

平成 30 年 9 月 6 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25450435

研究課題名(和文)新興アルボウイルスの牛に対する病原性の病理学的研究

研究課題名(英文)Pathological study on pathogenicity of emerging arboviruses to cattle

研究代表者

田中 省吾 (Tanaka, Shogo)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・ユニット長

研究者番号：10355216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：牛異常産の病因として疑われる新興アルボウイルスの病原性の有無を証明するため、胎齢早期、中期および満期の牛胎子由来培養筋芽細胞系を確立し、ウイルス接種後の遺伝子量を計測して胎齢ごとに増殖親和性を比較した。また、胎齢中期牛胎子にピートンウイルス(PEAV)を接種し、異常産の再現を試みるとともに接種後10日の牛胎子を検査した。その結果、PEAVは胎齢早期の筋芽細胞に高い増殖親和性を示し、胎齢早期牛胎子に対する感受性の高さが示唆された。また、胎齢中期牛胎子へのPEAV感染実験により体形異常産子の再現はできなかったが、非化膿性髄膜脳脊髄炎の発症、ウイルス遺伝子と抗原局在から牛に対する病原性を確認した。

研究成果の概要(英文)：To clarify pathogenicity of emerging arboviruses suspected as a cause of cattle congenital abnormalities, cultured myoblast lines derived from an early, middle- and full-term gestational bovine fetus were established, and compared viral tropism on each period by measuring the arbovirus-specific gene amount after inoculation. We also inoculated with Peaton virus (PEAV) in middle-term bovine fetuses and attempted to reproduce the congenital abnormalities, and pathologically examined other bovine fetuses on the 10-day after inoculation. As a result, PEAV showed high proliferative affinity to myoblasts derived from the early fetus, suggesting high sensitivity to early bovine fetuses. In addition, although the congenital anomalies could not reproduce by experimental infection with PEAV in the middle-term bovine fetuses, pathogenicity to cattle was confirmed by the onset of non-suppurative meningoencephalomyelitis, detection of PEAV genes and antigen localization in the affected fetuses.

研究分野：獣医学

キーワード：アルボウイルス 感染実験 病原性 ピートンウイルス 牛胎子

1. 研究開始当初の背景

アルボウイルスは節足動物によって媒介されるウイルスの総称であり、本邦ではアカバネウイルス (AKAV) やアイノウイルス、チュウザンウイルス等のアルボウイルス感染に起因する早流死産・体形異常等の牛異常産や脳脊髄炎・内水頭症が西日本を中心に現在でも発生し、経済的阻害因子となっている。これら周知のアルボウイルスばかりでなく、2011年12月から新規のオルソブニヤウイルス属シュマレンベルクウイルスによる反芻獣の異常産が欧州で流行し、地球温暖化の影響による媒介昆虫の分布域の膨張から今後も未知のアルボウイルス感染症のリスクは高まると予想される。国内においても近年、ピートンウイルス (PEAV) やサシュペリウイルス (SATV)、シャモンダウイルス等の国内新規のオルソブニヤウイルス属アルボウイルスが、媒介節足動物のヌカカから分離され流行していたことが明らかにされた¹⁾。また、臨床的にも沖縄県や九州・中国地方で発生した体形異常を伴う異常産子牛からこれら新興アルボウイルスに対する特異抗体が検出され、病原として疑われている。しかし、異常産子からウイルスが分離されず、牛を用いた感染実験も実施されていないため、病原性は未だ不明で診断やワクチン等の予防法の研究も進んでいない現状から、今後さらなる感染の拡大が危惧される。既報の新興アルボウイルスの感染を疑う臨床症例では、著しい関節彎曲症や骨格筋の消失・脂肪置換が病理組織学的特徴とされ、矮小筋症を特徴とするアカバネ病とは症状が異なる。アカバネ病の筋病変は、神経原性と筋原性の二元的起病性により説明されているが、新興アルボウイルスの筋病変の病理発生は筋組織への感染親和性がより高いことが予想され、牛における病原性の有無とともに病理発生を明らかにすることが、今後、効果的な予防法や確定診断法の確立のために喫緊の課題となっている。

