

資料

2018～2019年にわが国で発生した豚コレラの原因ウイルスの性状

深井 克彦

(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
越境性感染症研究領域 口蹄疫ユニット)

Fukai, K. (2019). Characteristics of classical swine fever virus that caused outbreaks between 2018 and 2019 in Japan
Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 74, 15-20.

キーワード：豚コレラ、豚コレラウイルス、豚

はじめに

2018年9月9日にわが国では26年ぶりに豚コレラ(CSF)の発生が確認された²⁾。2019年7月15日現在で、31事例65農場3と畜場で発生が確認され、殺処分頭数は122,090頭に及んでいる。また、岐阜県で717頭、愛知県で36頭、三重県で4頭、福井県で5頭、長野県で4頭の野生イノシシにおいてCSFウイルス(CSFV)が検出されている。さらに、野生イノシシにおけるCSF流行抑制を目的に、野生イノシシに対する経口ワクチンの投与が、2019年3月24日から愛知県および岐阜県で開始された。本稿では、2018～2019年のわが国におけるCSF発生の原因ウイルスの性状を概説する。

原因ウイルスの血清学および遺伝学的性状

2018年9月8日に1事例目の豚から採取した全血よりCPK細胞を用いてCSFVの分離を試みた。その結果、材料接種7日目に、抗CSFVモノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法により細胞質内に特異蛍光が確認され、全血材料からCSFVが分離された。分離されたCSFVはJPN/1/2018株と命名され、CPK細胞でさらに1代継代したウイルスを以降の性状解析に用い

た。

わが国で備蓄されているCSFワクチン(GPE⁻株)を1～2カ月齢の豚4頭に接種し、1か月後血清を採取した。それら4頭の血清およびGPE⁻株とJPN/1/2018株を用いて、OIEマニュアル⁷⁾に従って、蛍光抗体による中和試験を行った。その結果、GPE⁻株およびJPN/1/2018株に対する中和抗体価は、各々45～128倍および8～90倍であった(表1)。すなわち、ワクチン投与豚の血清は、ホモであるGPE⁻株に対して、ヘテロであるJPN/1/2018株より高い中和抗体価を示す傾向にあったが、JPN/1/2018株に対する中和抗体は検出されたため、備蓄ワクチンによる効果は期待出来ることが示唆された。

Vilčekら⁶⁾の方法に従って、JPN/1/2018株ゲノムの5' untranslated region (UTR) 領域を標的としたRT-PCR法を行った。その結果、予想された約280bpのPCR産物が得られた。得られたPCR産物の塩基配列を、RT-PCR法と同様のプライマーを用いたダイレクトシーケンシング法により決定し、遺伝子データベースから収集した62株のCSFV株とともに最尤法により遺伝子系統樹解析を行った(図1)。その結果、JPN/1/2018株は、Genotype 2のうちのSubgenotype 2.1に属することが確認された。また、JPN/1/2018株の全

表1：ワクチン投与豚血清のGPE⁻株およびJPN/1/2018株に対する中和抗体価

血清	ウイルス株	
	GPE ⁻	JPN/1/2018
ワクチン接種豚1	128	32
ワクチン接種豚2	64	90
ワクチン接種豚3	64	22
ワクチン接種豚4	45	8
ワクチン非接種豚1	<2	<2
ワクチン非接種豚2	<2	<2

