

11. 県内分離牛コロナウイルス (BCV) の遺伝子解析及び抗原性調査

大分家畜保健衛生所、宇佐家畜保健衛生所¹⁾

○病鑑 中出圭祐、(病鑑) 長岡健朗¹⁾

1 はじめに

県内の肉用牛飼養農家で BCV が関与した牛呼吸器病症候群 (BRDC) が発生し、それら症例の概要と分離された BCV の遺伝子解析や抗原性の比較を行ったので報告する。

2 農場概要及び経過

(1) 症例 1

交雑種肥育農場 (800 頭飼養)。県外市場から 1～2 ヶ月齢で導入。2014 年の 12 月 1 日より発熱、鼻水、発咳などが見られ、同月 18 日に 1 頭が死亡したことから原因究明のため病性鑑定の依頼があった (病性鑑定 A)。死亡した牛は同年 11 月 11 日に県外の家畜市場から導入した牛であった。また、その後も呼吸器症状が続いたことから同月 24 日に発症牛 5 頭について病性鑑定依頼があった (病性鑑定 B)。この発症牛 5 頭には 12 月 9 日と 16 日に導入され、呼吸器病が農場内で流行している時期であった。

(図 1)

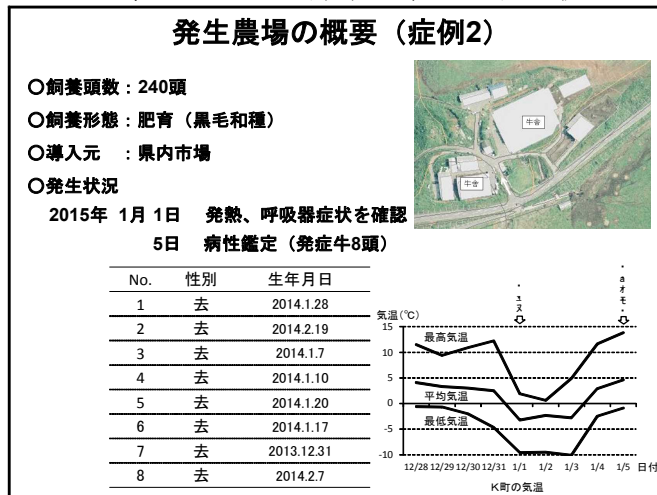
発生農場の概要 (症例1)				
○飼養頭数：800頭				
○飼養形態：肥育 (交雑種)				
○管理者：4名				
○導入元：県外市場 (約1～2ヵ月齢で導入)				
○発生状況				
2014年 12月 1日 発熱、呼吸器症状を確認。治療開始。				
18日 1頭死亡 ⇒病性鑑定A (死亡牛1頭)				
No.	性別	生年月日	導入日	発症日
1	♀	2014.9.13	2014.11.11	2014.12.1 (導入後20日)
24日 呼吸器病の継続 ⇒病性鑑定B (発症牛5頭)				
No.	性別	生年月日	導入日	発症日
1	♀	2014.10.21	2014.12.16	2014.12.24 (導入後 8日)
2	♀	2014.10.20	2014.12.9	2014.12.24 (導入後15日)
3	♀	2014.10.11		2014.12.20 (導入後11日)
4	♀	2014.10.20		2014.12.23 (導入後14日)
5	♀	2014.10.10		2014.12.21 (導入後12日)

(図 1) 症例 1 農場の概要及び経過

(2) 症例 2

黒毛和種肥育農場 (240 頭規模)。県内市場から 8～10 ヶ月齢で導入。2015 年の 1 月 1 日から呼吸器症状が確認され、同月 5 日に発症牛 8 頭について病性鑑定依頼があった。この 8 頭はいずれも 10 月の県内市場で購入した牛であった。なお、発症が確

認められた 1 月 1 日は前日に比べて最高気温が 10℃以上下がり、平均気温でも氷点下になるなど、この日より非常に冷え込みが厳しい日が数日続いた。(図 2)



