

ウシロタウイルス C の検出および遺伝学的性状に関する研究  
(Detection of bovine rotavirus C and study on its genetic properties)

馬 渡 隆 寛

## 目次

緒言	1
第一章 一農場において集団発生した成牛の下痢症例からのウシロタ ウイルス C の検出並びに VP6 および VP7 遺伝子の解析	9
序論	10
材料および方法	11
1. 調査農場	11
2. 糞便材料	11
3. 細菌および寄生虫検査	11
4. 免疫クロマトグラフィー法および RT-PCR 法による ウイルス検査	12
5. ウイルスの電子顕微鏡観察	13
6. ロタウイルス RNA のポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (RNA-PAGE)	14
7. RVC VP7 および VP6 遺伝子塩基配列の解読および分子系統 学的解析	14
結果	16
1. 調査農場での下痢の発生状況	16
2. 病原学的検査結果	16
3. VP7 遺伝子の塩基配列の解読および相同性解析	17
4. VP6 遺伝子の塩基配列の解読および相同性解析	17
5. 分子系統学的解析	18
考察	19

図表	23
第二章 2002 年から 2011 年に山形県で採材されたウシ下痢便 からのウシロタウイルス C の検出およびウシロタウイ ルス C 病の疫学的特徴	30
序論	31
材料および方法	33
1. ウシ糞便材料	33
2. 発生形態	33
3. 細菌学的検査、寄生虫学的検査および下痢関連ウイルス検査	34
4. 一酪農場で繰り返し集団発生した下痢症において検出された 病原微生物、発生状況および臨床症状の比較	36
結果	37
1. 下痢に関与する病原微生物の検出内訳	37
2. 下痢の発生形態	38
3. 下痢関連疾病の発生形態別の症例数と陽性頭数	40
4. 乳用成牛における下痢関連疾病の年別の症例発生件数	41
5. 乳用成牛における下痢に関与する病原微生物の月別の 症例発生件数	42
6. RVC 病の発生概要	42
7. 同一酪農場で繰り返し集団発生した下痢症において検出 された病原微生物、発生状況および臨床症状の比較	43
考察	45
図表	54

第三章 ウシロタウイルス C の全遺伝子解析による遺伝学的性状に 関する研究	68
序論	69
材料と方法	70
1. ウシ糞便材料	70
2. RVC6 株の全 11 文節遺伝子の全長解析	70
3. 相同性解析	71
4. 分子系統学的解析	71
5. 遺伝子型分類	71
結果	73
1. RVC 株の由来	73
2. RVC6 株の全 11 文節遺伝子の全長解析	73
3. RVC6 株の全 11 文節遺伝子の相同性解析	74
4. 全 11 分節遺伝子における分子系統学的解析および 遺伝子型分類	76
考察	78
図表	84
引用文献	114

## 緒言

ロタウイルス(RV)はレオウイルス科のロタウイルス属に分類され、ヒト、ウシ、ブタを始めとする多くの哺乳類や鳥類に感染して下痢や嘔吐等の胃腸炎を引き起こす主要な病原微生物である。RV は、小腸の腸管上皮細胞に感染し、微絨毛の配列の乱れや欠落などの組織病変の変化を引き起こす(31)。これにより、腸からの水の吸収が阻害され下痢を発症する(30, 100)。感染経路は、糞口感染が主なルートと考えられており、下痢便 1 G 当たり  $10^{10}$  個と多量のウイルスを排泄し、これが次の感染源となる(63)。RV は由来動物種ごとにウシ RV、 ヒト RV 等と呼ばれて区別されている。

RV 粒子は直径 80-100 nm の正十二面体構造をとり、コア、内殻および外殻の 3 層のカプシドで構成され、エンベロープは持たない。ゲノムは 6 つのウイルスタンパク(VP1~VP4、VP6 および VP7)および 5 または 6 つの非構造タンパク(NSP1~NSP5/6)をコードする 11 本の 2 本鎖 RNA 分節から成っている。NSP5/6 をコードしている第 11 文節を除き、1 つの遺伝子文節が 1 つのウイルス蛋白をコードしている。コアは主に VP2 で構成され、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼである VP1、RNA キャッピング酵素である VP3 とともに、ウイルス RNA を内包する。内殻を構成しているのは、VP6 である。外殻は、表面を取り囲む糖タンパクである VP7 とスパイク状に突出した VP4 によって構成される。また、VP4 はプロテアーゼ感作により VP8 と VP5 に開裂する。非構造タンパクは、ウイルスゲノムの複製(NSP2、NSP5)、翻訳(NSP3)、粒子形成(NSP4)、宿主の自然免疫系の抑制(NSP1)、エンテロトキシン活性を有し病原性への関与(NSP4)が報告されている(29, 31)。

RV の内殻を構成するタンパクである VP6 には主要抗原が存在し、RV はその抗原性および遺伝学的相違に基づいて複数の血清群に大別される(31)。現在、各血清群

はウイルス種として分類されている。現在までに RV は、RVA(様々な哺乳類および鳥類)、RVB(ヒト、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジおよびラット)、RVC(ヒト、ウシ、ブタ、イヌおよびフェレット)、RVD(鳥類)、RVE(ブタ)、RVF(鳥類)、RVG(鳥類)、RVH(ヒトおよびブタ)、RVI(イヌおよびネコ)および RVJ(コウモリ)の 10 種に区分され、括弧内に示した生物の糞便から検出されている(3, 31, 78, 84, 106)。加えて、各血清群の RV は、ポリアクリルアミドゲルを用いた RNA 電気泳動(RNA-PAGE)によって 11 本の RNA 分節の特徴的な移動パターンを示すため、RV を鑑定および分類する方法の 1 つとして活用されてきた。検出頻度の高い RV の RNA 移動パターンとして、RVA が 4-2-3-2、RVB が 4-2-2-3、RVC が 4-3-2-2 パターンを示す(31)。

RV の外殻を構成するタンパクである VP7 と VP4 には感染防御抗原として重要な血清型抗原が存在し、ウイルス中和試験により検出される。そのため、RVA では疫学研究に VP7 および VP4 の血清型別が従来用いられてきたが(31)、血清型別に用いる標準血清の入手および作出が困難であることや遺伝子解析が比較的容易になったことを受け、両タンパク遺伝子の塩基配列を基にした遺伝子型別が一般に実施されるようになった(77)。VP7 および VP4 の遺伝子型をそれぞれ G および P 遺伝子型と呼び、RVA では少なくとも 32 種類の G 遺伝子型および 47 種類の P 遺伝子型が報告されており(111)、この G あるいは P 遺伝子型は、動物種特異的に分布していることが明らかとなっている(31, 73)。このことから、RVA は基本的に同じ動物種内で感染環を形成していると考えられている。しかしながら、ヒトあるいは動物において、他の動物種に特徴的な遺伝子型株の検出も報告されており(19, 41, 72, 73, 75, 92, 118)、時に動物種の壁を超えた感染(種間伝播)も起こすと考えられている。このように、RV は人獣共通感染症の病原体としての可能性が指摘されており(73)、自然界において複雑な感染様式を形成しているものと考えられている。また、近年、RVB や RVC においても複数

の G および P 遺伝子型の存在が確認されている(80, 123, 140)。

RV のゲノムは分節化した RNA であるため、インフルエンザウイルスと同様に、異なる株の混合感染により RNA 分節の組換え(リアソートメント)が時に起きる。実際に、ヒト-動物との種間感染により発生したと思われる組換え体(リアソータント)ウイルス株のうち、現在ではヒトにおける新型ウイルスとして定着した株も存在している(110, 142)。このことから、リアソートメントは、遺伝的多様性を獲得する上で最も重要なメカニズムであると考えられている。また、リアソートメント以外の変異機構として単一の塩基が異なる塩基に置き換わる点突然変異や、RNA 分節内で部分的に重複あるいは欠損を起こすリアレンジメントが上げられる(43)。リアレンジメントは、第 5 文節(NSP1)及び第 11 文節(NSP5/6)において多く観察されている(31)。これらの変異機構は RV の遺伝的多様性獲得に重要な役割を果たしていると考えられるが、自然界においてその実態は不明な点が多い。また、ヒト RVA ワクチンの普及に伴い野外株の性状を正確かつ詳細に解析することがより必要となってきた。このため、Matthijnssens ら(76)は、VP4 および VP7 の 2 分節のみを用いていた従来の分類法に代わって、RVA の全 11 遺伝子文節を対象とした新しい遺伝子型分類法を提唱した。これに伴い、RVA の遺伝子認定機関として、ロタウイルスの専門家によって Rotavirus Classification Working Group (RCWG)が結成された(77)。その新たな分類法では、RVA の遺伝子型は VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5 に対応して、Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx(x は数字に相当する)と表記される。各遺伝子分節の遺伝子型別を行うには、そのオープンリーディングフレーム(ORF)の塩基配列を決定し、米国国立生物工学情報センターのサイト等で利用可能な BLAST を用いて既知の類似配列を検索する。両者間の一致率が当該 RNA 分節における遺伝子型のカットオフ値を超える場合、対象株の遺伝子型は既知配列の遺伝子型と同じで

あると判定する。部分配列を用いる場合、ORF の少なくとも 50%以上の配列を決定することが必要とされる。新規の型と考えられる配列を発見した場合は、その配列を RCWG のメンバーに送付して精査を受けた後、判定された遺伝子型番号が通知される(76, 77)。一方、RVA 以外の RV については、11 分節の型別基準は定まっていないが、RCWG の提唱している方法に準拠して RVC においても全 11 遺伝子文節を用いた遺伝子型分類が Yamamoto ら(140)および Soma ら(125)によって試みられている。しかしながら、これまでに RVC の全ゲノムの塩基配列が明らかになっているのはウシ由来の 2 株(Shintoku 株および Toyama 株)、ブタ由来の 1 株(Cowden 株)、ヒト由来の 7 株(Bristol 株、v508 株、BS347 株、Wu82 株、YNR001 株、OH567 株および BK0830 株)そしてイヌ由来の 1 株(KE174 株)のみである(14, 67, 125, 140)。このように、非常に少ない遺伝子情報に依るものであるために、厳密には RCWG の提唱している方法による遺伝子型分類法になっていない。従って、様々な宿主からの多数の遺伝子情報を明らかにすることが求められている。

RVA は従来の定型的な RV であり、ヒトでは検出頻度が最も高く臨床的にも重要である。感染性はきわめて高く、10~100 個の感染性ウイルス粒子により感染が成立する。環境中でも安定で、RVA を含む糞便を室温保存しても本ウイルスの感染性が 9 か月間維持されていたと報告されている(146)。また、畜舎消毒に多用されている第四級アンモニウム塩素系消毒薬や両性界面活性剤では本ウイルスは不活化されない(145)。したがって、衛生状態をいかに改善しても RV 感染の制御は困難であることから、RVA 感染症は世界中で発生しており、先進国と発展途上国の間に差はなく、5 歳までにほぼ全てのヒトが RVA に感染している(63)。世界中で 5 歳未満の乳幼児が RVA 感染に起因して年間約 50 万人死亡しており、特に、衛生環境や医療体制が十分に整っていない発展途上国でその 80%を占めている(102)。先進国の代表として、米国の



データを示すと、5 歳未満のロタウイルス感染者での年間の死亡例が 20～60 人、入院が 5.5～7 万人、救急外来受診者が約 20～27 万人、外来受診者が 41 万人に上ると推計されている(63)。我が国では、年間約 80 万人もの乳幼児が本症のため入院治療を受けており、その医療費負担は総額 100 億円にのぼるとされている(95, 144)。このように先進国では、死亡率は高くないものの、その経済的負担は甚大である。また、RVA は、ウシ、ブタ、ウマといった家畜においても幼齢期下痢症の主要な原因となっているが(12)、時に成牛下痢症の原因にもなっている(33, 121)。Sato らは 34 頭の搾乳牛を飼養する酪農場で 3 頭の成牛の RVA による下痢発生例を(121)、Fukai らは 90 頭の搾乳牛を飼養する酪農場で 8 頭の成牛の RVA による下痢発生例をそれぞれ報告している(33)。RVA 感染によって生じる幼若個体の死亡、治療費、発育遅延、搾乳牛の乳量減少そして肥育牛の増体量減少などは、大きな経済的損失となる(31, 62, 83, 108)。このように、RVA 感染症は公衆衛生及び動物衛生の両面において、世界中で深刻な被害をもたらしている。また、家畜やヒト等の様々な動物種において、臨床症状を示さずに RVA を長期間糞便中に排出し続ける不顕性感染(31, 73, 82, 112, 126, 128)または腸間膜リンパ節に持続的に保持し続ける持続感染(18, 32, 61, 85, 90, 91, 103, 104)を起こすことが報告されている。このような様式で RVA は、農場内に常在性を維持していると考えられている。一方、RVA 以外に RVB および RVC はブタで高頻度に検出されることが報告されているが(13, 17, 64, 69, 71, 116, 134)、培養細胞での増殖が困難なため(50, 134, 137)、RVA に比べてウイルス学のおよび疫学的に不明な点が多く残されたままとなっている。

RVC は、哺乳子豚における下痢症の原因ウイルスとして 1980 年に米国で最初に報告され(114)、その後、ヒト、ウシ、ブタ、イヌおよびフェレットで集団発生や散発発生例が報告されている(140)。ノトバイオート豚を用いた RVC の実験感染では、RVA

と同程度の病原性を示すことが報告されている(5, 114)。近年、RVC の下痢症は、月齢に関係なく RVA の下痢症と同様に世界中の多くの養豚農場で頻発していることが明らかにされた(17, 116, 134)。また、ブタとヒトの間で種間伝播したことを示唆する報告も認められる(39, 60)。本研究を開始するまで、ウシにおけるブロッキング ELISA を用いた RVC の抗体保有率調査によると、北海道の乳用成牛で 56%そして米国の肉用成牛で 47%といずれも高いことが確認されているにも関わらず(134)、RVC の検出報告は、Shintoku 株(133)および WD534tc 株(12)のみであった。後に、Toyama 株が検出され、全ゲノムの塩基配列が明らかにされている(125)。Shintoku 株は、1991 年に北海道の一酪農場の成牛の下痢便からアカゲザルの株化細胞である MA104 細胞を用いて分離された。なお、当該下痢は成牛においてのみ集団発生した。そして、MA104 細胞で増殖させた Shintoku 株を初乳未摂取の新生子牛に経口投与すると下痢が発生し、下痢便から投与ウイルスが検出されることが確認されている。また、Shintoku 株は、ウイルス中和試験ならびに VP4 および VP6 遺伝子塩基配列の解析結果から、抗原学的ならびに遺伝学的にヒト RVC およびブタ RVC と区別されることが明らかにされている(53, 54, 55, 134, 135)。一方、WD534tc 株は、1999 年に米国オハイオ州において成牛の下痢便から RVA と同時に検出され、遺伝学的ならびに抗原学的にブタ RVC Cowden 株と極めて近縁であることが報告されている。また、WD534tc 株の実験感染において、ウイルス排泄はノトバイオートウシでは殆ど確認されなかったのに対し、ノトバイオートブタでは明確に認められた(12)。これらのことから、WD534tc 株の本来の宿主はブタであると推測されている。このため、ウシを自然宿主とする RVC の集団が存在するのかを含め、ウシ RVC による下痢症の疫学実態やウイルスの遺伝学的性状等につて、不明な点が多く残されたままとなり、ウイルスの分類学上、一般的にウシは RVC の自然宿主に含まれない状況であった。

ウシの下痢症の原因として、ウイルス、細菌、原虫等の病原微生物の感染が上げられる(62, 108)。子ウシの感染性下痢症においては、ウシ RVA、ウシコロナウイルス(BCoV)、病原性大腸菌、クリプトスポリジウム、コクシジウム等が主要な原因病原微生物と考えられている(20, 21)。特に、新生子ウシ多発する下痢症については、ウシ RVA が主要な原因病原微生物として広く知られている(23)。成牛の感染性下痢では、BCoV、牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)、サルモネラ等が主な原因病原微生物として報告されており(8, 25, 34, 56, 97, 115)、特に、冬季赤痢と称される寒冷な季節に集団発生する下痢症は、BCoVが原因病原微生物であることが報告されている(34, 56, 97, 115)。一方、ウシの下痢症の原因調査において糞便から病原微生物が検出されない例も多数認められ、これらは環境および飼育管理の不適正によるストレス、過食、消化不良、吸収障害等による非感染性の下痢症として区分されている(62, 108)。しかしながら、非感染性下痢症の一部は、これまで未検査あるいは未知の病原微生物に起因する例も含まれると考えられる。そのような病原微生物の一つとしてウシ RVC が挙げられる。

これらのことから本研究では、ウシ RVC による下痢症の発生実態および本ウイルスの遺伝学的性状を明らかにすることを目的に、ウシの下痢便から RVC の検出および遺伝子解析を実施した。

第一章では、山形県の一乳肉複合農場で集団発生した搾乳牛の下痢症例からウシ RVC Yamagata 株が検出され、解析の結果、ウシは RVC の自然宿主の 1 つであることが裏付けられた。このことから、RVC は成牛の下痢症に関与し、ウシ RVC と呼ぶことを提唱した。第二章では、野外におけるウシ RVC の発生実態を解明するために、10 年間に山形県内の農場で発生した下痢症例から主要な下痢に関与する病原体を検出し、また、発生状況や臨床症状などの得られた情報について整理した。第三章では、

第二章で検出したウシ RVC6 株の全 11 遺伝子分節を解析し、遺伝的多様性、遺伝子動態そして生態について考察した。

## 第一章

一農場において集団発生した成牛の下痢症例からのウシロタウイルス C の  
検出並びに VP6 および VP7 遺伝子の解析  
(Detection of bovine rotavirus C from adult cattle in a farm with  
outbreak of diarrhea, and analysis of its VP6 and VP7 genes)

馬 渡 隆 寛

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

(指導教授：田 中 良 和)

平成 31 年 3 月

## 序論

国内外で、ウシから最初に検出された RVC は、1991 年に北海道において成牛の下痢便から分離された Shintoku 株である(133)。Shintoku 株は遺伝学的および抗原学的に既知のブタおよびヒト RVC と区別されたこと、さらに、初乳未摂取の新生子牛に経口投与すると下痢が発生し、その下痢便から投与ウイルスが検出されることが確認されたことから、ウシを自然宿主とする RVC である可能性が強く示唆されていた(53, 54, 55, 134, 135)。しかしながら、それ以降、ウシが RVC の自然宿主であることを示唆する症例はみつからなかった。唯一、1999 年に米国で成牛の下痢便から RVA と同時に検出された RVC WD534tc 株が検出されたが、本株は遺伝学的および抗原学的に Shintoku 株よりブタ RVC の Cowden 株とより近縁あることが報告された(12)。さらに、実験感染において、ウイルス排泄はノトバイオートウシでは殆ど確認されなかったのに対し、ノトバイオートブタでは明確に認められた(12)。従って、WD534tc 株の本来の宿主はブタであると考えられている。このことから、集団としてウシを自然宿主とする RVC が存在するのを含め、ウシ RVC の発生実態や遺伝学的性状等は不明な点が多く残されたままとなり、ウイルスの分類学上、一般的にウシは RVC の自然宿主に含まれない状況であった。

2002 年 4 月、山形県の一乳肉複合経営農場で集団発生した乳用成牛の下痢症が発生し、病性鑑定の結果、下痢を引き起こす主要な原因病原体としてウシ RVC のみが検出された。本章では、本症例における臨床症状および発生状況を示すとともに、Yamagata 株と命名したウシ RVC の遺伝子性状を解析し、ウシは RVC の自然宿主の 1 つであることを裏付け、RVC は成牛の下痢症に関与しウシ RVC と呼ぶことを提唱した。

## 材料および方法

### 1. 調査農場

調査農場は、山形県内の一乳肉複合経営農場であり、下痢発生時に乳用成牛 122 頭、乳用子牛および乳用育成牛 17 頭、肉用種繁殖用成牛 12 頭、肉用種子牛 7 頭を飼養していた。品種は、乳用種がホルスタイン種、肉用種が黒毛和種であった。乳用牛舎は対尻式の繋ぎ牛舎で、同牛舎内の脇に乳用子牛および乳用育成牛の専用スペースを設け飼養していた。また、肉用種繁殖用成牛および肉用種子牛は別棟の牛舎で飼養していた。疫学情報の収集は、調査農場の状況を確認しながら、畜主と診療獣医師から聞き取り調査を行った。また、産乳量調査は、出荷伝票に記載されている 1 日当たりの出荷乳量を 1 日当たりの産乳量とした。

### 2. 糞便材料

糞便材料は、本農場で下痢が発生した当日の 2002 年 4 月 25 日に下痢を発症した 3 頭(No. 1, 2, 3)の乳用成牛から採取した。この 3 頭は、牛舎入口からみて左側の入口付近に繋養されていた。No. 1 が 1997 年 7 月 27 日生れ(57 か月齢)、No. 2 が 1999 年 5 月 28 日生れ(35 か月齢)、No. 3 が 1998 年 2 月 15 日生れ(50 か月齢)であった。採取した糞便材料は、重量の 4 倍量のリン酸緩衝液(PBS)を加えて 20%の糞便懸濁液を作製した。糞便懸濁液を  $750 \times G$  で 10 分間遠心分離し、上清を糞便溶液としてウイルス検査に用い、残りの糞便溶液は使用時まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。また、採取した糞便材料の一部は、細菌検査および寄生虫検査の使用時まで  $4^{\circ}\text{C}$ で保存した。

### 3. 細菌および寄生虫検査

サルモネラ属菌検査は、糞便材料 1 G をハーナーテトラチオン酸ナトリウム酸塩培地 10 ml に接種し、43℃で 24 時間増菌培養した。その増菌培養液をノボビオシン(20 µl/ml)加 DHL 寒天培地へ画線塗抹して 37℃で 24 時間分離培養を行った。中心部黒色の円形コロニーを確認した場合は、性状検査を実施し菌を同定し、サルモネラの場合は型別用抗血清を用いて血清型を同定した。

病原性大腸菌の検査は、糞便材料を DHL 寒天培地に画線塗抹して 37℃で 24 時間分離培養を行い、培地上に発育した赤色コロニー各 5 個から QIAamp DNA Mini KIT(QIAGEN)を用いて DNA を抽出し、PCR 法によって病原性に関連する易熱性エンテロトキシン産性遺伝子(LT)、耐熱性エンテロトキシン産性遺伝子(ST)、ベロトキシン産性遺伝子(VT)、細胞侵入性遺伝子(inv)および外膜蛋白産性遺伝子(eaeA)の検出を行った(49)。

コクシジウム検査は、糞便材料 2 G を 58 ml の飽和食塩水に混和し、混和液をマックマスター計算盤に満たして光学顕微鏡でオーシストの有無を観察し、1 G 当たりのオーシスト数(OPG)を求めた。

クリプトスポリジウム検査は、ショ糖遠心浮遊法を用いてオーシストの検出を実施した。ショ糖溶液は、比重が 1.2 となるよう 500 G のショ糖を 650 ml の蒸留水で溶解して作製した。試験管に糞便材料 1 G と 5 ml のショ糖溶液を加えて混和後、3 ml のショ糖液を添加して試験管内を満たし、30 分間静置した。その後、混和液の最上面の液をカバーガラスで採取し、光学顕微鏡でオーシストの有無を観察した。

#### 4. 免疫クロマトグラフィー法および RT-PCR 法によるウイルス検査

RVA およびアデノウイルス(AdV)については、免疫クロマトグラフィー法を原理とした抗原検出キット(DIPSTIC Eiken ROTA および DIPSTIC Eiken ADENO; 栄研科



学)を用いて検査した。RVA は、RT-PCR 法も併用した。

作製した糞便溶液から SepaGeneRV-R(三光純薬)により抽出した RNA を用いて、ウシコロナウイルス(BCoV) M 遺伝子、RVA VP7 遺伝子、RVB VP7 遺伝子、RVC VP7 遺伝子および牛ウイルス性下痢症ウイルス(BVDV)5'末端非翻訳領域の検出を One step RT-PCR Kit(QIAGEN)を使用して RT-PCR 法により行った。RT-PCR 法におけるプライマーの塩基配列は表 1-1 に示す。RVA、RVB および RVC を含めたロタウイルス属(RVs)は、RT-PCR 前に、鋳型 RNA を 2  $\mu$ l、Dimethyl sulfoxide(DMSO)を 1  $\mu$ l、RNase フリー蒸留水を 14  $\mu$ l 加えて 95°C で 5 分加熱し、その後に、RT-PCR 反応液としては、5  $\times$  OneStep RT-PCR Buffer を 5  $\mu$ l、dNTP Mixture を 1  $\mu$ l、50  $\mu$ M に調整したプライマーを 0.25  $\mu$ l ずつ、RNase Inhibitor(40U/ $\mu$ l)を 0.5  $\mu$ l、QIAGEN One Step RT-PCR Enzyme Mix を 1  $\mu$ l 加えて全量が 25  $\mu$ l となるように調整した。RVs 以外の RT-PCR 反応液としては、5  $\times$  OneStep RT-PCR Buffer を 5  $\mu$ l、dNTP Mixture を 1  $\mu$ l、50  $\mu$ M に調整したプライマーを 0.25  $\mu$ l ずつ、RNase Inhibitor(40U/ $\mu$ l)を 0.5  $\mu$ l、QIAGEN One Step RT-PCR Enzyme Mix を 1  $\mu$ l、鋳型 RNA を 1  $\mu$ l 加えて混和したものを作成し、RNase フリー蒸留水を加えて全量が 25  $\mu$ l となるように調整した。RT-PCR の反応条件は、既報に従い実施した(表 1-1)。上記の反応は、GeneAmp® PCR System 9700(Applied Biosystems)を用いて行った。反応後、TAE バッファー(40 mM Tris·acetate/1 mM EDTA)を使用して作成したエチジウムブロマイド(0.5  $\mu$ g/ml)加 2%アガロースゲルを用いて PCR 産物の電気泳動を行い、UV トランスイルミネーターにて PCR による遺伝子の増幅の有無を確認した。

## 5. ウイルスの電子顕微鏡観察

糞便溶液を 10,000  $\times$  G で 20 分間遠心分離し、その上清を 30%ショ糖溶液に重層

して 100,000 × G で 2 時間遠心分離した。沈殿を少量の蒸留水に溶解し、2%モリブデン酸アンモニウムで陰性染色して透過型電子顕微鏡(JEM-1011; 日本電子)によるウイルス粒子の観察を行った。

#### 6. ロタウイルス RNA のポリアクリルアミドゲル電気泳動法(RNA-PAGE)

糞便溶液から抽出した RNA は、ミニスラブ電気泳動装置(ATTO)を用いて 10%ポリアクリルアミドゲルにて 40 mA で 2.5 時間電気泳動を行った。電気泳動終了後、ゲルを Silver Stain Plus(Bio-Rad)を用いて染色し、ロタウイルス RNA 分節の確認を行った。

#### 7. RVC VP7 および VP6 遺伝子塩基配列の解読および分子系統学的解析

完全長の VP7 遺伝子は、前述の RVC 検出用 RT-PCR 法での増幅産物を用い (表 1-1)、完全長の VP6 遺伝子は、Shintoku 株 VP6 遺伝子の 5'および 3'末端配列を基に設計したプライマー; Shintoku VP6-1(5'-GCA TTT AAA ATC TCA TTC ACA ATG-3')および Shintoku VP6-1352 (5'-AGC CAC ATA GTT CAC ATT TCA TCC T-3')を用いて One step RT-PCR Kit(QIAGEN)により RT-PCR 法を行い、得られた増幅産物を用いた(7)。これらの PCR 産物は、MicroSpin S-400 HR Columns(GE ヘルスケア・ジャパン)を用いて精製した。そして、DNA シーケンサー(ABI PRISM310 ; Applied Biosystems)を用いたダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。ダイレクトシーケンス法については、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)を用いて行った。シーケンスプライマーには、RT-PCR と同一のプライマーを用いた。塩基配列の解読については、(独)動物衛生研究所七戸研究施設に委託した。塩基配列データは Lasergene(DNASTAR)ソフトウェアを用いて Clustral W 法

により多重整列解析を実施し(117)、Tree-View プログラムを用いた近隣接合法により分子系統樹を作製した(101)。

## 結果

### 1. 調査農場での下痢の発生状況

2002 年 4 月 25 日、乳牛舎入口からみて左側の入口付近に繋養されていた 3 頭の乳用成牛が突然下痢を発症し、下痢の発生は数日のうちに農場内の全ての乳用成牛に拡大した。下痢便は茶色水様で、血液は混入していなかった。下痢を発症した牛に死亡例はみられず 3 日から 5 日以内に回復し、5 月 5 日には農場内で下痢はみられなくなった。農場レベルでの産乳量減少は下痢確認の翌日である 4 月 26 日から認められ、約一週間継続した。最も産乳量が減少したのは、下痢確認の 3 日後(4 月 28 日)であった(図 1-1)。下痢を発症した牛において鼻汁漏出等の呼吸器症状は認められなかった。同牛舎内の脇で飼養されていた乳用子牛および乳用育成牛、並びに、別棟の牛舎で飼養されていた肉用種繁殖牛および肉用子牛においては、下痢を含めて臨床症状は確認されなかった。また、同時期に近隣農場での下痢症の集団発生はみられなかった。

### 2. 病原学的検査結果

いずれの材料からもサルモネラ属菌は分離されず、分離された大腸菌において病原性に関与する主要な遺伝子は検出されず、コキシジウムおよびクリプトスポリジウムのオーシストも検出されなかった。

免疫クロマトグラフィー法あるいは RT-PCR 法によるウイルス検査において、いずれの材料からも RVA、RVB、AdV、BCoV および BVDV は検出されなかった。一方、RT-PCR 法により、RVC が 3 例中 2 例(No. 1 および No. 2)から検出された。なお、PCR 産物のアガロースゲル電気泳動後のエチジウムブロマイド染色において No. 2 は濃いバンドが確認されたが、No. 1 のそれは非常に薄かった。糞便材料の電子顕微鏡

観察によりロタウイルス様粒子が No. 2 で観察された(図 1-2)。一方その他のウイルス粒子はいずれの材料においても観察されなかった。糞便材料 No. 2 は、RNA-PAGE により典型的な RVC の RNA 電気泳動パターンである 4-3-2-2 パターンを示し、RVC Shintoku 株のそれと非常に類似していた(図 1-3)。

これらの結果から、糞便中に確認されたロタウイルスは RVC であることが明らかとなり、材料 No. 2 の RVC を Yamagata 株と名付けた。

### 3. VP7 遺伝子の塩基配列の解読および相同性解析

RVC Yamagata 株の VP7 遺伝子は、全長 1,063 bp であり、332 アミノ酸をコードしている 1 つの open reading frame(ORF)を含んでいた(DDBJ データベース accession number : AB108681)。Yamagata 株 VP7 遺伝子の塩基配列をウシ由来の RVC1 株(Shintoku)、ブタ由来の RVC3 株(Cowden、WH および HF)およびヒト由来の RVC6 株(88-220、OK450、Bristol、208、Moduganari および Jajeri)の VP7 遺伝子と比較した結果、Yamagata 株は Shintoku 株と最も高い相同性を示した(塩基配列 93.5%, アミノ酸配列 96.1%)(表 1-2)。一方、Yamagata 株とブタ由来の RVC との相同性は、塩基配列で 73.9~76.1%、アミノ酸配列で 72.6~75.0%、ヒト由来の RVC との相同性は塩基配列で 74.2~75.1%、アミノ酸配列で 72.9~73.8%といずれも低値であった(表 1-2)。

