

アカバネウイルス genogroup II による育成牛の 非化膿性脳脊髄炎

三竹博道^{1)†} 生水誠一¹⁾ 武田佳絵¹⁾ 加藤信正¹⁾ 田中省吾²⁾
梁瀬 徹²⁾ 加藤友子²⁾ 山川 睦²⁾

1) 福井県家畜保健衛生所 (〒918-8226 福井市大畑町69-10-1)

2) (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)

(2010年6月30日受付・2010年10月21日受理)

要 約

2008年に九州地方から北陸地方にかけて広範囲にアカバネウイルス (AKAV) が流行し、牛異常産が発生する中、福井県において起立不能や遊泳運動などの神経症状を主徴とする育成牛2例 (3カ月齢と11カ月齢) が確認された。2例ともに、病理組織学的検査において非化膿性脳脊髄炎が認められ、また、免疫組織化学的染色で中枢神経系組織にAKAV抗原が検出された。さらに、RT-PCRにより、これら2例の脳幹部からAKAV特異遺伝子が検出され、うち1例よりAKAVが分離された。以上の結果から、これら2例を生後感染型アカバネ病と診断した。また、分離株は、生後感染型アカバネ病の症例からこれまで分離されたことのないgenogroup IIに属するウイルスであることが確認された。

——キーワード：アカバネウイルス genogroup II, 生後感染, 非化膿性脳脊髄炎。

----- 日獣会誌 64, 140~144 (2011)

アカバネウイルス (AKAV) は、ブニヤウイルス科オルソブニヤウイルス属に属し、ウシヌカカなどの吸血昆虫によって媒介され、妊娠牛に感染して流産や死産、早産および先天異常子牛の出産など、いわゆる異常産を引き起こすことが知られている [1]。その一方で、AKAVは若齢牛に感染した場合、神経症状を伴う非化膿性脳脊髄炎の原因となることも報告されている [2-6]。

AKAVは3分節 (S, M, L) で構成されるマイナス1本鎖RNAゲノムを有する。国内分離株は遺伝子解析によりgenogroup IおよびIIの2つに大別されることが示されており [7]、これまでに神経症状を示した牛の脳や脊髄から前者に属する株が分離されている [2-4]。われわれは、九州地方から北陸地方にかけて広くアカバネウイルスが流行し、牛異常産が発生した2008年秋に、福井県内の一肥育農家において起立不能や遊泳運動などの神経症状を主徴とする2例に遭遇した。病性鑑定の結果、これらの神経症状は、genogroup IIに属するAKAVの感染に起因することが確認されたのでその概要を報告する。

材 料 お よ び 方 法

症例：2008年10月、ホルスタイン種約110頭を飼養する福井県内の肥育農家において起立不能、横臥状態となった3カ月齢の子牛 (症例1) と、起立困難から起立不能および遊泳運動の神経症状を示した11カ月齢の育成牛 (症例2) の2例を検索に用いた。2例とも福井県内の酪農家から導入しており、いずれの母牛も異常産関連のワクチンを接種していなかった。

病理学的検査：上記2例から主要臓器および中枢神経系組織を採取し、常法によりパラフィン包埋組織切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色による病理組織検査を行うとともに、中枢神経系組織については、抗AKAV家兔免疫血清を用いた免疫組織化学的染色を実施した。

RT-PCR およびウイルス分離：血清不含イーグルMEM培地 (日水製薬株, 東京) で作製した脳幹部10%乳剤から市販キット (Sepa Gene RV-R, 三光純薬株, 東京) によりRNAを抽出した。抽出したRNAと

† 連絡責任者：三竹博道 (福井県家畜保健衛生所)

〒918-8226 福井市大畑町69-10-1

☎0776-54-5104 FAX 0776-54-5966

E-mail: h-mitake-mn@pref.fukui.lg.jp

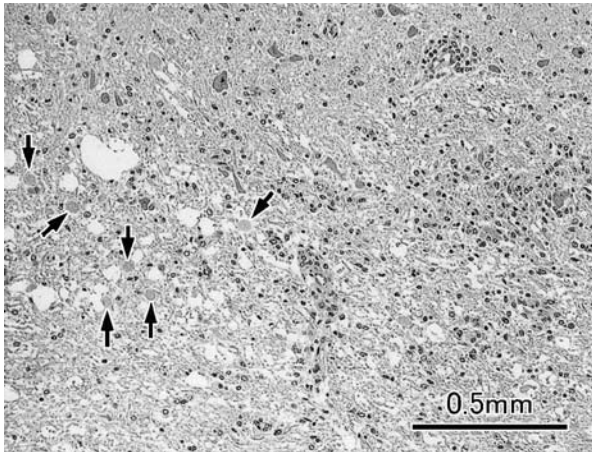


図1 症例1の延髄にみられたリンパ球およびマクロファージを主体とする囲管性細胞浸潤，グリア結節，グリア細胞増生および神経軸索の腫大（矢印）を伴った空胞化（HE染色）。

