

8 県内牛飼養農家で初めて分離された

D型インフルエンザウイルスと県内浸潤状況調査

東青地域県民局地域農林水産部青森家畜保健衛生所

○齋藤 豪 佐藤 宏樹
林 敏展 佐藤 尚人
阿部 知行 金野 加奈
須藤 隆史 渡部 巖

1 背景

D型インフルエンザウイルス（以下 IDV）は、2011年に米国において豚からC型インフルエンザウイルスと近縁なウイルスとして検出された¹⁾。その後、C型インフルエンザウイルスとは抗原性が異なることが確認されたことから²⁾、2016年に国際ウイルス分類委員会により”D型”と正式に認められた。

現在までに世界中のウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ラクダなど様々な動物から IDV に対する抗体が検出されているが、これまでに鶏などの家禽では抗体は確認されていない³⁻⁵⁾

米国においては抗体陽性率の高さから、主に牛の間で流行しているウイルスと考えられており、牛呼吸器病症候群（以下 BRDC）発症牛と健康牛におけるメタゲノム解析によると⁶⁻⁷⁾、IDV は呼吸器症状と有意に関連していた。

また、IDV の病原性については、実験感

染において、単独感染での病原性は低いが発病力は強いと報告されている⁸⁾。

日本においては、IDV の研究が近年になって進められているところであり、国内での流行状況や BRDC との関連性などはいまだ不明な点が多い状況である。県内においても浸潤状況は不明であり、県内で IDV が分離された事例はないため、過去の牛呼吸器疾病についての病性鑑定依頼材料を検索したところ、2 事例で IDV の遺伝子が検出された。

そこで今回、この 2 事例及び県内浸潤状況について IDV の調査を行ったので、その概要について報告する。

2 事例概要

(1) 事例 1

乳用牛 70 頭を飼養する農場において、2012 年、成牛 6 頭及び子牛 1 頭に発熱、発咳などの症状がみられ、その後、死亡牛が続発した。病性鑑定の結果、牛 RS ウイ

ルス及び *Mannhemia hemolytica* が関与した BRDC と診断された。

(2) 事例 2

乳用牛及び肉用牛 69 頭を飼養する農場において、2016 年、導入牛 2 頭中 1 頭に発熱がみられ、その後、発熱を示す牛が増加した。病性鑑定の結果、牛コロナウイルス及び牛 RS ウイルスが関与した BRDC と診断された。

3 材料と方法

(1) BRDC 事例調査

ア 材料

事例 1 については、鼻腔スワブ 10 検体、肺 2 検体、BRDC 発生 2~3 か月前に採材した牛血清 17 検体、発生時に採材した牛血清 10 検体を用いた。

事例 2 については鼻腔スワブ 17 検体、BRDC 発生時に採材した牛血清 16 検体と事例発生 3 週間後に採材した牛血清 15 検体を用いた。

イ 方法

(ア) 遺伝子検査

遺伝子検査は、鼻腔スワブ及び肺について牛ウイルス性下痢ウイルス、牛コロナウイルス、牛トロウイルス、牛アデノウイルス、牛 RS ウイルス、パラインフルエンザウイルス 3 型、牛ヘルペスウイルス、IDV の 8 種類のウイルスを検出するマルチプレックスリアルタイム PCR⁹⁾ を実施した。

