

学 術

牛伝染性リンパ腫発症を予測するがん検診技術

今内 覚¹⁾, 岡川朋弘^{1), 2)}

1) 北海道大学大学院獣医学研究院病原制御学分野 感染症学教室

2) 株式会社ファスマック

要 約

牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV) の感染を原因とするリンパ腫が全国で急増している。リンパ腫発症牛は淘汰の対象となり、牛乳や食肉の生産ができずに全部廃棄となる。全部廃棄になると牛の売却利益が失われるだけでなく、それまでに要した膨大な経費や時間も無駄になる。しかし、本病の発症機序は未だに不明な点も多く、発症を予測する方法も存在しない。本研究では、発症予測法の開発と実用化を目標に、プロウイルス挿入部位の網羅的増幅法 (RAISING: ライジング) を用いて、BLV感染細胞のクローナリティ解析を実施した。その結果、発症牛は未発症キャリアと比べてクローナリティ値 (Cv) が高く、本病の診断法並びに発症予測法として有用であることが示された。

キーワード: 牛伝染性リンパ腫, 牛伝染性リンパ腫ウイルス, クローナリティ, 発症予測, RAISING

1. はじめに

牛伝染性リンパ腫 (旧名: 牛白血病) は牛の悪性リンパ腫 (リンパ肉腫) で、主に牛伝染性リンパ腫ウイルス (bovine leukemia virus: BLV) の感染により引き起こされる。牛がBLVに感染すると、症状を示さない期間 (無症候期: AL) を経て、約30%の感染牛が持続性リンパ球増多症 (PL) となる。さらに1~5%の感染牛が地方病性牛伝染性リンパ腫 (enzootic bovine leukosis: EBL) と呼ばれるリンパ腫を発症し、全身にリンパ肉腫を呈して死に至る (図1)。BLV感染からEBL発症までには一般的に3年以上を要し、一部の感染牛のみがEBLを発症するが、EBLの発症機序には不明な点が多く残されている。牛伝染性リンパ腫は、日本では家畜伝染病予防法で家畜の重要疾病 (監視伝染病) に指定されている。牛伝染性リンパ腫の発症牛には届出義務があり、その発生数は2024年には4,420頭にのぼり、牛

の監視伝染病の中で最多である (図2)。1998年の発生数 (99頭) と比べるとその数は44倍以上に増加しており、有効なワクチンや治療法がない故、増加に歯止めがかかっていない。リンパ腫を発症した牛は淘汰対象となり、牛乳や食肉の生産に用いることはできず全廃棄となる。仮に非常に高価な肉用牛であってもリンパ腫が見つければ、全廃棄となり売却

