

市販の血清用キットを応用した乳汁エライザ法による 抗牛白血病ウイルス抗体検出法の確立

小西美佐子^{1)†} 石崎 宏²⁾ 中野美和²⁾ 芳賀 聡²⁾

小林創太¹⁾ 亀山健一郎¹⁾ 大崎慎人¹⁾

1) 国研農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門

(〒305-0856 つくば市観音台3-1-5)

2) 国研農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門

(〒329-2793 那須塩原市千本松768)

(2019年7月30日受付・2020年1月6日受理)

要 約

牛白血病ウイルス (BLV) 感染牛の早期摘発には、非感染牛の定期的な BLV 検査が重要であるが、頻回採血に要する労力や牛に与えるストレスが問題となっている。そこで、採材が容易な乳汁を検体とする抗体検査法として、乳汁エライザ法の確立を試みた。検査には市販の血清エライザキットを用い、その操作手順に従い常乳の乳清を検体として条件検討を行った。その結果、本乳汁エライザ法では、採材時間や分娩後日数等の差によらず乳清原液から抗 BLV 抗体を検出可能であり、判定には血清エライザ法のしきい値を適用可能であることが示された。また、個体乳の陽性率が 46.2~77.8% の農場 7 戸のバルク乳を本法により検査した結果、全検体が陽性であった。本法の活用により、定期的な BLV 検査の実施が容易となり、BLV のまん延防止に貢献するものと考えられる。

——キーワード：抗体検査、牛白血病ウイルス、乳汁エライザ、定期検査。

-----日獣会誌 73, 369~373 (2020)

牛白血病ウイルス (BLV) は、レトロウイルス科デルタレトロウイルス属に属し、牛に終生感染を引き起こすウイルスである。BLV は牛の B リンパ球に感染するため、感染牛の血液や乳汁を介して他の牛に水平伝播するほか、胎盤または産道感染により子牛に垂直伝播する。BLV 感染牛は生涯抗体とウイルス感染細胞を保有するが、その病態は個体によって異なる。感染牛の 60% 以上は不顕性感染となり、30% が持続性リンパ球増多症を、数% が地方病性牛白血病 (EBL) を発症するとされている [1]。

EBL 発症牛は元気消失、食欲及び乳量低下、削瘦、起立不能などの症状を示すほか、個体によっては眼球突出、体表リンパ節の腫脹などの外貌所見が認められる。EBL には治療法がなく、発症個体はすべて死亡する。また、発症牛はと殺解体禁止である。わが国では牛白血病の報告数が年々増加しており、その経済的損失が問題

となっている。しかし、BLV 感染が招く損害は EBL だけではない。既報では、BLV 感染牛は非感染牛に比べて乳量や受胎率が低いこと、また他の疾病 (乳房炎、下痢、肺炎) に対する感受性が高く、淘汰率が高いことが示されている [2, 3]。このことから、持続的な BLV 感染と牛の生産性低下には関連があり、症状の有無にかかわらず、BLV 感染が経済的損失を招き得ることが示唆される。したがって、BLV 感染阻止対策は牛の生産性向上においても非常に重要である。

平成 21~23 年に実施された抗体保有状況調査の結果、BLV はわが国全体に広がっており、その感染率は乳牛で 40.9%、肉用繁殖牛で 28.7% と高いことが明らかとなった [4]。このように感染率の高いわが国では、感染牛の一斉淘汰は困難であるため、ウイルスの伝播阻止には感染牛の早期摘発・隔離が重要となる。現在、わが国では BLV 検査法としてエライザ法による血中抗体

† 連絡責任者：小西美佐子 (国研農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門)

〒305-0856 つくば市観音台3-1-5 ☎029-838-7770 FAX 029-838-7880 (代表)

