

9. 県内で発生したピートンウイルスの関与を疑う牛の異常産

7 症例

大分家畜保健衛生所・玖珠家畜保健衛生所¹⁾・宇佐家畜保健衛生所²⁾

○病鑑 中出圭祐・中西年治・病鑑 林拓己

病鑑 大木万由子・手塚溪¹⁾・佐伯美穂²⁾

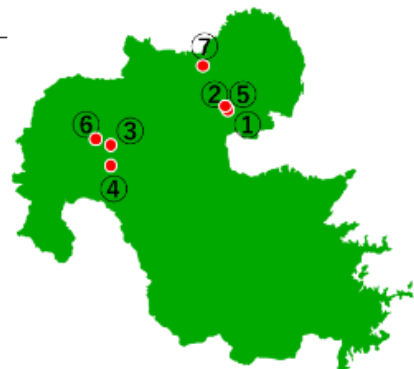
1. はじめに

2019年9月に1頭の流産(症例1)、2020年1~3月に頭部変形、大脳菲薄化、脊柱湾曲、関節拘縮などを伴う計6頭の体型異常子(症例2~7)が確認され、ピートンウイルス(PEAV)の関与が疑われたため、病性鑑定の概要を報告する。

2. 発生概要

発生日は2019年9月から2020年3月まで、県北部が4症例、県西部が3症例ですべて黒毛和牛で発生(表1、図1)、症例2と症例5は同一農場だった。胎齢は症例1は209日で流産であり、そのほかの症例では流産はなかった。

NO.	1	2	3	4	5	6	7
品種	黒毛和種	黒毛和種	黒毛和種	黒毛和種	黒毛和種	黒毛和種	黒毛和種
発生日	2019年 9月26日	2020年 1月14日	2020年 1月15日	2020年 2月5日	2020年 2月10日	2020年 2月10日	2020年 3月26日
胎齢	209 (流産)	278	286	282	253	285	260
産子の生死	死	生存	死	死	死	生存	死
初乳摂取	-	+	-	-	-	-	-
		初乳製剤※1					
母牛ワクチン※2	+	-	-	+	-	+	-
備考	5と同一農場			2と同一農場			



※1 抗PEAV中和抗体価<8を確認済み、※2 異常産3種混合ワクチン(PEAVは含まず)

表1(左) : 発生概要

図1(右) : 発生地図(数字は症例No.)

3. 異常産の病性鑑定の材料と方法

(1) 病理解剖検査 : 定法に基づき実施した。

(2) 病理組織学的検査

① 中枢神経系臓器及び骨格筋のHE染色を実施

② 中枢神経系臓器及び骨格筋の抗PEAVウサギ免疫血清を用いた免疫組織化学的染色(SAB法)を実施

(3) ウイルス学的検査

① PCR検査

i アルボウイルスウイルス検出用マルチプレックスRT-PCR : 産子の中枢神経系

臓器、母牛の血清

ii ペスチウイルス検出用 PCR：産子の中樞神経系臓器、母牛の血清

- ② シークエンス、分子系統樹解析：①の i の検査で陽性の検体は S 及び M ゲノム分節のシークエンスと分子系統樹解析を実施した。
- ③ ウイルス分離：産子的大脑及び脳幹を HmLu-1 細胞、BHK21 細胞、牛胎子的大脑や小脳などから自作した初代培養細胞で回転培養や静置培養で 3 代盲継代した。
- ④ 中和抗体検査：母牛血清、産子血清または体液について、PEAV、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、サシュペリウイルス、シャモンダウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス 1 型及び牛ウイルス性下痢ウイルス 2 型に対する中和抗体検査を実施した。

(4) 細菌学検査：定法に基づき実施した。

4. 異常産の病性鑑定の検査結果

(1) 病理解剖検査

外貌では全く著変の見られないもの、体型異常が軽度のもの、体型異常が強くみられるものが確認された（写真 1～4）。また、脊椎が湾曲しているもの（写真 5）、頭部の変形が見られるもの（写真 6）、大腦が低形成で小脳が未形成で脳室は拡張しているもの（写真 7, 8）などがあり、頭部変形、関節拘縮などの重度の体型異常を呈するものから、四肢の伸展などの軽度の体型異常を呈するもの、著変が全くないものまで病変の程度は様々だった。（表 2）



