

平成 31 年 3 月 30 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：2803

家畜の伝染性疾病に関する実態を踏まえたサーベイランス手法・検査
診断手法の研究

研究期間：平成28年度～平成30年度（3年間）

研究総括者名：山川 睦

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

(1) 中課題1：家畜の伝染性疾病に関する総合的なサーベイランス体制の構築に係る研究

発生時に直ちに清浄化対策を実施する必要がある伝染病については、国内での発生を早期に摘発することが重要である。また、伝染病対策の必要性の検討や実施している対策の有効性の評価のためには、伝染病の流行状況の変化を知ることが重要である。こうした観点から、国内では農林水産省と都道府県により、様々な伝染病を対象としたサーベイランスが実施されている。一方、WTO（世界貿易機関）の枠組みの元でのSPS（衛生と植物防疫のための措置）協定の発効により、輸入検疫の実施には国内の清浄性の証明などの科学的妥当性を求められることになったことを背景に、サーベイランスのデータに基づいた清浄性評価等を行うことが求められている。また、これまでの防疫対策によって清浄化が進んだ牛結核病や牛ブルセラ病については、清浄化の推進を目的としたサーベイランスから清浄性の維持を目的としたサーベイランスへの移行が必要となっている。しかしながら、現状のサーベイランスはこうした点から検討されておらず、サーベイランス結果の詳細な分析が困難な状況にあり、新たなサーベイランスの仕組みについて早急に検討する必要がある。そこで本研究課題では、国内外におけるサーベイランスの実態を踏まえて、対象疾病の選択や報告する情報の検討など、新たなサーベイランスの検討を行う。検討したサーベイランスの妥当性と実行可能性を確保するため、これらの検討は、都道府県の担当者等による検討会を開催して進める。

(2) 中課題2：アフリカ豚コレラの検査体制・病原性検証体制の整備及び高度化に係る研究

アフリカ豚コレラは、アフリカ豚コレラウイルスによる豚やイノシシの発熱や全身の出血性病変を特徴とする致死率の高い伝染病である。本病は発症動物の家畜としての経済的価値を失わせ、長期にわたり畜産業の生産性を低下させる。また、発生地域における社会的活動や国内流通はもとより輸出入にも影響を与え、多大な社会的・経済的損失を生む。以上のことから、アフリカ豚コレラは家畜衛生上最も問題とされる家畜伝染病の一つとなっている。我が国ではこれまで本病の発生は確認されていないが、アフリカでは常在しており、近年ではロシア及びその周辺諸国への発生拡大が確認されている。人や物の移動が活発化し、重要家畜伝染病の国際的拡大が懸念される現状にあって、アフリカ豚コレラ清浄国である我が国において本病の侵入を防止するには、海外からの侵入に対する警戒を怠ることなく、本病の早期発見と発生予防に努め、清浄性を維持していくことが重要である。アフリカ豚コレラの防圧が困難な理由は、本病の強い感染力に加えて、効果的なワクチンがない点、原因ウイルスの病原性の詳細が明らかにされていない点、精肉や食肉加工品の流通による感染拡大が容易に起こる点が挙げられる。このため、本研究課題では、より有効な防疫対策の構築に資するよう、海外の流行

株を収集し感染実験を行うことにより本病の病態や診断法の検証を行うとともに、感染豚由来の畜産物等の安全性について検討する。

2 研究内容

(1) 研究課題

(1) 中課題1：家畜の伝染性疾病に関する総合的なサーベイランス体制の構築に係る研究

1) 小課題1：国内外における全国サーベイランスの実施実態調査

海外におけるサーベイランス体制について、欧米2~3か国について中央政府及び地方政府の担当者を対象としたヒアリングと現地調査を行い、実施体制、届け出様式、データの構成、解析方法及び結果の還元方法などのサーベイランス制度を構成する各段階について詳細に調査するとともに、これらの国における問題点も把握する。さらに、各国で共通するサーベイランス対象疾病である牛結核病、牛ブルセラ病及びヨーネ病といった重要疾病について、これらのサーベイランスの具体的な採材方法、検査方法に加えて、擬陽性事例の取り扱いや陽性牛の摘発時の対応などの清浄化対策及びこれらにおける問題点について調査する。

一方、国内の全国サーベイランスの実施主体である都道府県における実施実態を把握するため、家畜の飼養戸数などを考慮して調査対象県を選定し、当該県の畜産主務課及び家畜保健衛生所等を対象とした現地調査を行う。現地調査では、実際に調査対象農場及び採材個体を選定し検査を実施するまでの手順と、これらの各段階における関係機関との連携状況を確認するほか、データの作成、保管、生産者への還元の実態について調査する。また、牛結核病、牛ブルセラ病及びヨーネ病のサーベイランスを対象に、検体の取り扱い、検査室検査の実施状況、検査履歴と検査結果に関するデータの取り扱いやサーベイランスの実施上の問題点などについて調査する。

2) 小課題2：個別疾病のサーベイランス手法の検討

清浄化が進展した牛結核病と牛ブルセラ病について、具体的なサーベイランス方法の検討を行う。検討は、採材から結果の公表までのすべての段階について行い、この過程で明らかとなった問題は、その都度、サーベイランス制度全体の検討に反映する。これらの2疾病以外の疾病については、本事業の2年目までに、実施の必要性やより有効なサーベイランス方法等について検討する。

3) 小課題3：新たな全国サーベイランス制度の検討

新たな全国サーベイランス制度を検討するため、全ての対象疾病に共通する項目として、サーベイランスの対象疾病の選定方法の検討、報告データの標準化、サ

ーベイランスの結果の解析・還元方法等について検討する。また、それぞれの対象疾病について、より有効かつ効率的なサーベイランス手法を提案する。これらの検討に当たっては、検討結果や提案内容の実行可能性を確保するため、都道府県と農林水産省消費・安全局動物衛生課（以下、「動物衛生課」）の担当者の意見を聞く検討会を開催する。

ア、対象疾病の選定方法の検討

農林水産省と都道府県の各段階における法制度や意思決定の仕組みを具体的に考慮しつつ、サーベイランスの対象疾病及びその内容を検討する仕組みを検討する。具体的には、サーベイランスの追加・改廃の考え方、客観性と透明性を確保する手法、柔軟かつ持続可能性のある制度の枠組みなどについて検討する。

イ、報告データの検討

より高度なサーベイランス手法の応用も可能となるよう、都道府県から動物衛生課への報告内容を検討する。また、効率的な集計・解析にはデータベースの活用が不可欠であることから、届け出内容のカテゴリー化や標準化を可能な限り進めることとし、これらを踏まえた届け出の方法に関するマニュアルを作成する。検討に当たっては、海外における先進的な取り組みの状況及び問題点を踏まえるとともに、都道府県における実施事務の実態を踏まえ、妥当かつ効率的な方法となるよう十分配慮する。

ウ、サーベイランスの結果の解析・還元方法の検討

サーベイランスの結果を定期的に公表する方法を検討する。検討においては、海外における取り組み状況を踏まえるとともに、持続可能性を確保するため、全ての疾病に応用可能な解析方法と報告書の様式等を検討に加え、報告書の作成のための実施体制についても提案する。

4) 小課題4：検討会の開催

小課題2及び3の検討のために、研究担当者のほか、動物衛生課及び都道府県の家畜衛生担当者等による検討会を開催する。参加都道府県は、家畜の飼養状況や地域性等を考慮して3～5県を選定する。

(2) 中課題2：アフリカ豚コレラの検査体制・病原性検証体制の整備及び高度化に係る研究

1) 小課題1：アフリカ豚コレラウイルスの収集

アフリカ豚コレラウイルスのOIEレファレンスラボラトリーから標準株及び近年の流行ウイルス株を導入する。

2) 小課題 2 : アフリカ豚コレラの検査体制の評価と高度化

ア、現診断法の特異性の検証

正常豚血清、他疾病野外材料や感染試験材料を用いて、現行の検査方法の非特異反応の有無の検証を行う。

イ、感染試験材料を用いた現検査法の評価

導入したウイルス株を用いた豚への感染試験を実施し、感染試験材料を用いてウイルス分離方法の評価や現行の PCR およびリアルタイム PCR、間接蛍光抗体法、抗体検査の評価を行う。

ウ、海外の検査キットの評価

海外で活用されているアフリカ豚コレラ検査キットを導入し、その特異性や感度について感染試験材料を用いて評価する。

3) 小課題 3 : アフリカ豚コレラウイルスの病原性の解析

ア、感染試験豚におけるウイルスの体内動態等の解析

導入したウイルス株を用いた豚への感染試験を実施し、ウイルスの潜伏期間や排泄期間、体内動態、さらに免疫応答を解析し、病性鑑定时における効果的な採材方法、採材時期を検証する。また感染豚に非感染豚を同居させる実験を行い、ウイルスの水平伝播様式を解析する。

イ、感染試験豚の臨床症状と特徴病変の検証

導入したウイルス株を用いた豚への感染試験を実施し、特に早期摘発のために有用な初期症状や類症鑑別に必要な特徴病変を解析する。また感染経路や感染ウイルス量の違いによる臨床症状及び肉眼病変の差を検証する。

4) 小課題 4 : アフリカ豚コレラウイルスの感染臓器及び食肉加工品内での感染性保持期間の検証

感染試験で得られた材料やウイルスを接種した食肉加工品が冷凍あるいは冷蔵保存下でどのくらいの期間感染性を保持できるか、ウイルス分離、PCR 等の検査によって検証する。また、実際に豚に食べさせる感染試験を実施し、その感染性保持期間を検証する。

(2) 年次計画

項目	平成28年度	平成29年度	平成30年度
1. 家畜の伝染性疾病に関する総合的なサーベイランス体制の構築に係る研究			
(1) 国内外における全国サーベイランスの実施実態調査	← 国内外の実態調査 (動物衛生研究部門) →		
(2) 個別疾病サーベイランス手法の検討	← 個別疾病サーベイランスの検討 (動物衛生研究部門) →		
(3) 新たな全国サーベイランス制度の検討	← 新たな制度の検討 (動物衛生研究部門) →		
(4) 検討会の開催	← 検討会の開催 (動物衛生研究部門) →		
2. アフリカ豚コレラの検査体制・病原性検証体制の整備及び高度化に係る研究			
(1) アフリカ豚コレラウイルスの収集	← 海外のウイルスの収集 (動物衛生研究部門) →		
(2) アフリカ豚コレラの検査体制の評価と高度化			
ア、現検査法の特異性の検証	← 現検査法の検証 (動物衛生研究部門) →		
イ、感染試験材料を用いた現検査法の評価		← 感染実験材料を用いた現検査法の検証 (動物衛生研究部門) →	
ウ、海外の検査キットの評価	← 海外の検査キットの評価 (動物衛生研究部門) →		
(3) アフリカ豚コレラウイルスの病原性の解析			
ア、感染試験豚におけるウイルスの体内動態等の解析	← 感染実験豚のウイルスの体内動態等の解析 (動物衛生研究部門) →		
イ、感染試験豚の臨床症状と特徴病変の検証	← 感染実験豚の臨床症状と特徴病変の検証 (動物衛生研究部門) →		

(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	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 (動物衛生研究部門)	山川 睦	20
1. 家畜の伝染性疾病に関する総合的なサーベイランス体制の構築に係る研究	動物衛生研究部門	○ 山本 健久	20
(1) 国内外における全国サーベイランスの実施実態調査	動物衛生研究部門 動物衛生研究部門 動物衛生研究部門 動物衛生研究部門 動物衛生研究部門	△ 山本 健久 小林 創太 (H28年4月～ H29年3月) 早山 陽子 村井 清和 (H28年4月～ H29年10月) 清水 友美子 (H29年4月～) 筒井 俊之	前出 20 20 50 20 10
(2) 個別疾病サーベイランスの検討	前出 前出 前出 前出 前出 前出 前出 前出	△ 山本 健久 小林 創太 (H28年4月～ H29年3月) 早山 陽子 村井 清和 (H28年4月～ H29年10月) 清水 友美子 (H29年4月～) 筒井 俊之	前出 前出 前出 前出 前出 前出 前出 前出
(3) 新たな全国サーベイランス制度の検討	前出 前出 前出 前出 前出	△ 山本 健久 小林 創太 (H28年4月～ H29年3月) 早山 陽子 村井 清和 (H28年4月～ H29年10月) 清水 友美子 (H29年4月～)	前出 前出 前出 前出 前出

(4) 検討会の開催	前出		筒井 俊之	前出
	前出	△	山本 健久	前出
	前出		小林 創太 (H28年4月～ H29年3月)	前出
	前出		早山 陽子	前出
	前出		村井 清和 (H28年4月～ H29年10月)	前出
	前出		清水 友美子 (H29年4月～)	前出
	前出		筒井 俊之	前出
	前出	○	山川 睦	前出
	前出	△	山川 睦	前出
	前出		山田 学	15
2. アフリカ豚コレラの検査体制・病原性検証体制の整備及び高度化に係る研究 (1) アフリカ豚コレラウイルスの収集	動物衛生研究部門		森岡 一樹	15
	動物衛生研究部門		森岡 一樹	15
	前出	△	山川 睦	前出
	動物衛生研究部門	△	深井 克彦	15
	前出		森岡 一樹	前出
	動物衛生研究部門		舩甚賢太郎	15
	動物衛生研究部門		亀山健一郎	15
	動物衛生研究部門		西 達也	15
	前出	△	深井 克彦	前出
	前出		森岡 一樹	前出
イ、感染試験材料を用いた現検査法の評価	前出		舩甚賢太郎	前出
	前出		亀山健一郎	前出
	前出		西 達也	前出
	前出	△	森岡 一樹	前出
	前出		深井 克彦	前出
	前出		舩甚賢太郎	前出
	前出		亀山健一郎	前出
	前出		西 達也	前出
	前出	△	山川 睦	前出
	前出	△	山田 学	前出
(3) アフリカ豚コレラウイルスの病原性の解析 ア、感染試験豚におけるウイルスの体内動態等の解析	前出		深井 克彦	前出
	前出			

イ、感染試験豚の臨床症状と特徴病変の検証	前出	△	森岡 一樹	前出		
	前出		舩甚賢太郎	前出		
	前出		亀山健一郎	前出		
	前出		西 達也	前出		
	前出		山田 学	前出		
	前出		深井 克彦	前出		
	前出		森岡 一樹	前出		
	前出		舩甚賢太郎	前出		
	前出		亀山健一郎	前出		
	前出		西 達也	前出		
	(4) アフリカ豚コレラウイルスの感染臓器及び食肉加工品内での感染性保持期間の検証		前出	△	山川 睦	前出
			前出		山田 学	前出
			前出		深井 克彦	前出
			前出		森岡 一樹	前出
前出		舩甚賢太郎	前出			
前出		亀山健一郎	前出			
前出	西 達也	前出				

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) 国内の現行サーベイランス実態把握

全都道府県を対象に質問票を用いた調査を実施し、我が国のサーベイランス制度について、更なる改善が見込める点を特定した（p14）。

(イ) 海外のサーベイランス制度の把握

米国及びニュージーランドで現地調査を行い、牛の結核病及びブルセラ病のサーベイランス等に関する現状や問題点を把握し、我が国の制度の在り方に関する検討に役立てた（p15）。

(ウ) 我が国の牛の結核病及びブルセラ病に係るサーベイランス等の在り方の提案

OIE が定める国際基準や海外での取組を踏まえ、清浄性確認及び維持サーベイランスの内容、検査・診断基準や摘発時の防疫対応等について、論点を明確化し、今後の在り方を提案した（p18）。

(エ) 我が国における今後のサーベイランスの提案

国内外における家畜疾病サーベイランスの実施状況等を踏まえ、今後の家畜疾病サーベイランスのあり方について、サーベイランスの定義、検討の方法、データベースの構築、年次報告書の作成およびこれらの実施体制の観点から提案した（p19）。

(オ) アフリカ豚コレラウイルスの OIE レファレンスラボラトリーから標準株及び近年の流行ウイルス株（東欧流行強毒株の Armenia07 株およびアフリカ流行弱毒株の Kenia05 株）を計 3 株導入した（p22）。

(カ) アフリカ豚コレラウイルスに対する現行の遺伝子検査（PCR）手法の特異性を確認した（p23）。また近年の東欧流行株に対する現行の遺伝子検査（PCR およびリアルタイム PCR）の有用性を確認した（p25）。

(キ) 豚の肺胞マクロファージ細胞の回収方法を確立し、得られた豚肺胞マクロファージ細胞を使用してアフリカ豚コレラウイルスの細胞変性効果（CPE）および血液吸着反応を確認した。近年の流行アフリカ豚コレラウイルスについても細胞を用いたウイルス分離および蛍光抗体法を用いたアフリカ豚コレラウイルス抗原の検出が実施可能であることを確認した（p26）。

(ク) 海外で販売されているアフリカ豚コレラウイルス抗体用検査キット 3 種類、抗原用検査キット 1 種類を導入し、感染試験材料を用いて評価した（p29）。その結果、我が国に現在東欧や中国で蔓延しているウイルスが侵入したと仮定した場合、初動対応として抗原用検査キットは有用であることが確認された。一方抗体検出キットは、アフリカ豚コレラの急性型を検出することは出来ず、我が国に現在東欧や中国で蔓延しているウイルスが侵入したと仮定した場合、初動対応として抗

- 体検出キットの使用は避けることが望ましいことが確認された (p30)。
- (ケ) アフリカ豚コレラの亜急性型や慢性型を診断するために、感染細胞を用いた間接蛍光抗体法による抗体検出方法を確立した (p31)。これまでのウイルス遺伝子検出、ウイルス分離、ウイルス抗原検出、遺伝子系統樹作成の診断手法に加え、この抗ウイルス抗体検出も可能となり、我が国におけるアフリカ豚コレラの甚急性、急性、亜急性、慢性のすべての病態を診断する体制が整った (p31)。
- (コ) アフリカ豚コレラウイルス Armenia07 株 (欧州流行強毒株) は筋肉内接種後 2 日か 3 日で血液中から検出されるようになり、接種 3~4 日目から鼻汁や唾液へと排出が始まることが確認された (p32)。
- (サ) アフリカ豚コレラの検査のための効果的な解剖方法、採材方法を確立した (p48)。
- (シ) アフリカ豚コレラウイルス Armenia07 株 (欧州流行強毒株) の同居豚への水平伝播率は 100%を示した (p33)。一方感染豚から次の豚へ感染が成立して症状を発現するまでには 10 日前後かかる事が確認された (p33)。また発熱開始時期やウイルスの排泄開始時期は自然感染経路での感染や微小ウイルス量での感染の場合、筋肉内接種による感染や高ウイルス量での感染より少し遅くなることが確認された (p35)。アフリカ豚コレラウイルスは感染伝播力が強いウイルスではあるが、豚群の中での伝播は 1 週間ほどかけて起こり、その後 1 週間ほどかけて斃死がみられるような発生を示し、口蹄疫や鳥インフルエンザと比較して潜伏期間は長く、緩やかに進行することが確認された (p33)。
- (ス) これまで行なったアフリカ豚コレラウイルスの豚への感染試験の結果、アフリカ豚コレラと豚コレラを含めた他の疾病との鑑別点として、臨床症状のみでは判断することは難しいが、高い発熱と元気消失、食欲不振、斃死の豚が 1~2 頭ではなく、豚群の中で広がっていく様子が確認されたときに、豚コレラもしくはアフリカ豚コレラを疑う事例として注視するべきであることが確認された (p53)。
- (セ) アフリカ豚コレラの臨床症状や解剖時肉眼病変の発現は感染経路や感染ウイルス量には左右されないことが明らかにされ、アフリカ豚コレラの診断には、特徴的な脾臓の腫大と腹腔内リンパ節の暗赤色化の解剖所見が有用であることが確認された (p53)。
- (ソ) 発熱を示し元気消失・食欲不振を示した豚を検査解剖することが重要で、まだ元気や食欲がある豚を解剖しても解剖所見を見逃すおそれがあることが示唆された (p40)。
- (タ) 血液材料からのウイルス遺伝子の検出は上記の特徴的な脾臓とリンパ節病変の発現の数日前から可能であることから、血液材料を用いたウイルス検査が診断と早期摘発には重要であることが確認された (p53)。
- (チ) アフリカ豚コレラウイルス感染豚の肉に含まれるウイルスの力価は徐々に低

