呼吸器病を主徴とした搾乳牛の牛コロナウイルス病

後藤敬一¹⁾石橋和樹^{1)†}江崎健二郎²⁾山中章喜³⁾

1) 福岡県中央家畜保健衛生所 (〒812-0881 福岡市博多区井相田2-1-3)

2) 福岡県筑後家畜保健衛生所 (〒833-0041 筑後市大字和泉606-1)

3) 福岡県八女中央家畜診療所 (〒834-0064 八女市蒲原字中道端1962-5)

(2006年8月29日受付・2007年3月5日受理)

要 約

2004年1月、38頭のホルスタイン種を飼養する酪農場において、呼吸器症状を主徴とし、下痢および搾乳量の減少を伴う疾病が認められた。発症牛群の糞便および鼻腔拭い液から牛コロナウイルス (BCV) 遺伝子が検出されるとともに、鼻腔拭い液からBCVが分離され、さらに、発症期および回復期の血清でBCVに対する鶏赤血球凝集抑制抗体価が有意に上昇した。いっぽう、牛RSウイルス、牛伝染性気管支炎ウイルス等の呼吸器病起因ウイルスは抗原検索、分離ともに陰性であり、抗体検査でも有意な上昇を示さなかった。また、有意な病原細菌および寄生虫は確認されなかった。これらの結果から今回の症例はBCV単独によるものと思われた。

——キーワード：牛コロナウイルス、呼吸器症状、搾乳牛。

----- 日獣会誌 60, 715～717 (2007)

牛コロナウイルス (BCV) 病は下痢を主徴とする疾病であるが、時に呼吸器症状を伴う [1]。2004年1月、1酪農場において呼吸器病を主徴としたBCV病が発生した。

日を要した。乳量は初発から1週後22%の生産減となり、発症前の生産量を回復するまでに25日間を要した。なお、飼養牛には牛伝染性鼻気管炎 (IBR) ワクチンが接種されていた。

農場概況および発生状況

発生農家は、搾乳牛28頭、乾乳牛4頭および未経産牛6頭を対尻式タイストール牛舎で飼育し、共有水槽により給水していた。2004年1月9日、自家産の搾乳牛1頭 (2産) が発熱、発咳および下痢を呈した。翌日、未経産牛2頭が発熱、発咳および鼻汁を呈したため加療したが、改善がみられず、3日目には38頭中32頭 (84.2%) に症状が認められたため病性鑑定が実施された。発症牛の臨床症状は、発熱17頭 (44.7%)、発咳24頭 (63.2%)、粘稠性の透明鼻汁14頭 (36.8%) および水様性下痢15頭 (39.5%) で、その一部は血様であった。個体別にみた臨床症状は、呼吸器および下痢症状を呈した牛34%、呼吸器症状のみ呈した牛34%、発熱のみ11%、下痢のみ5%と呼吸器症状を主徴としていた。加療は18頭に施され、初期には抗生物質、解熱剤および止瀉剤を使用していたが、回復を認めなかったため生菌剤を飼料添加により投与したところ、効果が認められた。しかし、すべての発症牛の症状が終息するまで21

材 料 お よ び 方 法

呼吸器および下痢症状を呈した4頭、呼吸器症状のみ1頭、下痢のみ1頭、発熱のみ1頭および未発症牛2頭の鼻腔拭い液、糞便、発症時および2週後の血清を採材した。病因が疑われるウイルス抗原の検出は市販キットを用いて実施した。鼻腔拭い液から免疫クロマトグラフィー法 (Directigen™ EZ RSV, 日本ベクトン・ディッキンソン(株), 東京) を用いて牛RSウイルス (RSV) 抗原の検出、同沈査細胞から蛍光抗体法 (IBR-FA, (株) 微生物化学研究所, 京都) を用いてIBR蛍光抗原の検出を、糞便から免疫クロマトグラフィー法 (ロタアデノラピッドテスト, 第一化学薬品(株), 東京) を用いて牛ロタウイルス (BRV) および牛アデノウイルス (AdeV) 抗原の検出を試みた。また、Tsunemitsuら [2] の方法に準じて鼻腔拭い液および糞便を用いてBCVを標的としたRT-PCR法を実施した。ウイルス分離は、鼻腔拭い液を牛胎児動脈 (BAT) 細胞, VeroT細胞, HRT-18細胞に接種し、3代盲継代した。ウイルス分離株の赤血

† 連絡責任者：石橋和樹 (福岡県中央家畜保健衛生所)

