

# 北海道における牛パラインフルエンザウイルス 3型の分子疫学的解析と迅速診断法の検討

尾宇江康啓<sup>1)†</sup> 榊原道子<sup>1)</sup> 成田雅子<sup>1)</sup> 佐藤雄太<sup>2)</sup> 菅野 徹<sup>3)</sup>

- 1) 北海道釧路家畜保健衛生所 (〒084-0917 釧路市大楽毛127-1)  
 2) 北海道ひがし農業共済組合姉別家畜診療所 (〒088-1646 厚岸郡浜中町姉別3-3)  
 3) 国研農業食品技術総合研究機構 動物衛生研究部門 北海道研究拠点 (〒062-0045 札幌市豊平区羊ヶ丘4)

(2016年8月17日受付・2017年3月8日受理)

## 要 約

2012年4月～2014年9月に北海道釧路管内で採材した牛呼吸器病発生事例76例の検査牛283頭及び健康牛検査15例の検査牛99頭の鼻腔スワブについて牛パラインフルエンザウイルス3型が標的のRT-PCRとウイルス分離を実施した結果、8例17頭が遺伝子陽性、7例14頭が分離陽性であった。分離株7株のP, N, M, HN遺伝子の解析の結果、5株がgenotype A (BPIV3A)、2株がgenotype C (BPIV3C) に分類され、BPIV3Aは既知株を含め4つのサブグループに細分類された。また、既存のプライマーはBPIV3Cの検出が困難であるため、BPIV3AとBPIV3Cの両方を検出可能なプライマーとBPIV3Cのみを検出するプライマーを設計し、いずれも特異性及び感度の両面で十分な実用性があることを確認した。

——キーワード：牛パラインフルエンザウイルス3型、分子疫学的解析、プライマー設計、RT-PCR、ウイルス分離。

-----日獣会誌 70, 363～369 (2017)

牛パラインフルエンザウイルス3型 (BPIV3) は子牛や育成牛の呼吸器病の原因として知られるが、近年、国内外で既存のBPIV3であるgenotype A (BPIV3A) とは塩基配列が大きく異なるgenotype C (BPIV3C) の分離事例が報告されている [1-4]。BPIV3Cは既存のRT-PCR用プライマー (桐沢力雄, 荻窪恭明, 田島誉士: ウシパラインフルエンザウイルス3型, ウシRSウイルス及びウシウイルス性下痢・粘膜病ウイルス感染のPCRによる検出, J Rakuno Gakuen Univ, 19, 225-237 (1994)) では検出できない可能性があることが指摘されており [1, 3], 北海道釧路管内においてもBPIV3のRT-PCRは陰性、ウイルス分離は陽性の事例が散見され、管内へのBPIV3Cの浸潤が疑われたため、BPIV3分離株の遺伝子解析を実施し、新たな迅速診断法を検討したので概要を報告する。

## 材料及び方法

**材料:** 2012年4月～2014年9月に牛呼吸器病発生事例76例の検査牛283頭及び健康牛検査15例の検査牛

99頭から鼻腔スワブを採材した。鼻腔スワブはダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) に懸濁後、2,000rpm 5分間遠心し、その上清をBPIV3のRT-PCR及びウイルス分離材料とした。

**ウイルス遺伝子検索:** 材料からRNA抽出キット (High Pure Viral RNA Kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いてRNAを抽出し、phosphoprotein (P) 遺伝子を標的とした桐沢らの報告にあるプライマーとRT-PCRキット (OneStep RT-PCR Kit, Qiagen, Hilden, Germany) を用いてRT-PCRを実施した。

**ウイルス分離:** 24穴プレートへ単層培養したMDBK細胞を、PBSで1回洗浄したのち材料を接種した。37℃で60分間吸着後、PBSで2回洗浄し、ゲンタマイシン 50 $\mu$ g/ml濃度のDMEMを加え、37℃で5日間の培養を2代目まで実施した。

**電子顕微鏡による鏡検:** ウイルス分離培養中にCPEを認めた検体について、培養上清を3,000rpm 10

† 連絡責任者(現所属): 尾宇江康啓 (北海道宗谷家畜保健衛生所)

