短　報

牛白血病ウイルスの簡易迅速PCR法の検討

三角加奈子[1)†]　日高　舞[1)]　笑喜東洋一[2)]　尾堂憲司[3)]　田邊　隆[1)]

1）鹿児島市食肉衛生検査所（〒891-0144　鹿児島市下福元町7852）
2）鹿児島市産業局農林水産部（〒891-0194　鹿児島市谷山中央4-4927）
3）鹿児島市健康福祉局保健所（〒892-8677　鹿児島市山下町11-1）

（2020年2月21日受付・2020年6月8日受理）

要　約

牛白血病のうち，地方病性牛白血病（以下，EBL）は牛白血病ウイルス（以下，BLV）の感染に起因して発生する．従来，ELISAによる抗BLV抗体検出によりBLV感染の確認を行っていたが，PCRによる新たなBLV検出法を検討した．組織の採取に白金耳を用い，DNA熱抽出法と既報のプライマーを用いたシングルPCRを組み合わせたPCR法（以下，白金耳法）を考案し，手技の簡易化・迅速化を図った．PCR産物の遺伝子解析では，既知のBLV遺伝子と99.55％の一致を認め，白金耳法のBLV検出精度が確認された．また，EBL症例，散発性牛白血病症例，陰性対照牛全個体におけるnested PCRと白金耳法のBLV検出結果はカッパ係数0.82と高い一致度を示した．以上の結果から，白金耳法はBLV検出法として有用であると考えられた．――キーワード：牛白血病ウイルス，白金耳，PCR.

日獣会誌　73，741～745（2020）

牛白血病は，牛白血病ウイルス（以下，BLV）に起因する地方病性牛白血病（以下，EBL）とBLVの関与しない散発性牛白血病（以下，SBL）に大別される［1］．発生のほとんどをウイルス性のEBLが占めており，全国的なBLVのまん延に伴い，牛白血病の発生頭数は増加の一途をたどっている．

BLV感染の確認は，おもにBLV遺伝子の検出や抗BLV抗体の検出により行われている［2］．本市においても，従来，抗BLV抗体検出キット（牛白血病エライザキット，JNC㈱，東京）を用いたELISAでBLV感染の有無を確認していた．しかし，本キットは本来，農場における全頭検査などを目的としており，少頭数の検査では1頭当たりの検査コストが高くなる［2］ことから，今回，コスト面で優れているPCR法への移行を検討した．PCR法の中でもFechnerら［3］のプライマーを用いたnested PCRは感度が高く，BLV検出法として広く用いられているが，2回のPCR反応を必要とするため，時間と労力を要する［4］．また，組織からのDNA抽出には一般的に市販のDNA抽出キットが用いられているが，手技が煩雑で検査にかかる負担が大きい［5］．そこで，新たなBLV検出法として，組織の採取に白金耳を用い，DNA熱抽出法と既報のプライマー［4］を用いたシングルPCRを組み合わせたPCR法（以下，白金耳法）を考案し，BLV検出にかかる手技の簡易化・迅速化を試みた．本論文では，白金耳法のBLV検出法としての有用性の検討を行ったので，その概要を報告する．

材料及び方法

症例：平成30年10月から令和元年12月までに本市と畜場に搬入された牛のうち，解体所見，血液所見，病理組織検査所見及びELISA検査結果などを総合して判定したEBL症例50頭及びSBL症例2頭を用いた．また，と畜検査に合格した30カ月齢以下の健常牛のうち，ELISA陰性の牛14頭を対照（以下，対照牛）として用いた．なお，EBL症例は，解体検査においてリンパ節の腫脹，臓器における腫瘤形成などの牛白血病を疑う所見が認められ，病理組織検査で病変部にリンパ芽球様腫瘍細胞のび漫性増殖を確認したもので，ELISA陽性を示した症例を対象とした．SBL症例は，胸腺に一致する部位に腫瘤を認め，免疫組織検査により病変部の腫瘍細胞がCD3陽性・CD79α陰性のTリンパ球由来であ

† 連絡責任者：三角加奈子（鹿児島市食肉衛生検査所）
〒891-0144　鹿児島市下福元町7852　☎099-262-2116　FAX 099-262-4940
E-mail : misumi-k00@city.kagoshima.lg.jp

