

13 5年間にわたる鳥取県での牛ウイルス性下痢ウイルス清浄化に向けた取り組み

倉吉家畜保健衛生所 ○増田恒幸 大下雄三 黒田萌黄 山里比呂志
西部家畜保健衛生所 岩尾 健 池本千恵美 田島理子

1 はじめに

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ボーダー病ウイルスが含まれるフラビウイルス科ペスチ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およびBVDV-3の3つ遺伝子型に大きく分類されている[1, 2]。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[2]。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よる他の感染症に対する罹患率の上昇など多岐にわたる[1]。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[3]。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[4, 5]。このためBVDV感染症の蔓延防止にはPI牛の早期摘発淘汰が最も重要である。

鳥取県では2012年以降、県内の乳用牛育成牧場を中心にBVDV清浄化対策を実施し、多数のPI牛を摘発している。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、未だ県内の清浄化を達成できていない。そのような状況の中、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。

2 鳥取県におけるこれまでのBVDV感染症対策

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、この育成牧場利用農場において多くのBVDV-2のPI牛が摘発された。この育成牧場においてBVDVの流行が認められたため、牧場預託牛の全頭検査を実施し、感染源となった育成牧場で長期間飼養されていたPI牛1頭を摘発し、そのPI牛と同居歴のある母牛の産子の検査を実施した。その結果、PI牛と同居していたことが確認された預託牛の産子22頭がPI牛として摘発された。現在は育成牧場の入牧予定牛に対して入牧前にBVDV-1および2を含む生ワクチンの接種と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[6]。また県内農場での監視対策として酪農家での年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2015年からは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[6, 7]。

3 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Y育成牧場に預託されていた。Y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し、受胎が確認された後、分娩の約2か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、Y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Y育成牧場に預託されていた預託牛の産子（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。

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	遺伝子型	E2遺伝子領域に基づく遺伝子型
1	H	B	2015/8/14	2016/1/8	4.8	Ho1	肉用	M-PI-1	BVDV-1	1c
2	S	S	2015/10/1	2016/4/19	6.6	Ho1	乳用	S-PI-3	BVDV-1	1c
3	M	B	2015/9/2	2016/6/9	9.2	Ho1	乳用	M-PI-2	BVDV-1	1c
4	M	B	2015/9/20	2016/7/1	9.3	F1	肉用	M-PI-3	BVDV-1	1c
5	M	I	2015/7/26	2016/8/24	13.0	Ho1	乳用	M-PI-4	BVDV-1	1c
6	S	S	2015/7/11	2016/10/27	15.5	Ho1	乳用	S-PI-4	BVDV-1	NT

* Ho1: ホルスタイン種 F1: 交雑種 (ホルスタイン種×黒毛和種) NT: 未実施

4 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[8]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[9]を用いて実施した。PI牛の血清を用いて、MDBK-SY細胞を37℃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[10]により行った。

5 PI牛の母牛の疫学情報

6頭のBVDV-1のPI牛の発生要因の究明するために、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(独)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.nlbc.go.jp/top.html?pc>) 及び畜主からの聞き取りによって得られた。

6 分離ウイルスのシーケンス及び遺伝子解析

症例1から5の分離ウイルスのE2領域のシーケンス解析は北海道大学に依頼した。得られた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MEGA5.22[11]を用いて近隣接合法による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。

7 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頭の母牛は全て、ほぼ同時期に県外のY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回接種していたが、症例4の母牛は1回のみ接種であった。

表2 摘発されたPI牛の母牛の個体情報

症例	生年月日	生産農場	種別	産歴	BVDV RT-PCR	BVDVワクチン接種歴	移動歴
1	2013/7/23	M	Hol	初産	—	Y育成牧場預託前にBVDV-1及び2含有不活化ワクチン2回接種	2014. 3. 22-2015. 6. 16 Y育成牧場預託
2	2013/9/29	S	Hol	初産	—	Y育成牧場預託前にBVDV-1及び2含有不活化ワクチン2回接種	2014. 6. 15-2015. 7. 17 Y育成牧場預託
3	2013/7/21	M	Hol	初産	—	Y育成牧場預託前にBVDV-1及び2含有不活化ワクチン2回接種	2014. 3. 22-2015. 6. 16 Y育成牧場預託
4	2013/6/28	M	Hol	初産	—	Y育成牧場預託前にBVDV-1及び2含有不活化ワクチン1回接種	2014. 1. 23-2015. 7. 17 Y育成牧場預託
5	2013/7/24	M	Hol	初産	—	Y育成牧場預託前にBVDV-1及び2含有不活化ワクチン2回接種	2014. 1. 23-2015. 6. 16 Y育成牧場預託
6	2013/7/8	S	Hol	初産	—	Y育成牧場預託前にBVDV-1及び2含有不活化ワクチン2回接種	2014. 3. 22-2015. 5. 16 Y育成牧場預託

8 分離ウイルスの遺伝子検査結果

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株は全てBVDV-1c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%から99.9%であり高い相同性を示していた。

