岡山県で分離されたアカバネウイルスの 抗原性と遺伝子解析

福富豊子^{1)†} 長井 誠²⁾ 奥田宏健¹⁾ 明石博臣³⁾
秦 守男¹⁾ 萱原佳美¹⁾ 秦野好博¹⁾

- 1) 岡山県家畜病性鑑定所 (〒709-2123 御津郡御津町河内2770-1)
2) 石川県南部家畜保健衛生所 (〒920-3101 金沢市才田町戊324-2)
3) 東京大学大学院農学生命科学研究科 (〒113-8657 文京区弥生1-1-1)

(2003年3月24日受付・2003年10月9日受理)

要 約

2001年9月～11月に岡山県では調査戸数の35%, 調査対象おとり牛の27.6%にアカバネウイルス (AKAV) に対する抗体陽転が認められた。2001年9月下旬に採血した未越夏おとり牛1頭の血漿および血球からウイルスが分離された。交差中和試験の結果, 分離株はAKAVと同定されたが, JaGAR39株やIriki株とは異なる抗原性を示すことが明らかとなった。そこで, 分離株の核蛋白コード領域の塩基配列を決定し進化系統樹解析を行った結果, 分離株はIriki株と同じクラスターに分類されるが, そのクラスター内では大きく離れた位置にあることから, 遺伝子構造の異なる株である可能性が示唆された。——キーワード: アカバネウイルス, 遺伝子解析, 抗原性の多様, Iriki株, おとり牛。

----- 日獣会誌 57, 101～105 (2004)

アカバネウイルス (AKAV) は, ブニヤウイルス科ブニヤウイルス属のシンプ群に属し, 吸血昆虫によって媒介され, 妊娠牛に感染した場合, 異常産を引き起こすことが知られている [8, 9]。ブニヤウイルスゲノムは, 3種類 (L, M, S) のマイナス1本鎖RNAで構成され, S RNAは核蛋白と非構造蛋白を, M RNAは粒子表面に存在し中和抗原でもある糖蛋白G1, 同じく糖蛋白であるG2および非構造蛋白を, L RNAはRNAポリメラーゼであるL蛋白をコードしている [5]。

近年, 岡山県ではAKAVの流行が頻発し [7], 特に1998年以降毎年その流行が確認されている。2001年においても, 本ウイルスの流行が確認されたため, おとり牛の血液を用いてウイルス分離を試みたところ, JaGAR39株やIriki株とは異なる抗原性を示すAKAVが分離された。分離株の遺伝子解析を実施するとともに, 分離株を用いた抗体調査を実施した。

材 料 お よ び 方 法

疫学調査用血清材料: 岡山県内で飼育されている20戸の未越夏牛おとり牛58頭から2001年6, 7, 8, 9, 10および11月に血清を採取し, AKAVに対する抗体を

中和試験により測定した。

異常産血清材料: 2001年9月～2002年3月に病性鑑定依頼があった流・早・死産10例 (1例は双子), 初乳未摂取先天異常子牛4例および初乳摂取先天異常子牛8例とそれらの母牛から採取した血清あるいは流死産胎子の場合は体液を用いた。

病理組織学的検査: 病理組織学的検査が可能であった3例の流産胎子, 4例の死産胎子, 4例の異常子牛の計11例について脳および主要臓器を10%ホルマリン液で固定後, パラフィン切片を作製しヘマトキシリン・エオジン染色を行い鏡検した。

中和試験: 抗体検査はマイクロタイター法による血清希釈中和試験で実施した。すなわち, 血清は56℃30分加熱非働化した後2倍段階希釈し, 各希釈液に100TCID₅₀に調整したウイルス液を等量加え37℃1時間感作後, HmLu-1細胞を各ウエルに0.1ml/ずつ加え, 5%炭酸ガス培養器で37℃7日間培養した。細胞変性効果 (CPE) を抑制した血清の最高希釈の逆数を中和抗体価とし, 2倍以上を陽性とした。

ウイルス分離材料: 2001年9月下旬に6戸12頭の初越夏おとり牛から採取したヘパリン加血液をウイルス分

† 連絡責任者: 福富豊子 (岡山県家畜病性鑑定所)

