

牛ウイルス性下痢と牛伝染性リンパ腫の移動時検査簡素化の検討

○杉江 勇二

1. はじめに

牛ウイルス性下痢（以下、BVD）と牛伝染性リンパ腫（以下、BL）は、導入や預託等の牛の移動時検査の項目になることが多い。本県では、平成30年度からのキャトル・ステーション事業開始以降、両項目のPCR検査頭数が大幅に増加し、検査方法の簡素化が課題となっている（図1）。そこで、今回、核酸簡易抽出法とmultiplex-qPCR法を組み合わせた新法を検討した。

2. 材料と方法

検討した新法は、検体と核酸抽出試薬を混ぜるだけで核酸を抽出（核酸簡易抽出法）し、それをそのままPCR反応液に添加し、multiplex qPCR法でBVDとBLを同時に検出する方法である。この新法における核酸抽出試薬は豚熱とアフリカ豚熱の検査でも用いられているLysis Buffer S（タカラバイオ㈱）を使用し、multiplex qPCR法については、BVDは岩手県の中央家畜保健衛生所の五嶋ら³⁾の手法、BLは島根県家畜病性鑑定室の渡辺ら⁴⁾の手法を参考にした。一方、従来法は、High Pure Nucleic Acid Kit（Roche社）によるカラム精製法で核酸を抽出し、BVDはVilcekら¹⁾の手法、BLはFechnerら²⁾の手法を用いて、合計3回のコンベンショナルPCR法を実施し、電気泳動像をもとに判定している（図2、表1）。

今回、新法を検討するために、以下の前試験（前試験①、②）と従来法との比較検討試験（比較試験①、②）を実施した。また、BVDとBLの検査に要する新法と従来法の検査時間と試薬費用を算出し比較した。

1) 前試験①：新法のPCR法でBVDとBLの同時検出の可否の確認

- ・材料：ウイルスコピー数が不明なBVDワクチン株（BVD1型：NOSE株、BVD2型：KZ-91CP株）とBL野外株の核酸をNOSE株とBL野外株、KZ-91CP株とBL野外株の組み合わせで、それぞれ混合し10倍段階希釈したサンプル
- ・方法：上記のサンプルを用いて、新法のPCR法でBVDとBLの同時検出を実施

2) 前試験②：新法のPCR法におけるmultiplex-qPCR法とsingle-qPCR法との違いによるBVDとBLの検出感度の差とmultiplex-qPCR法の特異性の確認

- ・材料：ウイルスコピー数が不明なBVDワクチン株（BVD1型：NOSE株、BVD2型：KZ-91CP株）とBL野外株の核酸をそれぞれ10倍段階希釈したサンプル
- ・方法：上記のサンプルを用いて、新法のPCR法でBVDとBLのmultiplex-qPCR法とsingle-qPCR法を実施

3) 比較試験①：従来法と新法のPCR法の違いによる検出感度の差

- ・材料：前試験②と同様に調製したサンプル
- ・方法：上記のサンプルを用いて、新法のsingle-qPCR法と従来法のPCR法を実施し、両者の検出感度を比較

4) 比較試験②：核酸簡易抽出法とカラム精製法の違いによる検出感度の差

- ・材料：BVDについては、BVDワクチン株（BVD1型：NOSE株、BVD2型：KZ-91CP株）の培養上清を牛の血清または白血球懸濁液で、ウイルス力価 $10^{-1} \sim 10^4$ TCID₅₀/mlに調製したサンプル

