バルク乳中抗体の検出による牛ウイルス性下痢ウイルス の浸潤状況調査

小佐々隆志¹⁾ 田島譽士^{1)†} 佐野公洋²⁾ 安富一郎³⁾

大橋和彦¹⁾ 小沼 操¹⁾

1) 北海道大学大学院獣医学研究科 (〒060-0818 札幌市北区北18条西9)

2) いぶり農業共済組合 北部家畜診療所 (〒059-1433 勇払郡早来町字遠浅423-133)

3) 遠軽地区農業共済組合 中央家畜診療所 (〒093-0731 紋別郡湧別町字芭露194-2)

(2004年3月15日受付・2004年7月1日受理)

要 約

北海道の2地区196軒の酪農家からのバルク乳の乳清を用いたウイルス中和試験により、牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)の浸潤状況を調査した。検査対象とした2地区は、バルク乳からBVDV遺伝子が検出されたA地区151軒と検出されなかったB地区45軒である。検査の結果、BVDV遺伝子検出の有無にかかわらず166軒(166/196 = 84.7%)の酪農家の検体が16倍以上の中和抗体価を示した。また、そのうち疫学情報の入手が可能であった132軒中、64軒(48.5%)では過去にBVDV感染が摘発されることがなく、ワクチン接種歴もなく、かつ自家生産牛のみの牛群であった。以上からこれらの地区には、感染経路は不明であるがBVDVが広く浸潤していることが明らかとなり、本感染症を牛群から清浄化するためには長期的な監視が必要であると考えられた。

——キーワード：BVDV, 清浄化, ウイルス中和試験, 乳清。

-----日獣会誌 57, 705～709 (2004)

牛ウイルス性下痢・粘膜病(BVD・MD)は世界各地で発生が認められ、生産性を低下させる一要因と考えられている[3, 4]。その原因は豚コレラウイルス(CSFV)および羊のボーダー病ウイルスとともにフラビウイルス科ペスチウイルス属を構成する牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)である。BVDVには2つの遺伝子型、すなわちBVDV1およびBVDV2が存在し[6]、両者では抗原性状に大きな差が認められる[15]。

現在、日本においてはBVD・MDに対するワクチンとして、3種および5種混合生ワクチンや不活化ワクチンが存在する。BVDVのみの予防を目的としたワクチン接種状況、BVDVの浸潤状況は完全には把握されていないのが現状である。そこで今回、北海道内におけるBVDVの浸潤状況を調査する目的で、牛群単位で採材可能なバルク乳を用いて、乳清を検体としたBVDVの中和抗体調査を行った。バルク乳清を用いた抗体調査は、諸外国においてELISAを用いて実施されており[2, 10, 12-14, 16]、牛群の抗体保有率の指標になると考えられる。また、各酪農家におけるBVDVワクチン接種

状況、過去のBVDV感染摘発の有無、および導入牛の有無などと牛群の抗体保有率との関連性を検討した。

材 料 お よ び 方 法

検体：2003年4月～8月にかけ北海道内の約300km離れた2地区(AおよびB地区)の全酪農家196軒(A地区151軒、B地区45軒)のバルクタンクから計197検体(A地区の一軒は2基のタンクを所有)の材料を得た。バルク乳50mlを4℃、3,000rpm、15分間遠心し、脂肪分を取り除いた上清(乳清)を試験に供した[17]。乳清を保存する場合には-20℃で保存した。また沈澱した体細胞から既報の方法[7]に準じRNAを抽出し、RT-PCR法によってBVDV遺伝子を検出した。

細胞：馬血清馴化MDBK(MDBK-HS)細胞は、10%非働化馬血清、0.292mg/ml L-グルタミン、抗生物質(ペニシリン200U/ml, ストレプトマイシン200μg/ml)および0.3% Tryptose Phosphate Brothを添加し、10% NaHCO₃でpH7.2に調節したイーグルMEMを用いて、37℃、5% CO₂存在下で培養した。

† 連絡責任者：田島譽士(北海道大学大学院獣医学研究科附属家畜病院)

