

黒毛和種肥育牛に見られた牛ライノウイルス感染症

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	永野, 博明 向原, 要一 前田, 隆道
巻/号	42巻3号
掲載ページ	p. 166-170
発行年月	1989年3月

黒毛和種肥育牛に見られた牛ライノウイルス感染症

永野博明*¹⁾ 向原要一*¹⁾ 前田隆道*¹⁾ 筒井泰司*¹⁾ 高本一義*²⁾ 佐々木正憲*²⁾

(平成元年 1 月 20 日受理)

Bovine Rhinovirus Infection in Japanese Black Cattle

HIROAKI NAGANO (Nagasaki Prefectural Chuo Livestock Hygiene Service Center,
Kaizu-Cho, Isahaya-Shi, Nagasaki-ken 854), YOICHI MUKAIBARA,
TAKAMICHI MAEDA, YASUJI TSUTSUI, KAZUYOSHI TAKAMOTO and MASANORI SASAKI

SUMMARY

There was an outbreak of an acute respiratory disease in cattle in Nagasaki Prefecture in March, 1987. The 45 cattle, all from different places in Nagasaki Prefecture from outside of the prefecture, involved in the outbreak showed fever, coughing, nasal discharge, labored breathing and diarrhea five days after they were introduced and five of them died.

Pasteurella haemolytica was isolated from six nasal swab specimens in seven ill cattle (85.7%). Mycoplasma SP. was isolated from two of seven specimens (28.6%). Two cytopathogenic virus strains were isolated in MDBK cell cultures from nasal swabs of cattle with marked leukopenia.

The isolants were readily inactivated by acid and heating at 50°C for 30 minutes, but they resisted chloroform. The type of their nucleic acid was determined to be RNA. Immunoelectron microscopy using convalescent serum revealed picornavirus-like particles in cultured material.

The isolants were neutralized with antiserum against the Sd-1 strain of bovine rhinovirus type 1.

A significant rise in antibody titer was shown against the isolants in convalescent serum of the ill cattle, but not against bovine respiratory syncytial virus, bovine adenovirus type 7, or bovine enterovirus. A small rise in antibody titer against bovine herpesvirus type 1, parainfluenza virus type 3 and bovine viral diarrhea mucosal disease virus, was shown. It is considered, however, that such a sero-conversion may be due to vaccination of combined vaccine against these viral agents.

Serologic survey against the isolated virus in sera collected from 195 cattle in 1987 in Nagasaki Prefecture revealed that 73.5% of those over one year old were antibody positive, while 29.9% of those from four to 10 months old particularly have a tendency to show a low positive rate.

—————*J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 42, 166~170 (1989).

要 約

1987年3月に、長崎県下の黒毛和種肥育農家において、県内から導入された45頭全頭が、導入後5日目から発熱、咳、鼻汁、呼吸困難を呈し、このうち5頭が死亡した。

発症牛7頭中6頭(85.7%)の鼻汁から*P. haemolytica*、2頭(28.6%)の鼻汁からMycoplasma sp. がそれぞれ分離された。さらに、白赤球数の減少の著明であった2頭(28.6%)の鼻汁からMDBK細胞に細胞変性効果を示す2株のウイルスを分離した。

分離ウイルスは核酸がRNA型で、理化学的性状、電子顕微鏡による観察結果および牛ライノウイルス1型(Sd-1株)の免疫血清で完全に中和されたことから牛ライノウイルス1型と同定された。

発症牛から採材したペア血清において、RS、エンテロ、アデノ-7型の各ウイルスに対する有意の抗体の動きは認められなかったが、分離ウイルスに対する抗体価は回復期血清において顕著に上昇していた。牛ヘルペスウイルス1型、パラインフルエンザウイルス3型、牛ウイルス性下痢・粘膜病ウイルスに対しても若干の抗体価の上昇があつたが、これは導入時の3種混合ワクチン接種によるものと思われる。

*¹⁾ 長崎県中央家畜保健衛生所(諫早市貝津町3118)

*²⁾ 長崎県北家畜保健衛生所(佐世保市竹辺町92)

Key Words: 牛ライノウイルス, 黒毛和種, 呼吸器病.

