

新たに市販された抗原 ELISA を用いた牛ウイルス性 下痢ウイルス検査の検証

増田恒幸^{1)†} 足羽朋子¹⁾ 山里比呂志¹⁾ 亀山健一郎²⁾

1) 鳥取県倉吉家畜保健衛生所 (〒682-0017 倉吉市清谷町 2-132)

2) (国研)農業・食品産業技術機構 動物衛生研究所 ウイルス・疫学研究領域
(〒305-0856 つくば市観音台 3-1-5)

(2015年8月14日受付・2016年1月8日受理)

要 約

鳥取県では2013年から公共牧場での牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) まん延防止対策として、RT-PCRによる全入牧牛のBVDV検査を実施している。RT-PCRによる検査は多くの時間と労力を要するため、E^{trns} 捕捉 ELISA キット (抗原 ELISA) の導入を検討した。BVDV の持続感染 (PI) 牛血清 22 検体及び BVDV 急性感染牛のペア血清を用いて ELISA を実施した結果、PI 牛血清 22 検体はすべて陽性、急性感染牛のペア血清は陰性となった。また、PI 牛 1 頭を含む 646 頭の野外血清を用いた場合も PI 牛 1 頭のみ陽性、ほかはすべて陰性となった。一方、血中抗体の影響を調べる目的で PI 牛血清に抗 BVDV 抗体陽性血清を混合した検体を用いたところ、抗体価 128 倍以上の場合に ELISA 結果が陰転する例が確認された。これらの成績から、移行抗体を保有する子牛の検査には注意が必要であるが、特異性が高く、手技が容易な抗原 ELISA は BVDV のスクリーニング検査に有用であると考えられた。

——キーワード：抗体陽性血清、抗原検出 ELISA、牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV)、RT-PCR。

-----日獣会誌 69, 187~191 (2016)

牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) による病態は多岐にわたり、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テウイルス属に属し、その遺伝的な違いや抗原性の差から 1 型ウイルス (BVDV-1) 及び 2 型ウイルス (BVDV-2) に分類されている [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、胎子が免疫寛容となり、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 PI 牛の摘発を進めており、2012 年までに 8 頭の BVDV-1 の PI 牛を摘発している。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において BVDV-2 の PI 牛が摘発されて以降、この育成牧場と関連する多くの農場において BVDV-2 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 BVDV-1 を

含む生ワクチンの接種が義務付けられていたが、BVDV-2 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 BVDV-2 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 BVDV-2 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 牛の大量発生につながったと考えられた。PI 牛の主要な発生源となった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 BVDV-1 及び 2 を含む生ワクチンの接種と BVDV の遺伝子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。遺伝子検査は 10 頭を上限としたプール血清を用いた RT-PCR [3] を実施している。しかし、RT-PCR は手技が煩雑で多検体処理には不向きであり、またプール検体で陽性または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。海外では 1990 年代の初めから比

† 連絡責任者：増田恒幸 (鳥取県倉吉家畜保健衛生所)

〒682-0017 倉吉市清谷町 2-132 ☎0858-26-3341 FAX 0858-26-8164 E-mail: masudat@pref.tottori.jp

