

公益財団法人 伊藤記念財団
大型プロジェクト事業

「牛伝染症リンパ腫の清浄化に向けた研究開発」
—発症早期診断法の開発とその実践—

令和4年度～令和6年度
(2022年度～2024年度)
研究成果報告書

目次

研究プロジェクトの概要	3
1. プロジェクト参加研究機関	
2. 大型研究プロジェクト委員	
3. 背景および目的	
4. 研究方法	
5. 研究結果	
6. 今後の展望	
本研究プロジェクトに至るまでの経緯	8
1. はじめに	
2. 牛伝染性リンパ腫ウイルス感染症に関するこれまでの知見と未解決の課題	
3. 牛伝染性リンパ腫ウイルス感染牛における未発症牛(キャリア牛)と EBL 発症牛の大きな違い	
4. 添付図	
【研究 1】牛伝染性リンパ腫ウイルスクロナリティ解析キットの開発	12
1. 背景	
2. 目的	
3. 材料と方法	
4. 結果	
5. 考察	
6. 参考文献	
7. 添付図	
【研究 2】牛伝染性リンパ腫ウイルスクロナリティ解析キットの多施設検証試験	27
1. 背景	
2. 目的	

3. 材料と方法
4. 結果
5. 考察
6. 添付図

【研究 3】地方病性牛伝染性リンパ腫発症早期診断法としての牛伝染性リンパ腫ウイルス

クローナリティ解析の有用性の検証・・・・・・・・・・・・・・・・・・37

1. 背景
2. 目的
3. 材料と方法
4. 結果
5. 考察
6. 参考文献
7. 添付図

研究成果発表一覧・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・48

1. 原著論文
2. その他論文（総説、紀要）
3. 招待講演
4. 学会発表（一般演題）
5. 知的財産
6. 受賞
7. アウトリーチ活動
8. 主な報道

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・55

研究プロジェクトの概要

プロジェクト名：

公益財団法人 伊藤記念財団 大型プロジェクト事業
「牛伝染症リンパ腫の清浄化に向けた研究開発」
―発症早期診断法の開発とその実践―

1. プロジェクト参加研究機関

- 1) 国立大学法人北海道大学
- 2) 国立感染症研究所
- 3) 株式会社ファスマック
- 4) 公益財団法人伊藤記念財団

2. 大型研究プロジェクト委員

役職	氏名	所属*	職位*
委員長	今内 覚	国立大学法人北海道大学大学院獣医学研究院	教授
委員	岡川 朋弘	国立大学法人北海道大学大学院獣医学研究院	特任助教
委員	前川 直也	国立大学法人北海道大学大学院獣医学研究院	特任助教
委員	直 亨則	国立大学法人北海道大学 One Healthリサーチセンター	特任講師
委員	斎藤 益満	国立感染症研究所 感染症危機管理研究センター	主任研究官
委員	松平 崇弘	株式会社ファスマック バイオ研究支援事業部	事業部長
委員	松本 光人	公益財団法人伊藤記念財団	専門委員長
委員	三枝 正彦	公益財団法人伊藤記念財団	専門委員

*各委員の所属および職位は、プロジェクト終了時（2025年3月）のもの。

3. 背景および目的

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%の感染牛がリン

パル増多症（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。

日本では BLV 感染が広がっており、2009～2011 年の全国調査では乳牛の 40.9%、肉牛の 28.7%が BLV に感染していると報告された。牛伝染性リンパ腫は、家畜伝染病予防法で監視伝染病（家畜の重要疾病）に指定され、発症牛の届出が義務付けられている。2024 年には 4,423 頭の発症が報告されており、1998 年（99 頭）と比べて 44 倍以上に増加している。この発生頭数は、過去 17 年間にわたって、牛の監視伝染病 37 種の中で最多である。

現在のところ、BLV に対するワクチンや治療法はなく、農場の衛生管理やウイルス検査、感染牛の隔離・淘汰によって感染拡大防止が試みられている。しかし、日本国内では EBL 発生増加に歯止めがかかっておらず、現状の対策だけでは十分ではないことが浮き彫りになってきている。一方で、牛肉の価格は世界的な需要の増加と飼育費用の上昇により高騰している。しかし、と畜検査でリンパ腫と診断された牛は全部廃棄となり、食肉として売却できないだけでなく、それまでに費やした膨大な費用や時間が無駄になってしまうため、畜産業に大きな経済的損失をもたらす。そのため、感染拡大防止策に加えて、EBL 発症リスクを評価し、高リスク牛の管理・選択的淘汰を行うことで、EBL 発生を未然に防ぐことが求められる。

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み込まれ、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。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。そのため、感染細胞のクローナリティは EBL 発症の診断マーカーになると期待される。

そこで本研究では、国立感染症研究所の斎藤益満 主任研究員らが開発したプロウイルス挿入部位の網羅的増幅法 RAISING (Rapid Amplification of the Integration Site without Interference by Genomic DNA Contamination) を応用して、BLV 感染牛のクローナリティ解析法を開発した。さらに、RAISING 法による BLV クローナリティ解析を臨床診断に応用し、EBL の発症早期診断法としての有用性を検証した。

4. 研究方法

本研究プロジェクトでは、以下3つの研究を実施した。

1) BLV クローナリティ解析キットの開発

(担当：国立感染症研究所、北海道大学、株式会社ファスマック)

本研究では、RAISING 法に用いる核酸増幅酵素ならびに核酸精製キットについて、複数のメーカーの製品の性能を検証し、BLV クローナリティ解析キットに最適な試薬を選抜した。それぞれの試薬を用いて RAISING 法を実施し、RAISING 法の増幅感度やクローナリティ解析の精度ならびに再現性を検証した。

2) BLV クローナリティ解析キットの多施設検証試験

(担当：北海道大学、国立感染症研究所、株式会社ファスマック)

1) の研究で選抜した試薬を用いて、BLV クローナリティ解析キットのトライアル版（トライアルキット）を作成した。まず、北海道大学、国立感染症研究所、株式会社ファスマックの3施設において、トライアルキットの予備試験を実施した（各施設2名ずつ）。そして、トライアルキットと検証用 DNA 検体を国内の14施設（大学、研究所等）に配布し、各施設でトライアルキットを用いた検体の増幅を実施した。得られたシーケンスデータをもとに、クローナリティ値（Cv）を算出し、クローナリティ解析の精度ならびに再現性を検証した。

3) EBL 発症早期診断法としての BLV クローナリティ解析の有用性の検証

(担当：北海道大学、国立感染症研究所)

国内農場の BLV 感染牛（AL, PL, EBL）の血液検体ならびに腫瘍組織検体を用いて、RAISING によりプロウイルス挿入部位を増幅し、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）を用いて BLV 感染細胞の Cv を解析した。さらに、「Cv」または現行の EBL 診断マーカーのひとつである「プロウイルス量」（プロウイルスのコピー数）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。さらに、BLV の実験感染によりリンパ腫を発症した羊において、経時的に Cv およびプロウイルス量を解析した。

5. 研究結果

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。まず、BLV を標的とした RAISING 法の増幅感度を調べたところ、感度は非常に高く、BLV プロウイルス量の低い検体でも挿入部位を

検出可能であることが示された。また、RAISING 法による BLV クローナリティ解析は、高精度かつ再現性の高い方法であることが示された。これらの結果をもとにして、最適な試薬を用いて構成された BLV クローナリティ解析のトライアルキットを開発した。トライアルキットの多施設検証試験において、本キットは実験間誤差が少なく、再現性が高い方法であることが示された。

野外の BLV 感染牛における大規模なクローナリティ解析において、Cv はリンパ腫未発症牛（AL、PL）よりもリンパ腫発症牛（EBL）で高く、感度 87.1%、特異度 93.0% と非常に高い精度で EBL を鑑別することが可能であった。さらに、BLV 感染羊において経時的にクローナリティ解析を実施したところ、Cv は BLV 感染直後では低い値を示したが、感染後期においてリンパ腫を発症する前の段階で上昇し、そのまま発症まで高い値を維持した。この結果から、RAISING によるクローナリティ解析は、BLV 感染におけるリンパ腫発症の早期予測に有用であることが示唆された。今後、RAISING 法による BLV クローナリティ解析が牛伝染性リンパ腫の鑑別診断法ならびに発症予測法として活用されることが期待される。

6. 今後の展望

現在我々は、RAISING 法による BLV クローナリティ解析の普及を目指し、国内の大学や各検査所、臨床獣医師、農家とのネットワークを駆使して、さらなる研究開発を進めている。今後の課題として、BLV 感染牛を対象とした大規模なクローナリティの追跡調査を行い、発症予測法としての診断基準（カットオフ値）や診断精度を検証したい。また、RAISING 法による BLV クローナリティ解析について、学術論文、学会発表や広報活動を積極的に実施し、解析法の普及活動にも努めている。株式会社ファスマックでは、BLV クローナリティ解析サービスに関する専用ページを開設し、RAISING 法による BLV クローナリティ解析の受託解析を実施している。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。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。

本研究プロジェクトに至るまでの経緯

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 2021 年には 4,375 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ため、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、全廃棄となり売却できないため、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った。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. BLV 感染症に関するこれまでの知見と未解決の課題

北海道大学大学院獣医学研究院は、長年 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から各団体・機関までを対象に幅広く行ってきた。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。

<過去のプレスリリース>

- 1) 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 (https://www.hokudai.ac.jp/news/170427_pr.pdf)
- 2) 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 (https://www.hokudai.ac.jp/news/170607_pr.pdf)
- 3) 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～ (https://www.hokudai.ac.jp/news/190807_pr2.pdf)
- 4) 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～ (https://www.hokudai.ac.jp/news/pdf/201222_pr.pdf)
- 5) 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～ (https://www.hokudai.ac.jp/news/pdf/220310_pr.pdf)
- 6) 農林水産省 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」 (<https://www.affrc.maff.go.jp/docs/press/191224.html>)

しかし、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 (the European Community's Leukosis Key) 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バ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ゲノム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。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。

3. BLV 感染牛における未発症牛(キャリア牛)と EBL 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くなる。このように、感染細胞のクローナリティは EBL 発症の診断マーカーになると期待される。以上の背景から、BLV 感染細胞のクローナリティに評価するために、プロウイルス挿入部位の増幅技術を開発するに至った。

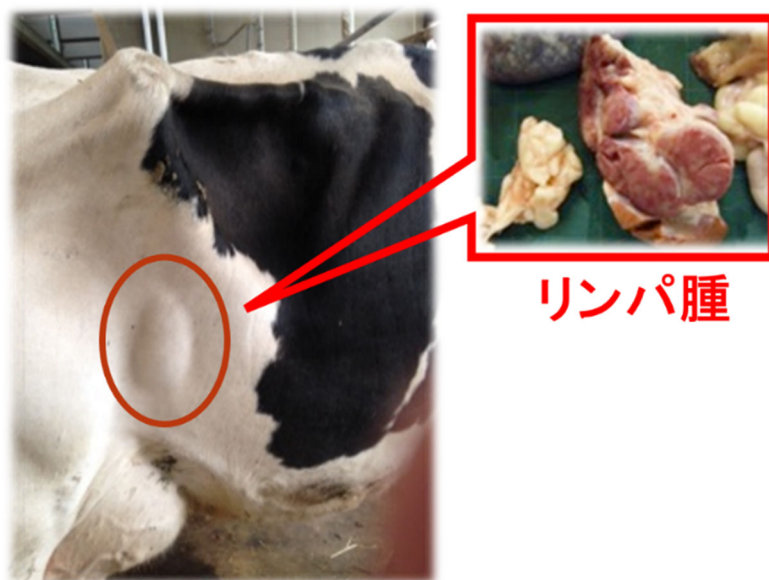
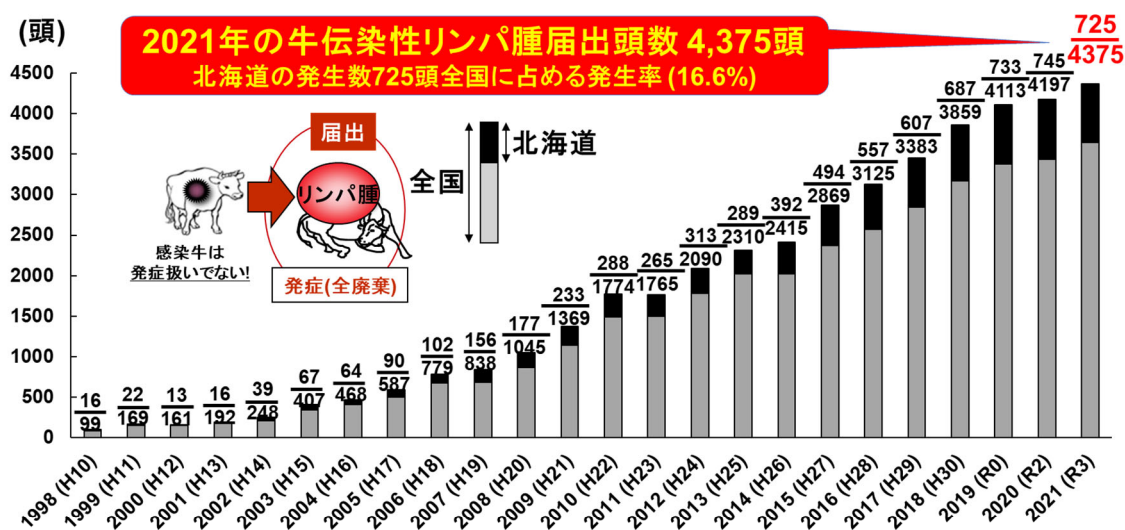


図1. 牛伝染性リンパ腫発症牛



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44.1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。

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)

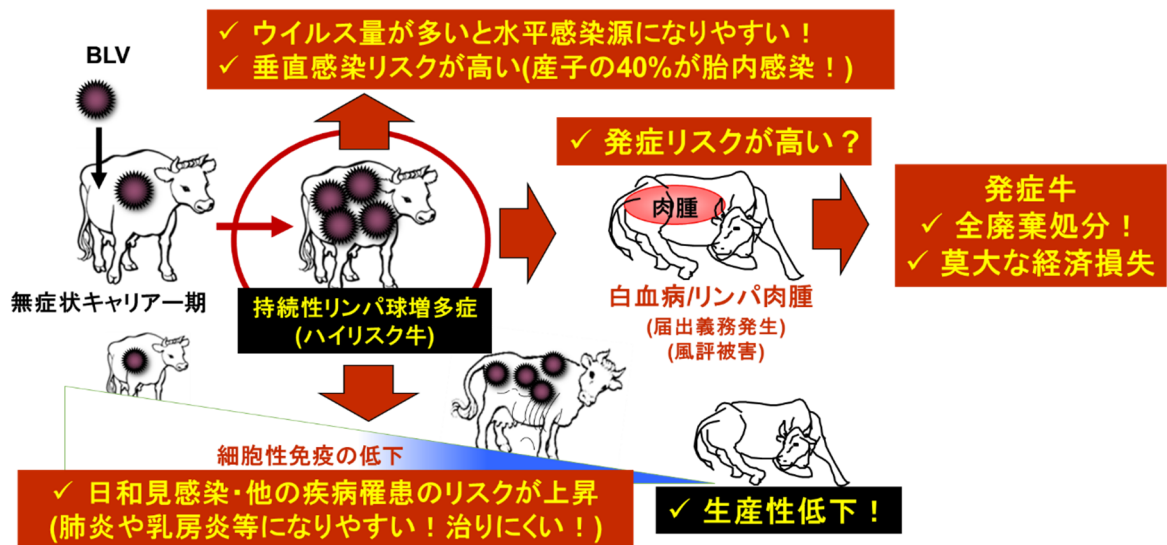


図3. ウイルス量が多い感染牛が及ぼす影響

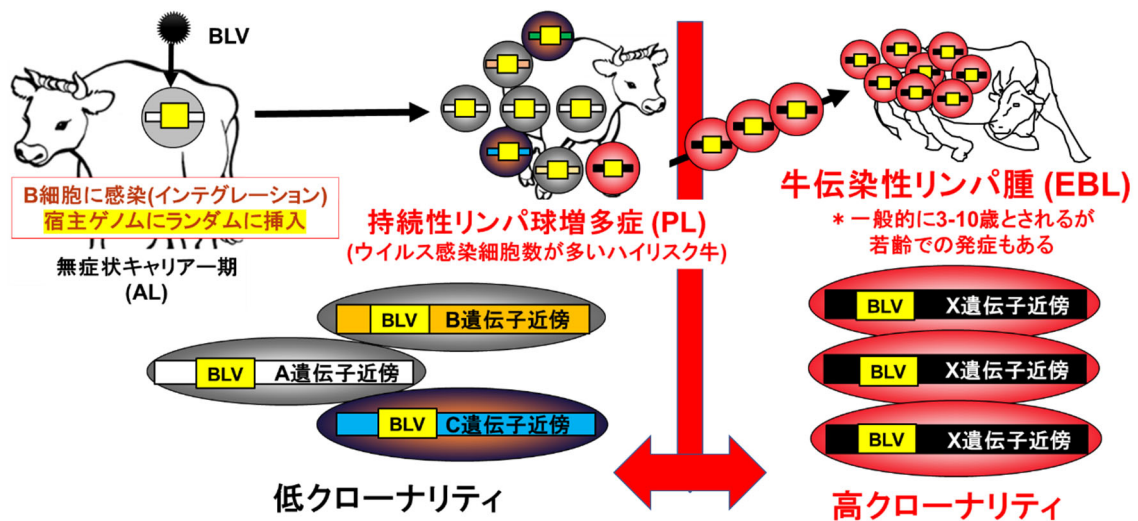


図4. BLV感染牛における感染細胞の単一性 (クローナリティ) の違い

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。

【研究 1】牛伝染性リンパ腫ウイルスクローナリティ 解析キットの開発

担当：国立感染症研究所、北海道大学、株式会社ファスマック

1. 背景

牛伝染性リンパ腫ウイルス(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) は、ヒトに感染して成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (ATL) を引き起こす。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 のプロウイルス挿入部位の同定や感染細胞のクローナリティを測定することが検討されていた。

