

表1 ビトラン-7を用いた受胎率

	指導前	指導後	一般販売
受胎頭数/移植頭数	10/69	72/161	37/66
受胎率	14.5%	44.7%	56.1%

※受胎牛には、未経産、経産牛を含む

14.5% (69頭中10頭)と低調であった。初めて使用する器具であり、操作方法の習得が不十分であったことが原因と推察された。

そこで、年間10頭以上の移植実績がある技術者数名を選定し、集中的にビトラン-7の普及啓発を図ることとした。選定技術者に対して研修会などによる繰り返し指導を行い融解技術の取得を促した(図3)。その結果、指導後のビトラン-7体外胚の移植受胎率は44.7%となった。さらに、融解方法を習得した技術者からビトラン-7体外胚の供給希望があったため、令和元年度からビトラン-7体外胚の一般販売も開始したところ、一般販売したビトラン-7体外胚の受胎率は56.1%であり良好な成績が得られた(表1)。

以上の研究で実証した体外受精胚生産技術およびガラス化胚の保存・融解器具「ビトラン-7」は、広島和牛の生産性向上に貢献すると考えられる。

## 謝辞

本研究の遂行にあたって、ミサワ医科工業株式会社および広島県農林水産局の受精胚事業を担当する職員そして、広島総合技術研究所畜産技術センター育種繁殖研究部の仲間たちに多大なる協力をいただいたことに深謝する。

優秀畜産技術者特別賞

# 成牛ウイルス性下痢症の疫学 および 迅速診断に関する研究

福田 昌治 ● ぶくだ まさはる

埼玉県農業技術研究センター 養豚・養鶏担当 担当部長

## 1. はじめに

成牛の下痢症は寒冷期に集団発生することが多く、特に乳用牛では、乳量が減少するなど経済的被害が大きい。その主原因として牛コロナウイルス(BCV)が従来からよく知られている。筆者は、2004年から家畜保健衛生所(以下、家保)の病性鑑定(ウイルス検査)を担当し、多くの成牛下痢症の事例に遭遇した。当時、BCV以外にも牛ロタウイルスB(RVB)、牛ロタウイルスC(RVC)、牛トロウイルス(BToV)が成牛下痢症の原因となっていることが明らかになっていた。しかし、これらの浸潤状況、臨床症状、疫学実態は不明な点が多かった。また、ウイルス性下痢症の検査では通常、標的ウイルス毎のRT-PCR法が用いられ、多くの労力とコストを要していた。そのため、より迅速で低コストな診断法の開発と、それによる疫学実態の解明が望まれていた。そこで筆者は、他県の担当者の協力を得て成牛下痢症について、全国規模の疫学調査を実施するとともに、その過程で明らかとなった成牛下痢症の原因となる主要なウイルス5種について、検査の迅速化・簡便化を図るため、これらを同時検出するマルチプレックスRT-PCR法を開発した。

## 2. 成牛下痢症疫学調査

全国の家保病性鑑定担当者を対象に、2004年から2011年までの8年間に病性鑑定を行った乳用成牛下痢症について、調査票に基づく任意のアンケート調査を実施したところ、17県から148件の事例の情報が得られた。これらに2004年から2013年までの10年間に埼玉県で病性鑑定を実施した乳用成牛下痢症64件の事例を合わせた212件について、疾病別の発生頻度、発生状況および臨床症状の類型化と特徴付けを行った。なお、本調査における乳用成牛の定義はおおむね2歳以上の乳用牛とした。また、「事例」とは個体毎の症例ではなく、農場単位の発生事例を意味する。

### 1) 調査成績および考察

212件の診断内訳を図1に示した。牛コロナウイルス(BCV)病が45%を占め、以下、牛ロタウイルスB(RVB)病、サルモネラ症、牛ロタウイルスC(RVC)病、牛ロタウイルスA(RVA)病および牛トロウイルス(BToV)病の順で3~9%認められた。23%の事例は原因が特定できなかった。子牛でしばしばみられる混合感染症の割合は低かった。

各疾病の臨床症状を図2に示した。

診断内訳の半数近くを占めたBCV病は成牛下痢症の主要因と考えられ、寒冷期に成牛で血便を伴って集団発生する下痢症、いわゆる冬季赤痢の原因として知られている。本調査においても、BCV病の過半数の事例で血便の排泄がみられ、一部の事例では死亡個体も確認された。また、鼻汁漏出のような呼吸器症状が一部の事例で認められた。