〒060-0818 札幌市北区北18条西9 ☎・FAX 011-706-5100

表1 ワクチン接種歴によるBVDV中和抗体保有状況^{a)}

地区	ワクチン接種歴		中 和 抗 体 価					
			<2	2	4	8	16≤	計
A	あり	育成等 ^{b)}	0	0	0	0	3 (100.0) ^{d)}	3 (100)
		搾 乳 ^{c)}	0	0	0	0	2 (100.0)	2 (100)
	なし		8 (5.5)	5 (3.4)	3 (2.0)	8 (5.5)	122 (83.6) ^{e)}	146 (100)
	計		8 (5.3)	5 (3.3)	3 (2.0)	8 (5.3)	127 (84.1)	151 (100)
B	あり	育成等 ^{b)}	1 (5.6)	0	0	3 (16.7)	14 (77.8)	18 (100)
		搾 乳 ^{c)}	0	0	0	0	0	0 (100)
	なし		1 (3.7)	1 (3.7)	0	0	25 (92.6)	27 (100)
	計		2 (4.4)	1 (2.2)	0	3 (6.7)	39 (86.7)	45 (100)
計			10 (5.1)	6 (3.1)	3 (1.5)	11 (5.6)	166 (84.7)	196 (100)

a) : 数字は各抗体価を示した農家数とその割合 (%) b) : 子牛, 育成牛, 未経産牛のみに接種歴あり
c) : 搾乳牛に接種歴あり d) : BVDV遺伝子陽性の1検体を含む
e) : BVDV遺伝子陽性の10検体を含む

ウイルス：中和試験には、BVDV1に属するNose株およびKS86-1cp株、BVDV2に属するKZ-91CP株を用いた [11]。これらはいずれも細胞変性効果 (CPE) を示し、それぞれ抗原性を異にする。

ウイルス中和試験： 5×10^5 /ml に調整したMDBK-HS細胞を96穴プレートに100 μ l ずつ分注し、37℃、5% CO₂ 存在下で培養した。細胞がシート状になったのを確認後、試験に供した。培養液を用いて1～8倍の範囲で2倍階段希釈したバルク乳清と、同じく培養液を用いて200TCID₅₀/25 μ l に調整したウイルス液を等量混合し、37℃で1時間静置した。培養細胞プレートの培養液を除去し、混合液を50 μ l ずつ細胞に接種した。37℃で1時間培養し吸着させた後、混合液を除去し、PBS (–) を用いて洗浄した。培養液100 μ l を加え、さらに5～6日間培養し、CPEを判定した。乳清の代わりに培養液を混合した液を接種した陰性対照を用意し、バックタイトレーションも行った。

全検体に対しNose株を用いたウイルス中和試験を行い、乳清の希釈倍率 (抗体価) が<2, 2, 4倍の検体に関してはさらにKS86-1cp株およびKZ-91CP株を用いた中和試験を実施した。BVDVと同じベスチウイルス属のCSFVの血清を用いた中和試験による抗体検出法に準じ、抗体価2倍以上を中和抗体保有とした [18]。また、複数株を用いて中和試験を行った検体に関しては、最大抗体価を示した株に対する中和抗体価を検体が持つ中和抗体価とした。

疫学調査：バルク乳採材時に各酪農家およびその酪農家を担当している獣医師から、BVDVワクチンの接種状況、過去のBVDV感染歴 (ウイルス陽性となった個体の有無)、導入牛の有無などの情報を得た。

成 績

牛群の抗体保有状況：AおよびB両地区ともほとんど

の検体がNose株に対し16倍以上の抗体価を保有していた (表1)。また、8倍以下の抗体価であった検体はすべてKS86-1cpおよびKZ-91cpに対する中和抗体価が2倍未満であった。2基のタンクを所有する農家において、それぞれのバルク乳清中抗体価は同じ16倍以上であった。A地区の151農家においては、中和抗体を保有しない農家は8軒 (5.3%) のみであり、残りの143軒 (94.7%) からは中和抗体が検出され、そのうち127軒 (84.1%) は今回抗体価の最大値とした16倍以上であった。B地区の45軒においては、2軒 (4.4%) を除くすべての農家から中和抗体が検出され、そのうち86.7% は16倍以上の抗体価であった。

BVDV遺伝子検出結果：A地区の11軒のバルク乳からBVDV遺伝子が検出された。B地区のバルク乳からはBVDV遺伝子は検出されなかった。BVDV遺伝子が検出された11軒の農家のバルク乳清はすべて、16倍以上の抗体価であった (表1)。

ワクチン接種歴と抗体保有状況 (表1)：ワクチン接種率はA地区3.3% (5/151)、B地区40.0% (18/45) であった。A地区では、搾乳牛群に対し5種混合不活化ワクチン (2軒)、育成牛に対し3種混合生ワクチン (3軒) が接種されていた。B地区では5種混合生ワクチンが、子牛または育成牛に接種されていた。ワクチン接種農家ではA地区100%、B地区77.8% (14/18軒) が16倍以上の中和抗体価を示した。また、非接種農家でもA地区83.6% (122/146軒) B地区92.6% (25/27) が16倍以上の中和抗体価を示していた。BVDV遺伝子が検出された11軒の農家中10軒は、ワクチン非接種農家であった。

