

1 子牛預託施設における牛コロナウイルス動態調査

県央家畜保健衛生所

大竹 祥紘、米山 州二、安西 真奈美

はじめに

牛コロナウイルス (BCoV) は、1~3週齢の子牛では下痢症、成牛では冬季赤痢を引き起こすとともに、牛呼吸器病症候群 (BRDC) の原因となることが知られている¹⁾。一般的に、感染牛が死亡することはまれであるが、月齢を問わず増体の減少や、搾乳牛においては泌乳量の急激な減少が認められることから、経済的損失の大きい疾病である^{2,3)}。BCoV は全国的に広く浸淫しており、毎年多くの発生が確認されている。しかし、BCoV の野外感染を受けた個体を季節ごとかつ経時的に調査し、集団内での感染伝播の動態や呼吸器及び消化器におけるウイルス排泄状況を示した情報は少なく、本ウイルスの動態は不明な点が多い。そこで、今回、栃木県内の子牛預託施設における導入牛群を対象として、夏、冬、春の3季節において、経時的に BCoV の動態を調査したので概要を報告する。

材料及び方法

1 調査対象

平成28年8月、12月、平成29年3月に預託施設に導入された乳用子牛(4~6か月齢)から、導入時に BCoV 抗体を保有していない個体を選出し、8月導入牛は4頭、12月導入牛は10頭、3月導入牛は6頭を調査対象とした。

2 臨床症状の評価

8月及び12月の導入子牛は、導入当日、導入後3日目、7日目、10日目、15日目及び21日目の計6回、3月の導入牛は、導入当日、導入後3日目、7日目及び10日目の計4回、臨床症状の確認

を行った(表1)。

3 遺伝子検査

検査材料は、表1に示した期間中に、各個体から鼻腔スワブ、直腸スワブ及び血液(プレイン採血管)を採取した。採取後、鼻腔スワブは4mLのPBSで、直腸スワブは計量後に3mLのPBSで希釈し、20,000×gで10分間の遠心分離を行い、その上清100µLを核酸抽出に用いた。また、血液は1,700×gで10分間の遠心分離を行い、血清100µLを核酸抽出に用いた。これらの検体について、核酸抽出キット(QIAamp MinElute Virus Spin Kit, (株)キアゲン, 東京)を用いて核酸を抽出後、既報⁴⁾に従い BCoV を標的としたリアルタイム PCR を実施し、検体中の BCoV 遺伝子量を測定した。なお、鼻汁では1スワブ当たり、糞便では1g 当たりの BCoV 遺伝子量を算出した。

また、BCoV の他に、鼻汁では、牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV)、牛 RS ウイルス (BRV)、牛アデノウイルス (BAV)、牛パラインフルエンザウイルス3型 (PI3V)、哺乳類オルソレオウイルス (MRV)、D 型インフルエンザウイルス (IDV)、糞便では、BVDV、MRV、ロタウイルス A~C (RVA~RVC)、牛トロウイルス (BTV) の特異遺伝子を対象として、既報⁵⁻¹²⁾に従って PCR 及び逆転写 PCR を実施した。

結果

1 8月導入子牛

調査対象牛4頭いずれにも臨床症状は認めず、BCoV 遺伝子も検出されなかった。また、BVDV、

BRSV、BAdV、PI3V、MRV、IDV、RVA、RVB、RVC及びBToVの特異遺伝子も検出されなかった。

2 12月導入子牛

調査対象牛10頭のうち、8頭で鼻汁漏出、発咳などの呼吸器症状を、3頭で軟便、下痢などの消化器症状、うち2頭で呼吸器及び消化器症状の双方を認め、計9頭で何らかの臨床症状を認めた(表2)。このうち6頭は、次回の調査日までに症状が消失していたが、症状消失後においても、BCoV 遺伝子は継続して検出された。1頭の牛の鼻汁又は糞便から BCoV 遺伝子が継続して検出された期間は、最短で8日間、長いものでは少なくとも2週間以上に渡っていた(最長期間は確認できず)。また、臨床症状を認めた9頭のうち4頭は、BCoV 遺伝子の検出量がピークを越えた後に症状を示していた(表3)。さらに、臨床症状を示さず、不顕性に経過する個体が1頭認められ、このような不顕性感染牛からも、呼吸器及び消化器症状ともに認めた発症牛と同等程度の BCoV 遺伝子が検出された(表2, 3, 図1)。

