

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2017～2021

課題番号：17H04639

研究課題名(和文) 東南アジアにおける日本に脅威となる豚の越境感染症の病理学的調査・解析

研究課題名(英文) Pathological investigation and analysis of transboundary swine disease threaten to Japan in south Asia

研究代表者

山口 良二 (Yamaguchi, Ryoji)

宮崎大学・農学部・特別教授

研究者番号：90150169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：東南アジアにおいて日本の脅威となる豚の越境感染症の病理学的研究を実施した。豚熱(CSF)、アフリカ豚熱(ASF)、高病原性PRRSはリンパ節に出血がみられ、肉眼的、臨床的に類似点が多い。病理学的解析により、病変形成の過程や感染する細胞、ウイルス遺伝子検出との比較が明確に異なり病理発生の違いが明確となった。日本への新たな豚への越境感染症が発生した場合の病性鑑定に重要な知見となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

産業動物感染症の病理学的研究は、遺伝子解析の機器が発達している中で、診断、病態解析の技術の中で重要となっている。特に生体内でのウイルスなどの病原体の分布と生体反応は病理以外では研究できない。問題点は豚の重要疾病の病理学的研究は抗体の入手の困難さ、病理学者が少ないこと、発生地の東南アジアの病理学的標本作製の技術的問題と材料を採取する国際共同研究としてのカウンターパートとの協力関係など多かった。今回はこれをすべてクリアする状況ができ病理学的研究が可能となり、豚の越境感染症の病理学的研究の結果、流行地での豚の疾患、豚熱、アフリカ豚熱、高病原性PRRS等の詳細な病気の形成過程が明確となった。

研究成果の概要(英文)：We conducted pathological studies of transboundary infectious diseases in pigs, which poses a threat to Japan from Southeast Asia. Classical swine fever (CSF), African swine fever (ASF), and highly pathogenic PRRS have similarities of many macroscopic lesions including hemorrhage in lymph node and clinical signs. By pathological analysis, the process of lesion formation, the cells to be infected, and the comparison with the detection of viral genes were clearly different, and the difference in pathogenesis was clarified. It shown that viruses mainly infect lymphocytes, epithelial cells, vascular endothelium, and nerve cells in CSF, systemic macrophages and a few of hepatocytes and renal cells in ASF, and macrophages in lymphatic tissues and lungs in highly pathogenic PRRS in filed cases. This was an important finding for diagnosis assessment in the event of a new transboundary infectious disease in pigs to Japan.

研究分野：獣医病理学

キーワード：病理学的研究 豚熱CSF アフリカ豚熱ASF 豚 越境感染症 国際共同研究 東南アジア ベトナム

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

国内に根深く浸潤し経済的に損失の大きい豚呼吸繁殖障害症候群 (PRRS)、豚流行性下痢 (PED) は、豚の重要疾病であり、申請者らもウイルス学的及びその遺伝子検索と病理学的検索を実施してきた。その一方で、宮崎では豚の口蹄疫や鶏の高病原性インフルエンザが大流行した。

中国から発生し、ベトナム国境を通過して急速に流行した高病原性 (HP) PRRS の日本への侵入が、口蹄疫や豚コレラ (豚熱、CSF) とともに危ぶまれる。さらに、採択後、さらに危険な疾病として発生した ASF は日本に侵入すると養豚業界だけでなく、日本の食料安全保証に重大な結果をもたらす。東南アジアの多くの研究機関や大学で、豚疾病診断はウイルス遺伝子の検出が主体である。ウイルスを分離し、感染実験施設のある世界の研究機関では、細胞に順化して分離するので、自然例との乖離が見られ、完全な病気の再現性は低い。中国から発生し、2007 年ベトナム国境を通過して急速にアウトブレイクした HPPRRS の例では自然例は死亡するなど重篤であったが、感染実験では子豚が死亡しなかった。自然例との乖離の説明のために、病理学的解析を行ったところ、自然例にはマクロファージに多量にウイルスが感染し、リンパ球、マクロファージの強力なアポトーシスと出血により、重篤な疾病となり、死亡したと判明した。が、細菌は分離されず、二次感染の病変は見られなかった。このように必ずしも分離株の感染実験は自然界の病態を表していない (*J Comp Pathol.* 2016)。近年は多様な抗体が市販され、HE 染色とともにより詳細な病態解析が可能となってきた。病原体の輸入は厳しく制限されているが、病原体を不活化するホルマリン固定後のパラフィンブロックは感染源とはならないため、日本での解析が可能である。ただ、現場との連携が問題となり、正確な材料の背景情報を入手できることが重要である。その点、ベトナムをはじめとする東南アジアでは、宮崎大学農学部、獣医病理学研究室出身の卒業生の多くが学長を始め重要なポジションにあり、連絡を密にできる状況にある。

