

自動核酸抽出器を活用した地方病性牛白血病(EBL)清浄化対策の推進

県北家畜保健衛生所

金澤礼樹、金子大成

はじめに

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)とウイルスが関与しない散発性牛白血病に分類される。近年、本病による死亡やと畜場における全部廃棄などの発生報告数が増加傾向にあり¹⁾、その殆どがEBLと言われている(図1)。

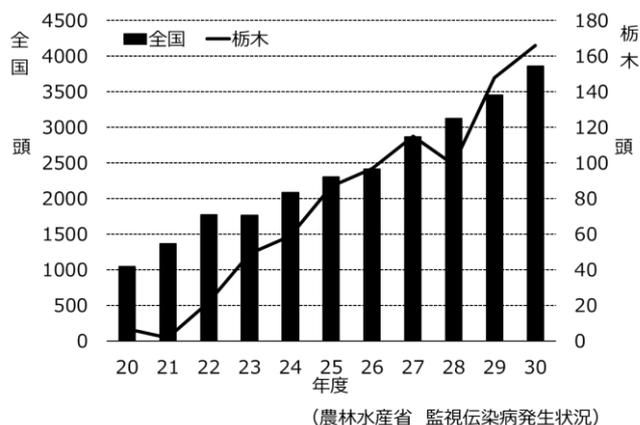


図1 牛白血病の発生状況(全国、栃木)

このような現状を踏まえ、国は平成27年度に「牛白血病に関する衛生対策ガイドライン」を策定し、本県では平成30年度に慢性疾病ワーキンググループが発足するとともに、EBL清浄化対策の取組が強化された。ガイドラインに沿った EBL 清浄化対策を進めるためには、BLV 検査により農場の感染状況を把握し、適切な対策指導を実施する必要がある。

BLV 検査方法として、抗体検査や遺伝子検査が主に用いられているが、特に遺伝子検査は、移行抗体の影響を受けずに早期に感染牛を摘発し、他個体への伝播リスクを推定でき

ることからも、EBL 清浄化対策に必要不可欠である。しかしながら、遺伝子検査は操作が煩雑で検査に長時間を要することから多検体処理には不向きとされている。実際、EBL 対策の強化により BLV 検査頭数が増加したことで、検査時間が増大し、農家への指導が遅れる等の弊害が顕在化した。

今回、検査作業の効率化を目的として、核酸抽出処理を自動化できる自動核酸抽出器を導入した。導入にあたり、従来の方法(以下、手動法)と比較試験を実施するとともに、自動核酸抽出器を用いた方法(以下、自動法)における検査の効率化を図り、EBL 対策を推進することができたので、その概要を報告する。

材料及び方法

1 検査材料

管内和牛繁殖農家8戸28頭について、7ml 及び2ml EDTA 管(以下、7ml 法、2ml 法)で採血した。さらに2ml 法は、ホルダーに差し込み直接採血する直接法と、先にプレーン管で採血した血液を2ml EDTA 管に分注する間接法を実施した。

2 DNA 抽出法

(1) 手動法

全血から塩化アンモニウム処理により末梢血単核球を分離し、DNA 抽出キット(DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, 東京)を用いて DNA を抽出した。

(2) 自動法

全血から DNA 抽出キット (MagDEA® Dx S, プレジジョン・システム・サイエンス (株), 千葉) を用いて、自動核酸抽出機 (magLEAD 6gC, プレジジョン・システム・サイエンス (株)) により DNA を抽出した。

3 評価方法

各抽出法を比較するために、作業時間、DNA 収量 (ng/μL)、遺伝子量 (コピー/10⁵ cells)、伝播リスク評価について、検査の効率性を以下の方法で検討した。

(1) 抽出作業時間

血液からの核酸抽出処理について、各抽出法の常法に従い実施し、作業時間を測定した。

(2) DNA 収量

蛍光定量 (Qubit® 2.0 Fluorometer, サーマフィッシャーサイエンティフィック (株), 神奈川) によって抽出物の DNA 濃度を測定した。また、収量値間における相関係数を測定した (0.40 ≤ R < 0.7 : 正の相関、0.7 ≤ R : 強い正の相関)。

