

精製核酸を用いることなく豚熱（CSF）と アフリカ豚熱（ASF）の同時診断が可能な 新規マルチプレックスリアルタイムPCR法の開発

國 保 健 浩・西 達 也

(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)

〒 187-0022 東京都小平市上水本町 6-20-1)

Kokuho, T. and Nishi, T. (2022):

Novel Multiplex Realtime Reverse Transcription PCR for Simultaneous Diagnosis of CSF and ASF with the Use of Crude Tissue Specimens

All about SWINE 60, 3-10

豚熱（CSF）とアフリカ豚熱（ASF）の流行の現状

本誌の読者におかれては、豚における感染症の流行状況、特に近年高い注目を集めるCSFやASFの発生状況については熟知されていると思われるので、ここではCSF、ASFの両疾病の動向に関する最近の情報に触れるとともに若干の解説を述べるに留める。

[CSFについて]

2018年9月に岐阜県で26年振りの発生をみたCSFは、2021年12月末現在までに76例を数えている。今般の流行では、これまでと違いその伝播に野生のイノシシが深く関わっており、養豚場で発生と相前後してCSFウイルス（CSFV）陽性のイノシシが多数摘発されており（陽性数4,359頭、本年1月5日現在）、その棲息域も北は宮城、山形から西は兵庫、和歌山まで25都府県へと拡がりを見せている（1）。一方、海外でもCSFVは

依然としてユーラシア、アジア、オセアニア、中南米に分布しているが、2018年9月以降、公式に発生が報告されているのは日本、ロシア、ブラジル、ブータンのみである（2）。CSFVはゲノムの遺伝子配列に応じて1型から3型までの3つの遺伝子型（genotype）に分けられ、それらの下位にはさらに十数種類の亜型（subgenotype）が存在する。現在、日本を含むアジアでは2.1型が主流となっており、次いで1.1, 2.2, 2.3型の順となっている。CSFVは血清学的に単一なため、ワクチンとしては安全性が高いことが知られる1.1型のC株やGPE株を用いて作られる生ワクチンが広く利用されている。国はCSFV陽性イノシシの棲息域の拡大を踏まえ、流行地でのイノシシを対象としたC株経口ワクチンの散布と養豚場における未感作豚へのGPE株ワクチンの接種を精力的に進めるとともに、野生イノシシに対するサーベイランスを強化している。

CSFの発生状況

2019年2月21日現在



図1 2007年1月から2019年2月における豚熱(CSF)の発生状況

[ASFについて]

2007年にアフリカ東岸からコーカサス地方へと侵出したASFは、その後ユーラシア大陸を經由して欧州、アジアへ拡大し、現在も各地で発生が続いている。直近(昨年10～12月期)のFAO週報でも、ロシア、韓国、マレーシア、インドネシア、ラオス、中国での発生情報が配信されている。これらの発生のうち、ここでは我が国への侵入との関連性が懸念される、韓国、中国での発生について、若干触れておきたい。2019年5月の北朝鮮での初発報告に続き、韓国では、同年9月に国境に接する京畿道の農場で初めて発生が報告され、10月には周辺の森林地帯でASFV感染イノシシが摘発されている。養豚場における発生は一時終息を見たものの、2020年9月には江原道で陽性イノシシ23頭が摘発され、続く10月には同地の農場で1年振りに再発した(韓国15、

16例目)。その後約半年間は再び平静を取り戻したものの陽性イノシシの摘発が続き(昨年12月末現在、計1,875例)、2021年5月以降は養豚場における発生へとつながっている(昨年12月末現在、計21例)。韓国の事例は本病の流行における野生イノシシの関与の大きさを示唆するだけでなく、ひと度イノシシの集団に侵入すると、その根絶が極めて困難になることを示している。同様の事態は野生イノシシの生息数が多い欧州でも観察されており、広い山林地帯に多数のイノシシが棲息する我が国においても野生イノシシ対策の適切な選択とその実施がASFのみならずCSFの防疫においても極めて重要な課題であることを浮き彫りにしている。

