

12 牛伝染性リンパ腫ウイルスの簡易検査法の検証

○八町 慶史

要 約

地方病性牛伝染性リンパ腫（以下、「EBL」という。）の陰性牛把握には一般的に抗体検査と nested PCR による遺伝子検査が行われているが、当所では検査効率の観点から抗体検査を用いてきた。ウインドウ期の感染を見逃さないためには遺伝子検査の必要があり、核酸抽出が不用なダイレクト PCR を導入し、一部検査法を改変し遺伝子検査の簡便化を検証した。材料は 2022 年度に採材した抗体陽性牛及び陰性牛の全血である。検証するダイレクト PCR は nested PCR（以下、「従来法」という。）と異なり遺伝子増幅を 1 回とするため、感度増強を目的として、①PCR 酵素について現在使用している酵素と新規に選択した酵素の比較と PCR サイクル数の検討、②感度の比較、③PCR 増感剤 Lipidure®（日油株式会社、東京）の利用を検証した。①では新旧 PCR 酵素でサイクル数を 35、40、45、50 回としてダイレクト PCR を行い、結果を比較した。②では 45 サイクル数でダイレクト PCR を行い、従来法の従来法と結果を比較した。③では陽性検体を 2 倍段階希釈し、PCR サイクル数を 35 回として、添加区と未添加区で結果を比較した。いずれも遺伝子増幅産物は電気泳動にて確認した。結果は、①新規選択酵素により検出感度が上昇した。②は 45 サイクル数でダイレクト PCR を行った場合では、従来法までの検出感度とは至らなかった。③は添加区で検出感度が上昇した。今回の結果から、添加物の活用と PCR サイクル数を 50 回とするダイレクト PCR を採用することにより、効率的に遺伝子検査を実施し、感染牛の把握に努めていく。

EBL は、牛伝染性リンパ腫ウイルス（以下、「BLV」という。）が原因の伝染病である。BLV は、牛の B リンパ球に感染後、プロウイルスとして牛のゲノムに挿入され、生涯持続感染をする。多くは無症状キャリアーとなるが、数%が悪性 B リンパ腫を発症する。発症に至ると、リンパ系細胞が腫瘍化し、全身のリンパ節をはじめ、さまざまな組織に腫瘍が形成され、必ず死の転帰をたどる。

本疾病に対する治療法はないことから、有効な対策としては感染牛の早期摘発・淘汰及び感染拡大防止が挙げられる。感染の有無を調べる検査には、BLV に対する抗体を検出する ELISA 法と、宿主のゲノムに挿入された BLV 遺伝子を検出する PCR があるが、これら検査法は検出が可能になる時期と検出限界が異なるため注意が必要である。

BLV は感染後、一定期間潜伏感染したのちウイルス血症を引き起こし感染後抗体が誘導される。免疫応答により BLV 遺伝子量は一定値に抑えられ、生涯にわたって感染後抗体が検出される（図 1）。

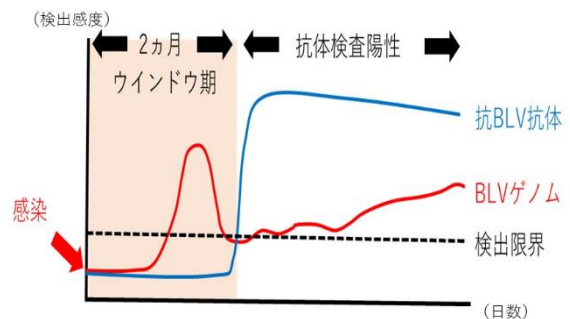


図 1 BLVのウインドウ期

したがって BLV のウインドウ期は通常感染症とは異なり比較的長期間となり、約 2 か月間に及

ぶ¹⁾。

当所では、EBL に対策意欲のある農家向けに毎年 BLV 陰性牛の ELISA 法を実施しているが、上述のウインドウ期を考慮すると、感染初期の個体で陰性判定が出てしまう可能性がある。しかし、従来法は図 2 のとおり検査工程が複雑なため、特に多検体を扱う場合は検査時間が長くなり、従来法実施時には検体間のクロスコンタミネーションが危惧される。一方、近年、BLV 検査について塩化アンモニウム溶血処理と核酸抽出を行わないダイレクト PCR が文献で報告されており^{2) 3)}、検査効率を向上させることができる。また、1stPCR のサイクル数を増やすことで従来法の 2ndPCR を行わなくとも検出感度を向上させることができる。そこで今回、効率的かつ高感度に BLV 遺伝子を検出できる体制を整備するため、1stPCR のみを行うダイレクト PCR の導入とダイレクト PCR の検出感度向上を検討していく。



