

## 北海道における牛ヘルペスウイルス4型の浸潤状況

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	吉間, 昌行 関, 慶久 一條, 満 ほか2名,
巻/号	58巻1号
掲載ページ	p. 33-36
発行年月	2005年1月

## 北海道における牛ヘルペスウイルス4型の浸潤状況

吉間昌行<sup>1)</sup> 関 慶久<sup>2)</sup> 一條 満<sup>1)</sup> 阿部紀子<sup>1)</sup> 今井邦俊<sup>3)†</sup>

1) 北海道後志家畜保健衛生所 (〒044-0083 虻田郡倶知安町字旭15)

2) 岩手県南家畜保健衛生所 (〒023-0003 水沢市佐倉河字東館41-1)

3) 御農業・生物系特定産業技術研究機構動物衛生研究所 (〒305-0856 つくば市観音台3-1-5)

(2004年2月12日受付・2004年8月16日受理)

## 要 約

牛ヘルペスウイルス4型 (BoHV-4) 国内分離株を抗原とする間接蛍光抗体法 (IFAT) および市販ELISAキットを用いて、1998～1999年に北海道で採取された牛血清230検体中の抗体検出を試みたところ、後志を含む3管内で抗体陽性農場を確認した。また、後志管内で採取された牛血清を用いてIFATを実施した結果、1998～1999年の血清では陽性農場が5戸であったのに対し、2000～2002年は9戸であった。1998年の抗体陽性農場4戸は2002～2003年においても陽性牛を確認した。また、2002年の抗体陽性農場4戸のうち、繁殖雌牛と育成牛が同居している3戸の抗体陽性率は64.7～100%で、そのうち2農場では育成牛の50%以上が陽性だった。いっぽう、繁殖雌牛と育成牛が別々に飼養されている1戸の陽性率は21.9%であった。今回の成績から、後志管内では、わが国で初めてBoHV-4が分離された1999年以前から本ウイルスが存在し、徐々に牛群に浸潤していることが示唆された。また、BoHV-4の伝播には育成牛が重要な役割を果たしており、感受性の育成牛と持続感染していると考えられる抗体陽性牛との接触感染が繰り返され、ウイルスが農場に常在化することが推察された。

——キーワード：抗体, BoHV-4, ELISA, ヘルペスウイルス, IFAT.

-----日獣会誌 58, 33～36 (2005)

牛ヘルペスウイルス4型 (Bovine herpesvirus 4, BoHV-4) は、ガンマヘルペスウイルス亜科に分類されており [7], 世界各地に広く浸潤していることが知られている [5]. 本ウイルスは結膜炎, 肺炎, 子宮炎, 皮膚疾患, 潰瘍性乳頭炎, 膀胱および第一胃の腫瘍, 起立不能等のさまざまな症例から分離され [5, 8], 流産との関連性も示唆されている [3, 5]. しかし, 臨床的に健康な個体からの分離も報告されており [2, 6], 特定の疾病との関係については不明の点が多い.

1999年に千葉県で起立不能を呈する牛の脊髄からBoHV-4が初めて分離されたことから, 本ウイルスが日本にも存在していることが確認された. また, その後の抗体調査により, わが国に広く抗体保有牛が存在していることが明らかとなった [1] が, これまでBoHV-4の疫学を詳細に検討した報告はなされていない. したがってBoHV-4の浸潤状況, 感染様式等を把握しておくことは, 家畜防疫上重要であると思われる.

BoHV-4の抗体検査は, 中和抗体の検出が困難であ

るのに対し, ELISAあるいは間接蛍光抗体法 (Indirect fluorescent antibody test, IFAT) の感度が良好であるとされている [4]. 今回, これらの方法を用いて北海道の牛群におけるBoHV-4の疫学調査を実施した.

## 材 料 お よ び 方 法

**IFATとELISA:** IFATはMDBK細胞で継代したBoHV-4, B11-41株 (国内分離株) [8] を抗原として実施した. 抗原スライドは, 5%牛胎子血清を加えたイーグルMEM培地で調整したMDBK細胞浮遊液に, ウイルス液をm.o.i. 0.62で接種し, ウェル式スライド<sup>a)</sup>上で24時間37℃5%炭酸ガス培養後, リン酸緩衝食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) (pH 7.4) で3回洗浄し, アセトン固定し作製した. 被検血清はPBS (pH 7.4) で20倍に希釈し, 抗原スライドのウェル上にマウントし, 37℃30分湿潤箱内で反応させた. 反応後,

a) CEL-LINE, U.S.A.