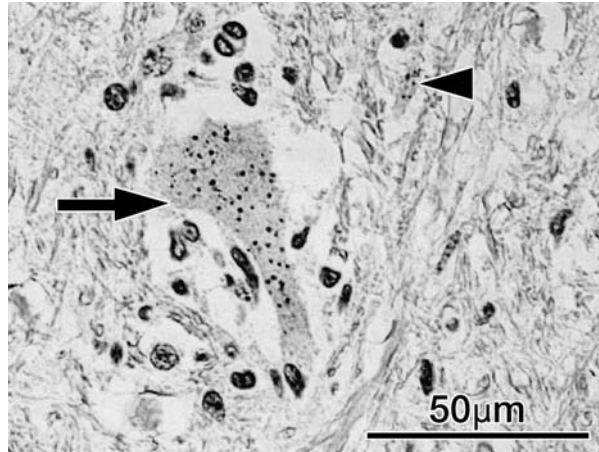


図2 症例2の延髄：神経細胞（矢印）と神経線維（矢頭）内にAKAV抗原がみられる．抗AKAV家兔免疫血清を用いた免疫組織化学的染色（SAB法）。

Akashiら [8] のAKAV S分節を標的としたプライマーおよび市販キット（OneStep RT-PCR Kit, Qiagen, Germany）を用いてRT-PCRを実施した．いっぽう，上記脳幹部乳剤をハムスター肺由来株化（HmLu-1）細胞へ接種した後，34℃で回転培養し，細胞変性効果（CPE）の出現を指標に3代盲継代してウイルス分離を試みた．

分離ウイルスの遺伝子相同性解析および分子系統樹解析：分離ウイルスからRNAを抽出後，Kobayashiら [7] のプライマーを用いて中和抗原GcをコードするM RNA分節の全長を増幅し，得られたPCR産物の塩基配列を決定した．タンパク質コード領域（4203塩基）について相同性解析および近隣結合法による分子系統樹解析を実施した．

中和モノクローナル抗体を用いたドットブロット法による抗原解析：AKAV OBE-1株中和抗原Gc上の7つの中和エピトープ（A1, A2, B, C1, C2, DおよびE）を認識するモノクローナル抗体を用い [9]，PVDV膜上にブロットした分離ウイルスとの反応性を調べた．

抗体検査：病性鑑定を実施した2例の血清を非動化後，HmLu-1細胞を用いたマイクロタイター法により，AKAV JaGAr39株，アイノウイルス（AINOV）JaNAr28株，チュウザンウイルス（CHUV）31株，イバラキウイルス（IBAV）No. 2株，牛流行熱ウイルス（BEFV）YHL株に対する中和抗体価を測定した．また，福井県内の牛アルボウイルス感染症発生予察のため2008年6, 8, 9, 11月に採血された未越冬牛おとり牛26頭（延べ104検体）についても同様に抗体検査を実施した．

成 績

病理学的検査：病理解剖では，2例ともに異常は認められなかった．病理組織学的検査では，2例ともに大脳から脊髄にかけてリンパ球およびマクロファージを主体とする囲管性細胞浸潤やグリア細胞の増数，グリア結節等の非化膿性脳脊髄炎が観察された．症例1の中脳，橋および延髄にみられたこれらの病変は重度で，特に延髄では神経軸索の膨化を伴う空胞化がみられた（図1）．症例2に認められた非化膿性脳脊髄炎は症例1に比べて軽度であった．

抗AKAV家兔免疫血清を用いた免疫組織化学染色の結果，2例とも囲管性に浸潤したマクロファージ，グリア細胞，神経細胞および神経線維にAKAV抗原が認められた．特に症例2では視床，中脳，橋，延髄および脊髄を主体に，神経細胞や神経線維に広範囲にわたって多数のAKAV抗原が観察された（図2）．

