

研 究

宮城県における死亡牛の延髄乳剤を用いた
牛ウイルス性下痢ウイルスの感染実態調査竹田百合子¹⁾、高森広典²⁾、西 清志¹⁾

1) 宮城県仙台家畜保健衛生所

2) 宮城県農林水産部畜産課

要 約

牛海綿状脳症 (BSE) 検査後の延髄乳剤を用いて、RT-PCRによる牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) の持続感染 (PI) 牛の感染実態調査を実施したところ、過去2年間 (平成24年2月から26年1月) に県内で死亡した24ヶ月齢以上の牛5,579頭中7戸7頭 (0.13%) からBVDV遺伝子が検出 (BVD1型: 5頭、2型: 2頭) された。7頭中6頭がホルスタイン種、1頭が交雑種で、全て雌、平均死亡月齢は36.6カ月齢であった。7頭は全て導入牛で、県外導入が4戸4頭、県内導入が3戸3頭であった。県内導入のうち、1戸1頭は県外導入PIがいた農場からの導入牛、残り2戸2頭は導入元が同一の県内A農場であった。A農場において、全頭採血によるPI牛追跡調査を実施したところ、全頭RT-PCR陰性で新たなPI牛は摘発されなかった。A農場における感染源は不明であったが、本調査を初めて活用した事例となった。分離ウイルスの遺伝子解析 (5'-UTR領域) では、過去のBVDV病性鑑定検体8検体が1a (n=7)、2a (n=1) に分類されたのに対し、今回の延髄乳剤分離株7検体は1b (n=3)、1c (n=2)、2a (n=2) と遺伝子型が異なっていた。以上から、県内では乳用種と導入牛のPI牛が多く、遺伝子型も多様化している可能性が示唆された。本手法は乳用種を主体に多くの農場を対象にできるため、感染実態把握の第一段階として有用と考えられた。

I はじめに

牛ウイルス性下痢ウイルスは発熱や下痢、呼吸器症状、異常産や粘膜病をおこすが、特に妊娠牛が胎齢125日未満にNCP株に感染しウイルスに免疫寛容となって生まれる持続感染 (PI) 牛が問題となる¹⁾。PI牛は発育不良を呈し多くが若齢で死亡するとされるが、外貌上異常なく成長する牛も存在し、生涯ウイルスを大量に排出するため牛群における感染源となる。しかし県内の過去10年間のBVDV感染の病性鑑定診断事例は6戸10頭と少なく、汚染状況が不明である。

牛海綿状脳症 (BSE) 特別措置法に基づき全国で

2003年より24ヶ月齢以上の死亡牛はすべて検査されているが、このBSE検査後の延髄乳剤を活用したBVDVの感染状況調査が岩手県、福岡県、千葉県で報告されている²⁾³⁾⁴⁾。宮城県も年間平均約2,500頭の死亡牛の検査を実施し、県内の牛飼養農場から広く検体の収集が可能である。今回県内のBVDV感染実態を把握するため、死亡牛の延髄乳剤を活用した調査を実施したため、その概要を報告する。

II 材料及び方法

1. 死亡牛の延髄乳剤を活用した調査

過去2年間 (平成24年2月から26年1月) に県

内で死亡した24ヶ月齢以上の牛5,579頭の延髄乳剤を使用した(表1)。内訳は乳用種が4,113頭、肉用種が1,393頭、交雑種が73頭で、ホルスタイン種雌の割合が最も多く(73.5%)、乳用種については647戸(県内の飼養戸数の97.9%)、肉用種は798戸(16.0%)から収集した。死亡後、延髄を採材するまでの平均採材日数は2.6日(0日～13日)で、平均死亡月齢は71.1ヶ月齢であった。

表1 延髄乳剤材料

区分	品種	雌	雄・去勢	検査戸数(割合)
乳用種 (4,113頭)	ホルスタイン種	4,100 (73.5%)	3	647/661戸 (97.9%)
	ジャージー種	8	1	
	ブラウンスイス	1	—	
肉用種 (1,393頭)	黒毛和種	1,066 (19.1%)	289	798/4,990戸 (16.0%)
	褐毛和種	20	5	
	日本短角種	10	3	
交雑種 (73頭)	肉×乳、肉×肉	40	33	
合計	5,579頭	5,245	334	

