

## 10 豚熱ワクチン接種豚におけるワクチン株検出事例

中央家畜保健衛生所

○村田 拓馬・小泉 舜史郎・石原 径佳

### I はじめに

本県では、2019 年 9 月から 11 月に計 5 農場で豚熱 (CSF) が発生し、同年 11 月から CSF ワクチン接種を開始した。CSF ワクチン接種開始以降、CSF ワクチン接種豚の病性鑑定を実施したところ、5 例中 3 例でワクチン株 (以下、GPE 株) 由来の抗原が検出された。野外におけるワクチン接種後 2 か月以降の豚の臓器からの遺伝子検出に関する報告は少ないため、その概要を報告する。

### II 農家概要及び発生状況

A 農場はミニブタ 6 頭を飼養する動物展示施設である。2020 年 1 月 15 日、数か月前から元気消失していた 1 頭 (A-1) が死亡した。当該豚には 2019 年 11 月 25 日に CSF ワクチンを接種していた。

B 農場は繁殖雌豚 77 頭を飼養する一貫経営農場である。2020 年 4 月 7 日、約 3 か月齢の肥育豚 6 頭 (内 2 頭が B-1、B-2) が急死、1 頭 (B-3) が起立不能となった。当該豚には同年 1 月 29 日に CSF ワクチンを接種していた。

C 農場は肥育豚 720 頭を飼育する肥育農家である。2020 年 6 月 12 日に約 2 か月齢の肥育豚 36 頭を導入し、12 頭ずつ 3 豚房に分けて飼育していた。そのうちの 1 頭 (C-1) が同月 30 日に元気消失し、同年 7 月 1 日に死亡した。当該豚には同年 5 月 18 日に CSF ワクチンを接種していた。

D 農場は県内 4 例目の CSF 発生農場で、経営再開に向け 2020 年 4 月 13 日に 3~4 か月の肥育豚を 20 頭導入したうち 4 か月齢 1 頭 (D-1) が同月 24 日朝に死亡した。当該豚には 2020 年 1 月 16 日に CSF ワクチンを接種していた。

E 農場は繁殖雌豚 30 頭を飼育する一貫経営農場である。2020 年 10 月上旬から 11 日までに子豚が 5 頭死亡し、同月 16 日に約 30 日齢の CSF ワクチン未接種の離乳豚 1 頭及び約 2.5 か月齢のワクチン接種済肥育豚 1 頭 (E-1) が死亡した。当該豚 (E-1) には 2020 年 9 月 29 日に CSF ワクチンを接種していた。

### III 材料と方法

ウイルス学的検査材料として A~E 農場の死亡豚又は鑑定殺豚の、扁桃、脾臓、腎臓及び採取可能な個体からは血清を採材し、検査に供した (表 1)。

方法は「豚熱の診断マニュアル」に基づき抗原検査 (遺伝子検査 (RT-PCR)、蛍光抗体法 (FA)) 及び抗体検査 (ELISA 法) を行った。

遺伝子検査は、採材した臓器を抗生物質添加ダルベッコ変法イーグル培地 (日水製薬)

に懸濁して 10%臓器乳剤とし、3,000rpm で 15 分間遠心した上清を検査材料とした。この臓器乳剤上清から High Pure Viral RNA Kit (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA は Vilcek らの方法<sup>1)</sup>に従ってペスチウイルス特異遺伝子を検出し、陽性の検体について制限酵素 Bgl I 及び EcoRV を用いて RFLP を行った。なお、CSFV 特異的遺伝子と推定された PCR 産物は、動物衛生研究部門にてダイレクトシーケンシングにより塩基配列を決定した。

また、扁桃を用いて凍結切片を作成し、豚コレラ FA (京都微研) の用法に従って FA を実施した。

抗体検査 (ELISA 法) は、B 農場 (鑑定殺豚 1 頭)、E 農場 (死亡豚 1 頭) の血清を検査に供し、豚コレラエライザキット II (JNC 株式会社) の用法に従い実施した。

表 1 材料の概要

農場名	豚番号	転帰	死殺時の月齢	ワクチン接種日齢	ワクチン接種後経過日数	品種
A	A-1	死亡	17歳齢	17歳齢	51日	ミニブタ (ゲッチンゲン)
B	B-1	死亡	4か月齢	約40日齢	69日	LWD
	B-2					
	B-3	起立不能 遊泳運動 (鑑定殺)				
C	C-1	死亡	3か月齢	約40日齢	44日	LWD
D	D-1	死亡	4か月齢	約35日齢	99日	L
E	E-1	死亡	2.5か月齢	約60日齢	17日	不明

#### IV 結果

検査結果について表 2 にまとめた。

A 農場の PCR 検査は脾臓のみ陽性であった。RFLP では、PCR 産物が BglI のみで切断され、およそ 243bp となったことから CSFV 特異的遺伝子と推定された。PCR 産物 (ペスチウイルスゲノム 5'-UTR 領域増幅産物) の 150bp の領域を用いて BLAST 検索を実施したところ、PCR 産物の塩基配列は GPE 株と 100%一致した。扁桃の FA は陽性であった。

