

原 著

兵庫県中部におけるアカバネウイルスによる子牛の
非化膿性脳脊髄炎と先天性奇形を伴う異常産の発生富田啓介[†] 加茂前仁弥 中条正樹 三宅由利子
小浜菜美子 浦本京也

兵庫県姫路家畜保健衛生所（〒670-0081 姫路市田寺東2-10-16）

（2010年12月27日受付・2011年4月15日受理）

要 約

2008年9月、2カ月齢の子牛が起立不能となった例を初発に、翌年5月まで、7市3町19戸20例でアカバネ病が発生した。2008年7～11月生まれの8例は、運動失調や麻痺を主徴とし、非化膿性脳脊髄炎を認めた（前期）。12月生まれの3例は、関節拘縮症を主徴とし、脊髄腹角神経細胞の減数、骨格筋の矮小化を認めた（中期）。2009年1月生まれの1例は、虚弱を主徴としたが、病変は無かった。3～4月生まれの8例は、盲目を主徴とし、水無脳症を認めた（後期）。免疫染色では前期の全例（5/5）で、中枢神経系組織にアカバネウイルス（AKAV）抗原が検出された。Simbu血清群検出RT-PCRは、中期まで陽性であった。AKAV特異的nested RT-PCRによる増幅産物の塩基配列を用いた系統樹解析では、AKAV Okayama2004株と近縁で、genogroup II AKAVに属した。これより、genogroup II AKAVでも異常産に先立ち、子牛の脳脊髄炎の原因となることが明らかになった。

——キーワード：関節拘縮症、水無脳症、genogroup II AKAV、非化膿性脳脊髄炎。

----- 日獣会誌 64, 781～786 (2011)

アカバネウイルス（AKAV）は、オルソブニヤウイルス属Simbu血清群に属し、genogroup IとIIの2つの遺伝子型に大別される [1]。AKAVは、妊娠した牛に感染すると、流産、早産、死産及び水無脳症、関節拘縮症候群を伴った先天異常子の分娩などの異常産を引き起こすことが知られている [2, 3]。一方、genogroup I AKAVの生後感染による非化膿性脳脊髄炎の発生が報告され [4-9]、その病原性が注目されている。今回、2008年のgenogroup II AKAV流行時に、正常分娩された子牛の脳脊髄炎から始まる流行期ごとの病態を、8カ月間にわたり観察したので報告する。

材料及び方法

病理検査：20例（0～70日齢，No. 1～20）を病理解剖し、主要臓器を10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定後、常法によりHE染色を実施した。また、前期5例（No. 1～5）の中枢神経系（CNS）組織では、抗AKAV（OBE-1株）家兎抗体を用いて、ストレプトアビジン-

ビオチン（SAB）法にて免疫染色を実施した。

ウイルス検査：Simbu血清群検出RT-PCRは、13例（No. 2～14）のCNS組織について、市販のキット（ISOGEN LS, 株ニッポン・ジーン, 東京）にてRNAを抽出後、S RNA分節を標的とした福富ら [10] のプライマーにて、市販のキット（Ready-to-Go RT-PCR Beads, GE Healthcare, U.K.）を用いて実施した。さらに、RT-PCR陽性の10例（No. 2～11）は、CNS組織の各部位における陽性率の比較を行った。

分子系統樹解析は以下のとおり行った。No. 2とNo. 3について、同様にRNA抽出後、AKAV S RNA分節を標的としたAkashiら [11] のプライマーにて、nested RT-PCRを実施した。得られたPCR産物は、市販のキット（QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN, U.S.A.）にて精製し、外注先（株北海道システム・サイエンス社）にてキット（BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, U.S.A.）を用いたダイレクトシーケンス法により、その塩基配列を決定した。

