

## 12 牛伝染性リンパ腫ウイルスの リアルタイム PCR 法の検討

○八町慶史

### 要 約

地方病性牛伝染性リンパ腫（EBL）の検査として、当所では、定量PCR法による牛伝染性リンパ腫ウイルス（BLV）遺伝子検査、抗体検査、リンパ球数測定を実施し、飼養者への指導等に活用している。今回、現行のリアルタイムPCRキット（cycleave法（①法））と、他のリアルタイムPCRキット2種類（multiplex法（②法））（CoCoMo法（③法））を比較検討した。

材料は平成29年から令和2年に採材した全血から抽出したDNA計24検体（高リスク13頭、中リスク2頭、低リスク9頭）。各キットで定量PCR法を行い、BLV遺伝子量を定量した。

結果は、①法と②法、①法と③法の間には共に正の相関性がみられた（相関係数=0.867、0.824）。次に、ROC曲線を用いて、②法及び③法におけるBLV遺伝子量の基準値を設定した。設定した基準値を基に24検体に対し実際にリスク分類を行い、診断の一致度を比較したところ、①法と②法、①法と③法の間では共に高い診断の一致度が確認された（重み付きカップ係数=0.85、0.93）。また、検査コスト及び検査時間を算出したところ、検査コストは③法が②法より安価、検査時間は②法が③法より短い結果であった。

以上より、②法及び③法は、検査法として有用であり、設定した基準値による診断精度も同程等であると判断された。今後は、検査時間が短い②法を中心に遺伝子検査を行的に確にリスク分類し、清浄化のための効果的な指導につなげていく。

EBLは、BLV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。感染は、汚染された注射針や直腸検査用手袋の連続利用等による人為的な伝播、感染牛の乳汁を介した伝播、分娩を介した垂直感染、吸血昆虫の媒介による水平感染により拡大するので、その防止対策が重要となる。当所では、竹内ら<sup>1)</sup>の方法を参考に、EBL検査結果を点数化し合計点によりリスクを3段階に分類し（図1）、感染牛の更新順位付け及び感染拡大防止の指導に役立

てている。検査項目は、抗体検査としてELISA法、リンパ球数を測定しECの鍵を求め、遺伝子検査としてリアルタイムPCR法を実施する。今回、現在使用しているリアルタイムPCRキットが販売停止予定のため、他のキットと比較、評価し、今後当所が導入するキットを検討した。

BLV抗体	ECの値	BLV遺伝子量 (copies/ml)
-	0	0
+	1	0
	2	<50
	2	<100
1	2	>100
		3
リスク分類	合計点	
高リスク	≥ 4	
中リスク	3	
低リスク	≤ 2	

図1 BLV伝搬リスク分類

### 材料及び方法

**材料:**平成29年4月から令和2年12月までに採材したホルスタイン種の乳牛から採血したEDTA加全血24検体で検討した。なお、全検体が、ELISA法（牛白血病エライザキット、JNC(株)、東京）及びFencherら<sup>2)</sup>によるenv遺伝子を標的としたnested PCR法にて陽性判定であり、24検体の内訳として、高リスク13頭、中リスク2頭、低リスク9頭である。

**遺伝子の抽出:**全血を塩化アンモニウムで溶血処理後、抽出キット(DNeasy Blood & Tissue Kit、(株)キアゲン、東京)を用いて白血球よりDNAを抽出し、μ Drop Plateを用いて260nm波長にて吸光度を測定し、抽出DNA量を算出した。

**リアルタイムPCR検査 (qPCR):** 現行のキットとして、①cycleave法 (Cycleave PCR Reaction Mix SP 及びウシ白血病ウイルス検出用 Probe/Primer/Positive control、タカラバイオ(株)、東京)、新たに検証す

