

第 二 部

5. シャモンダウイルスの関与が疑われる牛異常産事例

八重山家畜保健衛生所

○泉 里奈 高桑 悠子ほか

家畜衛生試験場

奥村 尚子 銘苅 裕二ほか

シャモンダウイルス(SHAV)は、アルボウイルスの1種で、オルソブニヤウイルス属旧シンプ血清群に属する。2002年に南九州のヌカカや牛から国内で初めて分離され、2003年に宮崎および鹿児島で発生した牛異常産への関与が疑われている。2015年12月から翌年3月にかけてSHAVの関与を疑う異常産事例が九州地方で多数発生した。その病原性と異常産への関与は十分に解明されていない。今回、管内でSHAVの関与が疑われる牛異常産事例に遭遇したので、概要を報告する。

【発生概要】2020年2月5日に、石垣市内の肉用牛20頭を飼養する繁殖農場にて、体形異常を伴う異常産が発生した。胎齢約279日齢の雄で死産であった。母牛は初産で、異常産ワクチン未接種だった。(図1)

症例概要

- 繁殖農場 石垣市内
成雌10頭、未経産2頭、育成牛3頭、子牛5頭 計20頭
- 個体情報
黒毛和種、死産胎子、頭尾長からの推定胎齢は8~9カ月齢
AI日からの換算では279日齢
- 当該母牛情報
初産、予定日は2月11日、異常産ワクチン未接種
- 経過
2019年5月2日 人工授精
2020年2月4日 PM 産気付く
2020年2月5日 AM 牽引、娩出、死産

図1 症例概要

【材料と方法】(1)死産胎子の病理解剖を行い、主要臓器等について定法に従い、病理組織学的検査、(2)ウイルス学的検査(RT-PCR検査、抗体検査、ウイルス分離)を実施した。(3)アルボウイルスサーベイランスにて、2019年5月から11月にかけて管内肉用牛繁殖農場(10戸28頭)について採血を行い、牛流行熱・イバラキ・アカバネ・チ

ュウザン・アイノ・ピートン・シャモンダウイルスの抗体検査およびウイルス分離を実施した。

【結果】(1)剖検所見では、前肢の拘縮や頸部~胸部の脊柱湾曲、下顎骨の癒合不全等が認められ、脳はほぼ欠損し延髄の一部が残存していた。(図2、3、4)

死産胎子の外貌



図2 死産胎子の外貌

剖検所見(脊柱)

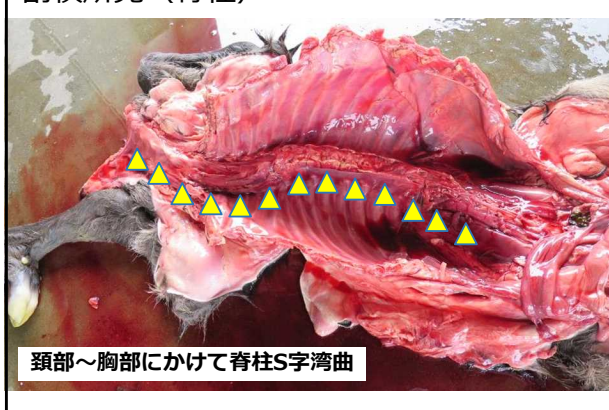


図3 剖検所見(脊柱)

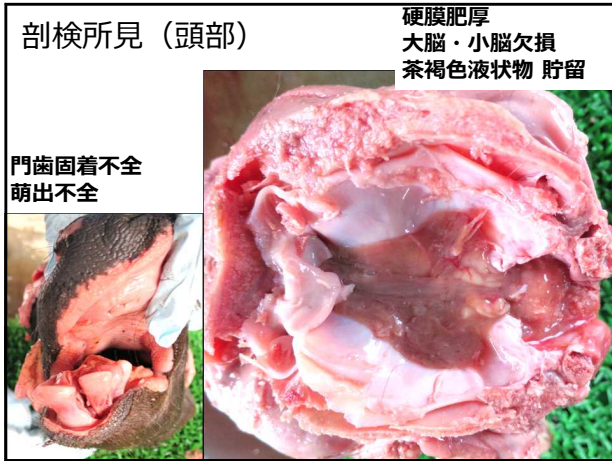


図4 剖検所見(頭部)