下するものの、4℃の冷蔵保存で5カ月以上、-20℃の冷凍保存では13カ月以上にわたり感染性を維持することが明らかにされた（p60）。

(ツ) アフリカ豚コレラウイルス実験感染豚の筋肉を用いてソーセージを作製して、-20℃の冷凍保存下の豚肉ソーセージ中においてどのくらいの期間ウイルスの感染性が維持されるか検査した場合でも、13ヶ月以上ウイルスの感染性が維持されることが確認された（p61）。

(テ) 1年以上冷凍保存したアフリカ豚コレラウイルス感染豚肉およびソーセージにおいても、豚が摂食するとウイルスに感染し、2週間以内に発症することが確認された。またその感染は概ね約10gの肉類を1回摂取するのみで成立することが明らかにされた（p62）。

(ト) ソーセージを用いた試験により、液相70℃3分以上の加熱によってアフリカ豚コレラウイルスの不活化が可能であることが確認された（p63）。

イ 成果の活用（別紙の（2）参照）

(ア) 牛の結核病およびブルセラ病の清浄確認サーベイランスの実施

本事業において、牛の結核病およびブルセラ病の清浄性を国内外に証明するため、3年間の清浄確認サーベイランスを実施することと、その際のサンプル数などの具体的内容を提案したことを踏まえ、農林水産省は平成30年度から32年度にこの提言に基づくサーベイランスを実施することを決定した。平成29年度において、当該サーベイランスを実施するための実施要領および検査マニュアルの整備、家畜伝染病予防法施行規則などの関連法令の改正を行った。疫学ユニットは、動衛研のヨーネ病ユニット及び病原機能解析ユニットとも連携し、これらの改正にかかる改正案の作成等に協力した。

(イ) アフリカ豚コレラに関するリーフレットの作成

本事業で得られた成果をもとに、農林水産省は平成30年度にアフリカ豚コレラに関するリーフレットを作成し、都道府県を通じて生産現場や家畜衛生現場への普及を行なっている。

(ウ) 特定家畜伝染病防疫指針の改訂

本事業で得られた成果をもとに、農林水産省は平成30年度にアフリカ豚コレラに関する特定家畜伝染病防疫指針を改訂し、都道府県を通じて生産現場や家畜衛生現場への普及を行なっている。

(エ) 旅客の携帯品から検出されたアフリカ豚コレラウイルス遺伝子の病性鑑定

本事業で整備された診断手法を用いて、動物検疫所において旅客の携帯品から検出されたアフリカ豚コレラウイルス遺伝子の病性鑑定を行なっている。

(2) 各研究課題の成果

ア 中課題1（家畜の伝染性疾病に関する総合的なサーベイランス体制の構築に係る研究）の研究成果

(ア) 工程管理及び成果目標

工程表
①国内及び海外におけるサーベイランスの実施状況を把握する。(小課題1 関連)。 (平成28年度、平成29年度)
↓
②都道府県の家畜衛生担当者及び動物衛生課の担当者が参加する検討会を開催する (小課題4 関連)。(平成28年度、29年度)
↓
③牛結核病とブルセラ病について、新たなサーベイランス手法を検討し、報告書にとりまとめる(小課題2 関連)。(平成28年度)
↓
④全てのサーベイランスを対象に、対象疾病の選定、計画の策定、結果の報告、データの分析及び分析結果の還元方法について検討し、報告書にとりまとめる(小課題3 関連)。(平成28-29年度)
成果目標：実行可能性を確保した新たなサーベイランス体制の構築に資するよう、国内外のサーベイランス実態を踏まえ、牛結核病と牛ブルセラ病についての具体的なサーベイランス方法及び、全ての対象疾病について、対象疾病の選定、サーベイランスの結果の報告、解析、還元方法等について検討した報告書を作成する。

(イ) 各工程の進捗状況及び成果

【工程表の①】

(国内)

農林水産省消費・安全局動物衛生課の協力の下に、全都道府県を対象に質問票を用いて、現行サーベイランスの実施調査を実施した結果、主に次の点が明らかとなった。

- ① サーベイランス結果のデータ入力に際して、用語や様式の標準化を行っている県は全体の4割に留まる。
- ② サーベイランスデータを分析・解釈した上で、生産者等に広く情報還元を行っている県は全体の5割以下である。
- ③ 摘発家畜（検査陽性家畜）に比べて、検査陰性家畜に関する情報は、詳細に記録されていない傾向がある。

これらの現状を踏まえた上で、諸外国の先進的な事例も参考にしながら、データの電子化や標準化などを更に進めることで、サーベイランスの実施効率性や結果の分析性能を向上できると考えられる。その結果、データの有効活用が促され、現在は十分とは言

えない生産者等への情報還元の取組が進んでいくことが期待される。

(海外：米国)

米国のサーベイランス制度並びに牛の結核病及びブルセラ病のサーベイランスの実施状況を調査した結果、主に次の点が明らかとなった。

- ① サーベイランスの種類として、ア) 国際獣疫事務局 (OIE) への通報疾病を対象とした受動的サーベイランス (州ごとに発生の有無を毎月報告)、イ) 結核病やブルセラ病等の撲滅対象疾病に係る能動的サーベイランス、ウ) 畜種ごとにテーマ (牛白血病、豚流行性下痢、薬剤耐性等) を定めて原則単年で実施するサーベイランスに大別される。
- ② 連邦政府、州政府、業界団体、大学及び診断機関が連携してサーベイランスを実施する枠組みが構築されており、特に上記ウ)のサーベイランスの実施に当たっては、あらかじめ業界団体等からニーズや意見を聴取している。
- ③ インターネットを利用したデータ管理システムが整備されており、サーベイランスで得られたデータは、分析・加工された後、図表を有効に活用して生産者等に分かりやすく還元している。

牛の結核病及びブルセラ病のサーベイランスは、と畜場での採材が主体になっており、結核病については結節検査 (一定割合のと畜からの肉芽腫性病変の提出を義務づけ)、ブルセラ病については無作為抽出による血清抗体検査を実施している。結核病はほぼ清浄化されているが、ブルセラ病は、イエローストーン国立公園周辺地域の野生動物が問題となっており、家畜への散発的な発生事例が問題となっている。

(海外：ニュージーランド {NZ})

NZ のサーベイランス制度並びに牛の結核病及びブルセラ病のサーベイランスの実施状況を調査した結果、主に次の点が明らかとなった。

- ① サーベイランスの種類として、ア) 政府機関直通の無料の専用電話回線を活用した有害生物及び疾病の通報システム (受動的サーベイランス)、イ) 診断機関等から提供される情報の継続的な監視・分析、ウ) 特定の疾病 (伝達性海綿状脳症 (TSE)、アルボウイルス感染症、鳥インフルエンザ (AI)) を対象とした能動的サーベイランスに大別される。
- ② 家畜衛生や防疫対応に関する諸体制に民間組織を活用している。例えば、トレーサビリティシステムの運用と牛結核病対策は、政府と業界の共同出資団体 (OSPRI) が行っている。
- ③ 米国と同様に、インターネットを活用したデータ管理システムを運用している。サーベイランス結果の情報還元については、報告書として年4回取りまとめて公表している。
- ④ NZ では牛のブルセラ病は既に撲滅されており、と畜場を含め特段のサーベイランスは実施されていない。牛の結核病については、野生動物 (ポッサム) で常在化し

ており、家畜（牛及び鹿）への伝播も継続的に確認されている。そのため、と畜場検査に加えて、リスクに応じて国土を分類した上で家畜の移動や農場検査に関する要件をそれぞれ定めることで、防疫対応を図っている。

（海外：デンマーク）

デンマークのサーベイランス制度並びに牛の結核病及びブルセラ病のサーベイランスの実施状況を調査した結果、主に次の点が明らかとなった。

- ① デンマークでは完全な中央集権制となっており、環境・食料省の獣医・食品管理局（DVFA）が家畜衛生行政を担っている。日本の都道府県に当たる行政組織は存在しない。デンマーク国内は島嶼部が多いため、首都にある本部に加えて、北部、南部、東部の3つの支部が存在している。緊急通報時の立ち入り検査の場合も、これらの支部から獣医師が農場に向かって、検査等を行う。
- ② 家畜衛生の中央診断施設としてデンマーク工科大学に中央研究施設（NRL）が、政府との契約に基づいて設置されている。NRLは、口蹄疫や豚コレラ等の確定診断を行うほか、民間診断施設であるSEGESの技術指導や品質管理を担当している。
- ③ サーベイランスの検査や、民間獣医師からの病性鑑定依頼などの一般的な検査は、生産者団体であるデンマーク農業・食料理事会が設置するSEGESが実施している。SEGESは、検査ロボットをはじめとする多検体検査に必要な設備を備えた民間検査機関であり、民間獣医師や政府からの出資を受けて検査を実施している。
- ④ 動物用医薬品を使用する全ての牛、豚及びミンクの生産者は、一人の獣医師と管理契約を結ぶことが法律で義務づけられている。契約内容には、サーベイランスとしての立ち入り検査や定期的な採材を行うことも含まれている。
- ⑤ サーベイランスの対象疾病はEU規則に定められる疾病の他、政府か生産者が必要と認めたものが選定されている。豚コレラのサーベイランスなどのように、EU規則に基づいて政府がサーベイランスを行う場合には、検体の送付までを生産者が負担し、検査費用は政府が負担している。一方、PRRSのように、生産者の要望で実施されているサーベイランスについては、計画、実施及び費用の負担は生産者の側で行われる。
- ⑥ 牛結核病については、無作為抽出方式の検査は実施されておらず、と畜場におけると畜後検査で結核が疑われた場合の検査と採精センターにおける種雄牛の検査のみが行われている。牛ブルセラ病については、輸入牛と種雄牛の検査に加えて、農場で流産が発生した場合の届け出が義務づけられ、必要に応じて採材が行われている。

（海外：オランダ）

オランダのサーベイランス制度並びに牛の結核病及びブルセラ病のサーベイランスの実施状況を調査した結果、主に次の点が明らかとなった。

- ① オランダも中央集権的な組織となっており、家畜衛生は農業・自然・食品品質省が担当している。本省は企画・立案のみを担当しており、施策の実施は全て出先機関

である Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority (NVWA) に委ねられている。NVWA では経費削減の観点から、地方に駐在する獣医師の拠点を廃止しており、各地域を担当する獣医師は、通常は自宅で業務を行い、緊急時には自宅から農場に向かうこととなっている。

- ② 家畜衛生の中央診断施設としては、国立大学であるワゲニンゲン大学の Wageningen Bioveterinary Research (WBVR) が農業省から委託を受けて中央研究施設 (National Reference Laboratory、NRL) の業務を行っている。NRL では、政府との契約に基づいて、緊急検査や疾病発生時に急増する周辺農場の検査が可能な体制を備えている。
- ③ サーベイランスで採材された検体の検査や民間獣医師からの病性鑑定に関する検査は、民間検査機関である GD Animal Health が行っている。GD はさらに、検査技術や検査試薬に関する研究・開発も行っている。
- ④ GD はパッシブサーベイランスにおいても重要な役割を担っており、獣医師や生産者を対象とした無料の電話相談窓口である Veekijker (フィーカイカー、オランダ語で「見渡す」の意) を設置している。Veekijker で得られた疾病発生などの情報は、電子的にまとめられて、NVWA に報告される。
- ⑤ 小規模農場を除く全ての家畜生産者は管理獣医師 1 名と契約を結ぶことが義務づけられている。一方、農場の品質管理の一貫で、管理獣医師が診療を行った場合の診療の記録や、抗生物質の使用履歴の記録が求められており、これらのデータを入力するためのシステムとして、GD が VeeOnline と呼ばれるデータベースを運用している。VeeOnline は、個体識別システムとも連携しており、同システムも使って、獣医師はサーベイランスで検査対象となる個体の条件や個体数を知ることできる。
- ⑥ アクティブ・サーベイランスの対象疾病は、EU 規則で定められたものに加えて、EU 規則に含まれていないが、必要と認められたものと、生産者が政府に要望したものについて実施されている。生産者の要望に基づくサーベイランスは、全て生産者の負担で実施される。
- ⑦ 牛結核病については、無作為抽出方式の検査は実施されておらず、と畜場におけると畜後検査で結核が疑われた場合の検査と採精センターにおける種雄牛の検査のみが行われている。牛ブルセラ病については、輸入牛と種雄牛の検査に加えて、農場で流産が発生した場合の届け出が義務づけられ、必要に応じて採材が行われている。

(平成 28～29 年度)

【工程表②及び③】

国及び県の家畜衛生行政関係者や個別疾病の専門家から構成される検討会を 3 回実施し、牛の結核病及びブルセラ病について、OIE が定める国際基準 (OIE コード) や海外での取組を踏まえ、清浄性確認及び維持サーベイランスの内容、検査・診断基準や

摘発時の防疫対応等について検討した。主な論点は以下の通りであった。

- ① OIE コードの清浄化基準を満たすため、0.1%の農場で感染があった場合に 95%以上の確率で摘発できるサーベイランスとして、肉用牛を含む全ての牛飼養農場のうち、延べ 3,000 戸を対象とした検査（清浄性確認サーベイランス）を 3 年間で実施する必要があると考えられた。ただし、この 3 年間の清浄性確認サーベイランスにおいて、現状よりも農場への立入検査戸数が純増すると考えられる一部の畜産主要県の理解を得ることが重要との指摘がなされた。
- ② 清浄化達成後は、現在の少なくとも 5 年に 1 回の全戸立入検査に代えて、流産事例（ブルセラ病）の検査や輸入牛の追跡検査などのリスクに応じた検査を行うべきであると考えられた（清浄性維持サーベイランス）。一方で、これらの検査は現在の体制では実施が難しいことから、清浄化を確認するまでの期間に、民間獣医師等との協力体制の構築や仕組み作りが必要であると考えられた。
- ③ 検査陽性牛の区分については、現在は患畜と判定されている抗体検査で陽性の場合（結核病では尾根部皺壁のツベルクリン皮内反応検査で陽性の場合）には疑似患畜とし、抗原検査で陽性となった場合に患畜とすることが適切と考えられた。また、結核病については、国際的に主流となっているインターフェロン γ 試験や頸部比較皮内反応検査などの検査法の導入及び PPD（精製ツベルクリンタンパク質誘導物）の使用を進めるべきであり、ブルセラ病については、補体結合反応に代えて、ELISA 法を主たる判定法とすることが適切と考えられた。
- ④ 新たな基準に基づく疑似患畜の摘発時には当該牛を病性鑑定殺するとともに、同居牛の全頭検査を行うこととし、検査の結果、患畜となった場合は同居牛の出荷を制限して清浄性が確認されるまで検査することなどが必要と考えられた。なお、この手法では農場の清浄性の証明までに一定期間を要することから、早期の淘汰も選択肢として検討されるべきとの指摘がなされた。
- ⑤ 一部の県では、家畜伝染病の検査の際に、条例に基づき手数料を徴収している。しかしながら、清浄性確認サーベイランス等では、無作為抽出での検査が必要であるため、公平性の観点から手数料の徴収は困難と考えられる。そのため手数料を徴収しない検査体制の構築などに時間を要する可能性も指摘された。（この点は本事業の検討事項ではないが、行政的に重要であると考えられるので記載する。）

（平成 28 年度）

【工程表④】

本事業で実施した、国内外におけるサーベイランスの実施状況に関する調査や、動物衛生課担当者との意見交換等を踏まえ、今後の家畜疾病サーベイランスのあり方として、次の提案をとりまとめた。これらの対応により、次の効果が期待される。

- ・科学的妥当性の確保
- ・確実な結果の活用
- ・持続的な実施と柔軟な改廃
- ・透明性の確保
- ・実施コスト及び人員の低減
- ・とりまとめ作業の効率化

① 定義の明確化

検討会（後述）による検討や年報のとりまとめの対象となるサーベイランスを次のように定義する。

- ・サーベイランス検討会の承認を得ているもの
- ・サンプル数等が防疫指針に規定されているか、実施マニュアルが定められているもの
- ・国が実施する突発的な疾病の発生に伴うサーベイランスを含む
- ・一部の都道府県や地域で実施される場合を含む
- ・研究事業や委託事業で実施される場合を含む
- ・都道府県や研究機関の裁量で実施される検査は含まない
- ・疾病発生時の清浄性確認検査等は含まない

② 検討過程の明確化

サーベイランスの位置づけを明確にし、持続的な実施を可能とするため、サーベイランス検討会を設置する。

ア、サーベイランス検討会の設置

- ・動物衛生課を事務局とし、都道府県代表、生産者代表、疫学の専門家を常設委員とする
- ・畜種別、疾病別の専門家や生産者を臨時委員とする

イ、サーベイランス検討会の開催

- ・全体会議：年1回、全ての臨時委員が出席し、年報の報告に基づいて全てのサーベイランスについてレビューする
- ・個別会議：新たなサーベイランスの具体的な検討と実施マニュアルの作成など、必要な臨時委員が参加して開催する

ウ、サーベイランス検討会の役割

- ・サーベイランスの実施には、検討会の承認を要するものとする
- ・検討会における検討の結果は家畜衛生部会に報告する
- ・結果を踏まえた防疫措置の検討は行わず、部会の各小委等への報告事項を作成する

③ 実施方法の明確化、実施マニュアルの作成

サーベイランスの実施にあたっては、防疫指針に基づいて既に実施されているものを除き、次の内容などを含む実施マニュアルを定め、都道府県に通知する。

ア、実施の目的

イ、検査の対象家畜、検査農場数や頭数

ウ、検査の実施期間（原則として1年間）

エ、検査及び判定の方法

オ、報告内容

④ データベースの整備

サーベイランスの結果の報告・集計をオンラインで自動化するため、クラウド上に次のようなデータベースシステムを設置する。

ア、国、都道府県および管理事業主体が接続して利用する

イ、県の担当者が報告を行い、システム内で集計された後、国や管理事業主体が集計結果を出力する

ウ、対象疾病の改廃や報告内容の変更に対応できるような設定機能を備える

エ、将来的には、耳標データベースや防疫マップと接続するが、それまでの間は、集計データを介して、マニュアルでこれらのデータと接続する。

⑤ 年次報告書の作成

毎年度、次の内容を含むサーベイランス年次報告書を発行する。この際、日本語版と英語版を同時に作成する。

ア、サーベイランスの概況、改廃状況

イ、個別疾病サーベイランスの結果

- ・発生状況
- ・検査結果
- ・結果を踏まえた対応（清浄化対策の開始など）

ウ、パッシブサーベイランスの結果

- ・通報件数
- ・類症鑑別の結果

(ウ) 成果目標に対する達成状況

今後の適切な家畜伝染病サーベイランスのあり方を検討するため、国内についてはアンケート調査と現地調査により、海外については、公表資料と現地調査により、それぞれ実施実態や問題点を把握・分析した。この結果に基づき、国や都道府県の防疫担当者による検討会を開催し、牛結核病と牛ブルセラ病のサーベイランスについて、見直し

