

—日本で使用されている動物用診断薬 (X)—  
牛感染症とその診断薬の概説

9 牛ウイルス性下痢・粘膜病

齋藤明人<sup>†</sup> (農林水産省動物医薬品検査所)

1 牛ウイルス性下痢・粘膜病の概要

牛ウイルス性下痢・粘膜病 (BVD) は、牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) による疾病で、発育不良、下痢、呼吸器症状を主徴とし、流産などの繁殖障害や稀に致死的な粘膜病を起こす。家畜伝染病予防法の届出伝染病 (牛、水牛) に指定されており、1998年以降の発生状況を見ると、発生頭数は、1998年が7頭、2001年以降は100頭前後で推移していたが、2011年は228頭、2012年は189頭、2013年は228頭であり、ここ数年は200頭前後となっている [1]。

BVDVは、フラビウイルス科ペスチウイルス属に分類されるプラス1本鎖のRNAウイルスであり、遺伝子型により1型と2型に分類される。感染牛の唾液、鼻汁、糞、尿、乳汁、精液など、あらゆる分泌物に含まれ、感染源となり、経口・経鼻で感染する。日本では、1967年に初めて分離された。宿主は、牛、めん羊、山羊、豚、鹿、水牛などであるが、牛への感受性が最も高い [2]。

BVDVが抗体陰性妊娠牛に感染すると、垂直感染により、死流産や奇形等の先天性異常を引き起こし、特に免疫能が獲得される時期 (胎齢80~120日) にBVDVに感染すると、生まれてきた子牛は免疫寛容となり、持続感染牛となる [3]。持続感染牛は、外見上は正常牛と区別がつかないが、BVDVを体内で産生し、分泌物中に排泄することにより、牛群内の汚染源となる。また、致死的な粘膜病となりやすい。粘膜病発症牛は、消化器にび爛、潰瘍が認められ、致死率は非常に高い (90~100%)。

非妊娠牛では、不顕性感染が多く、一過性の発熱や呼吸器症状、下痢を示すことがあるが、抗体を産生し、回復する。

予防方法としては、ワクチン (1型又は1型と2型を含む生ワクチン、1型と2型を含む不活化ワクチン) が

ある。治療方法はない。

2 診断方法

診断方法は、ウイルスの分離同定である。血液、尿、臓器からウイルス分離が可能であるが、初乳を摂取した子牛では、移行抗体の影響によりウイルス分離が陰性となることがあり注意を要する。この他、PCRによるウイルス遺伝子の検出がある。

3 診断薬の概要

BVDの診断薬として、牛ウイルス性下痢・粘膜病診断用金コロイド標識抗体反応キット及び牛ウイルス性下痢・粘膜病診断用酵素抗体反応キットの2種類が承認されている (表)。ともにBVDV抗原を検出するものである。使用方法及び判定については、概略を表に示している。詳細は使用説明書を参照のこと。

(1) 牛ウイルス性下痢・粘膜病診断用金コロイド標識抗体反応キット

①原理

イムノクロマト法を原理とし、白血球分画 (バフィーコート) 中のBVDV抗原を金コロイド標識抗BVDV NS3マウスモノクローナル抗体と反応させ、捕捉用モノクローナル抗体で捕捉し、可視化することで判定する。

②製法

金コロイド標識抗BVDV NS3マウスモノクローナル抗体をパッドに吸着させたものと、抗BVDV NS3マウスモノクローナル抗体をメンブレンに塗布させたものを、テストプレートとして組み合わせて製剤とする。

<sup>†</sup> 連絡責任者: 齋藤明人 (農林水産省動物医薬品検査所検査第一部)