(1) 遺伝子検査(RT-PCR、RFLP)

BSE検査後の延髄乳剤は検査実施まで凍結(−80℃)保存した。ELISAキットはH23・25年度はテセーBSE(Bio-Rad社)、H24年度はフレライザBSE(富士レビオ社)を用いた。検体は10～20検体を混合しプール検体を作成後、QIAamp Viral RNA Mini Kit(キアゲン社)を用いてRNAを抽出しRT-PCR⁵⁾を行った。陽性が検出された場合、個体別に検査し陽性個体を特定した。陽性検体は制限酵素Pst Iを用いたRFLPにより1と2型を判別した。

(2) ウイルス分離

RT-PCR陽性の検体は延髄乳剤をBFM細胞に接種後、37℃4日間静置培養し、ウイルス分離を行った。その後BVDVNose株を用いて干渉法を実施した。

2 遺伝子解析

死亡牛の延髄乳剤を活用した調査で分離したウイルス株7検体(延髄No.1～7)の遺伝子解析を実施した。また、県内の病性鑑定で過去10年間(平成16～25年度)にBVDV感染症と確定診断した6戸10検体(表2)のうち8検体(病鑑No.1～

8:RNA7検体、ウイルス株1検体)を含む、既知のウイルス株との系統樹解析を行った。

方法は、PCR産物をQIAquick PCR Purification Kit(キアゲン社)により精製後、Big-Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(ライフテクノロジーズジャパン社)を用いてサイクルシーケンス反応を行い、オートシーケンサー(ABI 3130x Genetic Analyzer: ライフテクノロジーズジャパン社)で分析し5'-UTRの塩基配列を決定した。分子系統樹はGenetyxネットワーク版 ver.11.1.2(株式会社ゼネティックス社)を用い、近隣結合法(NJ法)にて作成した。検査は動物衛生研究所に依頼して実施した。

表2 県内のBVDV感染症の確定診断事例(過去10年間)

戸数	年度	品種	頭数	月齢	症状	遺伝子型	遺伝子解析No.
1	H16	黒毛和種	4頭	1、9、35、49	下痢で死亡(PI牛) 同居検査で3頭のPI	1型	病鑑No.1 病鑑No.2
2	H17	ホルスタイン	2頭	4、11	発育遅延、粘膜病 同居検査で1頭のPI	1型	病鑑No.3 病鑑No.4
3	H18	交雑種	1頭	5	粘膜病	1型	病鑑No.5
4	H18	ホルスタイン	1頭	3	呼吸器症状 (粘膜病疑い)	2型	病鑑No.6
5	H18	ホルスタイン	1頭	33	流産(PI牛)	1型	病鑑No.7
6	H20	ホルスタイン	1頭	52	流産(PI牛)	1型	病鑑No.8

Ⅲ 結 果

1 死亡牛の延髄乳剤を活用した調査

5,579頭中7戸7頭(0.13%)からBVDV遺伝子を検出し、全てNCP株のウイルスが分離された(表3)。7頭の平均採材日数は3.3日、平均死亡月齢は36.6ヶ月齢であった。7頭中6頭がホルスタイン種、1頭が交雑種で、全て雌であった。BVDV遺伝子型は1型が5頭、2型が2頭であった。7頭は全て導入牛で、県外導入が4戸4頭(延髄No.1～4)、県内導入が3戸3頭(延髄No.5～7)であった。県内導入のうち、1戸1頭(延髄No.7)は県外導入PI(延髄No.4)がいたNo.4農場からの導入牛で疫学的に関連していた。県内導入の2戸2頭(延髄No.5、6)は導入元が同一の県内A農場であった。

表3 BVDV陽性検体

検体 No.	生年月日	死亡 月齢	採材 日数	種類	性別	遺伝 子型	導入歴	遺伝子 解析No.
1	H20.9.17	41	4	ホルスタイン	雌	1型	県外	延髄No.1
2	H20.4.28	46	3	ホルスタイン		1型	県外	延髄No.2
3	H21.7.12	32	4	ホルスタイン		1型	県外	延髄No.3
4	H19.6.30	58	3	ホルスタイン		1型	県外	延髄No.4
5	H22.10.6	24	4	ホルスタイン		2型	県内(A農場)	延髄No.5
6	H22.7.21	28	3	ホルスタイン		2型	県内(A農場)	延髄No.6
7	H22.10.24	27	2	交雑種		1型	県内(No.4農場)	延髄No.7
平均採材日数:3.3日 平均死亡月齢:36.6ヶ月齢						7戸7頭／5,579頭 (0.13%)		

