

## 県内で分離された牛コロナウイルス遺伝子型3

県央家畜保健衛生所

津田 彩子      後藤 裕克  
荒木 尚登      和泉屋 公一

### はじめに

平成29年12月から平成30年1月にかけて、県内6市町計6農場で、牛の呼吸器病及び下痢症による病性鑑定依頼があった。病性鑑定の結果、6農場全てから牛コロナウイルス（以下、BCoV）が分離され、PCR-RFLP法により遺伝子型3（以下、3型）に分類された。近年全国的に分布しているBCoVはほとんどが遺伝子型4（以下、4型）であり、国内における3型の分離報告は12年前が最後<sup>2)</sup>である。本県では、平成28年にも3型による牛コロナウイルス病が発生しており、症例および疫学状況について報告するとともに、分離株の遺伝子解析及び遺伝子型の違いによる抗体価の差について検討したので、併せて報告する。

### 発生概要

各農場の発生概要について、表1にまとめた。

表1 各農場における発生概要

症例	依頼時期	経営形態	発生概要	検体数 <sup>※</sup>
1	H29.12	肉用繁殖	11月下旬より下痢・発咳	糞5、鼻5
2	H29.12	肉用	当日より下痢（血便）	糞4
3	H29.12	酪農	数日前より下痢（鮮血便、腸管出血）、農場全体に蔓延、発生後5日で4/23頭死亡	糞5
4	H30.1	酪農	前月末より下痢発症、治癒後再発、乳量減少	糞3
5	H30.1	酪農	前月末より下痢発症、治癒後再発、乳量減少	糞3
6	H30.1	酪農	数日前より水様～泥状便	糞9

※糞：糞便乳剤、鼻：鼻腔スワブ

症例1と2は疫学関連農場で、1の農場が別農場の牛の受託管理を始めた11月下旬より、発咳を呈する牛が散見されるとともに下痢が農場に広がった。その後、牛の行き来のある2の農場でも下痢を呈

する牛が散見されるようになったため、2件同時に病性鑑定依頼があった。

症例3は、症例2の数日後に下痢の病性鑑定依頼があり、鮮血便を呈してうずくまる牛や、直腸に手を入れると内腔に血液が貯留している牛が散見され、発生から5日間で成牛4頭が死亡した。当該農場は、ほとんど外部の人や牛の出入りのない農場であった。

症例4、5、6は同一の飼料を給与している農場で、当初、飼料のロットが変わったことによる下痢を疑い、飼料の検査ができるか家畜保健衛生所に相談があったが、稟告及び症例1～3の病性鑑定結果と同時期であったことから、牛コロナウイルス病を否定する目的で検査を実施した。

## 材料と方法

### 1 病性鑑定

病性鑑定材料として、糞便及び鼻腔スワブ（表1）を供した。ウイルス学的検査として、鼻腔スワブについては、RSウイルス簡易キット、ロタ-アデノウイルス簡易キット、ウイルス分離（MDBK-SY、HRT-18<sup>6)</sup>）、遺伝子検査（PIV3<sup>4)</sup>、BVDV<sup>5)</sup>、BCoV<sup>3)</sup>）を、糞便乳剤については、ロタ-アデノ簡易ウイルスキット、ウイルス分離（MDBK-SY、HRT-18）、遺伝子検査（BVDV、BCoV）を実施した。また、BCoVについては、ペア血清を用いた中和試験を実施した。細菌学的検査は、症例1～3についてのみ定法にて実施した。

### 2 発生農場間の疫学関連状況

農場からの聞き取りにより、発生農場間の疫学関連を調査した。また、併せて平成28年度に3型を分離した農場との疫学関連も確認した。

### 3 分離株の遺伝子解析

分離されたBCoVの遺伝子型の確定のため、平成28年度県内分離株及び各症例における代表株の、遺伝子解析<sup>1)</sup>を実施した。

### 4 BCoV1型、3型及び4型を用いた中和試験結果の比較

6症例のペア血清を用いて、1型掛川株及び県内分離株3型、4型株を用いた中和抗体価の比較検討を実施した。

## 結 果

### 1 病性鑑定

検査結果について、表2にまとめた。

表2 病性鑑定結果

症例	BCoV検査					その他のウイルス検査	細菌学的検査
	PCR	PCR-RFLP	分離	PCR-RFLP (培養上清)	中和試験 (kakegawa株)		
1	糞 : 3/5 鼻 : 3/5	4型 (糞1) 3型 (その他)	糞 : 0/5 鼻 : 5/5	3型	2/5検体上昇	ロタ (キット) 1/5	<i>E. coli</i>
2	3/4	3型	1/4	3型	2/4検体上昇	(-)	<i>E. coli</i>
3	5/5	3型	5/5	3型	1/1検体上昇 群で抗体上昇	(-)	(-)
4	0/3	NT	3/3	3型	全例高い抗体価	NT	NT
5	0/3	NT	3/3	3型	全例高い抗体価	NT	NT
6	0/9	NT	9/9	3型	全例高い抗体価	NT	NT