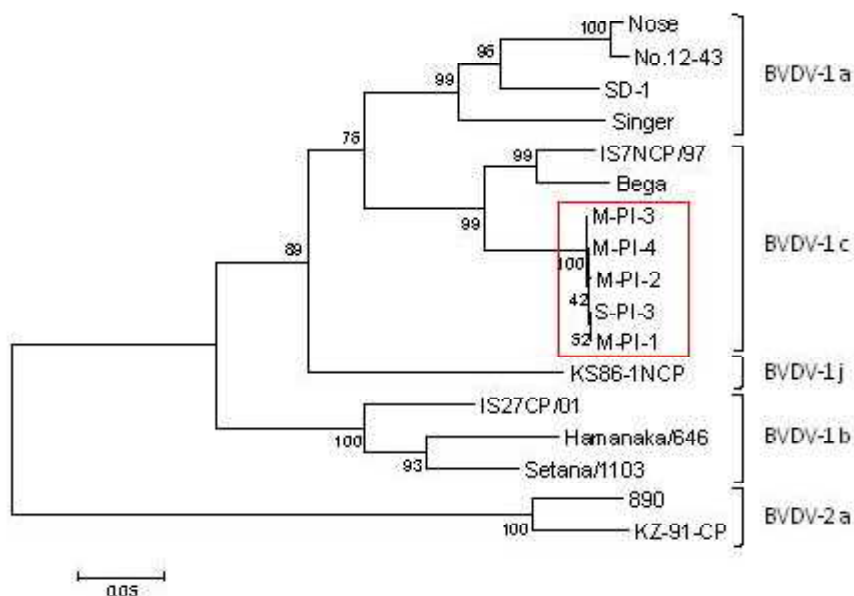


図 属取票で分離されたBVDV-1cのE2領域の分子系統樹
県内分離株5株とGenBankから得られた12株のE2領域1122bpの塩基配列について、MEGA5を用いて近隣接合法により分子系統樹を作製した。ブートストラップ解析は1000回実施した。県内分離株を四角枠で囲んで示す。

9 まとめ

2016年1月から6月にかけて、鳥取県で摘発されたPI牛はほぼ全てBVDV-1のPI牛であった。疫学調査の結果、摘発されたBVDV-1のPI牛の母牛は全て預託前に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Y育成牧場へ預託されていた。また今回摘発されたPI牛由来5株の分離ウイルスの遺伝子解析の結果、5株は全てBVDV-1c亜型に分類され、株間で高い相同性を示していた。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いる[12]。またE2領域の解析はBVDVの疫学調査に有用であるとの報告がなされている[13]。このため、今回分離されたBVDV-1cは同一ウイルスであり、未検査であった症例6のBVDV-1も、疫学的背景から同じウイルスと推察された。これらの結果から、2014年3月から12月頃にかけてY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[14]、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牛の母牛は全てBVDV-1及び2含有不活化ワクチンを接種していたが、胎児がPI牛として産出された。Groomsら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[15]。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[16]。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[17, 18]。今回母牛に接種されていたワクチンは不活化ワクチンであり、その株はBVDV-1aであるため、BVDV-1cの子宮内感染を完全に予防することができなかったと考えられた。

2013年以降の全県的なBVD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。約5年間の対策を通じて、BVDコントロールには、BVDについての正しい知識、関係機関の相互協力、徹底したPI牛摘発のためのルールの構築がなければ困難であると実感している。今後の県内BVD清浄化へ向けて、今までの対応を継続しつつ、県外導入牛や預託牛対策を厚く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、その胎児が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。しかし、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、これらの産子を全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を鑑みて[19]、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限りの対策行っており、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上げられている。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、清浄化には県単の取り組みだけでは限界があり、全国的なBVD対策の必要性を強く感じているところである。しかし、地域によるBVD対策は統一化されていないの

が現状である。日本におけるBVDV感染症の経済的損失の試算は為されていないが、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いる[20, 21]。鳥取県で2013年から始まったPI牛の淘汰補助事業は、国の家畜生産農場清浄化対策事業と名前を変え現在も継続している。現在までの約4年間で合計38頭のPI牛が淘汰され、その淘汰家畜の評価額は12,184,355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BVD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BVD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もあり、多くの国が対策に乗り出している状況である。日本でもBVD清浄化に向けて、地域単位だけの対策に止まらず、国主導による強力な清浄化プログラムが必要と考える。

10 謝辞

項を終えるにあたり、分離ウイルスのシーケンス解析を実施していただき、多くのご助言を賜りました国立大学法人北海道大学の迫田義博先生、鳥取県での対策当初からご指導、ご助言を賜りました、石川県公立大学法人石川県立大学の長井誠先生、国立研究開発法人農研機構動物衛生研究部門の亀山健一郎先生に深謝いたします。

11 引用文献

- [1] World organization for animal health : Bovine viral diarrhoea, Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2015, Chapter 2.4.7, http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.07_BVD.pdf (2015)
- [2] Peterhans E, Bachofen C, Stalder H, Schweizer M : Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV) : emerging pestiviruses doomed to extinction, *Vet Res*, 41, 44 (2010)
- [3] 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)
- [4] 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)
- [5] 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)
- [6] 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)
- [7] 増田恒幸: 鳥取県における牛ウイルス性下痢ウイルス清浄化への取り組み, *肉牛ジャーナル*, 27(9), 30-33 (2014)
- [8] Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ : Pesti

- vir uses 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)
- [9] 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)
- [10] 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)
- [11] Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S : MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 28, 2719-2731 (2011)
- [12] 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)
- [13] 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)
- [14] 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(1), 61-70 (2016)
- [15] 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, 39(12), 266 (2007)
- [16] 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)
- [17] Nagai M, Hayashi M, Ito 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)
- [18] 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)
- [19] Matsuno K, Sakoda Y, Kameyama K-I, Tamai K, Ito A, Kida H: Genetic and pathological characterization of bovine viral diarrhoea viruses recently isolated from cattle in Japan. J Vet Med Sci, 69(5), 515-520 (2007)
- [20] Gunn GJ, Stott AW, Humphry RW: Modelling and costing BVD outbreaks in beef

herds. Vet J, 167(2), 143-149 (2004)

- [21] Bartlett B, Grooms D: BVD-PI Eradication: Unintended Consequences. Michigan Dairy Review. July, 2008, <https://www.msu.edu/user/mdr/vol13no3/bartlett.html> (2008)