

## 豚熱ワクチン接種農場で発生した豚熱の病性鑑定

紀北家畜保健衛生所  
○山田陽子 松岡希枝  
安田裕子 山本敦司

### 【はじめに】

豚熱は、平成30年に岐阜県での国内26年ぶりの発生以降、野生いのししで感染が拡大している。和歌山県では令和2年6月に飼養豚への豚熱ワクチン接種を開始したが、同年10月には県内の野生いのししで初めて豚熱ウイルス（CSFV）感染が確認され、その後令和3年1月、県内で49年ぶりに養豚場での豚熱発生が確認された。ワクチン接種豚での発生は国内初発であった。その検査対応についての概要を報告する。

### 【発生概要】

総飼養頭数267頭の管内一貫経営養豚場において、令和3年1月8日に分娩舎の離乳豚の豚房で豚熱ワクチン接種をしたロットを2日後の1月10日に育成・肥育豚舎の3豚房へ移動した。移動から5～7日後の間に計5頭の死亡があったものの、畜主は寒冷の影響と考え通報には至らなかった。その約1週間後1月24日の晩に、再び衰弱個体を確認したため、家保に通報があった（図1）。

翌日家保が立ち入り検査を実施、衰弱個体を3頭確認し、同ロット6頭中5頭で40℃以上の発熱を確認した。当該ロットは68日齢で、ワクチン接種は50日齢で実施し、52日齢で当該豚舎へ移動していた。当該豚房の両隣の豚房（180日齢、153日齢）では異常豚は確認されなかった。農場周辺では豚熱感染野生いのししが11月に確認されていた（図2）。

### 【材料と方法】

#### （1）病性鑑定

立ち入り検査時に採取した死亡豚2頭、同居豚の血清及びEDTA加血液各6検体（死亡豚2頭含む）を用いて、血液学的検査、ウイルス学的検査、細菌学的検査および病理組織学的検査を実施した（図3）。その中で白血球数（WBC）測定、遺伝子検査（PCR）、抗体検査（ELISA）、凍結切片の蛍光抗体法（FA）は迅速診断として優先的に行った。

#### ① 血液学的検査

EDTA加血液を材料に、自動血球計数装置（poch-100iV Diff、シスメックス）によるWBCの測定を行った。

#### ② ウイルス学的検査

##### （ア） FA

扁桃、腎臓の凍結切片を材料に抗CSFV 蛍光標識抗体

(豚コレラFA、京都微研)を用いた染色を実施した。

(イ) ウイルス分離

扁桃、腎臓、脾臓の10%乳剤及び血清を材料にカバースリップを用いたCPK細胞でのウイルス分離を実施した。ウイルス分離確認は蛍光抗体法にて実施した。

(ウ) PCR

扁桃、腎臓、脾臓及び血清を材料にRNeasy Mini Kit (キアゲン)を用いてRNA抽出後、Š. Vilčekら(1994)によるプライマーおよびPrime Script II High Fidelity One Step RT-PCR Kit (タカラバイオ)を用いたRT-PCRを実施した。サーマルサイクラーはProFlex PCR System 3×32-Well (ライフテクノロジーズジャパン)を用い、下記条件にて反応を行った。

【PCR反応条件】

45°C	10min	
94°C	2min	
98°C	10sec	} 35cycle
55°C	15sec	
68°C	10sec	
68°C	5min	

PCR産物を2%アガロースゲルで電気泳動し、紫外線照射下で確認された約280bpのPCR産物について、制限酵素 *Bgl*I と *EcoRV* (タカラバイオ)を用い、37°C 60minで制限酵素処理を行い、処理後およそ243bpとなった検体をCSFV遺伝子陽性と判定した。

(エ) ELISA

血清を材料にELISA (豚熱エライザキットII、JNC株式会社)法による抗体検査を実施した。

③ 細菌学的検査

死亡豚の主要臓器について、10%羊血液寒天培地を用い、定法に従い菌分離を行った。

④ 病理組織学的検査

10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬した死亡豚の諸臓器について、定法に従いパラフィンブロック薄切標本を作製後ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色での一般染色を実施した。さらに、個体No.4の扁桃、腎臓、脾臓、肺、肝臓、大脳について、マウス抗CSFVモノクローナル抗体(WH303; APHA Scientific, Addlestone, UK)を用いた免疫染色を動物衛生研究部門にて実施した。

