別記様式第２号

19年度先端技術を活用した農林水産研究高度化事業事後評価用報告書

研究課題名	「口蹄疫を対象とした輸入検疫措置に関する研究（課題番号1792）」	研究期間	平成17～19年度

I　研究の概要

ワクチンを接種した国や地域では、感染との識別が重要となるため、その識別手法の調査・分析を行い、豚における識別法を開発した。さらに、口蹄疫ワクチン接種清浄国からの畜産物の輸入に備え、清浄性確認の評価手法を確立する目的で、牛と豚に口蹄疫ワクチンを接種し，その抗体の経時的動態を解析した。一方、解禁要請やＳＰＳ協定等に基づく諸外国からの要求に対応するため、各国における口蹄疫の流行の様相や防疫措置を現地視察、文献、資料を通じて調査分析し、ワクチン接種、ゾーニング、摘発淘汰措置などを詳細に検討した。さらに、それらの検討を踏まえ、口蹄疫の輸入リスク評価に当たって考慮すべき要因を明らかにした。

１．成果の内容

１）豚における口蹄疫ウイルス感染とワクチン接種による抗体の識別法の開発

一般に、口蹄疫清浄国で本病が発生した場合、その防疫対策として、感染動物の摘発淘汰と移動制限が行なわれる。しかし、摘発淘汰される動物の頭数が多数となる場合があるため、近年では限定的な緊急ワクチン接種が認められる傾向にある。その際、清浄性確認では感染個体とワクチン接種個体を識別する検査法が必要となる。これまで、牛では群単位でこれらを識別可能であることが報告されているが、他の偶蹄類動物では報告されていない。今回、口蹄疫ウイルスの組換え非構造蛋白質2Cおよび3Dを抗原としたウェスタンブロッティング法により、豚においてウイルス感染個体とワクチン接種個体の識別が可能となり、緊急ワクチン接種を行なった場合でも、感染豚の摘発に対しても応用が期待される。（表１，２；ｐ８）

２．成果の活用

今後、この開発された識別方法は、口蹄疫が発生してワクチンを用いて防圧を行なわれた場合に活用される。国外においては、現在ワクチン接種を実施している国や地域での清浄性の確認のための利用が考えられる。

１）「Differentiation of foot-and-mouth disease virus infected pigs from vaccinated pigs using a western blotting assay based on baculovirus expressed nonstructural proteins 2C and 3D」、Katsuhiko FUKAI, Kazuki MORIOKA, Seiichi OHASHI, Reiko YAMAZOE, Kazuo YOSHIDA, Kenichi SAKAMOTO、Japan Agricultural Research Quarterly (JARQ)、投稿中

２）「豚における口蹄疫ウイルス感染とワクチン接種による抗体の識別検査」、深井克彦、森岡一樹、大橋誠一、山添麗子、吉田和生、坂本研一、平成19年度動物衛生成果情報、No.7、＊、2008.3

