

3 管内 2 酪農場における牛コロナウイルスが関与した疾病の流行について

後志家畜保健衛生所

○村松 美笑子 美濃 絵梨佳
長尾 賢¹⁾

¹⁾ 現上川家畜保健衛生所

はじめに

牛コロナウイルス（BCoV）は、牛の呼吸器及び消化器に感染し、成牛では主に冬季に、子牛では年間を通して下痢を引き起こし、輸送熱や牛呼吸器病症候群（BRDC）にも関与することが知られている[1-3]。今回、令和 2 年 10 月下旬から 12 月上旬までの間に、管内 2 酪農場で BCoV が関与したと考えられる疾病が流行したことから、その発生状況について報告する。

I 発生の概要

1 A 農場

(1) 農場概要

乳用牛約 150 頭を飼養する酪農場で、成牛及び哺乳子牛はスタンション形式の搾乳牛舎及び乾乳牛舎で、育成牛は育成牛舎で飼養されている。預託及び公共牧野の利用はなく、5 年以上外部から牛の導入はなかったが、令和 2 年 10 月中旬に初妊牛 20 頭を道内から導入した。これまでに当該農場で呼吸器症状等が大きな問題になったことはなく、呼吸器病等のワクチン接種は実施していなかった。

(2) 発生状況

10 月下旬から搾乳牛が水様下痢と呼吸器症状を呈し始め、10 月 26 日に搾乳牛 1 頭が死亡、10 月 28 日には搾乳牛群 55 頭のほとんどが発熱し、10 月 29 日に妊娠 8 カ月の乾乳牛 1 頭が流産、搾乳牛 3 頭が死亡した。10 月 30 日には 4 カ月齢の育成牛 1 頭が下痢・呼吸器症状を呈し起立不能となり、11 月 2 日には 10 月 28 日から呼吸器症状を呈し起立困難となり、呼吸器病原因検索を実施した 3 頭の内 1 頭が死亡した。死亡牛 5 頭はいずれも重度の肺炎症状を呈していた。

この疾病の流行を受け、下痢原因検索、異常産原因検索、呼吸器病原因検索、子牛の下痢・呼吸器病原因検索、搾乳牛 1 頭の死亡原因検索の、計 5 件 9 頭の病性鑑定を実施した。

2 B 農場

(1) 農場概要

乳用牛約 150 頭を飼養する酪農場で、牛舎はタイストール形式の搾乳牛舎と乾乳牛舎からなり、子牛は搾乳牛舎の一角で飼養されていた。夏季は公共牧野を利用し、毎年 5 月に飼養牛全頭に呼吸器病 6 種混合不活化ワクチンを接種している。

(2) 発生状況

令和 2 年 11 月下旬から搾乳牛群で下痢が流行し、12 月 1 日に下痢原因検索の病性鑑定を実施した。12 月 4 日に 13 日齢の哺乳子牛と 12 月 7 日に 10 日齢の哺乳子牛が相次いで死亡したことから、死亡原因検索のため病性鑑定を実施した。

なお、飼養者から、子牛は頻繁に下痢をしている旨の稟告があった。

II 病性鑑定結果

1 A農場

(1) 下痢原因検索

搾乳牛 4 頭の糞便について検索を行い、全検体で BCoV 遺伝子を検出した。細菌検査等は全て陰性であった（表 1）。

(2) 異常産原因検索

流産牛の鼻汁及び糞便から BCoV 遺伝子を検出した。その他の呼吸器病ウイルス遺伝子検査及びウイルス分離は陰性であった（表 1）が、牛 RS ウイルス（BRSV）中和抗体価が有意に上昇した。BCoV 中和抗体価は前・後血清とも 64 倍で、有意上昇は認められなかった（表 2）。有意菌分離は陰性であった（表 1）。胎子の解剖学的所見では皮下膠様浸潤、暗赤色心のう水、胸水及び腹水の貯留、胸腔及び腹腔内臓器の暗赤色化と水腫等を認めたが、病原体の検出には至らず、病理組織学的検査においても感染症を疑う所見は得られなかった。