我々は HTLV-1 感染細胞のクローナリティを評価するために、HTLV-1 のプロウイルス挿入部位を網羅的に増幅する技術として RAISING (ライジング, Rapid Amplification of the Integration Site without Interference by Genomic DNA Contamination) を開発した (図 1) (Wada et al., 2022)。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、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が明らかになった (Wada et al., 2022)。このような HTLV-1 における研究成果から、同じレトロウイルスである BLV を対象としたクローナリティ解析にも RAISING が応用可能ではないかという発想に至った。

2. 目的

本研究では、BLV を標的とした RAISING 法を利用した BLV 感染牛のクローナリティ解析法の樹立を目的として、RAISING 法に用いる核酸増幅酵素ならびに核酸精製キットについて、増幅感度やクローナリティ解析の精度ならびに再現性を、複数のメーカーの製品で検証し、BLV クローナリティ解析キットに最適な試薬を選抜した。

3. 材料と方法

1) BLV 感染診断

BLV 感染診断は BLV プロウイルスを検出するリアルタイム PCR 法により実施した。ウシの血液あるいは組織検体から Wizard DNA Purification Kit (Promega) あるいは Quick-DNA Miniprep Kit (ZYMO RESEARCH) を用いて、DNA を抽出した。次に、牛伝染性リンパ腫ウイルス検出キット (Takara Bio) を用いて、DNA 検体中の BLV pol 遺伝子およびウシの RPPH1 遺伝子を LightCycler480 System II (Roche) にて定量した。リンパ腫の症状を呈したウシは、リアルタイム PCR 法に加えて、免疫フェノタイピング法 (Nishimori et al., 2017) を実施し、地方病性牛伝染性リンパ腫(EBL)発症の有無を診断した。

2) RAISING によるプロウイルス挿入部位の増幅

本研究では、以下 2 種類の試薬の組み合わせで RAISING を実施した (表 1)。また、RAISING に用いたプライマーを表 2 に示す。

表 1. 本研究で RAISING に用いた試薬

プロトコル	RAISING ver.1	RAISING ver.2
1. ssDNA合成	KOD Plus Neo (TOYOBO)	2× Amp Enzyme Mix (FASMAC)
2. カラム精製	Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (New England Biolabs)	RAISING DNA Cleanup Column (FASMAC)
3. ポリヌクレオチド付加	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (New England Biolabs)	Tailing Enzyme (FASMAC)
4. dsDNA合成 & 1st PCR	Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs)	2× Amp Enzyme Mix (FASMAC)
5. 2nd PCR	KOD Plus Neo (TOYOBO)	2× Amp Enzyme Mix (FASMAC)

表 2. 本研究で RAISING に用いたプライマー

プライマー名	プライマー配列	使用する実験手順	引用文献
BLV-F1	ATGAATGGCTCTCCCGCCTTTTT	ssDNA合成	Wada et al., 2022
BLV-F2	CTATCCGGCAGCGGTCAGGTAAG	dsDNA合成 & 1st PCR	Wada et al., 2022
Oligo-dT-AD2	ACAGCAGGTCAGTCAAGCAGTATTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTVN	1st PCR	Wada et al., 2022
BLV-F3	ACACTCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGA TCTACCCGCGTTYGYTTCCTGTCTT	2nd PCR	Wada et al., 2022
ADP1-NGS-R1	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC GATCTACAGCAGGTCAGTCAAGCAGTA	2nd PCR	Wada et al., 2022
Sequencing primer	ACACTCTTTCCTACACGAC	サンガーシーケンス	Illumina (San Diego, CA, USA)

RAISING ver.1 は、表 3 および表 4 のプロトコルに従って実施した。

表 3. RAISING ver.1 のプロトコル（試薬調整）

Step 1: ssDNA合成		
試薬	メーカー	液量 (μL)
Genomic DNA (50 ng/μL)	-	10.0
10× PCR Buffer for KOD-Plus-Neo	Toyobo	5.0
2 mM dNTPs	Toyobo	5.0
25 mM MgSO ₄	Toyobo	3.0
10 μM F1 primer	-	1.5
KOD-Plus-Neo (1 U/μL)	Toyobo	1.0
Ultrapure water (DDW)	-	24.5
計		50.0
Step 2: カラム精製		
ssDNAの精製は、Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (New England Biolabs) のマニュアルに従って実施し、精製ssDNAはDDW 9.6 μLで溶出した。		
Step 3: ポリヌクレオチド付加		
3-1. ポリA付加		
試薬	メーカー	液量 (μL)
ssDNA	-	8.2
10× TdT Buffer	New England Biolabs	1.1
2.5 mM CoCl ₂	New England Biolabs	1.1
10 mM dATP	New England Biolabs	0.35
TdT (20 U/μL)	New England Biolabs	0.25
計		11.0
3-2. ポリG付加		
試薬	メーカー	液量 (μL)
PolyA-tailed ssDNA	-	11.0
10× TdT Buffer	New England Biolabs	0.1
2.5 mM CoCl ₂	New England Biolabs	0.1
10 mM dGTP	New England Biolabs	0.35
DDW	-	0.45
計		12.0
Step 4: dsDNA合成 & 1st PCR		
試薬	メーカー	液量 (μL)
PolyAG-tailed ssDNA	-	12.0
5× Q5 Reaction Buffer	New England Biolabs	12.0
10 mM dNTPs	Thermo Fisher Scientific	1.2
10 μM F2	-	3.0
10 μM Oligo-dT-AD2	-	3.0
Q5 HS-High-Fidelity DNA polymerase (2 U/μL)	New England Biolabs	0.6
DDW	-	28.2
計		60.0
Step 5: 2nd PCR		
試薬	メーカー	液量 (μL)
1st PCR product (diluted 1:200 with DDW)	-	1.0
10× PCR Buffer for KOD-Plus-Neo	Toyobo	5.0
2 mM dNTPs	Toyobo	5.0
25 mM MgSO ₄	Toyobo	3.0
10 μM F3 primer	-	1.5
10 μM ADP1-NGS-R1	-	1.5
KOD-Plus-Neo (1 U/μL)	Toyobo	1.0
DDW	-	32.0
計		50.0

表 4. RAISING ver.1 のプロトコル（反応条件）

Step 1: ssDNA合成			
反応	温度	時間	サイクル数
Pre-denaturation	94℃	2 min	1
Denaturation	98℃	10 sec	25
Annealing & extension	68℃	75 sec	
Step 3: ポリヌクレオチド付加			
3-1. ポリA付加			
反応	温度	時間	
Poly(A)-tailing	37℃	30 min	
3-1. ポリG付加			
反応	温度	時間	
Poly(G)-tailing	37℃	15 min	
Inactivation	75℃	10 min	
Step 4: dsDNA合成 & 1st PCR			
反応	温度	時間	サイクル数
Pre-denaturation	65℃	5 min	1
Annealing	64℃	10 sec	1
	62℃	10 sec	
	60℃	10 sec	
	58℃	10 sec	
	56℃	10 sec	
	54℃	10 sec	
	52℃	10 sec	
Extension	72℃	90 sec	
Pre-denaturation	94℃	30 sec	1
Denaturation	98℃	10 sec	22
Annealing	68℃	10 sec	
Extension	72℃	1 min	
Step 5: 2nd PCR			
反応	温度	時間	サイクル数
Pre-denaturation	94℃	2 min	1
Denaturation	98℃	10 sec	30
Annealing & extension	68℃	1 min	

RAISING ver.2 は、表 5 および表 6 のプロトコルに従って実施した。

表 5. RAISING ver.2 のプロトコル（試薬調整）

Step 1: ssDNA合成		
試薬	メーカー	液量 (μL)
Genomic DNA (50 ng/μL)	-	10.0
2× Amp Enzyme Mix	FASMAC	25.0
10 μM BLV-F1 primer	-	1.0
Ultrapure water (DDW)	-	14.0
計		50.0
Step 2: カラム精製		
ssDNAの精製は、RAISING DNA Cleanup Column (FASMAC) を用いて実施し、精製ssDNAはDDW 7.4 μLで溶出した。		
Step 3: ポリヌクレオチド付加		
3-1. ポリA付加		
試薬	メーカー	液量 (μL)
ssDNA	-	6.6
10× Tailing Buffer	FASMAC	0.9
10× Tailing Enhancer	FASMAC	0.9
10 mM dATP Solution	FASMAC	0.35
Tailing Enzyme	FASMAC	0.25
計		9.0
3-2. ポリG付加		
試薬	メーカー	液量 (μL)
PolyA-tailed ssDNA	-	9.0
10× Tailing Buffer	FASMAC	0.1
10× Tailing Enhancer	FASMAC	0.1
10 mM dGTP Solution	FASMAC	0.35
DDW	-	0.45
計		10.0
Step 4: dsDNA合成 & 1st PCR		
試薬	メーカー	液量 (μL)
PolyAG-tailed ssDNA	-	10.0
2× Amp Enzyme Mix	FASMAC	25.0
10 μM BLV-F2	-	1.0
10 μM Oligo-dT-AD2	-	1.0
DDW	-	13.0
計		50.0
Step 5: 2nd PCR		
試薬	メーカー	液量 (μL)
1st PCR product (diluted 1:200 with DDW)	-	1.0
2× Amp Enzyme Mix	FASMAC	12.5
10 μM BLV-F3 primer	-	0.5
10 μM ADP1-NGS-R1	-	0.5
DDW	-	10.5
計		25.0

表 6. RAISING ver.2 のプロトコル（反応条件）

Step 1: ssDNA合成			
反応	温度	時間	サイクル数
Pre-denaturation	94℃	2 min	1
Denaturation	98℃	10 sec	25
Annealing & extension	68℃	1 min	
Step 3: ポリヌクレオチド付加			
3-1. ポリA付加			
反応	温度	時間	
Poly(A)-tailing	37℃	30 min	
3-1. ポリG付加			
反応	温度	時間	
Poly(G)-tailing	37℃	15 min	
Inactivation	75℃	10 min	
Step 4: dsDNA合成 & 1st PCR			
反応	温度	時間	サイクル数
Pre-denaturation	65℃	5 min	1
Annealing	64℃	10 sec	1
	62℃	10 sec	
	60℃	10 sec	
	58℃	10 sec	
	56℃	10 sec	
	54℃	10 sec	
	52℃	10 sec	
Extension	72℃	90 sec	
Pre-denaturation	94℃	30 sec	1
Denaturation	98℃	10 sec	21
Annealing	68℃	10 sec	
Extension	72℃	1 min	
Step 5: 2nd PCR			
反応	温度	時間	サイクル数
Pre-denaturation	94℃	2 min	1
Denaturation	98℃	10 sec	27
Annealing & extension	68℃	1 min	

3) RAISING 増幅産物のシーケンス解析ならびにクローナリティ値の算出

RAISING 法で得られた 2nd PCR の増幅産物を、AMPure XP (Beckman Coulter) を用いて精製した後に、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific)、Sequencing primer (表 2) を用いて増幅し、3130XI または 3730XI DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific) にて DNA シーケンス解析に供した。得られたシーケンスの波形データを、クローナリティ解析ソフト CLOVA (v1.0c; FASMAC) を用いて解析を行い、クローナリティ値 (clonality value: Cv) を算出した。

4) RAISING の増幅感度ならびにクローナリティ解析の精度の検証

BLV を標的とした RAISING の増幅感度やクローナリティ解析の精度を検証した。まず、BLV を標的とした RAISING の増幅感度を調べるために、BLV 感染細胞株 (BL3.1 または KU-1; Onuma et al., 1986, Harms and Splitter, 1996) と BLV 非感染細胞株 (BTL26; Ishiguro et al., 1994, Onodera et al., 1998) を様々な割合で混合した検体から DNA を抽出し、RAISING (上述の方法) によりプロウイルス挿入部位を増幅し、シーケンス解析を行い、Cv を算出した。

5) RAISING を用いたクローナリティ解析の精度ならびに再現性の検証

RAISING を用いたクローナリティ解析の精度ならびに再現性を検証した。RAISING ver.1 ならびに RAISING ver.2 については、2つの研究施設 (北海道大学、国立感染症研究所) において独立して同一の BLV 感染検体 (RAISING ver.1: n = 32, RAISING ver.2: n = 9) を用いてクローナリティ解析を実施し、結果を比較した。RAISING ver.2 については、3つの研究施設 (北海道大学、国立感染症研究所、株式会社ファスマック) において、実験者 2 名ずつが独立して同一の BLV 感染検体 (n = 13) を用いてクローナリティ解析を実施し、結果を比較した。

6) 統計解析

すべての統計解析は、GraphPad Prism 6 (GraphPad Software) を用いて実施した。 p 値が 0.05 未満の場合に統計的に有意であるとみなした。

4. 結果

1) RAISING ver.1 の増幅感度、クローナリティ解析の精度ならびに再現性の検証

BLV 感染細胞株由来の DNA 検体を RAISING ver.1 で増幅したところ、240~0.012 copy/100 cells の BLV プロウイルスを含む検体において、プロウイルス挿入部位の配列が検出された (図 2)。この結果から、RAISING ver.1 の増幅感度は非常に高く、BLV プロウイルス量の低い検体でも挿入部位を検出可能であることが示された。また、240~1.2 copy/100 cells のプロウイルスを含む検体において、正確に Cv を算出可能であった (図 3)。ほとんどの BLV 感染牛は 1.2 copy/100 cells 以上のプロウイルス量を示すことから、RAISING を用いたクローナリティ解析は野外の BLV 感染牛の解析に十分対応できることを示唆している。

さらに、RAISING によるクローナリティ解析の施設間差を検証したところ、2 施設における独立した解析により算出された BLV 感染牛検体の Cv は、非常に高い一致率を示した ($R^2=0.9949$) (図 4)。これらの結果から、RAISING-CLOVA は、BLV 感染細胞のクローナリティを測定するための高精度かつ再現性の高い方法であることが示された。

