

牛アデノウイルス 2 型が関与する乳用牛の呼吸器病、 消化器病集団発生

久保田直樹^{1)†} 折原 詳¹⁾ 吉良卓宏¹⁾ 畠間真一²⁾

1) 京都府中丹家畜保健衛生所 (〒 620-0954 福知山市字半田 371-2)

2) 国研農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 (〒 305-0856 つくば市観音台 3-1-5)

(2020 年 3 月 13 日受付・2020 年 5 月 11 日受理)

要 約

京都府内の酪農場において、牛が食欲不振、発熱、発咳等の呼吸器症状、下痢等の消化器症状を呈したとの通報を受け、PCR 及びウイルス分離検査による病性鑑定を実施した。その結果、複数の牛の糞便から牛アデノウイルス特異的遺伝子が検出され、牛アデノウイルス 2 型 (BAV-2) が分離された。また、急性期と回復期のペア血清を用いたウイルス中和試験によって BAV-2 抗体価の有意な上昇が確認され、本ウイルスの牛群内での流行と発症への関与が推察された。さらに、周辺地域のウイルス浸潤状況を把握するため、過去 3 年間に周辺農場で採取された乳用牛 599 頭分の血清を使ってウイルス中和試験を実施したところ、516 頭から BAV-2 中和抗体が検出された。発生農場及び周辺農場で BAV-2 が常在化し、牛群内に広く浸潤している実態が明らかとなった。

——キーワード：牛アデノウイルス、呼吸器病、血清型 2 型。

-----日獣会誌 73, 577~581 (2020)

牛アデノウイルス (BAV) は、鼻汁や糞便を介して牛に水平感染し、発熱や発咳、肺炎といった呼吸器症状、腸炎、下痢といった消化器症状を引き起こす [1]。また、虚弱子牛症候群の原因の 1 つとも考えられている。BAV はアデノウイルス科のウイルスで、10 種類の血清型が存在する [1]。血清型 1~3, 9, 10 が *Mastadenovirus* 属に、血清型 4~8 が *Atadenovirus* 属に分類される [1]。症状や病原性は血清型や株により異なる。血清型 7 では病原性の高いウイルス株 (袋井株) が報告されているが、その他の血清型は病原性が弱く、単独感染での発症はまれである。多くの場合、他の呼吸器病病原体との重複感染や、長距離輸送や飼養環境の変化等によるストレス、免疫機能低下が複合して発症に至る [1]。一般に成牛よりも新生子牛で感受性が高く、重症化しやすい。日本国内において、これまでに 3 型 [2], 4 型 [3], 7 型 [4] の分離報告がある。

BAV 2 型 (BAV-2) は、1960 年に Klein ら [5] が健康な牛の糞便から初めて分離し、綿羊からの分離例

も報告されているが、牛は BAV-2 に感染しても無症状か発症しても軽度であり [6]、過去に農場において臨床症状を呈したという報告は見当たらない。今回、京都府内の約 80 頭規模の酪農場において呼吸器及び消化器症状を呈した複数の牛から BAV-2 が分離され、本事例のおもな原因となったことが推察された。あわせて BAV-2 の浸潤状況を把握するため周辺農場における抗体調査も実施したので、その概要を報告する。

発 生 概 要

つなぎ牛舎 2 棟に成牛 54 頭 (約 24 カ月齢以上)、フリーバーン牛舎 1 棟に育成牛 19 頭 (約 3 カ月齢以上 24 カ月齢未満)、畜舎の外に設置されたカーフハッチに子牛 6 頭 (約 3 カ月齢未満) のホルスタイン種を飼養する酪農場 (A 農場) で、2019 年 2 月中旬頃より、牛群全体に食欲不振がみられ、発熱、発咳、下痢を呈する個体が散見された。同年 2 月 26 日に立入検査を実施し、成牛 5 頭、育成牛 1 頭の計 6 頭 (No. 1~6) について、

† 連絡責任者：久保田直樹 (京都府中丹家畜保健衛生所)

〒 620-0954 福知山市字半田 371-2

☎ 0773-25-1860 FAX 0773-25-1861

E-mail : n-kubota38@pref.kyoto.lg.jp

EDTA加血液、血清、鼻腔スワブ、糞便を採材した。6日後の3月4日、別の育成牛1頭(No. 7)に発熱、結膜充血、呼吸器症状が発生し、No. 1~6と同様の材料に加えて眼瞼スワブを採材した。最初の立入検査からおよそ1カ月後の3月28日、全7頭についてポスト血清を採材した。

