

—最近における動物衛生研究情報 (IV)—

我が国における牛伝染性鼻気管炎の現行ワクチン株と
野外ウイルス株を識別可能なPCR法

村上賢二[†] (動物衛生研究所ウイルス病研究チーム上席研究員)

小西美佐子 (同主任研究員)

亀山健一郎 (同研究員)

神吉 武 (富山県農林水産部農業技術課主任)

前田有紀子 (愛知県農林水産部畜産課主任)



村上賢二

1 はじめに

牛伝染性鼻気管炎 (infectious bovine rhinotracheitis (IBR)) は、牛ヘルペスウイルス1型 (BoHV-1) の感染によって起こる呼吸器及び生殖器の疾病である。世界各国の畜産農家に大きな経済的損失を与えており [1, 2], 日本では家畜伝染病予防法により届出伝染病に指定されている。IBRは、日本では1975年に家畜衛生試験場 (現動物衛生研究所) の稲葉博士らが開発した生ワクチン [3] の接種によってその発症がおさえられ、感染拡大が制御されている。しかし生ワクチンを使用していると、発症牛からウイルスが分離された場合、分離ウイルスがワクチン株か野外株であるかを識別することが、その後の防疫対策を進めていく上で重要になる。これまで長期にわたり世界中でIBR不活化または弱毒生ワクチンが、その発症をおさえるために広く使われていたが、諸外国では、10年以上前にウイルス遺伝子の一部に欠損が見られるIBR不活化ワクチンや生ワクチンが開発され、免疫動物と野外ウイルス感染動物との識別が可能になっている [4-6]。しかし、我が国で現在使用されている生ワクチンには、遺伝学的に識別可能なマーカーは付与されておらず、培養細胞で通常より低い温度 (30℃) で7日間培養し、その増殖性の差によって野外株と区別されてきたため、病性鑑定時に迅速で正確な識別は出来なかった。そこで、本研究においてIBR生ワクチン株と野外ウイルス株を迅速に識別可能とする遺伝子型別法で

あるポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法を開発したので報告する。

2 牛伝染性鼻気管炎とその原因ウイルス

牛伝染性鼻気管炎 (IBR) の病変は様々で [1, 2], 40℃以上の高熱と呼吸困難, 呼吸促迫, 流涙, 流涎, 水様性鼻汁などの呼吸器症状や結膜炎を主徴とする。乳牛では乳汁産出量の減少もみられる。ウイルスは生殖器官にも感染し, 陰門腔炎ならびに陰茎包皮炎を引き起こす。さらに, 新生児子牛の致命的な全身性感染症や, まれに脳炎を発症する場合もある。ウイルスは症状が治まった後も牛体内に潜伏感染しており, 輸送や妊娠といったストレスをきっかけに再活性化して他の牛に感染する。また, 二次的細菌性感染は, 病変および臨床症状を重篤化させる [7]。

原因ウイルスであるBoHV-1は、ヘルペスウイルス科アルファヘルペス亜科バリセロウイルス属に分類され、その遺伝子の大きさは、約135kbの線形二本鎖DNAである [8]。同じアルファヘルペスウイルス亜科に属する単純ヘルペスウイルス (HSV) などの遺伝子は9から11個の糖タンパク質をコードしており、これらの糖タンパク質は、ウイルスの細胞侵入と排出メカニズムに関係している。糖タンパク質B (gB) やgDのような特定の糖タンパク質はウイルスの複製にとって不可欠であるが、他の糖タンパク質には複製に必要なものもある。BoHV-1では少なくとも複製に必須ではない4つの糖タンパク質 (gC, gG, gI, gE) がコードされていることが明らかになっている [9]。gC以外のgG, gI,

[†] 連絡責任者：村上賢二 (動物衛生研究所)

