A 群 ロ タ ウ イ ル ス が 関 与 し た 成 牛 下 痢 症

小沼成尚^{1)†} 工藤一磨¹⁾ 小川秀治¹⁾ 桜田まみ¹⁾砂原栄子¹⁾ 馬渡隆寛²⁾ 恒光 裕³⁾

- 1) 秋田県中央家畜保健衛生所 (〒011-0904 秋田市寺内蛭根1-15-5)
 2) 山形県中央家畜保健衛生所 (〒990-2161 山形市漆山736)
 3) 独立行政法人農業技術研究機構動物衛生研究所七戸研究施設 (〒039-2586 上北郡七戸町字海内31)

(2002年11月5日受付・2003年1月16日受理)

要 約

2001年1月、秋田県ホルスタイン種飼養1農場で成牛3頭に下痢が発生した。下痢便3例を用いた寄生虫検査と細菌検査では下痢起因病原体は検出されなかった。いっぽう、電子顕微鏡観察によりロタウイルス様粒子のみが確認され、下痢便から抽出したRNAの電気泳動によりA群ロタウイルス (GAR) 特有の分節RNAが認められた。また、ウイルス分離により2例からGARが分離され、分離株のVP7血清型はG6, VP4遺伝子型はP [1] であった。分離株を用いた発症牛3頭と同居牛7頭における血清中の中和抗体検査では、発症牛2頭、同居牛1頭に有意な抗体上昇が確認された。以上の結果から、本症例は今までほとんど報告のなかった牛GAR単独感染による成牛下痢症と考えられた。

——キーワード：成牛，下痢，A群ロタウイルス，血清型，中和抗体。

----- 日獣会誌 56, 245～248 (2003)

ロタウイルス病はロタウイルスの感染に起因する急性伝染病で、下痢と脱水を主徴とする。本ウイルスは多くの哺乳類と鳥類の糞便から検出され、由来動物種ごとに牛ロタウイルス、ヒトロタウイルスなどと呼ばれて区別されているが、まれに動物種の壁を越えて感染することも知られている [16, 26]。ロタウイルスはVP6抗原の違いによりA～F群の6群に大別され、牛ロタウイルスはA, BおよびC群の3群が報告されている [12, 18, 23]。

A群ロタウイルス (GAR) 病は、ヒトにおいては3歳までの子供に多く発生が見られる他、大人のGAR感染に起因する下痢も報告されている [1, 11, 13]。いっぽう、牛においては子牛でのGAR病について多くの報告がなされているが、成牛での本ウイルス感染の多くは不顕性感染であると考えられており [17]、発症例の報告はきわめて少ない [20]。今回、ホルスタイン種飼養農家で認められた成牛の下痢症について病性鑑定を実施した結果、牛GAR病が疑われたので、その概要を報告する。

材 料 お よ び 方 法

検査材料：2001年1月22日、秋田県ホルスタイン

種成牛35頭、育成牛10頭を飼養する1農場において、4歳1頭、2歳2頭、計3頭の成牛に元気消失、食欲不振および激しい水様性の下痢がみられた。下痢は約3日間持続し、下痢の発生はこれら3頭のみであった。発症牛3頭から下痢発症時に採取した下痢便と血清、同時期に同居成牛7頭から採取した血清、また、下痢発生から21日後にこれらの牛から採取した血清を検査材料とした。

寄生虫ならびに細菌検査：寄生虫検査は下痢便の直接塗抹鏡検ならびにショ糖液浮遊法により虫体と虫卵を検査した。細菌検査は、下痢便を5%羊血液加寒天培地、DHL寒天培地および卵黄加CW寒天培地で好気あるいは嫌気培養した。また、HTT培地と20mg/mlノボピオシン加DHL培地でサルモネラ検査を実施した。病原因子検索は、毒素原性大腸菌線毛 (K88・K99・987P) 抗原検査^{a)}と、EAE [27]、LTおよびVT遺伝子検査^{b), c)}

a) 毒素原性大腸菌線毛抗血清セット、デンカ生研(株)、東京。

b) 毒素源性大腸菌LT遺伝子検出用プライマーセット、タカラバイオ(株)、滋賀。

c) 腸管出血性大腸菌VT遺伝子検出用プライマーセット、タカラバイオ(株)、滋賀。

† 連絡責任者：小沼成尚 (秋田県中央家畜保健衛生所)

