NARO 農研機構
国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

Epidemiological survey and studies on diagnostic methods for bovine viral mammillitis

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-03-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 猪島, 康雄, 今井, 邦俊, 村上, 賢二, 西森, 知子, 清水, 眞也, 横山, 隆, 泉對, 博 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00001728

資　料

牛ウイルス性乳頭炎の調査および診断法の開発

猪島　康雄[1)]，今井　邦俊[2)]，村上　賢二[1)]，西森　知子[2)]，清水　眞也[1)]，横山　隆[3)]，泉對　博[1)*]

（平成13年7月23日　受付）

Epidemiological survey and studies on diagnostic methods for bovine viral mammillitis

Yasuo INOSHIMA [1)], Kunitoshi IMAI [2)], Kenji MURAKAMI [1)], Tomoko NISHIMORI [2)],
Shinya SHIMIZU [1)], Takashi YOKOYAMA [3)] & Hiroshi SENTSUI [1)*]

日本各地で散発的に発生している牛の乳頭炎の病因として，パラポックスウイルス（PPV)および牛ヘルペスウイルス2型（BHV-2)が疑われている。これらウイルス性疾病の特異的診断法の開発を試みるとともに，国内における浸潤状況や生態系の調査を行った。PPVは寒天ゲル内沈降試験およびプロテインAGを使用したELISAで，BHV-2は中和試験で，全国各地から集めた牛血清の抗体検査を行った。PPV抗体陽性牛は広範囲に存在し，陽性率は70%以上であった。一方，BHV-2の抗体陽性牛の分布は限局しており，陽性率は約1%であった。野生動物ではニホンカモシカで高率にPPV抗体陽性例が検出され，家畜との間で本ウイルスの生態系が形成されている可能性が示唆された。両ウイルスについてPCRによる遺伝子診断法を開発し，その実用性を検討した。PPVでは，全ての種に共通なPCRプライマーを設定し，野外における発症動物の病変組織から，直接遺伝子診断を行う手法を開発した。また，そのPCR産物の制限酵素切断像から，4種類のウイルス分類を可能とした。BHV-2では，実験感染した乳のみマウスの筋肉・皮膚乳剤を用いて，shuttle PCR と増幅部位の*Alu*I切断像から，高感度で特異的診断が行えることを明らかにした。

はじめに

最近，日本各地において，乳牛に乳頭炎が散発することが報告され，畜産農家に経済的被害を与えている。牛の乳頭や口周辺に結節や水疱を形成する疾病は様々な原因により生ずるが，ウイルス性の乳頭炎は伝染性を有することにより大きな被害を与える。国内に存在する乳頭炎の原因となるウイルスとして，ポックスウイルス科のパラポックスウイルス（PPV)，ヘルペスウイルス科の牛ヘルペスウイルス2型（BHV-2)，パポバウイルス科の牛パピローマウイルスが考えられる。この中でBHV-2の存在は明らかでない。また，海外悪性伝染病には，乳頭炎を起こすウイルス性疾病が複数存在する。従って，国内に存在すると考えられる乳頭炎を起こすウイルス性疾病の特異的で迅速な診断法を開発し，それらウイルスの浸潤状況や生態系を明らかにし，ウイルス性乳頭炎を制御する手法を検討するとともに，海外悪性伝染病との類症鑑別を正確に行える検査方法を確立する必要がある。本研究では，*in vitro*における培養系が確立されていないパピローマウイルスを除外し，PPVとBHV-2に焦点を当て，疫学調査および診断法の開発を試みた。

また，平成9年から家畜伝染病予防法の一部が改正され，監視伝染病の中にヘルペスウイルス科およびポックスウイルス科に属するウイルス性疾病が新たに加えられ

1)　農林水産省家畜衛生試験場ウイルス病研究部（現：動物衛生研究所感染病研究部）
〒305-0856　茨城県つくば市観音台3-1-5
2)　農林水産省家畜衛生試験場北海道支場（現：動物衛生研究所北海道支所）
3)　農林水産省家畜衛生試験場総合診断研究部（現：動物衛生研究所感染病研究部）

* Corresponding author; Mailing address: Department of Infectious Diseases, National Institute of Animal Health, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856 Japan.　Tel:+81-298-38-7841. Fax:+81-298-38-7907. E-mail: sentsui@affrc.go.jp

た。これら大型ウイルスには中和試験が困難なものも多い。それらの実用的な診断法や検査法を開発する必要性からも本研究に取り組んだ。

試験研究方法

1. 抗体調査

（1）PPVの抗体検査

PPVの抗体検査は，寒天ゲル内沈降試験（AGID）およびELISAにより行った。抗原には，千葉県の乳頭炎発症牛から分離したChiba strainを使用した。AGID抗原は，Chiba strainを接種し細胞変性効果（CPE）が出現した牛胎児筋肉細胞（BFM）をMDBKと混合培養し，MDBKにCPEが出現した時点で感染細胞を採材し，0.1% tritonX-100を含む少量のPBSに浮遊・可溶化したものを使用した。

ELISA抗原はChiba strain 感染BFMの培養液をジアトリゾ酸ナトリウム密度勾配により濃縮・精製して使用した。PPV感染症は野生動物でも報告されているため，広範囲の動物種で疫学調査ができるよう，protein AGを使用したELISA法の開発を試みた。