過去のBVDV感染の発生歴と抗体保有状況：A、B両地区196軒中、過去にBVDV感染が摘発されたことのある酪農家は32軒であった。これら32軒のうち16倍以上の抗体価を示した農家は、A地区の25軒 (92.6%)、

表2 各農場における過去のBVDV感染歴と中和抗体保有状況

検体数 (%)

地区	BVDV感染 ^{a)}	中 和 抗 体 価					計
		<2	2	4	8	≥16	
A	有	0	0	0	2 (7.4)	25 (92.6) ^{b)}	27 (100)
	無	8 (6.5)	5 (4.0)	3 (2.4)	6 (4.8)	102 (82.3)	124 (100)
B	有	0	0	0	0	5 (100.0)	5 (100)
	無	2 (5.0)	1 (2.5)	0	3 (7.5)	34 (85.0)	40 (100)

a) : 過去にBVDV感染の摘発例があれば「有」とした

b) : BVDV遺伝子陽性の11軒の農家を含む

表3 バルク乳含有頭数とBVDV中和抗体保有状況

検体数 (%)

地区	頭数 ^{a)}	中 和 抗 体 価					計
		<2	2	4	8	≥16	
A	～30	5 (8.3)	1 (1.7)	1 (1.7)	7 (11.7)	46 (76.7)	60 (100)
	31～50	2 (2.7)	4 (5.5)	2 (2.7)	1 (1.4)	64 (87.7)	73 (100)
	51～100	1 (6.3)	0	0	0	15 (93.8)	16 (100)
	101	0	0	0	0	3 (100)	3 (100)
B	～30	0	0	0	0	10 (100)	10 (100)
	31～50	2 (8.7)	0	0	1 (4.3)	20 (87.0)	23 (100)
	51～100	0	1 (10.0)	0	2 (20.0)	7 (70.0)	10 (100)
	101	0	0	0	0	2 (100)	2 (100)

a) : 1基のバルク乳に含まれる搾乳牛の頭数

表4 疫学情報に基づく分類と高力価中和抗体保有状況^{a)}

BVDV 摘発 ^{b)}	ワクチン 接種 ^{c)}	導 入 牛		計
		有	無	
有	有	1 (0.8)	2 (1.5) [1]	3 (2.3)
	無	7 (5.3) [2]	17 (12.9) [6]	24 (18.2)
	計	8 (6.1)	19 (14.4)	27 (20.5)
無	有	4 (3.0)	11 (8.3)	15 (11.4)
	無	26 (19.7)	64 (48.5)	90 (68.2)
	計	30 (22.7)	75 (56.8)	105 (79.5)
計		38 (28.8)	94 (71.2)	132 (100)

a) : 16倍以上の高い抗体価を示した酪農家のうち、導入牛に関する情報が得られた132軒についてBVDV摘発、BVDVワクチン接種の有無と中和抗体保有状況を比較した。数字は農家数と132軒に占める割合 (%), [] 内はBVDV遺伝子陽性農家数を示す。

b) : 過去にBVDV感染症の摘発例があれば「有」とした

c) : 牛群内の牛にBVDVワクチンが接種されていれば「有」とした

B地区5軒 (100%) であった (表2)。過去にBVDV感染が摘発されたことのない酪農家では、中和抗体陰性や低い抗体価を示す検体もあったが、A地区82.3%およびB地区85.0%もの農家が16倍以上の中和抗体を保有していた。

搾乳頭数と抗体保有状況 : 採材したバルク乳に含まれていた搾乳牛頭数に基づき30頭以下、31～50頭、51～100頭および101頭以上に分類すると、AおよびB両地区ともバルク乳に含まれる搾乳頭数にかかわらず各群の

70～100%が16倍以上の抗体価を示していた (表3)。

導入牛の有無と抗体保有状況 : 16倍以上の抗体価を示した酪農家のうち、導入牛に関する情報が得られた132軒について、過去のBVDV発生歴、ワクチン接種の有無、導入牛の有無に基づき分類した (表4)。132軒中64軒 (48.5%) と半数近くが、過去にBVDV感染の摘発はなく、ワクチンも接種されておらず、かつ自家生産牛だけの牛群にも関わらず、16倍以上の抗体価を示していた。

考 察

BVDV感染症は多様な病態を示し、ウイルスの感染源と考えられる持続感染牛は、特徴的な粘膜病を発症することなく牛群に存在することが多い [7, 8]。この感染症の制圧のためには正確な浸潤状況の把握が必要である。そこで今回、北海道内の異なる2地区において、それぞれの地区内にあるすべての酪農家を対象としたBVDV浸潤状況を調査した。