### 4. VP6 遺伝子の塩基配列の解読および相同性解析

RVC Yamagata 株の VP6 遺伝子は、全長 1,352 bp であり、395 アミノ酸をコードしている 1 つの ORF を含んでいた(DDBJ データベース、accession number : AB108680)。Yamagata 株の VP6 遺伝子をウシ由来の RVC2 株(Shintoku および

WD534tc)、ブタ由来の RVC1 株(Cowden)およびヒト由来の RVC4 株(Bristol、208、Moduganari および Jajeri)の VP6 遺伝子と比較した結果、Yamagata 株の VP6 遺伝子は、VP7 遺伝子と同様に Shintoku 株と最も高い相同性を示した(塩基配列 98.1%、アミノ酸配列 99.5%)。一方、ウシ由来の WD534tc 株やブタ由来の RVC、また、ヒト由来の RVC との相同性は、塩基配列で 82.9%以下、アミノ酸配列で 91.6%以下であった(表 1-3)。

## 5. 分子系統学的解析

RVC VP6 遺伝子の分子系統樹を作製した結果、Yamagata 株と Shintoku 株は同じクラスターに属し、他の株が形成するクラスターと明確に区別された(図 1-4)。一方、ウシ由来の WD534tc 株はブタ由来の Cowden 株と同じクラスターに位置し、ヒト由来株は独自のクラスターを形成した。すなわち、WD534tc 株以外の RVC は、由来動物種に一致した 3 つのクラスターに区別された(図 1-4)。

## 考察

国内外で、ウシから最初に検出された RVC は、1991 年に北海道において成牛の下痢便から分離された Shintoku 株であり(133)、この症例が唯一、ウシを自然宿主とする RVC の存在を示唆するものであった(53, 54, 55, 134, 135)。そのために、集団としてウシを自然宿主とする RVC が存在するのを含め、ウシ RVC の発生実態や遺伝学的性状等は不明な点が多く残されたままとなり、ウイルスの分類学上、一般的にウシは RVC の自然宿主に含まれない状況であった。本章では、2002 年 4 月、山形県の一乳肉複合経営農場で集団発生した乳用成牛の下痢症について、様々な下痢に関与する病原微生物の検査および発生状況調査を行い、ウシは RVC の自然宿主の 1 つであることを裏付け、RVC は成牛の下痢症に関与し、ウシ RVC と呼ぶことを提唱する。

始めに本症例の病原検索を行った。下痢を発症した牛の糞便材料を用いて、細菌検査、寄生虫検査、免疫クロマトグラフィー法および RT-PCR 法によるウイルス検査により主要な下痢に関与する病原微生物の検出を試みた結果、RVC が唯一検出された病原微生物であった。さらに、電子顕微鏡観察からもロタウイルス様粒子のみが観察され、その他のウイルス粒子は観察されなかった。この検出された RVC は、RNA-PAGE で典型的な RVC の RNA 電気泳動パターンである 4・3・2・2 パターンを示し、Shintoku 株と非常に類似した電気泳動パターンを示した。これらの結果から、糞便中から検出された病原微生物は RVC であることが明らかとなり、Yamagata 株と命名した(79)。RVC はブタやヒトにおいて、下痢を引き起こす重要な腸管病原体とみなされている。そして、ウシにおいても、RVC Shintoku 株は、初乳未摂取の新生子牛に経口投与すると下痢が発生することが確認されている。以上の病原検索そして RVC に関するこれまでの知見から、本症例は RVC 感染に起因したと考えられ、本症を RVC 下痢症あ

るいは RVC 病と診断した。そして、Shintoku 株の検出された症例に次いで、RVC が成牛の下痢症に関与したことを示唆する 2 症例目となった。

本研究で検出された RVC Yamagata 株の VP7 および VP6 遺伝子の塩基配列を解読した。VP7 遺伝子は全長が 1,063 bp であり、332 アミノ酸をコードしている 1 つの open reading frame(ORF)を含んでいた。また、VP6 遺伝子は全長が 1,352 bp であり、395 アミノ酸をコードしている 1 つの ORF を含んでいた。このことは、ウシから検出された Shintoku 株および WD534tc 株を含めてヒトおよびブタから検出された RVC 株で共通していた。しかしながら、VP7 および VP6 遺伝子を相同性解析した結果、Yamagata 株は、塩基配列およびアミノ酸配列共にウシ由来の WD534tc 株やブタ由来の RVC、また、ヒト由来の RVC との相同性よりも Shintoku 株との相同性が非常に高かった。また、RVC VP6 遺伝子の分子系統学的解析において、Yamagata 株と Shintoku 株は同じクラスターに属して、ウシ由来の WD534tc 株やブタ由来の RVC、また、ヒト由来の RVC が形成するクラスターと明確に区別された。このことから、Yamagata 株は遺伝学的に Shintoku 株と極めて近縁であり、両株はブタおよびヒト RVC とは明確に区別されることが明らかとなった。これらの結果から、ウシは RVC の自然宿主の 1 つであることが明らかとなり、ウシ RVC と呼ぶことを提唱した。

RVC Yamagata 株の検出された本症例と Shintoku 株が検出された症例を比較することで以下の 3 点が類似していた。第 1 点として、農場内に飼養されている全ての乳用成牛に水様下痢と産乳量の低下が認められた。第 2 点として、死亡例は観察されなかった。第 3 点として、乳用子牛および乳用育成牛は下痢を認めなかった。この病態の類似点は、ウシ RVC 病の特徴であるのかもしれない。また、ウシ RVC 病の病態の類似点として示した点は、成牛で多発する BCoV 病の病態とも類似している。すなわち、本症例は 4 月下旬に発生したことから、発生時期が秋から春先にかけて頻発する



冬季赤痢とも称される BCoV 病の好発季節と重なった(38, 56, 97, 115)。一方、ウシ RVC 病の病態の類似点として示した点と BCoV 病の病態において相違点もみられた。具体的には、BCoV 病で時に認められる血便の排出や鼻水漏出等の呼吸器症状はウシ RVC 病では確認されなかった。これらの点は BCoV 病とウシ RVC 病を臨床的に鑑別する一助となる可能性がある。しかしながら、ウシ RVC に起因する下痢症と呼ぶことができるのは上記の 2 症例のみであり、今回、類似点そして相違点として示した点が、RVC の普遍的な特徴であるか結論付けるには症例数が少なすぎる。引き続きウシ RVC の下痢症に関する情報を集積していく必要がある。

また、米国および日本のウシにおいて RVC に対する抗体が 47～56 %の陽性率で検出されたことが報告されている(134)。このことから、ウシにおいて RVC の感染は頻繁に起きている可能性が高い。しかしながら、前述の通り本症例の発生以前にウシから検出された RVC は Shintoku 株のみである。このことは、BCoV 病と RVC 病に類似点が多いために、RVC 病が臨床的に BCoV 病と診断されて見逃されてきた、または RVC に感染しても臨床症状を示さない不顕性感染が多い可能性も考えられる。この点を明らかにすることは、本病の制御にとって重要である。下痢症の発生時には、臨床症状だけで診断せずに、実験室検査で BCoV と RVC を含めた RV を鑑別することで明らかになってくると思われる。引き続きウシにおける RVC 病に関する情報を集積していく必要がある。

本症例において下痢が観察されたのは乳用成牛のみであり、同農場で飼養されていた乳用子牛、乳用育成牛、肉用種繁殖用成牛そして肉用種子牛では観察されなかった。現在のところ、RVC の検出された症例は、乳用成牛のみである。このことから、品種の違いによる抗病性の違いあるいは搾乳がストレス要因となり抵抗力の低下を引き起こし、下痢発症に関与しているのかもしれない。また、RVA は、ウシ、ブタ、ウマと

いった家畜において幼齢期下痢症の主要な原因となっており、ヒトにおいても RVA は 6 か月齢から 2 歳をピークに 5 歳までに世界中のほぼ全ての小児に感染するのに対して、RVC 下痢症は 5~14 歳の子供で確認されることが多いことが報告されている(6, 65)。このことから、好発する年齢層に違いがあり、年齢層の高いことが RVC 下痢症の特徴であるのかもしれない。発生実態を明らかにすることは、ウシ RVC による下痢症の制御にとって重要である。これまでの RVC の検出症例から乳用成牛の下痢症に注目しがちであるが、子牛、肉用牛にも注目して RVC 病に関する情報を集積していく必要がある。

本症例において下痢の発生は、牛舎入口からみて左側の入口付近に繋養されていた 3 頭から始まったことから、ウイルスは、牛舎の出入りする物やヒトを介して侵入した可能性が示唆されるが、獣医師の聞き取り調査で同時期に近隣農場で集団下痢の発生は見られなかったことが確認されているため、近隣農場からの伝播を証明することはできなかった。ウイルス動態を明らかにすることは、ウシ RVC 病の制御に重要である。不顕性感染牛や持続感染牛の存在にも配慮しながら野外発生事例を集積し、遺伝子解析の手法を活用してウシ RVC の生態について明らかにする必要がある。

本章の結論として、ウシは RVC の自然宿主の 1 つであることを裏付けた。このことから、RVC は成牛の下痢症に関与し、ウシ RVC と呼ぶことを提唱した。

表 1-1 下痢関連ウイルスの RT-PCR 検査に用いたプライマー

Viral	Primer	Detection primers (5'→3')	Gene	Position	Product size (bp)	Reference
BCoV	F	ACCACCAGTTCTTGATGTGG	M	26–54	455	(38) Fukutomi <i>et al.</i> 1999
	R	GGCCTAACATACATCCTTCC		391–409		
RVA	Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCC GTCTGG	VP7	1–28	1,062	(45) Gouvea <i>et al.</i> 1990
	End9	GGTCACATCATACAATTCTAAT CTAAG		1036–1062		
RVB	9B3	CAGTAACTCTATCCTTTTACC	VP7	175–195	288	(15) Chinsangaram <i>et al.</i> 1994
	9B4	CGTATCGCAATACAATCCG		444–462		
RVC	U1	GGCATTTAAAAAAGAAGAAGC TGT	VP7	1–24	1,063	(135) Tsunemitsu <i>et al.</i> 1996
	U1063	AGCCACATGATCTTGTTTACGC		1042–1063		
BVDV	324	ATGCCCWTAGTAGGACTAGCA	Non structural regions	108–128	288	(138) Vilcek <i>et al.</i> 1994
	326	TCAACTCCATGTGCCATGTAC		375–395		

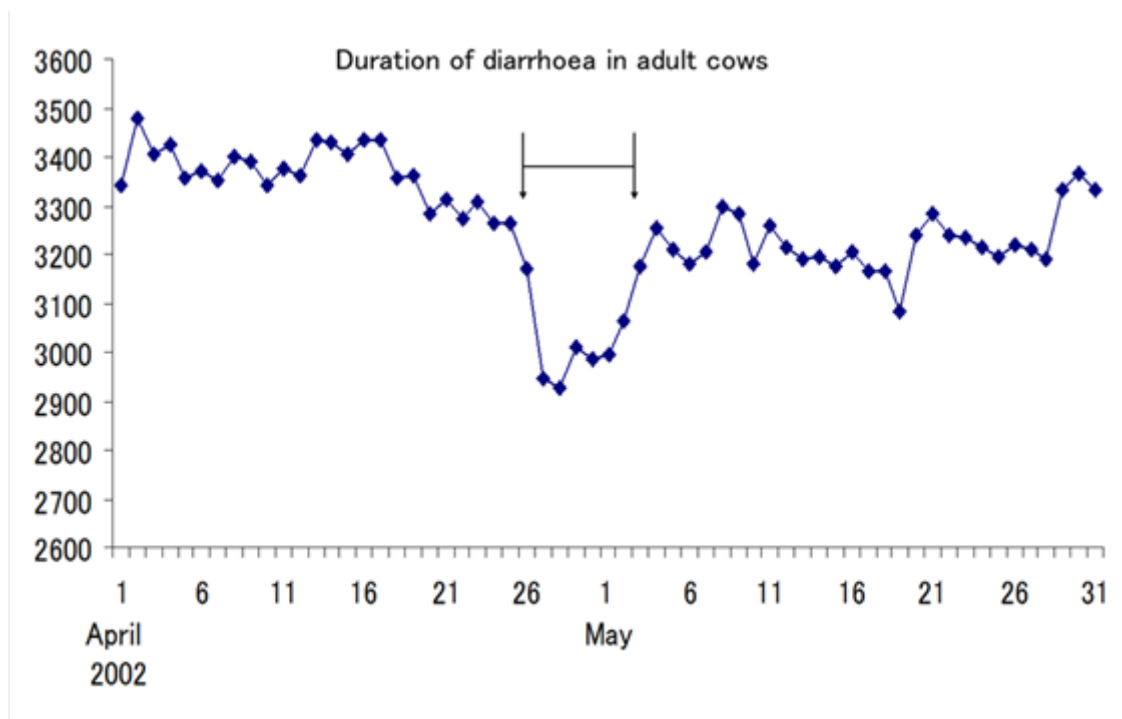


図 1-1 1 日当たりの農場の産乳量の推移 縦軸：産乳量 (kg)、横軸：日付 (日)

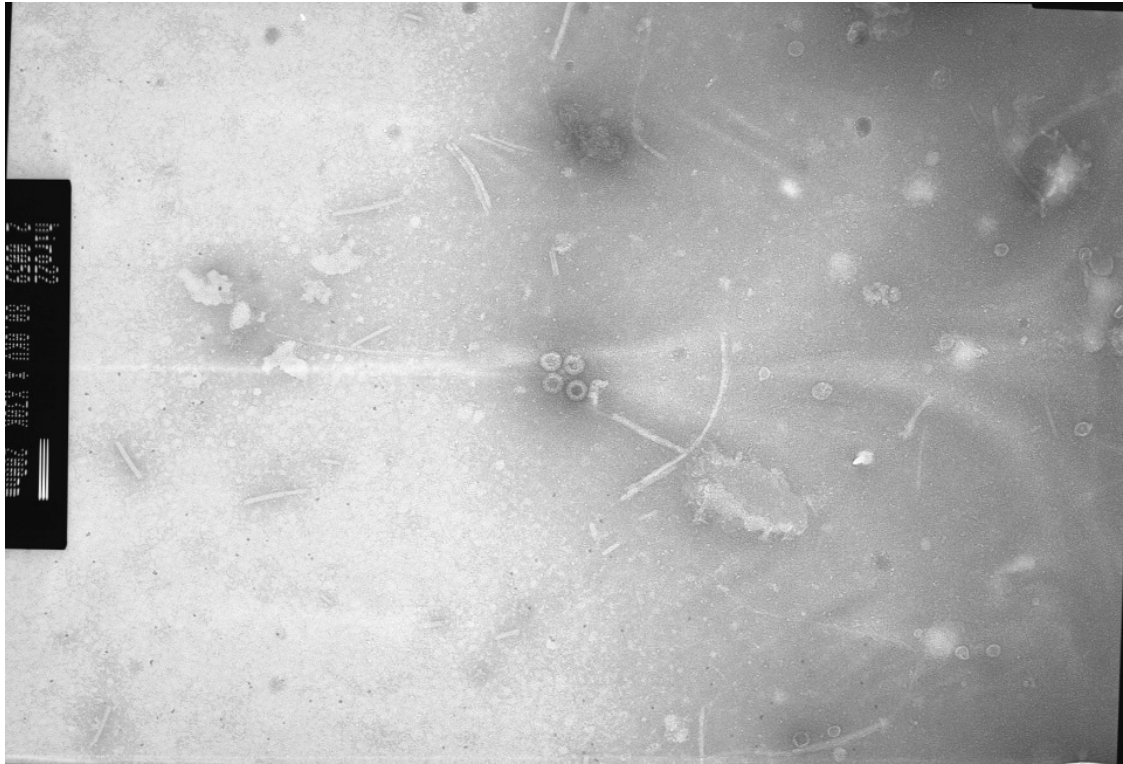


図 1-2 電子顕微鏡によるロタウイルス粒子像



図 1-3 ロタウイルス二本鎖 RNA の PAGE 移動パターンの比較。

レーン 1 : RVC Yamagata 株、レーン 2 : RVC Shintoku 株、レーン 3 : RVA OSU 株

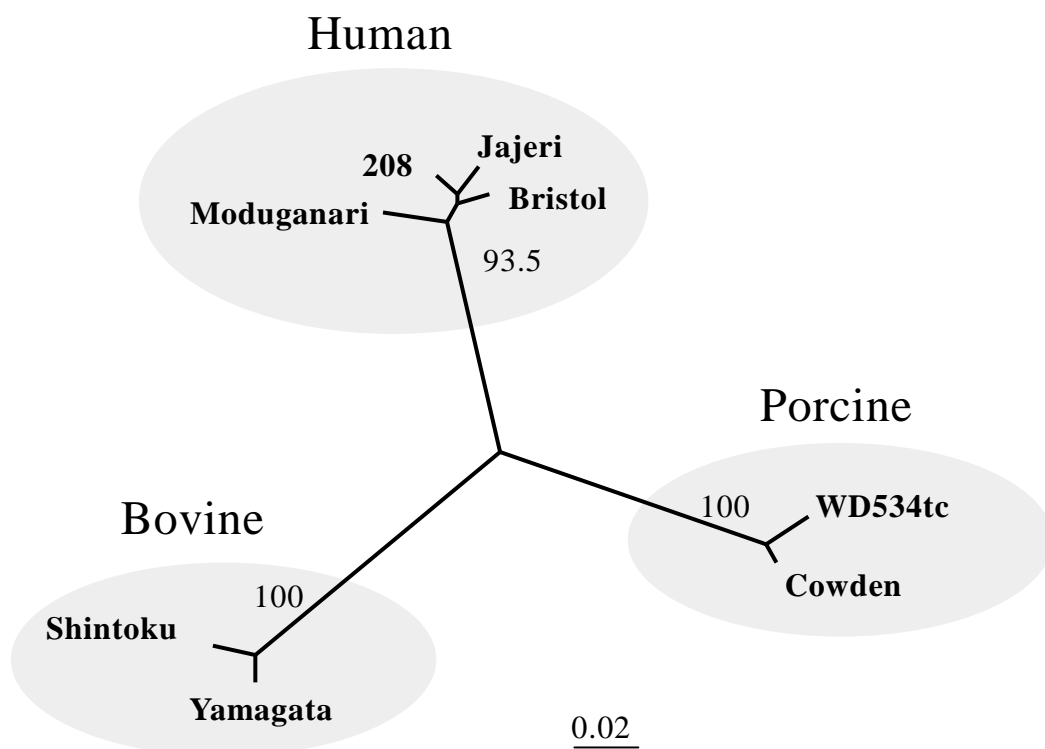


図 1-4 RVC VP6 遺伝子の関係を示した系統樹

表 1-2 RVC Yamagata 株と公表されている RVC 株の VP7 遺伝子の塩基配列および  
翻訳アミノ酸の相同性

Strain <sup>a</sup>	Species of origin	Identity with Yamagata VP7 (%)	
		Nucleotide	Amino acid
Shintoku	Bovine	<b>93.5</b>	<b>96.1</b>
Cowden	Porcine	76.1	74.7
WH	Porcine	75.5	75.0
HF	Porcine	73.9	72.6
88-220	Human	74.2	73.5
OK450	Human	74.2	73.5
Bristol	Human	74.7	73.5
208	Human	74.7	72.9
Moduganari	Human	75.1	73.8
Jaferi	Human	74.8	73.8

<sup>a</sup> 使用した株の VP7 遺伝子配列の accession numbers は、 Shintoku, U31750;  
Cowden, M61101; WH, U31749; HF, U31748; 88-220, M61100; OK450, D87544;  
Bristol, X77257; 208, AB008671; Moduganari, AF323979; and Jeferi, AF323982 で  
ある。



表 1-3 RVC Yamagata 株と公表されている RVC 株の VP6 遺伝子の塩基配列および  
翻訳アミノ酸の相同性

Strain <sup>a</sup>	Species of origin	Identity with Yamagata VP6 (%)	
		Nucleotide	Amino acid
Shintoku	Bovine	<b>98.1</b>	<b>99.5</b>
WD534tc <sup>b</sup>	Porcine?	81.6	87.8
Cowden	Porcine	82.9	91.6
Bristol	Human	81.9	88.9
208	Human	81.7	88.6
Moduganari	Human	81.9	88.4
Jajeri	Human	81.7	88.6

<sup>a</sup> 使用した株の VP6 遺伝子配列の accession numbers は、 Shintoku, M88768;  
WD534ts, AF162434; Cowden, M94157; Bristol, X59843; 208, AB008672;  
Moduganari, AF325805; and Jejeri, AF325805 である。

## 第二章

2002 年から 2011 年に山形県で採材されたウシ下痢便からのウシロタウイルス C の検

出およびウシロタウイルス C 病の疫学的特徴

(Detection of bovine rotavirus C from bovine diarrhea feces sampled in Yamagata

prefecture from 2002 to 2011 and epidemiological features of bovine rotavirus C

disease)

馬 渡 隆 寛

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

(指導教授：田 中 良 和)

平成 31 年 3 月

## 序論

ウシの下痢症発生には様々な病原微生物が関与している。その中で、第一章において、2002 年 4 月に山形県内で集団発生した乳用成牛の下痢症例から採材した糞便から、唯一 RVC が検出され Yamagata 株と命名された(79)。この株は、既報のブタ RVC およびヒト RVC 株よりもウシの糞便から検出された RVC Shintoku 株と最も近縁であることが明らかとなった(79)。以上の結果からウシは RVC の自然宿主の 1 つであることが裏付けられた。このことから、RVC は成牛の下痢症に関与し、ウシ RVC と呼ぶことを提唱した。それ以降、ウシ RVC が広く認知され、Fukuda らによってウシ RVC を含む主要な下痢関連ウイルスを検出するマルチプレックス RT-PCR が開発されたことも相まって(35)、家畜保健衛生所の業績発表会における 2004 年の石川県、2010 年の富山県、2011 年の埼玉県および新潟県、2012 年の香川県、2013 年の福井県、2014 年の青森県そして 2016 年の栃木県の報告(16, 59, 86, 87, 94, 99, 120, 131)、そして、福田らによる 2004 年から 2009 年までの概ね 5 年間の全国 18 県の家畜保健衛生所での成牛の下痢症の病性鑑定結果についてアンケート調査した報告により(36, 37)、ウシ RVC が乳用成牛の下痢症に関与している実態が明らかになってきた。しかしながら、品種や月齢との関連性等不明な点が多く残されており、引き続きウシ RVC の下痢症に関する情報を集積していく必要がある。また、福田らのまとめた報告(36, 37)は、統一的なフォーマットで発生状況や臨床症状などの情報を収集したものではなく、また、症例によっては未検査の病原体も存在するため、正確性や客観性を欠く部分もあると考えられる。そこで、本章では、野外におけるウシ RVC による下痢症の発生実態を明らかにすることを目的に、2002 年から 2011 年の 10 年間に山形県内の農場で発生した下痢症例から病性鑑定材料として得られた乳用牛、肉用牛そして乳肉

用子牛を合わせた 302 症例 906 検体の下痢便を用いて、統一的な検査方法で主要な下痢に關与する病原微生物の検出を行い、また、発生状況や臨床症状などの収集した情報について整理した。

## 材料および方法

### 1. ウシ糞便材料

2002 年から 2011 年の 10 年間に、山形県内の農場において発生した下痢症例から病性鑑定材料として得られた延べ 302 農場由来の 906 検体の下痢便材料を供試した。下痢便材料の内訳は、乳用成牛下痢 123 症例 478 検体、肉用成牛下痢 40 症例 148 検体、乳用子牛下痢 36 症例 77 検体および肉用子牛下痢 103 症例 203 検体であった。成牛と子牛の区分は、乳用成牛が 24 か月齢以上、肉用成牛が 12 か月齢以上、乳用肉用共に 6 か月齢以下を子牛とした。ウシの種類は、乳用牛がホルスタイン種、肉用牛が黒毛和種である。

採取した糞便材料より、重量の 4 倍量のリン酸緩衝液(PBS)を加えて 10%の糞便懸濁液を作成した。糞便懸濁液を  $750 \times G$  で 10 分間遠心し、遠心上清を糞便溶液としてウイルス検査への使用時まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。また、採取した糞便材料の残りは、細菌検査および寄生虫検査への使用時まで  $4^{\circ}\text{C}$  で保存し、使用後は  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### 2. 発生形態

各症例の発病率(累積発生率)を次の数式で求めた(7, 141)。

発病率(累積発生率) = 期間内に発生した患畜数 / 観察開始時点の感受性動物数。この数値から、各症例を次の 3 つの発生形態(A 集団発生、B 散発発生、C 単独発生)に分類した。

家畜衛生の分野において、集団発生について定義したものは 2012 年に福田の用いた方法以外にみつからない(36)。そこで、本研究においても A の集団発生の定義は、その方法に準拠して区分した。すなわち、収集した症例の平均発病率を成牛および子

牛毎に上記の式から求め、飼養頭数の規模毎に集団発生に該当する頭数を決定し、その条件に該当したものを集団発生とした。その他、同時期(概ね 7 日以内)に発生していること、空間的な集積性があることなども集団発生の条件として考慮した。これらの条件に該当せず、2 頭以上の小規模な発症がみられる症例を散発発生、1 頭のみの発生を単独発生とした。福田が用いた定義では、飼養頭数 5 頭以上の症例を集計対象としていたが、本研究では子牛も調査対象としているため、小規模農場である飼養頭数 5 頭未満の症例も集計対象とした。飼養頭数 5 頭未満で 2 頭以上の発症がみられた症例は散発発生、1 頭のみの発症は単独発生とした。

### 3. 細菌学的検査、寄生虫学的検査および下痢関連ウイルス検査

サルモネラ、病原性大腸菌、コクシジウム検査は、第一章と同様の方法で行った。すなわち、サルモネラ検査は分離培養後に培地上の疑わしいコロニーの性状検査を行い、サルモネラの場合は型別用抗血清を用いて血清型を同定した。病原性大腸菌の検査は分離培養後に培地上のコロニーから DNA を抽出し、PCR 法によって病原性遺伝子の検出を行った。コクシジウム検査は、飽和食塩水を用いた浮游法によるオーシストの有無を観察し、1 G 当たりのオーシスト数(OPG)を求めた。

下痢関連ウイルス、すなわち、BCV、RVA、RVB、RVC、Torovirus(ToV)および BVDV については、作製した糞便溶液から、High Pure Virus RNA Kit(Roche Switzerland)を用いて RNA を抽出し、One step RT-PCR kit(QIAGEN, USA)を用いて、これらウイルス遺伝子の検出を試みた。AdV(AdV I 及び AdV II)については、作製した糞便溶液から、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, USA)を用いて DNA を抽出し、TaKaRa Ex Taq (TaKaRa Bio, Japan)を用いてウイルス遺伝子の検出を試みた。RT-PCR および PCR に用いたプライマーの塩基配列は、表 2-1 に示した。RV(RVA、

RVB および RVC)は、RT-PCR 前に、鋳型 RNA を 2  $\mu$ l、Dimethyl sulfoxide(DMSO) を 1  $\mu$ l、RNase フリー蒸留水を 14  $\mu$ l 加えて 95℃で 5 分加熱し、その後に、RT-PCR 反応液として、5  $\times$  OneStep RT-PCR Buffer を 5  $\mu$ l、dNTP Mixture を 1  $\mu$ l、50  $\mu$ M に調整したプライマーを 0.25  $\mu$ l ずつ、RNase Inhibitor(40U/ $\mu$ l)を 0.5  $\mu$ l 、QIAGEN One Step RT-PCR Enzyme Mix を 1  $\mu$ l 加えて全量が 25  $\mu$ l となるように調整した。

RVs 以外の RT-PCR 反応液として、5  $\times$  OneStep RT-PCR Buffer を 5  $\mu$ l、dNTP Mixture を 1  $\mu$ l、50  $\mu$ M に調整したプライマーを 0.25  $\mu$ l ずつ、RNase Inhibitor (40U/ $\mu$ l)を 0.5  $\mu$ l 、QIAGEN One Step RT-PCR Enzyme Mix を 1  $\mu$ l、鋳型 RNA を 1  $\mu$ l 加えて混和したものを作成し、RNase フリー蒸留水を加えて全量が 25  $\mu$ l となるように調整した。PCR 反応液として、10  $\times$  EX Taq Buffer を 2.5  $\mu$ l、dNTP Mixture を 2  $\mu$ l、50  $\mu$ M に調整したプライマーを 0.25  $\mu$ l ずつ、TaKaRa Ex Taq を 0.25  $\mu$ l、鋳型 RNA を 1  $\mu$ l 加えて混和したものを作成し、RNase フリー蒸留水を加えて全量が 25  $\mu$ l となるように調整した。RT-PCR および PCR 反応条件は、それぞれ既報に従い実施した(表 2-1)。上記の反応は、全て GeneAmp® PCR System 9700(Applied Biosystems)を用いて行った。反応後、TAE バッファー(40 mM Tris-acetate/1 mM EDTA)を使用して作成したエチジウムブロマイド(0.5  $\mu$ g/ml)加 2%アガロースゲルを用いて PCR 産物の電気泳動を行い、UV トランスイルミネーターにて PCR による遺伝子の増幅の有無を確認した。なお、RVA および AdV 検査は、免疫クロマトグラフィ法を原理とした抗原検出キット(DIPSTIC Eiken ROTA および DIPSTIC Eiken ADENO; 栄研科学)も併用して検査を行った。RVA および AdV は、両方の方法で検出された場合、検出数の多い方を検出数とした。検出された下痢関連微生物の検出内訳については、乳用成牛、肉用成牛、乳用子牛、肉用子牛に分けて集計した。さらに、主要な下痢に関与する病原微生物の年次別、月別の検出内訳についてまとめ、

RVC の特徴について整理した。

#### 4. 一酪農場で繰り返し集団発生した下痢症において検出された病原微生物、発生状況および臨床症状の比較

2002 年から 2003 年の間に山形県内の同一農場で乳用成牛の下痢症が 3 回集団発生した。発生時期は、1 回目が 2002 年 1 月、2 回目が 2002 年 11 月、3 回目が 2003 年 12 月である。検査材料は、1 回目が下痢を発症した乳用成牛から糞便を 5 検体、2 回目が下痢を発症した乳用成牛から糞便を 5 検体および乳用子牛から糞便を 2 検体、そして 3 回目が下痢を発症した乳用成牛から糞便を 4 検体採材した。検査は、上記の「3. 細菌学的検査、寄生虫学的検査および下痢関連ウイルス検査」と同様の方法で実施した。そして、各下痢症の発生時に検出された病原微生物、発生状況および臨床症状等の収集した情報について整理した。



