

牛異常産への関与が疑われるデアギュラウイルスの 京都府における浸潤状況調査

久保田直樹^{1)†}吉良卓宏¹⁾梁瀬 徹²⁾

1) 京都府中丹家畜保健衛生所 (〒620-0954 福知山市字半田371-2)

2) 国研農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門鹿児島研究拠点
(〒891-0105 鹿児島市中山町2702)

(2020年12月7日受付・2021年4月16日受理)

要 約

デアギュラウイルス (D'Aguilar virus : DAGV) は牛異常産への関与が疑われる節足動物媒介性ウイルスで、国内における感染の確認は九州・沖縄地方が中心である。今回、2005～2018年に京都府で実施されたアルボウイルスサーベイランスにより、未越夏おとり牛498頭から採材した血清を用いて中和試験による抗体検査を実施したところ、2013、2017及び2018年に採材した17頭で抗体陽性であった。さらに、2017及び2018年に抗体陽性だった10頭の血液からDAGV特異遺伝子が検出され、2017年の4頭の血液からはDAGVを分離、九州・沖縄地方以外で初めてDAGVの侵入を確認した。——キーワード：アルボウイルス、牛異常産、オルビウイルス、

-----日獣会誌 74, 631～635 (2021)

デアギュラウイルス (D'Aguilar virus : DAGV) はレオウイルス科セドレオウイルス亜科オルビウイルス属に分類される節足動物媒介性ウイルス (アルボウイルス) であり、チュウザンウイルス (CHUV) と同様、パリウムウイルス種の血清型の一つとされている。同ウイルスの感染が確認された先天異常子では、水無脳症や小脳形成不全に伴う神経症状といったチュウザン病に類似した症状を呈すことから、牛異常産への関与が疑われている [1]。DAGVは1970年代、オーストラリアで初めて分離、同定され [2]、日本国内では1987年以降、九州・沖縄地方で同ウイルスの分離が報告されている [1, 3, 4]。

これまで、京都府はもとより周辺府県においてもDAGVに関する調査は実施されておらず、京都府へのDAGV侵入状況は不明である。しかし、過去のアルボウイルスサーベイランスにおいて、アイノウイルス、アカバネウイルスといった牛異常産関連アルボウイルスの京都府内への侵入を確認していることから、DAGV侵入の可能性も危惧された。そこで今回、DAGVの侵入状況を把握するため、京都府におけるDAGV調査を初めて実施したので、その概要を報告する。

材料及び方法

抗体検査：2005～2018年に京都府で実施されたアルボウイルスサーベイランスにおいて、未越夏おとり牛498頭から各年6、8、9及び11月の4回にわたって採取された血清を用いた。血清を56℃、30分非働化し、HmLu-1細胞とDAGV KSB-29/E/01株を用いたマイクロタイター法 [5] により、ウイルス中和試験を実施した。

ウイルス遺伝子検査：2017及び2018年の抗体陽性牛のうち、抗体陽転した前月以降に採材したEDTA添加血液を検査対象とした。血液は遠心分離して、血漿を得た後、血球成分をPBSで3回洗浄した (洗浄血球)。洗浄血球及び血漿から自動核酸抽出装置 (magLEAD 12gc, プレシジョン・システム・サイエンス(株), 千葉) により核酸を抽出し、血清型特異抗原をコードするDAGVゲノム分節2検出用プライマーセット (DAGV4-F/DAGV4-R) (国研農業・食品産業技術総合研究機構ホームページ (<http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/niah/disease/arbo/index.html>), (参照2020-12-07), 記載「牛のアルボウイルス検査マニュアル」) (表1) を用いて市販キット

† 連絡責任者：久保田直樹 (京都府中丹家畜保健衛生所)

