

県畜産技術振興センター飼養牛移動時等衛生検査実施状況と効率化の検討

○藤木 美佐子

1. はじめに

本県のキャトル・ステーション含む哺育牛飼養施設(CS等)では飼養牛の移動時に衛生検査(本検査)として牛伝染性リンパ腫ウイルス(BLV)や牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)等の検査を実施している。県内ではBLV陽性農家が多数存在し、CS等への導入実績のある農家においても陽性農家が少なからず存在する(表1)。またBVDVについては現在県内で陽性は確認されていないが、県外へ牛を預託する農家も多く、自農場へウイルスが侵入する可能性を常に抱えている。多くの農家から牛が集まるCS等において牛移動時にBLV、BVDVの検査を確実に実施することは家畜防疫上大変重要であるが、これらの検査は家畜検査センター(以下当センター)におけるウイルス病性鑑定に占める業務割合が高く、多検体の処理時には特に大きな労力を要している。

このような状況下、両ウイルスの従来の検査法を見直し、より効率的な検査手法について有用性を比較検討したので報告する。

2. 畜産技術振興センターでのBLV、BVDV検査実施状況

平成30年度のCS運営開始後、当センターで実施するBLV、BVDVの検査数が一気に増加し、CS以外の事業(高能力乳用牛遺伝資源醸成事業(KN)、高品質近江牛づくり推進事業、変化する消費者ニーズを捉えた近江牛生産技術の確立試験)における牛移動時検査も含め、現在に至るまでBLVは900検体/年、BVDVは400検体/年程度を実施している。

令和2年度以降、導入時の検査で毎年数頭のBLV陽性牛を、令和3年度にBVDV陽性牛を摘発しており、また令和2年度には導入から約1~2か月後に実施する場内移動時の検査においてもBLV陽性牛を摘発している(表1)。一方、導入から数か月後に実施する売却、売渡時の検査ではすべて個体で両ウイルスの陰性を確認しており、CS等へのBLV、BVDVの侵入および施設内での蔓延防止に寄与している(表2,3)。

3. 家畜検査センターでの本検査実施状況

本検査は主に家畜検査センターが担っており、毎週同じ検査スケジュールにて遺伝子検査を実施している(図1)。月曜日に導入対象農家で採血した出生子牛の血液検体が火曜日午後に当センターに搬入され、直ちに遺伝子検査を開始する。結果が判明後、同週末までに当該子牛を移動させるため、迅速な結果回答が求められている。検査数については導入元での子牛出生状況や畜技センター内での牛移動の都合で適宜決まるため各検査日の検体数は検査直前まで定まらず、2検体/日から30検体/日を超える場合もあり、多検体処理にも迅速に対応できる準備態勢が常に必要となっている。

4. 本検査におけるBLV、BVDV検査手法の見直し

検査精度を維持しながら効率的に本検査を実施し、当センターウイルス病性鑑定業務における負担を軽

減するためコンベンショナル PCR(従来法)からリアルタイム PCR(rPCR)への変更や白血球分離作業の省略、さらに核酸簡易抽出試薬の応用といった検査省力化について有用性を検討した。

(1)材料

令和5年度中にCS等導入牛検査(おおむね2週令以内の子牛)で実施したBLV陰性かつBVDV陰性の45検体およびBLV陽性かつBVDV陰性の5検体を用いた。

白血球分離浮遊液および全血検体の検出限界比較ではBLV陽性1検体の抽出核酸をDWにて10倍階段希釈したものを、核酸簡易抽出のBLV陽性コントロール感度比較にはBLV陽性の臓器乳剤をPBS(-)にて10倍階段希釈したものを供した。

(2)方法

1)白血球分離浮遊液

血液2mlから塩化アンモニウムによる溶血法により分離した白血球をPBS(-)500 μ lに浮遊した。

2)核酸抽出

カラム抽出はロシェ社High Pure Viral Nucleic Acid Kitにて白血球分離浮遊液または全血検体を材料として実施した。

全血からの核酸簡易抽出では、Solution N(TaKaRa社)試薬と全血を20 μ lずつ混合し、98 $^{\circ}$ Cで3分加熱後1200gで2分遠心分離した上清について、カラム抽出核酸液の3倍量をrPCRの鋳型として供した。陽性コントロールの比較ではBLV陰性の全血18 μ lに、陽性の臓器乳剤2 μ lを添加して実施した。

3)コンベンショナルPCR(従来法)

BLVについてはFechnerらの報告¹⁾したプライマーを用いTaKaRa Ex PremierTM DNA PolymeraseによりPCRを実施した。

BVDVについてはVilcekらの報告²⁾したプライマーを用いPrimeScriptTM One Step RT-PCR Kit Ver.2によりRT-PCRを実施した。

白血球分離浮遊液および全血検体の検出限界比較では抽出核酸をDWにて10倍階段希釈液を材料とした。

4)リアルタイムPCR(rPCR)