ウイルス遺伝子の検出と分離株の性状：症例1および2両方の脳幹部乳剤からAKAVに特異的な遺伝子が検出された．また，症例2の脳幹部乳剤を接種したHmLu-1細胞より円形化を特徴とするCPEを示すウイルス（FI-1/Br/08株）が分離された．

遺伝子解析の結果，FI-1/Br/08株とこれまでに分離されたAKAVの代表株のM RNA分節の相同性は，核酸レベルで89.0～99.9%，アミノ酸レベルで95.2～99.9%であり，特に同じ2008年に分離された他の株と遺伝学的にはほぼ同一であることが示された．また，2008年分離株以外でFI-1/Br/08株と最も近縁な株はOkayama2004株であった [10]．さらに分子系統樹解析を行ったところ，本株は2000年以降流行の主流であったIriki株が含まれるgenogroup Iではなく [2]，

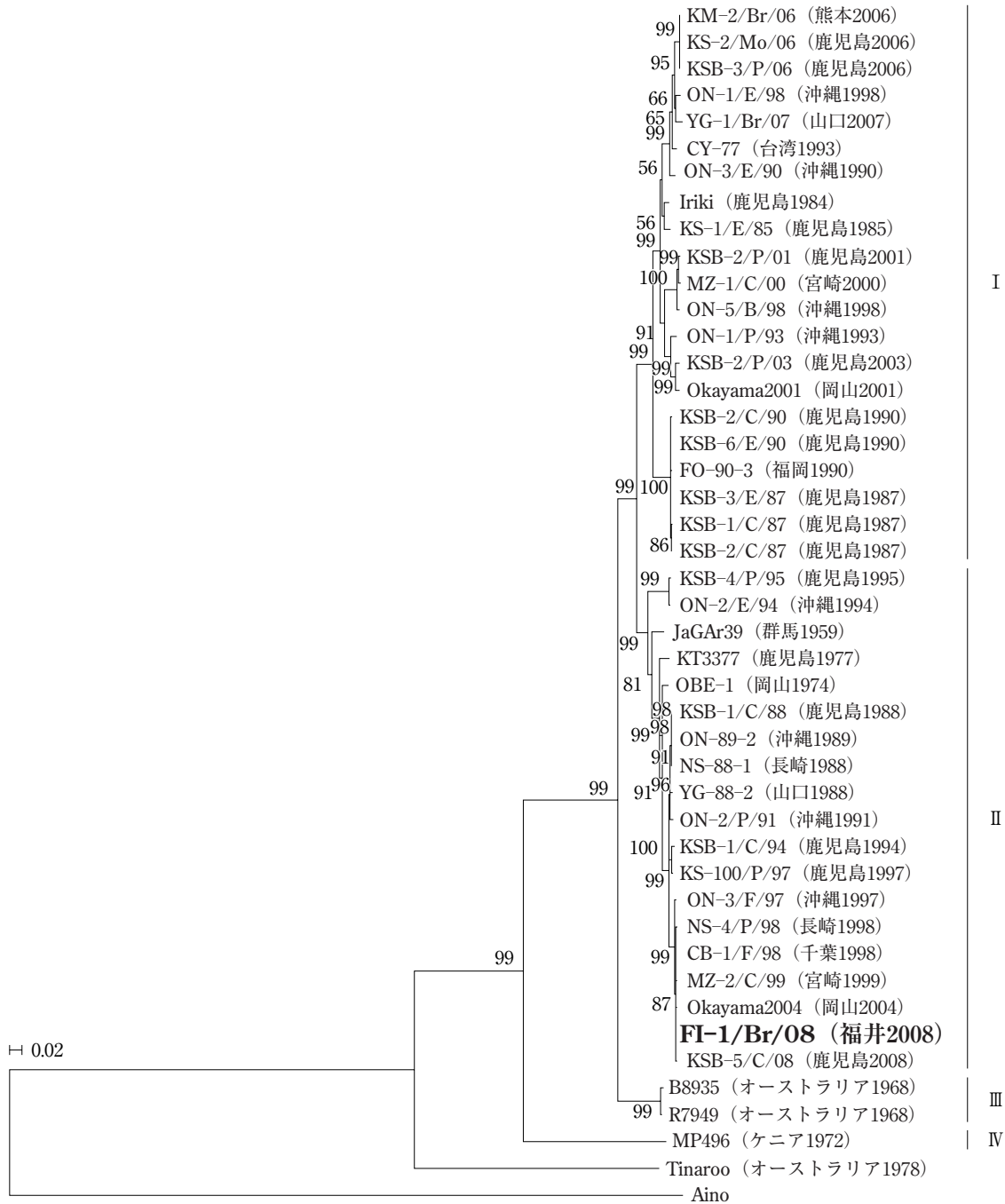


図3 アカバネウイルス M RNA 分節 (タンパク質コード領域) の塩基配列に基づく分子系統樹

JaGAR39 株や OBE-1 株と同じ genogroup II に属することが明らかとなった (図3)。

FI-1/Br/08 株は AKAV 中和抗原上の 7 つの中和エピトープのうち、E を認識するモノクローナル抗体を除く 6 つのモノクローナル抗体と反応し、JaGAR39 株とほぼ同じ反応パターンを示した (図4)。

抗体検査: 症例 1, 2 ともに JaGAR39 株に対する中和抗体のみ保有しており、抗体価はそれぞれ 32 倍, 16 倍であった。また、未越冬牛おとり牛では 8 月から 11 月にかけて 26 頭中 9 頭 (34.6%) に JaGAR39 株に対する抗体の陽転が確認されたが、AINOV, CHUV, IBAV

および BEFV に対しては抗体陽転が認められなかった。

考 察

神経症状を呈した子牛および育成牛 2 例の病性鑑定を実施したところ、病理学組織学的にマクロファージが主体の囲管性細胞浸潤や微小膿瘍が中枢神経系組織にみられないことからリステリア脳炎等が否定され、ウイルス学および血清学的に AKAV の感染が証明された。最終的に、症例 2 の脳幹部より分離された FI-1/Br/08 株の遺伝子解析結果から genogroup II に属する AKAV による非化膿性脳脊髄炎と診断された。