(3) 遺伝子量及び伝播リスク評価

検体について、BLV-CoCoMo-qPCR 法 (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10万細胞あたりの BLV コピー数 (コピー/10⁵ cells) を測定した。また、定量値間における相関係数の測定、並びに得られた遺伝子量 (コピー/10⁵ cells) について、伝播リスクを低リスク (1,000未満)、中リスク (1,000~10,000コピー)、高リスク (10,000コピー以上) と3分類し検討した。

4 自動法における作業方法の比較

自動法における検査作業の効率化を目的とし、採血量及び保存日数を比較した。

(1) 採血量の比較

同一個体について7ml 法及び2ml 法で採血し、3の評価方法を用いて検討した。

(2) 保存日数の比較

7ml 法及び2ml 法で採血した全血について、自動法で抽出処理するまでの保存日数を0から7日後まで変化させ、3の評価方法を用いて検討した。また、2ml 法は直接法及び間接法による比較も併せて実施した。なお、抽出処理するまでの全血は4℃の冷蔵庫内で保存し、十分な転倒混和を実施した。

5 EBL 対策指導状況

自動法導入前 (平成30年4月から令和元年5月まで) と導入後 (令和元年6月から10月まで) における月平均の抗体検査及び遺伝子検査頭数、指導農家戸数を比較した。

結果

1 両核酸抽出法の比較

12頭について7ml 法で採血し、当日中に各抽出法で抽出した。

(1) 抽出作業時間

12検体あたりの DNA 抽出に要した時間は、手動法は100分に対して自動法は30分となり、70分の短縮となった (表1)。

表1 12検体あたりの抽出作業時間

方法	手動法	自動法
作業内容	末梢血 単核球分離 (60分) ↓ 市販キットによる 抽出 (40分)	自動核酸抽出器 による抽出 (30分)
作業時間計	100分	30分
短縮時間	70分	

(2) DNA 収量

自動法における収量は手動法より約0.5倍有意に低い値となったが ($P < 0.05$)、平均値は $54.2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ と PCR 検査に供試する量は問題なく得られていた (表2)。また、両法における相関係数 (R) は0.90と強い相関が見られた (図2)。

表2 両核酸抽出法における DNA 収量 ($\text{ng}/\mu\text{L}$)

検体番号	手動法	自動法
1	179.0	79.6
2	66.4	44.4
3	84.8	54.0
4	116.0	51.6
5	107.0	43.2
6	107.0	44.4
7	124.0	45.6
8	106.0	43.2
9	224.0	92.0
10	104.0	43.2
11	118.0	55.2
12	102.0	54.4
平均	119.9	54.2*

* $P < 0.05$ vs 手動法

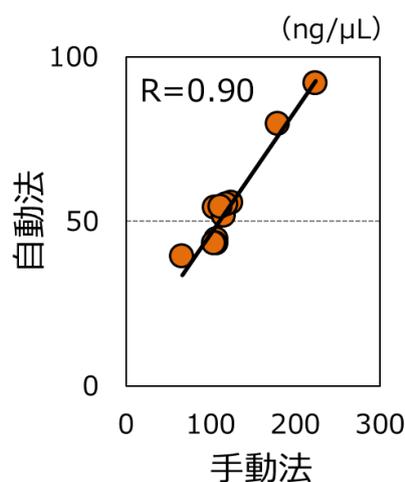


図2 両核酸抽出法における DNA 収量の相関

(3) 遺伝子量及び伝播リスク評価

自動法における遺伝子量は手動法より約1.6倍有意に高い値となった ($P < 0.05$)。また、12検体中11検体の伝播リスク評価が一致し、1検体のみが、手動法では低リスクと評価したものが自動法では中リスクへと評価が変動した (表3)。さらに、両法における相関係数 (R) は0.98と強い相関が見られた (図3)。

表3 両核酸抽出法における遺伝子量

検体番号	手動法		自動法	
	遺伝子量	伝播リスク	遺伝子量	伝播リスク
1	3685.5	中	7885.0	中
2	63.0	低	106.1	低
3	2975.8	中	4234.4	中
4	39.7	低	73.4	低
5	2569.4	中	3492.3	中
6	420.1	低	657.2	低
7	0.6	低	0.7	低
8	42.2	低	65.5	低
9	UD	—	UD	—
⑩	936.4	低	1587.6	中
11	6593.1	中	9389.0	中
12	4.8	低	12.9	低
平均	1575.5		2545.8*	

