

牛流行熱の発生とRT-PCR法の検討について

家畜衛生試験場 ○丹羽 毅、池宮城 一文
八重山家畜保健衛生所 新田 芳樹、鈴木 萌美

2012年9月八重山地域で8年ぶりに牛流行熱(以下、BEF)の発生が確認された。本県では過去25年間に5回のBEFの発生が確認されている。

今回、本事例について病性鑑定ならびに流行株の遺伝子解析を実施するとともに、補助診断に用いるRT-PCR法の検証を動物衛生研究所九州支所(以下、動衛研九州支所)と共に行ったので報告する。(表1)

表1 牛流行熱発生状況(過去25年間)

発生年月	発生地域	発生戸数	発生頭数	周辺地域の発生
1988年(10-11月)	沖縄本島北部(豊後町、伊佐名町)	3戸	3頭	九州四県、韓国
1989年(5-6月)	八重山3島(石垣、西表、小浜島)	86戸	333頭	台湾
2001年(10-11月)	八重山6島、宮古1島(八重山全島)(多良間島)	645戸	1,417頭	台湾
2004年(10月)	八重山1島(石垣)	1戸	4頭	台湾
2012年(9月-継続中)	八重山3島(石垣、西表、小浜島)	149戸 継続中	568頭 継続中	不明

1988年 伊佐名町
1989年 石垣島
2001年 八重山諸島
2004年 石垣島
2012年 石垣島

11~12年周期で大規模な流行が認められている

【発生概要および経過】

2012年9月18日、石垣市の和牛繁殖農場3戸で、発熱・鼻汁・起立不能等を呈する牛が相次いで確認され、臨床獣医師よりBEF疑いとして病性鑑定依頼があった。その後、石垣島全域ならびに周辺離島でも同様の事例報告が寄せられ、同年12月19日現在、計149戸568頭でBEFを疑う症例が確認されている。初発事例の3農場について病性鑑定を実施した。

(表2)

表2 初発事例の発生状況

通報日	2012年9月18日		
所在	石垣市		
農場	A農場	B農場	C農場
飼養頭数	母牛11頭 子牛8頭	母牛5頭 子牛1頭	母牛4頭 子牛2頭
発生頭数	母牛2頭	母牛1頭 子牛1頭	母牛3頭
臨床症状	発熱・食欲不振	発熱・食欲不振・起立不能	食欲不振

複数の臨床獣医師が相次いでBEF疑いの症例通報

【材料と方法】

①病性鑑定:発症牛並びに同居牛から採血を行い(A農場5頭、B農場3頭、C農場3頭)、BEFVの遺伝子検査、ウイルス分離及び抗体検査を実施した。遺伝子検査では、EDTA加血液の末梢白血球を供試材料とし、KhalilらのプライマーによるRT-PCRを実施し、陽性検体について動衛研九州支所へ遺伝子解析を依頼した。ウイルス分離は、ヘパリン加血液の血漿と洗浄血球を用い、HmLu-1、BHK-21、Vero細胞で実施した。また、前後血清を用いた中和試験により抗体価の有意上昇の有無を調べた。

② RT-PCR法の検証:本事例で認識された課題を解消すべく、当県分離11株を含む国内ならびに周辺諸国で分離されたBEFVの遺伝子情報を基に、動衛研九州支所と供にプライマー配列の変更・反応条件の検討を行ったプライマーを使用して、野外材料(31検体)を用いた有用性を検証した。(図1、2)

【病性鑑定マニュアル】

BEF確定診断 → ウイルス分離、中和試験(ペア血清)

【課題】

- 1) 確定診断までに時間を要し対策等に遅れが生じる
- 2) 遺伝子検査による診断は根拠が不明確
- 3) KhalilらのPCR法プロトコールの妥当性

- 国内株を標的にして設計されていない
- 病鑑材料では非特異反応が出やすい

野外材料で認められた非特異反応 →

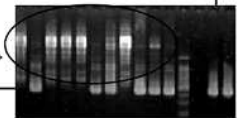


図1 本事例で認識された課題

- ・使用キット: OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN)
- ・改変primer: EG3_modified GAATCATTATGGGATCGGATC
EG2_modified CCAACCTACAACAGCAGATAAAAC
- ・増幅産物サイズ: 448bp

	temp.	time	cycle
reverse transcription	50°C	30 min.	1
inactivation of RT enzyme	95°C	15 min.	
denaturation	94°C	30 sec.	検討
annealing	検討	30 sec.	
extension	72°C	1 min.	
final extension	72°C	10 min.	1
[according to QIAGEN's instructions]	10°C	∞	

