

## 7 2018年から2024年に検出された牛A群ロタウイルスの分子疫学解析

県央家畜保健衛生所

関野惣介、湯澤裕史

### はじめに

牛ロタウイルスA感染症は、A群ロタウイルス(GAR)による、下痢を主訴とする疾病である。1～2週齢の新生子牛で発生が多く、当県においても子牛の下痢糞便からGARが最も高頻度に検出されている。症状は黄色の水様性下痢であり、死亡率は0～50%と報告されている<sup>1)</sup>。また、GAR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。血清型抗原は外殻蛋白質のVP7とVP4に存在し、VP7及びVP4の抗原性による血清型をG型及びP型と呼び<sup>1)</sup>、それぞれの遺伝子型から各株をGXP[X]と表記するのが通例である<sup>2)</sup>。予防には母子免疫を利用したワクチンが使用されているが、特定の遺伝子型の株をもとに作られているため、効果が限定的である可能性がある<sup>3)</sup>。さらに、当県における流行株の遺伝子型は調査されておらず、流行状況も不明である。そこで、県内におけるGARの遺伝子型と流行状況を把握するために、過去7年において病性鑑定で検出されたGARの分子疫学解析を実施したので、概要を報告する。

### 材料及び方法

#### 1 材料

2018年2月から2024年3月に、下痢を主訴とする病性鑑定の結果、GARが検出された31農場33症例の糞便33検体を材料とした。なお、33症例中3症例は同一農場であった。品種は黒毛和種が19検体、ホルスタイン種が

10検体、交雑種が4検体である。日齢は30日齢未満の子牛が31検体、9か月齢の育成牛が1検体、4歳の成牛が1検体である。

#### 2 方法

-80℃で保存していた10%糞便乳剤上清からMagExtractor™-RNA-（東洋紡社）を用いてRNAを抽出し、VP7遺伝子及びVP4遺伝子を標的としたnested-RT-PCR及びsemi-nested-RT-PCRを実施した<sup>4)</sup>。その後、それぞれの増幅産物を用いて、ダイレクトシーケンス法により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GAR株の塩基配列とともに、フリーソフトのMEGA7（[www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)）で整列化し、Neighbor-joining法によって分子系統樹を作成することで、遺伝子型を判定した。

### 結果

分子系統樹解析の結果、VP7遺伝子については、G6及びG10に分類された（図1）。なお、1株のみPCRで増幅されなかったため、分類不明のGXとした。VP4遺伝子については、多くはP[5]及びP[11]に分類されたが、1株ずつのみP[14]及びP[29]に分類された（図2）。そして、各株を遺伝子型ごとに分類した結果、G6P[5]、G6P[11]、G10P[11]、G6P[14]、GXP[29]の5種類に分類され、うちG6P[5]、G6P[11]、G10P[11]の3種類が主に検出され、計94%を占めた（表1）。また、1株ずつのみ検出されたG6P[14]、GXP[29]の2株は、それぞれ成牛及び育成牛下痢便から検出された。

