

## 8. 牛コロナウイルス株と臨床症状の関連 およびウイルス常在化に関する考察

大分県大分家畜保健衛生所

○病鑑 首藤 洋三 病鑑 滝澤 亮

### 【はじめに】

牛コロナウイルス（BCV）は、ウイルス性下痢の一主要原因であり、呼吸器病にも関与すると成書に記載されている。しかも本ウイルスは農場で容易に常在化し、侵入するとなかなか抜けない性質を持つと言われている<sup>1)</sup>。しかしながら、ウイルス株と臨床症状の関連や、農場常在化については未だ不明な点が多い。今回、これらの調査を行い、その要因について考察したので報告する。

### 【発生状況調査および遺伝子解析（調査1）】

2003～11年の間に診断したBCV病29症例について、発生時期、頭数、年齢、品種、臨床症状を調査後、後述の遺伝子解析結果と比較した。

遺伝子解析の材料は、2007～11年の間に診断したBCV病17症例由来のウイルス9株とRNA21検体を供試し、PCR-制限酵素断片長多型(RFLP)解析をKannoらの報告に基づき、BCVの病原性や宿主域の決定にも関与するウイルス糖タンパクS遺伝子領域内のpolymorphic region (567bp)を増幅させるRT-PCRを実施し、その増幅産物をAva II, Eco065 Iを用いて制限酵素処理を行い、切断パターンで4つの遺伝子型に分類した<sup>1)</sup>。分子系統樹解析も同様に、BCV S遺伝子領域内のpolymorphic region (411bp)を増幅させるRT-PCRを実施後、ダイレクトシーケンシングを行い当該領域の塩基配列を決定した。さらに得られた塩基配列に対して、ClustalWによる分子系統樹解析をBCV代表株ならびに他の国内分離株とともに実施し、検体の遺伝子型別分類を行った<sup>2)</sup>。

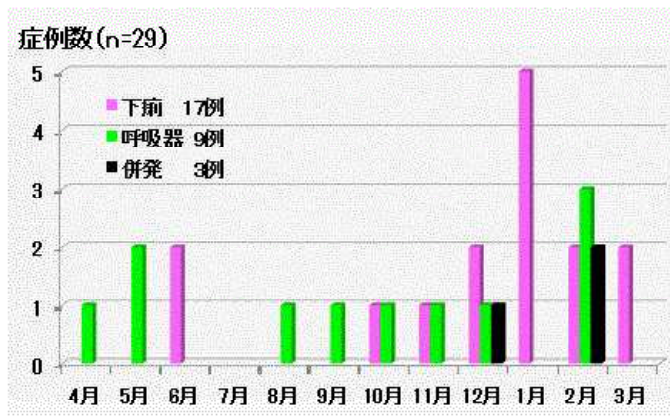
### 【成績（調査1）】

表1

29症例の発生時期と各症例の主徴については、11月～3月に20症例が確認されているが、4月～10月にも9症例確認された。主徴は下痢が1月に集中して認められたが、6月、10月にも確認されており、呼吸器症状主徴の症例はほぼ年間を通して確認された（表1）。

発生した年次、頭数、年

発生状況調査成績  
発生時期と各症例の主徴



年齢、品種、症状および診断に至った材料については、発生頭数がすべて5頭以上の集団、品種は黒毛和種が20症例であったが、ホルスタインや交雑種でも診断された。症状は、2006年までは下痢主徴の症例だったが、2007年以降は呼吸器あるいは下痢との併発症例が確認された。なお検出された材料の部位と確認された症状はすべて一致していた(表2)。

表2

発生状況調査成績  
発生頭数・年齢・品種・臨床症状

年	発生頭数	年齢	品種	下痢	呼吸器	診断材料	年	発生頭数	年齢	品種	下痢	呼吸器	診断材料
2003	5	成	ホルス	○		高視	2009	12	子	ホルス		○	ペア血清
	5	子	黒和	○		高視		5	子	黒和		○	ペア血清
2004	5	成	黒和	○		高視	2009	21	成	黒和		○	鼻汁
	30	子	FI	○		高視		10	成	ホルス	○		高視
	5	子	FI	○		高視		15	成	ホルス	●	●	高視・鼻汁
2005	6	成	黒和	○		高視	2010	5	子	黒和		○	鼻汁
	10	子	ホルス	○		高視		5	子	黒和	●	●	高視・鼻汁
2006	5	子	黒和	○		高視	2010	10	成子	黒和	○		高視
2007	6	子	黒和	○		高視		10	成	黒和		○	鼻汁
	10	成	黒和	○		高視		14	成	黒和		○	ペア血清
2007	8	成	黒和	●	●	高視・鼻汁	2010	30	子	FI		○	鼻汁
	13	成子	黒和	○		高視		10	子	黒和	○		高視
2008	5	子	黒和		○	鼻汁	2011	15	成子	黒和	○		高視
	30	成	黒和	○		高視		10	成	黒和	○		高視
							2011	20	成	ホルス		○	ペア血清