ベトナムとミャンマーは中国と接する国境が長く往来しやすいのでインドシナ半島多国間であらゆる感染症が問題となっている。中国からの感染症伝播の玄関となっているベトナム北部の豚の病態解析の研究は重要であるにもかかわらず、市民の感染症に対する意識も低く、解析には至らず、時に解体して食することもある。宮崎大学はミャンマーの獣医大学 (イェジン) と MOU (交流協定) を締結しているが、獣医大学は発展の緒に就いたばかりである。それゆえ、インドシナ半島の感染状況調査は、宮崎大学出身の学長が就任しているハノイのベトナム国立農業大学を材料採取や研究の拠点とする予定である。HPPRRS や PED の発生源である中国からの越境感染について情報開示が不明確なので、より国境に近いハノイで情報入手することで深い研究が可能となる。

宮崎では歴史的に 2 回の口蹄疫発生を経験し、畜産以外の多方面でも国益が損なわれた。東南アジアの大学では古くから当教室の卒業生が多数教員になり、1988 年に MOU を締結しているタイ・チュラロンコーン大学は動物やヒトが頻繁に往来する地理的に重要なインドシナ半島の東西合流地点にあるので、病理学的検査も必要である。さて、ホルマリンの病原体不活化は強力に感染性は皆無となるが、感染豚の病理 (病態検索) には、日本では行政上の制限があり、研究は農水省の機関のみ可能である。豚の疾病の多くは海外悪性伝染病である。ヒトの場合ベトナムでの高病原性インフルエンザによる死亡例について現地で詳細な病理学的な解析が行き届かなかった場合不活化パラフィンブロックの病理学的解析を日本で実施する。東南アジアで常在化している重要疾病 (*J Vet Diagn Invest.* 2014) が、日本に侵入して発生した場合に備えて、臨床・感染機序・ウイルス排泄機序について病理学的変化を明確にしておく必要がある。

特色としては、東南アジア全体に当教室の卒業生が教員として活躍し、強力なネットワークができてきていることである。特にベトナムでは申請者が主指導として学位を取得した学生が学長となり、情報共有が十分できている。東南アジアでは自然例の病理学的解析をする病理学者が少ないので、共同研究により病理学的解析の重要性を共有できる。近年の病理学の進展により合成ペプチドを用いた抗体作製の技術、組換え抗原を用いた蛋白に対する抗体の作製法など、病原体がなくても抗体が作製できるようになってきた。また、レーザー顕微鏡により、感染細胞の標的がわかるようになり、*in situ* ハイブリダイゼーションの技術による遺伝子の検出も感度よく可能となった。拠点となるハノイのベトナム国立農業大学との MOU と 2016 年の宮崎大学出身者の同窓会設立による信頼性から、ベトナムの豚の感染症の皆無に近かった解析が可能となり、CSF、口蹄疫、HPPRRS、豚流行性下痢症 (PED) 他、海外悪性伝染病 (日本への越境感染症) の病理学的検索とウイルス型を検索し診断と予防に結びつけていく。

