

6 18年ぶりに発生した流行性出血病ウイルス7型による牛異常産の病態、疫学および被害状況の分析

中央家畜保健衛生所

井上 大輔・鈴木 史子・早島 彬美・

吉野 文彦

対馬家畜保健衛生所

宮本 全

流行性出血病ウイルス（EHDV）はレオウイルス科オルビウイルス属に属する10分節の2本鎖RNAウイルスであり、7つの血清型が報告されている²⁾。ヌカカによって媒介され、各種反芻動物を宿主とする^{18,30)}。EHDVに最も感受性の高い種はシロオジカで、しばしば非常に重篤な症状と高い死亡率が認められる²⁰⁾。牛については、北米、オーストラリア、アジア、中東、アフリカ等、世界中で分離報告がある^{1, 2, 8, 16, 18, 21, 22, 28, 29)}。牛におけるEHDVの実験的感染では、長期間にわたるウイルス血症が観察されるものの、臨床的に顕著な症状を示さないことが多い^{3, 4)}。しかしながら、わが国で分離され、EHDV血清型2（EHDV-2）に分類されるイバラキウイルス（IBAV）については、実験的に牛に発熱や嚥下障害等の症状や、イバラキ病の自然発生例で認められるような病変が再現されている¹⁶⁾。

わが国における過去のEHDV感染症として、昭和34～35年に関東から九州にかけてイバラキ病の大流行があり、43,793頭が発病し、4,298頭が死亡した¹⁶⁾。その後長期間発生が認められなかったが、昭和57年および昭和62年に九州地方を中心としたイバラキ病の散発的な発生が報告されている^{10, 11, 23)}。さらに、平成9年と10年には、九州地方を中心として、嚥下障害等のイバラキ病に特徴的な臨床症状のほか、従来のイバラキ病ではみられなかった異常産の発生が1,000例以上確認された^{14, 24, 25, 27)}。この発生で分離されたウイルスは、当時IBAVの変異株と考えられていたが、後の研究でIBAVと血清学的に交差するEHDV血清型7（EHDV-7）であったことが明らかとなっている^{7, 13, 14)}。なお、当時大きな被害を出した本病ではあるが、その後発生がなか

ったこともあり、EHDV-7による異常産の発生機序は不明なままとなっている。

このような状況の中、平成28年、長崎県においてEHDV-7による異常産の発生が複数例確認された。そこで、これらの症例で実施された病性鑑定成績からEHDV-7による異常産の病態生理の解明を試みた。さらに、国内では18年ぶりとなった本発生に係る疫学の分析を行うとともに、発生の確認されていない農場も含めた県内の被害状況について調査を行い、一定の知見が得られたため報告する。

1 材料および方法

(1) 病性鑑定

平成28年9～11月に、酪農場2農場および黒毛和種繁殖農場1農場において発生した各1例（症例1～3）の流死産胎子（胎齢230～247日齢）を剖検に供した後、病理組織学的検査としてそれらの脳、脊髄、骨格筋および主要臓器、ならびに症例1の胎盤を10%ホルマリン液で固定後、パラフィン切片を作製しヘマトキシリン・エオジン染色を行い鏡検した。また、胎子の中枢神経系、主要臓器、消化器、骨格筋、舌、皮膚および気管、ならびに胎盤について、抗EHDV-7家兔免疫血清（農研機構動物衛生研究部門）を用いた免疫組織化学的染色（IHC）を実施した。さらに、胎子3頭の主要臓器および大脳について、5%馬血液加寒天培地およびDHL寒天培地を用いた細菌分離検査を実施した。

また、ウイルス学的検査として、胎子3頭の中枢神経系および主要臓器、症例1の胎盤、ならびに病性鑑定を行った各流死産胎子の母牛および症例1および2の同居牛の血球について、

