と畜検査で実用可能な牛白血病迅速診断法の検討

〇齋藤麻矢 1) 神谷可菜 1) 清水俊一 1) 大野祐太 2) 今内覚 3) 1) 早来食肉衛生検査所 2) 北海道立衛生研究所 3) 北海道大学院獣医学研究院

【はじめに】牛白血病は年々その頭数が増加している届出伝染病である。当所においても牛白血病と診断し全部廃棄となる牛の頭数は増加しており、非常に重要な疾病である。当所では、肉眼所見で診断に迷う場合、病理組織学的検査(以下「組織検査」)や市販のDNA抽出キットおよびBLV検出キット(以下、「従来法」)を用いたリアルタイム PCR 法(以下「qPCR」)を診断の一助としている。しかし、組織検査は手間や経験を要し、市販キットによる qPCR は、ウイルス疾患である地方病性牛白血病(以下「EBL」)の診断には非常に有効だが、経費と手技の煩雑さが問題となる。

今回、BLV プロウイルスおよび牛ゲノム DNA を標的とするプライマー/プローブセットを設計し、組織からの簡易 DNA 抽出法を新たに考案して、と畜検査における迅速診断法としての汎用性および精度について検討したので報告する。

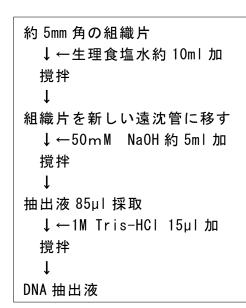
【材料および方法】2017年2月から2019年8月までに当所において牛白血病と診断又は疑った牛78頭の腫瘍塊および脾臓173検体を材料とした。採材した組織片は5mm角に分割してqPCRと組織検査を行った。そのうち11頭(36検体)の組織片について、GAPDH100コピーあたりのBLVプロウイルスコピー数(DNA比)と組織検査から細胞100個あたりのEBL様腫瘍細胞数(腫瘍細胞数比)を算出し比較した。

(1) qPCR

BLV が不検出または定量限界値以下 (BLV プロウイルスが 10² コピー以下) の検体は、 *GAPDH* の増幅を確認した上で、同じ検体に対して DNA 抽出キットの Nucleospin Tissue (タカラバイオ) にて DNA を抽出し、BLV 検出キットのウシ白血病ウイルス検出用 Probe/Primer/Positive control (タカラバイオ) にて qPCR を改めて実施した。

(2)組織検査

組織片から押捺標本を作成し、メイグリュンワルド・ギムザの2重染色を実施した。また、 同組織片を10%中性緩衝ホルマリン液にて固定、定法に従いパラフィン切片を作成し、



Primer Probe	塩基配列			
BLV-qF	GCCCCAGATTTCCTCTCAG			
BLV-qR	CTCTGCCCTGGTGATTAAGG			
BLV-qProbe	AATACAGCCCCGGGCCCTT			
	(FAM と BHQ1 で修飾)			
bovGAPDH-qF	CCCTTCACACTCTCCTTCCA			
bovGAPDH-qR	CTCTTCCTCTCGTGCTCCTG			
bovGAPDH-qProbe	TCCCTGGACCCCCAGCCC			
	(ROX と BHQ2 で修飾)			

第1表 プライマーとプローブの塩基配列

第1図 簡易 DNA 抽出法のフロ一図

HE 染色をした。各検体の 9 視野を鏡検・撮影(1000 倍・1 視野 90μm×67. 5μm)し、全細胞中の多形性および異型性を特徴とする EBL 様腫瘍細胞数の割合から腫瘍細胞数比を算出した。

【結果】調査した78頭のうち、組織検査から72頭がEBLであると診断し、本研究で構築した簡易DNA抽出法およびqPCR(以下、「新法」)では全ての検体でBLVが検出された。EBL以外の腫瘍のうち4頭(散発性牛白血病「SBL」2頭、高齢黒毛和種の非定型牛白血病2頭)ではBLVが検出されず、2頭(SBLと上皮系悪性腫瘍)では腫瘍塊におけるBLVプロイルス量が定量限界値以下であった。従来法では、前記4頭はBLV陰性、後記2頭は陽性であると判定された(第2表)。

DNA 比と腫瘍細胞数比に用いた 11 頭(36 検体)は BLV 陽性で、9 頭(31 検体)は EBL、2 頭(5 検体)は非 EBL であった。そのうち、EBL の腫瘍塊(27 検体)の DNA 比は 2.5~114.3(中央値 55.1)、脾臓(4 検体)では 1.1~2.9(中央値 2.0)であった。非 EBL の腫瘍塊(3 検体)の DNA 比は 0.1 以下、脾臓(2 検体)では 1.1 と 1.5 であった(第 3 表)。第 2 図に腫瘍塊および脾臓の DNA 比をすべてプロットしたものを示した。

