

## 9 県内初の牛トロウイルス及びC群ロタウイルスの混合感染による下痢症

中央家畜保健衛生所

○藤井 知世・曾田 泰史

### I はじめに

牛トロウイルス (BToV) はコロナウイルス科トロウイルス属に分類される RNA ウイルスであり、子牛や成牛に下痢や呼吸器症状を引き起こすが、感染牛のほとんどは不顕性感染である<sup>1)</sup>。BToV は、平成 16 年に愛知県において下痢で死亡した子牛から培養細胞

(HRT-18-aichi) で初めてウイルスが分離され<sup>2)</sup>、これ以降、下痢症を呈した牛からの分離事例が数例報告されている<sup>3, 4, 5, 6, 7)</sup>が、病態等は不明な点が多い。BToV の浸潤状況調査は本県をはじめ、愛知県<sup>2)</sup>、富山県<sup>3)</sup>、千葉県<sup>7)</sup>、長崎県<sup>8)</sup>、北海道<sup>9)</sup>など全国で実施されており、90%以上の高い抗体保有率が確認されている。

また、ロタウイルスはレオウイルス科ロタウイルス属に分類される RNA ウイルスで、牛では A～C 群が検出されている<sup>10)</sup>。牛 C 群ロタウイルス (RVC) は成牛、特に搾乳牛で泥状～水様性下痢、泌乳量減少を起こす<sup>11)</sup>。近年、本県を含め幾つかの県で RVC が関与した下痢症が報告されている<sup>12, 13, 14)</sup>。

今回、県内一酪農家において、搾乳牛及び育成牛が泥状～水様性下痢を呈したため、搾乳牛について病性鑑定を実施した結果、BToV 及び RVC の混合感染による下痢症と診断した。BToV による下痢症は県内初の事例であったため、その概要を報告する。

### II 発生概要

乳用牛 80 頭 (搾乳牛 58 頭)、子牛・育成牛 40 頭を飼養する酪農家において、平成 27 年 10 月 30 日に搾乳牛 2 頭が泥状～水様性下痢を呈し、その後搾乳牛及び育成牛の 70～80%に下痢が拡がり、搾乳牛の泌乳量減少が認められた。11 月 4 日に行った立ち入り検査では、搾乳牛の約 70%が発症していたが、初発牛 2 頭及び育成牛は回復傾向にあった。下痢症の原因究明を目的として、搾乳牛の病性鑑定を実施した。

当該農家では、牛の導入はなく、自家育成を行っているが、品評会等のため県外への牛の移動を行っている。下痢症関連ウイルスのワクチン接種は行っていない。なお、当該農家では、平成 23 年に RVC による搾乳牛の集団下痢症が発生している<sup>12)</sup>。

### III 材料及び方法

#### 1 病性鑑定

##### (1) 材料

初発牛 2 頭 (No. 1、2) を含む搾乳牛 7 頭から糞便及び発症期血清を採材し、その約

3 週間後に回復期血清を採材した。また、2 頭 (No. 3、4) からは EDTA 加血液も採材した。なお、No. 3 は平成 27 年 10 月 27 日に県外から帰着した牛であった。

## (2) 方法

EDTA 加血液 2 検体を材料とし、血液一般検査 (ヘマトクリット値、赤血球及び白血球数、白血球百分率、フィブリノーゲン値) を実施した。細菌学的検査では、糞便 7 検体を材料にサルモネラ検査を実施した。

ウイルス学的検査では、ダルベッコ変法イーグル培地 (日水) を用いて糞便の 10% 乳剤を作成、12,000rpm で 10 分間遠心し、HRT-18-aichi 細胞及び MA104 細胞に接種した。その後、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で 5~7 日間培養し、HRT-18-aichi 細胞を 2 代、MA104 細胞を 3 代盲継代した。また、継代後の細胞培養上清及び糞便乳剤を材料とし、福田らの方法<sup>15)</sup> により牛 A 群ロタウイルス (RVA)、牛 B 群ロタウイルス (RVB)、RVC、BToV、牛コロナウイルス (BCV) の遺伝子検査を実施した。さらに、検出された BToV の S 遺伝子、RVC の VP7、VP4 及び VP6 遺伝子解析を実施し、RVC の VP7 遺伝子塩基配列について、平成 23 年に当農場で発生した下痢症で検出された RVC と比較した。また、7 頭のペア血清を材料とし、Aichi/2004 株を用いた中和試験で BToV、Shintoku 株を用いた間接蛍光抗体法で RVC の抗体検査を実施した。

