

資料

豚の反芻獣ペスチウイルス感染事例

榊原裕二¹⁾、清水ひろみ¹⁾、大島 暁¹⁾、栗山伸人¹⁾、都筑智子²⁾、川西菜穂子³⁾

(¹⁾茨城県鹿行家畜保健衛生所、²⁾茨城県県北家畜保健衛生所、³⁾茨城県県西家畜保健衛生所)

Sakakibara, Y., Shimizu, H., Oshima, A., Kuriyama, N., Tsuduku, S. and Kawanishi, N. (2014).

Ruminant pestivirus outbreak of swine.

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 63, 12-16.

キーワード：豚、反芻獣ペスチウイルス、ボーダー病、豚コレラ

はじめに

平成19年4月1日に国内で豚コレラが清浄国となつて以降、本県では清浄性を確認するため、養豚場の全戸立入検査および豚コレラ ELISA 検査(以下、ELISA)により、年間100戸1,000頭の清浄性維持確認検査を行っている。しかし、豚コレラウイルス(以下、CSFV)と同属の牛ウイルス性下痢ウイルス(以下、BVDV)やボーダー病ウイルス(以下、BDV)等の反芻獣ペスチウイルスでも ELISA で抗体陽性と判定されるため、その識別検査が重要である。

今回、管内の養豚場において、ELISA 抗体陽性が確認され、ウイルス検査の結果、BDV に近縁のペスチウイルス、所謂反芻獣ペスチウイルスが分離されたので、その概要を報告する。

材料及び方法

抗体検査には豚コレラ ELISA キット(JNC 株式会社)を用い、ELISA 抗体陽性血清については中和試験を実施し、指示ウイルスとして CSFV GPE-株、BVDV Nose 株(以下、BVDV1)及び BVDV KZ91 株(以下、BVDV2)を使用した。

抗原検査の RT-PCR は ELISA 抗体陰性血清及び鼻腔スワブについて、プライマー 324及び326を用いて実施した。また、ウイルス分離は RT-PCR 陽性検体及び病理解剖豚の主要臓器を CPK 細胞を用いて4日間37℃で2代継代した。FA は扁桃の凍結切片やカバースリップを用いて、市販の豚コレラ FA (微生物化学研究所)、BVDV FITC Conjugate (VMRD 社)、抗 CSFV モノクローナル抗体及び抗汎ペスチウイルスモノクローナル抗体((独)農業・食品産業技術総合研究

機構 動物衛生研究所より分与)を用い、豚コレラ FA 以外は二次抗体に FITC 抗マウス抗体 (Fluorescein F(ab')₂ Fragment of Goat Anti-Mouse IgG(H+L), life technologies) を使用した。

農場の概要

当該農場は母豚100頭を飼養する一貫経営農場で、繁殖母豚は県内の特定農場から2~3ヶ月毎に数頭導入し、分娩舎内の2豚房で群飼している(図1)。分娩舎

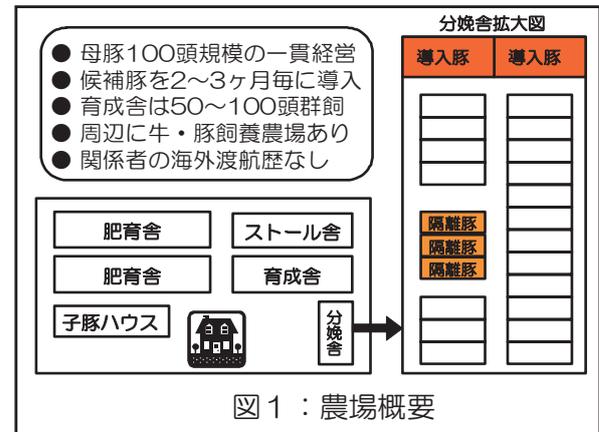


図1：農場概要

から子豚を移動する際に、発育遅延豚は分娩舎内の3つの隔離豚房に集めて飼育している。さらに、周辺農場には牛や豚の飼養農場が存在しているが、飼養者の海外渡航歴や反芻動物との接触はなかった。

