

簡易抽出法を用いた、高感度かつ多検体処理可能な

牛伝染性リンパ腫遺伝子検査法の検討

○八町 慶史

要約

牛伝染性リンパ腫ウイルス（以下、「BLV」という。）の env 領域を標的とした nested PCR 法による定性 PCR 法は、工程が多く作業時間を要する。そこで、検査工程の簡略化を図るため、リアルタイム PCR 法（以下、「qPCR 法」という。）及びアルカリ熱抽出を用いた核酸抽出法について検討した。qPCR 法の検討では、nested PCR 法の代替として既報の pol 領域を標的とした qPCR 法（以下、「UK 法」という。）を検討した。UK 法が国内検出遺伝子型を検出できるか検討するため、UK 法のプライマー・プローブ領域と、塩基配列データベース及び都内 BLV 陽性検体の塩基配列上の同一領域を比較し、ほぼ同等であることを確認した。また、段階希釈した核酸を用いて UK 法と nested PCR 法の検出限界を比較し、有意差は検出されなかった ($p=0.272$)。アルカリ熱抽出法は、既報から 8 連チューブを用いた高濃度かつ少量の NaOH を使用する抽出法に変更し、UK 法により検討した。アルカリ熱抽出法と従来のキットによる核酸抽出法（以下、「従来法」という。）を比較し、Ct 値に有意差を認めたが ($p<0.05$)、UK 法の Ct 値の差は 1.06 ± 1.68 (SD)であった。1 検体あたりの作業時間は、作業効率が向上したため 240 分から 110 分、コストは市販キットの購入が不要となり 700 円から 135 円となった。以上より、UK 法及びアルカリ熱抽出法は、従来の定性 PCR 検査法と同程度の検出感度を持ち、作業時間及びコストは大幅に削減し、効率的に検査が可能となった。

牛伝染性リンパ腫（以下、「EBL」という。）の原因病原体である Bovine leukemia virus（以下、「BLV」という。）は、デルタレトロウイルス属、オルソレトロウイルス亜科、レトロウ。イルス科の一員である。BLV は牛の B 細胞に感染し、逆転写反応によって二本鎖 DNA が合成され、牛のゲノム DNA にランダムに組み込まれ（プロウイルス化）、生涯維持される。BLV の牛から牛への伝播には水平伝播と直接伝播がある。主に水平伝播により農場内に感染が拡大するとみられており、なかでも、吸血アブによる機械的な伝播は特に重要な感染要因である役割を持つ¹⁻²⁾。BLV 陽性牛を吸血したアブの口器に付着したリンパ球が、乾燥しないうちにアブの吸血によって BLV 陰性牛に移行することで、確率的に BLV 伝播が

成立する²⁾。アブの口器に付着したリンパ球は、アブが飛翔するうちに乾固、変性し感染性を失うことが知られている³⁾。従って、吸血昆虫を介した農場内伝播を防ぐためには、農場内で BLV 陽性牛を正確に把握し、BLV 陽性牛と陰性牛の分離飼育により、BLV 陰性牛と物理的な距離を置くことが重要である⁴⁻⁵⁾。

EBL 感染症の診断法は、大きく抗体検査と遺伝子検査の 2 つに分けられる。抗体検査の中でも、ELISA 法は感度が高いことと多検体処理に要する時間が比較的に短いことがメリットとしてあげられる。一方で、BLV に感染してから抗 BLV 抗体が検出できるようになるまで要するウインドウ期が 2 か月程度と長く、その間に抗体検査を実施しても陰性判定となること、また、母牛か

ら子牛への移行抗体が生後 6 か月まで検出され、その間は BLV に感染したか否か判別できないことがデメリットとしてあげられる⁶⁾。遺伝子検査法には PCR 法があげられ、nested PCR 法やリアルタイム PCR 法（以下、「qPCR 法」という。）などが報告されている。PCR 法のウインドウ期は 1 か月程度であること、移行抗体存在下でも BLV 遺伝子を検出できることから⁶⁾、抗体検査のデメリットに対応することができる。抗体検査と遺伝子検査は検出するターゲットや感度が異なるため、組み合わせることにより正確な診断が可能となる。

