

石川県における牛トロウイルスが関与した下痢症

伊藤美加^{1)†} 市川雄一²⁾ 下池健一郎¹⁾ 松田達彦¹⁾
 上地正英¹⁾ 新谷英一¹⁾

1) 石川県南部家畜保健衛生所 (〒920-3101 金沢市才田町戊324-2)
 2) 石川県北部家畜保健衛生所 (〒929-2126 七尾市大津町1-47)

(2011年6月24日受付・2012年1月10日受理)

要 約

牛トロウイルス (BToV) は子牛における下痢症の一因子として知られるが、成牛への関与については不明な点が多い。2010年、石川県内の2戸の酪農場で発生した牛の下痢症を解析したところ、BToVの関与が疑われた。成牛の半数が下痢を呈したA農場では、検査個体のうち約半数でBToVに対する抗体陽転あるいは糞便よりBToV遺伝子が検出され、1頭からBToVが分離された。他の病原体検索が陰性であったことから、BToVを集団下痢症の一因と判断した。B農場では血様下痢を呈した子牛の糞便よりA農場分離株とS遺伝子配列が同一のBToV遺伝子が検出され、抗体陽転も認められたことから、BToVによる下痢症と診断した。分離ウイルスを用いて県内12農場で血清疫学調査を行った結果、肉用・乳用牛ともに広く抗体保有が認められた。以上の結果から、BToVは県内に広く浸潤し、子牛だけでなく成牛においても下痢の一因として関与している可能性が示唆された。——キーワード：成牛、牛トロウイルス、下痢。

----- 日獣会誌 65, 350～354 (2012)

トロウイルスは、エンベロープを有する+鎖RNAウイルスで、コロナウイルス科トロウイルス属に分類される。トロウイルスはさらにその宿主によって人、牛、豚及び馬トロウイルスに分けられる。牛トロウイルス (BToV) は、1979年に子牛の下痢便から発見され、ノトバイオート牛を用いた感染実験で子牛に起病原性が確認された [1]。しかし培養細胞での分離に成功する2004年まで、その診断及び調査研究が困難であったことから [2]、現在も成牛への関与や症状などに不明な点が残されている。

2010年、石川県で発生した下痢症について解析を行ったところ、2戸 (A, B農場) の酪農場においてBToVの関与が疑われたため、その概要を報告する。

材料及び方法

材料：A農場は、2010年1月29日に下痢を認めた6頭とその同居牛4頭の糞便及び組血清 (回復時2010年2月19日) と2009年6月23日採材の飼養牛42頭の保存血清を用いた。B農場は、2010年6月24日に血様下痢を認めた子牛1頭の糞便と同居子牛3頭を含む4頭の組血清 (回復時2010年8月11日～11月10日) 及び同居

子牛1頭 (2010年3月6日生まれ) の2010年2月18日採材の母牛血清を用いた。浸潤状況調査には、県内の乳用牛90頭 (9戸, 1.6～11.0歳 (平均4.6歳)) と肉用牛30頭 (3戸, 0.9～6.0歳 (平均2.8歳)) の2009年6月8日～2010年7月14日の保存血清を用いた。

ウイルス分離検査：糞便をPBS⁻で10%乳剤とし、3,000rpmで15分遠心した上清をさらに10,000rpmで10分遠心した上清を人直腸腺癌由来株化細胞 (HRT-18細胞) に接種、90分感作後、洗浄し、トリプシン (Type1, シグマ アルドリッチ ジャパン(株), 東京) 0.5 μg/mlを含む抗生物質添加Eagle's MEM (日水製薬(株), 東京) を加えて、37℃で回転培養を行った。またHRT-18-aichi細胞 [2] に、トリプシン0.1 μg/mlを含む10%糞便乳剤を接種、90分感作後、洗浄し、抗生物質添加Eagle's MEMを加えて37℃、5%CO₂下で静置培養を行った。また、分離ウイルスの同定は、培養上清を用いたRT-PCR及びシーケンス解析により実施した。

遺伝子検査：ウイルス分離に用いたものと同じの10%糞便乳剤の上清を材料に、RNA抽出キット (Trizol LS Reagent, インビトロジェン(株), 東京) でRNA

