

## 原 著

## 牛ロタウイルス C の関与が疑われた子牛の集団下痢症

大竹祥紘<sup>1)†</sup> 米山州二<sup>1)</sup> 大関綾子<sup>1)</sup> 猿山由美<sup>1)</sup>戸崎香織<sup>1)</sup> 小松亜弥子<sup>1)</sup> 鈴木 亨<sup>2)</sup>

1) 栃木県県央家畜保健衛生所 (〒321-0905 宇都宮市平出工業団地 6-8)

2) 国研農業・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

(〒305-0856 つくば市観音台 3-1-5)

(2017年9月25日受付・2018年7月17日受理)

## 要 約

平成28年5～6月、栃木県内の公共牧場の子牛(8～10カ月齢)が下痢を発症し、発症牛の糞便から牛コロナウイルス(BCV)の遺伝子及びコクシジウムの虫卵に加え、牛ロタウイルスC(RVC)の遺伝子が検出された。また、これらのウイルスに対する抗体検査でも、抗体価の有意な上昇が認められた。本症例により、RVCは子牛にも感染することが示唆されたことから、当所で保管している栃木県内の乳用幼若牛の血清100検体についてRVC抗体保有状況を調査した結果、83%の農場で抗体保有牛が検出され、特に12～23カ月齢の子牛では半数が抗体を保有していることが判明した。RVCは一般的に成牛下痢の原因ウイルスの1つとされてきたが、今回の調査を通じて、子牛の下痢でもその要因の1つとして関与していることが示唆された。——キーワード：子牛、下痢、抗体保有状況、ロタウイルスC。

-----日獣会誌 71, 697～701 (2018)

ロタウイルスはレオウイルス科に属し、11本の分節した2本鎖RNAをゲノムとして保有している。ロタウイルスは、冬季乳幼児嘔吐下痢症の主要原因ウイルスの1つとして発見され、単独感染による胃腸炎をはじめ、腸炎を起こすその他の病原体と混合感染し、重症下痢を引き起こすこと[1]などが報告されている。宿主域は広く、多数の哺乳類や鳥類で検出されている。本ウイルスは、ウイルス粒子の内殻蛋白質VP6をコードする遺伝子の違いによって、8種(ロタウイルスA～H)に分類される。さらに、それぞれの種は最外殻を構成する2種類の中和抗原VP7、VP4の遺伝子配列の違いによって型別され、ロタウイルスC(RVC)では、GxPx(G型：Glycoprotein, P型：Protease-sensitive protein)(xは型別番号)のように表記される[2]。

牛では、これまでにロタウイルスA(RVA)、ロタウイルスB(RVB)、RVCが検出されており、RVAはおもに子牛の下痢の原因病原体として、RVB、RVCは成牛の下痢の原因病原体として知られている[3]。RVAによる下痢は毎年全国的に発生が報告されているが、

RVCによる下痢は、1991年に国内初の分離株である新得株が分離されて以降、搾乳牛を中心に散発的な発生が報告されている[4, 5]。また、国内の搾乳牛から採取された牛RVCの遺伝子型はG2P3が主流である[2]。

RVC感染のおもな症状として、Mawatariら[5]による報告では、搾乳牛では突発性下痢(褐色水様性で血便は認めず、3～5日で回復)や搾乳量の減少(最大で約10%が1週間継続)を認めているが、同居子牛ではおもな症状は認めていない。また、Tsunemitsuら[6]は、過去に国内の搾乳牛及び肉用成牛におけるRVC抗体保有状況調査を実施し、56%の牛で抗体を検出したことを報告している。しかし、本報告において子牛のRVC抗体保有状況調査は実施していない。以上のことから、RVCの子牛の下痢に対する関与はこれまでのところ不明である。

今回、栃木県内で子牛の下痢で初めてRVCが検出されたことを受けて、栃木県内の乳用幼若牛の月齢ごとのRVC抗体保有状況を調査し、子牛におけるRVCの感染実態を明らかにすることを試みた。

† 連絡責任者：大竹祥紘(栃木県県央家畜保健衛生所)

