

8. 牛流産胎子からのブルータングウイルス血清型1の分離事例

家畜衛生試験場

○石井 圭子 銘苅 裕二

池宮城 一文

北部家畜保健衛生所

中尾 聡子 青木 雄也

仲村 真理

【はじめに】

ブルータング(以下 BT)は、レオウイルス科オルビウイルス属ブルータングウイルス(以下 BTV)によって引き起こされる、めん羊、山羊、牛など反芻獣の急性熱性疾患で、国際獣疫事務局(OIE)リスト疾病および日本では届出伝染病に指定されている。BTは、発熱、鼻漏、口腔・鼻粘膜・舌のチアノーゼ、腫脹、潰瘍を主徴とし、口蹄疫やイバラキ病との類症鑑別が重要である。また、諸外国では流早死産や大脳欠損等の異常産の報告もある。BTVは、主にめん羊に感染して顕著な症状を示すが、牛では不顕性感染が多いことが知られている(図1)。

国内では1994年に北関東においてめん羊、牛で初発事例が確認され(イバラキ病様症状)、これまでに4例の発生が報告されているが、いずれの事例においても異常産はみられていない。沖縄県では、1974年以降、おとり牛調査で頻繁に抗体陽転を認め、複数回BTVが分離されてきたが、BTの発生はなかった(図2)。

今回、沖縄本島北部の肉用牛一貫農場において国内で初めて牛の流産胎子からBTVが分離される事例が発生したので、その概要について報告する。

BTの国内での発生および流行状況

【発生状況】1994年に北関東3県(栃木、茨城、福島)においてめん羊・牛で初発、その後、国内で3例の発生
発熱、食欲減退、嚥下障害等を認めたが流産なし

【抗体調査】1974年の牛保存血清で抗体を確認(血清型1, 12, 20)以降、おとり牛調査で頻繁に抗体陽転

【BTV分離】1989年に沖縄本島おとり牛から初めて分離(血清型21)現在までに栃木県、中国・九州地域のめん羊・牛・ヌカカから6つの血清型が分離(血清型2, 3, 9, 12, 16, 21)

沖縄県では過去のおとり牛調査で頻繁に抗体陽転を認め、複数回BTVが分離されてきたが、これまでにBT発生なし

図2 BTの国内での発生および流行状況

【農場概要と発生状況】

発生農場は沖縄本島北部の肉用牛一貫農場で、牛57頭、山羊2頭を飼養し、県内から育成牛を導入していた。ワクチンはアカバネ病単味生ワクチンのみの接種であった。2017年7月17日、母牛1頭が流産し、胎齢約5カ月の胎子に体形異常はなかった。当該母牛は1歳5カ月齢で、前年11月に導入され今回が初回の妊娠であった。原因究明を目的として、同日、流産胎子、当該母牛および同居牛について病性鑑定を実施した(図3)。

ブルータング (BT)

【原因】ブルータングウイルス (BTV)
レオウイルス科オルビウイルス属
ヌカカによって媒介されるアルポウイルス
温帯～熱帯に広く分布
27の血清型

届出伝染病
OIEリスト疾病

【宿主】めん羊、牛、山羊などの反芻動物
めん羊で感受性が高く、牛では不顕性感染が多い

【症状】発熱、鼻汁漏出、口腔・鼻粘膜・舌
のチアノーゼ、腫脹、潰瘍が主徴
※諸外国では、流早死産や大脳欠損の
報告あり

口蹄疫、イバラキ病との類症鑑別が重要

図1 ブルータング(BT)

農場概要と発生状況

【所在地】沖縄本島北部
【飼養形態】肉用牛一貫
【飼養頭数】牛57頭(母牛20, 育成9, 子牛14, 肥育14)、山羊2頭
【導入状況】沖縄県内より育成牛を導入
【ワクチン】アカバネ病単味生ワクチンのみ
【接種状況】
【発生状況】2017年7月17日に母牛1頭が流産
流産胎子は胎齢146日(約5カ月)、体形異常なし
母牛は1歳半、前年11月に沖縄本島内より導入
2月の人工授精により今回が初回の妊娠
同居牛、山羊に異常はなく、続発もなし

