

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450416

研究課題名(和文) 牛の異常産関連アルボウイルスの媒介種を解明する

研究課題名(英文) Study on vector competence of biting midges for bovine arboviruses associated with congenital abnormalities

研究代表者

梁瀬 徹 (YANASE, Tohru)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門越境性感染症研究領域・上級研究員

研究者番号：90355214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：牛の異常産(流産、早産、死産、先天異常子の分娩)の原因となる節足動物媒介ウイルス(アルボウイルス)の媒介種を特定するため、人工吸血法によりウイルスを微小な吸血昆虫であるヌカカに摂取させる技術を確立した。アカバネウイルスを摂取させた場合、ヌカカ体内でのウイルスの増殖が確認されるとともに、感染ヌカカから採取した唾液からもウイルス遺伝子を検出し、ヌカカが媒介能を持つことを確認した。今後、本研究で確立した手法により、様々なアルボウイルスのヌカカによる媒介能を精査し、国内でのアルボウイルスの伝播リスクの評価に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Several arthropod-borne viruses (arboviruses), such as Akabane virus (AKAV), are associated with epizootic abortion, still birth, premature birth and congenital malformations in cattle and have severely impacted the livestock industry in Japan. However, little is known about competent vectors for these arboviruses. We developed an artificial feeding system to infect hematophagous insects, *Culicoides* biting midges, with arboviruses to test their vector competency. The replication of AKAV in the tested midges were observed and the viral gene was detected in saliva collected from them. These results indicate that *Culicoides* biting midges can transmit AKAV in the field. Our research will contribute to assess transmission risks on various arbovirus-vector combinations in Japan.

研究分野：衛生昆虫学、獣医ウイルス学

キーワード：ウイルス 媒介節足動物 獣医学 牛 異常産

### 1. 研究開始当初の背景

アカバネウイルス (AKAV) などのアルボウイルス (節足動物媒介ウイルス) による牛の異常産 (流産、早産、死産、先天異常子の分娩) の流行により、国内の牛繁殖農家や酪農家に大きな経済的損失が生じている。また、これまで国内で確認されていなかった新規のアルボウイルスの侵入も繰り返し起こっており、牛の異常産との関連が示唆されている。一方、世界に目を転じると、2011 年から欧州で AKAV に近縁のシュマレンベルクウイルスが蔓延し、牛やめん羊などに約 1 万件の異常産が発生している。

これまで、牛に疾病を起こすアルボウイルスの多くは、体長 1~3 ミリ程度の微小な吸血昆虫である *Culicoides* 属のヌカカ (図 1) から検出されている。*Culicoides* 属は、世界中で 1,400 種、国内では 80 種程度確認され



図 1.ヌカカ (左) と蚊 (右)

ていて、それぞれの種が多様な自然環境に適応し、生活環を維持している。

これまでは、野外で採集したヌカカからのウイルスの分離や検出により、媒介種が推定されてきた。しかし、主要な媒介種とされるウシヌカカの分布域を超えて AKAV の感染が広がったことなどから、国内に分布するヌカカのアルボウイルス媒介能を精査する必要が生じている。しかし、実験室内でヌカカを用いて、アルボウイルスの感染、体内での増殖の確認、だ液への移行といった、伝播に必要な過程を再現する実験系は国内で確立されておらず、媒介能の評価が困難である。

### 2. 研究の目的

本研究では、実験室内で、ヌカカのウイルス媒介能を精査する系を確立することにより、国内で牛の異常産を起こすアルボウイルスの媒介種を特定し、自然界におけるそれらのウイルスの感染環の解明を行う。媒介種の特定により、それらの分布や生態に基づく流行リスクの検証や、防除対策の開発が可能になり、牛のアルボウイルス感染症による被害を低減させることが期待できる。

### 3. 研究の方法

(1)人工吸血法によるウイルスの経口的摂取  
野外で採集したヌカカを、約 24 時間絶食させ、AKAV、またはアイノウイルス (AINOV)

を混和した馬もしくは牛の脱線血を、生き残ったヌカカに吸血させた。実体顕微鏡下で吸血した個体を選び、25 で約 10 日間、抗生物質を含む 10% ショ糖を与えて飼育後、-80 で保存した。

### (2)ヌカカ体内でのウイルス増殖の確認

ウイルスを摂取させたヌカカを磨砕して乳剤を作製し、その上清中のウイルス感染力価を測定した。

ヌカカを頭部、胸部、腹部に切断後、それぞれをビーズ破砕機で破砕し、それらから抽出した RNA を用いて、RT-PCR 法ならびにリアルタイム RT-PCR 法でウイルス遺伝子を検出した。

ヌカカの連続切片を作成し、抗 AKAV ウサギ免疫血清を用いて免疫組織化学染色を行い、ヌカカ体内でのウイルスの局在を調べた。

### (3)ヌカカだ液からのウイルス遺伝子の検出

ウイルスを摂取させてから 10 日後のヌカカをスライドガラス上に固定し、血清を満たしたガラスキャピラリー内に口吻を挿入後、30 分間保持し、だ液を採取した。だ液を含む血清から、RT-PCR 法によって、ウイルス遺伝子の検出を行った。

