

牛ウイルス性下痢ウイルスの国内分布および牛ウイルス性下痢・粘膜病の迅速診断に関する研究

亀山健一郎¹⁾, 小西美佐子¹⁾, 播谷 亮²⁾, 木村久美子²⁾, 坪井孝益³⁾, 村上賢二¹⁾

(平成 23 年 8 月 8 日 受付)

Studies for domestic distribution of *Bovine viral diarrhea virus* and rapid diagnosis of *Bovine viral diarrhea-mucosal disease* in Japan

Ken-ichiro KAMEYAMA¹⁾, Misako KONISHI¹⁾, Makoto HARITANI²⁾,
Kumiko KIMURA²⁾, Takamitsu TSUBOI³⁾ & Kenji MURAKAMI¹⁾

本研究では、国内における牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) 分離株の収集および亜型分布の解析を行うと共に、牛ウイルス性下痢・粘膜病の迅速診断法の開発を目指して抗 BVDV 抗体の作出を行った。収集した分離株の解析では、非細胞病原性株が大部分であること、国内における発生は 1a, 1b, 1c および 2a の 4 亜型でほぼ 100% を占めることが明らかとなった。一方、本研究で作出した抗体は抗原との結合力が不十分であり、診断系の開発には至らなかった。今後も国内分離株の収集と解析を継続すると共に、解析結果を活用して有用な診断系の開発を目指す。

-
- 1) 農研機構 動物衛生研究所 ウイルス・疫学研究領域
 - 2) 農研機構 動物衛生研究所 病態研究領域
 - 3) 農研機構 動物衛生研究所 ウイルス・疫学研究領域 (東北)

連絡担当著者：村上賢二

〒 305-0856 茨城県つくば市観音台 3-1-5

* Corresponding author: Kenji MURAKAMI
Research Team for Viral Diseases,
National Institute of Animal Health,
Kannondai 3-1-5, Tsukuba, Ibaraki, JAPAN
Tel: +81-29-838-7841
Fax: +81-29-838-7844
E-mail: muraken@affrc.go.jp

背景および目的

牛ウイルス性下痢・粘膜病 (BVD-MD) はウイルス性下痢ウイルス (BVDV) を病原体とする疾病である。世界各地で発生がみられ、下痢、発育不良、泌乳量の減少、繁殖障害などによる生産性の低下が問題となっている。慢性的に BVDV に感染した牛は「持続感染牛」と呼ばれ、多量のウイルスを生産にわたり排出し続ける。しかしながら、明確な症状を示さない場合が多く、長期間にわたる飼養や売買に伴う移動などによって牛群内および農場間の感染を広げる主要因となる。

BVD-MD の対策においてはこれら持続感染牛を中心とした感染個体の早期摘発が重要である。BVD-MD の診断はウイルス学的検査および補助診断法である遺伝子検査によって行われている。BVDV には培養細胞に細胞変性効果 (CPE) を起こす細胞病原性 (CP) 株と起こさない非細胞病原性 (NCP) 株が存在するため、特殊な細胞を用いる、干渉法や免疫染色法などの特殊手法を行うなど

の必要があり, 判定までに時間と手間がかかる。このため, 細胞を用いない BVD-MD の迅速診断法が求められている。

BVDV はその塩基配列により遺伝子型 1 型および 2 型に分けられ, 更に 1 型は 1a ~ 1o の 15 亜型, 2 型は 2a および 2b の 2 亜型に分けられている。BVDV の遺伝子型は抗原性と相関があることが知られており, それぞれの亜型間で抗原性が異なる¹⁾。BVDV は国内においても各地で分離されているものの, その性状の比較・解析は都道府県単位での報告に止まり, 全国的な解析は行われていない。

