

農場内におけるブタ A 群ロタウイルスの
動態に関する研究

2013年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科

宮崎 綾子

目次

緒言	1
第一章 一養豚場の哺乳豚で繰り返し集団発生した A 群ロタウイルス (RVA) 感染症の分子疫学的解析	6
序論	7
材料および方法	8
調査農場	8
糞便検体	9
細菌学的および寄生虫学的検査	9
RNA 抽出	10
RNA-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (RNA-PAGE)	10
RT-PCR 法による RVA VP7 および VP4 遺伝子の検出	10
RT-PCR 法による RVA 以外の下痢症ウイルス遺伝子の検出	11
塩基配列の解読	12
解読した RVA VP7 および VP4 遺伝子の G および P 遺伝子型別	13
分子系統樹解析	13
解読した塩基配列の GenBank 登録番号	14
結果	15
哺乳豚下痢の発生状況	15
細菌学的および寄生虫学的検査と下痢症ウイルス遺伝子検出結果	15
RNA-PAGE パターンによる検出 RVA の分類	16
RVA VP7 遺伝子の遺伝学的解析と G 遺伝子型別	16

新たな G 型である G26 の同定	17
RVA VP4 遺伝子の遺伝学的解析と P 遺伝子型別	18
RVA G 型および P 型の組み合わせ	19
考察	21
図表	25
第二章 一養豚場の各発育ステージのブタにおける 3 年間にわたる RVA の分子疫学的調査	39
序論	40
材料および方法	41
調査農場	41
糞便検体	41
RNA 抽出	42
RT-PCR 法による RVA VP7 および VP4 遺伝子の検出	42
塩基配列の解読	42
解読した RVA VP7 および VP4 遺伝子の G および P 遺伝子型別	42
分子系統樹解析	43
解読した塩基配列の GenBank 登録番号	43
統計学的解析	43
結果	45
各発育ステージのブタにおける RVA VP7 遺伝子検出率	45
RVA VP7 遺伝子の検出と糞便性状との関連	45
RVA VP7 遺伝子の遺伝学的解析と G 遺伝子型別	45
RVA VP4 遺伝子の遺伝学的解析と P 遺伝子型別	46

G 型および P 型のステージ毎ならびに調査年毎の分布	47
考察	49
図表	51
第三章 一養豚場の肉豚における RVA 遺伝子排泄動態の生後から出荷までの追跡調査	60
序論	61
材料および方法	62
調査農場	62
糞便検体	63
RNA 抽出	63
RT-PCR 法による RVA VP7 および VP4 遺伝子の検出	63
塩基配列の解読	64
解読した RVA VP7 および VP4 遺伝子の G および P 遺伝子型別	64
分子系統樹解析	64
解読した塩基配列の GenBank 登録番号	65
統計学的解析	66
結果	67
RVA VP7 遺伝子の検出率	67
RVA VP7 遺伝子の検出と下痢との関連	67
RVA VP7 遺伝子の遺伝学的解析と G 遺伝子型別	67
RVA VP4 遺伝子の遺伝学的解析と P 遺伝子型別	69
ブタ 10 頭における RVA 排泄パターンと G 型および P 型の変化	71
考察	74

図表	78
結論	93
謝辞	96
引用文献	97

緒言

A 群ロタウイルス (RVA) はヒトやブタおよびウシなどの家畜を含む哺乳類、ならびに鳥類に幅広く感染し、主に若齢個体に下痢や嘔吐を主徴とする急性腸炎を引き起こす (14)。ヒトにおいては、衛生状態や医療体制が十分に整っていないアジア・アフリカ諸国を中心として主に5歳未満の乳幼児約50万人が毎年RVA感染症により死亡している (62)。欧米や日本などの先進国では本病による死亡例は少ないものの、通院および入院治療にかかる医療費は膨大である。日本においてはRVA感染症により5歳未満の乳幼児が年間78,000人入院し、その直接医療費は約100億円と推計されている (51)。このように、本症は公衆衛生上非常に経済的負担の大きな疾病となっている。

RVAは家畜衛生においても重要な病原体であり、ブタ、ウシ、ウマなどの若齢家畜における下痢の主原因である (12, 14)。ブタにおいては、RVAは下痢原性大腸菌やコクシジウムとならんで哺乳豚下痢便から最も高頻度に検出される腸管病原体の一つであり (32, 69)、日本の調査では哺乳豚下痢症例の約40%からRVAが検出されている (33)。RVAは糞便を介して経口感染した後、主に小腸絨毛上皮細胞で増殖し上皮細胞の変性と壊死を引き起こす。絨毛上皮細胞は栄養物の消化吸収と電解質や水分の吸収に大きな役割を果たすことから、栄養の消化吸収不全や水分の吸収阻害が引き起こされ、重症例では嘔吐、水様性下痢、脱水、消瘦などを呈して死に至る。また、死に至らない例においても、下痢による飼料効率の低下に加えて呼吸器病も誘発され、発育が遅延する (71)。RVA感染症は死亡による直接的損失に加え、飼料効率の低下による飼料費の増加ならびに治療にかかる薬剤費および人件費の発生などによる間接的損失を与えることから、本病は養豚経営において経済的損失の大きな疾病となっている (56)。

RVA はレオウイルス科ロタウイルス属に分類されるエンベロープを持たないウイルスで、11本の分節状二本鎖RNAをゲノムとする。これらのRNA分節はウイルス構造蛋白質であるVP1~VP4, VP6とVP7, ならびに非構造蛋白質であるNSP1~NSP5およびNSP6をコードしており、NSP5とNSP6をコードする第11分節を除き1本のゲノム分節が一つのウイルス蛋白質をコードする(14)。ウイルス粒子は約75nmであり、コア、内殻、外殻の三重層から構成される。コアはVP1, VP2およびVP3, 内殻はVP6, そして外殻はVP7とVP4で構成される(14)。内殻蛋白質であるVP6には群抗原が存在し、その抗原性および遺伝学的相違に基づき、ロタウイルスはA群からH群の8群に分類される(46)。現在までに報告されているブタロタウイルスはA群, B群, C群およびE群に分類されるが、E群の報告はごく限られており、主にA群, B群およびC群ロタウイルスが下痢と関連して世界各国で検出されている(33, 39, 70, 71)。哺乳豚下痢より検出されるロタウイルスではA群が最も多く(31, 70)、日本国内でもその60~70%をA群が占める(33)。外殻蛋白質を構成するVP7とVP4はそれぞれ中和抗体を誘導し、感染防御において重要な役割を果たす。VP4はウイルスの宿主細胞への吸着にも関与し、腸管内におけるプロテアーゼの作用によりVP5*とVP8*に開裂することで感染性が高まる(14)。

RVAは、VP7とVP4に存在する中和抗原の反応性によりそれぞれG血清型とP血清型に分類される(14)。近年では、血清型別に用いる標準血清の入手が困難であること、また、シーケンスによる遺伝子解析が比較的安価かつ容易に実施可能となってきたことから、塩基配列の一致率に基づく遺伝子型別が主流となっている(45)。VP7とVP4のどちらにおいても塩基配列の一致率が80%未満の場合に異なる型と定義される(43, 45)。現時点までに、ヒトやその他の哺乳類および鳥類から27種類のG遺伝子型(G1~G27)および35種類のP遺伝子型

(P[1]~P[35]) が報告され、その組合せは非常に多様である (44)。以降、本論文では G 遺伝子および P 遺伝子型を G 型および P 型と記載する。RVA は分節状のゲノムを持つために、複数株が同時に感染すると時に遺伝子分節の組換えである遺伝子再集合を起こす (14)。遺伝子再集合により G 型および P 型を規定する VP7 遺伝子および VP4 遺伝子の交換が生じると G 型と P 型の組合せ (G/P 型) が変化する。遺伝子再集合は RVA が遺伝学的多様性を獲得する上で最も重要なメカニズムとなっている (30, 48)。

検出される G 型と P 型にはある程度の種特異性が確認されることから、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 (14)。しかし、ヒトや動物において他の動物種で主に確認される遺伝子型のウイルスも検出されることから、RVA は時に種間伝播を起こすと考えられる (22, 23, 34, 40)。ヒトにおいては G1~G4 ならびに P[4]と P[8]の組合せが流行株として主に確認されていた。しかし、近年ヒト RVA ワクチンの導入に伴って流行株調査が重点的に実施された結果、従来の流行株に加え、ウシやブタなど家畜で主に確認される遺伝子型をもつ株も検出され、家畜からヒトへのウイルスの種間伝播やヒト由来株と家畜由来株間における遺伝子再集合が起きていることが明らかとなった (5, 6, 13, 29, 47, 50, 57, 59)。このことから、家畜はヒト RVA の新たな流行株の供給源として注視されるようになった。ヒト RVA 感染症対策を推進する上で、ワクチン接種と並行して家畜 RVA の種間伝播リスクを最小限にとどめる必要があると考えられる。しかしながら、家畜における RVA 動態の詳細は不明であるため、有効な種間伝播リスクの低減方法は示されていない。

ブタ RVA はほぼすべての養豚農場に常在するために、ほとんどの母豚が感染歴を有する。哺乳中の子豚は乳汁を介した母子免疫によって感染から防御されるため、ブタ RVA 感染症の発生は 1 週齢以上の哺乳豚や離乳直後のブタで多発

する一方、1 週齢以下の哺乳豚では発生が少なく、発生しても症状は軽度であると考えられてきた (67, 71)。しかし、1990 年代後半より、北米を中心として 1 週齢以下の哺乳豚において RVA 感染症の発生が増加している (11, 26, 38)。疫学調査により、このような RVA 感染症は母豚数の多い農場、また、分娩舎をオールイン・オールアウトで管理している農場で多発する傾向にあることが報告され (11)、飼養管理と RVA 感染症発生の関連性が注目されている。農林水産省の畜産統計 (52) によると、日本においても養豚農場の飼養規模は拡大傾向にあり、一戸あたり飼養頭数は平成元年度の 246 頭が、平成 24 年度は 1,667 頭と約 7 倍に増加している。また、肉豚 1,000 頭以上を飼養する農場の割合も平成元年度の 18.3%から平成 24 年度には 38.8%と約 2 倍になっており、飼養規模の大きな農場も増加傾向にある。農場の規模拡大が進むと共に飼養形態も変化しており、欧米と同様にブタをロット単位で管理するロット生産システムや、疾病対策のために棟あるいは部屋毎にブタの導入と移動を一斉に実施して空舎期間を設けるオールイン・オールアウトシステムなど、多頭飼育に適した飼養管理方法を導入する農場も増加している。これらのことから、日本でも今後 RVA 感染症の発生増加が懸念される。しかし、日本ではブタ RVA 感染症に対するワクチンは市販されていないことから、飼養衛生管理が唯一の対策法となっており、有効な対策法の確立が求められている。

ブタ RVA 流行株の遺伝子型調査が様々な国や地域で広範に実施され、12 種類の G 型 (G1~G6, G8~G12, G26) および 13 種類の P 型 (P[1], P[5]~P[8], P[11], P[13], P[19], P[23], P[26], P[27], P[32], P[34]) と非常に多様な遺伝子型が確認されている (7, 25, 41, 44, 54, 58)。ブタ RVA では調査する時期や地域によって流行株の遺伝子型は異なり、時に非常に多くの遺伝子型が検出され流行株が特定できない例も報告されている (50)。また、ブタ RVA 感染症の集団発生時に確認される

株は農場既存株とは遺伝学的に異なるとの報告もあり、新たな株の出現が本 RVA 感染症の発生要因である可能性が示唆されている (2, 38)。しかし、農場間や農場内におけるブタ RVA の動態について分子疫学的調査を行った報告はごく限られており、RVA 感染症の集団発生と RVA の農場内存続機構に RVA の多様性がどのように関連しているのかは明らかにされていない。

このような背景の下、本研究では、農場内におけるブタ RVA の動態解析により、ブタ RVA 感染症の流行要因やブタ RVA の農場内存続機構を明らかにすることを主な目的とし、以下の課題に取り組んだ。第一章では、一養豚農場の哺乳豚で RVA 感染症が約一年間に繰り返し集団発生した症例において、RVA の G 型と P 型を決定し、ブタ RVA 感染症の集団発生と遺伝子型との関連について検討した。第二章では、国内一養豚農場の様々な発育ステージのブタで検出される RVA について 3 年間にわたる分子疫学的調査を実施し、農場内における RVA の分布と動態について検討した。第三章では、国内一養豚農場の肉豚 10 頭において生後から出荷までの RVA 遺伝子の排泄を個体毎に追跡調査し、同一個体での RVA の排泄動態を検討した。

第一章

一養豚場の哺乳豚において繰り返し集団発生した
RVA 感染症の分子疫学的解析

序論

ブタ RVA は哺乳豚下痢の主原因であり、日本では哺乳豚下痢症例の約 40% から本ウイルスが検出される (33)。現時点までに、ブタ RVA は 12 種類の G 型と 13 種類の P 型が確認され (7, 25, 41, 44, 54, 58)、遺伝学的に非常に多様である。しかし、遺伝学的多様性と RVA 感染症発生との関連については未解明な点が多く残されている。近年, Barreiros ら (2) や Lorenzetti ら (38) は、農場既存株とは遺伝学的に異なる流行株の出現が哺乳豚で RVA 感染症が流行する一因であることを報告した。一方、複数の国々で実施されたブタ RVA 流行株の調査では、同一時期に同一農場で採取した糞便より多様な G/P 型の RVA が確認されている (2, 8)。これらのことから、ブタ RVA 感染症の流行は農場外からの新たな RVA 株の侵入だけでなく、農場内に既存する RVA 株の蔓延に起因するとも考えられる。しかし、これまでに同一農場で継続的に RVA 流行株を調査した報告がなかったため、RVA 流行株の変遷やその由来についてはほとんど不明であった。

そこで、本章では、一養豚農場の哺乳豚で RVA 感染症が約 1 年間に繰り返し集団発生した症例において、検出された RVA の G/P 型別ならびに VP7 および VP4 遺伝子の遺伝学的解析を実施し、RVA 感染症の集団発生と RVA 株の性状との関連について検討した。

材料および方法

調査農場

宮崎県内の母豚約 4,000 頭を飼養する繁殖肥育一貫経営農場において調査を行った。当該農場では、外部からの病原体の侵入リスクを低減させるために厳しい衛生管理を行っていた。すなわち、入場においてヒトはシャワーを浴びたのちに農場専用の衣類と長靴を着用することが義務付けられ、機材は農場に持ち込む前に複合次亜塩素酸系消毒剤またはアルコールによる噴霧消毒を実施していた。繁殖候補豚は自家育成から SPF 農場からの外部導入に変更している途中であり、調査時期には月に一回約 180 頭が導入されていた。繁殖候補豚は 100 日齢で導入後、180 日齢まで繁殖候補豚舎で飼育され、その後、交配・妊娠舎へ移動して他の経産繁殖豚と混合飼育した。繁殖豚は 8 棟の交配・妊娠舎で飼育され、分娩 1 週間前に豚体をヨード系殺菌消毒薬で洗浄した後に分娩舎へ移動した。分娩舎は 14 棟あり、それぞれがオールイン・オールアウトで管理されていた。空舎となった分娩舎は水洗後に複合次亜塩素酸系消毒剤で消毒し、乾燥後は石灰乳塗布により仕上げ消毒が行われていた。24 日齢で離乳したブタは離乳豚舎へ移動後、60 および 105 日齢で育成舎および肥育舎に移動した。離乳舎、育成舎および肥育舎はオールイン・オールアウトで管理されており、離乳舎と育成舎は複合次亜塩素酸系消毒剤で、肥育舎は逆性石鹼で洗浄後の消毒を行っていた。作業者は交配・妊娠舎、分娩舎、離乳舎、育成舎および肥育舎でそれぞれ分かれており、長靴は豚舎毎に専用のもに交換されていたが、肥育舎のみ長靴交換は行われていなかった。

糞便検体

2009年2月から2010年3月にかけて哺乳豚下痢が4回集団発生した。各発生時に発症豚(1腹1頭)より計28検体の直腸便を採取した。採材したブタの頭数、日齢、および母豚の産歴を表1-1に示す。採材したブタの日齢は2~20日齢(中央値:5.5日齢)であり、母豚の産歴は初産~8産(中央値:1.0産)であった。全ての検体は抗生物質による治療を行う前に採材した。検体は採材後直ちに農場より動物衛生研究所まで冷蔵で送付され、細菌学的、寄生虫学および下痢症ウイルスの遺伝子検査に供した。

細菌学および寄生虫学的検査

細菌学的検査は、大腸菌、サルモネラ、および *Clostridium perfringens* を対象に行った。大腸菌の分離には DHL 寒天培地と 5%ヒツジ脱繊維素血液加寒天培地を用いた。一検体あたり大腸菌 10 コロニーを釣菌し、病原因子に関連する遺伝子を標的として PCR 法により検査を行い、病原因子が検出されたものを病原性大腸菌とした。標的遺伝子は易熱性エンテロトキシン (LT) 遺伝子、耐熱性エンテロトキシン (STI, STII) 遺伝子、ベロ毒素 (VT1, VT2) 遺伝子、線毛抗原 (F4, F5, F6, F41, F18), および attaching and effacing 病変に関与する eaeA 遺伝子とした。鋳型 DNA は InstaGene (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて抽出し、各標的遺伝子を PCR 法により増幅した (15, 19, 37)。次に、PCR 産物を TBE バッファー (89 mM Tris, 89 mM ホウ酸, 2 mM EDTA) で作製した 1.5%アガロースゲルで電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色し、UV トランスイルミネーターで遺伝子増幅産物の確認を行った。サルモネラの分離はラポパート培地とハーナーテトラチオン酸塩培地で増菌培養後、ノボビオシン加 DHL 寒天培地を用いて行った。*C. perfringens* の分離 (定量培養) はカナマイシン加 CW

培地を用いて行った。

寄生虫学的検査はコクシジウムとクリプトスポリジウムを対象に常法に従って行った。滅菌蒸留水で10倍希釈した糞便懸濁液からショ糖液遠心浮遊法でオーシストを集め、コクシジウム検査は100倍、クリプトスポリジウム検査は200倍で観察し、オーシストの有無を判定した。

RNA 抽出

採取した糞便に重量の9倍量のEagle's minimum essential medium (EMEM)を加えて10%糞便乳剤を作製後、750 × gで20分間遠心してその上清を回収し、TRIzol LS (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)を用いて総RNAの抽出を行った。なお、抽出毎に陰性対照(EMEM)を置いて抽出を行った。抽出後のRNAは50 μlのRNase/DNase-free waterで溶解し、使用時まで-20°Cで保存した。

RNA-ポリアクリルアミド電気泳動 (RNA-PAGE)

抽出したサンプルRNA 16 μlをSDS-PAGE sample buffer 4 μl (125 mM Tris-HCl (pH6.5), 25% Glycerol, 5% SDS, 0.25% Bromophenol blue)と混合し、市販のプレキャストゲル (e-PAGEL; E-T/R/D7.5L, Atto Corp., Tokyo, Japan) を使用してポリアクリルアミドゲル電気泳動バッファー (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS) 中にて20 mAで110分間電気泳動を行った。泳動終了後、Silver Stain Plus kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) で染色し、RVAのRNA-PAGEパターンの確認を行った (65)。

RT-PCR 法による RVA VP7 および VP4 遺伝子の検出

VP7 遺伝子の検出には表 1 - 2 に示したプライマーペア Beg9/End9 を用いた

(24)。反応液は QIAGEN OneStep RT-PCR kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて作製した。すなわち, 5 ×バッファーを 5 μ l, 10 mM の dNTP を 1 μ l, 50 μ M に調整したフォワードとリバースプライマーを各 0.3 μ l, Enzyme Mix を 1 μ l, そして RNaseOut (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) を 0.3 μ l 加え, 全量を 7.9 μ l となるよう調整した。サンプル RNA 2 μ l に 1 μ l の DMSO および 14.1 μ l の DNase/RNase-free water を加えて計 17.1 μ l とし, 98°C で 5 分間加熱, 4°C に急冷した後, 反応液を 7.9 μ l 加えて全量を 25 μ l とした。反応条件は 45°C で 30 分間の逆転写反応, 95°C で 15 分間の逆転写酵素失活の後, 94°C で 1 分間, 45°C で 2 分間, 72°C で 3 分間を 35 サイクル繰り返し, 最後に 72°C で 10 分間保温した後, 4°C で保存した。TBE バッファーで作製した 2%アガロースゲルで電気泳動した後, エチジウムブロマイドで染色し, UV トランスイルミネーターで遺伝子増幅産物の確認を行った。RT-PCR 反応毎に RNA 抽出時の陰性対照に併せて, RT-PCR 法の陰性対照 (DNase/RNase free water) および陽性対照 (ブタ RVA OSU 株 RNA) を加えて検査を行った。

VP4 遺伝子の VP8*フラグメントの検出には Gentch らの報告したプライマーペア Con3/Con2 を用い (21), 逆転写反応時の温度を 50°C, アニーリング温度を 50°C とし, VP7 遺伝子と同様の方法で実施した。

RT-PCR 法による RVA 以外の下痢症ウイルス遺伝子の検出

RVA 以外に 5 種類の下痢症ウイルス, すなわち, ブタ B 群および C 群ロタウイルス (RVB, RVC), 伝染性胃腸炎ウイルス (TGEV), ブタ流行性下痢ウイルス (PEDV), およびブタサポウイルス (PSV) について表 1 – 2 に示したプライマーペアを使用して RT-PCR 法による遺伝子検出を行った。RVB および RVC の検出には, プライマーペア PBVP7-18U/PBVP7-817L (36) および Cowden

VP7-U1/Cowden VP7-L1063 (66) を用い、逆転写反応温度を 45°C、アニーリング温度を 48°C とし、RVA VP7 遺伝子検出 RT-PCR 法と同様に行った。

TGEV 遺伝子の検出には、S 蛋白質遺伝子を標的としたプライマーペア F1121/R1122 を用い (55)、反応液の調整には RVA と同様に QIAGEN OneStep RT-PCR kit を用いた。すなわち、2 µl のサンプル RNA に 5 ×バッファーを 4 µl、10 mM の dNTP を 0.8 µl、50 µM に調整したフォワードおよびリバースプライマーを各 0.24 µl、Enzyme Mix を 0.8 µl、そして RNaseOut を 0.24 µl 加え、全量を 20 µl とするよう調整した。反応条件は 50°C で 30 分間の逆転写反応、95°C で 15 分間の逆転写酵素失活の後、94°C で 1 分間、50°C で 1 分間、72°C で 1 分間の反応を 35 サイクル繰り返し、最後に 72°C で 10 分間保温し、その後、4°C で保存した。

PEDV 遺伝子の検出は、M 蛋白質遺伝子を標的としたプライマーペア PEDV P1/PEDV P2 を用い (35)、アニーリング温度を 53°C とした以外は TGEV と同様の方法で実施した。また、PSV 遺伝子の検出には、RNA ポリメラーゼ遺伝子を標的としたプライマーペア P290/P110 を使用し (27)、逆転写反応温度を 45°C、アニーリング温度を 48°C として実施した。

塩基配列の解読

RVA VP7 および VP4 遺伝子の増幅産物は MicroSpin S-400 HR Columns (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) で精製した後、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を解読した。シーケンス反応には、RT-PCR 法と同一のプライマーを使用し、BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて、Applied Biosystems 3100 automated DNA sequencer にて行った。TJ4-1 株 VP7 蛋白質コード領域 (CDS) 全長の塩基配列決定には、RT-PCR 法と同一のプライマーに加えて、シーケンス用プライマー TJ4-1 494F (5'-GTA ACC

CAA TGG ACA TTA CAC TG-3') およびTJ4-1 368R (5'- CTA CTG AAA ATG ATG CGA TGT C-3') も使用した。得られた塩基配列の組み立て、編集および解析はMEGA 4 を用いて行った (60) 。

解読したRVA VP7およびVP4遺伝子のGおよびP遺伝子型別

The Rotavirus Classification Working Group (RCWG) が提唱するGおよびP遺伝子型分類基準では、部分配列のみしか得られていない場合、既知の遺伝子型株の塩基配列との一致率が、GおよびP遺伝子型別のカットオフ値である80%を少なくとも2%上回る、すなわち82%を超える場合に同一の遺伝子型とされる (45) 。そこで、解読したVP7およびVP4遺伝子についてBLASTサーチによる相同性検索を行い、上記の分類基準に従ってGおよびP型別を行った。なお、RCWGは、部分的塩基配列を用いたRVAの遺伝子型別の条件として、全open reading frame (ORF) 塩基配列の50%以上かつ500塩基長以上を解読することとしている。OSU株のVP7およびVP4遺伝子のORF全長はそれぞれ981塩基 (GenBank登録番号X04613) および2331塩基 (GenBank登録番号X13190) である。したがって、解読したVP7およびVP4遺伝子がそれぞれ500塩基と1166塩基に満たない場合には推定の遺伝子型とした。

