

岡山県におけるブルータングウイルスの流行と流行株の解析

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	福富, 豊子 大内, 紀章 澤田, 勝志 ほか3名,
巻/号	59巻8号
掲載ページ	p. 535-539
発行年月	2006年8月

岡山県におけるブルータングウイルスの
流行と流行株の解析

福富豊子[†] 大内紀章 澤田勝志 平井伸明
秦 守男 奥田宏健

岡山県家畜病性鑑定所 (〒709-2123 岡山市御津河内2770-1)

(2005年7月21日受付・2006年2月20日受理)

要 約

1994～2004年のブルータングウイルス (BTV) 疫学調査の結果、1997、1999、2000および2001年にウイルスの流行が認められた。VP3 遺伝子を標的とするPCRの結果、1997、1999年採材おとり牛血球から遺伝子が検出され、2001年の血球からBTV (OKB01株) が分離された。交差中和試験の結果、分離株は、既知のON89-1株 (BTV21) とは血清型が異なることが示唆された。OKB01株およびON89-1株を用いて、浸潤度調査を中和試験と競合ELISAによって行った結果、1999年と2001年にはOKB01株と類似するウイルスが、1997年には両株とは血清学的に異なるBTVの流行が判明した。分子系統樹解析の結果、1997年検出遺伝子は1999年および2001年とは所属するクラスターが異なっており、岡山県では過去8年間に、従来の日本分離株とは遺伝学および血清学的に異なる少なくとも2種類のBTV流行があったことが推測された。

——キーワード：ブルータングウイルス、分子系統樹解析、おとり牛、血清疫学調査、ウイルス分離。

日獣会誌 59, 535～539 (2006)

ブルータング (BT) は、緬山羊や牛の鼻腔、口腔粘膜の充血、腫脹、糜爛、潰瘍等を主徴とする疾病で国際獣疫事務局 (OIE) のリストA疾病に規定されている国際重要伝染病の一つである。その病因となるブルータングウイルス (BTV) は、レオウイルス科オルビウイルス属に分類され、現在までに24血清型の存在が確認されている。本ウイルスはヌカカ等の節足動物により媒介され、世界中の温帯～熱帯地域に分布している。国内ではMiuraら [7] が1970年代に採取された九州および沖縄地域の牛血清中にBTV血清型1、12および20の中和抗体を検出した。その後も九州や沖縄では本ウイルスに対する抗体陽転が確認され、ウイルスも分離されるようになったが、BTの発生は確認されなかった [3]。1994年に国内で初めて北関東地域の牛と羊にBTが発生し、また、2001年にもふたたび同地域の羊に発生が認められた [3]。

岡山県において、1994～2004年に採取した未越夏おとり牛の血清を用いてBTV疫学調査を実施した結果、1997、1999、2000および2001年の4カ年で本ウイルスの流行が認められた。1997および1999年には、おとり

牛の血球からBTV遺伝子が検出され、2001年にはおとり牛3頭の血球からBTVが分離された。本研究では、これらBTV遺伝子や分離株 (OKB01株) を用いて本県におけるBTVの流行や流行株の解析を試みた。

材料および方法

血清疫学調査：1994～2004年に岡山県内で飼育されている20戸/年のおとり牛56～83頭/年から6、8、9、10および11月に採取した血清を用い、BTVに対する抗体検査をJochimら [4] の方法に準じてゲル内沈降反応 (AGID) で実施した。

なおAGID抗体陽転が確認された年次の血清については、同じオルビウイルス属に分類される流行性出血熱ウイルス群との交差反応を否定するため、BTV血清型21 TO4-3株 [3] を抗原に用いた競合ELISAをOIEの診断マニュアルに準じて行った。

ウイルス分離と同定：抗体陽転が認められたおとり牛より採取されたヘパリン加血液をウイルス分離に供した。ヘパリン加血液は血球と血漿に分離し、血球はリン酸緩衝液 (PBS) で3回洗浄し、PBSに浮遊した。これ

[†] 連絡責任者：福富豊子 (岡山県家畜病性鑑定所)