るキットとして、②multiplex法 (ウシ白血病ウイルス検出キット、タカラバイオ(株)、東京) 及び③CoCoMo法

(CoCoMo-BLVqPCR、株式会社理研ジェネシス、東京)を用いて、BLV遺伝子量を定量した(表1)。

表1 PCRキットの違い

		標的env遺伝子	ハウスキーピング遺伝子 ※相対定量で活用	定量結果	定量法
現行	①cycleave法	Tax遺伝子	-	BLV遺伝子コピー数 copies/DNA mg	絶対定量
新たに検証	②multiplex法	Pol遺伝子	BPHH遺伝子	BLV遺伝子 (N)	相対定量 (標準品法)
	③CoCoMo法	LTR領域	BOLA-DNA遺伝子	BLV遺伝子コピー数 copies/g(湿重)	相対定量 (標準品法)

**解析:**求められた定量値を、Microsoft Excelの分析ツール (Microsoft® Excel® 2016、マイクロソフトコーポレーション、アメリカ) 及び統計ソフト (EZR、自治医科大学附属さいたま医療センター、埼玉)にて統計解析した。

### 結果

①法と②法、①法と③法の定量値を散布図で表し、相関分析を行った(図2)。

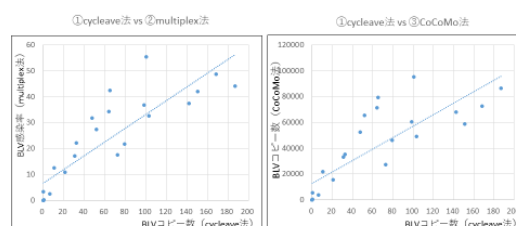


図2 現行キットとの比較

①法と②法の相関係数は0.867 (P<0.05)、①法と③法の相関係数は0.824 (P<0.05)と、いずれの検査も正の相関性がみられた。また、回帰分析を行い、

最小二乗法で回帰直線及び決定係数を求めたところ、①法と②法での回帰直線は  $y=0.2657x+6.6698$ 、決定係数 0.7521

( $P<0.05$ )、①法と③法での回帰直線は  $y=444.74x+12944$ 、決定係数 0.6783 ( $P<0.05$ ) となった。

①法の絶対定量法では、吸光度測定により DNA 濃度を求め、サンプル中の DNA 量を 1ng に調整し、「BLV 遺伝子量/サンプル中の DNA 1ng」を導き出す。②法及び③法の相対定量法では、定量 PCR よりハウスキーピング遺伝子量を測定し、「BLV 遺伝子量/ハウスキーピング遺伝子量」を導き出す。ハウスキーピング遺伝子は常にほぼ一定量が発現している遺伝子群のため、ハウスキーピング遺伝子量は細胞数に変換でき、「BLV 遺伝子量/細胞数」を導き出す。以上より、絶対定量法と相対定量法では導き出す値の分母が異なる。両定量法が導き出す分母の値を比較するため、今回検討する 24 検体で、DNA 濃度を測定し 1ng に調整し定量 PCR にてハウスキーピング遺伝子量を定量したところ、定量値にはばらつきがみられた (図 3)。

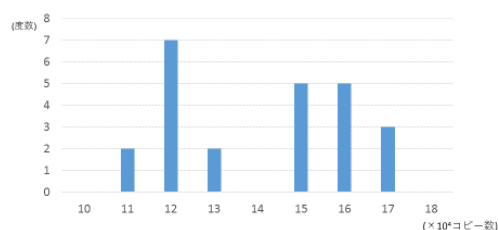


図3 ハウスキーピング遺伝子量の度数分布表

相対定量法での定量 PCR によるハウスキーピング遺伝子量の定量値が正確であるため、絶対定量法での吸光度測定による

調整では、多少のばらつきが生じる可能性が示唆された。以上より、新キットはサンプル間で正確に BLV 遺伝子量を比較でき、従来の絶対定量法より、より高い精度で診断できる可能性が示唆された。

次に、①法におけるリスク分類のための BLV 遺伝子量の基準値が、②法及び③法では、どの値となるかを明らかにするため、統計処理により基準値 (カットオフ値) を設定した。基準値の設定には ROC 曲線を描き、youden index を用いた (図 4)。

リスク分類	ROC曲線下面積 (AUC)	Youden Indexによる基準値 (カットオフ値)	感度・特異度	グラフ
②multiplex法	1～2点の基準値	0.907	感度：0.779 特異度：1	(1)
	2～3点の基準値	0.861	感度：0.833 特異度：0.833	(2)
③CoCoMo法	1～2点の基準値	0.828	感度：0.889 特異度：0.833	(3)
	2～3点の基準値	0.894	感度：0.833 特異度：0.5	(4)

