

# 県下におけるBVDV関連疾病の発生例

県央家畜保健衛生所

高山 環            前田 卓也  
篠崎 隆            英 俊征

## はじめに

BVDV（牛ウイルス性下痢・粘膜病ウイルス）は、フラビウイルス科ペスチウイルス属に属し、牛群に様々な病態を引き起こすことにより重大な経済損失を与えるウイルスである。通常、牛が感染した場合には急性感染を起こし、発熱、呼吸器症状、下痢等の症状を引き起こす。妊娠牛が感染した場合には胎仔へ子宮内感染を起こし、流死産や奇形といった異常産が発生する。胎仔の免疫形成前に感染した場合、BVDVに対し免疫寛容状態を引き起こす持続感染牛（以下、PI牛）として産出されることがある（図1）。PI牛は生涯にわたりウイルスを排出し、感染源として最も重要視されている<sup>1)3)5)6)</sup>。PI牛自身は発育不良以外に顕著な症状を呈さず、体内でウイルスの突然変異、同抗原CP株の重感染または異抗原CP株の感染により遺伝子組み替えが起こり、NC株からCP株へ変異し、粘膜病（以下、MD）を発症することが知られている<sup>1)</sup>。発症した場合、急性・慢性に係らず予後不良となる。

平成24年に県内でMDの発生及びBVDVが関与したと考えられる流産が発生したので報告する。

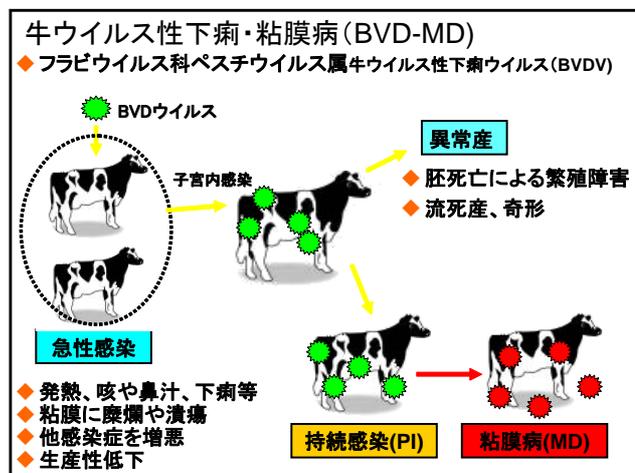


図1 BVD-MDの病態

## MD発生例（症例1）

平成24年3月、県内乳用牛飼養農場の育成牛3頭で下痢、呼吸器症状が認められた。うち1頭は初発時、下痢、呼吸器症状を呈していたことから糞便、鼻腔スワブ、発症時・過去血清について病性鑑定を実施したところBVD-MDの発症が疑われたため、病性鑑定殺を行った。

### 1 材料および方法

#### (1) 材料

病性鑑定殺に供した23ヶ月齢牛（ホルスタイン種）の臓器及び発症時に採取した糞便、鼻腔スワブ、血清及び過去血清（2ヶ月齢時に採取）を検査材料とした。

#### (2) 方法

##### ①病理学的検査

10%緩衝ホルマリンで固定後、パラフィン包埋、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を実施した。また、脾臓、腸管、腸間膜リンパ節の凍結切片でFITC標識BVDVポリクローナル抗体を用い直接蛍光抗体法による免疫染色を実施した。

##### ②細菌学的検査

$\beta$ -NAD加めん羊血液寒天培地、DHL寒天培地を用い好気及び微好気で37℃、48時間培養した。

##### ③ウイルス学的検査

###### i 抗原検出キット

糞便でロタ・アデノウイルス、鼻腔スワブでRSウイルスの抗原検出キット（各ウイルスの抗原イムノクロマトグラフ法）を用い、抗原検出を行った。

###### ii ウイルス分離

10%臓器乳剤を作成し、MDBK-SY細胞及びBFM細胞を用いウイルス分離（5%CO<sub>2</sub>下、7日間・3代継代）を実施した。同定は、FITC標識BVDVポリクローナル抗体を用い直接蛍光抗体法により行った。

###### iii 遺伝子検査

糞便、鼻腔スワブの10%乳剤からRNAを抽出し、牛パラインフルエンザウイルス3型（PI3）特異遺伝子、牛コロナウイルス（BCoV）特異遺伝子を検出するPCR検査を