〒709-2123 岡山市御津河内2770-1 ☎0867-24-3855 FAX 0867-24-3856

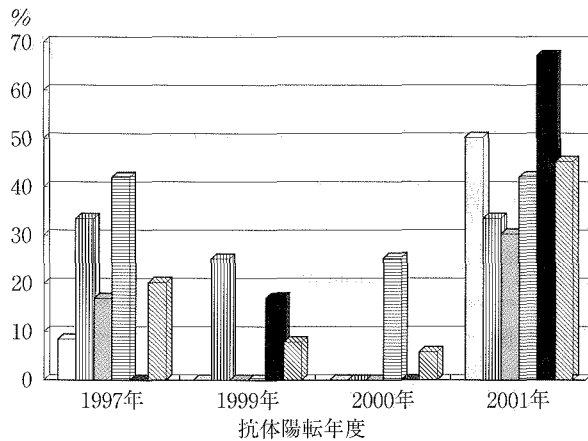


図1 BTVに対する抗体陽転状況 (AGID)
 □：県南東部 ▨：県南西部 ▩：県中西部
 ▤：県北西部 ■：県北東部 ▦：岡山県

らはウイルス分離に供するまで -80°C で保管した。

BHK-21細胞を単層培養した小試験管に前述した材料を接種し 37°C 90分吸着した後、細胞維持用培養液を加え 34°C で回転培養を行い、CPEの有無を観察した。CPEが観察されない場合には3代まで盲継代を実施した。

なお、細胞増殖用培養液にはイーグル液^{a)}を基礎培養液とした既報 [2] のものを用い、細胞維持用培養液には細胞増殖用培養液の牛胎子血清を2%としたものを用いた。分離ウイルスの同定は、BTV血清型21 ON89-1株に対する抗血清を用いた間接蛍光抗体法 (IFA) によって実施した。

分離ウイルスを用いた浸潤度調査：本県分離株およびON89-1株 [10] を用いて中和試験 (NT) を実施した。なお、中和抗体はHmLu-1細胞を用いて既報 [2] に準じてマイクロタイター法で測定し、細胞変性効果 (CPE) を抑制した血清の最高希釈の逆数を中和抗体価とし、2倍以上を陽性とした。

RT-PCR：ウイルスRNAは、BTVに対し抗体陽転が認められたおとり牛の洗浄血球および分離ウイルス培養上清から市販のキット^{b)}を用いて抽出した。RTおよびnested PCRはMcCollら [5, 6] が報告した血清群特異的抗原であるウイルスコア蛋白VP3遺伝子を標的としたプライマー (1st センスプライマー：1055～1083番目、アンチセンスプライマー：1734～1763番目、nested センスプライマー：1055～1083番目、アンチセンスプライマー：1410～1435番目) を用いて市販のキット^{c)}により実施した。なお、逆転写酵素反応は $42^{\circ}\text{C} \cdot 15$ 分、 $99^{\circ}\text{C} \cdot 5$ 分、 $5^{\circ}\text{C} \cdot 5$ 分で行い、PCRは $94^{\circ}\text{C} \cdot 30$ 秒、 $55^{\circ}\text{C} \cdot 1$ 分、 $72^{\circ}\text{C} \cdot 1$ 分を1サイクルとし35回繰り返し、最後に $72^{\circ}\text{C} \cdot 7$ 分反応させた。反応終了後、増幅産物は2%のアガロースゲル電気泳動によって確認した。

表1 分離BTV (OKB01株) 抗原性状解析

ウイルス	免疫血清	
	OKB01株*	ON89-1株
OKB01株	64	<2
ON89-1株	<2	1024

*：ウイルス分離牛の経過血清 (11月採血)

PCR産物の塩基配列の決定と分子系統樹解析：おとり牛血球から直接検出されたVP3遺伝子および分離ウイルスより増幅した当該遺伝子を用いて市販のキット^{d)}によるシーケンス反応を行いオートシーケンサー^{e)}で塩基配列を決定した。なお、塩基配列の決定は外部^{f)}に委託した。得られた塩基配列はNational Center for Biotechnology Informationのホームページ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 上のBlastを用いて相同性解析を実施した。

分子系統樹はClustal Xプログラム [11] を用いて近隣接合法 [9] により作成した。分子系統樹解析には、これまで国内で牛や羊血球から検出されたVP3遺伝子や分離株の当該遺伝子配列 (TO4-3株 (アクセッション番号; AB106889) [3], Y-39株 (AB106887) 等) を加えた。