図 2 従来法 (定性nested PCR)

材料と方法

使用した PCR プライマーは env 遺伝子領域を標的とした Fechner H ら⁴⁾のプライマーである。PCR 反応条件は既報²⁾の条件を参考に、94°C 2 分間の熱変性後、98°C 10 秒、62°C 5 秒、68°C 10 秒で PCR サイクルを実施した。PCR 産物は 2.0% アガロースゲルで 135V、25 分間の電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色後、ゲル撮影装置でバンドを確認した。

1 PCR 酵素とサイクル数の検討

材料は BLV 遺伝子量の少ない抗体陽性牛 5 検体である。現在使用している PCR 酵素

(SapphireAmp®Fast PCR Master Mix, タカラバイオ社, 滋賀) と新規に選択した PCR 酵素 (KOD One PCR Master Mix-Blue-, 東洋紡(株), 東京) (以下、「新酵素」という。) で 35、40、45 サイクルのダイレクト PCR を実施し、結果を比較した。

2 検出感度の比較とサイクル数の再検証

抗体陽性牛飼養農家 3 戸 (計 118 検体) に対し、新酵素、45 サイクルでダイレクト PCR を行い、従来法及び ELISA 法と結果を比較した。ELISA 法陽性ダイレクト PCR 陰性となった検体は追加検証のため、50 サイクルでダイレクト PCR を実施した。

3 PCR マスターミックスへの PCR 増感剤の添加

材料は 2 倍段階した抗体陽性牛 1 検体である。抗体陰性牛の全血で 1 倍から 64 倍まで段階希釈を行った。PCR マスターミックスへ PCR 増感剤 (Lipidure®-BL1002, 日油株式会社, 東京) を終濃度 0.5%wt で添加した添加区と未添加区を設け、新酵素、35 サイクルでダイレクト PCR を行い、添加区と未添加区の結果を比較した。

結果

1 PCR 酵素とサイクル数の検討

いずれのサイクル数でも新酵素でバンドが検出された (図 3)。また新酵素では 45 サイクルで全検体陽性となり、非特異バンドは検出されなかった。



図 3 PCR 酵素とサイクル数の検討

2 検出感度を比較とサイクル数の再検証

感度比較の結果は表 1 のとおりである。ダイレ

クト PCR と従来法の判定では、診断の一致度を示すカッパ係数は 0.9 で高い一致度であったが、4 検体でダイレクト PCR 陰性、従来法陽性となった。ダイレクト PCR と ELISA 法の判定では、ELISA 法陽性の 6 検体がダイレクト PCR で陰性となった。

表 1 検出感度の比較

		従来法 (nested PCR)		合計	ELISA 法
		陽性	陰性		
ダイレクト PCR (45サイクル)	陽性	3 6	0	3 6	3 6
	陰性	4	7 7	8 1	6
	合計	4 0	7 7	1 1 8	4 2

上記 6 検体で 50 サイクルのダイレクト PCR を実施したが、1 頭のみが陽性となった。この 6 検体の詳細は表 2 のとおりで、従来法では 4 頭のみ陽性となり、2 頭は遺伝子検査検出限界以下であった。

表 2 ダイレクト PCR が陰性となった 6 検体について

	ELISA	ダイレクト PCR (45 サイクル)	ダイレクト PCR (50 サイクル)	従来法 (nested PCR)
陽性数/検査数	6/6	0/6	1/6	4/6

3 PCR マスターミックスへの PCR 増感剤の添加

Lipidure® 添加区では 16 倍希釈まで、未添加区では 4 倍希釈までバンドが検出され、Lipidure® 添加により検出感度が 4 倍向上した (図 4)。



図 4 PCR マスターミックスへの Lipidure® の添加

PCR 酵素とサイクル数の検討及び検出感度の比較より、新酵素、50 サイクルでダイレクト PCR を実施することで一定レベルの検査精度を維持できたが、従来法より感度は低くなった。検出感度を示すと図 5 のとおりである。