遺伝子解析の結果、RFLPでは供試したサンプルはすべてAva II で非切断、Eco065 I で切断されたことから、すべてBCV遺伝子型4(4型)であることが判明した(図1)。RFLPの成績と臨床症状を比較すると、遺伝子型はすべて4型であったのに対し、症状は下痢、呼吸器等様々であった。したがって、同一遺伝子型の株でも症例によって臨床症状は異なることが判明した(表3)。

遺伝子解析結果

PCR-RFLP解析

※C: 掛川株  
(遺伝子型1)

「すべてAva II で非切断, Eco065 I で切断」・・・4型

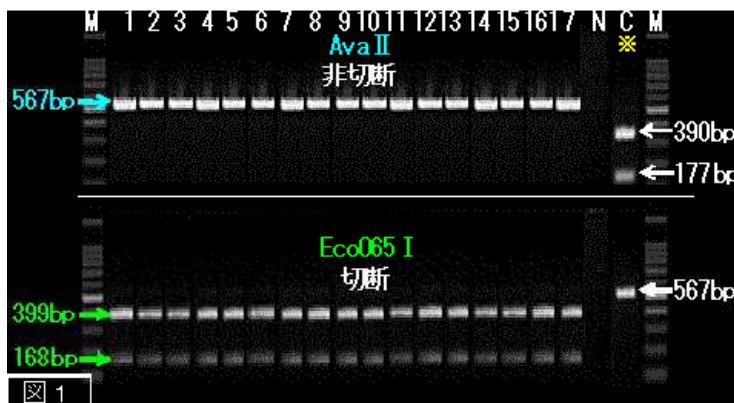


表3

遺伝子解析結果と症例の比較

同一遺伝子型の株でも症例によって臨床症状は異なる

年	発生頭数	年齢	品種	下痢	呼吸器	BCV	年	発生頭数	年齢	品種	下痢	呼吸器	BCV
2003	5	成	ホルス	○			2009	12	子	ホルス		○	
	5	子	黒和	○				5	子	黒和		○	
2004	5	成	黒和	○			2009	21	成	黒和		○	4型
	30	子	FI	○				10	成	ホルス	○		4型
	5	子	FI	○				15	成	ホルス	●	●	4型
2005	6	成	黒和	○			2010	5	子	黒和		○	4型
	10	子	ホルス	○				5	子	黒和	●	●	4型
2006	5	子	黒和	○			2010	10	成子	黒和	○		4型
2007	6	子	黒和	○		4型		10	成	黒和		○	4型
	10	成	黒和	○		4型		14	成	黒和		○	
2007	8	成	黒和	●	●	4型	2010	30	子	FI		○	4型
	13	成子	黒和	○		4型		10	子	黒和	○		4型
2008	5	子	黒和		○	4型	2011	15	成子	黒和	○		4型
	30	成	黒和	○		4型		10	成	黒和	○		4型
							2011	20	成	ホルス		○	

系統樹解析の結果、やはりRFLPと同様、すべて4型に分類され、国内分離株と近縁であることが分かった。ちなみに2005年以降の国内分離株はすべて4型であったとの報告があり、県内の状況もそれに一致していた<sup>2) 5) 10)</sup>。その4型由来の症例で、さらに同一の塩基配列を保

持する株が異なる症例から3組確認されたので、それぞれ比較を行ったところ、発生した地域は同じだが、発生年齢が異なり、臨床症状も一部一致していない症例が1組、地域が異なる症例が1組、発生地域と臨床症状が全く異なった症例が1組確認された。このように同一遺伝子型、さらには同一塩基配列を保持する株でも症例によって臨床症状は異なることが判明した（表4）。

表4

### 遺伝子解析結果と症例の比較

同一塩基配列を保持する株でも症例によって臨床症状は異なる

症例	発生地域	年	発生頭数	年齢	品種	下痢	呼吸器	診断材料	遺伝子型	塩基配列
①	泉西	2007	8	成	黒和	●	●	糞便 鼻汁	4	○
②	泉西	2008	5	子	黒和		○	鼻汁	4	○
③	泉央	2009	10	成	ホルス	○		糞便	4	△
④	泉北	2009	15	成	ホルス	●	●	糞便 鼻汁	4	△
⑤	泉央	2010	5	子	黒和		○	鼻汁	4	◇
⑥	泉南	2010	10	成、子	黒和	○		糞便	4	◇

