

## 牛白血病ウイルス (BLV) の遺伝子検査法の検討

紀北家畜保健衛生所

○山田陽子 亀位 徹

鳩谷珠希 豊吉久美

### 【背景及び目的】 (図 1、表 1)

BLV のリアルタイム PCR (r-PCR) 法は BLV 感染牛のリンパ球中の BLV プロウイルス遺伝子の検出および定量を行う方法である。r-PCR 法により摘発した BLV 遺伝子保有量が多い牛は、牛白血病発症リスク、もしくは BLV 伝播リスクの高い牛とされる。それらを優先的に分離飼育または淘汰することが、農場における感染率の低減や洗浄化につながるとされている。

BLV の r-PCR 法は、定法では前処理として全血を溶血処理して白血球を単離し、そこから DNA 抽出キットを用いてサンプル DNA (sDNA) を抽出し r-PCR 反応に供する。しかし白血球を単離せずに全血から直接 sDNA 抽出を行っても、保有 BLV 遺伝子量が微量でなければ、白血球を単離したときとほぼ同等の遺伝子量の結果が得られるという報告がある。当施設でも作業効率化のために、どの程度の BLV 遺伝子量であれば、全血からの直接抽出でも同等の結果が得られるか調査することとした。

また、BLV 遺伝子定量を正確に行うためには、抽出した sDNA を 1 反応につき 100ng 以下に調整した上で r-PCR 反応に供する必要がある。これはタカラバイオ社製「ウシ白血病ウイルス検出用 Probe/Primer/Positive control」に注意事項として記載されている。sDNA 量が多すぎると、r-PCR の蛍光シグナルが反応初期より徐々に上昇し増幅曲線の形がシグモイド型にならず、正しい判定ができないからである。しかし sDNA 量の調整により微量遺伝子の検体は希釈され検出できなくなる可能性がある。和歌山県ではまだ BLV 陰性農家が大半を占めており、微量であっても遺伝子陽性牛をいち早く摘発することも重要である。そこで遺伝子定性検査として、コンベンショナル PCR 法の一つで nested PCR という手法を併せて実施し、r-PCR との検出感度の違いを調査することにした。nested PCR は 1 回目の PCR 領域よりさらに内側の領域でのプライマーセットによる 2 回目の PCR を行う方法で、一般的に 1 回目の PCR より特異性を上げて実施する目的に用いられる。

以上をまとめると今回、効率よく正確に BLV 遺伝子検出および定量を行うために①全血と白血球からの sDNA の抽出②sDNA の濃度調整の有無③BLV 遺伝子の定量 (r-PCR) 及び BLV 遺伝子の検出 (nested PCR) をそれぞれ実施し比較調査した。

#### 【方法】（図 2、表 2）

BLV 抗体陽性率約 40%の酪農・繁殖複合経営農場の牛 33 頭の末梢血を供試材料とした。sDNA は DNA 抽出キット (DNeasy Blood & Tissue Kit、キアゲン) を用いて (1) 全血 100  $\mu$  L から抽出 (全血 DNA) (2) 全血 1 mL を 0.83% 塩化アンモニウム溶液にて溶血処理し単離した白血球から抽出 (白血球 DNA)、それらについて分光光度計により 260nm の波長における吸光度を測定し、DNA 濃度 (ng/ $\mu$  L) を算出した。全血 DNA および白血球 DNA について、1 本の反応に使用する DNA を 100ng 以下に調整・未調整の場合の r-PCR 及び nested PCR を実施し、計 8 パターンの結果を比較した。r-PCR にはタカラバイオ社製「ウシ白血球ウイルス検出用 Probe/Primer/Positive control」および「CycleaveRPCR Reaction Mix SP」を使用、nested PCR にはタカラバイオ社製 PCR キット「EmeraldAmp PCR Master Mix」および Fechnerらの報告によるプライマー (env5032、env5608r、env5099、env5221r) を使用した。

#### 【結果】（図 3～6、表 3、4）

全血と白血球から抽出した sDNA 濃度別検体数を図 3 に示す。sDNA の濃度分布は、白血球 DNA では 20～140ng/ $\mu$  L であったのに対し、全血 DNA では 0～40ng/ $\mu$  L であり、白血球 DNA は広い範囲の濃度分布であった。DNA 抽出の際、白血球 DNA では全血 DNA の場合のおよそ 10 倍の白血球を供しているため、このような結果になったと考えられた。リアルタイム PCR では、1 反応につき sDNA 量を 100ng 以下にする必要があり、容量として 5  $\mu$  L を用いるので、濃度は 20ng/ $\mu$  L 以下であれば、sDNA の希釈調整なしでリアルタイム PCR 反応に供することができる。全血 DNA では、20ng/ $\mu$  L 以下の調整が不要の検体が半数以上を占めていた。