３）「Differentiation of foot-and-mouth disease virus (FMDV) infected pigs from

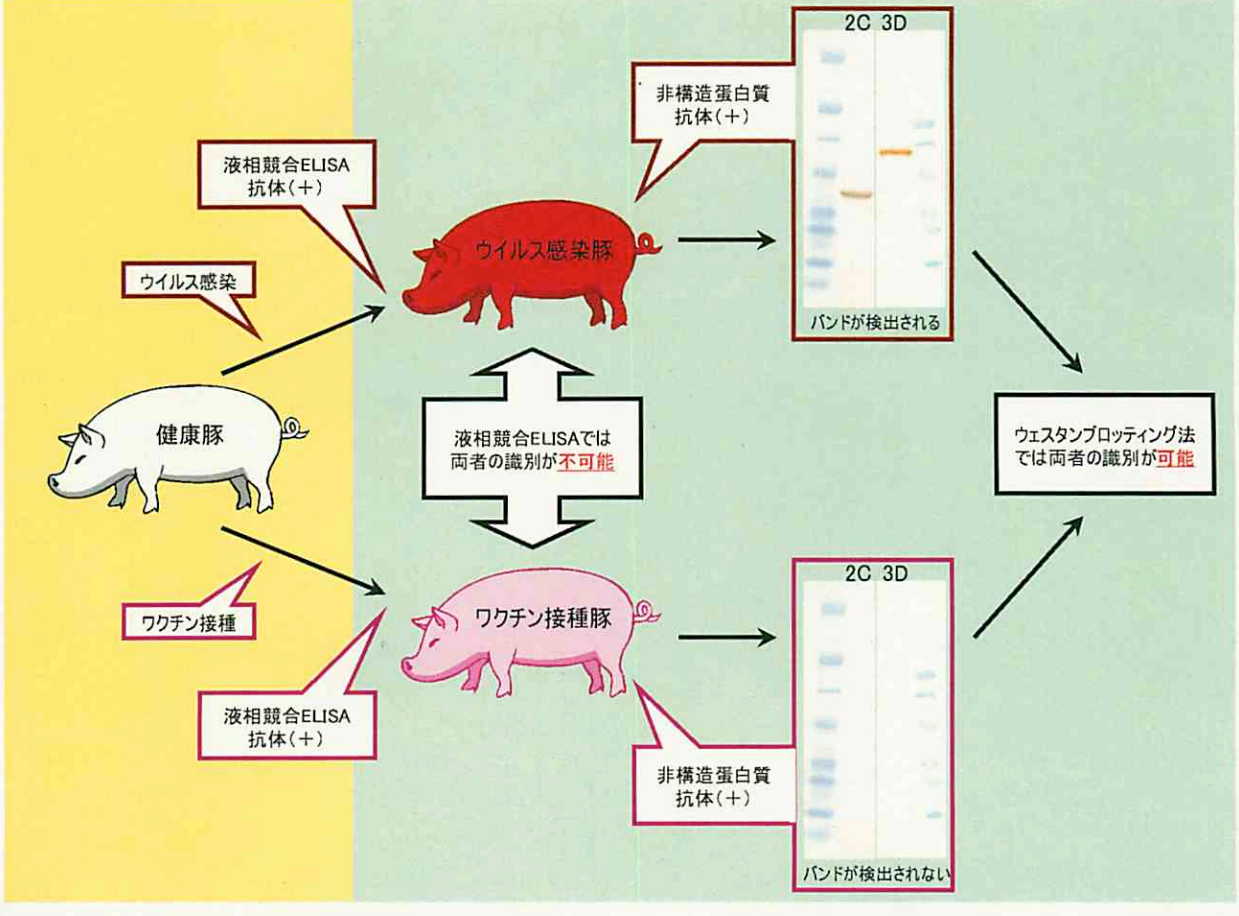
vaccinated pigs using a western blotting (WB) assay based on baculovirus expressed FMDV 2C and 3D antigens」、Katsuhiko Fukai, Kazuki Morioka, Seiichi Ohashi, Reiko Yamazoe, Kazuo Yoshida, Sakamoto Kenichi、13th international world association of veterinary laboratory diagnosticians symposium (Symposium proceedings) (2007.11)

4）口蹄疫ウイルス非構造蛋白質2Cによる豚での感染抗体とワクチン抗体の識別、山添麗子、森岡一樹、深井克彦、大橋誠一、吉田和生、坂本研一、第55回日本ウイルス学会集会（2007.11）

5）「口蹄疫の抗体識別」、山添麗子、森岡一樹、深井克彦、大橋誠一、吉田和生、坂本研一、水曜会（動物衛生研究所）(2008.2)

6）「口蹄疫ウイルス非構造蛋白を用いた抗体識別の検討」，吉田和生、森岡一樹、深井克彦、大橋誠一、山添麗子、坂本研一，第144回日本獣医学会学術集会（2007.9）

3．主なデータ・図表



Ⅱ　研究実績報告

１．中課題名「ワクチン接種動物と感染動物との鑑別手法の調査・分析」

近年、口蹄疫清浄国で本病が発生した場合、限定的な緊急ワクチン接種が認められる傾向にある。その際、清浄性確認では感染個体とワクチン接種個体を識別する検査法が必要となる。口蹄疫ウイルスの組換え非構造蛋白質 2C と 3D を用いて、豚で感染個体とワクチン接種個体をウェスタンブロッティング法により、豚においての識別が可能となり、緊急ワクチン接種を行なった場合でも、感染豚の摘発に有用である。

（１）小課題名「口蹄疫不活化ワクチン接種動物と感染動物の識別のための調査・分析」

18 年度で本小課題は予定通り調査を完了した。

（２）小課題名「牛以外の口蹄疫感受性動物、特に豚におけるワクチン及び感染抗体識別手法の開発」

18 年度からの開始課題である。

１）研究の進捗結果

18～19 年度に国内において豚の口蹄疫感染血清ならびにワクチン接種血清（中課題２）を作出した。その血清を用いて、18 年度に口蹄疫ウイルス（FMDV）接種豚における抗 3D 抗体の検出を行った。FMDV 接種豚 6 頭中 3 頭においてウェスタンブロッティング法（WB）および寒天ゲル内沈降法（AGID）により抗 3D 抗体が検出された。

