

ウシパラインフルエンザウイルス 3 型, ウシ RS ウイルス およ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

桐沢力雄*・荻窪恭明*・田島誉士**・田上勝則*・増田美之*
高橋清志**・川上善三*・岩井 滋*

Detection of Bovine Parainfluenza Virus Type 3, Bovine Respiratory
Syncytial Virus and Bovine Viral Diarrhea Mucosal Disease Virus infections
by Polymerase Chain Reactions

Rikio KIRISAWA*, Yasuaki OGIKUBO*, Motoshi TAJIMA**, Katsunori TAGAMI*,
Miyuki MASUDA*, Kiyoshi TAKAHASHI**, Yoshimi KAWAKAMI*
and Hiroshi IWAI*

(June, 1994)

緒 論

近年, わが国の畜産は, 生産性向上のため合理化を押し進め, 集約的畜産を展開している。それに伴い哺育期から育成期にかけてウイルス, 細菌およびマイコプラズマ等による呼吸器病や下痢等が多発し, 発育遅延を起こしたり重度の場合には死亡するなど大きな経済的損失を生産農家に与えている^{10,12,41)}。

呼吸器病の原因の中でウイルスの役割は重要であり, ウシパラインフルエンザウイルス 3 型 (BPI 3), ウシ RS ウイルス (BRSV), ウシヘルペスウイルス 1 型, ウシライノウイルスおよびウシアデノウイルス等が関与している。これらのウイルス感染による呼吸器疾患が原発となって細菌およびマイコプラズマ等の二次感染を受け重篤な症状を呈することが知られている^{26,44)}。

一方, 下痢の原因ウイルスとしてウシウイルス性下痢粘膜病 (BVD-MD) ウイルス, コロナウイルスおよびロタウイルス等がある。これらのうち BVD-MD ウイルスは妊娠牛に感染すると胎児感染をし, 死流産, 奇形あるいは外見は正常だがウイルスが持続感染している牛の出

産などを起こす¹⁾。この持続感染牛はウイルスを野外に常時放出しウイルスの汚染源となるとともに発育不良あるいは粘膜病を呈して死亡することから⁹⁾, 乳牛および肉牛生産農家で問題視されている。

これらのウイルス性感染症の蔓延を防ぐには迅速な早期確定診断を行うことが重要である。しかし, BRSV のようにウイルス分離が非常に困難で熟練を要するもの⁴⁷⁾, BVD-MD ウイルスでは細胞病原性株と非病原性株が存在しウイルス分離に最低 2 週間を要すること¹⁾などから, 迅速な確定診断は困難となっている。

そこで, 今回これらのウイルス性感染症のうち, BPI 3, BRSV および BVD-MD ウイルスに起因する疾患の早期確定診断を目的として, 近年, 迅速な遺伝子増幅法として開発されたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて, 鼻腔拭い液あるいは末梢血白血球から直接ウイルス遺伝子を増幅して, その有用性を検討した。

材料と方法

1) ウイルス

ウシパラインフルエンザウイルス 3 型 (BPI 3) として

* 酪農学園大学獣医学科獣医微生物学教室
Department of Veterinary Medicine (Veterinary Microbiology), Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069, Japan.

** 酪農学園大学獣医学科獣医内科学教室
Department of Veterinary Medicine (Veterinary Internal Medicine), Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069, Japan.

K-5株, BN-1株¹⁶⁾およびワクチン株のBN-CE株(財団法人化学及び血清療法研究所)を用いた。ウシRSウイルス(BRSV)は, NMK-7株¹⁷⁾とワクチン株のrs-52株²²⁾を用いた。ウシウイルス性下痢粘膜炎(BVD-MD)ウイルスには基準株として細胞病原性株(CP)のNose株²¹⁾, T-20株¹⁴⁾およびKS 86-1(+)株⁴⁰⁾と非細胞病原性株(NCP)のNo. 12株³³⁾およびKS 86-1(-)株³⁹⁾の5株と野外分離株13株を用いた。

さらに, ヒトパラインフルエンザウイルス3型(HPI 3)のHA-1株, ヒトRSウイルス(HRSV)のLong株, ウシライノウイルス1型(BRV-1)のM-17株²³⁾, ニューカッスル病ウイルス(NDV)のMiyadera株, センダイウイルス(HVJ)のMN株, マウス肺炎ウイルス(PVM)のNo. 15株およびウシヘルペスウイルス1型(BHV-1)のLos Angeles株を用いた。

ウイルス増殖は, BPI 3(BN-1株, K-5株)とBHV-1では株化ウシ腎細胞(MDBK細胞), BRSVのNMK-7株は初代ウシ腎細胞, rs-52株は成熟ハムスター肺由来株化細胞(HAL細胞)²²⁾, HRSVは株化ヒト喉頭ガン細胞(HEp-2細胞), HPI 3とHVJは株化アカゲザル腎細胞(LLC・MK₂)を用いて行った。

2) 野外材料

呼吸器疾患が常在するA牧場から11頭, 呼吸器病の流行がみられたB牧場から8頭, C牧場から10頭の計29頭の育成牛より鼻腔拭い液を採取し, ウイルス分離とRNA抽出に用いた。

BVD-MDウイルス持続感染牛2頭とBVD-MD発症牛4頭の末梢白血球を採取し, ウイルス分離とRNA抽出に用いた。

3) 鼻腔拭い液からのウイルス分離

鼻腔拭い液0.1mlを培養小試験管で培養した単層ウシ腎細胞に接種し, 37°C 60分間吸着後, 34°Cで7日間回転培養した。細胞変性効果(CPE)の出現が認められたものは, ウシ赤血球凝集能の有無を調べ, 陽性の場合にはBPI 3に対する抗血清を用い, 赤血球凝集抑制(HI)試験によりウイルスの同定を行った。CPEの出現のみられなかったものは3代まで継代を行ってCPE出現の有無を観察した。

4) 末梢白血球からのウイルス分離

末梢白血球を用いてBVD-MDウイルスの分離を行った。末梢白血球を3回凍結融解した後, 0.1mlを培養小試験管の単層ウシ胎子筋肉細胞に接種し, 37°C 60分間吸着後, 37°Cで7日間静置培養した。CPEが認められたものは, BVD-MDウイルスに対する抗血清を用い中和試験によりウイルスの同定を行った。CPEが認められな

