

牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛多発事例における5'非コード領域およびE2遺伝子の解析

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者名	林,みち子 村上,俊明 高井,光 山口,徹 舟木,理 長井,誠
発行元	日本獣医師会
巻/号	58巻11号
掲載ページ	p. 741-745
発行年月	2005年11月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛多発事例における

5'非コード領域およびE2遺伝子の解析

林みち子¹⁾ 村上俊明¹⁾ 高井 光¹⁾ 山口 徹¹⁾舟木 理¹⁾ 長井 誠^{2)†}

1) 石川県南部家畜保健衛生所 (〒920-3101 金沢市才田町戊324-2)

2) 石川県北部家畜保健衛生所 (〒929-2126 七尾市大津町1-47)

(2005年2月1日受付・2005年5月12日受理)

要 約

2003年、1酪農団地内の3戸(A, B, C)の農家において、3~12カ月齢の育成牛6頭(A農家4頭, B農家およびC農家各1頭)が牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)持続感染(PI)牛と診断された。原因ウイルスの疫学を明らかにするため、分離株の遺伝子解析を行った。5'非コード領域(5'NCR)の解析では、6株中5株(A農家4株とC農家1株)の分離株の塩基配列は同一であり、この酪農団地とは別の地域で1999年に分離された1株(IS17/99)とも一致したが、B農家の1株とは90.8%の相同性であった。いっぽう、E2遺伝子の解析では、A農家分離株4株と隣接するC農家分離株は高い相同性(99.1~100%)を示したが、5'NCRが同一であった他の地域の分離株とは94.9~95.7%であり、同一団地内であるが交流のないB農家分離株とは70.4%の相同性を示したのにすぎなかった。また、B農家分離株は隣接する農家で1999年にPI牛から分離された株と5'NCRおよびE2遺伝子が100%の相同性を示し、隣接農家からのウイルス伝播が示唆された。以上から、E2遺伝子の解析は疫学的な調査に有用であると考えられた。

—キーワード: 牛ウイルス性下痢ウイルス, 遺伝子解析, 疫学的解析。

日獣会誌 58, 741~745 (2005)

牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)は、豚コレラウイルスおよびボーダー病ウイルスとともにフラビウイルス科のペスチウイルス属に分類される[5]。BVDVゲノムは、約12.3キロベースのプラスセンス1本鎖RNAで、単一の大きなオープンリーディングフレーム(ORF)を持つ[11]。ORF上流の5'末端には保存性の高い約385ベースからなる5'非コード領域(5'NCR)が存在する。ORFの前半3分の1は構造蛋白、後半3分の2は非構造蛋白をコードしている。構造蛋白の一つであるE2蛋白は、ウイルスエンベロープを構成する糖蛋白であり、宿主の免疫反応を誘導する主要なウイルス抗原である[8, 11]。

BVDVは牛にさまざまな病態を引き起こし[1, 2]、世界中の養牛地域で経済損失をもたらす重要な病原体と考えられており[1, 6, 7]、牛ウイルス性下痢・粘膜病はわが国では家畜届出伝染病に指定されている。北欧諸国ではBVDVの撲滅対策が国家をあげて展開されているのに対し[4, 9, 15]、わが国では積極的な対策が行わ

れていないため各地で牛ウイルス性下痢・粘膜病が発生している。わが国においてもBVDVによる生産効率の低下を防ぐため、本病の清浄化が望まれている。清浄化を効率よく進めるためには本病の監視を続けることが重要であり、本病の発生があった場合、感染源あるいは感染経路の特定を行うことが、感染拡大を防止する上で必要である。

今回、1酪農団地において育成牛6頭がBVDV持続感染(PI)牛と診断された。この事例の感染源および感染経路の特定を試みるため、分離株の5'NCRおよびE2遺伝子の解析を行った。

材料および方法

発生状況: 石川県の1酪農団地で、2003年6月から9月にかけて3戸に飼養されていた6頭(A農家: 4頭, B農家: 1頭およびC農家: 1頭)をPI牛と診断した。A農家の4頭はいずれも2002年8月から9月に出生し、母牛はすべて自家育成であった。B農家の1頭は2001年9

