

乳肉複合経営農場における牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛の摘発症例について

仙台家畜保健衛生所

大関貴大, 齋藤拓海

1. はじめに

牛ウイルス性下痢 (BVD) は、BVD ウイルス (BVDV) の感染により引き起こされる感染症で、遺伝子型で1型及び2型、生物型でCP株及びNCP株に大別され、遺伝子型はさらに亜型に細分化される。BVDV が妊娠牛に感染した場合、胎齢により様々な病態を引き起こすことが知られており、胎齢100日前後でNCP株に感染すると、胎子は免疫寛容により持続感染牛 (PI 牛) となる可能性がある。PI 牛は健康牛と区別が難しく、終生ウイルスを排出することから他の牛への感染源となり⁴⁾、生産性を著しく低下させる原因となる。

令和6年、31頭を飼養するBVDVワクチン未接種の乳肉複合経営農場において、令和5年12月出生の子牛2頭 (乳用子牛1頭、肉用子牛1頭) が馬面で長期間発育不良を呈していたことから、BVDを疑い病性鑑定を実施しPI牛と診断した。併せて本症例の病性鑑定成績と過去の県内発生症例を比較したので報告する。

2. 材料及び方法

172日齢の乳用子牛及び353日齢の肉用子牛について、剖検を行った。

1) 病理組織学的検査

諸臓器を用いて、ヘマトキシリン・エオジン染色、免疫組織化学的染色 (一次抗体: BVDV-1&2 Mab clone 348、VMRD 社) を行った。

2) ウイルス学的検査

(1) 抗原 ELISA 検査: 血液および10%臓器乳剤を用いて、市販キット (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) を用いて実施した。

(2) 遺伝子検査 (RT-PCR および RFLP): 血液及び10%臓器乳剤を用いて、RNA を抽出し (High Pure Viral RNA kit、Roche 社)、RT-PCR⁷⁾ を行った。陽性の場合、制限酵素 *Pst* I を用いて RFLP を行った。

(3) ウイルス分離 (干渉法): 血液及び10%臓器乳剤をBFM細胞に接種した。37°C、5日間静置培養後、BVDV1型 (Nose 株) を接種し、CPEの有無を判定した。

(4) 中和試験: ペア血清について、BVDV1型 (Nose 株) と BVDV2型 (KZ-91 株) を指示ウイルスとし、MDBK-SY 細胞を用いて中和抗体価を測定した。

(5) シークエンス解析: 分離ウイルスの5'非翻訳領域 (UTR) 及びE2領域の遺伝子配列のPCR産物について、ダイレクトシークエンスを実施した。5'UTR領域の配列を用いてBLAST解析を行い、E2領域の配列を用いて分子系統樹解析を行った。

3) 細菌学的検査

主要臓器の一般細菌検査、小腸内容の定量培養検査、肺のマイコプラズマ遺伝子検査を実施した。

4) 生化学的検査

血液検査 (全自動血球計算機: MEK-6550)、白血球百分比 (血液塗抹、メイギムザ染色)、血液生化学的検査 (富士ドライケム NX500V)、尿検査を実施した。

5) 県内発生症例との比較

平成16年以降に県内で発生した4症例について、摘発月齢、臨床症状、病理組織学的検査結果及びウイルス学的検査結果を比較した。

3. 結果

1) 剖検所見

乳用子牛では、体表及び腸間膜リンパ節の腫大、胸腺の一部非薄化、右側側脳室の軽度拡張が認められた。肉用子牛では、浅頸リンパ節の腫大、胸腺の軽度腫大、前頭葉表面の微細な泡沫が認められた。

2) 病理組織学的検査

乳用子牛では、浅頸及び腸骨リンパ節でリンパ球減少、頸部胸腺で微小出血が認められた。肉用子牛では、浅頸リンパ節でリンパ球減少、頸部胸腺で充うっ血や好酸球浸潤、大脳で充うっ血が認められたが、BVD の急性感染牛や粘膜病発症牛で認められるようなリンパ節の壊死や胸腺の低形成等の特徴的な所見は認められなかった。各臓器を用いた免疫組織化学的染色では、2 頭共に複数の臓器で免疫系の細胞内に BVDV 陽性抗原が認められた(図 2)。

乳用子牛		肉用子牛		臓器(免疫染色)
肝臓	+	+		
脾臓	+	+		
腎臓	+	+		浅頸Ly(免疫染色) 陽性部位: 傍皮質のリンパ球細胞質
心臓	-	-		
肺	+	+		
浅頸Ly	+	+		
胸腺	-	+		
脳	-	+		

