

7 LAMP 法による現場家保で実施可能な牛白血病ウイルス遺伝子検査法の検討

中央家畜保健衛生所

酒井 芳子・井上 大輔

現在、本県の現場家保で行う牛白血病ウイルス(以下 BLV)検査は血液検査と ELISA 抗体検査で実施しているが、地方病性牛白血病(EBL)を疑う症例の中には血液検査所見だけでは判断し難い事例が多く、また、ELISA は迅速な実施が困難であるため、新たな補助的検査が求められている。

近年、遺伝子増幅技術のひとつとして LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法が開発され、簡便な遺伝子検査法として多くの分野で活用されている³⁾。本法は、一定温度で遺伝子を増幅することが可能であり、PCR 法に用いる様々な特殊機器を必要としない遺伝子検査法である。2009 年には本法を活用した BLV 遺伝子検査法に関する報告²⁾もなされ、感度の高い検査法として注目されているが、既報^{1,2,4)}による遺伝子抽出法や増幅装置を用いた検査法はコストや設備面から現場家保への導入に課題がある。

そこで今回、本法を現場家保でも実施可能とするため、簡便な方法について検討を行ったので、その概要を報告する。

1 試験 1：遺伝子抽出方法の検討

既報の遺伝子抽出法には市販の DNA 抽出キットが用いられているが、これに代わる遺伝子抽出方法について検討を行った。

(1) 材料と方法

EDTA 加血液(以下、全血)5頭分を用いて、3通りの「前処理」と3通りの「抽出法」の組み合わせの違いによる遺伝子抽出を行い、得られた抽出産物を図-2に示す方法で LAMP 法に供

し、検出率を比較した。

前処理は、各検体毎に図-1の1に示す方法で「洗浄 WBC」、「未洗浄 WBC」、「全血」の3通りを用意した。抽出法は、各前処理材料について図-1の2に示す方法で「抽出キット」、「加熱処理」、「凍結融解」による3通りの抽出を行い、最終的に各検体あたり9通りの抽出産物を得た。

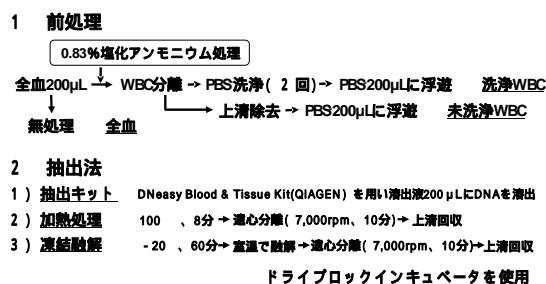


図-1 遺伝子抽出方法

LAMP 法は LoopampDNA 増幅キットおよび Loopamp 蛍光目視検出試薬(ともに栄研化学)と komiyama ら²⁾の報告に基づく BLV 遺伝子の LTR 領域を増幅するプライマーを用い、増幅反応(63、60分)と酵素失活反応(80、5分)には遺伝子増幅装置を使用した。また、結果判定は目視、紫外線照射、2%アガロースゲル電気泳動の3通りで行った。

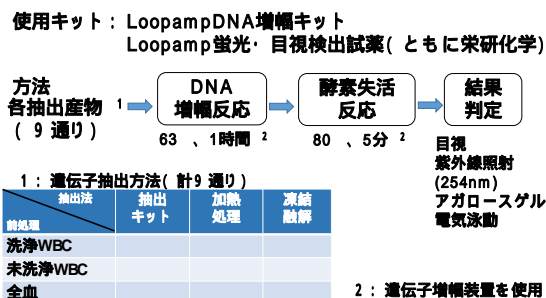


図-2 LAMP法

また、9通りの遺伝子抽出方法のうち、抽出キット（洗浄WBC、未洗浄WBC、全血）と加熱処理（洗浄WBC、未洗浄WBC）の5通りについては、同材料を用いたNested PCRとリアルタイムPCR（r-PCR）を実施し、LAMP法との検出率を比較した（表-1）。

表-1 他検査との比較

9通りの遺伝子抽出方法のうち、下表に斜線で示す5通りについて、Nested PCR¹およびリアルタイムPCR（r-PCR）²による検出率と比較

前処理	抽出法	抽出キット	加熱処理	凍結融解
洗浄WBC				
未洗浄WBC				
全血				

1: Nested PCR・Fechner, et al. 1997
2: rPCR・Cycleave PCR Reaction Mix SPおよびウシ白血球ウイルス検出用Probe/Primer/Positive control(TAKARA)

(2) 成績

図-3にLAMP反応の例として抽出キット使用でのLAMP成績を示す。洗浄WBC、未洗浄WBC、全血ともに、いずれの判定方法でも、5検体中4検体で陽性を示した。なお、陰性となった検体No.3は事前の検査で最も遺伝子量が少ない検体であった。

