

10 埼玉県における牛 RS ウイルス野外株の遺伝子及び抗原性解析

中央家畜保健衛生所

○宮下 知世

I はじめに

牛 RS ウイルス (BRSV) 病は、パラミクソウイルス科一本鎖 RNA ウイルスに属する BRSV の感染によって、発熱、呼吸器症状、泌乳量の減少、流産を引き起こす疾病であり、寒冷期に多く発症する¹⁾。県内で平成 24～28 年度に発生した牛の呼吸器症状を主訴とする病性鑑定では、ウイルスが検出された症例のうち、約 6 割で BRSV が検出されており、BRSV は牛の呼吸器症状の原因ウイルスとして重要である。

今回、平成 24～28 年度に県内で検出された BRSV 野外株の遺伝子解析により、系統を把握するとともに、県内 BRSV 野外株と国内標準株である NMK7 株との抗原性を比較し、県内 BRSV 野外株へのワクチンの有効性を検討したので、その概要について報告する。

II 材料及び方法

1 遺伝子解析及びアミノ酸配列解析

(1) 材料

平成 24～28 年度に県内 11 農場 (A～K 農場) で検出された BRSV 野外株 11 株 (A～K 株) を材料とした。発症年月日、採材場所、症状、BRSV ワクチン接種歴、病性鑑定実施時のウイルス検査成績を表 1 に示した。

表 1 遺伝子解析及びアミノ酸配列解析材料

農場	発症日	市町村	症状	BRSV ワクチン	成績	
					RT-PCR(+)	分離(+)
A	H24.12.16	東松山市	発熱、発咳、鼻汁	未接種	5/5	0/5
B	H24.12.23	本庄市	発熱、肺雑音、呼吸速迫	未接種	4/5	0/5
C	H24.1.15	日高市	発熱、発咳、死亡	未接種	5/5	0/5
D	H25.3.23	深谷市	鼻汁、死亡	4か月前 5種混合生	4/4	0/4
E	H26.2.27	桶川市	発熱、発咳、元気消失	未接種	7/8	0/8
F	H26.3.20	桶川市	発熱、発咳、鼻汁	未接種	2/5	NT
G	H28.1.16	深谷市	発熱、呼吸器症状	未接種	6/6	3/6
H	H28.1.18	深谷市	発熱、発咳、呼吸速迫	未接種	3/5	3/5
I	H28.2.27	秩父市	発咳、呼吸速迫	1年半前 5種混合不活化	5/5	2/5
J	H28.12.9	川島町	発熱、発咳	未接種	5/5	3/5
K	H29.1.20	桶川市	発咳、鼻汁、呼吸速迫	未接種	4/5	2/5

(2) 方法

Valarcher らの方法²⁾により、BRSV の G 蛋白遺伝子を標的としたプライマーを用いて塩基配列をダイレクトシーケンス法により解析した。また、データベースに登録されている BRSV 塩基配列と比較し、分子系統樹解析及び相同性解析を実施した。さらに、G 蛋白中央部に位置する抗原決定基を含むアミノ酸配列の解析を行い、NMK7 株²⁾と比較した。

2 中和試験

(1) 材料

K 農場の発症期血清 3 検体、回復期血清 5 検体を用いた。

(2) 方法

K 農場で分離された BRSV 野外株 (K 分離株) と NMK7 株を用いて中和試験を実施した。

III 結果

1 遺伝子解析及びアミノ酸解析

分子系統樹解析では、11 株は全てサブグループⅢに分類され、近年国内で報告されている BRSV 野外株と同一のサブグループであった (図 1)。分子系統樹には、平成 20～23 年に県内で検出された BRSV 野外株³⁾も示した (図 1 : H20①、H20②、H21、H23)。相同性解析では、11 株間の相同性は 95.6～100% で、11 株と NMK7 株との相同性は 89.0～90.4% であった (図 2)。D 株と E 株、G 株と H 株の相同性はそれぞれ 100% であった。

アミノ酸配列解析では、G 蛋白に存在する抗原決定基の立体構造に重要とされる⁴⁾173、176、182、186 番目のシステイン (Cys : C) は B～K 株全てで保存されていた。A 株では、158 番目にリシン (Lys : K) の挿入がみられ、159 番目以降のアミノ酸は全て B 株と一つずつずれた配列になっていた。また、B～K 株の抗原決定基アミノ酸配列について NMK7 株と比較したところ、NMK7 株では 206 番目、208 番目が共にプロリン (Pro : P) であるが、C～K 株では 206 番目がセリン (Ser : S)、B～K 株では 208 番目がロイシン (Leu : L) に置換されていた (図 3)。

