

9 令和2年度に県下で確認された流行性出血病ウイルスの流行について

中央家畜保健衛生所
酒井 芳子

流行性出血病ウイルス（以下、EHDV）はレオウイルス科オルビウイルス属の RNA ウィルスで、ヌカカによって媒介されるアルボウィルスのひとつである。EHDV には8つの血清型が存在し、国内では、このうち6つの血清型（1、2、5、6、7、10）の侵入が確認されている⁶⁾。EHDV 血清型2（以下、EHDV-2）に分類されるイバラキウイルスはイバラキ病の原因ウイルスであり、発熱や嚥下障害などを引き起こすことが知られているが、近年国内では血清型5や6あるいは7による嚥下障害や流死産も確認されている^{1、2、3、4、5)}。

今回、おとり牛調査において県下で2つの血清型の EHDV の流行が確認されたためその概要を報告する。

1 EHDV 関連疾病の発生状況

表-1に、これまでに国内で確認された EHDV 関連疾病の発生状況を示す。

昭和34年に九州～関東地方で EHDV-2 によるイバラキ病の発生が確認されて以降、しばらくは EHDV-2 のみの発生であったが、平成9～10年に九州地方で確認された EHDV-7 の大流行では、嚥下障害のほかに流死産も多発し、その後、平成27年に兵庫県で EHDV-6 による嚥下障害が⁴⁾、平成29年には沖縄県で EHDV-5 による流産事例が確認されている⁵⁾。

表-1 EHDV関連疾病の発生状況

発生年	地域	血清型	症状
昭和34～35年	九州～関東	EHDV-2	嚥下障害
57年	九州	EHDV-2	嚥下障害
62年	九州、中国、四国	EHDV-2	嚥下障害
平成 9～10年	九州	EHDV-7	嚥下障害、流死産
平成 25年	鹿児島	EHDV-2	嚥下障害
平成 27年	兵庫	EHDV-6	嚥下障害
平成 28年	福岡、長崎	EHDV-7	発熱、流死産
平成 29年	沖縄	EHDV-5	流産
令和 元年	宮崎	EHDV-7	嚥下障害、流産

2 材料および方法

(1) 抗体検査

県内6地域の未越夏牛72頭から令和2年6、8、9および11月に採取された血清288検体を用いて、牛流行熱ウイルス、アカバネウイルス、アイノウイルス、チュウザンウイルス、イバラキウイルス（IBAV）、ピートンウイルス、ディアギュラウイルス、シャモンダウイルスの中和試験を実施した（図-1）。さらに、9および11月血清144検体については分離株と IBAV No. 2 株との抗体価を比較した。

調査対象：県内6地域22戸の未越夏牛72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 288検体
方法：牛流行熱、アカバネ、アイノ、チュウザン、イバラキ（IBA）、ピートン、ディアギュラ、シャモンダウイルスの中和試験

■分離株とIBAV（No.2株）との抗体価比較

材料：血清（9,11月） 144検体
方法：中和試験

図-1 材料および方法1

(2) 遺伝子検査およびウイルス分離検査

8月以降の血漿および血球432検体について、

牛異常産関連ウイルスの RT-PCR およびウイルス分離を実施した。さらに、11月の血球72検体については、図-2に示す3種類のEHDV特異的プライマー²⁾、⁷⁾を用いて、プライマーによる検出感度の比較を行った。

■分離および遺伝子検査

材料：血漿および血球（8月以降）432検体

方法：1.牛異常産関連ウイルスのRT-PCR
2. HmLu1細胞に接種後、37℃静置培養（3～4代継代）

■プライマー感度比較

材料：血球（11月）72検体

方法：EHDV特異的プライマー3種を用いたRT-PCR

- ① EHDV血清群共通（大橋ら）
- ② EHDV血清群共通（山本ら）
- ③ EHDV-6特異的（白藤ら）

図-2 材料および方法2

また、抗原検索の結果得られた、県央地域の血球由来分離株2株および壱岐地域の血球由来抽出RNA1検体についてEHDVのゲノム分節2および3の塩基配列決定および分子系統樹解析を実施した。

■遺伝子解析

材料：血球由来分離株 2株
抽出RNA 1検体

家保（牛No.）	検体	株名
中央（中-9）	分離株	NS-3/E/20
中央（中-12）	分離株	NS-2/E/20
壱岐（壱-1）	抽出RNA	NS-1/E/20