図 2. 免疫組織化学的検査結果

3) ウイルス学的検査

抗原 ELISA 検査及び遺伝子検査(RT-PCR および RFLP)については、2 頭共に検査した検体全てで陽性であり、遺伝子型別検査は BVDV2型陽性であった(図 3)。ウイルス分離(干渉法)では、乳用子牛で、血清、白血球及び主要臓器のほか、眼結膜スワブ、鼻腔スワブ及び尿等の排泄物からも NCP 株が分離された。肉用子牛では、血清及

び白血球で NCP 株が分離された。中和試験では、2 頭共に BVDV1 型及び 2 型の抗体価は pre, post 血清共に抗体陰性であった。シーケンス解析については、5' UTR 領域では 2 頭から分離されたウイルス 2 株の塩基配列は 100%一致した。また、E2 領域では塩基配列は 99.82%一致し、クラスター I の BVDV2a 亜型に分類された(図 4)。

乳用子牛	ELISA	PCR	分離	肉用子牛	ELISA	PCR	分離
血清(pre, post)			+	血清(pre, post)			-
白血球(pre, post)			+	白血球(pre, post)	+		-
主要臓器			+	主要臓器		2型	NT
脾臓			-	小腸内容物			NT
空腸			+				
脳			+				
耳介			+				
浅頸Ly			+	乳用子牛, 肉用子牛		BVDV1型 中和抗体	BVDV2型 中和抗体
腸間膜Ly	+	2型	+	Pre血清		<2	<2
腸骨Ly			+	Post血清			
腸筋液			+				
卵胞液			+				
乳房			+				
眼結膜スワブ			+				
口腔スワブ			-				
鼻腔スワブ			+				分離株は全てNCP株
尿			+				
糞便			-				

図 3. ウイルス学的検査結果

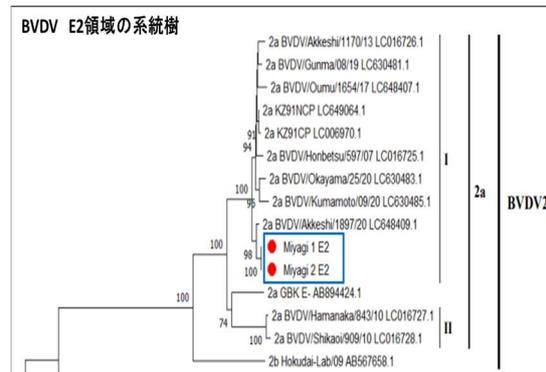


図 4. シーケンス解析結果

4) 細菌学的検査及び生化学的検査結果

乳用子牛では有意な菌は分離されず、肉用子牛では肺から *M. haemolytica* が分離された。生化学的検査では 2 頭共に異常値は認められなかった。

5) 本症例と県内発生症例との比較(図 4、図 5)

本症例は同農場にて 2 頭の PI 牛の摘発があり、県内発生症例では複数頭が摘発されたのは 4 農場中 2 農場であった。摘発月齢は、本症例は 6 及

び12ヵ月齢、県内発生症例は1～52ヵ月齢と様々であった。臨床症状は、本症例は2頭ともに発育不良、馬面を呈し、うち1頭は下痢が認められた。県内発生症例は、無症状が最も多く、次いで流産、発育不良、下痢の症状が散見された。また、ウイルス学的検査では、本症例と同様に、県内発生症例全てでNCP株が分離された。一方で、遺伝子型は本症例とは異なり、過去症例は全てBVDV1a亜型であった(図4)。過去の症例のうち、剖検を実施した平成16年症例と本症例を比較した。平成16年症例は、発育不良を呈し、剖検所見でリンパ節、胸腺及び脳に所見が認められた点は本症例と共通しており、加えて脾臓の腫大が認められた(図5)。組織所見では、リンパ節で著変なく、胸腺で広範囲の出血巣、脳で充うっ血、脾臓で白脾髄に星空像が散在性に認められたが、本症例と同様にBVDの急性感染牛や粘膜病発症牛の特徴的な所見は認められなかった。

	品種	頭数	摘発月齢	臨床症状	生物型	遺伝子型
H16	肉用種	4頭	1	発育不良 下痢 無症状 無症状	NCP	1a
			10			
			33			
			47			
H17	乳用種	1頭 (同居1頭 粘膜病)	11	無症状	NCP	1a
H18	乳用種	1頭	33	流産	NCP	1a
H20	乳用種	1頭	52	流産	NCP	1a
R6	乳用種	1頭	6	発育不良、馬面	NCP	2a
	肉用種	1頭	12			