6農場由来の糞便乳剤29検体及び症例1の鼻腔スワブ5検体を用いて、RT-PCR法によりBCoV遺伝子検索を実施したところ、鼻腔スワブ3検体、糞便乳剤11検体でBCoV特異遺伝子が検出され、Ava IIとEco065 IによるPCR-RFLP法により13検体（鼻腔3検体、糞便10検体）が3型に分類された。残り1検体（糞便）は4型であった。

また、これらの検体についてMDBK細胞及びHRT18細胞を用いたウイルス分離を実施したところ、糞便乳剤21検体、鼻腔スワブ5検体でHRT18細胞においてCPEが確認され、IFAによりBCoVと同定した。3代目培養上清からBCoV特異遺伝子が検出され、Ava IIとEco065 IによるPCR-RFLP法により26検体全てが3型に分類された。

さらに、病性鑑定時と、3週間から1か月後に採材したペア血清を用いて、BCoV 1型kakegawa株を用いた中和試験を実施したところ、症例1、2、3で抗体の上昇を認めた一方で、症例4、5、6では抗体価の上昇を認めなかった。以上から、症例1、2、3を3型による牛コロナウイルス病と診断した。

### 2 発生農場間の疫学関連状況

症例1、2は牛の往来を伴う関連農場、また、症例3、4、5、6は管理獣医師、飼料会社、酪農ヘル

パーなど、一部で疫学関連因子があった。しかし、症例1、2と3、4、5、6に関連因子はなかった。また、平成28年度の3型による牛コロナウイルス病発生農場も、今回の6症例との関連因子は認められなかった。

### 3 分離株の遺伝子解析

各症例の代表株6株は全て3型に属した。2005年（平成17年）頃まで確認されていた国内分離株とは異なるサブタイプを形成し、米国オクラホマ州分離株（2009–2011年）に比較的近縁であった（図1）。

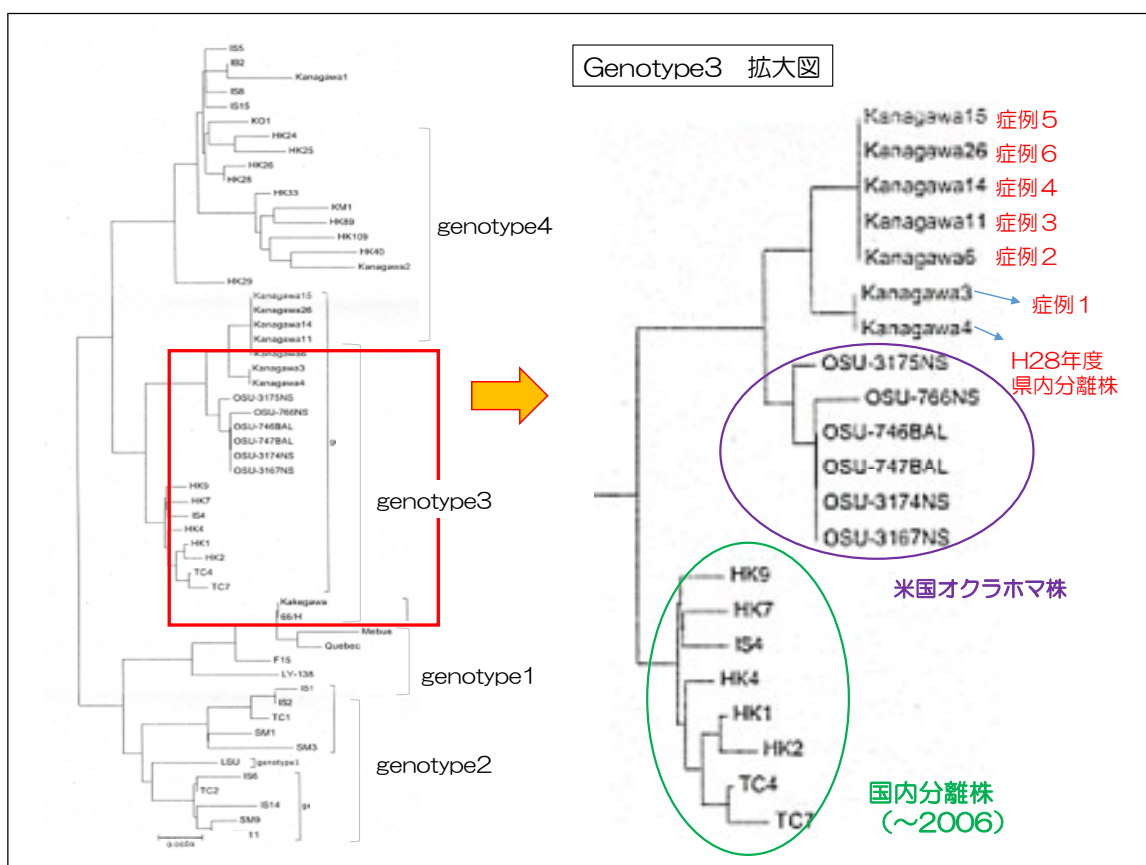


図1 分離株の遺伝子解析

(ウイルス構造蛋白S遺伝子多形部位411bpの遺伝子型別)