## 2 当該農家保存血清を用いた BToV 抗体検査

### (1) 材料

平成 23 年~25 年に当該農家で採取した下痢発症牛 (成牛) の保存血清 22 検体 (平成 23 年 : 12 検体、平成 24 年 : 5 検体、平成 25 年 : 5 検体) を用いた。

### (2) 方法

Aichi/2004 株を用いた中和試験を実施した。

## IV 成績

### 1 病性鑑定

No. 3、4 の血液一般検査では、有意な成績は得られなかった。サルモネラ検査は全頭陰性だった。

ウイルス学的検査では、5 頭 (No. 3~7) の糞便から BToV、4 頭 (No. 3~5、7) の糞便から RVC、1 頭 (No. 3) の糞便から RVA 特異遺伝子が検出された。RVB 及び BCV 特異遺伝子は検出されなかった。ウイルス分離では、4 頭 (No. 3、4、6、7) の糞便乳剤を接種した HRT-18-aichi 細胞で CPE が認められ、細胞培養上清から BToV 特異遺伝子が検出された。MA104 細胞では CPE は認められず、細胞培養上清からもロタウイルス特異

遺伝子は検出されなかった。

遺伝子解析では、BToV 分離株 (SIT BToV) の S 遺伝子塩基配列は Kagoshima/2004 株と 100%一致していた。今回検出された株の系統樹解析では、2005 及び 2008 年に国内で検出された株と同じクラスターに分類された (図 1)。

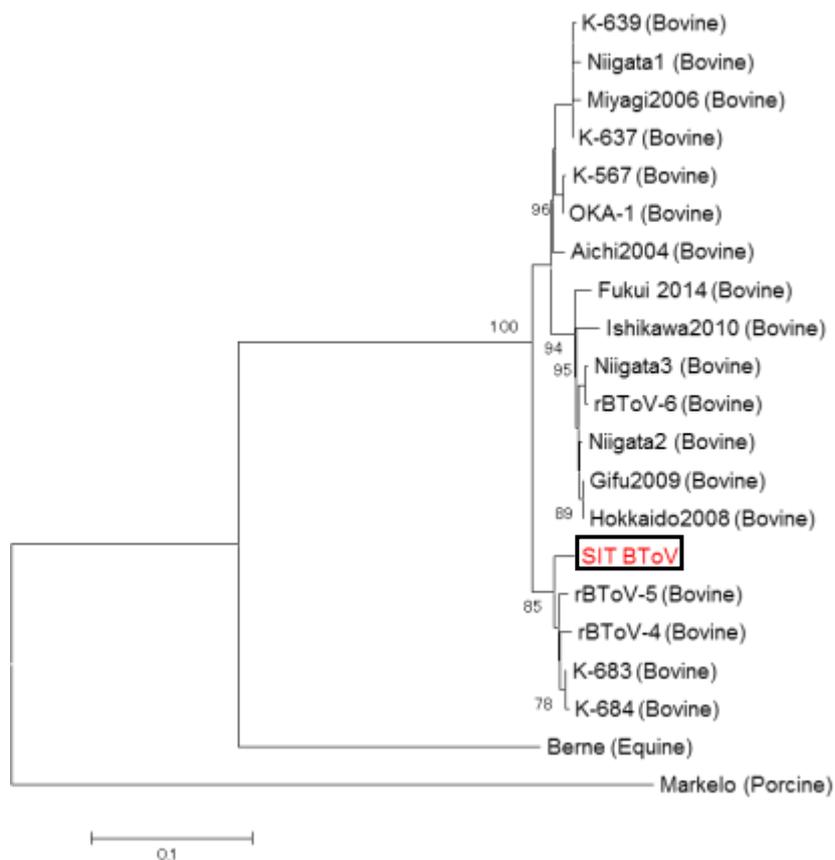


図 1 BToV S 遺伝子に関する系統樹

RVC 検出株 (SIT RVC) の VP7 遺伝子塩基配列は Y10 株との相同性が最も高く (97%)、系統樹解析では牛由来株が属する G2 クラスターに分類された (図 2)。