病理組織学的検査では、頸髄から胸髄において灰白質の大型神経細胞の減数を認め、クリューバー・バレラ染色を実施したところ、白質の髄鞘形成不全がみられた。抗SHAV抗体による免疫組織化学染色において、SHAV抗原は検出されなかった。(図5、6、7)骨格筋では筋線維の矮小化、低形成を認めたが、脂肪置換はみられなかった。



図5 胸髄腹角のHE染色像

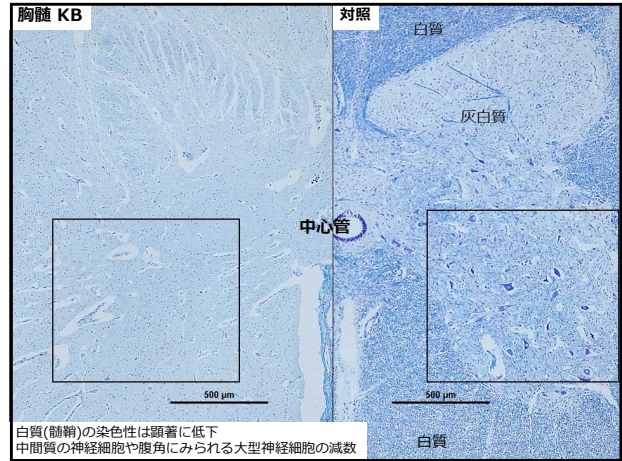


図6 胸髄のKB染色像

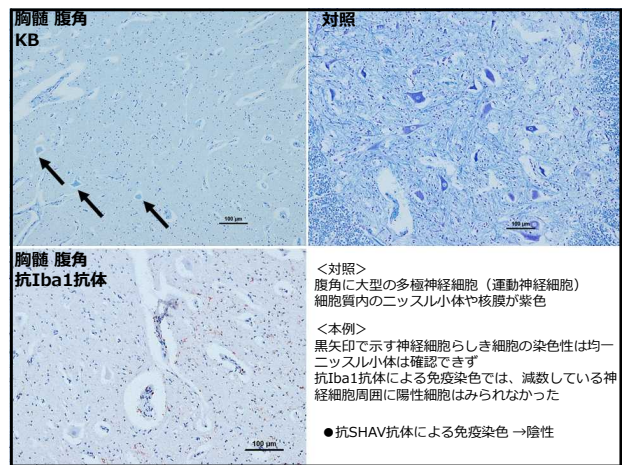


図7 胸髄腹角のKB染色像と抗Iba1抗体を用いた免疫染色像

(2)ウイルス学的検査では、RT-PCR検査で延髄から旧シンプ血清群に特異的な遺伝子が検出されたが、ウイルスは分離されなかった。(図9、10)

病原検索	
<ul style="list-style-type: none"> 細菌検査 <ul style="list-style-type: none"> 心、肺、肝臓、腎臓から <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (ID 99.8%) 肝臓、腎臓 レプトスピラfla-B遺伝子PCR 陰性 	アカバネ(AKA)、アイノ(AINO)、ピーン(PEA)、シャモンダ(SHA)、サシュベリ(SAT)、チュウサン(CHU)、デアキユラ(DAG)、流行性出血病(EHD)、イバラキ(IKA)ブルータング(BT)
<ul style="list-style-type: none"> ウイルス学的検査 <ol style="list-style-type: none"> 1) 遺伝子検査：RT-PCR <ul style="list-style-type: none"> 材料：胎子脊髄、主要臓器、胎盤 母牛(および同居牛)EDTA血 旧シンプ血清群 (AKAV、AINOV、PEAV、SHAV等)、パリアムウイルス群 (CHUV、DAGV等)、EHDウイルス(血清型共通)、BTV、BVDVを含むベステウイルス 結果：胎子延髄 旧シンプ血清群陽性 遺伝子検査：RT-PCR <ul style="list-style-type: none"> 材料：胎子延髄 旧シンプ血清群識別(AKA、AINO、PEA、SHA、SAT) 結果：陰性 	
→旧シンプ血清群識別PCRにて陰性となったため 農研機構 動物衛生研究部門九州研究拠点へ検査依頼	

