

牛伝染性リンパ腫（EBL、牛白血病）に 抵抗性のある牛の遺伝子の同定 ～ 牛伝染性リンパ腫の発症防止・清浄化に向けて ～

JRA畜産振興事業（平成30年～令和2年）

牛白血病感染・発症抵抗性牛の指標開発事業

（代表者）

堀 正敏 東京大学 大学院農学生命科学研究科 教授

（共同研究者）

今川 和彦 東海大学 東海大学総合農学研究所 教授
小林 朋子 東京農業大学 農学部 動物科学科 准教授
須田 義人 宮城大学 食産業学群 教授
草間 和哉 東京大学 大学院農学生命科学研究科 特任助教

【講演者略歴】

堀 正敏 Hori, Masatoshi

【現職】 東京大学 大学院農学生命科学研究科
獣医学専攻 獣医薬理学研究室 教授

【学位】 博士（獣医学）（東京大学）

【略歴】

- 1986.3 日本獣医畜産大学 獣医学専修 修士課程修了
- 1988.10 東京大学 農学部 助手
- 1994.10 米国 テキサス州立大学 サウスウエスタン
メディカルセンターダラス校 PD
- 1996.10 東京大学・大学院農学生命科学研究科・助手
- 2004.4 東京大学 大学院農学生命科学研究科 助教授
- 2007.4 同 准教授
- 2018.4 同 教授、同獣医学専攻 専攻長（現在に至る）

【所属学会】

日本獣医学会（評議委員、理事）、日本神経消化器病学会（理事）、日本平滑筋学会（理事）、日本薬理学会（評議委員）、LPS 内毒素研究会（世話人）日本消化管学会、マクロファージ分子細胞生物学研究会（運営委員）日本循環薬理学会、日本毒性学会、

【受賞歴】

（学術賞など）

1. 2005年6月 森永奉仕会賞
2. 2011年3月 日本獣医学会賞 「炎症に伴う消化管マクロファージを介した消化管運動機能障害の分子機構」

【研究テーマ】

- 1) Neurogastroenterology and motility
- 2) Smooth muscle biology
- 3) Biology and pharmacology of natural organic products

【公表論文、著書など】

原著論文（英文） 206 件 著書 8 件 総説・その他 48 件

Hori M*, Kita M, Torihashi S, Miyamoto S, Won KJ, Sato K, Ozaki H, Karaki H.: Upregulation of iNOS by COX-2 in muscularis resident macrophage of rat intestine stimulated with LPS.

Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol) (2001) 280:G930-938. [Cited times 121 \(IF:4.052\)](#)

Shafiqul Md Islam, Murata T, Hori M, Fujisawa M, Nagasaka R, Ushio H and Ozaki H*: Anti-inflammatory effects of phytosteryl ferulates in dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Br. J. Pharmacol.* (2008) 154:812-824 [Cited times 150 \(IF:8.739\)](#)

Tsuchida Y, Hatao F, Fujisawa M, Murata T, Kaminishi M, Seto Y, Hori M* and Ozaki H: Neuronal stimulation with 5-hydroxytryptamine 4 receptor induces anti-inflammatory actions via $\alpha 7$ nACh receptor on muscularis macrophages associated with postoperative ileus.

Gut (2011) 60:638-647 [Cited times 82 \(IF:23.059\)](#)



小林 朋子 Kobayashi, Tomoko

【現職】 東京農業大学 農学部 動物科学科 准教授

【学位】 博士（医学）（京都大学）

【略歴】

- 2007.3 酪農学園大学 獣医学部 獣医学科 卒業
- 2011.3 京都大学 医学研究科 医学専攻 博士課程 修了
- 2011.4 農研機構博士研究員 動物衛生研究所 ウイルス疫学領域
タイ-日本 人獣感染症共同研究センター
- 2012.7 京都大学ウイルス研究所 ウイルス病態研究領域 博士研究員
- 2014.4 東京農業大学 農学部 畜産学科（現：動物科学科）助教
- 2020.4 同 農学部 動物科学科 准教授

【所属学会】

獣医疫学会、日本獣医学会

【受賞歴】

1. 2017年3月 優秀口頭発表賞 日本獣医疫学会
ウイルス遺伝子配列からみた牛白血病ウイルスの流行動態の解析
2. 2010年8月 John Coffin Award 日本レトロウイルス研究会

【研究テーマ】

レトロウイルス学、感染病態学

【主な公表論文】

Ohnuki N*, Kobayashi T*, Matsuo M, Nishikaku K, Kusama K, Torii Y, Inagaki Y, Hori M, Imakawa K, Satou Y. A target enrichment high throughput sequencing system for characterization of BLV whole genome sequence, integration sites, clonality and host SNP. *Sci Rep.* 2021 25;11(1):4521.

Inagaki Y, Kobayashi T, Suda Y, Kusama K, Imakawa K. Genetic variation in Japanese Holstein cattle for EBL development. *BMC Vet Res.* 2020 28;16(1):407.

Kobayashi T, Inagaki Y, Ohnuki N, Sato R, Murakami S, Imakawa K. Increasing Bovine leukemia virus (BLV) proviral load is a risk factor for progression of Enzootic bovine leucosis: A prospective study in Japan. *Prev Vet Med.* 2019 :S0167-5877(18)30795-5.



