

【短 報】 産業動物

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

秦 葉奈子 尾宇江康啓 鈴木 雅美 成田 雅子

北海道釧路家畜保健衛生所（〒084-0917 釧路市大楽毛127-1）

要 約

近年、釧路管内で牛トロウイルス (BToV) 関与を疑う下痢症が散見され、その対策を講じるにあたってBToV浸潤状況を調査した。平成23年2月～25年8月までの調査では、牛鼻汁319検体中3検体、糞便112検体中15検体でBToV遺伝子が陽性となり、糞便4検体からBToVが分離された。陽性牛はすべて45日齢以下で、その多くは他病原体と混合感染していた。分離株の分子疫学的解析より、spike (S) 遺伝子前半およびhemagglutinin-esterase (HE) 遺伝子に多様性を認め、管内に2系統のBToV浸潤が判明した。平成5～24年に採材した成牛血清94検体を用いて、管内への浸潤状況を調査したところ、抗体陽性率97.9%、幾何平均抗体価 (GM値) 124.3倍と高値を示し、平成5年にはすでに管内への浸潤が推察された。BToVは多種消毒薬に感受性を示し、成牛で抗体陽性率およびGM値が高値であることから、環境の適切な清掃消毒、十分な初乳給与により、子牛のBToV病発症コントロールが可能であると推察された。

キーワード：牛トロウイルス、下痢症、浸潤状況調査

-----北獣会誌 60, 139～143 (2016)

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属し、1979年に子牛の下痢便から発見され^[1]、2004年に愛知県において下痢を呈した子牛から、初めてウイルスが分離された^[2]。

BToVは国内に広く浸潤しており^[2-5]、牛の下痢や呼吸器病の原因になるとされ^[2,4-7]、単独感染による成牛の集団下痢の発生も報告されている^[3]。

近年、釧路管内においても、BToVの関与を疑う子牛の下痢症が散見され、BToV対策を検討する必要がある。そのため、病性鑑定におけるBToVの検出状況を調査し、分子疫学的解析、浸潤状況調査を実施するとともに、消毒薬に対する感受性についても検討したので、概要を報告する。

材料および方法

1 検出状況調査

(1) ウイルス遺伝子検索

平成23年2月～25年8月までに、疾病原因検索のため釧路家畜保健衛生所に搬入された0.1～84カ月齢の牛の鼻汁319検体 (延べ86戸)、糞便112検体 (延べ39戸) を、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) に懸濁後、3,000 rpm10分間遠心分離し、その上清からISOGEN-LS (ニッポンジーン、東京) を用いてRNAを抽出し、BToVのnucleocapsid (N) 遺伝子を標的としたプライマー (BToV-Nf:5' -ATG AAT TCT ATG CTT AAT CCA-3' およびBToV-Nr:5' -AAT TCA AAG CCA CTT TTA TTG-3')^[4]とOneStep RT-PCR Kit (QIAGEN、東京) を用いてRT-PCRを実施した。

(2) ウイルス分離

BToV遺伝子陽性検体についてウイルス分離を実施した。材料はDMEMに懸濁後、3,000 rpm10分間遠心分

離し、その上清にTPCK Trypsin(タカラバイオ、滋賀)を0.25 µg/mlおよびゲンタマイシンを50 µg/ml濃度で加え、37°Cで20分間トリプシン処理を実施したものを接種材料とした。細胞はHRT18Aichiを使用し、24穴プレートにシートさせ、トリプシン作用を阻害する血清を除去するため、PBSで2回洗浄した後、処理済み材料を接種した。37°Cで60分間感作後、PBSで2回洗浄し、TPCK Trypsin 0.25 µg/ml、ゲンタマイシン50 µg/ml濃度のDMEMを加え、37°Cで4日間の静置培養を2代目まで実施した。

(3) 電子顕微鏡による鏡検

ウイルス分離培養中にCPEを認めた検体について、培養上清を3,000 rpm10分間遠心分離し、さらにその上清を35,000 rpm 2時間遠心分離した。沈渣を100 µlのPBSに懸濁させ、材料を3%リンタングステン酸でネガティブ染色を行い、透過型電子顕微鏡で鏡検した。

2 分子疫学的解析

分離ウイルス株について、十勝管内で分離された4株(Otofuke10、Toyokoro10、Makubetsu10、Shihoro11)と併せ、BToVの構造タンパク遺伝子であるspike (S)、membrane (M)、hemagglutinin-esterase (HE) およびNの各遺伝子のシーケンスを実施した。

まず、High Pure Viral RNA Kit(Roche、東京)を用いて分離株からRNAを抽出し、PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit(タカラバイオ)を用いてcDNAを作成した。このcDNAを鋳型とし、Breda株(accession number: AY427798)を基に設計したプライマー(表1)

