

鹿児島県内の飼養牛及び先天異常子牛における シャモンダウイルス感染状況の遡及調査

平島宜昌^{1)†} 坂口善二郎¹⁾ 岡田大輔¹⁾ 藤岡 舞^{1),2)} 北原尚英¹⁾
岩本滋郎¹⁾ 梁瀬 徹³⁾ 藤園昭一郎¹⁾

- 1) 鹿児島中央家畜保健衛生所 (〒 899-2201 日置市東市来町湯田 1678)
- 2) 南薩家畜保健衛生所 (〒 897-0302 南九州市知覧町郡 4210-18)
- 3) 国研農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 九州研究拠点 (〒 891-0105 鹿児島市中山町 2702)

(2017年3月13日受付・2017年7月24日受理)

要 約

シャモンダウイルス (SHAV) は、2015年12月から2016年4月にかけて、鹿児島県内で発生した15例の牛異常産の原因になったと考えられている。未越夏牛の抗体調査による近年のSHAVの県内への侵入状況及び過去の異常産との関連について遡及調査を実施したところ、1999～2016年の間に少なくとも6回(2001～2003年、2006年、2013年及び2015年)の抗体陽転と、SHAVの関与による3例の牛異常産(2002～2003年)を確認した。2歳以上の繁殖牛のSHAVに対する抗体保有率は、調査を開始した2003年は66.7%と高かったが、その後徐々に低下し、2014年はきわめて低い状況(8.5%)にあり、2015～2016年のSHAVが関与した異常産の発生の主たる要因の一つであったと考えられた。——キーワード：アルボウイルス、牛、異常産、体形異常、サーベイランス。

-----日獣会誌 70, 729～734 (2017)

シャモンダウイルス (SHAV) は、ブニヤウイルス目 (*Bunyavirales*) ペリブニヤウイルス科 (*Peribunyaviridae*) オルソブニヤウイルス属 (*Orthobunyavirus*) の節足動物媒介性ウイルス (アルボウイルス) である。SHAV は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 [1, 2]。しかしながら、1970年代以降、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。2002年、鹿児島県及び宮崎県において、ヌカカ及び未越夏牛の血漿から、国内で初めてSHAVが分離された [3]。また、翌年の2003年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3例において、先天異常子の血清よりSHAVに対する抗体が検出されたことから、異常産への関与が疑われた [3]。さらに、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 [4, 5]、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8月及び9月、鹿児島県内で採集されたヌカカ及び未越夏牛の血漿からSHAVが分離されるとともに、未越夏牛の抗体調査により県内広域におけるSHAVの感染が確認された。さらに、2015年12月から2016年4月にかけて、脊柱の弯曲、四肢の屈曲及び伸展等を主徴とした体形異常を伴う牛異常産が鹿児島県内で15例発生した。そのうち7例の中枢神経よりSHAVに特異的な遺伝子が検出されたこと及び病理組織学的特徴により、本ウイルスの異常産への関与が示唆された [6]。これを受け、鹿児島県内における過去のSHAVの県内侵入状況及びSHAVの関与した異常産の発生状況を明らかにするため、未越夏牛及び繁殖牛の保存血清並びに病理標本材料を用いた遡及調査を実施したので報告する。

材料及び方法

SHAV抗体保有状況調査：鹿児島県本土において、未

† 連絡責任者：平島宜昌 (鹿児島中央家畜保健衛生所)