写真 1：症例 1



写真 2：症例 3



写真 3：症例 5



写真 4：症例 6



写真 5 : 症例 7



写真 6 : 症例 7

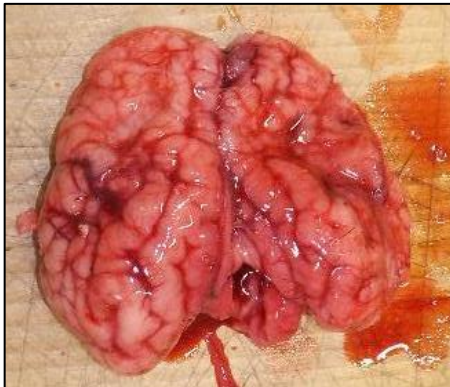


写真 7 : 症例 5



写真 8 : 症例 5

症例No.	1	2	3	4	5	6	7
頭部変形				+	+	+	+
脊柱湾曲			+	+	+		+
四肢 屈曲or伸展		+					+
関節拘縮			+		+		+
脳室拡張			+	+	+		+
大脳菲薄化					+		
小脳低形成			+	+	+		+

表 2 : 外貌、病理解剖検査所見一覧表

(2) 病理組織学的検査所見 (表 3)

- ① HE 染色 : 大脳などの中枢神経組織では非化膿性脳炎に特徴的な囲管性細胞浸潤 (症例 1, 2, 5, 7) やグリア結節 (症例 2, 4, 5, 6) が見られた (写真 9, 10)。また、脊髄の大型神経細胞の減数 (症例 2, 3, 4, 7) や骨格筋の筋繊維消失と脂肪置換 (症

