

令和2年3月25日

安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究委託事業
研究成果報告書

課題番号：3103

イノシシにおける豚コレラウイルスの動態解明及び伝播リスクの検証

研究期間：令和元年度（1年間）

研究総括者名：深井 克彦

試験研究機関名：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

1 研究目的

イノシシに対する豚熱ウイルス JPN/1/2018 株の病原性、感染イノシシの排泄・分泌物におけるウイルスの排泄量等について明らかにすることで、イノシシの豚熱まん延に対する関与やリスクおよび本病まん延防止を目的としたイノシシ対策に関する基礎的知見を得る。最終的にはイノシシ対策を通した、豚での効果的な防疫対策の確立を目指す。

現在も感染確認が継続しているイノシシにおける豚熱については、対象が野生動物であることに加えて、国内におけるイノシシの頭数は約 90 万頭と推定されており、対策が非常に困難な状況にある。そのような状況の中、農林水産省は新たなイノシシ対策として、海外での使用実績のある経口ワクチンの使用を決定した。この経口ワクチンの効果を評価する上で、本課題の研究目標である感染イノシシにおける臨床症状やウイルス排泄量の成績は欠かせない。

また、本課題で得られた成果は、畜産関係者が、イノシシの豚熱まん延に対する関与やリスクを理解する上での科学的な裏付けになるとともに、家畜保健衛生所等が本病を検査する上での最適な材料の採材部位等の有用な情報となる。

2 研究内容

(1) 研究課題

1) 中課題 1：イノシシ及び豚における豚コレラウイルスの感染試験

平成 30 年度に岐阜県で発生した豚熱の原因ウイルスを用いて、イノシシ及び豚に対する感染試験を実施し、イノシシ及び豚における臨床症状、ウイルス排泄及び抗体応答等を確認する。

・小課題 1：豚コレラウイルス JPN/1/2018 株のイノシシ及び豚に対する病原性解析

イノシシ及び豚に、平成 30 年度に岐阜県で発生した豚熱の原因ウイルス JPN/1/2018 株を $10^{6.5}$ TCID₅₀ の力価で経口接種する。具体的には、イノシシ及び豚を最低各 3 頭用いて感染試験を行う。なお、この力価は、平成 30 年度に同じウイルス株を用いて行った感染試験において、ウイルス接種豚が感染及び発症することが明らかとなっているものである。また、平成 30 年度に実施した当該ウイルスを用いた感染試験の観察期間は 2 週間であったが、今回はより長期間に渡って、ウイルス接種動物の経過を観察するために、試験期間を 1 か月間とする。今回試験期間を延長した理由は、平成 30 年度の感染試験において、試験期間中に死亡しなかったウイルス接種豚や抗体応答を示さなかった個体が存在したため、より長期間の試験期間を設定する必要性が生じたためである。

ウイルス接種後、経時的に臨床症状を観察するとともに、臨床材料中へのウイルス排泄や抗体応答を解析する。採取する臨床材料は、血清、全血、唾液、鼻汁

及び糞便を予定している。また、試験終了時には、解剖検査を行い、所見を観察するとともに、全身臓器を採取し、組織学的検索を行う。

(2) 年次計画

項目	令和元年度
1. イノシシ及び豚における豚コレラウイルスの感染試験	← 感染試験（農研機構） →
（1）豚コレラウイルス JPN/1/2018 株のイノシシ及び豚に対する病原性解析	
所要経費（合計）	6,000 千円

(3) 実施体制

項目	担当研究機関	研究担当者		エフォート (%)
研究総括者	農研機構 動物衛生研究部門	深井克彦		25
1. イノシシ及び豚における豚コレラウイルスの感染試験	農研機構 動物衛生研究部門	○	深井克彦	前出
（1）豚コレラウイルス JPN/1/2018 株のイノシシ及び豚に対する病原性解析	農研機構 動物衛生研究部門	△	深井克彦 山田学 森岡一樹 舩甚賢太郎 亀山健一郎 西達也	前出 20 20 20 20 20