High Pure Viral Nucleic Acid Kit (ロシュ・ダイアグノスティック(株))を用いて核酸を抽出後、PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 (タカラバイオ(株))を用い、Ohashiら¹⁵⁾の方法に従い、オルビウイルス属およびオルソブニヤウイルス属の各遺伝子を検出するマルチプレックスRT-PCRを実施するとともに、Hirashimaら⁷⁾の方法に従いEHDV-7、Vilcekら²⁶⁾の方法に従い牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)の各遺伝子を検出するRT-PCR、Rochaら¹⁷⁾の方法に従い牛ヘルペスウイルス1型(BHV-1)の遺伝子を検出するPCRを実施した。さらに、ウイルス分離検査として、上記遺伝子検査に供した材料について、それぞれHmLu-1細胞に接種後、37、5%CO₂環境下で培養を行い、7日間細胞変性効果(CPE)の観察を行った。CPEの認められなかった検体については、3代目まで盲継代を行った。CPEの認められた検体については、その培養上清についてEHDV-7の遺伝子を検出するRT-PCR⁷⁾を実施した。分離されたEHDV-7については1株(Nagasaki/SY-P/2016株; 症例1胎盤由来)を選抜し、平成9年に本県で発生した牛異常産由来EHDV-7株(Nagasaki/NS-1/1997株)と併せて、ダイレクトシーケンス法により全10分節の遺伝子の塩基配列(合計約18,000塩基)を決定し、遺伝子解析ソフトMEGA6を用いて分子系統樹解析を実施するとともに、両株の各分節の塩基配列の一致率を算出するとともに、系統樹の分岐から両株の分節遺伝子の由来について分析を行った。さらに、3例の胎子腹水および母牛血清、ならびに症例1の同居牛2頭および症例3の同居牛3頭の血清について、イバラキウイルス(IBAV)、アカバネウイルス(AKAV)、アイノウイルス(AINOV)、チュウザンウイルス(CHUV)、ピートンウイルス(PEAV)、ディアギュラウイルス(DAGV)、シャモンダウイルス(SHAV)、BVDV1型(BVDV-1)および2型(BVDV-2)、ならびにBHV-1の中和試験による抗体検査を実施した。

(2) EHDVの浸潤状況調査

平成28年6、8、9および11月に県内の20農

場で経時的に採取された75頭の未越夏牛の血清について、IBAVの中和試験による抗体検査を行った。また、8、9および11月に採取された同個体の血球について、-80で凍結融解を1回行った後、病性鑑定と同様の方法でEHDV-7遺伝子を検出するRT-PCR⁷⁾を実施した。

(2) 異常産の発生状況調査

平成26~28年度の県内の乳用牛における牛群検定成績から、胎齢240日齢未満を含む全胎齢での死流産頭数、同3か年の県内の乳用牛における家畜共済の病傷事故件数から胎齢240日齢以降での死産頭数をそれぞれ集計し、比較を行った。なお、各年度の調査農場数および頭数は表-1のとおりであった。

2 成績

(1) 病性鑑定

病性鑑定を実施した3農場における異常産の発生状況は表-2のとおりで、いずれの農場でも8月頃から胎齢250日齢未満での流死産が複数例発生していた。病性鑑定は各農場の2例目、もしくは3例目の異常産確認時に実施された。剖検では、3例目の胎子の脳に血管充盈が認められたのみで、その他の胎子および器官に著変は認められなかった。細菌学的検査では、有意菌は分離されなかった。胎子の病理組織学的検査では、症例1については著変が認められず、症例2および3については脳幹部に少数のグリア細胞の集簇、症例3の脳にうっ血が認められたのみであり、その他著変は認められなかった。EHDVのIHCでは、症例2の脳幹部においてわずかな陽性反応が確認されたのみであった(表-3)。また、症例3では、肺に含気が認められた。一方、胎盤を得ることができた症例1では、胎盤絨毛上皮の変性と子宮中隔に多数

表-1 異常産の発生状況調査における調査農場数および頭数

年度	牛群検定		家畜共済事故	
	農場数	調査頭数	農場数	調査頭数
平成26	46	2,192	144	5,151
平成27	46	2,162	144	5,010
平成28	46	2,109	138	4,407

表 - 2 病性鑑定実施農場における異常産発生状況

農場	品種	産次	発生月	胎齢(日齢)	体形異常	異常産ワクチン	症例番号
A	ホルスタイン種	2	8	248	-	無接種	1
	ホルスタイン種	6	8	239	-	無接種	
	ホルスタイン種	3	9	230	-	無接種	
	ホルスタイン種	2	10	204	-	無接種	
B	黒毛和種	不明	8	約 90	-	3種混合接種	2
	黒毛和種	2	10	約 240	-	3種混合接種	
C	ホルスタイン種	3	9	196	-	無接種	3
	ホルスタイン種	不明	9	不明	-	無接種	
	ホルスタイン種	1	11	247	-	無接種	

