

県外預託牛の産子から分離された牛ウイルス性下痢 ウイルスの疫学調査とその清浄化に向けた取り組み

増田恒幸^{1)†} 黒田萌黄¹⁾ 岩尾 健²⁾ 池本千恵美²⁾ 小谷道子³⁾
増田康充⁴⁾ 亀山健一郎⁵⁾ 迫田義博⁶⁾

- 1) 鳥取県倉吉家畜保健衛生所 (〒682-0017 倉吉市清谷町 2-132)
- 2) 鳥取県西部家畜保健衛生所 (〒689-4213 西伯郡伯耆町金屋谷 1540-17)
- 3) 鳥取県農林水産部 (〒680-8570 鳥取市東町 1-220)
- 4) 鳥取県畜産試験場育種改良研究室 (〒689-2503 東伯郡琴浦町松谷 606)
- 5) 国研農業・食品産業技術機構動物衛生研究部門 (〒305-0856 つくば市観音台 3-1-5)
- 6) 北海道大学大学院獣医学研究科 (〒060-0818 札幌市北区北 18 条西 9 丁目)

(2017年3月10日受付・2017年6月14日受理)

要 約

鳥取県では2012年以降、牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) 感染症清浄化対策を実施しており、多数の持続感染 (PI) 牛を摘発している。2016年1月から10月にかけてBVDV-1のPI牛が3農場で6頭摘発された。疫学調査の結果、6頭の母牛はほぼ同じ期間に県外の同一育成牧場へ預託されていたことが判明した。6頭中5頭から分離されたBVDVのE2遺伝子領域の分子系統樹解析では、5株はすべてBVDV-1cに分類され、株間の相同性は99.6～99.9%であった。このことから、PI牛の母牛は預託期間中にBVDV-1cに感染し、帰還後にPI牛を産出したと推察された。県外預託牛由来PI牛によるBVDVの侵入パターンが示されたため、BVDV感染症清浄化には地域単位の対策だけでなく、国主導による全国的な対策が必要と考えられた。

——キーワード：牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV)、疫学調査、持続感染牛。

-----日獣会誌 70, 575～579 (2017)

牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) 感染症は畜産経営に大きな経済的被害を及ぼす疾病と考えられている。BVDVは豚コレラウイルスやポーター病ウイルスが含まれるフラビウイルス科ペストウイルス属のウイルスで、遺伝子型の違いからBVDV-1とBVDV-2及びBVDV-3の3つの遺伝子型に大きく分類されている [1]。さらにBVDV-1はその塩基配列に基づいて少なくとも20の亜型に分類される [1]。BVDV感染症の病態は腸炎や呼吸器病、繁殖障害及び感染による免疫低下に起因する他の感染症に対する罹患率の上昇など多岐にわたる。牛群内のBVDVの流行で最も問題となるのが持続感染 (PI) 牛の存在である。BVDVワクチンを使用していない預託育成牧場などにPI牛が侵入すると、免疫を持たない妊娠牛にBVDVが感染し、胎子が免疫寛容となり、結果として多くのPI牛が産出される [2]。

PI牛は発育不良や下痢、肺炎などに罹患しやすいなどの特徴があるが、典型的な臨床症状を示さないことも多く、知らず知らずのうちに牛群に潜み、牛群への感染源となっている [3, 4]。このためBVDV感染症のまん延防止にはPI牛の早期摘発淘汰が最も重要である。

鳥取県では2012年に多くの酪農家が利用する県内の公共育成牧場においてBVDV-2のPI牛が摘発されて以降、この育成牧場を利用した農場において多くのBVDV-2のPI牛が摘発された。このため、2013年1月に牧場預託牛の全頭検査を実施し、育成牧場で長期間飼養されていたPI牛1頭を感染源として摘発した。併せて、そのPI牛と同居歴のある預託牛の産子の検査を実施したところ、2015年12月までに22頭がBVDV-2のPI牛として摘発された。2013年3月以降、育成牧場の入牧予定牛に対して入牧前にBVDV-1及び2を含む

† 連絡責任者：増田恒幸 (鳥取県倉吉家畜保健衛生所)

