

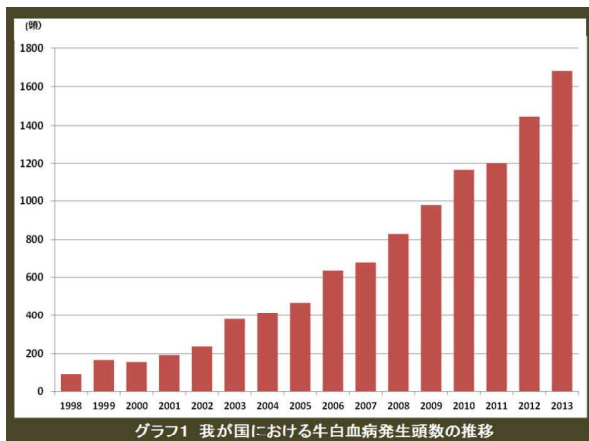
10. 地方病性牛白血病 (EBL) の清浄化を目指した簡便なリアルタイムPCR (RT-PCR) 法の検討

大分家畜保健衛生所

病鑑 ○長岡 健朗 病鑑 壁村 光恵
病鑑 内田 雅春

【はじめに】

地方病性牛白血病（以下 EBL）は牛白血病ウイルス（以下 BLV）によって起こされる伝染病で、世界的に見ると、デンマーク（1991年清浄化宣言）、英国（1999年清浄化宣言）、スウェーデン（2001年清浄化宣言）、フィンランド（1996年以降陽性牛の摘発なし）といったようにすでに清浄化に成功した国も少なくない。一方、我が国では、グラフ1に示すように、ここ10余年の間にその発生頭数は年々増加している。



本県では、特定疾病リスク低減対策事業として EBL 対策を行ってきており、これまでは、ハイリスク牛の摘発による、淘汰・早期更新といった対策を行ってきた。しかし、ハイリスク牛を摘発しても、それにより淘汰や更新が行われることは少なく、また、プロウイルスのコピー数と感染リスクとの関係も未解明であることから、2014年7月の担当者会議で、今後は、ハイリスク牛の摘発ではなく、陽性牛の摘発により、最終的に農場清浄化を目指すこととした。また、平成26年度は、年度途中であるため、主に清浄化可能な農場の選定や、畜主の意欲醸成にあたり、取り組みを始められる農場のみ陽性牛の摘発に移行することとした。

従来の本事業におけるハイリスクの摘発においては、採取された血液は、まず、各家畜保健衛生所で検査され、リンパ球の割合が60%以上かつリンパ球数が10,000個/ μ 1以上の検体のみが病性鑑定施設での RT-PCR 法によるプロウイルスのコピー数定量検査の対象となっていた。したがって、一度に RT-PCR 法による検査を行う検体数は多くても10検体程度であった。今後、陽性牛の摘発を目指すとなると全頭検査等を行うこと

となり、多検体検査への対応が必要となってくる。

一般的に行われている BLV の検査としては PCR 法等の遺伝子検査と受身赤血球凝集反応（PHA）等による抗体検査があげられる。遺伝子検査の方が抗体検査より感染後の検出時期が早いこと、移行抗体の影響を受けないことといった長所がある。また、受身赤血球凝集反応には 2% 程度の偽陽性があるとも言われている。しかし、PCR 法は病鑑施設でしか行えず、コスト・労力の点でも問題がある。今後、PCR 法で陽性牛の摘発を行うには解決すべき課題であった。

表 1 に現在行われている PCR 法や RT-PCR 法の各検査工程に要する労力・時間をまとめた。1 検体～50 検体の処理をしたときにかかるおおよその時間を示すとともに、その時間内に実際にかかる手数の程度を 3 段階（待ち時間が主な工程、実際の作業が多い工程、ほとんど実際の作業の工程）に分け分析した。その結果、血液から DNA 抽出の RT-PCR から DNA 抽出の工程を省くことができれば、時間・労力の少ない検査法になるものと考え、DNA 抽出にかわる前処理方法を検討したので報告する。

表1 PCR法の各工程に要する時間と手数

検査方法	PCR法	リアルタイムPCR	
		白血球からDNA抽出	血液からDNA抽出
白血球洗い出し	N/A	1～4H	N/A
DNA量測定	N/A	0.5～1.5H	N/A
DNA抽出	0.5～4H	0.5～4H	0.5～4H
PCR反応	3H (Nestedでは更に3H)	1H	1H
電気泳動	1～1.5H	N/A	N/A

