

6 BVD ウイルスの浸潤状況とスクリーニングを

目的とした採材・保管方法の検討

東青地域県民局地域農林水産部青森家畜保健衛生所

○ 林 敏展 佐藤 宏樹
米田 有希 高橋 優
金野 加奈 太田 智恵子
角田 裕美 中村 成宗

1 背景

牛ウイルス性下痢（以下「本病」という。）は、牛ウイルス性下痢ウイルス（以下「BVDV」という。）の感染を原因とし、感染牛では下痢、呼吸器症状等がみられるほか、妊娠牛では流産、不受胎等の繁殖障害や産子の異常がみられる疾病である。また、家畜伝染病予防法に規定する届出伝染病に指定されている。

通常、本病は、牛が BVDV に感染してから 2 から 3 週間後に、体内で十分な抗体を産生して BVDV を中和することから、症状は一過性で回復する。しかし、妊娠牛に感染した場合、胎子は感染時の胎齢によって、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持続感染牛（以下「PI 牛」という。）となり、同一牛群内の汚染源になるとともに、他農場への伝播源となる。¹⁾

本県における本病の発生は 2012 年以降確認されていない。しかし、本県から出荷された牛が他県において PI 牛と診断された事例は、過去 5 年間で、2016 年に 1 件、2018 年

に 2 件、2019 年に 3 件、2020 年に 3 件と継続して診断されている。

このような中、2020 年、本県大規模農場の出荷牛が他県において PI 牛と診断されたことを契機に、県内の感染状況を把握することとし、保存血清を用いた浸潤状況調査を実施した。

さらに、PI 牛摘発のためのスクリーニング検査を行うに当たり、採血など特別な手技によらない方法で手間をかけずに生産者自身が採材できるよう、採材方法と材料の保管方法について検討したので、その概要を報告する。

2 浸潤状況調査

(1) 調査材料

調査材料は、2015 年から冷凍保存していた血清を用いた。対象は、家畜伝染病予防事業に基づく定期検査で採取した 12 か月齢以上の繁殖に供する肉用牛 12,050 頭、乳用牛 10,674 頭で、内訳を表 1 に示した。

なお、本県では、2019年2月1日現在、肉用牛繁殖雌牛が12,500頭、乳用牛が11,700頭飼養されており、定期検査は、肉用牛を2年間隔、乳用牛を5年間隔で実施していることから、本調査材料で、県全体の状況を概ね把握できると考えた。

表1 調査材料の内訳

家保	(頭)		
	肉用牛	乳用牛	合計
青森	248	259	507
八戸	2,577	841	3,418
十和田	6,444	7,715	14,159
むつ	2,040	1,543	3,583
つがる	864	193	1,057
合計	12,050	10,674	22,724

(2) 調査方法の検討

調査材料が22,724検体と多いことから、効率的に調査を実施するため、調査をプール材料で行うこととし、リアルタイムPCRにより、PI牛の摘発が可能な血清プール数の算出を試みた。

検査に用いた試薬は、材料からのRNA抽出にHigh Pure Viral RNA Kit (Roche社)、リアルタイムPCRにTaqman Fast Virus 1-step Master Mix (ABI社)を使用した。また、BVDV遺伝子を検出するプライマー、プローブは、斎藤らの報告²⁾に準じた。

検証材料として、当所で所有する野外PI牛血清とBVDV培養液(Nose株)を用いた。

これらを10倍階段希釈した材料からRNAを抽出し、リアルタイムPCRを実施した結果、野外PI牛血清は、320倍希釈まで遺伝子が検出され、BVDV培養液では、表2に示すとおり、 10^2 TCID₅₀/mlのCt値は27.3であった。

PI牛は一生涯多量のウイルスを排泄し続け、血清中において $10^2 \sim 10^6$ TCID₅₀/mlのウイルス量を認める³⁾との報告がある。ここで、Ct値の理論値について考えると、PCRでは1サイクルごとに2の倍数で遺伝子が増幅するため、材料を2倍希釈するごとにCt値は1ずつ高くなる。

BVDV培養液から作製した 10^2 TCID₅₀/ml培養液を2倍階段希釈した時のCt値は表2のとおりであるが、本PCRではCt値36以上は非特異反応の可能性があるため、Ct値36未満となる 2^8 (=256倍)希釈が理論上の検出限界と考えられた。

表2 調査方法の検討結果

○ BVDV培養液

TCID ₅₀ /ml	(threshold 0.1)				
	$10^{5.0}$	$10^{4.0}$	$10^{3.0}$	$10^{2.0}$	$10^{1.0}$
Ct値	17.7	20.4	23.6	27.3	30.7

○ $10^{2.0}$ TCID₅₀/ml培養液のCt値(理論値)