本研究では、乳清を用いたウイルス中和試験によって浸潤状況を調査した。乳清中にはラクトフェリンなどの抗ウイルス活性を示す物質の存在が知られている [1]。今回の検査では、表1に示すように中和抗体価が<2を示す検体が約5%存在したことから、乳清内物質による非特異的なCPE抑制による見かけ上の中和抗体を検出しているのではないと考えられた。その結果、AB両地区とも約85%の農家がNose株あるいはそれと抗原性

がきわめて近いBVDVに対する抗体を保有していることが判明した。このことから、両地区にはBVDVが広く浸潤しており、流行ウイルスに抗原性の大きな違いはないことが推察された。

今回検査した酪農家には、搾乳牛を含めた全頭に対して不活化ワクチンが接種されていた農家や、子牛または育成牛に対して生ワクチンが接種されていた牛群が存在したが、ワクチン接種の有無に関わらず全体の85%もの農家が16倍以上の抗体価を示した(表1)。BVDV生ワクチン接種によって、今回の検体である乳清中にBVDV抗体が検出されるようになった可能性は否定できない。すなわち、子牛や育成牛に接種された生ワクチンウイルスが搾乳牛に感染した、あるいは若齢期にワクチンを接種された個体が成長し搾乳牛となったなどの可能性が考えられる。しかしながら、今回検査対象とした2地区196軒におけるワクチン接種農家は23軒(11.7%)と少なく、本調査における中和抗体検出が生ワクチン接種のみに起因しているとは考えにくい。

過去にBVDV感染が摘発されたことのある32軒の酪農家において、16倍以上の高い中和抗体価を示す農家が30軒(93.8%)もあった。また、BVDV遺伝子が検出された11軒の農家のバルク乳中の抗体価もすべて16倍以上であった。過去に摘発例のない164軒の酪農家では、中和抗体価の低い検体も存在したが、136軒(82.9%)の農家のバルク乳中の抗体価が16倍以上であった。これらの成績から、過去に摘発例がない酪農家にもBVDVが広く浸潤していると考えられた。表4に示すように今回の調査によって、過去にBVDV摘発例がなく、ワクチン接種も実施されておらず、さらに導入牛もない農家の半数近くが、16倍以上の中和抗体を保有することが明らかとなった。牛群が高い中和抗体価を保持している原因としては、ワクチン接種以外に、BVDV感染歴やワクチン接種歴の不明な牛の導入などによるBVDVの自然感染が考えられるが、その侵入経路は不明であった。バルク乳中の抗体保有状況をELISAにより調査した欧米の報告では、乳清中の抗体価は血清中の抗体価よりやや低くなるが互いに高い相関性があり、バルク乳清中抗体のELISA測定値は泌乳牛群中の抗体保有頭数と相関していることが明らかとなっている[2, 10, 12-14, 16]。今回、ELISA抗原の入手が困難であったため、中和試験を用いて牛群の抗体保有状況を調査した。最大でも16倍の抗体価までしか検査しなかったが、バルク乳に含まれる搾乳牛頭数によらず大部分の酪農家の検体が16倍以上の中和抗体価であった。バルク乳清中の抗体が牛群の抗体保有状況をよく反映している[12, 13]との報告からすると、今回検査対象とした地区ではBVDVが広く浸潤していると考えられた。

ワクチン接種率が低く、過去にBVDVが摘発された

ことのある農家が多いA地区では、バルク乳からBVDV遺伝子が検出された農家も多かった。逆にB地区では、バルク乳からBVDV遺伝子は検出されず、疫学調査ではワクチン接種率が高くBVDV摘発農家数も少なかった。しかしながら、上述のとおり中和抗体保有状況は、両地区ともほぼ同じであった。今回の調査で16倍以上の抗体価が確認され、BVDV遺伝子は検出されなかったそれぞれの地区の一軒ずつの農家で、調査後に持続感染子牛が1頭ずつ摘発された。これらの持続感染牛は、それぞれの農場で用いられていたワクチン株や以前に自然感染したウイルスとは抗原性の異なるBVDVが感染したため、感染防御ができなかったことによって発生した可能性がある。また、無症状キャリアーとして持続感染牛が牛群内に潜伏し、それが妊娠した場合には新たな持続感染牛が出生することもある[7, 8]。このようにして今回の持続感染牛が摘発された可能性が考えられる。BVDVは持続感染牛の存在によって牛群に留まっている可能性が高く、ヨーロッパ諸国ではそれらの持続感染牛の摘発淘汰による清浄化が功を奏している[5, 9]。今回の結果からも、牛群のBVDV清浄化のためには定期的に牛群を監視する必要性が示された。

