

1. はじめに

Classical swine fever (以下CSF)は、CSFウイルス (以下CSFV) の感染によって引き起こされる豚の熱性、敗血症性のウイルス性疾病であり、強い伝染力と高い致死率を特徴とする¹⁾。平成30年9月、我が国において26年振りにCSFの発生が確認された。現在野生いのししにもCSFVが浸潤しており、感染区域が拡大している²⁾。

愛知県では、平成30年12月に野生いのししでCSFVの感染が初めて確認され、平成31年2月から令和元年12月末までに、豚で18例CSFが発生している。それに伴い、CSFの検査対応として、異常豚通報、病性鑑定、発生農場疫学調査、発生状況確認検査、清浄性確認検査、監視対象農場解除検査、移動制限区域内出荷豚検査、アクティブサーベイランス、封じ込め確認環境検査、おとり豚検査、県内全農場サーベイランス及び野生いのしし調査等の検査を実施しており、平成31年2月から令和元年11月末までのCSFに関連する検査の検体数は、豚、環境及びいのししの検体を合わせて、26,427検体に上っている。また、膨大な数の検体について、正確かつ迅速に検査結果を出すため、検査工程及び作業動線等の検査体制を見直し、遺伝子検査試薬の比較検討による検査時間の短縮及び交差汚染防止対策を実施したので合わせて概要を報告する。

2. 材料と方法

平成31年2月から令和元年11月末にかけて豚で発生した17例のCSFに関し、豚23,700検体、環境材料1,669検体、野生いのしし1,058検体の計26,427検体についてCSFの各種検査を実施した。検体数の推移は図1、検査目的ごとの検体数と検査内容は表1のとおり。各検体については、豚コレラの診断マニュアル³⁾に従い、検査目的に応じ、①Vilcekらの方法⁴⁾を用いたペスチウイルス遺伝子検査 (以下 RT-PCR)、②酵素免疫測定法 (以下 ELISA 検査)、③白血球数計数検査 (以下 WBC 測定)、④蛍光抗体法 (以下 FA) を行った。好中球核の左方移動の確認、中和試験、ウイルス分離については一部の検体で実施した。また、⑤17例のCSF発生農場については、検体搬入時点で確認された特定症状を整理した。また、検査の信頼性を確保し、膨大な検体数に対して迅速に対応できる検査体制を整備するため、以下の3つの項目について検証を行った。

⑥自動核酸抽出装置の核酸抽出感度の検証

平成30年10月に導入した自動核酸抽出装置 (magLEAD12gC、プレシジョン・システム・サイエンス社) のRNA抽出感度について確認するため、BVDウイルスI型 (以下 BVDV I 型、

原液力価： $10^{4.4}$ TCID₅₀/50 μ l)と CSFV(原液力価： $10^{4.1}$ TCID₅₀/50 μ l)の2種類のウイルスについて、 10^{-1} から 10^{-5} まで10倍階段希釈を行い、原液及び各希釈段階のウイルスを自動核酸抽出装置及び従来から使用しているカラム抽出方式のキット(QIAamp Viral RNA Mini Kit、QIAGEN)でRNA抽出後、QIAGEN One Step RT-PCR Kit(QIAGEN)を用いてRT-PCRを行い、抽出感度を比較した。

⑦遺伝子検査試薬の比較検討

RT-PCRを迅速に実施するため、CSFV(力価： $10^{4.1}$ TCID₅₀/50 μ l)を 10^{-1} から 10^{-6} まで10倍階段希釈し、原液及び階段希釈したウイルスをRNA抽出後、3種類の遺伝子検査試薬(キットA～キットC)を用いてRT-PCRを行い、各試薬の反応時間と感度について比較を行った。