図9 ウイルス学的検査(遺伝子検査)

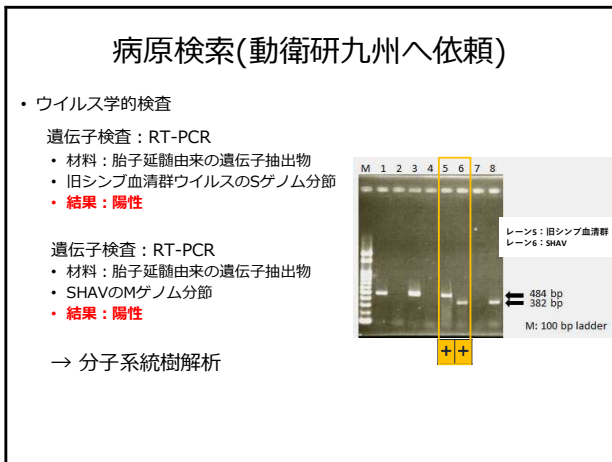


図10 ウイルス学的検査(遺伝子検査)

また、遺伝子解析の結果、2015年の鹿児島分離株と最も近縁であった(塩基配列相同性:Sゲノム分節99.32%、Mゲノム分節:100%)。(図11)

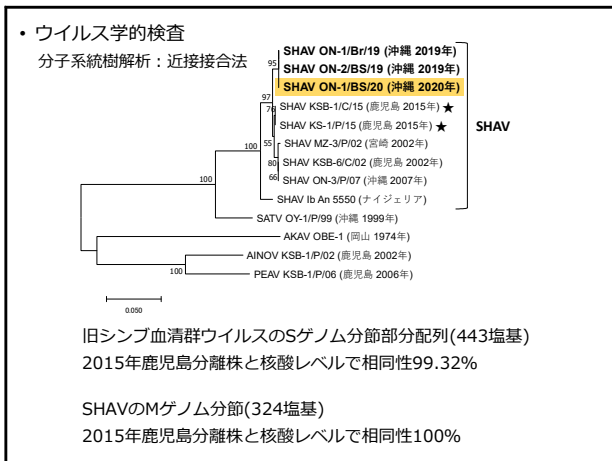


図11 分子系統樹解析

SHAV抗体検査では、当該母牛血清で256倍以上、胎子の脳脊髄液と腹水で4倍が確認された。(図12)

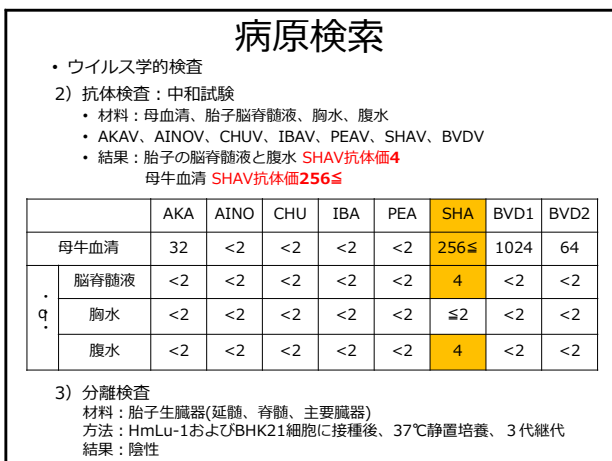


図12 ウイルス学的検査(抗体検査)

(3)アルボウイルスサーベイランスにて、2019年7月に1戸1頭、9月に6戸9頭、11月に1戸1頭のSHAV抗体の陽転が確認された。(図13)

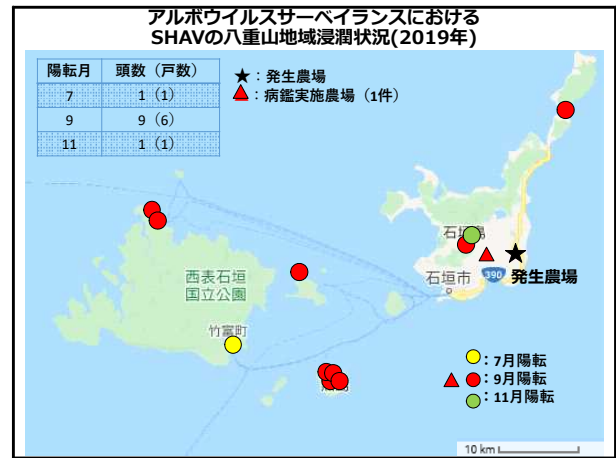


図13 SHAVの八重山地域浸潤状況(2019年)

