

【短報】

サシユペリウイルスの分離と疫学調査

相澤 真紀、新田 芳樹、津波 修

サシユペリウイルス(SATV)はブニヤウイルス科オルソブニヤウイルス属に属する、ヌカカなどの吸血昆虫により媒介されるアルボウイルスである。1957年にインドで初めて報告されたウイルスで、国内では1999年岡山県で初めて分離された。しかし、世界的にも本ウイルスに関するその他の報告は無く、依然不明な点の多いウイルスである。

沖縄県ではこれまでSATVの調査は実施されていなかったが、2006年県内広範囲でSATVの流行が確認され、3株のウイルスが分離された。今回、県内におけるSATVの実態把握を目的に、分離株の遺伝子解析、血清疫学調査ならびに牛異常産への関与についての検証を行ったので報告する。

材料および方法

1. ウイルス分離: 県内全域に配置されたおとり牛のヘパリン加血液を血漿と洗浄血球に分けて保存し、BHK-21細胞ならびにHmLu-1細胞を用いてウイルス分離に供した。

2. 分離ウイルスの同定: 分離株は(独)動物衛生研究所九州支所へ依頼し、イムドットプロット法による同定を行った。また、国内にはSATVのプロトタイプ(I-11155株)が存在しないことから、SATVと近縁で血清学的に同等とされるダグラスウイルス(DOUGV)を用いて交差中和試験を行った。

3. 株の遺伝子解析: 2006年沖縄分離株についてS分節はN-ORF、M分節はM-ORF、L分節は相補DNAの5'側の一部の塩基配列を決定し、1999年岡山分離株(OY-1/P/99)、プロトタイプである1955年インド分離株(I-11155)との、相同性解析と系統樹作成を行った。

4. 血清疫学調査: 1994年まで遡り、県内全域に配置された、未越夏または初越夏おとり子牛の保存血清を用いてウイルスの流行状況を、また、おとり子牛の母牛の血清を用い、各ウイルスの流行前の抗体保有率を調べた。供試ウイルスにはON-06-3株を用い、中和試験により、抗体価16倍以上を抗体陽性とし、4倍以上の抗体上昇が認められた場合を有意上昇とした。

5. 牛異常産の病性鑑定: 疫学調査により得られたウイルスの流行時期を基に、各流行前から流行後1年間に病性鑑定依頼のあった牛異常産を対象として実施した。検査は通常の牛異常産関連ウイルス検査、細菌検査、病理学的検査に加え、分離株による抗体検査、SATVを含むシンプ血清群のウイルス検出用に設計されたRT-PCR法(primer: AKAI206F/SimbuS637-656)を用いて行った。

結果

1. ウイルス分離: 2006年7月宜野座村、10月国頭村、12月与那国町で採材されたおとり牛の血漿から、HmLu-1細胞でウイルスが分離された(表1)。

表1 ウイルス分離結果

株名	分離細胞	材料	採材月日	採材地
ON-06-3	HmLu-1	おとり牛血漿	2006/7/25	宜野座村
ON-06-7	HmLu-1	おとり牛血漿	2006/10/24	国頭村
ON-06-14	HmLu-1	おとり牛血漿	2006/12/6	与那国町

2. 分離ウイルスの同定: 分離株はイムドットプロット法によりシンプ血清群共通のアカバネウイルス(AKAV)のN蛋白に対するモノクローナル抗体に反応し、AKAV、アインウイルス(AINOV)のG1蛋白に対するモノクローナル抗体には反応しなかった(図1:口絵)。