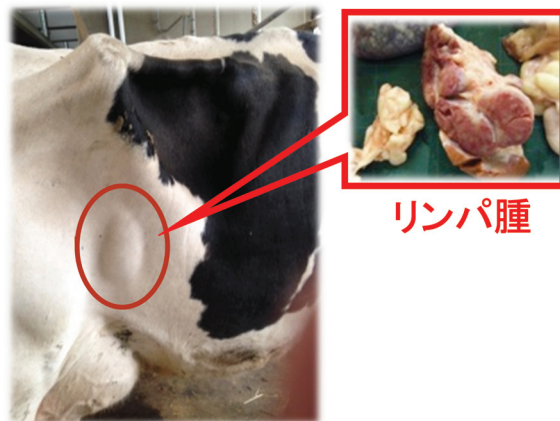


図1. 牛伝染性リンパ腫発症牛

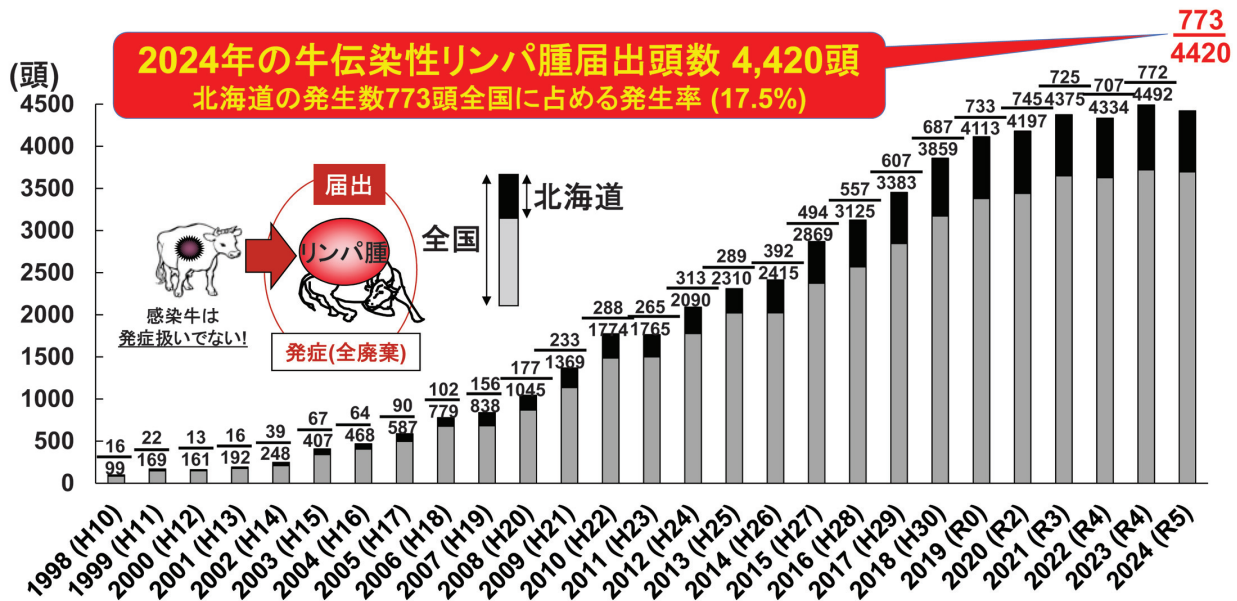


図2. 全国の牛伝染性リンパ腫の発生推移（家畜伝染病発生情報データベースより）

1. 牛伝染性リンパ腫届出数は、家畜伝染病予防法が指定する監視伝染病99種（家畜伝染病28種および届出伝染病71種）のうち牛の疾病では最多である（平成10年の44.6倍）。
2. 既に日本のウシの約35%が牛伝染性リンパ腫ウイルスに感染（2011年の農水省の調査報告による）しており、淘汰更新事業は事実上不可能な状況である。

できないだけでなく、感染後から発症牛に投じた餌代、飼育費、人件費などのそれまでに投じた経費と費やした時間の全てが水の泡に消える。地域によって異なるが、食肉衛生検査所における牛の全廃棄の原因の約30%が牛伝染性リンパ腫であるという報告もあり、A5ランクの牛を廃棄する時など、廃棄命令を出す担当獣医師からは、心情的にも非常に辛いとの悲痛な声も多くある。

牛伝染性リンパ腫は、短期間で日本の畜産業に甚大な被害をもたらす家畜衛生上の重大な課題となってしまう。牛伝染性リンパ腫に対する早急な対策を求める声は多いものの、すでに日本の牛の35%以上がBLVに感染しているとされ、感染牛の全頭淘汰による清浄化の実施は極めて困難な状況である（図2）。

2. これまでの知見と対策、その問題点

北海道大学大学院獣医学研究院は、古くからBLV感染症の迅速診断に基づく農場での感染防疫対策を生産者個人から各団体・機関まで対象に幅広く長年行ってきた。一方、提供された臨床検体を用いて、

牛伝染性リンパ腫の病態発生機序の研究も行ってきた。感染免疫・腫瘍免疫において病原体や腫瘍を排除する活性化リンパ球は、『免疫チェックポイント因子』によって制御され過剰な免疫応答が抑えられている。しかし一方で、牛伝染性リンパ腫では、種々の免疫制御因子の暴走が、病態の進行および維持に関連することが示唆され、感染細胞や腫瘍細胞が排除されない免疫回避機序の一因であることを明らかにしてきた。また、これらに対する抗体により、疲弊化した免疫が再活性化され、抗ウイルス効果を示すことを確認し、長年BLVに対するワクチン開発を妨げている理由の一つが免疫チェックポイント因子であることが明らかとなった。