研究担当者欄について、中課題担当者には○、小課題担当者には△を付すこと。

3 研究推進会議の開催状況

別紙の（1）のとおり

4 研究成果の概要

(1) 主要な成果

ア 成果の内容（別紙の（2）参照）

（ア）豚コレラウイルス JPN/1/2018 株のイノシシ及び豚に対する病原性解析

感染試験にはイノブタを用い、ウイルス接種 14 日前に経口ワクチン 1 ドーズを投与し、イノブタにウイルスを経口接種した群 1、イノブタにウイルスを経口接種した群 2、豚にウイルスを経口接種した群 3 の三群を設定した。試験期間は約 1 か月間とした。

群 2 および 3 では、ウイルス接種 2 日目から発熱や白血球減少が確認され、ウイルス接種 5 日目から結膜炎等が確認されたとともに、群 2 のイノブタ 2 頭がウイルス接種 17 および 19 日目に死亡した。一方、群 1 では、いずれの臨床症状も確認されなかった。

群 2 および 3 では、ウイルス接種 2 日目からウイルス遺伝子が血清等から検出され、ウイルス接種 4 日目から活性のあるウイルスが血清等から分離された。一方、群 1 では、ウイルス遺伝子が検出されなかった。

群 2 および 3 では、ウイルス接種 10 日目から ELISA 抗体が検出された。一方、群 1 では、ウイルス接種の時点で ELISA 抗体が検出された個体は 1 頭であり、その他の個体では、ウイルス接種 1 日目から検出された。

群 2 および 3 では、死亡したイノブタ 2 頭を除き、心外膜炎等のわずかな解剖所見が確認されたのみであった。一方、死亡したイノブタ 2 頭では、肺炎や壊死性腸炎に加えて、全身臓器の出血病変が確認された。

免疫組織化学的検索により、群 2 および 3 では、扁桃、リンパ節、腎臓、唾液腺導管、細気管支上皮細胞、皮膚付属線、尿細管、膀胱粘膜上皮および皮膚からウイルス抗原が顕著に検出された。一方、群 1 においては、目立った解剖所見は確認されなかった（p6～10）。

イ 成果の活用（別紙の（2）参照）

（ア）畜産関係者が、イノシシの豚熱まん延に対する関与やリスクを理解する上での科学的な裏付けになるとともに、家畜保健衛生所等が本病を検査する上での最適な材料の採材部位等の有用な情報となる。また、拡大 CSF 疫学調査チームが行う疫学調査・解析に対する基礎的知見を提供する。

(2) 各研究課題の成果

ア 中課題 1 (イノシシ及び豚における豚コレラウイルスの感染試験) の研究成果

(ア) 工程管理及び成果目標

工程表
①平成 30 年度に岐阜県で発生した豚熱の原因ウイルスを用いて、イノシシ及び豚に対する感染試験を実施し、イノシシ及び豚における臨床症状、ウイルス排泄及び抗体応答等を確認する (小課題 1 関連)。(令和元年度)
↓
②畜産関係者が、イノシシの豚熱まん延に対する関与やリスクを理解する上での科学的な裏付けになるとともに、家畜保健衛生所等が本病を検査する上での最適な材料の採材部位等の有用な情報となる。また、拡大 CSF 疫学調査チームが行う疫学調査・解析に対する基礎的知見を提供する (小課題 1 関連)。(令和元年度)
成果目標：イノシシに対する豚熱ウイルス JPN/1/2018 株の病原性、感染イノシシの排泄・分泌物におけるウイルスの排泄量等について明らかにすることで、イノシシの豚熱まん延に対する関与やリスクおよび本病まん延防止を目的としたイノシシ対策に関する基礎的知見を得る。最終的にはイノシシ対策を通した、豚での効果的な防疫対策の確立を目指す。

(イ) 各工程の進捗状況及び成果

【工程表の①】

感染試験に用いるウイルス株は、当初計画の JPN/1/2018 株から 11 事例目から分離された JPN/27/2019 株に変更した。変更した理由は、11 事例目の臨床症状が弱く、流行ウイルス株の病原性の変化が懸念されたためである。JPN/27/2019 株の全ゲノム配列は、1 例目から分離された JPN/1/2018 株の全ゲノム配列と 99.8%の相同性を有し、両ウイルス株はほぼ同一のウイルス学的性状を有することが推測された。また後述するように、流行ウイルス株の病原性の変化を示唆するような成績は得られず、ウイルス感染後の転帰は、各個体の基礎疾患の状況に依存することが示唆された。