〒620-0954 福知山市字半田371-2

☎ 0773-25-1860 FAX 0773-25-1861

E-mail : n-kubota38@pref.kyoto.lg.jp

京都府におけるディアギュラウイルス浸潤状況調査

表1 遺伝子検査及びシーケンス解析に使用したプライマー

検査	プライマー名	配列 (5'-3')	部位*	サイズ (bp)	用途	
遺伝子検査 (DAGV 同定)	DAGV4-F	ATTTACGGGTATGGTCAGAG	1854-1873	276	RT-PCR	
	DAGV4-R	CTAACAGCRATATTGACAC	2168-2150			
シーケンス解析	分離ウイルス	DAGVL2F	CAAAGGATCTGCAGGTTGATG	338-358	638	RT-PCR シーケンス
		DAGVL2R-2	CCCATCCTTTCTGACTCTGC	1016-997		
	遺伝子のみ 検出した検体	DAGVL2F	CAAAGGATCTGCAGGTTGATG	338-358	1791	1st RT-PCR
		DAGV4-R	CTAACAGCRATATTGACAC	2168-2150		
		DAGVL2F	CAAAGGATCTGCAGGTTGATG	338-358	679	semi-nested PCR シーケンス
		DAGVL2R-4	TATACTTCATCCATTGCGCT	1057-1038		

* : ジーンバンクに登録されている日本分離株の塩基配列に基づく

表2 抗体陽性牛における抗体価推移, 遺伝子検査及びウイルス分離検査結果

陽転年	個体 No.	農場	6月			8月			9月			11月		
			抗体価	抗体価	PCR	抗体価	PCR	分離	抗体価	PCR	分離	抗体価	PCR	分離
2013	1	A	<2	<2	NT	<2	NT	NT	32	NT	NT			
	2	B	<2	<2	NT	32	NT	NT	NT	NT	NT			
	3	C	<2	<2	NT	<2	NT	NT	16	NT	NT			
2017	1	D	<2	<2	-	16	+	-	64	-	NT			
	2		<2	<2	NT	<2	+	-	32	-	NT			
	3		<2	<2	-	32	+	-	32	-	NT			
	4	E	<2	<2	NT	<2	+	HL, BHK	64	-	NT			
	5		<2	<2	-	32	-	NT	64	-	NT			
	6		<2	<2	NT	<2	-	NT	8	-	NT			
2018	7	F	<2	<2	NT	<2	-	NT	64	-	NT			
	8	G	<2	<2	-	64	-	NT	16	-	NT			
	9		<2	<2	NT	<2	+	HL	32	-	NT			
	10		<2	<2	-	128	+	HL	32	-	NT			
	11	H	<2	<2	-	16	+	HL	32	+	-			
	12		<2	<2	-	32	+	-	32	-	NT			
	13		<2	<2	-	64	+	-	64	-	NT			
2018	1	A	<2	<2	NT	<2	-	NT	32	+	-			

NT : 未実施, + : DAGV 特異遺伝子検出, - : 検出せず / CPE 認めず

HL : HmLu-1 細胞で CPE 確認, BHK : BHK-21 細胞で CPE 確認

DAGV 特異遺伝子検出した検体, あるいはウイルス分離検査にて CPE を確認した検体は全て洗浄血球である。

なお, 2013 年及び 2018 年の「A 農場」は同一農場である。

(SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase, サーマファイッシャーサイエンティフィック(株, 東京)により RT-PCR を実施した。

ウイルス分離検査: 上記遺伝子検査において DAGV 特異遺伝子が検出された検体について, HmLu-1 及び BHK-21 細胞に接種, 5% CO₂ 下で静置培養にて 2 代継代し, 細胞変性効果 (CPE) を観察した。CPE が確認された培養上清を回収し, 上記遺伝子検査と同様の PCR 検査で分離ウイルスの確認を行った。

シーケンス解析: 分離ウイルスの核酸抽出物を鋳型として, DAGV ゲノム分節 2 に特異的なプライマーセッ

ト (DAGVL2F/DAGVL2R-2) (表 1) [6] を用いて, 市販キット (PrimeScript™ II High Fidelity RT-PCR Kit, タカラバイオ(株, 滋賀)により RT-PCR を実施, 増幅産物のプライマー部位を除く塩基配列 (638bp) をダイレクトシーケンスにより決定した。

