

日生研おより

2016年(平成28年)3月号 第62巻 第2号(通巻597号)

挨拶・巻頭言

コンプライアンスを考える…笹川千尋(2)

獣医病理学研修会

第54回 No. 1099 マウスの腹腔内腫瘍
……………残留農業研究所(3)

レビュー

アフリカ豚コレラ
…杉浦勝明・J.M. Sánchez-Vizcaino(4)

学会参加記

7th Asian Pig Veterinary Society
Congress (APVS2015) 参加記
場所：フィリピン・マニラ
期間：2015年10月25日～27日
……………竹山夏実・堤 信幸(10)

文献紹介

Mycoplasma bovis の病原性、持続感染
および播種……………近内将記(15)

お知らせ

編集後記……………(20)



コンプライアンスを考える

笹川千尋

昨年この覧では、次世代の更なる発展に願いを込めて「課題立国」を取り上げた。これに関連して嬉しい出来事も多くあった。特に10月は二人の日本人ノーベル賞受賞決定のニュースには国中が沸き返った。又秋に開始されたラグビーワールドカップにおける南アフリカ戦での日本チームの勝利にも興奮した。さらに地味ではあるが、農産物の昨年上半期の輸出総額(3,547億円)が前年比24.9%増加したことも、海外での和食ブームと訪日外国人の増加とも相まって、将来への明るいニュースとなった。

さて一方で、昨年は大企業において不正会計、データ改ざん、産地偽装等、コンプライアンス違反に関する不祥事が続発した特異な年でもあった。いずれの場合も、長期間に及ぶコンプライアンス違反があり、それが発覚したのが昨年たまたま多くあったとも言えよう。ところで、もともとは「法令遵守、内規遵守」等が使われていたはずだが、今や誰もが知っている「コンプライアンス」という言葉は、何故広く使われるようになったのだろうか。一説によれば、「コンプライアンス」は「コーポレートガバナンスの基本原則」の一つとして、大企業や外資企業が、その「カタカナ」の新鮮な響きから、社会規範や企業倫理に基づき企業経営していることをアピールするために使い始め、それが日本の社会に合うように独自に進化して日常語として定着したと言われている。又極端な成果主義から生ずる、不正、不公平、道義違反、商慣行逸脱、手順書の形骸化に社会的制裁を科す必要性が増えていることもその背景にあるのだろう。実際に、どんな職場であれ、一人に課せられる仕事量は年々多くなる一方、与えられる時間、予算、人員は以前に比べて少なくなり、結果として、「不正行為の防止」と「競争力・収益率の向上」を両立させることが難しくなり、これもコンプライアンス軽視の一因になっていると指摘されている。しかしそれを理由に、コンプライアンスをおろそかにすることは許されない。

海外でも昨年は、FIFA連盟の汚職事件やフォルクスワーゲン社の排ガス不正問題で世界中が驚かされた。1937年創業の名門フォルクスワーゲン社の長年に及ぶ排気ガスデータの捏造では、企業はむろんの事、科学技術立国を標榜する「ドイツブランド」にまで傷がついた。ここで私と長年共同研究してきたフランス、ストラスブール大学の教授がつぶやいた言葉を思い出した。彼とは偶然にも昨年10月にソウル大学のある記念シンポジウムに招かれた。その夜の懇親会の席で、「あの事件以来、フォルクスワーゲン社がテレビコマーシャルで流す、“Volkswagen: das Auto!”という自己陶酔的なセリフが空しくきこえる」と私に耳打ちした。彼が長年隣国のジーゼル車を愛用していたことをふと思い出した。

