

## 1. 乳肉複合農家における牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛 1 型, 2 型の同時発生事例

県西家畜保健衛生所

○古谷 道栄 柏井 美穂  
高橋 覚志 栗山 伸人

牛ウイルス性下痢粘膜病は、牛ウイルス性下痢ウイルス（以下、BVDV）によって引き起こされる疾病である。通常、牛が BVDV に感染しても症状は一過性で回復する。しかし、妊娠牛に感染した場合、胎子は感染時の胎齢によっては、生涯にわたって BVDV を体内に保有し続けるとともに体外に排出し続ける持続感染牛（以下、PI 牛）となって産出され、同一牛群内の汚染源になるとともに、他農場への伝播源となる<sup>1)</sup>。

また現在、BVDV は遺伝子型で BVDV1 型（以下、1 型）と BVDV2 型（以下、2 型）に分類されている。県内では過去に 1 型による発生事例や持続感染牛の摘発事例の報告がなされており、1 型は県内に浸潤していると考えられる。

今回、管内において BVDV1 型及び 2 型の PI 牛の同時摘発事例が発生したので報告する。

### PI 牛の摘発と経緯

当該農場は、ホルスタイン種成牛を 47 頭飼養し、産出される子牛はすべて交雑種であり、同農場で肥育され出荷されている。また、搾乳用の後継牛はすべて初妊牛を外部から導入している。

本年 8 月、哺乳牛 4 頭で呼吸器症状が認められた。当該牛について病性鑑定を実施したところ 2 頭が BVDV 抗原エライザ陽性であり、鼻腔スワブの PCR でも陽性であったため PI 牛であると疑った。そのため農場の BVDV の浸潤状況を確認するため飼養牛全頭の採血と毛根部の簡易キットによる抗原検査を行った。

### 子牛の病性鑑定

呼吸器症状を示した子牛 4 頭（No.1～4）について血清、鼻腔スワブを検査材料とした。BVDV 抗原エライザ（IDEXX 社）で、No.1, 2 は陽性（1 回目）となった。細菌検査は培養検査とマイコプラズマ検査を実施した。培養検査の結果、有意な菌は分離されず、No.1～3 は PCR でマイコプラズマ陽性となった。ウイルス検査は、PCR 法を用いて、牛 RS ウイルス・牛パラインフルエンザウイルス・コロナウイルス・牛伝染性鼻気管炎ウイルス・BVDV を検査した。No.1, 2 は BVDV 陽性であったので、RFLP（Restriction Fragment Length Polymorphism, 制限酵素断

片長多型)法を実施し、No.1は1型、No.2は2型と判別された(表1)。

解剖当日までにNo.1が死亡したためNo.2のみ解剖を行い、臓器スワブを採材し簡易キットにより抗原検査を実施し、鼻腔スワブ、唾液、直腸スワブ、毛根、皮膚は陽性、尿は弱陽性を示した。

## 農場の浸潤調査

### 1 材料

酪農部門で飼養する64頭について血液・毛根を採取した。

### 2 方法

- (1) 抗原検査：BVDV抗原エライザ(血清)、簡易キット(毛根)
- (2) 抗体検査：BVDV抗体エライザ、中和抗体検査(1型・2型)

### 3 結果

#### (1) 抗原検査

##### ア BVDV抗原エライザ

子牛No.1, 2：陽性(2回目) 他の子牛No.5, 6：陽性

##### イ 抗原簡易キット(毛根)

子牛No.1, 2：陽性

#### (2) 抗体検査

##### ア BVDV抗体エライザ

成牛47頭中41頭陽性

子牛17頭中4頭陽性

##### イ 中和抗体

子牛No.1, 2, 5, 6：陰性

No.1, 2はPI牛であることが判明した。

- (3) 子牛No.5, 6について再度抗原エライザを実施し、抗原陰性を確認するとともに抗体エライザにより抗体が確認され、PI牛ではないことが判明した。

## PI牛の概要

平成28年7月にPI牛を分娩した牛は、どちらも5月に市場を通して県外から導入された者で、分娩10か月前の平成27年9月に2頭とも授精されたと考えられる。PI牛になるには、妊娠90~120日齢にウイルスに暴露されていると考えられるため、母牛が感染したのは平成27年12月から平成28年1月と考えられる。導入された母牛はその時期にそれぞれ別の牧場にいたため、偶然に同じ時期にそれぞれ1型、2型に感染したものが、同時期に導入されたと考えられる。また、BVDV2型の摘発は本県では初めてとなる。(表3)

## バルク乳検査

牛群としての抗体価の推移を調べるため、BVDV 抗体エライザを用いて月に 1 回バルク乳の抗体価を検査した。PI 牛淘汰から 3 か月経過した時点でも抗体は陽性であるが、回帰直線 ( $y=0.0025X+0.266$ ) からバルク乳中の抗体が陰性になるのは PI 牛とう汰後 6 か月程度と推測される。(図 1)

## 考察及び今後の対策

管内の酪農家は育成牛の生産基盤を持たない農場が多く、そのような農場は外部からの導入が主になるため、農場への BVDV の進入の危険性は高いと考えられる。特に本農場は交雑種子牛を自農場で肥育するため、市場出荷時等による BVDV 抗原検査を受けることがないので、無症状なら発見が遅れることがある。

今回 2 頭の子牛が分娩された平成 28 年 7 月に BVDV が大量に排出され、農場全体が汚染したと考えられる。このとき、妊娠 90~120 日齢の胎児は、PI 牛になった可能性があるため、出生後に抗原検査を行う必要がある。また、監視のため牛群の抗体価の推移を確認するためバルク乳の抗体検査も併せて行っていく。

PI 牛からの急性感染では、牛群の繁殖成績の低下や病原微生物とストレス等による免疫状態の変調を起こす牛呼吸器病症候群の発症など、生産性が低下することが知られている。今回は子牛の呼吸器症状を発端に病性鑑定を実施し、PI 牛を早期に摘発することができた。なお、本年 6~8 月の繁殖成績は前年同期と差がなかった。

PI 牛を診断する抗原検査は、生後 1 か月間は移行抗体の影響で抗原が検出されないため、最初の抗原検査が 1 か月齢となることから PI 牛の確定するまで 2 か月程度要する。その間、隔離が必要だが汚染が懸念され、農場経営者の負担も大きい。そのため、より早期に診断できる方法の開発が求められている。

また自然感染牛のウイルスは変異を示さないが PI 牛のウイルスは変異を示す<sup>2)</sup>ことが言われている。今回 BVDV の 1 型と 2 型が同時に進入し農場内にウイルスが混在していたので、妊娠牛が 1 型、2 型に同時に感染した場合、胎内でウイルスが変異をおこす可能性がある。そのため、家保としても検査を継続する必要がある。

