

平成22年 3月 31日現在

研究種目： 基盤研究 (B)  
 研究期間： 2006 ~ 2009  
 課題番号： 18380184  
 研究課題名 (和文) 牛ウイルス性下痢ウイルス感染症の清浄化対策：  
 コホート研究によるリスク分析  
 研究課題名 (英文) Clean up program of bovine viral diarrhea virus infection:  
 Risk analyses by cohort study  
 研究代表者  
 田島 誉士 (TAJIMA MOTOSHI)  
 北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授  
 研究者番号：90202168

## 研究成果の概要 (和文)：

牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)感染経路の分析のための疫学調査を、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実施した。分離ウイルスの分子系統樹解析結果からは、局地的に同一の BVDV の感染によって流行が生じている危険性が高いことが示された。また、各種疫学情報を各方面から入手し、リストアップされた因子についての危険度を統計学的にリスク分析した。その結果、牛の導入、牛舎内へのカラスや猫の侵入、などいくつかの危険因子が抽出された。(221 文字)

## 研究成果の概要 (英文)：

Epidemiological survey for bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection was performed using bulk tank milk samples. Phylogenetic analyses of the gene of isolated BVDV indicated that genetically near BVDV was dominantly spread within restricted area. Various epidemiological information were collected from BVDV free farms and BVDV detected farms, and risk factors were estimated. The results indicated that some risk factors such as cow introduction from outside of farm, crow and/or cat invasion to the pen, and so on were pointed out for the prevalence of BVDV infection.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2006年度 | 4,300,000  | 1,290,000 | 5,590,000  |
| 2007年度 | 3,000,000  | 900,000   | 3,900,000  |
| 2008年度 | 3,000,000  | 900,000   | 3,900,000  |
| 2009年度 | 3,000,000  | 900,000   | 3,900,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 13,300,000 | 3,990,000 | 17,290,000 |

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、感染経路、危険因子、バルク乳検査、ハザードマップ

## 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、乳肉牛飼養農家にとって経済的損失の大きな感染症である。2004 年末には世界獣疫機構(OIE)の監視疾病にも指定され、生産獣医領域における対策の重要性も認識されつつある。BVDV 感染牛はウイルス名に含まれる下痢症を呈するのみでなく、発育不良、奇形、繁殖障害、肺炎など様々な臨床症状を呈する。また、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 に対するワクチンは数種類開発されているが、日本において接種は任意であるため接種状況は不明であり、それよりも何よりも生産現場におけるワクチンの有効性に関してはきわめて多くの疑問が残されている。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。

## 2. 研究の目的

本研究においては、牛群の BVDV 汚染状況を監視することによって流行状況を把握し、有効なバイオセキュリティ対策確立のためのコホート研究によるリスク分析を基に、ウイルスの牛群への侵入経路を解明して BVDV 予防法を確立することを目的とする。具体的な達成目標は以下のとおりである。

- (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、PI 牛

淘汰後の当該牛群の生産性の変化と BVDV 感染との関係を調べる。

- (3) 対象地域内の牛群を継続的に監視し、PI 牛が牛群へ侵入した時点からのその地域における環境要因、繁殖成績、個体移動状況、ワクチン使用歴などの疫学情報を収集し危険因子を分析する。
- (4) 危険因子が特定できた時点で、それに対する有効なバイオセキュリティ対策を考案実施し、引き続き汚染牛群を含む地域全体の感染状況を監視することによって、BVDV 排除が畜産経営に及ぼす効果を判定する。

これらのことから、BVDV の牛群への侵入経路を解明し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。

## 3. 研究の方法

感染性因子が、いつ、どこから集団内に侵入したのかを過去にさかのぼって“推測”することは可能であるが、故意的導入の証拠が得られない限り侵入経路を“確定”することは非常に難しい。本研究においては、現状を充分把握することによって考えうる危険因子をリストアップし、将来にわたってそれらのデータを収集して統計解析するという、現時点からの前向き研究 (コホート研究) を実施することによって、できるだけ不確定要素を排除した分析を行う。具体的な方法は以下のとおりである。

