アカバネウイルスの豚感染実験

丸山 成和, 丸山 典彦, 田中 良和
伊藤 宏, 植松 典昭

千葉県血清研究所

(昭和58年7月8日:受理)

1972~1975年, わが国で発生した牛の流早死産および異常子の原因は, アカバネウイルス (以下 AKV) であることが判明している. 牛以外の家畜の本ウイルスに対する抗体保有状況は, 古屋ら²⁾が, 人については中村ら³⁾が報告している. 家畜の感染実験については, Kurogi ら⁵⁾ Ikeda and Yonaiyama⁴⁾が報告している. 著者らは1977~1978年, 千葉県内の人1348例. 豚1134例について AKV に対する赤血球凝集抑制 (HI) 抗体価を測定した結果, 人では1.3%, 豚では1.4%の陽性率 (HI 抗体価10以上を陽性として判定) であった⁸⁾. 今回豚が AKV に感染した場合の所見を知る目的で感染実験を実施し, 若干の知見を得たので報告する.

実験豚は7カ月齢の SPF オーミニ豚10頭 (♂6頭, ♀4頭) を使用した. これらの実験豚はウイルス接種前36日に同居させた. ♀4頭は解剖時妊娠しており, ウィルス接種時の妊娠日齢は, 解剖時の胎児の大きさから換算すると, Nos. 4, 9は0日, Nos. 7, 10は32~42日であった. 使用ウイルスは AKV JaGAr 39株¹⁰⁾で哺乳マウス脳で20代継代し, その感染価は Vero 細胞で $10^{8.75}$ TCID₅₀/ml であった. このウイルス液を細胞維持液 (MM) (Eagle's MEM10%千葉血清製, Bovine Albumine Fraction V. 0.11% ARMOUR 社製, Tryptose phosphate broth 10% Difco 社製, 7.5% NaHCO₃ 2%, penicillin, streptomycin 各100 μ g/ml 含有) で希釈し $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml と $10^{8.0}$ TCID₅₀/ml のウイルス液を調製して豚に接種した. 接種方法は1ml($10^{3.0}$ TCID₅₀)を2頭 (♂, ♀各1頭 Nos. 3, 4) の皮下と2頭 (♂, ♀

各1頭 Nos. 7, 8) の静脈内に, 1ml($10^{5.0}$ TCID₅₀)を2頭 (♂ Nos. 1, 2) の皮下と2頭 (♀2頭 Nos. 5, 6) の静脈内に接種した. さらに1頭 (♀ No. 9) は皮下と静脈内に各1ml($10^{5.0}$ TCID₅₀) あて接種した. 残りの1頭 (♀ No. 10) はウイルス非接種豚とした. 実験豚は, ウィルス接種後1週間, 体温, 臨床所見, ウィルス血症を観察し, その後各週ごとに採血して HI 試験と中和 (NT) 試験を実施した. 雌4頭のうち Nos. 7, 9 はウィルス接種後3週に, Nos. 4, 10は4週後にそれぞれ解剖し, 胎児からのウィルス回収を試みた. HI⁹⁾ および NT 試験⁶⁾は microtiter 法, ウィルス血症の証明, 胎児からのウィルス回収には Vero 細胞を用いた. 各胎児の臓器は細胞増殖用培養液 (GM) (MM に Bovine Albumine Fraction V のかわりに56°C 30分非働化した AKV 中和抗体陰性子牛血清10%を添加し, 7.5% NaHCO₃ を1.5%含有) で10%乳剤とした. この乳剤を3,000rpm 30分遠心し, その上清を哺乳マウス脳内および Vero 細胞に接種した. Vero 細胞では, 細胞変性効果 (CPE) を示した細胞上清を Vero 細胞で2~3代継代後, CPE の有無により判定した.

表・1に示すように AKV を接種した9頭のうち, 元気食欲の減退を示したものが3頭, 41°C以上の発熱があったものが2頭, 白血球減少症, ウィルス血症を示したものはおのおの8頭であった. ウィルス血症はウィルス接種後2~4日にみられ, そのウィルス価は $10^{2.0}$ ~ $10^{8.0}$ TCID₅₀/ml であった. No. 8は臨床所見で, No. 6はウィルス血症でおのおの陰性であった. ウィルス接種後3週の抗体価は, HI 価10以上が9頭中5頭, NT 価は9頭全頭が4以上を示した.

