

牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛の摘発と遺伝子解析

加茂前仁弥¹⁾、小倉裕司²⁾、富田啓介¹⁾、廣田清和³⁾、渡邊 理⁴⁾

¹⁾兵庫県姫路家保、²⁾兵庫県洲本家保 ³⁾兵庫県畜産課 ⁴⁾ 兵庫県農総セ北部農技セ

【はじめに】

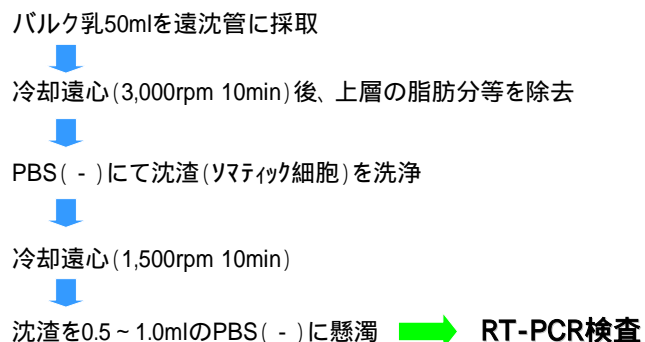
近年、牛群中に牛ウイルス性下痢ウイルス(以下 BVDV)の持続感染牛(以下 PI 牛)が存在することによる BVDV の蔓延が全国的に問題となっている。PI 牛の多くには発育不良や下痢などの症状がみられるが、無症状のまま成長し母牛となることもある。PI 牛は糞尿、唾液、乳汁などに BVDV を排出し続けるため、他の牛への感染源となり、免疫抑制の誘発や胎子感染をおこすなど、生産性に大きく影響すると考えられている。

平成 17 年 12 月、管内の酪農場で 9 か月齢の育成牛を PI 牛の粘膜病発症牛として摘発した。胎齢が約 40 日から 120 日の時期に BVDV に感染すると PI 牛となることが分かっており、調査の結果、摘発した PI 牛の母牛はこの時期に管内の A 育成農場に預託されていたことが判明した。このことから、母牛は同農場で感染したことが推察され、BVDV が蔓延している可能性も考えられたため、平成 18 年度に入牧牛および預託元の全頭検査(572 頭)を実施したところ、合計 6 頭の PI 牛を摘発した。6 頭の PI 牛から分離したウイルスは全て遺伝子型が 1 型で、互いに近縁の株であった。

平成 19 年度も酪農協や診療獣医師と協力してワクチン接種や定期的なモニタリングなどの対策を実施しており、スクリーニング検査として酪農協に所属する農場のバルク乳を用いた検査を実施した。

【検査材料および方法】

(1)バルク乳を用いたスクリーニング検査:A 育成農場に預託していた農場が所属する酪農協の全 89 戸のバルク乳について、図 1 に示す方法を用いて検査を実施した。



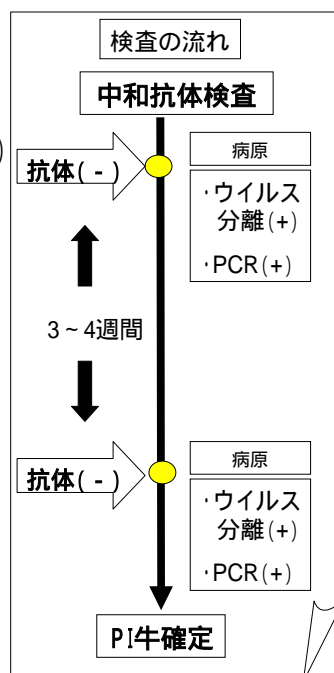
*** 500頭規模の牛群に1頭のPI牛が存在しても、
BVDV遺伝子の検出が可能**

図1 バルク乳を用いたスクリーニング検査(PCR検査)

(2)PI 牛の摘発:スクリーニング検査で陽性となった農場において、飼養牛全頭から血液を採材し、中和抗体検査(1型:Nose株、2型:KZ-91株)、ウイルス分離および Reverse Transcription-PCR(RT-PCR)を実施した。RT-PCRは、Vilcekらによって報告されたペスチウイルスに特異的な5'非翻訳領域(5'-UTR)を標的とするプライマ-324および326を用いて実施した。中和抗体価が2倍未満でRT-PCRが陽性の個体について、3週間以上の間隔を空けて採材、再検査を実施し、再検査においても抗体価の上昇が見られず、ウイルス分離およびRT-PCRが陽性の個体をPI牛と診断した。中和抗体検査にはMDBK-SY細胞、ウイルス分離にはBFM細胞を使用した。RT-PCRが陽性の個体は制限酵素Pstによる制限酵素断片長多型(RFLP)とダイレクトシーケンス法による遺伝子解析を行い、分子系統樹を作成した(図2)。

