

15 抗原ELISAを用いた牛ウイルス性下痢ウイルス検査の検証

倉吉家畜保健衛生所 ○増田恒幸 足羽朋子

1 はじめに

牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）による疾病は多岐にわたり、畜産経営に大きな経済的被害を及ぼす疾病と考えられている。BVDVはフラビウイルス科ペスチウイルス属のウイルスで、遺伝子型の違いによりBVDV1及びBVDV2が定義されている（1）。牛群内のBVDVの流行で最も問題となるのが持続感染（PI）牛の存在である。BVDVワクチンを使用していない預託育成牧場などにPI牛が侵入すると、免疫を持たない妊娠牛にBVDVが感染し、胎児が免疫寛容となり、結果として多くのPI牛が産出される（2）。

鳥取県では酪農場のバルク乳検査を中心にBVDVのPI牛の摘発を進めており、2012年までに8頭のBVDV1のPI牛を摘発している（3）。しかし、2014年に多くの酪農家が利用する県内の公共育成牧場でBVDV2のPI牛が摘発されて以降、育成牧場関連の多くのBVDV2のPI牛が摘発されている。育成牧場への預託牛は入牧前に呼吸器病対策としてBVDV1を含む生ワクチンを接種されていたが、BVDV2を含むワクチンは未接種であった。このため育成牧場内の多くの妊娠牛はBVDV2に対する免疫が十分に賦与されておらず、牧場内の同居PI牛によりBVDV2に感染し、育成牧場を介して、PI牛の入牧、育成牧場汚染、新たなPI牛産出、そのPI牛の入牧という負の連鎖が起こり、PI牛の大量発生に繋がったと考えられた（4）。

PI牛の主要な発生源となり得る育成牧場の清浄化を図るため、現在は入牧予定牛に対して入牧前にBVDV1及び2の生ワクチンの接種とBVDVの抗原検査を義務付けている。入牧前検査は年に6回実施しており、1回の処理検体数は約200検体である。抗原検査は10頭を上限としたプール血清を用いたRT-PCR（5）を実施している。しかし、RT-PCRは精密検査のため多検体処理には不向きであり、またプール検体で偽陽性が確認された場合には、再度、個体ごとの検査を実施しなければならず、最終判定までに多くの時間と労力を要する。このため代替の抗原検査法として2014年4月よりアイデックスラボラトリーズ株式会社（IDEXX(株)）から発売された抗原ELISA（抗原ELISA）の使用を検討し、検証試験を実施したのでその概要を報告する。

2 検証試験

1. 特異性の検討

病性鑑定室（当所）においてBVDVの持続感染（PI）牛と診断された牛血清22検体およびBVDV急性感染牛のペア血清（2検体）を用いて抗原ELISAを実施した。なお抗原ELISAはIDEXXの指導により実施した。その結果、PI牛と診断された牛血清22検体は全て抗原ELISA陽性となり、急性感染牛のペア血清は陰性であった（表1）。

2. 抗体陽性血清による被検血清希釈の影響の検討

あらかじめ中和抗体価を測定していたBVDV抗体陽性血清（抗体価はBVDV1:1024, BVDV2:4096）を用いて、BVDV2のPI牛血清を2倍階段希釈し抗原ELISAおよびBVDVのRT-PCRを実

施した。中和抗体価は常法により測定し、使用細胞はMDBK-SY細胞、攻撃ウイルスにはNos e株（BVDV1）、KZ91-CP株（BVDV2）を用いた。抗体陽性血清で希釈したPI牛の血清は2倍希釈から抗原ELISA陰性となったが、RT-PCRでは16倍希釈血清まで陽性となった（表2）。

3. 野外検体での検証試験

野外検体での性能を検証するため平成26年4月から7月に採材した入牧予定牛の血清437検体を用いた。抗原ELISAでは437検体中1検体で陽性となった。その後、陽性となった1検体についてはPI牛の確定診断を行った。血清を用いてRT-PCRおよびウイルス分離を実施した。ウイルス分離についてはMDBK-SY細胞を用いて37℃で4日間静置培養し、分離ウイルスの同定にはBVDV Direct FA Conjugate（VMR）を用いた直接蛍光抗体法を実施した。また2週間後に採血し、同様の検査およびペア血清を用いた中和抗体検査を実施した。2週間隔においてBVDV抗原が検出され（RT-PCR陽性、ウイルス分離陽性）、ペア血清ともBVDV1およびBVDV2に対する中和抗体を保有していなかったため、この牛をBVDVのPI牛と確定診断した。