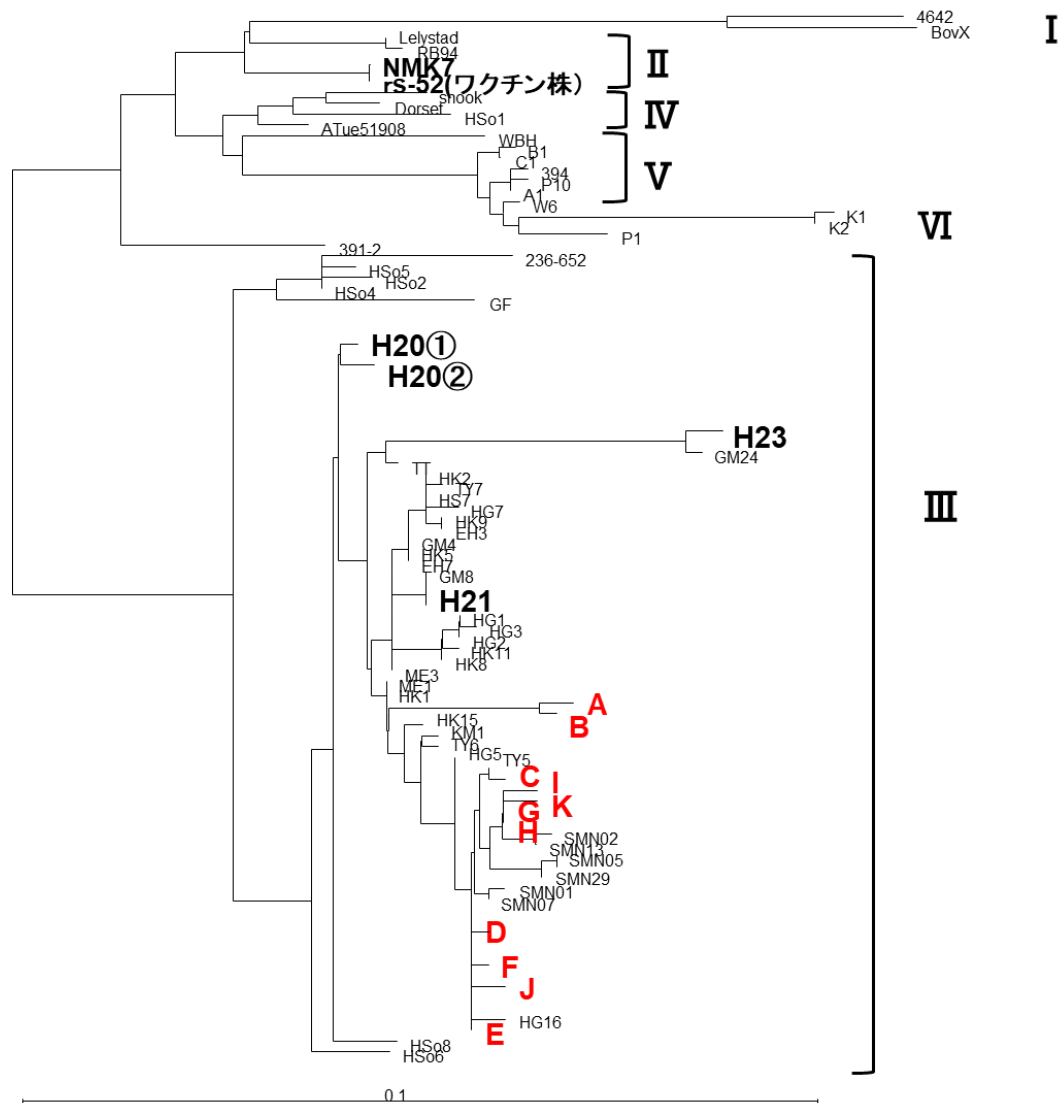


図1 系統樹解析結果

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	NMK7
A		98.7	95.6	96.0	96.0	95.8	96.0	96.0	95.6	95.6	95.6	89.0
B			96.4	96.8	96.8	96.6	96.8	96.8	96.4	96.4	96.4	89.8
C				99.6	99.6	99.4	99.6	99.6	99.2	99.2	99.2	90.0
D					100	99.8	99.6	99.6	99.2	99.6	99.2	90.4
E						99.8	99.6	99.6	99.2	99.6	99.2	90.4
F							99.4	99.4	99.0	99.4	99.0	89.1
G								100	99.6	99.2	99.6	90.0
H									98.7	99.2	99.6	90.0
I										98.7	99.2	90.0
J											98.7	90.0
K												90.0

