

# 乳汁を用いた牛白血病ウイルス検査法の検討

○ 大泉卓也・加藤雅樹・木内英昭・和田浩彦  
(長野県伊那家畜保健衛生所)

## 要約

地方病性牛白血病 (EBL) 対策には農場の感染状況把握が重要。乳汁を用いた EBL 各種検査の可能性を検討。試験 1 : ELISA は浸潤農場の血清、個体乳各 71 検体について実施し、個体乳は陽性 14 検体、陰性 57 検体。試験 2 : 6 ヶ月前血清陰性個体のうち個体乳陽性 1 個体、個体乳陰性だが S/P 値やや高値 1 個体の計 2 個体について血清の ELISA を実施し、陽転を確認。試験 3 : バルク乳によるスクリーニング検討のため、血清陽性個体中最低 S/P 値の乳清を 2 倍階段希釈し ELISA を実施。32 倍希釈以上は S/P 値 0.017 未満であり、バルク乳の ELISA には限界。試験 4 : PCR は陽性個体乳 13 検体、浸潤農場のバルク乳 2 検体の計 15 検体について実施し、全て陰性。以上より、乳汁を用いた EBL 検査法は個体乳の ELISA が有用であり、S/P 値 0.017~0.132 の間にカットオフ (CO) 値を設定することで血清と同等の判定が可能になると考察。

## 1 はじめに

EBL 対策には農場の牛白血病ウイルス (BLV) 感染状況を把握することが重要であり、そのために検査を推進する必要がある。現在、EBL 検査法として主に ELISA と PCR が行われているが、いずれも血液が必要であり、採材には労力を要する。そこで、省力的で農家も採材が可能な検査材料として乳汁を用いた検査法について検討した。乳汁を用いた検査法には複数の報告<sup>1) 2) 3)</sup>があるが、今回、著者らは個体乳及びバルク乳を用いた EBL 各種検査の可能性について改めて検討したので、その概要を報告する。

## 2 方法と結果

### 試験 1 血清・個体乳の ELISA

#### (1) 材料及び方法

2 農場 71 頭の血清及び個体乳を用いた (表 1)。

表 1 検体の農場名、採材日及び検体数

材料	農場名	採材日	検体数
血清	A 農場	6/12	32 検体
	B 農場	6/20	39 検体
個体乳	A 農場	12/4	32 検体
	B 農場	12/5	39 検体

個体乳は 5ml を 4℃、3,000rpm、15 分間遠心分離し、脂肪分を取り除いた乳清を供試し、市販キット (牛白血病エライザキット、JNC 社製) を用いて実施した。

#### (2) 結果

血清と同様に S/P 値 0.3 以上を陽性と判定したところ、血清で陽性を示した 14 検体のうち個体乳では 13 検体が陽性を示し、1 検体が陰性を示した。また、血清で陰性を示した 57 検体のうち個体乳では 56 検体が陰性を示し、1 検体が陽性を示した。(表 2)。

表2 血清・個体乳 ELISA 結果

		血清		合計
		判定		
個体乳	+	13	1	14
	-	1	56	57
S/P値: 0.3以上 + (血清・個体乳)0.3未満 -		14	57	71

## 試験2 血清による陽転の確認、個体乳陰性及び血清陽性の確認

### (1)材料及び方法

試験1の結果から、平成29年6月時点では血清は陰性であったが12月に個体乳の検査では陽性と判定された個体番号1及び6月に血清陰性で12月の個体乳もS/P値はやや高値であったものの陰性と判定された個体番号2は、この間に感染した可能性が考えられた。また、個体番号2及び6月には血清陽性であったが、12月に個体乳陰性と判定された個体番号3は陽性の基準を0.3以上としたCO値により個体乳陰性と判定された可能性が考えられた。この個体番号1、2、3の3個体について平成29年12月に再度血清を採材し、ELISAを実施した。

### (2)結果

3個体はいずれも血清陽性であり、個体番号1、2の陽転を確認した。また、個体番号2、3についても血清陽性であることを確認した(表3)。

表3 再度採材した血清 ELISA 結果

個体番号	血清 S/P値 (6/12 採材)		判定		血清 S/P値 (12/8 採材)	判定
	S/P値	判定	S/P値	判定		
1	0.004	-	1.394	+	2.294	+
2	0.095	-	0.212	-	2.774	+
3	3.738	+	0.132	-	2.741	+
S/P値: 0.3以上 + (血清・個体乳)0.3未満 -						

また、血清陽性牛のうち個体乳の最高S/P値は3.068、最低S/P値は0.132、血清陰性牛のうち個体乳の最高S/P値は0.016であった(表4)。

表4 個体乳 ELISA の平均・最高・最低 S/P 値

検査材料	判定	検体数	S/P値		
			平均	最高	最低
個体乳	+	16	1.141	3.068	0.132
	-	55	0.006	0.016	-0.030