抗原 ELISA を用いた BVDV 検査の検証

表1 検証試験に供した PI 牛の検体情報と抗原 ELISA の結果

個体 No.	検体 No.	月齢	検体情報	RT-PCR	遺伝子型	中和抗体価*		ELISA**	
						Nose 株	KZ-91CP 株	S-N	判定
1	1	48.1	PI 牛	+	BVDV-1	32	4	3.910	+
	2	48.8		+	BVDV-1	8	2	3.689	+
2	3	75.3	急性感染(プレ)	+	BVDV-1	64	8	0.012	-
	4	76.4	急性感染(ポスト)	-	-	4,096	128	0.005	-
3	5	6.9	PI 牛	+	BVDV-2	1	1	3.535	+
4	6	0.8	PI 牛	+	BVDV-2	1	1	3.910	+
5	7	29.3	PI 牛	+	BVDV-2	1	1	3.613	+
6	8	0.3	PI 牛	+	BVDV-2	4,096	128	3.657	+
	9	0.8		+	BVDV-2	2,048	16	3.570	+
7	10	32.7	PI 牛	+	BVDV-2	1	1	3.688	+
	11	33.2		+	BVDV-2	1	1	3.767	+
8	12	3.5	PI 牛	+	BVDV-2	2	1	3.669	+
9	13	9.5	PI 牛	+	BVDV-2	1	1	3.744	+
10	14	13.4	PI 牛	+	BVDV-2	1	1	3.757	+
	15	13.8		+	BVDV-2	1	1	3.581	+
11	16	2.5	PI 牛	+	BVDV-2	2	1	3.616	+
12	17	2.7	PI 牛	+	BVDV-2	NT	NT	3.499	+
13	18	33.7	PI 牛	+	BVDV-2	1	1	3.528	+
14	19	3.1	PI 牛	+	BVDV-2	1	1	3.560	+
15	20	3.2	PI 牛	+	BVDV-2	2	2	3.501	+
16	21	42.0	PI 牛	+	BVDV-1	1	1	3.446	+
17	22	3.5	PI 牛	+	BVDV-2	2	64	3.465	+
18	23	3.3	PI 牛	+	BVDV-2	1	1	3.507	+
19	24	7.5	PI 牛	+	BVDV-2	1	1	3.445	+

*：中和抗体価は常法により測定し、2 倍未満を 1、4,096 倍以上を 4,096 とした。使用細胞は MDBK-SY 細胞、中和用ウイルスには Nose 株 (BVDV-1)、KZ-91CP 株 (BVDV-2) を用いた。

**：指示陰性抗原の吸光度を N、検体の吸光度を S として S-N を算出し、S-N が 0.3 より大きいものを陽性とした。
NT：実施せず

較的容易かつ短時間で実施できる抗原検出 ELISA が BVDV の診断に用いられてきた [4, 5]。近年では高感度で高い特異性を持つ BVDV の構造蛋白である E^{ns} 捕捉 ELISA キットが市販されており [6]、わが国においても 2014 年 4 月から販売が開始された。本報では RT-PCR の代替の抗原検査法としてこの抗原検出 ELISA キットの使用を検討するとともに、その性能についての検証試験を実施したので、その概要について報告する。

材料及び方法

特異性の検証：PI 牛に対する特異性を検証するために、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 18 頭の血清延べ 22 検体 (検体 No. 1, 2 及び 5~24) 及び BVDV 急性感染牛 1 頭のペア血清 (検体 No. 3 及び 4) を用い抗原 ELISA キット (BVDV Ag エリーザキット, アイデックス ラボラトリーズ(株), 東京) を実施した。検査手順及び判定は付属の説明書にしたがった。具体的には、指示陽性抗原 2 ウェルの平均吸光度を P、指示陰性抗原の吸光度を N、検体の吸光度を S として S-N を算出し、S-N が 0.3 より大きいものを陽性とした。試験に供した個体及び検体の詳細は表 1 に

示すとおりである。

野外検体での検証試験：野外検体での検出効率を検証するため、平成 26 年 4 月~平成 27 年 1 月に採材した入牧予定牛の血清 646 検体を用いて従来法と抗原 ELISA の比較を行った。従来法は MDBK-SY 細胞を用いたウイルス分離及びプール血清 PCR を実施した。ウイルス分離は被検血清を接種した MDBK-SY 細胞を 37℃ で 4~10 日間静置培養し、CPE を基準に判定した。プール血清 PCR は 20 頭を上限として被検血清をプールし、プライマーセット 103-373 を用いた RT-PCR [7] により特異遺伝子を検出した。いずれかの検査で抗原が検出された牛については 2 週間後に採血し、同様の検査及びペア血清を用いた中和抗体検査を実施した。分離ウイルス及び遺伝子型の同定は市販のキット (BVDV Direct FA Conjugate, VMRD Inc., U.S.A.) を用いた直接蛍光抗体法及び制限酵素 *Pst* I を用いた制限酵素切断長多型 (RFLP) 解析 [8] により行った。

血清中抗体が抗原 ELISA の検出感度に与える影響についての検証：血清中の抗 BVDV 抗体が結果に与える影響について検討するため、抗 BVDV 抗体を含む牛血清 (以下、抗体陽性血清) を希釈し、BVDV-1 及び 2