方法：EHDVのゲノム分節2および3の塩基配列決定および分子系統樹解析

	コード領域
ゲノム分節2	VP2（抗原性を反映）
ゲノム分節3	VP3（地理的由来を反映）

図-3 材料および方法3

3 検査成績

(1) 抗体検査

11月調査において、IBAVに対する抗体陽転が諫早市および壱岐市の計4頭で確認され、陽転率は5.6%であった（表-2）。

(2) 遺伝子検査およびウイルス分離成績

遺伝子検査の結果、11月調査において県央、

壱岐地域の血球材料計5検体からEHDV特異遺伝子が検出され、このうち県央地域の3検体についてはウイルスも分離された（表-2）。

表-2 抗体および抗原検査成績

農場名	地域	個体No.	IBAV (No.2株) 抗体価		抗原検索 (材料: 血球)	
			9月	11月	RT-PCR (血清群共通プライマー①)	ウイルス分離
A	大田市	9	<2	<2	EHDV特異遺伝子検出	○
		10	<2	<2		
		11	<2	<2		
B	諫早市	12	<2	16	EHDV特異遺伝子検出	○
		13	<2	<2	EHDV特異遺伝子検出	○
		14	<2	<2		
		15	<2	<2	EHDV特異遺伝子検出	
		16	<2	<2	EHDV特異遺伝子検出	
C	壱岐市	1	<2	128	EHDV特異遺伝子検出	
		2	<2	<2		
		3	<2	32		
		4	<2	4		

※点線青枠内はイバラキ病ワクチン接種牛

IBAV陽転率5.6% (GM: 1.2)

遺伝子解析の結果、分離株2株の塩基配列の相同性は99.84%と非常に高く、同一由来の株であることが確認された。また、これら2株は血清型別RT-PCRにおいてEHDV-2陽性となり、平成12年のEHDV-2長崎株とゲノム分節2で99.47%、ゲノム分節3で99.84%の相同性を示した。一方、壱岐地域の抽出RNA1検体は県央地域の分離株との相同性が94.95%と若干低いことが確認された。

さらに、血清型別RT-PCRを実施した結果EHDV-6陽性となり、平成27年のEHDV-6兵庫株とゲノム分節3で98.42%の相同性を示した。

以上の結果から、県央地域の分離株はEHDV-2、壱岐地域の抽出RNAはEHDV-6と同定された（表-3）。

表-3 遺伝子解析結果

■塩基配列比較（ゲノム分節3の相同性）

家保（牛No.）	検体	株名	相同性 (%)
中央（中-9）	分離株	NS-3/E/20	99.84%
中央（中-12）	分離株	NS-2/E/20	99.84%
壱岐（壱-1）	抽出RNA	NS-1/E/20	94.95%

■既知のEHDV株との相同性

血清型別 RT-PCR	株名	ゲノム分節	相同性 (%)
EHDV-2 陽性	NS-2/E/20 (中-12)	EHDV-2	2 99.47
	NS-1/P/00 (平成12年長崎株)		3 99.84
EHDV-6 陽性	NS-1/E/20 (壱-1)	EHDV-6	3 98.42
	HG-1/E/15 (平成27年兵庫株)		

図-4に地理的由来を反映するゲノム分節3の部分配列に基づく分子系統樹を示す。

県央地域の分離株は平成12年長崎株を含む過去の EHDV-2 国内流行株と最も近縁であった。一方で、壱岐地域の検出 RNA は過去の EHDV-6 国内流行株と最も近縁であった。

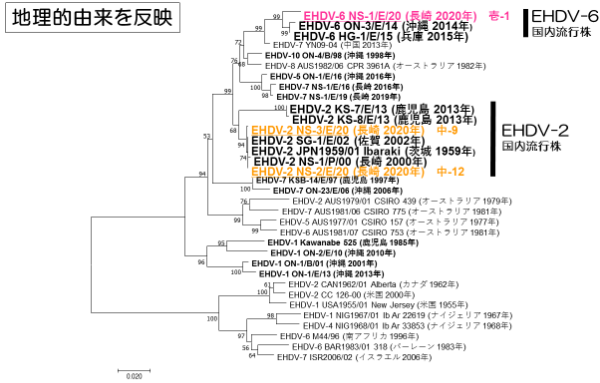


図-4 EHDVのゲノム分節3部分配列(634塩基)に基づく分子系統樹

続いて、図-5に抗原性を反映するゲノム分節2の部分配列に基づく分子系統樹を示す。EHDV-2分離株はアジア・オセアニア地域の分離株が多く存在するグループに属し、平成12年のEHDV-2長崎株を含む国内流行株と最も近縁であった。

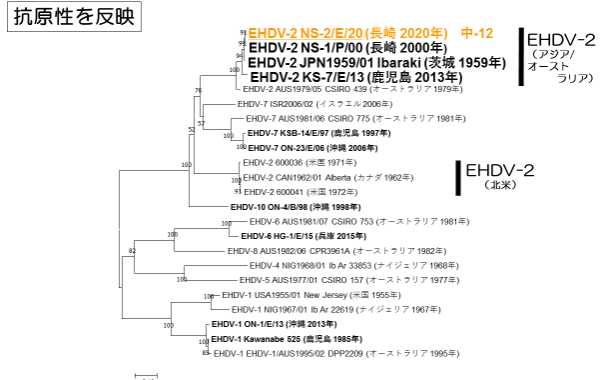


図-5 EHDVのゲノム分節2部分配列(575塩基)に基づく分子系統樹

(3) 分離株と IBAV 株との抗体価比較

分離株と、同じ EHDV-2 に属する IBAV No. 2 株との抗体価比較を実施した結果、EHDV-2 浸潤農場においては、分離株のほうが若干高い抗体価となったが、明らかな差は認められなかった(表-4)。なお、表に示す農場以外の個体の抗体価はすべて2倍未満であった。