本研究では, 国内における分離株の収集, ウイルス性状の解析を行うと共に, BVD-MD の迅速診断法の開発を目指し, BVDV に対する抗体の作出を行った。

国内分離株の収集と性状解析

北海道と東北を除く 5 地方 16 都府県の協力を得て, 近年分離された 104 株の BVDV およびその発生状況等の疫学的情報を収集した。

収集したウイルス株を牛胎子筋肉初代培養細胞に接種し, その生物型を確認したところ 13.4% (14 株) が CP 株, 残り 86.6% (90 株) が NCP 株であった。CP 株はいずれも異なる農場で分離されていたが, NCP 株は同一農場で複数頭の牛から分離されることが多かった。また, 5' - 非翻訳領域の塩基配列による分子系統解析の結果, 収集された国内分離株は 1a, 1b, 1c, 1j および 2a 型の 5 種類の遺伝子亜型に分類された。BVDV の主要なエンベロープ蛋白である E2 領域における分子系統解析においても同様の結果が得られた。

国内における BVDV 亜型分布状況の解析

同一農場の複数の個体からウイルスが分離された場合, 農場内の流行によって単一のウイルスが広がっている可能性が高いと考えられる。野外における遺伝子亜型の分布状況をより正確に把握するため, 同一農場での分離株の中から塩基配列が類似している株 57 株を重複株として削除し, 残りの 47 株を用いて BVDV の分布状況の解析を行った。

感染の引き金になったと考えられる 47 株の塩基配列を用いて作出した分子系統樹を図に示す。これらの株の遺伝子亜型の割合は 1a:36.2% (17 株), 1b:40.4% (19 株), 1c:8.5% (4 株), 1j:2.1% (1 株) および 2a:12.8% (6 株) であり, 関東以西における分布は 1a および 1b で全体の約 80% を占め, これに 2a と 1c を加えるとほぼ 100% となった (表)。1980 年代より存在が知られていた 1j 亜

表. BVDV 株の分離地および遺伝子型

地方	都道府県数	遺伝子型					計
		1a	1b	1c	1j	2a	
関東	7	10	10	4	0	3	27
中部	1	1	0	0	0	0	1
近畿	2	3	4	0	1	2	10
中国・四国	3	1	3	0	0	1	5
九州・沖縄	3	2	2	0	0	0	4
計	16	17	19	4	1	6	47
		(36.2%)	(40.4%)	(8.5%)	(2.1%)	(12.8%)	

型²⁾ は 1 株のみであり, 現在における浸潤度はかなり低いと推察される。この結果は, 各亜型間の割合は異なるものの北海道における報告³⁾ と一致しており, 国内ではこれら 4 亜型が主な浸潤株であると考えられる。

各地方における分布状況も全体的な傾向と大きな違いはないと考えられるが, 株数が少ない地方があること, 1c 亜型の 4 株がすべて関東地方での分離であることなど, 異なるデータの積み重ねが必要である。

また, 1a 亜型では生ワクチン株である No.12-43 株と塩基配列が完全に一致する分離株が多く存在した (図)。妊娠牛への生ワクチンの使用は持続感染牛の誕生を誘発するため禁忌となっているが, 何らかの理由でワクチンが妊娠牛に投与されている可能性が考えられる。

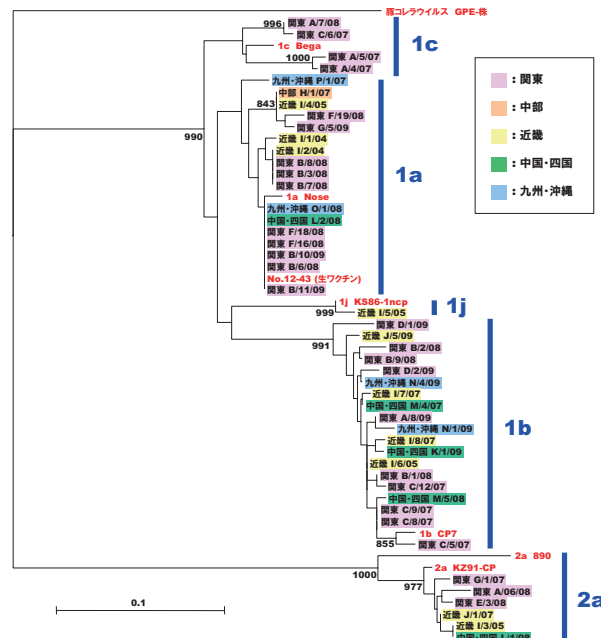


図. 国内で近年分離された BVDV 株の分子系統樹
5' - UTR 領域の塩基配列から Genetyx ネットワーク版 Ver.9 を用い, NJ 法による分子系統樹を作製した。赤字は各遺伝子亜型の参照株, 系統樹上の数値は Bootstrap 値 (1,000 回演算) を示す。株名は「分離された地方・都府県 / 通し番号 / 分離年」とした。