流産胎子、当該母牛・同居牛について病性鑑定を実施

図3 農場概要と発生状況

3.抗体検査:アカバネ、アイノ、チュウザン、イバラキ、ピートン、シャモンダウイルスおよび BVDV に対する抗体の有意上昇はなかった。分離株(BTV)を用いた中和試験の結果、当該母牛において、明瞭ではなかったものの、抗体の上昇が確認された(前血清 4 倍、後血清 16 倍)。なお、胎子体液の抗体は 2 倍未満であった。

4.一般細菌検査:有意菌の分離は陰性であった。

5.病理組織学的検査:特記所見はみられなかった。

以上の病性鑑定検査結果から、BTV 以外の他の病原体の関与や疾病を疑う所見はなく、本事例を BTV による流産と診断した(図 8)。

病性鑑定結果：抗体検査

◆アルボウイルス及びBVDV (I, II 型)
→当該母牛の抗体の有意上昇なし、胎子体液抗体陰性

◆分離株(BTV)
→当該母牛で抗体上昇
胎子体液抗体陰性

	生年月日	産歴	分離株(BTV)	
			pre	post
当該母牛	H28.1.28	1産	4	16
同居牛①	H28.2.16	未経産	64	NT
同居牛②	H28.4.11	未経産	16	NT
同居牛③	H28.5.29	未経産	8	NT
※細菌検査で有意菌分離(-) 病理組織学的な特記所見なし	脳脊髄液	-	<2	NT
	胸水	-	<2	NT
	尿水	-	<2	NT

BTV以外の他の病原体の関与や疾病を疑う所見なし

▶▶▶ 本事例をBTVによる流産と診断

図 8 病性鑑定結果:抗体検査

【遺伝子解析:材料および方法】

同居牛 EDTA 加血液および胎子臓器由来分離株から得られた RNA を用い、BTV 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、BTV ゲノム分節 2 を標的とした FLAC 法(Full-length Amplification of c-DNAs) (Maan et al) およびダイレクトシーケンス法によって遺伝子解析を実施した。

BTV ゲノムは 10 分節からなる 2 本鎖 RNA で構成されており、内殻コア蛋白 VP3 をコードする BTV ゲノム分節 3 の解析によって地理的由来を知ることができ、外殻コア蛋白(中和抗原)VP2 をコードする BTV ゲノム分節 2 の解析によって血清型を決定することができる(図 9)。

【遺伝子解析結果】

BTV ゲノム分節 3 の部分配列(520 塩基)について相同性検索を実施した結果、分離株はアジア・オセアニア地域に分布している BTV の一部で、2001~2002 年に九州で分離された株(血清型 16)と近縁(相同性 99.42%)であることが判明した(図 10)。

遺伝子解析：材料および方法

【材料】
胎子臓器由来分離株および同居牛 EDTA 加血液から得られた RNA

【方法】
1. BTVゲノム分節 3 (内殻コア蛋白VP3をコード) を標的としたRT-PCR法とダイレクトシーケンス法
2. BTVゲノム分節 2 (血清型特異中和抗原VP2をコード) を標的としたFLAC法(Maan et al)とダイレクトシーケンス法

10分節
2本鎖
RNA

内殻コア蛋白
VP3 → 地域性を反映
(地理的由来)

外殻コア蛋白
(中和抗原)
VP2 → 血清型特異的
(血清型を決定)

図 9 遺伝子解析:材料および方法

遺伝子解析結果；ゲノム分節 3 (地理的由来)

分分離株は
アジア・オセアニア
地域に分布している
BTVの一部

2001~2002年の
九州分離株と近縁
(相同性99.42%)

今回の供試検体：赤(矢印)
過去の国内分離株または
検出検体：青

図 10 遺伝子解析結果:ゲノム分節 3

遺伝子解析結果；ゲノム分節 2 (血清型)

分分離株は血清型 1
(BTV-1) と判明

2008年のBTV-1インド
分離株と最も近縁
(相同性96.19%)