当所では EBL 清浄化対策に関心の高い農家向けに BLV 検査を実施しており、BLV 陰性牛に対する定期的な抗体検査及び遺伝子検査の実施により BLV 感染状況の把握に努めている。遺伝子検査は、国内メーカーから販売されている定量 qPCR 試薬が高価であることを鑑み、コストを低く抑えられる定性 PCR 検査のうち、Fencher ら⁷⁾の報告した env 領域を標的とした nested PCR 法を実施している。一方、nested PCR 法は溶血処理、核酸抽出、1stPCR、2ndPCR、電気泳動と工程が多いため作業時間を要し、クロスコンタミネーションのリスクもある。また、PCR 法を実施するにあたり、白血球より DNA を抽出する必要がある。多くの施設では市販の抽出キットを用いて核酸抽出を実施しているが、検体数が多くなるほど作業時間及びコストを要する。そこで、遺伝子検査を簡略化し作業効率を向上させることを目的として、nested PCR 法を既報の qPCR 法に、市販キットを用いた核酸抽出法をアルカリ熱抽出法に変更し、検出感度の維持、作業時間及びコストの削減について比較検証した。

実験方法

1 PCR 法の検討

J. P. Jaworski ら⁸⁾が高感度であると報告した英国で実施されている pol 領域を標的とした qPCR 法（以下、「UK 法」という。）⁹⁾を選択した。UK 法のプライマー

プローブ配列は表 1 のとおりである。

表 1 UK法のプライマー・プローブ配列

Fw, 2321–2340	5'-CCTCAATTCCTTTAACTA-3'
Rv, 2421–2440	5'-GTACCGGGAAGACTGGATTA-3' 5'-TAATCCAGTCTTCCCGGTAC-3' (逆向き相補鎖)
Probe, 2341–2360	5'-FAM-GAACGCCTCCAGGCCCTTCA-BHQ-3'

1) UK 法のプライマー・プローブ配列と BLV ゲノム配列の比較

日本に浸潤している BLV 遺伝子型 (env 領域に基づく系統樹解析) は主に 1, 3 型のため¹⁰⁻¹¹⁾、INSDC 国際塩基配列データベースに登録されている BLV ゲノムのうち、BLV 遺伝子型が 1, 3 型の 384 検体（日本由来 378 検体、日本以外由来 6 検体）を抽出し、UK 法のプライマー・プローブ配列と同一の領域を検索した。方法は、MAFFT (version 7) にて塩基配列をマルチプルアライメントし、Jalview にて配列の一致度を求めた。

また、都内に浸潤している BLV ゲノムと比較するため、当所で BLV 陽性と判定した 13 頭を用いて、UK 法のプライマー・プローブ配列と同一の領域をダイレクトシーケンスにより決定した。方法は、既報¹²⁾の LP-4 gag-F/LP-4 pol-R プライマーを用いて long PCR を実施し、Fw 2152–2172 5' -AAATTTTAGTTGACACTTCGG-3' /Rv 2678–266 5' -CGTCTATGAGGTTGGAGT-3

‘(this study)プライマーを用いて PCR 産物からシーケンスを実施し、塩基配列を決定した。MAFFT (version 7) にて塩基配列をマルチプルアライメントし、Jalview にて配列を確認した。

2) UK 法と nested PCR 法の検出感度の比較

材料は、BLV コピー数が既知の DNA4 検体である。方法は、各検体を 16, 8, 4, 2, 1 コピー/2 μ l に段階希釈し、UK 法及び nested PCR 法を実施した。PCR 条件について、UK 法は DNA2 μ l を鋳型として、リ

アルタイム PCR キット (Hot Strat TTx (DNA) Kit、東洋紡 (株)、大阪) で 50 サイクルとし、nested PCR 法は DNA2 μ l を鋳型とし、PCR キット

(SapphireAmp® Fast PCR Master Mix、タカラバイオ (株)、滋賀) で、1stPCR を 35 サイクル、2ndPCR を 35 サイクルとした。試行回数は各検体をトリPLICATEで測定したため、12 回/各コピー数である。コピー数ごとに陽性数を求め、目的変数を陽性もしくは陰性、説明変数 1 を UK 法もしくは nested PCR 法、説明変数 2 をコピー数として、EZR にてロジスティック回帰分析を実施した。また、コピー数ごとに、UK 法で求められた Ct 値を明らかにした。

