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

相澤真紀^{1)†} 高吉克典²⁾ 国場 保¹⁾ 加藤友子³⁾ 梁瀬 徹³⁾山川 睦³⁾ 津田知幸⁴⁾

- 1) 沖縄県家畜衛生試験場 (〒900-0024 那覇市古波蔵112)
- 2) 沖縄県中央家畜保健衛生所 (〒901-1202 南城市大里字大里2505)
- 3) 独農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所九州支所 (〒891-0105 鹿児島市中山町2702)
- 4) 独農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所海外病研究施設 (〒187-0022 小平市上水本町6-20-1)

(2006年11月8日受付・2007年8月30日受理)

要 約

沖縄県で発生した牛流行熱 (BEF) の疫学的解析を目的に、1988年から2004年に沖縄で分離されたBEFウイルスのG遺伝子の分子系統樹解析を実施したところ、沖縄および台湾分離株は、ワクチン株であるYHL株やオーストラリア分離株とは異なるグループからなり、さらに、1980年代分離株と1990～2000年代分離株の2つのクラスターに分けられた。同一年に分離された沖縄と台湾分離株は高い相同性を示した。沖縄分離株とYHL株間では中和エпитープ領域に4カ所のアミノ酸の置換が確認されたが、ワクチン接種牛の血清は分離株に対しても同等の中和抗体価を示した。——キーワード：牛流行熱ウイルス、G遺伝子、分子系統樹解析、沖縄。

日獣会誌 61, 363～366 (2008)

牛流行熱ウイルス (BEFV) はラブドウイルス科エフェメロウイルス属のウイルスで、ヌカカなどの吸血昆虫によって媒介される [1, 2]。そのゲノムは5種類の構造蛋白と1本鎖 (–) RNA から構成され、ウイルス表面蛋白であるG蛋白は、中和エピトープを有する [3]。沖縄県では過去20年間に4回BEFの発生が確認されている (沖縄県畜産課資料)。そこで、BEFの予防対策を進める上で、流行ウイルスの性状および流行の疫学的解明が必要と考えられる。

本論文では、BEFV沖縄分離株と台湾およびオーストラリア分離株、ワクチン株とのG遺伝子の比較を行い、分子系統樹解析を行った。また、沖縄分離株とワクチン株の抗原性を比較した。

材 料 お よ び 方 法

ウイルス株：1988, 1989, 2001および2004年のBEF発症牛血液より分離されたBEFV沖縄分離株10株 (表1) とワクチン株であるYHL株を用いた。ウイルスの増殖には、無血清培地 (GIT培地, 日本製薬株, 東

京) で維持したハムスター肺由来株化細胞 (HmLu-1) を用いた。

中和試験に供した血清：各流行年におけるBEF野外発症牛の感染耐過血清ならびに、BEF発生がなかった時期に沖縄本島で飼養された野外牛に、BEF不活化ワクチンを2回接種後2週間を経過した牛血清を用いた。

塩基配列決定と分子系統樹解析：ウイルス培養上清よりRNA抽出キット (High Pure Viral RNA Kit, ロシユ・ダイアグノスティックス株, 東京) を用いてウイルスRNAを抽出し、BEFV G遺伝子の全長を増幅する既知のプライマーGF1, GR1 [4] を用いて、RT-PCRキット (TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV), タカラバイオ株, 滋賀) によりRT-PCRを実施した。PCR産物は、PCR産物精製キット (QIA quick PCR purification kit, キアゲン株, 東京) により精製し、シーケンス反応に用いた。塩基配列の読みとりにはキャピラリーDNAシーケンサー (ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer, アプライドバイオシステムズジャパン株, 東京) を用い、配列情報解析ソフトウェア (DNASIS®

† 連絡責任者：相澤真紀 (沖縄県家畜衛生試験場)

〒900-0024 那覇市古波蔵112 ☎098-832-1515 FAX 098-853-7376 E-mail: aizawamk@pref.okinawa.lg.jp

