

13 効率的な牛白血病ウイルス遺伝子検査方法の検討

東青地域県民局地域農林水産部青森家畜保健衛生所

○ 齋藤 豪 菅原 健
奈良 史子 渡邊 弘恭
加藤 直子 佐藤 尚人
中村 成宗 古谷 眞

1 背景

平成 18 年から平成 28 年における全国の牛白血病発生状況を図 1 に示した。牛白血病は、近年、発生頭数・戸数ともに増加しており、平成 18 年には 779 頭 635 戸であったものが、平成 28 年には 3,125 頭 1,998 戸と 10 年で発生頭数は約 4 倍、発生戸数は約 3 倍となっている。また、牛白血病発症による死亡やと畜場で牛白血病と診断され全廃棄されるなど、農家への経済的被害も増加している。

このような現状を踏まえ、平成 27 年に国が「牛白血病に関する衛生対策ガイドライン（以下、ガイドライン）」を策定、牛白血病対策を推進させ清浄化を目指すこととなった。

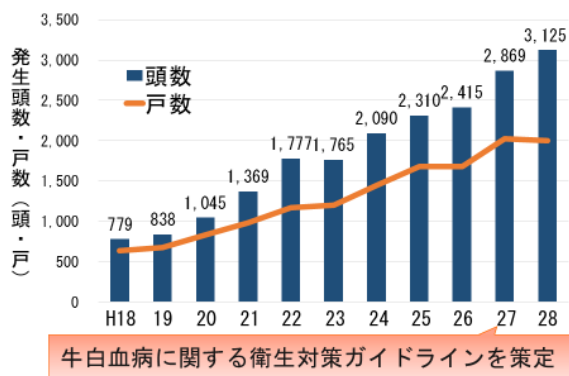


図 1 牛白血病の発生状況

特に、牛白血病で問題となっている地方病性牛白血病について、ガイドラインに沿った対策を進めるためには、多検体の牛白血病ウイルス（以下、BLV）検査を実施し農場の感染状況を把握する必要がある。

BLV 検査のうち遺伝子検査の特徴は、移行抗体に影響されず、早期に感染を確認することであるが、多検体の検査には労力と時間、経費を要する。

そこで、今回、効率的な BLV 遺伝子検査方法を検討比較したので、その概要を報告する。

2 材料と方法

(1) 遺伝子抽出方法の比較

ア 材料

材料は牛白血球及び全血各 35 検体を用いた。

イ 方法

遺伝子抽出は QIAamp DNA Mini [Qiagen]（以下、カラム抽出キット）及び CellEase Blood [COSMO BIO]（以下、加温抽出キット）を用いて実施した。

各キットの遺伝子抽出工程を図 2 に示

した。

カラム抽出キットでは、材料と試薬を混合し 56℃で 10 分加温後、カラムに分注。遠心により遺伝子を吸着させ、チューブを取替える方法により 3 回洗浄し溶出試薬を加え抽出した。

加温抽出キットでは、材料と試薬を混合後、72℃で 6 分、94℃で 3 分加温後、阻害物質を抑制する試薬を加え抽出した。

遺伝子抽出方法を比較するために、各材料・抽出キットの組合せごとの nested PCR 法（以下、nPCR 法）での陽性率、35 検体当たりの作業時間、1 検体当たりの経費について検討した。

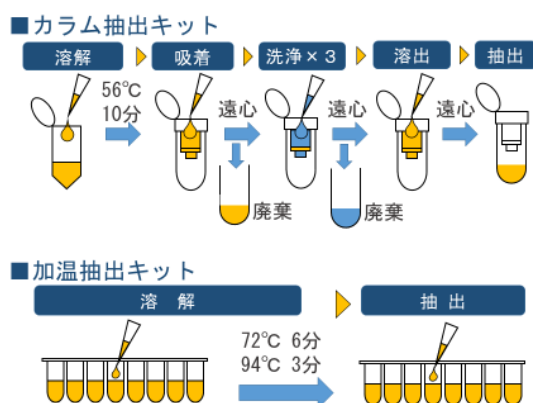


図 2 遺伝子抽出の工程

(2) 遺伝子増幅方法の比較

ア 材料

材料は牛白血球 35 検体を用いた。

イ 方法

遺伝子増幅は Fechner らの報告¹⁾したプライマーを用いた nPCR 法、BLV 検出用キット [TaKaRa] を用いたリアルタイム PCR 法（以下、rPCR 法）、Komiya らの