(3) 呼吸器病原因検索

検索した搾乳牛 3 頭の鼻汁全検体から BCoV 遺伝子を検出し、2 検体から BCoV を分離した。その他の呼吸器病ウイルス遺伝子検査、有意菌分離は全て陰性であった（表 1）。ウイルス抗体検査では 2 頭で BCoV 抗体の有意上昇を確認、他 1 頭は後血清を採材する前に死亡した（表 2）。

(4) 下痢・呼吸器病原因検索

4 カ月齢子牛の鼻汁及び糞便から BCoV 遺伝子を検出し、ウイルス分離は陰性だった（表 1）。ウイルス抗体検査では BCoV 中和抗体価が有意に上昇した（表 2）。

(5) 死亡原因検索

解剖学的所見では、肺は胸腔壁及び肺葉間で癒着し、表面に暗赤色の結節が多数形成され、内部には散発的な膿瘍形成を認めた。回腸及び盲腸には暗赤色化を認めた。ウイルス学的検査では肺病変部で BCoV 遺伝子を検出したが、コンベンショナル RT-PCR で僅かにバンドが認められる程度の弱陽性であった。細菌学的検査では、肺病変部から *Trueperella pyogenes* 及び *Mycoplasma bovis* を有意に分離した。

病理組織学的検査では、肺の結合組織の増生、リンパ球浸潤、膿瘍形成等を認め、やや慢性の化膿性肺炎を呈していた。一部で大きな壊死巣が見られ、壊死巣周辺の好中

表 1 A農場 病性鑑定結果一覧（ウイルス抗体検査以外）

検査目的	個体	年齢	検体	ウイルス遺伝子						ウイルス分離	有意菌分離	その他
				BCoV	BVDV	BRSV	IBR	PI3	A・B・C群ロタ			
下痢	1	3歳	糞便	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	サルモネラ属菌 クロストリジウム属菌 消化管内線虫 コクシジウムオーシスト 全検体-
	2	3歳	糞便	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
	3	3歳	糞便	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
	4	5歳	糞便	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
異常産	5	3歳	鼻汁	+	-	-	-	-	NT	-	-	ネオスポラ抗体 - ブルセラ抗体 -
		胎齢 259日	血清	+	-	-	-	-	NT	-	-	
		糞便	+	NT	NT	NT	NT	NT	-	NT	-	
呼吸器	6	4歳	鼻汁	+	-	-	-	-	NT	BCoV	-	
			鼻汁	+	-	-	-	-	NT	-	-	
			鼻汁	+	-	-	-	-	NT	BCoV	-	
死亡	8	4歳	臓器	肺のみ弱+	NT	-	-	-	NT	-	<i>Trueperella pyogenes</i> <i>Mycoplasma bovis</i>	肺病変部から <i>M. haemolytica</i> 遺伝子及び抗原検出
子牛呼吸器・下痢	9	4カ月	鼻汁	+	-	-	-	-	NT	-	NT	
			糞便	+	NT	NT	NT	NT	-	-	NT	

BCoV：牛コロナウイルス、BVDV：牛ウイルス性下痢ウイルス、BRSV：牛RSウイルス、IBR：牛伝染性鼻気管炎ウイルス、PI3：牛パラインフルエンザウイルス3型

＋：陽性（検出又は分離）、－：陰性（検出限界以下又は分離陰性）、NT：検査実施せず

球は燕麦細胞様を呈し、マンヘミア肺炎で見られる病変と類似していた。免疫染色によ

り肺の病変に一致して *Mannheimia haemolytica* 抗原を検出、また肺のパラフィン切片から *M. haemolytica* 遺伝子を検出した。腸管