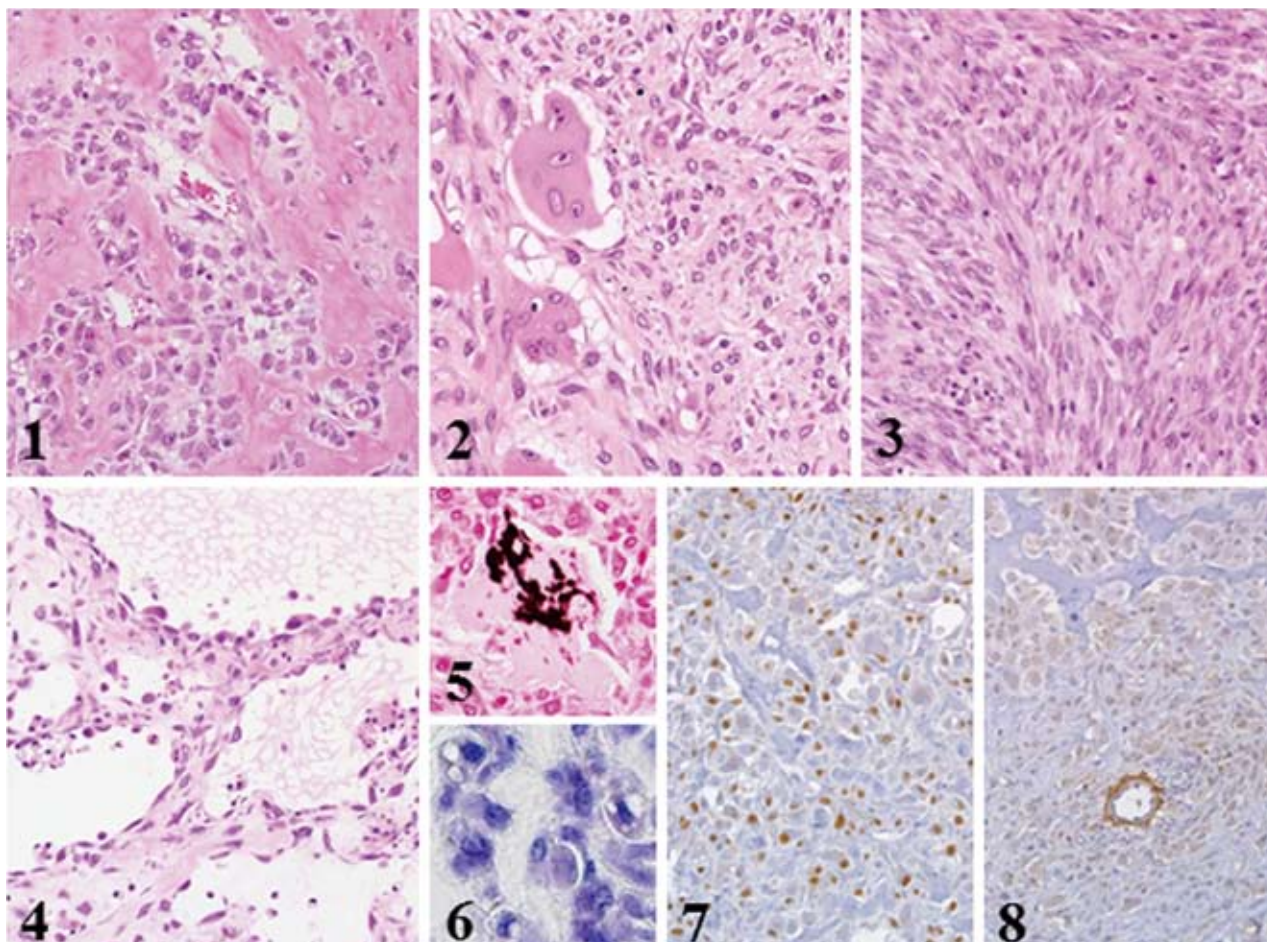
又、年末来日したフランスの古い友人からは、TGV(フランス高速鉄道)脱線事故の顛末を聴かされ、これにも驚愕した。パリテロ事件の翌日、11月14日土曜日の日本の新聞でも報道され記憶している人も多いと思う。フランス・ストラスブール近郊で発生した、死者11名、負傷者7名の惨事である。TGVは、パリ-ストラスブール間を2時間19分で走っている。フランス国有鉄道(SNCF)は、さらなる時間短縮のためにカーブをより穏やかにした新路線を建設した。本年4月開業目前の総仕上げの高速試験運転中に惨事は起こった。土曜日の試験運転ということもあり、SNCFの技術者とともに招待された関係者家族も同乗していた。運転室には3名までとする厳格な入室規定は無視され、7名が狭い運転室に入り込み、又別の車両には関係者の子供数名も無許可で同乗していた。ストラスブールまであと12kmの最後の緩やかなカーブ手前では、TGVは時速170kmに減速することが運行規定で定められていた。運転席に招き入れた7名との会話が盛り上がっていたかは定かではない。時速340kmで走行中の運転手は、カーブ突入の10秒前にあわててブレーキ操作を行ったが、総てはあとの祭りであった。時速240kmの猛スピードでカーブへ突入したTGVは軌道から大きく逸脱・大破し、最後部の車両は路線を横切る運河へと沈んだ。この事故調査の結果、SNCFの威信は深く傷つき、総裁の怒りの会見がフランスのテレビでは大きく報道されたようだ。

いずれの不祥事においても、個人とその属する組織に日常的なコンプライアンス軽視の風土があったことは否めない。誰もが経験するように、忙しい現代社会では結果や成果を急ぎ求め過ぎる。またプロセスよりも結果至上主義に陥りやすい。故事にあるように、「急いては事を仕損じる」は、私自身への戒めも込めてこの拙文の結びとしたい。

(常務理事・所長)

マウスの腹腔内腫瘍

第 54 回獣医病理学研修会 No. 1099 残留農薬研究所



動物：マウス、ICR[Crlj:CD1(ICR)]、雌、77 週齢。

臨床事項：本例は農薬の発がん性試験に用いた投与群の動物で、投与 72 週時に全身状態悪化のため切迫殺されたものである。当該腫瘍は投与 68 週より臨床的にも腹部の腫瘍として触知され、切迫殺時の大きさは $30 \times 15 \times 10 \text{ mm}$ であった。

剖検所見：右腹側皮下から腹腔内にかけて $45 \times 30 \times 25 \text{ mm}$ の白色腫瘍が認められた。ホルマリン固定後の断面は、白色充実性で一部腫瘍の周辺部では空隙が観察された。

組織所見：皮下織から腹腔内にかけて以下のように 4 つの増殖パターンを示す腫瘍組織を認めた。①多角形腫瘍細胞が類骨様の好酸性基質を伴い充実性に増殖 (図 1)。一部の細胞は小空隙を有す。②短紡錘形腫瘍細胞が好酸性細胞質を有する多核細胞を伴い不規則なシート状に増殖 (図 2)。③紡錘形腫瘍細胞が束状に増殖 (図 3)。④短紡錘形腫瘍細胞が嚢胞状に増殖 (図 4)。特殊染色では、①でみられた類骨様基質はわずかにコッサ反応陽性 (図 5) で、腫瘍細胞の小空隙はオイル赤 O 陰性だった (図 6)。免疫染色では、いずれの腫瘍細胞も同様の染色態度を示し、vimentin、PCNA、osterix (図 7) に陽性、SMA に弱陽性 (図 8) であった。②でみられた多核細胞は desmin 陽性、vimentin 弱陽性、osterix 陰性だった。(図 : Reproduced with permission of the