## 結果

### 1. 下痢に關与する病原微生物の検出内訳

乳用成牛の下痢症例 123 症例 478 検体における病原微生物の検出成績を表 2-2 に示す。1 種類の病原微生物のみ検出されたのが 98 症例(79.7%)246 検体(68.4%)、複数の病原微生物が検出されたのが 4 症例(3.2%)5 検体(1.0%)であった。そして、21 症例(17.1%)146 検体(30.6%)からは、病原微生物が検出されなかった。個々の病原微生物に関しては、陽性症例数および陽性検体数が最も多かったのは BCoV であり、BCoV のみが検出されたのが 71 症例(57.7%)219 検体(45.8%)、複数の病原微生物が検出されたのが 2 症例(1.6%)3 検体(0.6%)であった。その他の病原微生物については、多い順に RVB、RVA、RVC、サルモネラ(血清型は、全症例ともに *Salmonella* Typhimurium を検出)そして BVDV が検出された。RVC に関しては、7 症例(5.7%)27 検体(5.7%)から検出され、複数の病原微生物の検出された症例はみられなかった。RVA、RVB および RVC を合わせた RV 全体としてみると、1 種類の RV のみ検出されたのが 22 症例(17.9%)94 検体(19.7%)であり、複数の病原微生物が検出されたのは 3 症例(2.4%)3 検体(0.6%)であった。

肉用成牛の下痢症例 40 症例 148 検体における病原微生物の検出成績を表 2-3 に示した。1 種類の病原微生物のみ検出されたのが 31 症例(77.5%)89 検体(60.1%)、複数の病原微生物が検出されたのが 3 症例(7.5%)3 検体(2.1%)であった。そして、6 症例(15.0%)56 検体(37.8%)においては、病原微生物は検出されなかった。そして、RVC に関しては、いずれの症例からも検出されなかった。個々の病原微生物に関しては、BCoV が乳用成牛と同様に最も多く、BCoV のみが検出されたのが 25 症例(62.5%)73 検体(49.3%)、複数の病原微生物が検出されたのは 3 症例(7.5%)3 検体(2.1%)であっ

た。他の病原微生物については、多い順にコクシジウムそして RVA が検出された。

乳用子牛の下痢症例 36 症例 77 検体における病原微生物の検出成績を表 2-4 に示す。1 種類の病原微生物のみ検出されたのが 22 症例(61.0%)30 検体(39.0%)、複数の病原微生物が検出されたのは 1 症例(2.9%)3 検体(3.9%)であった。そして、13 症例(36.1%)44 検体(57.1%)においては、病原微生物が検出されなかった。そして、RVC に関しては、いずれの症例からも検出されなかった。個々の病原微生物に関しては、RVA のみが 13 症例(36.1%)21 検体(27.3%)から検出され、複数の病原微生物が 1 症例(2.9%)3 検体(3.9%)から検出され、症例数および検出数が最も多かった。他の病原微生物については、BCoV、コクシジウムそして病原性大腸菌が同じ陽性症例数および陽性検体数で検出された。

肉用子牛の下痢症例 103 件 203 検体における病原微生物の検出成績を表 2-5 に示した。1 種類の病原微生物のみ検出されたのが 44 症例(42.7%)66 検体(32.5%)、複数の病原微生物が検出されたのは 1 症例(1.0%)1 検体(0.5%)であった。そして、58 症例(56.3%)136 検体(67.0%)からは病原微生物が検出されなかった。そして、いずれの症例においても RVC は検出されなかった。それぞれの病原微生物に関しては、RVA が乳用子牛と同様に最も多く RVA のみが 17 症例(16.5%)21 検体(10.3%)から検出され、複数の病原微生物が 1 症例(1.0%)1 検体(0.5%)から検出された。他の病原微生物に関しては、多い順に病原性大腸菌、BCoV、コクシジウム、AdV、RVB そしてサルモネラ(血清型は、*Salmonella* Typhimurium)が検出された。

## 2. 下痢の発生形態

福田の用いた方法(36)で、本研究における飼養規模ごとの集団発生に分類される頭数を求めた。

乳用成牛と肉用成牛を合わせた成牛全体の平均発病率は 37.5%となった。飼養頭数 14 頭の 37.5%が 5 頭、飼養頭数 27 頭の 37.5%が 10 頭であることから、集団発生を、

- ① 飼養頭数 5～14 頭：発症頭数 5 頭以上
- ② 飼養頭数 15～27 頭：発症頭数平均発病率(37.5%)以上
- ③ 飼養頭数 28 頭以上：発症頭数：10 頭以上

と定義した。

また、乳用子牛と肉用子牛を合わせた子牛全体の平均発病率は 30.2%となり、飼養頭数 17 頭の 30.2%が 5 頭、飼養頭数 34 頭の 30.2%が 10 頭であることから、集団発生を、

- ① 飼養頭数 5～17 頭：発症頭数 5 頭以上
- ② 飼養頭数 18～34 頭：発症頭数平均発病率(30.2%)以上
- ③ 飼養頭数 35 頭以上：発症頭数 10 頭以上

と定義した。

病性鑑定を実施した 302 症例 906 検体における下痢の発生形態内訳を表 2-6 に示す。集団発生に関して、乳用成牛では集団発生由来が 100 症例(81.3%)421 検体(88.1%)、散発発生由来が 23 症例(18.7%)57 検体(11.9%)となり、肉用成牛では集団発生由来が 33 症例(82.5%)125 検体(84.5%)、散発発生由来が 7 症例(17.5%)23 検体(15.5%)となった。成牛は、全体的に集団発生が多く、散発発生が少ない傾向を示し、単独発生はみられなかった。乳用成牛および肉用成牛共に、単独発生は 1 症例もみられず、大多数は集団発生由来であった。一方、乳用子牛において集団発生由来が 3 症例(8.3%)17 検体(22.1%)、散発発生由来が 15 症例(41.7%)42 検体(54.5%)、単独発生由来が 18 症例(50.0%)18 検体(23.4%)となり、そして、肉用子牛において集団発生由来が 9 症例(8.7%)53 検体(26.2%)、散発発生由来が 31 症例(30.1%)87 検体(42.8%)、単独発生

由来が 63 症例(61.2%)63 検体(31.0%)となった。子牛は、全体的に集団発生に比べて散発発生や単独発生が多い傾向を示した。

### 3. 下痢関連疾病の発生形態別の症例数と陽性頭数

下痢便から病原微生物が検出された症例を当該病原体による下痢関連疾病と診断した。そして、各下痢関連疾病の症例数と陽性検体数を発生形態別に区分した。

乳用成牛の成績を表 2-7 に示す。BCoV 病においては、BCoV のみが検出された症例の 90.1%が集団発生、残りが散発発生であり、そして、BVD または RVA と共に検出された症例の全てが集団発生であった。RVB 病においては、RVB のみが検出された症例と RVA と共に検出された症例とに関わらず全てが集団発生であり、RVC 病においては、全てが RVC のみが検出された症例であり、その全てが集団発生であった。これらに対して、RVA 病においては、RVA のみが検出された症例の 60%が集団発生、残りが散発発生であり、そして、前述した RVB と共に検出された症例では全て集団発生であった。一方、サルモネラ症においては、全てがサルモネラのみ検出された症例であり、その全てが散発発生であった。

肉用成牛の成績を表 2-8 に示す。BCoV 病においては、BCoV のみが検出された症例の 92%が集団発生、残りが散発発生であり、そして、コクシジウムはまた RVA と共に検出された症例の全てが集団発生であった。コクシジウム病においては、コクシジウムのみが検出された症例の 40.0%が集団発生であり、残りが散発発生であり、そして、前述のとおり BCoV と共に検出された症例全てが集団発生であった。また、RVA 病において、RVA のみが検出された症例と前述のとおり BCoV と共に検出された症例とに関わらず全てが集団発生であった。

乳用子牛での成績を表 2-9 に示す。RVA 病においては、RVA のみが検出された症例

の 61.5%が散発発生を占め、30.8%が単独発生、7.7%が集団発生であり、BCoV と共に検出された 1 症が散発発生であった。BCoV 病においては、BCoV のみが検出された症例の 66.7%が単独発生、残りが集団発生であった。コクシジウム病においては、全てがコクシジウムのみ検出された症例であり、その 66.7%が散発発生であり、残りが集団発生であった。大腸菌症は全てが大腸菌のみ検出された症例であり、その全てが単独発生であった。

肉用子牛での成績を表 2-10 に示す。RVA 病においては、RVA のみが検出された症例の 58.8%が単独発生を占め、29.4%が散発発生、11.8%が集団発生であり、大腸菌と共に検出された 1 症例が散発発生であった。BCoV 病においては、全てが BCoV のみ検出された症例であり、50.0%が散発発生、37.5%が単独発生、12.5%が集団発生であった。コクシジウム病においては、全てがコクシジウムのみ検出された症例であり、その 50.0%が単独発生であり、集団発生と散発発生が 25.0%ずつであった。AdV 病および RVB 病においては、全てが 1 種類の病原微生物のみ検出された症例であり、その全てが集団発生であった。サルモネラ症においても、全てがサルモネラのみ検出された症例であり、その全てが散発発生であった。

#### 4. 乳用成牛における下痢関連疾病の年別の症例発生件数

RVC 病は乳用成牛でのみ確認されたため、乳用成牛における下痢関連疾病の年別(2002 年から 2012 年)の症例発生件数を図 2-1 に示した。BCoV 病は、毎年発生し、発生件数が最も多く確認された。次いで、RVB 病が 2002 年に 1 症例、2004 年に 2 症例、2005 年に 5 症例、2007 年に 2 症例、2009 年に 1 症例、2011 年に 1 症例、計 12 症例で確認され、RVA 病が 2003 年に 2 症例、2004 年に 2 症例、2005 年に 4 症例、計 8 症例で確認され、RVC 病が 2002 年に 1 症例、2003 年に 1 症例、2004 年に 3 症

例、2008年に1症例、2010年に1症例の計7症例で確認された。RV病としてみると、RVA病、RVB病およびRVC病のいずれかが10年間を通じて2006年を除いて毎年確認された。一方、サルモネラ症は2005年に4症例、2006年に1症例、計5症例で確認された。

#### 5. 乳用成牛における下痢に關与する病原微生物の月別の症例発生件数

乳用成牛における下痢関連疾病の月別の症例発生件数を図2-2に示した。BCoV病は毎月発生し、発生件数が8月を除いて最も多く確認された。特に10月から5月、すなわち秋から春にかけての寒冷的な季節に症例数が増加する傾向を示した。次いで、RVB病が1月に1症例、2月に2症例、4月に5症例、5月に1症例、7月に1症例、11月に2症例、計12症例で確認され、RVA病が2月に1症例、3月および4月に各2症例、11月に2症例そして12月に1症例、計8症例で確認され、RVC病が1月および4月に各2症例、11月、12月および6月に各1症例、計7症例で確認された。RV病としてしてみると、RVC病が6月に1症例、RVB病が7月に1症例で確認され、温かい季節の発生もみられているが、傾向として秋から春先にかけての寒冷的な季節の発生が多かった。一方、サルモネラ症は2月に1症例、5月に1症例、8月に3症例、計5症例で確認され、温かい季節に発生する傾向を示した。

#### 6. RVC病の発生概要

前述の通り、本研究において山形県内でRVC病は乳用成牛でのみ7症例認められた(表2-11)。この7症例の発生状況および臨床症状を整理したところ、4点の共通点がみられた。①集団発生である点、②秋から春に発生する点、③下痢便はいずれも茶褐色の水様性を呈した点、④産乳量の低下がみられた点である。また、興味深い点と

して、①農場 C で集団下痢が発生した 8 日後に同じ市内の近隣農場である農場 D で集団下痢が発生したこと、②2004 年と 2008 年の 2 回、同じ農場 C で集団下痢が発生したことの 2 点が挙げられる。

#### 7. 同一酪農場で繰り返し集団発生した下痢症において検出された病原微生物、発生状況および臨床症状の比較

2002 年から 2003 年に乳用成牛を 25 頭～28 頭飼養する農場 B において、下痢症の集団発生が 3 症例確認された。これらの発生状況および臨床症状の概要を下記および表 2-12 に示した。

##### <1 症例目>

2002 年 1 月 17 日、複数の乳用成牛が突然下痢を呈し、下痢の発生は 2 日以内に約半数の乳用成牛に広がった。子牛においては下痢の発症はみられなかった。下痢便は茶色水様性で、血便は認められなかった。また、下痢発症牛は産乳量減少（聞き取り調査のみ）を示す一方、呼吸器症状は認められなかった。農場内での下痢の発生期間は 8 日間であった。下痢を発症した 5 頭の乳用成牛から糞便を採材し、診断検査の結果、5 頭全てから RVB が検出され、その他の主要な下痢関連病原体は検出されなかった。

##### <2 症例目>

2002 年 11 月 21 日、数頭の成牛が下痢を呈し、下痢は農場内の全ての成牛に 6 日後までにまん延した。下痢便は水様性で血様を呈していた。また、下痢を発症した乳用成牛は産乳量減少を示し、最大の乳量減少は 14%であった。さらに、鼻汁漏出等の呼吸器症状もみられた。下痢の発症期間は 14 日間であった。下痢を発症した 5 頭の乳用成牛から糞便を採材し、診断検査の結果、5 頭全てから BCoV が検出され、その

他の主要な下痢関連微生物は検出されなかった。また、2 頭の同居子牛はいずれも同時期に水様下痢を呈し、そのうちの 1 頭は BCoV と RVA の混合感染、もう 1 頭は RVA のみが検出された。

### <3 症例目>

2003 年 12 月 15 日、数頭の成牛で下痢が発生し下痢は 4 日以内に農場内の全ての乳用成牛に広がった。子牛においては下痢の発症はみられなかった。下痢便は褐色水様性で血便は認められなかった。また、下痢を呈した成牛は産乳量減少を示し、最大の乳量減少は 9%であり、呼吸器症状は示さなかった。農場内での下痢の発症期間は 9 日間であった。採材した 4 頭の糞便材料は診断検査で 4 頭全てから RVC が検出され、その他の主要な下痢関連微生物は検出されなかった。また、同居していた育成牛 3 頭、子牛 3 頭はいずれも下痢は認められなかった。



## 考察

野外においてウシにおける RVC 病の発生実態を明らかにすることは、本症の制御にとって重要である。第一章において、ウシは RVC の自然宿主の 1 つであることを裏付けた。このことで、RVC は成牛の下痢症に関与し、ウシ RVC と呼ぶことができることを提唱した。それ以降、全国各地からウシにおける RVC 病の発生が報告され(16, 59, 86, 87, 94, 99, 120, 131)、乳用成牛の下痢症に関与している実態が徐々に明らかになってきた。しかしながら、品種や月齢との関連性等不明な点が多く残されており、引き続きウシにおける RVC 病に関する情報を集積していく必要がある。そこで、本章では、乳用牛、肉用牛そして乳肉用子牛も含めてウシにおける RVC による下痢症の発生実態について明らかにすることを目的に、10 年間わたって山形県内で収集した下痢便を用いて統一的な検査方法で下痢に関与する病原微生物の検出を行い、発生状況や臨床症状などの得られた情報について整理した。

これまでウシにおける RVC の検出症例は、初検出の Shintoku 株(133)、第 1 章で示した Yamagata 株(79)、Toyama 株(125)、家畜保健衛生所の業績発表会での報告(16, 59, 86, 87, 94, 99, 120, 131)そして福田らが 2004 年から 2009 年までの概ね 5 年間の全国 18 県の家畜保健衛生所での成牛の下痢症の病性鑑定結果をまとめた報告(5 症例(2.5%)から検出)(36, 37)があるが、いずれも乳用成牛の下痢症からのものである。本章の調査においても、RVC は乳用成牛の下痢便からのみ 7 症例(5.7%)検出され、肉用成牛、乳用子牛、肉用子牛の下痢便からは検出されなかった。このことから、RVC は、ウシの中でも乳用成牛の下痢症に関与している実態を強く示唆する結果となった。好発する季節について、既報では秋から春先にかけて検出される傾向を示し、本章の調査でも同様の傾向を示した(16, 36, 37, 59, 79, 86, 87, 94, 99, 120, 131, 133)。発生形

態について分類しているのは、福田らの報告みである(36, 37)。それによると、RVCの検出された5症例(2.5%)のうち4症例を分類し、3症例が集団発生、1症例が散发発生であると報告している。また、家畜保健衛生所の業績発表会で症例報告では、発生形態について定義して分類していないが、農場内で下痢症が蔓延した状況から集団発生であったことが推察される。本章の調査でも福田らの定義(36, 37)に基づいて下痢症の発生形態を分類した結果、全て集団発生であった。これまでの症例を総合してみると、発生形態に関して散发発生もみられているが、大勢は集団発生である。このことから、ウシ RVC は、主に秋から春先にかけての寒冷期に集団発生する乳用成牛の下痢症に関与していることが強く示唆された。

乳用成牛の下痢に関与する病原微生物の検出成績全体をみると、BCoVの検出頻度が最も高く、混合感染も含めて73症例(59.3%)を占め、それに続いて、検出頻度の高い順にRVB(9.7%)、RVA(6.5%)、RVC(5.7%)、サルモネラ(血清型：*Salmonella* Typhimurium)(4.1%)となった。BCoVは、成牛の下痢症において検出頻度が高く、集団発生を引き起こすことが知られている(38, 56, 57, 58, 97, 115)。福田らも成牛の下痢症において最も検出頻度が高く、70%以上が集団発生であると報告している(36, 37)。本章の調査においてもBCoVが最も多く検出され90%以上が集団発生であり、乳用成牛において集団発生する下痢症の主要な原因ウイルスであることが確認された。次に、RVAについてであるが、ウシなどの家畜において幼齢期下痢症の主要な原因ウイルスとして知られており(23)、時に成牛下痢症の原因にもなっていることが報告されている(33, 121)。福田らも成牛の下痢症から混合感染も含めて11症例検出し、集団発生、散发発生そして単独発生と様々な発生形態をとることを報告している(36, 37)。本症の調査においても乳用子牛から14症例(39.0%)検出されたのに対して、乳用成牛からは8症例(6.5%)検出され、主に子牛の下痢症に関与しているが、乳用成牛の下痢

症にも関与していることが確認された。因みに、肉用子牛からも 18 症例(17.5%)検出されたのに対して、肉用成牛から 2 症例(5%)検出され、主に子牛の下痢症に関与しているが、肉用成牛の下痢症にも関与していることが確認された。発生形態に関しては、混合感染も含めると集団発生が 75.0%そして散発発生が 25.0%となり、福田らの報告(36, 37)と違いがみられた。本章の調査も福田らの調査も症例数が少ないため、発生形態に関しては、引き続き情報を集積していく必要がある。

次に RVB についてであるが、ウシにおける RVB 病は米国(11)、英国(124)、日本(46, 47, 136)、インド(4, 42)で報告されている。海外では RVB による子牛の下痢症の報告が散見されるが、日本での報告は成牛、特に搾乳牛での集団発生する下痢症に限られている。ウシにおける RVB の浸潤状況に関して、Chang らは米国内の子牛下痢便および成牛下痢便を用いて RT-PCR 法による検出を行った結果、子牛下痢便で 5.6% (5/90)、成牛下痢便で 18.5%(15/81)が陽性となったことから、子牛および成牛の下痢症に関与していること、特に成牛の下痢症に深く関わっている可能性を示した(11)。

日本では、Tsunemitsu らが 33 農場のウシ血清 324 検体について ELISA 法による RVB 抗体検査を実施した結果、2 歳以上の成牛の抗体陽性率が 60%と比較的高率であることを報告している(137)。本研究においても、子牛に関しては肉用子牛から検出された 1 症例のみであり、乳用成牛から検出は混合感染も含めて 12 事例であったことから、子牛および成牛の下痢症に関与していること、そして特に乳用成牛の下痢症に関与していることが確認された。発生形態に関して本章の調査で 12 症例全て集団発生であったのに対して、福田らの調査によると成牛の下痢症から 16 症例検出し、集団発生が 2 症例、散発発生が 6 症例と報告しており(36, 37)、両調査に違いがみられた。RVB の検出症例数はまだ少ないため、発生形態に関しては、引き続き情報を集積していく必要がある。混合感染についてみると、RVA と RVB の検出された 2 症例(1.6%)、

BCoV と BVD の検出された 1 症例(0.8%)そして BCoV と RVA の検出された 1 症例(0.8%)のみであり、少ない傾向を示した。福田らの調査(36, 37)でも BCoV と RVA の混合感染が 2 症例(1.0%)のみであり、少ない傾向を示している。このことから、乳用成牛の下痢症は 1 種類の病原体が原因となって集団発生や散発発生を起こしていると考えられた。ウシの下痢症の原因調査において糞便から病原微生物が検出されない症例も多数認められる。本章の調査においても 21 症例(17.1%)から主要な下痢に関与する病原微生物が検出されなかった。福田らは、46 症例(23.0%)から主要な下痢に関与する病原微生物が検出されなかったと報告している(36, 37)。このような場合、原因を非感染性の要因に求めている(62, 108)。もちろん、不適正な環境および飼育管理によるストレス、過食、消化不良、吸収障害等の非感染性の要因に起因している場合もあるが、未知の病原微生物による下痢症、そして、下痢への関与が重要視されてこなかったために検査が実施されていない病原微生物に起因する下痢症等が含まれていると考えられている。そのような病原微生物の一つとして本研究ではウシ RVC に注目した。これからも、固定概念に囚われず RV を含め様々な病原微生物に注目して、下痢の原因究明をしていく必要があると考える。

乳用成牛の下痢に関与する病原微生物の検出頻度について興味深い点がみられた。これまで成牛の下痢症の原因として注目されてこなかった RVA、RVB そして RVC の検出頻度が、成牛の下痢に関与する主要な病原微生物として広く知られているサルモネラよりも高く(27, 96)、さらに、RVA、RVB そして RVC を含めた様々な RV の検出頻度は 25 症例(20.3%)を占め、BCoV の 73 症例(59.3%)に次ぐ大きな割合を占めた点である(27, 96)。補足として、サルモネラには 2,200 種以上の血清型があり(28)、ウシにおいて我が国では *Salmonella* Typhimurium が最も主要な血清型であり(119)、*Salmonella* Dublin および *Salmonella* Enteritidis を含めた 3 種の血清型が家畜伝染

病予防法で届出伝染病に指定されている。先行調査として福田らが成牛の下痢症に關与する病原体の検出頻度について報告している(36, 37)。その報告においても、混合感染も含めて BCoV が 101 症例(50.5%)、RVB が 16 症例(8.0%)、サルモネラが 16 症例(7.0%)、RVA が 11 症例(5.5%)そして RVC が 5 症例(2.5%)から検出されており、RVA、RVB そして RVC を含めた RV は 32 症例(16.0%)から検出され、大きな割合を占めている。このことから、RVA、RVB そして RVC を含めた RV は BCoV やサルモネラと同様に乳用成牛の下痢症に關与する主要な病原微生物であり、これまで考えられていたよりも大きな割合を占めて、乳用成牛の下痢症に關与している可能性が示唆された。しかしながら、福田らは RV の検査頻度が低いことを指摘しており、注目度はまだ低いことが窺える(36, 37)。一方、北海道および米国において RVC の抗体保有率がブロッキング ELISA を用いて調査され、北海道の乳用成牛で 56%、米国の肉用成牛で 47%といずれも高い抗体保有率が確認されている(134)。抗体保有率から推察して、ウシにおいて RVC の感染は頻繁に起きており、成牛の下痢症に關与している可能性が高い。しかしながら、これまでの RVC の検出症例数は、抗体保有率に比べて少なすぎる。その理由として次の 2 点が考えられる。1 点目として、RVC 病は BCoV 病と好発季節や発生形態が類似しているため、本病を臨床的に BCoV 病と診断されている可能性が考えられる。2 点目として、感染しても発症しない不顕性感染が多い可能性も考えられる。発生が見逃されてきたのか、あるいは不顕性感染が多いのか、この点を明らかにすることは、本病の制御にとって重要である。下痢症の発生時には、臨床症状だけで診断せずに、実験室検査で BCoV と RVC を含めた RV を鑑別して、引き続きウシにおける RVC 病に関する情報を集積していく必要がある。

RVC による下痢症の発生する季節について、前述のとおり BCoV および RVC を含め RV は共に秋から春先に多く検出される傾向を示し、好発季節が重なっていた(38,

56, 57, 58, 97, 115)。一方、サルモネラは夏季に多く検出される傾向を示した。サルモネラは成牛において不顕性感染が多く(26, 113)、栄養状態(119)、飼料給与内容(2)そして暑熱ストレス(17)などの要因により、通常散発的にサルモネラ症が発生するといわれている。このことは、福田らの報告でも同様の傾向を示している(36, 37)。BCoV および RV による下痢の好発季節とサルモネラによるそれとは異なると考えられ、好発季節が類症鑑別の一助になる可能性を示した。

RVC による下痢症の発症要因について、今回の成績を含めて RVC は肉用成牛から検出されず乳用成牛からのみ検出されていること、それから、前述のとおり、米国の肉用成牛の調査ではあるが、肉用成牛から 47%という高い抗体保有率が確認されている(134)。このことから、品種の違いによる抗病性の違いあるいは搾乳、妊娠、出産などがストレス要因となり抵抗力の低下が下痢の発症要因と関連しているのかもしれない。また、前述のとおり北海道の乳用牛および米国の肉用牛において RVC の高い抗体保有率が確認されている(134)。一方、家畜保健衛生所の業績発表会で報告された症例の中で、間接蛍光抗体法による RVC の抗体検査により下痢発生前血清は低い抗体価を示した一方、下痢回復後の血清では有意な抗体価の上昇が確認されている(36, 99, 120)。このことから、ウシにおいて RVC の感染は頻繁に起きている可能性が高いが、農場ごとの牛群でみると、感染歴のない牛群や感染から数年経過し抗体価の低い牛群が存在していると考えられる。そのような牛群で発症しているのかもしれない。また、本研究も含めてこれまでに子ウシの下痢症から RVC が検出されていない。その理由を説明するヒントとなる事象として、ヒトでは、RVA 下痢症の多くは 0~2 歳の乳幼児で確認されるのに対し、RVC 下痢症は 5~14 歳の子供で確認されることが多く、年齢層に違いがみられている点が挙げられる(63)。ウシにおいても好発しやすい年齢層があり、子牛よりも成牛、特に乳用成牛の下痢に関連しているのかもしれない。

しかしながら、一方で、ヒトでは、RVC が子供も成人も含めて年齢に関係なく下痢を引き起こす重要な腸管病原体とみなされている(66, 74, 98)。ブタにおいても RVC の下痢症は、月齢に関係なく RVA の下痢症と同様に世界中の多くの農場で頻発していることが明らかにされている(17, 116, 134)。このことから、ウシにおいても、RVC の下痢症は、年齢に関係なく下痢を引き起こす腸管病原体である可能性は否定できない。既報および本章の調査結果からは、子牛よりも成牛、特に乳用成牛の下痢症に関与していることが示唆されているが、既報および本章の調査も含め RVC の検出された症例は、Shintoku 株を除いて発生した下痢症例のうち病性鑑定材料として家畜保健衛生所で収集された下痢便を供試材料としている。この点を勘案すると、集まりやすい情報を収集しているというバイアスがかかっている可能性も否定できない。具体的には、乳用成牛の集団発生する下痢症は、冬季赤痢とも称される BCoV 病として広く認識されていること(38, 56, 57, 58, 97, 115)、そして、牛群内での下痢の広がりが早く、乳量減少も顕著であり、生産者の目につきやすいために多くの病性鑑定が依頼されやすくなり、その結果として情報が集まりやすくなっているために、乳用成牛の集団下痢からのみ RVC が検出されている可能性も否定できない。引き続き肉用成牛、乳用子ウシ、肉用子ウシの下痢症への RVC の関与について注視していく必要がある。また、本章の調査において散発発生あるいは単独発生の下痢症から RVC の検出はみられなかった。これまでも福田らの報告で乳用成牛の散発下痢が 1 症例あるのみで(36, 37)。しかしながら、発生形態に関しても上記のとおり集まりやすい情報を収集しているというバイアスがかかっている可能性も否定できないため、引き続き単独発生あるいは散発発生事例にも注視していく必要がある。

本研究において検出された 7 症例の RVC 病の発生状況および臨床症状を整理したところ、共通点が 4 点みられた。①集団発生である点、②秋から春先に発生する点、

③下痢便はいずれも茶褐色の水様性を呈した点、④産乳量の低下がみられた点である。また、発生状況や臨床症状が類似している BCoV 病との違いもみつかった。必発ではないが、BCoV 病は血便の排出および鼻汁漏出がみられるが、本研究において検出された 7 症例の RVC 病ではみられなかった。これらの共通点および相違点は、既報とも共通しており(16, 36, 37, 59, 86, 87, 94, 99, 120, 131, 133)、RVC 病の特徴と考えられ、BCoV 病と臨床的に鑑別する一助となる可能性がある。また、興味深い点として、①農場 C で集団下痢が発生した 8 日後に同じ市内の近隣農場である農場 D で集団下痢が発生したこと、②2004 年と 2008 年の 2 回、同じ農場 C で集団下痢が発生したことの 2 点が挙げられる。このように、RVC 病が近隣農場で続発した症例および同一農場で再発生した症例に関する報告はこれまでに無い。①に関して、現場調査で、農場 C と D の距離は 500m 程度であり、同じ診療獣医師が担当し、集乳経路が農場 C を経由した後に農場 D へ向かうことが判明し、本症例は人的要因により RVC 病が広がった可能性が考えられる。②に関しては、農場内に持続感染牛が維持されていたことによる再感染あるいは農場内へ新たな株の侵入による再感染の可能性が考えられるが、考察できる材料を持ち合わせていない。この上記 2 点に関しては、第 3 章において検出された RVC 株の遺伝子解析を実施し、さらなる考察をしていく予定である。

本章の調査において、B 農場で乳用成牛の集団下痢がくり返し 3 回発生した。そして、それぞれ異なる病原体(RVB、BCoV および RVC)が検出された。この B 農場の 3 症例を比較することで、発生状況および臨床症状の共通点と相違点について整理した(表 2-12)。3 症例の共通点としては、①発生時期が秋から春先の寒冷な季節である点、②糞の性状が水様である点、③乳量減少がみられた点、④発生形態が集団発生である点が挙げられる。また、RVB と BCoV、RVC と BCoV の検出された症例の間では、相違点がみられた。すなわち、BCoV の検出された症例において、①血便がみられた



点、②鼻水漏出がみられた点、③乳量減少の割合が大きかった点、④下痢の最盛期間が長かった点、⑤下痢の発症期間が長かった点が挙げられる。これらの共通点および相違点は、RVB 病および RVC 病の特徴と考えられ、BCoV 病と臨床的に鑑別する一助となる可能性がある。また、このような違いは、BCoV と RVB および RVC の組織親和性に違いによるのではないかと考えられる。すなわち、BCoV は経口的あるいは経鼻的に侵入し、鼻甲介、気管、肺等の呼吸器および小腸および大腸の絨毛および陰窩の上皮細胞に感染する(36, 58)。特に、結腸の陰窩上皮細胞の壊死と剥離がみられる(58)。このことから、BCoV 病は鼻水漏出や血便がみられるのではないかと考えられる。一方、RV 病は、経口的に侵入した RV は、小腸絨毛先端約 1/3 の成熟上皮細胞で増殖し、陰窩の底部に存在する小腸上皮幹細胞には感染しない(147)。感染後、絨毛は背が低くなり、幅が広がって吸収面積が著しく減り、また、微絨毛の配列の乱れや欠落などの組織病変を起こす。こうして、水の吸収能力が著しく傷害され下痢が起こる。しかし、小腸上皮細胞の再生が早く、陰窩からの新生と絨毛先端部での脱落により、3〜6 日で小腸絨毛の先端部は修復する(147)。このことから、BCoV 病に比べて RV 病は、乳量減少の割合が小さく、下痢の最盛期間が短く、下痢の発症期間が短くなると考えられる。