背景：牛伝染性リンパ腫ウイルス（BLV）とは

- 日本の農場への浸潤率、牛への感染率が増加している
 - 牛白血病（EBL）の原因となる
 - EBL発症牛は全廃棄され、年間30億円以上の損害が発生
- 有効な治療法がなく、早急な対策法の開発が必須**

本事業のねらい：

- BLV感染・EBL発症抵抗性牛の作出を最終目標とし、
1. BLV感染およびEBL発症に抵抗性を示す牛群から特異的な遺伝子情報および因子を同定する
 2. 選抜育種の指標となる因子を同定する



BLVの清浄化およびEBL発症の防止に繋げる

研究体制

統括責任者

東京大学 大学院農学生命科学研究科
堀 正敏 教授

共同研究

東海大学
総合農学研究所
今川和彦 教授

宮城大学
食産業学群
須田義人 教授

東京大学
大学院農学生命科学研究科
草間和哉 助教

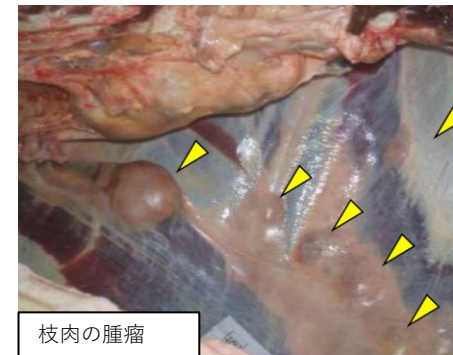
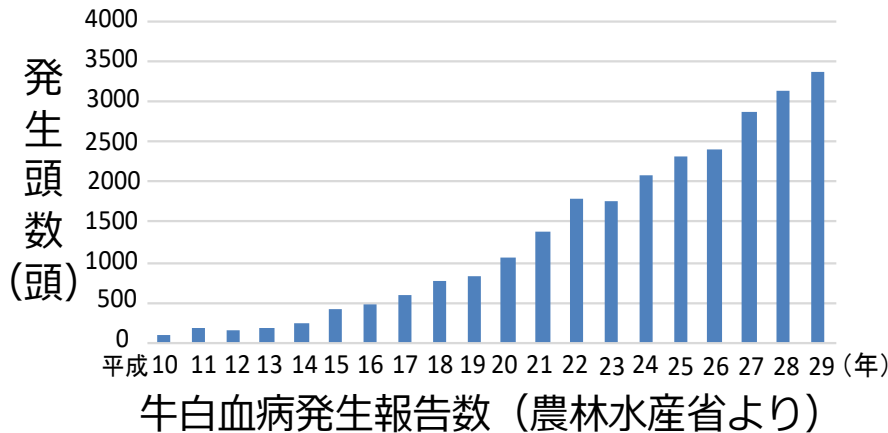
東京農業大学
農学部 動物科学科
小林朋子 准教授

外部評価委員

長崎大学 熱帯医学研究所 新興感染症学分野 安田二郎 教授
東京大学 大学院農学生命科学研究科 内田和幸 准教授

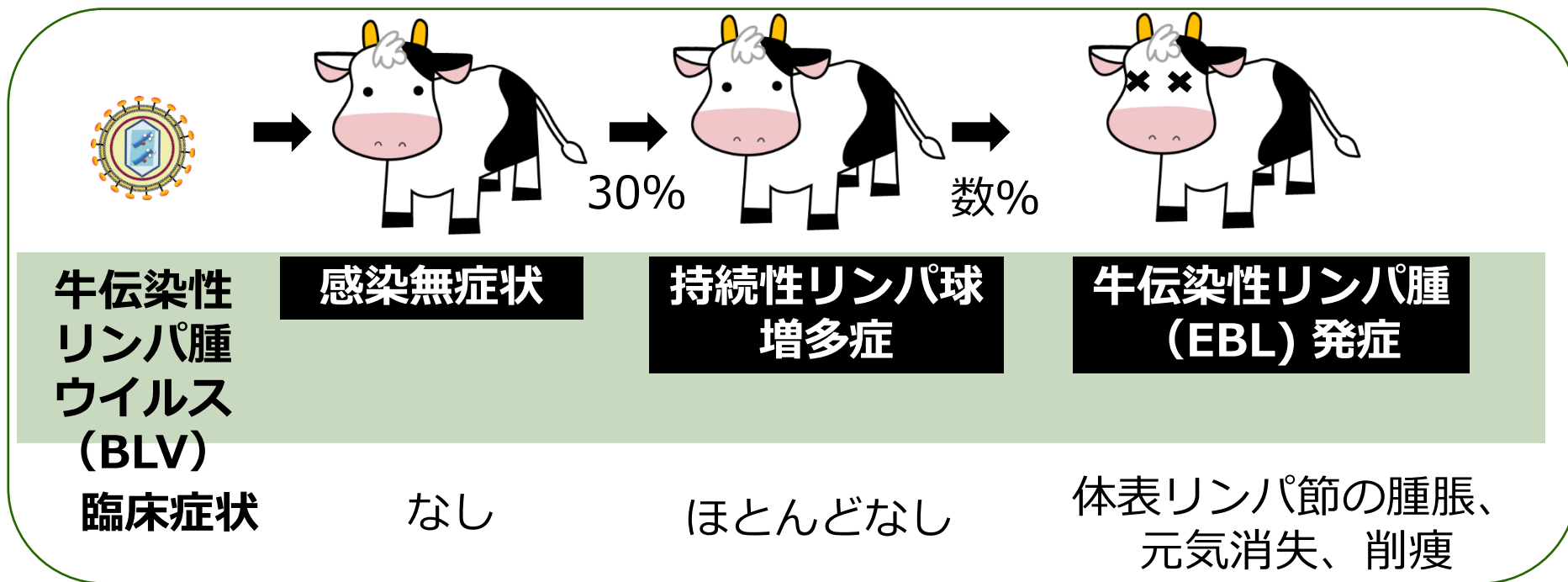
牛伝染性リンパ腫とは（牛白血病）

- 1. 全身に腫瘍ができるウシの疾病
- 2. BLVというウイルスが原因
- 3. 全国的にリンパ腫発症牛が増加（年間約4000頭が発症）



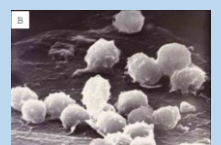
①背景

BLV感染と牛伝染性リンパ腫



感染経路

アブ・サシバエなどによる機械的伝播
母子感染も成立する (子宮内、母乳)
ほとんどが導入牛により牛群に持ち込まれる



(社団法人中央畜産会)