稿を終えるにあたり、PCR 検査、中和抗体検査等を実施して頂いた県北家畜保健衛生所病性鑑定第一、二課の皆様には深謝いたします。

## 参考文献

- 1) 牛ウイルス性下痢・粘膜病に関する防疫対策ガイドライン 農林水産省消費・安全局動物衛生課長通知
- 2) 田島誉士, 牛ウイルス性下痢ウイルス感染症, 日獣会誌, 65, 111~117 (2012)

表1 子牛の病性鑑定

子牛	誕生日	細菌検査		ウイルス検査(PCR)				
		培養	マイコプラズマ	BRSV	BPI3	コロナ	IBRV	BVDV
No.1	7/2	-	+	-	-	-	-	+1型
No.2	7/10	-	+	-	-	-	-	+2型
No.3	5/10	-	+	-	-	-	-	-
No.4	8/12	-	-	-	-	-	-	-

表2 農場の浸潤調査での抗原陽性牛

子牛	誕生日	エライザ		中和抗体	
		抗原	抗体	1型	2型
No.5 1回目	3/6	+	-	<2	<2
No.5 2回目		-	+	32	2
No.6 1回目	1/14	+	-	<2	<2
No.6 2回目		-	+	16	8

表3 PI牛の概要

区分	H27年												H28年												H29年		
	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月							
No.1	本牛					90~120日齢							出生	死亡													
	母牛		授精			県外A農場					導入		分娩														
No.2	本牛					90~120日齢							出生	淘汰													
	母牛		授精			県外B農場					導入		分娩														

同居牛(経産)	AI又はET時期	胎齢100日前後	分娩予定
---------	----------	----------	------

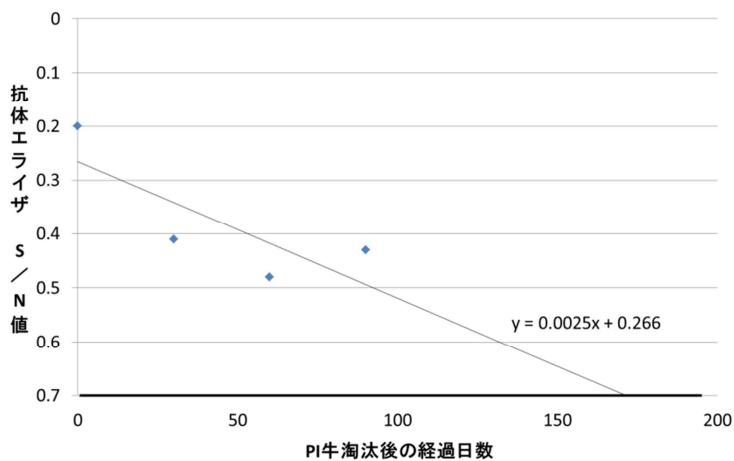


図1 バルク乳の BVDV 抗体エライザ値の推移

## 2. 管内一酪農場における牛ウイルス性下痢ウイルスの清浄化事例

鹿行家畜保健衛生所

○田邊 ひとみ 清水 ひろみ  
楠原 徹 菊池 理之

牛ウイルス性下痢ウイルス（以下、BVDV）による病態は呼吸器症状や下痢の他、流産や異常産などの繁殖障害、持続感染牛（以下、PI牛）の出生等、多岐にわたり、畜産経営に大きな経済被害を及ぼす。BVDVの流行で最も問題となるのはPI牛の存在で、牛群におけるBVDVの清浄化にはPI牛の淘汰が必須である。

平成27年7月、管内の酪農場でPI牛が摘発されたため、BVDV清浄化を実施したのでその概要を報告する。

### 農場の概要

当該農場は、成牛55頭、育成牛20頭の酪農場で、牛舎はフリーストールである。現在、飼養牛の約7割は自家産で、その他、年に1～2頭、組合等を通して導入しているが、飼養規模拡大のため平成24年3月から25年6月にかけて県内外の農家から経産牛及び育成牛合わせて34頭を導入した。育成牛の預託は実施していない。BVDVワクチンは、平成22年以降未接種であった。

なお、当該農場では平成21年3月にもPI牛の摘発があったが、その後全頭検査や子牛の検査により清浄化を達成している。

### 本事例におけるPI牛初摘発の概要

#### 1 摘発経緯

平成27年5月11日に生まれた子牛で哺乳力が弱く、虚弱であったため、同年7月2日に研究牧場へ預託し、治療及び育成を依頼した。7月13日には哺乳量は増えたが、その後再び食欲不振となり、17日に発熱、24日に死亡したため、当所に病性鑑定依頼があった（写真1）。

#### 2 病性鑑定

血液検査では、7月2日、6日、13日に採血した血漿について、抗体定量ELISA（Bio-X BVDV-ELISA kit；陽性は1+～5+）及び抗原ELISA（IDEXX BVDV Ag エリーザキット）を実施したところ、抗体は2日及び6日に3+判定であったものが7月13日には1+判定に減少し、抗原はすべて陽性であった。

解剖所見では、胸腺は著しく小さく（写真2）、肺の左右前葉から中葉にかけて微小膿瘍を伴う肝変化が広範囲にみられた（写真3）。

ウイルス検査では、主要臓器のMDBK-SY細胞を用いた培養でBVDV1型が分

離された。

細菌検査では、肺から *Streptococcus suis* が分離された。

病理組織検査では、肺で菌体を伴う化膿性肺炎が広範囲に認められ、一部では石灰化と異物巨細胞からなる肉芽腫病変が散見された。また、耳下及び下顎リンパ節では、石灰化と多核巨細胞からなる巣状病変が多数認められた。脾臓及び回腸パイエル板では、軽度のリンパ球減少が認められた。

以上の結果から、胸腺低形成を伴う BVDV 感染症の持続感染と診断した (PI-No.1)。

## BVDV 清浄化対策

### 1 浸潤状況調査

(1) 家畜伝染病予防法第 5 条に基づく検査（以下、5 条検査）の血清検査

平成 25 年 10 月 15 日に実施した 5 条検査の余剰血清 56 検体について、抗原 ELISA 及び抗体定量 ELISA を実施したところ、抗原はすべて陰性、抗体は 12 頭 (21.4%) が保有していた。抗体陽性牛は、平成 20 年以前に生まれた牛と導入牛であった。