〒011-0904 秋田市寺内蛭根1-15-5 ☎018-864-0401 FAX 018-862-7132

を実施した。

ウイルス検出：下痢便中のウイルス検査として、ウイルス抗原検査、RT-PCR法によるウイルス遺伝子検査、ウイルス分離、および電子顕微鏡法（EM）によるウイルス粒子の検索を実施した。

ウイルス抗原の検査は、市販のGAR抗原検出キット^{d)}およびアデノウイルス抗原検出キット^{e)}を使用した。

遺伝子検査：下痢便からTRIzol LS Reagent^{f)}でRNAを抽出し、牛コロナウイルス（BCV）S1遺伝子の1146塩基を標的として[22]、また牛ウイルス性下痢・粘膜炎（BVD-MD）ウイルス5'非翻訳領域の286塩基を標的として[25]、RT-PCR法で行った。

ウイルス分離：下痢便をリン酸緩衝生理食塩液（PBS）で10%乳剤にして低速遠心後、その上清を接種材料とした。なお、ロタウイルスの分離には接種材料に10 μ g/mlのトリブシン^{g)}を添加し、37℃30分感作させたものを用いた。分離用細胞として、牛胎子筋肉（BFM）細胞、牛腎由来株化（MDBK）細胞、および牛精巣（BT）細胞を37℃で静置培養した。また、ヒト直腸由来株化（HRT-18）細胞とアカゲザル腎由来株化（MA104）細胞には維持液にそれぞれ0.1 μ g/ml、1 μ g/mlのトリブシンを添加して37℃で回転培養した。分離の有無の確認は細胞変性効果（CPE）を指標として行い、CPEが認められない場合は1週間間隔で2回継代した。GARの同定は一次抗体に抗牛GAR免疫血清^{h)}、二次抗体にFITC標識抗兔IgGⁱ⁾を用いた間接蛍光抗体法（IFA）で行った。

EM：糞便乳剤を支持膜に滴下後、2%リンタングステン酸でネガティブ染色して電子顕微鏡で観察した。

ウイルス抗体検査：発症牛と同居牛のペア血清を用いてマイクロタイター法により中和試験を実施した。使用ウイルスは、BCV Kakegawa株、牛アデノウイルス3型WBR-1株、牛アデノウイルス7型袋井株、BVD-MDウイルスNOSE株、および本研究で分離した牛GAR分離株RONO-1株で、それぞれHRT-18細胞、MDBK細胞、BT細胞、BFM細胞、およびMA104細胞を使用した。なお、ロタウイルスの中和試験は維持液に1 μ g/mlトリブシンを加えて実施した。

RNAのポリアクリルアミドゲル電気泳動：糞便から抽出したRNAを10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、市販キット^{j)}で銀染色した。

d) イムノカードSTロタウイルス、(株)TFB、東京。

e) ディップスティック栄研アデノ、栄研化学(株)、東京。

f) インビトロジェン(株)、東京。

g) Trypsin Type I、(株)シグマ、アルドリッチ・ジャパン(株)、東京。

h) 動物用生物学的製剤協会、東京。 i) コスモバイオ(株)、東京。

j) シルバーステインプラス、日本バイオラッド・ラボラトリー(株)、東京。

GARのVP7血清型別ならびにVP4遺伝子型別：

GAR分離株2株からRNAを抽出し、RT-PCR法によりVP7遺伝子（1062bp）[9]とVP4遺伝子の5'末端から880bp[8]を増幅させた。増幅産物を鋳型としてダイレクトシーケンシングにより塩基配列を決定した。決定された配列と既知の両遺伝子との相似性検索をインターネット上で（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>）BLASTプログラムにより実施し、相似性の最も高い株のVP7血清型あるいはVP4遺伝子型を分離株のそれらと判断した。なお、分離株と相似性の最も高い株との一致率はClustal Wプログラムにより算出した。

成 績

寄生虫ならびに細菌検査：糞便材料3例のいずれから下痢関連の寄生虫ならびに細菌は検出されなかった。また、各材料から分離された大腸菌数は10⁴CFU/ml以下であった。