実施した。また、糞便、鼻腔スワブの 10 %乳剤、血清及びCPEを起こしたMDBK-S Y細胞培養上清からRNAを抽出し、ペスチウイルス特異遺伝子を検出するPCR検査を実施した<sup>2)12)14)</sup>。

ペスチウイルス特異遺伝子が検出されたPCR産物は、制限酵素 *Pst* I、*Bgl* I によるRFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism、制限酵素断片長多型) 法を実施し、BVDV 1型および2型の判別を行った<sup>13)</sup>。

## 2 成績

### (1) 病理学的検査

剖検所見では軽度の発育不良を呈し、鼻腔部粘膜に約 3mm、下顎粘膜に約 1cm の糜爛(写真 1)、空腸中～下部の粘膜肥厚、腸間膜リンパ節の顕著な腫大(写真 2)が見られた。組織所見では回腸炎、盲腸炎が認められ、陰窩上皮細胞が壊死し、パイエル板でリンパ球が著しく減少していた(写真 3)。

また、脾臓、腸管、腸間膜リンパ節の直接蛍光抗体法により、全てにおいてBVDVの特異蛍光を発する細胞が確認された(写真 4)。



写真 1 下顎粘膜部の糜爛



写真 2 小腸壁の肥厚、腸間膜リンパ節の腫大

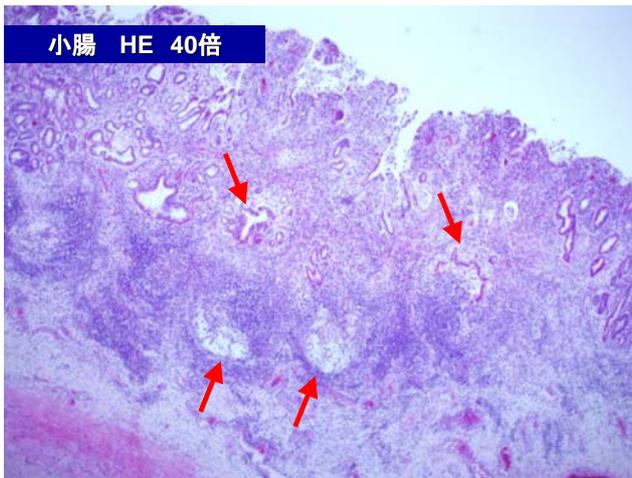


写真3 回腸の組織像 (HE染色、×40倍)

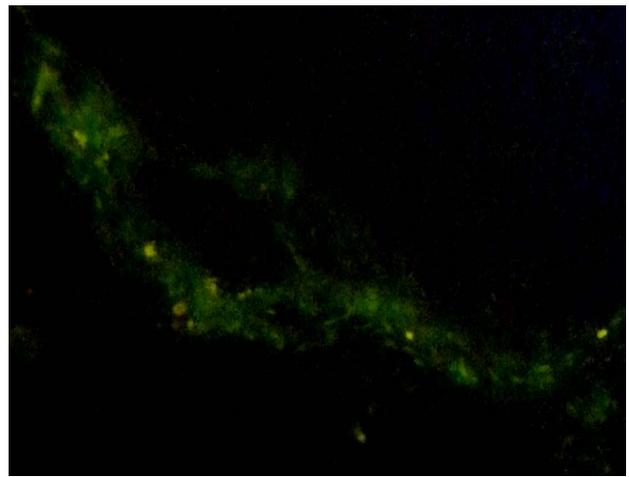


写真4 脾臓の直接蛍光抗体法による特異蛍光

## (2) 細菌学的検査

有意な細菌は分離されなかった。

## (3) ウイルス学的検査

### ①抗原検出キット

糞便でロタ・アデノ抗原陰性、鼻腔スワブでRS抗原陽性であった。

### ②ウイルス分離

肝臓、腎臓、脾臓、肺、腸間膜リンパ節からMDBK-SY細胞に2代目4日目、BFM細胞に1代目4日目にCPEを認め、直接蛍光抗体法によりBVDVと同定した。

### ③遺伝子検査

糞便、鼻腔スワブ、発症時・過去血清及びウイルスが分離された全ての培養上清からペステウイルス特異遺伝子が検出された。また、PCR産物を用いたRFLP法では制限酵素 *Bgl* I、*Pst* I で共に切断されず、BVDV 2型と同定した (写真5)。