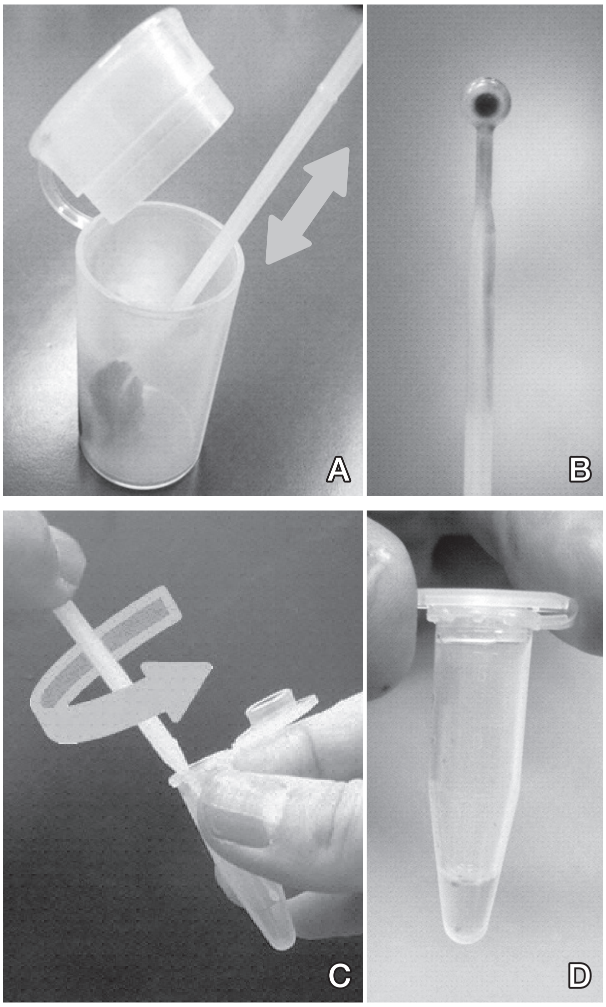

図1　白金耳による採材手順
A：組織片に白金耳を穿刺する．
B：先端のループに膜が張る程度に組織を採取する．
C・D：蒸留水100μlに懸濁する．

ることを確認した症例を対象とした．

白金耳法の概要：病変部，内腸骨リンパ節，及び脾臓にディスポーザブルプラスチック白金耳（イノキュレーションループ1μl，ザルスタット㈱，東京）（以下，白金耳）を穿刺して，先端のループの中に膜が張る程度に組織を採取した後（図1A，B），滅菌蒸留水100μlに懸濁した（図1C，D）．ヒートブロックで95℃，10分間熱処理した後，12,000rpmで5分間遠心分離し，その上清をDNAテンプレートとした．プライマーは，Nishimoriら［4］の報告に従い，BLVプロウイルスのpol領域をターゲットとした以下のものを使用した．

PV2-F：5'-ACTTTCAGACCCCCTTGACTGACA-3'
PV2-R：5'-AAACCTCTGCCCTGGTGATTAAGG-3'

PCR酵素にはプレミックスタイプのPCR試薬（EmeraldAmp® PCR Master Mix，タカラバイオ㈱，滋賀）を用い，記載の分量で調整した（表1）．反応条件は

表1　PCR反応液の組成

DW	10.9μl
EmeraldAmp PCR Master Mix（2×Premix）	12.5μl
PV2-F	0.3μl
PV2-R	0.3μl
テンプレート	1.0μl
合　計	25.0μl

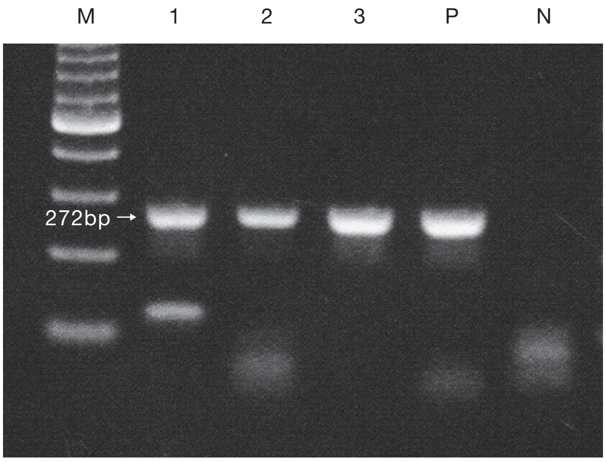

図2　BLVプロウイルスのPCR電気泳動像
M：100bp DNA Ladder（タカラバイオ㈱，滋賀）
1：心臓　　2：内腸骨リンパ節
3：脾臓　　P：陽性コントロール
N：陰性コントロール