2) RAISING ver.2 の増幅感度、クローナリティ解析の精度ならびに再現性の検証

RAISING-BLV ver.1 は、BLV プロウイルス挿入部位を正確かつ高感度に増幅可能であり、BLV 感染細胞のクローナリティ解析に有効な技術であるが、二社の核酸増幅酵素ならびに核酸精製キットを用いるため、試薬としての品質管理が難しく、キット化が困難であった。そこで、試薬の調達元を 1 社の試薬メーカーに限定し、このメーカーの試薬のみを用いた RAISING ver.2 のプロトコルを樹立した。

まず、BLV 感染細胞株由来の DNA 検体を RAISING ver.2 で増幅したところ、100~0.032 copy/100 cells の BLV プロウイルスを含む検体において、プロウイルス挿入部位由来の配列が増幅され、RAISING ver.2 と ver.1 は同等の検出感度であることが確認された (図 5)。さらに、クローナリティ解析で算出された Cv は、RAISING ver.2 と ver.1 と高度に一致した ($R^2=0.9985$) (図 6)。

次に、北海道大学と国立感染症研究所の 2 施設において、RAISING ver.2 の試薬と BLV 感染牛由来の DNA 検体 (n=9) を用いてクローナリティ解析の再現性を検討した。その結果、二施設において算出された Cv は高度に一致し ($R^2=0.9986$)、本解析法の再現性が高いことが示された (図 7)。

以上の研究により、1 社のメーカーの試薬のみを用いた、キット化が可能な RAISING

ver.2 を開発した。

最後に、株式会社ファスマックにおいて、RAISING ver.2 の試薬をパッケージ化し、キットの試作品（トライアルキット）を作成した。次に、北海道大学、国立感染症研究所、株式会社ファスマックの 3 施設において、トライアルキットの予備試験を実施したところ、すべての DNA 検体（n=13）について、各施設の 6 回の独立した実験で算出された Cv のばらつきは非常に小さく（Cv の誤差は±0.10 以内であった）、高度に一致した（ $R^2=0.994\sim0.999$ ）（図 8）。

以上の結果から、BLV クローナリティ解析キットには、RAISING-BLV ver.2 の試薬とプロトコルを用いることに決定した。

5. 考察

先行研究において、ligation-mediated PCR (Gillet et al., 2013)、ターゲットキャプチャシーケンス (Rosewick et al., 2017, Ohnuki et al., 2021)、インバース PCR (Artesi et al., 2021, Nishimori et al., 2021)、linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR) (Rosewick et al., 2020) など、BLV 感染細胞のプロウイルス挿入部位を増幅する方法が開発されている。これらの方法のほとんどは、挿入部位の検出に次世代シーケンスを必要とするが、解析費用が高く、解析に時間を要するため、多数の検体を対象とした臨床検査には不向きである。また、DNA 検体の前処理として制限酵素や超音波による DNA 断片化を必要とすることが多く、増幅や検出のバイアスを引き起こし、感度や再現性が低い可能性がある。そのため、BLV クローナリティ検査法を確立するためには、感度や再現性が高く、短時間かつ低コストで多数の検体を検査可能な手法の開発が求められていた。RAISING は、解析の性能ならびに費用の両面から従来法の問題点を克服した技術であり、高感度、高精度、高スループットでありながら、簡便（3 時間で増幅完了）かつ低コストに（特殊な試薬や高額な解析機器を必要としない）、プロウイルス挿入部位の増幅が可能である。

本研究では、RAISING 法を BLV プロウイルス挿入部位の増幅に応用し、プロトコルの改良を進め、核酸増幅酵素ならびに核酸精製キットについて複数の製品を検証して、BLV クローナリティ解析キットに最適な試薬の組み合わせを決定した。本研究で開発された RAISING ver.2 では、単一のメーカーの核酸増幅試薬を使用することで、キット化に向けた試薬の品質管理が可能となった。また、RAISING ver.2 は、DNA ポリメラーゼ、反応緩衝液と dNTP を含むプレミックス型の核酸増幅試薬を、すべての増幅工程に使用するため、増幅時のヒューマンエラーを防止し、作業時間を短縮すると期待される。RAISING 法

は、プロウイルス挿入部位の増幅までに 5 つの作業工程を要するため、作業の簡素化は解析結果の安定化に大きく寄与する。実際、RAISING ver.2 のトライアルキットを用いた 3 か所の施設、6 人の作業による実験では、非常に再現性の高いクローナリティ解析結果が得られた。

本研究では、キット化ならびに臨床検査への応用が実現可能な RAISING 法の開発に成功した。今後、本研究での技術開発を基盤として、RAISING 法が BLV 感染細胞のクローナリティ検査法に広く応用されると期待される。

6. 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, Uchimaru K, Miyazaki Y, Konnai S, Yanagihara K, Morishita K, Watanabe T, Yamano Y, Saito M. 2022. RAISING is a high-performance method for identifying random transgene integration sites. *Commun Biol* 5: 535.
- 2) Nishimori A, Konnai S, Okagawa T, Maekawa N, Goto S, Ikebuchi R, Nakahara A, Chiba Y, Ikeda M, Murata S, Ohashi K. 2017. Identification of an atypical enzootic bovine leukosis in Japan by using a novel classification of bovine leukemia based on immunophenotypic analysis. *Clin Vaccine Immunol* 24: e00067-17.
- 3) Onuma M, Koyama H, Aida Y, Okada K, Ogawa Y, Kirisawa R, Kawakami Y. 1986. Establishment of B-cell lines from tumor of enzootic bovine leukosis. *Leuk Res* 10: 689–695.
- 4) Harms JS, Splitter GA. 1996. Loss of MHC I transcription trans-activator in the bovine B-LCL, BL3.1. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 51, 39–54.
- 5) Onodera H, Ishiguro N, Horiuchi M, Shinagawa M. 1998. Characterization of differentially expressed genes in the bovine T lymphoma cell line. *Vet Immunol Immunopathol* 62: 209–219.
- 6) Ishiguro N, Ohzono T, Shinagawa T, Horiuchi M, Shinagawa M. 1994. A spontaneous internal deletion of the c-myb protooncogene enhances transcriptional activation in bovine T lymphoma cells. *J Biol Chem* 269: 26822–26829.
- 7) Gillet NA, Gutiérrez G, Rodríguez SM, de Brogniez A, Renotte N, Alvarez I, Trono K, Willems L. 2013. Massive depletion of bovine leukemia virus proviral clones located in genomic transcriptionally active sites during primary infection. *PLoS Pathog* 9: e1003687.

- 8) Rosewick N, Durkin K, Artesi M, Marçais A, Hahaut V, Griebel P, Arsic N, Avettand-Fenoel V, Burny A, Charlier C, Hermine O, Georges M, Van den Broeke A. 2017. Cis-perturbation of cancer drivers by the HTLV-1/BLV proviruses is an early determinant of leukemogenesis. *Nat. Commun.* 8: 15264.
- 9) Ohnuki N, Kobayashi T, Matsuo M, Nishikaku K, Kusama K, Torii Y, Inagaki Y, Hori M, Imakawa K, 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.
- 10) Artesi M, Hahaut V, Cole B, Lambrechts L, Ashrafi F, Marçais A, Hermine O, Griebel P, Arsic N, van der Meer F, Burny A, Bron D, Bianchi E, Delvenne P, Bours V, Charlier C, Georges M, Vandekerckhove L, Van den Broeke A, Durkin K. 2021. PCIP-seq: simultaneous sequencing of integrated viral genomes and their insertion sites with long reads. *Genome Biol.*, 22: 97.
- 11) Nishimori A, Andoh K, Matsuura Y, Kumagai A, Hatama S. 2021. Establishment of a simplified inverse polymerase chain reaction method for diagnosis of enzootic bovine leukosis. *Arch. Virol.* 166: 841-851.
- 12) Rosewick N, Hahaut V, Durkin K, Artesi M, Karpe S, Wayet J, Griebel P, Arsic N, Marçais A, Hermine O, Burny A, Georges M, Van den Broeke A. 2020. An Improved Sequencing-Based Bioinformatics Pipeline to Track the Distribution and Clonal Architecture of Proviral Integration Sites. *Front. Microbiol.* 11: 587306.