BLについては、BL陽性白血球懸濁液をBL陰性白血球懸濁液で10倍段階希釈したサンプル

- ・方法：上記のサンプルから核酸簡易抽出とカラム精製法で核酸を抽出し、新法の single-qPCR 法を実施し、それぞれの検出限界値と Ct 値を比較

3. 結果

- 1) 前試験①：新法の multiplex qPCR 法で BVD と BL の同時検出は可能であった (表 2)。
- 2) 前試験②：新法の PCR 法における multiplex-qPCR 法と single-qPCR 法との違いによる BVD と BL の検出感度に差はなく、multiplex-qPCR 法は特異的に BVD と BL を検出可能であった (表 3)。
- 3) 比較試験①：BVD と BL の検出感度について、新法の PCR 法は従来法の PCR 法と同等以上の検出感度であった (表 4)。
- 4) 比較試験②：PCR 反応液に添加する量が $2\mu\text{l}$ と同じ場合、核酸簡易抽出法はカラム精製法より Ct 値が高く、検出感度が劣る結果であったが、BVD の血清および白血球を用いた試験では検出限界値 (検出可能な最小ウイルス力価) に差はなかった (表 5)。しかし、BL の白血球を用いた試験では検出限界値 (検出可能な最小プロウイルス量 (参考値)) も劣る結果であった (表 7)。改善案として、核酸簡易抽出法で抽出した核酸について、PCR 反応液に添加する量を $2\mu\text{l}$ から $6\mu\text{l}$ に増やしたところ、BVD についてはカラム精製法と同等以上の Ct 値となり、検出感度が改善した (表 6)。さらに、BL についてはカラム精製法と同等以上の Ct 値までには改善しなかったものの、検出限界値が改善され、参考値の最小値である 15.6 コピー数/ 10^5 細胞まで検出できた (表 7)。
- 5) 新法と従来法の検査時間と試薬費用の算出と比較：
BVD と BL を検査した場合、従来法が 1 検体あたり検査時間 300 分、試薬費用 1,149 円であり、新法が 1 検体あたり検査時間 160 分、試薬費用 495 円であった (図 3)。

4. 考察

今回、検討した新法の qPCR 法は、BVD と BL を同時でも単独でも検出可能であり、従来のコンベンショナル PCR 法と同等以上の検出感度があった。また、PCR 反応液に添加する量が $2\mu\text{l}$ と同じ場合、核酸簡易抽出法は、カラム精製法より検出感度が落ちる結果であったが、PCR 反応液に添加する核酸量を通常時の $2\mu\text{l}$ から $6\mu\text{l}$ に増やすことで、検出感度の改善ができた。また、BVD の持続感染牛の血清中の BVD ウイルス力価は $10^2 \sim 10^6 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ との報告⁵⁾があり、今回の血清および白血球を用いた比較試験においても、新法で BVD ウイルス力価が $10^2 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ のサンプルで BVD 特異遺伝子の検出が可能であった。さらに、BL の比較試験において、参考値ではあるが、新法は 15.6 コピー数/ 10^5 細胞と低コピー数のウイルス量でも検出が可能であったことより、新法は普通の BVD と BL の検査に適応できると考えられた。そして、新法は従来法と比較して BVD と BL の検査に要する検査時間の短縮と試薬費用の削減が望めた。

以上より、新法は従来法と比べ検査手技が簡便で、牛の移動時の BVD と BL の検査に適応でき業務の効率化も図れると考えられた。

5. 参考文献

- 1) S.Vilcek, et al.: Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis, Archives of Virology, 136, 309-323(1994)
- 2) H.Fechner, et al.: Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to serological status of naturally infected cattle, Virology, 237(2), 261-269(1997)
- 3) Y.Goto, et al.: Design of multiplex quantitative reverse transcription-PCR system to simultaneously detect 16 pathogens associated with bovine respiratory and enteric disease, Journal of Applied microbiology, 129(4), 832-847(2020)
- 4) 渡邊ら: 新たな定性的 BLV 遺伝子検査の開発, 令和2年度島根県家畜保健衛生業績発表
- 5) 公益社団法人中央畜産会: 「牛ウイルス性下痢・粘膜病」, 2017年3月出版

