

岡山県で2016年10月～2017年4月に発生した ピートンウイルスの関与を疑う牛の流産及び 体形異常子の娩出

廣瀬友理¹⁾ 水上智秋¹⁾ 宇高成美²⁾ 田中省吾³⁾ 白藤浩明^{3)†}

- 1) 岡山県岡山家畜保健衛生所 家畜病性鑑定課(〒709-2123 岡山市北区御津河内2770-1)
2) 岡山県津山家畜保健衛生所(〒708-1117 津山市草加部547-8)
3) (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 九州研究拠点(〒891-0105 鹿児島市中山町2702)

(2019年2月13日受付・2019年9月23日受理)

要 約

岡山県で2016年10月～2017年4月に発生した、ピートンウイルス(Peaton virus: PEAV)感染の関与が疑われた牛異常産8例の病態を報告する。8例のうち1例は、肉眼的に関節拘縮や脊椎彎曲がない流産胎子であり、残りの7例の子牛には、体形異常が観察された。免疫組織化学的検索では、流産例を含む3例の脳にPEAV抗原が検出され、さらに流産例を含む2例の脳にはPEAV遺伝子も検出された。また、7例の体形異常子には、比較的高い力価の抗PEAV中和抗体が検出された。さらに、岡山県内の2016年の初越夏牛で、PEAVに対する抗体陽転が9～11月に認められた。これまで、PEAV感染に関連した新生子牛の先天性体形異常については、過去に国内でよく知られていたが、流産の病態に関する情報はほとんどない。本論文は、PEAV感染が関与したと考えられる流産に関する初めての報告である。——キーワード: アルボウイルス, 牛, 先天性体形異常, ピートンウイルス。

-----日獣会誌 73, 133～139 (2020)

ピートンウイルス(Peaton virus: PEAV)は、1970年代にオーストラリアでヌカカやおとり牛から分離された節足動物媒介性ウイルス(アルボウイルス)であり[1]、ペリブニャウイルス科オルソブニャウイルス属(genus *Orthobunyavirus*, family *Peribunyaviridae*)に分類される[2]。Parsonsonら[3]は、妊娠めん羊を用いた感染実験により、アカバネウイルス(Akabane virus: AKAV)と同様に、PEAVが胎子に大脳欠損及び関節彎曲症を引き起こすことを報告している。国内では、1999年に長崎県でおとり牛から、宮崎県では、ヌカカからそれぞれPEAVが分離されており[4]、2001年以降も九州・沖縄地方でおとり牛やヌカカからのPEAV分離例や牛の抗体陽性例が認められている[5, 6]。1996～2016年にはPEAVの関与を疑う牛異常産が計31例報告されているが[7]、これらの症例で認められた病態を牛の感染実験で再現した報告はなく、PEAV

感染による牛異常産の発生率や発病機序は不明である。

岡山県では、2016年のおとり牛でPEAVに対する抗体陽転がおもに9月と10月に認められ、一部では11月にも認められた。そして、2016年10月～2017年4月に発生した牛異常産8症例にPEAVの関与が疑われたため、病性鑑定の概要を報告する。また、PEAVによる牛異常産の発生率を把握するための一助とすべく、われわれは牛異常産発生農場にて妊娠牛の抗体調査を実施した。さらに、岡山県で過去にPEAVが侵入し、牛異常産に関与した可能性を調べるために、過去のおとり牛の血清と牛異常産の病性鑑定にて採取された母牛及び産子の血清についても抗体検査を実施したので、病性鑑定結果とあわせて報告する。

材料及び方法

発生概要: 8例の概要を表に示す。2016年10月に関

† 連絡責任者: 白藤浩明(国研農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 九州研究拠点)

〒891-0105 鹿児島市中山町2702 ☎099-268-2078 FAX 099-268-3088 E-mail: shirah@affrc.go.jp

岡山県で発生したピートンウイルスの関与を疑う牛異常産

表 牛異常産8例の発生概要, 中和試験結果, 剖検所見, 病理組織学的所見, PEAV 特異遺伝子及び抗原検出結果

	症例1	症例2	症例3	症例4	症例5	症例6	症例7	症例8
発生年月	2016年 10月	2017年 2月	2017年 2月	2017年 2月	2017年 3月	2017年 3月	2017年 3月	2017年 4月
母牛品種 ¹⁾	HF	JB	HF	JB	HF	HF	HF	JB
産子胎齢(日齢) ²⁾	152	238	258	278	263	273	282	275
産子生死	死	死	死	生	死	生	死	死
母牛へのワクチン接種 ³⁾	有	有	無	有	無	有	無	有
初乳摂取	無	無	無	無	無	無	無	無