感染試験には、イノシシの代替動物として、イノブタを用いた。感染試験においては、ウイルス接種 14 日前に経口ワクチン 1 ドーズを投与し、 $10^{6.5}$ TCID₅₀ の JPN/27/2019 株をイノブタ (10kg) 3 頭に経口接種した群 1、 $10^{6.5}$ TCID₅₀ の JPN/27/2019 株をイノブタ (10kg) 3 頭に経口接種した群 2、 $10^{6.5}$ TCID₅₀ の JPN/27/2019 株を豚 (10kg) 3 頭に経口接種した群 3 の三群を設定した。試験期間は約 1 か月間とし、最初の 2 週間は毎日、その後は週 2 回間隔で臨床材料を採取した。

群 2 および 3 の動物においては、ウイルス接種した 2 日目から発熱および白血球減少が確認された (図 1 および 2)。また、ウイルス接種した 5 日目から結膜炎、元

気消失、目やに漏出、鼻汁漏出、パイルアップおよび皮膚の紫斑が確認されたとともに、群 2 のイノブタ 2 頭がウイルス接種 17 および 19 日目に死亡した。一方、群 1 のイノブタは試験期間を通して、いずれの臨床症状も確認されなかった。

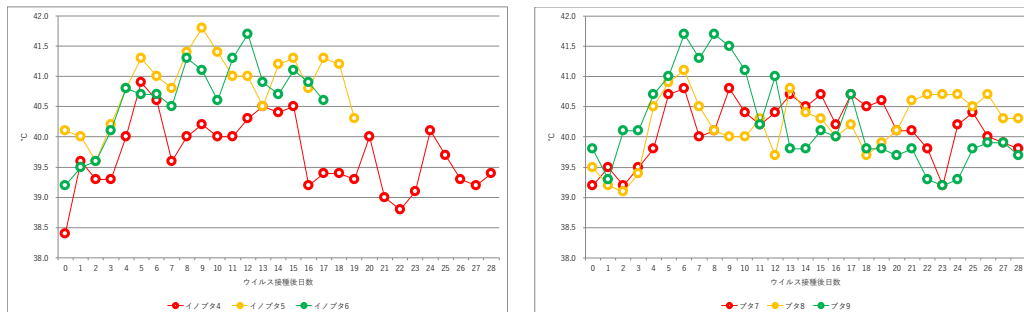


図 1 群 2 および 3 における体温の推移 (群 2 : 左、群 3 : 右)

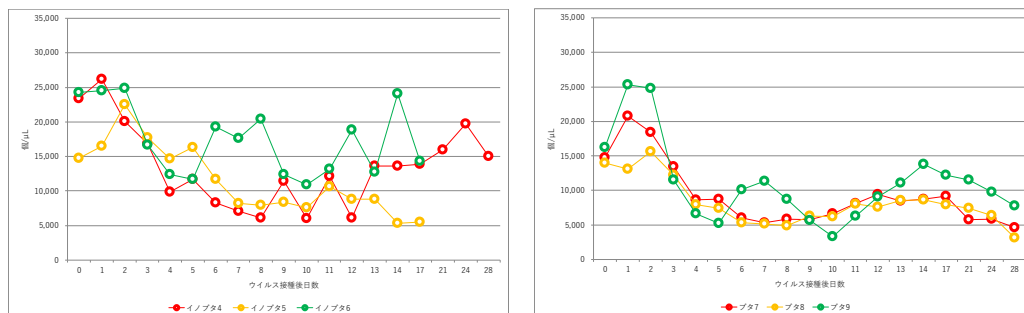


図 2 群 2 および 3 における白血球数の推移 (群 2 : 左、群 3 : 右)

臨床材料中へのウイルス排泄については、群 2 および 3 の動物においては、ウイルス接種した 2 日目から試験期間を通して、血清、全血、唾液、鼻汁および糞便からウイルス遺伝子が検出された (表 1 および 2)。また、ウイルス接種した 4 日目から試験期間を通して、血清、唾液および鼻汁から $10^{2.0} \sim 10^{6.0}$ TCID₅₀/mL の活性のあるウイルスが分離された。一方、群 1 のイノブタの臨床材料からは、試験期間を通して、ウイルス遺伝子が検出されなかった。

