

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

菅野 徹^{1)*}, 石原涼子¹⁾, 畠間真一¹⁾, 内田郁夫¹⁾, 山岸麻衣子²⁾, 石川義春¹⁾, 門田耕一¹⁾

(平成 22 年 7 月 27 日 受付)

Antigenic variation among recent Japanese isolates of bovine coronaviruses and experimental infection for the verification of their pathogenicity

Toru KANNO^{1)*}, Ryoko ISHIHARA¹⁾, Shinichi HATAMA¹⁾, Ikuo UCHIDA¹⁾, Maiko YAMAGISHI²⁾,
Yoshiharu ISHIKAWA¹⁾ & Koichi KADOTA¹⁾

牛コロナウイルスの国内流行株の抗原性比較解析を行った。4つの遺伝子型に属すウイルス株間には中和抗原性に差が認められたが、血清型の相違を示す程度ではなかった。遺伝子型 1 に属す掛川株に対する中和モノクローナル抗体 4H4 は、2, 3 および 4 型ウイルスに対する中和能が大きく低下していた。4H4 に対する中和抵抗性変異株の解析により中和抗原部位が S 蛋白の 284 番目のアミノ酸であることを特定した。掛川株および熊本株を牛に経口接種し、病原性再現試験を行った。熊本株を接種した牛には発熱、下痢などの典型的な症状が認められ、血漿、鼻汁、糞便からウイルス遺伝子が検出された。病理組織学的解析により、回腸を主に腸管全域における病変が認められたが、ウイルス遺伝子および抗原検出の結果は、その他にも鼻甲介粘膜、気管粘膜、肺および第 1-4 胃においてもウイルスが増殖することを示した。

背景

牛コロナウイルス (BCoV) 感染症は、成牛や新生子牛に下痢を引き起こす疾病として知られ、また、病状として軽度ではあるが発熱や咳などの呼吸器病にも関与することが認識されるようになった。発生は全国各地で認められ、農水省の監視・危機管理体制整備対策において毎年多くの発生件・頭数が報告されている。典型的な症状は 20～72 時間の潜伏期の後、突然に元気消失、食欲不振、水様性下痢や血便を呈し、搾乳牛では産乳量が激減するため、経済的損失が著しい。通常、予後は良好で数週間内で回復するが、新生子牛の場合、ストレスや二次感染そして初乳の摂取不足などにより死亡率は上昇する。本病は農場内に容易に常在化し、同一農家で再発生も認められる。このように日本全国に浸潤・蔓延している疾病であるが、その病原体である BCoV 株間の遺伝子性状、抗原性ならびに病原性に関しては、ウイルスが

- 1) 動物衛生研究所 環境・常在疾病研究チーム (北海道支所)
〒062-0045 北海道札幌市豊平区羊ヶ丘 4
- 2) 北海道宗谷家畜保健衛生所
〒098-5738 北海道枝幸郡浜頓別町緑が丘 8 丁目 3 番地

* Corresponding author: Toru KANNO, D.V.M., PhD
Hokkaido Research Station, Environmental/Enzootic Diseases
Research Team, National Institute of Animal Health, 4
Hitsujigaoka, Toyohira, Sapporo, Hokkaido 062-0045, JAPAN.
Tel: +81-11-851-5226
Fax: +81-11-853-0767
E-mail: kannot@affrc.go.jp

分離しにくいこともあり, 流行株を用いた詳細な解析が行われていなかった。そこで, 我々は近年 (1999 ~ 2009 年) の国内流行株を分離し, ウイルスの抗原性, 病原性および宿主域に関与すると考えられるエンベロープ糖タンパク S 遺伝子を用いた解析を行い, 本ウイルスの遺伝子型が4つに分類され, 遺伝学的系統が短期間で推移することを明らかにしてきた^{4,5)}。本ウイルスの抗原性は単一と報告されているが, 上記の結果より現在わが国において流行しているウイルスの抗原性状も変化していることが推測できることから, 国内で使用しているワクチン株との比較を含めて, 遺伝子性状と抗原性の相関を解析することが本病の防疫対策をとる上で重要となっている。また, 病原性に関しても, 国内流行株を用いた解析が行われておらず, 詳細な病原性状は不明である。本研究は, これら抗原性および病原性について解析することを目的とし, 平成 20 ~ 21 年度に動物衛生研究所重点強化研究費「研究課題名: 牛コロナウイルスの抗原性および病原性解析」により実施された。

