

### 3 牛白血病ハイリスク牛評価のための定量 PCR の比較検討

県北家畜保健衛生所

三好勇紀 岡崎克美

#### はじめに

牛白血病は、体表及び体腔内リンパ節の腫大、各種臓器における腫瘍形成等の異常を示す疾病で、地方病性牛白血病（以下、EBL）と散発性牛白血病に分類される<sup>1)</sup>。近年、牛白血病は増加傾向にあり、その殆どが EBL と言われている（図 1）。現在のところ、本疾病に対する有効な予防法や治療法は存在せず、と畜場に搬入され牛白血病と診断された場合は全部廃棄となるため、養牛農家にとって大きな経済的損失になる<sup>2)</sup>。

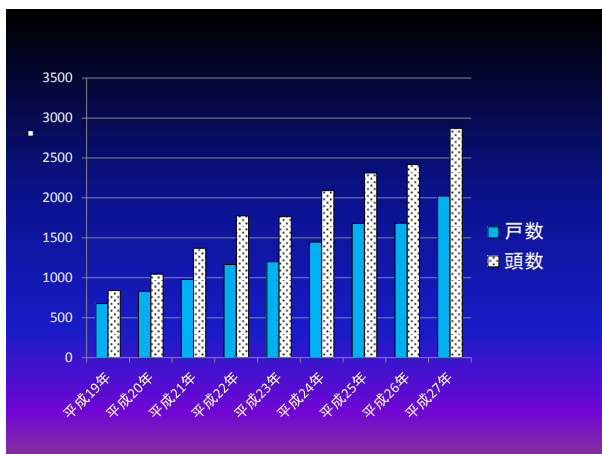


図 1 全国の発生報告数

本病の診断は、血液検査として、抗体検査（ELISA）、ウイルス培養試験（培養細胞接種試験）、遺伝子検査（PCR 法）がある<sup>3)</sup>。現在、BLV を伝播するリスクの高い牛（以下、ハイリスク牛）を評価する診断法として、牛白血病ウイルス（以下、BLV）BLV の tax 遺伝子を標的とした定量キット（以下、tax 法）を用いたリアルタイム PCR 法（以下、qPCR）が主

流となっている。今回、LTR 領域を標的とした定量キット（以下、LTR 法）が販売されたため、清浄化対策の推進を視野に入れ、両キットの検出感度、作業性、作業時間、コスト及び検査検体可能数について比較検討を行ったので、その概要を報告する。

#### 牛白血病リアルタイム PCR 法

牛白血病 qPCR 法は、既に販売されている tax 法と今年販売された LTR 法がある。両者は増幅の対象領域が異なり、tax 法は、ゲノム DNA 100ng 当たりのプロウイルスコピー数で表現されるため、ゲノム DNA の濃度をあらかじめ調整しておく必要がある。一方、LTR 法は、ゲノム DNA 100ng 当たりのプロウイルスコピー数で表現しないため、濃度調整は不要であるが、リンパ球 10 万個当たりのプロウイルスコピー数でウイルス量を表すために、サンプル中に含まれるリンパ球数を測定することが必要である。また、LTR 法は、リンパ球数の測定のため、プロウイルスの増幅と同時の反応となるが、リンパ球中に一定量含まれる内部遺伝子の増幅も行う必要があるなどの違いがある（図 2）。

#### 材料及び方法

牛白血病の浸潤が確認されている管内乳肉複合農家の飼養牛 67 頭から、プレーン管と EDTA 管による採血を実施した。

プレーン管は、3,000rpm で 15 分間遠心し、血清を分離し、ELISA 法に供した。

EDTA 管は、塩化アンモニウム法により末梢単核球を分離し、市販キット（DNeasy Blood&Tissue）を用いて DNA 抽出を行い、スクリーニング法として Pol 領域を標的とした nested-PCR 法を実施し、さらに nested-PCR 法陽性検体について、tax 法、LTR 法を実施した。

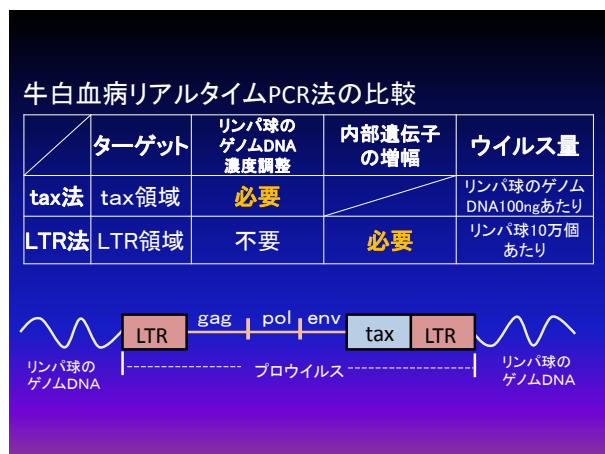


図2 牛白血病リアルタイム PCR 法の比較

## 結果

### 1 ELISA 法及び PCR

ELISA 検査では、67 頭中 40 頭が陽性であった。この 40 頭を対象として nested-PCR 法を実施したところ、29 頭が陽性であった。

ELISA 検査陽性、nested-PCR 法陰性であった 11 頭については、11 頭中 10 頭が生後 6 か月以内であった。また、育成牛の 1 頭で ELISA 法検査陰性、nested-PCR 法陽性であった。

nested-PCR 法陽性の 30 頭について tax 法及び LTR 法を実施したところ、27 頭が両法で陽性であったが、育成牛の 1 頭で tax 法陽性、LTR 法陰性と両法で結果が異なった。