表 - 3 流産胎子および胎盤の EHDV-IHC 成績

症例 No.	胎盤	大脳		脳幹部				延髄	小脳	脊髄	
		前頭葉	頭頂葉	側頭葉	線条体	間脳	中脳				橋
1	+ ~ ++	-	-	-	-	NT	NT	NT	-	-	-
2	NT	-	-	-	NT	-	- ~ +	- ~ +	NT	NT	-
3	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

症例 No.	心	肺	肝	腎	脾	胃				舌	骨格筋	皮膚	食道	気管	腸管
						第一	第二	第三	第四						
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	-	NT	NT	NT	NT	-
3	-	-	-	-	-	NT	-	-	-	NT	NT	-	-	-	NT

凡例 ++; 強陽性 +; 陽性 -; 陰性

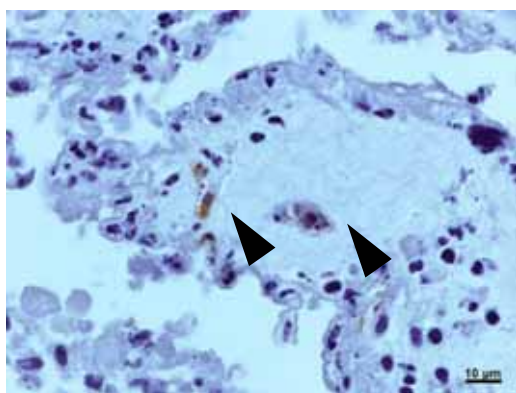


写真 - 1 症例1の胎盤における EHDV-IHC。子宮中隔の血管内皮と思われる細胞に確認された陽性反応(矢頭)。

の石灰沈着が認められ、子宮中隔の血管内皮や子宮内膜上皮と思われる細胞に明瞭な EHDV 陽性反応が認められた(写真 - 1 および表 - 3)。ウイルス学的検査では、3例の胎子諸臓器およびその母牛血球、症例1の胎盤、ならびに症例1および3の同居牛血球から EHDV-7 の遺伝子が検出され、症例1および2の胎子諸臓器および症例1の胎盤から EHDV-7 が分離された(表 - 4)。なお、その他の牛異常産関連ウイルスの遺伝子は検出されなかった。分離株の分子系統樹解析では、10分節すべての遺伝子がジーンバンクに

表 - 4 病性鑑定における EHDV-7 遺伝子検査およびウイルス分離検査成績

症例 No.	検査	大脳	小脳	脳幹部	脊髄	心臓	肺	肝臓	腎臓	脾臓	胎盤	母牛血球	同居牛血球
1	遺伝子	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+(7/7)
	分離	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
2	遺伝子	+	NT	NT	+	+	+	+	+	+	NT	+	NT
	分離	-	NT	NT	+	-	+	+	+	-	NT	-	NT
3	遺伝子	+	NT	NT	NT	+	+	+	+	+	NT	+	+(2/3)
	分離	-	NT	NT	NT	-	-	-	-	-	NT	-	-

凡例 +; 陽性 -; 陰性 NT; 実施せず

* カッコ内の数値は陽性頭数/検査頭数

登録された日本およびオーストラリアにおける検出株と同じクラスターに分類された(図-1)。また、Nagasaki/SY-P/2016株とNagasaki/NS-1/1997株の塩基配列の比較では、10分節中8分節が96%以上と比較的高い一致率を示し、系統樹の分岐から少なくとも7分節は同じ由来であることが示唆された(表-5)。一方で、VP1およびVP3の2つの分節については、一致率が93%程度と低く、両株の分節の由来は同一ではなかった。抗体検査では、症例1の胎子、3例の母牛ならびに症例1および3の同居牛でIBAVの抗体が検出された(表-6)。