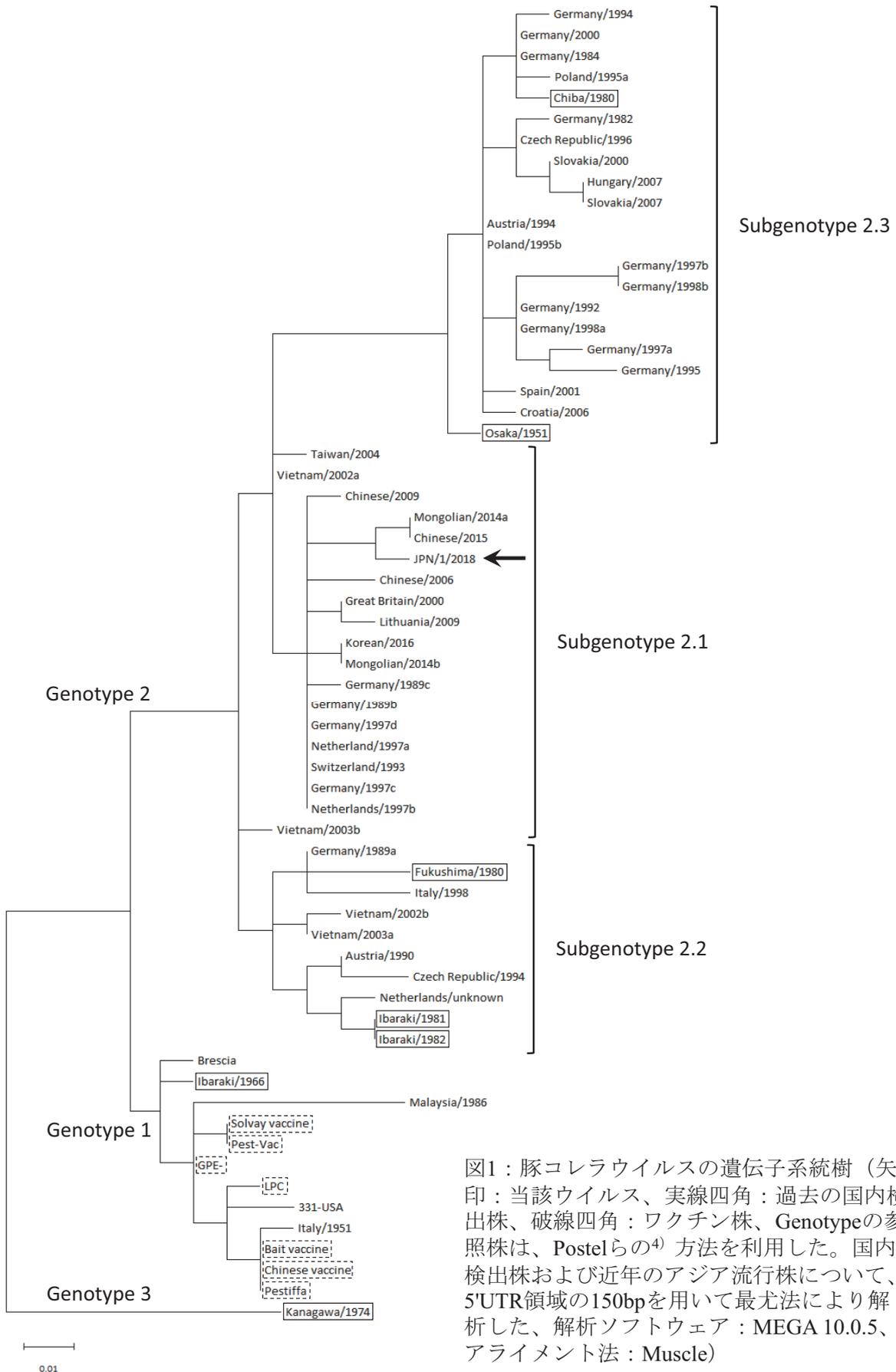


図1：豚コレラウイルスの遺伝子系統樹（矢印：当該ウイルス、実線四角：過去の国内検出株、破線四角：ワクチン株、Genotypeの参照株は、Postelらの⁴⁾方法を利用した。国内検出株および近年のアジア流行株について、5'UTR領域の150bpを用いて最尤法により解析した、解析ソフトウェア：MEGA 10.0.5、アライメント法：Muscle)

長ゲノムの塩基配列を次世代シーケンサーにより決定し、遺伝子データベース上のCSFV株と比較した結果、JPN/1/2018株はSubgenotype 2.1dに属することが確認された³⁾。Subgenotype 2.1dに属するCSFVは近年中国で発生が確認されている²⁾。一方で、Subgenotype 2.1dに属するCSFV株によるCSFの発生はわが国においてこれまで確認されていない。このことから、今回のわが国におけるCSFVの発生が、中国やその近隣諸国からのCSFV株の侵入に起因することが示唆された。

原因ウイルスの病原性状

JPN/1/2018株の病原性状を解析するため、豚に対する感染試験を実施した¹⁾。具体的には、 $10^{6.5}$ TCID₅₀のJPN/1/2018株を2か月齢の豚2頭に経口接種（群1）または筋肉内接種（群2）した。ウイルス接種翌日に同月齢の豚2頭を各々のウイルス接種豚と同居させた。また、JPN/1/2018株の病原性状の比較対照として、 $10^{6.5}$ TCID₅₀の強毒株ALD株を2か月齢の豚2頭に筋肉内接種し、その翌日に同月齢の豚2頭を同居させた（群3）。

