

牛伝染性鼻気管炎の病性鑑定事例

県央家畜保健衛生所

高山 環 池田 知美
英 俊征 後藤 裕克
井澤 清 吉田 昌司

緒言

牛伝染性鼻気管炎（以下、IBR）は、ヘルペスウイルス科アルファヘルペスウイルス亜科に属する牛ヘルペスウイルス1型（以下、BHV-1）による呼吸器症状、結膜炎、膣炎、流産及び腸炎といった多様な病態を起こす疾病である。また、他のヘルペスウイルスと同様に神経節に潜伏感染して生涯感染し続け、感染耐過牛は同居牛への感染源となる。そのため防疫が困難であり、経済上重要な疾病のひとつとして国際獣疫事務局（OIE）疾病リストに分類され、国内では届出伝染病に指定されている¹⁾⁵⁾⁹⁾¹¹⁾。

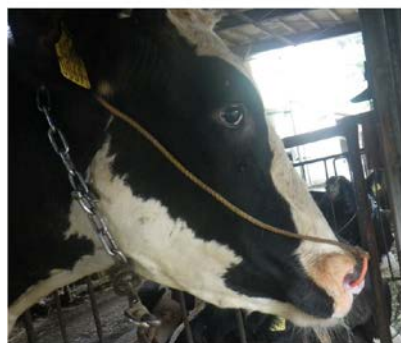
IBRは平成10年代前半に全国的な集団発生を認めたが、近年では散発的な発生が多く数戸数頭での届出が殆どである。今回、県内で8年ぶりとなるIBRの発生があったのでその病性鑑定事例について報告する。

発生農場の概要と経過

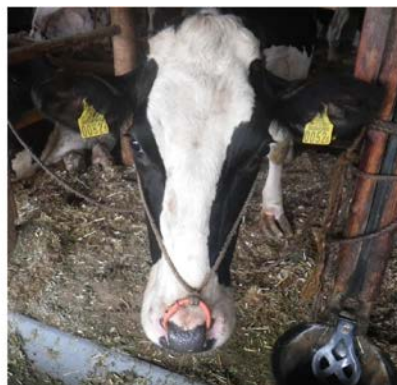
農場は乳用牛41頭（成牛35頭、育成牛4頭、子牛2頭）を飼養する酪農家で、飼養形態は対頭・対尻式ストール、自家産・自家育成を主体とする。平成27年6月下旬、成牛（45ヶ月齢）で発熱、鼻汁、流涎及び呼吸速迫の症状を認め抗生物質と補液による治療を行っていたが反応しないため、家保へ検診依頼があった。7月2日の検診時には計4頭（45～76ヶ月齢、No.1～4）（写真1）で同様の症状を認め、うち2頭が重篤な肺炎症状を起こしていた。症状は4頭のみで確認され、農場内で拡大する傾向はなく、発症牛近辺の子牛・育成牛にも症状は認められなかった。4頭は全て自家産、自家育成で呼吸器病ワクチンの接種歴はない。

当初、発症頭数が少なく症状が比較的軽度であったことから、牛RSウイルス病や牛マイコプラズ

マ肺炎の関与を疑い病性鑑定を実施した。



No.1(45ヶ月齢)



No.2(58ヶ月齢)

写真 1. 発症牛の様子

材料と方法

1 供試材料

発症牛 3 頭 (No.2~4) の鼻腔スワブを供試した。

2 被検材料

(1) ウイルス学的検査

ア 分離培養

MDBK-SY 細胞を用い 10%FBS 加 MEM、5%CO₂、37℃の条件下で 7 日間培養を 2 代継代した。ウイルスの同定は、CPE を呈した MDBK-SY 細胞に抗 BHV-1 血清を用いた直接蛍光抗体法 (FA) 及び培養上清の PCR 検査により行った。

イ 抗原検出キット (免疫クロマトグラフ法)

RS ウイルス

ウ PCR 検査及び RT-PCR 検査

牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV)¹⁷⁾、牛 RS ウイルス (BRV)¹⁶⁾、牛アデノウイルス (BAV)³⁾、牛コロナウイルス (BCV)¹²⁾、牛パラインフルエンザウイルス 3 型 (PI3)⁷⁾、