## 試験3 階段希釈した乳清の ELISA

### (1)材料及び方法

血清陽性牛のうち、S/P値が最高及び最低の乳清各1検体を蒸留水で256倍まで2倍階段希釈しELISAを実施した。

### (2)結果

試験1及び2の結果から、血清陰性牛のうち個体乳の最高S/P値は0.016であるため、CO値を0.017として判定を行った。その結果、S/P値が最高の乳清は256倍希釈でも0.017を上回ったが、最低の乳清は32倍以上の希釈で0.017を下回った。(表5)。

表5 階段希釈した乳清の ELISA 結果

検査材料	希釈なし	S/P値							
		×2	×4	×8	×16	×32	×64	×128	×256
最高 S/P値乳清	2.415	2.028	1.262	0.647	0.349	0.161	0.085	0.045	0.022
最低 S/P値乳清	0.158	0.140	0.078	0.051	0.029	0.015	0.007	0.010	0.007
S/P値 0.017以上 + (乳清) 0.017未満 -									

## 試験4 個体乳・バルク乳の PCR

### (1)材料及び方法

陽性の個体乳13検体、BLV浸潤農場のバルク乳2検体の計15検体について、個体乳5ml及びバルク乳50mlを4℃、3,000rpm、15分間遠心分離し、沈殿した細胞から市販抽出キット(QIAamp DNA Mini Kit、QIAGEN社製)によりDNAを抽出し、nested-PCRを実施した。

### (2)結果

全ての検体で遺伝子は検出されなかった。

## 5 考察

試験1では2個体で血清と個体乳の判定が一致せず、1個体で判定は陰性で一致するものの、個体乳のS/P値はやや高値を示し陽転の可能性

が考えられた。

試験 2 ではこれらの個体の血清を再度採材し BLV 感染の有無を調べたところ、個体番号 1、2 で陽転が確認され、個体番号 2、3 で個体乳陰性・血清陽性であることが確認された。試験 1 で血清陰性・個体乳陽性となった原因は、採材日に 6 ヶ月の間隔が空いており、この間に陽転したためと考えられた。また、血清陽性・個体乳陰性となった原因は、血清と同じ CO 値では個体乳は陰性と判定されることがあるためと考えられた。さらに、血清陰性・個体乳陰性であった検体で陽転が確認された原因は、6 ヶ月間で陽転したものの、CO 値により個体乳陰性と判定されたためと考えられた。このことから、血清と同じ CO 値 0.3 では個体乳で陰性と判定されてしまう陽性個体が存在することが明らかになった。そこで、個体乳の ELISA では血清陰性牛のうち個体乳の S/P 値が最高の個体でも陰性と判定することができ、血清陽性牛のうち個体乳の S/P 値が最低の個体でも陽性と判定することができる 0.017~0.132 に CO 値を設定することで、個体乳でも血清と同等の判定が可能になると考えられた。

試験 3 では乳清を 2 倍階段希釈し ELISA を行ったところ、血清陽性牛のうち S/P 値が最高の乳清では 256 倍希釈でも 0.017 を上回った。このことから、S/P 値が高い陽性個体は陰性個体の乳汁で 256 倍まで希釈されても、バルク乳の ELISA による BLV 浸潤農場のスクリーニングで摘発できる可能性があることがわかった。一方で、血清陽性牛のうち S/P 値が最低の乳清では 32 倍以上の希釈で 0.017 を下回った。これは、S/P 値が低い陽性個体は陰性個体の乳汁で 32 倍以上に希釈されると、バルク乳の ELISA で摘発できなくなってしまうことを表しており、バルク乳の ELISA による BLV 浸潤農場のスクリーニングには限界があることが明らかになった。

試験 4 では個体乳及びバルク乳を用いた nested-PCR を行ったが、いずれも遺伝子は検出されなかった。検体量を増やせば検出感度が向上する可能性はあるものの、採材に労力を要する。また、検査時間やコストもかかるため、省

力的で頻繁に行うことができる乳汁を用いた検査法として PCR は不向きであると考えられた。

## 6 おわりに

今回の結果から、個体乳を用いた ELISA は個体検査への応用が可能であり、農家でも採材が容易であることから乳汁の細菌検査等に併せるなど BLV 感染状況調査のハードルを下げるができると思われた。バルク乳を用いた ELISA では感染程度により限界はあるものの BLV 浸潤農場の摘発や農場全体の感染率把握への応用の可能性が示唆された。

今回は 2 農場 71 頭と検体数が限られていたため、さらに症例数を増やして検討する必要があると考えられるが、乳汁を用いた検査が確立されることで採材にかかる労力が軽減され、EBL 検査機会が増加することが期待される。

## 引用文献

- 1) 小林千恵：牛白血病ウイルス (BLV) の感染伝播リスクの分析，獣医畜産新報，70(11)：837-843(2017)
- 2) 内田郁夫：簡便かつ頻回採取が可能な検体を用いた家畜疾病の検査方法の開発，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研究成果報告書，RS2605(2017)
- 3) 道下久美：食肉処理場における乳用牛を対象とした乳汁からの牛白血病ウイルス (BLV) 遺伝子の検出，獣医畜産新報，64(10)：815-819(2011)