(2) PI 牛摘発後の全頭検査

平成 27 年 8 月 11 日、成牛 53 頭、育成牛及び子牛 28 頭、計 81 頭について、抗体定量 ELISA 及び抗原 ELISA を実施したところ、抗体は、81 頭中 74 頭 (91%) が陽性で、このうち 5+ が 42 頭と最も多く、抗原は 3 頭が陽性となった。さらに、バルク乳について BVDV 特異遺伝子を検出する RT-PCR を実施したが、陰性であった。

抗原陽性の 3 頭について、約 2 週間後に再検査を実施したところ、2 頭が陽性となり、PI 牛と判定した (PI-No.2 及び No.3)。

### 2 出生子牛の検査

平成 27 年 8 月から平成 28 年 6 月までに生まれた子牛 43 頭について、原則、初乳摂取前に抗原 ELISA を実施した。さらに、状況に応じて、2~3 週後に再検査を実施したところ、子牛 43 頭中 3 頭を PI 牛と診断した (PI-No.4, 5 及び 6 (写真 4))。

### 3 死流産胎児及び死亡牛の病性鑑定

平成 27 年 8 月から平成 28 年 6 月までに発生した死流産事例 4 例及び死亡事例 2 例について病性鑑定を実施した。

そのうち、平成 27 年 8 月 21 日に胎齢 198 日で流産した 1 例で、胎子の主要臓器から BVDV 特異遺伝子が検出され、脳からは BVDV が分離されたため、BVDV による流産と診断した (写真 5)。

### 4 清浄化確認のための全頭検査

平成 28 年 6 月 22 日、成牛 55 頭、育成牛及び子牛 18 頭の計 73 頭の血清につい

て抗体定性 ELISA (VDPro BVDV AB ELISA kit), 中和抗体検査及び抗原 ELISA を実施した。抗体検査は, ELISA では 69 頭 (94.5%), 中和抗体検査では 70 頭 (95.9%) が抗体を保有しており, 中和抗体価は 256 倍以上が 61 頭 (83.6%) と最も多く, 幾何平均は 175 倍であった (表 1)。また, 抗原はすべて陰性であった。

## 5 農場への指導, 今後の対策

摘発された PI 牛は淘汰まで隔離し, 妊娠牛と接触しないように指導した。さらに, 導入牛や育成牛へのワクチン接種の徹底を指導した。

今後は, 生後半年は移行抗体の影響を考慮して, 全頭検査時に 6 か月令未満であった子牛は, 平成 28 年 12 月に再検査を実施し, さらに, 平成 29 年度の 5 条検査時に検査を実施する予定である。

## PI 牛の概要及び推定感染時期 (表 2 及び 3)

摘発された 6 頭の PI 牛は 1 日齢から 13 か月齢であり, すべて病性鑑定を実施したが, PI-No.1 以外は異常はみられず, PI 牛の母牛は正常であった。

胎齢 18 日から 125 日の妊娠牛への感染で PI 牛が生まれるとすると, PI-No.2 は平成 25 年 11 月中旬から平成 26 年 3 月初旬の間に母牛に BVDV が感染したと考えられた。PI-No.2 以外の 5 頭は, PI-No.2 が農場内に存在していた平成 26 年 8 月から 27 年 9 月の間に妊娠牛に BVDV が感染したと考えられた (表 2)。

## 当該農場の繁殖成績

繁殖管理を指導している獣医師がハードヘルス型繁殖管理支援ソフトを使用して算出した「受胎牛率」, 「受胎牛率産後 180 日」, 「空胎日数」, 「授精回数」について, 平成 25 年 1 月から平成 28 年 8 月の各月平均は図 1 のとおりであった。全期間の平均は, それぞれ, 49.8%, 50.5%, 139.7 日, 2.41 回であった。受胎牛率及び受胎牛率産後 180 日については, 平均を下回った月, 空胎日数及び授精回数については, 平均を上回った月について, 繁殖成績が低下しているとみなした。その結果, すべての項目に共通して低下している時期は増頭した後の平成 25 年 10 月前後であった。

PI-No.2 が農場に存在していた平成 26 年 8 月から平成 27 年 8 月までを pre, 平成 27 年 9 月以降を post として繁殖成績の平均を t 検定で比較したところ, 受胎牛率産後 180 日に有意差がみられた ( $P < 0.05$ ) が, 他の 3 項目では有意差はみられなかった (表 4)。

## 考察

今回は, 虚弱牛の病性鑑定により PI 牛が摘発されたため, 直後に飼養牛を検査したところ, 約 9 割が抗体を保有しており, すでに農場全体に BVDV がまん延し

ていたことが伺われた。最終的には、当該牛あわせて計 6 頭の PI 牛が当該農場では摘発された。

一般的に、BVDV が農場に侵入する主な原因として、公共牧場の利用や牛の導入などが挙げられる。当該農場においても、飼養頭数拡大のため、不特定多数の農場から導入を実施したため、その導入牛から PI 牛が生まれ、BVDV が農場内にまん延した可能性が高い。

保存血清を検査したところ、平成 25 年 10 月時点では抗原は陰性で、抗体は平成 20 年以前に生まれた牛と導入牛のみが陽性であったことから、この時点ではまだ農場内に BVDV はまん延していなかったと考えられた。導入牛のワクチン接種歴は不明であるが、これらの牛が抗体を保有していたことから、この中に PI 牛を妊娠している牛がいた可能性が考えられた。その後、PI 牛が生まれたことで、農場内にウイルスがまん延し、平成 27 年 11 月から平成 28 年 3 月に PI-No.2 の母牛へ BVDV が感染したと推察された。

BVDV が感染して、胎盤感染が起きると、PI 牛の娩出の他、死流産などの繁殖障害が引き起こされる。他にも、妊娠初期に感染すると、一部は胚死亡が起きるため、不受胎となることにより、空胎日数の延長や授精回数の増加など繁殖成績が低下することが考えられた。そのため、過去数年間の当該農場の繁殖成績を調査した。PI-No.2 が生存していた時期と、PI 牛淘汰後を比較したところ、先に示した空胎日数や授精回数は特に差はでなかったが、受胎牛率産後 180 日は PI 牛がいる期間が有意に低いという結果になった。この時点以前から PI 牛がいた可能性はあるため、繁殖成績にどれくらい影響があったか、今回は明確にはできなかったが、BVDV のまん延により繁殖成績が低下する可能性は考えられる。今後のデータの解析や、他の事例での解析の積み重ねにより繁殖成績のいくつかの項目が低下することが明らかになれば、死流産などの明らかな被害の他、農場の繁殖成績の低下により BVDV の侵入を疑い、検査をすることで、早期発見につながるのではないかと考えられた。

