育成子牛からの牛パルボウイルスの分離と抗体調査

宮里俊光^{*1)} 後藤義之^{*2)} 黒木 洋^{*2)}

(昭和 56 年 9 月 18 日受理)

Isolation of Bovine Parvovirus in an Antibody Survey on Calves
SHUNKO MIYAZATO (Nansatsu Livestock Hygiene Service Center, Prefecture of
Kagoshima, Chiran, Kagoshima 897-03) et al.

SUMMARY

An antibody survey was conducted on 10 calves for 6 months beginning with November, 1979. Bovine parvovirus was isolated from the feces of 5 of these calves. The 10 calves showed a significant increase in titer of HI antibody against the isolated virus, showing that they might have been infected with parvovirus, without manifesting any clinical symptoms. During the assumed period of infection with this virus, there was no infection with bovine rotavirus, bovine coronavirus, or reovirus type I or II.

要 約

某牧場育成子牛でのウイルス動態を調べるとともに、野外におけるウイルス感染と疾病との関係を検討するため、1979 年の 11 月から 1980 年の 6 月の間に、糞便からのウイルス分離、抗体検査、および臨床症状について、長期間観察したところ、次のような成績が得られた。

1) 1979年12月から1980年1月の間に、試験牛10頭中5頭から牛パルボウイルスが分離された。また、試験牛全頭に分離ウイルスに対する HI 抗体価の有意上昇が認められ、牛パルボウイルスの感染があったものと思われた。

2) 牛パルボウイルスの感染があった時期に、牛ロタウイルス、牛コロナウイルス、レオウイルスⅠ型およびⅡ型の感染はいずれも認められなかった。

3) これらの試験牛はいずれも臨床的に異常はみられなかったが、牛パルボウイルスの感染の様相が明らかにされた。

近年、全国的に乳・肉用牛の集団飼育による畜産経営の大型化が進むにつれて、哺育期から育成期における下痢および肺炎による死亡、廃用および発育不良などによる損耗が著しく増大し、畜産農家に大きな経済的損失を与えている。

いっぽう、鹿児島県内の育成牧場でも、下痢症による死亡事故が多発するため、以前から下痢症に対する原因究明および防疫対策の確立が強く望まれてきた。

そこで、著者らは、原因究明の1つの手段として、ウイルス学的立場から、野外におけるウイルスの動態、およびウイルス感染と疾病との関係を検討するため、某牧場育成子牛について、経時的に糞便からのウイルス分離と抗体検査を試みると同時に、臨床観察を行なったところ、牛パルボウイルスの感染例に遭遇したので、その概要について報告する。

1. 材 料 お よ び 方 法

1) 試験牛と試験期間

試験牛は7日齢で導入した乳用雄子牛 10 頭とし、試験開始日齢は 10 日から 40 日、終了月齢は 7 カ月から

8 カ月とした。また、試験期間は 1979 年 11 月から 1980 年 6 月の間であった。

2) 検 査 材 料

ウイルス分離材料として、糞便を定期的に毎月 1 回または 2 回採取し、検査時まで -80°C に保存した。血清は糞便と同じ日に採取し、検査時まで -20°C に保存した。

3) 培 養 細 胞

牛胎児腎 (BEK) 細胞の 2 代培養細胞を用いた。増殖

*1) 鹿児島県南薩家畜保健衛生所 (鹿児島県川辺郡知覧町 4203)

*2) 農林水産省家畜衛生試験場九州支場 (鹿児島市中山町 2702)

育成子牛からの牛パルボウイルスの分離と抗体調査

培地は0.5%ラクトアルブミン水解物を含むアール (LE) 液に、牛血清 10%, 7.5% NaHCO₃ 0.5%, および抗生物質を加えた液を使用した。細胞は増殖培地で 3×10^5 個/ml になるように浮遊し、試験管 (11×100 mm) に 0.5 ml ずつ分注して、37℃ で静置培養した。細胞の単層が形成された後、アール液に 7.5% NaHCO₃ を 1% 加えた細胞洗浄液で、細胞表面を 3 回洗浄したのち使用した。

細胞維持液はイーストエキストラクトを 0.1% 加えた LE 液 (YLE 液) に 7.5% NaHCO₃ を 2% と抗生物質を加えたものを使用した。

4) ウィルス分離

糞便を細胞維持液で 5 倍乳剤にし、10,000rpm 30 分間遠心後、その上液を接種材料とし、これを細胞維持液で 10 倍に希釈したものを、それぞれ 4 本の細胞培養試験管に 0.1 ml ずつ接種した。37℃ 120 分間細胞にウイルスを吸着後、維持液を 0.5 ml ずつ加えて 34℃ で回転培養した。接種後 7 日目に、細胞培養液を採取し、さらに上記と同様の方法で 2 代継代培養を行った。

