

総説

牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛保有群の検出に関する研究

関 慶久

要約

牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) 持続感染 (PI) 牛保有群を精度高く検出するスポットテストの確立を目的に、46群2,454頭の牛および177株のBVDVを検査した。各群から6~12カ月齢の子牛3頭を抽出して、感染ウイルスと同一の遺伝子型の攻撃ウイルスを用いた中和試験およびウイルス分離から成るスポットテストを実施し、3頭中2頭以上から64倍以上の抗体価が検出または1頭以上からBVDVが分離された際に、当該群に高い確率でPI牛が存在することを推計学的に検討し、野外応用により証明した。6種類の制限酵素を用いた制限酵素断片長多型解析による遺伝子型別が、適切な攻撃ウイルスの簡便な選択に有用であることを明らかにした。

キーワード：牛ウイルス性下痢ウイルス、持続感染牛、制限酵素断片長多型解析、スクリーニング、スポットテスト。

牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) 感染症の防疫上、牛群から持続感染 (PI) 牛を除去することが重要である [1]。飼養牛全頭を対象としたウイルス分離は、PI牛を検出するための最も正確な検査であるが、本検査に先立ち、牛群中のPI牛の存在の有無を推察し得るスクリーニング法を活用することにより、BVDV防疫の効率的な推進が可能となる。

わが国の幾つかの地域では、PI牛を保有する乳用牛群を検出するスクリーニング法として、バルク乳からBVDV遺伝子を検出する方法 (バルク乳検査) が応用され、多数のPI牛が検出されている [2]。他方、多くのPI牛は粘膜病や発育遅延を含む様々な障害により繁殖適齢期まで

に死亡するか、あるいは淘汰されている [1]。この事実は、産歴を有する、すなわち泌乳期のPI牛が少数例にとどまることを示唆する。バルク乳検査は1検体により100頭以上の泌乳牛を飼養する群を評価し得るが [2]、非泌乳期のPI牛のみが存在する牛群を検出することはできず [3]、肉用牛群に応用することも困難である。

Houeら [4] は、牛群から抽出した子牛5頭中3頭以上から、高いBVDV中和抗体価が検出された時に牛群内にPI牛が存在すると判定する、いわゆる“スポットテスト”を考案した。本テストはPI牛の泌乳状態に関わらず、牛群内のPI牛の存在を調査することができるため、北欧諸国およびアメリカ合衆国で応用されている [3-

6]. 他方, PI牛はBVDVに対して免疫寛容を示し, その抗体価は陰性または低い値にとどまることから [1], PI牛が抗体検査対象として抽出された時は偽陰性と判定される可能性がある. また, わが国の野外には少なくとも7種類の遺伝子型 (1a, 1b, 1c, 1e, 1f, So, 2a) のBVDVが存在し [7-9], 異なった遺伝子型のBVDVは抗原学的に区別されるため [7,9], 血清中和試験に用いる攻撃ウイルスと感染ウイルスの遺伝子型が相違した時は正確な判定が困難になると考えられる. 精度の高いスポットテストの開発はBVDV防疫の推進を図る上で重要であるが, そのための諸条件は十分に検討されていない.

本研究では, PI牛保有群を精度高く検出するスクリーニング法の確立を目的として, はじめに, わが国の牛群に適用し得るスポットテストの諸条件を推計学的観点から検討した. 続いて, 推計学的検討により得られた最適条件下で本テストを野外応用し, PI牛保有群の検出における精度を検証した. さらに, スポットテストの精度を確保する上で重要となる中和試験用攻撃ウイルスの選択に資するため, わが国で分離されたBVDVを遺伝学的に解析し, 制限酵素断片長多型 (RFLP) 解析による本ウイルスの簡便な遺伝子型別法を検討した.

スポットテストの諸条件の推計学的検討

2000~2004年に, 岩手県内の20群 (Nos. 1-20) の飼養牛1,272頭を対象として, ウイルス分離および1a遺伝子型株を攻撃ウイルスとした血清中和試験を実施した.