分子系統樹解析

検出株およびGenBankより得た株のVP7またはVP4遺伝子の多重配列整列にはCLUSTAL W法、遺伝学的距離計算にはKimura-2 correction parameterを使用し、近隣結合法により系統樹解析を行った (43) 。系統樹の信頼性は1000回反復によるブーツストラップ確率により評価した。分子系統樹解析はMEGA 4 (60) を用いて行った。

解読した塩基配列のGenBank登録番号

解読したVP7およびVP4遺伝子の塩基配列をGenBankに登録した。登録番号 (accession number) を括弧内に示す。

RVA/Pig-wt/JPN/TJ1-1/2009/G9P[23] (VP7:AB611688, VP4:AB621582) ,
RVA/Pig-wt/JPN/TJ2-1/2009/G9P[13] (VP7:AB611689, VP4:AB621587) ,
RVA/Pig-wt/JPN/TJ2-2/2009/G9P[23] (VP7:AB611690, VP4:AB621583) ,
RVA/Pig-wt/JPN/TJ3-2/2009/G3P[7] (VP7:AB611692, VP4:AB621585) ,
RVA/Pig-wt/JPN/TJ4-1/2010/G26P[7] (VP7:AB605258, VP4:AB621586) ,
RVA/Pig-wt/JPN/TJ4-3/2010/G9P[23] (VP7:AB611691, VP4:AB621584) ,
RVA/Pig-wt/JPN/TJ4-5/2010/G5P[13] (VP7:AB611693, VP4:AB621588) 。

結果

哺乳豚下痢の発生状況

2009年の2月、3月、4月、および2010年3月の計4回哺乳豚下痢が集団発生した。調査農場における通常の下痢発生状況は、約5%の泌乳中母豚において一腹産子のうち1~2頭が発症する程度であった。しかし、集団発生時には、約20%から30%の泌乳中母豚において一腹産子全頭が水様性下痢や脱水症状を呈した。致死率はいずれの発生時でも5%以下であった。1回目と2回目の発生では発症豚の日齢や母豚産歴は様々であったが、3回目と4回目の発生では発症豚のほとんどは初産豚産子で7日齢以下であった(表1-1)。

細菌学および寄生虫学的検査と下痢症ウイルス遺伝子検出結果

細菌学および寄生虫学的検査ならびに下痢症ウイルス遺伝子の検出結果を表1-3に示した。RVA VP7 遺伝子の検出率は1回目の発生で81.8% (9/11)、2回目発生で80.0% (4/5)、3回目発生で100% (5/5)、4回目発生では85.7% (6/7)、合計で85.7% (24/28)であった。一方、その他の腸管病原体は4検体でのみ確認された。すなわち、1回目発生時には2検体(TJ1-3およびTJ1-9)でブタRVB遺伝子が、2回目発生時には1検体(TJ2-4)でブタコクシジウム(*Isospora suis* および *Eimeria porci*) が、そして4回目発生時には1検体(TJ4-7)でブタRVC遺伝子が検出された。その他の腸管病原体が検出された4検体のうち、4回目発生時のTJ4-7を除く3検体ではRVAも検出された。

4回の発生いずれにおいても高頻度にRVA遺伝子が検出されたことから、これらの発生にはRVAが関与していたことが明らかとなった。

RNA-PAGE パターンによる検出 RVA の分類

RT-PCR 法で RVA VP7 遺伝子が検出された 24 検体中 22 検体で RVA の RNA 分節泳動パターンが確認された。これらの検体で確認された RVA の泳動パターンはすべて、ブタ RVA 代表株である OSU 株と同様のロングパターンであり、遺伝子分節移動度の差異により図 1-1 に示すように 6 つの electropherotype (eI~eVI) に分類された。1 回目の発生時には 1 種類 (eI) , 2 回目では 2 種類 (eI, eII) , 3 回目では 1 種類 (eIII) , そして 4 回目発生時には 3 種類 (eIV, eV, eVI) の electropherotype が確認され、1 回目と 2 回目発生で確認された eI を除き、発生毎に異なる electropherotype が確認された (表 1-3) 。いずれの検体でも複数株の RVA に感染していることを示唆する泳動パターンは確認されなかったが、1 回目発生時の 2 検体 (TJ1-3 および TJ1-9) では RVA と RVB の混合感染を示唆する泳動パターンが確認された (データ掲載せず) 。

RVA VP7 遺伝子の遺伝学的解析と G 遺伝子型別

RVA VP7 遺伝子が検出された 24 検体中 15 検体で OSU 株 VP7 遺伝子 (GenBank 登録番号 X04613) の 74~1,001 番目に相当する 928 塩基長の塩基配列を決定した。BLAST サーチによる相同性検索と各 G 型代表株を含めた分子系統樹解析により、15 株中 11 株は G9 型、2 株は G3 型、そして 1 株は G5 型に分類された。残る 1 株の VP7 遺伝子は型別不能であった (図 1-2, 表 1-3) 。

G9, G3, および G5 型検出株について、GenBank より得た同 G 型代表株の VP7 遺伝子を含めてより詳細な分子系統樹解析を行った (図 1-3) 。

11 株の G9 型 VP7 遺伝子のうち、8 株 (TJ1-1, TJ1-2, TJ1-3, TJ1-7, TJ1-8, TJ1-9, TJ1-10 および TJ1-11) は 1 回目、2 株 (TJ2-1 および TJ2-2) は 2 回目、残る 1 株 (TJ4-3) は 4 回目発生で確認された。これら 11 株の VP7 遺伝子の塩基配列一致

率は 99.4~100%であった。G9 型の検出株は系統樹において Collins らの分類 (8) で lineage III および VI を形成するヒトおよびブタ由来 G9 型株とおなじクラスターに分類された。G9 型検出株と lineage VI を形成する日本のブタ由来 G9 型株である Hokkaido-14, JP35-7, JP16-3, JP32-4, および JP3-6 株との塩基配列一致率は 90.7~92.3%, 中国および日本のヒト由来 G9 型株である t203 および K-1 株に対して 92.5~93.4%の塩基配列一致率を示した (表 1 - 4)。一方, その他の lineage を形成する株に対しては 87.3~91.0% の塩基配列一致率であった。

G3 型の 2 株 (TJ3-2 および TJ3-4) は 3 回目発生時に確認された。TJ3-2 株および TJ3-4 株の VP7 遺伝子の塩基配列一致率は 100%であった。これら 2 株は系統樹において Martinez-Laso らの分類 (42) で lineage I を形成するブタおよびヒト由来 G3 型ウイルスに遺伝学的に近縁であり, タイ国のブタ由来 G3 型株である CMP039 株に 92.3~92.4%, 米国および日本のヒト由来 G3 型株である CC425 および YO 株に 89.5~90.5%の塩基配列一致率を示した (表 1 - 5)。その他の lineage を形成する株に対しては, 80.1~82.3%の塩基配列一致率であった。

G5 型 1 株 (TJ4-5) は 4 回目発生時に確認された。ヒト, ブタおよびウマ由来 G5 型株との系統樹解析を行った結果, TJ4-5 株は da Silva らの分類 (9) で lineage III を構成するヒトおよびブタ由来 G5 型ウイルスと共にクラスターを形成した。しかし, TJ4-5 株 VP7 遺伝子の塩基配列一致率は lineage III を形成するブタおよびヒト由来株に対して 87.6~88.7%, その他の lineage を形成するヒト, ウマおよびブタ由来株に対して 86.0~88.1%と低い値であった (表 1 - 6)。

新たな G 型である G26 の同定

G 型別が不能であった 1 株 (TJ4-1) は 4 回目の発生で確認された (図 1 - 2)。BLAST サーチによる相同性検索において, TJ4-1 株の VP7 遺伝子はタイ国の小児

下痢便より検出された 57vp7w 株 (GenBank 登録番号 DQ674932) (64) に最も高い塩基配列一致率 (93.1%) を示した。分子系統樹解析においても, TJ4-1 株および 57vp7w 株は, G3 型株と近縁であるが明確に区別される枝を形成した (図 1-3)。また, TJ4-1 株と 57vp7w 株の VP7 遺伝子は G3 型代表株に対してそれぞれ最大で 79.3%と 78.6%の塩基配列一致率しか示さなかった (表 1-5)。より詳細な解析を行うため, TJ4-1 株の VP7 遺伝子 CDS 全長の塩基配列を決定した。その結果, VP7 CDS 全長は 981bp であり, 326 個のアミノ酸をコードすることが予測された。得られた配列を既知の G1~G25 型代表株と比較した結果, G3 型 RRV 株に対して塩基配列で 80.2%, アミノ酸配列で 87.5%と最も高い一致率を示した (表 1-7)。一方, その他の G 型代表株との一致率は塩基配列で 61.1~78.1%, アミノ酸配列で 57.2~85.3%と低値を示した。RCWG は G 型の分類にあたり, 塩基配列一致率 80%をカットオフ値としている。最も一致率の高かった G3 型株に対する一致率がこのカットオフ値と近い値であったことから, RCWG へ配列情報を送付した。その結果, 当該遺伝子は新しい G 型である G26 と認定された (44)。

RVA VP4 遺伝子の遺伝学的解析と P 遺伝子型別

RVA VP7 遺伝子が検出された 24 検体中 13 検体で OSU 株 VP4 遺伝子 (GenBank 登録番号 X04613) の 70~843 番目に相当する 774 塩基長の塩基配列を決定した。BLAST サーチによる相同性検索と各 P 型代表株を含めた分子系統樹解析により, 13 株中 8 株は P[23]型, 3 株は P[7]型, そして 2 株は P[13]型に分類された (図 1-4, 表 1-3)。なお, 今回解読した VP4 塩基配列の長さは RCWG の提唱する基準に満たなかったため, 全て推定とした。

P[23]型検出株 8 株のうち, 6 株 (TJ1-1, TJ1-2, TJ1-7, TJ1-8, TJ1-10, および TJ1-11) は 1 回目, 1 株 (TJ2-2) は 2 回目, 残る 1 株 (TJ4-3) は 4 回目発生で確認

された。これら 8 株の VP4 遺伝子の塩基配列一致率は 99.7~100%と高く、分子系統樹では日本のブタ由来 P[23]型株である GUB7 株に遺伝学的に近縁な単一の枝を形成した。GUB71 株に対しては 91.0%, その他の P[23]型代表株に対しては 79.6~89.7%の塩基配列一致率を示した (表 1 - 8)。

P[7]型検出株 3 株のうち, 2 株 (TJ3-2 および TJ3-4) は 3 回目の発生時, 1 株 (TJ4-1) は 4 回目発生時に確認された。これら 3 株の VP4 遺伝子の塩基配列一致率は 99.7~100%であり, 分子系統樹において, ブタ P[7]型株代表株である OSU 株や中国および韓国のブタまたはウシ由来 P[7]型株と遺伝学的に近縁な単一の枝を形成した。これらの P[7]型株には 86.4~94.5%の塩基配列一致率を示した (表 1 - 9)。

一方, 2 回目発生時 (TJ2-1) と 4 回目発生時 (TJ4-5) に確認された P[13]型検出株間の塩基配列一致率は 80.3%と低く, 分子系統樹においてもこれらは区別された。TJ2-1 株はブタ由来 P[13]型の日本検出株 (FGP28, FGP35, FGP36 および GUB72 株) ならびに海外検出株 (CMP178, CMP213 および HP140 株) と同じクラスターに分類されたが, TJ2-1 株とこれら 7 株の塩基配列一致率は 83.3~84.6%と低値を示した。一方, TJ4-5 株はブタ由来 P[13]型のアイルランド検出株である 2B/05/Ire 株ならびに日本検出株である JP35-7 および JP13-3 株と同じクラスターに分類され, これら 3 株と 89.0%の塩基配列一致率を示した (表 1 - 10)。

RVA の G 型と P 型の組み合わせ

1 回目の発生では G9P[23], 2 回目の発生では G9P[13]および G9P[23], 3 回目の発生では G3P[7], そして 4 回目の発生では G26P[7], G9P[23], および G5P[13]と, 計 5 種類の G/P 型が確認された (表 1 - 4)。

G9P[23]型株および G9P[13]型株の VP7 遺伝子は塩基配列の一致率が 99.4%以

上と極めて近縁であったが、両者の P 型は異なっていた。同様に、G3P[7] 型株および G26P[7] 型株での VP4 遺伝子の塩基配列一致率は 99.7%以上と非常に近縁であったが、G 型は異なっていた。

考察

本章では、まず、約1年間に4回繰り返し集団発生した哺乳豚下痢での RVA の関与を明らかにし、次に VP7 および VP4 遺伝子の塩基配列解析により、下痢に関与した RVA は遺伝学的に多様であることを明らかにした。

本調査では、農場における飼養頭数に対して採材頭数が少なく、また、約半数の RVA VP7 遺伝子陽性例において VP7 あるいは VP4 遺伝子の塩基配列が決定できなかった。このような調査上の限界があったものの、4回の発生で少なくとも4種類の G 型 (G3, G5, G9, G26) と3種類の P 型 (P[7], P[13], P[23]), 5種類の G/P 型 (G3P[7], G5P[13], G9P[13], G9P[23], G26P[7]; 表1-3), そして6種類の electropherotype (eI~eVI; 図1-1) が確認され、4回の発生に関与した RVA は遺伝学的に多様であることが示された。さらに、下痢は集団発生であったこと、また、発生毎に異なる G/P 型をもつ RVA が検出される傾向が確認されたことから、遺伝学的に異なる RVA 株が分娩舎に出現したことによって RVA 感染症が繰り返し集団発生した可能性が考えられた。

G26 型を除いて、本調査で確認された G 型および P 型は世界各国のブタで広く確認されている遺伝子型であったが (8, 53, 59, 63), 検出株の VP7 および VP4 遺伝子の塩基配列はこれまでに検出された株とは遺伝学的に区別されることが確認された。この結果は、日本の養豚農場に浸潤する RVA 株の遺伝学的多様性を示すものと考えられた。

遺伝学的に異なる RVA が同一時期に農場内に複数存在することはこれまでも報告されている。すなわち、Collins らは同時期に同一農場の哺乳豚および離乳豚から2株~6株の RVA を確認しており (8), また、Barreiros らは一農場における下痢流行例より3株の RVA を検出している (2)。このような農場内に

おける RVA の遺伝学的多様性は、外部から農場内への新たな株の侵入により生じた可能性が考えられる。しかしながら、本調査によって、農場既存 RVA 株間での遺伝子再集合により遺伝学的多様性を獲得している可能性も新たに示された。すなわち、本調査で検出された G9P[23] 型 8 株と G9P[13]型 1 株の VP7 遺伝子はほぼ同一であったが、異なる P 型との組み合わせが確認された (表 1 - 3)。同様に、G3P[7] 型 2 株と G26P[7]型 1 株の VP4 遺伝子はほぼ同一であったが、異なる G 型との組み合わせが確認された (表 1 - 3)。RNA-PAGE で確認できないレベルで複数株 RVA の混合感染が起きていた可能性も完全には否定できないが、今回の成績は、農場内の RVA 株で遺伝子再集合を起こすことによって遺伝学的多様性を獲得し、その結果、群免疫から逃れた株が農場で蔓延する可能性を示していると考えられた。

Dewey らは、母豚数の多い農場、また、分娩舎をオールイン・オールアウト管理している農場で RVA 感染症が多く発生する傾向があることを報告している (11)。子ブタにおける RVA 感染症は、通常経口的に侵入するウイルス量が、母豚の初乳や乳汁を介して受け取る受動免疫の防御レベルを超える場合に発生すると考えられている。そのため、下痢の発症日齢や重症度は、母豚の免疫レベルや子ブタのウイルス暴露量に影響を与えるような飼養管理 (豚舎や豚房の形態など) や衛生管理に大きく影響を受ける (71)。本研究で調査した農場は母豚約 4,000 頭を飼養する大規模農場であり、母豚は 8 棟の妊娠舎と 14 棟の分娩舎に分かれて飼養されていた。また、分娩舎はオールイン・オールアウトで管理されており、子ブタの離乳と母豚の移動により豚舎が空になった後、豚舎全体を洗浄消毒した後完全に乾燥させ、さらに石灰乳により仕上げの消毒を行っていた。また、分娩 1 週間前の妊娠母豚は豚体を消毒した後に分娩房へ導入されていた。このような厳しい衛生管理と母豚の分離飼育により、母豚のウイルス暴露の機会

や暴露ウイルス株が不均一となったために、母豚の RVA に対する免疫レベルも一定でなかったとも推察された。下痢の発生毎に子ブタの発症日齢やその母豚産歴が異なっていたのは (表 1-1) , 子ブタが母豚から受け取った乳汁免疫, すなわち母豚の RVA に対する免疫レベルの不均一さを反映したものと考えられた。RVA 感染症の発生低減には, 母豚群の免疫レベルを均一化するような免疫賦与と哺乳豚への暴露ウイルス量を低減させる衛生管理が重要であると考えられた。

ブタで主に検出される G 型や P 型のウイルスがヒトから頻繁に検出されることが報告されている (5, 6, 13, 23, 68) 。このことから, ブタはヒト RVA 流行株の多様性を拡大させるウイルス供給源である可能性が示唆されている。今回の調査において新たに同定された G26 型の TJ4-1 株 VP7 遺伝子はヒト由来 57vp7w 株と最も高い塩基配列一致率 (93.1%) を示した。分子系統樹においてもこれら 2 株は同じクラスターを形成して遺伝学的に近縁であったことから, 57vp7w 株は G26 型に属すると考えられた。G26 型の起源がブタかヒトかは不明であるが, TJ4-1 株の VP4 遺伝子はブタ由来 P[7]型株の VP4 遺伝子に最も近縁であることから, TJ4-1 株はブタ由来株である可能性が高いとも考えられた。また, 57vp7w 株の VP4 遺伝子 (GenBank 登録番号 DQ674935) はブタ由来 P[19]型株の VP4 遺伝子と最も近縁であることから, 57vp7w 株はブタ由来, またはブタ由来株とヒト由来株の遺伝子再集合体であると考えられた。

本研究により, 国内一養豚場の哺乳豚で繰り返し集団発生した下痢から検出された RVA は遺伝学に多様であることを明らかにした。また, RVA の多様性は外部からの新しい株の侵入だけでなく, 農場内株間での遺伝子再集合によっても獲得されている可能性が示された。さらに, 発生は集団発生であったこと, 発生毎に異なる G/P 型をもつ RVA が検出される傾向が確認されたことから, 遺

伝学的性状の異なる RVA 株が分娩舎に出現したことにより RVA 感染症が集団発生した可能性が考えられた。今後、遺伝学的性状の異なる RVA 株の由来を解明するため、RVA の農場内での動態を詳細に調査する必要があると考えられた。

表 1 - 1 哺乳豚下痢集団発生時に採材したブタの頭数、日齢および母豚産歴

発生	発生年月	採材頭数	日齢	母豚産歴
1	2009 年 2 月	11	4-10 (7.0) *	1-7 (4.0)
2	2009 年 3 月	5	6-20 (9.0)	1-8 (6.0)
3	2009 年 5 月	5	2-5 (4.0)	1-1 (1.0)
4	2010 年 3 月	7	3-7 (5.0)	1-3 (1.0)
計		28	2-20 (5.5)	1-8 (1.0)

* 最小値－最大値 (中央値)

表 1 - 2 RT-PCR 法によるブタ下痢症ウイルス遺伝子検出用プライマー

標的 ウイルス	標的 遺伝子	プライマー名	配列 (5' - 3')	参考文献
ブタ A 群 ロタウイルス	VP7	Beg9	GGTCACATCATCAAAC TCTAATCT	(24)
		End9	GGCTTTAAAGAGAGAA TT C	
	VP4	Con3	TGGCTTCGCCATTTTAT AGACA	(21)
		Con2	ATTTCCGGACCATTTATA ACC	
ブタ B 群 ロタウイルス	VP7	PBVP7 -18U	GCGTTGCCACTGCTTC TC	(36)
		PBVP7 -816L	TTTTTATTGGCTTCGGC TACTC	
ブタ C 群 ロタウイルス	VP7	Cowden VP7-U1	GGCATTTAAAAAGAAG AGCTG	(66)
		Cowden VP7-L1063	AGCCCATGATCTTGTTT ACGC	
伝染性胃腸炎 ウイルス	スパイク (S) 蛋白	F1121	TATTTGTGGTYGTGGTY GTAATGC	(55)
		R1122	GGCTGTTTGGTAACTAA TTTRCCA	
ブタ流行性下 痢ウイルス	メンブレン (M) 蛋白	PEDV P1	TTCTGAGTCACGAACA GCCA	(35)
		PEDV P2	CATATGCAGCCTGCTCT GAA	
ブタサポウイ ルス	RNA 依存 RNA ポリメ ラーゼ	P290	GATTACTCCAAG TGGGACTCCAC	(27)
		P110	ACDATYTCATCATCACC ATA	

表 1 - 3 哺乳豚下痢発生時に検出された RVA の electropherotype, G 型および推定 P 型, ならびにその他の腸管病原体

発生	検体	RVA			その他の腸管病原体
		Electro-Pherotype	G 型	P 型 ^{a)}	
1	TJ1-1	eI	G9	P[23]	-
	TJ1-2	eI	G9	P[23]	-
	TJ1-3	eI	G9	nd	ブタ B 群ロタウイルス
	TJ1-4	- ^{b)}	-	-	-
	TJ1-5	-	-	-	-
	TJ1-6	-	nd ^{c)}	nd	-
	TJ1-7	-	G9	P[23]	-
	TJ1-8	eI	G9	P[23]	-
	TJ1-9	eI	G9	nd	ブタ B 群ロタウイルス
	TJ1-10	eI	G9	P[23]	-
	TJ1-11	eI	G9	P[23]	-
2	TJ2-1	eII	G9	P[13]	-
	TJ2-2	eI	G9	P[23]	-
	TJ2-3	eI	nd	nd	-
	TJ2-4	eII	nd	nd	<i>Eimeria porci</i> および <i>Isospora suis</i>
	TJ2-5	-	-	-	-
3	TJ3-1	eIII	nd	nd	-
	TJ3-2	eIII	G3	P[7]	-
	TJ3-3	eIII	nd	nd	-
	TJ3-4	eIII	G3	P[7]	-
	TJ3-5	eIII	nd	nd	-
4	TJ4-1	eIV	G26 ^{d)}	P[7]	-
	TJ4-2	eIV	nd	nd	-
	TJ4-3	eV	G9	P[23]	-
	TJ4-4	eV	nd	nd	-
	TJ4-5	eVI	G5	P[13]	-
	TJ4-6	eV	nd	nd	-
	TJ4-7	-	-	-	ブタ C 群ロタウイルス

a) 解読した VP4 塩基配列長が RCWG の基準に満たないため, P 型は推定である。

b) RNA-PAGE または RT-PCR 法により RVA 電気泳動パターンまたは遺伝子増幅が確認されなかった検体

c) RT-PCR 法では遺伝子増幅が確認されたが, ダイレクトシーケンスで得られた波形データから塩基配列が決定できなかった検体

d) 本調査で同定された新規 G 型

表 1 - 4 G9 型検出株の GenBank より得た同型代表株に対する VP7 塩基配列一致率

Lineage	代表株	各検出株に対する塩基配列一致率 (%)										
		TJ1-1	TJ1-2	TJ1-3	TJ1-7	TJ1-8	TJ1-9	TJ1-10	TJ1-11	TJ2-2	TJ2-1	TJ4-3
G9-I	RVA/Human-tc/JPN/AU32/1985/G9P[8]	89.1	89.1	89.1	89.1	89.1	89.1	89.1	89.1	89.1	88.8	89.2
G9-II	RVA/Human-tc/IND/116E/1985/G9P[11]	87.6	87.6	87.6	87.6	87.6	87.6	87.6	87.6	87.6	87.3	87.4
G9-III	RVA/Human-xx/THA/Mc345/G9P[X]	91.0	91.0	91.0	91.0	91.0	91.0	91.0	91.0	91.0	90.7	90.9
G9-IV	RVA/Human-wt/USA/OM46/1998/G9P[8]	89.9	89.9	89.9	89.9	89.9	89.9	89.9	89.9	89.9	89.9	89.8
G9-V	RVA/Human-xx/CHN/97SZ37/XXXX/G9P[X]	89.5	89.5	89.5	89.5	89.5	89.5	89.5	89.5	89.5	89.2	89.4
G9-IV	RVA/Pig-wt/JPN/Hokkaido-14/2001/G9P[23]	91.4	91.4	91.4	91.2	91.4	91.4	91.4	91.4	91.4	91.2	91.9
	RVA/Pig-wt/JPN/JP35-7/2002/G9P[13]	92.5	92.5	92.5	92.3	92.5	92.5	92.5	92.5	92.5	92.3	92.4
	RVA/Pig-wt/JPN/JP16-3/2002/G9P[23]	90.7	90.7	90.7	90.7	90.7	90.7	90.7	90.7	90.7	90.7	91.2
	RVA/Pig-wt/JPN/JP32-4/2002/G9P[23]	91.4	91.4	91.4	91.4	91.4	91.4	91.4	91.4	91.4	91.2	91.3
	RVA/Pig-wt/JPN/JP3-6/2002/G9P[6]	92.3	92.3	92.3	92.0	92.3	92.3	92.3	92.3	92.3	92.0	92.1
	RVA/Human-xx/JPN/K-1/XXXX/G9P[X]	92.8	92.8	92.8	92.8	92.8	92.8	92.8	92.8	92.8	92.5	92.7
	RVA/Human-xx/CHN/t203/XXXX/G9P[X]	93.4	93.4	93.4	93.1	93.4	93.4	93.4	93.4	93.4	93.1	93.2