[†] 連絡責任者：富田啓介（内閣府食品安全委員会事務局）

〒107-6122 港区赤坂5-2-20 赤坂パークビル22F

☎03-6234-1100 FAX 03-3584-7391

E-mail : keisuke.tomita@cao.go.jp

アカバネウイルスによる子牛の脳脊髄炎と異常産の発生

表1 症例ごとの病理及びウイルス検査成績

No.	受付 月日	生年 月日	日齢	病理検査成績 ¹⁾				ウイルス検査成績				
				非化膿性 脳脊髄炎	骨格筋変性 矮小化	腹角神経 細胞減数	水無 脳症	Simbu 血清群検出 RT-PCR ²⁾	中和試験			
									AKAV	AINOV	CHUV	
1	9/17	7/20	59	+	NT	-	-	NT	128	<2	<2	
2	9/29	8/26	34	+++	NT	-	-	+	>256	<2	<2	
3	10/8	8/30	39	++	-	-	-	+	>256	<2	<2	
4	10/8	9/10	28	+	-	-	-	+	>256	<2	<2	
5	10/15	10/9	6	+	+ ^{a)}	-	-	+	>256	<2	<2	
6	10/30	10/29	1	+	+ ^{a)}	-	-	+	>32	<2	<2	
7	11/27	11/19	8	+	+ ^{a)}	-	-	+	>256	<2	<2	
8	11/27	11/17	10	+	+ ^{a)}	-	-	+	>256	<2	<2	
9	12/4	12/3	1	±	++ ^{b)}	++	-	+	NT	<2	<2	
10	12/12	12/11	1	±	++ ^{b)}	+	-	+	NT	<2	<2	
11	12/16	12/12	4	-	NT	+	-	+	128	<2	<2	
12	1/26	1/21	5	-	± ^{b)}	-	-	-	128	<2	<2	
13	3/26	3/24	2	-	NT	-	+++	-	56	<2	<2	
14	3/31	3/26	5	-	NT	-	+++	-	32	<2	<2	
15	4/2	3/13	20	-	NT	-	+++	NT	16	<2	<2	
16	4/2	2/28	33	-	-	-	+++	NT	2	<2	<2	
17	4/9	4/9	0	-	± ^{b)}	NT	+	NT	8	<2	<2	
18	4/28	2/17	70	-	NT	NT	+++	NT	16	<2	<2	
19	4/28	4/23	5	-	-	NT	+++	NT	8	<2	<2	
20	5/20	4/23	27	-	-	NT	+++	NT	8	<2	<2	

1) - : 陰性 ± : ごく稀 + : 軽度 ++ : 中等度 +++ : 重度 NT : 未実施

2) - : 陰性 + : 陽性 NT : 未実施

a) 変性 b) 矮小化

AKAV : アカバネウイルス AINOV : アイノウイルス CHUV : チュウザンウイルス

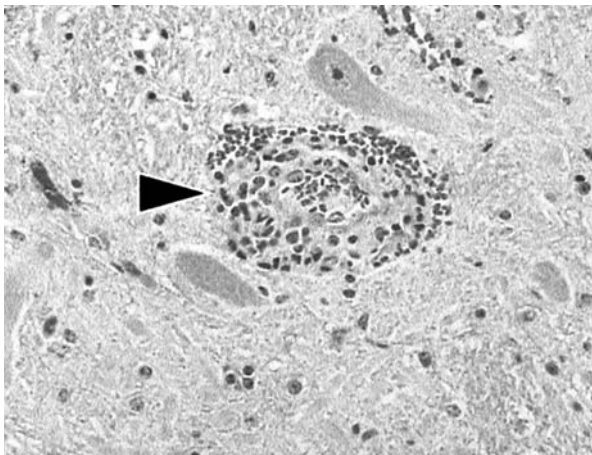


図1 流行前期での延髄の囲管性細胞浸潤 (No. 2)
血管周囲にリンパ球を主体とした細胞浸潤がみられる (矢頭). (HE染色 ×400)



図2 流行中期での脊髄腹角神経細胞の消失 (No. 9)
腹角神経細胞がほぼ消失している (円内).
(HE染色 ×40)

得られた塩基配列について、解析ソフトMEGA4 [12]を用いて、NCBIのプラスサーチ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)にて日本DNAデータベース(DDBJ)登録株と相同性解析及び分子系統樹解析を実施した。

