

岩手県における牛トロウイルスの初分離事例と浸潤状況

八重樫岳司 福成和博 佐々木家治

要 約

2010年11月, 肉用繁殖農場の下痢症状を呈した4~8カ月齢の育成牛の糞便から牛トロウイルス (BoTV) が分離され, 県内で初めてBoTVの下痢症への関与が確認された. 88農場455頭の血清を用いたBoTVの浸潤状況及び農場内動態調査の結果, 県内全域への高度な浸潤 (農場陽性率98.9%) が確認された. また, 加齢に伴う抗体価の上昇が認められ, 経時的に追跡した5農場では, 野外ウイルスの再感染を示す抗体価の有意上昇が認められた. 他の18農場の育成牛を追跡した検査では, 移行抗体価は4カ月齢で低下し, 10カ月齢以降に感染抗体が認められた. 下痢又は呼吸器病を呈した症例の材料を用いた回顧的検索において, 同ウイルスは検出されなかった. 初確認事例の症状の顕性化の要因として, 寒冷などのストレス及び他の病原体の複合的な関与が推察された.

キーワード: 牛トロウイルス, 下痢症

牛トロウイルス (BoTV) は, コロナウイルス科に属するウイルスで, 下痢や呼吸器病を引き起こすことが知られているが [1-4], 牛のコロナウイルスとは免疫原性が異なる. 従来はウイルス分離が困難であったが, 2004年, 愛知県において初めて分離されたのち [5], 同ウイルスは日本に広く浸潤し [5, 6], 子牛, 特に2週齢以下の子牛下痢の原因の一つであることが報告されている [3]. しかし野外における発生病例やウイルス分離例の報告はいまだ少なく, 同ウイルスの県内への浸潤状況及び関与した下痢の発症の実態は不明であり, 発生に至る要因についても十分に検討されていない.

2010年11月に県内においてBoTVが関与した症例に初めて遭遇したことから, 県内の浸潤状況及び農場内実態について調査し, その成績から発症要因について検討した.

材料および方法

病性鑑定: 2010年11月, 黒毛和種20頭を飼養する繁殖農場において, 4~8カ月齢の育成牛6頭が一斉に茶褐色の泥状ないし水様の下痢を発症した. 3日後には, 成牛1頭にも下痢が認められた. 対症療法により約1

週間で終息した. 畜主が家畜商である当該農場では牛の移出入が頻繁に行われていた. 病性鑑定は, 発症牛の下痢便及び経過血清を検査に用いた. ウイルス遺伝子の検索はTRIzol LS (INVITROGEN) により下痢便からRNAを抽出し, BoTV [7], 牛A群ロタウイルス (GARV) [8], 牛B群ロタウイルス (GBRV), 牛C群ロタウイルス (GCRV) [9] 及び牛コロナウイルス (BCV) [10] の各ウイルス遺伝子特異プライマーを用いたRT-PCR (OneStep RT-PCR Kit, QIAGEN) を行った. 検出されたBoTVのS遺伝子領域のRT-PCR産物は, ダイレクトシーケンスを実施し, 得られた塩基配列を解析した. BoTVの分離は, 愛知県から分与されたHRT18細胞を用い [5], 牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) の分離は牛胎子筋肉細胞及びBVDV Nose株を用いた干渉法 [11] で実施した. 抗体検査は, BoTV (Aichi/2004株), BCV, BVDVの1型及び2型並びにアデノウイルス7型 (Ad7) を用いた中和試験又はGARVを用いた赤血球凝集抑制試験により実施した. **BoTVの浸潤状況及び動態調査:** 浸潤状況調査は, 平成22年8月から平成23年12月にかけて県内全市町村88農場で飼養される牛455頭 (実頭数) から採取された

血清を材料とした。動態調査は、平成21年9月から平成22年10月にかけて酪農5農場の成牛各10頭から経時的（5回）に採取した血清及び平成23年6月から11月にかけて酪農18農場の1～12カ月齢までの育成牛各3頭から経時的（4回）に採取した血清を材料とした。抗体価の測定はBoTV及びHRT-18愛知細胞 [5] を使用したウイルス中和試験（マイクロタイター法）で行った。

