

県内の牛ウイルス性下痢持続感染牛摘発事例と毛根の活用

中央家畜保健衛生所

吉崎響

大川原志織

佐藤圭介

篠川有理

濱崎尚樹

小林淳彦

はじめに

牛ウイルス性下痢 (BVD) はフラビウイルス科ペスチウイルス属に分類される牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) が病原体となる牛の疾病であり、家畜伝染病予防法において届出伝染病に規定されている。急性感染 (TI) と持続感染 (PI) の感染様式をとり、TI 牛は発熱・下痢、呼吸器症状を呈したのち免疫を獲得し多くは回復するが、妊娠母牛に感染した場合は流産や異常産の原因となるため経済的な損失が大きく問題となる。特に、胎子の胎齢 100 日齢以下で母牛に感染した場合、胎子は免疫寛容により PI 牛として生まれてくる可能性がある。PI 牛は全身にウイルスが分布しており、生涯にわたり大量のウイルスを排出する。PI 牛は発育不良であることも多いが、無症状のため感染に気付かれず農場内での汚染源、農場間での伝播源となる [1]。BVDV のまん延防止には、速やかな PI 牛の摘発・淘汰が重要である。「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」では、PI 牛摘発の検査について、抗原検査で陽性となった牛について少なくとも 3 週間の間隔をあけて再度抗原検査を実施し判定するよう記載されている [2]。PI 牛と判定するまでに 3 週間を要することから、その間の同居牛への感染リスク、飼育コストが問題となる。

BVDV 抗原検査は RT-PCR、ウイルス分離又は抗原検出 ELISA が主に用いられ、検査材料にはバルク乳や血清、耳片が利用される [2, 3]。近年は毛包の BVDV 抗原を検出する免疫ペルオキシダーゼ (IPO) 法や、毛根を抗原検出 ELISA に用いた検査方法も報告されている [4, 5]。また、毛根を 30 本以上用いたリアルタイム PCR により BVDV 特異遺伝子の検出が可能であるとの報告もある [6]。PI 牛の皮膚の毛包上皮細胞には、BVDV が局在しており、皮膚の免疫組織化学 (IHC) 染色は PI 牛と TI 牛の判別に有用であるとされている [7]。牛の皮膚から採取した毛の毛根には毛包上皮細胞が付着しており、これを抗原検査に用いた場合 PI 牛は陽性、TI 牛は陰性となることも報告されている [4, 8]。PI 牛、TI 牛の判別に毛根を活用すれば、PI 牛判定に要する 3 週間という期間が短縮されることが期待される。そこで BVDV 検査における毛根の活用につなげるべく、本県の PI 牛摘発事例において検査対応にあたりるとともに、毛

根を PCR 検査に用いる際の処理条件について検証した。

発生概要

令和 7 年度本県において 3 農場で 4 頭の PI 牛 (①~④) が摘発された。乳用牛 40 頭規模の A 農場において、5 月の上牧前検査時に 1 頭が BVDV 抗原陽性となり、これを受けて同居牛検査を実施したところ、もう 1 頭陽性となった。この 2 頭は 3 週間後の抗原検査においても陽性となり、PI 牛 (①②) と判定された。続いて、A 農場から肉用牛 400 頭規模の B 農場へ移動していた子牛 1 頭が 6 月に PI 牛③として摘発された。これを受け B 農場では繁殖牛のスポット検査を実施した。また、A 農場と同一管内にある肉用牛 5 頭規模の C 農場において 7 月に 1 頭の PI 牛④が摘発され、同居牛検査を実施した。

検査材料・方法

(1) 抗原検査: 血清を用いたリアルタイム PCR (以下、qPCR) により BVDV 特異遺伝子の検出を行った。qPCR は B Hoffmann らの方法により実施した [9]。陽性となった牛は 3 週間後に再度検査を実施し、PI 牛の判定を行った。PI 牛の血清はコンベンショナル PCR (以下、cPCR) と制限酵素処理 (以下、RFLP) を実施し BVDV の遺伝子型を識別した。