【考察】

今回、死産胎子に体形異常や脊髄病変等を確認、SHAVに対する抗体および特異的な遺伝子が検出された。これらの結果とアルボウイルスサーベイランスで得られたSHAV抗体陽転の動向から、脊髄病変や脳欠損、体形異常へのSHAVの関与が疑われ、発生農場へのSHAV侵入時期は7月~9月、胎齢3カ月齢前後に感染したことが推察された。(図14)本例は既報のSHAVの関与を疑う異常産と異なり、脳欠損がみられた稀な例と考えられた。SHAVの病態や病原性についてはまだ解明されていない。今後、病態を把握するために症例数を集積し、侵入リスクを測る上でもアルボウイルス流行動態調査等による監視体制の維持が必要である。

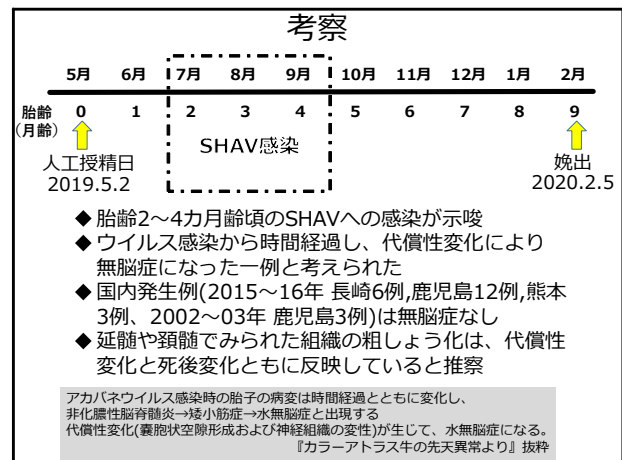


図14 考察

6. 沖縄県で発生した豚熱の病性鑑定の概要

家畜衛生試験場

○渡嘉敷 美波 石井 圭子

畜産課

高木 和香子

【はじめに】

2020年1月、沖縄県で豚熱(CSF)が33年ぶりに発生し(図1)、当场で疾病診断のための検査を実施したので、その概要について報告する。

発生概要			
2020年1月、本県で豚熱が33年ぶりに発生			
【初発農場概要】			
所在地：沖縄県うるま市			
通報日：2020年1月6日			
飼養形態：肥育農場(飼養頭数：422頭)			
稟告：12月20日以降で肥育豚が50頭死亡			
【続発農場概要】			
	通報日	飼養形態	備考
2例目	1/8	一貫	1例目に隣接
3例目	1/8	一貫	発生状況確認検査で摘発
4例目	1/14	肥育	異常豚通報
5例目	2/1	肥育	異常豚通報
6例目	2/24	肥育	異常豚通報
7例目	3/10	肥育	6例目に隣接

図1 発生概要

【材料と方法】

防疫指針に基づき、異常豚通報時の病性鑑定、発生農場疫学調査、発生状況/清浄性確認検査、疫学関連監視、制限区域出荷豚検査、野生イノシシ調査において、その目的に応じ延べ7,541検体、環境材料448検体を定法に従って実施した(図2)。

材料		
I 材料 (2020年1月~4月)		
目的	検査内容	検体数
異常豚通報時の病性鑑定	血球数測定、PCR、ELISA、FA	893
殺処分前検査	血球数測定、PCR、ELISA	753
発生農場疫学調査・疫学関連監視	血球数測定、PCR、ELISA	680
発生状況検査	血球数測定、PCR、ELISA	2721
清浄性確認検査	血球数測定、PCR、ELISA	2006
制限区域出荷豚検査	PCR	454
野生イノシシ調査	PCR	34

