

鹿児島県における牛の節足動物媒介性ウイルスに関する研究

山口大学大学院連合獣医学研究科

平島 宜昌

2018年3月

目 次

第 1 章	序論	1
第 2 章	複数の血清型の流行性出血病ウイルスの同時浸潤が認められたイバラキ病症例の発生状況と遺伝子解析	6
1.	緒言	
2.	材料及び方法	
3.	結果	
4.	考察	
第 3 章	2015 年に発生した牛流行熱と検出ウイルスの遺伝学的及び疫学的考察	23
1.	緒言	
2.	材料及び方法	
3.	結果	
4.	考察	
第 4 章	シャモンダウイルスの関与が示唆された牛の異常産の発生とウイルス感染状況の遡及調査	37
1.	緒言	
2.	材料及び方法	
3.	結果	
4.	考察	
第 5 章	総合考察	59

引用文献 63

謝辭 77

第1章 序論

アルボウイルス (Arboviruses ; Arthropod-borne viruses) とは、吸血性節足動物に感染してその体内で増殖し、吸血に伴ってヒトや家畜を含む脊椎動物に伝播されるウイルスの総称である。家畜に感染するアルボウイルスとして、トガウイルス科、フラビウイルス科、ペリブニャウイルス科、レオウイルス科、ラブドウイルス科及びアスファウイルス科等が知られており[望月雅美, 2011], 主にヌカカ、蚊及びダニ等によって媒介され、脳炎、急性熱性疾患、異常産等、様々な疾病の原因となる。加えて、トガウイルス科アルファウイルス属のウイルス (東部馬脳炎ウイルス、西部馬脳炎ウイルス等) や、フラビウイルス科フラビウイルス属のウイルス (日本脳炎ウイルス等) は、蚊やダニを介して家畜とヒトの間で伝播することから[Yun and Lee, 2014], 人獣共通感染症の原因としても重要である。

アルボウイルスは、ウイルスを媒介する吸血性節足動物の生息域に合わせて、広範囲に分布している。しかしながら、家畜への感染は吸血性節足動物の吸血活動によって引き起こされるため、その生息域や活動時期によって、ウイルスの感染に地域性や季節性が認められる。年間を通して気温が高く、吸血性節足動物の活動が活発な熱帯、亜熱帯地域においては、ウイルスが常在化し、家畜間で頻繁にウイルスの感染が繰り返されていると考えられている[梁瀬, 2009]。一方、わが国を含む温帯地域においては、気温の上昇する初夏から秋にかけて吸血性節足動物の活動が活発化するのに伴ってウイルス伝播がおこるが、気温の低下と吸血性節足動物の活動低下に伴って終息する。そのため、家畜疾病の原因として問題となるアルボウイルスは、国内に常在しているのではなく、気流によって、ウイルスの常在地である熱帯、亜熱帯地域から、ウイルスに感染した吸血性節足動物とともに国内に持ち込まれると考えられている[Hayama et

al., 2016].

わが国においても，家畜のアルボウイルス感染症は古くから知られており，特に牛へのアルボウイルス感染による急性熱性疾患及び異常産（死産，流産，早産，先天異常子の分娩）は，多大な経済的損失をもたらしている．イバラキ病及び牛流行熱は，それぞれイバラキウイルス（Ibaraki virus; IBAV）及び牛流行熱ウイルス（Bovine ephemeral fever virus; BEFV）による急性熱性疾患であり，家畜伝染病予防法に定める届出伝染病である．両疾病は，かつては一括して「流行性感冒」として家畜伝染病予防法における家畜伝染病に指定されており，1950～60年代には数万～数十万頭規模の発生が報告されている[農林水産省，2017]．また，国内における牛のアルボウイルスによる異常産の原因として，アカバネウイルス（Akabane virus; AKAV）によるアカバネ病が問題となっている．AKAV が妊娠牛に感染すると，その約 30%程度が胎子へ感染して増殖し，胎子が死亡した場合は死流産が起こる．流産に至らなかった場合も，水頭無脳症や関節弯曲症（四肢の弯曲，脊柱の S 字弯曲等）を伴う先天異常子の娩出等，様々な程度の異常産が起こる[Kurogi et al., 1977]．アカバネ病は 1970年代に全国的に大流行し，72年から75年にかけての流行では約 42,000 頭もの異常産が発生した[Kurogi et al., 1975]．また，近年になっても，アカバネ病の発生は頻繁に報告されている[農林水産省，2017]．さらに 2006 年には，九州地方の若齢牛において，AKAV の生後感染による非化膿性脳脊髄炎が報告されており[Kono et al., 2008; 平田ら，2008]，同様の事例は近年も散発している[高森ら，2013; 大谷ら，2013; 平島ら，2015]．アカバネ病と比較すると発生規模は大きくないが，アイノウイルス（Aino virus; AINOV）によるアイノウイルス感染症や，チュウザンウイルス（Chuzan virus; CHUV）によるチュウザン病も，しばしば発生がみられている[農林水産省，2017]．これらの牛アルボウイルス感染症は，ワクチンの開発及び接種の普及によって発生規模は減少してきているが，

上述の AKAV の生後感染による若齢牛の脳脊髄炎等の病型の変化や，地球温暖化に伴う吸血性節足動物の分布域の拡大等によって，これまで発生のなかった地域においても牛アルボウイルス感染症の発生が確認される等[梁瀬, 2015]，新たな問題が生じている。

加えて，近年はこれまで国内では検出されていなかった新たなアルボウイルスが確認され，牛の疾病への関連が示唆されている．ディアギュラウイルス (D'Aguilar virus; DAGV) は，CHUV と同じくレオウイルス科オルビウイルス属に属する．2001 年から 2002 年にかけて九州地方で発生したチュウザン病は[東條ら, 2003; 松森, 2003]，当初 CHUV によるものと考えられていたが，分離ウイルスの遺伝学的及び血清学的解析により [Ohashi et al., 2004b]，現在では DAGV によるものであったと考えられている．また，AKAV や AINOV と同じくペリブニャウイルス科オルソブニャウイルス属に属する 3 種のウイルス [ピートンウイルス (Peaton virus; PEAV)，サシュペリウイルス (Sathuperi virus; SATV)，シャモンダウイルス (Shamonda virus; SHAV)] が，1999 年以降次々に分離され，それぞれ牛の異常産への関与が示唆されている [Matsumori et al., 2002; Yanase et al., 2004; Yanase et al., 2005]．さらに，2011 年以降，欧州で牛に発熱，下痢，乳量低下及び先天異常子の娩出等を引き起こし，甚大な被害をもたらしているシュマレンベルクウイルス (Schmallenberg virus; SBV) は，SATV と SHAV の遺伝子再集合によって生じたウイルスであることが示唆されており [Yanase et al., 2012]，両ウイルスの侵入が確認されているわが国においても，同様の事象の発生が懸念されている。

牛のアルボウイルス感染症は，感染牛間での直接的な伝播ではなく，吸血性節足動物を介してウイルスが伝播することから，通常の伝染性疾病に対して行われる感染源対策や伝播防止対策が困難である．したがって，適切なワクチン接種による牛群の抗体保有率を上げる発病予防対策が必要となる．現在，国内

では AKAV, AINOV, CHUV, IBAV, PEAV 及び BEFV に対する生または不活化ワクチンが市販されており、関連する疾病の発生予防のために使用されている。一方で、上述のような国内に新たに侵入したウイルスに対しては、現状有効な防除手段は存在しない。また、近年の AKAV 国内流行株の遺伝子型は、子牛の脳脊髄炎の原因となった Iriki 株[Miyazato et al., 1989]に代表される Genogroup I が主体であるが[梁瀬, 2015], ワクチンの原株である OBE-1 株等が属する Genogroup II とは抗原性に若干の相違が認められることが報告されており[Kono et al. 2008], ワクチンの効果を十分に得るためには流行株の抗原性状の把握が必要である。そのため、継続的なサーベイランスによるアルボウイルスの侵入監視及び流行株の性状解析は極めて重要である。

鹿児島県は、九州の南端に位置し、離島も含めると南北約 600km に及ぶ広大な県土を有する。本県の気候は温帯から亜熱帯まで広範囲に及び、年間の平均気温は 18.5°C 程度と温暖であることから（気象庁データ）、アルボウイルスを媒介する吸血昆虫の活動が活発である。また、東シナ海を挟んで大陸に面しているため、常在地から多様なアルボウイルスが頻繁に侵入している[Kato et al., 2016b]。このような地理的及び気候的特性から、本県は様々なアルボウイルスの侵入門戸となりやすいと思われ、牛のアルボウイルス感染症の発生リスクが高く、関連する疾病の発生も頻繁に確認されている[Ogawa and Fujisono, 1992; 渡邊ら, 2000; 東條ら, 2003; 平田ら, 2008]。したがって、本県においてアルボウイルスのサーベイランス及び流行株の詳細な解析を実施する意義は大きいと考えられる。

本論文は、次の 3 章から構成される。第 2 章及び第 3 章では、鹿児島県内で 2013 年及び 2015 年に発生した牛の急性熱性疾患の症例について詳細な病性鑑定を実施し、国内または本土で 20 年以上の長期間発生のなかったイバラキ病及び牛流行熱であることを究明した。また、第 2 章では、遺伝学的及び血清学的

解析により，発生農場において複数の血清型の流行性出血病ウイルス (**Epizootic hemorrhagic disease virus; EHDV**) が同時期に侵入していたことを発見した．第 3 章では，分子疫学的解析により，検出された **BEFV** が過去の国内分離株と遺伝学的に区別され，近年台湾や中国で浸潤している **BEFV** に近縁なウイルスが新たに侵入していたことを確認した．第 4 章では，2015 年冬から 2016 年春にかけて鹿児島県内で発生した体形異常を伴う牛の異常産症例について病性鑑定を実施し，**SHAV** の関与を強く示唆する知見を得た．また，血清学的な遡及調査により，鹿児島県内の飼養牛における過去の **SHAV** の感染状況ならびに関与が示唆される異常産の発生状況について調査した．

第 2 章

複数の血清型の流行性出血病ウイルスの同時浸潤が認められたイバラキ病症例の発生状況と遺伝子解析

1 緒言

イバラキ病は、レオウイルス科 (*Reoviridae*), オルビウイルス属 (*Orbivirus*), EHDV 血清型 2 に属する IBAV による急性熱性疾患であり, 発熱, 食欲不振, 泡沫性流涎, 鼻汁漏出, 結膜充血等を伴う [Omori et al., 1969]. 特徴的な臨床症状は, 食道, 咽喉頭及び舌の変性・壊死に起因する嚥下障害である [Kitano, 2004]. IBAV は 10 分節の 2 本鎖 RNA をゲノムとして有し, ウイルス粒子は 7 つの構造蛋白からなる. 主要な外殻コア蛋白である VP2 は第 2 分節ゲノムにコードされている. VP2 は主要な中和抗原であり, ウイルスの血清型を決定する血清型特異的抗原である [Huismans et al., 1979; Mecham et al., 1988; Anthony et al., 2009]. また, 第 3 分節ゲノムは内殻コア蛋白である VP3 をコードしており, EHDV の異なる血清型の間でも保存性が高いことから, EHDV を網羅的に検出する際に群特異的な抗原として診断に利用されている他 [Ohashi et al., 2004a], 遺伝子解析によりウイルスの分離地域に基づくグルーピング (トポタイプ分類) が可能である [Anthony et al., 2009].

イバラキ病は, ブルータングに類似した急性熱性疾患として, 1959 年に初めて確認された [Omori et al., 1969]. 1959 年から 1960 年にかけてのイバラキ病の流行時においては, 4 万頭以上の牛が発症したと報告されている. その後, 1982 年, 1987 年に南日本で小規模な流行が確認されている [打越ら, 1983; 北野ら, 1988; 岩崎ら, 1990; 内布ら, 2000; 渡邊ら, 2000]. また, 1997 年から 1998 年にかけての発生では, 嚥下障害等のイバラキ病で認められる典型的な症状に加えて, 1,000 例以上の死流産が確認されており, 流産胎子及びその母牛から IBAV

様のウイルスが分離された[Ohashi et al., 1999; 渡邊ら, 2000]. 1997年に分離されたウイルスは、血清学的には IBAV と交差性が認められるものの、ゲノムの遺伝学的には従来の IBAV の相違がみられ、IBAV の変異株と考えられていた [Ohashi et al., 1999; Ohashi et al., 2002]. なお、国内においては、IBAV 以外にも EHDV 血清型 1 に属するウイルス (Kawanabe 株) の浸潤が確認されているが、その病原性については不明である [Miura et al., 1988].

2013年10月、鹿児島県北西部に位置する2農場において、黒毛和種繁殖牛が泡沫性流涎及び嚥下障害を呈したことから、イバラキ病が疑われた。本章では、病性鑑定による病原体の検出、発生農場内において検出されたウイルスの遺伝学的特徴ならびに未越夏牛サーベイランス成績に基づく疫学的考察について述べる。

2 材料及び方法

2-1 発生状況

2013年10月、鹿児島県北西部に位置する農場A及びBにおいて、黒毛和種の繁殖牛2頭がイバラキ病を疑う症状を呈した。農場A及びBはそれぞれ450頭及び15頭の黒毛和種繁殖牛を飼養しており、両農場間は約10 km 離れていた。農場Aの発症牛は、40°Cを超える発熱、泡沫性流涎、嚥下障害、眼球突出及び舌の腫脹を呈し、農場Bの発症牛は、発熱、食欲不振、泡沫性流涎、嚥下障害及び腹部膨満を呈していた。いずれの農場においても、同居牛には同様の症状は確認されなかった。対症的な治療の実施により、発症牛は22～24日後には回復した。なお、両農場とも、イバラキ病に対するワクチン接種は実施されていなかった。

2-2 血液材料の採取

2013年10月25日及び31日に、農場A及びBの発症牛2頭(A-1, B-1)及び非発症同居牛13頭(A-2~6, B-2~9)からへパリン加血を採取した。2,150g, 10分間遠心し、血漿と血球に分離した。血球はリン酸緩衝塩類溶液(Phosphate buffered saline; PBS(-))で3回洗浄後、等量のPBS(-)に再懸濁して洗浄血球とした。また、上記の牛からへパリン加血と同時に血清を採取してプレ血清とし、その約2週間後にポスト血清を採取した。

2013年6月、アルボウイルスのサーベイランスのため、鹿児島県内で飼養されている未越夏牛120頭を選定した。これらの未越夏牛から、6月、8月、9月、10月及び11月にへパリン加血及び血清を採取し、上記と同様に処理した。処理した血漿、洗浄血球は、ウイルス分離及び遺伝子検査に使用するまで-80℃にて冷凍保存した。また、血清については、中和試験に使用するまで-20℃にて冷凍保存した。

2-3 ウイルス分離

ハムスター肺由来株化細胞(HmLu-1)及びハムスター腎臓由来株化細胞(BHK-21)は、0.295%のトリプトースホスフェートブロス、0.015%の炭酸水素ナトリウム及び10%または5%の牛血清をそれぞれ添加したイーグルMEM培地(ニッスイ, 東京, 日本)を増殖培地(Growth medium; GM)とし、37℃にて培養した。これらの細胞を小試験管に播種し、37℃で24時間培養し、定着させた。Earle's液で3回洗浄した後、上述の血漿及び洗浄血球を接種し、37℃で1時間吸着させた。0.295%のトリプトースホスフェートブロス及び0.015%の炭酸水素ナトリウムを添加したイーグルMEMを維持培地(Maintenance medium; MM)とし、接種材料と置換して、細胞変性効果(Cytopathic effect; CPE)の出現を指標に37℃で7日間回転培養した。なお、CPEが観察されない場合はさらに2代盲継代した。

2-4 中和試験

96 ウェル平底マイクロプレートにて 56°C で 30 分間非働化处理した血清 50 μ l を MM で 2 倍階段希釈し (2~4096 倍), 100 TCID₅₀ に調製した等量のウイルス液と混和した. 混合液を 37°C で 1 時間反応させた後, GIT 培地 (Wako, 大阪, 日本) に浮遊させた HmLu-1 細胞を 100 μ l 添加した. 37°C, 5%二酸化炭素下で 1 週間培養後, CPE の有無を指標に判定した. CPE 発現が抑制された最も高い血清希釈倍率を中和抗体価とした.

2-5 ウイルス RNA 抽出, RT-PCR

ウイルスを増殖させた HmLu-1 細胞または BHK-21 細胞の培養上清または洗浄血球から, High Pure Viral RNA Kit (Roche, Mannheim, Germany) を用いてウイルス RNA を抽出した. RT-PCR は, Titan One tube RT-PCR Kit (Roche) を用いて実施した. cDNA 合成は, 50°C・30 分間で実施し, 続いて 94°C・2 分間の加温により逆転写酵素を不活化した. PCR 条件は, 94°C・30 秒間の熱変性, 55°C・30 秒間のアニーリング, 68°C・45 秒間の伸長反応を 10 サイクル行い, その後の 25 サイクルは伸長反応の時間を 1 サイクル当たり 5 秒間ずつ延長した. なお, 洗浄血球より抽出した RNA を用いる際は, さらに 10 サイクル多く実施した.