時間の幅は1検体～50検体の場合

【材料および方法】

1.材料

(1) 試験 1：今回検討した DNA 抽出を行わない RT-PCR 法（以下本法と呼ぶ）と他の検査法の特徴を比較する目的で、様々なレベルの遺伝子を持つと予想される血液 10 検体について本法および他の RT-PCR 法（血液から DNA を抽出（以下従来法と呼ぶ）、白血球から DNA を抽出）および通常の PCR 法（env 1st、env Nested、BLV Px）で検査し、それらの結果を比較した。

(2) 試験 2：より多い検体で本法と従来法を比較する目的で BLV 全頭検査した 60 頭のうち検体が残っていた 56 検体について本法と従来法で検査を行い、それらの結果を比較した。

(3) 試験 3：実際に本法を用いて陽性牛の摘発を行うことを想定して、清浄化取組中の A 農場および B 農場由来の検体について従来法および本法並行で検査を実施、それらの結果を比較した。

2.方法

本法における検体処理の流れを図 1 に示した。検体は 8 連 PCR チューブもしくはディープウェルチューブに入れて搬入されることを想定している。そこからマルチチャンネルピペットで血液 20 μ l を取り、TE 液で 150 μ g / ml に調整したプロテアーゼ K 液

40 μ l を入れた PCR チューブに移し、よく攪拌後、56 $^{\circ}$ C で 10 分間プロテアーゼ反応を行った。その後プロテアーゼ K を失活させるために加熱する必要があるが、このまま加熱すると血液が凝固してピペットで取りにくくなり、また、不均一になるため、プロテアーゼ処理検体の 2 μ l を、あらかじめ 8 μ l の蒸留水をいれた別の PCR チューブに移し、99.9 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱によりプロテアーゼ K を失活させた。さらにそのチューブに 2 倍濃度の PCR 反応液 10 μ l を加え、前処理の PCR を 5~8 サイクル行った。前処理の PCR に使用したプライマーや反応条件については表 2 に示した。反応後チューブを遠心分離し、透明な上清 2 μ l をテンプレートとして、TakaRa Cycleave キットもしくは同等のもので RT-PCR を行った。

これら、すべての工程で、検体はマルチチャンネルのピペットで移すことができるので、多検体の処理が容易に行えた。

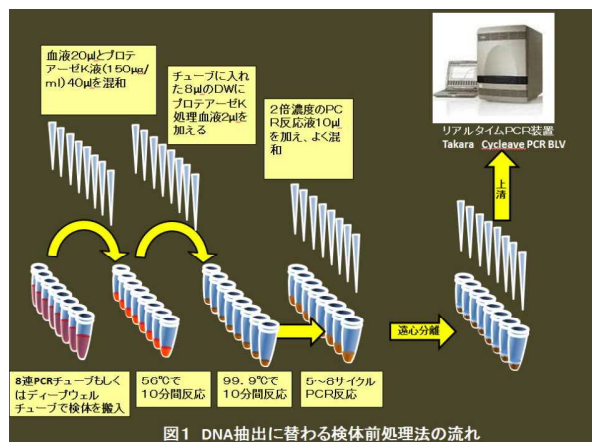


表2 前処理PCRの反応条件

プライマー (CycleaveBLV の外側に位置)

Priming PCR Primer F
CCTTCCCATGTGACCGGTTAC Tm55
 (NEAREST NEIGHBOR)

Priming PCR Primer R
TAGCAACCAATTCCGGACCAGG Tm54
 (NEAREST NEIGHBOR)

PCRサイクル

95 $^{\circ}$ C 10分 \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 30秒
 50 $^{\circ}$ C 1分
 72 $^{\circ}$ C 30秒 } \times 5~8回 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 30秒