19 年度には、豚を用いて作製したワクチン接種血清ならびに感染経過血清を用いて、それら抗体の識別法を検討した。口蹄疫ウイルスの組換え非構造蛋白質 2C および 3D を抗原としたウェスタンブロッティング法により、豚においてウイルス感染個体とワクチン接種個体の識別が可能となり、緊急ワクチン接種を行なった場合でも、感染豚の摘発に活用が期待される。

２）成果の内容

１．国内において豚の口蹄疫感染血清を口蹄疫ウイルス（FMDV）感染豚における抗 3D 抗体の検出を行い、FMDV 感染豚 6 頭中 3 頭においてウェスタンブロッティング法（WB）および寒天ゲル内沈降法（AGID）により抗 3D 抗体を検出した。

２．口蹄疫ウイルス感染豚３頭の経過血清中の抗体を、2C と 3D 蛋白質を抗原としたウェスタンブロッティング法により検査したところ、ウイルス感染 6 日後から抗体が検出され、41 日後まで継続的に抗体が検出された（表１）。

３．口蹄疫ワクチン接種豚４頭の経過血清中の抗体を、2C と 3D 蛋白質を抗原としたウェスタンブロッティング法により検査したところ、ワクチン接種 210 日後まで、抗体は検出されなかった（表２）

４．2C と 3D 蛋白質を抗原とした WB 法では、ウイルス感染豚からのみ抗体が検出され、ワクチン接種豚では抗体が検出されなかった。このことから、本法により、口蹄疫ウイルス感染豚とワクチン接種豚が識別可能であると考えられた。

３）成果の活用面・留意点

１．今後、この開発された識別方法は、口蹄疫が発生してワクチンを用いて防圧を行なわれた場合に活用される。　国外においては、現在ワクチン接種を実施している国や地域での清浄性の確認のための利用が考えられる。

２．国内では保有していないが、小課題１「**口蹄疫不活化ワクチン接種動物と感染動物の識別のための調査・分析**」で調査した口蹄疫診断研究所が保有する野外感染血清やワクチン接種血清を用いて本法を評価する必要がある。された問題点等を簡潔に記載。

４）具体的なデータ

表1　口蹄疫ウイルス感染豚における抗体の推移

感染後	豚1			豚2			豚4		
日数	2C-WB[a]	3D-WB[b]	LPBE[c]	2C-WB	3D-WB	LPBE	2C-WB	3D-WB	LPBE
0	NT[d]	−	<32	−	−	<32	−	−	<32
5	NT	−	362≦	NT	−	362≦	NT	−	362≦
6	NT	−	362≦	NT	+	362≦	NT	−	362≦
8	NT	−	362≦	NT	+	362≦	NT	+	362≦
11	NT	+	362≦	+	+	362≦	+	+	362≦
26	NT	+	362≦	+	+	362≦	+	+	362≦
41	NT	+	362≦	+	+	362≦	+	+	362≦

[a]バキュロウイルス発現2C蛋白質を抗原として用いたウェスタンブロッティング法
[b]バキュロウイルス発現3D蛋白質を抗原として用いたウェスタンブロッティング法
[c]口蹄疫ウイルスAsia1 Shamir株を抗原として用いた液相競合ELISA
[d]未実施

表2　口蹄疫ウイルスワクチン接種豚における抗体の推移

接種後	豚1			豚2			豚3			豚5		
日数	2C-WB[a]	3D-WB[b]	LPBE[c]	2C-WB	3D-WB	LPBE	2C-WB	3D-WB	LPBE	2C-WB	3D-WB	LPBE
0	−	−	<32	NT[d]	−	<32	NT	−	<32	−	−	<32
35	−	−	362≦	NT	−	362≦	NT	−	362≦	−	−	362≦
70	−	−	362≦	NT	−	362≦	NT	−	362≦	−	−	362≦
140	−	−	362≦	NT	−	362≦	NT	−	362≦	−	−	362≦
210	−	−	362≦	NT	−	362≦	NT	−	362≦	−	−	362≦

[a]バキュロウイルス発現2C蛋白質を抗原として用いたウェスタンブロッティング法
[b]バキュロウイルス発現3D蛋白質を抗原として用いたウェスタンブロッティング法
[c]口蹄疫ウイルスAsia1 Shamir株あるいは01 Manisaを抗原として用いた液相競合ELISA
[d]未実施

