

香川県の牛ウイルス性下痢粘膜病浸潤状況調査

東部家畜保健衛生所 坂下奈津美、清水茂長、野崎宏
畜産課 山本英次

はじめに

牛ウイルス性下痢ウイルス（Bovine viral diarrhoea virus : BVDV）感染症の病態には、急性感染、先天性感染、持続感染（Persistence infection : PI）等がある¹⁾。急性感染症は、発熱、下痢などを示し、通常は一過性で回復するが、免疫抑制によって抵抗性が弱まり消化器感染症や呼吸器感染症の複合感染を起こすことで被害が拡大する。先天性感染は、妊娠牛に BVDV が感染した場合に胎内で垂直感染を起こし流産や死産、先天異常が発生する。特に胎齢約 100 日以前に感染し、BVDV に免疫寛容となり生まれた PI 牛は、発育不良などの症状を示し、粘膜病を発症して死亡するリスクが高いだけでなく、生涯に渡り大量にウイルスを排出し続けるため他の牛の強い感染源になり、さらに問題が大きい。

本県では、2006 年から 2010 年の間の病性鑑定において、13 頭の BVDV1 型と 2 型の PI 牛（疑い牛も含む）を摘発した（図 1）。特に 2008 年から 2009 年にかけて摘発された 2 型 8 頭は、1 戸の肉用牛繁殖肥育一貫農場で飼育されていた牛で、1 頭の導入 PI 牛が原因であったことから、農場の感染状況を把握し、適切な対策を講じることの重要性が改めて示された。これらの状況を受け、2012 年から実施している「BVD-MD の清浄化対策事業」²⁾で収集した家畜伝染病予防法第 5 条定期検査の乳用牛の余剰血性及び病性鑑定牛等延 5,621 頭の検体を用いて県下全域の浸潤状況を調査したので報告する。

材料と方法

本調査ではまず、牛群のスクリーニング検査を実施し、陽性個体について PI の判定を実施した。次いで、PI 牛の同居牛とその産子を追跡検査した。

1. スクリーニング検査

検体の採材期間は 2012 年 4 月～14 年 12 月で実施した。検体は家畜伝染病予防法第 5 条検査対象牛（以下 5 条）の血清、検査依頼された導入牛（以下導入）、種畜候補牛（以下種畜）、放牧予定の牛（以下放牧）、呼吸器・病性鑑定実施牛（以下病鑑）の血清、血液、臓器で、延 5621 頭分を用いた（表 1）。品種は、ホルスタイン種、黒毛和種、交雑種、ジャージー種、ブラウンスイス種であった。なお、5 条検査対象の 4 戸は廃業予定などの理由で検査の同意が得られず未実施となった。

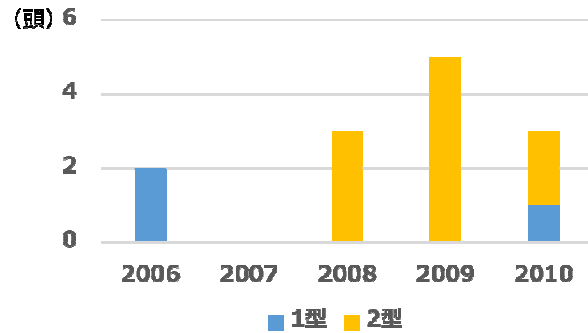


図1. 2006年～2010年の病性鑑定によるPI牛摘発状況（県内）

検査方法は、県内に BVDV ワクチンを接種する農家があることから 2013 年に報告した遺伝子検査の方法を用いた³⁾。遺伝子検査は 1 ステップリアルタイム RT-PCR (SYBR) 法で、血清の場合 25 頭までプール、その他の検体は個別に RNA を抽出して検体とした。具体的には、Vilcek らのプライマーで、アニーリング温度 56°C、40 サイクルの 1 ステップ RT-PCR を実施し、リアルタイムシステムで検出した。増幅を検出した場合、個体特定のため、個別の血清で遺伝子検査を行い、再度増幅を検出したものを遺伝子陽性牛とした。

表1. 遺伝子検査に用いた検体の内訳

検査対象項目	品種	頭数	戸数	材料
5条検査対象牛(5条)	H	4283	102	血清
	J	88		
導入牛(導入)	H	512	14	血清
	JB	15		
種畜候補牛(種畜)	JB	33	6	血清・白血球
入牧予定牛(放牧)	H	140	20	血清
	BS	5		
病性鑑定実施牛(病鑑)	H	197	55	臓器乳汁(肺、CNS) 血清、白血球
	JB	46		
	F1	99		
PI牛同居牛とその産子(同居)	J	1	6	血清
	H	80		
	F1	105		
	JB	17		
計※		5621	203	