2. 研究の目的

- (1) 異なる胎齢の牛胎子骨格筋由来の培養筋芽細胞系を確立し、培養筋芽細胞に新興アルボウイルスを接種して経時的にウイルス量を測定することにより、筋芽細胞におけるウイルス感染の親和性をウイルス種間で比較する。
- (2) 牛胎子にヌカカ由来の新興アルボウイルスを実験感染させ、早流死産や体形異常等の異常産を再現するとともに異常産子から接種ウイルスを分離してコッホの三原則に基づき病原性を証明する。
- (3) 実験的に再現された異常産子の肉眼的な体形異常について形態学的に精査するとともに、中枢神経系や骨格筋、主要臓器を主体に病理組織学的検査を実施して、形成された病変の特徴を明らかにする。
- (4) 中枢神経や骨格筋に形成された病変に

ついて、免疫組織化学的染色によりウイルス局在を検出して病変構築とウイルス感染の関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) と畜場から入手した胎齢早期 (胎齢 84 日) 中期 (胎齢 150 日) 及び満期 (胎齢 216 日) の健常な新鮮牛胎子の大腿部骨格筋の初代細胞培養を行い、三代継代・増殖させた培養細胞について、骨格筋マーカーである抗 myogenin 抗体と抗 desmin 抗体を用いた免疫組織化学的染色により筋芽細胞であることを確認後、確立した培養筋芽細胞に AKAV を対照として新興アルボウイルス (PEAV 及び SATV) を接種 (0.01MOI) する。経時的にウイルス接種培養筋芽細胞の上清から RNA を回収し、リアルタイム PCR 法²⁾により、ウイルス特異的な RNA 量を計測して胎齢ごとの増殖親和性をアルボウイルス種間で比較する。

(2) 人工授精あるいは購入した妊娠牛の妊娠中期牛胎子 (胎齢 150 日) について、外科的に子宮外からフィンガーチップ型探触子で胎子のエコー像を確認しながら胎子大腿部にピートンウイルス (KSB-1/P/06 株) 液を接種 ($10^{6.7}$ TCID₅₀) し、自然分娩による異常産を再現 (n=3) する。また別途、ウイルス接種後 10 日目に母子 (n=3) とともに剖検・採材してウイルス学的、病理組織学的及び免疫組織化学的検索により、ウイルス遺伝子や病変形成部位、ウイルス抗原の局在を検出する。

4. 研究成果

(1) 牛胎子骨格筋由来培養細胞は、培養開始後 24 時間でシートを形成し、3 日目から筋細管様の合胞体形成が観察された。すべての胎齢の培養細胞の核内に抗 Myogenin 抗体に対する陽性反応 (図 1 赤色) を認め、合胞体では細胞質内に抗 Desmin 抗体に対する陽性反応 (図 1 青色) がみられた。以上から胎子骨格筋由来培養細胞は筋芽細胞であることが確認された。

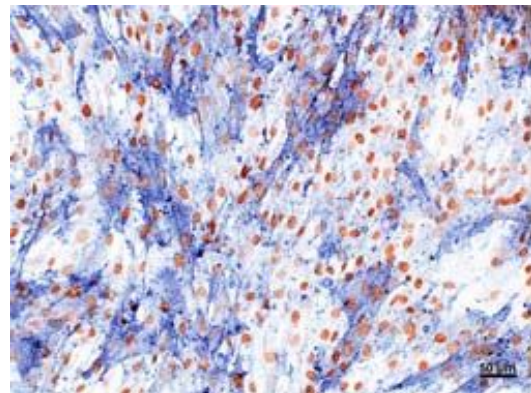


図 1 培養 72 時間後の胎齢 84 日培養筋芽細胞の免疫二重染色による Myogenin (赤色) と Desmin (青色) の検出

(2) 培養筋芽細胞へのアルボウイルス (AKAV、PEAV 及び SATV) 接種実験により、胎齢 150 日および 216 日の培養筋芽細胞ではそれぞれウイルス接種後 48 時間および 24 時間から AKAV は SATV より遺伝子コピー数が有意に増加し、PEAV よりも高い傾向にあったが、有意差は検出されなかった。一方、胎齢 84 日の培養筋芽細胞では PEAV が接種後 36 時間および 48 時間で AKAV や SATV よりも遺伝子コピー数が有意に高かった (図 2)。以上から PEAV は、胎齢早期の牛胎子の骨格筋に増殖親和性が高く、感染により骨格筋の消失・脂肪置換等の特徴病変形成に關与することが示唆された。一方、SATV は骨格筋での増殖能は AKAV や PEAV に比べて低く、神経原性主体の異なる病変形成機序が考えられた。