(2) 毛根を用いた抗原検査: PI 牛 3 頭の毛根と陰性対照として BVDV 陰性牛 3 頭の毛根を用い、以下に示す 2 通りの核酸抽出方法を検討し、qPCR、cPCR、RFLP に供した。

抽出法①: 毛根 5、10、20 本をそれぞれ 1.5 ml チューブへ入れ抽出キット (High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche 社)) 付属の Binding Buffer 200 μ l、PolyA 4 μ l、Proteinase K 50 μ l に浸漬し、72°C10 分間インキュベート後、キットの手順書に従い核酸抽出を実施した (図 1)。

抽出法②: 毛一掴み (約 50 本) を 50 ml 遠沈管に入れ、滅菌 PBS 2 ml に浸漬し、4°C一晩静置後、浸漬液 400 μ l から自動抽出機 (magLEAD 12gC (PSS 社)) による抽出を実施した (図 2)。



図1 毛根からの核酸抽出法①

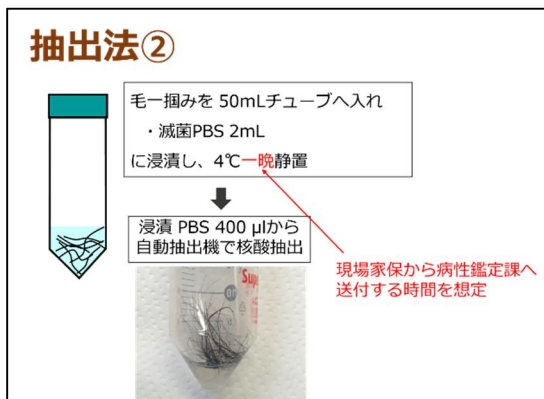


図2 毛根からの核酸抽出法②

(3) 抗体検査: MDBK-SY 細胞を用いた中和試験により血清中の BVDV1 型に対する中和抗体価を測定した。

(4) ウイルス分離: PI 牛 4 頭の血清を MDBK-SY 細胞に接種し 3 代継代後、上清を用いて qPCR を実施した。

(5) 遺伝子解析: 動物衛生研究部門へ依頼し、PI 牛 4 頭の血清を材料に、BVDV の 5' 非翻訳領域 (UTR) の塩基配列を用いた BLAST 解析及び E2 領域の配列を用いた分子系統解析により実施した。

検査結果

(1) 抗原検査: PI 牛 4 頭の血清は 2 回の検査で qPCR 陽性となり、RFLP の結果 BVDV1 と判定された (表 1)。

(2) 毛根を用いた抗原検査: 抽出法①、②ともに qPCR、cPCR において陽性となり、RFLP の結果が目視で確認可能であった (表 1, 図 3)。qPCR においては抽出法①が抽出法②よりも Ct 値が低かった。

表 1 qPCR 結果 (Ct 値)

個体	血清		毛根			
	1回目	2回目	抽出法①		抽出法②	
PI牛①	25.1	25.3	28.2	28.1	26.5	32.7
PI牛②	28.6	20.9	32.4	29.9	29.8	31.3
PI牛③	25.9	24.8	NT	NT	NT	NT
PI牛④	26.7	26.1	32.8	30.3	32.8	NT
陰性牛①	-	NT	NT	-	NT	NT
陰性牛②	-	NT	NT	-	NT	-
陰性牛③	-	NT	NT	-	NT	NT