VP4 遺伝子の塩基配列は Shintoku 株との相同性が最も高く (96%)、系統樹解析では牛由来株が属する P[3]クラスターに分類された (図 3)。VP6 遺伝子の塩基配列は Y08 株との相同性が最も高かった (96%)。いずれの遺伝子も国内で広く検出されている既報の株と近縁であった。

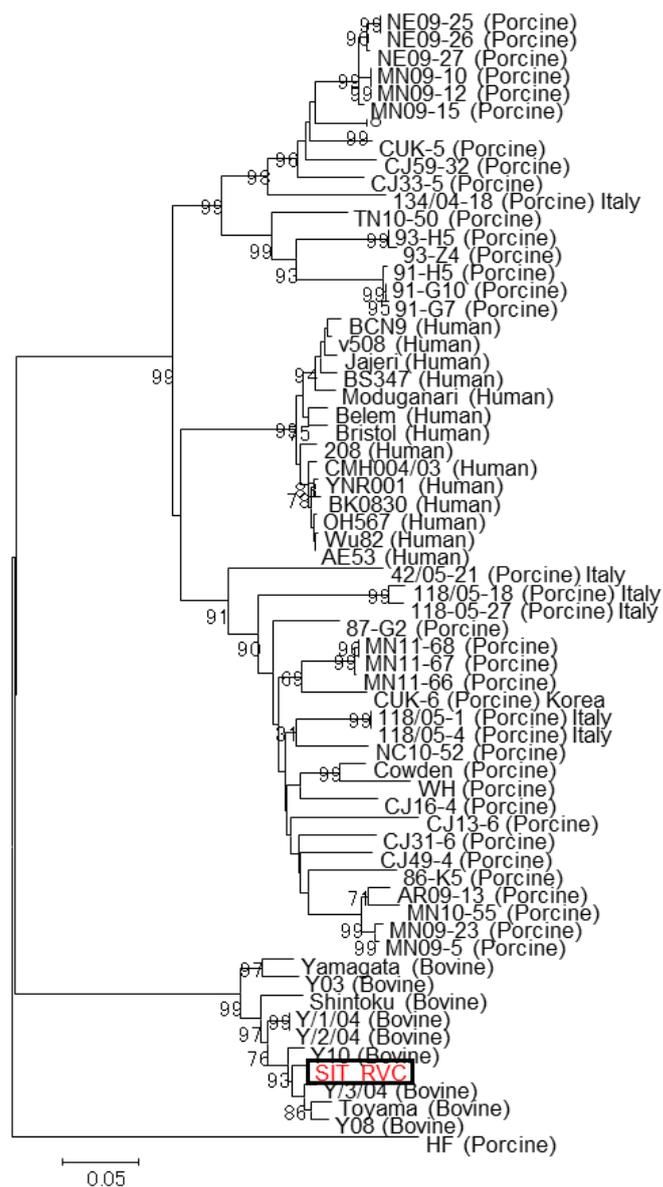


図 2 RVC VP7 遺伝子に関する系統樹

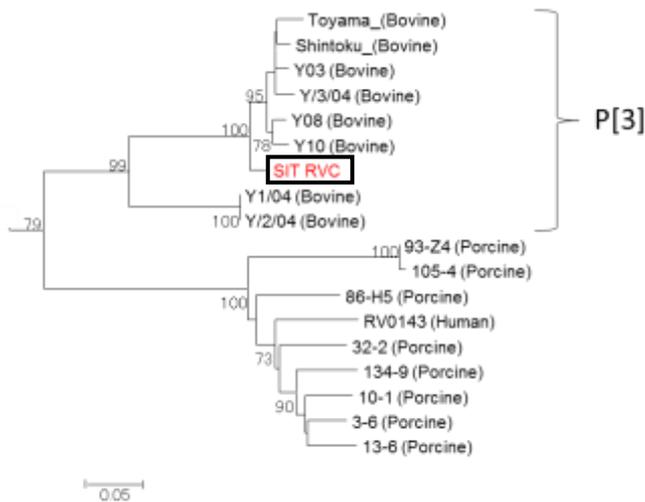


図 3 RVC VP4 遺伝子に関する系統樹

また、平成 23 年に当該農場で発生した下痢症で検出された RVC 株と今回検出された RVC 株の VP7 遺伝子の塩基配列を比較したところ、相同性は 92.1%であった。

BToV の中和試験では 4 頭 (No. 3、4、6、7)、RVC の間接蛍光抗体法では 7 頭全頭で有意な抗体価の上昇が認められた (表 1、2)。

表 1 BToV 抗体検査 (中和試験) 成績

No.	抗体価	
	発症期	回復期
1	2048	256
2	2048	256
3	256	2048
4	64	1024
5	256	512
6	128	1024
7	32	4096<

表 2 RVC 抗体検査 (間接蛍光抗体法) 成績

No.	抗体価	
	発症期	回復期
1	20	320
2	20	640
3	80	640
4	80	640
5	<20	1280
6	160	1280
7	<20	1280

## 2 当該農家過去血清を用いた BToV 抗体検査

BToV 中和試験の結果、平成 23 年～25 年の全ての検体が抗体を保有しており、GM 値は 222.8～430.5 倍であった (表 3)。

表 3 当該農家過去血清を用いた BToV 抗体検査成績

採材年度	検体数	抗体価	GM値
平成23年	12	128～2048	430.5
平成24年	5	64～512	222.8
平成25年	5	128～512	294.0