○ : 伝播リスク評価の変動あり * $P < 0.05$ vs 手動法

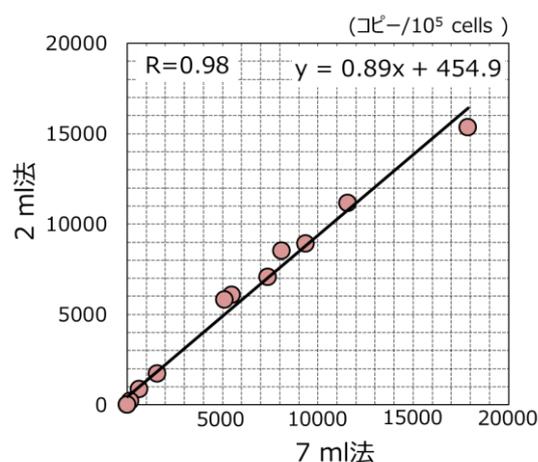


図3 両核酸抽出法における遺伝子量の相関

2 自動法における採血量の比較

14頭について7ml法及び2ml法で採血し、当日中に自動法によりDNA抽出した。

(1) DNA収量

双方における平均値は53.6、56.8 ng/ μ Lと十分なDNA量が得られ、有意差は認められなかった($P < 0.05$) (表4)。また、相関係数(R)は0.85と強い相関が見られた(図4)。

表4 各採血量におけるDNA収量

検体番号	(ng/ μ L)	
	7 ml法	2 ml法
1	69.6	60.0
6	44.4	45.6
7	45.6	58.8
10	43.2	42.4
11	55.2	65.2
20	73.6	67.2
21	44.5	49.2
22	68.8	69.6
23	57.6	60.4
24	52.0	62.0
25	71.2	76.0
26	44.8	50.4
27	38.0	35.6
28	41.2	52.8
平均	53.6	56.8

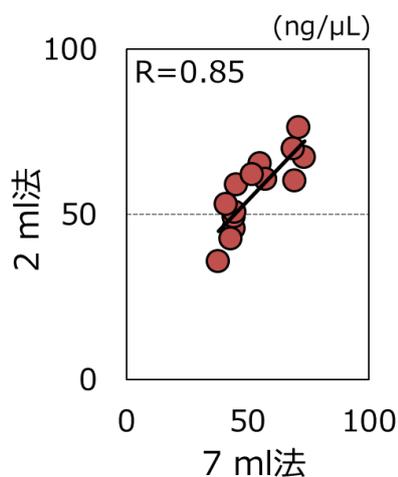


図4 各採血量におけるDNA収量の相関

(2) 遺伝子量及び伝播リスク評価

双方の遺伝子量間に有意差は認められなかった($P < 0.05$)。しかし、伝播リスク評価は14検体中12検体が一致したものの、片方が1コピー未満であった2検体について、もう片方が非検出となった(表5)。また、相関係数(R)は0.98と強い相関が見られた(図5)。

表5 各採血量における遺伝子量

検体番号	(コピー/ 10^5 cells)			
	7 ml法		2 ml法	
	遺伝子量	伝播リスク	遺伝子量	伝播リスク
1	7385.5	中	7048.8	中
6	657.2	低	870.3	低
7	0.5	低	UD	—
10	1587.6	中	1697.4	中
11	9389.0	中	8901.8	中
20	11580.0	高	11143.0	高
21	3.0	低	2.9	低
22	17884.0	高	14341.5	高
23	5514.0	中	6774.3	中
24	5135.0	中	6515.1	中
25	8120.0	中	8522.1	中
26	178.0	低	183.8	低
27	11.0	低	8.5	低
28	UD	—	0.1	低
平均	5188.1		5046.9	

UD: 非検出

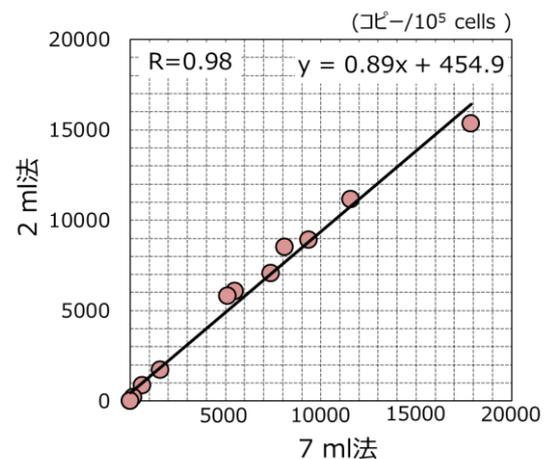


図5 各採血量における遺伝子量の相関

3 自動法における抽出処理するまでの保存日数の比較

12頭について7ml 法で、9頭について2ml 法の直接法及び間接法で採血し、保存日数を変化させ、自動法により DNA 抽出した。

(1) DNA 収量(7ml 法)