に先立って清浄性を証明するための抽出検査によるサーベイランスの計画を提案するとともに、清浄性を証明した後の効果的なサーベイランスの方法について検討した。この結果は、報告書にとりまとめて、農林水産省や都道府県に配布した。また、全ての疾病を対象とした新たなサーベイランスのあり方について、国内外での実施状況や、我が国の現状における問題点を踏まえ、透明性、科学的妥当性や効率性に留意した提案を作成した。この提案についても、報告書にまとめて、農林水産省及び都道府県等の関係機関に送付した。結核病とブルセラ病のサーベイランスについては、この提案に基づいて、28年度から30年度の3年間で、清浄性の確認のためのサーベイランスが実施されており、今後、サーベイランスの全体の見直しも進められることとなっている。研究計画に基づき、実行可能性の高い提案が作成され、また、スケジュール感を持って行政側で実行されており、社会実装を含めた全ての成果目標は達成されたと言える。

イ 中課題2 (アフリカ豚コレラの検査体制・病原性検証体制の整備及び高度化に係る研究) の研究成果の概要

(ア) 工程管理及び成果目標

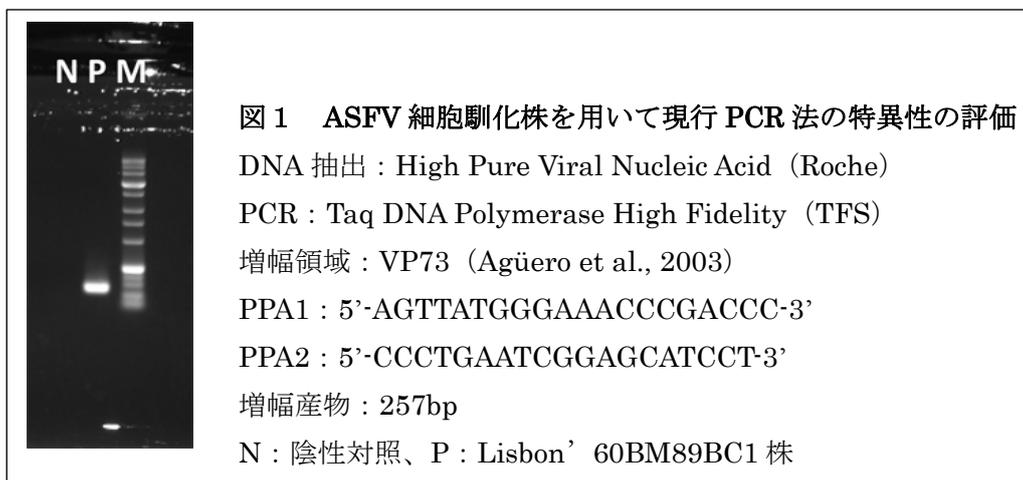
工程表
<p>① アフリカ豚コレラウイルス (ASFV) の OIE レファレンスラボラトリーから標準株及び近年の流行ウイルス株を導入する (小課題 1 関連)。海外の ASFV 検査キットを導入する (小課題 2 関連)。(平成 28 年度)</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>② 導入した近年の流行ウイルスを用いた感染試験を実施し、感染試験で得られた材料を用いて現行の検査法や導入した海外の検査キットを評価し、より効果的な検査体制を整備及び高度化する (小課題 2 関連)。<small>[※現行の診断法: PCR およびリアルタイム PCR、間接蛍光抗体法、抗体検査]</small></p> <p>また、アフリカ豚コレラ (ASF) の検査のための効果的な採材方法を検討するとともに、類症鑑別のための臨床症状や肉眼病変の特徴を写真や動画として記録し、より高精度かつ効率的な検査体制を構築する (小課題 3 関連)。(平成 29-30 年度)</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>③ 感染臓器やウイルスに汚染した食肉加工品の感染性保持期間を検証し、我が国の防疫対策に活用する (小課題 4 関連)。(平成 29-30 年度)</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>④ 既存の「特定家畜伝染病防除指針」に得られた成果を盛り込み、改訂 (小課題 2、3、4 関連)。(平成 30 年度)</p>
<p>成果目標: ASF の防疫対策の強化に資するよう、近年の流行ウイルス株を用いた感染試験を通じて本病の病態を明らかにし、臨床症状や特徴的病変をデジタルデータとして記録して家畜防疫関係者への啓蒙資料を作成するとともに、採材方法や現行診断法、海外の診断キットの有用性等について評価した結果をとりまとめて報告する。</p>

(イ) 各工程の進捗状況及び成果

【工程表の①】

小課題 1 関連: ASF の OIE レファレンスラボラトリー (Universidad Complutense de Madrid, Spain) から、ASFV Armenia 07 株 (近年東欧・中国で流行している強毒株)、Kenia 05 株 (近年アフリカで流行している弱毒株)、España 75 株 (標準株) の 3 株を導入した。(H29 年度)

小課題 2 関連：「ア、現診断法の特異性の検証」について、陰性対照と ASFV の過去の弱毒株（Lisbon' 60BM89BC1 株）を用いて PCR を実施した。その結果、ASFV 特異遺伝子（VP73 遺伝子）が検出され、海外病研究拠点における現在の遺伝子診断システムが有用であることが確認された（図 1）。（H28 年度）



「イ、感染試験材料を用いた現検査法の評価」については、現行のウイルス分離方法の評価を実施するため、豚より肺胞マクロファージ細胞を回収した。

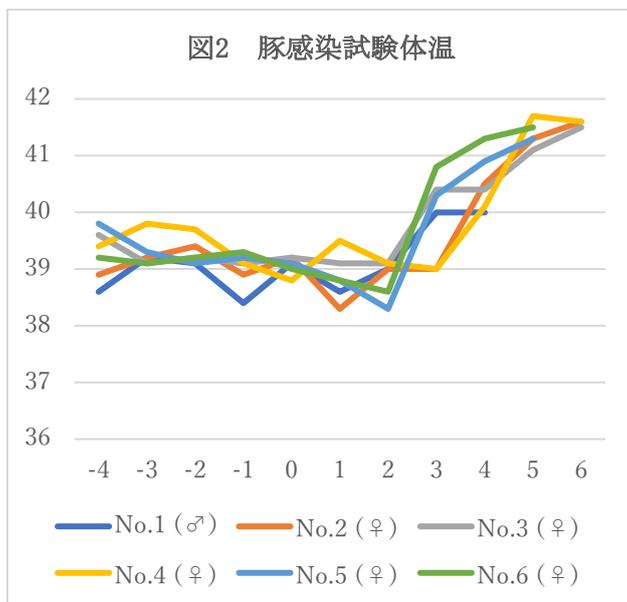
「ウ、海外の検査キットの評価」については、海外で販売されている ASFV 抗体検出キット 3 種類：INgezim PPA COMPAC (INGENSA, Spain)、INgezim PPA CROM (INGENSA, Spain) および ID screen ASF Indirect (ID Vet, France) を、また、抗原検出キット 1 種類：INgezim PPA DAS (INGENSA, Spain) を導入した。

（平成 28 年度）

【工程表の②】

小課題 1 関連：導入した 3 株を用いた豚への感染試験を実施し、それぞれの株の病原性を確認した。今回、ASFV Armenia07 株（欧州流行強毒株）、ASFV Kenia05 株（アフリカ流行弱毒株）、ASFV España 75 株（標準株）を接種したそれぞれの豚全例において発熱が認められた（図 2）。発熱は接種後 5 日目以降全例 41℃超の高熱を示した。ASFV Armenia07 株（欧州流行強毒株）を接種した豚 2 頭のうち 1 頭は接種後 5 日目に斃死した（図 3）。España 75 株（標準株）を接種した豚 2 頭は予後不良と判断して接種後 5 日目に解剖した（図 4）。Kenia05 株（アフリカ流行弱毒株）を接種した 2 頭と Armenia07 株（欧州流行強毒株）を接種した豚 1 頭は接種後 6 日目に解剖した。外貌から確認できた出血病変は今回 No.3 の 1 例のみであり（図 5）、臨床的に今回確認された症状と豚コレラの症状との鑑別は難しいことが示唆された。解剖検査の結果、脾臓の腫大（図 6）と内臓リンパ節の暗赤色化（図 7）は弱毒株接種豚も含めて全例で確認された。Armenia07 株（欧州流行強毒株）と España

75 株（標準株）接種豚では顕著な肺水腫と肺出血も確認された。ASF と豚コレラを含めた他の疾病との鑑別点として、特徴的な脾臓の腫大と内臓リンパ節の暗赤色化の解剖所見が有用である可能性が示された。



0 : 接種日
 No.1, 2 : ASFV Armenia07 株 (欧州流行強毒株) 筋肉内接種。
 No.3, 4 : ASFV Kenia05 株 (アフリカ流行弱毒株) 筋肉内接種。
 No.5, 6 : ASFV España 75 株 (標準株) 筋肉内接種。

接種 3 日目で 4 例発熱。接種後 4 日目で全例発熱。接種後 5 日目で全例 41℃ 超の高熱。



図 3 (左) : No.1, 2 : ASFV Armenia07 株 (欧州流行強毒株) 筋肉内接種。接種後 5 日目。朝 No.1 の豚の斃死を確認。外貌に特段の所見なし。発熱のみ。前日より元気消失食欲不振。

図 4 (右) : No.5, 6 : ASFV España 75 株 (標準株) 筋肉内接種。接種後 5 日目。元気消失食欲不振。外貌に特段の所見なし。発熱のみ。



図 5 : No.3 : ASFV Kenia05 株（アフリカ流行弱毒株）筋肉内接種。接種後 6 日目。直腸体温測定後に肛門から出血。発熱はあるものの元気。



図 6、7 : No.2 : ASFV Armenia07 株（欧州流行強毒株）筋肉内接種。接種後 6 日目解剖。脾臓の腫大顕著（図 6 : 左）。内臓リンパ節の色は暗赤色化（写真左の 3 つ）。体表リンパ節の色は正常（写真右の 4 つ）（図 7 : 右）。ASF の特徴病変である脾臓の腫大と内臓リンパ節の暗赤色化は弱毒株接種豚も含めて全例で確認された。

小課題 2 関連 : 「イ、感染試験材料を用いた現検査法の評価」について

1. PCR およびリアルタイム PCR

OIE レファレンスラボラトリーから入手した proficiency test 用サンプル（ASFV 感染豚の組織材料）を用いて上記と同様の方法で PCR を実施し、その有用性を確認した（図 8）。また、導入株の感染試験で得られた豚脾臓乳剤材料を用いてリアルタイム PCR 法の有用性についても検討し、ウイルス遺伝子を高感度かつ特異的に増幅できることを確認した（図 9）。（平成 29 年度）

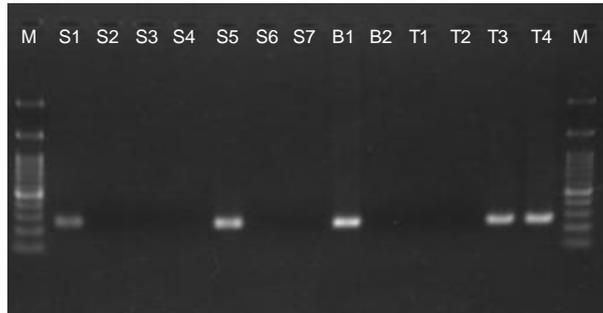


図8 PCR法を用いたASFVの検出

ASFV感染及び非感染豚の血清(S1-S7)、全血(B1、B2)及び組織(T1-T2)。ASFV感染豚の血清(S1、S5)、全血(B1)および組織(T3、T4)に目的のサイズ(257bp)のDNA増幅バンドが認められた。現行のPCR法の有効性が確認された。MはDNAマーカー。

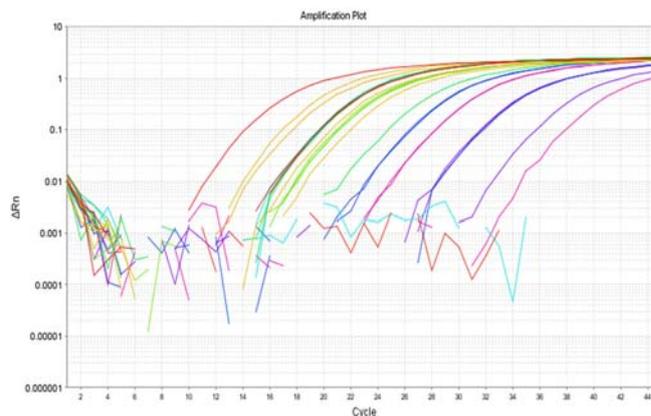


図9 リアルタイムPCRによるASFV遺伝子の検出

ASFVを実験感染させた豚の脾臓材を用いてKingら(2003)のリアルタイムPCR法を行った結果、ウイルス遺伝子の特異的な増幅が確認された。

2. 肺胞マクロファージ細胞を用いたウイルス分離

現行のマクロファージ細胞を用いたASFVの分離および診断法の有効性を確認するため、非感染豚肺からの肺胞マクロファージ細胞(PAM)の回収法を確立した。回収された肺胞マクロファージ細胞にASFV野外株 Armenia07株、Kenya05株および Espana75株を実験感染させた個体の血清、さらに細胞に馴化した Lisbon' 60BM89BC1株を接種することで、ASFVに関する感受性、細胞変性効果(CPE)およびウイルス感染依存的な血球吸着反応(HAD)を評価した。その結果、海外病拠点にて回収したPAM細胞は全てのASFV株に感受

性を示し、細胞変性効果（CPE: 図 10）ならびに、明確な血球吸着反応(HAD: 図 11)が確認できた。加えて、米国プラムアイランド研究所より海外病拠点に導入されている抗 ASFV 抗体を用いて直接蛍光抗体法の有用性についても評価した。ASFV 細胞馴化 Lisbon' 60BM89BC1 株をカニクイザル腎臓由来の不死化細胞株 Cos-1 に接種した後、抗 ASFV 抗体を反応させたところ、抗 ASFV 抗体は ASFV を接種した細胞のみに明らかな陽性を示した(図 12)。これらの上記の結果は、現行の検査法の有用性を支持するだけでなく、海外病拠点において、ウイルス分離および蛍光抗体法を用いた ASFV 検出が十分に実施可能であることを示している。(平成 29 年度)

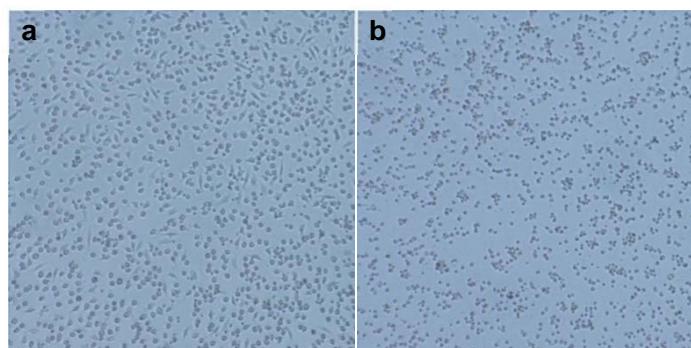


図 10 豚肺胞マクロファージ(PAM)細胞を用いた ASFV による細胞変性効果(CPE)の検証

Armenia07 株実験感染豚の血清を PAM 細胞に接種; 接種 4 日目の像。a: ASFV 非感染豚血清接種、b: ASFV 感染豚血清接種。ASFV に感染した肺胞マクロファージ細胞は丸くなり、最終的には萎縮する。

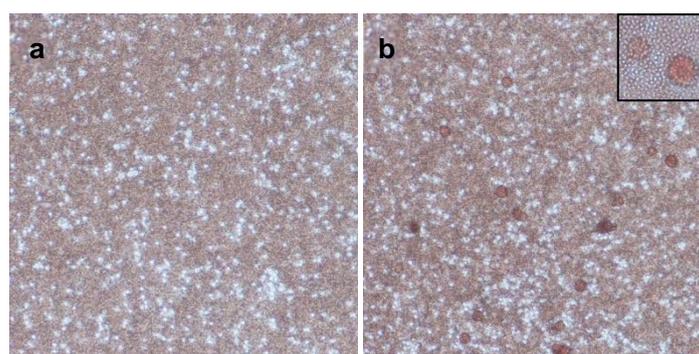


図 11 PAM 細胞を用いた ASFV による血球吸着反応 (HAD) の検証

Armenia07 株実験感染豚の血清を PAM 細胞に接種; 接種 2 日目の像。a: ASFV 非感染豚血清接種、b: ASFV 感染豚血清接種。ASFV に感染した PAM 細胞に赤血球が吸着している。枠内は高倍率で観察したもの。

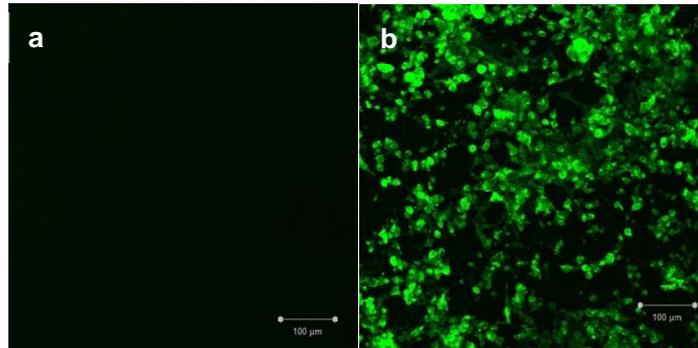


図 12 ASFV 感染細胞を用いた蛍光抗体法の検討

ASFV 細胞馴化 Lisbon60 株をカニクイザル腎臓由来の不死化細胞株 Cos-1 細胞に接種。a:非接種、b: 細胞馴化 Lisbon60 株接種。ASFV 感染細胞のみに明瞭な蛍光シグナルが認められた。

近年の欧州・中国流行株がマクロファージ細胞に感染した場合、ASFV 感染特異的な血球吸着反応（HAD）を示すため HAD を指標に診断が可能である。一方、2017 年には欧州の ASF 流行国であるラトビアにてマクロファージ細胞に感染するが HAD を示さないウイルス株がイノシシから分離されている。したがって、HAD を示さない ASFV 株を検出できる検査体制の整備も重要な課題となる。そこで、HAD 法以外の検査手法として、ASFV 野外株を PAM 細胞に接種し、直接蛍光抗体(FA)法を用いて細胞内に増殖するウイルスを検出できるかどうかを検証した。なお HAD を示さない株（HAD 陰性株）を動物衛生研究部門 海外病拠点では保有していないことから、本試験では、流行株（Armenia07 株: HAD 陽性株）を用いて実施した。結果として、FA 法により ASFV を接種した PAM 細胞のみに抗 ASFV 抗体が反応し、蛍光シグナルが確認された（図 13）。この成果は、海外病拠点において、HAD 陰性株のウイルス抗原の検出が実施可能であることを示している。（平成 30 年度）