(イ) ウイルス分離

ウイルス分離は、両事例の鼻腔スワブ 6 検体について HRT-18 細胞に接種後、トリプシンを添加して 1 週間 3 代培養した。分

離の判定は HA 試験と IDV のリアルタイム PCR により実施した。

(ウ) 遺伝子解析

遺伝子解析は、分離ウイルスの HEF 遺伝子配列についてダイレクトシーケンス解析及び系統樹解析を実施した。

(エ) 抗体検査

抗体検査は、牛血清について RDE 処理及び 50% 鶏血球吸着処理後、0.5% 鶏血球を用いて HI 試験を実施した。

(2) 県内浸潤状況調査

ア 材料

2015 年~2019 年に採材された牛血清 505 検体を用いた。

イ 方法

上記 3(1)イ(エ)と同様の方法で抗体検査を実施した。

ウ 比較項目

地域別陽性率、品種別陽性率、月齢別陽性率・抗体価、陽性率別農場数、個体別抗体価について比較した。

なお、陽性率別農場数、個体別抗体価の比較は 50 戸各 5 検体、計 250 検体を材料とした。

4 結果

(1) BRDC 事例

ア 遺伝子検査・ウイルス分離

表 1 には事例 1 において検出されたウイルスの結果を示しており、加えて発生当時に実施した細菌分離検査と臨床症状についても示した。

結果として 9 頭において IDV が検出され、重感染した 5 頭は起立不能、呼吸困難など重症となっており、IDV のみ検出され

た4頭は重感染した個体より症状が軽度である傾向が見られた。

表2には事例2において検出されたウイルスの結果等を示した。

結果として7頭においてIDVが検出され、IDVのみ検出された2頭は症状がなく、そのうち1頭がウイルス分離陽性であった。

表1 事例1における抗原検査結果

No.	材料	RSV			IDV			発生当時のその他検査結果	
		PCR	PCR	PCR	PCR	PCR	分離	細菌分離	臨床症状
1	スワブ	+	+	+	+	+	+	有意菌なし	起立不能、呼吸困難、流涙、膿様鼻汁
2	スワブ	-	+	+	+	+	+	<i>M. haemolytica</i>	起立不能、呼吸困難、流涙、膿様鼻汁
3	スワブ	-	+	NT	+	+	NT	<i>M. haemolytica</i>	起立不能、呼吸困難、膿様鼻汁
4	スワブ	+	+	NT	+	+	NT	<i>M. haemolytica</i>	流涙、呼吸困難、膿様鼻汁
5	スワブ	+	+	NT	+	+	NT	有意菌なし	元気・食欲なし、水様性鼻汁
6	スワブ	-	+	NT	+	+	NT	NT	元気・食欲なし、水様性鼻汁
7	スワブ	-	+	NT	+	+	NT	NT	元気・食欲なし、流涙、水様性鼻汁
8	スワブ	-	+	NT	+	+	NT	NT	症状なし
9	スワブ	-	-	NT	+	+	NT	NT	症状なし
10	スワブ	-	-	NT	+	+	NT	NT	症状なし
11	肺	-	+	NT	+	+	NT	<i>M. haemolytica</i>	死亡牛
12	肺	-	-	NT	+	+	NT	<i>M. haemolytica</i>	死亡牛

■ : 病原体複数検出
■ : IDV単独検出

表2 事例2における抗原検査結果

No.	材料	BCV		RSV		IDV		発生当時のその他検査結果		
		PCR	PCR	PCR	PCR	PCR	PCR	分離	細菌分離	臨床症状
1	スワブ	-	-	-	-	-	-	NT	有意菌なし	2/1 発熱 2/6 死亡
2	スワブ	-	-	-	-	-	-	+	有意菌なし	症状なし
3	スワブ	-	-	-	-	-	-	+	<i>M. haemolytica</i>	2/2 発熱
4	スワブ	-	-	-	-	-	-	NT	有意菌なし	2/2 発熱
5	スワブ	-	-	-	-	-	-	+	有意菌なし	症状なし
6	スワブ	-	-	-	-	-	-	+	<i>M. haemolytica</i>	2/2 発熱
7	スワブ	-	-	-	-	-	-	NT	有意菌なし	症状なし
8	スワブ	-	-	-	-	-	-	NT	有意菌なし	症状なし
9	スワブ	+	-	-	-	-	-	NT	有意菌なし	初発導入牛 その後発熱なし
10	スワブ	+	+	-	-	-	-	NT	有意菌なし	食欲不振
11	スワブ	+	+	+	+	+	+	-	<i>M. haemolytica</i>	症状なし
12	スワブ	+	-	-	-	-	-	NT	有意菌なし	2/3 発熱
13	スワブ	+	+	+	+	+	+	+	<i>M. haemolytica</i>	2/3 発熱
14	スワブ	+	+	-	-	-	-	NT	有意菌なし	症状なし
15	スワブ	+	+	+	+	+	+	NT	有意菌なし	2/4 発熱
16	スワブ	+	-	-	-	-	-	NT	<i>P. multocida</i>	症状なし