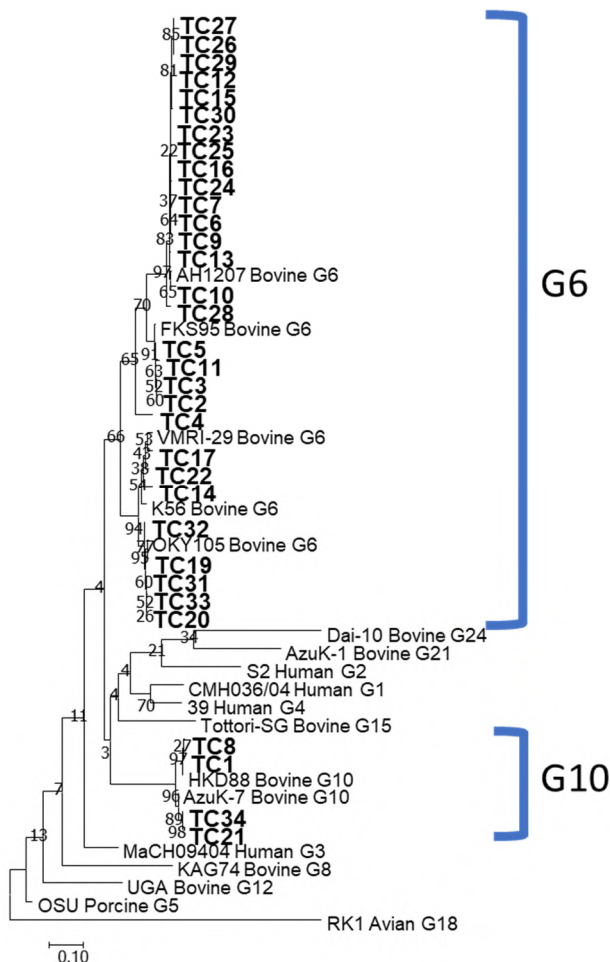


図 1 VP7 遺伝子 (729bp) の分子系統樹

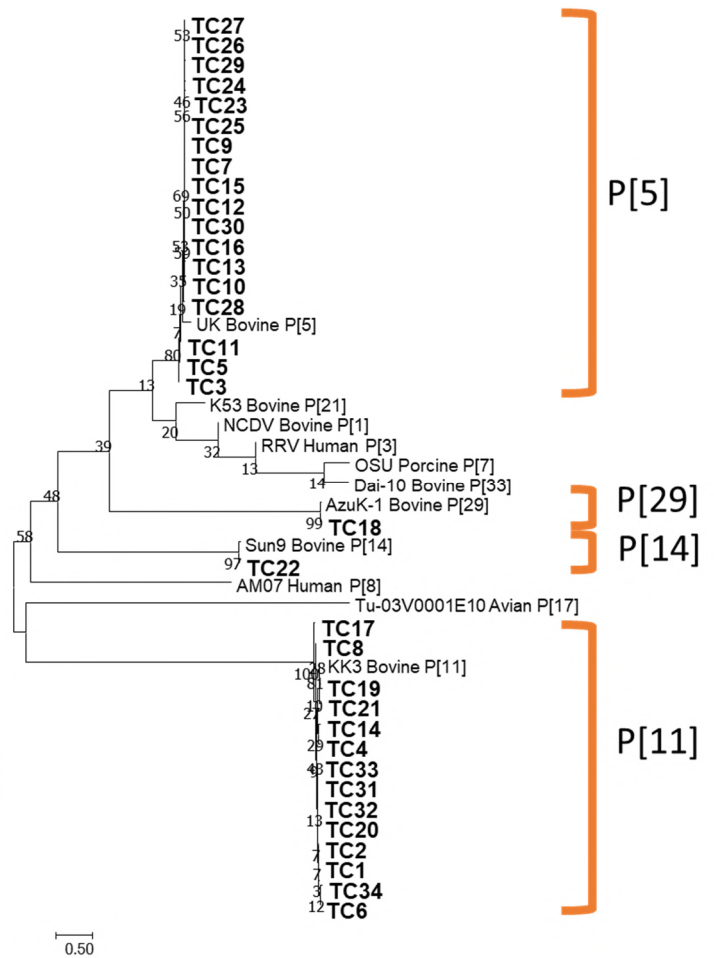


図 2 VP4 遺伝子 (587bp) の分子系統樹

表 1 品種ごとの遺伝子型分類

| 遺伝子型     | 黒毛和種 | ホルスタイン種 | 交雑種 | 計       |
|----------|------|---------|-----|---------|
| G6P[5]   | 16   | 0       | 2   | 18(55%) |
| G6P[11]  | 0    | 7       | 2   | 9(27%)  |
| G10P[11] | 2    | 2       | 0   | 4(12%)  |
| G6P[14]  | 0    | 1       | 0   | 1(3%)   |
| GXP[29]  | 1    | 0       | 0   | 1(3%)   |
| 計        | 19   | 10      | 4   | 33      |

また、品種ごとの遺伝子型を確認すると黒毛和種では G6P[5] が、ホルスタイン種では G6P[11] が多く検出され、品種により流行株の遺伝子型が異なっていた (表 1)。

さらに、VP4 遺伝子については同一遺伝子

型内で塩基配列の差異がほとんど認められなかったが、VP7 遺伝子については、同一遺伝子型内でもいくつかのクラスターを形成していた。そのため、新たに G6 内のクラスターを G6a～e、G10 内のクラスターを G10a、b と分類し (図 3)、各株を例のように表記した (例: G6aP[5])。そして、遺伝子型だけでなく、G 型のクラスターも加味して分類した各株を、採材年毎に表へまとめた (表 2)。その結果、G6P[5]、G6P[11]、G10P[11] の 3 種類は、さらに計 9 種類に分類され、表 2 のとおり、同じ遺伝子型でも 1～4 年で新しいクラスターの株に置き換わっていた。

