

# 10 ディアギョラウイルスの関与を疑う牛異常産の発生ならびに県内分離株の分子疫学的考察

中央家畜保健衛生所

酒井 芳子・鈴木 史子

ディアギョラウイルスはレオウイルス科オルビウイルス属のウイルスで、パリアムウイルス群に分類される。パリアムウイルス群にはチュウザン病の原因であるチュウザンウイルスも存在し、血清学的に若干の中和交差性を示すことが確認されている<sup>1)</sup>。

本ウイルスはヌカカによって媒介されるアルボウイルスの一種であり、過去には2001年から2002年にかけて本県を含む九州地方で本ウイルスの流行および関与を疑う牛異常産が複数確認されている<sup>2、3、4、5)</sup>。

今回、本県において17年ぶりに本ウイルスの関与を疑う牛異常産が確認されたとともに、アルボウイルス動態調査において県下で本ウイルスの流行が確認され、おとり牛から分離されたDAGVについて血清学および分子学的調査を行った結果、若干の知見が得られたのでその概要を報告する。

## 1 異常産の発生状況

症例1の発生は2019年2月、黒毛和種繁殖農場における死産で、子牛には眼球混濁が認められた。症例2の発生は同年3月、10日齢の黒毛和種子牛が出生時より起立不能や盲目、神経症状を呈した。症例3の発生は同年2月、ホルスタイン種の子牛1頭が起立異常、旋回、盲目を呈し、33日齢で病性鑑定が実施された。なお、症例1および2の母牛には異常産4種混合ワクチンが接種されており、症例3の母牛は異常産ワクチン未接種であった(表-1)。

表-1 異常産の発生状況

	家保	品種	胎齢/日齢	発生状況	母牛産歴/異常産ワクチン
症例1	中央	黒毛和種	胎齢256日	・2019年2月15日死産 ・眼球混濁	2産目/ 4種混合
症例2	県南	黒毛和種	10日齢	・2019年3月9日出生 ・出生時より起立不能、盲目、斜視、舌の突出を呈す ・3月19日病性鑑定 ・初乳製剤摂取済み	3産目/ 4種混合
症例3	県南	ホルスタイン種	33日齢	・2019年2月15日出生 ・生後2週目ごろ起立異常、旋回、盲目に気付く ・3月20日病性鑑定 ・初乳摂取済み	3産目/ なし

## 2 材料および方法

### 1) 病性鑑定

各異常産子の臓器・器官、体液、胎盤、母子および同居牛血清を用いて、解剖、病理組織学的、細菌学およびウイルス学的検査を実施した。病理組織学的検査では定法に従いHE染色を実施した。細菌学的検査は定法に従って分離検査を実施した。ウイルス分離検査はHmLu-1およびBHK21細胞に接種後、37℃静置培養で3代継代を実施した。ウイルス遺伝子検査では、旧シンプ血清群、パリアムウイルス群、ブルータンク、伝染性出血熱(EHD)および牛ウイルス性下痢(BVD)ウイルスの特異遺伝子を検出するRT-PCRを実施した。ウイルス抗体検査では、アカバネ(AKA)、アイノ(AIN)、ピートン(PEA)、チュウザン(CHU)、イバラキ(IBA)、DAG、シャモンダ(SHA)、牛ヘルペスウイルス1型(BHV1)およびBVDウイルスに対する中和試験を実施した。

### 2) アルボウイルス動態調査

調査対象は県内6地域22戸の未越夏牛75頭で、6月から11月にかけて採材された各材料につい

て、図-1に示す方法で抗体検査、分離および遺伝子検査を実施した。さらに、9月調査時に分離された3地域の分離株3株を用いて、パリアムウイルス群の血清型を規定する中和抗原 VP2をコードするゲノム分節2の塩基配列決定および分子系統樹解析を行い、分離ウイルスの同定および県内分離株の相同性確認、ならびに同時期に鹿児島県で分離された DAGV 株や過去の DAGV 株との相同性比較を行った（図-2）。