北海道大学プレスリリース：

- (1) https://www.hokudai.ac.jp/news/170427_pr.pdf；牛難治性疾病の制御に応用できる免疫チェックポイント阻害薬（抗 PD-L1 抗体）の開発にはじめて成功
- (2) https://www.hokudai.ac.jp/news/170607_pr.pdf；牛難治性疾病の制御に応用できる免疫チェックポイント阻害薬（抗 PD-1 抗体）を、抗 PD-L1 抗体薬に続き開発

- (3) https://www.hokudai.ac.jp/news/190807_pr2.pdf ;
ウシの疾病に有効となる抗ウイルス効果の確認に成功 ～牛白血病などの新規制御法への応用に期待～
- (4) https://www.hokudai.ac.jp/news/pdf/201222_pr.pdf;
プロスタグランジンE₂を介した免疫チェックポイント阻害薬の新たな耐性獲得機構の解明 ～新たな免疫療法への応用に期待～
- (5) https://www.hokudai.ac.jp/news/pdf/220310_pr.pdf;
母牛はわが身を削って子牛を出産する～牛伝染性リンパ腫と分娩との関係、周産期に疾病が多発するメカニズムの一端を証明～
- 農林水産省プレスリリース：
- (6) <https://www.affrc.maff.go.jp/docs/press/191224.html> ;
2019年農業技術10大ニュース選出「牛白血病の新たな制御方法、抗ウイルス効果の確認に成功ー牛の難治性疾病に対する応用に期待ー」

BLV感染症の診断法は、主に感染の有無の検査のみに留まっており、EBLを発症する個体を予測することはできない。さらにEBLを発症していても体表のリンパ節のみが腫脹するとは限らず、体内で発生したリンパ腫を診断するのは極めて困難である。これまで、我々が行ってきた牛伝染性リンパ腫の病態発生機序解明の研究では、BLV感染牛の病態進行は、リンパ球数増加やウイルス量増加と関係することを明らかにしてきた。牛伝染性リンパ腫におけるリンパ球数の増加は、古くからECの鍵として発症や病態進行のリスク評価として使われてきた。しかし、BLV感染以外でもリンパ球の増加は多々起こり得ることから、感染ウイルス量の定量による病態との評価を行ってきた。当初は、BLVは指示細胞に対してシンシチウム（合胞体）を形成するという性質を利用してパイオアッセイ法を行い、得られるウイルス価で評価していたが、操作が煩雑であることや培養やシンシチウムのカウントに時間を要することから、1990年台後半に分子生物学研究に導入されたreal-time PCR法を用いたウイルス遺伝子の定量法を立ち上げた。すなわち、RNAウイルスであるBLVが感染したのちに宿主遺伝子に組込まれたプロウイルスを定量し、病態との関与や発症リスク解析を進めた。