一方、BCV病に続いて診断内訳の上位を占めたRV(RVA、RVBおよびRVC)病の主症

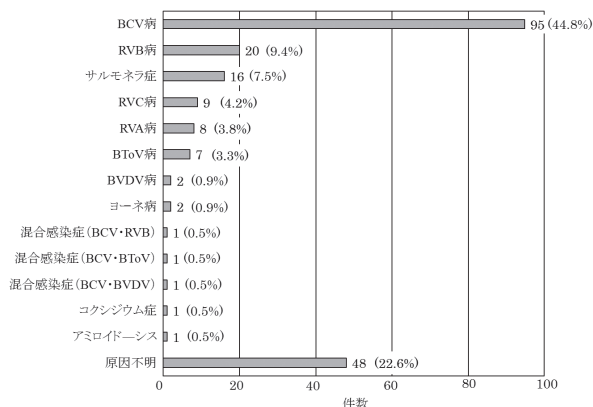


図1 乳用成牛下痢症212件の診断内訳

状は、既報の事例と同様に軟便や水様便の排出および食欲低下であり、血便や呼吸器症状は通常みられないと考えられた。

RVB病およびRVC病の国内における発生報告は乳用の成牛を中心にみられる。本調査においてRVB病の事例数はBCV病に次いで多かったことから、RVB病は乳用成牛下痢症の主要因の1つと考えられた。

RVAは新生子牛下痢症の主要因として従来から知られているが、時に成牛においても本ウイルスによる下痢の発生がみられ、本調査でも8件の事例がみられた。本調査において各疾病の集団発生の割合をみると、RVA病では約4割と、他のウイルス病やサルモネラ症と比較して低かった。RVAは不顕性感染も多く、牛群内で感染を繰り返し、加齢に伴い抗体価が上昇することが知られていることから成牛での発生は個体の免疫状態が影響し、主に抗体価の低い牛などを中心に通常、散発的に起こるものと考えられた。

