

2 牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛の摘発検査方法の検討

県中央家畜保健衛生所

濱谷景祐、齋藤俊哉、芝田周平

はじめに

牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）による疾病の発生は、世界各地でみられ、下痢、発育不良、泌乳量の減少、繁殖障害などによる生産性の低下が起こる¹⁾。また、妊娠牛がBVDVに急性感染し、その際に胎齢125日未満の胎子が子宮内感染すると、胎子はそのBVDVに対して免疫寛容となり、持続感染（PI）牛として出生してくる²⁾。PI牛は、多量のウイルスを生涯にわたり排泄し続けるが、明確な症状を示さない場合が多く、牛群内及び農場間の感染を広げる主要因となる。そのため、本疾病の対策としては、PI牛を中心とした感染個体の早期摘発が重要である¹⁾²⁾。

本県では、BVDV検査を、牛の病性鑑定時のみならず、放牧予定牛に対して、齋藤らのウイルス分離検査法（簡易法）³⁾により、平成15年から実施してきた。これは県内公共牧場にPI牛が侵入するのを未然に防ぐことを目的としたものである。しかし、この簡易法はPI牛が免疫寛容であり、BVDVに対する抗体を保有していないことを原則とした検査体制であった。今回、抗体を保有したPI牛を疑う病性鑑定事例に遭遇したことから、放牧予定牛のBVDV検査体制を見直したので、その概要を報告する。

材料及び方法

材料は、平成20年～25年9月末までに検査依頼のあった、牛ウイルス病の病性鑑定270件及び放牧予定牛9391頭の牛の血清（血

漿、血球及び流産胎子体液等を含む）を用いた。

検査は、遺伝子検査（RT-PCR [Vilcekら]）、ウイルス分離検査（希釈法及び簡易法）及び抗体検査（Nose[N]株及びKZ91CP[K]株に対する中和抗体価を測定）を実施した。希釈法は96穴マイクロプレートを用い、被検血清を液体培地で3倍階段希釈、等量のMDBK-SY細胞浮遊液を接種した後、37℃にて静置培養した。その後、CPEを指標に判定した。また、簡易法では、1検体につき1穴を用い、被検血清0.01mlとMDBK-SY細胞浮遊液0.19mlを接種し、37℃静置培養した後、CPEを指標に判定した³⁾。

結果

牛ウイルス病の病性鑑定依頼270件で、BVDVの関与を疑い持ち込まれたものは82頭、うち21頭をPI牛として摘発した。これらは、PI牛にしばしば見られる発育不良（3頭）、発育不良及び下痢（3頭）、下痢（1頭）、下痢及び呼吸器症状（1頭）、流産（2頭）などを呈していたが、臨床症状を認めない個体が11頭いた（図1）。さらに、放牧予定牛では、9391頭からPI牛を20頭（図2）摘発し、合計41頭（一部疑い牛を含む）を摘発した。

病性鑑定で摘発したPI牛21頭の血清から、BVDVに対する特異遺伝子が検出され、そのほとんどからBVDVが分離された（表1）。一方、PI牛が通常保有しないとされる本ウイルスに対する中和抗体を4頭（症例1～4）が保有

していた(表2)。

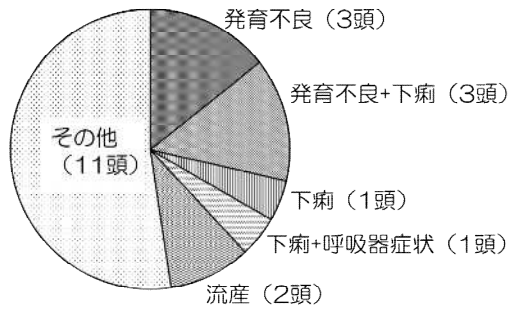


図1 摘発PI牛の臨床症状(病性鑑定)