H:ホルスタイン種 J:ジャージー種 BS:ブラウンスイス種 JB:黒毛和種 F1:交雑種
※病鑑とその他の項目で重複を含む

表2. 5条検査対象牛及び移動等に伴う検査の成績

項目	陽性数/検体数				
	5条 ^a	導入 ^b	種畜 ^b	放牧 ^b	同居 ^b
戸数	2/102	2/14	0/6	0/20	1/6
頭数	2/4371	6/527	0/33	0/145	2/202

a: 全頭対象 (例外あり) b: 依頼牛のみ対象

表3. 病性鑑定実施牛の検査の成績

項目	陽性数/検体数		
	総数	内訳	
戸数	4/55	酪	1/32
		肉	3/23
頭数	10/343	H	1/198
		F1	8/99
		JB	1/46

酪:酪農 肉:肉用牛関連

2. PI の判定及び追跡調査

スクリーニングで陽性となった個体は病性鑑定マニュアルに則ったウイルス分離と抗体検査を実施し PI 牛を特定した。特定された PI 牛の同居牛とその産子 (以下同居) は清浄化対策として追跡検査を継続した。追跡検査はスクリーニングと同様の方法で実施した。

3. 疫学的調査

遺伝子陽性となった牛について、月齢、産地、飼養農場の経営形態、品種等について調査検討した。

4. 遺伝子解析

遺伝子陽性牛の中から酪農場の PI 牛 5 頭と急性感染牛 1 頭由来の 6 株 (①~⑥)、肉用牛関連農場由来の 2 株 (⑦⑧) を検体とした。

遺伝子解析は、BVDV5'非翻訳領域の遺伝子配列 (NADL 株で 288bp) をサンガー法で決定し、MEGA6 を用いた近隣結合法で、既存 BVDV 各遺伝子型の代表株と系統樹解析を実施した。

成績

1. スクリーニング検査結果

遺伝子検査成績を表に示した(表 2、3)。5 条が 2 戸 2 頭、牛の移動に伴う導入、種畜、放牧の検査では、導入で 2 戸 6 頭が陽性であった。同居では 1 戸 2 頭が陽性であった。病鑑では 4 戸 10 頭が陽性であった。病鑑の遺伝子陽性牛を経営形態別にみると、酪農場 1 戸、繁殖・肥育などの肉用牛関連農場 3 戸、品種別にみるとホルスタイン種と黒毛和種各 1 頭、交雑種は 8 頭で検出された。

表4. 遺伝子陽性牛の詳細情報

牛No.	農場	対象	品種	月齢	PI判定	産地	遺伝子解析
1	A	5条	H	72	PI※	県外	②
2	B	5条	H	18	急性	自家産	NT
3	C	導入	H	27	PI	県外	①
4	C	導入	H	20	急性	県外	NT
5	C	導入	H	19	急性	県外	③
6	D	導入	JB	9	急性	県外	NT
7	C	導入	H	32	PI	県外	④
8	C	導入	H	24	急性	県外	NT
9	E	病鑑	F1	0	NT	自家産	NT
10	F	病鑑	F1	1	急性	県外	NT
11	F	病鑑	F1	3	急性	県外	NT
12	G	病鑑	JB	12	NT	県外	⑤
13	F	病鑑	F1	1	NT	県外	NT
14	H	病鑑	H	4	PI	自家産	NT
15	F	病鑑	F1	2	NT	県外	NT
16	F	病鑑	F1	3	NT	県外	NT
17	F	病鑑	F1	3	NT	県外	NT
18	F	病鑑	F1	3	NT	県外	NT
19	F	同居	F1	2	NT	県外	⑦
20	F	同居	F1	2	NT	県外	NT
21	F	同居	F1	2	NT	県外	NT
22	F	同居	F1	2	NT	県外	NT
23	C	同居	F1	0	PI	自家産	⑥
24	C	同居	F1	0	PI	自家産	⑧

牛No.1~24、農場：A-H、対象：検査対象項目、品種：H, JB, F1、月齢：0~32ヵ月、PI判定：PI(PI牛)・急性(急性感染)・NT(Not tested)、産地：県外産・自家産、遺伝子解析：①~⑧・NT(Not tested)
※PI疑い牛

2. PIの判定及び追跡調査結果

全遺伝子陽性牛 24 頭の検出状況と PI 判定の結果を表に示した (表 4)。5 条は急性感染 1 頭と PI の判定前に淘汰された PI 疑い牛 1 頭、導入は急性感染 4 頭、PI 牛 2 頭、病鑑は遺伝子陽性の 10 頭の内 PI 判定までの検査が可能であったのは 3 頭で、その内 1 頭が PI 牛であった。