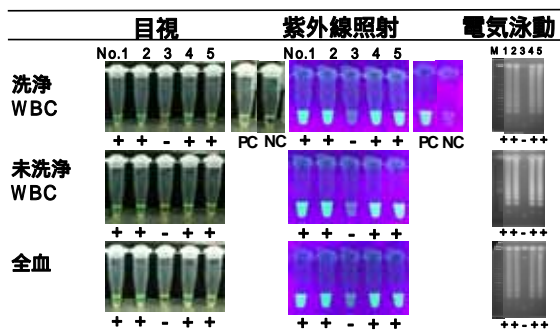


図-3 抽出キット使用でのLAMP成績の比較

9通りの抽出産物を用いたLAMP試験の結果、抽出キット（洗浄WBC、未洗浄WBC、全血）と加熱処理（洗浄WBC、未洗浄WBC）のLAMP検出率はいずれも80%であり、すべて目視で十分判定可能であった。一方、全血の加熱処理や凍結融解による方法では検出率が低く、遺伝子抽出方法として不適と判断された。

表-2 LAMP成績まとめ

抽出キット	前処理	LAMP検出率(%)		
		目視	紫外線照射	電気泳動
抽出キット	洗浄WBC	80	80	80
	未洗浄WBC	80	80	80
	全血	80	80	80
加熱処理	洗浄WBC	80	80	80
	未洗浄WBC	80	80	80
	全血	100	100	80
増幅反応前から蛍光発色(偽陽性反応)				
凍結融解	洗浄WBC	20	20	20
	未洗浄WBC	0	0	0
	全血	0	0	40

抽出キット（洗浄WBC、未洗浄WBC、全血）および加熱処理（洗浄WBC、未洗浄WBC）のLAMP検出率とNested PCRおよびr-PCRの検出率の比較では、いずれのLAMP成績もNested PCRおよびr-PCRと100%一致した。また、洗浄WBCと未洗浄WBCに関しては、加熱処理でも抽出キットと同等のLAMP成績が得られた（表-3、4）。

表-3 Nested PCR, r-PCRとの検出率の比較 (抽出キット)

抽出法	前処理	検体 No.	LAMP	Nested PCR	r-PCR (copies/10ng)	検出率(%)		
						LAMP	Nested PCR	r-PCR
抽出キット	洗浄WBC	1	+	+	4,220.6	80	100	100
		2	+	+	5,607.2			
		3	-	-	ND			
		4	+	+	934.4			
		5	+	+	1,519.9			
抽出キット	未洗浄WBC	1	+	+	3,110.2	80	100	100
		2	+	+	3,179.6			
		3	-	-	ND			
		4	+	+	287.7			
		5	+	+	779.0			
抽出キット	全血	1	+	+	983.9	80	100	100
		2	+	+	3,060.0			
		3	-	-	ND			
		4	+	+	858.2			
		5	+	+	2,157.9			

表-4 Nested PCR, r-PCRとの検出率の比較 (加熱処理)

抽出法	前処理	検体 No.	LAMP	Nested PCR	r-PCR (copies/10ng)	検出率(%)		
						LAMP	Nested PCR	r-PCR
加熱処理	洗浄WBC	1	+	+	318.2	80	100	100
		2	+	+	11.5			
		3	-	-	ND			
		4	+	+	18.8			
		5	+	+	176.4			
	未洗浄WBC	1	+	+	347.3	80	100	100
		2	+	+	264.3			
		3	-	-	ND			
		4	+	+	29.5			
		5	+	+	227.7			

なお、抽出キットと加熱処理のどちらがよりBLV遺伝子の抽出効率が優れているかを確認したところ、抽出キットを用いた方が有意に遺伝子量が多く、加熱処理では遺伝子量が少なくなることが確認された（図-4）。

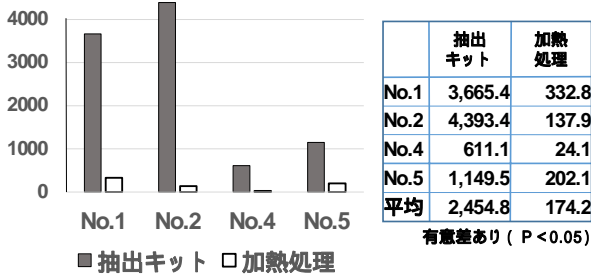


図 - 4 抽出キットと加熱処理のBLV遺伝子量比較 (copies/10ng)

2 試験 2 : BLV 遺伝子収量向上についての検討
 試験 1 の結果、操作性が簡便な未洗浄 WBC を用いた加熱処理でも LAMP 法が実施可能ではあるものの、遺伝子収量に問題があることが明らかとなったことから、未洗浄 WBC の加熱処理における BLV 遺伝子収量の向上について検討を行った。