A農場では後継牛をすべて自家生産、育成でまかっていたが、2019年2月12日に初めて府外から3頭の牛を導入し、その直後に本事例が発生した。検査牛7頭のうちNo. 3と4が導入牛である。また、呼吸器病対策として毎年秋に牛6種混合ワクチン(キャトルウィン-6、(株)微生物化学研究所、京都)を成牛全頭に接種しており、直近では2018年10月29日に接種していた。

材料及び方法

採材したEDTA加血液、ペア血清、鼻腔スワブ、糞便、眼瞼スワブについて、以下の検査を実施した。

細菌学的検査: 2月26日に採材した6頭分の鼻腔スワブ及び糞便について、鼻腔スワブは5%馬血液加寒天培地を用いて37℃で微好気培養を、糞便はDHL寒天培地を用いて37℃で好気培養を実施した。分離された菌は、市販キット(アピスタフ、アピ20、ラピッドID32ストレップアピ、シスメックス・バイオメリユ(株)、東京)を用いて同定した。

ウイルス遺伝子検査: 7頭の鼻腔スワブ及び1頭の眼瞼スワブの乳剤から自動核酸抽出装置(magLEAD 12gc、プレジジョン・システム・サイエンス(株)、千葉)により核酸を抽出し、牛RSウイルス(BRSV) [7]、牛コロナウイルス(BCoV) [8]、牛パラインフルエンザウイルス3型(BPI3) [7]、BAdV [9]、牛伝染性鼻気管炎ウイルス(IBRV) [10]についてPCR検査を実施した。また、7頭の糞便について10%乳剤を作製後、同様に核酸を抽出し、BCoV、BAdV及び牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)についてPCR検査を実施した [11]。

ウイルス分離検査: 7頭の鼻腔スワブ及び糞便、1頭の眼瞼スワブの乳剤について、MDBK及びMDBK-SY細胞に接種して2代継代し、細胞変性効果(CPE)を観察した。CPEが確認された培養上清を回収し、上記遺伝子検査と同様のPCR検査で分離ウイルスの確認を行った。

シークエンス解析: 分離ウイルスの確認検査で得られたBAdV hexon領域のPCR産物をテンプレートとして、PCRプライマー(BALF/BARF) [9]を使ったダイレクトシークエンスにより塩基配列を決定した。さらに、MEGA Xによる分子系統樹解析、BLASTによるシークエンスデータベースの検索を行った。

抗体検査: 7頭のペア血清を56℃、30分間で非働化

した後、BRSV NMK7株、BPI3 BN-1株、BAdV袋井株及び本事例分離ウイルス、IBRV 758株、BVDV 1型Nose株及び2型KZ-91CP株を使ったウイルス中和試験を実施した。BCoVについては、Kakegawa株を使ったHI試験による抗体検査を実施した。

浸潤状況調査: A農場及び周辺地域の酪農場13農場(B~N農場)の計14農場において過去3年間に採材して凍結保存した599頭分の血清について、本事例で分離されたBAdVを使ったウイルス中和試験を実施した。

成績

細菌学的検査: No. 2~6の鼻腔スワブより種々の細菌が分離されたものの、市販キットで環境または口腔内常在菌と同定、あるいは同定不能であり、牛の呼吸器病に関係する細菌は分離されなかった。また糞便からはNo. 1~6のいずれにおいても、下痢に関係する有意菌は分離されなかった。

ウイルス遺伝子検査: No. 1, 5, 7の糞便から、BAdVのhexon領域をターゲットとしたnested PCRにおいて、BAdV特異的遺伝子を検出した。その他のウイルスについては、特異的遺伝子を検出しなかった(表1)。

ウイルス分離検査: No. 1, 3, 4, 5, 7の糞便材料を接種した培養細胞において、細胞の円形化といったCPEを確認した。2代目培養上清から核酸を抽出し、上記遺伝子検査と同様にPCR検査を実施したところ、No. 1, 5, 7の糞便培養上清からBAdV特異的遺伝子を検出した(表2)。

シークエンス解析: No. 1, 5, 7の糞便から分離されたウイルスについて解析を実施し、hexon領域の塩基配列(601bp)を決定した(アクセション番号LC528154)。3株の塩基配列は100%一致し、分子系統樹解析を行った結果、BAdV-2に分類された(図)。また、BLAST検索の結果、2006年に米国アイオワ州で登録されたBAdV-2(アクセション番号DQ630762.1)に最も近縁であり、一致率は99.5%であった。