ウイルス検出：EMによりロタウイルス様粒子がいずれの糞便材料からも検出されたのに対し、他のウイルス様粒子は認められなかった。ウイルス抗原検出キットでは3例の糞便材料すべてGAR陽性を示したが、アデノウイルスはいずれも陰性であった。また、BCVならびにBVD-MDウイルス遺伝子検出用RT-PCR法ではいずれの材料も陰性であった。

ウイルス分離では、MA104細胞に接種した3例中2例で接種1代目からCPEがみられた。IFAにより分離ウイルスは牛GARと同定され、それら分離株は個体番号5由来のものをRONO-1株、また、個体番号10由来のものをRONO-2株とそれぞれ命名された。いっぽう、他の細胞ではCPEはまったくみられなかった。また、3例の糞便から抽出したRNAの電気泳動によりGAR特有の11本の分節RNA（4-2-3-2）が確認され、それらはいずれも同一像を示した（図1）。

中和抗体検査：GAR以外のウイルスにおいては、抗

図1 RNA-ポリアクリルアミドゲル電気泳動像。

1～11：分節番号，a：豚A群ロタウイルスOSU株，
b：糞便1，c：糞便2，d：糞便3。

表1 下痢発症牛ならびに同居牛における組血清を用いた中和試験および糞便のウイルス検査

個体 番号	年齢 (歳)	下痢発症 の有無	抗体価 ^{a)}		糞便のロタウイルス検査	
			急性期 ^{b)}	回復期 ^{c)}	RNA 分節検出	ウイルス 分離
1	7	無	256	256	検査せず	検査せず
2	7	無	32	32	検査せず	検査せず
3	1	無	256	256	検査せず	検査せず
4	2	有	64	128	陽 性	陰 性
5	4	有	8	64	陽 性	陽 性
6	2	無	8	16	検査せず	検査せず
7	1	無	128	128	検査せず	検査せず
8	1	無	32	128	検査せず	検査せず
9	1	無	32	64	検査せず	検査せず
10	2	有	64	256	陽 性	陽 性

a) 中和試験には個体番号5から分離したRONO-1株を用いた

b) 発症時

c) 初回採材から21日後

体価の有意上昇はみられなかった。いっぽう、GARに対しては、発症牛3頭中GARが分離された2頭と同居牛1頭に有意な抗体価の上昇が認められた(表1)。

GARのVP7血清型とVP4遺伝子型：分離株2株VP7遺伝子951塩基の配列を決定した結果、両者はまったく同一であった。既報株との比較では、牛GAR RF株(VP7血清型G6; GenBankアクセッション番号X65940)と塩基配列で99.8%と最も高い一致率を示した。よって、検出株のVP7血清型はG6と判明した。分離株2株VP4遺伝子5'末端より780塩基の配列を決定した結果、両者はまったく同一であった。既報株との比較では、VP7遺伝子と同様に牛GAR RF株(VP4遺伝子型P [1]; GenBankアクセッション番号U65924)と塩基配列で99.7%と最も高い一致率を示した。よって、分離株のVP4遺伝子型はP [1] であることが示された。

考 察

成牛にみられる集団下痢症の主要原因はBCVであり、特に冬季での成牛下痢症の多くはBCVに起因するものと考えられている[3, 21]。しかし、時にBCVが関与しない成牛のウイルス性下痢症も認められ、その原因として牛B群ロタウイルスや牛C群ロタウイルス、またBVD=MDウイルス[2, 12, 23]が報告されている。いっぽう、牛GARは子牛下痢症の主要原因であり[18]、わが国においても子牛下痢便からの本ウイルスの検出例が数多く報告されている[10, 15, 19]。しかし、牛GARが関与したとされる成牛下痢症に関してはほとんど報告例はなかった。いっぽう、ヒトにおいては、GARによる成人下痢症に関して幾つか報告され、散発的な成人下痢症の5~10%にGARが関与していると考えられている[11]。今回、われわれは成牛下痢症に遭遇し、下痢