試験研究方法

1. 4つの遺伝子型ウイルスに対するウサギ抗血清の作製

分子系統樹解析において4つに分類された遺伝子型から各々代表株を選択し, ウサギに接種することにより免疫血清を作製した。

2. 抗原性比較解析

ウイルス株と免疫血清を用いた蛍光抗体法や交差中和試験を行い, 株間の抗原性状の比較解析を行った。さらに, 日本初発例からの分離株で本病の病性鑑定に多く使用される掛川株¹⁾に対する中和モノクローナル抗体 4H4⁷⁾を用いた中和試験を行い, 各株に対する中和能の比較を行った。

3. ウイルス粒子上の中和抗原部位の特定

ブラック法により掛川株のウイルス力価を測定後, 4H4 培養上清の中和抗体価を 50% ブラック阻止法により算出した。96 穴プレート上にて掛川株を 10 倍階段希釈し, 50% ブラック阻止を示した希釈の 100 倍濃度の 4H4 を等量加え, 5% CO₂ 存在下で 37°C, 1 時間の反応後, HRT-18G 細胞に接種し培養を続けた。ウイルス増殖の認められた最高希釈穴から培養上清を回収し, ブラック純化を 2 回行い, エスケープミュータントウイルス (中和抵抗性変異株) とした。作出したエスケープミュータントウイルスのゲノム RNA を抽出後, 抗原性に関与する S および HE 蛋白をコードする遺伝子を RT-PCR により増幅

Kakegawa (掛川) 株

試験 1 No.227 牛 (10 ヶ月齢): 培養上清 60ml を経口投与

試験 2 No.230 牛 (13 ヶ月齢): 培養上清 1 ㎖ を経口投与

Kumamoto/1/07 (熊本) 株

試験 1 No.231 牛 (15 ヶ月齢): 培養上清 1.2 ㎖ を経口投与

試験 2 No.248 牛 (3 日齢): No.231 牛糞便 5 ㎖ 乳剤を経口投与

No.249 牛 (3 日齢): No.231 牛糞便 10 ㎖ 乳剤を経口投与

試験 3 No.251 牛 (8 日齢): No.249 牛糞便 20 ㎖ 乳剤を経口投与



臨床症状の変化および血漿、鼻汁、糞便中のウイルス遺伝子の有無、そして抗体の応答を検証

図 1. 動物試験

した。この塩基配列を決定することにより, 変異部位, すなわち中和抗原部位であるアミノ酸を特定した。

4. 動物接種試験

掛川株および現在の流行遺伝子型である 4 型から熊本株 (Kumamoto/1/07) を用いた動物試験を行った (図 1)。使用牛は試験開始前に BCoV 抗体陰性を確認した。接種後, 臨床症状の変化および血漿, 鼻汁, 糞便中のウイルス遺伝子の有無, そして抗体の応答を検証した。ウイルス遺伝子は材料から RNA を抽出後, 恒光ら⁸⁾による N 遺伝子を増幅するプライマーセットを用いた RT-PCR を行い, さらに著者の設定したプライマーセット (未発表) を用いた nested PCR を行った。血中抗体の有無そして抗体価測定は, それぞれのウイルスに対する中和試験により行った。

牛体内でのウイルス増幅課程での遺伝子変異を検証するため, 糞便ならびに鼻汁からの分離ウイルスの S 遺伝子の塩基配列を決定し, 熊本株と比較した。

発症例の各組織からウイルス遺伝子の検出を上記の方法で行い, また, 病理組織学的解析を HE 染色および抗熊本株ウサギ血清を用いた免疫染色にて行った。

結 果

1. 抗原性比較解析

遺伝子型 1 から掛川株および 66/H (ワクチン) 株, 2 から石川株 (Ishikawa/2/99), 3 から北海道株 (Hokkaido/12/03), 4 から熊本株 (Kumamoto/1/07) を選択し, これらのウサギ免疫血清を作製した。これら免疫血清を用いた蛍光抗体法ではウイルス株間の差は認められなかった。一方, 交差中和試験においては, 抗原