(1) 材料と方法

感染牛 3 頭の未洗浄 WBC を用いて、表 - 5 に示す 6 通りの抽出法 (血液増量、抽出産物の希釈、プロテイナーゼ K によるタンパク分解処理 (PK 処理)、抽出キット) を行い、r-PCR により BLV 遺伝子量を測定した。

表 - 5 BLV遺伝子収量向上についての検討

全血の量	抽出法	方法
1 2mL	加熱	加熱 (100 、 8分) 遠心分離 (7,000rpm、10分) 上清回収
2 200µL	加熱 (原液)	加熱 (100 、 8分) 遠心分離 (7,000rpm、10分) 上清回収
3	" (10倍希釈)	加熱処理 (原液) を DW で 10倍希釈
4	" (100倍希釈)	" 100倍希釈
5 200µL	P K 処理 ¹	PK を添加 (0.4mg/ml) 加熱 (56 、 10分) ² 酵素失活処理 (95 、 10分) ² 上清回収
6 200µL	抽出キット	(試験 1 と同様)

1 PK処理: プロテイナーゼK処理
 2 ドライブロックインキュベータを使用

(2) 成績

6 通りの抽出産物を用いた r-PCR の結果、抽出キットでの収量が最も高かったが、PK 処理はそれに次ぐ収量があり、2 つの間に有意差はないことが確認された (表 - 6)。

表 - 6 未洗浄WBC処理法別のBLV遺伝子量比較

検体No.	全血の量	抽出法	No. 9		No. 13		No. 19	
			Nested PCR	r-PCR (copies/10ng)	Nested PCR	r-PCR (copies/10ng)	Nested PCR	r-PCR (copies/10ng)
1	2mL	加熱	+	ND	+	5.05	+	18.31
2	200µL	加熱 (原液)	+	1.12	+	7.89	+	43.69
3		" (10倍希釈)	-	ND	+	3.42	+	10.50
4		" (100倍希釈)	-	ND	-	ND	+	ND
5	200µL	P K 処理	+	4.48	+	112.30	+	237.99
6	200µL	抽出キット	+	14.04	+	337.02	+	914.80

(ND : 検出限界以下)

有意差なし (P > 0.05)

3 試験 3 : 未洗浄 WBC (PK 処理) を用いた LAMP 法と他検査との感度比較

未洗浄 WBC の PK 処理による抽出産物でも問題なく LAMP 法が実施できることを確認するため、以下の検討を行った。

(1) 材料と方法

感染牛 8 頭と非感染牛 1 頭の未洗浄 WBC の PK 処理材料を用いた LAMP 法を実施し、Nested PCR および r-PCR による検出率と比較した。

(2) 成績

抗体陽性検体の検出率は、LAMP 法 (目視、紫外線照射、電気泳動による判定)、Nested PCR、r-PCR の順に 75%、75%、89%、89%、50% であり、現場家保で実施可能な目視および紫外線照射判定での LAMP 検出率は、Nested PCR より低いもののリアルタイム PCR より高かった (表 - 7)。

表 - 7 未洗浄WBC(PK処理)を用いたLAMP法と他検査との成績比較

検体 No.	リンパ球数 (/µl)	病性鑑定成績			未洗浄WBC (PK処理)		
		ELISA	r-PCR (copies/10ng)	Nested PCR	LAMP法		
				(目視)	(紫外線照射)	(電気泳動)	
1	3,444	-	NT	-	-	-	
3	2,974	+	ND	-	-	-	
4	3,906	+	ND	+	-	+	
5	6,643	+	ND	+	+	+	
6	3,567	+	ND	+	+	+	
8	4857	+	17.35	+	+	+	
9	2294	+	56.57	+	+	+	
13	5250	+	527.33	+	+	+	
19	4851	+	2528.93	+	+	+	

検出率 50% 89% 75% 75% 89%

NT: 検査未実施
 ND: 検出限界以下

4 試験 4 : LAMP 変法の検討

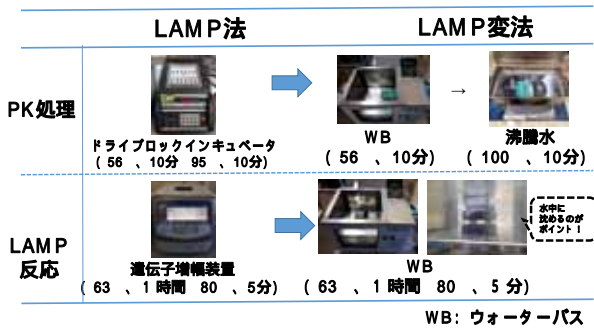
PK 処理と LAMP 反応を現場家保にある機器を用いて実施する方法について検討を行った。

