

# バルク乳検査で摘発した牛ウイルス性下痢

## 持続感染牛発生農場対策

○ 平野皓己・今村友子・林健  
(長野県伊那家畜保健衛生所)

### はじめに

牛ウイルス性下痢 (bovine viral diarrhea, BVD) は、牛ウイルス性下痢ウイルス (bovine viral diarrhea virus, BVDV) によって引き起こされる感染症である。一過性感染では熱発、白血球減少、活力および食欲低下、軽度の下痢や呼吸器症状を呈するが、通常は抗体を保有して概ね回復する。しかし、問題となるのは、免疫寛容状態にある持続感染 (persistent infection, PI) 牛である。BVD 抗体未保有の妊娠牛が BVDV に感染し、胎齢約 18～150 日の胎子が子宮内感染すると、胎子は生涯にわたって BVDV を体内に保有し続けるとともに体外に排出し続ける PI 牛となって産出されることがある。PI 牛の存在により農場内で急速に BVDV 感染が拡大し、多大な経済的損失を与える [1, 2, 3]。

本例は導入牛により BVDV 感染が拡大した事例であり、その対策及び PI 牛の検査方法について検討したので、その概要を報告する。

### 経過

2020 年 6 月に県の酪農生産性向上対策事業の一環として、管内酪農家 66 戸における PI 牛の摘発を目的としたバルク乳スクリーニング検査を実施し、1 戸陽性となった。全頭抗原 ELISA 検査を実施し、PI 牛 (以下、初発 PI 牛) 1 頭を摘発、7 月に淘汰した。初発 PI 牛は 2019 年 12 月に北海道導入された個体であり、淘汰

されるまで約 7 ヶ月間、当該農場に存在していた。また、導入時には乾乳期群、分娩後は泌乳前期群に属していた。

初発 PI 牛を淘汰し、当該農場における BVDV 浸潤状況調査を実施し、2021 年 3 月現在も初発 PI 牛と同居した妊娠牛産子 (新生子牛) の抗原 ELISA 検査を継続している。

### 農場概要

当該農場は搾乳牛 130 頭を飼養し、牛舎形態はフリーバーンである。年に数回、北海道から導入を行っている。子牛に関して、ホルスタイン雌は自家育成、乳牛を借り腹とした ET 産子、ホルスタイン雄や F1 は出荷している。

### 初発 PI 牛の摘発

#### 材料及び方法

血清 114 検体を用いて抗原 ELISA 検査 (Idexx BVDV Ag エリーザキットを使用) を実施した。陽性牛については 3 週間以上の間隔をあけ再検査を実施し、Nose 株 (BVDV 1 型)、KZ-91CP 株 (BVDV 2 型) に対する中和抗体価を MDBK-SY 細胞を用いた同時接種法により測定した。

#### 結果

飼養牛 114 検体中 1 検体で抗原 ELISA 陽性が確認され、再検査も陽性であり、抗体価の上昇は認められず、初発 PI 牛と確定した。

## 新生子牛の検査

### 材料及び方法

新生子牛耳片組織53検体を用いて抗原ELISA検査を実施した。陽性の場合には3週間以上の間隔をあけ、血清を用いて再度検査を実施した。検体No. 04, 13 では中和抗体価の測定を行った。

### 結果

53 検体中、抗原 ELISA 検査 1 回目陽性は 6 頭確認された。2 回目も陽性であった個体は 4 頭確認され PI 牛（以下、PI 子牛）と確定した。

1 回目陽性、2 回目で陰性となったのは 2/53 検体（約 3.7%）であった。また、BVDV1 型、2 型の中和抗体価の上昇は認めなかった（表 1）。

表 1 新生子牛の検査結果  
(検査 1 回目陽性個体のみ)

No	抗原ELISA 1回目	抗原ELISA 2回目	BVDV1		BVDV2	
			pre	post	pre	post
04	+	+	64	8	8	<2
13	+	-	8	4	8	<2
17	+	+	NT	NT	NT	NT
23	+	+	NT	NT	NT	NT
34	+	-	NT	NT	NT	NT
35	+	+	NT	NT	NT	NT

(NT:実施せず)