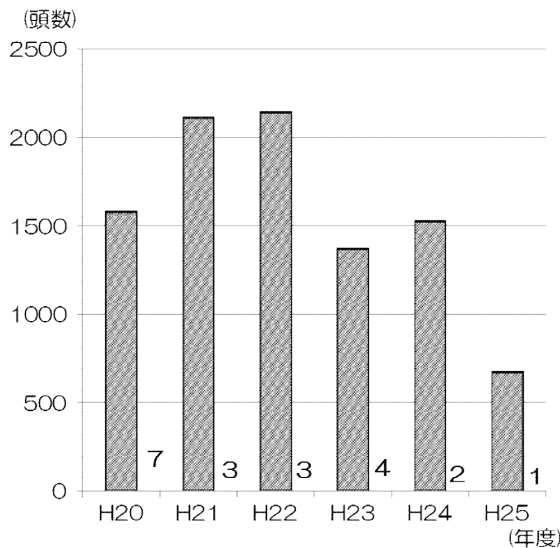


図2 放牧予定牛検査でのPI牛摘発状況

年ごとの摘発頭数は、バーの右下に数字表記

症例1~4のPI牛は、血清を材料とした簡易法ではすべてウイルスが分離されなかったが、症例1及び3は希釈法により、症例2及び4は、単離した白血球を材料とした希釈法でウイルスが分離された。また、N株に対する中和抗体価は、8か月齢の黒毛和種の症例1が8倍、生後1日~4日齢の交雑種又はホルスタイン種の症例2~4が、32~4096倍であった。

表1 病性鑑定での摘発PI牛一覧

年度	農家	PI牛	鼻病 不発	下痢	流産	呼吸器	月齢等	遺伝子		分離		中和 試験	
								RT-PCR	MOBK-SY	N株	K株	N株	K株
H20	A	病1	○	○			11	+	+	<2	NT		
		病2					2	+	+	NT	NT		
		病3	○				5	+	+	<2	<2		
		病4		○		○	5	+	+	NI	NI		
H22	E	病5				6	+	+	<2	<2			
		病6			○		胎齢 180日	+	+	<2	<2		
H23	G	病7	○	○			7	+	+	<2	<2		
		病8					1	+	+	<2	<2		
	H	病9					1	+	+	<2	<2		
		病10					1	+	+	<2	<2		
I	病11	○				6	+	+	<2	<2			
	病12			○		胎齢 210日	+	+	<4	<4			
H24	K	病13	○	○			8	+	+	8	<2		
		病14		○			9	+	+	<2	<2		
L	病15	○				2	+	+	<2	<2			
	病16					2日	+	+	<2	<2			
M	病17					30	+	+	<2	NT			
	病18					1日	+	-	4096	1024			
H25	O	病19				4日	+	+	32	NT			
		病20				3日	+	-	64	NT			
P	病21	病21				34	+	+	<2	NT			

表2 抗体保有PI牛(症例1~4)

症例	PI牛	月齢等	抗体検査		ウイルス分離		
			中和 試験	N株	材料:血清		材料:白血球
					簡易法	希釈法	希釈法
1	病13	8か月	8	<2	-	+	NT
2	病18	1日	4096	1024	-	-	+
3	病19	4日	32	NI	-	+	NI
4	病20	3日	64	NT	-	-	+

放牧予定牛検査で摘発されたPI牛20頭については、すべての血清から、BVDVに対する特異遺伝子が検出され、簡易法によりウイルスが分離された。

考察

PI牛は、分泌物に多量のウイルスを排泄するが、典型的な臨床症状を示すことは少ない。中でも発育不良は高率に認められる症状(39.5%)とされている²⁾が、今回、病性鑑定で発育不良を呈した摘発牛は6頭(28.5%)であり、前述の報告と比較すると低かった。また、図1に示したとおり、発育不良を含むPI牛を疑う症状を伴わないPI牛が多く存在する可能性が高いことから、今後はそれらを考慮した病性鑑定及び摘発検査を意識する必要

があると思われた。

さらに、PI 牛は通常 BVDV に対する中和抗体を持っていないとされるが、今回、抗体を保有した PI 牛 4 頭に遭遇した。症例 2~4 は生後間もない牛であったことから、初乳摂取による移行抗体を検出したものと推察された。しかし、症例 1 の PI 牛は、通常、移行抗体が消失する時期（6 か月齢）を過ぎても抗体を保有していた。この PI 牛の中和抗体について、非特異反応である可能性を否定するため、アセトン処理⁴⁾を行ったが、未処理のものと同様の結果を示した。今後は、さらに症例数を蓄積し、中和抗体が検出された要因について、解明したい。