表 1 群 2 における臨床材料からのウイルス遺伝子の検出状況

豚 番号	臨床 材料	ウイルス接種後日数																		
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	17	21	24	28
イノブタ4	血清	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	全血	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	唾液	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	鼻汁	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	糞便	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
イノブタ5	血清	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
	全血	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
	唾液	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
	鼻汁	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
	糞便	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
イノブタ6	血清	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
	全血	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
	唾液	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
	鼻汁	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
	糞便	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT

表2 群3における臨床材料からのウイルス遺伝子の検出状況

豚 番号	臨床 材料	ウイルス接種後日数																		
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	17	21	24	28
ブタ7	血清	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	全血	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	唾液	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	鼻汁	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	糞便	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ブタ8	血清	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	全血	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	唾液	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	鼻汁	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	糞便	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ブタ9	血清	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	全血	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	唾液	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	鼻汁	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	糞便	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+

ELISA 抗体については、群2 および 3 の動物においては、ウイルス接種した 10 日目から試験期間を通して検出された(表3)。一方、群1 の動物においては、ウイルス接種の時点で抗体が検出された個体は 1 頭であり、その他の個体においては、ウイルス接種した 1 日目から試験期間を通して検出された。

表3 群1～3におけるELISA 抗体の検出状況

豚 番号	ウイルス接種後日数																			
	-14	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	17	21	24	28/29
イノブタ1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
イノブタ2	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
イノブタ3	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
イノブタ4	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
イノブタ5	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
イノブタ6	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
ブタ7	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+	+	+	+
ブタ8	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+	+	+	+
ブタ9	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+/-

解剖所見については、群2 および 3 の動物においては、死亡したイノブタ 2 頭を除き、心外膜炎（イノブタ 4）、肺炎（イノブタ 4、豚 7、8 および 9）、腹膜炎（イノブタ 4）、脾臓の軽度梗塞（イノブタ 4、豚 8 および 9）、脾門リンパ節の赤色化（豚 8）、膀胱の点状出血（豚 8）が確認されたのみであった。一方、死亡したイノブタ 2 頭においては、肺炎や壊死性腸炎に加えて、扁桃、下顎リンパ節、浅頸リンパ節、膝下リンパ節、鼠径リンパ節、胃肝リンパ節、胃腸リンパ節、腸間膜リンパ節、内腸骨下リンパ節および小腸パイエル氏板の出血、および皮下、小脳、心外膜、胃粘膜、消化管漿膜、腎臓、膀胱粘膜および結腸粘膜の点状出血といった全身臓器の出血病変が確認された(図3)。

免疫組織化学的検索により、死亡したイノブタを含めて群2 および 3 においては、扁桃、リンパ節および腎臓からウイルス抗原が顕著に検出され、当該臓器が検査材料として適していることが確認された。また、唾液腺導管、細気管支上皮細胞、皮

膚付属線、尿細管および膀胱粘膜上皮からウイルス抗原が顕著に検出され、排泄・分泌物中への長期間のウイルス排泄が示唆された。さらに、皮膚からウイルス抗原が顕著に検出され、皮膚バイオプシー材料の迅速・簡易診断法への応用が期待される（データ示さず）。これらの所見に加えて、死亡したイノブタ 2 頭においては、肺、脾臓、リンパ節および壊死性腸炎病変部においてサルモネラ属菌抗原が確認され、敗血症が死亡原因と考えられた。一方、群 1 においては、目立った解剖所見は確認されなかった。

