

秋田県内で発生した兎出血病と検査法の検討

秋田県北部家畜保健衛生所
○李 英輝

● 兎出血病(RHD)について

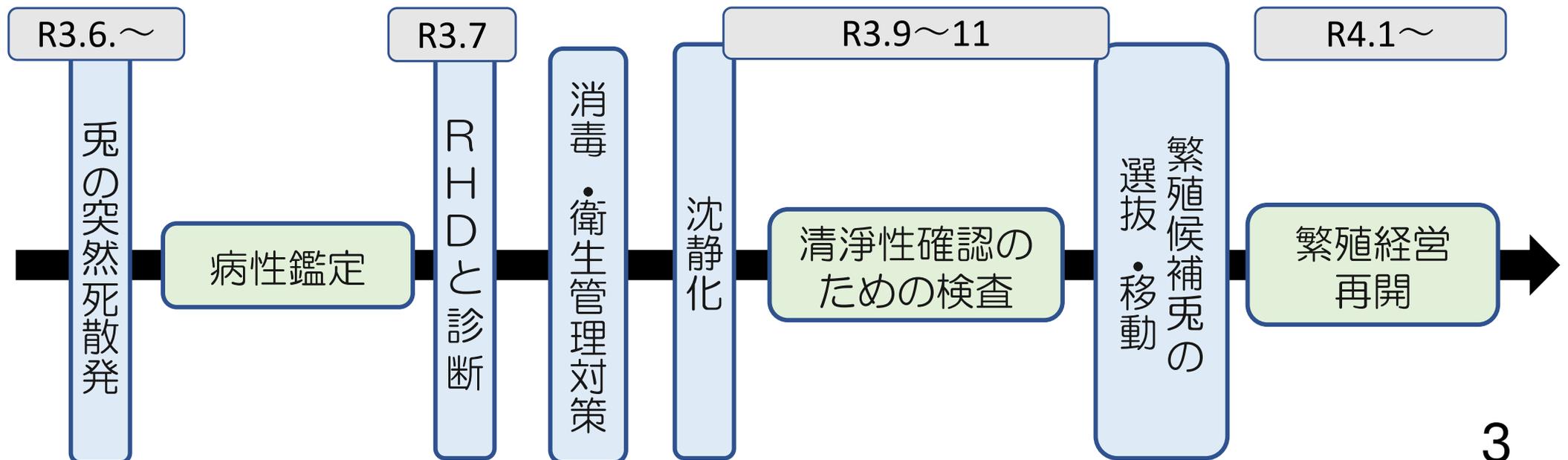
- カリシウイルス科 (Caliciviridae) ラゴウイルス属 (Lagovirus)
兎出血病ウイルス (RHDV)が原因
- 沈鬱、発熱、神経症状、鼻出血etc
半日～数日の経過で死亡する致死性の高い伝染性疾患
- ノンエンベロープウイルス、一部消毒薬に対し耐性
環境下では数週間程度感染性を保つ
- 1984年に中国で初めて確認。2010年にフランスでこれまでと
遺伝的に異なる**RHDV2型**が新興(**RHDV2**)
- **2019年以降国内でもRHDV2による兎の死亡事例が全国的に散発**
(栃木、福島、岩手etc)
- EUではワクチンが承認されているが、日本やアメリカでは未承認

**2021年秋田県で初となるRHDV2による兎出血病が発生
その後農場の清浄化を確認するため検査法を検討**

●概要

飼養畜種	兎（日本白色種）、鶏、めん羊
兎飼養羽数 (2021年4月時点)	2,500羽(第1農場:2,000羽、第2農場:500羽)
導入	2年に1回、北海道から種雄兎を導入
飼養形態	ハウス内に木製または金属製のケージで飼養

