

## 4. CSF 侵入防止対策

大分家畜保健衛生所・<sup>1)</sup> 豊後大野家畜保健衛生所・<sup>2)</sup> 玖珠家畜保健衛生所・<sup>3)</sup> 宇佐家畜保健衛生所

○病鑑 平松香菜恵・(病鑑) 吉田史子・加藤洋平<sup>1)</sup>・山崎窓<sup>2)</sup>・澤野貴之<sup>3)</sup>

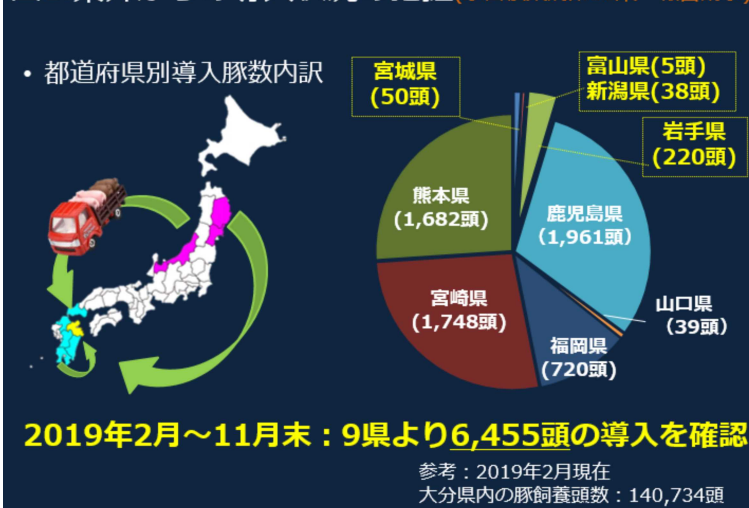
2018年9月、岐阜県において国内26年ぶりとなるCSFの発生が確認された。2019年11月末現在、1府8県において15万頭を越える豚や飼養いのししが殺処分され、CSFに感染した野生いのししは12県で確認されている。大分県では1972年以降、CSFの発生は確認されていない。今回は、国内26年ぶりのCSF発生を受けて大分県で取り組んだ5つのCSF侵入防止対策を報告する。

### 1. 県外からの導入状況の把握

2019年2月、愛知県のある1農場においてCSF感染を確認。診断前に出荷された出荷先の1府4県の農場においてもCSF感染が確認された。この事例で、豚は県境関係なく全国に流通していることが明らかとなり、大分県内の養豚場がどれぐらい大分県外から豚を導入しているかを把握するため、家畜伝染病予防法第52条に基づき報告徴求を実施した。各家畜保健衛生所(家保)の豚に関する業務を担当している職員を中心に県外から豚を導入する養豚農家から導入日・導入元の農場・導入頭数等の報告を受け、Excelシートに入力し、電子サーバを用いて職員間で情報を共有している。

報告を受けた結果、2019年2月～11月末までに9県より6,455頭の豚の導入が確認された。多くが鹿児島県・宮崎県・熊本県などの九州からの導入であったが、一部、東北地方や北陸地方からも導入されていることがわかった。(図1)

図1. 県外からの導入状況の把握(家畜伝染病第52条 報告請求)



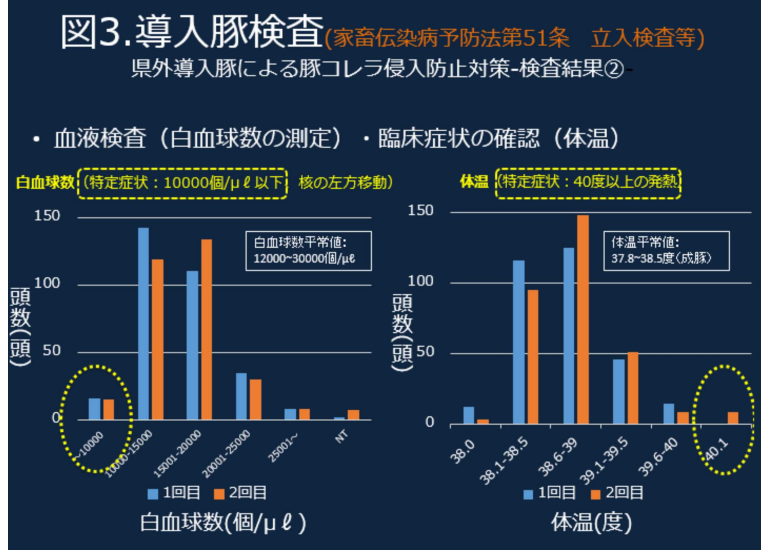
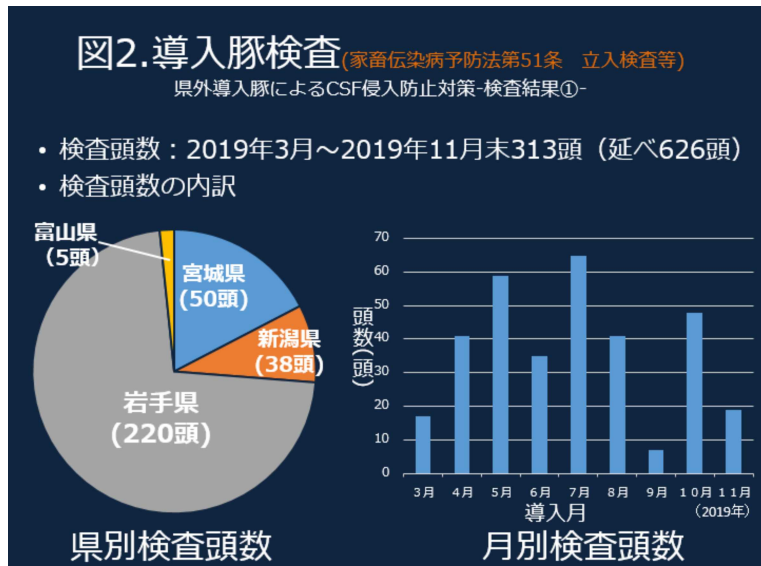
### 2. 導入豚検査