〒098-5738 枝幸郡浜頓別町緑ヶ丘8-3

☎ 01634-2-2106 FAX 01634-2-4340

E-mail: one.yasuhiro@pref.hokkaido.lg.jp

表1 遺伝子解析に用いたプライマー

プライマー名	標的遺伝子	領域1*	領域2*	配列 (5'-3')	備考	
BPIV3-A/C-N-F	N 遺伝子, P 遺伝子前半	56-76	56-76	AGGATTAAGAAGCTTTACCGA		
BPIV3-1F		588-605	588-605	TTTGGRTATCCAKCRTGT		
BPIV3-2F		1106-1123	1106-1123	GAGTTATGCAATGGGTGT		
BPIV3-3F		1698-1715	1698-1715	AAAACCTTAGGATTAAYGG		
BPIV3-1R		703-685	703-685	AAYGCTCTAACYGRGTAA		
BPIV3-2R		1291-1273	1291-1273	TTCAARCTYTGCTTGGCYT		
BPIV3-3R		1867-1848	1867-1848	GGCYGATGAGATGTCRGTG		
BPIV3-4R		2377-2358	2377-2358	AGRTGTACTGATAGATTCCA		
PIR3		2854-2835	2866-2847	CCTCTCTGTAAATCGAGTGC	桐沢ら 1994	
PIF1			2124-2143	2124-2143	GCTCAGATAGTAGAGCTGAG	桐沢ら 1994
BPIV3-4F	P 遺伝子後半, M 遺伝子	2916-2936	2928-2948	AAGACAAGAGAGTTGTATGTG		
BPIV3-5F		3482-3502	3494-3514	CARTCATACATMAAYGAACCTC		
BPIV3-6F		3870-3889	3882-3901	GAYCCRCCCAAACATGGRTC		
BPIV3-7F		4438-4456	—	TCATGGTTCATCTMGGGYT	BPIV3A に適用	
BPIV3-8F		—	4572-4591	TTTCATGTCAATGCAACTGG	BPIV3C に適用	
BPIV3-5R		3528-3508	3540-3520	ACTTCTTCATCACTCTTGCGAG		
BPIV3-6R		3901-3881	3913-3893	TCMAGATATCTDGAHCCATGT		
BPIV3-7R		4411-4392	4423-4404	TCTARAATCTGAACYACTCC		
BPIV3-8R		5017-4998	—	CGGGCYTTGGCTTTCYCTCTG	BPIV3A に適用	
BPIV3-A-M-R		5491-5472	—	AAGAGCGACTGCTGCGGTRA	BPIV3A に適用	
BPIV3-C-M-R		—	5203-5183	TTTTGGATTGTTGACTAGCAC	BPIV3C に適用	
BPIV3-A/C-HN-F		HN 遺伝子	6824-6843	6818-6837	ATGGAATATTGGARRCACAC	
BPIV3-9F			7756-7775	—	TGATAAACCDTATGCAGCRT	BPIV3A に適用
BPIV3-10F	—		7625-7644	TCAACTCCGAAAGTTGACGA	BPIV3C に適用	
BPIV3-11F	8176-8194		8169-8188	GCATAATGTACTATCACGG		
BPIV3-9R	7310-7292		7304-7286	TRCCAGATGTACAYCTCCA		
BPIV3-10R	8286-8269		—	CCCAGTGGGTTAGCGGA	BPIV3A に適用	
BPIV3-11R	—		8358-8340	CGTGTGTCTGTTGCGTAAG	BPIV3C に適用	
BPIV3-A/C-HN-R	8726-8707		8720-8701	ATTGAGRTGACATTCWGGRT		

\*領域1はBN-1株の領域、領域2はSD0835株の領域を示す

分間遠心し、その上清を溶液濃縮ユニット (Vivaspin 6-50K, Sartorius, Gottingen, Germany) を用いて濃縮を行った。濃縮材料を3%リンタングステン酸でネガティブ染色を行い、透過型電子顕微鏡で鏡検した。

**分離株の遺伝子解析:** 分離株の nucleoprotein (N), P, matrix (M), haemagglutinin/neuraminidase (HN) の各遺伝子のシーケンスを実施した。遺伝子解析に用いたプライマーは表1のとおりであり、既知のBPIV3である Shipping Fever 株 [5], Kansas 株 [5], BN-1 株 [6, 7], SD0835 株 [4] を基に遺伝子解析ソフト (GENETYX Ver.11, 株ゼネティックス, 東京) を用いて設計するとともに桐沢らの報告にあるプライマーも併用した。まず、上述のRNA抽出キットを用いて分離株からRNAを抽出し、cDNA合成キット (PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit, タカラバイオ(株), 滋賀) を用いてcDNAを作成した。このcDNAと増幅用プライマー及びPCRキット (PrimeSTAR GXL DNA Polymerase, タカラバイオ(株), 滋賀) を用いてPCRを行った。増幅用プライマーはBPIV3-A/C-N-FとPIR3, PIF1とBPIV3-A-M-R, BPIV3-A/C-HN-F