〒321-0905 宇都宮市平出工業団地 6-8

☎ 028-689-1200 FAX 028-689-1279

E-mail: ootakey02@pref.tochigi.lg.jp

## 材料及び方法

**検査材料：**栃木県内の公共牧場において、2016年5月22～25日に水様性の下痢を発症した8カ月齢の牛9頭、及び6月1日に泥状から水様性の下痢を続発した10カ月齢の牛5頭の糞便（正常～水様）及びペア血清（急性期血清：5月25日、6月1日／回復期血清：6月22日）を検査に用いた。さらに、栃木県内の乳用幼若牛のRVC抗体保有状況調査のため、下痢などの臨床症状を認めていない牛から採取された血清100検体（12戸分：0～5カ月齢9頭、6～11カ月齢8頭、12～23カ月齢6頭、24～47カ月齢28頭、48カ月齢以上49頭）を検査に供した。

**病原体検査：**糞便14検体について、Eagle's minimum essential medium培地で10%乳剤を作製した後、12,000×gで10分間遠心し、その上清を0.45μmのフィルターでろ過したものについて、RNA抽出キット（Direct-zol RNA MiniPrep, Zymo Research Corp. Orange, CA, U.S.A.）を用いてRNAを抽出した。RVA, RVB, RVC, 牛トロウイルス（BToV）、牛コロナウイルス（BCV）の特異遺伝子を対象に既報 [7, 8] に従って、逆転写PCR（RT-PCR）を実施した。また、病性鑑定マニュアル第4版（[http://www.naro.affrc.go.jp/org/niah/disease\\_byousei-kantei2016/index.html](http://www.naro.affrc.go.jp/org/niah/disease_byousei-kantei2016/index.html)）に従って、細菌学的検査及び寄生虫学的検査を実施した。さらに、急性期血清14検体については同上のキットでRNAを抽出し、牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）の特異遺伝子を対象に、既報 [9] に従ってRT-PCRを実施した。

**抗体検査：**ペア血清14検体について、間接蛍光抗体法（IFA）によりRVC（新得株）に対する抗体価を、また中和試験によりBCV（掛川株）、BVDV（Nose株、KZ91CP株）、BToV（愛知株）に対する抗体価を測定した。なお、急性期から回復期にかけて4倍以上の抗体価の上昇が認められた場合を抗体価の有意な上昇と判断した。

**RVCの分子系統樹解析：**RT-PCRで検出したRVC2検体のVP7及びVP4遺伝子のそれぞれの翻訳領域について、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、GenBankから収集した既知のRVC株の塩基配列とともに、MEGA7（<http://www.megasoftware.net/>）で整列化し、Neighbor-joining法 [2] によって分子系統樹を作成した。なお、遺伝的距離についてはmaximum composite likelihood法により算出し、ブートストラップ解析は1,000回実施した。また、塩基配列の相同性は遺伝情報処理ソフトウェア（GENETYX ver.6.1, 株ゼネティクス, 東京）を用いて解析した。

**RVC抗体保有状況調査：**保存血清100検体（12戸分）について、IFAによってRVC抗体価を測定し、20倍以上の抗体価を認めた検体を陽性と判断した。

## 成 績

**発生状況：**本集団下痢症の発生時、当該公共牧場では搾乳牛約100頭、子牛約180頭が飼養（マス飼い）されていた。初発牛は2016年4月25～26日にかけて導入された群の一部で、同年5月22日から2頭で軽度の下痢を確認し、5月25日までに計9頭が水様性の下痢を発症した。また、6月1日に下痢を続発した5頭は、同一牛舎内の別枠で飼養していた群であった。

**病原体検査：**糞便では14検体中2検体でRVC、6検体でBCVの特異遺伝子を検出した（表）。一方、RVA, RVB, BToV, BVDVの特異遺伝子は検出されなかった。細菌検査では有意菌の分離はなかったが、寄生虫検査では糞便14検体中9検体でコクシジウムオーシスト（200～4,200個/g）を検出した（表）。

**抗体検査：**RVC及びBCVに対する抗体価の有意上昇をそれぞれ11頭及び10頭で認めたが、それらのうち8頭は両ウイルスに対する抗体価の有意な上昇を認めた（表）。また、BVDV及びBToVについては、すべての個体で抗体価の上昇は認められなかった（データ未掲載）。

**RVCの分子系統樹解析：**RVCに対するRT-PCR陽性2検体間でVP7及びVP4遺伝子の塩基配列に相違は認められなかったため、本症例は同一のRVC株に起因することが考えられた。また、分子系統樹解析の結果、本株は既報の国内の牛RVCが属するG2P3に分類されることが示された（図1）。相同性解析の結果、今回塩基配列を決定した2検体のVP7遺伝子は2010年に山形県の乳用成牛から検出されたY10株（相同性96.6%）、VP4遺伝子は1991年に北海道の乳用成牛から検出された新得株（相同性96.3%）と遺伝学的に最も近縁であることが判明した。

