

5 核酸精製が不要なダイレクト RT-qPCR 法による牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛の摘発方法の検討

県央家畜保健衛生所

関野惣介、湯澤裕史

はじめに

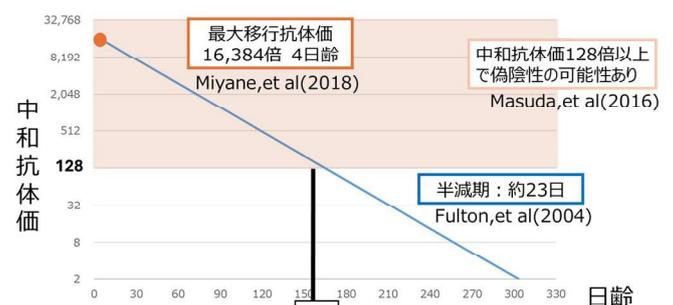
牛ウイルス性下痢 (BVD) はフラビウイルス科ペスチウイルス属に属する牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) の感染による疾病であり、届出伝染病に分類される^{1) 2)}。急性感染すると、呼吸器症状、下痢、不受胎及び早期胚死滅などがみられるが、胎子の免疫機能が成熟する前に妊娠牛が感染すると、胎子は免疫寛容となり、持続感染牛 (PI 牛) となって生まれる場合がある^{1) 2)}。PI 牛は生涯ウイルスを排出し続ける感染源となり、PI 牛から生まれる子牛は常に PI 牛となるため、PI 牛の早期摘発とつが必須の対策となる^{1~3)}。

背景

本県は令和元年度から検査体制強化のために以下 2 つの検査に抗原 ELISA (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) を導入している。1 つ目は県内放牧予定牛検査であり、平成 30 年度以前は乳用牛のみを対象に家畜衛生研究部のみが実施できるウイルス分離を実施していたが、令和元年度から乳用牛及び肉用牛を対象に、各家保で実施できる抗原 ELISA に変更した。2 つ目は農場の自主検査であり、大規模農場における導入牛及びその新生子牛の検査に対応するため、農場が採材した耳片においても検査できる抗原 ELISA を導入した。

しかし、抗原 ELISA は移行抗体の影響で偽陰性となる場合がある⁴⁾。そこで、何か月齢

未満の場合、偽陰性となる可能性があるかを推算した。まず、確認できた最大移行抗体価が 16,384 倍で 4 日齢の PI 牛の場合⁵⁾、半減期が約 23 日であるため⁶⁾、偽陰性となる可能性がある中和抗体価 128 倍⁴⁾となるのは 165 日齢である。したがって約 6 か月齢未満の場合、偽陰性となる可能性があると推測される (図 1)。しかし、本県では入牧月齢の若齢化が進み、令和 6 年度における県内放牧予定牛



➡ 約6か月齢未満の場合、偽陰性となる可能性がある

図 1 偽陰性の可能性がある月齢

検査月齢の約 7 割が 6 か月齢未満であることから、本検査方法の変更が必要となっている。

そのため、移行抗体の影響がない遺伝子検査が望ましいが⁵⁾、従来の核酸精製物を用いた RT-qPCR 法 (以下、旧法) では検査費用及び作業時間が増加してしまう。そこで、核酸精製を不要とすることで、安価かつ作業時間を短縮できるダイレクト RT-qPCR 法 (以下、新法) を検証したので、概要を報告する。

材料及び方法

1 供試材料

標準的な BVDV として、1 型である Nose 株 (3×10^4 TCID₅₀/0.1mL) 及び 2 型である KZ91CP 株 (2×10^6 TCID₅₀/0.1mL) を材料とした。また、PI 牛 32 検体、非感染牛 96 検体の血清及び PI 牛 4 検体、非感染牛 2 検体の耳片も材料とした。

なお、PI 牛及び非感染牛の定義は次のようにした。血清を用いて、3 週間間隔に 2 回の抗原検査 (MDBK-SY 細胞を用いたウイルス分離⁷⁾ 及び旧法) 及び定法で中和試験 (指示ウイルス: Nose 株及び KZ91CP 株) を実施し、2 回の抗原検査が陽性となり、中和抗体価が増加しなかった牛を PI 牛とした³⁾。また、血清を用いた抗原検査で陰性となった牛を非感染牛とした。

2 RT-qPCR 法

旧法は MagExtractor™-RNA- (東洋紡社) を用いて核酸精製後、One Step TB Green® PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (TAKARA) の反応液に核酸精製物を添加した。一方、新法は One Step Easy Direct RT-qPCR Kit (Non-treatment) (TAKARA) を使用しており、材料を反応液に直接添加する。なお、両法の primer 及び新法の probe に関しては同じ文献⁸⁾ を参考にした。