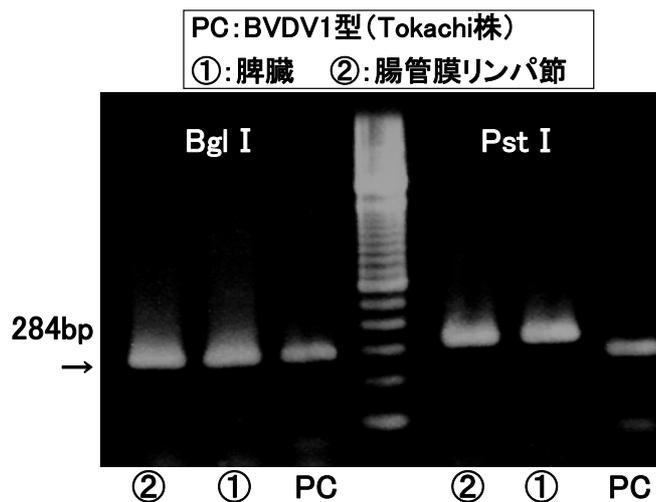


写真5 遺伝子検査結果 (RFLP法)

### 流産例 (症例2~8)

平成 22 ~ 24 年にかけて、県内乳用牛飼養農場 3 戸、肉用牛飼養農場 1 戸 7 例で流産が発生した。4 戸の飼養頭数は 30 ~ 60 頭で、自家育成・県外育成預託、導入の有無は様々だった。

#### 1 材料及び方法

##### (1) 材料

乳用牛飼養農場 3 戸 6 例、肉用牛飼養農場 1 戸 1 例の計 7 例の流産胎仔、母牛及び同居牛血清、母牛臍スワブを検査材料とした。

##### (2) 方法

###### ①病理学的検査

10%緩衝ホルマリンで固定後、パラフィン包埋、HE染色を実施した。

###### ②細菌学的検査

$\beta$ -NAD加めん羊血液寒天培地、DHL寒天培地を用い好気及び微好気で 37℃、48 時間培養した。

###### ③ウイルス学的検査

###### i ウイルス分離

10%臓器乳剤を作成し、MDBK-SY 細胞を用いたウイルス分離 (5% CO<sub>2</sub> 下、7 日間・3

代継代) を実施した。

## ii 中和抗体検査

BVD-MD 1 型・2 型 (MDBK-S Y 細胞、ウイルス抗原: NOSE 株、KZ-91 株)、アカバネ病・アイノウイルス感染症・イバラキ病・牛流行熱・チュウザン病 (Hm 1 u-1 細胞) についてマイクロタイター法により 37 °C、CO<sub>2</sub> 下で静置培養し、7 日後に判定した。

## iii 遺伝子検査

10 %臓器乳剤からRNAを抽出し、ペスチウイルス特異遺伝子を検出するPCR検査を実施した。

## 2 成績

### (1) 病理学的検査

流産は共通して胎齢 5 ~ 7 ヶ月齢で発生し、全例で胸水、腹水の貯留、5 例で全身皮下の膠様浸潤、1 例で奇形 (下顎短小、角膜混濁、四肢の湾曲) と発育遅延が認められた (写真 6)。

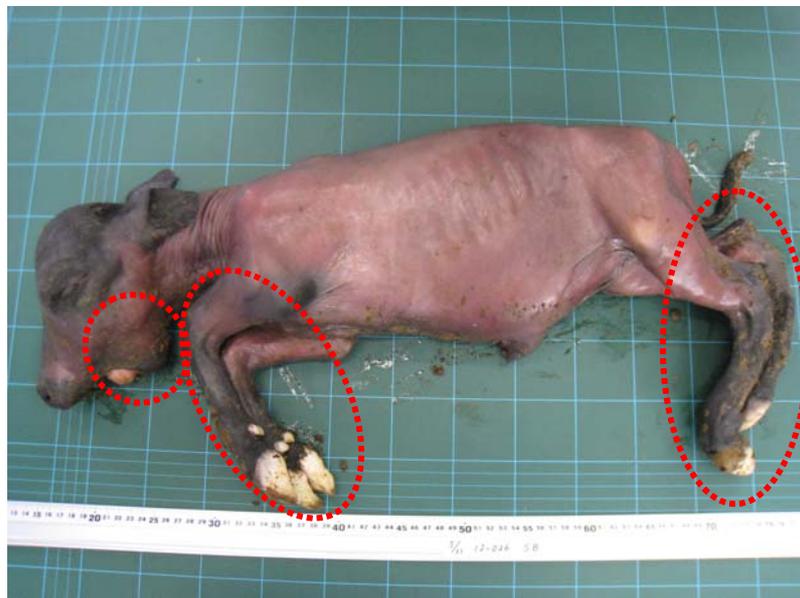


写真 6 奇形が見られた流産胎仔 (症例 6)