両法による陽性率は、それぞれ 93%、90% であった（表 1）。

表 1 ELISA 法及び PCR 法結果

	頭数	ELISA	nested-PCR	tax法	LTR法
成牛	27	+	+	+	+
	1	+	+	-	-
	1	+	-	NT	NT
	18	-	-	NT	NT
育成	1	+	+	+	-
	2	+	-	NT	NT
	1	-	+	-	-
	7	-	-	NT	NT
哺乳子牛	8	+	-	NT	NT
	1	-	-	NT	NT
計		40/67	30/67	28/30	27/30

### 2 相関関係

LTR 法のコピー数によって階層ごとに区分し、LTR 法の頭数、tax 法の頭数及びコピー数を比較したところ、LTR 法で 100 コピー以上の検体での結果に差はなかったが、tax 法陽性、LTR 法陰性であった育成牛の 1 頭は、tax 法で 2.05 コピー/100ng と低値であった（表 2）。

さらに、tax 法と LTR 法の相関関係を調べたところ、相関係数 0.96 となり、両者に正の相関関係が認められた（図 3）。

表 2 リアルタイム PCR 法コピー数

LTR法 (コピー/リンパ球10万個)	LTR法 (陽性頭数/検査頭数)	tax法 (陽性頭数/検査頭数)	tax法 (コピー/100ng)
$10^4 \leq$	15/27	15/28	189~872
$10^3 \leq < 10^4$	7/27	7/28	42~116
$10^2 \leq < 10^3$	4/27	4/28	1.85~8.66
$10^1 \leq < 10^2$	1/27	2/28	0.268~2.05

### 3 作業性と作業時間

作業性について、tax 法はゲノム DNA の濃度調整が必要であり、LTR 法は不要であった。また、作業時間について、tax 法は 1 検体の濃度調整に約 3 分、qPCR 反応時間に 70 分要し、LTR 法は qPCR 反応時間に 165 分かかった。さらに、一度に検査できる検体数は、tax 法では 90 検体、LTR 法では 40 検体であった。

tax 法、LTR 法それぞれの検体数ごとのトータル時間を算出したところ、LTR 法で、最大 41 検体や 81 検体と、検体数が 40 検体の倍数から 1 検体でも増えると時間が大幅に増え、tax 法は、90 検体までは 3 分ずつ増えた。そのため、30 検体では差は 5 分と最小だが、90 検体では 155 分の差が出るのが判明した (図 4)。

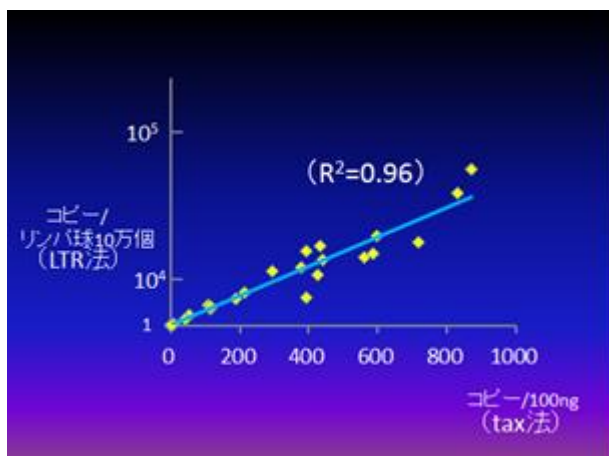


図 3 相関関係



図 4 作業性と作業時間

#### 4 コスト

それぞれ必要な試薬を用いて、1 検体のみ検査した場合、tax 法は 6,387 円、LTR 法は 6,630 円となり、殆ど差はなかった。

しかし、LTR 法での最大検体数である 40 検

体検査時の 1 検体当たりのコストを算出したところ、tax 法は 1,016 円、LTR 法は 555 円となり、約 2 倍の差があった (図 5)。

	tax法	LTR法
1検体	6,387円	6,630円
40検体	1,016円	555円

図 5 コスト

#### まとめ及び考察

今回、キットの選択肢が増えたことを踏まえ、今後家畜保健衛生所が清浄化対策の推進に活用していく上で、より使いやすい方法を選択するため、tax 法と LTR 法の比較検討を行った。

その結果、比較検討を行った 30 頭のうち、tax 法陽性、LTR 法陰性と結果が異なった 1 頭については、両法の検出限界領域での相違であると考えられるため、どちらの方法もハイリスク牛の評価に影響を及ぼさず、有用と考えられた。

さらに、管内での平均的な飼養規模で検査を想定した場合、作業性、作業時間及びコストを考えると、LTR 法が使い易いと思われた。しかし、多頭飼養されているメガファームで迅速な結果が求められる場合には、キットの選択の考慮も必要であると思われた。

また、ELISA 法と PCR 法の検査結果において、移行抗体の影響で抗体検査のみ陽性を示す個体や、遺伝子検査でも nested-PCR 法陽性

で qPCR 陰性を示す個体が存在した。そのため、ハイリスク牛評価において、どちらのリアルタイム PCR 法を選択・使用するには、遺伝子検査及び抗体検査を含む血液検査の成績を総合的に判断することが必要と考えられた。そして、これまで tax 法で検査を実施してきたが、今後は濃度調整が不要で、多検体時のコストが節約できる LTR 法での検査体系の確立も視野に入れ、比較検討農場数の例数を増やし、tax 法と LTR 法でのデータを蓄積し、どのような農場でも相関関係が成立するのか、様々な農場でも対応できるか検証していきたい。

#### 参考文献

- 1 葛谷光隆ら：日獣会誌 69, 617-621, 2016
- 2 須藤重寿佳ら：日獣会誌 65, 883-887, 2012
- 3 竹嶋伸之輔ら：臨床獣医 34, 34-40, 2016