かったものは, Nose株を用いた干渉法¹¹⁾によりNCP株の有無を調べた。

5) 血清抗体検査

BPI 3に対する抗体価はBN-1株を抗原としたHI試験で測定した。BRSVに対する抗体価はrs-52株を用いた中和試験により求めた。

6) RNAの抽出とcDNAの作製

各種ウイルス液, 鼻腔拭い液および末梢白血球よりRNAzol B (Biotex Lab., Inc.)を用いてRNAを抽出した。次に, これらのRNAにランダムプライマーを添加し逆転写酵素を用いてcDNAを作製し, PCRの鋳型DNAとして用いた。

7) DNAの抽出

BHV-1感染培養細胞のDNAを常法に従って抽出した²⁰⁾。

8) プライマー

BPI 3では, 910 N株の塩基配列をもとにPタンパク遺伝子³⁶⁾をDNA増幅の標的とした。BPI 3と同じウイルス科に属するHPI 3のPタンパク遺伝子⁴²⁾との塩基配列の相同性をDNA解析用ソフトDNASIS(日立)で調べたところ, 約70%と高い値を示した。それらをもとに正方向のプライマーとして両ウイルスに共通のPIF 1とPIF 2の2種類を, 逆方向のプライマーとして両ウイルスに共通のPIR 1とBPI 3に特異的なPIR 3を設定した(Table 1)。

BRSVの場合, Gタンパク遺伝子をDNA増幅の標的とし, 391-2株の塩基配列²⁴⁾をもとに2種類の正方向のプライマー(RSF 2とRSF 4)と2種類の逆方向のプライマー(RSR 1とRSR 2)を設定した(Table 2)。

BVD-MDウイルスの場合, p 20, gp 48およびgp 25遺伝子をDNA増幅の標的とし, NADL株の塩基配列⁹⁾をもとに2種類の正方向のプライマー(F 1とHCF 1)と2種類の逆方向のプライマー(R 1とHCR 1)を設定した(Table 3)。

プライマーは, DNAシンセサイザー(Model 380 B, Applied Biosystems社)を用いて合成した。各ウイルスのプライマーにより増幅する領域をFig. 1に示した。

9) PCR

PCR用チューブにcDNAサンプルあるいはDNAサンプル2 μ l, 10x反応液(100 mM Tris-HCl pH 8.8, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 1% TritonX-100) 4 μ l, 200 μ MのdATP, dCTP, dGTPおよびdTTPをそれぞれ0.8 μ l, 1 μ Mの正方向および逆方向のプライマーをそれぞれ1 μ l, そして蒸留水28.3 μ lを加え総量39.5 μ lとした。ミネラルオイルを40 μ l重層した後, 94°C 6分間加熱

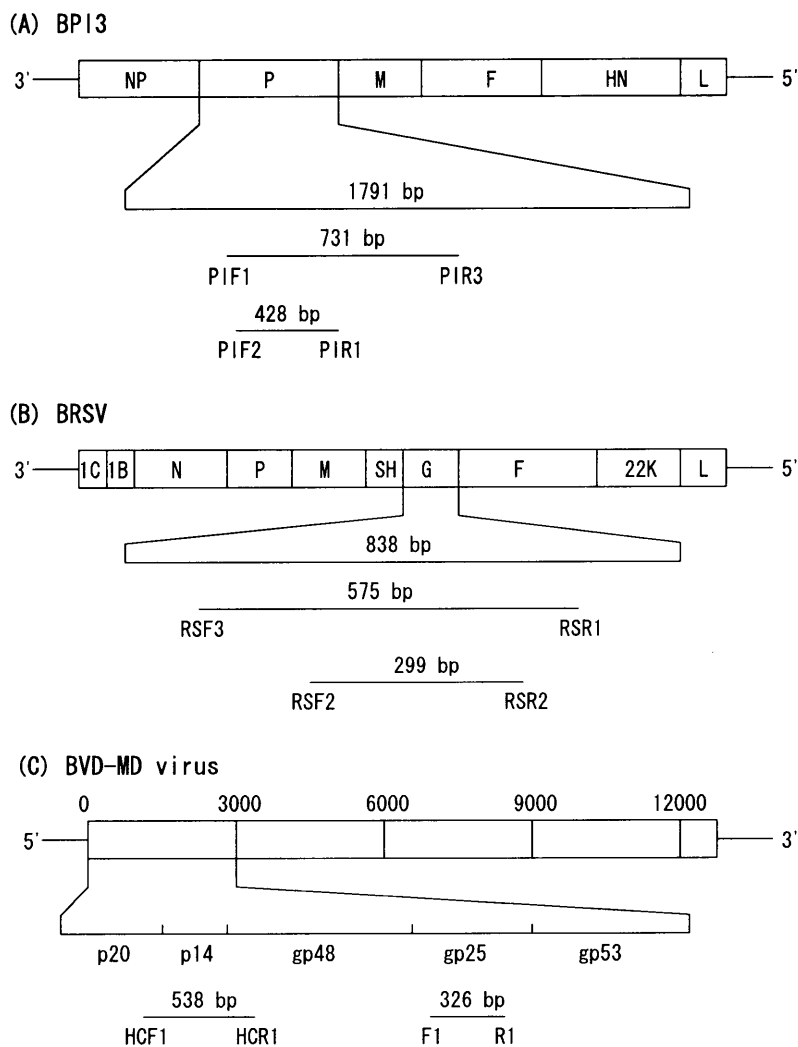


Fig. 1. Scheme of amplification regions of BPI3(A), BRSV(B) and BVD-MD virus genome(C).

Table 1. Nucleotide sequence and location of primers on the P protein gene of BPI 3

Primer	Specificity	Sequence (5'–3')	Location
PIF 1	BPI 3 and HPI 3	GCTCAGATAGTAGAGCTGAG	2124–2143
PIF 2	BPI 3 and HPI 3	GGAGAGATGGATAAGGACTC	2231–2250
PIR 1 (reverse)	BPI 3	ATTCTCTTCCCTTGGGATCC	2658–2639
PIR 3 (reverse)	BPI 3 and HPI 3	CCTCTCTGTAAATCGAGTGC	2854–2835

Table 2. Nucleotide sequence and location of primers on the G protein of BRSV

Primer	Sequence (5'–3')	Location
RSF 2	AAAGCACCACACTGTCCCAA	326–345
RSF 3	ATCACTCGTCATCACAGCCA	171–190
RSR 1 (reverse)	AGAGGATGCCTTGTTGTGGA	745–726
RSR 2 (reverse)	TTGAGGGTGATTGTAGGGG	624–605