### (1) 牛群への BVDV 浸潤状況調査

北海道内の複数地域内の全酪農家を対象としたバルク乳検査によって、BVDV 陽性農家を特定し PI 個体を摘発する。すなわち、泌乳 PI 牛が存在する農家のバルク乳には BVDV が多量に含まれているので、バルク乳から体細胞を回収して RNA を抽出し、BVDV 特異的 RT-PCR を実施することによって陽性農家の特定が可能であり、多軒数の農家を一度に検査できる。陽性農家の全頭検査によって特定された PI 牛については、出生地を確認し胎子期の感染経路を推定する。それらの結果に基づき、ハザードマップを作成する。

### (2) 疫学調査および感染経路の分析

検査対象農家におけるワクチン接種状況、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、飼料自給率、呼吸器および消化器の感染性疾患発生状況、繁殖成績、乳検データなどの情報を畜主、農家担当獣医師、あるいは農協から得る。それ

ら個体の情報に関して陽性農家および陽性個体について分析し、牛群への BVDV 侵入経路として疑わしい項目をリストアップする。

### (3) 危険因子の分析

リストアップされた因子についての危険度を統計学的にリスク分析するとともに、疫学調査に基づく BVDV 進入経路を解明する。

## 4. 研究成果

(1) 北海道内の酪農専業地域（オホーツク、根室）、乳肉農家混在地域（石狩、胆振）の酪農家を対象として、各地区における牛群への BVDV 浸潤状況を調査した。まず、バルク乳を用いた牛群検査を実施した。すなわち、各地域における酪農家のバルク乳について、RT-PCR 法によって BVDV 遺伝子の有無を検査した。BVDV 遺伝子が検出された農家（陽性農家）については、その農家で飼養されている子牛、育成牛、未経産牛などの非泌乳牛を含む全頭を対象として血清を用いた RT-PCR 法によってウイルス遺伝子検査を実施し、PI 牛を特定した。その結果、数年にわたり BVDV 対策を実施している地域においては陽性農家が摘発されなくなった。何の対策も実施されてこなかった地域では、800 戸中 17 戸（2.1%）の農家が陽性となり、22 頭の持続感染牛（PI）が摘発された。この地域も、継続的（年 1 回）に監視検査を実施することによって、PI 牛摘発数は徐々に減少した。研究期間中偶発的に、検査を 1 年とぼしてしまうアクシデントが生じ、これによって陽性戸数はほぼ対策前に戻ってしまった（800 戸中 10 戸、11 頭）。本方法における BVDV 非浄化地帯の監視検査間隔は 1 年未満が適切であり、それ以上間隔が空くと、対策前の状態に戻ってしまう可能性が示唆された。

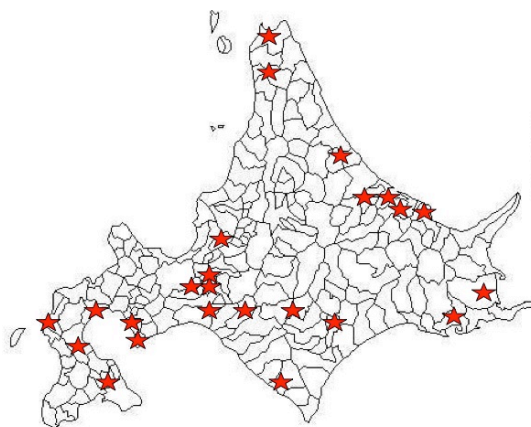


図 1. BVDV 持続感染 (PI) 牛発生地分布  
摘発された PI 牛の出生地または胎子期を過ごした場所を☆印で示した。

また、それらの摘発された PI および病勢鑑定等によって PI と特定された個体について、畜主の了解を得た後に、PI 個体の耳標登録情報あるいは血統書に基づきそれらの個体およびその母牛の出生地ならびに移動歴を調査して胎子期の飼養地を特定した。地図上にそれらの情報をプロットし、図 1 のようなハザードマップを作成した。BVDV の浸潤状況を目視化したこの地図に基づき、予想される流行地点の特定を試みたが不可能であった。しかしながら、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。