BLVについてはWatanabeら³⁾の報告したプライマーとプローブを、BVDVについてはGotoら⁴⁾の報告したプライマーとプローブを用い、One Step PrimeScriptTM III RT-qPCR Mix, with UNG(TaKaRa社)により実施した。

白血球分離浮遊液および全血検体の検出限界比較では3)と同様の材料を用いた。

(3)結果

1)rPCR法利用の検討

BLVについては検査した50検体すべて従来法とrPCRの結果が一致し、陽性5検体のCt値は28.7~33.5であった(表4)。

BVDV については陽性例がなく、陽性検体での検証ができなかった。従来法で陰性であった 50 検体中 4 検体で Ct 値の高い蛍光が検出された(表 5)。

2) 白血球分離浮遊液と全血検体の比較

白血球分離浮遊液を用いた従来法にて BLV 陽性であった 5 検体全ての全血検体において陽性が確認され、従来法、rPCR とも両検体で同等の感度を示した(図 2)。陰性 15 検体については全血検体においても全て陰性であった。

陽性 1 検体を用いた検出限界の比較では白血球分離浮遊液、全血検体とも 10^4 倍希釈で検出限界となり、従来法と rPCR で同等の結果が得られた(図 3)。

3) 全血からの核酸簡易抽出法応用の検討

陽性コントロールの感度比較ではカラム抽出と簡易抽出で同等の結果であったが、野外陽性の 2 検体では簡易抽出の感度が著しく低下した(表 6)。

(4) 考察

BLV においては従来法と rPCR で本検査における野外検体の結果が全て一致し、rPCR での Ct 値が安定した値であったことから本検査での rPCR 利用が可能であると考えられた。

また、白血球分離浮遊液と全血の比較では両検体で結果が一致し、従来法と rPCR ともに同等の検出感度であったことから、白血球分離作業の省略が検査結果に影響しないことが示唆された。

さらに、簡易な抽出法の利用について、豚熱アフリカ豚熱 rPCR 前処理用市販試薬を応用したスクリーニングの利用を検討したが本検査における実用には不適であることがわかった。

BVDV については本年度本県では陽性事例がなく陽性検体での検証はできなかった。従来法での野外陰性検体では約 1 割で Ct 値の高い蛍光が検出されたが、これらの検体について従来法にて再検査をすることで本検査での rPCR 利用が可能であると考えられた。

また、BVDV 抗体陽性の PI 牛(哺育期の PI 牛)において血清を材料とした遺伝子検査でも BVDV 特異遺伝子の検出が十分可能であったとの報告⁵⁾もあり、全血検体での BVDV 検査は有用である可能性が高いと考えられる。

本検査において rPCR を適用した場合、概算で一検体当たりの PCR 試薬費用が BLV で 436 円から 234 円、BVDV で 880 円から 234 円に減額できると算定され、BVDV の 1 割程度で再検査を実施することになった場合でも従来より低く抑えられると見込まれた。

5. まとめ

県内には BLV 陽性農家が多数確認されており、多くの農家から牛が集まる本県の CS において牛移動時に行う本検査は家畜防疫上重要な意義があるが、多検体を処理する検査日が多く、当センターにおける検査負担割合の高い状態が続いている。このため安定した水準での検査継続に向けて検査の省力化を模索する必要があり、今回、従来の検査法の煩雑な作業工程の見直しを検討した。

野外検体での検証により従来法であるコンベンショナル PCR に代わって rPCR の利用が可能であること、白血球分離作業の省略が検査精度に影響しないことが示唆された。

これらの手法を本検査で実用化した場合、特に 24 検体以上の多検体を処理する検査日においては白血球分離作業の省略により 80 分程度、rPCR の利用により 80～120 分程度検査時間が短縮され、大幅な労力の軽減が期待される。

今後は本検査での実用化に向けて野外検体での検証の継続に加え、スクリーニング検査手法のさらなる簡略化を実現する技術向上を目指して試行を積み重ねていきたい。

6. 参考文献

- 1) H. Fechner, et al. : Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to serological status of naturally infected cattle, *Virology*, 237(2), 261-269(1997)
- 2) S. Vilcek, et al. : Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis, *Archives of Virology*, 136, 309-323(1994)
- 3) 渡邊ら: 新たな定性的 BLV 遺伝子検査の開発, 令和 2 年度島根県家畜保健衛生業績発表集録
- 4) Y. Goto, et al. : Design of multiplex quantitative reverse transcription-PCR system to simultaneously detect 16 pathogens associated with bovine respiratory and enteric disease, *Journal of Applied microbiology*, 129(4), 832-847(2020)
- 5) 宮根ら: 哺育期の牛ウイルス性下痢・粘膜病診断のための血清を用いた遺伝子検査有用性の検証, 第 64 回北海道家畜保健衛生業績発表集録, 69-74(2016)

