

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380169

研究課題名(和文)牛ウイルス性下痢ウイルスの牛群汚染様式に関する疫学的・免疫学的解明

研究課題名(英文)Epidemiological and immunological analyzes of spread manner of bovine viral diarrhea virus in the herd

研究代表者

田島 誉士(TAJIMA, Motoshi)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号：90202168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円、(間接経費) 3,960,000円

研究成果の概要(和文)：牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)による牛群汚染様式を解明するため、バルク乳検査によって陽性となった農家と陰性であった農家を無作為に抽出して比較解析した。農家の立地と発生状況に統計学的な因果関係が見出されたが、ウイルス遺伝学的には関連性が見出されなかった。発生農家の飼養牛の免疫学的解析において、BVDVは卵胞液に局在する傾向が強いこと、子宮内感染を容易にする免疫学的バイアスをBVDVが誘導している可能性が高いことが疑われた。

研究成果の概要(英文)：In order to estimate the spread manner of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in and among the dairy herd, epidemiological and immunological analyzes were done for the BVDV detected and free herd discriminated by the bulk tank milk tests. Although the correlation between the geographical place of farm and outbreak of BVDV was recognized, prevalent viruses were not common based on the genetical analysis of the detected virus gene. On the immunological analyzes, BVDV might prefer to localize in ovary fluid in the infected cattle. Moreover, it was strongly suspected that BVDV might bias the immune status of infected cattle for the easy transmission of virus in uterus.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、臨床獣医学

キーワード：牛ウイルス性下痢ウイルス BVDV 持続感染牛 PI 胎子感染 サイトカイン プロファイル 防疫対策

1. 研究開始当初の背景

牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) 感染症は世界各地で流行し、生産獣医領域における対策の重要性が認識されつつある疾病である。子宮内感染によって BVDV に免疫寛容状態で娩出された持続感染(PI)牛は、牛群内の汚染源として流行の重要な役割を担っている。PI 牛は無症状で経過することが多く、さらに臨床症状も多様であることから、日常診療における症状に基づく本症の摘発は容易ではない。BVDV の一過性感染は牛に一時的な免疫抑制状態を誘起し、牛群の感染症に対する抵抗性を低下させている可能性がある。これらが、本感染症の防疫対策を複雑かつ困難なものとし、畜産経営における経済的被害の拡大をもたらしている。したがって、より効果的な BVDV 予防法を確立することは、生産獣医療における重要課題の一つである。BVDV は日本にも常在しており、牛の移動、畜産関係者の出入り、畜産物の流通などによる伝播が指摘されている。さらに、BVDV は野生反芻獣をも宿主としていることから、牛群への侵入門戸は多いと考えられ、その経路も含めて不明な点が多い。侵入伝播経路を含めた感染成立機序を解明することは、症状のみによって摘発が困難な感染症の場合には重要な課題である。欧米を含めた諸外国において、本症に関する対策は永年にわたり国家規模でなされている。日本においても、PI 牛の存在が牛群の疾病発生率に影響を及ぼしている可能性も認められる。さらに、国際間で農畜産物の流通が盛んになっている現在、感染症対策の遅れは国際社会における日本の畜産物貿易の障害の一つになりうる。本研究によって得られる結果は、国内における BVDV 予防法の確立のみならず、諸外国における対策法と比較することによって、我が国における生産獣医療に寄与するばかりでなく国際的防疫対策確立のための基礎データとしても貴重なものとなる。

2. 研究の目的

本研究においては、BVDV の牛群への侵入経路解明によって流行の危険因子を特定して、より効果的な BVDV 予防法を確立し、生産性の向上をめざす。

- (1) 日本の乳牛の半数以上が飼養されている北海道の酪農地帯を対象にしてバルク乳を用いた BVDV 検査を実施し、BVDV 汚染牛群と非汚染牛群とを識別する。
- (2) 汚染牛群内の PI 牛を特定して、その個体の感染経路を調査するとともに、疫学情報を収集し危険因子を分析する。
- (3) 摘発された PI 牛体内のウイルス分布を比較し、免疫担当細胞の発現程度を解析することによって、PI 成立機序を解明する。

- (4) BVDV 汚染牛群における同居牛の急性感染による影響を評価するため、同居牛の末梢血白血球を用いて免疫能を分析する。

これらの検討から、PI 成立機序を免疫学的に解明することによって、PI 牛発生阻止のために有効な免疫賦与法を確立できる。また、急性感染における免疫応答能の評価結果は、汚染牛群における同居牛の予後判定に際しての、貴重な判断材料とすることができる。