図2 材料 検査目的と検査内容

1. 検査体制：検体は農場から当场へ直接搬入され、

車両消毒、検体受取、検体処理、各種検査は担当専従で行い、バイオセキュリティを考慮した動線の確保を徹底した(図3、図4)。

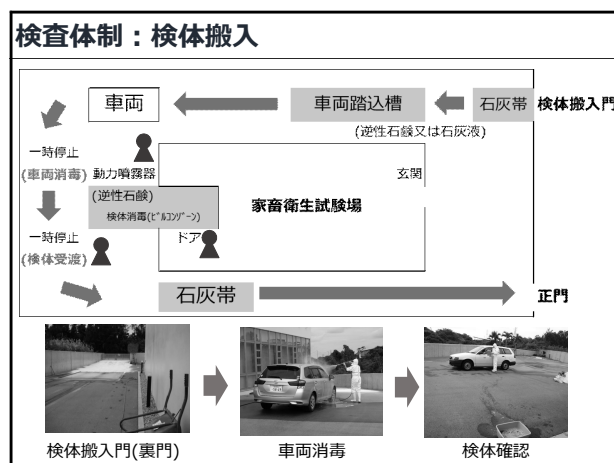


図3 検査体制 検体搬入

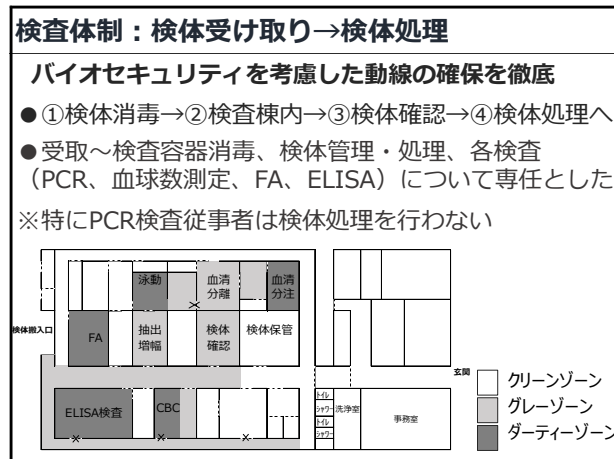


図4 検査体制 検体受け取りと検体処理

2. 血球数測定：EDTA 加血液を用い実施(白血球(WBC)1万個/ μ 1以下を陽性)。
3. 遺伝子検査：血清、臓器(扁桃、脾、腎)、環境材料を用い遺伝子抽出、ペスチウイルス RT-PCR、RFLP解析(*Bgl*1、*Pst*1)、アフリカ豚熱(ASFV)PCRを実施。
4. 蛍光抗体法(FA)：扁桃を用い実施。
5. 抗体検査：非働化血清を用いCSF-ELISAを実施。
2. 遺伝子解析(動衛研実施)：5' UTR 領域(150

bp)について実施。

材料と方法

II 方法

- 1.血球数測定**：EDTA加血液
全自動血球計数器、**白血球(WBC)1万個/μl以下を陽性**
- 2.遺伝子検査**：血清、臓器(扁桃、脾、腎)、環境材料
①ベスチウイルスRT-PCR
②RFLP解析(Bg/1、Pst1)
③アフリカ豚熱(ASFV)PCR
- 3.蛍光抗体法(FA)**：扁桃
豚コレラ診断用蛍光抗体/京都微研
- 4.抗体検査**：非働化血清
豚コレラエライザキット/ニッポンジーン
- 5.遺伝子解析(動衛研実施)**：発生農場由来株
5'UTR領域(150 bp)

図5 検査方法

【結果】

各発生農場の病性鑑定結果(病鑑受付日、飼養形態、摘発頭数/検査頭数)は、1例目(1月6日、肥育、6/10)、2例目(1月8日、一貫、6/45)、3例目(1月8日、一貫、8/51)、4例目(1月14日、肥育、5/15)、5例目(2月1日、肥育、25/31)、6例目(2月24日、肥育、7/30)、7例目(3月10日、肥育、10/60)であった。発生農場7戸の陽性率は、異常豚病性鑑定でWBC数0~53.8%、血清PCR15.7~80.6%、臓器PCR16.7~100%、FA0~100%、ELISA3.9~53.3%、発生農場疫学調査で血清PCR6.1~85%、環境PCR0~26%、ELISA0~30%であった(図6~12)。