【成績および考察】

1.成績

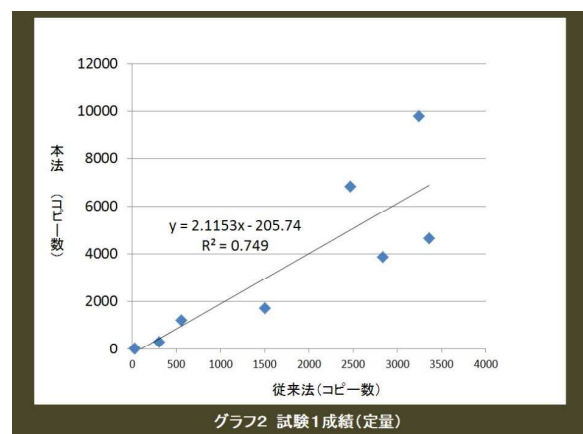
(1) 試験 1 : 表 3 に各検査法による陽性・陰性の成績をまとめた。感度はコンベンショナル PCR の env Nested が他の検査法よりやや優れ、一方、env1st はやや劣り、他の検査法は、本法も含め概ね同等であった。

グラフ 2 に従来法と本法のコピー数の相関を示した。両者の成績は概ね相関し、相関係数は 0.749 だった。

表3 試験1成績(定性)

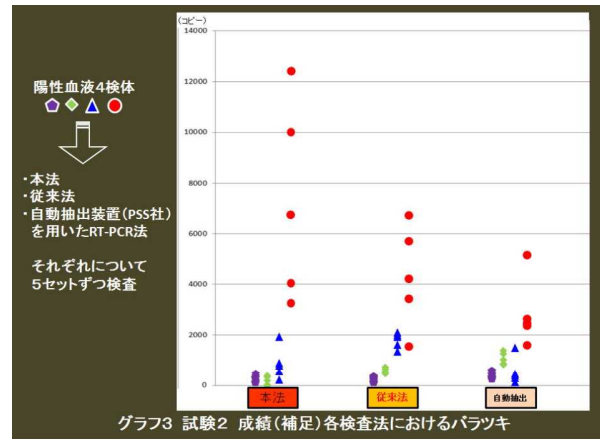
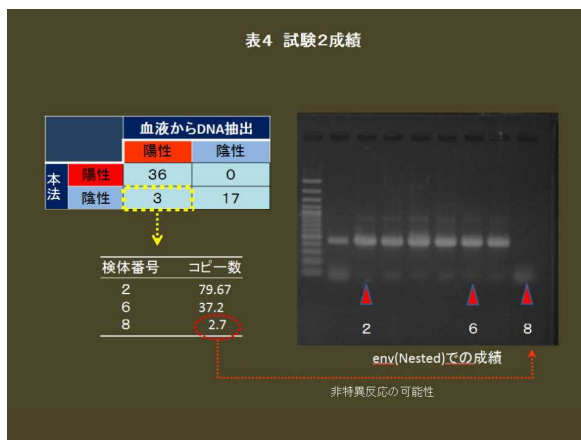
検体	リアルタイムPCR			PCR		
	本法	従来法	WBCから抽出	env		BLV px
				1st	Nested	
1	-	-	-	-	+	±
2	+	+	±*	+	+	+
3	+	+	±*	-	+	+
4	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	-	+	+
8	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+

* : ± \rightarrow 10コピー以下



(2) 試験 2. 本法と従来法の相関は低かったが、陰性・陽性は、ほぼ一致した。表 4 には本法と従来法での陽性・陰性をまとめた。38 検体では本法・従来法ともに陽性であり、17 検体では本法・従来法ともに陰性であった。一方、本法で陰性で従来法が陽性であったものが 3 検体あった。それらはすべてコピー数が低値 (最大 79.67 コピー) であり、うち 1 検体は、もっとも感度が高い envNestd で検査しても陰性であり、偽陽性の可能性があると思われる。

試験 2 では本法と従来法での相関が低かったため、どちらかの再現性が低いのではないかと考え、陽性血液 4 検体について、本法、従来法、さらに核酸抽出精度が高いとされている自動抽出機を用いた RT-PCR、それぞれ 5 セットずつ検査を行い、その精度を比較した (グラフ 3)。その結果、本法は、特に遺伝子量が多い検体でバラツキが大きく出ることが分かった。



(3) 試験 3. 表 5 に農場 A の成績を示した。8、9、10 月での 3 回の検査で述べ 84 検体から 4 検体で陽性牛が摘発された。これらはすべて本法、従来法ともに陽性であった。このように PCR 法では移行抗体を持っている牛からの陽性牛の摘発も可能である。特に今回は、個体番号 46 の子牛のように、1 日齢で、すでに遺伝子陽性のもも摘発され、その感染経路も、初乳や産道ではなく、子宮内感染であろう、と言うように推察することも可能であった