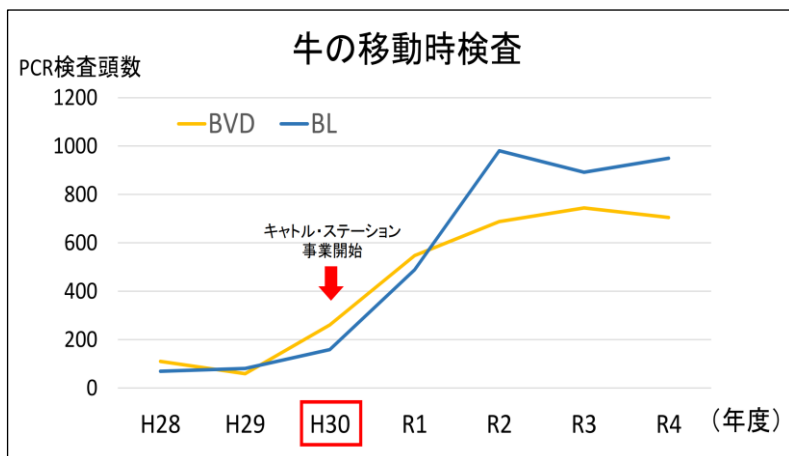


図1. 滋賀県での牛の移動時における BVD と BL の PCR 検査頭数の推移

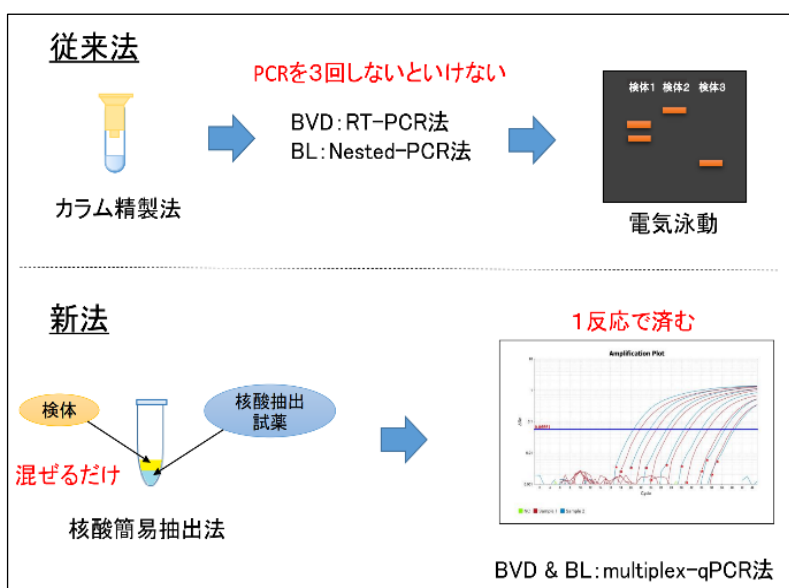


図2. 従来法と新法の比較

表 1. 従来法と新法に用いる検査試薬と手法

	核酸抽出 キット/試薬	PCRキット	プライマー/プローブ
従来法	Roche社 High Pure Nucleic Acid Kit	◆BVD タカラバイオ(株) PrimeScript One-Step RT-PCR ver.2 (Dye Plus) ◇BL タカラバイオ(株) TaKaRa Ex Premier DNA Polymerase	◆BVD Vilcek S. et al. (1994) ◇BL Fechner H. et al. (1997)
新法	タカラバイオ(株) Lysis Buffer S	◆BVD & ◇BL タカラバイオ(株) One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix, with UNG	◆BVD Y.Goto (Design of multiplex quantitative reverse transcription-PCR system to simultaneously detect 16 pathogens associated with bovine respiratory and enteric diseases) ◇BL 渡邊ら(令和2年度島根県家畜保健衛生業績 発表「新たな定性的BLV遺伝子検査の開発」)

表 2. multiplex-qPCR 法での BVD と BL の同時検出

核酸		multiplex	
ウイルス	希釈倍率	BVD	BL
BVD1型 + BL	10 ⁰	21.0	25.6
	10 ⁻¹	24.2	28.9
	10 ⁻²	27.3	32.1
	10 ⁻³	30.9	36.4
	10 ⁻⁴	34.5	—
	10 ⁻⁵	37.3	—
BVD2型 + BL	10 ⁰	18.7	25.3
	10 ⁻¹	21.7	28.5
	10 ⁻²	25.0	31.7
	10 ⁻³	28.5	35.1
	10 ⁻⁴	31.9	—
	10 ⁻⁵	34.8	—

数値:Ct値 ー:検出限界以下

表 3. multiplex-/single-qPCR 法の比較

核酸	ウイルス	希釈倍率	multiplex		single		増幅曲線 (赤:multiplex、青:single)
			BVD	BL	BVD	BL	
BVD 1型		10 ⁻³	28.7	—	28.8	NT	
		10 ⁻⁴	32.0	—	31.8	NT	
		10 ⁻⁵	35.5	—	35.5	NT	
		10 ⁻⁶	38.6	—	—	NT	
		10 ⁻⁷	—	—	—	NT	
BVD 2型		10 ⁻³	26.8	—	26.8	NT	
		10 ⁻⁴	30.1	—	30.2	NT	
		10 ⁻⁵	33.3	—	33.4	NT	
		10 ⁻⁶	36.8	—	36.7	NT	
		10 ⁻⁷	37.4	—	39.2	NT	
BL		10 ⁰	—	28.6	NT	28.4	
		10 ⁻¹	—	31.8	NT	31.6	
		10 ⁻²	—	34.6	NT	34.6	
		10 ⁻³	—	—	NT	—	