とPrimeSTAR GXL DNA Polymerase(タカラバイオ)を用いてPCRを行った。PCR産物はQIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN)を用いて精製し、Breda株、Aichi04株S遺伝子(accession number: AB526866)およびHE遺伝子(accession number: AB661460)、Gifu07株S遺伝子(accession number: AB526863)の塩基配列を基に作成したプライマーとBigDye Terminator v.3.1 cycle sequencing kit(Life Technologies、東京)によりシーケンス反応を行い、Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer(Thermo Fisher Scientific、神奈川)で解析した。得られた塩基配列は既知BToVと併せ、GENETYXver.12(ゼネティックス、東京)を用いて分子系統樹を作成した。なお、S遺伝子は前半(5'末端側2,400 bp)と後半(3'末端側2,355 bp)に分けて解析した。

3 浸潤状況調査

釧路管内分離株Akkeshi12を抗原とした中和試験により、平成5、9、14、19、24年に採材した牛血清94検体(月齢:15~186カ月齢、中央値:32.5カ月齢)の抗体価を測定した。血清を96穴プレート上で2倍段階希釈し、 $10^{2.3} \text{TCID}_{50}/0.1 \text{ ml}$ に調整した等量の抗原液と混和した。感作は37°Cで1時間行い、HRT18Aichiに接種した。

4 消毒薬への感受性

分離株Akkeshi12を1,000倍および2,000倍に希釈した複合塩素系消毒薬、塩素系消毒薬、逆性石鹼、なら

表1. BToV構造タンパク遺伝子増幅用PCRプライマー

名称	増幅部位	塩基配列(5'→3')
BToV-SeqAf	ORF1a 3'末端~S遺伝子3'末端	TTG GTG AGG AGT TGT GTT CC
BToV-SeqAr		ACG CTG AAA CCA TCC AGA AGC
BToV-SeqBf	S遺伝子3'末端~3'NTR	ATT TCA TCC AGC ACC AAG ACC
BToV-SeqBr		ACA CAG TGG AGC CAG AGG CAA

表2. BToV陽性事例一覧

農場	平均日齢	材料	陽性/検体数		他病原体検出状況
			遺伝子	分離	
A	3	糞便	1/1	0/1	牛ノロウイルス
B	9	糞便	2/5	1/5	BRoV、 <i>E.coli</i>
C	12	糞便	3/3	1/3	クリプトスポリジウム
D	30	糞便	1/5	0/5	BCV
E	30	糞便	3/10	0/10	<i>E.coli</i>
F	30	糞便	5/5	2/5	BRoV
G	45	鼻汁	3/5	0/5	BCV、牛パラインフルエンザウイルス3型、 <i>Mycoplasma bovis</i>

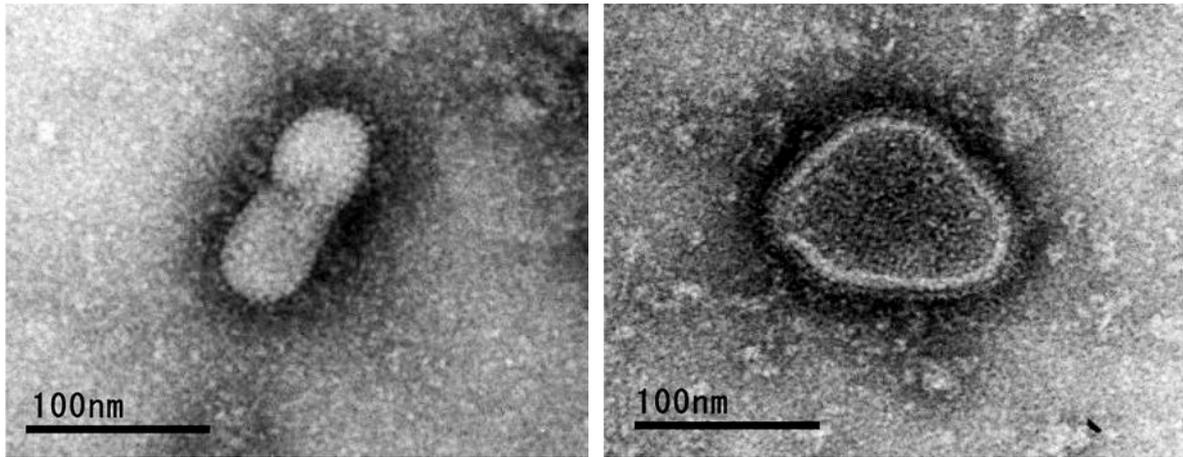


図1. 電子顕微鏡法により検出されたトロウイルス様粒子

びに1%消石灰上清などに陰性対照（水道水）に加え、室温で5分間感作させた。反応液は速やかに10倍階段希釈を行い、HRT18Aichiに接種し、ウイルス力価(TCID₅₀/0.1 ml)を測定した。

