

## 石川県で近年分離された牛ウイルス性下痢ウイルスの遺伝子解析と血清学的性状

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	林, みち子 村上, 俊明 高井, 光 ほか4名,
巻/号	59巻5号
掲載ページ	p. 320-324
発行年月	2006年5月

## 石川県で近年分離された牛ウイルス性下痢ウイルスの 遺伝子解析と血清学的性状

林みち子<sup>1)</sup> 村上俊明<sup>1)</sup> 高井 光<sup>1)</sup> 長井 誠<sup>2)†</sup>  
山口 徹<sup>1)</sup> 舟木 理<sup>1)</sup> 明石博臣<sup>3)</sup>

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)

3) 東京大学大学院農学生命科学研究科 (〒113-8657 文京区弥生1-1-1)

(2005年10月13日受付・2005年12月20日受理)

### 要 約

1995年から2005年までに石川県で分離された牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) 32株について、遺伝子性状および血清学的解析を行った。E2遺伝子の分子系統樹解析では、石川県のBVDVは4つのサブグループに分けられ、BVDV-1aは9株(28.1%)であり、BVDV-1bは17株(53.1%)であった。交差中和試験では、BVDV-2とBVDV-1内の各サブグループとの抗原性状に有意な差(抗原類似率(R値):0.3~1.1)が認められたが、BVDV-1のサブグループ内でも有意な差(1.0~23.9)が認められた。国内のワクチン株のうちの一つである生ワクチンNo.12株の免疫血清と各グループのR値は23.9以下であった。これらの結果から、石川県においては、従来から用いられてきた生ワクチン株や検査に用いる標準株とは抗原性状の異なるBVDVが優位に流行していることが示唆された。

—キーワード:牛ウイルス性下痢ウイルス, 遺伝子解析, 石川県, 血清学的性状。

日獣会誌 59, 320~324 (2006)

牛ウイルス性下痢・粘膜病は家畜届出伝染病に指定されており、養牛経営上重要な疾病の一つである[3, 13, 14]。わが国では本病の感染源となっている牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)持続感染(PI)牛に対して積極的な対策を行っていないため、本病は毎年、各地で発生しており、石川県においても過去11年間に36頭のPI牛が摘発されている。BVDVはゲノムの塩基配列の違いからBVDV-1およびBVDV-2に分類され[12]、その抗原性状の違いも明らかにされている[2]。近年、従来のBVDV-1ワクチンに加え、BVDV-2も成分に加えた不活化ワクチンが市販された。さらに、BVDV-1の中にも抗原性状の多様性があることが明らかにされており[4, 6, 19]、ワクチンによる予防を行う際には、その地方に流行している株の型の把握が重要と考えられる。また、BVDV流行時の抗体検査において、わが国で広く用いられているNose株[16]に対する抗体価が流行年度によってばらつく場合がある。このことは、BVDV-1サブグループ間の抗原性状の違いによると考えられるが、中和試験等による血清学的診断を行う際には流行株の抗原性状を正確に把握しておくことが必要と考えられる。

そこで今回、石川県において最近11年間に分離された32株のBVDVについて、遺伝子型および抗原性状を調べた。

### 材 料 お よ び 方 法

**ウイルス:**石川県の分離株との比較を行うため、ワクチンの親株であるNo.12株[21]およびわが国の代表株KS86-1cp株[24]、SoCP/75株[25]およびKZ91-CP株[20]を用いた。

**BVDV分離株:**石川県において1995年から2005年に持続感染牛および粘膜病から分離された32株のBVDVを検査に供した。

**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の抽出および塩基配列の決定は既報[11]と同様に行った。RT-PCRはE2遺伝子を標的としたプライマー2274F-3434R[18]を用い、BVDV SD-1株[8]の遺伝子位置2462-2812(351塩基)に相当する塩基配列を決定した。すでに塩基配列を決定した11株[18]については、DNA Data Bank Japan (DDBJ)に登録済