求められる、汚染状況に応じた対策方法



ウイルス検査

抗体検査

BLV
陽性
農家
約90%

抗体陽性
約50%

抗体陰性
約50%

高ウイルス量
約30%

低ウイルス量
約70%

発症
約5%

非発症
約95%

直接的な損失は
発症後に発生

と畜場発見
全部廃棄

重要な
違い

病態進行

感染しやすい/しにくい牛
を知りたい

→感染リスク指標

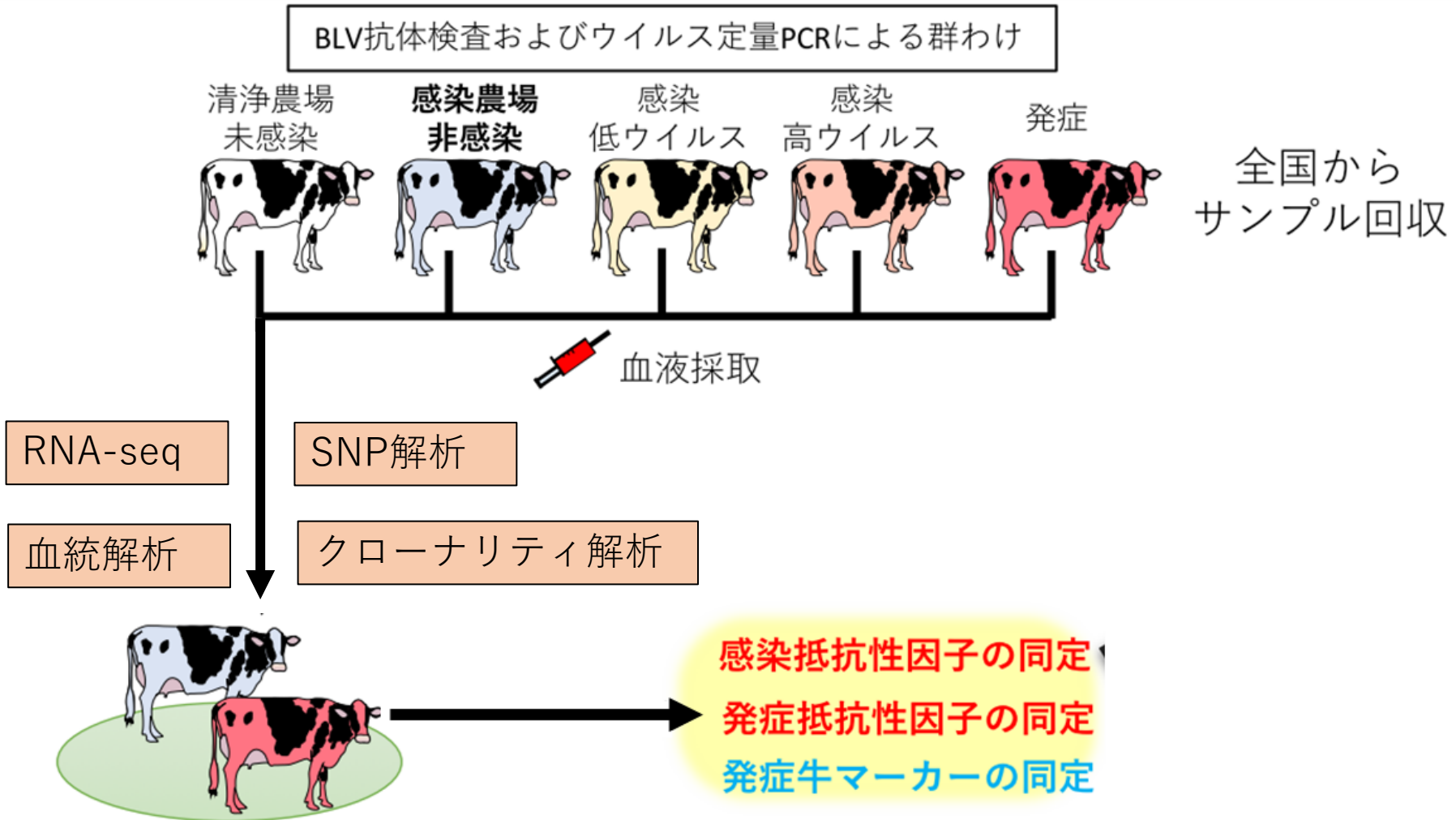
発症ハイリスク牛を
知りたい

→発症リスク指標

生前に転帰を
知りたい

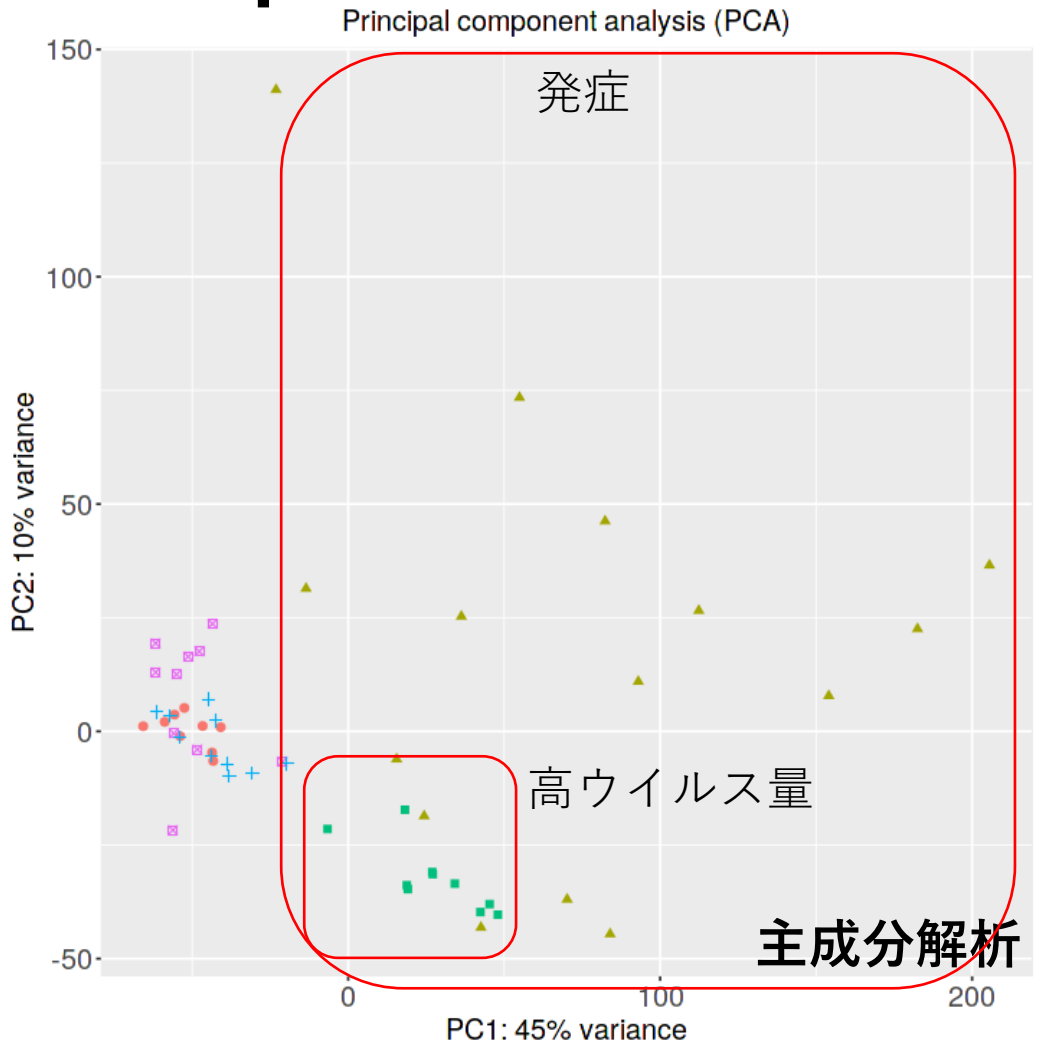
→発症を早期に診断する指標