結果：病性鑑定

●1例目
農場概要

飼養形態	肥育
飼養頭数	422頭

経緯
11月下旬 食欲不振・死亡頭数が増加
12月20日 抗生物質による治療開始
1月6日 家保へ通報
1月8日 疑似患畜確定

陽性数/検査数(陽性率)
※ELISAは疑陽性を含む

- 1.血球数測定**
病性鑑定 1/10(10%)
殺処分前 8/40(20%)
- 2.CSF-PCR**
病性鑑定 血清 6/10(60%)
臓器 1/1(100%)
殺処分前 68/80(85%)
環境材料 13/50(26%)
- 3.FA** 1/1(100%)
- 4.CSF-ELISA**
病性鑑定 5/10(50%)
殺処分前 24/80(30%)

通報の遅れによる高い農場内浸潤率

図6 病性鑑定結果 1例目

●2例目
農場概要

飼養形態	一貫
飼養頭数	874頭

経緯
12月下旬 死亡頭数が増加
1月7日 1例目陽性による病性鑑定→陽性
1月8日 疑似患畜確定

陽性数/検査数(陽性率)
※ELISAは疑陽性を含む

- 1.血球数測定**
病性鑑定 5/22(22.7%)
殺処分前 NT
- 2.CSF-PCR**
病性鑑定 血清 6/45(13.3%)
臓器 9/9(100%)
殺処分前 NT
環境材料 1/50(2%)
- 3.FA** 0/1(0%)
- 4.CSF-ELISA**
病性鑑定 3/31(9.7%)
殺処分前 NT

1例目と比較すると検査陽性率は低い

図7 病性鑑定結果 2例目

●3例目
農場概要

飼養形態	一貫
飼養頭数	3,012頭

経緯
1月8日 1例目発生状況確認検査→陽性
1月9日 病性鑑定
1月10日 疑似患畜確定

陽性数/検査数(陽性率)
※ELISAは疑陽性を含む

- 1.血球数測定**
病性鑑定 10/45(22.2%)
殺処分前 0/26(0%)
- 2.CSF-PCR**
病性鑑定 血清 8/51(15.7%)
臓器 9/9(100%)
殺処分前 2/33(6.1%)
環境材料 3/50(6%)
- 3.FA** 3/3(100%)
- 4.CSF-ELISA**
病性鑑定 2/51(3.9%)
殺処分前 0/36(0%)

一部の離乳豚房と分娩舎のみで陽性

図8 病性鑑定結果 3例目

●4例目
農場概要

飼養形態	肥育
飼養頭数	1,717頭

経緯
1月8日 1例目発生状況確認検査→陰性
1月14日 異常豚通報(起立不能)
1月15日 疑似患畜確定

陽性数/検査数(陽性率)
※ELISAは疑陽性を含む

- 1.血球数測定**
病性鑑定 3/13(23.1%)
殺処分前 8/40(20%)
- 2.CSF-PCR**
病性鑑定 血清 5/15(33.3%)
臓器 5/6(83.3%)
殺処分前 15/50(30%)
環境材料 0/50(0%)
- 3.FA** 2/2(100%)
- 4.CSF-ELISA**
病性鑑定 8/15(53.3%)
殺処分前 5/50(10%)