- **BVDV中和抗体検査**
MDBK-SY細胞
標準株(BVD1型:Nose、BVD2型:KZ-91)
- **ウイルス分離検査**
BFM細胞
- **RT-PCR**
材料からRNA抽出後、BVDVのRT-PCR
<5'非翻訳領域(5'-UTR)>
- **遺伝子解析**
・増幅PCR産物の制限酵素断片長多型
・ダイレクトシーケンス
・分子系統樹解析

図2 PI牛摘発検査



(3)乳清を用いた抗体検査:BVDVの浸潤状況の調査を目的として、11市町89戸のバルク乳からレンネット法を用いて乳清を抽出し、中和抗体検査を実施した。

3 結果

(1)平成18年度のスクリーニング検査は全戸陰性であったが、平成19年7月の検査でB農場1戸が陽性となったため、B農場飼養牛の全頭検査(30頭)を実施し、1頭のPI牛を摘発した。さらに、疫学調査から当該牛は別の酪農協に所属するC農場で出生していたことが判明したため、C農場のバルク乳と飼養牛の全頭検査(36頭)を実施したところ、さらに1頭のPI牛を摘発した。BおよびC農場の全頭検査における中和抗体価は、いずれの農場も2型の抗体価が高値であった(表1)。

表1 各農場の中和抗体価

	B農場		C農場	
	バルク乳 乳清	血清 GM値	バルク乳 乳清	血清 GM値
1型	32	97 (n=30)	<2	2 (n=36)
2型	64	927 (n=30)	32	1,127 (n=36)

(2) 摘発した2頭の病性鑑定を行ったところ、2頭ともに削そうや泌乳量の減少等のBVDに特徴的な臨床症状を示していた(図3)。



図3 摘発したPI牛

病理学的検査では、1頭で大脳白質部に囲管性細胞浸潤がみられたが、2頭ともにBVDに特徴的な腸管の陰窩ヘルニアやリンパ濾胞の壊死は認めなかった。ウイルス学的検査では、それぞれのPI牛からBVDVを分離し、蛍光抗体法(FA法)により血清、白血球、脾臓、肝臓、腎臓においてウイルスを確認した。分離したBVDV2株はBFM細胞に接種後、3代継代してもCPEが確認できなかったため、細胞病原性株(CP株)による干渉法を実施し、いずれも非細胞病原性株(NCP株)であることを確認した。粘膜病は、PI牛の体内でNCP株がCP株へ変異し、重感染することによって発症することが分かっており、病理学的所見と併せて、今回の症例では、粘膜病は発症していないと考えられた。また、1頭は胎齢約120日の胎子を妊娠していたため、胎子への感染の有無を確認するために、ウイルス分離およびPCR検査を実施したところ、脾臓、大脳、腹水、胎盤からウイルスが検出され、胎子にも感染していたことが判明した(図4)。

ウイルス分離

脾臓、大脳、腹水から分離

PCR検査

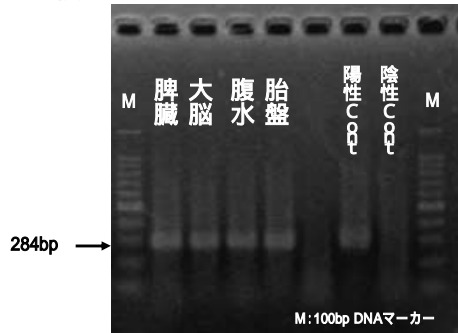


図4 胎子検査結果

遺伝子解析では、増幅 PCR 産物を用いて制限酵素 Pst による制限酵素断片長多形 (RFLP) を実施したところ、B、C 農場で分離された株はともに切断されず、遺伝子型が 2 型であることが推察された(図 5)。