BLV感染抵抗性、EBL発症抵抗性の原因遺伝子情報を明らかにする



リンパ腫発症抵抗性遺伝子の探索

RNAseqによる解析



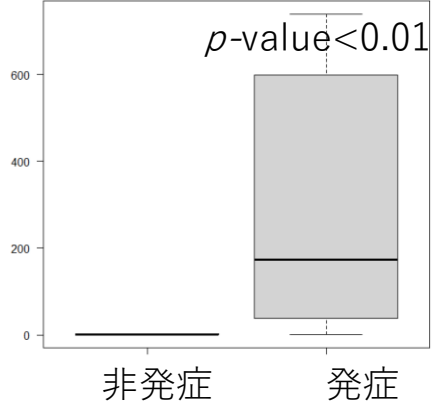
RNAseq解析	N
清浄農場非感染	9
暴露非感染	10
感染低ウイルス量	10
感染高ウイルス量	10
発症	15
合計54	

- 清浄農場非感染(C)
- ⊠ 暴露非感染(U)
- ⊕ 感染低ウイルス量(L)
- 感染高ウイルス量(H)
- ▲ 発症(EBL)

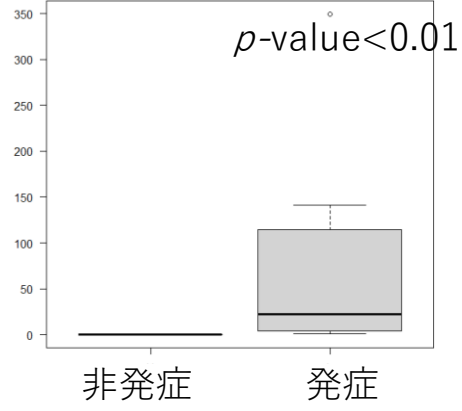
高ウイルス量の牛と発症牛とで有意に発現が変動している遺伝子について、さらに解析を行った

