

平成 30 年 9 月 3 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26292160

研究課題名(和文) 潜在性感染症としての牛ウイルス性下痢ウイルス対策：牛群間伝播様式の解明と防疫法

研究課題名(英文) Control of bovine viral diarrhea virus infection as a latent disease: preventive investigation for the transmission

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) 11,800,000円

研究成果の概要(和文)：牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)の牛群間伝播様式を解明するため、バルク乳検査や入牧牛検査で摘発された持続感染(PI)牛の感染成立機序を、疫学的およびウイルス遺伝学的解析によって検討した。その結果、子宮内感染した状態で、妊娠牛として移動することによって移動先で新たな流行を引き起こす事例が多数を占めることが判明した。確実な防疫を実施するためには、ワクチンのみに依存せずBVDVフリーの状態を樹立することが望ましいと考えられた。

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 performed for the BVDV detected and free herd discriminated by the bulk tank milk tests and the mass surveillance. The results indicated that in-uterus persistently infected fetus moved as pregnant cow with the dam among the herd, then the new prevalence was confirmed. It seemed to be important for the prevention to keep the BVDV-free status besides vaccination.

研究分野：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

科学研究費補助金研究成果報告書

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、症状のみによる摘発が困難な感染症である本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

本研究の達成目標は、BVDV 感染症の流行状況の実態を把握し、潜在性感染症としての影響を分析することによって、より効率的な BVDV 防疫対策法を確立することである。本症の対策として重点を置くべきは、子宮内感染によって免疫寛容状態で産出されてくる持続感染(PI)牛への対応である。出生後検査は非効率的であり、出生前診断の可能性を探る必要がある。そのためにはまず、牛群間の BVDV 伝播様式を分析して、牛群レベルでのウイルス感受性因子の有無を解析する。胎子感染成

立状態での BVDV の牛群間伝播、すなわち PI 胎子妊娠牛の移動にともなう感染拡大の実態をまず検索する。その一手段として、疫学的情報に基づく胎子感染の危険因子の抽出と、牛群レベルでの比較に基づく母牛の免疫応答能の解析である。胎子感染という潜伏状態で牛群間を移動するなどの流行様式の解析によって、胎子感染予防法を開発して防疫対策に活用する。

- (1) PI 牛潜伏状況を検証するために、北海道内数カ所の酪農地帯を対象にバルク乳検査を用いて網羅的に検査する。
- (2) 北海道内複数箇所の公共牧野の入牧検診時に、若牛育成牛群中の PI 潜伏状況を検証する。
- (3) PI 牛の移動によるウイルス伝播と、急性感染による胎子 PI の移動による伝播の実態を究明し、牛群間伝播の危険因子を抽出する
- (4) BVDV 汚染牛群における PI 産生率に及ぼす宿主側因子を解明し、子宮内胎子の PI 成立の有無を推測できる基準を設定し、防疫対策に役立てる。
- (5) BVDV の生産獣医療に対する影響を分析し、効果的な予防法を確立する。

これらの検討から、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。宿主側のウイルス感受性因子を解析することによって、迅速正確な PI 牛摘発法を確立できる。

3. 研究の方法

バルク乳検査を利用して、牛群の BVDV 清浄状況を調査する。公共牧場の入牧牛検査や受託育成農場の着地検査などによって、PI 牛の発生状況を網羅的に調べる。それらの結果に基づき汚染牛群を特定し、農場の疫学情報からウイルス伝播様式を解析する。汚染牛群内での急性感染の被害状況を分析し、ウイルスの潜在性を検討して防疫法を確立する。

(1)牛群への BVDV 浸潤状況調査

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 ウイルスである BVDV の特異的遺伝子断片の有無を検査する。また、道内外の多数の農家から牛が集まってくる公共牧場および受託育成農家での着地検査も血清を用いて同様に実施する。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) ウイルス拡散様式の検討

摘発された PI 牛が子宮内感染を受けたと疑われる時期の飼養地を推定し、そこにおける発生状況を調査する。PI 牛から検出されるウイルスの遺伝子型を特定し、流行状況を把握する。さらに感染源を推定するために、ウイルス抗原遺伝子の塩基配列の相同性を比較検討する。