関連病原体として牛GARのみが検出された。また、発症牛において牛GARに対する中和抗体価の有意上昇を確認した。これらのことから、本症例は過去にほとんど報告のなかった牛GAR単独感染による成牛下痢症である可能性が強く示唆された。よって、今後は牛GARは子牛だけでなく成牛下痢症の原因因子として着目する必要があると考えられた。なお、疫学的関連調査では、畜主は人工授精師であるため、他の農場への出入りはあったが、同時期に近隣農場での下痢症の発生はみられなかった。また、当該農場での牛の導入は1999年以降はなく、感染経路は特定出来なかった。

牛GARの主なVP7血清型はG6、G8およびG10、VP4遺伝子型はP [1]、P [5] およびP [11] であると報告されている[16]。今回検出された株のVP7血清型はG6、VP4遺伝子型はP [1] であった。Falconeら[5]は149例の子牛下痢症から分離された牛GARのVP7血清型とVP4遺伝子型の検出頻度は、G6P [5] (38.3%)、G10P [11] (31.5%)、G6P [11] (3.6%)の順で多く認められたと報告している。日本では、Ishizakiら[14]が子牛下痢症由来76株について調べた結果、G6P [5] (60.5%)、G10P [11] (17.1%)、G6P [11] (9.2%)、G10P [5] (6.6%)の組み合わせが認められたが、G6P [1] はまったくみられなかったとしている。また、Fukaiら[6, 7]は、子牛下痢症由来28株のVP7血清型とVP4遺伝子型はG6P [5] (89.3%)、G6P [11] (7.1%)、G10P [11] (3.6%)であったこと、また、1995~1998年での鹿児島県内の子牛下痢便104検体についての調査では、優位なVP7血清型とVP4遺伝子型は年次により異なり、VP4遺伝子型は1996年のP [1] を含む混合型が優位であった以外はP [5]、P [11] であったことを報告している。いっぽう、成牛由来株についてはSatoら[20]の報告があるのみで、G8P [1] であったとしている。すなわち、子牛由来のGARではVP4遺伝子型がP [1] を示す株は野外ではあまり優位でないのに対し、成牛由来では既報ならびに今回の両者とも当該遺伝子型はP [1] であった。これらのことから、成牛下痢発現の要因として、P [1] を示す株に対する免疫状態が低かったこと、あるいは、P [1] を示す株の病原性が強いことが推測された。

牛GARに対する血清中の中和抗体検査を実施した。中和抗体はウイルス外殻蛋白のVP7とVP4の両者に対する免疫応答として誘導されると考えられている[24]。今回、急性期の段階でいずれの材料も抗体価8~256倍の範囲で中和抗体を保有しており、牛GARに対する高い抗体保有率が示された。いっぽう、血清中抗体価と防御との関連では、中和抗体価が128倍以上のものには発症が見られなかった。しかし、64倍以下の抗体価を有する牛では発症の有無はさまざまであり、必ずしも血清

中抗体価が低いからといって感染や発症を起こすとは限らなかった。ヒトでは血清中の中和抗体価よりも糞便中のIgA抗体価が発症防御の指標となると報告されている[4]。今後はこの点について、症例数を積み重ねて検討していきたい。

