

シャモンダウイルスの関与が疑われる牛異常産事例

奥村 尚子¹⁾ 銘苅裕二¹⁾ 石井圭子¹⁾ 泉里奈²⁾ 荒木美穂³⁾

1)家畜衛生試験場 2)八重山家畜保健衛生所 3)中央家畜保健衛生所

【はじめに】シャモンダウイルス(SHAV)は、節足動物媒介性ウイルス(アルボウイルス)の1種で、オルソブニヤウイルス属シンプ血清群に属する。2002年に南九州のスカカや牛から国内で初めて分離され[1]、2003年に宮崎や鹿児島で発生した牛異常産への関与が疑われている[2,3]。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散発した[3,4,5]。ウイルス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、沖縄県八重山地域で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】農場は、肉用牛20頭(成雌10頭、未経産2頭、育成3頭、子牛5頭)を飼養する繁殖農場であった。2019年5月2日に人工授精を行い、2020年2月4日に母牛が産気づくが、自力で娩出できず、翌日胎子を牽引すると雄胎子の体形異常を伴う死産であった。胎齢は約279日齢。母牛は初産、異常産ワクチン未接種だった。

【材料と方法】(1)病理解剖と病理組織学的検査 死産胎子の病理解剖を行い、採材臓器を定法に従い、ヘマトキシリン・エオジン染色(以下、HE)、脊髄についてクリューバー・バレラ染色(以下、KB)、前肢と第二胸椎付近の骨格筋についてリンタンングステン酸ヘマトキシリン染色(以下、PTAH)を実施した。脊髄の抗SHAV家兔免疫血清を用いた免疫組織化学的染色(SAB法)を動物衛生研究部門へ依頼した。

(2)細菌検査 心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓を血液寒天培地、第四胃内容物をスキロー培地で培養した。肝臓と腎臓は、レプトスピラ鞭毛の構成成分の一つであるflaB遺伝子について遺伝子検査を行った。

(3)ウイルス学的検査(遺伝子検査、抗体検査、ウイルス分離) 胎子延髄、脊髄、主要臓器、胎盤、母牛と同居牛6頭の血液を用いて、シンプ血清群ウイルス(アカバネウイルス:AKAV、アイノウイルス:AINV、ピートンウイルス:PEAV、サシュペリウイルス:SATV、SHAV)、パリアム血清群ウイルス(チュウザンウイルス:CHUV、ディアギュラウイルス:DAGV等)、イバラキウイルス:

IBAV(EHDV-2)等の流行性出血病ウイルス、ブルータングウイルス(BTV)、牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)を含むペスチウイルス属の遺伝子検査(RT-PCR法)を実施した。また、母牛血清、胎子脳脊髄液、胎子胸水及び腹水を用いて、牛異常産に関連するアルボウイルス6種(AKAV, AINV, CHUV, IBAV, PEAV, SHAV)とBVDV I・II型の中和試験による抗体検査を実施した。分離は、胎子延髄、脊髄、主要臓器を用いて、HmLu-1細胞とBHK-21細胞に接種後、37℃の5%CO₂インキュベーター内で7日間静置培養し、3代盲継代した。動物衛生研究部門へ胎子延髄を用いたシンプ血清群ウイルスのSゲノム分節とSHAVのMゲノム分節を標的としたRT-PCR実施とこれらのPCR産物についてダイレクトシーケンスと分子系統樹解析を依頼した。

(4)アルボウイルスサーベイランス 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、AKAV, AINV, CHUV, IBAV, PEAV, SHAV、牛流行熱ウイルスの中和試験による抗体検査とウイルス分離を実施した。

【結果】(1)死産胎子の頭尾長は93cm、体重は21kgであった。剖検所見では、前肢の拘縮や頸部～胸部の脊柱湾曲、下顎骨の融合不全、門歯の固着不全、萌出不全が認められ、脳硬膜は肥厚しており、内部には茶褐色の液状物が貯留し、大脳小脳はほぼ欠損、延髄の一部が残存していた(図1,2,3)。心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓に著変はなかった。病理組織検査では、延髄は融解変性により中心管を含む灰白質が消失し、空隙形成、白質は血管周囲腔の拡張や神経網の粗しょう化、空胞変性がみられた。頸髄灰白質の大型神経細胞は減数し、腹角ではほとんど認められなかった。背索から側索は神経網の粗しょう化、空胞変性し、髄鞘は確認できなかった。側索から腹索は面積が減少し、髄鞘形成不全あるいは神経線維の減少が疑われた。胸髄灰白質の中間質から腹角の神経細胞、大型神経細胞が減数し、白質との境界は不明瞭であった(図4,5)。頸

