

11 牛白血病ウイルス遺伝子検査の省力化の検討

東青地域県民局地域農林水産部青森家畜保健衛生所

○林 敏展 菅原 健
 齋藤 豪 相馬 亜耶
 水島 亮 太田 智恵子
 森山 泰穂 渡部 巖
 小笠原 和弘

1 はじめに

牛白血病は牛白血病ウイルス（以下、BLV）感染による地方病性牛白血病と、ウイルス感染の関与が確認されていない散发性牛白血病の総称であり、平成 10 年より届出伝染病として発生報告が義務づけられた。¹⁾

全国及び本県の牛白血病の発生状況を図 1 に示した。²⁾全国では年々増加傾向にあり、本県でも近年 40 頭程度の発生があるため、我々は様々な検査により感染牛を摘発する等の汚染低減対策を行っている。

本県で実施している牛白血病の検査方法を表 1 に示した。血液検査や抗体検査は現地家保で実施されており、診断に有用なツールであるが、血液検査での所見は牛白血病のみに特有のものではなく、異形細胞も形態の確認など診断が難しく、多検体に不向きである。また、抗体検査は高感度で多検体処理が容易であるが、移行抗体の影響を受けるため、子牛の検査には適さない。近年は移行抗体に影響されず、感染初期においても BLV 遺伝子が検出できる遺伝子検査が行われている³⁾が、当該検査は病鑑施設でのみ実施可能であり、試薬等のコストも高く、多検体では労力も大きいと、頻りに利用し難い状況である。

そこで、遺伝子検査について、簡便に行う

検査法（以下、簡便法）が紹介された⁴⁾ことから、コストや労力の負担軽減のため、当所でも実施可能かどうか検討したので、その概要を報告する。

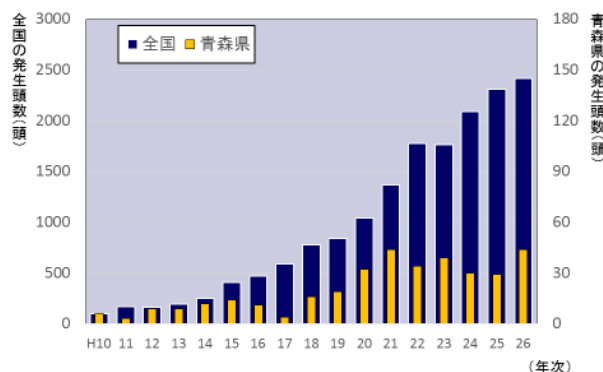


図1 牛白血病の発生状況

表1 牛白血病の検査方法

検査法	血液検査 (血液塗沫等)	抗体検査 (ELISA等)	遺伝子検査 (PCR等)
メリット	現地家保で実施 異形細胞の確認	現地家保で実施 多検体が容易	移行抗体に 影響されない 検出時期 早
デメリット	診断が難しい 多検体に不向き	移行抗体に影響	病鑑施設で実施 コスト・労力 大

2 材料及び試験方法

野外牛全血 17 検体を用い、簡便法、従来のリアルタイム PCR 法（以下、q-PCR 法）及び nested-PCR 法の各検査を行い、定性判定、定量判定及び検査に係るコスト、作業時間の比較を行った。

なお、簡便法は既報⁴⁾に従い実施した。q-PCR 法は全血由来白血球から DNA mini Kit (QIAGEN 社)により抽出した遺伝子について、ウシ白血病ウイルス検出用 Probe/ Primer/ Positive control 及び Cycleave PCR Reaction Mix (TaKaRa 社)を用いて実施した。nested-PCR 法は q-PCR 法と同様に抽出した遺伝子について、Fencher らのプライマーを用いて実施した。

3 成績

(1) 定性判定成績

定性判定の成績を表 2 及び図 2 に示した。

簡便法では、17 検体中 13 検体陰性、4 検体陽性であり、全ての検体において q-PCR 法と同一の結果であった。nested-PCR 法とは、微反応で陽性となった 1 検体でのみ結果が異なった。また、簡便法と nested-PCR 法とで、カッパ係数は 0.85 となり、両法は高い一致を示した。

表2 成績(定性判定)

検体No.	簡便法	q-PCR法	nested-PCR法	(備考) ELISA抗体
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	+
12	+	+	+	+
13	-	-	+	+
14	+	+	+	+
15	-	-	-	+
16	+	+	+	+
17	+	+	+	+

•簡便法とnested-PCR法との成績の比較

		nested-PCR法		
		陰性	陽性	合計
簡便法	陰性	12	1	13
	陽性	0	4	4
	合計	12	5	17

• k係数=0.85

	0~0.4	低い一致
k係数の	0.41~0.60	中等度の一致
評価基準	0.61~0.80	かなりの一致
	0.81~	高い一致

図2 成績(定性判定)