- 令和3年6月初旬ごろより第1農場兎舎で突然死が散発、21日まで15羽死亡
同日家保が立入、剖検
病性鑑定を行い7月15日にRHDと確定診断



●発生経過

第1農場
兔舎9棟

兔舎



第2農場
兔舎3棟



孵卵舎

鶏舎

鶏舎

鶏舎

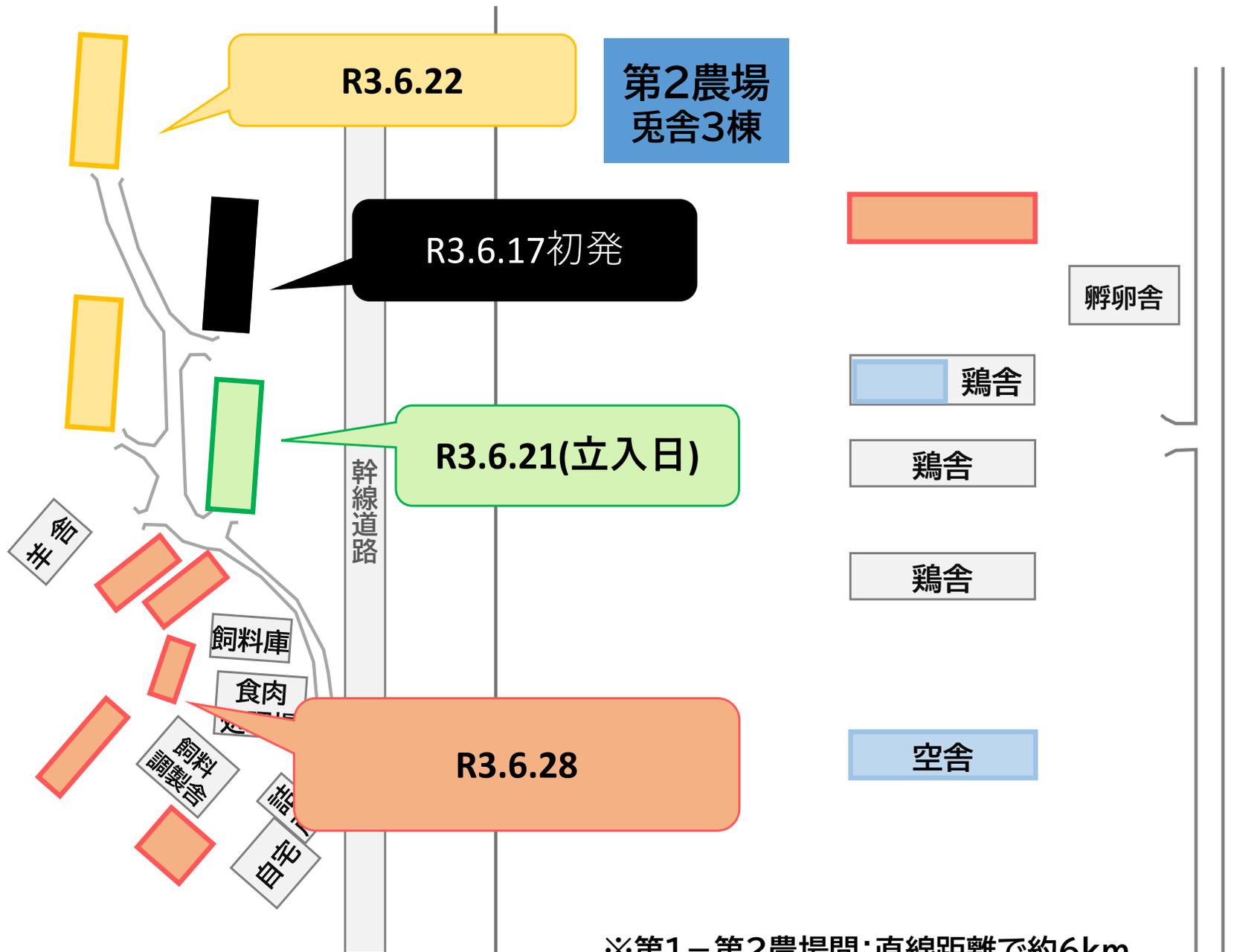
空舎

※第1－第2農場間:直線距離で約6km

●発生経過

第1農場
兔舎9棟

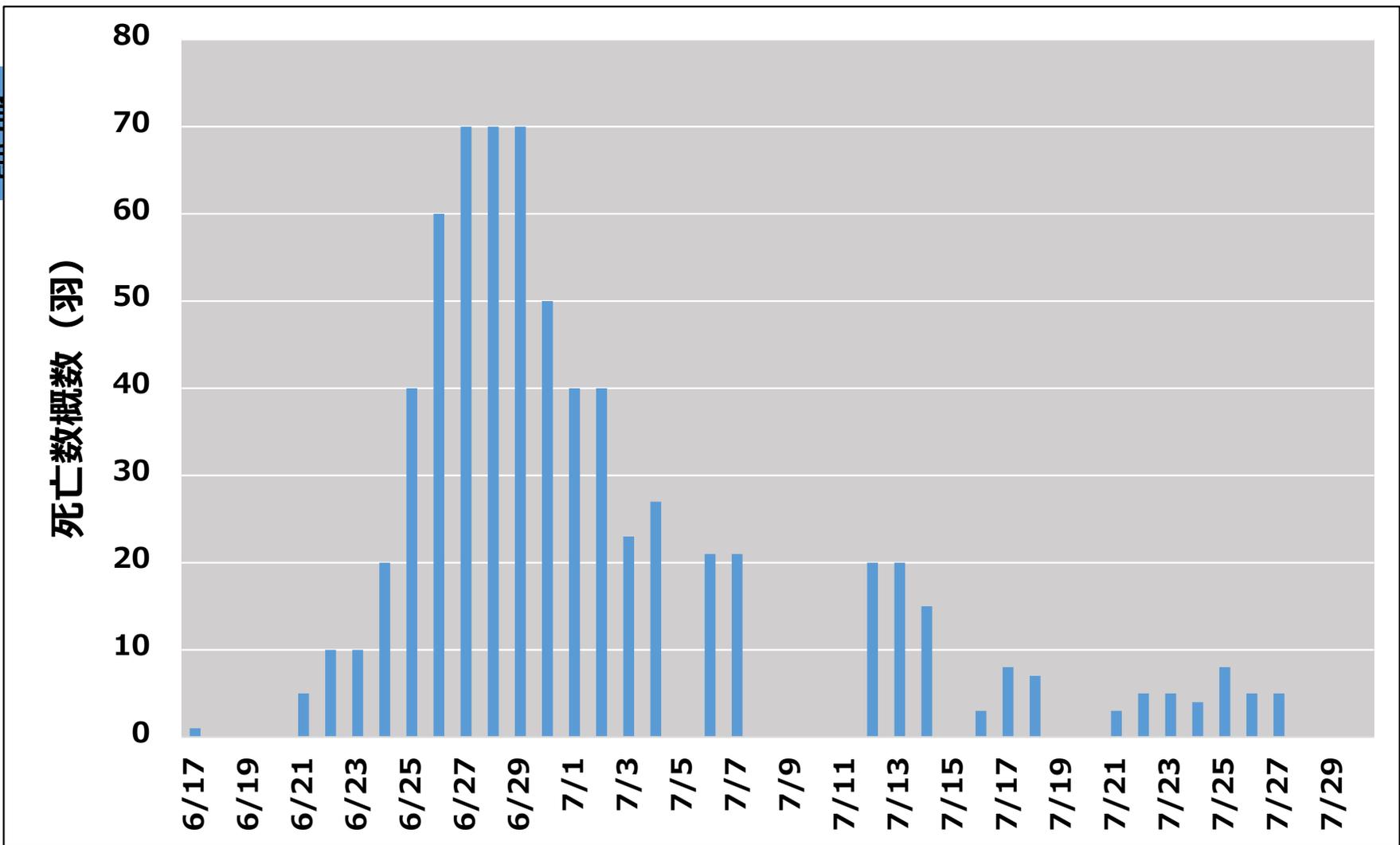
第2農場
兔舎3棟



※第1－第2農場間:直線距離で約6km

●発生経過

第 兎



発生から約1か月で**約2,000羽**が死亡

(飼養兎の**約80%**に相当)

●病性鑑定 材料と方法

■材料

死亡兎 5 検体(成畜3羽、子畜2羽)：臓器生材料、ホルマリン材料
心臓、気管および肺、肝臓、脾臓、腎臓、脳、糞便および尿

■検査方法

病理組織検査：定法で実施(HE染色、PTAH染色)

細菌検査：定法で実施

ウイルス検査：**(初回病性鑑定)**

RHDV RT-PCR

RHDV2 RT-PCR

PCR産物シーケンス解析

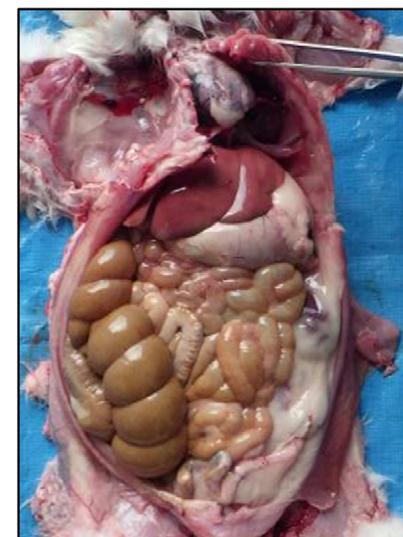
(清浄性確認のための検査)