〒185-8511 国分寺市戸倉1-15-1

☎042-321-1841 FAX 042-321-1769

E-mail: saito@nval.maff.go.jp

表 日本で承認されている牛ウイルス性下痢・粘膜病診断薬の概要

商品名	製造販売業者名	使用目的	使用方法（概略）		承認年月日
			使用方法	判定	
テストン トBVDV	㈱タウンズ	牛血液中の牛ウイルス性下痢ウイルス NS 3 抗原の検出	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 被験牛より全血 2ml 以上を採血する。</li> <li>2) 血液よりバフィーコートを回収し、赤血球溶解液を加え、遠心、白血球ペレットを回収する。</li> <li>3) 洗浄液に浮遊させ、遠心し、沈殿した白血球に白血球溶解液を加え、室温で 2～3 分静置後遠心し、上清を試料とする。</li> <li>4) テストプレートを取り出し、試料 100 <math>\mu</math>l を試料滴下部に滴下する。</li> <li>5) 室温で 15 分間静置し、判定窓内の検出部位 [T] と反応確認部位 [C] の赤紫色のラインの発色の有無を観察する。</li> </ol>	反応確認部位 [C] に赤紫色のラインが出現した場合、検査が正常に行われたものと判定する。検出部位 [T] に赤紫色のラインが出現した場合を BVDV 抗原陽性と判定する。	平成24年 9月13日
IDEXX BVDV Ag エリ ーザキッ ト	アイデックス ラボ ラトリー ズ㈱	牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV I 型及び II 型) 持続感染牛の血清における BVDV 抗原の検出	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) マイクロプレートを準備する。</li> <li>2) 検出抗体液を全ウェルに分注する。</li> <li>3) 指示陰性抗原を 2 ウェル、指示陽性抗原を別の 2 ウェルに分注する。</li> <li>4) 検体を残りのウェルに分注する。</li> <li>5) 37℃で 2 時間又は 2～8℃で 12～18 時間反応させる。</li> <li>6) 洗浄液で 5 回洗浄する。</li> <li>7) コンジュゲートを各ウェルに分注する。</li> <li>8) 室温で 30 分間反応させる</li> <li>9) 洗浄液で 5 回洗浄する。</li> <li>10) TMB 溶液を各ウェルに分注する。</li> <li>11) 遮光し、室温で 10 分間反応させる。</li> <li>12) 反応停止液を各ウェルに分注する。</li> <li>13) 450nm で測定する。</li> </ol>	指示陽性抗原 2 ウェルの平均吸光度を P、指示陰性抗原 2 ウェルの平均吸光度を N、検体の吸光度を S として S-N を求める。  S-N : 0.300 以下 陰性 S-N : 0.300 より大 陽性  ただし、N は 0.250 以下かつ P-N は 0.150 以上でなければならない。	平成25年 9月25日

③使用上の注意

判定時間を過ぎたテストプレートは、乾燥等により結果が変化することがあるので、判定に使用しないこと。

被験血液は、検査まで冷所保存し、凍結しないこと。

テストプレートは使用事開封し、開封後速やかに使用すること。冷蔵保存していた場合は、室温に戻してから使用すること。

(2) 牛ウイルス性下痢・粘膜病診断用酵素抗体反応キット

①原理

サンドイッチ ELISA 法を原理とし、プレートに吸着させた 3 種類の BVDV モノクローナル抗体と血液中の BVDV 抗原を反応させ、さらにペルオキシダーゼ標識抗体と反応・発色させて検出するものである。

②製法

3 種類の BVDV モノクローナル抗体をプレートに吸着させたもの、ペルオキシダーゼを標識抗体としたもの、TMB を発色基質液としたもの等を組み合

わせて製剤とする。

③使用上の注意

検体は非動化していない血清を使用し、全血又は血漿は使用しないこと。

使用時には、室温に戻してから使用し、使用後は 2～8℃で保存すること。

(3) その他

両診断薬とも、確定診断は、ウイルス分離など他の検査結果と合わせて獣医師が総合的に判断すること。また、BVDV の持続感染であることの確定には、2～3 週間後の再検査でウイルス抗原を検出することが必要である。

参考文献

[1] 農林水産省 HP : 監視伝染病の発生状況 ([http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi\\_densen/kansi\\_densen.html](http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/kansi_densen.html))