例 2, 3, 5, 7) が見られた (写真 11, 12)。

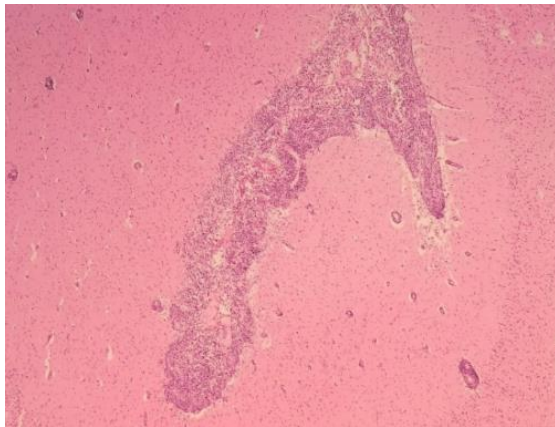


写真 9 : 症例 1 大脳 対物×4

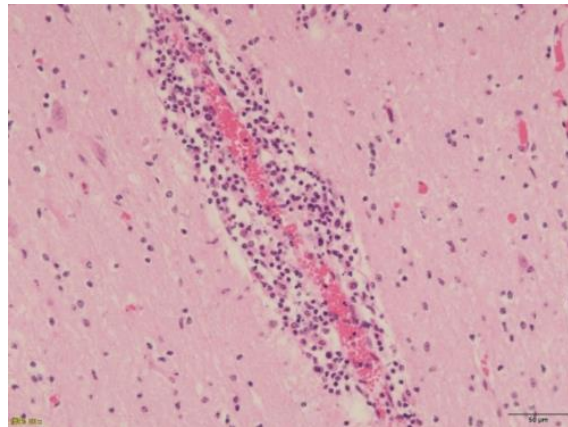


写真 10 : 症例 3 大脳 対物×4

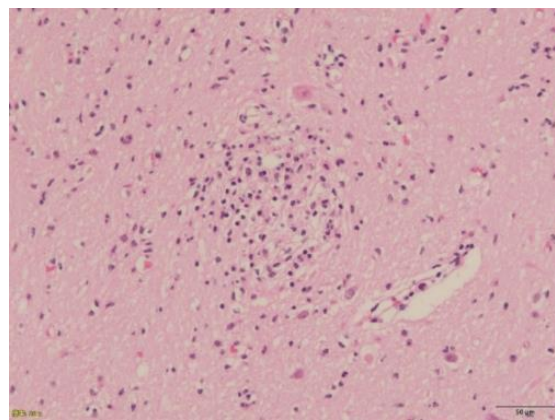


写真 11 : 症例 3 大脳 対物×4

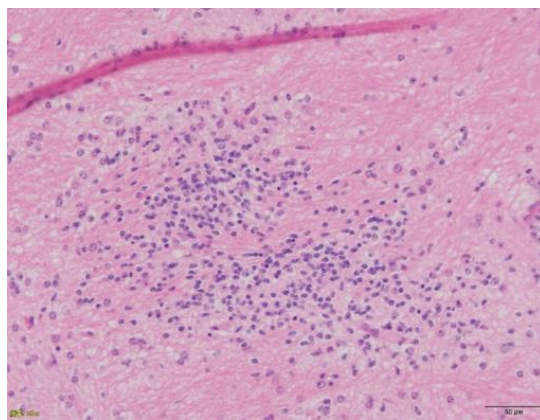


写真 12 : 症例 6 間脳 対物×20

② 免疫組織化学的染色：中枢神経組織の神経細胞の細胞質や軸索に抗原反応が見られた (症例 1, 5) (写真 13~18)