２．中課題名「ワクチン抗体の経時的動態調査」

ワクチン接種状況も含めた口蹄疫清浄性確認のための評価の手法を検討するため、牛および豚に口蹄疫ワクチン血清型OおよびAsia 1をそれぞれ接種し，ワクチン抗体を経時的に測定し，体内でのワクチン抗体の経時的動態を共同研究機関とともに詳細に調査検討した。その結果、ワクチン抗体の推移が牛および豚で初めて明らかとなり，口蹄疫の防圧時にワクチンを用いる際の基礎的なデータが作出された。

１）研究の進捗結果

17 年度はワクチン接種前の牛および豚において、口蹄疫ウイルスに対する抗体測定を WRL LP-ELISA 法および中和試験にて測定し、ワクチン接種後の抗体の経時的動態調査を行うことに適しているかを検討した。その成果を受けて 18 年度は口蹄疫ワクチン血清型 O および血清型 Asia 1 を牛 2 頭および豚 3 頭ずつに接種し，その抗体価の推移を LP-ELISA および中和試験にて測定し，さらに次年度用いる牛および豚の選択を行った。19 年度はデータをより詳細なものとするために再度口蹄疫ワクチンを牛および豚に同様に接種してその抗体価の推移を同様に測定し，前年度のデータと併せて，共同研究機関とともに解析を

行った。

2）成果の内容

1．口蹄疫ウイルス血清型Oおよび Asia 1 に対するワクチンとも抗体価の推移は LP ELISA 抗体および中和抗体でほぼ同様の推移を示した。抗体価は牛豚ともに接種後 3ー6 日目から抗体が上昇し、1ー2 週間前後で一次的なピークを示し，抗体価は若干下降するが，3 週前後から上昇し，10ー20 週で 2 次的なピークを示すことが明らかとなった（図 1,2,3,4）。

2. 抗体価を牛および豚で比較すると 2 次的なピークは豚の方が高く，血清型で比較すると，O より Asia 1 の方が高いことが明らかとなった（図 1,2,3,4）。

3. 18 年度および 19 年度の接種試験は血清型 O および Asia 1 とも同じロットのワクチンを用いているが，結果的に 19 年度は有効期限に近いものを用いた。そこで，18 年度および 19 年度でそれぞれの抗体価の推移を比較すると，血清型 O および Asia 1 とも 2 次的なピークの抗体価は殆ど変わらないが，18 年度ではその後抗体価が比較的維持されていたのに対し，19 年度では抗体価は急激に下降することが明らかとなった（図 1,2,3,4）。

3）成果の活用面・留意点

1．ワクチン接種状況も含めた口蹄疫清浄性確認のための評価の手法を検討することが可能となった。また，口蹄疫の防圧時にワクチンを用いる際の基礎的なデータとして活用できる。

2. 本血清がワクチン抗体と感染抗体の識別に対する研究に活用されている。

3. 他の血清型に対して行う必要があること，頭数が少ないこと，本実験は 1 回接種で抗体価の推移を検討したが，複数回の接種による検討が必要であることが問題点として残る。

4）具体的なデータ

図１－４（別紙参照）

3．中課題名「口蹄疫に関するリスクの評価」

1）研究の進捗結果

18 年度は口蹄疫のワクチン接種について、国際的な基準・指針や諸外国の制度などを網羅的に調査分析し、ワクチン接種戦略について体系的にとりまとめた。また、口蹄疫ワクチンに関する最新の知見を収集分析し、ワクチン接種に伴う問題点を分析した。19 年度は、口蹄疫ワクチン接種国などが一部地域を清浄化し輸出する場合（地域主義）のリスク評価の方法について検討するため、国際的な情報を収集分析するとともに、実際にこれらのリスク評価を実施している国や地域主義を適用している国の現地調査を実施した。それらの結果に基づいて、口蹄疫に関して地域主義を適用した場合の輸入リスク評価において考慮すべき項目を検討した。

2）成果の内容

1．近年、国際機関などでは口蹄疫ワクチンをより積極的に防疫対策に活用する方向で検討が進められており、それを受けて口蹄疫発生時のワクチン使用を容認する方向で検討している国（EU、豪州）があることが明らかとなった。