BCoV 遺伝子の検出状況は、鼻汁では導入後3日目に1頭から検出されはじめ、7日目には10頭全てから検出された。その後、BCoV 検出個体数は漸減し、導入後15日目には8頭、21日目には5頭となった。BCoV の遺伝子量は、その個体から検出されはじめた時点でピークを示し($9.4 \times 10^7 \sim 1.1 \times 10^9$ コピー/スワブ)、その後、漸減した(表3)。一方、糞便から BCoV 遺伝子が検出されはじめたのは鼻汁よりも遅く、導入後7日目に4頭、15日目に7頭、21日目に6頭から検出された。遺伝子量は、鼻汁と同様に検出され始めた時点でほぼピークを迎えるものの、鼻汁と比較するとその量は少なく($1.8 \times 10^3 \sim 1.7 \times 10^6$ コピー/g)、その後、漸減した(表3)。なお、血清においては、いずれの検体からも

BCoV 遺伝子は検出されなかった。

BCoV 遺伝子の検出時期は、全ての個体において、鼻汁と糞便で同時、あるいは鼻汁から検出された後に糞便から検出という傾向で、検出頭数のピークは鼻汁がより早期であった。

BCoV の他の遺伝子検出状況は、導入後7日目において、No. 5, 7の牛の糞便から RVA 遺伝子が検出されたが(表3)、その他のウイルス遺伝子は、いずれの検体からも検出されなかった。

3 3月導入子牛

いずれの個体においても臨床症状は認めなかったものの、導入後7日目、10日目に1頭の鼻汁と糞便から BCoV 遺伝子が検出され、その検出量は12月導入子牛のものと同程度であった(表3, 4)。しかし、当該個体の他に BCoV 遺伝子を検出した個体はなく、水平伝播は認められなかった。また、BCoV 以外のウイルスの遺伝子は、いずれの検体からも検出されなかった。

まとめ及び考察

BRDC や下痢症の原因の一つである BCoV の野外における動態調査のため、県内子牛預託施設の導入子牛において、平成28年8月、12月、平成29年3月の3回、経時的に調査を行った。

8月の導入牛における調査では、全ての個体において BCoV 感染を疑う所見は得られなかった。12月の導入牛における調査では、導入後3日目において、10頭中1頭で BCoV 感染を認めた後、導入後7日目には全ての個体に伝播し、試験期間中に9頭で鼻汁漏出、発咳、軟便、下痢等の臨床症状を認めた。3月の導入牛における調査では、導入後7日目に1頭で BCoV の感染を認めたものの、当該個体に臨床症状は認められなかった。また、その BCoV 遺伝子検出量は12月の個体と同程度であったにもかかわらず、他の個体への水平伝播は認められなかった。こ

のことから、BCoV は季節性が明瞭であり、今回のように、冬期においては、ウイルスが急速に伝播、まん延し、BRDC や下痢症の原因として、注意が必要と考えられた。BCoV が冬期に流行の危険性が增大するメカニズムについては不明であるが、ヒトにおいては、低温の環境にさらされることによって、気道感染症の危険性及びその重症度を高めること¹³⁾や鼻腔内温度の低下が、粘膜における物理的な保護や、白血球の食作用などを阻害し、感染症にかかりやすくなる可能性が報告されている¹⁴⁾。

また、BCoV と同じコロナウイルスである伝染性胃腸炎ウイルス及びマウス肝炎コロナウイルスを用いた試験において、湿度50%の環境よりも、湿度20%の環境の方がウイルス粒子の生存率が高かったとする報告もあり¹⁵⁾、同様の理由から、BCoV も低温、低湿度である冬期に流行の危険性が高くなっていると考えられる。

今回の調査では、1頭の牛の鼻汁又は糞便から BCoV 遺伝子を継続して検出した期間は、最短で8日間であったが、最長期間は少なくとも2週間以上に渡ることが判明した。また、BCoV に感染すると、感染後3~4日程度でその個体からの BCoV 排泄量がピークを迎え、それと同時期あるいはその後に臨床症状を呈するため、症状を確認できる頃には、既に大量の BCoV が排泄されていると考えられた。さらに、症状を確認できる期間は BCoV が排泄されている期間と比べるとかなり短く、症状が消失した後においても BCoV の排泄は継続していると考えられた。

また、12月導入牛の調査の中で、BCoV に感染し、発症牛と同等程度の BCoV 排泄が起きているにもかかわらず、臨床症状を確認できない個体が1頭認められた。BCoV については、臨床症状を示さない不顕性感染牛や、継続的にウイルスを排泄している持続感染牛の存在が示

唆されており、感染源として重要であると考えられている^{3,16)}。このような不顕性感染牛や持続感染牛における、BCoV の排泄量は不明であったが、今回確認された不顕性感染牛においては、発症牛とほぼ同等量の BCoV を排泄していた。今回の調査で検出したのは RNA であるため、排泄された BCoV の感染性に言及することはできなかった。しかし、その検出量から、他の個体へ BCoV を伝播させるリスクは、発症牛と同等であると考えられ、特に、不特定多数の牛が集合するような預託施設においては、不顕性感染牛は、臨床症状が消失した個体とともに、牛群内に BCoV をまん延させる要因として非常に重要であると考えられた。