BVD は今年度から防疫対策ガイドラインや、PI 牛淘汰等の補償制度が策定され、全国的に清浄化対策を推進している疾病である。清浄化のためには、BVDV について畜主が理解し、対策を講じることが必要であるため、今後、管内の飼養者へ積極的に啓蒙していきたい。





写真1 PI-No. 1



写真2 PI-No. 1 胸腺

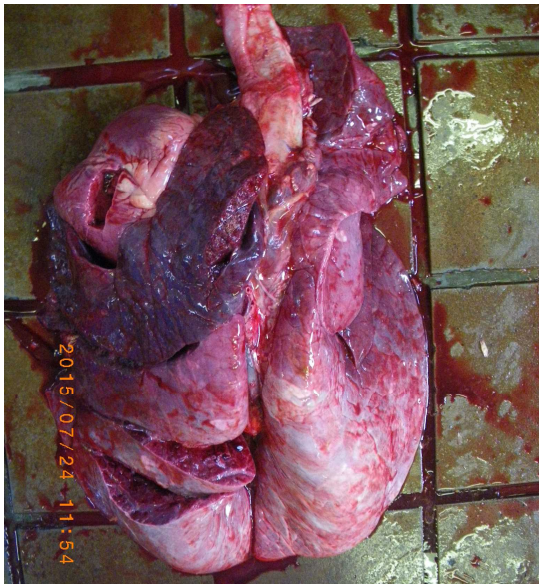


写真3 PI-No. 1 肺の肝変化

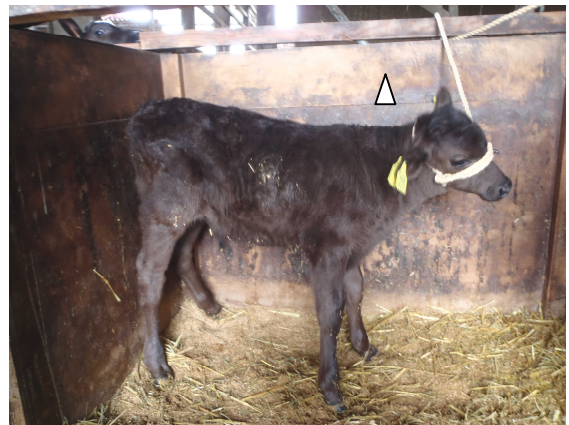


写真4 PI-No. 6



写真5 流産胎児

表1 中和抗体検査結果 (H28.6.22)

抗体価	<2	2	4	8	16	32	64	128	256<	計	幾何平均
頭数	3			1		1	1	6	61	73	175

表2 摘発PI牛の概要

PI-No.	摘発検査	生年月日	検査1回目	検査2回目	自衛殺(死亡)	死亡日齢	当該農場での生存期間	推定感染時期(胎齢18~125日)	
								胎齢18日	胎齢125日
1	病鑑	H27.5.11			H27.7.24	74	H27.5.11~7.2	H26.8.22	H26.12.7
2	全頭	H26.8.4	H27.8.11	H27.8.27	H27.9.1	393	H26.8.4~H27.8.27	H25.11.15	H26.3.2
3	全頭	H27.5.17	H27.8.11	H27.8.27	H27.9.1	107	H27.5.17~8.27	H26.8.28	H26.12.13
4	子牛	H27.10.9	H27.10.9	H27.10.20	H27.10.21	12	H27.10.9~21	H27.1.20	H27.5.7
5	子牛	H28.1.4	H28.1.4	NT	H28.1.5	1	H28.1.4~5	H27.4.17	H27.8.2
6	子牛	H28.3.28	H28.3.31	H28.4.11	H28.4.14	17	H28.3.28~4.14	H27.7.10	H27.10.25

表3 PI牛感染時期予測

年	H25			H26												H27												H28					
	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4		
PI-1											AI	感染									生存												
PI-2	AI	感染																															
PI-3											AI	感染										生存											
PI-4															AI	感染																	生
PI-5																						AI	感染									生	
PI-6																																生	

※ AI…人工授精

表4 繁殖成績の比較

	授精回数	空胎日数	受胎牛率 産後180日	受胎牛率
pre	2.3	133.8	41.9*	48.7
post	2.2	130.5	57.9*	50.8

※ P<0.05 (t検定)

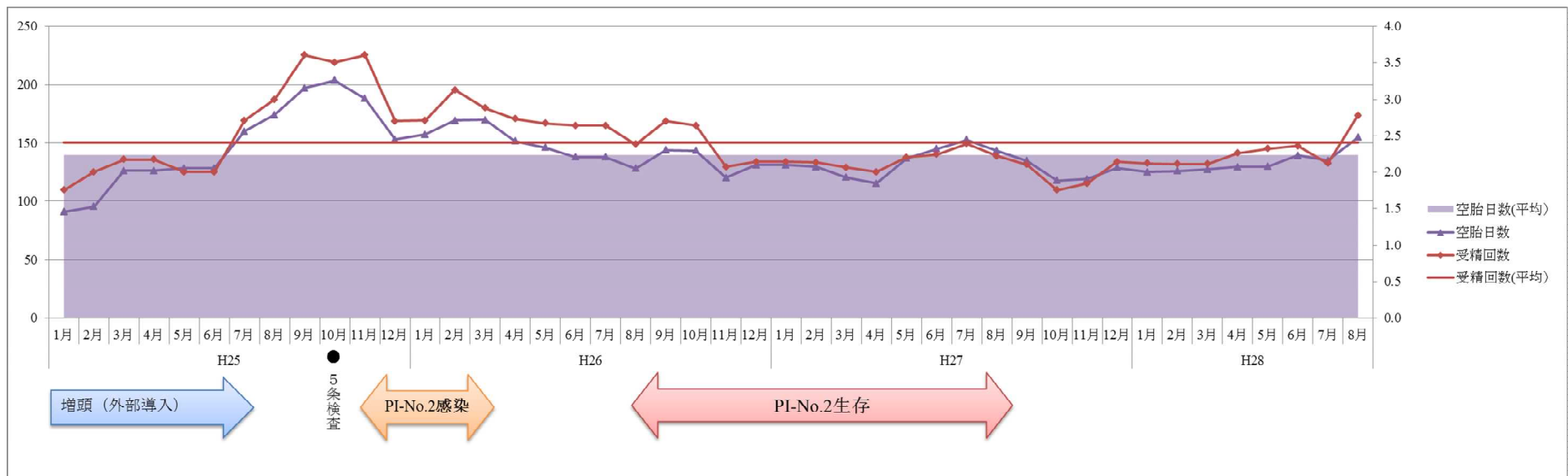
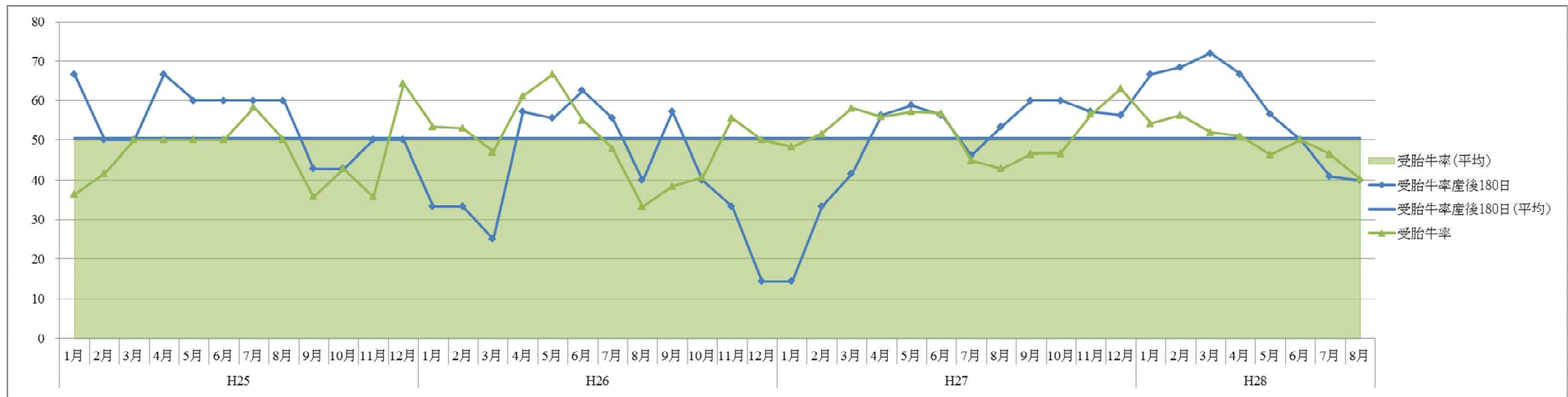