数値:Ct値 ー:検出限界以下 NT:未実施

表 4. 従来法と新法の PCR 法による検出感度の比較

標的遺伝子	核酸の希釈倍率	従来の PCR法	single-qPCR法 (平均Ct値)	従来のPCR法:電気泳動像
BVD 1型	10 ⁻⁴	+	+(31.8)	
	10 ⁻⁵	+	+(34.8)	
	10 ⁻⁶	+	+(38.5)	
	10 ⁻⁷	-	※	
	10 ⁻⁸	-	-	
BVD 2型	10 ⁻⁴	+	+(29.6)	
	10 ⁻⁵	+	+(33.0)	
	10 ⁻⁶	±	+(36.5)	
	10 ⁻⁷	-	※	
	10 ⁻⁸	-	-	
BL	10 ⁰	+	+(30.8)	
	10 ⁻¹	+	+(34.1)	
	10 ⁻²	-	※	
	10 ⁻³	-	※	

- : 検出限界以下 ※ 蛍光非検出時あり

表 5. 核酸抽出方法の違いによる BVD 遺伝子検出感度

標的遺伝子	ウイルスカ価 (TCID ₅₀ /ml)	血清		白血球懸濁液	
		カラム精製	簡易抽出	カラム精製	簡易抽出
BVD 1型	10 ⁴	25.0 <	26.4	25.2 <	26.7
	10 ³	28.5 <	29.8	28.7 <	31.0
	10 ²	31.5 <	32.9	32.0 <	33.5
	10 ¹	35.1 <	36.1	35.2 <	37.0
	10 ⁰	38.8 >	38.0	38.6 <	39.7
	10 ⁻¹	40.2 <	-	-	-
BVD 2型	10 ⁴	27.0 <	27.9	26.9 <	27.8
	10 ³	30.5 <	31.4	30.1 <	31.6
	10 ²	33.9 <	35.2	34.0 <	35.2
	10 ¹	38.5 >	37.9	35.7 <	37.3
	10 ⁰	40.5 >	40.0	38.9 <	40.2
	10 ⁻¹	-	-	-	-

数値:Ct値 - : 検出限界以下
 ※BVD持続感染牛の血清中ウイルス量は10²~10⁶TCID₅₀/mlとの報告がある

表 6. 核酸添加量の違いによる BVD 遺伝子検出感度

標的遺伝子	ウイルスカ価 (TCID ₅₀ /10ml)	白血球懸濁液			
		カラム精製	簡易抽出		
			核酸添加量 2μl	核酸添加量 2μl	核酸添加量 4μl
BVD 1型	10 ²	32.4	33.4	32.5	31.4
	10 ¹	34.9	37.2	36.4	35.0
	10 ⁰	38.6	-	39.0	37.7
	10 ⁻¹	-	-	-	-
BVD 2型	10 ²	33.2	34.9	33.9	32.5
	10 ¹	36.7	38.3	36.7	36.0
	10 ⁰	38.2	-	-	38.6
	10 ⁻¹	-	-	-	-

数値:Ct値 - : 検出限界以下

表 7. 核酸抽出方法と核酸添加量の違いによる BL 遺伝子検出感度

標的 遺伝子	希釈倍率	※参考値 copies/ 10 ⁵ 細胞	白血球懸濁液			
			カラム精製	簡易抽出		
			核酸添加量 2μl	核酸添加量		
			2μl	4μl	6μl	
BL	10 ⁰	2645.0	26.9	30.5	30.0	29.4
	10 ⁻¹	1239.0	29.8	32.7	31.9	31.1
	10 ⁻²	122.3	32.8	35.6	34.9	34.8
	10 ⁻³	15.6	35.2	—	36.7	36.5
	10 ⁻⁴	—	38.7	—	—	—
	10 ⁻⁵	—	—	—	—	—

※CoCoMo-BLV検出キットを使用 数値:Ct値 ー:検出限界以下

図 3. 従来法と新法の検査時間と試薬費用の比較