〒305-0856 つくば市観音台3-1-5

☎029-838-7841

FAX 029-838-7907

E-mail : muraken@affrc.go.jp

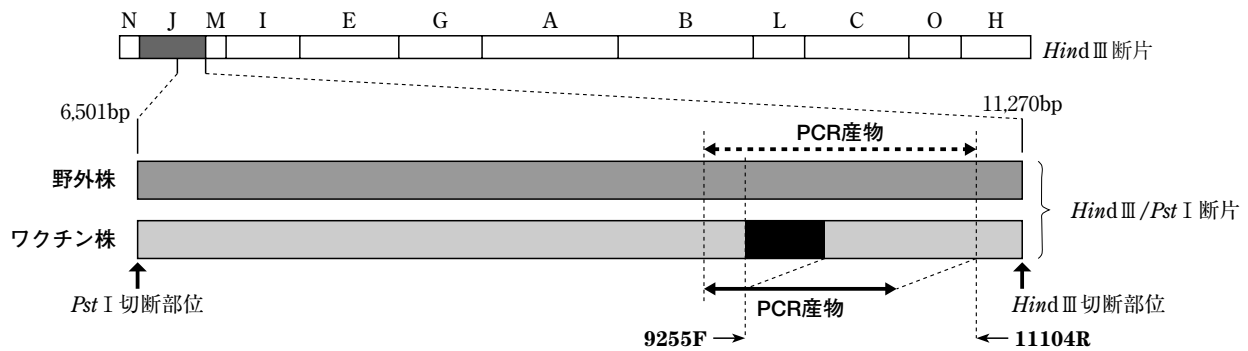


図1 BoHV-1 野外分離ウイルス株とワクチン株の *Hind* III/*Pst* I 処理による生ずる遺伝子断片の構造
点線両端矢印は野外分離ウイルス、太線両端矢印はワクチン株のPCR産物の大きさを示す。ワクチン株における黒色領域は遺伝子欠損領域を示す。

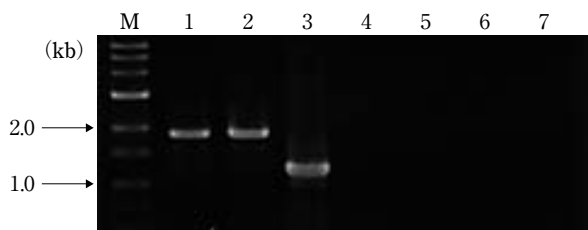


図2 PCRによる各種牛ヘルペスウイルスDNAの検出
M; 1kb 分子量マーカー, 1; BoHV-1 型 (LA 株), 2; BoHV-1 型ワクチン親株 (758 株), 3; ワクチン株 (758-43 株), 4; BoHV-2 型 (ミネソタ株), 5; AIHV-1 型 (WC11 株), 6; BoHV-4 型 (B11-41 株), 7; ウイルス非感染細胞培養上清

表1 ワクチン株と野外ウイルス分離株を識別するPCRプライマー

プライマー	塩基配列	配列位置 ^a
9255F	5'-GGCTGATTGACCGCAACGC-3'	9,255-9,273
11104R	5'-GGGTGGAACAGGCAGGTGAA-3'	11,085-11,104

a: BHV-1 Cooper 株の塩基配列

表2 PCR試薬の調整 (50 μ l 反応液中)

試薬	容量
① 10x PCRバッファー (Mg ²⁺ 含)	5 μ l
② 2mM dNTP	4 μ l
③ DMSO	2.5 μ l
④ 1.25 U TaqDNAポリメラーゼ (Takara ExTaq)	5 μ l
⑤ 9255F (10 pmol/ μ l)	1 μ l
⑥ 11104R (10 pmol/ μ l)	1 μ l
⑦ サンプルDNA	~1 μ gまで
⑧ 蒸留水で全量が50 μ lになるように調整する	

表3 PCR反応条件

反応ステップ	反応温度	反応時間	反応サイクル
前熱変性	96 $^{\circ}$ C	2分	1サイクル
熱変性	96 $^{\circ}$ C	20秒	
アニーリング	60 $^{\circ}$ C	30秒	25サイクル
伸長反応	72 $^{\circ}$ C	2分	
後伸長反応	72 $^{\circ}$ C	3分	1サイクル

PCR産物をアガロースゲル電気泳動すると、野外分離ウイルスで約1,850bp、現行生ワクチンで約1,200bpのバンドがみられる。

gE 欠損変異体は、生体内で病原性が著しく低下することから [10]、諸外国では BoHV-1 gE 欠損変異体を生ワクチンとして広く利用しており、IBR の防除に寄与している。

3 ワクチン株と野外ウイルス株を識別する PCR 法の開発

DNA 遺伝子は制限酵素を用いて消化処理を行うといくつかの遺伝子断片に切断されることから、BoHV-1 もその性質を利用して遺伝子型別が行われる。我が国で用いられている生ワクチン株は、*Hind* III 処理によって生じる遺伝子断片のうち、一つの断片 (J 断片) の大きさが異なることが報告されている (図1) [11]。そこで、

我々は BoHV-1 Cooper 株の遺伝子配列を基にこの J 断片内の *Hind* III/*Pst* I の 2 重制限酵素処理断片領域を増幅する PCR プライマーを数種類作製し、ワクチン株とその親ウイルス株 (758 株) の PCR 産物の分子量に差が生じる領域を探索したところ、1 領域において PCR 産物の大きさに明瞭な差が認められた。その PCR 産物についてシーケンス解析を行ったところ、ワクチン株には 652 bp の欠損領域が存在することが明らかになった (図1) [12]。野外ウイルス株と生ワクチン株を明瞭に区別する PCR プライマー及び試薬の調整ならびに PCR 反応条件を表1, 2 および3 に示す。