表2 BVDV-1のPI牛血清に2倍階段希釈した抗体陽性血清を混和した際の抗原ELISA結果

	抗体陽性血清			
	No. 1 (1,024)	No. 2 (4,096)	No. 3 (512)	No. 4 (8)
	2,048	NA	+/+	NA
	1,024	NA	+/+	NA
	512	+/+*	+/+	NA
	256	+/+	+/+	+/+
抗 Nose	128	+/+	+/+	+/+
抗体価	64	+/+	+/+	+/+
(算定値)	32	+/+	+/+	+/+
	16	+/+	+/+	+/+
	8	+/+	+/+	+/+
	4	+/+	+/+	+/+
	2	+/+	+/+	+/+

*RT-PCR/抗原ELISAの成績をそれぞれ示す。
括弧内は抗体陽性血清原液のNose株に対する抗体価を示す。
NA:該当なし

表3 BVDV-2のPI牛血清に2倍階段希釈した抗体陽性血清を混和した際の抗原ELISA結果

	抗体陽性血清			
	No. 1 (4,096)	No. 2 (1,024)	No. 3 (16)	No. 4 (2,048)
	2,048	+/-*	NA	NA
	1,024	+/-	NA	+/+
	512	+/+	+/-	+/+
	256	+/+	+/-	+/+
抗 KZ	128	+/+	+/-	+/+
-91CP	64	+/+	+/+	+/+
抗体価	32	+/+	+/+	+/+
(算定値)	16	+/+	+/+	+/+
	8	+/+	+/+	+/+
	4	+/+	+/+	+/+
	2	+/+	+/+	+/+

*RT-PCR/抗原ELISAの成績をそれぞれ示す。
括弧内は抗体陽性血清原液のKZ-91CP株に対する抗体価を示す。
NA:該当なし

のPI牛の血清と混和した検体を用いて抗原ELISA及びRT-PCRを実施した。詳細には、牛4頭から採取した抗体陽性血清を市販のBVDVフリー牛血清で2倍階段希釈し、BVDV-1及び2に対する抗体価が計算上1以下となるまでの希釈列を作製した。次に各希釈血清にBVDV-1もしくはBVDV-2のPI牛の血清を等量混合し、検体とした。なお、この2頭のPI牛は表1に含まれていない個体である。RT-PCRはプライマーセット324-326 [3]を用いて実施した。抗BVDV抗体陽性血清の中和抗体価は定法により測定した。各抗体陽性血清の中和抗体価(抗Nose株, 抗KZ-91CP株)は、No. 1:(1,024, 4,096), No. 2:(4,096, 1,024), No. 3:(512, 16), No. 4:(8, 2,048)であった。希釈血清に混和したPI牛の血清のウイルス力価(遺伝子型)はBVDV-1 $10^{3.1}TCID_{50}/ml(1a)$ 及びBVDV-2 $10^{4.3}TCID_{50}/ml(2a)$ であった。陰性対照にはNo. 3及び4のプレ血清であるBVDV抗体及び抗原陰性血清を用いた。

成 績

特異性の検証: PI牛と診断された牛血清22検体は月齢に関わらずすべての個体で抗原ELISA陽性となった。また、PI牛の血清及び急性感染牛のプレ血清はプライマーセット324-326を用いたRT-PCR [3]において陽性を示し、ポスト血清は陰性を示したが、抗原ELISAではプレ及びポスト血清ともに陰性であった(表1)。

野外検体での検証試験: 従来法及び抗原ELISAのいずれにおいても検査した646検体中1検体のみが陽性となった。陽性となった1検体については、2週間後の再検査においても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Nose株及び

KZ-91CP株に対する中和抗体を保有していなかった。その後、RFLP解析によりこの牛をBVDV-2のPI牛と確定診断した。

血清中抗体が抗原ELISAの検出感度に与える影響についての検証: 抗体陽性血清の希釈列にBVDV-1のPI牛の血清を混和した検体では4頭の抗血清のいずれの希釈段階においても抗原ELISA, RT-PCRともに陽性となった(表2)。一方、BVDV-2のPI牛の血清を混和した検体ではRT-PCRはすべて陽性となったものの、抗原ELISAではNo. 1が算定値1,024倍以上、No. 2が128倍以上及びNo. 4が512倍以上で陰性となった(表3)。陰性対照として用いた抗BVDV抗体陰性血清(抗体陽性牛No. 3及びNo. 4のプレ血清)ではBVDV-1及びBVDV-2いずれのPI牛血清と混和した場合も抗原ELISA, RT-PCRともに陽性となった(データ示さず)。