なお、G6eP[11] のうち同一農場から検出さ

れた株であり、それぞれ 2021 年 11 月、2023 年 12 月、2024 年 1 月に採材された 3 株は、VP7 遺伝子及び VP4 遺伝子の塩基相同性が 99%以上一致していた。

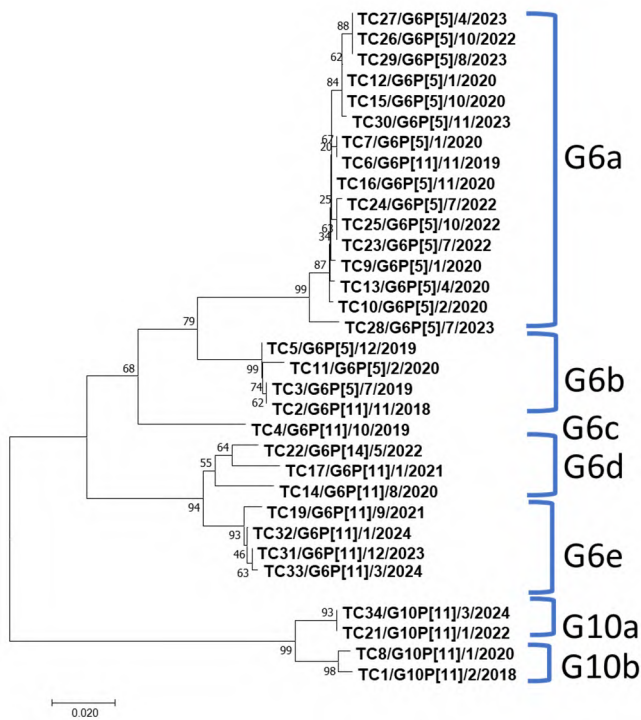


図 3 VP7 遺伝子のクラスター分類  
(参考株を除いた県内株のみ)

表 2 採材年ごとの遺伝子型分類

|           | 2018 | 2019 | 2020 | 2021 | 2022 | 2023 | 2024 |
|-----------|------|------|------|------|------|------|------|
| G6aP[5]   |      |      | 7    |      | 4    | 4    |      |
| G6bP[5]   |      | 2    | 1    |      |      |      |      |
| G6aP[11]  |      | 1    |      |      |      |      |      |
| G6bP[11]  | 1    |      |      |      |      |      |      |
| G6cP[11]  |      | 1    |      |      |      |      |      |
| G6dP[11]  |      |      | 1    | 1    |      |      |      |
| G6eP[11]  |      |      |      | 1    |      | 1    | 2    |
| G10aP[11] | 1    |      | 1    |      |      |      |      |
| G10bP[11] |      |      |      |      | 1    |      | 1    |

考察

各株を遺伝子型分類した結果、G6P[5]、G6P[11]、G10P[11]の 3 種類が優位に検出された。これらは他県の報告でも多く検出されて

いる遺伝子型であり<sup>5,6,7)</sup>、ワクチンが有効な遺伝子型である<sup>8)</sup>。したがって、県内牛 GAR の予防に現行のワクチンが効果的であることが確認された。一方、1 株ずつのみ、成牛及び育成牛から検出された G6P[14]、GXP[29]はまれな遺伝子型であり、ワクチンの効果が期待できない遺伝子型である<sup>5)</sup>。なお、国内の報告では、G6P[14]と同じ P[14]の株は、子牛の正常便から検出された G8P[14]の Sun9 株<sup>9)</sup>及び、成牛下痢便から検出された G15P[14]の Tottori-SG 株<sup>10)</sup>のみであり、GXP[29]と同じ P[29]の株は、成牛下痢便から検出された G21P[29]の Tak2 株<sup>11)</sup>及び子牛正常便から検出された G21P[29]の Azu-1 株<sup>4)</sup>のみである。このようにまれな遺伝子型である P[14]及び P[29]の検出例 3 例ずつのうち 2 例が育成牛及び成牛の下痢便から検出されている。したがって、育成牛及び成牛の GAR 感染症の発生要因には、まれな遺伝子型に対して免疫を獲得していないことが考えられた。