B 農場の生豚 (B-3) における抗体検査 (ELISA 法) は陽性であった。PCR 検査では死亡豚 2 頭 (B-1、B-2) の扁桃のみ陽性であった。RFLP では、PCR 産物が BglI のみで切断され、およそ 243bp となったことから CSFV 特異的遺伝子と推定された。PCR 産物 (ペスチウイルスゲノム 5'-UTR 領域増幅産物) の 150bp の領域を用いて BLAST 検索を実施したところ、PCR 産物の塩基配列は GPE 株と 100%一致した。死亡豚 2 頭及び生体 1 頭の扁桃を用いた FA は全て陽性であった。

C 農場の PCR 検査は扁桃のみ陽性であった。RFLP では、PCR 産物が BglI のみで切断され、およそ 243bp となったことから CSFV 特異的遺伝子と推定された。PCR 産物 (ペスチウイルスゲノム 5'-UTR 領域増幅産物) の 150bp の領域を用いて BLAST 検索を実施したところ、PCR 産物の塩基配列は GPE 株と 100%一致した。

ろ、PCR 産物の塩基配列は GPE<sup>-</sup>株と 100%一致した。扁桃を用いた FA は陰性であった。

D 農場の PCR 検査及び扁桃を用いた蛍光抗体法は陰性であった。

E 農場は死亡豚 1 頭における抗体検査 (ELISA 法) は擬陽性であった。PCR 検査及び扁桃を用いた蛍光抗体法は陰性であった。

表 2 CSF 検査結果

農場名	豚番号	抗体検査 (ELISA法)	RT-PCR (陽性臓器)	RFLP		FA
				Bgl I	EcoRV	
A	A-1	NT	+(脾臓)	+	-	+
B	B-1	NT	+(扁桃)	+	-	+
	B-2	NT	+(扁桃)	+	-	+
	B-3	+	-	NT	NT	+
	C-1	NT	+(扁桃)	+	-	-
D	D-1	NT	-	NT	NT	-
E	E-1	±	-	NT	NT	-

## V 考察

感染実験豚では、GPE<sup>-</sup>株が接種後 14 日後に扁桃から検出されることが報告されている<sup>2)</sup>が、野外接種豚における臓器からの遺伝子の検出報告は少ない。A 農場の事例では、ワクチン接種から 51 日後に扁桃及び脾臓から GPE<sup>-</sup>株が検出されている。A 農場の事例では品種はミニブタであり、飼養環境も動物展示施設であるため一般の豚飼養農場と異なっていた。また、年齢も 17 歳と高齢であったため、品種、飼養環境、年齢等の要素がワクチン株の検出期間に関与していることが示唆された。

B 農場の事例では、接種から 69 日後に扁桃から、C 農場の事例ではワクチン接種から 44 日後に扁桃から GPE<sup>-</sup>株が検出された。CSF 弱毒生ワクチン株である C 株では、扁桃において接種後 3 日から 77 日間遺伝子が検出され、98 日後でも検出され得ることが報告されている<sup>3)</sup>。今回の事例から、GPE<sup>-</sup>株の遺伝子も、ワクチン接種後 1~2 か月以上も扁桃から検出されることが明らかとなった。

一方、D 農場の事例では、ワクチン接種から 98 日後に臓器から遺伝子及び抗原が検出されなかったことから、GPE<sup>-</sup>株は接種から約 3 か月までに臓器から検出できなくなることが示唆された。E 農場の事例ではワクチン接種から 17 日後に GPE<sup>-</sup>株が検出されなかったが、それはワクチン接種豚の健康状態、年齢、品種等の個体差によるものと考えられた。

ワクチン接種豚の GPE<sup>-</sup>株の検出期間は個体によって差があり、ワクチン接種豚の健康状態や年齢、品種などが、GPE<sup>-</sup>株遺伝子の検出の期間や体内分布に影響する可能性が考えられた。また、ワクチン接種豚では、ワクチン株が検出され得ることに留意し、発生状況の経緯や同居豚の状態、白血球数や抗体の保有状況と合わせて、農場全体の状況を把握し病性鑑定を実施することが重要であると考えられた。今後も、ワクチン接種豚における GPE<sup>-</sup>株の検出期間や体内分布の解明のため、事例の検証を積み重ねる必要がある。

VI 引用文献

- 1) Vilcek S, et al. : 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)
  
- 2) Tamura T, et al. : Selection of classical swine fever virus with enhanced pathogenicity reveals synergistic virulence determinants in E2 and NS4B. Journal of Virology, 06 Jun 2012, 86 (16) :8602-8613
  
- 3) Marylène T, et al. : Classical swine fever: Comparison of oronasal immunisation with CP7E2alf marker and C-strain vaccines in domestic pigs Veterinary Microbiology, Volume 142, Issues 1-2, 21 April 2010, Pages 59-68