3. 研究の方法

バルク乳検査を利用して、牛群への BVDV 浸潤状況を調査する。その結果に基づき汚染牛群を特定し、汚染牛群内の PI 牛を摘発する。その PI 牛体内のウイルス分布状況を調べ、局所における免疫細胞の機能との関係を分析する。急性感染における牛の免疫応答能を、サイトカインプロファイリングによって比較検討する

(1)牛群への BVDV 浸潤状況調査

北海道内の酪農家を対象として、BVDV 浸潤状況を調査する。出荷直前のバルク乳約 500ml を採材し、それぞれの体細胞を回収して全 RNA を回収する。逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法によって、RNA ウィルスである BVDV の特異的遺伝子断片の有無を検査する。バルク乳で陽性となった農家を対象に、子牛、育成牛、未経産牛などの非泌乳牛を含む全頭検査を、血清を用いた RT-PCR 法によって実施する。ウイルス遺伝子検出によって陽性個体を特定し、PI を摘発する。PI 牛および PI 牛摘発農家に関する疫学情報を畜主、農家担当獣医師、あるいは農協から得て、ウイルス侵入門戸を推定するとともに、牛群が被った影響を評価する。

(2)PI 牛体内のウイルス分布と免疫応答

摘発された PI 牛体内における BVDV の分布状況を定量的 PCR によって検索するとともに、同部位におけるサイトカイン発現量も定量する。特に卵胞液および卵巣におけるウイルス量とサイトカイン発現量の解析によって、PI 発生機序に関連が深いと考えられる因子の抽出を試みる。

(3)急性感染が及ぼす影響

陽性農家での PI 牛との同居牛について、末梢血中のサイトカインプロファイルを解析する。それに基づき、PI 産生や急性感染に際して影響を受けていると思われるサイトカイン種を選定する。

4. 研究成果

(1) 牛群への BVDV 浸潤状況調査

BVDV 浸潤状況を毎年約二千戸のバルク乳検査を継続することによって調査し、汚染牛群と清浄牛群を選別した。バルク乳検査で陽

性となった農家を対象に、子牛、育成牛、未経産牛などの非泌乳牛を含む全頭検査を、血清を用いた RT-PCR 法によって実施した。ワクチン接種状況、飼養牛導入の有無、公共牧野使用歴および放牧時期、飼養形態および規模、などの情報を畜主、農家担当獣医師、あるいは農協から得て、ウイルス侵入門戸の推定を試みるとともに、摘発農家の地理的位置関係を解析した。発生農家の立地に統計学的に因果関係が認められたが、分離ウイルスの遺伝子の比較では、同一感染源を疑わせる塩基配列の相同生は確認されなかった。また、すべての地域に共通する危険因子として、導入牛が抽出された。

これまで実施してきている地域単位でのバルク乳検査を、1年ごとから6ヶ月ごとに短縮したところ、より効率的な清浄化対策となることが示されたが、地域によって汚染状況がさまざまであり、侵入経路の特定は可能であった。

また、摘発された PI 牛が子宮内感染を受けた時期を限定し、その時期に母牛が飼養されていた場所を特定した。その場所と母牛の出生地を地図上にプロットすると、図1のようになった。子宮内感染を受けた地域に偏りがあり、当該地域に潜在的に PI 牛が飼養されていることが強く疑われた。すなわち、重点監視地域の選別は可能であることが示唆され、今後も継続的に検査する必要性が示された。

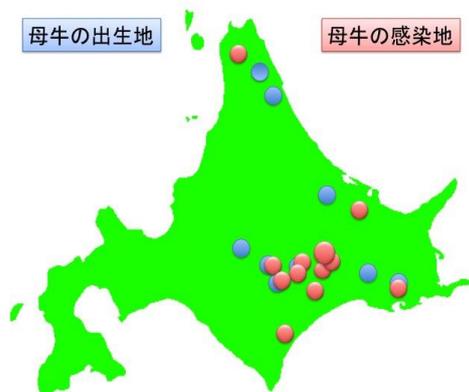


図1. BVDV 持続感染(PI)牛発生地分布
摘発された PI 牛の母牛の出生地と感染地を示す。感染血は特定の地域に偏っていることが示唆された。

(2) PI 牛体内のウイルス分布

PI 牛は子宮内感染により出生するが、垂直感染の詳細な機序は明らかとなっていない。そこで、本研究では PI 牛において卵胞液、血清および白血球中のウイルスを定量し、卵子や胚への直接感染の可能性、繁殖障害に及ぼす影響、有効な BVDV 対策を考察した。

摘発された PI 牛 12 頭について、それらの血清、白血球および卵胞液中のウイルス量を定量 RT-PCR 法を用いて BVDV 遺伝子コピー数

を基に算出した。単位体積あたりのウイルス RNA 量で比較すると、図 2 に示すとおり卵胞液中のウイルス RNA 量は血清および白血球中のそれより有意に多かった。