調査対象：県内6地域22戸の未越夏牛75頭  
採材時期：6月下旬、8月中旬、9月下旬、11月中旬

■抗体検査

材料：血清  
方法：AKA,AIN,PEA,CHU,IBA,DAG,SHAVの中和試験

■分離および遺伝子検査

材料：血漿および洗浄血球（8月以降）  
方法：1. HmLu1細胞に接種後、37℃静置培養（3～4代継代）  
2. 牛異常産関連ウイルスのRT-PCR

図-1 アルボウイルス動態調査1

■分離株の遺伝子解析

材料：分離株 計3株

家保（牛No.）	株名
中央（中-1）	NS-1/E/18
県北（北-13）	NS-2/E/18
吉岐（吉-12）	NS-3/E/18

方法：中和抗原VP2をコードするゲノム分節2の塩基配列決定および分子系統樹解析

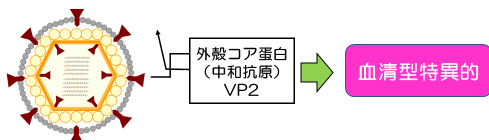


図-2 アルボウイルス動態調査2

3 検査成績

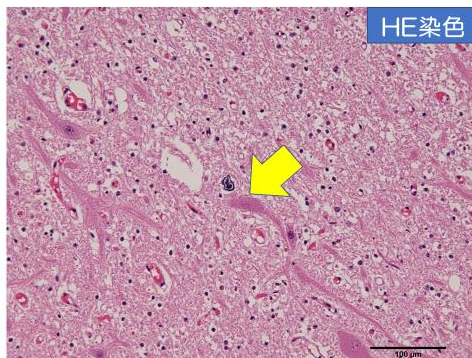
1) 病性鑑定成績

解剖所見：全症例に共通して大脳欠損が認められた。その他、症例1では眼球混濁と脳脊髄液増量、症例2ではリンパ節腫脹、症例3では脳脊髄液増量が認められた（表-2）。

表-2 解剖所見

	症例1	症例2	症例3
大脳欠損	○	○	○
眼球混濁	○		
脳脊髄液増量	○		○
リンパ節腫脹		○	

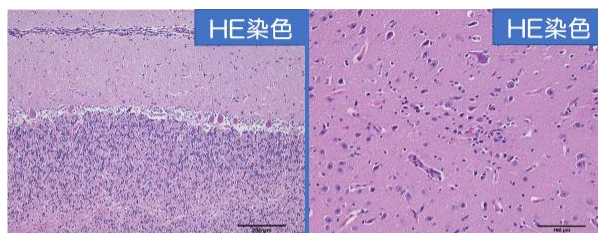
組織所見：症例1では、小脳髄質に石灰沈着が認められた（写真-1）。



小脳髄質に石灰沈着

写真-1 組織所見(症例1)

症例2では、小脳におけるプルキンエ細胞の変性・脱落および大脳線条体におけるグリア細胞の集簇が極わずかに認められた（写真-2）。



小脳におけるプルキンエ細胞の変性・脱落

大脳線条体におけるグリア細胞の集簇

写真-2 組織所見(症例2)

症例3では大脳線条体において神経食現象と石灰沈着が極わずかに認められ、間脳において石灰沈着が散見された（写真-3）。

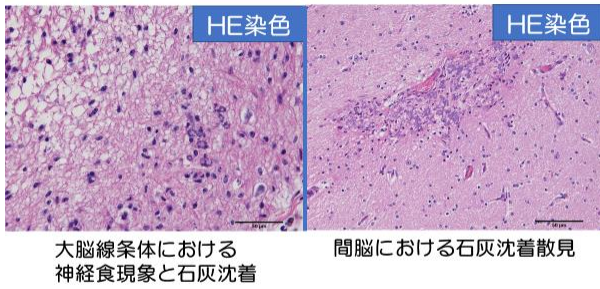


写真-3 組織所見(症例3)