(3) 急性感染が及ぼす影響

受託育成農家あるいは公共牧野での PI 牛との同居牛について、ウイルス保有状況を検査する。基本的に着地検査において陰性牛のみを入場させているので、同居牛内での急性感染は生じないはずである。しかしながら、現状が十分に把握されているとはいえないので、実際に確認する。

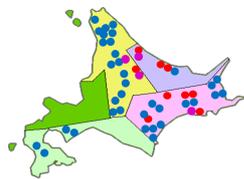
4. 研究成果

(1) 牛群への BVDV 浸潤状況調査

BVDV 清浄化状態を確認するために道内各地の酪農地帯のバルク乳を網羅的に検査した結果は下表のとおりである。

検査年	検査数	陽性件数	陽性率
2014	1299	31	2.4
2015	1486	56	3.8
2016	1447	18	1.2
2017	1379	15	1.1

2014年11月から2015年7月までの8ヶ月間に入牧牛や受託牛など25,810頭の検査をしたところ、124頭のPI牛が摘発された。摘発されたPI牛が子宮内感染を受けた時期を推定し、その場所を遺伝子方別に地図上にプロットすると、図1のようなった。子宮内感染を受けた地域に偏りは認められず、重度汚染地帯は認められなかったものの、北海道



子宮内感染場所	頭数(頭)	1型(%) ●	2型(%) ●
出生農家	50	72.0	28.0
出生農家以外	46	69.6	30.4
不明	28	71.4	28.6

図1 子宮内感染を受けた場所による流行状況
摘発されたPI牛が子宮内感染を受けたと推測される飼養地を示す。

内ほぼ全域にまんべんなく流行源となるPI牛が潜在している可能性が確認された。

(2) ウイルス拡散様式の検討

上記多数の流行状況の中で、一流行に着眼し摘発されたPI牛の感染源を、子宮内感染の時期から推測し、ウイルス遺伝子の相同性を基に解析して、流行様式を検討した。

S農場でPI子牛(S1)が摘発されたため全頭検査を行ったところ、他に4頭のPI子牛(S2~S5)が摘発された。これらの5頭はほぼ同時期に出生しており、母牛の移動歴から5頭とも同じ預託牧場(N牧野)での感染であることが強く疑われた。N牧野でのBVD発生状況を調査するため同牧野内の全頭検査を行ったところ、5頭のPI牛(N1~N5)が摘発された。また、この管内での流行を調査するために2013年3月~2015年2月の間に管内で摘発された20頭のPI牛も調査した。塩基配列の系統樹解析の結果、図2のとおりとなり同一ウイルスによる流行が長期間にわたり同一牧野内で継続していたことが判明した。

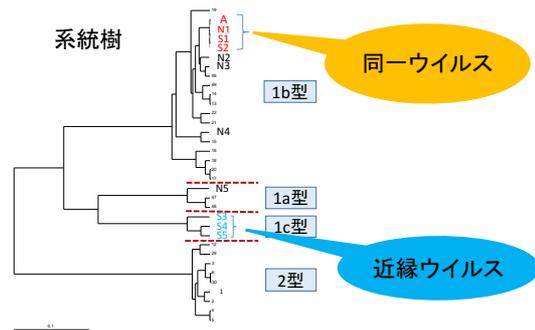


図2. BVDVのE2抗原遺伝子の系統樹解析
2系統のウイルスによる流行が長期間にわたり継続していた。

N1は1年以上の間N牧野に預託されていた成牛で、この牛が預託されていた期間とS1, S2の母牛の子宮内感染時期が一致することから、S1およびS2はN1からN牧野で感染したと考えられた。また、N1は管内の別の牧野で子宮内感染して出生した牛であり、S農場で発育してN牧野に預託されていた。N2~N4は子宮内感染した場所がそれぞれ異なり、管内、道内、道外であった。そこで管内でのPI牛の流行を調査したところ、6農場9頭で2型、4農場11頭で1b型が流行していた。1c型は管内でも摘発されず、感染源は不明であった。1b型のうち1頭はN1と100%の相同性であり、子宮内感染はN牧野であった。これらの流行を図示すると図3のとおりである。大流行のように思えた発生も、複数の公共牧野での影響を受けた一農家でのPI牛の潜伏による被