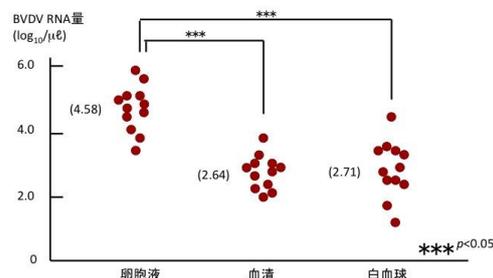


図2. PI 牛の卵胞液、血清および白血球中のウイルス量の比較
卵胞液中のウイルス量が血清や白血球より有意に多かった。

また、血中と卵胞液中のウイルス RNA 量との間に有意な相関が認められなかったことから、血中のウイルス RNA 量に依存することなく卵胞液にウイルスが多く分布することが判明した。各 PI 牛体内でウイルス分布を比較すると、12 頭中 11 頭で卵胞液中のウイルス量が最も多かった。BVDV 遺伝子亜型の違い、年齢、産歴、臨床症状によるウイルス分布の程度の差は認められなかったことから、常に卵胞液中に多量のウイルスが存在することが判明した。

以上の結果から、ウイルスは卵胞液中に多量に存在し、卵子や胚への直接感染や繁殖障害に何らかの影響を与えていることが示された。また、急性感染や生ワクチン接種の際に、ウイルスが血中から排除された後も、卵胞内で残存する可能性があり、長期にわたって繁殖障害に影響を及ぼしている可能性も示唆された。このことは BVDV 対策に影響を及ぼすため、定期的な牛群および出生牛のスクリーニング検査の重要性が示された。

(3) 急性感染時の免疫応答と PI 産生の関係

PI 牛高率自然発生牛群(高発生牛群)における母牛の免疫状態を解析した。PI 牛産生に関与するとされている C-X-C ケモカイン受容体 4 型(CXCR4)およびインターロイキン 4(IL-4)、IL-6、IL-10、IL-12p40、インターフェロン α(IFN-α)、IFN-γ、トランスフォーミング増殖因子 β(TGF-β)などのサイトカイン遺伝子発現量を定量した。高発生牛群内の PI 子牛を産出した母牛と正常子牛の母牛との間に、CXCR4 およびサイトカインの遺伝子発現量に有意差は認められなかった。PI 牛は摘発されたが 1 頭のみであった牛群(低発生牛群)および PI 牛が摘発されなかった牛群(フリー牛群)の牛と比較すると、発生率の高低に関係なく PI 牛発生牛群では、CXCR4 の

遺伝子発現量は有意に低かった。高発生牛群とフリー牛群においては、IL-10 の遺伝子発現量が低発生牛群より有意に高かった。高発生牛群とフリー牛群は、サイトカインプロファイルはほぼ同様であった。以上をまとめると、図 3 のとおりである。

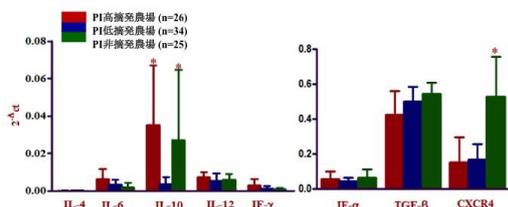


図 3 牛群ごとのサイトカインプロファイルおよび CXCR4 の比較

高発生牛群内の PI 子牛を産出した母牛と正常子牛を産出した母牛との間に、CXCR4 発現量の有意差は認められなかった。しかしながら、フリー牛群の牛と比較すると、発生牛群の牛の CXCR4 発現量は有意に低かった。これは、発生牛群で飼養されている牛は PI を産出する危険性を有していることを示唆している。サイトカインプロファイルでは、高発生牛群の方が低発生牛群より IL-10 発現量が有意に高かった。この免疫状態の違いが、PI 子牛発生率の違いに何らかの影響を及ぼしていることが考えられた。すなわち、PI 牛発生牛群において、CXCR4 の発現率が低く IL-10 の発現量が高い牛群では、PI 子牛が産出されてくる危険性が高いと推測できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

- ① 田島 誉士: 知らぬ間に被害を及ぼす伝染病を防ぐには-牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) 感染症. 酪農ジャーナル 10 月号; 32-34, 2013. 査読無し
- ② 齋野仁、臼井章、大野浩、川内京子、迫田義博、田島 誉士: 牛ウイルス性下痢ウイルス感染症の地域的な対策事例と効果の検証. 日獣会誌 66(11); 791-796, 2013. 査読有り
- ③ Helal, M.A.Y., Hoshino, Y., Takagi, S. & Tajima, M.: C-X-C chemokine receptor type 4 and cytokine expressions in cows of a dairy herd with high prevalence of calves persistently infected with bovine viral diarrhea virus. Jpn. J. Vet. Res. 61(3); 109-116, 2013 査読有
- ④ Kohara, J., Nishikura, Y., Konnai, S., Tajima,

