

総 説

石川県における 2008 年のアカバネウイルスの流行と中和試験による流行株抗原性状の推定

細川明香¹⁾ 村上俊明^{1)*} 田中孝一¹⁾ 早川裕二¹⁾
南 藤子¹⁾ 小前博文¹⁾ 長井 誠²⁾

1) 石川県南部家畜保健衛生所 (〒920-3101 石川県金沢市才田町戊324-2)
2) 石川県畜産総合センター (〒929-1325 石川県羽咋郡宝達志水町坪山ナ部93-2)

* 連絡担当者：村上俊明

TEL : 076-257-1262

FAX : 076-257-2122

e-mail : muraka-t@pref.ishikawa.lg.jp

【要約】

2008年石川県において10年ぶりにアカバネウイルス(AKV)の流行が確認された。おとり牛を用いた調査の結果、2008年8～9月にかけて、能登地方を中心とした57頭中11頭(19.3%)にAKV抗体の陽転が確認された。また、9月～11月採材アカバネ病ワクチン未接種牛474頭の保存血清を用いた疫学調査においても、26頭にAKVに対する抗体保有が認められた。AKVはその抗原性状により大きく二つに分類されることから、2008年石川県での流行株の把握を目的に、同時期採材された血液からの、ウイルス分離ならびにAKV特異遺伝子の検出を試みたが全頭陰性であった。そこで流行株の抗原性状を推定するため、AKV抗体の陽転が確認されたおとり牛血清について、プロトタイプのJaGAr-39株ならびに同グループの1998年石川県分離株と、その変異株の代表とされるIriki株を用いた片側交差中和試験を行った。その結果、野外血清はJaGAr-39株ならびに1998年石川県分離株に対しIriki株よりも4～64倍高い抗体価を示し、2008年に石川県で流行したAKVは1998年に石川県で流行した株と類似した抗原性状を有すると推察された。

【キーワード：アカバネウイルス、抗原性状、石川県、中和試験、流行】

【はじめに】

アカバネ病は牛に異常産や生後感染による脳炎を引き起こし養牛経営に被害をもたらす疾病である[3, 4]。アカバネ病の原因ウイルスであるアカバネウイルス(AKV)はブニヤウイルス科オルソブニヤウイルス属に属するRNAウイルスである。吸血昆虫によって媒介されるアル

ボウイルスで、ウシヌカカの仲間が本ウイルスの主要媒介種として知られている[2]。AKVは1998～1999年にかけての全国的な流行以降、九州・沖縄を中心とした西日本ではたびたび小規模な流行が確認されており、2006～2007年にかけては九州地方を中心に生後感染による脳炎型のアカバネ病の集団発生が確認されている

[6]。石川県でも1998年には23年ぶりのAKVの流行があり、能登地方を中心にアカバネ病による被害が発生したが[8]、以降2008年まで、AKVの流行は確認されなかった。

全国の家保では、家畜防疫対策要項(平成11年4月12日付け11畜A第467号農林水産省畜産局長通知)の監視伝染病のサーベイランス対策指針に基づく検査の一環として、未越夏牛をおとり牛として管内全域に配置しアルボウイルス感染症のサーベイランスを実施している。2008年8月、石川県においておとり牛に10年ぶりとなるAKVに対する抗体の陽転が認められた。そこで今回のAKVの流行を詳しく調査するため、AKVの県内における浸潤状況をウイルス分離、AKV遺伝子の検出および抗体検査により調べた。さらにAKV代表株を用いた片側交差中和試験による流行株の抗原性状の推察を試みた。

[材料および方法]

(1)おとり牛による流行状況調査材料

石川県の加賀地区(加賀市、白山市)に19頭、口能登地区(羽咋市、宝達志水町、内灘町)15頭、中能登地区(志賀町、中能登町、七尾市)9頭および奥能登地区(穴水町、輪島市、能登町、珠洲市)に14頭、計57頭の未越夏のおとり牛を配置し、2008年6、8、9および11月の4回採血を行い、ウイルス分離、ウイルス遺伝子の検出およびAKV抗体検査を実施した。