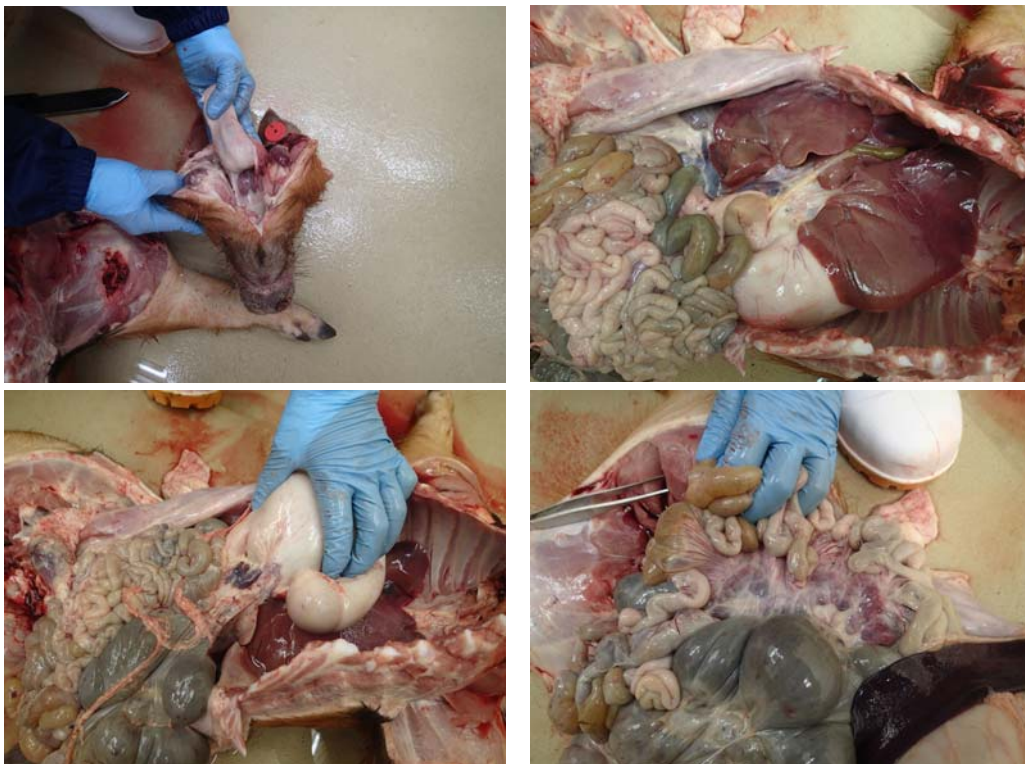


図3 死亡イノブタにおける出血病変（左上：扁桃、右上：胃肝リンパ節、左下：胃腸リンパ節、右下：腸間膜リンパ節）

以上のように、イノブタと豚の間で、臨床症状や解剖所見に顕著な違いは確認されなかった。一方、死亡したイノブタ 2 頭については、サルモネラ属菌による敗血症の可能性が、免疫組織化学的検索から疑われた。すなわち、基礎疾患が、本ウイルス株による転機に関与すると考えられた。また、本試験においては、ウイルス遺伝子と抗体が 2 週間程度共存しており、野外において確認されているウイルス遺伝子が検出されず、抗体のみが検出された個体の経過は、1 か月以上であると推察された。さらに、経口ワクチンを投与した群 1 においては、臨床症状やウイルス排泄および解剖所見は確認されず、その有効性が確認された。しかし、野外におけるワクチンの採食とウイルス感染のタイミングは様々であると考えられるため、さらなる

検証が必要であると考えられた（令和元年度）。

【工程表②】

畜産関係者に、イノシシの豚熱まん延に対する関与やリスクを周知する目的で、わが国で開催された講習会や学会等で、本感染試験の成績を報告した。また、家畜保健衛生所や動物検疫所等に、本病を検査する上での最適な材料の採材部位等を情報提供する目的で、本感染試験で用いた採材方法や検査手法を、農林水産省を通じて、あるいは個別に提供した。さらに、拡大 CSF 疫学調査チームが行う疫学調査・解析に対する基礎的知見を提供する目的で、本感染試験で得られた潜伏期やウイルス排泄期間および抗体検出期間等の成績を提供した（令和元年度）。

（ウ）成果目標に対する達成状況

イノシシの代替としてイノブタを用い、また、JPN/1/2018 株と全ゲノム配列がほぼ同一な JPN/27/2019 株を用いることにより、イノシシに対する豚熱ウイルス JPN/1/2018 株の病原性、感染イノシシの排泄・分泌物におけるウイルスの排泄量等について明らかにし、イノシシの豚熱まん延に対する関与やリスクおよび本病まん延防止を目的としたイノシシ対策に関する基礎的知見を得ることが出来た。本研究事業で得られた成果は、最終的にはイノシシ対策を通じた、豚での効果的な防疫対策の確立に活用することが出来ると考えられる。さらに、当初予定していなかった経口ワクチンを用いた試験を行い、その有効性を確認することが出来た。

5 研究成果の発表（主要な論文、取得した（申請中）の特許等を記述）

別紙の（３）～（８）のとおり

6 目的の達成に当たっての現時点での問題点等

全ての目標を達成することが出来た。

研究推進会議の開催状況、研究成果の発表(論文、特許等)等

試験研究課題名	イノシシにおける豚コレラウイルスの動態解明及び伝播リスクの検証
---------	---------------------------------