各検出株に対して最も高い塩基配列一致率を太字で示した。株名は RVA/由来動物種-由来材料 (wt, 野外材料; tc, 細胞分離株) / 分離国/株名/分離年/G 型と P 型を表す。

表 1 - 5 G3 および G26 型検出株, ならびに 57vp7w 株の GenBank より得た G3 型代表株に対する VP7 塩基配列一致率

Lineage	代表株	塩基配列一致率 (%)			
		TJ3-2 (G3)	TJ3-4 (G3)	TJ4-1 (G26)	57vp7w
G3-I	RVA/Human-tc/JPN/YO/1977/G3P[8]	89.6	89.5	74.9	73.8
	RVA/Human-xx/USA/CC425/2001/G3P[9]	90.5	90.3	75.0	74.2
	RVA/Pig-wt/THA/CMP039/2002/G3P[19]	92.4	92.3	75.6	75.6
G3-II	RVA/Simian-tc/USA/RRV/1975/G3P[3]	82.3	82.2	79.3	78.6
G3-III	RVA/Dog-wt/ITA/RV198/95/2001/G3P[3]	80.8	80.7	76.7	76.7
G3-IV	RVA/Rabbit-wt/ITA/160/01/2001/G3P[22]	80.2	80.1	75.7	75.6

各検出株に対して最も高い塩基配列一致率を太字で示した。株名は RVA/由来動物種-由来材料 (wt, 野外材料; tc, 細胞分離株) / 分離国/株名/分離年/G 型と P 型を表す。

表 1 - 6 G5 型検出株の GenBank より得た同型代表株に対する VP7 塩基配列一致率

Lineage	代表株	塩基配列一致率
		(%)
		TJ4-5
G5-I	RVA/Pig-wt/THA/CMP178/200X/G5P[X]	86.9
	RVA/Human-tc/BRA/IAL-28/1992/G5P[8]	86.0
G5-II	RVA/Horse-tc/GBR/H-1/1983/G5P[7]	87.2
	RVA/Pig-wt/VEN/A46/1985/G5P[X]	86.6
	RVA/Pig-tc/USA/OSU/1977/G5P9[7]	88.1
	RVA/Pig-wt/ITA/344/04-1/2004/G5P[27]	86.2
G5III	RVA/Pig-tc/ARG/C134/1986/G5P[9]	87.6
	RVA/Human-wt/CHN/LL3354/2000/G5P[6]	88.7
	RVA/Pig-wt/IRL/10/07/Ire/2007/G5P[X]	88.4

各検出株に対して最も高い塩基配列一致率を太字で示した。株名は RVA/由来動物種-由来材料 (wt, 野外材料; tc, 細胞分離株)/分離国/株名/分離年/G型と P型を表す。

表 1 - 7 TJ4-1 株と既知の G 型代表株の VP7 遺伝子間における塩基配列とアミノ酸配列の一致率

G 型	代表株	GenBank 登録番号	TJ4-1 株に対する 一致率 (%)	
			塩基配列	アミノ酸 配列
G1	RVA/Human-tc/JPN/KU/1978/G1P[8]	D16343	75.2	82.0
G2	RVA/Human-tc/JPN/S2/1980/G2P[x]	M11164	73.8	75.2
G3	RVA/Simian-tc/USA/RRV/1975/G3P[3]	V01546	80.2	87.5
G3	RVA/Simian-tc/ZAF/SA11/1958/G3P[2]	EU636932	77.7	85.3
G4	RVA/Pig-tc/USA/Gottfried/1983/G4P[6]	X06759	72.9	74.6
G5	RVA/Pig-tc/USA/OSU/1977/G5P9[7]	X04613	76.9	81.3
G6	RVA/Cow-tc/GBR/UK/1973/G6P[5]	X00896	74.7	82.0
G7	RVA/Chicken-tc/IRL/Ch-2/1979/G7P[x]	X56784	64.7	59.3
G8	RVA/Cow-tc/THA/A5/1990/G8P[1]	D01054	74.8	78.0
G9	RVA/Human-tc/IND/116E/1985/G9P[11]	L14072	77.0	81.3
G10	RVA/Cow-tc/JPN/KK3/1983/G10P[11]	D01056	74.6	80.7
G11	RVA/Pig-tc/MEX/YM/1983/G11P[7]	M23194	75.4	82.0
G12	RVA/Human-tc/PHL/L26/1987/G12P[4]	M58290	73.6	78.9
G13	RVA/Horse-tc/GBR/L338/1991/G13P[18]	D13549	75.2	79.2
G14	RVA/Hourse-tc/JPN/CH13/1994/G14P[12]	D25229	78.1	81.0
G15	RVA/Cow-tc/IND/Hg18/1995/G15P[21]	AF237666	74.2	76.5
G16	RVA/Mouse-tc/USA/EW/1986/G16P[16]	U08430	74.2	82.3
G17	RVA/Turkey-tc/IRL/Ty-1/1979/G17P[17]	S58166	64.7	60.6
G18	RVA/Pigeon-tc/JPN/PO-13/1983/G18P[17]	D82979	64.7	57.5
G19	RVA/Chicken-tc/DEU/02V0002G3/2002/G19P[30]	FJ169861	63.1	57.2
G20	RVA/Human/wt/ECU/Ecu534/2006/G20P[28]	EU805775	74.6	81.0
G21	RVA/Cow-wt/JPN/AzuK-1/2006/G21P[29]	AF454421	73.5	74.6
G22	RVA/Turkey-tc/DEU/03V0002E10/2003/G22P[35]	EU486973	61.1	58.3
G23	RVA/Pheasant-wt/HUN/Phea14246/2008/G23P[X]	FN393056	64.5	58.5
G24	RVA/Cow-tc/JPN/Dai-10/2007/G24P[33]	AB513837	71.4	73.2
G25	RVA/Bat-wt/KEN/KE4852/07/2007/G25P[6]	GU983676	71.6	77.4

各 G 型代表株に対して最も高い一致率を太字で示した。株名は RVA/由来動物種-由来材料 (wt, 野外材料; tc, 細胞分離株) /分離国/株名/分離年/G 型と P 型を表す。

表 1 - 8 推定 P[23]型検出株の GenBank より得た同型代表株に対する VP4 塩基配列一致率

代表株	塩基配列一致率 (%)							
	TJ1-1	TJ1-2	TJ1-7	TJ1-8	TJ1-10	TJ1-11	TJ2-2	TJ4-3
RVA/Pig-wt/ESP/34461-4/2003/G2P[23]	88.1	88.1	88.1	88.1	88.1	88.1	88.1	87.8
RVA/Pig-wt/JPN/GUB71/2006/G4P[23]	91.0	91.0	91.0	91.0	91.0	91.0	91.0	91.0
RVA/Pig-wt/JPN/JP16-3/2002/G9P[23]	89.5	89.5	89.5	89.5	89.5	89.5	89.5	89.7
RVA/Pig-wt/JPN/JP32-4/2002/G9P[23]	89.4	89.4	89.4	89.4	89.4	89.4	89.4	89.4
RVA/Pig-wt/JPN/Hokkaido-14/2001/G9P[23]	85.9	85.9	85.9	85.9	85.9	85.9	85.9	85.6
RVA/Pig-wt/KOR/06-285/2006/G9P[23]	89.1	89.1	89.1	89.1	89.1	89.1	89.1	89.4
RVA/Pig-wt/JPN/GUB46/2006/G9P[23]	88.5	88.5	88.5	88.5	88.5	88.5	88.5	88.5
RVA/Pig-tc/VEN/A34/1985/G5P[23]	79.9	79.9	79.9	79.9	79.9	79.9	79.9	79.6

解読した VP4 塩基配列長が RCWG の基準に満たないため、P[23]型検出株の P 型は推定である。各検出株に対して最も高い塩基配列一致率を太字で示した。株名は RVA/由来動物種-由来材料 (wt, 野外材料; tc, 細胞分離株)/分離国/株名/分離年/G 型と P 型を表す。

表 1 - 9 推定 P[7]型検出株の GenBank より得た同型代表株に対する VP4 塩基配列一致率

代表株	塩基配列一致率 (%)		
	TJ3-2	TJ3-4	TJ4-1
RVA/Pig-tc/USA/OSU/1977/G5P9[7]	94.5	94.5	94.2
RVA/Pig-tc/GBR/SW20-21/1976/Porcine/G1P[7]	90.5	90.5	90.4
RVA/Cow-wt/GBR/PP-1/1973/G3P[7]	86.5	86.5	86.4
RVA/Pig-wt/CHN/JL94/2004/G5P[7]	90.3	90.3	90.1
RVA/Cow-tc/KOR/KJ338-1/G8P[7]	90.6	90.6	90.5

解読した VP4 塩基配列長が RCWG の基準に満たないため、P[7]型検出株の P 型は推定である。各検出株に対して最も高い塩基配列一致率を太字で示した。株名は RVA/由来動物種-由来材料 (wt, 野外材料; tc, 細胞分離株)/分離国/株名/分離年/G 型と P 型を表す。

表 1 - 1 0 推定 P[13]型検出株の GenBank より得た同型代表株に対する VP4 塩基配列一致率

代表株	塩基配列一致率 (%)	
	TJ2-1	TJ4-5
RVA/Pig-tc/VEN/A46/1985/G5P[13]	79.4	82.3
RVA/Pig-xx/BRA/ICB2191/2002/GxP[13]	77.6	84.6
RVA/Pig-wt/JPN/JP13-3/2002/G9P[13]	79.7	89.0
RVA/Pi-wt/JPN/JP35-7/2002/G9P[13]	79.7	89.0
RVA/Pig-wt/IRL/2B/05-Ire/2005/G9P[13]	80.1	89.0
RVA/Pig-wt/THA/CMP178/2002/G5P[13]	83.5	79.9
RVA/Pig-wt/THA/CMP213/2002/G3P[13]	83.5	79.9
RVA/Pig-tc/IND/HP140/1987/G6P[13]	83.3	81.4
RVA/Pig-wt/JPN/GUB72/2006/G9P[13]	84.2	81.7
RVA/Pig-wt/JPN/FGP28/2009/G9P[13]	84.6	81.9
RVA/Pig-wt/JPN/FGP35/2009/G4P[13]	83.8	80.8
RVA/Pig-wt/JPN/FGP36/2009/G4P[13]	83.8	80.8
RVA/Pig-tc/AUS/MDR-13/1992/GxP[13]	76.8	81.4
RVA/Pig-wt/IRL/1/07-Ire/2007/G4P[13]	76.5	78.3

解読した VP4 塩基配列長が RCWG の基準に満たないため、P[13]型検出株の P 型は推定である。各検出株に対して最も高い塩基配列一致率を太字で示した。株名は RVA/由来動物種-由来材料 (wt, 野外材料; tc, 細胞分離株)/分離国/株名/分離年/G 型と P 型を表す。

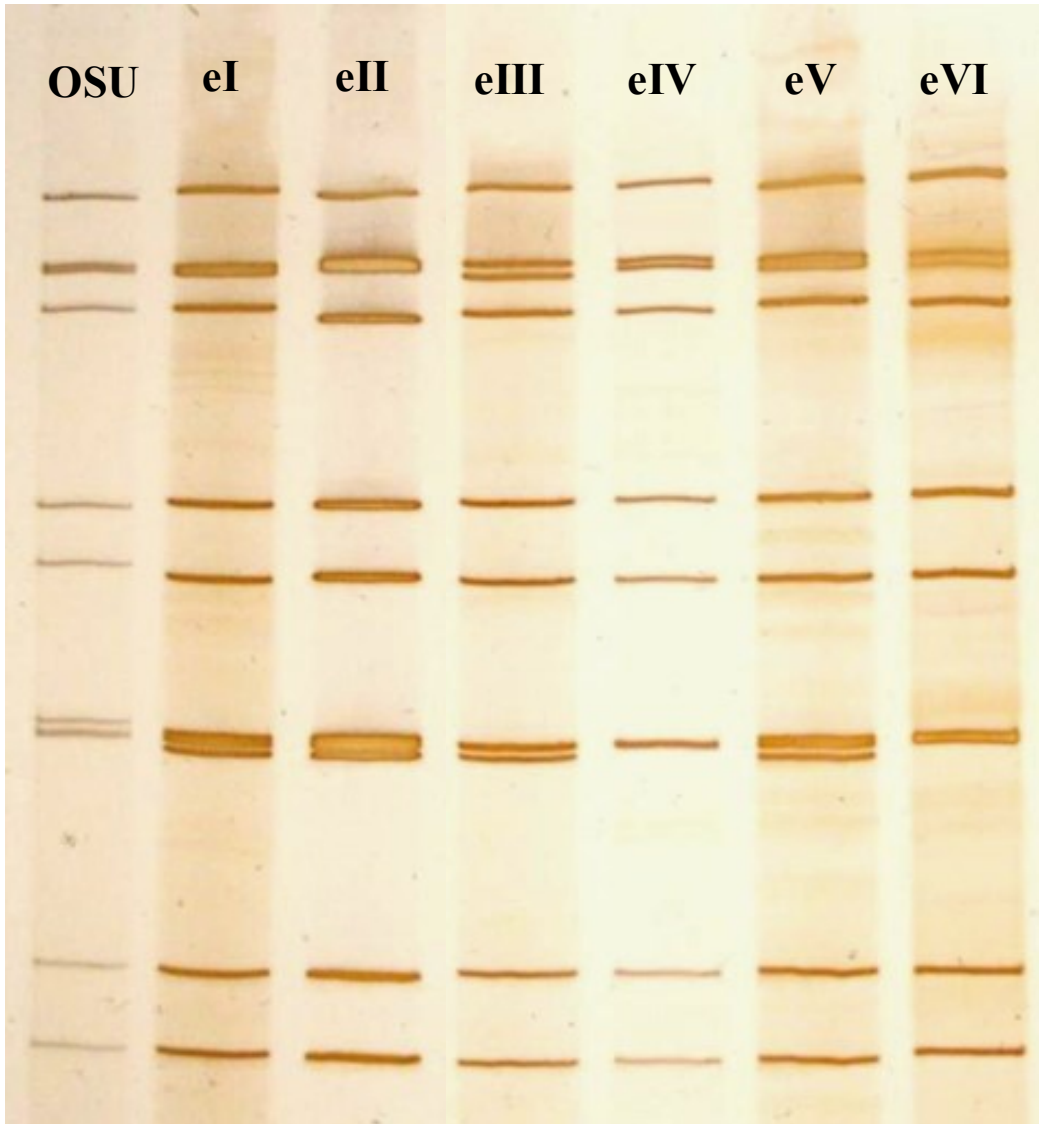


図1-1 各発生時に検出されたRVAのElectropherotypes (eI~eVI)。OSU株はブタRVAの代表株であり、ロングパターンの泳動像を示す。

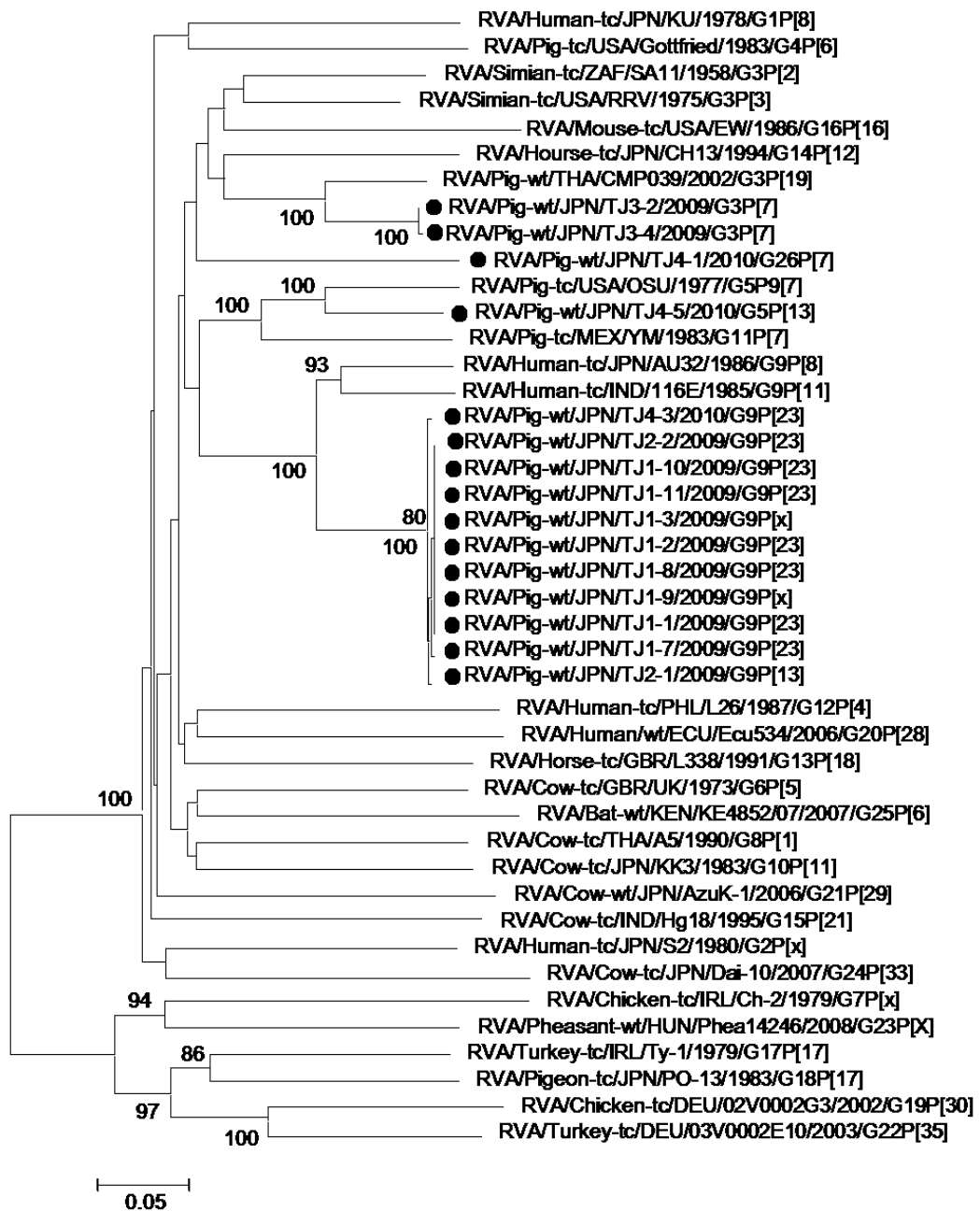


図1-2 本調査で検出された RVA 株と GenBank より得た G1~G25 型代表株の VP7 遺伝子塩基配列に基づく分子系統樹。OSU 株 (GenBank 登録番号 X04613) の 74 番目から 1001 番目に相当する 928 塩基を解析に用いた。60%以上のブーツストラップ値を各分枝に示す。本調査で検出された VP7 遺伝子を黒丸で示した。株名は RVA/由来動物種-由来材料 (wt, 野外材料; tc, 細胞分離株)/分離国/株名/分離年/G 型と P 型を表す。

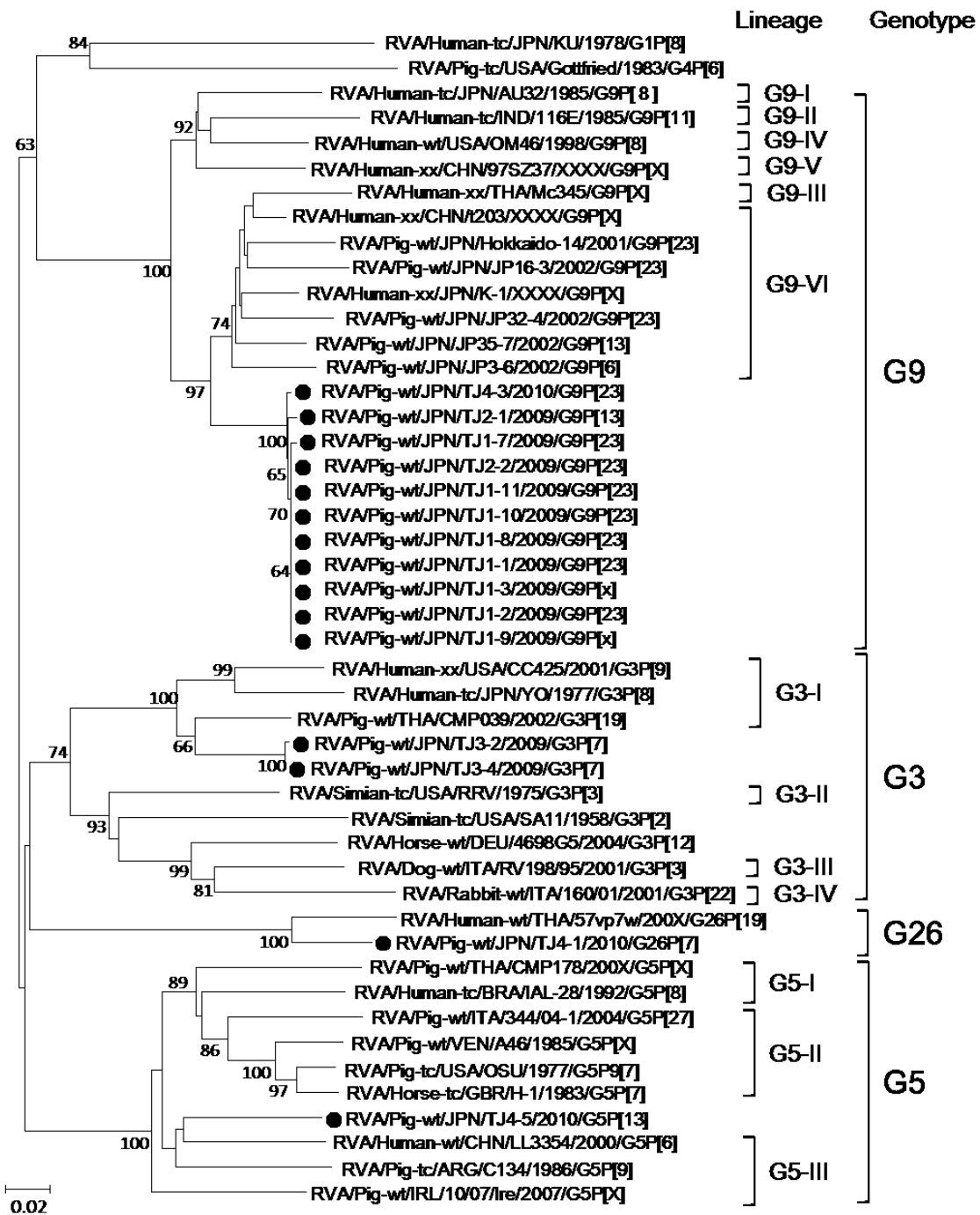


図1-3 本調査で検出された G3, G5, G9 および G26 型 RVA 株と GenBank より得た同 G 型株の VP7 遺伝子の塩基配列に基づく分子系統樹。OSU 株 (GenBank 登録番号 X04613) の 278 番目から 1001 番目に相当する 724 塩基を解析に用いた。60%以上のブーツストラップ値を各分枝に示す。本調査で検出された VP7 遺伝子を黒丸で示した。G3, G5, および G9 型の Lineage はそれぞれ引用文献 42, 9, 8 に基づいて分類した。株名は RVA/由来動物種-由来材料 (wt, 野外材料; tc, 細胞分離株)/分離国/株名/分離年/G 型と P 型を表す。