新規プライマーおよびプローブ設計

Nested-RT-PCRおよびリアルタイムRT-PCRの検討

●剖検所見

検体	No.		1	2	3	4	5
	性		♀	♀	♂	♀	♂
	日齢		>1歳齢	>1歳齢	117日齢	117日齢	不明
所見	外貌			鼻出血	鼻出血		
	気管支	泡沫性粘液	○	○	○	○	○
		粘膜充血		○	○	○	
		粘膜充うっ血	○				
	肺	出血	○	○	○	○	○
	肝臓	脆弱	○	○	○	○	○
		褪色	○	○			

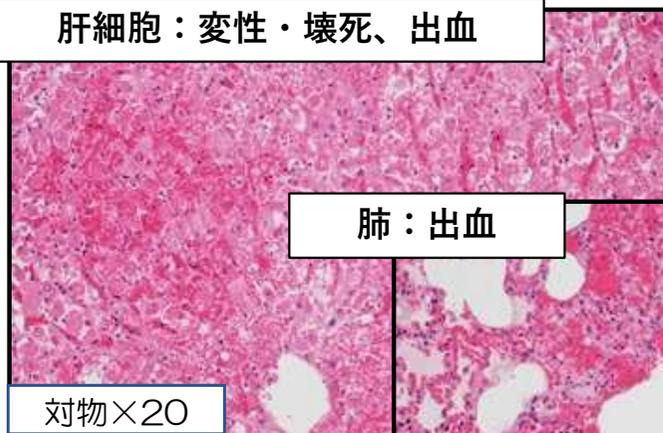


●検査結果(病理検査・細菌検査)

◆病理組織検査

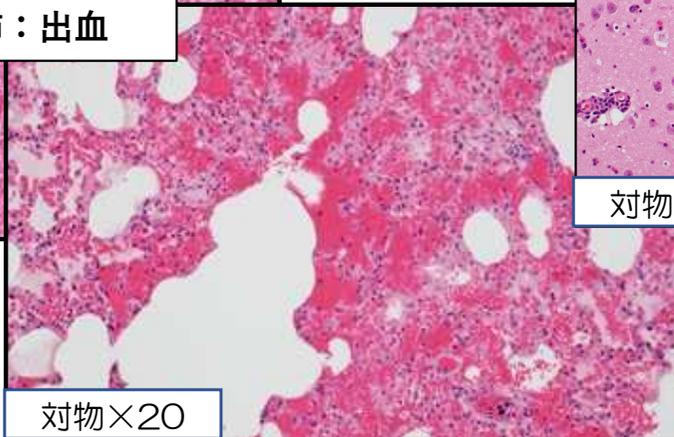
No.	区分	肝臓	肺・気管支・心臓・脾臓・腎臓	大脳・中脳・小脳・延髄
No.1	成獣	壊死性肝炎	充うっ血、出血	
No.2	成獣	壊死性肝炎	充うっ血・出血	
No.3	成獣	壊死性肝炎	充うっ血・出血	
No.4	仔獣	壊死性肝炎	充うっ血・出血	
No.5	仔獣	壊死性肝炎	充うっ血・出血	多巣性壊死、囲管性細胞浸潤充うっ血

肝細胞：変性・壊死、出血



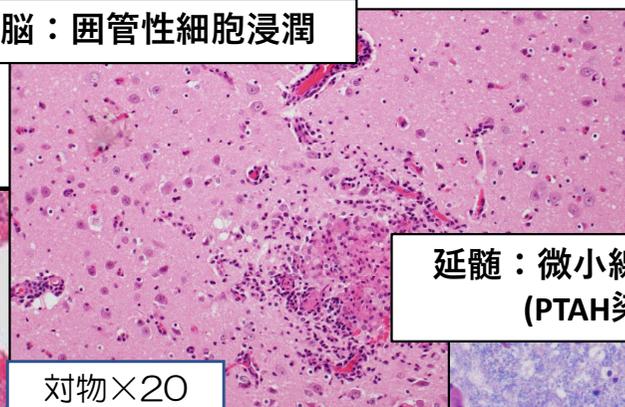
対物×20

肺：出血



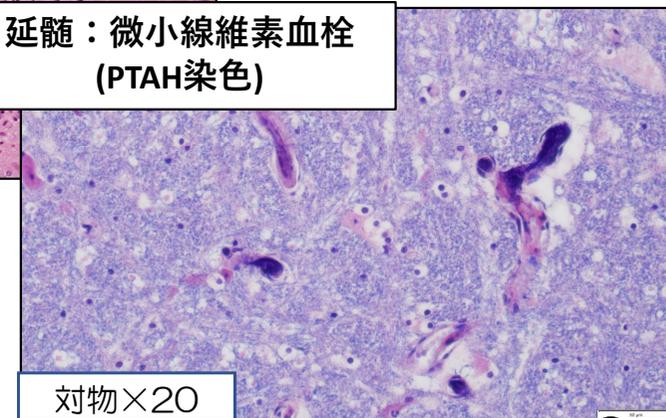
対物×20

大脳：囲管性細胞浸潤



対物×20

延髄：微小線維素血栓 (PTAH染色)