E-mail : mkonishi@affrc.go.jp

検査法と、nested PCR またはリアルタイム PCR によるウイルス遺伝子検査法が広く用いられている。

感染牛の早期摘発には、非感染牛に対してこれらの検査を定期的に行うことが重要であるが、採血に伴う痛みや保定によるストレスが牛の生産性を低下させる [5, 6] だけでなく、採材者の労力も要するため、定期検査のための頻回採血が困難な場合がある。そこでわれわれは、BLV 検査の効率化を図るため、頻回採取が容易な乳汁を用いた抗 BLV 抗体検査法として、乳汁エライザ法の確立を試みた。検査には動物用診断薬である市販の血清エライザキットを用い、乳等省令で定める常乳（分娩 6 日後以降の乳汁）の乳清を検査対象として、検体の採材及び処理条件の検討を行った。

材料及び方法

本研究は、農研機構動物衛生研究部門（動衛研）並びに畜産研究部門（畜産研）の動物実験委員会の認可を受けて実施した（動衛研認可 No. 14-029, 14-030, 畜産研認可 No. 14112051, 15112044 及び 1611B069）。検査対象牛の感染の有無は、血中抗体検査及びウイルス遺伝子検査（ウイルス検査）によって確認し、いずれかの検査結果が陽性のものを感染牛、いずれも陰性のものを非感染牛とした。

血中抗体検査（血清エライザ）：市販の血清エライザキット（牛白血病エライザキット, JNC (株), 東京）を用いた。本キットの測定原理は、牛白血病ウイルス持続感染羊胎子腎細胞から抽出精製された gp51 を抗原とした間接エライザ法である。血清エライザの検査手順と結果判定はキット添付の使用説明書に従って実施した。なお、本キットでは、下記の式を用いて算出した S/P 値（指示陽性血清の吸光度に対する被検血清の吸光度の比）0.3 以上を判定基準としている。

S/P 値 =

$$\frac{\text{(抗原陽性ウエル中の試料血清の吸光度)} - \text{(抗原陰性ウエル中の試料血清の吸光度)}}{\text{(抗原陽性ウエル中の指示陽性血清の平均吸光度)} - \text{(抗原陰性ウエル中の指示陽性血清の平均吸光度)}}$$

ウイルス遺伝子検査：既報 [7] に従って EDTA 血から末梢血白血球 (WBC) を分離し、市販の核酸抽出キット (DNeasy Blood & Tissue, (株)キアゲン, 東京) を用いて DNA を抽出した。得られた DNA について、既報のプライマーセット [7] と市販の PCR 酵素 (TAKARA Ex Taq, タカラバイオ (株), 滋賀) を用いて nested PCR を実施した。

乳汁エライザ：夾雑物及び脂肪分による非特異的反応を避けるため、乳清を乳汁エライザの検体とした。乳

汁は採材後 4℃ で保存し、採材翌日に 3,000rpm, 4℃ で 20 分遠心して脂肪層と沈渣を除いた上清を乳清とした。乳汁エライザには血清エライザキットを用い、血清エライザの手順に従って実施した。陽性コントロール及び陰性コントロールには、キット添付の指示陽性血清及び指示陰性血清を用いた。

乳汁エライザの条件検討：乳清の至適希釈倍率を検討するため、BLV 汚染農場（農場 A）で飼養される BLV 感染牛 13 頭及び非感染牛 9 頭の乳清を PBS で希釈し、原液から 200 倍までの希釈系列を用いて乳汁エライザを実施した。採材は平成 26 年 6 月に実施し、朝の搾乳時にミルカー装着前の前搾り乳を手搾りで採取した。また、乳汁採取後にこれらの牛から採取した血液を用いて血清エライザを実施し、乳汁エライザの結果と比較した。続いて、乳汁エライザのしきい値を検討するため、BLV 感染状況が不明な未知の農場 4 戸（農場 B～E）で飼養される牛 130 頭の乳清及び血清を用いて両エライザを実施した。採材は平成 26 年 9 月から翌年 12 月の間に実施した。血清エライザの結果をもとに乳汁検体を陽性、陰性に分類し、乳汁エライザの S/P 値を用いて ROC 解析を実施し、乳汁エライザのしきい値を算出した。さらに、130 頭中 100 頭については、WBC DNA を用いた nested PCR を行い、その結果を両エライザの結果と比較した。

