への簡易核酸抽出法の適応性の検証

宮崎県内の養牛農場で飼養されている BLV 感染牛 40 頭と非感染牛 30 頭 (計 70 頭) の血液から MagLEAD システムを用いて DNA を抽出・精製した。

簡易核酸抽出法による前処理は、0.1% SDS 溶液 100uL に血液 2uL を加え、95、10 分間で反応させた。

簡易核酸抽出法によって得られた血液 2uL をテンプレートとして ddPCR 法によるプロウイルス量の定量を行った。

精製 DNA を用いた測定結果と簡易核酸抽出法で得られた測定結果を比較・検討した。

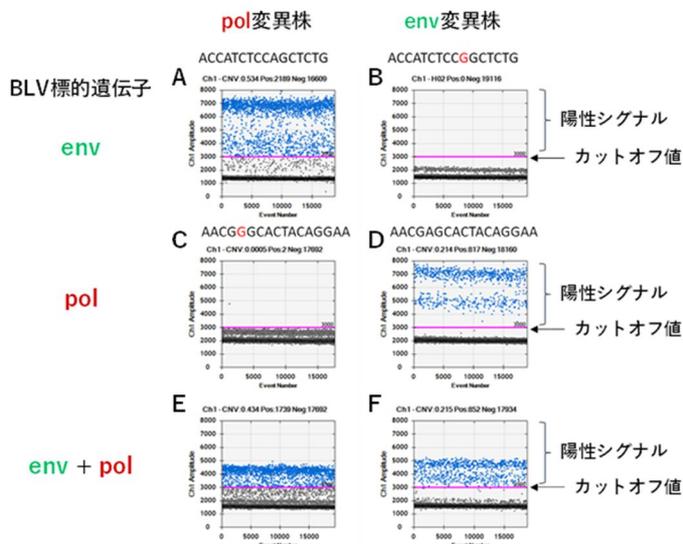
BLV 感染細胞を用いて、簡易核酸抽出法による ddPCR の検出限界 (LoD) を求めた。

4. 研究成果

(1) ddPCR 法と既存のリアルタイム PCR 法との比較検証

BLV の env および pol 遺伝子と、牛のハウスキーピング遺伝子である RPP30 遺伝子が同じ反応条件で増幅できるアニーリング温度を検討した結果、51 で最も良好な結果が得られた。BLV 遺伝子の変異に対応するため、env と pol それぞれに対するプライマー・プローブを混合して用いることとした (図 1)。

図 1 . ddPCR におけるプライマー・プローブ設計の検討。A, C, E: pol 遺伝子に変異がみられた検体。B, D, F: env 遺伝子に変異がみられた検体。図上部の塩基配列は変異箇所 (赤字) を示す。図中の青い点は BLV 遺伝子が特異的に増幅した陽性シグナルを示す。env 遺伝子を標的としたプライマー・プローブでは、env 変異株の陽性シグナルが検出されなかった (B)、pol 遺伝子を標的としたものでは、pol 変異株の陽性シグナルが検出されなかった (C)、env と pol のプライマー・プローブの両方を混合したものでは両者の変異株を検出できた (E, F)。



スピアマンの順位相関係数を用いて両者のプロウイルス量を比較した結果、相関係数は 0.98 ($p<0.01$) と高い相関を示した (図 2)。

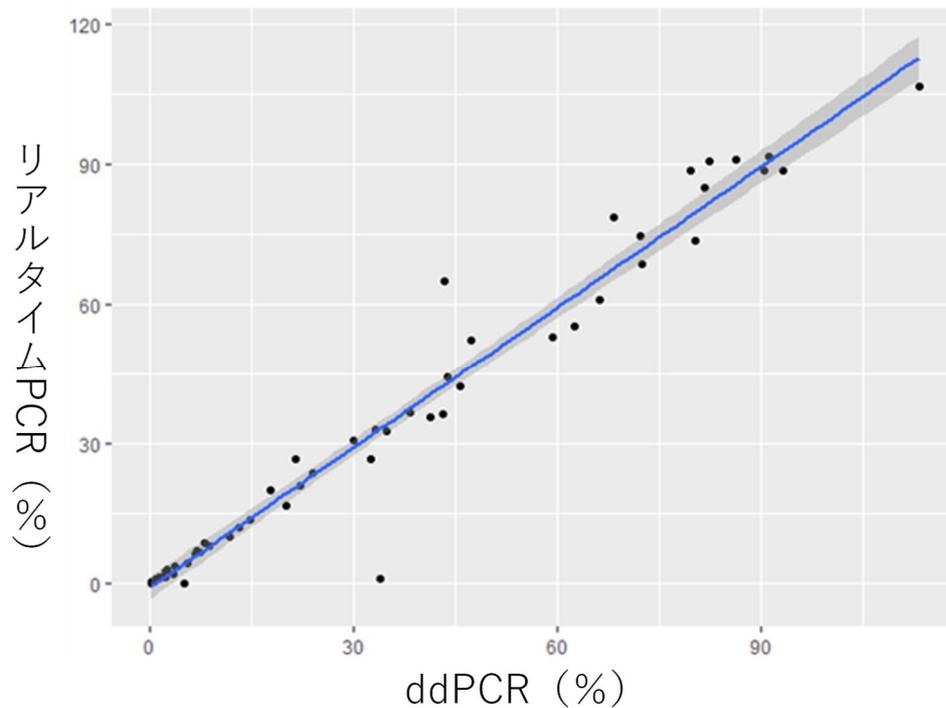


図 2 ddPCR とリアルタイム PCR の相関分析結果 (N=57)。Y 軸はリアルタイム PCR, X 軸は ddPCR の結果を示す。青い線は回帰直線, 灰色の領域は 95% 信頼区間を示す。