〒812-0881 福岡市博多区井相田2-1-3

☎092-581-0325 FAX 092-581-0474

E-mail : ishibashi-k3711@pref.fukuoka.lg.jp

表1 発症牛の各種ウイルスに対する抗体調査成績

No.	BCV		BVDV		RSV		IBR		PI-3V	
	前	後	前	後	前	後	前	後	前	後
1	10	1,280	16	8	<2	<2	8	8	<2	<2
2	10	640	8	8	<2	<2	8	16	<2	<2
3	160	1,280	≥256	256	256	128	4	8	8	8
4	1,280	10,240	≥256	≥256	≥256	≥256	16	8	16	8
5	10	640	4	8	≥256	≥256	4	8	<2	<2
6	20	320	4	8	64	64	2	4	<2	<2
7	160	640	≥256	≥256	≥256	≥256	8	8	16	8
8	320	2,560	≥256	≥256	16	32	64	64	64	32
9	640	2,560	≥256	≥256	64	128	64	64	256	128

球凝集反応（HA）試験はFukutomiら [3] の報告に準じて分離株と子牛由来株である Mebus 株を比較した。すなわち、ウイルス培養液を 10^5 TCID₅₀/ml に調整後、1%マウス血球液および0.5%鶏血球液を用いて、4℃および37℃で1時間感作後、HA価を測定した。また、抗Mebus株家兎免疫血清を用いて、中和試験を実施した。さらに遺伝子解析は、材料として同一個体の糞便および鼻腔拭い液を用い、比較の対照としてMebus株および成牛下痢由来株である掛川株を用いた。まず、Hasok-suzら [4] の報告に準じて中和抗体、病原性等に関与しているとされるスパイク蛋白の一部であるS1遺伝子について相同性を検索した。次に、1999年に中条らが兵庫県家畜保健衛生所業績発表で報告した方法に準じて、迅速診断の標的部分として用いる比較的安定しているN遺伝子部分について増幅後、制限酵素Hinc IIによる制限酵素断片長多型（RFLP）を実施した。牛の前後血清を用いたIBRV、RSV、牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）、牛パラインフルエンザウイルス3型ウイルス（PI-3V）については中和試験を、BCVについて鶏赤血球凝集抑制（HI）試験を用いてウイルス抗体検査を実施した。細菌学的検査は症状を示した牛の鼻腔拭い液および下痢便を5%めん羊血液加トリプトソイ寒天培地およびDHL寒天培地に塗布し、好気培養、ならびに、変法GAM寒天培地に塗布し、嫌気培養をそれぞれ37℃3日間培養した。寄生虫学的検査として糞便を材料とし、平が考案したOリング法 [5] で消化器系寄生虫卵検査を実施した。

成 績

ウイルス分離の結果、3代盲継代後にHRT-18細胞にのみ細胞変性効果（CPE）が認められた。CPEを示した細胞内に抗BCVモノクローナル抗体（動物製剤協会より購入）を用いた間接蛍光抗体法で特異蛍光を認めたことから、分離株をBCVと同定した。なお、IBRV、RSV、BRVおよびAdeV抗原は検出されなかった。RT-PCR法では、BCVに特異的な遺伝子がすべての糞

表2 分離株とMebus株とのHA能の比較

	鶏血球		マウス血球	
	4℃	37℃	4℃	37℃
分離株	64	<2	128	64
Mebus株	256	128	128	128

便および9検体中7検体の鼻腔拭い液で検出された。抗体検査の結果、BCVに対するHI価がすべての検体で有意な上昇を示したが、BVDV、RSV、IBRおよびPI-3Vについては、ウイルス中和抗体価の有意な上昇はみられなかった（表1）。細菌学および寄生虫学的検査の結果、有意菌および寄生虫卵は認められなかった。分離株とMebus株の生物学的性状比較のために実施したHA試験の結果、マウス血球では両株間に差を認めなかったが、鶏血球ではMebus株が4℃および37℃において同様なHA性を示したのに対し、分離株は37℃ではHA性が認められなかった（表2）。中和試験では、抗Mebus株免疫血清に対して、ホモのMebus株が51,200倍、分離株は12,800倍を示した。遺伝子解析の結果、N遺伝子のRFLPはMebus株および掛川株が切断されたのに対して、分離株は切断されなかった。S1遺伝子の相同性は糞便と鼻腔拭い液では100%同一であった。また、Mebus株および掛川株との相同性はそれぞれ96.9%、97.3%であった。

考 察

本症例では、農場へのウイルス進入経路は特定できなかったが、舎内での感染拡大が早かったのは、農場が共有の水槽により給水していたこと、および、発咳等による飛沫感染によると考えられた。その結果として、牛群の85%が発症、バルク乳量は日量で最大22%が減少した。また、約半数が加療され、回復までに25日間を要した。

