

# 研究情報

## 牛コロナウイルス (BCoV) 流行株の遺伝子型別が可能な PCR-制限酵素断片長多型 (RFLP) 解析の開発

KANNO Toru

環境・常在疾病研究チーム 主任研究員 菅野 徹

牛コロナウイルス(BCoV)感染症は、新生子牛や成牛の下痢ならびに呼吸器症状を主徴とする疾病です。本病は世界中で発生しており、日本でも全国的に発生が認められ、牛ウイルス性消化器病で最多の発生頭数が毎年報告されています。新生子牛以外では本病の死亡率は高くありませんが、搾乳牛では泌乳量が激減し、子牛では発育遅延がおきることから酪農家にとっては経済的損失の著しい疾病の一つにあげられます。さらに、原因となるウイルスは容易に農場内に常在化するよう同じ農家で毎年のように発生が認められることもあります。このように酪農環境において問題の多い疾病ですが、原因となるBCoV各流行株間の遺伝学のおよびウイルス学的な比較解析は十分になされていない状況にありました。そこで、我々はこれまでに、本ウイルスの流行動態を解明する目的で日本各地における本病発生例の材料からウイルスを分離し、その遺伝学的解析を行ってきました。その結果、エンベロップ糖タンパクS遺伝子中の polymorphic regionの配列を用いた分子系統樹解析により国外株と日本分離株は4つの遺伝子型に分類されることを報告しました(図1)。この遺伝子型別を行うには、通常、ウイルスの遺伝子配列を決定(シーケンシング)し、この配列の比較解析を解析用コンピューターソフトで行うことが必要です。これから得られる詳細な遺伝子情報は有用なものです。時間や経費がかかり、また専用の高額精密機器が必要になるため、各都道府県の家畜保健衛生所等の現場での

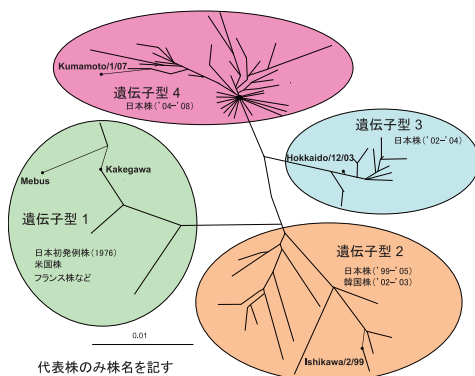


図1 S遺伝子を用いた牛コロナウイルスの分子系統樹

応用には限界がありました。そこで短時間で比較的安価、そして多検体処理が行えるPCR-制限酵素断片長多型(RFLP)を利用したBCoV遺伝子型別法の開発を行いました。

今回開発した方法は、系統樹解析に用いているウイルス糖タンパクS遺伝子中の polymorphic region領域を含むようにRT-PCRを行い、これを制限酵素AvaIIとEcoO65Iで消化後の電気泳動パターンから型別を行います。これにより分けられる4つのパターンは、それぞれ系統樹解析で分類される4つの遺伝子型に対応しています(図2)。実際に1999年から2008年の10年間に14道府県(北海道、山形県、栃木県、茨城県、富山県、石川県、岐阜県、和歌山県、大阪府、島根県、高知県、熊本県、鹿児島県、沖縄県)で発生した事例から分離した174株のウイルスのうち2株を除き、本法による遺伝子型別が系統樹解析によるものと一致していることを確認しました。

本法により牛コロナウイルス流行株の実用的な遺伝子型別が可能となり、各地域における本ウイルスの流行動態や伝播経路を把握するのに活用できるものと考えています。

最後に、共同で本法開発を行った富山県東部家保の神吉 武先生ならびに発生例の材料および分離ウイルスを提供していただいた各家畜保健衛生所の諸先生に深謝いたします。

掲載誌 Kanno T. et al. J Vet Med Sci.71(1),2009,83-86.  
この研究内容は動衛研ホームページでもご覧頂けます。  
<http://niah.naro.affrc.go.jp/publication/seikajoho2/2008/niah08002.html>

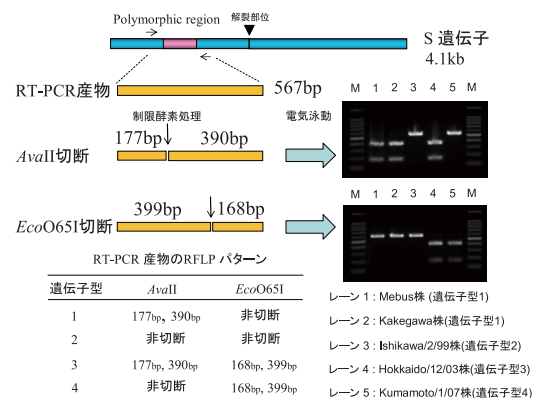


図2 PCR-RFLP による遺伝子型別