全豚舎で陽性

図9 病性鑑定結果 4例目

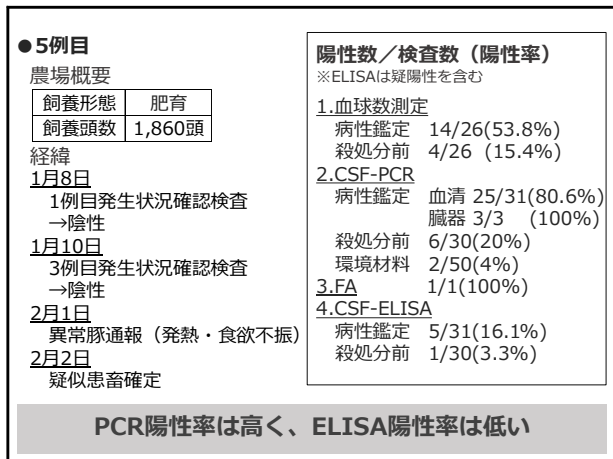


図 10 病性鑑定結果 5 例目

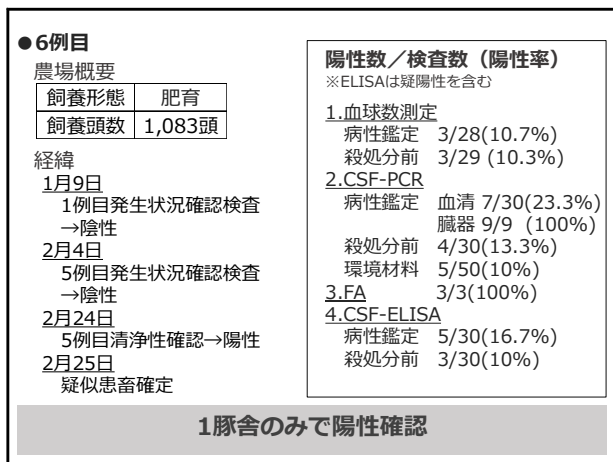


図 11 病性鑑定結果 6 例目

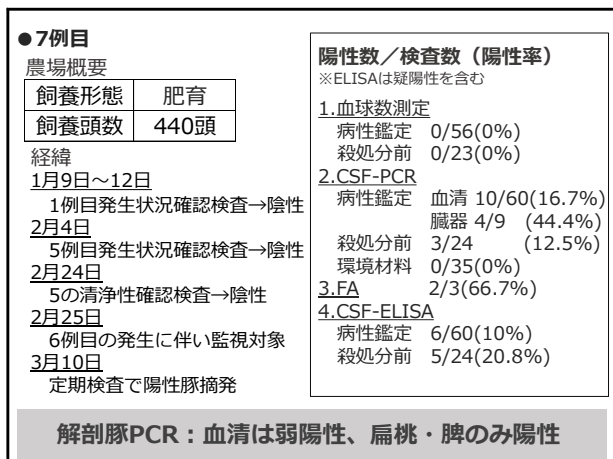


図 12 病性鑑定結果 7 例目

発生状況／清浄性確認検査では、一部農場でPCR、ELISA で陽性または疑陽性が確認されたが、再検査で総合的に判断し豚熱を否定した(図 13)。うち 1 戸で牛ウイルス性下痢 (BVD) I 型持続感染豚が摘発された事例があった(図 14)。