〒709-2123 御津郡御津町河内2770-1 ☎0867-24-3855 FAX 0867-24-3856

離に供した。ヘパリン加血液は血球と血漿に分離し、血球はリン酸緩衝液（PBS）で3回洗浄し、PBSに浮遊した。これらはウイルス分離に供するまで -80°C で保管した。

培養細胞：ウイルス分離にはHmLu-1細胞およびBHK-21細胞を、中和試験にはHmLu-1細胞を用いた。

なお、細胞増殖用培養液はイーグルMEM^{a)}を基礎培養液とした既報[6]のものを、細胞維持用培養液は細胞増殖用培養液の牛胎子血清を2%としたものを用いた。

ウイルス分離：HmLu-1細胞およびBHK-21細胞を単層培養した小試験管に血漿および血球を0.1ml接種し 37°C 90分吸着した後、細胞維持用培養液を加え 34°C で回転培養を行い、CPEの有無を観察した。CPEが観察されない場合には3代まで盲継代を実施した。

使用ウイルス：中和試験にはAKAV JaGAR-39株[13]、Iriki株[12]および分離ウイルスを用いた。

免疫血清：AKAV JaGAR-39株およびIriki株に対する免疫血清は独立行政法人動物衛生研究所から分与された。分離株に対する免疫血清は、既報[6]に準じ作成した。

RT-PCR法：市販のキット^{b)}を用いてウイルス培養上清からウイルスRNAを抽出した後、Akashiら[4]が報告したS RNA核蛋白コード領域を標的としたプライマーAKSF19、AKSR740を用いて市販のキット^{c)}によりRT-PCRを実施した。なお、逆転写酵素反応は $42^{\circ}\text{C} \cdot 15\text{分}$ 、 $99^{\circ}\text{C} \cdot 5\text{分}$ 、 $5^{\circ}\text{C} \cdot 5\text{分}$ で行い、PCRは $94^{\circ}\text{C} \cdot 30\text{秒}$ 、 $55^{\circ}\text{C} \cdot 30\text{秒}$ 、 $72^{\circ}\text{C} \cdot 1\text{分}$ を1サイクルとし35回繰り返す。最後に $72^{\circ}\text{C} \cdot 7\text{分}$ 反応させた。反応終了後、増幅産物は2%のアガロースゲル電気泳動によって確認した。

核蛋白コード領域の塩基配列の決定と進化系統樹解析：分離株の核蛋白コード領域の塩基配列を決定するため、QIAGEN EX II Gel Extraction Kit^{d)}を用いてDNAを精製し、ABI PRISM 377 DNA Sequencer^{e)}で塩基配列を読みとった。なお、塩基配列の決定は外部施設^{f)}に委託した。

進化系統樹はClustal Wプログラム[15]を用いて近隣接合法[14]により作成した。核蛋白コード領域の進化系統樹解析には、DDBJ（DNA Data Bank of Japan）データベースから得たAKAV 15株およびTinaroo virus (TINV)を加えた。

表1 地域別2001年おとり牛のアカパネウイルスに対する抗体陽転状況

地 域	アカパネウイルス (JaGAR39株)			抗体陽転時期
	抗体陽転戸数/ 検査戸数陽 転率(%)	抗体陽転頭数/ 検査頭数陽 転率(%)		
南 部	2/4 (50.0)	5/12 (41.7)		10月下旬～11月下旬
南西部	1/4 (25.0)	3/12 (25.0)		10月下旬
中西部	0/4 (0)	0/10 (0)		
北西部	1/4 (25.0)	1/12 (8.3)		10月下旬
北東部	3/4 (75.0)	7/12 (58.3)		9月下旬～11月下旬
県全体	7/20 (35.0)	16/58 (27.6)		9月下旬～11月下旬

表2 分離ウイルスとアカパネウイルスとの交差中和試験

ウイルス	免 疫 血 清		
	Okayama 2001	JaGAR39	Iriki
Okayama 2001	1,024	128	256
JaGAR39	4,096	4,096	4,096
Iriki	512	256	2,048