（2）BHV-2の抗体検査

BHV-2の抗体検査は，96ウエルマイクロプレートを用いた中和試験により行った。ウイルスはMinnesota strain，細胞はBFM を用いた。最初に，4倍希釈した血清について中和試験を行った。1検体当たり2ウエルを使用し，50%以上のCPEを抑制したものを抗体陽性とした。また，陽性検体については血清を2倍階段希釈し抗体価を測定した。

（3）検査血清の採材

国内におけるPPVおよびBHV-2の浸潤状況を調べるため，各地の家畜保健衛生所の協力で，1997年から1998年にかけて、全国各地の農場から牛血清1,819例を採材した。BHV-2抗体陽性を示した2地域については，更に浸潤状況を調べるため2000年度に26農場323検体の牛血清を採取した。また，野生動物におけるPPVの浸潤状況を調べるため，岐阜大学をはじめとする様々な研究機関から，9種類272検体の野生動物血清の提供を受けた。詳細は，ニホンカモシカ66，シカ55，ニホンザル30，タヌキ24，イノシシ30，ヌートリア30，ツキノワグマ30，ハクビシン5，アナグマ2である。

2. 遺伝子診断法の開発

（1）PPVの遺伝子診断法

PPVは中和試験による血清型別が困難なため，制限酵素切断パターンによる株間の比較検討を試みた。牛およびニホンカモシカから分離した6株のPPVをBFMに接種し，新たに開発したアルカリ法（フェノール抽出前にアルカリ処理をして細胞を溶解する）によって，感染細胞からウイルスゲノムDNAを抽出し，*Bam*HI，*Eco*RI，*Hind*III，*Kpn*I，*Sal*I，*Xho*Iなどの制限酵素を用いて切断し，電気泳動した。

オルフウイルスのエンベロープ領域の塩基配列を基にプライマーを設計し，PPV特異的PCRの開発を試みた。4種類のPPV標準株，国内の羊，牛，ニホンカモシカから分離された7株のPPVについて，それらの感染細胞DNAを用いてPCRを検討した。また，PPV感染症が疑われた牛，羊，ニホンカモシカの病変部組織（図2-1）から直接DNAを抽出し，PCR診断を試みた。

PCRと制限酵素処理（PCR-RFLP）によるPPVの簡易分類法の確立を試みた。4種類のPPV標準株について，上記PCRにより得られたPCR産物から塩基配列を決定し，制限酵素切断サイトを検索した。また，国内分離株について，PCR-RFLPによる分類を試みるとともに，現在の分類法であるウイルスゲノムDNAの*Kpn*I処理による分類結果と比較検討した。

使用した国内分離株の由来は図3脚注に示す。

（2）BHV-2の遺伝子診断法

ウイルスエンベロープ糖蛋白質であるgB遺伝子の塩基配列（9,388bp）から，図4に示す位置に2組のプライマーセット（A,B）とそれぞれの増幅部位の内側にsemi-nestedプライマーを設定した。PCR反応のcycling conditionとして，以下に示す3つの反応プロトコールを検討した。

①熱変性，アニーリング，伸長反応の3段階反応を繰り返す標準的な方法のPCR（3-PCR）。

②熱変性の次にアニーリングと伸長反応を同時に行う2段階反応を繰り返すPCR（shuttle PCR）。

③semi-nested PCR。

また，アニーリング温度やサイクル数がPCRの感度，特異性に影響を与えることが知られているので，アニーリング温度（60，62，64℃），サイクル数（45，50，60回，semi-nested PCRは30，35回）を変えて検出感度・特異性を検討した。BHV-2以外に牛ヘルペスウイルス1型（BHV-1）および4型（BHV-4），Alcelaphine herpesvirus-1（AHV-1），羊ヘルペスウイルス2型（OHV-2），ウマヘルペスウイルス1型（EHV-1），オーエスキー病ウイルス（ADV），牛アデノウイルス7型（BADV-7），PPVの8種のDNAウイルスについて反応性

を調べた。OHV-2 DNAは自然感染している羊の白血球からDNAを抽出したが，そのほかのウイルスDNAは感染細胞あるいはその培養上清から抽出した。陰性対照として非感染BFMおよびMDBK細胞からDNAを抽出した。また，筋肉内接種により発症した乳飲みマウスの10%筋肉・皮膚乳剤を用いて，臨床材料からBHV-2遺伝子の検出を試みた。乳剤のウイルス力価は25$TCID_{50}$/0.1mlであった。乳剤からのDNA抽出は以下の4つの方法で行った。

①10分間煮沸した乳剤の遠心後上清。

②煮沸後proteinase K（最終濃度1mg/ml）を加え50℃，一晩処理した乳剤の遠心後上清。

③Proteinase Kのみで処理した乳剤の遠心後上清。

④フェノール処理。

3.　PPVの牛感染試験

AGIDおよびELISAでPPV抗体が陰性であることを確認した牛3頭の口腔内粘膜および腹部皮膚にPPVを接種し，経時的に採血し，AGIDおよびELISAで抗体価を測定した。また，PCRおよびSouthern blot hybridizationにより末梢白血球からPPV遺伝子の検出を試みた。実験感染牛2頭はPPV接種約5ヶ月後にデキサメサゾーン（DM）を，1頭は約2年後にインターフェロンγ（IFNγ）を投与し，経過観察後病理解剖し，各種臓器からPPV遺伝子の検出を行った。一方、臨床症状は認められないがPPV抗体陽性の自然感染牛1頭についても，同様に抗体価の測定およびPPV遺伝子の検出を行った。

