

7 県内で発生したロタウイルスCによる成牛の集団下痢症と疫学的考査

家畜保健衛生所 岡田真紀 葛城肅仁

はじめに

ロタウイルス (RV) は、A~G までのウイルス種が知られているが、牛から検出される RV は A、B および C の 3 種である [1]。RVA は主に子牛に下痢を起こし、RVB および RVC は主に成牛に下痢を起こす [1]。RVC による下痢症の報告は近年増えているが [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9]、疫学的情報に乏しく、ウイルス分離の報告は少ない [2, 9]。県内の RVC による下痢症は平成 25、26 年に 2 例発生を確認している [7]。今回、平成 29 年 3 月と 6 月に同一市内の二酪農家で発生した RVC による成牛の集団下痢症と、併せて過去の発生を加えた 4 事例について疫学的調査を行ったので、その概要を報告する。

発生概要

A 農場は繋飼い牛舎で搾乳牛 30 頭と子牛 4 頭を飼養する酪農家で、平成 29 年 3 月 6 日に搾乳牛 8 頭が下痢を発症し、その後 1 週間で 14 頭に拡大した。下痢発生 1 週間前に県外から未經産牛を 2 頭導入していた。下痢発症牛には泥状から水様性の下痢、食欲不振および乳量低下が認められた。また、下痢を発症していない牛 9 頭にも食欲不振および乳量低下が認められた (乳量低下牛)。未經産導入牛 (導入牛)、乾乳牛および子牛は下痢を発症しなかった。

B 農場は繋飼い牛舎で搾乳牛 40 頭を飼養する酪農家で、平成 29 年 6 月 2 日に数頭が下痢を発症し、その後 1 週間で約 10 頭に拡大した。下痢発生 10 日前に県外より未經産牛を 2 頭導入していた。下痢発症牛の症状は A 農場と同様であり、導入牛および泌乳量の少ない牛は下痢を発症しなかった。なお、B 農場は A 農場と同じ市内にあり直線で約 4.8 km 離れていた。

二農場の出荷乳量は下痢発生 2、3 日後から低下した (図 1)。A 農場では下痢未発症の牛にも乳量低下を認め、その内 1 頭が泌乳停止となったため乳量低下が著しく、約 20 日程度継続した。一方 B 農場では通常の乳量より 2 割程度減少したが、7 日間程度で回復した。

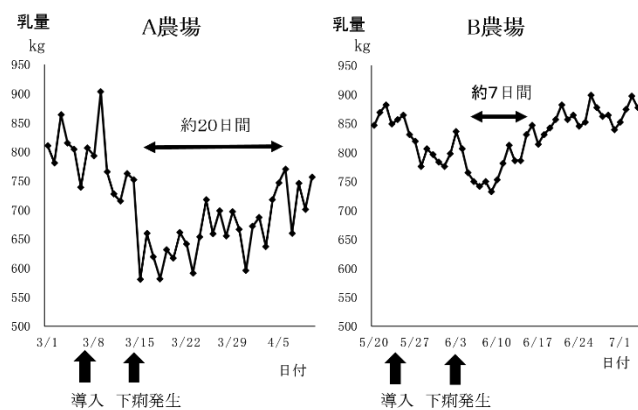


図1 A農場およびB農場の出荷乳量の推移

材料および方法

材料として A 農場の下痢発症牛 6 頭、下痢未発症牛である乳量低下牛 8 頭、導入牛 2 頭、乾乳牛 1 頭および子牛 2 頭の糞便およびペア血清を、B 農場の下痢発症牛 6 頭と導入牛 2 頭の糞便およびペア血清を用いた (表 1)。

1. ウイルス検査

遺伝子検査：糞便乳剤より抽出した RNA を用い RVC、RVB、牛コロナウイルス (BCV)、牛トロウイルス (BoTV) は Fukuda らの報告 [11]

に準じて Multiplex RT-PCR を実施した。牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) は Vilcek らの報告 [12] に基づき RT-PCR を実施した。

RVA 簡易検査：市販の簡易キット (ディップスティック栄研ロタ) を用いた。

血清抗体検査：RVA および RVC は間接蛍光抗体法 (IFA) で行い、BoTV、BVDV1 および BVDV2 は中和試験、BCV は血球凝集抑制試験 (HI) を実施した。