細菌学的検査成績では全症例で菌分離陰性であった。

ウイルス学的検査ではウイルス分離および遺伝子検査全症例すべて陰性であった。

ウイルス抗体検査では、症例1において母牛血清および死産胎子体液中に DAGV および CHUV 抗体が検出され、DAGV 抗体のほうがより高い抗体価を示した。症例2および3では、農場内における DAGV の浸潤が確認された(表-3)。

以上の臨床所見および各種検査成績に加え、感染推定時期である9月と県内における DAGV 流行時期が一致することを踏まえ、3症例は DAGV の関与を疑う牛異常産と診断された。

表-3 ウイルス抗体検査成績

	検体	AKA	AIN	PEA	CHU	IBA	DAG	SHA	BHV 1	BVD 1	BVD 2
症例1	母牛血清	16	<2	32	16	<2	256	<2	<2	64	4
	子牛脳内髄液	<2	<2	<2	4	<2	64	<2	<2	<2	<2
	子牛胸水	<2	<2	<2	4	<2	32	<2	<2	<2	<2
症例2	母牛血清	32	8	<2	32	<2	256	<2	<2	16	8
	子牛血清※1	16	2	<2	4	<2	128	<2	<2	16	8
	同産牛①血清	16	128	<2	32	64	128	<2	<2	<2	<2
	同産牛②血清	4	2	32	16	<2	256	<2	<2	<2	<2
	同産牛③血清	16	8	128	16	<2	256	<2	<2	128	16
症例3	母牛血清	4	4	2	2	2	32	<2	<2	2	2
	子牛血清※2	4	2	2	2	2	8	<2	<2	2	2
	子牛脳内髄液	<2	<2	<2	<2	<2	4	<2	<2	<2	<2
	同産牛①血清	2	<2	<2	<2	2	4	<2	<2	2	2
	同産牛②血清	<2	<2	<2	<2	2	8	<2	<2	2	2
同産牛③血清	2	<2	<2	<2	2	4	<2	<2	2	2	
同産牛④血清	2	<2	<2	<2	2	8	<2	<2	2	2	

※1：初乳製剤摂取済、※2：初乳摂取済み

3症例をDAGVの関与を疑う牛異常産と診断

## 2) アルボウイルス動態調査

抗体検査成績：9月から11月にかけて、対馬を除く県下で DAGV の抗体陽転が確認され、その最終陽転率は 31.9% であった。また、11月調査時には DAGV 抗体陽転牛において CHUV の抗体陽転も認められたが、その抗体価は DAGV のものと比較して低かった(表-4)。

表-4 抗体検査成績

家保		8月 陽転率 (%)	9月 陽転率 (%)	11月 陽転率 (%)
中央	DAGV (KY115株)	0	33.3	80.0
	CHUV (C31株)	0	0	80.0
県北	DAGV	0	13.3	30.8
	CHUV	0	0	30.8
県南	DAGV	0	0	20.0
	CHUV	0	0	20.0
五島	DAGV	0	0	6.7
	CHUV	0	0	6.7
香岐	DAGV	0	16.7	25.0
	CHUV	0	0	25.0
対馬	DAGV	0	0	0
	CHUV	0	0	0
県全体	DAGV	12.2 (GM:1.2)	31.9 (GM:5.9)	
	CHUV	0 (GM:1.0)	31.9 (GM:2.6)	

遺伝子検査成績：血球および血漿を用いた RT-PCR の結果、スライドに黄色で示す4地域において、9月および11月採材の血球材料19検体から DAGV 特異遺伝子が検出された(表-5)。