### 採材方法の比較検討

#### 材料及び方法

本例では耳片組織の採材には耳片採取器（Zee tag : Z tag 社製）を使用した（写真 1）。



写真 1

使用にあたっては、チューブカバーをピンにかぶせ、アダプター部分にチューブをセットし（写真 2）、牛の耳を挟んで耳介内面より背面に向かって採取した（写真 3, 4）。

検体の入ったチューブに抗原 ELISA 検査キット付属の浸漬液 150~250  $\mu$ L をチューブ底面（写真 5, 6）から加え軽く攪拌し、耳片を完全に浸漬させた。室温（18~26 $^{\circ}$ C）で 12~24 時間静置し、検査には浸漬液 50 $\mu$ L を供した。



写真 2



写真 3



写真 4

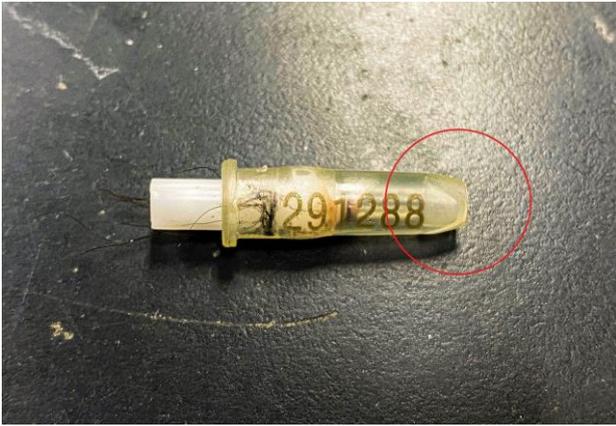


写真5



写真6

### 結果

耳片採取に関しては採血と比較して優位性が認められた（表2）。

表2 耳片採取と採血の比較

項目	耳片	血液
・農家が簡便かつ単独で扱えるか	◎	×
・専門知識は必要ないか	◎	×
・初乳の影響は受けないか	◎	×
・検体保存（※農場での）	◎	×
・家畜保健衛生所の人的負担	◎	△
・農家の人的負担	○	○
・検査での取り扱い	○	○
・牛への負担（侵襲性）	○	◎

## 浸潤状況調査

### 材料及び方法

泌乳前期群6頭、泌乳後期群6頭、乾乳期群4頭、導入牛5頭、計21頭の血清（24検体）を用いて中和抗体価を測定した。

また、初発PI牛淘汰後の導入牛のうち3頭

では導入時と導入後3ヶ月後に抗体検査を実施した。

### 結果

泌乳前期群ではBVDV1型及びBVDV2型の抗体保有が認められた。泌乳後期群及び乾乳期群においても抗体保有が認められたが、泌乳前期群に比べ抗体価のばらつきが認められた。導入牛においては抗体保有状況に一定の傾向は認められず、導入から3ヶ月後にも抗体価の上昇は認められなかった（表3）。

表3 中和抗体価

No	グループ	BVDV1		BVDV2		抗原ELISA
		pre	post	pre	post	
1	泌乳前期	128	NT	32	NT	-
2	泌乳前期	256	NT	128	NT	-
3	泌乳前期	128	NT	256	NT	-
4	泌乳前期	1024	NT	256	NT	-
5	泌乳前期	512	NT	32	NT	-
6	泌乳前期	>2048	NT	>2048	NT	-
7	泌乳後期	2	NT	16	NT	-
8	泌乳後期	64	NT	128	NT	-
9	泌乳後期	512	NT	128	NT	-
10	泌乳後期	512	NT	1024	NT	-
11	泌乳後期	256	NT	16	NT	-
12	泌乳後期	>2048	NT	128	NT	-
13	乾乳期	128	NT	128	NT	-
14	乾乳期	4	NT	4	NT	-
15	乾乳期	64	NT	1024	NT	-
16	乾乳期	1024	NT	512	NT	-
17	導入牛	>2048	NT	16	NT	-
18	導入牛	<2	NT	<2	NT	-
19	導入牛	128	256	128	128	-
20	導入牛	<2	<2	<2	<2	-
21	導入牛	32	32	<2	<2	-

(NT:実施せず)