### 4 BCoV1型、3型及び4型を用いた中和試験結果の比較

1型、3型及び4型の、6農場のペア血清における抗体価の推移をグラフにまとめた（図2）。全症例で、抗体価には差があるものの、遺伝子型に関わらず同様の推移がみられ、既報<sup>1)</sup> のとおり遺伝子型が違ってても中和抗体が交差することが確認できた。一方で、抗体価の分布を遺伝子型別にみると

(図3)、全症例で遺伝子型3型に対する抗体価が高く、特にpost血清において1型と3型、3型と4型間で有意に差があることがわかった。

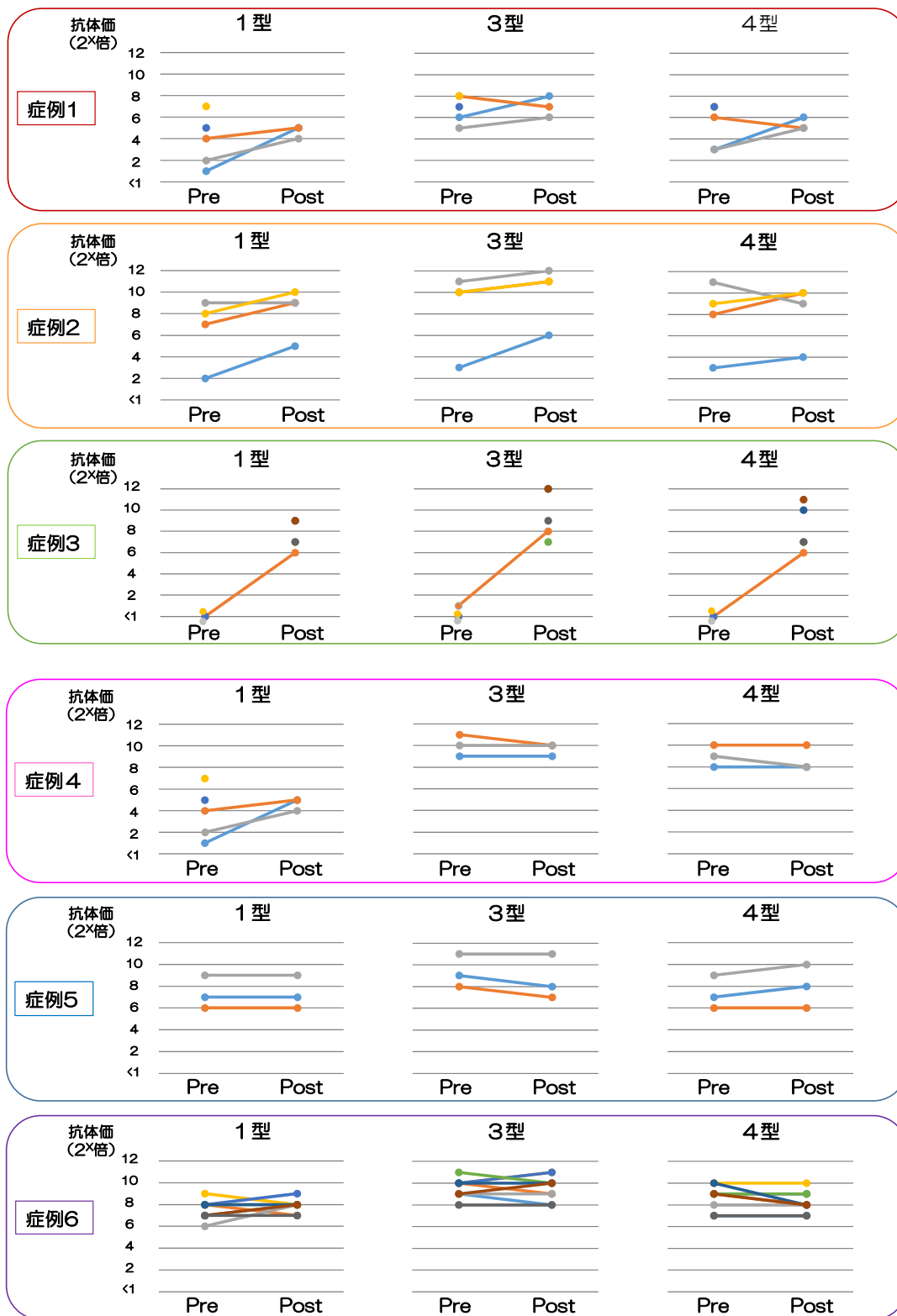


図2 6農場におけるペア血清の遺伝子型別中和抗体価の推移

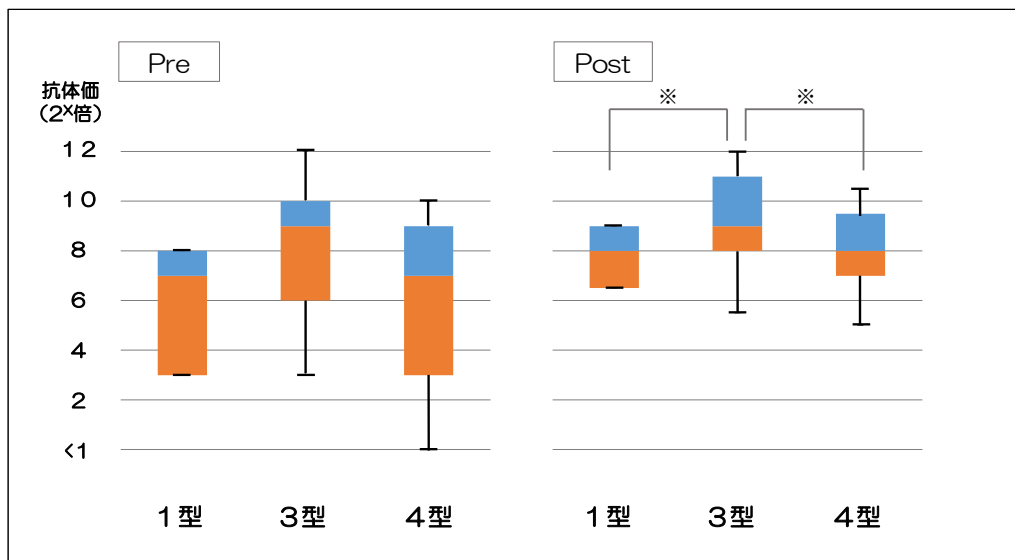


図3 遺伝子型別抗体価の分布（6症例集計）

Steel-Dwass法による多重比較 ※：有意差あり（有意水準5%）

## 考 察

平成29年11月から平成30年1月にかけて県内で発生した呼吸器病及び下痢症の牛から分離されたBCoVは、平成28年度に発生した1例に引き続き、全国で広く分布している4型ではなく、3型であった。今回、各農場における感染経路の特定には至らなかったが、県内でBCoV3型が浸潤している可能性が示唆された。

また、遺伝子解析の結果、過去の国内株よりも米国株に近い位置に分類されたことから、今回の分離株は、過去の流行ウイルスが農場で維持されていたのではなく、少なくとも平成28年以前に以前とは異なるタイプの3型が外部より県内に侵入し、広がったと考えられる。さらに中和試験では、かねてからの報告<sup>1)</sup>とは若干異なり、遺伝子型の違いにより、有意に中和抗体価に差が出ることを示唆された。