とBPIV3-A/C-HN-Rの各セットを用い、PIF1とBPIV3-A-M-Rで増幅しない検体についてはPIF1とBPIV3-C-M-Rのプライマーセットを用いた。PCR産物は精製キット (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Germany) を用いて精製し、表1のプライマーとシーケンスキット (BigDye Terminator v.3.1 cycle sequencing kit, Applied Biosystems, U.S.A.) によりシーケンス反応を行い、遺伝子解析システム (ABI3130 genetic analyzer, Applied Biosystems, U.S.A.) で解析し、既知のBPIV3である Shipping Fever 株, Kansas 株, BN-1 株, Q5592 株 [8], SD0835 株, NM09 株 [9], 12Q061 株 [2], HS9 株 [1] と塩基配列の比較を行った。塩基配列の比較には上述の遺伝子解析ソフトを用いた。

**検出用プライマーの設計と検証試験:** 分離株及び既知のBPIV3の塩基配列から上述の遺伝子解析ソフトを用いてBPIV3A及びBPIV3Cのいずれも検出可能なプライマーと、遺伝子型別のためのBPIV3Cのみを検出するプライマーをP遺伝子上に設計した。これらのプライマーは牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) [10], 牛

表2 BPIV3 分離株及び参照株

株名	GenBank accession number	Genotype	分離年	採取地	引用文献
Akkeshi12	LC170481 (N, P, M), LC170488 (HN)	A4	2012年	北海道厚岸郡厚岸町	
Akkeshi14	LC170482 (N, P, M), LC170489 (HN)	A4	2014年	北海道厚岸郡厚岸町	
Hamanaka13-1	LC170483 (N, P, M), LC170490 (HN)	A1	2013年4月	北海道厚岸郡浜中町	
Hamanaka13-2	LC170484 (N, P, M), LC170491 (HN)	A1	2013年12月	北海道厚岸郡浜中町	
Kushiro13	LC170485 (N, P, M), LC170492 (HN)	C	2013年	北海道釧路郡釧路町	
Akan13	LC170479 (N, P, M), LC170486 (HN)	C	2013年	北海道釧路市阿寒町	
Akan14	LC170480 (N, P, M), LC170487 (HN)	A1	2014年	北海道釧路市阿寒町	
Shipping Fever	AF178655	A2	1958年	アメリカ	[5]
Kansas	AF178654	A2	1984年	アメリカ	[5]
BN-1	AB770484	A1	1963年	日本	[6, 7]
SD0835	HQ530153	C	2008年	中国	[4]
Q5592	EU277658	B	不明	オーストラリア	[8]
NM09	JQ063064	A3	2009年	中国	[9]
12Q061	JX969001	C	2012年	韓国	[2]
HS9	LC000638	C	2012年	日本(広島県)	[1, 3]

コロナウイルス (BCoV) [11], 牛RSウイルス (BRSV) [12] 等と同時にRT-PCRを実施することを想定し、アニール温度55℃でのRT-PCRの実施が可能となるように設計した。検出用プライマーの特異性の検証として、BPIV3管内分離株、BVDV 1型Nose株及び2型Kanazawa91株、BCoV Kakegawa株、BRSV rs52株、牛トロウイルス (BToV) 管内分離株の各ウイルス由来RNAについて、新規検出用プライマーを用いたRT-PCRを実施した。RNA抽出及びRT-PCRは上述のキットを使用した。検出用プライマーの感度の検証として、分離株を $10^2$ TCID<sub>50</sub>/0.1ml~ $10^{-2}$ TCID<sub>50</sub>/0.1mlに10倍段階希釈を行い、おのおのの希釈液200 $\mu$ lからRNAを抽出し、新規検出用プライマーを用いたRT-PCRを同様の方法で実施した。さらに、既存のBPIV3のRT-PCR陽性事例材料6検体と既存のRT-PCRは陰性でBPIV3分離陽性事例材料6検体についても新規検出用プライマーを用いて同様にRT-PCRを実施した。

## 成 績

**ウイルス遺伝子検索：**牛呼吸器病発生事例8例の検査牛17頭の材料からBPIV3のP遺伝子が検出された。健康牛検査の材料からはBPIV3の遺伝子は検出されなかった。

**ウイルス分離：**牛呼吸器病発生事例5例の検査牛6頭の材料及び健康牛検査2例の検査牛8頭の材料からBPIV3を分離した。

**電子顕微鏡による鏡検：**牛呼吸器病発生事例2例の材料から分離された2株 (Akkeshi12株, Hamanaka13-1株) 及び健康牛検査2例の材料から分離された2株 (Kushiro13株, Akan13株) について実施し、これら4株すべてにおいてBPIV3と推察される100~200nmの不定形なウイルス粒子を多数認めた (図1)。