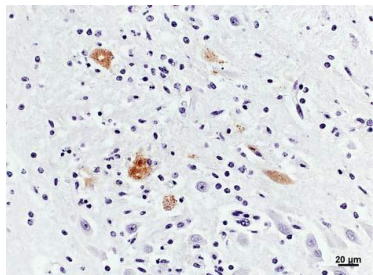


写真 13 : 症例 1 視床

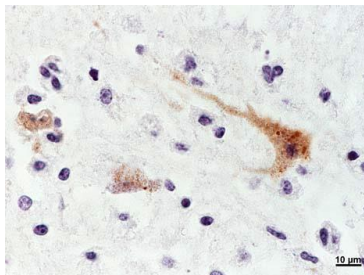


写真 14 : 症例 1 視床

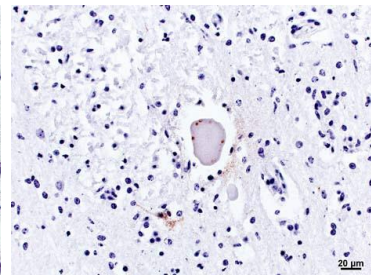


写真 15 : 症例 1 中脳

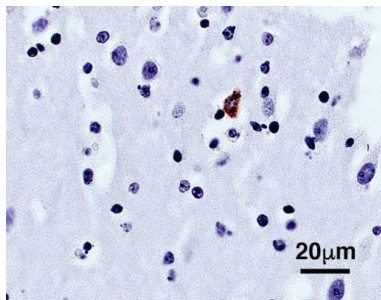


写真 16 : 症例 5 大脳

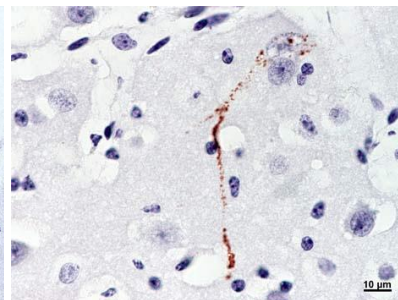


写真 17 : 症例 5 大脳

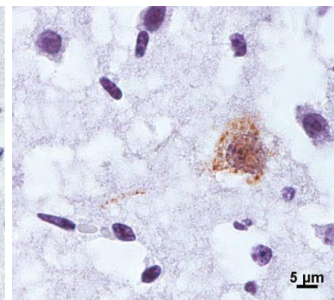


写真 18 : 症例 5 大脳

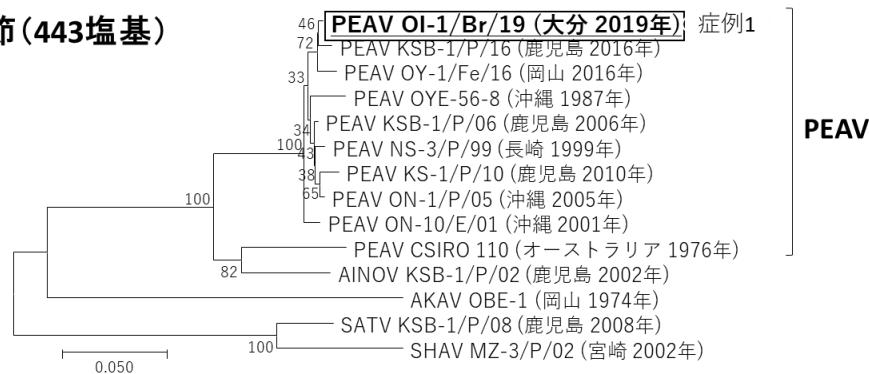
症例NO.		1	2	3	4	5	6	7
H.E染色	大脳							
	血管性細部浸潤	+	+			+		+
	グリア結節 グリア細胞集簇		+		+	+	+	
	石灰様沈着物					+	+	
小脳								
分子層の菲薄化 プルキンエ細胞の減数 顆粒層細胞の減数			+	+	NT			
脊髄								
髄膜への細胞浸潤 腹角の神経細胞の 重度減数～消失	+		+	+	+			+
白質が未発達 髄鞘の脱落								+
骨格筋	消失・脂肪置換		+	+		+		+
免疫組織 化学的染色	大脳	+				+		
	中脳	+		NT	NT	+	NT	NT
	延髄	+			NT		NT	NT
	頸髄	+		NT	NT		NT	

表3：病理学的検査所見一覧表

(3) ウイルス学的検査

- ① PCR 検査：産子大脳及び脳幹（プール）から PEAV の特異遺伝子を確認（症例1）。
- ② シークエンス、分子系統樹解析：S ゲノム分節、M ゲノム分節の両方で 2016 年に鹿児島県でおとり牛から分離された株と最も高い相同性を示した（相同性 S ゲノム分節：99.10%、M ゲノム分節：98.65%）（症例1）（図2）。

Sゲノム分節(443塩基)



Mゲノム分節(445塩基)

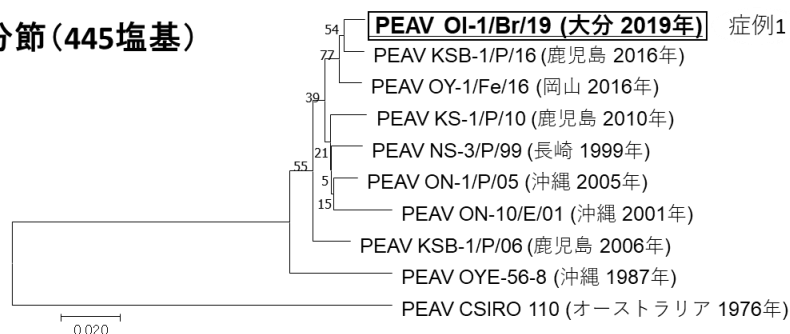


図2：旧 Simbu 血清群ウイルスの S ゲノム分節部分配列（443 塩基）に基づく分子系統樹（上）、PEAV の M ゲノム分節部分配列（445 塩基）に基づく分子系統樹（下）

③ ウイルス分離：すべて陰性

④ 中和抗体検査：母牛と産子の両方で PEAV に対する中和抗体を確認した（症例 2, 3, 4, 6, 7）（表 4）。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、サシュペリウイルス、シャモンダウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス 1 型、牛ウイルス性下痢ウイルス 2 型に対して、母牛と産子の両方で中和抗体が確認されたものはなかった。

症例No.	1	2	3	4	5	6	7
母牛	256≤	16	128	16	NT	64	128
産子					NT		
血清		32	32	256≤			
胸水or腹水	<8			胸水64 腹水128			
脳脊髄液						8	128

表 4：PEAV の中和抗体検査

(4) 細菌学検査：すべて陰性。

5. 異常産の病性鑑定の診断

PCR や免疫染色で特異遺伝子や抗原を確認（症例 1, 5）、病理組織検査で非化膿性脳炎や矮小筋症等の所見を確認（症例 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7）、抗体検査で母子の両方で抗体を確認（症例 2, 3, 4, 6, 7）したことから、7 症例を PEAV の関与を疑う異常産と診断した（表 5）。既報では PEAV の関与が疑われる異常産は非化膿性脳炎や体型異常が主症状であり、症例 1 は体型異常の伴わない流産と貴重な症例となった。