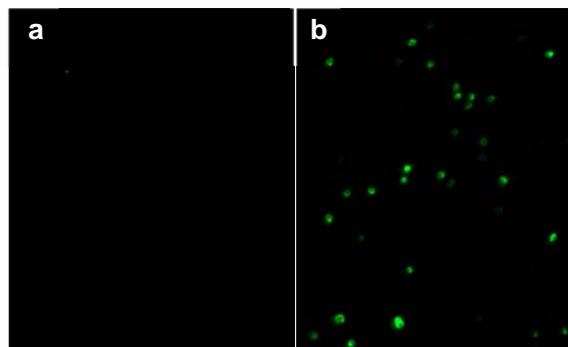


図 13 ASFV 感染 PAM 細胞を用いた直接蛍光抗体法の検討

PAM 細胞に Armenia07 株を接種。a: 非接種、b: Armenia07 株接種。ASFV 感染 PAM 細胞のみに明瞭な蛍光シグナルが認められた。

小課題2 関連：「ウ、海外の検査キットの評価」について

1. 海外のASFV 検査キットの評価と利用について

ASFV Armenia07 株を筋肉内接種することで実験感染させた個体より採材した試料を用いて、海外より導入した検査キットの評価を行った。実施したキットは、ウイルス抗原を認識する ELISA タイプの INgezim PPA DAS (INGENASA, Spain) [DAS] および抗ウイルス抗体を認識するイムノクロマトタイプの INgezim PPA CROM (INGENSAS, Spain) [CROM] (図 14) である。マニュアルに従い DAS には全血を CROM には血清を用いた。その結果、ウイルス抗原を認識する DAS は発熱等の臨床症状が認められた個体で陽性だった。一方、抗ウイルス抗体を検出する CROM では全てが陰性の結果となった (表 1)。強毒株 Armenia 07 株を用いた実験感染では、ASFV に対する抗体産生が起こる前に臨床末期になっていると考えられた。(平成 29 年度)



図 14 海外より導入した診断キット

a: INgezim PPA DAS、b: INgezim PPA

表 1：海外より導入した ASF 検出キットの評価：筋肉内接種

試験個体情報			市販キット	
個体番号 No.	接種後日数 (dpi)	臨床症状 (発熱)	DAS	CROM
10	2	なし	陰性	陰性
4	4	あり	陽性	陰性
5	5	あり	陽性	陰性
6	6	あり	陽性	陰性
7	7	あり	陽性	陰性

次に、Armenia07 株感染豚の肉およびその肉から作られたソーセージを用いた食餌試験から得られた試料を使い、実際の畜産現場で起こりうる可能性のある条件での検査キットの評価を行なった。また、上記の 2 キットの加えて、さらに INgezim PPA COMPAC (INGENSA, Spain) [COMPAC] および ID Screen ASF Indirect (ID Vet, France) [ID Vet] の抗ウイルス抗体検出キットの 2 キット (図 15) を加えた計 4 キットの評価を実施し

た。マニュアルに従い DAS には全血を CROM、COMPAC および ID Vet には血清を用いた。結果として、ウイルス抗原を認識する DAS(ELISA)は発熱等の臨床症状が認められた ASF 発症個体を全て検出できた。一方、抗ウイルス抗体を検出する CROM(イムノクロマト)、COMPAC および ID Vet では全てが陰性の結果を示した(表2)。本結果は、食餌接種により発熱等の臨床症状が認められるまでの期間は延長したものの、発症後は筋肉内接種試験同様に症状が進行したため、ASFV に対する抗体産生が起こる以前に臨床末期になったことに起因すると考えられる。改めて、急性型の症状を示す強毒株が侵入した場合、抗ウイルス抗体検出キットの利用は難しいことが示唆された。欧州・中国流行株が我が国に侵入した場合の初動対応には、抗ウイルス抗体検出キットの使用は避けるべきである。一方、亜急性型や慢型の症状を示す弱毒株が侵入した場合、または清浄性の確認および ASF が常在化した場合のスクリーニングには有用であると考えられた。(平成 30 年度)

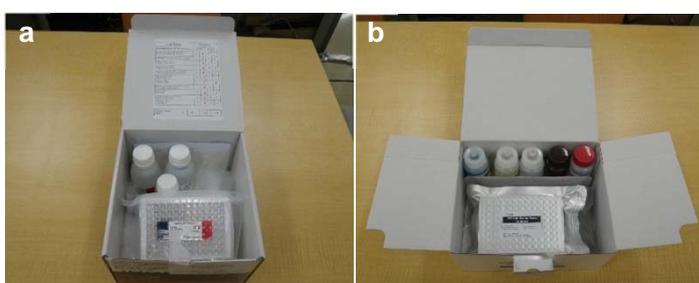


図 15 海外より導入した抗体検出キット

a: INgezim PPA COMPAC、b: ID Screen ASF Indirect

表 2 : 海外より導入した ASF 検出キットの評価: 食餌試験

試験個体情報			市販キット			
個体番号 No.	接種後日数 (dpi)	臨床症状 (発熱)	DAS	CROM	COMPAC	ID Vet
1	11	あり	陽性	陰性	陰性	陰性
2	11	あり	陽性	陰性	陰性	陰性
3	10	あり	陽性	陰性	陰性	陰性
4	12	あり	陽性	陰性	陰性	陰性
5	12	あり	陽性	陰性	陰性	陰性
6	12	なし	陰性	陰性	陰性	陰性
7	10	あり	陽性	陰性	陰性	陰性
8	10	なし	陰性	陰性	陰性	陰性
9	10	あり	陽性	陰性	陰性	陰性

No.1-3 は、ASFV 感染豚の肉から作られたソーセージを 1 回食餌群、No.4-5 は、ソーセージ頻回食餌群、No.7-8 は、ASFV 感染豚の肉を頻回食餌群

2. 感染細胞を用いた血清抗体検査法の確立

急性型の欧州・中国流行株以外にも亜急性型または慢性型の ASFV 株の侵入に対する検査体制の整備は ASF の防疫対策として重要である。亜急性型や慢性型の ASF の検出にはウイルス抗原を検出する以外に抗ウイルス抗体の検出も有効な手段となる。抗ウイルス抗体の検出には、上記の海外の市販検査キットのいくつかも有用であるが、コスト面および緊急対応等で柔軟な利用が難しい場合が想定される。そこで、市販キットの代替えとなる抗ウイルス抗体検出法の確立を行った。ウイルス抗原は、アフリカミドリザル腎臓由来不死化細胞株である Vero 細胞に細胞馴化 ASFV 株を接種することで作製した。抗体陽性試料には、弱毒株を実験感染することで得られた ASFV 感染耐過豚血清（プラムアイランド研究所より入手）を使用し、血清中の抗 ASFV 抗体は間接蛍光抗体法（IFA）により検出した。結果として、ASFV 感染耐過血清のみで蛍光シグナルが認められた（図 16）。この成果は、動物衛生研究部門 海外病拠点において、亜急性型または慢性型の ASF 症例の検出が実施可能であることを示している。以上、これまでのウイルス遺伝子検出、ウイルス分離、ウイルス抗原検出、遺伝子系統樹作成の診断手法に加え、抗ウイルス抗体検出も可能となり、我が国におけるアフリカ豚コレラの甚急性、急性、亜急性、慢性のすべての病態を診断する体制が整った。（平成 30 年度）

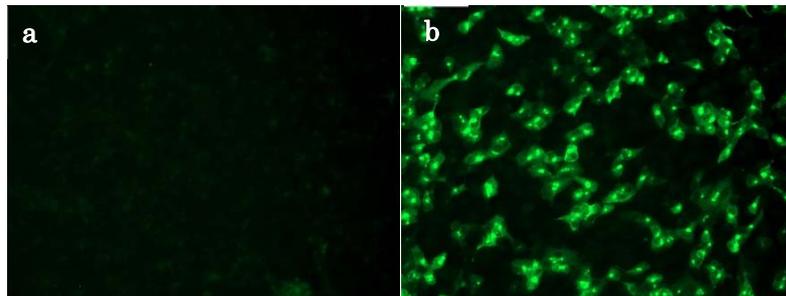


図 16 ASFV 感染 Vero 細胞を用いた間接蛍光抗体法の検討

ASFV 細胞馴化 Lisbon60 株に感染したカニクイザル腎臓由来不死化細胞株 Vero 細胞に豚血清を添加。a: 非感染豚血清、b: ASFV 感染豚耐過血清。ASFV 感染豚耐過血清のみ明瞭な蛍光シグナルが認められた。

小課題 3 関連：

「ア、感染試験豚におけるウイルスの体内動態等の解析」について

ASFV Armenia07 株を実験感染させた豚のヘパリン血液（全血）、血清、鼻腔スワブ、唾液、糞便を採材し、ウイルスの潜伏期間と排泄時期を、リアルタイム PCR を用いて検索した。

実験 1 として 8 週齢の豚 10 頭に ASFV Armenia07 株感染豚の脾臓乳剤 10,000 倍希釈

液を 1 mL 筋肉内接種した ($10^3\text{HAD}_{50}/\text{mL}$)。接種後毎日血液材料 (血清とヘパリン血 (以下全血))、鼻腔スワブ、唾液、糞便を採材して接種後 7 日目まで臨床症状を観察した。斃死豚は随時解剖した。結果として、早い豚では接種後 2 日目の血液材料からウイルス遺伝子が検出された (表 3)。接種後 3 日目では 9 例中 8 例の豚の血液からウイルス遺伝子が検出された。鼻汁へのウイルス排泄は接種後 3 日目から始まり、唾液と糞便へのウイルス排泄は早いものでは接種後 4 日から確認された (表 3)。発熱の症状は早いものでは接種後 3 日目から確認され、接種後 5 日目以降では 4 頭中 3 頭の豚が元気消失、食欲不振を呈した。血液からのウイルス検出時期は発熱の 1 日もしくは 2 日前、鼻汁や唾液からのウイルス排泄は発熱、元気消失、食欲不振の症状と同時期であった。(平成 29 年度)

表 3 : ASFV Arm07 株感染豚の臨床採材材料からのリアルタイム PCR 解析結果

	接種 2 日目					接種 3 日目					接種 4 日目					接種 5 日目				
	全血	血清	鼻腔スワブ	唾液	糞便	全血	血清	鼻腔スワブ	唾液	糞便	全血	血清	鼻腔スワブ	唾液	糞便	全血	血清	鼻腔スワブ	唾液	糞便
1	±	-	-	-	-	+	+	-	-	-										
2	+	+	-	±	±	Er	+	±	-	-										
3	±	-	-	-	-	+	±	-	-	-										
4	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-										
5	±	±	-	-	-	+	+	±	-	-	+	+	+	±	±					
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	±	-	-
7	±	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
8	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	±	+
9	±	-	-	-	-	+	+	-	±	-	+	+	+	+	-	+	+			
10	±	-	-	-	-															

+: 陽性 ($\text{Ct} < 35$)、±: Doubtful ($35 < \text{Ct} < 39$)、-: 陰性 ($39 < \text{Ct}$)。網掛け: 解剖後で検査なし。Er: Error.
 接種 0 日目と接種 1 日目では全サンプル陰性。接種 6 日目以降すべて陽性。接種 7 日目実験終了。

実験 2 として 8 週齢の豚 2 頭に同量 ($10^3\text{HAD}_{50}/\text{mL}$) の脾臓乳剤を接種し、それぞれ接種豚 1 頭につき 2 頭の豚を同居させた。接種後毎日血液材料 (血清とヘパリン血 (以下全血))、鼻腔スワブ、唾液、糞便を採材して同居 11 日目まで臨床症状を観察した。斃死豚は随時解剖した。接種豚では接種後 3 日目の血液からウイルス遺伝子が検出され、鼻汁と唾液へのウイルス排泄は接種後 4 日目から確認された (表 4)。豚 2 は接種後 5 日目に斃死し、

豚1は接種後6日目に計画解剖した。豚2と同居していた豚5と6では同居8日目の血液から、豚1と同居していた豚3と4では同居11日目の血液からウイルス遺伝子が検出された(表4)。同居豚4頭すべてにおいて接種豚からの水平感染が確認された(感染率100%)。接種豚2は接種後4～5日目に鼻汁および唾液からウイルスを排泄しており、同居豚5と6はその時期に感染したものと思われ、その後同居9日目に発熱の症状を呈した。接種豚1は接種5～6日目に鼻汁および唾液からウイルスを排泄しており、同居豚3と4はその時期に感染したものと思われ、その後豚4は同居10日目に、豚3は同居11日目に発熱の症状を示した。2つの群の差は接種豚から排泄されたウイルス量にあると思われ、感染豚から次の豚の症状発現が確認される期間は10日前後であることが確認された。接種試験の結果からASFV感染豚では感染後4～5日で発熱の症状を示して、鼻汁や唾液へとウイルスを排泄することが確認された。今回同居豚は同居4～5日で感染した後、さらに4～5日後に発症することが確認され、ASFは感染伝播力が強いウイルスではあるものの、口蹄疫や高病原性鳥インフルエンザのように同居1～2日で感染し発症するような感染様式を示すものではないことが確認された。

表4：ASFV Arm07株感染豚および同居豚の臨床採材材料からのリアルタイムPCR解析結果

		動物室1			動物室2		
		豚1 (接種豚)	豚3 (同居豚)	豚4 (同居豚)	豚2 (接種豚)	豚5 (同居豚)	豚6 (同居豚)
接種3日目 同居3日目	全血	+	-	-	+	-	-
	血清	+	-	-	+	-	-
	鼻スワブ	±	-	-	-	-	-
	唾液	-	-	-	-	-	-
	糞便	-	-	-	-	-	-
接種4日目 同居4日目	全血	+	-	-	+	-	-
	血清	+	-	-	+	-	-
	鼻スワブ	+	-	-	+	-	-
	唾液	±	±	-	±	-	-
	糞便	-	-	-	-	-	-
接種5日目 同居5日目	全血	+	-	-	+	-	-
	血清	+	-	-	+	-	-
	鼻スワブ	+	-	-	+	-	-
	唾液	+	-	-	+	-	-
	糞便	-	-	-	-	-	-

接種 6 日目 同居 6 日目	全血	+	-	-		-	-
	血清	+	-	-		-	-
	鼻スワブ	+	±	±		-	-
	唾液	+	-	-		±	-
	糞便	±	-	-		-	-
同居 7 日目	全血		-	-		-	-
	血清		-	-		-	-
	鼻スワブ		±	-		-	-
	唾液		-	-		-	-
	糞便		-	-		-	-
同居 8 日目	全血		-	-		+	±
	血清		-	-		-	-
	鼻スワブ		-	-		-	-
	唾液		±	-		-	-
	糞便		-	-		-	-
同居 9 日目	全血		-	-		+	+
	血清		-	-		+	+
	鼻スワブ		±	-		-	-
	唾液		±	-		±	-
	糞便		-	-		-	-
同居 10 日目	全血		-	±		+	+
	血清		-	-		+	+
	鼻スワブ		-	-		+	±
	唾液		+	+		±	-
	糞便		-	-		-	-
同居 11 日目	全血		+	+		+	+
	血清		±	+		+	+
	鼻スワブ		±	±		+	+
	唾液		±	±		+	±
	糞便		-	-		-	-

+: 陽性 (Ct<35)、±: Doubtful (35<Ct<39)、-: 陰性 (39<Ct)。網掛け: 解剖後で検査なし。

接種 0 日目から接種 2 日目では全サンプル陰性。同居 11 日目実験終了。

(平成 29 年度)

実験3として自然感染経路による感染実験を行なった。8週齢の豚3頭にASFV Armenia07株感染豚の脾臓乳剤10,000倍希釈液を1mL鼻腔内接種した($10^3\text{HAD}_{50}/\text{mL}$)。同じく8週齢の豚3頭に同量の脾臓乳剤希釈液を口腔内に接種した。また同量の脾臓乳剤希釈液($10^4\text{HAD}_{50}/\text{mL}$ の脾臓乳剤希釈液を0.1mL)を注射した豚肉片を豚に食べさせることを試みた。接種後毎日血液材料(血清とヘパリン血(以下全血))、鼻腔スワブ、唾液、糞便を採材して接種後13日目まで臨床症状を観察した。斃死豚は随時解剖した。

経鼻接種群3頭のうち、1頭(豚3)で接種後4日目の血液材料からウイルス遺伝子が検出された(表5)。この豚3では接種5日目に発熱がみられ、鼻汁へのウイルス排泄も接種後4日目から、唾液へのウイルス排泄は接種後5日目から認められた(表5)。他の2頭では接種後5日目(豚1)と7日目(豚2)から、それぞれまず鼻腔や唾液からウイルス遺伝子が検出され、その後接種後9日目の血液材料からウイルス遺伝子が検出された(表5)。発熱は接種後8日目と10日目に認められた。接種豚では、まず血液材料からウイルス遺伝子が検出され、同居豚では、まず鼻汁や唾液からウイルス遺伝子が検出されていることから、この豚1と豚2の2頭は先に感染した豚3から水平感染した可能性が高いと考えられた。

経口接種群3頭では、1頭(豚7)で接種後2日目の血液材料からウイルス遺伝子が検出された(表5)。この豚7では接種後3日目に発熱がみられ、鼻汁へのウイルス排泄は接種後5日目から確認された(表5)。豚9は接種後5日目に事故死するまで、検査材料からのウイルス遺伝子検出は認められなかった。豚8では経鼻接種の豚1と2と同様に、血液材料より先に鼻汁や唾液からウイルス遺伝子が検出される傾向を示したことから、豚7からの水平感染が疑われた。豚8は接種後8日目から発熱がみられた。

今回ウイルス液を注入した肉を食べさせようとした群では、ウイルス遺伝子は検出されず(表5)、発熱も認められなかった(図37)。豚が肉の塊を殆ど食べなかったために感染が起こらなかったと思われる。事前の検討では豚は肉の細切れを抵抗なく食べたが、0.1mLのウイルス液を注入するために今回用意した肉の塊は豚が食べるにはサイズが大き過ぎたと考えられた。感染豚の肉を食べさせる実験の際には肉を細かくミンチ状にして食べさせるなど、工夫が必要と思われた。

今回、自然感染経路でのウイルス接種を行い、経鼻接種、経口接種共に $10^3\text{HAD}_{50}/\text{mL}$ のウイルス量(1mLに1000個のウイルス)で少なくとも3頭に1頭で感染を確認した。自然感染経路で豚群の中に感染を引き起こすためには $10^3\text{HAD}_{50}/\text{mL}$ のウイルス量が必要であることが示唆された。一方で、豚群の中で1頭の豚に感染が引き起こされた場合、その群の他の豚に水平感染が容易に起こることも確認された。今回、血液中からのウイルス遺伝子の検出は、発熱日の前日から発熱日の翌日の間に確認されており、発熱までの間にウイルス血症が徐々に起こるのではなく、ウイルス血症の発現とほぼ同時期に発熱することも確認された。鼻汁や唾液へのウイルス排泄は、経口接種した豚では血液中から遺伝子が検出されてから2日後もしくは3日後に、経鼻接種した豚では血液中から遺伝子が検出されたのと同日から2日後にかけて認められた(表5)。今回、筋肉内接種の感染豚と比較して、自然感