(2)浸潤状況調査材料

9~11月に県内7市町より採材されたアカバネ病ワクチン未接種牛474頭の保存血清を用い、抗体調査を実施した。なお、対象牛は石川県で最後にAKVの流行が確認された1998年以降に生まれた牛とした。

(3)ウイルス分離および遺伝子検査材料

抗体陽転の認められたおとり牛材料に加え、2008年7~11月に採材された保存血清ならび

に血漿で、抗体検査によりAKV抗体の陽転が確認された41検体ならびに、抗体陰性であった104検体について、ウイルス分離とAKVの特異遺伝子の検出を試みた。

(4)AKV特異遺伝子の検出

血清および血漿からTrizol LS (インビトロゲン、カナダ)を用いてRNAを抽出した。抽出したRNAはRNA PCR Kit (AMV) Ver3.0(タカラバイオ、滋賀)を用いてRT-PCRを行った。プライマーはAKAI172F (5' -CAG AAG AAG GCC AAG ATG GT-3')およびAKAI560R (5' -AAG TTG ACA TCC ATT CCA TC-3') [6]を使用した。PCR産物は、2%アガロースゲルで電気泳動を行い、0.1 μg/mlのエチジウムブロマイドで染色し、トランスイルミネーターで観察した。

(5)ウイルス分離

血清および血漿をHmLu-1細胞に接種し、37°Cで回転培養を実施した。細胞変性効果(CPE)の有無を観察した。CPEが観察されない場合、盲継代を3代繰り返した。

(6)AKVに対する抗体検査

被検血清を56°Cで30分間非働化し、HmLu-1細胞を用いマイクロタイター法による血清希釈中和試験を行った。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、抗体価2倍以上を陽性とした。なお、中和試験には、AKV JaGAr-39株 [10]を指示ウイルスとして用いた。

(6)片側交差中和試験

AKVに対する抗体が陽転したおとり牛11頭の11月に採取した血清を用い、JaGAr-39株、1998年石川県分離株(Ishi-1)ならびにIriki株を用いて片側交差中和試験を実施した。

[結果]

(1)おとり牛による流行状況調査

2008年6月のウイルス分離および抗体検査は、移行抗体と考えられる抗体価が検出され

た10頭以外は全頭陰性であったが、8月に口能登地区で1頭にAKV抗体の陽転が見られた。9月には、口能登地区でさらに1頭、中能登地区で1頭、奥能登地区で7頭の抗体陽転牛が確認されたが、11月には新たな抗体陽転牛は認められず、流行後(11月)におけるおとり牛の抗

体陽性率は、奥能登地区7頭/14頭(50%)、中能登地区1頭/19頭(5%)、口能登地区3頭/15頭(20%)であった。一方、加賀地区(金沢市以南)では全期間を通して抗体陽転牛は確認されなかった(Table1)。

Table 1. antibody titers against AKV of sentinel calves in ishikawa Prefecture from June to November in 2008

calf No.	region	June	August	September	November
1	Okunoto	<2	<2	<2	<2
2		<2	<2	<2	<2
3		<2	<2	<2	<2
4		<2	<2	<2	<2
5		<2	<2	<2	<2
6		<2	<2	<2	<2
7		<2	<2	<2	<2
8		<2	<2	8	64
9		<2	<2	16	64
10		<2	<2	32	64
11		<2	<2	16	16
12		4	<2	<2	<2
13		<2	<2	64	64
14		4	<2	128	128
15	Nakanoto	<2	<2	64	32
16		<2	<2	<2	<2
17		<2	<2	<2	<2
18		<2	<2	<2	<2
19		<2	<2	<2	<2
20		<2	<2	<2	<2
21		<2	<2	<2	<2
22		<2	<2	<2	<2
23		<2	<2	128	128
24		Kuchinoto	<2	<2	<2
25	<2		<2	32	256
26	2		<2	<2	<2
27	<2		<2	<2	<2
28	<2		<2	<2	<2
29	<2		<2	<2	<2
30	<2		64	1024	4096
31	4		<2	8	32
32	<2		<2	<2	<2
33	2		<2	<2	<2
34	<2		<2	<2	<2
35	8		<2	<2	<2
36	<2		<2	<2	<2
37	2		<2	<2	<2
38	<2	<2	<2	<2	
39	Kaga	<2	<2	<2	<2
40		<2	<2	<2	<2
41		<2	<2	<2	<2
42		<2	<2	<2	<2
43		<2	<2	<2	<2
44		<2	<2	<2	<2
45		2	<2	<2	<2
46		<2	<2	<2	<2
47		<2	<2	<2	<2
48		<2	<2	<2	<2
49		8	<2	<2	<2
50		<2	<2	<2	<2
51		<2	<2	<2	<2
52		<2	<2	<2	<2
53		<2	<2	<2	<2
54		<2	<2	<2	<2
55		<2	<2	<2	<2
56		4	<2	<2	<2
57		<2	<2	<2	<2