表1. 各遺伝子型ウイルスとウサギ免疫血清の交差中和試験

ウイルス株	ウサギ免疫血清				
	α Kakegawa	α 66/H	α Ishikawa	α Hokkaido	α Kumamoto
Kakegawa (遺伝子型 1)	$2^{15.5}$ (100)*	$2^{14.5}$	2^{14}	2^{15}	2^{13}
66/H (遺伝子型 1)	$2^{15.5}$ (84)	2^{15} (100)	2^{14}	$2^{14.5}$	2^{13}
Ishikawa/2/99 (遺伝子型 2)	2^{15} (50)	$2^{13.5}$ (35)	$2^{15.5}$ (100)	2^{14}	2^{14}
Hokkaido/12/03 (遺伝子型 3)	2^{16} (60)	$2^{15.5}$ (50)	$2^{14.5}$ (25)	2^{17} (100)	2^{14}
Kumamoto/1/07 (遺伝子型 4)	2^{14} (42)	$2^{13.5}$ (35)	$2^{13.5}$ (42)	$2^{14.5}$ (35)	$2^{14.5}$ (100)

中和抗体価はウイルス増殖を抑えた最高希釈の逆数で示した。

* 括弧内は抗原性の相関度を表す R 値を示した。

$$R=100\sqrt{r1 \times r2}$$

r1= ヘテロ抗体価(2株)/ホモ抗体価(1株), r2= ヘテロ抗体価(1株)/ホモ抗体価(2株)

表2. 中和モノクローナル抗体 4H4 の各遺伝子型ウイルスに対する中和抗体価

	遺伝子型 1		遺伝子型 2	遺伝子型 3	遺伝子型 4
	Kakegawa	66/H	Ishikawa/2/99	Hokkaido/12/03	Kumamoto/1/07
4H4 培養上清	2^{12} (4,096)	2^{11} (2,048)	< 2	< 2	< 2
4H4 マウス腹水	$2^{18.5}$ (370,728)	$2^{17.5}$ (185,364)	$2^{5.5}$ (45)	$2^{8.5}$ (362)	2^5 (32)

中和抗体価はウイルス増殖を抑えた最高希釈の逆数で示した。

性相関度を示す R 値では株間の抗原性に差が認められた (表1)。さらに、掛川株に対する中和モノクローナル抗体 4H4 は、2, 3 および 4 型ウイルスに対する中和能が大きく低下していた (表2)。

2. 中和抗原部位の特定

4H4 の存在下で掛川株を培養することにより、エスケープミュータントウイルスを作出した。このうち、15 株の S 遺伝子 (約 4.1kb) を決定したところ、全ての株の 851 番目の塩基に T から C への変異が認められ、これは S 蛋白の 284 番目のアミノ酸をバリンからアラニンへ変異させるものであった。一方、HE 遺伝子 (約 1.3kb) には変異が認められなかった。

3. 動物接種試験

1) 掛川株

掛川株を接種した牛 2 頭 (No. 227 および 230) には発熱、鼻汁、下痢等の症状は認められなかった。No. 227 では血

漿 (5 日目) と鼻汁 (12 日目) からウイルス遺伝子が nested PCR で検出され、No. 230 では鼻汁 (9 および 10 日目) からウイルス遺伝子が検出された。抗体の陽転は No. 227 では試験期間中 (20 日間) 認められず、No. 230 では最終日 (11 日目) に低力価 ($\times 4$) ではあるが認められた。