### (2) 細菌学的検査

2 例の母牛膈スワブから *Arcanobacterium pyogenes* が分離された。

### (3) ウイルス学的検査

#### ① ウイルス分離

全例でCPEを起こすウイルスは分離されなかった。

### ②中和抗体検査

全ての症例でBVD-MD 1型・2型共に2倍以上の抗体を保有していた。アカバネ病、アインウイルス感染症・イバラキ病・牛流行熱・チュウザン病の抗体価は全て2倍未満だった。

### ③遺伝子検査

以下の流産胎仔臓器及び母牛血清よりペスチウイルス特異遺伝子が検出された。

- ・症例2：肝臓、脾臓、腎臓、肺、脳
- ・症例3～5：肝臓、腎臓、脳、母牛血清
- ・症例6：肝臓、腎臓、脳
- ・症例7：肝臓、母牛血清
- ・症例8：脾臓

以上の結果を表1にまとめた。

表1 検査成績

症例	胎齢 (ヶ月)	体液貯留	膠様浸潤	臓器 PCR	その他
2	6.5	○	○	+	・ <i>A.pyogenes</i> 分離
3	5.0	○	○	+	
4	6.5	○	○	+	
5	6.0	○	—	+	
6	7.0	○	—	+	・ <i>A.pyogenes</i> 分離 ・奇形(下顎短小等)
7	7.0	○	○	+	
8	7.0	○	○	+	

### 中和抗体価の推移

症例1～8の計5戸においてBVDVの感染時期を推定するため、BVD-MD 1型・2型の中和抗体検査を行った。

## 1 材料および方法

### (1) 材料

MD・流産発生後の同居牛の全頭検査に採材した血清及び平成20～24年に採材した保存血清を用いた。

### (2) 方法

MDBK-SY細胞を使用し、マイクロタイター法により37℃、CO<sub>2</sub>下で静置培養した。ウイルス抗原はNOS株、KZ-91株を用い、7日後に判定した。抗体価は1024倍まで測定し、1024倍以上は1024倍、2倍未満は2倍として幾何平均値（GM値）を算出した。

## 2 成績

症例1の農場ではGM値が平成20年は1型5.71、2型3.51であったが平成23年には1型64.0、2型279.17と推移しており、平成20～23年にかけて、2型抗体価の有意な上昇が認められた（図2）。症例2～4の農場では群のGM値が平成22年は1型22.84、2型10.28、平成23年は1型66.51、2型215.27と推移しており、平成22～23年にかけて、2型抗体価の有意な上昇が認められた。また、本農場では育成舎における2型抗体価が高い傾向にあった（図3）。