次に、本 PCR 法の特異性を調べるために BoHV-1 野外分離ウイルス株および他のヘルペスウイルス属のウイ

ルス (BoHV-2, アルセラピンヘルペスウイルス1型 (AIHV-1 (旧BoHV-3)), BoHV-4) DNAを用いてPCR法を行った。その結果, BoHV-1以外のヘルペスウイルスでは, いずれのウイルスにおいても増幅産物は認められなかった (図2)。さらに, 野外分離ウイルス株においてワクチン株遺伝子欠損領域にあたる部位に欠損領域が存在する株があるか否かを調べるために, 全国の家畜保健衛生所の協力を得て44株の国内分離株を収集し, 本PCRプライマーセットを用いてPCRを行ったところ, 全ての野外分離株由来PCR産物の分子量は758株と同サイズであり, ワクチン株とは異なっていた。また, そのPCR産物の塩基配列解析を行ったところ, 1株を除き完全に一致していた (1株は一致率99.9%であった)。これらのことから, 本PCRの増幅領域は野外ウイルス株において非常に安定して保存されていることが明らかになった。

本PCR法はIBRの病性鑑定において, 分離ウイルスが野外株であるか生ワクチン株であるかを, 従来法では1週間必要だった検査を3時間程度で識別することを可能とするので, 多くの家畜保健衛生所や検査機関で利用して頂ければ幸いである。

最後に, 野外分離ウイルス株収集に協力頂いた全国家畜保健衛生所の諸先生に深謝する。

参 考 文 献

- [1] Gibbs EPJ, Rweyemamu MM : Bovine herpesviruses. I. Bovine herpesvirus-1. *Vet Bull*, 47, 317-343 (1977)
- [2] Tikoo SK, Campos M, Babiuk LA : Bovine herpesvirus 1 (BHV-1) : biology, pathogenesis, and control. *Adv Virus Res*, 45, 191-223 (1995)
- [3] 稲葉祐二, 高橋英司, 黒木 洋, 後藤義之, 佐藤邦彦, 大森常良, 原田熊幸, 菊池龍彦, 広瀬 修, 山本通孝, 児玉和夫, 岸 茂 : 牛伝染性鼻気管炎生ウイルスワクチンの開発, *日獣会誌*, 28, 410-4 (1975)
- [4] van Engelenburg FA, Kaashoek MJ, Rijsewijk FA, van den Burg L, Moerman A, Gielkens AL, van Oirschot JT : A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 is avirulent in calves. *J Gen Virol*, 75 (Pt 9), 2311-8 (1994)
- [5] Kaashoek MJ, Moerman A, Madic J, Rijsewijk FA, Quak J, Gielkens AL, van Oirschot JT : A conventionally attenuated glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine. *Vaccine*, 12 (5), 439-44 (1994)
- [6] Strube W, Auer S, Block W, Heinen E, Kretzdorn D, Rodenbach C, Schmeer N : A gE deleted infectious bovine rhinotracheitis marker vaccine for use in improved bovine herpesvirus 1 control programs. *Vet Microbiol*, 53 (1-2), 181-9 (1996)
- [7] Yates WD : A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Can J Comp Med*, 46 (3), 225-63 (1982)
- [8] Van Refenmortel M, Fauquet C, Bishop D, Carstens E, Estes M, Lemon S, Maniloff J, Mayo M, McGeoch D, Pringle C, Wickner R : Family Herpesviridae, Virus taxonomy; Classification and nomenclature of viruses, 203-25, Academic Press, San Diego, CA (2000)
- [9] Schwyzer M, Ackermann M : Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Vet Microbiol*, 53 (1-2), 17-29 (1996)
- [10] Kaashoek MJ, Rijsewijk FA, Ruuls RC, Keil GM, Thiry E, Pastoret PP, Van Oirschot JT : Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE, or in both the gI and gE gene. *Vaccine*, 16 (8), 802-9 (1998)
- [11] Horiuchi M, Yamazaki N, Furuoka H, Matsui T, Nakagawa M, Ishiguro N, Shinagawa M : Restriction endonuclease analysis of bovine herpesvirus type 1 isolates from calves with fatal encephalitis : comparison with vaccine virus. *J Vet Med Sci*, 57 (3), 577-80 (1995)
- [12] Kamiyoshi T, Murakami K, Konishi M, Izumi Y, Sentsui H : The presence of a deletion sequence in the BHV-1 UL49 homolog in a live attenuated vaccine for infectious bovine rhinotracheitis (IBR). *Vaccine*, 26 (4), 477-85 (2008)