BCoVはこれまで1型から順に4型へと移行してきており、3型と4型の抗体価の相関が高いと予測していたが、1型・4型間よりも1型・3型間及び3型・4型間の相関性が低かった。このことから、ワクチン株である1型や、現在の国内流行株である4型の抗体を持っていても、今回の分離株が感染した際の臨床症状は強く出る可能性があると考えられた。今後、県内で4型が分離された際に、今回の3型の分離株で中和試験を実施する、過去の3型株を取り寄せて、今回の3型抗体価と比較するなど、更なる検証が必要である。

以上のことから、近年県内で分離された3型株は、平成28年以前に外部から県内に侵入し、過去の国内株と遺伝子学的、血清学的に若干異なることが示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、BCoVの遺伝子解析を実施及びご助言いただきました国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 病態研究領域寒地酪農衛生ユニット 菅野徹主席研究員に深謝いたします。

## 参考文献

- 1) 菅野ら：動衛研研究報告（第117号）、19-25（2001）.
- 2) Kanno et al.：J. Gen. Viral. 88（2007）.
- 3) Kanno et al.：J. Vet. Med. Sci. 71（2009）.
- 4) Kirisawa, R., et al.：J. Rakuno Gakuen Univ. 19, 225-237（1994）.
- 5) Vilcek, S., et al.：Arch. Virol. 136, 309-323（1994）.
- 6) 病性鑑定指針 平成27年3月13日付消安第4686号農林水産省消費安全局通知，109-111