成 績

地域別の2001年おとり牛のAKAVに対する抗体陽転状況：2001年には調査対象戸数の35.0%，調査対象おとり牛の27.6%が陽転した。地域別にみると、県中西部を除く広範囲な地域でAKAVに対するおとり牛の抗体陽転が認められた。特に県北東部と県南部は、それぞれ調査対象戸数の75.0%，50.0%，同様に調査対象おとり牛の58.3%，41.7%が陽転し、他の地域に比べ高い陽転率を示した。また、抗体陽転時期は県北東部で最も早く9月下旬～11月下旬、他の地域は10月下旬～11月下旬であった（表1）。

ウイルス分離：おとり牛の血液からウイルス分離を実施した結果、県北東部で飼養される1頭の血漿および血球材料からHmLu-1細胞およびBHK-21細胞にCPEを示すウイルスが分離され、Okayama2001株と名付けた。なお、血漿および血球分離ウイルスは、血漿由来Okayama 2001株免疫血清によって同程度に中和され、同一ウイルスと考えられたため、以下の試験にはOkayama 2001株を用いた。

分離ウイルスとAKAVとの交差中和試験：交差中和試験の結果、AKAV JaGAR39株に対する免疫血清のOkayama2001株とIriki株に対する抗体価はJaGAR39株に対する抗体価の1/32～1/16倍を示した。いっぽう、Iriki株に対する免疫血清は、JaGAR39株に対しIriki株に対するのと同様な抗体価を示したが、Okayama2001株に対してはIriki株に対する抗体価の1/8の256倍を示した。これに対し、Okayama2001株に対する免疫血清は、JaGAR39株とIriki株に対しOkaya-

a) 日水製薬(株)，東京。 b) RNA Zol B, TEST, U.S.A.

c) RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1, タカラバイオ(株)，滋賀。

d) QIAGEN, Germany。 e) Applied Biosystems, U.S.A.

f) タカラバイオ(株)，DNA解析センター，滋賀。

図1 アカバネウイルス S RNA の進化系統樹

表3 核蛋白コード領域塩基配列の相同性

ウイルス	AKAV			Okayama 2001
	JaGAr39	OBE-1	Iriki	
AKAV ^{a)}				
JaGAr39	100	98.8	98.2	97.5
OBE-1		100	97.3	96.9
Iriki			100	97.3
Okayama 2001				100

a) : アカバネウイルス

ma2001 株と同様な抗体価を示した (表2)。

これらの結果から、Okayama2001 株はAKAV と同定されたが、Okayama2001 株はJaGAr39 株やIriki 株とは異なる抗原性を示すことが判明した。そこでさらに詳細な分離株の性状解析のため遺伝子解析を試みた。

核蛋白コード領域塩基配列の相同性：AKAV 遺伝子を検出するプライマーを用いて、RT-PCRにより遺伝子検出を試みたところ、分離ウイルス感染細胞培養上清から遺伝子が検出された。Okayama2001 株のRT-PCR産物は722bpの大きさであり、分離株を含めAKAV 株間の相同性は97～99%と非常に高かった (表3)。

核蛋白コード領域の進化系統樹解析：進化系統樹解析の結果、分離ウイルス Okayama 2001 株は1984年に鹿児島県で分離されたIriki 株に代表される流行株と同じクラスターに分類されるものの、そのグループ内では大きく離れた位置にあることが明らかになった (図1)。

異常産関連ウイルス抗体検査：2001年9月～2002年3月に発生した異常産22症例について異常産関連ウイルスに対する抗体検査を実施したが、初乳摂取子牛以外にはOkayama2001株を含めAKAVに対する抗体を保有する異常産子はなく、アカバネ病は確認されなかった。なお、胎子体液および初乳未摂取子牛からアイノウイルス、イバラキウイルス、チュウザンウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルスに対する抗体は検出されなかった。

病理組織学的所見：いずれの材料についてもウイルス感染を示唆する所見は認められなかった。

考 察

岡山県では1998年に大規模なAKAVの流行が認められ [7]、それ以降、毎年本ウイルスの流行が確認されている。2001年の流行は、9月に県北東部から始まり、県中西部を除く広い地域で11月まで認められ、調査対象戸数の35%、調査対象おとり牛の27.6%が陽転した。