3 考察

抗原ELISAを用いて特異性の検証を行った結果、当所でPI牛と確定診断された22検体の血清は全て陽性となった。しかし、PI牛でない急性感性症例のペア血清ではウイルス抗原が検出されなかったポスト血清のみならず、抗原が検出されたプレ血清でも抗原ELISA陰性となった。またキット添付説明書には移行抗体を保有する若齢牛では検出感度が低下する可能性があるとして記載されていたが、本試験では移行抗体を高い保有していた2検体についても抗原ELISAで検出可能であった。このため抗原ELISAはPI牛血清に対する高い特異性を有することが示唆された。

キット添付説明書に記載してある【移行抗体】による抗原ELISAの検出感度への影響を確認するために実施した血清希釈試験では、高い中和抗体を保有する野外感染血清で希釈したPI牛血清（抗原陽性血清）は、2倍希釈検体から抗原ELISA陰性になったのに対して、16倍希釈検体までRT-PCRでは検出が可能であった。この抗原ELISAはBVDVの構造タンパクであるE^{ns}領域を標的としている。E^{ns}領域はウイルスの中和反応に関与する部位であるため、抗体陽性血清で希釈した場合、中和抗体によりE^{ns}領域がマスクされてしまい、2倍希釈検体でさえ抗原ELISAで検出ができなかったと考えられる（6）。一方、今回実施したRT-PCRの標的部位はBVDVの5'末端非翻訳領域（5' UTR）のため、中和抗体の影響を受けにくく16倍希釈検体からもBVDV遺伝子が検出できたと考えられた。検証試験1.で移行抗体を保有する若齢牛血清2検体に対しても抗原ELISAで陽性となったが、血中抗体が抗原ELISAの検出感度の低下を招く可能性が示唆された。このため移行抗体を保有する若齢牛の検査や抗体保有状況が分からない血清のプール検体を検査する場合、抗原ELISAは注意して使用する必要がある。

野外検体での検証試験では437検体中1検体で陽性となり、この個体は後の確定検査でPI牛と診断された。その他の血清では偽陽性反応は認められず、野外への応用は十分可能であると考えられた。

抗原ELISAは検査開始から約3時間で結果の判定が可能で、特殊な機器を必要としないため簡易性や多検体処理性能に優れていると考える。検査コストは約500円/検体であり、年間コストは約1200頭の入牧前検査を実施すると仮定した場合、約600,000円となる。一方、RT-PCRは材料からのRNAの抽出、RTおよびPCR反応、PCR産物の電気泳動、エチジウムブロマイド染色による結果の判定と検査手技が複雑で簡易性、多検体処理性能に優れているとは言えず、使用する機器も多いため特殊な施設でしか実施できない。また判定までに約7時間と時間も要する。検査コストは約1,500円/検体であるが、検体プールが可能なため、10頭プールで検査し、5%の割合で陽性または非特異反応が出ると仮定した場合、上述の入牧検査にかかるコストは約450,000円である（表3）。特異性が高く、簡易性、迅速性に優れている抗原ELISAは多検体の検査を実施する場合のスクリーニング検査に非常に有用であるが、その一方、少数検体の検査や剖検材料を用いた検査等ではRT-PCRが有用であると思われる。それぞれの検査法の特徴を理解し、検査目的によって使い分けることが効率的なBVDVの診断に繋がると考える。

多くの妊娠牛が飼養されている預託育成牧場でのBVDV清浄性の維持はBVDV蔓延防止において非常に重要である。その清浄性維持の鍵となるBVDVの入牧前検査を始めとする、BVDVに関わる全ての検査は当所で実施してきたが、特殊な機器を必要とせず、手技が簡易な抗原ELISAは預託元の農場を管轄する現地の家畜保健衛生所（現地家保）でも十分実施可能である。今後はスクリーニング検査としてBVDVの入牧前を現地家保で実施し、陽性検体のみ当所に搬入し精密検査を実施し、確定診断を行うというような検査体制を整備していく予定である。このように検査の迅速化、効率化を図りながら、今後も預託育成牧場の清浄性を維持していく。