成 績

BTVに対する疫学調査：AGIDを用いたBTVに対する疫学調査成績を図1に示した。1994～2004年までの11年間に抗体陽転は1997、1999、2000および2001年の4カ年で認められた。1997年は県北東部家保を除く4家保管内で陽転がみられ、県下全体では20%の陽転率を示した。1999および2000年の陽転率はそれぞれ7.4および5.3%と低率であったが、2001年には県下全域で44.8%が陽転した。また、陽転開始時期は1997年と2001年は9月下旬、1999年と2000年は11月下旬であった。なお、AGIDで抗体陽転が認められた個体はELISAでも陽性を示したことから、今回AGIDにより検出されたのはBTVに対する抗体であることが確認された。

ウイルス分離と同定：ウイルス分離の結果、2001年9月下旬に採取した県南東部および県南西部家保管内の3農場で飼養されるおとり牛各1頭 (計3頭) の血球から

- a) TRIZOL[®] LS REAGENT, インビトロジェン(株), 東京.
- b) RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0, タカラバイオ(株), 滋賀.
- c) 日本製薬(株), 東京.
- d) Big Dye Terminator v 20 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, U.S.A.
- e) ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, U.S.A.
- f) 北海道システム・サイエンス(株), 北海道.

BHK-21細胞にCPEを示すウイルスが分離された。分離ウイルスは、いずれもIFAにより細胞質に特異蛍光が認められたことからBTVと同定した。分離ウイルス3株は、当該ウイルス分離牛1頭の経過血清（11月下旬採血）によって同程度に中和され同一ウイルスと考えられたため、県南西部家保管内のおとり牛から分離されたウイルスをOKB01株と名付けた。OKB01株とON89-1株を用いた交差NTの結果、両株間に交差性が認められなかった（表1）。

分離ウイルスを用いた浸潤度調査：OKB01株が4年の流行に関与したか否かを分離株およびON89-1株を用いたNTとAGIDおよび競合ELISAによって調査した結果を図2に示した。1997年はAGIDおよび競合ELISAで抗体陽転牛が確認されたが、NTの結果、両株に対する中和抗体陽転牛は認められなかった。1999年以降はOKB01株に対する中和抗体陽転率は、競合ELISAの結果とよく相関した。ON89-1株に対する中和抗体陽転率は、いずれの年もOKB01株と比較すると低い値で推移した。内訳をみると、OKB01株に対し抗体陽転が確認されたおとり牛の一部にON89-1株に対し2～4倍の低レベルの抗体価を示す陽転牛が認められた。両株の中和抗体価（11月）の幾何平均（GM）値を比較するとOKB01株に対する抗体価が有意に高い値を

示した（表2）。

BTV VP3 遺伝子の検出と塩基配列の相同性：1997および1999年にそれぞれ2戸6頭および3戸7頭のおとり牛の血球からBTV遺伝子が検出された。それぞれの年次に検出された遺伝子（OKB1997（AB244087）およびOKB1999（AB244088））と2001年に分離したOKB01株（AB244089）nested PCR産物の相同性解析結果を表3に示した。OKB01株とOKB1999は高い相同性を示したのに対し、いずれもOKB1997とは93%の相同性を示すにとどまった。その他の国内外分離株との相同性解析の結果、OKB1999およびOKB01株は国内分離株であるTO4-3株およびY-39株、さらに台湾で分離されたKM株（AY493688）と高い相同性を示した。これに対しOKB1997は国内分離株やKM株より、むしろ東南アジアで分離されたCS156株（AY322428）[8]と高い相同性を示したが、その相同性は94.7%であった。

BTV VP3 遺伝子の分子系統樹解析：OKB01株およびおとり牛血球から直接検出された遺伝子（OKB1997およびOKB1999）さらに国内で流行した他のBTV遺伝子の塩基配列を用いて分子系統樹解析を実施したところ、OKB1997は同年に鳥取県で牛血球から直接検出されたBTV遺伝子[3]ならびに1996年に沖縄県で分離されたOK45株[3]に最も近縁であることが判明した。また、別のクラスターに分類されたOKB01株は、OKB1999とともに2001年に北関東でBTを発症した羊から分離されたTO92-01株[3]と最も近縁であることが明らかになった（図3）。