岡山県では、1974年にアカバネ病ワクチンの原株となったOBE-1株 [9] が分離されて以来、27年ぶりにAKAVが分離された。分離ウイルスは、AKAVの標準株であるJaGAr39株とは抗原性が異なることが明らかになった。また、1984年に鹿児島県で [12]、1992年には台湾で [11] 子牛の非化膿性脳炎および神経症状を示す子牛からIriki株が分離されているが、今回のOkayama2001株はIriki株とも抗原性を異にすることが明らかになった。

近年, AKAV の病原性, 抗原性の変異が報告されている [1, 7, 12, 16, 17]. また, 韓国では 2000 年に神経症状を示した成牛の AKAV 感染が報告されているが [10], 本県では 2001 年の AKAV 流行期に子牛や成牛に AKAV が関与したと思われる神経症状を示す症例は確認されなかった. さらに, Okayama2001 株を用いて, 病性鑑定依頼があった異常産材料について抗体検査を実施したが, Okayama2001 株が関与したと思われる異常産は確認できなかった. その要因として, 1998 年以降毎年 AKAV の流行が認められ [7], 県内牛群の抗体陽性率が高かったことが推測され, 大きな流行に至らなかったことが考えられる.

今回分離した Okayama2001 株の異常産への関与や子牛および成牛への病原性については明らかにすることができなかったが, 今後, これらについて検討する必要があると考える.

Akashi ら [2, 3] は, S RNA 遺伝子解析により AKAV 国内分離株が大きく 3 つのクラスターに分けられることを明らかにし, 海外から侵入時期を異にした AKAV が定着している可能性を示唆した. 核蛋白コード領域の進化系統樹解析の結果, 分離株は Iriki 株と同じクラスターに分類されたが, そのクラスター内では大きく離れた位置にあり, 遺伝子構造の異なる株である可能性が示唆された. なお, 今回遺伝子解析対象とした S RNA は, 核蛋白をコードする遺伝子であり, 中和抗原性や病原性に関わるとされる G1 糖蛋白や G2 糖蛋白をコードする M RNA [5] とは分節を異にするが, 塩基配列が公表されているところから AKAV の進化をみる目的で使用した. 今回の分離株の由来については, 今後, 同時期に分離された株の遺伝子解析データが集積されることによって明らかになると思われる.

アカパネ病予防にはワクチン接種の励行はもちろんのこと, 多くのウイルスを分離し詳細な抗原性を調べることが, 各地域で流行している AKAV の疫学解明のために重要だと考える.

最後に, AKAV 免疫血清を分与して頂いた独立行政法人動物

衛生研究所, おとり牛からの採材にご協力を頂いた家畜保健衛生所の関係各位に深謝する.

