

同一農場で検出された牛ロタウイルスの相同性解析

東部家畜保健衛生所

山本英次・矢野敦史・上村圭一

宮本純子・竹内康裕

1. はじめに

牛の下痢症、特に子牛に見られる下痢症は発生率や致死率が高いことから、畜産農家にとって最も経済損失の大きい疾病の一つである。牛ロタウイルスは子牛の下痢の半数以上に関与しているとの報告もあり、牛のウイルス性下痢症の主要な病原体である。

2. 発生状況

搾乳経産牛を約 200 頭飼育し、自家産子牛と外部導入子牛を哺育育成する農場で、子牛の下痢が継続して発生した。産出された子牛のほぼすべてが下痢の症状を呈し、大部分は一過性の症状で回復するものの、一部は重度の脱水、削瘦となり死亡した。同農場では牛下痢 5 種混合ワクチンが接種されていた。

3. 材料

平成 18 年 9 月に下痢症状を呈する子牛 3 頭と無症状の子牛 3 頭の計 6 頭（11～76 日齢）の糞便を採取した。また、同年 12 月に再度、下痢症状を呈する子牛 7 頭（9～13 日齢）の糞便を採取し検査材料とした。

表1 材料

• 材料:子牛糞便(9月、12月に採材)

	9月	12月
検体数	6	7
日齢	11～76	9～13
糞便性状	白色下痢 3 正常 3	全て 白～黄白色下痢

4. 方法

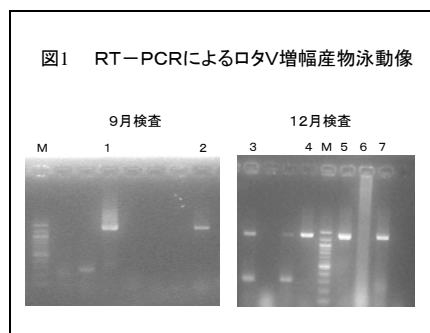
- (1) 寄生虫学的検査：シヨ糖浮遊法により寄生虫卵の検出を行なった。
- (2) 細菌学的検査：DHL 培地、5%羊血液寒天培地で 24 時間培養後、API により同定した。ハーナーテトラチオン酸塩培地で 24 時間培養後、ノボピオン加 DHL 培地に塗布し 24 時間培養後、API により同定した。
- (3) ウイルス学的検査：ロタウイルス検出キット（ディップスティック栄研ロタ）を用いた抗原検出を行なった。また、イーグル MEM 培地を用いて糞便を 10%乳剤とし、RNA を抽出、RT-PCR 法による牛ウイルス性下痢・粘膜病ウイルス、牛コロナウイルス、牛ロタウイルス特異遺伝子の検出を行なった。ロタウイルス特異遺伝子の検出された検体については、RNA ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）パターンと比較、外郭蛋白（VP7、VP4）遺伝子の塩基配列決定による相同性解析を実施した。

4. 成績

- (1) 寄生虫学的検査：寄生虫卵は検出されなかった。
- (2) 細菌学的検査：有意な細菌は検出されなかった。
- (3) ウイルス学的検査：牛ウイルス性下痢・粘膜病ウイルス、牛コロナウイルス特異遺伝子は検出されなかった。ロタウイルス検出キットで 9 月の下痢症状有の 3 検体中 1 検体、無症状の 3 検体中 1 検体が陽性であった。12 月の検体では 7 検体中 2 検体が陽性であった。牛ロタウイルスの RT-PCR 法において、9 月の下痢症状有の 3 検体中 1 検体、無症状の 3 検体中 1 検体が陽性であった。12 月の検体では 7 検体中 5 検体が陽性であった（表 2、図 1）。

表2 ロタウイルス検出キット RT-PCR法による検出状況

	検査頭数	簡易キット陽性頭数		RT-PCR陽性頭数	
		検査頭数	陽性頭数	検査頭数	陽性頭数
9月	下痢症状有 3	3	1	3	1
	無症状3	3	1	3	1
12月	下痢あり 7	7	2	7	5



RNA ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) パターンの比較結果、9月の牛ロタウイルスRNAは標準株 (OSU) と同じRNA分節の並びであったが、12月の牛ロタウイルスRNAは第10分節と第11分節の順序が入れ替わるショートパターンであった (図2)。

検査可能であった3株 (9月1株、12月2株) の外郭蛋白 (VP7、VP4) 遺伝子の塩基配列決定による相同性解析の結果、VP7 遺伝子の塩基配列から9月、12月の牛ロタウイルスはともにG6血清型に属することが判明した。VP7 遺伝子における相同性は、12月の2株間では100%であったが、9月、12月の株間では約80%であった。また、VP4 遺伝子の塩基配列から、9月の株は遺伝子型P [11]、12月の株は遺伝子型P [5] に属することが判明した。(表3)

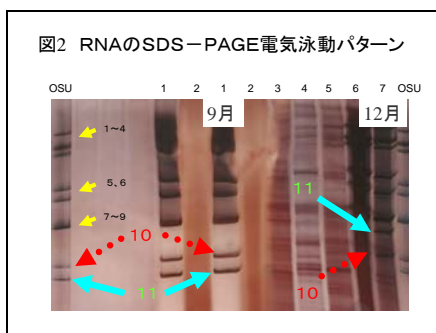


表3 塩基配列決定による解析結果

月	検体番号	VP 7		VP4 遺伝子型
		血清型	相同性	
9月	1	G6	80%	P[11]
12月	6	G6	100%	P[5]
	7	G6		P[5]

考察

同農場で9月と12月に検出された牛ロタウイルスは、解析の結果、異なる株であった。9月以降に12月の株が農場に侵入したと考えられた。調査の結果、人や器具機材、車両、導入牛など、侵入の機会は多くあったものの、実際の侵入経路は不明であった。牛ロタウイルスの進入経路の究明や農場内での動態把握のためには、他農場も含めた調査の継続が必要であると考えられた。

牛ロタウイルスは、清浄化は難しいものの、飼育環境のウイルス汚染度を低下させることにより被害を低減させることが可能である。同農場へは、子牛の隙間風の遮断や適切な敷料の使用などによるストレス軽減と飼育環境の清掃と消毒、ワクチン接種の継続を指導した。調査の継続で農場内でのウイルス動態が明らかとなれば、さらに有効な対処方法の立案が可能となると考えられる。

謝辞

今回検出された牛ロタウイルスについて、RNA ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) パターンの比較、外郭蛋白 (VP7、VP4) 遺伝子の塩基配列決定による相同性解析を実施していただいた、(独) 動物衛生研究所 ウイルス病研究チーム 恒光 裕博士に深謝する。