中和抗体・母牛								
PEAV CSIRO 110 株	32	8	8	16	8	8	16	64
PEAV KSB-1/P/06 株	NT ⁴⁾	32	32	32	8	8	16	256
中和抗体・産子 ⁵⁾								
PEAV CSIRO 110 株	<2	2	256	16	2	32	2	256
PEAV KSB-1/P/06 株	<2	4	256	16	8	16	4	NT

頭部変形	-	+	+	-	+	-	記録無し	+
脊椎弯曲	-	+	+	-	+	-	+	+
四肢の屈曲あるいは伸展	-	+ ⁶⁾	+ ⁶⁾	-	+ ⁶⁾	-	+ ⁶⁾	+ ⁶⁾
関節拘縮	-	+	+	+	+	+	+	+
脳室拡張	判定不能 ⁷⁾	-	+	-	-	-	-	-
脳の空洞形成	判定不能 ⁷⁾	-	+	-	+	-	-	-
小脳低形成	判定不能 ⁷⁾	+	-	-	+	-	-	+

非化膿性髄膜炎	+	-	+	-	-	-	-	-
脳の石灰沈着	-	-	+	-	+	-	-	+
脊椎の低形成	NT	NT	+	-	+	-	+	+
骨格筋の消失・脂肪置換	NT	+	+	-	+	-	+	+

PEAV 特異遺伝子	+	-	+	-	-	-	-	-
PEAV 抗原(免疫染色)	+	+	+	-	-	-	-	-

1) HF: ホルスタイン, JB: 黒毛和種

2) 産子胎齢8カ月未満の症例1及び症例2を流産と判断

3) 牛異常産予防3種混合(アカバネ, アイノ, チュウザン)ワクチン

4) 検査実施せず

5) 症例1は腹水, 症例2は胸水, 症例3, 4, 6及び8は血清, 症例5及び7は心嚢水を供試

6) 前肢及び後肢の両方に屈曲あるいは伸展が認められた

7) 脳に融解が生じていたため判定不能

節拘縮や脊椎弯曲を伴わない流産が発生し(症例1), 2017年2~4月に計7頭の体形異常子が娩出された(症例2~8)。これらの症例は, すべて異なる農場で発生した。なお, 産子の胎齢が8カ月未満の症例を流産, 胎齢8カ月以上の胎子が死んだ状態で娩出された症例を死産と判断した[8]。

病理学的検査: 各症例について剖検を行い, 肉眼病変の有無を観察した。剖検後, 各臓器を10%中性緩衝ホルマリン液で固定し, 定法に従ってヘマトキシリン・エオジン(HE)染色標本及びクリューバー・バレラ(KB)染色標本を作製し鏡検した。また, 免疫組織化学的染色試薬(ヒストファインシンプルステイン MAX-PO (MULTI) 及びヒストファインシンプルステイン AEC 溶液, (株)ニチレイバイオサイエンス, 東京)を用いたポリマー法にて, 免疫組織化学的染色を実施した。一次抗血清として, 抗PEAV(NS-3/P/99株)家兔血清(希釈倍率×1,500)を用い, アクチナーゼE(科研製薬(株), 東

京)を0.1%添加したPBS中に37℃で10分静置して抗原賦活化後, 抗血清を室温で30分反応させた。

ウイルス学的検査: 母牛血液, 子牛の中樞神経系組織及び体液に加えて, 症例1については胎子の主要臓器を供試し, ウイルスRNA抽出キット(QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN, U.S.A.)を用いてRNAを抽出した。その後, RT-PCRキット(OneStep RT-PCR Kit, QIAGEN, U.S.A.)を用いて, アルボウイルス検出用マルチプレックスRT-PCR法及びペスチウイルス検出用RT-PCR法を実施した[9, 10]。また, アルボウイルス検出用マルチプレックスRT-PCR法により陽性となった検体は, PEAV特異検出用RT-PCR法を実施した。本法では, PEAVのMゲノム分節を標的とした2つのプライマー(Forward: CCTTCCATACGC CATTAGGTGA, Reverse: TGCTCATCACATTCA GATGA)を使用し, 前述のアルボウイルス検出用マルチプレックスRT-PCR法と同様の条件で検査を実施し