**RVC抗体保有状況調査：**12戸中10戸（83%）でRVC抗体保有牛が確認され、全検体での陽性率は53%（53/100頭）であった。また、月齢別では、12カ月齢未満の牛のRVC抗体保有率は12%（2/17頭）であったが、12～23カ月齢の牛のRVC抗体保有率は50%（3/6頭）に上昇した（図2）。

## 考 察

栃木県内の公共牧場において子牛14頭に泥状～水様性の下痢が認められ、病性鑑定を実施した。その結果、発症牛はRVC, BCV, コクシジウム等の複数の病原体に感染していることが確認され、その主要要因となったのは、おそらく子牛において単独感染での病原性が証明

表 糞便からの病原体検出状況並びに急性期及び回復期血清を用いた抗体検査結果

No.	月齢	発症日	糞便採取日	PCR法		コクシジウム(OPG)*	RVC (Shintoku) 抗体価		BCV (kakegawa) 抗体価	
				RVC	BCV		急性期	回復期	急性期	回復期
1	8	5/23	5/25	-	-	400	<20	320	128	256
2	8	5/25	5/25	-	-	1,200	<20	320	128	1024
3	8	5/22	5/25	-	-	400	320	640	32	256
4	8	5/23	5/25	+	-	1,000	80	1280	128	512
5	8	5/23	5/25	-	-	200	<20	40	128	512
6	8	5/23	5/25	-	+	4,200	<20	40	128	512
7	8	5/23	5/25	+	-	200	80	5120	16	256
8	8	5/24	5/25	-	-	3,200	320	320	256	256
9	8	5/22	5/25	-	+	-	640	640	128	512
10	10	6/1	6/1	-	-	-	640	2560	256	512
11	10	6/1	6/1	-	+	200	1280	5120	4	1024
12	10	6/1	6/1	-	+	-	320	1280	64	128
13	10	6/1	6/1	-	+	-	80	2560	64	1024
14	10	6/1	6/1	-	+	-	160	1280	256	2048

\* OPG : oocysts per gram

■ : 急性期から回復期にかけて抗体価の有意な上昇を示したものを表す

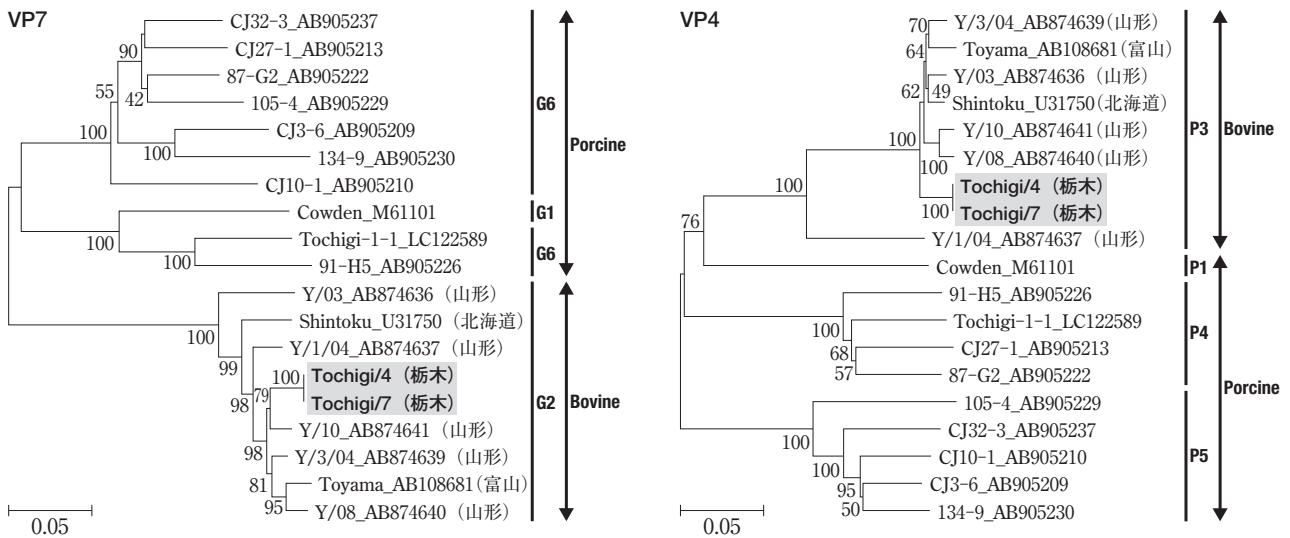


図1 RVCのVP7(左図)及びVP4(右図)遺伝子に対する分子系統樹

系統樹の右側に遺伝子型及び検出動物種を示す。■は今回検出した株を表し、本研究以外の株については全て株名、GenBankアクセッション番号の順で示してある(牛由来株についてはさらに検出地域名を記載)。