牛ヘルペスウイルス 1 型 (BHV-1) ¹⁵⁾ について各ウイルス特異遺伝子を標的に PCR 検査及び RT-PCR 検査を行った (表 1)。

表 1. PCR 検査及び RT-PCR 検査

	標的遺伝子
牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV)	5' NCR/N ^{pro}
牛RSウイルス (BRSV)	G蛋白
牛アデノウイルス (BAV)	Hexon領域
牛コロナウイルス (BCV)	核蛋白
牛パラインフルエンザウイルス3型 (PI3V)	P蛋白
牛ヘルペスウイルス1型	gC領域

(2) 細菌学的検査

ア 分離培養

β-NAD 加めん羊血液寒天培地及び DHL 寒天培地を用い、37°C、48 時間の好気・微好気培養を行った。

イ PCR 検査

Hayflick 培地及び BHL 培地で増菌後、*Mycoplasma bovis*、*M.bovigenitalium* の各 16SrRNA、*M.disper* の特異 DNA 断片を標的に PCR 検査を行った。

結果

1 ウイルス学的検査

分離培養では No.2、3 で 1 代目 3 日目にヘルペスウイルスに特有の CPE を呈し、FA により BHV-1 と同定した。(図 1a) また、培養上清から BHV-1 特異遺伝子が検出された。

PCR 検査では No.2~4 の鼻腔スワブから BHV-1 特異遺伝子が検出された (図 1b)。RSV 抗原検出キットは全て陰性であり、BVDV、BAV、BCV、PI3V の PCR 検査についても全て陰性であった。

2 細菌学的検査

No.2 から *Bibersteinia (Pasteurella) trehalosi* が分離され、No.3 からは *M.disper* の特異 DNA 断片が検出された。

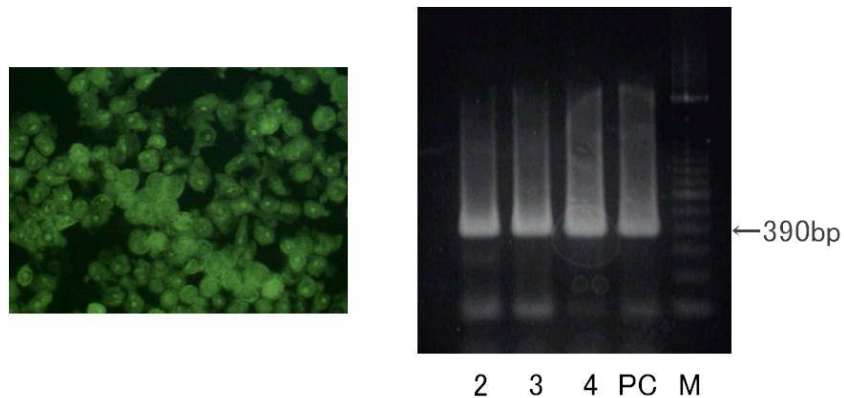


図 1a. MDBK-SY 細胞の BHV-1 FA 像 図 1b. BHV-1 PCR アガロースゲル電気泳動像

抗体検査

1 供試材料

発症牛 4 頭 (No.1~4) の前後血清 (採材日 : 7 月 2 日、7 月 16 日)、周辺牛 4 頭 (No.5~8) の血清 (採材日 : 7 月 16 日) の計 12 検体を供試した。

2 検査方法

BVDV1・2、BRSV、PI3V、BHV-1 について、MDBK-SY 細胞を用いた中和試験をマイクロタイター法により行い (37℃、CO₂ 条件下で静置培養)、7 日後に判定した。BCV については鶏血球を用いた赤血球凝集抑制 (HI) 試験を行った (表 2)。

表 2. 抗体検査

中和抗体試験	
使用細胞	MDBK-SY細胞
抗原	BVDV1・2 : NOSE株・KZ-91株
	BRSV : NM株
	PI3V : BN1-1株
	BHV-1 : Los Angeles株、分離株
HI試験	
鶏血球	
抗原	BCV : 掛川株

3 成績

各抗原に対する No.1~8 の抗体価を表 3 に示した。

発症牛 No.1、2、4 で BHV-1 の Los Angeles (LA) 株、分離株に対し抗体価の有意な上昇を認め、周辺牛 No.5~8 では LA 株で 2 倍未満から 8 倍、分離株で 4 倍から 32 倍の抗体を保有していた。その他、1 頭で BVDV1 型及び 7 頭で BCoV、PI3V の抗体を保有していた。