ウイルス分離：20%糞便乳剤をトリプシン (100 μ g/ml) 処理後、MA104 細胞に接種し、37°C 4 日間回転培養し、盲継代した。分離培養液より RNA を抽出し、RVC、RVB、BCV、BoTV [11]、BVDV [12]、哺乳類オルソレオウイルス [13]、牛エンテロウイルス [14] について RT-PCR を実施した。

2. 寄生虫検査

寄生虫検査は浮遊法により虫卵およびコクシジウムオーシストの有無を確認した。

結果

1. ウイルス検査

遺伝子検査：A 農場の下痢発症牛 6 頭、乳量低下牛 8 頭、導入牛 2 頭の糞便および B 農場の下痢発症牛 6 頭の糞便から RVC 特異遺伝子を検出した (表 2, 3)。その他のウイルスは検出されなかった。

RVA 簡易検査：A 農場の子牛 1 頭のみ陽性だった。

血清抗体検査：A 農場では 19 頭中 13 頭、B 農場では 8 頭中 6 頭のポスト血清で RVC 抗体上昇が認められ、その他のウイルスに有意な抗体の上昇は認められなかった。A 農場の導入牛 1 頭および B 農場の導入牛 2 頭はプレ血清で高い RVC 抗体価を示した (表 4, 5)。

表 1 材料：糞便およびペア血清

		頭数
A農場	下痢発症牛	6
	乳量低下牛	8
	下痢未発症牛	
	乾乳牛	1
	導入牛	2
	子牛	2
合計		19
B農場	下痢発症牛	6
	導入牛	2
	合計	8

表 2 A農場 糞便の遺伝子検査結果

	No.	RVC	BCV	RVB	BoTV	BVDV	RVA
下痢発症牛	1	+	-	-	-	-	-
	2	+	-	-	-	-	-
	3	+	-	-	-	-	-
	4	+	-	-	-	-	NT
	5	+	-	-	-	-	NT
	6	+	-	-	-	-	NT
乳量低下牛	7	+	-	-	-	-	NT
	8	+	-	-	-	-	NT
	9	+	-	-	-	-	NT
	10	+	-	-	-	-	NT
	11	+	-	-	-	-	NT
	12	+	-	-	-	-	NT
下痢未発症	13	+	-	-	-	-	NT
	14	+	-	-	-	-	NT
	乾乳牛	15	-	-	-	-	NT
	16	+	-	-	-	-	NT
	導入牛	17	+	-	-	-	NT
	18	-	-	-	-	-	+
	子牛	19	-	-	-	-	-

表3 B農場 糞便の遺伝子検査結果

	No.	RVC	RVB	BCV	BoTV	BVDV
下痢発症牛	1	+	-	-	-	-
	2	+	-	-	-	-
	3	+	-	-	-	-
	4	+	-	-	-	-
	5	+	-	-	-	-
	6	+	-	-	-	-

表4 A農場血清抗体検査

	No.	RVC		RVA		BCV		BVDV1		BVDV2		BoTV		
		pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	
下痢発症牛	1	<10	640	320	640	≥640	≥640	<2	<2	<2	<2	64	64	
	2	<10	320	640	640	≥640	≥640	<2	<2	<2	<2	128	64	
	3	<10	≥1280	320	640	≥640	≥640	<2	<2	<2	<2	64	64	
	4	<10	≥1280	NT	NT	≥640	≥640	<2	<2	<2	<2	128	32	
	5	<10	≥1280	NT	NT	≥640	≥640	<2	<2	<2	<2	128	128	
	6	<10	≥1280	NT	NT	≥640	≥640	<2	<2	<2	<2	128	128	
下痢未発症	7	<10	160	NT	NT	≥640	≥640	<2	<2	<2	<2	64	64	
	8	<10	640	NT	NT	160	≥640	<2	<2	2	2	32	32	
	9	<10	320	NT	NT	≥640	≥640	<2	<2	2	2	64	32	
	10	<10	160	NT	NT	≥640	≥640	≥256	≥256	≥256	≥256	128	32	
	11	160	320	NT	NT	NT	≥640	<2	<2	<2	<2	≥256	64	
	12	<10	320	NT	NT	≥640	≥640	<2	<2	<2	<2	128	128	
	13	320	640	640	320	≥640	≥640	<2	<2	<2	<2	≥256	64	
	14	320	320	640	320	≥640	≥640	<2	<2	<2	<2	128	128	
	乾乳	15	<10	160	NT	NT	≥640	≥640	<2	<2	16	16	≥256	32
	導入	16	40	320	640	640	≥640	≥640	≥256	≥256	≥256	≥256	32	32
		17	320	320	640	640	≥640	≥640	8	8	8	8	16	16
	子牛	18	<10	<10	160	320	≥640	≥640	128	128	≥256	≥256	128	128
		19	<10	<10	320	320	≥640	≥640	<2	<2	8	2	64	64