2 ⁿ 希釈	(threshold 0.1)				
	0	1	2	8	9
Ct値	27.3	28.3	29.3	35.3	36.3

↓ 非特異の可能性

以上の成績から、今回の調査材料からPI牛を摘発できる判定可能な血清プール数については、より確実かつ効率的に検出するため、96検体とした。

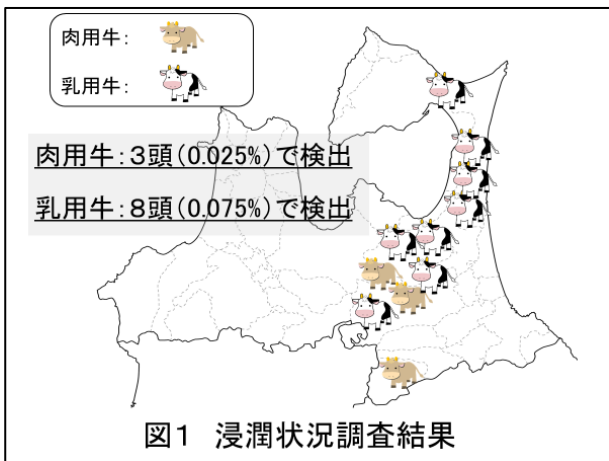
検証のため、96倍希釈した野外PI牛3頭の血清を使用し、リアルタイムPCRを行ったところ、全てCt値36未満となり問題なく検出されたため、浸潤状況調査は96検体の血清をプールして実施した。

なお、遺伝子が検出された血清プール材料は、個体毎に検査を行った。

(3) 調査結果

(2)の方法で検査を行った結果、肉用牛では、12,050頭のうち、3頭で遺伝子が検出され、陽性率は0.025%であった。乳用牛では、10,674頭のうち、8頭で遺伝子が検出され、陽性率は0.075%であった。

遺伝子が検出された牛の飼養場所を図1に示した。特に、飼養頭数の多い地域で確認された。



3 スクリーニングを目的とした採材・保管方法の検討

(1) 目的

農林水産省が作成した本病のガイドラインでは、スクリーニング検査は、バルク乳(複数農場の生乳を合せた合乳を含む。以下同じ。)を用いた RT-PCR、スポットテスト又は5条検査の余剰血清等(プール血清を含む。)を用いた RT-PCR¹⁾と記載されている。しかし、非搾乳牛や肉用牛の血清を材料とする場合、獣医師による採血が必要となるため、生産者が採材することができず、労力も大きい。

そこで、PI牛摘発のためのスクリーニング検査の採材を、生産者自身でも実施できるよう、①採材が容易であること、②保管に特別な器具・機材が不要であること、③検査までの日数に余裕がもてるよう長期保存が可能