発生経過及び病性鑑定

平成24年2月7日、豚コレラ清浄性維持確認検査のため、当該農場において日齢別に29頭の採血を行い、翌日に ELISA を実施したところ、14頭(48.3%)で抗体陽性が確認された。同日、直ちに当該農場に緊急立入りをして、飼養豚の移動自粛を要請するとともに、飼養豚の臨床症状の確認、35頭の体温測定及び採血を実施した。その結果、発熱や白血球数の減少を呈する

異常豚は確認されなかったが、ELISA で35頭中26頭(74.3%)の抗体陽性を確認した。また、RT-PCRでは、35頭のうち約120日齢の1頭からペスチウイルス属に特異的な遺伝子が検出されたことから、(独)農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所に遺伝子解析を依頼した結果、BDVに近縁のペスチウイルスであることが判明し、豚コレラは否定された。

この結果を踏まえ、当該農場にはと畜場への出荷に限定して移動自粛を解除し、異常豚が認められた場合は早期通報するよう指導した。

2月13日、当該農場におけるウイルスの浸潤状況を確認するために再度立入りをして、ペア血清として8日に採血した繁殖豚11頭とELISA抗体陰性の肥育豚8頭及び同居豚の肥育豚67頭の採血を行った。その結果、ペア血清のELISAは19頭中9頭が陽性となり、繁殖豚2頭が陽転した。また、RT-PCRでは、8日に遺伝子を検出した肥育豚と同一の1頭が陽性であった。当該豚のELISAはプレ及びポスト血清共に陰性であったことから、この個体を持続感染豚と診断し、淘汰した。一方、同居豚67頭のELISAは50頭(74.6%)が抗体陽性となり、抗体陰性だった17頭についてRT-PCRを実施した結果は全て陰性であった。さらに、ELISA抗体陽性の50頭について、中和試験を実施した結果、CSFVは22頭で2倍から4倍、BVDV1は44頭で2倍から64倍、BVDV2は全て2倍以下を示し、CSFVに対する抗体価がBVDV1に対する抗体価に比べて明らかに低かった(表1)。

表1 ELISA陽性検体の中和試験結果

中和試験			頭数
CSFV	BVD1	BVD2	
	<2		6
	×2		3
<2	×4	<2	4
	×8		7
	×16		5
	×32		3
	×2		1
	×4		2
×2	×8	<2	6
	×16		2
	×32		4
	×64		2
×4	×16	<2	3
	×32		2

一方、ウイルス排泄豚の摘発・淘汰を目的として、異常豚の病性鑑定及び初産豚の子豚の鼻腔スワブのウイルス検査を実施した。病性鑑定は平成24年2月14日から3月19日までに抗体陽転が確認された繁殖豚1頭及び30~110日齢の発育遅延豚5頭について実施した結果、2頭からウイルスが分離された。また、鼻腔ス

ワブは分娩舎内の初産豚の子豚及び発育遅延豚の隔離豚房3ヶ所を対象に、平成24年4月から10月までに385頭についてRT-PCRを実施した結果、4月10日に採材した隔離豚房の1頭が陽性となり、当該豚は数日後に死亡した。

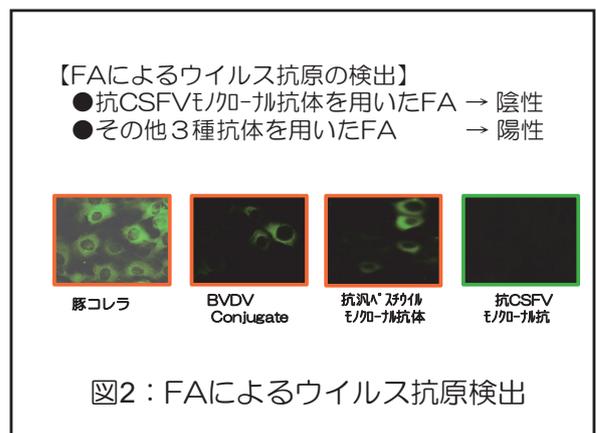
ウイルス分離の結果は約120日齢の持続感染豚1頭、病性鑑定の解剖豚2頭、鼻腔スワブのRT-PCR陽性となった1頭の合計4頭から分離されたため(分離株名: Border disease virus, FNK2012-1~4)、CPK細胞でウイルスが増殖することが確認されたが、何れも細胞変性効果は確認されなかった(表2)。また、カバース