† 連絡責任者:長井 誠(石川県南部家畜保健衛生所)

〒920-3101 金沢市才田町戊324-2 ☎076-257-1262 FAX 076-257-2122

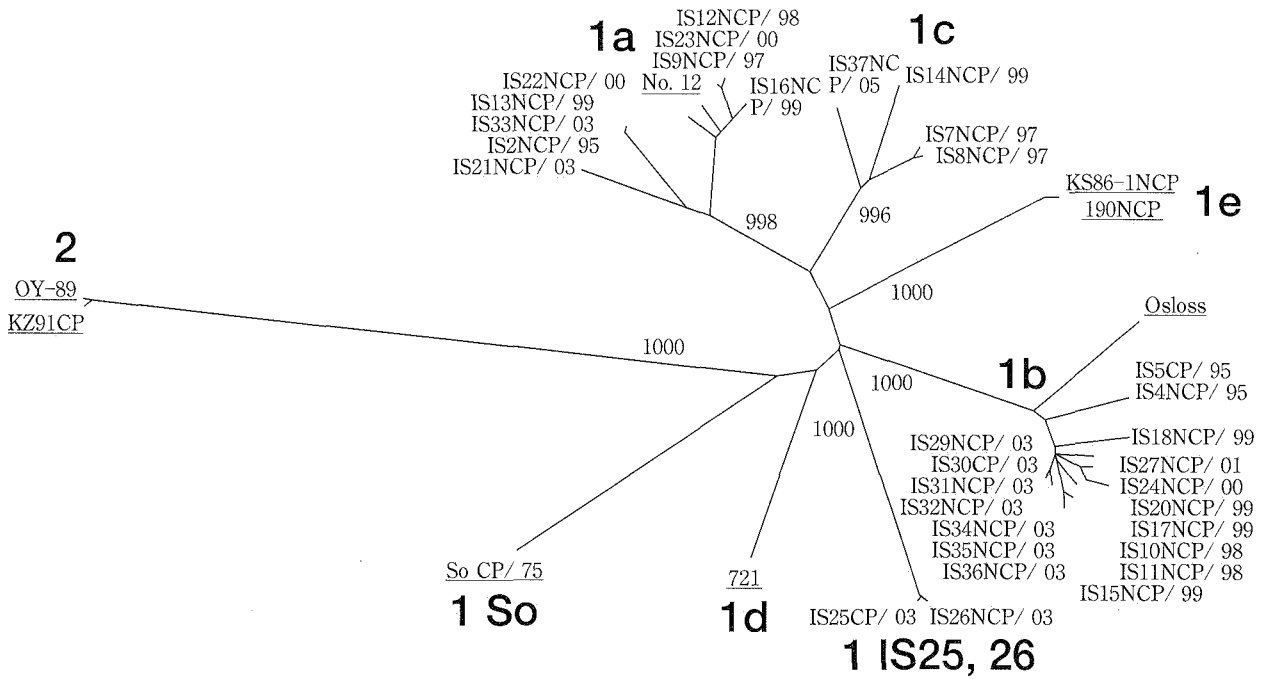


図1 石川県において1995年から2005年までに分離されたBVDV32株のE2遺伝子351bpの分子系統樹  
 下線はBVDV標準株を示す。分岐の数値はブーストラップ値を示す。各株のDNA Data Bankの登録番号は以下のとおり。IS2NCP/95：AB243032, IS4NCP/95：AB105630, IS5CP/95：AB105627, IS7NCP/97：AB105618, IS8NCP/97：AB105619, IS9NCP/97：AB243033, IS10NCP/98：AB105632, IS11NCP/98：AB243034, IS12NCP/98：AB243035, IS13NCP/98：AB105614, IS14NCP/99：AB105620, IS15NCP/99：AB243036, IS16NCP/99：AB105615, IS17NCP/99：AB105633, IS18NCP/99：AB243037, IS20NCP/99：AB243038, IS21NCP/00：AB243039, IS22NCP/00：AB243040, IS23NCP/00：AB243041, IS24NCP/00：AB243042, IS25CP/01：AB106637, IS26NCP/01：AB105638, IS27CP/01：AB243043, IS29NCP/03：AB243044, IS30CP/03：AB243045, IS31NCP/03：AB243046, IS32NCP/03：AB243047, IS33NCP/03：AB243048, IS34NCP/03：AB243049, IS35NCP/03：AB243050, IS36NCP/03：AB243051, IS37NCP/05：AB243052, No. 12：AB105610, Osloss：M96687, 721：AF144609, KS86-1 NCP：AB078950, 190NCP：AB105635, So CP/75：AB105636, KZ-91CP：AB105639, OY-89：AB105640