保存日数が0から7日後までの平均値は54.3～58.6 ng/ μ L と十分な DNA 量が得られており、0日後と比べて有意差は認められなかった(P<0.05)(表6)。

表6 各保存日数における DNA 収量

(ng/ μ L)

検体番号	0 日後	1 日後	3 日後	7 日後
1	69.6	62.0	66.4	73.6
6	44.4	39.1	47.6	51.6
7	45.6	45.1	56.4	57.6
10	43.2	43.2	39.2	46.4
11	55.2	66.4	64.4	67.2
13	54.4	51.2	50.4	54.4
14	56.0	53.2	49.2	46.8
15	68.8	66.8	61.2	72.8
16	28.8	35.4	34.1	32.7
17	62.4	64.8	62.0	68.8
18	43.2	44.0	42.4	44.0
19	80.0	83.2	85.2	87.2
平均	54.3	54.5	54.9	58.6

(2) 遺伝子量及び伝播リスク評価(7ml 法)

0日後の平均値と比べて各日数の平均値に有意差は認められなかった(P<0.05)。また、伝播リスク評価は12検体中11検体が一致し、10,000コピー付近の値であった1検体のみ、中リスクから高リスクへと変動した(表7)。

表7 各保存日数における遺伝子量

(コピー/ 10^5 cells)

検体番号	0 日後		1 日後		3 日後		7 日後	
	遺伝子量	伝播リスク	遺伝子量	伝播リスク	遺伝子量	伝播リスク	遺伝子量	伝播リスク
1	7385.5	中	7440.5	中	7009.2	中	6774.2	中
6	657.2	低	922.4	低	851.5	低	898.0	低
7	0.5	低	1.2	低	0.9	低	2.2	低
10	1587.6	中	1837.7	中	2003.3	中	2168.9	中
⑪	9389.0	中	10501.5	高	10643.6	高	12984.6	高
13	9844.0	中	7441.6	中	8258.6	中	7771.3	中
14	4855.0	中	4840.6	中	4872.9	中	5001.9	中
15	14329.0	高	15330.4	高	15531.0	高	14646.3	高
16	176.0	低	172.6	低	119.1	低	130.4	低
17	10289.0	高	11216.1	高	11214.3	高	10714.3	高
18	1307.0	中	1490.1	中	1266.1	中	1233.4	中
19	20602.0	高	17804.5	高	18273.1	高	19008.4	高
平均	6701.8		6583.3		6670.3		6786.2	

○ : 伝播リスク評価の変動あり

(3) DNA 収量 (2ml 法)

いずれの採血法も、保存日数が0から7日後までの平均値は55.3~60.5 ng/ μ L であり、十分な DNA 量が得られていた。0日後の直接法の平均値と比べて各日数の直接法の平均値に有意差は認められず、間接法も同様の結果であった ($P < 0.05$)。また、同日数におけるいずれの採血法の平均値に有意差は認められず、他の日数においても同様の結果であった ($P < 0.05$) (表8)。

(4) 遺伝子量及び伝播リスク評価 (2ml 法)

0日後の直接法の平均値と比べて各日数の直接法の平均値に有意差は認められず、間接法も同様の結果であった ($P < 0.05$)。また、同日数におけるいずれの採血法の平均値に有意差は認められず、他の日数においても同様の結果であった ($P < 0.05$)。伝播リスク評価は9検体中8検体が一致し、10,000コピー付近の値であった1検体のみ変動した (表9)。さらに、1コピー未満であった1検体で非検出となることがあった。