EHDV の第 3 分節ゲノムの一部配列を増幅する RT-PCR は, EHDV 群特異的プライマーセット EP3U1416F/E31931R[Ohashi et al., 2004a]を使用した. また, EHDV の第 2 分節ゲノムを増幅するため, IBAV 特異的プライマーセット (EHDIBAL2F/EHDIBAL2R-2) ならびに 1997 年の IBAV 変異株に特異的なプライマーセット (EHD97L2F/EHD97L2R) を新たに設計した (表 1-1). さらに, EHDV 血清型 1 を検出するため, 既報[Maan et al., 2010]のプライマ

ーセット (EHDV-1/S2/103-124F/EHDV-1/S2/1021-1001R) を使用した. IBAV の第 2 分節ゲノム全長を増幅するため, 2 組のプライマーセット (IBAVL2-1-17F /EHDIBAL2R-2, EHDIBAV2F/IBAL2R) を使用し, 前者はアニーリング温度を 45℃とした (表 1-1). RT-PCR 産物は 1.5%アガロースゲル/TAE (Tris·acetate·EDTA) で電気泳動し, エチジウムブロマイドで染色後, UV トランスイルミネーターにて可視化した.

表 1-1 EHDV の第 2 分節ゲノムを標的としたプライマー配列.

Oligonucleotide	配列 (5'-3')	Position	Purpose	引用文献
[IBAV]				
IBAVL2-1-17F	GTAAATTTGTCCCCAGA	1-17	RT-PCR, sequencing	
IBAVL2-552-571F	CTATGCATCGGGTCAGGAAC	552-571	sequencing	
IBAVL2-1107-1126F	GCCATATGGGGAGATAATAG	1107-1126	sequencing	
EHDIBAL2F	TACGCAAGGTAAGAGACCAGA	1667-1687	RT-PCR, sequencing	
IBAVL2-2284-2305F	ATGAGGACCTATTACCAAATGTA	2284-2305	sequencing	
IBAVL2-661-642R	GTTCTTCCGTGAAAACATCAAC	661-642	sequencing	
IBAVL2-1212-1193R	GCCACATCATATCTGTTCGC	1212-1193	sequencing	
IBAVL2-1785-1766R	CAGTCATACAGAACGCTCGG	1785-1766	sequencing	
EHDIBAL2R-2	TCTTCTCCACCTCTTGCATT	2283-2264	RT-PCR, sequencing	
IBAL2R	GTAAGTTTGTGTGCCAGTAAACC	3002-2978	RT-PCR, sequencing	[Ohashi et al., 2002]
[EHDV 血清型 1]				
EHDV-1/S2/103-124F	ATATCCTGGGGAAACCATATGG	103-124	RT-PCR, sequencing	[Maan et al., 2010]
EHDV-1/S2/462-481F	GCTCGCATACACCTATGAAT	462-481	sequencing	
EHDV-1/S2/609-590R	ACATCTGGTCGACTATGCCT	609-590	sequencing	
EHDV-1/S2/1021-1001R	ATCTGCCCTGATGTGGTGTGTTG	1021-1001	RT-PCR, sequencing	[Maan et al., 2010]
[IBAV1997 変異株]				
EHD97L2F	GATGGGATCCTATACAAACCATC	499-520	RT-PCR	
EHD97L2R	AATCGTCAGCACCTCTGGTTATC	868-847	RT-PCR	

2-6 シークエンス，分子系統樹解析

QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) で精製した RT-PCR 産物を鋳型として，表 1-1 に示したプライマーセット及び Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて，サイクルシークエンス反応を行った。反応産物は，ABI3100-Avanti Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) による解析に供し，塩基配列を決定した。決定した塩基配列は，GENETYX ver. 10.1.3 software (Genetyx, 東京, 日本) にて編集し，ソフトに付属する GENETYX homology search tools を用いて GenBank 登録配列と比較した。本論で決定した塩基配列は，既知の EHDV (表 1-2) の第 3 分節ゲノムの塩基配列及び第 2 分節ゲノムの VP2 コード領域の推定アミノ酸配列と，それぞれ CLUSTAL W および MUSCLE によりアラインメントを行った後，近隣結合法にて，MEGA6[Tamura et al., 2013]を用いて分子系統樹を作成した。得られた樹形の信頼性は，bootstrap 法を 1,000 回繰り返して検定した。

表 1-2 分子系統樹解析に使用した EHDV 株

株名	血清型	検出場所 (年)	由来	GenBank accession No.	
				第2分節ゲノム	第3分節ゲノム
Ibaraki-2	2	Japan (1959)	Affected cattle	AB078620	AB078621
Y87061	2	Japan (1987)	Cattle	AB078624	AB078625
KSB-14/E/97	本研究	Japan (1997)	Cattle	AB078628	AB078629
KS-7/E/13	本研究	Japan (2013)	Cattle	LC018714	LC042608
Kawanabe	1	Japan (1984)	Cattle	—	LC042606
KS-1/E/13	本研究	Japan (2013)	Cattle	—	LC042607
New Jersey	1	USA (1955)	White-tailed deer	NC_013397	AM744979
Ib Ar 22619	1	Nigeria (1967)	<i>Culicoides</i> spp.	AM745008	AM745009
Alberta	2	Canada (1962)	White-tailed deer	AM744998	AM744999
CSIRO 439	2	Australia (1979)	Cattle	AM744988	AM744989
Ib Ar 33853	4	Nigeria (1967)	<i>Culicoides</i> spp.	AM745018	AM745019
CSIRO 157	5	Australia (1977)	Cattle	AM745028	AM745029
CSIRO 753	6	Australia (1981)	Cattle	AM745038	AM745039
318	6	Bahrain (1983)	Cattle	AM745068	AM745069
CSIRO 775	7	Australia (1981)	Cattle	AM745048	AM745049
DPP59	8	Australia (1982)	Cattle	AM745058	AM745059

3 結果

3-1 EHDV 検出のための RT-PCR

EHDV 群特異的 RT-PCR では、発症牛 2 頭及び非発症同居牛 13 頭中 7 頭から遺伝子が検出された。このうち、発症牛 2 頭 (A-1, B-1) と非発症同居牛 3 頭 (A-3, B-6, B-7) から IBAV に特異的な遺伝子が検出された (表 1-3)。

EHDV 群特異的 RT-PCR で検出された遺伝子産物の塩基配列は、9%の違いで 2 グループに分かれた。発症牛 2 頭 (A-1, B-1) と非発症同居牛 5 頭 (A-3, B-3, B-6, B-7, B-9) から検出された遺伝子の配列は、過去に国内で分離された IBAV の第 3 分節ゲノムの塩基配列に相同性が高く (Ibaraki-2 株, Y87061 株に 97.2 ~97.8%), それ以外の非発症同居牛 2 頭 (A-2, B-5) は、GenBank に登録された EHDV の第 3 分節ゲノムの塩基配列と相対的に相同性が低かった (<92%)。上述の血液サンプルから検出された IBAV の第 2 分節ゲノムの塩基配列は、これまでに分離された IBAV の塩基配列と 95.5~95.6%の相同性であった。

3-2 ウイルス分離

農場 B の非発症同居牛 2 頭 (B-7, B-9) から、BHK-21 細胞に CPE を示すウイルスが 2 株分離され、それぞれ KS-7/E/13 株及び KS-8/E/13 株と命名した (表 1-3)。分離ウイルス 2 株は、EHDV 群特異的 RT-PCR で遺伝子が検出された。加えて、2013 年 9 月から 11 月にかけて採取した未越夏牛の血液サンプルから 6 株のウイルスが分離された。これらのうち 3 株については、EHDV 群特異的 RT-PCR で遺伝子が検出され、それぞれ KS-1/E/13 株, KS-2/E/13 株及び KS-5/P/13 株と命名した。これら以外の 3 株については、既報 [Kato et al., 2016a] のオルビウイルス属特異的な RT-PCR 及びシーケンスにより、DAGV と同定した (data not shown)。

表 1-3 RT-PCR, ウイルス分離及び血清学的検査成績

農場	牛番号	RT-PCR		ウイルス分離 ^{b)}		中和抗体価					
		EHDV		HmLu-1	BHK-21	Ibaraki-2 ^{c)}		KS-1/E/13 ^{c)}			
		第3ゲノム分節	第2ゲノム分節			プレ血清	ポスト血清	プレ血清	ポスト血清		
A	A-1 ^{a)}	+	+	-	NT	1024	1024	2	2	2	2
	A-2	+	-	-	NT	2	8	2	256		
	A-3	+	+	-	NT	2	512	<2	<2		
	A-4	-	-	-	NT	<2	16	<2	<2		
	A-5	-	-	-	NT	<2	<2	<2	<2		
	A-6	-	-	-	NT	<2	<2	<2	<2		
B	B-1 ^{a)}	+	+	-	-	128	1024	4	2	2	2
	B-2	-	-	-	-	<2	512	<2	2	2	2
	B-3	+	-	-	-	512	256	2	2	2	2
	B-4	-	-	-	-	<2	512	<2	2	2	2
	B-5	+	-	-	-	2	4	16	128		
	B-6	+	+	-	-	64	128	<2	8	8	8
	B-7	+	+	-	+ (KS-7/E/13)	8	256	<2	<2	<2	<2
	B-8	-	-	-	-	<2	2	<2	<2		
	B-9	+	-	-	+ (KS-8/E/13)	<2	128	<2	2	2	2

a) 発症牛, b) 括弧内は分離株名を示す, c) 中和試験に使用したウイルス株名を示す, NT : not tested

発生農場及び未越夏牛より分離されたウイルス 5 株について、IBAV, 1997 年の IBAV 変異株及び EHDV 血清型 1 の第 2 分節ゲノムを標的とした血清型特異的 RT-PCR を実施したところ、KS-7/E/13 株及び KS-8/E/13 株から IBAV の第 2 分節ゲノムに特異的な増幅が検出された (図 1-1)。一方、KS-1/E/13 株、KS-2/E/13 株及び KS-5/P/13 株からは、EHDV 血清型 1 の第 2 分節ゲノムに特異的な増幅が検出された。1997 年の IBAV 変異株に特異的な遺伝子は検出されなかった。

KS-7/E/13 株及び KS-8/E/13 株より検出された第 2 及び第 3 分節ゲノムの塩基配列は、発症牛 2 頭 (A-1, B-1) と非発症同居牛 3 頭 (A-3, B-6, B-7) から検出された配列と相同であった。また、非発症同居牛 2 頭 (B-3, B-9) より検出された第 3 分節ゲノムの遺伝子の塩基配列は、KS-7/E/13 株及び KS-8/E/13 株に相同であった。KS-1/E/13 株、KS-2/E/13 株及び KS-5/P/13 株より検出された第 3 分節ゲノムの塩基配列は、非発症同居牛 2 頭 (A-2, B-5) から検出された同じ分節ゲノムの配列に一致していた。KS-1/E/13 株、KS-2/E/13 株及び KS-5/P/13 株の第 2 分節ゲノムの塩基配列は、国内 (Kawanabe 株) 及びオーストラリア (DPP2209 株) で分離された EHDV 血清型 1 にそれぞれ 97.3%及び 96.8%一致していた。VP2 コード領域の推定アミノ酸配列の比較解析において、KS-1/E/13 株、KS-2/E/13 株及び KS-5/P/13 株の当該領域の配列は、Kawanabe 株及び DPP2209 株にそれぞれ 99.3%及び 98.3%相同であった。

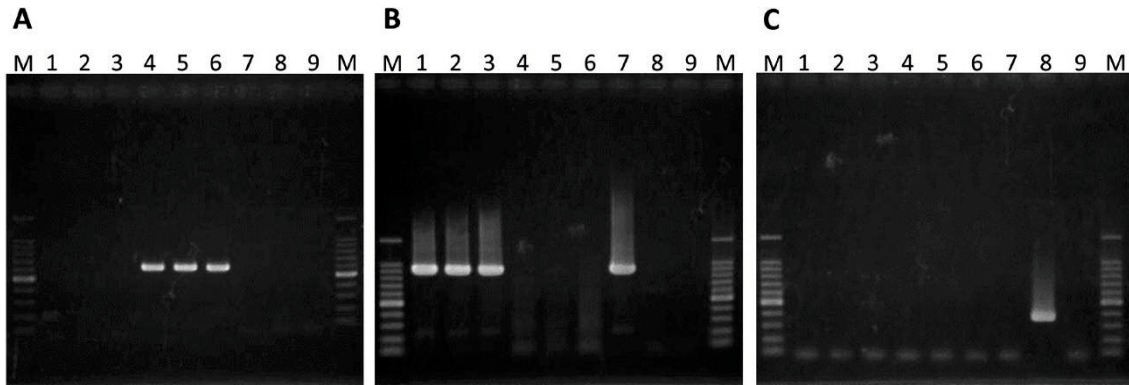


図 1-1 EHDV の第 2 分節ゲノムを標的とした RT-PCR 産物の泳動像.

(A) IBAV 特異的プライマーセット (目的バンドサイズ : 617 bp)

(B) EHDV 血清型 1 特異的プライマーセット (目的バンドサイズ : 919 bp)

(C) IBAV 1997 年変異株に特異的なプライマーセット (目的バンドサイズ : 370 bp)

各レーンの検体は下記のとおり.

1: KS-1/E/13 株, 2: KS-2/E/13 株, 3: KS-5/P/13 株, 4: KS-7/E/13 株, 5: KS-8/E/13 株,
6: IBAV Ibaraki-2 株, 7: EHDV 血清型 1 Kawanabe 株, 8: IBAV 1997 年変異株
KSB-14/E/97 株, 9: water (陰性コントロール), M: 100 bp DNA ラダーマーカー

3-3 中和試験

IBAV (Ibaraki-2 株) を用いた中和試験により, 発症牛 2 頭 (A-1, B-1) 及び非発症同居牛 7 頭 (A-3, B-2, B-4, B-6, B-7, B-9) のポスト血清で, 128~1,024 倍の中和抗体価で IBAV に対する抗体が検出された (表 1-3). 一方, 非発症同居牛 2 頭 (A-2, B-5) では, ポスト血清で KS-1/E/13 株に対し 128~256 倍の抗体価で抗体が検出された. 両ウイルス間の交差性は 8 倍未満で大きくなく, 両方のウイルスに対して抗体価の高いサンプルはなかった. 未越夏牛の IBAV に対する抗体陽転は, 2013 年の 10 月から 11 月にかけて, 鹿児島県北東部に位置する 3 農場 6 頭で確認された.

3-4 EHDV の分子系統樹解析

EHDV の第 3 分節ゲノムの一部配列に基づく分子系統樹において、本研究における分離株 2 株 (KS-7/E/13 株及び KS-1/E/13 株) を含む日本国内分離株及びオーストラリア分離株は単一のクラスターを形成した (図 1-2)。しかし、Kawanabe 株と KS-1/E/13 株は其中でさらに単一のクレードを形成し、他の株とは比較的低い関連性であった。KS-7/E/13 株の第 2 分節ゲノムの 2,960 塩基の配列及び推定される VP2 蛋白の 982 残基のアミノ酸配列は、国内分離株である Ibaraki-2 株及び Y87061 株とは、それぞれ塩基配列レベルで 95.6%及び 96.1%、アミノ酸配列レベルで 97.5%及び 98.2%相同であった。なお、オーストラリア (CSIRO439 株) 及び北米 (Alberta 株) で分離された EHDV 血清型 2 の株とは、それぞれ塩基配列レベルで 93.0%及び 71.3%、アミノ酸配列レベルで 96.0%及び 73.6%の相同性であった。一方、KS-7/E/13 株と 1997 年の IBAV 変異株 (KSB-14/E/97 株) は、塩基配列レベルで 69.7%、アミノ酸配列レベルで 67.5%の相同性であり、大きく異なっていた。EHDV の VP2 コード領域の推定アミノ酸配列に基づく分子系統樹では、KS-7/E/13 株は過去の IBAV 分離株と同じクラスターに属した (図 1-3)。一方、KSB-14/E/97 株は、他の EHDV 血清型 2 との関連性は低く、EHDV 血清型 7 (CSIRO775 株) と同じクレードに含まれた。

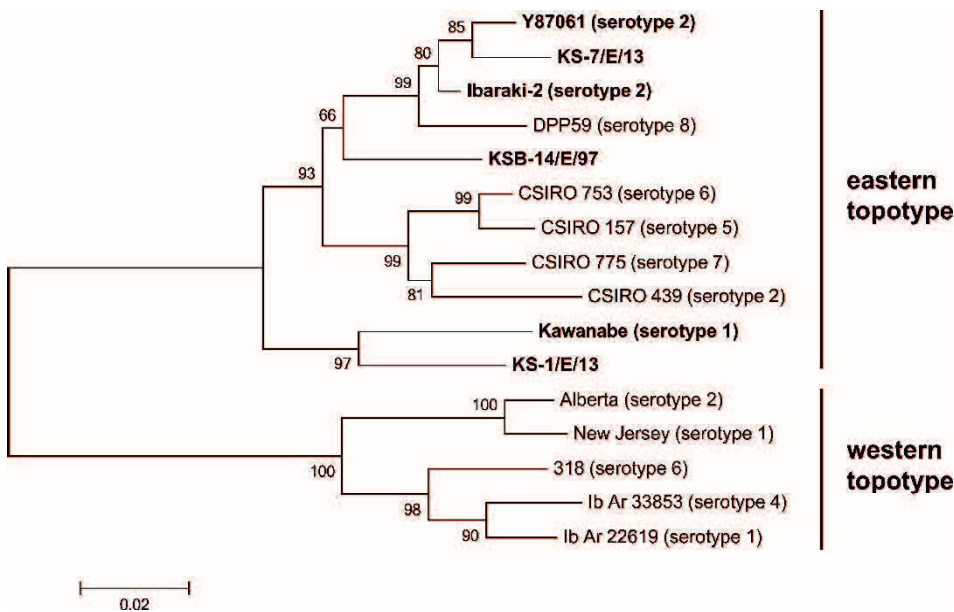


図 1-2 EHDV の第 3 分節ゲノムの塩基配列（一部）に基づく分子系統樹. 国内分離株は太字にて示す. 系統樹上の数値はブートストラップ値を示す（1,000 回演算，百分率にて示す）.