また, ウイルスが分離されずに遺伝子のみが検出された検体では, DAGVL2F/DAGVL2R-2 を用いた RT-PCR によって増幅が確認されなかったため, プライマーセット (DAGVL2F/DAGV4-R) を用いた 1st RT-PCR を実施後, さらにプライマーセット (DAGVL2F/DAGVL2R-4) を用いた semi-nested PCR を市販のキット (Tks Gflex™ DNA Polymerase, タカラバイオ(株,

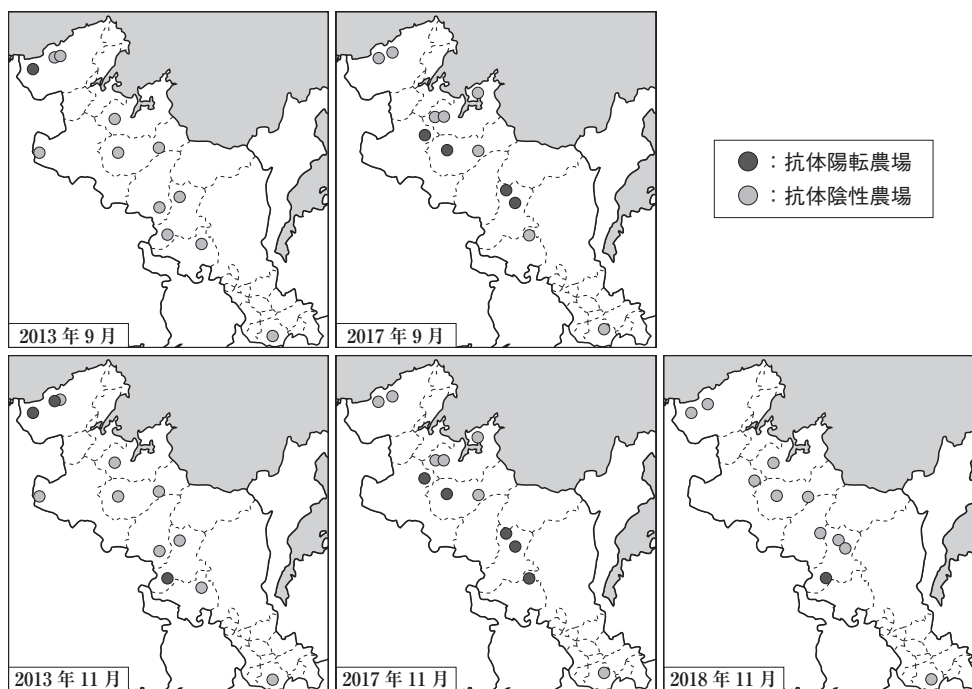


図1 京都府内における抗体陽転農場分布図

滋賀)により実施し、分離ウイルスで得られた配列と対応する領域の配列を、ダイレクトシーケンスにより決定した。

決定された配列をもとに、これまでに国内外で分離された DAGV 株の配列との比較を Clustal Omega による相同性解析、並びに MEGA X による分子系統樹 (Maximum Likelihood 法) の作成により行った。

成 績

抗体検査：498頭中17頭でDAGV抗体陽性であった。抗体陽性牛は、2013年に3農場3頭、2017年に5農場13頭、2018年度に1農場1頭で確認され、抗体価は16～128倍であった(表2)。また抗体陽転は、2013及び2017年には一部の農場が9月期の採血で、2018年の1農場では11月期の採血にて確認された(図1)。なお、抗体陽転率は、2013年は8.6%(35頭中3頭)、2017年は44.8%(29頭中13頭)、2018年は3.4%(29頭中1頭)であった。

ウイルス遺伝子検査：2017及び2018年の抗体陽性牛14頭のうち、10頭の洗浄血球からDAGV特異遺伝子が検出された(表2)。

ウイルス分離検査：DAGV特異遺伝子を検出した10頭のうち、2017年の4頭の洗浄血球において、細胞の円形化といったCPEが認められ、ウイルスが分離された(表2)。さらに2代目培養上清のPCR検査において、すべての上清からDAGV特異遺伝子が検出された。

