

## 【短報】

# 流行性出血病ウイルス(血清型5)の関与が疑われる牛の流産事例

石井圭子<sup>1)</sup>, 銘苅裕二<sup>1)</sup>, 仲村 望<sup>2)</sup>, 荒木美穂<sup>2)</sup>

1)家畜衛生試験場 2)八重山家畜保健衛生所

### 【はじめに】

流行性出血病ウイルス(以下 EHDV)はヌカカによって媒介されるアルボウイルスで、反芻動物に感染して急性熱性疾患を起こすが、EHDV 全体で見れば牛では不顕性感染が多い。EHDV はこれまでに7つの血清型が確認されており(1, 2, 4~8), 国内では1959~1960年に関東地方以南で血清型2によるイバラキ病(以後散発), 2015年に兵庫県で血清型6によるイバラキ病様疾病, 1997~1998, 2016年に九州地方でEHDV 血清型7による急性熱性疾患と異常産の報告がある。本県ではこれまでに病性鑑定事例やおとり牛調査で血清型1, 2, 6, 7, 10(血清型10は暫定)の分離または遺伝子が検出されているが, 今回, 流産胎子から血清型5が検出され, 異常産への関与が疑われたので, その概要を報告する。

### 【農場概要と発生状況】

農場は石垣市の肉用牛繁殖農場で, 計42頭(母牛24頭, 子牛18頭)を飼養し, 直近の導入歴はなかった。2017年8月中旬, 母牛1頭(6歳)が流産し, 流産胎子(胎齢6ヵ月)に体形異常はみられなかった。当該母牛は4~5産で, 発生時に食欲低下等の症状はなく, 分娩前に下痢ワクチンを接種していたが, 異常産関連ワクチンは過去3年間未接種であった。また, 同居牛にも異常はみられず続発もなかった。流産の原因究明を目的として, 流産胎子, 母牛および同居牛について病性鑑定を実施した。

### 【病性鑑定: 材料と方法】

流産胎子の主要臓器, 胃内容, 胎盤および母牛・同居牛(4頭)のEDTA加血液, ヘパリン加血液, 血清を用いて以下に示す通りの方法で各種検査を行った。

1. 遺伝子検査: 胎子臓器10%乳剤(脳と心・肝・腎・脾の5臓器プール), 胎盤, 羊水(胃内容), 母牛・同居牛EDTA加血液を用い, アル

ボウイルス multiplex RT-PCR 法(大橋ら), EHDV RT-PCR 法(山本ら), EHDV 型別 RT-PCR 法(Maanら), 牛ウイルス性下痢(以下 BVD)ウイルス RT-PCR 法(Vileckら)を実施した。

2. ウイルス分離: 胎子臓器10%乳剤(脳, 5臓器プール)と母牛・同居牛の洗浄血球および血漿を用いて, ハムスター肺由来 HmLu-1 細胞およびハムスター腎由来 BHK-21 細胞に接種後, 37℃で静置および回転培養で, 5代継代を行った。

3. 抗体検査: 母牛および同居牛前後血清を用い, アカバネ(以下 AKA), アイノ(以下 AINO), チュウザン(以下 CHU), イバラキ(以下 IBA), ピートン(以下 PEA), シャモンダ(以下 SHA), 牛流行熱(以下 BEF)および BVD の中和試験を実施した。