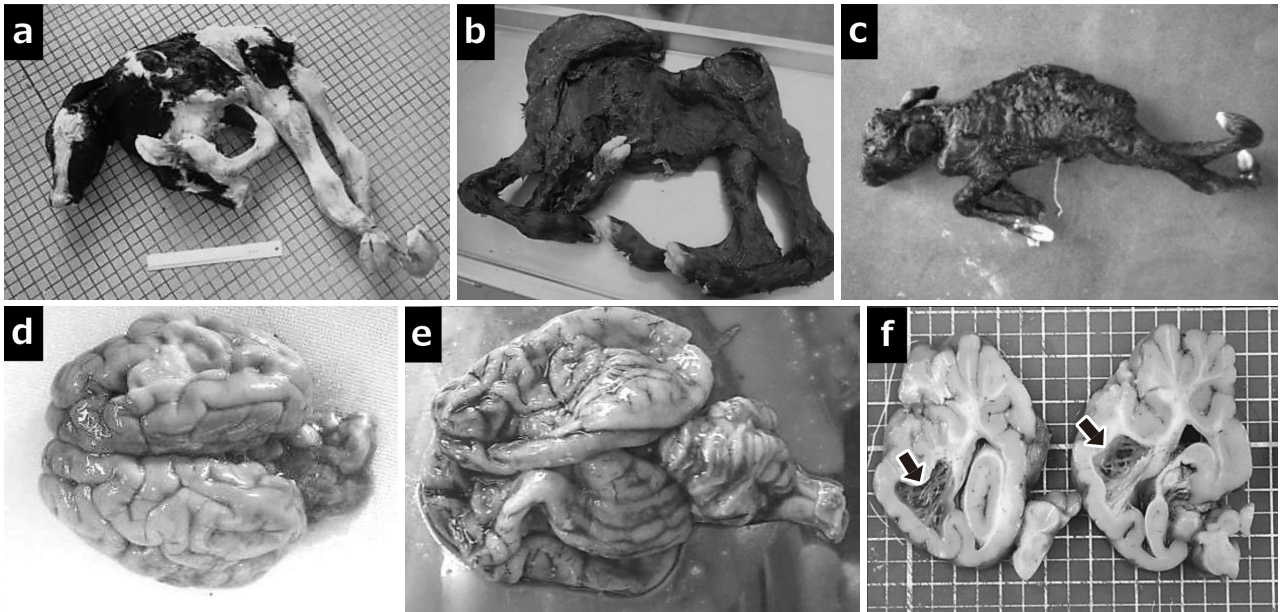


図1 症例3, 5及び8の胎子の外貌 (a~c) 並びに症例2, 3及び5の脳 (d~f) の肉眼的異常

症例3及び8では脊椎弯曲や四肢の屈曲及び伸展 (a及びc), 症例5 (b) では脊椎弯曲や四肢の屈曲が認められる。また, 症例2では小脳低形成 (d), 症例3では脳室拡張による大脳の菲薄化 (e), 症例5では大脳実質の空洞 (f, 矢印) がそれぞれ認められる。

た。遺伝子検査及び免疫組織化学的染色により陽性と判定された個体は、脳乳剤をVero, HmLu-1及びBHK-21細胞に接種し、回転培養によるウイルス分離を試みた [11]。

遺伝子解析：前述のPEAV特異検出用RT-PCR法で陽性と判定された検体について、PCR産物(488塩基)をPCR産物精製キット(QIAquick Gel Extraction kit, QIAGEN, U.S.A.)を用いて精製し、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、遺伝情報処理ソフトウェア(GENETYX Ver.10, 株ゼネティックス, 東京)を用いて、日本、オーストラリア及びイスラエルで分離されたPEAVとの相同性を算出した。また、MEGA5により分子系統樹解析(最尤法)を行った [12]。