また、今回の調査から、2週間以上に渡り BCoV の排泄が続く個体が確認されたことから、特に冬期において、BCoV の感染を確認したような場合は、症状のみで個体の状態を判断するのではなく、少なくとも2週間程度は当該牛群全体を注意深く観察する必要があると考えられた。

BCoV は、BRDC や下痢症の原因とされているが、12月導入牛の調査では呼吸器症状を認めた個体が8頭、消化器症状を認めた個体が3頭であった。さらに、消化器症状を認めた3頭のうち、2頭の糞便からは RVA 遺伝子も検出された。RVA は子牛に下痢を引き起こす病原体として知られ、BCoV と混合感染することで症状を悪化させるとされている¹⁷⁾。また、BCoV の遺伝子量は、全ての個体において、糞便中よりも鼻汁中の方が多かったことから、12月の調査の際に流行した BCoV は、消化器よりも呼吸器に対する病原性が強かったものと推測されるが、このことについては宿主側の要因も考えられることから、各器官に対する病原性の実態は不明である。今回、調査対象としたのは子牛であるため、

今後、株間における標的器官の違い、子牛と成牛での病原性の違い等についても調査し、不顕性感染牛や持続感染牛の存在も含め、その実態を明らかにしていきたい。

謝辞

稿を終えるにあたり、検査材料の採取、臨床症状の観察に御協力いただきました農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 生化学ユニットの皆様には深謝いたします。

引用文献

- 1) UDENI B. R. BALASURIYA : Coronaviridae, Veterinary Microbiology, D. Scott McVey, et al eds, 3rd ed, 456-473, wiley blackwell publ, Hoboken(2013)
- 2) 恒光裕 : 牛コロナウイルス病, 動物の感染症, 明石博臣ら編, 第3版, 107, 近代出版, 東京(2011)
- 3) Kanno T et al. J Vet Med Sci. 71(1), 83-6(2009)
- 4) Decaro N et al. J Virol Methods. 151(2), 167-71(2008)
- 5) Vilcek S et al. Arch Virol. 309-323, 136(1994)
- 6) Valarcher JF et al. J Virol. 74(22), 10714-28(2000)
- 7) Allard A et al. J Clin Microbiol, 28(12), 2659-67(1990)
- 8) Maluquer de Motes C et al. Appl Environ Microbiol, 70(3), 1448-54(2004)
- 9) Kirisawa R et al. J. Rakuno Gakuen Univ, 19, 225-237(1994)
- 10) Leary TP et al. J Clin Microbiol, 40, 1368-1375(2002)
- 11) Ferguson L et al. Virology, 486, 28-34(2015)
- 12) Fukuda M et al. Arch Virol, 157, 1063-1069(2012)
- 13) Mourtzoukou EG et al. Int J Tuberc Lung Dis, 11(9), 938-43(2007)
- 14) Eccles R et al. Acta Otolaryngol, 122(2), 183-91(2002)
- 15) Casanova LM et al. Appl Environ Microbiol, 76(9), 2712-7(2010)
- 16) Paul S. et al. Coronaviridae, FIELDS VIROLOGY, David M. Knipe, et al eds, 6th ed, 825-858, Lippincott Williams & Wilkins publ, Philadelphia(2013)
- 17) 恒光裕 : ロタウイルス病, 動物の感染症, 明石博臣ら編, 第3版, 103-104, 近代出版, 東京(2011)

表1. 調査期間及び調査内容

導入 年月	調査 期間	調査 頭数	導入後日数						
			0	3	7	10	15	21	
H28. 8	H28. 8. 7 ～29	4					C	CS	CS
H28. 12	H28. 12. 6 ～27	10	CS	CS	CS				
H29. 3	H29. 3. 6 ～16	6					CS	NT	NT

※CS：症状確認、検体採取 C：症状確認 NT：調査実施せず

表2. 12月導入牛群に認めた臨床症状と症状を認めた個体の頭数

個体 No.	導入後日数					
	0日	3日	7日	10日	15日	21日
1	-	発咳	-	-	-	-
2	-	-	発咳、鼻汁	発咳、鼻汁	-	-
3	-	-	-	発咳	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	下痢	-	-	-
6	-	-	-	発咳、下痢	-	-
7	-	-	-	発咳、軟便	-	-
8	-	-	-	-	発咳	-
9	-	-	鼻汁	-	発咳	-
10	-	-	発咳	発咳	-	-
呼吸器 症状 (頭)	0	1	3	5	2	0
消化器 症状 (頭)	0	0	1	2	0	0