(2) EHDVの浸潤状況調査

調査対象農場におけるEHDV-7遺伝子検出およびIBAV抗体陽転状況は表-7のとおりで、9月から11月にかけて、調査対象とした20農場のうち

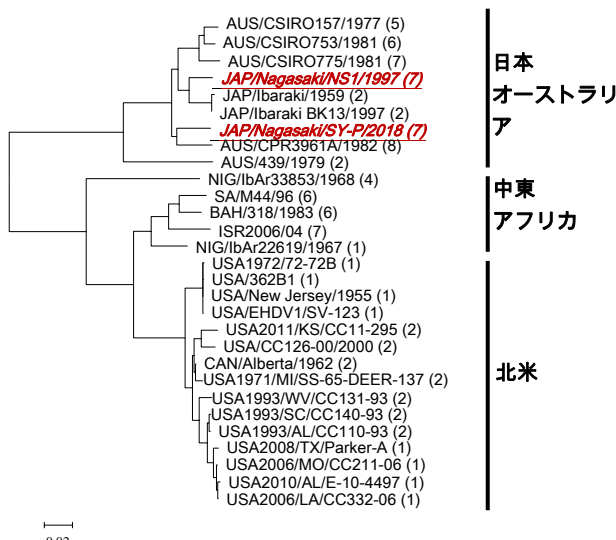


図-1 EHDV VP1 遺伝子の部分配列(3,855bp)に基づく分子系統樹

9農場で抗体陽転が認められ、抗体陽転個体15頭のうち11頭(73%)の血球からEHDV-7の遺伝子が検出された。

(3) 異常産の発生状況調査

家畜共済の病傷事故件数における平成26~28年度の胎齢240日以上での死産頭数は図-2のとおりで、平成28年度の死産頭数は例年と比較して大きな差はなかった。一方で、牛群検定における胎齢240日未満も含む流死産頭数は図-3のとおりで、平成28年8~11月に例年の同時期よりも有意に多い頭数の流死産が発生していた(p<0.01)。

3 まとめおよび考察

病性鑑定の結果を総合して、ウイルスの分離された症例1および2はEHDV-7による異常産、遺伝子のみが検出された症例3はEHDV-7の関与を疑う異常産と診断された。今回、各症例の胎子に認められた病変、ウイルス分離状況、ある

表-5 Nagasaki/SY-P/2016株とNagasaki/NS-1/1997株の塩基配列の比較

分節	コード	解析塩基数(nt)	一致率(%)	分節の由来
6	VP5	1,563	98.1	同
7	VP7	1,081	97.8	同
2	VP2	2,924	97.7	同
8	NS2	1,102	97.4	同
4	VP4	1,903	97.3	同
9	VP6	865	97.0	同
10	NS3	735	97.0	同
5	NS1	1,682	96.1	不明
1	VP1	3,855	93.6	異
3	VP3	2,685	93.1	異

表-6 病性鑑定における牛異常産関連ウイルス抗体検査成績

症例 No.	検体	IBAV	AKAV	AINOV	PEAV	CHUV	DAGV	SHAV	BHV-1	BVDV-1	BVDV-2
1	胎子	16	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	母牛	32	64	256	4	64	128	4	2	<2	<2
	同居牛1	8	16	256	256	256	128	256	8	<2	<2
	同居牛2	128	16	256	4	<2	<2	4	4	256	64
2	胎子	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	母牛	8	256	16	<2	2	32	128	<2	256	256
3	胎子	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	母牛	256	256	<2	<2	<2	2	<2	<2	<2	<2
	同居牛1	256	<2	<2	<2	<2	2	<2	<2	256	256
	同居牛2	256	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	同居牛3	256	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	64	256

表 - 7 平成 28 年度の長崎県におけるおとり牛の IBAV 抗体陽転および EHDV-7 の遺伝子検出状況

農場	市町	供試牛数	6月下旬		8月中旬		9月下旬		11月中旬	
			遺伝子 ^a	抗体陽転 ^b	遺伝子	抗体陽転	遺伝子	抗体陽転	遺伝子	抗体陽転
A	佐世保市	2	0	0	0	0	0	0	0	0
B	島原市	4	0	0	0	0	0	0	0	0
C	島原市	3	0	0	0	0	1	0	1	1
D	諫早市	5	0	0	0	0	1	1	3	2
E	諫早市	4	0	0	0	0	4	4	1	0
F	大村市	3	0	0	0	0	0	0	1	1
G	平戸市	7	0	0	0	0	0	0	0	0
H	平戸市	3	0	0	0	0	0	0	0	0
I	対馬市	3	0	0	0	0	0	0	0	0
J	壱岐市	5	0	0	0	0	0	0	0	0
K	壱岐市	3	0	0	0	0	0	0	0	0
L	壱岐市	4	0	0	0	0	0	0	0	0
M	五島市	4	0	0	0	0	0	0	0	1
N	五島市	5	0	0	0	0	0	0	2	2
O	五島市	3	0	0	0	0	0	0	0	0
P	西海市	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Q	雲仙市	4	0	0	0	0	0	0	0	0
R	南島原市	4	0	0	0	0	1	1	1	1
S	北松浦郡佐々町	3	0	0	0	0	1	0	3	3
T	新上五島町	3	0	0	0	0	0	0	0	2