対物×20

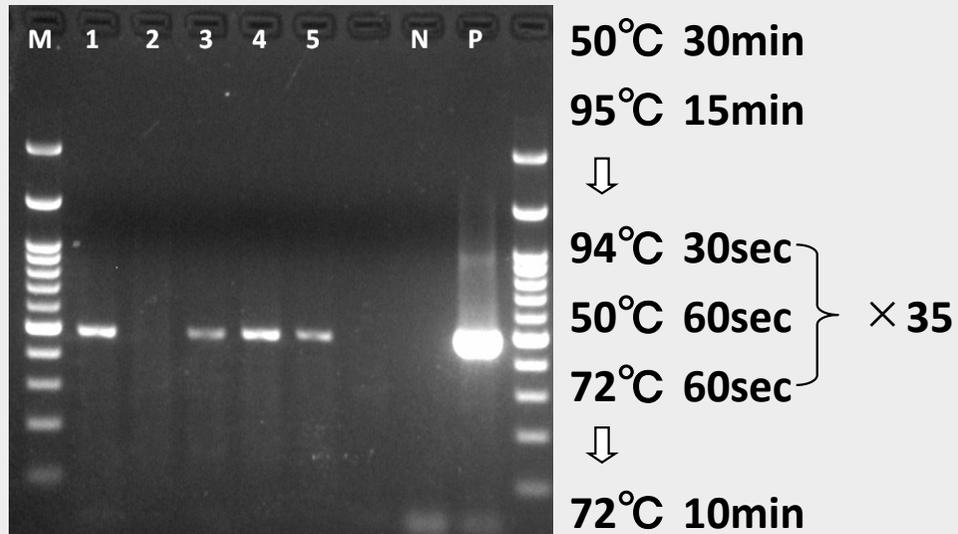
◆細菌検査

全検体有意菌分離陰性

●ウイルス検査(RT-PCR)

現行法

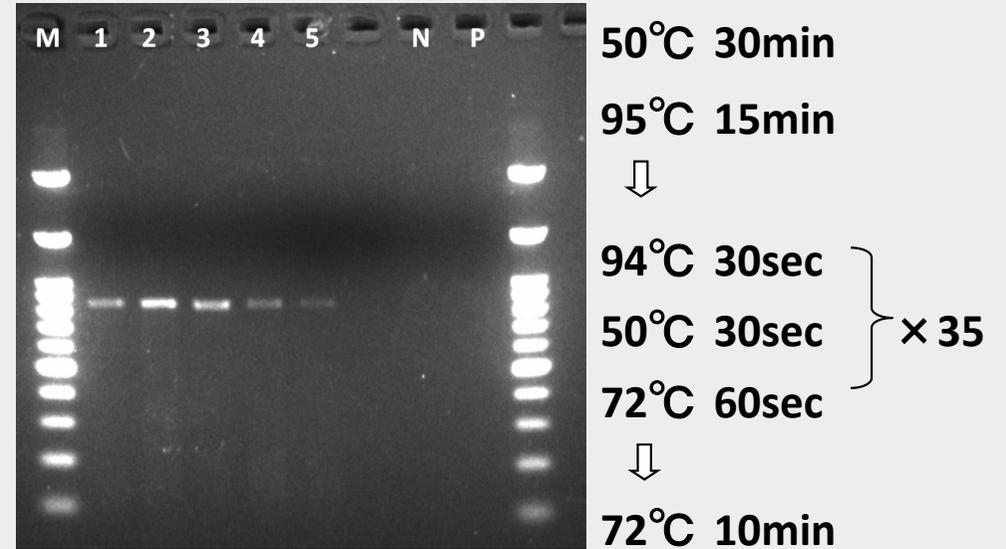
(Le Gall et al.1998 病性鑑定マニュアル 第4版)



RHDV2特異的RT-PCR(OIE法)

(WOAH Terrestrial Manual Chapter.3.7.2)

※共にQIAGEN onestep RT-PCRを使用

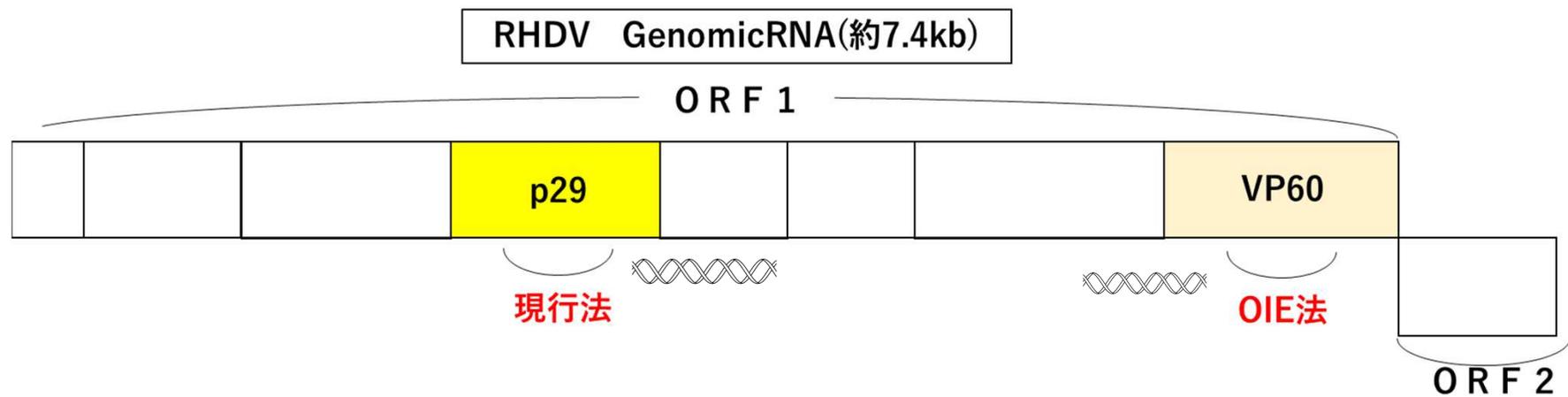


M:100bpマーカー N:ネガティブコントロール P:ポジティブコントロール(福島県中央家保より分与)

	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
現行法	+	-	+	+	+
OIE法	+	+	+	+	+

RHDV2による兎出血病と診断

●ウイルス検査(RT-PCR)



現行法・OIE法のPCR両増幅産物を塩基配列解析



国内で登録されたRHDV2の配列と99%以上相同

現行法のプライマー結合部位に5カ所の変異

Forward Primer

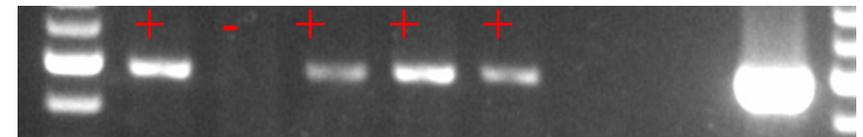
RHDV1 : GTTCACATATC**GAGGGCGAG**

RHDV2 : GTTCACATATC**AAAGGCAAG**

Reverse Primer

RHDV1 : GGTA**CTCAAGGGACCCTGTC**

RHDV2 : GGTA**TTCAAGGGACCCTGCC**



遺伝子が検出出来ない個体がいる
など感度低下の原因となっている可能性

●ウイルス検査(RT-PCR) 検査法検討

◆発生農場における衛生対策 ▶

10月以降、RHDによる死亡なし

- 繁殖の中止(空舎期間を設定し消毒、ケージを離し兎同士の接触防止)
- 作業員の専任化、専用の長靴や着衣の設置
- 農場内の作業動線の整理
- RHDVに有効な消毒の実施(アルデヒド製剤噴霧 + 消石灰散布)