Nishimoriら［4］の報告に従い，94℃2分の熱変性の後，94℃15秒，68℃50秒を1サイクルとして45サイクルとした．PCR産物を100Vで35分間電気泳動し，採材部位のいずれかにおいて272bpの位置にバンドを認めたものを，BLVプロウイルス陽性と判定した（図2）．採材から判定までの所要時間は，2時間30分であった．

PCR産物の検証：白金耳法により得られたPCR産物の遺伝子解析を行い，既知のBLV遺伝子との一致度を確認した．EBL症例，SBL症例及び対照牛については，白金耳法とnested PCRで検査を実施し，両方の判定結果を比較した．

統計的手法：今回検証に用いた全個体（66頭）におけるnested PCRと白金耳法とのBLVプロウイルス検出結果の一致度について，Landisら［6］の報告に従ってカッパ係数を算出し，評価した．

結　　果

白金耳法により得られたPCR産物の遺伝子解析では，BLVpvAJ030株（GenBankアクセッション番号：AP019594.1）と99.55%一致することを確認した．

EBL症例（50頭）では，nested PCRにおいて50頭全頭（検出率100%）でPCR陽性となったのに対し，

表2　EBL症例におけるPCR結果

	PCR結果	nested PCR	白金耳法
EBL症例（50頭）	陽性数（頭）	50	49
	陰性数（頭）	0	1

表3　各臓器におけるBLV遺伝子の検出率

	nested PCR			白金耳法		
	病変部	内腸骨Ly	脾 臓	病変部	内腸骨Ly	脾 臓
検出率（%）	96	100	98	96	98	90

表4　SBL症例におけるELISA及びPCR結果

	ELISA	nested PCR			白金耳法		
		病変部	内腸骨Ly	脾 臓	病変部	内腸骨Ly	脾 臓
症例1	+	+	+	+	+	+	+
症例2	−	−	−	+	−	−	−

白金耳法では50頭中49頭（検出率98%）で陽性となった（表2）．各臓器における検出率はnested PCRでは病変部96%，内腸骨リンパ節100%，脾臓98%となったのに対し，白金耳法では病変部96%，内腸骨リンパ節98%，脾臓90%であった（表3）．nested PCRに比べて検出感度がやや劣る臓器はあったものの，白金耳法により各部位から高率にBLV遺伝子を検出した．

SBL症例（2頭）では，症例1はELISA・白金耳法・nested PCRすべて陽性となり，症例2ではELISA・白金耳法陰性に対してnested PCR陽性となった（表4）．

ELISA陰性の対照牛（14頭）では，白金耳法は全頭陰性となったが，nested PCRでは2頭で陽性となった．

今回検証に用いた全個体（66頭）におけるnested PCRと白金耳法のBLV検出結果（表5）はカッパ係数0.82と高い一致度を示した．

考　　察

今回，新たなBLV検出法として白金耳法を考案し，有用性を検討した．白金耳はおもに微生物の移植に用いられるが，定量白金耳は湿菌体や培養液の量を大まかに量る目的でも使用される．そこで本研究では，白金耳を用いて，一定量の組織の採取を試みた．予備試験において白金耳を穿刺して得られる組織量を計量したところ，0.80±0.32mg（n＝50）となった．特に，採材量が少なかった0.35～0.45mgの5検体を用いて行ったPCRがすべて陽性となったことから，白金耳で採取される組織量はPCR材料として十分量であると判断した．白金耳