表1 BEFV沖縄分離株の由来

分離ウイルス株	採材地	採材月日	継代数
ON-BEF-88-1	本島(恩納村)	1988/10/30	4
ON-BEF-88-3	本島周辺離島 (伊是名島)	1988/10/30	4
ON-BEF-88-4	本島周辺離島 (伊是名島)	1988/10/29	5
ON-BEF-89-1	八重山諸島 (石垣島)	1989/ 7/20	7
ON-BEF-89-2	八重山諸島 (石垣島)	1989/ 5/29	8
ON-BEF-89-3	八重山諸島 (石垣島)	1989/ 6/13	8
ON-BEF-01-1	宮古諸島 (多良間島)	2001/10/14	4
ON-BEF-01-2	八重山諸島 (石垣島)	2001/11/13	4
ON-BEF-01-3	八重山諸島 (石垣島)	2001/12/04	4
ON-04-1	八重山諸島 (石垣島)	2004/10/14	4

Pro, 日立ソフトウェアエンジニアリング(株, 東京)により得られた配列を解析した。沖縄分離株およびYHL株と, DNA Data Bank of Japan (DDBJ) から得た台湾およびオーストラリア分離株のG遺伝子について, CLUSTAL W プログラムを用いて配列のアラインメントを行い, 系統樹作成ソフトウェア (TreeView ver. 1.62) により系統樹を作成した。株間の配列の相同性解析は, University of Wisconsin Genetic Computer Group (UWGCG) の配列解析ソフトウェアを用いて行った。

中和試験: ON-BEF-88-1, ON-BEF-89-1, ON-BEF-01-1 および ON-04-1 を各発生年の代表株とし, この4株とYHL株を用いた中和試験を実施した。中和試験はマイクロタイター法で実施した。血清を56℃で30分間加熱非働化した後2倍階段希釈し, 各希釈液に200TCID₅₀に調整したウイルス液を等量加えて37℃1時間感作後, HmLu-1細胞を各ウェルに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倍数の逆数を中和抗体価とした。希釈液ならびに細胞浮遊液にはGIT培地を用いた。

成 績

BEFV G遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列の相同性: 沖縄分離株間のG遺伝子の塩基配列は, 97.4%以上の相同性を示し, 1988年および1989年に分離された6株, 2001年および2004年に分離された4株の配列はそれぞれが99.6%以上一致していた。沖縄分離株10株とYHL株およびオーストラリア分離株との相同性はそれぞれ96.8~97.2%および90.5~91.2%と比較的低い

表2 中和エпитープ領域のアミノ酸置換部位

ウイルス株	中和エピトープ領域				
	G1 (487~ 503aa)	G2 (168~ 189aa)	G3a (49~ 63aa)	G3b (215~ 231aa)	G3c (262~ 271aa)
	Y-S ₄₉₉ -K	F-N ₁₇₀ -G	Q---I	N-D ₂₂₃ -P	I-Q ₂₇₁
YHL株	S	N		D	Q
1988年 沖縄分離株*	N	T	—	E	R
1989年 沖縄分離株*	N	T	—	E	R
2001年 沖縄分離株*	S	T	—	E	Q
2004年 沖縄分離株	S	T	—	E	Q

※同年に分離された全ての株を含む。

表3 BEFV沖縄分離株とYHL株との中和試験

ウイルス	感染耐過牛血清				ワクチン 接 種 牛血清
	1988年	1989年	2001年	2004年	
ON-BEF-88-1	256	128	256	128	256
ON-BEF-89-1	256	128	256	128	256
ON-BEF-01-1	256	256	512	256	512
ON-04-1	256	512	512	128	512
YHL株	32	32	16	32	256

値を示した。いっぽう, 沖縄分離株と台湾分離株の相同性は97.4~100%であり, 特に2001年に八重山諸島周辺で分離された3株と同年台湾で分離された2株は99.7%以上一致し, 2004年に双方で分離された株は99.8%の相同性が認められた。また, 1980年代に双方で分離された株間(1984年台湾分離株1株, 1988, 1989年沖縄分離株6株)でも99.5%以上の相同性が認められた。

アミノ酸配列の比較でも塩基配列と同様の傾向が認められ, 沖縄分離株10株の間では98.7%以上の相同性が保たれていた。YHL株と沖縄分離株間のアミノ酸を比較すると, 607個のアミノ酸のうち1980年代の分離株では12~13個, 2000年代の沖縄分離株では9個の置換が認められた。中和エピトープ領域でのアミノ酸の置換は, YHL株と沖縄分離株間で4カ所確認され(N₁₇₀→T, D₂₂₃→E, Q₂₇₁→R, S₄₉₉→N), そのうち2カ所(S₄₉₉, Q₂₇₁)は1980年代の沖縄分離株のみに認められた(表2)。

