

II 調查研究成績

1 牛白血病ウイルス遺伝子検査における DNA 抽出法の比較検証

県中央家畜保健衛生所

大竹祥紘、米山州二、中村真弓、井上恭一

はじめに

牛白血病ウイルス(BLV)は、悪性のリンパ腫である地方病性牛白血病の原因ウイルスとして知られており、感染後はプロウイルスとして感染細胞の染色体に組み込まれ、生涯にわたって感染が持続する。BLVは我が国の牛群に広く浸淫しており、平成21～22年に実施された全国調査では肉用牛の28.7%、乳用牛の40.9%がBLVに対する抗体を保有していることが確認されている。感染牛を摘発するための方法としては、現在、抗体検査や遺伝子検査が主に用いられている。しかし、抗体検査のみでは感染初期の摘発が困難であること、移行抗体の影響を受けること等から、より精度の高い検査法である遺伝子検査を実施せざるを得ない。遺伝子検査には、感染の有無のみを判定する定性検査と、感染牛が保有しているプロウイルス量を測定することで、他個体への伝播リスクの推定等が可能な定量検査がある。しかし、当該検査は1検体当たりにかかる費用が大きいうえ、検査対象となるのはプロウイルス遺伝子であるため、ゲノムDNA(以下、DNA)を検査対象とする必要があり、操作が煩雑で長時間を要することから、特に多検体の場合には敬遠される傾向にある。そこで、遺伝子検査の簡便化を目的として、検査に供するDNAの抽出法に着目し、各種方法について比較した結果、より効率的に遺伝子検査が実施可能であると考えられたので、概要を報告する。

材料及び方法

1 検査材料

BLVの感染状況を把握済みの乳牛12頭(うちBLV感染牛9頭)から、EDTA-2Na入り採血管で採取した血液を用いた。採取した血液は、全血、塩化アンモニウム処理によって全血から分離した末梢血単核球(以下、PBMC)、全血を遠心分離後に採取したバフィーコート(以下、BC)の3種類の状態にし、以下の方法でDNA抽出を実施した。なお、全血は200 μ L、PBMCは106個をDNA抽出に供し、全ての方法でDNA溶出液は50 μ Lとした。

2 DNA抽出法

(1)カラム法

DNA抽出キット(DNeasy Blood & Tissue Kit, (株)キアゲン, 東京)を用いて、全血及びPBMCから全自動核酸抽出機(QIAcube, (株)キアゲン, 東京)によってDNAを抽出した。

(2)磁性粒子(以下、MB)法

DNA抽出キット(MagDEA® Dx S, プレシジョン・システム・サイエンス(株), 千葉)を用いて、全血及びPBMCから全自動核酸抽出機(magLEAD 6gC, プレシジョン・システム・サイエンス(株), 千葉)によってDNAを抽出した。

(3)凝集分配(以下、AP)法

DNA抽出キット(SepaGene®, 積水メディカル(株), 東京)を用いて、マニュアルに従って全血及びPBMCからDNAを抽出した。

(4)アルカリ熱抽出(以下、AHE)法

PBMCを水酸化ナトリウム(50mM)45 μ Lで加熱溶解(95～100℃、10分)した後、Tris-

HCL(1M)を5 μ L加え、遠心(15,000 \times g、5分)後に上清を回収した。

(5)BC熱処理(以下、BHE)法

当所で新たに考案した方法で、全血を10分間遠心(1,800 \times g)後に、BC層から20 μ L採取し滅菌蒸留水30 μ Lを加えてよく混合した。その後、加熱(95~100 $^{\circ}$ C、5分)及び遠心(15,000 \times g、5分)をしてから上清を回収した。

3 評価方法

カラム法(PBMC及び全血)、MB法(PBMC、全血)、AP法(PBMC及び全血)、AHE法(PBMC)、BHE法(BC)の8通りの組み合わせについて(表1)、DNAの精製度及び手技の均一化の観点から当所の常法としているカラム法によるPBMCからの抽出を基準として比較した。比較項目はDNA収量(ng/ μ L)、検出感度、定量性、所要時間、費用の項目とし、より簡便に検査が可能な方法を検討した。なお、各項目の評価方法は以下のとおりとした。