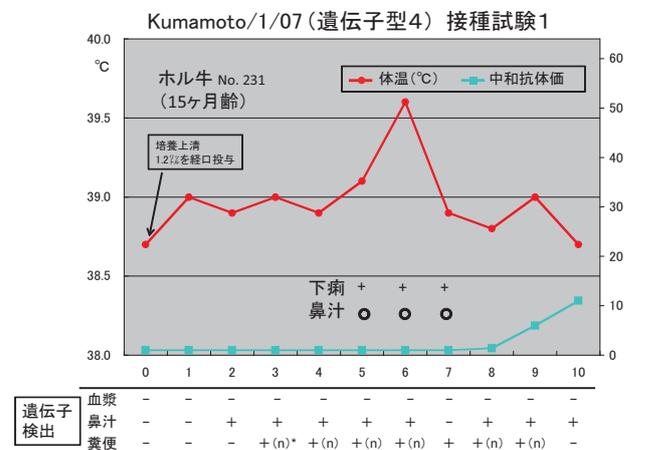


図2. 熊本株接種試験

* (n): nested PCRで検出

Kumamoto/1/07 (遺伝子型4) 接種試験2

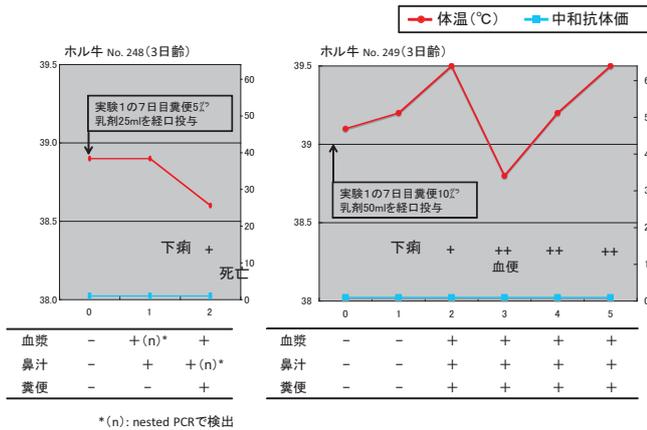


図3. 熊本株接種試験2

Kumamoto/1/07 (遺伝子型4) 接種試験3

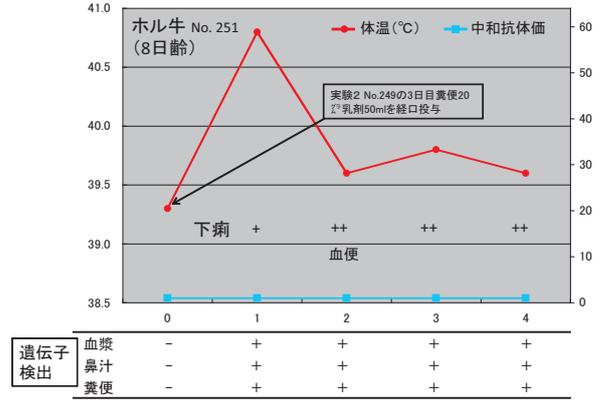


図4. 熊本株接種試験3

表3. 分離ウイルスのS遺伝子における遺伝子変異

	nt536	nt696	nt982	nt984	nt3157
Kumamoto/1/07	A	T	C	T	C
試験2 糞便	GorA	A	C	T	C
試験2 鼻汁	A	A	C	T	C
試験3 糞便	G	A	C	T	C
試験3 鼻汁	G	T	<u>T</u>	<u>G</u>	TorC