⑧検査室のふき取り検体を用いたペスチウイルス遺伝子の汚染状況調査

ペスチウイルスの遺伝子による検査室の汚染状況を確認するため、PCRグレードの滅菌水(以下DW)で湿らせた滅菌綿棒でふき取りを行った。その後、ふき取りした綿棒をDW(約1.9ml/検体)で攪拌し、RNA抽出後、QIAGEN One Step RT-PCR Kit(QIAGEN)を用いてRT-PCRを行い、ペスチウイルス遺伝子による汚染箇所を確認した。



図1：CSF 検査検体数の推移

表1：検査目的ごとの検体数と検査内容

検査名	件数	検体数	検査材料検体数	検査方法
異常豚通報・病性鑑定	101	1,440	発症豚中心に10頭以上+死亡豚	PCR,ELISA,血液検査,FA
発生農場疫学調査	62	2,761	15～20頭/豚舎+環境40～50検体	PCR,ELISA
発生状況確認検査	104	3,342	5頭/豚舎(最低30頭/農場)+臨床症状のある豚	PCR,ELISA,血液検査,(FA)
清浄性確認検査	146	5,145	5頭/豚舎(最低30頭/農場)+臨床症状のある豚	PCR,ELISA,血液検査,(FA)
野生イノシシ調査	1,058	1,058	捕獲イノシシ、死亡イノシシ	PCR,ELISA
監視対象農場解除検査	180	6,423	5頭/豚舎(最低30頭/農場)	(PCR),ELISA,(血液検査)
移動制限区域内出荷豚検査	77	1,642	25頭/農場	PCR
アクティブサーベイランス	46	414	2頭分の扁桃・脾臓・腎臓/農場or25頭/農場	PCR
封じ込め確認環境検査	33	481	発生農場の環境材料(国と協議して決定)	PCR,(ウイルス分離)
おとり豚検査	11	260	21～30頭/農場	PCR,ELISA等
県内全農場サーベイランス	111	3,177	5頭/豚舎(最低30頭/農場)+臨床症状のある豚	PCR,ELISA
その他	11	284	自主検査等のため検体数は様々	PCR

3. 結果

① RT-PCRの結果、CSF陽性農場由来の豚は236/664検体(35.5%)が陽性、CSF陰性農場由来の豚は11/4,831検体(0.2%)が陽性、環境材料は13/1,669検体(0.8%)が陽性、野生いのししは99/1,058検体(9.4%)が陽性であった。

② ELISA検査の結果、CSF陽性農場由来の豚は178/1,937検体(9.2%)が陽性、CSF陰性農場由来の豚は45/18,970検体(0.2%)が陽性、野生いのししは117/929検体(12.6%)が陽性であった。

③ WBC測定の結果、CSF陽性農場由来の豚は372/1,763検体(21.1%)が陽性、CSF陰性農場由来の豚は404/8,545検体(4.7%)が陽性であった(1万個/ μ l未満陽性)。

④ FAの結果、CSF陽性農場由来の豚は16/31検体(51.6%)が陽性、CSF陰性農場由来の豚は0/52検体が陽性であった。

⑤ CSF発生農場において、検体搬入時点で確認された特定症状は(表2)のとおり。「発熱,元気消失,食欲減退」や「急死・突然死」については複数事例で確認されたが、それ以外の特定症状については見られないか少数の事例(1~3事例)のみで確認された。

⑥ 2種類の抽出方法についてRNAの抽出感度を比較した結果、いずれの方法もBVDV I型は 10^{-3} 希釈したサンプルまで、CSFVは 10^{-4} 希釈したサンプルまで電気泳動でバンドが確認された(図2)。

⑦ 3種類の遺伝子検査試薬でRT-PCRの検査反応時間及び検出感度について比較した結果、キットBがキットAに比べ遺伝子検査時間が1時間以上早く、追加の検証で検出感度も同等以上となることが確認できた。キットCについては、検査時間はキットAとキットBの間、反応時間は同等であった(図3、図4)。