繁殖経営再開のため、優秀且つウイルスフリーの個体を本場から第2農場へ移動のため清浄性確認のための検査依頼

糞便および環境スワブ材料を用いたPCRによる遺伝子検出

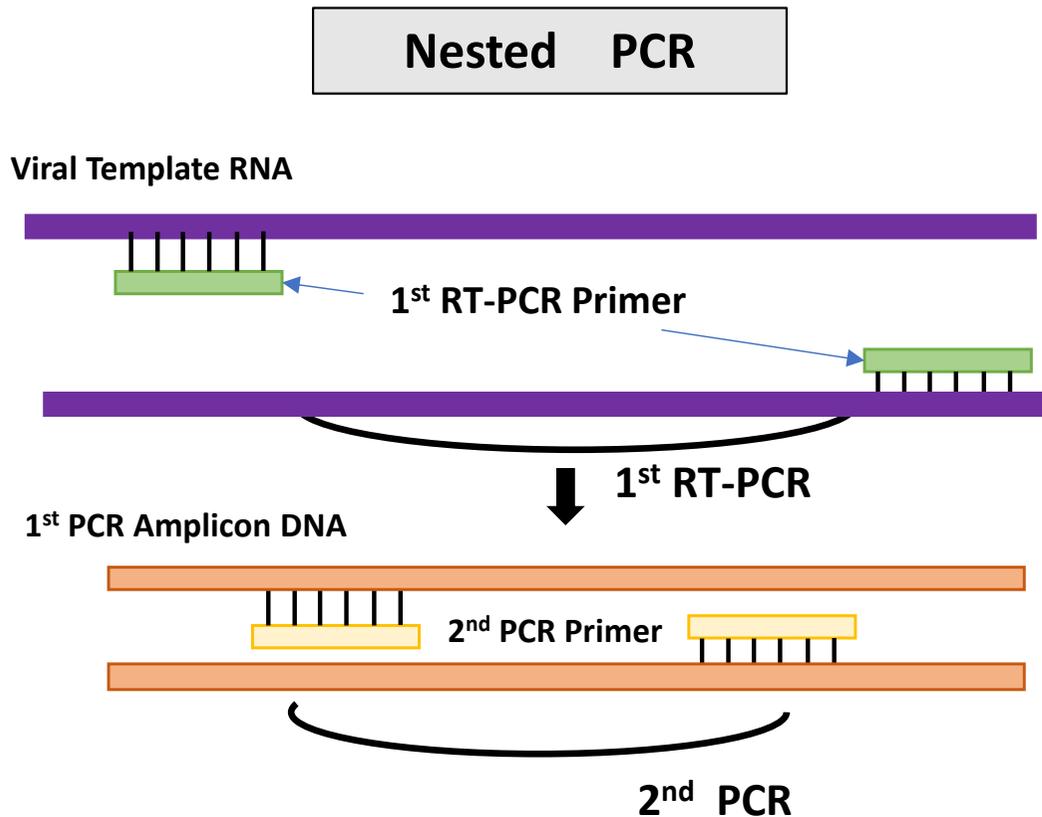
現行法よりも高感度の検査系を検討

NestedRT-PCR

リアルタイムRT-PCR

●Nested RT-PCR

- 相同性の高いRHDV2を元に新規プライマーを設計(Primer3plusを使用)
1型、2型比較し変異の少ない部分を選択



1stPCR

- Forward(2155-2174)

RHDV1 : TCATTCGAGGGGTGCCAACAA
RHDV2 : TCATTCGAGGGGTGCCAACAA

- Reverse(2774-2793) ※現行法のリバースプライマーと共通

RHDV1 : GACAGGGTCCCTTGAGTACC
RHDV2 : GAGAGGGTCCCGGTAATACC

2ndPCR

- Forward(2186-2205)

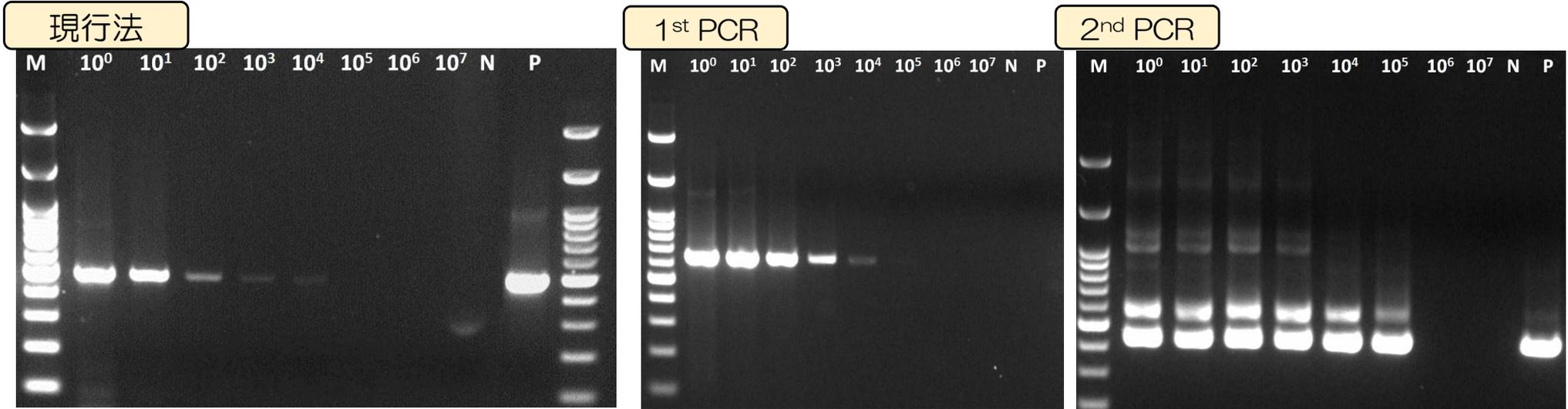
RHDV1 : TCTACCCAGACGCCAATAC
RHDV2 : TCTACCCAGACGCTCAATAC

- Reverse(2599-2618)