症例No.	1	2	3	4	5	6	7	
胎齡	209 (流産)	278	286	282	253	285	260	
体型異常 頭部変形・脊柱彎曲 関節拘縮・大脳菲薄化 小脳低形成 等	-	+ (軽度)	+	+	+	+ (軽度)	+	
PCR	+	-	-	-	-	-	-	
免疫染色	+	-	-	-	+	-	-	
病理組織検査 HE染色等 血管性細胞浸潤 グリア結節 骨格筋の消失・脂肪置換 脊髄神経細胞減数 等	+	+	+	+	+	+	+	
抗PEAV 中和抗体	母牛	256≤	16	128	16	NT	64	128
	産子	<8	32	32	256≤	NT	8	128

表 5：病性鑑定検査成績のまとめ

6. PEAV 浸潤状況調査（おとり牛の PEAV 抗体検査）

未越夏牛 70 頭について、4 回（2019 年 6 月、8 月、9 月、11 月）血清を採取し、PEAV に対する中和抗体検査を実施。8 月に 70 頭中 18 頭、9 月に 12 頭、11 月に 5 頭、合計 35 頭の抗体陽転牛を確認した。また、陽転頭数は大分家保管内で少なかったものの、他の管内では大きな差はなかった。陽転頭数が 35 頭と例年と比較して突出して多く、広範囲、長期間のウイルス浸潤が PEAV の関与を疑う異常産の発生増の原因と考えられた。

	6月	8月	9月	11月	合計
大分	0/10	2/10	1/10	0/10	3/10
豊後大野	0/20	10/20	1/20	0/20	11/20
玖珠	0/20	4/20	3/20	2/20	9/20
宇佐	0/20	2/20	7/20	3/20	12/20
合計	0/70	18/70	12/70	5/70	35/70
2018年	0/70	3/70	11/69	0/67	14/70
2017年	0/70	0/70	0/70	0/70	0/70
2016年	0/71	0/71	0/71	18/68	18/71
2015年	0/71	0/71	0/68	2/66	2/71

表 6：おとり牛の PEAV 抗体検査結果

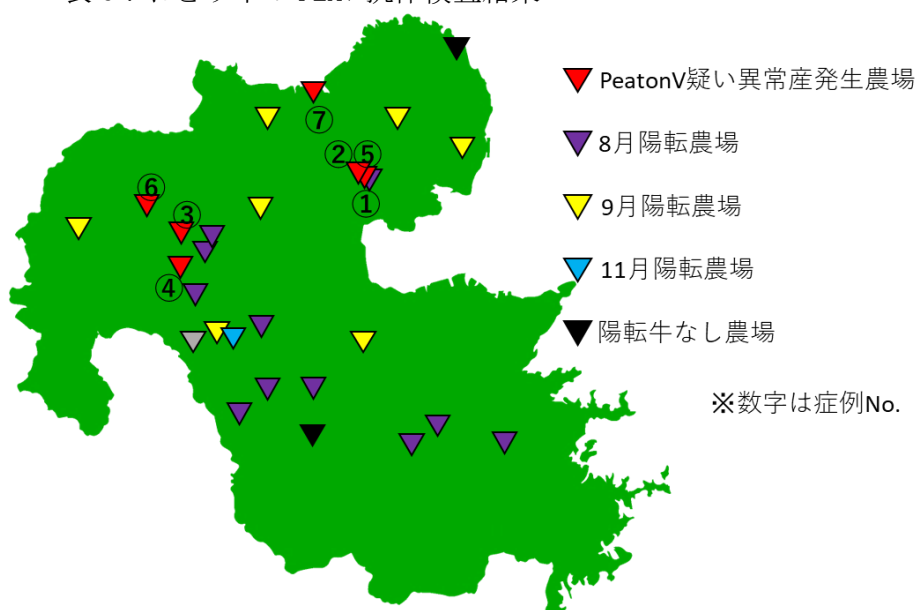


図 3：おとり牛の PEAV 抗体検査地図

7. PEAV 侵入時期の推定（症例 1, 2, 5）

(1) 症例 2, 5 発生農場について、2019 年度初夏～晩秋に継続的に採血している同居牛 10 頭の保存血清（2 カ月毎に 10 頭を採血（奇数月 5 頭、偶数月 5 頭））の抗 PEAV 中和抗体検査を実施。2019 年 9 月 4 日と 10 月 3 日の血清で抗体価が上昇していることを確認した。

