

1989年,沖縄に発生した牛流行熱

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	高吉, 克典 国場, 保 比嘉, 弘正
巻/号	44巻6号
掲載ページ	p. 591-594
発行年月	1991年6月

1989年、沖縄に発生した牛流行熱

高吉克典¹⁾ 国場 保²⁾ 比嘉弘正¹⁾ 松川俊一¹⁾

大城喜光¹⁾ 多嘉良 功³⁾ 平田勝男⁴⁾

- 1) 沖縄県家畜衛生試験場 (那覇市古波蔵 112, 〒900)
- 2) 沖縄県北部家畜保健衛生所 (名護市伊差川 31, 〒905-11)
- 3) 沖縄県農林水産部畜産課 (那覇市泉崎 1-2-32, 〒900)
- 4) 沖縄県農共連八重山家畜診療所 (石垣市美咲町 1, 〒907)

(平成2年7月30日受付・平成3年2月8日受理)

An Outbreak of Bovine Ephemeral Fever in Okinawa Prefecture in 1989

KATSUNORI TAKAYOSHI¹⁾, TAMOTSU KOKUBA²⁾, HIROMASA HIGA¹⁾, SYUNICHI MATUKAWA¹⁾, KIKO OSHIRO¹⁾, ISAO TAKARA³⁾ and KATSUO HIRATA⁴⁾ (¹⁾ Institute of Animal Health, Okinawa Prefecture, Kohagura Naha Okinawa 900, ²⁾ Hokubu Livestock Hygiene Service Center, Okinawa Prefecture, Isagawa Nago Okinawa 905-11, ³⁾ Livestock Division, Agriculture and Forestry Department, Okinawa Prefectural Government, Izumizaki Naha Okinawa 900, ⁴⁾ Agricultural Mutual Aid of Yaeyama, Okinawa Prefecture, Misakicho Isigaki Okinawa 907)

SUMMARY

In May and June 1989, 333 cattle suffered from pyrexia, anorexia, shortness of breath, orbital edema, muscular tremor, and ataxia in the Yaeyama Islands, Okinawa Prefecture. A neutralizing antibody against bovine ephemeral fever (BEF) virus was detected in 26 of 41 (63%) serum samples collected from these cattle. Eight cytopathogenic viral strains were isolated in the HmLu-1 cells, and neutralized with anti-serum against the YHL strain of the BEF virus. From these results, the present cases were diagnosed as BEF.—**Key Words** : bovine ephemeral fever, BEF virus, epidemiology.

-----*J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 44 591~594 (1991)

要 約

沖縄県八重山群島で1989年5月から6月にかけて、発熱、食欲不振または廃絶、呼吸促迫、流涎、眼瞼腫脹、筋肉の振戦、跛行、起立困難または不能等を主徴とする牛の疾病が多発した。牛流行熱 (BEF) ウイルスに対する発症牛の血清中和抗体の保有率は63%であった。発症初期牛の血液中のパフィーコートから円形顆粒状の細胞変性効果を示すウイルスが分離された。分離ウイルスは直径60~150 nmの円錐型の形態を示し、BEF ウイルス家兔免疫血清により中和された。これらの検査結果から、八重山群島で発生した牛の疾病をBEFと診断した。

沖縄県では、1971年に本島北部および南部地域に、1976年には八重山群島で牛流行熱の発生²⁾があった。また1988年には九州6県で本病の発生²⁾があり、本県でも12年ぶりに本島北部地域で発生²⁾があったが続発はなかった。しかし翌1989年5月から八重山群島の牛に一過性の発熱、跛行等の症状を示す疾病が発生し、牛流行熱 (BEF) と診断した。

材料および方法

抗体調査用血清

1989年5月20日から6月13日の間に採血された発症中または回復後の牛41例の血清を抗体調査用血清として用いた。なおこれらの牛は牛流行熱ワクチン未接種であった。また、1985年から1989年にかけて各年4回 (5月、7月、9月、11月) 追跡調査した県内の6カ月

齡未滿の未越夏牛(おとり牛)の血清もあわせて用いた。

ウイルス分離材料

バフィーコート：発症牛の採血にはヘパリン加真空採血管が用いられ、血液は直ちに4℃に保存し送付された。送付血液はNAGANOら⁷⁾の方法に準じ処理した。すなわち、4℃、2,500 rpmで15分間遠心した後、バフィーコート部分を採取し冷却したリン酸緩衝食塩液(PBS) (pH 7.2) で3回洗浄した後、維持液(MM)を加え-80℃に保存した。MMは、5%牛アルブミンを4%含んだイーグルMEMに2.95%トリプトースフェイト・ブロス(TPB) 10%、3%L-グルタミン1%、1%イーストエキストラクト(YE) 10%、20%グルタミン酸ナトリウム5%、10%グルコース2%、7.5%重炭酸ナトリウム2%および抗生物質を加えたものを使用した。

