

日本で初めて分離された genotype C の牛パラインフル エンザウイルス 3 型による呼吸器病の発生事例

清水 和^{1)†} 秋山昌紀²⁾ 兼廣愛美¹⁾ 桑山 勝¹⁾ 小西美佐子³⁾

1) 広島県西部家畜保健衛生所 (〒739-0013 東広島市西条御条町1-15)

2) 広島県東部家畜保健衛生所 (〒720-8511 福山市三吉町1-1-1)

3) 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所
(〒305-0856 つくば市観音台3-1-5)

(2015年8月6日受付・2015年10月27日受理)

要 約

2012年1月に県内の肉用牛肥育農家2戸で呼吸器病が発生し、牛パラインフルエンザウイルス3型(BPIV3)HS8及びHS9株が分離された。遺伝子解析の結果、両株の塩基配列は大きく異なっており、HS8株は国内標準株と同じgenotype A (BPIV3a)に、HS9株は2011年に報告された中国分離株と同じgenotype C (BPIV3c)に分類されることが判明した。わが国ではこれまでBPIV3aしか分離報告がなく、本事例が国内初のBPIV3c分離報告となる。本事例により、国内に少なくともBPIV3a及びBPIV3cの2種類の遺伝子型のBPIV3が存在することが明らかとなった。HS9株とBPIV3aの部分塩基配列を比較した結果、両者の相同性は現行のRT-PCR法で用いるプライマーが標的とするP遺伝子領域で最も低く、同プライマーではBPIV3b及びBPIV3cを検出できない可能性があることが示された。したがって、今後国内の牛パラインフルエンザ対策のために、全遺伝子型のBPIV3を検出可能なウイルス遺伝子検査法を開発する必要があると考える。

——キーワード：牛パラインフルエンザウイルス3型、分子系統解析、genotype A、genotype C、P蛋白遺伝子。

-----日獣会誌 69, 87~92 (2016)

牛呼吸器病症候群 (bovine respiratory disease complex, 以下BRDC) は、牛ヘルペスウイルス1型 (BHV-1)、牛RSウイルス (BRSV)、牛パラインフルエンザウイルス3型 (BPIV3)、牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV)、牛アデノウイルス7型などのウイルス、*Mannheimia haemolytica*、*Pasteurella multocida*などの細菌並びにマイコプラズマの感染によって引き起こされるが、しばしばこれらの病原体の複合感染により重篤化することが知られている [1-3]。BRDCは、罹患牛の肥育期間の延長や死亡による損失のみならず、予防や治療、または隔離等のまん延防止措置にかかる費用など、農家に最も大きい経済的損失を招くため、各国で非常に重要視されている [2-4]。

牛パラインフルエンザは、長距離輸送、放牧や集団飼育などのストレスを受けた際に多発することから、輸送

熱とも呼ばれる [5]。本疾病の病原体であるBPIV3は、複合感染によりBRDCを引き起こす [5]ほか、単独感染でも重度の呼吸器症状を引き起こす場合があるため、その感染予防対策が重要である。

これまでBPIV3の遺伝子型は単一と考えられていたが、2008年に豪州で従来の流行株と異なる塩基配列を有する株が確認された。これにより初めてBPIV3に複数の遺伝子型が存在することが判明した [6]。その後、さらに異なる遺伝子型のBPIV3の分離が2011年及び2013年に中国並びに韓国から相次いで報告され [7, 8]、現在ではBPIV3の遺伝子型は従来のBPIV3が属するgenotype A (BPIV3a)、豪州分離株 (Q5592株) [6]が属するgenotype B (BPIV3b)並びに中国分離株 (SD0835株) [7]及び韓国分離株 (12Q061株) [8]が属するgenotype C (BPIV3c)の3種類に分類され

† 連絡責任者：清水 和 (広島県西部家畜保健衛生所)