Table 3. Nucleotide sequence and location of primers of BVD-MD virus

Primer	Sequence (5'–3')	Location	region
HCF 1	AGCTGTACCACATTTATGTGTG	765–786	p 20
HCR 1 (reverse)	TTCTCTGGCCAGATTCCATG	1302–1283	gp 48
F 1	CTTCCCTTACTGTGATGTC	1878–1897	gp 25
R 1 (reverse)	TTCAGCTGTTGTCAGCTCCA	2203–2184	gp 25

後 72°C に保ち Taq ポリメラーゼ 0.5 μ l (2.5 単位, Perkin-Elmer Cetus) を加えた。反応条件は、熱変性ステップ 94°C 1 分間、アニーリングステップに 60°C 1 分間、伸長反応ステップに 72°C 3 分間を 1 サイクルとして、Thermal Cyclic Reactor (Model TC-100, Hoei Science Co LTD) を用いて 30 サイクル行った。増幅 DNA 断片は 2% アガロースゲル電気泳動で解析した。

結 果

1. BPI3 および BRSV 感染の PCR による診断

1) BPI3 検出用 PCR の確立

BPI3 の P 遺伝子を標的に、2 種のプライマーペアを設定し PCR を行った。鋳型 DNA には 3 株の BPI3, HPI3, 2 株の BRSV, HRSV, NDV, PVM, HVJ, BRV-1 および BVD-MD ウイルスの Nose 株の cDNA と BHV-1 の DNA を用いた。プライマーペア・PIF 1-PIR 3 の場合、BPI3 3 株と HPI3 が増幅し、その塩基数は約 730 bp で予想した値と一致した (Fig. 2 A)。プライマーペア・PIF 2-PIR 1 では、BPI3 のみが増幅し、その塩基数は約 430 bp で予想した値と一致したことから (Fig. 2 B)、このプライマーペアを用いると BPI3 を特異的に検出できることが示された。

PCR による検出感度を上げるためにネステッドダブル PCR を試みた。BPI3 のウイルス液 (10^7 TCID₅₀) から RNA を抽出し cDNA を 20 μ l 作製した後、 10^{-7} まで 10 倍階段希釈し、2 μ l を鋳型 DNA として用いた。プライマーペア・PIF 1-PIR 3 により 1 回目の PCR を行うと 10^{-2} 希釈 (10^4 TCID₅₀ に相当) まで DNA 断片の増幅がみられた (Fig. 3 A)。続いて、1 回目の増幅遺伝子の内側に設定

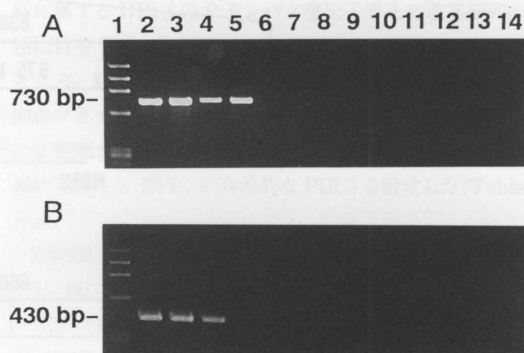


Fig. 2. Electrophoresis of amplified products using primer pairs PIF1-PIR3(A) and PIF2-PIR1 (B) of BPI3. Lane 1, DNA-size marker ϕ X174/*Hae*III digest; lane 2, BPI3 BN-1 strain; lane 3, BPI3 K-5 strain; lane 4, BPI3 BN-CE strain; lane 5, HPI3; lane 6, HVJ; lane 7, PVM; lane 8, NDV; lane 9, BRSV NMK-7 strain; lane 10, BRSV rs-52 strain; lane 11, HRSV; lane 12, BRV-1; lane 13, BVD-MD virus; lane 14, BHV-1.

したプライマーペア・PIF 2-PIR 1 を用いて 1 回目の PCR 産物 2 μ l を鋳型として 2 回目の PCR を行ったところ、 10^{-5} 希釈 (10 TCID₅₀ 相当) まで約 430 bp の特異的な DNA 断片が検出され (Fig. 3 B)、感度が 1,000 倍上昇した。

2) BRSV 検出用 PCR の確立

BRSV の G タンパク遺伝子を標的に 2 種のプライマーペアを設定し PCR を行った。鋳型 DNA には、BPI3 の

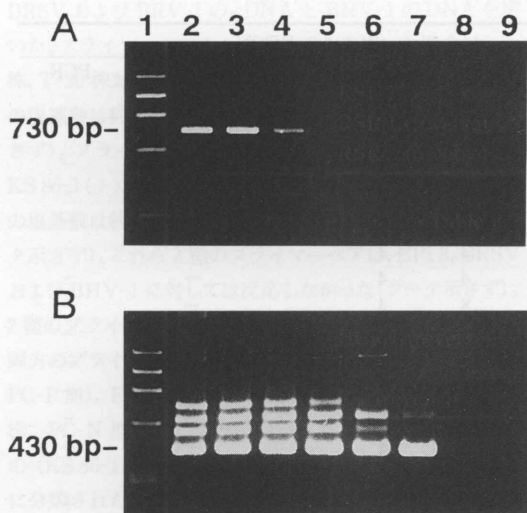


Fig. 3. (A) Sensitivity of BPI3 cDNA amplification with primer pair PIF1-PIR3. RNA was extracted from 10^7 TCID₅₀ of BPI3 and reverse transcribed to cDNA in a volume of 20 μ l. The cDNA dilutions were from 10^0 to 10^{-7} in lanes 2 to 9. Lane 1: ϕ X174/*Hae*III digest as DNA-size marker. (B) Reamplification of the PCR products with nested primer pair PIF2-PIR1. Each lane corresponds to that shown in (A).

PCRの検討で使用したものを同様に用いた。RSF 3とRSR 1のプライマーペアを用いた場合、BRSVのみが増幅し、その塩基数は約580 bpと予想した値と一致した (Fig. 4 A)。プライマーペア・RSF 2-RSR 2でもBRSVが増幅し、その塩基数は約300 bpと予想した値と一致し、他の鋳型DNAでは増幅がみられなかった (Fig. 4 B)。このことより、これら2種類のプライマーペアを用いるとBRSVを特異的に検出できることが示された。

PCRの検出感度を上げるためにネステッドダブルPCRを試みた。BRSVのウイルス液 (10^4 TCID₅₀) からRNAを抽出しcDNAを20 μ l作製した後、 10^{-6} まで10倍階段希釈し、2 μ lを鋳型DNAとして用いた。プライマーペア・RSF 4-RSR 1により1回目のPCRを行うと 10^{-1} 希釈 (10^2 TCID₅₀相当)までDNAの増幅がみられた (Fig. 5A)。続いて、1回目の増幅遺伝子の内側に設定したプライマーペア・RSF 2-RSR 2を用いて1回目のPCR反応産物2 μ lを鋳型として2回目のPCRを行ったところ、約300 bpの特異的なDNA断片が 10^{-4} (0.1 TCID₅₀相当)希釈まで検出でき (Fig. 5 B)、感度が1000倍上昇した。