遺伝子量の多い検体、少ない検体および遺伝子未検出の検体の r-PCR の増幅曲線の結果例を図 4 に示す。遺伝子陽性で sDNA 濃度未調整の場合 (グラフ左上および中上)、全血 DNA と白血球 DNA の増幅曲線が重ならず遺伝子量にも差があったが、sDNA 濃度調整した場合 (グラフ左下および中下)、全血と白血球の曲線が重なり、ほぼ同じ増幅を示した。また、陰性検体の未調整の白血球 DNA (グラフ右上) では、曲線ではなく直線を示す蛍光強度が検出され、遺伝子増幅とは異なる蛍光色素の経時的分解が示された。

r-PCR で陽性となった各種検体の BLV 遺伝子量別検体数を図 5 に示す。検体数の分布として、DNA 濃度未調整の場合は全血白血球ともに遺伝子量が 1,000～10,000 (copies/100ngDNA) を示す検体が多く、調整した場合は遺伝子量が 10,000 (copies/100ngDNA) 以上を示す検体が多かった。

各種検体の BLV 遺伝子量を比較したグラフ（図 6）では、全血と白血球を比較したとき（上段）、濃度未調整の場合相関が低く、調整すると高い相関が得られた。また未調整と調整を比較したとき（下段）、全血の場合は相関が高く、白血球の場合は相関が低くなった。

各種検体の BLV 遺伝子検出検体数の結果を表 3 に示す。DNA 濃度調整の有無に関わらず r-PCR と nested PCR で全血 DNA と白血球 DNA に共通して陽性は 12 検体であった。濃度未調整の白血球 DNA の nested PCR では更に 3 検体の陽性が確認され、もっとも検出率が高かった。それら 3 検体は表 4 に示すとおり、r-PCR で 10copies/100ngDNA 以下のごく微量の検体で、濃度調整後では検出されなかったり、全血 DNA と白血球 DNA で検出が一致しないものがあった。共通して陽性だった 3 検体以外の 12 検体は全て各パターンで 10 copies/100ngDNA 以上の結果であった。

#### 【まとめと考察】（図 7、8）

全血と白血球の比較では、sDNA 濃度調整済みで BLV 遺伝子量が 10 copies/100ngDNA 以上であれば、検出・定量がほぼ同等であった。sDNA 濃度調整をしないと r-PCR の増幅曲線の障害がおき、調整した場合と比べて少ない遺伝子量で算出されるため、遺伝子定量には sDNA 濃度調整が必ず必要であるということがわかった。また微量遺伝子の検出には濃度未調整白血球 DNA の nested PCR がもっとも感度が高い結果となった。濃度未調整白血球 DNA は、得られる sDNA 量が全血 DNA より多く希釈をしないので、最も濃縮された状態で遺伝子を検出しているため検出率が高かったと考えられる。

以上のことから検査法の使い分けとして、高感度な濃度未調整白血球 DNA の nested PCR は、BLV 低浸潤農場や導入牛検査で、新たな感染源の摘発のために有効であると考えられた。また、遺伝子定量検査は sDNA 濃度調整が必要で、希釈により検出感度が落ちる可能性があるため、BLV 高浸潤農場での遺伝子量が多い牛の摘発の際に有用であることがわかった。その際は濃度調整済み全血 DNA が、手間を省いた上で白血球 DNA と同等の成績が得られることがわかった。

今後、県内の BLV 検査体制として、まず定期的なスクリーニング検査として、エライザによる抗体検査と nested PCR による遺伝子検出検査を行う。その結果から判明した低浸潤農場ではスクリーニング陽性牛を分離飼育または淘汰対象として指導する。高浸潤農場では更に遺伝子定量検査、EC の鍵判定等により、高リスク牛の優先順位付けを行い、リスクの高い牛の更新を指導し、BLV 蔓延防止と清浄化に努めていきたいと考える。

#### 【参考文献】

- ・村上賢二：牛白血病の現状と臨床現場での診断法、家畜診療、第61号、13-18（2014）
- ・渡邊章俊：牛白血病リアルタイム PCR 検査法の検討、平成 23 年度家畜衛生研修会（病性鑑定・ウイルス部門）事例報告抄録
- ・羽岡美智代：牛白血病ウイルス (BLV) リアルタイム PCR 検査法の検討、平成二十五年度獣医学術近畿地区学会要旨集
- ・Fechner H. et al.: Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virology* 237:261-269. (1997)