群3のウイルス接種豚2頭においては、下痢、起立困難、食欲廃絶および遊泳運動がウイルス接種5日後に確認された。これらの豚は人道的エンドポイントに達したと判断し、同日安楽殺した。群3の同居豚も、ウイルス接種豚2頭と同様の症状を示したが、試験最終日の同居12日後まで生残した。一方、群1および2の豚は、紫斑や結膜炎を示したが、全頭が試験期間中生残した。また、群1のウイルス接種豚においては、食欲低下や活力低下も確認された。

群3のウイルス接種豚においては、ウイルス接種1～2日後から40℃以上の発熱および白血球数の減少が確認された（図2）。群3の同居豚においても、同居6～8日後から発熱および白血球数の減少が確認された。一方、群1および2のウイルス接種豚は、ウイルス接種4～7および8～12日後から発熱が確認されたが、白血球数の減少は、発熱が確認される以前のウイルス接種2～3日後から確認された。群1および2の同居豚各1頭は、同居8および12日後から発熱を示した。また、同居豚全頭が、同居14日後までに白血球数の減少を示した。しかし、群1および2の同居豚各1頭は、試験期間中、40℃以上の発熱を示さなかった。

各豚の血清、ヘパリンで凝固防止した血液（全血）、唾液、鼻汁および糞便の臨床材料からのウイルス遺伝

子の検出状況を表2に示した。群3のウイルス接種豚においては、ウイルス接種1～2日後から臨床材料中にウイルス遺伝子が検出され始めたのに対し、群1および2のウイルス接種豚においては、ウイルス接種3日後から検出され始めた。一方、群1～3のウイルス接種豚の分泌・排泄物（唾液、鼻汁および糞便）からウイルス遺伝子が検出された4～7、4～8および5日後から、各群の同居豚の血液材料（血清および全血）からウイルス遺伝子が検出された。すなわち、ウイルス接種豚から同居豚への水平伝播は、JPN/1/2018株およびALD株ともに、容易に起こることが示唆された。

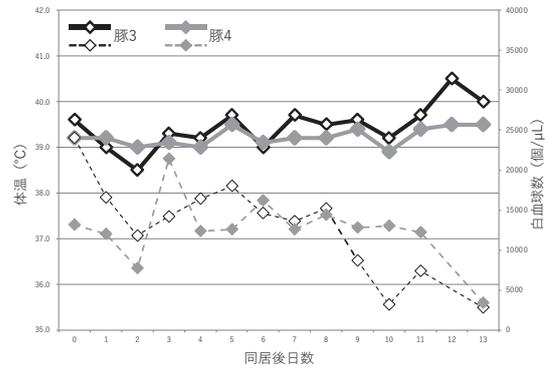
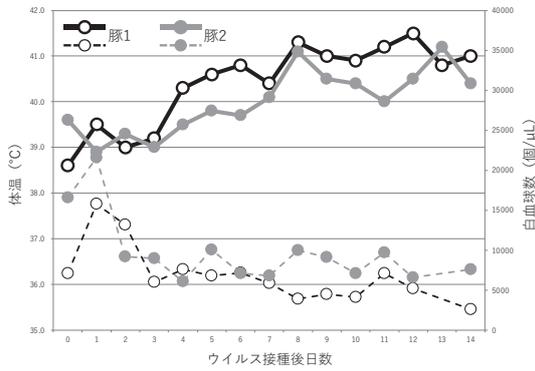
一方、今回感染試験に使用した豚全頭の扁桃において、蛍光抗体法において陰窩上皮細胞の細胞質に特異蛍光が確認された。また、ELISA抗体は、群1のウイルス接種豚1頭、群2のウイルス接種豚2頭および同居豚1頭において、試験最終日に確認された。一方、群3の豚においては、試験期間中、ELISA抗体は確認されなかった。