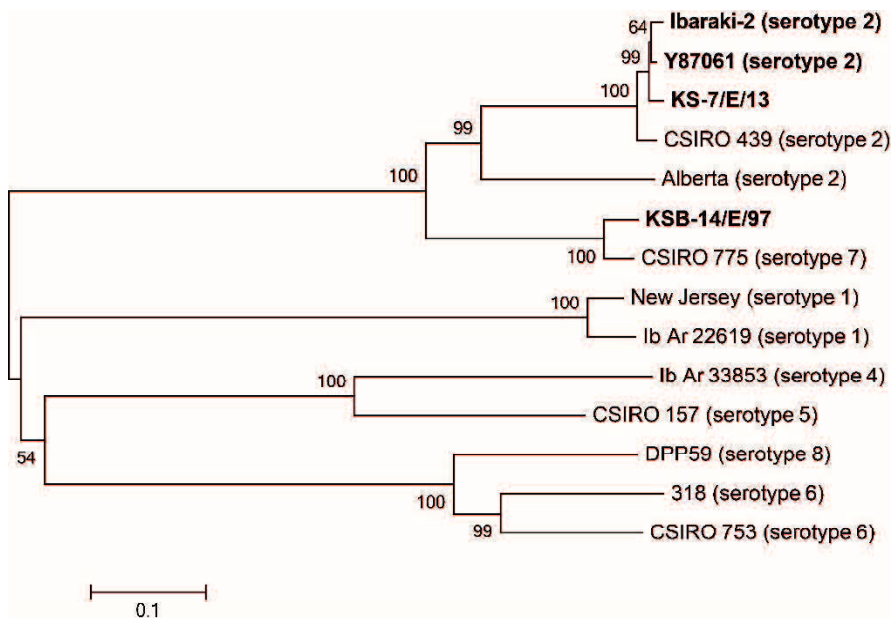


図 1-3 EHDV の VP2 全長の推定アミノ酸配列に基づく分子系統樹. 国内分離株は太字にて示す. 系統樹上の数値はブートストラップ値を示す（1,000 回演算，百分率にて示す）.

4 考察

2013年10月に鹿児島県内で発生した2症例は、嚥下障害等のイバラキ病に典型的な臨床症状に加え、IBAV 遺伝子及び抗体が検出されたことから、イバラキ病と診断した。発生農場で分離されたIBAVは、これまでのIBAV分離株に遺伝学的に近縁であり、同様の病原性を維持し、イバラキ病に典型的な臨床症状の発症に関与したと考えられた。一方で、IBAVの変異株と考えられていたKSB-14/E/97株はIBAVを含むEHDV血清型2とは関連性が低く、EHDV血清型7に分類された。1997年から1998年にかけてのイバラキ病流行時、発症牛からはIBAVに対する抗体が検出されていたが[渡邊ら, 2000; 内布ら, 2000], これはIBAVとEHDV血清型7の間にある低レベルの血清学的交差性によるものと考えられ、正確な診断には血清学的検査に加え、遺伝学的及びウイルス学的検査成績を含めた総合的判断が必要と考えられた。

2013年のイバラキ病発生時において、EHDV血清型1がIBAVと同地域及び同農場で広がっていた。EHDV血清型1は、北米における野生鹿の出血性病変や、牛の熱性疾患に関与することが報告されているが[Murphy et al., 2006; Cêtre-Sossah et al., 2014], 他の地域では反芻獣の死亡に関与した報告はない[Savini et al., 2011]. したがって、わが国における過去に感染が広がった際と同様に[Miura et al., 1988], EHDV血清型1は2013年のイバラキ病発生には関与していないと考えられる。日本で分離されたEHDV血清型1 (Kawanabe株, KS-1/E/13株)は、第3ゲノム分節の塩基配列に基づく分子系統樹により、イースタントポタイプに分類されるが、他の国内及びオーストラリア分離株とは区別された。このことは、EHDV血清型1の国内分離株が、進化の中で他の株から地理的に隔離されたことを示している。

他の分節ゲノムをもつウイルスと同様に、異なる血清型のEHDVが同時感染すると、遺伝子再集合が起こる可能性がある[Allison et al., 2012; Anbalagan et

al., 2014]. 今回のイバラキ病発生農場における IBAV と EHDV 血清型 1 の同時浸潤は、それらのウイルス間での遺伝子再集合の可能性を示唆する。一方で、両ウイルスが同時期に浸潤していたにもかかわらず、遺伝学的及び血清学的解析により、両ウイルスの同一個体への感染は確認されなかった。ブルータングウイルスの血清型 1 及び 8 を実験的に同時感染させた場合、2 つのウイルス間における干渉作用によって、それぞれのウイルスの増殖が抑制された報告があり [Dal Pozzo et al., 2013], 今回も同様の現象が起こっていた可能性がある。今後、2013 年に分離された EHDV のフルゲノム解析により、遺伝子再集合が起こっているかを検討する必要がある。

未越夏牛における IBAV に対する抗体陽転はしばしば報告されていたが[本川ら, 2002], EHDV 血清型 2 による真性のイバラキ病発生は、国内では 26 年間確認されていなかった。今回、イバラキ病の発生及び未越夏牛の IBAV の抗体陽転は、鹿児島県の北西部に限定されており、他県においてもイバラキ病の発生はなかった[農林水産省, 2017]。未越夏牛のサーベイランスにおいて、IBAV の抗体陽転は 10 月から 11 月にかけてみられていたが、当該時期における発生農場や抗体陽転農場に近い 4 か所の観測地点における平均気温は、10 月初め～中旬には 20℃前後であったが、11 月には急激に低下した(気象庁データ)。IBAV を媒介する *Culicoides* 属ヌカカの飛翔能力は、20℃以下で著しく減少することが報告されており [Tsutsui et al., 2011], *Culicoides* 属ヌカカの飛翔に適さない温度条件が、吸血行動を抑制し、ウイルス拡散と疾病の発生を狭い地域にとどめた可能性がある。

Ibaraki-2 株と KS-7/E/13 株の間には VP2 蛋白コード領域の推定アミノ酸配列にはわずかな差しかなく、Ibaraki-2 株を原株とした現行のワクチンは、近年の野外株に対し、依然として有効と考えられる。1959 年の流行では、8 月に九州及び四国地方で最初に確認され、4 か月の間に関東地方までイバラキ病が拡が

った[Omori et al., 1969]. このことは, IBAV の侵入時期や抗体保有状況によっては, かつてのようなイバラキ病の大流行を引き起こす可能性を示唆している. 今回の 26 年ぶりのイバラキ病発生は, 発生リスクが依然として国内に存在していることを示す貴重な症例であった. 一方で, 鹿児島県内におけるイバラキ病に対するワクチン接種率は低いことが報告されており[中嶋ら, 2005], 現在も同様の状況と考えられる. 今後も継続的なワクチン接種によって抗体保有率を上昇させるとともに, サーベイランスによってウイルス侵入状況を監視する必要がある.

第3章

2015年に発生した牛流行熱と検出ウイルスの遺伝学的及び疫学的考察

1 緒言

牛流行熱 (Bovine ephemeral fever; BEF) は, ラブドウイルス科 (*Rhabdoviridae*) エフェメロウイルス属 (*Ephemerovirus*) に属する BEFV による牛及び水牛における急性熱性疾患である [Walker et al., 2015]. BEF 発症牛は突然の発熱 (40~42 °C), 食欲不振, 沈鬱, 呼吸促拍, 流涙, 泡沫性流涎, 関節炎, 歩様踳踉及び起立不能を呈し, 低率だが, 妊娠牛が流産を起こすこともある. 通常, 致死率は 1%未満と低く, 多くの症例で発症牛は軽度~中程度の症状を呈し数日で回復するが, しばしば重度の肺気腫を伴う肺炎を起こす. また, 乳用牛では, BEF は泌乳停止や乳量減少を呈するため, 甚大な経済的被害をもたらす [St. George, 2004; Walker et al., 2015].

BEFV のウイルス粒子は弾丸状の形状をもち, 約 14.9 kb のマイナス 1 本鎖 RNA をゲノムとして有する [Walker et al., 2015]. ウイルス粒子の構造蛋白のうち, 外被糖蛋白質 (G 蛋白) はウイルス粒子表面にスパイク状に突出し, 免疫反応を惹起する. G 蛋白上には, 3 つの主要な中和エピトープ (G1, G2, G3) がモノクローナル抗体を用いた解析により同定されている [Cybinski et al., 1990; Cybinski et al., 1992]. BEFV は吸血性節足動物によって媒介されると考えられているが, 国内における主要な媒介種は未だ明らかになっていない.

日本国内における BEF の流行は 1950 年代から繰り返し発生している [Shirakawa et al., 1994]. 最も大規模な流行は 1949 年から 1951 年にかけてであり, 770,000 例の発生と 10,000 頭以上の死亡が報告されている [稲葉, 1971]. 日本本土の最後の BEF 発生は 1992 年であり, それ以降は沖縄県の八重山諸島及び近隣の多良間島でのみ確認されている [相澤ら, 2008; Niwa et al., 2015].

Hayama et al., 2016]. 現在まで国内で使用されているワクチンは、1966年に山口県で分離された YHL 株に由来している [Inaba et al., 1973].

2015年9月、鹿児島県本土南西部において、発熱、泡沫性流涎、起立不能を呈した牛が発見され、さらに翌月には同様の症例が、約40 km 南に離れた種子島で確認された。2015年9月末には、沖縄県において BEF の発生が確認されていたことから [農林水産省, 2017], BEF を疑って検査を実施した。本章では、病性鑑定成績とともに、検出されたウイルスの遺伝子解析及び疫学的考察について述べる。

2 材料及び方法

2-1 発生状況

2015年9月29日、鹿児島県本土の南部に位置する農場 A1 にて、3頭の繁殖牛が40°C以上の発熱、元気消失、食欲不振、呼吸器症状、跛行及び起立困難を呈した (表 2-1)。なお、飼養牛61頭中20頭が、8月7日から10月8日にかけて同様の症状を呈していた。同様の発症牛は、10月上旬に農場 A1 の1 km 圏内の3農場 (A2~A4) でも認められた (表 2-1)。それぞれの農場は、黒毛和種を45頭から92頭飼養していた。さらに、9月24日から10月5日までの期間に、種子島の2農場 (B1, B2) において、突然の発熱、元気消失、食欲不振、鼻汁漏出、起立困難が4頭で確認された (表 2-1)。農場 B1 と B2 の間の距離は約300 m であり、それぞれ15頭及び7頭の黒毛和種を飼養していた。全ての発症牛に対して対症的な治療が実施され、いずれも2~3日後に回復した。

表 2-1 臨床症状, RT-PCR 及び抗体検査成績, 括弧内はシークエンス解析及び分子系統樹解析に使用した検体名を示す.

地域	農場	報告日 (採材日)	牛番号	臨床症状	発症日	発症/回復	RT-PCR ^{a)}	中和抗体価	
								プレ	ポスト
A1		9/29 (9/30)	A1-1	発熱 (41.0°C), 元気消失, 食欲不振, 呼吸器症状	9/27	発症	+	2	128
			A1-2	発熱 (40.6°C), 元気消失, 食欲不振	9/29	発症	+	<2	16
			A1-3	発熱 (40.8°C), 元気消失, 食欲不振	9/30	発症	+ (KS-BEF-1)	<2	32
			A1-4	発熱, 元気消失, 食欲不振	8/7	回復	-	64	256
			A1-5	発熱, 元気消失, 食欲不振	9/11	回復	-	8	256
			A1-6	発熱, 元気消失, 食欲不振, 跛行	8/26	回復	-	128	256
A2		10/2 (10/2)	A2-1	発熱 (41.0°C), 元気消失, 食欲不振	9/7	回復	-	128	128
			A2-2	発熱 (40.1°C), 元気消失, 食欲不振	9/13	回復	+	32	128
			A3-1	発熱 (42.0°C), 元気消失, 食欲不振	9/30	発症	+	<2	64
			A3-2	発熱 (39.8°C), 元気消失, 食欲不振	9/22	回復	-	64	512
			A3-3	発熱 (39.7°C), 元気消失, 食欲不振, 動作緩慢	9/25	回復	-	<2	32
A3		10/2 (10/2)	A3-4	発熱 (41.0°C), 元気消失, 食欲不振, 歩様異常	9/26	回復	+	8	128
			A3-5	発熱 (40.5°C), 元気消失, 食欲不振, 歩様異常	9/27	回復	+	<2	16
			A4-1	発熱 (41.6°C), 元気消失, 食欲不振, 動作緩慢	10/6	発症	+	<2	128
			A4-2	無症状	-	-	-	<2	2
			A4-3	無症状	-	-	-	<2	<2
A4		10/7 (10/7)	B1-1	発熱 (40.2°C), 元気消失, 食欲不振, 起立困難, 鼻汁漏出	10/4	発症	+ (KS-BEF-2)	2	8
			B1-2	発熱 (39.6°C), 元気消失, 食欲不振, 鼻汁漏出	9/24	回復	-	16	8
			B1-3	発熱 (39.5°C), 元気消失, 食欲不振,	9/27	回復	-	32	32
			B1-4	無症状	-	-	-	<2	2
			B1-5	無症状	-	-	-	128	256
			B1-6	無症状	-	-	-	2	<2
B2		10/7	B2-1	元気消失, 食欲不振, 白血球減少症	10/5	発症	+	2	128

(10/7)	B2-2	無症状	-	-	.	<2	2
	B2-3	無症状	-	-	.	<2	<2

2-2 血液材料の採取

6農場 (A1~4, B1, B2) において、発症牛 7 頭及び回復牛 11 頭、非発症同居牛 7 頭から、2015 年 9 月 30 日、10 月 2, 5, 7 日にヘパリン加血を採取した (表 2-1)。2,150 g、10 分間遠心して血漿と血球を分離し、血球は PBS(-) で 3 回洗浄した後、等量の PBS(-) に再懸濁して洗浄血球とした。また、上記の牛からヘパリン加血と同時に血清を採取してプレ血清とし、その約 2 週間後にポスト血清を採取した。

2015 年 6 月、アルボウイルスのサーベイランスのため、鹿児島県内で飼養されている未越夏牛 120 頭を選定した。これらの未越夏牛から、6 月、8 月、9 月、10 月及び 11 月にヘパリン加血及び血清を採取し、上記と同様に処理した。また、2015 年 10 月 23 日に農場 B1 及び B2 の周囲 1 km に位置する農場で健常牛 13 頭から血清を追加採材した。処理した血漿、洗浄血球は、ウイルス分離及び遺伝子検査に使用するまで -80°C にて冷凍保存した。また、血清サンプルについては、中和試験に使用するまで -20°C にて冷凍保存した。

2-3 ウイルス分離

ハムスター肺由来株化細胞 (HmLu-1)、ハムスター腎臓由来株化細胞 (BHK-21) 及びアフリカミドリザル腎臓由来株化細胞 (Vero) は、0.295 % のトリプトースホスフェートブロス、0.015 % の炭酸水素ナトリウム及び 5~10% の牛胎子血清 (Fetal bovine serum; FBS) を添加したイーグル MEM 培地 (ニッスイ) を増殖培地 (GM) とし、 37°C にて培養した。これらの細胞を小試験管に播種し、 37°C で 24 時間培養し、定着させた。Earle's 液で 3 回洗浄した後、上述の洗浄血球を接種し、 37°C で 1 時間吸着させた。0.295 % のトリプトースホスフェートブロス及び 0.015 % の炭酸水素ナトリウムを添加したイーグル MEM を維持培地 (MM) とし、接種材料と置換して、CPE の出現を指標に 34°C

で7日間回転培養した。なお、CPEが観察されない場合はさらに2代盲継代した。

2-4 中和試験

96 ウェル平底マイクロプレートにて56°Cで30分間非働化処理した血清50 μ lをMMで2倍階段希釈し(2~4,096倍), 100 TCID₅₀に調製した等量のBEFV YHL株のウイルス液と混和した。混合液を37°Cで1時間反応させた後, GIT培地(Wako)に浮遊させたHmLu-1細胞を100 μ l添加した。37°C, 5%二酸化炭素下で1週間培養後, CPEの有無を指標に判定した。CPE発現が抑制された最も高い血清希釈倍率を中和抗体価とした。

2-5 ウイルス RNA 抽出及び RT-PCR

上述の洗浄血球から, High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche) 用いてウイルス RNA を抽出した。BEFV の G 蛋白をコードする遺伝子 (G 遺伝子) の一部配列を検出するプライマーセット (BEFV-AO-F/BEFV-AO-R) [Niwa et al., 2015]を用いた RT-PCR を, One step RT-PCR Kit (QIAGEN) を用いて実施した。RT-PCR 産物を 1.5 %アガロースゲル/TBE (Tris-borate-EDTA) を用いて電気泳動し, GelRed (Wako) にて染色後, UV トランスイルミネーターで可視化した。

また, BEFV の G 遺伝子の全長を増幅するため, プライマーセット gpF1/gpR1872 [Ting et al., 2014]を用いた RT-PCR を, PrimeScript™ RT-PCR Kit ver. 2 (Takara, 草津, 日本) を用いて実施した。得られた RT-PCR 産物を 1.5%アガロースゲル/TAE にて電気泳動し, エチジウムブロマイドにて染色後, UV トランスイルミネーターで可視化した。

2-6 シークエンス及び分子系統樹解析

High Pure PCR Cleanup Micro Kit (Roche) または QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) で精製した RT-PCR 産物を鋳型として, Big Dye Terminator v3.1 Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いたサイクルシークエンス反応を実施した. 反応産物は, ABI 3100-Avanti Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) による解析に供し, 塩基配列を決定した. 決定した塩基配列の編集及びアミノ酸配列の推定は, GENETYX ver. 10.1.3 software (Genetyx) にて行い, ソフトに付属する GENETYX homology search tools (Genetyx) を用いて, 検出された RT-PCR 産物の塩基配列及びアミノ酸配列と, GenBank 登録配列とを比較した. 本論で決定した塩基配列は, 既知の BEFV の G 遺伝子の塩基配列 (塩基長 1,823bp) と, CLUSTAL W によりアラインメントを行ったのち, 近隣結合法にて, MEGA6[Tamura et al., 2013]を用いて分子系統樹を作成した. 得られた樹形の信頼性は, bootstrap 法を 1,000 回繰り返して検定した.