† 連絡責任者：伊藤美加 (石川県南部家畜保健衛生所)

〒920-3101 金沢市才田町戊324-2 ☎076-257-1262 FAX 076-257-2122 E-mail: miika@pref.ishikawa.lg.jp

表1 RT-PCR で使用したオリゴヌクレオチドプライマーと反応条件

標的ウイルス	プライマー	塩基配列 (5'→3')	ゲノム上の位置	領域	PCR 条件	産物の大きさ	文献
BToV	S5	GTGTTAAGTTTGTGCAAAAAT	36-56	Spike (S)	(94°C 1 min, 55°C 2 min, 72°C 2 min) 30サイクル	741 bp	[3]
	S3	TGCATGAAGCTCTATATGGTGT	777-758				
BCoV	up	GCCGATCAGTCCGACCAATC	92-111	Nucleocapsid	(94°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 2 min) 30サイクル	407 bp	[4]
	down	AGAATGTCAGCCGGGTAT	498-480				
GAR	Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTTTGG	1-28	VP 7	(94°C 1 min, 45°C 2 min, 72°C 3 min) 30サイクル	1062 bp	[5]
	End9	GGTCACATCATACAATTCTAACCTAAG	1062-1036				
GBR	9B3	CAGTAAGTCTATCCTTTACC	196-216	Segment 9	(94°C 1 min, 42°C 1.5 min, 72°C 3 min) 30サイクル	281 bp	[6]
	9B4	CGTATCGCAATACAATCCG	443-426				
GCR	CowdenU	GGCATTAAAAAAGAAGAAGCTGT	1-24	VP 7	(94°C 1 min, 45°C 2 min, 72°C 3 min) 30サイクル	1063 bp	[7]
	CowdenL	AGCCACATGATCTTGTTCACGC	1063-1042				

抽出を行い、BToV、牛コロナウイルス (BCoV)、A群ロタウイルス (GAR)、B群ロタウイルス (GBR)、C群ロタウイルス (GCR) について、RT-PCR用キット (One-Step RT-PCR Kit, (株)キアゲン, 東京) により RT-PCR を実施した。反応条件は、2本鎖 RNA のロタウイルスについては 98°C 5分 で熱変性を行った後、50°C 30分 95°C 15分の RT 反応を行い、続いて表1に示した条件で PCR 反応を行った。シーケンス解析は、BToV は、A 農場の分離ウイルス及び B 農場の糞便乳剤を由来とした RT-PCR 産物を、高純度核酸抽出キット (High Pure PCR Product Purification Kit, ロシユ・ダイアグノスティックス(株), 東京) で精製後、DNA シーケンス受託サービス (オベロンバイオテクノロジー(株), 東京) を利用して塩基配列を決定し、得られた配列は解析ソフト (MEGA4, Arizona State University, U.S.A.) を用い、インターネット上の BLAST search により相同性の高い配列を選択、多重整列と近隣結合法 (NJ 法) による系統樹解析を実施した。BCoV は、分離ウイルスを (独)動物衛生研究所北海道支所に依頼し、解析した。

抗体調査: BToV は A 農場分離株と HRT-18-aichi 細胞, BCoV は A 農場分離株と HRT-18 細胞, 牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) は Nose 株と牛胎子筋肉細胞 (BFM 細胞), 牛アデノウイルス 7 型 (BA7) は Fukuroi 株と BFM 細胞を用いて、中和試験を常法により実施した。また B 農場の BCoV 抗体調査は、赤血球凝集抑制 (HI) 反応で実施した。すなわち、被検血清をカオリン処理及び鶏血球で吸収した後 PBS⁻ で 2 倍階段希釈し、等量の 4HA 単位の BCoV Kakegawa 株を加えて、室温で 1 時間感作させた。その後、0.5% 鶏血球浮遊液を加え室温で 1 時間静置後、HI を観察した。