本章の結論として、RVC は、秋から春先にかけて乳用成牛において集団発生する下痢症に関与する主要な病原微生物の 1 つであることが示唆された。また、RVA、RVB そして RVC を含めた RV は、BCoV に次いで大きな割合を占める乳用成牛の下痢症に関与する主要な病原微生物であることが示唆された。また、RVC 病を含めた RV 病は、BCoV 病と発生形態および発生時期に関して類似の傾向を示すことが明らかになった。また、臨床症状に関して、RVC 病と RVB 病は共通点があり、RVC 病と BCoV 病では相違点のあることが明らかになった。



図 2-1 乳用成牛における下痢関連疾病の年別症例発生件数

縦軸：件数 横軸：年

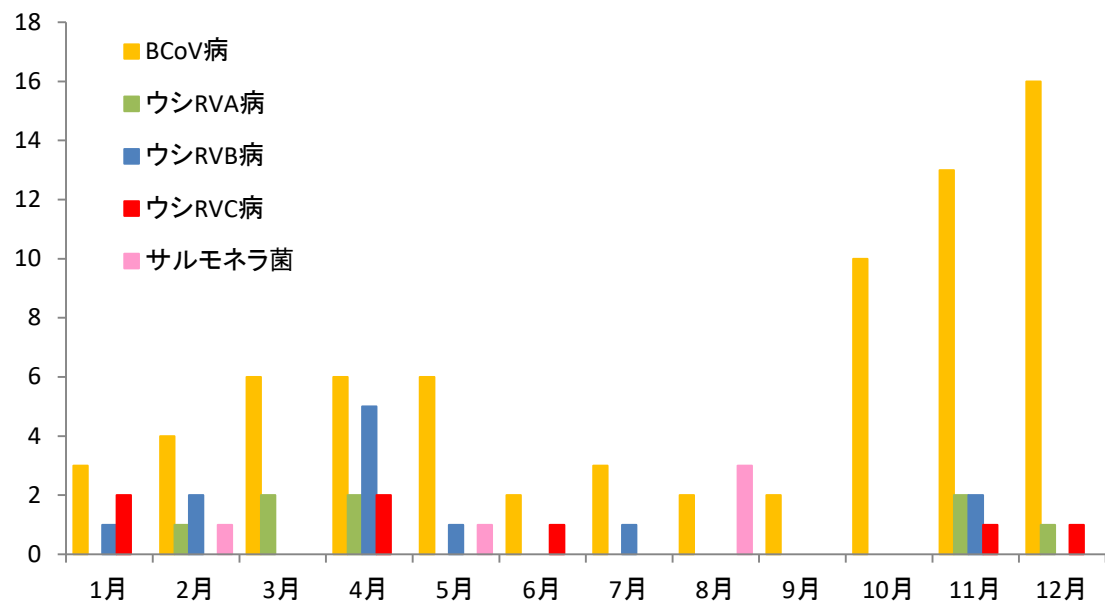


図 2-2 乳用成牛における下痢関連疾病の月別症例発生件数

縦軸：件数 横軸：月

表 2-1 ウイルス検出に用いたプライマー

ウイルス	プライマー	プライマー配列(5'→3')	遺伝子	位置	PCR 産物(bp)	参照	
BCoV	F	ACCACCAGTTCTTGATGTGG	M	26–54	455	(38) Fukutomi <i>et al.</i> 1999	
	R	GGCCTAACATACATCCTTCC		391–409			
RVA	Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	VP7	1–28	1062	(45) Gouvea <i>et al.</i> 1990	
	End9	GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG		1,036–1,062			
RVB	9B3	CAGTAACTCTATCCTTTTACC	VP7	175–195	288	(15) Chinsangaram <i>et al.</i> 1994	
	9B4	CGTATCGCAATACAATCCG		444–462			
RVC	U1	GGCATT TAAAAAAGAAGAAGCTGT	VP7	1–24	1063	(133) Tsunemitsu <i>et al.</i> 1999a	
	U1063	AGCCACATGATCTTGTTTACGC		1,042–1,063			
BVDV	324	ATGCCCWTAGTAGGACTAGCA	非構造蛋白	108–128	288	(138) Vilceket <i>et al.</i> 1994	
	326	TCAACTCCATGTGCCATGTAC		375–395			
ToV	S5	GTGTTAAGTTTGTGCAAAAAT	S	20,956–20,976	742	(48) Hoet <i>et al.</i> 2003	
	S3	TGCATGAACTCTATATGGTGT		21,677–21,697			
AdV I	BALF (Fiest)	GRTGGTCIYTRGATRTRATGGA	Hexon	19,235–19,256	641	(68) Maluquer de Motes <i>et al.</i> 2004	
	BARF (Fiest)	AAGYCTR TCATCYCCDGGCCA		19,852–19,872			
	BALN (Nested)	ATTCARGTWCCWCARAARTTTTTTGC		19,347–19,370	430		
	BARN (Nested)	CCWGAATAHRIAAARTTKGGATC		19,747–19,769			
AdV II	Pr-BALF (Fiest)	TCAGCTGGTAGTGCWRCRACATGAG	Protease	17,380–17,404	677		(68) Maluquer de Motes <i>et al.</i> 2004
	Pr-BARF (Fiest)	GAAGAAGATGAWGAAGAMGAYTAA		18,032–18,056			
	Pr-BALF (Nested)	ACTTTTGATTGYMGATTTCCAGG		17,472–17,494	625		
	Pr-BARF (Nested)	TTTTATTAADCCA AKYTTWGTATT		17,973–17,996			

表 2-2 乳用成牛糞便材料から下痢関連病原体の検出成績

下痢関連病原体	陽性症例数 (陽性材料数)	%
BCoV	71 (219)	57.7 <sup>a)</sup> (45.8) <sup>b)</sup>
RVB	10 (53)	8.1 (11.1)
RVC	7 (27)	5.7 (5.7)
RVA	5 (14)	4.1 (2.9)
サルモネラ	5 (14)	4.1 (2.9)
RVA+RVB	2 (2)	1.6 (0.4)
BCoV+BVD	1 (2)	0.8 (0.4)
BCoV+RVA	1 (1)	0.8 (0.2)
検出されず	21 (146)	17.1 (30.6)
計	123 (478)	100 (100)

a)陽性症例数の割合

b)陽性材料数の割合

表 2-3 肉用成牛糞便材料からの下痢関連病原体の検出成績

下痢関連病原体	陽性症例数 (陽性材料数)	%
BCoV	25 (73)	62.5 <sup>a)</sup> (49.3) <sup>b)</sup>
コクシジウム	5 (14)	12.5 (9.4)
BCoV+コクシジウム	2 (2)	5 (1.4)
RVA	1 (2)	2.5 (1.4)
BCoV+RVA	1 (1)	2.5 (0.7)
検出されず	6 (56)	15 (37.8)
計	40 (148)	100 (100)

a)陽性症例数の割合

b)陽性材料数の割合

表 2-4 乳用子牛糞便材料からの下痢関連病原体の検出成績

下痢関連病原体	症例数 (材料数)	%
RVA	13 (21)	36.1 <sup>a)</sup> (27.3) <sup>b)</sup>
BCoV	3 (3)	8.3 (3.9)
コクシジウム	3 (3)	8.3 (3.9)
病原性大腸菌	3 (3)	8.3 (3.9)
BCoV+RVA	1 (3)	2.9 (3.9)
検出されず	13 (44)	36.1 (57.1)
計	36 (77)	100 (100)

a)陽性症例数の割合

b)陽性材料数の割合

表 2-5 肉用子牛糞便材料からの下痢関連病原体の検出成績

下痢関連病原体	症例数 (材料数)	%
RVA	17 (21)	16.5 <sup>a)</sup> (10.3) <sup>b)</sup>
病原性大腸菌	11 (15)	10.6 (7.3)
BCoV	8 (16)	7.8 (7.9)
コクシジウム	4 (5)	3.9 (2.5)
AdV	2 (4)	1.9 (2.0)
RVB	1 (3)	1 (1.5)
サルモネラ	1 (2)	1 (1.0)
RVA+病原性大腸菌	1 (1)	1 (0.5)
検出されず	58 (136)	56.3 (67.0)
計	103 (203)	100 (100)

a)陽性症例数の割合

b)陽性材料数の割合



表 2-6 成牛および子牛における下痢の発生形態

	症例数 材料数	集団発生 (%)	散発発生 (%)	単独発生 (%)
乳用成牛	123	100 (81.3)	23 (18.7)	0 (0.0)
	478	421 (88.1)	57 (11.9)	0 (0.0)
肉用成牛	40	33 (82.5)	7 (17.5)	0 (0.0)
	148	125 (84.5)	23 (15.5)	0 (0.0)
乳用子牛	36	3 (8.3)	15 (41.7)	18 (50.0)
	77	17 (22.1)	42 (54.5)	18 (23.4)
肉用子牛	103	9 (8.7)	31 (30.1)	63 (61.2)
	203	53 (26.2)	87 (42.8)	63 (31.0)
成牛計	163	133 (81.6)	30 (18.4)	0 (0.0)
	626	546 (87.2)	80 (12.8)	0 (0.0)
子牛計	139	12 (8.6)	46 (33.1)	81 (58.3)
	280	70 (25.0)	129 (46.1)	81 (28.9)
合計	302	145 (48.0)	76 (25.2)	81 (26.8)
	906	616 (68.0)	209 (23.1)	81 (8.9)

表 2-7 乳用成牛における下痢関連疾病の発生形態別の症例数と陽性頭数

疾病	症例数	集団発生 (%)	散発発生 (%)
	陽性頭数		
BCoV 病	71	64 (90.1)	7 (9.9)
	219	210 (95.9)	9 (4.1)
RVB 病	10	10 (100)	0 (0.0)
	53	53 (100)	0 (0.0)
RVC 病	7	7 (100)	0 (0.0)
	27	27 (100)	0 (0.0)
RVA 病	5	3 (60.0)	2 (40.0)
	14	11 (78.6)	3 (21.4)
サルモネラ症	5	0 (0.0)	5 (100)
	14	0 (0.0)	14 (100)
RVA 病+RVB 病	2	2 (100)	0 (0.0)
	2	2 (100)	0 (0.0)
BCoV 病+BVD 病	1	1 (100)	0 (0.0)
	2	1 (100)	0 (0.0)
BCoV 病+RVA 病	1	1 (100)	0 (0.0)
	1	1 (100)	0 (0.0)
不明	21	12 (57.1)	9 (42.9)
	146	115 (78.8)	31 (21.2)

表 2-8 肉用成牛における下痢関連疾病の発生形態別の症例数と陽性頭数

疾病	症例数	集団発生 (%)	散発発生 (%)
	陽性頭数		
BCoV 病	25	23 (92.0)	2 (8.0)
	73	69 (94.5)	4 (5.5)
コクシジウム症	5	2 (40.0)	3 (60.0)
	14	6 (42.9)	8 (57.1)
BCoV 病＋コクシジウム症	2	2 (100)	0 (0.0)
	2	2 (100)	0 (0.0)
RVA 病	1	1 (100)	0 (0.0)
	2	2 (100)	0 (0.0)
BCoV 病＋RVA 病	1	1 (100)	0 (0.0)
	1	1 (100)	0 (0.0)
不明	6	4 (66.7)	2 (33.3)
	56	45 (80.4)	11 (19.6)

表 2-9 乳用子牛における下痢関連疾病の発生形態別の症例数と陽性頭数

疾病	症例数 陽性頭数	集団発生 (%)	散発発生 (%)	単独発生 (%)
RVA 病	13	1 (7.7)	8 (61.5)	4 (30.8)
	21	1 (4.8)	16 (76.2)	4 (19.0)
BCoV 病	3	1 (33.3)	0 (0.0)	2 (66.7)
	3	1 (20.0)	0 (0.0)	2 (80.0)
コクシジウム症	3	1 (33.3)	2 (66.7)	0 (0.0)
	3	1 (33.3)	2 (66.7)	0 (0.0)
大腸菌症	3	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (100)
	3	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (100)
BCoV 病+RVA 病	1	0 (0.0)	1 (100)	0 (0.0)
	3	0 (0.0)	3 (100)	0 (0.0)
不明	13	0 (0.0)	4 (30.8)	9 (69.2)
	44	14 (31.8)	21 (47.7)	9 (20.5)

表 2-10 肉用子牛における下痢関連疾病の発生形態別の症例数と陽性頭数

疾病	症例数 陽性頭数	集団発生 (%)	散発発生 (%)	単独発生 (%)
RVA 病	17	2 (11.8)	5 (29.4)	10 (58.8)
	21	4 (19.1)	7 (33.3)	10 (47.6)
大腸菌症	11	0 (0.0)	4 (36.4)	7 (63.6)
	15	0 (0.0)	8 (53.3)	7 (46.7)
BCoV 病	8	1 (12.5)	4 (50.0)	3 (37.5)
	16	2 (12.5)	11 (68.8)	3 (18.7)
コクシジウム症	4	1 (25.0)	1 (25.0)	2 (50.0)
	5	1 (20.0)	2 (40.0)	2 (40.0)
AdV 病	2	2 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)
	4	4 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)
RVB 病	1	1 (100)	0 (0)	0 (0.0)
	3	3 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)
サルモネラ症	1	0 (0.0)	1 (100)	0 (0.0)
	2	0 (0.0)	2 (100)	0 (0.0)
RVA 病＋大腸菌症	1	0 (0.0)	1 (100)	0 (0.0)
	1	0 (0.0)	1 (100)	0 (0.0)
不明	58	2 (3.4)	15 (25.9)	41 (70.7)
	136	39 (28.7)	56 (41.2)	41 (30.1)

症例 No.	農場	発生年月日		場所	成牛の 飼養頭数	RVC 陽性数/ 検査数	下痢発生形態
1	A	2002 年	4 月 25 日	寒河江市	122	2/3	集団発生
2	B	2003 年	12 月 17 日	山形市	23	4/4	集団発生
3	C	2004 年	1 月 5 日	天童市	40	8/8	集団発生
4	D	2004 年	1 月 13 日	天童市	31	3/6	集団発生
5	E	2004 年	6 月 2 日	白鷹町	29	5/5	集団発生
6	C	2008 年	4 月 8 日	天童市	40	5/6	集団発生
7	F	2010 年	11 月 4 日	上山市	90	1/1	集団発生

表 2-11 山形県内の酪農場で検出された RVC 病症例の概要

表 2-12 BCoV 病、RVB 病および RVC 病の発生状況および臨床症状の概要

疾病	RVB 病	BCoV 病	RVC 病
発生時期	2002 年 1 月	2002 年 11 月	2003 年 12 月
成牛の飼養頭数	28	26	25
糞便性状	水様、茶色	水様、血様	水様、茶色
乳量減少 <sup>a</sup>	+	14%	9%
呼吸器症状 <sup>a</sup>	—	鼻水漏出	—
下痢発症数	乳用成牛の約半数	全ての乳用成牛および子ウシ	全ての乳用成牛
農場内の下痢最盛期	2 日後	6 日後	4 日後
農場内の下痢発症期間	8 日	14 日	9 日

<sup>a</sup>+:有 —:無





### 第三章

ウシロタウイルス C の全遺伝子解析による遺伝学的性状に関する研究  
(Study on genetic properties by whole genome analysis of bovine  
rotavirus C)

馬 渡 隆 寛

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

(指導教授：田 中 良 和)

平成 31 年 3 月

## 序論

第一章において、2002年4月に山形県内で集団発生した乳用成牛の下痢症例から RVC Yamagata株を検出し、ウシはRVCの自然宿主の1つであることを裏付けた。そのことから、RVCは成牛の下痢症に関与し、ウシRVCと呼ぶことを提唱した。それ以降、ウシRVCが広く認知され、FukudaらによってウシRVCを含む主要な下痢に関与するウイルスを検出するマルチプレックスRT-PCRが開発されたことも相まって(35)、家畜保健衛生所の業績発表会において相次いで症例報告がされてきた(16, 59, 86, 87, 94, 99, 120, 131)。そして、第二章において、主要な下痢に関与する病原微生物の検出を行い、発生状況や臨床症状など収集した情報について整理し、ウシRVCの検出された下痢症の発生実態について整理した。以上のように、ウシRVCの発生実態について徐々に明らかになってきているが、現状として遺伝子情報は極端に少ない。これまでにウシから検出されたRVCにおいて遺伝子情報が明らかになっている株は4株のみである。すなわち、Shintoku株とToyama株は全11文節の遺伝子情報が明らかになっているが(125)、Yamagata株はVP6とVP7遺伝子のみ(79)、そしてWD534tc株はVP6遺伝子のみである(12)。RVAは、リアソートメント、点突然変異そしてリアレンジメントといった様々な遺伝的多様性獲得機構を有している(31, 43, 110, 142)。RVCにおいても同様の機構を有していると考えられているが、限られた遺伝子情報のために、野外におけるウシRVCの遺伝子性状についてほとんど明らかにされていない。このことを明らかにすることは、本病の制御にとって重要である。従って、数多くの遺伝子情報を明らかにすることが求められている。

そこで、本章では、第二章でRVCを検出した7症例のうち、Yamagata株の検出された1症例を除く6症例から1株ずつ抽出した計6株の全11文節遺伝子を解析し、野外におけるウシRVCの遺伝的多様性、遺伝子動態そして生態等について考察を行った。

## 材料と方法

### 1. ウシ糞便材料

第二章において、2002 年から 2011 年の 10 年間にわたって、山形県内の酪農場および肉用牛農場で発生した成牛および子牛の下痢症例のうち、病性鑑定材料として得られた延べ 302 農場由来の 906 検体の下痢便を用いて下痢に関与する微生物の検索をした結果、乳用成牛の 7 症例 27 検体から RVC が検出された。そのうち 6 症例の乳用成牛の下痢便を本章の調査に用いた。2002 年 4 月に Yamagata 株の検出された 1 症例は、電子顕微鏡検査、ウイルス分離、RNA-PAGE 等様々な検査に繰り返し用いたため、遺伝子検査に十分な下痢便材料が残っていなかったため除外した。この 6 症例から症例ごとに下痢便を 1 検体ずつ抽出し、計 6 株を遺伝子検査に供した。糞便溶液の作製および保存は、第一章と同様の方法で行った。なお、この 6 症例は、第二章において発生状況や臨床症状などの収集した情報について整理している。

### 2. RVC6 株の全 11 文節遺伝子の全長解析

RT-PCR およびダイレクトシーケンス法を用いて、ウシ由来の RVC6 株の全 11 文節遺伝子(VP1~VP4、VP6、VP7 および NSP1~5)の ORF 全長の解読を行った。糞便溶液からの RNA の抽出は、第二章と同様の方法で行った。ウシ由来の RVC6 株の NSP3、NSP4 および NSP5 遺伝子を除いた 8 遺伝子の全長配列は、既報のプライマーセット(125)を用いて RT-PCR で増幅および塩基配列の決定を行った(表 3-1)。そして、NSP3、NSP4 および NSP5 遺伝子の全長配列は、ヒト RVC 株 Bristol の対応遺伝子から独自に設計したプライマーセットを用いて RT-PCR で増幅および塩基配列の決定を行った(表 3-2)。RT-PCR および塩基配列の決定は、第一章と同様の方法で行った。

### 3. 相同性解析

NCBI の GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)に登録されている RVC 株を BLAST により検索し、相同性解析に用いた。本章で決定したウシ由来の RVC6 株の全 11 文節遺伝子の塩基配列も、DNA Data Bank of Japan(DDBJ) 塩基配列データベースに提出し GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)から入手することができる。その accession number は、表 3-3 に示した。それらの全 11 文節遺伝子の ORF 全長配列データは Lasergene software(DNASTAR)の MEGALIGN program の CLUSTAL W 法を用いて並べられた(132)。遺伝的距離は遺伝子レベルで Kimura two-parameter correction そしてアミノ酸レベルで Poisson correction パラメータを用いて計算された(76)。

### 4. 分子系統学的解析

NCBI の GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)に登録されている RVC 株を BLAST により検索し、分子系統学的分析に用いた。本章で決定したウシ由来の RVC6 株を含め、それらの全 11 文節遺伝子の ORF 全長配列について、MEGA5 program を用いて近隣結合法(neighbour-joining 法)による分子系統学的分析を行った(129)。また、その信頼性を、1000 回反復による ブートストラップ確率により検証した。

### 5. 遺伝子型分類

近年、Matthijnssens ら(76)は、RVA の全 11 遺伝子文節を対象とした新しい遺伝子型分類法を提唱した。そして、遺伝子分類は RCWG によって提案された定義に基づくことが推奨されている(77)。簡潔に説明すると、分子系統学的解析でクラスターになった株のクラスター内(遺伝子型内)とクラスター間(遺伝子型間)の塩基配列またはアミノ酸配列の相同性の頻度を求め、遺伝子型内と遺伝子型間を分ける割合を見積

もり、それを遺伝子型分類するカットオフ値を推定している。RVC においても、Yamamoto らおよび Soma らがこの方法に準拠してカットオフ値を推定し全 11 分節の遺伝子型分類を行っているが(125, 140)、遺伝子情報の少ない RVC ではカットオフ値を明確に推定できない。従って厳密には RCWG によって提案された定義に従っていないが、実情として分子系統学的解析で RVC 株は動物種ごとのクラスターに収束することから、それぞれの遺伝子分節の遺伝子型を分けるカットオフ値は、動物種間の塩基配列の最大の相同性よりもわずかに高い値、すなわち小数点以下を切り上げた相同性をカットオフ値としている。従って、カットオフ値が低めに推定されてしまっている。後に、Marthaler らが多数のブタ RVC 株のデータを用いて RCWG によって提案された定義に基づいて VP7 遺伝子のカットオフ値に修正を加えている(70)。本章で決定したウシ由来の 6 株の全 11 文節遺伝子のデータを追加し、上記の方法でカットオフ値を推定し、各文節の遺伝子型分類を行った。

## 結果

### 1. RVC 株の由来

RVC6 株は、第二章において山形県内で集団発生した乳用成牛の下痢症例から採取した下痢便から検出された。そして、6 症例から症例ごとに下痢便を 1 検体ずつ抽出し、検出された RVC6 株をそれぞれ Y/03、Y/1/04、Y/2/04、Y/3/04、Y/08 そして Y/10 と命名した(80)。この 6 株を用いて、以降の解析を行った。なお、この 6 株の由来サンプルについての情報を表 3-3 にまとめた。

第二章でも述べたが、RVC の検出された 6 症例のうち下痢症の発生状況に興味深い特徴が 2 点認められた。すなわち、1 点目は、2004 年に同じ市内にある近隣農場 C と D において乳用成牛の下痢症が続けて集団発生した点である。1 月 5 日に農場 C で Y/1/04 株が検出され、次いで、8 日後の 1 月 13 日に農場 D で Y/2/04 株が検出されている。2 点目は、4 年間の時を経て同じ農場 C において乳用成牛の下痢症が集団発生した点である。2004 年に Y/1/04 株そして 2008 年に Y/08 株が検出されている。以上の 2 点については、RVC の検出された症例で初めて確認されたことである。

### 2. RVC6 株の全 11 文節遺伝子の全長解析

Y/03、Y/1/04、Y/2/04、Y/3/04、Y/08 そして Y/10 と命名した RVC6 株の全 11 文節遺伝子(VP1～VP4、VP6、VP7、NSP1～5)の ORF 全長をダイレクトシーケンスにより決定することができた。決定した全長塩基配列数および推定されたアミノ酸数は、全 11 文節遺伝子が解読済の既報株であるウシ由来の 2 株(Shintoku および Toyama)、代表的なヒト由来株(Bristol)およびブタ由来株(Cowden)と共に、表 3-4 に整理した。新たに命名したウシ由来の 6 株、Shintoku 株および Toyama 株のアミノ酸数を比較すると、VP4 遺伝子を除いた残りの文節遺伝子で同じであった。そして、Y/1/04 と Y/2/04 の 2 株のみが、VP4 遺伝子のアミノ酸数が 2 個多かった。具体的に各文節遺伝

子の推定されたアミノ酸数は、VP1 が 1,090 個、VP2 が 881 個、VP3 が 695 個、VP6 が 395 個、VP7 が 332 個、NSP1 が 395 個、NSP2 が 312 個、NSP3 が 402 個、NSP4 が 146 個、NSP5 が 209 個であり、そして VP4 だけが 733 個と 735 個に分かれた。次に、由来動物種間で比較してみると、ウシ由来株の VP6、VP7、NSP2 および NSP3 はヒト由来株およびブタ由来株とも一致した。一方、残りの文節遺伝子は、由来動物種によって違いがみられた。ウシ由来株の VP2、VP4、NSP4 および NSP5 は、ヒトおよびブタ由来株よりも少なく、逆にウシ由来株の VP3 および NSP1 は、ヒトおよびブタ由来株よりも多かった。そして、ウシ由来株の VP1 はヒト由来株とは一致したがブタ由来株よりも多かった。

### 3. RVC6 株の全 11 文節遺伝子の相同性解析

新たに命名したウシ由来の RVC6 株の遺伝的関連性をゲノム全体で評価するために、相同性解析を行った。全 11 文節遺伝子の ORF の塩基配列およびアミノ酸配列の相同性は、全 11 文節遺伝子が解読済の既報株であるウシ由来の 2 株(Shintoku および Toyama)、代表的なヒト由来株(Bristol)およびブタ由来株(Cowden)そして、ある文節のみ明らかなウシ由来の 2 株(Yamagata および WD534tc)と共に、文節ごとに表 3-5 a-j に示した。

新たに命名した RVC6 株を含めたウシ由来株全体の各文節遺伝子の相同性を調べると、VP4 遺伝子を除いた残りの分節は、共に塩基配列レベルで 91.0~100%、アミノ酸レベル 89.0~100%という高い相同性を示した。なお、WD534tc 株は、ウシ由来株であるがブタ由来株と近縁であることが知られているため(12)、VP6 遺伝子の比較から除外した。文節ごとに相同性を解析すると、最も高い相同性は VP6 遺伝子(塩基配列レベルで 95.1~100%、アミノ酸配列レベルで 99.5~100%)であり、次いで VP1 遺伝子(塩基配列レベルで 93.9~100%、アミノ酸レベルで 97.2~100%)そして VP2 遺伝子(塩基配列レベルで 95.0~100%、アミノ酸レベルで 97.8~100%)が比較的高い

相同性を示した。対照的に、最も低い相同性は VP4 遺伝子であり(塩基配列レベルで 83.7~100%、アミノ酸配列レベルで 88.9~100%)、次いで、NSP4(塩基配列レベルで 91.8~99.8%、アミノ酸配列レベルで 89.0~99.3%)は比較的低い相同性を示した。以上のように、ウシ由来株の間で VP4 遺伝子を除いた 10 文節遺伝子は高度に保存されているものの、文節ごとに解析すると相同性に違いがみられた。そして、最も相同性の低い VP4 遺伝子では株間のばらつきも認められた。すなわち、Y/1/04 と Y/2/04 の株間の VP4 遺伝子の相同性は、塩基配列およびアミノ酸レベルで共に 100%であり、また、Y/03、Y/3/04、Y/08、Y/10、Shintoku および Toyama の株間の相同性も塩基配列レベルで 96.0~98.0%、アミノ酸レベルで 96.9~98.8%と高い相同性を示した一方で、Y/1/04 および Y/2/04 の系統と Y/03、Y/3/04、Y/08、Y/10、Shintoku および Toyama の系統間では、塩基配列レベルで 83.7~84.8%とアミノ酸レベル 88.9~89.9%と低い相同性を示した。さらに、ウシ由来株の VP4 遺伝子の推定されたアミノ酸を CLUSTAL W で整列および分析を行った結果、Y/1/04 株と Y/2/04 株は、他の 6 株に存在しないアミノ酸 1 個の欠損と 3 個の挿入を有することが明らかになった(図 3-1)。また、Y/1/04 と Y/2/04 株の共通の分節の相同性は、VP4 遺伝子において塩基配列レベルおよびアミノ酸レベルで 100%であることを前述したが、それ以外の文節においても NSP4 遺伝子を除いて塩基配列レベルおよびアミノ酸レベルで 100%であり、NSP4 遺伝子が塩基配列レベルおよびアミノ酸レベルでそれぞれ 99.8%および 99.3%であった。

ヒト、ブタおよびウシにおける由来動物種間の全長塩基配列および推定されたアミノ酸の相同性解析を行った。由来動物種同士および由来動物種ごとの株間の全 11 文節遺伝子の ORF の塩基配列の相同性は表 3-6 そして推定されたアミノ酸の相同性は表 3-7 に示した。全 11 文節遺伝子の塩基配列レベルおよびアミノ酸レベルの相同性は、ウシ由来株とヒト由来株間において塩基配列レベルで 64.9~82.1%およびアミノ酸配列レベルで 54.3~89.1%、ウシ由来株とブタ由来株間において塩基配列レベルで



66.9～82.6%およびアミノ酸配列レベルで 58.9～91.6%であった。このように全 11 分節遺伝子において、WD534tc 株を除くウシ RVC 株同士の相同性に比べて、動物種間で比較的低い相同性を示した。

#### 4. 全 11 分節遺伝子における分子系統学的解析および遺伝子型分類

新たに命名したウシ由来の RVC6 株における遺伝的関連性を明らかにするために、データベースから得られた既知のウシ RVC、ヒト RVC およびブタ RVC 株の塩基配列を用いて文節ごとに分子系統学的解析および遺伝子型分類を行った。分子系統学的解析の結果、11 分節遺伝子共に、新たに命名したウシ由来の RVC6 株は既報のウシ RVC 株も含めて、ヒト RVC およびブタ RVC から区別され、ウシ RVC 株のクラスターを形成することを示した(図 3-2a-j)。VP4 遺伝子においてウシ RVC 株のクラスター内で 2 つの明らかに区別される系統が存在した。この 2 つの系統は、相同性解析においても相同性の高い 2 つの系統として分かれ、そのうちの 1 系統にアミノ酸 1 個の欠損と 3 個の挿入を有していた。そして、Y/1/04 および Y/2/04 株の構成されている方を系統 I そして Shintoku、Toyama、Y/03、Y/3/04、Y/08、Y/10 株、Shintoku および Toyama 株で構成されているもう一方を系統 II と名付けた(図 3-2)。遺伝子型分類において、VP7 遺伝子を除いた 10 分節遺伝子は、新たに命名したウシ由来の RVC6 株を加えて Soma らによって推定された塩基配列レベルでのカットオフ値(125)について検討した結果、各文節遺伝子のカットオフ値はそれぞれ、NSP1 が 74%、NSP2 が 89%、NSP3 が 80%、NSP4 が 70%、NSP5 が 79%、VP1 が 86%、VP2 が 84%、VP3 が 86%、VP4 が 77%、WD534tc 株を除いた VP6 が 85%のままで変更はなかった(表 3-6)。従って、VP4 遺伝子において名付けた系統 I および II は、遺伝子型として分けることはできなかった。また、VP7 遺伝子に対するカットオフ値については、新たに命名したウシ RVC6 株を加えて Marthaler らによって推定された塩基配列レベルでのカットオフ値(70)について検討した結果、85%のカットオフ値に変更はなかつ