採材条件及び保存法の検討：採材の時間及びタイミングの違いによる乳汁エライザの結果への影響の有無を検証するため、希釈倍率の検討に用いた農場 A の牛 22 頭について、朝・夕の搾乳時に前搾り乳、本搾り乳（ミルカー装着時にサンプラーを用いて採取）及び後搾り乳（本搾り終了後に手搾りで採取）を採材し、それぞれの乳汁エライザの結果を血清エライザの結果と比較した。

さらに、泌乳期の経時的な乳中抗体量の変化が乳汁エライザの結果に及ぼす影響を検証するため、農場 A で飼養される BLV 感染牛 6 頭及び非感染牛 4 頭より、平成 26 年 8 月から翌年 8 月の間に定期的に乳汁及び血液を採材した。乳汁は分娩 6 日後、並びに分娩 1 カ月後から乾乳まで 1 カ月ごとに採材し、乳汁エライザに用いた。血液は、各牛の分娩予定の 1 カ月前に採材したほか、分娩 1 カ月後からは乳汁と同時に採材し、ウイルス検査に用いた。また、乳清の凍結保存が結果に与える影響の有無を検証するため、農場 A の牛 22 頭の朝の前搾り乳の乳清を -20℃ で冷凍保存し、3 カ月後に乳汁エライザを実施して凍結前の結果と比較した。

バルク乳からの抗体検出：乳汁エライザ法を用いて、バルク乳からの抗体検出が可能か否かを検討するため、平成 27 年 9 月から平成 29 年 1 月の間に BLV 汚染農場 7 戸（農場 F～L）で飼養される牛 177 頭の個別前搾り乳並びに各農場のバルク乳を採取した。各サンプルの

表1 感染状況が不明な検体を用いた乳汁エライザと血清エライザの結果比較

検査法*		血清エライザ (S/P 値 \geq 0.3)		合計
		+	-	
乳汁エライザ (S/P 値 \geq 0.3)	+	37	0	37
	-	0	93	93
乳汁エライザ (S/P 値 \geq 0.35)	+	37	0	37
	-	0	93	93

* () 内はしきい値を示す。

+ : 陽性, - : 陰性

乳清を用いてエライザを実施し、農場別に個体別乳及びバルク乳で結果を比較した。また、バルク乳の陰性対照として農場Aで飼養される非感染牛6頭の乳汁を等量混合し作成した合乳サンプルを用いた。

統計学的解析：各サンプルを用いた乳汁エライザと血清エライザのS/P値の相関について、ピアソンの積率相関係数(r)を算出し、無相関検定によりその有意性を検証した。相関の強さの基準は、 $r > 0.7$: 強い正の相関あり、 $0.4 < r \leq 0.7$: 相関あり、 $0.2 < r \leq 0.4$: 弱い相関あり、 $r \leq 0.2$: 相関なし、とした。本研究で実施した統計学的解析には、すべて統計フリーソフトウェアR (Version 3.4.3)を用い、各種解析における有意水準は0.05とした。

成 績

乳清エライザの反応条件：BLV感染牛13頭及び非感染牛9頭の乳清希釈系列を用いた乳汁エライザのS/P値と血清エライザのS/P値は、いずれの希釈倍率でも有意な正の相関($P < 0.05$)を示したが、その相関係数 r は原液が0.989 (95%信頼区間 [95% CI] : 0.974~0.996)と最も高く、50倍で0.769 (95% CI : 0.495~0.904)、100倍で0.634 (95% CI : 0.290~0.833)、及び200倍で0.537 (95% CI : 0.149~0.782)と、乳清の希釈倍率の増加に従って低下した。また、陽性判定のしきい値を血清エライザと同じS/P値0.3以上としたとき、原液及び50倍希釈の乳清を用いた乳汁エライザの結果はすべて血清エライザの結果と一致したが、100倍希釈以降は感染牛で結果が陰転する検体が認められた。

これらの結果を踏まえ、これ以降の実験では乳清を希釈せずに原液のまま使用した。感染状況が不明な牛130頭の検体を用いたROC解析により算出された乳汁エライザのしきい値は、S/P値0.35であった。しきい値をS/P値0.35とした場合、並びに0.3とした場合の乳汁エライザの判定結果は、すべて血清エライザの結果と一致した(表1)。また、乳汁エライザと血清エライザのS/P値は有意な強い正の相関を示した($r = 0.996$ [95%