(2) 摘発された PI 牛からの分離ウイルスの主要抗原 (E2) 遺伝子の多様性に基づく系統樹解析を実施したところ、図 2 に示すような系統樹が得られた。地域ごとに遺伝的にきわめて近縁なウイルスが流行していることが示唆され、各地できわめて狭い範囲での局地的な流行が生じていることが明らかとなった。このことから、流行を地域内に封じ込めることは、感染拡大阻止のために重要な事項であることが示唆された。

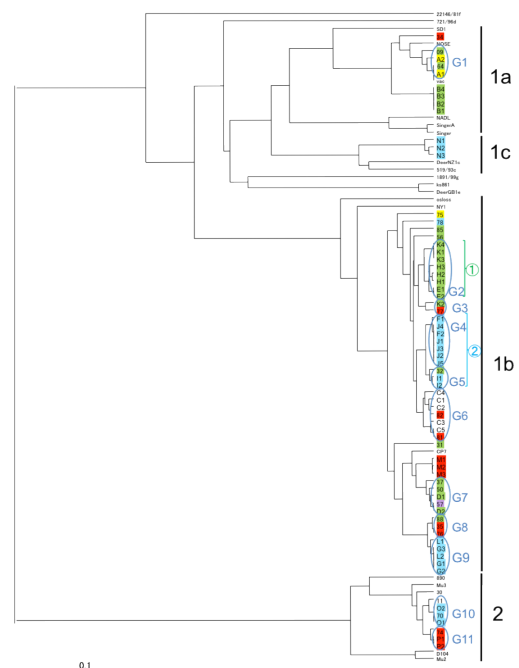


図 2. 野外分離 BVDV の E2 抗原遺伝子の多様性に基づく系統樹  
色の違いは PI 牛発生地域の違いを示し、同一色は同一地域内での発生。

(3) バルク乳検査におい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、BVDV 感染経路の分析のための疫学調査を実施した。BVDV 対策実施地域では、導入牛から

の出生子牛が PI であることが多く、牛群内への BVDV の侵入は導入牛を介してなされる可能性が高いことが示唆された。そこで、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、飼料自給率、呼吸器および消化器の感染性疾患発生状況、繁殖成績、乳検データなどの情報について畜主、農家担当獣医師、あるいは農協から入手し、リストアップされた因子についての危険度を統計学的にリスク分析した。その結果、表に示すとおり牛の導入、育成牛舎の除糞頻度、外来者用施設入り口踏み込み消毒槽の設置、牛舎内へのカラスの侵入、牛舎内への猫の侵入、動物侵入防止対策の実施、が危険率  $p < 0.005 \sim 0.05$ 、オッズ比  $3.8 \sim 11.4$  の範囲で危険因子として抽出された。また、ワクチン接種の励行によって、PI 牛の発生を抑えることは不可能であり、むしろワクチン接種したという安心感によって監視体制がおろそかになる傾向が見いだされた。

表. BVDV 流行の危険因子

| 危険因子                 | オッズ比 | p 値   |
|----------------------|------|-------|
| 導入牛無                 | 3.8  | 0.042 |
| 育成舎の除糞頻度 1 回/<br>週未満 | 6.1  | 0.005 |
| 訪問者用踏込槽無し            | 7.6  | 0.009 |
| カラスの侵入               | 7.4  | 0.039 |
| 猫の侵入                 | 4.9  | 0.022 |
| 動物侵入対策の未実施           | 11.4 | 0.009 |