## V まとめ及び考察

下痢を呈した搾乳牛の糞便から BToV 及び RVC の特異遺伝子が検出され、BToV が分離された。さらに、BToV 及び RVC の有意な抗体価の上昇も認められた。以上の結果から、本症例を BToV 及び RVC の混合感染による下痢症と診断した。本症例は県内初の BToV による下痢症であった。1 頭の糞便から RVA 特異遺伝子が検出されているが、7 頭中 1 頭のみで検出されていることから、本症例では RVA は関与していないと判断した。

本症例で検出された RVC と平成 23 年に当該農場で発生した RVC による下痢症で検出された株の VP7 遺伝子塩基配列を比較した結果、相同性は 92.1%と低値であったことから、本症例の株と平成 23 年に検出された株は異なる株であり、新たに当該農場内に侵入したものと考えられた。当該農場では、平成 23 年の RVC による下痢症の後も、毎年搾乳牛や

子牛で下痢が発生しており、病性鑑定で下痢症関連ウイルスの遺伝子検査を実施しているが、RVC 及び BToV は検出されていなかった。このことから、今回検出された RVC は下痢症発生直前に当該農場に侵入したと考えられた。また、当該農場の過去血清を用いた BToV 抗体検査では、平成 23 年時点で抗体を保有しており、BToV は平成 23 年以前から当該農場内に侵入していたことが分かったものの、侵入時期は特定できなかった。八重樫ら<sup>16)</sup>の報告では、BToV 抗体をもつ成牛を 1 年間追跡し、抗体検査を行ったところ、野外ウイルスの再感染を示す抗体価の上昇が認められており、BToV 抗体が低下した牛では農場内に常在するウイルス又は新たに農場内に侵入したウイルスに再感染することが示唆されたとしている。本症例でも当該農場内に以前から常在していた BToV が感染したか、下痢症発生の 3 日前に県外から帰着した牛がいたことから、この牛が農場内にウイルスを持ち込んだ可能性が考えられた。

野外の多くの牛が BToV に感染しているにもかかわらず、そのほとんどが不顕性感染である要因は未だ明らかになっておらず、発症要因としては他の病原体との混合感染や飼育環境、飼育条件などのストレスが挙げられている<sup>1,17)</sup>。本症例でも RVC との混合感染であったことや、発症前に気温の日較差が大きく（発症 2～4 日前の日較差平均：13.6℃、発症 5～10 日前の日較差平均：9.4℃）、発症 4 日前には最低気温が当月で最も低いことが確認されており、これらが発症の一因となった可能性が考えられた。