3 感度確認試験

Nose 株及び KZ91CP 株を滅菌 PBS で 10 倍階段希釈したものをを用いて、新法及び旧法により実施した。

4 血清を用いた新法及び旧法の比較試験

PI 牛 32 検体、非感染牛 96 検体の血清を用いて、新法及び旧法により実施した。なお、阻害物質であるヘモグロビンの影響を確認するため⁹⁾、強く溶血した検体を 2 検体含めた。

5 耳片を用いた新法及び旧法の比較試験

PI 牛 4 検体、非感染牛 2 検体の耳片を用いて実施した。なお、前処理として 1mm 程度の耳片を 400 μ l の滅菌 PBS の入ったチューブに入れ、1 回凍結融解した後に、ボルテックス及びスピンドウンした上清を用いて実施した。

結果

1 感度確認試験

Nose 株において、新法は 10^4 、旧法は 10^5 倍希釈まで検出し、KZ91CP 株において、新法は 10^5 、旧法は 10^6 倍希釈まで検出した (表 1)。したがって、新法は旧法と比較して検出限界量が 10 倍高い結果となった。また、各検体における新法と旧法の Ct 値の差の平均値は 3.5 であった。

表 1 感度確認試験での Ct 値

希釈倍率	Nose株		KZ91CP株	
	新法	旧法	新法	旧法
10^1	23.2	19.2	21.1	18.9
10^2	26.7	22.0	24.7	23.3
10^3	30.4	26.7	28.0	26.2
10^4	34.7	30.4	31.6	28.3
10^5	UD	35.0	37.6	31.3
10^6	UD	UD	UD	35.0
10^7	UD	UD	UD	UD

※UD: 検出されず

2 血清を用いた新法及び旧法の比較試験

新法及び旧法で PI 牛は 32 検体全て陽性、非感染牛は 96 検体全て陰性だった。PI 牛における各法の Ct 値について、新法の平均値は 25.9 だったが、旧法の平均値は 20.1 とその差は 5.8 であった。また、溶血した 2 検体の Ct 値について、新法では 24.4 と 23.7、旧法では 19.3 と 18.0 となり、各法における平均値の差は 5.4 と 5.8 よりも低い値となった。なお、両法において Ct 値が明らかに高い検体

(新法：31.3、旧法 24.5) と低い検体（新法：21.6、旧法 15.6）が 1 検体ずつあった(表 2)。

表 2 PI 牛血清における Ct 値

検体番号	新法	旧法	備考
1	27.2	21.5	
2	27.0	21.0	
3	28.9	24.4	
4	27.5	21.6	
5	27.5	22.3	
6	28.8	22.9	
7	24.4	20.1	
8	27.0	20.5	
9	21.6	15.6	
10	25.5	20.3	
11	31.3	24.5	
12	23.8	17.7	
13	24.6	18.8	
14	24.1	18.2	
15	23.6	18.1	
16	25.9	19.6	
17	23.7	17.7	
18	28.0	21.9	
19	23.7	18.0	溶血検体
20	25.8	19.5	
21	27.0	20.8	
22	25.9	19.7	
23	24.7	18.1	
24	26.6	20.5	
25	24.4	19.3	溶血検体
26	27.9	21.5	
27	27.3	21.5	
28	24.2	18.5	
29	23.5	17.9	
30	25.8	20.3	
31	26.1	20.3	
32	25.9	20.9	
平均値	25.9	20.1	差 5.8
溶血検体の平均値	24.1	18.7	差 5.4

3 耳片を用いた新法及び旧法の比較試験

耳片調査の結果、新法及び旧法で PI 牛は 4 検体全て陽性、非感染牛は 2 検体全て陰性であった。PI 牛における各法の Ct 値について、新法の平均値は 31.1 で、旧法の平均値は 26.2 とその差は 4.9 であった(表 3)。

表 3 PI 牛耳片における Ct 値

検体番号	新法	旧法	備考
1	31.1	23.8	
2	31.9	26.8	
3	30.8	28.3	
4	30.6	25.8	
平均値	31.1	26.2	差 4.9

考察

感度確認試験の結果、新法は旧法と比較して検出限界量が 10 倍高く、各検体における Ct 値の差の平均値が 3.5 であった。Ct 値が 1 低下するごとに検出遺伝子量は約 2 倍となるため¹⁰⁾、検出できた遺伝子量の差は 2 の 3.5 乗、つまり約 11 倍異なると推測される。したがって、新法は旧法と比較して感度が 10 倍程度低いと考えられた。