表・2は胎児所見について示した. 肉眼的には, いずれも形態異常は認められなかった. 4頭のうちウィルスを接種した3頭 (Nos. 4, 7, 9) はいずれも羊水から $10^{2.0}$ ~ $10^{3.0}$ TCID₅₀/ml のウィルスが回収された. No. 7の

Experimental infection of pigs with Akabane virus.

Seika MARUYAMA, Fumihiko MARUYAMA,
Yoshikazu TANAKA, Hiroshi ITOH,
Noriaki UEMATSU.
Chiba Serum Institute.

表・1 アカバネウイルス接種豚の臨床症状、ウイルス血症および HI. NT 価

豚				接種ドースと経路		臨床症状				ウイルス血症							HI. NT 価 (上段 HI. 下段 NT)			
No.	性別	妊日	娠齡	ドース (TCID ₅₀ /ml)	経路	元氣 食欲	発熱	白血球 減少	神経 症状	接種後日数							接種後週			
										1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4
1	♂			5.0	SC	—	—	+	—	—	—	+	+	—	—	—	<5 2	<5 2	40 64	40 32
2	♂			"	"	—	—	+	—	—	—	+	+	—	—	—	<5 2	5 4	160 128	80 64
3	♂			3.0	"	—	—	+	—	—	+	+	—	—	—	—	<5 2	<5 4	40 32	20 16
4	♀	0		"	"	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	—	<5 2	<5 8	10 4	5 4
5	♂			5.0	iV	+	—	+	—	—	+	+	—	—	—	—	<5 2	5 8	40 128	40 64
6	♂			"	"	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	<5 2	<5 4	<5 8	<5 4
7	♀	32~42		3.0	"	+	—	+	—	—	—	+	—	—	—	—	<5 2	<5 4	<5 4	/
8	♂			"	"	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	<5 2	<5 2	<5 4	<5 2
9	♀	0		5.0	SC. iV	+	—	+	—	—	+	+	—	—	—	—	<5 2	<5 8	5 4	/
10	♀	32~42		/	/	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<5 2	<5 2	<5 2	<5 2

妊娠日齡：解剖時の胎児の大きさから換算したウイルス接種時の妊娠日齡。

SC：皮下接種，iV：静脈内接種，No. 9 は皮下と静脈内に同時接種，No. 10 はウイルス非接種豚。

表・2 摘出胎児の所見と胎児からのウイルス回収

実験豚 No.	胎児数	胎児の 大きさ(cm)	胎児の 胎齡※ ¹	羊水量 (ml)	肉眼的異 常の有無	胎児からのウイルス回収						
						脳	肺	肝	脾	腎	羊水	胎児※ ²
4	7	≒ 1	20	≒ 80	—	●※ ³	●	●	●	●	2.0※ ⁴	2.0
7	10	12~15	60~70	≒ 30	—	1※ ⁵	—	—	—	—	2.0	
						2	—	—	—	—		
						3>3.0	—	—	—	—		
						4	—	—	—	—		
						5 3.0	—	—	—	—		
						6 3.0	—	—	—	—		
9	9	≒ 1	20	≒ 150	—	●	●	●	●	●	3.0	2.0
10 (ウイルス 非接種豚)	9	9~10	60~70	≒ 30	—	1	—	—	—	—	—	
						2	—	—	—	—		
						3	—	—	—	—		
						4	—	—	—	—		
						5	—	—	—	—		
						6	—	—	—	—		

※¹：解剖時の胎児の大きさから換算した胎齡。 ※²：胎児の10%乳剤 (No. 4 は 7 頭プール No. 9 は 9 頭プール)。

※³：試験せず。 ※⁴：TCID₅₀/g または ml。 ※⁵：胎児の個体番号。

胎児数は10頭で、体長は12~15cmであった。このうち6頭について各臓器からウイルス回収を試みた。その結果3頭の脳から $10^{3.0}$ TCID₅₀/g以上のウイルスが回収された。しかし他の3頭の脳からは回収出来なかった。Nos. 4, 9の胎児は、体長約1cmで胎児数がそれぞれ7頭と9頭であった。これら7頭と9頭の胎児をおのおのプールして、GMで10%乳剤にしウイルス回収を試みた。その結果、いずれも $10^{2.0}$ TCID₅₀/gのウイルスが回収された。一方ウイルス非接種頭(No. 10)の胎児9頭中6頭について、各臓器よりウイルス回収を試みたが、いずれも陰性であった。