(図 2) 症例 2 農場の概要及び経過

3 材料と方法

(1) 病性鑑定

① 症例 1

ア 病性鑑定 A：死亡畜 1 頭について以下の検査を行った。

(ア) 病理解剖

(イ) 細菌学的検査：心臓、肺、胸水からの細菌分離

(ウ) ウイルス学的検査：肺の前葉及び後葉からの呼吸器病関連ウイルス（牛ウイルス性鼻気管支炎ウイルス（BHV-1）、牛パラインフルエンザウイルス 3 型（PI-3）、牛 RS ウイルス（BRSV）、BCV、牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）、牛アデノウイルス（BAV））の PCR または RT-PCR 検査。ウイルス分離検査では肺の前葉及び後葉乳剤を BFM 細胞、HRT-18G 細胞、Vero 細胞、MDBK 細胞に接種後、3 代継代。

イ 病性鑑定 B：発症畜 5 頭の鼻腔スワブについて以下の検査を行った。

ウイルス学的検査：鼻腔スワブ 5 検体からの呼吸器病関連ウイルスの PCR または RT-PCR 検査。ウイルス分離検査では鼻腔スワブ（プール検体）を BFM 細胞、HRT-18G 細胞、Vero 細胞、MDBK 細胞に接種後、3 代継代。

② 症例 2：発症畜 8 頭の鼻腔スワブについて以下の検査を行った。

(ア) 細菌学的検査：鼻腔スワブ 5 検体からの細菌分離

(イ) ウイルス学的検査：鼻腔スワブ 8 検体からの呼吸器病関連ウイルスの PCR または RT-PCR 検査。ウイルス分離検査では鼻腔スワブ（プール検体）を BFM 細胞、HRT-18G 細胞、Vero 細胞、MDBK 細胞に接種後、3 代継代。

(2) 標準株を用いたウイルス中和抗体試験

症例 1 及び症例 2 について、ペア血清を用いて以下の呼吸器病関連ウイルスに対する中和抗体試験を実施した。

- ・牛ウイルス性鼻気管支炎ウイルス（BHV-1：756 株）
- ・牛パラインフルエンザウイルス 3 型（PI-3：YN-1 株）

- ・牛 RS ウイルス (BRSV : NMK7 株)
- ・牛コロナウイルス (BCV : 掛川株)
- ・牛ウイルス性下痢ウイルス 1 型 (BVDV-1 : Nose 株)
- ・牛アデノウイルス 7 型 (BAV-7 : Fukuroi 株)