試験研究成績の概要

1.　疫学調査

（1）PPVの浸潤状況

1997年から1998年にかけて日本各地から採材した牛血清1,819検体について抗体保有状況を調べた結果，全体の陽性率は72%で（表1），その値は年齢とともに上昇していた（表2）。各都道府県ごとの陽性率は40～98%で，日本国内の牛は高率にPPVに感染していることが示された。野生動物では，ニホンカモシカで抗体陽性率36.4%であったが，その他の動物はすべて抗体陰性であった。

牛から分離したPPV4株とニホンカモシカから分離したPPV2株のウイルスゲノムDNAを，6種類の制限酵素で切断し株間の電気泳動像を比較した結果，牛由来の4株とニホンカモシカ由来の1株は，基本的に同一切断パターンを示した。しかし，PPV属に分類されている牛丘疹性口炎ウイルス，偽牛痘ウイルス，オルフウイルス，アカシカパラポックスウイルスの各標準株とは，若干異なっていた。

PPVの分類にはウイルスゲノムDNAの*KpnI*による切断パターンが指標として使用されている。この分類法では，ニホンカモシカから分離した2株のPPVのうち1株はオルフウイルスに，他の1株は牛から分離した4株とともに牛丘疹性口炎ウイルスに分類された。オルフウイルスに対するモノクローナル抗体を入手し，その反応性によって分類を試みたところ，同一結果が得られた。ニホンカモシカは，オルフウイルスと牛丘疹性口炎ウイルス両方の感染を受けていることが示された。

（2）BHV-2の浸潤状況

牛血清1,819検体について抗体保有状況を調べた結果，全体の陽性率は0.98%であった（表1）。4県でのみ陽性牛が検出され，陽性率は2～10%であった。また，抗体価は4～16倍であった。大分県の1例は米国からの輸入牛，その他の陽性牛は全て国内産であった。鹿児島県ではA島でのみ陽性牛が検出されたが，2000年度に陽性農場とその周囲にある3農場の計4農場（40検体）について調べたところ，全てで陽性牛が検出された（農場ごと陽性率は10～70%）。沖縄県の1998年の調査では，15農場のうち40%が陽性であったが（農場ごとの陽性率は14～50%），2000年度の調査では，22農場の36%が陽性であり（農場ごとの陽性率は5～81%），初回の調査で陽性牛が検出された農場は2回目の調査でも陽性牛が認められた。

2.　診断法の開発

（1）PPVの診断法の開発

設計したプライマー（図1）は，4種類のPPV標準株すべてを検出することができた。国内分離株7株もすべて，同様に検出可能であった。このPCR法を野外発症例の診断に応用したところ，semi-nested PCRによりすべての病変部からウイルスDNAが検出できた。これらの特異性はSouthern blot hybridizationにより確認した（図2-2）。

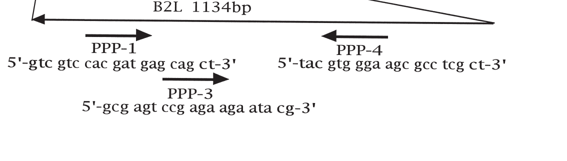

図１　オルフウイルスNZ2株の塩基配列を基に作成したパラポックスウイルス属に共通なPCRプライマー。

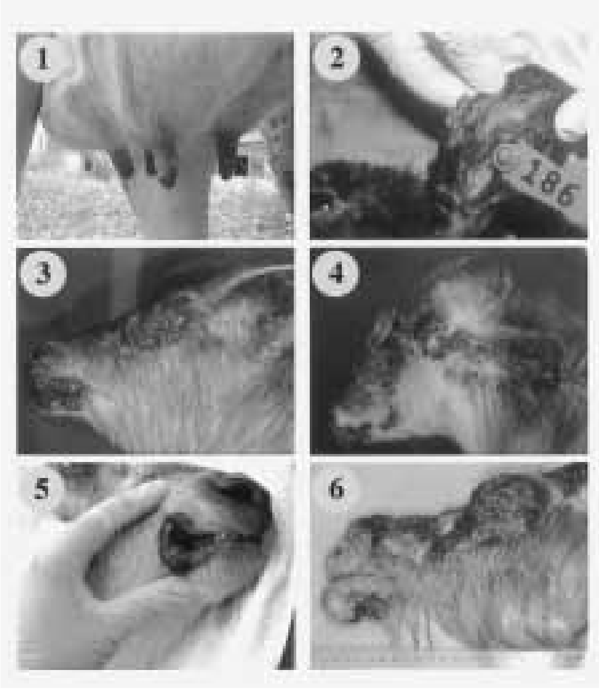

図 2-1：検査材料を採材した動物の病変組織
1：牛乳頭の水疱。2：羊の耳の潰瘍。
3〜6：ニホンカモシカ顔面の皮膚病変。

図 2-2 PCRによる病変組織中のパラポックスウイルス遺伝子の検出。

これら病変部の組織から，PCR(A)，Semi-nested PCR (B)，Semi-nested PCR 産物のSouthern blot hybridization(C)により，パラポックスウイルス遺伝子が検出された。
M: 分子量マーカー，1: 牛乳頭の水疱，2: 羊の耳の潰瘍，3〜6: ニホンカモシカ顔面の皮膚病変，7: ウイルス対照（オルフウイルス），8: 陰性対照（牛胎児筋肉細胞）。