〒682-0017 倉吉市清谷町 2-132 ☎0858-26-3341 FAX 0858-26-8164 E-mail: masudat@pref.tottori.jp

表1 2016年1月から10月にかけて摘発されたPI牛の個体情報

症例	生産農場	摘発農場	生年月日	摘発日	月齢	種別	用途	分離株名	臨床症状
1	H	B	2015/ 8/14	2016/ 1/ 8	4.8	Hol	肉用	M-PI-1	発育不良, 下痢
2	S	S	2015/10/ 1	2016/ 4/19	6.6	Hol	乳用	S-PI-3	著変なし
3	M	B	2015/ 9/ 2	2016/ 6/ 9	9.2	Hol	乳用	M-PI-2	著変なし
4	M	B	2015/ 9/20	2016/ 7/ 1	9.3	F1	肉用	M-PI-3	発育不良, 被毛粗剛, 肺炎
5	M	I	2015/ 7/26	2016/ 8/24	13.0	Hol	乳用	M-PI-4	発育不良
6	S	S	2015/ 7/11	2016/10/27	15.5	Hol	乳用	S-PI-4	発育不良

*Hol: ホルスタイン種 F1: 交雑種 (ホルスタイン種×黒毛和種)

ワクチンの接種と BVDV の遺伝子検査を義務付けており、その清浄性を維持している [5]。なおワクチン接種について、2014 年までは不活化ワクチン 2 回接種、2015 年以降は生ワクチン 1 回接種を実施している。また県内農場での監視対策として 2013 年から酪農家での年 2 回のバルク乳検査、県外導入牛の導入後の検査、県外預託牛の預託前検査を実施している。さらに PI 牛の摘発淘汰を円滑に実施できるよう、PI 牛の淘汰補助事業を整備するなど県独自の清浄化対策に取り組んでいる [5]。対策は現在も継続しているが、PI 牛の摘発は散発しており、いまだ県内の清浄化を達成できていない。このような状況の中、2016 年 1 月から 10 月にかけて BVDV-1 の PI 牛が 3 農場で 6 頭摘発された。疫学調査の結果、6 頭はほぼ同じ期間に同じ場所で母牛が BVDV-1 に感染したため、PI 牛として産出されたと考えられた。今回、この疫学調査結果から得られた知見をもとに、BVDV 感染症清浄化に向けた今後の展望について考察を行ったので、これまでの対策状況と合わせて報告する。

材料及び方法

発生状況: 2016 年 1 月と 4 月に 2 頭の BVDV-1 の PI 牛が県外預託前の検査で摘発された (症例 1, 2)。2 頭の母牛は同時期に県外の X 育成牧場に預託されていた。X 育成牧場では全国から育成牛が預託され、預託された育成牛は人工授精され、受胎が確認された後、分娩の約 2 カ月前まで飼養されていた。過去の検査で母牛が PI 牛であることは否定されていたため、X 育成牧場での感染が疑われた。この結果を受けて、緊急措置として同時期に X 預託牧場に預託されていた牛の産子 (約 150 頭) の検査を実施し、2016 年 5 月から 10 月にかけて 4 頭の BVDV-1 の PI 牛 (症例 3, 4, 5, 6) を摘発した。6 頭の PI 牛の個体情報を表 1 に示す。

BVDV 検査: BVDV 検査は牛の血清を用いて、抗原 ELISA (BVDV Ag エリーザキット, アイデックス ラボラトリーズ(株), 東京) または RT-PCR [6] を実施した。抗原 ELISA または RT-PCR で陽性が確認された牛は、2 週間または 3 週間後に同様の検査を実施し、再度

陽性となったものを PI 牛と診断した。ウイルス分離は MDBK-SY 細胞 [7] を用いて実施した。PI 牛の血清を用いて、MDBK-SY 細胞を 37°C で 4~10 日間静置培養し、細胞変性効果 (CPE) を基準に判定した。分離ウイルスの同定は市販の標識抗体 (BVDV Direct FA Conjugate, VMRD Inc., U.S.A.) を用いた直接蛍光抗体法により行った。遺伝子型の推定は制限酵素 *Pst* I (タカラバイオ(株), 滋賀) を用いた制限酵素切断長多型 (RFLP) 解析 [8] により行った。