a 血球から EHDV-7 の遺伝子が検出された頭数

b ワクチン未接種個体で前回検査時から 4 倍以上の抗体価の上昇が認められた頭数

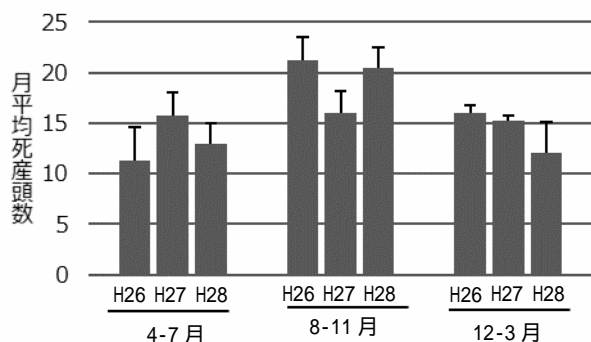


図 - 2 平成 26 ~ 28 年度における胎齢 240 日齢以降での死産頭数

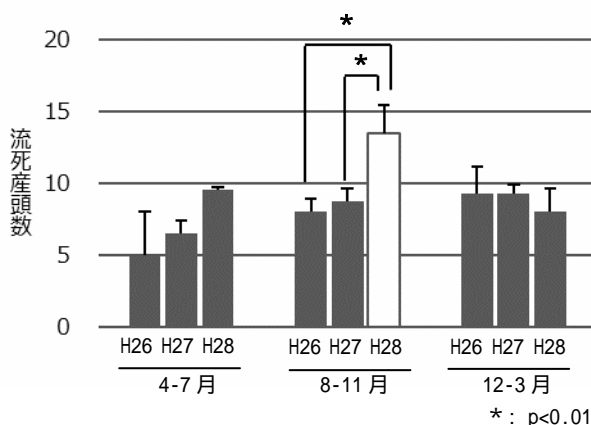


図 - 3 平成 26 ~ 28 年度における胎齢 240 日齢未満を含む全胎齢での流死産頭数

いはウイルス抗体検出状況は、平成 9 年および 10 年の発生症例で認められたものとほぼ同様であった^{24,25,27}。当時のこれらの報告では、胎子の病変が軽微であることや、胎子からの抗体検出率が低いこと、胎子からウイルスが分離されていること等から、本病の発生機序として、胎子感染後に急激な致死性障害が起き、病変形成前に流死産が起きた可能性や、胎盤炎が起きていた可能性などが考察されている^{24,27}。しかしながら、胎盤等におけるウイルスや病変の検索はなされておらず、これらの考察を決定づける科学的証拠は得られていなかった。今回の症例では、抗体検査成績から、胎子は胎内感染を受けた後比較的速やかに娩出されたと考えられた。また、胎子の全身諸臓器からウイルスが分離されたが、EHDV-7 の IHC を実施した結果、供試したいずれの臓器においても明瞭な陽性反応が確認されず、胎子諸臓器における EHDV-7 のウイルス量が少なかったことが示唆された。これらのことから、3 例の胎子体内ではいずれも顕著なウイルス増殖が起きていなかったと考えられる。さらに、いずれの症例においても、胎子には強

い病変が認められず、特に症例3では娩出されるまで胎子が生きていたことが示唆された。その一方で、胎盤や子宮においては病変の形成とウイルスの増殖が認められた。これらのことから、少なくとも今回検査を行った3例の流死産は、ウイルスが胎子よりも母体側、すなわち胎盤や子宮等に強く作用した結果起きたものである可能性が高いと考えられる。ヒトの周産期疾病のひとつである絨毛膜羊膜炎では、胎盤で細菌感染による炎症が起きることでプロスタグランジンが産生され、子宮の収縮が引き起こされるほか、マクロファージが産生するコラーゲン分解酵素により子宮頸部の熟化や破水が起こり、好中球から放出されるエラスターゼや活性酸素により卵膜組織が破壊され、子宮収縮が増強されることにより、妊娠状態が破綻し、早産が起きる^{6,9)}。牛においても胎盤炎や子宮炎が起きた場合、同様の経過を辿り、胎子の早期娩出が惹起される可能性が考えられる。牛胎子が子宮外での生活能力を獲得する最短妊娠期間は、正常の妊娠期間の90%を経過した頃、すなわち胎齢250~260日とされている⁵⁾。今回の3例はいずれも胎齢250日齢未満であり、これらの胎子は娩出されたものの生存できず、流死産となった可能性が考えられた。また、IHCで子宮中隔の血管内皮と思われる細胞にEHDVの陽性反応が認められたことから、血管の障害により胎盤におけるガスや栄養代謝産物の輸送が障害されたことが疑われ、これらの循環不全等から胎子が死亡、あるいは衰弱し、流死産となった可能性も否定できない。今回得られたこれらのデータは、いまだ明らかではないEHDV-7による牛異常産の病態解明に寄与するものである。しかしながら、本ウイルスの母体への影響等についてはいまだ不明な部分が多く、今後、感染実験による詳細な検証が必要である。