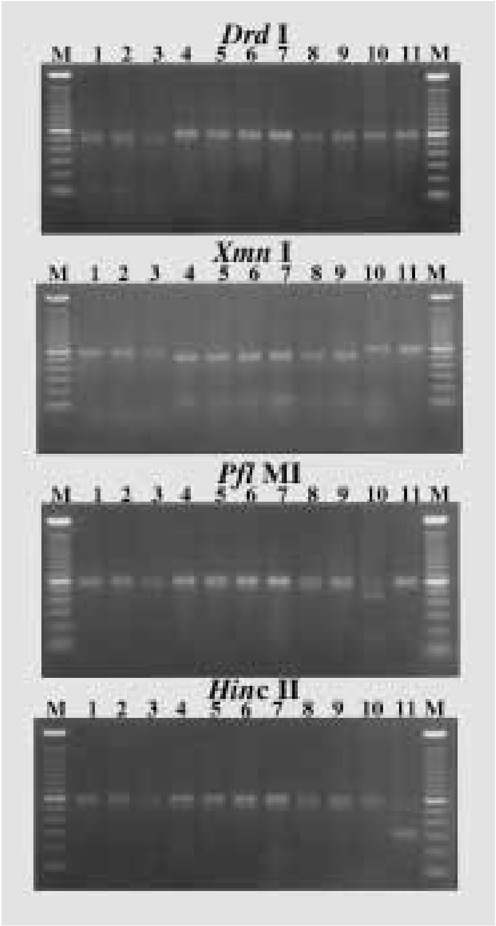

図 3 PCR-RFLPによるパラポックスウイルスの解析。
Semi-nested PCR 産物を*Drd*I, *Xmn*I, *Pfl*MI, *Hinc*II で切断することにより，4種類のパラポックスウイルス（オルフウイルス，牛丘疹性口炎ウイルス，偽牛痘ウイルス，アカシカパラポックスウイルス）に分類できる。
M: 分子量マーカー，1: NZ2（オルフウイルス標準株），2: Iwate（羊の口唇部丘疹から分離），3: S-1（ニホンカモシカの皮膚結節状病変から分離），4: Ishikawa-S（ニホンカモシカの口唇部丘疹から分離），5: V660（牛丘疹性口炎ウイルス標準株），6: Aomori（牛の口唇部丘疹から分離），7: Chiba（牛の乳頭部水疱から分離），8: V94（健康牛末梢白血球から分離），9: Ishikawa-B（牛の乳頭部水疱から分離），10: VR634（偽牛痘ウイルス標準株），11: DPV（アカシカパラポックスウイルス標準株）。

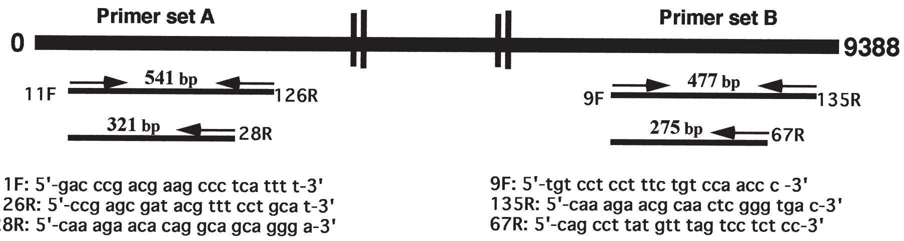

図４　BHV-2 gB遺伝子の塩基配列を基に作成したPCRプライマー。

表１　国内におけるパラポックスウイルスと牛ヘルペスウイルス2型抗体陽性牛の分布状況

地方名	県名	検査個体数	パラポックスウイルス 陽性個体数 AGID[1]	ELISA[2]	合計	陽性率(%)	牛ヘルペスウイルス2型 陽性個体数[3]	陽性率(%)
北海道		330	182	56	238	72.1	0	0.0
東北	青森	50	37	5	42	84.0	3	6.0
	岩手	50	26	8	34	68.0	0	0.0
	山形	50	16	12	28	56.0	0	0.0
関東	千葉	110	56	3	59	53.6	0	0.0
	茨城	50	36	1	37	74.0	0	0.0
	栃木	50	24	5	29	58.0	0	0.0
	群馬	59	34	7	41	69.5	0	0.0
中部	新潟	50	36	4	40	80.0	0	0.0
	長野	50	37	0	37	74.0	0	0.0
	岐阜	50	36	2	38	76.0	0	0.0
近畿	三重	50	29	2	31	62.0	0	0.0
	滋賀	50	42	0	42	84.0	0	0.0
	和歌山	50	21	7	28	56.0	0	0.0
中国	岡山	55	26	9	35	63.0	0	0.0
	鳥取	60	29	17	46	76.7	0	0.0
	広島	61	19	18	37	60.6	0	0.0
四国	愛媛	77	41	6	47	61.0	0	0.0
	高知	64	58	2	60	93.8	0	0.0
九州	福岡	53	44	6	50	94.3	0	0.0
	大分	50	34	10	44	88.0	1	2.0
	佐賀	50	26	4	30	60.0	0	0.0
	長崎	50	36	7	43	86.0	0	0.0
	熊本	50	22	8	30	60.0	0	0.0
	宮崎	50	48	1	49	98.0	0	0.0
	鹿児島	50	13	7	20	40.0	4	2.0
	沖縄	100	80	15	95	95.0	10	10.0
	合計	1819	1088	222	1310	72.0	18	0.98