■ : 病原体複数検出
■ : IDV単独検出

イ ウイルス分離

表3にウイルス分離結果の詳細を示し

た。6検体について実施したところ、継代3代目で事例2のNo. 11を除いた5検体にHAがみられ、全検体についてIDV遺伝子陽性であった。

なお、全検体で細胞にCPEは認められず、培養上清に牛コロナウイルス遺伝子は確認されなかった。

このことから県内で初めてIDVの分離が確認された。

表3 ウイルス分離結果

事例	No.	1代目		2代目		3代目	
		HA価	PCR	HA価	PCR	HA価	PCR
1	1	<2	-	<2	-	32	+
	2	<2	+	<2	+	256	+
2	2	<2	+	<2	+	512	+
	6	<2	+	32	+	256	+
	11	<2	+	<2	+	<2	+
	13	<2	+	<2	+	64	+

ウ 遺伝子解析

図1にHEF遺伝子配列について系統樹解析結果を示した。IDVは大きく3系統あり、今回の分離株は2事例とも日本国内に広くみられる株と同系統であった。

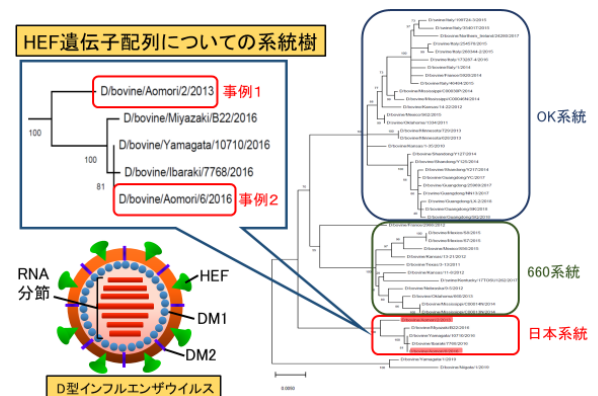


図1 系統樹解析結果

エ 抗体検査

図2は2事例における抗体検査結果を示した。なお、抗体陽性の判定はHI試験で抗体価が40倍以上とした。これは以降の抗体検査成績についても同様である。

事例1では、BRDC発生2～3か月前に比べ、発生時の陽性率が100%、GM値が298.6と大きく上昇していた。

