

10 本県におけるディアギュラウイルスの流行並びにアルボウイルス侵入リスク要因分析

中央家畜保健衛生所
酒井 芳子

ディアギュラウイルス(DAGV)はレオウイルス科オルビウイルス属のウイルスで、パリアム血清群ウイルス(PALV)に分類される。PALVにはチュウザン病の原因であるチュウザンウイルス(CHUV)も存在し、血清学的に若干の中和交差性を示すことが確認されている¹⁾。本ウイルスはヌカカによって媒介されるアルボウイルスの一種であり、過去には平成13年度及び平成30年度に本県を含む九州地方で本ウイルスの流行及び関与を疑う牛異常産が複数確認されている^{2、3、4、5、6)}。今回、本県において4年ぶりに本ウイルスの流行が確認されたことから、分離株の分子疫学的及び血清学的分析を実施し、併せてアルボウイルス侵入リスク要因分析を実施したのでその概要を報告する。

1 材料及び方法

1) アルボウイルス動態調査

調査対象は県内6地域20戸の未越夏牛73頭で、6月から11月にかけて採材された血清292検体、血漿及び洗浄血球438検体について、図-1に示す方法で抗体検査、分離及び遺伝子検査を実施した。

調査対象：県内6地域20戸の未越夏牛73頭
採材時期：6月下旬、8月中旬、9月下旬、11月中旬

■抗体検査

材料：血清 292検体

方法：中和試験 (AKA, AIN, PEA, CHU, IBA, DAG, SHAV)

■分離及び遺伝子検査

材料：血漿及び洗浄血球 8月以降) 438検体

方法：1. HmLu細胞に接種後、37℃静置培養 (3~4代継代)

2. RT-PCR

(アルボマルチプレックス、PALVマルチプレックス)

図-1 材料及び方法：アルボウイルス動態調査1

さらに、11月調査時に分離された3地域の分離株3株を用いて、PALVの血清型を規定する中和抗原VP2をコードするゲノム分節2の塩基配列決定及び分子系統樹解析を行い、分離ウイルスの同定及び県内分離株の相同性確認、並びに同時期に他県で分離されたDAGV株や過去のDAGV株との相同性比較を行った。さらに、11月血清については分離株と既知のDAGV株並びにCHUV株との抗体価比較を行った(図-2)。

■分離株の遺伝子解析

材料：分離株 計3株

家保(牛No)	株名
中央(中-8)	NS-1/E/22
県北(北-3)	NS-2/E/22
県南(南-11)	NS-3/E/22

方法：中和抗原VP2をコードするゲノム分節2の塩基配列決定及び分子系統樹解析

→同定、相同性比較

■DAGV抗体価比較

材料：11月血清 73検体

方法：中和試験

DAGV：KY115株、平成30年・令和4年長崎分離株

CHUV：C31株

図-2 材料及び方法：アルボウイルス動態調査2

2) アルボウイルス侵入リスク要因分析

平成30年度から令和4年度のサーベイランス対象37農場を対象に、ヌカカの生息地となりうる「農場周辺(200m以内)における水辺(水田、池、川、海など)の存在」「農場内における常時湿潤な環境」及び「運動場」についてそれぞれの有無を聞き取り、各項目におけるウイルス侵入率及び3項目全てを満たす農場のウイルス侵入率を算出した。

2 成績

1) 抗体検査

11月調査において、県内本土地域でDAGVの抗体陽転が確認され、その陽転率は12.3%であつ

た。また、DAGV 抗体陽転牛においては CHUV の抗体陽転も認められたが、その抗体価は DAGV のものと比較して低いものであった（表 - 1）。

表 - 1 抗体検査成績

家保		8月	9月	11月	
		陽転率 (%)	陽転率 (%)	陽転率 (%)	GM
中央	DAGV(KY113株)	0	0	26.7	4.4
	CHUV(C3株)	0	0	26.7	1.8
県北	DAGV	0	0	6.7	1.3
	CHUV	0	0	6.7	1.1
県南	DAGV	0	0	28.6	4.6
	CHUV	0	0	28.6	1.8
五島	DAGV	0	0	0	
	CHUV	0	0	0	
吉岐	DAGV	0	0	0	
	CHUV	0	0	0	
対馬	DAGV	0	0	0	
	CHUV	0	0	0	
県全体	DAGV			12.3	1.9
	CHUV			12.3	1.3

2) 遺伝子検査

血球及び血漿を用いた RT-PCR の結果、抗体陽転を認めた 3 地域において、11 月採材の血球材料 5 検体から PALV 特異遺伝子が検出され、うち 1 検体からは DAGV 特異遺伝子も検出された（表 - 2）。