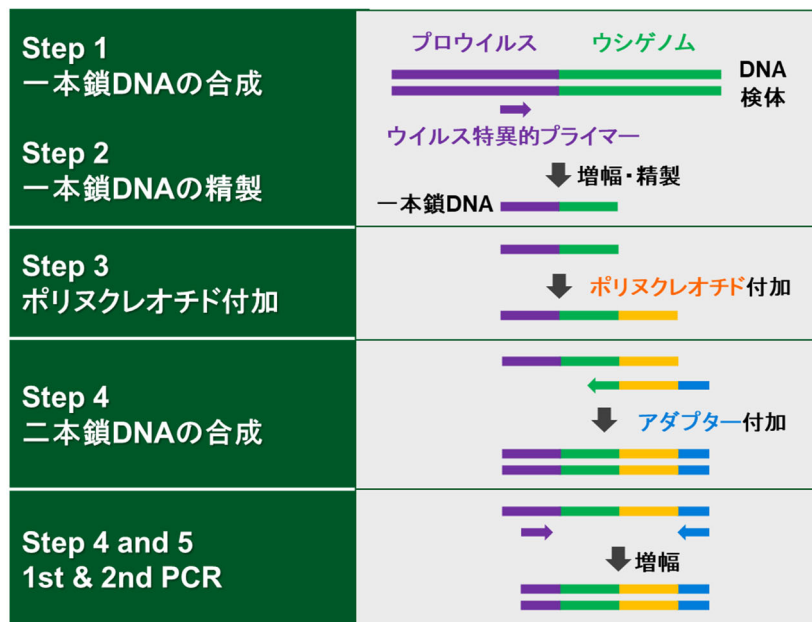


図1. RAISINGの原理

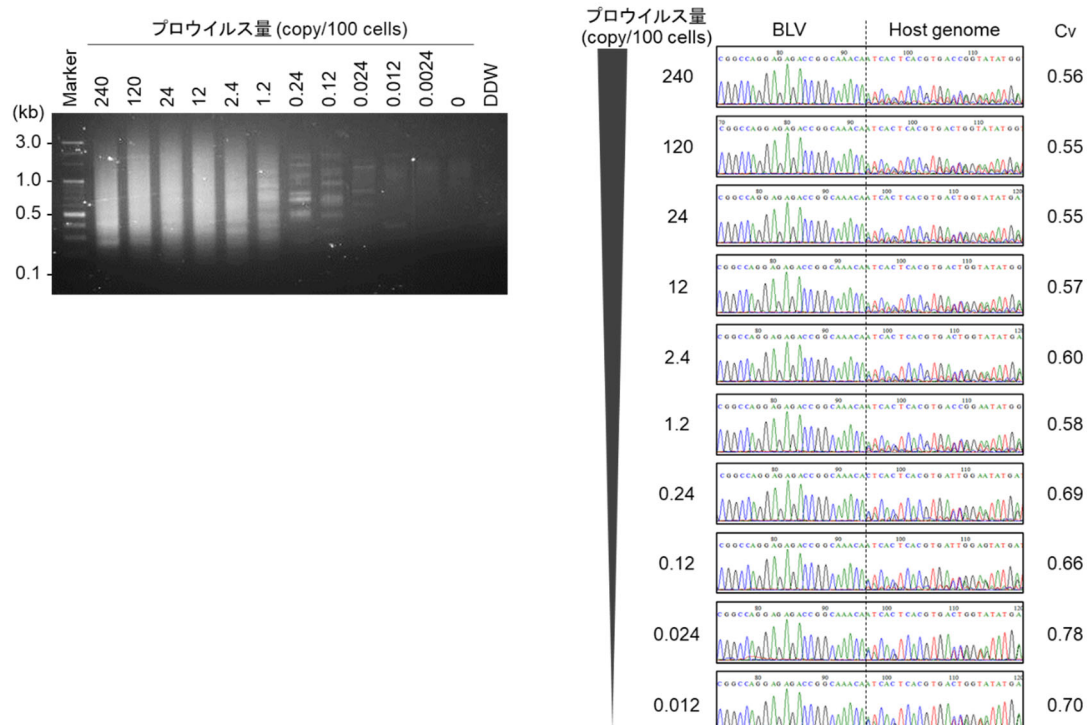


図2. RAISING ver.1の増幅感度

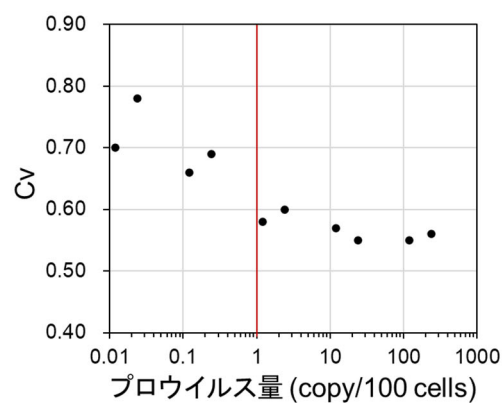


図3. RAISING ver.1によるクローナリティ解析の検出精度

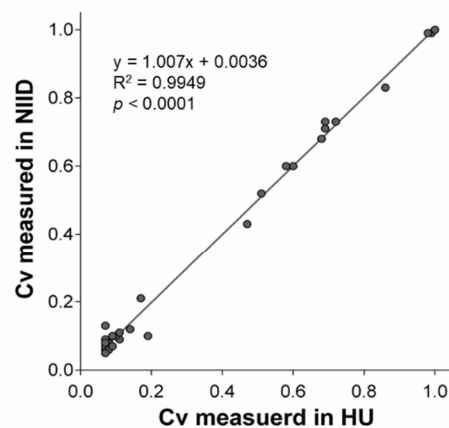


図4. RAISING ver.1によるクローナリティ解析の再現性

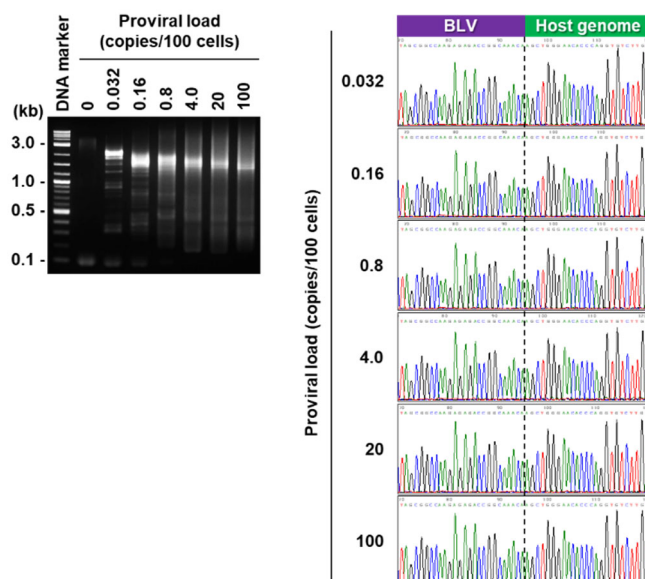


図5. RAISING ver.2の増幅感度

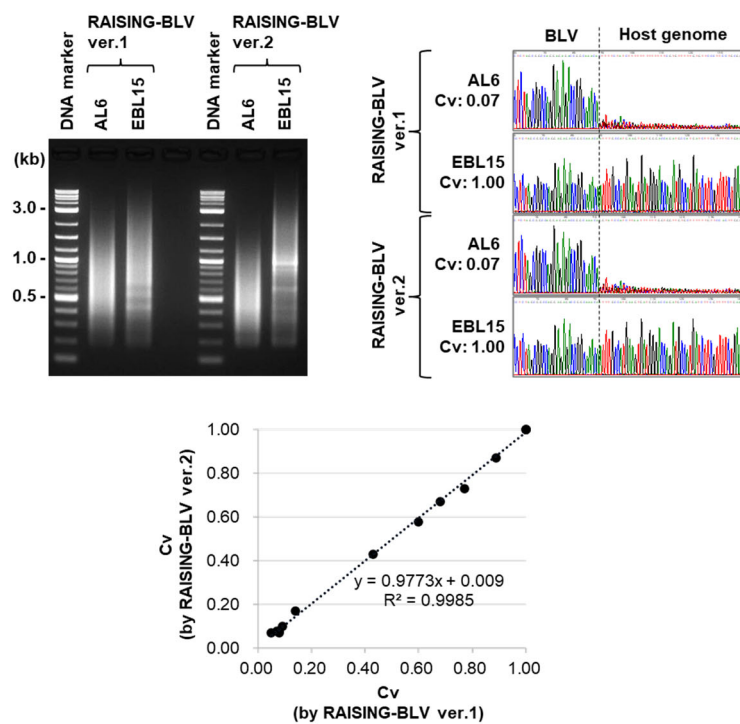


図6. RAISING ver.1およびver.2の性能比較

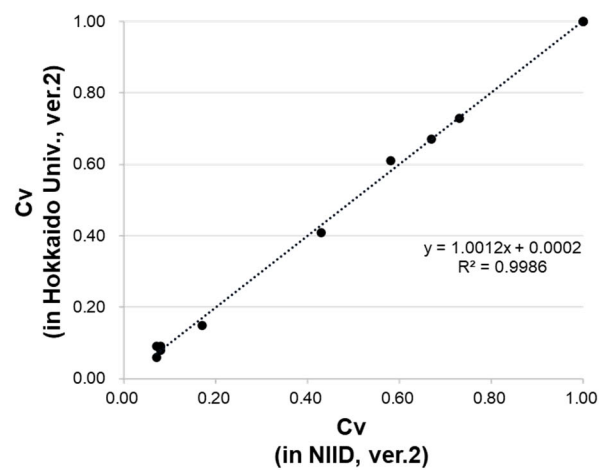
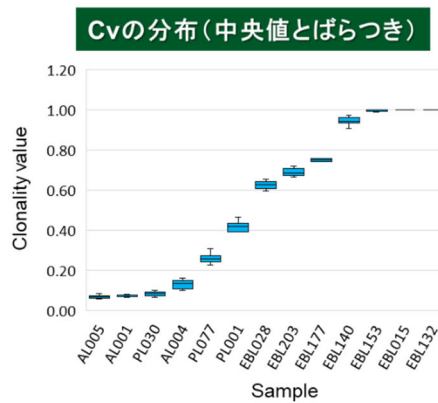


図7. RAISING ver.2によるクローナリティ解析の再現性



RAISING-BLV ver.3.0 トライアルキット (FASMAG)



Cvの寄与率(R^2)

		FAS		HU		NIID	
		1st	2nd	O	T	N	Y
FAS	1st	1.000	0.997	0.998	0.996	0.997	0.998
	2nd	0.997	1.000	0.998	0.998	0.997	0.998
HU	O	0.998	0.998	1.000	0.997	0.998	0.999
	T	0.996	0.998	0.997	1.000	0.994	0.998
NIID	N	0.996	0.997	0.998	0.994	1.000	0.996
	Y	0.998	0.998	0.999	0.998	0.996	1.000

**図8. RAISING-BLV トライアルキットを用いた予備試験
(3施設におけるクローナリティ解析の再現性)**

【研究 2】牛伝染性リンパ腫ウイルスクローナリティ 解析キットの多施設検証試験

担当：北海道大学、国立感染症研究所、株式会社ファスマック

1. 背景

【研究 1】において、高感度、高精度、高スループットでありながら、簡便かつ低コストに牛伝染性リンパ腫ウイルス(BLV)プロウイルス挿入部位の増幅が可能な RAISING ver.2 の開発に成功した。RAISING ver.2 を利用した BLV クローナリティ解析キット (RAISING-BLV キット) を用いた臨床検査を広く普及させるためには、本解析キットの安定性と再現性が検査室の環境や測定者の技量によって偏らないことが望ましい。そこで本研究では、RAISING-BLV キットのトライアルキットを作成し、日本国内の 14 の研究施設から参加者を募って、多施設検証試験を実施した (図 1)。

2. 目的

本研究では、RAISING-BLV キットを用いたクローナリティ解析の施設間差 (再現性) を検証することを目的として、国内の 14 施設の実験室において RAISING-BLV キットによるプロウイルス挿入部位の増幅を実施し、各施設における増幅結果ならびにクローナリティ解析結果を比較した。さらに、RAISING-BLV キットの使用感や改善点について客観的な評価を得るために、検証試験の参加者を対象として実施後アンケートを行った。

3. 材料と方法

1) 血液からの DNA 検体の抽出と濃度調整

BLV 感染牛 (n=10) の血液から Quick-DNA Miniprep Kit (ZYMO RESEARCH) を用いて、DNA を抽出した。抽出した DNA 検体について、NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific) により 260 nm における吸光度を測定し、DNA 濃度を決定し、DDW で希釈して 50 ng/μL に調整した。さらに、これらの DNA 検体についてアガロース電気泳動を行い、DNA の断片化がないことを確認した。

2) RAISING-BLV キットによるプロウイルス挿入部位の増幅

本研究では、RAISING-BLV キット (【研究 1】表 1, RAISING ver.2) とプライマー (【研

究 1】表 2) を用いて、【研究 1】表 5 および表 6 のプロトコルに従って、プロウイルス挿入部位を増幅した。

3) 多施設検証試験

RAISING-BLV キット（トライアルキット）と BLV 感染牛の DNA 検体（n=10）を国内の 14 施設（大学、研究所等）に配布し、各施設の実験室において 1 名の作業者が 2) の方法で RAISING を実施した。各施設で得られた RAISING の増幅産物を【研究 1】の 3-3) で示した方法により DNA シークエンス解析に供し、クローナリティ値 (clonality value: Cv) を算出した。

4) 実施後アンケート

検証試験の実施後に各施設の作業者を対象として、アンケートを行った。質問項目は以下の通り。

- ・ 作業者の実験歴（実験経験や実験頻度）
- ・ 作業内容の感想（難易度、時間、全体を通して・各作業内容について気になった点）
- ・ 使用機材（サーマルサイクラー、遠心分離機）
- ・ キット付属以外の使用試薬（イソプロパノール、エタノール、DDW）
- ・ 使用したプラスチック消耗品（1.5mL チューブ、PCR チューブ、ピペットチップ）
- ・ 普段使用している DNA 抽出法、DNA 濃度測定法、サンガーシーケンスの方法
- ・ その他のご意見

4. 結果

1) 多施設検証試験における増幅結果とクローナリティ解析結果

14 研究機関において、BLV 感染牛の DNA 検体（n=10）について RAISING-BLV キットによる増幅を実施した。14 名の作業者のうち 11 人が RAISING による増幅作業を初めて行ったが、各施設で増幅されたプロウイルス挿入部位の配列パターンは、すべてのサンプルとすべての施設で一致していた（図 2）。クローナリティ解析の結果、算出された Cv はすべてのサンプルで高度に一致しており、Cv の平均値の誤差範囲は-0.06 から+0.14 であった（図 3）。さらに、各研究室で得られた Cv の寄与率（一致度）を解析したところ、2 施設ごとの全ペアで強い相関が認められた（ $R^2 = 0.967-0.999$ ）（図 4）。

以上の検証試験により、RAISING-BLV キットによるクローナリティ解析は、実験間誤

差が少なく、再現性が高い方法であることが示された。

2) 実施後アンケートにおける、作業者と作業内容に関する集計結果

検証試験実施後に参加者を対象としてアンケート調査を実施し、全 14 施設から回答を得た。今回の検証では、どの施設でも PCR 関連実験の経験が豊富な方 (実験経験 3~25 年) が作業を実施し、普段の実験頻度 (PCR 関連) は様々であった (月 1 回~週 5 回) (図 5)。RAISING 法による増幅反応について、作業内容自体は「簡単」あるいは「ふつう」と感じるという回答が多数 (82%) だったが、増幅工程が 5 ステップに分かれるため、作業時間 (反応時間) を長いと感じるという回答が多かった (64%) (図 5)。

全体を通して気になった点としては、「作業マニュアル (文書) の改善が必要」(6 名)、「作業工程が多く煩雑」(5 名)、「試薬の数が多く混乱」(3 名)、「少数の検体では実施しにくい (微量の試薬を使用する工程があるため)」(2 名)、「プレミックス試薬が扱いにくい (粘性が高いため)」(2 名) という意見があった (図 6)。各作業内容について気になった点としては、「ステップ 1 (ssDNA 合成)」(1 名)、「ステップ 2 (ssDNA 精製)」(5 名)、「ステップ 3 (ポリヌクレオチド付加)」(2 名)、「ステップ 4 (dsDNA 合成 & 1st PCR)」(4 名)、「ステップ 5 (2nd PCR)」(1 名) という意見があった (図 6)。

3) 実施後アンケートにおける、作業環境に関する集計結果

今回の検証試験で使用した機材は、サーマルサイクラーは Bio-Rad 製および Thermo Fisher Scientific 製が多く、遠心分離機はトミー精工製および KUBOTA 製が多かったものの、機材のメーカーや機種、性能は施設により様々であった (図 7)。しかし、増幅結果やクローナリティ解析の結果に大きな違いは認められなかったことから、使用機材による影響は少ないと思われる。また、今回の検証試験で使用した試薬 (キット付属以外のイソプロパノール、エタノール、DDW) は、富士フィルム和光純薬や Thermo Fisher Scientific の製品が多かった (図 8)。使用したプラスチック消耗品 (1.5mL チューブ、PCR チューブ、ピペットチップ) は、WATSON や日本ジェネティクスの製品が多かった (図 9)。しかし、他のメーカーの製品を使った施設を含めて、施設間で結果の偏りはなく、解析結果に与える影響は少ないと考えた。

今後の RAISING-BLV キットの製品化に向けた参考情報として、各施設の実験設備環境についても調査した。DNA 抽出キットは、カラム式の抽出キットを使っている施設が多く、QIAGEN 製のキットが半数以上を占めていた (図 10)。DNA の濃度測定 (吸光光度

計)には、全施設で NanoDrop とその同等品が使われていた (図 10)。一方で、フルオロメーターの普及率は低く、吸光光度計による濃度測定を想定するべきと結論付けた (図 10)。また、サンガーシーケンス解析については、受託解析 (外注) で実施している施設が多いものの、自研究室で実施している場合もあった (図 11)。自研究室の場合、全施設で Thermo Fisher Scientific (ABI) 製のシーケンサーを使っていた。受注先は様々であったが (図 11)、CLOVA でのクローナリティ解析に必要なデータファイル (ABI 形式) はいずれの解析会社においても出力・納品されるため、クローナリティ解析はどの施設でも実際に実施可能であることが明らかになった。

5. 考察

本研究では、RAISING-BLV キットによるクローナリティ検査の臨床応用を推進するために、全国 14 の研究施設で多施設検証試験を実施し、さまざまな検査室環境における解析結果を比較した。その結果、RAISING-BLV キットを用いたクローナリティ解析は高い安定性と再現性を示し、どのような実験環境でも信頼性の高い結果が得られることが示された。実際、本検証試験では、11 名の作業者が初めて RAISING による増幅を行ったが、すべての施設において、すべての検体について正確な Cv が算出された。

今回の検証試験の実施後に、試験に参加した作業員 14 名に RAISING-BLV キットやクローナリティ解析法に関してヒアリングを行った。ヒアリングでは、実験内容の難易度は簡単あるいはふつうであるという意見が多く、【研究 1】で実施した RAISING ver.2 への改良による作業内容の簡便化が効果的であったことが確認された。一方で、合計で 3 時間以上かかる作業時間がまだ長いという意見も挙げられた。この意見を考慮して、試薬や増幅プロトコルをさらに改良し、反応時間をさらに短縮する改良が望まれる。さらに、反応液の準備や ssDNA 精製などの工程において機械を用いて自動化し、作業時間の短縮を図ることも有効である。また、作業マニュアルや試薬のラベリングがわかりにくく、改善点として指摘された。キットの製品化にあたっては、これらの意見を考慮して開発を進めていく必要がある (表 1)。



RAISINGによるクローナリティ解析の実用化に向けて、
プロタイプキットを用いて多施設における施設間差(再現性)を検証する。

図1. RAISING-BLV トライアルキットの多施設検証試験



図2. 多施設検証試験における増幅産物のシーケンス解析結果

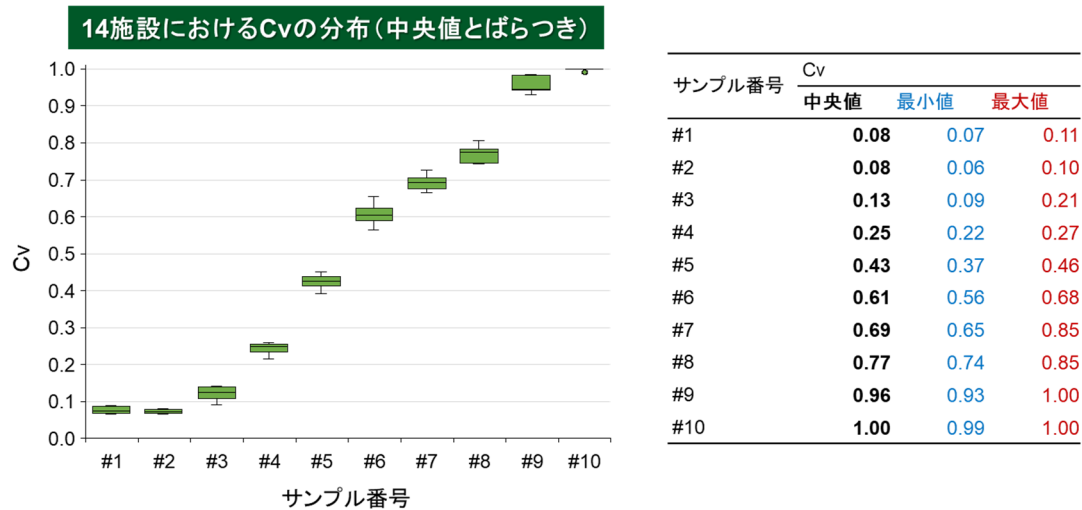


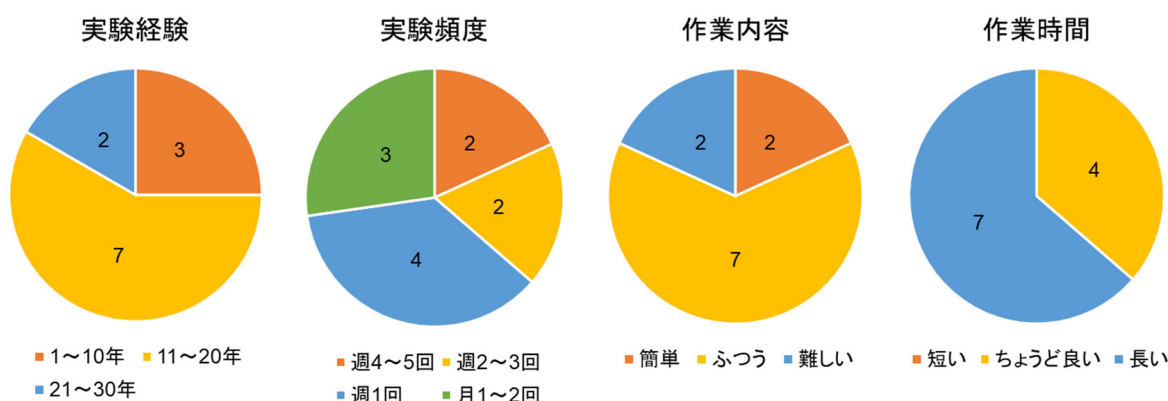
図3. 多施設検証試験におけるクローナリティ解析結果

14施設におけるCvの寄与率(R²)