2 アルカリ熱抽出法と核酸抽出法（従来法）の検出限界の比較

材料は、BLV 陽性牛 25 頭の白血球懸濁液とした。方法は図 1 のとおりで、アルカリ熱抽出法では 500mM NaOH を用いて白血球懸濁液 20 μ l から終 24.69 μ l の抽出液を、従来法では抽出キット (QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit、(株) キアゲン、東京) を用いて白血球懸濁液 160 μ l から終 100 μ l の抽出液を溶出した。両抽出法から得た抽出液を鋳型に UK 法を実施し Ct 値を求めた。EZR で対応のある t 検定を実施し両抽出法の Ct 値を比較するとともに、両抽出法の Ct 値の差 (Δ Ct=アルカリ熱抽出法 Ct-従来法 Ct) を求めた。

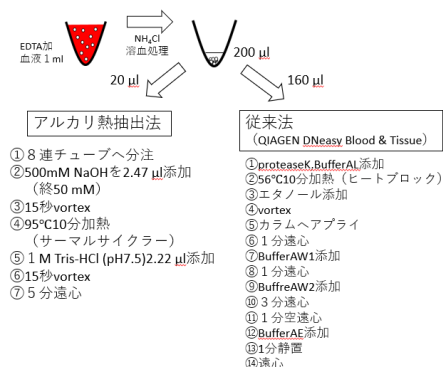


図 1 アルカリ熱抽出法と従来法の作業工程

3 作業時間及びコストの比較

nested PCR 法と、UK 法及びアルカリ熱抽出法を組み合わせた改良法について、10 検体実施する場合にかかる作業時間及びコストを求めた。

結果

1 PCR 法の検討

1) UK 法のプライマー・プローブ配列と BLV ゲノム配列の比較

INSDC 国際塩基配列データベースの登録されている BLV ゲノムと、UK 法の forward、probe、逆相鎖の reverse 配列の一致度は図 2 のとおりである。一致度が最も低い箇所は reverse 配列 5' 側から 19 番目であり (94% (A) /6% (G))、全体的に高い一致度であった。

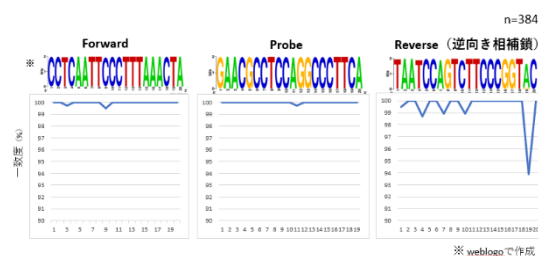


図 2 INSDC国際塩基配列データベースと比較

当所で BLV 陽性と判定した 13 頭の BLV ゲノムと、UK 法の forward、probe、逆相鎖の reverse 配列の一致度は図 3 のとおりである。1 頭で probe 配列 5' 側から 2 番目に A→G を認めたのみで、全体的に高い一致度であった。

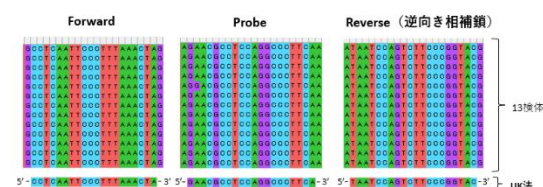


図 3 BLV陽性検体との比較

2) UK 法と nested PCR 法の検出限界の比較

UK 法と nested PCR 法のコピー数ごとの

陽性数は表 2 のとおりである。ロジスティック回帰分析では、説明変数 1 (UK 法もしくは nested PCR 法) で有意差は検出されなかった ($p=0.272$)。UK 法におけるコピー数ごとの Ct 値は図 4 のとおりである。いずれの Ct 値も 35~40 程度であった。