病性鑑定材料の回顧調査：2009年～2011年までに呼吸器病及び下痢の病性鑑定を行った24農場の131頭から採取された牛の鼻腔スワブ又は糞便をBoTVの検索に用いた。また、これらの症例から得た経過血清について前述の方法により抗体検査を行った。

成 績

初発事例の病性鑑定成績：成牛1頭を除く、6頭の糞便からBoTV及びGARVの遺伝子が検出され、うち2頭からはBoTVが分離された。血清からBVDVは検出されなかった。ウイルス抗体検査では、BoTV（5頭）、BVDV（4頭）及びGARV（2頭）に抗体価の有意な

上昇が確認された。他の病原体は検出されず、抗体価の有意な上昇や生化学的な異常値も確認されなかった。分離されたBoTVのS遺伝子（665bp）の解析の結果、国内の牛から検出された既知株と95.9～97.0%の相同性を有し、2004年に愛知県で分離された株 [5] と最も近似（97.0%）した（図1）。

BoTVの浸潤状況及び動態調査成績：県内全域の88農場455頭のうち、BoTVに対する抗体保有率は、農場レベルで98.9%、頭数レベルで94.3%であり極めて高い浸潤状況を示した（表1）。抗体が陰性であったのは1農場のみであった。年齢別では0～5カ月齢（110頭）で陽性率97.3%（幾何平均抗体価GM29）、6～10カ月齢（128頭）で陽性率89.1%（GM18）、1歳齢（60頭）で陽性率86.7%（GM54）、2歳齢（56頭）で陽性率98.2%（GM73）、3歳齢（51頭）で陽性率100%（GM113）、4歳齢以上（50頭）で陽性率100%（GM182）といずれも高値の陽性率で、GM値は加齢に伴い上昇する傾向を示した（表2）。

5農場の成牛各10頭を一年間追跡した抗体検査成績

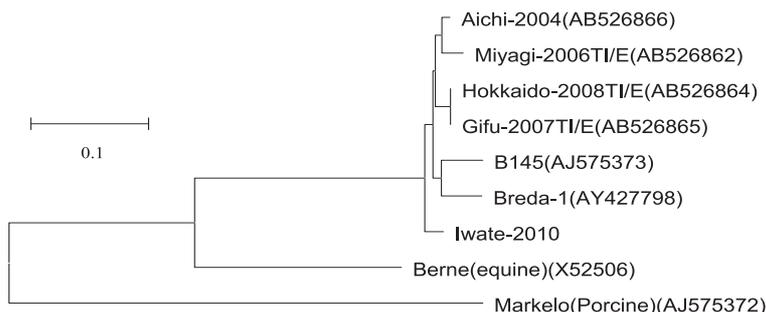


図1 分離株及び参照株の分子系統樹

表1 浸潤状況

地 域	検 査		陽 性		陽性率	
	戸 数	頭 数	戸 数	頭 数	戸 数	頭 数
中 央	36	217	36	209	100.0%	96.3%
県 南	32	148	31	134	96.9%	90.5%
県 北	20	90	20	86	100.0%	95.6%
全 県	88	455	87	429	98.9%	94.3%

表2 月年齢別の陽性頭数、陽性率、幾何平均（GM）値

月年齢区分	検査頭数	陽性頭数	陽性率	GM値
0-5カ月齢	110	107	97.3%	29
6-10カ月齢	128	114	89.1%	18
1歳齢	60	52	86.7%	54
2歳齢	56	55	98.2%	73
3歳齢	51	51	100.0%	113
4歳齢以上	49	49	100.0%	182
全 体	454	428	94.3%	44

表3 5農場の成牛の抗体価（GM値）の推移

農場区分	平成21年			平成22年	
	9月9日	10月9日	10月31日	3月17日	10月26日
A	35	54	24	431	
B	38	91	21	235	70
C	128	558	70	215	91
D	70	83	32	215	45
E	76	99	59	48	