(1) 材料と方法

感染牛 12 頭の未洗浄 WBC を材料とし、ウォー

ターバス（56、10分）と沸騰水（100、10分）を用いたPK処理とLAMP法（以下、LAMP変法と呼ぶ）を実施し、Nested PCR および r-PCR による検出率と比較した（表 - 8）。

表 - 8 LAMP変法の検討



(2) 成績

各検査法による検出率は、LAMP 変法（目視、紫外線照射、電気泳動による判定）、Nested PCR、r-PCR の順に 83%、92%、92%、92%、75%であった。LAMP 変法の成績は Nested PCR の成績とほぼ一致したが、遺伝子量の少ない検体 No. 7 については目視による判定が困難であった（表 - 9）。

表 - 9 LAMP変法と他検査との成績比較

検体 No.	病性鑑定成績			未洗浄WBC (PK処理)		
	リンパ球数 (/μl)	ELISA	r-PCR (copies/10ng)	LAMP変法		
				(目視)	(紫外線照射)	(電気泳動)
2	3,360	+	ND	-	-	-
5	6,643	+	ND	+	+	+
6	3,567	+	ND	+	+	+
7	2,736	+	6.05	+	-	+
10	3,616	+	89.59	+	+	+
11	5,338	+	279.78	+	+	+
12	9,178	+	516.61	+	+	+
14	6,138	+	679.44	+	+	+
15	8,034	+	1301.38	+	+	+
16	4,015	+	1383.49	+	+	+
17	10,374	+	1832.84	+	+	+
18	6,786	+	1992.28	+	+	+

検出率 75% 92% 83% 92% 92%

5 まとめおよび考察

試験1の結果、抽出キットを用いた方法が最も遺伝子抽出効率が優れていたが、コストや設備面から現場には不向きであることから、これに代わる方法について検討を行った。その結果、未洗浄 WBC の PK 処理により得られた抽出産物を用いた LAMP 法の検出感度は、Nested PCR には劣るものの r-PCR より高く、操作性も簡便であることが確認された。さらに、今回検討した PK 処理や LAMP 反応をウォーターバスや沸騰水で実施する LAMP 変法であれば、現場家保で十分検出可

能であり、BLV 遺伝子検査法として有用と考えられた。また、抽出産物中の BLV 遺伝子量が少ない検体の中には目視判定が困難なものも確認されたことから、判定時に紫外線照射器を使用することで、より確実な判定が可能と思われた。

今回、現場家保でも実施可能な BLV 遺伝子検査法を考案したことにより、ELISA 検査が実施できない状況にあっても、迅速かつ的確な EBL 診断や陽性牛と陰性牛の群分けが可能となり、また移行抗体を保有する若齢子牛の感染状況も現場で迅速に判断することが可能になると考える（表 - 10）。

表 - 10 まとめおよび考察

・ 目的に応じた BLV 遺伝子検査の実施より迅速かつ的確な EBL 診断や効果的な農場対策に繋げる

検査法	検査目的	実施場所
LAMP 変法	BLV 感染の有無 EBL 診断(否定) 陽性牛と陰性牛の群分け 若齢子牛の感染確認	現場家保
Nested PCR	BLV 感染の有無 ELISA (+) かつ LAMP (-) となった場合の確認	検査棟
r-PCR	BLV 遺伝子量の把握 陽性牛群内の配置決め 淘汰・更新の順位付け	

今後は、LAMP 変法を現場に普及させるとともに、検査目的に応じて LAMP 変法、Nested PCR および r-PCR の 3 つの BLV 遺伝子検査法を使い分けることで、より迅速かつ的確な EBL 診断や効果的な農場対策に繋げたい。

6 参考文献

- 1) Chiho kimiyama, Kazuhiko Suzuki, Yasuo Miura, Hiroshi Sentsui: Development of loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis of bovine leukemia virus infection. Journal of Virological Methods 157, 175-179, 2009
- 2) Komiyama C., Suzuki K., Miura Y., Sentsui H. 2009. Development of loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis of bovine leukemia virus infection. J. Virol. Methods 157: 175-179. doi:10.1016/j.jviromet.2008.12.015
- 3) 高野弘, 酒井栄一, 佐々木泰治: LAMP

(Loop-mediated isothermal amplification)法の原理と応用. モダンメ
ディア 60 巻7号, 211-231, 2014

- 4) Yuka OKUWA, Michiko
MIYAMATO-HAYASHI, Takaichi TANAKA, Yuji
HAYAKAWA, Yasuo INOSHIMA: Simple and
rapid method for routine screening of
bovine leukemia virus by loop-mediated
isothermal amplification assay. The
Journal of Veterinary Medical
Science 79(1): 137-140, 2017