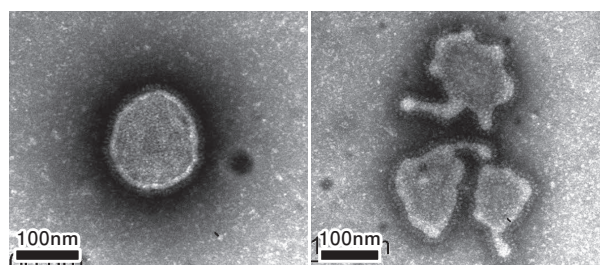


図1 電子顕微鏡にて観察されたBPIV3粒子  
写真左はKushiro13株, 写真右はAkan13株。

**分離株の遺伝子解析：**牛呼吸器病発生事例5例の材料から分離された5株 (Akkeshi12株, Akkeshi14株, Hamanaka13-1株, Hamanaka13-2株, Akan14株) 及び健康牛検査2例の材料から分離された2株 (Kushiro13株, Akan13株) について実施した。各株間の塩基配列相同性は、N遺伝子は82.1~99.8%, P遺伝子は79.6~99.8%, M遺伝子は82.8~99.9%, HN遺伝子は80.4~99.9%の範囲内であり、5株がBPIV3Aに、2株がBPIV3Cに分類された。BPIV3Aについては、N, P, M, HNのいずれの遺伝子においても塩基配列の違いから、BN-1株, Hamanaka13-1株, Hamanaka13-2株, Akan14株はgenotype A1, Shipping Fever株及びKansas株はgenotype A2, MN09株はgenotype A3, Akkeshi12株及びAkkeshi14株はgenotype A4に細分類された (図2)。BPIV3Aに分類された5株はすべて呼吸器病発生事例の材料由来であり、既存のRT-PCRでも鼻腔スワブ材料から遺伝子が検出されていた。また、M遺伝子下流の非翻訳領域でgenotype A1, A2, A3, A4の各株間で多様性に富む傾向にあった (図3)。BPIV3Cに分類された2株はいずれも健康牛検査の材料由来であり、既存のRT-PCRでは鼻腔スワブ材料から遺伝子が検出されなかった。また、

表3 新規検出用プライマー

プライマー名	標的遺伝子	領域 1*	領域 2*	配列 (5'-3')	増幅サイズ
BPIV3-A/C-F	P 遺伝子	2188-2209	2188-2209	CAATGGAACCSAAATCCAGGAA	657bp (BPIVA)
BPIV3-A/C-R		2844-2823	2856-2835	AATYGAGTGCTCTCTTCTGTGT	669bp (BPIVC)
BPIV3-C-F	P 遺伝子	—	2512-2531	GGAGGAGATTTGGAAGCAAG	244bp (BPIVC)
BPIV3-C-R		—	2755-2737	CTGTCCGTGTACTGATCGT	