〒739-0013 東広島市西条御条町1-15

☎ 082-423-2441 FAX 082-424-1826

E-mail : m-shimizu87987@pref.hiroshima.lg.jp

表1 BPIV3 遺伝子型解析に用いたプライマー

標的遺伝子	プライマー名	領域	塩基配列 (5'-3')	増幅サイズ(bp)	引用文献
P	PIF1	2124-2143	GCTCAGATAGTAGAGCTGAG	730	Kirisawa et. al, 1994
	PIR3	2835-2854	CCTCTCTGTAAATCGAGTGC		
M	Mfwd	3751-3771	GCATCACAAACTCCGCAATAT	1,047	Zhu et. al, 2011
	Mseq1	4777-4798	TGCTTGATTTTTCCGACTCCT		
HN	HNfwd	6833-6854	TGGAACACACAAACAGCACAA	1,697	Wen et. al, 2012
	HNrev	8481-8505	TTTGAACTTCTGTTTTGAATA		

ている。しかしながら、世界的に BPIV3 の遺伝子解析の報告は少なく、その流行状況や病原性など、いまだ不明な点が多い。今回われわれは、呼吸器症状を呈した牛から、わが国で初めて BPIV3c を分離し、同株の遺伝学的解析と抗原性の検索を行ったので、その概要を報告する。

材料及び方法

発生状況：2012年1月に県内の肉用牛肥育農家2戸（農家A及びB）で発熱、発咳、食欲不振及び水様性鼻汁漏出を主症状とする呼吸器病が発生した。農家Aは県北部、農家Bは県西部に位置し、飼養頭数は農家Aが100頭、農家Bが150頭であった。両農家は県内の家畜市場から、出荷時に牛呼吸器病5種混合生ワクチンを接種した牛を導入しており、農家Bでは導入後に牛呼吸器病5種混合不活化ワクチンを追加接種していた。農家Aでは1月23日に最初の発症牛が認められ、27日までに7頭が加療を要するに至った。農家Bでは21日に発咳が認められ、31日には牛舎全体に呼吸器症状が拡大し、2月1日までに7頭が治療を要し、2月3日に1頭が死亡した。

ウイルス分離：農家Aの発症牛4頭及び農家Bの発症牛4頭の鼻腔スワブ計8検体を牛胎子筋肉細胞、MDBK細胞及びVero細胞に接種し、34℃で10～14日間の回転培養を3代継代して細胞変性効果（CPE）の有無を確認した。

ウイルス遺伝子検査：分離されたウイルスを同定するため、CPEを示した検体からRNA抽出用試薬（ISOGEN-LS、(株)ニッポンジーン、東京）を用いてRNAを抽出し、既報のプライマーを用いてBPIV3及びBRSV検出用RT-PCRを実施した[9]。本法は、1st PCRとしてRT-PCRを実施し、1st PCRで得られた増幅産物を鋳型DNAとして2nd PCRを行うRT-nested PCRであり、1st PCRには市販キット（TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0、タカラバイオ(株)、滋賀）を、2nd PCRには市販キット（TaKaRa Ex Taq、タカラバイオ(株)、滋賀）を使用し、いずれもキット添付の説明書に従って反応を行った。PCR産物は1.5%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色により目的

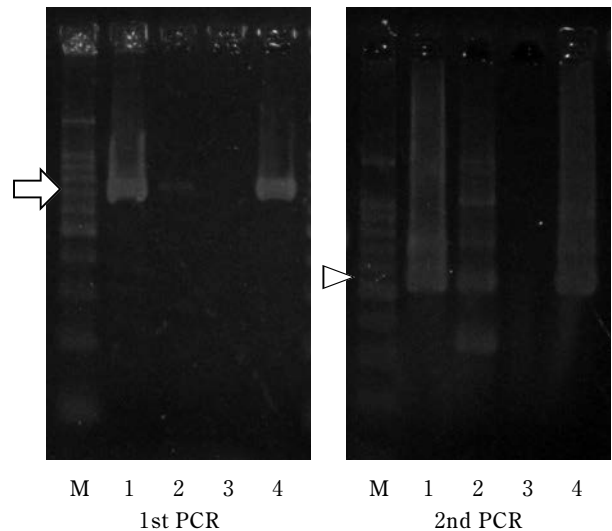


図1 BPIV3 検出用 PCR の電気泳動像

矢印 (731bp) と矢頭 (535bp) が目的遺伝子、M：100bp DNA ラダーマーカー、1：HS8 株、2：HS9 株、3：陰性コントロール、4：陽性コントロール