このように、中和抗体を保有する PI 牛が存在することから、今後、PI 牛を見逃すことのない様に、当所の放牧予定牛 BVDV 検査体制を以下のとおり改善した（図 3）。

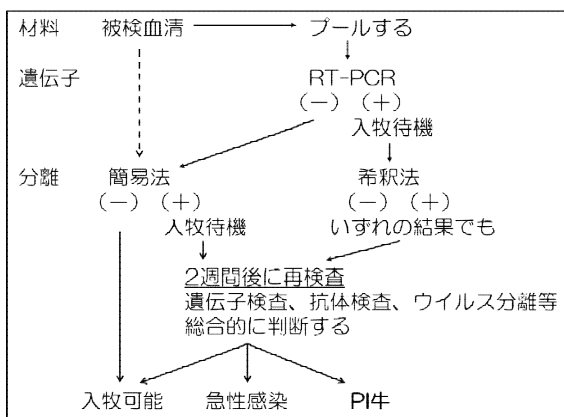


図 3 検査体制（改善後）

まず、被検血清をプール血清として、RT-PCR を実施する。RT-PCR の結果が陰性の場合、簡易法によるウイルス分離を行い、その結果が陰性であれば、入牧可能とする。RT-PCR 陽性の場合、入牧を待機してもらい、希釈法によるウイルス分離を実施する。血清からウ

イルスが分離できない場合は、中和抗体による影響を考慮し、可能であれば EDTA 添加血液から単離した白血球を用いて再度分離を行う。また、PI 牛を疑う結果の場合は、2 週間後に再度採材するなど、状況に応じた検査により、総合的に判定をすることで、より確実な検査体制とした。

これにより、多検体を対象とする放牧予定牛の BVDV 検査は、検査コストと手間が増えてしまうが、PI 牛が公共牧場に侵入してしまうリスクやその損害を考えれば、この体制の変更は有意義であると考えられる。

病性鑑定マニュアル⁵⁾によれば、PI 牛と確定診断するには、一定期間をあけて採材したペア血清で、ともにウイルスが分離され、なおかつ中和抗体価の上昇を認めないことが条件とされている。これまで、当所では BVDV に対する抗体を保有していない PI 牛が大多数であったため、放牧予定牛の BVDV 検査は、簡易法によるウイルス分離のみを実施していた。この方法は、被検血清と細胞を同時接種するだけでよく、作業の省力化に加えコスト軽減も可能であり、多検体処理を必要とする放牧予定牛の PI 牛摘発に有用なものである³⁾。また、2003~2007 年の成果については、岩根らが報告⁶⁾しており、検査の有用性が証明されている。また、簡易法によるウイルス分離以外にも、バルク乳を使った遺伝子検査やスポットテストなど、いくつか BVDV の検査方法が存在することから、牛の導入の際や公共牧場等へ複数の農場から牛が集まるような場合には、事前にいずれかの検査を実施すべきである。

最後に、BVDV の PI 牛摘発検査は、数種類の検査を適切に実施し、その結果から総合的に判断することが重要であると再認識すると

ともに、今後も BVDV 撲滅に寄与したい。

参考文献

- 1) K Kameyama. et al. Studies for domestic distribution of Bovine viral diarrhea virus and rapid diagnosis of Bovine viral diarrhea-mucosal disease in Japan, Bull. Natl. Inst. Anim. Health No.118, 19-22, (2012)
- 2) 田島誉士. (2012) 日獣会誌, 65: 111-117
- 3) 齋藤俊哉ら. (2004) 牛腎由来株化細胞 MDBK-SY 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法, 57(12), 785-788
- 4) M Shimizu. et al. Frequency of Persistent Infection of Cattle with Bovine Viral Diarrhea-Mucosal disease Virus in Epidemic Areas, J. Vet. Sci. 49(6): 1045-1051, 1987
- 5) 全国家畜衛生職員会. 病性鑑定マニュアル第 3 版, 64-66
- 6) 岩根浄子ら. (2007) 栃木県で分離された牛ウイルス性下痢ウイルスの分子系統解析. 第 49 回栃木県家畜保健衛生所業績発表会集録, 53 ~ 58.