2. 研究の目的

東南アジアは世界の養豚業の 60% を占め、日本に越境しうる常在重要感染症は、日本の養豚業にとって侵入すると深刻である。病原体検出には PCR 検査が容易・安価で、病気の機序を調べる病理学的検索はほとんどなされない。病理検査がされない理由には、病理診断技術、手間 (時間)、免染用抗体が比較的高価で良好な抗体が入手困難であるなど技術的未確立による要因が多い。病原体の原因は変異しやすい RNA ウイルスが多く、過去と全く違う病態も存在する。細胞株に順化して分離した株の感染実験の多くは、自然感染の病態を反映しない。重要疾病には、CSF、口蹄疫、HPPRRS、PED 等、海外悪性伝染病が含まれ、病理学的検索はなされていない。病理の技術進歩を駆使して病理学的に検索し診断と予防に結びつける。

3. 研究の方法

東南アジアで、常在化している CSF、口蹄疫、HPPRRS の豚の越境感染症に絞って病理学的に検索する。研究遂行中に致死率が異常に高くワクチンもない日本に侵入すると大問題となるアフリカ豚熱 (ASF) がベトナムに大流行してとまって問題となったので緊急に調査対象とした。調査拠点を研究施設が整っているベトナム国立農業大学とする。材料収集は主にベトナム、ミャンマーを対象とする。ミャンマーはクーデターのため一部材料採取したが、継続不可能となった。申請者ら研究室卒業生が多く所属する東南アジア各国の研究組織との連携が材料採取には不可欠である。研究協力者は東南アジア出身の現留学生在が主体となることで、情報収集やその後の病理学的検索の効率が良くなる。病理学的研究が近年可能になった改善の理由は、抗体入手が困難でも、合成ペプチド、組換え抗原で抗体作製が可能となったこと、レーザー顕微鏡にて抗原局在部を明確にできること、組織内遺伝子の検出が可能となったことと東南アジアとのネットワークである。

CSF、HPPRRS、ASF の発生状況と発症豚を調査し病理学的材料を採取する。肉眼検査で病変所在部位を記載し、肺、リンパ節、脾臓、腎臓、肝臓、腸を含む主要臓器を採取し、中性緩衝ホルマリンで固定する。これらは繊細で技術移転が必要で、固定や標本作成に少し不備があると改正不可能となる。組織内の遺伝子検出を目的とするときは、固定をホルマリンから、パラホルムアルデヒドに変更するか、両方の固定法を実施する。遺伝子系統樹を作製する場合は生材料を各大学の冷凍庫に保存し、シーケンスはベトナム国立農業大学など、その国内で実施する。あるいは遺伝子抽出後シーケンスをその国でするか、外注するか、シーケンスできる国に運搬する。これらの材料は病気の発症と関連するので、研究協力者のもと発症場所で採取する。

以上の病理学的検索の困難さは以下のことが背景にあったが今回病理学的解析のために解決策が出てきた。ベトナムやミャンマーでは、顕微鏡も少なく診断に結びつく所見を記載する技術が未熟であるが、ネットワークや連携で解決する。抗体のラインナップが乏しかったが、近年多くの抗体が市販されるようになった。ウイルス粒子がないと抗体が作製できなかったが、組換え抗原や合成ペプチドが抗原として使用できるようになった。生体で感染細胞の同定困難さは、抗体により免染や二重染色で容易になった。

以前から、宮崎大学病理学教室卒業生(博士)は東南アジアの主要大学の教員となって活躍しており東南アジアと申請者との間に強いネットワークが以前から存在する。産業動物の病気に関してはPCRの発達とともに、PCR検査が簡易であるがために病理学的検査がほとんどなされていないことが多い。また、病理学は固定、パラフィン包埋から出発するがその点から未熟で(これから立て直すらしい)(ベトナム、ミャンマー)、東南アジアではこれらについて強いニーズがあり、産業動物の病態を明らかにするために病理学の技術や新技術が不可欠である。