		施設番号													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
施設番号	1	1.000	0.998	0.997	0.998	0.996	0.995	0.996	0.999	0.987	0.997	0.993	0.986	0.987	0.997
	2	0.998	1.000	0.996	0.997	0.994	0.989	0.991	0.997	0.981	0.994	0.994	0.985	0.986	0.995
	3	0.997	0.996	1.000	0.996	0.995	0.994	0.993	0.997	0.986	0.996	0.995	0.990	0.979	0.995
	4	0.998	0.997	0.996	1.000	0.997	0.993	0.998	0.998	0.987	0.995	0.993	0.992	0.986	0.994
	5	0.996	0.994	0.995	0.997	1.000	0.993	0.995	0.997	0.991	0.996	0.992	0.990	0.988	0.995
	6	0.995	0.989	0.994	0.993	0.993	1.000	0.997	0.996	0.979	0.998	0.992	0.987	0.972	0.997
	7	0.996	0.991	0.993	0.998	0.995	0.997	1.000	0.997	0.985	0.997	0.991	0.993	0.979	0.994
	8	0.999	0.997	0.997	0.998	0.997	0.996	0.997	1.000	0.985	0.999	0.994	0.990	0.984	0.997
	9	0.987	0.981	0.986	0.987	0.991	0.979	0.985	0.985	1.000	0.984	0.971	0.979	0.990	0.978
	10	0.997	0.994	0.996	0.995	0.996	0.998	0.997	0.999	0.984	1.000	0.993	0.988	0.980	0.998
	11	0.993	0.994	0.995	0.993	0.992	0.992	0.991	0.994	0.971	0.993	1.000	0.988	0.970	0.995
	12	0.986	0.985	0.990	0.992	0.990	0.987	0.993	0.990	0.979	0.988	0.988	1.000	0.967	0.983
	13	0.987	0.986	0.979	0.986	0.988	0.972	0.979	0.984	0.990	0.980	0.970	0.967	1.000	0.979
	14	0.997	0.995	0.995	0.994	0.995	0.997	0.994	0.997	0.978	0.998	0.995	0.983	0.979	1.000

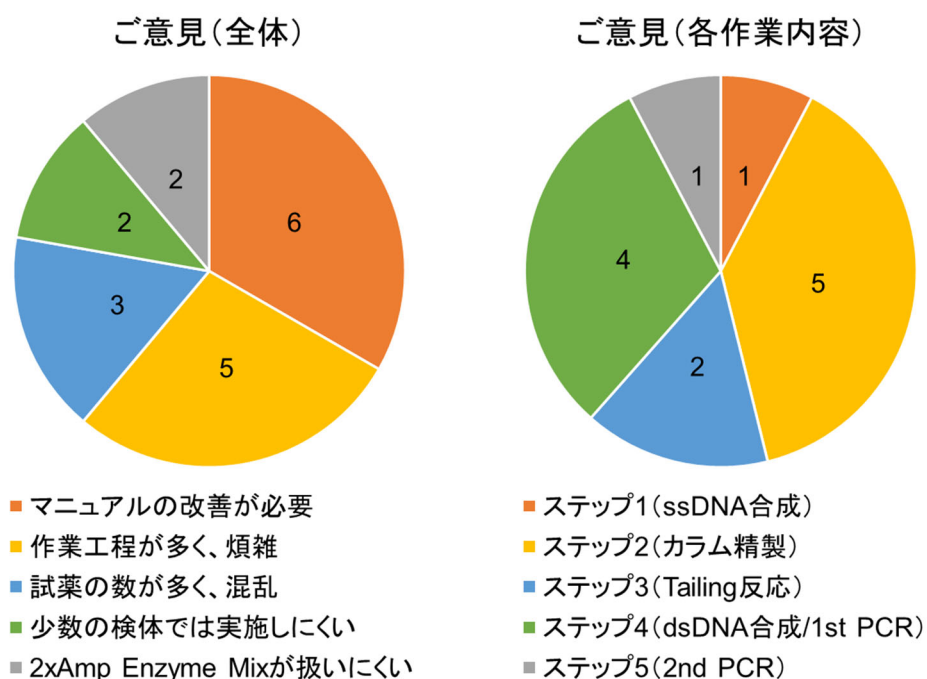
■ Cvの寄与率が高いほど、赤色を濃く表示している。

図4. 多施設検証試験におけるクローナリティ解析の再現性

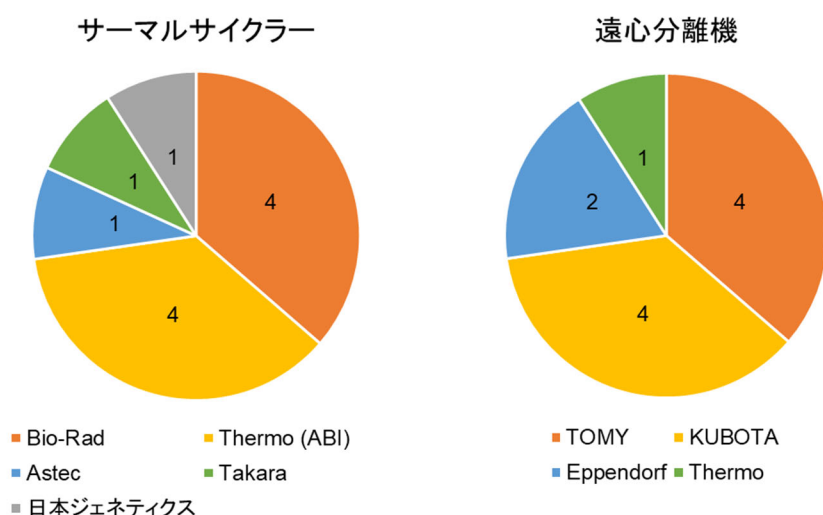


- 今回の検証では、どの施設でもPCR関連実験の経験が豊富な方が作業を実施した。
- 普段の実験頻度（PCR関連）は様々であった（月1回～週5回）。
- 作業内容自体は、「ふつう」あるいは「簡単」と感じる方が多数で、高評価を得られた。
- 一方で、作業時間を「長い」と感じる方が多数で、今後の改善点である。

**図5. 実施後アンケートのヒアリング結果
（実験歴、作業内容の感想）**

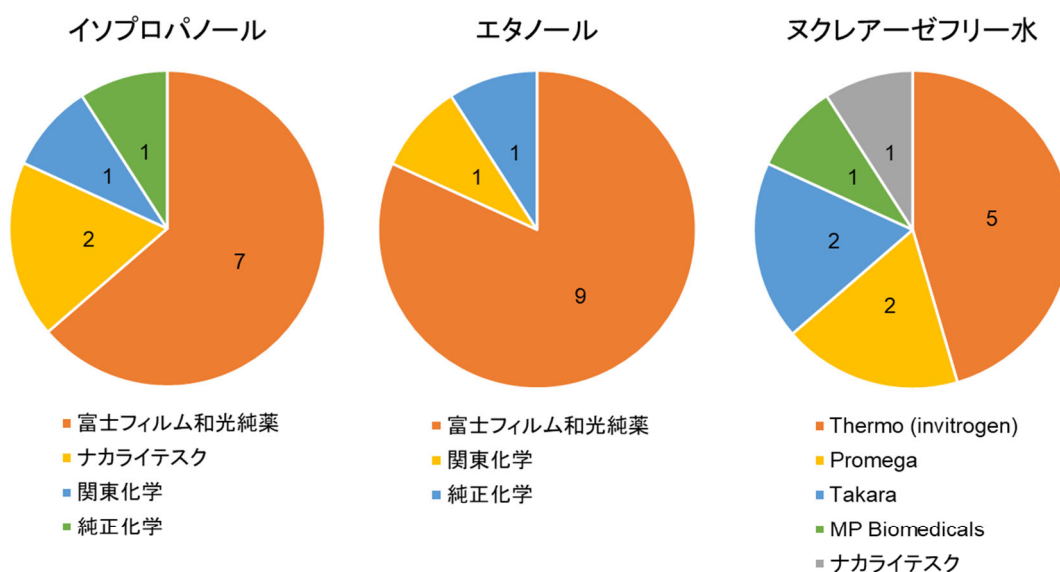


**図6. 実施後アンケートのヒアリング結果
（気になった点）**



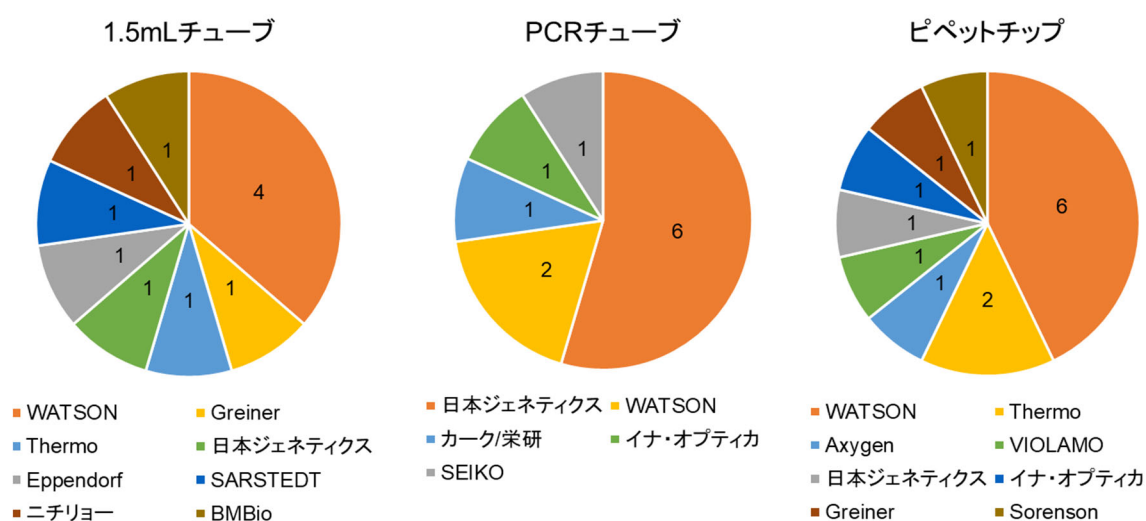
様々な機材を用いて増幅作業を実施したが、機材による結果の違いは認められなかった。

図7.今回の検証試験で使用した機材



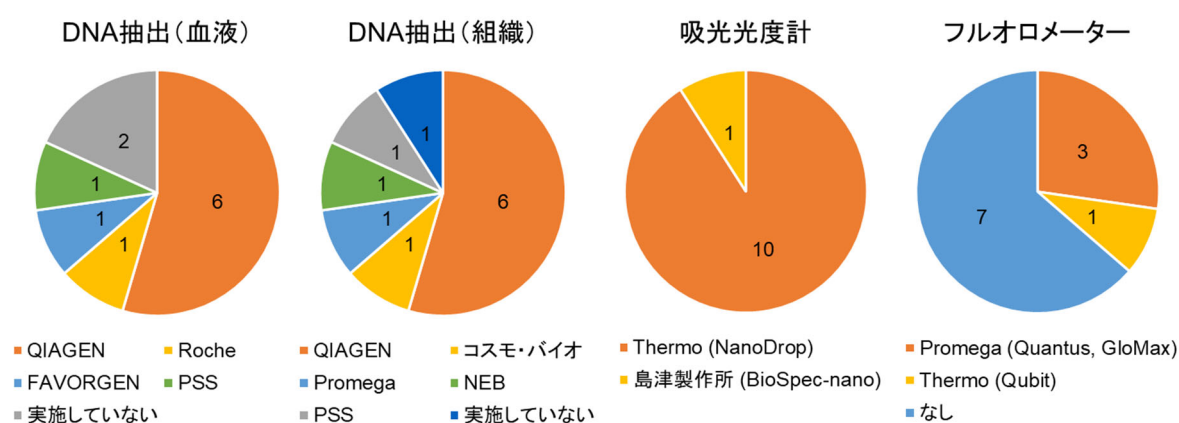
様々なメーカーの試薬(キット付属以外のもの)を用いて増幅作業を実施したが、解析結果に違いは認められなかった。

図8.今回の検証試験で使用した試薬



様々なメーカーのプラスチック消耗品を用いて増幅作業を実施したが、解析結果に違いは認められなかった。

図9. 今回の検証試験で使用したプラスチック消耗品



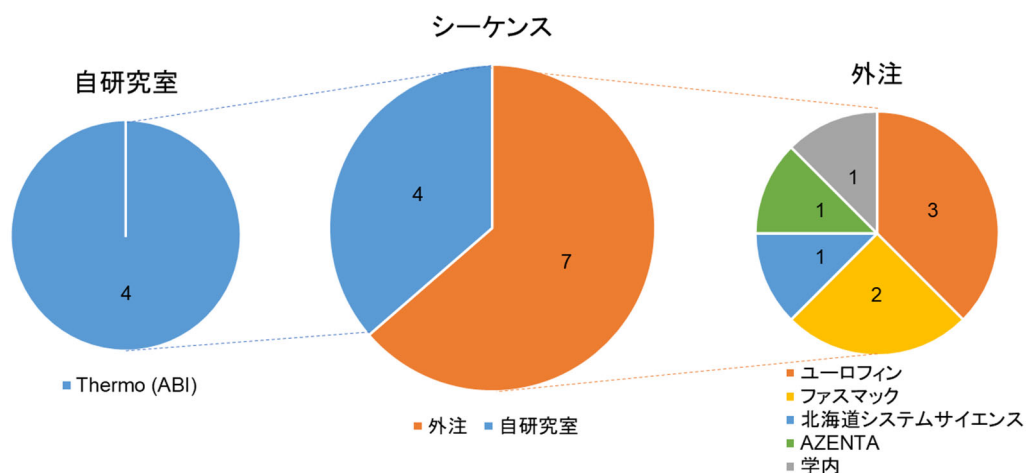
本キットの製品化に向けた参考情報として、DNAの抽出法・濃度測定法を伺いました。

DNA抽出キットは、カラム式の抽出キットを使っている先生が多く、QIAGEN製のキットが半数以上を占めていました。

DNAの濃度測定(吸光光度計)には、全施設でNanoDropとその同等品が使われていました。

フルオロメーターの普及率は低く、吸光光度計による濃度測定を想定するべきと考えました。

図10. DNAの抽出法と濃度測定法



- ☞ サンガーシーケンス解析は外注で実施している研究室が多いものの、自研究室で実施されている先生方もいらっしゃいました。
- ☞ 自研究室で実施されている先生方は、Thermo (ABI) 製のシーケンサーを使っていました。
- ☞ 外注先は様々でしたが、CLOVAでのクローナリティ解析に必要なデータファイル(AB1形式)は解析結果として出力されるものと思いました。

図11. シーケンス解析の方法

表1. ヒアリングから得られた今後の課題

ご意見	改善策
● 作業時間を「長い」と感じる	☐ 試薬やプロトコルの改良による作業時間の短縮
● マニュアルの改善が必要 (作業内容に関する混乱)	☐ ユーザーマニュアルの改訂による作業内容の明確化
● 作業工程と試薬が多く、煩雑で混乱しやすい	☐ 試薬チューブのラベリングの工夫による混乱防止
● ステップ2(カラム精製) (溶出液量、カラムの扱いに関する混乱)	☐ 精製用試薬やプロトコルの改良による作業の簡便化
● ステップ4(dsDNA合成→1st PCR) (特殊なステップダウン反応に関する混乱)	☐ ユーザーマニュアルの改訂による作業内容の明確化