また、事例2では、BRDC発生時と発生3週間後の陽性率、GM値に大きな変化は見られなかった。

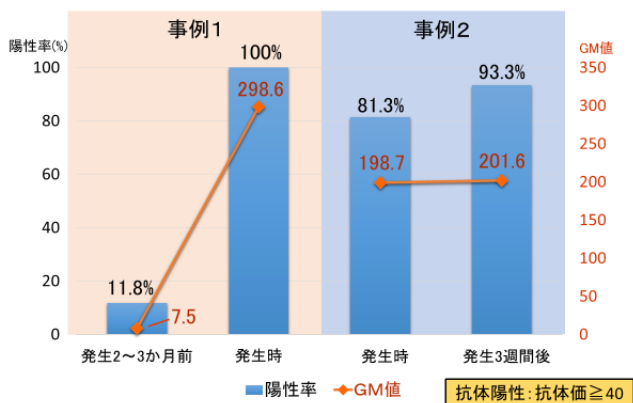


図2 2事例における抗体検査結果

(2) 県内浸潤状況調査

ア 地域別・品種別陽性率

図3は地域別・品種別陽性率の結果を示しており、県全体では32.3%となった。管内別では上北地域の陽性率が最も高く45.8%であった。

また、品種別の陽性率ではホルスタイン種が黒毛和種より高く50%であった。

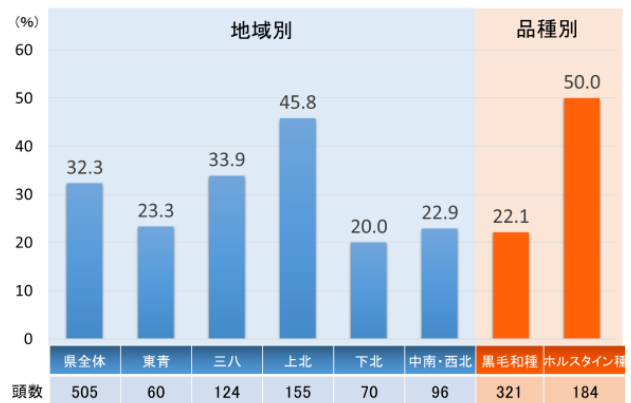


図3 地域別・品種別陽性率

イ 月齢別陽性率・抗体価

図4は月齢別陽性率を示しており、6～11か月齢において陽性率が低値で、その後、加齢に伴い上昇する傾向が見られた。

さらに図5には1歳未満における陽性率・抗体価を月齢別で示した。0か月齢で最も陽性率、GM値が高く、その後低下していき、6か月でほぼ抗体が消失した。

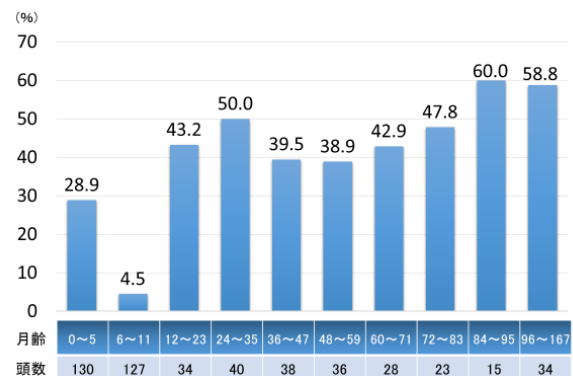


図4 月齢別陽性率

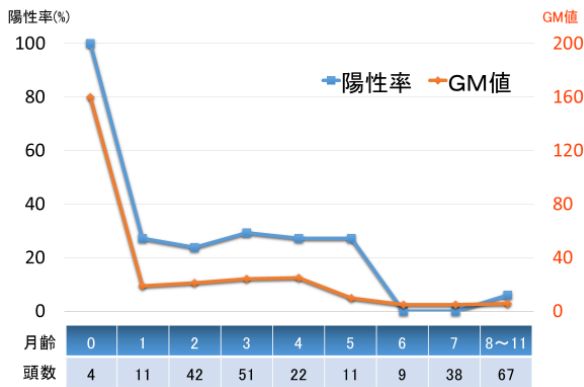


図5 1歳未満の月齢別陽性率・抗体価

ウ 陽性率別農場数・個体別抗体価

図6は陽性率別農場数・個体別抗体価を示した。なお、本発表ではインフルエンザウイルスの感染を約80%防御できるといわれる¹⁰⁾320倍以上の抗体価を高い抗体価とした。