表5 B農場血清抗体検査

No.	IFA				中和試験						HI		
	RVC		RVA		BoTV		BVD1		BVD2		BCV		
	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	
下痢発症牛	1	40	320	320	320	32	32	<2	<2	<2	<2	≥640	≥640
	2	<10	320	80	160	64	128	<2	<2	<2	<2	≥640	≥640
	3	40	≥1280	320	320	64	64	<2	<2	<2	<2	≥640	≥640
	4	NT	320	NT	NT	NT	64	NT	<2	NT	<2	NT	≥640
	5	40	320	320	160	≥256	128	≥256	128	16	8	≥640	≥640
	6	80	640	320	320	≥256	≥256	≥256	≥256	16	16	≥640	≥640
導入牛	7	320	640	640	320	64	64	≥256	64	≥256	64	≥640	≥640
	8	160	160	320	320	≥256	128	≥256	128	16	16	≥640	≥640

ウイルス分離 : B農場の6検体中1検体の5代目で細胞変性効果を認めた(写真1)。分離培養液より抽出したRNAについてRT-PCRを実施したところRVC特異遺伝子を検出した。その他のウイルスは検出されなかった。しかし、安定したRVCの増殖に至らなかった。

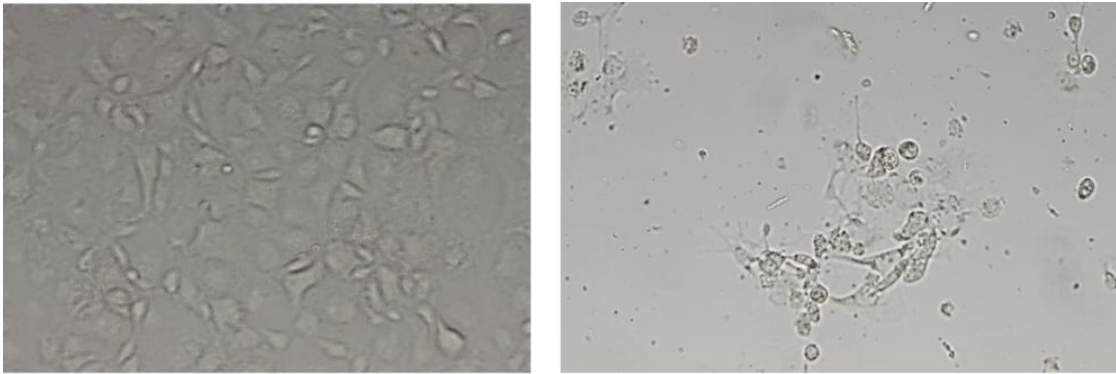


写真1 MA104細胞を用いたウイルス分離（100倍）

左：陰性対照 右：分離5代目でCPEを確認

2. 寄生虫検査

寄生虫卵、コクシジウムオーシストは検出されなかった。

まとめ

以上の結果から、二農場ともRVCによる成牛の集団下痢症と診断し、A農場では下痢を発症しなかった牛についてもRVC感染により乳量低下を引き起こしたと診断した。

疫学的関連調査

概要

県内では過去に①平成25年にC農場と②平成26年にA農場でRVCによる集団下痢症が発生しており、③平成29年A農場と④平成29年B農場の事例を加えて4例が確認されている（表6）。A農場と4例目のB農場は直線で約4.8km離れた同じ市内にあり、1例目のC農場はA農場と約4.9km、B農場と約4.1km離れた隣市にあり、全ての農場は5km以内に存在することが分かった（図2）。なお、①、③、④例目は直前に県外から牛を導入しており、抗体検査の結果より導入牛が農場へRVCを持ち込んだ可能性が示唆されている。これら4例について疫学的関連調査を行った。