表 3. 抗体検査結果

左:7/2採血、右:7/16採血

No.	BHV-1 (LA株)		BHV-1 (分離株)		BVD 1型		BVD 2型		BRSV		BCoV		PI3V	
	1	2	64	NT	128	<2	<2	<2	<2	<2	2	NT	320	NT
2	<2	32	<2	128	<2	<2	<2	<2	2	2	160	80	128	64
3	2	4	8	16	<2	<2	<2	<2	<2	<2	80	80	64	32
4	16	256	64	256	<2	<2	<2	<2	2	<2	640	320	128	128
5	NT	<2	NT	8	NT	<2	NT	<2	NT	<2	NT	80	NT	128
6	NT	2	NT	4	NT	<2	NT	<2	NT	<2	NT	80	NT	64
7	NT	8	NT	32	NT	512	NT	<2	NT	<2	NT	40	NT	128
8	NT	4	NT	32	NT	<2	NT	<2	NT	<2	NT	<10	NT	<2

(×倍)

結果まとめ及び診断

各検査成績をまとめ、表 4 に示した。

分離培養では No.2、3 から BHV-1 が分離され、No.2~4 から BHV-1 特異遺伝子が検出された。また、No.1、2、4 で有意に抗体価が上昇していた。また、発症牛 4 頭のうち臨床症状が重篤だった No.2、3 からはそれぞれ、*B.trehalosi* 及び *M.disper* が検出された。

臨床症状及び以上の検査結果より総合的に判断し、本症例を IBR と診断した。

表 4. 各検査結果

	ウイルス学的検査			細菌学的検査	臨床症状
	分離培養	PCR BHV-1	抗体検査 BHV-1		
No. 1	NT	NT	↑	NT	鼻汁、呼吸速迫、 肺音粗励、重篤、治療中
No. 2	+ BHV-1	+	↑	<i>B. trehalosi</i>	鼻汁、流涎、呼吸速迫、 肺音無、最も重篤
No. 3	+ BHV-1	+	-	<i>M. dispar</i>	呼吸速迫、肺雑音 重篤、初診時は回復傾向
No. 4	-	+	↑	-	鼻汁、呼吸速迫 初診時は回復傾向

ウイルス全長ゲノムの制限酵素切断パターン比較

分離された BHV-1 について分子疫学的考察を行うため、BHV-1 亜型 1（以下 BHV-1.1）の代表株である LA 株及び県内で過去に分離された株との制限酵素切断パターンについて比較を行った。

1 供試材料

今回分離株 1 検体、LA 株 1 検体、1995 年から 2007 年に県内で過去に分離された株 6 検体の計 8 検体を供試した。過去分離株はいずれも集団発生を起こし、呼吸器症状、結膜炎及び死亡を認めた典型的症例である 6 症例からの分離株を選出した。

2 検査方法

(1) ウイルス DNA 試料

25cm²培養フラスコの MDBK-SY 細胞に各分離株及び LA 株を接種し、100% CPE を確認した時点で PBS(-) 10ml で細胞を回収した。回収した細胞は遠心洗浄（1,000rpm・5 分）を 2 回行い、2.0ml TE Buffer（10mM Tris-HCL, 1mM EDTA, pH8.0）に浮遊して凍結保存した。凍結保存した細胞浮遊 TE Buffer 500 μl を 0.5mg/ml プロテナーゼ溶液と 1% SDS で可溶後（37℃・6 時間）、フェノール：クロロホルムで 3 回抽出し、-80℃・1 夜のエタノール沈殿後の沈渣を TE Buffer 50 μl

に溶解して、DNA 試料とした⁴⁾⁶⁾⁸⁾。

(2) 制限酵素による切断

制限酵素は、ワクチン株との識別及び亜型判別に用いられる *Hind*III、*Pst* I 及び分離株の切断パターン分析に用いられる酵素のうち *Pvu* I、*Pvu* II の 4 種類を使用した⁴⁾⁶⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾。消化は DNA 試料 10.0 μ l、各制限酵素調整液 10.0 μ l を混合し、37°C・3 時間で行った。

