

プール血清及びバルク乳を用いた ELISA 法による

農場の牛白血病ウイルス抗体陽性率の推測

○ 大泉卓也・中島博美・小林良人
(長野県伊那家畜保健衛生所)

要約

地方病性牛白血病 (EBL) 対策には農場の牛白血病ウイルス (BLV) 浸潤状況調査による感染牛把握が重要だが、検査手数料の負担、採血の労力により頻回検査の困難等が課題。プール血清及びバルク乳を用いた ELISA 法 (EL) により農場における BLV 抗体陽性牛 (陽性牛) 有無の判定と BLV 抗体陽性率 (陽性率) 推測の可否を検討。試験 1 : 陽性牛プール血清の希釈系列 EL では検出限界は陽性率 1 % で陽性率推測は困難。試験 2 : 農場毎プール血清 EL では陽性牛有無の判定が可能。試験 3 : 陽性牛プール乳清の希釈系列 EL では検出限界は陽性率 5 % で陽性率推測が可能。試験 4 : バルク乳 EL による推定陽性率は個体毎の血清を用いた陽性率と概ね同等。試験 5 : バルク乳 EL による管内酪農場の陽性率調査では、管内 52 農場に陽性牛が存在し、うち 18 農場は BLV 浸潤状況調査未実施。EL にプール血清あるいはバルク乳利用で BLV 清浄性確認検査時の検査手数料の負担が軽減され、バルク乳利用で頻回検査が可能と考察。

1 はじめに

EBL 対策には農場の BLV 浸潤状況調査により農場の感染牛を把握する必要がある。この BLV 浸潤状況調査の実施には三つの課題があり、第一に BLV 浸潤状況調査未実施では農場の感染牛の有無や陽性率がわからないこと、第二に検査手数料の負担がかかること、第三に採血に労力がかかるため、頻回検査ができないことが挙げられる。これらの課題を解決するため、農場毎のプール血清及びバルク乳を用いた EL により農場の陽性牛有無の判定及び陽性率推測の可否について検討したので、その概要を報告する。

2 方法と結果

試験 1 陽性牛プール血清の希釈系列の EL

(1) 材料及び方法

陽性牛 100 頭の血清を用いた。50 μ l ずつプールした血清を市販キット (牛白血病エライザキット、JNC 社製) に付属の血清希釈液を用いて希釈系列を作成し、EL を実施した (表 1)。

表 1 陽性牛プール血清の希釈倍率及び血清濃度

希釈倍率 (×)	血清濃度 【陽性率】 (%)
希釈なし	100
1.11	90
1.25	80
1.43	70
1.67	60
2	50
2.5	40
3.33	30
5	20
10	10
20	5
100	1
200	0.5
1000	0.1
2000	0.05
10000	0.01
希釈液のみ	0

(2) 結果

S/P 値 0.3 以上を陽性と判定したところ、検出限界は陽性率 1 % であった (表 2)。

表2 陽性プール血清の希釈系列の EL 結果

陽性率(%)	S/P値
100	4.450
90	4.135
80	3.964
70	3.774
60	4.079
50	3.738
40	3.847
30	3.354
20	3.186
10	2.247
5	1.413
1	0.353
0.5	0.249
0.1	0.072
0.05	0.051
0.01	0.031
0	0.024

S/P 値が 3 を超えると陽性率の上昇が垂直傾向となり、陽性率の高い検体が低い検体よりも S/P 値が低くなるものもみられた (図 1)。

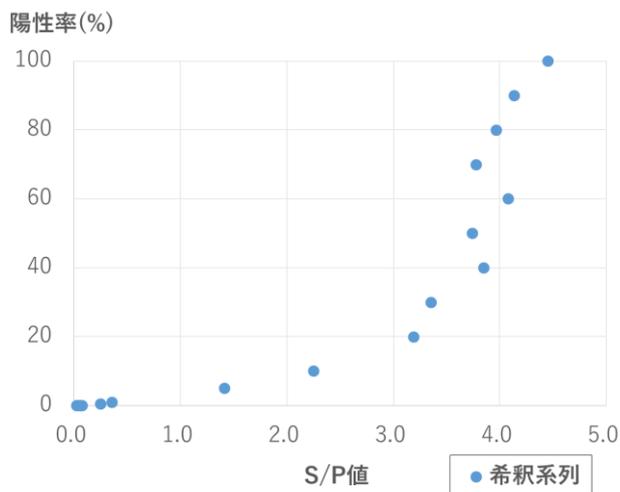


図1 陽性プール血清の希釈系列の EL 結果

試験2 農場毎プール血清の EL

(1)材料及び方法

実際に農場における陽性牛有無の判定の可否を、陽性率が判明している 10 農場、検査未実施で陽性率が判明していない主に乳用牛を飼養している 2 農場及び主に肉用牛を飼養している 2 農場の計 14 農場の血清を用いて検討した。血清は農場毎に 50 μl ずつプールし EL を実施した。