図1 平成25年1月から平成28年8月までの繁殖成績

### 3. バルク乳中の牛ウイルス性下痢ウイルス特異遺伝子及びELISA抗体検出によるサーベイランス体制の検討

県北家畜保健衛生所

○赤上 正貴 高安 真理子

山下 薫 都筑 智子

牛ウイルス性下痢ウイルス（以下、BVDV）に感染した牛群では、産乳量、乳質及び繁殖成績の低下といった慢性的な経済損失が引き起こされる。特に牛群の感染源となるBVDV持続感染（以下、PI）牛は、特徴的な臨床症状を認めにくく、PI牛の摘発には積極的なサーベイランスが有効となる。今回、県内の全酪農場400戸でPI牛の摘発検査を年1回実施するため、効果的なサーベイランス体制を検討したので、その概要を報告する。

#### 本県におけるPI牛の摘発状況及びBVDVサーベイランス手法の検討

##### 1 PI牛の摘発状況

平成26～27年度に実施した家畜伝染病予防法第5条に基づく定期検査等（以下、定期検査）で採取した乳用牛の血清（206戸12,785頭分）を用いてELISA法によるBVDV抗原検査（以下、抗原検査）を実施したところ、12戸24頭のPI牛を摘発した。さらに、PI牛とう汰後に出生した子牛の抗原検査では、3戸4頭を摘発した。PI牛の年齢別分布（図1）は、36か月齢を含む未經産牛が24頭（86%）、経産牛が4頭（14%）であった。

##### 2 BVDV浸潤状況（図2）

定期検査実施農場206戸についてELISA法によるBVDV抗体検査（以下、抗体検査）を実施したところ、ELISA抗体（以下、抗体）が162戸で検出され、抗体陽性率は平均33%であった。移動歴及びワクチン接種歴のない自家育成牛が抗体陽性となった農場（以下、BVDV浸潤農場）は93戸（45%）で、抗体陽性率は平均37%であった。

また、PI牛摘発農場12戸の抗体陽性率は50～97%（中央値87%、平均値80%）であった。抗体陽性率80%以上のBVDV浸潤農場21戸中8戸（38%）はPI牛摘発農場であり、PI牛摘発農場で高い抗体陽性率を示す傾向が認められた。

##### 3 まとめ

本県で摘発されたPI牛の多くは未經産牛であり、PI牛摘発とう汰を効果的に進めるには未經産牛に重点を置いた体制が必要であることが分かった。また、PI牛摘発農場の抗体陽性率は他のBVDV浸潤農場と比べると極めて高い傾向を示したことから、BVDV抗体保有状況からPI牛の存在を推定できることが示唆された。

## 4 BVDV サーベイランス手法の検討

農林水産省が平成28年4月に策定した「牛ウイルス性下痢・粘膜病に関する防疫対策ガイドライン」では、まん延防止対策としてPI牛摘発のための定期検査余剰血清等又はバルク乳を用いた RT-PCR 等によるスクリーニング検査を少なくとも年1回実施することを推奨している。定期検査余剰血清を用いた場合、本県の全酪農場の検査には4年を要し、年1回の検査を行うためには、定期検査対象外の酪農場約300戸の採材を別途行う必要がある。一方、バルク乳からのBVDV遺伝子検出（以下、遺伝子検査）は、県内2か所のクーラーステーション（以下、CS）から全ての酪農場をまとめて採材することができるため、年1回のスクリーニング検査をすることはできる。しかし、検査対象は搾乳牛のみで、PI牛の大半を占める未經産牛は検査対象外になってしまう。

そこで、年1回のスクリーニング検査を行うためには、採材が容易なCSのバルク乳を材料とし、さらに未經産牛のPI牛も摘発できる検査手法の工夫が必要と考え、バルク乳の遺伝子検査に加えて抗体検査の併用を検討するため、パイロット調査を実施した。

### パイロット調査

#### 1 材料

遺伝子検査には、搾乳牛群にPI牛が確認されたA農場の農場バルク乳及び当該農場のバルク乳を含む10トン集乳車の合乳を採取した。農場バルク乳は10ml、30ml及び50ml、集乳車の合乳は50mlを遠沈管に採取し、遠心分離後の体細胞浮遊液（図3）からRNAを抽出した。また、農場バルク乳の冷蔵保存期間の影響を検討するため、4℃・4日間保存したものを同様に処理し材料とした。