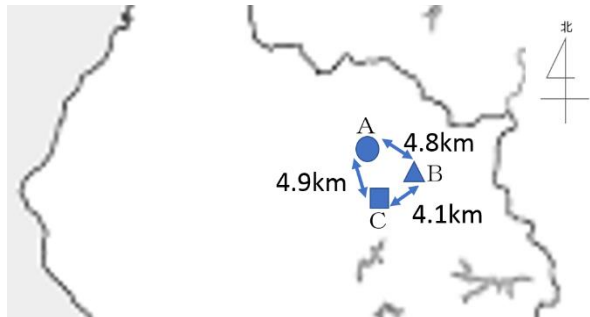


図2 発生農家の位置関係

●A農家 ▲B農家 ■C農家

材料および方法

材料は各事例の糞便3検体ずつとし、3例目は導入牛の糞便1検体を含む3検体とした（表6）。方法は糞便より抽出したRNAを用いて、RVCのVP6、VP7およびVP4遺伝子についてダイレクトシーケンスによって塩基配列を決定し、相同性を比較した。また、既報のRVC株の塩基配列を加えて系統樹解析を実施した。

表6 疫学的関連調査

発生年月	農場	疫学情報	材料
①H25年5月	C	直前に県外から牛を導入	糞便3検体
②H26年3月	A	不明	糞便3検体
③H29年3月	A	直前に県外から牛を導入	糞便3検体(導入牛1検体)
④H29年6月	B	直前に県外から牛を導入 A農場と同じ市内	糞便3検体

結果

各事例で採取した3検体は全て遺伝子が完全に一致し、1事例で1株のRVCが侵入していたことが明らかとなった。各事例で得られた株の遺伝子配列を比較した結果をまとめ(表7, 8, 9)、併せて各株の分子系統樹解析を図に示した(図3, 4, 5)。各株はこれまでに牛RVC株が属するG2P [3] 遺伝子型に分類され、各株の比較で相同性が最も低かった株は、VP6では③の株、VP7では④の株、VP4では①の株であった。またVP4では②③の株はgenogroup Iに、①④の株はgenogroup IIに分類された。これらの結果から、4株の相同性は低く、遺伝学的に異なる可能性が示唆された。

表7 各事例間のVP6遺伝子に関する相同性[%]

	①C農場 H25	②A農場 H26	③A農場 H29	④B農場 H29
①C農場 H25		99.0	94.8	99.4
②A農場 H26			94.5	98.5
③A農場 H29				94.6
④B農場 H29				

表8 各事例間のVP7遺伝子に関する相同性[%]

	①C農場 H25	②A農場 H26	③A農場 H29	④B農場 H29
①C農場 H25		98.5	96.4	92.3
②A農場 H26			95.3	91.6
③A農場 H29				91.6
④B農場 H29				

表9 各事例間のVP4遺伝子に関する相同性[%]

	①C農場 H25	②A農場 H26	③A農場 H29	④B農場 H29
①C農場 H25		77.1	76.7	95.3
②A農場 H26			96.5	77.2
③A農場 H29				77.2
④B農場 H29				