報告²⁾したプライマーを用いた LAMP 法を実施した。

これら 3 法の遺伝子増幅方法を検討するために、白血球とカラム抽出キットの組合せで抽出した検体についての陽性率、35 検体当たりの作業時間、陽性 DNA を 10 倍階段希釈した際の検出された最高希釈倍率、1 検体当たりの経費について比較した。

3 結果

(1) 遺伝子抽出方法の比較

遺伝子抽出方法を比較した結果を図 3、4、5 に示した。

nPCR 法における各組合せの陽性率は、白血球とカラム抽出キットの組合せが最も高く 37.1%、白血球及び全血と加温抽出キットの組合せが最も低く 31.4%となった。

35 検体当たりの作業時間は、全血と加温抽出キットの組合せが最も短く 30 分、白血球とカラム抽出キットの組合せが最も長く 150 分となった。

また、1 検体当たりの経費は、カラム抽出キットが 438 円、加温抽出キットが 380 円となり、加温抽出キットの方が安価であった。

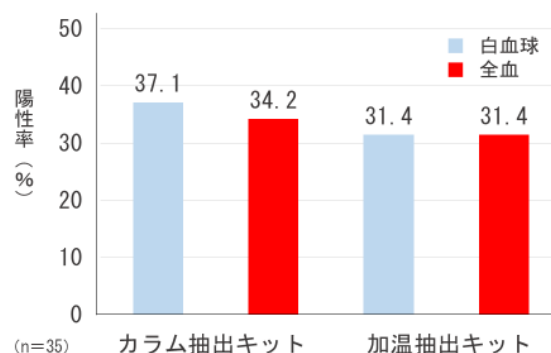


図 3 nPCR 法における陽性率

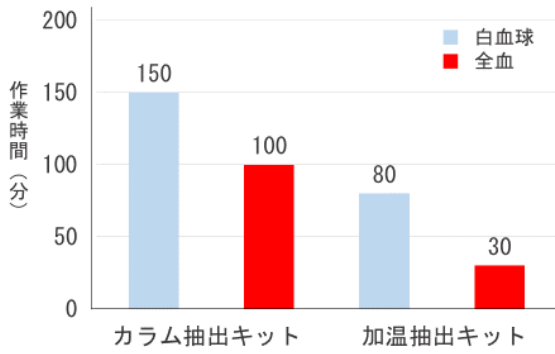


図4 35 検体あたりの作業時間

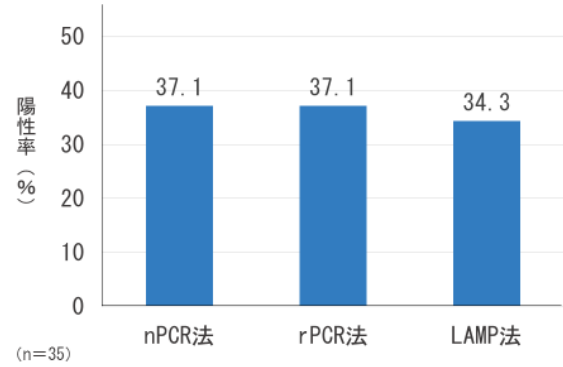


図6 遺伝子増幅方法ごとの陽性率

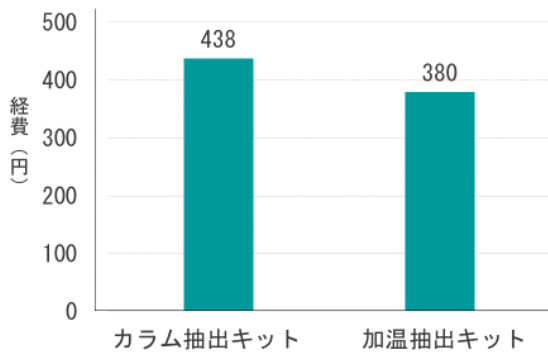


図5 1 検体当たりの経費

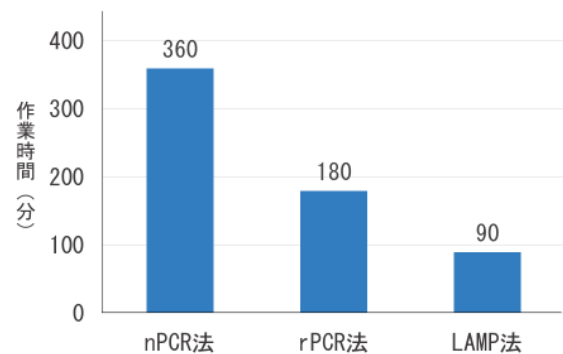


図7 35 検体あたりの作業時間

(2) 遺伝子増幅方法の比較

遺伝子増幅方法を比較した結果を図6、7、8及び9に示した。

遺伝子増幅方法ごとの陽性率は、各方法で大きな差はなかったが、nPCR法とrPCR法が最も高く37.1%、LAMP法は34.3%となった。

35 検体当たりの作業時間は、LAMP法が最も短く90分、次いでrPCR法が180分、PCR法が最も長く360分となった。

検出された最高希釈倍率は、nPCR法とrPCR法が最も高く 10^2 倍、LAMP法は 10^1 倍まで検出された。