ウイルス学的検査成績に基づき, 6カ月齢以上の全ての検査牛をPI牛および非PI牛に分類した. また, 非PI牛の抗体価において, 64倍以上を高い抗体価, 32倍以下を低い抗体価として区別した. 各群から6~12カ月齢のBVDVワクチン未接種牛3頭を抽出した時に, 高い抗体価を有する非PI牛が2頭以上含まれる確率 (P_{SN})

およびPI牛が1頭以上含まれる確率 (P_{VI}) をそれぞれhypergeometric probability model [4,5] を用いて算出した. さらに, 両条件のいずれかが満たされる確率 (P_{Total}) を, $P_{Total} = P_{SN} + P_{VI} - P_B$ の計算式により算出した. P_B は高い抗体価を有する2頭の非PI牛および1頭のPI牛から成る3頭が抽出される確率を意味し, PI牛が存在しない群の P_{Total} は P_{SN} と一致する. PI牛, 高い抗体価の非PI牛および低い抗体価の非PI牛の存在頭数がそれぞれx, yおよびz頭である群において, 3頭を抽出した時の P_{SN} , P_{VI} および P_B の各確率は, $P_{SN} = 1 - (C_{x+z,3} \times C_{y,0} + C_{x+z,2} \times C_{y,1}) / C_{x+y+z,3}$, $P_{VI} = 1 - (C_{x,0} \times C_{y+z,3}) / C_{x+y+z,3}$ および $P_B = C_{x,1} \times C_{y,2} \times C_{z,0} / C_{x+y+z,3}$ の計算式を用いて算出された. これらの確率は, 他の月齢区分, すなわち6~18カ月齢, 6~24カ月齢および6カ月齢以上から3頭を抽出した条件下でも計算された.

表1に各群から検出されたPI牛の頭数および月齢ならびにPI牛から得たBVDV分離株の遺伝子型を示す. 20群1,272頭のウイルス分離により, 5群 (Nos. 1-5) から2~102カ月齢のPI牛18頭が検出された. 18頭中12頭は6カ月齢以上であり, 3群 (Nos. 1-3) に存在した12頭中8頭および2群 (Nos. 4,5) に存在した6頭中1頭が6~12カ月齢の月齢区分に含まれた. 6カ月齢以上のPI牛12頭中9頭におけるBVDV中和抗体は陰性であり, 他の3頭においては2または4倍の低い値の抗体が検出された. 分子系

表1 PI牛の検出および分離株の遺伝子型

群No.	検査頭数	PI牛の頭数	分離株の遺伝子型
1	19	5 (6, 7, 9, 56, 102) ^{a)}	1a
2	102	5 (5, 5, 6, 6, 8)	1a
3	30	2 (10, 11)	1a
4	73	5 (2, 4, 4, 4, 12)	1b
5	55	1 (28)	1b
6-20	993	0	

a) 括弧内の数値はPI牛の月齢を示す.

統解析により，3群（Nos. 1-3）由来の12株および2群（Nos. 4,5）由来の6株は，血清中和試験の攻撃ウイルスと同一の1a遺伝子型または抗原性状が類似する1b遺伝子型 [9] に分類された。

6～12カ月齢，6～18カ月齢，6～24カ月齢および6カ月齢以上の各月齢区分における P_{Total} を表2に示す。PI牛を保有した5群（Nos. 1-5）の P_{Total} はいずれの月齢区分でも0.975以上の高い値を示した。PI牛を保有しない15群中8群（Nos. 13-20）の P_{Total} はいずれの月齢区分でも0.000であった。他の2群（Nos. 6,7）の P_{Total} は，6～12カ月齢の月齢区分において0.714以上であり，より高齢の牛が含まれる他の月齢区分では0.929以上を示した。月齢区分に関わら

表2 各月齢区分における P_{Total} 値

群No.	月齢区分			
	6-12	6-18	6-24	6 \leq
1-4	1.000	1.000	1.000	1.000
5	1.000	1.000	0.975	0.998
6	0.774	0.944	0.973	0.982
7	0.714	0.929	0.954	0.976
8	0.000	0.050	0.125	0.782
9	0.000	0.000	0.000	0.638
10	0.000	0.000	0.000	0.206
11	0.000	0.000	0.000	0.013
12	0.000	0.000	0.000	0.001
13-20	0.000	0.000	0.000	0.000