とする遺伝子断片の増幅の有無を確認した。

BPIV3 の遺伝子型解析：HS8 株及び HS9 株の遺伝子型を解析するため、分離ウイルスの RNA から既報のプライマーを用いて BPIV3 の P 蛋白質遺伝子 (P 遺伝子) [9]、M 蛋白質遺伝子 (M 遺伝子) [7] 及び HN 蛋白質遺伝子 (HN 遺伝子) [10] 領域を増幅した。各プライマーの情報は表 1 に示した。増幅された遺伝子断片の塩基配列を市販キット (Big Dye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit, Applied Biosystems, ライフテクノロジー(株)、東京) を用いダイレクトシーケンス法により決定した。続いて、解析ソフト MEGA 5 ver.5.10 [11] により分離株と既報の BPIV3 の各遺伝子領域の相同性を比較した。結果に基づいて分子系統樹を作成し、Zhu ら [7] の報告に従い分離株の遺伝子型を決定した。

抗体検査：各農家の発症牛のペア血清（発症期及び回復期）計 16 検体について、中和試験により BPIV3 (BN-1 株)、BHV-1 (758 株)、BRSV (NMK7 株) 並びに BVDV (Nose 株) に対する抗体価の上昇の有無を確認した。また、分離ウイルスの血清学的交差性を調べるため、A 農場の発症牛 2 頭並びに B 農場の発症牛 3 頭の