過去に国内で分離されたEHDVについては、その内殻タンパクをコードする第3分節、すなわちVP3領域の遺伝子解析の結果から、アジア太平洋地域で動いているEHDVの一部であることが報告されている^{7,13,19)}。今回分離された

Nagasaki/SY-P/2016株についても、10分節すべての遺伝子が系統樹解析でアジア太平洋地域で検出された株と同じクラスターに分類された。また、少なくとも7分節の遺伝子が平成9年に流行し牛に異常産を引き起こした株と同一由来で、2分節が異なる由来であったことから、Nagasaki/SY-P/2016株は、遺伝子再集合により変異した平成9年の流行株と近縁なウイルスと考えられた。また、EHDVの浸潤状況調査では、平成28年9~11月にかけて、長崎県内の広い地域でEHDV-7の動きが確認された。さらに、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が毎年報告している全国のおとり牛調査成績では、平成28年9月に九州地方北部(福岡県、佐賀県、長崎県および熊本県)、11月には沖縄県、九州地方南部(宮崎県、鹿児島県)、中国地方(岡山県および広島県)、四国地方(徳島県、香川県および高知県)、関西地方(滋賀県、京都府および兵庫県)でEHDVの抗体の陽転が確認され、非常に広い地域にEHDVが浸潤したことが示唆されている¹²⁾。このような状況の中、本県においては、平成28年8~11月、胎齢240日未満の流産が多く発生していたことが示唆された。以上のことから今回の発生に係る疫学と被害状況を考察すると、平成10年に国内で確認されたEHDV-7による異常産の発生後も、牛に異常産を引き起こす株がアジア太平洋地域で変異しながらも維持されており、この株が平成28年8~9月に本県を含めた九州地方北部に侵入し、その後西日本に広く浸潤したこと、さらに長崎県内の広い地域でウイルスの感染が起こり、発生の確認されていない農場も含めて、複数の農場で若い胎齢での流死産を引き起こした可能性が考えられた。EHDV-7が動いた時期に240日齢未満での流産が増えたという状況は、先に示した本病が胎盤炎等の結果惹起されるものであるという仮説を支持する成績とも考えられる。また、今回の流行では浸潤地域の広さから大きな被害が出ていた可能性も考えられる。今後もアジア太平洋地域では病原性株が維持される可能性が高く、わが国に侵入し、被害を引

き起こすことが危惧されるが、現在、わが国では EHDV-7 に対するワクチンは、その費用対効果が不明であることもあり、市販に至っていない。この費用対効果を検討するためには正確な被害状況の把握が重要であり、こうしたデータを蓄積するため、今後、EHDV-7 の動きが確認された際には、若い胎齢での流死産の発生に注意する必要がある。