髄と胸髄の KB 染色において、対照胸髄(牛、胎齢約7カ月齢)に比べ、全体的に染色性は低下し、白質髄鞘の減少がみられた。対照では、腹角の大型多極神経細胞(運動神経細胞)が多数みられ、細胞質内のニッスル小体や核膜が紫色に染色されたが、本例では、黒矢印で示す神経細胞らしき細胞の染色性は均一で、ニッスル小体は確認できなかった(図6)。腰髄は、灰白質と白質の境界は明瞭で、腹角の大型神経細胞の減数はみられなかった。抗 SHAV 抗家兔免疫血清を用いた免疫組織化学染色にて、延髄及び脊髄は陰性であった。前肢骨格筋にて、筋膜や筋紡錘構造は認められるが、筋周膜におおわれる筋線維は大小不同がみられた。筋線維の形成がごくわずかな部位では、筋周膜と紡錘形から楕円形核の細胞が柵状にみられた。同部位の PTAH 染色において、筋線維は袋状にわずかに形成され、横紋構造は不明瞭だった。心臓、肺、肝臓、腎臓に細菌感染を疑う所見は認められなかった。

(2)細菌検査では、心臓、肺、肝臓、腎臓から *Vibrio parahaemolyticus* が分離された。レプトスピラの遺伝子検査は陰性だった。

(3)ウイルス学的検査では、延髄から SHAV 遺伝子が検出され、分子系統樹解析の結果、2015 年の鹿児島分離株と最も近縁であった(相同性 S ゲノム分節 99.32%, M ゲノム分節 100%)(図7)。SHAV 中和抗体は、当該母牛血清では 256 倍以上、胎子の脳脊髄液と腹水では4倍だった(図8)。分離は陰性だった。

(4)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9)。ウイルス分離は2019 年7月に EHDV1 株、9月に DAGV2 株、10月に AKAV1 株が分離されたが、SHAV は分離陰性だった。

【考察】今回、死産胎子に脳欠損や脊髄病変、関節彎曲、前肢拘縮などの体形異常を認め、SHAV に対する抗体と特異的な遺伝子が検出された。これらの病原検査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、病態への SHAV 関与が疑われ、発生農場への SHAV 侵入時期は2019 年7月から9月、胎子へのウイルス感染時期は胎齢3カ月齢前後と推察された。SHAV の関与を疑う既報の異常産事例では、脳の石灰沈着が高率に認められる[3,4,5]。これは変性した神経細胞に対する反応で病変部の修復像と考えられ、アイノウイルス感染症や PEAV の関与

が疑われる異常産など脳炎が比較的軽度な疾病で認められている[6,7]。本例は既報の SHAV の関与を疑う異常産事例と異なり、脳欠損が認められ、非化膿性脳脊髄炎を示唆する所見はほとんどみられなかった。本例の無脳症の機序として、AKAV 感染でみられるウイルス感染後時間が経過してから起こる代償性変化(嚢胞状空隙形成及び神経組織の変性変化)[8]の可能性を考えた。本例は人工授精日からの換算では胎齢 279 日齢、頭尾長からの推定胎齢は8から9カ月齢であった。延髄や頸髄の一部でみられた神経網の粗しょう化や空隙形成を伴う構造の崩壊は、代償性変化を反映している可能性があり、KB 染色にて頸髄と胸髄に認められた白質髄鞘の形成不全は、大脳欠損による運動神経下行路の神経線維の萎縮、消失に関連している可能性がある。しかし、胎子が死亡してから娩出されるまでの経過が長いと自己融解が進むため、代償性変化との鑑別が困難と思われた。胎子の SHAV への感染時期と脳欠損を含めた病態の関連はいまだ不明な点が多い。本例は胎齢3カ月齢前後に SHAV へ感染し、脳欠損や脊髄病変、体形異常への関与が疑われ、中和抗体存在下の胎子延髄から SHAV 遺伝子が検出された稀な例と考えられた。