ず高い P_{Total} が得られた当該2群（Nos. 6,7）の成績は，ウイルスの群内感染が比較的最近まで成立していたことを示唆した [6]。残りの5群（Nos. 8-12）の P_{Total} は，6～12カ月齢の月齢区分では0.000であったが，より高齢の牛が含まれる他の月齢区分においては0.000～0.782の範囲に増加し，過去のウイルス感染が示唆された [6]。以上の成績は，検査時におけるウイルスの流行の有無，すなわちPI牛の存在の有無を特定するためには，6～12カ月齢の子牛の解析がより効果的であることを示した既報 [5] の成績を支持した。

表3に6～12カ月齢の3頭を抽出した時の各確率値を示す。6～12カ月齢の範囲に計8頭のPI牛が存在した3群（Nos. 1-3）の P_{SN} は0.500以下と低く， P_{VI} は0.886以上と高かった。当該月齢に1頭のPI牛が存在した，あるいはPI牛が存在しなかった2群（Nos. 4,5）の P_{SN} は1.000であり， P_{VI} は0.375以下と低かった。これらの成績から，3群（Nos. 1-3）で認められた低い値の P_{SN} は当該月齢区分に抗体陰性あるいは低い抗体価を示す多数のPI牛が含まれたことに起因すること，このため，血清中和試験による高い抗体価の検出のみではPI牛保有群を偽陰性と判定する可能性があること，また，偽陰性の判定はウイルス分離の併用により低減されることが示唆された。

表3 6～12カ月齢における各確率値

群No.	PI子牛 ^{a)}	非PI子牛		確率値			
		≥ 64 ^{b)}	≤ 32	P_{SN}	P_{VI}	P_B	P_{Total}
1	3	3	0	0.500	0.950	0.450	1.000
2	3	3	1	0.371	0.886	0.257	1.000
3	2	2	1	0.300	0.900	0.200	1.000
4	1	7	0	1.000	0.375	0.375	1.000
5	0	5	1	1.000	0.000	0.000	1.000
6	0	6	3	0.774	0.000	0.000	0.774
7	0	5	3	0.714	0.000	0.000	0.714
8-20	0	0	5-23	0.000	0.000	0.000	0.000

a) 6～12カ月齢のPI子牛頭数。

b) 血清中和抗体価。

以上より、各群から6～12カ月齢のBVDVワクチン未接種子牛3頭を抽出して、血清中和試験およびウイルス分離を行うことにより、PI牛を保有する群を精度高く検出し得ると推察された。

スポットテストの野外応用

2005～2006年に岩手県内の他の26群、すなわち24酪農場（A-X）および2肉用牛繁殖農場（Y,Z）において、6～12カ月齢のBVDVワクチン未接種子牛3頭を抽出し、血清中和試験およびウイルス分離から成るスポットテストを実施した。BVDV株間での抗原性状の違いを考慮して、血清中和試験には4種類の遺伝子型（1a, 1b, 1e, 2a）の攻撃ウイルスを用い、各ウイルス抗体価のうち最高値を中和抗体価とした。3頭中2頭以上から64倍以上の抗体価が検出または1頭以上からBVDVが分離された時にスポットテスト陽性と判定した。同テスト後に、26群の全飼養牛1,182頭のウイルス分離を実施し、PI牛の有無を調査した。

表4に26農場のウイルス学的検査成績を示す。スポットテストにより、9農場（A-G, Y, Z）が陽性と判定された。8農場（A-E, G, Y, Z）の陽性判定は血清中和試験により、他の1農場（F）のそれは血清中和試験およびウイルス分離の両検査により得られた。全飼養牛を対象としたウイルス分離により、6酪農場および2肉用牛繁殖農場から成る8農場（A-F, Y, Z）から12頭のPI牛が検出された。PI牛のうち、泌乳期の乳用牛は1農場（A）から検出された38カ月齢の1頭に限られ、他の11頭は31カ月齢以下の未経産の乳用牛または肉用牛であった。これらの成績から、本テストにより、PI牛の泌乳状態に関わらず、乳用および肉用の両牛群における同牛の存在を高い精度で推測し得ることが示唆された。