シーケンス解析：2017年分離ウイルス株4株及び2018年のDAGV遺伝子検出核酸1検体について解析を

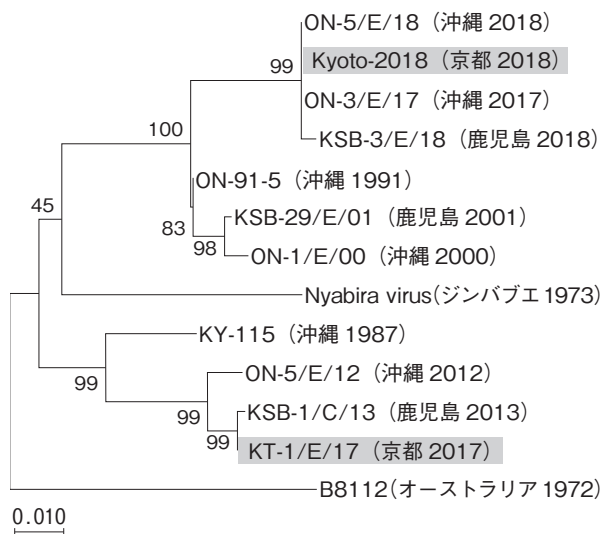


図2 DAGVゲノム分節2の配列(638bp)に基づく分子系統樹解析の結果

実施し、DAGVゲノム分節2の一部領域の塩基配列(638bp)を決定した。2017年分離4株の塩基配列は100%一致し、分子系統樹解析を行った結果、2013年に鹿児島県で分離されたKSB-1/C/13株に最も近縁であり、一致率は99.84%であった。また2018年にDAGV遺伝子を検出した検体は、同年鹿児島県で分離されたKSB-3/E/18株に最も近縁であり、一致率は99.69%であった(図2)。なお、2017年と2018年のDAGVの配列の相同性は92.01%であった。

考 察

今回、抗体検査において17頭の抗体陽性牛が確認された。2013年は複数農場において抗体陽転が確認され、同年鹿児島県でヌカカからDAGVが分離されている[6]ことなどから、8～9月に京都府にもDAGVが侵入したと考えられた。2017年は京都府内の広域のおとり牛で抗体陽転が確認され、DAGV特異遺伝子の検出、並びにDAGVの分離が認められたことから、抗体が陽転した8～9月に京都府にDAGVが侵入したと考えられた。なお、2013及び2017年に抗体陽転が確認された農場は、各農場間における牛の移動もなく、最も近い農場同士でも3km以上の距離があることから、地域内でヌカカによるウイルスの伝播が起こったことが示唆された。また2018年は1農場のみではあるものの抗体陽転が確認され、ウイルス特異遺伝子も検出された。シーケンス解析により検出されたウイルスは同年に鹿児島県で検出されたDAGV(KSB-3/E/18)と高い相同性を示したことから、ウイルス検出農場では2018年に導入や九州地方への牛の移動がなかったことから、起源を同じくするウイルスが、まん延地域から気流等で運ばれたヌカカにより持ち込まれたと考えられた。

2017年に分離されたDAGVは、シーケンス解析により2018年に検出されたDAGV遺伝子と遺伝学的に異なることがわかった。これは当該ウイルスが京都府内で越冬・維持されているのではなく、年ごとに異なるウイルス株が侵入していることを示唆している。さらに2017年分離株は同年に国内で分離されたウイルス株(ON-3/E/17)よりも、2013年鹿児島県分離株(KSB-1/C/13)に近縁であり、国内でも地域によって、まん延するウイルス株が異なることが示された。これまで京都府の近隣府県では、DAGVの検出は報告されていないが、2010年の東北地方におけるアカバネ病の流行[7, 8]や兵庫県における流行性出血病の発生[9]のように、国外からウイルスに感染したヌカカが長距離を移動して、スポット的に京都府に侵入した可能性も考えられた。