抗体検査には、PI牛摘発農場（A,B農場）、PI牛の最終とう汰から3か月が経過した農場（C,D農場）、PI牛の最終とう汰から1年以上が経過した農場（E,F農場）、未經産牛へのBVDVワクチン接種農場（G,H農場）各2戸の農場バルク乳8検体を採取した。農場バルク乳を遠沈管に採取し、遠心分離後の脱脂乳を材料とした（図3）。また、搾乳中のPI牛が摘発されたA農場及び1か月齢のPI牛が摘発されたB農場では、継時的にバルク乳を採取して抗体の推移を調査した。

#### 2 方法

BVDVに特異的な遺伝子（以下、BVDV遺伝子）の検出は、Vilcekらが報告した5'非翻訳領域部分のプライマー(324,326)を用いたRT-PCR法により実施した。

抗体検査は、市販のキットを用いた競合エライザ法で実施し、S-N値が0.7以下を抗体陽性と判定した。

#### 3 結果

農場バルク乳の全ての検体、10トン集乳車の合乳及び4℃・4日間保管したバ



ルク乳から BVDV 遺伝子を検出した。

抗体は、A,B 及び C,D 農場で検出され、E,F 及び G,H 農場で検出されなかった（表 1）。また、PI 牛とう汰後の抗体の推移は、A,B 農場とも、PI 牛とう汰後 180 日前後でバルク乳から抗体が検出されなくなることが回帰直線から推察された（図 4）。

### 3 まとめ

バルク乳の遺伝子検査では、4℃・4 日間保管した 10ml 材料から BVDV 遺伝子の検出が可能であった。県内の CS では、常時バルク乳を 30ml 容器に 2 日間冷蔵で保管し 3 日目に廃棄している。そのため、廃棄するバルク乳を材料にした遺伝子検査でも阻害因子等の影響を受けずに、信頼できる結果が得られた。また、PI 牛 1 頭の乳が 300 ～ 500 倍に希釈された 10 トン集乳車の合乳から BVDV 遺伝子を検出できたため、10 トンまでの合乳による遺伝子検査が可能であることが分かった。

抗体検査では、PI 牛を飼養していない BVDV 浸潤農場のバルク乳からは抗体を検出できなかった。一方、PI 牛を飼養する農場ではバルク乳から抗体が検出され、とう汰後も 6 か月間程度検出された。また、1 か月齢の PI 牛を摘発した農場でもバルク乳から抗体が検出されたことから、バルク乳の抗体検査は未経産牛の PI 牛が存在する指標として活用できると考えられた。

バルク乳から BVDV 遺伝子が検出された農場では、全飼養牛を対象とした PI 牛の特定が必須である。一方、バルク乳から抗体のみが検出された農場では、搾乳牛以外に PI 牛が存在する可能性と既に PI 牛が斃死又は移動した可能性があるため抗体の検出状況を経過観察する必要がある。以上から、図 5 のとおりバルク乳からの BVDV 遺伝子及び抗体検出を組合せて評価することで、搾乳牛だけでなく乾乳牛、未経産牛及び子牛に PI 牛が存在することが推定できると考えられた。

## 県内 CS の保管乳を活用した BVDV サーベイランスの実証

### 1 材料

県内 2 か所の CS のうち集乳農場数が最大の CS と連携し、4℃・2 日間保管の集乳車の合乳 56 検体及び合乳する前の農場バルク乳 219 戸 237 検体を採取した。材料の処理方法はパイロット調査に準じた。

### 2 方法

全検体について遺伝子検査を実施し、抗体検査は農場バルク乳について実施した。検査方法はパイロット調査に準じた。

### 3 結果（表 3）

BVDV 遺伝子は、集乳車の合乳 56 検体中 3 検体から検出された。さらに合乳前の農場バルク乳 219 戸 237 検体中 3 戸 3 検体から検出され、このうち全頭検査に

応じた2戸についてはPI牛を特定することができた。

抗体は、農場バルク乳219戸237検体中8戸12検体から検出され、BVDV遺伝子検出農場3戸は全て抗体陽性となった。BVDV遺伝子が検出されなかった5戸について、1か月後に再検査を実施したところ、約3か月前にPI牛をとう汰した農場1戸のみが抗体陽性となり、残る4戸は抗体が陰性に転じた。

#### 4 まとめ

集乳車の合乳及び農場バルク乳の遺伝子検査結果が一致したことから、集乳車単位での検査でも、十分に信頼性のある結果を得られることが分かった。抗体検査では、PI牛が摘発された3戸は全て抗体陽性で、PI牛が飼養されていることを裏付ける結果となった。また、再検査で抗体が陰転した農場4戸は、検査以前にPI牛の飼養歴があった可能性はあるが、検査時にはPI牛が既に斃死又は移動等により農場内にはいないものと考えられた。

### 総括

一般的にBVDVのPI牛は、発育不良や繁殖障害により分娩前に斃死又は廃用されることが多いと考えられる。本県で摘発されたPI牛も、未經産牛が86%を占め、バルク乳を用いたサーベイランス体制を構築するうえで子牛から未經産牛のPI牛を摘発できる検査法の工夫が望まれていた。そこで、バルク乳を材料とし、遺伝子検査と抗体検査の結果を組み合わせ、PI牛の存在を推定できる評価システムを新たに考案した。県内酪農場の半数にあたる219戸を対象に実証試験を行ったところ、検査法と評価システムの信頼性を確認することができた。

実証試験の抗原検査では、農場バルク乳の検査に加え、集乳車単位の検査を行ったところ、遺伝子検査の結果が一致した。そのため、遺伝子検査を集乳車単位で行うことで、検体数を4分の1に集約でき、検査精度を落とすことなく検査労力の省力化が図られることが裏付けられた。

一方、BVDVサーベイランスに応用したバルク乳からの抗体検出は、スイスなどBVDVの清浄化を達成したヨーロッパ諸国で使われている検査法である。県内の酪農場の約半数（45%）がBVDV浸潤農場である中で、バルク乳の抗体検査ではPI牛を飼養する可能性がある農場のみを的確に絞り込むことができ、バルク乳を用いた抗体検査の有用性を実証することができた。

今回、集乳車単位の遺伝子検査及び農場バルク乳の抗体検査を組合せることで（図6）、搾乳牛だけでなく未經産牛のPI牛を飼養する農場を特定でき、400戸の酪農場におけるBVDVサーベイランスを効率的に実践できる体制を構築できた。

今後は、県内の全酪農場を対象に少なくとも年1回、本体制によるサーベイランスを行い、定期的にPI牛の摘発とう汰を実施することで、本病のまん延及び清浄化が推進されることを期待する。