2-7 吸血昆虫の採集

6W ブラックライト蛍光灯、または紫外線 LED を誘引光源とした吸引型ライトトラップ[Yanase et al., 2011; 梁瀬ら, 2014]を牛舎内に一晚設置し, 吸血昆虫を採取した. 未吸血の生きた雌を選別し, 実体顕微鏡下で形態学的特徴に基づいて種を分類した. 採集した吸血昆虫の一部は, 吸血済みの雌個体を 25°C の環境下で 3 日間飼育して血液を消化させ, 生存個体を種ごとに分別した. 吸血昆虫は, 採集場所及び種ごとにプールし, ウイルス分離に供するまで-80°C に保存した. 吸血昆虫からのウイルス分離は, 既報[Yanase et al., 2005]の方法により, BHK-21 細胞を用いて実施した.

3 結果

3-1 RT-PCR 及びウイルス分離

BEFV の G 遺伝子の一部配列を増幅する RT-PCR では、発症牛 7 頭 (A1-1~3, A3-1, A4-1, B1-1, B2-1) 及び回復牛 3 頭 (A2-2, A3-4, A3-5) から遺伝子が検出された。各農場で検出された BEFV 遺伝子を比較したところ、それぞれの塩基配列は一致しており、過去に分離された BEFV の G 遺伝子と高い相同性 (87.5 ~100%) であった。なお、発症牛、回復牛及び非感染牛から採取した 25 検体の洗浄血球をウイルス分離に供したが、ウイルスは分離されなかった。

3-2 中和抗体試験

7 頭全ての発症牛及び 11 頭中 6 頭の回復牛で、BEFV 抗体価の有意な上昇が認められた (表 1)。また、それ以外の回復牛は、プレ血清の時点で高い抗体価を有していた (16~128 倍)。農場 B1 の非発症同居牛 (B1-5) からは、高い抗体価が確認された (256 倍)。なお、プレ血清時点で BEFV 抗体価 16 倍以上の牛からは、RT-PCR では BEFV 遺伝子は検出されなかった。農場 B1 及び B2 より 1 km 圏内の 7 農場で実施した血清学的サーベイランスでは、抗体は検出されなかった。また、未越夏牛のアルボウイルスサーベイランスにおいて、BEFV に対する抗体は検出されなかった。

3-3 G 遺伝子の相同性比較及び分子系統樹解析

2 頭の発症牛 (A1-3, B1-1) の血液サンプルより抽出したウイルス RNA から、BEFV の G 遺伝子全長 (プライマー結合部位を含む 1,827 塩基) を増幅し、それぞれ KS-BEF-1 株及び KS-BEF-2 株と命名した。2 株間に塩基の置換は認められず、1988 年から 2012 年にかけて国内で分離された BEFV に塩基配列レベ

ルで 96.3～96.8%，アミノ酸レベルで 98.7～99.3% 相同であった（表 2-2）。なお、YHL 株との相同性は塩基配列レベルで 95.7%，アミノ酸レベルで 98.5% と相対的に低かった。2015 年に検出された 2 株は、2013 年から 2014 年にかけて台湾に侵入した株とほぼ一致していた（塩基配列レベルで 99.7～99.8%，アミノ酸レベルで 99.7～99.8%）。また、近年中国で分離された BEFV は、2015 年の国内検出株と高い相同性であった（塩基配列レベルで 98.9～99.1%，アミノ酸レベルで 99.0～99.1%）。なお、オーストラリアや中東で分離された BEFV は、2012 年にトルコで分離された株を除き、2015 年の国内検出株との相同性は低かった（塩基配列レベルで 89.5～92.3%，アミノ酸レベルで 94.3～97.4%）。

G 遺伝子の塩基配列に基づく分子系統樹解析で、KS-BEF-1 株及び KS-BEF-2 株は、2013 年から 2014 年の台湾分離株及び 2011 年から 2012 年の中国分離株と同じクレードに属し、これまでの国内分離株とは区別された（図 2-1）。また、2012 年にトルコで分離された 3 株（2012/TR/CU15, 2012/TR/CU16, 2012/TR/CP3）がこれらと同じクレードに含まれた。

3-4 吸血昆虫に関する検討

農場 A1～3 で採集した 1,692 匹の *Culicoides* 属ヌカカ及び 2 匹の蚊をウイルス分離に使用した。なお、最も優勢な種は *Culicoides lungchiensis* (1,486 匹) であり、加えて 8 種類 (*C. arakawae*, *C. cylindratus*, *C. jacobsoni*, *C. ohmorii*, *C. oxystoma*, *C. punctatus*, *C. sumatrae*, *C. tainanus*) のヌカカが少数ながら採取されていた (1～168 匹)。なお、サンプルの状態が悪く、採取された蚊の種を同定することは困難であった。これらのサンプルからウイルスは分離されなかった。

表 2-2 2015 年国内流行株と東アジア分離株の G 遺伝子の塩基配列及び推定アミノ酸配列の相同性比較.

	塩基配列の相同性 (%)	推定アミノ酸配列の相同性 (%)
台湾分離株 (2013–2014)	99.7 – 99.8	99.7 – 99.8
中国分離株 (2011–2012)	98.9 – 99.1	99.0 – 99.7
台湾分離株 (1984–2013)	96.2 – 97.0	98.2 – 99.5
日本分離株 (1988–2012) a)	96.3 – 96.8	98.7 – 99.3
中国分離株 (2002)	96.7	99.2
中国分離株 (1976)	96.2	98.2
YHL 株 a)	95.7	98.5

a) G 遺伝子の短い配列 (1,821 nt, 607 aa) を相同性比較に使用した.

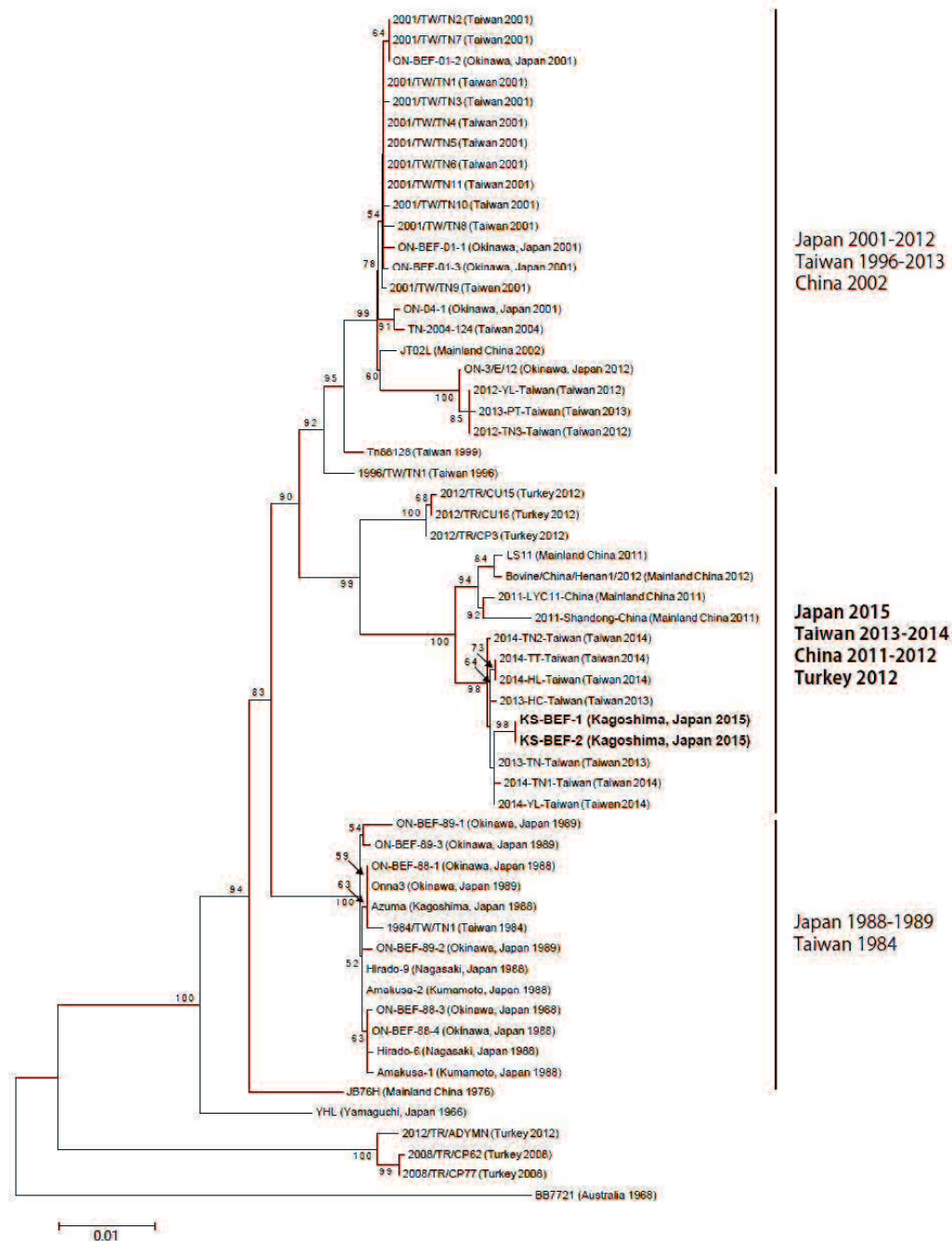


図 2-2 BEFV の G 遺伝子の塩基配列に基づく分子系統樹. 本研究における検出株を太字にて示す. 系統樹上の数値はブートストラップ値を示す (1,000 回演算, 百分率にて示す).

4 考察

発症牛の臨床症状及び病性鑑定成績から、6 症例を BEF と診断した。八重山諸島においては近年でも BEF 発生が見られていたが[相澤ら, 2008; Hayama et al., 2016], 今回の発生は日本本土における 23 年ぶりの BEF 発生であった。発生農場においては、初発牛が発見される数週間前から同様の症状がみられていたが、今回の発生は散発的かつ小規模であり、また、発症牛の症状が比較的軽度であったことから、発見の遅れを招いたと考えられた。なお、農場 A1 で妊娠牛 2 頭が流産しているが、BEFV の関与は不明である。過去に日本本土で報告されている BEF の事例では広範囲での流行が認められていたが[稲葉ら, 1971; Nagano et al., 1990; Shirakawa et al., 1994], 2015 年の発生地域は限定的であった。発生地域は比較的飼養密度の低い地域であったことに加え、発生農場では発生後早期に殺虫剤散布が行われていた。これらの要因が、広域へのウイルス拡散を抑制したのかもしれない。

RT-PCR において、発症後 6 日目までの感染牛の血液から BEFV に特異的な遺伝子が検出されており、BEF 診断における RT-PCR の有効性が確認された。なお、発症後 19 日の回復牛 1 頭 (A2-2) から、弱陽性のバンドが検出された。BEFV のウイルス血症は 2~8 日間とされているが[Zheng et al., 2016], 検出限界に近いレベルの BEFV の微量な遺伝子断片が血液サンプル中に含まれており、RT-PCR で検出された可能性がある。

検出された BEFV の G 遺伝子の一部配列は、全ての農場で一致していた。今回の BEF は県本土と種子島の 2 地域で発生し、発生農場間は約 100 km 離れているが、両地域で BEF を引き起こした BEFV が同一起源であることを示している。過去の BEF 流行時には、気流によって媒介節足動物が長距離伝播したことが示唆されている[Nagano et al., 1990; Finlaison et al., 2010; Aziz-Boaron et al., 2012; Hayama et al., 2016]. 今後、2012 年から 2013 年の事例と同様に

[Hayama et al., 2016], 気象モデルを用いて 2015 年の流行時における媒介節足動物の飛来源について解析する必要がある。

BEFV の G 遺伝子全長の塩基配列に基づく分子系統学的解析により, これまで分離された BEFV は, オーストラリア, 中東及び東アジアの 3 地域の系統に分類されている [Trinidad et al., 2014]. さらに, 東アジア系統は年代ごとに, 3 つのクレードに細分される [Niwa et al., 2015; Ting et al., 2016]. 2015 年の国内流行株は, 過去の国内分離株と系統学的に区別され, 2013 年~2014 年の台湾分離株, 2011 年~2012 年の中国分離株及び 2012 年トルコ分離株と同じクレードに含まれた. このクレードに含まれる BEFV は, まず中国本土で 2011 年に感染が拡がり, 2013 年~2014 年に台湾へ侵入したと考えられる [Zheng et al., 2012; Ting et al., 2016]. 今回実施した分子系統樹解析の結果, 2015 年の国内流行株と, 近年の台湾及び中国の株との間に疫学的関連があることが示された. また, BEFV の遺伝子グループの変換は東アジアで急速に起こったと考えられる.

これまでのところ, 国内における BEFV の主要な媒介節足動物は明らかになっていない. 今回, 発生農場においても, 蚊とともに多くの *Culicoides* 属ヌカカが採集されたが, ウイルスは分離されず, 媒介種の特定には至らなかった. 先行研究では, ヌカカに BEFV を実験的に経口摂取させても増殖が確認されなかったことが報告されている [Venter et al., 2003]. また, 蚊は BEFV の媒介節足動物として疑われているが, 今発生農場における採集数は少なく, 主要な媒介種ではなかったと思われる. BEFV 伝播における蚊及びヌカカの役割は未だ不明であり, 今後更なる検証が必要と考えられる.

ワクチン接種は, BEF の防除に最も効果的な手段である. 国内で使用されている現行の BEF ワクチンの原株である YHL 株と, 近年東アジアで循環している BEFV との間にアミノ酸の置換は蓄積しているが, 中和エピトープ部位の A

ミノ酸配列は比較的保存されていると考えられている。2015年の国内流行株とYHL株の中和エピトープ部位の推定アミノ酸配列の相違は2アミノ酸残基のみであった（170番目のアスパラギン及び223番目のアスパラギン酸が、それぞれスレオニンとグルタミン酸に置換）。加えて、2015年の国内流行株に感染した牛では、YHL株に対する高い抗体が誘導されていた。したがって、YHL株と現在東アジアで循環しているBEFVの間には抗原的に大きな違いはなく、用法どおり適切に接種を行えば、依然としてワクチンは有効と考えられる。一方、イスラエルで発生したBEF事例においては、不活化ワクチンは強い抗体反応を誘導するが、3回接種後も50%にしか発病抑制効果がなかったことが報告されている[Aziz-Boaron et al., 2012]。加えて、ワクチン接種によって誘導された免疫反応は長期には持続しないと考えられることから[Aziz-Boaron et al., 2012; Ting et al., 2014]、定期的なワクチン接種による抗体レベルの維持が必要と考えられる。

近年、中国やトルコにおけるBEFの大規模な流行は、2015年の国内流行株と同じクレードに属するBEFVによって引き起こされたものであるが、以前に報告されていた流行時より死亡率が高くなっている傾向がある[Zheng et al., 2012; Oğuzoğlu et al., 2015]。また、国内において広範囲にBEFの流行が起こった場合、国内における肉用牛及び乳用牛生産に大きな経済的損失を与えることが予測される。しかしながら、BEFに対するワクチンの接種率は、イバラキ病に対するワクチンと同様、鹿児島県においては非常に低いことが報告されており[中嶋ら, 2005]、現在も同様の状況が継続していると考えられる。今回の2015年のBEF発生が、牛飼養者や獣医師に対し、BEFの大規模な流行の危険性に警鐘を鳴らすとともに、被害低減のためワクチン接種推進につながることを期待する。加えて、近隣国や地域との情報交換及び継続的かつ高感度のモニタリングが、国内におけるBEFの発生予測と早期警戒に重要と考えられる。

第4章

シャモンダウイルスの関与が示唆された牛の異常産の発生とウイルス感染状況の遡及調査

1 緒言

SHAV は、ペリブニャウイルス科 (*Peribunyaviridae*) オルソブニャウイルス属 (*Orthonunyavirus*) のアルボウイルスであり、AKAV や AINOV 等と同じシンプ群に属する。1960年代にナイジェリアで牛の血液や *Culicoides* 属のヌカカから初めて分離されたが[Causey et al., 1972; Lee et al., 1979], 1970年代以降は SHAV に関する報告はなく、SHAV の感染と家畜の疾病との関連は不明であった。しかしながら、2002年に鹿児島県及び宮崎県において、ヌカカと未越夏牛の血漿から国内で初めて SHAV が分離された[Yanase et al., 2005]。さらに、翌2003年の1月から2月にかけて、宮崎県内で発生した体形異常を伴う牛異常産事例で、初乳未摂取の先天異常子の血清から SHAV に対する抗体が検出され、異常産への関与が疑われた[Yanase et al., 2005]。なお、異常産の発生は報告されていないが、2002年及び2007年には沖縄県において SHAV の侵入が確認されており[Yanase et al., 2012; Kato et al., 2016a], これまで SHAV はしばしば国内に侵入していたと考えられる。

2015年12月から翌2016年4月にかけて、体形異常を伴う異常産事例が発生し、病性鑑定及び疫学調査の結果、SHAV の関与が疑われた。本章では、本事例の病性鑑定成績の詳細について述べるとともに、本事例の発生を受けて実施した遡及調査から、鹿児島県内の飼養牛における過去の SHAV の感染状況及び SHAV の関与を疑う異常産の発生状況ならびに本事例の発生要因について考察した。

2 材料及び方法

2-1 発生状況

2015年12月から翌2016年4月にかけて、鹿児島県内の黒毛和種飼養農場において、体形異常を呈し、アルボウイルスの関与が疑われる異常産が15件発生した。先天異常子15頭の胎齢は275日から299日であり、四肢の関節拘縮、頸部弯曲及び頭部変形等の体形異常が様々な程度で認められた。先天異常子2頭は、免疫グロブリンを含む市販の初乳製剤を給与されていたが、母牛の初乳を摂取していた個体はいなかった。なお、15症例中12例の母牛に、AKAV、AINOV及びCHUVの3種混合不活化ワクチン（異常産ワクチン）が接種されていた。

2-2 血液及び体液材料の採取

先天異常子15頭及びその母牛から、血清及び体液類（胸水、腹水、心嚢水、脳脊髄液）を採取した。また、アルボウイルスのサーベイランスのため、2016年6月に鹿児島県本土で飼養されている未越夏牛60頭を選定した。これらの未越夏牛から、6月、8月、9月、10月及び11月にヘパリン加血及び血清を採取した。ヘパリン加血は、2,150g、10分間遠心して血漿と血球を分離し、血球はPBS(-)で3回洗浄した後、等量のPBS(-)に再懸濁して洗浄血球とした。処理した血漿及び洗浄血球は、ウイルス分離に使用するまで-80℃にて冷凍保存した。また、血清及び体液類については、中和試験に使用するまで-20℃にて冷凍保存した。

2-3 臓器サンプル

先天異常子15頭を剖検し、採取した中枢神経（大脳、脳幹部、脊髄）をホモ

ジネート後, 0.295%のトリプトースホスフェートブロス及び 0.015%の炭酸水素ナトリウムを添加したイーグル MEM (ニッスイ) を添加して 10%臓器乳剤を作製し, 2,150g, 10 分間遠心分離した上清を臓器サンプルとした.