※ 改変primerでの annealing温度 48、50、52°C } について検証
cycle数 30、35、40

図2 BEFV RT-PCRのプロトコールの検討

【結果】

① 病性鑑定： RT-PCR の結果、全農場において BEFV 特異遺伝子が検出された(A 農場 1 頭、B 農場 2 頭、C 農場 3 頭)。PCR 産物の遺伝子解析の結果、BEFV の G 遺伝子の一部配列と高い相同性(約 98%)が確認され、分子系統樹解析では 2000 年代に東アジアで分離された株と同クラスターに分類されることが判明した。ウイルス分離では、HmLu-1 細胞より 1 株が分離された(C 農場 1 頭)。抗体検査においては、抗体価の有意上昇(A 農場 4 頭、B 農場 2 頭、C 農場 3 頭)が認められ、牛流行熱と診断した。(表 3, 図 3)

表 3 病性鑑定結果

農場	牛 No.	体温 (°C)	WBC 数	症状	PCR	ウイルス分離	抗体検査		報告 (病性鑑定依頼: 9/18)	ワクチン接種歴
							Pre	Post		
A	1	NT	6,100	+	-	-	256	4096 ≤	9/14より発症、9/18:復調	H21/1回
	2	39.1	5,000	+	+	-	2	4096 ≤	9/18発症、鼻汁・食欲(+)	H19.21各1回
	3	38.5	9,800	-	-	-	<2	4	同居牛	未接種
	4	38.6	8,500	-	-	-	<2	16	同居牛	未接種
	5	38.9	9,200	-	-	-	<2	<2	同居牛	未接種
B	1	39.6	3,900	+	+	-	4	4096 ≤	起立不能	未接種
	2	41.1	9,500	+	+	-	<2	64	9/17夕方より食欲不振(子牛)	未接種
	3	38.3	8,700	-	-	-	32	32	同居牛(13歳)	未接種
C	1	39.6	6,200	+	+	-	16	4096 ≤	9/17より食欲不振	H22/2回
	2	39.8	4,000	+	+	-	<2	256	9/17より食欲不振	未接種
	3	39.3	8,900	+	+	+	<2	64	9/17より食欲不振	未接種

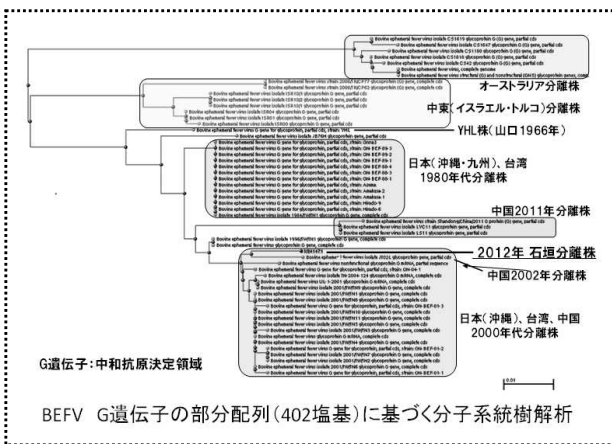


図 3 牛流行熱の遺伝子解析結果

② RT-PCR 法の検証: Khalil らのプライマーによる RT-PCR 法では、多くの非特異反応が認められたが、検討後の RT-PCR 法では検出感度の上昇および非特異反応の減少が認められた。そのことより、遺伝子診断における特異性の向上が図られた。(図 4)

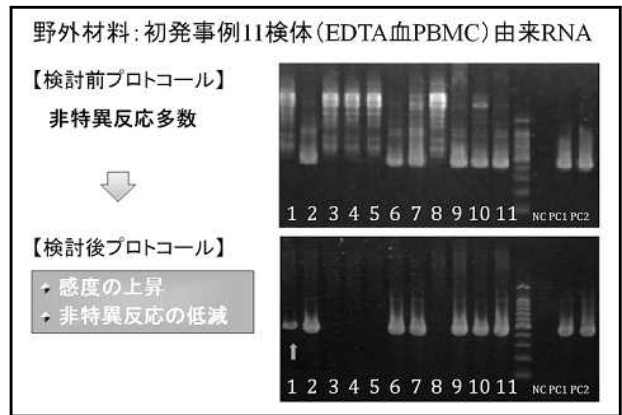


図 4 野外材料を用いた RT-PCR 法検証結果

【まとめ】

本県で 8 年ぶりに BEF が発生し、石垣島を中心とした八重山諸島で大規模な流行が確認された。本県では、1989、2001、2012 年と 11 から 12 年間隔で BEFV の大規模な流行を繰り返している。分離株は 2000 年代のアジア株と同クラスターに分類され、2000 年以降の沖縄分離株間に大きな変異は確認されなかった。BEF 疑い事例確認時には、出荷牛への緊急ワクチン接種等の地域をあげたまん延防止対策を行うために、迅速な診断が必要とされる。しかし、病性鑑定マニュアルに BEFV を検出するための遺伝子診断に関する記述は無く、また、既報の RT-PCR 法では非特異反応が多数認められたことから、迅速な診断を行う際に支障が生じた。今回、動衛研九州支所の協力の下、RT-PCR 法の検証を行った結果、特異性ならびに感度の向上が確認された。今後、本法の病性鑑定マニュアルへの記載等により、早期の診断が可能となり、円滑な緊急防疫対応につながる事が望まれる。