有意差検定: 浸潤状況調査の有意差検定は、F 検定で分散を確認したのち、T 検定で実施した。

細菌検査及び寄生虫卵検査: 糞便を材料に、常法により実施した。

表2 各下痢ウイルスを標的とした RT-PCR 検査成績

農場	検体	糞便の状態	BToV	BCoV	GAR	GBR	GCR
A	1 ^a	水溶性下痢	+	-	-	-	-
	2 ^b		-	+	-	-	-
	3		-	-	-	-	-
	4		-	+	-	-	-
	5		+	-	-	-	-
	6		-	+	-	-	-
	7	正常	-	-	-	-	-
	8		-	-	-	-	-
	9		+	-	NT	NT	NT
	10		-	-	NT	NT	NT
B	1	血様下痢	+	-	-	-	-

a: BToV が分離された b: BCoV が分離された
 +: 目的とする大きさのバンドが検出された
 -: バンドは検出されなかった
 NT: 未実施

成 績

発生概要: A 農場の管理獣医師より、5 日前より水様～軟便の下痢症が集団的に発生しているとの連絡を受け、2010 年 1 月 29 日に立入検査を行ったところ、成牛 37 頭のうち、6 頭で水溶性の下痢症状を確認した。2010 年 1 月 24 日の初発から最終発生までに成牛の約半数が下痢症状を呈し、うち 1 頭に血便を認めた。発症期間は個体あたり 2～7 日間、農場全体では約 2 週間であった。出荷乳量は初発から 2 日後より低下し始め、2010 年 2 月 8 日に回復するまで、最大で 11%、平均 5% 減少した。下痢以外発熱、呼吸器症状はなく、別棟の子牛、育成牛での発生はなかった。当該農場は、毎年 11 月、成牛に対し下痢 5 種混合ワクチンを接種していた。

B 農場は、A 農場と直線で約 7.1km 離れた距離に位置しており、2010 年 6 月 20 日より 2 カ月齢の子牛 1 頭が 40°C の発熱及び泥状の下痢症状を示した。発症の翌日及び翌々日に管理獣医師が抗生物質製剤 (オキシテトラ

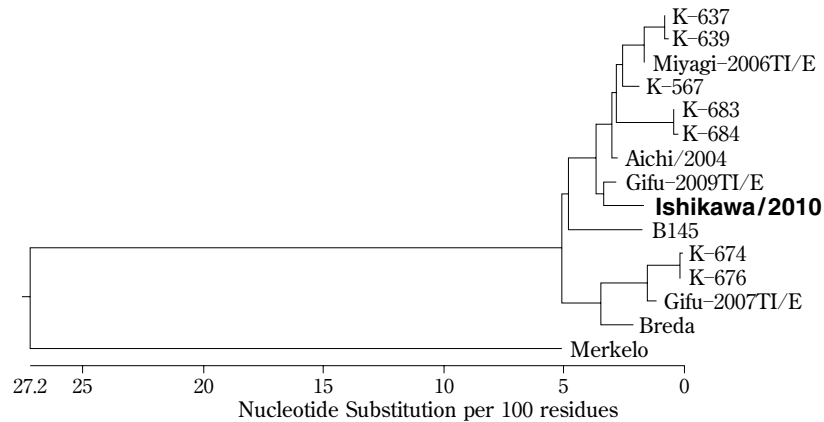


図1 BToVの系統樹解析 (S遺伝子領域)

表3 A, B農場におけるBToV及びBCoV抗体検査成績

農場	検体	発症時月齢	BToV			BCoV		
			流行前 09.6.23	発生時 10.1.29	回復時 10.2.19	流行前 09.6.23	発生時 10.1.29	回復時 10.2.19
A	1	28	1024	64	1024	256	512	2048
	2	72	256	1024	512	1024	256	256
	3	33	NT	32	128	NT	256	256
	4	76	256	64	128	256	256	1024
	5	46	256	64	128	128	1024	1024
	6	58	64	2048	512	128	512	1024
	7	30	256	64	128	256	512	2048
	8	65	256	32	256	256	1024	2048
	9	27	NT	128	256	NT	2048	1024
	10	38	64	4096	1024	256	512	1024