抗体検査: No. 3を除く7頭中6頭で分離BAdVに対する中和抗体価の有意な上昇を認めた。その他のウイルスに対する中和抗体価の有意な上昇は認めなかった(表3)。

浸潤状況調査: 中和抗体検査の結果、14農場すべてで分離ウイルスに対する中和抗体を検出、599頭中516頭が中和抗体を保有し、抗体保有率は86.1%、抗体価は2倍から256倍以上で、GM値は6.41であった(表4)。

考察

A農場において食欲不振、呼吸器及び消化器症状を呈した複数の牛の糞便からウイルスが分離され、遺伝子解析の結果いずれもBAdV-2であることが確認された。

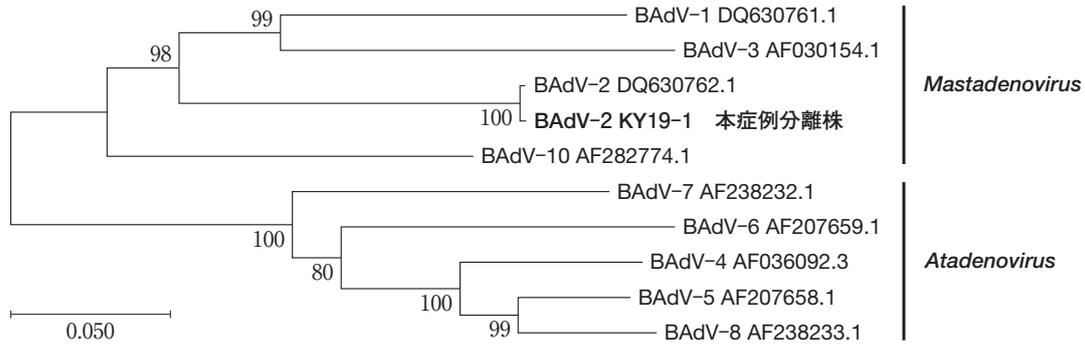


図 BAdV Hexon 遺伝子 BALF/BARF PCR 増幅領域の塩基配列を基に作成した分子系統樹近隣結合法、ブートストラップ値1,000で解析を行った。

表1 ウイルス遺伝子検査結果

個体	月齢	臨床症状	検査材料	BRSV	BCoV	BPI3	BAdV	IBRV	BVDV
No. 1	37	なし	糞便 鼻腔スワブ	NT -	- -	NT -	+ -	NT -	- NT
No. 2	68	発熱 肺音粗励	糞便 鼻腔スワブ	NT -	- -	NT -	- -	NT -	- NT
No. 3	20	なし	糞便 鼻腔スワブ	NT -	- -	NT -	- -	NT -	- NT
No. 4	21	なし	糞便 鼻腔スワブ	NT -	- -	NT -	- -	NT -	- NT
No. 5	39	下痢	糞便 鼻腔スワブ	NT -	- -	NT -	+ -	NT -	- NT
No. 6	4	発咳	糞便 鼻腔スワブ	NT -	- -	NT -	- -	NT -	- NT
No. 7	20	発熱 呼吸促迫 結膜充血	糞便 鼻腔スワブ 眼瞼スワブ	NT - -	- - -	NT NT NT	+ - -	NT - -	- NT NT

+ : 特異的遺伝子検出, - : 検出せず, NT : 未実施

Hexon 領域 601bp の配列は分離株間で 100% 一致しており、同じ由来の BAdV-2 が農場内に浸潤していると考えられる。急性期と回復期のペア血清で、7 頭中 6 頭の牛の BAdV-2 中和抗体価が有意に上昇しており、またウイルス遺伝子検査や細菌検査では鼻腔スワブや糞便から症状に関連する他の病原体が検出もしくは分離されなかった。これらのことから、BAdV-2 が本集団発生のおもな原因となったと考えられる。なお、ウイルス分離において CPE を認め、かつ PCR 検査で遺伝子を検出できなかった No. 3, 4 の検体について、その CPE の特徴が BAdV によるものと大きく異なることから BAdV 以外の何か細胞変性を起こしたのではないかと推察されるが、原因の特定には至っていない。

発生の中心となったのはつなぎ牛舎の成牛で、育成牛舎の育成牛の一部にも発熱、発咳、呼吸促迫、結膜充血、下痢等の症状が認められた。一方、1993 年に Rusvai ら [6] が行った BAdV-2 の感染試験では、No. 19 株を 120~140 日齢のホルスタイン種に鼻腔内接種すること