Japanese Society of Toxicologic Pathology from Ito T. et al. Spontaneous extraskelatal osteosarcoma with various histological growth patterns in the abdominal wall of an ICR mouse. *J. Toxicol. Pathol.* **29** : in press, 2016)

診断：骨外性骨肉腫

考察：本腫瘍は顕著な多形性、腹腔内への強い浸潤性、高い増殖活性を有しており、骨芽細胞のマーカー osterix に陽性で、類骨基質を認めるため、悪性の骨腫瘍が疑われた。しかし、肉眼・組織学的検査いずれにおいても既存の骨との連続性が認められなかったことから「骨外性骨肉腫」と診断した。上記②でみられた多核細胞は免疫染色結果から腫瘍細胞ではなく再生性の横紋筋と考えた。本発がん性試験では同様の腫瘍発生はなく、自然発生性の症例と考えられる。マウスにおける自然発生性の骨外性骨肉腫は極めて稀で、多彩な増殖パターンを認める点が本症例の特徴であった。本腫瘍の由来は不明であるが、腫瘍細胞が SMA 弱陽性であることから、過去の報告^{1,2)}を参考に血管周皮細胞あるいは筋線維芽細胞であると推察した。(伊藤 強)

参考文献：

1. Wijesundera, K.K. et al. 2013. *J. Toxicol. Pathol.* **26** : 309-312.
2. Hemingway, F. et al. 2012. *Virchows Arch.* **460** : 525-534.

アフリカ豚コレラ

杉浦 勝明 (評議員、東京大学大学院農学生命科学研究科)
J.M. Sánchez-Vizcaíno (マドリッド・コンプルテンセ大学獣医学部)

アフリカ豚コレラ (ASF) は豚およびイノシシに重篤な症状を引き起こす疾病であり、アフリカに常在する。その原因となる ASF ウイルスは極めて伝染力が強く、一旦侵入すると豚群内で直接または間接接触により急速に拡がる。ASF ウイルスは豚肉製品中や環境中に長期間生存する。野生のイノシシで常在化することがある。ヒメダニ (*Ornithodoros*) に定着することもある。この疾病に対するワクチンは未だ開発されておらず、治療法もない [21]。

ASF は、アフリカ以外では、かつてヨーロッパの一部の国、カリブ海諸国、南米にも侵入したことがある。最近では、アフリカにおいて発生が増加するとともに、2007 年以降、コーカサス諸国、ロシア、東欧諸国に侵入し、大きな経済被害をもたらしている。養豚生産の大規模化および人の国際交流の増大により本病の国際的なまん延のリスクは高まり、世界の養豚産業にとって大きな脅威となっている [21, 27]。

病原体

ASF ウイルスは、*Asfarviridae* 科の *Asfivirus* 属に分類され、節足動物により媒介される唯一の二本鎖 DNA ウイルスである。170 ~ 190kb の大きなゲノムを有し、100 以上の構造タンパクからなる複雑な構造をしたウイルスである。ASF ウイルスは中和抗体を生じないことから、抗原型の違いは確認されていないが、vp72 蛋白の制限酵素分析によりウイルスの遺伝子型の特特定が可能である。現在までに 22 の遺伝子型が確認されている [1]。ASF ウイルスには、極めて病原性が高くほとんどの豚を死亡させるものから、抗体陽性を示すだけのものまで様々ある [5]。一般に、高病原性、中病原性、低病原性に分類され、高病原性の株は一般に甚急性型または急性型 (感染 3 ~ 8 日後に死亡) を生じる。中病原性の株は、急性型 (感染 11 ~ 15 日後に死亡) および亜急性型 (20 日後に死亡) を生じる。慢性型に関与するウイルス株は中 ~ 低病原性であり、かつてスペイン、ポルトガルおよびドミニカ共和国で常在化した時期にのみ観察された [22, 24]。

感受性動物

ASF ウイルスはすべての豚科の動物 (*Suidae*) に感染する。すなわち、家畜の豚、ヨーロッパイノシシ、イボイノシシ (*Phacochoerus africanus*)、ヤブイノシシ (*Potamochoerus porcus*)、シンリンイノシシ (*Hylochoerus spp.*)、ペッカリー (*Tayassu spp.*) に感染する。このうち発症するのは、家畜の豚、ヨーロッパイノシシで、それ以外の動物種では発症せず、アフリカではイボイノシシはダニとともに生活環を形成しレゼルボアとなっている [19, 20, 30]。米大陸に生息するペッカリーも発症せず、レゼルボアとなると言われている [28]。

臨床症状および病理所見

ASF の症状には、原因となるウイルス株の病原性、感染経路、ウイルス量、宿主の状態により甚急性、急性、亜急性および慢性型がある。清浄農場に少量の ASF ウイルスが侵入した場合には発熱と一部のリンパ節の出血を生じるくらいで、高い死亡率や典型的な症状を示さない。この場合、数日後にウイルスの増殖に伴い高い死亡率と典型的な臨床症状と病変を伴う爆発的な発生が観察される [22]。