害拡大であったことが明らかとなった。

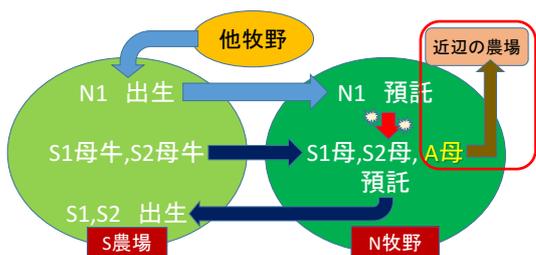


図3 一酪農家に端を発した流行様式

以上のことから、妊娠牛の移動の際に BVDV が拡散する危険性が高いことが判明した。出生時および移動時に検査をすることは、BVDV の蔓延を防ぐために有効である。

(3) 急性感染が及ぼす影響

一肉牛育成農家において生後急性感染による PI の大流行が発生し、この解析によって新たな旧政官専用式を見いだした。当該農家は数日～数週齢の主に F1 牛を、毎月 50～100 頭導入し約 8 ヶ月間肥育して出荷している素牛育成農家であった。導入時に血清中 BVDV 遺伝子陰性を確認し、約 1 週間ハッチ専用牛舎内で哺乳して呼吸器病ワクチンを接種、その後ロボット哺乳牛舎へと移動させる。成長につれ離乳、育成牛舎へと順次移動し、導入から出荷まで 6 棟の牛舎を使用して飼養していた。2014 および 2015 年の導入時 PI 牛摘発状況はそれぞれ 665 頭中 1 頭および 1006 頭中 2 頭であった。2016 年 1-4 月に導入した 337 頭中 4 頭が PI 牛として摘発され、入舎が阻止された。5 月にロボット哺乳牛舎で呼吸器病や下痢が流行し、特定の病原体を見いだせなかったため、再度その牛舎で飼養中の 171 頭全頭の BVDV 検査を実施したところ 16 頭の BVDV 陽性牛が摘発され、4 頭は呼吸器病症状が悪化して斃死した。2 週間後の検査で 9 頭は陰転したが、3 頭は再びウイルス遺伝子が確認され廃用となった。その後、検査を頻回実施して監視したところ、急性感染と考えられる BVDV 陽性牛が 2016 年末までに 51 頭確認され、そのうち 24 頭において 3 週間隔の検査で陽性が確認されたので PI 牛と判断した。4 頭は、3 週間隔の確認検査をする前に症状が悪化して斃死した。PI 牛と判断された症例の中には、導入時およびハッチからロボット哺乳牛舎への移動時にそれぞれ BVDV 陰性が確認されたものの元気活気が芳しくなく、約 1 ヶ月間で 4 回の陰性が確認された後に陽転し PI 牛となった牛も確認された。2017 年 3 月までにも、同様に 15 頭が急性感染による PI 牛と判断されたが、3 月初旬を最後に発生がなくなった。流行期間中の導入牛着地検査で、2 頭の PI 牛

が摘発され、これらの牛が在来飼養牛と接触することはなかった。大流行した BVDV の遺伝子型はほとんどが 2 型であり、それらの遺伝子塩基配列の相同性は 99.7-100%であった。これらは、2016 年 2 月の導入牛検査で PI 牛として摘発されたウイルスときわめて炊き麻生同性を示した。発生状況から、牛-牛伝播、環境-牛伝播、牛潜伏ウイルスの発現などの可能性が考えられた。清浄化対策として、疑似牛の頻回検査による BVDV 確認の必要性が示唆された。

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 6 件)

