

令和5年11月6日

牛伝染性リンパ腫ウイルス抵抗性マーカー遺伝子の簡易検査キットが誕生

【発表のポイント】

- 牛伝染性リンパ腫ウイルス（BLV）は牛や水牛に感染して、血液のガンを引き起こすウイルス性の感染症で、監視伝染病の中で最も発生数が多い。
- BLVに一度感染すると生涯にわたって持続感染し、治癒することはない。
- 感染牛の中には生まれつきウイルスが体内で増えにくい体質（抵抗性）の牛がいる。
- 抵抗性のマーカー遺伝子の検査はこれまで時間と労力を要した。
- 本学はタカラバイオ株式会社との共同研究により、抵抗性のマーカー遺伝子の簡易検査法を確立。
- 本手法により、短時間かつ少ない労力で抵抗性のマーカー遺伝子を検出することが可能となった。
(従来の手法と比較して10時間以上短縮可能)



△図1：牛伝染性リンパ腫ウイルス（BLV）抵抗性に関するマーカー遺伝子検出用リアルタイムPCR関連試薬

【概要】

宮崎大学産業動物防疫リサーチセンターの関口敏教授、野津昂亮研究員と、タカラバイオ株式会社との共同研究の成果として、牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV) 抵抗性マーカー遺伝子の簡易検査キットが生まれました。

牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV) 感染症は、家畜の慢性難治性感染症で、感染牛の生産性を下げます。近年、BLV 感染症の新たな伝播制御法として、病気に強い遺伝的体質 (抵抗性)を持つ牛の活用が着目されています。しかし、抵抗性のマーカー遺伝子の検査はこれまで時間と労力を要しました。今回開発した手法により、qPCR で短時間かつ少ない労力で抵抗性のマーカー遺伝子を検出することが可能となりました。更に、本手法は純度の高い DNA を精製する必要が無いため、沢山の牛の遺伝子を効率よく検査することが可能です。

本手法は、必要試薬をオールインワンで含んだ検査キットとしてタカラバイオ株式会社より「BLV Resistant Marker Gene Detection Kit」として製品化され、2023年11月6日(月)の発売を予定しています。

【背景】

牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV) は牛の B リンパ球に感染し、リンパ肉腫 (ガン) を引き起こす腫瘍ウイルスです。BLV 感染牛はガンを発症するだけでなく、乳量や体重も低下します。BLV に対する治療法やワクチンはなく、完治しないため、感染拡大を防ぐには感染牛を隔離するなどの対応策しかありません。

近年、BLV 感染症の新たな伝播制御法として、病気に強い遺伝的体質 (抵抗性)を持つ牛の活用が着目されています。抵抗性を持つ牛は、体内のウイルス量が極めて少ないため、他の牛に感染させたり、ガンを発症したりするリスクが低いことが知られています。抵抗性のマーカー遺伝子は複数あり、その中でも、対立遺伝子の1つである、牛 MHC-DRB3*009:02 (DRB3*009:02)が最も強力なものであることが知られています。

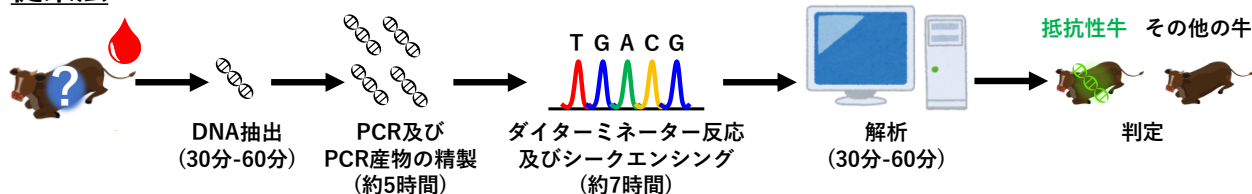
しかし、DRB3*009:02 を特異的に検出する為には、非常に塩基配列が類似した他の DRB3 遺伝子と識別する必要があります。これまで DRB3*009:02 の識別はシークエンシングによる塩基配列の確定といった、高価かつ労力が必要な方法で行われてきました。その為、BLV 抵抗性遺伝子検査のハードルは高く、中々普及しませんでした。そこで、本学はタカラバイオ株式会社との共同研究を行い、その成果として、抵抗性のマーカー遺伝子の簡易検査法が生まれました。