(2)結果

陽性率が判明している 10 農場のうち、陽性

牛が存在する 9 農場は S/P 値が 0.3 以上であり、陽性牛が存在しない 1 農場は S/P 値が 0.3 未満であった。検査未実施の 4 農場のうち、W、X、Z 農場は S/P 値が 0.3 以上であり、Y 農場は S/P 値が 0.3 未満であった (表 3)。

表3 農場毎プール血清の EL 結果

農場	頭数 (乳用牛/肉用牛)	陽性頭数	陽性率 (%)	S/P値	陽性牛の有無
A	121 (121/0)	104	86.0	3.732	有
B	38 (38/0)	22	57.9	4.123	有
C	54 (54/0)	21	38.9	4.301	有
D	49 (49/0)	16	32.7	3.484	有
E	92 (92/0)	26	28.3	3.683	有
F	34 (34/0)	7	20.6	3.092	有
G	48 (0/48)	6	12.5	2.838	有
H	59 (59/0)	4	6.8	2.486	有
I	48 (48/0)	1	2.1	1.551	有
J	87 (67/20)	0	0	0.043	無
W	71 (71/0)	未検査	不明	3.629	有?
X	43 (41/2)	未検査	不明	2.111	有?
Y	47 (2/45)	未検査	不明	0.060	無?
Z	33 (0/33)	未検査	不明	2.962	有?

試験3 陽性牛プール乳清の希釈系列の EL

(1)材料及び方法

陽性牛 10 頭の乳清を用いた。100 μl ずつプールした乳清を市販キットに付属の血清希釈液を用いて希釈系列を作成し、EL を実施した (表 4)。

表4 陽性牛プール乳清の希釈倍率及び乳清濃度

希釈倍率 (×)	乳清濃度【陽性率】 (%)
希釈なし	100
1.11	90
1.25	80
1.43	70
1.67	60
2	50
2.5	40
3.33	30
5	20
10	10
20	5
100	1
200	0.5
1000	0.1
2000	0.05
10000	0.01
希釈液のみ	0

(2)結果

乳清で血清と同等の判定を行うため、カット

オフ値をS/P値0.017~0.132に設定¹⁾し判定したところ、検出限界は陽性率5%であった(表5)。

表5 陽性プール乳清の希釈系列のEL結果

陽性率(%)	S/P値
100	1.100
90	0.868
80	0.684
70	0.620
60	0.542
50	0.463
40	0.394
30	0.228
20	0.237
10	0.138
5	0.073
1	0.016
0.5	0.011
0.1	0.002
0.05	-0.004
0.01	0.009
0	0.003

測定されたS/P値はほぼ右肩上がりになっており、近似曲線を作成すると $y=102.1x+0.4135$ の式が得られた。決定係数は0.9795と1に近かった(図2)。

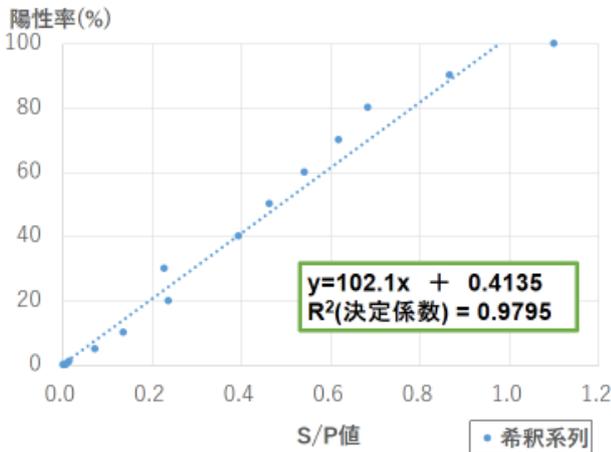


図2 陽性プール乳清の希釈系列のEL結果

試験4 バルク乳のEL

(1) 材料及び方法

陽性率が判明している11農場のバルク乳をELに用いることで、実際に農場における陽性牛有無の判定及び陽性率推測の可否を検討した(表6)。

表6 バルク乳のELを実施する11農場の血清を用いた浸潤状況調査結果

農場	頭数	陽性頭数	陽性率(%)
a	121	104	86.0
b	33	20	60.6
c	38	22	57.9
d	41	14	34.1
e	84	17	20.2
f	10	2	20.0
g	43	7	16.3
h	45	6	13.3
i	21	2	9.5
j	45	3	6.7
k	4	0	0

バルク乳は血清と同様に10 μ lをELに供した。

(2) 結果

3農場についてはバルク乳での推定陽性率は実際の陽性率より高くなったものの、それ以外の8農場についてはバルク乳での推定陽性率と実際の陽性率は概ね等しかった(図3)。