BEFV G遺伝子の分子系統樹解析: 沖縄分離株は台湾分離株とともに, オーストラリア分離株およびYHL株とは遺伝学的に離れていた。また, 沖縄分離株は台湾分離株とともに1990年代以降の沖縄分離株と, 1980年代の沖縄分離株の2つのクラスターに分類された(図1)。

沖縄分離株とYHL株との中和試験: 中和試験の結果, 各流行年のBEF発症牛の感染耐過血清は, 沖縄分離株

図1 BEFV G 遺伝子の塩基配列による分子系統樹

に対する中和抗体価に差は認められなかったが、YHL株に対する中和抗体価は低くなる傾向が認められた。いっぽう、ワクチン接種牛の血清は沖縄分離株に対してYHL株に対する場合と同様の中和抗体価を示し、差は認められなかった(表3)。

考 察

沖縄県でのBEF発生は過去20年間に4回(1988, 1989, 2001, 2004年)と、九州以北の2回(1988, 1991年)[5]に対し、流行頻度が高い傾向にある。1988年は九州各県[1, 5-7]で合計372頭が発症し、沖縄県でも本島と周辺の伊是名島において発生(3戸3頭)が確認された(沖縄県畜産課資料)。同時期、韓国でも大規模なBEFの発生があり、下層ジェット気流によって九州北部に流行が拡大したと考えられている[1, 5]。1989, 2001および2004年の発生はいずれも、沖縄本島から南西約400km、台湾の東約200kmに位置する八重山諸島を中心に起こった。1989年は5～6月にかけて石垣島、西表島、小浜島(86戸333頭)[8]で、2001年は10月から翌年1月にかけて宮古諸島の多良間島から、八重山諸島西端の与那国島までの広範囲(645戸, 1,417頭)で、2004年は10月に石垣島(1戸4頭)で発生があった(沖縄県畜産課資料)。また、近接する台湾では過去20年間で、1989～1990, 1996, 1999, 2001, 2002および2004年にBEFの発生が報告されており[4, 9, 10]、1988年を除いて沖縄県と同時期に流行が起こっていた。いっぽう、1991年は福岡県、高知県、韓国で発生がみられたが、沖縄県での発生は確認されなかった[5]。

BEFV G 遺伝子の塩基配列に基づく分子系統樹解析の結果、沖縄分離株は台湾分離株と同じクラスターに属し、オーストラリア分離株やYHL株とは遺伝学的に離れていたことから、沖縄と台湾の流行には疫学的な関連があったことが推察された。特に、2001および2004年に八重山諸島で分離された株は、同時期に台湾で分離された株とほぼ一致した配列を示すことから、台湾の流行が八重山諸島にも波及した可能性が示唆された。

1988年は中国、韓国、九州、沖縄本島北部、翌年には台湾や八重山諸島でも発生が確認され、東アジア地域でBEFの大きな流行があったことがうかがえる[1, 5-7, 11]。遺伝子解析の結果、1980年代の台湾および沖縄分離株は、それぞれ高い塩基配列の相同性を示しており、両地域の流行は同一起源のウイルスによるものであったことが推察された。いっぽう、1988年の沖縄本島および周辺の島の分離株と、1989年の八重山諸島分離株は高い相同性をもつが、1988年の分離地の沖縄本島から翌年の八重山諸島に流行が拡大したとは考えにくい。したがって、1989年の八重山諸島での発生は、2001および2004年の発生と同様に台湾などの近接する発生地域から、直接波及した結果であると推測する。BEFVは媒介昆虫を介して気流に乗って、広い範囲に伝播すると考えられていることから[2, 5]、今後沖縄県への侵入ルートについて、気象データや周辺地域の発生情報などを用いた検討が必要であると考えられた。

台湾では、1996年以降流行株の抗原性に変異が認められたことから、最近の流行株と抗原性が近い株へのワクチン株の変更や抗原性の異なる株を用いた混合ワクチンの開発について検討が行われてきた[4, 9, 10]。沖縄分離株と現行ワクチンの基株であるYHL株間でも、中和エピトープ領域にアミノ酸の置換が確認されたため、抗原性状の比較を行ったところ、ワクチン接種牛の血清は沖縄分離株に対しても、YHL株と同等の中和活性を有していることが確認された。したがって、現行ワクチンは最近の流行株に対しても効果が期待されることから、今後の防疫対策にも有効であると考えられた。