† 連絡責任者: 長井 誠 (石川県北部家畜保健衛生所)

〒929-2126 七尾市大津町1-47

☎0767-68-3636

FAX 0767-68-6295

表1 解析を行ったBVDV分離株

分離株名	由来農場	飼養頭数	分離年月	年齢	導入状況	臨床症状	IS29/03/A株との相同性(%)	
							5'NCR	E2(アミノ酸)
IS29/03/A			2003.8	11カ月	自家産	発育不良	100	100
IS31/03/A	A	60	2003.8	11カ月	自家産	粘膜病	100	100
IS32/03/A			2003.9	12カ月	自家産	発育不良	100	99.1
IS35/03/A			2003.11	15カ月	自家産	健康	100	100
IS33/03/B			B	103	2003.10	24カ月	自家産	不受胎
IS7/97/C	C	148	1997	不明	自家産	健康	90.7	70.1
IS34/03/C			2003.12	4カ月	自家産	下痢	100	100
IS13/99/D	D	62	1999.10	3歳	自家産	健康	90.8	70.4
IS3/95/E	E	71	1995.9	3歳	県外導入	健康	99.2	—**
IS4/95/E			1995.10	5歳	県外導入	粘膜病	99.2	90.6
IS10/98	*	25	1998	不明	自家産	下痢	99.2	94.9
IS15/99	*	30	1999	不明	県内導入	健康	99.6	—
IS17/99	*	166	1999	不明	県外導入	健康	100	94.9
IS18/99	*	33	1999.9	不明	県外導入	健康	99.6	94.9

* : 当該酪農団地外の石川県内の農場由来

** : データなし

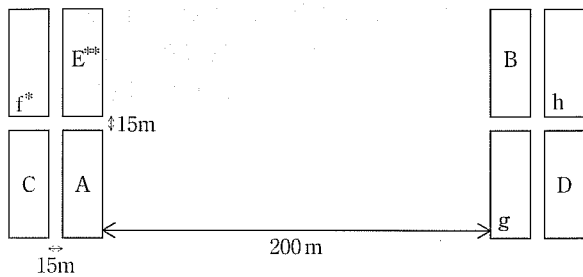


図1 酪農団地内の農家の位置

* : 小文字はBVDVが分離されていない農場を示す

** : 大文字はBVDVが分離された農場を示す

月生まれで、母牛は自家育成牛であったが、C農家の1頭は2003年7月生まれで、母牛はB農家から2001年に導入された。A農家とC農家は隣接しており、B農家は以前PI牛が1999年に1頭摘発され、同年12月に淘汰されたD農家と隣接していた。また、C農家も以前PI牛1頭を1997年に淘汰しており、AおよびC農家と隣接するE農家においても1995年に2頭のPI牛を淘汰していた(表1および図1)。

使用ウイルス：A～E農家のPI牛より分離したBVDV10株に加えて、県内の他地域で分離された4株を用いた(表1)。

ウイルス分離：ウイルス分離および培養は牛胎子筋肉(BFM)細胞[16]を用い、その培養にはイーゲル minimum essential medium 培地^{a)}にBVDVの混入がないことを確認した牛胎子血清を10%添加した培地を使用した。

ウイルスRNAの抽出、逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)および塩基配列の決定：ウイルス

RNAは、感染BFM細胞培養上清から市販のキット^{b)}を用いて抽出し、RT-PCRは既報[13]に記載した方法で実施した。プライマーは5'NCRおよびE2遺伝子を標的とした324-326[21]および2274F-3434R[12]を使用し、増幅された領域のうちBVDV SD-1遺伝子[3]における位置の135-354および2462-2812に相当する領域の塩基配列を決定した。塩基配列の決定は、PCR産物を市販のキット^{c)}で精製し、ダイレクトシーケンス法で行った。

塩基配列の解析：得られた5'NCRの塩基配列はDNA Data Bank Japan (DDBJ)のホームページ上のCLUSTAL Wプログラム[19]を用いて多重整列解析を実施した。5'NCRおよびE2蛋白遺伝子の塩基配列ならびに推定されるE2蛋白のアミノ酸配列の相同性は遺伝子解析ソフト^{d)}を用いて算出した。