リアルタイムPCRによる指標遺伝子発現の解析

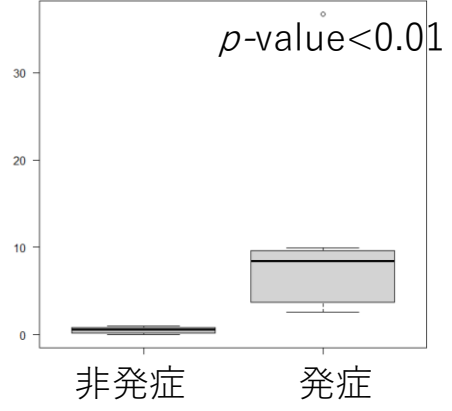
遺伝子A



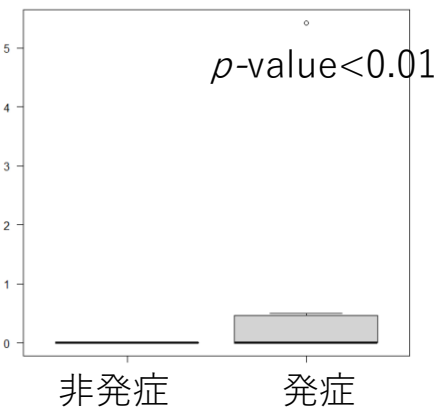
遺伝子B



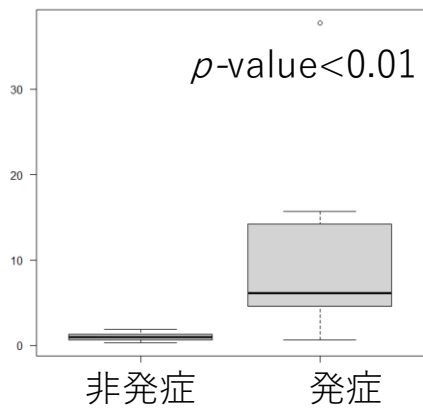
遺伝子C



遺伝子D



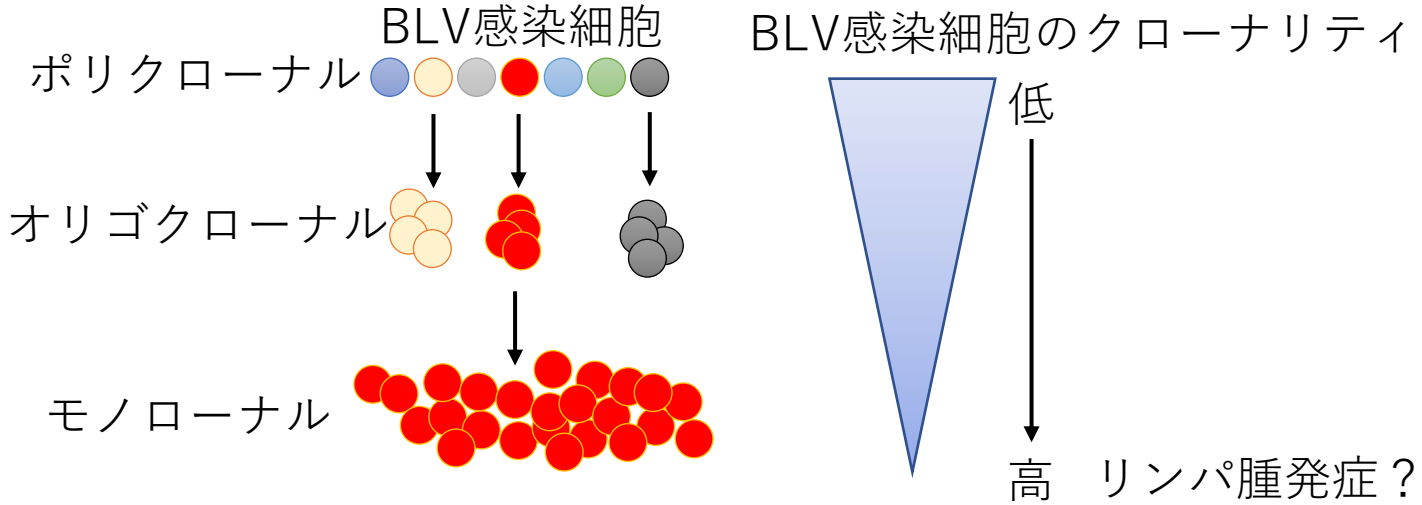
遺伝子E



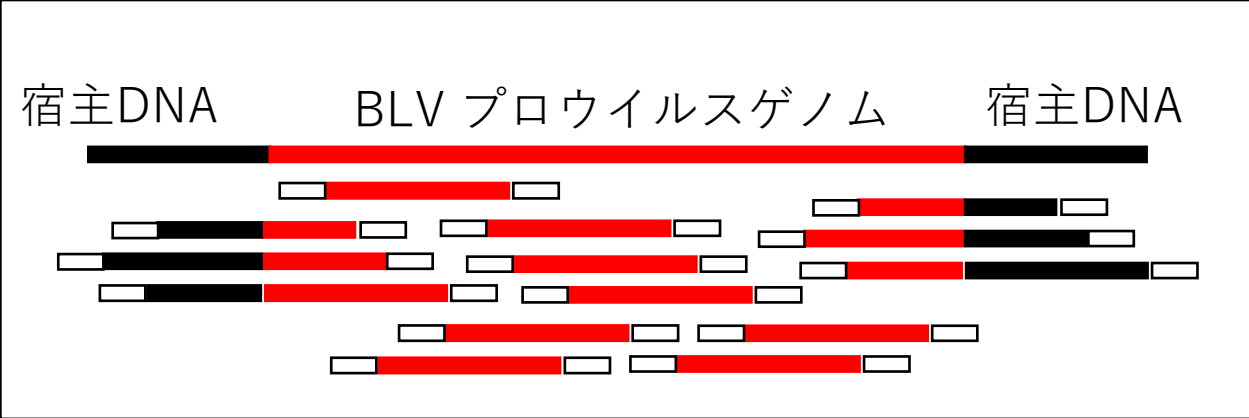
← 神奈川食肉センター搬入健康畜および発症牛リンパ節（気管気管支リンパ節）でのmRNA発現