表 6 には農場 B の成績を示した。農場 B はすべて陰性でであった。このように BLV 陰性の農場も存在することから、今後は陰性農場を把握し、そこでは導入時検査の徹底により、陰性の状態を維持することが大切であると思われる。

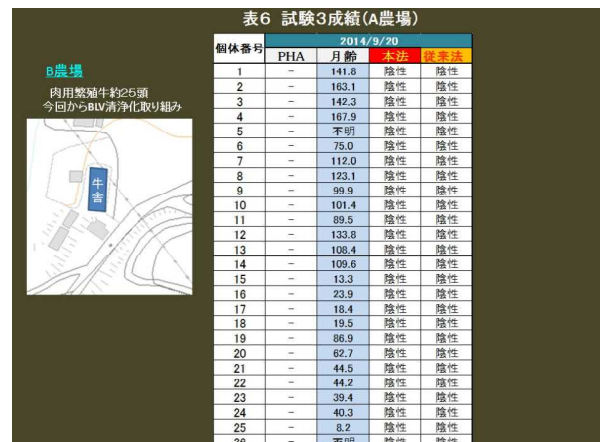


表7にこれらの今回調査した検査法の特徴をまとめた。また表8ではこれら検査法に要するコストを比較した。

本法はすべての工程がマルチチャンネルでできるため、多検体を処理するには検査時間、労力とももともと優れた。しかし、検査工程が多いため、10検体程度であれば従来法の方が早くできると考えられた。また、感度では env での NestedPCR が優れ、いっぽう定量検査では DNA 抽出を行っての RT-PCR 法が再現性に優れる等、他の検査法にもそれぞれ長所があるので目的に応じて使い分けることが望まれる。

一方、検査にかかるコストでは、RT-PCR や DNA 抽出に市販のキットを使用する方法では、その分コスト高になる。本法は DNA 抽出キットを使用しないので他の RT-PCR 法よりは安価であるが、RT-PCR には検出キットを使用しているので PCR 法よりは高価になる。しかし、キットを使用せず、合成したプライマーおよび MGB プローブを使用することができればコストは大幅に安くなり、そのコストは約11700円と、PHA と同程度になる。

表7 今回比較した検査法の特徴

検体	リアルタイムPCR			PCR		
	本法	従来法	WBCから抽出	env		BLV px
				1st	Nested	
感度	○	○	○	△	◎	○
定量性	△	○	◎	×	×	×
検査時間	◎	○	△	△	×	△
労力	◎	○	×	△	△	△

・本法・・・多検体の処理に優れる -----> 全頭検査等
 ・従来法・・・10検体程度なら本法より検査時間・労力とも優れる
 ・WBCから抽出・・・定量性に優れる -----> ハイリスク牛の摘発等
 ・PCR(env Nested)・・・感度に優れる -----> 後継牛の選抜等

表8 各検査法にかかるコスト

検体	リアルタイムPCR		PCR	
	本法	従来法	1st	Nested
主な資材	プロテアーゼK PCR酵素 PCRプライマー PCRチューブ PR-PCR反応液 TAKARAcytleaseキット RT-PCRプレート	DNA抽出キット PR-PCR反応液 TAKARAcytleaseキット RT-PCRプレート	DNA抽出キット PCR酵素 PCRプライマー PCRチューブ アガロース	DNA抽出キット PCR酵素 PCRプライマー PCRチューブ アガロース
50検体あたり	¥39,200	¥59,200	¥25,300	¥27,600

RT-PCRに合成したプライマー、MGBプローブを使用できれば
 - ¥27,500
 ¥11,700 ←----- 間接赤血球凝集反応 (PHA) 50検体 (陽性率20%) ¥10,200 とほぼ同等

2. 考察

本法により RT-PCR 法に要する労力とコストを大幅に下げることができ、特に多検体の処理での労力削減効果が顕著であった。本法を利用することにより全頭検査等多検体の検査を頻回に行うことが可能になれば、早期の対策により陽転を防ぐことができ、また感染原因の特定の一助にもなると考えられる。

一方、他の検査法にもそれぞれに長所があるので、状況に応じて使い分けることが必要である。

現在、県内の BLV は、その汚染度も高く、清浄化は現実的ではないと言う声も多い。しかし、取り組みやすい農場から取り組んでいき、そのノウハウの蓄積をすることができれば、あらたな解決法も見えてくることも考えられる。本法を用いての検査でその1歩を踏み出せることが望まれる。