(1) DNA収量

全ての方法間で、カラム法(PBMC)をコントロール群としてダネットの重比較検定を、PBMCを対象とした方法及び全血を対象とした方法についてそれぞれボンフェローニの多重比較検定を実施した。なお、ボンフェローニ法は、調整化された有意水準P'を求め、各比較

ペアの有意性検定(t検定)の確率値に対してP'(PBMC:0.0084(P<0.05),0.0017(P<0.01)、全血:0.017(P<0.05),0.0034(P<0.01))で判定を行った。

(2)検出感度

既報に基づいて実施したネステッドPCR(以下、nPCR)¹⁾による定性検査結果を用い、偽陰性の検体を1検体でも確認した方法は定性検査には不適とした。

(3)定量性

BLV感染牛由来の検体についてリアルタイムPCR(以下rPCR)(ウシ白血病ウイルス検出用Probe/Primer/Positive control及びCycleavePCR[®] Reaction Mix SP, タカラバイオ(株), 滋賀)で宿主のDNA100ngあたりのプロウイルス遺伝子量(コピー/100ng DNA)を測定した。なお、操作はマニュアルに従ってサンプルDNA添加量を5 μ Lとし、DNA濃度が20ng/ μ Lより高濃度であるものは20ng/ μ Lとなるように希釈して用いた。20ng/ μ Lに満たない検体については、定量後に100ng DNA当たりのコピー数に換算した。その後、カラム法(PBMC)の定量値と各種方法の定量値間でウイルコクソンの順位和検定(全血、BC)、ウイルコクソンの符号付順位検定(PBMC)及び相関により評価し、カラム法(PBMC)の定量値との間に相関を認めなかった方法は不適とした。

表1 抽出法と材料の組合せ

方法	カラム法		MB 法		AP 法		AHE 法	BHE 法
材料	PBMC	全血	PBMC	全血	PBMC	全血	PBMC	BC
抽出キット	DNeasy Blood & Tissue Kit		MagDEA Dx SV		Sepa Gene		-	-
手技	全自動核酸抽出機(QIAcube)による		全自動核酸抽出機(magLEAD 6gC)による		マニュアルに従う		1:PBMC 分離 2:50mM NaOH 90 μ l 添加 3:熱処理:95~100 $^{\circ}$ C 10分 4:1M Tris HCl 10 μ l 添加 5:遠心分離:1,5000 \times g 5分	1:BC 層から 20 μ l 採取 2:滅菌蒸留水 30 μ l 添加 3:熱処理:95~100 $^{\circ}$ C 5分 4:遠心:15,000 \times g 5分

表2 抽出法毎の DNA 収量 (ng/μL)

方法 材料	カラム法		MB 法		AP 法		AHE 法	BHE 法
	PBMC	全血	PBMC	全血	PBMC	全血	PBMC	BC
No.1	148.0	3.4	61.2	14.0	4.4	8.6	6.7	0.8
No.2	372.0	12.4	36.4	20.3	27.8	9.2	10.6	1.5
No.3	320.0	18.0	77.6	17.5	68.4	2.2	12.4	1.4
No.4	113.0	36.0	36.2	23.1	1.1	19.0	8.5	1.7
No.5	236.0	11.4	77.2	27.8	8.2	13.1	12.6	5.0
No.6	300.0	16.5	73.2	28.4	10.2	6.4	11.2	2.7
No.7	232.0	35.7	134.0	36.9	26.8	13.5	12.7	5.4
No.8	464.0	32.9	80.8	32.0	84.4	11.0	17.3	6.2
No.9	276.0	32.7	87.6	25.8	8.8	22.0	14.8	4.7
No.10	178.0	13.5	56.8	16.2	40.4	4.2	10.1	1.6
No.11	170.0	7.8	55.2	19.5	12.1	9.3	9.2	2.6
No.12	161.0	9.5	47.6	19.0	2.4	7.6	10.8	2.8
平均	247.5	19.2*	68.7*	23.4*	24.6*	10.5*	11.4*	3.0*