県内飼育牛 195 頭の血清について分離ウイルスに対する抗体の保有状況を見たところ 4~10 カ月齢では低い陽性率 (29.9%) を示し, 1 歳以上の牛では高い陽性率 (73.5%) が得られ, 県内に広く浸潤していることがわかった。

日本では, 清水ら⁵⁾, 黒木ら²⁾および山下ら^{6,7)}が, 呼吸器症状を示した病牛の鼻汁から牛ライノウイルス (BRV) を分離している。

今回, 著者らもウイルス性の呼吸器病と思われる黒毛和種肥育牛の症例から, BRV を分離した。さらに, 血液検査成績, 発病牛の前後血清における抗体検査成績から同ウイルスによる呼吸器病と診断した。また, 長崎県における同ウイルスの浸潤状況も調査したので, あわせて概要を報告する。

1. 材料および方法

1) ウイルスおよび細菌分離材料

滅菌綿棒を鼻腔内に挿入して鼻汁を採取し, 細菌およびマイコプラズマの分離用材料は普通ブイヨンに, また, ウイルス分離用材料は細胞維持培地に採材した。

2) 血清

昭和 62 年 3 月 26 日に発症時の採血を行い, これを前血清とし, 4 月 15 日に後血清として同一牛から再度採血した。また, 同年 4~10 月の間の期間に採血した県内飼育牛 195 頭の血清について, 浸潤状況を調査した。血清は使用時まで -20°C に保存された。

3) 血液学的検査

白血球数, 赤血球数は血球計算盤法, 血球容積はミクロヘマトクリット法, 血清総蛋白質は日立の血清蛋白計で測定した。

4) 細菌学的検査

細菌は, 5% 馬血液加ハートインフュージョン寒天で, 37°C 48 時間, 好気, 嫌気 (ガスバック法) 培養を, マイコプラズマは, ハイフリック培地およびウレアプラズマ鑑別用培地で微好気 (ローソク培養法) 培養を行った。

5) 薬剤感受性試験

一濃度ディスク (昭和) を用い, ハートインフュージョン寒天培地で実施した。

6) ウイルス学的検査

細胞培養: MDBK 細胞, Vero 細胞および BEK-1 細胞を用いた。増殖培地はトリプトースフォスフェートプロス 10%, 牛胎子血清 10%, 7.5% NaHCO_3 1% および抗生物質を含んだイーグル MEM を使用した。細胞維持液は GIT 培地を用いた。

使用ウイルス: 牛 RS ウイルス (BRSV) の NMK-7 株, 牛ヘルペスウイルス 1 型 (BHV-1) の 758 株, 牛ウイルス性下痢・粘膜病ウイルス (BVD-MDV) の Tokachi 株および牛エンテロウイルス (BEV) の 8510 株を使用した。

感染価の測定: ウイルス材料を GIT 培地で 10 倍階段希釈し, それぞれの希釈材料を 4 本の培養細胞試験管に接種し, 34°C で 7 日間培養し, CPE の出現を観察して, TCID_{50} を算出した。

中和試験: 常法に従って血清希釈法により実施した。BRSV は Vero 細胞, BVD-MDV は BEK 1 細胞を用い試験管法で, BHV-1 および BEV は MDBK 細胞とマイクロプレートを用いて同時接種法により行った。

赤血球凝集抑制試験: 市販のパラインフルエンザウイルス 3 型 (PIV-3) および牛アデノウイルス 7 型 (BADV-7) 抗原 (微生物化学研究所) を用い実施した。