接種後の培養細胞の観察は、ウイルス感染の指標として細胞変性効果 (CPE) と、感染細胞培養液の赤血球凝集 (HA) 性を調べることによって行ない、また、封入体の出現はカバースリップの BEK 細胞に材料を接種し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して観察した。

感染細胞液の HA 性の検査は、マイクロタイター法⁹⁾ により行い、ウシとモルモット血球液を用いる場合は 4℃ で、また、ニワトリとヒト血球液を用いる場合は 25℃ で、それぞれ感作を行った。

5) ウィルス

HA 抗原および参照ウイルスは、牛パルボウイルス (Haden 株)、牛ロタウイルス (Lincoln 株)、牛コロナウイルス (Mebus 株)、レオウイルス I 型 (Lang 株) および II 型 (C-121R 株)、牛伝染性鼻気管炎 (IBR) ウ

イルス (758 株)、牛エンテロウイルス (BF-1 株) を用いた。牛コロナウイルスは BEK-1 (牛胎児腎由来) 細胞で、その他のウイルスは BEK 細胞で、それぞれ増殖させた感染細胞培養液を 3,000 rpm 10 分間遠心沈殿し、その上液を HA 抗原またはウイルス液として使用した。

6) 感染価の測定

ウイルス液を細胞維持液で 10 倍階段希釈し、それぞれの希釈ウイルス液を 4 本の細胞培養試験管に 0.1 ml ずつ接種し、37℃ で 120 分間細胞にウイルスを吸着後、維持液を 0.5 ml ずつ分注し、34℃ で 7 日間回転培養を行った。分離ウイルスでは、0.5% モルモット血球液を 0.5 ml ずつ培養試験管に加え、4℃ で 120 分感作後、HA 性の有無を、また参照ウイルスでは CPE の出現の有無を指標にして感染を判定し、TCID₅₀ を算出した。

7) 免疫血清

既知牛パルボウイルス Haden 株¹⁾ および分離ウイルス T-10 株に対する免疫血清は INABA ら⁵⁾ の方法に準じ、モルモットで作製した。

8) 赤血球凝集抑制 (HI) 試験

反応術式は、マイクロタイター法により、牛パルボおよび牛ロタウイルスは INABA ら^{4,6)}、牛コロナウイルスは SATO ら¹²⁾、レオウイルス I 型および II 型は KUROGI ら⁹⁾ の方法に準じた。

2. 成績

1) 臨床観察

試験期間中、試験牛には著変はみられず、呼吸器病、下痢およびその他の事故で死亡または廃用となるものはなかった。

2) 糞便からのウイルス分離状況

糞便材料を BEK 細胞に接種したところ、1979 年 12 月 20 日に 1 頭、1980 年 1 月 18 日に 4 頭の計 5 頭の糞便から 5 株のウイルスが分離された。分離株は、それぞ

表1 糞便からのウイルス分離状況

試験牛 No.	糞便採取日	1979				1980							
		年	11	12		1	2	3	4	5	6		
	日	5	19	4	20	8	18	4	20	4	18	21	6
6													
7													
8					+								
9													
10							+						
16													
17							+						
18							+						
19							+						
20													

+: ウィルス分離   その他ウィルス分離(-)

図1 分離ウイルスの増殖におよぼす IUDR の影響

れ T-8 株, T-10 株, T-17 株, T-18 株および T-19 株とした (表1). これらのウイルスはいずれも, 接種 4~7 日後に, 細胞の顆粒形成, 崩壊および限局性の脱落等の CPE を示し, またモルモットとヒト赤血球を凝集した.

3) 分離ウイルス間の血清学的関係

自然感染牛血清の HI 抗体価が, すべての分離ウイルス抗原に対し 160 倍と同一値であった. したがって, これらの 5 株は抗原的に同一ウイルスと考えられた. そこで, T-10 株を代表株に選び以下の各種性状を調べた.

4) 封入体の観察

T-10 株を接種後 4 日目から, エオジン好性の核内封入体が多数認められた.

5) 物理・化学的性状

すべて INABA ら⁴⁾の記載に準じて行った.

(1) 5-ヨード-2'-デオキシウリジン (IUDR) のウイルス増殖におよぼす影響: T-10 株, IBR ウイルスは増殖を抑制されたが, エンテロウイルスは増殖を抑制されなかった (図1).

(2) エーテルに対する感受性: T-10 株, エンテロウイルスは感染価の低下を認めなかったが, IBR ウイルスはエーテル処理により完全に不活化された.

(3) 加熱による影響: T-10 株は 70℃ 30 分の加熱により感染価の低下を認めなかったが, IBR ウイルスは完全に不活化された. エンテロウイルスはわずかに感染価の低下を認めた.