染経路による感染豚の発熱の発現時期は遅く、ウイルスの潜伏期間は長く、鼻汁や唾液へのウイルス排泄時期も遅いことが確認された。(平成 30 年度)

表 5 : ASFV Arm07 株自然感染経路感染豚の臨床採材材料からのリアルタイム PCR 解析結果

		経鼻接種			経口接種			食餌接種		
		豚 1	豚 2	豚 3	豚 7	豚 8	豚 9	豚 4	豚 5	豚 6
接種 2 日 目	全血	—	—	—	+	—	—	—	—	—
	血清	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	鼻スワブ	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	唾液	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	糞便	—	—	—	—	—	—	—	—	—
接種 3 日 目	全血	—	—	—	+	—	—	—	—	—
	血清	—	—	—	+	—	—	—	—	—
	鼻スワブ	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	唾液	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	糞便	—	—	—	—	—	—	—	—	—
接種 4 日 目	全血	—	—	±	+	—	—	—	—	—
	血清	—	—	+	+	—	—	—	—	—
	鼻スワブ	—	—	+	±	—	—	—	—	—
	唾液	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	糞便	—	—	—	—	—	—	—	—	—
接種 5 日 目	全血	—	—	+	+	—		—	—	—
	血清	—	—	+	+	—		—	—	—
	鼻スワブ	+	—	+	+	±		—	—	—
	唾液	±	—	+	—	—		—	—	—
	糞便	—	—	±	—	—		—	—	—
接種 6 日 目	全血	—	—	+	+	—		—	—	—
	血清	—	—	+	+	—		—	—	—
	鼻スワブ	±	—	—	+	—		—	—	—
	唾液	+	—	+	±	—		—	—	—
	糞便		—	+	—	—		—	—	—
接種 7 日 目	全血	—	—	+	+	—		—	—	—
	血清	—	—	+	+	—		—	—	—
	鼻スワブ	+	+	—	+	±		—	—	—

	唾液	±	+	+	±	±		-	-	-
	糞便	-	-	+	-	-		-	-	-
接種 8 日 目	全血	±	-			±		-	-	-
	血清	-	-			-		-	-	-
	鼻スワブ	±	-			-		-	-	-
	唾液	±	±			±		-	-	-
	糞便	-	-			-		-	-	-
接種 9 日 目	全血	+	+			+		-	-	-
	血清	+	-			+		-	-	-
	鼻スワブ	-	-			-		-	-	-
	唾液	±	-			-		-	-	-
	糞便	-	-			-		-	-	-
接種 10 日目	全血	+	+			+		-	-	-
	血清	+	+			+		-	-	-
	鼻スワブ	+	-			±		-	-	-
	唾液	±	-			±		-	-	-
	糞便	-	-			-		-	-	-
接種 11 日目	全血	+	+			+		-	-	-
	血清	+	+			+		-	-	-
	鼻スワブ	+	±			+		-	-	-
	唾液	±	±			±		-	-	-
	糞便	±	-			-		-	-	-
接種 12 日目	全血	+	+					-	-	-
	血清	+	+					-	-	-
	鼻スワブ	+	+					-	-	-
	唾液	+	+					-	-	-
	糞便	-	±					-	-	-
接種 13 日目	全血		+					-	-	-
	血清		+					-	-	-
	鼻スワブ		+					-	-	-
	唾液		+					-	-	-
	糞便		-					-	-	-

+: 陽性 (Ct<35)、±: Doubtful (35<Ct<39)、-: 陰性 (39<Ct)。網掛け: 解剖後で検査なし。

接種 0 日目から接種 1 日目では全サンプル陰性。接種 13 日目実験終了。

実験4として感染ウイルス量によるASFV感染豚の病態の差を検討した。これまで $10^3\text{HAD}_{50}/\text{mL}$ のASFV Armenia07株を筋肉内に接種した実験を行ってきたが、今回、そのウイルス量を100倍希釈した $10^1\text{HAD}_{50}/\text{mL}$ 、さらに100倍希釈した $10^{0.1}\text{HAD}_{50}/\text{mL}$ の低ウイルス量の2群と、 $10^6\text{HAD}_{50}/\text{mL}$ の高ウイルス量の1群の病態を比較した。8週齢の豚を10頭用意して、3頭ずつに $10^{0.1}\text{HAD}_{50}/\text{mL}$ 、 $10^1\text{HAD}_{50}/\text{mL}$ のASFV Armenia07株を筋肉内接種した。残りの豚4頭に $10^6\text{HAD}_{50}/\text{mL}$ のASFV Armenia07株を筋肉内接種した。接種後毎日血液材料（血清とヘパリン血（以下全血））、鼻汁、唾液、糞便を採材して臨床症状を観察した。斃死豚は随時解剖した。

$10^6\text{HAD}_{50}/\text{mL}$ の高ウイルス量接種群では早いものでは接種後1日の血液材料からウイルス遺伝子が検出され、接種後2日目には4頭全例の血液材料からウイルス遺伝子が検出され、鼻汁からのウイルス排泄も確認された。実験1と2の $10^3\text{HAD}_{50}/\text{mL}$ 筋肉内接種豚の結果と比較すると、血液材料からのウイルス遺伝子検出も鼻汁からのウイルス排泄も早く認められることが判明した。

一方、低ウイルス量接種の2群では、 $10^1\text{HAD}_{50}/\text{mL}$ 接種群では接種後3日目に1頭の全血からウイルス遺伝子が検出されているが、それぞれ血液材料や鼻汁、唾液からのウイルス遺伝子の検出時期に顕著な差は認められず、実験1と2の $10^3\text{HAD}_{50}/\text{mL}$ 筋肉内接種豚の結果と比較しても、有意な差は認められなかった。 $10^{0.1}\text{HAD}_{50}/\text{mL}$ 接種群、 $10^3\text{HAD}_{50}/\text{mL}$ 接種群共に、接種後5日目には全例の全血、血清からウイルス遺伝子が検出された。接種後9日目、10日目では糞便からもウイルス遺伝子が検出された。当初実験期間を20日（3週間）に設定していたが、接種10日までに全例で斃死または瀕死に陥ったため、10日で全例を解剖して実験を終了した。（平成30年度）

表6：ASFV Arm07株の感染ウイルス量を変えて行なった筋肉内接種感染豚の臨床採材材料からのリアルタイムPCR解析結果

		$10^{0.1}\text{HAD}_{50}/\text{mL}$			$10^1\text{HAD}_{50}/\text{mL}$			$10^6\text{HAD}_{50}/\text{mL}$			
		豚1	豚2	豚3	豚4	豚5	豚6	豚7	豚8	豚9	豚10
接種1 日目	全血	—	—	—	—	—	—	+	—	±	—
	血清	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	鼻スワブ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	唾液	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	糞便	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
接種2 日目	全血	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
	血清	—	—	—	—	—	—	+	±	±	±
	鼻スワブ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	唾液	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	糞便	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

接種 3 日目	全血	－	±	±	+	－	+	+	+	+	+
	血清	－	－	－	±	－	－	+	+	+	+
	鼻スワブ	－	－	－	－	－	－	+	+	+	+
	唾液	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
	糞便	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
接種 4 日目	全血	±	+	+	+	±	+	+	+	+	+
	血清	－	±	+	+	－	+	+	+	+	+
	鼻スワブ	－	－	－	±	－	－	+	+	+	+
	唾液	－	－	－	±	－	±	+	+	±	±
	糞便	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
接種 5 日目	全血	+	+	+	+	+	+	+	+	－	－
	血清	+	+	+	+	+	+	+	+	－	－
	鼻スワブ	±	+	+	+	±	+	+	+	－	－
	唾液	－	－	－	+	±	－	+	－	－	－
	糞便	－	－	－	－	±	－	－	±	－	－
接種 6 日目	全血	+	+	+	+	+	+				
	血清	+	+	+	+	+	+				
	鼻スワブ	+	+	+	+	+	+				
	唾液	－	－	±	±	－	±				
	糞便	－	－	－	－	－	±				
接種 7 日目	全血	+	+	+		+	+				
	血清	+	+	+		+	+				
	鼻スワブ	+	+	+		+	+				
	唾液	－	－	+		±	±				
	糞便	－	－	－		－	±				
接種 8 日目	全血	+	+	+		+					
	血清	+	+	+		+	+				
	鼻スワブ	+	+	+		+	+				
	唾液	－	±	+		±	±				
	糞便	－	－	－		－	±				
接種 9 日目	全血	+	+	+							
	血清	+	+	+							
	鼻スワブ	+	+	+							
	唾液	±	±	+							
	糞便	+	－	－							

接種 10日 目	全血	+	+								
	血清	+	+								
	鼻スワブ	+	+	+							
	唾液	-	±								
	糞便	±	±	+							

+: 陽性 (Ct<35)、±: Doubtful (35<Ct<39)、-: 陰性 (39<Ct)。網掛け: 解剖後で検査なし。

接種0日目では全サンプル陰性。接種10日目実験終了。

「イ、感染試験豚の臨床症状と特徴病変の検証」について

ASFV Armenia07株を実験感染させた豚の臨床症状を観察し、特徴的な解剖時肉眼所見を確認した。実験1として8週齢の豚10頭にASFV Armenia07株感染豚の脾臓乳剤10,000倍希釈液を1mL筋肉内接種した(10³HAD₅₀/mL)。接種後3日目に5頭で発熱がみられ、実験終了までに10頭中8頭で41℃以上の高い発熱が確認された(図17)。未発熱は接種後3日目に計画解剖および急死した個体の2頭のみであった。接種後5日目以降に解剖した5頭中4頭では、元気消失・食欲不振を示した(図20)。外貌から病変を確認できた個体は鼻出血もしくは肛門からの出血がみられた3頭のみであった。試験期間中に斃死した個体は4頭確認されたが、斃死個体に共通するASFV特徴病変は外貌からは今回確認出来ず(図19)、死亡個体の外貌所見からは豚コレラ症例を含めた他の疾病との鑑別は難しいことが確認された。接種後5日目以降に解剖した豚5頭中著変を認めた4頭において、死亡後時間が経過しても血液が凝固しなかった。接種後3日目に計画解剖された豚4頭では深麻酔下放血時に血餅が出来にくいといった現象は確認出来なかった。接種後3日目に計画解剖された4頭では、特徴的な解剖所見は確認されなかった(図23)。本病の摘発には早期発見が重要ではあるが、発熱の症状を示した日に解剖しても、未だ内臓病変は形成されていないことが確認された。一方、接種後5日目以降に解剖した5頭中4頭では、脾臓と腹腔内リンパ節の暗色化と腫大が確認された(表7)。特に脾臓の幅は正常のものと比較して顕著に厚くなり、色も性状でみられる小豆色と比較して著しく黒色を呈していた(図21~23)。腹腔内リンパ節の中では特に胃と肝臓の周囲のリンパ節と腎門リンパ節の色が顕著に暗赤色化を示していた(図24~26)。この脾臓と腹腔内リンパ節の変化は腹部を開いてすぐに容易に確認できることから、アフリカ豚コレラ鑑別のための重要な判断所見になる可能性が示された。赤色腹水の増量と胃から大腸にかけての消化管粘膜の出血も5頭中4頭で確認された(表7)。扁桃の出血は5頭中3頭で確認された(表7)。肺水腫は斃死例では全例で確認されており、接種後7日目まで生存した1頭では軽度で確認された(表7)。今回腎臓の色の暗赤色化は1頭でみられたのみで、腎臓、肝臓や心臓の漿膜面の出血病変はいずれも認められなかった(表7)。

表 7 : ASFV Arm07 株感染豚の臨床症状および解剖時肉眼所見

	DPI	臨床症状				解剖時肉眼所見								
		斃死 (D) or 計画解剖 (E)	発熱	元気消失 食欲不振	外貌の出血病変	脾腫	腹腔内リンパ節暗赤色化	腹水増量	肺水腫	消化管粘膜出血	腎臓の出血・暗赤色化	扁桃の出血・暗赤色化	肝臓・心臓の出血	
1	3	E	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	3	E	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3	3	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	3	E	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10	3	D	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	
6	5	E	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5	5	D	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	
9	5	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
8	6	D	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	
7	7	E	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	

赤字：接種 5 日目以降で半数以上の豚で確認された所見。

実験 2 として 8 週齢の豚 2 頭に同量の脾臓乳剤を接種し、それぞれ接種豚 1 頭につき 2 頭の豚を同居させた。接種豚 2 頭では実験 1 と同様に接種後 3 日目から発熱がみられ (図 18)、接種後 4 日目から元気消失・食欲不振を示し (図 27)、1 頭は接種後 5 日目に下痢を発症した後突然死した (豚 2) (図 28)。斃死豚の外貌からは出血病変を含めた著変は認められなかった。もう 1 頭は接種後 6 日目に計画解剖した。接種豚 2 頭では特徴的な脾臓の腫大と内臓リンパ節の暗赤色化の解剖所見が確認された。その他赤色腹水増量、肺水腫、消化管粘膜の出血、腎臓の暗赤色化が確認された。豚 2 と同居させた豚 5 と 6 では同居 9 日目から発熱がみられ (図 18)、同居 11 日目では餌を食べずにうずくまっていた (図 30)。発熱 2 日後の同居 11 日目に豚 5 と 6 の解剖を行ったところ、豚 5 では特徴的な脾臓の腫大と内臓リンパ節の暗赤色化の解剖所見が顕著に確認されたが (図 32)、豚 6 では脾腫はみられた

ものの、腹腔内リンパ節の暗赤色化は一部のリンパ節で部分的にみられるのみであった。その他の所見として、消化管粘膜の出血と腎臓の色の暗赤色化は2頭共に確認されたが、肺水腫や赤色腹水の増量の所見は確認されなかった(表8)。豚1と同居させた豚3では同居11日目から発熱がみられ(図18)その日に計画解剖された。また豚4では同居10日目から発熱がみられ(図18)、翌日に計画解剖された。これら2頭では発熱はみられてはいたものの、元気があり餌も食べていた(図29)。発熱の症状を確認してすぐの解剖であったため、実験1の接種後3日目に解剖した4頭と同様にほとんど解剖所見を示さないことが予想されたが、予想に反して2頭共に脾腫(図31)と消化管粘膜の出血が確認された。豚4では腎臓の色の暗赤色化も確認された。豚1は接種後6日目に解剖されて動物室から居なくなっていたため、豚3と4は同居6日目以前には感染していたものと思われる。豚1からのウイルス排泄量が少なかったため、豚5と6と比較して発熱の症状の発現が遅くみられた可能性が疑われたが、それでも感染後5日以上経っているために脾腫や消化管病変がみられたのではないかと考えられた。今回、豚3の腹腔内リンパ節の暗赤色化はほとんど確認できなかった。一部のリンパ節では剖面で確認できて表面からは判断が難しかった。腹腔内リンパ節の病変は発熱後2日目以降の症例を解剖して確認すると判断が容易にできると考えられた。具体的には発熱を示し元気消失・食欲不振を示した豚を検査解剖することが重要で、まだ元気や食欲がある豚を解剖しても所見を見逃すおそれがあることが示唆された。同居11日目に発熱し、その日に解剖された豚3では深麻酔下放血時に血餅が形成されたが、それ以外の同居豚および接種豚では血餅が出来にくいことが確認された。

今回の実験1および実験2の結果から、ASFと豚コレラを含めた他の疾病との鑑別点として、臨床症状のみでは判断することは難しいが、高い発熱と元気消失、食欲不振の豚が1～2頭ではなく、豚群の中で広がっていく様子が確認されたときに、豚コレラもしくはASFを疑う事例として注視するべきであることが示された。ASFVの感染によって発熱、元気消失、食欲不振を呈した豚の解剖検査を行った場合、ASFと豚コレラを含めた他の疾病との鑑別点として、特徴的な脾臓の腫大と内臓リンパ節の暗赤色化の解剖所見が有用であることが今回の接種試験と同居試験の結果によって示唆された。今回の実験では消化管粘膜の出血病変も高率に確認されているが、消化管を開けることは手間がかかる上、汚染を広げる恐れがあることから、消化管の観察は補遺的な所見を得るに留めるべきであろう。他疾病との鑑別上重要な所見としては、脾臓と腹腔内リンパ節の所見のみで十分であると考えられた。ASFV感染豚の末梢血中では白血球数と共に血小板が著しく低下し、血液が凝固しにくくなる特徴を示すことが知られている。今回の実験1および実験2においても、共に豚の解剖時に血液が凝固せずに血餅が出来にくい現象が確認された。これもASF感染を疑う重要な所見であることが確認された。今回、腎臓の暗赤色化はほとんどの接種豚で認められなかったものの、同居豚では高率に認められたことは大変興味深い。その差を生じる要因については今後症例数を増やして検討していく必要がある。(平成29年度)

表 8 : ASFV Arm07 株感染豚および同居豚の臨床症状および解剖時肉眼所見

豚	接種 or 同居	臨床症状				解剖時肉眼所見								
		斃 死 (D) or 計 画 解 剖 (E)	発 熱	元 気 消 失 食 欲 不 振	外 貌 の 出 血 病 変	脾 腫	腹 腔 内 リ ン パ 節 暗 赤 色 化	腹 水 増 量	肺 水 腫	消 化 管 粘 膜 出 血	腎 臓 の 出 血 ・ 暗 赤 色 化	扁 桃 の 出 血 ・ 暗 赤 色 化	肝 臓 ・ 心 臓 の 出 血	
1	接種	E	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	
3	同居	E	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	
4	同居	E	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	
2	接種	D	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	
5	同居	E	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	
6	同居	E	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	

赤字 : 2/3 以上の豚で確認された所見。今回臨床症状の発熱、解剖所見の脾腫と消化管粘膜出血は全例で確認された。

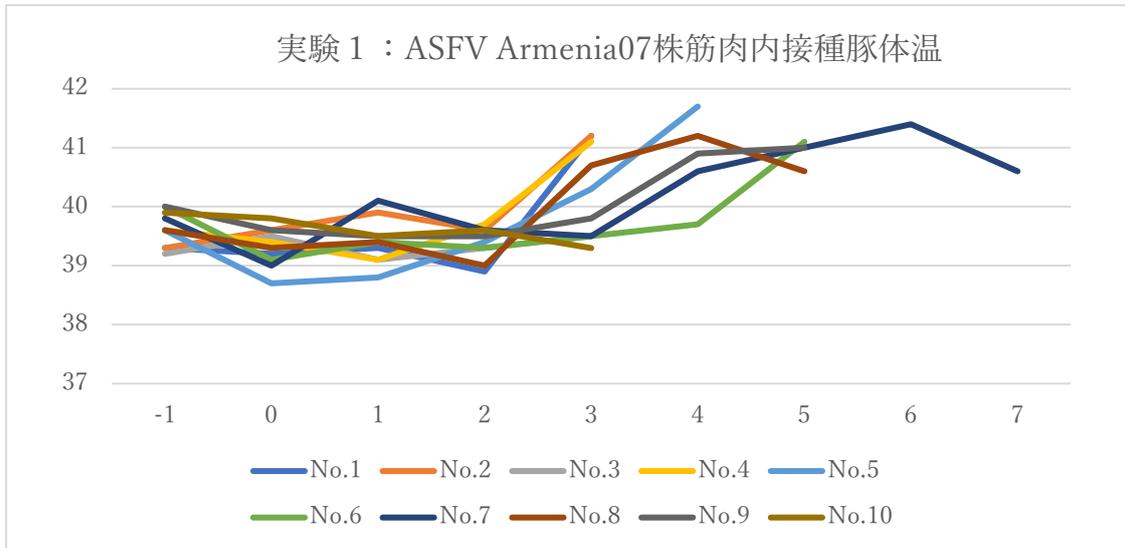


図 17 : 豚筋肉内接種感染実験体温

0 : 接種日。 ASFV Armenia07 株（欧州流行強毒株）筋肉内接種。

接種後 3 日目に 5 頭発熱。接種後 4 日目+2 頭発熱。接種後 5 日目+1 頭発熱。発熱は 10 頭中 8 頭（8 頭すべてで 41°C 超）。未発熱は接種後 3 日目に計画解剖及び急死した個体。