福田らによる埼玉県内の BToV 浸潤状況調査では、16 か月齢以上の育成牛及び成牛では全ての個体が BToV 抗体を保有していたと報告しており<sup>18)</sup>、埼玉県内でも BToV は広く浸潤していることが確認されている。このことから、県内の多くの農家で BToV による下痢症発生の可能性があると考えられる。しかし、BToV は一般的にはまだ広く認識されておらず、今後は農家への情報提供を行うとともに、牛舎の消毒の徹底や移動牛を一定期間隔離飼育するなど、飼養衛生管理基準の徹底を行うことが重要だと考えられる。

## VI 謝辞

BToV 及び RVC の遺伝子解析を実施していただいた国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門の鈴木亨上級研究員、HRT-18-aichi 細胞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、RVC 間接蛍光抗体法についてご助言いただきました群馬県家畜衛生研究所の皆様に深謝いたします。

## VII 参考文献

- 1) 鈴木亨：牛トロウイルス, 家畜診療, 62, 259-269 (2015)
- 2) Kuwabara M, et al. : First isolation of cytopathogenic bovine torovirus in cell culture from a calf with diarrhea, Clin Vaccine Immunol, 14, 998-1004 (2007)
- 3) 宮本剛：搾乳牛で発生した牛トロウイルス (BToV) による伝染性下痢症, 平成 22 年

度富山県畜産関係業績集録, 23-28 (2010)

- 4) Aita T, et al. : Characterization of epidemic diarrhea outbreaks associated with bovine torovirus in adult cows, Arch Virol, 157, 423-431 (2012)
- 5) 伊藤美加ら : 石川県における牛トロウイルスが関与した下痢症, 日獣会誌, 65, 350-354 (2012)
- 6) 八重樫岳司ら : 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, 岩獣会報, 39, 16-19 (2013)
- 7) 松本千明ら : 牛トロウイルスが関与した子牛の下痢症, 平成 25 年度千葉県家畜保健衛生業績発表会集録, 32-35 (2013)
- 8) 吉野文彦ら : 長崎県下における牛トロウイルスの浸潤状況調査, 平成 25 年度長崎県家畜保健衛生業績発表会集録, 31-34 (2013)
- 9) 秦葉奈子ら : 釧路管内における牛トロウイルスの分子疫学的解析および浸潤状況調査, 北獣会誌, 60, 139-143 (2016)
- 10) 明石博臣ら : 動物の感染症, 近代出版, 第 3 版, 103-104 (2011)
- 11) 全国家畜衛生職員会 : 病性鑑定マニュアル, 農林水産省消費・安全局監修, 第 4 版, 117-119 (2015)
- 12) 多勢景人ら : 県内 3 酪農家で発生した牛 C 群ロタウイルスによる成牛の下痢症, 平成 24 年度調査研究成績報告書, 42-52 (2012)
- 13) 佐藤圭介ら : 県内初の C 群ロタウイルスによる牛の伝染性下痢症, 平成 24 年度新潟県家畜保健衛生業績発表会集録, 37-39 (2012)
- 14) Mawatari T, et al. : Whole-genome analysis of bovine rotavirus species C isolates obtained in Yamagata, Japan, 2003-2010, J Gen Virol, 95, 1117-1125 (2014)
- 15) Fukuda M, et al. : Development and application of one-step multiplex reverse transcription PCR for simultaneous detection of five diarrheal viruses in adult cattle, Arch Virol, 157, 1063-1069 (2012)
- 16) 八重樫岳司ら : 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, 岩獣会報, 39, 16-19 (2013)
- 17) Hoet AE, et al. : Detection of bovine torovirus and other enteric pathogens in feces from diarrhea cases in cattle, J Vet Diagn Invest, 15, 205-212 (2003)
- 18) 福田昌治ら : 牛下痢症病性鑑定の解析と牛トロウイルスの浸潤状況, 平成 20 年度調査研究成績報告書, 32-38 (2008)