分子系統解析により、4農場（A-D）由来の5株、2農場（E, F）由来2株および他の2農

場（Y, Z）由来5株の遺伝子型はそれぞれ1a, 1cおよび1bに分類された（表4）。PI牛が存在した8農場（A-F, Y, Z）から抽出した子牛3頭の血清中和抗体価は、農場ごとに攻撃ウイルスにより様々な程度で相違し、7農場（A-F, Y）の陽性判定は攻撃ウイルスと分離株の遺伝子型が相違した時にも得られたが、他の1農場（Z）の陽性判定は両ウイルスの遺伝子型が同一時に限られた。この事実は、攻撃ウイルスの遺伝子型が抗体価の正確な評価、すなわちスポットテストにおける精度の高い判定のために重要であること示す既報 [3] の成績と一致した。わが国の分離株は高い頻度で1aおよび1b、中頻度で1c, 1eおよび2a、稀に1fおよびSoの遺伝子型に型別されている [7-9]。したがって、わが国で流行する主要な5種類の遺伝子型株（1a, 1b, 1c, 1e, 2a）を血清中和試験の攻撃ウイルスとして使用することにより、攻撃ウイルスと感染ウイルスの抗原性状の相違に起因する偽陰性判定の出現を低減し得ると考えられた。

RFLP解析による遺伝子型別

1957～2006年に日本で分離された177株のBVDVを用いて、遺伝子型を簡便に識別し得るRFLP解析法を検討した。175株はわが国の病牛から、他の2株は輸入された牛胎子血清から分離された。

BVDV遺伝子のE2領域を標的として、新たに設計した42F（5'-ATG GRC CRG CYT TCC ARA TGG T-3'）および既報の6R [10] から成るプライマー組を用いたRT-PCR法を行った。177株の全てから予測された大きさの増幅産物が得られ、シークエンシングに基づく塩基配列上、いずれの増幅産物も532bpであった。同配列に基づく分子系統樹上、わが国の牛から分離された175株中63, 69および18株は1a, 1bおよび1c, 4, 2, 2および17株は1e, 1f, Soおよび2aの各遺伝子型に分類された。輸入された牛胎子血清由来の2株は1d型に属した。得られ

た遺伝子型の種類およびそれらの出現頻度から、これら供試株はわが国の流行株 [7-9] を代表すると考えられた。

6種類の制限酵素 (*Apo* I, *Mly* I, *BstAP* I, *Pvu* II, *Ear* I, *EcoR* V) を用いた177株のRFLP解析パターンは表5に示す11グルー

表4 スポットテストおよび飼養牛全頭からのウイルス分離成績

農場	飼養頭数	スポットテスト						PI牛の頭数	
		抽出子牛	血清中和抗体価				ウイルス分離	非泌乳期	泌乳期
			1a型 ^{a)}	1b型	1e型	2a型			
A	61	1	256 ^{b)}	64	64	32	—	1 (31) ^{c)}	1 (38) ^{c)}
		2	1024	512	256	64	—		
		3	2048	512	512	256	—	1a ^{d)}	
B	35	1	1024	128	64	32	—	1 (4)	0
		2	4096 \leq	2048	2048	64	—		
		3	4096 \leq	2048	1024	128	—	1a	
C	55	1	512	256	16	32	—	1 (1)	0
		2	1024	512	128	64	—		
		3	1024	512	256	64	—	1a	
D	33	1	512	256	32	32	—	1 (21)	0
		2	2048	128	128	16	—		
		3	2048	512	64	32	—	1a	
E	38	1	<2	<2	<2	<2	—	1 (26)	0
		2	1024	512	256	256	—		
		3	2048	1024	1024	128	—	1c	
F	84	1	<2	<2	<2	<2	+	1 (12)	0
		2	256	128	8	4	—		
		3	4096 \leq	1024	128	64	—	1c	
G	37	1	<2	<2	<2	<2	—	0	0
		2	512	2048	256	256	—		
		3	1024	4096 \leq	512	128	—		
H	38	1	4	2	<2	<2	—	0	0
		2	8	8	<2	<2	—		
		3	512	512	512	128	—		
I-X	16-76	1	<2	<2	<2	<2	—	0	0
		2	<2	<2	<2	<2	—		
		3	<2	<2	<2	<2	—		
Y	35	1	256	1024	256	64	—	4 (2-5)	0
		2	2048	4096 \leq	512	128	—		
		3	2048	4096 \leq	512	256	—	1b	
Z	45	1	<2	<2	<2	<2	—	1 (2)	0
		2	16	64	8	4	—		
		3	64	128	16	32	—	1b	