表 2 UK法とnested PCR法の検出限界の比較

	UK法 (陽性数/試行数)	nested PCR法 (陽性数/試行数)
16コピー	12/12	12/12
8コピー	9/12	11/12
4コピー	7/12	8/12
2コピー	6/12	6/12
1コピー	4/12	6/12

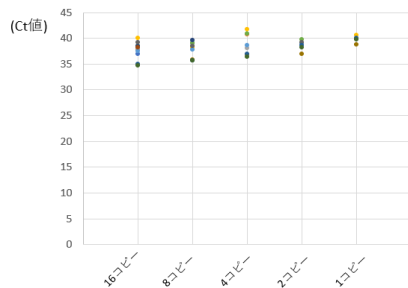


図 4 各コピー数ごとの Ct 値

2 アルカリ熱抽出法と核酸抽出法（従来法）の検出感度の比較

両抽出法の Ct 値は図 5 のとおりである。アルカリ熱抽出法の Ct 値の平均値は 30.23、従来法の Ct 値の平均値は 29.14、対応のある t 検定では有意差が検出された ($p<0.05$)。また、 $\Delta Ct = 1.06 \pm 1.68$ (SD) となった。

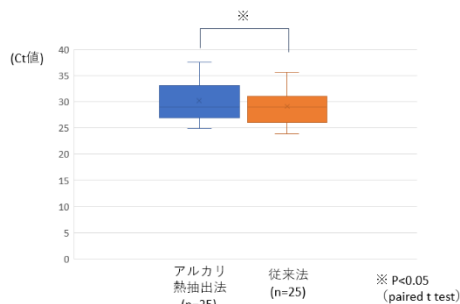


図 5 アルカリ熱抽出法と従来法の検出感度の比較

3 作業時間及びコストの比較

結果は図 6 のとおりである。作業時間について、nested PCR 法では溶血処理後、核

酸抽出、1stPCR、2ndPCR、電気泳動の実施に 240 分程度要し、改良法では溶血処理後、アルカリ熱抽出、qPCR の実施に 110 分程度要した。コストについて、nested PCR 法では 1 検体当たり 700 円程度要し、改良法では 1 検体当たり 135 円程度要した。

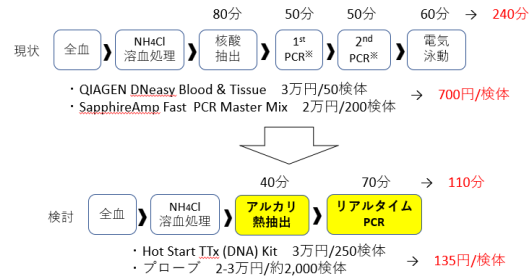


図 6 作業時間とコストの比較

参考

INSDC 国際塩基配列データベースに登録されている BLV ゲノムと、UK 法のプライマー・プローブ配列の一致度は全体的に高く、両者の配列はほぼ同等であったと判断できる。また、逆向き相補鎖の reverse 配列 5' 側から 19 番目に 6% の割合でミスマッチを認めたが、これを元の reverse 配列に直すと、5' 側から 2 番目のミスマッチとなる。PCR の成功性にはプライマー 3' 側の配列の一致性が重要であり、5' 側のミスマッチは比較的許容される。以上より、今回認めたミスマッチが PCR の成功性に与える影響は低いと考えられる。

当所で BLV 陽性と判定した 13 頭の BLV ゲノムと、UK 法のプライマー・プローブ配列の一致度はほぼ 100% で、両者の配列はほぼ同等であったと判断できる。プローブはミスマッチが増えるほどに Tm 値が低下し検出感度も低下するが、今回プローブ内に認めたミスマッチは 1 か所のみで、検出感度に与える影響は低いと考えられる。また、プローブの中心から 3' 側に向けてミスマッチがあるほど検出感度は低下するが、今回認めたミスマッチは 5' 側から 2 番目のため、この点からも検出感度に与える影響は低いと考えられる。

UK 法と nested PCR 法の検出限界の比較では、コピー数ごとの陽性数はほぼ同等の

結果となった。ロジスティック回帰分析では有意差は検出されなかったが、同等性が示されたわけではないため、同等性検定等によって解析していく必要がある。また、16、8、4、2、1 コピーで各 Ct 値は同程度であったが、これは BLV コピー数が低くなるほど、鋳型中に BLV ゲノムが含まれる確率とプライマー・プローブが目的の箇所にハイブリダイズする確率が減るため、Ct 値の差がそこまで認められなかった可能性がある。