- ① Goto, S., Konnai, S., Okagawa, T., Nishimori, A., Maekawa, N., Gondaira, S., Higuchi, H., Koiwa, M., Tajima, M., Kohara, J., Ogasawara, S., Kato, Y., Suzuki, Y., Murata, S. & Ohashi, K.: Increase of cells expressing PD-1 and PD-L1 and enhancement of IFN- γ production via PD-1/PD-L1 blockade in bovine mycoplasmosis. *Immunity, Inflammation and Disease* (2017), 1-9, doi: 10.1002/iid3.173, 2017 査読有
- ② Ando, T., Takino, T., Makita, K., Tajima, M., Koiwa, M. & Hagiwara, K.: Sero-epidemiological analysis of vertical transmission relative risk of Borna disease virus infection in dairy herds. *J. Vet. Med. Sci.* 78: 1669-1672-, 2016. 査読有
- ③ 加藤肇、中尾茂、中田悟史、佐藤礼一郎、大西守、田島誉士: エンドトキシン中和剤を含む牛サルモネラ不活化ワクチン接種牛の臨床病理学的所見. *日獣会誌* 68(6); 379-383, 2015 査読有
- ④ Kato, H., Sato, R., Oonishi, M. & Tajima, M.: Comparison of vaccination protocols for bovine herpesvirus type 1 and bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Med. Res.* 2(5); 1034-1037, 2015. 査読有
- ⑤ 田島誉士: 牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛対策とは!? *臨床獣医* 33(7); 12-15, 2015. 査読無し
- ⑥ 田島誉士: BVD ウイルス感染症の現状と対策. *家畜診療* 62(1); 5-10, 2015. 査読無し

[学会発表] (計 6 件)

- ① 田島誉士、遠藤恭子、山本浩平、田中志奈、大塚浩通: 新たな視点からの牛ウイルス性下痢ウイルス清浄化対策法の必要性.

平成 29 年度獣医学術地区学会（北海道）、産業動物獣医学会，2017.

- ② Tajima, M., Nitta, A., Sawada, M., Nakamura, H. Ohtsuka, H.: Prevalence of bovine viral diarrhoea virus infection in Hokkaido, Japan; epidemiological analyses based on the viral genotype. XXIX World Buiatrics Congress (第 29 回世界牛病学会ダブリン、アイルランド) 2016.
- ③ 新田温子、澤田真里、中村北斗、大塚浩通、田島誉士：2014 年 11 月以降に北海道内で摘発された牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛の疫学的解析．平成 27 年度獣医学術地区学会（北海道）、産業動物獣医学会，2015.
- ④ 澤田真里、中村北斗、新田温子、大塚浩通、田島誉士：牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛発生農家を基にした感染拡大様式分析．平成 27 年度獣医学術地区学会（北海道）、産業動物獣医学会，2015.
- ⑤ 斎野仁、川内京子、臼井章、大野浩、田島誉士、迫田義博：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．平成 26 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会（岡山）、2015.
- ⑥ Tajima, M. & Sasaki, R.: Transmission of bovine viral diarrhoea virus by pregnant cows; observation in a farm. XXVIII World Buiatrics Congress(第 28 回世界牛病学会ケアンズ、オーストラリア), 2014.

[図書] (計 5 件)

- ① 田島誉士、デーリイマン社、テレビ・ドクター 4 よくわかる乳牛の病気 100 選、2017、pp22-25, 40-43, 58, 114-117, 120-125, 150, 174-177.
- ② 田島誉士、緑書房、これからの乳牛群管理のためのハードヘルズ学<成牛編>、2017、伝染病の防疫 pp. 306-323.
- ③ 田島誉士、文永堂出版、コアカリ産業動物臨床学、2016、pp47-51, 89-94, 95-107
- ④ 田島誉士、文永堂出版、獣医内科学第 2 版 (大動物編)、2014、pp233, 255-256, 267-270, 273, 292-295, 357.
- ⑤ 田島誉士、緑書房、子牛の医学 胎子期から出生、育成期まで、2014、pp232-237, 304, 331-333.

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) 研究分担者

高橋 俊彦 (TAKAHASHI TOSHIHIKO)
酪農学園大学・獣医学群・教授
研究者番号：40709771

萩原 克郎 (HAGIWARA KATSURO)
酪農学園大学・獣医学群・教授
研究者番号：50295896