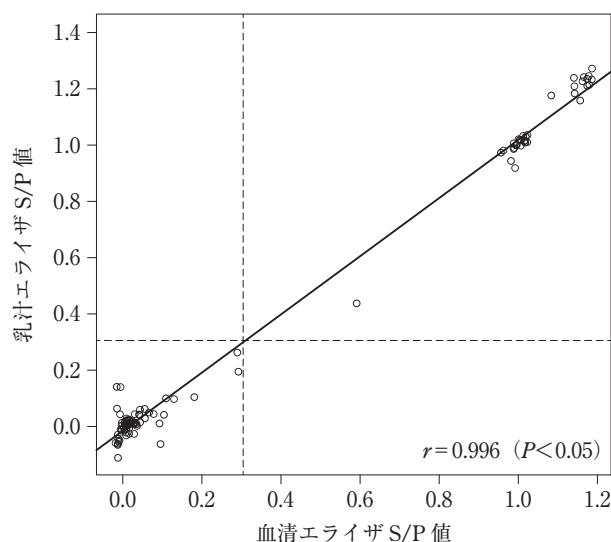


図 乳汁エライザと血清エライザのS/P値比較

r : ピアソンの積率相関係数 (有意水準は0.05), 破線はエライザのしきい値 (S/P値0.3)を示す

CI : 0.994~0.998], $P < 0.05$) (図)。さらに、しきい値をS/P値0.3及び0.35とした乳汁エライザの結果は、いずれもnested PCRの結果とも一致した。これらの結果を踏まえ、これ以降の実験では乳汁エライザのしきい値として、血清エライザと同じS/P値0.3を採用した。

検体の採材条件及び保存法：朝、夕の前搾り乳、本搾り乳及び後搾り乳を用いた乳汁エライザの結果は、すべて血清エライザの結果と一致しており、各サンプルを用いた乳汁エライザと血清エライザのS/P値はすべて有意な正の相関を示した($r > 0.998$, $P < 0.05$)。また、採材時間及びタイミングの異なる乳汁を用いたエライザ間でも、S/P値はすべて有意な正の相関を示した($r > 0.998$, $P < 0.05$)。分娩6日後から乾乳まで定期的に採材した乳汁を用いたエライザの結果は、BLV感染牛6頭はすべて陽性、非感染牛4頭はすべて陰性であった。また、分娩1カ月後から乾乳までの乳汁及び同日に採材した血清を用いたエライザのS/P値は、すべて有意な正の相関を示した($r > 0.889$, $P < 0.05$)。また、nested PCRの結果は、すべて血清エライザ及び乳汁エライザの結果と一致した。乳清の冷凍前後のエライザ結果はすべて一致した。

バルク乳からの抗体検出：表2に検査対象農場F~Lにおける個体乳及びバルク乳を用いたエライザの結果を示した。各農場の抗体陽性率は42.9~77.8%であった。また、個体乳を用いたエライザにおけるS/P値の中央値は、農場H以外の全農場でその平均値より高かった。バルク乳を用いた乳汁エライザの結果は全農場が陽性であった。また、非感染牛の合乳サンプルを用いた乳汁エライザの結果は陰性であった。

表2 個体乳及びバルク乳を用いた乳汁エライザの結果比較

農場	検査頭数	抗体陽性頭数 (個体乳)	抗体陽性率 (%) ^{*1}	乳汁エライザ S/P 値 (個体乳) ^{*2}				乳汁エライザ S/P 値 (バルク乳) ^{*2}
				平均値	25% tile	中央値	75% tile	
F	17	13	76.5	1.93	1.15	2.52	2.74	2.59
G	22	14	63.6	1.28	0.00	2.00	2.04	2.19
H	13	6	46.2	1.23	0.01	0.05	2.59	2.61
I	28	18	64.3	1.61	0.01	2.48	2.54	2.49
J	21	16	76.2	1.81	1.87	2.37	2.42	2.37
K	27	21	77.8	2.01	1.51	2.42	2.69	2.98
L	48	34	70.8	1.02	0.00	1.33	1.64	1.16