2002 年及び 2007 年に沖縄県において SHAV の侵入が確認されている[9,10]。分子系統樹解析より、2015 年に国内へ侵入した SHAV と同様の性状を持つと判明した今回の SHAV 株は、2019 年時点でもアジアの熱帯・亜熱帯地域に存在しており、八重山地域へ侵入したと考えられている。日本国内への侵入リスクを測るため、今後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重要である。さらに牛に対する SHAV の病原性や病態を把握するためにウイルスのさらなる性状解析や感染実験症例、野外症例の集積が必要である。

最後に抗 SHAV 家兔免疫血清を用いた免疫組織化学的染色、ウイルスゲノムの解析を実施頂いた(国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門暖地疾病防除ユニット田中省吾氏、白藤浩明氏に感謝する。



図1 死産胎子の外貌

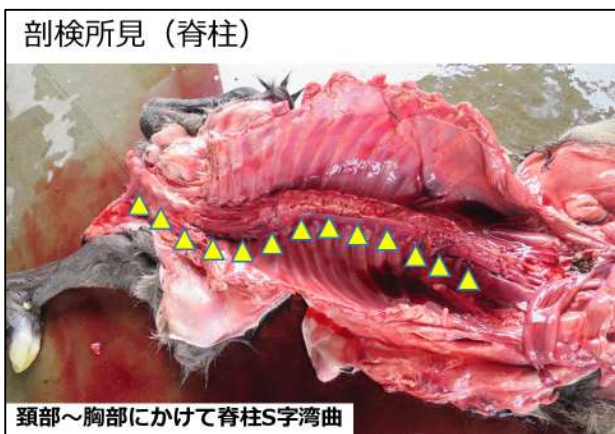


図2 剖検所見(脊柱)



図3 剖検所見(頭部)