Table2. Comparison of neutralizing antibody titers against representative AKV strains

calf No.	Representative AKV strains		
	JaGAR-39	Ishi-1	Iriki
1	64	32	8
2	64	64	4
3	64	64	8
4	16	64	2
5	64	256	8
6	128	512	32
7	32	16	4
8	128	128	16
9	256	1024	16
10	4096	4096	128
11	32	8	2
Geometric mean	93.4	120.2	9.1

(2) 浸潤状況調査

ワクチン未接種牛を対象に行ったAKV抗体検査による浸潤状況調査では、奥能登地区は194頭中11頭(5.7%)、中能登地区は69頭中2頭(2.9%)、口能登地区は134頭中13頭(9.7%)が抗体陽性だったが、加賀地区では77頭すべて抗体陰性であった。

(3) AKV特異遺伝子の検出およびウイルス分離

抗体陽転の認められたおとり牛ならびに、2008年7月～11月採材の145検体についてAKV特異遺伝子の検出およびウイルス分離を実施したが、全検体陰性であった。

(4) 片側交差中和試験

AKVに対する抗体が陽転したおとり牛11頭の血清を用いて実施した片側交差中和試験成績をTable2に示した。JaGAR-39株に対する抗体価はIriki株に対するそれより4～32倍高く、Ishi-1株に対する抗体価はIriki株に対するそれより4～64倍高かった。幾何平均値はIshi-1株に対する抗体価が120.2倍と最も高く、Iriki株に対する抗体価との差は13.2倍であった。

[考察]

アルボウイルスの流行をサーベイランスする目的で全国的に実施されているおとり牛の抗体調査の結果、2008年8月に中国、近畿および北陸地方で抗体陽性率の上昇が確認され、11月までに22府県で抗体陽性牛が確認された(平成20年度家畜衛生研修会(病性鑑定・ウイルス部門)資料)。本県では、8月に口能登地区、9月に口能登地区以北で抗体陽性牛が確認されたが、それ以降陽転牛はみられなかった。このことから今回の流行は能登地方を中心に主に8月から9月にかけてあったものと推察された。1998年の流行時のAKV抗体陽性率は奥能登地区で44.6%(246/552頭)、中能登地区23.2%(95/410頭)、口能登地区8.3%(14/169頭)および加賀0%(0/763頭)であったが、今回は奥能登地区5.7%、中能登地区2.9%、口能登地区9.7%および加賀地区0%といずれも1998年よりも低率であり、2008年の本県における流行は1998年より小規模であったと考えられ