甚急性型の特徴は、高熱 (41 ~ 42°C)、食欲消失、静止、過呼吸、皮膚の充血と突然死で病変はほとんど見つからない [22, 24]。

急性型は、高熱 (40 ~ 42°C)、元気・食欲消失、横臥を特徴とする。皮膚に青紫色の変色や出血斑がみられ、これらの変色は、特に皮膚の白い豚では顕著である。一部の豚では耳、尻尾、四肢、腹部にチアノーゼの紫斑を生じる。腹痛や便秘・下痢を生じることもある。下痢は初期は粘性性だが末期には血液が混じる。呼吸困難、嘔吐、鼻汁排出、神経症状も報告されている。妊娠豚は流産を起こす。白血球の減少がみられることもある。発症後 7 日以内に死亡する。死後解剖では、脾臓、リンパ節、腎臓および心臓に出血がみられる。脾臓は腫大し、暗赤色または黒色になる (図 1) [5, 22, 24]。

亜急性型は急性に似ているが、急性ほど重篤でない。しかし、亜急性型で生じる水疱病変は出血性で

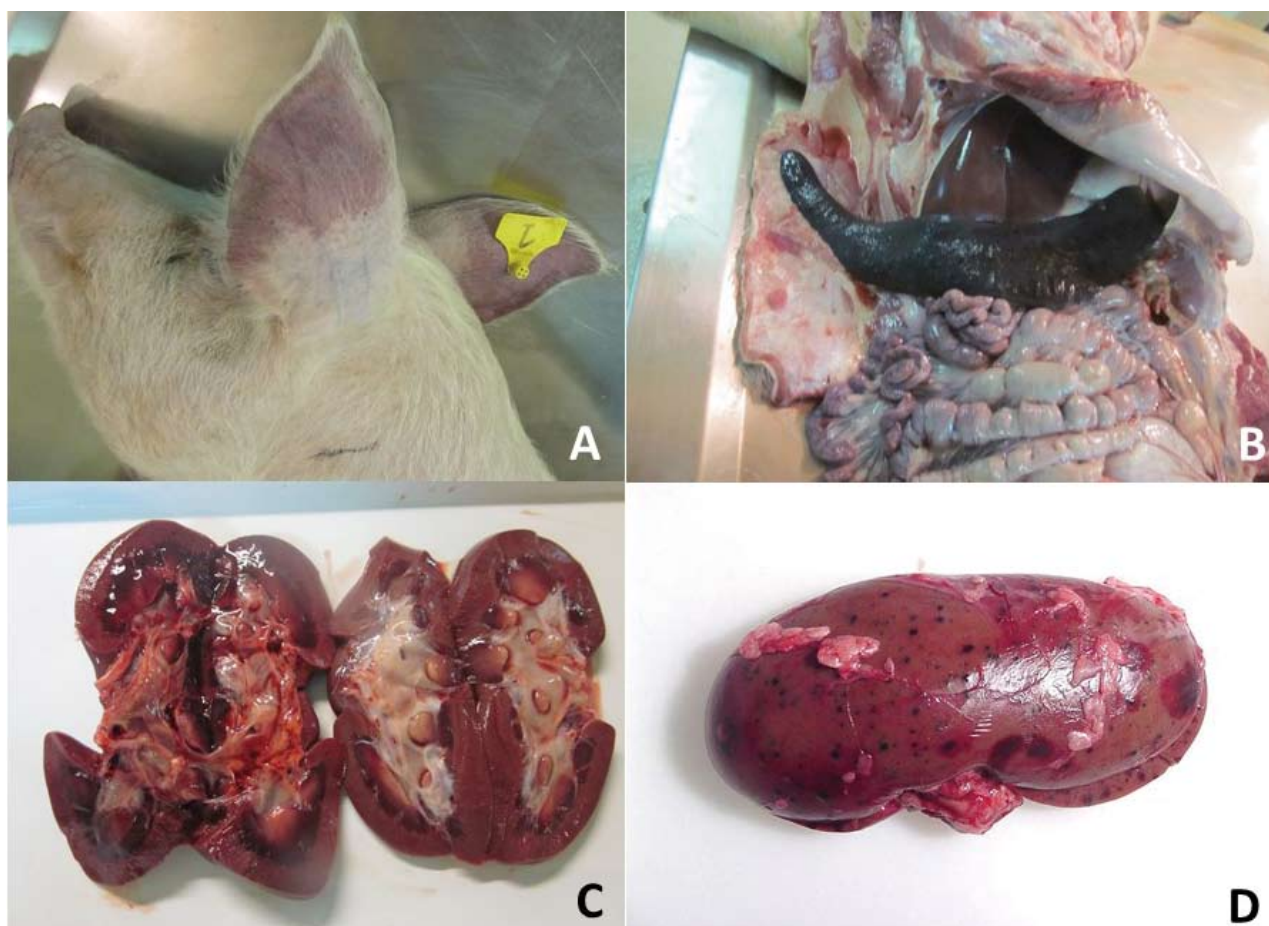


図1 急性型アフリカ豚コレラの病変 (A: 耳に生じたチアノーゼ紫斑、B: 腫大し黒色化した脾臓、C: 腎臓髄質の出血、D: 腎臓皮質の点状出血)

急性型より重篤である。死亡率は成豚ではそれほど高くないが、子豚では高い。発熱、血小板減少、白血球減少が発症中に見られ、7～20日以内に死亡する [22, 24]。

低病原性のウイルス株の感染を受けた豚は慢性型を起こす。慢性型の症状は、皮膚の壊死病変と関節炎である。症状を示さずに抗体陽性を示すのみの豚もいる。間歇的な発熱、食欲消失、沈鬱、流産、削瘦、発育不良である。呼吸器症状や関節の腫脹を生じることがある。咳、下痢、嘔吐も報告されている。死亡率は低い。死後解剖では、肺の連結小葉、乾酪性肺炎、非敗血症性線維性心膜炎、胸膜癒着、全身性リンパ節腫脹、関節腫脹がみられる [5, 22, 24]。