では大腸粘膜の一部に陰窩の拡張と上皮細胞の壊死を認め、BCoV による病変に類似していたことから免疫染色を実施したが、抗原は検出されなかった。

2 B 農場

(1) 下痢原因検索

検索した搾乳牛 2 頭の糞便全検体から BCoV 遺伝子を検出した。

(2) 死亡原因検査① 12月4日死亡、13日齢

剖検時、臀部に黄白色の下痢便付着を認め、脱水が顕著であった。解剖学的所見では、肺の前葉から中葉に赤色化、肝臓に一部退色、第四胃粘膜及び小腸の一部に赤色化を認めた。ウイルス学的検査では気管スワブ、肺、直腸便で BCoV 遺伝子を検出した。その他、気管スワブ及び肺乳剤で BRSV 遺伝子検査を、直腸便で A 群ロタウイルス抗原検査を実施するも陰性であった。細菌学的検査では五大臓器、糞便等から有意菌は分離されず、寄生虫学的検査で直腸便からクリプトスポリジウムを鏡検にて検出した。病理組織学的検査では、気管から気管支の粘膜上皮細胞に変性・壊死を確認。また脳、五大臓器、消化管などの各所に血栓形成を認めた。

(3) 死亡原因検査② 12月7日死亡、10日齢

剖検時、臀部に下痢便付着を認めた。解剖学的所見では、肺の前葉から中葉に赤色化を認め、右肺はモザイク様に赤色化していた。肝臓及び腎臓は一部退色し、第四胃及び一部空腸粘膜に赤色化を認めた。ウイルス学的検査では気管スワブ、肺、結腸粘膜で BCoV 遺伝子を検出した。気管スワブ、肺乳剤で牛 RS ウイルス遺伝子検査を、直腸便で A 群ロタウイルス抗原検査を実施するも陰性であった。細菌学的検査では五大臓器及び糞便等からの有意菌分離は陰性で、寄生虫学的検査で直腸便からクリプトスポリジウムをイムノクロマト

グラフ法で検出した。病理組織学的検査で各種臓器に血栓形成を認め、気管及び気管支の粘膜上皮細胞の変性・壊死、結腸陰窩上皮細胞の脱落・壊死を認め、これらの病変に一致して免疫染色で BCoV 抗原を検出した（図 1-2、矢頭）。

表 2 A 農場 病性鑑定結果一覧（ウイルス抗体検査）

病鑑目的	個体	年齢	材料	BCoV	BVDV1	BVDV2	BRSV	IBR	PI3
異常産	5	3歳	前血清	64	<2	<2	4	<1	256
			後血清	64	<2	<2	16	<1	256
呼吸器	6	4歳	前血清	2	<2	<2	<2	<1	512
			後血清	32	<2	<2	2	<1	256
	7	4歳	前血清	2	<2	<2	<2	<1	1024
			後血清	128	<2	<2	2	<1	1024
呼吸器・死亡	8	4歳	前血清	4	<2	<2	<2	<1	128
下痢・呼吸器（子牛）	9	4カ月	前血清	8	<2	<2	8	<1	4
			後血清	64	<2	<2	<2	<1	<2

表中の数字はウイルス増殖を抑えた血清の最高希釈倍数

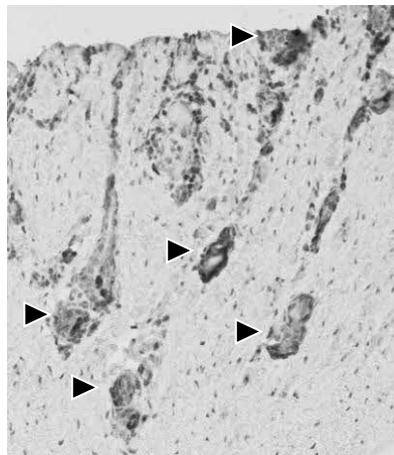


図 1 気管粘膜（免疫染色）

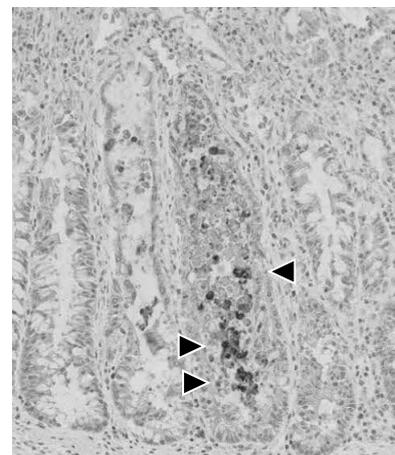


図 2 結腸粘膜（免疫染色）

III 対策

A農場では、作業着、長靴等の頻回洗浄及び消毒、育成牛舎との間での手指の消毒又は手袋の交換、育成牛舎での発症牛の隔離など、衛生管理の徹底を指導した。また、哺育・育成牛に呼吸器病弱毒生ワクチンの鼻腔内接種を実施した。その他、毎年の育成期の牛等への呼吸器病ワクチン接種を推奨した。