*P<0.01 vs PBMC(カラム法)(ダネット法による)

結果

1 DNA収量

カラム法(PBMC)の収量は他のいずれの方法よりも有意に多く(P<0.01)、市販キットを用いないAHE法、BHE法はともに収量は低い傾向にあった(表2)。PBMCからの抽出のみを対象とした比較では、カラム法とそれ以外の方法間並びにMB法に対してAP法及びAHE法間で(図1)、全血からの抽出のみを対象とした比較では、カラム法とAP法間及びMB法とAP法間に有意差を確認した(図2)。よって、PBMCを対象とした場合にはカラム法が最も高濃度のDNAを回収可能であり、全血を対象とした場合にはカラム法とMB法が同程度の量のDNAを回収可能であると判明した。

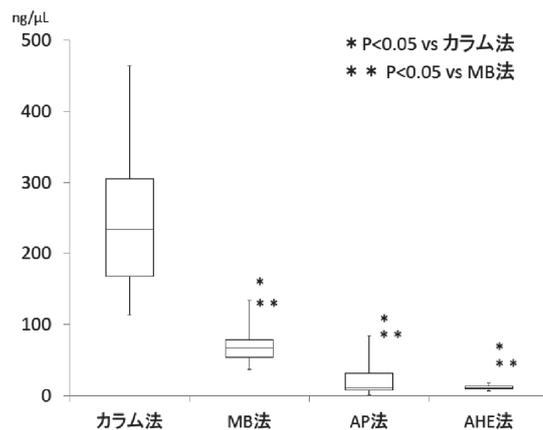


図1 PBMCを抽出対象としたときの各抽出法のDNA収量について

カラム法が他のいずれの方法よりも高濃度のDNAを回収可能であり(P<0.05)、次いでMB法が高濃度であった(P<0.05)(ボンフェローニ法による)。

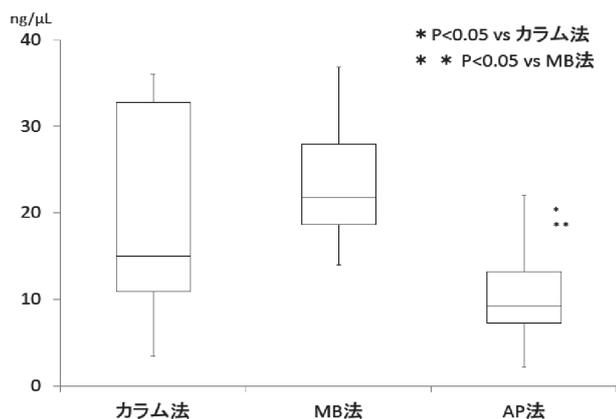


図2 全血を抽出対象としたときの各抽出法のDNA収量について

カラム法とMB法はAP法より高濃度のDNAを回収可能であったが、カラム法とMB法との間に有意差は認められなかった(ボンフェローニ法による)。

2 検出感度

nPCRの結果、カラム法(PBMC)では9検体でBLV遺伝子を検出し、MB,AP法(全血)及びBHE法がカラム法(PBMC)の結果と一致した(表3)。

また、これら9検体はカラム法(PBMC)によるrPCRの定量値が10コピー/100ng DNAという、rPCRの検出限界付近である検体を含んでいた(表4)。しかし、その他の方法では1検体ずつ偽陰性の検体を確認したことから、これらの方法は定性検査には不向きであると判断した。

3 定量性

定量値は方法毎に様々であり、最もカラム法(PBMC)に近いもので、カラム法(PBMC)の平均定量値の約1.6倍から最も乖離していたもので約122倍もの値となったが、カラム法(PBMC)で高コピー及び低コピーであった検体はその他の方法でも同様の傾向が見られた。また、カラム法(PBMC)とそれ以外の方法間でそれぞれウイルコクソンの順位和検定及びウイルコクソンの符号付順位検定を実施したところ、MB法(PBMC)及びAP法(全血)以外の全ての方法が有意に高値となっており(表4)、経時的調査の途中等で方法の変更をした場合に、急激に病態が進行したかのような誤解を生む恐れがあ