〒 899-2201 日置市東市来町湯田 1678

☎ 099-274-7555 FAX 099-274-7556

E-mail: hirashima-yoshimasa@pref.kagoshima.lg.jp

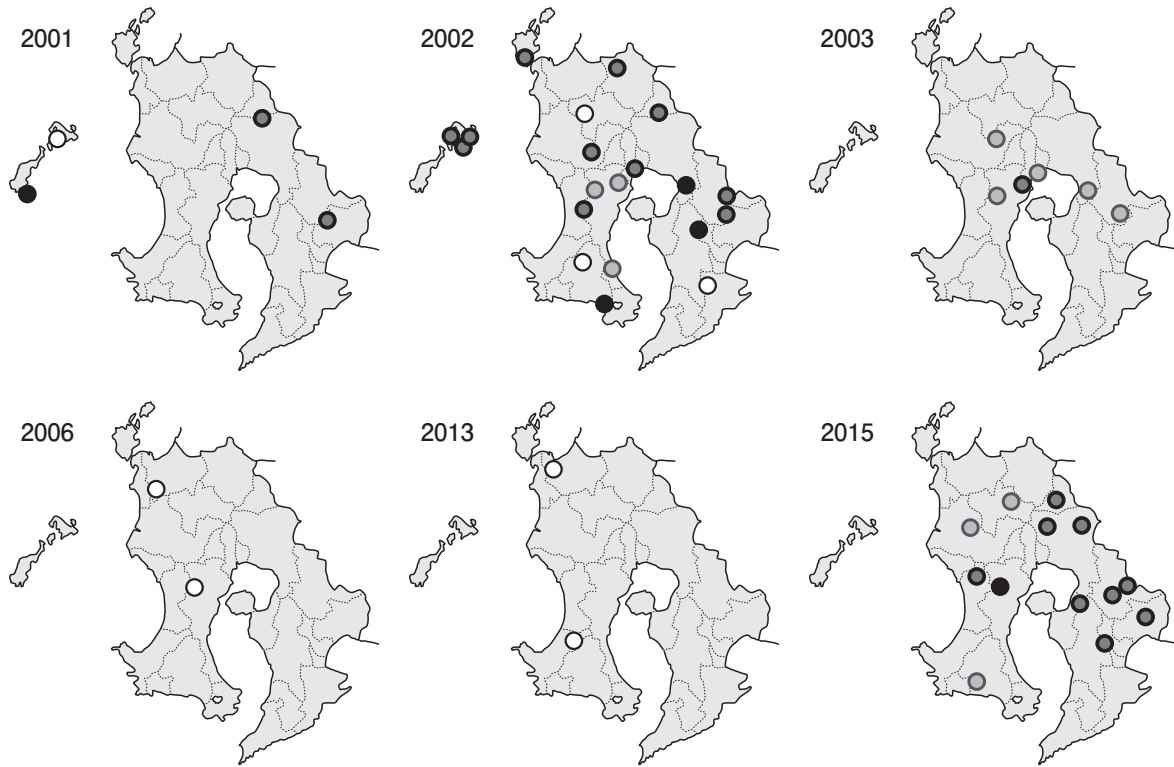


図1 未越夏牛のSHAVに対する抗体陽転状況
 図中の丸は抗体陽転農場の位置、丸の色は抗体陽転時期（●：8月陽転、●：9月陽転、●：10月陽転、○：11月陽転）をそれぞれ示す。

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。なお、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頭から各年ごとに5回（6月、8～11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。これらの保存血清を 56°C で30分間非働化処理後、HmLu-1細胞を用いた中和試験を常法により行い、SHAV KSB-6/C/02株 [3] 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。

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（アカバネウイルス：AKAV、アイノウイルス：AINOV、チュウザンウイルス：CHUV、イバラキウイルス：IBAV、ピートンウイルス：PEAV）及び牛ウイルス性下痢ウイルス（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、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、ヘマトキシリン・エオジン（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標本から市販キット（RNeasy FFPE Kit, 株式会社キアゲン, 東京）を用いてRNAを抽出し、SHAVを含むオルソブニヤウイルス属のS RNA分節を検出する既報のプライマーセット（AKAI206F：5'-CACAAACCAAgTgTCgATCTTA-3', SimbuS637-656：5'-gAgAATCCAgATTTAgCCCA-3'） [6] を用いて、市販キット（One step RT-PCR Kit, 株式会社キアゲン, 東京）により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及びサシュペリウイルス：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。

成 績

SHAV抗体保有状況調査：未越夏牛においては、調査期間内に6回（2001～2003年、2006年、2013年及び

表 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	発生月日	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	
							先天異常子母牛		中枢神経(脳・脊髄)	骨格筋
No. 1	2002年12月12日	黒毛和種	有	261	前肢屈曲, 後肢伸展, 頸部拘縮	脊柱S字弯曲, 側脳室拡張(軽度)	32	64	石灰沈着, 脊髄腹角神経細胞の減数	脂肪置換, 筋線維の矮小化
No. 2	2003年2月16日	黒毛和種	有	289	前肢屈曲, 後肢伸展	脊柱S字弯曲	16		石灰沈着, 脊髄腹角神経細胞の減数	筋線維の矮小化
No. 3	2003年2月18日	ホルスタイン種	有	276	前肢屈曲, 後肢伸展	脊柱S字弯曲, 側脳室拡張(軽度)	64	128	著変なし	脂肪置換, 筋線維の矮小化

*AKAV, AINOV 及び CHUV の3種混合不活化ワクチン

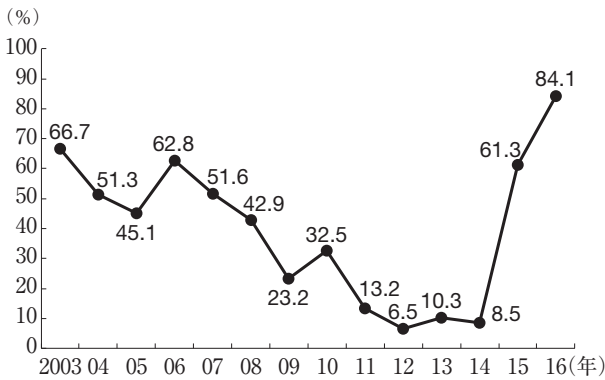


図2 繁殖牛のSHAV抗体保有率の年別推移

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。

2015年)のSHAVに対する抗体陽転が確認された(図1)。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年にふたたび大きく上昇した(61.3%) (図2)。