【研究 3】 地方病性牛伝染性リンパ腫発症早期診断法としての牛伝染性リンパ腫ウイルスクローナリティ解析の有用性の検証

担当：北海道大学、国立感染症研究所

1. 背景

日本において 2009 年から 2011 年にかけて実施された全国調査では、日本の乳牛の 40.9%、肉牛の 28.7%が牛伝染性リンパ腫ウイルス(BLV)に感染していることが報告されており、このウイルスが全国の農場で蔓延していることが示されている (Murakami et al., 2013)。現在、BLV 感染症に対して利用可能なワクチンや治療法は存在しないため、農場での BLV 感染症への対策は、牛群衛生管理に基づくウイルスの伝播防止と、BLV 感染牛の検査と淘汰または隔離によって試みられている (Kuczewski et al., 2021)。ヨーロッパやオセアニアの一部の国々では、BLV 感染牛の積極的な淘汰を実施し、BLV の根絶に成功している (Lv et al., 2024)。しかし、日本のように BLV が蔓延した状況では、BLV 感染牛の数が多く、多大な労力と費用を必要とするため、淘汰戦略による清浄化は現実的には実行不可能である。

一方、国際的な牛肉需要の高まりや飼育コストの上昇に伴い、日本市場における枝肉価格や子牛価格が上昇している。日本ではと畜場検査で牛伝染性リンパ腫の臨床症状が認められた牛はと畜場法により全部廃棄処分となるため、地方病性牛伝染性リンパ腫(EBL)の発症は肉用牛農家にとって大きな経済的損失となる。このような状況下では、感染拡大を防ぐことに加え、EBL 発症リスク分析に基づいて高リスクの BLV 感染牛を選別し淘汰することで、EBL 発症を未然に防ぐことが有効である。しかし、現在利用可能な BLV 検査法のほとんどは、抗体やプロウイルスを検出するものであり、BLV の感染診断には有効だが、EBL 発症リスクを解析することはできない (Mekata et al., 2016)。

そこで我々は、EBL 発症のリスクマーカーとして、BLV 感染細胞のクローナリティに着目した。BLV はプロウイルスとして感染細胞のゲノム DNA にランダムな位置に組み込まれる (Gillet et al., 2007)。リンパ腫を発症していない無症候期(AL)およびリンパ球増多症(PL)牛では、さまざまな感染細胞が存在し、プロウイルス組込み部位が多様で、感染細胞のクローナリティは低い(Gillet et al., 2013, Nishimori et al., 2021)。一方、EBL 牛では、特定の感染細胞が異常に増殖し、特定のプロウイルス組込み部位の割合が増加し、感染細胞のクローナリティが高くなる (Gillet et al., 2013, Nishimori et al., 2021)。

2. 研究の目的

【研究 1】および【研究 2】において我々は、BLV プロウイルス挿入部位を網羅的に増幅する技術である RAISING と BLV 感染細胞のクローナリティを定量化するソフトウェア (CLOVA) を開発した。そこで本研究では、RAISING 法による BLV クローナリティ解析を臨床症例に応用し、牛伝染性リンパ腫の鑑別診断法ならびに発症予測法としての有用性を検証した (図 1)。

3. 材料と方法

1) BLV 感染診断および DNA 抽出

【研究 1】の 3-1)で示した方法により、BLV 感染診断を実施した。BLV 陽性牛については、全自動血球計数器 Celltac α (日本光電社) を用いて末梢血中のリンパ球数を測定し、リンパ球数が 8,000 個/ μ l 未満の個体を AL、8,000 個/ μ l 以上の個体を PL と定義した。また、リンパ腫の症状を呈したウシでは、リアルタイム PCR 法によるプロウイルス量の定量に加えて、免疫フェノタイピング法 (Nishimori et al., 2017) または免疫グロブリン重鎖再構成 PCR 法 (IgH PCR) (Nishimori et al., 2017) によって B 細胞の異常増殖を確認し、プロウイルス量が高く、B 細胞の異常増殖が認められた症例を EBL 発症牛とした。

2) DNA 抽出および濃度測定

ウシの血液あるいは組織検体から Wizard DNA Purification Kit (Promega) あるいは Quick-DNA Miniprep Kit (ZYMO RESEARCH) を用いて、DNA を抽出した。抽出した DNA 検体について、NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific) による 260 nm における吸光度の測定もしくは Qubit Flex Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) による dsDNA 定量によって、DNA 濃度を決定した。

3) RAISING-BLV キットによるプロウイルス挿入部位の増幅およびクローナリティ解析

本研究では、RAISING ver.1、vet2.0 あるいは ver.2 の試薬 (【研究 1】表 1) とプライマー (【研究 1】表 2) を用いて、【研究 1】表 3~6 のプロトコルに従って、DNA 検体における BLV プロウイルス挿入部位を増幅した。そして、RAISING の増幅産物を【研究 1】の 3-3)で示した方法により DNA シークエンス解析に供し、クローナリティ値 (clonality value: Cv) を算出した。

4) 統計解析

すべての統計解析は、GraphPad Prism 6 (GraphPad Software) を用いて実施した。 p 値が 0.05 未満の場合に統計的に有意であるとみなした。

4. 結果

1) BLV 感染牛におけるクローナリティ値の解析

まず、AL 牛 ($n=107$)、PL 牛 ($n=79$)、EBL 牛 ($n=101$) の血液検体、および EBL 牛の腫瘍組織検体 ($n=169$) を用いて、RAISING による BLV クローナリティ解析を行った。また、先行研究でプロウイルス量が EBL 診断の候補マーカーであることが提唱されているため、これらの検体についてプロウイルス量も測定した (Somura et al., 2014)。EBL および AL/PL の血液検体における RAISING の代表的な結果を図 2 に示す。EBL015 では、血液および腫瘍検体でプロウイルス挿入部位がモノクローナル増殖パターンを示し、Cv は 1.00 と算出された (図 2)。一方、AL002 と PL002 では、プロウイルス挿入部位がポリクローナルパターンを示し、Cv はそれぞれ 0.09 と 0.06 であった (図 2)。全検体の結果をまとめると、血液検体においては、EBL は AL または PL よりも有意に高い Cv を示した (図 3)。また、EBL の腫瘍の Cv は、EBL の血液の Cv よりも高かった (図 3)。一方でプロウイルス量は、EBL の腫瘍検体は血液検体よりも高い値を示したが、血液中においては PL と EBL で有意差がなかった (図 3)。以上の結果は、血液の Cv が EBL と AL・PL を鑑別するための有効なマーカーであることを示している。

2) RAISING によるクローナリティ解析の臨床的有用性

BLV クローナリティ解析によって算出された Cv が EBL の鑑別診断に有用であるかどうかを調べるため、受信者動作特性 (ROC) 解析を行い血液検体の Cv および プロウイルス量による EBL 診断の特異度および感度を調べた。EBL の診断における血中 Cv のカットオフ値は 0.17 であり、感度 87.1%，特異度 93.0% で EBL 症例を鑑別可能であった (図 4)。EBL の血液検体 101 例中、Cv が 0.17 未満であったのは 13 例 (12.9%) であった (図 4)。これらの個体では、腫瘍組織においては Cv が高かったが、血液中では Cv が低かった。一方で、血液中の Cv が 0.17 以上の AL および PL は 13 例 (7.0%) 認められた (図 4)。Cv が高い AL・PL 牛については、EBL 発症リスクが高い可能性があり、予後を調査すべきである。一方、血中のプロウイルス量のカットオフ値は 32.10 copy/100 cells

であったが、これは EBL 検体の半数以上がカットオフ値より低い値を示したため、マーカーとしては適切ではなかった（図 4）。以上の解析から、Cv はプロウイルス量に比べて EBL の診断マーカーとして優れていることが示された。

3) BLV 感染羊のリンパ腫モデルにおける経時的なクローナリティ解析

ヒツジは BLV の自然宿主ではないが、実験的に BLV 感染させると、ウシよりも短い潜伏期間の後、高い頻度でリンパ腫を発症する (Gillet et al., 2007)。そこで、EBL 発症の予測マーカーとしての Cv の有用性を検討するため、ヒツジの BLV 実験感染モデルを用いて経時的にクローナリティを解析した。Cv は、BLV 感染直後は低い値を示したが、感染後期においてリンパ腫を発症する前の段階で上昇し、そのまま発症まで高い値を維持した（図 5）。また、Cv はプロウイルス量よりも早いタイミングで上昇が認められており、発症予測マーカーとしての優位性が改めて確認された（図 5）。以上の結果から、RAISING によるクローナリティ解析は、BLV 感染におけるリンパ腫発症の早期予測に有用であることが示された。

5. 考察

本研究では、EBL 発症牛と非発症牛について、BLV 感染細胞の Cv を RAISING を用いて解析した結果、Cv は EBL を感度、特異度ともに高く識別可能であった。一方、血液中のプロウイルス量による EBL 診断の感度と特異度は非常に低く、別の先行研究の結果と一致している (Konishi et al. 2019)。プロウイルス量の上昇は EBL 発症に必要な過程だと思われるが、EBL の発症と早期診断の診断マーカーとしては適切ではなかった。

本研究で解析した EBL 症例のうち、13 検体 (12.9%) が末梢血で Cv が低く、感染細胞のクローン増殖を認めなかったが、これは我々の以前の報告 (Nishimori et al., 2017) と一致する所見である。今後は、このような末梢血で感染細胞のクローン増殖を認めない症例について、補助的な診断マーカーを探索し、より確実な EBL の鑑別診断法を樹立したい。

EBL 発症のリスク評価における RAISING-CLOVA によるクローナリティ解析の有用性をさらに検証するためには、スクリーニング試験でより高い Cv を示した AL・PL 牛に焦点を当てて、野外の農場における大規模な追跡調査が必要である。これまでの研究で、HTLV-1 感染キャリアのクローナリティ解析により、感染細胞の Cv が成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (ATL) 発症前の末梢血プロウイルス量の増加よりも早く増加することが示され、この方法が ATL のリスク評価に適用できることが示唆されている (Saito et al., 2020, Wada

et al., 2022)。本研究では、症例数は少ないものの、ヒツジのリンパ腫モデルならびに BLV 感染牛において同様の結果が確認された。このことから、RAISING による BLV クローナリティ解析は、BLV 感染牛の中から発症ハイリスク牛を特定するために有効な手法であることが期待される。

日本では、EBL 症例は依然として増加しているが、BLV 感染症に対する治療薬やワクチンは市販されていない。そのため、BLV 感染率の高い農場では、EBL 発症を防止するために感染牛の選択的淘汰を行う必要がある。感染牛の淘汰の優先順位を決定するには、RAISING を用いたクローナリティ解析により EBL 発症リスクを評価することが有用である。RAISING 検査キットの製品化と牛の癌スクリーニング検査の普及は、EBL の発生による生産物自体の損失や牛の育成にかけた無駄なコストを削減することに繋がり、農家の不安を軽減するとともに、和牛の安定生産に貢献すると期待される。

現在我々は、RAISING 法による BLV クローナリティ解析の普及を目指し、国内の大学や各検査所、臨床獣医師、農家とのネットワークを駆使して、さらなる研究開発を進めている。今後の課題として、BLV 感染牛を対象とした大規模なクローナリティの追跡調査を行い、発症予測法としての診断基準（カットオフ値）や診断精度を検証したい

（図 6）。また、RAISING 法による BLV クローナリティ解析について、学術論文、学会発表や広報活動を積極的に実施し、解析法の普及活動にも努めている。株式会社ファスマックでは、BLV クローナリティ解析サービスに関する専用ページを開設し、RAISING 法による BLV クローナリティ解析の受託解析を実施している（図 7）。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。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 8）。

6. 参考文献

- 1) Murakami K, Kobayashi S, Konishi M, Kameyama K, Tsutsui T. 2013. Nationwide survey of bovine leukemia virus infection among dairy and beef breeding cattle in Japan from 2009–2011. J Vet Med Sci 75:1123–1126.
- 2) Kuczewski A, Orsel K, Barkema H W, Mason S, Erskine R, van der Meer F. 2021. Invited review: Bovine leukemia virus-Transmission, control, and eradication. J Dairy Sci 104: 6358–6375.
- 3) Lv G, Wang J, Lian S, Wang H, Wu R. 2024. The Global Epidemiology of Bovine Leukemia

Virus: Current Trends and Future Implications. *Animals* 14: 297.

- 4) Mekata H. 2016. Diagnosing bovine leukemia virus infection. *Jpn J Large Anim Clin* 6: 221–226 (in Japanese).
- 5) Gillet N, Florins A, Boxus M, Burteau C, Nigro A, Vandermeers F, Balon H, Bouzar AB, Defoiche J, Burny A, Reichert M, Kettmann R, Willems L. 2007. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology* 4: 18.
- 6) Gillet NA, Gutiérrez G, Rodríguez SM, de Brogniez A, Renotte N, Alvarez I, Trono K, Willems L. 2013. Massive depletion of bovine leukemia virus proviral clones located in genomic transcriptionally active sites during primary infection. *PLoS Pathog* 9: e1003687.
- 7) Nishimori A, Andoh K, Matsuura Y, Kumagai A, Hatama S. 2021. Establishment of a simplified inverse polymerase chain reaction method for diagnosis of enzootic bovine leukosis. *Arch. Virol.* 166: 841-851.
- 8) Nishimori A, Konnai S, Okagawa T, Maekawa N, Goto S, Ikebuchi R, Nakahara A, Chiba Y, Ikeda M, Murata S, Ohashi K. 2017. Identification of an atypical enzootic bovine leukosis in Japan by using a novel classification of bovine leukemia based on immunophenotypic analysis. *Clin Vaccine Immunol* 24: e00067-17.
- 9) Somura Y, Sugiyama E, Fujikawa H, Murakami K. 2014. Comparison of the copy numbers of bovine leukemia virus in the lymph nodes of cattle with enzootic bovine leukosis and cattle with latent infection. *Arch Virol* 159:2693–2697.
- 10) Konishi M, Kobayashi S, Tokunaga T, Chiba Y, Tsutsui T, Arai S, Kameyama KI, Yamamoto T. 2019. Simultaneous evaluation of diagnostic marker utility for enzootic bovine leukosis. *BMC Vet Res* 15:406.
- 11) Saito M, Hasegawa H, Yamauchi S, Nakagawa S, Sasaki D, Nao N, Tanio M, Wada Y, Matsudaira T, Momose H, Kuramitsu M, Yamagishi M, Nakashima M, Nakahata S, Iha H, Ogata M, Imaizumi Y, Uchimarui K, Morishita K, Watanabe T, Miyazaki Y, Yanagihara K. 2020. A high-throughput detection method for the clonality of Human T-cell leukemia virus type-1-infected cells in vivo. *Int J Hematol* 112:300–306.
- 12) 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, Uchimaru K, Miyazaki Y, Konnai S, Yanagihara K, Morishita K, Watanabe T, Yamano Y, Saito M. 2022. RAISING is a high-performance method for identifying random transgene integration sites. *Commun Biol* 5: 535.