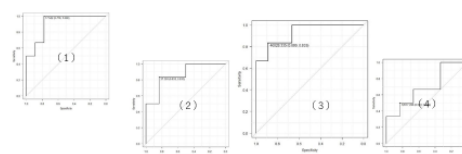


図4 ROC曲線による基準値(カットオフ値)の設定

まず、求められた ROC 曲線下面積 (AUC) より、②法及び③法は、①法と同等にリスク分類できることが示された。基準値の設定には、youden index により求められた基準値に加え、先の回帰分析で求めた回帰直線も活用して、表 2 のとおり設定した。

表2 設定したリスク分類のための基準値

	①cycleave法	②multiplex法	③CoCoMo法
0点	0コピー	0%	0コピー
1点	0-50コピー	0-20%	0-40,000コピー
2点	50-100コピー	20-40%	40,000-80,000コピー
3点	>100コピー	>40%	>80,000コピー

最後に、設定した基準値を実際に当てはめて、②法及び③法における3段階のリスク分類を行い、重み付きカッパ係数から①法との診断の一致度を求めた（表3）。

表3 重み付きカッパ係数による診断の一致度評価

		②multiplex法				③CoCoMo法			
		高リスク	中リスク	低リスク	計	高リスク	中リスク	低リスク	計
①基準法	高リスク	13頭	0頭	0頭	13頭	13頭	0頭	0頭	13頭
	中リスク	0頭	1頭	1頭	2頭	0頭	2頭	0頭	2頭
	低リスク	0頭	1頭	8頭	9頭	0頭	1頭	8頭	9頭
	計	13頭	2頭	9頭	24頭	13頭	3頭	8頭	24頭
重み付きカッパ係数=0.850932					重み付きカッパ係数=0.927052				

①法と②法のカッパ係数は0.850932、①法と③法のカッパ係数は0.927052となり、設定した基準値で①法と同等の診断ができることが示された

相関分析より、①法と②法、①法と③法はともに高い正の相関性を示したため、①法と同等の精度で診断可能なことが示された。②法及び③法の設定した基準値については、高い診断の一致度が確認されたことより、有用と判断した。以上より、②法及び③法は、検査法として有用であり、設定した基準値による診断精度も①法と同程度であると判断された。

### 考察

実際にどのキットを当所に導入するか検討するため、②法及び③法を使って40検体の検査にかかるコスト及び時間を求めた。検査コストは、1検体当たり、②法が1,228円、③法が789円となり、③法のほうが安価であった。検査時間は、②法と③法では作業工程が大きく異なり、③法の作業時間は、②法よりさらに1時間強必要となった（図5）。遺伝子検査は、微量の

クロスコンタミネーションでも検査結果に大きな影響がある点を考慮し、今後は検査工程及び作業時間の少ない②法を主体とすることとした。PCR検査は、標的遺伝子領域に変異があると検出されない場合もあるため、③法の併用も検討していく。

最後に、今後は今回設定した基準値を基にBLV感染牛の的確なリスク分類を実施する。リスク分類によって牛の更新の順序、牛舎内の牛の配置方法、日常の牛の管理の順序などを検討し、飼養者ごとに具体的かつ実効性のある対策指導を行っていく。

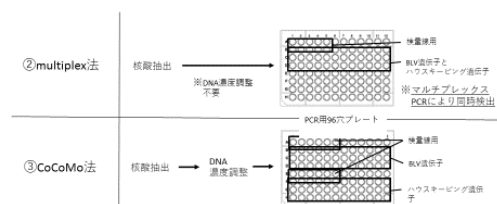


図5 検査工程の比較

### 引用文献

- 1) 竹内美穂 磯田加奈子 藤森英雄: 地方病性牛白血病の清浄化に向けたウイルス学的検査からのアプローチ, 平成27年度東京都家畜保健衛生所業績発表会集録, 37-40 (2015)
- 2) 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, 261-269 (1997)