表3 nPCR による定性検査結果

方法 材料	カラム法		MB法		AP法		AHE法	BHE法
	PBMC	全血	PBMC	全血	PBMC	全血	PBMC	BC
No.1	-	-	-	-	-	-	-	-
No.2	+	+	+	+	+	+	+	+
No.3	+	-	+	+	+	+	+	+
No.4	+	+	-	+	-	+	-	+
No.5	-	-	-	-	-	-	-	-
No.6	-	-	-	-	-	-	-	-
No.7	+	+	+	+	+	+	+	+
No.8	+	+	+	+	+	+	+	+
No.9	+	+	+	+	+	+	+	+
No.10	+	+	+	+	+	+	+	+
No.11	+	+	+	+	+	+	+	+
No.12	+	+	+	+	+	+	+	+

※網掛け部分は偽陰性であった検体

表4 rPCRによる定量検査結果(コピー/100ng)

方法	カラム法		MB法		AP法		AHE法	BHE法
	PBMC	全血	PBMC	全血	PBMC	全血	PBMC	BC
No.2	9,685	243,847	6,302	52,542	34,063	31,951	292,414	1,987,678
No.3	6,507	4,091	28,688	25,773	70,441	22,209	159,486	1,111,555
No.4	10	UD	18	98	216	63	474	3,777
No.7	32,784	245,299	26,663	50,532	161,571	88,490	299,094	1,337,987
No.8	7,631	116,146	16,470	51,816	23,511	36,335	213,864	2,013,642
No.9	12,294	104,585	37,691	54,972	66,677	60,102	356,682	2,148,992
No.10	10,796	189,967	20,796	45,074	9,934	27,310	227,819	1,542,060
No.11	2,817	48,363	2,604	7,642	5,886	5,709	45,372	660,482
No.12	17,829	254,182	20,759	53,129	567,723	30,931	481,476	1,456,109
平均	11,150	134,053*	17,776	37,953*	104,446*	33,677	230,742**	1,362,475**
/カラム法 (PBMC)	1.0	12.0	1.6	3.4	9.4	3.0	20.7	122.2

UD: 非検出

* $P < 0.05$ vs カラム法(PBMC) (ウイルコクソンの順位和検定及び符号付順位検定による)

** $P < 0.01$ vs カラム法(PBMC) (ウイルコクソンの順位和検定及び符号付順位検定による)

表5 カラム法(PBMC)の定量値と他の抽出法の定量値との相関係数(R)

方法	カラム法	MB法		AP法		AHE法	BHE法
	全血	PBMC	全血	PBMC	全血	PBMC	BC
R	0.74	0.54	0.64	0.49	0.89	0.67	0.37

$0.4 \leq R < 0.7$: 正の相関 $0.7 \leq R$: 強い正の相関

ることが判明した。さらに、BHE法以外の全ての方法でカラム法(PBMC)の定量値と正の相関を確認したことから(表5)、BHE法は定量検査には不向きであると判断した。

4 所要時間

12検体からDNAを抽出するのに要した時間はカラム法(PBMC)では80分であったが、MB

法(PBMC)及びAHE法では60分、カラム法(全血)では50分、MB法(全血)及びBHE法では30分で抽出作業が完了した。しかし、AP法のPBMCでは130分、全血では100分と、どちらの材料ともカラム法(PBMC)より多くの時間を要した(図3)。