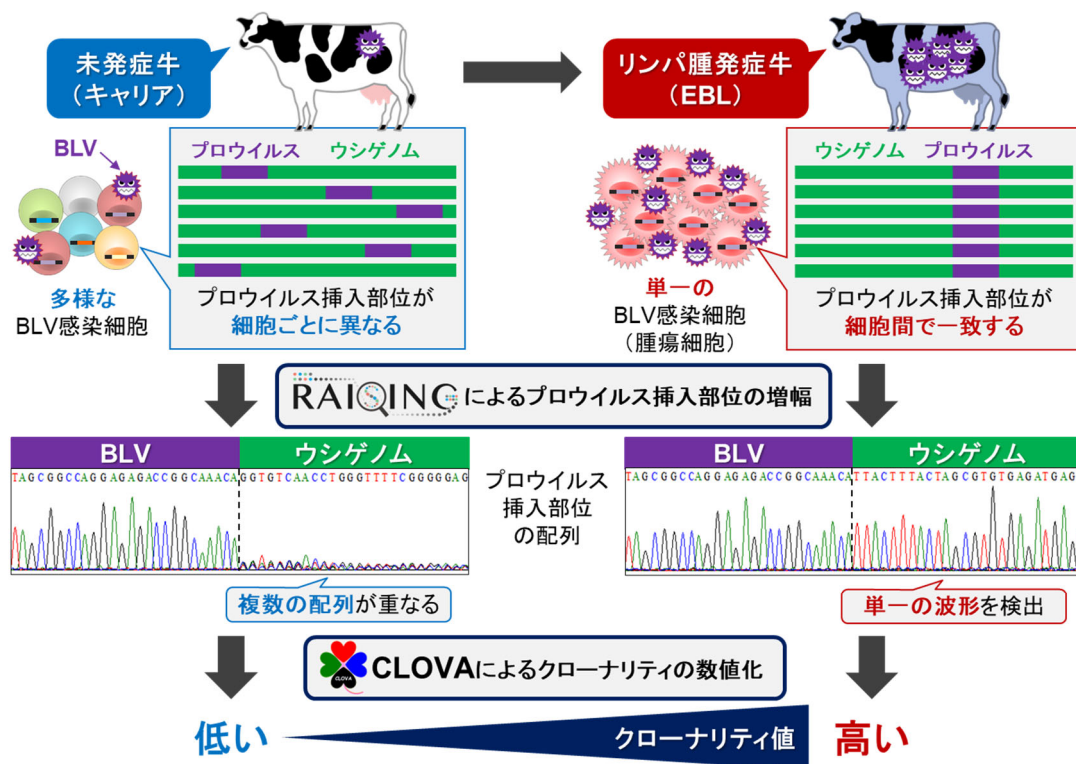


図1. RAISINGによるBLVクローナリティ解析

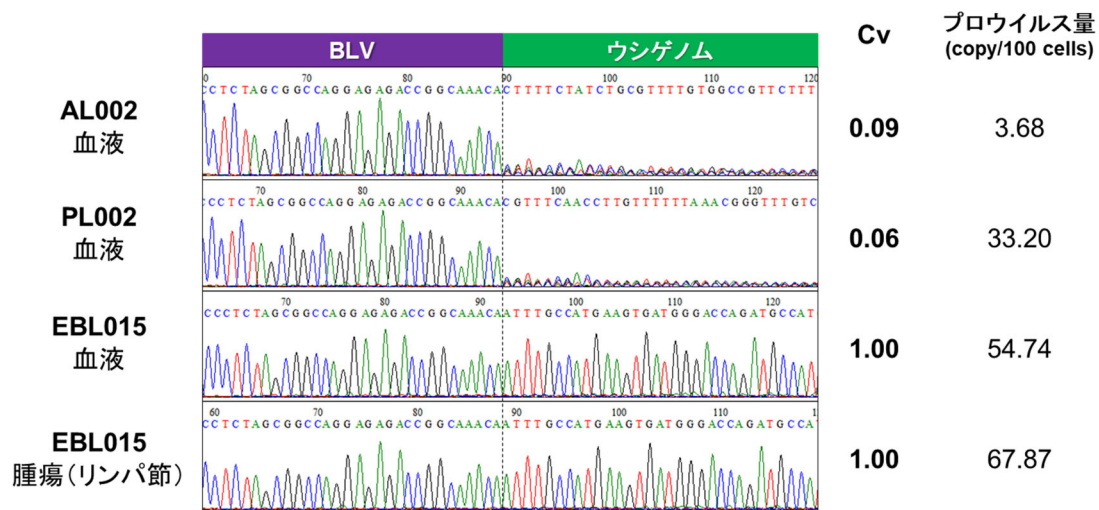


図2. BLV感染牛における代表的なクローナリティ解析結果

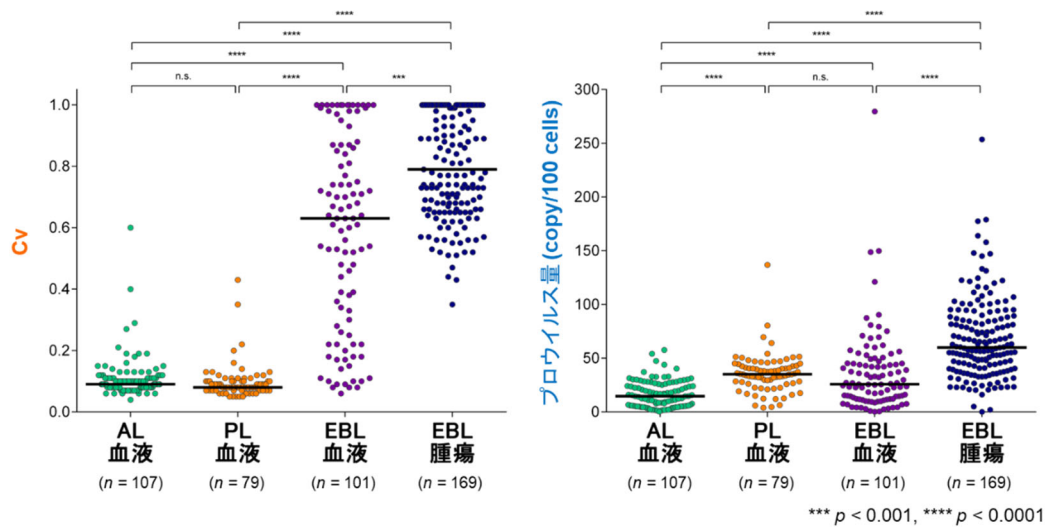
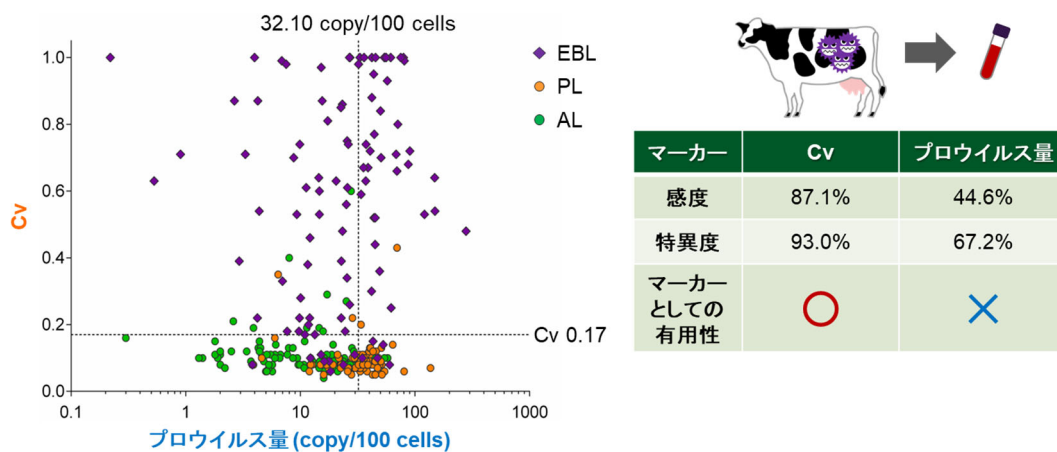


図3. BLV感染牛におけるクローナリティ解析結果



RAISINGによるクローナリティ解析は、EBLの鑑別診断法として有用である。

図4. 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

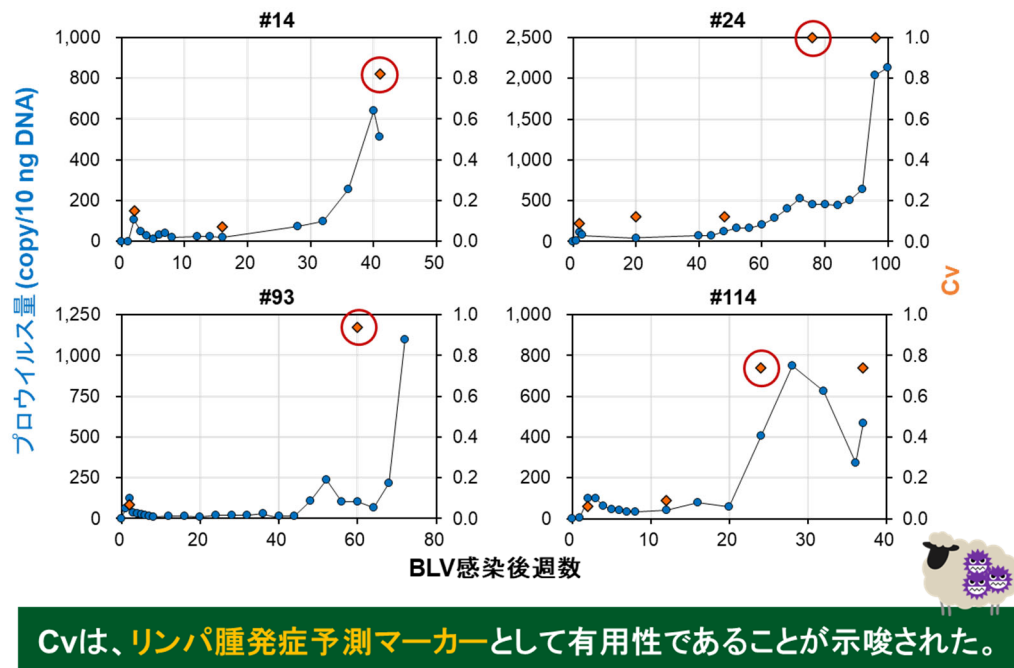


図5. 感染モデル羊における経時的なクローナリティ解析

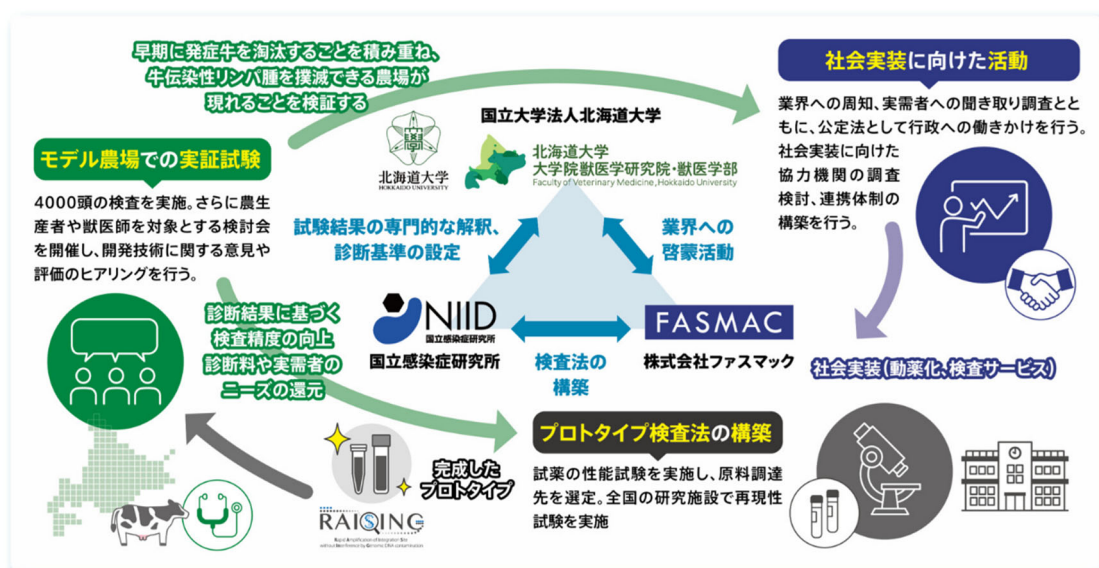


図6. 今後の研究開発構想



図7. 株式会社ファスマック 動物検査事業 Webページ

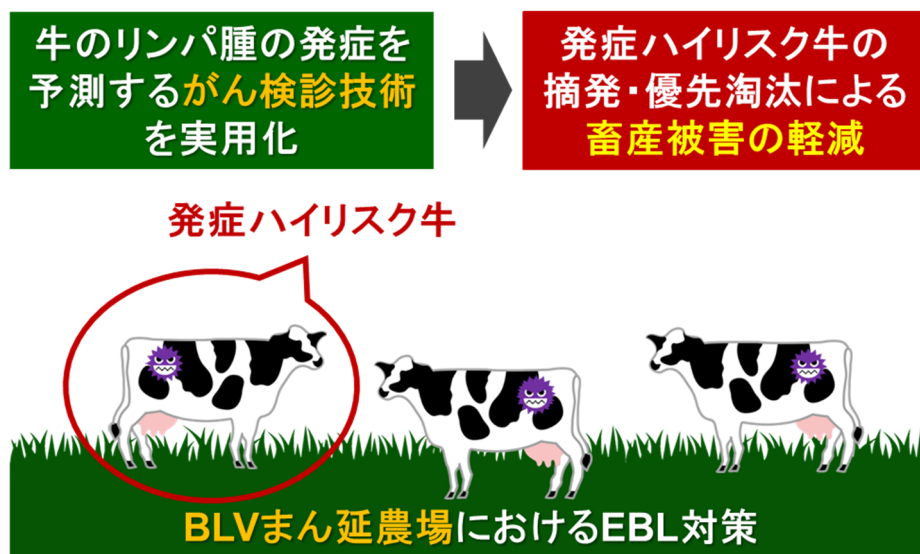


図8.牛伝染性リンパ腫の現状から考える将来像

研究成果発表一覧

1. 原著論文 5 報

- 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, 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, 13:e0259522. doi: 10.1128/spectrum.02595-22.
- 3) Nao N, Okagawa T, Nojiri N, Konnai S, Shimakura H, Tominaga M, Yoshida-Furihata H, Nishiyama E, Matsudaira T, Maekawa N, Murata S, Muramatsu M, Ohashi K, Saito M. Chimeric provirus of bovine leukemia virus/SMAD family member 3 in cattle with enzootic bovine leukosis. *Arch Virol.* 2024, 169(3):47. doi: 10.1007/s00705-024-05970-3.
- 4) Okagawa T, Nojiri N, Yoshida-Furihata H, Nao N, Tominaga M, Kohara J, Gondaira S, Higuchi H, Takeda Y, Ogawa H, Yamada S, Murakami K, Suzuki Y, Takai S, Maezawa M, Inokuma H, Shimizu K, Inoshima Y, Usui T, Tagawa M, Yamamoto M, Mekata H, Esaki M, Ozawa M, Matsudaira T, Maekawa N, Murata S, Ohashi K, Saito M, Konnai S. Performance evaluation of an improved RAISING method for clonality analysis of bovine leukemia virus-infected cells: a collaborative study in Japan. *J Vet Med Sci.* 2025, 87(5):551-558. doi: 10.1292/jvms.25-0031.
- 5) Nakamura H, Konnai S, Okagawa T, Maekawa N, Tiyananee W, Ikehata M, Matsubara K, Watari K, Kamitani K, Saito M, Kato Y, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Comprehensive Analysis of Immune Checkpoint Molecules Profiles Phenotype and Function of Exhausted T Cells in Enzootic Bovine Leukosis. *J Immunol. in press.* doi: doi.org/10.1093/jimmun/vkaf050

2. その他論文（総説、紀要） 9 報

- 1) 今内 覚, 岡川 朋弘. ピックアップ新技術：牛のリンパ腫発症を予測するがん検診技術を開発. リスク高い牛の優先淘汰による発生予防に期待. *DAIRYMAN*. 73(2): 64-66. 2023 年 2 月.
- 2) 今内 覚, 岡川 朋弘. 牛伝染性リンパ腫の現状から最後の砦：発症予測法について. *臨床獣医*. 41(2): 46-52. 2023 年 2 月.
- 3) 今内 覚, 岡川 朋弘. 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～. *北海道獣医師会誌*. 67(2): 10-13. 2023 年 2 月.
- 4) 今内 覚, 岡川 朋弘. 成果紹介：ウシ伝染性リンパ腫の早期発症診断による経済損失低減の実現. *JATAFF ジャーナル*. 11(4): 45-50. 2023 年 4 月.
- 5) 今内 覚, 岡川 朋弘. 講座：牛伝染性リンパ腫診断の新技術・早期発症予測診断法 RAISING とは. *家畜診療*. 70(5): 259-266. 2023 年 5 月.
- 6) 今内 覚, 岡川 朋弘, 斎藤 益満. One Health アプローチにもとづく BLV/HTLV-I 感染症におけるリンパ腫の診断と早期発症予測法の開発. *臨床とウイルス*. 51(4): 192-198. 2023 年 10 月.
- 7) 岡川 朋弘. 新規 BLV クローナリティ解析技術を用いた EBL 発症予測法の開発. *動物用ワクチン・バイオ医薬品研究会ニュースレター*. 28: 23-25. 2023 年 12 月.
- 8) 今内 覚, 岡川 朋弘. 牛のリンパ腫発症を予測するがん検診技術. *畜産技術*. 834: 24-29. 2024 年 11 月.
- 9) 今内 覚. 牛のリンパ腫発症を予測するがん検診技術. *J. Vet. Epidemiol.* 28(2): 95-100. 2024 年 12 月.