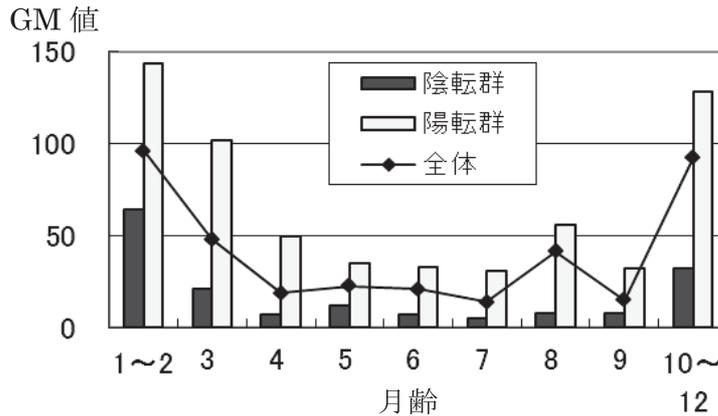


図2 移行抗体及び感染抗体の推移

では、全農場の各2頭から10頭に有意な抗体上昇が認められた。とりわけ3月に採取された血液に高い抗体価が認められる傾向があった（表3）。追跡期間中これらの牛に下痢は認められなかった。

18農場の育成牛を追跡した結果、およそ4カ月齢で移行抗体価の低下が認められた。また、10農場（陽転群）で抗体価の有意な上昇が認められたが、8農場（陰転群）では確認されなかった。前者では初期の移行抗体価が高く、後者と比較して移行抗体価の低下月齢が延長し、およそ約8カ月齢時に抗体価の有意な上昇が認められた（図2）。

病性鑑定材料の回顧調査：過去の病性鑑定例24農場131頭の材料からBoTVは検出されなかった。呼吸器又は下痢症状を主徴としたRSウイルス感染症（1例）、コロナウイルス感染症（2例）、原因特定に至らなかった2例の計5農場7頭の経過血清に抗体価の有意な上昇が確認された。

考 察

2010年11月に4～8カ月齢の育成牛6頭及び成牛1頭が呈した下痢症例において、育成牛の糞便からBoTV及びGARVの遺伝子が検出され、うち2頭からBoTVが分離された。また、BoTV及びGARVのそれぞれ5頭及び2頭に抗体価の有意な上昇が認められた。BVDV

抗体の上昇は4頭に認められたが、検索した範囲では牛群内にBVDV持続感染牛の存在は確認できなかった。近年、新潟県において成牛の下痢へのBoTVの関与も報告されている。今回の事例の成牛からはウイルスが検出されず、成牛が呈した下痢症状への関与は特定できなかったが、下痢を呈する育成牛からBoTVが分離されたことから、BoTVが強く関与した下痢症の県内初の事例と考えられた。

BoTVの県内全域への高度な浸潤が確認された。年齢別に、加齢に伴う抗体価の上昇傾向が認められ、追跡した5農場の成牛においても、野外ウイルスの再感染を示す抗体価の有意な上昇が認められた。これらの成績は、既報 [1, 5] と一致していた。抗体が低下した牛は、農場内に常在する又は新たに侵入したBoTVの感染を受け、不顕性感染を繰り返し、追加免疫を獲得していることを示唆していた。

育成牛の移行抗体は、およそ4カ月齢時までに低下し、野外感染により10カ月齢以降には抗体を獲得する実態が確認された。特に高い移行抗体を保有していた10農場では、後に抗体価の有意な上昇が認められ、農場内に高度にウイルスが浸潤していることが示唆された。これらの農場では移行抗体価が消失する前にウイルス感染が起こっているように思われた。BoTV抗原の検出は3週齢以前に多く [1]、移行抗体では完全に

感染防御できないことが報告されている [7]。しかし、本調査の10農場では、移行抗体が一定の程度まで低下した後に抗体価の陽転が確認されたことから、移行抗体はウイルスの初感染に少なからず防御の役割を果たしているように思われた。野外において子牛がBoTVの感染を受ける時期は、移行抗体価のレベル及び農場内ウイルスの汚染の程度が深く関連しているように考えられた。