(2) 疫学調査のための殺処分前の検査および環境検査

立入の翌日、各豚舎 10～12 頭、計 68 頭の血清および全血を採血し、WBC の測定、CSFV の PCR、ELISA を実施した。また、豚舎内（床、壁、扉、餌箱など）、器具、作業車など計 50 か所の環境スワブを採材し、CSFV の PCR を実施した（図 4）。各種検査方法は病性鑑定時と同様の方法で行った。

## 【結果】

### （1）病性鑑定

採血個体 6 頭中 5 頭で白血球数減少を認め、6 頭全頭の血清および死亡豚 2 頭の 3 臓器（扁桃、脾臓、腎臓）全てから CSFV 遺伝子が検出された（図 5、6）。検出遺伝子（扁桃乳剤）は動物衛生研究部門での遺伝子解析の結果、5' UTR 領域において岐阜 1 例目と同一であると判明した（図 7）。扁桃、脾臓の凍結切片の CSFV 蛍光抗体法は全て陰性であったが（図 6）、ウイルス分離では 2 頭の 3 臓器（扁桃、脾臓、腎臓）全てから CSFV が分離された（図 8）。死亡豚 1 頭が ELISA 抗体陰性であった（図 5）。病理組織学的検査では、大脳、小脳で囲管性細胞浸潤、髄膜炎が認められ、扁桃、脾臓でのリンパ球減少が認められた（図 9）。免疫染色では、主に扁桃の陰窩上皮細胞（図 10）、大脳の髄膜炎の炎症細胞浸潤部位（図 11）にて陽性反応が確認された。細菌学的検査では各臓器から有意菌は分離されなかった。

### （2）疫学調査のための殺処分前検査および環境検査

殺処分前検査では、68 頭採材中、PCR 陽性個体は 2 頭で、発生豚房と同一ロットで別豚房の 1 頭と、100 日齢の肥育豚 1 頭であった。ELISA 陰性は 3 頭で、ワクチン接種前離乳豚、前日ワクチン接種子豚、発生豚房と同一ロットで別豚房の豚のそれぞれ 1 頭ずつであった。WBC 減少個体は発生ロットの母豚の 1 頭であったが、軽度減少であった（図 12）。

環境検査では、50 か所採材中、発生豚房、発生豚房と同一ロットの豚がいる豚房、種豚・繁殖豚舎および飼料庫で PCR 陽性であった（図 13）。

## 【考察】

体温、WBC、PCR の結果から、発生豚房はほぼ全頭発症していたと考えられた。解剖豚では剖検所見は乏しかったものの、組織所見で大脳、小脳で囲管性細胞浸潤、扁桃、脾臓でのリンパ球減少等の豚熱特有の病変が多数確認された。また、免疫染色を実施した No. 4 は免疫染色陽性部位から感染初期と推察され、ELISA 陰性との結果と合致していた。

疫学調査の 68 頭の殺処分前検査では、WBC 著減個体がおらず、

PCR 陽性も 2 頭のみで、発生ロット以外に発症豚の存在はなかったと推察されたが、PCR 陽性 ELISA 陽性で感染歴の可能性のある肥育豚、PCR 陰性 ELISA 陰性の移行抗体消失ワクチン接種前豚が存在し、ウイルスが過去に農場に侵入し、今後も感染リスクにさらされる個体がいることが判明した。

環境検査では、発生豚房以外は飼料庫周辺で PCR 陽性が多数検出された。農場でアライグマ等が確認されていたとの防疫作業従事者の報告からも、野生動物の関与によるウイルス伝播が示唆された。

ワクチン接種のみでは発症を完全に防ぐことはできないため、今後も野生動物の侵入対策や豚舎間移動時の人や物の消毒等、飼養衛生管理徹底の指導の継続が重要である。

最後に各種検査においてご協力いただいた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研究部門の山田学先生に深謝します。

#### 【参考文献】

- ・ Vilcek, S., et al.: Arch. Virol. 136, 309-323(1994).