表-5 遺伝子検査成績

家保	材料	DAGV 特異遺伝子	8月	9月	11月
中央	血球	+	0/15	8/15	5/15
県北	血球	+	0/14	2/14	0/14
県南		-	0/15	0/15	0/15
五島	血球	+	0/15	0/15	1/15
香岐	血球	+	0/12	2/12	1/12
対馬		-	0/3	0/3	0/2
県全体			0/74	12/74	7/73

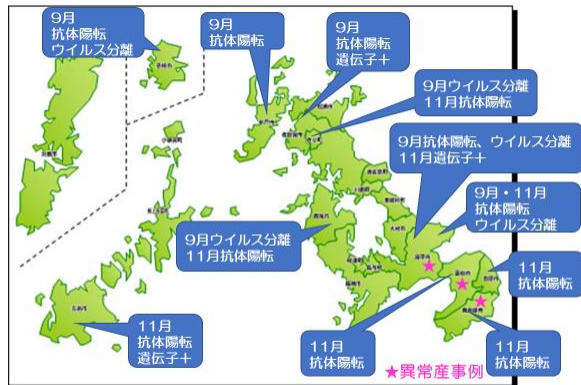
ウイルス分離成績：DAGV 特異遺伝子が検出された19検体のうちスライドに示す13検体については、ウイルス分離検査において、HmLu-1細胞接種の2代目に細胞変性効果が認められ、培養上清から DAGV 特異遺伝子が検出された。なお、農場1の2頭においては、9月と11月の両方でウイルスが分離された(表-6)。

表－6 ウイルス分離成績

農場 牛No.	採材月	飼養場所	材料	継代歴	株名	
1	中-1	9月および11月	諫早市	血球	HL2	NS-1/E/18
	中-3					
	中-4					
2	中-5	9月	諫早市	血球	HL2	
	中-6					
	中-7					
	中-8					
	中-9					
3	中-10	9月	西海市	血球	HL2	
4	北-13	9月	北松浦郡	血球	HL2	NS-2/E/18
5	香-12	9月	香崎市	血球	HL2	NS-3/E/18

HmLu-1細胞2代目の4～5日目に細胞変性効果（CPE）を確認  
培養上清からDAGV特異遺伝子を検出

図－3に、調査成績をもとにした DAGV 浸潤状況と、異常産事例のプロット図を示す。県下の広範囲で本ウイルスの流行が確認され、流行確認地域内の3か所において本ウイルスの関与を疑う牛異常産が確認された。



図－3 DAGV浸潤状況

遺伝子解析結果：分離株3株の塩基配列は完全に一致し、同じ由来のものであることが確認された。さらに、分離株と既知の DAGV 株との相同性をみた結果、分離株の塩基配列は同時期に鹿児島県において分離された株と 99.84%の相同性を示し、2001年の鹿児島分離株とは、塩基配列で 97.17%、アミノ酸配列で 99.52%の相同性を示した。以上の結果から、分離ウイルスは DAGV と同定された（表－7）。

表－7 遺伝子解析結果

■分離株3株の塩基配列比較

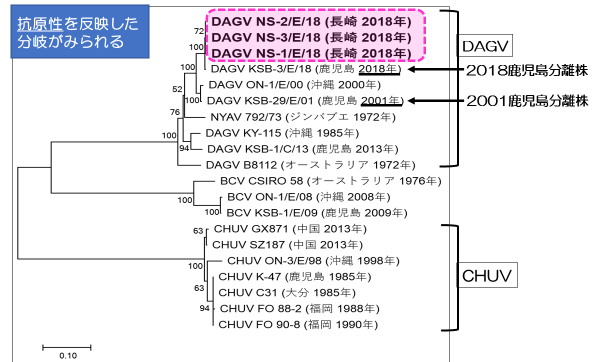
家保（牛No.）	株名
中央（中－1）	NS-1/E/18
県北（北－13）	NS-2/E/18
香岐（香－12）	NS-3/E/18

