

産 9

新たな定性的 BLV 遺伝子検査手法の開発

渡邊 勉 ○石倉洋司 安部哲朗

島根県家畜病性鑑定室

1. はじめに：当室では、従来、定性的 BLV 遺伝子検査は Fechner らの手法（以下、F 法）に基づき、nested-PCR を実施してきた。nested-PCR は感度向上のため有用であるが、反応時間が長く、作業が複雑でコンタミネーションのリスクがある。そこで今回、F 法を改良し、リアルタイム PCR 法（以下、新法）を開発したので報告する。

2. 材料および方法：新法はプローブ法とし、forward プライマーは F 法における 2nd 用 reverse プライマー (env5521r) を reverse-complement した配列を改良し、reverse プライマーは F 法 1st 用 reverse プライマー (env5608r) を改良した。プライマー間は 117bp で、プローブを新たに設計した。反応条件は 95℃ 60 秒で activation した後に、95℃ 15 秒および 60℃ 30 秒を 45 サイクルとした。新法の有用性を検証するため、以下のとおり野外材料を用いて BLV 検査を実施した。県内 2 酪農場の協力を得て、7 か月齢以上の飼養牛 126 頭から血清および EDTA 加全血を採材した。血清は市販キットを用いて抗体検査 (ELISA) を実施した。全血は溶血処理にて回収した白血球から DNA を抽出し、F 法および新法を実施した。

3. 成績：ELISA 陽性個体は 73 例で、そのうち F 法陽性は 71 例、新法陽性は 72 例であり、ELISA の結果に対して F 法の感度は 97.2%、新法は 98.6% であった。ELISA 陰性個体では、F 法および新法ともに全例陰性であった。

4. 考察：新法は F 法と比較して同等以上の検出感度を示した。ELISA 陽性個体で遺伝子が検出されなかった個体については、感染ウイルス量が極端に抑えられているか、プライマーが標的とする塩基配列が一致していない可能性も考えられる。遺伝子検出感度は、標的とする遺伝子領域や酵素など複数の要因に影響を受けるため、定量的リアルタイム PCR においても、使用する市販キットによって感度は異なり、必ずしも結果が一致しない。検査時間は、F 法が約 7 時間に対し、新法が約 2 時間と短縮することができ、1 検体あたりの試薬費用は F 法 245 円、新法 113 円と半額以下となった。また、新法では F 法と比較して PCR 産物を扱うことがなく、作業の効率化およびコンタミネーションのリスク低減を図ることができた。

産 10

岡山県における牛ロタウイルス A の疫学調査

○水戸康明¹⁾ 梅田浩二²⁾ 鈴木 亨³⁾

1) NOSAI 岡山西部家畜診 2) (株) EWNJ 3) 農研機構 動衛研

1. はじめに：牛ロタウイルス A (RVA) による子牛の下痢症は、臨床現場において頻繁に遭遇する病気のひとつである。今回、効果的な予防対策を実施するために、岡山県における牛 RVA の疫学調査を実施したので概要を報告する。

2. 材料および方法：発生状況調査 2017 年 9 月～2021 年 3 月の間に下痢を発症した 2～257 日齢の牛（黒毛和種：196 検体、F1：134 検体、ホルスタイン種：185 検体、ジャージー種：7 検体、その他：4 検体）の糞便 526 検体を用い病原体検出キット (DipFit コスモバイオ社) で RVA の検出を行った。

中和抗体の保有状況調査 2016 年 9 月～12 月の間に採血した下痢 5 種ワクチン未接種農場における 1.9～9.9 歳の健康な乳用種母牛（ホルスタイン種 87 検体、ジャージー種 14 検体）の血清 101 検体を用い牛 RVA (Gunma8701 株：G6P [1]) に対する中和抗体価を測定した。

RVA 遺伝子型別決定 2017 年 10 月～2020 年 5 月の間に下痢を発症した子牛（黒毛和種：7 検体、F1：7 検体、ホルスタイン種：11 検体）の糞便 25 検体を用い、ダイレクトシーケンシング法により G 遺伝子型 (VP7) 及び P 遺伝子型 (VP4) を決定し、系統樹解析を実施した。

3. 結果：牛 RVA 陽性率（陽性率）は 29.5% (155/526) であった。品種別の陽性率は黒毛和種 34.2% (67/196)、F1 28.4% (38/134)、ホルスタイン種 24.3% (45/185) であったが有意差はみられなかった。牛 RVA 感染に関連する要因を診療回数、発症日齢、転場、発症季節、性別とし解析を実施したが有意差は見られなかった。抗体陽性率は、100% (101/101) であった。遺伝子型の出現率は、G6P [5] 32.0% (8/25)、G6P [11] 24.0% (6/25)、GIOP [11] 32.0% (8/25)、G6P [x] 8.0% (2/25)、GxP [11] 4.0% (1/25) であった。

4. 考察：下痢糞便の約 1/3 から牛 RVA が検出されており、岡山県でも子牛下痢症の原因として重要である。0～14 日齢までの発症が多かったが、品種や日齢などに関わらず感染がみられた。乳牛は牛 RVA の中和抗体を 100% 保有しており、ほとんどの農場に浸潤し、常在化していると考えられた。遺伝子型はワクチン抗原に含まれている遺伝子型と同一もしくは交差免疫があるのでワクチン接種は予防に有効と考えられるが、今後詳細な検討が必要である。