-: リアルタイムPCR陰性 NT: 実施なし

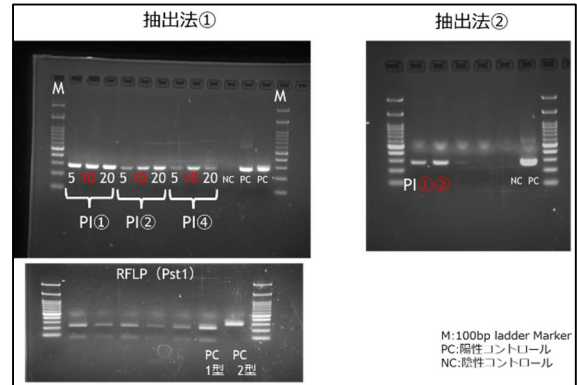


図3 毛根の cPCR、RFLP 結果

(3) 抗体検査: PI 牛 3 頭は 2 回の検査において抗体価 2 倍未満であった。PI 牛②は 1 回目の検査時に抗体を保有していたものの 2 回目の検査時には 2 倍未満となっており、移行抗体であったと判断された (表 2)。A 農場の同居牛は多くが高い抗体価を示し、B 農場のスポットテスト対象牛、C 農場の同居牛全てが 256 倍以上の抗体を保有していたことから 3 農場においてウイルスの侵入、流行があったことが推察された (図 4, 表 3)。

表 2 PI 牛の中和抗体価

個体	中和抗体価	
	1回目	2回目
PI牛①	<2	<2
PI牛②	4096 \leq	<2
PI牛③	<2	<2
PI牛④	<2	<2

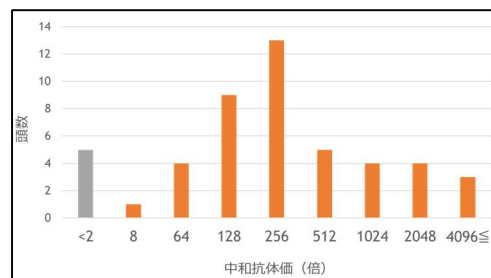


図4 A 農場同居牛の中和抗体価

表3 B農場、C農場同居牛の中和抗体価

B農場：スポットテスト		C農場：全頭検査	
個体	中和抗体価	個体	中和抗体価
繁殖牛①	512	繁殖牛①	256 \leq
繁殖牛②	2048	繁殖牛②	256 \leq
繁殖牛③	4096 \leq	繁殖牛③	256 \leq
導入牛	512	自家産子牛	256 \leq

(4) ウイルス分離：PI牛4頭の血清を接種した細胞はいずれも細胞変性効果（CPE）が認められなかったが、3代継代した培養上清のqPCR陽性であり、ウイルス分離陽性と判定された。

(5) 遺伝子解析：PI牛4頭の血清から得られた5'UTR領域の塩基配列は100%一致し、BLAST解析の結果、BVDV1の1b亜型と近縁であった。PI牛①③④の血清はE2領域のPCR増幅が認められ、得られた塩基配列は99.46%以上一致した。さらに分子系統解析によりBVDV1の1b亜型に分類され、クラスターIに属していることが分かった（図5）。