1) 寒天ゲル内沈降試験で陽性となった個体。
2) 寒天ゲル内沈降試験は陰性だが、酵素抗体法で陽性となった個体。
3) ウイルス中和試験で陽性となった個体。

上記プライマーで4種類のPPV標準株の遺伝子を増幅し，それらの塩基配列を解析し，*Drd*I，*Xmn*I，*Pfl*MI，*Hinc*IIがそれぞれのPCR産物を特異的に切断する制限酵素であることを確認した。国内分離株7株について，このPCR-RFLPによる分類を行い，従来法による分類結果と比較したところ，両者は完全に一致した。（図3）

（2）BHV-2の診断法の開発

2組のプライマーセット（A，B）は，いずれのPCRプロトコールにおいても同程度の感度を示した（検出限界：0.4〜0.04TCID$_{50}$）。しかし，アニーリング温度を60と62℃に設定した条件では，時に非感染細胞由来DNAで非特異的バンドが出現したが，プライマーセットAの方が出現頻度が低く，このセットの方が優れていた。非特異的バンドはアニーリング温度を64℃に設定した場合には認められなかった（図5）。従ってアニーリング温度を64℃とした。また，サイクル数は3-PCRおよびshuttle PCRは50回，semi-nested PCRは30回とした。この条件下ではそれぞれのプロトコールにおけるおおよその所要時間は，2.5時間，2時間および3.5時間であった。従って，BHV-2の診断には、迅速性からshuttle PCRによる遺伝子検出法を採用することにした。BHV-2以外のウイルスゲノムDNAからは増幅産物は得られなかった（図6）。また，増幅領域には塩基配列から*Alu*Iサイトが1箇所存在し，得られたPCR産物は*Alu*Iの処理により切断された。

煮沸処理のみを行ったマウス乳剤はPCR陰性であったが，その他の抽出法ではBHV-2遺伝子が検出された（図7）。

表2　牛の年齢とパラポックスウイルス抗体陽性率の関係

	年齢								
	1	2	3	4	5	6	7	8	合計
北海道	20/23[1]	33/46	33/60	37/54	38/51	29/39	24/27	23/29	237/329
	87.0[2]	71.7	55.0	68.5	74.5	74.4	88.9	79.3	72.5
東北	1/3	15/25	13/21	12/16	7/17	5/8	3/4	6/6	62/100
	33.3	60.0	61.9	75.0	41.2	62.5	75.0	100.0	62.0
関東	21/75	21/48	21/33	41/50	19/27	16/16	8/9	10/11	157/269
	28.0	43.8	63.6	82.0	70.1	100.0	88.9	90.9	58.4
中部	12/22	12/14	16/20	6/9	5/7	13/13	4/5	8/9	76/99
	54.5	85.7	80.0	66.7	71.4	100.0	80.0	88.9	76.8
近畿	1/7	8/15	18/23	11/19	12/19	20/25	8/13	23/26	101/147
	14.3	53.3	78.3	57.9	63.2	80.0	61.5	88.1	68.7
中国	2/6	14/28	15/27	11/20	12/18	16/18	9/10	14/19	93/146
	33.3	50.0	55.6	55.0	66.7	88.9	90.0	73.7	63.7
四国	18/35	8/11	6/11	2/2	0/2	6/7	4/5	3/4	47/77
	51.4	72.7	54.5	100.0	0.0	85.7	80.0	75.0	61.0
九州	46/72	68/92	53/71	46/58	27/44	14/18	11/12	29/33	294/400
	63.9	73.9	74.6	79.3	61.4	77.8	91.7	87.9	73.5
合計	121/243	179/279	175/266	166/228	120/185	119/144	71/85	116/137	1067/1567
	49.8	64.2	65.8	72.8	64.9	82.6	83.5	84.7	68.1