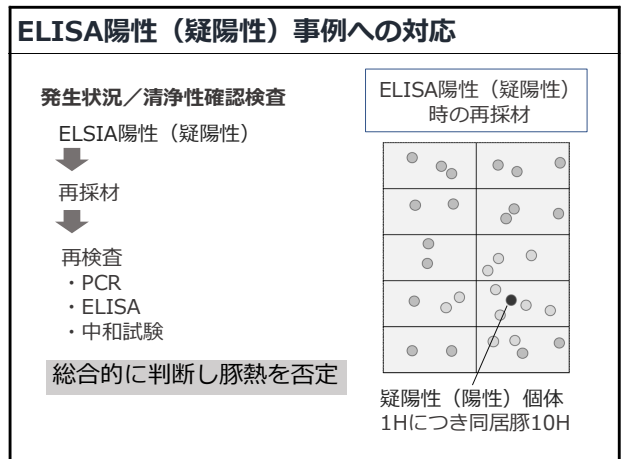


図 13 ELISA 陽性(疑陽性)事例への対応

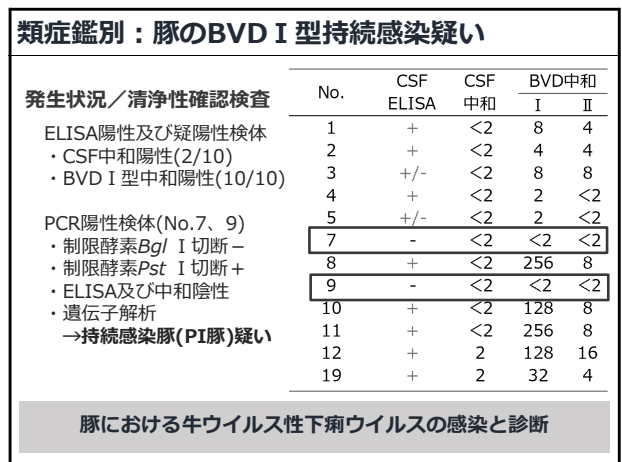


図 14 豚の BVD I 型持続感染疑い

出荷豚とイノシシは全て PCR 陰性を確認した。また、遺伝子解析の結果、沖縄分離株は 2019 年の岐阜県野生イノシシ分離株と近縁であった(図 15)。

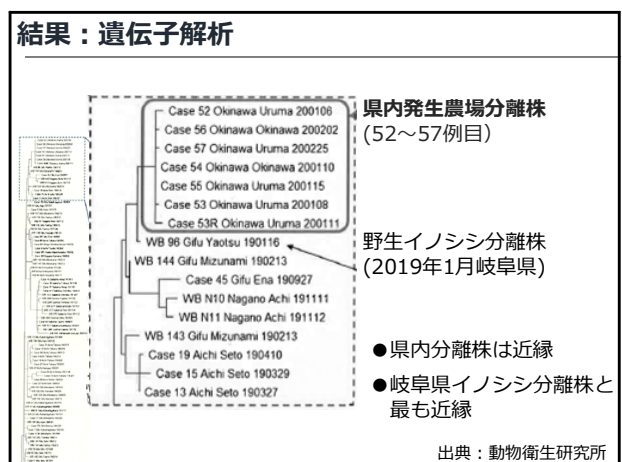


図 15 遺伝子解析結果

【まとめと考察】

一貫農場では肥育農場と比較して検査陽性率が低かったことから、侵入時期や飼養形態等が関与して農場内ウイルス浸潤状況は様々であり、確認検査において、農場全体からサンプリングする重要性が示された。発生農場のうち 6 戸では各検査において明瞭な陽性反応を示したが、重点監視定期検査で摘発された 7 例目の解剖豚 PCR のうち 1 頭で血清弱陽性、扁桃・脾臓陽性となり、疑似患畜の確定には解剖豚の臓器 PCR が必要であることが分かった(図 16)。

まとめと考察①
<ul style="list-style-type: none">●一貫農場では比較的検査陽性率が低い<ul style="list-style-type: none">→飼養形態によるウイルス浸潤状況の違いがある→農場全体からサンプリングし検査することが重要●発生農場のうち6戸では各検査において明瞭な陽性反応●7例目の解剖豚PCRのうち1頭で血清弱陽性、扁桃・脾臓陽性<ul style="list-style-type: none">→疑似患畜確定には解剖豚の臓器PCRが必要

図 16 まとめと考察①

発生状況／清浄性確認検査では、ELISA 検査において陽性、疑陽性の非特異反応がしばしば確認された。一部農場で CSF と交差する BVD 感染豚が病性鑑定の妨げとなったことから、検査結果を総合的に判断することの重要性を再認識した。また、制限区域内出荷豚と野生イノシシは全て PCR 陰性であり、発生期間中の野生イノシシへの感染はなく、本県のウイルス侵入はうるま市と沖縄市に限局していたと示唆された。今回の検査においては、バイオセキュリティを考慮した検査体制の整備によりウイルスの施設内汚染防止が図られ、迅速かつ的確な診断に繋がった(図 17)。

病性鑑定：まとめと考察②
<ul style="list-style-type: none">●ELISA検査の非特異反応（陽性・疑陽性）●豚熱のPCR及びELISA検査はBVDと交差<ul style="list-style-type: none">→検査結果を総合的に判断することが重要●制限区域出荷豚検査454頭は全てPCR陰性●野生イノシシ検査34頭は全てPCR陰性<ul style="list-style-type: none">→野生イノシシへの感染なし→ウイルス侵入はうるま市・沖縄市に限局●バイオセキュリティを考慮した動線と作業を徹底<ul style="list-style-type: none">→良好な検査体制を構築できた

図 17 まとめと考察②