(3) 遺伝子学的検査

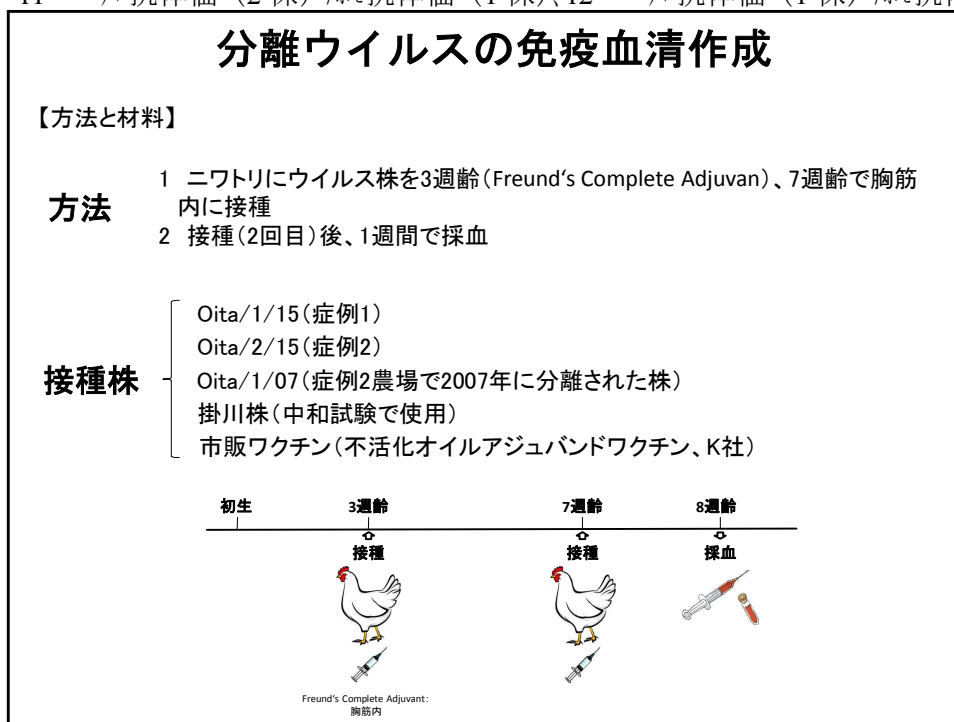
分離された BCV2 株 (症例 1 : Oita/1/15、症例 2 : Oita/2/15)、症例 2 農場で 2007 年に分離された BCV 株 (Oita/1/07) 及び国内古典株とされる BCV 掛川株について、S 蛋白質遺伝子の Polymorphicregion (411bp) のシーケンスを行い、系統樹解析と塩基配列の相同性を比較。

(4) 交差中和試験

BCV4 株 (Oita/1/15、Oita/2/15、Oita/1/07、掛川株) 及び市販ワクチン (不活化オイルアジュバンドワクチン、K 社) を用い、ニワトリに 3 週齢 (Freund 's Complete Adjuvan)、7 週齢で胸筋内に接種し、抗 BCV 免疫ニワトリ血清を作成 (図 3)。これらの血清を用いて交差中和試験を実施。交差中和抗体価から抗原性相関度を示す R 値を求めた。

$$R = 100 \sqrt{r_1 \times r_2}$$

$r_1 = \frac{\text{ヘテロ抗体価 (2 株)}}{\text{ホモ抗体価 (1 株)}}$ 、 $r_2 = \frac{\text{ヘテロ抗体価 (1 株)}}{\text{ホモ抗体価 (2 株)}}$



(図 3) 抗 BCV 免疫ニワトリ血清の作成方法

(5) 分離株を用いた中和抗体試験

症例 1 について、(2) の余剰血清と同農場で分離された BCV 株 (Oita/1/15) を用いて、再度中和抗体試験を実施した

4 結果

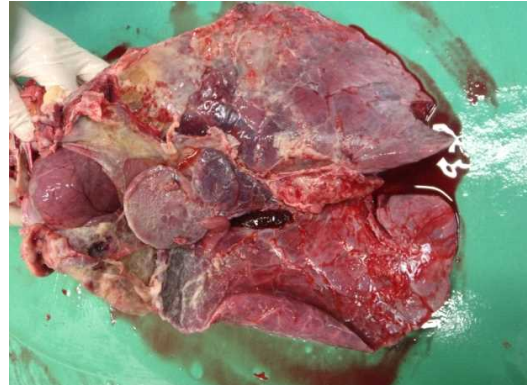
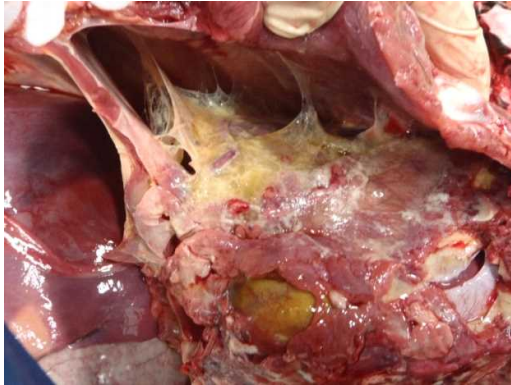
(1) 病性鑑定