抗体検査：母牛血清と初乳未接種の産子血清または体液を用いた。AKAV, アイノウイルス, チュウザンウイルス, イバラキウイルス, 牛流行性下痢ウイルス1型(Nose株), 2型(KZ-91cp株)及びPEAVについて、中和試験をマイクロタイター法により実施した [11]。PEAVは1976年オーストラリア分離株(CSIRO 110株)と2006年鹿児島分離株(KSB-1/P/06株)を使用し、抗体価を比較した。

2016年PEAV浸潤状況調査：2016年初夏牛血清及び豚血清を供試した。牛は同一個体から5回(6, 8, 9, 10月及び11月)血清を採取した。豚は10, 11月に2~5カ月齢の90頭(10頭/戸), 2017年1, 2月に3~6カ月齢の67頭(7~10頭/戸)の血清を採取し、

PEAV CSIRO 110株を用いて中和試験を実施した。抗体価2倍以上を陽性とした。

同居牛抗体調査：症例6の農場で2016年12月~2017年4月に正常分娩した母牛22頭について、2016年10月に採取した血清を供試し、PEAV CSIRO 110株を用いて中和試験を実施した。

岡山県における遡り調査：2001~2015年に前述の浸潤状況調査と同様に採材した初夏牛血清4,451検体及び2004~2015年に岡山家畜保健衛生所家畜病性鑑定課に依頼のあった流早死産、体形異常及び中枢神経系の異常を呈した牛異常産144症例の母牛血清、産子血清または体液278検体について、PEAV CSIRO 110株を用いて中和試験を実施した。

成 績

肉眼所見：8例の病理所見を表に示す。流産の1例(症例1)では、体形異常は認められなかった。残りの7例(症例2~8)で体形異常が認められ、流産(症例2)及び死産の4例(症例3, 5, 7及び8)では四肢の関節拘縮、頭部変形及び脊椎弯曲等の著しい体形異常が認められた(図1a~1c)。生存例の2例(症例4, 6)では関節の拘縮が認められた。また、中枢神経系の異常として、小脳の低形成が3例、脳室拡張による大脳の菲薄化が1例で認められ、脳の実質部分に空洞が形成される例も2例認められた(図1d~1f)。