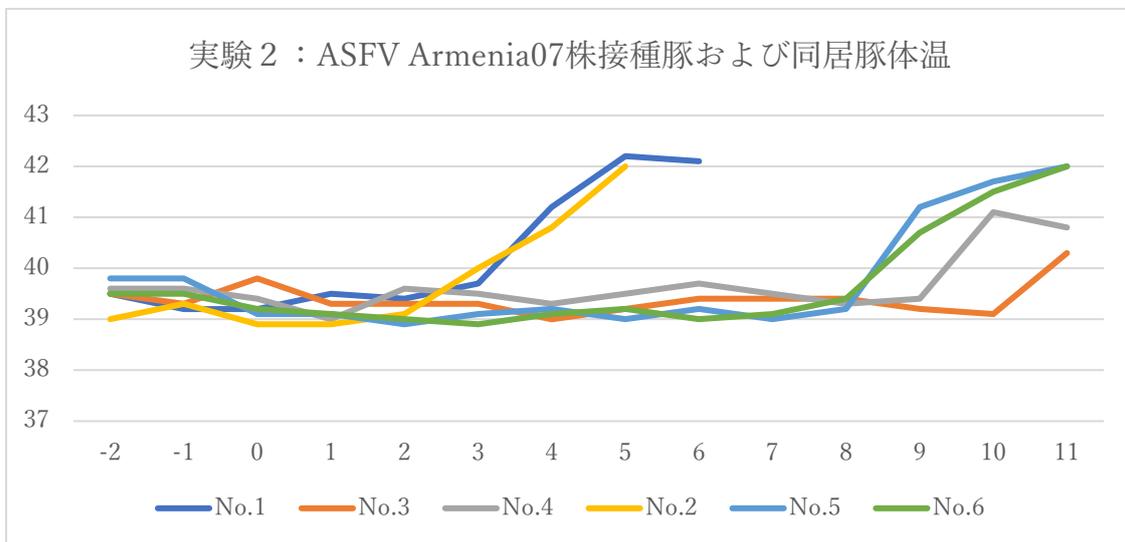


図 18 : 豚同居感染実験体温

0 : 接種日および同居日。 ASFV Armenia07 株（欧州流行強毒株）筋肉内接種。

No.1: 接種豚（No.3 および No.4 同居）。 No.2: 接種豚（No.5 および No.6 同居）。

接種後 3 日目に接種豚 2 頭発熱。同居豚は同居 9 日目に 2 頭。同居 10 日目+1 頭発熱。同居 11 日目+1 頭発熱。発熱は同居豚 4 頭すべてで確認。



図 19 (左) : 豚 5 と豚 9 : ASFV Armenia07 株 (欧州流行強毒株) 筋肉内接種。接種後 5 日目。朝 2 頭の豚の斃死を確認。外貌に特段の所見なし。発熱のみ。前日より元気消失食欲不振。
 図 20 (右) : 豚 7 : ASFV Armenia07 株 (欧州流行強毒株) 筋肉内接種。接種後 7 日目。7 日目に解剖を予定していた 4 頭のうち生存はこの 1 頭のみ。

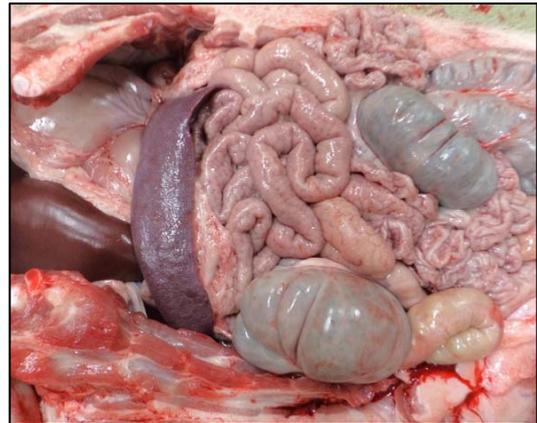


図 21 (左) : 豚 5 : ASFV Armenia07 株 (欧州流行強毒株) 筋肉内接種。接種後 5 日目。
 図 22 (右) : 正常豚。
 脾臓の腫大と暗色化が顕著にみられる。右の対照の正常豚と比較するとわかりやすい。今回接種後 5 日目以降に解剖した 5 頭中 4 頭において、顕著な脾腫が確認された。



図 23 (左)：接種後 3 日目の豚 1~4 および接種後 6 日目の豚 8 の脾臓。ASFV Armenia07 株（欧州流行強毒株）筋肉内接種。接種後 3 日目に解剖した 4 頭ではまだ顕著な脾腫は認められない。接種後 6 日目では非常に大きくなっている。

図 24 (右)：豚 7：ASFV Armenia07 株（欧州流行強毒株）筋肉内接種。接種後 7 日目。腎門リンパ節の暗赤色化が容易に確認できる。腎臓には出血性病変は認められない。



図 25 (左)：豚 7：ASFV Armenia07 株（欧州流行強毒株）筋肉内接種。接種後 7 日目。

図 26 (右) 正常対照豚の胃の周囲のリンパ節。

胃の周囲のリンパ節の暗赤色化が容易に確認できる。右の正常対照と比較するとわかりやすい。通常胃や肝臓周囲のリンパ節は周囲結合組織や脂肪組織にまぎれて確認することは難しいが、ASF 症例では赤黒いリンパ節を一目で確認することができる。脾臓とリンパ節の変化は開腹後すぐに容易に確認することが可能であるため、ASF と豚コレラを含めた他の疾病との鑑別点として、非常に有用な着目点であることが示唆された。



図 27 (左) : 接種豚 1 と同居豚 3 と 4 : ASFV Armenia07 株 (欧州流行強毒株) 接種後 5 日目、同居 5 日目。同居豚は元気に餌を食べているが接種豚は元気消失・食欲不振を示す。

図 28 (右) : 接種豚 2 : ASFV Armenia07 株 (欧州流行強毒株) 接種後 5 日目。接種豚は元気消失・食欲不振および下痢を示す。



図 29 (左) : 同居豚 3 と 4 : ASFV Armenia07 株 (欧州流行強毒株) 同居 11 日目。豚 3 はこの日発熱を認めたが、元気はあり、餌を完食している。

図 30 (右) : 同居豚 5 と 6 : ASFV Armenia07 株 (欧州流行強毒株) 同居 11 日目。豚 5 と 6 は元気がなく食欲不振で餌をほとんど食べていない。



図 31 (左)：同居 11 日目の豚 3～6：開腹すると脾臓の腫大と色の病変が同居豚 4 頭すべてで確認される。

図 32 (右)：豚 5：同居 11 日目。肝臓周囲リンパ節。

肝臓周囲のリンパ節の暗赤色化が顕著に確認できる。肝臓や消化管しょう膜面には出血性病変は認められない。

「ASF の検査のための効果的な解剖方法、採材方法」について

ASF の感染豚を農場で解剖すると感染を広げる恐れがある。特に通常の解剖方法に従って広く開腹すると、腹水や血液で周辺を汚染してしまう (図 33)。しかしながら、豚コレラや他疾病との鑑別には解剖検査が重要である。そこで、ASF の検査のための効果的な解剖方法、採材方法を検証し、より感染拡大リスクが少なく、迅速で簡便な解剖方法および臓器材料の採材方法を確認した。今回、左脇腹部分のみの開腹により、腹水や血液による汚染を最小限にして脾臓、腎臓、内臓リンパ節の状態を観察して採材できることを確認した (図 34)。この方法では、ASF の特徴所見である脾臓の腫大と内臓リンパ節の暗赤色化が容易に観察できた (図 35)。また脾臓、腎臓、内臓リンパ節の採材も容易であった。一方、右脇腹部分からのアプローチでは、増量した腹水をこぼさないように脾臓や内臓リンパ節の状態を観察することは難しいことも確認した (図 36)。初動時の豚の解剖においては広く開腹開胸して全身諸臓器の病変を確認することが重要であるが、ひとたび発生が起こった場合、周辺農場や関連農場において感染拡大リスクを少なくする解剖・採材の方法として、本解剖方法が有用であると考えられる。(平成 29 年度)

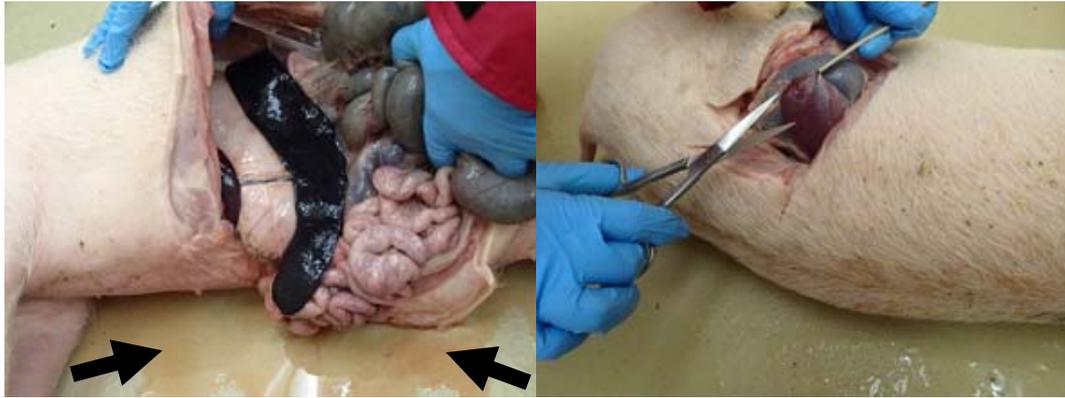


図 33 (左)：通常の開腹では腹水による周辺汚染が顕著 (矢印)。

図 34 (右)：左わき腹部分のみの開腹による腎臓採材。腹水はこぼれず。



図 35 (左)：左わき腹部分のみの開腹部位から腫大した脾臓 (矢印) の観察。

図 36 (右)：右わき腹から開腹すると、大きく開けても脾臓や内臓リンパ節、腎臓の観察は難しく、増量した腹水を腹腔内に維持するのは困難。

実験 3 として自然感染経路による感染の際の臨床症状と特徴病変について確認した。実験 1 と 2 と同じウイルス株の ASFV 東欧流行強毒株 (Armenia07 株) を 8 週齢の豚の口腔内、鼻腔内に接種し ($10^3\text{HAD}_{50}/\text{mL}$)、特徴的な臨床症状および肉眼病変、解剖所見を病理学的に解析した。同量の脾臓乳剤希釈液 ($10^4\text{HAD}_{50}/\text{mL}$ の脾臓乳剤希釈液を 0.1mL) を注射した豚肉片を食べさせた豚 3 頭は、感染は認められなかったと判断された。経口接種群では豚 9 が接種後 4 日目に採材時に事故死したため、豚 7 と豚 8 の 2 頭のみ結果を示した。主な臨床症状及び解剖時肉眼所見は表 9 に取りまとめた (表 9)。

経鼻接種群では 1 頭で接種後 5 日目から発熱がみられ (豚 3)、残りの 2 頭は接種後 8 日目 (豚 1) と 10 日目 (豚 2) から発熱が確認された (図 37)。発熱は全例 41°C 以上の高熱を示した。早くに発熱した豚 3 は接種後 6 日目から鮮血便を示し (図 39)、食欲廃絶、元気消失して壁際に座り込んでいた。接種後 7 日目に鮮血便がひどく、予後不良と判断して解剖

した。接種後 8 日目に発熱した豚 1 は接種後 10 日目から元気消失・食欲廃絶を示し、接種後 12 日目から下痢がみられて接種後 13 日目朝に斃死した。接種後 10 日目に発熱した豚 2 は接種 12 日目から耳翼の皮膚に紅班がみられるようになり (図 40)、元気消失、食欲不振を示し、接種 13 日目には下痢を呈した (図 41)。

経鼻接種群 3 頭の主な解剖時肉眼病変として、脾臓の黒色化と腫大 (図 42)、胃の周囲のリンパ節を中心とした腹腔内リンパ節の暗赤色化 (図 43)、腹水増量、腎臓の出血病変 (図 44)、解剖時に時間が経っても血が固まりにくい状態 (血液凝固不全) (図 45) は全例で確認された。消化管粘膜の充出血 (図 46) と扁桃の出血病変 (図 47) は豚 1 と豚 2 の 2 例で確認された。斃死した豚 1 では肺水腫が顕著にみられ (図 48)、心臓 (図 49) と肝臓 (図 50) に出血病変も確認された。

経口接種群では 1 頭で接種後 3 日目から発熱がみられ (豚 7)、残りの豚 8 は接種後 10 日目から発熱が確認された (図 37)。発熱は全例 41°C 以上の高熱を示した。早くに発熱した豚 7 は接種後 5 日目から元気消失、食欲不振を示して壁際に座り込むようになった。ただ、外貌からは特筆すべき症状は確認できなかった。接種後 7 日目に横臥して動かなくなり、予後不良と判断されて解剖された。接種後 10 日目に発熱した豚 8 は発熱と同時に元気消失、食欲不振を示し、接種後 11 日目に動かなくなったことから予後不良と判断されて解剖した。外貌からは特筆すべき症状は確認できなかった。

経口接種群 2 頭の主な解剖時肉眼病変として、脾臓の黒色化と腫大、胃の周囲のリンパ節を中心とした腹腔内リンパ節の暗赤色化、解剖時に時間が経っても血が固まりにくい状態 (血液凝固不全) が共に確認された。腹水増量、消化管粘膜の充出血、腎臓の出血病変は豚 7 のみで確認された。

今回、自然感染経路での感染実験を行なったところ、実験 1 と実験 2 の筋肉内接種で高率に確認された脾臓の黒色化と腫大、腹腔内リンパ節の暗赤色化の所見は、経鼻接種、経口接種共に感染豚で顕著に認められ、この脾臓と腹腔内リンパ節の肉眼病変は ASF に特徴的であり、豚コレラを含めた他の疾病との鑑別点として有用な所見であることが強く示唆された。経鼻接種、経口接種の異なる二つの感染経路で感染豚の病態に顕著な差は認めなかった。今回の感染実験では筋肉内接種豚と比較して、経過が少し長くなる傾向を示した。発熱してから解剖するまでの経過日数で解剖時肉眼所見の結果を並べると (表 10)、病変は脾臓とその周辺のリンパ節から始まる傾向を示した。また、発熱してから解剖するまでの経過日数が長い豚ほど、内臓諸臓器の出血病変が進行する傾向を示し (表 10)、とくに腎臓で高率かつ顕著に確認された。筋肉内接種と同量のウイルスを経口接種、経鼻接種した場合、発症し斃死するまでの経過が長く緩やかとなることによって、耳翼の紅斑病変や腎臓や肝臓、心臓の出血性病変が進行し、確認され易くなるのではないかと考えられた。(平成 30 年度)

表 9 : ASFV Arm07 株の自然感染経路による感染豚の臨床症状および解剖時肉眼所見

豚	接種経路	臨床症状					解剖時肉眼所見								
		斃死 (D) or 計画解剖 (E)	発熱	元気消失 食欲不振	外貌の出血病変	下痢	脾腫	腹腔内リンパ節暗赤色化	腹水増量	肺水腫	消化管粘膜充出血	腎臓の出血・暗赤色化	扁桃の出血・暗赤色化	肝臓・心臓の出血	解剖時の血液凝固不全
1	経鼻	D	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	経鼻	E	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
3	経鼻	E	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
7	経口	E	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
8	経口	E	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
4	食餌	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	食餌	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	食餌	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

赤字：感染が確認された豚の半数以上の豚で確認された所見。今回臨床症状の発熱、元気消失・食欲不振、解剖所見の脾腫と消化管粘膜出血、腹水増量は全例で確認された。食餌接種の3例ではリアルタイム PCR の結果からも感染は認められなかった。経口接種の豚9は接種4日目に事故死したため結果から除外した。

表 10：表 9 の解剖時肉眼所見の結果を発熱後の日数で並び替えた場合の結果

豚	接種 経路	PID	発 熱 後 日 数	脾 臓 の 黒 色 化	脾 臓 の 腫 大	胃 腸 Ln の 色	腎 門 Ln の 色	胃 肝 Ln の 色	腸 間 膜 Ln の 色	腹 水 増 量	腎 臓 の 出 血 ・ 色	消 化 管 粘 膜 充 出 血	扁 桃 の 出 血 ・ 色	肺 水 腫	心 臓 ・ 肝 臓 の 出 血
8	経口	11	1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	経鼻	7	2	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
2	経鼻	13	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
7	経口	7	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
1	経鼻	13	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4-6	食餌	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

赤字：感染が確認された豚の半数以上の豚で確認された所見。今回の解剖時肉眼所見の結果を発熱後の日数で並べ替えてみると、肉眼病変は脾臓とその周辺のリンパ節から始まる傾向を示した。筋肉内接種で認められなかった腎臓の病変が今回高率に認められた。

実験 4 として感染ウイルス量による ASFV 感染豚の臨床症状と肉眼病変の差を検討した。これまで $10^3\text{HAD}_{50}/\text{mL}$ の ASFV Armenia07 株を筋肉内に接種した実験を行ってきたが、そのウイルス量を 100 倍希釈した $10^1\text{HAD}_{50}/\text{mL}$ 、さらに 100 倍希釈した $10^{0.1}\text{HAD}_{50}/\text{mL}$ の低ウイルス量の 2 群と、 $10^6\text{HAD}_{50}/\text{mL}$ の高ウイルス量の 1 群の病態を比較した。8 週齢の豚を 10 頭用意して、3 頭ずつに $10^{0.1}\text{HAD}_{50}/\text{mL}$ 、 $10^1\text{HAD}_{50}/\text{mL}$ の ASFV Armenia07 株を筋肉内接種した。残りの豚 4 頭に $10^6\text{HAD}_{50}/\text{mL}$ の ASFV Armenia07 株を筋肉内接種した。接種後臨床症状を観察し、斃死豚及び瀕死豚は随時解剖した。主な臨床症状及び解剖時肉眼所見は表 11 に取りまとめた。