診断

発熱の症状があり、死後解剖で腫大した脆い暗赤色の脾臓と胃、肝臓および腎リンパ節の出血性腫大が確認された場合にはASFの感染を疑うべきである。低病原性のウイルス株による感染の場合には臨床症状や病理所見のみで診断することは困難である。豚コレラ、豚丹毒、豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS)、サルモネラ症その他の全身性の敗血症、

出血性の疾患、重金属中毒との類症鑑別が必要となる [22, 24]。

実験室内診断法としては、まずウイルス分離がある。ASFウイルスは、感染が疑われる豚の血液または組織材料を豚の白血球または骨髄組織に接種することにより分離できる。豚の肺胞マクロファージおよび血液の単球細胞でもASFウイルスは増殖する。感染した培養細胞は、豚の赤血球をその表面に吸着する。低病原性株による感染細胞は吸着性がないことが多い [24]。

ASFの抗原は組織スメアやクリオスタット切片、バッフィーコートからも蛍光抗体法 (FAT) により検出できる。ウイルス抗原の核酸はポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により確認できる。PCRはウイルス分離や抗原検出に適さない腐敗した材料に特に有効である。PCRには従来型とリアルタイムPCRがあり、いずれも国際獣疫事務局 (OIE) による妥当性確認が行われている [22]。

血清学的検査も特に常在地域において、有効な診断方法である。ASFウイルスの抗体は感染後長期間にわたり持続する。様々な血清学的検査法 (酵素免疫測定法 (ELISA)、イムノブロット法、間接蛍光抗体法、カウンター免疫電気泳動法など) が開発

されている。ELISA は国際貿易用に推奨されている。清浄国での最初の発生を確認するにあたっては、ウイルス分離と PCR での検出物の塩基配列特定が推奨される [22, 26, 31]。

地理的分布

ASF は、1921 年にケニアでモンゴメリーによりその存在が報告されて以降、アフリカ大陸、特にサハラ以南で発生が報告されていた [10]。発生率が最も高い地域は、赤道から北部トランスバールにかけての地域である。ASF は 1957 年にポルトガルに侵入して以降、3 回にわたりアフリカ大陸からそれ以外の地域に侵入している (図 2)。1957 年にポルトガルに侵入した際には直ちに撲滅された。1960 年再びポルトガルに侵入した際にはすぐには撲滅されず、1994 年までに複数のヨーロッパ諸国に広がった。すなわち、スペイン (1960 年)、フランス (1964 年)、イタリア (1967 年、1983 年)、マルタ (1978 年)、ベルギー (1985 年)、オランダ (1986 年) に侵入した。1970 年代にはカリブ海のキューバ (1971 年、1980 年)、ドミニカ共和国 (1978 年)、ハイチ (1978 年)、さらに南米のブラジル (1978 年) に広がった [13, 23, 28]。

マルタおよびドミニカ共和国での発生では国内の豚を全頭殺処分することにより撲滅された。スペインおよびポルトガルでは 1960 年代に本病が常在化し、その後撲滅に 30 年かかった [27]。このようにアフリカ以外の国での発生については最終的には撲滅されたが、サルジニアで常在化している [4, 17]。

1998 年にはマダガスカルに侵入した。2007 年にはモーリシャスに侵入したが、撲滅された。また、2007 年にグルジア共和国に侵入し、その後周辺のアルメニア、アゼルバイジャンなどのコーカサス諸国、ロシア (2007 年)、イラン (2009 年)、ウクライナ (2012 年)、ベラルーシ (2013 年)、エストニア、ラトビア、リトアニア、ポーランド (2014 年) に侵入した。これらの国では、家畜の豚での発生のほか、野生のイノシシでも常在化している [7, 25, 27]。