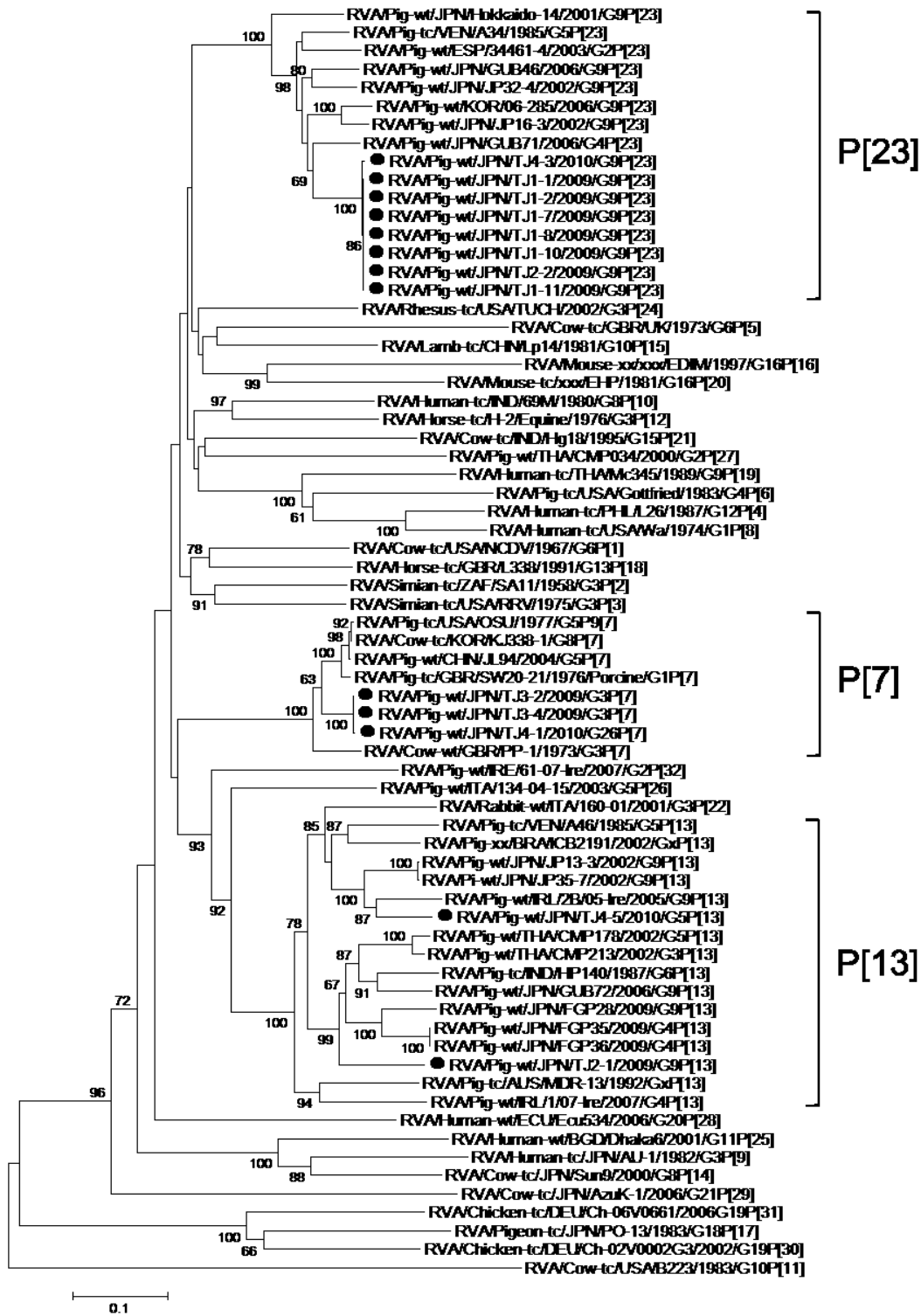


図1-4 本調査で検出されたRVA株およびGenBankより得た各P型株のVP4遺伝子塩基配列に基づく分子系統樹。OSU株 (GenBank登録番号 X04613) の70番目から843番目に相当する774塩基を解析に用いた。解読したVP4塩基配列長がRCWGの基準に満たないため、P[13]検出株のP型は推定である。60%以上のブーツストラップ値を各分枝に示す。本調査で検出されたVP4遺伝子を黒丸で示した。株名はRVA/由来動物種-由来材料 (wt, 野外材料; tc, 細胞分離株)/分離国/株名/分離年/G型とP型を表す。

第二章

一養豚場の各発育ステージのブタにおける
3年間にわたる RVA の分子疫学的調査

序論

第一章では、一養豚農場で繰返し集団発生した哺乳豚下痢において、その原因となった RVA は遺伝学的に多様であり、発生毎に異なる G/P 型を持つ株が検出される傾向があることを明らかにした。Lorenzetti らは (38)、ワクチン接種農場の哺乳豚で RVA 感染症が集団発生した事例において検出された RVA は、ワクチン株と同じ G/P 型を有するが遺伝学的にはワクチン株と区別されたことを報告している。これらのことから、自然感染やワクチン接種により獲得された群免疫を回避するようなウイルス株の出現が、RVA 感染症の発生要因となる可能性が考えられた。

RVA はこれまで、哺乳豚や離乳豚の他に、肥育豚や分娩前後の母豚においても検出されている (3, 18, 20, 59)。しかし、同一養豚農場において発育ステージ毎での G/P 型の分布状況を長期間調査した報告はないため、RVA の農場内における動態には不明な点が多く残されている。

そこで、本章では、国内一養豚農場において、泌乳中母豚とそれらの哺乳豚、ならびに、30, 60, 90, 120, および 150 日齢豚における RVA の分布と G/P 型を 3 年間にわたって分子疫学的手法により調査した。

材料および方法

調査農場

千葉県内の母豚約 500 頭を飼養する繁殖肥育一貫経営農場において調査を行った。当該農場では、外部からの病原体の侵入リスクを低減させるために厳しい衛生管理を行っていた。すなわち、入場においてヒトはシャワーを浴びた後に農場専用の衣服と長靴を着用することが義務付けられ、機材は農場に持ち込む前に紫外線照射またはアルコール噴霧による消毒が実施された。繁殖候補豚は自家生産し、ブタの導入は年に 2-3 頭程度であった。繁殖豚は 1 棟の妊娠・種付け舎で飼養し、分娩 1 週間前に豚体を消毒した後分娩舎へ移動した。分娩舎は 2 棟あったが、それぞれ連続使用で常にブタが在舎したため、豚舎全体の洗浄消毒は実施しておらず、空いた豚房を水洗後逆性石鹼で消毒するのみであった。哺乳豚は 28 日齢で離乳した後、同時期に離乳したブタと混合して離乳舎へ移動した。その後、離乳舎にて 100 日齢まで飼養した後、群編成せずに肥育舎へ移して出荷まで飼養した。離乳舎および肥育舎は豚舎毎あるいは部屋毎にオールイン・オールアウトで管理されていた。ブタの移動後空舎となった豚舎または部屋は、豚房を含め全てが水洗されグルタールアルデヒドで消毒されていた。なお、豚房間は高さ 1 m 以上のパネルで仕切られ、隣接する豚房のブタとの直接接触は不可能であった。作業者は分娩・離乳・肥育の各発育ステージで完全に分けられ、豚舎毎に専用の長靴に履き換えていた。

糞便検体

2006～2008 年の 7～9 月において年 1 回の計 3 回農場を訪問し、哺乳豚とその母豚各 10 頭、ならびに 30, 60, 90, 120 および 150 日齢豚各 5～10 頭から直腸便計

145 検体を採取した (表 2 - 1) 。採取した糞便は直ちに冷蔵にて動物衛生研究所へ輸送し, 正常便 (固形便), 軟便, 泥状便, および水様便に分類して糞便性状を記録した後, RNA 抽出まで -80°C にて保存した。

RNA 抽出

第一章と同様に 10%糞便乳剤を作製後, TRIzol-LS を用いて遠心上清から総 RNA を抽出した。抽出した RNA は 50 μl の DNase-RNase free water で溶解し, RT-PCR 法の実施まで -20°C で保存した。

RT-PCR 法による RVA VP7 および VP4 遺伝子の検出

第一章と同様の方法で RVA VP7 および VP4 遺伝子の検出を行った。VP7 遺伝子は Beg9/End9 プライマーセット (24), VP4 遺伝子は Con3/Con2 プライマーセット (21) を用いて各遺伝子を増幅した。

塩基配列の解読

第一章と同様に, 増幅産物は MicroSpin S-400 HR Columns (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) あるいは QIAquick gel extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA) により精製し, ダイレクトシーケンスにより塩基配列を解読した。得られた塩基配列の組み立て, 編集および解析は MEGA 5 (61) を用いて行った。

解読した RVA VP7 および VP4 遺伝子の G および P 遺伝子型別

第一章と同様に, 解読した VP7 および VP4 遺伝子について BLAST サーチによる相同性検索を行い, RCWG が提唱する分類基準 (45) に従って G および P 型別を行った。

分子系統樹解析

検出株およびGenBankより得た株のVP7またはVP4遺伝子の多重配列整列にはCLUSTAL W法, 遺伝学的距離計算にはKimura-2 correction parameterを使用し, 近隣結合法により系統樹解析を行った (43)。系統樹の信頼性は1000回反復によるブーツストラップ確率により評価した。分子系統樹解析はMEGA 5を用いて行った (61)。

解読した塩基配列のGenBank登録番号

本調査で解読したVP7およびVP4遺伝子の塩基配列において, JP40-H5株およびJP91-K2株のVP4遺伝子を除き, 同じGまたはP型に属する株間での一致率は, 98.6%以上と互いに極めて近縁であった。そのため, JP40-H5株およびJP91-K2株を含む計7株のVP7およびVP4遺伝子の塩基配列をGenBankに登録した。登録番号 (accession number) は括弧内に示す。

RVA/Pig-wt/JPN/JP40-G8/2006/G4P[13] (VP7, AB735631; VP4, AB735638),
RVA/Pig-wt/JPN/JP40-H4/2006/G9P[13] (VP7, AB735632; VP4, AB735639),
RVA/Pig-wt/JPN/JP40-H5/2006/G9P[6] (VP7, AB735633; VP4, AB735640),
RVA/Pig-wt/JPN/JP69-F6/2007/G9P[6] (VP7, AB735634; VP4, AB735641),
RVA/Pig-wt/JPN/JP69-F8/2007/G5P[6] (VP7, AB735635; VP4, AB735642),
RVA/Pig-wt/JPN/JP69-H4/2007/G5P[13] (VP7, AB735636; VP4, AB735643),
RVA/Pig-wt/JPN/JP91-K2/2008/G9P[13] (VP7, AB735637; VP4, AB735644)。

統計学的解析

軟便, 泥状便, および水様便と正常便におけるRVA VP7遺伝子の検出率の比

較解析をカイ二乗検定にて行った。

結果

各発育ステージのブタにおける RVA VP7 遺伝子検出率

各発育ステージのブタにおける RVA VP7 遺伝子の検出率を表 2-1 に示した。3 年間の調査において計 145 検体中 29 検体 (20.0%) から RVA VP7 遺伝子が検出された。調査年毎の検出率は 2006 年で 16.0%, 2007 年で 24.4%, 2008 年で 20.0% とほぼ一定であった。発育ステージ別の検出率は、30 日齢豚で 66.7% (調査年別で 60.0~80.0%) と最も高く、次いで哺乳豚で 43.3% (調査年別で 40.0~50.0%) であった。泌乳中母豚や 120 日齢豚からも RVA VP7 遺伝子が検出されたが、検出率は調査年によって異なり、検出されない年もあった。一方、3 年間を通じて 60, 90 および 150 日齢豚からは全く RVA VP7 遺伝子が検出されなかった。

RVA VP7 遺伝子の検出と糞便性状との関連

哺乳豚においては、正常便が 17 例 (56.7%)、軟便が 8 例 (26.7%)、泥状便が 5 例 (16.7%) であり、水様便は観察されなかった。RVA VP7 遺伝子の検出率は軟便 (6/8, 75.0%) および泥状便 (5/5, 100%) において、正常便 (2/17, 11.8%) よりも有意に高かった ($p < 0.01$)。一方、30 および 120 日齢のブタ、ならびに母豚においては、30 日齢豚より採取した軟便より RVA VP7 遺伝子が検出された一例を除き、RVA 遺伝子は正常便からのみ検出された。

RVA VP7 遺伝子の遺伝学的解析と G 遺伝子型別

VP7 遺伝子が検出された 29 例中 25 例において、OSU 株 VP7 遺伝子の 76~927 番目に相当する 880 塩基長の塩基配列を決定した。BLAST サーチによる相同性検索と各 G 型代表株を含めた分子系統樹解析により、25 株中 13 株は G9 型、8 株

は G5 型, 4 株は G4 型にそれぞれ分類された (図 2 - 1 および表 2 - 2)。同じ G 型に属する株間での VP7 遺伝子の塩基配列一致率は 98.6%以上と高く, これらは遺伝学的に極めて近縁であった。

G9 型検出株 13 株は, 日本のブタ由来 G9 型株である JP3-6 株と遺伝学的に最も近縁であり, 同株に対して 93.4~93.9%, 中国のヒト由来 t203 株に 93.6~94.1%, その他の G9 型代表株に対して 87.2~93.3%の塩基配列一致率を示した (表 2 - 3)。一方, G5 型検出株 8 株は, イタリア, ベネズエラおよび米国のブタ由来ならびに英国のウマ由来 G5 型株 (134/04-15, A34, A46 および OSU ならびに H-1 株) に遺伝学的に近縁であり, これら 5 株に対して 89.3~91.5%の塩基配列一致率を示した。また, 他の G5 型代表株に対しては 84.1~88.9%の塩基配列一致率であった (表 2 - 4)。G4 型農場株はデンマークのブタ由来 G4 型株である DK23753S 株と共にクラスターを形成したが, 同株に対しては 87.7~88.0%, 他の G4 型代表株に対しては 84.4~86.7%の一致率であった (表 2 - 5)。

RVA VP4 遺伝子の遺伝学的解析と P 遺伝子型別

VP7 遺伝子が検出された 29 例中 27 例で OSU VP4 遺伝子の 88~819 番目に相当する 732 塩基長の塩基配列を決定した。BLAST サーチによる相同性検索と各 P 型代表株を含めた系統樹解析により, 27 株中 15 株は P[13]型, 12 株は P[6]型に分類された (表 2 - 2 および図 2 - 2)。なお, 今回解読した VP4 塩基配列の長さは RCWG の提唱する基準に満たなかったため, すべて推定とした。

JP91-K2 株を除く P[13]型検出株計 14 株間での VP4 遺伝子塩基配列一致率は 99.3%以上と高く, 系統樹においても単一の枝を形成した。これら 14 株は日本のブタ由来 P[13]型ウイルスである TJ2-1 株に遺伝学的に最も近縁であり, 同株に対し 92.0~92.2%の塩基配列一致率を示した (表 2 - 6)。その他の P[13]型代表

株に対する塩基配列一致率は 74.0~83.8%と低いものであった。一方, JP91-K2 株は他の P[13]型検出株に対して 78.6~78.8%の塩基配列一致率しか示さず, 系統樹においても遺伝学的に離れた枝を形成した。JP91-K2 株は日本 (TJ4-5 および JP35-7 株) およびアイルランド (2B/05-Ire 株) のブタ由来 P[13]型株に遺伝学的に近縁であり, これら 3 株に対して 85.6~88.8%の塩基配列一致率を示した。しかし, 他の P[13]型代表株に対する塩基配列一致率は 76.0~79.4%と低値であった。

同様に, JP40-H5 株を除く P[6]型検出株計 11 株は互いに 99.2%以上の塩基配列一致率を示し, 系統樹においても単一の枝を形成した。これら 11 株は日本のブタおよびヒト由来 P[6]型株である JP3-6 および AU19 株と遺伝学的に近縁であり, これら 2 株に対して 89.6~90.4%の塩基配列一致率を示した。他の P[6]型代表株に対する塩基配列一致率は 77.2~85.3%と低値であった。一方, JP40-H5 株と他の P[6]型検出株間での塩基配列一致率は 79.0~79.4%であり, 両者は系統樹においても遺伝学的に区別される枝を形成した。JP40-H5 株はアメリカおよび日本のブタ由来 P[6]型株である Gottfried および pig2-24d 株に最も近縁であり, これら 2 株に対して 88.8~89.6%の塩基配列一致率を示した。他の P[6]型代表株に対する塩基配列一致率は 76.8~82.3%と低値であった。

G 型および P 型のステージ毎ならびに調査年毎の分布

VP7 遺伝子が検出された 29 例中 23 例で G 型および P 型が決定できた。3 年間にわたる調査において, 少なくとも 5 種類の G/P 型が確認された (G4P[13], G5P[6], G5P[13], G9P[6], G9P[13]) (表 2-2)。

調査年毎に検出された G/P 型と株数は, 2006 年には G4P[13]と G9P[13]が各 2 株, G9P[6]が 1 株であったが, 2007 年には G5P[6]が 6 株, G5P[13]が 2 株, G4P[13]と G9P[6]が各 1 株, また, 2008 年には G9P[6]が 4 株, G9P[13]が 3 株, G4P[13]が 1

株であった。いずれの調査年においても少なくとも 3 種類以上の G/P 型が確認されたが、優勢に検出される株が変化する傾向が観察された。

ステージ毎にみると、調査年毎に検出される G/P 型が変化する傾向が観察された。哺乳豚においては調査年毎に一つの流行株が確認され、その G/P 型は変化していた。すなわち、2006 年には G4P[13]が優勢に検出されたが、2007 年には G5P[6]、そして 2008 年には G9P[6]が優勢に検出された。同様の傾向は 30 日齢豚でも観察されたが、調査年毎に 2 種類から 3 種類と複数の G/P 型が検出される傾向があった。すなわち、2006 年には G9P[6]と G9P[13]が検出されたが、2007 年には G4P[13]、G5P[6] および G5P[13]が、2008 年には G4P[13]と G9P[13]が検出された。

同じ調査年においては、2006 年に哺乳豚と 30 日齢豚の両方で G5P[6]が検出された例を除いて、検出される G/P 型が哺乳豚と離乳豚で異なる傾向が観察された。さらに、哺乳豚とその母豚のペア間においても検出される G/P 型が異なる例が観察された。すなわち、2007 年には母豚から G5P[6]の JP69-X6 株が検出された一方、その産子である哺乳豚からは G9P[6]を示す JP69-F6 株が検出された。同様に、2008 年には母豚より G9P[13]の JP91-D8 株が検出されたが、その産子である哺乳豚からは G9P[6]の JP91-G8 株が検出された。

一方、同じ G/P 型のウイルスが異なる調査年で検出される例も認められた。すなわち、G4P[13]は 2006 年の哺乳豚から JP40-G4 株と JP40-G8 株、2007 年と 2008 年の 30 日齢豚から JP69-H5 株と JP91-H3 株がそれぞれ検出された。同様に、G9P[13]が 2006 年の 30 日齢豚から JP40-H1 株と JP40-H4 株ならびに 2008 年の母豚から JP91-D8 株が検出され、G9P[6]は 2007 年と 2008 年の哺乳豚から JP69-F6 株、JP91-G1 株、JP91-G4 株、JP91-G7 株および、JP91-G8 株が検出された。

考察

本章では、農場内における RVA の感染動態を明らかにすることを目的とし、3 年間にわたり各発育ステージのブタ糞便における RVA 排泄状況を調査した。その結果、調査期間を通じて哺乳豚と離乳豚から高頻度に RVA 遺伝子が検出され、また、調査年により検出率に違いがあったものの、泌乳中母豚や肥育豚からも RVA 遺伝子が検出された。これらの結果は、哺乳豚や離乳豚において RVA 検出率が高いとする報告 (4, 18, 20, 58)、Benfield らによる分娩前後の母豚糞便から RVA が分離培養されたとの報告 (3)、および Steyer らによる RT-PCR 法で哺乳豚や離乳豚に併せて、70 日齢以上の肥育豚からも RVA 遺伝子が検出されたとの報告 (58) と一致するものであった。調査年毎にみると、いずれの調査年においても複数の発育ステージのブタで RVA 遺伝子が検出される傾向が観察された。すなわち、2006 年には哺乳豚と離乳豚でのみ RVA 遺伝子が検出されたが、2007 年には泌乳中母豚、哺乳豚および離乳豚、2008 年には泌乳中母豚、哺乳豚、離乳豚および肥育豚において RVA 遺伝子が確認された。

RVA は哺乳豚下痢便から高頻度に検出される一方で、不顕性感染も頻繁に認められることが報告されている (8, 58)。本調査においても、哺乳豚では RVA 遺伝子の検出率が正常便より下痢便において有意に高かったが、その他の発育ステージにおいては糞便性状と RVA 遺伝子検出率には関連が認められず、RVA 遺伝子は 1 例の例外を除いて全て正常便から検出された。加えて、本調査では 1 年に 1 回の農場訪問時に採材したことを考慮すると、RVA 感染は同時期に様々な発育ステージのブタで発生している一方、哺乳期以外の豚においては多くが不顕性感染である可能性が示唆された。

本調査で検出された RVA の VP7 および VP4 遺伝子を解析した結果、3 年間の

調査において少なくとも 5 種類 (G4P[13], G5P[6], G5P[13], G9P[6], および G9P[13]) の G/P 型が確認された。調査年毎では 2~4 種類の G/P 型が確認されたが、優勢に検出される G/P 型は発育ステージ毎に異なり、また、調査年毎に変化する傾向があった。このことは、これまでの報告と同様に、農場内におけるブタ RVA の遺伝学的多様性を裏付ける結果であった。このような多様性は農場外からの新たな株の侵入によって獲得される可能性も否定できないが、第一章で得られた成績と同様に、農場内ウイルスの遺伝子再集合により獲得した可能性も考えられた。すなわち、今回の 3 年間にわたる調査で検出された RVA において、JP40-H5 および JP91-K2 株を除き、同じ遺伝子型に分類される VP7 および VP4 遺伝子は非常に近縁であったが、同じ G 型の VP7 遺伝子を有しながら異なる P 型と組合せを作る株や、逆に同じ P 型の VP4 遺伝子を有するものの異なる G 型と組合せをつくる株が観察された。一方で、同じ G/P 型を有する株が調査年をまたがって異なる発育ステージのブタから検出される例も観察された。このことから、異なる発育ステージのブタ間でウイルスが伝播することによりウイルスが農場内で維持される可能性も考えられた。

本章では、3 年間にわたる調査を通じて、一農場内の様々な発育ステージのブタにおいて遺伝学的に多様な RVA が分布していることを明らかにした。また、RVA は農場内の異なる発育ステージのブタ間で伝播し、混合感染や農場株間の遺伝子再集合を起こすことによって、農場内における遺伝学的多様性を獲得する可能性が示唆された。

表 2-1 各日齢または発育ステージのブタにおける RVA VP7 遺伝子の検出率

調査年	泌乳中母豚	哺乳豚	離乳豚		肥育豚			合計
			30 日齢	60 日齢	90 日齢	120 日齢	150 日齢	
2006	0/10 (0.0%) ^{a)}	4/10 (40.0%)	4/5 (80.0%)	0/5 (0.0%)	0/10 (0.0%)	0/5 (0.0%)	0/5 (0.0%)	8/50 (16.0%)
2007	4/10 (40.0%)	4/10 (40.0%)	3/5 (60.0%)	0/5 (0.0%)	0/5 (0.0%)	0/5 (0.0%)	0/5 (0.0%)	11/45 (24.4%)
2008	1/10 (10.0%)	5/10 (50.0%)	3/5 (60.0%)	0/5 (0.0%)	0/5 (0.0%)	1/5 (20.0%)	0/10 (0.0%)	10/50 (20.0%)
合計	5/30 (16.7%)	13/30 (43.3%)	10/15 (66.7%)	0/15 (0.0%)	0/20 (0.0%)	1/15 (6.7%)	0/20 (0.0%)	29/145 (20.0%)

^{a)} RVA VP7 遺伝子陽性検体数/検査検体数 (%陽性)

表 2 - 2 検出された RVA の G 型および推定 P 型^{a)}

調査年	株名	発育ステージ	G 型	推定 P 型
2006	JP40-G3	哺乳豚	nd ^{b)}	P[13]
	JP40-G4	哺乳豚	G4	P[13]
	JP40-G5	哺乳豚	nd	P[13]
	JP40-G8	哺乳豚	G4	P[13]
	JP40-H1	離乳豚 (30 日齢)	G9	P[13]
	JP40-H2	離乳豚 (30 日齢)	G9	nd
	JP40-H3	離乳豚 (30 日齢)	G9	nd
	JP40-H4	離乳豚 (30 日齢)	G9	P[13]
	JP40-H5	離乳豚 (30 日齢)	G9	P[6]
2007	JP69-X6	泌乳中母豚	G5	P[6]
	JP69-X10	泌乳中母豚	G5	P[6]
	JP69-F6	哺乳豚	G9	P[6]
	JP69-F7	哺乳豚	G5	P[6]
	JP69-F8	哺乳豚	G5	P[6]
	JP69-F10	哺乳豚	G5	P[6]
	JP69-H1	離乳豚 (30 日齢)	G5	P[6]
	JP69-H2	離乳豚 (30 日齢)	G5	P[13]
	JP69-H3	離乳豚 (30 日齢)	nd	P[13]
	JP69-H4	離乳豚 (30 日齢)	G5	P[13]
	JP69-H5	離乳豚 (30 日齢)	G4	P[13]
2008	JP91-D8	泌乳中母豚	G9	P[13]
	JP91-G1	哺乳豚	G9	P[6]
	JP91-G4	哺乳豚	G9	P[6]
	JP91-G7	哺乳豚	G9	P[6]
	JP91-G8	哺乳豚	G9	P[6]
	JP91-H2	離乳豚 (30 日齢)	nd	P[13]
	JP91-H3	離乳豚 (30 日齢)	G4	P[13]
	JP91-H4	離乳豚 (30 日齢)	G9	P[13]
	JP91-K2	肥育豚 (120 日齢)	G9	P[13]