蚊およびヌカカ：1989年の8月から10月にかけて八重石石垣市で採取された蚊(総計44匹)およびヌカカ(総計22匹)は採取日別に蚊およびヌカカごとにプールされ、10%蔗糖液を与え26℃で3日間飼育された後、エーテルで麻酔死され⁴⁾、4℃で送付された。送付された蚊およびヌカカはそのプールごとに乳剤とし使用時まで-80℃に保存した。

中和試験

KUROGIら^{4,5)}の方法に準じマイクロプレートを用いて実施した。すなわち、56℃ 30分間非動化した血清を2倍階段希釈し同量のBEFウイルス液(YHL株, 200 TCID₅₀)を加え、37℃ 1時間処理した後、HmLu-1細胞浮遊液(3 × 10⁵個/ml)を加えて37℃ 5%炭酸ガスふらん器内で培養した。CPEを完全に抑制した血清の最高希釈の逆数を中和抗体価とし、抗体価2倍以上を陽性とした。なお、血清希釈、ウイルス液および細胞浮遊液の調整にはいずれも増殖培地(GM)としてイーグルMEMに2.95%TPB 10%、3%L-グルタミン1%、牛胎子血清(BEFVに対する中和抗体陰性)10%、7.5%重炭酸ナトリウム1%および抗生物質を加えたものを使用した。

ウイルス分離

細胞培養：凍結保存してあったバフィーコート、蚊およびヌカカの乳剤は融解後4℃、3,000 rpmで15分間遠心した。バフィーコートは遠心上清を接種材料とした。また、蚊およびヌカカの乳剤では遠心上清を孔径450 nmのメンブランフィルターで濾過した濾液を接種材料とした。予め単層を形成したHmLu-1細胞培養試験管に前述材料を接種、37℃ 1時間吸着した。その後、アール液に7.5%重炭酸ナトリウム0.4%を加えた洗浄液で3回洗浄し、MMを加え34℃で回転培養した。観察日数は7日間とし、7日目の培養液を次代の継代材料として採取し2代まで継代した。

哺乳マウス脳内接種：CPEの認められた細胞培養液を採取し、凍結・融解後4℃、3,000 rpmで15分間遠心し、その上清0.02 mlを生後1~3日齡の哺乳マウスの脳内に接種した。観察日数は7~14日とし、未発症マウスでは接種7日目に半数の脳を採取し乳剤として継代し、残りの半数については観察を続けた。

いっぽう、異常マウスが認められた場合は、黒木ら⁴⁾の方法に準じそのつど脳乳剤を作成し継代した。

分離ウイルスの同定

HmLu-1細胞培養試験管を用いてウイルス希釈法によりBEFウイルス家兎免疫血清による中和試験を実施した。すなわち、分離ウイルスをMMで10倍階段希釈し、これに同量のBEFウイルス家兎免疫血清(10倍に希釈)を加えて37℃ 1時間感作し、各希釈当たり4本の培養試験管にウイルス・血清混合液0.1 mlずつ接種し、37℃ 1時間吸着後MMを0.5 ml加え34℃で回転培養した。

いっぽう、その対照としてBEFウイルス家兎免疫血清の代わりにMMをウイルス液と同量加えたものを同様に処理し培養した。CPEの有無を7~10日間観察し、50%細胞培養感染価(TCID₅₀)をBehrens-Kärber³⁾で算定した。

成 績

発生状況および臨床症状

発生状況：1989年5月8日から6月27日にかけて86戸333頭に発生がみられた。なお本疾病による死亡牛は認められなかった。

臨床症状：発症は牛の年齢に関係なくみられた。突然の元気消失、食欲不振または廃絶、吸収促迫、流涎、眼腫脹、発熱(40~41.5℃)等の症状の他に特徴的な所見としては発症牛の約93%(309/333)に筋肉の振戦がみられ、約27%(91/333)に四肢の関節痛や関節の浮腫による跛行がみられた。また、約32%(106/333)に起立困難または起立不能がみられたが、これらの症状は概ね2~3日で回復した。