アルカリ熱抽出法と従来法の検出感度の比較では、対応のある t 検定で有意差が検出され、従来法のほうが検出感度は高い結果となったが、その差は Ct 値 0.06 であり、アルカリ熱抽出法でも高水準の検出感度は維持された。その理由として、既報¹³³⁻¹⁶⁾のアルカリ熱抽出法では、サンプルが 10 倍程度希釈される量の 25-50mM NaOH を添加していたが、今回 500mM NaOH を少量使用することに変更し、サンプルの希釈を 1.25 倍程度に抑えたことが、検出感度の向上に寄与したと考えられる。また、現行のリアルタイム PCR の機器では 1 コピーの検出も可能で、その Ct 値として 35~45 程度が報告されている¹⁷⁻¹⁹⁾。従来法からアルカリ熱抽出法に切り替え Ct 値が 1 程度上昇したとしても、その Ct の理論値は 36~46 であり、理論上検出可能な範囲であるため、検査への影響はほぼないと判断できる。今後は、従来法からアルカリ熱抽出法に切り替えることで検出限界が変化するか明らかにし、検査精度をより明らかにしていく必要がある。

作業時間及びコストの比較では、作業時間は 240 分から 110 分に短縮された。これは nested PCR 法から qPCR 法に切り替えたことで、PCR 反応が 1 回で済むこと、電気泳動が不要であることに加え、アルカリ熱抽出は従来法よりも作業工程が少ないことが要因と考えられる。また、今回検証したアルカリ熱抽出法は既報と一部工程を変更しており、既報では 1.5ml チューブに一定量の NaOH を加え、ヒートブロックで加

熱をするが、今回検証したアルカリ熱抽出法では、8 連チューブに高濃度少量の NaOH を加え、サーマルサイクラーで加熱した。このことにより 8 連ピペットを使用し多検体処理することが容易になり、作業効率が向上したことが要因と考えられる。コストは 1 検体あたり 700 円から 135 円に削減した。これは、市販の核酸抽出キットが不要となったことが要因と考えられる。

まとめ

BLV 遺伝子検査の作業効率向上を目的として nested PCR 法を UK 法による qPCR 法に変更するため、UK 法のプライマー・プローブ配列と BLV ゲノム配列を比較し、ほぼ同等であることを確認した。また、nested PCR 法と UK 法の検出限界を比較し、有意差は検出されなかった。次に、市販キットを用いた核酸抽出法（従来法）をアルカリ熱抽出法に変更するため検出感度を比較し、有意差は検出されたが、 $\Delta Ct=1.06$ であった。以上より、nested PCR 法を UK 法に、従来法をアルカリ熱抽出法に変更しても、従来の定性 PCR 法と同程度の検出感度を維持できると判断した。また、作業時間及びコストも大幅に削減でき、日々の検査業務の負担軽減に大きく寄与することが示唆された。今後は、本法を用いて EBL 対策のための検査を実施するとともに、UK 法とアルカリ熱抽出法を組み合わせた場合の検出限界を明らかにしていく。

引用文献

- 1) 村上賢二：EBL の病因と感染伝播様式、畜産技術、6 (2017)
- 2) Bech-Nielsen S, Piper CE, Ferrer JF：Natural mode of transmission of the bovine leukemia virus: role of bloodsucking insects, American journal of veterinary research, 39, 1089-1092 (1978)
- 3) 農林水産省：牛白血病に関する衛生対策ガイドライン、(2015)