一方、世界最大の豚肉生産・消費国である中国では、最近、単なる強毒株の再発といった事象とは異なる問題が見出だされており、我が国の防疫

対策にも影響しかねないことからここでは二点を取り上げておきたい。一点目は、冷凍豚肉（および豚肉製品）の問題である。農林水産省動物検疫所では、国際空海港等で家畜伝染病予防法に基づく指定検疫物の検疫や違法な輸入畜産物の摘発を行っているが、違法持ち込み物品の中からはASFV 遺伝子陽性の豚肉加工品が多数見つかり（2018年10月以降、計98例；参考文献3）、そのうち4例からは増殖性を備えた“生きた”ウイルスが分離されている（4）。このような状況では、ウイルスに汚染されている可能性のある豚肉製品の違法な持ち込みを禁止する必要があるだけでなく、流行地における発生がピークを過ぎて数年を経た時点でもこのような監視体制の緩和は極めて慎重に行うべきである。これらASFV陽性の製品の殆どにはミンチされた冷凍豚肉が使われていたことから、当地での発生に際して検査をすり抜けてと畜され、冷凍肉として長期に保管されていた汚染ミンチ肉が年月を経て再び市中に流通している可能性が疑われる。このことは、たとえ流行の去った後であっても冷凍豚肉やその加工品（包装資材等を含む）を介してウイルスが我が国に持ち込まれるリスクが残ることを意味し、厳格な輸入検査の実施や旅客に対する輸出入の規則の周知を長期的視点に立って継続することの大切さを再認識させる。

二点目は、近年、中国国内で強毒型として知られる現在の流行株とは異なるウイルスが見つかり（5、6）。1つは現在の流行株と遺伝的に近縁だが毒性の低い変異株であり、もう1つ（株としては2種類見つかり）はかつて欧州で分離された株に近縁な弱毒株で、いずれも豚に対する致死性が低く明瞭な症状を示しに

くい。国際機関への公式の発生報告はなされておらず詳細は不明であるが、いずれの株も試作ワクチンとして作られた株であることが疑われている。これらの株は、たとえ弱毒株であっても致死的な病状を示すことがあるだけでなく、生産性の低下や産仔数の減少を招くとともに、強い病原性が復帰してしまうリスクを伴う。人為的に改変された株であるにせよ自然に生じた株であるにせよ、このような“不明瞭な”病態を示すウイルスに感染した豚は、と畜検査等をすり抜ける可能性が高く、故に何らかの機会に日本に持ち込まれるリスクを高める。現在の流行が中国から“染み出す”ようにアジアに拡散していった経緯を考えると、このような弱毒株が流行地の周辺から間接的に我が国へと侵入するリスクについても留意する必要がある。

CSF、ASFの防疫には、一にも二にも豚群や非感染の野生イノシシ集団へのウイルスの侵入防止、豚と陽性イノシシとの物理的分離、即ちバイオセキュリティの確保が重要である。しかしながらCSFについては既に多数のイノシシ集団にウイルスが侵入していることから、フィールド調査により陽性イノシシの分布や集団内の汚染度を的確に把握しつつ、隔離対策に反映することを次善の策として進めていかざるを得ない。一方、ASFについては外来の畜産物に対する検疫を強化して、流行地からの豚肉およびその加工品の持ち込みを防止することが肝要であるが、自己申告が基本となっている空海港での検疫だけですべてを防ぐことは難しく、万一の侵入に備えて、地域や農場における重層的な防疫体制を整備、運用することが必要である。次節では、CSFおよびASFの早期検知の鍵となる診断法を概説しつつ、現行法

の課題を踏まえて我々が最近開発した新しい遺伝子検査法を紹介する。

豚熱およびアフリカ豚熱の診断

CSF と ASF は共に発熱，元気消失，食欲廃絶，チアノーゼ等，臨床的に極めて類似した所見を示すことから，外貌の観察のみに基づいて診断することには問題が多い。教科書的には，CSF については脾臓の梗塞性出血や腎臓の点状出血等が，また ASF についても脾腫やリンパ節の暗赤色化，血液の凝固不全といった異常が“特徴的”な病変として記述されているため，へい死した豚やイノシシを検視することで容易に鑑別できるものと考えられがちであるが，これらの変化は罹患した動物にもれなく見出される変化ではなく，また発症の経過や環境中に存在する他の病原体によって病状が歪められるため，“特徴的”な病変の有無のみを頼りに診断を行うことは誤診につながりかねない。そのため国際獣疫事務局（OIE）が発行する基準書である OIE マニュアルには「検査室