野外の牛の多くがBoTVに感染しているながらも、ほとんどが不顕性を示す一方で、少数が下痢を発症する要因については十分に検討されていない [3]。Hoetらは、他の病原体と混合感染した場合に症状が重度化することを述べるとともに、寒さが感染リスクの増加につながる可能性を報告している [1]。また、本調査においても、牛の移出入が頻繁に行われていた農場の背景から、今回の下痢にBoTV及びGARVの感染が複雑に関与したことが疑われた。県内の初確認事例の発生時期は11月下旬であり、寒暖差が激しかったことを気象データにより確認できている。これらのことより、1症例の成績ではあるが、BoTVによる下痢の発症には、寒冷などのストレス及びGARV及びBVDVなどの他の病原体の感染が複合的に関与したのかもしれない。BoTVが症状を発現する要因については、今後、引き続き検討する必要があると考えられた。

謝 辞

BoTV (Aichi/2004) 及びHRT18細胞 (愛知株) を分与していただいた愛知県中央家畜保健衛生所の皆様に深謝する。

引用文献

- [1] Hoet AE, Nielsen PR, Hasoksuz M, Thomas C, Wittum TE, Saif LJ : J Vet Diagn Invest, 15, 205-212 (2003)
- [2] Scott FMM, Holliman A, Jones GW, Gray EW, Fitton J : Vet Rec, 138, 284-285 (1996)
- [3] Kirisawa R, Takeyama A, Koiwa M, Iwai H : J Vet Med Sci, 69, 471-476 (2007)
- [4] Vanopdenbosch et al : Vet Rec, 129, 203 (1991)
- [5] Kuwabara M, Wada K, Maeda Y, Miyazaki A, Tsunemitsu H : Clin. Vaccine Immunol, 14, 998-1004
- [6] Woode GN, Saif LJ, Quesada M, Winand NJ, Pohlenz JF, Gourley NK : Am J Vet Res, 46, 1003-1010 (1985)
- [7] Hoet AE, Smiley J, Thomas C, Nielsen PR, Wittum TE : Am J Vet Res, 64, 485-490 (2003)
- [8] Chinsangarm Vet Diagn Invest, 6, 302-307 (1994)
- [9] Tsunemitsu H, Jaing B, Saif LJ : Arch Virol, 141, 705-713 (1996)
- [10] Tsunemitsu H, Smith DR, Saif LJ : Arch Virol, 144 (1), 167-175 (1999)
- [11] Shimizu M, Satou K : Jpn J Vet Sci, 49, 1045-51 (1987)

文 献 抄 録

サスカチュワン州で発生した封入体肝炎と関連する鶏アデノウイルスの病型的および分子生物学的特徴
Dar A, Gomis S, Shirley I, Mutwiri G, Brownlie R, Potter A, Gerdts V, Tikoo SK
(サスカチュワン州立大学, カナダ)
Avian Dis, 56, 73-81 (2012)

封入体肝炎 (IBH) は、カナダとアメリカにおける養鶏産業において重大な経済的損失を引き起こす、主要な世界的疾病問題の一つである。疾病は、突然の発症と高致死率に特徴づけられる。IBHに関連する鶏アデノウイルス (FAdVs) の異なる血清型の中では、グループ1のFAdV血清型8が多くのIBHの症例から分離されている。この研究では、私たち

はFAdVをサスカチュワン州農場の17日齢ブロイラーの肝臓から分離した。新しく分離されたウイルスは、IBHV (SK) と名付けられた。しかし、ヘキソン遺伝子のL1部位の配列解析に基づく、IBHV (SK) はFAdV血清型8bの764株に分類される。これらの研究は、FAdV血清型8bの完全なヘキソン遺伝子配列を初めて解析したものである。2日齢 (n=48) と2週齢 (n=56) の雛における実験的感染では、83%と43%の致死率であった。鶏における疾病モデルの確立に伴うIBHV (SK) の完全なヘキソン遺伝子の決定は、型特異的な診断試薬の進展と病原性FAdV感染に対する実験的ワクチンの評価のための分析を容易にするであろう。

(岩手大学獣医病理学研究室)