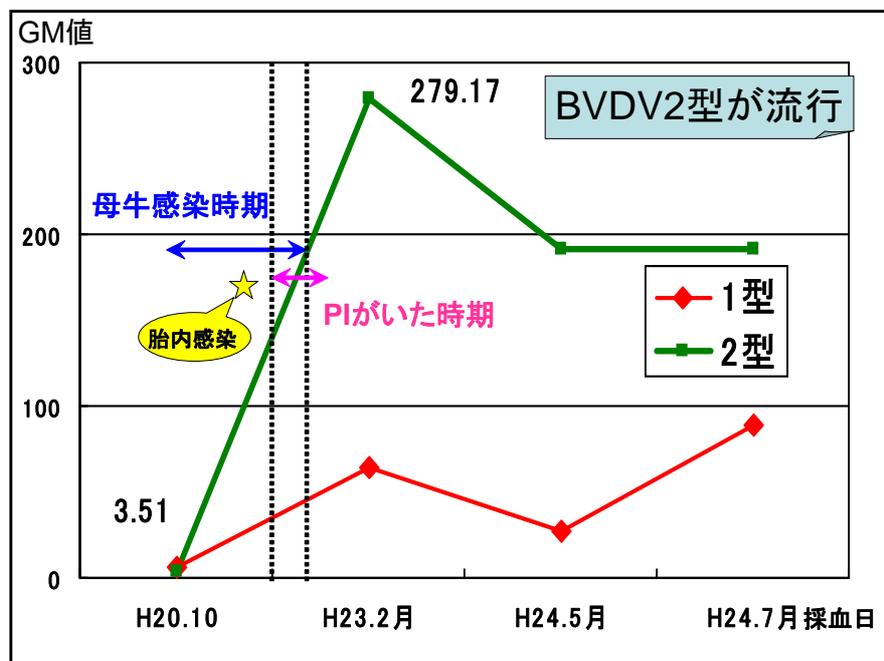


図2 中和抗体価の推移（症例1）

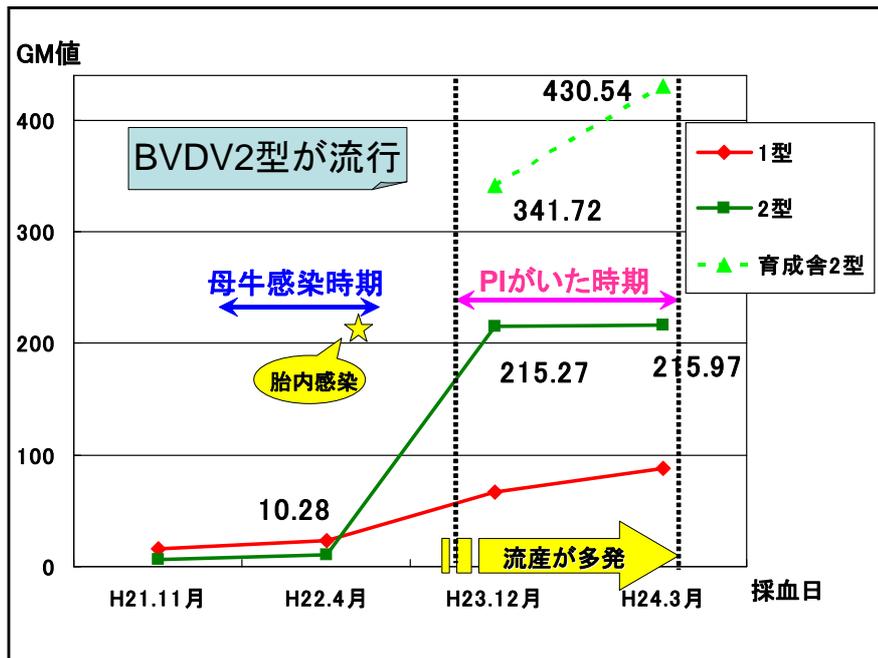


図3 中和抗体価の推移 (症例 2 ~ 4)

また、症例 5 ~ 8 では流産が多発していたとされる時期より以前に 1 型抗体価が高い傾向にあった。

## 考察

### 1 MD 発症例

平成 24 年 3 月の発症時・過去血清よりペスチウイルス特異遺伝子を検出し、各臓器から BVDV 2 型の CP 株が分離されたこと、病理学的検査で MD に特徴的な組織所見が認められたことから<sup>15)</sup>、当該牛は BVDV 2 型よる MD と診断した。PI 牛を産出する胎齢 80 ~ 120 日から換算し平成 21 年 7 月頃に胎内感染し、平成 24 年 3 月に MD を発症したと考えられた。

中和抗体検査では平成 20 ~ 23 年にかけて群で 2 型の流行があったことが推察され、また MD 発症牛は発症前の PI 牛時、平成 22 年 2 ~ 8 月の期間に農場内に滞在していた。本農場は 9 割以上で自家育成を行っており、一部で預託や県内導入している。これらのことから、平成 20 ~ 21 年の期間に農場内に BVDV が侵入し、急性感染・PI 牛の存在を介して BVDV 2 型が拡大したと考えられた。

### 2 流産例

1 例で BVDV 感染による流産に特徴的な奇形が認められた他に特徴的な病理学的所見は得られな

かったが、流産胎仔7例全ての臓器よりペスチウイルス特異遺伝子が検出され、また、2例で *A.pyogenes* が分離されていることから、症例3～5、7・8はBVDV単独による流産、症例2、6は *A.pyogenes* との複合感染による流産と診断した。