【成果】

関口教授と野津研究員は、タカラバイオ株式会社との共同研究の成果として、BLV 抵抗性マーカー遺伝子 DRB3*009:02 と牛リファレンス遺伝子を同時に検出する qPCR 法を見いだしました。更に、本手法と Lysis Buffer R を用いた牛血液からの DNA 抽出法と組み合わせることで、より簡便かつ短時間に検査が可能となりました。

(図 1)

従来法



本手法

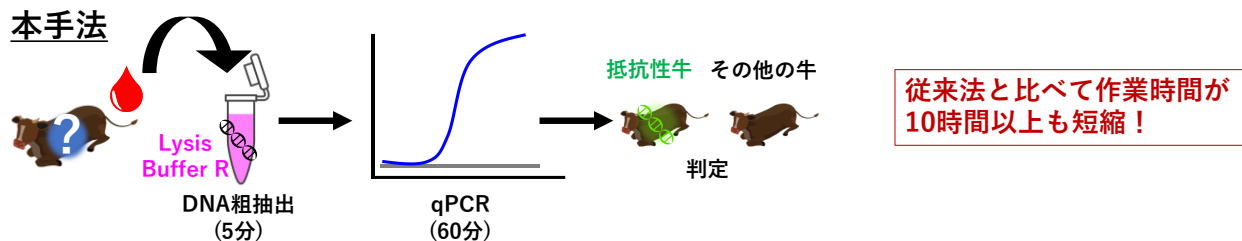


図2. 従来のDRB3*009:02検査法と本手法の作業の比較

本手法を用い、DRB3対立遺伝子型が様々な牛を検査した結果、DRB3*009:02保有牛のみを特異的に検出することに成功しました。(下表)

検体	保有しているDRB3対立遺伝子型		本手法 qPCR結果
	対立遺伝子1	対立遺伝子2	
牛1	*011:01	*014:01:01	陰性
牛2	*018:01	*028:01	陰性
牛3	*010:01	*011:01	陰性
牛4	*012:01	*028:01	陰性
牛5	*015:01	*016:01	陰性
牛6	*009:02	*016:01	陽性
牛7	*005:02	*012:01	陰性
牛8	*005:02	*016:01	陰性
牛9	*009:02	*015:01	陽性
牛10	*015:01	*027:03	陰性
牛11	*001:01	*011:01	陰性
牛12	*007:01	*015:01	陰性
牛13	*009:02	*016:01	陽性
牛14	*009:01	*011:01	陰性
牛15	*037:01	*044:01	陰性

更に、Lysis Buffer R による牛血液からの粗抽出 DNA の安定性試験を行いました。結果、粗抽出 DNA を抽出後室温で 1 週間静置後に試験しても、安定した PCR 反応を行うことが可能であることが分かりました。(図 3)