表2：ウイルス検査結果

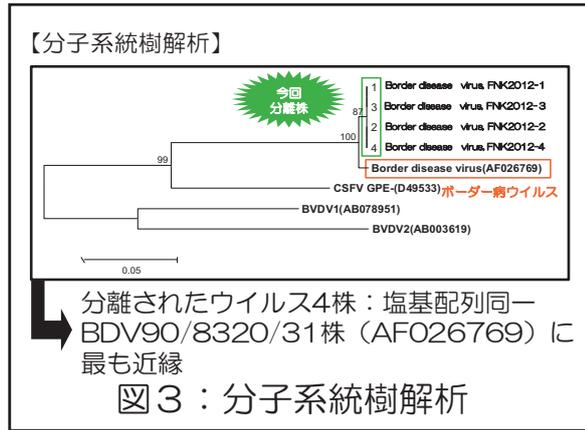
No	日齢	生死	症状	ELISA	PCR	分離	備考
1	120	生	無	-	+	+	持続感染豚
2	母豚	生	無	+	-	-	
3	110	生	発育遅	+	ND	-	隔離豚房
4	45~50	生	発育遅	+	ND	+	隔離豚房
5	40~50	死	発育遅	ND	ND	-	
6	40~50	死	発育遅	ND	ND	-	
7	30~40	死	発育遅	ND	+	+	隔離豚房
8	35	生	発育遅	ND	+	+	鼻腔スワブ陽性

4頭から反芻獣⁺スライム分離 ←

リップの抗CSFVモノクローナル抗体を用いたFAでは陰性であったが、その他の3種類の抗体では陽性を示した(図2)。また、分離された4株の反芻獣ペスチ



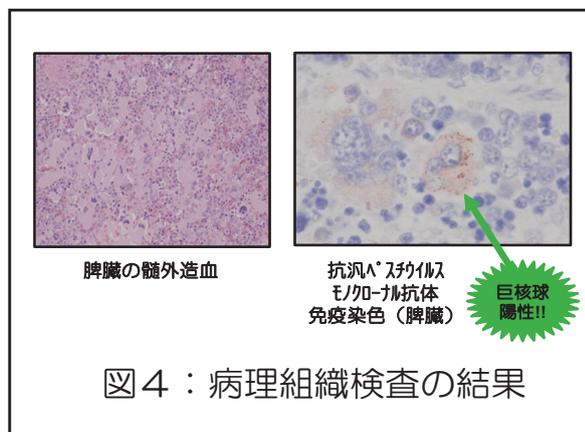
ウイルスについてはダイレクトシーケンスによる塩基配列の決定を行い、相同性検索を実施した結果、4株とも同一の塩基配列を示し、BDV90/8320/31株(Accession No.AF026769)に最も近縁であった(図3)。さらに、ウイルスが分離された発育遅延豚2頭の病理検査では、主な所見として脾臓での血管炎を伴う広範囲の壊死、骨髄の巣状壊死や低形成が認められた。抗汎ペスチウイルスモノクローナル抗体を用いた免疫染色



では、脾臓の巨核球で陽性反応を示した。(表3、図4)。

表3：病理組織検査の結果

所見	No.4	No.7
脾臓		
髄外造血	++	+++
血管炎を伴う広範囲の壊死	-	+++
リンパ節	+++	+
小脳		
プルキンエ細胞樹状突起の腫大	+++	+++
骨髄		
巣状壊死	+	-
低形成	-	++
心臓		
髄外造血	++	-
線維索性心外膜炎	-	+
腎臓		
髄外造血	+	-
肺		
間質性肺炎 (ニューモシスチス・カリニ)	-	+



清浄化対策

1) 清浄化対策会議の開催

農場の立入り及び病性鑑定により豚コレラは否定されたものの、豚で水平感染するペスチウイルスが分離されたため、農場内における蔓延防止及び清浄化対策を検討するため、農林水産省消費・安全局動物衛生課、(独)農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所、県畜産課及び家畜保健衛生所による打合せを行った。

その結果、発生農場の防疫対応の他、ウイルス排泄豚の摘発・淘汰を目的として、異常豚の病性鑑定や初産豚の子豚及び隔離豚房豚の鼻腔スワブによるウイルス検査の実施、農場内のウイルス浸潤状況を把握する目的として、繁殖豚及び肥育豚のELISAの実施、さらに、種豚導入元の農場及び当該農場周辺の豚・牛飼養農場について浸潤状況を把握するためにELISA等を実施することとした。

