

3 メガファームにおける牛ウイルス性下痢ウイルススクリーニング検査方法の検討

県中央家畜保健衛生所

濱谷景祐、齋藤俊哉、高橋一郎

はじめに

牛ウイルス性下痢ウイルス(以下 BVDV という)による疾病の発生は世界各地でみられ、成牛に急性感染を起こし、下痢、発育不良、泌乳量の減少及び繁殖障害などによる生産性の低下が起こる¹⁾。また、妊娠 100 日前後の牛が BVDV に暴露され、胎子が子宮内感染すると、胎子はその BVDV に対して免疫寛容となり、持続感染(以下 PI という)牛として娩出される²⁾。この PI 牛は、多量のウイルスを生涯にわたり排泄し続けるが、明確な症状を示さない場合が多く、牛群内及び農場間に感染を広げ新たな PI 牛を生む主要因となる。そのため、本疾病の対策としては、PI 牛を中心とした感染個体の早期摘発が重要である¹⁾²⁾。

近年、メガファームと称する酪農経営形態が増えつつあるが、そこに PI 牛がいることが疑われた場合、牛群内から PI 牛を摘発するには、検体数が多い分、検査に要する時間及び経費は莫大となる。また、農場内で飼養されながら一見無症状の PI 牛を摘発できない場合、その経済的損失も多大になることが予想される。したがって、的確な検査により早期にまん延防止及び清浄化を図ることが重要である。

すでに、バルク乳を利用した遺伝子検査が有用であることが知られているが、対象が搾乳牛に限定されるため早期に全頭検査できないことが問題であった。当研究室では、過去にプール血清を利用した遺伝子検査及び齋藤らの MDBK-SY 細胞を用いたウイルス分離検査

³⁾(以下「簡易法」という)の併用活用について報告している⁴⁾。この遺伝子検査についてプールする検体数をさらに増やすことにより、早期の農場内全頭検査が可能となることから、効率的かつ省力的な BVDV スクリーニング検査方法の確立を目的に、多検体プール血清を利用した遺伝子検査及び簡易法の併用活用について検証したので、その概要を報告する。

試験 1

希釈 PI 牛血清による検査感度の検証

材料と方法

平成 23~26 年に摘発された PI 牛の血清 14 頭分を材料として、96 検体プールを想定し PI 牛血清 10 μ l に BVDV フリーの市販牛胎子血清 950 μ l を加えて 96 倍希釈した。陽性対照として当研究室保存の BVDV1 型 Nose 株を 10^4 TCID₅₀ から 10^{-1} TCID₅₀ まで 6 段階 10 倍階段希釈した。検査は RT-PCR (Vilcek ら⁷⁾) 及び virotype BVDV RT-PCR Kit(QIAGEN)によるリアルタイム PCR(以下 qPCR という)を行い、同時に個別検査として簡易法によるウイルス分離検査を実施した。簡易法では、1 検体につき 1 穴を用い、被検血清 14 μ l と MDBK-SY 細胞浮遊液 0.19ml を接種し、37 静置培養後、CPE を指標として判定³⁾した。

結果

RT-PCR では通常の 35 サイクルで全ての検

体で遺伝子を検出したが、No.4 及び 5 ではバンドが薄く不明瞭であったため、増幅サイクルを 35 から 50 サイクルに増やしたところ、バンドは明瞭となった。また、qPCR では、陽性対照とした Nose 株は希釈段階に応じてすべて検出された（図 1）。一方、PI 牛の希釈血清も Ct 値 27.9 ~ 30.4 ですべて検出され、検査結果の判定も容易であった（図 2）。簡易法では、No.4, 11, 13 を除く他の検体でウイルスが分離された。

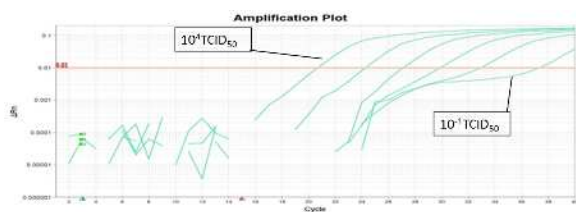


図 1 qPCR における陽性対照 (Nose 株: $10^4 \sim 10^1$ TCID₅₀) の検出結果

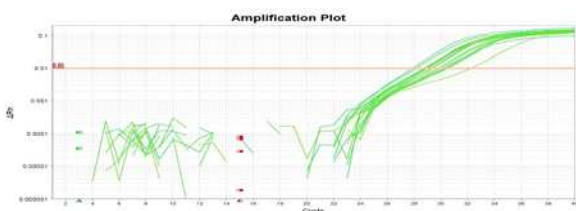


図 2 qPCR における PI 牛希釈血清の検出結果 (No. 1 ~ 14)