## 遺伝子解析

### 材料及び方法

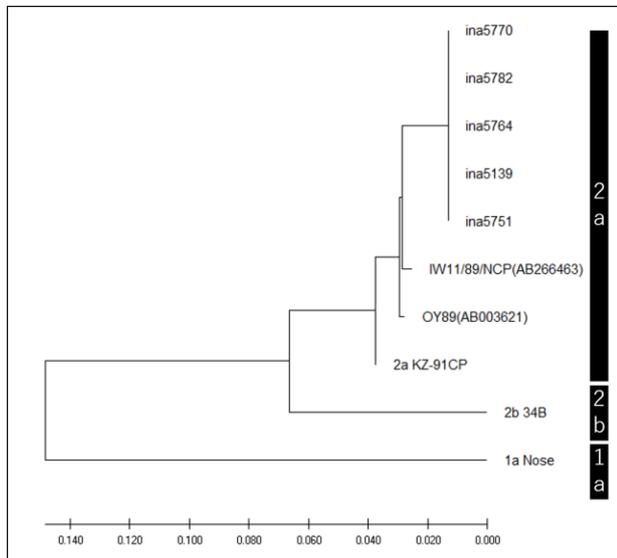
初発PI牛、PI子牛4頭の血清から抽出したRNAをVilcekらのプライマーを用いてpesti遺伝子における5'非翻訳領域を標的としたRT-PCRを実施し、得られたPCR産物を用いてシーケンス解析及び分子系統樹解析を行った

[4, 5]。

## 結果

初発 PI 牛及び PI 子牛 4 頭のいずれの遺伝型も 2a 型であり、同じグループに属していた (図 1)。

図 1 遺伝型系統樹



※初発 PI 牛(ina5139)

PI 子牛(ina5770, ina5782, ina5764, ina5751)

## 考 察

遺伝子解析結果から PI 子牛は全て BVDV 2a 型であり、初発 PI 牛由来であることが推測された。

初発 PI 牛淘汰後の浸潤状況調査では BVDV 1 型及び BVDV 2 型中和抗体の保有が認められたが、泌乳期群間での差異はなかった。初発 PI 牛と接触のない泌乳後期群においても BVDV 2 型の抗体価保有を認めたことから、フリーバーンやパーラー搾乳時のウイルス伝播の可能性や本例以前に感染があった可能性も示唆された。また、本例の導入牛による BVD 汚染は BVDV 2 型であったが、BVDV 1 型の抗体保有も認められ、過去に BVDV1 型による汚染の可能性も示唆された。

当該農場では導入牛検査やワクチネーションプログラムを実施しておらず、BVDV が侵入可能な環境であり、導入牛の中には BVDV 抗体を保有していない個体も認められ、PI 牛娩出のリ

スクが依然として懸念された。今後は導入牛検査やワクチネーションプログラムの検討、定期的なバルク乳検査の継続が必要と思われる。

また、本例を通して BVD 検査における検体採取方法について、耳片採取は採血と比較して取り扱いの容易さが実感できた。専門知識を必要とせず、獣医師でなくても実施できること、耳片採取器等が実用的な価格で販売されている点や侵襲性の低さから農家の理解が得やすい方法と思われる。また、疫学関連農場で PI 牛が確認されるなど同時多発的に複数農場で検査を行うことを想定した場合にも各農家が検体を採取し、家畜保健衛生所に持ち込むことで複数農家の同時対応が可能であると思われる。

新生子牛検査にて抗原 ELISA 検査 1 回目陽性、2 回目陰性の個体で抗体価の上昇を認めない個体が存在したことから 1 回目の陽性は非特異反応が疑われた。血清を用いた抗原 ELISA 検査の特異性は高いとの報告 [6] があるが、耳片を用いた非特異反応のデータは少なく、今後は耳片検査における非特異反応発生率の検討も必要と思われる。

## 引用文献

- [1] 獣医内科学 (文栄堂出版 p, 292)
- [2] 牛ウイルス性下痢・粘膜病に関する防疫対策ガイドライン, 農林水産省消費・安全局動物衛生課長通知, 平成 28 年 4 月 28 日 28 消案第 734 号
- [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 巻 (2012) 2 号 p, 111-117)
- [4] 福成和博ら: 岩手県内の農場で死亡した牛における牛ウイルス性下痢ウイルスの感染状況調査 (2013)
- [5] Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, et al: Pestiviruses isolated from pigs, cattle sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. Arch Virol, 136, 309-323 (1994)

- [6] 増田恒幸ら：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)）