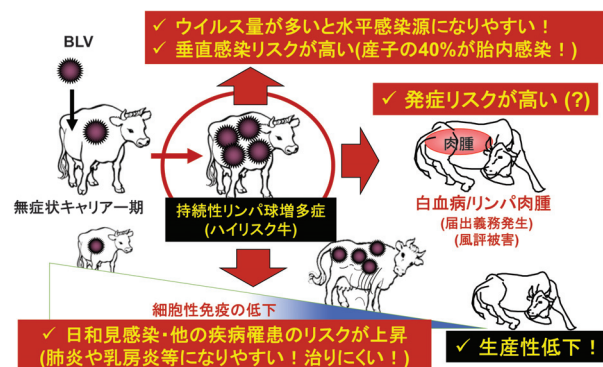


図3. ウイルス量が多い感染牛が及ぼす影響

数万頭にも及ぶ感染牛の解析結果から、BLV感染牛のプロウイルス量の増加は病態進行を反映するだけでなく、水平感染リスク、子宮内感染を含む垂直感染リスク、免疫低下に伴う日和見感染リスク評価にも有用であることも明らかにしてきた（図3）。さらに、得られた成果を基盤に一定のプロウイルス量を基準とするハイリスク牛の提唱も行った。実際にハイリスク牛は生産性においてマイナスとなる点が多く、ハイリスク牛をコントロールすることで農場におけるウイルス感染伝播の抑制などBLV感染牛の管理対応に貢献することが可能であった。しかし、BLV感染率が急上昇し、感染牛の大規模淘汰や分離飼育が困難な現状に陥った中では、農場のニーズは、どの感染牛が発症するのか？すなわち、感染牛の中から発症リスクが高まった個体を効率的に選別し、優先淘汰を行いたいという対策にシフトしていった。そこで我々が提唱したプロウイルス量の測定を基盤とするハイリスク牛が発症のハイリスクにもなるか検証を重ねた。予想では発症となるリンパ腫は、感染細胞で構成されていることから、プロウイルス量の増加が反映され発症リスクも高いと考えられた。しかし、プロウイルス量が多いハイリスク牛からの発症例もあった一方、ハイリスク牛でも発症しない感染牛が少なくなかった。このことから牛伝染性リンパ腫の発症を予測するという農場の新たなニーズに応えるためにはプロウイルス量の測定に代わる新たなアプローチが必要であった。

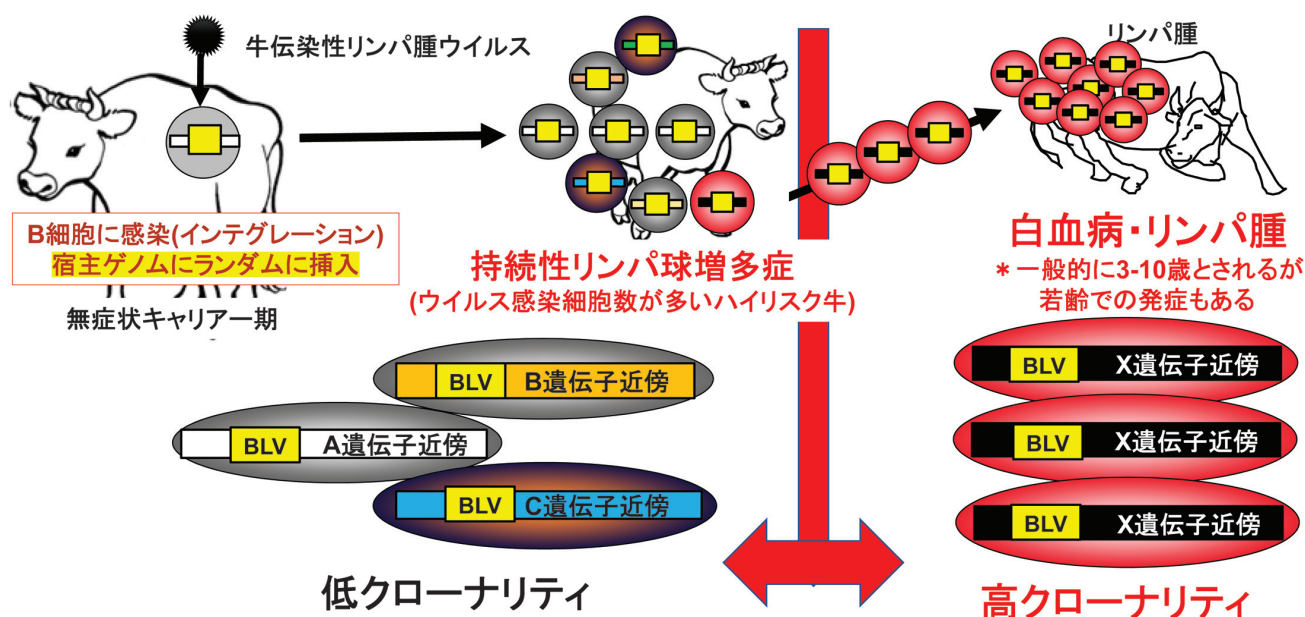


図4. BLV感染牛における感染細胞の単一性(クローナリティ)の違い

プロウイルスが挿入されるゲノム位置はランダムで感染細胞によって異なる。リンパ腫を発症したEBL牛では特定の感染細胞が異常増殖しているため、特定のプロウイルス挿入部位の占める割合が上昇し、感染細胞のクローナリティが高くなる。