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)。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3a~c)、剖検により全例で脊柱のS字弯曲(図3d~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(図4a)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4b)。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(図4c)。なお、SHAVの免疫組織化学染色では、すべての症例の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でオルソポニャウイルス属の遺伝子は検出されなかった。すべての症例で、母牛はAKAV, AINOV及びCHUVの3種混合不活化ワクチン(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当たる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[7]。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症例すべ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。

考 察

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[3]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

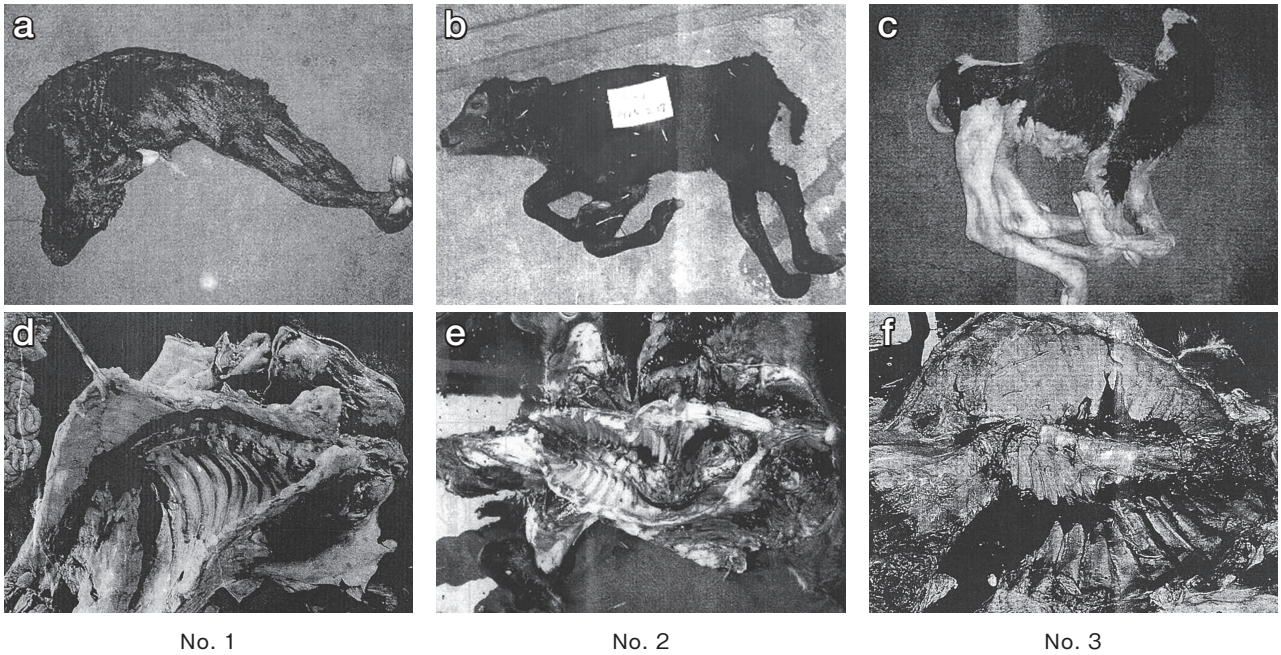


図3 SHAVが関与した2002～2003年の牛異常産事例
先天異常子の外貌及び剖検所見（脊柱弯曲）。

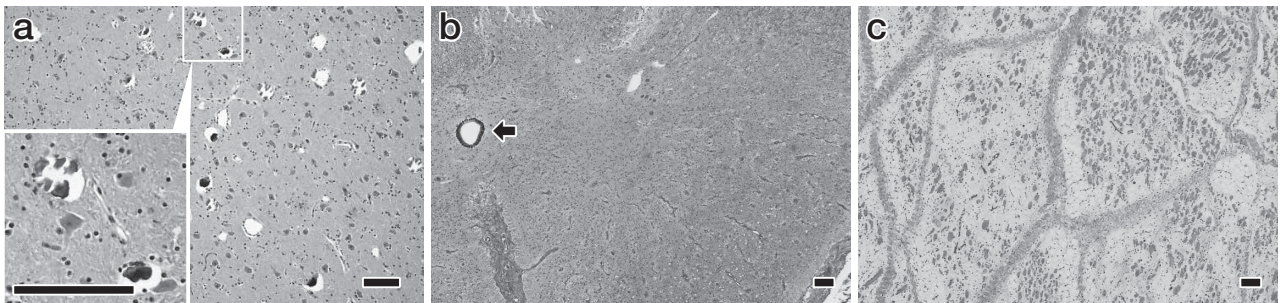


図4 SHAVが関与した2002～2003年の牛異常産事例の病理組織学的所見（HE染色 Bar=100µm）

- a：先天異常子の脳に認められた多発性石灰沈着（症例No. 2）。
- b：先天異常子の脊髄腹角部（症例No. 1）。神経細胞が減数し、白質と灰白質の境界部が不明瞭となっている。矢印は中心管を示す。
- c：先天異常子の骨格筋の筋線維の脂肪置換及び矮小化（症例No. 1）。