表1 ワクチン未接種牛の牛流行熱ウイルスに対する中和抗体価の分布

採血月日	検体数	中和抗体価								
		<2	2	4	8	16	32	64	128	256 ≤
1989/5/20	1	1								
/5/22	2		1			1				
/5/25	21		3	3	3		3	1	2	6
/5/29	4		2	1		1				
/5/30	5			5						
/6/13	8		4		2	1				1
合計	41	15	1	4	5	3	3	1	2	7

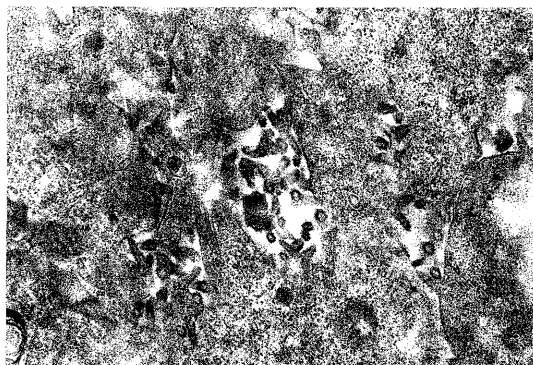


写真1 分離ウイルス89-71-1株感染HmLu-1細胞の超薄切片の電子顕微鏡像。細胞膜から発芽するウイルス粒子

表2 牛流行熱家兔免疫血清による中和試験

ウイルス材料	処 理	
	免疫血清加	維持培地加
89-836-3	≤0.5*	2.75
89-836-4	≤0.5	1.75
89-71-1	0.25	3.00
89-71-2	≤0.5	1.75

*: log TCID₅₀/0.1 ml

表3 沖縄県のおとり牛の牛流行熱抗体調査

採血時期	1985	1986	1987	1988	1989
5月		2/73*	0/75	2/88	4/85
7月	0/76	0/73	0/73	0/85	0/83
9月	0/67	0/70	0/72	0/83	0/80
11月	0/62	0/68	0/68	7/61	1/69

*: 陽性頭数/検査頭数

表4 八重山地域におけるおとり牛の牛流行熱抗体調査

採血時期	1985	1986	1987	1988	1989
5月		1/20*	0/15	1/15	1/15
7月	0/15	0/20	0/15	0/15	0/15
9月	0/7	0/20	0/15	0/15	0/15
11月	0/7	0/20	0/15	0/14	1/13

*: 陽性頭数/検査頭数

中和試験

牛流行熱ワクチン未接種の41例のBEFウイルスに対する抗体保有率は63% (26/41)であった(表1)。この検査結果から、発症初期の中和抗体陰性牛のパフィーコートウイルス分離材料に用いた。

ウイルス分離

細胞培養: 発症初期の牛8頭のパフィーコートを材料とした、HmLu-1細胞でウイルス分離を実施したところ、初代で培養5日目から8例中1例に、また、

継代2代目からは培養5日目から8例全例に円形顆粒状のCPEを示すウイルスが分離された。分離ウイルス8株のうち代表株89-71-1株について、その感染HmLu-1細胞を電子顕微鏡で観察(農水省家畜衛生試験場九州支場実施)したところ、直径約60~150nmの円錐状ウイルス粒子が確認された(写真1)。

哺乳マウス脳内接種: 細胞培養でCPEの認められた継代2代目のHmLu-1細胞培養上液を接種材料とした。初代で接種後11日目、また、継代2代目で接種後8~11日から8例中3例に神経症状が認められた。

分離ウイルスの同定

分離されたウイルスの中から4株を選び検査材料とした。いずれの株でも、BEFウイルス家兔免疫血清により中和された(表2)。

疫学的調査

中和試験: 過去5年間の沖縄全域および八重山群島(石垣市)でのおとり牛のBEFウイルスに対する抗体保有状況を追跡調査した(表3, 4)。

本県全域では、1988年11月に61頭中7頭、1989年11月に69頭中1頭に抗体陽転が認められた。1988年の陽転例はすべて同年BEFの発生があった沖縄本島地域のおとり牛であった。