3. BLV感染牛における未発症牛(キャリア牛)とリンパ腫発症牛の大きな違い

BLVをはじめとするレトロウイルスは、感染細胞のゲノムDNAにプロウイルスとして組込まれ、持続感染する。プロウイルスが挿入されるゲノム位置はランダムで、感染細胞によって異なる。リンパ腫を発症していないALやPL牛では様々な感染細胞が存在しているため、多様なプロウイルス挿入部位が認められ、感染細胞の単一性(クローナリティ)は低くなる(図4)。一方、リンパ腫を発症したEBL牛では特定の感染細胞が異常増殖しているため、特定のプロウイルス挿入部位の占める割合が上昇し、感染細胞のクローナリティが高くなる(図4)。例えば感染ウイルス量がともに多いPL牛とEBL牛でも、ハイリスク牛でもあるPL牛ではクローナリティが低い一方、特定の感染細胞が異常増殖しているEBL牛ではクローナリティが高いことになる。そこで、クローナリティを基盤に評価するBLVのプロウイルス挿入部位の増幅技術を開発した。

4. 開発した発症予測法‘RAISING’

ヒトの成人T細胞白血病/リンパ腫(ATL)の原因は、BLVに近縁なレトロウイルスであるヒトT細胞白血病ウイルス1型(Human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1)の感染である。HTLV-1の感染者のほとんどは無症状(キャリア)であるが、リンパ腫を発症すると予後が不良なことから、がん細胞の早期の検出が極めて重要である。その早期診断法としてHTLV-1の遺伝子組込み部位の同定や遺伝子組込み細胞のクローナリティを測定することが考えられていた。国立感染症研究所の斎藤益満主任研究員らは、HTLV-1の遺伝子導入部位を検出することにより、クローナリティを評価するプロウイルス挿入部位の網羅的増幅法ライジング(RAISING: Rapid Amplification of the Integration Site without Interference by Genomic DNA Contaminationの略)を開発した(図5)

(参考 URL: https://fasmac.co.jp/rais_method_case). RAISINGは、従来のクローナリティ解析技術よりも迅速で(3時間で増幅完了)、簡便かつ低コスト

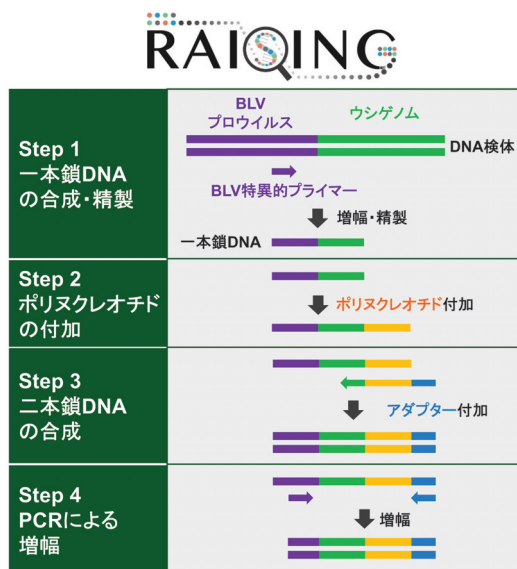


図 5. RAISINGの原理

で実施可能な方法（特殊な試薬や高額な解析機器を必要としない）でありながら、高感度・高精度にクローナリティを解析可能な技術である。さらに、斎藤主任研究員らはクローナリティの程度を正確に数値化することが可能な独自の解析ソフト（CLOVA）も開発し、HTLV-1に感染した688人のサンプルを用いてRAISINGの有用性を検証した。その結果、RAISINGはATL患者のクローナリティ値

を感度100%、特異度94.8%で識別できることが確認され、ATLリスク評価として極めて有用な診断法であることを報告した（Wada *et al.*, 2022）。同時に斎藤主任研究員らは北海道大学との共同研究によってRAISINGを同じレトロウイルスを原因とする牛伝染性リンパ腫にも応用した。その結果、RAISINGは、ATL患者の解析結果同様、EBL発症牛と未発症キャリアをクローナリティ値によって識別可能であることが確認された（Wada *et al.*, 2022）（図 6）。

5. RAISINGによる牛伝染性リンパ腫の発症予測

羊は牛伝染性リンパ腫の有用な感染モデル動物である。牛はBLVが感染してから牛伝染性リンパ腫を発症するまで長期間の潜伏期が必要とするのに対し、羊は短期間で高率でリンパ腫を発症する。そこで、岩手大学農学部との協力のもと、BLV実験感染羊のクローナリティ値およびプロウイルス量の動向を解析した。その結果、RAISINGによるクローナリティ値はリンパ腫を発症する前に、プロウイルス量よりも早いタイミングで上昇することが確認された。この感染実験により得られた成績はRAISINGが牛伝