a) 攻撃ウイルスの遺伝子型を示す。

b) イタリック体は各攻撃ウイルスにより得られた抗体価のうち最高値を示す。

c) 括弧内にPI牛の月齢を示す。

d) PI牛からの分離株の遺伝子型を示す。

表5 177株のRFLP解析に基づくグループ分類

グループ	遺伝子型	株数	下記酵素により得られた切断片長 (bp)					
			<i>Apo</i> I	<i>Mly</i> I	<i>BstAP</i> I	<i>Pvu</i> II	<i>Ear</i> I	<i>EcoR</i> V
I	1a	37	265, 267	146, 386 ^{a)}	nd	nd	nd	nd
II	1a	26	265, 267	nd ^{b)}	nd ^{c)}	nd	nd	nd
III	1b	22	nd	252, 280	nd	nd	nd	nd
IV	1b	47	nd	95, 185, 252 ^{d)}	nd	nd	nd	nd
V	1c	14	nd ^{e)}	nd ^{f)}	256, 276	nd	nd	nd
VI	1c	4	nd	nd	256, 276 ^{g)}	52, 480	nd	nd
VII	1d	2	nd	nd	nd ^{h)}	nd	262, 270	nd
VIII	1e	4	265, 267	nd	nd	218, 314	nd	nd
IX	1f	2	nd	nd	nd	nd	nd	nd
X	So	2	nd	252, 280	256, 276	175, 357	nd	nd
XI	2a	17	nd	nd	nd	nd	nd	167, 365

nd: 切断されず。

a) 106, 146および280bpに切断されるNose株を除く。

b) 190および342bpに切断されるIW20/97/NCP株を除く。

c) 174および358bpに切断されるIW59/05/NCPおよびIS21NCP/00株を除く。

d) 95, 118, 134および185bpに切断されるIS3NCP/95およびIS6NCP/95株を除く。

e) 265および267 bpに切断されるIW1/87/NCPおよびTC TA142/01株を除く。

f) 252および280 bpに切断されるIW1/87/NCP, IW4/89/NCPおよびTC TA142/01株を除く。

g) Okazaki/01/04株は切断されず。

h) 174および358bpに切断されるOK 1 (CA)NCP/03株を除く。

プ (I ~ XI) に分類された。各グループを構成する大多数の株は同一の切断パターンを、少数株が異なる切断パターンを示した。他方、後者の少数株の切断パターンは、6種類の制限酵素を用いた解析により、他のグループ株の切断パターンから区別された。各グループは単一の遺伝子型株から構成され、1a遺伝子型株はグループIおよびIIに、1b型株はグループIIIおよびIVに、1c型株はグループVおよびVIに含まれた。1d, 1e, 1f, Soおよび2aの各遺伝子型株はそれぞれVII, VIII, IX, XおよびXIのグループに属した。グループ間の切断像の相違は2%アガロースゲル電気泳動後のエチジウムブロマイド染色により区別された。

これらの成績から、本RFLP解析法により、これまでわが国で分離された8遺伝子型を簡便に識別し得ることが示唆され、本法を血清中和試験における適切な攻撃ウイルスの選択に活用することにより、PI牛保有群を検出するスポットテストの精度が向上すると考えられた。