B農場では、発症牛の隔離、子牛の保温、子牛の飼養環境の消毒、作業着や長靴等の消毒・交換など衛生管理の徹底を指導した。また、非流行群である乾乳牛群に呼吸器病6種混合不活化ワクチンの追加接種を実施した。

IV 疫学調査

2農場における被害が大きかったことから、本流行の要因を考察するため、当該農場及び周辺地域におけるBCoVの浸潤状況を確認し、またBCoVの抗原性の変化の有無、2農場で流行した株の分子疫学的解析、各農場で流行が始まった時期の気温について調査した。

1 当該農場及び周辺地域におけるBCoVの浸潤状況調査：疫学保存血の抗体調査

平成18年以降の疫学保存血清193検体を用い、当該農場を含む周辺農場飼養牛のBCoV抗体保有状況を調査した。その結果、98.4%を占める190検体で中和能を示し、その抗体価は32~4,096倍以上であった。このうちA農場は平成18年、平成23年、平成28年、令和3年の血清計16検体を含み、B農場は平成23年、平成26年の血清計8検体が含まれていたが、全検体でBCoV中和能を確認し、抗体価は64~512倍であった。

2 ウイルス抗原性比較

浸潤状況調査で確認したBCoV中和抗体価64倍以上の血清8検体を用いて、従来中和試験に用いている1976年日本初発事例由来株であるBCoV掛川株と今回A農場の呼吸器病原因検索で分離されたウイルス株(R2後志株)に対する中和能の差を比較した。その結果中和抗体価の差は、8検体中7検体は2倍以下の誤差範囲に収まった。

3 ウイルス遺伝子分子疫学的解析

R2後志株とB農場の病性鑑定で検出されたBCoV遺伝子を用いて、BCoVスパイクタンパク質S遺伝子全長の塩基配列を決定し、このうちpolymorphic regionの分子系統樹解析により遺伝子型別を実施した。BCoVは本解析により4つの遺伝子型に分類される[1, 4-6]が、このうちA農場で流行した株は遺伝子型4に、B農場由来のBCoVは遺伝子型3に分類された(図3)。また、両株間の遺伝子配列の相同性は98.4%であった。なお、本解析は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部門に依頼した。

4 流行地域における気温変化

飼養者の稟告から各農場において下痢症が始まったと考えられる時期、A農場は10月23日または24日、B農場は11月24日前後の各地域の気温を、気象庁ホームページ[8]にて確認したところ、いずれの場合も急激な気温低下が認められた(図4)。