4. 研究成果

東南アジアにおける日本の脅威となる豚の越境感染症のうち、豚コレラについて病理学的調査を実施した。2018年9月以降日本でも岐阜、愛知から新しい伝染病として各養豚場で大問題となっている。日本では殺処分されるため、自然例の病態を調べることは不可能であるが、増殖組織、排出部位、臨床症状

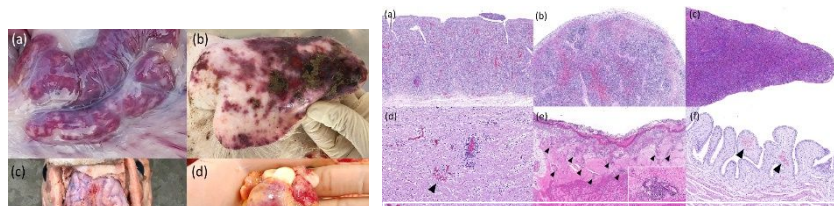


図2 CSF組織写真 a,扁桃 b,リンパ節 c, 脾臓 d,脳 e,胃 f,膀胱

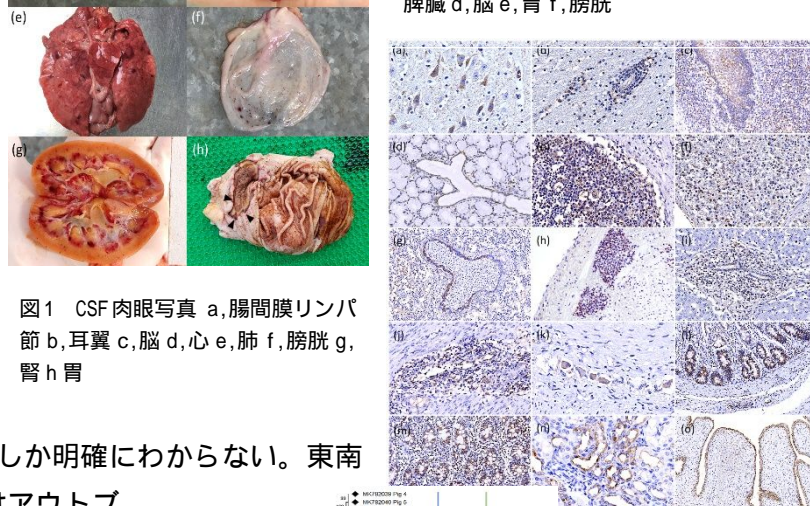


図3 CSF免疫組織写真 a,大脳 b,小脳 c,扁桃 d,唾液腺 e,リンパ節 f,脾臓 g, 肺 h,心臓 i,肝 j,胃 k,胃神経叢 l,小腸 m,大腸 n,腎臓

図1 CSF肉眼写真 a,腸間膜リンパ節 b,耳翼 c,脳 d,心 e,肺 f,膀胱 g, 腎 h 胃

の理由等は病理検査でしか明確にわからない。東南

アジアでは、豚コレラはアウトブレイクが頻発している。ベトナムの4県の異なった農場でアウトブレイクした20-50日齢の子豚と母豚の計12頭を豚コレラの病理学的検査を行いOIE推奨PCRで検査し急性症例で死亡率は10-70%であった。図1に示すように外貌は10頭のうち6頭の体幹部皮膚に発疹が、9頭の耳には斑状出血が見られた。共通した剖



図4 分離されたCSFウイルスの遺伝子系統樹が分離(病理検査したもの)

日本、愛知、岐阜 2019年7月23日：三重県

検所見としては脳の充血、下顎リンパ節の充出血、腸間膜リンパ節の充出血、耳にみられた斑状出血であった。その他、腎臓、膀胱粘膜と肺にも出血が見られた。図2に示すように組