抗体検査は、18例の血清について、ハムスター肺由来株化(HmLu-1)細胞を用いたマイクロタイター法に

て[4], AKAV JaGAr39株, アイノウイルスJaNAr28株, チュウザンウイルス31株に対する中和試験を行った。

ウイルス分離は、Simbu血清群検出RT-PCR陽性牛4例(No. 2~5)の脳乳剤上清, 髄液について、HmLu-1細胞を用い、細胞変性効果を指標に3代継代した。

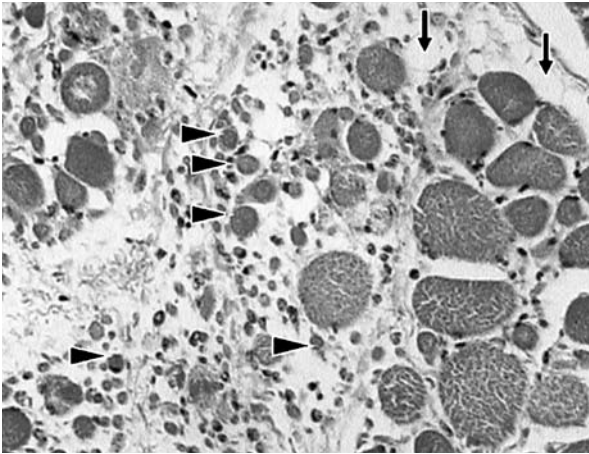


図3 流行中期での骨格筋の矮小化 (No. 9)
横断面での筋線維は大小不同で、委縮した筋線維 (矢頭) と、脂肪性置換 (矢印) がみられる。
(HE 染色 × 400)

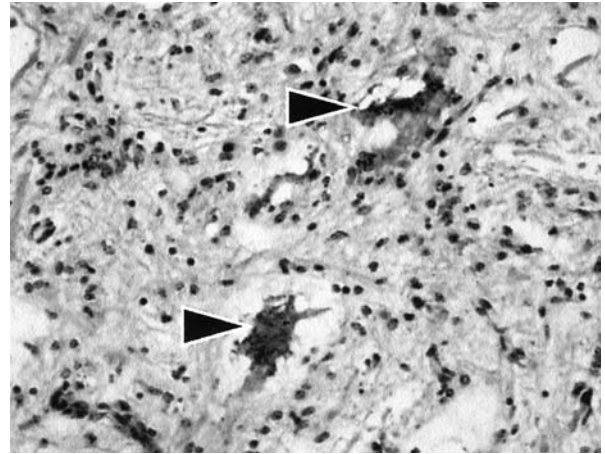


図5 脊髄の神経細胞のアカバネウイルス (AKAV) 抗原 (No. 2).
変性した神経細胞の細胞質にAKAV抗原がみられる (矢頭). (免疫染色 SAB法 × 400)

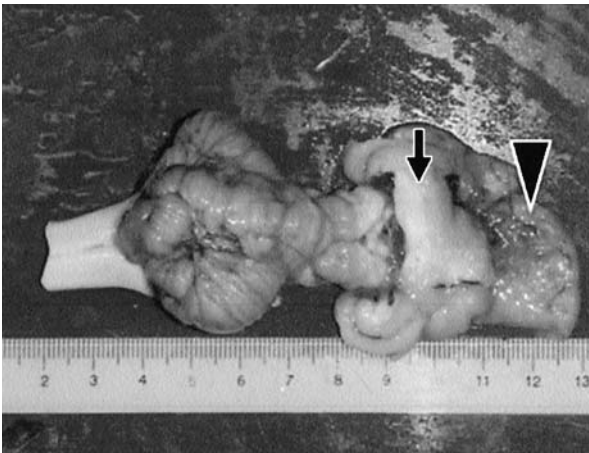


図4 流行後期での水無脳症 (No. 14)
大脳はほぼ欠損し (矢頭), 視床間脳 (矢印) が露出している。

表2 中枢神経系組織における抗アカバネウイルス抗体による免疫染色の成績

No.	大脳	小脳	脳幹	脊髄
1	-	-	-	+
2	+	+++	+	+++
3	-	+	-	+
4	-	-	-	+
5	-	-	+	-
陽性率 (%) (陽性数/検体数)	20 (1/5)	40 (2/5)	40 (2/5)	80 (4/5)