※-：臨床症状認めず

表3. 12月導入牛における臨床症状の発現日と BCoV 遺伝子検出状況の推移

個体 No.	検体	導入後日数						備考
		0日	3日	7日	10日	15日	21日	
1	N	-	4.4×10^8	5.6×10^6	NT	-	-	
	F	-	-	1.7×10^6	NT	1.3×10^5	-	
2	N	-	-	1.2×10^8	NT	2.1×10^7	1.8×10^6	
	F	-	-	-	NT	-	1.8×10^3	
3	N	-	-	9.4×10^7	NT	1.7×10^5	-	
	F	-	-	7.2×10^5	NT	4.0×10^5	1.8×10^4	
4	N	-	-	6.8×10^8	NT	2.2×10^5	-	
	F	-	-	6.5×10^4	NT	-	-	
5	N	-	-	2.0×10^8	NT	1.7×10^7	1.4×10^6	7日目に
	F	-	-	-	NT	6.0×10^5	2.0×10^5	RVA 検出
6	N	-	-	1.8×10^8	NT	-	-	
	F	-	-	1.8×10^3	NT	7.3×10^3	-	
7	N	-	-	2.1×10^8	NT	5.4×10^4	-	7日目に
	F	-	-	-	NT	5.4×10^5	1.8×10^5	RVA 検出
8	N	-	-	1.1×10^9	NT	4.2×10^6	1.2×10^5	
	F	-	-	-	NT	3.4×10^5	-	
9	N	-	-	1.7×10^8	NT	7.1×10^6	1.3×10^6	不顕性
	F	-	-	-	NT	-	8.4×10^5	感染牛
10	N	-	-	1.5×10^8	NT	1.8×10^7	1.9×10^6	
	F	-	-	-	NT	3.6×10^5	3.7×10^3	
BCoV 検出 頭数	N	0	1	10	NT	8	5	
	F	0	0	4	NT	7	6	

※N：鼻汁（コピー/スワブ）、 F：糞便（コピー/g）、 -：非検出、 NT：検査実施せず

※※網掛けは当該個体に臨床症状を認めた時点を示す

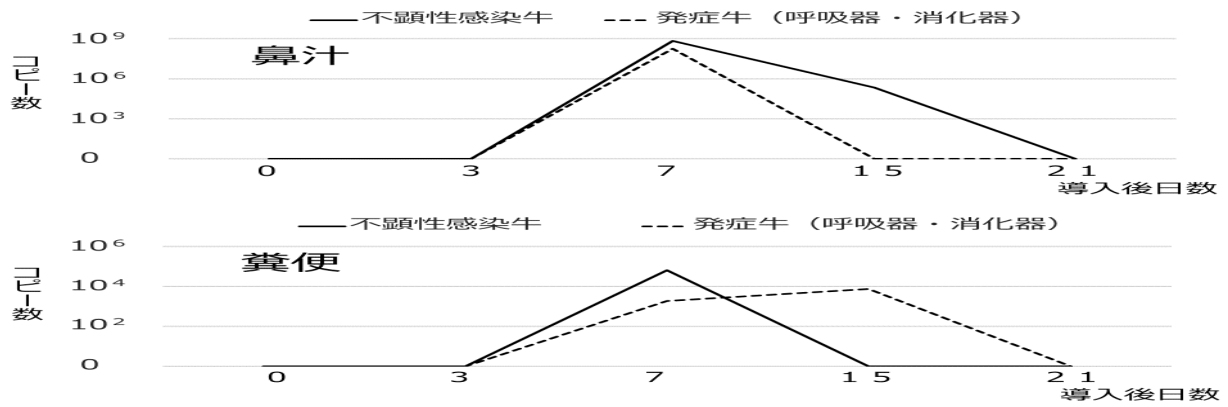


図1. 不顕性感染牛と、呼吸器及び消化器症状ともに認めた発症牛の BCoV 遺伝子排泄量の推移

※鼻汁：コピー/スワブ 糞便：コピー/g

表4. 3月導入牛の各種検体における BCoV 遺伝子検出状況の推移

個体 No.	検体	導入後日数			
		0日	3日	7日	10日
1	N	-	-	6.5×10^7	3.3×10^6
	F	-	-	8.9×10^5	2.4×10^5
2	N	-	-	-	-
	F	-	-	-	-
3	N	-	-	-	-
	F	-	-	-	-
4	N	-	-	-	-
	F	-	-	-	-
5	N	-	-	-	-
	F	-	-	-	-
6	N	-	-	-	-
	F	-	-	-	-

※N：鼻汁(コピー/スワブ)、 F：糞便 (コピー/g)