全体の抗体価は10倍未満～1,240倍を示したが、そのうち320倍以上の高い抗体価を示す個体は32頭であった。

また、その32頭中22頭(68.8%)の個体が陽性率80%以上の農場で飼養されていた。

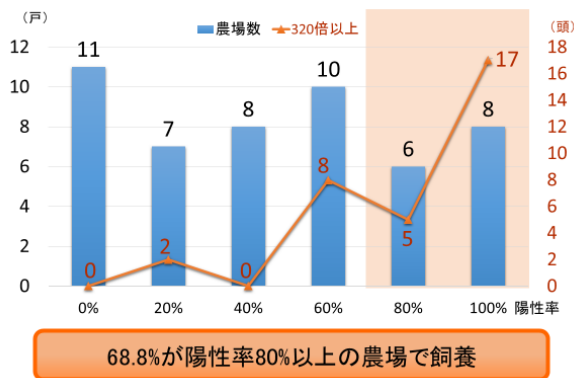


図6 陽性率別農場数・個体別抗体価

5 まとめ・考察

過去に発生したBRDC発生2事例において、県内で初めてIDVが分離されたことから、少

なくとも事例1が発生した2012年にはIDVが県内に侵入していたことが確認された。

また、県内の広い範囲で抗体が確認されたことからIDVは県内に広く浸潤していると考えられた。

更に、事例1においてBRDC発生前後で陽性率の大きな上昇がみられたことや、抗体が消失後、加齢に伴い陽性率が上昇していたこと、高い抗体価を示す個体が飼養される農場では陽性率が高かったことからIDVの強い水平伝播性が考えられた。

また、今回の2事例ではIDVが単独感染していた個体は症状が軽度であったことや無症状の牛からもウイルスが分離されたことから、IDVは単独感染では病原性が低い可能性が示唆された。

更に、事例1のBRDC発生時には抗体価が既に大きく上昇し、事例2のBRDC発生後の抗体価に大きな変化が見られなかったことから、IDVはBRDC発症の一時的要因になっている可能性が示唆された。

なお、品種別の陽性率に差があったことについては、品種による感受性に違いはないというこれまでの報告とは異なっており、引き続き詳細な調査が必要と考えられた。

以上のことから、今回の調査結果において、水平伝播性などの病態については既報と同様であると考えられた。しかし、IDVは未だ不明な点が多く、今後も調査を継続しBRDCへの関与などを含めたIDVの実態解明の一助とする所存である。

6 謝辞

本調査実施にあたり、ダイレクトシーケンス及び系統樹解析を実施していただいた

東京大学の村上先生に深謝する。

参考文献

- 1) Hause BM ら : Isolation of a novel swine influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza C viruses, PLoS Pathog, 9, e1003176 (2013)
- 2) Hause BM ら : Characterization of a Novel Influenza Virus in Cattle and Swine: Proposal for a New Genus in the Orthomyxoviridae Family, MBio, 5, e00031-e00014 (2014)
- 3) Ferguson L ら : Influenza D Virus Infection in Mississippi Beef Cattle, Virology, 486, 28-34 (2015)
- 4) Nedland H ら : Serological evidence for the co-circulation of two lineages of influenza D viruses in equine populations of the Midwest United States, Zoonoses Public Health, 65, e148-e154 (2018)
- 5) Salem E ら : Serologic Evidence for Influenza C and DVirus among Ruminants and Camelids, Africa, 1991-2015, Emerg Infect Dis, 23, 1556-1559 (2017)
- 6) TF Ng ら : A Metagenomics and Case-Control Study To Identify Viruses Associated with Bovine Respiratory Disease, J Virol, 89, 5340-5349 (2015)
- 7) Namita M ら : Metagenomic characterization of the virome associated with bovine respiratory disease in feedlot cattle identified novel viruses and suggests an etiologic role for influenza D virus
Journal of General Virology, 97, 1771-1784 (2016)
- 8) Lucas F ら : Pathogenesis of Influenza D Virus in Cattle, J Virol, 90, 5636-5642 (2016)
- 9) 齋藤豪ら : マルチプレックスリアルタイム PCR を活用した牛呼吸器病ウイルス遺伝子検査の効率化, 平成 30 年度青森県家畜保健衛生業績発表会集録, 38-42 (2019)
- 10) Trombetta CM ら : Overview of Serological Techniques for Influenza Vaccine Evaluation: Past, Present and Future, Vaccines, 2, 707-737 (2014)