PI 牛の母牛の疫学情報: 6 頭の BVDV-1 の PI 牛の発生要因を究明するために、その母牛の個体情報 (生年月日, 生産農場, PI 牛出生時の産歴, 過去の BVDV 検査歴, BVDV ワクチン接種歴, 移動歴) について調査した。個体情報は御家畜改良センター [牛の個体識別情報検索サービス] (<https://www.id.nbc.go.jp/top.html?pc>) 及び畜主からの聞き取りによって得られた。

分離ウイルスのシーケンス及び遺伝子解析: 症例 1~5 の分離ウイルスの全 E2 遺伝子の増幅は既報 [9] のとおりに実施した。増幅させた PCR 産物の塩基配列は BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, U.S.A.) によりシーケンス反応を行い、オートシーケンサー (3500 Genetic Analyzer, Life Technologies, U.S.A.) で塩基配列を決定し、遺伝子情報処理ソフトウェア (GENETYX ネットワーク版 v12.0.1, GENETYX, 東京) を用いて解析した。得られた全 E2 遺伝子 1122bp の塩基配列は ClustalW を用いてアライメントし、GeneBank から得られた参照株とともに MEGA5.2 [10] を用いて近隣接合法による分子系統樹解析を実施し、遺伝子型を決定した。また株間の相同性解析も合わせて実施した。

成 績

6 頭の母牛の疫学調査結果: 表 2 に PI 牛の母牛の個体情報を示す。6 頭の母牛はすべて、ほぼ同時期に県外の X 育成牧場に預託されており、PI 牛を初回分娩で産出していた。預託前に BVDV ワクチンを全頭接種しており、いずれも BVDV-1 及び 2 含有不活化ワクチンであった。症例 1, 2, 3, 5, 6 の母牛はワクチンを 2 回接

表2 摘発されたPI牛の母牛の個体情報

症例	生産農場	生年月日	種別	産歴	BVDV RT-PCR	BVDV ワクチン接種歴	預託歴
1	M	2013/ 7/23	Hol	初産	—	不活化ワクチン2回接種	2014/ 3/22～2015/ 6/16
2	S	2013/ 9/29	Hol	初産	—	不活化ワクチン2回接種	2014/ 6/15～2015/ 7/17
3	M	2013/ 7/21	Hol	初産	—	不活化ワクチン2回接種	2014/ 3/22～2015/ 6/16
4	M	2013/ 6/28	Hol	初産	—	不活化ワクチン1回接種	2014/ 1/23～2015/ 7/17
5	M	2013/ 7/24	Hol	初産	—	不活化ワクチン2回接種	2014/ 1/23～2015/ 6/16
6	S	2013/ 7/ 8	Hol	初産	—	不活化ワクチン2回接種	2014/ 3/22～2015/ 5/16

*Hol: ホルスタイン種

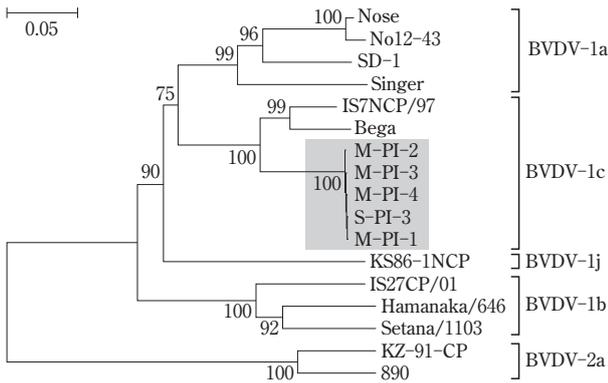


図 鳥取県で分離されたBVDV-1cのE2領域の分子系統樹

県内分離株5株とGeneBankから得られた12株のE2領域1122bpの塩基配列について、MEGA5を用いて近隣接合法により分子系統樹を作製し、塩基置換モデルはKimura 2パラメータモデルを用いた。ブートストラップ解析は1,000回実施し、70以上を示した。県内分離株を■で囲んで示す。