\*領域 1 は BN-1 株の領域, 領域 2 は SD0835 株の領域を示す

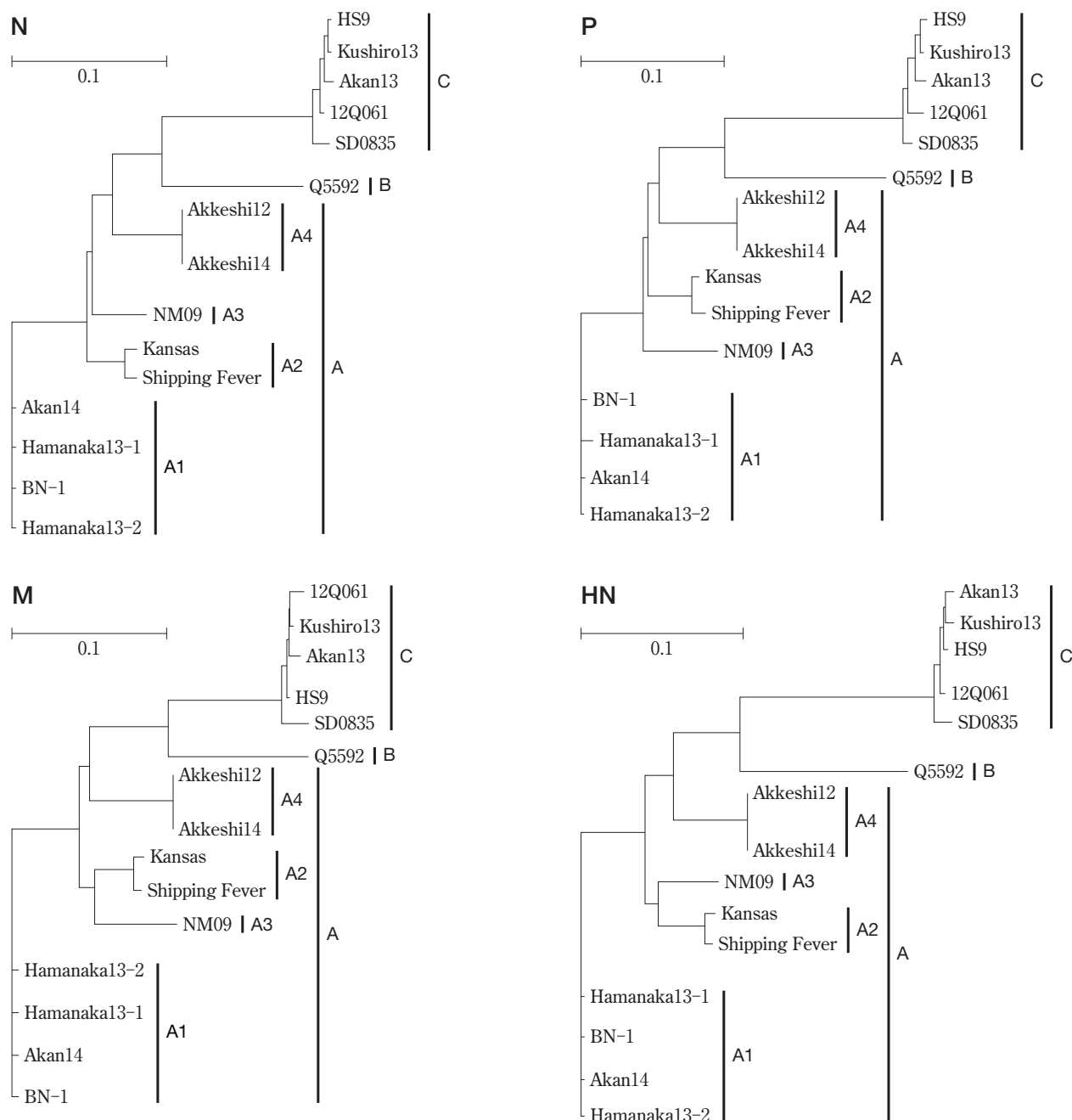


図2 BPIV3 分離株及び既知株の系統樹

N : nucleoprotein P : phosphoprotein M : matrix HN : haemagglutinin/neuraminidase

BN-1 (A1)	131 : AAAAGAAAAGGAAAAAGAAAAAGAAAAAGAAAAA	-----	164
Hamanaka13-1 (A1)	131 : .....	.....GAAAAAGAA	180
Hamanaka13-2 (A1)	131 : .....	.....GAAAAAGAA	-----A 174
Akan14 (A1)	131 : .....	-----	164
Shipping Fever (A2)	131 : .....G...A·GC·CT·C...GACCG·GA·C...GCAGAACGCACACAA	--	178
Kansas (A2)	131 : .....G·G·A·GC·CT·C...GACCG·GA...CAGAACGCACACAA	--	178
NM09 (A3)	131 : ..G.....A·C·CC·C...GATCG·GACC·GCAGAACACACACAG	--	178
Akkeshi12 (A4)	131 : ..GG.....GC·C·C...GATCG·AC	-----	163
Akkeshi14 (A4)	131 : ..GG.....GT·C·C...GATCG·AC	-----	163
BN-1 (A1)	165 : --AACACCCGCAAAGACCGAGATCAATCAGAGCACCCACAACCAAGCAGAA		212
Hamanaka13-1 (A1)	181 : AA.....C...C.....		230
Hamanaka13-2 (A1)	175 : AA.....C.....		224
Akan14 (A1)	165 : -----GC...C.....		212
Shipping Fever (A2)	179 : -----	-----G	188
Kansas (A2)	179 : -----	-----G	188
NM09 (A3)	179 : -----	-----A...GG	188
Akkeshi12 (A4)	164 : -----CAGA·C·AA·CA·A·AGG·A·C.....	AGG	200
Akkeshi14 (A4)	164 : -----CAGA·C·AA·CA·A·AGG·A·C.....	AGG	200