病理組織学的所見：流産(症例1)及び死産(症例3)の各1例において、脳の髄膜や実質における囲管性のリ

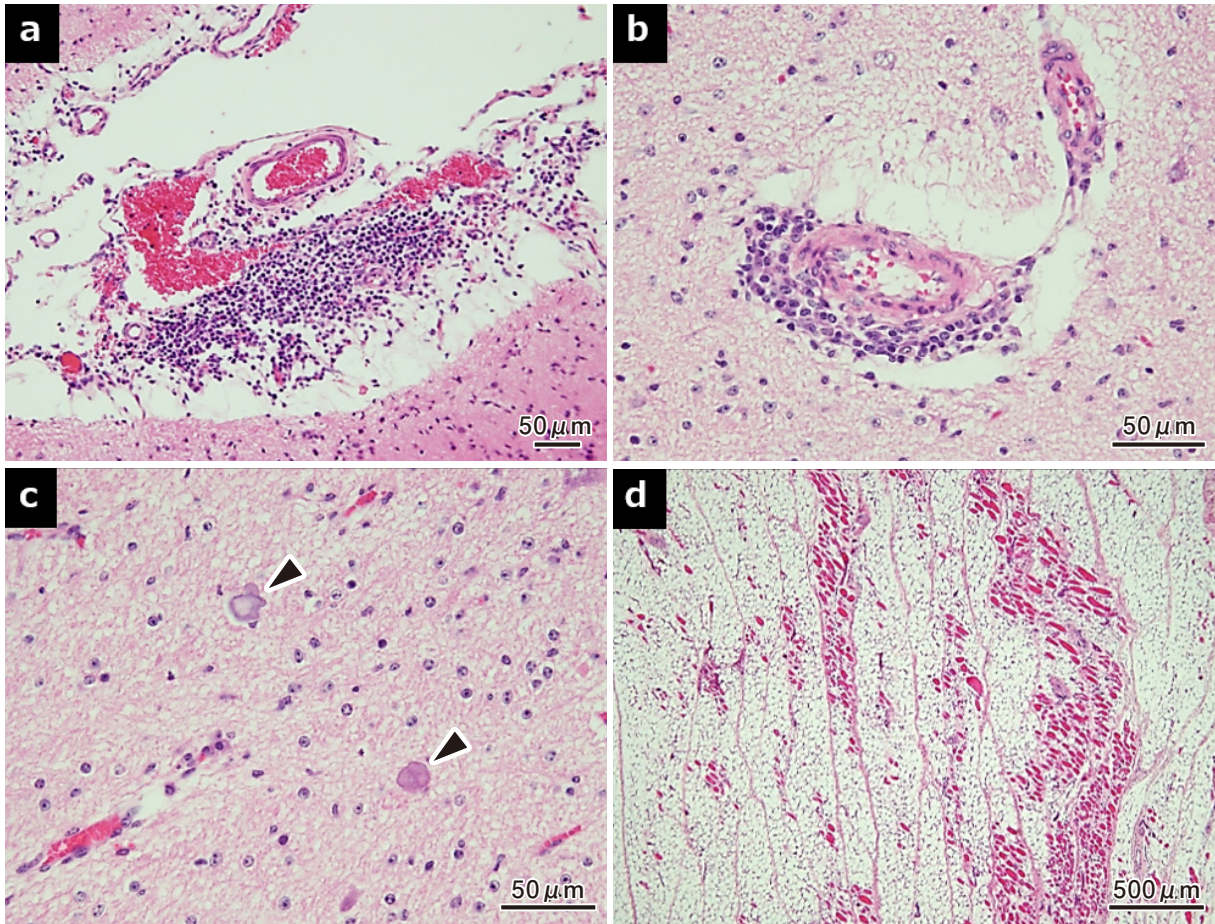


図2 脳及び骨格筋に認められた組織病変

大脳髄膜 (a) 及び大脳実質の血管周囲 (b) にリンパ球浸潤が認められ、間脳実質に石灰沈着 (c, 矢頭) が認められる (Bar=50 μ m). 骨格筋では筋線維の矮小化または消失並びに脂肪組織への置換が認められる (d) (Bar=500 μ m). 写真はすべて症例3. (HE染色)

ンパ球浸潤 (図2a, 2b), 実質における石灰沈着 (図2c) が観察された. 他の死産例の3例 (症例5, 7及び8) では, 脊椎の低形成が認められた (図3). さらに, 症例2, 3, 5, 7及び8において, 四肢の骨格筋に筋線維の萎縮・消失や脂肪組織への置換が観察された (図2d). 一方, 生存例では組織学的な異常は認められなかった. 免疫組織化学的染色では, 流産及び死産の3例 (症例1~3) において, 大脳の変性した神経細胞にPEAV抗原の陽性反応が散見された (図4).

ウイルス学的検査: 症例1の脳, 症例3の大脳及び脳幹よりPEAV特異遺伝子が検出された (表). その他の検体ではPEAVを含むアルボウイルスの特異遺伝子は検出されず, また, 全検体でベスチウイルス遺伝子陰性であった. 症例1~3の10%脳乳剤を用いてウイルス分離を実施した結果は, いずれも陰性であった.

遺伝子解析: 症例1及び3で検出されたPEAVは, Mゲノム分節の部分配列 (438塩基) において, 2016年9月に鹿児島で分離されたPEAV KSB-1/P/16株と最も近縁であり (核酸配列の相同性は98.20~

98.64%), 1999~2010年の国内分離株とも近縁であった (図5).

抗体検査: 全症例で母牛からPEAVに対する抗体が検出され, 症例1を除く7症例で産子から2~256倍のPEAVに対する中和抗体が検出された. PEAV CSIRO 110株とKSB-1/P/06株との比較では, KSB-1/P/06株に対する中和抗体価が母牛では7頭中4頭, 産子では7頭中3頭で高い値を示した (表). 全症例でPEAV以外のウイルスに対する抗体は検出されなかった (データ示さず).

2016年PEAV浸潤状況調査: 牛では9月に県内の50頭中22頭で抗体が陽転し, 10月 (49頭中8頭), 11月 (47頭中1頭) にも陽転が認められた. 豚では全検体で抗体価が2倍未満であった.

同居牛抗体調査: 母牛22頭中13頭がPEAVに対する中和抗体を保有しており (59.1%), 中和抗体価は1頭が2倍, 残りの12頭が32~256倍であった.