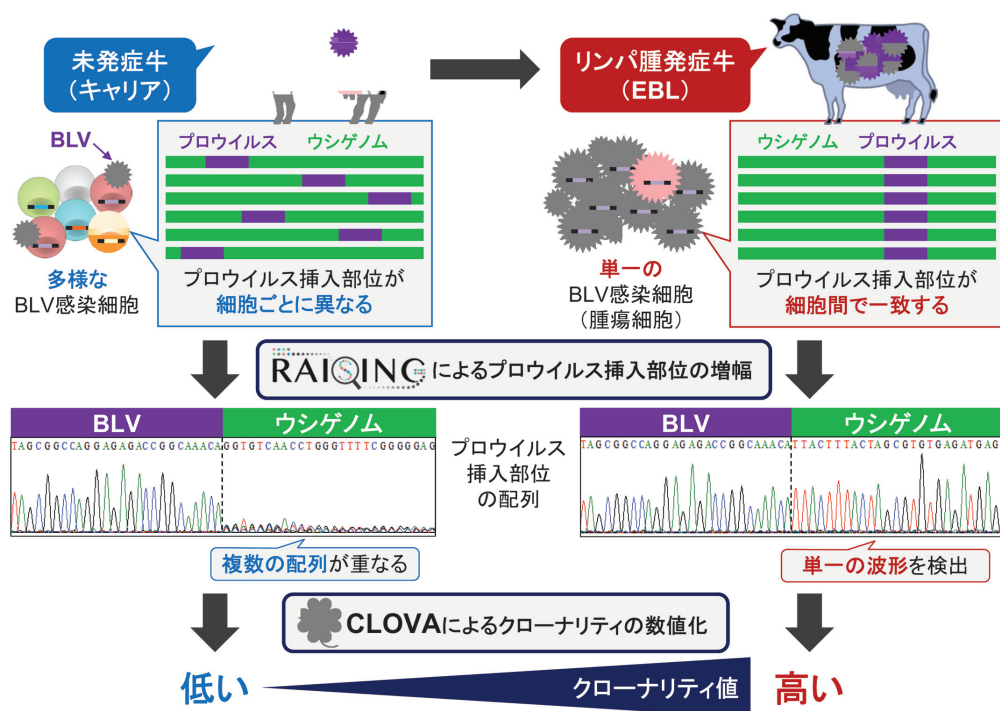


図 6. RAISINGによるクローナリティ解析

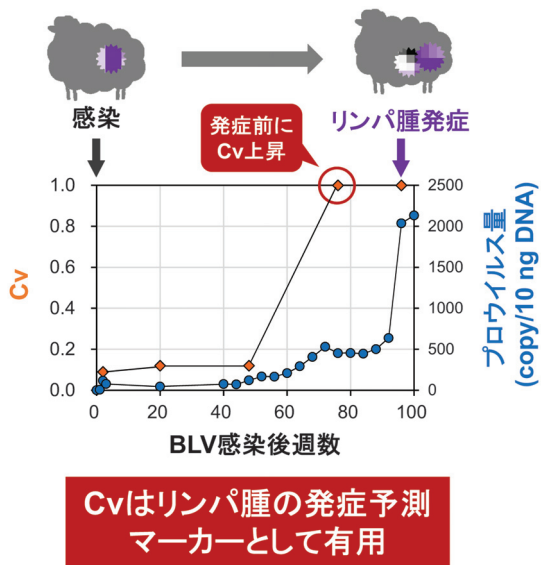


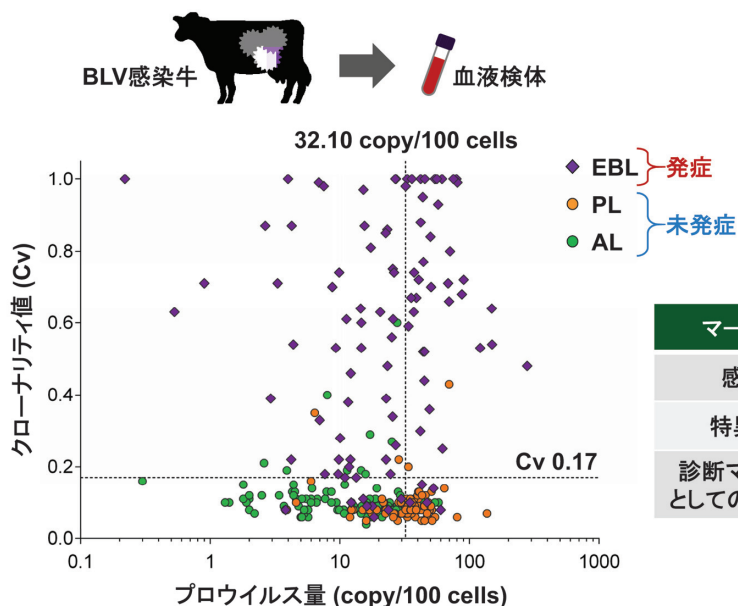
図7. 感染モデルにおけるRAISINGによる発症予測

染性リンパ腫の発症予測にも応用できることを強く示すものである(図7)。そこで、野外のBLV感染牛を対象にRAISINGの増幅感度や再現性を検証した。すなわち、国内の農場で発生したBLV感染牛(AL, PL, EBL) 287頭の血液並びに169検体の腫瘍検体を用いて、RAISINGによりプロウイルス挿入部位を増幅し、CLOVAを用いてBLV感染細胞のクローナリティ値を解析した。さらに、クローナリティ値あるいはこれまでのEBL診断マーカーであったプロウイルス量を用いてEBLの鑑別診断を試み、感度と特異度を算出して、EBLの診断法としての有

用性を検証した。その結果、BLVを標的としたRAISINGは高感度、高精度であることが示され、高い再現性で感染細胞のクローナリティを測定可能であった。さらにBLV感染牛のクローナリティ解析を実施したところ、クローナリティ値は未発症牛(AL, PL)よりもEBLで高くなっていた(図8)。一方、従来の診断マーカーであったプロウイルス量はEBLとPLの血液検体で同程度であり、明確な差は認められなかった。実際に、クローナリティ値をマーカーとしてEBL診断を試みたところ、感度87.1%、特異度93.0%と非常に高い精度でEBLを鑑別することができた(図8)。一方、プロウイルス量をEBL診断のマーカーにした場合は、感度44.6%、特異度67.2%となり、EBLと未発症牛を見分けることができなかった(図8)(Okagawa *et al.*, 2022)。

6. 今後の展望

本研究により、RAISINGを用いたクローナリティ解析は、EBLの診断と発症予測に非常に有効な方法であることが示された。現在我々は、RAISING試薬キットの市販化を目指して、研究コンソーシアムを形成しさらなる研究開発を進めている。さらに、本開発技術を用いた「牛のがん検診」の実用化を目指し、国内の大学や各検査所、臨床獣医師、生産者とのネットワークを駆使して、本診断