免疫電子顕微鏡法による観察: ALMEIDA と WATERSON¹⁾ の方法に準じて行った。すなわち, MDBK 細胞に分離ウイルスを接種し, 接種後 3 日目に CPE が 70% 程度見られたとき, 培養液と細胞をハーベストして, 凍結融解を 3 回繰り返した。次に $3,000\text{ rpm}$ で 5 分間遠心した上清をさらに $38,000\text{ rpm}$ で 120 分間遠心した。沈渣を少量の PBS^- に浮遊し, エッペンドルフの微量遠心管に入れ, No. 7 の牛の後血清を PBS^- で 4 倍に希釈したものを同量入れ混合し 37°C で 1 時間, さらに 4°C 1 夜反応させた。その後, $15,000\text{ rpm}$ で 30 分遠心して, その沈渣を 1 滴の蒸留水に再浮遊した後, 2% リンタングステン酸で陰性染色し, 日本電子の 1,200 EX-1 で観察した。

2. 成績

1) 発生概況

黒毛和種肥育牛 500 頭を飼養する農家で, 10 カ月齢前後の子牛を昭和 62 年 3 月 4 日に 15 頭, 3 月 5 日に 15 頭, 3 月 15 日に 15 頭, 計 45 頭を導入したところ, 導入後 5 日目から鼻汁, 下痢および呼吸困難を主徴とする疾病が発生した。カナマイシン, アンピシリンなどの抗生物質で治療されたが, 症状は軽減せず, 3 月 14 日に 2 頭, 3 月 25 日に 2 頭, さらに 3 月 27 日に 1 頭が死亡した。17 カ月齢以上の同居牛には異常は認められなかった。

発症した導入牛は, いずれも 4~6 カ月齢時に牛伝染性鼻気管炎 (IBR) ワクチンを接種されており, 導入直後に IBR, PI-3, BVD-MD の 3 種混合ワクチンを接種されていた。

発症牛 7 頭について病性鑑定を行った。

2) 血液検査成績

3 月 26 日に採材した血液の血液検査成績は表 1 のとおりである。白血球数は $1,700\sim 7,500$ 個/ mm^3 の範囲

にあり、白血球の減少が顕著であった。

3) 病原検索成績

全例の鼻汁から、*Pasteurella haemolytica* が分離された。No. 6, 7 の鼻汁からはハイフリック培地でマイコプラズマが分離されたが、ウレアプラズマ鑑別用培地では分離されなかった。さらに、MDBK 細胞において2株のウイルスが分離された。

2株の分離ウイルス(62 Nagasaki-1 株, 62 Nagasaki-2 株)は、いずれも MDBK 細胞に初代で接種後2~3日目頃より、円形、顆粒状のCPEを示した。分離ウイルスは、IUDR では増殖を抑制されず、クロロホルム処理による感染価の低下も認められなかったが、pH 4.0 によって完全に不活化された。また、1モルのMgCl₂あ

るいは生理食塩液存在下において、50℃ 30分の加熱処理により完全に不活化された(表2)。0.05μmのメンブランフィルターで濾過しても著明な感染価の低下は認められなかった。さらに、免疫電子顕微鏡法による観察では、直径約25nmのウイルス粒子の集塊が確認された(写真1)。

4) 薬剤感受性試験成績

P. haemolytica の薬剤感受性試験の結果、アンピシリン、カナマイシン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、チアンフェニコールに感受性であった。

5) 分離ウイルスの血清学的性状

分離株 62 Nagasaki-1 (62 N-1) と 62 Nagasaki-2 (62 N-2) は BRV-1 型の免疫血清で中和された(表3)。

表1 発症牛の血液検査成績

牛番号	白血球数 (個/mm ³)	赤血球数 (万個/mm ³)	血球容積 (%)	血清総蛋白 (g/dl)
1	5,400	895	46	7.6
2	3,600	850	40	8.0
3	7,500	840	43	7.0
4	4,500	680	40	6.8
5	3,600	920	53	6.3
6	2,600	770	36	7.8
7	1,700	610	31	7.4