BToVはコロナウイルス科トロウイルス属に属する。国内の牛群における浸潤状況については、抗体検査による各地の調査において、高い

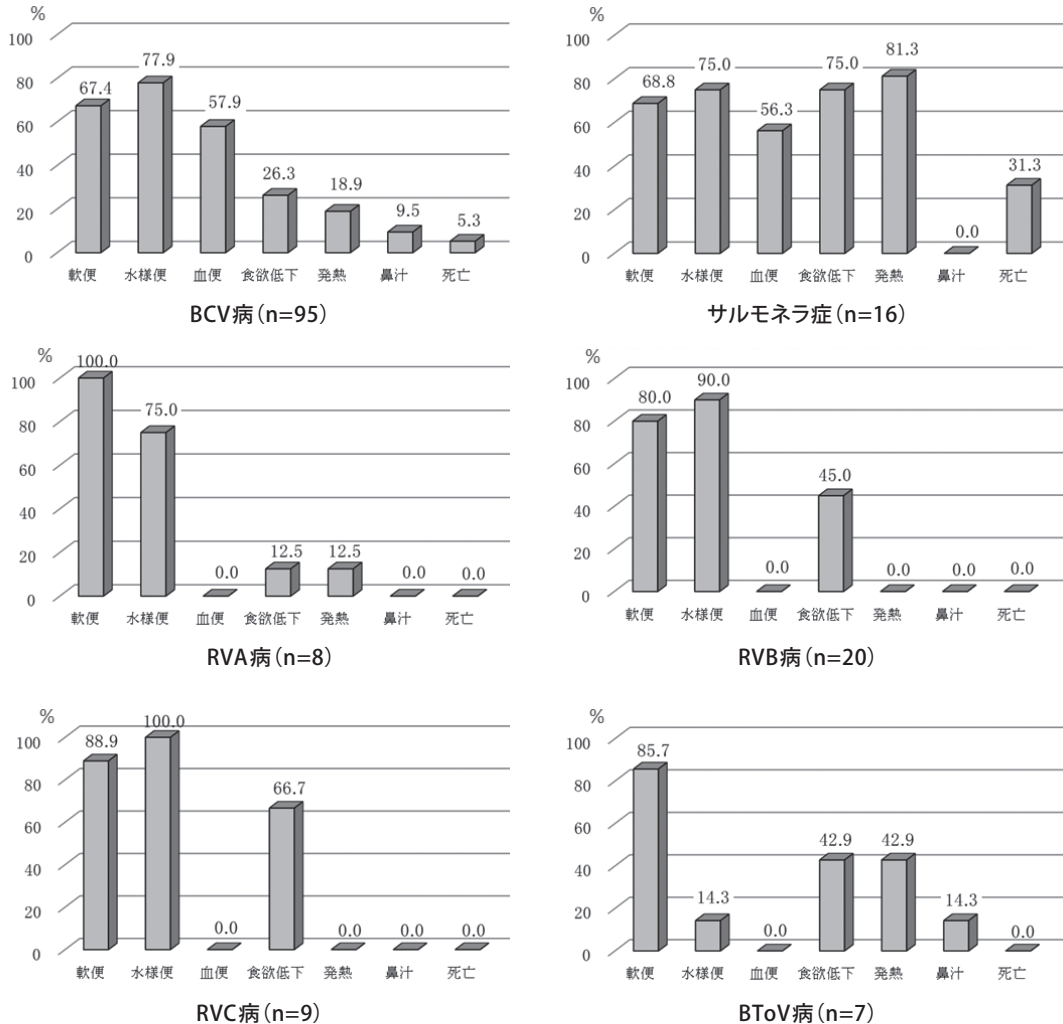


図2 各疾病の臨床症状

陽性率が報告されている。本調査で挙げた BToV 病の事例7件のうち6件の下痢便性状は軟便であり、本病による下痢症状は軽度と考えられた。また、本病はBCV病と同様に呼吸器症状を示す報告もあり、本調査でも1件で鼻汁漏出がみられた。

各ウイルス病と並んでサルモネラ症が診断内訳の上位を占めた。臨床症状ではBCV病と同様に血便および死亡がみられた。しかし、サルモネラ症では死亡がみられた事例の割合は

BCV病と比較して高く、発熱や食欲低下の割合も他の疾病と比較して有意に高い傾向にあり、発生期間も長かった。

原因が特定できなかった事例には発生期間が長期間のものや農場内で1頭のみが発症した事例もみられ、感染症以外の原因によるものが多く含まれている可能性も考えられた。

成牛下痢症の発生時期(図3)については、ウイルス病ではサルモネラ症と異なり暑熱期の発生件数が少ない傾向にあった。BCV病

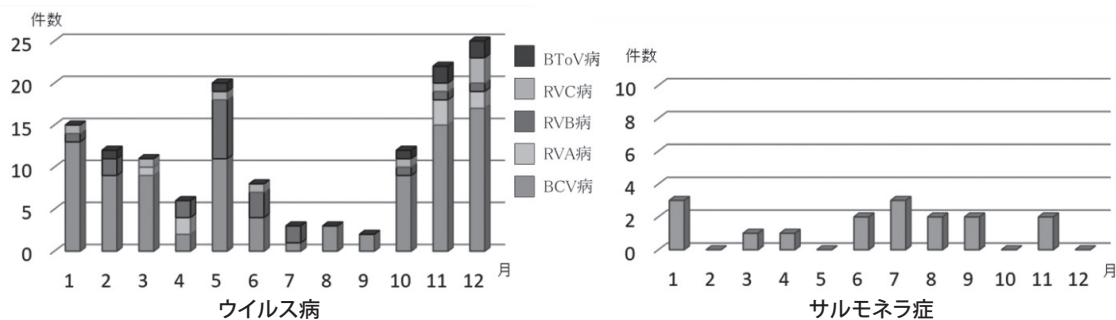


図3 各疾病の発生時期

では5月と12月に発生のピークがみられ、RVB病でも5月に発生のピークがみられたことからBCV病を始めとする主要ウイルス病は寒冷期の他、気温差の大きな時期に発生しやすいものと推測された。

## 2) まとめ

今回の解析結果から、乳用成牛において下痢が集団発生する事例では、BCV病、RVB病、RVC病、BTov病およびサルモネラ症のいずれかに診断できる可能性があると考えられた。確定診断には病原検査の成績を含めた総合的な判断が不可欠であるが、本調査で試みたような疫学情報の整理と集積は、発生時の早い段階でウイルス病あるいはサルモネラ症の可能性を認識し、迅速な初動対応により農場内および近隣農場への蔓延や子牛での発生を防止することの一助になり得ると考えられた(日本獣医師会雑誌, 72, 679-685, 2019)。

## 3. マルチプレックスRT-PCR法

成牛下痢症疫学調査において、主要な原因ウイルスであることが確認された5種ウイルス(BCV、RVA、RVB、RVCおよびBTov)の低コストかつ迅速な検査法として、これらの同時検出が可能なマルチプレックスRT-PCR法を開発した。

## 1) 方法

RVB、BCVおよびBTovは既報のプライマーを使用した。RVAはVP6遺伝子を標的とする既報のフォワードプライマーと新たに設計したりバースプライマーを使用し、RVCはVP6遺伝子を標的とするプライマーを新たに設計した。市販RT-PCRキットを用いて5種プライマーペア混合下で試験し、最適反応条件を決定した。

## 2) 成績

プライマー濃度およびサイクル数の検討を加味した結果、スミアの程度、各特異バンドの明瞭さ、および検出感度から、プライマー濃度0.4μM、アニーリング温度52℃およびサイクル数35回が最も適した条件と考えられた(図4)。