1) 陽性数／検査数

2) 陽性率（%）

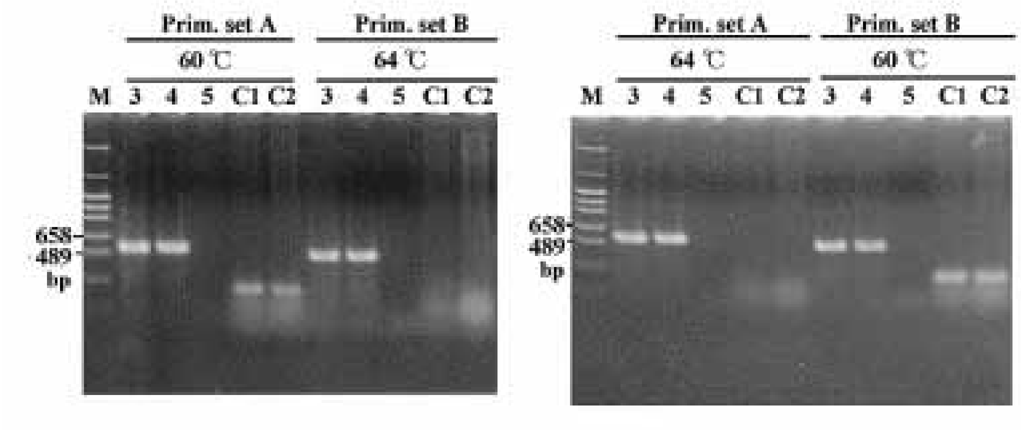

図５　Shuttle PCRのBHV-2遺伝子検出に与えるアニーリング温度の影響。
3〜5: BHV-2のウイルス力価, 3: 4 $TCID_{50}$, 4: 0.4 $TCID_{50}$, 5: 0.04 $TCID_{50}$,
C1: MDBK細胞由来DNA, C2: BFM細胞由来DNA, M: 分子量マーカー。

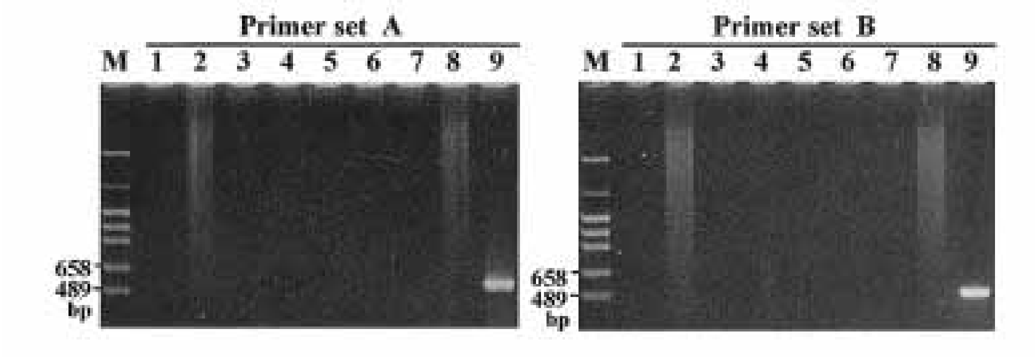

図６　Shuttle PCRの特異性の確認。
1: BHV-1, 2: BHV-4, 3: AHV-1, 4: OHV-2, 5: ADV, 6: EHV-1,
7: BADV-7, 8: PPV, 9: BHV-2 , M: 分子量マーカー

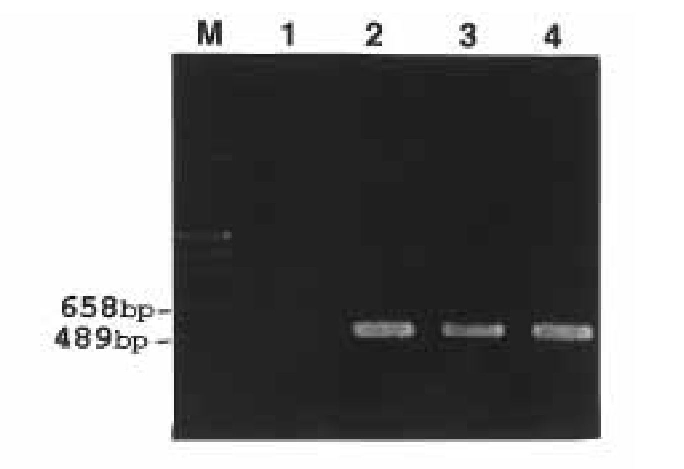

図７　Shuttle PCRによるマウス乳剤中のBHV-2遺伝子の検出。
1: 煮沸処理, 2: 煮沸後proteinase K処理, 3: proteinase K処理, 4: フェノール処理,
M: 分子量マーカー

3.　PPV実験感染牛の抗体価の推移とウイルス遺伝子の検出

すべての実験感染牛は口腔粘膜ウイルス接種部に小結節を形成した。PPVに対する抗体は約2週間で上昇し，高い抗体価を長期間持続した。自然感染牛の抗体価は低い値で推移したが，その変動状況から持続感染が示唆された。実験および自然感染牛ともに，PPV遺伝子が末梢白血球から検出されることは稀であった。しかし，DMまたはIFNγ投与により宿主動物の免疫能を制御した場合には高率に検出された。病理解剖時の各種組織では，中枢神経系およびリンパ系組織からウイルス遺伝子が検出された（表3)。

まとめと考察

PPV感染症の全国的な疫学調査は行われたことがなく，国内の牛における浸潤状況は不明であった。本研究の結果，国内の牛が高率にPPVに感染していることが示された。しかし，PPV感染症の報告は最近まで少なかった。本疾病の症状は二次感染が起こらない場合は軽度に推移するため，報告されることなく処理されていた可能性がある。最近世界各地で口蹄疫が流行し，国内でも約90年ぶりの発生が認められたことが原因で，畜主が家畜の乳房や口唇周囲を注意深く観察するようになり，その結果PPV感染症の発症報告が増加したと考えられる。PPVは現在4種類のウイルスグループに分類されている。国内の抗体陽性牛が同一のパラポックスウイルス感染によるものか，パラポックスウイルス属の異なるウイルスによるものか，今後調査する必要がある。