での検査が必須である」と記載されている。両疾病の確定診断には原因となるウイルスの分離がゴールドスタンダードだが，分離までに時間を要すること，検体の状態が分離の成否に影響すること等から，確実な検査法であるとは言い難い。そのため同マニュアルでは，その他の抗原検出法として，CSF については扁桃の凍結切片を用いた蛍光抗体染色法（FAT 法）や抗原 ELISA 法が，ASF については血球吸着反応（HAD 反応；注 1）のほか，CSF と同様の各種の抗原検出法が推奨されているが，COVID-19 を例に挙げるまでもなく，現在は迅速性，実用性に優れた抗原検出法として PCR が広く用いられている。我が国でも，現在 CSF については Vilcek らが開発した逆転写 PCR 法（7）の改良型が，また ASF についても King らが開発したリアルタイム PCR 法（8）の変法が特定家畜伝染病防疫指針（以下，防疫指針）に記載され，都道府県が実施する病性鑑定業務に広く利用されている。（両検査の手順を図 2 に示す。）

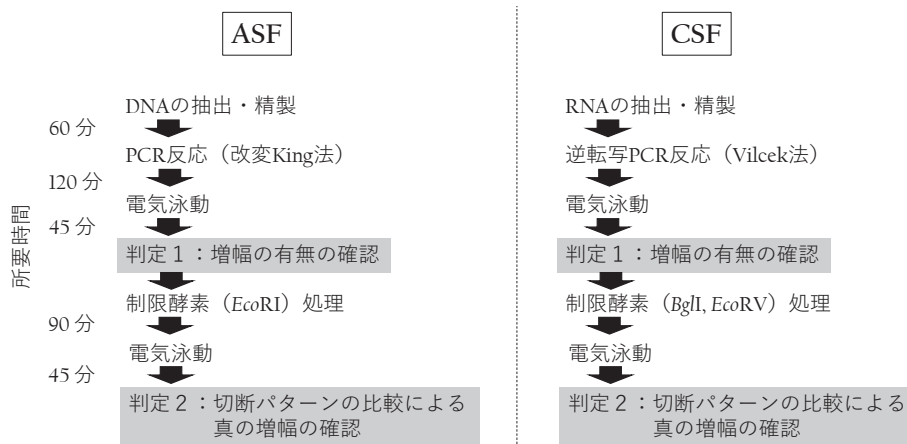


図2 現在，都道府県の病性鑑定施設で実施されている ASF および CSF の遺伝子検査手順

注 1：ASFV に感染した宿主細胞で特異的に認められる豚赤血球の吸着反応

しかしながら、現行の PCR 検査には、①検査開始前に検体から被検試料となる核酸（ウイルス核酸）を抽出・精製する必要があること、②核酸の抽出・精製工程や反応液の調整過程で、直近で取り扱った陽性試料や陽性対照による交差汚染が生じやすく、誤判定のリスクを伴うこと、③最終的な判定に電気泳動による増幅産物の確認および酵素処理時の変化の確認（正しい陽性産物であれば特定の酵素でのみ切断される）が必要かつ交差汚染のリスクが高い上に判定に時間を要すること、といった欠点がある。さらに、CSF と ASF は臨床症状のみに基づいて鑑別することが困難なため、家畜伝染病予防法で定められる「特定症状」が認められた症例に対しては両方の検査を並行して実施することが防疫指針上で求められているが、現行の検査法には、④ RNA ウイルスである CSFV と DNA ウイルスである ASFV を別個に取り扱わなければならない、という短所があった。

豚熱およびアフリカ豚熱の簡易、迅速な診断・識別法の開発

そこで我々は、CSF および ASF 個別の遺伝子検査法にまつわるこれらの欠点を解消するため、令和 2 年から開始した農林水産省委託プロジェクト研究事業において、タカラバイオ株式会社と共同で新規検査法の開発に取り組むこととした。開

発の方針として、上記①～④の問題点を解決するため、I. 検体から核酸を精製することなく検査が可能な反応系を構築する（①、②への対策）、II. 反応時間の短い TaqMan 型（注 2）のリアルタイム PCR 系を採用する（③への対応）および III. RNA と DNA を区別することなく一括して取り扱える複数遺伝子同時検出型（マルチプレックス型）フォーマットとする（④への対応）こととし、加えて IV. 検査工程の成否の指標となる内部標準遺伝子の検出系の搭載を目指すこととした。