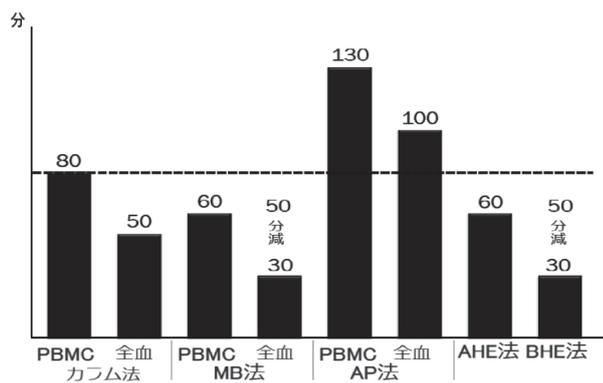


図3 抽出法毎の12検体当たりの作業時間

MB法(全血)及びBHE法は、カラム法(PBMC)と比べて作業時間を50分短縮可能であった。

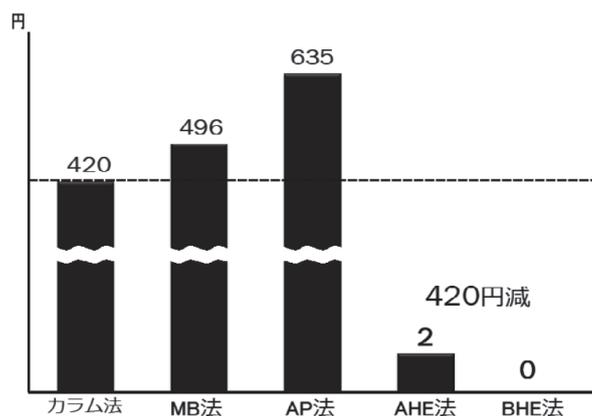


図4 抽出法毎の1検体当たりの費用

キットを用いた抽出ではカラム法が最も低コストであったが、AHE法及びBHE法は、カラム法と比べて約420円の削減が可能であった。

5 費用

カラム法(PBMC)では、1検体当たりの費用は約420円であったが、キットの不要なAHE法及びBHE法では、ほとんど費用をかけずにDNA

の抽出が可能であった。しかし、MB法及びAP法ではそれぞれカラム法(PBMC)よりも76円、215円の費用増となった(図4)。

表6 カラム法(PBMC)を基準とした他の抽出法との比較結果

方法	材料	DNA収量(平均)	検出感度(定性検査)	定量検査		費用(円)*	時間(分)*
				定量値	相関係数		
カラム法	PBMC	247.5	○	-	-	420	80
	全血	19.2	偽陰性 1	有意に高値	0.74	420(±0)	50(-30)
MB法	PBMC	68.7	偽陰性 1	有意差なし	0.54	496(+76)	60(-20)
	全血	23.4	○	有意に高値	0.64		30(-50)
AP法	PBMC	24.6	偽陰性 1	有意に高値	0.49	635(+215)	130(+50)
	全血	10.5	○	有意差なし	0.89		100(+20)
AHE法	PBMC	11.4	偽陰性 1	有意に高値	0.67	2(-418)	60(-20)

まとめ及び考察

今回、BLVに感染している牛を正確に把握するために必須である遺伝子検査の簡便化を図るために、当所の常法としているカラム法(PBMC)を基準として、検査に供するDNAの抽出法について検討を行った結果(表6)、各種方法の評価は以下のとおりとなった。

カラム法は、PBMCを抽出対象とした場合には、他のいずれの方法よりも有意に高濃度であった。このことは検体保存や再検査を考慮した場合に非常に有益である。また、定性検査の検出感度も優れており、DNAの精製度の観点からも安定した定量検査が可能であると考えられるが、抽出作業には80分を要する。

全血を抽出対象とした場合には、定性検査及び定量検査でそれぞれ異なる検体が非検出となった。

以上のことから、カラム法はPBMCを抽出対象とした場合には作業に長時間を要するものの、定性検査、定量検査ともに良好な結果が得られると思われた。一方、全血を対象とした場合には、DNA収量、検出感度、定量性の観点からBLVの遺伝子検査には不向きと考えられた。

MB法は、PBMCを抽出対象とした場合には、定性検査で偽陰性の検体を1検体確認した。定量検査では、カラム法(PBMC)の定量値との間に有意差はなく、正の相関を確認した。また、抽出作業の時間を20分短縮可能であった。