^{a)} 解読した塩基配列長が RCWG の基準に満たなかったため推定の P 型を示す。

^{b)} RT-PCR で陽性となったものの、塩基配列が決定できなかったものを nd と示す。

表 2-3 G9 検出株の GenBank より得た同型代表株に対する VP7 塩基配列一致率

代表株	各検出株に対する塩基配列一致率 (%)												
	JP40- H1	JP40- H2	JP40- H3	JP40- H4	JP40- H5	JP69- F6	JP91- D8	JP91- G1	JP91- G4	JP91- G7	JP91- G8	JP91- H4	JP91- K2
RVA/Pig-wt/JPN/JP3-6/2002/G9P[6]	93.4	93.5	93.4	93.4	93.5	93.9	93.6	93.9	93.9	93.9	93.8	93.9	93.9
RVA/Pig-wt/JPN/Hokkaido-14/2001/G9P[23]	92.8	93.0	92.8	92.8	92.8	93.3	93.1	93.3	93.3	93.3	93.2	93.3	93.3
RVA/Human-xx/JPN/K-1/XXXX/G9P[X]	93.2	93.3	93.2	93.2	93.2	93.3	93.1	93.3	93.3	93.3	93.2	93.3	93.3
RVA/Human-xx/CHN/t203/XXXX/G9P[X]	94.1	94.2	94.1	94.1	94.1	93.9	93.6	93.9	93.9	93.9	93.8	93.9	93.9
RVA/Human-xx/VTN/608VN/Vietnum/G9P[X]	92.8	93.0	92.8	92.8	92.8	92.8	92.6	92.8	92.8	92.8	92.7	92.8	92.8
RVA/Human-xx/THA/Mc345/G9P[X]	91.3	91.1	91.3	91.3	91.0	90.8	90.6	90.8	90.8	90.8	90.7	90.8	90.8
RVA/Human-xx/JPN/00-SG2509VP7/XXXX/G9P[X]	92.0	92.2	92.0	92.0	92.0	91.8	91.6	91.8	91.8	91.8	91.7	91.8	91.8
RVA/Human-xx/IRL/CIT-254RV/XXXX/G9P[X]	89.3	89.4	89.3	89.3	89.3	89.2	89.0	89.2	89.2	89.2	89.1	89.2	89.2
RVA/Human-wt/USA/OM46/1998/G9P[8]	89.4	89.5	89.4	89.4	89.7	89.4	89.2	89.4	89.4	89.4	89.3	89.4	89.4
RVA/Human-tc/IND/116E/1985/G9P[11]	87.3	87.4	87.3	87.3	87.5	87.4	87.2	87.4	87.4	87.4	87.3	87.4	87.4
RVA/Human-xx/JPN/A32/XXXX/G9P[X]	87.8	88.0	87.8	87.8	88.1	87.8	87.6	87.8	87.8	87.8	87.7	87.8	87.8
RVA/Human-xx/CHN/97SZ37/XXXX/G9P[X]	88.5	88.6	88.5	88.5	88.5	88.8	88.5	88.8	88.8	88.8	88.6	88.8	88.8

各検出株に対して最も高い塩基配列一致率を太字で示した。株名は RVA/由来動物種-由来材料 (wt, 野外材料; tc, 細胞分離株) /分離国/株名/分離年/G 型と P 型を表す。

表 2 - 4 G5 型検出株の GenBank より得た同型代表株に対する VP7 塩基配列一致率

代表株	各検出株に対する塩基配列一致率 (%)							
	JP69-X6	JP69-X10	JP69-F7	JP69-F8	JP69-F10	JP69-H1	JP69-H2	JP69-H4
RVA/Pig-wt/ITA/134/04-15/2004/G5P[26]	90.6	90.3	90.3	90.3	90.3	90.3	90.3	90.3
RVA/Pig-wt/VEN/A46/1985/G5P[X]	89.5	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3
RVA/Pig-tc/VEN/A34/1985/G5P[23]	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3
RVA/Horse-tc/GBR/H-1/1983/G5P[7]	91.3	91.5	91.5	91.5	91.5	91.5	91.5	91.5
RVA/Pig-tc/USA/OSU/1977/G5P9[7]	90.8	90.8	90.8	90.8	90.8	90.8	90.8	90.8
RVA/Pig-wt/ITA/344/04-1/2004/G5P[27]	88.9	88.4	88.4	88.4	88.4	88.4	88.4	88.4
RVA/Human-tc/BRA/IAL-28/1992/G5P[8]	88.0	88.2	88.2	88.2	88.2	88.2	88.2	88.2
RVA/Pig-wt/THA/CMP178/200X/G5P[X]	86.8	86.6	86.6	86.6	86.6	86.6	86.6	86.6
RVA/Pig-tc/ARG/C134/1986/G5P9	84.9	84.9	84.9	84.9	84.9	84.9	84.9	84.9
RVA/Pig-wt/IRL/10/07/Ire/2007/G5P[X]	84.1	84.1	84.1	84.1	84.1	84.1	84.1	84.1
RVA/Human-wt/VEN/KH210/2004/G5P[6]	84.7	84.7	84.7	84.7	84.7	84.7	84.7	84.7
RVA/Human-wt/CHN/LL4260/2001/G5P[6]	86.0	86.0	86.0	86.0	86.0	86.0	86.0	86.0
RVA/Human-wt/CHN/LL3354/2000/G5P[6]	85.9	85.9	85.9	85.9	85.9	85.9	85.9	85.9

各検出株に対して最も高い塩基配列一致率を太字で示した。株名は RVA/由来動物種-由来材料 (wt, 野外材料; tc, 細胞分離株) /分離国/株名/分離年/G 型と P 型を表す。

表 2 - 5 G4 型検出株の GenBank より得た G4 型代表株に対する VP7 塩基配列一致率

代表株	各検出株に対する塩基配列一致率 (%)			
	JP40-G4	JP40-G8	JP69-H5	JP91-H3
RVA/Pig-wt/DEN/DK23753S/2006/G4P[x]	88.0	88.0	87.8	87.7
RVA/Pig-wt/BRA/838/07-Po/2007/G4P[6]	86.7	86.7	86.6	86.7
RVA/Human-tc/AUS/M3014/XXXX/G4P[X]	84.7	84.7	84.5	84.4
RVA/Pig-wt/BRA/ICB2185/1995-97/G4P[6]	84.5	84.5	84.9	84.8
RVA/Human-wt/MEX/D151/1988/G4P[6]	85.2	85.2	85.3	85.2
RVA/Human-tc/CHN/R479/2004/G4P[6]	84.5	84.5	84.7	84.5
RVA/Human-wt/IND/mani-362/2007/G4P[6]	84.7	84.7	84.8	84.7
RVA/Pig-xx/THA/CMP77/XXXX/G4P[X]	84.8	84.8	84.9	84.8
RVA/Human-wt/ITA/VA75/XXXX/G4P[X]	84.0	84.0	84.3	84.4
RVA/Pig-tc/USA/Gottfried/1983/G4P[6]	84.3	84.3	84.4	84.5
RVA/Pig-wt/BRA/843/07-Po/2007/G4P[6]	85.8	85.8	86.1	86.0
RVA/Human-tc/GBR/ST3/1975/G4P2A[6]	84.9	84.9	84.8	84.9

各検出株に対して最も高い塩基配列一致率を太字で示した。株名は RVA/由来動物種-由来材料 (wt, 野外材料; tc, 細胞分離株) /分離国/株名/分離年/G 型と P 型を表す。

表 2 - 6 推定 P[13]型検出株の GenBank より得た同型代表株に対する VP4 塩基配列一致率

代表株	各検出株に対する塩基配列一致率 (%)														
	JP40 -G8	JP40 -G3	JP40 -G4	JP40 -G5	JP40 -H1	JP40 -H4	JP69 -H2	JP69 -H3	JP69 -H4	JP69 -H5	JP91 -D8	JP91 -H4	JP91 -H2	JP91 -H3	JP91 -K2
RVA/Pig-wt/JPN/TJ4-5/2010/G5P[13]	78.8	78.8	78.8	78.8	78.8	78.8	79.0	78.8	79.0	79.0	79.0	79.0	79.0	79.0	88.0
RVA/Pi-wt/JPN/JP35-7/2002/G9P[13]	79.4	79.4	79.4	79.4	79.4	79.4	79.6	79.4	79.6	79.6	79.6	79.6	79.6	79.6	88.8
RVA/Pig-wt/IRL/2B/05-Ire/2005/G9P[13]	78.4	78.4	78.4	78.4	78.4	78.4	78.6	78.4	78.6	78.6	78.6	78.6	78.6	78.6	85.6
RVA/Pig-wt/JPN/FGP28/2009/G9P[13]	83.0	83.0	83.0	83.0	83.0	83.0	83.2	83.0	83.2	83.2	83.2	83.2	83.2	83.2	79.2
RVA/Pig-tc/IND/HP140/1987/G6P[13]	83.6	83.6	83.6	83.6	83.6	83.6	83.8	83.6	83.8	83.8	83.8	83.8	83.8	83.8	79.4
RVA/Pig-tc/VEN/A46/1985/G5P[13]	78.2	78.2	78.2	78.2	78.2	78.2	78.4	78.2	78.4	78.4	78.4	78.4	78.4	78.4	78.0
RVA/Rabbit-wt/ITA/160-01/2001/G3P[22]	76.2	76.2	76.2	76.2	76.2	76.2	76.4	76.2	76.4	76.4	76.4	76.4	76.4	76.4	77.0
RVA/Pig-wt/IRL/1/07-Ire/2007/G4P[13]	74.0	74.0	74.0	74.0	74.0	74.0	74.2	74.0	74.2	74.2	74.2	74.2	74.2	74.2	77.2
RVA/Pig-tc/AUS/MDR-13/1992/GxP[13]	74.8	74.8	74.8	74.8	74.8	74.8	75.0	74.8	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	76.0
RVA/Pig-wt/JPN/TJ2-1/2009/G9P[13]	92.2	92.2	92.2	92.2	92.2	92.2	92.0	92.2	92.0	92.0	92.0	92.0	92.0	92.0	77.2

解読した VP4 塩基配列長が RCWG の基準に満たないため、P[13]型検出株の P 型は推定である。各検出株に対して最も高い塩基配列一致率を太字で示した。株名は RVA/由来動物種-由来材料 (wt, 野外材料; tc, 細胞分離株)/分離国/株名/分離年/G 型と P 型を表す。

表 2-7 推定 P[6]型検出株の GenBank より得た同型代表株に対する VP4 塩基配列一致率

代表株	各検出株に対する塩基配列一致率 (%)											
	JP40- H5	JP69- F10	JP69- F6	JP69- F7	JP69- F8	JP69- H1	JP69- X10	JP69- X6	JP91- G1	JP91- G4	JP91- G7	JP91- G8
RVA/Pig-wt/JPN/pig2-24d/2002/GXP[6]	88.8	77.2	77.2	77.4	77.2	77.4	77.2	77.4	77.6	77.6	77.6	77.6
RVA/Pig-tc/USA/Gottfried/1983/G4P[6]	89.6	78	77.6	77.8	78	77.8	78	77.8	77.6	77.6	77.6	77.6
RVA/Human-tc/JPN/AU19/1997/G1P[6]	76.8	89.6	89.6	89.8	89.6	89.8	89.6	89.8	89.6	89.6	89.6	89.6
RVA/Pig-wt/JPN/JP3-6/2002/G9P[6]	79.8	90.2	90.2	90.4	90.2	90.4	90.2	90.4	89.8	89.8	89.8	89.8
RVA/Human-tc/GBR/ST3/1975/G4P[6]	79	79.2	79.2	79.4	79.2	79.4	79.2	79.4	78.8	78.8	78.8	78.8
RVA/Human-tc/VEN/M37/1992/GxP[6]	79.4	80.2	80.2	80.4	80.2	80.4	80.2	80.4	79.8	79.8	79.8	79.8
RVA/Human-wt/BRA/NB-150/1997/GxP[6]	82.1	81.1	81.1	81.3	81.1	81.3	81.1	81.3	80.7	80.7	80.7	80.7
RVA/Human-wt/ECU/EC2184/2005/G11P[6]	81.3	82.1	82.1	82.3	82.1	82.3	82.1	82.3	81.7	81.7	81.7	81.7
RVA/Pig-wt/ESP/51/04/2003/G4P[6]	82.1	82.7	82.7	82.9	82.7	82.9	82.7	82.9	82.3	82.3	82.3	82.3
RVA/Human-wt/ITA/128/07-34/2006/G3P[6]	80.7	83.1	83.1	83.3	83.1	83.3	83.1	83.3	82.7	82.7	82.7	82.7
RVA/Pig-wt/ITA/134/04-8/2003/GxP[6]	82.3	83.7	83.7	83.9	83.7	83.9	83.7	83.9	83.3	83.3	83.3	83.3
RVA/Human-wt/VNM/KH210/2004/G5P[6]	82.1	82.9	82.9	83.1	82.9	83.1	82.9	83.1	82.5	82.5	82.5	82.5
RVA/Pig-wt/ITA/34/04-11/2003/G3P[6]	80.7	83.1	83.1	83.3	83.1	83.3	83.1	83.3	82.7	82.7	82.7	82.7
RVA/Pig-wt/BRA/838/07-Po/2007/G4P[6]	81.3	85.1	85.1	85.3	85.1	85.3	85.1	85.3	85.1	85.1	85.1	85.1
RVA/Pig-wt/BRA/843/07-Po/2007/G4P[6]	79.8	82.1	82.1	82.3	82.1	82.3	82.1	82.3	81.7	81.7	81.7	81.7
RVA/Pig-wt/ITA/134/04-7/2003/GxP[6]	78.8	82.9	82.9	83.1	82.9	83.1	82.9	83.1	82.5	82.5	82.5	82.5
RVA/Human-wt/SVN/SI-MB6/G3P[6]	79.8	81.7	81.7	81.9	81.7	81.9	81.7	81.9	81.5	81.5	81.5	81.5

解読した VP4 塩基配列長が RCWG の基準に満たないため、P[6]型検出株の P 型は推定である。各検出株に対して最も高い塩基配列一致率を太字で示した。株名は RVA/由来動物種-由来材料 (wt, 野外材料; tc, 細胞分離株)/分離国/株名/分離年/G 型と P 型を表す。

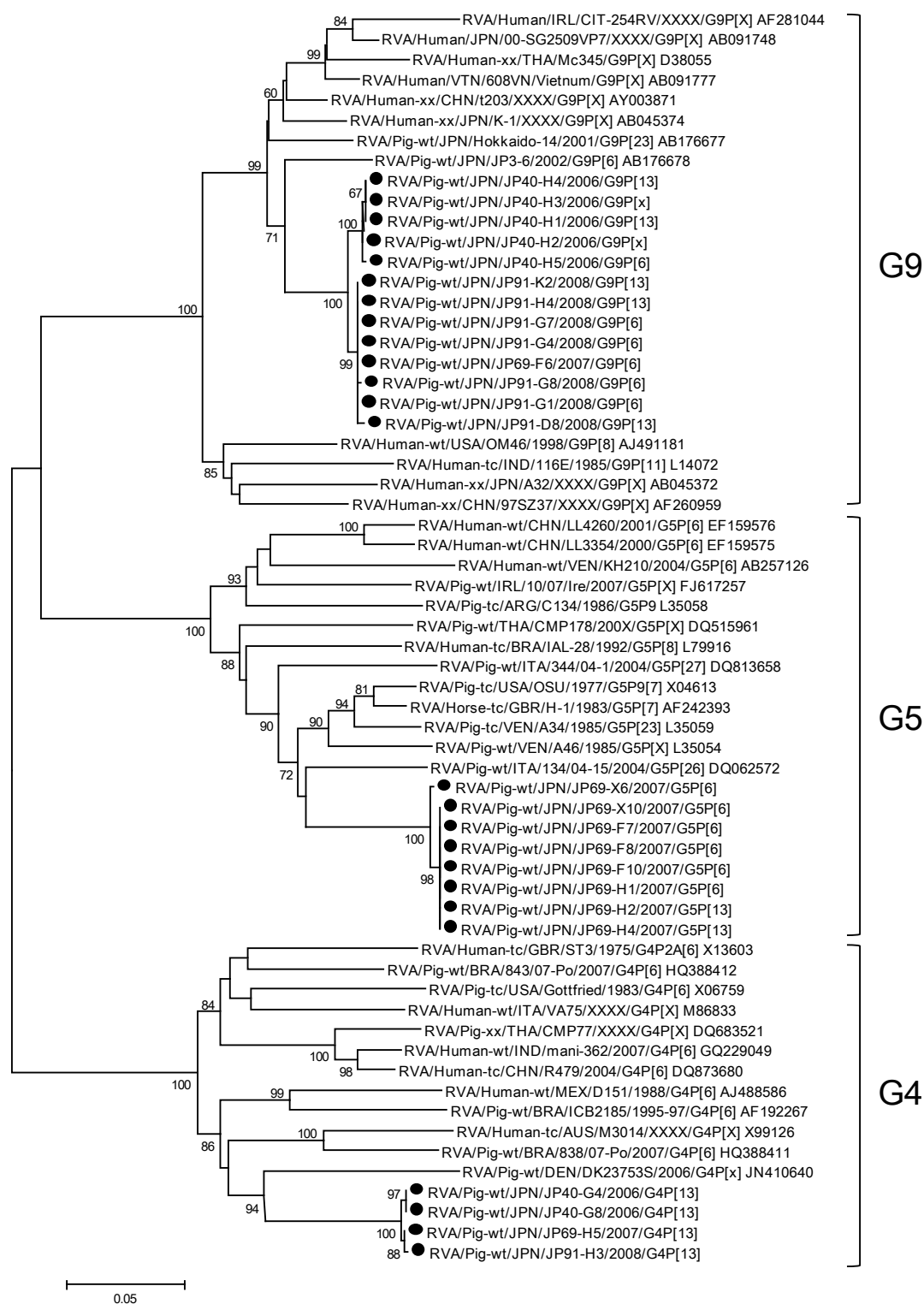


図2-1 本調査での検出株およびGenBankより得た各G型株のVP7遺伝子塩基配列に基づく分子系統樹。OSU株 (GenBank登録番号 X04613) の76番目から927番目に相当する852塩基を解析に用いた。60%以上のブーツストラップ値を各分枝に示す。本調査での検出株を黒丸で示した。株名はRVA/由来動物種-由来材料 (wt, 野外材料; tc, 細胞分離株)/分離国/株名/分離年/G型とP型を表す。

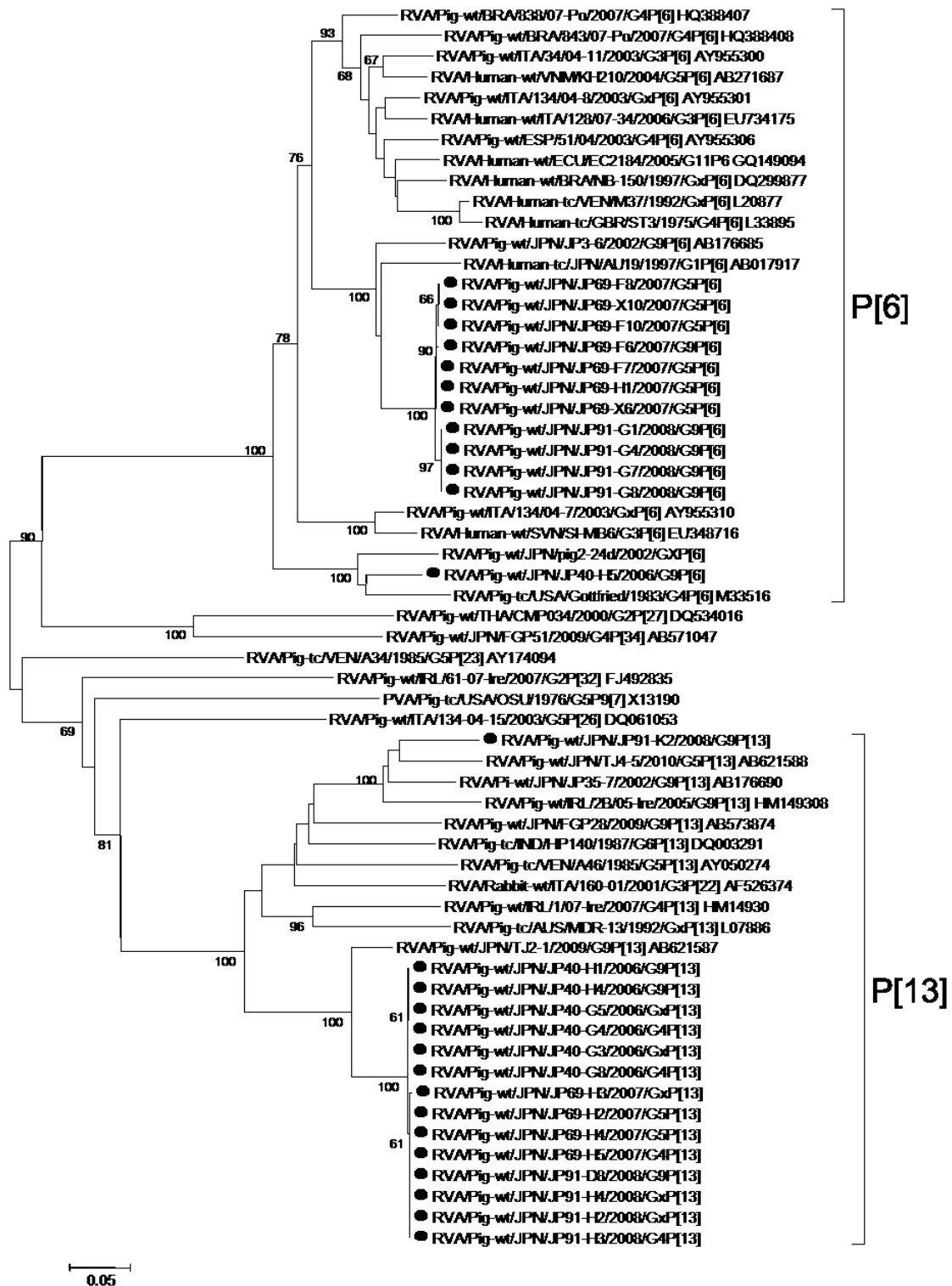


図 2-2 本調査での検出株および GenBank より得た各 P 型株の VP4 遺伝子塩基配列に基づく分子系統樹。OSU 株 (GenBank 登録番号 X13190) の 200 番目から 693 番目に相当する 494 塩基を解析に用いた。解読した塩基配列長が RCWG の基準に満たなかったため推定の P 型を示す。60%以上のブーツストラップ値を各分枝に示す。本調査での検出株を黒丸で示した。株名は RVA/由来動物種-由来材料 (wt, 野外材料; tc, 細胞分離株)/分離国/株名/分離年/G 型と P 型を表す。

第三章

一養豚場の肉豚における RVA 遺伝子排泄動態の
生後から出荷までの追跡調査

序論

第一章では、哺乳豚における RVA 感染症の発生要因の一つとして、既存の RVA と遺伝学的に区別される RVA が農場内に新たに出現することを示した。第二章では、農場内の様々な発育ステージのブタにおいて遺伝学的に多様な RVA が分布すること、また、農場内の異なる発育ステージのブタ間でウイルスが伝播し、混合感染や遺伝子再集合を起こすことにより農場内における遺伝学的多様性を獲得する可能性を明らかにした。

本章では、より詳細に農場内におけるウイルス動態を解明するため、国内一養豚場において肉豚 10 頭を生後から出荷まで追跡し、同一個体における RVA 遺伝子の排泄動態を分子疫学的に調査した。

材料および方法

調査農場

2002年11月から2003年6月にかけて、栃木県内の母豚約900頭を飼養する繁殖肥育一貫経営農場において調査を行った。当該農場において、子ブタは出生後離乳まで分娩舎で母豚と共に腹毎の豚房で飼育した後、28日齢、59日齢および101日齢でそれぞれ離乳舎、子豚舎および肥育舎へ移動した。離乳時には、同日に離乳した他腹由来の子ブタと混合して体格で大別した後、10~12頭を一群として群編成を行った。離乳以降の飼育群の変更はなく、一群一豚房のまま各豚舎へ移動して飼養した。分娩舎、離乳舎、育成舎および肥育舎はすべて連続使用し常にブタが在舎するために、豚舎全体の洗浄消毒は実施していなかったが、ブタの移動後空となった豚房は水洗し逆性石鹼で消毒されていた。豚房間はブタ同士の直接接触が可能な金属柵で仕切られ、また、日齢の異なるブタが隣接する豚房に飼養されることもあった。繁殖候補豚は自家育成であり、外部からのブタの導入はほとんどなかった。繁殖母豚は2棟の妊娠・種付舎で飼育され、分娩1週間前に5棟ある分娩舎のいずれかへ移動したが、移動前の豚体消毒等を行っていなかった。農場外からの病原体の侵入を防ぐ目的で、車両および搬入物品の消毒やシャワー後の農場専用衣類および長靴の着用が義務付けられていた。一方、農場内では豚舎毎の長靴や衣類の交換はなく、豚舎に入る前に長靴を踏み込み消毒するのみであった。飼料については一般の飼料会社より購入しており、餌の切り替えは哺乳前期~後期(5~28日齢)、哺乳中期~離乳前期(10~40日齢)、離乳前期~育成期(35~65日齢)、育成期~肥育前期(60日齢~130日齢)、肥育後期(120日齢以降)で行われていた。