(1) 電気泳動

エチジウムブロマイド加 0.6%アガロースゲルを用い、サブマリン泳動槽により 80V・5 時間の泳動を行った。

3 成績

*Hind*III、*Pst* I、*Pvu* I、*Pvu* II による DNA 消化物の電気泳動像を図 2 に示した。4 種類の酵素において全ての株で同様の切断パターンを示した。また、*Hind*III 及び *Pst* I による切断で LA 株と今回分離株が同様の切断パターンを示したことから、今回分離株は野外株であり、BHV-1.1 に分類された。

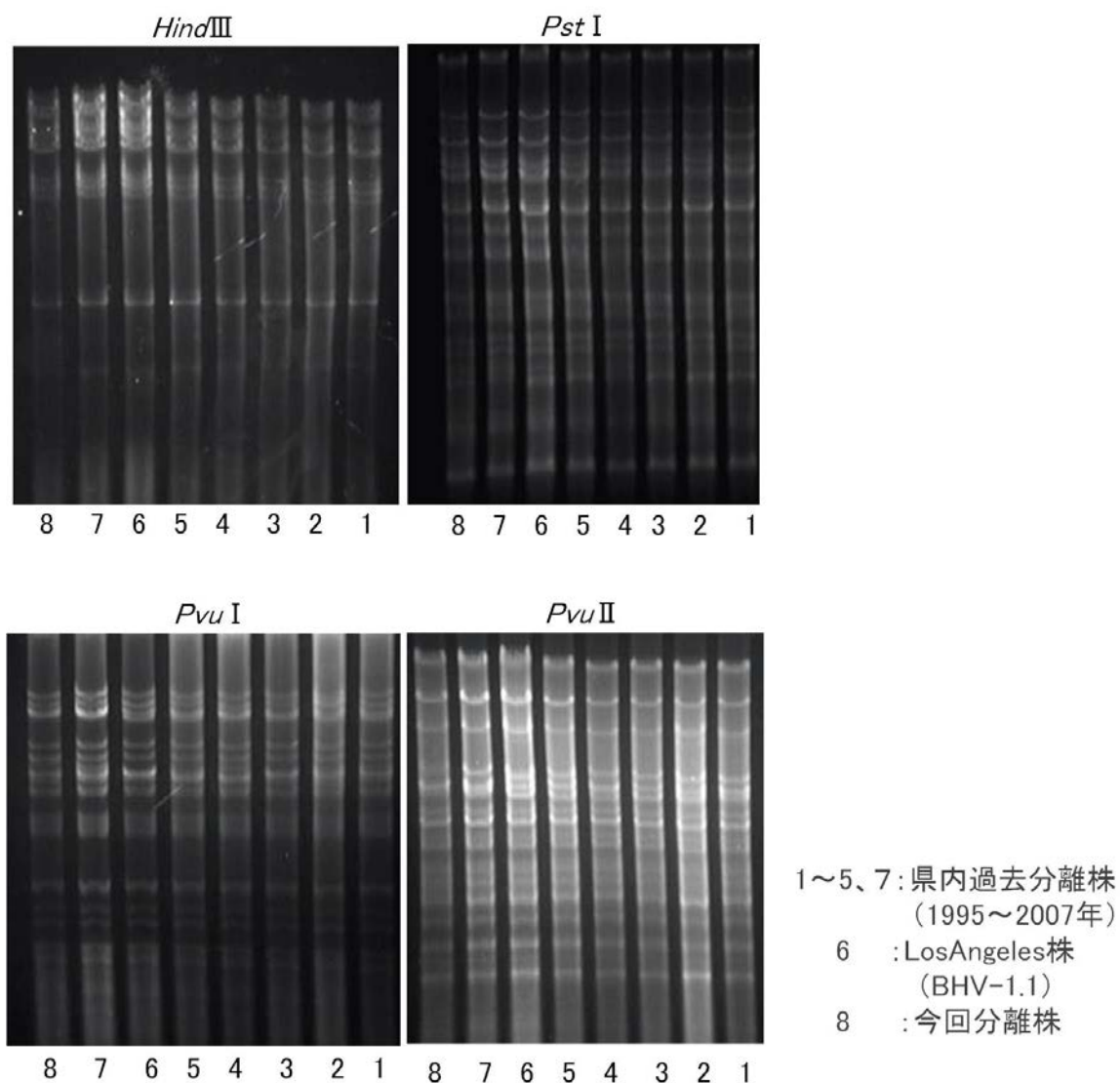


図2. 各制限酵素による DNA 消化物の電気泳動像

考察

疫学情報より、当該農場は自家産・自家育成を主体としており直近に牛の導入はなく、発症した4頭も自家産・自家育成で過去の移動歴はない。加えて、周辺農場でIBRを含めた呼吸器疾患の発生は確認されていないことから、外部からの原因ウイルス侵入により、今回の発生に至った可能性は低いと考えられる。