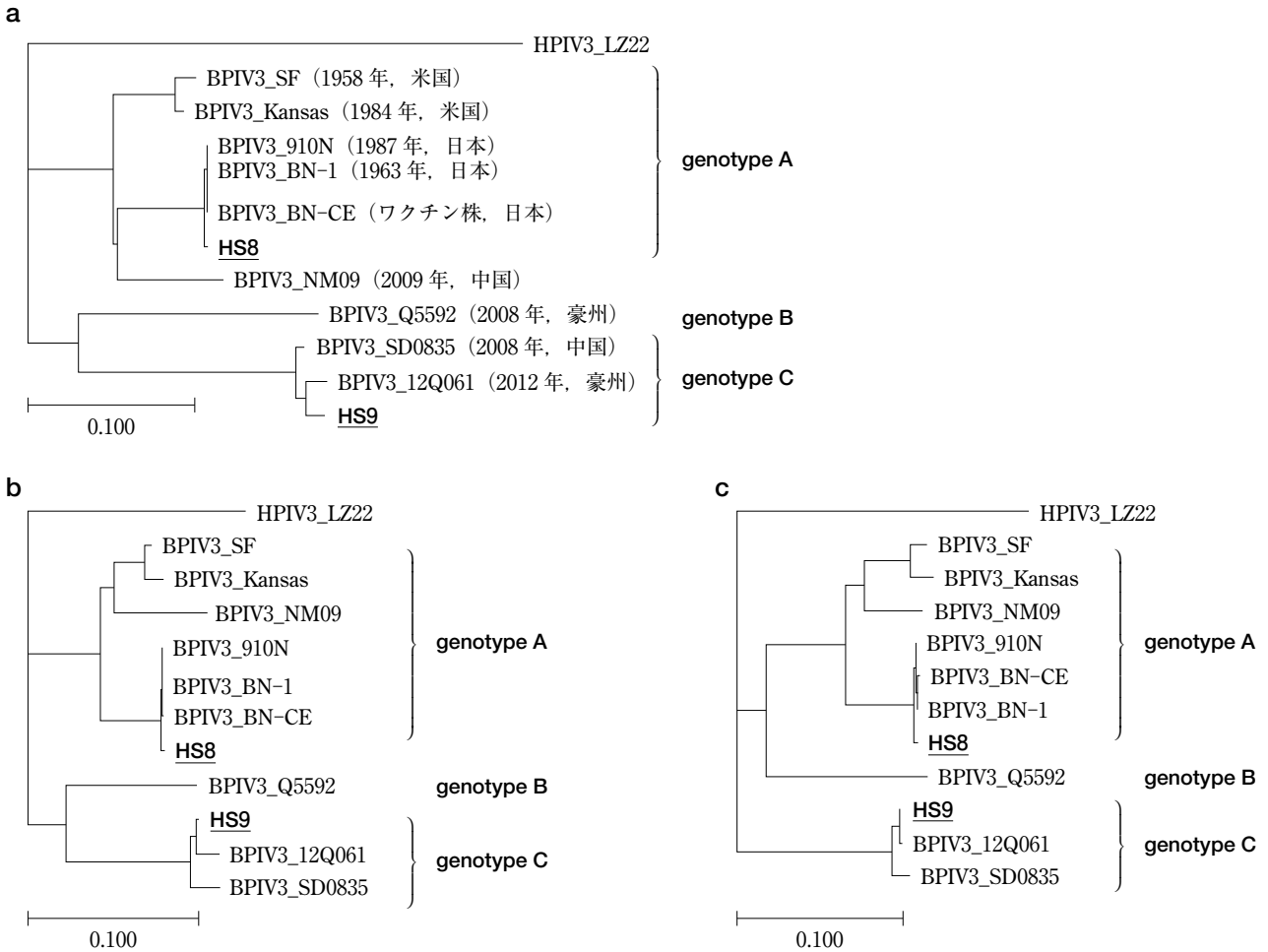


図2 BPIV3の塩基配列分子系統解析結果

P 遺伝子領域 (a), M 遺伝子領域 (b), HN 遺伝子領域 (c) の分子系統樹を示す。

HPIV3: ヒトパラインフルエンザウイルス 3 型 BPIV3: 牛パラインフルエンザウイルス 3 型

アンダーバー以降は株名 a の () 内は分離年及び国名

ペア血清について、BPIV3 BN-1 株及び分離株 2 株を用いた交差中和試験を実施した。

細菌検査: 発症牛の鼻腔スワブ計 8 検体について、5% 羊血液寒天培地で 37℃, 48 時間嫌気培養及び DHL 寒天培地で 37℃, 24 時間の好気培養を実施した。

成 績

ウイルス分離: 農家 A の 4 検体中 3 検体の MDBK 細胞 2 代目及び農家 B の 4 検体中 2 検体の MDBK 細胞 1 代目で CPE を起こすウイルスが分離され、農家 A の分離株を HS8 株、農家 B の分離株を HS9 株とした。また、農家 A の 4 検体中 3 検体の Vero 細胞 3 代目に細胞変性効果を起こすウイルスが分離された。

ウイルス遺伝子検査: RT-PCR の結果、HS8 株及び HS9 株は BPIV3 であることが示された。ただし、BPIV3 検出用 RT-PCR において、HS8 株は 1st 及び 2nd PCR とともに明瞭なバンドが認められたのに対し、HS9 株は 1st PCR でごく薄いバンドが、2nd PCR では

表 2 BPIV3 分離株と既報の BPIV3 との塩基配列相同性

株名	genotype	塩基配列相同性 (%)					
		HS8			HS9		
		P ^{*1}	M ^{*2}	HN ^{*3}	P	M	HN
BN-1	A	99.5	99.7	99.5	81.2	84.9	81.2
910N	A	99.5	99.7	99.5	80	84.8	80.3
Kansas/ 15626/84	A	90.8	93.3	91.5	81.5	83.5	81.5
Q5592	B	77.6	84.1	82.4	80.1	85.2	82.3
SD0835	C	76.8	83.8	80	98.5	97.9	97.8
HS9	C	75.8	85.3	80.4			

※ 1: P 遺伝子 ※ 2: M 遺伝子 ※ 3: HN 遺伝子

非特異的な増幅が多く認められた (図 1)。一方、Vero 細胞で CPE を示したウイルスは BRSV であることが判明した。

BPIV3 の遺伝子型解析: 遺伝子型解析の結果、HS8 株は既報の BPIV3 国内株 (BN-1, BN-CE 及び 910N 株) [6, 11, 12] と同じ genotype A に、HS9 株は

BPIV3cによる呼吸器病の発生事例

表3 発症牛の各種ウイルス抗体検査結果

農家	牛 No.	ウイルス分離		中和試験 [※]								備考
		BPIV3	BRSV	BPIV3		BRSV		BVDV		BHV1		
				Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	
A	A1	+	-	64	≥ 256	8	≥ 128	≥ 256	≥ 256	<2	<2	HS8株 分離牛
	A2	+	+	≥ 256	≥ 256	<2	≥ 128	≥ 256	≥ 256	2	2	
	A3	+	+	≥ 256	128	2	≥ 128	≥ 256	≥ 256	<2	<2	
	A4	-	+	32	≥ 256	16	≥ 128	≥ 256	≥ 256	4	4	
B	B1	+	-	32	≥ 256	≥ 128	≥ 128	≥ 256	≥ 256	8	4	HS9株 分離牛
	B2	+	-	32	≥ 256	≥ 128	≥ 128	32	128	16	16	
	B3	-	-	64	≥ 256	≥ 128	≥ 128	≥ 256	≥ 256	<2	2	
	B4	-	-	8	≥ 256	≥ 128	≥ 128	≥ 256	≥ 256	4	4	

