

論文審査の結果の要旨

氏名 神馬繭子

本論文は、ウイルス塩基配列の間で共通した相互に相補的でない Motif を自動的に選択することによりウイルス間共通プライマーを設計できる Coordination of Common Motif (CoCoMo) アルゴリズムを用いることにより、未知を含めた全ての牛白血病ウイルス (BLV) 株を高感度・正確に定量可能な世界で初めてのリアルタイム polymerase chain reaction (PCR) 法 (BLV-CoCoMo-qPCR 法) を構築し、その方法と他の検出方法との比較解析、そして今まで解析することが困難であった牛白血病の病態進行に伴うウイルス量の増加を始めて明らかにしたことについて述べられている。

BLV は人類の悪性疾患である成人 T 細胞白血病 (ATL) を誘発する成人 T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) と最も近縁な高度に進化したレトロウイルスであり、HTLV-1 と同様に白血病を惹起する。BLV の感染率は世界的に拡大の一途を辿っており、多くの被害を出している。BLV は感染後、プロウイルスとなり長期間宿主内に潜伏するため、ウイルス粒子および mRNA の検出は困難である。プロウイルス自体も非常に微量であることが多く、BLV の病態進行を定量的に高感度に検出する方法の確立が強く望まれている。また、BLV は比較的変異の少ないウイルスとして知られているが、現在 356 種類の long terminal repeat (LTR) 領域の遺伝子配列がデータベースに登録されており、さらに未知の配列を有する BLV が存在する可能性も示唆されている。そこで本研究では、BLV プロウイルスを定量的に測定し、異なる変異株間でも比較可能な方法の確立を目指して BLV-CoCoMo-qPCR 法を確立した。

本研究では最初に、全ての BLV 株を高感度・正確に定量できるリアルタイム PCR 法の確立を行った。BLV プロウイルス増幅のターゲットとしてプロウイルスの両端にある LTR 配列を選択し、GenBank から 356 種の BLV-LTR 遺伝子配列を収集した。それら全てを特異的に増幅できるプライマーセットを CoCoMo アルゴリズムにより設計した。得られた 49 種類の候補プライマーから、72 対の組み合わせを選択し、タッチダウン PCR による増幅試験を行い、12 対の候補プライマーを選択した。リアルタイム PCR を用いた融解曲線分析により最も特異的に BLV-LTR 配列を増幅できる CoCoMo6 および CoCoMo81 プライマー対 (総縮重度: 1.3×10^7) を選択した。さらに、検出感度および特異性をあげるため TaqMan MGB プローブも作成した。また、BoLA-DRA 遺伝子を指標とすることでプロウイルス量を 10 万個の細胞あたりのコピー数として算出することに成功した。

次に、本方法の測定精度を確認したところ、良好な測定精度と再現性が得られた。続いて、BLV 以外の 6 種類のレトロウイルス分子クローン及びコントロールベクターを用いたリアルタイム PCR を行ったところ、BLV のみで増幅は認められたことから高い特異性が

示された。さらに、プロウイルス量とシンシチウム形成能を比較したところ、非常に高い相関が認められた。また、国外で蔓延していた、遺伝子情報が不明であり、他の PCR 法によって検出できなかった BLV を本方法により検出することに成功し、シーケンスにより、特異性の高さも確認された。

続いて、BLV 感染牛の病態進行とプロウイルス量との相関性を調べた。牛白血病の病態は未発症健康、リンパ球増多症 (PL)、発症へと進展する。そこで、BLV 非感染牛 117 頭、感染健康牛 163 頭、PL 牛 16 頭及び発症牛 89 頭のプロウイルス量を算出した。その結果、病態進行に伴い牛白血病プロウイルス量が有意に増加していることが本方法を用いることにより、初めて明らかになった。

さらに、本方法の感度は既存の TaqMan MGB assay 法及び市販の TaKaRa Cycleave PCR 法と同等以上であることを確認された。続いて、391 頭のウシを用いて本方法と Nested PCR 法、血清学的検出方法である酵素抗体法 (ELISA)、ゲル内沈降 (AGID) 法および受身赤血球凝集反応 (PHA) 法で得られた結果を比較した。本方法の感度は Nested PCR 法より高かった。また、本方法と血清学的検査法により得られた結果は必ずしも一致しなかったため、その原因を調べるために 2 頭のウシを用いて BLV 感染実験を行った。ウイルス感染後のプロウイルス量、ELISA 及び PHA 法による測定された抗体価の推移を比較したところ、高い抗体価を示した個体は低いプロウイルスを維持していた。

本研究において開発した BLV-CoCoMo-qPCR 法は、牛白血病の病態進行を正確に判定する技術であることが立証された。また、CoCoMo プライマーを用いることで既存のプライマーでは検出できなかった配列をも検出することが可能となった。さらに、現在汎用されている血清学的診断技術に加えて、プロウイルス定量法の有効性が証明された。

現在、本方法による BLV プロウイルス定量キットの実用化を目指した企業による開発が進められている。CoCoMo アルゴリズムを用いたウイルス定量法は、変異の著しいヒト免疫不全ウイルス及びインフルエンザウイルスなどの変異株の検出にも応用可能であると考えられる。

なお、本論文は、竹嶋 伸之輔、遠藤 大二、間 陽子との共同研究であるが、論文提出者が主体となって解析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士 (生命科学) の学位を授与できると認める。