た(表 3-6)。従って、ウシ由来の RVC 株は、全 11 分節遺伝子において 1 つの遺伝子型に属することを示した(図 3-2a-j)。RCWG により提唱された RVA の新たな分類法に準拠すると(6, 41)、ウシ由来の RVC 株の遺伝子型は VP7-BP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5 に対応して、G2-P[3]-I3-R3-C3-M4-A3-N3-T3-E3-H3 となった。一方、ブタ RVC は、Marthaler らの示したとおり、VP7 遺伝子において 7 つのブタ遺伝子型(G1、G3 および G5~9)に分かれ、残りの 10 文節の遺伝子型は全て P[1]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 に分類された(70)。その文節ごとの遺伝子型内で、ウシ由来の RVC 株に着目すると、検出された年ごとに分子系統学的に分かれる傾向はみられなかった。北海道で検出された Shintoku 株、富山県で検出された Toyama 株、山形県で検出されたその他の株といった地域ごとに分岐する傾向もなく、ランダムに別れた。また、各文節は株ごとに同じ傾向を示して分子系統学的に分かれることはなく、文節ごとにランダムに分かれた。しかし、Y/1/04 と Y/2/04 株だけは同じ傾向を示して分かれた。

## 考察

RVC は、様々な遺伝的多様性獲得機構を有していると考えられているが、限られた遺伝子情報のために、野外におけるウシ RVC の遺伝子性状についてほとんど明らかにされていない。そこで、本章では、第二章で乳用成牛の下痢便から検出した RVC6 株の全 11 文節遺伝子を解析し、野外におけるウシ RVC の遺伝的多様性、遺伝子動態そして生態等について考察を行った。

本章で新たに命名したウシ由来の RVC6 株と全 11 文節遺伝子の明らかな既報のウシ、ヒトおよびブタ RVC 株のアミノ酸数について比較を行った。文節ごとに解析すると、各文節のウイルスタンパクの機能上の役割(29, 31)が決まっていることに関係していると思われるが、由来動物種に関わらずアミノ酸数は概ね同じであり、文節ごとに固有のアミノ酸数が決まっていることが確認された。次に、由来動物種ごとに解析すると、由来動物種に関わらず同じ文節もあるが、7 分節、すなわち VP1、VP2、VP3、VP4、NSP1、NSP4 および NSP5 のアミノ酸数に違いがみられたことから、由来動物種ごとに固有のアミノ酸数が決まっているようである。注目点として、Y/1/04 株と Y/2/04 株の VP4 遺伝子分節のアミノ酸数が、他のウシ由来株より 2 個多かった点が挙げられる。このような例は、ある文節の遺伝子情報だけ明らかなブタ由来株において確認されており、VP4、VP6 そして VP7 遺伝子のアミノ酸数に多様性がみられているが(52, 70, 127)、ウシ由来株において初めて確認された。

全 11 文節遺伝子を相同性解析することで、文節ごとの塩基配列の相同性に違いがみられることが明らかになっている。ヒト RVC は、VP6 遺伝子の最も高い相同性と VP1 および VP2 遺伝子の高い相同性が確認され、対照的に VP3 遺伝子を除いて NSP4 および NSP5 遺伝子において同程度に最も低い相同性が確認されたことが報告されている(140)。但し、この報告による VP3 遺伝子の相同性の低さは、リアソータントの可能性が示唆されているため、ここでの考察材料からは除外する。そして、RVA にお

いても、ヒト RVC の報告と類似のことが述べられている(76, 140)。尤も、RVA において VP7 および VP4 遺伝子を用いた分類法が長年用いられ、最も多様性のある 2 文節であることは知られている(111)。また、ブタ RVC においても VP7 および VP4 遺伝子における多様性が報告されている(52, 70, 125, 140)。本章で新たに命名した RVC6 株の全 11 文節遺伝子の塩基配列において、VP6 遺伝子の最も高い相同性、VP1 および VP2 遺伝子の高い相同性が確認され、対照的に、VP4 遺伝子は別にして NSP4 遺伝子の最も低い相同性および NSP5 遺伝子の比較的低い相同性が観察され、概ね RVA およびヒト RVC と同様の傾向を示した。また、注目点として、RVA およびブタ RVC と同様に、ウシ由来の RVC の VP4 遺伝子において相同性の低い株(Y/1/04 および Y/2/04)が見つかった点である。このように、ウシ由来の RVC において文節ごとの塩基配列の相同性の違いは、個々のウイルススタンパクの機能上の役割と関連して RVA およびヒト RVC と類似の様式で進化してきたことを示唆している。

既報のウシ、ブタそしてヒト RVC 株との相同性解析により、本章で新たに命名したウシ由来の RVC6 株の全 11 文節遺伝子は共にブタおよびヒト RVC 株よりもウシ RVC 株と高い相同性を示した。さらに、分子系統学的解析の結果から、この RVC6 株は、11 分節共にヒト RVC およびブタ RVC から明らかに分かれたウシのクラスターに収束した。以上の結果から、本章で 11 分節遺伝子配列を決定したウシ由来の RVC6 株は、ウシ RVC であることが明らかとなったと同時に、いずれの遺伝子分節においても他の動物種由来株とリアソータントを起こしていないことも明らかになった。このことから RVA と同様に RVC においても、基本的に動物種内で感染環を形成していることが示唆された。しかしながら、ヒト RVC 株において VP3 遺伝子配列に明らかな多様性が確認され、動物由来の RVC あるいは新規の遺伝子型に属する未確認のヒト RVC 株からのリアソータントの可能性が示唆されている(140)。また、VP6 遺伝子の部分的な遺伝子配列のみの解析も含まれるが、種間伝播を示唆する株の検出が報告されている(12, 40, 51)。リアソータントおよび種間伝播に注意を払うことは、

本病の制御に重要である。ウシ RVC においても引き続き全 11 遺伝子文節の遺伝子情報を収集し、注視していく必要がある。また注目点として、ウシのクラスター内で Y/1/04 株と Y/2/04 株系統と他の RVC 株の系統に分かれた点が挙げられる。この Y/1/04 株と Y/2/04 株は、他のウシ由来株と比べて、アミノ酸が 1 個欠損し、3 個挿入がみられている。ウシ RVC において VP4 遺伝子にリアレンジメントとまでは言えないが、挿入や欠損がみられ、多様性のあることが初めて確認された。このような VP4 遺伝子の多様性は、感染防御抗原として重要な血清型抗原の存在する外殻タンパクであるため(29, 31)、免疫などの選択圧を受けやすいことに関連しているのかもしれない。

本章で決定した RVC6 株の全 11 遺伝子文節の遺伝子型を分類するためのカットオフ値を求めたところ、既報どおりであった。従って、ウシ RVC の全 11 分節は全て文節ごとに 1 種類の遺伝子型に属することが今回のデータでも示された。今回、VP4 遺伝子分節はウシのクラスターに収束したが、2 系統に分岐したため、カットオフ値の推定を試みたが、株数が少なく明確に推定することができず遺伝子型として分けることができなかった。しかしながら、相同性の低さと挿入と欠損がみられることから、暫定的に系統 I および II と分けることとした。後に、Jeong ら(52)が多くのブタ RVC 株を用いて VP4 遺伝子のカットオフ値を塩基配列の相同性を 77%(125)から 83%に修正し、遺伝子型分類を行っている。本章で暫定的に分けた系統 I および II の間の塩基配列の相同性は 83.7~84.8%であるため、ウシ RVC の VP4 遺伝子は 1 つの遺伝子型のみである。しかしながら、カットオフ値には変遷がある。VP6 遺伝子のカットオフ値を Soma らが 85%と推定し(125)、日本のブタの遺伝子情報を収集し Suzuki らが 87%(127)、さらに韓国のブタの遺伝子情報を収集し Jeong らが 90%と修正している(52)。また、VP7 遺伝子も最初に Soma らが 84%と推定していたが(125)、Marthaler らが北米のブタの遺伝子情報を追加したことで 85%と修正している(70)。これまでの VP4、VP6 そして VP7 遺伝子の解析から、ブタ RVC 株は、ウシおよびヒト RVC 株よりも多様性に富むと考えられる。従って、様々な国からブタ RVC の遺伝子情報を

集積することで、正確なカットオフ値を推定することができ、遺伝子型分類が発展していくと考えられる。

分子系統学的解析によると、ウシ RVC 株はそれぞれの文節遺伝子において同じ遺伝子型に属しているものの、遺伝的関連性は文節ごとに異なっていることを窺わせた。そこで、各文節を北海道系統、富山系統、山形系統、それらの混合した系統として系統分類し、各株の各文節における遺伝子動態について考察した(図 3-3)。VP1 遺伝子は、山形検出の 1 株と Shintoku 株が混在した北海道・山形混合系統、残りの山形検出の 5 株と Toyama 株が混在した富山・山形混合系統に分類された。VP2 遺伝子は、全ての株が北海道・富山・山形の混在した混合系統に属し、VP3 遺伝子は、山形県で検出された 6 株が山形系統、北海道で検出された Shintoku 株が北海道系統、富山県で検出された Toyama 株が富山系統に分類された。そして、残りの文節も文節ごとに様々な株の組み合わせで系統分類された。以上のように、北海道で検出された Shintoku 株、富山県で検出された Toyama 株、山形県で検出されたその他の株というように地域ごとに分かれる傾向もみられず、また検出された株は年ごとに分子系統学的に分かれる傾向はみられず、独立して複数の系統にランダムに別れているようにみえる。また、各文節は株ごとに同じ傾向を示して分かれずに、文節ごとにランダムに別れているようにみえる。以上の系統分類から遺伝子動態を推察すると、各文節において同じ遺伝子型内に存在する株が、いくつかの系統間でリアソータントを起こした結果であると推測された。つまり、野外において各遺伝子分節は、株間で複雑にリアソータントを起こしていると考えられた。故に、異なった遺伝的背景をもつ複数の RVC 株が国内に広く分布し、ウシの下痢症に関与していることが示唆された。

RVC の検出された 6 症例は、第二章において発生状況や臨床症状などの収集した情報について整理した。そして第二章でも指摘したが、興味深い 2 点の特徴に関して、本章で決定した全 11 遺伝子分節の解析結果から遺伝子レベルでの考察を行った。1 点目として、農場 C において乳用成牛の下痢症の集団発生があり、その 8 日後に近隣の

農場 D において乳用成牛の下痢症の集団発生が観察された点である。これまでに RVC 病が近隣農場で続発した症例の報告は無かった。現地調査で、両農場には疫学的に関連のあることが判明していた。本章での相同性解析の結果から、C の農場で検出された Y/1/04 と D 農場で検出された Y/2/04 株はほぼ同一の株であることが明らかになった。本症例は遺伝子レベルでもウシ RVC が下痢症発生農場から持ち込まれて下痢症の続発につながった可能性が示唆された。そして、冬季赤痢と称される BCoV 病と同様に周辺地域で流行が拡大する可能性が示唆された。2 点目として、2004 年と 2008 年に同じ農場 C において乳用成牛の下痢症の集団発生が観察された点である。RVC 病が同一農場で再発生した症例に関する報告はこれまでに無かった。日本における RVA の流行は、毎年冬期から春期にかけて、季節性に発生する。この特徴的な季節性パターンは、日本に限らず、世界中の温帯気候の地域において普遍的に認められる(31)。このような疫学的特徴は、下痢の非流行期においても RVA が自然界に存続している可能性を示していると考えられる。また、家畜における RVA 病は、同一農場で本症の発生が繰り返し認められるという疫学的特徴を示していることから、RVA は農場内に常在化している可能性が指摘されている(22, 23, 44, 88, 89)。このような要因として、環境中で安定であること、(24)、不顕性感染(31, 73, 82, 112, 126, 128)または持続感染(18, 32, 61, 85, 90, 91, 103, 104)している個体が感染源になる可能性が指摘されている。第二章において RVC も同様の季節性パターンが認められている。そして、当初、VP7 遺伝子の解析から 2004 年に検出された Y/1/04 株と 2008 年に検出された Y/08 株の塩基配列の相同性が 95.1%、アミノ酸配列の相同性が 97.9%と高いことから、本症例も農場内での RVC の常在化が原因ではないかと考えた。全 11 分節の遺伝子解析をすることで、VP4 遺伝子は、遺伝子の欠損と挿入があり、相同性が低いことが明らかになった。また、VP4 遺伝子以外の文節遺伝子においても比較的高い相同性を示しているものの、分子系統学的に文節ごとに近縁な株が異なり、各文節は同じ傾向を示して分かれずに、文節ごとにランダムに別れているように見える。このことから、

Y/01/04 株と Y/08 株は、異なった遺伝的背景をもつ株であることが示唆された。以上の結果から、本症例は、農場内での RVC の常在化が原因ではなく、新たな RVC 株が農場内に侵入したとこで再発生したと推察された。存続様式の解明は、防疫対策を講じる上で重要な情報になる。RVC においても存続様式を明らかにしていく必要がある。そのためにも、引き続き全 11 文節遺伝子を解析し、遺伝情報を集積する必要がある。

結論として、全 11 遺伝子分節を解析することにより、VP4 遺伝子において、欠損と挿入のある相同性の低いウシ RVC 株の存在が明らかになった。また、ウシ RVC は、文節ごとに独立してリアソータントを繰り返し、遺伝的多様性を獲得していることが示唆された。このことから、異なった遺伝的背景をもつ複数の RVC 株が国内に広く分布し、ウシの下痢症に関与していることが示唆された。また、人為的に広がりや同一農場内で再感染が初めて確認され、RVC の生態の一端が確認された。



表 3-1 RVC の遺伝子解析に用いた既報プライマー

プライマー	プライマー配列(5' -3' )	極性	参照株	位置	
				開始	末尾
NSP1-FB3	GGCTTTAAAAAAGAGCTGG	+	Bristol	1	19
NSP1-FS1	CACAGTATATAGGTGCGCATT	+	Shintoku	984	1004
NSP1-RB	GCCACATAGAGTTTAGTCTGTTG	-	Bristol	1247	1269
NSP1-RB4	AGCCACATAGAGTTTAGTCTG	-	Bristol	1250	1270
NSP2-FB2	GGCTTTTAAATTGCACGTCGG	+	Bristol	1	21
NSP2-FC1	TCCCAGCTGATCACTGGT	+	Cowden	2	19
NSP2-FS1	ATCGCGATCAGACTGCTT	+	Shintoku	597	614
NSP2-RB	TGCTTGTAACCTTCACTCAC	-	Bristol	989	1008
NSP2-RB2	AGCCACATATGCACAGCTG	-	Bristol	1019	1037
NSP2-RS1	CCAACAAATCCGCAACTCTAC	-	Shintoku	240	262
VP1-FB3	GGCTAAAAAAATGG	+	Bristol	1	15
VP1-FC1	TCCACAGTCGTGATGGACTAC	+	Cowden	5	25
VP1-FC2	CACAATGGGATGCTTCTCAAC	+	Cowden	1572	1592
VP1-FS2	TGCATTACGAGGTCTGACGA	+	Shintoku	2043	2062
VP1-FS3	ACGTACCAAAAGCGGACGTT	+	Shintoku	2783	2802
VP1-FS4	CCCAGATGTATAAGCATGAC	+	Shintoku	2819	2838
VP1-FS5	AGGTATATAGCTGGAGGAA	+	Shintoku	2052	2070
VP1-RB1	GTTTTCCGAGAACTGTCTG	-	Bristol	1839	1857
VP1-RB2	GCCACAATATGCAATCCACT	-	Bristol	3289	3308
VP1-RB5	AGCCACAATATGCAATCC	-	Bristol	3292	3309
VP1-RB6	TAGCATACGCCACAGCTT	-	Bristol	3210	3227
VP1-RS1	CACGCTGCTAAATGATACGG	-	Shintoku	496	515
VP2-FB1	CAGTTGAGGACAAATCGTTC	+	Bristol	14	33
VP2-FB3	GGCTTAAAAAGATCAGTTGAGG	+	Bristol	1	22
VP2-FC3	GAATCGCTAGTTGCAATGCAGT	+	Cowden	1250	1271
VP2-FS1	ACACTGATGGGTTGCAGA	+	Shintoku	2205	2222
VP2-FT1	AAAACGCATGCCGACTAC	+	Toyama	640	657
VP2-FT2	AACACTGATGGGTTGCAGA	+	Toyama	547	565
VP2-RB1	CTCACTTCACCTGCTTGA	-	Bristol	1389	1406
VP2-RB2	CAAAGTTTGAGGTCGTACAAAG	-	Bristol	2710	2731
VP2-RB3	AGCCACAAAGTTTGAGGTCG	-	Bristol	2717	2736
VP2-RS1	ACATAGTCAGGCATCTCCTCT	-	Shintoku	550	570
VP2-RT1	CATAGTCAGGCATCTCCTCT	-	Toyama	201	220
VP2-RT2	AGTCAATGTGCCACCAA	-	Toyama	70	87
VP3-FS1	CGTTCATTGCAATCCAGTTC	+	Shintoku	26	45
VP3-FS2	CCGTCATGTACGATAATTGGAG	+	Shintoku	919	940
VP3-FT1	TGGTTGGTGGGAAAGAGAAC	+	Toyama	1779	1798
VP3-RS1	CTCACTTTTCCTGTACGTAG	-	Shintoku	1271	1290
VP3-RS2	AGCCACATCATACGGTAGAG	-	Shintoku	2147	2166
VP3-RT1	TGCCAGTACTTAACCAGAAC	-	Toyama	328	347
VP4-FS1	TCAGGATCAATGGCGTCCTCA	+	Shintoku	13	33
VP4-FS2	TCAAAATTGGACGGTTCGAC	+	Shintoku	1031	1050
VP4-FS3	AGCTTAAAAAAGTCAGGA	+	Shintoku	1	18
VP4-FT2	GAGACTTGCTGGAAGATGTG	+	Toyama	1726	1745
VP4-RS1	CTCCTGATGAATGCAACCCA	-	Shintoku	1209	1228
VP4-RS2	GCCACATAATAAGTCGATCTCC	-	Shintoku	2231	2252
VP4-RT1	TCTTCCCAATTGAAGCTATC	-	Toyama	585	604
VP6-3299	GCATTTAAAATCTCATTC	+	Bristol	1	18
VP6-3297	AGCCACATAGTTCACATT	-	Bristol	1335	1352
VP7-U1	GGCATTTAAAAAAGAAGAAGCTGT	+	Cowden	1	24
VP7-L1063	AGCCACATGATCTTGTTTACGC	-	Cowden	1042	1063

Soma らの用いたプライマー

表 3-2 RVC の遺伝子解析に用いた独自に設計したプライマー

プライマー	プライマー配列(5' -3' )	極性	参照株	位置	
				開始	末尾
NSP3-F1	GGCTTTTAAAAGCACTTGCTG	+	Bristol	1	22
NSP3-R1331	AGCCACACTGTAAGCAGTCT	-	Bristol	1331	1350
NSP4-F15	CAGATCACTTTGCTCCACGA	+	Bristol	15	34
NSP4-R547	CGGGTATGACGTTTTTCTCC	-	Bristol	457	566
NSP5-F1	GGCTTTAAAAATTGCGAC	+	Bristol	1	18
NSP5-R709	AGCCACAGATCGGGTTGGGG	-	Bristol	709	730

表 3-3 2003 年から 2010 年までに山形県で検出されたウシ RVC の由来および文節ごとの GenBank accession number

No.	発生日	農場	株	Gene Bank accession number										
				VP1	VP2	VP3	VP4	VP6	VP7	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
1	2003年10月17日	B	Y/03	AB874606	AB874612	AB874618	AB874624	AB874630	AB874636	AB874642	AB874648	AB874654	AB874660	AB874666
2	2004年1月5日	C	Y/1/04	AB874607	AB874613	AB874619	AB874625	AB874631	AB874637	AB874643	AB874649	AB874655	AB874661	AB874667
3	2004年1月13日	D	Y/2/04	AB874608	AB874614	AB874620	AB874626	AB874632	AB874638	AB874644	AB874650	AB874656	AB874662	AB874668
4	2004年6月2日	E	Y/3/04	AB874609	AB874615	AB874621	AB874627	AB874633	AB874639	AB874645	AB874651	AB874657	AB874663	AB874669
5	2008年4月8日	C	Y/08	AB874610	AB874616	AB874622	AB874628	AB874634	AB874640	AB874646	AB874652	AB874658	AB874664	AB874670
6	2010年11月4日	F	Y/10	AB874611	AB874617	AB874623	AB874629	AB874635	AB874641	AB874647	AB874653	AB874659	AB874665	AB874671

表 3-4 RVC 株の文節ごとの塩基配列数(nt)および推定されたアミノ酸数(aa)

	VP1		VP2		VP3		VP4		VP6		VP7	
	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
Y/03	3298	1090	2709	881	2141	695	2240	733	1352	395	1063	332
Y/04/1	3298	1090	2709	881	2141	695	2247	735	1352	395	1063	332
Y/04/2	3298	1090	2709	881	2141	695	2247	735	1352	395	1063	332
Y/04/3	3298	1090	2709	881	2141	695	2240	733	1352	395	1063	332
Y/08	3298	1090	2709	881	2141	695	2240	733	1352	395	1063	332
Y/10	3298	1090	2709	881	2141	695	2240	733	1352	395	1063	332
Shintoku	3309	1090	2727	881	2166	695	2253	733	1352	395	1063	332
Toyama	3309	1090	ND	881	ND	695	2253	733	1352	395	1063	332
Bristol	3309	1090	2736	884	2166	693	2283	744	1353	395	1063	332
Cowden	3290	1082	2736	884	2145	692	2246	736	1352	395	1063	332

	NSP1		NSP2		NSP3		NSP4		NSP5	
	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
Y/03	1273	395	1037	312	1350	402	540	146	719	209
Y/04/1	1273	395	1037	312	1350	402	540	146	719	209
Y/04/2	1273	395	1037	312	1350	402	540	146	719	209
Y/04/3	1273	395	1037	312	1350	402	540	146	719	209
Y/08	1273	395	1037	312	1350	402	540	146	719	209
Y/10	1273	395	1037	312	1350	402	540	146	719	209
Shintoku	1273	395	1037	312	1350	402	ND	146	719	209
Toyama	ND	395	ND	312	ND	402	ND	146	ND	209
Bristol	1270	394	1037	312	1350	402	613	150	730	212
Cowden	1235	393	995	312	1348	402	613	150	693	210

ND: Not determined

表 3-5 ウシ RVC8 株、代表的なヒトおよびブタ RVC 株の間の塩基配列および推定されたアミノ酸の相同性

(a) NSP1

	ウシ								ブタ	ヒト
	Shintoku	Toyama	Y/03	Y/1/04	Y/2/04	Y/3/04	Y/08	Y/10	Cowden	Bristol
Shintoku		96.0	94.5	95.5	95.5	96.0	93.9	94.6	72.8	67.7
Toyama	96.5		93.1	94.0	94.0	94.1	91.9	92.4	73.3	67.2
Y/03	95.2	94.9		97.9	97.9	94.5	96.0	93.4	72.6	67.7
Y/1/04	96.2	95.7	98.2		100	95.5	97.1	93.9	72.8	67.9
Y/2/04	96.2	95.7	98.2	100		95.5	97.1	93.9	72.8	67.9
Y/3/04	97.0	95.4	95.2	96.5	96.5		93.7	94.3	73.0	67.2
Y/08	94.9	94.4	97.0	98.2	98.2	95.2		92.8	72.1	67.3
Y/10	95.2	94.9	94.7	95.7	95.7	94.9	94.4		72.1	67.9
Cowden	70.6	71.4	70.1	70.9	70.9	70.9	69.6	71.1		68.1
Bristol	62.1	62.4	61.6	61.9	61.9	61.9	60.6	61.4	61.9	

斜め上段が塩基配列そして下段が推定されたアミノ酸の相同性(%)

## (b) NSP2

	ウシ								ブタ	ヒト
	Shintoku	Toyama	Y/03	Y/1/04	Y/2/04	Y/3/04	Y/08	Y/10	Cowden	Bristol
Shintoku		98.4	97.8	98.1	98.1	97.4	95.7	96.2	82.6	81.5
Toyama	98.7		97.0	96.9	96.9	96.7	94.8	95.4	82.5	81.3
Y/03	98.7	98.7		97.3	97.3	96.7	95.0	95.6	81.9	80.6
Y/1/04	99.4	98.7	98.7		100	96.8	96.0	95.7	82.5	81.3
Y/2/04	99.4	98.7	98.7	100		96.8	96.0	95.7	82.5	81.3
Y/3/04	99.0	98.4	98.4	99.0	99.0		95.3	98.1	82.1	81.0
Y/08	97.4	96.8	96.8	97.4	97.4	97.8		94.5	81.8	80.6
Y/10	97.4	96.8	97.4	97.4	97.4	98.4	96.5		82.0	80.7
Cowden	87.5	87.5	87.5	87.5	87.5	87.8	88.1	86.9		87.1
Bristol	84.6	84.3	84.0	84.6	84.6	84.6	85.3	83.7	93.6	

斜め上段が塩基配列そして下段が推定されたアミノ酸の相同性(%)

## (c) NSP3

	ウシ								ブタ	ヒト
	Shintoku	Toyama	Y/03	Y/1/04	Y/2/04	Y/3/04	Y/08	Y/10	Cowden	Bristol
Shintoku		97.2	94.6	97.3	97.3	97.8	97.0	97.6	77.3	79.2
Toyama	97.8		92.9	95.1	95.1	96.6	98.2	96.3	77.7	79.1
Y/03	96.5	96.5		94.3	94.3	93.1	92.9	93.1	76.9	78.9
Y/1/04	98.5	97.3	97.0		100	95.9	94.9	96.0	77.8	79.4
Y/2/04	98.5	97.3	97.0	100		95.9	94.9	96.0	77.8	79.4
Y/3/04	98.3	97.5	96.0	97.8	97.8		96.4	97.2	77.4	78.4
Y/08	97.0	98.3	95.8	96.5	96.5	96.8		96.1	77.5	78.7
Y/10	97.8	96.5	95.8	98.3	98.3	97.0	95.8		77.5	78.9
Cowden	80.8	81.3	81.5	81.5	81.5	81.6	80.6	81.8		78.2
Bristol	81.3	81.1	79.8	80.3	80.3	80.8	80.1	80.8	78.6	

斜め上段が塩基配列そして下段が推定されたアミノ酸の相同性(%)

## (d) NSP4

	ウシ								ブタ	ヒト
	Shintoku	Toyama	Y/03	Y/1/04	Y/2/04	Y/3/04	Y/08	Y/10	Cowden	Bristol
Shintoku		92.5	94.1	94.1	93.9	91.8	92.5	93.4	66.9	64.9
Toyama	94.5		94.6	97.5	97.3	94.3	94.3	96.4	68.6	65.8
Y/03	95.2	97.9		95.9	95.7	93.7	94.3	95.2	68.5	68.0
Y/1/04	93.8	99.3	97.3		99.8	96.4	96.4	98.0	68.9	66.0
Y/2/04	93.2	98.6	96.6	99.3		96.1	96.1	97.7	68.9	65.8
Y/3/04	89.0	93.2	93.2	92.5	91.8		94.6	95.2	68.2	65.6
Y/08	91.1	94.5	93.2	93.8	93.2	90.4		95.2	69.1	65.1
Y/10	93.8	97.9	95.9	97.3	96.6	91.8	92.5		68.9	66.4
Cowden	58.9	60.3	60.3	60.3	59.6	60.3	62.3	60.3		69.5
Bristol	55.0	57.6	57.6	57.6	57.0	58.3	58.3	56.3	63.3	

斜め上段が塩基配列そして下段が推定されたアミノ酸の相同性(%)



## (e) NSP5

	ウシ								ブタ	ヒト
	Shintoku	Toyama	Y/03	Y/1/04	Y/2/04	Y/3/04	Y/08	Y/10	Cowden	Bristol
Shintoku		95.2	95.7	96.2	96.2	96.5	94.9	95.1	77.8	75.1
Toyama	94.7		94.1	94.6	94.6	97.1	94.4	94.6	78.1	74.6
Y/03	95.2	95.2		97.0	97.0	95.4	94.1	94.3	78.1	75.0
Y/1/04	95.7	95.2	96.2		100	95.6	94.0	94.1	77.2	75.6
Y/2/04	95.7	95.2	96.2	100		95.6	94.0	94.1	77.2	75.6
Y/3/04	96.7	98.1	96.7	96.2	96.2		95.2	95.4	78.4	75.0
Y/08	95.7	96.2	95.7	95.2	95.2	98.1		99.2	76.7	74.5
Y/10	95.7	96.2	95.7	95.2	95.2	98.1	98.1		76.9	74.8
Cowden	74.8	76.2	75.7	74.8	74.8	76.2	75.2	75.2		76.9
Bristol	67.0	67.9	66.0	67.9	67.9	67.0	65.6	66.0	71.2	

斜め上段が塩基配列そして下段が推定されたアミノ酸の相同性(%)

## (f) VP1

	ウシ								ブタ	ヒト
	Shintoku	Toyama	Y/03	Y/1/04	Y/2/04	Y/3/04	Y/08	Y/10	Cowden	Bristol
Shintoku		94.7	94.5	94.8	94.8	95.7	94.8	94.1	80.0	79.8
Toyama	98.3		95.3	95.9	95.9	94.3	95.5	95.2	80.5	80.6
Y/03	98.4	98.3		97.7	97.7	94.2	97.1	96.6	80.3	80.3
Y/1/04	98.1	98.2	98.3		100	94.6	97.9	97.1	80.2	80.0
Y/2/04	98.1	98.2	98.3	100		94.6	97.9	97.1	80.2	80.0
Y/3/04	98.6	97.6	97.7	97.2	97.2		94.4	93.9	79.5	79.7
Y/08	98.2	98.0	98.4	98.5	98.5	97.4		96.5	80.5	80.0
Y/10	98.1	98.3	98.4	98.0	98.0	97.5	98.1		80.3	80.1
Cowden	90.7	90.7	90.7	90.5	90.5	90.7	90.7	90.4		85.4
Bristol	89.0	88.9	88.7	88.4	88.4	88.6	88.5	88.3	92.6	

斜め上段が塩基配列そして下段が推定されたアミノ酸の相同性(%)