※ BPIV3: BN-1株, BRSV: NMK7株, BVDV: Nose株及び BHV1: 758株

表4 BPIV3の交差中和試験結果

農家	牛 No.	供試ウイルス					
		BN-1		HS8		HS9	
		pre	post	pre	post	pre	post
A	A1	16	320	32	320	4	80
	A4	32	320	32	640	8	80
B	B1	16	1280	16	640	8	320
	B3	64	640	64	640	16	320
	B4	8	640	8	640	<2	320

BPIV3 中国分離株 (SD0835株) [7] 及び韓国分離株 (12Q061株) [8] 同様, genotype Cに分類されることが判明した (図2). HS8株及びHS9株と既報のBPIV3でP, M及びHN遺伝子の部分塩基配列を比較したところ, いずれも他の遺伝子型のBPIV3に対して80~85%とやや低い相同性を示した (表2).

抗体検査: 農家Aの4検体中2検体, 農家Bの4検体中4検体の発症牛の回復期血清でBPIV3 BN-1株に対する抗体価の有意な上昇が認められた. また, 農家Aの4検体すべての回復期血清でBRSV NMK7株に対する抗体価が有意に上昇していたほか, 農家Bの4検体中1検体の回復期血清でBVDV Nose株に対する抗体価の有意な上昇が認められた (表3). また, 交差中和試験の結果, 全頭の回復期血清でBPIV3 BN-1株, HS8株並びにHS9株に対する有意な中和抗体価の上昇が認められたが, いずれも農家Bの方が高かった (表4).

細菌検査: 農家A及び農家Bの各1頭の鼻腔スワブから *Pasteurella multocida* が有意に分離された.

総合診断: 農家AについてはBPIV3とBRSV, 農家BについてはBPIV3とBVDVの混合感染及び細菌の関与によるBRDCと診断した.

考 察

これまでわが国で分離が報告されたBPIV3の遺伝子型はすべて genotype Aであったが [12, 13], 本事例に

PIF1	GCTCAGATAGTAGAGCTGAG	1st PCR F primer
BPIV3_910N	*****	} genotype A
BPIV3_BN-1	*****	
BPIV3_BN-CE	*****	
BPIV3_Q5592	**C*****G**AT****	genotype B
BPIV3_SD0835	*****A*****	} genotype C
BPIV3_12Q061	*****A*****	
PIR3	GCACTCGATTACAGAGAGG	1st PCR R primer
BPIV3_910N	*****	} genotype A
BPIV3_BN-1	*****	
BPIV3_BN-CE	*****	
BPIV3_Q5592	*****A***	genotype B
BPIV3_SD0835	*****A*****A***	} genotype C
BPIV3_12Q061	*****A*****A***	
PIF2	GGAGAGATGGATAAGGACTC	2nd PCR F primer
BPIV3_910N	*****	} genotype A
BPIV3_BN-1	*****	
BPIV3_BN-CE	*****	
BPIV3_Q5592	A**A*****A*	genotype B
BPIV3_SD0835	A*****G*****A**C*	} genotype C
BPIV3_12Q061	A*****G*****A**C*	
PIR1	GGATCCCAAGGGAAGAGAAT	2nd PCR R primer
BPIV3_910N	*****	} genotype A
BPIV3_BN-1	*****	
BPIV3_BN-CE	*****	
BPIV3_Q5592	***AAT*GG*****G**	genotype B
BPIV3_SD0835	**G*****A*****	} genotype C
BPIV3_12Q061	**G*****A*****	

図3 現行のBPIV3検出用プライマーと既報のBPIV3の配列比較
プライマー配列と一致する塩基は*で示した.