1989年の陽転例は石垣市のおとり牛であった。

ウイルス分離: 石垣市で採材された蚊およびヌカカを材料としてウイルス分離を試みたが、継代3代目までウイルスは分離されなかった。

考 察

八重山群島で、発熱、筋肉の振戦、跛行等の症状を示す牛の疾病が多発した。発症牛は牛流行熱ワクチン未接種であったがBEFウイルスに対する血清の中和試験では63% (26/41)の抗体保有率であった。発症初期の牛のパフィーコートからウイルスが分離され、性状検査からBEFウイルスと同定された。おとり牛による血清疫学的調査では、1988年11月にBEFの発生があった沖縄本島地域ではおとり牛でも同11月に抗体陽転が認められた。しかし、今回BEFの発生があった八重山群島では、1989年の5月から9月までおとり牛の抗体陽転が認められず、BEFウイルスの動きが察知できなかった。このことは今後のおとり牛の配置に問題を残すものであった。また同地域ではBEF発生の終息後採材された蚊およびヌカカでのウイルス分離は陰性であった。このことは採取したこれら吸血昆虫の数があまりも少数であったことにも大きな原因があるものと考えられる。しかし、11月におとり牛で抗体陽転が認められ、依然ウイルスが動いている可能性が示唆された。BEFは蚊やヌカカ等のベクターを介して伝播すると考えられているため、一般に夏の終わり頃から晩秋にかけて発生する

といわれている¹⁾。いっぽう、星野⁸⁾は八重山石垣市で BEF の重要なベクターとして疑われているウシヌカカの周年活動をj確認している。

今回5月から6月の初夏に同症の発生があった要因には、このような地域特有のベクターの活動が関与したためではないかと思われる。さらに興味あることは、1989年の2月から3月にかけて台湾で BEF の大流行があったことである(呂 栄修, 私信)。このように本病の発生が台湾と沖縄でほぼ同一時期あるいはやや遅れてみられたことは、本病の疫学および予防に重要な情報を提供するものと考えられる。

稿を終るにあたり、電子顕微鏡による観察等を実施していただいた農林水産省家畜衛生試験場製剤研究部製剤工学研究室 三浦康男室長、総合診断研究部病理診断研究室久保正法室長に深謝いたします。

引用文献

- 1) 稲葉右二: 牛病学, 大森常良, ほか編, 第2版, 233~237, 近代出版, 東京(1988).
- 2) 沖縄県農林水産部畜産課: 沖縄県における牛流行性感冒発生記録, 家畜衛生資料 No. 7, 37~60 (1989).
- 3) 北村 敬: ウイルス検査のための組織培養技術, 第3刷, 186~188, 近代出版, 東京(1980).
- 4) 黒木 洋, 秋葉和温, 久保正法, ほか: 日獣会誌, 39, 166~170 (1986).
- 5) KUROGI H., YUJI I., EIJI T., et al.: *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)*, 18, 97~108 (1978).
- 6) 黒木 洋, 稲葉右二, 佐藤邦彦, ほか: 日獣会誌, 26, 495~499 (1973).
- 7) NAGANO H., HAYASHI K., KUBO M., et al.: *Jpn. J. Vet. Sci.*, 52, 307~314 (1990).
- 8) 星野千春: 沖縄県家畜保健衛生業績発表会集録, 第9回, 43~46 (1982).

《海外文献要録》

急性ウイルス性肝炎の病理発生: 鶏の封入体肝炎

Pathogenesis of an Acute Viral Hepatitis: Inclusion Body
Hepatitis in the Chicken

Md. SAIFUDDIN and C. R. WILKS: *Arch. Virol.*, 116, 33~43 (1991).

本論文は鶏の封入体肝炎の病理発生を究明する目的で行ったものである。トリアデノウイルス(8血清型)を2日齢のSPF雛に経口接種して封入体肝炎を作出し、その病理発生を研究した。接種後ELISAと免疫組織化学的染色によって組織内のウイルス抗原の出現状況を経時的に調べた。ELISAによるウイルス抗原は、腸上皮では接種後12時間から13日まで認められ、血漿中では接種後24時間にピークに達して後低下し、7日に再びピークになり、以後減少した。その血漿中のウイルス抗原の2回目のピークは障害を受けた肝細胞からのウイルスの放出によると思われる。肝臓の抗原価は接種後2日から検出され、6日にピークに達した。肝臓では、ウイ

ルス抗原は最初に洞様毛細血管内皮細胞に局在していたが、時間の経過とともにウイルス抗原陽性肝細胞が増加した。以上の組織外にも少量のウイルス抗原が検出された。いっぽう、接種後7日から血清中に中和抗体が出現し、これとともに全組織内のウイルス抗原価は減少し、接種後15日にはそれは検出されなくなった。鶏の封入体肝炎は接種後24時間に認められた細胞無関連ウイルス血症(ウイルスはおそらく腸管内で増殖したものと思われる)がウイルスの体内移行に主役を果たすと考えられる。以上の考え方から本実験は他のウイルス性肝炎(例えば人のA型肝炎)の有用なモデルになることが示唆された。(学会誌編集委員会)