岡山県における遡り調査: 全検体の中和抗体価は2倍未満であった.

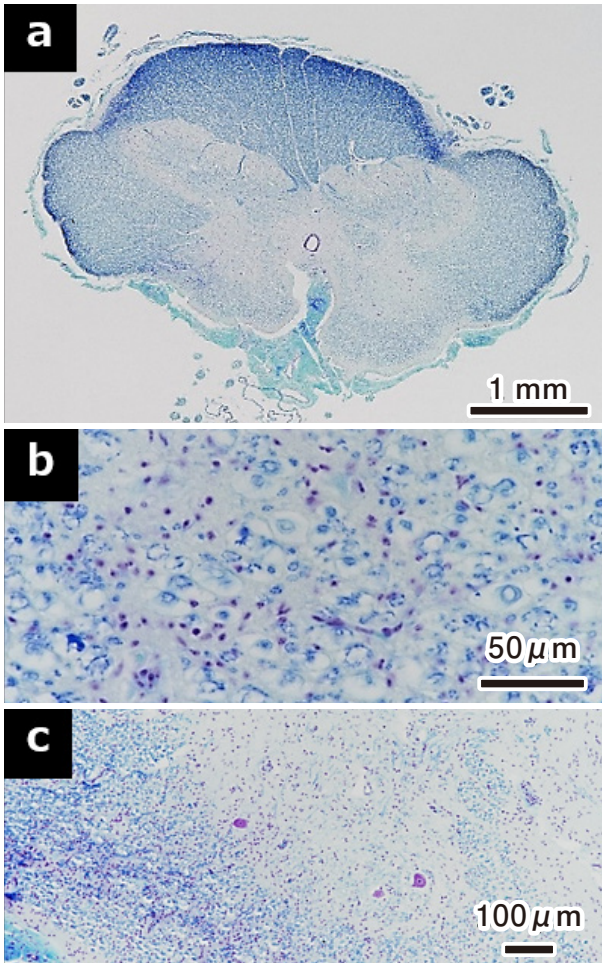


図3 脊髄に認められた組織病変
 症例3の脊髄は全体的に小さく、特に腹角の形成が悪く、白質灰白質の境界が不明瞭である (a) (Bar=1mm). 腹索では髄鞘の形成が悪く (b) (Bar=50μm), 腹角では神経細胞が著しく減数している (c) (Bar=100μm). (クリューバー・バレラ染色)

考 察

岡山県内で発生した牛異常産8症例の病性鑑定を実施したところ、過去に国内で発生したPEAVの関与を疑う牛異常産と同様の病理所見が認められ [7], PEAVに対する中和抗体や中枢神経系におけるPEAV遺伝子あるいはPEAV抗原が検出された。よって、これらの症例を、PEAVの関与を疑う牛異常産と診断した。今回の発生では、体形異常、脊髄低形成や骨格筋の消失・脂肪置換が比較的多く認められ、一部の症例で脳室拡張や小脳低形成といった脳の肉眼的異常が認められた。

症例1は、PEAVの関与が疑われる流産として世界で初めての報告例である。岡山県内でPEAVに対する抗体陽転が2016年9月に認められたこと、翌10月に本症例が発生したこと及び産子の脳からPEAV遺伝子とウイルス抗原が検出されたことから、本症例ではPEAV

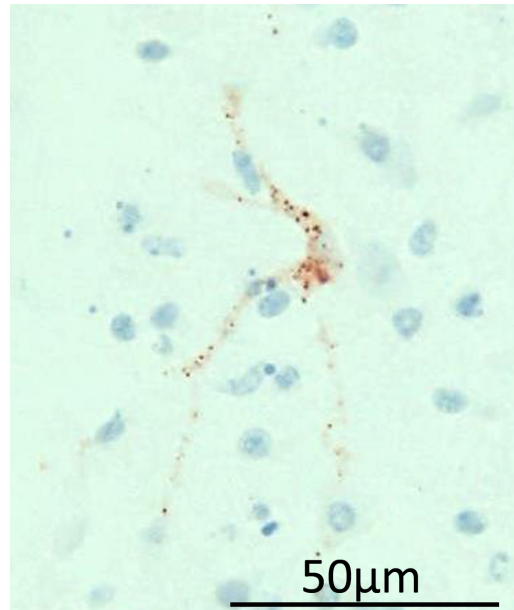


図4 大脳に認められたPEAV抗原
 大脳の変性した神経細胞に陽性反応が認められる (Bar=50μm). 写真は症例1 (免疫組織化学的染色)