の配列を用いた。

**分子系統樹解析：**得られた塩基配列は、DDBJ ホームページ上のCLUSTAL Wプログラム [27] により近隣接合法 [23] を用いて分子系統樹解析を実施した。得られた系統樹の信頼性を得るため、ブーストラップ解析 [9] を1,000回繰り返した。

**免疫血清および交差中和試験：**分子系統樹解析により分けられたグループの代表株について免疫血清を作成した。BVDV-1b (IS27CP/00), BVDV-1c (IS8NCP/97), BVDV-1e (KS86-1CP), BVDV-1IS25, 26 (IS25CP/03), BVDV-1So (So CP/75) およびBVDV-2 (KZ91CP) については既報 [19] と同様にめん羊を用いて作成した。BVDV-1aについてはNo. 12株 [21] を代表株とし、免疫血清は約1歳の育成牛に牛5種混合ワクチンを接種し、約4週間後に採血して得た。交差中和試験は既報 [19] と同様に実施した。

**抗原類似率：**各グループ間の抗原性状を比較するため、交差中和試験で得られた抗体価を用い、以下の式によって抗原類似率 (R 値) [15] を計算した。

$$R \text{ 値} = 100 \times \frac{\sqrt{\frac{\text{免疫血清Bに対するA株の抗体価} \times \text{免疫血清Aに対するB株の抗体価}}{\text{免疫血清Aに対するA株の抗体価} \times \text{免疫血清Bに対するB株の抗体価}}}}{\text{成 績}}$$

**分子系統樹解析：**32株の石川県分離株および塩基配列が既知の日本分離株 (No. 12株：BVDV-1a, KS86-1NCP株および190NCP株：BVDV-1e, So CP/75株：BVDV-So, KZ91CP株およびOY-89株：BVDV-2) ならびに外国分離株 (Osloss株 [7]：BVDV-1b, 519株 [5]：BVDV-1cおよび721株 [5]：BVDV-1d) のE2遺伝子領域の一部について分子系統樹解析を行った。分子系統樹から、石川県の分離株は9株がBVDV-1a, 17株がBVDV-1b, 4株がBVDV-1cおよび2株がその他のBVDV-1サブグループ (BVDV-1IS25, 26) に分類された (図1)。分離された年別にサブグループの分離状況を調べたところ、BVDV-1aおよびBVDV-1bはほぼ毎年分離されたが、2000年を除き、

BVDV-1bの方が多く分離される傾向にあった。BVDV-2は1995年から2005年の間では1株も分離されなかった(表1)。

**交差中和試験成績：**系統樹解析で分類した各グループ代表株の免疫血清交差中和試験を行い、各グループの幾何平均抗体価からR値を計算した。BVDV-2とBVDV-1の各サブグループとのR値は0.3から1.1、BVDV-1内のサブグループ間のR値は1.0から23.9の間であった(表2)。

## 考 察

石川県で1995年から2005年の間に分離されたBVDVを分子系統的に解析したところ、BVDV-1aは32株中9株(28.1%)であり、BVDV-1bが最も多く17株(53.1%)であった。海外における報告では、英国はBVDV-1aが優位に流行しているが[28]、米国、スペイン、ドイツ、オーストリア、フランス、イタリア、スウェーデンでは1bが他のサブグループより優位に流行していると報告されている[1, 17, 26, 29]。わが国では、八重樫ら[30]は岩手県においてBVDV-1aが33株中17株を占めていたと報告しているが、石川県ではわが国のワクチン株の親株であるNo. 12株が含まれる