引用文献

- [1] Bishop RF: In A. Z. Kapikian (ed) : Viral infection of the gastrointestinal tract, 131-167, Marce Dekker, Inc, New York, N.Y. (1994)
- [2] Bolin SR, Mc Clurkin AW, Cutlip RC, Coria MF : Am J Vet Res, 46, 2467-2470 (1985)
- [3] Clark MA : Br Vet J, 149, 51-70 (1993)
- [4] Coulson BS, Grimwood K, Hudson I, Barnes GL and Bishop RF : J Clin Microbiol, 30, 1678-1684 (1992)
- [5] Falcone E, Tarantino M, Di Trani L, Cordioli P, Lavazza A, Tollis M : J Clin microbiol, 37, 3879-3882 (1999)
- [6] Fukai K, Maeda Y, Fujimoto K, Itou T, Sakai T : Vet Microbiol, 86, 343-349 (2002)
- [7] Fukai K, Sakai T, Kamata H : Aust Vet J, 76, 418-422 (1998)
- [8] Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, Bhan MK : J Clin Microbiol, 30, 1365-1373 (1992)
- [9] Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark KF, Forrester B, Fang ZY : J Clin Microbiol, 28, 276-282 (1990)
- [10] Goto Y, Kurogi H, Inaba Y, Matumoto M : Vet Microbiol, 11, 177-184 (1986)
- [11] Griffin DD, Fletcher M, Levy ME, Ching-Lee M, Nogami R, Edwards L, Peters H, Montague L, Gentsch JR, Glass RI : J Infect Dis, 185, 1502-1505 (2002)
- [12] Hayashi M, Nagai M, Hayakawa Y, Takeuchi K, Tsunemitsu H : Vet Rec, 149, 331-332 (2001)
- [13] Hrdy DB : Rev Infect. Dis. 9, 461-469 (1987)
- [14] Ishizaki H, Sakai T, Shirahata T, Taniguchi K, Urasawa T, Urasawa S, Goto H : Vet Microbiol, 48, 367-372 (1996)
- [15] 児玉 道, 小倉与四夫, 竹中寛睦, 山下秀之, 橋本和典, 伊東保一郎, 笹原二郎 : 家畜衛生研究報告, 77, 1-8 (1978)
- [16] Mebus CA, Wyatt RG, Sharpee RL, Sereno MM, Kalica AR, Kapikian AZ, Twienhaus MJ : Infect Immun, 14, 471-474 (1976)
- [17] 村上洋介 : 牛病学, 清水高正編, 第2版, 238-240, 近代出版, 東京 (1988)
- [18] Saif LJ, Fernandez FM : J Infect Dis, 174, Suppl 1 S98-106 (1996)
- [19] Sato K, Inaba Y, Takahasi E, Ito Y, Kurogi H, Akashi H, Satoda K, Omori T, Matumoto M : Microbiol Immunol, 22, 499-503 (1978)
- [20] Sato M, Nakagomi T, Tajima K, Ezura K, Akashi H, Nakagomi O : J Clin Microbiol, 35, 1266-1268 (1997)
- [21] Takahashi E, Akashi H, Inaba Y : JARQ, 17, 185-190 (1983)
- [22] Tsunemitsu H, Smith DR, Saif LJ : Arch Virol, 144, 167-175 (1999)
- [23] Tsunemitsu H, Saif LJ, Jiang B, Shimizu M, Hiro M, Yamaguchi H, Ishiyama T, Hirai T : J Clin Microbiol, 29, 2609-2613 (1991)
- [24] 浦沢正三, 谷口孝喜, 小林宣道 : ウイルス, 42, 145-153 (1992)
- [25] Vilcek S, Herring AJ, Nettleton PF, Lowing JP, Peton DJ, : Virus Res, 43, 137-147 (1996)
- [26] Wyatt RG, Sly DL, London WT, Palmer AE, Kalica AR, Van Kirk DH, Chanock RM, Kapikian AZ : Arch Virol, 50, 17-27 (1976)
- [27] 八柳 潤, 齋藤志保子, 森田盛大 : 感染症学雑誌, 69, 1286-1293 (1995)

The Role of the Group A Rotavirus in Adult-cow Diarrhea

Narihisa ONUMA^{*†}, Kazuma KUDO, Shuji OGAWA, Mami SAKURADA, Eiko SUNAHARA, Takahiro MAWATARI, and Hiroshi TSUNEMITSU

^{*} Chuo Livestock Hygiene Service Center, 1-15-5 Terauchi-Hirune, Akita, 011-0904, Japan

SUMMARY

Bacterial and parasitic pathogens were negative in fecal samples taken from three adult diarrheal cows on a dairy farm in Akita Prefecture in January 2001, Electron microscopy revealed only rotavirus particles in the samples. RNA-polyacrylamide gel electrophoresis detected group-A rotavirus (GAR) RNA segments. GAR was isolated from two samples with MA104 cells, the VP7 serotype of which was G6 and the VP4 genotype of which was P[1]. Significant GAR antibody response was observed in two affected and one non-affected cow. Results indicate that GAR infection caused diarrhea in the adult cows in this study.

— Key words : adult cows, diarrhea, group A rotavirus, serotype, virus-neutralizing antibody.

[†] Correspondence to : Narihisa ONUMA (Chuo Livestock Hygiene Service Center)

1-15-5 Terauchi-Hirune, Akita, 011-0904, Japan TEL 018-864-0401 FAX 018-862-7132

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 56, 245 ~ 248 (2003)