糞便検体

同日に娩出された3腹10頭(3頭または4頭/腹)のブタに耳票を装着して個体識別を行い、生後7日から217日の間、1週間に2回(7~120日齢)または2週間に1回(120日齢以降)直腸便を採取した。哺乳期(7~24日齢)には60検体、離乳期(28~56日齢)には90検体、育成期(59~101日齢)には130検体、肥育期(105~217日齢)には120検体で合計400検体を採取した(表3-1)。採取した糞便は直ちに動物衛生研究所へ冷蔵にて輸送し、糞便性状を正常便(固形便)、軟便、泥状便、および水様便に分類して記録した後、RNA抽出まで-80°Cで保存した。この10頭は離乳後に一群とされ、出荷まで同一群として同一豚房で他のブタと混合されることなく飼養された。

RNA抽出

第一章と同様に10%糞便乳剤を作製後、TRIzol-LSにて総RNAを抽出した。抽出したRNAは50 µlのDNase-RNase free waterで溶解し、RT-PCR法に供するまで-80°Cで保存した。

RT-PCR法によるRVA VP7およびVP4遺伝子の検出

第一章と同様にBeg9/End9プライマーセット(24)を用いてRVA VP7遺伝子の検出を行った。VP4については当初Con3/Con2プライマーセット(21)を用いて遺伝子の増幅を行ったが、検出率が低かったことから、同じCon3/Con2プライマーセットを用いて再増幅を行った。再増幅にはTakara Ex Taq kitを使用し、1 µlのRT-PCR産物に5×バッファーを5 µl、10 mMのdNTPを4 µl、50 µMに調整したフォワードおよびリバースプライマーをそれぞれ0.3 µlずつ、Ex Taqを0.15 µl加え、全量を25 µlとなるよう調整した。反応条件は94°Cで5分間の熱変性後、

94°Cで30秒間, 50°Cで30秒間, 72°Cで1分間を30サイクル繰り返し, 最後に72°Cで10分間保温し, その後4°Cで保存した。しかし, VP4 遺伝子が決定できたのはVP7 遺伝子陽性 71 検体中 24 検体のみであったため, 新たにプライマーセット VP4-13F (5'-GCT TCG CTC ATT TAY AGA C-3') /VP4- 821R (5'-TCT CTA TTA TAT TGC ATT TCT TTC C-3') を設計し, VP7 遺伝子陽性 47 検体について VP4 遺伝子の検出を再度試みた。RT-PCR 法の反応液は第一章と同様に作製し, アニーリング温度を 50°Cとして反応を行った。また, 前述と同様に RT-PCR 法と同じプライマーセットを使用して再増幅を行った。

塩基配列の解読

第一章と同様に, 増幅産物はMicroSpin S-400 HR Columns (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) あるいはQIAquick gel extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA) により精製し, ダイレクトシーケンスにより塩基配列を解読した。得られた塩基配列の組み立て, 編集および解析はMEGA 5 (61) を用いて行った。

解読したRVA VP7およびVP4遺伝子のGおよびP遺伝子型別

第一章と同様に, 解読したVP7およびVP4遺伝子についてBLASTサーチによる相同性検索を行い, RCWGが提唱する分類基準 (45) に従ってGおよびP型別を行った。

分子系統樹解析

検出株およびGenBankより得た株のVP7およびVP4遺伝子の多重配列整列にはCLUSTAL W法, 遺伝学的距離計算にはKimura-2 correction parameterを使用し, 近隣結合法により系統樹解析を行った (43) 。系統樹の信頼性は1000回反復によ

るブーツストラップ確率により評価した。分子系統樹解析はMEGA 5を用いて行った (61)。

解読した塩基配列のGenBank登録番号

本調査で解読した VP7 および VP4 遺伝子は、同じ型に属する株間では塩基配列一致率が 98.7%以上と互いに極めて近縁であった。そのため、下記に示す代表株 15 株の VP7 遺伝子および VP4 遺伝子の塩基配列を GenBank に登録した。登録番号 (accession number) を括弧内に示す。

RVA/Pig-wt/JPN/pig2-98d/2003/G11P[7] (VP7:AB701777, VP4:AB701781),
RVA/Pig-wt/JPN/pig5-31d/2002/G9P[23] (VP7:AB690412, VP4:AB701782),
RVA/Pig-wt/JPN/pig5-88d/2003/G5P[27] (VP7:AB690410, VP4:AB690421),
RVA/pig-wt/JPN/pig6-7d/2002/G4P[6] (VP7:AB690413, VP4:AB701783),
RVA/Pig-wt/JPN/pig8-115d/2003/G2P[34] (VP7:AB690411, VP4:AB690422),
RVA/Pig-wt/JPN/pig8-31d/2002/G9P[6] (VP7:AB701778, VP4:AB701784),
RVA/Pig-wt/JPN/pig8-63d/2003/G2P[27] (VP7:AB701779, VP4:AB701785),
RVA/Pig-wt/JPN/pig9-28d/2002/G5P[6] (VP7:AB690403, VP4:AB690414),
RVA/Pig-wt/JPN/pig9-42d/2002/G5P[13] (VP7:AB690404, VP4:AB690415),
RVA/Pig-wt/JPN/pig9-49d/2002/G5P[7] (VP7:AB690405, VP4:AB690416),
RVA/Pig-wt/JPN/pig9-59d/2003/G11P[27] (VP7:AB690406, VP4:AB690417),
RVA/Pig-wt/JPN/pig9-94d/2003/G11P[13] (VP7:AB690407, VP4:AB690418),
RVA/Pig-wt/JPN/pig9-98d/2003/G5P[13] (VP7:AB690408, VP4:AB690419),
RVA/Pig-wt/JPN/pig9-112d/2003/G11P[13] (VP7:AB701780, VP4:AB701786),
RVA/Pig-wt/JPN/pig9-115d/2003/G11P[34] (VP7:AB690409, VP4:AB690420)。

統計学的解析

軟便, 泥状便および, 水様便を下痢便とし, 正常便と下痢便におけるRVA遺伝子検出率の比較をカイ二乗検定にて行った。

結果

RVA VP7 遺伝子の検出率

10 頭のブタから採取した計 400 検体の直腸便中 71 検体 (17.8%) で RVA VP7 遺伝子が検出された。検出率は離乳期において 37.8% と最も高く、次いで育成期 (20.0%)、肥育期 (6.7%)、そして哺乳期 (3.3%) の順であった。

RVA VP7 遺伝子の検出と下痢との関連

離乳期から肥育期にかけて採取した 340 検体中 111 検体 (32.6%) は、軟便、泥状便、水様便などの下痢便であった (表 3-1)。下痢の発生率は育成期において最も高く (57.7%, 75/130)、次いで離乳期 (17.8%, 16/90)、肥育期 (16.7%, 20/120) の順であった。肥育期においては下痢便における RVA VP7 遺伝子の検出率 (20.0%, 4/20) が正常便の検出率 (4.0%, 4/100) と比較して有意に高かった ($P < 0.01$)。同様に、正常便よりも下痢便において RVA VP7 遺伝子の検出率が高くなる結果が離乳期 (56.3%, 9/16 vs. 33.8%, 25/74) と育成期 (22.7%, 17/75 vs. 18.2%, 10/55) でも確認されたが、統計学的に有意ではなかった。哺乳期に RVA VP7 遺伝子が検出されたのは 2 検体のみであったため、RVA 遺伝子検出と下痢との関連は解析できなかった。1 検体については下痢便より検出されたが、他方については記録前に糞便処理を行ったために糞便性状は不明であった。

RVA VP7 遺伝子の遺伝学的解析と G 遺伝子型別

VP7 遺伝子が検出された 71 検体中 60 検体において、OSU 株 VP7 遺伝子の 278~1001 番目に相当する 724 塩基長の塩基配列を決定した。一方、8 検体では複数株 RVA の混在を示唆するシーケンスの波形データが得られたことにより、

また、3 検体では解析困難な波形データにより塩基配列が決定できなかった。

BLAST サーチによる相同性検索と各 G 型代表株を含めた分子系統樹解析により、60 株中 34 株は G5 型、15 株は G11 型、6 株は G2 型、4 株は G9 型、そして 1 株は G4 型にそれぞれ分類された (図 3-1)。同じ G 型に属する検出株の VP7 遺伝子塩基配列の一致率は 98.7%以上と高く、遺伝学的に極めて近縁であった。

G5 型検出株 34 株はブタ RVA 代表株である OSU 株に 91.9~92.9%、ベネズエラのブタ由来 G5 型株である A34 株に 90.5~91.8%の塩基配列一致率を示し、これらの株と遺伝学的に最も近縁であった (表 3-2)。他の G5 型代表株には 82.6~89.5%の塩基配列一致率を示した。一方、G11 型検出株 15 株は、古典的なブタ由来 G11 型株である YM 株 (メキシコ由来) に 85.9~86.0%の塩基配列一致率しか示さなかったが (表 3-3)、エクアドルのヒト由来 EC2184 株やベネズエラのブタ由来 A253 株に 88.6~91.7%の塩基配列一致率を示し、これらと遺伝学的にも最も近縁であった。G2 型検出株 6 株はタイ国、イタリアおよびアイルランドのブタ由来 G2 型株である CMP034, 34461-4 および 48/07-Ire 株と同じクラスターに分類されたが、塩基配列一致率は 85.5~87.3%と低値であった (表 3-4)。また、米国、バングラデシュおよび中国のヒト由来 G2 型株である DS-1, MMC6 および TB-Chen 株に対しても 79.8~81.5%の塩基配列一致率しか示さなかった。G9 型検出株 4 株は日本のブタ由来 G9 型株である JP3-6 株に最も近縁であり、同株の VP7 遺伝子に対して 98.0%~98.2%の塩基配列一致率を示した (表 3-5)。その他の G9 型株の VP7 遺伝子に対する塩基配列の一致率は 84.7~93.5%であった。また、G4 型検出株は古典的なブタ由来 G4 型株である Gottfried 株 (米国由来) や ST3 株 (英国由来) とは遺伝学的に遠く、82.0~83.3%の塩基配列一致率しか示さなかった (表 3-6)。一方、ブラジルのブタ由来 G4 型株である BRA838/07-Po および ICB2185 株、ならびにメキシコのヒト由来株である D151

株と遺伝学的に近縁であったが、塩基配列一致率は 83.6~85.0%と低値であった。

RVA VP4 遺伝子の遺伝学的解析と P 遺伝子型別

VP7 遺伝子が検出された 71 検体中、Con3/Con2 プライマーセットによる RT-PCR 法で VP4 遺伝子が検出されたのは 19 検体、同プライマーセットによる RT-PCR 産物の再増幅で検出されたのは 7 検体の計 26 検体であり、そのうち VP4 遺伝子の塩基配列が決定できたのは 24 検体のみであった。VP7 遺伝子陽性の残り 47 検体について、VP4-13F/VP4-821R プライマーセットにより再検査した結果、RT-PCR 法により 26 検体、RT-PCR 産物の再増幅により 21 検体の計 47 検体で VP4 遺伝子が検出され、うち 41 検体で VP4 遺伝子の塩基配列が決定できた。すなわち、2 組のプライマーセットを使用した結果、VP7 遺伝子陽性 71 検体中 65 検体で OSU VP4 遺伝子の 172~879 番目に相当する 708 塩基長の塩基配列を決定した。一方、4 検体では複数株 RVA の混在を示唆するシーケンスの波形データが出現したことにより、また、2 検体では解析困難な波形データにより塩基配列が決定できなかった。

BLAST サーチによる相同性検索と各 P 型代表株を含めた系統樹解析により、これら 65 株中 28 株は P[7]型、16 株は P[13]型、10 株は P[27]型、5 株は P[6]型、4 株は P[34]型、そして 2 株は P[23]型に分類された (図 3-2)。なお、今回解読した VP4 塩基配列の長さは RCWG の提唱する基準に満たなかったため、すべて推定とした。

P[6], P[7], P[23], P[27], および P[34]型に分類された検出株では、同じ P 型に属する検出株の VP4 遺伝子塩基配列一致率は 99.0%以上と高く、分子系統樹上でもそれぞれの P 型検出株は一つの枝に集束して分類された。一方、P[13]型検出株間の塩基配列一致率は 77.7~100%と幅広く、分子系統樹上においても 3 つのク

クラスターに分類された。各クラスター内における VP4 遺伝子の塩基配列一致率はそれぞれ 99.9%以上と高い一方、クラスター間での塩基配列一致率は最高でも 78.9%と低値であった。

P[6]型検出株計 5 株は古典的なブタ由来 P[6]型株である Gottfried 株と遺伝学的に最も近縁であり、88.2%の塩基配列一致率を示した (表 3-7)。一方、その他の P[6]型代表株に対する塩基配列一致率は 77.4~80.1%と低値であった。同様に、P[7]型検出株計 28 株は古典的ブタ由来 P[7]型株である OSU 株や韓国のブタ由来 07-109-8 株に遺伝学的に近縁であり、これら 2 株に対して 94.7~95.3%の塩基配列一致率を示した (表 3-8)。P[23]型検出株 2 株は日本、韓国およびベネズエラのブタ由来 P[23]型株である JP32-4 ,06-285 および A34 株と遺伝学的に近縁であり、これら 3 株に対して 87.8~91.1%の塩基配列一致率を示した (表 3-9)。他の P[23]型代表株に対する塩基配列一致率は 84.4~87.7%であった。P[27]型検出株はブタ由来 P[27]型株である CMP034 株 (タイ国由来) に最も近縁であったが、塩基配列一致率は 84.8~85.6%と低値であり、その他の P[27]型株に対しても 77.1~85.4%の塩基配列一致率しか示さなかった (表 3-10)。P[34]型検出株はブタ由来 P[34]型株である FGP51 株 (日本由来) に最も近縁であったが、塩基配列一致率は 82.9~83.3%と低値であった。

P[13]型検出株は分子系統樹において 3 つのクラスターに区別された (図 3-2)。1 つ目のクラスターは、ブタ由来 P[13]型株である MDR-13 株 (オーストラリア由来) に最も近縁であったことから、MDR-13 クラスターとした。MDR-13 クラスターには 3 回目と 4 回目のウイルス排泄ピーク時に検出された 6 株が分類された。これら 6 株は MDR-13 株とは 88.5~88.7%の塩基配列一致率を示したが、その他の P[13]型代表株には 76.3~79.9%の塩基配列一致率しか示さなかった (表 3-11)。2 つ目のクラスターは古典的なブタ由来 P[13]型株である HP140

株 (インド由来) と日本のブタ由来 FGP28 株を含むクラスター (HP140 クラスターと標記) で, 5 回目ピーク時に検出された 2 株が分類された。これら 2 株は FGP28 株と遺伝学的に最も近縁であり, 93.3%の塩基配列一致率を示したが, その他の P[13]型代表株には 77.4~82.3%の塩基配列一致率しか示さなかった。3 目のクラスターはブタ由来 P[13]型株である A46 株 (ベネズエラ由来), JP35-7 株 (日本由来), および 2B/05-Ire 株 (アイルランド由来) を含むクラスター (A46 クラスターと標記) で, 1 回目から 2 回目のピークに検出された 8 株が分類された。これら 8 株は 2B/05-Ire および JP35-7 株に 85.1~85.6%の塩基配列一致率を示したが, その他の P[13]型代表株には 76.5~80.4%の塩基配列一致率しか示さなかった。

ブタ 10 頭における RVA 排泄パターンと G 型および P 型の変化

ブタ 10 頭における生後 7 日~217 日の RVA 排泄状況と検出された G/P 型を表 3-12 に示した。個体毎にみると, ウイルス排泄は平均 28 日齢 (範囲: 7~42 日齢) から開始し, 平均 109 日齢 (範囲: 98~119 日齢) まで持続した。ウイルス排泄は間欠的に繰り返して計 4~6 回確認され, その間隔は 7~52 日間であった。

ブタ 10 頭から 13 種類の G/P 型 (G2P[27], G2P[34], G4P[6], G5P[6], G5P[7], G5P[13], G5P[27], G9P[6], G9P[23], G11P[7], G11P[13], G11P[27], G11P[34]) が確認された。各個体では, 2~3 種類の G 型と 2~5 種類の P 型による計 3~6 種類の G/P 型が確認された。同じ G 型または P 型遺伝子の再排泄は 8 頭 (ブタ#2~#4, #6~#10) で確認され, 6 頭 (ブタ#3, #4, #6, #7, #9, #10) では同じ G/P 型を 10~56 日の間隔で再排泄していた。

次に, ブタ 10 頭における RVA 遺伝子の排泄状況を経時的に確認したところ, 計 5 回の排泄ピークが確認された。1 回目の排泄ピークは離乳後 1 週間以内である 28~31 日齢に観察された。7 頭 (ブタ#1, #3, #5, #7~#10) においては RVA 遺伝

子が初めて検出されたのに加え、哺乳期に RVA 遺伝子が検出された 2 頭 (ブタ #2 および #6) においても RVA 遺伝子が確認された。このピークでは 2 種類の G 型 (G5 および G9) と 3 種類の P 型 (P[6], P[13], および P[23]) による計 4 種類の G/P 型 (G5P[6], G5P[13], G9P[6], および G9P[23]) が確認された。また, 31 日齢の 2 頭 (ブタ#2 および #9) では複数株の混在が確認された。

2 回目の排泄ピークは 1 回目のピークから約 2 週間後となる 42~49 日齢に同じ離乳舎において確認された。このピークでは 10 頭全頭より RVA 遺伝子が確認されたが, うち 9 頭では 1 回目のピークでも RVA 遺伝子が確認されていた。このピークでは G5 型と P[7]型または P[13]型の組合せが優勢に検出され, 4 頭 (45 日齢のブタ#1, #3 および#5 ならびに 49 日齢のブタ#8) では複数株の混在が確認された。5 頭 (ブタ#3, #6, #7, #9, および#10) では 1 回目と 2 回目の両方のピークで G5 型の VP7 遺伝子が検出されたが, うち 2 頭 (ブタ#7 および #10) でのみ同じ G/P 型である G5P[13]が確認された。1 回目と 2 回目のピークで検出された P[13]型の VP4 遺伝子は同じ A46 クラスタに属していた。

3 回目の排泄ピークは育成舎へ移動する前後である 56~59 日齢にかけて観察され, G11 型と P[13], P[27], または P[34]型の組合せが優勢に確認された。2 頭 (ブタ#3, #10) において 2 回目と 3 回目のピークの両方で P[13]型が検出されたが, 3 回目ピークで確認された P[13]型は MDR-13 クラスタに属し, 2 回目ピークで確認された P[13]型とは遺伝学的に異なっていた。また, このピークでは 1 頭 (59 日齢のブタ#7) において, 複数株の混在が確認された。59~73 日齢にかけては散発的に 4 頭より G2P[27]型が検出された (59 日齢のブタ#6, 63 日齢のブタ#8, 66 日齢のブタ#4, および 73 日齢のブタ#2) 。

4 回目の排泄ピークは肥育舎への移動 2 週間前である 92 日齢から始まり, 98 日齢でピークとなり, 移動後の 105 日齢まで確認された。このピークでは G5P[7]

型が優勢に検出された。4頭 (ブタ#2, #4, #6, および#7) では2回目のピークでも P[7]型が検出されており, そのうち3頭 (ブタ#4, #6, および#7) は同じ G/P 型である G5P[7]のウイルスを再排泄していた。4回目のピークでは他にも G5P[13], G5P[27], G11P[7], および G11P[13]が3頭 (ブタ#2, #4, および#6) で確認され, 98日齢の3頭 (ブタ#1, #7, および#10) では複数株の混在が確認された。2頭 (ブタ#9 および#10) で P[13]型遺伝子の再排泄が確認されたが, この P[13]型の VP4 遺伝子は3回目ピーク時に検出された P[13]型と同様に MDR-13 クラスターに属し, 1回目および2回目ピーク時に確認された A46 クラスターの P[13]型とは遺伝学的に離れていた。

5回目の排泄ピークは肥育舎移動後10日である112日齢から119日齢にかけて観察され, G2P[34], G11P[7], G1P[13], および G11P[34]型が散発的に確認された。2頭 (ブタ#3 および#9) で確認された P[13]型の VP4 遺伝子は HP140 クラスターに属し, 1回目から4回目に検出された P[13]型とは遺伝学的に区別された。また, 119日齢の1頭 (ブタ#10) において複数株の混在が確認された。

考察

本章では、農場内における RVA の動態をより詳細に解明するため、国内一養豚農場の肉豚 10 頭において、出生から出荷までの RVA 遺伝子の排泄状況調査と検出される RVA の分子疫学的解析を行った。

本調査では、RVA 排泄は 10 頭において生後 7~119 日と哺乳期や離乳期のみならず育成期や肥育期まで確認された。一方, Fu らによる同様の調査では、すべてのブタで 40 日齢以前にはウイルス排泄が認められるが、60 日齢以降は出荷時までウイルス排泄は確認されていない (16, 17)。両調査の結果が異なった要因の一つとして検査方法の違いが考えられた。すなわち, Fu らは市販の抗原検出 ELISA で RVA 排泄の確認を行ったが (16, 17), 我々は ELISA よりも 100 倍から 1,000 倍感度が高いとされる RT-PCR 法により調査を行った (28)。Steyer らは、我々と同様の VP7 遺伝子を標的とした RT-PCR 法により、哺乳豚や離乳豚のみならず 70 日齢以上の肥育豚からも RVA 遺伝子を検出し、その陽性率は 18.9%と高値であったことを報告している (59)。また, Benfield らは分娩前後の母豚から RVA を分離している (3)。これらの報告と今回の調査成績を合わせると、RVA 感染はブタの生涯を通じて起こると考えられた。

検出された RVA の G 型および P 型を決定した結果、少なくとも 5 種類の G 型 (G2, G4, G5, G9, G11), 6 種類の P 型 (P[6], P[7], P[13], P[23], P[27], P[34]), および 13 種類の G/P 型 (G2P[27], G2P[34], G4P[6], G5P[6], G5P[7], G5P[13], G5P[27], G9P[6], G9P[23], G11P[7], G11P[13], G11P[27], G11P[34]) が確認され、調査農場に浸潤する RVA は遺伝学的に非常に多様であることが明らかにされた。この結果は、第二章で得られた成績や、同一農場内に複数の RVA 株が検出されたとするこれまでの報告 (2, 38) と同様の結果であり、養豚農場に存在する RVA の遺

伝学的多様性をより証拠づけるものと考えられた。

本調査では、RVA の排泄ピークにおいて複数の G 型あるいは P 型が確認される傾向があり、また、各ピークにおいて複数株 RVA の混在を示唆するシーケンス波形データも認められた。これらのことから、農場内では複数株の RVA による混合感染も起きていると考えられた。さらに、同一の遺伝子型に属する検出株の VP7 遺伝子および VP4 遺伝子はほぼ同一である一方、異なる G/P 型をもつ株が確認されたことから (表 3-12)、農場内で遺伝子再集合が起きている可能性が示唆された。以上の結果より、農場内 RVA の伝学的多様性は、混合感染とその結果により生じる遺伝子再集合によって維持されている可能性が示唆された。

これまでにブタにおける RVA の再排泄は確認されていたが (4, 16)、それは再感染によるものなのか、検出できないレベルでの持続感染なのかは不明であった。本調査においても RVA の排泄は繰り返し確認された。遺伝子解析の結果、再排泄時には、ほとんどの検体において異なる G/P 型が確認されたことから、ブタは多様な RVA に繰り返し暴露されることにより異なる G/P 型をもつ RVA を繰り返し排泄すると考えられた。ウイルス排泄と G/P 型の変化はブタの豚舎移動に伴って確認されたことから、ブタは豚舎移動時に各豚舎に存在する RVA 株に暴露され、その結果、RVA を繰り返し排泄する可能性が示唆された。また、Deguchi らは離乳時の群編成に伴うストレスにより、B および T リンパ球の機能が 3~4 週間にわたって低下し、呼吸器病に罹患しやすくなることを報告している (10)。調査農場では離乳時に体格による群編成を行っていたことから、ストレスに起因するリンパ球の機能低下により RVA に易感染性となり、繰り返し RVA を排泄した可能性も考えられた。さらに、ウイルス排泄と G/P 型の変化は在舎期間中にも確認された。これは、各豚舎における豚部屋の仕切りは金属柵であり隣接する