*1 陽性頭数/検査頭数

*2 エライザのしきい値は S/P 値 \geq 0.3

考 察

本研究では、既存の血清エライザキットを使用した BLV の乳汁エライザ法の確立を目指し、判定や検体について条件を検討した。乳清の希釈系列を用いた乳汁エライザの結果、乳清の原液を用いた乳汁エライザと血清エライザの S/P 値が最も高い正の相関を示したことから、並びに希釈により結果が陰転する検体があったことから、乳汁エライザの検体には乳清原液が適していると考えられる。ROC 解析で算出された乳汁エライザのしきい値 (S/P 値 0.35) は、血清エライザのしきい値 (S/P 値 0.3) に非常に近く、どちらのしきい値を用いても乳汁エライザと血清エライザの結果は一致していた。また、両エライザの S/P 値は有意な正の相関を示した。これらのことから、乳汁エライザのしきい値には血清エライザのしきい値を適用可能と考えられた。また、感染状況が未知な野外サンプルを用いた乳汁エライザの結果が血清エライザとすべて一致したことから、乳汁エライザは血清エライザの代替法となり得ると考えられた。

同一個体からさまざまな条件下で採材した検体を用いた乳汁エライザにおいて、その結果がすべて一致しただけでなく、それぞれの S/P 値が有意な正の相関を示したことから、本乳汁エライザ法では、採材の時間 (朝夕)、タイミング (前搾り、本搾り、後搾り) によらず抗 BLV 抗体を検出可能であることが判明した。したがって、本乳汁エライザ法では、各農場の搾乳設備やスケジュールに応じて採材方法を選択することが可能である。また、牛では乳汁中の IgG 量が分娩後の時間経過に伴い急速に低下することが知られている [8]。さらに乳汁中の抗 BLV 抗体についても、分娩後 5 日以降は急激に抗体価が低下することが示されている [9]。

しかし、今回、6 頭の感染牛の分娩 6 日後以降の乳汁を用いた乳汁エライザの結果はすべて陽性であった。このことから、本乳汁エライザ法では、分娩後日数の経過により抗体量が低下した乳汁からも高感度に抗 BLV 抗体を検出可能であり、泌乳時期を問わず検査可能である

ことが示された。さらに、凍結保存前後の乳汁エライザの結果が一致したことから、本乳汁エライザ法では凍結保存乳清も使用可能であることが示された。

今回、本乳汁エライザ法を用いて 7 戸の BLV 汚染農場のバルク乳を検査したところ、すべての検体が陽性となった。これは、対象農場の陽性率が比較的高かった (46.2~77.8%) ことに加え、各農場に S/P 値が高い個体が多く存在したことにより、合乳後も乳中の抗体濃度がエライザの検出限界を下回らなかったためと考えられる。このことから、バルク乳を用いた乳汁エライザ法の感度には、農場の感染率だけでなく、感染牛の乳中抗体濃度及び乳量も影響を与える可能性があると考えられる。したがって、本法を用いたバルク乳検査については、今後さらに検体を収集し、農場の感染率、個体乳を用いたエライザの S/P 値の分布並びに個体乳量と感度の関連性を検証するとともに、感度及び特異度を確定したうえで実用性を検討する必要がある。

本乳汁エライザ法の検査対象は搾乳牛に限られるが、乳汁を検体とすることで、採材時に牛に与えるストレス及び採材者の労力が軽減されるため、特に大規模酪農家における定期的な BLV 検査の実施が容易になると考えられる。本エライザ法の活用により BLV 感染牛の早期摘発の効率化が進むことで、わが国における EBL 対策が推進することを期待したい。

本研究は、農林水産省の「安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究委託事業 (RS2605, 平成 26~28 年実施)」の助成を受け実施された。研究推進に当たってご協力くださった畜主様、家畜保健衛生所の皆様、農研機構畜産研究部門技術支援センター那須業務科の皆様、鳥取県倉吉家畜保健衛生所の小林朋子様、沖縄県家畜衛生試験場の石井圭子様、澤井美和様、田口由利子様にこの場をお借りして深謝する。