図4. 県内発生症例との比較

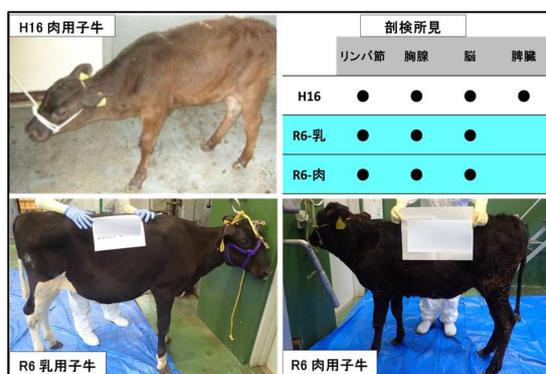


図5. 平成16年剖検症例との比較

4. 考察

本症例の子牛2頭は、病理組織学的検査より、BVDの急性感染や粘膜病発症の特徴的な所見は認めず、ウイルス学的検査よりBVDV2型遺伝子陽性及び抗体陰性であったことからBVDV2型のPI牛と診断した。

PI牛は、鼻汁、唾液、糞、尿等に大量のウイルスを排出することが知られており³⁾、摘発後は速やかに淘汰し、農場内の浸潤状況を調査し、発生を予防することが重要である。本症例の乳用子牛の鼻腔スワブや尿からBVDVが分離されたことから、当該子牛はウイルスを排泄し他の牛の感染源となっていたことが示唆された。

肉用子牛の症例については、*M. haemolytica*の感染が確認されたが、PI牛はBVDV以外の病原因子に対して免疫応答能は低く、二次感染や日和見感染による下痢症や肺炎症状を発症しやすい³⁾ことから、BVDVの持続感染による免疫低下の影響で当該菌に感染した可能性が考えられた。

本症例の母牛の感染時期は、PI牛の発生機序及び出生日が令和5年12月であることから、令和5年6月頃と考えられた。分離されたBVDVは塩基配列が極めて類似しており、出生時期も同じであることから、同一のウイルスにより発生したと考えられた。

本症例については、ウイルスの農場再侵入や新たなPI牛の出現を防ぐためにも牛導入時の着地検査、適切なワクチン接種及び飼養衛生管理基準遵守の徹底を行っていくことが重要である。

本症例と過去症例を比較した結果、臨床症状、病理学的検査及びウイルス学的検査において、すべての症例に一貫した所見は得られなかった。県内で分離されたBVDVの遺伝子型は、平成20年度以前は1a型、令和6年度は2a型であった。これは、2000年から2020年にかけて国内流行株

が 1a 型から 2a 型に変化しているという報告⁵⁾と類似していた。

また、Hult ら²⁾は BVDV 感染を広げる最も重要なリスク因子は農場間における牛の移動であると報告していることから、県内の遺伝子型の変化についても牛の移動に起因している可能性が高く、牛の移動歴の把握は重要であることが示唆された。

国内における粘膜病発症牛を含む BVD の発生頭数は、毎年 100 件以上届出されている⁶⁾。特に、北海道における届出数が最も多く、東北地方では毎年 20 頭程度届出されているが、さらに県内では数年に 1 頭程度と届出数が少なくなっている。五嶋ら¹⁾は BVDV が流行した乳用種育成農場での経済的損失の推定額は約 220 万円であったと報告しており、一度 PI 牛が発生すれば農場の経済的損失は少なくないと予想される。当県においては、BVD の発生が少ないものの、本病の蔓延を防ぐため、農場に対し BVD 対策の重要性を啓蒙し、PI 牛の淘汰やワクチン接種を推進していく必要がある。

5. 謝辞

シーケンス解析にご協力いただいた 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構、動物衛生研究部門動物感染症領域ウイルスグループ、西森朝美先生に深謝します。

6. 参考文献

- 1) 五嶋祐介ほか: 牛ウイルス性下痢ウイルスが流行した乳用種育成牧場における経済損失の推定とワクチンの費用便益分析. 岩手県獣医師会会報, Vol. 46 (No. 2), 47 - 50 (2020).
- 2) Hult L, Lindberg A : Experiences from BVDV control in Sweden, *Prev Vet Med*, 72, 143-148; discussion 215-219 (2005)
- 3) 猪熊壽ほか: 獣医内科学第 2 版-大動物編-日

本獣医内科学アカデミー編. 文英堂出版(2014)

- 4) 公益社団法人中央畜産会: 牛ウイルス性下痢・粘膜病(2017)
- 5) Nishimori et al. : 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).
- 6) 農林水産省 消費・安全局: 監視伝染病の発生状況,
https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/kansi_densen.html
- 7) Vilcek S, et al. : 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)