マーカー	Cv	プロウイルス量
感度	87.1%	44.6%
特異度	93.0%	67.2%
診断マーカーとしての有用性	○	×

図8. 診断マーカーとしてのクローナリティ値とプロウイルス量の比較

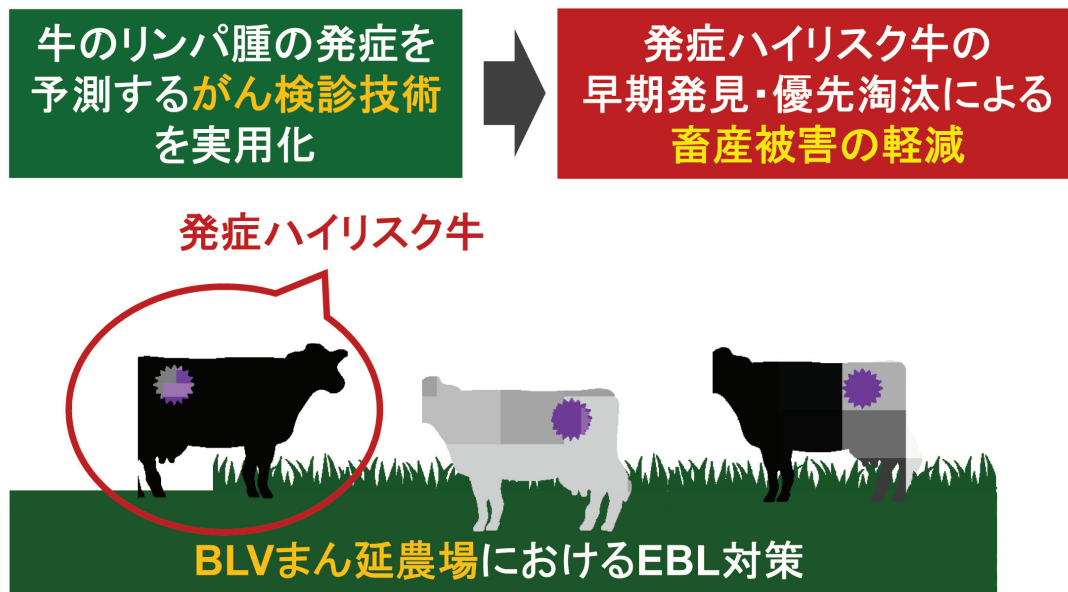


図9. 牛伝染性リンパ腫の現状から考える将来像

法の大規模な実証研究を進めている。将来的に、牛のリンパ腫の発症を予測するがん検診が実用化されれば、発症ハイリスク牛の診断が可能となる（図9）。ハイリスク牛の摘発と優先淘汰を進めることにより、農場におけるEBLの発生を未然に防ぎ、畜産被害の軽減並びに生産性の向上に貢献すると期待される（図9）。

今回紹介したRAISINGによるBLVクローナリティ解析は株式会社ファスマックにて既に実施可能である（ngs@fasmac.co.jp 参考URL: https://fasmac.co.jp/rais_method_case）。

7. 謝 辞

公益財団法人伊藤記念財団 大型研究プロジェクト事業、文部科学省 科学研究費助成事業、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物系特定産業技術研究支援センター イノベーション創出強化研究推進事業、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）、並びにオープンイノベーション研究・実用化推進事業、農林水産省 安全な畜産水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業、及び北海道大学大学院獣医学研究院臨床研究推進研究費の支援の下で実施されたもので、岩手大学（村上賢二先生、山田慎二先生）、北海道内の農業共済組合や

食肉衛生検査所、北海道立総合研究機構農業研究本部畜産試験場、ゆうべつ牛群管理サービス、標茶町など牛伝染性リンパ腫対策に取り組む多数の機関との共同研究成果です。多くの共同研究者およびご協力頂きました皆様に改めて深謝いたします。

【参考文献】

- 1) Wada Y, Sato T, Hasegawa H, Matsudaira T, Nao N, Coler-Reilly ALG, Tasaka T, Yamauchi S, Okagawa T, Momose H, Tanio M, Kuramitsu M, Sasaki D, Matsumoto N, Yagishita N, Yamauchi J, Araya N, Tanabe K, Yamagishi M, Nakashima M, Nakahata S, Iha H, Ogata M, Muramatsu M, Imaizumi Y, Uchimar K, Miyazaki Y, Konnai S, Yanagihara K, Morishita K, Watanabe T, Yamano Y, Saito M. RAISING is a high-performance method for identifying random transgene integration sites. *Commun Biol.* 2022 Jun 2;5(1):535. doi: 10.1038/s42003-022-03467-w.
- 2) Okagawa T, Shimakura H, Konnai S, Saito M, Matsudaira T, Nao N, Yamada S, Murakami K, Maekawa N, Murata S, Ohashi K. Diagnosis and early prediction of lymphoma using high-throughput clonality analysis of bovine leukemia virus-infected cells. *Microbiol Spectr.* 2022 Oct 13:e0259522. doi: 10.1128/spectrum.02595-22.
- 3) 今内 寛ら、牛のリンパ腫発症を予測するがん検診技術を開発～発症予測法の実用化による畜産被害の軽減に期待～ プレスリリース
(<https://www.hokudai.ac.jp/news/2022/10/post-1113.html>)
2022年10月21日。