表1. P1件の血清および急性感染症例のペア血清を用いたELISA検証試験

検体 No.	検査 No.	月齢	遺伝子検査	ウイルス分類	遺伝子型	抗体価 Nose	抗体価 KZ-91CP	診断	S-N	ELISA判定	
1	1	48.1	+	+	BVDV1	32	4	P1件	3.910	+	
1	2	48.8	+	+	BVDV1	8	2	P1件	3.689	+	
3	3	75.3	+	-	BVDV1	64	8	急性感染 (7%)	0.012	-	
2	4	76.4	-	-	NT	409.6	128	急性感染 (ボルト)	0.005	-	
3	5	6.9	+	+	BVDV2	1	1	P1件	3.535	+	
4	6	0.8	+	+	BVDV2	1	1	P1件	3.910	+	
5	7	20.3	+	+	BVDV2	1	1	P1件	3.613	+	
6	8	0.3	+	+	BVDV2	409.6	128	P1件	3.657	+	
7	9	0.8	+	+	BVDV2	204.8	16	P1件	3.570	+	
7	10	32.7	+	+	BVDV2	1	1	P1件	3.688	+	
7	11	33.2	+	+	BVDV2	1	1	P1件	3.767	+	
8	12	3.5	+	+	BVDV2	2	1	P1件	3.669	+	
9	13	9.5	+	+	BVDV2	1	1	P1件	3.744	+	
10	14	13.4	+	+	BVDV2	1	1	P1件	3.757	+	
10	15	13.8	+	+	BVDV2	2	1	P1件	3.581	+	
11	16	2.5	+	+	BVDV2	2	1	P1件	3.616	+	
12	17	2.7	+	+	NT	NT	NT	P1件	3.499	+	
13	18	33.7	+	+	BVDV2	1	1	P1件	3.528	+	
14	19	3.1	+	+	BVDV2	1	1	P1件	3.560	+	
15	20	3.2	+	+	BVDV2	2	2	P1件	3.501	+	
16	21	42.0	+	+	NT	BVDV1	1	1	P1件	3.446	+
17	22	3.5	+	+	BVDV2	2	64	P1件	3.465	+	
18	23	3.3	+	+	BVDV2	1	1	P1件	3.507	+	
19	24	7.5	+	+	BVDV2	1	1	P1件	3.445	+	

※S-N<0.3 陽性

表2. 抗体陽性血清を用いた検体希釈の検証

検体希釈率	S-N	ELISA判定	RT-PCR
2	0.1595	---	+
4	0.0525	---	+
8	0.0205	---	+
16	0.0015	---	+
32	-0.0065	---	---
64	-0.0085	---	---
128	-0.0075	---	---
256	0.0045	---	---

※S-N>0.3 陽性

表3. 抗原ELISAとRT-PCRの比較

検査方法	迅速性	陽陽性	多検体処理	検体プール	遺伝子型別*	検査費用 (円) **	
						単価	年間
ELISA	○	○	○	×	×	500	600,000
RT-PCR	△	×	△	○	○	1,500	450,000

※PCR産物のRFLPにより判定
 ※※検査頭数は入牧前検査1200頭/年、RT-PCRは5頭プールで実施し、5%の確率で陽性（非特異）となりリテストを行った場合を想定して算出

4 謝辞

本稿を終えるにあたり貴重なご助言を頂きましたIDEXX(株)の相澤早苗先生ならびに(独)動物衛生研究所の亀山健一郎先生に深謝いたします。

5 引用文献

- (1) 田島誉士:日獣会誌, 65, 11-117 (2012)
- (2) 田島誉士:家畜診療, 62巻1号, 5-10 (2015)
- (3) 増田恒幸:平成24年度鳥取県畜産技術業績発表会集録,
http://www.pref.tottori.lg.jp/secure/831113/h24_20.pdf (2013)
- (4) 増田恒幸:平成25年度鳥取県畜産技術業績発表会集録,
<http://www.pref.tottori.lg.jp/secure/916963/25-19.pdf> (2014)
- (5) Vilcek S, et al : Arch Virol, 136, 309-323 (1994)
- (6) Weiland E, et al : J Virol, 66, 3677-3682 (1992)