より初めてわが国にBPIV3cが存在することが明らかになった. Horwoodら [6] は, BPIV3bが豪州でのみ確認された理由について, 豪州が他の畜産国と地理的に離れている点, 並びに同国の厳しい検疫規制が関与すると推測している. 一方, Wenら [10] は, BPIV3aは過

去に北米から輸入した畜産物を介して中国に侵入したものである。わが国の BPIV3c が近年海外から侵入したのか、以前から国内に存在していたのかは不明であるが、本事例では県内の 2 農家において、同時期にそれぞれの農家から異なる遺伝子型の BPIV3 が分離されたことから、国内に両方の遺伝子型の BPIV3 が流行している可能性がある。したがって今後、県内の過去の BPIV3 分離株の遺伝子型を調査するとともに、国内の BPIV3a 及び BPIV3c の現在の流行状況を調査し、わが国における BPIV3 浸潤状況を把握する必要がある。

既報では遺伝子型の異なる BPIV3 株間では P 遺伝子の塩基配列相同性が最も低いとされており [7, 10]、本事例においても同様の結果が示された。現在、全国の家畜保健衛生所で BPIV3 のウイルス遺伝子検出に用いられる RT-PCR 法のプライマーは、BPIV3a である 910N 株の P 遺伝子の塩基配列を基に設計されている [9]。この現行の BPIV3 検出用 RT-PCR のプライマー領域を既報の BPIV3a, BPIV3b 及び BPIV3c の各株の塩基配列と比較したところ、図 3 に示したように BPIV3b 及び BPIV3c と同プライマーの相同性は BPIV3a に比べてやや低く、特に 2nd PCR のプライマーの 3' 領域で不一致が多く認められた。本事例においても、ウイルス力価がほぼ同等のウイルス液 (HS8 株: $10^{6.5}$ TCID₅₀/0.1ml, HS9 株: $10^{6.8}$ TCID₅₀/0.1ml) から抽出した RNA をほぼ等量 (約 100ng) RT-PCR の鋳型として用いたにもかかわらず、図 1 に示したように HS8 株と HS9 株で 1st PCR の増幅効率に差が認められた。したがって、現行の RT-PCR 法では BPIV3b 及び BPIV3c の遺伝子が検出できない可能性が考えられる。このため、今後さらに国内分離株を収集し、遺伝子型を解析してすべての遺伝子型の BPIV3 を検出可能とするプライマーを設計する必要がある。

交差中和試験において、感染した BPIV3 の遺伝子型によらず全頭の回復期血清で BPIV3 BN-1 株, HS8 株並びに HS9 株に対する有意な中和抗体価の上昇が認められたことから、遺伝子型の異なる BPIV3 間にある程度の血清学的交差性があるものと考えられる。BPIV3a である HS8 株が流行していた A 農家の牛では、HS9 株に対する抗体価上昇の程度が B 農家に比べて低かったが、農家 B では市場出荷時に接種された牛呼吸器病 5 種混合生ワクチンに加え、導入後に牛呼吸器病 5 種混合不活化ワクチンを追加接種していた。したがって、この差が農家 B の感染牛でより強く抗体産生が誘導された原因である可能性もあり、BPIV3 の遺伝子型による病原性及び抗原性の差については、今後症例を集めて検証を重ねる必要がある。