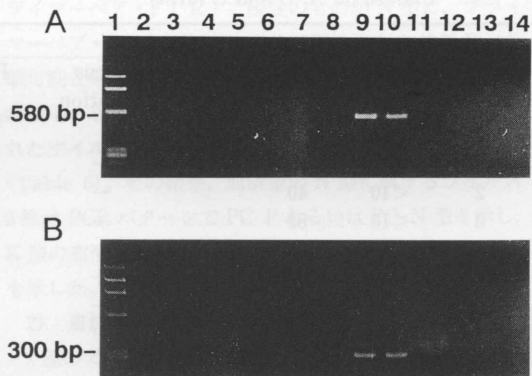


Fig. 4. Electrophoresis of amplified products using primer pairs, RSF3-RSR1(A) and RSF2-RSR2(B) of BRSV. Each lane corresponds to that shown in Fig. 2.

3) PCRによるBPI3およびBRSV感染の診断

BPI3およびBRSVのネステッドダブルPCRを呼吸器疾患の流行がみられた3牧場の子牛の診断に応用し、ウイルス分離の結果と比較した (Table 4)。

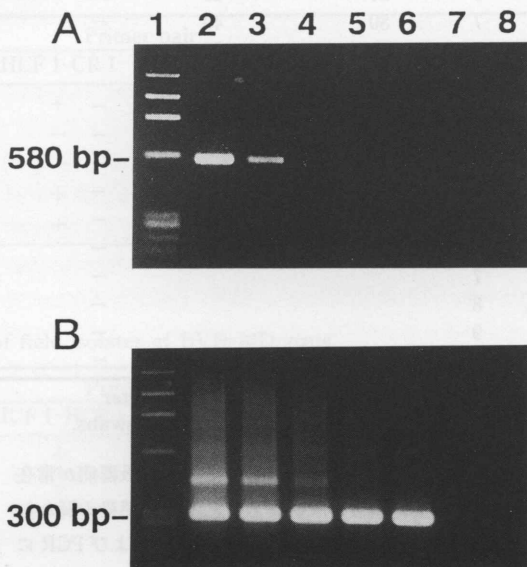


Fig. 5 (A) Sensitivity of BRSV cDNA amplification with primer pair RSF3-RSR1. RNA was extracted from 10^4 TCID₅₀ of BRSV and reverse transcribed to cDNA in a volume of 20 μ l. The cDNA dilutions were from 10^0 to 10^{-6} in lane 2 to 8. Lane 1: ϕ X174/*Hae*III digest as DNA-size marker. (B) Reamplification of the PCR products with nested primer pair RSF2-RSR2. Each lane corresponds to that shown in (A).

Table 4. PCR and virus isolation for detection of BRSV and BPI 3 from nasal swabs of cattle with respiratory disease on A, B and C farms

Calf No.	BPI 3				BRSV					
	HI titer			Virus isolation	PCR	SN titer ¹⁾			Virus isolation	PCR
	0	2 w	4 w ²⁾			0	2 w	4 w		
A farm										
1	<10	40		-	+	8	8		-	-
2	<10	40		-	+	<2	<2		-	-
3	<10	80		-	+	4	4		-	-
4	<10	160		+	+	2	<2		-	-
5	<10	640		+	+	4	4		-	-
6	10	20		-	-	8	4		-	-
7	10	20		-	-	4	8		-	-
8	10	20		-	-	4	4		-	-
9	10	20		-	-	2	4		-	-
10	10	20		-	-	16	8		-	-
11	10	20		-	-	8	4		-	-
B farm										
1	20		10	-	-	<2		4	-	+
2	80		80	-	-	<2		4	-	+
3	80		80	-	-	2		8	-	-
4	80		80	-	-	2		8	-	-
5	80		80	-	-	4		16	-	+
6	20		10	-	-	4		8	-	-
7	80		40	-	-	4		8	-	-
8	80		80	-	-	8		16	-	-
C farm										
1				-	-				-	-
2				-	-				-	-
3				-	+				-	-
4				-	+				-	-
5				-	-				-	-
6				-	-				-	-
7				-	-				-	-
8				-	+				-	-
9				-	-				-	-
10				-	-				-	-

1) SN titer: Serum neutralization titer.

2) Weeks after collection of nasal swabs.

A 牧場は、子牛の集団肥育育成牧場で呼吸器病が常在しており、抗体調査の成績をもとに BPI 3 感染の疑われた 11 例について検討した。ウイルス分離および PCR に供した鼻腔拭い液は、BPI 3 抗体陽転時より約 2 週間前に採取された材料を用いた。その結果、2 例から BPI 3 が分離された。ネステッドダブル PCR で解析したところ、BPI 3 の遺伝子がウイルス分離例 2 例を含む 5 例から検出された。これら 5 例の BPI 3 に対する抗体は有意に上昇していたが、他の 6 例 (No. 6~11) では 1 管の上昇であった。BRSV に対する抗体の動きは全頭でみられなかった。

B 牧場は、初めて子牛を導入した新牛舎で呼吸器病が発生し、8 例について同様に検討した。抗体調査の成績か

ら BRSV 感染が示唆されたが、ウイルス分離はなされなかった。ネステッドダブル PCR で解析したところ、3 例から BRSV の遺伝子が検出された。

C 牧場は、子牛の集団育成牧場で呼吸器病が発生し、10 例について同様に検討した。その結果、ウイルス分離が分離された例は 1 例もなかったが、ネステッドダブル PCR では BPI 3 の遺伝子が 3 例検出された。

2. BVD-MD ウイルス感染の PCR による診断

1) BVD-MD ウイルス検出用 PCR の確立

BVD-MD ウイルスの p 20, gp 48 および gp 25 遺伝子を標的に 4 種のプライマーを設定し、PCR を行った。鋳型 DNA には BVD-MD ウイルス 5 株 (Nose 株, T-20