4. 一般細菌検査: 胎子について定法に従って実施した。

5. 病理組織学的検査: 胎子について定法に従って実施した。

### 【病性鑑定結果】

流産胎子はミイラ化しており, 眼窩陥没, 脳融解がみられたが, 体形異常はなかった(図1)。

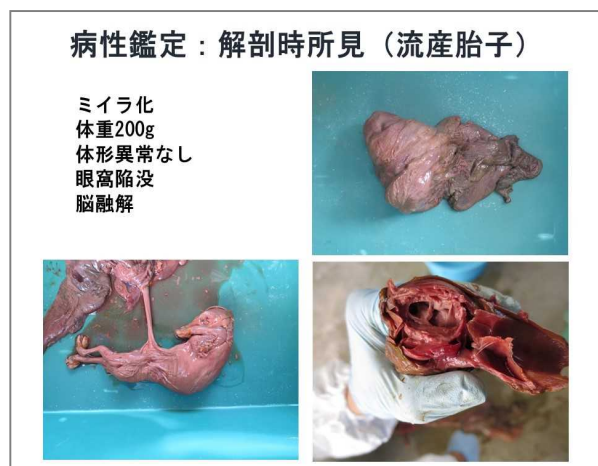


図1 流産胎子の解剖時所見

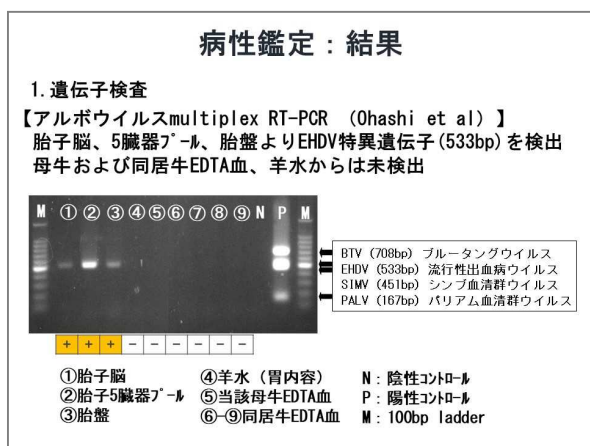


図2 アルボウイルス multilex RT-PCR 結果

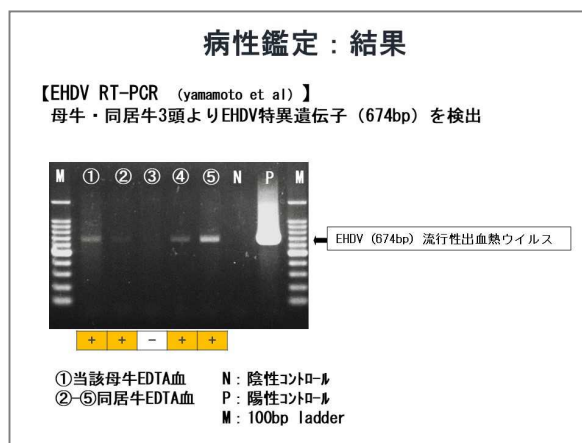


図3 EHDV RT-PCR 結果

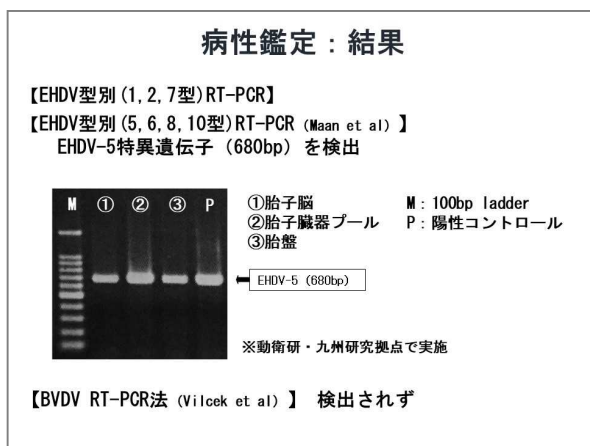


図4 EHDV 型別 RT-PCR および BVDV RT-PCR 結果

1. 遺伝子検査:アルボウイルス multilex RT-PCR 法において、胎子臓器 10%乳剤 (脳, 5 臓器プール) と胎盤で EHDV 特異遺伝子 (533bp) が検出され、他のアルボウイルスは検出されなかった (図2). 次に、アルボウイルス multilex RT-PCR 法で特異遺伝子が検出されなかった母牛および同居牛 5 頭の EDTA 加血液を用いて EHDV RT-PCR 法を実施したところ、母牛と同居牛 3 頭で EHDV 特異遺伝子 (674bp) が検出された (図3). 続いて EHDV 型別 RT-PCR 法にて EHDV 血清型 5 の特異遺伝子 (680bp) が検出された. なお、BVD ウイルスの遺伝子は検出されなかった (図4).

2. ウイルス分離: 陰性であった.

表1 アルボウイルス抗体検査

	産歴	AKA		AINO		CHU		IBA		BEF		PEA		SHA	
		pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post
当該母牛	5産	32	8	32	16	<2	<2	64	32	128	64	8	16	<2	<2
同居牛	2産	<2	<2	<2	<2	<2	<2	8	8	<2	<2	128	128	<2	<2
同居牛	初産	<2	<2	<2	<2	<2	<2	64	8	<2	<2	256≤	64	<2	<2
同居牛	初産	<2	2	<2	<2	<2	<2	32	16	<2	<2	256≤	256≤	<2	<2
同居牛	初産	<2	<2	<2	<2	<2	<2	32	32	<2	<2	128	32	<2	<2

表2 BVD ウイルス抗体検査

	産歴	BVD1		BVD2	
		pre	post	pre	post
当該母牛	5産	512	1024	16	16
同居牛	2産	<2	<2	<2	2
同居牛	初産	4	2	16	8
同居牛	初産	16	64	64	16
同居牛	初産	32	32	16	8

3. 抗体検査: 母牛および同居牛は IBA, PEA, BVD 等の抗体を保有していたが、有意上昇はみられなかった (表1, 2).