図3 Genotype AのM遺伝子下流の非翻訳領域の比較  
 ・はBN-1株と同一塩基であることを示す。

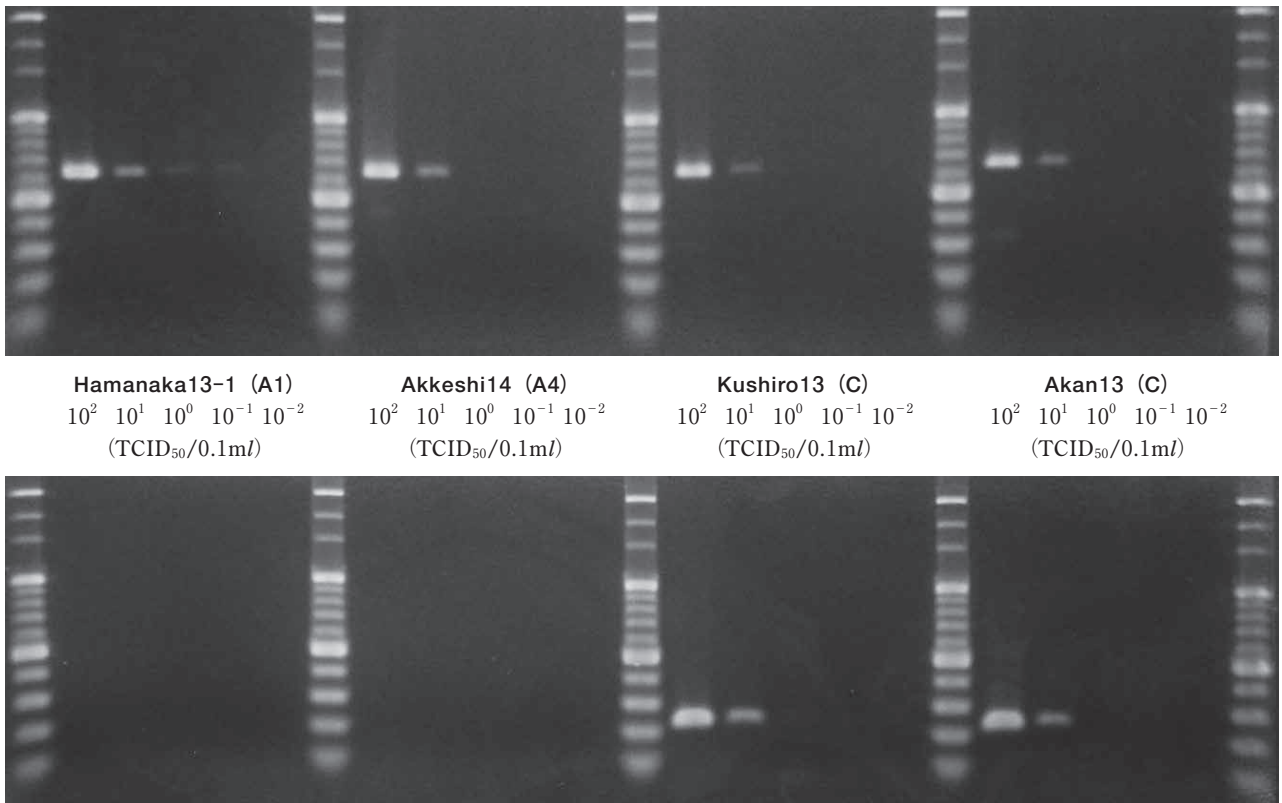


図4 検出用プライマーの感度の検証

上段はAC検出用プライマー (BPIV3A: 657bp, BPIV3C: 669bp), 下段はC検出用プライマー (BPIV3C: 244bp) によるRT-PCRの電気泳動像を示す。

SD0835株同様, P遺伝子の725番目の塩基からBPIV3Aにはみられない12塩基の挿入を認め、さらに, P遺伝子の1,798番目の塩基の変異により, SD0835株にはない終止コドンの出現を認め, SD0835株と比べるとP遺伝子のアミノ酸が1つ少ないことが判明した。シーケンスを実施したBPIV3分離株及び参照株のGenBank accession numberは表2のとおりである。

**検出用プライマーの設計と検証試験:** BPIV3A及びBPIV3Cのいずれも検出可能なプライマー (AC検出用プライマー: BPIV3-A/C-F及びBPIV3-A/C-R) とBPIV3Cのみを検出するプライマー (C検出用プライマー: BPIV3-C-F及びBPIV3-C-R) を設計した (表3)。AC検出用プライマーは検証に供したBPIV3であるHamanaka13-1株 (genotype A1), Akkeshi14株 (genotype A4), Kushiro13株 (BPIV3C) 由来RNA