#### 【考察（調査1）】

発生状況調査成績から、BCV病は、成牛・子牛問わず比較的温暖な時期でも確認されており、呼吸器病単独での発生頻度も決して低いとは考えられない<sup>6)</sup>。したがってBCV病監視は、これまで冬季の下痢を重視してきたが、今後は年間を通して、BRDCの1要因としても重視すべきであると考察した。また遺伝子解析結果から、県内で検出されたBCVはすべて4型で、さらに、同一の塩基配列を保持する株でも症例によって臨床症状は異なるということが判明したことから、BCVは腸管と呼吸器いずれの組織にも親和性を有し、感染牛は下痢、呼吸器症状どちらも起こし得ると考察した。実際Parkらの感染実験報告においても、下痢症例牛からの分離ウイルス（腸管病原性株）を牛に経口接種し、下痢症状を起こした牛の呼吸器から免疫染色によりウイルス抗原が検出されている<sup>3)</sup>。したがって野外では、下痢は糞便等の経口感染、呼吸器は飛沫などの経鼻感染といった感染様式や、各部位での増殖が容易な免疫状態といった宿主側の要因によって臨床症状が個体ごとに多様化すると考察した。

#### 【血清学的調査および糞便検査（調査2）】

血清学的調査については、2007～11年にBCVワクチン非接種農場72戸の1歳以上の牛で採取された血清、延べ1663頭分を材料とし、BCV遺伝子型1（1型）の掛川株<sup>4)</sup>と、4型の県内分離株を用いて中和試験での抗体検査を実施し、判定については中和抗体価4倍以上を陽性とした。さらに2種の株に対する中和抗体価の差の検定は、統計ソフトStatView ver. 5.0を使用し、Wilcoxon符号付順位和検定を行った。糞便検査は、そのうちの6戸（A～F農場）、延べ422頭分の糞便を供試し、HRT-18G細胞によるウイルス分離およびRT-PCRによるBCV抗原検出を行い、併せてRFLPによる遺伝子型別を実施した。

#### 【成績（調査2）】

抗体検査の結果、抗体陽性率は1型が83.8%、4型が92.1%であった。抗体価GM値は1型が $2^{6.70}$ 、4型が $2^{9.11}$ で、両株間の抗体価に強い正の相関が認められ、検定の結果、両株間の抗体価に有意差が認められた ( $P < 0.001$ ) (図2)

6農場で行った糞便検査では、A農場とB農場の同一牛3頭からBCV4型が継続して検出された。A農場の1頭からは、3か月ごとに採取された糞便から15か月間にわたり継続して検出され、抗体価は128倍以上で推移し、その間下痢等の臨床症状は認められなかった。またB農場の2頭からは4か月後にも検出され、抗体価はともに64倍以上で推移し、同様に臨床症状も確認されなかった (図3)。

【考察 (調査2)】

血清学的調査の成績から、調査牛の抗体陽性率は4型で9

2.1%と高率で抗体価も4型が有意に高く、前述の遺伝子解析でも、検出されたBCVはすべて4型であったことから、調査牛の抗体は4型のホモ、1型ヘテロの抗体であると考察した。また調査牛は全頭ワクチン非接種であり、年齢は1歳以上であることから、移行抗体とは考えにくく、県内飼養牛への高率な4型野外感染が示唆された。

糞便検査の結果、BCVを継続的に排出する牛が2農場で確認された。当該牛に下痢等の症状や、急性感染時のような抗体価の有意上昇は認められず、64倍以上での推移から、本牛が所謂「BCV持続感染牛」<sup>8) 9) 10)</sup>と考えられ、本牛の存在が、高率な野外感染と農場常在化の主要因であると考察した。

また、1型と4型の抗体価については、強い正の相関があり、中和交差性が認められた。成書では元々BCVの血清型は単一で、現行のワクチン株は1型だが、ここ10年で流行遺伝子型が1-2-3-4型へと変化し、野外株との遺伝子的相同性の低下が報告されている。しかし、今回の抗体価の差は血清型の相違を示す程度ではなく<sup>7) 10)</sup>、現行ワクチンでも有効と考えられるが、今後遺伝子変異の蓄積により、1型抗体による中和

血清学的調査成績

4型の抗体陽性率,抗体価が1型より高値

- BCV抗体陽性率
  - ・1型 : 83.8%
  - ・4型 : 92.1%

両株間の抗体価  
強い正の相関

- BCV抗体価 (GM値)
  - ・1型 :  $2^{6.70}$
  - ・4型 :  $2^{9.11}$

両株間の抗体価に有意差が認められた ( $P < 0.001$ )