試験 2

県内メガファームでの野外試験

検査対象

農場内に PI 牛の存在が疑われた、飼養規模 1,233 頭の県内 A 農場

材料と方法

材料は、平成 27 年サーベイランスの残余血

清を用いた。通常、サーベイランスでは、ヨネ病スクリーニング検査のため、deep well tube に分注する。これらを 12 連ピペットにて 14 μ l ずつ、まず、ウイルス分離用に 96 穴マイクロプレートへ接種し、次に、リザーバーを使用し、96 検体ごとのプール検体を 1 検体として、合計 13 検体を検査に供した。検査方法については試験 1 と同様に実施した。

結果

遺伝子検査において、A 農場のプール血清 13 検体から特異遺伝子は検出されず、簡易法による 1,233 検体のウイルス分離検査もすべて陰性であった。今回の検査により、採材当時の A 農場における BVDV の清浄性を確認することができた。

考察

報告によると、PI 牛の血清中に排泄される BVDV は、 $10^{4.25} \sim 10^{4.5}$ TCID₅₀ 程度と報告されている⁵⁾。また、他の報告では、100 検体プール血清でも遺伝子検査により検出が可能とされている⁶⁾。今回、我々も試験 1 により 96 検体プールと同等の倍率に希釈した PI 牛の血清について十分に検出が可能であったことから、96 検体プール血清の利用についても可能と判断した。ただし、移行抗体を保有した若齢牛の場合、プール血清で遺伝子が検出されても、簡易法で個体特定できないことがあるため注意が必要である。

通常、血清を 1.5ml チューブに保存していた場合、ウイルス分離用として 1 検体ずつ 96 穴マイクロプレートへの血清接種と、遺伝子検査用として 2ml チューブにプールする必要がある。多検体でのその作業は非常に煩雑であった。しかし、今回、deep well tube、リ

ザーバー及び12連ピペットを用いることで、簡易法の血清接種とプール血清の作製を一連の作業の中で効率的かつ省力的に行うことができ、メガファームが検査対象となる場合においては、特に有用である。

検査経費の面では、RT-PCRでは1検体あたり1,200円の経費を要するが、今回の96検体プールによる遺伝子検査及び簡易法を併用することで、その経費を約100分の1に低減させることが可能となった。同じスクリーニング検査としては、バルク乳を利用した検査も有効とされるが、乾乳牛は検査対象とならない。一度に全頭検査が可能な点においても、プール血清を用いた遺伝子検査は有用であると考えられた。

今回検討したBVDVスクリーニング検査は、農場全頭が一度に検査可能で、残余血清を利用すれば採材の手間を省き、検体取扱いの効率化及び省力化を図ることが可能である。また、検査経費も約100分の1に低減でき、現場で実施可能なPI牛の早期摘発検査として有用と思われる。今後は、メガファームにおける多検体検査以外にも、預託先でPI牛が確認された場合の農場内全頭検査等、野外での事例に活用することで、BVDVのまん延防止及び清浄化の一助としたい。

参考文献

- 1) K Kameyama. et al. Studies for domestic distribution of Bovine viral diarrhea virus and rapid diagnosis of Bovine viral diarrhea-mucosal disease in Japan, Bull. Natl. Inst. Anim. Health No. 118, 19-22, 2012
- 2) 田島誉士. 牛ウイルス性下痢ウイルス感染症, 日獣会誌, 65: 111-117, 2004

- 3) 齋藤俊哉ら. 牛腎由来株化細胞 MDBK-SYを用いた牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛の簡易検査方法, 日獣会誌, 57(12), 785-788, 2004
- 4) 筆者ら. 牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛の摘発検査方法の検討, 第55回栃木県家畜保健衛生業績発表会
- 5) 坪井考益ら. 農林水産省家畜衛生試験場研究報告, 第104号, 15-21
- 6) Weinstock D, Bhudevi B, Castro AE et al. Single-tube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of bovine viral diarrhea virus in pooled bovine serum. J Clin Microbiol. 2001 Jan; 39(1): 343-6.
- 7) Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ: 136, 309-323 (1994)