2-4 病理学的検査

先天異常子 15 頭の剖検し, 得られた中枢神経及び骨格筋を, 10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し, 常法によりパラフィン包埋切片を作製後, ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施して鏡検した.

2-5 細菌学的検査

先天異常子 15 頭から採取した中枢神経及び主要臓器を材料とし, 5%緬羊血液加トリプトソイ寒天培地, DHL 寒天培地, チョコレート寒天培地及び 5%緬羊血液加 GAM 寒天培地を用いて, 好気培養, 5%炭酸ガス培養及び嫌気培養を実施した.

2-6 ウイルス分離

ハムスター肺由来株化細胞 (HmLu-1) 及びハムスター腎臓由来株化細胞 (BHK-21) は, 0.295%のトリプトースホスフェートブロス, 0.015%の炭酸水素ナトリウム及び 5~10%の牛胎子血清 (FBS) を添加したイーグル MEM 培地 (ニッスイ) を増殖培地 (GM) とし, 37°Cにて培養した. これらの細胞を小試験管に播種し, 37°Cで 24 時間培養し, 定着させた. Earle's 液で 3 回洗浄した後, 上述の血漿, 洗浄血球, 臓器サンプル及び県内の 2 農場で採集した *Culicoides* 属ヌカカの乳剤を接種し, 37°Cで 1 時間吸着させた. 0.295%のトリプトースホスフェートブロス及び 0.015%の炭酸水素ナトリウムを添加したイーグル MEM を維持培地 (MM) とし, 接種材料と置換して, CPE の出現を指標に 37°Cで 7

日間回転培養した。なお、CPE が観察されない場合はさらに 2 代盲継代した。

2-7 中和試験

96 ウェル平底マイクロプレートにて 56°C で 30 分間非働化处理した血清及び体液類 50 μ l を MM で 2 倍階段希釈し (2~256 倍), 100 TCID₅₀ に調製した等量の AKAV JaGAr39 株, AINOV JaNAr28 株, CHUV C31 株, BEFV YHL 株, IBAV No.2 株, PEAV CSIRO110 株, SHAV KSB-6/C/02 株, 牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) Nose 株のそれぞれのウイルス液と混和した。混合液を 37°C で 1 時間反応させた後, GIT 培地 (Wako) に浮遊させた HmLu-1 細胞または GM に浮遊させた牛胎子筋肉細胞 (BFM) を 100 μ l 添加した。37°C, 5%二酸化炭素下で 1 週間培養後, CPE の有無を指標に判定した。CPE 発現が抑制された最も高い血清希釈倍率を中和抗体価とした。

2-8 ウイルス RNA 抽出及び RT-PCR

ウイルスを増殖させた HmLu-1 細胞または BHK-21 細胞の培養上清及び上述の臓器サンプルから, High Pure Viral RNA Kit (Roche) を用いてウイルス RNA を抽出した。オルソブニヤウイルス属の S RNA 分節の一部配列を検出するプライマーセット (AKAI206F: 5'-CACAACCAAgTgTCgATCTTA-3', SimbuS637-656: 5'-gAgAATCCAgATTTAgCCCA-3') を用いた RT-PCR を One step RT-PCR Kit (QIAGEN) を用いて実施した。また, 分離ウイルスについては, オルソブニヤウイルス属の S 及び M RNA 分節の全長ならびに L RNA 分節の一部を増幅する RT-PCR を, 既報[Yanase et al., 2012]のプライマーセットを使用して実施した。得られた RT-PCR 産物は 1.5%アガロースゲル/TBE にて電気泳動し, GelRed (Wako) またはエチジウムブロマイドにて染色後, UV トランスイルミネーターで可視化した。

2-9 シークエンス及び分子系統樹解析

QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) で精製した RT-PCR 産物を鋳型として、オルソブニヤウイルス属の S RNA 分節の全長、L RNA 分節の一部配列ならびに SHAV の M RNA 分節の全長を増幅する既報[Yanase et al., 2012]のプライマーセット及び Big Dye Terminator v3.1 Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、サイクルシーケンス反応を行った。反応産物は、ABI 3100-Avanti Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) による解析に供し、塩基配列を決定した。決定した塩基配列は、GENETYX ver. 10.1.3 software (Genetyx) にて編集し、ソフトに付属する GENETYX homology search tools を用いて GenBank 登録配列と比較した。本論で決定した S, M, L RNA 分節の塩基配列は、既知の SHAV を含むオルソブニヤウイルス属のそれぞれの RNA 分節の塩基配列と、近隣結合法にて、MEGA7[Kumar et al., 2016]を用いて分子系統樹を作成した。得られた樹形の信頼性は、bootstrap 法を 1,000 回繰り返して検定した。

2-10 SHAV 抗体保有状況の遡及調査

鹿児島県本土において、未越夏牛(1999～2016年)及び2歳以上の繁殖牛(乳用牛含む)(2003～2016年)より採取後、 -20°C にて保存されていた血清を調査に用いた。未越夏牛については1農場当たり1～3頭、延べ447戸の1,043頭から各年毎に5回(6, 8, 9, 10, 11月)、繁殖牛については延べ521戸の1,654頭から各年のアルボウイルス流行期後の晩秋から冬季(11月～翌年2月)に1回採取した血清を、それぞれ使用した。上述の方法で中和試験を行ない、SHAV KSB-6/C/02株に対する中和抗体価を測定した。未越夏牛では各年における中和抗体価4倍以上の抗体陽転状況を、繁殖牛では中和抗体価8倍以上の抗体保有

率をそれぞれ調査した。

2-11 体形異常を伴う牛異常産の病性鑑定材料の再調査

上述の SHAV 抗体保有状況の遡及調査において、SHAV の抗体陽転が確認された年の冬から翌春にかけて発生した体形異常を伴う牛異常産の病性鑑定事例のうち、牛異常産に関連するアルボウイルス 5 種 (AKAV, AINOV, CHUV, IBAV, PEAV) 及び BVDV に対する抗体が検出されず、原因不明となっていた事例を抽出した。各事例の先天異常子及びその母牛から採取後、 -20°C にて保存されていた血清を用いて、上述の方法で中和試験を行ない、SHAV KSB-6/C/02 株に対する中和抗体価を測定した。また、それぞれの事例の中樞神経のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本から常法により組織切片を作製し、HE 染色及び抗 SHAV 兔免疫血清を用いた SHAV の免疫組織化学染色を施して鏡検した。さらに、FFPE 標本から RNeasy FFPE Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出し、上述のオルソブニヤウイルス属の S RNA 分節の一部配列を検出するプライマーセットを用いて RT-PCR を実施した。上述の検査により、SHAV の異常産へ関与が疑われた場合は、当該事例の先天異常子等の血清及び未越夏牛の保存血清を用いた、牛異常産への関与が疑われているアルボウイルス 2 種 (PEAV, SATV) の中和抗体検査並びに過去の牛異常産関連アルボウイルスのサーベイランス成績から、当該事例における SHAV 以外のアルボウイルスの関与を検討した。

3 結果

3-1 病理学的検査及び細菌学的検査

先天異常子は外貌上、斜頸 (10/15) 及び関節拘縮症 (12/15) (図 3-1a) が高

頻度に確認され、剖検では頭部変形 (6/15)、脊柱弯曲 (11/15) (図 3-1b)、骨格筋の退色 (5/15) が特徴的に認められた (表 3-1)。大脳半球には肉眼的な著変は認められなかったが、側脳室拡張が 2 頭で、小脳低形成が 1 頭で認められた。病理組織学的検査では、大脳及び脳幹部において、神経細胞の石灰化 (11/15)、単核球の囲管性細胞浸潤 (6/15) (図 3-1c)、グリオシス (5/15) が認められた。さらに、脊髓腹角の神経細胞の減数及び消失が 10 頭で認められ、白質と灰白質の境界部が不明瞭化していた。骨格筋においては、脂肪置換 (12/15)、筋線維の萎縮 (9/15) (図 3-1d) 及び多発性筋炎 (9/15) は主要な病変であり、肉眼的な骨格筋の退色と関連していた。なお、細菌学的検査で有意菌は分離されなかった。

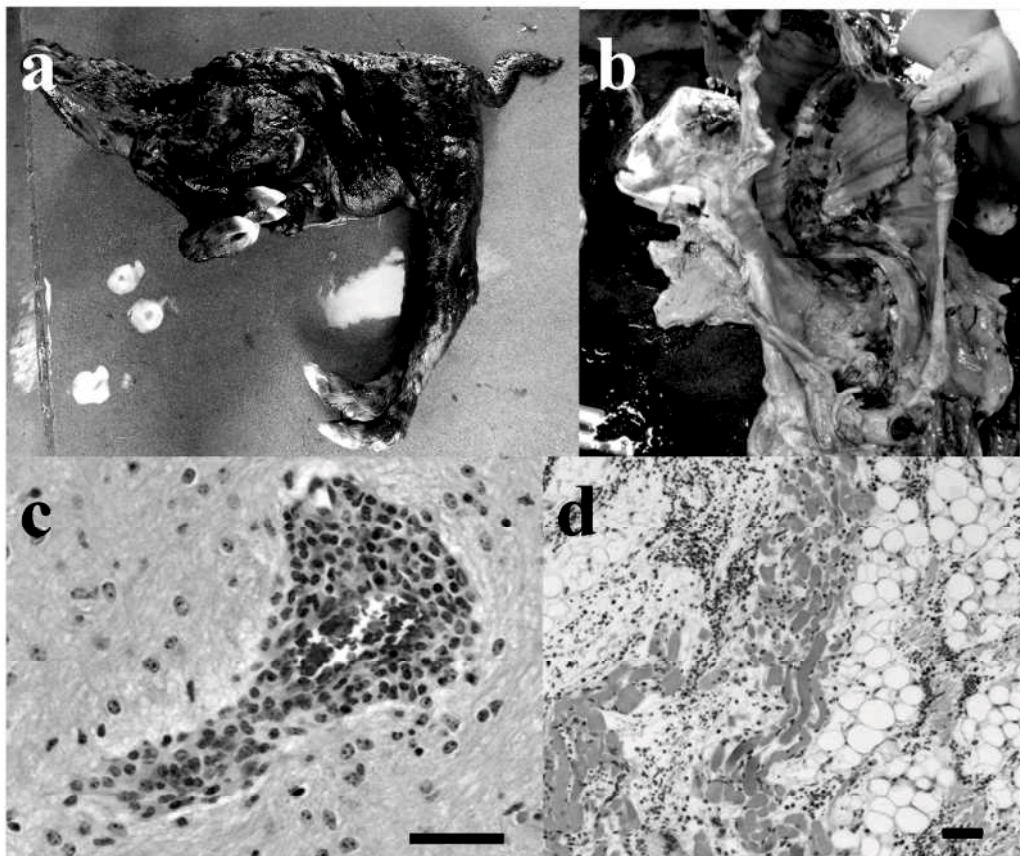


図 3-1 先天異常子の外貌，剖検所見及び病理組織学的所見

- a 斜頸，関節拘縮症を呈した先天異常子（症例 3）
- b 脊柱の彎曲（症例 7）
- c 中脳における囲管性細胞浸潤（症例 7）（HE 染色，Bar=50 μ m）
- d 骨格筋における脂肪置換及び筋線維の萎縮（症例 3）（HE 染色，Bar=50 μ m）

3-2 先天異常子の臓器サンプルの RT-PCR 及びウイルス分離

RT-PCR で先天異常子 15 頭中 7 頭の中樞神経（大脳，脳幹部または脊髄）からオルソブニヤウイルスの S RNA 分節に特異的な遺伝子（485 bp）が検出され（表 3-1），RT-PCR 産物の塩基配列は，検出株間で 1～2 塩基の相違のみでほぼ一致しており，過去に国内で分離された SHAV の配列と高い一致がみられた．なお，4 症例から採取した臓器からウイルスは分離されなかった．

3-3 先天異常子及び母牛の抗体検査

全ての先天異常子の血清から SHAV に対する抗体が検出され（抗体価 2～64 倍），他の異常産に関連するアルボウイルスに対する抗体は検出されなかった（表 3-1）．なお，初乳製剤を給与されていた 2 頭の血清からは BVDV に対する抗体が検出された．また，全ての母牛からも SHAV に対する抗体が検出された（抗体価 16～ \geq 256 倍）．

表 3-1 発生状況, RT-PCR, 抗体検査, 病理学的検査成績

症例番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	合計
胎齡 (日)	281	275	280	278	285	291	281	280	293	279	290	287	287	276	299	
鑑定殺	+	+	+		+	+	+	+	+		+		+			9
死産				+						+	+	+		+	+	6
RT-PCR (SHAV)	+			+	+	+				+		+			+	7
中和抗体価	8	32	32	64	2	32	32	16	8	16	4	16	16	4	64	
外貌	+		+	+	+		+	+		+		+		+	+	10
閉節拘縮				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12
剖頭部	+	+	+										+			4
下顎短小																
変形	+		+							+		+				4
頭部左右非対称																
側脳室拡張									+			+				2
小脳低形成							+									1
脊柱彎曲	+		+	+	+		+	+		+	+	+		+	+	11
骨格筋の退色					+	+			+	+	+					5
組					+		+					+				5
織												+				
学的				+		+		+		+		+		+	+	8
的							+	+	+	+						6
所														+		5
見				+		+				+		+	+	+	+	10
見																
腹角神経細胞の減数・消失																
脂肪置換	+		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12
萎縮	+		+		+	+	+		+		+			+	+	9
筋炎	+		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9

3-4 アルボウイルスサーベイランス及び分子系統樹解析

2015年8月から10月にかけて、県本土全域の未越夏牛13戸25頭においてSHAVに対する抗体陽転が認められた。また、AKAVに対する抗体陽転が9月から11月にかけて(6戸8頭)、PEAVに対する抗体陽転が9月及び11月(3戸3頭)にそれぞれ認められた。さらに、県東部及び県北東部の未越夏牛からそれぞれ8月及び9月に採取した血漿から、BHK-21細胞に明瞭なCPEを示すウイルス2株が分離され、それぞれKS-1/P/15株及びKS-2/P/15株と命名した。加えて、鹿児島県内で2015年9月に採集した*C.tainanus*から、1株のウイルスが分離され、KSB-1/C/15株と命名した。分離ウイルスのS及びMRNA分節の全長ならびにL RNA分節の一部配列の塩基配列は、いずれも過去に国内外で分離されたSHAVの配列と非常に高い相同性が認められた(S RNA: 98.3~99.5%, M RNA: 89.0~97.9%, L RNA: 91.5~98.0%)。さらに、先天異常子7頭の中樞神経より検出されたSHAVのS RNA分節の一部配列は分離ウイルスとほぼ一致していた。分子系統樹解析により、2015年分離株は、いずれのRNA分節も2002年及び2007年に国内で分離されたSHAVと同じクラスターに属した(図3-2)。