- : 陰性 + : 軽度 ++ : 中等度 +++ : 重度

成 績

発生状況：兵庫県中部でのアカバネ病の発生は、2008年7月20日に正常分娩された2カ月齢の子牛が起立不能となった例を初発に、9月17日～2009年5月20日の間の約8カ月間に、7市3町19戸20例であった。

臨床症状は、2008年7～11月生まれの8例 (1～59日齢) は麻痺、歩様異常、傾頸 (前期)、12月生まれの3例 (1～4日齢) は関節拘縮症 (中期)、2009年1月生まれの1例 (5日齢) は虚弱、3～4月生まれの8例 (0～70日齢) は盲目、茫然踏立 (後期) を主徴とした。品種は、ホルスタイン種10例、交雑種7例、黒毛和種3例であった。母牛へのAKAVワクチンは、全例未接種であった。

病理検査：前期の8例は、CNS組織に囲管性細胞浸

潤、グリア結節、神経細胞の変性等の非化膿性脳脊髄炎を認め (表1, 図1), 脳幹、脊髄で病変が強い傾向にあった。さらに4例では、骨格筋の変性を認めた (表1)。中期の3例は、脊髄腹角神経細胞の減数、骨格筋の矮小化、ごくまれな炎症を認めた (表1, 図2, 3)。1月生まれの1例は、骨格筋の矮小化をごくまれに認める以外著変は無かった (表1)。後期の8例は、水無脳症を認めたが、炎症は無かった (表1, 図4)。免疫染色では、前期の全例 (5/5) で、脊髄80% (4/5)、脳幹と小脳40% (2/5)、大脳20% (1/5) の順に、神経細胞の細胞質等にAKAV抗原が検出された (表2, 図5)。AKAV抗原は、病変が重度なほど多い傾向にあった。

ウイルス検査：Simbu血清群検出RT-PCRは、中期までの10例で陽性であった (表1)。CNS組織ごとの検出頻度は、脳幹77.7% (7/9)、脊髄62.5% (5/8)、小脳33.3% (3/9)、大脳22.2% (2/9)、脳脊髄液10% (1/10) であった (表3)。AKAV nested RT-PCR産物のS RNA分節の相同性解析では、Okayama2004と最も近縁で (No. 2は99.7%, No. 3は99.6%), 系統樹解析ではgenogroup II AKAVに分類された (図6)。抗

表3 中枢神経系組織におけるSimbu血清群検出RT-PCRの成績

No.	大脳	小脳	脳幹	脊髄	髄液
2	NT	NT	NT	NT	+
3	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	-
5	-	+	+	-	-
6	-	-	+	-	-
7	-	-	+	-	-
8	-	-	-	+	-
9	-	-	+	+	-
10	-	-	+	NT	-
11	-	-	-	+	-
陽性率 (%) (陽性数/検体数)	22.2 (2/9)	33.3 (3/9)	77.9 (7/9)	62.5 (5/8)	10 (1/10)

- : 陰性 + : 陽性 NT : 未実施

体検査は、全例でAKAV抗体のみ保有していた(表1)。ウイルス分離は陰性であった。

考 察

2008年9月から翌年5月まで、20例をアカバネ病と診断した。7~11月生まれの8例で非化膿性脳脊髄炎を認め、前期とした。12月生まれの3例で矮小筋症を認め、中期とした。1月生まれの1例では、著変は無かった。2~4月生まれの8例で水無脳症を認め、後期とした。この脳脊髄炎、矮小筋、水無脳症へと移行する病態は、胎子感染型アカバネ病の病態 [2, 3] と一致していた。