図2 野外株塩基配列の相同性解析結果

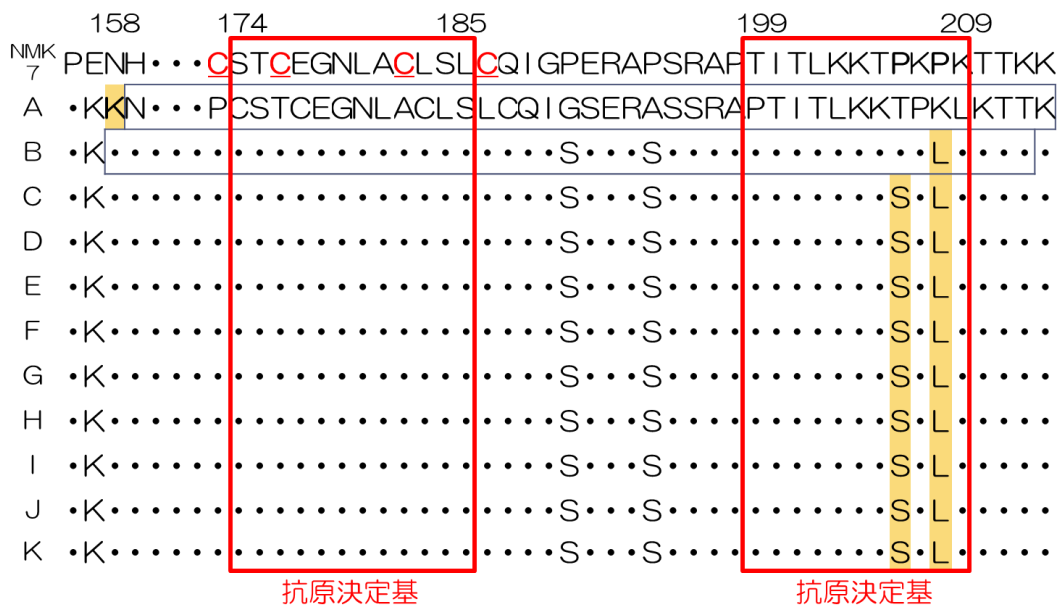


図3 アミノ酸配列解析結果（・はNMK7株と比較し変異がないことを示す）

2 中和試験

中和試験の結果は表2のとおりであり、K分離株とNMK7株に対する中和抗体価に有意な差は認められなかった。

表2 中和試験結果

	No.	NMK7株	K分離株
発症期	2	4	8
	4	16	16
	5	16	32
回復期	1	128	128
	2	128	128
	3	64	128
	4	256 \leq	256 \leq
	5	64	128

IV まとめ及び考察

BRSVはG蛋白の塩基配列によりサブグループI～VIに分類され²⁾、多くの生ワクチンや一部不活化ワクチンに使用されているrs-52株、国内標準株のNMK7株はサブグループIIに、近年国内で検出されている野外株の多くはサブグループIIIに分類される^{5~7)}。今

回、検索した県内 BRSV 野外株 11 株は全てサブグループⅢに分類され、近年の国内流行株と同一のサブグループであった。多勢ら³⁾は、平成 20～23 年に検出された県内 BRSV 野外株と NMK7 株との相同性は 86.6～90.7%であったと報告している。今回検査した県内 BRSV 野外株 11 株と NMK7 株との相同性は 89～90.4%であり、平成 20～23 年検出野外株と比較して NMK7 株との相同性に大きな差はなかった。また、D 株と E 株、G 株と H 株の相同性はそれぞれ 100%であったが、D 株と E 株は発症日や発生場所が離れており、疫学的関連は不明であった。G 農場と H 農場は管理獣医師や集乳ルートが異なっており、ウイルスの侵入経路は特定できなかったものの、発症日が近いことや農場間の直線距離が約 1 km と近接していることから、疫学的関連がある可能性が考えられた。近隣に農場が複数戸存在するような場所で本病が発生した場合には、消毒の徹底などの防疫対策を一層徹底する必要があることが再確認された。