① 症例 1

ア 病性鑑定 A

(ア) 剖検所見

胸腔内で胸膜、心膜が著しく癒着し、肺は暗赤色に変色。(図 4,5)



(図 4) 胸膜、心膜の著しい癒着

(図 5) 肺の暗赤色変化

(イ) 細菌学的検査

肺、胸水及び心臓から *Mannheimia haemolytica* を分離した。

(ウ) ウイルス学的検査

肺の前葉及び後葉から BVDV の特異遺伝子を検出した。ウイルス分離では全て陰性であった。

イ 病性鑑定 B

(ア) ウイルス学的検査

鼻腔スワブ 5 検体中、4 検体で BCV、1 検体で BVDV の特異遺伝子を検出 (表 1)。ウイルス分離では HRT 細胞で CPE を認めたため、遺伝子検査で BCV (Oita/1/15) と同定した。それ以外の細胞では全て陰性であった。

	BHV-1	PI-3	BRSV	BCV	BVDV
No.1	陰性	陰性	陰性	陽性	陰性
No.2	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
No.3	陰性	陰性	陰性	陽性	陰性
No.4	陰性	陰性	陰性	陽性	陽性
No.5	陰性	陰性	陰性	陽性	陰性

(表 1) 症例 1 病性鑑定 B の PCR 検査結果

② 症例 2

(ア) 細菌学的検査

鼻腔スワブ 5 検体中、5 検体で *Mycoplasma bovirhinis*、4 検体で *Pasteurella multocida* を分離した。

(イ) ウイルス学的検査

鼻腔スワブ 8 検体中、3 検体で BRSV、3 検体で BCV の特異遺伝子を検出した (表 2)。ウイルス分離では HRT 細胞で CPE を認めたため、遺伝子検査で BCV

(Oita/2/15) と同定した。それ以外の細胞では全て陰性であった。

	BHV-1	PI-3	BRSV	BCV	BVDV
No.1	陰性	陰性	陽性	陽性	陰性
No.2	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
No.3	陰性	陰性	陰性	陽性	陰性
No.4	陰性	陰性	陰性	陽性	陰性
No.5	陰性	陰性	陽性	陰性	陰性
No.6	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
No.7	陰性	陰性	陽性	陰性	陰性
No.8	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性

(表 2) 症例 2 の PCR 検査結果

(2) 標準株を用いたウイルス中和抗体試験

① 症例 1

5 頭中、PI-3 で 1 頭、BVDV-1 で 2 頭に中和抗体価の上昇が見られた (表 3)。PCR やウイルス分離で陽性だった BCV に対する抗体価の上昇は確認できなかった。

No.	BHV-1		PI-3		BRSV		BCV		Ad-7		BVDV-1	
	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post
1	<2	<2	16	4	16	4	8	4	<2	<2	64	32
2	<2	2	8	2	8	4	16	4	<2	<2	64	512
3	<2	<2	16	2	8	4	16	8	<2	<2	16	16
4	2	<2	2	8	8	16	16	32	<2	<2	<2	64
5	<2	<2	<2	<2	8	16	8	16	<2	<2	<2	<2

(表 3) 症例 1 の中和抗体試験結果

② 症例 2

8 頭中、BRSV で 6 頭、BCV で 1 頭に中和抗体価の上昇が見られた (表 4)。また、PI-3、BAV-7、BVDV-1 も 1 頭で中和抗体価の上昇が見られたがいずれも No.8 の牛であった。PCR やウイルス分離で陽性だった BCV に対する抗体価の上昇は顕著ではなかった。

