

10. 地方病性牛白血病 (EBL)の清浄化を目指した簡便なリアルタイムPCR (RT-PCR)法の検討

大分家畜保健衛生所

○病鑑 長岡健朗、病鑑 壁村光恵、(病鑑) 内田雅春

【はじめに】 EBLは牛白血病ウイルス (BLV)により起こされる伝染病である。北欧諸国等ではその清浄化に成功しているのに対し、我が国では過去10年の間にEBLの発生頭数は年々増加している。本県では特定疾病リスク低減対策事業としてハイリスク牛の摘発を中心としたEBL対策を行ってきた。本年7月の担当者会議で、今後は陰性牛群を拡大することにより農場清浄化を目指すこととした。陰性牛群を確認するためには、抗体検査より遺伝子検査の方が検出時期も早く、移行抗体の影響も受けないことから優れるが、従来行っていた方法 (従来法) では、DNAの抽出に労力・時間がかかるため、検査可能な検体数が限られてしまっていた。そこで、DNA抽出を行わないRT-PCR法を検討したので報告する。

【材料】 試験1. 予備試験：様々なプロウイルス量が想定された血液10検体

試験2. EBL高度浸潤が疑われ全頭検査を行った農場由来の血液56検体

試験3. 清浄化取組中の農場2戸由来の血液

【方法】 血液 $20\mu\text{l}$ とプロテアーゼK (150ng/mL) $40\mu\text{l}$ を混和し 56°C で処理した後に、この $2\mu\text{l}$ を $8\mu\text{l}$ の蒸留水と混和、 99.9°C でプロテアーゼKを不活化した。このチューブに2倍濃度のPCR反応液 $10\mu\text{l}$ を加え、5～8サイクルのPCR反応を行った。この反応物の遠心上清をテンプレートにしてRT-PCR (タカラCycleave®PCR)を行った。すべての検体は従来法と本法で、また試験1ではさらにコンベンショナルPCRで検査し比較した。

【成績】 試験1. 従来法と本法の成績は概ね相関し、相関係数は0.749だった。感度はコンベンショナルPCRのNestedPCRがRT-PCRよりやや優れた。

試験2. 従来法と本法の相関は低かったが、陰性・陽性は、ほぼ一致した。従来法で陰性の17検体は本法でもすべて陰性であり、一方、本法で陰性で従来法が陽性であったものは3検体だった。それらはすべてコピー数が低値 (最大79.67 Ct^{-})であり、うち1検体は偽陽性の可能性があった。

試験3. 陽性農場で現在清浄化取組み中のA農場では、陰性牛群で現時点で2頭の陽性牛が摘発された。今回あらたに清浄化取組み農場としたB農場では全頭 (26頭) 陰性であった。陰性、陽性の検査結果は従来法と本法ですべて一致した。

【考察】 本法によりRT-PCR法に要する労力とコストを大幅に下げることができるので、全頭検査等多検体の検査を頻回を行うことが可能である。頻回の検査を行うことができれば陽性牛と陰性牛の隔離がすみやかに行え、あらたな陽転を防ぐことができるとともに、感染原因の特定の一助にもなると考えられる。一方、試験2に見られるように、定量検査としては、従来法と差が出る場合もあり、また感度ではNestedPCRの方がやや優れるので、状況に応じてこれら検査法を使い分けることにより、BLV清浄化に向けての大きなツールになるものと思われる。