### 4. 研究成果

(1)人工吸血法により、ヌカカにアルボウイルスを混和した血液を摂取させる方法を確立し、実験室内でヌカカの媒介能を評価できるようになった (図 2)。



図 2.人工吸血法によって飽血したヌカカ

(2)経口的に AKAV を摂取させたウシヌカカ、シガヌカカ、ホシヌカカ、キタオカヌカカから、約 10 日間飼育後に、一定のウイルス感染力価が検出され、ウイルスの増殖が起きていることが示唆された (図 3)。特にウシヌカカではウイルスの感染力価が高く、AKAV に対して感受性が高いと考えられた。一方、ムナジロヌカカやニワトリヌカカでは、RT-PCR やリアルタイム RT-PCR によりウイルス遺伝子は検出されたがウイルスの感染力価は検出限界以下であったことから、ウイルスの増殖はほとんど起こっていないと考えられた。

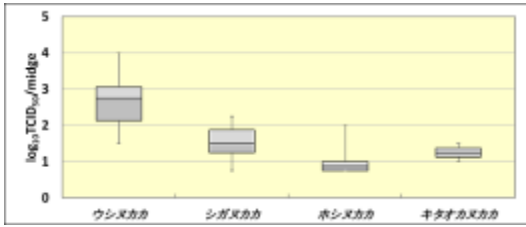


図3. AKAV を経口摂取したヌカカから検出されたウイルスの感染力価

(3)AKAV を経口的に摂取させたウシヌカカおよびシガヌカカで、ウイルス遺伝子が初期の感染部位である中腸だけでなく、胸部や腹部で検出されたことから、ヌカカの体内でウイルスの増殖が起こり、感染が広がっていることが示唆された。また、腹部のみでのウイルス遺伝子の検出も、一部の個体で認められたことから、体内での感染の広がりが阻害されている可能性が考えられた。

(4)AINOV を経口的に摂取させたウシヌカカおよびホシヌカカで、ウイルス遺伝子が頭部、腹部、胸部すべてに確認された。一方、シガヌカカでは腹部のみでウイルス遺伝子が検出され、感受性もしくは増殖性が高くないことが疑われた(図4)

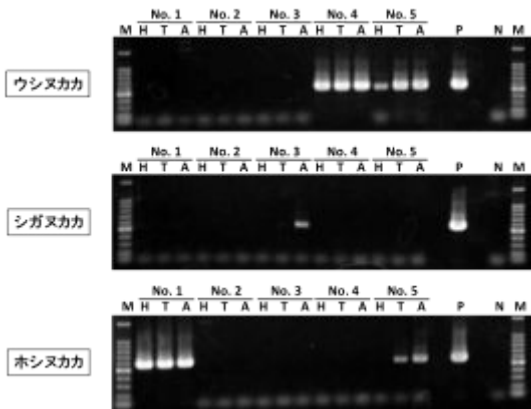


図4. AINOV を経口的に摂取させたヌカカの各部位からのウイルス遺伝子の検出

H,頭部;T,胸部;A,腹部;P,陽性対照(AINOV); N,陰性対照(D.W.); M,100bp DNA ラダーマーカー

(5)抗 AKAV 家兔免疫血清を用いた免疫組織化学染色により、ヌカカの体内組織(脂肪体、中腸、だ液腺など)で陽性抗原が認められた(図5)。

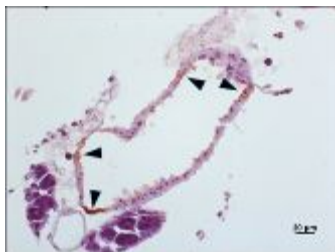


図5. AKAV を経口的に摂取させたヌカカの中腸細胞で認められたウイルス抗原



図6. AKAV を経口的に摂取させたヌカカからのだ液の採取

(6)AKAV を経口的に摂取させたヌカカよりガラスキャピラリーによって採取しただ液(図6)から、RT-PCR によりウイルス遺伝子を検出した。

本研究では、人工吸血法によりウイルスを微小な吸血昆虫であるヌカカに摂取させる技術を確認、アカバネウイルス等のヌカカ体内での増殖の確認、感染ヌカカから採取しただ液からのウイルス遺伝子検出の3点を実施し、成果を得ることができた。これらの結果により、自然界で起こっているヌカカによるアルボウイルスの伝播を、実験室内で再現できることを、国内に分布するヌカカ種ならびにアルボウイルスを用いて示すことができた。今後、本研究で確立した手法により、様々なアルボウイルスのヌカカによる媒介能を精査し、国内でのアルボウイルスの伝播リスクの評価に貢献するとともに、アルボウイルス感染症の防除技術への応用も可能と考えている。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表](計3件)

Yanase T. Searching for *Culicoides* vectors of bovine arboviruses in Japan. XXV International Congress of Entomology 2016.9.29 Orange county convention center (Orlando, Florida, USA)

梁瀬 徹, 我が国におけるヌカカ媒介性アルボウイルス感染症の発生状況. 第159回日本獣医学会学術集会 2016.9.6 日本大学(神奈川県藤沢市)

梁瀬 徹, 加藤 友子, 白藤 浩明, 田中 省吾, 日本産 *Culicoides* 属ヌカカ体内でのアカバネウイルスの増殖性. 第67回日本衛生動物学会大会 2015.3.28 金沢大学(石川県金沢市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梁瀬 徹 (YANASE, Tohru)

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 越境性感染  
症研究領域・上級研究員

研究者番号：90355214

### (2) 研究分担者

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 越境性感染  
症研究領域・ユニット長

研究者番号：10355216

### (3) 連携研究者

木村 久美子 (KIMURA, Kumiko)

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 病態研究領  
域・上級研究員

研究者番号：30391444

白藤 浩明 (SHIRAFUJI, Hiroaki)

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 越境性感染  
症研究領域・主任研究員

研究者番号：40414726