† 連絡責任者: 今井邦俊 (帯広畜産大学大動物特殊疾病研究センター)

〒080-8555 帯広市稲田町西2線11 ☎0155-49-5892 FAX 0155-49-5386

表1 北海道9支庁管内の抗体検査

支庁	戸数	検体数	抗体陽性数			
			IFAT		ELISA	
			戸数	検体数	戸数	検体数
後志	15	30	1	2	2	2
IS	5	20	1	3	1	2
AB	8	25	2	2	2	2
SU	3	30	0	0	0	0
KM	15	30	0	0	0	0
HY	14	25	0	0	0	0
TK	2	20	0	0	0	0
KS	9	30	0	0	0	0
NM	20	20	0	0	0	0
9	91	230	4	7	5	6

表2 後志管内における抗体検査 (2000~2002年)

市町村	戸数	検体数	蛍光抗体陽性数	
			戸数	検体数
A	18	50	4	7 (14.0%)
B	12	59	1	2 (3.4%)
C	4	20	1	2 (10.0%)
D	2	10	1	1 (10.0%)
E	6	30	1	1 (3.3%)
F	17	47	1	1 (2.1%)
G	5	25	0	0
H	7	61	0	0
I	2	10	0	0
J	2	4	0	0
K	1	5	0	0
L	17	48	0	0
M	1	5	0	0
N	5	25	0	0
14	99	399	9	14 (3.5%)

PBS (pH 7.4) で3回洗浄し、FITC標識抗牛IgG (H+L) 家兎F(ab')<sub>2</sub><sup>b)</sup> を37℃ 30分湿潤箱内で反応させた。反応後PBS (pH 7.4) で3回洗浄し、グリセリン緩衝液で封入後、蛍光顕微鏡下で核内あるいは核周囲に明らかな蛍光が観察されたものを陽性とした。

ELISA抗体の測定は、市販のELISAキット<sup>c)</sup> を使用し、マニュアルに従い実施した。

牛血清：1998~1999年に、北海道内の9支庁管内91農場の230頭から採取された牛血清をIFATとELISAによる抗体検査に供した(表1)。また、後志管内で2000~2002年に管内14市町村で採取された99農場399検体の牛血清をIFATによる抗体検査に供し(表2)、本検査で抗体保有が確認された農場が所在する6市町村を含む9市町村については、さらに1998~1999年に採取された92農場307検体について遡行調査を実施

b) P.A.R.I.S, France.

c) BoHV-4 Elisa Kit, BIO-X Diagnostics, Belgium.

表3 後志管内における抗体検査 (1998~1999年)

市町村	戸数	検体数	蛍光抗体陽性数	
			戸数	検体数
A	16	51	2	6 (11.8%)
B	15	48	2	5 (10.4%)
C	3	6	1	1 (16.7%)
D	2	3	0	0
E	6	24	0	0
F	16	42	0	0
H	12	37	0	0
J	19	81	0	0
L	3	15	0	0
9	92	307	5	12 (3.9%)

表4 後志管内抗体陽性農場4戸の抗体検査

農場	検査頭数	陽性頭数	陽性率 (%)	区分	備考
A-1	14	10	71.4	乳用牛	自家育成
A-2	17	11	64.7	乳用牛	自家育成
B-1	32	7	21.9	乳用牛	預託育成
B-2	8	8	100.0	肉用牛	自家育成

した(表3)。

抗体陽性農場における疫学調査：抗体保有牛が確認された後志管内の2町村4農場については、ウイルスの感染・伝播様式を探るため、2002年8月に、12カ月から14カ月齢の育成牛とその母親の血清11組22検体を含む71検体についてIFATによる抗体検査を実施した(表4)。

このうち3農場については、繁殖牛の初回受精から2002年8月までの授精記録をもとに、抗体陽性群と抗体陰性群の平均空胎日数、平均授精回数、初受胎授精日齢について集計し(表5)、Wilcoxonの順位和検定により、有意差の検定を行った。

## 成 績

IFATとELISAによる抗体検出：IFATにより9支庁91農場の230検体中3支庁管内4戸7頭(3.0%)の陽性が確認され(表1)、このうち1戸2頭は後志管内の農場で採取されたものであった。また、ELISAにおいては3支庁管内5戸6頭(2.6%)の陽性が確認され(表1)、このうち2戸2頭は後志管内の農場由来であった。

後志管内における浸潤状況および遡行調査：2000年から2002年に後志管内において採取された血清を検査したところ、6市町村9農場の14検体(3.5%)が陽性を示した(表2)。

さらに、これら6市町村を含む9市町村で1998~1999年に採取された血清を用いて遡行調査をしたところ、3市町村5農場12検体(3.9%)で陽性を示した(表3)。このうち2市町村4農場の検体は1998年に採取