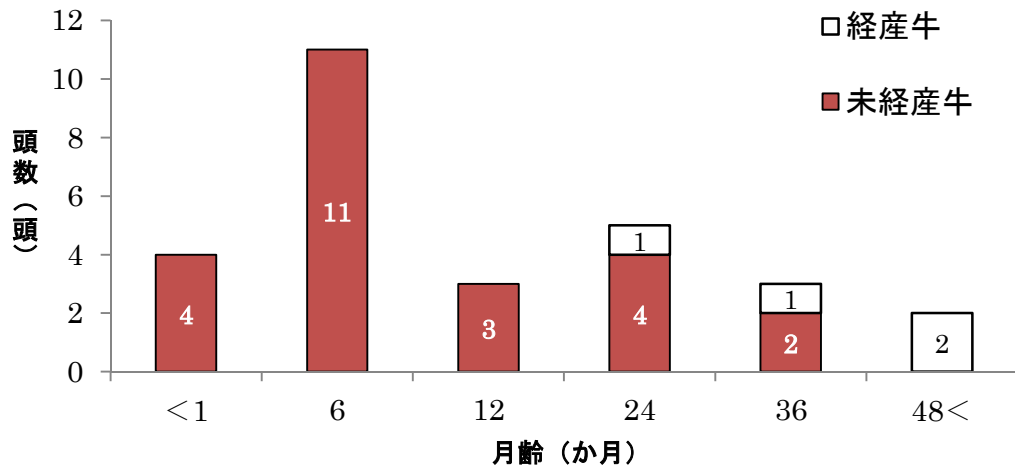


図1 PI牛の年齢別分布

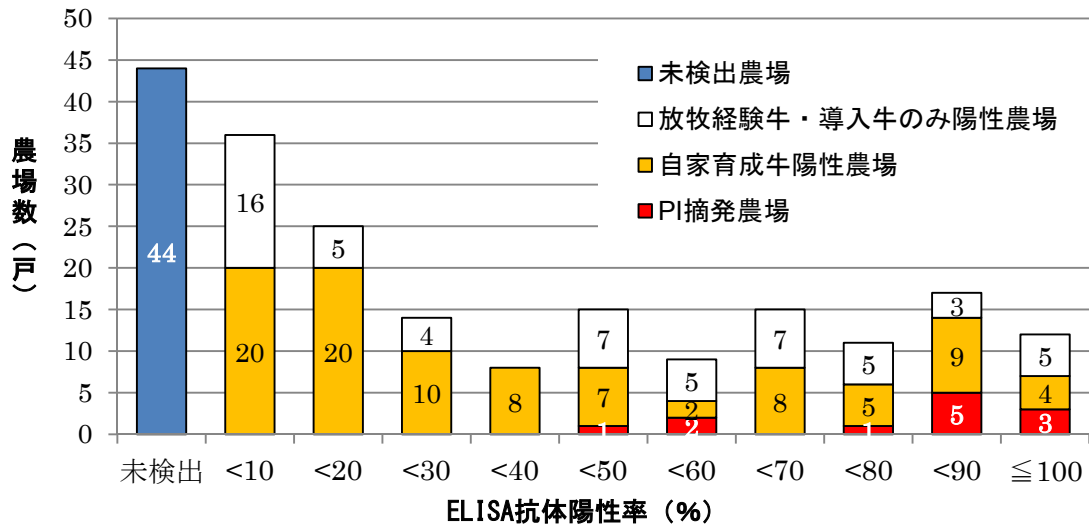


図2 BVDV抗体陽性率別農場分布

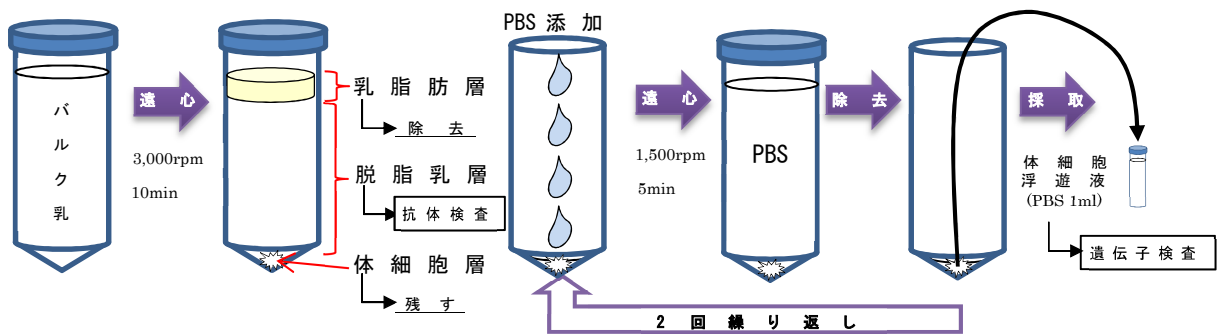


図3 バルク乳の処理方法



表 1 パイロット調査におけるBVDV抗体検査結果

区分	農場名	材料	S-N値	判定
PI牛摘発農場（飼養中）	A農場	バルク乳	0.30	陽性
	B農場	バルク乳	0.20	陽性
PI牛最終摘発とう汰から3か月経過	C農場	バルク乳	0.61	陽性
	D農場	バルク乳	0.50	陽性
PI牛最終摘発とう汰から1年経過	E農場	バルク乳	0.88	陰性
	F農場	バルク乳	0.92	陰性
未經産牛 BVDV ワクチネーション	G農場	バルク乳	0.80	陰性
	H農場	バルク乳	0.84	陰性