(4) 1M MgCl₂ 存在下での 50℃ 60 分の加熱の影響:

T-10 株, エンテロウイルスは 1M MgCl₂, YLE, 蒸留水の存在下で, 感染価の低下を認めなかったが, IBR ウイルスは YLE, 蒸留水の存在下で感染価がやや低下する傾向が認められ, さらに 1M MgCl₂ の存在下では完全に不活化された.

(5) トリプシンの影響: T-10 株, エンテロウイルスは感染価の低下を認めなかったが, IBR ウイルスはトリプシン処理により完全に不活化された.

図1以外の性状の成績は, 表2に示した.

表2 分離ウイルスの物理・化学的性状

ウイルス		参照ウイルス		
		分離ウイルス	IBR	エンテロ
エーテル	20%	4.75* (5.0)	<1.5 (6.75)	5.5 (5.0)
加熱	70℃ 30 分	4.75 (4.75)	<0.5 (6.25)	2.5 (4.5)
加熱 50℃ 60分	{ 1 M MgCl ₂ YLE H ₂ O	3.75 (3.25)	<0.5 (4.75)	5.0 (5.0)
		3.75 (3.5)	2.75 (4.25)	4.5 (4.75)
		3.5 (3.25)	3.05 (5.0)	4.0 (5.0)
		トリプシン (0.5%)	3.75 (3.5)	<0.5 (4.0)

( ) 内は処理前

* TCID₅₀/0.1 ml(log)

6) 電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察

1% リンタングステン酸で, ネガティブ染色し, 日立 H-300 型電子顕微鏡を用いて観察したところ, ウイル

ス粒子は直径 20~25 nm の球形で、エンベロープは認められなかった。

7) 分離ウイルスの血清学的性状

既知牛パルボウイルスの Haden 株免疫血清によって、すべての分離ウイルスの赤血球凝集が抑制された。さらに T-10 株に対する免疫血清により、分離ウイルスおよび Haden 株の赤血球凝集が抑制されたことから、分離ウイルス 5 株はすべて牛パルボウイルスと同定された(表 3)。

表 3 分離ウイルスと既知牛パルボウイルスとの血清学的関係

分離ウイルス	Haden 株に対する免疫血清の HI 抗体価	T-10 株に対する免疫血清の HI 抗体価
T-8	2,560	5,120
T-10	2,560	5,120
T-17	2,560	2,560
T-18	2,560	2,560
T-19	5,120	5,120
Haden 株*	5,120	2,560

* 既知牛パルボウイルス

図 2 分離ウイルスに対する HI 抗体価の推移

8) T-10 株に対する HI 抗体価の推移

試験牛における移行抗体と思われる抗体は 12 月中にはほぼ低下し、1980 年 1 月 8 日に、6 号牛、8 号牛、9 号牛、16 号牛および 17 号牛に、また 1 月 18 日には、7 号牛、10 号牛、18 号牛および 19 号牛に、さらに 2 月 4 日には 20 号牛に、それぞれ HI 抗体価の有意上昇がみられた(図 2)。

9) 既知ウイルスに対する HI 抗体価の推移

T-10 株に対する HI 抗体価の有意上昇がみられた時期に、牛コロナウイルスに対する HI 抗体価の有意上昇が、試験牛 1 頭にみられた。しかし、牛ロタウイルス、レオウイルス I 型および II 型に対する HI 抗体価の有意上昇はみられなかった。

3. 考 察

哺育育成を行っている某牧場の乳用雄子牛について、ウイルス動態、およびウイルス感染と疾病との関係を検討するため、調査を行ったところ、1979 年 12 月から 1980 年 1 月の間に、試験牛 10 頭中 5 頭からウイルス 5 株を分離した。これら分離ウイルスの性状は INABA ら⁴⁾の牛パルボウイルスの性状と一致し、血清学的にも牛パルボウイルスと同定された。また本ウイルスが分離された時期と前後して、HI 抗体価の有意上昇が、1980 年 1 月 8 日に 5 頭、1 月 18 日に 4 頭、2 月 4 日に 1 頭の試験牛全頭に認められた。

分離ウイルスのうち、T-8 株は移行抗体の低下後、HI 抗体価の最も低い時期に分離されたが、他の 4 株では抗体価からみると、いずれも HI 抗体価 160 倍でも分離されている。このことは、一般にウイルスの腸管感染症においては、局所抗体と血中抗体は本質的に異なり、それらの推移も差異のあることを反映しているものと考えられる。すなわち、WOODE and BRIDGER¹⁸⁾、WOODE¹⁹⁾、児玉ら⁸⁾は、牛ロタウイルスのような腸管感染症に対して血中抗体が存在していても感染を防御できないと述べている。牛パルボウイルス感染の場合に、血中抗体があっても腸管の局所免疫が成立しなければ腸管感染を防御できず、糞便中からウイルスが分離されることが考えられる。