株, No. 12 株, KS 86-1(+)株, KS 86-1(-)株), BPI 3, BRSV および BRV-1 の cDNA と BHV-1 の DNA を用いた。プライマーペアとして F 1-R 1 を用いた場合, Nose 株, T-20 株および No. 12 株で DNA の増幅がみられ, その塩基数は約 330 bp と予想した値と一致した(データ示さず)。プライマーペア・HCF 1-HCR 1 では, No. 12 株, KS 86-1(+)株および KS 86-1(-)株で増幅がみられ, その塩基数は約 540 bp と予想した値と一致していた(データ示さず)。これら 2 種のプライマーペアは, BPI 3, BRSV および BHV-1 に対しては反応しなかった(データ示さず)。2 種のプライマーペアの増幅パターンを解析したところ, 両方のプライマーペアにそれぞれ反応するもの(No. 12 株, PC-P 型), F 1-R 1 のみに反応するもの(Nose 株, T-20 株, PC-N 型) および HCF 1-HCR 1 のみに反応するもの(KS 86-1(+)株, KS 86-1(-)株, PC-K 型) の 3 群に分類された (Table 5)。今回用いたウイルス株は血清学に, N 型(Nose 株, T-20 株, No. 12 株)と K 型(KS 86

-1(+)株, KS 86-1(-)株) の 2 種に分類されており, プライマーペア・F 1-R 1 で陽性のものが N 型に, プライマーペア・HCF 1-HCR 1 のみで陽性のものが K 型に分類可能と考えられた。このことを確認するために, 持続感染牛から分離されたウイルス 5 株と発症牛から分離されたウイルス 8 株の合計 13 株の PCR パターンを調べた (Table 6)。その結果, 血清型の N 型に属するウイルス 2 株は PCR パターンで PC-P あるいは PC-N 型を示し, K 型の血清型の 11 株はすべて PCR パターンの PC-K 型を示した。

2) 自然感染牛の PCR による診断

2 種のプライマーペアを用いた PCR を野外の BVD-MD ウイルス持続感染牛 2 頭 (症例 A, B) と発症牛 4 頭 (症例 C~F) の診断に応用し, ウイルス分離の結果と比較した (Table 7)。全例から BVD-MD ウイルスが分離され, 持続感染牛 2 頭からは NCP ウイルスが, 発症牛からは NCP と CP ウイルスの両方あるいは CP ウイルスのみが

Table 5. PCR amplification pattern of laboratory BVD-MD virus strains

Strain	Biotype ¹⁾	Serotype	Primer pair		PCR type
			HCF 1-CR 1	F 1-R 1	
No. 12	NCP	N	+	+	PC-P
Nose	CP	N	-	+	PC-N
T-20	CP	N	-	+	PC-N
KS 86-1 (+)	CP	K	+	-	PC-K
KS 86-1 (-)	NCP	K	+	-	PC-K

1) CP: Cytopathogenic, NCP: Noncytopathogenic

Table 6. PCR amplification pattern of field isolates of BVD-MD virus

Field isolate ¹⁾	Biotype	Serotype	Primer pair		PCR type
			HCF 1-HCR 1	F 1-R 1	
PI-1	CP	K	+	-	PC-K
-2	CP	K	+	-	PC-K
-3	CP	K	+	-	PC-K
-4	CP	K	+	-	PC-K
-5	CP	K	+	-	PC-K
MD-1	CP	K	+	-	PC-K
-2	CP	K	+	-	PC-K
-3	CP	K	+	-	PC-K
-4	CP	N	+	+	PC-P
-5	CP	K	+	-	PC-K
-6	CP	N	-	+	PC-N
-7	CP	K	+	-	PC-K
-8	CP	K	+	-	PC-K

1) PI, virus isolates from persistently infected cattle; MD, virus isolates from cattle with mucosal disease.

Table 7. PCR and virus isolation for detection BVD-MD virus from leukocytes of naturally infected cattle

Case	Biotype of isolated virus (es)	Primer pair		Clinical signs
		HCF 1-HCR 1	F 1-R 1	
A	NCP	+	-	No
B	NCP	+	+	No
C	NCP and CP	+	+	Diarrhea, mucosal disease
D	NCP and CP	-	+	Diarrhea, mucosal disease
E	NCP and CP	+	+	Diarrhea, mucosal disease
F	CP	+	+	Diarrhea, mucosal disease

分離された。同じウイルス分離材料を PCR で解析したところ、全例から BVD-MD ウイルスの遺伝子が検出され、本法が BVD-MD の迅速な確定診断として有用であることが示された。全例の PCR 増幅パターンを解析したところ、症例 A は PC-K 型、症例 B, C および F が PC-P 型、症例 D, E が PC-N 型に分類された。

考 察

1. BPI 3 および BRSV 感染の PCR による診断

ウシウイルス性呼吸器疾患で重要視されている BPI 3 および BRSV 感染を迅速に診断する目的で、著者らは BPI 3 および BRSV に特異的なプライマーペアを用い、鼻腔拭い液を材料とする両ウイルス感染症の PCR による診断法を確立した。

BPI 3 感染の PCR による診断は未だ報告がなく、今回が初めてである。プライマー設定に用いた P タンパクは L タンパクと共同して RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性を担い¹³⁾、ウイルス遺伝子の複製に重要な作用をすることから、その塩基配列がよく保存され変異が少ないと考えられている。BPI 3 と HPI 3 の P タンパク遺伝子の相溶性が約 70% と高いことからそれがうかがわれる。この高い相溶性のため、BPI 3 に特異的なプライマーの設定が困難で、今回設定した 4 種類のうち BPI 3 に特異的なものは 1 種類のみであった。プライマーペア・PIF 1-PIR 3 は BPI 3 と同様に HPI 3 を増幅したことから各種動物の PI 3 を検出できるものと考えられた。PIF 2 と PIR 1 のプライマーペアは BPI 3 に特異的であると考えられた。さらに、これらのプライマーペアは BPI 3・BN-1 株を異種細胞で長期継代して弱毒化した BN-CE 株にも反応したことから、今回設定したプライマーの塩基配列の保存性は高く、BPI 3 の確定診断に応用可能と考えられた。

BRSV の PCR による検出は、これまでに 1 件報告されているのみである³²⁾。今回のプライマーは、これまでに塩基配列が報告されている G タンパク、P タンパク、NP タンパク、F タンパク、M タンパク、および SH タンパク

のうち^{24,25,29,37,45,48)}、HRSV と最も塩基配列の相溶性が低い (約 30%) G タンパク遺伝子を選択して設定した。Mallipeddi ら³⁰⁾ は BRSV 3 株の G タンパクの遺伝子の塩基配列を決定し、既に報告されている BRSV の 391-2 株のそれと比較し、90~97% と高い相溶性のあることを報告している。さらに、遺伝子データベースに登録されている 8 株の G タンパクの塩基配列 (Genbank, Accession No. L 08410~7) の相溶性を調べたところ、約 94~99% の相溶性を示した。今回設定したプライマーは、BRSV の強毒株を異種細胞で連続継代して作出した弱毒 rs-52 株にも強毒株と同様に反応したことから、プライマーの塩基配列がこれまでに報告された 14 株の G タンパク遺伝子の塩基配列との比較から、高い相溶性を有することが明らかとなったことから (データ示さず)、BRSV の確定診断に有用と考えられた。