成 績

5'NCRの相同性の比較：A農家のPI牛からの分離株をIS29/03/A、IS31/03/A、IS32/03/AおよびIS35/03/A、B農家PI牛からの分離株をIS33/03/BおよびC農家PI牛からの分離株をIS34/03/Cと名付け、石川県で過去に分離された株とともに多重整列解析を行った後、各株間の相同性を調べた。A農家の4株、IS34/03/C株および1999年に別の地域で分離された株

a) イーゲルMEM, 日水製薬(株), 東京。

b) Trizol LS, Invitrogen co, U.S.A.

c) High Pure PCR Product Purification Kit, Roche, German.

d) GENETYX-MAC version10.1, ソフトウエア開発, 東京。

表2 各株間の5'NCR (BVDV SD-1株における遺伝子位置135-354)塩基配列の相同性 (%)

	IS29	IS31	IS32	IS35	IS34	IS17	IS3	IS4	IS15	IS10	IS18	IS33	IS13	IS7
IS29/03/A	—	100	100	100	100	100	99.2	99.2	99.6	99.2	99.6	90.8	90.8	90.7
IS31/03/A	—	—	100	100	100	100	99.2	99.2	99.6	99.2	99.6	90.8	90.8	90.7
IS32/03/A	—	—	—	100	100	100	99.2	99.2	99.6	99.2	99.6	90.8	90.8	90.7
IS35/03/A	—	—	—	—	100	100	99.2	99.2	99.6	99.2	99.6	90.8	90.8	90.7
IS34/03/C	—	—	—	—	—	100	99.2	99.2	99.6	99.2	99.6	90.8	90.8	90.7
IS17/99	—	—	—	—	—	—	99.2	99.2	99.6	99.2	99.6	90.8	90.8	90.7
IS3/95/E	—	—	—	—	—	—	—	99.2	98.8	98.4	98.8	90.0	90.0	89.9
IS4/95/E	—	—	—	—	—	—	—	—	98.8	98.4	98.8	90.0	90.0	89.9
IS15/99	—	—	—	—	—	—	—	—	—	98.8	99.2	90.4	90.4	90.3
IS10/98	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	99.6	90.8	90.8	90.7
IS18/99	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	91.2	91.2	91.1
IS33/03/B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100	92.7
IS13/99/D	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	92.7
IS7/97/C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

IS29/03/A	Y P D C K P G F S Y A I A K N D E I G P L G A T G L T T Q W Y E E Y S D G M R L R D S T V E V W C K D G E F R Y L V R C E
IS31/03/A
IS32/03/A I
IS35/03/A
IS34/03/C
IS17/99	... S K K ..
IS4/94/E D A H T ..
IS10/96	... N L N Q
IS33/03/B	H L E Y S · K E · · · V · K D · · H E · K · E · T M · I K I T · Y P · · T
IS13/99/D	H L E Y S · K E · · · V · K D · · H E · K · E · T M · I K I T · Y P · · T
IS7/97/C R · D D E K V E S V · K D · T P V · T M · V A Q · T I M K K · A
IS29/03/A	R E A R Y L A S L H T R A L P T S V V F E K L L D G K E Q E D I V E M D D N F E F G L C P C D A R P L I R G K F N
IS31/03/A
IS32/03/A
IS35/03/A
IS34/03/C
IS17/99 N · I
IS4/94/E V K · I · N · S V K
IS10/96 K S
IS33/03/B	· · T · · · K · S · · · · · F E · L R R K · · · · · K · I V · · Y ·
IS13/99/D	· · T · · · K · S · · · · · F E · L R R K · · · · · K · I V · · Y ·
IS7/97/C I I · K · F · Q R · · T · · G V V