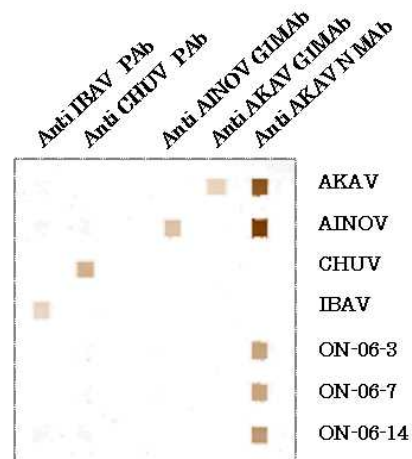


図1 イムドットプロット法による抗原解析

交差中和試験の結果、分離株は SATV と血清学的に同等とされる DOUGV の抗血清により増殖が抑制された(表2)。

表2 DOUGV との交差中和試験結果

virus	抗DOUGV血清	対照
DOUGV	<1.0	3.5
ON-06-3	3.25	5.0

Log₁₀TCID₅₀/0.1ml

3. 遺伝子解析結果: シンプ血清群のウイルス遺伝子は、3分節のマイナス1本鎖 RNA から構成され、S分節は核酸蛋白を、M分節は中和抗原をコードする。イムドットプロット法によりシンプ血清群のウイルスと確認された分離株について、各分節の相同性解析を行った結果、分離株はいずれも S-RNA 分節の塩基配列が 99.7%以上とほぼ一致しており、同一のウイルスと考えられた。また、シンプ血清群ウイルスの中で SATV と最も高い相同性(>97%) を示した(表3)。1999年に岡山県で分離された SATV とは、各分節の塩基配列が 96%以上一致していた(表4)。S分節の分子系統樹解析からも SATV と遺伝学的に最も近縁であること確認された(図2)。

表3 シンプ血清群ウイルスとのS-RNA 分節の塩基配列の相同性

ウイルス名	株名	S分節の相同性
分離株 (宜野座)	ON-06-3	100 %
(国頭)	ON-06-7	100 %
(与那国)	ON-06-14	99.7 %
SATV	I-11155	>97 %
DOUV	CSIRO150	>91 %
SHAV	An5550	>92 %
AINV	JaNAr28	>78 %
PEAV	CSIRO110	>77 %
AKAV	OBE-1	>77 %

表4 SATV 岡山分離株ならびに DOUGV との各 RNA 分節の塩基配列の相同性

ON-06-3株	S分節	M分節	L分節
SATV 岡山株	>98 %	>96 %	>96 %
DOUGV 代表株	>91 %	>84 %	>87 %

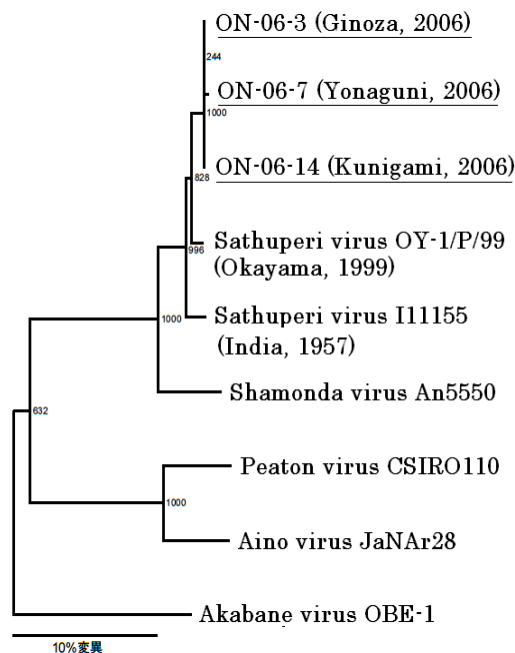


図2 S-RNA 分節の塩基配列の分子系統樹

4. 疫学調査結果: 2006年の流行は本島北部(11/14頭)、中南部(15/26頭)、八重山(9/30頭)と、県内広範囲における大規模な流行であったことが確認された。一方、間に位置する宮古地域での流行は確認されなかった。1994年以降の遡り調査の結果、2000年(宮古、八重山)、2001年(本島)に小規模な流行が確認された(図3)。また、2000年、2006年の流行前における母牛の抗体保有率はそれぞれ3%、16%であった。

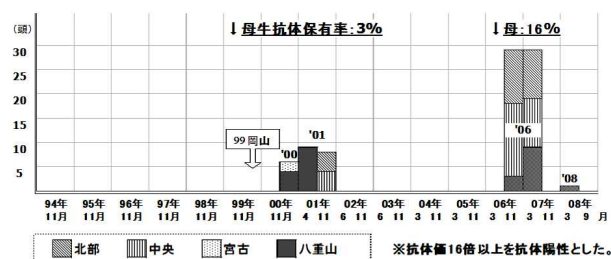


図3 疫学調査結果

5. 牛異常産病性鑑定: 疫学調査結果に基づき、2000年1月～2002年12月ならびに2006年1月～2008年12月の間に病性鑑定依頼のあった牛異常産について、ウイルスの関与を検証した。その結果、体形異常を伴う牛異常産への関与は確認されなかった。流死産症例では、母牛の前後血清に有意な抗体上昇