ニホンカモシカから分離されたPPVは，ニホンカモシカに特異的なウイルスではなく，牛丘疹性口炎ウイルスまたはオルフウイルスに近縁または同一ウイルスであることが示唆された。ニホンカモシカは，かってはその生息地は高山地帯に限られていたが，特別天然記念物として保護されていることで個体数が増加し，その生息地が牛や羊の放牧地と重複するようになり，本疾病の感染を受ける機会が増加したと思われる。つまり自然界において，ニホンカモシカはPPVのリザーバーとなって，牛や羊との間でウイルス生態系を形成している可能性が示唆された。

PPV属に特異的なPCR法の開発に成功した。一般に，PPVは野外材料からの分離が困難で，電子顕微鏡でビリオンが観察されている病変組織でも，ウイルス分離が不成功に終わることが多い。PPVの感染によって起こる牛の丘疹性口炎，緬山羊の伝染性膿疱性皮膚炎，特用家畜である鹿の伝染性膿疱性皮膚炎は届出伝染病に指定されている。今回開発したPCR法はこれら疾病の迅速診断法に有効であると思われる。また，症状が類似した海外悪性伝染病との類症鑑別にも有効と思われる。

PCR-RFLPによるPPVの簡便な分類法の確立に成功した。この方法により，ウイルスを分離することなく，病変部組織から直接・迅速に遺伝子診断をし，原因ウイルスを分類することが可能となった。また，牛と緬山羊，家畜と野生動物のPPV感染症の関連など，野外におけるPPVの分子疫学調査にも有効と思われる。

PPV感染症は同一個体で再発が認められる。再発の原因として，再感染および持続感染しているウイルスの再活性化が考えられる。PPV実験感染牛および自然感染牛を使用し，PPV持続感染の可能性について血清学的および遺伝子学的検査の両面から検討した結果，PPVは牛に持続感染し，継続的に宿主の免疫系を刺激しているものと思われた。また，ウイルス遺伝子の検出状況から，本

表3　パラポックスウイルス感染牛の様々な組織中からのウイルス遺伝子検出

組織	実験感染牛			自然感染牛
	B90	B95	B97	B94
大脳	ND	++	ND	ND
延髄	ND	++	ND	ND
胸脊髄	ND	++	ND	ND
骨髄	ND	++	-	ND
脾臓	-	-	-	++
肺	ND	-	ND	ND
心臓	ND	++	ND	ND
腎臓	ND	-	ND	ND
肝臓	ND	-	ND	ND
浅頸リンパ節	++	++	ND	-
下顎リンパ節	ND	++	ND	ND
腸間膜リンパ節	-	++	ND	ND
鼠径リンパ節	ND	-	ND	ND
腸骨下リンパ節	ND	-	-	+
膝窩リンパ節	ND	++	ND	ND
腋窩リンパ節	ND	++	-	ND
三叉神経節	ND	-	ND	ND
坐骨神経	ND	-	ND	ND
腋窩神経	ND	-	ND	ND
末梢血白血球	+	++	ND	+

++: PCR, Southern blot hybridizationいずれも陽性。
+　: PCR 陰性, Southern blot hybridization 陽性。
－ : PCR, Southern blot hybridizationいずれも陰性。
ND: 検査せず。

ウイルスの潜伏部位は，末梢白血球よりも中枢神経系やリンパ系組織である可能性が考えられた。

これまでBHV-2が日本に存在するか不明であったが，今回の抗体調査により本ウイルスが既に日本に存在していることが初めて明らかにされた。しかし，全体の陽性率は低く，地域的な分布も限定的であった。大分県の1例は流行地である米国からの輸入牛であり，導入時に既に抗体を保有していたものと考えられた。また，1997～98年に陽性であった農場や地域は2000年の調査でも陽性を示したことから，一度侵入を許した農場や地域でBHV-2が常在化する傾向の強い事が示された。しかし，今回調査した範囲では，BHV-2抗体陽性牛の存在する農場で乳房炎が多い傾向が認められたが，乳頭炎は特に問題視されていなかった。BHV-2は一度感染すると容易に潜伏感染を起すが，妊娠・出産などのストレス下でウイルスの再活性化が起こり発病したり，授乳している子牛や導入牛の感染源になったりするといわれている。しかし，周産期のストレスで必ず発病するわけではなく，発病の誘発には他の要因も関与すると思われる。その病理発生については殆ど研究が進んでいないので不明な点が多い。乳頭炎の発生は突発的で，多くは農場単位での散発的な発生であるが，時には地域流行的な発生をみることが報告されている。 今回の調査ではBHV-2の感染と乳頭炎の直接的な関連は明らかにならなかったが，今後の持続的調査が必要と思われる。

BHV-2の感染により、乳牛では乳頭に水疱が形成されるが，授乳時に母牛から感染した子牛では口腔粘膜の紅斑，口唇，鼻腔，鼻鏡の潰瘍形成等の症状が認められる。しかし，類似した症状を示す海外悪性伝染病もあることから，診断に際しては注意を要する。今回確立したshuttle PCRは類似疾患との類症鑑別にも応用可能と思われる。今回，ウイルス力価の低いマウス乳剤から，しかも簡便な試料調製法で陽性結果が得られたことから，本研究で確立されたshuttle PCRは臨床材料の検査においても高い感度を示すと考えられる。このことは現場での応用に際し有用と思われる。