アンダーラインは同義置換

Kumamoto/1/07(遺伝子型4) 接種試験2

No.249牛: 5日目回腸

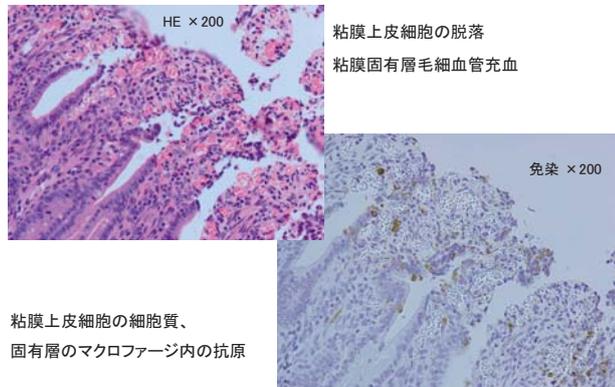


図5. 回腸における病変とウイルス抗原

Kumamoto/1/07(遺伝子型4) 接種試験3

No.251牛: 4日目 鼻甲介粘膜

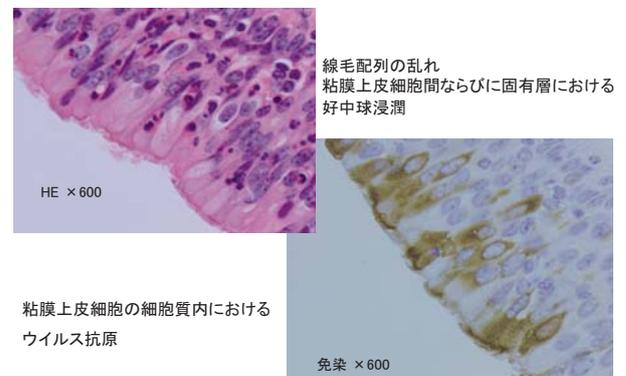


図6. 鼻甲介粘膜における病変とウイルス抗原

2) 熊本株

熊本株を接種した牛 (No. 231) は発熱および血液を含む軟便を呈した (図2)。鼻汁と糞便からウイルス遺伝子が検出され、接種7日目から抗体の陽転が認められた。

No. 231 の糞便材料の PBS 懸濁液を接種した新生子牛2頭 (No. 248 および 249) のうち No. 248 は2日目に軟便を呈した後、死亡した (図3)。No. 249 は下痢 (血) 便を呈した。両頭の血漿、鼻汁、糞便からウイルス遺伝子が検出されたが、抗体の陽転は試験期間中 (5日間) 認めら

れなかった。

No. 249 の糞便材料の PBS 懸濁液を接種した新生子牛1頭 (No. 251) は発熱および下痢 (血) 便を呈した (図4)。血漿、鼻汁、糞便からウイルス遺伝子が検出されたが、抗体の陽転は試験期間中 (4日間) 認められなかった。

No. 249 の鼻汁および糞便、そして No. 251 の鼻汁および糞便から分離したウイルスの S 遺伝子中にはのべ5カ所の変異部位が認められた。このうち3カ所はアミノ酸変異を伴う変異であったがいずれも polymorphic region

表4. No.251 牛 各臓器（組織）からのウイルス遺伝子およびウイルス抗原検出

臓器（組織）	RT-PCR	病理（免染）	臓器（組織）	RT-PCR	病理（免染）
鼻甲介粘膜	+	++	盲腸	+	++
鼻腔粘膜	+	-	結腸 上部	+	++
気管粘膜	+	+	結腸 中部	+	+
肺 右前葉	+ n*	-	結腸 下部	+	++
肺 右中葉	+	-	直腸 上部	+	++
肺 右後葉	+ n	-	直腸 下部	+	+
肺 左前葉前部	+	-	肺門リンパ節	NT	-
肺 左前葉後部	+	-	空腸付属リンパ節	+ n	-
肺 左後葉	+	-	回腸付属リンパ節	+	+
十二指腸 上部	+	+	結腸付属リンパ節	NT	+
十二指腸 下部	+ n	+	第一胃	+	-
空腸 上部	-	+	第二胃	+	-
空腸 中部	-	+	第三胃	+	+
空腸 下部	+	++	第四胃	+	+
回腸 上部	-	+	心臓	NT	-
回腸 中部	-	+++	肝臓	+ n	-
回腸 下部	+	+++	腎臓	+ n	-
回盲部	+	+++			

* nested PCR で検出

の領域外であった（表3）。

病理組織学的解析により、回腸を主に腸管全域における粘膜上皮細胞の剥離脱落と粘膜固有層の毛細血管充血、水腫、リンパ管拡張および変性壊死が認められた（図5）。免疫染色では上記の粘膜上皮に加え、鼻甲介粘膜、気管粘膜、第3-4胃にも抗原が検出された（図6）。さらにRT-PCRにより、腸管全域に加え、第1-4胃、鼻甲介粘膜、気管粘膜、肺および腸管の付属リンパ節からウイルス遺伝子が検出された（表4）。