表5　nested PCR及び白金耳法による全個体からのBLVプロウイルス検出結果

		白金耳法		
		陰 性	陽 性	合 計
nested PCR	陰 性	12[a]	0	12
	陽 性	4[b]	50[c]	54
	合 計	16	50	66

a：対照牛12頭
b：EBL 1頭，SBL 1頭，対照牛 2頭
c：EBL 49頭，SBL 1頭

による採材は，穿刺するだけで一定量の組織を採取可能で簡便なうえに，材料とする組織片の計量も不要であるため，採材工程の迅速化が図られた．また，組織を材料としたPCRにおけるDNA抽出には，一般的に市販のDNA抽出キット（たとえば，Nucleospin® Tissue Kit, MACHEREY-NAGEL社，Germany）が用いられているが，組織の破砕・複数回の洗浄・遠心分離を必要とするなど手技が煩雑で，所要時間も1時間以上を要する．白金耳法では組織の破砕処理は不要で，DNA抽出は手技が簡便な熱抽出法を採用したため，所要時間も15分程度に短縮できた．PCR工程では，反応液調整の省力化のためにプレミックスタイプのPCR試薬を使用し，PCR反応が2回必要なnested PCRではなく，既報で高い特異性を示したプライマーを用いてシングルPCRを行うことで，PCR反応にかかる所要時間を5時間から1時間30分に短縮することができた．

以上，これらの手技を組み合わせることで，全工程の所要時間は6時間30分から2時間30分となった．また，工程の省略が経費の削減にもつながり，1検体当たりの試薬にかかる経費は，ELISA約3,000円，nested PCR約2,000円に対し，白金耳法は約500円となった．

本市でEBLと判定した症例において，白金耳法はnested PCRと同様に，高率にBLV遺伝子を検出した．EBL発症牛ではリンパ節や脾臓でプロウイルス量が有意に増加していること［7］が報告されており，白金耳による限られた採材量でもPCRで検出可能となるのに十分なプロウイルス量が採取できていると考えた．今回検証に用いたEBL症例50頭のうち，1頭で白金耳法陰性となった．この症例では，肉眼的に腫瘍塊の広範囲で自壊を認めており，nested PCRにおいても内腸骨リンパ節からのみBLVプロウイルスが検出され，病変部，脾臓では不検出であった．組織の自壊に伴い，壊死でDNAの分解がおこり，PCRで検出できなかった可能性がある．白金耳による採材の際には自壊部分を避け，場合によっては追加の採材を行うことが必要であると考えられた．

SBL症例における検証では，症例1，2ともにBLV

プロウイルスが検出された．今回検証に用いたSBL症例は，免疫組織検査によりTリンパ球由来の腫瘍であることを確認した症例であり，腫瘍の発症はBLV感染に起因したものではないと考えられる．今般のBLVのまん延によりBLV感染を認めるEBL以外の腫瘍症例が報告されており［8］，今回SBL症例1及び2からBLVプロウイルスが検出されたのも，偶発的な感染によるものと考えられた．

症例2ではELISA陰性・nested PCR陽性となったことから，抗体価上昇前の感染初期の症例であることが示唆された［2］．BLVプロウイルス量は，ウイルス感染後，無症状キャリア，持続性リンパ球増多症，そして発症へ進行するに伴って増加していく［9］．nested PCRはBLV感染牛のうち感染初期の低プロウイルス量であってもBLVプロウイルスを検出することが報告されており［4］，症例2でnested PCR陽性・白金耳法陰性となったのは，感染初期でプロウイルス量が十分に上昇しておらず，nested PCRでのみ検出された可能性が考えられた．症例2と同様に，ELISA陰性の対照牛においてもnested PCR陽性・白金耳法陰性の抗体価上昇前の感染初期と思われる個体が2頭認められ，nested PCRの感度の高さが改めて示された．

以上のSBL症例及び対照牛の結果から，BLV感染初期における白金耳法のBLV検出感度不足が示唆されたが，白金耳法はあくまでもEBL判定の一助とするものであり，発症前のわずかなBLV感染まで検出する感度は必ずしも必要としていない．EBL症例における白金耳法のBLV検出感度はnested PCRとほぼ同等であり，検査精度としては十分であると考える．

近年，リアルタイムPCRによる定量PCRを用いたEBL発症牛の摘発の試みが多くの検査機関で行われ，牛白血病補助診断としての有用性が示されている［10］．しかし，本市を含め，リアルタイムPCR装置を所有していない検査所もいまだに数多い．白金耳法は手技が簡便で特別な機器を必要としないため，BLV検出法として多くの検査所で導入可能である．牛白血病を疑った保留検査頭数は今後いっそう増加していくと考えられるため，安価で簡便迅速な白金耳法をEBL判定に活用することで検査業務の負担軽減が期待できる．今後もさまざまな症例で白金耳法を実施し，解体所見や病理組織検査結果と総合的に判断することで，より正確な判定につなげていきたい．