1つめの導入状況をうけ、県外からのCSF侵入防止対策のため、2019年3月より導入豚検査を実施することとした。九州各県および山口県においてはCSF発生農場の監視農場および関連農場がないことが確認できたため、検査対象は九州各県および山口県以外からの導入豚とした。検査頭数は繁殖候補豚は全頭、肥育豚は95%の信頼

で 10 % の感染を摘発できる頭数とした。検査内容は臨床症状の確認・血液検査・CSF 抗原検査・CSF 血清抗体検査とした。検査日については、亀山らの報告<sup>1)</sup>に今回の国内発生株は以前国内で発生していた株よりも病原性が弱い、症状がわかりにくい、感染 3 日目以降から血中のウイルスが検出できる、感染後死亡することなく感染 14 日以降より抗体が陽転する個体もいる、との知見があることから、導入日と導入 21 日後の 2 回検査とした。検査方法は、家保において豚コレラ防疫指針に基づいた臨床症状の確認・直腸温の測定・白血球数の測定を実施、病性鑑定部(病鑑)では CSF 遺伝子検査および血清抗体検査を実施。検査結果は当日中に当該家保へ報告している。

2019 年 3 月～ 2019 年 11 月までに 4 県から導入された 313 頭延べ 626 頭を検査した。月別に導入頭数をみると毎月検査対象地域より豚が導入されていることがわかる。(図 2)

CSF 感染の特定症状として、白血球の減少・発熱などが挙げられる。検査した導入豚の中には白血球数が 10,000 個/ $\mu$ l 以下を示した個体が 626 頭中 31 頭(4.95%)、体温が 40 度を越える個体は 626 頭中 8 頭(1.27%)で見られたが、臨床症状に問題はなく、輸送ストレスや外気温の影響を受けたものと考えられる。(図 3)CSF 抗原検査および抗体検査では検査した全ての血清より、CSF 特異的遺伝子および抗体は検出されなかった。



### 3. 野生いのしし検査

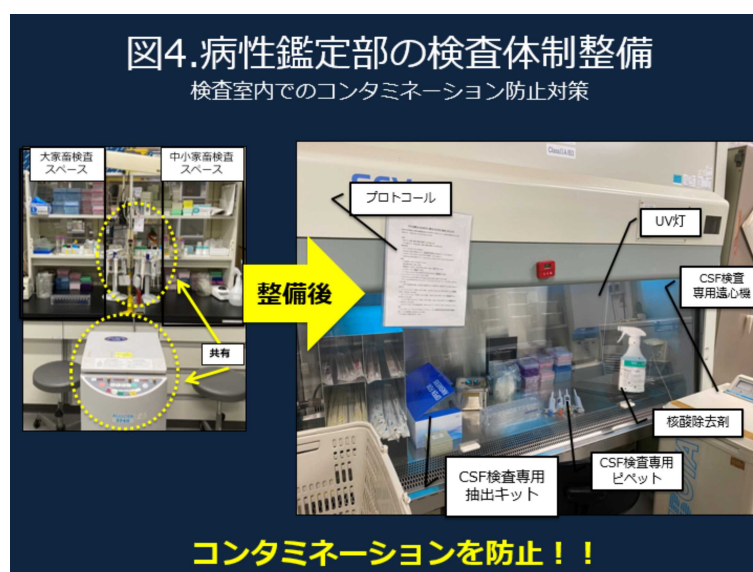
CSF が国内で広がっている大きな要因として野生いのししが挙げられる。県内では、捕獲野生いのししの CSF 血清抗体検査を実施し、2019 年度全 56 頭の CSF 抗体陰性を確認。また、農林水産省消費・安全局動物衛生課長通知(平成 30 年 9 月 14 日付 30 消安第 3127 号)に基づき野生いのしし群における CSF 浸潤状況を確認するために、死亡いのししにおける CSF 抗原検査を 2019 年 11 月末現在 6 頭実施し、全て CSF 抗原陰性