組織学的には脾臓とリンパ節のリンパ球著明な減少と充血、急性膀胱炎（膀胱上皮の空胞変性）、扁桃の拡張とリンパ球の著明な減少、間質性気管支肺炎、非化膿性脳炎、心臓の血管炎、胆管周囲性肝炎、間質性腎炎がみられた。図3に示すように抗CSF抗体を用いた免疫化学染色を行い、脳、扁桃、唾液腺、リンパ節、肺、胃、小腸、大腸、腎臓に陽性を認めた。細胞では、リンパ球、上皮細胞、血管内皮、神経細胞に陽性、すなわち、ウイルス増殖が確認された。図4に示すように遺伝子型2.5を示した。ちなみに日本で発生しているCSFウイルスの遺伝子型2.1でとも中等度の病原性を示すタイプであった。

ベトナムで最初にASFアウトブレイクが報告されたのは2019年3月である。中国では2018年に発生し、致死率が高いため中国の豚の過半数は死亡されたとされている。その後ベトナム北部で記録され、

ベトナム南部まで2019年のうちに伝染していった。ワクチンはないので、全淘汰となる。高熱、横臥、嘔吐、食欲不振、皮膚の出血、呼吸不全、神経症状、嗜眠などの症状があり、それらの自然例について病理解剖する機会があった。8例の急性例を材料とした。図4は扁桃、リンパ節、脾臓であるが、病理学的にリンパ節、肝臓、脾臓、腎臓、心臓等の出血と壊死が主な病変であった。免疫染色では全身のマクロファージにASF抗原が陽性で、わずかの肝細胞と腎細胞に陽性がみられた。ASFV 2型の遺伝子型を示した。

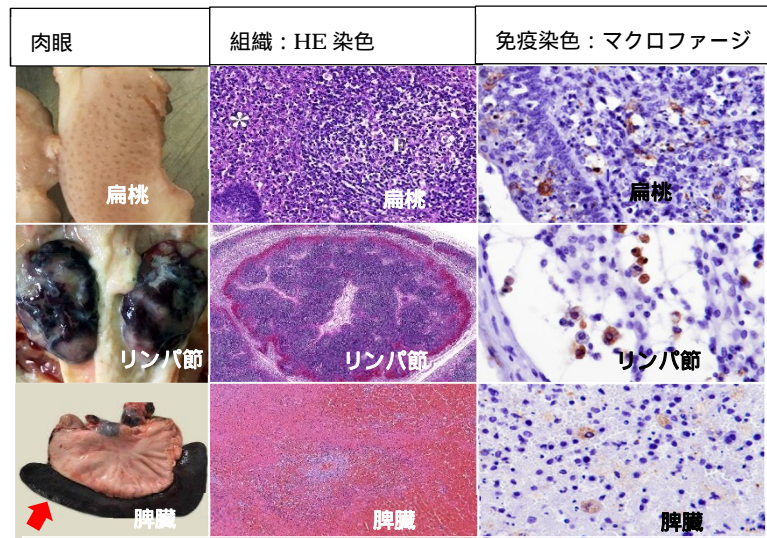


図5 ASF肉眼、組織、免疫組織学的染色の写真

さらに、豚のASF4例の回復例を論文にした。臨床的には異常はなく血清のASFV抗体は陽性を示した。病理学的にはリンパ組織、肺、心臓など罹患臓器に出血と壊死に対する生体修復反応である線維化が主な変化であった。ウイルス抗原は極少量見られ、定量PCRではASFVは陰性で消失していた。

さらに、豚のASF4例の回復例を論文にした。臨床的には異常はなく血清のASFV抗体は陽性を示した。病理学的にはリンパ組織、肺、心臓など罹患臓器に出血と壊死に対する生体修復反応である線維化が主な変化であった。ウイルス抗原は極少量見られ、定量PCRではASFVは陰性で消失していた。