- 4) 松田敬一, 佐藤真由美, 大橋さやか, 遠藤祥子, 村松良永, 小井田有美, 鈴木一教松田敬一ら : 臨床現場での牛白血病清浄化対策と問題点, 家畜感染症学会誌, 7 (2018)
- 5) 芳賀 聡 : 放牧地における牛伝染性リンパ腫 ウイルス (BLV) 感染拡大を防ぐ, 畜産技術, 9 (2022)
- 6) 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, 221-226 (2016)
- 7) Fechner H, Blankenstein P, Looman AC, Elwert, Geue L, Albrecht C, Kurg A, Beier D, Marquardt O, Ebner D : Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle, Virology, 237, 261h269 (1997)
- 8) J. P. Jaworski, A. Pluta, M. Rola-Luszczak, S. L. McGowan, C. Finnegan, K. Heenemann, H. A. Carignano, I. Alvarez, K. Murakami, L. Willems, T. W. Vahlenkamp, K. G. Trono, B. Choudhury, J. Kuzmak : Interlaboratory Comparison of Six Real-Time PCR Assays for Detection of Bovine Leukemia Virus Proviral DNA, Journal of Clinical Microbiology, 56(7), e00304-18 (2018)
- 9) Rola-Luszczak M, Finnegan C, Olech M, Choudhury B, Kuzmak J : Development of an improved real time PCR for the detection of bovine leukaemia provirus nucleic acid and its use in the clarification of inconclusive serological test results, Journal of Virological Methods, 189, 258 -264 (2013)
- 10) Asfaw Y, Tsuduku S, Konishi M, Murakami K, Tsuboi T, Wu D, Sentsui H : Distribution and superinfection of bovine leukemia virus genotypes in Japan, Archives of Virology, 150, 493h505 (2005)
- 11) 須藤亜寿佳, 岩田竜治, 朴 天鎬 : 山形県で流行している Bovine Leukemia Virus の遺伝子型別及び病理学的検索, 日獣会誌, 65, 883-887 (2012)
- 12) Meripet Polat Yamanaka, Susumu Saito, Yukiko Hara, Ryosuke Matsuura, Shin-nosuke Takeshima, Kazuyoshi Hosomichi, Yasunobu Matsumoto, Rika A. Furuta, Masami Takei, Yoko Aida : No evidence of bovine leukemia virus proviral DNA and antibodies in human specimens from Japan, Retrovirology, 19(7), (2022)
- 13) 羽入さち子, 佐藤圭介, 小野里洋行, 桐生直哉, 福留静, 會田恒彦, 樋口良平 : 簡便に多検体処理が可能な牛伝染性リンパ腫ウイルス比較定量方法の検討, 令和2年度新潟県家畜保健衛生業績発表会
- 14) 大竹祥紘, 米山州二, 中村真弓, 井上恭一 : 牛白血病ウイルス遺伝子検査における DNA 抽出法の比較検証, 平成29年度家畜衛生研究部年報
- 15) 吉田加寿子, 柳沼幸, 伊藤岩夫 : PCR 法による食品中の腸管出血性大腸菌 0157 の VT 遺伝子検出の基礎的検討, 福島県衛生研究所年報 No. 25, (2007)
- 16) 東洋紡社 (株), KOD One® PCR Master Mix 取扱説明書
- 17) Sarah Palmer, Ann P. Wiegand, Frank Maldarelli, Holly Bazmi, JoAnn M. Mican, Michael Polis, Robin L. Dewar, Angeline Planta, Shuying Liu, Julia A. Metcalf, John W. Mellors, John M. Coffin : New Real-Time Reverse Transcriptase-Initiated PCR Assay with Single-Copy Sensitivity for Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA in Plasma, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 41(10), 4531-4536 (2003)
- 18) Amin Forootan, Robert Sjöback, Jens Björkman, Björn Sjögreen, Lucas Linz, Mikael Kubista : Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-

time PCR (qPCR), Biomolecular Detection and Quantification, 12, 1-6 (2017)

19) Manabu Seo, Reona Takabatake, Satoshi Izumi, Hirotaka Unno, Yudai Kawashima, Unoh Ki, Shigeo Hatada, Ikuo Katoh, Satoshi Nakazawa, Takahiko Matsumoto, Yuuki Yonekawa, Michie Hashimoto, Waka Lin, Reo Maeda, Riztyan, Mari Onishi, Satoshi Futo, Masahiro Kishine, Kazumi Kitta : Novel Bioprinting Application for the Production of ReferenceMaterial Containing a Defined Copy Number of Target DNA, Analytical Chemistry, 91, 12733-12740 (2019)