のいずれからも遺伝子を検出し、C検出用プライマーはBPIV3CであるKushiro13株由来RNAからのみ遺伝子を検出した。また、いずれのプライマーにおいても他のウイルス由来RNAには反応を認めなかった。AC検出用プライマーは検証に供したBPIV3であるHamana-ka13-1株 (genotype A1), Akkeshi14株 (genotype A4), Kushiro13株及びAkan13株 (BPIV3C) のいずれも10TCID<sub>50</sub>/0.1ml相当のウイルス液由来RNA (RT-PCR反応への持ち込み量は0.4TCID<sub>50</sub>相当) から遺伝子を検出した。C検出用プライマーはBPIV3CであるKushiro13株及びAkan13株のみ10TCID<sub>50</sub>/0.1ml相当のウイルス液由来RNAから遺伝子を検出した (図4)。既存のRT-PCR陽性事例材料6検体 (genotype A1及びA3各3検体) と既存のRT-PCRは陰性でBPIV3分離陽性事例材料6検体 (すべてBPIV3C) を材料としたRT-PCRでは、AC検出用プライマーはすべての材料由来RNAから遺伝子を検出し、C検出用プライマーは既存のRT-PCRは陰性でBPIV3Cが分離された材料由来RNAのみから遺伝子を検出した。

## 考 察

牛呼吸器病発生事例8例の検査牛17頭の材料からBPIV3のP遺伝子が検出され、うち5例の検査牛6頭の材料からBPIV3Aが分離された。また、健康牛検査2例の検査牛8頭の材料からはBPIV3のP遺伝子は検出されなかったが、BPIV3Cが分離された。これらの材料を採取した10例10農場の内訳は、乳用牛搾乳農場が3農場、乳用牛育成預託農場が3農場、肉用肥育牛育成農場が4農場であり、いずれの農場においてもBPIV3ワクチンを接種していた。牛の導入については、乳用牛搾乳農場では導入はなかったものの、乳用牛育成預託農場及び肉用肥育牛育成農場は通年で牛が導入されていた。

遺伝子解析結果から管内にはBPIV3A及びBPIV3CのBPIV3が浸潤しており、さらにBPIV3Aは4群に分類されたサブグループのうち2群が浸潤していることが判明した。BPIV3Aは3群のサブグループに分類されるとNeillら [13] が報告しているが、今回解析したAkkeshi12株及びAkkeshi14株はこれまでのサブグループに属さないBPIV3であった。また、M遺伝子下流の非翻訳領域においてBPIV3Aの各株間で多様性に富む傾向があり、この部位の解析は今後のBPIV3の分子疫学的解析に有用であると考えられた。BPIV3CはP遺伝子上にBPIV3Aにはみられない12塩基の挿入を認めた点で既報のBPIV3C分離株と同様であったが、P遺伝子末端部においてSD0835株や12Q061株にはない終止コドンの出現を認め、P遺伝子のアミノ酸が1つ少ないことが判明した。P遺伝子の最終アミノ酸の欠失

は、広島県で分離されたHS9株にも同様にみられたことから、国内のBPIV3Cに独自の傾向である可能性がある。

今回の調査ではBPIV3Cの検出事例はいずれも健康牛由来であり、牛に対するBPIV3Cの病原性はBPIV3Aよりも低い可能性があるが、モルモットへのBPIV3C感染実験では、致死率は高く、呼吸器症状が顕著であったとの報告 [14] があるため、今後は牛に対する病原性の検討が必要であると思われる。

既存のプライマーではBPIV3Cの検出は困難であることから、BPIV3AとBPIV3Cのいずれも検出可能なプライマーとBPIV3Cのみを検出するプライマーを新たに設計した。これらのプライマーは特異性及び感度の両面で十分な実用性があることが確認できたため、今後の牛パラインフルエンザの迅速診断への活用が期待できる。