農場	検体	発症時月齢	BToV				母牛分娩前
			発生時 10.6.24	回復時			
			10.8.11	10.9.27	10.11.10		
B	1	2	16	512	256	128	NT
	2	3	4096	512	256	NT	256
	3	3	1024	512	256	NT	NT
	4	1	512	256	256	16	NT

NT: 未実施 (材料なし)

■: 有意な上昇あり

サイクリン)を投与したが、23日より血様下痢となったため、24日に立入検査を行った。同じ牛房の同居子牛3頭及び同じ牛舎内の成牛に異常は認めなかった。

ウイルス分離検査: A農場は、検体1(表2のa)の糞便乳剤をHRT-18-aichi細胞に接種した2代目に、検体2(表2のb)の糞便乳剤をHRT-18細胞に接種した3代目に、培養細胞にCPEが観察され、BToV及びBCoVが分離された。B農場は、検体1の糞便乳剤をHRT-18細胞及びHRT-18-aichi細胞に接種し4代目継代したが、細胞にCPEは観察されず、ウイルスは分離されなかった。

遺伝子検査: RT-PCR検査では、A農場はBToV及びBCoVがそれぞれ10検体中3検体で陽性を示した。

一方、B農場はBToVのみ陽性であった(表2)。A農場で分離されたBToVとB農場で検出されたBToVについて、S遺伝子領域(700bp)の塩基配列を決定したところ、100%の相同性が認められた。また系統樹解析により、A農場分離株は既報のGifu-2009TI/E株[8]とは97.9%、Aichi/2004株[2]とは96.6%の高い相同性を示し、それらと近縁な株であった(図1)。得られた配列はIshikawa/2010株としてDDBJに登録した(Accession number: AB622467)。一方、A農場で分離されたBCoVについて、S遺伝子領域中のpolymorphic region(411bp)の解析を行ったところ、県内C酪農場で2008年11月に下痢便より分離された株、及び他県の株(YM8, YM12, GF1, GF2, HK36, WK8)[9]と100%の相同性が認められ、遺伝子型4に分類された(データ示さず)。

抗体調査: A農場では、BToVに対する抗体価が検体1, 3及び8で、BCoVに対する抗体価が検体1, 4及び7で、有意に上昇した(表3)。また、BToVについて、流行前の牛群の抗体価を知るため、2009年6月23日の保存血清に対して調査を行ったところ、42頭の抗体価は8~4096倍(GM=130倍)であった。そして、BToVについて、ウイルス分離陽性、RT-PCR陽性及び抗体上昇がみられた検体1, RT-PCR陽性であった検体5及び9、抗体上昇がみられた検体3及び8の計5頭(検体1, 3, 5, 8及び9)の発生時抗体価は128倍以下であり、前述の保存血清との比較が可能であった3頭(検体1, 5及び8)については、7カ月前の2009年6月23日時点より抗体価の有意な低下が認められた(表3)。一方、BVDV及びBAD7の抗体価に上昇は認めなかった(データ示さず)。

B農場では、BToVに対する抗体価が検体1で有意に上昇した(表3)。また検体2, 3及び4の同居子牛は、発生時512倍以上の抗体価を保有しており、その後経時的な低下が認められた。検体2の分娩約2週間前の母牛の抗体価は、256倍であった(表3)。一方、BCoV、

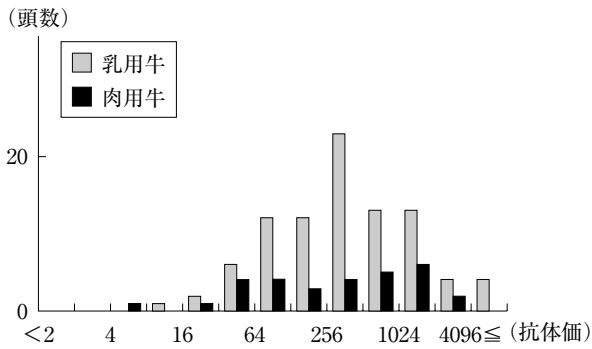


図2 石川県内飼養牛のBToV抗体保有状況

BVDV及びBAD7の抗体価に上昇は認めなかった(データ示さず)。

浸潤状況調査: BToVの浸潤状況調査を県内の乳用牛90頭及び肉用牛30頭の12戸120頭について実施したところ、抗体陽性率は100%で、幾何平均は乳用牛256倍、肉用牛203倍であり、畜種による有意差は認められなかった(図2)。また、年齢による抗体保有状況を調べるため、2歳未満及び2歳以上で分類し、両方が含まれる乳用牛農家1戸(2歳未満3頭、2歳以上7頭の計10頭)、肉用牛農家1戸(2歳未満5頭、2歳以上5頭の計10頭)でそれぞれ検定を実施したところ、有意差は認められなかった(データ示さず)。