Oberst ら³²⁾ は、BRSV の F タンパク遺伝子を標的とした PCR を種々の分離株に応用して良好な成績を得ている。しかし、プライマーペアは 1 種類しか設定しておらず、野外例の診断への応用はなされていない。今回設定した PCR の検出限界を調べたところ、BPI 3 および BRSV でそれぞれ 10^4 TCID₅₀ および 10^2 TCID₅₀ であり、野外例を的確に診断するには感度が不十分と考えられた。そこで、1 回目の PCR プライマーの内側に設定したプライマーペアを用いて再増幅 (ネステッドダブル PCR) したところ、両ウイルスで検出感度が 1000 倍上昇した。同様の成績は、ウマヘルペスウイルス 1 型と 4 型¹⁹⁾、豚コレラウイルス²⁷⁾、B 型肝炎ウイルス¹⁸⁾ など多くのウイルスで報告されている。

ネステッドダブル PCR を野外例に応用したところ、ウイルス分離の成績より優れていることが示されたが、11 例の検出にとどまり、3 牧場で 18 頭が PCR 陰性となった。これは、BPI 3 を実験感染させた場合、鼻汁中への排出期間は一般に 8~10 日間程度であるが野外での感染ではこれよりも短期間であること⁷⁾、BRSV では実験感染で感染後 4~10 日間の間と報告されていること⁴⁷⁾ から、採材時

期にウイルスが排出されていなかった可能性が考えられた。特に、A牧場では、血清抗体の有意の上昇をみた5例からはすべてBPI 3のウイルス遺伝子を検出したのに対し、有意の上昇をみなかった例からは検出されなかったことからそれがうかがわれる。PCR陽性の11例のうち、1回目のPCRで陽性となったのはわずかに1例のみであったことから(データ示さず)、野外例の診断にはネステッドダブルPCRが必須と考えられた。

以上のことより、今回設定したプライマーを用いてネステッドダブルPCRを行うとBPI 3およびBRSVの集団発生を迅速、的確に診断できることが示された。

2. BVD-MDウイルス感染のPCRによる診断

BVD-MDウイルスにはCP株およびNCP株が存在することから、ウイルスの分離同定に数週間を要する。このため、BVD-MDウイルスの早期検出を目的にPCRを応用した報告が数例なされている。PCRの標的遺伝子としてBelak and Ballagi-Pordanyがgp 48²⁾、Roehle and Woodwardがgp 53³⁵⁾、Brockがp 125⁴⁾、Schroeder and Balassu-Chanはp 20, p 58およびp 125³⁸⁾、そしてBoyer³⁾は5'端の非コード領域を用いている。これらのPCRでは多くのBVD-MDウイルス株の検出は可能であるが、血清型の型別はできない。そこで、今回、BVD-MDウイルスの検出とともに血清型別が可能なPCRの確立を試みた。

血清型に関与している主要なウイルス糖蛋白はgp 53と考えられているが^{39,28)}、この領域は塩基の相同性が株間で非常に低いこと³⁴⁾からプライマーの設定には不適と考えられた。Roehle and Woodward³⁵⁾のgp 53を標的としたPCRでは、検出できない株が多く存在していたことからそれがうかがえる。それに代わる領域として、p 20, gp 48およびgp 25をプライマー設定に用いた。ウイルスエンベロープにはgp 25, gp 48およびgp 53が存在しており、gp 25はgp 53とヘテロダイマーを、gp 48はホモダイマーを、さらにgp 53もホモダイマーを形成することが報告されている^{43,46)}。ヘルペスウイルスでは主要なエンベロープタンパクであるgBは開裂型のgBとヘテロダイマーを形成し³¹⁾、特にgHとgLはヘテロダイマーを形成することで初めて中和抗体のエピトープとなることが報告されている^{5,15)}。このことから、BVD-MDウイルスにおいても、ホモダイマーあるいはヘテロダイマー形成が抗原性状に変化をもたらしている可能性がある。

日本におけるBVD-MDウイルスの血清型は、Shimizuら⁴⁰⁾により中和試験で2群に分けられている。今回の基準株5株および野外分離株13株のPCRパターンは3群に分類でき、gp 25のプライマーの塩基配列の保存されて

いるウイルスがN型、この領域は保存されていないがp 20およびgp 48のプライマーの塩基配列の保存されているのがK型に分類されることが示唆された。このことから、血清型を決定する因子の一つとしてgp 25とgp 53のヘテロダイマーの構造が重要であることが推察された。

野外の持続感染牛および発症牛に今回設定したPCRを応用したところ、ウイルス分離の成績と良く一致し、迅速診断に有用であることが示された。PCRパターンにより6例中5例がN型ウイルス、1例がK型ウイルスと推定された。

以上の成績より、今回設定したPCRによりBVD-MDウイルス罹患牛の早期摘発および感染ウイルスの血清型別の可能性が示された。

要 約

ウシバラインフルエンザウイルス3型(BPI 3)およびウシRSウイルス(BRSV)によるウシの呼吸器疾患とウシウイルス性下痢・粘膜病の早期確定診断を目的としてPCR法の応用を試みた。

BPI 3のPタンパク遺伝子を標的として2組のプライマーペアを設定してPCRを行ったところ、特異的にBPI 3のPタンパク遺伝子領域が増幅した。BRSVのGタンパク遺伝子を標的に2組のプライマーペアを設定しPCRを行ったところ、BRSVのGタンパク遺伝子領域が特異的に増幅した。両ウイルスのPCRによる検出感度を高めるためにネステッドダブルPCRを試みたところ、感度が1000倍上昇した。呼吸器症状を示した3牧場のウシの確定診断に本法を応用したところ、ウイルス分離の成績よりはるかに優れていた。このことから、本法によるBPI 3およびBRSV感染の迅速診断の有用性が示された。

BVD-MDウイルスのp 20, gp 48およびgp 25遺伝子を標的に4種類のプライマーを設定し、基準株5株(Nose株, T-20株, No. 12株, KS 86-1(+))株およびKS 86-1(-)株と野外分離株13株を用いてPCRを行った。2組のプライマーペアの増幅パターンを解析したところ、3群に分類され血清型別が可能であった。持続感染牛2頭と発症牛4頭に本法を応用したところ、全例からウイルス遺伝子が検出され、本法がBVD-MDの迅速診断に有用であることが示唆された。

