

公衆衛生

牛白血病ウイルスのリアルタイム PCR 法の検討

○佐々木真紀子¹⁾ 川瀬 遵¹⁾ 吉本佑太²⁾ 安達俊輔¹⁾ 杉橋章義¹⁾

1) 食肉衛生検査所 2) 出雲保健所

1. はじめに：牛白血病は、リンパ節の腫大等の異常を示す疾病であり、牛白血病ウイルス (BLV) の感染による地方病性と原因不明の散発型に分類される。と畜検査で牛白血病と診断された際は、枝肉等は全部廃棄処分とされる。牛白血病の診断は、病理組織検査や補助的診断法として受け身赤血球凝集反応を利用した血清抗体価測定が行われていたが、当該キットが販売中止となった。その他の診断法として、ELISA 法、PCR 法、リアルタイム PCR 法が報告されている。ELISA 法は、取り扱う検体数が少ないため、コスト高となってしまう。リアルタイム PCR 法や PCR 法は、通常、血液サンプルの核酸精製と PCR 反応液の調整を行った後実施するが、当所ではより検査の簡便化が求められている。一方、近年の PCR 試薬の開発によって、未精製の血液から BLV 遺伝子を検出する PCR 法が報告されるようになったが、未精製の血液を使用したリアルタイム PCR 法の報告はなく、今回、未精製の血液サンプルを使用したリアルタイム PCR 法の予備検討を行った。

2. 材料と方法：(1) 模擬検体を用いたリアルタイム PCR 試薬の評価：BLV 非感染の牛血液に BLV の *pol* 遺伝子の配列を含むプラスミドを添加し、 10^5 コピー/ μ l に調整後、DW で 2~200 倍に希釈した。これらをサンプルとして、未精製のサンプルを対象とした 2 種類の試薬、KOD SYBR qPCR Mix (KOD 法) と Ampdirect plus (Amp 法) を使用してリアルタイム PCR を行い、Ct 値を比較した。(2) 模擬検体を使用した Amp 法の検出下限：上記プラスミド (10^0 ~ 10^6 コピー/ μ l) を含む牛血液 (1~10 倍希釈) をサンプルとし、Amp 法を実施した。検量線を作成し、相関係数 (r^2)、増幅効率、検出下限を求めた。(3) 牛血液からの BLV 遺伝子の検出：牛白血病発症牛 3 頭、病畜牛 4 頭、健康牛 3 頭の計 10 頭の血液を DW で 2 倍、4 倍希釈し、Amp 法を実施した。さらに、これらの血液サンプルから核酸を精製し、BLV を検出する市販のリアルタイム PCR キットにより、BLV コピー数を定量した。Amp 法と市販のキットの結果を比較した。(4) 補助的診断法の比較：4 種類の補助的診断法について、検査コストや作業所要時間等を比較した。

3. 結果：(1) 模擬検体を用いた評価：KOD 法において、Ct 値の平均は 32.5~42.3 であり、血液の希釈段階が低いほど Ct 値は高い傾向を示した。Amp 法においては、血液原液~10 倍希釈液での Ct 値の平均は 27.7~29.2 であり、20 倍希釈以降において増加する傾向を示した。Ct 値は、KOD 法と比較して Amp 法で低い傾向がみられたことから、Amp 法は PCR 阻害物質に対する抵抗性が高いと考えられた。(2) 模擬検体を用いた Amp 法の検出下限：血液の 2 倍または 4 倍希釈で検出下限が 10 コピー/ μ l と他の希釈段階と比較して良好な結果を示し、 r^2 は 0.998~0.999、増幅効率は 106.9%~108.3% と適正な範囲であった。(3) 牛血液からの BLV 遺伝子の検出：Amp 法と市販のキットによる結果は一致し、2 法とも 5 検体から BLV 遺伝子を検出した。また、陽性検体の BLV コピー数は 59~2198 コピー/ μ l を示したことから、Amp 法では少なくとも 59 コピー/ μ l までは検出可能であることが確認できた。(4) 補助的診断法の比較：Amp 法は 1 検体あたりのコストが 215 円、作業所要時間が 25 分であり、作業所要時間は他の検査法と比較して短く、リアルタイム PCR 装置があれば、比較的 low コストであると考えられた。

4. 考察：今回の結果から未精製血液サンプルを用いたリアルタイム PCR では、Amp 法が簡便に BLV を検出できる有用な方法となる可能性が示唆された。と畜検査においては、発症牛の発見に用いるため、Amp 法の検出感度で十分であると考えられる。さらに、作業の簡便化、時間の短縮を図るため、PCR 反応液の冷凍ストックについても今後検証予定である。今後のさらなる検討とデータの蓄積によって、牛白血病の精密検査の負担軽減と効率化につなげたいと考える。