その結果、以下の特長を有するマルチプレックス型のリアルタイム遺伝子検出系の構築に成功した（図 3）。

1. CSFV, ASFV および内部標準となるブタ GAPDH 遺伝子（注 3）をそれぞれ独立した PCR 増幅反応により特異的に増幅する
 2. 不純物に耐性の高い逆転写酵素、PCR 酵素を採用することで、血清や組織乳剤を簡易な前処理のみで反応に供することが可能
 3. 特殊な DNA 分解酵素を併用することで、直近の増幅反応に由来する増幅産物を特異的に分解し、偽陽性を低減することが可能
- 当該検査の実施手順を図 4 に示す。この図に示すように、本検査では被検試料として血清を使用することにより、（検体数によるものの）概ね 2 時間以内に検査結果を得ることができるため、判

注 2：リアルタイム PCR には大きく分けて SYBR（サイバー）型と TaqMan（タックマン）型の 2 種類がある。1 組のプライマーで増幅された DNA 産物の量を DNA に結合する SYBR 色素のシグナルの強弱として検出する SYBR 型とは異なり、1 組のプライマーとその標的産物に結合する 1 つのプロープをセットとして用い、そのプライマーから発せられるシグナルの強弱として増幅産物の量を検知する TaqMan 型では、プロープを標的産物ごとに異なる蛍光色素で標識し、それぞれの標的に特異的なプライマーと併せて使用することで 1 つの試験管内で一度に別々の増幅反応を進めつつ、異なる蛍光シグナルの増減をモニタリングすることで個々の標的産物の増幅量を知ることができるためマルチプレックス PCR 法に適する（ただし、このような場合、個々の増幅反応は同一の条件下で行う必要がある）。

注 3：グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼと呼ばれる、殆ど全ての哺乳動物の細胞に存在する酵素のひとつで糖の分解に関与する。その遺伝子は常時安定して発現しており、内部標準遺伝子として利用しやすい。

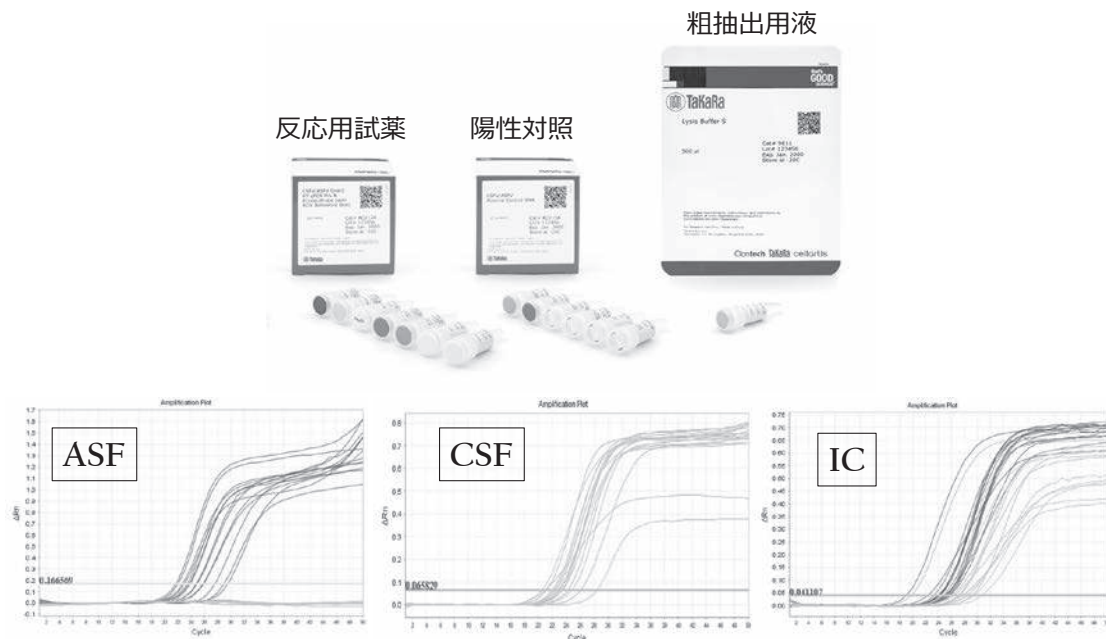


図3 タカラバイオ社から販売されているCSF/ASFの遺伝子検出検査用マルチプレックスリアルタイムPCR用試薬群(上)と同試薬を用いた検査における代表的なASF, CSFおよび内部標準(IC)の遺伝子検出例(下)