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年の広範囲にわた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[8]、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[6]、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℃[9]をおおむね上回っており（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つな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[6]、SHAVが関与したと考えられた。なお、ウイルスの伝播時期に当たる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[3]、鹿児島県内においても同時期に発生していたことが新たに確認された。2015～2016年に発生した15症例中7例で中枢神経からSHAVに特異的な遺伝子が検出されていること[6]、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[10]、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、すで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[11]、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[11]。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[3]。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頭／3頭）及び80%（12頭／15頭）[6]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[12]、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衛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。

2015年冬から2016年春にかけては、鹿児島県内のみならず、九州地方の他県においてもSHAVの関与と思われる異常産の発生が報告されており（家畜衛生週報、3420、290（2016））、九州の広範囲にわたってウイルス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[13]には至っていない等、その病原性や病態についてはいまだ不明な点が多い。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のまん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。

最後に、抗SHAV 免疫血清の分与並びにSHAVの免疫組織化学染色をご指導いただいた、(国研)農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門九州研究拠点の田中省吾 暖地疾病防除ユニット長に深謝する。

引用文献

- [1] 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)
- [2] Lee VH : Isolation of viruses from field populations of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in Nigeria, *J Med Entomol*, 16, 76-79 (1979)
- [3] 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)
- [4] 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 Schmallenberg virus, *Arch Virol*, 157, 1611-1616 (2012)
- [5] 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 (2016)
- [6] Hirashima Y, Kitahara S, Kato T, Shirafuji H, Tanaka S, Yanase T : Congenital malformations of calves infected with Shamonda virus, southern Japan, *Emerg Infect Dis*, 23, 993-996 (2017)
- [7] 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)
- [8] Kurogi H, Inaba Y, Takahashi E, Sato K, Goto Y, Sato K, Omori T, Hatakeyama H : Development of inactivated vaccine for Akabane disease, *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)*, 18, 97-108 (1978)
- [9] 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)
- [10] 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)
- [11] 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)
- [12] 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)
[13] 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)

Retrospective Survey of Shamonda Virus Infection in Sentinel and Breeding Cattle
and in Malformed Calves in Kagoshima Prefecture

Yoshimasa HIRASHIMA^{1)†}, Zenjiro SAKAGUCHI¹⁾, Daisuke OKADA¹⁾, Mai FUJIOKA^{1),2)},
Syoei KITAHARA¹⁾, Jiro IWAMOTO¹⁾, Tohru YANASE³⁾
and Shoichiro FUJISONO¹⁾

- 1) *Kagoshima Central Livestock Hygiene Service Center, 1678 Yuda, Higashiichiki, Hioki, 899-2201, Japan*
- 2) *Nansatsu Livestock Hygiene Service Center, 4210-18 Kohri, Chiran, Minamikyushu, 897-0302, Japan*
- 3) *Kyushu Research Station, National Institute of Animal Health, NARO, 2702 Chuzan, Kagoshima, 891-0105, Japan*

SUMMARY

Shamonda virus (SHAV) was suspected to have been involved in congenital malformations of calves in Kagoshima Prefecture from December 2015 to April 2016. In order to clarify the relationship between the spread of SHAV and the occurrence of malformations in previous years, serological surveys in sentinel and breeding cattle and in malformed calves were performed in Kagoshima Prefecture. Between 1999 and 2016, the spread of SHAV was identified in 2001-2003, 2006, 2013 and 2015, and in utero SHAV infections were detected in three congenital malformed calves in the winter of 2002-2003. After a large SHAV epizootic in 2002, seroprevalence against the virus gradually decreased through breeding, from 66.7% in 2003 to 8.5% in 2014. The low seroprevalence in 2014 might be due to one of the main factors in the spread of SHAV and occurrence of congenital malformations in 2015.

— Key words : arbovirus, cattle, congenital abnormality, malformation, surveillance.

† Correspondence to : Yoshimasa HIRASHIMA (*Kagoshima Central Livestock Hygiene Service Center*)

1678 Yuda, Higashiichiki, Hioki, 899-2201, Japan

TEL 099-274-7555 FAX 099-274-7556 E-mail : hirashima-yoshimasa@pref.kagoshima.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 70, 729 ~ 734 (2017)