伝播経路

ASF は感染動物との直接接触により伝播するほか、豚肉製品や人や車両などによる媒介、ダニの媒

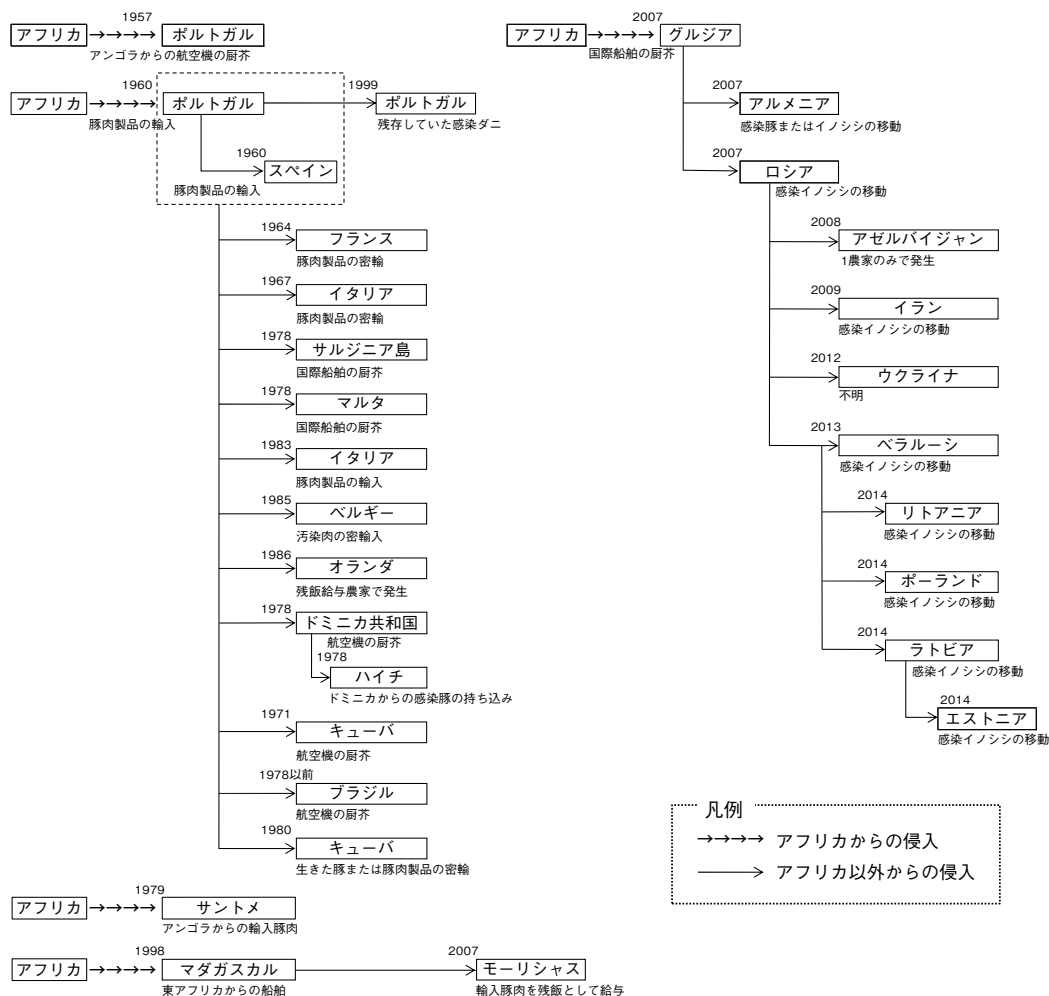


図 2 アフリカ豚コレラの発生国と侵入経路

介によっても伝播する(図3)。直接接触は口鼻經由が主で、エアロゾルによる伝播は接近した短距離間で生じる。ASFウイルスは感染動物のすべての組織および体液中から検出される。特に、血液中には高濃度で存在する。感染動物の死後解剖、血便などにより血液が環境中に排出されると、長期間にわたり環境がウイルスにより汚染され感染源となる。ウイルスは汚染された車両、飼料、農機具などによっても媒介される。一部の豚はキャリアになることもわかっている[24]。

ASFは、ダニの吸血によっても伝播する。ダニはウイルスを機械的に媒介するだけでなく、経期感染、経卵感染および雌雄間感染を生じる。アフリカでは、ASFウイルスは、生まれたばかりのイボイノシシが住居としている洞窟に棲むマダニ(Ornithodoros moubata)との間で循環している。一度感染したダニは生涯感染し、感染したダニのコロニーは数年にわたりウイルスを維持する。ASFウイルスはヨーロッパでは、マダニ(Ornithodoros erraticus)に感染する[25]。他の吸血昆虫、たとえば蚊やサシバエも機械的にウイルスを媒介する可能性がある[24]。

清浄国、清浄地域への侵入経路

1957年に初めてアフリカ以外の国、ポルトガルに侵入した際の侵入経路は、アンゴラからリスボンに到着した航空機より排出された厨芥であり、これがリスボンの空港付近の養豚農家で豚に給与されることにより発生を招いた。マダガスカル、グルジアへの侵入経路はアフリカからの船舶より排出された厨芥であった。これらの初発国から周辺国などへの拡大は、国際航空機、国際船舶より排出された厨芥(サルジニア、マルタ、ドミニカ共和国、キューバ1971年、ブラジル)や、人が密輸入した豚肉製品

(フランス、イタリア、ベルギー、オランダ)や、密入国者が持ち込んだ豚肉製品(キューバ1980年)が原因となった。1999年のポルトガルでの散発的な発生は、残存していた感染ダニが原因となった。最近のコーカサス諸国、東欧諸国への侵入には、感染したイノシシの移動も関与している[2, 3, 5, 8, 12, 22, 24, 25, 26, 27]。

侵入後のまん延経路

これまでに発生が報告されたアフリカ以外の26か国のうち、フランス、ベルギーおよびオランダにおいては早期診断と迅速なまん延防止対策がとられ短期間で撲滅された。これら以外の国では、次の経路がまん延の原因となった。①感染豚の移動—ウイルスの弱毒化により感染豚の発見が困難となり、その結果、発生が発見され移動制限がとられるまでの間、感染豚が移動した(スペイン、ブラジル)。②都市で排出された、ASFウイルスに汚染された厨芥が未加熱で近郊の養豚農家で給与された(多数の国)。③と畜場に感染した豚が運ばれ、と畜・解体され、感染した内臓が近郊の養豚農家で豚に給与された(キューバ)、感染豚を処理したと畜場の排液が河川を汚染し感染源となった(ポルトガル、ドミニカ共和国、ハイチ)、④感染したダニの媒介により感染した子豚から大量のウイルスが排出された(ポルトガル、スペイン)、⑤汚染されたワクチンが使用された(ブラジル)、⑥感染したイノシシが移動した(サルジニア、スペイン、コーカサス諸国、ロシア、東欧諸国)[8, 9, 12, 15, 17, 30]。