また、黒毛和種では G6P[5]が、ホルスタイン種では G6P[11]が多く検出され、これは他県の報告でも同様である<sup>7,8)</sup>。品種によって遺伝子型の偏りが生じているのは、品種によって、遺伝子型に対する感受性が異なる可能性も考えられるが、他県では、黒毛和種から G6P[11]が、ホルスタイン種から G6P[5]が検出された例もあるため<sup>7,8)</sup>、遺伝子型に対する感受性の差異によるものではなく、飼養形態や流通の相違が関与していると推測され、導入牛や預託戻り牛などが主な侵入経路であると考えられた。

さらに、VP7 領域を細分類化したところ、県内の検出株が 1~4 年で新しいクラスターの株に置き換わっていた。また、ヒト GAR の国内流行株においても、同様に複数のクラス

ターの株が数年単位で入れ替わるように流行しており<sup>12)</sup>、一度発生しても、数年後に新しい株が農場内に侵入するリスクがあると推測された。

一方、同一農場で検出された3株が2年程度の間隔が空いてもVP7遺伝子及びVP4遺伝子の塩基相同性が99%以上一致していたことから、農場内に一度GARが侵入すると長期に残存する可能性も考えられた。本農場は酪農場であり、2年の間に母牛の多くが更新され、本株に対する移行抗体が付与された子牛の減少が再発原因の1つと推測された。

本調査によりGAR対策として、主な感染経路と考えられた導入牛や預託戻り牛の隔離による侵入防止に加え、発生農場においては敷き藁や牛床の洗浄消毒などによる再発防止対策の重要性が再認識された。また、県内検出株の多くは、ワクチンが有効な遺伝子型であることから、ワクチン接種は発症予防に効果的と考えられた。しかし、育成牛及び成牛においてワクチンの効果が期待できない遺伝子型の株も一部検出されたほか、数年単位で新しい株が県内に侵入している傾向も認められたことから、今後も調査を継続し、GARの動態解明と発生予防に寄与したい。

#### 参考文献

- 1) 恒光裕: ロタウイルス病, 獣医伝染病学, 清水悠紀臣編〈第5版〉, 97-99, 近代出版, (2000)
- 2) 小林宣道, 浦澤正三: 特集1: 胃腸炎ウイルス 1. ロタウイルス. ウイルス 50(2), 157-172, (2000)
- 3) 岡田伸隆: 母牛へのワクチネーションによる子牛下痢症に対する効果の実際, 日本家畜臨床感染症研究会誌, 4, 61-66, (2009)
- 4) Masako Abe *et al.*: Molecular epidemiology of rotaviruses among healthy calves in Japan: Isolation of a novel bovine rotavirus bearing new P and G genotypes. *Virus Research*, 144, 250-257, (2009)
- 5) Nobutaka Okada, Yuichi Matsumoto: Bovine rotavirus G and P types and sequence analysis of the VP7 gene of two G8 bovine rotaviruses from Japan. *Veterinary Microbiology*, 84, 297-305, (2002)
- 6) Katsuhiko Fukai *et al.*: Changes in the prevalence of rotavirus G and P types in diarrheic calves from the Kagoshima prefecture in Japan. *Veterinary Microbiology*, 86, 343-349, (2002)
- 7) Koki Odagiri *et al.*: Development of Genotype-Specific Anti-Bovine Rotavirus A Immunoglobulin Yolk Based on a Current Molecular Epidemiological Analysis of Bovine Rotaviruses A Collected in Japan during 2017-2020. *Viruses*, 12, 1386, (2020)
- 8) 新地英俊: 牛ロタウイルス感染症3価・牛コロナウイルス感染症・牛大腸菌性下痢症(K99精製線毛抗原)混合(アジュバント加)不活化ワクチン, 動物用ワクチン, 88-92, 文永堂出版株式会社, (2011)
- 9) Katsuhiko Fukai *et al.*: Molecular characterization of novel P[14], G8 bovine group A rotavirus, Sun9,

isolated in Japan. Virus Research, 105, 1, 15, 101-106, (2004)

- 10) Tsuneyuki Masuda *et al.*: Identification of novel bovine group A rotavirus G15P[14] strain from epizootic diarrhea of adult cows by de novo sequencing using a next-generation sequencer. Veterinary Microbiology, 171, 66-73, (2014)
- 11) Katsuhiko Fukai *et al.*: Molecular characterization of a novel bovine group A rotavirus. Veterinary Microbiology, 123, 217-224, (2007)
- 12) 藤井克樹：ロタウイルス流行株の変遷. ウイルス, 73, 1, 33-44, (2023)