結 果

1 検出状況調査

(1) ウイルス遺伝子検索

BToV遺伝子は、鼻汁では319検体中3検体から検出され（陽性率0.9%）、糞便では112検体中15検体から検出された（陽性率13.4%）。また、陽性個体はすべて45日齢以下であり、その多くは牛コロナウイルス（BCV）、牛ロタウイルス（BRoV）、病原性大腸菌（*E.coli*）など、他の病原体と混合感染していた（表2）。

(2) ウイルス分離

3戸4検体の糞便からBToV（Akkeshi12、Hamanaka13、Kushirol13）を分離した。

(3) 電子顕微鏡による鏡検

直径80から140 nmのスパイクを有するトロウイルス様粒子を多数認めた（図1）。

2 分子疫学的解析

S遺伝子後半、MおよびN遺伝子の塩基配列について既知の国内株と比較すると、相同性は最も低い株間で96.7%であった。一方、S遺伝子前半で92.7%、HE遺伝子で91.5%であった（表3）。

また、S遺伝子前半およびHE遺伝子では、塩基配列の相同性からそれぞれ2つの系統に大別されることが判明し、管内分離株Akkeshi12およびHamanaka13は、管内分離株のKushirol13を含む国内株とは異なっていた（図2）。

3 浸潤状況調査

平成5～24年の各年の抗体陽性率は93.3～100%、全体では97.9%であった。幾何平均抗体価（GM値）は、各年64.0～298.6倍、全体では124.3倍であった（表4）。

4 消毒薬への感受性

陰性対照の水道水ではウイルス力価は $10^{5.0}$ TCID₅₀/0.1 mlであったが、2,000倍希釈の逆性石鹼では、 $10^{2.3}$ TCID₅₀/0.1 ml、1,000倍希釈の逆性石鹼、1,000倍およ

表3. BToV国内株間の各遺伝子の相同性

遺伝子	S（前半）	S（後半）	M	HE	N
塩基数	2,400 bp	2,355 bp	702 bp	1,260 bp	492 bp
塩基配列相同性（%）	92.7～99.8	96.9～100	97.1～100	91.5～99.9	96.7～100

表4. 平成5～24年に採材された牛血清におけるBToV抗体陽性率および抗体価の推移

採材年	H5	H9	H14	H19	H24	全体
検体数	19	15	20	22	18	94
抗体陽性率	94.7%	93.3%	100.0%	100.0%	100.0%	97.9%
幾何平均抗体価	82.6	101.6	64.0	181.0	298.6	124.3