今後の動向—養豚産業への脅威

2007年にアフリカからグルジアにASFが侵入し、周辺のコーカサス諸国、ロシアへと発生が拡大し、EU諸国への侵入リスクが高まった。また、近年アフリカにおいてもASFの発生が増加しており、侵入源としてのリスクが増大している。このような背景の下、ASFの侵入防止対策の検討に資するため、EU諸国およびアジアへの侵入リスク評価が行われている。これらのリスク評価は、アフリカおよびコーカサス諸国などでのASFの発生分布、清浄国における豚の飼養密度、発生国と清浄国との間の地理的な距離や貿易関係などをもとに行われている。

欧州食品安全機関(EFSA)は2010年、ASFの侵入リスク評価を行い、EU加盟国への侵入リスクは中程度と推定したが、その後、ASFはロシアで常在化するとともに近隣の東欧諸国へ侵入した[7]。Costardらは2013年、アフリカ、コーカサス諸国、

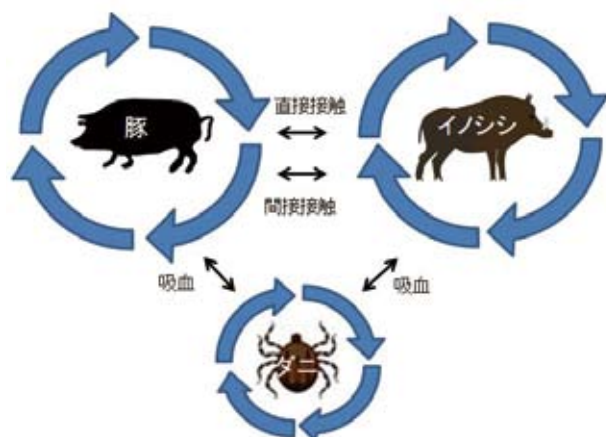


図3 アフリカ豚コレラの伝播経路

ロシアなどからの豚肉製品の不法輸入による侵入リスクを計算し、フランス、ドイツ、イタリア、英国への侵入リスクが高いと推定した [4]。Murらは、アフリカや東欧からの汚染厨芥を載せた車両、船舶、航空機による侵入リスクを推定した [13, 14]。その結果、ポーランド、リトアニア、フィンランド、エストニアおよびドイツへの侵入リスクが高かった。特にポーランドおよびリトアニアは車両による侵入リスクが高く、フィンランドでは船舶による侵入リスクが高く、ドイツ、フランスおよび英国では航空機による侵入リスクが高かった。

ヨーロッパでは2億頭を超える豚が飼養されている上、多数の野生のイノシシが生息しており、イノシシがこの疾病の伝播の重要な役割を果たしている [10]。Murらによれば、生きた豚の輸入による侵入リスクは高くない [13]。しかし、コーカサス諸国やロシアから感染したイノシシの移動を通じてASFが侵入するリスクは、フィンランド、リトアニア、ラトビアおよびポーランドで最も高いと推定された [6, 16, 18]。実際に2014年、ベラルーシからリトアニア、ラトビア、ポーランドへ侵入し、ラトビアからエストニアへ侵入した。イノシシの生息密度が高い地域では、一旦侵入すると、ASFが常在化する可能性が高い。観光産業としてイノシシの狩猟がさかんな地域では、狩猟用イノシシの頭数を維持するためにイノシシへの餌付けの慣習がある。餌が汚染されていれば、イノシシへの感染の原因となる。イノシシが生息する地域に位置する養豚農家のバイオセキュリティ強化および狩猟関係者と養豚農家とのコミュニケーション強化の重要性が指摘されている [7]。

アジアでは、中国国内だけでも5億頭近い豚が飼養され、さらに、この地域の需要を賄うために世界中から大量の豚肉製品が輸入されている。養豚農家の中にはバイオセキュリティの低い庭先養豚農家もあり、一旦侵入した場合の暴露リスクが高いと想像される。また、集約的な大規模農家に侵入した場合には急速に拡がるのが容易に想像される。最近では、中国によるアフリカ諸国への投資が進み、その中にはアンゴラ、コンゴ、ケニア、ナイジェリア、南アフリカなどのASF常在国がある。これらの国と中国との間の貿易量が増大するとともに、多数の中国人が労働者としてアフリカに在住するほか、旅行者も増加し、アフリカ-中国間の船舶、航空機、人の往来が増加している。このような中で、筆者 (Sánchez-Vizcaíno) らは、アフリカおよびヨーロッパから中国へのASFの侵入リスクを比較評価し、①世界中から輸入される大量の豚内臓肉、②アフリカ在住の中国人労働者または旅行者による豚肉

製品の不法輸入、③汚染された貨物船または旅客船の3つの高リスク経路を特定した。一方、ロシアからの侵入リスクについては、流行地域から中国国境までの距離が長いことから、アフリカほど高くないものの、陸路車両や野生イノシシの移動による侵入リスクは無視できないとした [26]。

防疫対策

ASFに対する主な侵入防止対策は、豚および豚肉製品の輸入監視と豚への残飯給与の禁止である。特に、発生地域からの航空機などから排出される厨芥は、焼却し、豚の飼料として使われないようにしなければならない [24]。ASF発生国と隣接する国においては野生イノシシと豚との接触もリスク要因となることから、豚の放牧農家や庭先農家ではフェンスなどを設けてバイオセキュリティを強化する必要がある [22]。

ASFの侵入リスク評価が行われた場合には、その結果判明した高リスク経路を関係者に周知することにより、侵入防止の徹底と早期発見の確保に役立てる。また、臨床症状や病理所見を農家や獣医師に周知することは、効果的な防疫対策に必須である [22]。