解剖所見として、群3の豚4頭中3頭において、脳の充血、髄膜の充血および白色混濁もしくは髄膜血管の拡張が確認された（表3）。また、群1および2の豚8頭中1頭において、脳髄膜の血管拡張が確認された。一方、群3の豚全頭において、扁桃の多巣壊死と小膿瘍形成が確認されたが、群1および2の豚においては確認されなかった。腎臓の点状出血は、群3の豚4頭中3頭で確認されたが、群1および2の豚では8頭中1頭で確認されたのみであった。脾臓、リンパ節、小腸と大腸および皮膚病変については、群間で顕著な差は確認されなかった。脾臓辺縁の多巣梗塞およびリンパ節の赤色化が、群1および2の豚8頭中4頭および群3の豚4頭中3頭で確認された。結腸のボタン状潰瘍が、群1～3の豚各1頭で確認された。

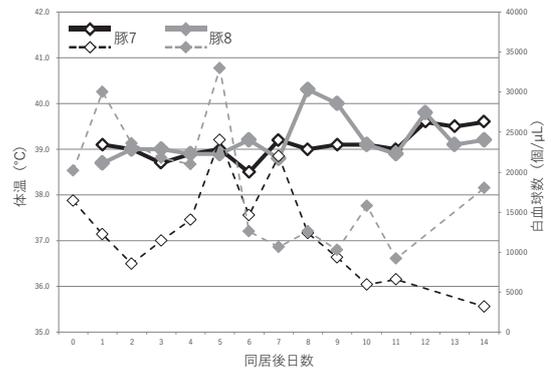
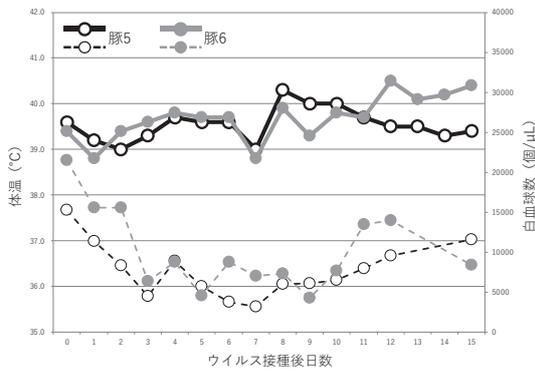
おわりに

本稿における解析成績から、現在国内で備蓄されているCSFワクチンのJPN/1/2018株に対する効果は期待出来ると考えられた。また、JPN/1/2018株のゲノム解析の成績から、JPN/1/2018株が近隣のアジア諸国からわが国に持ち込まれた可能性が示唆された。一方、JPN/1/2018株の病原性状の解析から、JPN/1/2018株がALD株に比べて、軽度な症状のみを示す一方で、発熱等の症状を示す前から排泄・分泌物中にウイルスを排泄していること、ウイルス接種豚から同居豚へのウイルスの水平伝播に関しては、両株に大きな

群1 (JPN/1/2018株 経口接種)



群2 (JPN/1/2018株 筋肉内接種)



群3 (ALD株 筋肉内接種)

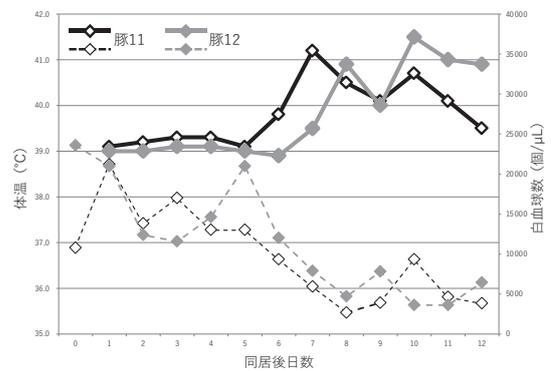
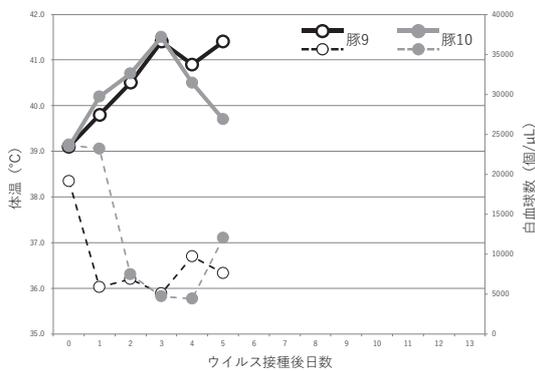


図2：群1～3の豚における体温および白血球数（体温：実線、白血球数：破線、豚9および10はウイルス接種5日後に安楽殺した、※成績は、引用文献¹⁾に示した成績を和訳および改変したものである）