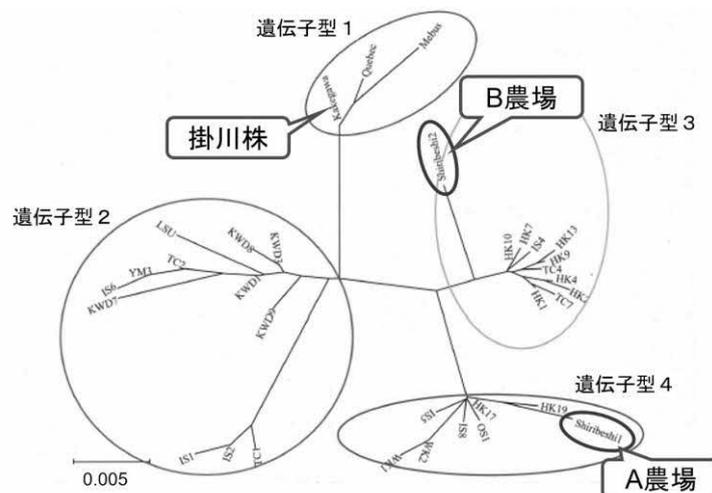


図3 BCoV S遺伝子のpolymorphic regionに関する分子系統樹

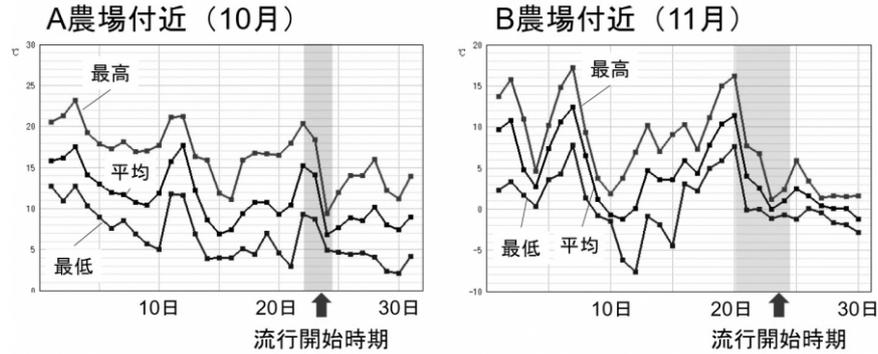


図4 下痢流行開始時の気温

V 考察及びまとめ

1 病性鑑定結果について

A農場及びB農場で実施した全ての病性鑑定においてBCoVが検出され、一連の疾病にBCoVが関与したと考えられた。一過性の下痢症及び呼吸器症状については、全検体でBCoV遺伝子が検出され、一部ではBCoVが分離されており、A農場ではBCoV中和抗体の有意上昇が認められたこと、また数日で牛群全体に広がった発生状況から、BCoVが主要因の一つであると考えられた。

A農場の呼吸器病原因検索の抗体検査においては、前血清のBCoV中和抗体価が全て8倍以下の低値を示したのに対し、無作為に選ばれた当該農場の疫学保存血16検体は全て中和抗体価64倍以上であった。過去の報告では、赤血球凝集抑制試験におけるBCoV抗体価が20倍未満の牛で呼吸器病の治療を要するリスクが高くなることが示されており[3]、抗体価の低い個体で呼吸器症状を呈した可能性が示唆された。またパラインフルエンザウイルス3型(PI3)中和抗体価の高値を認め、A農場では本流行以前にPI3感染症が流行したと考えられた。

A農場の異常産原因検索においては、BRSV抗体価の有意上昇が認められ、BCoVに対しては64倍の中和抗体価を示し有意上昇は認められなかったが、流産当日の検査で母牛の糞便及び鼻汁からBCoV遺伝子が検出されており、母体の全身状態の悪化に関与していた可能性は否定できない。

A農場における成牛の死亡については、直接的な原因はBRDCと考えられた。過去の報告では、BCoV感染が関与するBRDCで早ければ5日で死亡し、感染後9日目以降の死亡牛では臓器からBCoVの分離は出来なかったことが示されている[3]。本牛は、起立困難となった翌日の検査で鼻汁からBCoV遺伝子が検出され、かつBCoVが分離されたこと、発症から急性経過を辿り4日後に死亡していることから、BCoV感染がBRDCの引き金となった可能性あるいは増悪因子となった可能性がある。当該農場で死亡した他4頭も同様の肺炎症状を呈しており、BCoV感染による全身状態の悪化の後、二次感染等により重症化した可能性がある。

B農場の子牛の死亡原因については、BCoV及びクリプトスポリジウムが確認されたこと、病理組織学的検査においてBCoV抗原が確認されたことから、BCoV感染が主要因と推察された。

なお、BCoV感染による下痢症の重症例で死亡する機序については、下痢症から脱水、アシドーシスと低血糖状態に至り、ショック状態と心不全によって死亡するのではないかと推察されている[9]。飼養者の稟告から、B農場では子牛の下痢症が常態化していると考えられ、クリプトスポリジウム等による複合感染の影響も大きいものと推察された。