→ 発症牛特異的な遺伝子発現の上昇が末梢血、リンパ節でも確認できた
→ これらの遺伝子発現が、発症の指標となりうることが示唆された

BLV感染細胞のクローナリティ解析



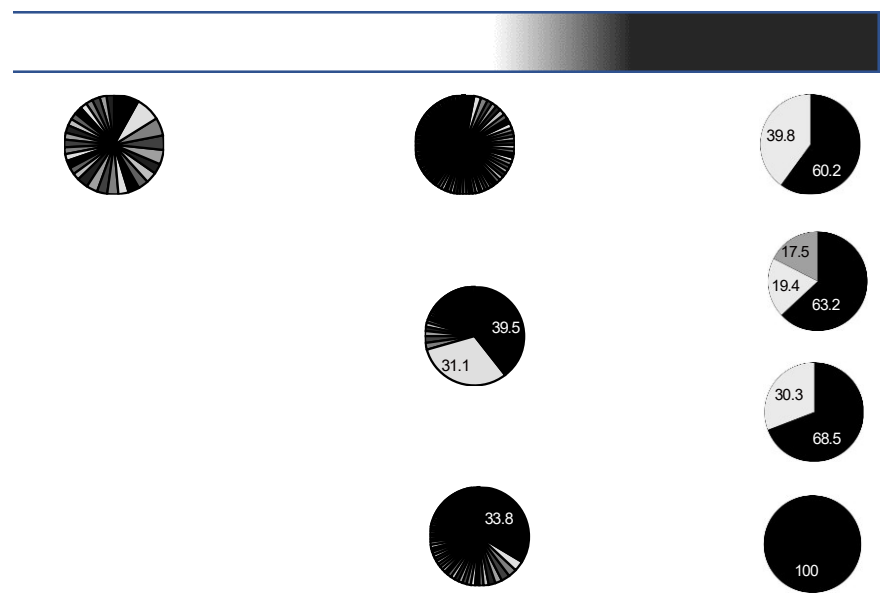
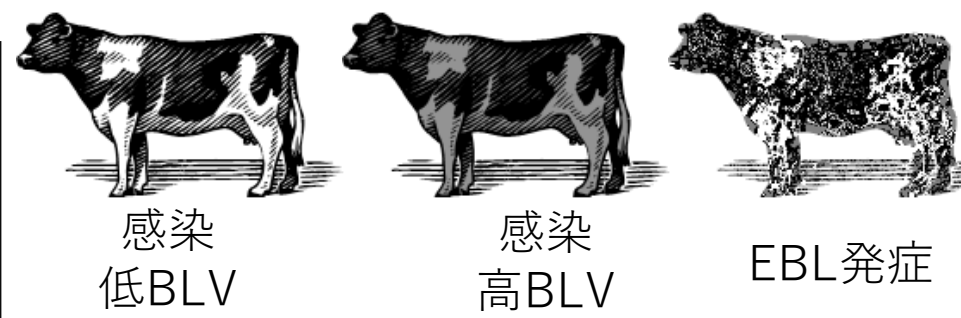
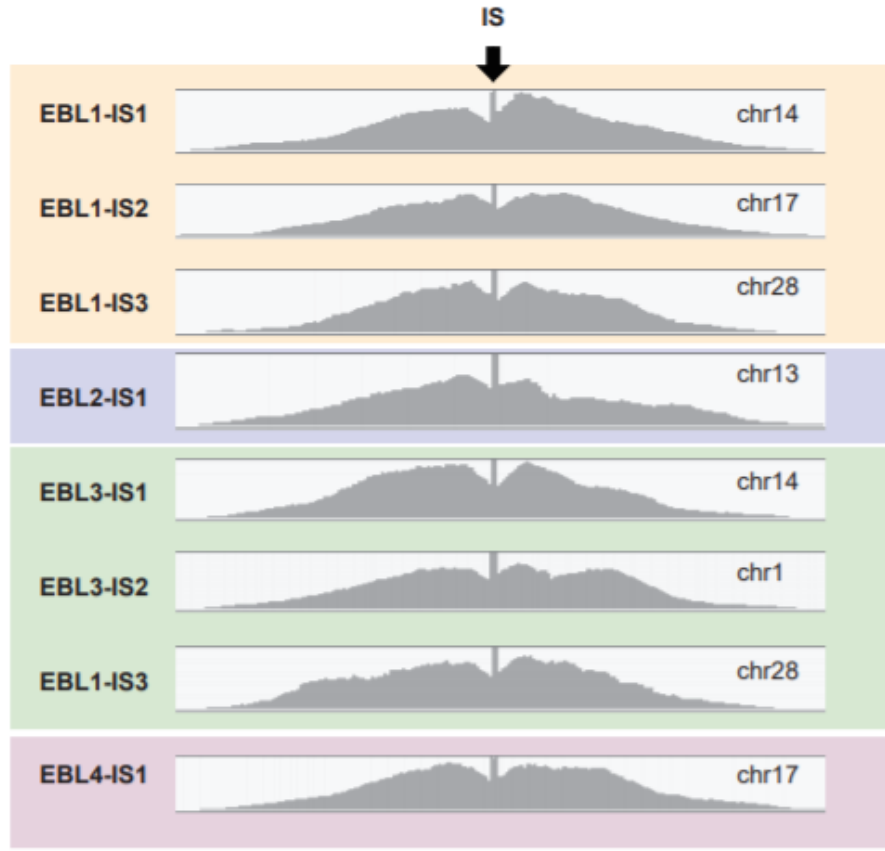
Ohnuki et al., Sci.rep. 2021



➡ BLV DNA-capture-seq法 (クローナリティ簡易解析法) を開発

リンパ腫発症指標の探索

牛白血病感染・発症抵抗性牛の指標開発事業



発症牛におけるBLV挿入部位の特定
 四頭のリンパ腫発症牛の腫瘍組織において、BLV挿入部位特定法を確立

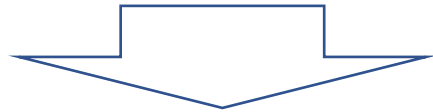
クローナリティ解析
 発症牛はクローナリティが高かった

➡ 感染高PVLやEBL発症牛の診断にクローナリティ解析は有効であり、生前に発症の転帰を知る手がかりとなる

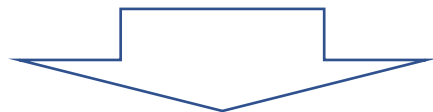
(Ohnuki et al., 2021)

BLV感染・EBL発症抵抗に関するSNP・近傍遺伝子

- (発症6 無症状67) : 高度に有意なSNP; 第3番染色体
有意なSNP ; 第20番染色体および第22染色体
- (感染73 非感染27) : 高度に有意なSNP; なし
有意なSNP (P<0.01); 第6番染色体
- (プロウイルス量) : 候補SNP;第1番, 第2番, 第4番,第5番,第7番,
第8番,第17番染色体