た。石川県では1998年のアカバネ病発生後ワクチン接種率が一時上昇したが、近年接種率は低下し2008年の接種率は26.7%と1998年とほぼ同等であり、石川県におけるアカバネ病ワクチン接種はすでに1979年から始まっていることから牛群のAKVに対する抗体レベルは1998年と差はなかったと考えられ、今回の流行が小規模であった要因は牛側にないものと思われた。これまでわが国では冬季にAKVは確認されておらず、より低緯度(熱帯地方あるいは亜熱帯地方)の地域より媒介昆虫によって運ばれ、繰り返し国内へ侵入していると考えられている [6]。1975年および1998年のAKV流行も全国的な流行であり、媒介昆虫の北上がAKVの流行に関わっているものと考えられている。しかし、流行の確認された能登地区に比べて加賀地区は低緯度にあるものの流行は確認されず、1998年も同様であることから[8]、石川県への媒介昆虫の侵入は北上によるのではなく、他の経路があることが疑われた。1998年に比べて小規模であったことについては、1998年の奥能登地区は9月に1311.0mmの降水量を記録しており、媒介昆虫の大量発生があったことが推察されたのに対し、2008年の気象台のデータによると9月の降水量は2008年の16.7%に当たる219.5mmであり、媒介昆虫が発生しにくい状態であったことが推察され、このことが流行が拡大しなかった理由の一つとして考えられた。

近年のAKV遺伝子解析により、わが国のAKVはプロトタイプであるJaGAr-39株やワクチン原株であるOBE-1株を含むグループとIriki株で代表される変異株を含むグループに大別されている [1, 5, 11]。2006年南九州地方で牛に生後感染による脳炎の大きな流行があり、Iriki株を含むグループに属するAKVが分離された [6]。このグループとワクチン株とは抗原性状に差異が認められることが報告されて

おり、抗原性状の広い範囲に有効なワクチン開発の必要性が示唆されている [6]。また、AKVは抗原性状、病原性の変異を起こしやすいことが示唆されており [9]、流行株がどんな抗原性状を有するかを確認することは重要と考えられる。今回、ウイルス遺伝子検出およびウイルス分離は、いずれも陰性であったことから、流行株の抗原性状の把握を目的に両グループの代表株ならびに1998年石川県分離株(Ishi-1株; JaGAr-39株と同じグループ [8])を用いて、おとり牛のAKV陽転血清による片側交差中和試験を実施した。その結果、おとり牛の血清は、Iriki株に対する抗体価は、JaGAr39株ならびにIshi-1株に対してIriki株よりも幾何平均値で10.3~13.2倍高い値を示した。このことから、今回の本県における流行株はプロトタイプのグループに属する株であると推察され、現行の市販ワクチンは2008年の流行株に有効であったと考えられた。抗原性状の推定に用いた本手法は、ウイルスが分離されない事例において流行株の抗原性状を推定するうえで有用であると考えられた。

本県では2008年の流行開始以降、2009年春までAKVの関与が疑われる異常産の監視を続けてきたが、アカバネ病の発生は確認されなかったものの、他県では異常産等の報告がなされている(農林水産省消費・安全局 畜水産安全管理課、動物衛生課：家畜衛生週報、2009年、No.3071、229ページ)。今回石川県では、流行規模が小さかったことが異常産の発生がなかった要因と考えられた。

石川県では1998年の発生時には媒介昆虫の調査を実施し、ヌカカ類を捕虫しミヤマヌカカ、ホシヌカカ等を確認したが、その後媒介昆虫の調査は行われていない。今後サーベイランスをさらに正確に行うためには媒介昆虫についての調査も必要と思われた。

[引用文献]