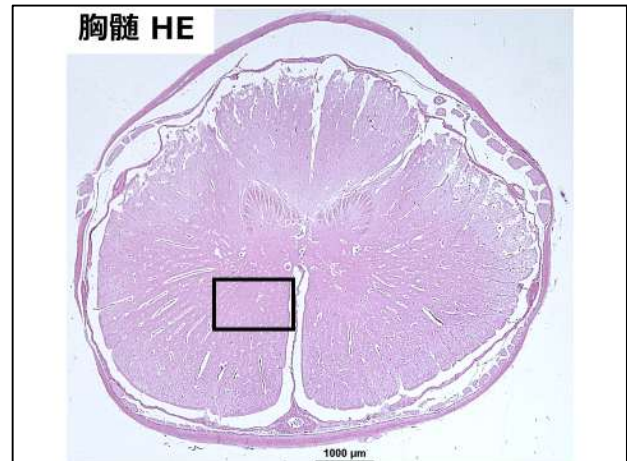


図4 胸髄の HE 写真

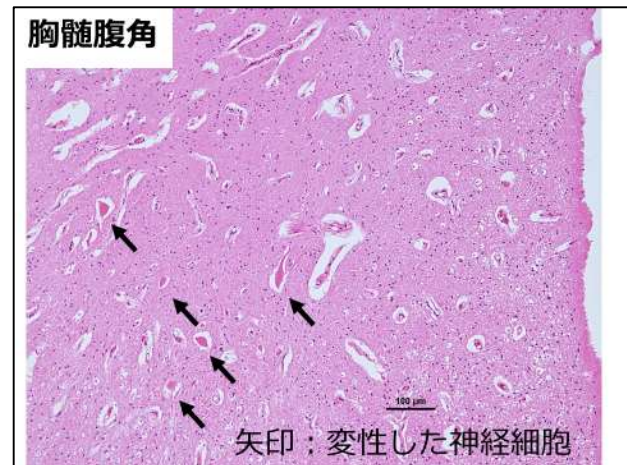


図5 胸髄灰白質腹角の HE 写真

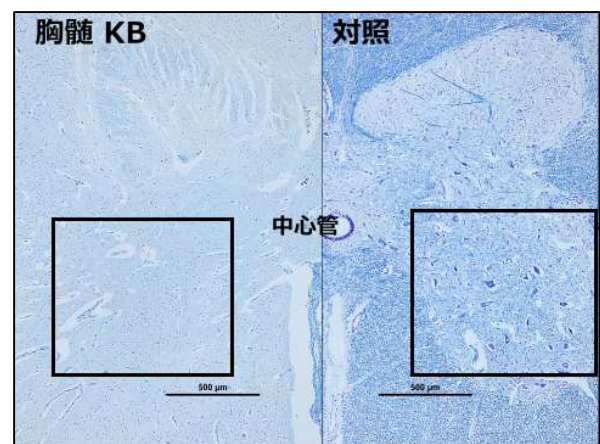


図6 胸髄の KB 写真

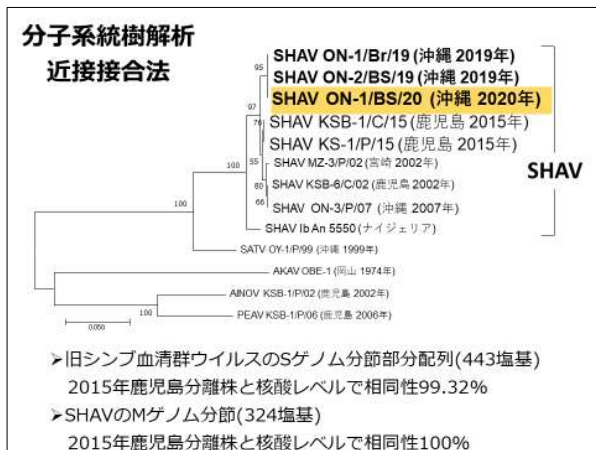


図7 SHAV の分子系統樹解析



図8 抗体検査及び分離検査

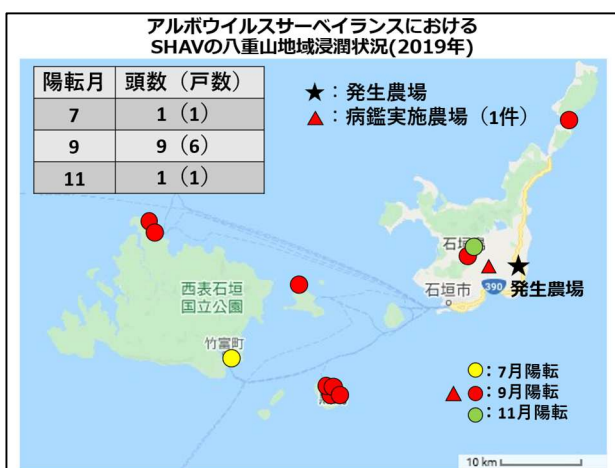


図9 SHAV の八重山地域浸潤状況(2019 年)

【引用文献】

- [1]Yanase T, Maeda K, Kato T, Nyuta S, Kamata H, Yamakawa M, Tsuda T : The resurgence of Shamonda virus, an African Simbu group virus of the genus *Orthobunyavirus*, in Japan, Arch Virol, 150, 361-369 (2005)
- [2]前田浩二ら：Shamonda ウイルスの分離と宮崎県内の浸潤状況，平成 15 年度全国家畜保健衛生業績抄録，51 (2004)
- [3]平島宜昌ら：鹿児島県内の飼養牛及び先天異常子牛におけるシャモンダウイルス感染状況の遡及調査，日獣会誌，70, 729-734 (2017)
- [4]早島彬美ら：シャモンダウイルスの関与を疑う牛の異常産の病態に関する一考察，平成 28 年度全国家畜保健衛生業績抄録，21 (2017)
- [5]福田美津紀ら：県内でのシャモンダウイルスの関与を疑う牛異常産事例，平成 28 年度全国家畜保健衛生業績抄録，22 (2017)
- [6]有田章一ら：アインウイルスとアカバネウイルス野外感染牛における異常産の病理学的比較，家畜診療，48(10), 669-676(2001)
- [7]津波修ら：ピートンウイルスによる牛異常産の病理学的特徴，沖縄県家畜衛生試験場年報，第 44 号 (2008)
- [8]アカバネ病，カラーアトラス牛の先天異常，浜名克己監修，44-50，学窓社，東京 (2006)
- [9]Yanase T, Kato T, Aizawa M, Shuto Y, Shirafuji H, Yamakawa M, Tsuda T : Genetic reassortment between Sathuperi and Shamonda viruses of the genus *Orthobunyavirus* in nature : implications for their genetic relation-ship to Schmallenberg virus, Arch Virol, 157, 1611-1616 (2012)
- [10]Kato T, Yanase T, Suzuki M, Katagiri Y, Ikemiyagi K, Takayoshi K, Shirafuji H, Ohashi S, Yoshida K, Yamakawa M, Tsuda T : Monitoring for bovine arboviruses in the most southwestern islands in Japan between 1994 and 2014, BMC Vet Res, 12, 125 (2016)