表2 分離株の物理・化学的性状

処 理 法	ウ イ ル ス		対 照 ウ イ ル ス	
	62Nagasaki-1	62Nagasaki-2	BHV-1	BEV
IUDR	3.5* (3.5)**	3.5 (3.5)	1.0 (6.5)	4.5 (5.5)
クロロホルム (10%)	3.5 (3.5)	3.5 (3.5)		4.5 (4.5)
pH 4.0	≦0.5 (3.5)	≦0.5 (3.5)		4.5 (4.5)
50℃ (生理食塩液) 30分加熱	≦0.5 (3.5)	≦0.5 (3.5)		≦0.5 (4.5)
1M MgCl ₂	≦0.5 (3.5)	≦0.5 (3.5)		4.5 (4.5)

注) *: log TCID₅₀/0.1 ml **: () 内は処理前

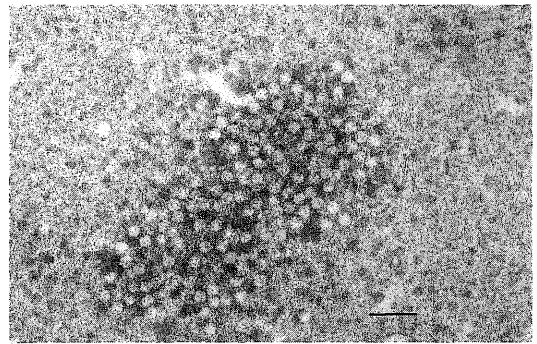


写真1 *スケールは100nm

表3 ウイルス希釈による牛ライノウイルス免疫血清に対する中和試験

ウイルス	免疫血清			
	維持培地	Sd-1	EC-11	
Sd-1 (1型)	4.8*	1.2		**
EC-11 (2型)	2.8	•		≦0.5
62Nagasaki-1***	3.2	≦0.5		2.5
62Nagasaki-2***	2.2	≦0.5		1.8

注) *: log TCID₅₀/0.1 ml **: 実施せず
***: 分離株

表4 発生前後の血清の抗体検査

牛番号	中 和 価										HI 価			
	分離ウイルス		BRSV		BEV		BHV-1		BVD-MDV		PIV-3		BAd-7	
	前*	後**	前	後	前	後	前	後	前	後	前	後	前	後
1	8	64	≧32	32	<1	<1	≧32	≧32	<1	16	160	160	<10	<10
2	64	≧64	2	2	4	1	16	8	<1	32	20	320	<10	<10
3	16	64	8	8	1	<1	32	32	4	16	10	10	<10	<10
4	4	32	<1	8	<1	<1	16	16	<1	8	<10	160	<10	<10
5	16	≧64	16	8	<1	1	16	4	<1	2	80	80	<10	<10
6	4	NT***	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	10	NT	<10	NT
7	2	64	≧32	16	<1	<1	<1	≧32	<1	8	40	80	<10	<10