BVDV-1aよりも1a以外のBVDV-1が優位を占める傾向にあった。このことから、国内では地方によって優位に流行しているBVDVの遺伝子型が異なっていることが示唆された。

抗原性状を比較するため交差中和試験を行い、各遺伝子型間のR値を算出した。R値は25未満であった場合、重要な抗原性状の違いを示すと考えられている[15]。BVDV-1の各サブグループとBVDV-2とのR値は0.3から1.1であり、また、BVDV-1のサブグループ間のR値も1.0から23.9といずれも25未満を示した。Becherら[4]はBVDV-1のサブグループ間のR値がBVDV-1とBVDV-2とのR値よりも低い場合があることを報告しているが、今回もBVDV-1bとBVDV-1eとのR値は1.0であり、BVDV-1とBVDV-2とのR値よりも低値を示した。このようにBVDV-1内のサブグループにおいても有意な抗原性状の差が認められ、サブグループ間によっては2以上の中和価の差異が認められた。このことは、中和試験において使用するBVDVのサブグループが流行株と異なれば、流行株に対する抗体を見落とす可能性があることを示唆している。BVDVの抗体価を測定する場合には、わが国の標準株であるNose株(BVDV-1a)、KS86-1cp株(BVDV-1e)およびKZ91-CP株(BVDV-2)に加え、BVDV-1bの株、たとえばIS27CP/00株を中和試験の指示ウイルスに用いるべきと考えられた。さらに流行株がこれら標準株と抗原性状に大きな相違が認められる場合には、流行株についても中和試験を行う方が正確な抗体価が得られると考えられた。

IS25CP/03およびIS26NCP/03は2003年に本県で分離され、遺伝子解析の結果ドイツで分離された株と類似しているものの、わが国では新しい遺伝子型であった[18]。このサブグループと他のサブグループとの抗原性状を比較したところ、R値は0.8から15.9であり、抗原的にも新しい血清型であることが今回明らかになった。このサブグループに類似する株はその後国内では見つかっていない。1975年に鹿児島県で分離されたSo/75株

表1 年度ごとのBVDV遺伝子型の株数

分離年	BVDVの遺伝子型				
	BVDV-1a	BVDV-1b	BVDV-1c	BVDV-1IS25,26	BVDV-2
1995	1	2	0	0	0
1996	0	0	0	0	0
1997	1	0	2	0	0
1998	1	2	0	0	0
1999	2	4	1	0	0
2000	3	1	0	0	0
2001	0	1	0	2	0
2002	0	0	0	0	0
2003	1	7	0	0	0
2005	0	0	1	0	0
合計	9	17	4	2	0

表2 BVDV各遺伝子型代表株に対する免疫血清を用いた交差中和試験成績

ウイルス	各遺伝子型代表株に対する免疫血清						
	No. 12 (BVDV-1a)	IS27CP/00 (BVDV-1b)	IS8NCP/97 (BVDV-1c)	KS86-1cp (BVDV-1e)	IS25CP/03 (BVDV-1 IS26,26)	So CP/76 (BVDV-So)	KZ91CP (BVDV-2)
BVDV-1a	100*	12.1	23.9	3.6	15.9	10.2	0.6
BVDV-1b		100	8.8	1.0	3.4	7.4	0.3
BVDV-1c			100	3.5	5.3	11.1	1.1
BVDV-1e				100	1.6	2.2	0.6
BVDV-1IS25, 26					100	4.4	0.8
BVDV-1So						100	0.5
BVDV-2							100