表2 ウイルス分離検査における CPE の有無

個体	接種材料	MDBK		MDBK-SY	
		初代	2代目	初代	2代目
No. 1	糞便 鼻腔スワブ	- -	- -	- -	+* -
No. 2	糞便 鼻腔スワブ	- -	- -	- -	- -
No. 3	糞便 鼻腔スワブ	+ -	+ -	+ -	+ -
No. 4	糞便 鼻腔スワブ	- -	- -	+ -	+ -
No. 5	糞便 鼻腔スワブ	- -	- -	+ -	+* -
No. 6	糞便 鼻腔スワブ	- -	- -	- -	- -
No. 7	糞便 鼻腔スワブ 眼瞼スワブ	- - -	- - -	+ - -	+* - -

+ : CPE 確認, - : CPE 確認せず

* : 培養上清の PCR で BAdV 特異的遺伝子検出

表3 抗体検査結果

	BRSV		BCoV		BPI3		IBRV		BVDV-1		BVDV-2		BAdV-7		分離 BAdV	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
No. 1	<2	<2	640	640	8	8	<2	<2	<2	<2	4	2	<2	<2	<2	256*
No. 2	8	4	640	320	32	64	8	4	64	64	64	64	32	16	<2	128*
No. 3	64	16	320	160	≥ 256	≥ 256	4	2	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	128	64	128
No. 4	128	128	640	320	≥ 256	128	<2	<2	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	8	64*
No. 5	<2	<2	1,280	320	8	16	4	<2	<2	<2	2	2	<2	<2	8	64*
No. 6	<2	<2	10	<10	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	128*
No. 7	<2	<2	640	320	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	16	64*

* : 有意な抗体価上昇, Pre: プレ血清 (2019.2.26 採材, No. 7のみ 2019.3.4 採材), Post: ポスト血清 (2019.3.28 採材)
 キャトルウィン-6 接種歴: No. 1~5: 2018.10.29, No. 6: 2019.3.6, No. 7: 未接種

表4 A農場及び周辺農場における牛のBAdV-2抗体保有状況

農場	採材年月	検査頭数	陽性頭数	抗体保有率 (%)	抗体価ごとの頭数										GM 値	
					<2	2	4	8	16	32	64	128	≥ 256			
A	2017.5	64	41	64.1	23	7	13	11	10							3.2
B	〃	31	30	96.8	1	1	6	11	9	3						8.7
C	2017.6	40	29	72.5	11		7	5	5	4	3	1	4		8.9	
D	〃	20	19	95.0	1	2	3	8	5	1					7.2	
E	2017.11	80	78	97.5	2	1	13	41	17	4	2				8.7	
F	2017.12	27	12	44.4	15	4	2	4	1	1					2.1	
G	2018.5	107	104	97.2	3	4	15	50	28	5	2				8.6	
H	2018.6	26	26	100			6	12	7		1				8.9	
I	〃	33	25	75.8	8	3	5	13	2	2					4.4	
J	〃	47	46	97.9	1	3	14	17	9	3					7.1	
K	2019.4	28	20	71.4	8	4	8	6	1	1					3.2	
L	2019.5	41	41	100		1	3	12	13	12					13.7	
M	〃	22	18	81.8	4	4	1	5	4	4					6.0	
N	2019.6	33	27	81.8	6	6	10	8	2	1					3.8	
計		599	516	86.1	83	40	106	203	113	41	8	1	4		6.41	

で、接種後3~8日目に鼻汁排出と努力性呼吸が、11~14日目に血中抗体価の陽転がそれぞれ認められた。しかし、本事例で確認された発熱、発咳、下痢、結膜充血などの症状については記述されていない。本事例の原因となったBAdV-2株は呼吸器病に関連するという点で過去の報告と共通するが、成牛にも感染、発症し、重症化していることから過去に報告のあるBAdV-2株より病原性が強い可能性が考えられる。呼吸器症状を呈していたにもかかわらず、ウイルスの検出もしくは分離が糞便からのみだったことから、糞便中のウイルス排出量が多く感染拡大の主要因となった可能性も考えられるが、正確な病原性確認のためにはさらなる感染試験等が必要である。

ウイルスの侵入経路については、立入検査時の稟告で外部導入牛が疑われたが、導入元の農場において呼吸器病等の発生は認められない。むしろ外部導入されたウイルス感受性の高い牛が、A農場に常在化していたBAdV-2に感染して発症し、環境中へのウイルス排泄量が上昇したことで、抗体価の低い同居牛へも感染拡大