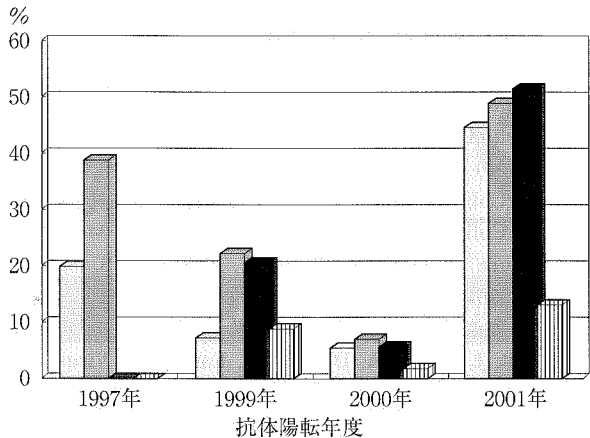


図2 分離ウイルスを用いた浸潤度調査

□：AGID法 ■：競合ELISA法
 ●：NT法（OKB01株） ▨：NT法（OKB89-1株）

表2 OKB01株とON89-1株に対する中和抗体陽転率と抗体価（11月）

年度	抗体陽転率 (%)		中和抗体価 (GM)	
	OKB01	ON89-1	OKB01	ON89-1
1997	0	0	1.0	1.0
1999	20.6	8.8	23.8	1.3
2000	5.4	1.8	4.0	1.3
2001	51.7	13.8	29.2	1.2

表3 BTV VP3遺伝子の部分塩基配列の相同性

	OKB01株	OKB1999*	OKB1997*	TO4-3株	Y-39株	KM株	CS156株
OKB01株	100						
OKB1999*	99.2	100					
OKB1997*	93.4	93.1	100				
TO4-3株	99.2	98.4	93.7	100			
Y-39株	99.2	98.4	93.7	99.5	100		
KM株	99.2	98.9	93.6	98.4	98.4	100	
CS156株	93.9	93.7	94.7	94.2	94.1	92.1	100

*：洗浄血球から直接検出

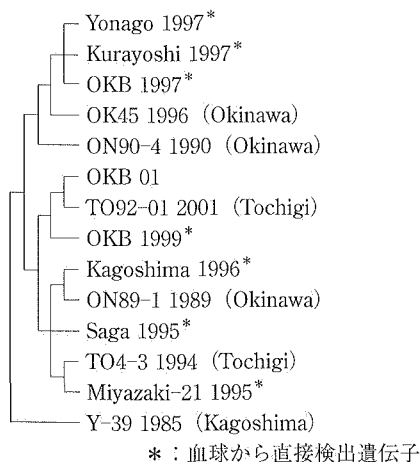


図3 日本国内で検出されたBTV VP3 遺伝子の部分塩基配列を基にした分子系統樹

考 察

1994年にわが国で初めてBTが発生 [3] し、同年BTVに対する抗体検査が開始されて以来、岡山県では1997, 1999, 2000および2001年の4カ年にウイルスの流行が確認された。中でも2001年の流行は県下全域に及び、BTV抗体調査開始以来最大規模であった。2001年におとり牛から分離されたBTV OKB01株は、BTV血清型21 ON89-1株 [10]、ならびに1994および2001年に北関東地域でBTを発症した羊から分離され、同様に血清型21と同定されたBTV (TO4-3およびTO92-01株) [3] と血清型が異なると思われる。

OKB01株およびON89-1株を用いたNT, AGIDおよび競合ELISAを実施した結果、1999と2001年にはOKB01株と類似する血清学的性状を有するウイルスが、1997年には両株とは血清学的に異なるBTVの流行が明らかになった。2000年については、抗体陽転率が低く流行株を特定するのは困難であるが、これら抗体検査結果から勘案するとOKB01株と血清学的に類似するウイルスの流行が示唆された。なお、OKB01株に対する中和抗体陽転牛の一部にON89-1株に対し低レベルの抗体陽転牛が認められたが、すでに報告 [7, 10] されているように異なる血清型間で生じる類属反応と思われた。

Gotoら [3] は、BTV VP3 遺伝子領域の分子系統樹解析から国内流行株は2つのクラスターに分類されるこ

とを明らかにした。本県のOKB01株や検出遺伝子 (OKB1997およびOKB1999) はそれぞれ所属するクラスターが異なり、1997年と1999年以降の本県流行株の由来は異なると思われる。

以上のことから、岡山県では1997年以降の8年間に従来の日本分離株 [3, 10] とは遺伝学的および血清学的に異なる少なくとも2種類のBTVの流行があったことが示唆された。

近年、おとり牛を用いた血清疫学調査の結果、西日本各地および北関東あるいは東北の一部地域でBTVの流行がしばしば確認されている [3]。牛や山羊ではBTは不顕性感染の率が高いとされるが、長期間ウイルス血症を示し、めん羊へのレゼルボアとなっているのではないかとされており [1]、今後ともBTVの動向には注意が必要である。