1. Akashi, H., Kaku, Y., Kong, X. and Pang, H. 1997. Sequence determination and phylogenetic analysis of the Akabane bunyavirus S RNA genome segment. *J. Gen. Virol.* 78: 2847-2851.
2. Bishop, D. H. L. 1990. Bunyaviridae and their replication. Part I: Bunyaviridae. In *Virology*, 2nd edn, PP. 1155-1173. Edited by BN Fields & DM Knip. New York: Raven.
3. Charles, J. A. 1994. Akabane virus. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 10: 525-546.
4. Inaba, Y., Kurogi, H. and Omori, T. 1975. Akabane disease: epizootic abortion, premature birth, stillbirth and congenital arthrogryposis-hydranencephaly in cattle, sheep and goats caused by Akabane virus. *Aust. Vet. J.* 51: 584-585.
5. Kobayashi, T., Yanase, T., Yamakawa, M., Kato, T., Yoshida, K. and Tsuda, T. 2007. Genetic diversity and reassortments among Akabane virus field isolates. *Virus Res.* 130: 162-171.
6. Kono, R., Hirata, M., Kaji, M., Goto, Y., Ikeda, S., Yanase, T., Kato, T., Tanaka, S., Tsutsui, T., Imada, T. and Yamakawa, M. 2008. Bovine epizootic encephalomyelitis caused by Akabane virus in southern Japan. *BMC Vet. Res.* 4: 1-10.
7. Miyazato, S., Miura, Y., Hase, M., Kubo, M., Goto, Y. and Kono, Y. 1989. Encephalitis of cattle caused by Iriki isolate, a new strain belonging to Akabane virus. *Nippon Juigaku Zasshi.* 51: 128-136.
8. 長井 誠, 村上俊明, 源野 朗, 松本忠幸, 竹内久平, 上地正英, 早川裕二, 島野 健, 一二三誓祐, 明石博臣. 2000. 石川県におけるアカバネウイルスの流行と分離ウイルスの性状. *日獣会誌.* 53: 655-660
9. Ogawa, Y., Fukutomi, T., Sugiura, K., Sugiura, K., Kato, K., Tohya, Y. and Akashi, H. 2007. Comparison of Akabane virus isolated from sentinel cattle in Japan. *Vet. Microbiol.* 124: 16-24.
10. Oya, A., Okuno, T., Ogawa, T., Kobayashi, I. and Matumoto, T. 1961. Akabane, a new arbor virus isolated in Japan. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 14: 101-108.
11. Yamakawa, M., Yanase, T., Kato, T. and Tsuda, T. 2006. Chronological and geographical variations in the small RNA segment of the teratogenic Akabane virus. *Virus Res.* 121: 84-92.

Prevalence of Akabane virus and presumption of antigenic property using neutralization tests of the epidemic virus in Ishikawa Prefecture in 2008

Sayaka Hosokawa¹⁾, Toshiaki Murakami^{1)*}, Takaichi Tanaka¹⁾,
Yuji Hayakawa¹⁾, Fujiko Minami¹⁾, Hirofumi Komae¹⁾ and Makoto Nagai²⁾

1) Ishikawa Nanbu Livestock Hygiene Service Center
(Bo 324-2, Saida-cho, Kanazawa-shi, Ishikawa 920-3101)

2) Ishikawa Prefectural livestock research center
(Bu 93-2, Tsuboyama, Hodatsushimizu-cho, Ishikawa 929-1325)

* correspond to : Toshiaki Murakami

TEL : 076-257-1262

FAX : 076-257-2122

e-mail : muraka-t@pref.ishikawa.lg.jp

ABSTRACT

Prevalence of Akabane virus was confirmed in Ishikawa Prefecture in 2008 for the first time in a decade. From August to September in 2008, a serological surveillance of the Akabane virus (AKV) in Ishikawa Prefecture demonstrated that 11 out of 57 (19.3 %) sentinel calves mainly housed in Noto region exhibited seroconversion to the virus. Furthermore, serological investigation using reserved sera of unvaccinated cattle in Ishikawa Prefecture from September to November indicated that 26 out of 474 cattle possessed the neutralizing antibody against AKV. Since AKV was subdivided into two subgroups by antigenic difference, the antigenic property of prevalence viruses is importance. However virus isolation and RT-PCR of AKV from sera collected in the same period were negative. To estimate the antigenic property of epidemic AKV, we investigated the reactivity of neutralizing antibodies of sentinel calves in Ishikawa Prefecture against representative strains of AKV, prototype strain: JaGAR-39, strain of prototype group: Ishi-1, and typical variant strain: Iriki. The antibody titers of cattle in Ishikawa Prefecture against Ishi-1 strain and JaGAR-39 strain were 4 to 64 folds higher than those against Iriki strain. Present finding suggests that the antigenic property of the epidemic virus in Ishikawa Prefecture in 2008 is similar to that of virus, which was prevalent in Ishikawa Prefecture in 1998.

【Key Word : Akabane virus, antigenic property, Ishikawa Prefecture, neutralization test, Prevalence】