\*：抗原類似率(R値)で示す

は遺伝学および血清学的にユニークな株であるが、その後わが国では類似株は分離されていない。また、KS86-INCP株に代表される、かつてK群と呼ばれ、遺伝子解析からBVDV-1eに分類されることが判明したサブグループも近年分離報告が見あたらない。なぜこれらのサブグループが分離されなくなったかは不明であるが、IS25CP/03のような新しいサブグループのBVDVが出現する可能性もあり、今後監視を継続する必要があると思われる。

わが国では、これまでBVDV-1aに分類されるNo. 12株を親株とする生ワクチンが予防に使われており、近年BVDV-1aとBVDV-2を含む不活化ワクチンも市販されている。BVDV-1aのワクチンで免疫した牛群におけるBVDV-1bに対する抗体価が低いことから、BVDV-1aのワクチンはBVDV-1bの感染を十分に防げるかについて疑問視する報告がある [10, 22]。石川県ではこれまでワクチン接種群にBVDV感染症の発生は確認されていないが、今後ワクチンの効果について監視を続けていく必要があると思われる。

#### 引用文献

- [1] Arias P, Orlich M, Prieto M, Rosales SC, Thiel H-J, Alvarez M, Becher P : *Vet Microbiol*, 96, 327-336 (2003)
- [2] Avalos-Ramirez R, Orlich M, Thiel H-J, Becher P : *Virology*, 286, 456-465 (2001)
- [3] Baker, JC : *J Am Vet Med Assoc*, 190, 1449-1458 (1987)
- [4] Becher P, Avalos-Ramirez R, Orlich M, Rosales SC, König M, Schweizer M, Stalder H, Schirmer H, Thiel H-J : *Virology*, 311, 96-104 (2003)
- [5] Becher P, Orlich M, Kosmidou A, König M, Baroth M, Thiel H-J : *Virology*, 262, 64-71 (1999)
- [6] Couvreur B, Letellier C, Collard A, Quenon P, Dehan P, Hamers C, Pastoret P-P, Kerkhofs P : *Virus Res*, 85, 17-28 (2002)
- [7] De Moerlooze L, Lecomte C, Brown-Shimmer S, Schmetz D, Guiot C, Vandenberg D, Allaer D, Rossius M, Chappuis G, Dina D, Renard A, Martial JF A : *J Gen Virol*, 74, 1433-1438 (1993)
- [8] Deng R, Brock KV : *Virology*, 191, 867-879 (1992)
- [9] Felsenstein J : *Evolution*, 39, 783-791 (1985)
- [10] Fulton RW, Ridpath JF, Confer AW, Saliki JT, Burge LJ, Payton ME : *Biologicals*, 31, 89-95 (2003)
- [11] 林みち子, 村上俊明, 高井 光, 山口 徹, 舟木 理, 長井 誠 : *日獣会誌*, 58, 741-745 (2005)
- [12] 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)
- [13] Houe H : *Biologicals*, 31, 137-143 (2003)
- [14] Houe H : *Vet Microbiol*, 64, 89-107 (1999)
- [15] Hubalek Z : *J Appl Bacteriol*, 52, 307-318 (1982)
- [16] Kodama K, Sasaki N, Fukuyama S, Izumida A, Ishii F : *Bull Nippon Vet Zootech Coll*, 23, 51-60 (1974)
- [17] Luzzago C, Bandi C, Bronzo V, Ruffo G, Zecconi A : *Vet Microbiol*, 83, 265-274 (2001)
- [18] Nagai M, Hayashi M, Sugita S, Sakoda Y, Mori M, Murakami T, Ozawa T, Yamada N, Akashi H : *Virus Res*, 99, 103-113 (2004)
- [19] 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)
- [20] Nagai M, Sato M, Nagano H, Pang H, Kong X, Murakami T, Ozawa T, Akashi H : *Vet Microbiol*, 60, 271-276 (1998)
- [21] Omori T, Inaba Y, Morimoto T, Tanaka Y, Kurogi H, Matumoto M : *Jpn J Microbiol*, 11, 133-142 (1967)
- [22] Ridpath JF : *Biologicals*, 31, 127-131 (2003)
- [23] Saitou N, Nei M : *Mol Biol Evol*, 4, 406-425 (1987)
- [24] Shimizu M, Satou K, Nishioka N, Yoshino T, Momotani E, Ishikawa Y : *Vet Microbiol*, 19, 13-21 (1989)
- [25] Shirai J, Tanaka Y, Horiuchi T : *Jpn J Vet Sci*, 46, 901-904 (1984)
- [26] Tajima M, Frey H-R, Yamato O, Maeda Y, Moennig V, Scholz H, Greiser-Wilke I : *Virus Res*, 76, 31-42 (2001)
- [27] Thompson JD, Higgins DS, Gibson TJ, *Nucleic Acids Res*, 22 (1994)
- [28] Vilcek S, Drew TW, McGoldrick A, Paton DJ : *Vet Microbiol*, 69, 227-237 (1999)
- [29] Vilcek S, Paton DJ, Durkovic B, Strojny L, Ibata G, Moussa A, Loitsch A, Rossmann W, Vega S, Scicluna MT, Palfi V : *Arch Virol*, 146, 99-115 (2001)
- [30] 八重樫岳司, 清宮幸男, 迫田義博, 関 慶久 : *日獣会誌*, 57, 31-25 (2004)