引 用 文 献

［1］ Kettmann R, Burny A, callebaut I, Droogmans L, Mammerickx M, Willems L, Portetelle D : Bovine leukemia virus, The Retroviridae, Levy J, ed, 3, 39-81, Plenum Press, New York (1994)

［2］ 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（増刊号），221-226（2016）

［3］ Fechner H, Blankenstein P, Looman AC, Elwert J, Geue L, Albrecht C, Kurg A, Beier D, Marquardt O, Edner D : Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle, Virology, 237, 261-269 (1997)

［4］ Nishimori A, Konnai S, Ikebuchi R, Okagawa T, Nakahara A, Murata S, Ohashi K : Direct polymerase chain reaction from blood and tissue samples for rapid diagnosis of bovine leukemia virus infection, J Vet Med Sci, 78, 791-796 (2016)

［5］ 大西広輔，板谷　巧，服部賢吾，森越真梨恵，木村宏之，迫　陽子，喜井維大，宮根和弘：組織を材料とするダイレクトPCR法を用いた牛白血病ウイルスの迅速検査法の検討，獣医公衆衛生研究，21，62-65（2018）

［6］ Landis JR, Koch GG : The measurement of observer agreement for categorical data, Biometrics, 33, 159-174 (1977)

［7］ Somura Y, Sugiyama E, Fujikawa H, Murakami K : Comparison of the copy numbers of bovine leukemia virus in the lymph nodes of cattle with enzootic bovine leukosis and cattle with latent infection, Arch Virol, 159, 2693-2697 (2014)

［8］ 萩原昌代，斉藤守弘，石川義春，門田耕一：白血病ウイルス感染牛におけるリンパ系腫瘍の組織学的検討，日獣会誌，67，199-203（2014）

［9］ Jimba M, Takeshima S, Matoba K, Endoh D, Aida Y : BLV-CoCoMo-qPCR: Quantitation of bovine leukemia virus proviral load using the CoCoMo algorithm, Retroviology, 7, 91 (2010)

［10］ 宗村桂子，小川　仁，杉山恵美，藤川　浩，村上賢二：東京都におけると畜牛の地方病性牛白血病発生状況と牛白血病ウイルス浸潤状況，日獣会誌，67，523-528（2014）

Examination of Simple and Rapid PCR Method for Bovine Leukemia Virus

Kanako MISUMI[1)†], Mai HIDAKA[1)], Toyokazu SHOGI[2)], Kenji ODO[3)]
and Takashi TANABE[1)]

1) *Kagoshima City Meat Inspection Center, 7852 Shimofukumoto-cho, Kagoshima, 891-0144, Japan*
2) *Kagoshima City Taniyama Agriculture and Forestry Division, 4-4927 Taniyama Chuo, Kagoshima, 891-0194, Japan*
3) *Kagoshima City Environmental Health Division, 11-1 Yamashita-cho, Kagoshima, 892-8677, Japan*

SUMMARY

Enzootic bovine leukosis (EBL) is caused by bovine leukemia virus (BLV). To detect BLV, we investigated a simple rapid inspection method using PCR with heat-extracted DNA from the tissues collected by disposable loops (loop method). In the genetic analysis, the PCR products showed a homology of 99.55% with the known BLV gene, confirming the accuracy of the loop method as a BLV detection system. The comparative analysis of BLV detection between nested PCR and the loop method in EBL cases, sporadic bovine leukemia cases, and negative control cattle, showed almost perfect agreement with a kappa value of 0.82. These results indicate that the loop method would be useful as a BLV detection method.

—— Key words : bovine leukemia virus, disposable loop, PCR.

† *Correspondence to : Kanako MISUMI (Kagoshima City Meat Inspection Center)*
7852 Shimofukumoto-cho, Kagoshima, 891-0144, Japan
TEL 099-262-2116　FAX 099-262-4940　E-mail : misumi-k00@city.kagoshima.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 73, 741～745 (2020)