	5/7	6/7	7/4	8/2	9/4	10/3	11/8	12/10
①		<2		<2		128		128
②	<2		<2		128		128	
③		<2		<2		32		64
④		<2		<2		<2		<2
⑤		<2		<2		2		2
⑥		<2		<2		<2		<2
⑦	<2		<2		2		2	
⑧	<2		<2		<2		<2	
⑨	<2		<2		256 ≤		64	
⑩	4		4		<2		<2	

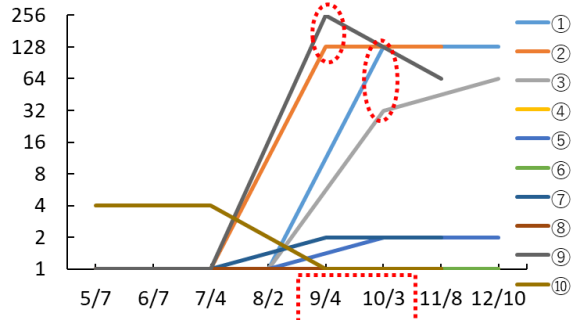


表 7 (左) : 症例 2, 5 発生農場同居牛の PEAV 抗体検査結果一覧表

図 4 (右) : 症例 2, 5 発生農場同居牛の PEAV 抗体検査結果グラフ

(2) 「6. PEAV 浸潤状況調査 (おとり牛の PEAV 抗体検査)」を実施した 70 頭のうち、症例 1 発生農場、症例 2, 5 発生農場の隣接農場で飼養されているおとり牛 4 頭は 2019 年 8 月 29 日の血清で抗体価が上昇していることを確認した。

	6/17	8/29	9/25	11/28
⑪	4	8	8	4
⑫	16	2	4	2
⑬	2	128	256 ≤	256 ≤
⑭	2	256 ≤	256 ≤	256 ≤

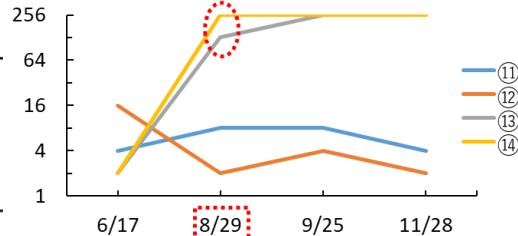


表 8 (左) : 症例 1 発生農場、症例 2, 5 発生農場に隣接農場で飼養されるおとり牛の PEAV 抗体検査結果一覧表

図 5 (右) : 症例 1 発生農場、症例 2, 5 発生農場に隣接農場で飼養されるおとり牛の PEAV 抗体検査結果グラフ

(3) (1) (2)の結果、PEAV に感染後、抗体価が上昇し始めるまでの期間を 6 日、中和抗体価がピークに達するまでの期間を 14 日と仮定すると、7 月 27 日～8 月 15 日に症例 1 発生農場、症例 2, 5 発生農場にピートンウイルスが侵入したと推察した。

8. PEAV 侵入時期と病変の関連 (症例 1, 2, 5)

「7. PEAV 侵入時期の推定」の結果、ウイルスの農場侵入時期を各症例の胎齢を併せると、症例 1 は胎齢 148～167 日、症例 2 は胎齢 107～126 日、症例 5 は胎齢 55～74 日に感染したと考えられた (図 6 下段)。

また、学会において国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生部門よりピートンウイルスの感染試験の結果が発表されており、胎齢 150 日のウイルス接種では接種直後の解剖では非化膿性脳炎の所見があったものの、ウイルス接種牛は正常分娩し、産子は体型異常もなく非化膿性脳炎の所見もなかったことから、胎齢 150 日以降の感染では胎子は抵抗性を有し、異常産は発症しないと考察されている。別の感染試験では胎齢 40 日のウイルス接種では胚は死滅しており、これまでの野外症例も併せて考えると体型異常を引き起こす最も感受性のある胎齢が 70～120 日であると推定されている (図 6 上段)。