今回、臨床症状として発熱 (図 38) と元気消失・食欲不振は接種ウイルス量に関わらず、全例で確認された (100%)。全例 41°C 以上の高熱を示し、 42°C を超えるものも 10 頭中 6 頭で確認された。発熱して元気、食欲を失くした豚は壁際に集まって折り重なるようにうずくまっていた (図 51)。解剖時肉眼所見も脾臓の腫大と解剖したときに時間が経っても血が固まりにくい現象 (血液凝固不全) は、接種ウイルス量に関わらず全例で確認された。腹腔内リンパ節の暗赤色化 (90%) と消化管粘膜の充出血 (90%)、腹水増量 (80%) も接種ウイルス量に関わらず高率に確認された。接種後 6 日目以降に解剖した症例では、前述の所見に加えて、腎臓、扁桃、肝臓、心臓の出血性病変も高率に確認された。斃死例では全例で肺水腫が確認された。

10¹HAD₅₀/mL、10⁶HAD₅₀/mL 接種群とこれまでの 10³HAD₅₀/mL 接種群とでは、症状、症状発現時期、解剖時肉眼病変に顕著な差は認められなかった。10^{0.1}HAD₅₀/mL 接種群でも、発熱時期やウイルス排泄時期が少し他の群より遅かったものの、他群と同様の症状、解剖時肉眼病変を示した。10^{0.1}HAD₅₀/mL、10¹HAD₅₀/mL の低容量のウイルスを筋肉内接種した豚も感染、発症し、斃死した。今回感染ウイルス量は本病の発症・病態にそれほど大きな影響を与えず、感染が成立してしまえば、豚は発症して高い致死率を示し、特徴的な肉眼病変が確認できることが判明した。脾臓や腹腔内リンパ節、腎臓の病変は、接種後 4 および 5 日目に解剖された 10⁶HAD₅₀/mL 接種群より接種後 6 および 8 日目に解剖された 10¹HAD₅₀/mL 接種群、さらに接種後 10 日目に解剖された 10^{0.1}HAD₅₀/mL 接種群のほうが顕著にみられ、経過が長いほうが強く発現する傾向を示した。

ASF の特徴病変である脾臓の腫大・黒色化と胃の周囲のリンパ節の暗赤色化はすべての感染試験で確認され、本症の臨床症状や解剖時肉眼病変は感染経路や感染ウイルス量には左右されないことが示された。そして ASF と豚コレラを含めた他の疾病との鑑別点として、この特徴的な解剖所見が有用であることが明らかになった。豚コレラを含めた他の疾病との鑑別が可能な特異的な臨床症状は示さないものの、41℃以上の高熱を示して、壁に寄り添うように群れ重なる様子、元気消失・食欲不振、強い伝染力（High contagious）と高い致死率を示した場合、また、群の中で1週間ほどかけて伝播し、次の1週間で斃死していくといった状況がみられた場合、豚コレラもしくは ASF を強く疑う必要があることが示唆された。この症状と発生状況、特徴的な解剖時肉眼病変の組み合わせが ASF と豚コレラを含めた他疾病との鑑別に有効なメルクマールとなることを確認した。一方で、特徴的な脾臓とリンパ節病変の発現の数日前からウイルス血症が起こることから、血液材料を用いた遺伝子検出などウイルス学的診断が早期摘発には重要であることが確認された。（平成 30 年度）

表 11 : ASFV Arm07 株の感染ウイルス量の差による臨床症状および解剖時肉眼所見の比較

豚 No	接種 量	P I D	臨床症状					解剖時肉眼所見									
			斃 死 (D) or 計 画 解 剖 (E)	発 熱	元 気 消 失 食 欲 不 振	外 貌 の 出 血 病 変	下 痢	脾 腫	腹 腔 内 リン パ 節 暗 赤 色 化	腹 水 増 量	肺 水 腫	消 化 管 粘 膜 充 出 血	腎 臓 の 出 血 ・ 暗 赤 色 化	扁桃 の 出 血 ・ 暗 赤 色 化	肝 臓 ・ 心 臓 の 出 血	解 剖 時 の 血 液 凝 固 不 全	
1	10 ^{0.1}	10	D	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
2	10 ^{0.1}	10	E	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	
3	10 ^{0.1}	10	D	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
4	10 ¹	6	D	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
5	10 ¹	8	E	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
6	10 ¹	8	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
7	10 ⁶	5	E	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	
8	10 ⁶	5	E	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	
9	10 ⁶	4	E	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	
10	10 ⁶	4	E	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	

PID: post inoculation days (接種後日数)。接種量は HAD₅₀/mL。

赤字：半数以上の豚で確認された所見。臨床症状として発熱と元気消失・食欲不振は全例で確認された（100%）。解剖時肉眼所見も脾臓の腫大と解剖したときに時間が経っても血が固まりにくい現象（血液凝固不全）は全例で確認された。腹腔内リンパ節の暗赤色化（90%）と消化管粘膜の充出血（90%）、腹水増量（80%）も高率に確認された。接種6日目以降に解剖した症例では、前述の所見に加えて、腎臓、扁桃、肝臓、心臓の出血性病変も高率に確認された。斃死例では全例で肺水腫が確認された。

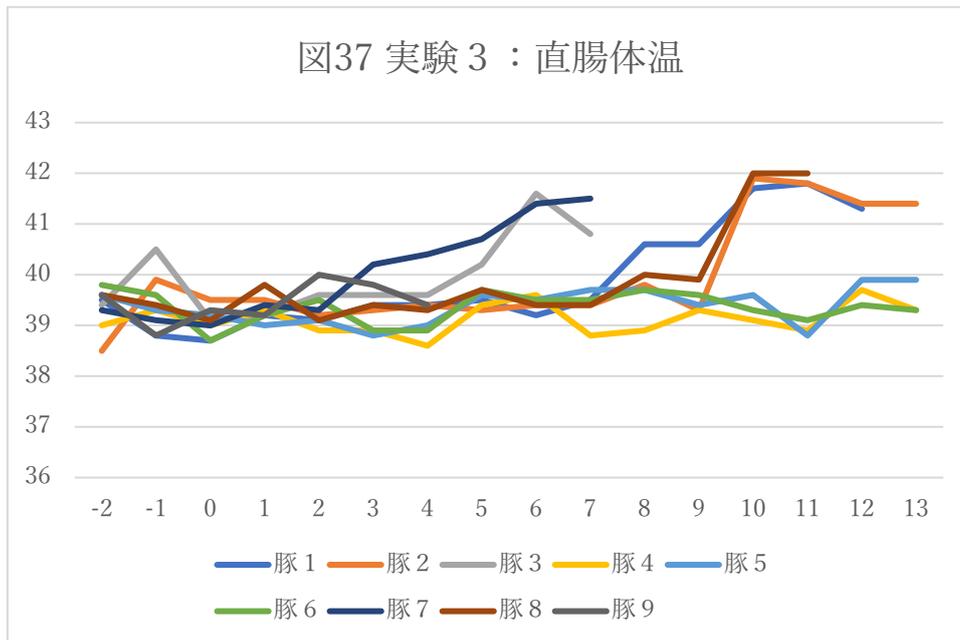


図 37 : 豚自然感染経路感染実験体温

0 : 接種日。 ASFV Armenia07 株 (欧州流行強毒株) 接種。

経鼻接種群では 1 頭で接種後 5 日目から発熱がみられ(豚 3)、残りの 2 頭は接種後 8 日目 (豚 1) と 10 日目 (豚 2) から発熱が確認された。

経口接種群では 1 頭で接種後 3 日目から発熱がみられ (豚 7)、残りの豚 8 は接種後 10 日目から発熱が確認された。豚 9 は接種後 4 日目に事故死。

食餌接種の 3 頭では感染、発熱は認められなかった。

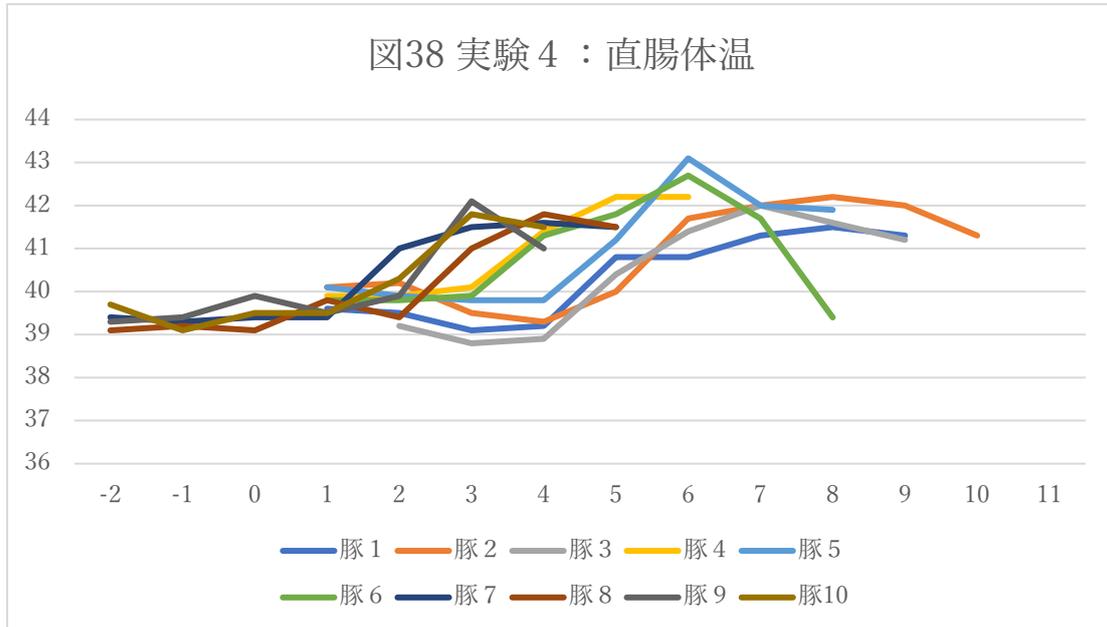


図 38 : ウイルス接種量を変えて筋肉内接種した感染実験体温
 0 : 接種日。 ASFV Armenia07 株 (欧州流行強毒株) 筋肉内接種。
 接種ウイルス量に関わらず、全例で発熱が確認された。高ウイルス量接種豚では発熱は接種後 2 日目から確認された。全例 41°C 以上を示し、42°C を超えるものも 10 頭中 6 頭で確認された。

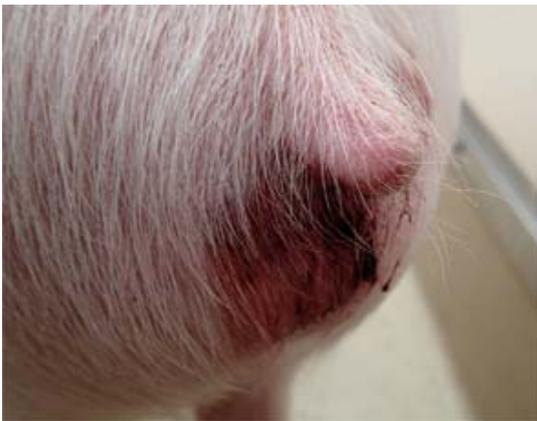


図 39 (左) : 経鼻接種後 6 日目。血便をして肛門からは鮮血がみられた。

図 40 (右) : 経鼻接種後 13 日目。耳翼の皮膚の紅斑。



図 41 (左)：経鼻接種後 13 日目。脾臓は黒色調を呈して著しく腫大。開腹するとすぐに確認できる。腹水は著しく増量。

図 42 (右)：経鼻接種後 13 日目。胃の周囲のリンパ節は黒色調を呈して著しく腫大 (矢印)。リンパ節周囲は水腫を呈する。腹水増量。

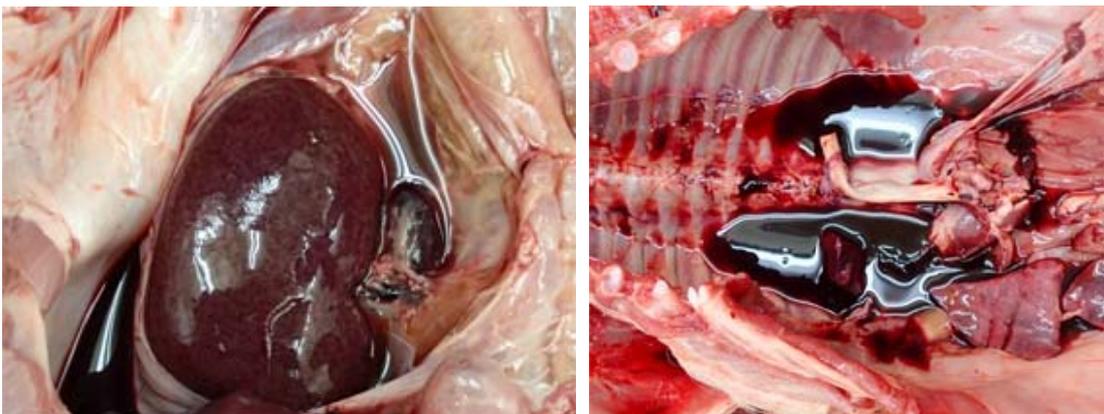


図 43 (左)：経鼻接種後 13 日目。腎臓は黒褐色調を呈して著しく腫大。腎門リンパ節も暗赤色を呈して著しく腫大。

図 44 (右)：経鼻接種後 13 日目。朝斃死していたのを確認。解剖終了時の午後 1 時半の時点でも血液は血餅を作ることなく固まっていない。血液が固まりにくいという特徴を示す。

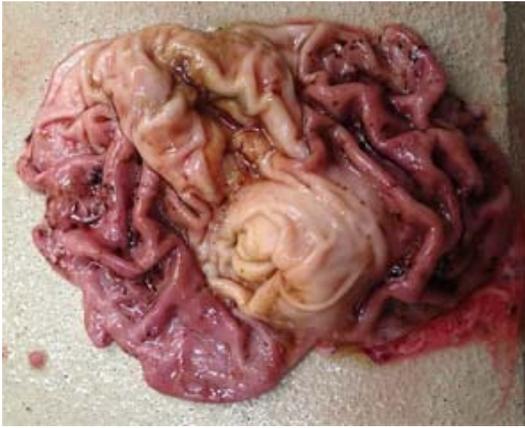


図 45 (左) : 経鼻接種後 13 日目。胃粘膜の充出血。



図 46 (右) : 経鼻接種後 13 日目。扁桃の充出血。



図 47 (左) : 経鼻接種後 13 日目。肺水腫により著しく膨隆した肺。表面は光沢を持ち、小葉間
間質は明瞭にみられる。斃死例では全例で肺水腫を確認。

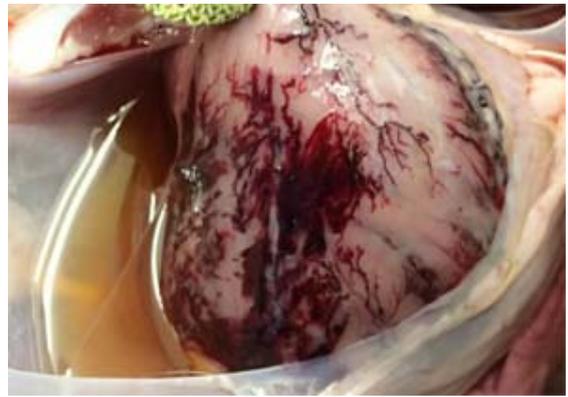


図 48 (右) : 経鼻接種後 13 日目。心臓の出血。黄色透明心嚢水の顕著な増量。



図 49 (左) : $10^6\text{HAD}_{50}/\text{mL}$ の高ウイルス量を筋肉内接種して 3 日目および 4 日目の豚 4 頭。部屋の隅に折り重なるようにしてうずくまって、餌を食べない。全例で体温 41°C 以上の高熱。
 図 50 (右) : $10^{0.1}\text{HAD}_{50}/\text{mL}$ の微量ウイルス量を筋肉内接種して 10 日目の豚。接種 9 日目からの水様下痢。



図 51 (右) : $10^{0.1}\text{HAD}_{50}/\text{mL}$ の微量ウイルス量を筋肉内接種して 10 日目の豚の脾臓。3 頭共に脾臓は著しく腫大。特に厚みを増している。脾臓の腫大はすべての感染実験において、接種後 5 日目以降の感染豚の全例で確認された。

図 52 (右) : $10^{0.1}\text{HAD}_{50}/\text{mL}$ の微量ウイルス量を筋肉内接種して 10 日目の豚の腎臓。3 頭共に腎臓に出血病変がみられ、色調は暗赤褐色調を呈する。腎臓の出血性病変が接種後 7 日目以降の豚において高率に認められる傾向を示した。

【工程表の③】

小課題 4 関連：

1. ASFV 感染豚の筋肉および筋肉を用いた食肉加工品（ソーセージ）内における、細胞を用いた感染性保持期間の検討

小課題 1 にて導入した ASFV 3 株（Armenia07 株、Kenia05 株、España 75 株）を用いた感染試験により、ウイルスを接種した実験感染豚 6 頭（各株を 2 頭ずつに接種）から得られた筋肉（1 頭あたり頸部、肩部および腿部の 3 箇所）を冷蔵および冷凍保存した。またこの筋肉を用いて作製したソーセージを冷蔵および冷蔵保存した。これらの筋肉やソーセージが冷凍あるいは冷蔵保存下でどの程度の期間感染性を保持するかを検証するため、乳剤材料を保存 1 ヶ月後毎に作製した（平成 29 年度）。

作製した乳剤材料中に含まれる ASFV の力価は豚肺胞マクロファージ（PAM 細胞）への感染性を指標として定量した。冷蔵（4℃）にて保存した筋肉では保存後 1 ヶ月目から変色や腐敗などの変化が生じ、ウイルス力価が検出限界（ $10^{1.1}$ HAD₅₀/ml）以下となる検体が散見されたものの、保存 5 ヶ月目が経過した検体においてもすべての豚から感染性ウイルスが検出された（データ示さず）。冷凍（-20℃）にて保存した筋肉においては時間経過と共にウイルス力価が低下する様子が確認され（図 53、A）、すべての検体の平均ウイルス力価は、保存後 1 ヶ月目の $10^{2.87}$ HAD₅₀/ml から 13 ヶ月目では $10^{1.68}$ HAD₅₀/ml と約 1/15 に減少した。しかしながら、13 カ月間の冷凍後も多数の検体から感染性ウイルスが検出された（データ示さず）。（平成 30 年度）

冷凍ソーセージの場合においても、保存 3 ヶ月目から保存 13 ヶ月目のウイルス力価の平均値は $10^{2.05}$ HAD₅₀/ml から $10^{1.44}$ HAD₅₀/ml に低下したが、13 ヶ月目の検体のうち 6 頭中 4 頭分から感染性のウイルスが検出された（データ示さず）。（平成 30 年度）

以上の結果から、ASFV 感染豚の肉および加工品に含まれる ASFV の力価は時間経過と共に徐々に低下すると考えられるものの、4℃保存の筋肉では 5 ヶ月以上、-20℃保存の筋肉およびソーセージでは 13 ヶ月以上の長期間にわたり ASFV は感染性を維持することが明らかとなった。

2. ASFV 感染豚の筋肉および筋肉を用いた食肉加工品（ソーセージ）の摂食による豚への感染性の評価

ASFV を含む豚肉および食肉加工品からの豚への感染リスクを評価する為、これらの検体を豚に摂食させる試験を実施した。具体的には、小課題 4-1 で保存した ASFV 感染豚 No.2 の筋肉およびソーセージ（ASFV Armenia07 株に感染、筋肉：凍結 19 ヶ月、ソーセージ：凍結 16 カ月）を 3 群、各 3 頭に分けた計 9 頭の豚に単回および複数回摂食させ、体温測定と臨床症状の観察および血中および排泄物中のウイルス遺伝子の検出を行った。