本稿を終えるにあたり、競合ELISAおよび分子系統樹解析を実施していただくとともにON89-1株および免疫血清を分与していただいた御動物衛生研究所の後藤義之総合防疫研究官、清水真也主任研究官に深謝する。また、おとり牛からの採材にご協力をいただいた家畜保健衛生所の関係各位に深謝する。

引用文献

- [1] 明石博臣：牛病学，清水高正，稲葉右二，小沼操，金川弘司，藤永 徹，本好茂一編，第二版，253-254，近代出版，東京（1988）
- [2] 福富豊子，大内紀章，奥田宏健，丸野史郎，田林宏一：日獣会誌，44，17-19（1991）
- [3] Goto Y, Yamaguchi O, Kubo M : Veterinaria Italiana, 40, 78-82 (2004)
- [4] Jochim MM, Chow TL : AM J Vet Res, 30, 33-41 (1969)
- [5] McColl KA, Gould AR : Aust Vet J, 71, 97-101 (1994)
- [6] McColl KA, Gould AR : Virus Res, 21, 19-34 (1991)
- [7] Miura Y, Inaba Y, Tsuda T, Tokuhisa S, Sato K, Akashi H : Natl Inst Anim Hlth Q, 22, 154-158 (1982)
- [8] Pritchard, L, Sendow, I, Lunt, R, Hassan, S, Kattenbelt, J, Gould, A, Daniels, P, Eaton, B : Virus Res, 101, 193-201 (2004)
- [9] Saitou N, Nei M : Mol Biol Evol, 4, 406-425 (1987)
- [10] 高吉克典，国場 保，久保正法，三浦康男：日獣会誌，47，651-654（1994）
- [11] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DS : Nucleic Acids Res, 25, 4876-4882 (1997)

Antigenic and Genetic Analyses of Bluetongue Viruses Prevalent
in Okayama Prefecture

Toyoko FUKUTOMI*[†], Motoaki OOUCHI, Katsushi SAWADA, Nobuaki HIRAI,
Morio HADA and Kouken OKUDA

* Okayama Prefecture Veterinary Diagnostic Laboratory, 2770-1 Okayama-city, Mitsu, 709-2123, Japan

SUMMARY

Serological surveys from 1994 to 2004 revealed that Bluetongue virus (BTV) infection among sentinel calves had occurred in Okayama Prefecture in 1997, 1999, 2000, and 2001. BTV RNA segment 3 encoding the serogroup-specific VP3 was detected from blood cell samples obtained from seropositive sentinel calves in 1997 and 1999. Moreover, BTVs were isolated from three blood cell samples in 2001. Using cross-neutralization tests, the isolates had a different serological characteristic from the ON89-1 strain of BTV21 isolated in Japan. Neutralization tests and competitive ELISA with the isolate and ON89-1 strain were performed using the sentinel calf sera in 1997, 1999, 2000, and 2001. The results demonstrated that BTV prevalent in Okayama Prefecture in 1997 and BTV present in 1999 and 2001 had the same serological characteristic as the isolate different serological characteristics from the isolate and ON89-1 strain. Phylogenetic analysis revealed that the BTV gene detected in 1997 was on a different branch from those detected in 1999 and 2001. These results suggest that the spread of at least two distinct BTVs genetically and serologically different from the previous Japanese isolate has occurred in Okayama Prefecture during the eight years from 1997 to 2004.

— Key words : Bluetongue virus, phylogenetic analysis, sentinel calves, serological survey, virus isolation.

† Correspondence to : Toyoko FUKUTOMI (Okayama Prefecture Veterinary Diagnostic Laboratory)

2770-1 Okayama-city, Mitsu, 709-2123, Japan TEL 0867-24-3855 FAX 0867-24-3856

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 59, 535 ~ 539 (2006)

動物用医薬品 鎮痛注射剤 要指示医薬品

非麻薬性 鎮痛剤 劇ベトルファール®

1mL中 酒石酸ブトルファノールを5mg含有

使い易い10mLバイアル

犬と猫の術後の疼痛管理に!



成分・分量 / 酒石酸ブトルファノール5.0mg / mL
効能・効果 / 犬・猫：術後の鎮痛
取扱い上の注意 / 貯法：室温保存
包装 / 10mLバイアル

※製品の使用に際しては添付の説明書を熟読してください。

Meiji 明治製薬株式会社
東京都中央区京橋2丁目4番16号
http://www.meiji.co.jp/agriculture/

劇 = 劇薬