

令和 5年 4月 30日

令和4年度 宮崎県内共同研究報告書

研究代表者： 牛谷 雄一

1. 研究課題名	日本語表記：核酸精製が不要なBLVの遺伝子定量法の開発 英語表記：Development of quantitative PCR for BLV without nucleic acid isolation			
2. 研究期間	令和 4年 4月 1日 ~ 令和 5年 3月 31日			
3. 共同研究者	氏名	機関・所属部署名		職名
	川野 義彦	JA こばやし 畜産部		部長
	関口 敏	宮崎大学・農学部・獣医学科 産業動物防疫リサーチセンター・防疫戦略部門		准教授 部門長
4. 研究目的	<p>牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV) は牛の B リンパに感染し、プロウイルスとして感染細胞中に長期にわたり存在する。BLV の検査法は主に BLV に対する特異抗体を検出する ELISA 検査と、プロウイルスを検出する遺伝子検査がある。これまで当会としては、生産者が安心して BLV 非感染牛を購入できるように、家畜市場に上場する繁殖用雌子牛を対象に ELISA 検査（セリ前検査）を実施してきた。しかし、感染初期（感染後約 1 か月）の BLV 感染牛は抗体が十分に産生されず、ELISA 検査で陰性（偽陰性）となる可能性がある。そこで「CADIC 宮崎県内共同研究事業」を活用し、ELISA 検査で偽陰性となるリスクを定量的に推定した。さらに、前向き野外調査によってそのリスクを実証することに成功した。このことから、現場ではセリ前検査で偽陰性を防ぐための対応が求められている。そこで、宮崎大学の関口敏准教授と協議しながら、偽陰性のリスクを低減するための方法を検討した。</p> <p>偽陰性を完全に防ぐことは難しいが、偽陰性となる確率を下げることはできる。その方法とは検査回数を増やすことと、1 回の検査の感度を上げることである。検査回数を増やす方法は、採血の手間や生産者の精神的・肉体的負担、検査コストなどの問題があり、現実的ではない。そこで我々は遺伝子検査に着目した。ELISA で抗体が検出される時期が感染後約 1 か月に対し、遺伝子検査であれば、感染後約 1 週間でプロウイルスを検出することができる。しかし、遺伝子検査は ELISA 検査に比べてコストが高く、生産者の負担が大きい。また、遺伝子検査では血液から白血球の核酸を抽出する作業があり、この工程が検査の大半を占める。そこで本研究は、核酸精製が不要な遺伝子定量法を開発することを目的とした。</p>			
5. 研究内容・成果	<p>【材料と方法】</p> <p>試験には宮崎県内の肉用牛繁殖農場から採取した牛の血液を実験に供した。デジタル PCR 法ではバイオラッド社の QX200 Droplet Digital PCR システムを用いて BLV 感染細胞数を測定し、血液細胞全体に占める感染細胞数の割合 (CNV2 値) を算出した。qPCR 法では、BLV のプロウイルス量 (PVL 値) の測定に、BLV 検出用 Probe/Primer/Positive control (タカラバイオ) と Cycleave PCR®Reaction Mix SP (タカラバイオ) を用いた。BLV に対する特異的プライマーとプローブには env 領域を、ハウスキープングジーンには RPP30 をターゲットとした。次に、デジタル PCR における DNA 抽出法の検討をする</p>			

ため、牛の血液（36 検体）について、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）による DNA 抽出と、MagLEAD システム（プレジジョン・システム・サイエンス）による抽出をそれぞれ行ったのち、デジタル PCR システムにより感染細胞率を測定した。得られた CNV2 値と PVL 値からスピアマンの順位相関係数を算出した。有意水準は 5%とした。

【結果】

BLV の温度グラジエント（50～63℃）を用いたアニーリング温度の条件検討では、50℃または 51℃が最も良好な結果が得られた。1 ウェルで BLV のプロウイルスとハウスキーピング遺伝子の RPP30 の 2 つの遺伝子を同時測定した結果、BLV および RPP30 ともにシグナルが強く、ポジティブとネガティブの区別が明確で非常に良好な結果が得られた。この反応条件で、加熱と SDS 添加による簡易抽出方法をデジタル PCR 法に応用した。血液 1 滴に対して SDS 溶液（0.1%）50uL、加熱する温度と反応時間は 95℃、10 分間で実施した。SDS 法による簡易抽出法で測定した感染細胞率と MagLEAD システムによる抽出法の値とを比較し、相関分析を行った結果、両者の相関係数は 0.7 以上（ $p < 0.0001$ ）となり、有意に強い相関がみられた（図）。本研究成果は、国際科学雑誌「Journal of virological methods」で報告された。さらに、本技術は当会が運営する家畜衛生検査事業に実装されている。

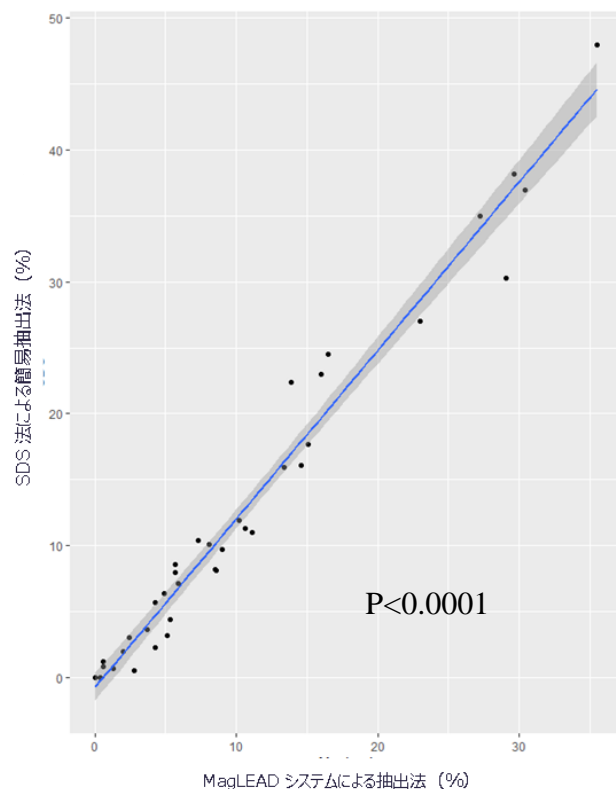


図. MagLEAD システムによる抽出法と SDS 法による簡易抽出法の相関分析

6. 成果となる論文・学会発表等

（※参考となる資料を添付してください。）

Wu, X., Notsu, K., Matsuura, Y., Mitoma, S., El Daous, H., Norimine, J., & Sekiguchi, S. (2023). Development of droplet digital PCR for quantification of bovine leukemia virus proviral load using unpurified genomic DNA. *Journal of virological methods*, 315, 114706. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2023.114706>

※必要に応じて、枠を広げて記載してください。