4 文献

- 1) Albayrak H *et al.*: A serologic investigation of epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV) in cattle and gazella subgutturosa subgutturosa in Turkey, *Trop Anim Health Prod*, 42, 1589-1591 (2010)
- 2) Anthony SJ *et al.*: Genetic and phylogenetic analysis of the outer-coat proteins VP2 and VP5 of epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV): comparison of genetic and serological data to characterise the EHDV serogroup, *Virus Res*, 145, 200-210 (2009)
- 3) Aradaib IE *et al.*: Experimental epizootic hemorrhagic disease virus infection in calves: virologic and serologic studies, *J Vet Diagn Invest*, 6, 489-492 (1994)
- 4) Gibbs EP *et al.*: Infection of British deer and farm animals with epizootic hemorrhagic disease of deer virus, *J Comp Pathol*, 87, 335-343 (1977)
- 5) 浜名克己: 妊娠期の異常(産業動物), 獣医繁殖学, 第2版, pp319-344, 森純一編, 文永堂出版, 東京, (2001)
- 6) 平野秀人ら: 早産と絨毛膜羊膜炎, 産婦人科治療, 91, 11-16 (2005)
- 7) Hirashima Y: Reemergence of Ibaraki disease in southern Japan in 2013, *J Vet Med Sci*, 77, 1253-1259 (2015)
- 8) Huismans H *et al.*: The nucleic acid and proteins of epizootic hemorrhagic disease virus, *Onderstepoort J Vet Res*, 46, 95-104 (1979)
- 9) 伊奈志帆美ら: 絨毛膜羊膜炎, 産科と婦人科, 75, 1550-1555 (2008)
- 10) 岩崎充祐ら: 宮崎県に発生したイバラキ病, 日獣会誌, 43, 244-248 (1990)
- 11) 北野良夫ら: イバラキ病による斃死牛の病理学的観察, 41, 884-888 (1988)
- 12) 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: おとり牛を用いたアカバネ病等の抗体調査, 動物衛生研究部門ホームページ, <http://www.naro.affrc.go.jp/niah/arbo/ibaraki/index.html>, (参照 2018-08-28)
- 13) Ohashi S *et al.*: Analysis of intratypic variation evident in an Ibaraki virus strain and its epizootic hemorrhagic disease virus serogroup, *J Clin Microbiol*, 40, 3684-3688 (2002)
- 14) Ohashi S *et al.*: Identification and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of a variant of the Ibaraki virus from naturally infected cattle and aborted fetuses in Japan, *J Clin Microbiol*, 37, 3800-3803 (1999)
- 15) Ohashi S *et al.*: Simultaneous detection of bovine arboviruses using single-tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction, *J Virol Methods*, 120, 79-85 (2004)
- 16) Omori T *et al.*: Ibaraki virus, an agent of epizootic disease of cattle resembling bluetongue. I. Epidemiologic, clinical and pathologic observations and experimental transmission to calves, *Jpn J Microbiol*, 13, 139-157 (1969)
- 17) Rocha MA *et al.*: A high sensitivity-nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls, *Vet*

- Microbiol, 63, 1-11 (1998)
- 18) Savini G *et al.*: Epizootic haemorrhagic disease, Res Vet Sci, 91, 1-17 (2011)
- 19) Shiarafuji H *et al.*: Characterization of genome segments 2, 3 and 6 of epizootic haemorrhagic disease virus strains isolated in Japan in 1985-2013: Identification of their serotypes and geographical genetic types, Infect Genet Evol, 53, 38-46 (2017)
- 20) Stallknecht DE *et al.*: Hemorrhagic disease in white-tailed deer in Texas: a case for enzootic stability, J Wildl Dis, 32, 695-700 (1996)
- 21) Temizel EM *et al.*: Epizootic haemorrhagic disease in cattle, Western Turkey, Emerg Infect Dis, 15, 317-319 (2009)
- 22) Uchinuno Y *et al.*: Differences in Ibaraki virus RNA segment 3 sequences from three epidemics, J Vet Med Sci, 65, 1257-1263 (2003)
- 23) 打越律男ら: 1982年に発生したイバラキ病, 日獣会誌, 36, 648-652 (1983)
- 24) 内布幸典ら: イバラキウイルスの関与が疑われた牛の異常産, 日獣会誌, 52, 565-569 (1999)
- 25) 内布幸典ら: 福岡県でウイルスの越冬が疑われたイバラキ病の2年連続発生, 日獣会誌, 53, 372-376 (2000)
- 26) Vilcek S *et al.*: Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis, Arch Virol, 136, 309-323 (1994)
- 27) 渡邊洋一郎ら: 1997年に鹿児島県で発生したイバラキ病と流死産胎子から分離されたウイルスの性状, 日本獣医師会雑誌, 53, 302-306 (2000)
- 28) Weir RP *et al.*: EHDV-1, a new Australian serotype of epizootic haemorrhagic disease virus isolated from sentinel cattle in the Northern Territory, Vet Microbiol, 58, 135-143 (1997)
- 29) Yadin H *et al.*: Epizootic haemorrhagic disease virus type 7 infection in cattle in Israel, Vet Rec, 162, 53-56 (2008)
- 30) Yanase T *et al.*: Isolation of bovine arboviruses from *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in southern Japan: 1985-2002, J Med Entomol, 42, 63-67 (2005)