考 察

各遺伝子型のウイルス株間には抗原性の差が認められた。しかし、ロタやピコルナウイルスでは株間の中和抗体価がヘテロでそれぞれ20倍以上の差がある時に血清型が異なるとするが、これはR値に換算すると5に相当する²⁾。よって、今回の結果は、各遺伝子型ウイルス株間の抗原性の差は血清型の相違を示す程度ではないことになる。国内流行株の抗原性比較解析に関しては、岡山県の1995年から97年にかけての発生例からの分離6株について報告があるが、この成績においても掛川株とは抗原性が異なるが、血清型の相違までは認められなかったことが示されている³⁾。ただし、系統樹解析からも国内流行株のS遺伝子の多様性が進行していることは明らかであり、抗原性もこれに伴い変化することが推測される。

よって、今後も流行株の遺伝子性状とともに抗原性についても調査を継続する必要がある。事実、掛川株の中和モノクローナル抗体4H4は、遺伝子型2, 3および4に属すウイルスに対する中和能が大きく低下していた。このような変異の蓄積が血清型の相違に繋がることが予想される。

4H4が認識する掛川株の中和抗原部位はS蛋白の284番目のアミノ酸であることが特定された。しかし、4H4抵抗性を示したウイルス複数株の284番目のアミノ酸は掛川株と同一であった。これは284番目のアミノ酸と同一エピトープを形成する他アミノ酸の変異が影響しているものと推測される。また、BCoVの中和抗原部位としては、掛川株と同様に遺伝子型1に属す、カナダのケベック株に対する中和モノクローナル抗体を用いた解析により、polymorphic region内に位置するS蛋白の528番目のアミノ酸が中和抗原部位であることが報告されている⁹⁾。今回我々の成績の中和抗原部位はpolymorphic region外に位置していた。このことはpolymorphic region以外にも中和抗原に関与する領域があることを示し、遺伝子比較解析と抗原性の相違をリンクさせるには解析に用いる領域を広げる必要があるのではと推測される。

動物試験の結果から、掛川株の牛病原性が弱いことを示唆する成績を得、一方熊本株を用いた牛病原性の再現が可能であり、腸管以外においてもウイルスが増殖する

ことが明らかとなった。掛川株は、現存する中で最も継代歴の浅いものを使用したが、それでも培養細胞で9代目であることから病原性が低減化したことも考えられる。また、牛体内におけるウイルス増殖も微弱であったことから、本株を非病原性株として用いたBCoVの病原性や宿主域に關与する遺伝子の解析が可能である。ただし、今回は少数頭を用いた結果であることから、今後頭数を増やして確証を得る必要がある。

熊本株を用いた試験では、いずれも典型的な症状を示した。農場内における伝播に近似させるために、また生体内におけるウイルス遺伝子の変異と牛病原性の変化を検証するために2回目以降は糞便を経口投与した。

試験2および3の糞便および鼻汁から分離したウイルスから、3カ所の非同義置換を検出したが、いずれも系統樹解析に用いた polymorphic region 外の領域にあった。また、その変異も固定されたものではないことから、RNA ウイルス特有の quasispecies (多様性) を拾っているかもしれない。polymorphic region には遺伝子多様性が認められ、また、この領域を用いた系統樹解析において、ここ10年で遺伝子型が2-3-4と推移したことから、この領域内での遺伝子変異の速度が他より速いことが考えられた。しかし、牛体内一回の増幅でこれら遺伝子型が変異するほどの効率があつては系統樹を用いた疫学解析の有効性が疑われる。そこで、どのような変異が生じているかを確認した。

今回得られた成績は、掛川株をルーツとして日本国内における本ウイルスの遺伝子型が変化する過程には相当数のウイルス増殖の機会がなければならないことを示している。もしくはそもそもルーツの異なる遺伝子型のウイルスが日本に侵入し、一時期に蔓延したのかもしれない。遺伝子型推移の牛体内における検証には、さらに継続した動物試験が必要である。

病理組織学的解析により、本病の主徴から推測される組織に病変が認められたが、ウイルス遺伝子および抗原検出の結果は、その他にも鼻甲介粘膜、気管粘膜、肺および第1-4胃においてもウイルスが増殖することを示していた。Parkらによる報告では、韓国の成牛下痢症例(冬季赤痢)からの分離ウイルスを牛に経口接種し、下痢症状を起こした牛の呼吸器(鼻甲介粘膜、気管粘膜、肺)から免疫染色によりウイルス抗原が検出されたとし、この結果から、近年のBCoVが消化器に加え、呼吸器指向性が高まったと推測している⁶⁾。我々の結果も同様であり、消化器そして呼吸器のいずれもがウイルスの増殖場所であると考えられる。また、本病はいったん農場内に