表2：臨床材料からのウイルス遺伝子の検出状況

群	豚番号	ウイルス接種後日数/同居後日数																
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
1	1	-/-/- ^{a)}	-/-/-	-/-/-	-/+/-	+/-/-	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	NT ^{b)}	+/+/+/+	NT
	2	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/+/-	+/-/-	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	NT	+/+/+/+	NT
	3	NT	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/+/-	-/+/-	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	NT	+/+/+/+	NT
	4	NT	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/+/-	-/+/-	-/+/-	-/+/-	-/+/-	-/+/-	NT	+/+/+/+	NT	NT
2	5	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/+/-	+/-/-	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	NT	NT	+/+/+/+
	6	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/+/-	+/-/-	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	NT	NT	+/+/+/+
	7	NT	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/+/-	-/+/-	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	NT	NT	+/+/+/+
	8	NT	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/+/-	+/-/-	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	NT	NT	+/+/+/+
3	9	-/-/-	-/-/-	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	NT	NT	NT								
	10	-/-/-	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	NT	NT	NT								
	11	NT	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/+/-	-/-/-	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	NT	NT
	12	NT	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	NT	NT

a) 左から、血清、全血、唾液、鼻汁および糞便からのウイルス遺伝子の検出成績を表す（陽性：+、陰性：-）。また、いずれかの材料が陽性を示した日を薄い灰色、全ての材料が陽性を示した日を濃い灰色で示す。
 b) 検査を実施せず。
 ※上記成績は、引用文献¹⁾に示した成績を和訳および改変したものである。

表3：主な剖検所見

群	豚番号	病変							
		脳病変	扁桃病変	腎点状出血	脾梗塞	リンパ節出血	ポタン状潰瘍	皮膚病変	膀胱点状出血
1	1	+ ^{a)}	-	-	+	+	+	+	-
	2	-	-	+	+	+	-	+	-
	3	-	-	-	+	+	-	+	-
	4	-	-	-	-	-	-	+	+
2	5	-	-	-	-	-	-	+	-
	6	-	-	-	-	-	+	+	-
	7	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	+	+	-	+	-
3	9	-	+	+	+	+	-	-	+
	10	+	+	+	+	+	-	+	+
	11	+	+	+	-	+	-	+	-
	12	+	+	-	+	-	+	+	-

a) 病変の確認状況を表し（陽性：+、陰性：-）、病変が確認された豚については薄い灰色で示す。
 ※上記成績は、引用文献¹⁾に示した成績を和訳および改変したものである。

差がないことが確認された。感染試験の成績から、特徴ある臨床症状の発見が困難であり、養豚現場での日常的な観察をより一層徹底する必要性が示唆された。

利益相反

著者は開示すべき利益相反はない。

謝辞

2018～2019年におけるCSFの病性鑑定および原因ウイルスに対する各種解析に多大なるご尽力とご助言を頂いた農研機構動物衛生研究部門海外病研究拠点の皆様へ深謝します。また、国内備蓄ワクチン接種豚血清をご提供頂いた農林水産省動物医薬品検査所の皆様へ感謝いたします。さらに、2018～2019年におけるCSFの防疫対策に日々奮闘なさっている全ての関係者の皆様へ深く敬意を表します。

引用文献

- 1) Kameyama K, et al. (2019) Experimental infection of pigs with a classical swine fever virus isolated in japan for the first time in 26 years. J Vet Med Sci, in press.
- 2) Luo Y, et al. (2017) Isolation and characterization of a moderately virulent classical swine fever virus emerging in China. Transbound Emerg Dis, 64: 1848-1857.
- 3) Nishi T, et al. (2019) Genome sequence of a classical swine fever virus of subgenotype 2.1, isolated from a pig in Japan in 2018. Microbiol Resour Anounc, 8: e01737-18.
- 4) Postel A, et al. (2012) Improved strategy for phylogenetic analysis of classical swine fever virus based on full-length E2 encoding sequences. Vet

Res, 43: 50.

- 5) Postel A, et al. (2019) Reemergence of classical swine fever, Japan, 2018. *Emerg Infect Dis*, 25: 1228-1231.
- 6) Vilček Š, et al. (1994) 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.
- 7) World Organization for Animal Health (2018) Chapter 3.8.3., Classical Swine Fever (Hog Cholera) (infection with classical swine fever virus), *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2018*. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.08.03_CSF.pdf