糞便および鼻腔拭い液からBCV特異遺伝子を検出し、鼻腔拭い液からBCVが分離された。また、検査に供し

たすべての前後血清で、BCVに対するHI価が有意に上昇した。検査の結果、他のウイルスの関与は認められず、また、細菌学および寄生虫学的検査でも病害因子は確認されなかった。このことから、今回の呼吸器症状を主徴とした症例はBCV単独感染による疾病と思われた。Tsunemitsuら〔6〕は呼吸器からもBCVは容易に分離されると報告しており、呼吸器症状を伴う成牛のBCV病は国内でも発生がみられている。今回の症例について詳細に臨床症状を観察した結果、呼吸器症状のみを呈した牛が呼吸器および下痢症状を呈した牛と同率(34%)であったこと、それに比べ下痢のみを呈した牛は5%と低率であった。これらの結果から、本症例は、従来の下痢を主徴とするBCV病とは異なり、呼吸器症状を主徴とした症例と考えられた。

さらに、Fukutomiら〔3〕はBCV株間に多様な抗原性が存在することを報告しているが、今回の分離株も、Mebus株とは37℃における鶏血球に対するHA性および抗Mebus株免疫血清に対する中和抗体価が異なった。また、分離株はMebus株および掛川株とは、そのS1およびN遺伝子部分に遺伝子学的性状に違いがみられた。今後は、下痢を主徴とする発生事例からの分離株との比較をする必要があると思われる。

最後に、助言をいただくとともにMebus株および抗Mebus株家兔免疫血清を分与いただいた(独)動物衛生研究所の恒光 裕先生に深謝する。

引用文献

- 〔1〕 恒光 裕：牛コロナウイルス病，獣医感染症カラーアトラス，見上 彪編，第一版，76-77，文永堂出版，東京(2002)
- 〔2〕 Tsunemitsu H, Smith DR, Saif LJ : Experimental Inoculation of adult dairy cows with bovine coronavirus and detection of coronavirus in feces by RT-PCR, Arch Virol, 144, 167-75 (1999)
- 〔3〕 Fukutomi T, Tsunemitsu H, Akashi H : Detection of bovine coronaviruses from adult cows with epizootic diarrhea and their antigenic and biological diversities, Arch Virol, 144, 997-1006 (1999)
- 〔4〕 Hasoksuz M, Sreevatsan S, Cho KO, Hoet AE, Saif LJ : Molecular analysis of the s1 subunit of the spike glycoprotein of respiratory and enteric bovine coronavirus isolates, Virus Res, 84, 101-109 (2002)
- 〔5〕 平沼 亨，藤崎幸蔵，安藤義路：家畜臨床寄生虫アトラス，23-27，チクサン出版，東京(1995)
- 〔6〕 Tsunemitsu H, Yonemichi H, Hirai T, Kudo T, Onoe S, Mori K, Shimizu M : Isolation of Bovine coronavirus from feces and nasal swabs of calves with diarrhea, J Vet Med Sci, 53, 433-437 (1991)

Bovine Respiratory Coronavirus Disease in Dairy Cattle

Keiichi GOTO*, Kazuki ISHIBASHI†, Kenziro EZAKI and Shouki YAMAMOTO

* Fukuoka Chuou Livestock Hygiene Service Center, 2-1-3 Isouda, Hakata, Fukuoka, 812-0881, Japan

SUMMARY

On January 9, 2004, 38 Holstein cows bred in Fukuoka Prefecture showed signs of respiratory symptoms with diarrhea. Milk production had diminished rapidly, and Bovine coronavirus (BCV) was initially isolated from nasal cavity swabs. After a two-week period of testing, the resulting rise in hemagglutination inhibition antibody titer (HI-titer) positively identified the presence of BCV. When testing for Bovine RS virus and Infectious Bronchitis Respiratory virus, neither could be isolated or confirmed by their antigen. Their resulting antibody titer did not rise, and no likely bacteria or parasites matching their symptoms were present in this case. BCV was therefore identified as the primary cause of the dairy cattle's respiratory disease.

— Key words : Bovine coronavirus, Dairy cow, Respiratory symptom.

† Correspondence to : Kazuki ISHIBASHI (Fukuoka Chuou Livestock Hygiene Service Center)

2-1-3 Isouda, Hakata, Fukuoka, 816-0081, Japan

TEL 092-581-0325 FAX 092-581-0474 E-mail : ishibashi-k3711@pref.fukuoka.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 60, 715 ~ 717 (2007)