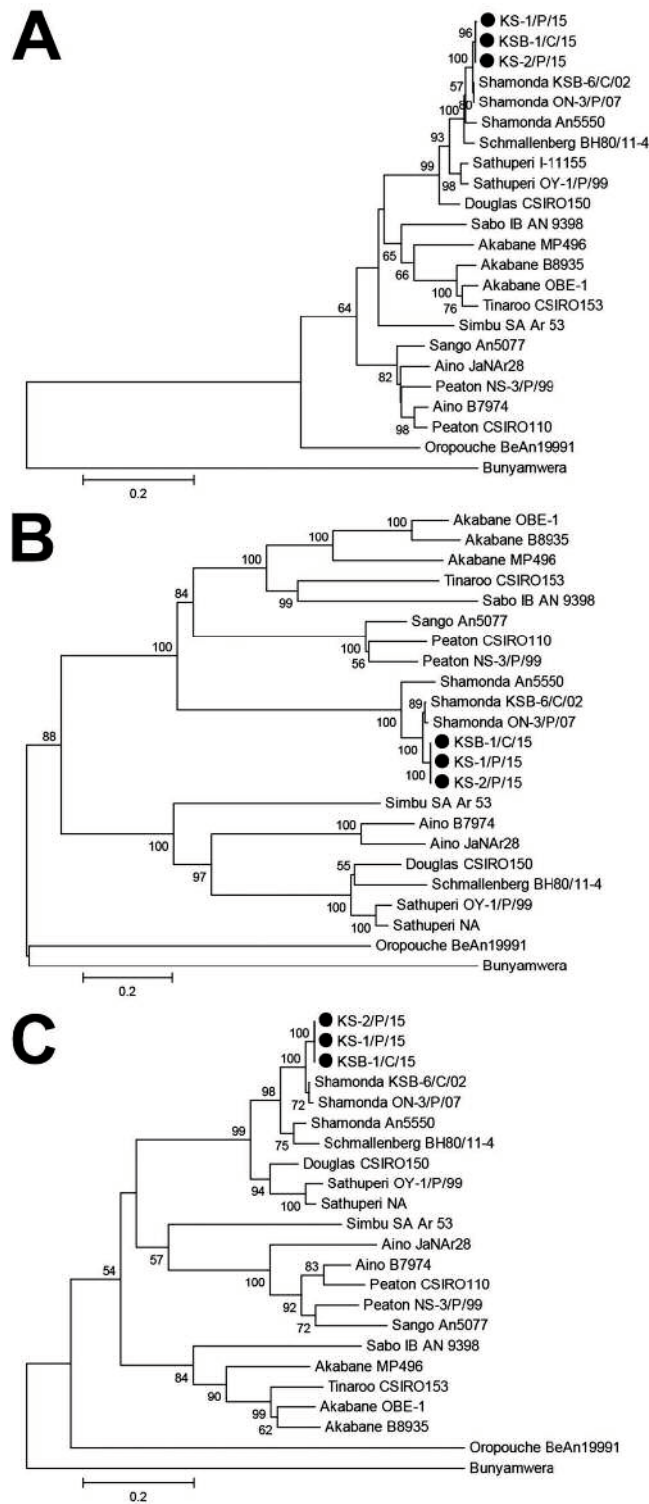


図 3-2 オルソブニヤウイルス属の各 RNA 分節の塩基配列に基づく分子系統樹. A: S RNA 分節, B: M RNA 分節, C: L RNA 分節をそれぞれ示す. ●は本研究で分離された SHAV を示す. 系統樹上の数値はブートストラップ値を示す (1,000 回演算, 百分率にて示す).

3-5 SHAV 抗体保有状況の遡及調査

未越夏牛においては、調査期間内に 6 回（2001～3、2006、2013 及び 2015 年）の SHAV に対する抗体陽転が確認された（図 3-3）。各年の抗体陽転戸数並びに頭数及び抗体陽転時期は、2001 年は 3 戸 4 頭（8～9 月陽転）、2002 年は 20 戸 35 頭（8～11 月陽転）、2003 年は 6 戸 8 頭（9～10 月陽転）、2006 年は 2 戸 2 頭（11 月陽転）、2013 年は 2 戸 3 頭（11 月陽転）、2015 年は 13 戸 25 頭（8～10 月陽転）であった。繁殖牛の SHAV 抗体保有率は、2003 年（66.7 %）以降 2014 年までに低下し（8.5 %）、2015 年に再び大きく上昇した（61.3 %）（図 3-4）。

3-6 体形異常を伴う牛異常産の病性鑑定材料の再調査

上述の未越夏牛の抗体保有状況の遡及調査において、SHAV に対する抗体陽転の認められた 5 カ年（2015 年を除く）の冬から翌春にかけて発生した体形異常を伴う牛異常産の病性鑑定事例のうち、原因不明となっていた 10 例を抽出した（2002 年：1 例、2003 年：6 例、2006 年：1 例、2007 年：2 例）。このうち、2002 年 12 月に発生した 1 例（症例 No.1）及び 2003 年 2 月に発生した 2 例（症例 No.2 及び No.3）において、初乳未摂取の先天異常子の血清から SHAV に対する抗体が検出された（中和抗体価：16～64 倍）（表 3-2）。いずれも外貌上、四肢の屈曲または伸展等の体形異常を呈し（図 3-4a～c）、剖検により全例で脊柱の彎曲（図 3-4d～f）、症例 No.1 及び No.3 では軽度の側脳室拡張が確認された。病理組織学的に、症例 No.1 及び No.2 の中枢神経（大脳または脊髄）の多発性石灰沈着及び脊髄腹角の神経細胞の減数が認められ、白質と灰白質の境界はやや不明瞭であった（図 3-5）。また、全例で骨格筋の筋線維の脂肪置換及び矮小化が認められた。なお、SHAV の免疫組織化学染色では、全ての症例の中

中枢神経組織において陽性抗原は確認されず、FFPE 標本を用いた RT-PCR でオルソブニヤウイルス属の遺伝子は検出されなかった。全ての症例で、母牛は異常産ワクチンの接種歴があった。

症例 No.1～3 のアルボウイルス伝播時期にあたる 2002 年には、鹿児島県内の未越夏牛における AKAV 及び AINOV の抗体陽転が報告されていた[中嶋ら, 2005]。また、2002 年 6 月から 11 月にかけて未越夏牛 26 戸 59 頭より採取後に保存されていた血清を用いた中和抗体検査では、9 月から 11 月にかけて SATV の小規模な抗体陽転 (3 戸 4 頭) が確認され、PEAV の抗体陽転は認められなかった。なお、3 症例全ての先天異常子から、SATV に対する抗体は検出されなかった。

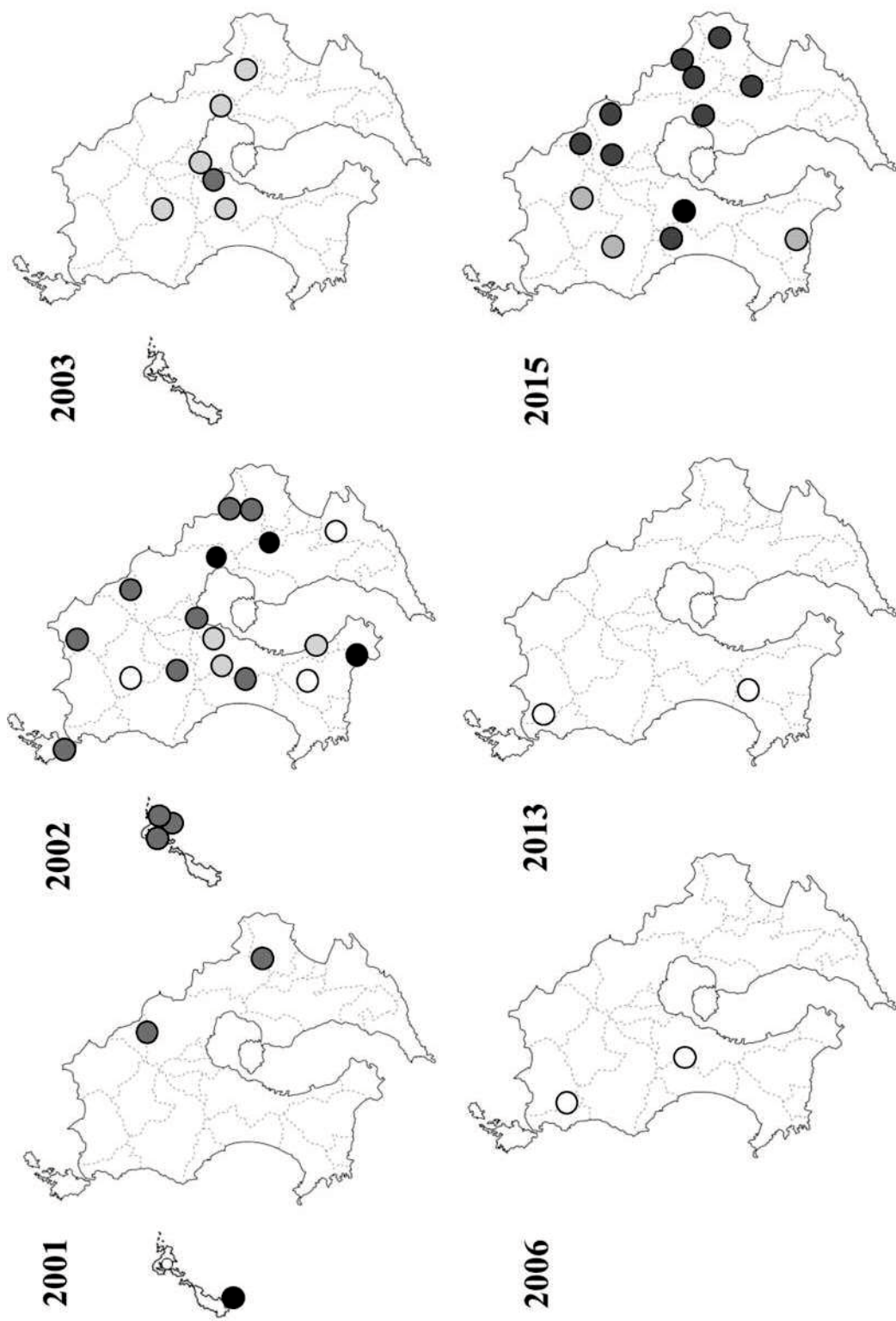


図 3-3 未越夏牛の SHAV に対する抗体陽転状況. 図中の丸は抗体陽転農場の位置, 丸の色は抗体陽転時期 (● : 8 月陽転, ● : 9 月陽転, ● : 10 月陽転, ○ : 11 月陽転) をそれぞれ示す.

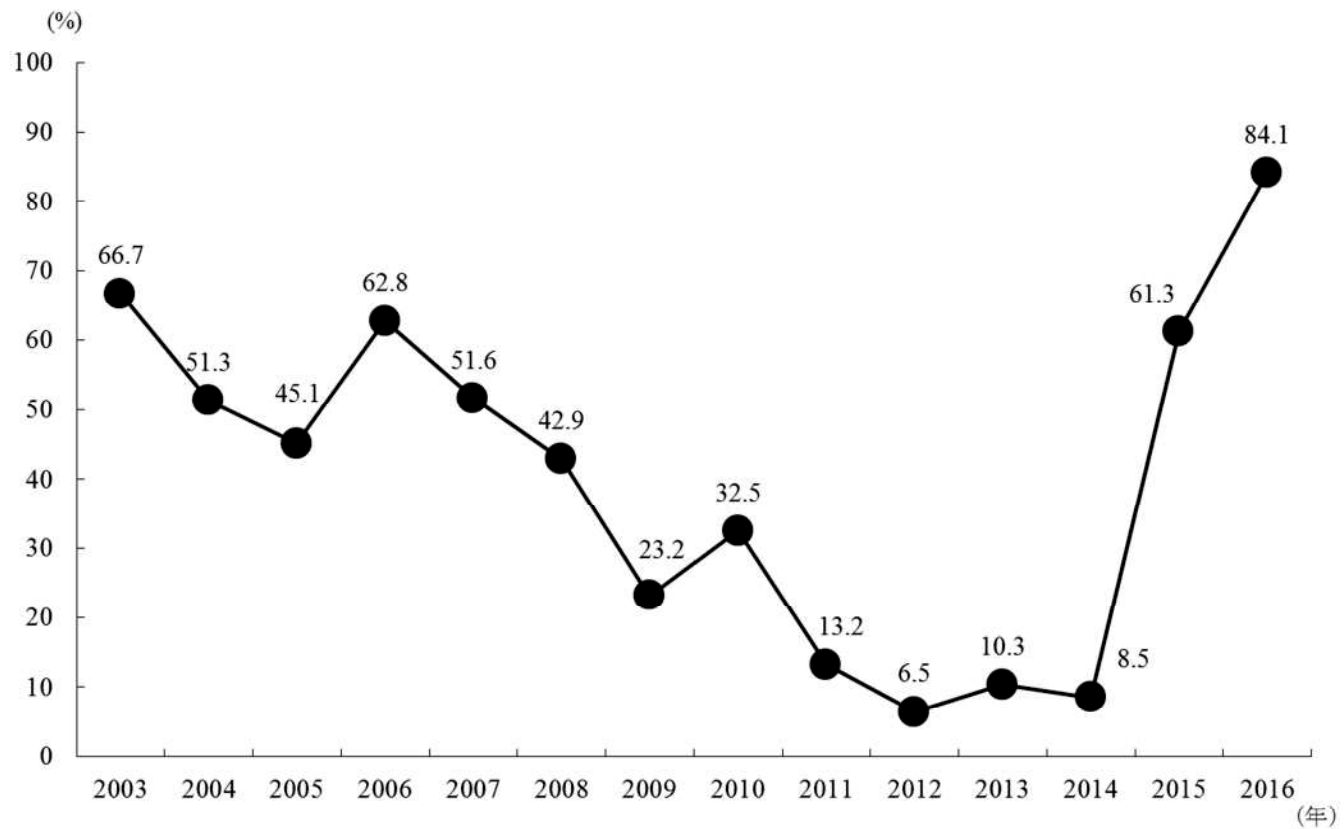


図 3-4 繁殖牛の SHAV 抗体保有率の年別推移. 中和抗体価 8 倍以上を抗体陽性とし, 各年の検査頭数における抗体陽性頭数の割合 (百分率) を抗体保有率とした.

表 3-2 過去の体形異常を伴う病性鑑定事例の発生状況及び病性鑑定成績

症例	発生日	品種	母牛への異常産ワクチンの接種歴	分娩時胎齢	外貌	剖検所見	SHAV抗体検査	病理組織学的検査	
								中枢神経 (脳・脊髄)	骨格筋
No. 1	2002/12/12	黒毛和種	有	261	前肢屈曲, 後肢伸展, 頸部拘縮	脊柱 S 字彎曲, 側脳室拡張 (軽度)	先天異常子 母牛	石灰沈着, 脊髓腹角神経細胞 の減数	脂肪置換, 筋線維の矮小化
No. 2	2003/2/16	黒毛和種	有	289	前肢屈曲, 後肢伸展	脊柱 S 字彎曲	先天異常子 母牛	石灰沈着, 脊髓腹角神経細胞 の減数	筋線維の矮小化
No. 3	2003/2/18	ホルスタイン種	有	276	前肢屈曲, 後肢伸展	脊柱 S 字彎曲, 側脳室拡張 (軽度)	先天異常子 母牛	著変なし	脂肪置換, 筋線維の矮小化
							母牛	128	



図 3-4 SHAV の関与が示唆された 2002 年及び 2003 年の牛異常産事例. 先天異常子の外貌及び剖検所見 (脊柱の彎曲).

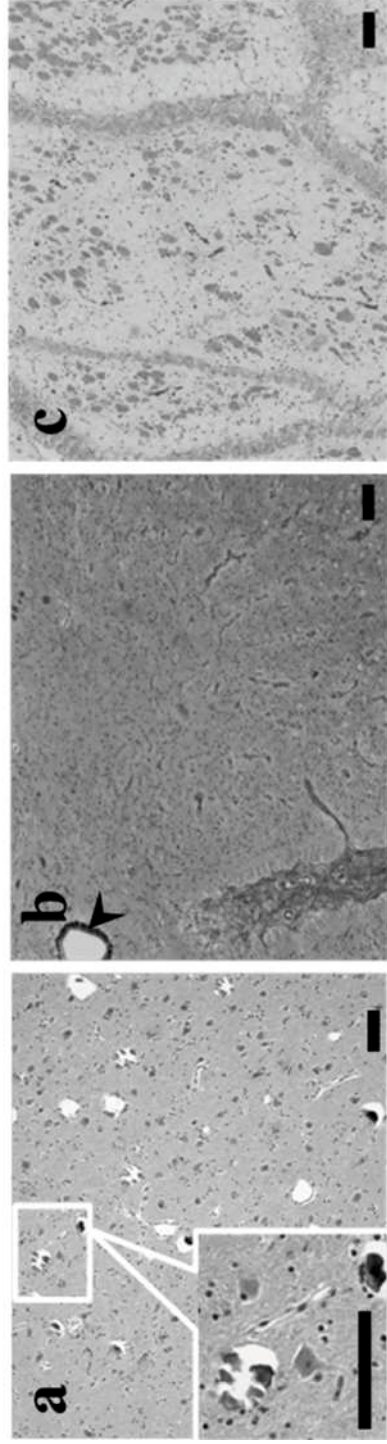


図 3-5 SHAV の関与が示唆された 2002 年及び 2003 年の牛異常産事例の病理組織学的所見 (HE 染色, Bar=100 μ m).

a 大脳が多発性石灰沈着 (症例 No.2)

b 脊髓腹角部 (症例 No.1). 神経細胞が減少し, 白質と灰白質の協会部が不明瞭化している. 矢頭は中心管を示す.

c 骨格筋の筋繊維の脂肪置換及び矮小化 (症例 No.1).