謝 辞

種々のウイルス株を御提供下さいました諸先生に感謝いたします；札幌医科大学の千葉峻三先生、HRSV株；北海道大学獣医学部の喜田宏先生、HPI 3株；長崎大学医学部の佐藤浩先生、PVM株；農林水産省家畜衛生試

験場の清水実嗣先生, BVD-MD ウイルス野外分離株; 株式会社微生物化学研究所の久保田道雄先生, BRSV 株。

本研究は 1992 年度酪農学園大学共同研究の助成を受けて行われた。

文 献

- 1) Baker, J. C., 1987. Bovine viral diarrhoea virus: A review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **190**: 1449-1458.
- 2) Belak, S. and A. Ballagi-Pordany, 1991. Bovine viral diarrhoea virus infection: rapid diagnosis by the polymerase chain reaction. *Arch. Virol. Suppl.*, **3**: 181-190.
- 3) Boye, M., S. Kamstrup and K. Dalsgaard, 1991. Specific sequence amplification of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) and hog cholera virus and sequencing of BVDV nucleic acid. *Vet. Microbiol.*, **29**: 1-13.
- 4) Brock, K. V., 1991. Detection of persistent bovine viral diarrhoea virus infections by DNA hybridization and polymerase chain reaction assay. *Arch. Virol. Suppl.*, **3**: 199-208.
- 5) Browne, H., V. Baxter and T. Minson, 1993. Analysis of protective immune responses to the glycoprotein H-glycoprotein L complex of herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.*, **74**: 2813-2817.
- 6) Brownlie, J., 1990. Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.*, **23**: 371-382.
- 7) Bryson, D. G., 1990. Parainfluenza-3 virus in cattle, In *Virus Infections of Ruminants*. (Z. Dinter and B. Morein, ed.), pp. 319-333. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.
- 8) Collett, M. S., R. Larson, C. Gold, D. Strick, D. K. Anderson and A. F. Purchio, 1988. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology*, **165**: 191-199.
- 9) Donis, R. O., W. Corapi, W. and E. J. Dubovi, 1988. Neutralizing monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus bind to the 56K to 58K glycoprotein. *J. Gen. Virol.*, **69**: 77-86.
- 10) Frank, G. H., R. E. Briggs and K. G. Gillette, 1986. Colonization of the nasal passages of calves with *Pasteurella haemolytica* serotype 1 and regeneration of colonization after experimentally induced viral infection of the respiratory tract. *Am. J. Vet. Res.*, **47**: 1704-1707.
- 11) Gillespie, J. H., S. H. Mardin and N. B. Darby, 1962. Cellular resistant in tissue culture, induced by noncytopathogenic strains, to a cytopathogenic strain of virus diarrhoea virus of cattle. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **110**: 248-250.
- 12) Gillette, K. G. and P. C. Smith, 1985. Respiratory syncytial virus infection in transported calves. *Am. J. Vet. Res.*, **46**: 2596-2600.
- 13) Hamaguchi, M., T. Yoshida, K. Nishikawa, H. Naruse and Y. Nagai, 1983. Transcriptive complex of Newcastle disease virus. I. Both L and P proteins are required to constitute an active complex. *Virology*, **128**: 105-117.
- 14) Hashiguchi, Y., S. Inui, K. Nanba and T. Kumagai, 1978. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease. II. Isolation and characterization of a cytopathogenic virus and experimental production of the disease. *Natl. Inst. Anim. Health Q.*, **18**: 118-127.
- 15) Hutchinson, L., H. Browne, V. Wargent, N. Davis-Poynter, S. Primorac, K. Goldsmith, A. C. Minson and D. C. Johnson, 1992. A novel herpes simplex virus glycoprotein gL forms a complex with glycoprotein H (gH) and affects normal folding and surface expression of gH. *J. Virol.*, **66**: 2240-2250.
- 16) Inaba, Y., T. Omori, M. Kono and M. Matumoto, 1963. Parainfluenza 3 virus isolated from Japanese cattle. I. Isolation and identification. *Jap. J. Exp. Med.*, **33**: 313-329.
- 17) Inaba, Y., Y. Tanaka, K. Sato, T. Omori and M. Matumoto, 1972. Bovine respiratory syncytial virus. Studies on an out-break in Japan, 1968-1969. *Jpn. J. Microbiol.*, **16**: 373-383.
- 18) Kaneko, S., R. H. Miller, S. M. Feinstone, M. Unonra, K. Kobayashi, N. Hattori and R. H. Purcell, 1989. Detection of serum hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis using the polymerase chain reaction assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **86**: 312-316.
- 19) Kirisawa, R., A. Endo, H. Iwai and Y. Kawakami,