⑧ 遺伝子抽出作業を行う場所や、検体保管の冷蔵庫、施設入口のドアノブ等のふき取り材料から、ペスチウイルスの遺伝子が検出された(表3、図5)。

表2：検体搬入時点での特定症状

特定症状	発生No. 県国		1	2	3	4	6	7	8	9	12	13	14	17
	8	9	13	14	16	19	21	22	28	30	35	50		
紫斑		○								○				○
発熱,元気消失,食欲減退	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
便秘,下痢														○
結膜炎														
歩行困難,後躯麻痺,痙攣					○									
削瘦,被毛粗剛,発育不良		○												○
異常産	○													
皮下出血,血便等										○				
複数の繁殖豚等の突然死			○		○					△	○	△	○	
県発生No.5,10,11,15,16は特定症状なし														
△:12例目→子豚のみの死亡,14例目→1頭のみの死亡														

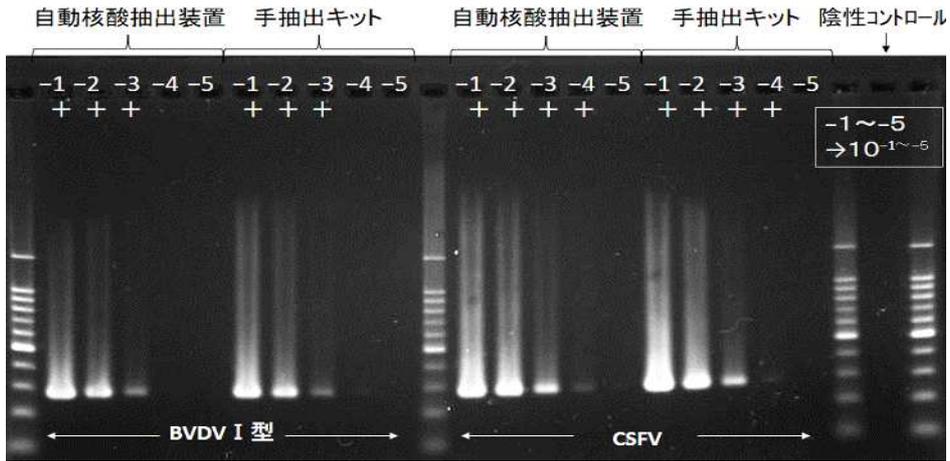


図 2 : 2 種類の抽出方法を用いた RT-PCR の電気泳動結果

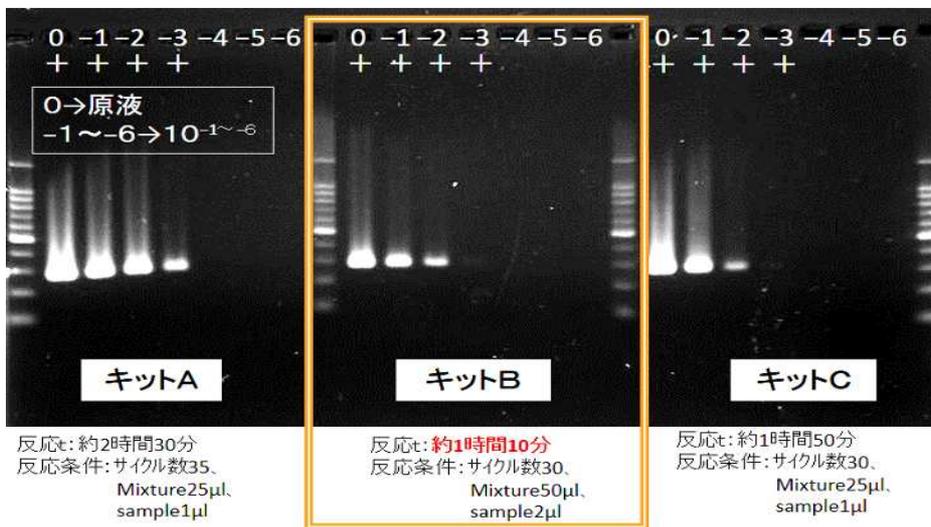


図 3: 3 種類の遺伝子検査試薬の比較結果

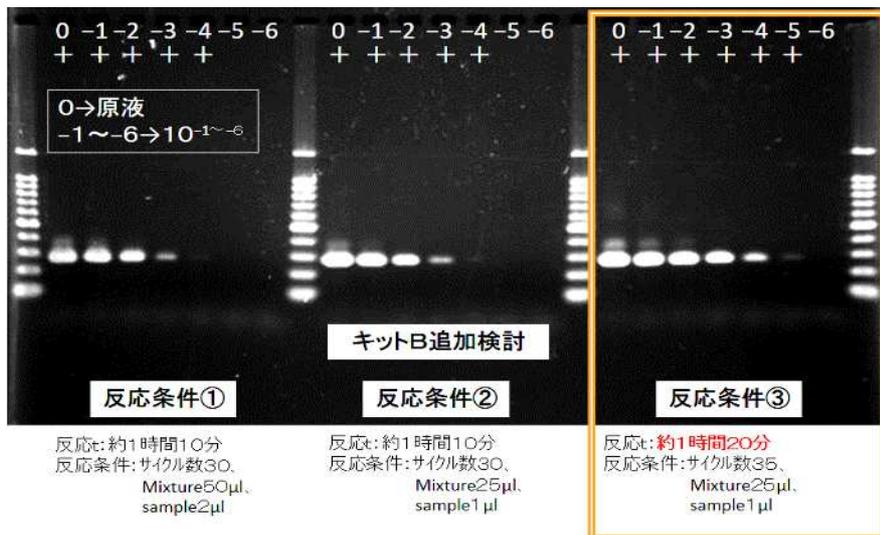


図 4: 遺伝子検査試薬の追加検証結果

表 3:検査室のふき取り場所

(黄色塗り赤文字の場所が陽性、表 3 の番号は図 5 の番号の位置を示す)

No.	検査室のふき取り場所	当該場所の主な用途
1	クリーンベンチ①内部	RNA抽出、試薬調整等