4 考察

RT-PCR 及び抗体検査成績から、先天異常子 15 頭は SHAV に胎内感染していたと考えられた。2 症例では先天異常子から BVDV に対する抗体が検出されたが、BVDV 感染による異常産の際に認められる小脳形成不全等の特徴的な所見 [Grooms, 2003] が認められなかったことから、初乳製剤由来の抗体と考えられた。さらに、先天異常子の外貌、剖検所見及び病理組織学的所見は、過去に国内で発生した SHAV の関与が疑われた異常産事例 3 件に酷似していた [Yanase et al., 2005]。このことから、今回の異常産 15 件における SHAV の関与が強く示唆された。なお、2015 年には SHAV 以外にも AKAV 及び PEAV の県内侵入が確認された。これらのアルボウイルス感染に起因する先天異常子では、上述の剖検及び病理組織学的所見が認められることが報告されているが [Kurogi et al., 1977; 相澤ら, 2010]、先天異常子から AKAV 及び PEAV に対する抗体は検出されなかったことから、これらのウイルスの関与を否定した。

未越夏牛の SHAV 抗体保有状況の遡及調査において、2001 年以降、複数回の SHAV 県内侵入が確認された。2002 年及び 2015 年はウイルス侵入時期が 8 月と早く、県本土の広域に感染が確認されたが、それ以外の年は、抗体陽転のみられた地域が限定されているか、もしくは陽転の確認が 11 月と遅い時期であった。したがって、それらの年では、県内の牛群で SHAV の大規模な感染は起こらなかったと考えられる。Yanase ら [Yanase et al., 2005] は、2002 年に国内で初めて SHAV が分離されたことを報告しているが、血清学的な遡及調査により、少なくとも 2001 年の時点で、SHAV が国内に侵入していたことが示唆された。また、繁殖牛の SHAV 抗体保有率は、2003 年は 66.7% と高く、2002 年の広範囲に渡るウイルス感染拡大の結果と考えられたが、その後年々低下し、2014 年には 8.5% まで下がっていた。一般に、アルボウイルスに対する抗体を保有する牛では、ウイルス血症が抑えられ [Kurogi et al., 1978]、胎子への感染とそれに

続く異常産は起こらないと考えられる。2015年に鹿児島県内に侵入した SHAV は、過去に国内で分離された SHAV と塩基配列の相同性が高く、抗原性に大きな差はないと考えられたが、2014年までの SHAV 抗体保有率低下の結果、2015年は SHAV 感染時の胎内感染が起こりやすい状況であったと考えられる。さらに、SHAV の抗体陽転が確認された2015年8月から10月にかけての鹿児島県内の平均気温は、ウイルスを媒介するヌカカの活動が活発となる温度である20°C[Tsutsui et al., 2010]を概ね上回っており（気象庁データ）、SHAV の伝播が頻繁に起こっていた可能性がある。これらの要因が複合的に作用し、2015年から2016年にかけての異常産発生に繋がったと推察された。

未越夏牛の抗体保有状況に基づいて抽出した体形異常を伴う牛異常産事例のうち、2002年12月及び2003年2月に発生した計3例の先天異常子については、抗体検査成績及び病理学的所見から、2015年から2016年にかけて発生した症例と同様に SHAV が関与したと考えられた。なお、ウイルスの伝播時期にあたる2002年には、鹿児島県内における AKAV, AINOV 及び SATV の抗体陽転が確認されたが、先天異常子からこれらの異常産関連アルボウイルス及び BVDV に対する抗体は検出されず、異常産への関与はなかったと考えられた。SHAV の関与した牛異常産は、2014年以前は2003年に宮崎県内で発生した事例のみが報告されていたが[Yanase et al., 2005]、鹿児島県内においても同時期に発生していたことが今回新たに確認された。なお、2015年から2016年にかけて発生した症例で中枢神経から SHAV に特異的な遺伝子が検出されたこと、遡及調査において作製後14年が経過した FFPE 標本からも RNA ウイルスである BVDV の遺伝子検出が報告されていることから[関ら, 2002]、今回、FFPE 標本からのオルソブニヤウイルス属の遺伝子検出を試みたが、特異的な遺伝子は検出されなかった。また、SHAV の免疫組織化学染色でも、陽性抗原は確認されなかった。一般に、アカバネ病等のアルボウイルスによる異常産における先天

異常子では、既に体内からウイルスが消失している場合が多く、抗原検出が非常に困難であることに加え[梁瀬, 2015], FFPE 標本の長期保管による RNA の損傷, 劣化等が影響したと考えられた。

牛のアルボウイルス性異常産の予防には、繁殖牛へのワクチン接種による免疫付与が最も効果的とされる[梁瀬, 2015]. 同じオルソブニヤウイルス属の AKAV と AINOV は、交差中和試験において、SHAV とほとんど交差しないことが報告されている[Yanase et al., 2005]. また、県内で発生した SHAV の関与した異常産事例における母牛へのワクチン接種率は、2002～2003 年及び 2015～2016 年のいずれにおいても、それぞれ 100% (3/3 頭) 及び 80% (12/15 頭) と高かった。このことから、SHAV の感染に対し、現行の異常産ワクチンの交差免疫による予防効果はほとんど期待できないと考えられた。そのため、対策としては畜舎消毒や媒介昆虫対策等が中心となるが、ウイルスを媒介するヌカカの発生場所は多様かつ広範囲に及ぶことから[Yanase et al., 2013], 殺虫剤や忌避剤による防除は困難であり、その効果は限定的と考えられる。したがって、SHAV の今後の国内侵入状況と異常産の発生状況との関連及び経済的損失への影響等を精査した上で、SHAV に対するワクチンの必要性を検討すべきと思われる。加えて、現行の異常産ワクチンの接種によって防御可能なアルボウイルスによる異常産は、確実に予防するよう農家を指導する必要がある。

アフリカ、中東及びアジアにおける過去のサーベイランス成績[Causey et al., 1972; Yanase et al., 2005; Brenner et al., 2014]から、SHAV は広域に分布していると推測される。また、流行地からの媒介節足動物の長距離移動は、これまで侵入のなかった地域への SHAV の侵入と異常産の発生を招きうる。2015 年冬から 2016 年春にかけては、九州地方の他県においても SHAV が関与したと思われる異常産が発生しており、同時期に九州の広範囲に渡って SHAV が侵入したと考えられる。一方で、繁殖牛の抗体保有率が低い状況下においても、過去

にアカバネ病やアイノウイルス感染症等でみられたような数百～数千頭規模の異常産発生[Forman et al., 2008]には至っていない等，その病原性や病態については未だ不明な点が多い．今後，SHAV の感染から異常産発生に至るまでの要因の解析を行うとともに，国内外における SHAV の蔓延状況と異常産の発生動向を継続的に監視していく必要がある．

第5章 総合考察

アルボウイルスは、吸血性節足動物に感染してその体内で増殖し、吸血に伴ってヒトや家畜を含む脊椎動物に伝播されるウイルスの総称であり、家畜、特に牛へのアルボウイルス感染は急性熱性疾患及び異常産の原因として知られ、多大な経済的損失をもたらしている。わが国においては、IBAV や BEFV による牛の急性熱性疾患、AKAV, AINOV, CHUV による牛の異常産の被害が大きく、ワクチン接種を主体とした対策がとられている。一方で、ワクチンの存在しない国内新規のアルボウイルス (SHAV, SATV 等) が近年次々に分離され、関連が疑われる牛の異常産の発生も確認されていることから、継続的なサーベイランスによるアルボウイルスの侵入監視が重要と考えられている。また、既知のウイルスであっても、複数の遺伝子型の存在や経年的な変異の蓄積により、分離株の間で抗原性の多様化がみられ、抗原性の異なる株も確認されており、ワクチンの効果を十分に得るため、流行株の抗原性状の把握は必要である。そこで、本研究では、2013 年及び 2015 年に鹿児島県内で発生したイバラキ病及び牛流行熱の症例の詳細な病性鑑定により、発生農場に侵入した原因ウイルスの遺伝学的、血清学的及び疫学的特徴を明らかにした。また、2015 年から 2016 年にかけて鹿児島県内で発生した体形異常を伴う牛異常産における SHAV の関与を明らかにするとともに、これまで不明であった過去の鹿児島県内の飼養牛における SHAV の感染状況及び同ウイルスの関与した牛異常産の発生状況の遡及調査を行ない、以下の成績を得た。

1. 2013 年 10 月、鹿児島県内の 2 農場で黒毛和種繁殖牛 2 頭が発熱、泡沫性流涎、嚥下障害等のイバラキ病を疑う症状を呈した。発症牛の血液から IBAV の遺伝子を検出し、ポスト血清から IBAV に対する抗体 (中和抗体価 : 1,024

倍)を検出した。また、発生農場の非発症同居牛から分離された IBAV

(KS-7/E/13 株)は、第 2 分節ゲノムの VP2 コード領域の推定アミノ酸配列に基づく分子系統樹解析により、過去に分離された IBAV (EHDV 血清型 2) に近縁であり、1997 年から 1998 年にかけて死流産を引き起こした KSB-14/E/97 株 (EHDV 血清型 7) を含む他の血清型の EHDV と区別された。このことから、2013 年に発生した 2 症例は、EHDV 血清型 2 の IBAV によって引き起こされた 26 年ぶりのイバラキ病であることが判明した。

2. EHDV は 10 分節の 2 本鎖 RNA をゲノムとして有するウイルスであり、他の分節ゲノムをもつウイルスと同様に、異なる血清型のウイルスが同時感染すると、遺伝子再集合を起こす可能性がある。2013 年のイバラキ病発生農場においては、IBAV とともに、EHDV 血清型 1 に属するウイルスが検出され、異なる血清型の EHDV が農場内に同時に侵入していたことが明らかとなった。検出された EHDV 血清型 1 はイバラキ病発症には関与しておらず、また、両血清型の EHDV の同時感染を示唆する成績は得られなかったが、今後フルゲノム解析により遺伝子再集合の有無を検証する必要があると考えられた。

3. 2015 年 9 月から 10 月にかけて、鹿児島県内の 2 地域 6 農場において、繁殖牛が発熱、起立困難等の臨床症状を呈した。発症牛または回復牛の血液から BEFV の遺伝子が検出され、BEFV に対する中和抗体価の有意上昇または高い抗体価が確認された。このことから、これらの症例は沖縄県以外では 23 年ぶりに発生した BEF と判明した。

4. 発症牛 2 頭より検出された BEFV (KS-BEF-1 株及び KS-BEF-2 株) の G 遺伝子の塩基配列に基づく分子系統樹解析の結果, 2015 年に県内に侵入した BEFV は, 2012 年以前に国内で分離された BEFV とは遺伝学的に区別され, 2011 年から 2012 年にかけての中国及び 2013 年から 2014 年にかけて台湾で流行した BEFV と同じクレードに分類された. このことから, 2015 年の流行株は近年東アジアで分離されている BEFV と疫学的に関連していることが示唆された.

5. 2015 年 12 月から 2016 年 4 月にかけて鹿児島県内で体形異常を伴う異常産が 15 症例発生した. 病性鑑定の結果, 過去に国内で発生した SHAV の関与を疑う異常産の症例に類似した病理組織学的所見が認められた. また, 全ての先天異常子から SHAV に対する抗体が検出されるとともに, 15 頭中 7 頭の中樞神経から SHAV に特異的な遺伝子が検出された. さらに, 未越夏牛のサーベイランスの結果, 同年 8 月から 10 月にかけて SHAV の県内侵入が確認され, 分離ウイルスは過去に国内外で分離された SHAV に近縁であった. このことから, 今回の異常産 15 症例への SHAV の関与が強く示唆された.

6. 鹿児島県内における過去の SHAV の感染状況や SHAV の関与した異常産の発生状況の実態は不明であったことから, 保存材料を用いた遡及調査を実施した. その結果, 少なくとも 2001 年時点で SHAV が県内に侵入していたことが示唆された. また, 国内で初めて SHAV が分離された 2002 年には県内で大規模な SHAV の感染が起り, 翌年には繁殖牛の抗体保有率が高い状態 (66.7%) であったが, その後 2014 年までに抗体保有率が低下 (8.5%) していたことが明らかとなり, 2015 年から 2016 年にかけて発生した SHAV

の関与による異常産発生の一因となったことが示唆された。さらに、2002年12月及び2003年2月に、県内で3例のSHAVの関与による異常産が発生していたことが新たに確認された。

本研究において確認されたイバラキ病及びBEFは、特定地域を除けば長期間発生がなく、現場の獣医師や飼養農家の関心も薄らいでいると思われ、ワクチン接種率及び牛群の抗体保有率も低い状況にあると推察される。分離または検出されたIBAV及びBEFVの抗原性状は過去に分離されたそれぞれのウイルスと大きな違いはないと考えられ、現行のワクチンは依然として有効と考えられる。また、本研究によって、SHAVはたびたび県内に侵入しており、牛の異常産に関与していることが強く示唆された。SHAVの感染に対する有効な防御手段は現状存在しないが、異常産ワクチンの存在するAKAV等の対策を確実に講じた上で、SHAVの侵入状況や異常産の発生動向を検証し、ワクチンの必要性を検討する必要があると思われる。また、遺伝子再集合によって新たなウイルスが生じる可能性を考慮し、従前より全国的に実施されている未越夏牛のサーベイランスにおけるウイルス分離や抗体調査に加えて、RT-PCR法やリアルタイムRT-PCR法等の高感度な遺伝子検査法を組み合わせることで、今後もアルボウイルスの侵入状況を継続的に監視する必要がある。本研究で得られた知見が、ワクチン接種の推進及びアルボウイルス感染症の防疫対策の一助となることを期待したい。

引用文献

相澤真紀, 高吉克典, 国場保, 加藤友子, 梁瀬徹, 山川睦, 津田知幸: 沖縄県で分離された牛流行熱ウイルスの分子疫学的解析, 日獣会誌, **61**, 363-366 (2008)

相澤真紀, 新田芳樹: 沖縄県における牛アルボウイルス流行の特徴, 臨床獣医, **28**, 29-33 (2010)

Allison A. B., Holmes E. C., Potgieter A. C., Wright I. M., Sailleau C., Breard E., Ruder M. G., Stallknecht D. E.: Segmental configuration and putative origin of the reassortant orbivirus, epizootic hemorrhagic disease virus serotype 6, strain Indiana. *Virology* **424**, 67-75 (2012)

Anbalagan S., Cooper E., Klumper P., Simonson R. R., Hause B. M.: Whole genome analysis of epizootic hemorrhagic disease virus identified limited genome constellations and preferential reassortment. *J. Gen. Virol.* **95**: 434-441 (2014)

Anthony S. J., Maan N., Maan S., Sutton G., Attoui H., Mertens P. P. : Genetic and phylogenetic analysis of the core proteins VP1, VP3, VP4, VP6 and VP7 of epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV). *Virus Res.* **145**, 187-199 (2009a)

Anthony S. J., Maan S., Maan N., Kgosana L., Bachanek-Bankowska K., Batten C., Darpel K. E., Sutton G., Attoui H., Mertens P. P. : Genetic and

phylogenetic analysis of the outer-coat proteins VP2 and VP5 of epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV): comparison of genetic and serological data to characterise the EHDV serogroup. *Virus Res.* 145, 200-210 (2009b)

Aziz-Boaron, O., Klausner, Z., Hasoksuz, M., Shenkar, J., Gafni, O., Gelman, B., David, D. and Klement, E.: Circulation of bovine ephemeral fever in the Middle East—strong evidence for transmission by winds and animal transport. *Vet. Microbiol.* 158, 300-307 (2012)

Brenner J. Preliminary report of serosurvey for circulation of viruses of the Simbu serogroup in dairy cattle in Israel, 2014. ProMed. 2016 Apr 17 [cited 2016 Dec 1]. <http://www.promedmail.org>, archive no. 20160417.4165684. (2016)

Causey OR, Kemp GE, Causey CE, Lee VH : Isolations of Simbu-group viruses in Ibadan, Nigeria 1964-69, including the new types Sango, Shamonda, Sabo and Shuni. *Ann Trop Med Parasitol*, 66, 357-362 (1972)

Cêtre-Sossah C., Roger M., Sailleau C., Rieau L., Zientara S., Bréard E., Viarouge C., Beral M., Esnault O., Cardinale E. : Epizootic haemorrhagic disease virus in Reunion Island: evidence for the circulation of a new serotype and associated risk factors. *Vet. Microbiol.* 170, 383-390 (2014)

Cybinski, D. H., Davis, S. S. and Zakrzewski, H. : Antigenic variation of the bovine ephemeral fever virus glycoprotein. *Arch. Virol.* 124, 211-224 (1992)

Cybinski, D. H., Walker, P. J., Byrne, K. A. and Zakrzewski, H. :Mapping of antigenic sites on the bovine ephemeral fever virus glycoprotein using monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 71: 2065-2072 (1990)

Dal Pozzo F., Martinelle L., Thys C., Sarradin P., De Leeuw I., Van Campe W., De Clercq K., Thiry E., Saegerman C. : Experimental co-infections of calves with bluetongue virus serotypes 1 and 8. *Vet. Microbiol.* 165, 167-172 (2013)

Finlaison, D. S., Read, A. J. and Kirkland, P. D. :An epizootic of bovine ephemeral fever in New South Wales in 2008 associated with longdistance dispersal of vectors. *Aust. Vet. J.* 88: 301-306 (2010)

Forman S, Hungerford N, Yamakawa M, Yanase T, Tsai HJ, Joo YS, Yang DK, Nha JJ : Climate change impacts and risks for animal health in Asia. *Rev Sci Tech*, 27, 581-597 (2008)