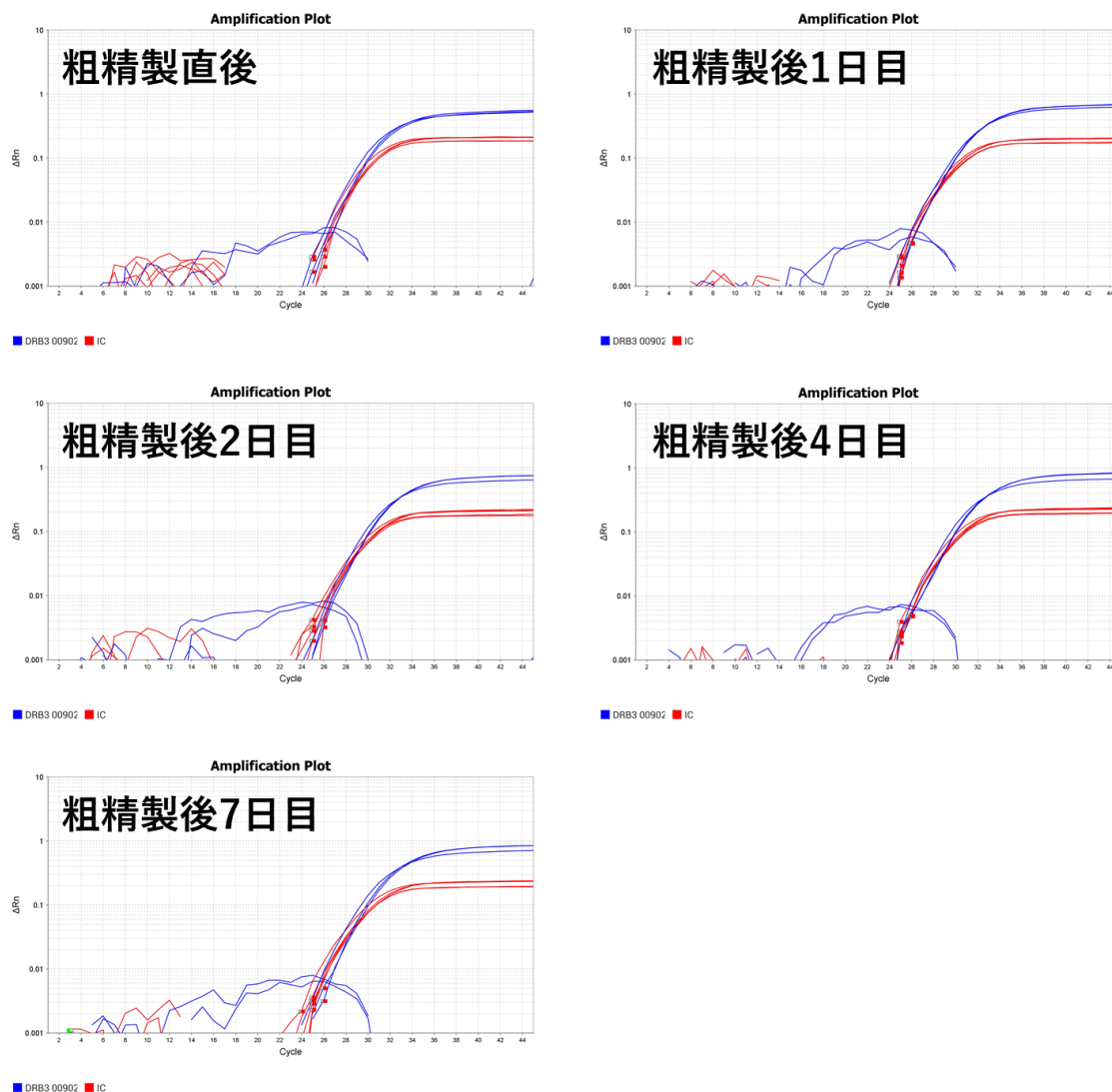


図 3. 粗抽出 DNA を経時的に PCR して増幅曲線の再現性を調べた結果。青い曲線が *DRB3*009:02* の検出を、赤い曲線が牛リファレンス遺伝子の検出を示している。5 頭の牛から内 3 頭の *DRB3*009:02* 保有牛の検出に成功し、本結果は粗抽出後 1 週間経っても再現性が見られた。

以上より、本手法は簡便かつ診断感度・特異度が高く優れた検査法であると言えます。

【展望】

本手法が、病気に強い牛を利用した BLV の対策に使用されます。これまで、BLV の感染拡大を防ぐには感染牛を隔離するなどの対応策しかありませんでした。BLV Resistant Marker Gene Detection Kit の発売により、家畜育種戦略からも BLV 感染症問題の解決に踏み出すことが可能となりました。

<研究に関する問合せ先>

宮崎大学 産業動物防疫リサーチセンター
教授 関口 敏

TEL : 0985-58-7676

e-mail : sekiguchi@cc.miyazaki-u.ac.jp

<取材に関する問合せ先>

宮崎大学 企画総務部総務広報課

担当 : 崎向

TEL : 0985-58-7114

e-mail : kouhou@of.miyazaki-u.ac.jp