細菌学的検査: A, B農場ともに有意菌は分離されなかった。

寄生虫卵検査: A, B農場ともに虫卵は検出されなかった。

考 察

2010年に発生した下痢症について解析した結果、A農場はBToVとBCoVの両方が関与した成牛の集団下痢症、B農場はBToVが関与した子牛の単独下痢症と診断した。

A農場は採材を行った10頭のうち半数の5頭(検体1, 3, 5, 8及び9)で、BToV検出及び抗体調査結果の両方又は一方が陽性を示した。臨床的には検体1, 3及び5は下痢症状を確認したが、採材時に無症状であった検体8及び9については、流行期間を通じての症状は不明であった。しかし下痢を確認し、BToVが分離された検体1では、それ以外の病原体は検出されず、血清学的にもBToV感染が示されていること、同じく下痢を確認した検体3及び5では、BToV以外の病原体の関与が示されなかったことから、本症例においてBToVが下痢の一因として働いたと考えられた。BToVは子牛下痢症の原因因子として知られるが、今回のA農場のように、成牛の集団下痢症からBToVを分離し、関与を示唆した事例は少ない。A農場では同時にBCoVの関与も示唆されたが、BToVはBCoV、牛ロタウイルス、サルモネラ等

の、他の病原体との同時検出事例が多く報告されている[2, 8, 10-12]。

B農場の検体1は、ウイルス分離は陰性であったが、BToVのRT-PCR陽性及び抗体調査で感染が示され、他の病原体の関与は示されなかった。今回の事例では下痢発症より3日目に血様下痢が認められたが、BToV感染は空腸中部から回腸、盲腸、結腸にかけて、絨毛の委縮及び腸陰窩の壊死を引き起こす[13]。そのため、症状が進むと血便症状が起きることが推測され、血様下痢症の場合、BToV感染も視野に入れる必要があると考えられた。

A農場でBToVの関与が疑われた5頭の抗体価は発生時128倍以下を示していた。そして5頭のうち血清が保存されていた3頭については、7カ月前より抗体価が低下していたことが確認された。また、B農場において無症状で経過した同居子牛は、発生時512倍以上の抗体価を保有していた。これらより、血清抗体の存在と下痢発症の関連性について検討が必要と考えられた。

県内12戸の浸潤状況調査で全頭が抗体陽性を示したこと、またB農場で下痢を認めた検体1より前に、母牛の抗体調査により検体2の感染が示唆されたことから、BToVは石川県内の農場に広く浸潤しているものと考えられた。Itoらは2004年4月～2005年5月に12県32農場から収集した糞便でBToVの疫学調査を行っており、その際、石川県の検体からはBToVは検出されなかったものの、BToVは全国的に浸潤していると考察している[12]。今回の結果は、それを裏付けるものとなった。

BToV感染症は一般にまだ広く知られておらず、ワクチンも存在していない。また、A及びB農場のBToVはS遺伝子領域のシーケンス解析の結果、同一又は非常に近縁なウイルスと判明し、どちらかの農場よりウイルスが侵入した可能性も否定できない。そのため、今後は牛飼養者に対する啓発と、飼養衛生管理指導を継続して行う必要がある。

本報告に関して、ご助言下さった(独)動物衛生研究所ウイルス病研究チーム恒光 裕先生、分離BCoVの遺伝子解析をしていただいた環境・常在疾病研究チーム菅野 徹先生、HRT-18-aichi細胞を分与いただいた、愛知県中央家畜保健衛生所の皆様へ感謝する。