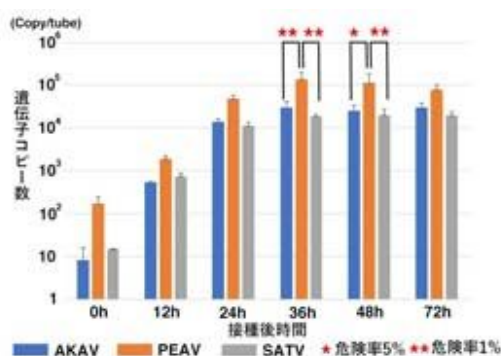


図 2 胎齢早期培養筋芽細胞におけるアルボウイルスの増殖親和性の比較

(3) 牛胎子への PEAV 感染実験において妊娠母牛 1 頭は、ウイルス接種後 28 日目に 41 を超える体温上昇が一週間ほど継続し、その後平熱に復したが、発熱から 18 日後に妊娠 192 日で流産した。流産胎子は、PEAV に対する血清抗体価が剖検時 64 倍であったが、出生時生存しており、肉眼的な異常はみられず、流産の原因が PEAV 感染に起因するかは不明であった。残りの母牛 2 頭は、妊娠 286 日 (接種後 138 日) 及び妊娠 291 日 (接種後 132 日) に正常分娩した。生きて娩出された新生子牛は、体重 32.7kg と 31.5kg で体長はともに 87cm であり、肉眼的な異常はみられなかった。PEAV に対する血清抗体価は、それぞれ 16 倍と 4 倍であった。流産胎子を含めて中枢神経系や主要臓器から PEAV 遺伝子は検出されず、病理組織学的検査でも PEAV 感染に起因する病変形成は認められなかった。以上から、胎齢 150 日以降の牛胎子は、PEAV 感染に対して抵抗性を有し、異常産の発症には至らないことが示唆された。

(4) 胎齢 150 日の牛胎子に PEAV を接種後、10 日目に剖検採材した 3 頭のうち 10 日目に細菌感染により流産した 1 頭を除く 2 頭ではともに中枢神経系組織や心臓、骨格筋から PEAV 遺伝子が検出された。また、2 頭の中枢神経系組織の髄膜に非化膿性炎を認め、大脳

や中脳、小脳、橋、延髄及び脊髄にリンパ球を主体とする囲管性細胞浸潤やグリア結節形成、グリオシスが認められた (図 3)。

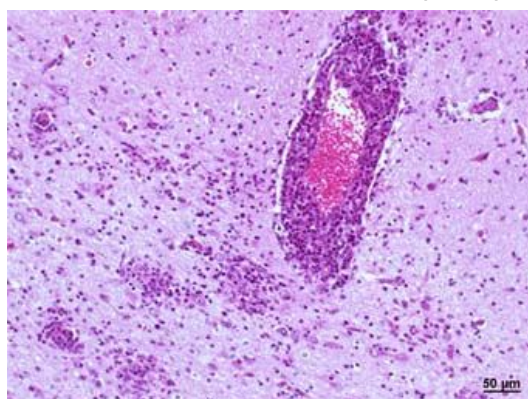


図 3 大脳外腹側核にみられた囲管性細胞浸潤、グリア結節及びグリオシス

抗 PEAV ウサギ免疫血清を用いた免疫組織化学的染色では、中枢神経系組織に病変形成を認めた 2 頭ともに病変部の神経細胞や神経軸索、グリア細胞に陽性反応が認められた (図 4)。一方、骨格筋や主要臓器には陽性反応はみられなかった。胎齢中期牛胎子への PEAV 実験感染により接種後 10 日までに非化膿性髄膜脳脊髄炎の形成とともにウイルス遺伝子、病変形成部にウイルス抗原を検出したことから、牛胎子に対する PEAV の病原性が確認された。