(2) 定量判定成績

定量判定の成績を図 3 に示した。

簡便法で得られたコピー数と q-PCR 法で得られたコピー数を比較したが、それぞれの相関性は得られなかった。

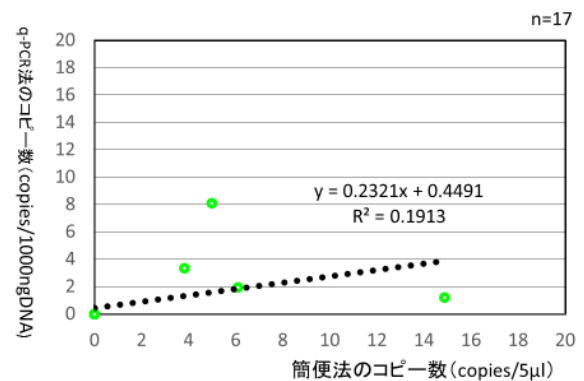


図3 成績(定量判定)

(3) コスト・作業時間の比較

各方法に係る主な資材、50 検体分のコスト、作業時間を試算したものを表 3 に示した。

コストに関しては、DNA 抽出キットを含めない分、簡便法は q-PCR 法よりも安価であった。作業時間については、少ない検体数では q-PCR 法が、50 検体の試算では簡便法が効率的であった。

表3 検査に係るコスト・作業時間

方法	簡便法	q-PCR法	nested-PCR法
主な資材	プロテアーゼ PCR試薬 TAKARA試薬	DNA抽出キット TAKARA試薬	DNA抽出キット PCR試薬 泳動試薬
コスト @50検体	53,500 円	70,200 円	40,325 円
作業時間 @50検体 (試算)	3時間20分	5時間20分	12時間00分

4 まとめ

簡便法は定性判定において、q-PCR法と同一の成績であり、nested-PCR法と比べても高い一致を示した。定量判定では相関は認めなかったものの、簡便法はコスト面で優れており、作業時間も検体数が多くなるにつれ、効率的であった。

以上より、簡便法は当所でも実施可能と判断した。

簡便法により、q-PCR法に要する労力とコストを大幅に下げることができることから、多検体の処理による労力削減効果が大きく見込まれる。このことから、全頭検査等多検体の検査を頻回行うことが可能になり、より早く隔離等の対策を行うことができ、本病未感染牛への感染を防ぐ効果が期待された。また、本病の感染要因は人為的伝播やアブ等による水平伝播と多々考えられるが、感染を一早く検出できることで、感染原因の特定の一助になることも考えられた。

各検査法における感度、定量性、検査時間、労力面から見た特徴を図4に示した。各検査法は感度や定量性、検査時間や労力に優れているという特徴があり、検査の目的に応じて使い分けることが重要である。簡便法は多検体の処理に優れるため、全頭検査等の頻回の検査、q-PCR法は検体数が少なければ検査時間・労力は優れており、定量性に優れるため、

ハイリスク牛の摘発、nested-PCR法は感度に優れるため、後継牛の選抜等に用いることが考えられた。

特に、簡便法は分離放牧前の群編成の検査や、分離放牧後の陰性牛の頻回なモニタリング検査、また牛白血病清浄化を目指す大型農家に対し、未感染牛の頻回な感染状況確認検査に有効と考えられた。

方法	簡便法	q-PCR法	nested-PCR法
感度	○	○	◎
定量性	△	○/◎	×
検査時間	◎	○	×
労力	◎	○	×

- ・簡便法 …… 多検体の処理に優れる 全頭検査等
- ・q-PCR法 …… 定量性に優れる ハイリスク牛の摘発
- ・nested-PCR法 …… 感度に優れる 後継牛の選抜等

図4 各遺伝子検査法の特徴

今後はこれらさまざまな検査を組み合わせ、より効率的に本病感染個体の抽出をおこない、牛白血病の清浄化を進めていく所存である。

<参考文献>

- 1) HP<http://www.naro.affrc.go.jp/org/niah/disease_fact/t08.html> (2016年3月8日アクセス)
- 2) HP<http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/kansi_densen.html>監視伝染病発生状況(2016年3月8日アクセス)
- 3) 日獣会誌 62 499~502(2009):我が国の地方病性牛白血病の発生動向と対策-その現状と課題-
- 4) 平成 26 年度大分県家畜保健衛生並びに畜産関係業績発表会「地方病性牛白血病 (Eb1) の清浄化を目指した簡便なりアルタイムPcr (Rt-Pcr) 法の検討」長岡健朗