表-4 分離株とIBAV No.2株との抗体価比較

農場名	地域	個体 No.	IBAV (No.2株)		令和2年長崎分離株		抗原検索 (材料:血球)
			9月	11月	9月	11月	
A	大村市	9	<2	<2	<2	2	EHDV-2分離
		10	<2	<2	<2	<2	
		11	<2	<2	<2	<2	
B	諫早市	12	<2	16	<2	32	EHDV-2分離
		13	<2	<2	<2	2	
		14	<2	<2	2	<2	EHDV特異遺伝子検出
		15	<2	<2	<2	2	
C	壱岐市	1	<2	128	<2	128	EHDV-6遺伝子検出
		2	<2	<2	<2	<2	
		3	<2	32	<2	32	
		4	<2	4	<2	4	

(4) プライマーによる感度比較

EHDV-6 に対する既存の EHDV 検索用プライマー3種の検出感度を比較した結果、EHDV-6 に対しては、プライマーによって検出感度に差があり、EHDV-6 特異的プライマー、EHDV 血清群共通プライマー②、EHDV 血清群共通プライマー①の順に感度が高いことが確認された。また、壱岐市の No. 2~4 の3頭については10月にイバラキ病ワクチンが接種されていたが、当該個体からも EHDV-6 特異遺伝子が検出された(表-5)。なお、表に示す農場以外の個体はすべて陰性であった。

表-5 プライマーによる感度比較

農場名	地域	個体 No.	IBAV (No.2株) 抗体価		RT-PCR (材料:血球)			血清型
			9月	11月	EHDV血清群共通 (プライマー①)	EHDV血清群共通 (プライマー②)	EHDV-6 特異的 (プライマー③)	
A	大村市	9	<2	<2	+	+	-	EHDV-2
		10	<2	<2	-	-	-	
		11	<2	<2	-	-	-	
B	諫早市	12	<2	16	+	+	-	EHDV-2
		13	<2	<2	+	+	-	
		14	<2	<2	-	-	-	
		15	<2	<2	+	+	-	
C	壱岐市	1	<2	128	+	+	+	EHDV-6
		2	<2	<2	-	-	+	
		3	<2	32	-	+	+	
		4	<2	4	-	+	+	

※点線青枠内はイバラキ病ワクチン接種牛

感度: プライマー③>②>①

4 まとめおよび考察

令和2年度は、県下2地域で EHDV-2 と EHDV-6 の2つの血清型の EHDV 流行が確認された。EHDV-6 の流行確認については、沖縄県、兵庫県につづき国内3例目であり、九州地域では初確認となる。

また、EHDV-2、EHDV-6 ともに今回の流行は限局的なものであり、関与を疑う事例は確認

されなかったが、特に EHDV-6 については、近年、嚙下障害が確認された兵庫株と非常に近縁であったことから、病原性を有する株である可能性も否定できないと考えられた。

それぞれのウイルスの侵入時期については、11 月調査時の EHDV-2 浸潤農場の分離株に対する抗体価が全体的に低かったことから、侵入してまもない状況であったことが推察された。

また、EHDV-6 浸潤農場における IBAV 抗体価は 2 倍未満から 128 倍と幅があったが、平成 27 年の兵庫県における調査において、EHDV-6 と IBAV との交差性は低いことが確認されていることから、今回の EHDV-6 流行株に対する真の抗体価は、IBAV に対する抗体価よりもかなり高いことが推察され、ウイルスは 10 月頃には侵入していた可能性が疑われた。

また、今回、複数のイバラキ病ワクチン接種牛から EHDV-6 特異遺伝子が検出されたことから、EHDV-6 についてはワクチン抗体による感染防御ができなかったものと推察された。

さらに、EHDV-6 に対してはプライマーによる感度の違いが確認されたことから、今後、おとり牛調査や病性鑑定で EHDV 検索を実施する際には、抗体検査成績と併せ必要に応じて複数のプライマーを用いた遺伝子検索を実施することが重要と思われた。

今後も様々な血清型の EHDV が同時に県内に侵入しうることを想定し、流行の早期予察や的確な疾病診断に繋げたい。

最後になりましたが、今回、EHDV 検索に際して多大なるご助言ならびに遺伝子解析を実施していただきました、国立研究開発法人農研機構の梁瀬徹先生ならびに白藤浩明先生に深謝いたします。

5 参考文献

(1) 白藤浩明：牛の異常産や熱性疾患の原因となるアルボウイルスに関する最近の知見、The Journal of Farm Animal in Infectious Disease Vol.7 No.3 2018

(2) 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)

(3) 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)

(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) 石井ら：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、沖縄県家畜衛生試験場年報第 54 号 (2018)

(6) 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)

(7) 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)