全ての感染牛からプロウイルスが検出され、非感染牛は全て未検出となった結果、カッパ係数は 1 となった。

(2) ddPCR 法への簡易核酸抽出法の適応性の検証

スピアマンの順位相関係数を用いて両者のプロウイルス量を比較した結果、相関係数は 0.906 ($p<0.01$) と高い相関を示した (図 3)。

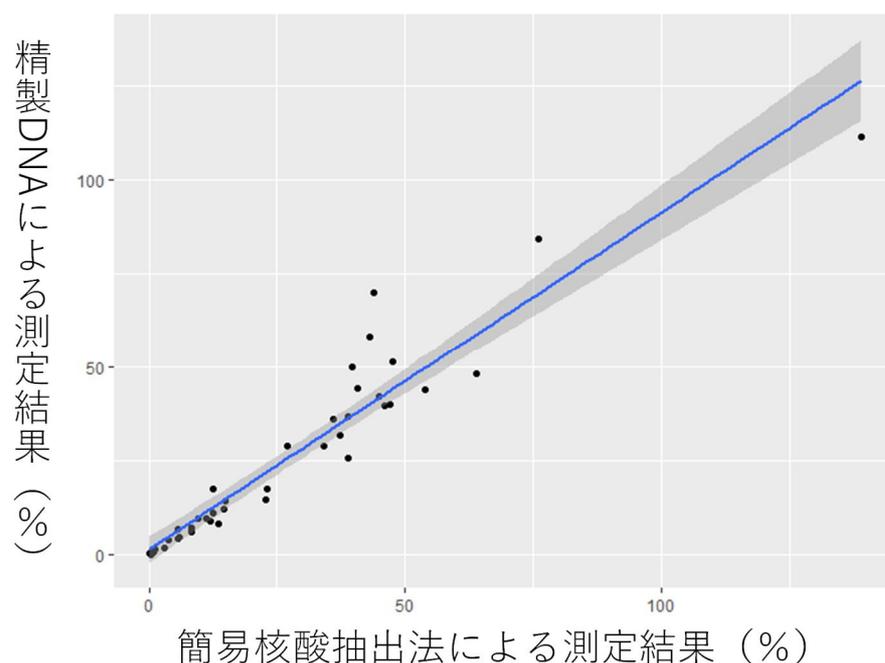


図 3 .精製 DNA を用いた測定結果と簡易核酸抽出法を用いて定量した結果の相関分析 (N=40)。Y 軸は精製 DNA の結果、X 軸は簡易核酸抽出法による結果を示す。青い線は回帰直線, 灰色の領域は 95% 信頼区間を示す。

全ての感染牛からプロウイルスが検出され、非感染牛は全て未検出となった結果、カップ係数は1となった。

LoD は約 1.6% (800 感染細胞/mL) であった。

5 . 考察

BLV 感染は畜産業に経済的被害をもたらす重要家畜伝染病の一つである。本疾病に対するワクチンや治療法はないため、ウイルスの伝播を防ぐためには感染源となる高いプロウイルス量の感染牛を優先的に更新または隔離飼育する必要がある。そのためには、感染の有無だけでなく、プロウイルス量を測定する必要がある。しかしながら、プロウイルスの定量検査にかかる費用を理由に、プログラムへの参加を断念する地域も少なくない。BLV 対策への取り組みをさらに加速させるためには、より簡便で安価な定量法を開発する必要がある。そこで本研究では、デジタル PCR を用いた定量法の開発と、簡便かつ安価な DNA 抽出方法を開発した。

本研究によって創出した革新的な技術は次の3点である。一つは、世界で初めて BLV に対する絶対定量技術を確立したこと。次に、DNA 精製が不要な簡易抽出法をデジタル PCR 法でも実現したこと。最後に、血液 1 滴というごく微量なサンプルからプロウイルス量を高精度に定量できたことである。医学分野ではデジタル PCR を用いてヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) や HIV の感染量を定量するための技術が開発されている。しかし、畜産領域においてこの技術を利用した報告はなく、本研究が世界で初めての技術となる。