## (g) VP2

	ウシ								ブタ	ヒト
	Shintoku	Toyama	Y/03	Y/1/04	Y/2/04	Y/3/04	Y/08	Y/10	Cowden	Bristol
Shintoku		95.9	97.1	96.8	96.8	96.5	96.3	95.9	80.3	79.1
Toyama	99.5		95.0	96.0	96.0	95.8	95.9	95.4	80.2	78.9
Y/03	99.1	99.1		95.8	95.8	95.5	95.1	95.3	80.0	78.8
Y/1/04	99.7	99.7	99.2		100	97.2	96.7	96.3	79.8	79.5
Y/2/04	99.7	99.7	99.2	100		97.2	96.7	96.3	79.8	79.5
Y/3/04	99.5	99.5	99.1	99.7	99.7		97.7	95.8	80.0	79.4
Y/08	99.1	99.1	98.6	99.2	99.2	99.1		95.6	79.9	79.4
Y/10	98.3	98.3	98.3	98.4	98.4	98.3	97.8		79.4	78.8
Cowden	89.8	89.6	89.8	89.9	89.9	89.6	89.7	89.1		83.1
Bristol	88.2	88.1	88.3	88.5	88.5	88.2	87.9	87.7	92.6	

斜め上段が塩基配列そして下段が推定されたアミノ酸の相同性(%)

## (h) VP3

	ウシ								ブタ	ヒト
	Shintoku	Toyama	Y/03	Y/1/04	Y/2/04	Y/3/04	Y/08	Y/10	Cowden	Bristol
Shintoku		94.2	95.0	95.3	95.3	95.1	94.5	94.2	78.2	79.1
Toyama	95.4		93.8	94.0	94.0	93.7	93.3	93.0	78.0	78.0
Y/03	96.7	95.8		98.6	98.6	98.4	98.9	96.7	78.0	78.6
Y/1/04	97.1	95.8	98.6		100	98.7	98.0	97.1	78.4	78.6
Y/2/04	97.1	95.8	98.6	100		98.7	98.0	97.1	78.4	78.6
Y/3/04	96.3	95.4	98.1	98.1	98.1		97.9	96.8	78.2	78.6
Y/08	96.3	95.7	99.0	98.1	98.1	98.0		96.1	78.2	78.7
Y/10	95.4	95.1	97.3	97.4	97.4	96.8	96.8		77.9	78.3
Cowden	84.5	83.1	83.7	84.3	84.3	84.0	84.1	83.4		81.8
Bristol	83.5	82.3	83.1	83.3	83.3	83.3	83.4	83.1	84.4	

斜め上段が塩基配列そして下段が推定されたアミノ酸の相同性(%)

## (i) VP4

	ウシ								ブタ	ヒト
	Shintoku	Toyama	Y/03	Y/1/04	Y/2/04	Y/3/04	Y/08	Y/10	Cowden	Bristol
Shintoku		96.9	97.8	84.8	84.8	97.5	96.7	96.8	76.1	69.7
Toyama	98.1		96.9	83.7	83.7	97.1	96.0	96.0	75.7	69.7
Y/03	98.2	98.6		84.5	84.5	97.7	96.5	96.6	75.6	69.5
Y/1/04	89.9	89.7	89.8		100	84.3	84.0	84.1	76.8	70.8
Y/2/04	89.9	89.7	89.8	100		84.3	84.0	84.1	76.8	70.8
Y/3/04	97.8	98.4	98.8	89.4	89.4		96.8	96.9	75.3	69.6
Y/08	96.9	97.1	97.4	89.0	89.0	97.4		98.0	75.8	69.9
Y/10	96.9	97.1	97.4	88.9	88.9	97.4	97.8		75.3	69.9
Cowden	78.7	78.3	78.3	80.6	80.6	78.3	77.7	77.2		71.9
Bristol	72.0	71.6	72.2	72.8	72.8	72.2	71.6	71.9	73.4	

斜め上段が塩基配列そして下段が推定されたアミノ酸の相同性(%)

## (j) VP6

	ウシ										ブタ	ヒト
	Shintoku	Toyama	Yamagata	Y/03	Y/1/04	Y/2/04	Y/3/04	Y/08	Y/10	WD534tc	Cowden	Bristol
Shintoku		97.0	98.0	97.1	97.9	97.9	97.2	97.1	96.0	79.9	80.8	81.2
Toyama	99.5		98.0	97.0	96.5	96.5	96.0	97.1	96.5	80.1	81.0	81.1
Yamagata	99.5	100		98.2	97.6	97.6	97.0	97.8	96.8	80.3	81.1	81.3
Y/03	99.5	100	100		96.9	96.9	96.0	97.1	96.3	80.4	81.3	81.4
Y/1/04	99.5	100	100	100		100	97.0	96.6	95.8	80.5	81.4	81.7
Y/2/04	99.5	100	100	100	100		97.0	96.6	95.8	80.5	81.4	81.7
Y/3/04	99.5	100	100	100	100	100		96.0	95.1	80.2	81.2	81.2
Y/08	99.5	100	100	100	100	100	100		96.1	80.7	81.7	81.3
Y/10	99.5	100	100	100	100	100	100	100		80.4	81.0	80.9
WD534tc	87.6	88.1	88.1	88.1	88.1	88.1	88.1	88.1	88.1		98.3	82.4
Cowden	91.1	91.6	91.6	91.6	91.6	91.6	91.6	91.6	91.6	95.7		83.5
Bristol	88.4	88.9	88.9	88.9	88.9	88.9	88.9	88.9	88.9	88.1	91.6	

斜め上段が塩基配列そして下段が推定されたアミノ酸の相同性(%)

## (k) VP7

	ウシ									ブタ	ヒト
	Shintoku	Toyama	Yamagata	Y/03	Y/1/04	Y/2/04	Y/3/04	Y/08	Y/10	Cowden	Bristol
Shintoku		93.8	93.4	92.1	95.0	95.0	94.6	93.8	94.2	75.1	74.8
Toyama	96.7		92.4	91.0	95.4	95.4	97.1	97.5	96.0	74.2	73.5
Yamagata	96.1	97.0		95.3	93.5	93.5	93.3	92.1	93.1	74.9	73.4
Y/03	96.7	97.3	97.9		92.3	92.3	91.9	91.4	92.1	74.8	73.4
Y/1/04	96.4	97.9	96.7	97.0		100	96.4	95.1	96.2	75.3	74.6
Y/2/04	96.4	97.9	96.7	97.0	100		96.4	95.1	96.2	75.3	74.6
Y/3/04	96.1	98.5	97.0	97.3	97.0	97.0		97.0	97.5	74.4	73.2
Y/08	96.4	99.7	96.7	97.0	97.9	97.9	98.2		96.7	74.3	73.3
Y/10	96.4	98.5	96.7	97.0	97.6	97.6	97.6	98.2		74.6	74.2
Cowden	74.4	74.4	74.7	74.7	75.3	75.3	74.1	74.7	74.7		83.1
Bristol	73.8	73.2	73.5	73.5	74.4	74.4	73.5	73.2	73.8	87.7	

斜め上段が塩基配列そして下段が推定されたアミノ酸の相同性(%)

表 3-6 ウシ、ブタおよびヒト RVC 株における動物種内および動物種間の塩基配列の  
相同性

遺伝子分節	畜種	株数	Nucleotide sequence identity (%)			カットオフ値※ (%)
			ヒト	ブタ	ウシ	
NSP1	ヒト	10	92.7-99.9	66.7-68.1	65.7-68.9	74
	ブタ	1			72.1-73.3	
	ウシ	8			91.9-100	
NSP2	ヒト	10	93.7-100	85.2-88.0	80.0-82.1	89
	ブタ	1			81.8-82.6	
	ウシ	8			94.5-100	
NSP3	ヒト	10	92.6-99.8	76.3-78.2	77.2-79.4	80
	ブタ	1			76.9-77.8	
	ウシ	8			92.9-100	
NSP4	ヒト	13	94.3-99.8	68.1-69.5	64.9-68.9	70
	ブタ	1			66.9-69.1	
	ウシ	8			91.8-99.8	
NSP5	ヒト	10	92.0-99.5	76.1-77.1	73.2-75.6	79
	ブタ	1			76.7-78.4	
	ウシ	8			94.0-100	
VP1	ヒト	8	94.4-99.7	85.0-85.7	79.3-80.7	86
	ブタ	1			79.5-80.5	
	ウシ	8			93.9-100	
VP2	ヒト	9	94.5-99.8	82.9-83.3	78.3-79.4	84
	ブタ	1			79.4-80.3	
	ウシ	8			95.0-100	
VP3	ヒト	8	83.5-99.3	81.8-85.3	76.5-79.1	86
	ブタ	1			77.9-78.4	
	ウシ	8			93.0-100	
VP4	ヒト	13	95.4-99.7	71.4-72.2	69.2-70.8	77
	ブタ	1			75.3-76.8	
	ウシ	8			83.7-100	
VP6	ヒト	13	96.1-100	82.8-84.3	80.6-83.2	ND
	ブタ	1			80.8-98.3	
	ウシ	10			79.9-100	
VP6(WD534tcを除く)	ヒト	13	96.1-100	82.8-84.3	80.6-82.0	85
	ブタ	1			80.8-81.7	
	ウシ	9			95.1-100	
VP7	ヒト	14	94.2-99.7	73.2-84.4	72.7-75.3	85
	ブタ	87			71.3-77.3	
	ウシ	9			91.0-100	

※VP7 遺伝子の遺伝子型分類は Marthaler ら (2013) そして残りの遺伝子の遺伝子  
型分類は Soma ら (2013) によって報告されたカットオフ値を用いた。

株数：分子系統学的解析と同じ株を使用

ND: Not determined



表 3-7 ウシ、ブタおよびヒト RVC 株における動物種内および動物種間の推定された  
アミノ酸の相同性

遺伝子分節	畜種	株数	Amino acid sequence identity (%)		
			ヒト	ブタ	ウシ
NSP1	ヒト	10	93.4-100	60.7-61.9	58.8-62.4
	ブタ	1			69.6-71.4
	ウシ	8			94.4-100
NSP2	ヒト	10	94.9-100	92.0-93.9	83.0-86.9
	ブタ	1			86.9-88.1
	ウシ	8			96.5-100
NSP3	ヒト	10	94.5-100	76.4-78.6	78.1-81.3
	ブタ	1			80.6-81.8
	ウシ	8			95.8-100
NSP4	ヒト	13	92.0-100	62.0-64.7	54.3-60.3
	ブタ	1			58.9-62.3
	ウシ	8			89.0-99.3
NSP5	ヒト	10	92.0-99.5	69.8-71.2	64.2-68.4
	ブタ	1			74.8-76.2
	ウシ	8			94.7-100
VP1	ヒト	8	97.2-99.8	92.6-93.2	88.1-89.1
	ブタ	1			90.4-90.7
	ウシ	8			97.2-100
VP2	ヒト	9	97.6-99.9	92.4-93.1	87.2-88.5
	ブタ	1			89.1-89.9
	ウシ	8			97.8-100
VP3	ヒト	8	85.4-99.3	84.4-90.3	80.4-83.7
	ブタ	1			83.1-84.5
	ウシ	8			95.1-100
VP4	ヒト	13	96.2-99.7	72.6-73.4	71.0-73.0
	ブタ	1			77.2-80.6
	ウシ	8			88.9-100
VP6	ヒト	13	98.2-100	90.6-91.6	87.6-88.9
	ブタ	1			91.1-95.7
	ウシ	10			87.6-100
VP6(WD534tcを除く)	ヒト	13	96.1-100	82.8-84.3	87.8-88.9
	ブタ	1			91.1-91.6
	ウシ	9			99.5-100
VP7	ヒト	14	97.3-100	70.2-87.7	72.6-74.4
	ブタ	87			71.4-80.1
	ウシ	9			96.1-100

株数：分子系統学的解析と同じ株を使用

Shintoku	1:MASSLYRQLISQNYSTGNEILLDQQINKTTVDYVDAGNYTYAQLPPTTUGAESTYESAFSAPEITGPYINTVIKLSDL	80
Toyama	1:.....V...A.....T...G...Y...A...P.....Y..TI..KL...S	80
Y-03	1:.....V...A.....T...G...Y...A...P.....Y..TV..KL...S	80
Y-1-04	1:.....I...T.....T...G...F...S...S.....H..TT..NW...I	80
Y-2-04	1:.....I...T.....T...G...F...S...S.....H..TT..NW...I	80
Y-3-04	1:.....V...A.....T...G...Y...A...P.....Y..TV..KL...S	80
Y-08	1:.....V...A.....K...G...Y...A...P.....Y..AV..KL...S	80
Y-10	1:.....V...A.....T...G...Y...A...P.....Y..AV..KL...S	80
Shintoku	81:DSNVVVLYQKPTSTVKLLKNGPESYSWNLAFAELWYGKANTTVTSDYSGMTNSEKSVEVDHDSLVLFWNEGSTALSNEKV	160
Toyama	81:G...V...S.V...L.N...S.SWN.....SGM.N.E...E.D.....GSTA...K.	160
Y-03	81:D...V...S.V...L.N...S.SWS.....SGM.N.E...E.D.....GSTA...K.	160
Y-1-04	81:N...V...N.I...F.H...N.DVN.....SSL.N.E...T.N.....AGIV...K.	160
Y-2-04	81:N...V...N.I...F.H...N.DVN.....SSL.N.E...T.N.....AGIV...K.	160
Y-3-04	81:D...I...S.V...L.N...S.SWN.....SGM.S.E...E.D.....GSTA...K.	160
Y-08	81:D...I...S.I...I.N...S.SWN.....AGM.N.E...E.D.....GSTA...K.	160
Y-10	81:D...I...S.V...L.N...S.SWN.....AGM.N.K...E.D.....GSTA...E.	160
Shintoku	161:INFSNVWGVLIKLTSTNTRIDICMANMNF <del>TS</del> DSFNWEEWTHNFP <del>RSAS</del> <del>---</del> MNIYTDYYLASVDFYSQIRALQOPIITT	237
Toyama	161:IN...V.V...L.SNT.I.V...AD.DN. <del>TS</del> D.....T.....E <del>S</del> <del>---</del> MNI.T...A...D..S.IR.S...I...	237
Y-03	161:IN...V.V...L.SNI.I.V...AG.DN. <del>TS</del> D.....T.....E <del>S</del> <del>---</del> MNI.T...A...D..S.IR.S...I...	237
Y-1-04	161:VN...M.M...P.SSS.V.V...AN.ND. <del>T</del> D.....K.....ANNINISM.A...A...D..N.LK.L...V...	239
Y-2-04	161:VN...M.M...P.SSS.V.V...AN.ND. <del>T</del> D.....K.....ANNINISM.A...A...D..N.LK.L...V...	239
Y-3-04	161:IN...V.V...L.NNA.I.V...AD.DN. <del>TS</del> D.....T.....E <del>S</del> <del>---</del> MNI.T...A...D..S.IR.S...I...	237
Y-08	161:ID...V.V...L.SDT.I.V...AN.DN. <del>TS</del> D.....T.....E <del>S</del> <del>---</del> MNI.T...A...D..S.IR.S...I...	237
Y-10	161:IN...V.V...L.SNT.I.V...SN.GN. <del>TS</del> D.....T.....E <del>S</del> <del>---</del> MNI.T...P...H..S.IR.S...I...	237
Shintoku	238:VENMKVKVREGSINVDEVVSQKSLWQEVRYVRDITLQCKIESEVVRGGGUGYDTSVAFKTIINHYSYTRAGEAVNAHV	317
Toyama	238:..M..V.V.....T.A...A.....	317
Y-03	238:..M..V.V.....T.A...A.....	317
Y-1-04	240:..I..M.I.....I.S...T.....	319
Y-2-04	240:..I..M.I.....I.S...T.....	319
Y-3-04	238:..M..V.V.....T.A...A.....	317
Y-08	238:..M..V.V.....T.A...A.....	317
Y-10	238:..M..V.V.....T.A...A.....	317
Shintoku	318:TISFNNLKERSYGGSLPTDFKIGRFDIIDVDITYMIDYWDSEIFKNMVYVRDLRADMGGFNYSSAMSYYFRIPVQGYPG	397
Toyama	318:..I...L.....S.M.G...A...K.....	397
Y-03	318:..I...L.....S.I.G...T...R.....	397
Y-1-04	320:..V...M.....A.M.S...N...R.....	399
Y-2-04	320:..V...M.....A.M.S...N...R.....	399
Y-3-04	318:..I...L.....S.I.G...A...R.....	397
Y-08	318:..I...L.....S.M.G...V...R.....	397
Y-10	318:..I...L.....S.M.G...V...R.....	397
Shintoku	398:LHSSGVGRFTYERSLLSQQFTDQVALNSMRVFVRATSSDGMFTAGNINARRIASGTGFAYS DGYVTETVGTVSFISLIPS	477
Toyama	398:.....A.T.....V..	477
Y-03	398:.....A.S.....V..	477
Y-1-04	400:.....V.S.....V..	479
Y-2-04	400:.....V.S.....V..	479
Y-3-04	398:.....A.S.....V..	477
Y-08	398:.....A.S.....V..	477
Y-10	398:.....A.S.....V..	477
Shintoku	478:NPNYQTPIASSSTVRMDLERKINDLENDFNELASSVALGDILSLAMSPLTFANLLESVPAIASSVKDVAANVMKKFKTKK	557
Toyama	478:.....G.....	557
Y-03	478:.....G.....	557
Y-1-04	480:.....S.....	559
Y-2-04	480:.....S.....	559
Y-3-04	478:.....G.....	557
Y-08	478:.....G.....	557
Y-10	478:.....G.....	557
Shintoku	558:MFKKAAPKYKEYIIGDLLIEDVTNLPRSTTAMDFDDITSAMVSTTNRLQLTDVETLSEIVARSADDFIPNRA YRMIEDG	637
Toyama	558:.....K.....LP.....D...I.....D.A...D.	637
Y-03	558:.....K.....LP.....D...I.....N.A...D.	637
Y-1-04	560:.....K.....IS.....D...I.....N.T...N.	639
Y-2-04	560:.....K.....IS.....D...I.....N.T...N.	639
Y-3-04	558:.....K.....LP.....D...I.....N.A...D.	637
Y-08	558:.....R.....LP.....D...I.....N.A...D.	637
Y-10	558:.....R.....LP.....D...V.....N.T...D.	637
Shintoku	638:MHVEATPNGVFSYDLATLQQQNFDMKFMQLASKSPVISAIVD FATLKMRD TYGVST D INYKLVASDAPTIVSF INNNN	717
Toyama	638:.....G.....N.....K.....V.....L.....	717
Y-03	638:.....N.....K.....V.....L.....	717
Y-1-04	640:.....R.....D.....N.....V.....L.....	719
Y-2-04	640:.....R.....D.....N.....V.....L.....	719
Y-3-04	638:.....G.....S.....K.....V.....L.....	717
Y-08	638:.....G.....N.....K.....I.....L.....	717
Y-10	638:.....G.....N.....K.....V.....L.....	717
Shintoku	718:PLIPNRIEGLLRQCRI	733
Toyama	718:.....L.....	733
Y-03	718:.....L.....	733
Y-1-04	720:.....I.....	735
Y-2-04	720:.....I.....	735
Y-3-04	718:.....L.....	733
Y-08	718:.....L.....	733
Y-10	718:.....L.....	733

図 3-1 ウシ RVC8 株の VP4 遺伝子アミノ酸配列

一致するアミノ酸は点、空白はダッシュ、欠損および挿入は囲みで表示

(a) NSP1

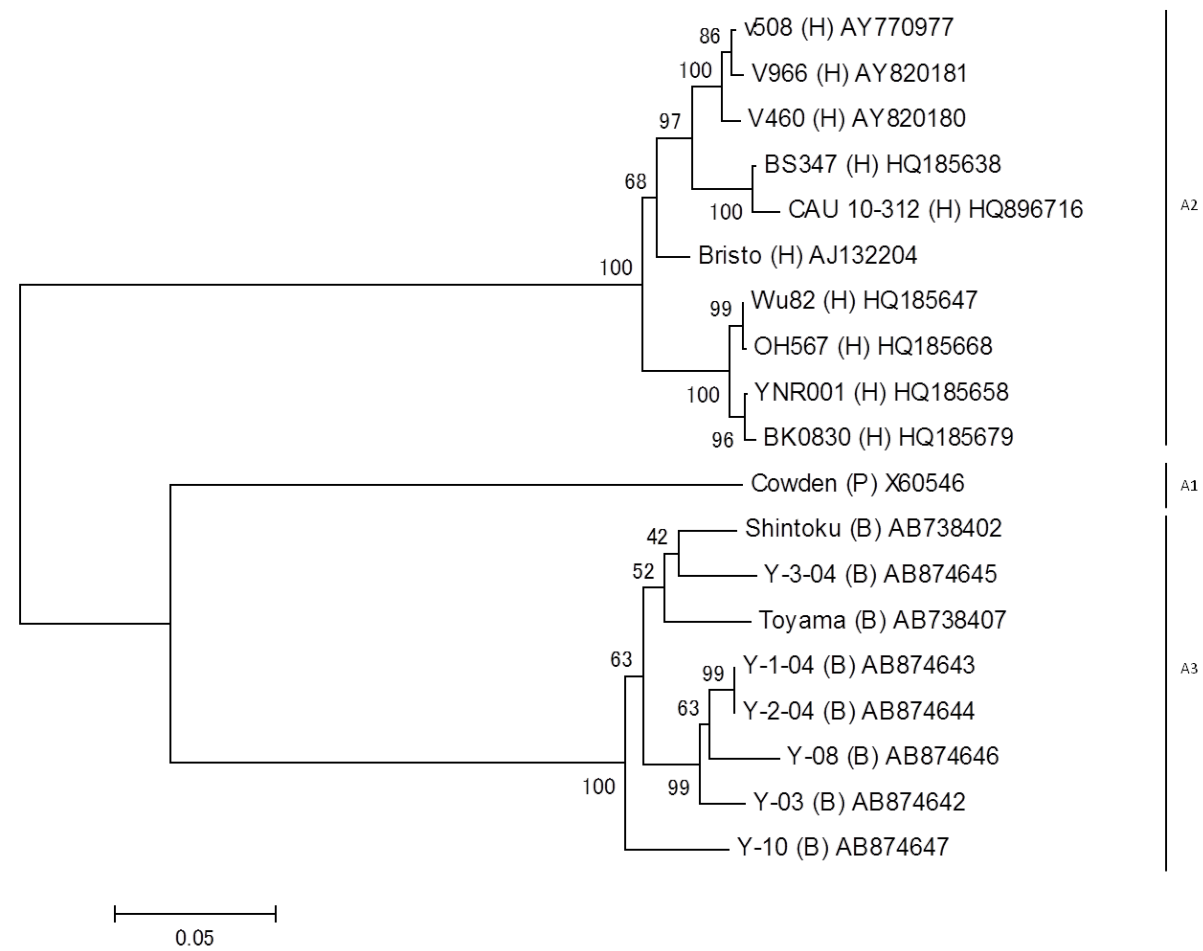
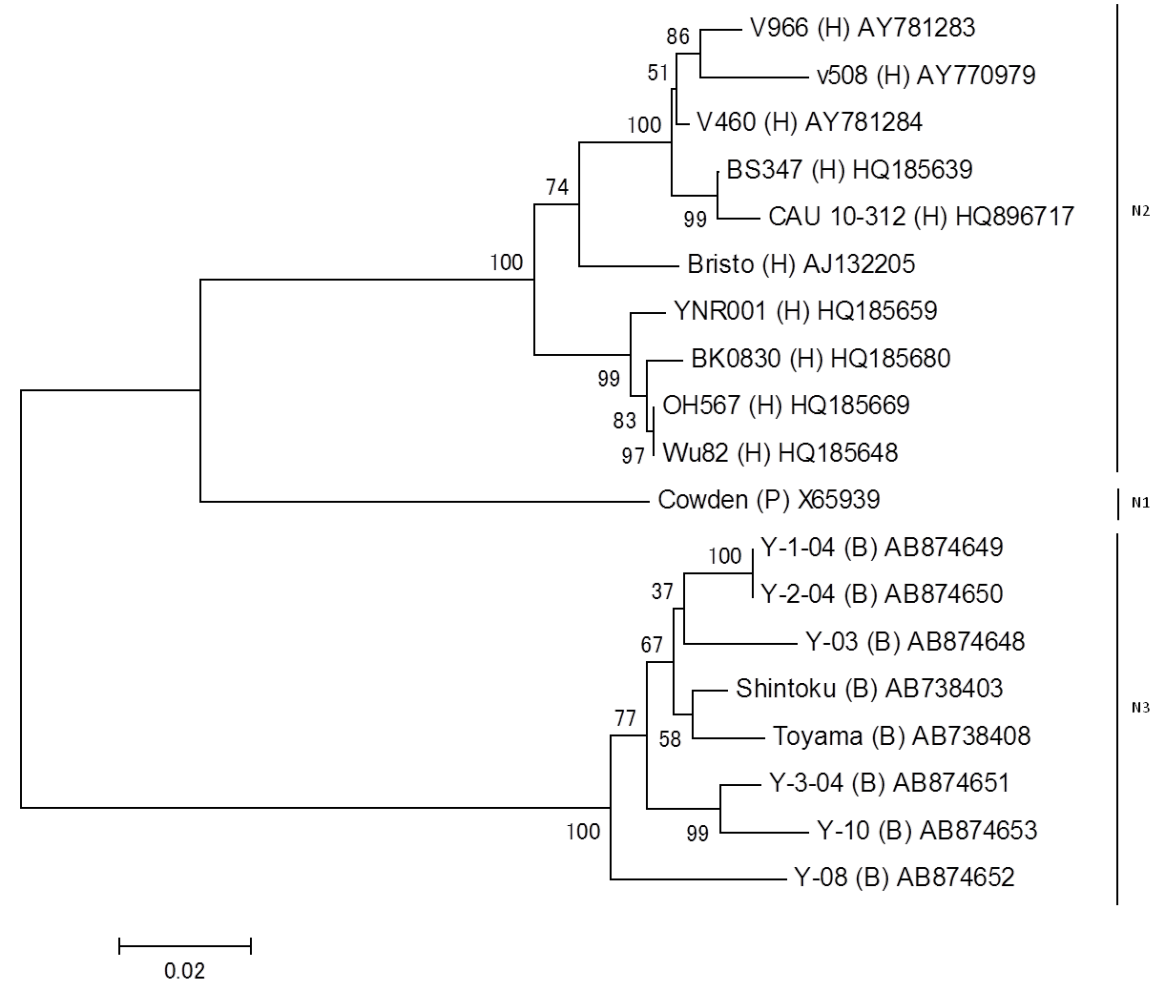


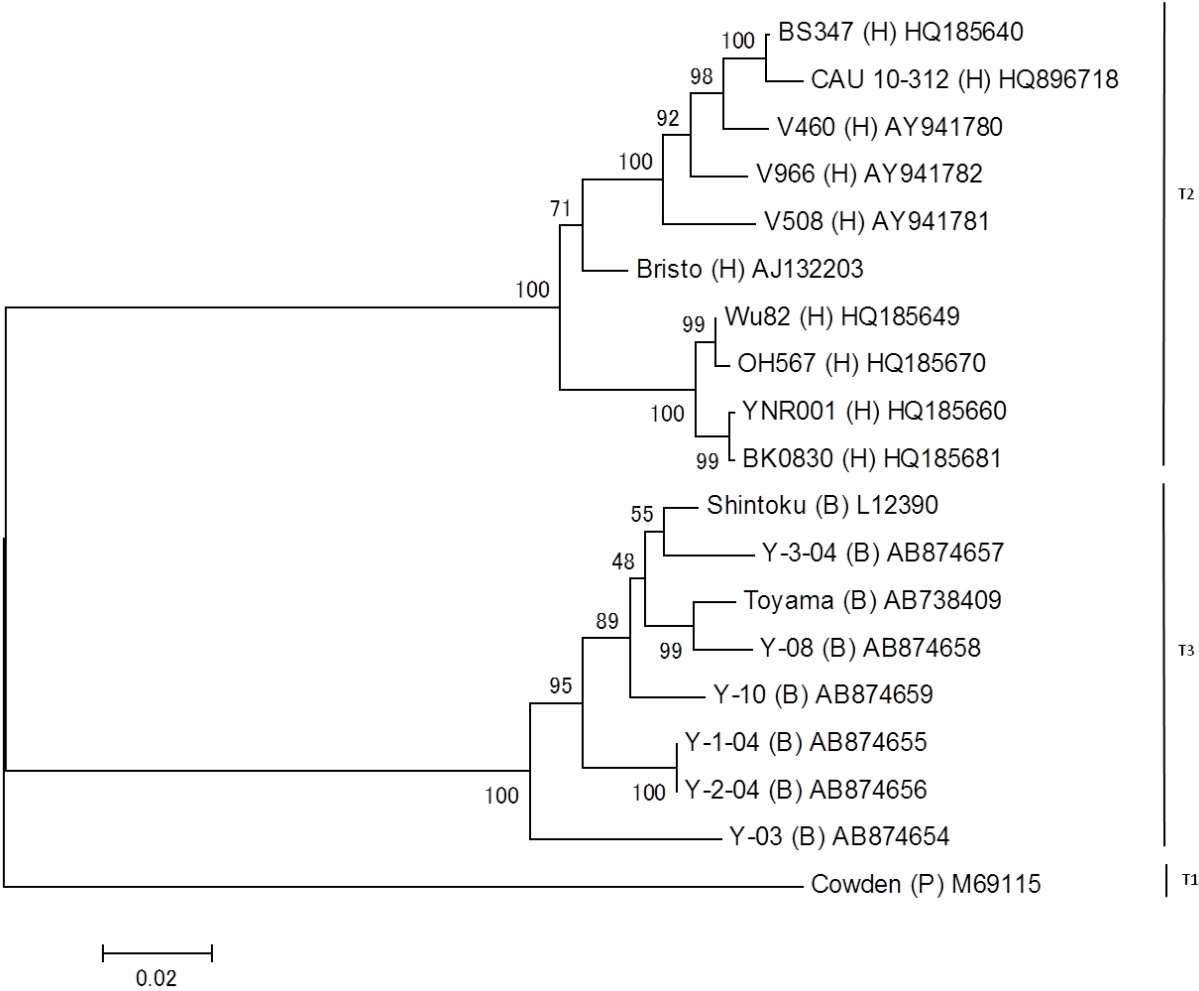
図 3-2 本章で決定したウシ株を含む RVC の全 11 分節遺伝子の分子系統学的解析

B:bovine, H:human, P:porcine, GenBank accession number が記載されている。遺伝子型を右側に記載、クラスター内の系統をローマ数字で記載