牛パルボウイルスは ABINANTI & WARFIELD¹⁾により健康な子牛の腸管から、BATES ら²⁾により子牛の下痢便から、またわが国では INABA ら⁴⁾により子牛の下痢便から、SUGIMURA ら¹⁷⁾により流産胎児からそれぞれ分離されている。ウイルスの病原性については、感染試験で、SPAHN ら¹³⁾は経口投与や鼻腔内投与により、抗体陰性子牛にかかる下痢や呼吸器症状がみられると報告し、また STORZ ら¹⁶⁾は妊娠牛の静脈内または胎児に直接接種すると、いずれも流産あるいは死産がみられると報告している。しかし、これらの分離例や実験感染例があるに

もかわらず、野外における本ウイルスの病原性については明らかでない。

野外における本ウイルスの抗体調査では、ABINANTI & WARFIELD¹⁾, STORZ ら¹⁵⁾, SUGIMURA ら¹⁷⁾ は、成牛では抗体保有率はかなり高く、牛群に広く浸潤していると報告している。今回の報告では、臨床上、一見健康と思われる野外の牛についてウイルス分離、抗体の動きを詳細に追跡してみると高率に感染は認められるが、抗体応答の程度はさまざまであった。すなわち、試験牛の 17, 18, 19 および 20 号では感染による抗体価の上昇パターンが明らかでなく、また抗体の持続も短かいものが多かった。

いっぽう、後藤ら³⁾ は当牧場における子牛の下痢症に関与する各種ウイルスの動態について長期間観察を行なったところ、この牧場では、従来から移行抗体の低下に伴い、いろいろなウイルスが感染し、抗体は上昇するが抗体価の変動が著しく、短時間で抗体価は低下し、また再感染すると報告している。したがって今回の牛バルボウイルスについて、一時期をとらえてみると多数の牛バルボウイルスが分離され、いっせいに感染する様相が認められた。しかし、このウイルスの物理化学的性状から考えてみると、一度牧場に侵入した場合、根絶することは不可能であり、移行抗体の低下に伴って、常に感染する機会が多いものと考え。今回の報告は、野外の牛における複雑な腸管感染症の様相を明確にするため詳細な観察を実施したことに意義あるものと考え。

文 献

- 1) ABINANTI, F. R. & WARFIELD, M. S.: *Virology*, 14, 288~289 (1961).
- 2) BATES, R. C., STORZ, J. and REED, D. E.: *J.*

- Infect. Dis.*, 126, 531~536 (1972).
- 3) 後藤義之, 黒木 洋, 宮里俊光, ほか: 第 91 回日本獣医学会講演要旨, 159 (1981).
- 4) INABA, Y., et al.: *Arch. Gesamte. Virusforsch.*, 42, 54~66 (1973).
- 5) INABA, Y., et al.: *Jap. J. Microbiol.*, 17, 85~86 (1973).
- 6) INABA, Y., et al.: *Microbiol. Immunol.*, 21, 531~534 (1977).
- 7) 稲葉右二: 日獣会誌, 31, 127~135 (1978).
- 8) 児玉 道, ほか: 家畜衛生研究報告, 77, 1~8 (1978).
- 9) KUROI, H., et al.: *Arch. Gesamte. Virusforsch.*, 45, 157~160 (1974).
- 10) MEBUS, C. A., et al.: *Can. Vet. J.*, 12, 69~72 (1971).
- 11) MEBUS, C. A., STAIR, E. L., RHODES, M. B., et al.: *Am. J. Vet. Res.*, 34, 145~150 (1973).
- 12) SATO, K., et al.: *Vet. Microbiol.*, 2, 83~87 (1977).
- 13) SPAHN, G. J., MOHANTY, S. B. and HETRICK, F. M.: *Cornell Vet.*, 56, 377~386 (1966).
- 14) STAIR, E. L., et al.: *Vet. Path.*, 10, 155~170 (1973).
- 15) STORZ, J., BATES, R. C., WARREN, G. S., et al.: *Am. J. Vet. Res.*, 33, 269~272 (1972).
- 16) STORZ, J., et al.: *Am. J. Vet. Res.*, 39, 1099~1102 (1978).
- 17) SUGIMURA, T., TANAKA, Y., KITA, E., et al.: *Nat. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)*, 14, 42~47 (1974).
- 18) WOODE, G. N. & BRIDGER.: *Vet. Rec.*, 96, 85~88 (1975).
- 19) WOODE, G. N., et al.: *Vet. Rec.*, 97, 148~149 (1975).