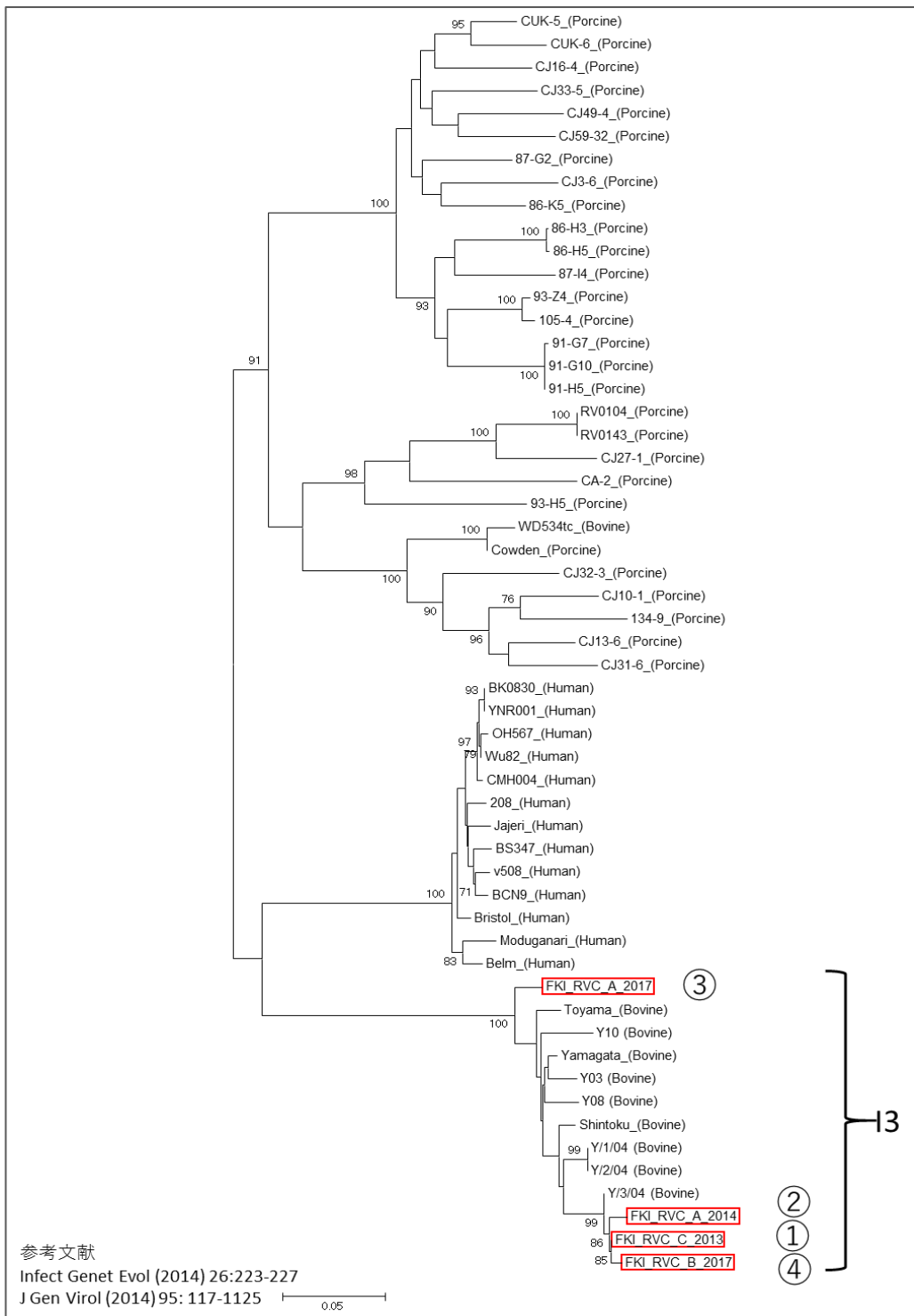


図3 VP6の分子系統樹

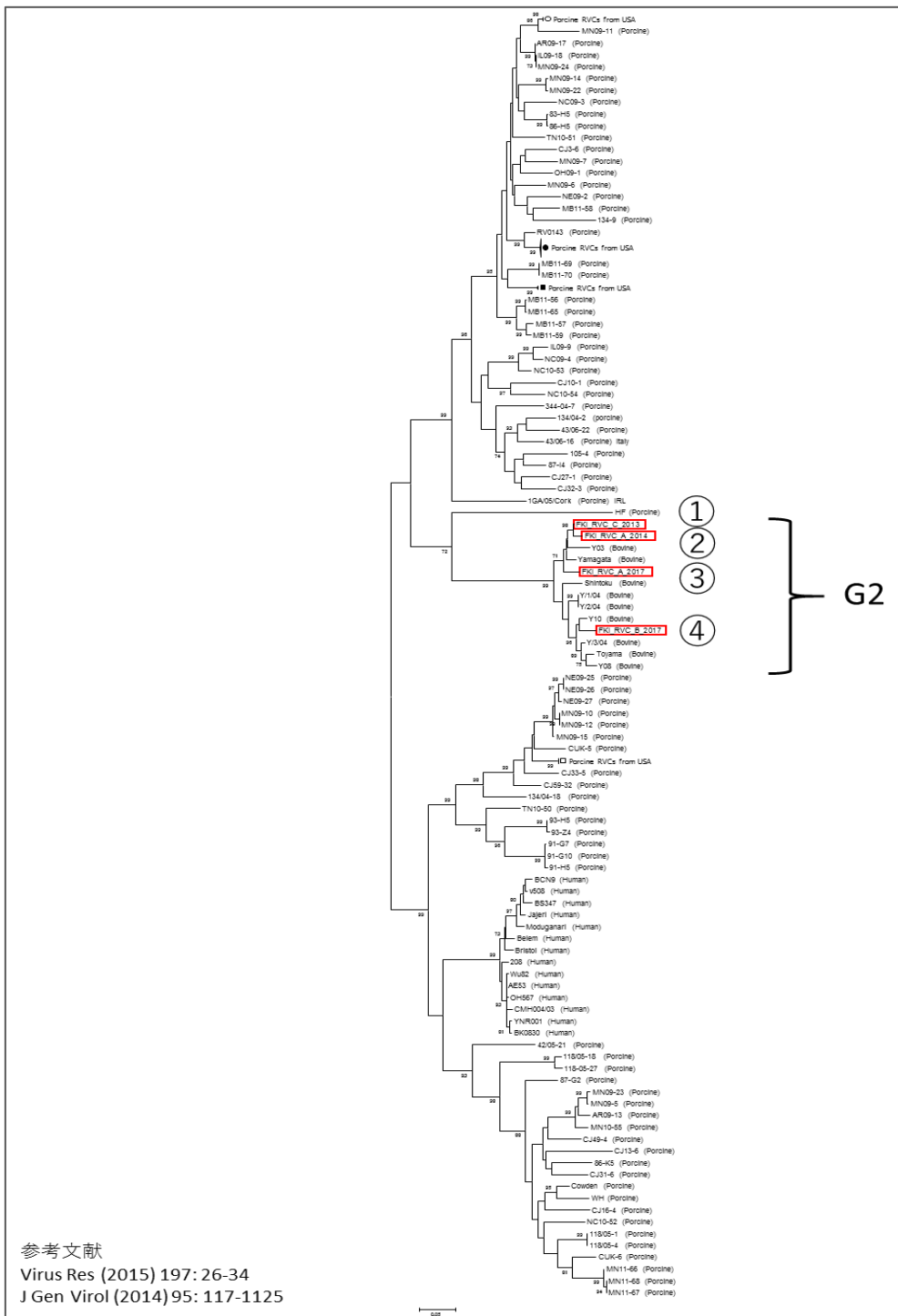


図4 VP7の分子系統樹

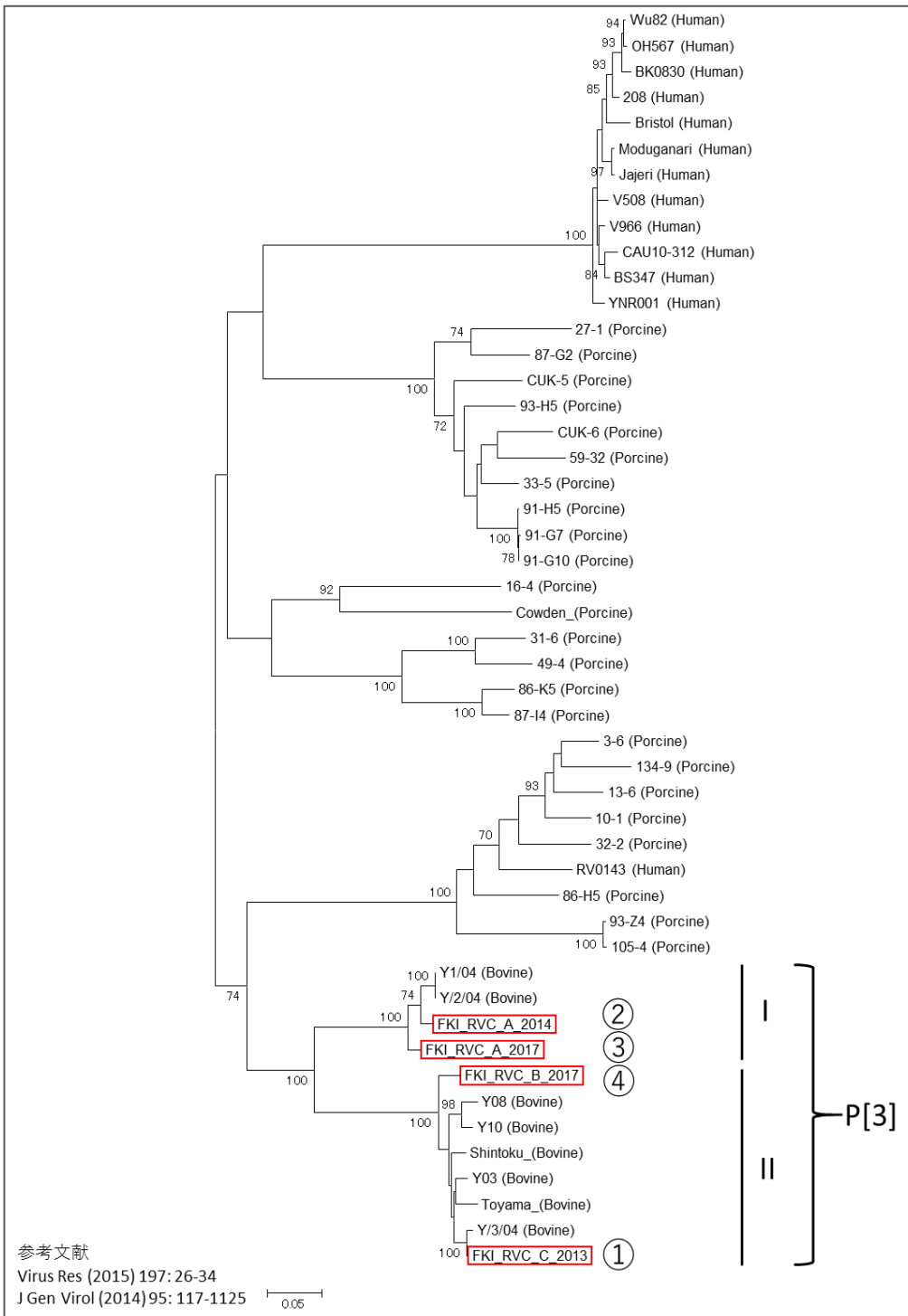


図5 VP4の分子系統樹

考察

平成 29 年 3 月と 6 月に同じ市内の二酪農家で成牛の集団下痢症が発生し、病性鑑定の結果から RVC による集団下痢症と診断した。乳量低下による減収は A 農場で約 18 万円、B 農場で 4 万 6 千円と試算（福井県農業共済組合）され、A 農場では下痢未発症の牛にも RVC 感染による乳量低下が拡がったため経済的損失が大きかった。また、A 農場では RVC による集団下痢症の発生は 2 回目であり、何らかの対策が必要と考えられた。なお RVC は分離が難しいとされており、分離の報告はほとんどない [2, 9]。今回 B 農場の 1 検体から分離の可能性があり、安定的な増殖に向けて分離を継続中である。