ゲノムアノテーションの結果プロウイルス量で得たSNPに候補遺伝子検出



SUGCT、HCFC2、YIPF5、**PTPRD**、USP38

protein tyrosine phosphatase receptor type D (PTPRD) : 腫瘍抑制遺伝子



PTPRD近傍のA⇒C置換が、プロウイルス量の有意な低下を引き起こすことが推察

発症抵抗性種雄牛の同定

と畜検査にて発症が確認された雌牛（娘・孫）6,022頭におけるEBL発症頭数

牛の頭数

	総頭数	EBL(%)	non-EBL(%)	オッズ比 [95% CI]	p値
Total	6022	69 (100)	5953	-	-
種雄血統					
Sire1	351	0	351 (100)	0.00 [0.00 - 0.93]	0.033 *
Sire2	336	5 (1.49)	331 (98.5)	1.33 [0.50 - 3.24]	0.44
Sire3	297	0	297 (100)	0.00 [0.00 - 1.11]	0.049 *
Sire4	241	5 (2.07)	236 (97.9)	1.89 [0.72 - 4.66]	0.20
Sire5	226	2 (0.88)	224 (99.1)	0.76 [0.13 - 2.88]	1.00
Sire6	223	6 (2.69)	217 (97.3)	2.52 [1.05 - 5.95]	0.042 *
Sire7	220	1 (0.45)	219 (99.5)	0.39 [0.02 - 2.24]	0.52
Sire8	212	5 (2.36)	207 (97.6)	2.17 [0.82 - 5.35]	0.09
Sire9	169	3 (1.78)	166 (98.2)	1.58 [0.42 - 4.96]	0.44
Sire10	158	1 (0.63)	157 (99.4)	0.54 [0.03 - 3.18]	1.00
Sire11	147	1 (0.68)	146 (99.3)	0.58 [0.03 - 3.43]	1.00
Sire12	121	4 (3.31)	117 (96.7)	3.07 [1.00 - 8.24]	0.049 *

父方祖父の血統により、発症オッズ比が低い血統を同定
牛伝染性リンパ腫の遺伝率は0.19

(Inagaki et al. 2020)

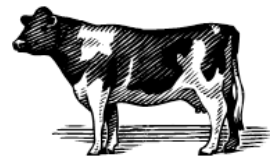
- ◎ **抗体検査＋プロウイルス量測定＋感染細胞クローナリティ解析**
 - 正確な伝染性リンパ腫発症診断法樹立
 - 発症転帰を予測可能
- ◎ **伝染性リンパ腫発症牛を識別する候補遺伝子を同定**
 - 発症リスクの定量化へ
- ◎ **発症牛/非発症牛、感染牛/非感染牛、プロウイルス量に関連するSNP解析**
 - 標的になるSNP候補がそれぞれ見つかった
 - 特にプロウイルス量を制御するPTPRD近傍のA→CのSNP置換を発見
- ◎ **世界で初めてBLV感染するがEBL発症抵抗性の種雄牛を同定**

本事業のまとめ

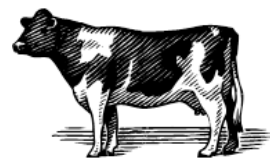
牛白血病感染・発症抵抗性牛の指標開発事業

清浄農場

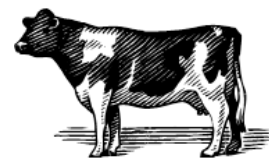
B L V 汚 染 農 場



未感染



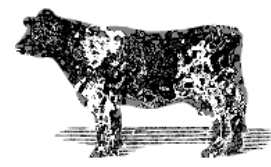
非感染



感染
低BLV



感染
高BLV



EBL発症

< 評価系 >

病理解剖

死後診断のみ

抗体検査

抗体量だけでは発症指標にならない

プロウイルス量

は発症指標にならない

感染細胞
クローナリティ

プロウイルス量
発症転帰の指標

特異的遺伝子
発現

発症指標

SNP解析

プロウイルス量を制御するSNP、非感染と感染を分ける候補

育種遺伝学的
特色

EBLを発症しない種雄牛

★RNAseq解析結果

牛伝染性リンパ腫発症牛を識別する候補遺伝子
→キット化してEBL発症転機の診断へ利用可能

★SNP解析結果（プロウイルス量制御に関与するSNP）

→PCRキット化して感染抵抗性牛診断へ利用可能

★クローナリティ解析による牛伝染性リンパ腫発症診断技術

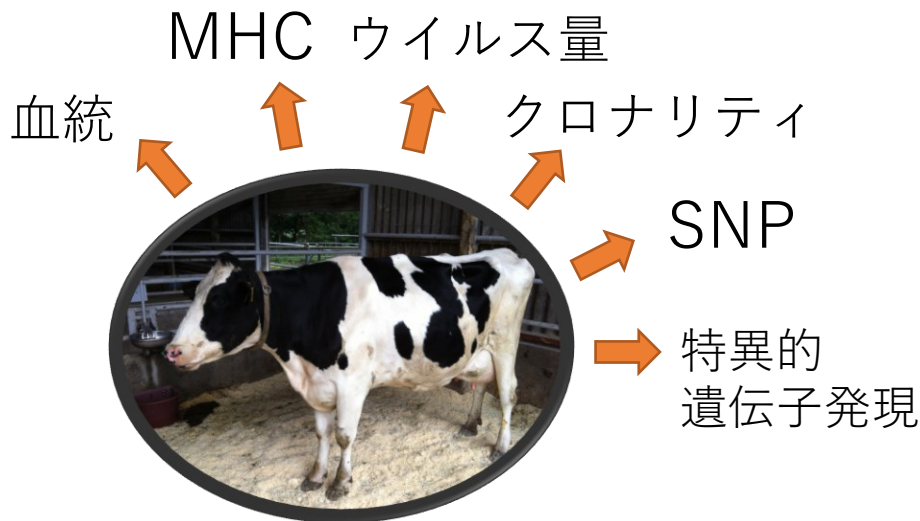
→簡便な方法への代替を実証し、
牛伝染性リンパ腫発症の診断や発症転帰診断への利用可能