CSF, ASF, 高病原性 PRRS はリンパ節に出血がみられ、肉眼的、臨床的に類似点が多く、鑑別しなければならないが、今回の結果を含めた病理学的解析により、日本の脅威となる豚の越境感染症の病理発生の違いを知りうる知見を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Izzati Uda Zahli, Hoa Nguyen Thi, Lan Nguyen Thi, Diep Nguyen Van, Fuke Naoyuki, Hirai Takuya, Yamaguchi Ryoji	4. 巻 7
2. 論文標題 Pathology of the outbreak of subgenotype 2.5 classical swine fever virus in northern Vietnam	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Veterinary Medicine and Science	6. 最初と最後の頁 164 ~ 174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/vms3.339	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Izzati Uda Zahli, Inanaga Minori, Hoa Nguyen Thi, Nueangphuet Phawut, Myint Ohnmar, Truong Quang Lam, Lan Nguyen Thi, Norimine Junzo, Hirai Takuya, Yamaguchi Ryoji	4. 巻 67
2. 論文標題 Pathological investigation and viral antigen distribution of emerging African swine fever in Vietnam	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transboundary and Emerging Diseases	6. 最初と最後の頁 2589-2601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tbed.13851	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Van Diep Nguyen, Chojookhuu Narantsog, Fuke Naoyuki, Myint Ohnmar, Izzati Uda Zahli, Suwanruengsri Mathurot, Hishikawa Yoshitaka, Yamaguchi Ryoji	4. 巻 67
2. 論文標題 New tropisms of porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) in pigs naturally coinfecting by variants bearing large deletions in the spike (S) protein and PEDVs possessing an intact S protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transboundary and Emerging Diseases	6. 最初と最後の頁 2589 ~ 2601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tbed.13607	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Van Diep Nguyen, Chojookhuu Narantsog, Fuke Naoyuki, Myint Ohnmar, Izzati Uda Zahli, Suwanruengsri Mathurot, Hishikawa Yoshitaka, Yamaguchi Ryoji	4. 巻 68
2. 論文標題 New tropisms of porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) in pigs naturally coinfecting by variants bearing large deletions in the spike (S) protein and PEDVs possessing an intact S protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transboundary and Emerging Diseases	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tbed.13607	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Myint Ohnmar, Yoshida Ayako, Sekiguchi Satoshi, Van Diep Nguyen, Fuke Naoyuki, Izzati Uda Zahli, Hirai Takuya, Yamaguchi Ryoji	4. 巻 15
2. 論文標題 Development of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of porcine epidemic diarrhea virus specific antibodies (IgG) in serum of naturally infected pigs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Veterinary Research	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12917-019-2123-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Van Diep N, Sueyoshi M, Norimine J, Hirai T, Myint O, Teh APP, Izzati UZ, Fuke N, Yamaguchi R	4. 巻 14
2. 論文標題 Molecular characterization of US-like and Asian non-S INDEL strains of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) that circulated in Japan during 2013-2016 and PEDVs collected from recurrent outbreaks.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Veterinary Research	6. 最初と最後の頁 96-107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12917-018-1409-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Uda Zahli Izzati, Nguyen Thi Hoa, Nguyen Thi Lan, Nguyen Van Diep, Takuya Hirai, Ryoji Yamaguchi
2. 発表標題 Pathological study of subgenotype 2.5 classical swine fever virus endemic in Northern Vietnam
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会、つくば国際会議場
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryoji YAMAGUCHI
2. 発表標題 Pathological studies of possible transboundary diseases in pigs
3. 学会等名 アジア獣医病理学会、ベトナム (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohnmar Myint, Ayako Yoshida, Satoshi Sekiguchi, Nguyen Van Diep, Naoyuki Fuke, Uda Zahli Izzati, Takuya Hirai, Ryoji Yamaguchi*
2. 発表標題 Development of Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Detection of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Specific Antibodies (IgG) in Serum of Natural Infected Pigs
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会、つくば国際会議場
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ミャンマー獣医学大学とも進めていたがクーデターにより中断された。さらに、国情があり、共同として研究を進めにくいところもあった。

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	乗峰 潤三 (Norimine Junzo) (30627667)	宮崎大学・農学部・教授 (17601)	
研究分担者	菱川 善隆 (Hoshikawa Yoshitaka) (60304276)	宮崎大学・医学部・教授 (17601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
ベトナム	VietnamNationalUniversityofAgriculture		