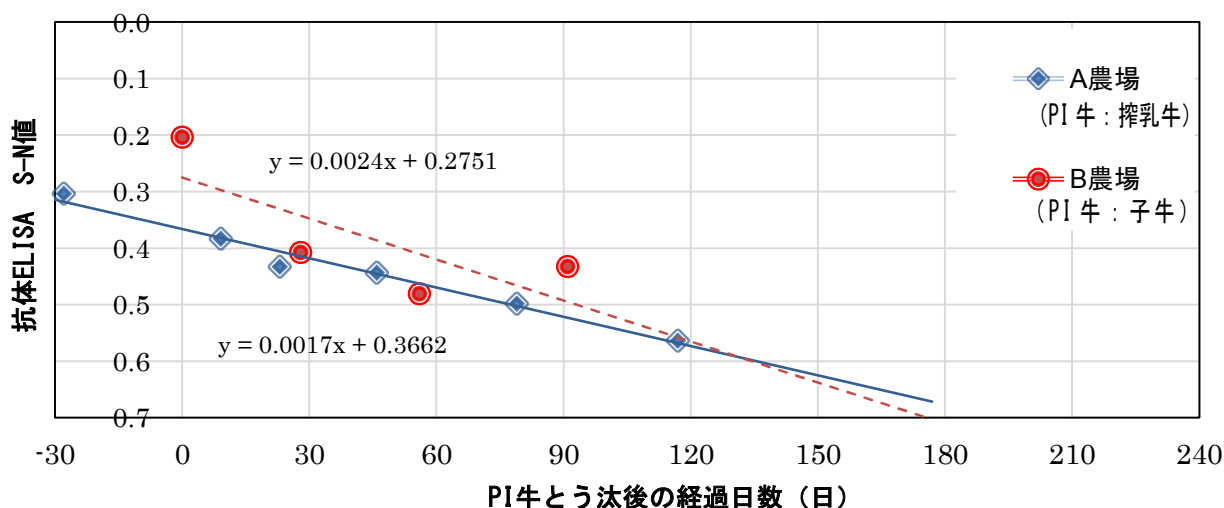


図 4 PI牛摘発農場におけるバルク乳中 ELISA 抗体の推移

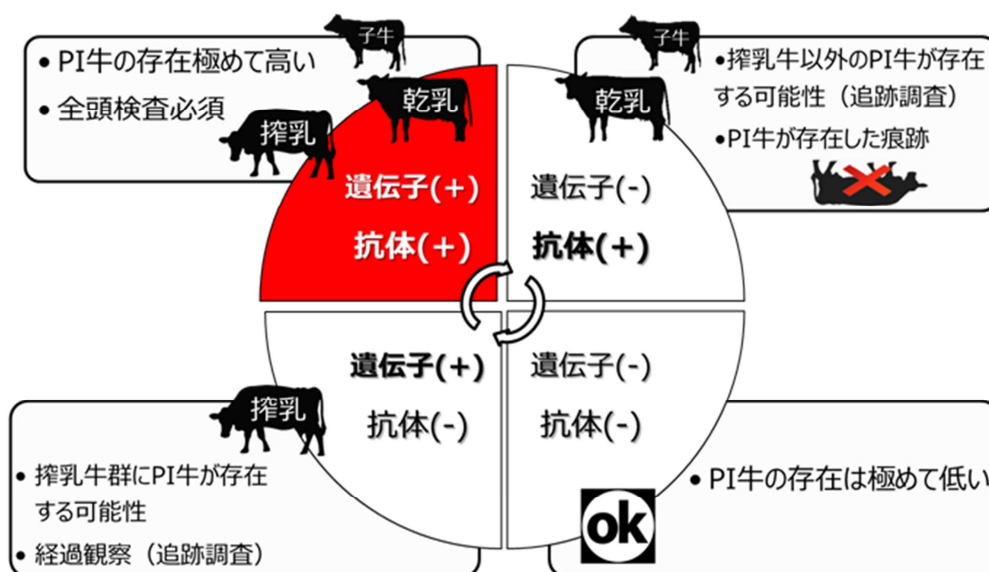


図 5 バルク乳中BVDV遺伝子及び ELISA 抗体検出状況による評価

表3 CSにおける農場バルク乳及び集乳車合乳のBVDV検査結果

材 料	農場バルク乳 ( 戸数 / 検体数 )			集乳車合乳 ( ) 内一致率
	陽性	陰性	合計	
抗体検査				
遺伝子検査	陽性	3/3	0/0	3/ 3
	陰性	5/9	211/225	216/234
合 計	8/12	211/225	219/237	56

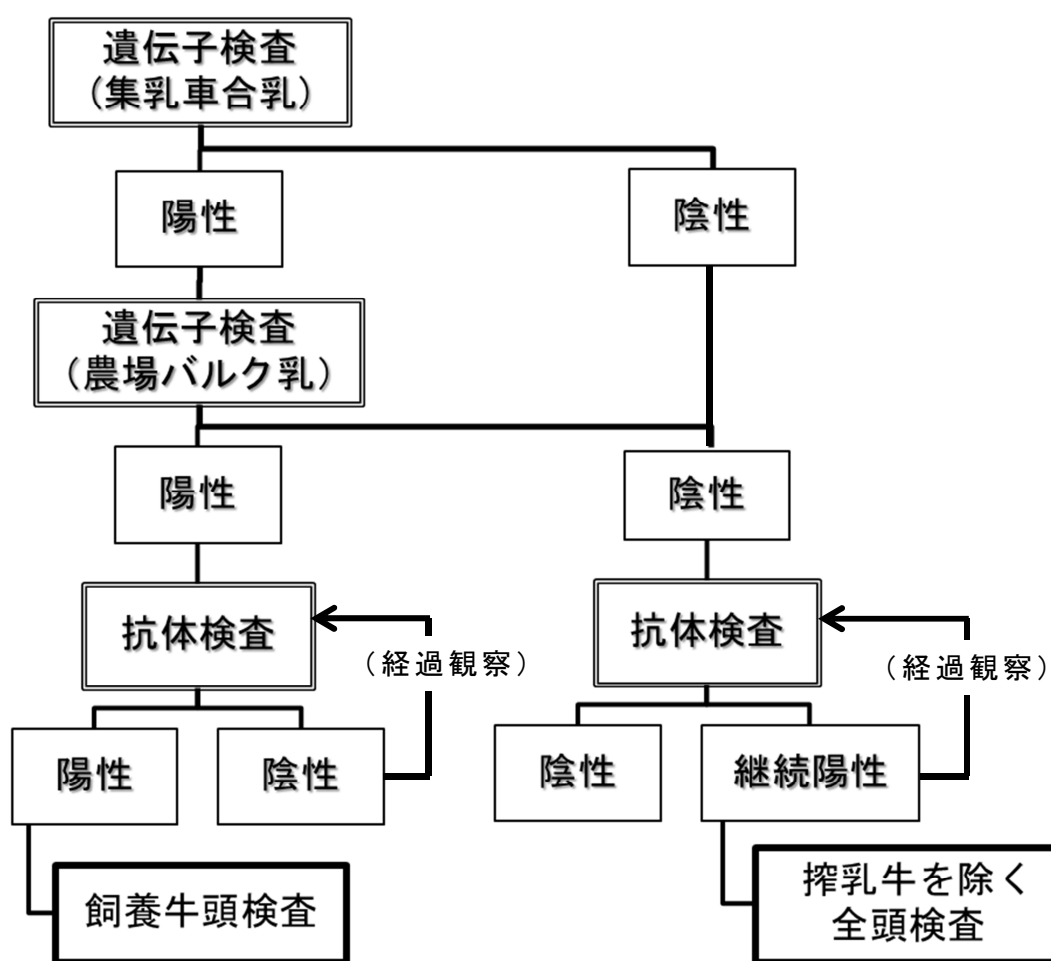


図6 本県におけるBVDVサーベイランスの検査フロー