2．ワクチンの使用に関して技術的な進展は認められるものの、ワクチン抗体と感染抗

体の識別方法、ワクチン接種動物の個体管理や利用方法、経済的妥当性の検証に問題があることが明らかとなった。

3．一国内の一部地域を評価する場合には、周辺地域の口蹄疫発生リスクや獣医組織などを定性的リスク評価の手法を用いて網羅的に評価する必要性がある。

4．定性的なリスク評価において、重点的に評価すべき事項として、5つの大項目と24の小項目からなる評価項目を提示し、それぞれについて評価する際の視点を明示した。（図5）

3）成果の活用面・留意点

1．ワクチン接種や地域主義に関する事項は国際基準に盛り込まれている。今回得られた成果は行政が実際にこれらの措置に基づく輸入検疫措置を検討する上で有用であると考えられる。

2．実際のリスク評価に当たっては、評価対象となる疾病や地域の状況によって、重点的に評価すべき事項が異なる場合があることに留意する必要がある。

4）具体的なデータ

図5（別紙参照）

別紙　（図１－５）

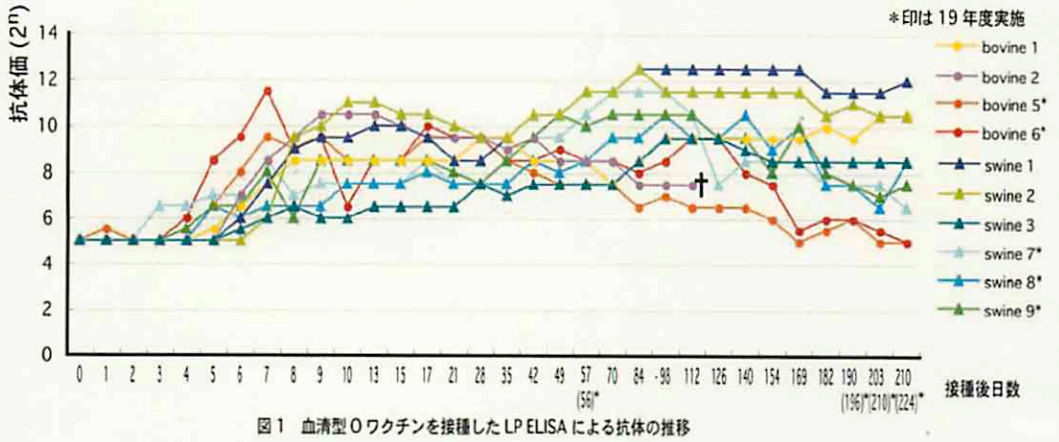


図１　血清型Ｏワクチンを接種した LP ELISA による抗体の推移

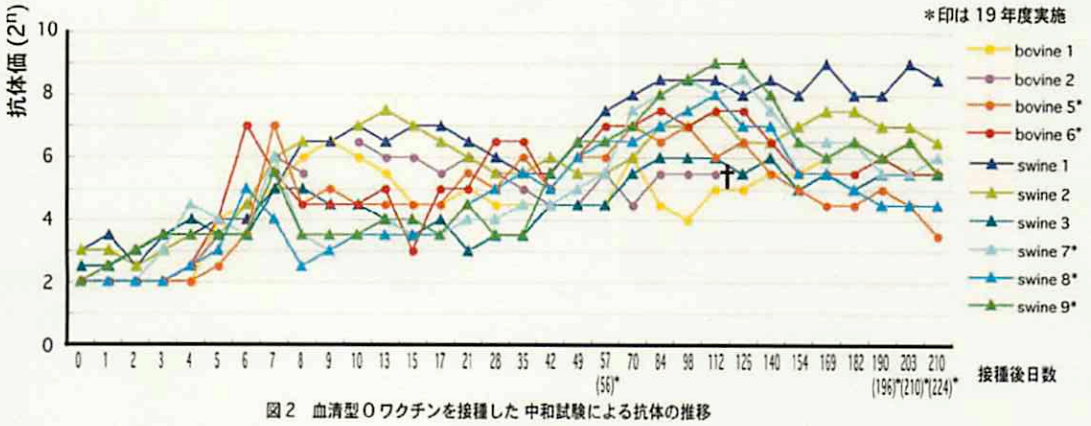


図２　血清型Ｏワクチンを接種した 中和試験による抗体の推移

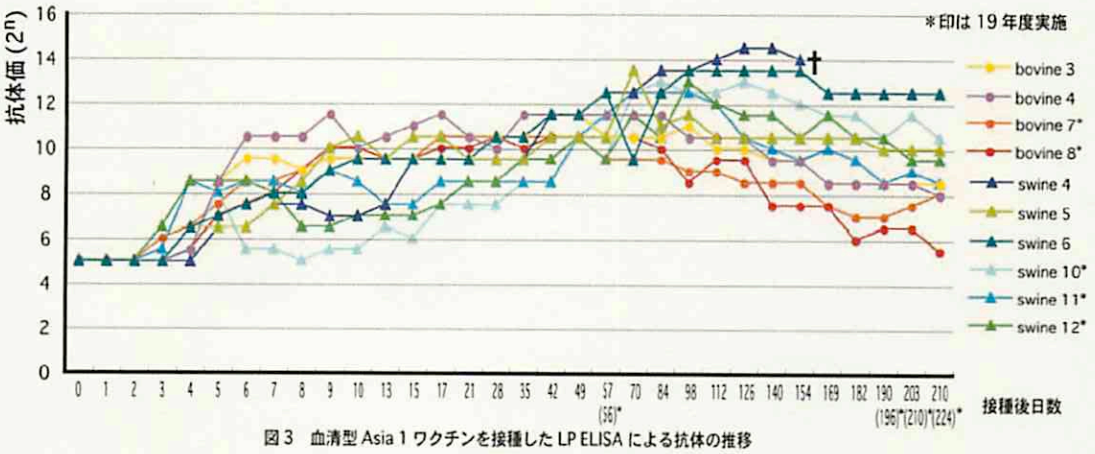


図３　血清型 Asia 1 ワクチンを接種した LP ELISA による抗体の推移

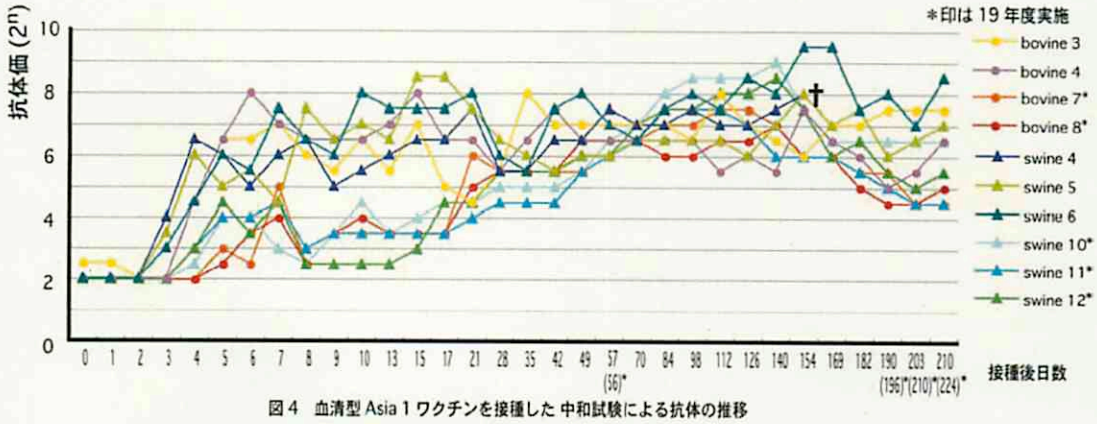


図４　血清型 Asia 1 ワクチンを接種した 中和試験による抗体の推移

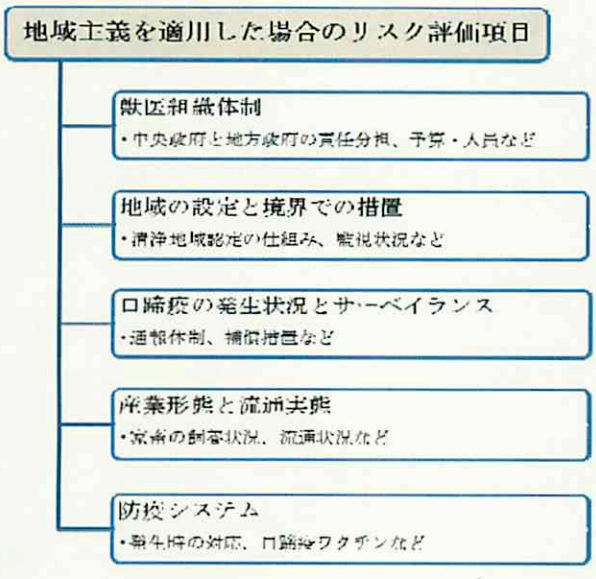


図５　口蹄疫に関して地域主義を適用する場合のリスク評価項目