#### 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 8 件)

- ①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
- ②Kadohira, 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, in press, 2010. 査読有
- ③Mingala, C.N., Konnai S, Tajima, M., Onuma M. and Ohashi, K. : Classification of new BVDV isolates from Philippine water buffalo using the viral E2 region. J. Basic Microbiol. 49, 1-6, 2009. 査読有
- ④Kameyama, K., Sakoda, Y., Matsuno, K., Itoh, A., Tajima, M., Nakamura, S. and Kida, H.: Cleavage of the NS2-3 protein in the cells of cattle persistently infected with non-cytopathogenic bovine viral diarrhea virus. Microbiol. Immunol. 52, 277—282, 2008. 査読有
- ⑤Tajima, M., Ohsaki, T., Okazawa, M. and Yasutomi, I.: Availability of oral swab sample for the detection of bovine viral diarrhea virus (BVDV) gene from the cattle persistently infected with BVDV. Jpn. J. Vet. Res. 56, 3-8, 2008 査読有
- ⑥門平睦代、安富一郎、ジェニファー・マルコフ、田島誉士：北海道湧別町における牛ウイルス性下痢ウイルス感染に関する量的リスク評価. 獣医疫学雑誌 11 (1), 32-39, 2007. 査読有
- ⑦Kameyama, K., Sakoda, Y., Tamai, K., Igarashi, H., Tajima, M., Mochizuki, T., Namba, Y. and Kida, H.: Development of an immunochromatographic test kit for rapid detection of bovine viral diarrhea virus antigen. J. Virol. Methods 38, 140-146, 2006. 査読有
- ⑧Tajima, M.: The prevalent genotypes of bovine viral diarrhea virus in Japan, Germany and the United States of America. Jpn. J. Vet. Res. 54, 129-134, 2006. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ①田島誉士：牛ウイルス性下痢ウイルス感染症のウイルス遺伝子の多様性と防疫対策に関する研究 第 147 回日本獣医学会学術集会、2009 年 4 月 3 日、栃木県総合文化センター（栃木県宇都宮市）
- ②加藤肇、一條祐一、佐藤礼一郎、江村有紀子、高久英徳、田島誉士：牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) ワクチンによる中和抗体価持続期間に関する調査 平成 20 年度日本産業動物獣医学会(北海道)、2008 年 9 月 13 日、洞爺湖温泉ホテル万世閣（北海道洞爺湖町）
- ③Tajima, M. : Epidemic of bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection originated from 3 persistently infected cattle on a farm during a 5-year period. 第 25 回世界牛病学会、2008 年 7 月 8 日、SYMA Sport and Event Center(ブダペスト、ハンガリー)
- ④田島誉士：3 頭の持続感染牛に起因した牛ウイルス性下痢ウイルスの一農家での流行とその清浄化対策 平成 19 年度日本産業動物獣医学会（北海道）、2007 年 9 月 1 日、酪農学園大学（北海道江別市）
- ⑤田島誉士：牛ウイルス性下痢ウイルス感染症摘発のための検査材料の簡易な採取法 平成 18 年度日本産業動物獣医学会（北海道）、2006 年 9 月 7 日、北海道大学学術交

流会館（札幌市）

- ⑥ Tajima, M. : Easy sampling method for the detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) gene from persistently infected cattle with BVDV. 第24回世界牛病学会、2006年10月16日、Nice-Acropolis Congress Centre（ニース、フランス）

〔図書〕（計3件）

- ① 田島 誉士、チクサン出版社、子牛の科学、2009、pp54-56  
② 田島 誉士、デーリィマン社、テレビドクター3乳牛の病気と対処100選、2007、pp24-27  
③ 田島 誉士、近代出版、動物の感染症第二版、2006、pp108

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田島 誉士 (TAJIMA MOTOSHI)  
北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授  
研究者番号：90202168

### (2) 研究分担者

門平 睦代 (KADOHIRA MUTSUYO)  
帯広畜産大学・畜産学部・准教授  
研究者番号：20313976

### (3) 連携研究者

片桐 成二 (KATAGIRI SEIJI)  
酪農学園大学・獣医学部・教授  
研究者番号：00292061  
小沼 操 (ONUMA MISAO)  
北海道大学・名誉教授  
研究者番号：70109510