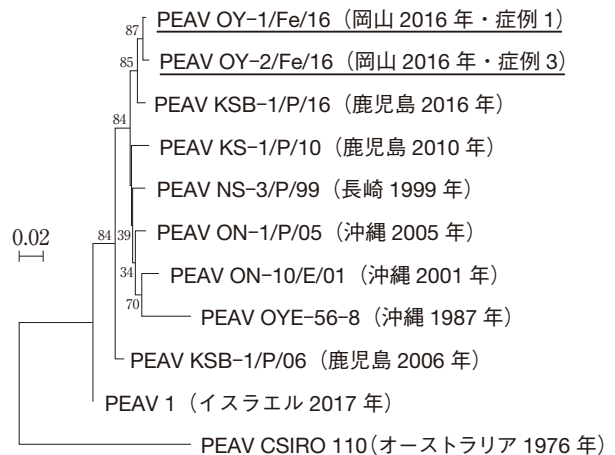


図5 PEAVM ゲノム分節の部分配列 (438 塩基) に基づく分子系統樹
 症例1及び3で検出された検体を下線で示す。系統樹上の数値は Bootstrap 値を表す (1,000 回演算, 百分率にて示す)。

感染後30日以内に、その感染が原因となって流産を発生したと推察される。また、過去の症例では肉用種のみ発生が認められていたが [7], 今回はホルスタインの症例が5例認められた。よって、今回のPEAVが過去の流行株とは異なる特徴をもつ可能性が考えられる。しかし、PEAV M 遺伝子に基づく遺伝子解析では、今回の流行株及び2016年9月に鹿児島で分離されたKSB-1/P/16株は過去の国内分離株と近縁であり、オーストラリア及びイスラエル分離株と離れた関係にあった。今

後、他のゲノム分節も遺伝子解析を行い、過去の分離株と比較する必要がある。

PEAV に対する中和試験では、KSB-1/P/06 株が CSIRO 110 株より抗体価が高く出る傾向にあり、今回県内で流行した株は、KSB-1/P/06 株とより抗原性が近いと考えられる。今後、国内で PEAV の中和試験を行う際には、KSB-1/P/06 株を含む国内分離株を用いるべきと考えられる。

2016 年の浸潤状況調査では、岡山県内で 44% の調査対象牛で 9 月に抗体陽転がみられ、11 月まで陽転が認められた。このことから、県内で PEAV がおよそ 2 カ月間にわたって広範囲に伝播したと考えられる。一方、今回実施した遡り調査の結果から、過去 15 年間は岡山県内への PEAV の侵入がなかったと考えられる。

症例 6 の農場における抗体検査により、当該農場では、採材の時点で発症牛と同居牛を合わせた母牛全体の 60.9% (23 頭中 14 頭) が PEAV に感染しており、感染母牛 14 頭中 1 頭 (7.1%) に異常産が発生したことが明らかになった。しかし、PEAV が妊娠牛に感染した場合の異常産の発生率を特定するためには、より多くの情報が必要である。今後、PEAV の動きが認められた場合には、通常の病性鑑定に加えて広く抗体検査を実施して感染の実態を把握することや、感染実験を行うことにより、PEAV 感染による牛異常産の発生率や発病機序を明らかにする必要がある。