各ウイルスから抽出したRNAを階段希釈し

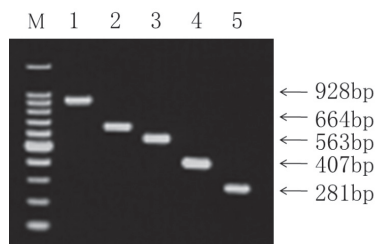


図4 最適条件下で実施したマルチプレックスRT-PCR法の泳動像

1: RVA (Shimane株) 2: BTov (Aichi/2004株)  
 3: RVC (Shintoku株) 4: BCV (Mebus株)  
 5: RVB (Nemuro株) M: 100bp DNA Ladder  
 反応条件: プライマー濃度 0.4μM、アニーリング温度 52℃、サイクル数 35回

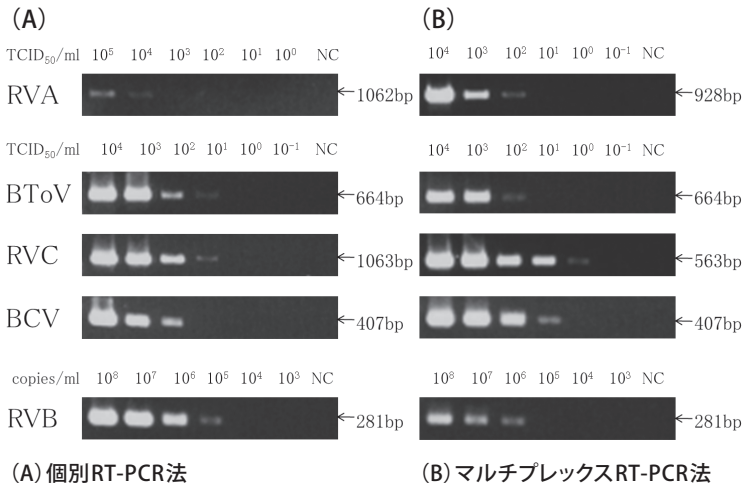


図5 各ウイルスの検出限界

個別RT-PCR法およびマルチプレックスRT-PCR法の検出限界は、それぞれ次のとおり。

- RVA (Shimane株)：  
10<sup>4</sup>および10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub>/ml
- BToV (Aichi/2004株)：  
10<sup>1</sup>および10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub>/ml
- RVC (Shintoku株)：  
10<sup>1</sup>および10<sup>0</sup> TCID<sub>50</sub>/ml
- BCV (Mebus株)：  
10<sup>2</sup>および10<sup>1</sup> TCID<sub>50</sub>/ml
- RVB (Nemuro株)：  
10<sup>5</sup>および10<sup>6</sup> copies/ml

て既報の個別RT-PCR法(従来法)と検出感度を比較した結果、RVBとBToVでは従来法の方が高感度であったが、その他のウイルスでは本法がより高感度であった(図5)。

標的ウイルス以外の牛RNAウイルス10種、培養細胞5種および成牛陰性糞便80検体について本法を実施した結果、いずれも陰性であり、非特異反応はみられなかった。

対象ウイルスのいずれかに起因する下痢症25件の陽性糞便60検体を用いて本法を実施した結果、59検体、事例単位では25件全てが陽性となり、診断上利用可能と考えられた。

本法では試薬コスト、必要な検体の量およびPCR反応時間が従来法の5分の1に低減された。

### 3) まとめ

本法は成牛におけるウイルス性下痢症の診断および監視において、迅速で費用効果の高い有用なツールとなると考えられた(Archives of Virology, 157, 1063 -1069, 2012)。

## 4. おわりに

以上の研究により、成牛下痢症における

BCVなどのウイルス関与の実態や原因別の疫学的特徴が明らかとなった。また、5種の主要起因ウイルスの同時検出が可能なマルチプレックスRT-PCR法を開発し、その有効性を確認できた。本法の活用による診断結果の集積は、成牛下痢症疫学のさらなる解明に大きく貢献すると考えられた。現在、農林水産省の病性鑑定指針に収載され、家保の日常診断に使用されている。注意点として、RVBなどでは検出感度の比較において従来法と若干の差がみられたため、発生状況などからウイルス性下痢症が強く疑われる陰性事例では従来法や他のプライマーによる追試験を検討する必要がある。

最後に、ご指導いただいた元国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門の恒光裕先生に深謝する。家保の日常業務と併行して上記研究に取り組むには、当時の上司、同僚の理解や協力が不可欠であった。この場をお借りして謝意を表したい。また、疫学調査にご協力いただいた全国家保の病性鑑定担当者の皆様に深謝する。