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検体の血清はすべて陽性と判定された。また、646検体の野外材料を用いた試験においても、確定診断でBVDV-2のPI牛と診断された1検体のみが陽性となり、その他はすべて陰性と判定された。これらの結果は従来法であるウイルス分離及びプール血清のRT-PCRによる診断と完全に一致した。

一方、PI牛でない急性感染症例のペア血清(表1, No. 3及び4)ではポスト血清のみならず、RT-PCRでウイルス遺伝子が検出されたプレ血清でも抗原ELISA陰性となった。この結果から、抗原ELISAはRT-PCRよりも検出感度は落ちるものの、本抗原ELISAがPI牛の診断に有用であることが示された。急性感染個体の検

出については、今回 1 症例 1 頭のみ成績であるため、今後症例を重ね検討していく必要があると考えられた。

血清中の BVDV 抗体による抗原 ELISA への影響を確認した試験では、KZ-91CP 株に対する算定抗体価 128 倍以上の血清と BVDV-2 の PI 牛血清を反応させた場合に抗原 ELISA で陰性となる場合があった (表 3)。抗原 ELISA は BVDV の構造タンパクである E^{rns} を標的としている。E^{rns} はウイルス粒子の表面に存在し、抗体の標的となりやすい部位であるため [9]、抗血清と反応させた場合、血清中の抗体により E^{rns} がマスクされてしまい、抗原 ELISA での感度低下を招いたと考えられた。同様に、移行抗体を保有する子牛は抗原 ELISA では検出できない場合があるとの報告もある [10]。しかし、本試験では移行抗体と考えられる中和抗体を保有する若齢 PI 牛血清 3 検体 (検体 No. 8, 9 及び 22) は抗原 ELISA で陽性となった。データには示していないが、Nose 株に対する抗体価が最も高い検体 (表 2: No. 2, 2,048 倍) では判定は陽性であるものの S-N 値が約 0.6 と著しく低い値を示した。このため、BVDV-1 に対しても数千倍の高い抗体価を保持する場合には ELISA の判定に影響を及ぼす可能性が示唆された。以上の結果から、抗原 ELISA は PI 牛の摘発を目的とした野外への応用は十分可能であると考えられる。一方で高いレベルの抗体を保有する場合に偽陰性を示す可能性があることから、抗原 ELISA 陰性となる中和抗体の値や、移行抗体や感染抗体が抗原 ELISA に与える影響の違いなどさらなる検証が必要と思われる。

多くの妊娠牛が飼養されている育成牧場での BVDV 清浄性の維持は、BVDV まん延防止のために非常に重要である。これまで、その清浄性維持の鍵となる入牧牛の BVDV 遺伝子検査はすべて当所で実施していたため、検査材料の搬入から結果の判定まで多くの時間と労力を要していた。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。検査コストは約 500 円 / 検体であり、年間約 1,200 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 及び 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いえない。また特殊な機器を有する施設でしか実施できず、判定までに約 7 時間を要する。しかし、RT-PCR で上述の入牧検査を実施するに当たり、5 頭プールで検査を実施した場合、最初の RT-PCR は 240 検体、そのうち 5% の割合で陽性または非特異反応が出現し、個別別に再検査したと仮定すると、その検体数は 60 検体となり、年間合計 300 検体となる。1 検体当たりの RT-PCR にかかる費用を 1,500 円とすると、

年間コストは約 450,000 円となるため、抗原 ELISA を実施した場合と比較して安価である。また PCR 産物を用いて BVDV の遺伝子型をただちに判定できるというメリットもある。したがって、これら両者の特性を考慮すると、特異性が高く、簡易性、迅速性に優れている抗原 ELISA は多検体を処理する必要があるスクリーニング検査に非常に有用であり、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。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 の診断につながると考える。今後は入牧前検査として抗原 ELISA を用いたスクリーニング検査を現地家保で迅速に実施し、陽性検体を当所に搬入し、確定診断を行うという検査体制を整備していく予定である。高い移行抗体を保有する若齢牛の検査には注意を要するため、現在は 6 カ月以上の入牧牛を対象にこの抗原 ELISA を実施することを考えている。このように検査の迅速化、効率化を図りながら、今後も育成牧場の清浄性を維持し県内の BVDV まん延防止に努めていきたい。