本症例では、成牛4頭のみで症状を確認し農場内での拡大は認められず、発症牛近辺にいた周辺牛4頭のBHV-1中和抗体価が2倍未満から32倍と低い傾向にあったことから、発症牛からのウイルス排泄量は少なかったと推察された。また、症状は比較的軽微であり、IBRの急性型において典型的症

状とされる酷い咳、喘鳴、流涙、結膜炎等の呼吸器症状や流産等の生殖器症状は認められなかった。重い肺炎症状を示した2頭については、No.2から*B.trehalosi*の分離と、No.3からは*M. disper*の特異DNA断片の検出があり、二次感染により症状が悪化したものと考えられる。

ウイルス全長ゲノムの制限酵素切断パターン比較は、従来から野外株とワクチン株との区別や、亜型分類（BHV-1.1：呼吸器型〈IBR〉、BHV-1.2：生殖器型〈IPV〉）を行うための診断技術として利用されてきた方法である²⁾⁶⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾。この方法により、今回分離株は野外株のBHV-1.1に分類され、また、4種類の制限酵素による切断パターンにおいて、典型的症例である過去分離株との差異は殆ど認められなかったことから、今回分離株は過去分離株と同様の系統のBHV-1であることが示唆された。

これらのことから本症例は、農場内に過去IBRに感染したBHV-1の潜伏感染牛がおり、何らかのストレスを原因に再帰帰し、感染源となった可能性もあると考えられた。

IBRの回帰発症は、初感染時と同様の呼吸器症状や生殖器症状を呈するものの、特徴的な突発性高熱を呈さなかったり症状が軽微であることから初感染と区別ができる一方で、発生が見逃され被害が拡大することがある¹¹⁾¹⁴⁾。そのため本症例のように特徴的な症状を示さず、感染拡大が認められない場合であっても類症鑑別にIBRを含めて病性鑑定を行うことが重要と考えられた。

また、感染耐過牛は生涯にわたりBHV-1に感染し同居牛への感染源となる。そのため、発生農場では①被害の拡大を最小限に抑えるため定期的なワクチン接種により発症予防を行い排泄ウイルス量の軽減を図ること、②更なる感染源を増やさないために牛を導入する際にはIBR非発生農場から行うこと、③感染源を除去するために感染牛の摘発淘汰を行うことを平行して行うことが重要であると考えられる。

引用文献

- 1)病性鑑定指針 平成20年6月2日付消安第880号農林水産省消費安全局通知,13-18
- 2)Bruce S:J.gen.Virol.Vol.66,2787-2792 (1985)
- 3)Carlos:Appl Environ Microbiol,Vol.70 (2004)
- 4)Claude HAMELIN et al.Jpn.Vet.Sci.52 (3) ,461-467 (1990)
- 5)David O.White,Frank J.Fenner : 医学ウイルス学 (第四版) ,173-174,近代出版 (1996)
- 6)Eiichi HONDA :Jpn.J.Vet.Sci,Vol.51 (6) ,1143-1149,1989
- 7)Kirisawa:J.rakuno Gakuen Univ (1944)

- 8)Nobutaka Suzuki et al:Microbiol Immunol,Vol.25 (12) ,1291-1301 (1981)
- 9)Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2015,CHAPTER2.4.13. ,Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2010
- 10)Motohiro HORIUCHI: J.Vet.Sci,Vol.5, (3) ,577-580,1995
- 11)岡崎克則 : 臨床獣医,Vo.8,No.3 (1990)
- 12)Tsunemitsu:Arch virol,Vol.144 (1999)
- 14)Sashi B.Mohanty,Sukanta K.Dutta : 獣医ウイルス学 (初版) 、83-91、文永堂 (1982)
- 15)Schynts:Vet Micro,Vol.66 (1999)
- 16)Valarcher:J virol,Vol.74 (2000)
- 17)Vilcek:Arch virol,Vol.136 (1994)