系統樹上の数値はブートストラップ値(パーセンテージ)であり、スケールバーは塩基置換率を示す。

されているBCVやコクシジウムであると推測された。また、急性期血清を用いた抗体検査では、RVCに対して半数が160倍以上の抗体価を、BCVに対しては9頭が128倍以上という高い抗体価を示したが、それらの特異遺伝子が検出された個体は全体の半数以下(RVC: 2/14頭, BCV: 6/14頭)であったことから、病性鑑定実施時は、これらウイルス感染後の回復期であったことが推測された。

豚の事例では、勝田ら[10]の調査により、病原体の混合感染によって下痢を呈した離乳豚の90.9%からロタウイルスが検出されている。このことから、RVCは子牛においては下痢をはじめとする各種疾病の重症化をもたらす要因として関与している可能性が考えられ、実際本症例でもRVCの事前感染により腸管粘膜障害等を引き起こしてBCVやコクシジウムといった他の病原体に感染、発症しやすい状態になっていたと推測さ

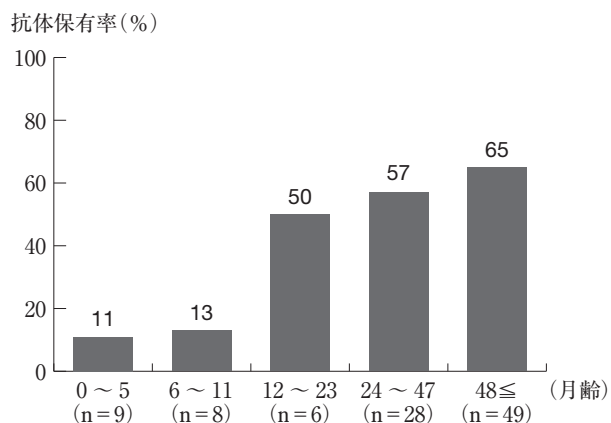


図2 栃木県内で飼養されている乳牛における月齢別のRVC抗体保有状況

れた。

さらに、その他の調査結果として、初発日、続発日付近において外気温の日較差が大きく推移していたことも判明した。今回の発生は導入間もない群での発生であったことから、複数病原体の感染に加えて、気象条件や群の再編成等の環境ストレスによる免疫力の低下も一要因として重なり、今回の集団下痢に至ったと推測された。

今後、経営規模拡大や労働力軽減に役立てるため、需要が高まってくることが想定される公共牧場や集合預託施設であるが、不特定多数の牛が集合するということが認識し、衛生管理の徹底や細やかな牛群観察を実施することが非常に重要であることが改めて認識された。

分子系統樹解析により、今回子牛で検出したRVCの遺伝子型は、国内の乳用成牛でよく検出されている株と同じG2P3に分類された。さらに、相同性解析の結果、成牛由来既知株と高い相同性(84.0～96.6%)を示したことから、国内に存在している牛RVCは成牛、子牛の区別なく広くまん延していることが示唆された。

抗体保有状況調査では、栃木県内の乳用幼若牛にも広くRVCが流行していることが判明した。これまでのRVCの症例はすべて成牛での発生であり、子牛におけるRVCの感染実態は不明のままであったが、今回の検査により、少なくとも8～10カ月齢の子牛でもRVCに感染していること、さらに24カ月齢に至るまでの間に約半数の牛がRVCに感染している実態が明らかとなった。

成牛に集団下痢症を引き起こすとされるRVCであるが、本調査から、子牛においても下痢の発症に関与している可能性が示された。したがって、子牛の下痢の場合にはRVAだけでなく、RVCの関与も疑い、遺伝子検査及び抗体検査を実施することが必要と考えられた。今後