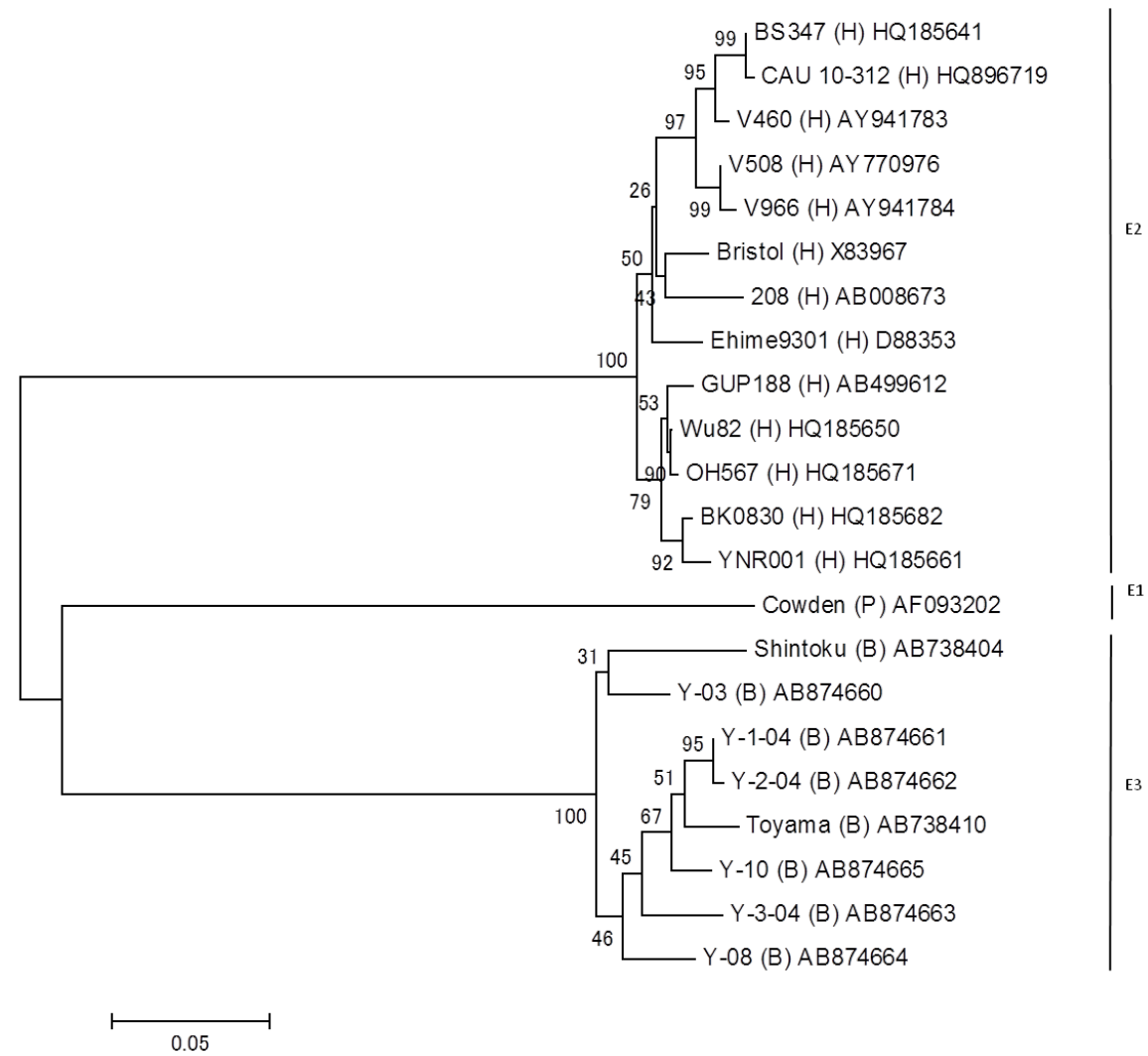
(b) NSP2



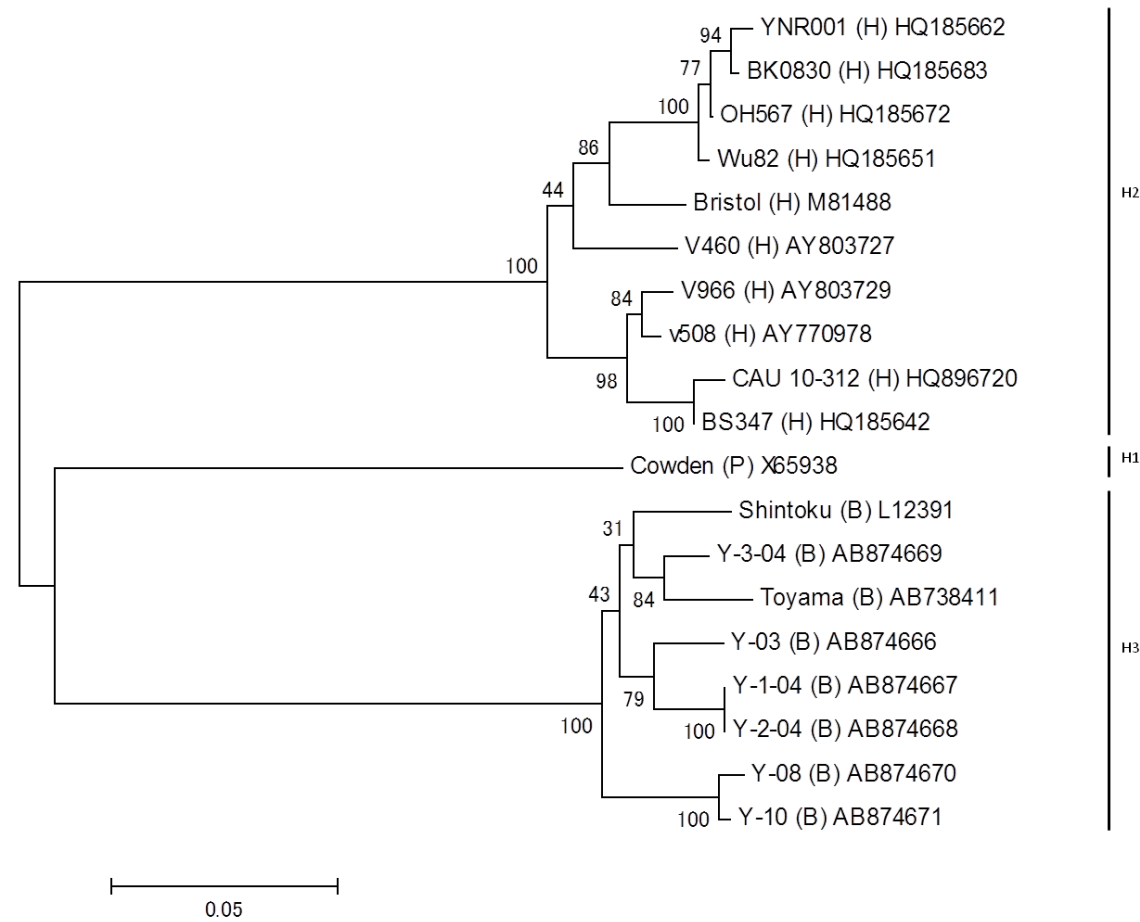
(c) NSP3



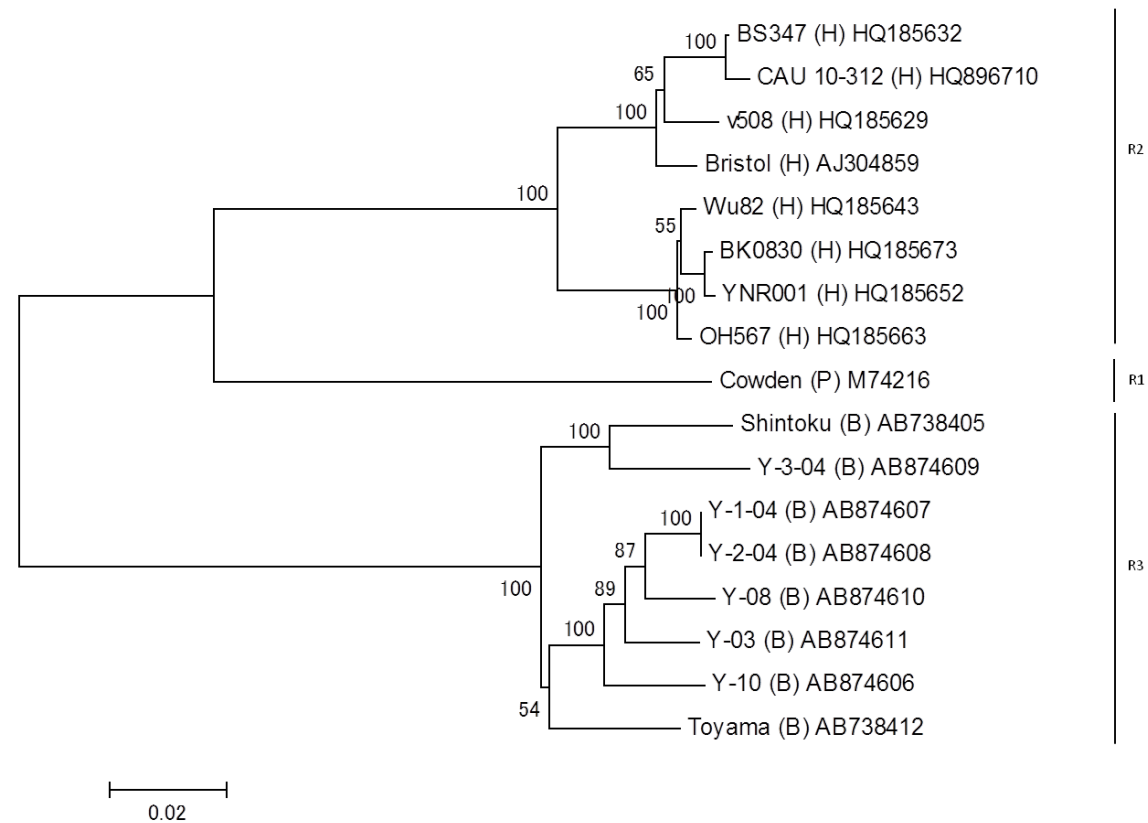
(d) NSP4



(e) NSP5

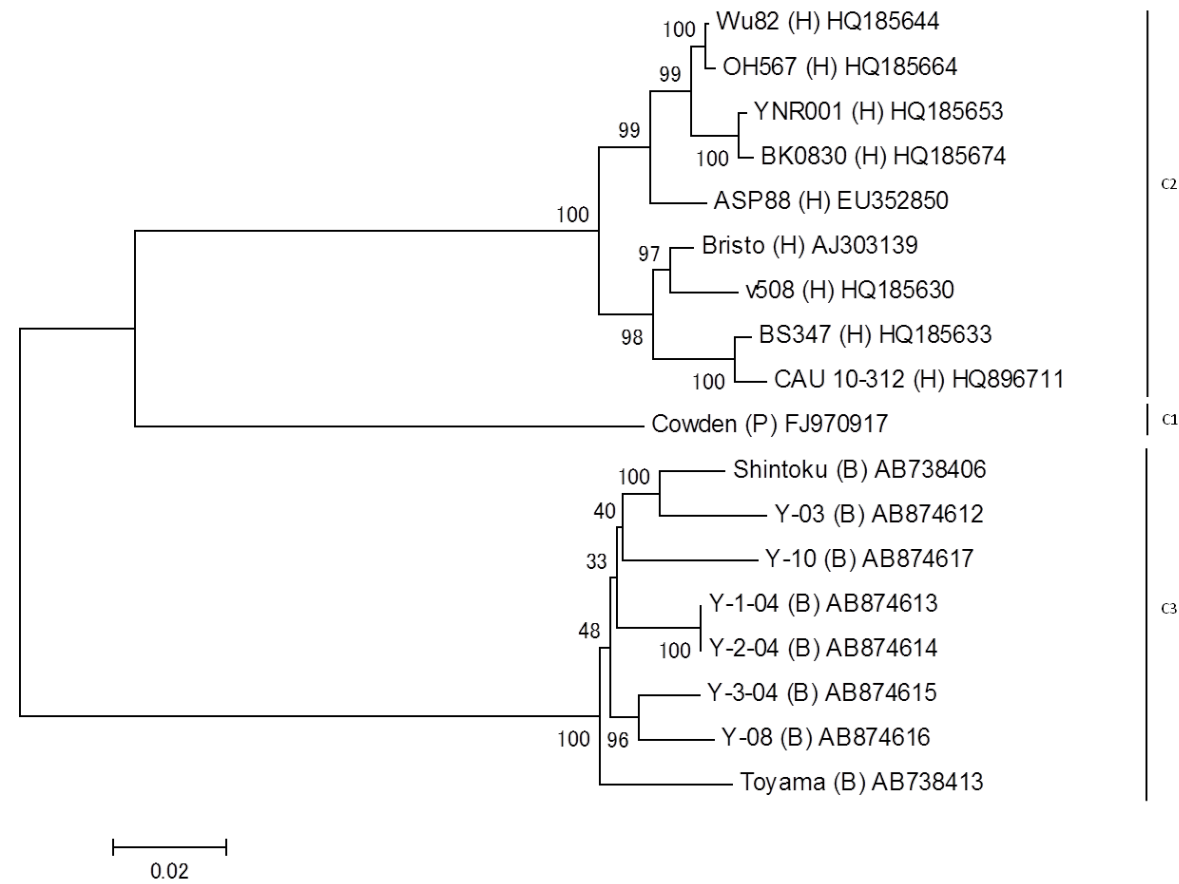


(f) VP1

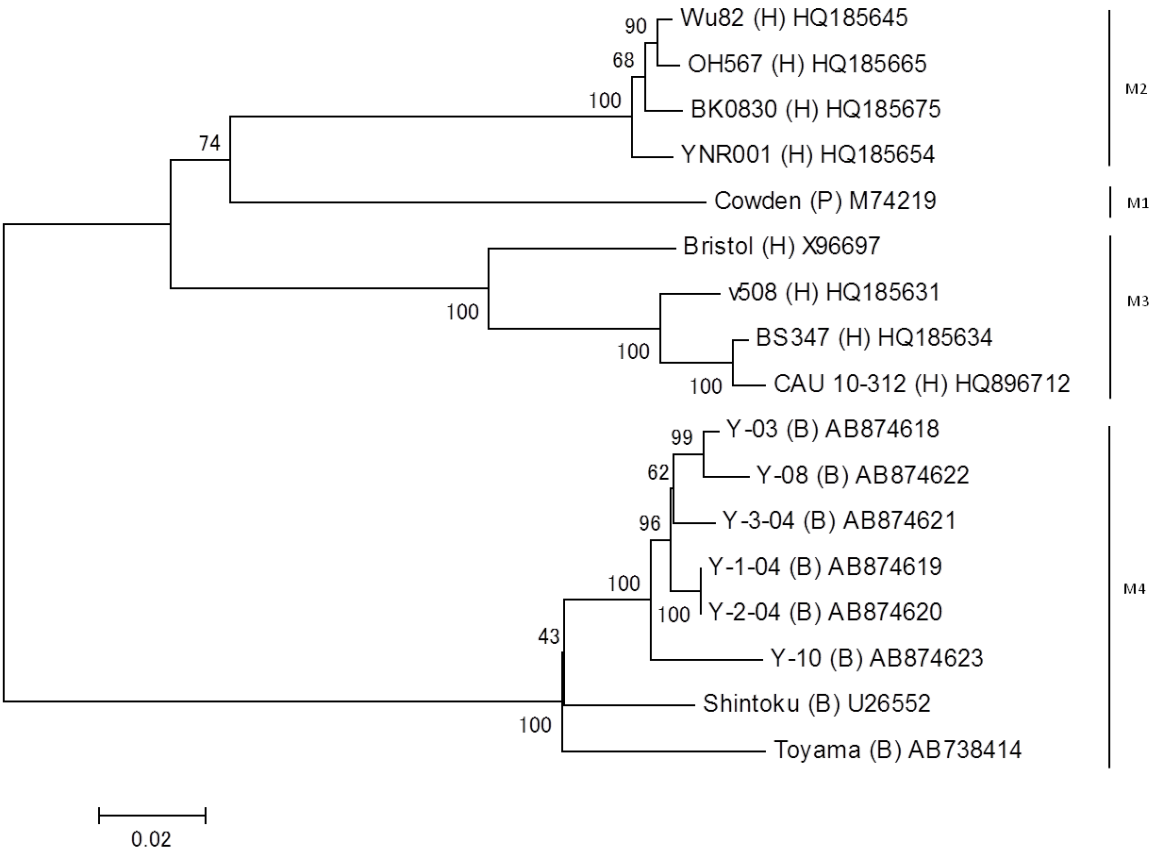




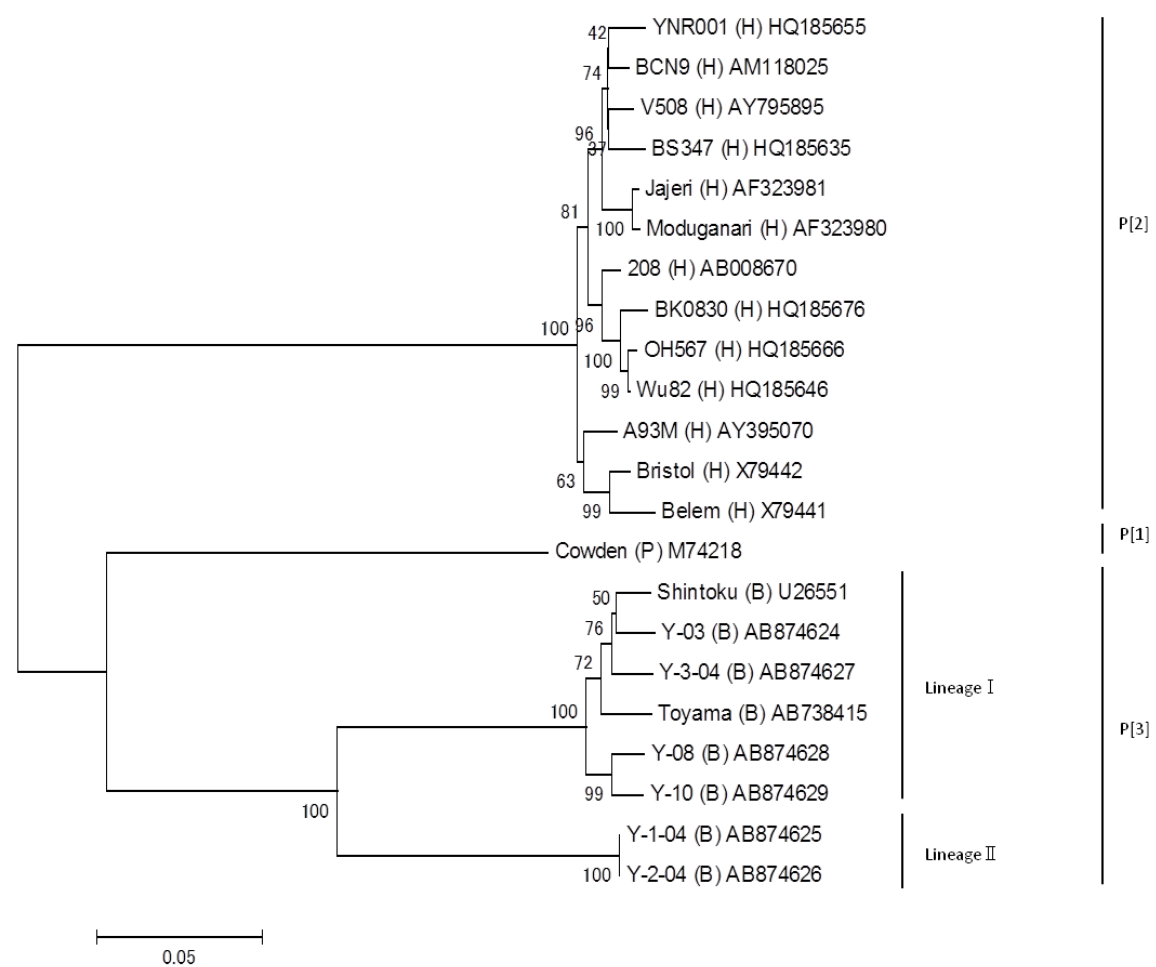
(g) VP2



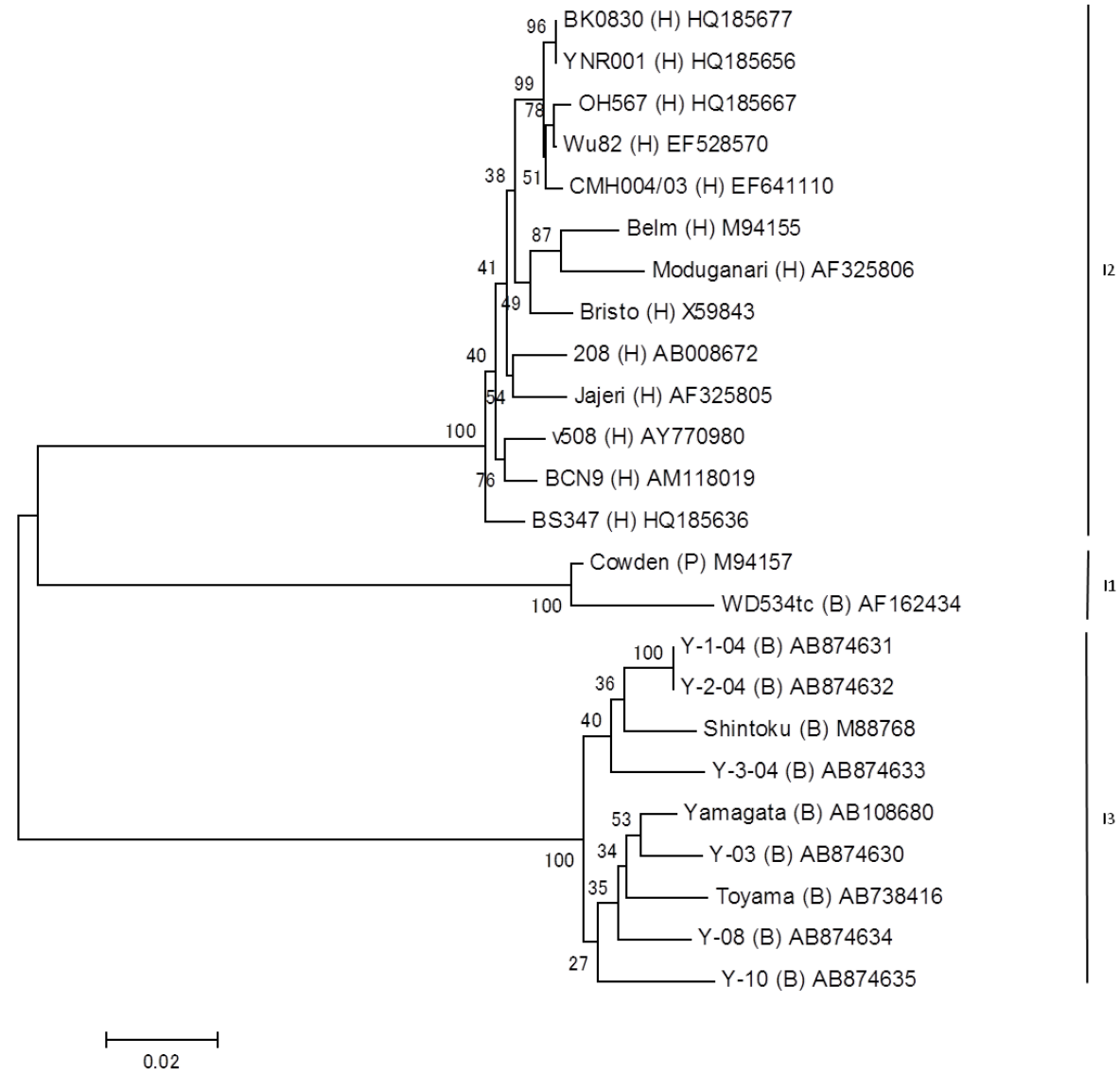
(h) VP3



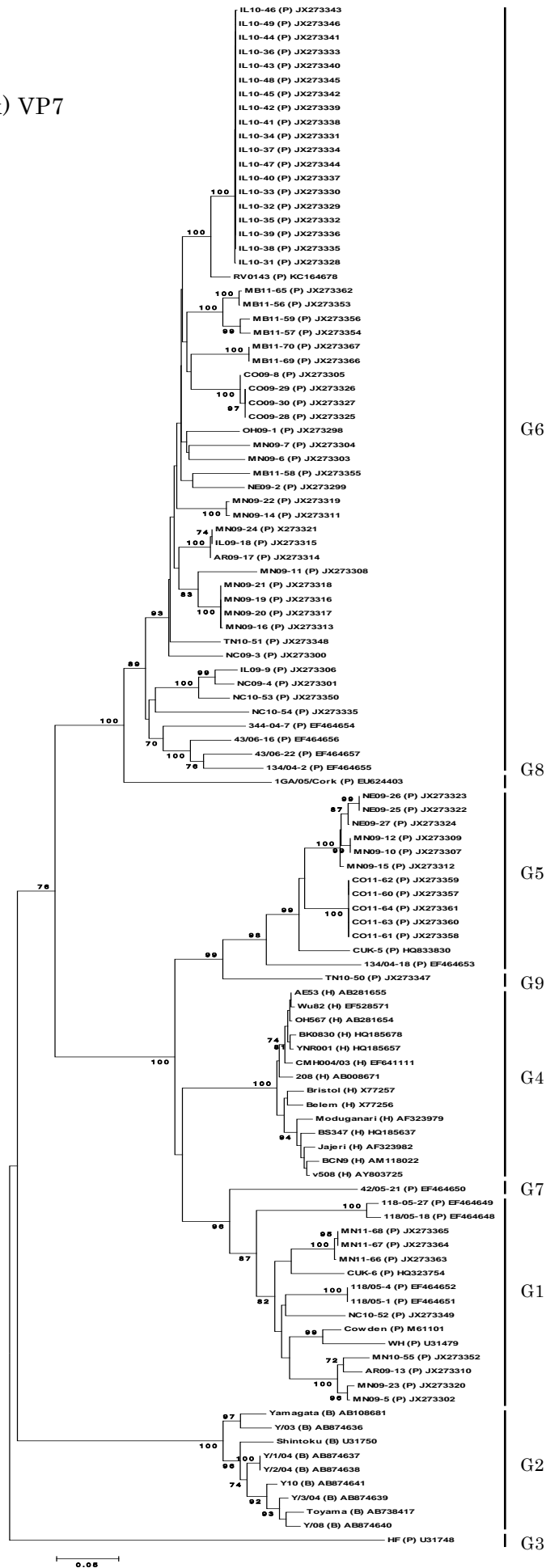
(i) VP4



(J) VP6



(k) VP7



	Y/03	Y/1/04	Y/2/04	Y/3/04	Y/08	Y/10	Shintoku	Toyama
VP1	TY	TY	TY	HY	TY	TY	HY	TY
VP2	HTY	HTY	HTY	HTY	HTY	HTY	HTY	HTY
VP3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	H	T
VP4	HTY	Y	Y	HTY	HTY	HTY	HTY	HTY
VP6	TY	HY	HY	HY	TY	TY	HY	TY
VP7	Y	TY	TY	TY	TY	TY	H	TY
NSP1	Y	Y	Y	HTY	Y	Y	HTY	HTY
NSP2	HTY	HTY	HTY	Y	Y	Y	HTY	HTY
NSP3	HTY	HTY	HTY	HTY	HTY	HTY	HTY	HTY
NSP4	HY	TY	TY	TY	TY	TY	HY	TY
NSP5	Y	Y	Y	HTY	Y	Y	HTY	HTY

図 3-3 ウシ RVC 株における各文節の遺伝子動態

H	北海道系統
T	富山系統
Y	山形系統(系統が分かれる場合数字で表現)
TY	富山・山形混合系統
HY	北海道・山形混合系統
HTY	北海道・富山・山形混合系統

## 引用文献

1. Adah M. I., Wade A., Oseto M., Kuzuya M. & Taniguchi K. (2002). Detection of human group C rotaviruses in Nigeria and sequence analysis of their genes encoding VP4, VP6, and VP7 proteins. *J. Med. Virol.* 66, 269-275.
2. Anderson R. J., Walker R. L., Hird D. W. & Blanchard P. C. (1997). Case-control study of an outbreak of clinical disease attributable to *Salmonella menhaden* infection in eight dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 210, 528-530.
3. Bányai K., Kemenesi G., Budinski I., Földes F., Zana B., Marton S., Varga-Kugler R., Oldal M., Kurucz K. & Jakab F. (2017). Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. *Infect. Genet. Evol.* 48, 19-26.
4. Barman P., Ghosh S., Das S., Varghese V., Chaudhuri S., Sarkar S., Krishnan T., Bhattacharya S. K., Chakrabarti A. & other authors. (2004). Sequencing and sequence analysis of VP7 and NSP5 genes reveal emergence of a new genotype of bovine group B rotaviruses in India. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2816-2818.
5. Bohl E. H., Saif L. J., Theil K. W. A., Agnes G. & Cross, R. F. (1982). Porcine pararotavirus: detection, differentiation from rotavirus, and pathogenesis in gnotobiotic pigs. *J. Clin. Microbiol.* 15, 312-319.
6. Bridger J. C. (1994). pp. 369-407. In: *Viral Infection of the Gastrointestinal Tract*, 2nd ed. (Kapikian, A. Z. ed.), Marcel Dekker, New York.
7. Cameron A. (2002). 監視伝染病等防疫体制支援事業 家畜疾病総合情報システム検討会 疫学分析手法検討会, 家畜疾病調査のためのツールボックス; サーベイルランスの実践的方法論とソフトウェア・普及版 pp. 22. 日本獣医師会, 東京

8. Carman S., van Dreumel T., Ridpath J., Hazlett M., Alves D., Dubovi E., Tremblay R., Bolin S., Godkin A. & Anderson N. (1998). Severe acute bovine viral diarrhea in Ontario, 1993-1995. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10, 27-35.
9. Castello A. A., Arguëlles M. H., Villegas G. A., Olthoff A. & Glikmann G. (2002). Incidence and prevalence of human group C rotavirus infections in Argentina. *J. Med. Virol.* 67, 106-112.
10. Caul E. O., Ashley C. R., Darville J. M. & Bridger J. C. (1990). Group C rotavirus associated with fatal enteritis in a family outbreak. *J. Med. Virol.* 30, 201-205.
11. Chang K. O., Parwani A. V., Smith D. & Saif L. J. (1997). Detection of group B rotaviruses in fecal samples from diarrheic calves and adult cows and characterization of their VP7 genes. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2107-2110.
12. Chang K. O., Nielsen P. R., Ward L. A. & Saif L. J. (1999). Dual infection of gnotobiotic calves with bovine strains of group A and porcine-like group C rotaviruses influences pathogenesis of the group C rotavirus. *J. Virol.* 73, 9284-9293.
13. Chasey D., Bridger J. C. & McCrae, M. A. (1986). A new type of atypical rotavirus in pigs. *Arch. Virol.* 89, 235-243.
14. Chen Z., Lambden P. R., Lau J., Caul E. O. & Clarke I. N. (2002). Human group C rotavirus: completion of the genome sequence and gene coding assignments of a non-cultivable rotavirus. *Virus Res.* 83, 179-187.
15. Chinsangaram J., Akita G. Y. & Osburn B. I. (1994). Detection of bovine group B rotaviruses in feces by polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 302-307.
16. 對馬澄人, 豊澤直子. 青森県つがる家畜保健衛生所. (2015). 県内初の C 群ロタウ



- イルスによる乳用成牛の集団下痢症. 平成 26 年度全国家畜保健衛生業績抄録. 2.
17. Collins P. J., Martella V. & O'Shea H. (2008). Detection and characterization of group C rotaviruses in asymptomatic piglets in Ireland. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2973-2979.
  18. Crawford S. E., Patel D. G., Cheng E., Berkova Z., Hyser J. M., Ciarlet M., Finegold M. J., Conner M. E. & Estes M. K. (2006). Rotavirus viremia and extraintestinal viral infection in the neonatal rat model. *J. Virol.* 80, 4820-4832.
  19. De Grazia S., Martella V., Rotolo V., Bonura F., Matthijnsens J., Banyai K., Ciarlet M. & Giammanco G. M. (2011). Molecular characterization of genotype G6 human rotavirus strains detected in Italy from 1986 to 2009. *Infect. Genet. Evol.* 11, 1449-1455.
  20. De la Fuente R., Luzon M., Ruiz-Santa-Quiteria J.A., Garcia A., Cid D., Orden J.A., Garcia S., Sanz R. & Gomez-Bautista M. (1999). Cryptosporidium and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. *Vet. Parasitol.* 80, 179-185.
  21. De Rycke J., Bernard S., Laporte J., Naciri M., Popoff M. R. & Rodolakis A. (1986). Prevalence of various enteropathogens in the feces of diarrheic and healthy calves. *Ann. Rech. Vet.* 17, 159-168.
  22. De Verdier Klingenberg K., Nilsson M. & Svensson L. (1999). Rotavirus G-type restriction, persistence, and herd type specificity in Swedish cattle herds. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6, 181-185.
  23. Dhama K., Chauhan R.S., Mahendran M. & Malik S.V. (2009). Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. *Vet. Res. Commun.* 33, 1-23.
  24. Dharakul T., Riepenhoff-Talty M., Albini B. & Ogra P. L. (1988). Distribution of rotavirus antigen in intestinal lymphoid tissues: potential role in

- development of the mucosal immune response to rotavirus. *Clin. Exp. Immunol.* 74, 14-19.
25. Edrington T. S., Ross T. T., Callaway T. R., Martinez C. H., Hume M. E., Genovese K. J., Poole T. L., Anderson R. C. & Nisbet D. J. (2008). Investigation into the seasonal salmonellosis in lactating dairy cattle. *Epidemiol. Infect.* 13, 381-390.
  26. Edrington T. S., Schultz C. L., Genovese K. J., Callaway T. R., Looper M. L., Bischoff K. M., McReynolds J. L., Anderson R. C. & Nisbet D. J. (2004). Examination of heat stress and stage of lactation (early versus late) on fecal shedding of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* in dairy cattle. *Foodborne Pathog. Dis.* 1, 114-119.
  27. Edrington T. S., Ross T. T., Callaway T. R., Martinez C. H., Hume M. E., Genovese K. J., Poole T. L., Anderson R. C. & Nisbet D. J. (2008). Investigation into the seasonal salmonellosis in lactating dairy cattle. *Epidemiol. and Infect.* 136, 381-390.
  28. Ekperigin H. E. & Nagaraja K. V. (1998). Microbial food borne pathogenes, *Salmonella*. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 14, 17-2
  29. Estes M. K. & Cohen J. (1989). Rotavirus gene structure and function. *Microviol. Rev.* 53, 410-449.
  30. Estes M. K. & Atmar R. L. (2003). Viral pathogens in the intestine. In: *Microbial Pathogenesis and the Intestinal Epithelial Cell*. Hecht G (Ed.), ASM Press, Washington, DC, USA, 525-545.
  31. Estes M. K. & Greenberg H. B. (2013). Rotaviruses. In: *Fields Virology*. 6th ED. Knipe DM, Howley PM (Ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 1347-1401.