4. 一般細菌検査: 有意菌分離陰性であった.

5. 病理組織学的検査: 特記所見はなかった.

以上の結果から、EHDV 以外の他の病原体の関与や疾病と考えられる所見はなく、本事例を

EHDV の関与を疑う流産と診断した。

### 【遺伝子解析：材料および方法】

内殻コア蛋白 VP3 をコードする BTV ゲノム分節 3 の解析による地理的由来の特定と、外殻コア蛋白 (中和抗原) VP2 をコードする BTV ゲノム分節 2 の解析による血清型の決定のため、遺伝子解析を実施した。胎子臓器 10%乳剤 (脳, 5 臓器プール) および胎盤から得られた RNA を用いて、EHDV ゲノム分節 3 を標的とした RT-PCR 法およびダイレクトシーケンス法と、EHDV ゲノム分節 2 を標的とした、Maan らの FLAC 法 (Full-length Amplification of c-DNAs) およびダイレクトシーケンス法を行った (図 5)。

### 【遺伝子解析結果】

EHDV ゲノム分節 3 の部分配列 (493 塩基) について相同性検索を実施した結果、アジア・オセアニア地域に分布している EHDV の一部で、2016 年に本県のおとり牛血液から分離された株 (EHDV 血清型 7 (以下 EHDV-7)) と近縁であった (相同性 98.78%) (図 6)。また、EHDV ゲノム分節 2 の部分配列 (668 塩基) について相同性検索を実施した結果、EHDV 血清型 5 (以下 EHDV-5) であることが判明し、1997 年にオーストラリアで分離された株に近縁であった (相同性 90.24%) (図 7)。なお、今回の系統樹解析に記載はないが、2016 年に本県のおとり牛血液から分離された EHDV-5 と近縁であることが判明した (ゲノム分節 3; 相同性 99.79%, ゲノム分節 2: 相同性 100%)。

### 【まとめ】

2017 年 8 月中旬、沖縄県石垣市の肉用牛繁殖農場で発生した牛の流産事例において、流産胎子の臓器乳剤 (脳, 5 臓器プール), 胎盤, 母牛および同居牛の血液より EHDV 特異遺伝子が検出された。

遺伝子解析の結果、検出された検体はアジア・オセアニア地域由来で、2016 年に本県のおとり牛から分離された株 (EHDV-7) と近縁 (相同性 98.78%) であることが確認された。また、血清型 5 と判明し、1997 年にオーストラリアで分離された株に近縁 (相同性 90.24%) であった。本県では、これまでに 5 つの血清型 (1, 2, 6, 7, 10) の分離または遺伝子が検出されていたが、流産胎子からの EHDV-5 の検出は本事例が世界初となる。