を確認した症例が 2 件認められた。しかし、ウイルスの関与を疑う病理所見は認められず、また、胎子や母牛からのウイルス分離ならびに、SATV に対する RT-PCR 検査においても抗原は検出されなかったことから、今回、SATV の流死産への関与は特定できなかった(図4)。

【症例1】胎齢5ヶ月流産 (2007年11月石垣市)		
	pre	post
胎子(胸水)	≤4	—
母牛(10才)	64	≥256

【症例2】胎齢8ヶ月流産 (2007年12月西表島)		
	pre	post
胎子(心嚢水)	≤2	—
胎子(胸水)	≤4	—
母牛(2才)	16	64

【症例1, 2共通】

- SATV PCR検査(胎子臓器、体液、母牛pre血液):陰性
- ウイルス分離、細菌検査、病理組織検査:陰性

図4 流産母牛に SATV 抗体の有意上昇が認められた牛異常産症例

ま と め

SATV は 1957 年インドで初めて報告されたウイルスである。その後世界的にも分離報告は無かったが、1999 年岡山県で牛の血液から分離され、国内で初めてウイルスの存在が確認された。岡山県の調査では牛異常産への関与は認められなかったものの、依然不明な点の多いウイルスである。

今回分離株の同定にあたり、国内に SATV のプロトタイプである I-11155 株が存在しないこと、ならびに I-11155 株については S 分節の塩基配列のみの公表であることから、ウイルスの同定にはイムノドットプロット法、遺伝子解析ならびに、SATV と近縁で血清学的に同等とされる DOUGV を用いた交差中和試験を用いて実施した。その結果、2006 年に沖縄本島ならびに八重山諸島で分離されたウイルス 3 株は、遺伝学的性状に加え抗原性状の両面から、SATV であることが確定された。

疫学調査の結果、2006 年の SATV は沖縄本島全域ならびに八重山諸島で極めて大きな流行を呈した。しかし、岡山県同様牛異常産への関与は認められず、これらウイルスの病原性は比較的弱いと考えられた。

一方、八重山地域と沖縄本島の大きな流行の間、

宮古地域では流行が認められなかったことから、これらウイルスの侵入ルートは、かつて考えられていた南から北へ島伝いの伝播ではなく、大陸側からの直接的な侵入であることが推察された。

遡り調査の結果、SATV は岡山県で国内初の流行が認められた翌年の 2000 年～ 2001 年にかけて、本県でも小規模な流行があったことが確認された。通常、アルボウイルスは清浄地域に侵入した際、大流行をおこし、抗体保有率をあげることで流行を抑制すると考えられている。しかし、2000 年の流行前における母牛の抗体保有率は 3%と 2006 年の 16%に比べて流行極めて低かったにもかかわらず 2006 年の様な大流行には至らなかった。このことは、ベクターとの関係等、抗体保有率以外の要因がこれらウイルスの流行を抑制していたことが示唆される。しかし、2006 年本県での大流行を呈し、さらに翌 2007 年には大分県でも SATV の流行と、SATV の関与を疑う牛異常産が確認されていることから、ベクターへの馴化や株の変異等が懸念される。

近年世界的にも温暖化の影響によるアルボウイルス性疾病の多様化や流行地域の拡大が危惧されていることから、引き続きアルボウイルスの監視と流行株の把握に努める必要があると考える。

謝辞:株の同定、解析ならびに御指導を賜りました独立行政法人 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ウイルス部門の先生方に深謝致します。

研究課題名:沖縄県におけるアルボウイルスの疫学解析

研究期間: H18 ～ 20

研究担当:相澤真紀、新田芳樹

発表論文等:

1)相澤ら. 2007. 第 33 回家畜保健衛生所業績発表会集録

2)相澤ら. 2008. 第 34 回家畜保健衛生所業績発表会集録