2 遺伝子解析

疫学関連があった2検体(延髄No.4、7)は99.5%、A農場由来の2検体(延髄No.5、6)は100%の高い相同性が認められた(図1)。過去の病性鑑定検体(病鑑No.1~8)は1a(n=7)、2a(n=1)、延髄乳剤分離検体(延髄No.1~7)は1b(n=3)、1c(n=2)、2a(n=2)に分類された。

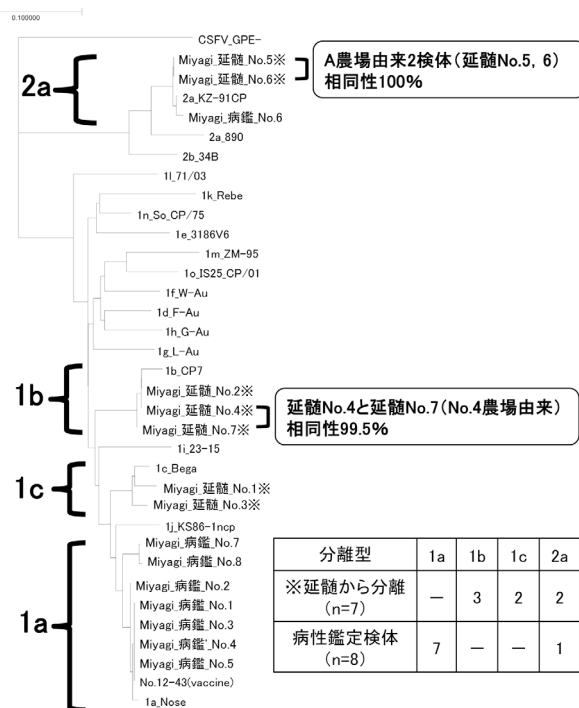


図1 BVDV 5'-UTR領域の遺伝子解析結果

IV A農場におけるPI牛追跡調査

2頭(延髄No.5、6)のPI牛を出荷したA農場において、飼養牛にPI牛がいないか追跡調査を実施した。A農場は酪農経営で、全て自家産であり、過

去10年間に牛の導入やBVDVのワクチン接種歴はなかった。飼養牛56頭(搾乳牛46頭、育成牛10頭)全頭の血清(採血日:H25.8.20)について、前述のRT-PCRを実施した。

その結果BVDV遺伝子は検出されず、新たなPI牛は確認されなかった。なお、延髄No.5の母牛は採血時既に死亡していたが、延髄No.6の母牛はPIを否定した。

V まとめ及び考察

本調査で5,579頭中7戸7頭(0.13%)からBVDVウイルスが分離されたことで、宮城県内にも一見正常牛として飼養されているBVDV感染牛の存在が明らかとなった。検出率は、福成らの報告(0.38%)²⁾、大山の報告(0.28%)³⁾より低い割合であった。平均死亡月齢は、今回の調査対象の死亡牛全体が71.1ヶ月齢であるのに対し、陽性牛は平均36.6ヶ月齢と低い傾向にあった。岩手県の死亡牛でも2歳齢の若い牛の検出が多かったこと²⁾や海外でも2歳未満の陽性率が8割以上との報告⁶⁾⁷⁾もあることから、BSE検査対象外の24ヶ月齢以下の牛の検出率は更に高い可能性が考えられた。一方で、福成ら²⁾の報告のように9歳でもPI牛が摘発されており、県内でも最大58ヶ月齢と長く生存するPI牛の存在が確認された。

摘発されたPI牛はホルスタイン種での検出が最も多く、全て県外または県内導入牛であった。PresiらはBVDV感染のリスク因子として乳用種を含む牛群、夏放牧、導入牛等ではBVDV陽性率が高かったことを報告している⁷⁾。また、ホルスタイン種での検出が多かった要因として、県内の市場上場前の黒毛和種子牛が5種混合ワクチンを接種していることに対し、ホルスタイン種は農場ごとに接種率が異なることが考えられた。遺伝子解析では、今回分離した7検体の遺伝子型は1b、1c、2aであり、特に1型は過去の病性鑑定検体の1aとは異なっていた。これは今回の陽性牛が全て導入牛であり、全国の分離株の流行状況²⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾を反映していると考えられる。これらの結果から、県内では乳用種と導入牛による