Langedijk らの報告⁸⁾では、G 蛋白のアミノ酸配列で 174 番目から 185 番目、199 番目から 209 番目に抗原決定基が存在するとしている。さらに、173 番目と 186 番目、176 番目と 182 番目の Cys によりつくられるジスルフィド架橋が抗原決定基の立体構造に重要だとされている⁴⁾。フランスでは、この 4 つの Cys がアルギニン (Arg) に置換された株が分離されたことが報告されている²⁾。これと類似する例として、ヒト RSV では抗原決定基における Cys から Arg への置換が *in vitro* において確認されており、この置換によって表面抗原及び構造を変化させることが報告されている⁴⁾。今回の検査では抗原決定基において、NMK7 株と比較して、B～K 株では 208 番目の Pro が Leu に、C～K 株では 206 番目の Pro が Ser に置換していたものの、4 つの Cys は保存されていた。206 番目及び 208 番目の Pro の Ser、Leu への置換は八重樫ら⁶⁾や平島ら⁹⁾の報告でもみられているが、いずれの株でも 4 つの Cys は保存されており、全て抗原性に変化はないとされている。今回も、K 分離株及び NMK7 株を用いた中和試験で抗体価に差がみられなかったことや、4 つの Cys が全て保存されていたことから、B～K 株と NMK7 株の抗原性に差はないと考えられた。また、NMK7 株は rs-52 株と抗原性に差がないことから¹⁰⁾、現行ワクチンは B～K 株に対して有効であると考えられた。

A 株では、抗原決定基の前に位置する 158 番目に Lys の挿入がみられた。これは 3 つのアデニンがこの部位に挿入されていたためであった。159 番目以降の配列は B 株の 158 番目以降の配列と同一であった。アミノ酸挿入による抗原決定基アミノ酸配列の変化の抗原性への影響は過去に報告がなく、不明である。4 つの Cys の位置も 1 つずつずれていることから、抗原決定基立体構造が変化した可能性も考えられ、今後、より詳細な検討が必要である。

今回調査した農場では、11 農場中 9 農場がワクチン未接種であり、2 農場はそれぞれ発生 4 か月前、1 年半前にワクチン接種を行っていたものの、病性鑑定の結果では発症期血清の中和抗体価は低値であった。このことから、発生が集中する寒冷期に高い抗体価を維

持できるよう適切な時期に接種を行うことが重要であると考えられる。今後も適切なワクチンの接種を推奨するとともに、流行株や抗原性の変化に注視していきたい。

V 謝辞

BRSV の遺伝子解析を実施していただいた国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 小西美佐子先生に深謝いたします。

VI 参考文献

- 1) 明石博臣ら：動物の感染症, 近代出版, 第 3 版, 101-102 (2011)
- 2) Valarcher JF, et al. : Evolution of bovine respiratory syncytial virus, *J. Virol*, 10714-10728 (2000)
- 3) 多勢景人ら：県内で発生した牛 RS ウイルス病と流行株の遺伝子解析, 埼玉県調査研究成績報告書, 53, 14-21 (2011)
- 4) Langedijk PM, et al. : Antigenetic structure of the central conserved region of protein G of bovine respiratory syncytial virus, *J. Virol*, 4055-4061 (1997)
- 5) 佐藤岳彦：千葉県の牛 RS ウイルス流行株遺伝子解析, 全国家畜保健衛生業績抄録 (2011)
- 6) Yaegashi G, et al. : Genetic and antigenic analyses of bovine respiratory syncytial virus detected in Japan, *J. Vet. Med. Sci.* 67, 145-150 (2005)
- 7) 酒井芳子ら：長崎県下における牛 RS ウイルス流行株の分子学および抗原学的解析, 全国家畜保健衛生業績抄録 (2010)
- 8) Langedijk PM, et al. : Proposed three-dimensional model for the attachment protein G of respiratory syncytial virus, *J. Virol*, 77, 1249-1257 (1996)
- 9) 平島宜昌：鹿児島県における牛 RS ウイルス野外株の分子系統解析, 平成 25 年度鹿児島県家畜保健衛生業績発表会抄録 (2013)
- 10) Kubota M, et al. : Establishment of an attenuated strain of bovine respiratory syncytial virus for live virus vaccine, *Jpn. J. Vet. Sci.* 52(4), 695-703 (1990)