[2] 動物の感染症, 小沼 操他編, 第二版, 108, 近代出版, 東京 (2002)

[3] 迫田義博: 牛ウイルス性下痢病 (BVD) の現状と今後の課題, 日獣会誌, 60, 817-819 (2007)

# 10 牛カンピロバクター症

平野文哉<sup>†</sup>（農林水産省動物医薬品検査所）

## 1 牛カンピロバクター症の概要

カンピロバクター属菌には、17菌種が含まれる。多くの哺乳類や鳥類の消化管、生殖器、口腔内に常在しており、そのうちのいくつかの菌種では動物や人に病原性を示すことが知られている [1]。ここでは、わが国で承認のある診断薬の対象疾病である「牛カンピロバクター症」について概要を示す。

牛カンピロバクター症は、*Campylobacter fetus* subsp. *fetus* 及び *C. fetus* subsp. *venerealis* によって引き起こされる、不妊や流産等の繁殖障害を主徴とする感染症である [2]。わが国においては、年に数件程度の発生が認められる [3]。

流産については、全妊娠期間を通して見られるが、特に妊娠中期での発生が多い。また、雄牛では無症状で精液性状にも異常が認められない [4] が、感染源となることから、検査による保菌牛の摘発が重要と考えられる。

主な感染経路は、経口感染 (*C. fetus* subsp. *fetus*) 及び交尾感染 (*C. fetus* subsp. *venerealis*) である。汚染された精液や人工授精器具等によって、直接または間接的な生殖器相互の接触によって伝播されることも多い [2]。

牛カンピロバクター症は、家畜伝染病予防法施行規則により届出伝染病（対象：牛及び水牛）に、家畜改良増殖法施行規則により、種畜の交配に伴う疾病の蔓延防止を目的とした種畜検査の対象疾病に指定されている。

## 2 診断方法

疫学調査や臨床検査により、不受胎牛や流産牛が認められた場合、ちつ粘液を用いて試験管凝集反応を行う。

また、臨床検査、剖検及び細菌検査で得られた試料について、蛍光抗体法でスクリーニング的に検査を行う。蛍光抗体法の他に、PCR検査や病理組織学的検査も行われている [5]。わが国で承認のある診断薬には、「牛カンピロバクター病診断用蛍光標識抗体」及び「カンピロバクター・フィタス凝集反应用菌液（ちつ粘液凝集反应用菌液）」がある（表）。なお、本稿では、商品名及び成分（菌）名は、承認内容に合わせて記載することとした。

## 3 診断薬の概要

### (1) 牛カンピロバクター病診断用蛍光標識抗体

#### ア 診断薬の原理

直接蛍光抗体法による。

#### イ 診断薬の製法

カンピロバクター・フィタスの2亜種4菌株で免疫した羊血清のγグロブリン分画にフルオレセイン・イソチオシアネートを標識し、遊離色素及び非特異物質を除去した後に、染色力価を4倍以上になるように調整し、凍結乾燥した多価蛍光標識抗体である。

#### ウ 診断薬の使用法

蛍光標識抗体に、付属の溶解用液全量を加えて振盪溶解する。溶解した蛍光標識抗体を使用前に3,000rpmで15分間遠心する。包皮洗浄液や、精液等の可検標本と添付の指示菌液をそれぞれ別のスライドグラスに塗抹し、火焰固定したのち、乾燥を防ぎながら37℃、30分間蛍光標識抗体で染色する。染色終了後、リン酸緩衝食塩液で30分間洗浄する。この間、数回液をとりかえる。洗浄後、緩衝グリセ

表 承認製剤一覧

商品名	主成分	使用目的	製造販売業者名	承認年月日
牛カンピロバクター病診断用蛍光標識抗体	カンピロバクター・フィタスベネレアル型UM株、1336株及びフィタス型今帰仁株、661株蛍光標識抗体	カンピロバクター・フィタス菌体の検出	(獨)農業・食品産業技術総合研究機構	昭和50年3月15日
カンピロバクター・フィタス凝集反应用菌液（ちつ粘液凝集反应用菌液）	カンピロバクター・フィタスベネレアル型UM株の死菌液	ちつ粘液中のカンピロバクター・フィタスに対する凝集抗体の検出	(獨)農業・食品産業技術総合研究機構	昭和60年5月28日