引用文献

- [1] Akashi H, Inaba Y : Virus Res, 47, 187-196 (1997)
- [2] Akashi H, Kaku Y, Kong X, Pang H : J Gen Virol, 78, 2847-2851 (1997)
- [3] Akashi H, Nakamura K, Murakami T : J Vet Med Sci, 59, 837-840 (1997)
- [4] Akashi H, Onuma S, Nagano H, Ohta M, Fukutomi T : Arch virol, 144, 2101-2109 (1999)
- [5] Bishop, D. H. L. 1990. pp. 1155-1173. In : Virology, 2nd ed. (Fields, B. N., Knipe, D. M., Chanock, R. M., Hirsch, M. S., Melnick, J. L., and Monath, T. P. eds.) New York, Raven Press.
- [6] 福富豊子, 奥田宏健, 明石博臣, 別所利恵, 橋本尚美, 三戸利博, 長野博子, 長井 誠 : 日獣会誌, 50, 442-447 (1997)
- [7] 福富豊子, 奥田宏健, 明石博臣, 小澤清一郎, 多田幸四郎, 萱原佳美 : 日獣会誌, 53, 377-382 (2000)
- [8] Kurogi H, Inaba Y, Goto Y, Miura Y, Takahashi H : Arch Virol, 47, 71-83 (1975)
- [9] Kurogi H, Inaba Y, Takahashi E, Sato K, Omori T, Miura Y, Goto Y, Fujiwara Y, Hatano Y, Kodama K, Fukuyama S, Sasaki N, Matumoto M : Arch Virol, 51, 67-74 (1976)
- [10] Lee JK, Park JS, Choi JH, Park BK, Lee BC, Hwang WS, Kim JH, Jean YH, Haritani M, Yoo HS, Kim DY : Vet Pathol, 39, 269-273 (2002)
- [11] Liao YK, Lu YS, Goto Y, Inaba Y : J Basic Microbiol, 36, 33-39 (1996)
- [12] Miyazato S, Miura Y, Hase M, Kubo M, Goto Y, Kono Y : Jpn J Vet Sci, 51, 128-136 (1989)
- [13] Oya A, Okuno T, Ogata T, Kobayashi I, Matumoto T : Jpn J Med Sci Biol, 14, 101-108 (1961)
- [14] Saitou N, Nei M : Mol Biol Evol, 4, 406-425 (1987)
- [15] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ : Nucleic Acids Res, 22, 4673-4680 (1994)
- [16] Uchida K, Murakami T, Sueyoshi M, Tsuda T, Inai K, Acorda JA, Yamaguchi R, Tateyama S : J Vet Diagn Invest, 12, 518-524 (2000)
- [17] Yoshida K, Tsuda T : Clin Diagn Lab Immunol, 5, 192-198 (1998)

Antigenic and Genetic Characteristics of the Akabane Viruses Isolated from
Sentinel Cattle in Okayama Prefecture

Toyoko FUKUTOMI^{*†}, Makoto NAGAI, Kouken OKUDA, Hiroomi AKASHI, Morio HADA,
Yoshimi KAYAHARA and Yoshihiro HATANO

^{*} Okayama Prefecture Veterinary Diagnostic Laboratory, 2770-1 Mitsu-cho, Mitsu,
709-2123, Japan

SUMMARY

A serological survey conducted in Okayama Prefecture from September to November, 2001, revealed that 35% of the farms and 27.6% of sentinel calves investigated were positive for antibodies to the Akabane virus (AKAV). The virus was isolated from erythrocytes and blood plasma of a sentinel calf in late September. As a result of the cross-neutralization (NT) test, the isolates demonstrated various antigenic relationships to the reference (JaGAR39) strain and a distinct antigenic relationship with a highly virulent AKAV known as the Iriki strain. S RNA sequence data identified the isolate as the same as reported AKAVs. Phylogenetic analysis with known AKAVs put the isolate in the cluster that includes the Iriki strain, but in a very divergent position. These results suggest that the isolate may be a new genotype.

— Key words : Akabane virus, gene analysis, diversity of antigenic relationships, Iriki strain, sentinel calves.

[†] Correspondence to : Toyoko FUKUTOMI (Okayama Prefecture Veterinary Diagnostic Laboratory)

2770-1 Mitsu-cho, Mitsu, 709-2123, Japan TEL 0867-24-3855 FAX 0867-24-3856

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 57, 101 ~ 105 (2004)

マイシリン製剤20g

乾乳用 ホーミング[®]DC

〈乾乳時〉1容器全量注入

マイシリン製剤20g

ホーミング[®]MC

〈泌乳時の乳房炎治療〉1容器全量注入

ジクロキサシリン製剤20g

ホーミング[®]DX

〈泌乳時の乳房炎治療〉1容器全量注入

高単位ビタミンAD3E内服薬1L

ビタオイル 2液

投与量：〈分娩時〉200cc

高単位VA特殊調整 1000万IU 100mL

エクセレントA-1000液

投与量：200cc

総合強壮・強肝内服液

パラゲンドール[®]

投与量：〈分娩時〉500cc

Riken

理研畜産化薬株式会社

〒332-0011 埼玉県川口市元郷4丁目1番8号

Tel: 048 (224) 8451 (代)

Fax: 048 (224) 8451

✉ rikenmed@mx2.alpha-web.ne.jp