表 1. 県内の BLV 陽性農家戸数

		農家戸数	陽性戸数
乳用牛	全県	32	19
	CS等利用農家	24	18
肉用繁殖牛	全県	34	10
	CS等利用農家	23	8

R6. 2. 29現在廃業農家は除く

表 2. CS 等における BLV 検査実績

検査目的	年 度					
	H30	R1	R2	R3	R4	R5
CS	0/25	11/186	5/329	10/367	3/391	5/317
導入 KN	—	1/24	1/31	1/26	2/29	0/25
その他	—	—	—	—	—	—
CS	0/8	0/156	4/470	0/369	(1)/427	0/323
場内移動 KN	—	0/22	1/25	0/23	0/27	0/22
その他	—	—	—	—	—	—
CS	—	0/20	0/72	0/81	0/47	0/18
売却譲渡 KO	—	—	—	—	—	—
その他	—	0/1	0/1	0/12	0/4	—
検査数計	33	409	928	878	925	705

表 3. CS 等における BVDV 検査実績

検査目的	年 度					
	H30	R1	R2	R3	R4	R5
CS	0/25	0/186	0/329	1/367	0/391	0/317
導入 KN	—	0/24	0/31	0/26	0/29	0/25
その他	—	0/7	0/5	0/22	0/27	0/28
CS	—	—	—	—	—	—
売却譲渡 KN	—	—	—	—	—	—
その他	—	0/47	0/35	0/40	0/25	0/46
検査数計	25	264	400	455	472	416

月	火	水	木	金
県内農家で被検牛採血		PCR 電気泳動 結果報告	県内農家から牛移動	県内農家から牛移動
(検体搬入)	検体搬入 (14:00までに) 白血球分離 核酸抽出 PCR	<再検査>		
畜技センター職員	畜技センター職員 当センター職員	当センター職員	畜技センター職員	畜技センター職員

図 1. CS 等関連の検査スケジュール

表 4. 従来法と rPCR 結果比較 (BLV)

方法		コンベンショナルPCR	
		+	-
rPCR	+	5	0
	-	0	45

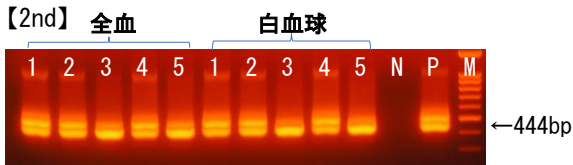
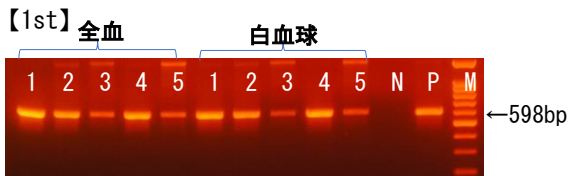
表 5. 従来法と rPCR 結果比較 (BVDV)

方法		コンベンショナルPCR	
		+	-
rPCR	+	0	4
	-	0	41

図 2. BLV 陽性検体の感度比較

(全血, 白血球分離浮遊液)

検体 No.	rPCR (Ct値)		従来法	
	全血	白血球	全血	白血球
1	27.80	28.99	+	+
2	29.10	28.57	+	+
3	32.94	33.05	+	+
4	28.25	28.74	+	+
5	31.51	32.8	+	+

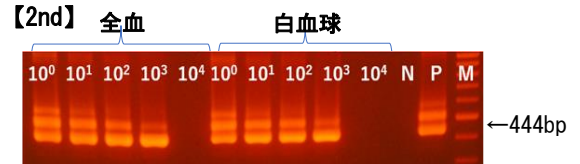
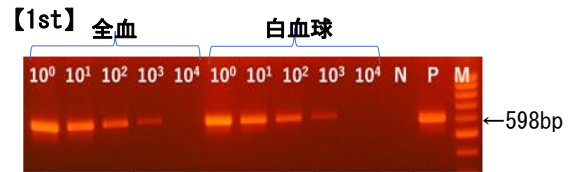


1~5: 検体 N: 陰性コントロール
P: 陽性コントロール M: 100bpマーカー

図 3. BLV 陽性検体の検出限界比較

(全血, 白血球分離浮遊液)

希釈倍率	rPCR (Ct値)		従来法	
	全血	白血球	全血	白血球
10 ¹	27.80	28.99	+	+
10 ²	30.16	31.77	+	+
10 ³	34.39	33.95	+	+
10 ⁴	36.9	36.39	+	+
10 ⁵	—	—	—	—



N: 陰性コントロール P: 陽性コントロール
M: 100bpマーカー

表 6. 核酸簡易抽出法利用による感度比較

① BLV 陽性コントロール

希釈倍率	rPCR (Ct値)	
	カラム抽出	簡易抽出
10 ⁰	30.90	31.35
10 ¹	33.73	34.77
10 ²	37.17	37.84
10 ³	—	41.56

② BLV 全血陽性検体

検体No.	rPCR (Ct値)	
	カラム抽出	簡易抽出
4	28.25	40.27
5	31.51	—