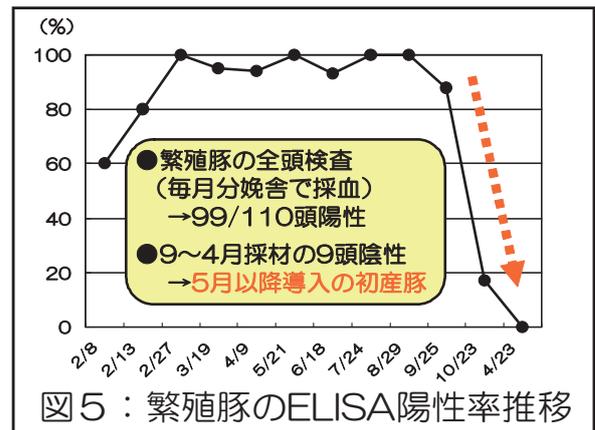
2) 当該農場の防疫対応

ウイルスの農場外への拡散防止と農場内のまん延防止のため、飼養衛生管理区域内への侵入車両の消毒、移動して空になった豚房の消毒、各豚舎の入口に踏込消毒槽の設置と消毒薬の交換、分娩舎内の隔離豚房間に接触防止のための仕切り板の設置、農場従事者には豚房毎に専用衣服と長靴使用など、これらの防疫対応を徹底して実施した。

3) 当該農場のウイルス浸潤調査

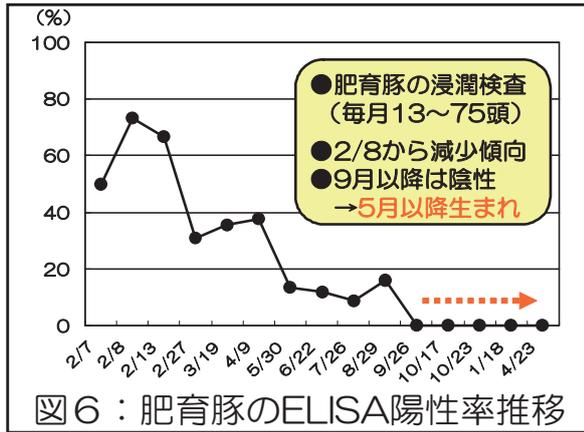
(1) 繁殖豚のウイルス浸潤調査

平成24年2月8日から平成25年4月23日までの期間に、繁殖豚の全頭検査を実施するため分娩舎で繁殖豚を毎月採血し、ELISAを実施した。その結果、110頭中99頭(90%)が抗体陽性であった。また、抗体陰性の繁殖豚11頭中の9頭は9月以降の採材で確認され、その全てが5月以降に導入された初産豚であった。(図5)。



(2) 肥育豚のウイルス浸潤調査

平成24年2月7日から10月23日までの期間に、13~75頭を毎月採材してELISAを実施した。その結果、最初に抗体陽性を確認した2月8日の陽性率73.3%をピークに減少傾向を示し、9月以降は陰転した(図6)。



4) 周辺農場の浸潤検査

当該農場を中心に半径 3 km 圏内の養豚場12戸について、平成24年 3月29日から 6月 6日までの期間に、肥育豚195頭の抗体検査を実施した。その結果、ELISA は全て陰性、CSFV 及び BVDV1 の中和抗体価は何れも 2 倍以下であった。

また、半径 2 km 圏内の酪農家 5 戸について、平成24年10月11日から22日の期間に、育成牛39頭の BVDV 1 及び 2 の中和試験、4 戸についてはバルク乳の RT-PCR を実施した。その結果、中和抗体は何れも 2 倍以下で、バルク乳の RT-PCR は全て陰性であった。