1 検体当たりの経費は、nPCR法が最も安価となり174円、次いでLAMP法が602円、rPCR法が840円であった。

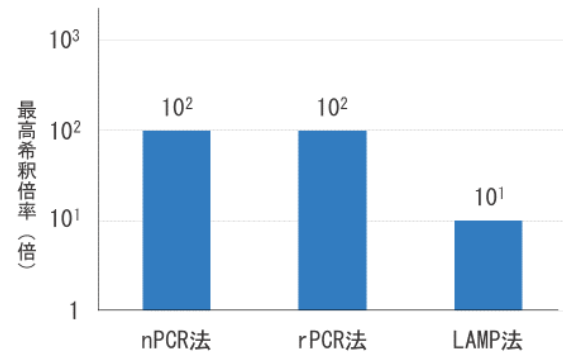


図8 検出された最高希釈倍率

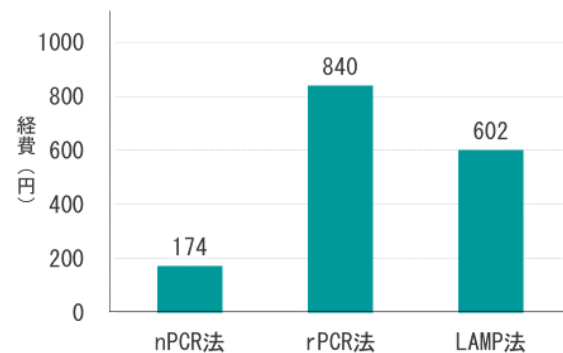


図9 1 検体当たりの経費

4 まとめ・考察

材料毎の結果では白血球は陽性率が高く、全血は作業時間が短い結果となった。

また、遺伝子抽出方法毎の結果をみると、カラム抽出キットは抽出率が高く、加温抽出キットは作業時間が短く、経費が安価であった。

次に、遺伝子増幅方法の結果は、nPCR 法、rPCR 法の順に感度が高く、LAMP 法は作業時間が短い結果となった。また、経費は nPCR 法が最も安価であった。

以上の結果から、作業時間や効率を重視する場合は、全血と加温抽出キットの組合せで遺伝子を抽出後に LAMP 法で検査する方法が効率的であり、スクリーニング検査など多検体の検査をする際には有用な方法であった。

また、感度を重視する場合、白血球とカラム抽出キットの組合せで遺伝子を抽出し、rPCR 法で検査する方法が最適で、陰性の確認検査に適した方法であった。

このことから、牛白血病の遺伝子検査を実施する際には、目的に応じて検査法を適切に選択することが労力と時間、経費を考える上で重要であった。

今後も適切に病性鑑定を実施し、牛白血病清浄化推進の一助とする所存である。

method for diagnosis of bovine leukemia virus infection. Journal of Virological Methods 157;175-179(2009)

参考文献

- 1) Fechner H ら Provirus Variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle Virology 237;261-269(1997)
- 2) Komiyama C ら Deveropment of loop-mediated isothermal amplification