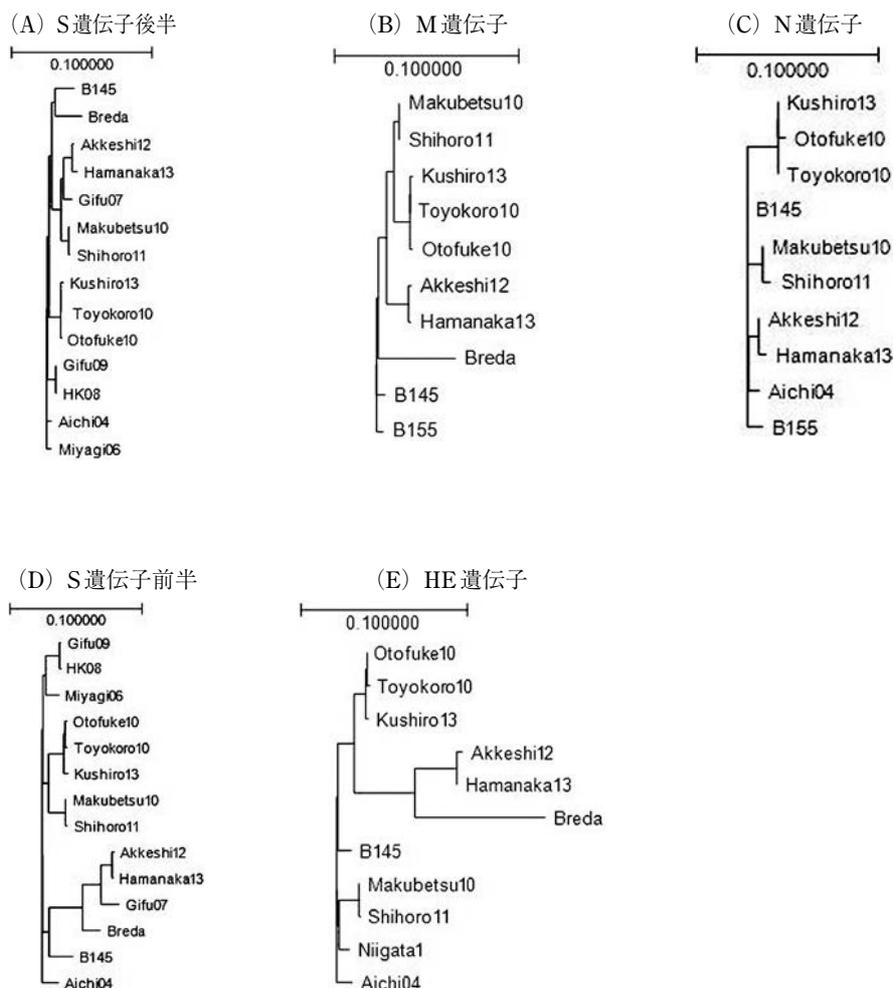


図2. BTov各遺伝子の分子系統樹

び2,000倍希釈の複合塩素系および塩素系消毒薬ならびに1%消石灰上清では検出限界以下 ($\leq 10^{1.5}$ TCID₅₀/0.1 ml) までウイルス力価は減少した。

考 察

今回、牛の鼻汁および糞便検体について、下痢および呼吸器病原因検索のために病性鑑定を行ったところ、鼻汁より糞便から多くBTov遺伝子が検出され、BTov陽性牛はすべて45日齢以下の新生子牛であった。これらのことから、本ウイルスは主に新生子牛における下痢症の原因になっていると考えられた。また、新生子牛の下痢症では病原体の混合感染が一般にみとめられることが報告されており、今回の成績もそのことを裏付ける結果となった。

BTovの分子疫学的解析では、S遺伝子前半およびHE遺伝子は、塩基配列の相同性からいずれも2系統に大別され、管内分離株 Akkeshi12 および Hamanaka13 は、管内分離株の Kushiro13 を含む国内株とは異なってい

た^[8]。このことから、管内には、遺伝子学的に区別される2系統のBTovが浸潤していることが明らかとなった。

管内へのBTov浸潤状況調査では、いずれの年も成牛において抗体陽性率は93%以上、またGM値も64倍以上に高値で推移していた。このことから、少なくとも平成5年からすでに管内農場にBTovが広く浸潤しており、野外感染を繰り返しているものと推察された。

BTovの消毒薬への感受性については、調査した4種の消毒薬に対して感受性があることが判明した。

今回の調査で、成牛において抗体陽性率およびGM値が高値であったこと、BTovが多種の消毒薬に感受性を示したことから、初乳の十分な給与による免疫の賦与、環境の清掃・消毒により、若齢牛のBTov病発症をコントロールすることが可能と推察された。

また、S遺伝子前半およびHE遺伝子に多様性が見られたことより、これらの遺伝子を株間で比較することは、今後の分子疫学的調査に有用であると考えられた。

BToVに関する知見は未だ少ないのが現状であり、今後も引き続き調査を継続していきたい。

稿を終えるにあたり、HRT18Aichi細胞を分与して頂いた愛知県家畜保健衛生所の皆様に深謝いたします。

引用文献

- [1] Woode GN, Reed DE, Runnels PL, Herring MA, Hill HT: Studies with an unclassified virus isolated from diarrheic calves, *Vet Microbiol*, 7, 221-240 (1982)
- [2] Kuwabara M, Wada K, Maeda Y, Miyazaki A, Tsunemitsu H: First isolation of cytopathogenic bovine torovirus in cell culture from a calf with diarrhea, *Clin Vaccine Immunol*, 14, 998-1004 (2007)
- [3] Aita T, Kuwabara M, Murayama K, Sasagawa Y, Yabe S, Higuchi R, Tamura T, Miyazaki A, Tsunemitsu H: Characterization of epidemic diarrhea outbreaks associated with bovine torovirus in adult cows, *Arch Virol*, 157, 423-431 (2012)
- [4] Ito T, Okada N, Fukuyama S: Epidemiological analysis of bovine torovirus in Japan, *Virus Res*, 126, 32-37 (2007)
- [5] Kirisawa R, Taketama A, Koiwa M, Iwai H: Detection of bovine torovirus in fecal specimens of calves with diarrhea in Japan, *J Vet Med Sci*, 69, 471-476 (2007)
- [6] Hoet A, Nielsen P, Hasoksuz M, Thomas C, Witum T, Saif L: Detection of bovine torovirus and other enteric pathogens in feces from diarrhea cases in cattle, *J Vet Diagn Invest*, 15, 205-212 (2003)
- [7] 伊藤美加、市川雄一、下池健一郎、松田達彦、上地正英、新谷英一：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)
- [8] Ito T, Katayama S, Okada N, Masubuchi K, Fukuyama S, Shimizu M: Genetic and antigenic characterization of newly isolated bovine toroviruses from Japanese cattle, *J Clin Microbiol*, 48, 1795-1800 (2010)