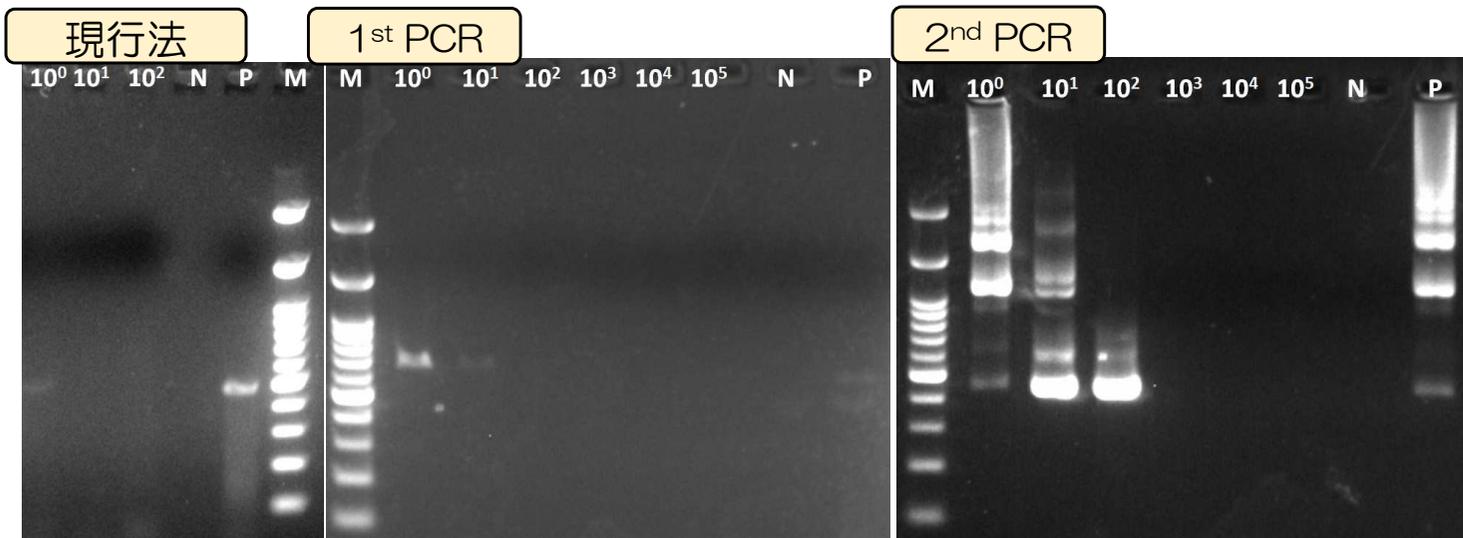
RHDV1 : AATTGAGCCACCTTGGTCAC
RHDV2 : AATTGACGGACCTTAGTCAC

●Nested RT-PCR

●肝臓臓器生材料($10^0 \sim 10^7$ 倍階段希釈)



●尿($10^0 \sim 10^5$ 倍階段希釈)



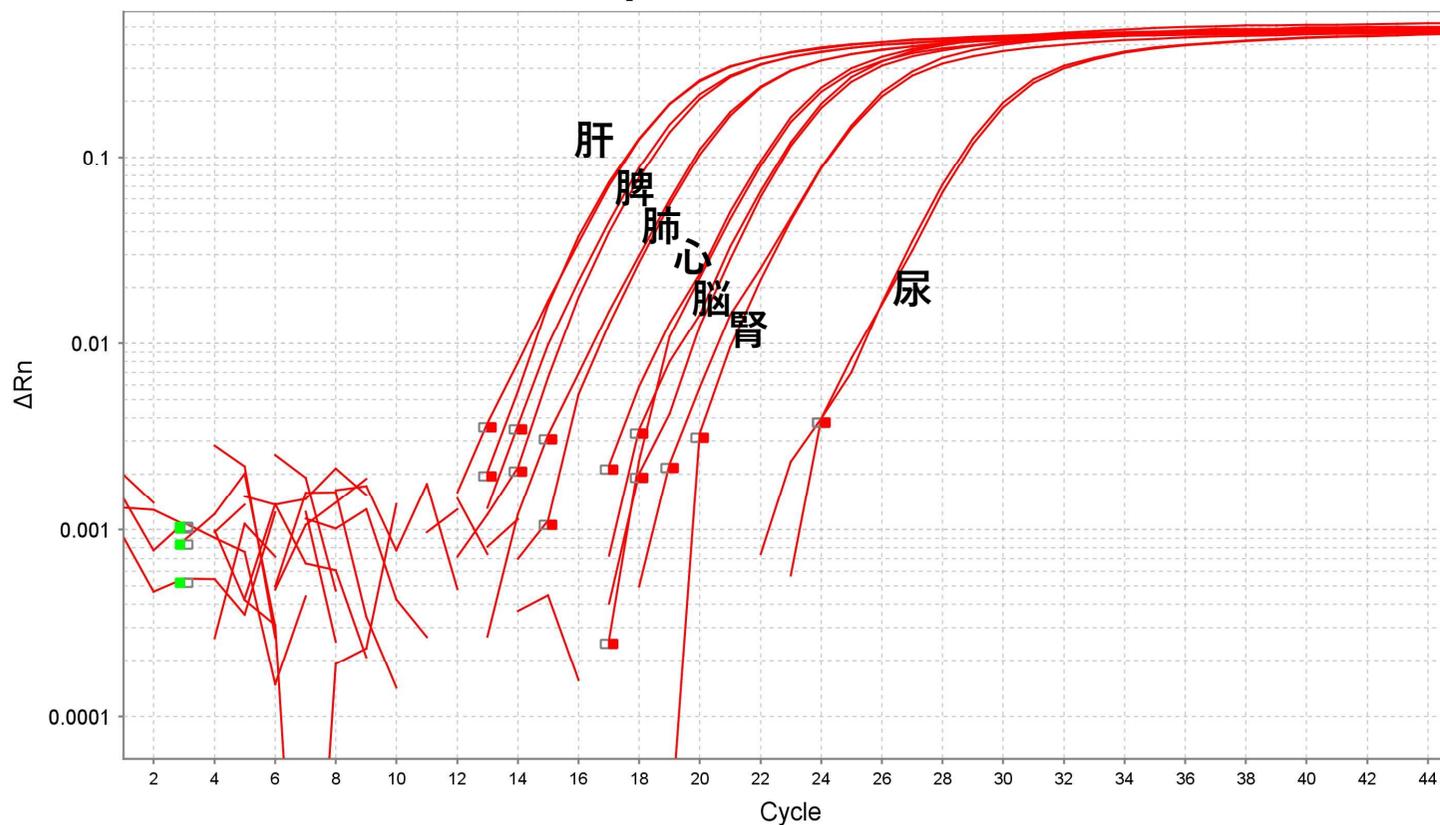
	現行法	Nested
肝生材料 :	$10^4 \rightarrow$	10^5
尿 :	$10^0 \rightarrow$	10^2