豚房のブタとの直接接触が可能であったこと、また豚舎を連続使用していたために日齢の異なるブタが隣接豚房へ移動することもあったことを考慮すると、隣接する豚房のブタからウイルスが水平伝播した可能性も考えられた。また、当該農場は外部からの病原体の侵入防止に対しては厳密な対策をとっていたが、農場内では豚舎毎の衣類や長靴の交換はなく豚舎間での消毒は踏み込み消毒槽の使用のみであったことから、農場内で管理者がウイルスを伝播した可能性も考えられた。一方、ウイルス排泄および遺伝子型の変化と発育に伴う飼料の変化には関連が認められなかった。

近年、ブタやウシにおける RVA の不顕性感染は、種間伝播や遺伝子再集合によるヒト RVA 新興株の発生源として懸念されている (1, 8, 59)。本調査により、ブタでは生後から出荷までに高頻度に不顕性感染が起きている可能性を明らかにした。Abe ら (1) は正常牛から、また、Collins ら (8) は正常豚から培養細胞を用いて RVA を分離している。これらのことから、ウイルス分離などにより検出株の感染性の確認は行っていないが、今回の調査において正常豚から検出された RVA は感染性を保持している可能性があると考えられた。

ブタと飼育管理者間で RVA が種間伝播し、その結果としてヒトで効率的に増殖する遺伝子再集合体が生じる可能性は常に懸念されており (49)、種間伝播を最小限にする管理が重要と考えられる。今回の成績において、RVA 遺伝子がブタ糞便中で繰り返し検出されたことから、今まで考えられていた以上に、ブタの糞便中には RVA が高頻度に存在すると推測される。すでに Steyer らが報告したように (59)、ブタなどの家畜糞尿は広く肥料として農業に使用されていること、また、RVA は環境中で極めて安定であることを考えると、ブタの糞中に排泄された RVA による河川の汚染や肥料を介した生野菜の汚染の有無についても今後調査を行っていく必要があると考えられる。

本章では、国内一養豚場における肉豚 10 頭の追跡調査により、ブタは繰り返し多様な RVA 遺伝子を排泄することを明らかにした。その排泄と G/P 型の変化は主にブタの豚舎移動時に認められるが、時に在舎期間中にも起こることを示した。また、農場内で頻繁に RVA の混合感染が発生することが明らかにされ、その結果として生じる遺伝子再集合により RVA は遺伝学的多様性を維持し、農場に常在する可能性が考えられた。これらの知見は、農場内における RVA の存続機構の解明に寄与できるものと考えられる。

表 3-1 離乳期, 育成期, および肥育期における下痢発生率ならびに正常便と下痢便における RVA VP7 遺伝子検出率の比較 ^{a)}

	検体数	下痢便検体数 (%)	RVA VP7遺伝子検出検体数 (%)	
			正常便	下痢便
離乳期				
(28~56日齢)	90	16 (17.8%)	25 (33.8%)	9 (56.3%)
育成期				
(59~101日齢)	130	75 (57.7%)	10 (18.2%)	17 (22.7%)
肥育期				
(105~217日齢)	120	20 (16.7%)	4 (4.0%)*	4 (20.0%)*

^{a)} 軟便から水様便を呈したものを下痢便とした。

* RVA VP7 遺伝子検出率が下痢便において正常便よりも有意に高いことを示す ($P < 0.01$)。

表 3 - 2 G5 型検出株の GenBank より得た同型代表株に対する VP7 塩基配列一致率

代表株	G5 型検出株 34 株に対する塩基配列一致率 (%)
RVA/Pig-tc/VEN/A34/1985/G5P[23]	90.5~91.8
RVA/Pig-tc/USA/OSU/1977/G5P9[7]	91.9~92.9
RVA/Pig-wt/ITA/134/04-15/2003/G5P[26]	88.4~89.5
RVA/Pig-wt/THA/CMP178/200X/G5P[X]	82.6~84.0
RVA/Human-tc/BRA/IAL-28/1992/G5P[8]	84.7~85.7
RVA/Pig-tc/ARG/C134/1986/G5P9	84.6~85.5
RVA/Human-wt/CHN/LL3354/2000/G5P[6]	84.0~84.6

各検出株に対して最も高い塩基配列一致率を太字で示した。株名は RVA/由来動物種-由来材料 (wt, 野外材料; tc, 細胞分離株) /分離国/株名/分離年/G 型と P 型を表す。

表 3-3 G11 型検出株の GenBank より得た同型代表株に対する VP7 塩基配列一致率

代表株	G11 型検出株 15 株に対する塩基配列一致率 (%)
RVA/Human-wt/ECU/EC2184/2005/G11P[6]	91.5~91.7
RVA/Pig-tc/VEN/A253/1988/G11P9[7]	88.6~88.7
RVA/Pig-wt/IRL/60/07-Ire/2007/G11P[26]	87.1~87.3
RVA/Pig-tc/MEX/YM/1983/G11P9[7]	85.9~86.0
RVA/Human-wt/NPL/KTM368/2004/G11P[25]	86.0~86.2

各検出株に対して最も高い塩基配列一致率を太字で示した。株名は RVA/由来動物種-由来材料 (wt, 野外材料; tc, 細胞分離株) /分離国/株名/分離年/G 型と P 型を表す。

表 3 - 4 G2 型検出株の GenBank より得た同型代表株に対する VP7 塩基配列一致率

代表株	G2 型検出株 6 株に対する塩基配列一致率 (%)
RVA/Human-wt/CHN/TB-CHen/1996/G2P[4]	80.9~81.1
RVA/Human-wt/BGD/MMC6/2005/G2P[4]	81.4~81.5
RVA/Human-tc/USA/DS-1/1976/G2P[4]	79.8~79.9
RVA/Pig-wt/IRL/48/07-Ire/2007/G2P[32]	85.5~85.5
RVA/Pig-wt/ESP/34461-4/2003/G2P[23]	85.6~85.9
RVA/Pig-wt/THA/CMP034/2000/G2P[27]	87.0~87.3

各検出株に対して最も高い塩基配列一致率を太字で示した。株名は RVA/由来動物種-由来材料 (wt, 野外材料; tc, 細胞分離株) /分離国/株名/分離年/G 型と P 型を表す。

表 3 - 5 G9 型検出株の GenBank より得た同型代表株に対する VP7 塩基配列一致率

代表株	G9 型検出株 4 株に対する塩基配列一致率 (%)
RVA/Pig-wt/JPN/JP3-6/2002/G9P[6]	98.0~98.2
RVA/Human/CHN/t203/XXXX/G9P[X]	93.4~93.5
RVA/Human/THA/Mc345/G9P[X]	90.4~90.5
RVA/Pig-wt/JPN/Hokkaido-14/2001/G9P[23]	90.8~91.0
RVA/Human-wt/USA/OM46/1998/G9P[8]	87.6~87.7
RVA/Human-tc/IND/116E/1985/G9P[11]	84.7~84.9

各検出株に対して最も高い塩基配列一致率を太字で示した。株名は RVA/由来動物種-由来材料 (wt, 野外材料; tc, 細胞分離株)/分離国/株名/分離年/G 型と P 型を表す。

表 3 - 6 G4 型検出株の GenBank より得た同型代表株に対する VP7 塩基配列一致率

代表株	G4 型検出株 (pig6-7d) に対する塩基配列一致率 (%)
RVA/Pig-wt/BRA/ICB2185/XXXX/G4P[X]	84.0
RVA/Human-wt/MEX/D151/1988/G4P[6]	83.0
RVA/Pig-wt/BRA838/07-Po/2007/G4P[6]	85.0
RVA/Pig-wt/BRA843/07-Po/2007/G4P[6]	83.6
RVA/Pig-tc/USA/Gottfried/1983/G4P[6]	82.0
RVA/Human-tc/GBR/ST3/1975/G4P2A[6]	83.3
RVA/Pig-wt/THA/CMP77/XXXX/G4P[X]	82.6

各検出株に対して最も高い塩基配列一致率を太字で示した。株名は RVA/由来動物種-由来材料 (wt, 野外材料; tc, 細胞分離株) /分離国/株名/分離年/G 型と P 型を表す。

表 3 - 7 推定 P[6]型検出株の GenBank より得た同型代表株に対する VP4 塩基配列一致率

代表株	推定 P[6]型検出株 5 株に対する塩基配列一致率 (%)
RVA/Pig-tc/USA/Gottfried/1983/G4P[6]	88.2
RVA/Pig-wt/JPN/JP3-6/2002/G9P[6]	77.4
RVA/Human-tc/VEN/M37/1992/GxP[6]	80.1
RVA/Human-tc/GBR/ST3/1975/G4P[6]	79.9
RVA/Pig-wt/ITA/221/04-20/XXXX/GxP[6]	78.7

解読した VP4 塩基配列長が RCWG の基準に満たないため、P[6]型検出株の P 型は推定である。各検出株に対して最も高い塩基配列一致率を太字で示した。また、株名は RVA/由来動物種-由来材料 (wt, 野外材料; tc, 細胞分離株) /分離国/株名/分離年/G 型と P 型を表す。

表 3-8 推定 P[7]型検出株の GenBank より得た同型代表株に対する VP4 塩基配列一致率

代表株	推定 P[7]型検出株 28 株に対する塩基配列一致率 (%)
RVA/Pig-wt/IRL/2/07-Irc/2007/G4P[7]	89.6~90.1
RVA/Pig-wt/AUS/BMI-1/1992/GxP[7]	91.7~91.7
RVA/Pig-wt/JPN/TJ3-2/2009/G3P[7]	94.3~94.7
RVA/Pig-wt/KOR/07-109-8/2007/G8P[7]	94.9~95.3
RVA/Pig-tc/USA/OSU/G5P9[7]	94.7~95.2

解読した VP4 塩基配列長が RCWG の基準に満たないため、P[7]型検出株の P 型は推定である。各検出株に対して最も高い塩基配列一致率を太字で示した。また、株名は RVA/由来動物種-由来材料 (wt, 野外材料; tc, 細胞分離株) /分離国/株名/分離年/G 型と P 型を表す。

表 3 - 9 推定 P[23]型検出株の GenBank より得た同型代表株に対する VP4 塩基配列一致率

代表株	推定 P[23]型検出株 2 株に対する塩基配列一致率 (%)
RVA/Pig-tc/VEN/A34/1985/G5P[23]	89.2
RVA/Pig-wt/JPN/JP32-4/2002/G9P[23]	90.8-91.1
RVA/Pig-wt/KOR/06-285/2006/G9P[23]	87.8~88.0
RVA/Pig-wt/THA/CMP48/08/2008/G3P[23]	84.4
RVA/Pig-wt/JPN/Hokkaido-14/2001/G9P[23]	87.1~87.7

解読した VP4 塩基配列長が RCWG の基準に満たないため、P[23]型検出株の P 型は推定である。各検出株に対して最も高い塩基配列一致率を太字で示した。また、株名は RVA/由来動物種-由来材料 (wt, 野外材料; tc, 細胞分離株)/分離国/株名/分離年/G 型と P 型を表す。

表 3-10 推定 P[27]型検出株の GenBank より得た同型代表株に対する VP4 塩基配列一致率

代表株	推定 P[27]型検出株 10 株に対する塩基配列一致率 (%)
RVA/Pig-wt/THA/CMP034/2000/G2P[27]	84.6~85.4
RVA/Pig-wt/SVN/P21-5/XXXX/G1P[27]	80.5~81.3
RVA/Pig-wt/ITA/344-04-1/2004/G5P[27]	77.1~77.8

解読した VP4 塩基配列長が RCWG の基準に満たないため、P[27]型検出株の P 型は推定である。各検出株に対して最も高い塩基配列一致率を太字で示した。また、株名は RVA/由来動物種-由来材料 (wt, 野外材料; tc, 細胞分離株)/分離国/株名/分離年/G 型と P 型を表す。

表 3-1-1 推定 P[13]型検出株の GenBank より得た同型代表株に対する VP4 塩基配列一致率

クラスター	代表株	各クラスターに属する推定 P[13]検出株に対する塩基配列一致率 (%)		
		MDR-13 (6 株)	HP140 (2 株)	A46 (8 株)
MDR-13	RVA/Pig-tc/AUS/MDR-13/1992/GxP[13]	88.5~88.7	77.4	78.7~78.9
	RVA/Pig-wt/IRL/1/07-Ire/2007/G4P[13]	79.8~79.9	79.0	76.5~76.6
HP140	RVA/Pig-tc/IND/HP140/1987/G6P[13]	76.3~76.5	82.3	80.2~80.4
	RVA/Pig-wt/JPN/FGP28/2009/G9P[13]	78.4~78.6	93.3	80.1~80.2
A46	RVA/Pig-tc/VEN/A46/1985/G5P[13]	76.3~76.5	79.3	80.1~80.2
	RVA/Pi-wt/JPN/JP35-7/2002/G9P[13]	78.1~78.3	79.0	85.1~85.3
	RVA/Pig-wt/IRL/2B/05-Ire/2005/G9P[13]	78.3~78.4	79.8	85.4~85.6

解読した VP4 塩基配列長が RCWG の基準に満たないため、P[13]型検出株の P 型は推定である。各検出株に対して最も高い塩基配列一致率を太字で示した。また、株名は RVA/由来動物種-由来材料 (wt, 野外材料; tc, 細胞分離株)/分離国/株名/分離年/G 型と P 型を表す。

表 3-12 ブタ 10 頭の生後 7 日目から 217 日目にかけて検出された RVA の G/P 型^{a)} (続く)

発育 ステージ	日齢	豚				
		#1	#2	#3	#4	#5
哺乳期	7	- ^{b)}	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-
	17	-	-	-	-	-
	21	-	-	-	-	-
	24	-	GndP[6]	-	-	-
離乳期	28	G9P[6]	-	G5P[6]	-	-
	31	G9P[23]	GxP[x]	G5P[6]	-	G9P[23]
	35	-	-	-	-	-
	38	G5P[7]	-	-	-	-
	42	G5P[7]	G5P[7]	G5P[13]	G5P[7]	-
	45	GxP[7]	G5P[7]	GxP[13]	G5P[7]	GxP[7]
	49	-	-	-	-	-
	52	-	-	-	-	-
	56	-	-	G11P[13]	-	-
育成期	59	G11P[34]	G11P[nd]	G11P[13]	G11P[27]	-
	63	-	-	-	-	-
	66	-	-	-	G2P[27]	-
	70	-	-	-	-	-
	73	-	G2P[27]	-	-	-
	77	-	-	-	-	-
	80	-	-	-	-	-
	84	-	-	-	-	-
	88	-	-	-	-	G5P[27]
	92	-	-	-	-	-
	94	-	GndP[7]	-	-	-
98	GxP[27]	G11P[7]	G5P[7]	G5P[7]	-	
101	-	-	-	G5P[7]	-	
肥育期	105	-	-	-	G5P[7]	-
	108	-	-	-	-	-
	112	-	-	-	-	-
	115	-	-	G11P[13]	-	-
	119	-	-	-	G11P[7]	G2P[34]
	133	-	-	-	-	-
	148	-	-	-	-	-
	161	-	-	-	-	-
	175	-	-	-	-	-
	189	-	-	-	-	-
	203	-	-	-	-	-
217	-	-	-	-	-	

a) 解読した塩基配列長が RCWG の基準に満たなかったため推定の P 型を示す。

b) -, RT-PCR 法により VP7 遺伝子あるいは VP4 遺伝子が検出されなかった検体; Gx または P[x], 複数 RVA 株の混在を示唆するシーケンス波形データにより遺伝子型別が不可能であった検体; Gnd はたは P[nd], シーケンスの波形データの乱れにより遺伝子型別が不可能であった検体。

表 3-12 ブタ 10 頭の生後 7 日目から 217 日目にかけて検出された RVA の G/P 型^{a)}(続き)

	日齢	豚				
		#6	#7	#8	#9	#10
哺乳期	7	G4P[6]	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-
	17	-	-	-	-	-
	21	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-
離乳期	28	G5P[6]	-	-	G5P[6]	G5P[13]
	31	-	-	G9P[6]	GxP[x]	-
	35	-	G5P[13]	-	-	-
	38	-	-	-	-	-
	42	G5P[7]	G5P[7]	-	G5P[13]	G5P[13]
	45	G5P[7]	G5P[13]	G5P[7]	-	G5P[13]
	49	-	-	G5P[x]	G5P[7]	-
	52	-	-	-	-	-
	56	-	-	-	-	G11P[13]
育成期	59	G2P[27]	G11P[x]	-	G11P[27]	G11P[27]
	63	-	-	G2P[27]	-	-
	66	-	-	-	-	-
	70	-	-	-	-	-
	73	-	-	-	-	-
	77	-	-	-	-	-
	80	-	-	-	-	-
	84	-	-	-	-	-
	88	-	-	-	-	-
	92	G5P[7]	-	-	-	-
	94	G5P[7]	G5P[7]	-	G11P[13]	-
	98	G5P[7]	GxP[7]	-	G5P[13]	GxP[13]
101	G5P[7]	-	-	-	-	
肥育期	105	-	-	-	-	-
	108	-	-	-	-	-
	112	-	-	-	G11P[13]	-
	115	-	-	G2P[34]	G11P[34]	GxP[nd]
	119	-	-	-	-	-
	133	-	-	-	-	-
	148	-	-	-	-	-
	161	-	-	-	-	-
	175	-	-	-	-	-
	189	-	-	-	-	-
	203	-	-	-	-	-
	217	-	-	-	-	-

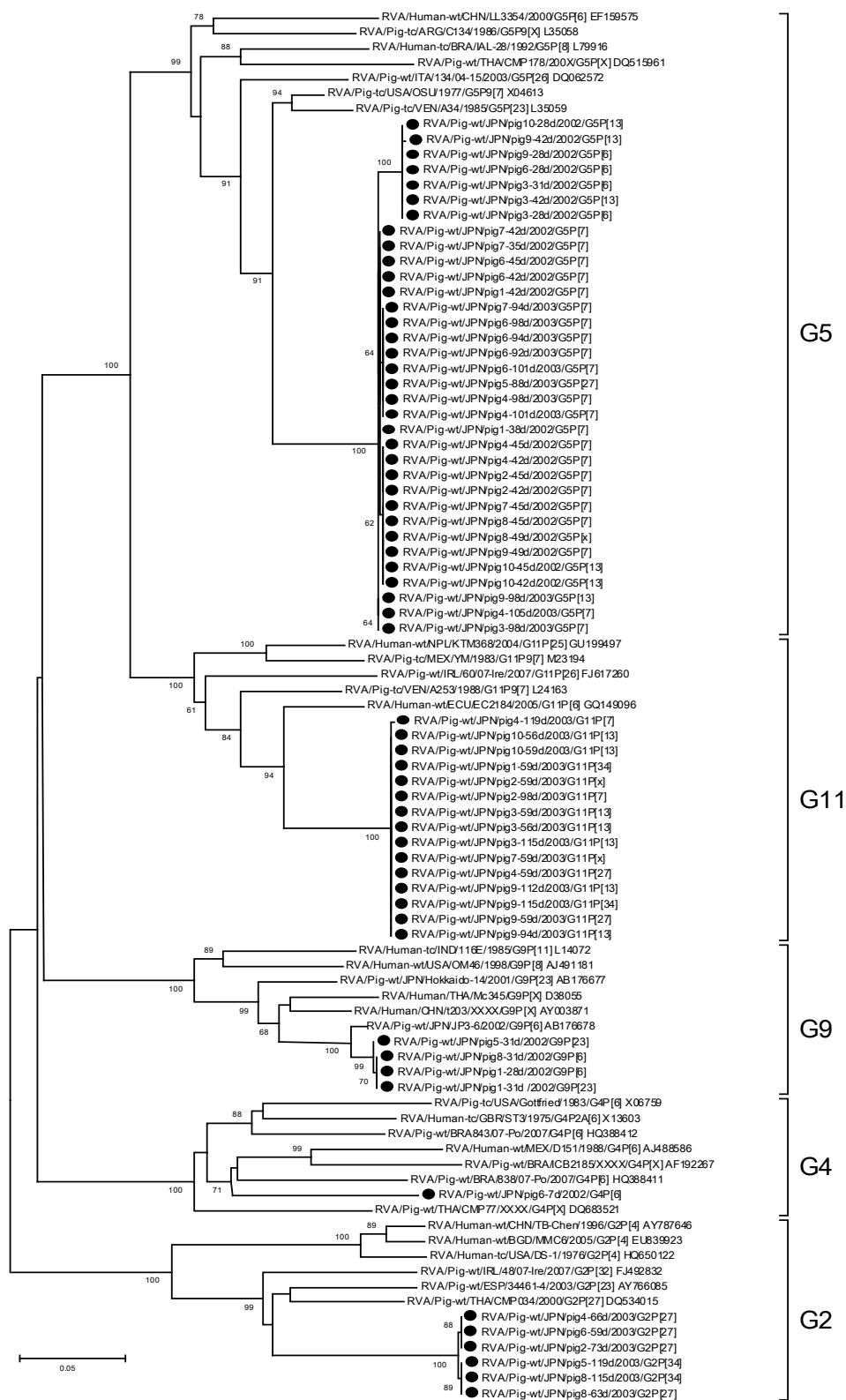


図3-1 本調査で検出された株およびGenBankより得た各G型株のVP7遺伝子塩基配列に基づく分子系統樹。OSU株のVP7遺伝子(GenBank登録番号X04613)の172番目から879番目に相当する708塩基を解析に用いた。60%以上のブーツストラップ値を各分枝に示す。本調査で検出されたVP7遺伝子を黒丸で示した。株名はRVA/由来動物種-由来材料(wt, 野外材料; tc, 細胞分離株)/分離国/株名/分離年/G型とP型を表す。

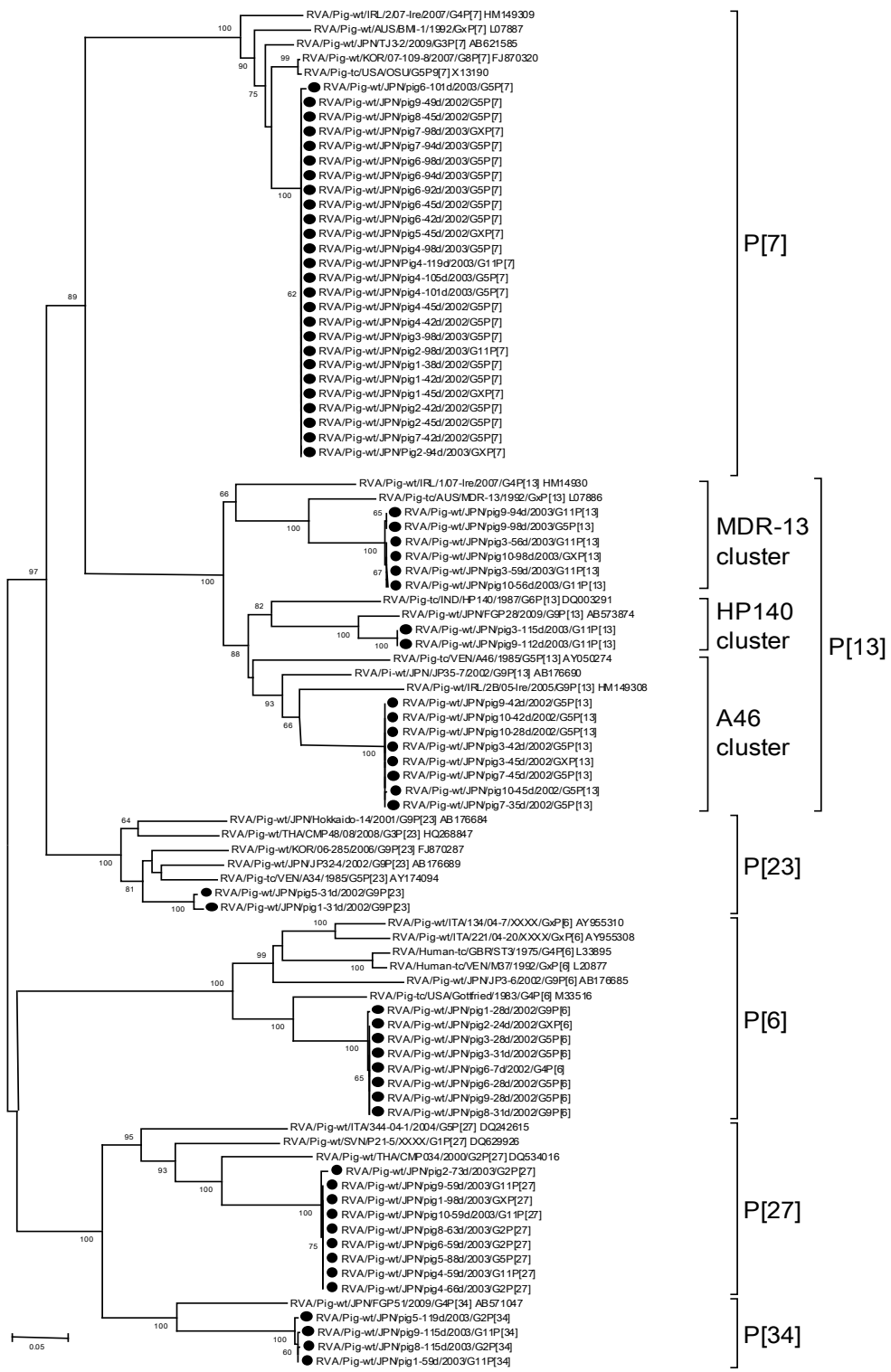


図3-2 本調査で検出された株およびGenBankより得た各P型株のVP4遺伝子塩基配列に基づく分子系統樹。OSU株VP4遺伝子(GenBank登録番号X13190)の88番目から753番目に相当する666塩基を解析に用いた。解読した塩基配列長がRCWGの基準に満たなかったため推定のP型を示す。60%以上のブーツストラップ値を各分枝に示す。本調査で検出されたVP4遺伝子を黒丸で示した。株名はRVA/由来動物種-由来材料(wt, 野外材料; tc, 細胞分離株)/分離国/株名/分離年/G型とP型を表す。