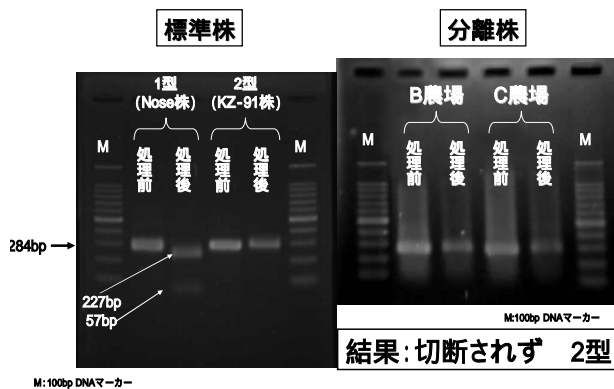


図5 制限酵素Pst による制限酵素断片長多型 (RFLP)

また、ダイレクトシーケンスによる解析結果により、BおよびC農場の株は99.6%の相同性があり、それぞれ BVDV 2型のジーンバンク登録株との相同性が97%以上と高かったことから、分離株はいずれも2型と判定した。

県内では平成16年にも遺伝子型が2型のBVDVを分離しており、その分離株と今回の株を比較解析したところ、98%以上の相同性があり近縁であることが判明したが、疫学的な関連はなかった。また、平成18年度にA育成農場で分離した株と、平成19年度に分離した2株との相同性は約77%と低く、異なる株であることが判明した(表2、図6)。

表2 分離株の相同性

	B農場	C農場	H16年 (2型)	A農場 (1型)	Nose株 (1型標準)	KZ91株 (2型標準)
B農場		99.6%	99.1%	77.8%	77.2%	98.3%
C農場	99.6%		98.7%	77.4%	77.0%	97.9%
H16年 (2型)	99.1%	98.7%		80.2%	79.4%	98.5%
A農場 (1型)	77.8%	77.4%	80.2%		94.7%	80.5%
Nose株 (1型標準)	77.2%	77.0%	79.4%	94.7%		81.0%
KZ-91株 (2型標準)	98.3%	97.9%	98.5%	80.5%	81.0%	

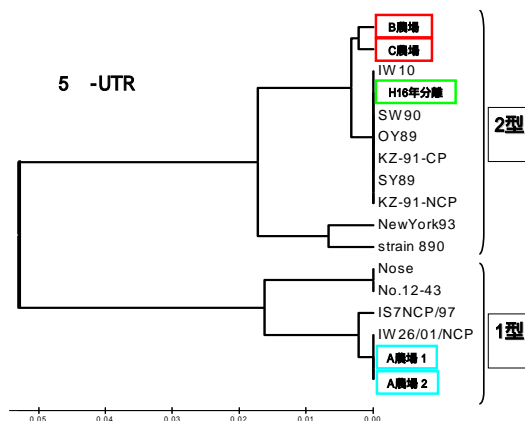
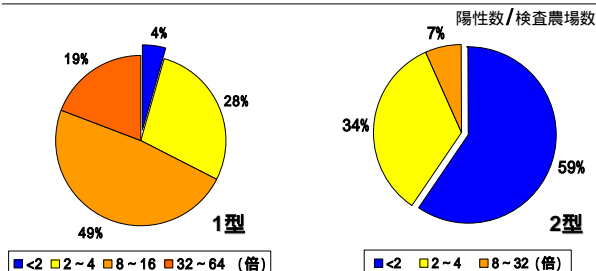


図6 遺伝子解析結果

(3) 乳清を用いた抗体調査の結果、1型は約96%の農場で陽性、2型は9市町の約40%の農場で陽性となっており、管内の農場に2型のウイルスが浸潤していることが推察された(表3)。

表3 調査結果

市町	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1型	12/13	1/1	10/10	17/19	8/8	14/14	9/9	2/3	8/8	3/3	1/1
2型	4/13	1/1	4/10	4/19	1/8	7/14	6/9	1/3	6/8	0/3	0/1



4 まとめおよび考察

バルク乳を用いた BVDV のスクリーニング検査を実施することにより、平成 19 年度に 2 頭の PI 牛を摘発した。この検査は PI 牛の摘発に有用な方法であり、今後も継続する必要があると思われる。ウイルス学的検査の結果、PI 牛 2 頭から BVDV2 株を分離したが、いずれも遺伝子型は平成 18 年度に分離した 1 型の株とは異なる 2 型の株であり、由来の異なる BVDV であると推察された。また、平成 16 年に県内で分離した 2 型の株とは近縁の株であることが判明したが、疫学的な関連はなかった。このことから県内には 1 型と同様、2 型の BVDV も浸潤していることが推察される。しかし、今回のスクリーニング検査を実施した地域は管内の一部の地域であることから、さらに対象地域を拡大し、PI 牛の摘発を進めたい。