引用文献

- [1] Kobayashi S, Hidano A, Tsutsui T, Yamamoto T, Hayama Y, Nishida T, Muroga N, Konishi M, Kameyama K, Murakami K: Analysis of risk factors associated with bovine leukemia virus seropositivity within

- dairy and beef breeding farms in Japan: A nationwide survey, *Res Vet Sci*, 96, 47-53 (2014)
- [2] Emanuelsson U, Scherling K, Pettersson H : Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds, *Prev Vet Med*, 12, 121-131 (1992)
- [3] Ott SL, Jhonson R, Wells SJ : Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd level productivity on US dairy farms, *Prev Vet Med*, 61, 249-262 (2003)
- [4] Murakami K, Kobayashi S, Konishi M, Kameyama K, Tsutsui T : Nationwide survey of bovine leukemia virus infection among dairy and beef breeding cattle in Japan from 2009-2011, *J Vet Med Sci*, 75, 1123-1126 (2013)
- [5] Fønss A, Munksgaard L : Automatic blood sampling in dairy cows, *Comput Electron Agr*, 64, 27-33, (2008)
- [6] Hopster H, van der Werf JT, Erkens JH, Blokhuis HJ : Effects of repeated jugular puncture on plasma cortisol concentrations in loose-housed dairy cows, *J Anim Sci*, 77, 708-714 (1999)
- [7] Asfaw Y, Tsuduku S, Konishi M, Murakami K, Tsuboi T, Wu D, Sentsui H : Distribution and superinfection of bovine leukemia virus genotypes in Japan, *Arch Virol*, 150, 493-505 (2005)
- [8] Korhonen H, Marnila P, Gill HS : Milk immunoglobulins and complement factors, *Brit J Nutr*, 84, 75-80 (2000)
- [9] Konishi M, Ishizaki H, Kameyama K, Murakami K, Yamamoto T : The effectiveness of colostral antibodies for preventing bovine leukemia virus (BLV) infection in vitro, *BMC Vet Res*, 14, 419 (2018)

Establishment of Milk ELISA for Anti-Bovine Leukemia Virus Antibody Detection

Misako KONISHI^{1)†}, Hiroshi ISHIZAKI²⁾, Miwa NAKANO²⁾, Satoshi HAGA²⁾,
Sota KOBAYASHI¹⁾, Ken-ichiro KAMEYAMA¹⁾ and Makoto OSAKI¹⁾

1) *National Institute of Animal Health, NARO, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*

2) *Institute of Livestock and Grassland Science, NARO, 768 Senbonmatsu, Nasushiobara, 329-2793, Japan*

SUMMARY

Early detection of cattle infected with bovine leukemia virus (BLV) through periodic testing is one of the most important measures for the prevention of BLV spread on farms. However, repeated blood sampling causes stress for the animals and increases labor costs. In this study, to resolve these issues, we established an ELISA for anti-BLV antibody detection with the undiluted whey portion of milk instead of sera by using the commercial serum ELISA (sELISA) kit available in Japan. The milk ELISA (mELISA) can detect anti-BLV antibodies from the milk samples of infected cattle regardless of differences in sampling time and lactation periods of sampling animals. The mELISA were also validated by the sELISA with sera from the same cow tested. The results of the two tests matched for all samples. In addition, we tested seven bulk milk samples collected from seven BLV-infected farms. Although further validation of the sensitivity and specificity of mELISA using bulk milk samples is required, all samples tested positive for mELISA in this study. Application of our established mELISA will reduce the stress on the animals and the labor costs in the periodic testing for BLV infected cattle.

— Key words : antibody detection, bovine leukemia virus (BLV), milk ELISA, periodic test.

† *Correspondence to : Misako KONISHI (National Institute of Animal Health, NARO)*

3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan

TEL 029-838-7770 FAX 029-838-7880 (switchboard) E-mail : mkonishi@affrc.go.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 73, 369 ~ 373 (2020)