引用文献

- [1] 田島啓士：牛ウイルス性下痢ウイルス感染症，日獣会誌，65，111-117 (2012)
- [2] 田島啓士：BVD ウイルス感染症の現状と対策，家畜診療，62，5-10 (2015)
- [3] Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ : Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis, Arch Virol, 136, 309-323 (1994)
- [4] Sandvik T, Krogsrud J : Evaluation of an antigen-capture ELISA for detection of bovine viral diarrhoea virus in cattle blood samples, J Vet Diagn Invest, 7, 65-71 (1995)
- [5] Synge BA, Clark AM, Moar JA, Nicolson JT, Nettleton PF, Herring JA : The control of bovine viral diarrhoea virus in Shetland, Vet Microbiol, 64, 223-229 (1999)
- [6] Kampa J, Ståhl K, Renström LH, Alenius S : Evaluation of a commercial E^{rns}-capture ELISA for detection of BVDV in routine diagnostic cattle serum samples, Acta Vet Scand, 49, 7 (2007)
- [7] Weinstock D, Bhudevi B, Castro AE : Single-tube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in pooled bovine serum, J Clin Microbiol, 39, 343-346 (2001)
- [8] Harpin S, Elahi SM, Cornaglia E, Yolken RH, Elazhary Y : The 5'-untranslated region sequence of a potential new genotype of bovine viral diarrhoea virus, Arch Virol, 140, 1285-1290 (1995)
- [9] Weiland E, Ahl R, Stark R, Weiland F, Thiel HJ : A second envelope glycoprotein mediates neutraliza-

tion of a pestivirus, hog cholera virus, *J Virol*, 66, 3677-3682 (1992)
[10] Brinkhof J, Zimmer G, Westenbrink F : Comparative study on four enzyme-linked immunosorbent assays

and a cocultivation assay for the detection of antigens associated with the bovine viral diarrhoea virus in persistently infected cattle, *Vet Microbiol*, 50, 1-6 (1996)

Verification of a New Commercial Antigen-Specific ELISA for the Detection of the Bovine Viral Diarrhea Virus

Tsuneyuki MASUDA^{1)†}, Tomoko ASHIBA¹⁾, Hiroshi YAMASATO¹⁾, and Ken-ichiro KAMEYAMA²⁾

1) *Kurayoshi Livestock Hygiene Service Center, 2-132 Seidani-cho, Kurayoshi, 682-0017, Japan*

2) *Viral Disease and Epidemiology Reseach Division, National Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba-shi, 305-0856, Japan*

SUMMARY

In order to prevent the spread of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in public pastures, since 2013 all heifers in the Tottori Prefecture have been tested for BVDV using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) before they are pastured. However, because RT-PCR is time consuming and labor intensive, a new commercial ELISA based on the detection of the E^{rns} antigen was evaluated as an alternative method. Twenty-two sera of persistently infected (PI) cows and two paired sera of transiently infected (TI) cows were tested to evaluate sensitivity. All sera of PI cows were positive, and paired sera from the TI cow were negative. Field samples of 646 sera, including one PI cow, were tested for BVDV antigen using ELISA. Only one sample from the PI cow tested positive. However, it displayed a negative result when the PI serum was mixed with a high BVDV antibody-positive serum. Therefore, although performing ELISA on PI calves in the presence of persistent maternal antibodies requires attention, it is a useful screening test for detecting BVDV because of its high sensitivity and ease of use. — Key words : antibody-positive serum, antigen detection ELISA, bovine viral diarrhoea virus (BVDV), reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

† Correspondence to : Tsuneyuki MASUDA (*Kurayoshi Livestock Hygiene Service Center*)

2-132 Seidani-cho, Kurayoshi, 682-0017, Japan

TEL 0858-26-3341 FAX 0858-26-8164 E-mail : masudat@pref.tottori.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 69, 187~191 (2016)