なお、今回抗体を検出した検体では、DAGVと血清学的に交差するとされるCHUVの抗体は検出されなかった。

これまで京都府内において、DAGVによる異常産の発生等は認められていないものの、今回、本州で初めてDAGVの感染が確認された。本調査の結果からDAGV

は九州以外の地域にも侵入、伝播されていることが明らかとなり、近隣地域においても同様の事態が起こりうることを示唆された。今後もDAGVの侵入や同ウイルスの関与が疑われる異常産の発生を注視し、流行様式や病態の解明を進める必要がある。

引用文献

- [1] Ohashi S, Matsumori Y, Yanase T, Yamakawa M, Kato T, Tsuda T : Evidence of an antigenic shift among Palyam serogroup orbiviruses, *J Clin Microbiol*, 42, 4610-4614 (2004)
- [2] Cybinski DH, St George TD : Preliminary characterization of D'Aguilar virus and three Palyam group viruses new to Australia, *Aust J Biol Sci*, 35, 343-351 (1982)
- [3] Yanase T, Kato T, Kubo T, Yoshida K, Ohashi S, Yamakawa M, Miura Y, Tsuda T : Isolation of bovine arboviruses from *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in southern Japan: 1985-2002, *J Med Entomol*, 42, 63-67 (2005)
- [4] 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)
- [5] 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)
- [6] Kato T, Shirafuji H, Tanaka S, Sato M, Yamakawa M, Tsuda T, Yanase T : Bovine arboviruses in *Culicoides* biting midges and sentinel cattle in southern Japan from 2003 to 2013, *Transbound Emerg Dis*, 63, e160-e172 (2016), (online), (DOI: 10.1111/tbed.12324, Epub 2015 Jan 19. PMID: 25597441), (accessed 2020-12-07)
- [7] 高森広典, 日野正浩, 高橋幸治, 豊島たまき, 竹田百合子, 高野泰司, 田中省吾, 山川 睦 : 宮城県で発生したアカバネ病の発生時期による病理学的特徴とウイルス遺伝子検出部位の推移, *日獣会誌*, 66, 39-44 (2013)
- [8] Yanase T, Hayama Y, Shirafuji H, Tsutsui T, Terada Y : Surveillance of *Culicoides* biting midges in northern Honshu, Japan, during the period of Akabane virus spread, *J Vet Med Sci*, 81, 1496-1503 (2019)
- [9] Kamomae Y, Kamomae M, Ohta Y, Nabe M, Kagawa Y, Ogura Y, Kato T, Tanaka S, Yanase T, Shirafuji H : Epizootic hemorrhagic disease virus serotype 6 infection in cattle, Japan, 2015, *Emerg Infect Dis*, 24, 902-905 (2018)

Surveillance of D'Aguilar Virus in Kyoto Prefecture

Naoki KUBOTA^{1)†}, Takuhiro KIRA¹⁾ and Tohru YANASE²⁾

1) *Chutan Livestock Hygiene Service Center, 371-2 Handa, Fukuchiyama, 620-0954, Japan*

2) *Kyushu Research Station, National Institute of Animal Health, National Agricultural and Food Research Organization, 2702 Chuzan, Kagoshima, 891-0105, Japan*

SUMMARY

D'Aguilar virus (DAGV) that is an arthropod-borne virus suspected of being involved in bovine abnormal births, has been confirmed the domestic spread of infection mainly in the Kyushu-Okinawa region. Serological surveillance of DAGV was conducted using serum samples collected from 498 sentinel cattle in Kyoto Prefecture between 2005 and 2018. Neutralization antibodies against DAGV were detected in 17 cattle tested in 2013, 2017, and 2018. A DAGV-specific gene was amplified from the blood samples of 10 seropositive cattle tested in 2017 and 2018, and the virus was isolated from four of them that were collected in 2017. In Japan, this is the first detection of DAGV outside of the Kyushu-Okinawa region.

— Key words : arthropod-borne virus, bovine abnormal births, orvivirus.

† *Correspondence to : Naoki KUBOTA (Chutan Livestock Hygiene Service Center)*

371-2 Handa, Fukuchiyama, 620-0954, Japan

TEL 0773-25-1860 FAX 0773-25-1861 E-mail : n-kubota38@pref.kyoto.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 74, 631 ~ 635 (2021)