M. & Onuma, M.: Effects of interferon-t on cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. Jpn. J. Vet. Res. 60; 63-70, 2012. 査読有

- ⑤ 田島 誉士: 牛の内科実習- 牛ウイルス性下痢ウイルス感染症対策. 臨床獣医 30(6); 59-62, 2012. 査読無し
 - ⑥ Helal, M.A.Y., Okamatsu, H. & Tajima, M.: Bovine viral diarrhea virus infection in a dairy herd with high prevalence of persistently infected calves. Jpn. J. Vet. Res. 60; 111-117, 2012 査読有
 - ⑦ 田島 誉士: 牛ウイルス性下痢ウイルス感染症. 日獣会誌 65(2); 111-117, 2012. 査読有り
 - ⑧ 加藤肇、江村有希子、澤向陽一、佐藤洋平、西松栄光、佐藤礼一郎、大西守、田島 誉士: Two-step vaccine program の牛ウイルス性下痢ウイルス 2 型に対する有用性評価. 日獣会誌 64(6); 453-456, 2011. 査読有
 - ⑨ 田島 誉士: 牛の内科実習- 牛ウイルス性下痢・粘膜病 (BVD-MD). 臨床獣医 29(6); 45-49, 2011. 査読無し
 - ⑩ 田島 誉士: PI 牛の発生を抑える効果的ワクチンはない-シリーズ バイオセキュリティを見直す. デーリィマン 61(8); 30-31, 2011. 査読無し
 - ⑪ Kadohira, M. and Tajima, M.: A case control study of bovine viral diarrhea virus (BVDV) persistent infection (PI) in Betsukai of Hokkaido, Japan. J. Vet. Med. Sci. 72, 635-638, 2010. 査読有
 - ⑫ 加藤 肇・田島 誉士: 牛ウイルス性下痢ウイルスと繁殖障害. 家畜診療 57(11); 689-691, 2010. 査読有り
 - ⑬ 加藤肇、一條祐一、江村有紀子、佐藤礼一郎、高久英徳、田島 誉士: 牛ウイルス性下痢ウイルスワクチンによる中和抗体価維持期間に関する調査. 日獣会誌 63; 33-37, 2010. 査読有
- [学会発表] (計 5 件)
- ① 佐々木良輔、田島 誉士: 北海道産妊娠牛による牛ウイルス性下痢ウイルス伝播の実態. 平成 25 年度獣医学術地区学会 (北海道)、産業動物獣医学会, 2013 年 9 月 7 日、帯広畜産大学 (北海道帯広市)
 - ② 小倉有美子、田島 誉士: 牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛における卵胞液へのウイルス分布. 平成 24 年度獣医学術地区学会 (北海道)、産業動物獣医学会, 2012 年 9 月 6 日、酪農学園大学 (北海道江別市)
 - ③ Tajima, M. & Helal, M.: Bulk tank milk test for surveillance of persistently infected cattle with bovine viral diarrhea virus (BVDV); effect for eradication in Hokkaido, Japan. 第

27回世界牛病学会、2012年6月5日、Lisbon Congress Center(リスボン、ポルトガル)

- ④ Helal, AYM, Tajima, M.: Bovine viral diarrhoea virus infection in a dairy herd with high prevalence of persistently infected calves. International symposium on worldwide infectious diseases of farm animal in production medicine; prospective and perspective, 2012年2月3日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
- ⑤ Tajima, M. : Availability of tank lorry milk for the surveillance of persistently infected cattle with bovine viral diarrhoea virus (BVDV). 第26回世界牛病学会、2010年11月15日、Espacio Riesco (サンチャゴ、チリ)

[図書] (計3件)

- ① 田島 誉士、緑書房、子牛の医学、2014、pp232-233, 233-237, 303, 304, 331-333,
- ② 田島 誉士、デーリィマン社、牛の呼吸器病、2013、pp169-182
- ③ 田島 誉士、近代出版、動物の感染症第三版、2011、pp95-96

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田島 誉士 (TAJIMA MOTOSHI)
酪農学園大学・獣医学群・教授
研究者番号：90202168

(2) 連携研究者

門平 睦代 (KADOHIRA MUTSUYO)
帯広畜産大学・畜産学部・教授
研究者番号：20313976
(2013年8月22日：研究分担者から連携研究者へ変更)

今内 覚 (KONNAI SATOSHI)
北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授
研究者番号：40396304