これらは、いずれも補助診断方法として
全国の家畜保健所や食肉衛生検査所にて利用可能である

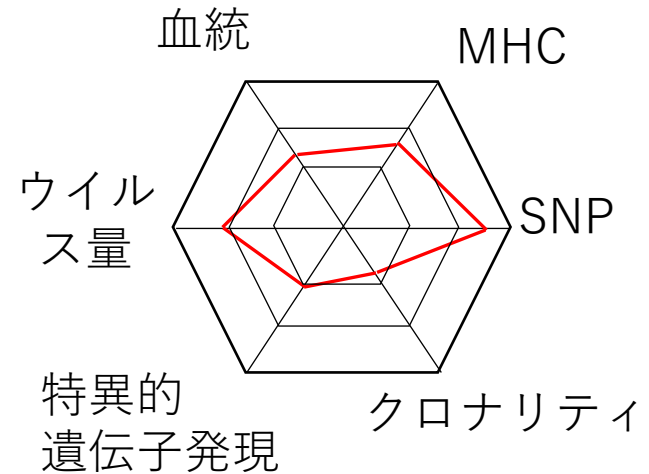
★発症抵抗性種雄牛

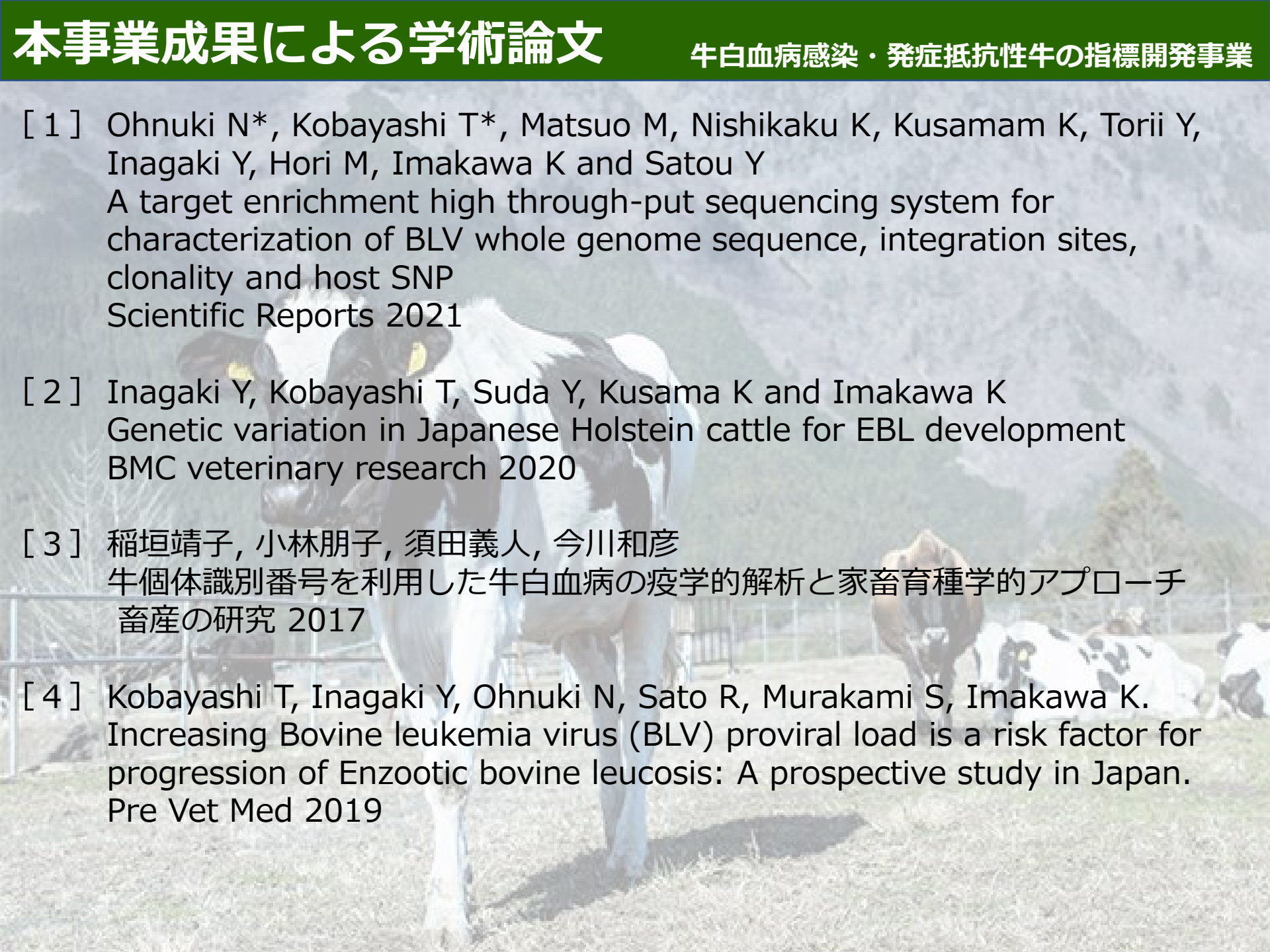
→日本全国において人工授精などに用いることにより、抵抗性牛の作出が可能である。

★これらを総合的に利用しBLV感染・牛伝染性リンパ腫発症リスク総合診断技術の開発による牛伝染性リンパ腫の撲滅へ



各農場でリスク評価



- 
- [1] Ohnuki N*, Kobayashi T*, Matsuo M, Nishikaku K, Kusamam K, Torii Y, Inagaki Y, Hori M, Imakawa K and Satou Y
A target enrichment high through-put sequencing system for characterization of BLV whole genome sequence, integration sites, clonality and host SNP
Scientific Reports 2021
- [2] Inagaki Y, Kobayashi T, Suda Y, Kusama K and Imakawa K
Genetic variation in Japanese Holstein cattle for EBL development
BMC veterinary research 2020
- [3] 稲垣靖子, 小林朋子, 須田義人, 今川和彦
牛個体識別番号を利用した牛白血病の疫学的解析と家畜育種学的アプローチ
畜産の研究 2017
- [4] Kobayashi T, Inagaki Y, Ohnuki N, Sato R, Murakami S, Imakawa K.
Increasing Bovine leukemia virus (BLV) proviral load is a risk factor for progression of Enzootic bovine leucosis: A prospective study in Japan.
Pre Vet Med 2019

研究にご協力いただいた方々に感謝いたします。

神奈川県食肉衛生検査所
神奈川県農業共済組合
宮城農業共済組合
神奈川県中央家畜保健衛生所
神奈川県湘南家畜保健衛生所
岩手県北家畜保健衛生所
釧路丹頂農業協同組合
北海道ひがし農業共済組合
採材にご協力いただいた獣医師、農家の方々

熊本大学
佐藤賢文先生
松尾美沙希先生

東京農業大学
稲垣靖子先生
村上寛史先生
野口龍生先生

大学院生
大貫永輝
西角光平