32. Fenaux M., Cuadras M. A., Feng N., Jaimes M. & Greenberg H. B. (2006). Extraintestinal spread and replication of a homologous EC rotavirus strain and a heterologous rhesus rotavirus in BALB/c mice. *J. Virol.* 80, 5219-5232.
33. Fukai K., Takahashi T., Tajima K., Koike S., Iwane K. & Inoue K. (2007). Molecular characterization of a novel bovine group A rotavirus. *Vet. Microbiol.* 20, 217-224.
34. Fukutomi T., Tsunemitsu H. & Akashi H. (1999). Detection of bovine coronaviruses from adult cows with epizootic diarrhea and their antigenic and biological diversities. *Arch. Virol.* 144, 997-1006.
35. Fukuda M., Kuga K., Miyazaki A., Suzuki T., Tasei K., Aita T., Mase M., Sugiyama M. & Tsunemitsu H. (2012). 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.
36. 福田昌治. (2012). 成牛ウイルス性下痢症の疫学および迅速診断に関する研究, 第一章 成牛ウイルス性下痢症の原因別発生頻度および疫学特徴に関する調査 pp6-37. 岐阜大学大学院連合獣医学研究科(岐阜大学)
37. 福田昌治. (2015). 成牛のウイルス性下痢症について. *家畜診療* 62, 599-609.
38. Fukutomi T., Tsunemitsu H. & Akashi H. (1999). Detection of bovine coronaviruses from adult cows with epizootic diarrhea and their antigenic and biological diversities. *Arch. Virol.* 144, 997-1006.
39. Gabbay Y. B., Borges A. A., Barardi C. R. M., Linhares A. C., Mascarenhas J. D. P., Simoe J. D. P., Glass R. I. & Jiang B. (2006). Excretion profiles of porcine and human group C rotaviruses in children from Belem, Para, Brazil: evidence for interspecies transmission and sequential infections. *Proceedings of the 9th Double Stranded RNA Viruses Meeting, Cape Town, South Africa*, p.

40. Gabbay Y. B., Borges A. A., Oliveira D. S., Linhares A. C., Mascarenhas J. D., Barardi C. R., Simoes C. M., Wang Y., Glass R. I. & Jiang B. (2008). Evidence for zoonotic transmission of group C rotaviruses among children in Belem, Brazil. *J. Med. Virol.* 80, 1666-1674.
41. Ghosh S., Varhese V., Samajdar S., Sinha M., Naik T. N. & Kobayashi N. (2007). Evidence for bovine origin of VP4 and VP7 genes of human group A rotavirus G6P[14] and G10P[14] strains. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2751-2753.
42. Ghosh S., Varghese V., Sinha M., Kobayashi N. & Naik T. N. (2007). Evidence for interstate transmission and increase in prevalence of bovine group B rotavirus strains with a novel VP7 genotype among diarrhoeic calves in Eastern and Northern states of India. *Epidemiol. Infect.* 135, 1324-1330.
43. Ghosh S. & Kobayashi N. (2011). Whole-genomic analysis of rotavirus strains: current status and future prospects. *Future Microbiol.* 6, 1049-1065.
44. Goto T., Kurogi H., Inaba Y. & Matumoto M. (1986). Sequential isolation of rotavirus from individual calves. *Vet. Microbiol.* 11, 177-184.
45. Gouvea V., Glass R. I., Woods P., Taniguchi K., Clark K. F., Forrester B. & Fang Z. (1990). Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28, 276-282.
46. Hayashi M., Nagai M., Hayakawa Y., Takeuchi K. & Tsunemitsu H. (2001). Outbreak of diarrhoea and milk drop in cows infected with bovine group B rotavirus. *Vet. Rec.* 149, 331-332.
47. Hayashi M., Murakami T., Kuroda Y., Takai H., Ide H., Awang A., uzuki T., Miyazaki A., Nagai M. & Tsunemitsu H. Reinfection of adult cattle with rotavirus B during repeated outbreaks of epidemic diarrhea. *Can. J. Vet. Res.* (2016). 80, 189-196.
48. Hoet A. E., Nielsen P. R., Hasoksuz M., Thomas C., Wittum T. E. & Saif L. J.

- (2003). Detection of bovine torovirus and other enteric pathogens in feces from diarrhea cases in cattle. *J. Vet. Diag. Invest.* 15, 205-212.
49. Itou F., Yamaoka K., Ogino T. & Kanbe M. (1995). A PCR method for examining diarrhea--*Escherichia coli*. *Jpn. J. Clin. Pathol.* 43, 772-775.
  50. James V. L., Lambden P. R., Caul E. O. & Clarke I. N. (1998). Enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant human group C rotavirus inner capsid protein (VP6) to detect human group C rotaviruses in fecal samples. *J. Clin. Microbiol.* 36, 3178-3181.
  51. Jeong Y. J., Park S. I., Hosmillo M., Shin D. J., Chun Y. H., Kim H. J., Kwon H. J., Kang S. Y., Woo S. K. & other authors. (2009). Detection and molecular characterization of porcine group C rotavirus in South Korea. *Vet. Microbiol.* 138, 217-224.
  52. Jeong Y., Matthijssens J., Kim D. S., Kim J. Y., Alfajaro M. M., Park J. G., Hosmillo M., Son K. Y., Soliman M. & other authors. (2015). Genetic diversity of the VP7, VP4 and VP6 genes of Korean porcine group C rotaviruses. *Vet. Microbiol.* 176, 61-69.
  53. Jiang B., Tsunemitsu H., Gentsch J. R., Glass R. I., Green K. Y., Qian Y. & Saif L. J. (1992). Nucleotide sequence of gene 5 encoding the inner capsid protein (VP6) of bovine group C rotavirus: comparison with corresponding genes of group C, A, and B rotaviruses. *Virology* 190, 542-547.
  54. Jiang B., Tsunemitsu H., Gentsch J. R., Saif L. J. & Glass R. I. (1993). Nucleotide sequences of genes 6 and 10 of a bovine group C rotavirus. *Nucleic Acids Res.* 21, 2250.
  55. Jiang B., Gentsch J. R., Tsunemitsu H., Saif L. J. & Glass R. I. (1999). Sequence analysis of the gene encoding VP4 of a bovine group C rotavirus: molecular evidence for a new P genotype. *Virus Genes* 19, 85-88.

56. Kanno T., Hatama S., Ishihara R. & Uchida I. (2007). Molecular analysis of the S glycoprotein gene of bovine coronaviruses isolated in Japan from 1999 to 2006. *J. Gen. Virol.* 88, 1218-1224.
57. Kanno T., Kamiyoshi T., Ishihara R., Hatama S. & Uchida I. (2009). Phylogenetic studies of bovine coronaviruses isolated in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 71, 83-86.
58. Kanno T. (2013). Bovine coronavirus disease. In: Akashi H., Eguchi M., Kamio T., Kamomae H., Sakai Y., Haga T. & Manabe N. (eds), *Buiatrics 3rd edn*, pp. 239-240 Kindai Press, Tokyo.
59. 葛城肅仁, 田中知未. 福井県家畜保健衛生所. (2014). 一酪農家で発生した成牛の C 群ロタウイルス病, 平成 25 年度全国家畜保健衛生業績抄録. 9.
60. Kattoor J. J., Saurabh S., Malik Y. S., Sircar S., Dhama K., Ghosh S., Bányai K., Kobayashi N. & Singh R. K. (2017). Unexpected detection of porcine rotavirus C strains carrying human origin VP6 gene. *Vet. QUARTERLY.* 37, 252-261.
61. Kim H.-J. J., Park J.-G. G., Matthijnessens J., Lee J.-H. H., Bae Y.-C. C., Alfajaro M. M., Park S.-I. I., Kang M.-I. I. & Cho K.-O. O. (2011). Intestinal and extra-intestinal pathogenicity of a bovine reassortant rotavirus in calves and piglets. *Vet. Microbiol.* 152, 291-303.
62. Kobayashi K. (1996) Diseases of the intestine. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. In: Murakami D., Motoyoshi S., Hasegawa A., Kawamura S., Naito Y. & Maede Y. (eds). Tokyo: Buneido Press, pp. 189-202.
63. 国立感染症研究所 ロタウイルス感染性胃腸炎とは  
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/3377-rota-intro.html>
64. Kuga K., Miyazaki A., Suzuki T., Takagi M., Hattori N., Katsuda K., Mase M., Sugiyama M. & Tsunemitsu H. (2009). Genetic diversity and classification of

- the outer capsid glycoprotein VP7 of porcine group B rotaviruses. *Arch. Virol.* 154, 1785-1795.
65. Kuzuya M., Fujii R., Hamano M., Yamada M., Shinozaki K., Sasagawa A., Hasegawa S., Kawamoto H., Matsumoto K., Kawamoto A., Itagaki A., Funatsumaru S. & Urasawa S. (1998). Survey of human group C rotaviruses in Japan during the winter of 1992 to 1993. *J. Clin. Microbiol.* 36, 6-10.
  66. Kuzuya M., Fujii R., Hamano M., Nishijima M. & Ogura H. (2007). Detection and molecular characterization of human group C rotaviruses in Okayama Prefecture, Japan, between 1986 and 2005. *J. Med. Virol.* 79, 1219-1228.
  67. Mackow E. R. (1995). Group B and C rotaviruses. In *Infections of the Gastrointestinal Tract*, pp. 983-1008. Edited by M. J. Blaser, P. D. Smith, J. J. Ravdin, H. B. Greenberg, R. L. Guerrant. New York: Raven Press.
  68. Maluquer de Motes C., Clemente-Casares P., Hundesa A. & Girones R. (2004). Detection of bovine and porcine adenoviruses for tracing the source of fecal contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1448-1454.
  69. Marthaler D., Rossow K., Gramer M., Collins J., Goyal S., Tsunemitsu H., Kuga K., Suzuki T., Ciarlet M. & Matthijnssens J. (2012). Detection of substantial porcine group B rotavirus genetic diversity in the United States, resulting in a modified classification proposal for G genotypes. *Virology* 433, 85-96.
  70. Marthaler D., Rossow K., Culhane M., Collins J., Goyal S., Ciarlet M. & Matthijnssens J. (2013). Identification, phylogenetic analysis and classification of porcine group C rotavirus VP7 sequences from the United States and Canada. *Virology* 446, 189-198.
  71. Marthaler D., Suzuki T., Rossow K., Culhane M., Collins J., Goyal S., Tsunemitsu H., Ciarlet M. & Matthijnssens J. (2014). VP6 genetic diversity,

- reassortment, intragenic recombination and classification of rotavirus B in American and Japanese pigs. *Vet. Microbiol.* 172, 359-366.
72. Martella V., Banyai K., Ciarlet M., Iturriza-Gomara M., Lorusso E., De Grazia S., Arista S., Decaro N., Elia G., Cavalli A., Corrente M., Lavazza A., Baselga R. & Buonavoglia C. (2006). Relationships among porcine and human P [6] rotaviruses: evidence that the different human P [6] lineages have originated from multiple interspecies transmission events. *Virology* 344, 509-519.
  73. Martella V., Bányai K., Matthijnssens J., Buonavoglia C. & Ciarlet M. Zoonotic aspects of rotaviruses. (2010). *Vet. Microbiol.* 140, 246-255.
  74. Matsumoto K., Hatano M., Kobayashi K., Hasegawa A., Yamazaki S., Nakata S., Chiba S. & Kimura Y. (1989). An outbreak of gastroenteritis associated with acute rotaviral infection in schoolchildren. *J. Infect. Dis.* 160, 611-615.
  75. Matthijnssens J., Rahman M., Martella V., Xuelei Y., De Vos S., De Leener K., Ciarlet M., Buonavoglia C. & Van Ranst M. (2006). Full genomic analysis of human rotavirus strain B4106 and lapine rotavirus strain 30/96 provides evidence for interspecies transmission. *J. Virol.* 80, 3801-3810.
  76. Matthijnssens J., Ciarlet M., Heiman E., Arijs I., Delbeke T., McDonald S. M., Palombo E. A., Iturriza-Gómara M., Maes P., Patton J. T., Rahman M. & Van Ranst M. (2008). Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J. Virol.* 82, 3204-3219.
  77. Matthijnssens J., Ciarlet M., Rahman M., Attoui H., Bányai K., Estes M. K., Gentsch J. R., Iturriza-Gómara M., Kirkwood C. D., Martella V., Mertens P. P., Nakagomi O., Patton J. T., Ruggeri F. M., Saif L. J., Santos N., Steyer A., Taniguchi K., Desselberger U. & Van Ranst M. (2008). Recommendations for



- the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. Arch. Virol. 153, 1621-1629.
78. Matthijnssens J., Otto P. H., Ciarlet M., Desselberger U. & Van R. M., Johne R. (2012). VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. Arch. Virol. 157, 1177-1182.
  79. Mawatari T., Taneichi A., Kawagoe T., Hosokawa M., Togashi K. & Tsunemitsu H. (2004). Detection of a Bovine Group C Rotavirus from Adult Cows with Diarrhea and Reduced Milk Production. J. Vet. Med. Sci. 66, 887-890.
  80. Mawatari T., Hirano K., Tsunemitsu H. & Suzuki T. (2014). Whole-genome analysis of bovine rotavirus species C isolates obtained in Yamagata, Japan, 2003-2010. J. Gen. Virol. 95, 1117-1125.
  81. Mawatari T., Hirano K., Ikeda H., Tsunemitsu H. & Suzuki T. (2014). Surveillance of diarrhea-causing pathogens in dairy and beef cows in Yamagata Prefecture, Japan from 2002 to 2011. Microbiol. Immunol. 58, 530-535
  82. McNulty M. S. & Logan E. F. (1983). Longitudinal survey of rotavirus infection in calves. Vet. Rec. 113, 333-335.
  83. Megan E. S., Mangkey A. B., Sandy R., Rocky J. B., Wendy B., Hemant N., Binu V., Loyd S., Barbara S. & Alfonso C. (2012). Development and performance evaluation of calf diarrhea pathogen nucleic acid purification and detection workflow. J. Vet. Diagn. Invest. 24, 945-953.
  84. Mihalov-Kovács E., Gellért Á., Marton S., Szilvia L., Farkas E.F., Oldal M., Jakab F., Martella V. & Bányai K. (2015). Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. Emerg. Infect. Dis. 21, 660.
  85. 三竹博道. (2015). ウシにおけるロタウイルス A の存続様式に関する研究, 第三章

ウシ腸間膜リンパ節における RVA の持続性 pp65-89. 岐阜大学大学院連合獣医学研究科(岐阜大学)

86. 宮本剛志, 保田仁美. 富山県東部家畜保健衛生所. (2013). 複数農場で流行した C 群ロタウイルスによる乳用成牛の下痢症. 平成 24 年度全国家畜保健衛生業績抄録. 8.
87. 宮本純子, 澤野一浩. 香川県東部家畜保健衛生所. (2013). C 群ロタウイルスが関与した成牛の下痢症. 平成 24 年度全国家畜保健衛生業績抄録. 15-16.
88. Miyazaki A., Kuga K., Suzuki T. & Tsunemitsu H. (2012). Analysis of the excretion dynamics and genotypic characteristics of rotavirus A during the lives of pigs raised on farms for meat production. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2009-2017.
89. Monini M., Biasin A., Valentini S., Cattoli G. & Ruggeri F. M. (2011). Recurrent rotavirus diarrhoea outbreaks in a stud farm, in Italy. *Vet. Microbiol.* 149, 248-253.
90. Mossel E. C. & Ramig R. F. (2002). Rotavirus genome segment 7 (NSP3) is a determinant of extraintestinal spread in the neonatal mouse. *J. Virol.* 76, 6502-6509.
91. Mossel E. C. & Ramig R. F. (2003). A lymphatic mechanism of rotavirus extraintestinal spread in the neonatal mouse. *J. Virol.* 77, 12352-12356.
92. Mukherjee A., Ghosh S., Bagchi P., Dutta D., Chattopadhyay S., Kobayashi N. & Chawla-Sarkar M. (2011). Full genomic analyses of human rotavirus G4P[4], G4P[6], G9P[19] and G10P[6] strains from North-eastern India: evidence for interspecies transmission and complex reassortment events. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 1343-1346.
93. Mwenda, J. M., Peenze, I., Omollo, E., Galo, M. & Steele, A. D. (2003). Human group C rotaviruses identified in Kenya. *East. Afr. Med. J.* 80, 73-76.
94. 長門正志, 堀澄. 石川県北部家畜保健衛生所. (2005). 牛 C 群ロタウイルスが関与した乳用成牛の下痢症. 平成 16 年度全国家畜保健衛生業績抄録. 54-55.

95. Nakagomi, T., Nakagomi, O., Takahashi, Y., Enoki, M., Suzuki, T. & Kilgore, P. E. (2005). Incidence and burden of rotavirus gastroenteritis in Japan, as estimated from a prospective sentinel hospital study. *J. Infect. Dis.* 192 Suppl 1: S106-110.
96. 中村政幸. (1998). 成牛のサルモネラ症,家畜診療 45,139-151.
97. Natsuaki S., Goto K., Nakamura K., Yamada M., Ueo H., Komori T., Shirakawa H. & Utinuno Y. (2007). Fatal winter dysentery with severe anaemia in an adult cow. *J. Vet. Med. Sci.* 69, 957-960.
98. Nilsson M., Svenungsson B., Hedlund K. O., Uhnöo I., Lagergren A., Akre T. & Svensson L. (2000). Incidence and genetic diversity of group C rotavirus among adults. *J. Infect. Dis.* 182, 678-684.
99. 大竹祥紘, 米山州二. 栃木県中央家畜保健衛生所. (2016). 県内公共牧場におけるC群ロタウイルスをはじめ複数の病原体が関与した牛の集団下痢症. 平成28年度全国家畜保健衛生業績抄録. 5-6.
100. Osborne M. P., Haddon S. J., Worton K. J., Spencer A. J., Starkey W. G., Thornber D. & Stephen J. (1991). Rotavirus-induced changes in the microcirculation of intestinal villi of neonatal mice in relation to the induction and persistence of diarrhea. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 12, 111-120.
101. Page R. D. (1996). TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12, 357-358.
102. Parashar U. D., Gibson C. J., Bresse J. S. & Glass R. I. (2006). Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 304-306.
103. Park J. G., Kim H. J., Matthijnessens J., Alfajaro M. M., Kim D. S., Son K. Y., Kwon H. J., Hosmillo M., Ryu E. H., Kin J. Y., Cena R. B., Lee J. H., Kang M. I., Park S. I. & Cho K. O. (2013). Different virulence of porcine and porcine-like bovine rotavirus strains with genetically nearly identical

- genomes in piglets and calves. *Vet. Res.* 44, 88.
104. Park J.-G. G., Kim D.-S. S., Matthijnessens J., Kwon H.-J. J., Zeller M., Alfajaro M. M., Son K.-Y. Y., Hosmillo M., Ryu E.-H. H., Kin J.-Y. Y., Lee J.-H. H., Park S.-J. J., Kang M.-I. I., Kwon J., Choi J.-S. S. & Cho K.-O. O. (2014). Comparison of pathogenicities and nucleotide changes between porcine and bovine reassortant rotavirus strains possessing the same genotype constellation in piglets and calves. *Vet. Microbiol.* 171, 51-62.
  105. Pen ˆaranda M. E., Cubitt W. D., Sinarachatanant P., Taylor D. N., Likanonsakul S., Saif L. & Glass R. I. (1989). Group C rotavirus infections in patients with diarrhea in Thailand, Nepal, and England. *J. Infect. Dis.* 160, 392-397.
  106. Phan T. G., Leutenegger C. M., Chan R. & Delwart E. (2017). Rotavirus I in feces of a cat with diarrhea. *Virus Genes.* 53, 487-490.
  107. Qiao H., Nilsson M., Abreu E. R., Hedlund K. O. Johansen K., Zaori G. & Svensson L. (1999). Viral diarrhea in children in Beijing, China. *J. Med. Virol.* 57, 390-396.
  108. Radostits O. M., Gay C. C., Blood D. C. & Hinchcliffe K. W. (2000). Diseases of the alimentary tract. In: *Veterinary Medicine: a Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*. 9th edn. London: Harcourt-Brace, pp. 234-246.
  109. Rahman M., Banik S., Faruque A. S., Taniguchi K., Sack D. A., Van Ranst M. & Azim T. (2005). Detection and characterization of human group C rotaviruses in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4460-4465.
  110. Rahman M., Matthijnssens J., Yang X., Delbeke T., Arijs I., Taniguchi K., Iturriza-Gomara M., Iftekharuddin N., Azim T. & Van Ranst M. (2007). Evolutionary history and global spread of the emerging g12 human

- rotaviruses. *J. Virol.* 81, 2382-2390.
111. RCWG. (2016). New 468 Genotypes.  
<https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification469/rcwg>.
  112. Reynolds D. J., Hall G. A., Debney T. G. & Parsons K R. (1985). Pathology of natural rotavirus infection in clinically normal calves. *Res. Vet. Sci.* 38, 264-269.
  113. Richardson A. (1975). Salmonellosis in cattle. *Vet. Rec.* 96, 329-331.
  114. Saif L. J., Bohl E. H., Theil K. W., Cross R. F. & House J. A. (1980). Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. *J. Clin. Microbiol.* 12, 105.
  115. Saif L. J., Brock K. V., Redman D. R. & Kohler E. M. (1991). Winter dysentery in dairy herds: electron microscopic and serological evidence for an association with coronavirus infection. *Vet. Rec.* 128, 447.
  116. Saif L. J. & Jiang B. (1994). Nongroup A rotaviruses of humans and animals. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 185, 339-371.
  117. Saitou N. & Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
  118. Santos N. & Hoshino Y. (2005). Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev. Med. Virol.* 15, 29-56.
  119. Sato K., Carpenter T. E., Case J. T. & Walker R. L. (2001). Spatial and temporal clustering of Salmonella serotypes isolated from adult diarrheic dairy cattle in California. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13, 206-212.
  120. 佐藤圭介, 里麻啓. 新潟県中央家畜保健衛生所. (2013). 一酪農場で発生した C 群ロタウイルスによる牛ロタウイルス病. 平成 24 年度全国家畜保健衛生業績抄録. 7.

121. Sato M., Nakagomi T., Tajima K., Ezura K., Akashi H. & Nakagomi O. (1997). Isolation of serotype G8, P6[1] bovine rotavirus from adult cattle with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1266-1268.
122. Schnagl R. D., Boniface K., Cardwell P., McCarthy D., Ondracek C., Coulson B., Erlich J. & Morey F. (2004). Incidence of group C human rotavirus in central Australia and sequence variation of the VP7 and VP4 genes. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2127-2133.
123. Shepherd F. K., Herrera-Ibata D. M., Porter E., Homwong N., Hesse R., Bai J. & Marthaler D. G. (2018). Whole Genome Classification and Phylogenetic Analyses of Rotavirus B strains from the United States. *Pathogens.* 18, 7.
124. Snodgrass D. R., Herring A. J., Campbell I., Inglis J. M. & Hargreaves F. D. (1984). Comparison of atypical rotaviruses from calves, piglets, lambs and man. *J. Gen. Virol.* 65, 909-914.
125. Soma J., Tsunemitsu H., Miyamoto T., Suzuki G., Sasaki T. & Suzuki T. (2013). Whole-genome analysis of two bovine rotavirus C strain: Shintoku and Toyama. *J. Gen. Virol.* 94, 128-135.
126. Steyer A., Poljsak-Prijatelj M., Barlic-Maganja D. & Marin J. (2008). Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: evidence of interspecies transmission and genome reassortment. *J. Gen. Virol.* 89, 1690-1698.
127. Suzuki R., Hasebe A., Miyazaki A. & Tsunemitsu H. (2014). Phylogenetic characterization of VP6 gene (inner capsid) of porcine rotavirus C collected in Japan. *Infect. Genet. Evol.* 26, 223-227.
128. Swiatek D. L., Palombo E. A., Lee A., Coventry M. J., Britz M. L. & Kirkwood C. D. (2010). Detection and analysis of bovine rotavirus strains circulating in Australian calves during 2004 and 2005. *Vet. Microbiol.* 140, 56-62.
129. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. & Kumar S. (2011).

- MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731-2739.
130. Taniguchi K. (2002). Reovirus diversity of rotavirus and protection against rotavirus infection. *Uirusu* 52, 141-146.
131. 多勢景人, 福田昌治. 埼玉県中央家畜保健衛生所. (2013). 県内 3 酪農家で発生した牛 C 群ロタウイルスによる成牛の下痢症. 平成 24 年度全国家畜保健衛生業績抄録. 5-6.
132. Thompson J. D., Higgins D. G. & Gibson T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
133. Tsunemitsu H., Saif L. J., Jiang B. M., Shimizu M., Hiro M., Yamaguchi H., Ishiyama T. & Hirai T. (1991). Isolation, characterization, and serial propagation of a bovine group C rotavirus in a monkey kidney cell line (MA104). *J. Clin. Microbiol.* 29, 2609-2613.
134. Tsunemitsu H., Jiang B. & Saif L. J. (1992). Detection of group C rotavirus antigens and antibodies in animals and humans by enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2129-2134.
135. Tsunemitsu H., Jiang B. & Saif L. J. (1996). Sequence comparison of the VP7 gene encoding the outer capsid glycoprotein among animal and human group C rotaviruses. *Arch. Virol.* 141, 705-713.
136. Tsunemitsu H., Morita D., Takaku H., Nishimori T., Imai K. & Saif L. J. (1999). First detection of bovine group B rotavirus in Japan and sequence of its VP7 gene. *Arch. Virol.* 144, 805-815.
137. Tsunemitsu H., Kamiyama M., Kawashima K., Katsuda K., Kohmoto M., Saif

- L. J., Shouji T. & Onodera T. (2005). Molecular characterization of the major capsid protein VP6 of bovine group B rotavirus and its use in seroepidemiology. *J. Gen. Virol.* 86, 2569-2575.
138. Vilcek S., Herring A. J., Herring J. A., Nettleton P. F., Lowings J. P. & Paton D. J. (1994). 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.
139. Webster R. G., W. J. Bean, O. T. Gorman, T. M. Chambers & Y. Kawaoka. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 56, 152-179.
140. Yamamoto D., Ghosh S., Kuzuya M., Wang Y. H., Zhou X., Chawla-Sarkar M., Paul S. K., Ishino M. & Kobayashi N. (2011). Whole-genome characterization of human group C rotaviruses: identification of two lineages in the VP3 gene. *J. Gen. Virol.* 92, 361-369.
141. 山根逸郎. (2005). 獣医疫学実用ハンドブック pp.13-14. チクサン出版社. 東京
142. Yang J., Wang T., Wang Y., Lu B., Bai X., Zhang L., Wang M. & Wang H. (2007). Emergence of human rotavirus group a genotype G9 strains, Wuhan, China. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1587-1589.
143. Yee E. L., Jiang B., Kendall R. S., Humphrey C. & Glass R. I. (2006). Group C rotavirus in a pediatric kidney transplant patient with diarrhea. *J. Clin. Virol.* 36, 306-308.
144. Yokoo M., Arisawa K. & Nakagomi O. (2004). Estimation of annual incidence, age-specific incidence rate, and cumulative risk of rotavirus gastroenteritis among children in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57, 166-171.
145. Dharakul T., Riepenhoff-Talty M., Albin B. & Ogra P. L., (1988). Distribution



- of rotavirus antigen in intestinal lymphoid tissues: potential role in development of the mucosal immune response to rotavirus. *Clin. Exp. Immunol.* 74, 14-19.
146. Woode M., Arisawa K. & Nakagomi O. (2004). Estimation of annual incidence, age-specific incidence rate, and cumulative risk of rotavirus gastroenteritis among children in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57, 166-171.
147. 川本聡志 & 谷口孝善. (2014). ロタウイルス. *ウイルス* 64(2), 179-190.