稿を終えるに当たり、MDBK-HS細胞、KS86-1cp株およびKZ-91CP株の分与ならびにウイルス中和試験をご指導いただいた北海道大学大学院獣医学研究科動物疾病制御学講座微生物学教室迫田義博先生に感謝する。本研究の一部は農林水産省から日本獣医学会への委託事業「生産性向上飼養管理技術の開発」として実施された。

引用文献

- [1] Arnold D, Di Biase AM, Marchetti M, Pietrantoni A, Valenti P, Seganti L, Superti F : Antiviral Res, 53, 153-158 (2002)
- [2] Beaudeau F, Belloc C, Seegers H, Assie S, Pourquier P, Joly A : J Vet Med B, 48, 705-712 (2001)
- [3] Chi J, VanLeeuwen JA, Weersink A, Keefe GP : Prev Vet Med, 55, 57-68 (2002)
- [4] Chi J, VanLeeuwen JA, Weersink A, Keefe GP : Prev Vet Med, 55, 137-153 (2002)
- [5] Greiser-Wilke I, Grummer B, Moennig V : Biologicals, 31, 113-118 (2003)
- [6] Heinz FX, Collett MS, Purcell RH, Gould EA, Howard CR, Houghton M, Moormann RJM, Rice CM, Thiel HJ : Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, van Regenmortel MHV, et al eds, 859-878, Academic Press, San Diego (2000)
- [7] 小佐々隆志, 田島誉士, 大橋和彦, 小沼 操 : 日獣会誌 57, 511-514 (2004)
- [8] Lindberg AL : Vet Q, 25, 1-16 (2003)
- [9] Lindberg AL, Alenius S : Vet Microbiol, 64, 197-222 (1999)
- [10] Melendez P, Donovan A : Prev Vet Med, 60, 237-241 (2003)

- [11] Nagai M, Ito T, Sugita S, Genno A, Takeuchi K, Ozawa T, Sakoda Y, Nishimori T, Takamura K, Akashi H : Arch Virol, 146, 685-696 (2001)
- [12] Niskanen R : Vet Rec, 133, 341-344 (1993)
- [13] Niskanen R, Alenius S, Larsson B, Jacobsson SO : Arch Virol, Suppl 3, 245-251 (1991)
- [14] Niskanen R, Alenius S, Larsson B, Juntti N : J Vet Med B36, 113-118 (1989)
- [15] Pellerin C, van den Hurk J, Lecomte J, Tussen P : Virology, 203, 260-268 (1994)
- [16] Pritchard GC, Kirkwood GM, Sayers AR : Vet Rec, 150, 182-183 (2003)
- [17] Radwan GS, Brock KV, Hogan JS, Smith KL : Vet Microbiol, 44, 77-91 (1995)
- [18] Sakoda Y, Hikawa M, Tamura T, Fukusho A : J Virol Methods, 75, 59-68 (1998)

Detecting the Neutralizing Antibody in Bulk-milk Whey To Investigate Prevalence of Infection with the Bovine Viral-diarrhea Virus

Takashi KOZASA*, Motoshi TAJIMA†, Kimihiro SANO, Ichiro YASUTOMI,
Kazuhiko OHASHI and Misao ONUMA

** Laboratory of Infectious Diseases, Department of Disease Control, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Kita 18-9, Kita-ku, Sapporo, 060-0818, Japan*

SUMMARY

We investigated bulk milk samples from 196 herds in 2 districts of Hokkaido (151 farms from district A and 45 farms from district B) to determine the prevalence of infection with the bovine viral-diarrhea virus (BVDV). The BVDV was detected from a few area-A samples but from none of the area-B samples. The virus-neutralization test conducted to detect BVDV antibodies in bulk-milk whey showed neutralizing-antibody titers (NT) of more than 16 in 166 samples (84.7%). Epidemiological information obtained from 132 of the 166 herds showed that 64 herds (48.5%) had BVDV NT of more than 16. None of these herds, however, had histories of BVDV infection or vaccination; and no animals had been introduced into them from other farms. These results suggest that BVDV prevailed in these areas irrespective of BVDV-gene detection, although the origin of the BVDV infection remained unclear. Therefore, eradicating BVDV from dairy populations may necessitate long-term assessment of herd BVDV infection. — Key words : BVDV, eradication, virus-neutralization test, whey.

† Correspondence to : Motoshi TAJIMA (Veterinary Teaching Hospital, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University)

Kita 18-9, Kita-ku, Sapporo, 060-0818, Japan TEL · FAX 011-706-5100

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 57, 705 ~ 709 (2004)