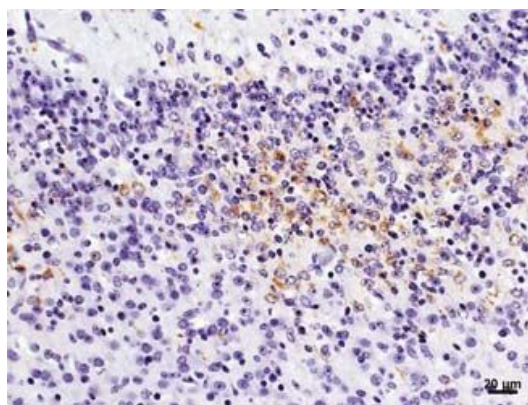


図 4 PEAV 接種後 10 日目の牛胎子大脳の皮質外～内錐体細胞層の多数の神経細胞やグリア細胞に PEAV 抗原の陽性反応がみられる。

< 引用文献 >

- 1) Yanase, T., Fukutomi, T., Yoshida, K., Kato, T., Ohashi, S., Yamakawa, M., Tsuda, T. The emergence in Japan of Sathuperi virus, a toropical Simbu serogroup virus of the genus Orthobunyavirus, *Arch Virol*, 149;1007-1013, 2004
- 2) Shirafuji, H., Yazaki, R., Shuto, Y., Yanase, T., Kato, T., Ishikura, Y., Sakaguchi, Z., Suzuki, M., Yamakawa, M. Broad-range detection of arboviruses belonging to Simbu serogroup lineage 1 and specific detection of Akabane, Aino and Peaton

viruses by newly developed multiple TaqMan assays, *J Virol Methods*, 225;9-15, 2015

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

田中 省吾, 加藤 友子, 山川 睦, 白藤 浩明, 梁瀬 徹 (2018) 牛胎子由来培養筋芽細胞におけるオルソポニヤウイルスの増殖親和性の相違. 鹿児島県獣医師会会報. 第 61 号. 印刷中 (査読有)

〔学会発表〕(計 2件)

田中 省吾, 加藤 友子, 山川 睦, 白藤 浩明, 梁瀬 徹 ピートンウイルス実験感染牛胎子による病原性の解析. 第 161 回日本獣医学会学術集会. 2018.9.11-13. つくば国際会議場 (茨城県・つくば市)

田中 省吾, 加藤 友子, 白藤 浩明, 梁瀬 徹 牛胎子由来培養筋芽細胞における国内新規アルポウイルスの感染動態の比較. 第 160 回日本獣医学会学術集会. 2017.9.13 鹿児島大学 (鹿児島県・鹿児島市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 省吾 (TANAKA, Shogo)
国立研究開発法人農研機構動物衛生研究部門・越境性感染症研究領域・暖地疾病防除ユニット・ユニット長
研究者番号: 1 0 3 5 5 2 1 6

(2) 研究分担者

梁瀬 徹 (YANASE, Toru)
国立研究開発法人農研機構動物衛生研究部門・越境性感染症研究領域・暖地疾病防除ユニット・上級研究員
研究者番号: 9 0 3 5 5 2 1 4

(3) 連携研究者

木村 久美子 (KIMURA, Kumiko)
国立研究開発法人農研機構動物衛生研究部門・病態研究領域・病理ユニット・上級研究員
研究者番号: 3 0 3 9 1 4 4 4

(4) 連携研究者

白藤 浩明 (SHIRAFUJI, Hiroaki)
国立研究開発法人農研機構動物衛生研究部門・越境性感染症研究領域・暖地疾病防除ユニット・主任研究員
研究者番号: 4 0 4 1 4 7 2 6

(5) 連携研究者

窪田 力 (KUBOTA, Chikara)
鹿児島大学・共同獣医学部・教授
研究者番号: 8 0 4 2 0 6 5 2