No.	BHV-1		PI-3		BRSV		BCV		Ad-7		BVDV-1	
	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post
1	<2	<2	16	8	4	128	64	256	128	64	512	512
2	<2	<2	4	4	32	256	64	128	64	128	256	256
3	<2	<2	32	32	4	128	128	64	64	128	1024	512
4	8	8	8	16	128	1024	256	256	256	256	512	1024
5*	<2		<2		8		128		64		512	
6	<2	<2	2	8	8	64	128	64	64	64	512	256
7	<2	<2	4	2	8	64	128	64	128	64	512	128
8	<2	<2	4	16	64	16	32	64	32	128	128	512

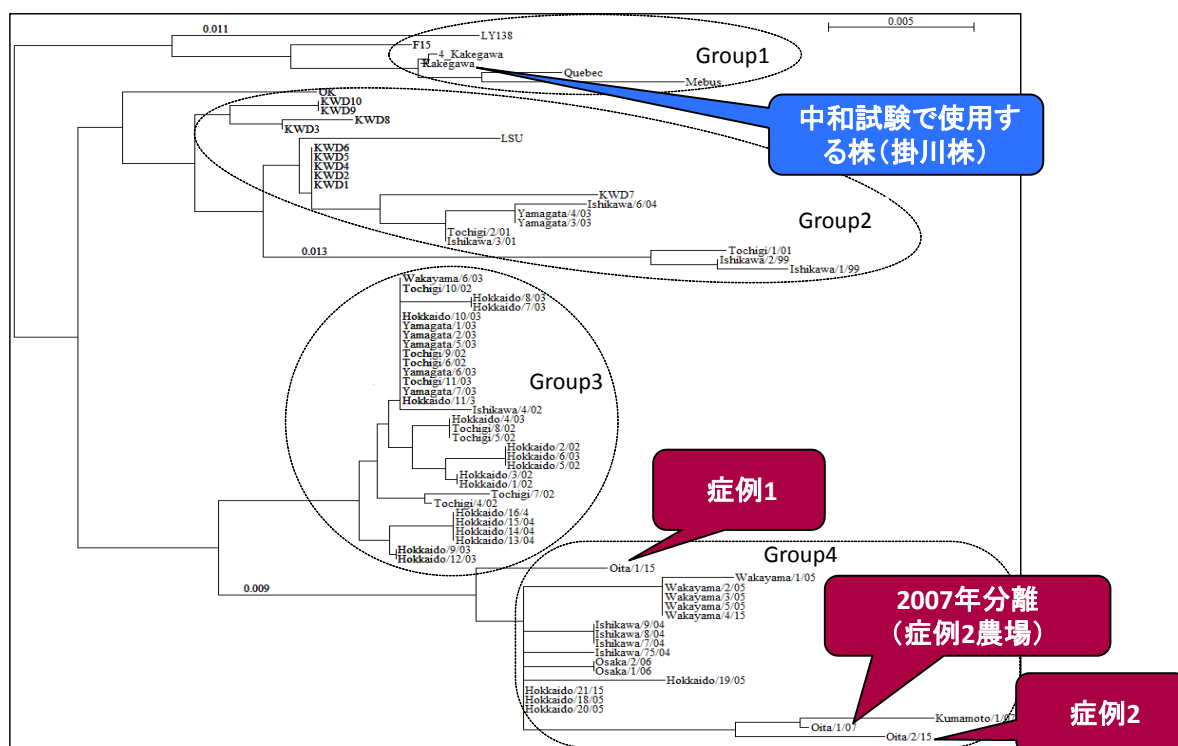
(表 4) 症例 2 の中和抗体試験結果

(3) 遺伝子学的検査

各ウイルス株の塩基配列の相同性は、96.0～99.4%であり、県内で分離された3株間（Oita/1/15、Oita/2/15、Oita/1/07）は高い相同性を示したものの、掛川株だけは相同性が低くなり系統樹解析では、県内分離3株と別のグループに入った（表5、図6）。また、症例2農場で分離された2株（Oita/2/15、Oita/1/07）は8年もの年月が経過しているにもかかわらず最も高い相同性を示した。