1993. Detection and identification of equine herpesvirus-1 and -4 by polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.*, **36**: 57-67.
- 20) Kirisawa, R., H. Ohmori, H. Iwai and Y. Kawakami, 1993. The genomic diversity among equine herpesvirus-1 strains isolated in Japan. *Arch. Virol.*, **129**: 11-22.
- 21) Kodama, K., N. Sasaki, S. Fukuyama, A. Izumida and F. Ishii, 1974. Studies on cytopathogenic bovine viral diarrhea virus recovery, identification, and properties of the isolated virus. *Bull. Nippon Vet. Zootech. College*, **23**: 51-60.
- 22) Kubota, M., S. Fukuyama, K. Kodama and N. Sasaki, 1990. Establishment of an attenuated strain of bovine respiratory syncytial virus for live virus vaccine. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **52**: 695-703.
- 23) Kurogi, H., Y. Inaba, Y. Goto, A. Takahashi, K. Sato, T. Omori and M. Matumoto, 1974. Isolation of rhinovirus from cattle in outbreaks of acute respiratory disease. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, **44**: 215-226.
- 24) Lerch, R. A., K. Anderson and G. W. Wertz, 1990. Nucleotide sequence analysis and expression from recombinant vectors demonstrate that the attachment protein G of bovine respiratory syncytial virus is distinct from that of human respiratory syncytial virus. *J. Virol.*, **64**: 5559-5569.
- 25) Lerch, R. A., E. J. Stott and G. W. Wertz, 1989. Characterization of bovine respiratory syncytial virus protein and mRNA and generation of cDNA clones to the viral RNA. *J. Virol.*, **63**: 833-840.
- 26) Lillie, L. E., 1974. The bovine respiratory disease complex. *Can. Vet. J.*, **15**: 233-242.
- 27) Liu, S-T., S-N. Li, D-C. Wang, S-F. Chang, S-C. Chiang, W-C. Ho, Y-S. Chang and S-S. Lai, 1991. Rapid detection of hog cholera virus in tissues by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, **35**: 227-236.
- 28) Magar, R., H. C. Minocha and J. Lecomte, 1988. Bovine viral diarrhea virus proteins: heterogeneity of cytopathogenic and noncytopathogenic strains and evidence of a 53K glycoprotein neutralization epitope. *Vet. Microbiol.*, **16**: 303-314.
- 29) Mallipeddi, S. K. and S. K. Samal, 1992. Sequence comparison between phosphoprotein mRNAs of human and bovine respiratory syncytial virus identifies a divergent domain in the predicted protein. *J. Gen. Virol.*, **73**: 2441-2444.
- 30) Mallipeddi, S. K. and S. K. Samal, 1993. Sequence variability of the glycoprotein gene of bovine respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.*, **74**: 2001-2004.
- 31) Meredith, D. M., J-M. Stocks, G. R. Whittaker, I. W. Halliburton, B. W. Snowden and R. A. Killington, 1989. Identification of the gB homologues of equine herpesvirus types 1 and 4 as disulphide-linked heterodimers and their characterization using monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.*, **70**: 1161-1172.
- 32) Oberst, R. D., M. P. Hays, K. J. Hennessy, L. C. Stine, J. F. Evermann and C. L. Kelling, 1993. Identifying bovine respiratory syncytial virus by reverse transcription-polymerase chain reaction and oligonucleotide hybridizations. *J. Clin. Microbiol.*, **31**: 1237-1240.
- 33) Omori, T., Y. Inaba, T. Morimoto, Y. Tanaka, H. Kurogi and M. Matumoto, 1967. Bovine diarrhea virus. I. Isolation of noncytopathogenic strains detectable by END method. *Jpn. J. Microbiol.*, **11**: 133-142.
- 34) Paton, D. J., J. P. Lowings and A. D. T. Barrett, 1992. Epitope mapping of the gp53 envelope protein of bovine viral diarrhea virus. *Virology*, **190**: 763-772.
- 35) Roehe, P. M. and M. J. Woodward, 1991. Polymerase chain reaction amplification of segments of pestivirus genomes. *Arch. Virol. Suppl.*, **3**: 231-238.
- 36) Sakai, Y., S. Suzu, T. Shioda and H. Shibuta, 1987. Nucleotide sequence of the bovine parainfluenza 3 virus genome: its 3' end and the genes of NP, P, C and M proteins. *Nucleic Acids Res.*, **15**: 2927-2944.
- 37) Samal, S. K. and M. Zamola, 1991. Nucleotide sequence analysis of a matrix and small hydrophobic protein dicistronic mRNA of bovine respi-

- ratory syncytial virus demonstrates extensive sequence divergence of the small hydrophobic protein from that of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.*, **72**: 1715-1720.
- 38) Schroeder, B. A. and T. C. Balassu-Chan, 1990. Specific sequence amplification of bovine viral diarrhoea virus nucleic acid. *Arch. Virol.* **111**: 239-246.
- 39) Shimizu, M. and K. Satou, 1987. Frequency of persistent infection of cattle with bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus in epidemic areas. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **49**: 1045-1051.
- 40) Shimizu, M., H. Watanabe, K. Satou and S. Murakami, 1989. Antigenic diversity of bovine viral diarrhoea-mucosal disease (BVD-MD) viruses recently isolated from persistently infected cattle and mucosal disease, and serologic survey on bovine sera using antigenically different BVD-MD viruses. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **51**: 1115-1122.
- 41) 清水高正, 1977. ウシのマイコプラズマ感染症. *日獣会誌*; **30**: 367-373.
- 42) Spriggs, M. K. and P. L. Collins, 1986. Sequence analysis of the P and C protein genes of human parainfluenza virus type 3: patterns of amino acid sequence homology among paramyxovirus proteins. *J. Gen. Virol.*, **67**: 2705-2719.
- 43) Thiel, H-J., R. Stark, E. Weiland, T. Rumenapf and G. Meyers, 1991. Hog cholera virus: molecular comparison of virions from a pestivirus. *J. Virol.*, **65**: 4705-4712.
- 44) Thomson, R. G., 1980. A perspective on respiratory disease in feedlot cattle. *Can. Vet. J.* **21**: 181-185.
- 45) Walravens, K., R. Kettman, A. Collard, P. Coppe and A. Burny, 1990. Sequence comparison of between the fusion protein of human and bovine respiratory syncytial viruses. *J. Gen. Virol.*, **71**: 3009-3014.
- 46) Weiland, E., R. Stark, B. Haas, T. Rumenapf, G. Meyers and H-J. Thiel, 1990. Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J. Virol.*, **64**: 3563-3569.
- 47) Wellemans, G., 1990. Bovine respiratory syncytial virus, In *Virus Infections of Ruminants*. (Z. Dinter and B. Morein, ed.), pp. 363-375, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.
- 48) Zamora, M. and S. K. Samal, 1992. Gene junction sequence of bovine respiratory syncytial virus. *Virus Res.*, **24**: 115-121.

Summary

Methods for the rapid detection of bovine parainfluenza virus type 3 (BPI3), bovine respiratory syncytial virus (BRSV) and bovine viral diarrhoea mucosal disease (BVD-MD) virus were developed using polymerase chain reactions (PCR).

Primers for PCR to detect BPI3 were designed from the P protein gene of the virus. Two primer pairs amplified expected fragments of the virus. PCR primers to detect BRSV were designed from the G protein gene of the virus. Two primer pairs amplified expected fragments of the virus. Reamplification of the PCR products with a set of nested primers increased the PCR sensitivity 1000-fold in both viral systems. We applied these techniques to the detection of BPI3 and BRSV within nasal swab samples from cattle with respiratory disease. In both viral infections, it was demonstrated that the PCR techniques were superior to virus isolation.

Primers for PCR to detect BVD-MD virus were designed from the p20, gp48 and gp25 genes of the virus. By the use of two primer pairs, cytopathogenic Nose, T-20 and KS86-1(+) strains, noncytopathogenic No. 12 and KS86-1(-) strains, and 13 field isolates could be detected. Three patterns of PCR amplification were recognized, and it was possible to identify serotypes of the viruses. We applied this PCR technique to detect BVD-MD virus from six affected cattle including two persistently infected ones. There was complete concordance between the results

of PCR and virus isolation.