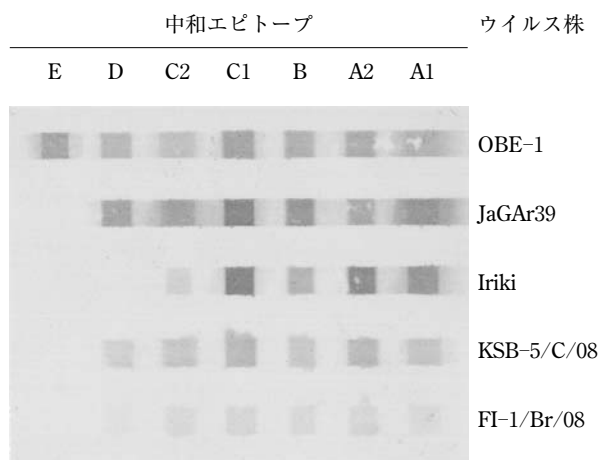


図4 中和モノクローナル抗体とアカバネウイルス2008年分離株 (FI-1/Br/08株およびKSB-5/C/08株) との反応性

これまでにAKAVが生後感染し非化膿性脳脊髄炎を発症した牛からウイルスが分離されたのは1984年 [4]と2006年 [2, 3] の2事例で、分離ウイルスはいずれもgenogroup Iに属していた。いっぽう、genogroup IIに属する株も、子牛脳内接種試験 [10] やマウスの感染実験 [11] によって非化膿性脳脊髄炎を引き起こす可能性が示唆されていたものの、これまで直接的な関与を示した報告はなかった。しかし、今回、神経症状を呈した牛からgenogroup IIに属するAKAVが分離され、genogroup Iのみならずgenogroup IIに属する株が生後感染により臨床症状を伴う非化膿性脳脊髄炎を引き起こすことが初めて証明された。

福井県内におけるAKAVの流行は、10年ぶりである異常産関連ワクチンの母牛への接種率が約2割程度であったことから、ほとんどの牛がAKAVに対し無防備な状態であったと推察された。未越夏おとり牛の抗体検査ではJaGAR39株に対し34.6%が抗体陽転し、いわゆる異常産を特徴とする胎子感染型アカバネ病は11例確認されたが(データ未公表)、生後感染型アカバネ病が確認されたのは本2事例のみであった。また、2008年秋から2009年春までの国内における発生状況も、胎子感染型アカバネ病が約200例確認されたのに対し、生後感染型アカバネ病は14例と少数であった(農林水産省・消費安全局動物衛生課調べ)。1984年に神経症状を呈した牛から初めてIriki株が分離された当時もわずか10頭のみでの発生であったことから [4]、いずれのgenogroupに属するかに関わらず、AKAVが胎子期以外の感染において脳脊髄炎を引き起こす確率は元来低いと推察される。しかし、今後、2006年の事例 [2, 3, 5] が再発する可能性も考えられ、引き続き監視とワクチンの励行が必要で