を確認している。

#### 4. 病鑑内での CSF 検査体制の整備

CSF 検査で最も注意しなければならないことがコンタミネーションである。CSFV が属するフラビウイルス科ペスチウイルス属には牛粘膜下痢病ウイルス (BVDV) および羊のボーダー病ウイルス等も属している。これらのウイルス病についての遺伝子検査はすべて 324-326 というプライマーを用いて同じ 5'末端の遺伝子領域を増幅して診断する。過去には豚に BVDV やボーダー病ウイルスが感染した事例も報告されている<sup>2) 3)</sup>。また、大分県内では 2018 年度から BVDV の持続感染牛 (PI 牛) の摘発が多数あり、正確に診断するためには、検査室内でのコンタミネーション防止対策が必要であると考えられた。

これまでは、大家畜ウイルス検査と中小家畜ウイルス検査で作業スペースや試薬については分けていたものの、遠心機やピペットは共有している状態であった。そこで、紫外線照射のできる安全キャビネットを CSF 検査専用スペースとし、試薬・遠心機・ピペットなど全てを CSF 検査専用とし、核酸除去スプレーを購入し、検査前・後に拭き取りを実施し、コンタミネーション防止対策を実施した。(図 4)



#### 5. 豚精液中の CSF 遺伝子検査の検討


大分県農林水産指導センター畜産研究部は 2011 年度より豚精液凍結受託製造をしている。国内で CSF が発生したこと、CSF は精液中にも排出されることより検査体制の整備が必要であると考えられた。そこで、CSF ウイルス液を培養液および豚の精液で希釈したものから遺伝子検出を試みたが、精液中は夾雑物が多いからかこれまでの検査系では検出できなかった。(図 5)

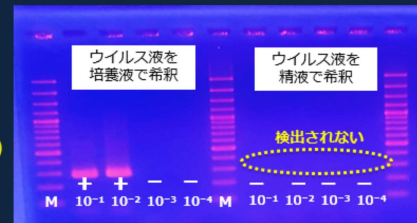
検証の結果、抽出キットをプロテアーゼ K を使用するものに変更。また、反応キットをワンステップキットに変更したところ通常検査系としても感度が 10 倍上がった。精液中の検出感度も通常検査系と同等とできた。さらにワンステップキットに変更したことにより、検査時間の短縮、コンタミネーション防止にもつながると考えられる。(図 6)

今後も養豚場への飼養衛生管理基準の徹底指導などの侵入防止対策に加え、CSFV が侵入した場合に早期発見ができるよう迅速かつ正確な診断に努めたい。

## 図5.豚精液中の遺伝子検査の検討

- ・大分県農林水産研究指導センター畜産研究部の豚精液凍結受託製造
- ・目的：豚精液中におけるCSFV遺伝子の検出


【方法】  
抽出キット：  
High Pure Viral RNA Kit  
反応キット：  
TaKaRa Ex Taq (2step RT-PCR)  
→反応時間約3時間

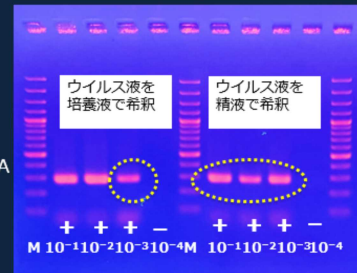


**検出感度低下！改善が必要！**



## 図6.豚精液中の遺伝子検査の検討

【方法】  
抽出キット：  
High Pure Viral Nucleic Acid Kit  
反応キット：  
SuperScript III One-Step  
RT-PCR System with PlatinumR Taq DNA  
Polymerase (1step RT-PCR)  
→反応時間約2時間20分 (40分短縮)



【結果】通常検査系として**検出感度が10倍up**  
通常検査系と精液中の検査の感度を同等にできた  
**検査時間の短縮**、コンタミネーションの防止

### 参考文献

- 1) ken-ichiro KAMEYAMA, Experimental infection of pigs with a classical swine fever virus isolated in japan for the first time in 26 years, The Journal of Veterinary Medical Science, 2019 Volume 81 Issue 9 Pages 1277-1284 (2019)
- 2) 高久英徳, 野外豚からの牛ウイルス性下痢ウイルス抗体の検出, 日獣会誌 60.125-130 (2007)
- 3) 榎原裕二, 豚の反芻獣ペスチウイルス感染事例, Proc Jpn Pig Vet Soc No.63 2014