	症例1 Oita/1/15	症例2 Oita/2/15	2007年分離株 Oita/1/07	中和試験使用株 掛川株	
Oita/1/15					
Oita/2/15	98.4				高い
Oita/1/07	98.6	99.4			低い
掛川株	96.8	96.0	96.2		

(表5) 症例2の中和抗体試験結果



(図6) 各ウイルス株の系統樹解析

(4) 交差中和試験

作成した抗BCV免疫ニワトリ血清とウイルス株を使い、交差中和試験を実施したところ以下の結果となった（表6）。株間の抗原性に差が認められ、中でも塩基配列で相同性の高かった県内分離3株の間ではR値は高くなり、塩基配列の相同性が低かった掛川株と県内分離3株との間ではR値は低くなった。また、症例2農場で8年の年月を経て分離された2株間では、塩基配列の相同性と同様にR値は高くなった。

分離ウイルスの抗原性比較（交差中和試験）					
	相関度が高い				
	相関度が低い				
	中和抗体価(R値)				
	ニワトリ免疫血清				
	Oita/1/15	Oita/2/15	Oita/1/07	掛川株	市販ワクチン
Oita/1/15	2 ¹¹ (100)	2 ^{10.25}	2 ¹⁰	2 ⁸	2 ^{8.75}
Oita/2/15	2 ¹¹ (77)	2 ¹¹ (100)	2 ^{11.25}	2 ⁹	2 ¹⁰
Oita/1/07	2 ¹¹ (100)	2 ¹¹ (154)	2 ¹⁰ (100)	2 ⁸	2 ⁹
掛川株	2 ^{8.5} (21)	2 ^{8.25} (27)	2 ^{9.75} (46)	2 ¹⁰ (100)	2 ^{11.5}

R = 100√r1 × r2
r1 = ヘテロ抗体価(2株)/ホモ抗体価(1株)
r2 = ヘテロ抗体価(1株)/ホモ抗体価(2株)
※ 抗原性相関度を示す

交差中和試験は組み合わせ毎に4本ずつ実施

(表6) 各ウイルス株及び市販ワクチンの交差中和試験結果

(5) 分離株を用いた中和抗体試験

抗原性に差があることが判明したため、症例1農場について病性鑑定時の余剰血清と分離されたウイルス株を用いて、再度中和抗体試験を実施したところ、掛川株では中和抗体価の上昇が見られなかったが、分離株では2頭で中和抗体価の上昇が確認された。(表7)

No.	掛川株		Oita/1/15	
	pre	post	pre	post
1	8	4	8	4
2	16	4	64	8
3	16	8	16	32
4	16	32	8	128
5	8	16	64	512

(表7) 分離株を用いた中和抗体試験結果 (症例1)

5 考察

- (1) 病性鑑定結果から、症例1及び症例2で複数のウイルスや細菌が感染したBRDCと診断した。また、発症した牛は症例1農場では輸送直後であったこと、症例2農場では冬季に急激に気温が下がった時期であることから、輸送ストレスや寒冷ストレスが発症を惹起したものと考察した。
- (2) 遺伝子学的検査の結果から、複数のBCV株が県内にまん延していることが示唆されたが、症例2農場は今回分離されたBCV株(Oita/2/15)と2007年に分離されたBCV

株（Oita/1/07）はきわめて近縁であり、2007年に侵入したBCV株が農場内に常在し、2015年に分離されたものと考えられた。

- (3) 遺伝子学的検査及び交差中和試験の結果により、遺伝子学的に近縁な県内分離3株（Oita/1/15、Oita/2/15、Oita/1/07）と古典株である掛川株の間で抗原性が大きく変化していた。塩基配列の相同性が高い株間では抗原性の相関度であるR値も高く、塩基配列の相同性が低い株間ではR値も低くなっていた。これらのことから、今後病性鑑定で中和試験を行う際にはウイルス株の選定に注意が必要であると考えられた。