図2 各株のE2蛋白N端のアミノ酸配列の比較

(IS17/99株)は同一の塩基配列であった。また、IS33/03/B株と1999年にD農家のPI牛から分離された株 (IS13/99/D)も塩基配列が一致した。1997年にC農家で分離された株 (IS7/97/C)および1995年にE農家で分離された株 (IS3/95/EおよびIS4/95/E)は、2003年にA、BおよびC農家から分離された株とは90.7～92.7%および90.0～99.2%の相同性であった (表2)。

E2遺伝子の相同性の比較:得られた各株のE2遺伝子の塩基配列から推定されるアミノ酸配列のアライメントを行った。A農家の4株およびIS34/03/C株はほぼ同一の配列を示し、IS33/03/B株とIS13/99/D株の配列は完全に一致していた (図2)。各株間の塩基配列およびア

ミノ酸配列の相同性を算出したところ、A農家の4株およびIS34/03/C株は塩基配列で99.1～99.7%、アミノ酸配列で99.1～100%の高い相同性を示したが、IS17/99株とは94.6～94.9%および94.9～95.7%、さらにIS33/03/B株とは70.0～70.3%および70.4%の相同性であった (表3)。

考 察

感染経路および感染源を特定する場合、当該農場において患畜の既往歴、牛の導入および飼養管理状況等について疫学的調査を実施するが、これらの調査だけでは十分な情報を得ることができない場合がある。そこで今回、1酪農団地でPI牛が多発した事例について、感染源

表3 各株間のE2蛋白N端の塩基配列およびアミノ酸配列の相同性

	IS29	IS31	IS32	IS35	IS34	IS17	IS4	IS10	IS33	IS13	IS7
	塩基配列 (%)										
IS29/03/A		99.7	99.7	99.4	99.7	94.9	91.7	96.9	70.0	70.0	73.3
IS31/03/A	100		99.4	99.1	99.4	94.6	91.4	96.6	70.3	70.3	73.6
IS32/03/A	99.1	99.1		99.1	99.4	94.6	91.4	96.6	70.3	70.3	73.6
IS35/03/A	100	100	99.1		99.7	94.6	91.4	96.3	70.3	70.3	73.6
IS34/03/C	100	100	99.1	100		94.9	91.7	96.6	70.0	70.0	73.3
IS17/99	95.7	95.7	94.9	95.7	95.7		89.4	94.9	69.4	69.4	71.5
IS4/95/E	90.6	90.4	90.6	90.4	90.4	88.9		90.3	69.9	69.9	72.9
IS10/98	94.9	94.9	90.4	94.9	94.9	92.3	88.0		70.4	70.4	73.0
IS33/03/B	70.4	70.4	70.4	70.4	70.4	67.0	67.8	67.3		100	76.6
IS13/99/D	70.4	70.4	70.4	70.4	70.4	67.0	67.8	67.3	100		76.6
IS7/97/C	70.1	70.1	70.1	70.1	70.1	69.2	70.1	68.4	69.6	69.6	
	アミノ酸配列 (%)										

および感染経路を解明するため、疫学解析の一助として分離株の遺伝子解析を行った。

A 農家については、摘発されたPI牛4頭は生年月日も近く、母牛はいずれもPI牛ではなかったことから、感染源は同一であることが予想された。5'NCRの解析では、この4頭からの分離株の塩基配列はすべて一致したが、さらにC農家の2003年のPI牛からの分離株IS34/03/Cおよび1999年に別の地域の牛からの分離株IS17/99とも一致した。E2遺伝子の解析を行い推定されるアミノ酸配列で比較したところ、A農家の4株とIS34/03/C株はきわめて類似した配列を示したが、IS17/99株とは異なっていた。IS17/99株が分離された農家とA農場およびC農場とは牛の行き来が行われておらず、疫学的な関連性が菲薄であったが、このことはE2遺伝子の解析結果と一致した。C農家のPI牛の母牛はB農家より2001年に導入されたが、推定される感染時期（2002年秋から2003年春）にはB農家ではなくC農家で飼養されていた。また、B農家とC農家は今回の牛の導入以外には交流がなかった。C農家はA農家に隣接しており、C農家の2003年のPI牛が感染を受けたと推定される時期の直前の2002年夏にA農家でPI牛4頭が出生している。IS34/03/C株は、C農家で1997年にPI牛と診断された牛からの分離株IS7/97/Cとは塩基配列が異なっていたが、A農家からの分離株3株とE2蛋白のアミノ酸配列が100%一致していた。したがって、C農家の2003年のPI牛の感染源はA農家のPI牛であることが推定された。B農家のPI牛からの分離株IS33/03/Bは、隣接するD農家で1999年に摘発淘汰されたPI牛からの分離株IS13/99/Dと5'NCRおよびE2遺伝子が100%一致したことから、D農家のPI牛が感染源であることが推察された。