2	クリーンベンチ①外部	
3	クリーンベンチ②内部	
4	クリーンベンチ②外部	
5	安全キャビネット内部	検体処理 (乳剤作成・血清分注等)
6	安全キャビネット外部	
7	BSL施設内ドアノブ	人の移動
8	ウイルス部屋冷蔵庫	検体、RNA抽出物、試薬等保管
9	PCR用マイクロピペット	試薬調整、RNA抽出物分注
10	ウイルス部屋ハズボックス	検体等の移動
11	検体保管用冷蔵庫	検体保管
12	PCRセット専用引き出し	No. 9やチップ等を保管
13	細菌部屋安全キャビネット内部	検体処理 (乳剤作成・血清分注等)
14	細菌部屋安全キャビネット外部	
15	細菌部屋冷蔵庫	検体、RNA抽出物、試薬等保管
16	細菌部屋試薬調整スペース	試薬調整
17	細菌部屋検体用机	RNA抽出物の分注
18	細菌部屋ハズボックス	検体等の移動
19	試薬・サンプル保管用冷凍庫	検体、試薬等保管



図 5:検査室のふき取り場所

(黄色塗り赤文字の場所が陽性、表 3 の番号は図 5 の番号の位置を示す)

4. 考察及びまとめ

CSF 陽性農場由来の豚検体における RT-PCR の陽性率は 236/664 検体 (35.5%)、ELISA 検査の陽性率は 178/1,937 検体 (9.2%)、WBC 測定の陽性率は 372/1,763 検体 (21.1%)、FA の陽性率は 16/31 検体 (51.6%) であった。CSF 陽性農場においても、検査のタイミングによって CSF ウイルス浸潤率が低い農場などがあったため、このような結果になったと考えられる。

また、CSF 陰性農場由来の豚検体における RT-PCR の陽性率は 11/4,831 検体 (0.2%)、ELISA 検査の陽性率は 45/18,970 検体 (0.2%)、WBC 測定の陽性率は 404/8,545 検体 (4.7%)、FA の陽性率は 0/52 検体であった。