2 流行の要因について

当該農場及び周辺地域のBCoV浸潤状況調査の結果から、両農場ともBCoV抗体を群としては保有していたと考えられた。今回流行したBCoVの抗原性に大きな差は認めら

れず、2農場ではそれぞれ異なる株が流行していた。過去の報告では、一度感染した牛が回復後も長期的間欠的にウイルスを排出し続けることが確認され、持続感染牛の存在が示唆されており[7]、今回の流行は、各牛群で維持されていたウイルス株によるものと考えられた。また各農場で下痢が始まった時期に急激な気温低下があったことから、気温低下等のストレスによる免疫低下に伴って発症後、群全体に疾病が流行し、他のウイルス呼吸器病の関与や二次感染等により様々な病態を引き起こしたと考えられた。

3 対策について

今回の流行では、2農場とも成牛群で下痢が流行した後、子牛の群への波及が認められた。A農場では二次感染等による成牛の病態悪化が顕著であったが、本流行前のPI3感染症の流行も示唆され、ワクチン未接種であることが影響した可能性がある。B農場での子牛の死亡については、複合感染の影響及び子牛の保温管理が不十分であったことも重篤化の原因になったと考えられた。

以上のことから、より重篤な病態につながりやすい子牛を守るためには、成牛と子牛の飼養区画を分けて子牛を守ること、特に疾病が流行している時期には飼養区画毎に長靴等を交換又は消毒し、まめに手指を消毒するなど衛生管理を徹底することが重要であると考えられた。複合感染及び二次感染等による重症化防止のためには、育成期等のワクチン接種による牛群への免疫賦与などが重要であると考えられた。本疾病流行の発端と考えられる下痢症の対策としては、気温の急激な低下などの環境変化に対し、事前に敷料を増加するなどして対応することも有効であると考えられた。

稿を終えるにあたり、本発表において検査に御協力をいただきました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部門 鈴木亨先生、また日頃から生産現場において家畜衛生に尽力され、本件においても農場の指導等に御協力いただいたみなみ北海道農業共済組合後志支所の皆様に深謝いたします。

引用文献

- [1] 菅野徹、石原涼子、畠間真一、内田郁夫、山岸麻衣子、石川義春、門田耕一：牛コロナウイルス国内流行株の抗原性比較解析と病原性試験、動衛研研究報告、117、19-25 (2011)
- [2] Saif LJ : Bovine respiratory coronavirus, *Vet Clin Food Anim*, 26, 349-364(2010)
- [3] Storz J, Lin X, Purdy CW, Chouljenko VN, Kousoulas KG, Enright FM, Gilmore WC, Briggs RE, Loan RW : Coronavirus and *Pasteurella* infections in bovine shipping fever pneumonia and Evans' Criteria for causation, *J Clin Microbiol*, 38(9), 3291-3298(2000)
- [4] Kanno T, Kamiyoshi T, Ishihara R, Hatama S, Uchida I : Phylogenetic studies of bovine coronaviruses isolated in Japan, *J Vet Med Sci* 71(1), 83-86(2009)
- [5] Mekata H, Hamabe S, Sudaryatma PE, Kobayashi I, Kanno T, Okabayashi T : Molecular epidemiological survey and phylogenetic analysis of bovine respiratory coronavirus in Japan from 2016 to 2018, *J Vet Med Sci*, 82(6), 726-730(2020)
- [6] Kanno T, Ishihara R, Hatama S, Uchida I : Antigenic variation among recent Japanese isolates of bovine coronaviruses belonging to phylogenetically distinct genetic groups, *Arch Virol*, 158, 1047-1053(2013)
- [7] Kanno T, Ishihara R, Hatama S, Uchida I : A long-term animal experiment indicating persistent infection of bovine coronavirus in cattle, *J Vet Med Sci*, 80(7), 1134-1137(2018)
- [8] 気象庁ホームページ (過去の気象データ検索)
<http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>
- [9] Clark MA : Bovine coronavirus, *Br Vet J*, 149, 51-70(1993)