BTV-1の分離は、
日本国内では初
インド、オーストラ
リア、欧州、アフリ
カ等では多数あり

今回の分離株：赤(矢印)
過去の国内分離株：青

図 11 遺伝子解析結果:ゲノム分節 2

また、BTV ゲノム分節 2 の部分配列(576 塩基)について相同性検索を実施した結果、分離株は BTV 血清型1(以下 BTV-1)で、2008 年にインドで分離された株に最も近縁(相同性 96.19%)であることが判明した。BTV-1 の分離は、インド、オーストラリア、欧州、アフリカ等では多数報告されているが、日本国内では初めての確認であった(図 11)。

【BTV 農場浸潤状況調査】

病性鑑定検査の結果を受け、流産発生時から約 4 週間後に、農場で飼養する牛 25 頭および山羊 2 頭の EDTA 加血液、ヘパリン加血液、血清を用いて、病性鑑定検査時と同様の方法で BTV 遺伝子検査、ウイルス分離、分離株 (BTV-1) に対する中和試験を実施した。その結果、BTV 特異遺伝子は検出されず、ウイルス分離も陰性であった。農場の BTV-1 抗体保有率は 89% と高いものであったが、抗体価は 2 倍から 64 倍で、GM 値は 11 倍であった (図 12)。

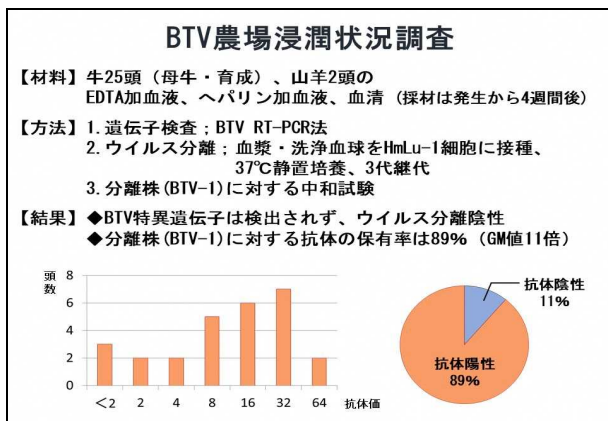


図 12 BTV 農場浸潤状況調査

【おとり子牛調査】

沖縄県内への BTV-1 侵入状況を把握することを目的とし、県内で飼養されている母牛 85 頭とその産子 (未越夏子牛 5,7,9,11 月採材) 339 頭 (延べ) のヘパリン加血液および血清を用いて、病性鑑定検査時と同様の方法でウイルス分離と分離株 (BTV-1) に対する中和試験を実施した。その結果、母牛およびおとり子牛ともにウイルス分離は陰性であった。また母牛の抗体保有率は 86.7~100% と高く、おとり子牛の抗体陽転率は 43.5% で、八重山地域を除き、おもに 7 月にかけて抗体が陽転していることが判明した。陽転した子牛の抗体価は 16~128 倍で、異常産を起こした母牛と同様、感染抗体としてはピーク値が低い傾向がみられた (図 13)。

【まとめ】

2017 年 7 月 17 日、沖縄本島北部の肉用牛一貫農場において牛の流産が発生した。流産胎子臓器乳剤、母牛の洗浄血球より BTV が分離され、牛の流産胎子から BTV が分離された国内初の事例であった。

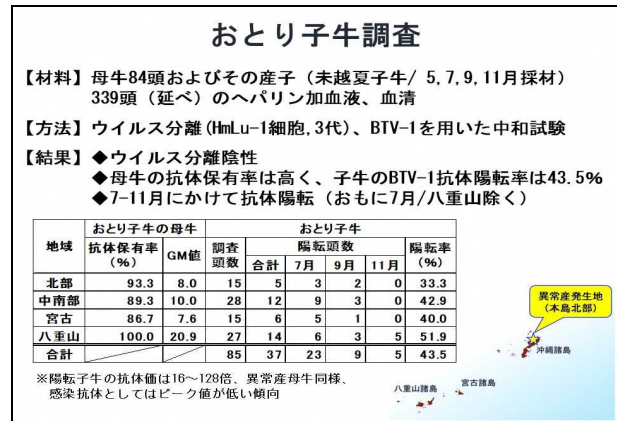


図 13 おとり子牛調査

遺伝子解析の結果、分離株はアジア・オセアニア地域由来で、2001~2002 年の九州分離株と近縁 (相同 99.42%) であった。また、血清型 1 と判明し、2008 年のインド分離株と近縁 (相同性 96.19%) であった。国内では、これまでに 6 つの血清型 (2,3,9,12,16,21) が分離されているが、血清型 1 の分離は本事例がはじめてとなる。