PI牛が多く、遺伝子型も多様化している可能性が示唆された。

A農場の追跡調査では、出荷した2頭（延髄No.5、6）のPI牛は生まれた時期が近く、感染時期は平成21年11月から平成22年4月頃と推測された。延髄No.6の母牛は本調査でPI牛であることが否定されたものの、延髄No.5は母牛が死亡していたため、胎子感染を否定できなかった。本農場は全て自家産で牛の導入歴もBVDVワクチン接種歴もないため感染源は不明だったが、本調査を初めて活用した事例となった。

BVDVのPI牛の調査にはバルク乳、プール血清を用いる方法のほか、スポットテストなどが報告されている¹⁾。本調査は当所にある既存の材料で検査可能で、特に乳用種については2年間で県内飼養戸数の97.9%の農家から収集できた利点があり、本法はPI牛の感染実態の第一段階の把握として有用と考えられた。A農場の追跡調査においては同居牛にPI牛が摘発されず、現在PI牛による損失がないことの確認ができた。しかしPI牛の生存時に潜在的な損耗要因となっていた可能性もある。本法がPI牛の陽性率が高いとされる24ヶ月齢以下の牛の実態把握ができないことから、更なる蔓延防止には乳用種のバルク乳検査や導入牛の着地検査などの検査体制の構築が必要と思われた。

これまで国内では全国統一した撲滅対策はなく各自治体により対策が異なっているが、組織的な対策が清浄化に有効であることが報告されている¹⁰⁾¹¹⁾。今回の感染実態を畜産団体等の講習会などで情報提供し理解を求めている。

VI 謝 辞

遺伝子解析にご協力いただいた 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構、動物衛生研究所ウイルス・疫学研究領域、亀山健一郎先生に深謝します。

引用文献

- 1) 田島誉士 (2012) 牛ウイルス性下痢ウイルス感染症, 日獣会誌, 65, 111-117
- 2) 福成和博, 八重樫岳司, 千葉伸ほか (2013) 岩手県内の農場で死亡した牛における牛ウイルス性下痢ウイルスの感染状況調査, 日獣会誌, 66, 785-790
- 3) 大山慶 (2012) 死亡牛BSE検査材料を活用した牛ウイルス性下痢・粘膜病サーベイランス平成24年度福岡県家畜保健衛生業績発表会集録, 31-33
- 4) 関根大介, 大坪岳彦, 松本千明ほか (2012) 死亡牛検査余剰延髄を用いた牛ウイルス性下痢ウイルス検出手技の検討. 平成24年度 (第54回) 千葉県家畜保健衛生業績発表会集録, 21-23
- 5) Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, et al. (1994) Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis, Arch Virol., 136. 309-323.
- 6) Houe H (1992) Age distribution of animals persistently infected with bovine Virus diarrhea Virus in twenty-two Danish Dairy Herds, Can J Vet Res., 56. 194-198.
- 7) Presi P, Struchen R, Knight-Jones T, et al. (2011) Bovine Viral Diarrhea (BVD) eradication in Switzerland-Experiences of the first two years, Prev Vet Med., 99. 112-121.
- 8) 林みち子, 村上俊明, 高井光ほか (2006) 石川県で近年分離された牛ウイルス性下痢ウイルスの遺伝子解析と血清学的性状, 日獣会誌, 59, 320-324
- 9) Matsuno T, Sakoda Y, Kameyama K et al. (2007) Pathobiological Characterization of Bovine Viral Diarrhea Viruses recently isolated from cattle in Japan, J Vet Med Sci., 69. 515-520.
- 10) 斎野仁, 川内京子, 臼井章ほか (2013) 牛ウイルス性下痢ウイルス感染症の地域的な対策事例と効果の検証, 日獣会誌, 66, 791-796
- 11) 関口敏 (2012) 欧米における牛ウイルス性下痢ウイルス感染症のリスクアナリシスとコントロールスイスの例を中心にー, 日獣会誌, 65, 591-596