また、DNA比と腫瘍細胞数比は、相関係数が 0.92 の正の相関が認められた (第3図)。

【考察】EBL と診断した 72 頭について全て簡易 DNA 抽出法で BLV が検出され、本研究で構築した新法の感度は十分であった。非 EBL の症例において BLV 陽性となった検体については、BLV の起因によらず腫瘍が発現したと考えられ、同様の症例が報告されている 2 これは、不顕性で BLV に感染していたため、腫瘍組織に浸潤していたわずかな感染リンパ球の BLV が検出されたと推察された。

と畜検査において重要なのは BLV の感染の有無ではなく、発病しているかどうかの診断である。宗村は EBL 発症牛の腫大リンパ節については BLV 遺伝子量が診断基準になりうる²⁾と述べている。と畜場における迅速診断法における診断基準の確立を目標としていることから、BLV の陽性陰性判定でなく BLV プロウイルス量の定量が必須であると考えた。今回、簡易 DNA 抽出法を用いた qPCR の信頼性を見るために DNA 比と病理組織学的な腫瘍

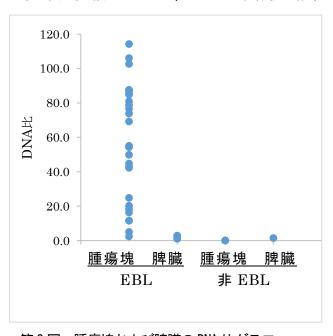
一回、間の DNA 抽出 など用いた 切 の の信頼 E を 見るために DNA 比 C E M 生 M 機 手 的な 産 場 細胞数比について比較した。両者は、高い相関性をもつことがわかり、DNA 比は EBL の腫瘍細胞数を反映していた。これは、荻原らが各臓器のウイルス量が組織所見に直接反映されていると考察している点とも一致している 3)。

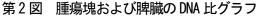
組織検査		頭数	qPCR 新法	従来法
EBL		72 頭	陽性	_
非 S H H B L	上皮系悪性 腫瘍	1頭	陽性 (定量限界 値以下)	陽性
	SBL(散発性 牛白血病)	1頭		
		2 頭	陰性	陰性
	高齢黒毛和種の 非定型牛白血病	2頭	陰性	陰性

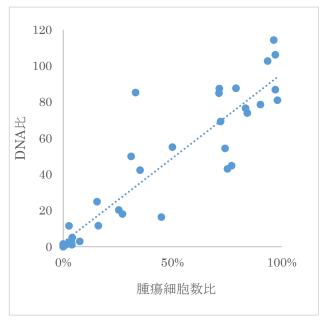
	EBL		非 EBL	
	腫瘍塊	脾臓	腫瘍塊	脾臓
検体数	27	4	3	2
平均值	56.8	2.0	0.1	1.3
中央値	55. 1	2.0	0.1	1.3
最小値	2.5	1. 1	0.0	1. 1
最大値	114. 3	2. 9	0.1	1. 5

第3表 腫瘍塊および脾臓の DNA 比

第2表 腫瘍塊における qPCR および組織検査結果







第3図 DNA 比および腫瘍細胞数比

また、BLV 陽性牛の脾臓では、EBL と非 EBL の DNA 比に差異がなく、両者を区別するには 脾臓は診断材料としては適さないと考えられた。脾臓を除いた非 EBL の DNA 比は 0.1 以下 (BLV プロウイルス量が定量限界値以下)であったことから、EBL の診断には腫瘍塊の DNA 比を用いるべきであることがわかった。

今回の結果から、新たに構築した簡易 DNA 抽出法を用いた qPCR は、腫瘍塊を用いた EBL診断に有効であることが確認できた。検体搬入から数時間で検査結果を出せることと、市販品を利用するより低コストで検査が行えることから、と畜検査における迅速診断法として非常に有用であることがわかった。今後は、さらに多くの症例について比較し、診断基準値について検証を進めたい。

参考文献 1) 荻原晶代ら: 牛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) 2) 宗村佳子: 牛白血病ウイルス遺伝子量を指標とした地方病性牛白血病の診断法に関する研究 博士 (獣医学) 甲第 446 号 (2015) 3) 荻原晶代ら: 牛白血病の病理組織学的診断及び CoCoMo 法を用いた BLV 遺伝子コピー数の検討平成 30 年度全国食肉衛生検査所協議会微生物部会