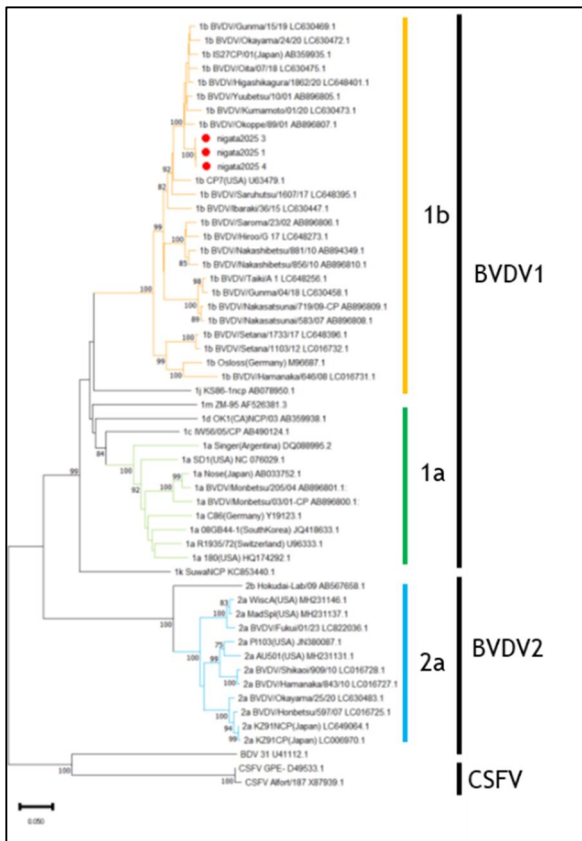


図5 E2領域遺伝子解析結果

まとめ

毛根を用いた抗原検査の結果から、毛根をPCR検査に用いることが可能であった。抽出法

①、②ともにBVDV特異遺伝子が検出されたが、抽出法①の方が抽出法②より感度が高いと考えられた。抽出法①は5、10、20本いずれもPCR陽性となったが、毛根の太さ・状態による結果のバラつきが出ると考えられるため、10本以上検査に用いるのが望ましい。抽出法①において採材容器から毛を取り出し処理する作業は、手間が掛かりコンタミネーションの原因となる恐れがある。対して抽出法②ではより簡単な操作で遺伝子抽出が可能であることから、抽出法②において浸漬試薬・条件の検討を重ねることにより感度を上げることが効率的な検査実施に有用である。毛根は採材が容易でありスクリーニング検査時に省力化が期待されることから、毛根の活用により幅広いスクリーニング検査が可能となる。また、移行抗体の影響が少ないと考えられることから検査精度の向上が期待され、さらにTI牛とPI牛の判別への利用も期待される。今回の検証結果をもとにデータを蓄積することで、BVDV検査における毛根の活用につなげたい。

遺伝子解析の結果、3農場のウイルスはBVDV1の1b亜型クラスターIに分類された。これは近年の国内分離株の主要なクラスターであった[10, 11]。3農場のウイルスは、塩基配列の一致率の高さから、同一のウイルスを起源としていることが示唆される。A農場からB農場へ移動したPI牛については、A農場で感染したものと考えられる。C農場についてはA農場、B農場との間で牛の移動はなく、経路の特定には至らなかったが、A農場とC農場が同一管内であることを踏まえると同一のウイルスが侵入した可能性が高い。今後は疫学情報の収集と共に県内のスクリーニング検査の強化により、まん延防止に努めたい。

稿を終えるにあたり、遺伝子解析を実施していただいた国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門ウイルスグループ西森朝美先生に深謝致します。

参考文献

- [1] 公益社団法人 中央畜産会：牛ウイルス性下痢・粘膜病（2018）
- [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：平成28年4月28日28消安第734号農林水産省消費・安全局動物衛生課長通知
- [3] 矢口裕司ら：牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛における耳片を用いた抗原エライザの活用，第60回茨城県家畜保健衛生業績発表会（2019）

- [4] 福成和博ら：毛根を用いた免疫ペルオキシダーゼ法による牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛の簡易検出法，日獣会誌，71，179-184(2018)
- [5] 大川原ら：毛根を用いた牛ウイルス性下痢抗原 ELISA 検査法の検討，日獣会誌，76，283-288(2023)
- [6] K Singh ら：Development of a novel diagnostic test for detection of bovine viral diarrhea persistently infected animals using hair, J Vet Sci, 12, 295-297(2011)
- [7] B L Njaa ら：Diagnosis of persistent bovine viral diarrhea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens, J Vet Diagn Invest, 12, 393-399(2000)
- [8] 矢口裕司ら：牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛診断における抗原エライザ法とイムノクロマト法の応用，第58回茨城県家畜保健衛生業績発表会(2016)
- [9] B Hoffmann ら：A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses, Journal of Virological Methods, Volume 136, 1-2 (2006)
- [10] A Nishimori ら：Endemic infections of bovine viral diarrhea virus genotypes 1b and 2a isolated from cattle in Japan between 2014 and 2020, J Vet Med Sci, 84(2), 228-232 (2022)
- [11] Y Abe ら：Genetic and antigenic characterization of bovine viral diarrhea viruses isolated from cattle in Hokkaido, Japan, J Vet Med Sci, 78(1), 61-70 (2016)