この検査で摘発したPI牛の同居牛とその産子について検査したところ1戸2頭が遺伝子陽性であり、2頭ともPI牛であった。

3. 疫学的調査結果

遺伝子陽性牛は月齢別では月齢6ヵ月以下が15頭、7～12ヵ月が2頭、13～24ヵ月が4頭、25ヵ月齢以上が3頭であった(表5)。産地別では県外産19頭、自家産5頭であった。経営形態別では、酪農4農場、肥育2農場、肉用牛繁殖2農場

表5. 遺伝子陽性牛の疫学的背景
(A)月齢、産地別

項目	陽性(PI)頭数
0～6	15(3)
7～12	2
13～24	4
25～	3(3)
県外導入	19(3)
自家産	5(3)

(B)飼養農場、品種別

飼養農場	陽性農場数	品種	陽性(PI)頭数	遺伝子解析
酪農	4	H	8(4)	①～④
		F1	7(2)	⑤⑥
肥育	2	F1	7	⑦
繁殖	2	JB	2	⑧

に陽性牛が認められた。品種別ではホルスタイン種8頭、酪農場の交雑種7頭、肥育農場の交雑種7頭、繁殖農場の黒毛和種2頭であった。

PI牛では、25ヵ月齢以上の成牛3頭が県外導入の乳用牛で、6ヵ月齢未満の3頭が感染牛の同居牛産子であった。

4. 遺伝子解析結果

BVDV 5'非翻訳領域の遺伝子配列を各遺伝子型の代表株と香川株①～⑧を用いて系統樹解析したものを図に示した(図2)。酪農場のA農場とC農場は、桃色②、青色①⑤⑥③④、肉用牛一貫経営農場のG農場は緑色⑧、肉用牛哺育育成農場のF農場は黄色⑦で示した。解析の結果、香川株の遺伝子型は1b型6株、1c型1株、2a型1株と決定された。

また、C農場において、追跡調査で判明したPI牛⑤⑥は母牛の同居牛①と近縁であることがわかり、

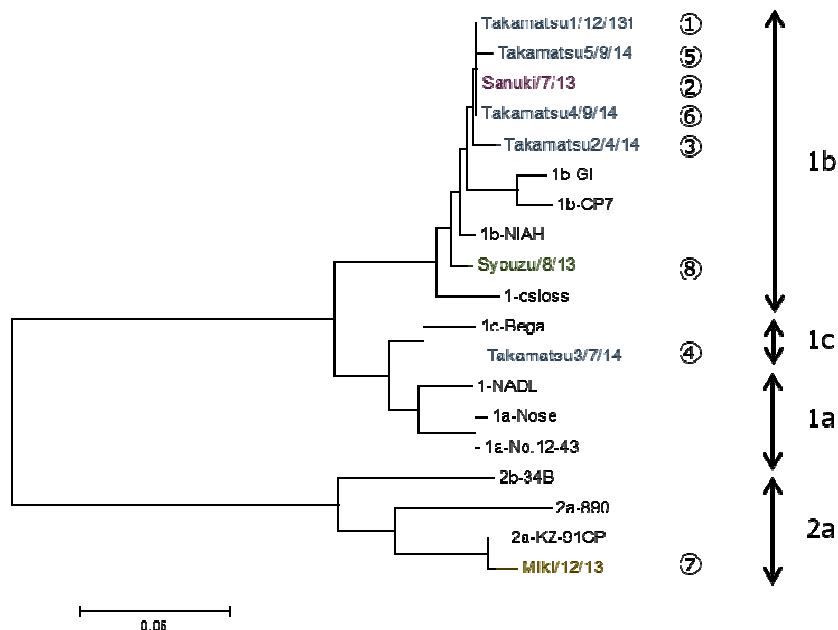


図2. 検出されたBVDVの5'非翻訳領域遺伝子系統樹解析

両母牛が同居感染し、PI 牛を産出したという感染経路が強く疑われた。

5. 6 ヶ月齢以上の県内乳用牛 BVDV 浸潤状況

乳用牛について、BVDV の検出状況を 5 条と 6 か月齢以上の導入の結果から重複の無いように集計し浸潤状況としてまとめると、検査実数では 102 戸 4883 頭中、遺伝子陽性が 3 戸 7 頭、内 PI 牛が 2 戸 3 頭であった (表 6)。この検体数は 2014 年 2 月現在の定期報告数の 95%以上をカバーしており、概ね県内の状況を示していると考えられた。これより遺伝子陽性率を算出すると、戸数が 2.94%、頭数が 0.14%であった。PI 牛検出率は、戸数が 1.96%、頭数が 0.06%であった。