表8 各保存日数における DNA 収量

検体番号	(ng/ μ L)					
	0 日後		3 日後		7 日後	
	直接	間接	直接	間接	直接	間接
20	67.2	65.6	65.0	67.6	55.2	56.2
21	49.2	50.4	50.0	48.4	42.4	46.0
22	69.6	75.6	84.0	87.2	70.4	86.0
23	60.4	46.4	56.4	56.4	54.0	50.8
24	62.0	56.4	58.0	43.6	56.4	48.0
25	76.0	81.6	76.8	82.4	72.4	73.2
26	50.4	48.8	61.2	57.6	55.6	52.8
27	35.6	41.2	25.9	38.9	34.1	40.8
28	52.8	56.4	52.4	62.4	57.2	57.2
平均	58.1	58.0	58.8	60.5	55.3	56.8

表9 各保存日数における遺伝子量

検体番号	(コピー/ 10^5 cells)											
	0 日後				3 日後				7 日後			
	直接		間接		直接		間接		直接		間接	
	遺伝子量	伝播リスク	遺伝子量	伝播リスク	遺伝子量	伝播リスク	遺伝子量	伝播リスク	遺伝子量	伝播リスク	遺伝子量	伝播リスク
20	11143.0	高	11960.1	高	13152.9	高	12943.1	高	14146.6	高	13482.4	高
21	2.9	低	3.8	低	4.1	低	4.7	低	4.1	低	3.4	低
22	14341.5	高	14805.6	高	15174.1	高	14376.8	高	17865.5	高	16885.5	高
23	6774.3	中	6021.3	中	7390.6	中	6212.3	中	6076.8	中	6428.8	中
24	6515.1	中	5831.4	中	6214.3	中	6114.1	中	6966.8	中	6276.1	中
25	8522.1	中	9220.0	中	9074.4	中	10056.3	高	9086.1	中	8118.9	中
26	183.8	低	191.2	低	181.0	低	191.2	低	177.5	低	158.6	低
27	8.5	低	8.3	低	9.4	低	11.3	低	10.5	低	9.9	低
28	0.1	低	0	低	0	低	UD	-	UD	-	UD	-
平均	5276.8		5338.0		5689.0		5556.6		6037.1		5707.1	

○ : 伝播リスク評価の変動あり

UD : 非検出

4 EBL 対策指導状況

自動法の導入前と比較し、導入後の月平均の抗体及び遺伝子検査頭数、指導農家戸数は、それぞれ1.3倍、3.0倍、4.4倍と増加した(図6)。

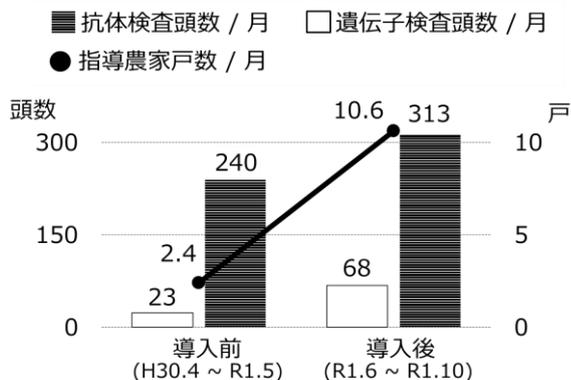


図6 EBL 対策指導状況

まとめ及び考察

核酸抽出法の比較の結果、自動法は、作業時間の大幅な短縮並びに手動法と同等の伝播リスク評価が可能であると考えられた。なお、自動法の遺伝子量が手動法と比べて約1.6倍有意に高値となったことを考慮し、手動法から自動法に切り替えた際の伝播リスク評価に基づく指導には注意が必要である。

自動法では、採血量、保存日数、2ml 法の採血法のいずれにおいても有意差は認められなかった。また、1コピー未満の検体では非検出となる可能性があるため、抗体検査結果を併用した診断をする必要がある。今後は、少量の採血量で、保存日数が7日後までならまとめて自動法で抽出可能であり、採血時に間接法も利用することで、より効率良く検査が可能であると考えられた。

農場指導状況の比較の結果、自動法の導入により EBL 対策指導を大幅に推進することができた。自動法の採用により多検体処理の効

率が上がり、短縮時間分を迅速な結果回答及び農家指導へ充てられたためだと考えられる。

以上のことから、自動法は有用であり、今後は、自動法により作業の効率化を図るとともにより多くの農家指導を通じ、EBL 清浄化に向けて尽力していきたい。

参考文献

- 1) 監視伝染病の発生状況：農林水産省
<https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/kansi_densen.html>