総括

牛群から抽出した6~12カ月齢のBVDVワクチン未接種子牛3頭を対象として、感染ウイルスと同一遺伝子型の攻撃ウイルスを用いた血清中和試験およびウイルス分離の両者から成るスポットテストを実施することにより、PI牛を保有する群を高い精度で検出し得ることが明らかとなった。また、RFLP解析は流行株の簡便な遺伝子型別法として有用であり、本法の実施により血清中和試験における適切な攻撃ウイルスの選択が可能になった。以上より、今回開発したスポットテストおよびRFLP解析は、BVDV防疫の効率的な推進に貢献し得ると考えられた。

本研究の遂行にあたり、多大なご指導およびご助言を賜った岐阜大学大学院連合獣医学研究科(独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所ウイルス病研究チーム長)の恒光 裕客員教授に深甚なる謝意を表す。また、貴重なご指導を賜った帯広畜産大学の鈴木宏志教授、岩手大学の品川邦汎教授、東京農工大学の本多英一教授、岐阜大学の杉山誠教授

に厚く御礼申し上げます。さらに、本研究へのご理解とご支援を賜った岩手県中央家畜保健衛生所の清宮幸男所長をはじめとする岩手県中央、県南および県北の各家畜保健衛生所ならびに農林水産部畜産課の上司、先輩、同僚に感謝の意を表する。

本研究の推進には国内各地からの分離株と正確な分子系統解析が不可欠であり、貴重なBVDV株を分与いただいた各都道府県および独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所の皆様ならびにシークエンス解析のご支援をいただいた財団法人岩手生物工学研究センターの西原昌宏博士に御礼申し上げます。

本総説は、2008年に岐阜大学大学院連合獣医学研究科に提出した論文を基に作成した。詳細については、「J Vet Med Sci, 68, 255-258 (2006)」, 「J Vet Med Sci, 69, 1087-1089 (2007)」および「J Vet Med Sci, 70, 393-395 (2008)」の3報を参照いただきたい。

引用文献

- [1] Baker JC : Bovine viral diarrhoea virus : a review, J Am Vet Med Assoc, 190, 1449-1458 (1987)
- [2] Kozasa T, Tajima M, Yasutomi I : Relationship of bovine viral diarrhoea virus persistent infection to incidence of diseases on dairy farms based on bulk tank milk test by RT-PCR, Vet Microbiol, 106, 41-47 (2005)
- [3] Pillars RB, Grooms DL : Serologic evaluation of five unvaccinated heifers to detect herds that have cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus, Am J Vet Res, 63, 499-505 (2002)
- [4] Houe H, Baker JC, Maes RK : Application of antibody titers against bovine viral diarrhoea virus (BVDV) as a measure to detect herds with cattle persistently infected with BVDV, J Vet Diagn Invest, 7, 327-332 (1995)
- [5] Houe H : Serological analysis of a small herd sample to predict presence or absence of animals persistently infected with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in dairy herds, Res Vet Sci, 53, 320-323 (1992)
- [6] Houe H : Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections, Vet Microbiol, 64, 89-107 (1999)
- [7] Hayashi M, Murakami T, Takai H : Genomic and serological characterization of bovine viral diarrhoea virus recently isolated in Ishikawa Prefecture in Japan, J Jpn Vet Med Assoc, 59, 320-324 (2006)
- [8] Matsuno K, Sakoda Y, Kameyama K : Genetic and pathobiological characterization of bovine viral diarrhoea viruses recently isolated from cattle in Japan, J Vet Med Sci, 69, 515-520 (2007)
- [9] Nagai M, Ito T, Sugita S : Genomic and serological diversity of bovine viral diarrhoea virus in Japan, Arch Virol, 146, 685-696 (2001)
- [10] Sentsui H, Nishimori T, Kirisawa R : Mucosal disease induced in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus by antigenically different cytopathic virus, Arch Virol, 146, 993-1006 (2001)