表5 抗体陽性農場の繁殖成績

	A-1 農場 (n=10)		A-2 農場 (n=10)		B-1 農場 (n=10)	
	-*	+	-	+	-	+
頭数	3	7	2	8	22	8
平均年齢	5.3±3.2**	7.1±3.4	3.0±0.0	6.5±1.6	4.9±1.7	6.4±1.7
5歳以上頭数	1	6	0	6	8	5
平均空胎日数	146.0±89.8**	179.3±121.2	129.5±106.8	143.4±69.5	180.8±125.0	163.3±110.6
平均受精回数	2.5±2.1**	2.9±2.2	1.5±1.0	2.5±2.2	2.2±1.6	1.9±0.9
初受胎受精日齢	530.7±82.6**	756.6±261.4	479.0±84.9	576.9±146.1	不明	不明

\* - : 蛍光抗体陰性; + : 蛍光抗体陽性      \*\* 平均値±標準偏差

A-1 農場

母	+	-	-	-
子	-	+	+	+

A-2 農場

母	+	+	+	+	+	+	-
子	+	+	+	-	-	-	+

- : 抗体陰性牛; + : 抗体陽性牛

図1 2農場における母子の抗体保有状況

されたものであり、BoHV-4が日本で初めて分離された1999年以前に採取されたものであった。また、成績には示していないが、これらの4農場のうち3農場は2002年の調査で、2003年の調査ではこの1農場においても抗体保有牛が確認された。

**抗体陽性農場における疫学調査：**抗体陽性牛が確認された2町4農場71頭の抗体検査の結果、自家育成している3農場の抗体陽性率が64.7～100%であるのに対し、離乳後、分娩直前まで、育成牛を別の農場に預託している農場の陽性率は21.9%であった(表4)。なお、A-2農場を除く3農場は前述の遡行調査で1998年採取の牛血清においても抗体が検出されている。

抗体検査を実施した71頭のうち、12カ月から14カ月齢の育成牛とその母牛11組22頭の成績をみると、母牛の抗体保有の如何に関わらず、子の50%以上が抗体を保有していた(図1)。

また、抗体陽性牛が確認された2町3農場50頭の繁殖記録を集計したところ、平均空胎日数、平均授精回数および初受胎受精日齢に関して、各農場のBoHV-4抗体陽性牛群と陰性牛群の間に有意差は認められなかった(Wilcoxonの順位和検定、危険率<0.05)(表5)。また、これらの個体では、臨床的に結膜炎、肺炎、皮膚疾患、潰瘍性乳頭炎等の異常所見を認める個体は観察されなかった。

## 考 察

IFATあるいはELISAによる抗体検査成績から、北海道後志管内においても、BoHV-4が浸潤していることが示された。しかも、1998年に採取された4農場の血清において抗体保有牛が確認されたことから、千葉県でBoHV-4が分離された1999年以前にすでに後志管内にはBoHV-4が存在していたことが明らかとなった。また、これら4農場のうち3農場については、その4年後の2002年の抗体検査においても抗体陽性牛が確認され、残る1農場についても、2003年に抗体保有牛が確認されたことは、BoHV-4が一旦農場に侵入すると、常在化することを示している。

Asanoら[1]は、今回IFAに用いた株と同じBoHV-4、B11-41株の感染実験を実施し、本ウイルスが持続感染することを証明した。すなわち、実験に供した3例全例で接種後42日以降においても、リンパ組織および神経組織等でウイルスDNAを証明し、その時点までELISA抗体が高レベルで維持されたことを報告した。そのうち1例においては接種後479日の検索で、同様の結果を得ている。このことは野外においても抗体保有牛が、本ウイルスに持続感染している可能性が高いことを示している。

また、本ウイルスは緊密な接触により水平感染すること、あるいは胎子感染することが示されている[5]。

今回の調査では、抗体陽性農場3戸において、母牛の抗体保有の如何に関わらず、12カ月から14カ月齢の育成牛の50%以上が抗体を保有していた。月齢から、これは移行抗体ではなく、感染抗体であると考えられる。この抗体が胎子感染によるものである可能性を否定することはできないが、抗体陰性の母牛の子にも抗体陽性牛が見られることや、育成牛を他の農場に委託している農場で抗体保有率が低いことなどから、同居感染が頻繁に起こっている可能性が高いと示唆される。

いずれにせよ、抗体陽性農場では、BoHV-4は育成期の段階までに、多くの個体が感染し、さらにこれらが持続感染することにより新たな感染源となり、牛群全体に広がっていくことが推察された。すなわち、牛群にお