5) 関連農場の浸潤状況

繁殖候補豚の導入を行った農場 4 戸について、平成22年から平成23年に採材した保存血清406検体を用いて ELISA を実施した結果、全て陰性であった。

まとめ

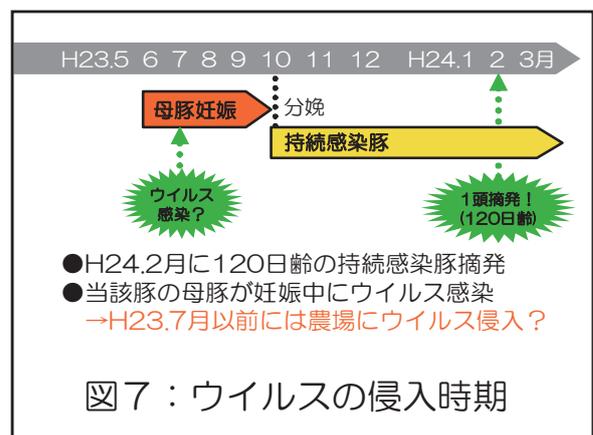
今回、豚コレラ清浄性維持確認検査のため実施した ELISA で抗体陽性率が高い豚群を確認した。当該農場には、飼養豚の移動自粛を要請し、同日実施した緊急立入検査では、発熱、血小板や白血球数の減少などの異常豚は見られず、血清の RT-PCR で陽性となった 1 頭の遺伝子解析の結果、BDV に近縁のベスチウイルスと判明した。これらの迅速な検査対応により、豚コレラウイルスの関与を否定したことから、と場への出荷に限定して移動自粛を解除することができた。

平成24年 2月 8日の時点では ELISA 陽性率が74.3%と高く、既に発生当初からウイルスが農場内にまん延していたが、これは常時ウイルスを排泄している持続感染豚が存在していたことが、一要因と考えられる。また、繁殖豚の ELISA では、平成24年 2月に実施し

たペア血清で 2 頭の陽転が確認されたことから、この時期に分娩舎内でウイルスが動いていたことは明らかである。さらに、平成24年 2月から 4月にウイルス分離された 3 頭の発育遅延豚は、分娩舎内の隔離豚房で飼養されていたことから、これらの豚が繁殖豚へウイルス感染を拡大した原因と考えられた。

当該農場では抗体陰性で導入した繁殖候補豚を分娩舎内で群飼していたため、導入した豚がおとり豚となり、農場内でのウイルスの動きを把握する一つの指標となった。毎月実施していた分娩舎での繁殖豚の ELISA では、平成24年 4月以前に導入した豚は分娩後には陽転していたが、平成24年 5月以降に導入した繁殖豚における抗体陽転は確認されなかった。また、平成24年 9月下旬以降に採材した肥育豚の ELISA では全て陰性であったことを考慮すると、平成24年 4月から 5月を境に農場内のウイルスが沈静化したことが示唆された。

当該農場へウイルスが侵入した時期は、ウイルス感染した豚が明確な臨床症状を示さなかったため、飼養者の聞き取り調査からは特定できなかった。しかし、平成24年 2月に約120日齢の持続感染豚が確認されていることから、当該豚の母豚が妊娠中にウイルス感染があったと考えられ、少なくとも平成23年 7月以前には農場内にウイルスが侵入していた可能性が推察された (図7)。



ウイルスが侵入した原因究明については、繁殖候補豚の導入元農場や周辺養豚場の抗体検査では全て陰性であったことから、これらの農場からウイルスが侵入した確証は得られなかった。また、飼養者の海外渡航歴はなく、外国人労働者の雇用等の海外との接点も認められなかった。さらに、周辺酪農場の検査では BVDV の感染は確認されなかったものの、全ての農場の検査を実施していないため、反芻獣からの感染の可

能性は完全に否定できない。そのため、今後は牛、羊、山羊及び豚等の感受性動物における広域な浸潤調査により、本ウイルスの浸潤状況および侵入経路等の詳細な解明が求められる。

現在、我が国では豚コレラ清浄国となって5年、更に国内の最終発生から20年の間、清浄性を維持してきた。これは、国内における豚コレラの検査体制が確立されているためと考えられる。今回の事例でも、豚コレラを想定した迅速な対応と的確な検査を実施したことで、BDVに近縁のペスチウイルス感染によるものと判明した。しかし、本ウイルスに関する国内の知見は十分でないため、今後はより詳細な研究が期待される。

稿を終えるにあたり、検査及び助言を頂いた(独)農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所の山田俊治先生に深謝いたします。