ある。また、以前の発生事例とあわせた詳細な疫学調査や分離ウイルスの病原性解析によって発生要因や機序を解明することが生後感染型アカバネ病の対策に不可欠と考える。

引用文献

- [1] 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: Epizootic congenital arthrogryposis-hydranencephaly syndrome in cattle: isolation of Akabane virus from affected fetuses, *Arch Virol*, 51, 67-74 (1976)
- [2] 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*, 4, 20 (2008)
- [3] 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, 771-776 (2008)
- [4] 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, *Jpn J Vet Med Sci*, 51, 128-136 (1989)
- [5] Kamata H, Inai K, Maeda K, Nishimura T, Arita S, Tsuda T, Sato M: Encephalomyelitis of cattle caused by Akabane virus in southern Japan in 2006, *J Camp Pathol*, 140, 187-193 (2009)
- [6] Uchida K, Murakami T, Sueyoshi M, Tsuda T, Inai K, Acorda JA, Yamaguchi R, Tateyama S: Detection of Akabane viral antigens in spontaneous lymphohistiocytic encephalomyelitis in cattle, *J Vet Diagn Invest*, 12, 518-524 (2000)
- [7] Kobayashi T, Yanase T, Yamakawa M, Kato T, Yoshida K, Tsuda T: Genetic diversity and reassortments among Akabane virus field isolates, *Virus Res*, 130, 162-171 (2007)
- [8] Akashi H, Onuma S, Nagano H, Ohta M, Fukutomi T: Detection and differentiation of Aino and Akabane Simbu serogroup bunyaviruses by nested polymerase chain reaction, *Arch Virol*, 144, 2101-2109 (1999)
- [9] Yoshida K, Tsuda T: Rapid detection of antigenic diversity of Akabane virus isolates by dot immunobinding assay using neutralizing monoclonal antibodies, *Clin Diagn Lab Immunol*, 5, 192-198 (1998)
- [10] Kurogi H, Inaba Y, Takahashi E, Sato K, Satoda K, Omori T: Experimental infection of calves with Akabane virus, *Bull Natl Inst Anim Health*, 75, 1-8 (1977)
- [11] Ogawa Y, Fukutomi T, Sugiura K, Sugiura K, Kato K, Tohya Y, Akashi H: Comparison of Akabane virus isolated from sentinel cattle in Japan, *Vet Microbiol*, 124, 16-24 (2007)

Nonsuppurative Encephalomyelitis of Calves Caused by Akabane Virus Genogroup II

Hiromichi MITAKE*†, Seiichi SHOZU, Yoshie TAKEDA, Nobumasa KATO, Shogo TANAKA,
Tohru YANASE, Tomoko KATO and Makoto YAMAKAWA

* *Fukui Livestock Hygiene Service Center, 69-10-1 Obatake, Fukui, 918-8226, Japan*

SUMMARY

Two calves showed neurological symptoms such as astasia, dysstasia and ataxia in Fukui Prefecture during the wide-ranging epidemic of Akabane disease from Kyushu to Hokuriku regions in 2008. Nonsuppurative encephalomyelitis was observed in the calves by histopathological examination. Akabane viral antigen and genome were consistently detected from the central nervous system of the calves through immunohistochemistry and RT-PCR, respectively, and the virus was isolated from one of them. Based on these findings, these two calves were diagnosed with postnatal Akabane virus infection. Through phylogenetic analysis, the isolate was classified into genogroup II, which has not been isolated from Akabane viral encephalomyelitis in cattle by postnatal infection. — Key words : Akabane virus genogroup II, postnatal infection, nonsuppurative encephalitis.

† *Correspondence to : Hiromichi MITAKE (Fukui Livestock Hygiene Service Center)*

69-10-1 Obatake, Fukui, 918-8226, Japan

TEL 0776-54-5104 FAX 0776-54-5966 E-mail : h-mitake-mn@pref.fukui.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 64, 140 ~ 144 (2011)