症例1では胎齢150日前後以降での感染と考えられ、体型異常が見られなかったという点では動衛研の感染試験のデータと一致するが、非化膿性脳炎が形成され、流産を引き起こしたという点では異なる結果となった。また、症例2では体型異常の高感受性胎齢70～120日の終わり頃もしくは終了後に感染したと考えられ、体型異常は四肢の伸展のみと軽度だった。症例5では高感受性期間胎齢70～120日より前、もしくは始め頃に感染したと考えられ、頭部変形、脊柱彎曲、関節拘縮、大脳の菲薄化、小脳低形成など重度の病変が確認されたことから、高感受性期間胎齢70～120日の中でも早い時期はより体型異常の病変が重度であり、遅い時期は比較的軽度である可能性が示唆された。(図6下段)

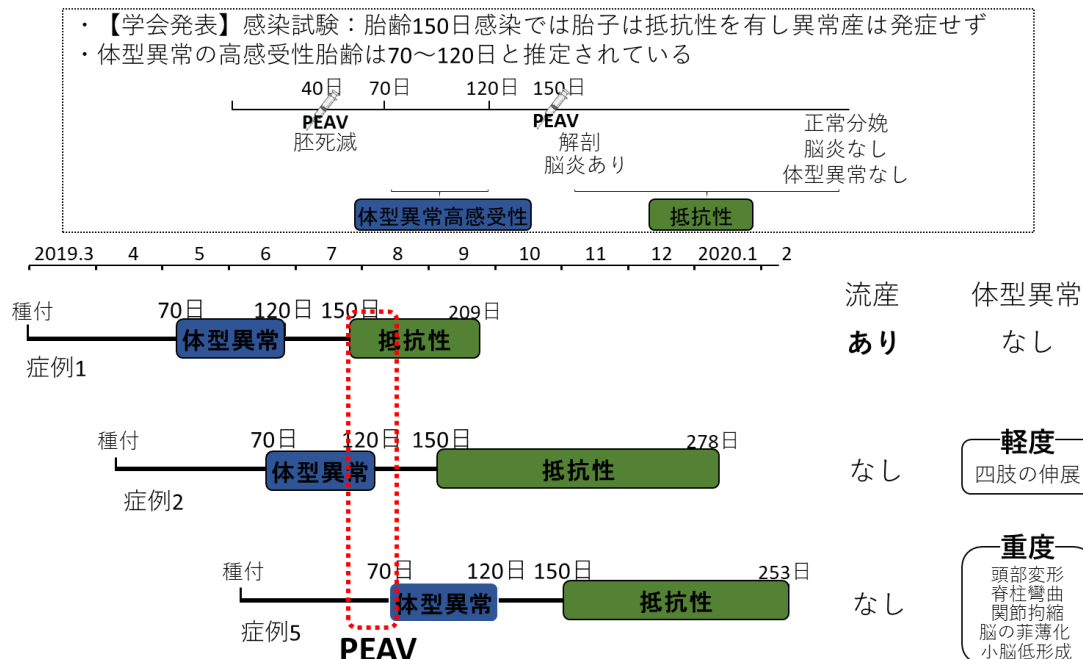


図6：PEAV侵入時期と病変の関連（症例1, 2, 5）

9. 終わりに

今回の発生を受け、大分県畜産協会では2020年度よりピートンウイルスが含まれる異常産4種混合ワクチンを助成の対象に追加した。

【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, Sanfacon 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)
- [13] 廣瀬友理，水上智秋，宇高成美，田中省吾，白藤浩明：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，日獣会誌，73，133～139（2020）
- [14] Antoine Poskin, Stephanie Verite, Loic Comtet, Yves Van der Stede, Brigitte Cay & Nick De Regge: Persistence of the protective immunity and kinetics of the isotype specific antibody response against the viral nucleocapsid protein after experimental Schmallenberg virus infection of sheep, *Veterinary Research* volume 46, Article number: 119 (2015)