注) *: 前血清 昭和62年3月26日採材 **: 後血清 昭和62年4月15日採材 ***: 実施せず

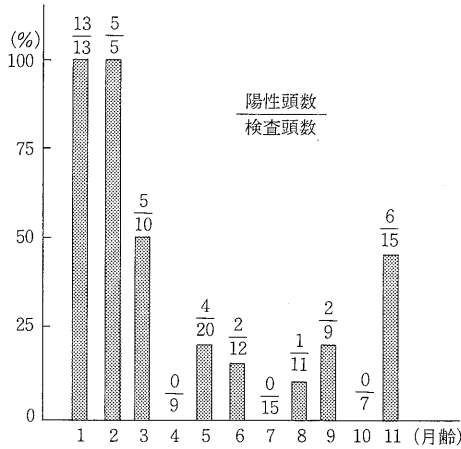


図1 62Nagasaki-1 株に対する月齢別抗体陽性率

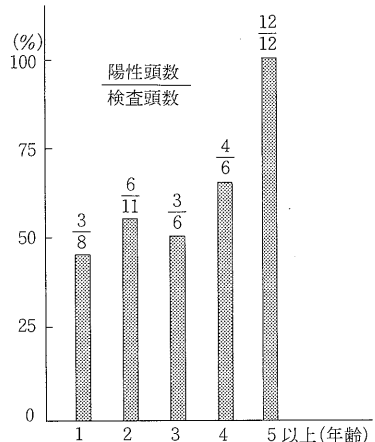


図2 62Nagasaki-1 株に対する年齢別抗体陽性率

表5 長崎県内飼育牛における 62Nagasaki-1 株に対する抗体保有状況

地区名	1歳未満		1歳以上	
長崎市	4/9*	44.4%	6/11	54.5%
大村市	0/14	0	2/5	40.0
五島	14/39	35.9	11/14	78.6
北松浦郡	0/16	0	11/13	84.6
南高来郡	20/35	57.1	18/23	78.3
老岐	0/14	0	2/2	100
計	38/127	29.9	50/63	73.5

注) *: 陽性頭数/検査頭数

6) 62 N-1 株の MDBK 細胞における増殖

34℃においては62 N-1株の増殖は、回転培養で10^{6.0} TCID₅₀/0.1 ml, 静置培養で10^{5.75} TCID₅₀/0.1 ml と両者における差は認められなかった。しかし、37℃静置培養では10^{4.0} TCID₅₀/0.1 ml と力価が低かった。

7) 抗体検査成績

各種ウイルスに対する発症前後の血清の抗体検査成績は表4のとおりである。分離ウイルス(62 N-1)に対しては、6頭中5頭において抗体価の上昇が見られた。また、BHV-1に対しては6頭中1頭、BVD-MDVに対しては6頭中6頭およびPIV-3に対しては6頭中3頭で抗体価の上昇が見られた。いっぽう、BRSV, BEV, BAdV-7に対しては抗体価の上昇は見られなかった。

8) 長崎県内飼育牛における 62 N-1 株に対する抗体の分布

1歳未満は地区別に差がみられたが、県全体では1歳以上に比べ低い陽性率であった(表5)。月齢別に見ると3カ月齢までは陽性率が高く、4~10カ月齢では陽性率がとくに低い傾向にあった(図1)。

1歳以上の牛では、内県一円で高い陽性率を示し、広

く浸潤していた。1歳以上ではあまり差は見られなかったが、5歳以上では全例陽性であった(表5, 図2)。

品種別にみた抗体検査成績では、ホルスタイン種では91頭中40頭(44%), 黒毛和種では104頭中48頭(46.2%), 褐毛和種では6頭中3頭(50%), マリーグレー種では20頭中20頭(100%)の陽性率であった。

3. 考 察

発熱, 鼻汁, 呼吸困難などの呼吸器症状を示す牛の鼻汁2例から2株のウイルスが分離され性状検査の結果からBRV-1型と同定された。

分離ウイルスはこれまでの報告^{2,5,6)}と同様に37℃より34℃の方が増殖はよかった。しかし、清水ら⁵⁾の分離したChitose株は37℃静置培養ではウイルスの増殖がなく、CPEを起ささないが、62 N-1株は37℃静置培養でも若干の増殖が見られCPEを示した。このことは、同じ血清型でも増殖能に差があることを示すものかもしれない。

また、免疫電子顕微鏡法を応用し、分離ウイルスを接種したMDBK細胞上清と後血清を混合感作した結果、直径25 nmの小型のウイルスの凝集のみ観察された。

ROSENQUIST⁴⁾はウイルス分離牛の血清の抗体の動きから、牛の呼吸器病の原因はBRVとしている。BRVを接種された子牛が呼吸器病を発症した例³⁾もある。今回の発生でも、血液検査の結果では白血球数の減少が目立ち、とくにウイルスが分離された2頭は顕著であった。さらに、病牛のペア血清において、分離ウイルスに対し有意な抗体価の上昇が見られ、呼吸器病にBRVが関与したことが強く示唆された。