表 - 2 遺伝子検査成績

家保	材料	特異遺伝子		8月	9月	11月
		PALV	DAGV			
中央	血球	+		0/15	0/15	2/15
県北	血球	+	+	0/15	0/15	1/15
県南	血球	+		0/14	0/14	2/14
五島		-		0/15	0/15	0/15
吉岐		-		0/11	0/11	0/11
対馬		-		0/3	0/3	0/3
県全体				0/730	0/73	5/73

3) 分離検査

11 月採材の血球 4 検体において、HmLu- 1 細胞接種 2 ~ 3 代目に細胞変性効果が認められ、培養上清から DAGV 特異遺伝子が検出された（表 - 3、4）。

表 - 3 ウイルス分離成績

農場	牛No.	採材月	飼養場所	材料	継代歴
1	中-7	11月	諫早市	血球	HL3
	中-8	11月	諫早市	血球	HL2
2	北-3	11月	北松浦郡	血球	HL2
3	南-9	11月	吾妻町	血球	HL3

HmLu- 細胞 2~3 代目の 4~5 日目細胞変性効果 (CPE) を確認

→ 培養上清から DAGV 特異遺伝子を検出

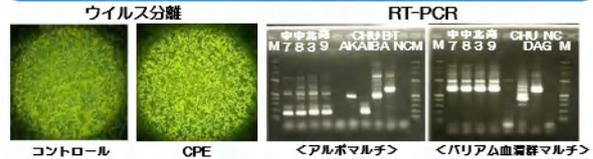


表 - 4 検査成績まとめ

地域	牛No.	中和抗体価		遺伝子検査		分離
		CHUV (C31株)	DAGV (KY113株)	PALV 特異遺伝子	DAGV 特異遺伝子	
諫早市	中6	8	512			
	中7	8	256	+		+
	中8	8	512	+		+
大村市	中13	16	256			
北松浦郡	北3	8	32	+	+	+
島原市	南7	16	128			
雲仙市	南9	8	256	+		+
	南10	4	256			
	南11	8	512	+		

4) 遺伝子解析

分離株 3 株の塩基配列は完全に一致し、同じ由来のものであることが確認された。さらに、分離株と既知の DAGV 株との相同性をみた結果、分離株の塩基配列は同時期に佐賀県及び福岡県で分離された株と 100% 一致し、平成 30 年長崎分離株とは、塩基配列で 99.8%、アミノ酸配列で 100% の相同性を示した。以上の結果から、分離ウイルスは DAGV と同定された（表 - 5）。

表 - 5 遺伝子解析結果

■ 分離株 3 株の塩基配列比較

家保 (牛No.)	株名
中央 (中-8)	NS-1/E/22
県北 (北-3)	NS-2/E/22
県南 (南-9)	NS-3/E/22

100%一致

■ 分離株と既知の DAGV 株との相同性

株名	塩基配列 (%)	アミノ酸配列 (%)
SG-1/E/22(令和4年佐賀分離株)	100	100
FO-1/E/22(令和4年福岡分離株)	100	100
NS-1/E/18(平成30年長崎分離株)	99.8	100

→ 分離ウイルスは DAGV と同定

さらに分子系統樹解析の結果、分離ウイルスは平成30年国内分離株と同一クレードに属し、令和元年から令和2年の国内分離株とは異なるクレードに分類された(図-3)。

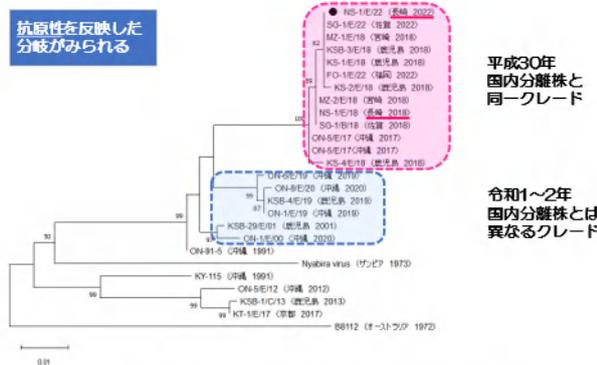


図-3 分離株のゲノム節2部分配列(638塩基)に基づく分子系統樹

5) 抗体価比較

分離株と既知の DAGV 株並びに CHUV 株との抗体価比較の結果、分離株に対する抗体価は DAGV KY115 株及び平成30年長崎分離株と同等であり、CHUV とは明らかな差があることが確認された(表-6)。

表-6 抗体陽転牛における DAGV/KY115 株、分離株・CHUV 抗体価比較

地域	牛No.	中和抗体価			
		CHUV (C31 株)	DAGV (KY115 株)	DAGV (平成30年長崎分離株)	DAGV (令和4年長崎分離株)
諫早市	中6	8	512	512	512
	中7	8	256	512	512
	中8	8	512	512	512
大村市	中13	16	256	256	256
北松浦郡	北3	8	32	64	64
島原市	南7	16	128	256	256
雲仙市	南9	8	256	256	256
	南10	4	256	256	256
	南11	8	512	512	512