表6. 県内乳用牛 (6 ヶ月齢以上) のBVDV浸潤状況

	検体数	遺伝子陽性 頭数	陽性率 (%)	PI牛頭数	陽性率 (%)
農家戸数	102	3	2.94	2	1.96
頭数	4883	7	0.14	3	0.06

と考慮された。これより遺伝子陽性率を算出すると、戸数が 2.94%、頭数が 0.14%であった。PI 牛検出率は、戸数が 1.96%、頭数が 0.06%であった。

考察

今回の調査より、6 か月齢以上の乳用牛については、BVDV 陽性率が戸数 2.94%、頭数 0.14%と低く、また、6 ヶ月齢未満の県内産乳用牛の放牧予定牛や種畜候補牛からは不検出であったことから県内酪農場は調査時、比較的清潔な状態と考えられた。また、PI 牛の検出率は戸数 1.96%、頭数 0.05%と高くなく、これはアメリカの酪農場の 20 戸 5,500 頭規模の調査で報告⁴⁾されている戸数 15%、頭数 0.13%の検出率より低い値であった。また、遺伝子陽性牛が 1 農場で複数頭出た事例は、全て県外からの初妊牛導入で牛を更新している酪農家 C において導入時の検査で摘発された例のみであるため、県内に多数の PI 牛を生産する酪農場がある可能性は非常に低いことが明らかになった。

病性鑑定実施牛の遺伝子陽性牛は、経営形態別では肉用牛関連農場、品種別では F1 に多く、これは肉用子牛の哺育育成農場 F での検出が影響していた。育成農場では様々な農場から子牛を導入し、免疫状態がそろわない状態で群飼育されるので PI 牛に限らず BVDV が侵入すると牛呼吸器病症候群の要因になり、病性鑑定まで持ち込まれやすいと考えられた。

疫学的調査では、24 ヶ月齢以下の若齢牛、特に 6 か月以下の幼若牛に 15 頭と多く検出された。産地別では県外産が最も多く、次いで自家産、県内導入からは検出されなかった。飼養農場と品種で分類すると、酪農 4 農場、肥育 2 農場、繁殖 2 農場が陽性農場で、品種は交雑種が酪農場と肉用牛関連農場を合わせて 14 頭と多く検出された。特に、肥育に分類した交雑種の哺育育成農場では県外導入が多く、若齢のうちに感染した個体が多く確認された。また、陽性牛の 9 割は酪農場で生産されたことが分かった。

遺伝子陽性牛の内 PI 牛について、25 ヶ月齢以上の成牛で検出された 3 頭は、全て県外導入牛であり、酪農場で飼養されるホルスタイン種であった。6 か月齢未満の PI 牛 3 頭は感染牛の同居牛産子の追跡検査で陽性となった牛であったため、すでに農場に BVDV が持ち込まれた状態での摘発であった。これより、25 ヶ月齢以上、県外導入、ホルスタイン種が県内の農場に PI 牛が侵入する要因の共通項として挙げられた。

検出された BVDV の遺伝子型については、1b 型が 6 株と多く、⑤と⑥を①の関連株とみなすと 4 株が確認された。また、1c、2a 型も 1 株ずつ確認され、近年全国的にも多く報告されている 1b 型が多いことと、それ以外にも多様な株が県内に侵入していることが分かった。

まとめ

今回の調査で、県内の乳用牛の BVDV 浸潤率は高くないことが分かった。牛の更新を全て導入牛で賄う酪農場 C と育成農場 F で多数の遺伝子陽性牛が確認された。同居の検査で PI 牛 2 頭摘発され、まん延を未然に防止できたが、追跡調査の重要性が示された。『25 ヶ月以上、導入、ホルスタイン種』という条件の牛のリスクも示された。これらのことより、飼養形態に合わせて導入牛検査、病性鑑定牛検査と陽性農家の重点的対策を実施することで香川県の BVDV のまん延防止は可能と示唆された。

参考文献

- 1) 田島誉士, 牛ウイルス性下痢ウイルス感染症, 日獣会誌, 65 (2012)
- 2) 大谷徳寿, 5 条検査を活用した乳用牛の持続感染牛摘発による BVD-MD 清浄化対策, 香川県家畜保健衛生業績発表会(2012)
- 3) 坂下奈津美, BVDV の PI 牛摘発に向けたリアルタイム PCR 法 (SYBR 法) の検討, 香川県家畜保健衛生業績発表会(2013)
- 4) Houe H *et al.* Prevalence of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus in 20 dairy herds in two counties in central Michigan and comparison of prevalence of antibody-positive cattle among herds with different infection and vaccination status, J Vet Diagn Invest, 7, 321-326 (1995)