BVDVの水平伝播は牛同士の接触によって起こり[20]、PI牛が牛群に導入された場合、抗体を保有しない感受性のある牛が感染を起こす[1, 18]。A農家の場

合、4頭のPI牛が感染した時期に周囲の農家にはA農家分離株と相同性の高い株を保有するPI牛がみられず、牛ウイルス性下痢・粘膜病の発生も認められなかったが、2001年から2002年にかけてA農家の飼養牛のBVDV抗体保有率が55.9%から88.1%に上昇していることから（データ示さず）、A農家にPI牛が導入された可能性が推察された。しかし、この時期に導入した牛は淘汰されており、検査材料は残されていなかったため感染源の特定には至らなかった。

B農家のPI牛の感染源はD農家の1999年に淘汰されたPI牛分離BVDVと同じと推察されたが、B農家のPI牛が感染したと推察される2001年までの約1年間は搾乳牛においてPI牛がBおよびD、さらには隣接するgおよびh農家のいずれにも確認されなかった。また、B農家とD農家との牛のやり取りも行われていなかった。さらに、BVDVには近距離での空気感染が証明されているが[10, 14]、B農家とD農家とは道路を挟んで約20mの距離があり、空気感染による伝播は可能性が低いと考えられた。B農家とD農家は共同で作業を行うことがあり、牛に使用するロープ等の資材も共同で使用することがあることから、間接的にD農家からB農家にウイルスが伝播し、抗体陰性の感受性を有する牛の間でB農家のPI牛の母牛に感染するまでの約1年間ウイルスが保持された可能性が考えられた。C農家の場合、A農家と共同作業および資材の共有を行っていたことから、A農家から間接的にウイルスが伝播されたものと考えられた。

これらのことから、同一年度に近接した地域で分離された株であっても、交流のない農家間では疫学的に関連性はなく、むしろ、近接し、交流のある農家間では分離年代を超えて疫学的関連性が示された。これは、PI牛が淘汰された後も、何らかの形で牛群にウイルスが保持され、感染の危険性が高いことを示している。

今回の調査では、遺伝子解析を取り入れることでより

多くの情報を得ることができた。5'NCRはペスチウイルス属では保存性が高く、この領域を標的としてペスチウイルス属を検出することも可能であり、ウイルス遺伝子検出に有用な領域である [21]。いっぽう、BVDVのサブグループ1cは、5'NCRの解析では1aに含まれることから、5'NCRはサブグループに不適さないことも報告されている [17]。今回の成績から、E2 遺伝子の解析は5'NCRのそれより詳細な結果を得ることができた。これらのことから、E2 遺伝子の解析は疫学調査を行う上で、より有用であると考えられた。