100%一致

■分離株と既知のDAGV株との相同性

株名	塩基配列 (%)	アミノ酸配列 (%)
KSB-3/E/18 (2018年 鹿児島分離株)	99.84	
KSB-29/E/01 (2001年 鹿児島分離株)	97.17	99.52

図－4に、分離株のゲノム分節2の部分配列に基づく分子系統樹を示す。この系統樹では、各ウイルス株の抗原性を反映した分岐をみることができる。分離ウイルスは2018年鹿児島分離株と最も近縁であり、次いで、2001年鹿児島分離株とも近縁であった。



図－4 分離株のゲノム分節2部分配列（638塩基）に基づく分子系統樹

さらに、アルボウイルス動態調査で基準株として用いた DAGV KY115 株ならびに CHUV C31 株と、分離株との血清学的交差性を確認した結果、KY115 株と分離株はほぼ同等の抗体価であり、CHUV とは、交差性はあるものの明らかに抗体価に差があることが確認された（表－8）。

表-8 抗体陽転牛におけるDAGV(KY115株、分離ウイルス株)とCHUVの抗体価比較

牛No.	DAGV		CHUV
	KY115株	2018 長崎分離株	C31株
中-4	512	1024	32
北-5	1024	1024	32
南-7	256	512	16
五-3	1024	1024	32
壱-11	512	512	16

#### 4 まとめおよび考察

今回、大脳欠損を伴う死産症例において本ウイルスの関与が確認されたことから、既報の神経症状等を伴う出生子牛のほかに死産の病態も起こりうる事が明らかとなった。

また、おとり牛2頭の血球からは42日間にわたりウイルスが分離されたことから、DAGVは抗体存在下でも長期間生存可能ことが確認された。また、遺伝子解析の結果、分離株は2018年鹿児島分離株と非常に高い相同性を示したことから、同じ由来である可能性が示唆された。さらに、抗原性を規定する遺伝子領域において、分離株と2001年鹿児島分離株は高い相同性を示し、中和試験において分離株とCHUVは血清学的交差性があるものの、抗体価には明らかな差があることが確認された。このことは、2001年鹿児島分離株と類似した結果であり<sup>4)</sup>、分離株は2001年鹿児島分離株と類似の抗原性を持つものと考えられた。

本ウイルスの関与を疑う牛異常産については、異常産からのウイルス分離事例がなく、初乳未接種子牛での抗体確認が難しいなどの理由から、ウイルスの関与を確定できた事例が非常に少なく、牛異常産への影響についても不明な部分が多いのが現状である。関連究明のためには、ウイルスの動態把握や症例データの積み重ねが重要であることから、今後も本ウイルスの動態を注視し、異常産への関連究明に努めたい。

最後に、今回の病性鑑定に関し多大なるご助言を賜るとともに、分離株の同定・解析を実施

していただきました、農研機構 動物衛生研究部門 越境性感染症研究領域の梁瀬徹先生、白藤浩明先生に深謝いたします。

#### 5 参考文献

- 1) Ohashi S, Matsumori Y, Yanase T, Yamakawa M, Kato T, Tsuda T: Evidence of an Antigenic Shift among Palyam Serogroup Orbiviruses. J Clin Microbiol, 42(10), 4610-4614(2004)
- 2) 松森洋一: 長崎県で流行したチュウザン病のウイルス性状と浸潤状況. 臨床獣医, Vol. 21, No. 4, 23-26(2003)
- 3) 松森洋一, 島田善成: 長崎県におけるD' Aguilar ウイルスの浸潤状況. 平成14年度家畜保健業績発表会
- 4) 東條悦子, 牧内浩幸, 福永哲也, 赤崎正武, 鬼塚剛, 中嶋久仁子: 臨床獣医, Vol. 21, No. 8, 48-52(2003)
- 5) 大橋誠一: オルビウイルス流行株の変異に関する分子遺伝学的研究. 動衛研研究報告, 第113号, 47-49