ソーセージを単回投与した第 1 群（豚 1～3）では 3 頭すべてが 9～10 日目から 40℃以上の発熱が確認され、ソーセージを 6 回投与した第 2 群（豚 4～6）では豚 4 および 5 は 10

日目から発熱が確認されたものの、豚6は飼育期間を通じて発熱しなかった（(データ示さず)）。筋肉を6回投与した第3群（豚No.7～9）では豚7および9がそれぞれ4および6日目から発熱した（データ示さず）。豚8では7および8日目に40℃を超えたものの、その後低下した（データ示さず）。体温の上昇が顕著だった7頭は血中からもウイルス遺伝子が検出されたことから感染が成立していたと考えられる（データ示さず）。（平成30年度）

3. ASFVの熱による不活化条件の検証

ASFVの熱による不活化条件を明らかにすることを目的として、高力価のウイルス液および感染豚の筋肉から作製したソーセージを用いた検証を行った。

ウイルス液を用いた試験では、ASFV Armenia07株の培養上清を70～90℃の熱水中に3、15、30および60分間浸漬した後に回収し、ウイルス力価をPAM細胞を用いて測定した。その結果、当初 $10^{6.0}$ HAD₅₀/25μl程度あったウイルス力価は70℃、3分以上の加熱によりいずれもPAM細胞への感染性を示さなくなり、ウイルス力価が検出限界である $10^{0.5}$ HAD₅₀/25μl以下まで低下した（図53）。（平成30年度）

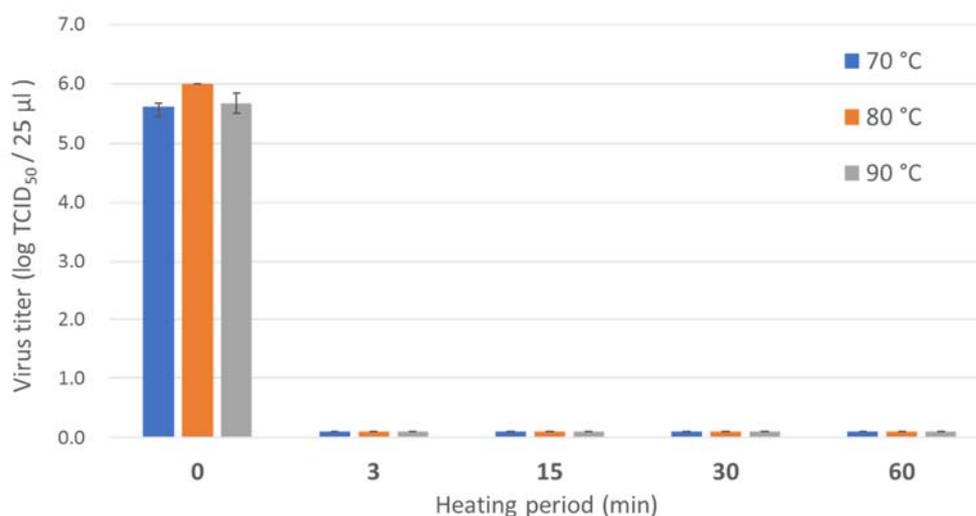


図 53 : ASFV 培養上清を 70～90℃で処理した際のウイルス力価の変化

ソーセージを用いた試験では、上記の摂食試験に用いたものと同じソーセージを約1cmの長さに切断し、70および80℃の熱水に3、15、30、60分浸漬することにより加熱処理した。これらの検体の10%乳剤を作製し、0.45μmフィルターにて滅菌した後のウイルス力価をPAM細胞にて測定した。加熱前のソーセージ乳剤はフィルターによる滅菌後で約 $10^{0.5}$ HAD₅₀/25μlあったが、70℃、3分以上の加熱によりいずれもPAM細胞への感染性を失い、力価が検出限界である $10^{0.5}$ HAD₅₀/25μl以下まで低下した。（図54）

以上の結果から、ウイルスを含むソーセージにおいても1cm角の大きさで液相70℃、3

分以上の加熱で ASFV Armenia07 株を不活化できることを確認した。(平成 30 年度)

しかしながら、今回はケーシングが切断され、熱水が内部に浸透しやすい状態での加熱を行っていること、ウイルス量の比較的少ない筋肉のみを用いて作成したソーセージであったことから、全体がケーシングで覆われた完全なソーセージやブラッドソーセージの様に含有するウイルス量が多い材料を用いて作製された加工品では不活化までの加熱時間が延長する可能性があることに留意する必要がある。

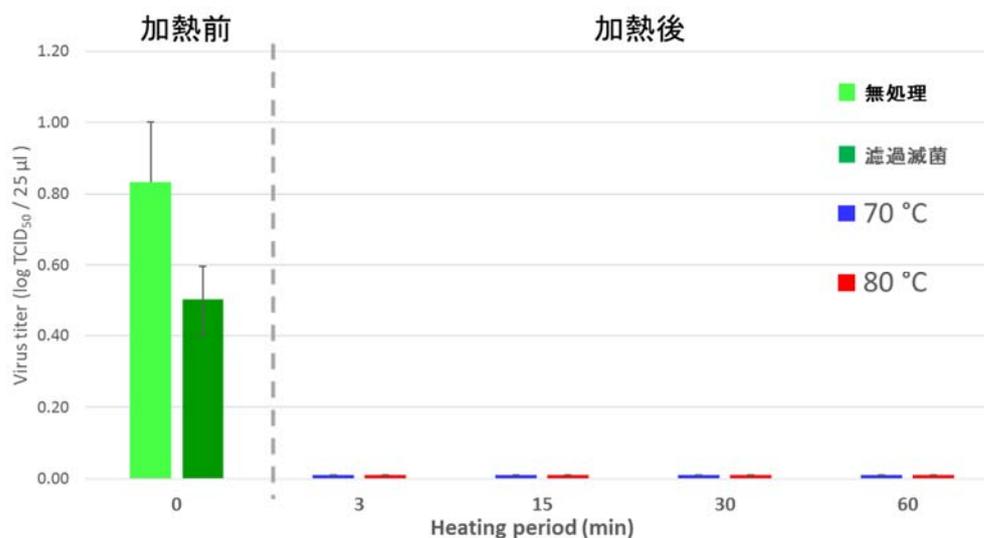


図 54：感染豚の肉から作成したソーセージ（1cm 角）を 70 および 80°C の熱水に浸漬した際のウイルス力価の変化。加熱後の検体は濾過滅菌後に力価測定を行った。

【工程表④】

上記の小課題 2、3、4 で得られた成果を既存の「特定家畜伝染病防除指針」に盛り込み、本指針の改訂に寄与した。また ASF についてのリーフレットを作成して各都道府県や動物検疫所に配布すると共に農林水産省のホームページの中で本病の臨床症状や特徴的病変について啓発した。さらに農研機構・動物衛生研究部門のホームページ内において ASF についての解説と簡単な Q&A を公開した。本研究課題で得られた成果については豚病研究会報や家畜衛生学雑誌、養豚会、養豚の友といった科学雑誌や広報誌で公表して関係者に啓発している。(平成 30 年度)

(ウ) 成果目標に対する達成状況

ASFV の導入が当初の予定より遅れたものの、ウイルス導入後速やかにその病原性を確認し、豚への感染試験を小課題 1 の予備試験を含めて計 6 回実施した。それらの実験の解析結果を通じて本病の病態を明らかにし、臨床症状や特徴的病変をデジタルデータとして記録し、家畜防疫関係者向け資料を作成し、農林水産省や農研機構・動物衛生研究部門のホームページを通じて啓発している。当初の目標である「特定家畜伝染病防除指針の改訂」を達成

し、農林水産省が都道府県を通じて生産現場や家畜衛生現場への普及を行っているところである。3年間の実施期間内で当初予定していたすべての成果目標を達成している。

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

中課題1、中課題2共に当初計画されたすべての目標を達成している。

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	家畜の伝染性疾病に関する実態を踏まえたサーベイランス手法・検査診断手法の研究
---------	----------------------------------------

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		
2803	9	有	2	0	7	3	7	0	0	0	0	1	有

(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
③	第1回検討会	2016年7月1日	農研機構 動物衛生研究部門	15	無	<ul style="list-style-type: none"> サーベイランスの実施体制に関する調査結果 結核病とブルセラ病のサーベイランスの見直しの方向性 その他
③	第2回検討会	2016年10月7日	農研機構 動物衛生研究部門	14	無	<ul style="list-style-type: none"> 結核・ブルセラのサーベイランスの在り方 結核・ブルセラの摘発時の対応 米国のサーベイランス制度(現地調査報告) その他
③	第3回検討会	2017年2月8日	農研機構 動物衛生研究部門	15	無	<ul style="list-style-type: none"> NZのサーベイランス制度(現地調査報告) 本年度の報告書(案)について その他
①	第1回推進会議	2017年2月8日	農研機構 動物衛生研究部門	18	有	<ul style="list-style-type: none"> 研究課題の進捗状況と今後の計画 事業成果目標の記載内容の変更 その他

①	第1回推進会議	2016年8月4日	農林水産省消費・安全局	10	有	<ul style="list-style-type: none"> 研究課題の概要 全体計画と今年度計画 その他事務連絡
①	第2回推進会議	2017年2月14日	農林水産省消費・安全局	9	有	<ul style="list-style-type: none"> 研究課題の進捗状況と今後の計画 事業成果目標の記載内容の変更 その他事務連絡
①	第1回推進会議	2018年2月21日	農林水産省消費・安全局	18	有	<ul style="list-style-type: none"> 研究課題の進捗状況と今後の計画 その他事務連絡
①	第1回推進会議	2018年2月28日	農研機構 動物衛生研究部門	10	有	<ul style="list-style-type: none"> 研究課題の進捗状況 その他
①	第1回推進会議	2019年2月27日	農林水産省消費・安全局	10	有	<ul style="list-style-type: none"> 研究課題の成果報告 その他事務連絡

(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	機関名
②	<ul style="list-style-type: none"> 国内の現行サーベイランス実態把握 海外のサーベイランス制度の把握 我が国の牛の結核病及びブルセラ病に係るサーベイランス等の在り方の提案 	我が国のサーベイランス制度の見直し	来年度以降、国の家畜衛生当局にて見直しの作業が随時開始される予定	農研機構 動物衛生研究部門
②	今後の家畜疾病サーベイランスの提案	我が国のサーベイランス制度の見直し	来年度以降、国の家畜衛生当局にて見直しの作業が随時開始される予定	農研機構 動物衛生研究部門
①	アフリカ豚コレラに関するリーフレット作成	アフリカ豚コレラの症状の啓発	農林水産省が都道府県を通じて生産現場や家畜衛生現場への普及を行なっている。	農研機構 動物衛生研究部門
①	アフリカ豚コレラに関する特定家畜伝染病防疫指針の一部改訂(平成30年10月31日)	我が国におけるアフリカ豚コレラの防疫	農林水産省が都道府県を通じて生産現場や家畜衛生現場への普及を行なっている。	農研機構 動物衛生研究部門

②	<ul style="list-style-type: none"> ・アフリカ豚コレラウイルスのOIEレファレンスラボラトリーから標準株及び近年の流行ウイルス株(東欧流行強毒株のArmenia07株およびアフリカ流行弱毒株のKenia05株の)を計3株を導入した ・近年の流行株に対する現行のアフリカ豚コレラ診断手法の有用性を確認した。 ・ウイルス遺伝子検出、ウイルス分離、ウイルス抗原検出、遺伝子系統樹作成の診断手法に加え、抗ウイルス抗体検出も可能となった。 ・アフリカ豚コレラウイルスArmenia07株(欧州流行強毒株)の同居豚への水平伝播率は100%を示した。一方感染豚から次の豚へ感染が成立して症状を発現するまでには10日前後かかる事が確認された。アフリカ豚コレラウイルスは感染伝播力が強いウイルスであるものの、口蹄疫や高病原性鳥インフルエンザのように同居1日2日で感染し発症するような感染様式を示すものではないことが確認された。 ・高い発熱と元気消失、食欲不振の豚が1頭2頭ではなく、豚群の中で広がっていく様子が確認されたときに、豚コレラもしくはアフリカ豚コレラを疑う事例として注視すべきであることが確認された。 ・アフリカ豚コレラの臨床症状や解剖時肉眼病変の発現は感染経路や感染ウイルス量には左右されないことが明らかにされ、アフリカ豚コレラの診断には、特徴的な脾臓の腫大と腹腔内リンパ節の暗赤色化の解剖所見が有用であることが確認された。 ・血液材料からのウイルス遺伝子の検出は上記の特徴的な脾臓とリンパ節病変の発現の数日前から可能であることから、血液材料を用いたウイルス検査が診断と早期摘発には重要であることが確認された。 ・アフリカ豚コレラの検査のための効果的な解剖方法、採材方法を確認した。 	我が国におけるアフリカ豚コレラの現行の診断方法の高度化。	我が国におけるアフリカ豚コレラの甚急性、急性、亜急性、慢性のすべての病態を診断する体制が整った。	農研機構 動物衛生研究部門
①	・旅客の携帯品から検出されたアフリカ豚コレラウイルス遺伝子の病性鑑定	我が国におけるアフリカ豚コレラの水際防疫	動物検疫所で検出した旅客の携帯品からのアフリカ豚コレラウイルス遺伝子について、ウイルス分離、遺伝子検査の病性鑑定を行なっている。	農研機構 動物衛生研究部門

②	<p>・アフリカ豚コレラウイルス感染豚の肉に含まれるウイルスの力価は徐々に低下するものの、4℃の冷蔵保存で5か月以上、-20℃の冷凍保存では13か月以上にわたり感染性を維持することが明らかにされた。</p> <p>・アフリカ豚コレラウイルス実験感染豚の筋肉を用いてソーセージを作成して、-20℃の冷凍保存下の豚肉ソーセージ中においてどのくらいの期間ウイルスの感染性が維持されるか検査した場合でも、13ヶ月以上ウイルスの感染性が維持されることが確認された。</p> <p>・1年以上冷凍保存したアフリカ豚コレラウイルス感染豚肉およびソーセージにおいても、豚が摂食するとウイルスに感染し、2週間以内に発症することが確認された。またその感染は概ね約10gの肉類を1回摂取するのみで成立することが明らかにされた。</p> <p>・ソーセージを用いた試験により、液相70℃ 3分以上の加熱によってアフリカ豚コレラウイルスの不活化が可能であることが確認された。</p>	我が国へのアフリカ豚コレラ侵入リスク検証	冷凍汚染肉によるアフリカ豚コレラ国内侵入リスクを確認し、動物検疫所と連携して水際防疫の強化を行なっている。	農研機構 動物衛生研究部門
---	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------	-------------------------------------------------------	---------------

(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
ロシア及び東欧諸国におけるアフリカ豚コレラ(ASF)の発生とその現状について、舩甚賢太郎, 亀山健一郎, 山田学, 山川睦、日本豚病研究会報、72巻、p.1-7、2018年8月	農研機構 動物衛生研究部門
東欧強毒株を用いたアフリカ豚コレラウイルス感染実験について、山田学, 舩甚賢太郎, 亀山健一郎, 山添麗子, 西達也, 森岡一樹, 深井克彦, 山川睦、日本豚病研究会報、72巻、p.8-15、2018年8月	農研機構 動物衛生研究部門

(4)口頭発表

タイトル、発表者名、学会等名、発表年月	機関名
アフリカ豚コレラについて-東欧の現状と対策-、舩甚賢太郎、第92回日本豚病研究会研究集会、2018年5月	農研機構 動物衛生研究部門
東欧流行株を用いたアフリカ豚コレラウイルス感染試験について、山田学、舩甚賢太郎、亀山健一郎、山添麗子、西達也、森岡一樹、深井克彦、山川睦、第92回日本豚病研究会研究集会、2018年5月	農研機構 動物衛生研究部門
アフリカ豚コレラウイルスArmenia07株実験感染豚の病理学的解析、山田学、舩甚賢太郎、亀山健一郎、山添麗子、西達也、森岡一樹、深井克彦、山川睦、第161回日本獣医学会学術集会 2018年9月	農研機構 動物衛生研究部門
アフリカ豚コレラ、山田学、第161回日本獣医学会学術集会アフリカ豚コレラ緊急公開セミナー 2018年9月	農研機構 動物衛生研究部門
アフリカ豚コレラ-海外の発生状況と臨床症状-、平成30年度日本豚病臨床研究会(第75回定例会)、2018年10月	農研機構 動物衛生研究部門
Establishment of the ASF diagnosis system in Japan, Kentaro Masujin, International seminar for the risk and prevention of invasion of African swine fever virus into Japan, 2018年11月	農研機構 動物衛生研究部門
Study for inactivated condition of ASFV for the food supply chain in Japan, Ken-ichiro Kameyama, International seminar for the risk and prevention of invasion of African swine fever virus into Japan, 2018年11月	農研機構 動物衛生研究部門
Experimental study of ASF in pigs performed in NIAH, Manabu Yamada, International seminar for the risk and prevention of invasion of African swine fever virus into Japan, 2018年11月	農研機構 動物衛生研究部門
アフリカ豚コレラの病原体と診断の研究、山田学、日本学術会議食料科学委員会アフリカ豚コレラ緊急シンポジウム、2018年12月	農研機構 動物衛生研究部門
アフリカ豚コレラ、山田学、家畜衛生フォーラム'18、2018年12月	農研機構 動物衛生研究部門

(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
②	米国の家畜衛生サーベイランス制度について、村井清和、獣疫学雑誌、2017年12月	農研機構 動物衛生研究部門
②	ニュージーランドの家畜衛生サーベイランス制度について、村井清和、獣疫学雑誌、2017年12月	農研機構 動物衛生研究部門
⑤	我が国の家畜衛生サーベイランスの改善 効率化に関する調査報告書～ 牛の結核病及びブルセラ病のサーベイランス等 ～、動物衛生研究部門ウイルス・疫学研究領域疫学ユニット、事業報告書、2017年3月	農研機構 動物衛生研究部門
⑤	我が国の家畜衛生サーベイランスの改善・効率化に関する調査報告書(全国サーベイランスの見直し等)、動物衛生研究部門ウイルス・疫学研究領域疫学ユニット、事業報告書、2018年4月	農研機構 動物衛生研究部門
④	アフリカ豚コレラ、舛甚賢太郎、養豚界、緑書房、2018年4月	農研機構 動物衛生研究部門
④	アフリカ豚コレラの特徴と侵入防止対策、山川睦、養豚の友、2018年11月	農研機構 動物衛生研究部門
④	中国で広がるアフリカ豚コレラ農場でできる対策は？山田学、養豚界、緑書房、2018年11月	農研機構 動物衛生研究部門

(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
②	アフリカ豚コレラ対策	日本農業新聞	2018年8月9日	農研機構 動物衛生研究部門	

(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		
CO2インキュベーター	Panasonic MCO-170AI CUVH	1台	878256	878256	アフリカ豚コレラウイルスの分離、培養	