疫学的関連調査の結果では、県内で発生した RVC による集団下痢症の事例は疫学的関連が低く、血清抗体検査の結果からも、導入牛がウイルスを農場内に持ち込んだ可能性が高いと考えられた。対策として、県外導入牛は下痢などの異常がなくても一定期間隔離することが非常に重要であることが再確認された。しかしながら隔離スペースのない農場も多く、個人での対策には限界がある。他県では廃業した鶏舎を改築した共同隔離牛舎を設置し、伝染性疾患のまん延を予防する取り組みが報告されており [10]、当県でも参考になると考えられる。導入牛の隔離は、口蹄疫などその他の伝染性疾患の侵入対策としても有効であることから、引き続き農家に対して指導をしていく。

謝辞

遺伝子解析を実施していただい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、ウイルス・疫学研究領域、鈴木亨先生に深謝いたします。

引用文献

- [1] 牛病学 第三版 近代出版 237-239
- [2] Tsunemitsu H, Saif LJ : J Clin Microbiol, 29, 2609-2613 (1991)
- [3] Mawatari T et al. : J Vet Med Sci, 66(7), 887-890 (2004)
- [4] 宮本剛志ら：平成 23 年度富山県業績発表会抄録
- [5] 佐藤圭介ら：平成 23 年度新潟県業績発表会抄録
- [6] 宮本純子ら：平成 24 年香川県業績発表会抄録
- [7] 葛城肅仁ら：平成 25 年福井県業績発表会抄録
- [8] 大竹祥紘ら：平成 28 年栃木県業績発表会抄録
- [9] 中山恵：第 57 回全国業績発表会抄録
- [10] 福留信司ら：平成 21 年新潟県業績発表会抄録
- [11] Fukuda M et al. : Arch Virol, 157, 1063-1069 (2012)
- [12] Vilcek S, et al. : Arch Virol, 136. 309-323 (1994)
- [13] Thomas P. Leary et al. : J. Clin. Microbiol, 40, 1368-1375 (2002)
- [14] Miquel A J, et al. : Appl Environ Microbiol, 71 (7). 3536-3543 (2005)