<sup>†</sup> 連絡責任者：平野文哉（農林水産省動物医薬品検査所検査第一部）

〒185-8511 国分寺市戸倉1-15-1

☎042-321-1841 FAX 042-321-1769

E-mail: humiya\_hirano@nval.maff.go.jp

リン液で封入し、蛍光顕微鏡で観察する。指示菌とほぼ同様の特異蛍光を示すカンピロバクター・フィタス菌体が認められたとき陽性と判定する。

## (2) カンピロバクター・フィタス凝集反応用菌液（ちつ粘液凝集用菌液）

### ア 診断薬の原理

凝集反応による。

### イ 診断薬の製法

カンピロバクター・フィタスの培養菌を集菌・洗浄し、0.3vol%ホルマリン加生理食塩液にマクファーランド混濁管No. 3の濃度に浮遊させ、抗原価を調整したものである。

### ウ 診断薬の使用法

タンポン、ピペットあるいは綿棒で採取したちつ粘液に、約10倍量の0.3vol%ホルマリン加生理食塩液（以下、希釈液とする）を加えて室温に24時間放置し、粘液中の抗体を十分に溶出させたものをちつ粘液溶出原液とする。ちつ粘液溶出原液を、希釈液を用いて希釈し、適宜の倍数まで希釈系列を作る。溶出液の希釈系列の各試験管に診断用菌液0.5mlを加え、よく振ってから37℃で18～24時間感作後判定する。判定のために、あらかじめ標準比濁管（100%、75%、50%、25%及び0%凝集度）

を作成しておく。この標準混濁管と比較しながら、50%凝集以上を示す溶出液の最終希釈倍数から、判定表に従って判定する。

## 4 そ の 他

採材について、発情期の雌牛は、抗体が希釈されてしまうため、できるだけ黄体期の粘液を試料として用いることが望ましい。また雌雄牛共に、牛相互の感染を起さないように、採取時に使用する器材等については、衛生的に取り扱うようお願いしたい。

## 参 考 文 献

- [1] 見上 彪：カンピロバクター属と感染症，獣医微生物学第2版，82-84（2003）
- [2] 見上 彪：牛カンピロバクター症，獣医感染症カラーアトラス第2版，131（2006）
- [3] 農林水産省：監視伝染病の発生状況（農林水産省HP：[http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi\\_densen/kansi\\_densen.html](http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/kansi_densen.html)）（2010）
- [4] 独農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所：牛カンピロバクター症（[http://www.naro.affrc.go.jp/org/niah/disease\\_fact/t18.html](http://www.naro.affrc.go.jp/org/niah/disease_fact/t18.html)）（2011）
- [5] 農林水産省消費・安全局：病性鑑定指針（平成10年10月22日付け10畜A第1937号農林水産省畜産局長通知）96-99（2010）

---

## 11 その他感染症と抗体検出用抗原 （製品の一覧表のみ）

中村成幸<sup>†</sup>（農林水産省動物医薬品検査所）

表 わが国で承認されているアカバネ病診断薬の概要

商品名	製造販売業者	使用目的	測定原理	承認年月日
アカバネエライザキット	JNC(株)	牛血清中のアカバネウイルスに対する抗体の検出	競合エライザ法	平成17年 8月26日

注：「牛感染症とその診断薬の概説」の1から10で紹介した診断薬以外で入手可能な診断薬を選び記載した。

---

<sup>†</sup> 連絡責任者：中村成幸（農林水産省動物医薬品検査所検査第一部）

〒185-8511 国分寺市戸倉1-15-1

☎042-321-1841 FAX 042-321-1769

E-mail : nakamura@nval.maff.go.jp