10倍～100倍程度の感度上昇

●リアルタイムRT-PCR

Nestedと同様Primer3plusを用いて設計(Taqmanプローブ法)
発症兔からの各臓器生材料および尿から遺伝子検出

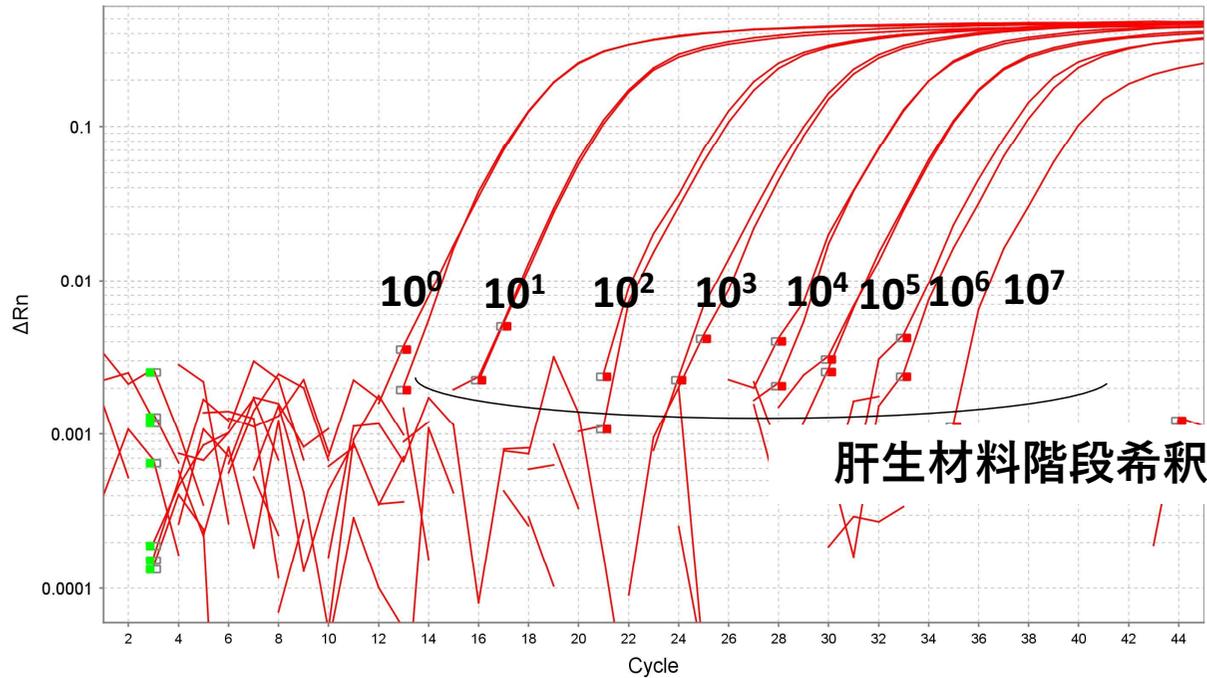
●発症兔臓器生材料・尿



抽出部位	Ct平均値
肝臓	16.00
脾臓	16.80
肺	18.30
心臓	20.60
腎臓	21.22
脳	22.62
尿	27.06

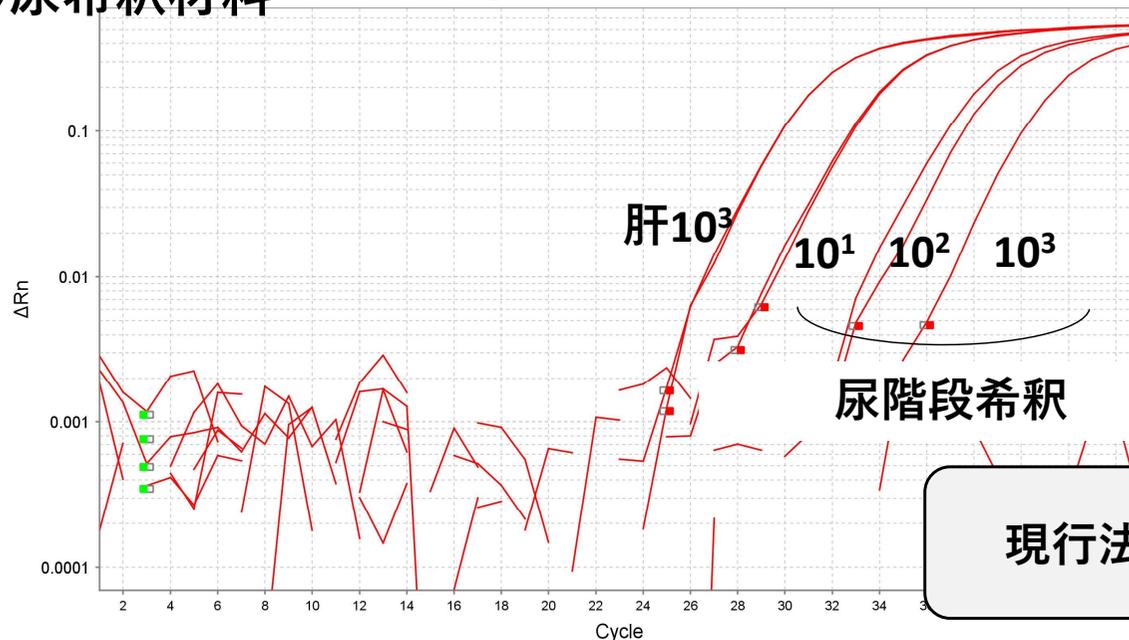
発症兔の各臓器及び尿から遺伝子が検出

●肝臓臓器生材料



肝希釈倍率	Ct平均値
10^0	16.00
10^1	19.27
10^2	24.12
10^3	27.55
10^4	30.97
10^5	33.29
10^6	35.93
10^7	(38.19)

●尿希釈材料



尿希釈倍率	Ct平均値
尿 10^1	31.39
尿 10^2	35.74
尿 10^3	(38.65)