デジタル PCR を BLV の定量検査に利用する利点として、限界希釈を行うためサンプル中の PCR 阻害要因を軽減できること、検量線を必要とせず、絶対的な定量を行えること、ポジティブな微小区画数を直接カウントするため定量精度が高いこと、PCR 阻害要因の軽減と飽和するまでの増幅によって高い感度が得られることなどがあげられる。特に、qPCR では作業が煩雑だけでなく、検査実施者の技量が検査結果に大きく影響する。qPCR を使って正確なプロウイルス量を安定して計測するためには、熟練した技術が求められる。それに対し、デジタル PCR は絶対定量であるため、安定して再現性のあるデータが得られる。

次に、デジタル PCR が PCR を阻害する夾雑物の影響を軽減できる性質を利用し、DNA の精製が不要な SDS 抽出法を確立した。BLV が感染する白血球のゲノムを抽出し、PCR のテンプレートとして使用するためには、血中のタンパク質を除去し、純度の高い DNA を精製する必要があった。これに対し、本法は希釈と加温だけで済み、DNA とタンパク質が混在した状態でもテンプレートとして使用できる。DNA の精製がいらないため、DNA 抽出にかかる時間が三分の一以下に、抽出コストを約 98% 減らすことに成功した。

最後に、血液 1 滴からプロウイルス量を正確に定量する技術を確立した。検査に使用する血液が 1 滴で済む利点は、採血にかかる作業時間を削減できるだけでなく、動物に与えるストレスを軽減できるという動物福祉の観点からも大きな意味がある。今後は、血液 1 滴をより簡便に安価に採取できる技術の開発が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Wu Xinyue, Notsu Kousuke, Matsuura Yuichi, Mitoma Shuya, El Daous Hala, Norimine Junzo, Sekiguchi Satoshi	4. 巻 315
2. 論文標題 Development of droplet digital PCR for quantification of bovine leukemia virus proviral load using unpurified genomic DNA	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Virological Methods	6. 最初と最後の頁 114706 ~ 114706
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jviromet.2023.114706	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Notsu Kosuke, El Daous Hala, Mitoma Shuya, Wu Xinyue, Norimine Junzo, Sekiguchi Satoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Identifying Pathogen and Allele Type Simultaneously in a Single Well Using Droplet Digital PCR	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e00493-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/msphere.00493-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Notsu Kosuke, El Daous Hala, Mitoma Shuya, Norimine Junzo, Sekiguchi Satoshi	4. 巻 99
2. 論文標題 A pooled testing system to rapidly identify cattle carrying the elite controller BoLA-DRB3*009:02 haplotype against bovine leukemia virus infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 HLA	6. 最初と最後の頁 12 ~ 24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tan.14502	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Daous HE, Mitoma S, Elhanafy E, Thi Nguyen H, Thi Mai N, Notsu K, Kaneko C, Norimine J, Sekiguchi S.	4. 巻 11
2. 論文標題 Relationship between Allelic Heterozygosity in BoLA-DRB3 and Proviral Loads in Bovine Leukemia Virus-Infected Cattle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Animals (Basel)	6. 最初と最後の頁 647
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ani11030647.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 El Daous H, Mitoma S, Elhanafy E, Thi Nguyen H, Thi Mai N, Hara A, Duangtathip K, Takezaki Y, Kaneko C, Norimine J, Sekiguchi S.	4. 巻 67
2. 論文標題 Establishment of a novel diagnostic test for Bovine leukaemia virus infection using direct filter PCR	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transbound Emerg Dis.	6. 最初と最後の頁 1671-1676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tbed.13506.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kosuke Notsu, Anuwat Wiratsudakul, Shuya Mitoma, Hala El Daous, Chiho Kaneko, Heba M El-Khaiat, Junzo Norimine, Satoshi Sekiguchi	4. 巻 9(11)
2. 論文標題 Quantitative Risk Assessment for the Introduction of Bovine Leukemia Virus-Infected Cattle Using a Cattle Movement Network Analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 903
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens9110903	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 野津 昂亮, Hala El Daous1, 三苫 修也, 乗峰 潤三, 関口 敏
2. 発表標題 リアルタイムPCRを用いた牛伝染性リンパ腫抵抗性遺伝子の新規簡易同定法の開発
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原 未歩, 牛谷 雄一, 野津 昂亮, Hala El Daous, 芹田 光玲, 三苫 修也, 乗峰 潤三, 関口 敏
2. 発表標題 確率論的手法を用いた肉用牛の外部導入における牛伝染性リンパ腫ウイルス感染のリスク評価
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 芹田 光玲, 野津 昂亮, El Daou Hala, 三苦 修也, 乗峰 潤三, 関口 敏
2. 発表標題 ドロップレットデジタルPCRを用いた牛伝染性リンパ腫ウイルス感染細胞数の絶対定量法の開発
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 抗病性及び病原体遺伝子の同時検査法並びに抗病性及び病原体遺伝子の同時検査キット	発明者 関口敏、野津昂亮	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-140503	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 対立遺伝子の検出方法及び対立遺伝子の検出キット	発明者 関口敏、野津昂亮	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-66098	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 防疫支援装置，防疫支援方法及びプログラム	発明者 関口敏	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-170272	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
エジプト	ベンハー大学		