引用文献

- [1] Woode GN, Reed DE, Runnels PL, Herrig 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] Hoet AE, Smiley J, Thomas C, Nielsen PR, Wittum TE, Saif LJ: Association of enteric shedding of bovine

- torovirus (Breda virus) and other enteropathogens with diarrhea in veal calves, *Am J Vet Res*, 64, 485-490 (2003)
- [4] 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, 167-175 (1999)
- [5] Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY : Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens, *J Clin Microbiol*, 28, 276-282 (1990)
- [6] Chinsangaram J, Akita GY, Osburn BI : Detection of bovine group B rotaviruses in feces by polymerase chain reaction, *J Vet Diagn Invest*, 6, 302-307 (1994)
- [7] Tsunemitsu H, Jiang B, Saif LJ : Sequence comparison of the VP7 gene encoding the outer capsid glycoprotein among animal and human group C rotaviruses, *Arch Virol*, 141, 705-713 (1996)
- [8] Ito T, Katayama S, Okada N, Masubuchi K, Fukuyama S, Shimizu M : Genetic and antigenic characterization of newly isolates bovine toroviruses from Japanese cattle, *J Clin Microbiol*, 48, 1795-1800 (2010)
- [9] Kanno T, Kamiyoshi T, Ishihara R, Hatama S, Uchida I : Phylogenetic studies of bovine coronaviruses isolated in Japan, *J Vet Med Sci*, 71, 83-86 (2009)
- [10] Hoet AE, Nielsen PR, Hasoksuz M, Thomas C, Witum TE, Saif LJ : Detection of bovine torovirus and other enteric pathogens in feces from diarrhea cases in cattle, *J Vet Diagn Invest*, 15, 205-212 (2003)
- [11] Kirisawa R, Takeyama 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)
- [12] Ito T, Okada N, Fukuyama S : Epidemiological analysis of bovine torovirus in Japan, *Virus Res*, 126, 32-37 (2007)
- [13] Woode GN, Pohlenz JF, Gourley NE, Fagerland JA : Astrovirus and Breda virus infections of dome cell epithelium of bovine ileum, *J Clin Microbiol*, 19, 623-630 (1984)

Outbreak of Bovine Torovirus Diarrhea in Ishikawa Prefecture

Mika ITO^{*†}, Yuichi ICHIKAWA, Kenichiro SHIMOIKE, Tatsuhiko MATSUDA,
Masahide UECHI and Eiichi SHINTANI

** Nanbu Livestock Hygiene Service Center, 324-2 Bo, Saida-machi, Kanazawa, 920-3101, Japan*

SUMMARY

Bovine torovirus (BToV) is a causal factor for diarrhea in calves, but its symptoms in adult cattle remain unclear. The involvement of BToV was investigated in the 2010 occurrence of diarrhea in cattle at two dairy farms in Ishikawa Prefecture. At Farm A, half of the adult cattle had diarrhea, and about half of the investigated cattle showed the presence of BToV, as evidenced by seroconversion against BToV or fecal sample detection of a BToV gene. A BToV strain was isolated from the fecal sample of one bovine from Farm A. Because other pathogens were not detected, we concluded that the cause of the enteric disease was BToV. At Farm B, a BToV strain was detected from a fecal sample of a calf with hemorrhagic diarrhea. The S gene sequence of the BToV strain detected from the Farm B fecal sample was the same as that isolated from the Farm A bovine. Because seroconversion was also detected, the causative agent of diarrhea was diagnosed as BToV. A sero-epidemiological analysis of 12 farms in the prefecture using an isolated virus demonstrated that the BToV antibody was widespread among dairy and beef cattle. These results suggest that BToV is present throughout Ishikawa Prefecture and causes diarrhea not only in calves but also in adult cattle.

—Key words : adult cattle, bovine torovirus, diarrhea.

† Correspondence to : Mika ITO (Nanbu Livestock Hygiene Service Center)

324-2 Bo, Saida-machi, Kanazawa, 920-3101, Japan

TEL 076-257-1262 FAX 076-257-2122 E-mail : miika@pref.ishikawa.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 65, 350 ~ 354 (2012)