Genomic and Serological Characterization of Bovine Viral Diarrhea Virus Recently Isolated in Ishikawa Prefecture in Japan

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

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

SUMMARY

During the period 1995 to 2005, a total of 32 BVDV isolates were recovered from persistently infected calves and cattle with mucosal disease in Ishikawa Prefecture. All isolates were divided on the basis of phylogenetic analysis into four subgroups. Nine out of 32 isolates (28.1%) were classified as a subtype BVDV-1a, while 17 (53.1%) were classified as BVDV-1b. The calculated antigenic similarity (R) among BVDV-1 subgroups and BVDV-2 as revealed by cross-neutralization assay showed significant antigenic differences between BVDV-1 and BVDV-2 (0.3~1.1) and within BVDV-1 subgroups (1.0~23.9). A No. 12 strain of BVDV-1a, which has been used as a parent strain of Japanese live vaccine showed R values of 0.6, 12.1, 23.9 and 10.2 when compared with BVDV-2, 1b, 1c and 1So, respectively. The data suggested that antigenically different BVDVs from the Japanese representative and the parent vaccinal strain are very widespread in Ishikawa Prefecture.

— Key words : Bovine viral diarrhea virus, genomic analysis, Ishikawa Prefecture, serological property.

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

Bo 324-2 Saida, Kanazawa, 920-3101, Japan TEL 076-257-1262 FAX 076-257-2122

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 59, 320~324 (2006)

獣医師様のために開発された

# まかせて安心! カルテファイルの達人

カラー管理が一目で分かる  
サンプルセットをご覧ください。

**ポイント1**  
迷子カルテがなくなります。

**ポイント2**  
大きくて見つけやすい  
特殊ラミネート加工の見出し

**ポイント3**  
使いやすさと  
手にやさしい加工で特許取得

**ポイント4**  
様々なカラー管理ができます。  
(モデル・ターミナル・名前・パースティ)

※販売店の方もお気軽にご連絡ください。

新製品も随時ご紹介致します。

カルテ管理が一目で分かる  
小冊子をご用意しています。

※まずはお気軽に、  
資料請求下さい。

●お問い合わせ・資料請求はお気軽に...

電話 0120-500-896  
048-924-5757  
FAX 048-924-1717  
ホームページ <http://www.pencabin.com>  
Eメール [medical@pencabin.com](mailto:medical@pencabin.com)  
※FAX・Eメールは24時間受付致します。

■製造・販売元 カルテファイル&カルテラックの専門会社です。

## ペンキャビン株式会社

—カルテファイル研究所—

営業本部 〒340-0034 埼玉県草加市氷川町2104番地17-502