- ※1 本法は従来法と同様に精製した核酸試料にも適用が可能
- ※2 ASF、CSFおよび内部標準(IC)の3種の異なる標的遺伝子の検出が可能な3つ以上の検出チャンネルを有する機器が必要

図4 CSF/ASFの遺伝子検出検査用マルチプレックスリアルタイムPCR法の実施手順

定結果に基づいて迅速な防疫対応の準備と実行が可能となる。組織乳剤を使用する場合には、乳剤の調整時間を考慮する必要があるが、血清の場合と同様に調整した乳剤はそのまま検査に供するこ

とができる(現行法と同様に精製済み核酸試料を用いることも可能)。また、検査に要する試料は2μLと少量なので、例えば血清を用いる場合には、数十μLほどの新鮮血があれば検査が可能で

ある。そのため採材の手間も大幅に軽減でき、多検体のサーベイランス等にも適性が高い。

一方、本検査では同時に3種類（リファレンス色素を用いる場合には4種類）の蛍光シグナルを検出するため、やや高価なりアルタイム検出機器が必要となる点が普及の障害になるかも知れない。また、蛍光シグナルの検出に関して、被検試料の色調の強さや過度な混濁の有無等、検体の状態が蛍光の検出を阻害する可能性がある点にも留意されたい。溶血により極端に赤味の着いた試料では蛍光シグナルの検出が抑制されるため、このような検体については、ア. 溶血や混濁のない新鮮な血清を採取し直す、イ. 色味の影響が抑えられる程度まで検体を適度に希釈する、ウ. 適切なキットを用いて検体から核酸を精製した後に本検査に供する、のいずれかの対応が推奨される（なお、イ. については試薬の説明書に詳細が記載されている。また、製品のラインナップ、製品番号や仕様の詳細についてはタカラバイオ社のHPを参照されたい。；参考文献9）。

まとめ

繰り返しになるが、CSFならびにASFの防疫にはまずは「バイオセキュリティの強化」が死活的に重要である。しかしながら、唯一つの方策で感染症の侵入を抑えることは不可能であり、農場、地域、国といった異なるレベルで有機的な対策を積み上げ、組み合わせることで初めて効果的なリスク低減措置が実現できよう。そのような基本的な防疫措置を講じるとともに、有効なワクチンの利用やサーベイランスの実施を着実に進めることでCSFの清浄化やASFの侵入阻止が達成できるのではないだろうか。本稿で紹介した新たな

遺伝子検査法がそのような場で活用され、家畜生産、家畜衛生に関わる方々の一助となれば幸いである。

謝辞

本検査法の開発ならびに製品化に当たって共同研究にご参画頂いたタカラバイオ株式会社、研究試料をご提供いただいた都道府県の家畜保健衛生所ならびに当研究グループ職員各位に深謝する。本研究は、農林水産省の「安全な農畜水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業（官民・国際連携によるASFワクチン開発の加速化）」(JPJ008617.20319736)により実施した。

参考文献

1. 農林水産省 <https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/csf/attach/pdf/domestic-25.pdf> (2022年1月11日閲覧)
2. 国際獣疫事務局 (OIE) WAHIS インターフェイス <https://wahis.oie.int/#/home>
3. 農林水産省動物検疫所 https://www.maff.go.jp/aqs/topix/pdf/asf_positive_97_jpn.pdf (2022年1月11日閲覧)
4. 舛甚賢太郎ら, 旅客携帯品として海外から持ち込まれた輸入禁止の豚肉加工品からのアフリカ豚コレラウイルス (ASFV) の分離. 豚病研究会報 (2019) 74: 7-14.
5. Sun E et al., Emergence and prevalence of naturally occurring lower virulent African swine fever viruses in domestic pigs in China in 2020. *Sci. China Life Sci.* (2021) 64, <https://doi.org/10.1007/s11427-021-1904-4>.

6. Sun E et al., Genotype I African swine fever viruses emerged in domestic pigs in China and caused chronic infection. *Emerg. Microbes Infect.* (2021) in press
7. Vilcek S et al., 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.* (1994) 136: 309-323.
8. King et al., Development of a Taqman PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *J. Virol. Methods* (2003) 107: 53-61.
9. https://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?catcd=B1000711&subcatcd=B1000787&unitid=U100009519