なことの3点を条件に検討した。

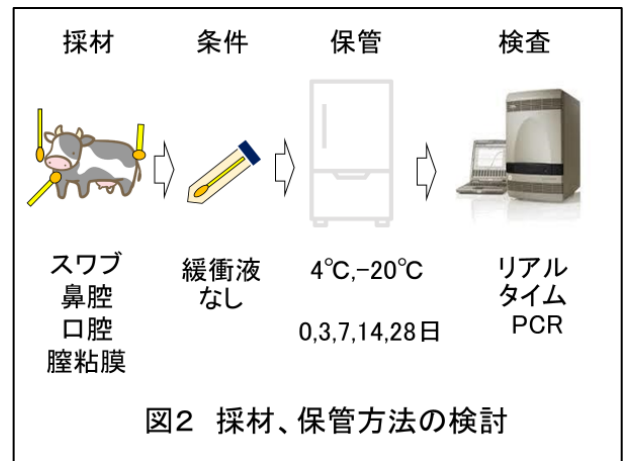
(2) 採材方法の検討

(1)の条件を考慮し、採材・保管方法を検討し、その概要を図2に示した。

採材は、綿棒を用いたスワブで、採材部位は、容易に採材できる鼻腔、口腔、膣粘膜とした。

また、PBS等の緩衝液は入れずに保管し、検査に供するものとした。

保管は、温度を4℃と-20℃、期間を0、3、7、14、28日として、検討を行った。



(3) 検査材料及び検査方法

PI牛と診断された乳牛1頭から、上記(2)により採材したスワブから抽出したRNAについて、先に示す方法でリアルタイムPCRを実施し、Ct値の比較を行った。

(4) 検査結果

各スワブの保存期間ごとのCt値を図3に示した。

鼻腔スワブは、4℃と-20℃の保管温度のいずれも保存期間による影響は認められず、Ct値は維持されていた。

口腔スワブの-20℃保管では、Ct値を維持していたが、4℃保管では、保存期間が長くなるにつれてCt値は高くなり、28日目には

35 付近であった。

また、腔粘膜スワブは、4℃と-20℃の保管温度のいずれも14日間までCt値が概ね維持されていたが、鼻腔スワブよりも高い値であった。

全体で比較すると、鼻腔スワブのCt値が一番低い傾向がみられ、14日目までは、検査に十分な量であった。

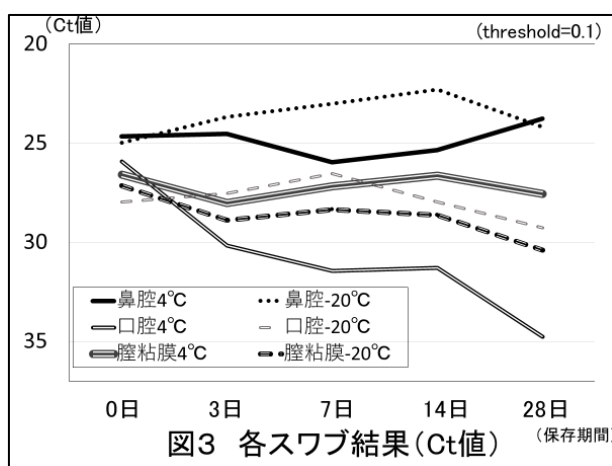


図3 各スワブ結果(Ct値)

4 まとめと考察

今回の浸潤状況調査では、肉用牛で0.025%の陽性率、乳用牛で0.075%の陽性率であった。この数値は、平成24年度診断予防事業調査における全国の抗原検査成績の0.63%⁴⁾、茨城県の乳用牛調査の0.19%⁵⁾と比べて低い値であり、香川県の乳用牛調査の0.05%⁶⁾と同程度であったことから、本県のBVDV浸潤度は低いと考えられた。

なお、平成25年度の本県におけるBVDV調査による死亡牛の陽性率は0.36%⁷⁾であり、今回の調査の陽性率と比べ大きな差異がみられた。これは、調査対象が死亡牛であり、今回の調査対象と異なるため、単純に比較はできないものの、PI牛であった場合、今回の調査対象である12か月齢以上となる前に死亡する可能性が高いこと、症状を示さず健康

牛としてと畜場に出荷されたことなどが要因と考えられた。

今回の調査で遺伝子が検出された肉牛3頭、乳牛8頭については、PI牛の可能性あることから、追跡調査が必要である。

また、保存血清のプール材料を用いた本調査は効率的であり、大規模農場の感染状況確認に有用と考えられた。

次に、スクリーニングを目的とした採材・保管方法の検討では、すべてのスワブで、いずれの保存状況でも14日間まで検査に十分な遺伝子が検出されたが、口腔スワブの4℃保存でCt値が保存期間が長くなるにつれて増加したこと、鼻腔スワブのCt値が最も低い傾向がみられたことから、スクリーニングには、生産者が容易に採材、保管できる鼻腔スワブの4℃保管が最も適していると考えられた。

また、鼻腔スワブを10頭分プールした材料でも理論上判定が可能と考えられたため、牛房単位でのスクリーニングへの応用が期待された。

なお、口腔スワブの4℃保存でCt値が経日的に増加したことについては、唾液のpHや含まれる成分が要因と推察されたが、特定には至らなかった。

5 今後の展望

本調査により、本県のBVDV浸潤度は低いと想定されたが、本県においてPI牛の存在は確認されている状況である。

今後は、生産者に対して、本病浸潤状況の情報提供を行うとともに、本調査のスクリーニングを目的とした方法により誰でも簡単に採材できることを普及し、多くの材料を短

時間で診断できることを伝え、生産者自らが自身の農場の清浄性を維持する意識を持てるように指導していくことで、本県の清浄性の維持に努める所存である。

参考文献

- 1) 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
- 2) 齋藤豪ら：マルチプレックスリアルタイムPCRを活用した牛呼吸器病ウイルス遺伝子検査の効率化,平成30年度青森県家畜保健衛生業績発表会集録,38-42(2019)
- 3) 亀山健一郎ら、持続感染牛により撒播される「牛ウイルス性下痢・粘膜病」.臨床獣医,2004.Feb.Vol122, No.2
- 4) 平成24年度診断予防技術向上対策事業成績(BVD-MD)
- 5) 赤上正貴ら：バルク乳中の牛ウイルス性下痢ウイルス特異遺伝子及びELISA抗体検出によるサーベイランス体制の検討,第58回茨城県家畜保健衛生業績発表会
- 6) 坂下奈津美ら：香川県牛ウイルス性下痢ウイルス浸潤状況調査,平成26年度家畜保健衛生業績発表会(香川県)
- 7) 林敏展ら：県内の牛ウイルス性下痢浸潤状況,平成25年度青森県家畜保健衛生業績発表会