抗 BVDV 抗体の作製

抗原抗体反応を用いた抗原診断法で重要となる抗 BVDV 抗体の標的には E^{ms} 蛋白を選択した。E^{ms} 蛋白は BVDV に存在する 3 種類のエンベロープ蛋白の中で最も保存性が高いとされる蛋白であり、これに対する抗体は多様な BVDV に反応することが示されている⁴⁾。

現在までに BVDV 1 型標準株である Nose 株の E^{ms} 遺伝子を用いて大腸菌およびバキュロウイルス発現系を用いて組換え E^{ms} 蛋白を作出し、マウスおよびウサギに免疫することでモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を得た。しかし、いずれも組換え抗原およびウイルス粒子との結合力が不十分であり、BVDV 迅速診断法を構築するには至らなかった。

今後の発展

本研究における国内分離株の解析から、国内分離されるウイルスはその 85% 超が NCP 株であること、我が国に浸潤する BVDV は 1a, 1b, 1c および 2a の 4 亜型が大勢を占めていることが明らかとなった。

分離株に占める NCP 株の割合が高かったことから、CPE を指標としない検査法の重要性が示されたと言える。診断法の開発に関しては E^{ms} を標的とし、多様な BVDV に反応する抗体の作出を目指したが十分な結合力を持つ抗体は得られなかった。国内の主要な BVDV 流行株が 4 亜型と比較的少なかったことから、今後はウイルス

全粒子を用いるなどにより強く反応する抗体を複数作出し、それらを組み合わせることで迅速診断系の確立を目指したい。

謝 辞

本研究は平成 20-21 年度動物衛生研究所重点強化研究の助成を受けて行った。検体の収集にご協力頂いた家畜保健衛生所の皆様に深謝する。

参考文献

- 1) Nagai, M., Ito, T., Sugita, S., et al.: Genomic and serological diversity of bovine viral diarrhoea virus in Japan. *Arch. Virol.* 146, 685-696 (2001).
- 2) Shimizu, M., Satou, K., Nishioka, N., et al.: Serological characterization of viruses isolated from experimental mucosal disease. *Vet. Microbiol.* 19, 13-21 (1989).
- 3) Matsuno, K., Sakoda, Y., Kameyama, K., et al.: Genetic and pathobiological characterization of bovine viral diarrhoea viruses recently isolated from cattle in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 69, 515-520 (2007).
- 4) Xue, W., Blecha, F. & Minocha, H.C.: Antigenic variations in bovine viral diarrhoea viruses detected by monoclonal anti-bodies. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1688-1693 (1990).

Summary

Studies for domestic distribution of *Bovine viral diarrhoea virus* and rapid diagnosis of Bovine viral diarrhoea-mucosal disease in Japan.

Ken-ichiro KAMEYAMA ¹⁾, Misako KONISHI ¹⁾, Makoto HARITANI ²⁾,
Kumiko KIMURA ²⁾, Takamitsu TSUBOI ³⁾ & Kenji MURAKAMI ¹⁾

The present study was aimed to develop rapid diagnostic systems of Bovine viral diarrhoea-mucosal disease (BVD-MD). This study was composed of three works: collection of *Japanese Bovine viral diarrhoea virus* (BVDV) isolates, analysis of domestic distribution of BVDV subgenotypes, and development of anti-BVDV antibodies. Because of the affinities of the antibodies produced were too low, any diagnostic system did not developed. However, it was revealed that most of the Japanese isolates were non-cytopathogenic and almost 100% of domestic outbreaks were caused by the viruses classified in 4 subgenotypes of 1a, 1b, 1c, and 2a. We are planning to continue these investigations and hope the results contribute to control of BVD-MD.