謝　辞

本研究を行うにあたり下記の方々の協力をいただいたことを感謝します。

共同研究者

諸岡晃（科技庁特別研究員），黒田順史（和歌山県紀北家保），吉田昌徳（群馬県家衛研），南明博（高知県中部家保），山本靖典（山口県中部家保），池谷優子（愛媛県八幡浜家保），浅野明宏（北海道網走家保）

パラポックスウイルス標準株の分与

Dr. A.A. Mercer (University of Otago, Dunedin, New Zealand)

パラポックスウイルス野外分離株の提供

村上俊明（石川県南部家畜保健衛生所），源宣之（岐阜大学）

野生動物の材料採取・提供

源宣之，平井克哉，鈴木義孝（岐阜大学），田川裕一（家畜衛生試験場），青柳高弘，木内英昭（長野県松本家畜保健衛生所），池上良（富山県東部家畜保健衛生所），澤田健二（岡山県津山家畜保健衛生所），福冨豊子（岡山県家畜病性鑑定所），浜崎伸一郎（野生動物保護管理事務所関西支所）

オルフウイルスのモノクローナル抗体の提供

Dr. N. Ueda (University of Otago, Dunedin, New Zealand)，宮本和明（和歌山県立医大）

成績の取り扱い

1） Kuroda, Y. et al. : An epidemic of parapoxvirus infection among cattle: Isolation and antibody survey. J. Vet. Med. Sci. 61, 749-753 (1999).

2） Inoshima, Y. et al. : Use of protein AG in an enzyme-linked immunosorbent assay for screening for antibodies against parapoxvirus in wild animals in Japan. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 6, 388-391 (1999).

3） Sentsui, H. et al. : Isolation of parapoxvirus from a cow treated with interferon-γ. Vet. Microbiol. 70, 143-152 (1999).

4） Inoshima, Y. et al. : Simple preparation of parapoxvirus genome DNA for endonuclease analysis. Microbiol. Immunol. 44, 69-72 (2000).

5） Inoshima, Y. et al. : Detection and diagnosis of parapoxvirus by the polymerase chain reaction. J. Virol. Methods 84, 201-208 (2000).

6） Sentsui, H. et al. : Survey on antibody against parapoxvirus among cattle in Japan. Microbiol. Immunol. 44, 73-76 (2000).

7） Inoshima, Y. et al. : Serological survey of parapoxvirus infection in wild ruminants in Japan in 1996-9. Epidemiol. Infect. 126, 153-156 (2001).

8） Inoshima, Y. et al. : Genetic heterogeneity among

parapoxviruses isolated from sheep, cattle and Japanese serows (*Capricornis crispus*). J. Gen. Virol. 82, 1215-1220 (2001).

9) Iketani, Y. et al. : Persistent parapoxvirus infection in cattle. Microbiol. Immunol. 46, 285-291 (2002).

10) Imai, K et. al. : Development of shuttle polymerase chain reaction for detection of bovine herpesvirus 2 gene. (Submitted).

11) 今井ら：牛ヘルペスウイルス2型遺伝子検出のためのPCR法の検討. 第129回日本獣医学会 (2000).

12) 今井ら：牛ヘルペスウイルス2の浸潤状況調査. 第131回日本獣医学会 (2001).

Summary

Epidemiological survey and studies on diagnostic methods for bovine viral mammillitis

Yasuo INOSHIMA[1)], Kunitoshi IMAI[2)], Kenji MURAKAMI[1)], Tomoko NISHIMORI[2)], Shinya SHIMIZU[1)], Takashi YOKOYAMA[3)] & Hiroshi SENTSUI[1)] *

Bovine mammillitis has been sporadically observed among cattle in Japan. Since parapoxvirus (PPV) and bovine herpesvirus type 2 (BHV-2) were suspected as agents of the diseases, specific and sensitive methods for diagnosis of these diseases were studied. Seroepidemiological surveys were performed on PPV by agar gel immunodiffusion test and ELISA using protein AG, and on BHV-2 by virus neutralization tests. Serum samples were collected from cattle in various parts of Japan. Positive reactors to PPV were found all over Japan and the rate of positive reactors was more than 70%. On the other hand, reactors to BHV-2 were found sporadically and their positive rate was about 1%. Positive reactors to PPV were observed in Japanese serow, suggesting that PPV is transmitted between domestic and wild animals. Genetical diagnosis methods by PCR were developed for the detection of PPV and BHV-2, and their practical use was evaluated. Semi-nested PCR was applied to the diagnosis of PPV infection and it was able to detect viral DNA from lesions of clinically affected animals in the fields. The reaction was effective for all PPV strains and these were divided into 4 groups by restriction fragment length polymorphism. Shuttle PCR was developed for diagnosis of BHV-2 infection and the specificity and sensitivity of the reaction were confirmed by digestion with restriction endonuclease *Aul*I and by using homogenized muscle and skin of mice experimentally infected with BHV-2.

Bull. Natl. Inst. Anim. Health No. 108, 23-32 (March 2002)