全血を対象とした場合にはカラム法と有意差はなかったものの、最も平均回収量が多く、定性検査ではカラム法(PBMC)と同程度の検出感度であった。定量検査では、カラム法(PBMC)の定量値に比べて有意に高く、正の相関があることを確認した。また、抽出作業の時間を50分短縮可能であった。しかし、MB法では1検体当たり76円の費用増となった。

以上のことから、MB法は76円/検体の費用増となるものの、全血を対象とした場合には定性検査、定量検査どちらも対応可能で、さらに、

作業時間を50分短縮可能であることから、BLVの遺伝子検査を行う際には有用であると考えられた。なお、その定量値はカラム法(PBMC)での定量値に比べて高値であることに注意する必要がある。

AP法は、PBMCを抽出対象とした場合には、定性検査で偽陰性の検体を1検体確認したが、全血を対象とした場合には、検出感度はカラム法(PBMC)と同程度であった。しかし、作業時間は延長(PBMC：50分、全血：20分)し、1検体当たり215円の費用増となった。

以上のことから、AP法は費用が増加すること、作業時間が延長するという点から、本法をBLVの遺伝子検査に採用するメリットはないと考えられた。

AHE法は、PBMCを対象とした抽出法のなかで、最もDNA収量が少なく、定性検査では偽陰性の検体を1検体確認した。また、定量検査ではカラム法(PBMC)との相関は認められているものの、手法の性質上、DNAの精製度としてはキットを用いた抽出法に劣ると思われる。

以上のことから、AHE法はBLVの定性検査には不向きであると考えられた。一方、時間短縮、費用削減が可能なることから定量検査については検討の余地はあるが、DNA収量や精製度を考慮すると、今回はあえて本法を採用するメリットはないと考えられた。

BHE法は、全ての方法の中でDNA収量が最も少ないが、定性検査ではカラム法(PBMC)と同程度の検出感度であった。また、作業時間を50分短縮可能で、キットを用いないため、費用をほとんどかけずに抽出可能であった。しかし、定量検査ではカラム法(PBMC)との相関は認められなかった。

以上のことから、BHE法は定性検査の簡便化及び費用の削減に非常に有用と考えられたが、定量検査には不向きと考えられた。

これら各種方法の特徴を踏まえ、遺伝子検査の簡便化を念頭に置いた場合、BLV感染牛のスクリーニング等のために実施する定性検査に

は、当所で新たに考案したBHE法が非常に有用であり、特別なキットを用いることもないため、多検体の場合にも作業時間や費用が大幅に増加しないと考えられた。定量検査については、DNA収量や精製度を考慮するとカラム法(PBMC)が最適であると思われた。一方、MB法(全血)は、76円/検体の費用増となってしまうものの、カラム法(PBMC)の定量値との相関が認められること、カラム法(PBMC)と同等の伝播リスク評価が可能(高コピー個体と低コピー個体の入れ替わりが起きていない)であること、50分の時間短縮が可能であることから十分に代用法として機能すると考えられた。また、本法は定性検査結果もカラム法(PBMC)と一致していたため、費用を考慮しなければBLVの遺伝子検査に有用であると思われた。しかし、その定量値はカラム法(PBMC)での定量値と比べると有意に高値であったため、同一農場・個体での定量検査で両者を併用するというようなことは避け、抽出法はどちらか一方に統一すべきである。

以上のように、検査目的に合わせて抽出法を選択することで、より効率的に遺伝子検査を実施することが可能であると考えられた。

最後に、本検証は、キャノンメディカルシステムズ(株)との共同研究の中で実施したものであり、検証に御協力いただきましたキャノンメディカルシステムズ(株)の皆様に深謝いたします。

参考文献

- 1) Kuckleburg CJ, Chase CC, Nelson EA, Marras SA, Dammen MA, Christopher-Hennings J : Detection of bovine leukemia virus in blood and milk by nested and real-time polymerase chain reactions. J Vet Diagn Invest. Jan; 15(1), 72-76(2003)