CSF 陰性農場由来の検体においても、BVDV 等他のペスチウイルスやワクチン株を検出したため RT-PCR において 0.2%が陽性となった。また、非特異反応や BVDV との交差反応により、ELISA 検査でも 0.2%が陽性となった。非特異反応は、数日後の当該豚及び周辺豚の再検査で ELISA 検査の再現性がない検体や周辺豚含めいずれも陰性となった検体、中和試験を実施して BVDV、CSFV のいずれも抗体陰性となったものを非特異反応と判断している。WBC 測定では、哺乳豚など正常値が低い個体の測定や他のウイルス等の影響により、4.7%と CSF 陰性農場由来の検体における他の検査と比較して高い陽性率となった。

以上のことから、農場内に潜む CSF ウイルスを検出するためには、RT-PCR を中心とした指針に記載の検査を複数検体で実施し、検査結果については非特異反応等も考慮し、臨床症状等と合わせ、総合的に判断する必要があると考えられた。

また、環境材料の検査は主に CSF 発生農場発生時の疫学調査及び封じ込めの環境材料確認検査で実施したが、13/1,669 検体(0.8%)が陽性となった。陽性は全て CSF 発生農場発生時の疫学調査の検体であり、封じ込めの環境材料確認検査において陽性は確認されなかった。その後、発生農場の一部では検査も実施しながらおとり豚を導入したが問題はなく、農場の再開に繋げることができた。

養豚密集地域における CSF 発生時には、発生状況確認検査や清浄性確認検査の検査対象は膨大となる。膨大な数の検査を実施する上で、検査の効率化、迅速化が求められた。また、限られた場所と時間と人員の中で膨大な数の検査を実施するにあたり、指針に記載されている「好中球核の左方移動の確認」、「FA」、「中和試験」、「ウイルス分離」については、PCR 等優先度の高い他の検査の円滑な実施の妨げとなる可能性があるため「必要に応じて実施」とすべきと考えられた。

膨大な数の検体について、正確かつ迅速に検査結果を出すために実施した⑥と⑦の検証については、⑥の検証により、他の抽出方法と同等の抽出感度であることが判明、遺伝子検査の RNA 抽出工程の信頼性について確認することができ、⑦の検証により、遺伝子検査の検出感度を下げることなく検査時間を短縮でき、より迅速な防疫対応への着手が可能となった。

また、交差汚染防止対策の一環として実施した⑧の結果、検査室の様々な場所がペスチウイルス遺伝子に汚染されていることが明らかになった。血液塗抹や WBC 測定を行っていた検査室のドアブは陰性であったが、CSFV 遺伝子検査を実施していたウイルス及び細菌検査室のドアブは陽性であったことから、豚やいのししの血液や生材料による汚染ではなく、PCR 反応後の増幅した PCR 産物が検査室を汚染した可能性が考えられた。検体処理から電気泳動までの作業工程を全て同じ部屋で行っていたため、電気泳動に関連する PCR 産物を扱う作業の過程で、検査室が汚染されたものと考えられた。

調査の結果を受けて、電気泳動の作業スペースを別の部屋に移動させ、検体処理から RT-PCR 反応までの作業と作業スペースを独立させるなど、作業動線の見直しを図ったほか、

検査室内の除染、UV 灯の設置等交差汚染防止対策を強化し、検査担当者の意識向上に繋がった。今後も必要に応じて検査を継続し、交差汚染防止対策を強化しながら、迅速で効率的な検査対応を実施していきたい。

引用文献

- 1) 動物の感染症, 202-203 (2002)
- 2) 豚コレラに関する特定家畜伝染病防疫指針, 1-2 (2019)
- 3) 豚コレラに関する特定家畜伝染病防疫指針 別紙 1「豚コレラの診断マニュアル」, 73-81 (2019)
- 4) Vilcek S, Herring AJ et al : Arch Virol, 136, 309～323 (1994)