課題 番号	(1) 研究推 進会議 等開催 回数	(2) 行政が 活用し うる成 果の有 無	(3)学術論文数		(4)口頭発表回数		(5) 出版 図書数	(6)国内特許権等数		(7)国際特許権等数		(8) 報道 件数	(9) 物品購 入の有 無
			和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得		
3	2	有	0	0	4	3	0	0	0	0	0	0	無

(1)研究推進会議等の開催実績

区分:①推進会議、②現地検討会、③その他

区分	推進会議の名称	年月日	開催場所	参加者 数	消費・安全局担当 官の出席有無	主な議題及び決定事項
①	第1回研究推進会議	2019年8月28日	農林水産省 消費・安全局 第9会議室	9	有	試験の進捗状況と今後の実施内容
①	第2回研究推進会議	2020年2月28日	農林水産省 消費・安全局 第9会議室	9	有	試験の進捗状況と今後の試験計画

(2)行政が活用しうる成果

区分:①行政がすでに活用した成果、②行政が活用する目途がたった成果

区分	成果の内容	主な利用場面	活用状況
①	イノシシの豚熱蔓延に対する関与やリスクに関する基礎的知見	養豚農場におけるバイオセキュリティ対策の改善	農林水産省が都道府県を通じて、養豚農家を指導する際に活用される
①	本病を検査する上での最適な材料の採材部位および検査手法	家畜保健衛生所等が行う病性鑑定	家畜保健衛生所等が行う病性鑑定時に活用される
①	本感染試験で得られた潜伏期やウイルス排泄期間および抗体検出期間等の成績	拡大CSF疫学調査チームが行う疫学調査・解析	拡大CSF疫学調査チームが行う疫学調査・解析時に活用される

(3)学術論文

タイトル、著者名、学会誌名、巻、ページ、発行年月	機関名

(4)口頭発表

タイトル、発表者名、学会等名、発表年月	機関名
国内で発生した豚コレラ～病性と検査に係る留意点～、深井克彦、令和元年度東北地域病性鑑定連絡会議、2019年7月11日	東北地域病性鑑定連絡会議
豚コレラ-概論と感染試験について、深井克彦、令和元年度家畜衛生講習会(海外悪性伝染病特殊講習会)、2019年8月27日	農林水産省
Characteristics of classical swine fever virus that caused outbreaks between 2018 and 2019 in Japan、深井克彦、CSF seminar、2019年10月16日	Animal and Plant Quarantine Agency, South Korea
Characteristics of classical swine fever virus that caused outbreaks between 2018 and 2019 in Japan、深井克彦、2019 International Symposium for Classical Swine Fever、2019年10月24日	China Institute of Veterinary Drug Control, China
Characteristics of classical swine fever virus that caused outbreaks between 2018 and 2019 in Japan、深井克彦、Experience Exchange on Prevention Techniques And Training Course of Diagnosis of Classical Swine Fever、2019年11月19日	Animal Health Research Institute, Taiwan
CSF(豚コレラ)の病性及び防疫対応、深井克彦、令和元年度地域畜産技術研究会、2020年2月5日	神奈川県畜産技術協会
2018年より中部地域で発生しているCSF(豚コレラ)ウイルスについて、深井克彦、令和元年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会、2020年2月9日	日本獣医師会

(5) 出版図書

区分: ①出版著書、②雑誌、③年報、④広報誌、⑤その他

区分	著書名、(タイトル)、著者名、出版社名、発行年月	機関名

(6) 国内特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

(7) 国際特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

(8) 報道件数

区分: ①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映

区分	記事等の名称	掲載紙・放送社名	年月日	機関名	備考

(9) 購入物品

品名	規格	員数	購入実績(円)		使用目的	備考
			単価	金額		
実験動物用オリ	W:70cm×D:70cm×H:70cm	3	329,400	988,200	感染試験期間中にイノシシを収納するため	
全自動製氷機	FM-120K	1	494,640	494,640	感染試験サンプルおよびウイルス培養上清からのウイルス遺伝子検出の際にサンプルや試薬を冷やすため	
PCRシステム	MiniAMP Plus-S2 Thermal Cycler	1	631,800	631,800	感染試験サンプルおよびウイルス培養上清からのウイルス遺伝子検出	