また、同時に病牛の鼻汁からはマイコプラズマやP. haemolyticaも分離されており、これらが複合して病勢を

悪化させたものと思われるが、分離した *P. haemolytica* はカナマイシン、アンピシリンに感受性であったので、治療に用いた両抗生物質で症状が軽減されなかったことから、病勢はこのウイルスが主であろうと考えられた。

分離ウイルスに対する抗体調査成績から、このウイルスが県内に広く浸潤していること、また4~10カ月齢の子牛の多くは抗体陰性で、この時期に感染する危険が大きいことがわかった。このことは、山下ら⁶⁾の報告による広島県の状況と一致した。

最後に分離ウイルスの血清型別試験を実施していただいた農林水産省家畜衛生試験場の明石博臣博士ならびに、免疫電子顕微鏡法のご指導をいただいた同家畜衛生試験場の村上洋介博士に謝意を表す。

引用文献

- 1) ALMEIDA, J. D. and WATERSON, A. P.: *Adv. Virus Res.*, 15, 307~338 (1969).
- 2) KUROGI, H., et al.: *Arch. Ges. Virusforsch.*, 44, 215~226 (1974).
- 3) MOHANTY, S. B., et al.: *Amer. J. Vet. Res.*, 30, 1105~1111 (1969).
- 4) ROSENQUIST, B. D.: *Amer. J. Vet. Res.*, 32, 685~688 (1971).
- 5) SHIMIZU, Y., et al.: *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.*, 14, 35~41 (1974).
- 6) 山下秀之, ほか: 日獣会誌, 32, 25~30 (1979).
- 7) 山下秀之, ほか: 日獣会誌, 38, 514~520 (1985).

《海外文献要録》

仔牛 1 例の肝臓に寄生したコクシジウム症

Hepatic Coccidiosis in a Calf

J. E. COLLINS, J. P. DUBEY and K. D. ROSSOW: *Vet. Pathol.*, 25, 98~100 (1988).

14 週齢のアンガス×ヘレフォード交雑種の雌仔牛が、2 週間にわたり体重減少、傾眠、食欲不振を示した。病理解剖時、死体は消瘦し(体重 65 kg)、脱水や、肝臓の灰白色斑状の退色領域を伴う腫大が見られた。胆嚢は顕著に膨張し、肝リンパ節は腫大、剖面は水腫性であった。第四胃には毛球があったが、他の消化管には著変はなかった。肝臓、腎臓、胆嚢、肝リンパ節、小腸、心臓を光顕的、電顕的に検索した結果、コクシジウムのメロントが肝内胆管の剝離した、または正常な上皮細胞の細胞質内に観察された。メロントはトリクローム陽性を示し、電顕的に上皮細胞細胞質内の寄生性空胞内にあり、ほぼ成熟したメロゾイトを含んでいた。メロゾイトは2層

の薄膜、円錐小体、ロブトリー、渦巻き状のミトコンドリアとおびただしい短糸を含んでいた。これらの特徴から、このコクシジウムは *Eimeria* 科に属すると推測された。本原虫感染は肝内胆管にかぎられ、その病変はミンクにおける *E. hiepei*、ウサギにおける *E. stiedae* によるものと類似していた。*Eimeria* による腸コクシジウム症は、牛、羊、山羊で最もよく見られる。その中で胆嚢に侵入するものは山羊、羊では知られてはいたが、牛では報告がない。本症例のコクシジウムは、山羊の胆嚢におけるものと類似していたが、有性生殖期の原虫は認められなかった。

(日本獣医師会雑誌編集委員会)