

下痢症非流行牛群における下痢症原因ウイルスの検索

東部家畜保健衛生所 山本英次

はじめに

牛のウイルス性下痢症は、発生した場合の経済的被害が大きく、その制御は畜産経営上重要である。ウイルス性下痢症発生時には、病性鑑定検査や疫学調査が実施されるものの、原因ウイルスの農場への侵入経路が判明しない場合も多く見られる。一方で、下痢症状のない牛群の牛（以下健康牛）からの下痢症原因ウイルス（以下ウイルス）の検出が報告されている。このことは、健康牛が感染源となってる可能性を示唆している。しかし、健康牛のウイルス保有状況等についての情報は十分蓄積されていない。このため、より有効な下痢症の発生予防対策に活用するため、県内の健康牛での下痢症原因ウイルスの保有状況を調査した。

材料

調査の実施協力について同意の得られた、搾乳牛約 100 頭を飼育の県内 1 酪農家を対象農家とし、同農家を実施している「ヨーネ病清浄性確認検査」の余剰糞便を使用し、平成 20 年 12 月から平成 21 年 10 月までの期間に 4 回採材された、延べ 449 検体を材料とした。（表 1）

(表1)材料

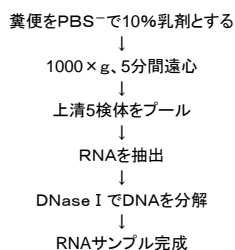
- 搾乳牛約100頭を飼育の県内1酪農家
- ヨーネ病清浄性確認検査余剰糞便
- 採材日(検体数)
 - 平成20年12月18日 (111)
 - 平成21年 4月27日 (115)
 - 平成21年 7月27日 (113)
 - 平成21年10月13日 (110) 合計 449検体

方法

RNA抽出

糞便をPBS⁻で10%乳剤とし、1000×g、5分間遠心後、上清5検体をプールし、ISOGEN-LS（ニッポンジーン）を用いてRNAを抽出した。抽出RNA中の残存DNAを除去するため、DNase I（タカラバイオ株式会社）でDNAを分解した。（表 2）

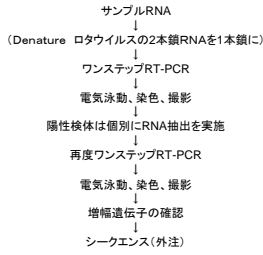
(表2)RNA抽出



PCR法

牛コロナウイルス（以下BCV）、牛トロウイルス、A群ロタウイルス、B群ロタウイルスの4種類について、PrimeScript[®] One Step RT-PCR Kit Ver.2（タカラバイオ株式会社）を用いてワンステップRT-PCR法により検出を試みた。標的遺伝子と思われる増幅が確認された検体については、再度、サンプルごとにRNAを抽出し、PCRを実施した。標的遺伝子と思われる増幅が確認された検体については、増幅産物を精製後、遺伝子配列の決定した。（タカラバイオ株式会社）（表 3）

(表3)RT-PCR



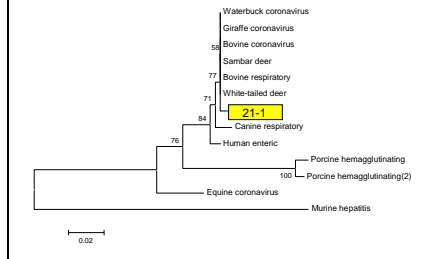
結果

平成 20 年 12 月採材の 111 検体中 1 検体 (0.9%) から BCV とと思われる遺伝子の増幅が確認された。遺伝子配列決定の結果、BCV 遺伝子であることが確認された。その他は陰性であった。(表 4、5)

(表4)結果

	H20.12.18	H21.4.27	H21.7.27	H21.10.13	計
牛コロナウイルス	1/111	0/115	0/113	0/110	1/449
牛トロウイルス	0/111	0/115	0/113	0/110	0/449
A群ロタウイルス	0/111	0/115	0/113	0/110	0/449
B群ロタウイルス	0/111	0/115	0/113	0/110	0/449
計	1/111	0/115	0/113	0/110	1/449

(表5)検出BCV遺伝子の系統樹解析



考察

これまで報告されている、健康牛からの下痢症原因ウイルス検出状況と比較を行った。BCV に関する検出率は、桐沢らが平成 15 年から 16 年にかけて実施した調査では 4.4%、伊藤らが平成 18 年から 20 年にかけて実施した調査では、呼吸器からではあるものの 2.8%であり、本調査の検出率 0.9%よりも高かった。(表 6) 今後、BCV 陽性検体についてはS 遺伝子の解析を実施し、国内で流行株との比較、また、同農場では、今後検出される株との比較を実施する予定である。

(表6)これまでの報告との比較

報告者	調査期間	調査地域	調査頭数	陽性率(%)				備考
				コロナ	トロ	Aロタ	Bロタ	
桐沢ら	H15.10 ~ H16.3	北海道	114	4.4	4.4	5.3	NT	
伊藤ら	H18 ~ H20	1道16県	106	2.8*	NT	NT	NT	*呼吸器
本調査	H20.12 ~ H21.10	香川県	111	0.9	0	0	0	