Grooms DL: Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 20(1), 5-19 (2004)

Hayama, Y., Moriguchi, S., Yanase, T., Suzuki, M., Niwa, T., Ikemiyagi, K., Nitta, Y., Yamamoto, T., Kobayashi, S., Murai, K. and Tsutsui, T. : Epidemiological analysis of bovine ephemeral fever in 2012–2013 in the subtropical islands of Japan. *BMC Vet. Res.* 12: 47 (2016)

平島 宜昌, 別府 成, 是枝 輝紀, 岡田大輔, 梁瀬徹, 岡野良一 : 鹿児島県において2013~2014年に発生したアカバネウイルスによる若齢牛の脳脊髄炎と異常産, 獣医畜産新報 68(5), 351-357, (2015)

平田 美樹, 後藤 介俊, 池田 省吾, 濱田 忠子, 有川 恵理, 藏園 光輝, 梁瀬 徹, 山川 睦: 鹿児島県で発生した若齢牛の非化膿性脳脊髄炎, 日獣会誌 61(10), 771-776 (2008)

Huisman H., Bremer C. W., Barber T. L. : The nucleic acid and proteins of epizootic haemorrhagic disease virus. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 46, 95-104 (1979)

稲葉右二: 牛流行熱, 家畜衛生試験場研究報告, 62, 1-15 (1971)

Inaba, Y., Kurogi, H., Sato, K., Goto, Y., Omori, T. and Matumoto, M. : Formalin-inactivated, aluminum phosphate gel-adsorbed vaccine of bovine ephemeral fever virus. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 42, 42-53 (1973)

岩崎 充祐, 後藤 義之, 三浦 康男, 長友 盛雄, 甲野 雄次: 宮崎県に発生したイバラキ病とその疫学 日獣会誌 ,43(4), 244-248 (1990)

Kato T, Yanase T, Suzuki M, Katagiri Y, Ikemiyagi K, Takayoshi K, Shirafuji H, Ohashi S, Yoshida K, Yamakawa M, Tsuda T : Monitoring for bovine arboviruses in the most southwestern islands in Japan between 1994 and 2014, *BMC Vet Res*, 12:125 (2016a)

Kato T, Shirafuji, H., Tanaka, S., Sato, M., Yamakawa, M., Tsuda, T. and Yanase, T. . Bovine arboviruses in *Culicoides* biting midges and sentinel cattle in southern Japan from 2003 to 2013. *Transbound Emerg Dis.* 63(6):e160-e172 (2016b)

北野 良夫, 山下 静馬, 福山 孝人: イバラキ病による斃死牛の病理学的観察, 日獣会誌, 41(12), 884-888 (1988)

Kitano Y. :Ibaraki disease in cattle. In: Infectious Diseases of Livestock, 2nd ed. (Coetzer, J. A. W. and Tustin, R. C. eds.), Oxford University Press, Cape Town. pp. 1221-1226 (2004)

Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 33, 1870-1874 (2016)

Kono R, Hirata M, Kaji M, Goto Y, Ikeda S, Yanase T, Kato T, Tanaka S, Tsutsui T, Imada T, Yamakawa M.: Bovine epizootic encephalomyelitis caused by Akabane virus in southern Japan. *BMC Vet Res.* 13, 4:20 (2008)

Kurogi H, Inaba Y, Goto Y, Miura Y, Takahashi H.: Serologic evidence for etiologic role of Akabane virus in epizootic abortion·arthrogryposis·hydranencephaly in cattle in Japan, 1972-1974. *Arch Virol.* 47(1), 71-83 (1975)

Kurogi H, Inaba Y, Takahashi E, Sato K, Satoda K.: Congenital abnormalities in newborn calves after inoculation of pregnant cows with Akabane virus. *Infect Immun.* 17(2), 338-343 (1977)

Kurogi H, Inaba Y, Takahashi E, Sato K, Goto Y, Satoda K, Omori T, Hatakeyama H : Development of inactivated vaccine for Akabane virus. *Nat. Inst Anim Health Q (Tokyo)*, 18, 97-108 (1978)

Lee VH : Isolation of viruses from field populations of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in Nigeria, *J Med Entomol*, 16, 76-79 (1979)

Maan N. S., Maan S., Nomikou K., Johnson D. J., El Harrak M., Madani H., Yadin H., Incoglu S., Yesilbag K., Allison A. B., Stallknecht D. E., Batten C., Anthony S. J., Mertens P. P. : RT-PCR assays for seven serotypes of epizootic haemorrhagic disease virus & their use to type strains from the Mediterranean region and North America. *PLoS ONE* 5: e12782 (2010)

Matsumori Y, Inai K, Yanase T, Ohashi S, Kato T, Yoshida K, Tsuda T.: Serological and genetic characterization of newly isolated Peaton virus in Japan. *Arch Virol.* 147(2), 401-410 (2002)

松森洋一：長崎県で流行したチュウザン病のウイルス性状と浸潤状況，臨床獣医，21(4)，23-26 (2003)

Mecham J. O., Dean V. C. : Protein coding assignment for the genome of

epizootic haemorrhagic disease virus. *J. Gen. Virol.* 69: 1255-1262 (1988)

Miura Y., Miyazato S., Kubo M., Goto Y., Kono Y. : Kawanabe virus, an isolate from a calf in Japan: a new virus belonging to the New Jersey serotype of the epizootic hemorrhagic disease serogroup of genus Orbivirus. *Jpn. J. Vet. Sci.* 50, 942-945 (1988)

Miyazato S, Miura Y, Hase M, Kubo M, Goto Y, Kono Y.: Encephalitis of cattle caused by Iriki isolate, a new strain belonging to Akabane virus. *Nihon Juigaku Zasshi.* 51(1), 128-136 (1989)

本川 正人, 清宮 幸男, 八重樫 岳司, 恒光 裕 : 東北地方で初めて確認されたイバラキウイルスの浸潤, 日獣会誌, 55(10), 658-660 (2002)

Murphy M. D., Hanson B. A., Howerth E. W., Stallknecht D. E. : Molecular characterization of epizootic hemorrhagic disease virus serotype 1 associated with a 1999 epizootic in white-tailed deer in the eastern United States. *J. Wildl. Dis.* 42, 616-624 (2006)

望月雅美 : 第3章 I. ウイルス学総論, 2. ウイルスの分類 p156, 獣医微生物学 第3版 (見上彪 監修) , 文永堂出版(2011)

Nagano, H., Hayashi, K., Kubo, M. and Miura, Y. : An outbreak of bovine ephemeral fever in Nagasaki Prefecture in 1988. *Nihon Juigaku Zasshi* , 52, 307-314 (1990)

中嶋久仁子, 池田省吾, 渡邊洋一郎, 永徳正裕, 津田知幸 : 鹿児島県における牛アルボウイルスの流行および抗体保有状況, 日獣会誌, 58, 180-185 (2005)

Niwa, T., Shirafuji, H., Ikemiyagi, K., Nitta, Y., Suzuki, M., Kato, T. and Yanase, T. : Occurrence of bovine ephemeral fever in Okinawa Prefecture, Japan, in 2012 and development of a reverse-transcription polymerase chain reaction assay to detect bovine ephemeral fever virus gene. *J. Vet. Med. Sci.* 77, 455-460 (2015)

農林水産省: 監視伝染病の発生状況 (2017)

http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/kansi_densen.html

Ogawa T and Fujisono S: Theoretical epidemiology on bovine ephemeral fever outbreaks in Tanegashima island, Kagoshima Prefecture of Japan in 1988. *J. Vet Med. Sci.* 54, 923-929 (1992)

Oğuzoğlu, T. Ç., Ertürk, A., Çizmecı, Ş. G., Koç, B. T. and Akça, Y. : A report on bovine ephemeral fever virus in Turkey: Antigenic variations of different strains of BEFV in the 1985 and 2012 outbreaks using partial glycoprotein gene sequences. *Transbound. Emerg. Dis.* 62, e66-e70 (2015)

Ohashi S., Yoshida K., Watanabe Y., Tsuda T. : Identification and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of a variant of the Ibaraki virus from naturally infected cattle and aborted fetuses in Japan. *J.*

Clin. Microbiol. 37, 3800-3803 (1999)

Ohashi S., Yoshida K., Yanase T., Tsuda T. : Analysis of intratypic variation evident in an Ibaraki virus strain and its epizootic hemorrhagic disease virus serogroup. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3684-3688 (2002)

Ohashi S., Yoshida K., Yanase T., Kato T., Tsuda T. : Simultaneous detection of bovine arboviruses using single-tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 120, 79-85 (2004a)

Ohashi S, Matsumori Y, Yanase T, Yamakawa M, Kato T, Tsuda T. : Evidence of an antigenic shift among Palyam serogroup orbiviruses. *J Clin Microbiol.* 42(10), 4610-4614 (2004b)

Omori T., Inaba Y., Morimoto T., Tanaka Y., Ishitani R. : Ibaraki virus, an agent of epizootic disease of cattle resembling bluetongue. I. Epidemiologic, clinical and pathologic observations and experimental transmission to calves. *Jpn. J. Microbiol.* 13, 139-157 (1969)

大谷 研文, 入部 忠, 村田 風夕子, 梁瀬 徹, 白藤 浩明, 山川 睦: アカバネ病診断におけるリアルタイム RT-PCR の応用, 日獣会誌, 66(6), 398-402 (2013)

Savini G., Afonso A., Mellor P., Aradaib I., Yadin H., Sanaa M., Wilson W.,

Monaco F., Domingo M. : Epizootic heamorrhagic disease. *Res. Vet. Sci.* 91, 1-17 (2011)

関慶久, 吉間昌行, 今井邦俊 : RT-PCR によるパラフィン標本からの牛ウイルス性下痢ウイルス遺伝子検出法の検討, *日獣会誌*, 55, 652-657 (2002)

Shirakawa, H., Ishibashi, K. and Ogawa, T. : A comparison of the epidemiology of bovine ephemeral fever in South Korea and south-western Japan. *Aust. Vet. J.* 71, 50-52 (1994)

St. George, T. D. : Bovine ephemeral fever. *Infectious Diseases of Livestock*, 2nd ed. (Coetzer, J.A.W. and Tustin, R. C. eds.), Oxford University Press, Cape Town. pp1183-1193 (2004)

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725-2729 (2013).

Ting, L. J., Lee, M. S., Lee, S. H., Tsai, H. J. and Lee, F. : Relationships of bovine ephemeral fever epizootics to population immunity and virus variation. *Vet. Microbiol.* 173, 241-248 (2014)

Ting, L. J., Lee, M. S., Lin, Y. L., Cheng, M. C. and Lee, F. : Invasion of exotic bovine ephemeral fever virus into Taiwan in 2013–2014. *Vet. Microbiol.* 182, 15-17 (2016)

Trinidad, L., Blasdell, K. R., Joubert, D. A., Davis, S. S., Melville, L., Kirkland, P. D., Coulibaly, F., Holmes, E. C. and Walker, P. J. : Evolution of bovine ephemeral fever virus in the Australian epizootic. *J. Virol.* 88, 1525-1535 (2014)

Tsutsui T., Hayama Y., Yamakawa M., Shirafuji H., Yanase T. : Flight behavior of adult *Culicoides oxystoma* and *Culicoides maculatus* under different temperatures in the laboratory. *Parasitol. Res.* 108, 1575-1578 (2011)

高森 広典 , 日野 正浩 , 高橋 幸治, 豊島 たまき , 竹田 百合子 , 高野 泰司 , 田中 省吾 , 山川 睦: 宮城県で発生したアカバネ病の発生時期による病理学的特徴とウイルス遺伝子検出部位の推移, 日獣会誌 , 66(1), 39-44 (2013)

東條悦子, 牧内浩幸, 福永哲也, 赤崎正武, 鬼塚剛, 中嶋久仁子: 2002年に鹿児島県内で発生したチュウザン病, 臨床獣医, 21(8), 49-52 (2003)

打越 律男, 江永 直樹, 下平 秀丸, 青木 保子, 南川 藤夫, 徳永 光伸, 今村 重春, 原 利視, 宮地 万吉, 梶原 忠彰: 1982年に発生したイバラキ病, 日獣会誌 , 36(11), 648-652 (1983)

内布 幸典, 石橋 和樹, 横山 敦史, 川鍋 真里, 高木 英二: 福岡県でウイルスの越冬が疑われたイバラキ病の2年連続発生, 日獣会誌, 53(6), 372-376 (2000)

Venter, G. J., Hamblin, C. and Paweska, J. T. : Determination of the oral susceptibility of South African livestock-associated biting midges, *Culicoides* species, to bovine ephemeral fever virus. *Med. Vet. Entomol.* 17, 133-137 (2003)

Walker, P. J. and Klement, E. : Epidemiology and control of bovine ephemeral fever. *Vet. Res.* 46, 124 (2015)

Yanase T, Fukutomi T, Yoshida K, Kato T, Ohashi S, Yamakawa M, Tsuda T. : The emergence in Japan of Sathuperi virus, a tropical Simbu serogroup virus of the genus Orthobunyavirus. *Arch Virol.* 149(5), 1007-1013 (2004)

Yanase, T., Kato, T., Kubo, T., Yoshida, K., Ohashi, S., Yamakawa, M., Miura, Y. and Tsuda, T. : Isolation of bovine arboviruses from *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in southern Japan: 1985-2002. *J. Med. Entomol.* 42, 63-67 (2005)

Yanase T, Maeda K, Kato T, Nyuta S, Kamata H, Yamakawa M, Tsuda T : The resurgence of Shamonda virus, an African Simbu group virus of the genus Orthobunyavirus, in Japan. *Arch Virol*, 150, 361-369 (2005)

梁瀬徹 : ヌカカが媒介する家畜のアルボウイルス, 衛生動物, 60(3), 195-212 (2009)

Yanase, T., Hirata, M., Matsumori, Y., Matsumura, M., Kato, T., Shirafuji, H., Yamakawa, M., Hayama, Y. and Tsutsui, T. : Detection of *Culicoides brevitarsis* activity in Kyushu. *J. Vet. Med. Sci.* 73, 1649-1652 (2011)

Yanase T, Kato T, Aizawa M, Shuto Y, Shirafuji H, Yamakawa M, Tsuda T : Genetic reassortment between Sathuperi and Shamonda viruses of the genus Orthobunyavirus in nature: implications for their genetic relationship to Schmollenberg virus, *Arch Virol*, 157, 1611-1616 (2012)

Yanase T, Matsumoto Y, Matsumori Y, Aizawa M, Hirata M, Kato T, Shirafuji H, Yamakawa M, Tsuda T, Noda H. : Molecular identification of field-collected *Culicoides* larvae in the southern part of Japan, *J Med Entomol*, 50, 1105-1110 (2013)

梁瀬徹, 早山陽子, 白藤浩明, 山川睦, 加藤友子, 堀脇浩孝, 筒井俊之, 寺田裕 : Light-emitting diodes (LED)を利用した *Culicoides* 属ヌカカ捕集用ライトトラップの開発, 日本応用動物昆虫学会誌, 58(2), 127-132 (2014)

梁瀬徹 : -最新の家畜疾病情報 (XI) -アカバネ病, 日獣会誌, 68, 674-676 (2015)

Yun SI, Lee YM.: Japanese encephalitis: the virus and vaccines. *Hum Vaccin Immunother.* 10(2), 263-279 (2014)

渡邊 洋一郎, 牧内 浩幸, 今藤 豊重, 山崎 嘉都夫, 鬼塚 剛, 大橋 誠一: 1997年に鹿児島県で発生したイバラキ病と流死産胎子から分離されたウイルスの性

状, 日獣会誌, 53(5), 302-306 (2000)

Zheng, F. and Qiu, C. : Phylogenetic relationships of the glycoprotein gene of bovine ephemeral fever virus isolated from mainland China, Taiwan, Japan, Turkey, Israel and Australia. *Virologica J.* 9, 268 (2012)

Zheng, F. Y., Chen, Q. W., Li, Z., Gong, X. W., Wang, J. D. and Yin, H. : Experimental infection with bovine ephemeral fever virus and analysis of its antibody response cattle. *Res. Vet. Sci.* 104, 146-151 (2016)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、懇切なるご指導及びご助言を賜りました、農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門の梁瀬 徹 上級研究員に深く感謝申し上げます。また、平成 24 年度長期研修中より、多大なるご指導及びご鞭撻を賜りました、農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門の加藤 友子氏、白藤 浩明 主任研究員、田中 省吾 暖地疾病防除ユニット長ならびに山川 睦 海外病研究調整監をはじめとする諸先生方に深謝致します。

また、論文作成にあたり、ご助言を賜りました、鹿児島大学共同獣医学部 基礎獣医学講座 分子病態学分野の叶内 宏明 准教授に心より感謝申し上げます。

さらに、本研究の遂行ならびに日常の業務においてご助言、ご協力を賜りました、鹿児島中央家畜保健衛生所の藤岡 舞 技術専門員（現、南薩家畜保健衛生所）、坂口 善二郎 技術主査、上村 俊介 技術主査（現、農政部畜産課）をはじめとする病性鑑定課の皆様、同所の藤園 昭一郎 所長及び岡野 良一 所長（現、鹿児島県種豚改良協会）、宮崎家畜保健衛生所の松本 春菜 主任技師ならびに福田 美津紀 技師をはじめとする各都道府県のウイルス担当者の皆様、そして、鹿児島県内の家畜保健衛生所の皆様方に心よりお礼申し上げます。

最後に、本研究の遂行、論文の作成に際し、常に支えてくれた家族に心からの感謝の意を表し、謝辞とさせていただきます。