症例2～4を産出した農場では平成23年2月より流産が多発しており、流産胎仔からペスチウイルス特異遺伝子が検出されたため、平成24年に全頭検査を実施し、PI牛1頭を摘発した。PI牛を産出する胎齢80～120日から換算し、PI牛は平成22年9月頃に胎内感染したと考えられる。中和抗体検査では平成22～23年にかけて、群で2型の流行があったことが推察され、育成舎で特に高い抗体価を保有していた。松本らはPI牛が存在する農場は牛群の抗体保有率が高く、1型・2型共に移行抗体が消失する時期は約8ヶ月齢であると報告している<sup>9)</sup>。この育成舎では5～27ヶ月齢牛が飼養されていたため8ヶ月齢未満の育成牛が保有していた抗体価を移行抗体とみなし、かつPI牛の抗体価は1型・2型共に2倍未満であったため見かけ上の抗体陰性牛とし、これらを除くと平成23、24年には育成舎の全頭で抗体を保有しており、平成23年度には既に育成舎内で感染が拡大していたと思われた。本農場は自家育成・県外育成預託共に実施しており、PI牛は平成23年3月から平成24年に摘発されるまでの期間、農場内の育成舎で自家育成されていた。これらのことから平成22年に農場内にBVDVが侵入してPI牛を産出し、自家育成を行ったことで育成舎内にBVDVが拡大、成牛舎へ波及したものと推察された。

症例5、6、7、8を産出した3農場では過去に群にBVDV1型の流行があったと推察されるが、流産が多発したとされる時期には群の抗体価が低い傾向にあり、群としての流行は認められなかった。これら3戸の農場は自家育成・県外預託や導入を実施している等様々な形態を取っており、これら流産は外部からの侵入または過去の流行により、群に存在していたBVDVにより散発的に発生したと推察された。

## 今後の対策

全国におけるBVD-MD発生件数は平成13年以降年間100頭以上であり、この多くは臨床症状を示し摘発されたPI牛やMD発症牛である。しかし無症状のPI牛、急性感染による流産や下痢症による被害を考えると、この発生件数はBVDV感染による被害の一部に過ぎない。また、近年はBVD-MDに対する意識の向上により、多くの県で清浄化に向けた取り組みが開始されており摘発件数も増加傾向にある。これら取り組みではスポットテストやバルク乳からの遺伝子検査法等のスクリーニング検査を用いてPI牛を摘発した例が数多く報告されている<sup>4)5)10)11)</sup>。

過去、湘南地域で実施した抗体保有状況調査においては、①地域全域にわたりBVDV 1型・2型が浸潤している、②1型・2型の浸潤率に差は認められない、③移動歴のある牛がBVDVを侵入させている可能性がある、④移動歴の少ない一部農場でも高率にBVDVが浸潤しているとされている<sup>8)</sup>。本症例においても数例は自家育成で移動が殆ど見られない農場での発生であり、全戸でBVDVの流行を確認している。本県では多くの農場で県外導入・育成預託を実施しており、本症例以外にもBVDV感染による被害が拡大していると推察され、本県においても被害拡大防止に向けた取り組みを行う必要があると考える。そのためには、①スポットテストやバルク乳からの遺伝子検査といった簡便で効果的なスクリーニング検査によるPI牛の摘発、②導入牛・下牧牛のBVDV検査による農場内へのウイルス侵入防止、③適切なワクチン接種の利用等により、ウイルスの侵入及び蔓延を防止する対策を講じていく必要がある。

#### 引用文献

- 1) 明石博臣：日生研たより,58巻,2号,16-24(2012)
- 2) 桐沢力雄ら：J.Rakuno Gakuen Univ,19(1),225-237(1994)
- 3) 清水高正ら：牛病学（第二版）,201-205
- 4) 関慶久ら：平成18年度岩手県獣医畜産業績発表会集録18番(2007)
- 5) 田島誉士：家畜診療,56巻12号,707-712(2009)
- 6) 田島誉士：日獣会誌,65巻,111-117(2012)
- 7) 長井誠：JVM,vol54,No.12,977-979(2001)
- 8) 松本哲ら：平成21年度神奈川県家畜保健衛生業績発表会集録5番(2010)
- 9) 松本哲ら：平成22年度神奈川県家畜保健衛生業績発表会集録9番(2011)
- 10) 三宅百合子ら：第42回兵庫県家畜保健衛生業績発表会集録4番(2007)
- 11) 安富一郎：家畜診療、52巻4号231-241(2005)
- 12) Toru KANNO et al:J.Vet.Med.Sci.71(1):83-86(2009)
- 13) Harpin S,Elahi SM,Cornaglia E,et al：Arch Virol,140,1285-1290(1995)
- 14) Vilcek S,Herring AJ,Herring JA,et al：Arch Virol,136,309-323(1994)
- 15) 病性鑑定指針：平成20年6月2日付農林水産省消費・安全局通知