侵入すると、なかなか抜けない性質を持ち、これには牛体内における持続感染を疑っているが、未だ検証されていない。今回、牛病原性再現試験に成功したことから、今後は長期間の感染試験を行い、持続感染の検証を行う予定である。

引用文献

- 1) Akashi, H., Inaba, Y., Miura, Y., Tokuhisa, S., Sato, K. and Satoda, K.: Properties of a coronavirus isolated from a cow with epizootic diarrhea. *Veterinary Microbiology*. 5, 265-276 (1980).
- 2) El-Ghorr, A.A., Snodgrass, D.R., Scott, F.M. and Campbell, I.: A serological comparison of bovine coronavirus strains. *Arch. Virol.* 104, 241-248 (1989).
- 3) Fukutomi, T., Tsunemitsu, H. and Akashi, H.: Detection of bovine coronaviruses from adult cows with epizootic diarrhea and their antigenic and biological diversities. *Arch. Virol.* 144, 997-1006 (1999).
- 4) Kanno, T., Hatama, S., Ishihara, R. and Uchida, I.: Molecular analysis of the S glycoprotein gene of bovine coronaviruses isolated in Japan from 1999 to 2006. *J. Gen. Virol.* 88, 1218-1224 (2007).
- 5) Kanno, T., Kamiyoshi, T., Ishihara, R., Hatama, S. and Uchida, I.: Phylogenetic studies of bovine coronaviruses isolated in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 71, 83-86 (2009).
- 6) Park, S.J., Kim, G.Y., Choy, H.E., Hong, Y.J., Saif, L.J., Jeong, J.H., Park, S.I., Kim, H.H., Kim, S.K., Shin, S.S., Kang, M.I. and Cho, K.O.: Dual enteric and respiratory tropisms of winter dysentery bovine coronavirus in calves. *Arch. Virol.* 152, 1885-1900 (2007).
- 7) Sato, M., Akashi, H., Hirai, S., Kimura, Y. and Takahashi, M.: Production of monoclonal antibodies against the Kakegawa strain of bovine coronavirus and their characterization. *J. Vet. Med. Sci.* 53, 147-148 (1991).
- 8) Tsunemitsu, H., Smith, D.R. and Saif, L.J.: 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) Yoo, D., and Deregt, D.: A single amino acid change within antigenic domain II of the spike protein of bovine coronavirus confers resistance to virus neutralization. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 297-302 (2001).

Summary

Antigenic variation among recent Japanese isolates of bovine coronaviruses and experimental infection for the verification of their pathogenicity

Toru KANNO^{1)*}, Ryoko ISHIHARA¹⁾, Shinichi HATAMA¹⁾, Ikuo UCHIDA¹⁾, Maiko YAMAGISHI²⁾,
Yoshiharu ISHIKAWA¹⁾ & Koichi KADOTA¹⁾

Recent Japanese field isolates of bovine coronaviruses, reference Kakegawa strain and vaccine strain, which belongs to 4 genotypes by phylogenetic analysis of the S glycoprotein gene, were analyzed for their antigenic properties by indirect immunofluorescent and neutralization tests. In the results of neutralization tests, there are antigenic differences among viruses, however it didn't show the degree of indication of distinct serotype. Monoclonal antibody, 4H4, against the Kakegawa strain, which belong to genotype 1, significantly lacked neutralizing activity for genotype 2, 3, and 4 viruses. Analysis of using escape mutant viruses from 4H4 revealed that the antigenic site of Kakegawa strain was mapped to at amino acid position 284 of S glycoprotein. Experimental infection of Kakegawa and Kumamoto strains were conducted for verification of their pathogenicity. The cattle and calves inoculated with the Kumamoto strain showed pyrexia and diarrhea, and viral gene was detected in plasma, nasal discharge and feces by RT-PCR. Histological examination showed lesions in small and large intestines mainly in ileum. BCoV RNA and antigen were detected in nasal turbinates, trachea, lung, rumen, reticulum, omasum and abomasum as well as intestinal tract.