種していたが、症例4の母牛は1回のみ接種であった。

分離ウイルスの遺伝子解析結果: 分離ウイルスのE2遺伝子領域における分子系統樹解析の結果、5株はすべてBVDV-1c亜型に分類された(図)。また株間のE2領域1122bpの相同性解析を実施した結果、塩基配列で99.6～99.9%であり、高い相同性を示していた。

考 察

2016年1月から10月にかけて、鳥取県の4市町6農場で、BVDV-1のPI牛が9頭、BVDV-2のPI牛が2頭摘発されている。疫学調査の結果、摘発された6頭のBVDV-1のPI牛の母牛はすべて預託前にRT-PCRによりBVDV陰性が確認されており、2014年1月から2015年7月に県外のX育成牧場へ預託されていた。また、E2領域遺伝子はエンベロープを構成するE2蛋白をコードし、最も変化に富む部分と考えられており[11]、E2領域の解析はBVDVの疫学調査に有用であるとの報告がされているため[12]、このPI牛由来6株のうち5株の分離ウイルスE2領域の遺伝子解析を実施した。分離ウイルス5株のE2領域塩基配列を解析したところ、

すべてBVDV-1c亜型に分類され、株間で高い相同性を示していた。未検査であった症例6のBVDV-1も、疫学的背景から同一ウイルス由来であると推察された。これらの結果から、2014年3月から12月頃にかけてX育成牧場でBVDV-1cの流行があり、預託されていたPI牛の母牛への感染が強く疑われた。

近年、国内ではBVDV-1b及び2aが中心に分離されており[9]、BVDV-1cはこれまでに鳥取県内で確認されたことがなく、育成牛の県外預託により新たなBVDVが県内へ侵入したと考えられた。このため、全国から多くの牛が集まる育成牧場を利用する際は、預託前にBVDV検査を実施するとともに、BVDVワクチン接種などの予防対策を行う必要性が改めて示唆された。本事例では6頭のPI牛の母牛はすべてBVDV-1及び2含有不活化ワクチンを接種されていたが、胎子がPI牛として産出された。Groomsら[13]は不活化ワクチンを2回接種した場合、BVDVの子宮感染予防率は約60%と報告している。またBVDVの抗原性は遺伝子型によって大きく異なり、ワクチンに含まれる株と遺伝子型が異なる株が感染した場合、その感染を完全に予防できないとされている[14]。さらに遺伝子亜型間でも抗原性に差があるという報告もある[15, 16]。これらの理由から、本事例では母牛は不活化ワクチンを接種していたが、子宮内感染を防ぐことができなかったと推察された。2015年3月以降からは県外預託牛に対し、子宮内感染の防御効果が高いと考えられるBVDV-1及び2含有生ワクチンを預託前に1回接種している。

2013年以降の全県的なBVDV感染症対策により、2017年2月現在、牛群に潜む42頭のPI牛を摘発している。今後は県内のBVDV感染症清浄化へ向けて、これまでの対応を継続しつつ、県外導入牛や預託牛対策を実施していく予定である。県外預託牛や県外導入牛は当該牛がPI牛でなくとも、その胎子がBVDVに感染しているかどうかは診断できず、分娩後に検査するまで産子がPI牛であるか否か判定できない。また、牛の導入や帰還から分娩までにはタイムラグがあるため、これらの産子をすべて検査することは非常に困難である。しかし、本事例のように疫学的に関連があるPI牛が複数摘発さ

れた際には、同一預託元や導入元の牛の産子検査を早急に実施し、PI 牛を早期に摘発することは、牛群のウイルス汚染を防ぐために重要であると考えられた。また近年、全国的に BVDV-2a が多く分離されている状況に鑑みて [17]、県内のセリ上場前の和牛子牛に接種する呼吸器病対策ワクチンについて従来の BVDV-1 含有生ワクチンから BVDV-1 及び 2 含有生ワクチンへ変更した。