引用文献

- [1] St George TD, Standfast HA, Cybinski DH, Filippich C, Carley JG : Peaton Virus: a new Simbu group arbovirus isolated from cattle and *Culicoides brevitarsis* in Australia, *Aust J Biol Sci*, 33, 235-243 (1980)
- [2] Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, Harrach B, Harrison RL, Knowles NJ, Kropinski AM, Krupovic M, Kuhn JH, Mushegian AR, Nibert M, Sabanadzovic S, Sanfaçon H, Siddell SG, Simmonds P, Varsani A, Zerbini FM, Gorbalenya AE, Davison AJ : Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017), *Arch Virol*, 162, 2505-2538 (2017)
- [3] Parsonson IM, McPhee DA : Bunyavirus pathogenesis, *Adv Virus Res*, 30, 279-316 (1985)
- [4] Matsumori Y, Inai K, Yanase T, Ohashi S, Kato T, Yoshida K, Tsuda T : Serological and genetic characterization of newly isolated Peaton virus in Japan, *Arch Virol*, 147, 401-410 (2002)
- [5] 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), (online), (<https://bmcvetres.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12917-016-0747-z>), (accessed 2019-05-17)
- [6] Kato T, Shirafuji H, Tanaka S, Sato M, Yamakawa M, Tsuda T, Yanase T : Bovine arboviruses in *Culicoides* biting midges and sentinel cattle in southern Japan from 2003 to 2013, *Transbound Emerg Dis*, 63, e160-e172 (2016), (online), (<https://doi.org/10.1111/tbed.12324>), (accessed 2019-05-17)
- [7] Matsumori Y, Aizawa M, Sakai Y, Inoue D, Kodani M, Tsuha O, Beppu A, Hirashima Y, Kono R, Ohtani A, Yanase T, Shirafuji H, Kato T, Tanaka S, Yamakawa M : Congenital abnormalities in calves associated with Peaton virus infection in Japan, *J Vet Diagn Invest*, 30, 855-861 (2018)
- [8] 吉岡耕治 : 妊娠期の異常, 牛病学, 明石博臣, 江口正志, 神尾次彦, 加茂前秀夫, 酒井 豊, 芳賀 猛, 眞鍋 昇編, 第 3 版, 162-167, 近代出版, 東京 (2013)
- [9] Ohashi S, Yoshida K, Yanase T, Kato T, Tsuda T : Simultaneous detection of bovine arboviruses using single-tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction, *J Virol Methods*, 120, 79-85 (2004)
- [10] Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ : Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis, *Arch Virol*, 136, 309-323 (1994)
- [11] 松森洋一, 石丸憲二, 大橋誠一, 津田知幸 : 長崎県で分離されたピートンウイルスの性状と浸潤状況, *日獣会誌*, 55, 215-218 (2002)
- [12] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S : MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, *Mol Biol Evol*, 28, 2731-2739 (2011)

Abortion and Congenital Malformations in Cattle Suspected of being Caused
by Peaton Virus Infection in Okayama, Japan,
from October 2016 to April 2017

Yuri HIROSE¹⁾, Chiaki MIZUKAMI¹⁾, Narumi UTAKA²⁾, Shogo TANAKA³⁾
and Hiroaki SHIRAFUJI^{3)†}

1) *Okayama Livestock Hygiene Service Center, 2770-1 Mitsukochi, Kita-ku, Okayama, 709-2123, Japan*

2) *Tsuyama Livestock Hygiene Service Center, 547-8 Kusakabe, Tsuyama, 708-1117, Japan*

3) *Kyushu Research Station, National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization (NARO), 2702 Chuzan, Kagoshima, 891-0105, Japan*

SUMMARY

This paper describes pathological features of 8 cattle presumably associated with Peaton virus (PEAV) infection in Okayama, Japan, from October 2016 to April 2017. Among those cattle, the case of an abortion had neither spinal curve nor arthrogyrosis based on gross observations, while 7 calves exhibited congenital malformations. Immunohistochemical examinations revealed PEAV antigens in the cerebrum of 3 cases, including 1 aborted fetus and 2 cases with malformations. PEAV RNA was also detected in the brains of 2 cases, including the aborted fetus. In all 7 calves with malformations, relatively high titers of neutralizing antibodies against PEAV were detected. In addition, PEAV seroconversion was confirmed in sentinel cattle from September 2016 to November 2016 in Okayama. Although congenital malformations in the newborn calves associated with PEAV infections have previously been well documented in Japan, there is little information concerning the pathological features of abortion. This is the first report on an abortion presumably associated with PEAV infection. — Key words : arbovirus, cattle, congenital malformations, Peaton virus.

† *Correspondence to : Hiroaki SHIRAFUJI (Kyushu Research Station, National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization (NARO))
2702 Chuzan, Kagoshima, 891-0105, Japan
TEL 099-268-2078 FAX 099-268-3088 E-mail : shirah@affrc.go.jp*

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 73, 133 ~ 139 (2020)