図 5 遺伝子解析：材料と方法

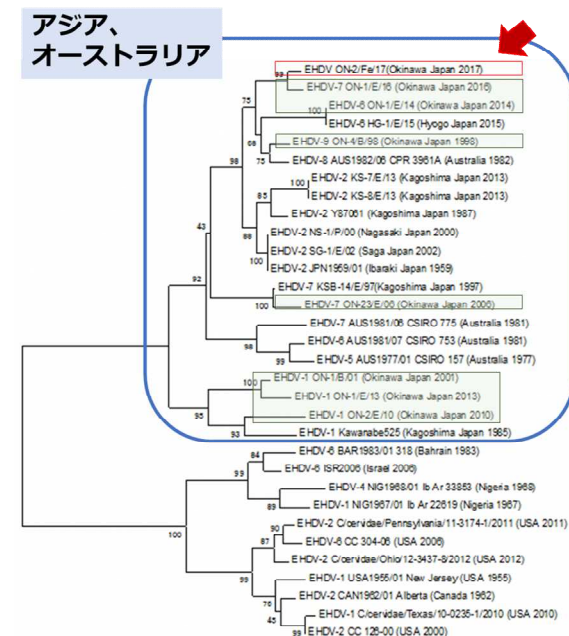


図 6 遺伝子解析結果：ゲノム分節 3

矢印：今回の検出検体

緑：過去の沖縄分離株または検出検体

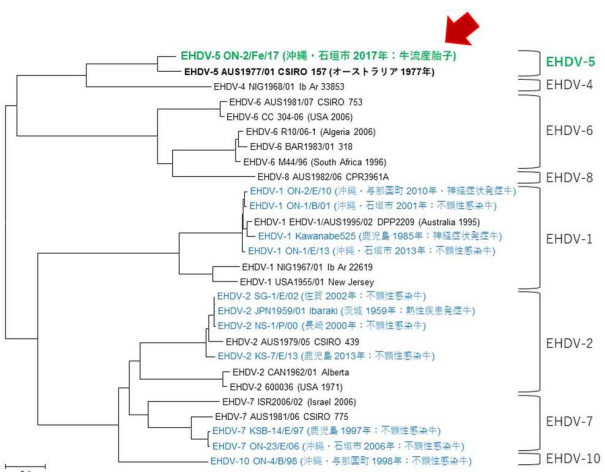


図 7 遺伝子解析結果：ゲノム分節 2

緑：今回の検出検体 青：過去の国内分離株

### 【考察】

本県では、おとり牛調査や病性鑑定においてこれまでも複数の血清型の EHDV が確認されているが流行はみられていない。今回、牛の流産事例において胎子から EHDV-5 の遺伝子が初めて検出されたが、ウイルス分離には至らずウイルス感染と発症との関連や性状等の詳細は不明であった。本事例では続発もなく、宿主側の偶発的要因が重なった上での発症とも考えられるが、胎子や母牛および同居牛から EHDV-5 の遺伝子が検出されたことより、EHDV-5 が流産に関与したことが示唆された。

近年の EHDV に関連すると考えられる疾病発生報告を鑑み、イバラキ病ウイルス (EHDV-2) だけではなく、他の血清型も含めて EHDV 全体として捉えて病性鑑定を実施し、EHDV に関する新たな知見の収集に努める必要性を感じた。また、本県はアルボウイルス常在地に最も近隣に位置し、ウイルスを媒介する節足動物の活動に適した温暖な地域であるため、国内への疾病侵入リスクを測る上でも、引き続き EHDV を含むアルボウイルスの監視体制を維持することが重要であると考えられた。

### 【謝辞】

今回検出された EHDV の同定、解析ならびに本稿を作成するにあたり、ご指導・ご助言を賜りました(国)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(九州研究拠点)の白藤浩明先生、梁瀬徹先生、田中省吾先生に深謝いたします。

### 【参考文献】

[1] Anthony, S J et al. : Genetic and phylogenetic analysis of the outer-coat proteins VP2 and VP5 of epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV): comparison of genetic and serological data to characterise the EHDV serogroup, *Virus Res*, 145, 200-210 (2009)

[2] 井上ら:流行性出血病ウイルス 7 型による牛異常産の発生と疫学的考察,平成 29 年度日本産業動物獣医学会(九州地区)抄録(2017).

[3] 岩崎ら:宮崎県に発生したイバラキ病とその疫学, *日獣会誌*, 43, 244-248 (1990)

[4] 加茂前ら:兵庫県におけるイバラキ病様疾病の発生,第 51 回兵庫県家畜保健衛生業績発表会集録(2015)

[5] Kato, T et al. : Monitoring for bovine arboviruses in the most southwestern islands in Japan between 1994 and 2014. *BMC Vet Res*, 12, 125 (2016)

[6] Maan, S et al. : Rapid cDNA synthesis and sequencing techniques for the genetic study of bluetongue and other dsRNA viruses, *J Virol Methods*, 143, 132-139 (2007)

[7] 丹羽ら:2010 年度に認められた多様な牛アルボウイルスの流行状況, *沖縄県家畜衛生試験場年報*, 47, 67-69 (2011)

[8] 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)

[9] Shiarafuji, H et al. : Characterization of genome segments 2, 3 and 6 of epizootic hemorrhagic disease virus strains isolated in Japan in 1985-2013: Identification of their serotypes and geographical genetic types, *Infect Genet Evol*, 53, 38-46 (2017)

[10] 渡邊ら:1997 年に鹿児島県で発生したイバラキ病と流産胎子から分離されたウイルスの性状, *日獣会誌*, 53, 302-306 (2000)

[11] 山本ら:福岡県内で発熱を呈した牛からの流行性出血病ウイルス (EHDV) の分離と EHDV 検出用 RT-PCR 法の新規プライマーの開発,平成 29 年度日本産業動物獣医学会(九州地区),抄録(2017)