このように鳥取県では可能なかぎりの対策を行っており、多くの PI 牛を摘発することで、清浄化へ向けて一定の成果はあげられている。しかし、県外導入牛や県外預託牛の問題から分かるように、清浄化には県単独の取り組みだけでは限界があり、全国的な対策の必要性を強く感じているところであるが、現状として、地域による BVDV 感染症対策は統一化されていない。これは BVDV 感染症の病態が複雑かつ多岐にわたるため、その被害実態があまり認識されていないためと考える。しかし、海外ではスコットランドやアメリカにおいて BVDV 汚染群の年間の被害実態が報告されており [18]、鳥取県においても 2013 年から取り組んでいる PI 牛淘汰補助事業において、現在 37 頭の PI 牛が淘汰され、その淘汰家畜の評価額は合計 12,061,842 円となっている。淘汰 PI 牛の評価額を BVDV 感染症の直接的な損失額とすると、これは鳥取県における約 4 年間の BVDV 感染症の最低被害額と考えられ、畜産経営上無視できない疾病であることが改めて示された。

欧州諸国では国家的な BVDV 感染症清浄化対策が実施され、スイスやドイツなどほぼ清浄化に成功した国をはじめ、多くの国が対策に乗り出している状況である。日本においても BVDV 感染症清浄化に向けて、地域単位だけの対策にとどまらず、国主導による強力な清浄化プログラムが必要と考える。

稿を終えるに当たり、鳥取県での対策当初からご指導、ご助言をいただいた、石川県公立大学法人石川県立大学の長井 誠教授に深謝する。

引用文献

- [1] Peterhans E, Bachofen C, Stalder H, Schweizer M : Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV) : emerging pestiviruses doomed to extinction, *Vet Res*, 41, 44 (2010)
- [2] 田島誉士 : BVD ウイルス感染症の現状と対策, *家畜診療*, 62, 5-10 (2015)
- [3] 田島誉士 : 牛ウイルス性下痢ウイルス感染症, *日獣会誌*, 65, 111-117 (2012)
- [4] Kozasa T, Tajima T, Yasutomi I, Sano K, Ohashi K, Onuma M : Relationship of bovine viral diarrhoea virus persistent infection to incidence of diseases on dairy farms based on bulk tank milk test by RT-PCR, *Vet Microbiol*, 106, 41-47 (2005)
- [5] 増田恒幸, 足羽朋子, 山里比呂志, 亀山健一郎 : 新たに市販された抗原 ELISA を用いた牛ウイルス性下痢ウイルス検査の検証, *日獣会誌*, 69, 187-191 (2016)
- [6] Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ : 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 (1994)
- [7] 齋藤俊哉, 山口 修, 深井克彦 : 牛腎由来株化細胞を用いた牛ウイルス性下痢ウイルスのウイルス分離法および抗体検査法, *日獣会誌*, 56, 717-721 (2003)
- [8] Harpin S, Elahi SM, Cornaglia E, Yolken RH, Elazhary Y : The 5'-untranslated region sequence of a potential new genotype of bovine viral diarrhoea virus, *Arch Virol*, 140, 1285-1290 (1995)
- [9] Abe Y, Tamura T, Torii S, Wakamori S, Nagai M, Mitsuhashi K, Mine J, Fujimoto Y, Nagashima N, Yoshino F, Sugita Y, Nomura T, Okamatsu M, Kida H, Sakoda Y : Genetic and antigenic characterization of bovine viral diarrhoea viruses isolated from cattle in Hokkaido, Japan, *J Vet Med Sci*, 78, 61-70 (2016)
- [10] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S : MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, *Mol Biol Evol*, 28, 2719-2731 (2011)
- [11] van Rijn PA, van Gennip HGP, Leendertse CH, Paton DJ, Moormann RJM, van Oischoot JT : Subdivision of the pestivirus genus based on envelope glycoprotein E2, *Virology*, 237, 337-348 (1997)
- [12] 林みち子, 村上俊明, 高井 光, 山口 徹, 舟木 理, 長井 誠 : 牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛多発事例における 5' 非コード領域および E2 遺伝子の解析, *日獣会誌*, 58, 741-745 (2005)
- [13] Grooms DL, Bolin SR, Coe PH, Borges R, Coutu CE : Fetal protection against continuous exposure to bovine viral diarrhoea virus following administration of a vaccine containing an inactivated BVDV fraction, *Am J Vet Res*, 68, 1417-1422 (2007)
- [14] Ridpath JF : Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: impact of biotype and genotype on U.S. control programs, *Prev Vet Med*, 72, 17-30 (2005)
- [15] Nagai M, Hayashi M, Itou M, Fukutomi T, Akashi H, Kida H, Sakoda Y : Identification of new genetic subtypes of bovine viral diarrhoea virus genotype 1 isolated in Japan, *Virus Genes*, 36, 135-139 (2008)
- [16] Ridpath JF, Fulton RW, Kirkland PD, Neill JD : Prevalence and antigenic differences observed between bovine viral diarrhoea virus subgenotypes isolated from cattle in Australia and feedlots in the southwestern United States, *J Vet Diagn Invest*, 22, 184-191 (2010)
- [17] Matsuno K, Sakoda Y, Kameyama K, Tamai K, Ito A, Kida H : Genetic and pathobiological characterization of bovine viral diarrhoea viruses recently isolated from cattle in Japan, *J Vet Med Sci*, 69, 515-520 (2007)
- [18] Gunn GJ, Stott AW, Humphry RW : Modelling and costing BVD outbreaks in beef herds, *Vet J*, 167, 143-149 (2004)