## 引用文献

- [1] Konishi M, Okura T, Shimizu M, Akiyama M, Kameyama K, Takeuchi K : Complete genome sequence of the first isolate of genotype C bovine parainfluenza virus type 3 in Japan, *Genome Announcements*, 2, 6 (2014)
- [2] Oem JK, Lee EY, Lee KK, Kim SH, Lee MH, Hyun BH : Molecular characterization of a Korean bovine parainfluenza virus type 3 isolate, *Vet Microbiol*, 162, 224-227 (2013)
- [3] 清水 和, 秋山昌紀, 兼廣愛美, 桑山 勝, 小西美佐子 : 日本で初めて分離された genotype C の牛パラインフルエンザウイルス3型による呼吸器病の発生事例, *日獣会誌*, 69, 87-92 (2016)
- [4] Zhu YM, Shi HF, Gao YR, Xin JQ, Liu NH, Xiang WH, Ren XG, Feng JK, Zhao LP, Xue F : Isolation and genetic characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from cattle in China, *Vet Microbiol*, 149, 445-451 (2011)
- [5] Bailly JE, McAuliffe JM, Skiadopoulou MH, Collins PL, Murphy BR : Sequence determination and molecular analysis of two strains of bovine parainfluenza virus type 3 that are attenuated for primates, *Virus Genes*, 20, 173-182 (2000)
- [6] Inaba Y, Omori T, Kono M, Matumoto M : Parainfluenza 3 virus isolated from Japanese cattle. I. Isolation and identification, *Jpn J Exp Med*, 33, 313-329 (1963)
- [7] Okura T, Kokuho T, Konishi M, Kameyama K, Takeuchi K : Complete genome sequence of bovine parainfluenza virus type 3 strain BN-1 and vaccine strain BN-CE, *Genome Announcements*, 1, 1 (2013)
- [8] Horwood PH, Gravel JH, Mahony TJ : Identification of two distinct bovine parainfluenza virus type 3 genotypes, *J Gen Virol*, 89, 1643-1648 (2008)
- [9] Wen YJ, Shi XC, Wang FX, Wang W, Zhang SQ, Li G, Song N, Chen LZ, Cheng SP, Wu H : Phylogenetic analysis of the bovine parainfluenza virus type 3 from cattle herds revealing the existence of a genotype A

- strain in China, *Virus Genes*, 45, 542-547 (2012)
- [10] Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ : Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis, *Arch Virol*, 136, 309-323 (1994)
- [11] Tsunemitsu H, Smith DR, Saif LJ : Experimental inoculation of adult dairy cows with bovine coronavirus and detection of coronavirus in feces by RT-PCR, *Arch Virol*, 144, 167-175 (1999)
- [12] Vilcek S, Elvander M, Ballagi-Pordany A, Belak S : Development of nested PCR assays for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples, *J Clin Microbiol*, 32, 2225-2231 (1994)
- [13] Neill JD, Ridpath JF, Valayudhan BT : Identification and genome characterization of genotype B and genotype C bovine parainfluenza type 3 viruses isolated in the United States, *BMC Veterinary Research*, 11, 112-117 (2015)
- [14] Shi HF, Zhu YM, Dong XM, Cai H, Ma L, Wang S, Yan H, Wang XZ, Xue F : Pathogenesis of a genotype C strain of bovine parainfluenza virus type 3 infection in albino guinea pigs, *Virus Res*, 188, 1-7 (2014)

---

### Genomic Characterization of Bovine Parainfluenza Virus Type 3 in Hokkaido and Development of Rapid Diagnostic Method

Yasuhiro OUE<sup>1)†</sup>, Michiko SAKAKIBARA<sup>1)</sup>, Masako NARITA<sup>1)</sup>, Yuta SATO<sup>2)</sup> and Toru KANNO<sup>3)</sup>

- 1) *Hokkaido Kushiro Livestock Hygiene Service Center, 127-1 Otanoshike, Kushiro, 084-0917, Japan*
- 2) *Hokkaido Higashi Agricultural Mutual Relief Association, Anebetsu Branch, 3-3 Anebetsu, Hamanaka, Akkeshi, 088-1646, Japan*
- 3) *Hokkaido Research Station, National Institute of Animal Health, 4 Hitsujigaoka, Toyohira, Sapporo, 062-0045, Japan*

#### SUMMARY

A total of 283 nasal swabs collected from cattle during 76 respiratory disease outbreaks and 15 health condition surveys in the Kushiro area of Hokkaido between April 2012 and September 2014 were examined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and virus isolation for bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3). The RT-PCR results revealed 17 nasal swabs from eight outbreaks to be positive for BPIV3. BPIV3 was isolated from 14 nasal swabs from seven surveys. A sequence analysis of seven BPIV3 isolates from seven cattle revealed that five BPIV3 isolates were of genotype A, and two were of genotype C. Furthermore, the genotype A isolates, including USA and China strains, could be subdivided into four subgenotypes. In addition, since the current RT-PCR method could not detect genotype C isolates, we designed two primer sets: one could detect both genotype A and C viruses and the other could detect genotype C viruses alone. These primers have sufficient specificity and sensitivity.

— Key words : bovine parainfluenza virus type 3, genomic characterization, PCR primer design, RT-PCR, virus isolation.

† Correspondence to (Present address) : Yasuhiro OUE (Hokkaido Soya Livestock Hygiene Service Center)

8-3 Midorigaoka, Hamatonbetsu, Esashi, 098-5738, Japan

TEL 01634-2-2106 FAX 01634-2-4340

E-mail : one.yasuhiro@pref.hokkaido.lg.jp

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 70, 363 ~ 369 (2017)