今回の脳脊髄炎は、胎子でなく正常分娩された子牛でみられた。これらのCNS組織では、免疫染色により神経細胞の細胞質にAKAV抗原を、さらに、RT-PCRによりSimbu血清群遺伝子を検出、これよりAKAVによる脳脊髄炎と診断した。潜伏期間 [13] を考えると、脳脊髄炎を起こしたほとんどの例が母体内で感染し、分娩後発症したと考えられるが、7~8月生まれで30日齢以降の発症例は、分娩後に感染し発症した生後感染型であったと推察される。なお、材料は得ていないが、流早産もあったと思われる。免疫染色によるAKAV抗原検出量は、病変の強い部位で多い傾向にあり、検出部位は脊髄が多く、2006年流行時の報告 [6-9] とほぼ一致している。また、RT-PCRによる遺伝子検出は、免疫染色では抗原が未検出であった部位でも検出された。CNS組織以外の病変として、後半には骨格筋の変性を認めた。Leeら [5] 及びKamataら [7] も骨格筋病変を報告しており、これはAKAVによる病変であるものと推察される。

中期では、矮小筋症と脊髄神経細胞の消失、軽度の炎症を認めた。Simbu血清群遺伝子は、この時期まで検出された。遺伝子検出部位は、脳幹・脊髄で高頻度であ

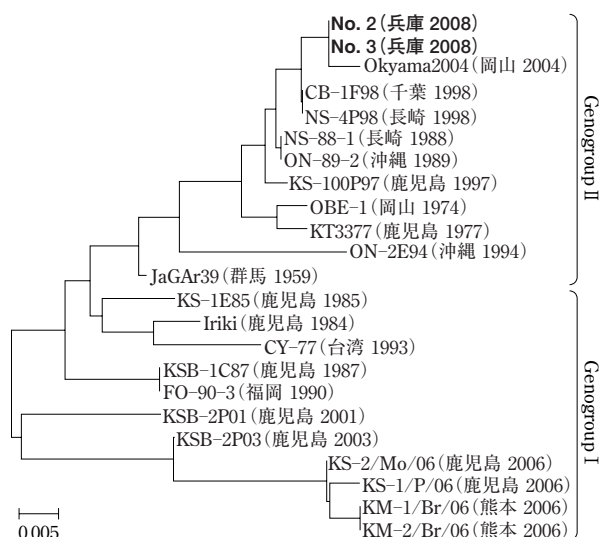


図6 アカバネウイルスS RNA増幅産物の塩基配列に基づく分子系統樹

り、2006年流行時の報告 [6-9] と一致している。

1月生まれの1例は、病理学的に著変は無かったが、初乳未摂取でAKAV抗体のみ保有していたことより診断した。これより、病変の移行期間が存在すると推察される。

後期は、水無脳症を認めたが、炎症は無く、Simbu血清群遺伝子も検出されなかった。使用プライマーの相違による検出感度の差はあるものの、炎症が残っている時期、少なくとも中期までは、PCRが診断に有効であると推察される。

S RNA分節の系統樹解析ではOkayama2004株と近縁で、生後感染型の脳脊髄炎を起こすことが知られているIriki株 [4, 5] や、2006年流行株 [6-9] とは異なるgenogroup IIに属した。genogroup IIのJaGAR39株やOBE-1株は牛の脳内接種しないかぎり脳炎はおこさないとされてきたが [13], Ogawaら [14] は、マウス接種試験によりOkayama2004株は、Iriki株同様神経向性がみられ、OBE-1株より病原性が強いと報告している。今回の子牛の脳脊髄炎の流行もその報告を裏付けるものであった。

以上より、genogroup IIに属するAKAVでも、先天性奇形を伴う異常産に先立ち、子牛の脳脊髄炎の原因となることが明らかになった。今回、脳脊髄炎8例に対し、虚弱、水無脳症、関節湾曲症候群を伴った先天異常産は13例であり、2006年のgenogroup I AKAVの異常産発生率 [9] に比べ多かった。これはgenogroup IIによる病原性の相違を反映したものと推察される。

今回の発生例は、母牛へのAKAVワクチンは、全例未接種であった。また、アカバネ病予防にはワクチンが有効であり、さらに適切な初乳摂取の励行は被害低減に効果がある。次回流行に備え、高い接種率を維持し被害