Epidemiological Survey of Bovine Viral Diarrhea Virus Isolated from the Offspring
of Cows Moved to an Another Prefecture and the Eradication Efforts
in Tottori Prefecture

Tsuneyuki MASUDA^{1)†}, Moegi KURODA¹⁾, Ken IWAO²⁾, Chiemi IKEMOTO²⁾,
Michiko KODANI³⁾, Yasumitsu MASUDA⁴⁾, Ken-ichiro KAMEYAMA⁵⁾
and Yoshihiro SAKODA⁶⁾

- 1) *Tottori Prefecture Kurayoshi Livestock Hygiene Service Center, 2-132 Seidani-cho, Kurayoshi, 682-0017, Japan*
- 2) *Tottori Prefecture Seibu Livestock Hygiene Service Center, 1540-17 Kanayadani, Hoki-cho, Saihaku-gun, 689-4213, Japan*
- 3) *Tottori Prefecture Department of Agriculture, 1-220 Higashi-machi, Tottori, 680-8570, Japan*
- 4) *Rearing Improvement Laboratory, Tottori Prefecture Livestock Research Center, 606 Matsutani, Kotoura-cho, Tohaku-gun, 689-2503, Japan*
- 5) *Viral Diseases and Epidemiology Research Division, National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*
- 6) *Laboratory of Microbiology, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Kita 18, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo, 060-0818, Japan*

SUMMARY

Since 2012, efforts toward the eradication of bovine viral diarrhea virus (BVDV) have been undertaken in Tottori Prefecture because many persistently infected (PI) cows have been detected. In 2016, six PI cows had been detected on three farms in Tottori Prefecture between January and October. An epidemiological survey revealed that the inseminated dams of the six PI cows had been moved to the same ranch outside Tottori Prefecture during approximately the same period. Using phylogenetic analysis of the 1122-base pair E2 gene sequence of BVDV isolated from five of the six PI cows, all five isolates were classified as BVDV-1c, with high nucleotide sequence homology (99.6–99.9%). These results suggest that the dams of the six PI cows were infected with BVDV-1c during the insemination period and then gave birth to PI cows after returning to Tottori Prefecture. As the route of invasion for PI offspring through inseminated cows moved to another prefecture demonstrated, BVDV eradication will require both local and interregional efforts.

— Key words : bovine viral diarrhea virus, epidemiological survey, persistently infected cow.

† Correspondence to : Tsuneyuki MASUDA (*Kurayoshi Livestock Hygiene Service Center*)

2-132 Seidani-cho, Kurayoshi, 682-0017, Japan

TEL 0858-26-3341 FAX 0858-26-8164 E-mail : masudat@pref.tottori.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 70, 575 ~ 579 (2017)