るBoHV-4の常在化には、育成期までの牛の役割が大きいものと思われた。

今回の調査では、抗体陽性農場が少数に限られており、このウイルスの伝播力はさほど強くないと考えられた。しかし、遡行調査の成績は、抗体保有農場が徐々に増加する傾向を示しており、これにはBoHV-4に持続感染している導入牛の関与が疑われる。今後もこのウイルスの動態には注意を払う必要がある。

また、このウイルスは子宮炎等の繁殖障害を持つ牛の生殖器からの分離が報告されているが [5]、今回の成績からは、各農場における平均空胎日数、平均授精回数および初受胎授精日齢に関しては、BoHV-4抗体陽性牛と陰性牛の間に有意差を認めず、BoHV-4感染と繁殖成績との関連性を解明するには至らなかった。

また今回の調査では、今までに報告されている結膜炎、肺炎、皮膚疾患、潰瘍性乳頭炎 [5] 等の所見を認める個体は観察されなかった。Asanoら [1] は、BoHV-4, B11-41株の感染実験において、白血球の増多以外には、臨床的な異常を認めなかったとしている。BoHV-4感染と疾病との関連は不明だが、少なくとも本ウイルスの病原性は低く、発症には免疫抑制などの他の

要因を必要とするのかも知れない。

稿を終えるにあたり、BoHV-4, B11-41株を分与頂いた、(株)農業・生物系特定産業技術研究機構動物衛生研究所、泉對博先生、ご助言および技術指導を賜りました同研究所北海道支所、西森知子先生、石原涼子先生の諸氏に深謝する。

#### 引用文献

- [1] Asano A, Inoshima Y, Murakami K, Iketani Y, Yamamoto Y, Sentsui H : J Vet Med Sci, 65, 87-93 (2003)
- [2] Belak S, Palfi V : Acta Vet Acad Sci Hung, 24, 249-253 (1974)
- [3] Czaplicki G, Thiry E : Prev Vet Med, 33, 235-240 (1998)
- [4] Edwards S, Newman RH : Vet Microbiol, 10, 149-154 (1985)
- [5] Goyal SM, Naeem K : Vet Bull, 62, 181-200 (1992)
- [6] Luther PD, Bradley PG, Haig DA : Res Vet Sci, 12, 496-498 (1971)
- [7] Minson AC, Davison A, Eberle R : Virus Taxonomy, van Regenmortel et al eds, 7th report, 203-225, Academic Press, U.S.A. (2000)
- [8] Yamamoto Y, Murakami K, Inoshima Y, Nakane T, Saika K, Sentsui H : Arch Virol, 145, 2363-2370 (2000)

### Infiltration of Bovine Herpesvirus 4 into the Hokkaido District, Japan

Masayuki YOSHIMA\*, Nobuhisa SEKI, Michiru ICHIJO, Noriko ABE and Kunitoshi IMAI†

\* Hokkaido Shiribeshi Livestock Hygiene Center, 15 Asahi, Kutchan, Abuta, 044-0083, Japan

#### SUMMARY

Serological investigation of the bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) was performed on sera collected from 91 farms in 9 sub-prefectural districts on the island of Hokkaido, Japan. A B11-41 strain isolated in Japan was used as the antigen in indirect fluorescent antibody tests (IFAT). A commercial kit was used for ELISA. The results of these tests showed that farms in 3 sub-prefectural districts were antibody-positive. Detailed epidemiological investigations were then performed in the Shiribeshi district, where farms positive for the BoHV-4 antibody were located. IFAT showed 5 farms to be positive on the basis of sera collected between 1998 and 1999 and 9 farms to be positive on the basis of sera collected between 2000 and 2002. Furthermore, 4 farms that had been serologically positive in 1998 remained positive in sera collected between 2002 and 2003. Three farms positive in 2002 housed cows and heifers together. On those farms, from 64.7 to 100% of animals were positive. On 2 of those farms, more than 50% of the heifers were serologically positive. On one farm positive in 2002, where cows and heifers were separately housed. 21.9% of the animals were positive. These results indicate that, before its first isolation in Japan, in 1999, BoHV-4 had already existed and had spread in the Shiribeshi district. Epidemiological investigations suggest that heifers may play an important role in spreading infection and that repeated infections between cows and susceptible heifers may maintain the virus in the herd. — Key words : antibody, BoHV-4, ELISA, herpesvirus, IFAT.

† Correspondence to : Kunitoshi IMAI (Research Center for Animal Hygiene and Food Safety)

2-11 Inada, Obihiro, 080-855, Japan TEL 0155-49-5892 FAX 0155-49-5386

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 58, 33 ~ 36 (2005)