3. 招待講演 26 回

- 1) 今内 覚. 牛伝染性リンパ腫 (旧名:牛白血病) の現状と早期発症診断による経済損失低減の実現. 山口県畜産振興協会 令和 4 年度家畜生産農場衛生対策事業. 2023 年 2 月 21 日.
- 2) 今内 覚. 動物も新薬で病気から救える時代に. 国民との科学・技術対話事業. 2023 年 3 月 14 日.
- 3) 今内 覚. 牛のリンパ腫発症を予測するがん検診技術. 岩手県中央家畜保健衛生所セミナー. 2023 年 4 月 27 日.

- 4) 今内 覚. 動物難治性疾病に対する新規予防・治療法の開発. 北里大学第 486 回獣医学科セミナー〈特別講演〉. 2023 年 5 月 18 日.
- 5) 岡川 朋弘. 新規 BLV クローナリティ解析技術を用いた EBL 発症予測法の開発. 動物用ワクチンバイオ医薬品研究会 2023 年度シンポジウム. 2023 年 5 月 19 日.
- 6) 今内 覚. 動物難治性疾病に対する新規予防・治療法の開発. 第 15 回大動物臨床研究会特別セミナー. 2023 年 5 月 26 日.
- 7) 今内 覚. 牛伝染性リンパ腫への対策に向けて. 松前町肉牛改良センター特別講演会. 2023 年 6 月 28 日.
- 8) 岡川 朋弘. 牛のリンパ腫発症を予測するがん検診技術の開発. 第 166 回日本獣医学会学術集会 ランチョンセミナー. 2023 年 9 月 8 日.
- 9) 今内 覚. 牛伝染性リンパ腫における最近の知見、新たな発症予測診断について. 北海道獣医師会留萌支部獣医新技術講習会. 2023 年 9 月 20 日.
- 10) 今内 覚. 酪農教育ファームにおける安全・衛生. 中央酪農会議 令和 5 年度酪農教育ファームスキルアップ研修会. 2023 年 9 月 22 日.
- 11) 今内 覚. 牛伝染性リンパ腫対策の最新知見. 令和 5 年岩手県獣医師会研修会. 2023 年 10 月 13 日.
- 12) 今内 覚. 早期発症診断によって経済損失低減を実現する牛のがん検診. 知の集積と活用の方 産学官連携協議会 2023. 2023 年 11 月 7 日. (北海道大学ロバスト推薦)
- 13) Tomohiro Okagawa. From Bench to Farm: Development of Immunotherapy and Clonality Analysis Technologies for BLV Control. The 1st International All Things Bovine Leukemia Virus Conference. 2023 年 11 月 8 日.
- 14) 今内 覚. 牛伝染性リンパ腫とは? 最後の砦! 発症予測診断法 RAISING とは? 2023 アグリビジネス創出フェア in Hokkaido - 北海道の食と農の明日へ-. 2023 年 11 月 9~10 日. (北海道大学ロバスト推薦)
- 15) 今内 覚. 牛伝染性リンパ腫の現状から最後の砦: 発症予測法について. 第 41 回日本獣医師会獣医学術学会年次大会 (令和 5 年度) 特別企画. 2023 年 12 月 3 日.
- 16) 今内 覚. 牛伝染性リンパ腫ってどういう病気? 感染・発症・診断の基本と最前線. 細胞診クラブ 牛伝染性リンパ腫フォーラム. 2024 年 1 月 20 日.
- 17) 今内 覚. 動物も新薬で病気から救える時代に. 国民との科学・技術対話事業. 2024 年 2 月 21 日.
- 18) 今内 覚. 牛伝染性リンパ腫の現状から最後の砦: 発症予測法について. 新潟県獣医

師会産業動物部会 特別講演会. 2024 年 3 月 1 日.

- 19) 今内 覚. 牛伝染性リンパ腫について 感染・発症・診断の基本と最前線. 東京都芝浦食肉衛生検査所研修会. 2024 年 5 月 23 日.
- 20) 今内 覚. 牛伝染性リンパ腫の現状と発症予測法. 第 64 回獣疫学会学術集会シンポジウム. 2024 年 8 月 31 日.
- 21) 今内 覚. 牛伝染性リンパ腫発症牛の全部廃棄大幅削減による日本経済の活性化～前がん細胞検診技術 RAISING の実用化～. 第 6 回南九州畜産獣医学拠点(SKLV)セミナー. 2024 年 9 月 25 日.
- 22) 今内 覚. 牛伝染性リンパ腫発症牛の全部廃棄大幅削減による日本経済の活性化～前がん細胞検診技術 RAISING の実用化～. 鹿児島県家畜畜産物衛生指導協会令和 6 年度家畜生産農場衛生対策事業に係る牛伝染性リンパ腫対策講習会. 2024 年 9 月 26 日.
- 23) 今内 覚. 動物も新薬で病気から救える時代に. 国民との科学・技術対話事業. 2024 年 10 月 25 日.
- 24) 今内 覚. 牛伝染性リンパ腫診断の新技术・早期発症予測診断法 RAISING とは. 第 66 回岐阜県家畜保健衛生業績発表会. 2024 年 12 月 20 日.
- 25) 今内 覚. 牛伝染性リンパ腫の現状、発症早期診断法の開発とその実践. 第 42 回日本獣医師会獣医学術学会年次大会（令和 6 年度）. 2025 年 1 月 26 日.
- 26) 今内 覚. 牛伝染性リンパ腫を巡る情勢. 独立行政法人家畜改良センター新冠牧場牛の飼養・衛生管理に関するセミナー. 2025 年 3 月 26 日.

4. 学会発表（一般演題） 6 回

<口頭発表>

- 1) 富永 みその, 今内 覚, 岡川 朋弘, 神谷 可菜, 齋藤 麻矢, 安富 一郎, 目堅 博久, 前川 直也, 村田 史郎, 大橋 和彦. 牛伝染性リンパ腫の診断と早期発症予測法の開発. 令和 5 年度 日本産業動物獣医学会（北海道）. 2023 年 8 月 31 日.
- 2) 富永 みその, 岡川 朋弘, 嶋倉 穂南, 齋藤 益満, 松平 崇弘, 直 享則, 山田 慎二, 村上 賢二, 前川 直也, 村田 史郎, 大橋 和彦, 今内 覚. クローナリティ解析による地方病性牛伝染性リンパ腫に対する発症予測法の開発. 第 166 回日本獣医学会学術集会. 2023 年 9 月 8 日.
- 3) 廣瀬 海風, 今内 覚, 岡川 朋弘, 富永 みその, 松原 幸芽, 前川 直也, 村田 史郎, 大橋 和彦. 子牛における地方病性牛伝染性リンパ腫発症は母牛由来の腫瘍細胞が

原因か？ 令和 6 年度 日本産業動物獣医学会（北海道）. 2024 年 8 月 29 日.

- 4) Nakamura H, Konnai S, Okagawa T, Ikehata M, Maekawa N, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Comprehensive expression analysis of immune checkpoint molecules in BLV-infected cattle. The 12th Sapporo Summer Seminar for One Health. 2024 年 9 月 3 日.
- 5) 松原 幸芽, 岡川 朋弘, 斎藤 益満, 松平 崇弘, 直 亨則, 神谷 可菜, 齋藤 麻矢, 前川 直也, 村田 史郎, 大橋 和彦, 今内 寛. 非典型的な地方病性牛伝染性リンパ腫症例の RAISING 法を用いた性状解析. 第 167 回日本獣医学会学術集会. 2024 年 9 月 10 日.

<ポスター発表>

- 6) 直 亨則, 岡川 朋弘, 野尻 直未, 今内 寛, 嶋倉 穂南, 富永 みその, 吉田 初佳, 西山 依里, 松平 崇弘, 前川 直也, 村田 史郎, 大橋 和彦, 斎藤 益満. 地方病性牛伝染性リンパ腫における牛伝染性リンパ腫ウイルス/SMAD3 融合遺伝子の検出. 第 70 回日本ウイルス学会学術集会. 2023 年 9 月 27 日.

5. 知的財産

なし

6. 受賞 4 件

- 1) 松原 幸芽. 北海道大学地方学実践支援プログラム 2023. 2023 年 7 月 11 日.
- 2) 岡川 朋弘. 日本農学進歩賞. 2023 年 11 月 24 日.
- 3) Hayato Nakamura. The 12th Sapporo Summer Seminar for One Health Award for Oral Presentation Excellence. 2024 年 9 月 4 日.
- 4) 廣瀬 海風. 令和 6 年度日本産業動物獣医学会（北海道）奨励賞. 2024 年 10 月 11 日.

7. アウトリーチ活動 12 件

- 1) 北海道大学, 国立感染症研究所, 株式会社ファスマック, 岩手大学, 伊藤記念財団. プレスリリース「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～」2022 年 10 月 21 日.
- 2) 株式会社ファスマック. 第 166 回日本獣医学会学術集会 要旨集・ホームページへの広告掲載（動物診断関連サービス：RAISING 法による BLV クロナリティ解析）2023 年 9 月.

- 3) 株式会社ファスマック. 第 166 回日本獣医学会学術集会でのランチョンセミナーの開催. 2023 年 9 月.
- 4) 株式会社ファスマック. 農業 Week 畜産 Expo への出展 (RAISING 法による BLV クロナリティ解析) 2023 年 10 月.
- 5) 株式会社ファスマック. BioJapan への出展 (RAISING 法による BLV クロナリティ解析) 2023 年 10 月.
- 6) 株式会社ファスマック. BLV クロナリティ解析サービス専用ページの開設 (自社ホームページ の動物検査事業) 2023 年 12 月.
- 7) 岡川 朋弘. 牛伝染性リンパ腫発症前診断法. 宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター 検疫・診断コースワーク. 2024 年 3 月 8 日. (実習講師)
- 8) 株式会社ファスマック. 第 42 回日本獣医師会獣医学術学会年次大会への出展 (牛伝染性リンパ腫発症牛の全部廃棄大幅削減による日本経済の活性化～前がん細胞検診技術 RAISING の実用化～) 2024 年 1 月.
- 9) 株式会社ファスマック. 第 42 回日本獣医師会獣医学術学会年次大会でのランチョンセミナーの開催. 2024 年 1 月.
- 10) 岡川 朋弘. 牛伝染性リンパ腫発症前診断法. 宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター 検疫・診断コースワーク. 2025 年 2 月 7 日. (実習講師)
- 11) 株式会社ファスマック. 令和 6 年度家畜診療等技術全国研究集会への出展 (牛伝染性リンパ腫発症牛の全部廃棄大幅削減による日本経済の活性化～前がん細胞検診技術 RAISING の実用化～) 2024 年 2 月.
- 12) 北海道大学, 国立感染症研究所, 株式会社ファスマック, 伊藤記念財団, 他 11 機関. プレスリリース「牛リンパ腫発症予測診断技術 RAISING の精度の高さを証明 ～国内初の 14 研究機関による多施設検証試験を実施～」 2025 年 3 月 28 日.

8. 主な報道 15 件

- 1) 日経バイオテク. 北海道大、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～. 2022 年 10 月 21 日.
<https://bio.nikkeibp.co.jp/atcl/release/22/10/21/14882/>
- 2) 北海道新聞. 牛のリンパ腫発症を予測するがん検診技術を開発. 2022 年 10 月 21 日.
<https://www.hokkaido-np.co.jp/article/748805>
- 3) 農業協同組合新聞. 牛のリンパ腫発症を予測するがん検診技術を開発 北大、ファ

スマックなど4者. 2022年10月24日.

<https://www.jacom.or.jp/niku/news/2022/10/221024-62339.php>

- 4) 農業共済新聞. 牛伝染性リンパ腫 発症予測を実現 対策大きく前進 北海道大学などが開発. 2022年11月1週号2面.
- 5) 日本農業新聞. 牛リンパ腫発症予測 早期淘汰可能に 北大など技術開発. 2022年11月4日号1面. <https://www.agrinews.co.jp/news/index/114669>
- 6) 日経バイオテク. 北大や感染研がレトロウイルスの発症予測に新技術、牛リンパ腫やATLへの応用に期待. 2022年11月11日.
<https://bio.nikkeibp.co.jp/atcl/column/16/052000031/110700097/>
- 7) 科学新聞. 牛のリンパ腫発症予測がん検診技術を開発. 2022年11月11日第3896号.
- 8) JVM NEWS. 牛のリンパ腫発症を予測するがん検診技術を開発 北海道大学. 2022年11月21日. <https://bunaido-shuppan.com/jvmnews/article/jvm20221121-001>
- 9) 開拓情報. 牛リンパ腫発症予測方法開発 畜産被害の軽減に向けて. 2022年12月15日号7面. https://www.kaitakusya.or.jp/data_files/view/476/mode:inline
- 10) Science Japan - The Science News. Predicting the onset of bovine lymphoma — Development of cancer screening technology. 2022年12月19日.
<https://sj.jst.go.jp/news/202212/n1219-01k.html>
- 11) 日経バイオテク. 牛リンパ腫発症予測診断技術 RAISING の精度の高さを証明 ～国内初の14研究機関による多施設検証試験を実施～. 2025年3月28日.
<https://kyodonewsprwire.jp/release/202503256257>
- 12) 共同通信 PRWIRE. 牛リンパ腫発症予測診断技術 RAISING の精度の高さを証明 ～国内初の14研究機関による多施設検証試験を実施～. 2025年3月28日.
<https://kyodonewsprwire.jp/release/202503256257>
- 13) AFP BB News. 牛リンパ腫発症予測診断技術 RAISING の精度の高さを証明. 2025年3月28日. <https://kyodonewsprwire.jp/release/202503256257>
- 14) 農業協同組合新聞. 牛リンパ腫発症予測診断技術 RAISING の精度の高さを証明 国内14研究機関で検証試験を実施. 2025年4月1日.
<https://www.jacom.or.jp/niku/news/2025/04/250401-80580.php>
- 15) JVM NEWS. 牛リンパ腫発症予測診断技術 RAISING の精度の高さを証明 今内 寛先生らの研究グループ. 2025年4月21日. <https://bunaido-shuppan.com/jvmnews/article/jvm20250421-002>

謝辞

本研究を遂行するにあたり、貴重な検体のご提供やご助言をいただき、多施設検証試験にもご参画いただきました、岩手大学獣医学部 村上 賢二 先生、山田 慎二 先生、宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター 目堅 博久 先生、多施設検証試験にご協力いただきました、北海道立総合研究機構小原 潤子 先生、酪農学園大学 樋口 豪紀 先生、権平 智 先生、帯広畜産大学 小川 晴子 先生、武田 洋平 先生、北里大学 高井 伸二 先生、鈴木 康規 先生、東京大学 猪熊 壽先生、前澤 誠希 先生、岐阜大学 猪島 康雄 先生、清水 薫 先生、鳥取大学 笛吹 達史 先生、岡山理科大学 田川 道人 先生、宮崎大学 山本 真理 先生、鹿児島大学 小澤 真 先生、江寄 真南 先生、貴重な臨床検体をご提供いただきました、農業共済組合、家畜保健衛生所、食肉衛生検査所、ゆうべつ牛群管理サービス、標茶町の皆様、公益財団法人伊藤記念財団 事務局の皆様をはじめとする、多くの皆様に改めて深謝いたします。

公益財団法人 伊藤記念財団

〒153-0064 東京都目黒区下目黒一丁目8番1号アルコタワー12階

TEL 03-5747-9721 FAX 03-5747-9722