したのではないかと推測している。導入牛の抗体価上昇が同居感染牛に先行しているのはこのためではないかと推察されるが、これらを証明するための検査材料が採取されておらず、詳細な時系列解析はできない。一方、浸潤状況調査ではA農場を含む14農場すべてでBAdV-2に対する中和抗体が検出され、少なくとも2017年以降BAdV-2が周辺地域に広く浸潤していることが明らかとなった。これら流行地域へ牛を導入する、もしくは流行地域から牛を移動させる際には、呼吸器及び消化器病の発生リスクを考慮する必要がある。

本論文は、国内初のBAdV-2感染及び分離報告となる。世界的にも1960年米国での初分離以降 [5], BAdV-2の分離報告が少なく情報が限定されている。BAdV-2の家畜衛生上の重要性を明らかにするため、今後、分離されたウイルスの性状解析、病原性解明、BAdV-2の流行実態調査を進める必要がある。

引用文献

[1] 今内 覚: アデノウイルス病, 動物の感染症, 明石博臣,

- 内田郁夫, 大橋和彦, 後藤義孝, 須永藤子, 高井伸二, 宝達 勉編, 第四版, 95-96, 近代出版, 東京 (2019)
- [2] 山下秀之, 原 元宣, 野田雅博, 千田広文, 中西英三: 急性の呼吸器・下痢症状を呈した牛からの牛アデノウィルス3型の分離, 日獣会誌, 39, 774-780 (1986)
- [3] Tanaka Y, Inaba Y, Ito Y, Omori T, Matumoto M: Bovine Adenovirus. I. Recovery of a serotype, Nagano, from Japanese cattle, Jpn J Microbiol, 12, 77-95 (1968)
- [4] Matumoto M, Inaba Y, Tanaka Y, Sato K, Ito H, Omori T: New serotype 7 of bovine adenovirus, Jpn J Microbiol, 14, 430-431 (1970)
- [5] Klein M, Zellat J, Michaelson TC: A new bovine adenovirus related to human adenovirus, P Soc Exp Biol Med, 105, 340-342 (1960)
- [6] Rusvai M, Glavits R, Kucsera L, Belak S: Experimental infection of weaned calves and lambs with two strains of bovine adenovirus type 2, Zbl vet Med B, 40, 148-154 (1993)
- [7] Valarcher JF, Schelcher F, Bourhy H: Evolution of bovine respiratory syncytial virus, J virol, 74, 10714-10728 (2000)
- [8] 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)
- [9] Mglguer de Motes C, Clemente-Casares P, Hundesa A, Martín M, Girones R: Detection of bovine and porcine adenoviruses for tracing the source of fecal contamination, Appl Environ Microb, 70, 1448-1454 (2004)
- [10] Kamiyoshi T, Murakami K, Konishi M, Izumi Y, Sentsui H: The presence of a deletion sequence in the BHV-1 UL49 homolog in a live attenuated vaccine for infectious bovine rhinotracheitis (IBR), Vaccine, 26, 477-485 (2008)
- [11] Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ: Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis, Arch Virol, 136, 309-323 (1994)

Epidemic of Bovine Adenovirus type 2 Associated with Respiratory and Digestive Signs in Dairy Cattle

Naoki KUBOTA^{1)†}, Sho ORIHARA¹⁾, Takuhiro KIRA¹⁾ and Shinichi HATAMA²⁾

1) *Chutan Livestock Hygiene Service Center, 371-2 Handa, Fukuchiyama, 620-0954, Japan*

2) *National Institute of Animal Health, National Agricultural and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*

SUMMARY

Respiratory and digestive disorders, including anorexia, pyrexia, coughing, and diarrhea, were observed in most cattle on a dairy farm in Kyoto, Japan. Bovine adenovirus-specific genes were detected by PCR and bovine adenovirus type 2 (BAdV-2) was isolated from the feces of several animals. A significant increase of BAdV-2 antibody titers was confirmed with a virus neutralization (VN) test using paired sera, suggesting the association of the virus with the clinical signs. A BAdV-2 seroepidemiological survey was conducted using 599 archive serum samples collected from cattle from surrounding farms in the previous 3 years. BAdV-2 VN titers were detected in 516 samples (86%). These results suggest that BAdV-2 is indigenous and widely spread in cattle in the region where the survey was conducted.

— Key words : bovine adenovirus, respiratory syndrome, serotype 2.

† *Correspondence to : Naoki KUBOTA (Chutan Livestock Hygiene Service Center)*

371-2 Handa, Fukuchiyama, 620-0954, Japan

TEL 0773-25-1860 FAX 0773-25-1861 E-mail : n-kubota38@pref.kyoto.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 73, 577 ~ 581 (2020)