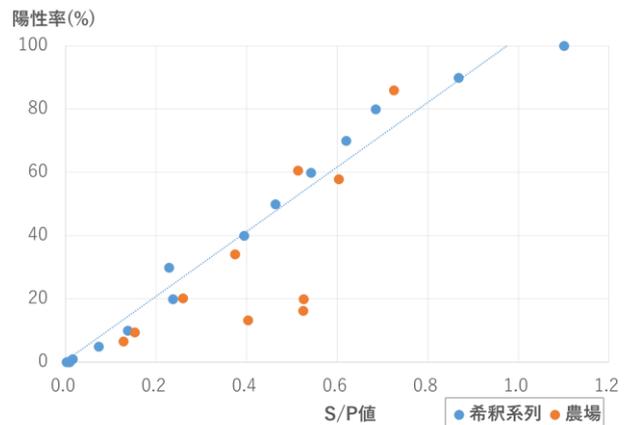


図3 バルク乳のEL結果

試験5 バルク乳のELによる管内酪農場の推定陽性率調査

(1) 材料及び方法

管内76農場のバルク乳を用いてELを実施し測定されたS/P値を試験3で得られた式に代入することで、各農場の推定陽性率を調査した。

(2) 結果

少なくとも管内 52 農場には陽性牛が存在すると推測され、そのうち 18 農場は BLV 浸潤状況調査未実施であった(表 7)。

表 7 バルク乳の EL による管内酪農場の推定陽性率調査結果

推定陽性率 (%)	農場数	浸潤状況調査	
		実施農場数	未実施農場数
A (5未満)	24	8	16
B (5~25)	22	12	10
C (25~50)	17	13	4
D (50~75)	8	4	4
E (75以上)	5	5	0
計	76	42	34

(平成29年4月~平成31年3月 時点)

5 考察

試験 1 においてプール血清 EL の検出限界は陽性率 1 % であり、プール血清を利用することで高い検出感度で農場における陽性牛有無の判定が可能と考えられた。一方で、S/P 値が 3 を超えると陽性率の上昇が垂直傾向となり、陽性率の高い検体が低い検体よりも S/P 値が低くなるものもみられたことから、陽性率の推測は困難であると考えられた。

試験 2 では陽性率が判明している 10 農場のうち、陽性牛が存在する 9 農場は S/P 値が 0.3 以上、陽性牛が存在しない 1 農場は S/P 値が 0.3 未満となり、正確に農場における陽性牛有無の判定を行うことができた。また、検査未実施の 4 農場のうち、W、X、Z 農場は S/P 値が 0.3 以上であるため陽性牛が存在すると推測され、Y 農場は S/P 値が 0.3 未満であるため陽性牛が存在しないと推測された。このことから、プール血清を用いた EL により農場における陽性牛有無の判定が可能であると考えられた。

試験 3 においてプール乳清 EL の検出限界は陽性率 5 % であり、プール血清と比べると検出感度は劣るものの、プール乳清を利用することで農場における陽性牛有無の判定が可能と考えられた。また、測定された S/P 値から近似曲

線を作成すると $y=102. x+0. 4135$ の式が得られ、決定係数からも測定された S/P 値を式に代入することで陽性率推測が可能と考えられた。

試験 4 では 11 農場のうち、3 農場についてはバルク乳での推定陽性率が実際の陽性率より高くなった。バルク乳での推定陽性率が実際の陽性率と異なる要因として農場の飼養頭数、乾乳牛の頭数、陽性牛の S/P 値及び乳量等が考えられ、バルク乳の EL ではこれらの要因についても考慮し評価する必要がある。一方、その他の 8 農場はバルク乳での推定陽性率と実際の陽性率は概ね等しく、一部例外はあるもののバルク乳の EL により陽性率の推測が可能であると考えられた。

試験 5 ではプール乳清 EL の検出限界が陽性率 5 % であるため、推定陽性率 5 % 未満の A についても陽性牛が存在する可能性は否定できない。少なくとも、推定陽性率 5 % 以上の B、C、D、E については陽性牛が 1 頭以上存在すると考えられた。管内 52 農場には陽性牛が存在すると推測され、そのうち 18 農場は BLV 浸潤状況調査未実施であり、陽性牛が存在するにもかかわらず EBL 対策が十分に実施されていないと考えられることから、早期に BLV 浸潤状況調査を実施し対策をとる必要があると考えられた。

今回の結果から、プール血清及びバルク乳を用いた EL を実施することで農場内の陽性牛の存在が判明するため、個体検査を実施する意義が増すと考えられた。陽性率により実施するべき EBL 対策の内容は異なるが、バルク乳の EL では陽性率の推測が可能であるため、個体検査を実施する前に対策方針を立てることが可能であると考えられた。また、BLV の清浄性が確認された農場は個体検査を実施する必要がなくなるため、検査手数料の負担軽減が期待される。さらに、採材が容易なバルク乳を利用することで頻回検査が可能になり、新規感染牛を早期に特定することができると考えられた。

6 おわりに

プール血清及びバルク乳を用いた EL の活用法として、プール血清を用いた EL は農場の陽

性牛有無を判定することが可能であり、肉用牛飼養農場においても実施が可能である。バルク乳を用いた EL は農場の陽性牛有無を判定することが可能であることに加え、頻回検査が可能である特性を活かし、農場のモニタリングに利用することで BLV 対策の効果判定に利用が可能であると考えられる。これらの方法を活用した BLV 検査の効率化が、BLV 清浄化達成への一助となることを期待する。

引用文献

- 1) 大泉卓也：牛白血病ウイルス検査における乳汁を用いた ELISA 法の活用法検討，臨床獣医，438(5)：44-46(2019)