今回実施した分子疫学的解析の結果、沖縄県でのBEFの発生は台湾での流行と関連性が高いことが示唆された。今後も、抗体調査等による沖縄県内でのBEFVの流行状況の把握や、ワクチン接種の推進に努めるとともに、近隣諸地域のBEF発生情報を早期に得るため、内外の関係機関との連携が防疫を強化する上で重要であると考えられた。

引 用 文 献

- [1] Ogawa T : Epidemiological investigation of bovine ephemeral fever outbreaks in Kyushu Island in Japan during the fall of 1988, *Prev Vet Med*, 14, 69-76

- (1992)
- [2] Walker PJ : Bovine ephemeral fever in Australia and the world, *Curr Top Microbiol Immunol*, 292, 57-80 (2005)
 - [3] Kongsuwan K, Cybinski DH, Cooper J, Walker PJ : Location of neutralizing epitopes on the G protein of bovine ephemeral fever rhabdovirus, *J Gen Virol*, 79, 2573-2581 (1998)
 - [4] Wang FI, Hsu AM, Huang KJ : Bovine ephemeral fever in Taiwan, *J Vet Diagn Invest*, 13, 462-467 (2001)
 - [5] Shirakawa H, Ishibashi K, 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)
 - [6] Nagano H, Hayashi K, Kubo M, Miura Y : An outbreak of bovine ephemeral fever in Nagasaki Prefecture in 1988, *Jpn J Vet Sci*, 52, 307-314 (1990)
 - [7] Ogawa T, 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)
 - [8] 高吉克典, 国場 保, 比嘉弘正, 松川俊一, 大城喜光, 多嘉良功, 平良勝男 : 1989年, 沖縄に発生した牛流行熱, *日獣会誌*, 44, 591-594 (1991)
 - [9] Hsieh YC, Chen SH, Chou CC, Ting LJ, Itakura C, Wang FI : Bovine ephemeral fever in Taiwan (2001-2002), *J Vet Med Sci*, 67, 411-416 (2005)
 - [10] Hsieh YC, Wang SY, Lee YF, Chen SH, Mak PO, Chu CY : DNA sequence analysis of glycoprotein G gene of bovine ephemeral fever virus and development of a double oil emulsion vaccine against bovine ephemeral fever, *J Vet Med Sci*, 68, 543-548 (2006)
 - [11] 小河 孝, 佐藤忠一, 山根逸郎, 井上忠恕 : 中国における牛流行熱の発生と流行状況, *Bull Natl Inst Anim Health*, 100, 29-35 (1994)

Molecular Epidemiological Analysis of Bovine Ephemeral Fever Virus Isolated in Okinawa Prefecture

Maki AIZAWA^{*†}, Katsunori TAKAYOSHI, Tamotsu KOKUBA, Tomoko KATO,
Toru YANASE, Makoto YAMAKAWA and Tomoyuki TSUDA

** Okinawa Prefectural Institute of Animal Health, 112 Kohagura, Naha, 900-0024, Japan*

SUMMARY

To define the epidemiology of Bovine Ephemeral Fever (BEF) in Okinawa prefecture, the glycoprotein gene of ten Okinawan BEF virus isolates between 1988 and 2004 were sequenced and subjected to phylogenetical analysis with other available BEF viruses. Phylogenetical analysis revealed that the Okinawan and Taiwanese isolates formed a monophyletic group that was separated from the vaccine (YHL) strain and the Australian isolates and were further divided into two clusters, those isolated in the 1980s and those isolated in the 1990 and 2000s. High nucleotide identities were observed between the Okinawan and Taiwanese isolates in the same year, indicating an epidemiological link between the BEF outbreaks in Okinawa prefecture and those in Taiwan. Although four amino acid substitutions in the neutralizing epitopes of the glycoprotein were found between the YHL strain and Okinawan isolates, immune serum from vaccinated cattle equally neutralized both the Okinawan isolates and the YHL strain in the neutralization test.

— Key words : Bovine Ephemeral Fever Virus, Glycoprotein genes, Molecular Epidemiological Analysis, Okinawa.

† Correspondence to : Maki AIZAWA (*Okinawa Prefectural Institute of Animal Health*)

112 Kohagura, Naha, 900-0024, Japan

TEL 098-832-1515 FAX 098-853-7376 E-mail : aizawamk@pref.okinawa.lg.jp

— *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 61, 363 ~ 366 (2008) —