低減に努めたいと考える。

最後に、早期より情報を提供していただいた診療獣医師の諸先生、抗血清を作製していただいた東京大学の明石博臣教授、免疫染色を実施していただいた獣動物衛生研究所の芝原友幸主任研究員に深謝する。

引用文献

- [1] 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)
- [2] 稲葉右二 : 牛病学, 清水高正編, 第2版 (182-188), 近代出版, 東京 (1988)
- [3] Inaba Y, Matumoto M : Congenital arthrogryposis-hydranencephaly syndrome, *Viral diseases of food animals*, Gibbs EOJ ed, Academic Press, London, 653-671 (1981)
- [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] Lee JK, Park JS, Choi JH, Park BK, Lee BC, Hwang WS, Kim JH, Jean YH, Jean YH, Haritani M, Yoo HS, Kim DY : Encephalomyelitis associated with akabane virus infection in adult cows, *Vet Pathol*, 39, 269-273 (2002)
- [6] 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)
- [7] 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 Comp Pathol*, 140, 187-193 (2009)
- [8] 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)
- [9] 山上 睦 : アカバネウイルスによる牛の脳脊髄炎, *家畜診療*, 56, 141-147 (2009)
- [10] 福富豊子, 吉田和生, 津田知幸, 奥田宏健, 多田幸四郎, 萱原佳美 : 牛から分離された新しいブンヤウイルス属シンプ群ウイルスの性状と侵潤状況, *日獣会誌*, 54, 358-362 (2001)
- [11] 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)
- [12] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumars S : MEGA4 : Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0, *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596-1599 (2007)
- [13] Konno S, Nakagawa M : Akabane disease in cattle : Congenital abnormalities caused by viral infection. *Experimental disease, Vet Pathol*, 19, 3, 267-279 (1982)
- [14] 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)

Occurrence of Nonsuppurative Encephalomyelitis and Congenital Abnormalities
of Calves Resulting from the Akabane Virus in Middle Hyogo Prefecture

Keisuke TOMITA*†, Masahiro KAMOMAE, Masaki CHUJO, Yuriko MIYAKE
Namiko KOHAMA and Kyohya URAMOTO

* *Himeji Livestock Hygiene Service Center of Hyogo Prefecture, 2-10-16 Taderahigashi,
Himeji, 670-0081, Japan*

SUMMARY

Between September 2008 and May 2009, an outbreak of Akabane disease occurred in 20 calves in 7 cities and 3 towns in middle Hyogo Prefecture. The first case was a 2-month-old calf showing difficulty in standing. Nonsuppurative encephalomyelitis was observed in 8 calves born between September and November 2008 that showed neurological symptoms, such as ataxia and paralysis. Loss of spinal ventral horn neurons and muscular atrophy were observed in 3 calves born in December that were arthrogryposis. No pathological change was observed in a calf born in January 2009 that was experiencing weakness. Hydranencephaly was observed in 8 calves born between March and April 2009 that showed neurological symptoms, such as blindness. Immunohistochemically, Akabane viral antigens were detected in the central nervous system (CNS) in the cases of encephalomyelitis period. By RT-PCR, Simbu serogroup S gene was detected in the CNS of the calves born up to December 2008. The nucleotide sequences of PCR products of Akabane viral S gene were closely related to Okayama 2004 and classified into genogroup II. These findings suggest that the Akabane virus belonging to genogroup II caused not only congenital abnormalities but also encephalitis in the calves.

— Key words : arthrogryposis, hydranencephaly, genogroup II Akabane virus, nonsuppurative encephalomyelitis.

† *Correspondence to : Keisuke TOMITA (Cabinet Office, Government of Japan, Food Safety Commission)*

Akasaka Park Bld. 22nd F., 5-2-20 Akasaka, Minato-ku, 107-6122, Japan

TEL 03-6234-1100 FAX 03-3584-7391 E-mail : keisuke.tomita@cao.go.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 64, 781 ~ 786 (2011)