結論

ブタ RVA 感染症は主に哺乳豚や離乳豚の下痢および嘔吐を主徴とし、死亡だけでなく、発育不良や飼料効率の低下、回復後の呼吸器病への罹患率上昇などをもたらすことから、養豚産業において経済的損失の大きな疾病である。国内では本病に対するワクチンは市販されておらず、飼養衛生管理の改善が唯一の対策法であるが、農場内におけるウイルス動態には不明な点が多い。また、近年では、ヒトへのブタ RVA の種間伝播が時として発生していることが明らかとなり、ブタ RVA の農場間ならびに農場内における動態について関心が高まっている。

そこで、本研究では、農場内におけるブタ RVA の動態解析により、ブタ RVA 感染症の流行要因やブタ RVA の農場内存続機構を明らかにすることを主な目的とし、養豚農場内における RVA の分布と遺伝子型について分子疫学的調査を行い、以下の成果を得た。

1. 同一農場で約一年間繰り返し集団発生した哺乳豚下痢の原因である RVA は遺伝学的に多様であることを明らかにし、性状の異なる株が分娩舎で出現することにより RVA 感染症が集団発生する可能性を示した。
2. ブタ RVA TJ4-1 株の VP7 遺伝子はこれまで報告のなかった新たな G 遺伝子型 (G26) であること、そして、その遺伝学的性状を明らかにした。また、TJ4-1 株に高い相同性 (93.1%) を示すタイ国のヒト症例由来 57vp7w 株も G26 型に属することを明らかにした。さらに、TJ4-1 株と 57vp7w 株の VP4 遺伝子はブタ由来株の VP4 遺伝子にごく近縁であったことから、G26 型はブタ由来株である可能性を示した。

3. 哺乳豚や離乳豚だけでなく一部の肥育豚や泌乳中母豚の糞便からも RVA 遺伝子が検出される一方、その多くは不顕性感染である可能性を示した。また、農場内に存在する RVA は遺伝学的に多様であることを明らかにするとともに、農場内の異なる発育ステージのブタ間でウイルスが伝播する可能性を示した。
4. 肉豚は生後から出荷までに繰り返し多様な RVA 遺伝子を排泄することを明らかにした。また、ウイルス遺伝子の排泄と遺伝子型の変化は主にブタの豚舎移動時に認められるが、時に在舎期間中にも起こることを明らかにした。
5. 農場内における RVA の遺伝学的多様性は、外部からの株の侵入に加え、農場株間の遺伝子再集合により獲得される可能性を示した。

以上、本研究において、養豚農場内における RVA の動態を分子疫学的手法により明らかにした。本研究で得られた知見により、①分娩舎における RVA 量の低減 (分娩舎の洗浄消毒の徹底)、②分娩舎における性状の異なる RVA 株の出現防止 (分娩舎のバイオセキュリティの強化)、および③農場内に存在する RVA の多様化防止 (農場外および農場内バイオセキュリティの強化)、の3点が哺乳豚における RVA 感染症発生低減にむけた衛生管理技術を策定する上で重要であると考えられた。一方で、RVA は感染豚の糞便に大量に排泄され、また環境中で非常に安定したウイルスであることから、衛生管理のみで対策を行うことは困難であるとも考えられる。今後、多様なブタ RVA に対して均一な免疫を母豚に賦与できるワクチンの開発も必要であると考えられた。

さらに、本研究において RVA が幅広い日齢のブタで高頻度に確認されることが明らかになった。RVA は時に種間伝播を起こすことから、今後はブタからヒトへの RVA の伝播リスクについても検討する必要があると考えられた。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の計画と遂行、そして取りまとめに終始ご指導とご助言を賜りました独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所の恒光裕博士に深く感謝いたします。また、研究の取りまとめに対し、終始ご指導、およびご校閲を賜りました岐阜大学応用生物科学部人獣共通感染症研究室の杉山誠教授に深甚なる謝意を表します。

また、論文草稿にあたり、適切にご助言を賜りました岐阜大学の浅井鉄夫教授、帯広畜産大学の猪熊壽教授、岩手大学の村上賢二教授、東京農工大学の竹原一明教授に厚くお礼申し上げます。

さらに、日頃からご助言を頂き実験にご協力いただきました同研究所の鈴木亨博士、久我和史博士、河本麻理子博士、勝田賢博士に心より感謝いたします。

検体の採取にご尽力いただきました、日本養豚開業獣医師協会の呉克昌獣医師、野津手麻貴子獣医師、奥村華子獣医師、動物衛生研究所の高木道浩博士、鈴木孝子博士、久保正法博士、芝原友幸博士、山根逸郎博士、小林秀樹博士、日本獣医生命科学大学の池田秀利教授 (元動物衛生研究所)、東京農業大学の山本孝史教授 (元動物衛生研究所)、各都道府県家畜保健衛生所の長期研修生の皆様、そして農場の皆様方に心よりお礼申し上げます。また、実験にご協力いただきました服部奈千子氏、國府田寛子氏、高橋美子氏、菅野たい子氏、色川政江氏、伊藤咲江氏に感謝いたします。

最後に、常に励まし支えていただいた動物衛生研究所の鈴木千恵博士と加藤花名子氏、そして農業・食品産業技術総合研究機構 農村工学研究所 中村真人博士に心から感謝いたします。

引用文献

- 1) Abe, M., Ito, N., Morikawa, S., Takasu, M., Murase, T., Kawashima, T., Kawai, Y., Kohara, J. and Sugiyama, M. (2009). Molecular epidemiology of rotaviruses among healthy calves in Japan: isolation of a novel bovine rotavirus bearing new P and G genotypes. *Virus. Res.* 144, 250~257.
- 2) Barreiros, M., Alfieri, A., Alfieri, A., Medici, K. and Leite. J. (2003). An outbreak of diarrhoea in one-week-old piglets caused by group A rotavirus genotypes P[7], G3 and P[7], G5. *Vet. Res. Commun.* 27, 505~512.
- 3) Benfield, D. A., Stotz, I., Moore, R. and McAdaragh, J. P. (1982). Shedding of rotavirus in feces of sows before and after farrowing. *J. Clin. Microbiol.* 16, 186~190.
- 4) Bernard, S. and Jestin, A. (1985). Rotavirus infections in conventional pigs - kinetics excretion in feces of rotavirus antigens, antibodies and immune-complexes by pigs from birth up to 3 months of age. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 32, 306~315.
- 5) Bok, K., Castagnaro, N., Borsa, A., Nates, S., Espul, C., Fay, O., Fabri, A., Grinstein, S., Miceli, I., Matson, D. O. and Gómez J. A. (2001). Surveillance for rotavirus in Argentina. *J. Med. Virol.* 65, 190~198.
- 6) Carmona, R. C., Timenetsky, M. C., da Silva, F. F. and Granato, C. F. (2004). Characterization of rotavirus strains from hospitalized and outpatient children with acute diarrhoea in São Paulo, Brazil. *J. Med. Virol.* 74, 166~172.

- 7) Collins, P. J., Martella, V., Buonavoglia, C. and O'Shea, H. (2010). Identification of a G2-like porcine rotavirus bearing a novel VP4 type, P[32]. *Vet. Res.* 41, 73.
- 8) Collins, P. J., Martella, V., Sleator, R. D., Fanning, S. and O'Shea, H. (2010). Detection and characterisation of group A rotavirus in asymptomatic piglets in southern Ireland. *Arch. Virol.* 155, 1247~1259.
- 9) da Silva, M. F., Tort, L. F., Gómez, M. M., Assis, R. M., Volotão, E. M., de Mendonça, M. C., Bello, G. and Leite, J. P. (2011). VP7 Gene of human rotavirus A genotype G5: Phylogenetic analysis reveals the existence of three different lineages worldwide. *J. Med. Virol.* 83, 357~366.
- 10) 出口栄三郎 (2011). 豚のストレス, 免疫機能低下, 易感染とその対応～豚サーコウイルス 2 型 (PCV2) のワクチン接種による PCV2 の豚体内動態と農場内コントロール. *日本豚病研究会報* 58, 3~10.
- 11) Dewey, C., Carman, S., Pasma, T., Josephson, G. and McEwen, B. (2003). Relationship between group A porcine rotavirus and management practices in swine herds in Ontario. *Can. Vet. J.* 44, 649~653.
- 12) Dhama, K., Chauhan, R. Mahendran, M. and Malik, S. (2009). Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. *Vet. Res. Commun.* 33, 1~23.
- 13) Esona, M. D., Geyer, A., Banyai, K., Page, N., Aminu, M., Armah, G. E., Hull, J., Steele, D. A., Glass, R. I. and Gentsch, J. R. (2009). Novel human rotavirus genotype G5P[7] from child with diarrhea, Cameroon. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 83~86.

- 14) Estes, M. K., and Kapikian, A. Z. (2007). Rotaviruses. *In*: Knipe, D. M. and Howley, P. M. [ed.], *Field's Virology*, 5th ed., vol. 2, pp. 1917~1973. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- 15) Frydendahl, K. (2002). Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Vet. Microbiol.* 85, 169~182.
- 16) Fu, Z. and Hampson, D. (1987). Group A rotavirus excretion patterns in naturally infected-pigs. *Res. Vet. Sci.* 43, 297~300.
- 17) Fu, Z. and Hampson, D. (1989). Natural transmission of group A rotavirus within a pig-population. *Res. Vet. Sci.* 46, 312~317.
- 18) Fu, Z., Hampson, D. and Blackmore, D. (1989). Detection and survival of group A rotavirus in a piggery. *Vet. Rec.* 125, 576~578.
- 19) Gannon, V. P., Rashed, M., King, R. K. and Thomas, E. J. (1993). Detection and characterization of the eae gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31, 1268~1274.
- 20) Gatti, M. S., Ferraz, M. M., Rácz, M. L. and de Castro, A. F. (1993). Rotavirus excretion in naturally infected pigs with and without diarrhoea. *Vet. Microbiol.* 37, 187~190.
- 21) Gentsch, J. R., Glass, R. I., Woods, P., Gouvea, V., Gorziglia, M., Flores, J., Das, B. K. and Bhan, M. K. (1992). Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1365~1373.
- 22) Gentsch, J. R., Laird, A. R., Bielfelt, B., Griffin, D. D., Banyai, K., Ramachandran, M., Jain, V., Cunliffe, N. A., Nakagomi, O., Kirkwood, C. D., Fischer, T. K., Parashar, U. D., Bresee, J. S., Jiang, B. and Glass, R. I. (2005).

- Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J. Infect. Dis.* 192 (Suppl 1), S146~159.
- 23) Gouvea, V., de Castro, L., Timenetsky, M. C., Greenberg, H. and Santos, N. (1994). Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. *J. Clin. Microbiol.* 32, 1408~1409.
- 24) Gouvea, V., Glass, R. I., Woods, P., Taniguchi, K., Clark, H. F., Forrester, B. and Fang, Z. Y. (1990). Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28, 276~282.
- 25) Halaihel, N., Masía, R. M., Fernández-Jiménez, M., Ribes, J. M., Montava, R., De Blas, I., Gironés, O., Alonso, J. L. and Buesa, J. (2010). Enteric calicivirus and rotavirus infections in domestic pigs. *Epidemiol. Infect.* 138, 542~548.
- 26) Hoang, H. T., Park, S., Cho, Y. I., Madson, D., Stevenson, G., Schwartz, K., Cooper, V., Janke, B. and Yoon, K. J. (2012). Diagnostic survey of porcine rotavirus-associated diarrhea. *In: Proceedings of the 22nd International Pig Veterinary Society Congress, Jeju, Korea, vol. II, pp.401.*
- 27) Honma, S., Nakata, S., Kinoshita-Numata, K., Kogawa, K. and Chiba, S. (2000). Evaluation of nine sets of PCR primers in the RNA dependent RNA polymerase region for detection and differentiation of members of the family Caliciviridae, Norwalk virus and Sapporo virus. *Microbiol. Immunol.* 44, 411~419.
- 28) Husain, M., Seth, P. and Broor, S. (1995). Detection of group A rotavirus by reverse-transcriptase and polymerase chain-reaction in feces from children with acute gastroenteritis. *Arch. Virol.* 140, 1225~1233.

- 29) Iturriza-Gómara, M., Dallman, T., Bányai, K., Böttiger, B., Buesa, J., Diedrich, S., Fiore, L., Johansen, K., Koopmans, M., Korsun, N., Koukou, D., Kroneman, A., László, B., Lappalainen, M., Maunula, L., Marques, A. M., Matthijnssens, J., Midgley, S., Mladenova, Z., Nawaz, S., Poljsak-Prijatelj, M., Pothier, P., Ruggeri, F. M., Sanchez-Fauquier, A., Steyer, A., Sidaraviciute-Ivaskeviciene, I., Syriopoulou, V., Tran, A. N., Usonis, V., Van Ranst, M., De Rougemont, A. and Gray, J. (2011). Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network. *Epidemiol. Infect.* 139, 895~909.
- 30) Iturriza-Gómara, M., Isherwood, B., Desselberger, U. and Gray, J. 2001. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J. Virol.* 75, 3696~3705.
- 31) Janke, B. H., Nelson, J. K., Benfield, D. A. and Nelson, E. A. (1990). Relative prevalence of typical and atypical strains among rotaviruses from diarrheic pigs in conventional swine herds. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2, 308~311.
- 32) Johnson, M. W., Fitzgerald, G. R., Welter, M. W. and Welter, C. J. (1992). The six most common pathogens responsible for diarrhea in newborn pigs. *Vet. Med.* 4, 382~386.
- 33) Katsuda, K., Kohmoto, M., Kawashima, K. and Tsunemitsu, H. (2006). Frequency of enteropathogen detection in suckling and weaned pigs with diarrhea in Japan. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18, 350~354.

- 34) Khoury, H., Ogilvie, I., El Khoury, A. C., Duan, Y. and Goetghebeur, M. M. (2011). Burden of rotavirus gastroenteritis in the Middle Eastern and North African pediatric population. *BMC Infect. Dis.* 11, 9.
- 35) Kim, O., Choi, C., Kim, B. and Chae, C. (2000). Detection and differentiation of porcine epidemic diarrhoea virus and transmissible gastroenteritis virus in clinical samples by multiplex RT-PCR. *Vet. Rec.* 146, 637~640.
- 36) Kuga, K., Miyazaki, A., Suzuki, T., Takagi, M., Hattori, N., Katsuda, K., Mase, M., Sugiyama, M. and Tsunemitsu, H. (2009). Genetic diversity and classification of the outer capsid glycoprotein VP7 of porcine group B rotaviruses. *Arch. Virol.* 154, 1785~1795.
- 37) Kwon, D., Kim, O. and Chae, C. (1999). Prevalence of genotypes for fimbriae and enterotoxins and of O serogroups in *Escherichia coli* isolated from diarrheic piglets in Korea. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11, 146~151.
- 38) Lorenzetti, E., da Silva Medeiros, T. N., Alfieri, A. F. and Alfieri, A. A. (2011). Genetic heterogeneity of wild-type G4P[6] porcine rotavirus strains detected in a diarrhea outbreak in a regularly vaccinated pig herd. *Vet. Microbiol.* 154, 191~196.
- 39) Martella, V., Bányai, K., Lorusso, E., Bellacicco, A. L., Decaro, N., Camero, M., Bozzo, G., Moschidou, P., Arista, S., Pezzotti, G., Lavazza, A. and Buonavoglia, C. (2007). Prevalence of group C rotaviruses in weaning and post-weaning pigs with enteritis. *Vet. Microbiol.* 123, 26~33.
- 40) Martella, V., Bányai, K., Matthijnssens, J., Buonavoglia, C. and Ciarlet, M. (2010). Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet. Microbiol.* 140, 246~255.

- 41) Martella, V., Ciarlet, M., Bányai, K., Lorusso, E., Arista, S., Lavazza, A., Pezzotti, G., Decaro, N., Cavalli, A., Lucente, M. S., Corrente, M., Elia, G., Camero, M., Tempesta, M. and Buonavoglia, C. (2007). Identification of group A porcine rotavirus strains bearing a novel VP4 (P) Genotype in Italian swine herds. *J. Clin. Microbiol.* 45, 577~580.
- 42) Martínez-Laso, J., Román, A., Rodríguez, M., Cervera, I., Head, J., Rodríguez-Avial, I. and Picazo, J. J. (2009). Diversity of the G3 genes of human rotaviruses in isolates from Spain from 2004 to 2006: cross-species transmission and inter-genotype recombination generates alleles. *J. Gen. Virol.* 90, 935~943.
- 43) Matthijssens, 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. and 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.
- 44) Matthijssens, J., Ciarlet, M., McDonald, S. M., Attoui, H., Bányai, K., Brister, J. R., Buesa, J., Esona, M.D., Estes, M. K., Gentsch, J. R., Iturriza-Gómara, M., Johne, R., Kirkwood, C. D., Martella, V., Mertens, P. P., Nakagomi, O., Parreño, V., Rahman, M., Ruggeri, F. M., Saif, L. J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Patton, J. T., Desselberger, U. and Van Ranst, M. (2011). Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch. Virol.* 156, 1397~1413.
- 45) Matthijssens, 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. and Van Ranst, M. (2008). Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch. Virol.* 153, 1621~1629.
- 46) Matthijssens, J., Otto, P. H., Ciarlet, M., Desselberger, U., Van Ranst, M. and Johne, R. (2012). VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch. Virol.* 157, 1177~1182.
- 47) Matthijssens, J., Potgieter, C. A., Ciarlet, M., Parreño, V., Martella, V., Bányai, K., Garaicoechea, L., Palombo, E. A., Novo, L., Zeller, M., Arista, S., Gerna, G., Rahman, M. and Van Ranst, M. (2009). Are human P[14] rotavirus strains the result of interspecies transmissions from sheep or other ungulates that belong to the mammalian order Artiodactyla? *J. Virol.* 83, 2917~2929.
- 48) Maunula, L. and Von Bonsdorff, C. H. (2002). Frequent reassortments may explain the genetic heterogeneity of rotaviruses: analysis of Finnish rotavirus strains. *J. Virol.* 76, 11793~11800.
- 49) Midgley, S. E., Hjulsager, C. K., Larsen, L. E., Falkenhorst, G. and Bottiger, B. (2011). Suspected zoonotic transmission of rotavirus group A in Danish adults. *Epidemiol. Infect.* 140, 1013~1017.
- 50) Midgley, S. E., Bányai, K., Buesa, J., Halaihel, N., Hjulsager, C. K., Jakab, F., Kaplon, J., Larsen, L. E., Monini, M., Poljšak-Prijatelj, M., Pothier, P., Ruggeri, F. M., Steyer, A., Koopmans, M., and Böttiger, B. (2012). Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. *Vet. Microbiol.* 156, 238~245

- 51) Nakagomi, T., Nakagomi, O., Takahashi, Y., Enoki, M., Suzuki, T. and 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.
- 52) 農林水産省大臣官房統計部 (2012). 平成 24 年畜産統計. 農林水産省, 東京 (http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tikusan/pdf/tikusan_12.pdf.)
- 53) Okitsu, S., Khamrin, P., Thongprachum, A., Maneekarn, N., Mizuguchi, M. and Ushijima, H. (2011). Predominance of porcine P[23] genotype rotaviruses in piglets with diarrhea in northern Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 49, 442~445.
- 54) Parra, G. I., Vidales, G., Gomez, J. A., Fernandez, F. M., Parreño, V. and Bok, K. (2008). Phylogenetic analysis of porcine rotavirus in Argentina: increasing diversity of G4 strains and evidence of interspecies transmission. *Vet. Microbiol.* 126, 243~250.
- 55) Paton, D., Ibata, G., Sands, J. and McGoldrick, A. (1997). Detection of transmissible gastroenteritis virus by RT-PCR and differentiation from porcine respiratory coronavirus. *J. Virol. Methods.* 66, 303~309.
- 56) Saif, L. J., and Fernandez, F. M. (1996). Group A rotavirus veterinary vaccines. *J. Infect. Dis.* 174 (Suppl 1), S98~106.
- 57) Santos, N., Lima, R. C., Pereira, C. F. and Gouvea, V. (1998). Detection of rotavirus types G8 and G10 among Brazilian children with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2727~2729.
- 58) Steyer, A., Poljsak-Prijatelj, M., Barlic-Maganja, D., Jamnikar, U., Mijovski, J. Z. and Marin, J. (2007). Molecular characterization of a new porcine rotavirus P genotype found in an asymptomatic pig in Slovenia. *Virology.* 359, 275~282.

- 59) Steyer, A., Poljsak-Prijatelj, M., Barlic-Maganja, D. and Marin, J. (2008). Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: evidence of interspecies transmission and genome reassortment. *J. Gen. Virol.* 89, 1690~1698.
- 60) Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596~1599.
- 61) Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731~2739.
- 62) Tate, J. E., Burton, A. H., Boschi-Pinto, C., Steele, A. D., Duque, J., Parashar, U. D. and WHO-coordinated Global Rotavirus Surveillance Network. (2012). 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 12, 136~141.
- 63) Teodoroff, T., Tsunemitsu, H., Okamoto, K., Katsuda, K., Kohmoto, M., Kawashima, K., Nakagomi, T. and Nakagomi, O. (2005). Predominance of porcine rotavirus G9 in Japanese piglets with diarrhea: close relationship of their VP7 genes with those of recent human G9 strains. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1377~1384.
- 64) Theamboonlers, A., Bhattarakosol, P., Chongsrisawat, V., Sungkapalee, T., Wutthirattanakowit, N. and Poovorawan, Y. (2008). Molecular characterization of group A human rotaviruses in Bangkok and Buriram, Thailand during

- 2004-2006 reveals the predominance of G1P[8], G9P[8] and a rare G3P[19] strain. *Virus Genes*. 36, 289~298.
- 65) Theil, K., McCloskey, C., Saif, L., Redman, D., Bohl, E., Hancock, D., Kohler, E. and Moorhead, P. (1981). Rapid, simple method of preparing rotaviral double-stranded ribonucleic acid for analysis by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 14, 273~280.
- 66) Tsunemitsu, H., Jiang, B. and Saif, L. (1996). Sequence comparison of the VP7 gene encoding the outer capsid glycoprotein among animal and human group C rotaviruses. *Arch. Virol.* 141, 705~713.
- 67) 恒光 裕 (1999). 豚ロタウイルス病. 柏崎 守, 久保正法, 小久江栄一, 清水実嗣, 出口栄三郎, 古谷 修, 山本孝史 (編) 豚病学—生理・疾病・飼養—, 第4版, pp271~277. 近代出版, 東京
- 68) Uchida, R., Pandey, B. D., Sherchand, J. B., Ahmed, K., Yokoo, M., Nakagomi, T., Cuevas, L. E., Cunliffe, N. A., Hart, C. A. and Nakagomi, O. (2006). Molecular epidemiology of rotavirus diarrhea among children and adults in Nepal: detection of G12 strains with P[6] or P[8] and a G11P[25] strain. *J. Clin. Microbiol.* 44, 3499~3505.
- 69) Wieler, L. H., Ilieff, A., Herbst, W., Bauer, C., Vieler, E., Bauerfeind, R. Failing, K., Klös, H., Wengert, D., Baljer, G. and Zahner, H. (2001). Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in southern Germany. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.* 48, 151~159.
- 70) Will, L., Paul, P., Proescholdt, T., Aktar, S., Flaming, K., Janke, B., Sacks, J., Lyoo, Y., Hill, H., Hoffman, L. and Wu, L. (1994). Evaluation of rotavirus infection and diarrhea in Iowa commercial pigs based on an epidemiologic

study of a population represented by diagnostic laboratory cases. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 416~422.

- 71) Yuan, L., Stevenson, W. G. and Saif, L. J. (2006). Rotavirus and Reovirus, *In*: Straw, E. B., Zimmerman, J. J., D'Allaire, S. and Taylor J. D. [ed.] *Diseases of Swine*, 9th ed., pp. 435~454. Blackwell Publishing Professional, Ames.