()内は2ウェルの内1方しか立ち上がりを認めず

現行法と比較し100倍～1000倍程度の感度上昇

●清浄性確認検査(環境材料)

■採材場所および時期：第2農場空舎 A（2021年8月31日採材）

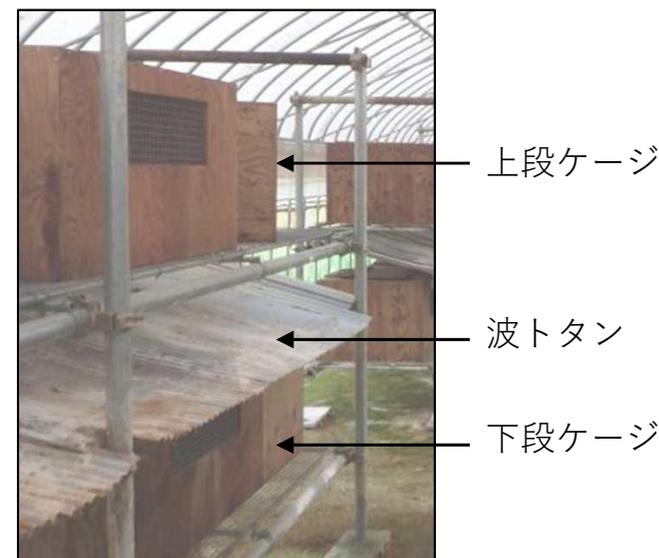
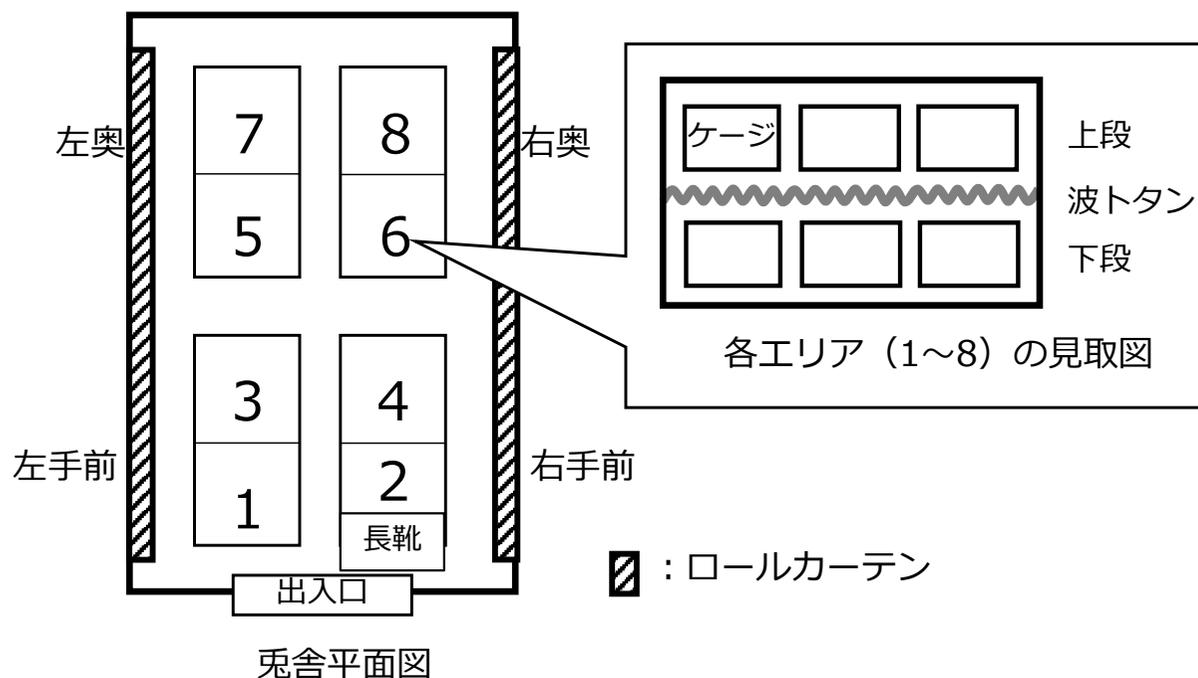
第2農場空舎 B（2021年11月4日採材）

■採材場所：（2兎舎各30か所）

舎内を8エリアから3か所ずつ(24か所)（上段ケージ、波トタン表面、下段ケージ）

ロールカーテン4か所(左手前、左奥、右手前、右奥)

長靴2足



全60検体(プール43検体)で陰性を確認

●清浄性確認検査(糞便)

採材月日	検査区分	延羽数	検査結果	備考
9月3日	移動前	37	※1羽陽性?	疑陽性兎1羽：とう汰 疑陽性兎の近隣にいた陰性兎7羽：隔離舎Bに保留 その他陰性兎29羽：隔離舎Aに保留
9月13日	再検査	29	全羽陰性	隔離舎Aから第2農場へ移動
9月27日	移動前	64	全羽陰性	隔離舎Aから第2農場へ移動
10月7日	移動後	26	全羽陰性	
10月7日	再検査	7	全羽陰性	隔離舎Bから第2農場へ移動
11月8日	移動前	50	全羽陰性	隔離舎Aから第2農場へ移動

※9月3日に行った検査(Nested-RT-PCR)で1羽疑陽性としてとう汰
非特異的バンドの可能性あり

計151羽（延213羽）について検査を実施

150羽の繁殖候補群を確保

- 兎農場における突然死の散発、病性鑑定の結果**県内初の兎出血病と診断**
近年国内でも新たに**RHDV 2**によるものと判明
- 環境検査、糞便検査の依頼に際し現行法よりも感度の優れる方法として新規の**NestedPCR、リアルタイムPCRの系を検討**
- NestedPCRでは**現行法の10～100倍**、リアルタイムPCRでは**100倍～1000倍程度**感度の上昇を認める
- RHDV 1 や他県で発生している遺伝子型に適用できるかどうかはさらなる検証が必要だが感度、多検体の処理、非特異反応の少なさなどリアルタイムPCRは特に有用
- 今後の展望
導入兎の糞便材料による着地検査(結果判明までは隔離飼養)
環境検査による定期的な衛生対策の見直しと飼養衛生管理の強化
所有者と作業従事者の意識向上
飼養兎を対象としたモニタリング検査の実施

RHDVの侵入防止とまん延防止に継続して取り組み

農場飼養兎の安定供給に寄与