6) アルボウイルス侵入リスク要因分析

環境要因別のウイルス侵入率は、農場周辺に水場がある場合が68%、農場内に常時浸潤環境がある場合が60%、運動場がある場合が55%であった(図-4)。さらに、3項目全てを満たす農場のウイルス侵入率は、71%(7農場中5農場)であった。また、これらの農場ではいずれも複数年度に渡り複数種のウイルス侵入が確認された(表-7)。

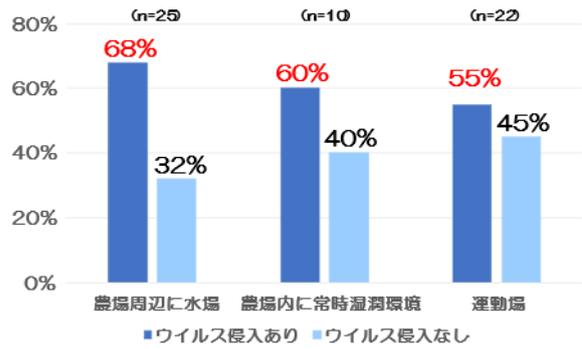


図-4 アルボウイルス侵入リスク要因調査1(環境要因別)

表-7 アルボウイルス侵入リスク要因調査2

- ・3項目全てを満たす農場のウイルス侵入率71%(5/7農場)
- ・複数年度に渡り複数種のウイルス侵入

地域	農場No.	品目	飼養頭数	農場周辺の水場	農場内の浸潤環境	運動場	侵入回数/調査回数	ウイルスの種類
諫早市	1	B	94	池(50m)	湿潤	○	4/5	DAGV EHDV7 SATV PEAV
東彼杵郡	2	B	75	川(30m) 湧水	湿潤 日当たり悪い	○	0/2	
北松浦郡	3	B	80	牛舎前に溜池等あり 池(100m)	湿潤	○	3/5	DAGV EHDV7 PEAV
佐世保市	4	B	58	池(3m)	濡った厩舎と乾燥した厩舎が混在	○	2/5	DAGV AKAV SATV PEAV
雲仙市	5	B	120	川(200m)	糞の堆積あり 湿潤	○	2/4	DAGV AKAV PEAV
五島市	6	B	124	海(130m)	湿潤	○	2/5	DAGV SATV PEAV
新上五島町	7	B	77	海(50m)	やや湿潤	○	0/3	

3 まとめ及び考察

遺伝子解析の結果、抗原性を規定する遺伝子領域において、令和4年に本県を含む九州地方で確認された DAGV 株の塩基配列は100%一致し、平成30年国内分離株と極めて近縁であった。このことから、令和4年に九州地方に侵入した DAGV はすべて同一由来株であり、平成30年流行時と同じ常在地域から国内に侵入した可能性が疑われた。また、抗体価比較において、各 DAGV 株の抗体価は同等であり、CHUV 抗体価とは明らかな差があったことから、平成30年と令和4年の流行株に血清学的性状の変化は認められないことが明らかとなった。

また、アルボウイルス侵入リスク要因調査において、農場周辺の水場に加え、農場内に常時湿潤な環境や運動場といった条件が重なると侵入リスクが極めて高くなる傾向が確認された。

DAGV などワクチンによる感染防御が期待できないウイルスの被害低減のためには農場内へのウイルス侵入防止対策が非常に重要となる。こ

のことから、各農場で実施可能な対策として、ヌカカが飛来する6月までに農場内の湿潤環境を可能な限り無くし、糞便除去等をこまめに行うことが重要と考える。今後、牛異常産注意喚起の際には、ワクチン対策に加えスライドに示すような飼養環境対策の重要性についても周知を強化するとともに、迅速かつ正確な流行予察に努め関連疾病の予防に寄与したい。

最後になりましたが、今回、分離株の同定・解析を実施していただきました、農研機構 動物衛生研究部門 越境性感染症研究領域の梁瀬徹先生に深謝いたします。

4 参考文献

- 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(10), 4610-4614(2004)
- 2) 松森洋一：長崎県で流行したチュウザン病のウイルス性状と浸潤状況, 臨床獣医, Vol. 21, No. 4, 23-26(2003)
- 3) 松森洋一, 島田善成：長崎県における D' Aguilar ウイルスの浸潤状況. 平成 14 年度家畜保健業績発表会
- 4) 東條悦子, 牧内浩幸, 福永哲也, 赤崎正武, 鬼塚剛, 中嶋久仁子：臨床獣医, Vol. 21, No. 8, 48-52(2003)
- 5) 大橋誠一：オルビウイルス流行株の変異に関する分子遺伝学的研究. 動衛研研究報告, 第 113 号, 47-49
- 6) 酒井芳子, 鈴田史子：ディアギュラウイルスの関与を疑う牛異常産の発生ならびに県内分離株の分子疫学的考察, 令和元年度日本獣医師会獣医学術学会