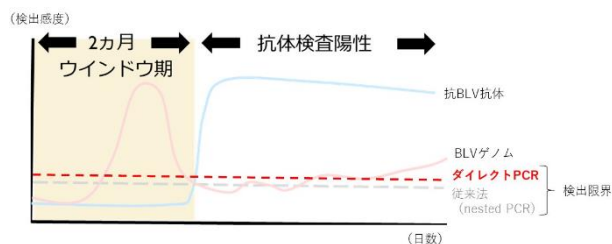


図 5 ダイレクト PCR の検出感度

検出感度が従来法に満たなかった原因として、鋳型量が異なることが起因していると想定される。従来法では核酸抽出を行うため、最終的な PCR の鋳型量はリンパ球約 5 万個分と計算されるが、ダイレクト PCR の鋳型量はリンパ球約 5 千個分と 10 倍の差が生じる。そして、ダイレクト PCR では PCR 阻害物質の影響を受けやすいことも、検出感度が低下した要因であると想定される。

Lipidure®とは日油株式会社が開発した MPC ポリマーで、免疫測定系をはじめとしたさまざまな製品に応用されている。2022 年度の日本医療検査科学会で、Lipidure®を活用し SARS-CoV2 の PCR 検査の感度向上について報告があった⁵⁾。予備試験では、抗体陽性牛 2 検体から核酸抽出し、Lipidure®を加え 35~45 サイクルで PCR を実施した場合は、添加区未添加区で差を認めなかったため、Lipidure®はダイレクト PCR の検出感度を向上させることが示唆された。これは、加熱処理による核酸の遊出の促進もしくは PCR 阻害物質の抑制の効果があると推測される。

また所要時間とコストの違いについて比較したところ、表 3 のとおり作業工程が省略されたことで、所要時間は約 2 時間、コストは 1 検体当たり約 280 円と、所要時間及びコストが半分以上削

減された。

表3 検査の所要時間とコスト

	従来法 (nested PCR)	ダイレクトPCR
所要時間	約4時間半	約2時間
コスト	約830円	約280円

※1検体当たり

今後は、新酵素、50 サイクルで行った場合、Lipidure®を活用した場合、これらを併用した場合、何コピーまで陽性にできるか明らかにすることで、他の手法と感度が比較しやすくなり、結果からおおよそのコピー数を推定できるようになる。また、検出感度向上のため検査工程を改良する。全血からのダイレクト PCR は鑄型量が少ない点、PCR 阻害物質を含む点を考慮し、塩化アンモニウム溶血処理による白血球の濃縮まで行い、白血球からダイレクト PCR を行う工程を検討していく。

最後に、今回導いた最適な PCR 条件及び Lipidure®の活用を導入することで効率的に遺伝子検査を行い、ELISA 検査も併用することで、ウインドウ期を含めた陽性牛の把握に努めていく。

引用文献

- 1) 目堅博久: 牛白血病ウイルス感染症の検査法とその特徴, 産業動物臨床医学雑誌, 6 巻増刊号, 221-226 (2016)
- 2) Asami Nishimori, Satoru Konnai, Ryoyo Ikebuchi, Tomohiro Okagawa, Ayako Nakahara, Shiro Murata, Kazuhiko Ohashi : Direct polymerase chain reaction from blood and tissue samples for rapid diagnosis of bovine leukemia virus infection, J Vet Med Sci, 78, 791-796 (2016)
- 3) 宮本真智子, 川内京子, 榊原伸, 宮根和弘, 目堅

博久:ダイレクト PCR による牛伝染性リンパ腫感
染源リスク牛の検出, 日本獣医師会雑誌, 75 巻 3
号, 46~50 (2022)

4) Fechner H, Blankenstein P, Looman AC, Elwert J, Geue L, Albrecht C, Kurg A, Beier D, Marquardt O, Edner D: Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle, Virology, 237, 261-269 (1997)

5) 鈴木裕貴, 古波津春希, 近藤聖奈, 松田将: MPC ポリマーを用いた PCR 検査法の再現性向上, 日本医療検査科学会第 54 回大会 (2022)