血清を用いた両方の比較試験の結果、新法は旧法と同等の検出率を有し、非特異反応も確認されなかった。また、平均 Ct 値の差が 5.8 と感度調査の 3.5 より大きい値となり、血清による増幅反応の阻害があったと考えられるが、溶血検体の Ct 値の差の平均:5.4 が平均 Ct 値の差 5.8 よりも小さかったことから、阻害物質であるヘモグロビン以外の阻害物質による影響を受けたと推測される。しかし、平均 Ct 値よりも明らかに高い Ct 値 31.1 の検体も検出できたことから、血清を用い

た新法は PI 牛の摘発方法として有用であることが示された。

耳片を用いた両法の比較試験の結果でも、新法は旧法と同等の検出率を有し、非特異反応も確認されなかった。また、平均 Ct 値の差が 4.9 と感度調査の 3.5 よりは大きい、血清調査の 5.8 よりは小さく、増幅反応が血清よりは阻害されない可能性がある。しかし、検体数が少なく、そもそも平均 Ct 値が高いことから、耳片を用いた新法の感度に懸念があった。

そこで、耳片による検査で想定される最大 Ct 値が検出できる値なのかを推算した。まず、新法による血清と耳片の平均 Ct 値の差である 5.2 が PI 牛における血清と耳片の Ct 値の差であると仮定した。そして、血清による試験で平均値よりも明らかに大きい最大 Ct 値 31.3 に 5.2 を足した値、36.5 が耳片検査において想定される最大 Ct 値であると推算した。この 36.5 という値は、感度確認検査で検出できた新法最大 Ct 値 37.6 及び新法のサイクル数 45 よりも低いことから、耳片を用いた新法も PI 牛の摘発方法として有用であると考えられた(図 2)。

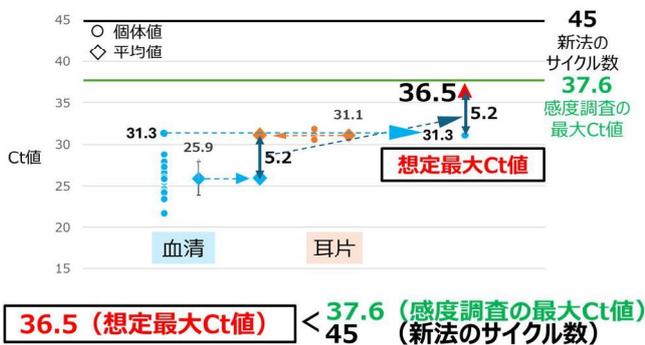


図 2 耳片検査における想定最大 Ct 値の推算

本県の令和 6 年度における抗原 ELISA 検査数は 4,978 検体 106 回であり、新法は抗原 ELISA より検査費用が 1 検体当たり約 50 円安価となり、作業時間が 1 検査あたり約 40 分短縮する。新法に変えることにより、移行抗体による偽陰性の影響がなくなるだけでなく⁵⁾、年間約 25 万円の経費削減及び約 71 時間の作業時間短縮が期待できる(図 3)。今後は新法を検査体制に導入し、PI 牛の確実な摘発及び業務効率化に寄与したい。

令和6年度の抗原ELISA検査数は4,978検体106回

	抗原ELISA		新法
検査費用 (1検体)	550円	50円安価	500円
作業時間 (1検査)	1時間	40分短縮	20分

移行抗体による偽陰性なし + 年間25万円の経費削減及び71時間の作業時間短縮が期待

図 3 抗原 ELISA と比較した新法の利点

参考文献

- 1) 村上賢二：牛ウイルス性下痢, 家畜伝染病ハンドブック, 村上賢二・産野弘一編, 148-150, 朝倉書店, (2020)
- 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 (2012)
- 3) 牛ウイルス性下痢・粘膜病に関する防疫対策ガイドライン(平成 28 年 4 月 28 日 28 消 安 第 734 号 農林水産省消費・安全局動物衛生課長通知)
- 4) 増田恒幸ら：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, 日獣会誌, 69, 187-191 (2016)

- 5) 宮根和弘ら：移行抗体を保有する牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛の血清中遺伝子量の調査, 日獣会誌, 72, -191 (2016)
- 6) RW Fulton et al: Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1a, BVDV1b, BVDV2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3 virus bovine respiratory syncytial virus *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in beef calves, antibody decline by half-life studies and effect on response to vaccination. Vaccine, 22, 5-6, 643-649, (2004)
- 7) 齋藤俊哉ら：牛腎由来株化細胞 MDBK-SY細胞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)
- 8) B. Hoffmann et al: A universal heterologous internal control system for duplex real-timeRT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. Journal of Virological Methods, 136, 200-209, (2006)
- 9) WA Al-Soud et al: Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. Journal of Clinical Microbiology, 39(2):485-493 (2001)
- 10) I Made Artika et al: Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis . Genes(Basel), 13(12), 2387, (2022)