引用文献

- [1] Baker JC : J Am Vet Med Assoc, 190, 1449-1458 (1987)
- [2] Brock KV : Vet Clin North Am Food Anim Pract, 20, 1-3 (2004)
- [3] Deng R, Brock KV : Virology, 191, 867-879 (1992)
- [4] Greiser Wilke I, Grummer B, Moennig V : Biologicals, 31, 113-118 (2003)
- [5] Heinz FX, Collett MS, Purcell RH, Gould EA, Howard CR, Houghton M, Moormann RJM, Rice CM, Thiel H-J : Virus Taxonomy, van Regenmortel MHV, et al eds, 859-878, Academic Press, San Diego (2000)
- [6] Houe H : Biologicals, 31, 137-143 (2003)
- [7] Houe H : Vet Microbiol, 64, 89-107 (1999)
- [8] König M, Lengsfeld T, Pauly T, Stark R, Thiel HJ : J Virol, 69, 6479-6486 (1995)
- [9] Lindberg ALE, Alenius, S : Vet Microbiol, 64, 197-222 (1999)
- [10] Mars MH, Brusckhe CJM, Van Oirschot JT : Vet Microbiol, 66, 197-207 (1999)
- [11] Meyers G, Thiel H J : Adv Virus Res, 47, 53-118 (1996)
- [12] Nagai M, Hayashi M, Sugita S, Sakoda Y, Mori M, Murakami T, Ozawa T, Yamada N, Akashi H : Virus Res, 99, 103-113 (2004)
- [13] Nagai M, Ito T, Sugita S, Genno A, Takeuchi K, Ozawa T, Sakoda Y, Nishimori T, Takamura K, Akashi H : Arch Virol, 146, 685-696 (2001)
- [14] Niskanen R, Lindberg A : Vet J, 165, 125-130 (2003)
- [15] Nuotio L, Juvonen M, Neuvonen E, Sihvonon L, Husu-Kallio J : Vet Microbiol, 64, 231-235 (1999)
- [16] Shimizu M, Satou K : Jpn J Vet Sci, 49, 1045-1051 (1987)
- [17] Tajima M : Vet Microbiol, 99, 131-138 (2004)
- [18] Theil H-J, Plagemann PGW, Moennig V : Field Virology, Fields BN, et al eds, third ed, 1059-1073, Lippincott-Raven, Philadelphia (1996)
- [19] Thompson JD, Higgins DS, Gibson TJ : Nucleic Acids Res, 22 (1994)
- [20] Viet A-F, Fourichon C, Seegers H, Jacob C, Guihenneuc-Jouyaux : Prev Vet Med, 63, 211-236 (2004)
- [21] Vilcek S, Herring AJ, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ : Arch Virol, 136, 309-232 (1994)

Analyses of the 5' Non-Coding Region and E2 Gene of Bovine Viral Diarrhea Virus Isolates from Multiple Occurrences of Persistent Infection

Michiko HAYASHI*, Toshiaki MURAKAMI, Hikaru TAKAI, Toru YAMAGUCHI, Osamu FUNAKI and Makoto NAGAI†

* *Ishikawa Nanbu Livestock Hygiene Service Center, Bo 324-2 Saida, Kanazawa, 920-3101, Japan*

SUMMARY

In 2003, five heifers and a calf that calved on three different farms, farms A, B and C, within a collective farm, were identified as being persistently infected (PI) with bovine viral diarrhoea virus (BVDV). To identify the epidemiological links between these multiple occurrences, genetic analyses of the 5' non-coding region (5'NCR) and E2 gene of the isolates were performed. According to the 5'NCR sequencing, five isolates consisting of four from Farm A and one from Farm C had an identical sequence. Moreover, the 5'NCR sequence of another BVDV isolate (IS17/99) obtained from a different area in 1999 was also identical. The level of identity between the isolates from Farm B and the five isolates was 90.8%. In contrast, a sequence analysis of the E2 gene revealed that the deduced level of amino acid sequence identity of the five isolates was 99.1% to 100%, whereas the identity between IS17/99 and the five isolates was 94.9% to 95.7%. In addition, the level of identity between the isolate from Farm B and the five isolates was only 70.4%. The 5'NCR and E2 gene sequence of the isolate from Farm B were identical with those of an isolate in 1999 from a calf persistently infected with BVDV that calved in the neighborhood, suggesting that the virus was transmitted from the neighboring farm. This data shows that analysis of the E2 gene is useful in the epidemiological investigation of field BVDV isolates.

— Key words : bovine viral diarrhoea virus, genetic analysis, epidemiological analysis.

† Correspondence to : Makoto NAGAI (Ishikawa Hokubu Livestock Hygiene Service Center)

1-47 Otsu, Nanao, 929-2126, Japan TEL 0767-68-3636 FAX 0767-68-6295

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 58, 741 ~ 745 (2005)