も、こうした流行状況調査や農場内における感染動態の解明、さらに疫学情報を蓄積していき、牛RVCの感染実態を明らかにしていきたいと考えている。

## 引用文献

- [1] Zhang SX, Zhou YM, Xu W, Tian LG, Chen JX, Chen SH, Dang ZS, Gu WP, Yin JW, Serrano E, Zhou XN : Impact of co-infections with enteric pathogens on children suffering from acute diarrhea in southwest China, *Infect Dis Poverty*, 5, 64 (2016), (online), (<https://idpjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40249-016-0157-2>), (accessed 2017-7-18)
- [2] Suzuki T, Hasebe A, Miyazaki A, Tsunemitsu H : Analysis of genetic divergence among strains of porcine rotavirus C, with focus on VP4 and VP7 genotypes in Japan, *Virus Res*, 197, 26-34 (2015)
- [3] 恒光 裕 : ロタウイルス病, 動物の感染症, 明石博臣編, 第3版, 103-104, 近代出版, 東京 (2011)
- [4] Tsunemitsu H, Saif LJ, Jiang BM, Shimizu M, Hiro M, Yamaguchi H, Ishiyama T, Hirai T : Isolation, characterization, and serial propagation of a bovine group C rotavirus in a monkey kidney cell line (MA104), *J Clin Microbiol*, 29, 2609-2613 (1991)
- [5] Mawatari T, Taneichi A, Kawagoe T, Hosokawa M, Togashi K, Tsunemitsu H : Detection of a bovine group C rotavirus from adult cows with diarrhea and reduced milk production, *J Vet Med Sci*, 66, 887-890 (2004)
- [6] Tsunemitsu H, Jiang B, Saif LJ : Detection of group C rotavirus antigens and antibodies in animals and humans by enzyme-linked immunosorbent assays, *J Clin Microbiol*, 30, 2129-2134 (1992)
- [7] Fukuda M, Kuga K, Miyazaki A, Suzuki T, Tasei K, Aita T, Mase M, Sugiyama M, Tsunemitsu H : Development and application of one-step multiplex reverse transcription PCR for simultaneous detection of five diarrheal viruses in adult cattle, *Arch Virol*, 157, 1063-1069 (2012)
- [8] Kuzuya M, Fujii R, Hamano M, Nakamura J, Yamada M, Nii S, Mori T : Molecular analysis of outer capsid glycoprotein (VP7) genes from two isolates of human group C rotavirus with different genome electropherotypes, *J Clin Microbiol* 34, 3185-3189 (1996)
- [9] Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ : Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis, *Arch Virol*, 136, 309-323 (1994)
- [10] 勝田 賢, 河本麻理子, 川島健司, 恒光 裕 : 子豚下痢便からの病原微生物の検出成績, 豚病会報, 48, 1-6 (2006)

## Possible Involvement of Bovine Rotavirus C on Outbreak of Diarrhea in Calves

Yoshihiro OHTAKE<sup>1)</sup>, Shuji YONEYAMA<sup>1)</sup>, Ayako OZEKI<sup>1)</sup>, Yumi SARUYAMA<sup>1)</sup>,  
Kaori TOSAKI<sup>1)</sup>, Ayako KOMATSU<sup>1)</sup> and Tohru SUZUKI<sup>2)</sup>

1) *Central Tochigi Prefectural Livestock Health and Hygiene Center, 6-8 Hiraide kougyo-danchi, Utsunomiya, 321-0905, Japan*

2) *Division of Viral Disease and Epidemiology, National Institute of Animal Health, National Agricultural and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*

### SUMMARY

Bovine rotavirus C (RVC), bovine coronavirus (BCV), and coccidia were detected in a herd of calves with diarrhea at a public ranch in Tochigi Prefecture from May to June 2016. A significant increase in anti-RVC and -BCV titers were also observed in the calf herd. Moreover, 100 serum samples collected at 12 farms in Tochigi Prefecture were subjected to an indirect immunofluorescence assay to investigate bovine RVC antibody prevalence in dairy calves from a variety of young age groups. Antibodies against RVC were detected at 83% of the farms. Our data also showed that about 50% of calves from 12 to 23 months of age were infected with bovine RVC. In this study, we demonstrate that bovine RVC is an important causative agent of diarrhea in adult cows as well as calves. — Key words : calf, diarrhea, prevalence of antibody, rotavirus C.

† *Correspondence to : Yoshihiro OHTAKE (Central Tochigi Prefectural Livestock Health and Hygiene Center)  
6-8 Hiraide kougyo-danchi, Utsunomiya, 321-0905, Japan  
TEL 028-689-1200 FAX 028-689-1279 E-mail : ootakey02@pref.tochigi.lg.jp*

— *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 71, 697 ~ 701 (2018)