※ 検定方法 : Wilcoxon符号付順位和検定  
統計ソフト : StatView ver.5.0

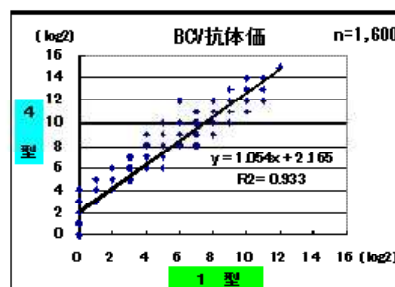


図2

糞便検査成績

2農場の牛3頭からBCV4型が継続して検出

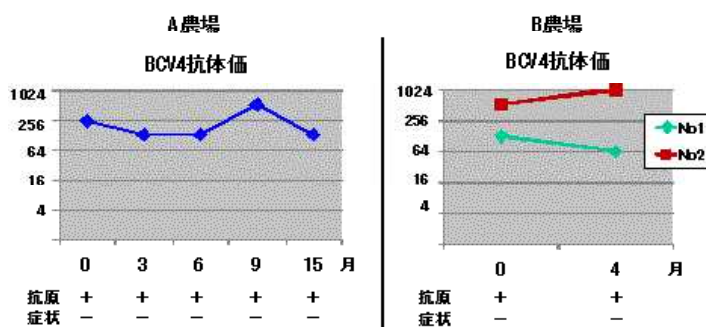


図3

能の低下、すなわちワクチン効果の低下が危惧される。

#### 【まとめ】

今回の調査で、BCV病は呼吸器病の発生頻度も高く、株と臨床症状の関連では株側ではなく宿主側の要因であり、ウイルスの農場常在化は「BCV持続感染牛」が主要因であるという考察に至った。BCV病は、毎年多くの発生件数・頭数が報告され、単独感染症例では死亡率も低く予後は良好だが、二次感染などで死亡率は上昇し、発生による農家の経済的

- #### 今後の展望
- ・より正確な発生状況の把握 (年間を通じ呼吸器病も視野に採材, 診断)
  - ・ワクチン接種の推進, 指導 (特に移行抗体消失後の感染, 発症予防)
  - ・国内流行株の情報共有 (抗原解析・血清学的調査)
  - ・「持続感染牛」の検証 (野外調査・感染実験)

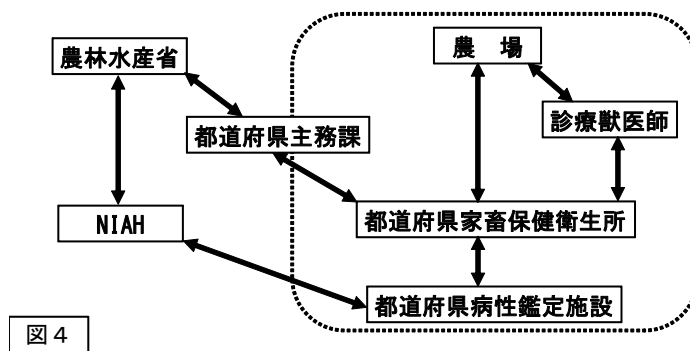


図4

損失は大きいと言われている<sup>10)</sup>。したがって、BCV病対策は家畜衛生上重要であり、継続調査による本疾病の更なる解明が対策の一助になると考えられる。そこで今後の展望は、家保から農家・診療獣医師へ、年間を通じ呼吸器病も視野に入れた採材や情報提供を行うことでより正確な発生状況の把握が可能となる。そして家保から農場へのワクチン接種の推進指導と連携して、病性鑑定施設では、診断は勿論、継続調査と技術情報を動物衛生研究所や都道府県と密に共有し、今回見出された「持続感染牛」の科学的検証を行うため、野外調査データの蓄積とともに感染実験も模索して行きたいと考える(図4)。

本報告を終えるにあたり、BCVの分子系統樹解析にご助言・ご協力いただいた動物衛生研究所北海道支所の菅野先生に深謝する。

#### 引用文献

- 1) Kanno et al. *J. Vet. Med. Sci.* 71(1):83-86(2009)
- 2) Kanno et al. *J. Gen. Virol.* 88:1218-1224(2007)
- 3) S. J. Park et al. *Arch. Virol.* 152, 1885-1900(2007)
- 4) Akashi et al. *Veterinary Microbiology.* 5, 265-276(1980)
- 5) Jae-Ho JEONG et al. *J. Vet. Med. Sci.* 67(2):187-189(2005)
- 6) 石橋ら 日獣会誌 60, 715~717 (2007)
- 7) Fukutomi et al. *Arch. Virol.* 144, 997-1006(1999)
- 8) 加地ら 平成15年島根県業績発表会集録 (2003)
- 9) 田口文広 ウイルス 第53巻 第2号, 201-209 (2003)
- 10) 菅野ら 動衛研研究報告 第117号, 19-25 (2010)