実験動物(マウス、ハムスター、モルモット、ウサギ)でのAKV感染実験は、Anderson and Campbell¹⁾, Kurogiら²⁾および本橋ら(私信)により試みられている。しかし牛、めん羊および山羊以外の家畜、特に豚での感染実験はみられない。著者らの実験では、感染豚は白血球減少症、ウイルス血症を示し、ウイルス接種後3~4週にHI抗体価10~160を示した。Kurogiら³⁾の妊娠山羊でのAKV感染実験およびIkeda and Yonaiyama⁴⁾の鶏胎児でのAKV感染実験では、いずれも胎児の脊椎側湾症などの特徴的形態異常が観察されたが、我々の実験ではみられなかった。しかし実験に使用した豚の解剖時における胎児の体長は、母豚の生年月日、同居開始日が同時であったにもかかわらずかなり差があった。体長から解剖時の胎齢を換算するとNos. 4, 9は約20日、Nos. 7, 10は60~70日となる。一方同居開始日を種付月日と仮定すると、解剖時の胎齢は57~64日となりNos. 7, 10は体長と一致するがNos. 4, 9は一致しない。Nos. 4, 9の胎児が正常なのかどうかは、種付月日を明確にした試験でさらに検討が必要であろう。また胎児乳剤や胎児脳よりウイルス回収が可能であったことは、AKVの垂直感染の可能性を示唆するものと考ええる。一方人および豚の抗体保有率は牛、めん羊および山羊に比較し非常に低いことから^{2), 8), 9)}、本ウイルスの人および豚における感受性は低いものと考えられるが、今後豚異常産および豚胎児の形態異常とAKVとの関連性などの検討が必要と考ええる。

文 献

- 1) Anderson, A. A. and Campbell, C. h. (1978). Experimental Placental transfer of Akabane virus in the hamster. *Amer. J. vet. Res.* **39**, 301-304.
- 2) 古屋美人, 広池忠夫, 中尾丹美, 荏司秀雄, 加藤清人, 原田熊幸, 稲葉右二, (1977). 千葉県下における各種動物および人血清のアカバネウイルスに対する抗体調査, 日獣会誌, **30**, 440-444.
- 3) 後藤義之 (1976). アカバネ病の血清診断法とくにHI試験の術式について. 日獣会誌, **29**, **11**, 628-631.
- 4) Ikeda, S., and Yonaiyama, K. (1978). Deformities of chick embryos in experimental Akabane virus infection. *Nat. Inst. Anim. Hlth. quart.* **18**, 89-96.
- 5) Kurogi, H., Inaba, Y., Takahashi, E., et al. (1977). Experimental infection of pregnant goats with Akabane virus. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.* **17**, 1-9.
- 6) Kurogi, H., Inaba, Y., Miura, Y., et al. (1975). Serological evidence for etiologic role of Akabane virus in epizootic abortion Arthrogryposis-Hydranencephaly in cattle in Japan, 1972-1974. *Archives of Virology.* **47**, 71-83.
- 7) Kurogi, H., Inaba, Y., Takahashi, E., et al. (1978). Pathogenicity of different strains of Akabane virus for mice. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.* **18**, 1-7.
- 8) 丸山成和, 丸山典彦, 伊藤 宏, 田中良和, 植松典昭 (1983). 千葉県内における人および豚のアカバネウイルスに対する抗体調査, 日獣会誌, **36**, 330-333.
- 9) 中村忠義, 松山達夫, 奥野 剛, 大谷 明 (1967). アルボウイルスの抗体保有調査, 医学のあゆみ, **60**, **2**, 72-73.
- 10) Oya, A., Okuno, T., Ogata, T., Kobayashi, I., and Matsuyama, T. (1961). Akabane, a new arbo virus isolated in Japan. *Jap. J. med. Sci. Biol.* **14**, 101-108.