分離株 (BTV-1) を用いた中和試験では、当該母牛において明瞭ではなかったものの、抗体上昇が確認された。農場の抗体保有率は 89% と高く、GM 値は 11 倍であった。また、おとり子牛調査の結果、ウイルス分離は陰性、BTV-1 抗体陽転率は 43.5% で、おもに 7 月にかけて抗体の陽転が認められた。陽転子牛の抗体価は 16~128 倍で、感染抗体としてはピーク値が低い傾向がみられた。

【考察】

沖縄県では、1974 年以降、おとり子牛調査で頻繁に抗体陽転を認め、複数回 BTV が分離されてきたが BT の発生はなく、今回が BT を疑う初めての事例であった。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、胎子からの BTV 分離は BTV が流産に関与したことを強く示唆するものと思われる。

BT は主にめん羊の疾病であり牛では不顕性感染が多いとされている。しかしながら今回、国内で初めて牛の流産胎子から BTV が分離され、牛異常産との関与が強く示唆されたことから、沖縄県を含む国内での BT 発生に注意が必要であると考えている。幸いにも大きな流行はみられていないが、今後も分離株の病原性等の性状解析、BTV 侵入およびまん延状況の把握とともに、異常産等の病性鑑定における BTV 検索は必要と思われる。

また、沖縄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、国内疾病侵入リスクを測るうえでも、引き続き BTV 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と考えている。

【謝辞】

分離株の同定、解析ならびに発表に際し多大なるご助言を賜りました動物衛生研究部門・九州研究拠点の白藤浩明先生、梁瀬徹先生に深謝いたします。

【参考文献】

- 1) Erasmus, B. J. : Virus Infection of Ruminants, (dinterz et, al eds.), Elsevier Amsterda : 227-237(1990)
- 2) 後藤義之 : 羊のブルータング, 獣医感染症カラーアトラス(第2版) : 367-368
- 3) 岩根浄子ら: 日獣会誌, 62 : 451-456(2009)
- 4) 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)
- 5) Miura, Y., Goto, Y., Kubo, M. et al. : Am. J. Vet. Res. 49 : 2022-2025(1988)
- 6) Miura, Y., Inaba, Y., Hayashi, S. et al. : Vet. Microbiol. 5 : 277-282(1980)
- 7) Miura, Y., Inaba, Y., tsuda, T. et al. : Seroepizootiological survey on blue tangué virus infection in cattle in Japan, Natl. Inst. Anim. Health Q(tokyo), 22 : 154-158(1982)
- 8) Miura, Y., Miyazato, S., Kubo, M. et al. : Jpn. J. Vet. Sci, 50 : 942-945(1988)
- 9) 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)
- 10) Peters, M. et al. : Dtsch Tierarztl Wochenshr Aug. 115(8) : 298-303(2008)
- 11) 白藤ほか: ブルータングウイルス国内分離株の血清型別と遺伝子解析, 第147回日本獣医学会学術集会(栃木), ポスター要旨(2009)
- 12) 白藤ほか : 遺伝子解析によるブルータングウイルス日本国内分離株の血清型同定, 動衛研研究報告, 119 : 57-63(2014)

13) 高吉ら: 沖縄県におけるブルータングウイルスの分離と抗体調査, 日獣会誌, 47 : 651-654(1994)

14) Vilcek, S. et al. : Pestiviruses isolated from pigs, cattle sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis, Arch. Virol, 136 : 309-323(1994)

15) Wouda, W. et al. : Tijdschr Diergeneeskd, May. 15, 134(10) : 422-427(2009)