乳肉問わず牛呼吸器病の発生に苦慮する農家は多く、迅速な原因究明と、有効な防疫対策の確立が求められて

いる。このため、本事例で得られた知見を活用し、より精度の高い BPIV3 の検査体制を早期に整備することが重要である。

引用文献

- [1] Martin SW, Bohac JG : The association between serological titers in infectious bovine rhinotracheitis virus, bovine virus diarrhea virus, parainfluenza-3 virus, respiratory syncytial virus and treatment for respiratory disease in ontario feedlot calves, *Can J Vet Res*, 50, 351-358 (1986)
- [2] 藤井満貴, 富永 潔, 平田浩一郎, 松田普二, 河村和俊 : 乳用子牛に集団発生した牛 RS ウイルス感染症, *日獣会誌*, 43, 494-498 (1990)
- [3] 上村涼子, 中村健太郎, 末吉益雄 : 日本国内における牛の呼吸器感染性 *Mycoplasma* の浸潤状況調査, *日獣会誌*, 65, 871-875 (2012)
- [4] Snowden GD, Van Vleck LD, Cundiff LV, Bennett GL : Bovine respiratory disease in feedlot cattle: Environmental, genetic, and economic factors, *J Anim Sci*, 84, 1999-2008 (2006)
- [5] 明石博臣 : 牛のパラインフルエンザ, 獣医伝染病学, 清水悠紀臣, 鹿江雅光, 田淵 清, 平棟孝志, 見上 彪編, 第 5 版, 90, 近代出版, 東京 (2000)
- [6] Horwood PH, Gravel JH, Mahony TJ : Identification of two distinct bovine parainfluenza virus type 3 genotypes: *J Gen Virol*, 89, 1643-1648 (2008)
- [7] Zhu YM, Shi HF, Gao YR, Xin JQ, Liu NH, Xiang WH, Ren XG, Feng JK, Zhao LP, Xue F : Isolation and genetic characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from cattle in China, *Vet Microbiol*, 149, 445-451 (2011)
- [8] Oem JK, Lee EY, Lee KK, Kim SH, Lee MH, Hyun BH : Molecular Characterization of a Korean bovine parainfluenza virus type 3 isolate, *Vet Microbiol*, 162, 224-227 (2013)
- [9] 桐沢力雄, 荻窪恭明, 田島誉士 : ウシパラインフルエンザウイルス 3 型, ウシ RS ウイルス及びウシウイルス性下痢・粘膜病ウイルス感染の PCR による検出, *J Raku-no Gakuen Univ*, 19, 225-237 (1994)
- [10] Wen YJ, Shi XC, Wang FX, Wang W, Zhang SQ, Li G, Song N, Chen LZ, Cheng SP, Wu H : Phylogenetic analysis of the bovine parainfluenza virus type 3 from cattle herds revealing the existence of a genotype A strain in China, *Virus Genes* (2012)
- [11] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S : MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, *Mol Biol Evol*, 28, 2731-2739 (2011)
- [12] Inaba Y, Omori T, Kono M, Matumoto M : Parainfluenza 3 virus isolated from Japanese cattle, *Isolation and identification*, *Jpn J Exp Med*, 33, 313-329 (1963)
- [13] Okura T, Kokuho T, Konishi M, Kameyama K, Takeuchi K : Complete Genome Sequence of Bovine Parainfluenza Virus Type 3 Strain BN-1 and Vaccine Strain BN-CE, *Genome Announcements*, 1, 1 (2013)

The First Case in Japan of Bovine Respiratory Disease Caused by the Isolates
of the Genotype C Bovine Parainfluenza Virus Type 3

Madoka SHIMIZU^{1)†}, Masanori AKIYAMA²⁾, Megumi KANEHIRO¹⁾,
Masaru KUWAYAMA¹⁾ and Misako KONISHI³⁾

- 1) *Western Center for Livestock Hygiene Service, Hiroshima Prefecture, 1-15 Saijogojo-cho, Higashi-Hiroshima-shi, 739-0013, Japan*
- 2) *Eastern Center for Livestock Hygiene Service, Hiroshima Prefecture, 1-1-1 Miyoshi-cho, Fukuyama-shi, 720-8511, Japan*
- 3) *National Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba-shi, 305-0856, Japan*

SUMMARY

Bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3) isolates are classified into three genotypes (BPIV3a to c). In 2012, two BPIV3 (HS8 and HS9) strains were isolated from the nasal swabs of cattle kept on two farms in Hiroshima Prefecture. The results of partial genome sequence analysis revealed that the two strains belonged to different genotypes. While the HS8 strain was classified as BPIV3a, the HS9 strain was classified as BPIV3c, which is the latest genotype of BPIV3. This is the first report of BPIV3c isolates in Japan. The low level of the sequence identity of the P gene between the HS9 and BPIV3a isolates suggested that the current RT-PCR method will fail to detect BPIV3c strains. Thus, appropriate primers that can detect all the genotypes need to be designed.

— Key words : bovine parainfluenza virus type 3, genome sequence analysis, genotype A, genotype C, P gene.

† Correspondence to : Madoka SHIMIZU (*Western Center for Livestock Hygiene Service, Hiroshima Prefecture*)

1-15 Saijogojo-cho, Higashi-Hiroshima-shi, 739-0013, Japan

TEL 082-423-2441 FAX 082-424-1826 E-mail : m-shimizu87987@pref.hiroshima.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 69, 87 ~ 92 (2016)