発生地域におけるASFの防疫措置は、早期摘発、発生農場における家畜の殺処分および発生地域における豚および豚肉製品の移動禁止である。他の要因、たとえば、イノシシやダニの関与についても分析し、必要があればこれらの要因に対する防疫措置も講じるべきである [22]。

現在のところ、ASF感染を防ぐためのワクチンは開発されていない。ASFウイルスの複雑な性質、遺伝子の多様性、さらには免疫反応の回避に働く複数の病原性要因、中和抗体の不在がワクチン開発を困難にしている主な理由である。ASFが1950年代にヨーロッパに侵入して以降ワクチン開発の試みがなされている。特に1960年代にポルトガルとスペインにおいて弱毒ワクチンによる実験が行われたが、皮膚や関節に慢性症状が出現し十分な結果は得られなかった [21]。

参考文献

1. Bastos, A.D., Penrith, M.L., Cruciere, C., Edrich, J.L., Hutchings, G., Roger, F. and Couacy-Hymann, E. 2003. Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterization. *Arch. Virol.*, **148** : 693-706.
2. Fernando S. Boinas, F.S., Wilson, A.J., Hutchings,

- G.H., Martins, C., Dixon, L. J., 2011. The Persistence of African Swine Fever Virus in Field-Infected *Ornithodoros erraticus* during the ASF Endemic Period in Portugal. *PLoS ONE* **6** : e20383.
3. Costard, S., Wieland, B., de Glanville, W., Jori, F., Rowlands, R., Vosloo, W., Roger, F., Pfeiffer, D.U. and Dixon, L.K. 2009. African swine fever : how can global spread be prevented? *Philos T R Soc B*, **364** : 2683–2696.
 4. Costard, S., Jones, B.A., Martínez-Lopez, B., Mur, L., de la Torre, A., Martínez, M., Sánchez-Vizcaino, F., Sánchez-Vizcaino, J.M., Pfeiffer, D.U. and Wieland, B. 2013. Introduction of African Swine Fever into the European Union through Illegal Importation of Pork and Pork Products. *PLoS ONE* **8** : e61104.
 5. Costard, S., Mur, L., Lubroth, J., Sánchez-Vizcaino, J.M. and Pfeiffer, D.U. 2013. Epidemiology of African Swine Fever Virus. *Virus Res* **173** : 191–7.
 6. De la Torre, A., Bosch, J., Iglesias, I., Muñoz, M.J., Mur, L., Martínez-Lopez, B., Martínez, M., Sánchez-Viscaino and J.M. 2015. Assessing the risk of African swine fever introduction into the European Union by wild boar. *Transboundary and Emerging Diseases*. **62** : 272–9.
 7. European Food Safety Authority (EFSA). 2010. Scientific opinion on African swine fever. *EFSA Journal*, **8** : 1556.
 8. Gogin, A.G.V., Malogolovkin, A. and Kolbasov, D. 2013. African swine fever in the North Caucasus región and the Russian Federation in years 2007–2012. *Virus Res* **173** : 198–203.
 9. Mannelli, A., Sotgia, S., Patta, C., Sarria, A., Madrau, P. and Sanna, L. 1997. Effect of husbandry methods on seropositivity to African swine fever virus in Sardinian swine herds. *Prev. Vet. Med.* **32** : 235–241.
 10. Marquer, P. 2010. Pig farming in the EU, a changing sector. In *Statistics in focus*. EUROSTAT 2010.
 11. Montgomery, R. E. 1921. On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony). *J. Comp. Pathol.* **34** : 159–191.
 12. Moura, J.A., McManus, C.M., Bernal, F.E.M. and Melo, C.B. 2010. An analysis of the 1978 African swine fever outbreak in Brazil and its eradication. *Rev Sci tech Off int Epiz* **29** : 549–563.
 13. Mur, L., Martínez-Lopez, B., Martínez-Aviles, M., Costard, S., Wieland, B., Pfeiffer, D.U. and Sánchez-Vizcaino, J.M. 2012. Quantitative risk assessment for the introduction of African swine fever virus into the European Union by legal import of live pigs. *Transbound Emerg Dis* **59** : 134–144.
 14. Mur, L., Martínez-Lopez, B. and Sánchez-Vizcaino, J.M. 2012. Risk of African swine fever introduction into the European Union through transport-associated routes : returning trucks and waste from international ships and planes. *BMC Vet Res*, **8** : 149.
 15. Mur, L., Atzeni, M., Martínez-López, B., Feliziani, F., Rolesu, S. and Sánchez-Vizcaino, J.M. 2014. Thirty-Five-Year Presence of African Swine Fever in Sardinia : History, Evolution and Risk Factors for Disease Maintenance. *Transbound Emerg Dis*.
 16. Mur, L., Martínez-López, B., Costard, S., de la Torre A., Jones, B.A., Martínez, M., Sánchez-Vizcaino, F., Muñoz, M.J., Pfeiffer, D.U., Sánchez-Vizcaino, J.M. and Wieland, B. 2014. Modular framework to assess the risk of African swine fever virus entry into the European Union. *BMC Vet Res*. **10** : 145.
 17. Mur, L., Martínez-López, B., Gallardo, C., Gortazar, C. and Sánchez-Vizcaino, J.M. 2012. Monitoring of African Swine Fever in the Wild Boar Population of the Most Recent Endemic Area of Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*. **59** : 526–31.
 18. Oravainen, J., Lyytikäinen, T., Sahlström, L. and Tammiranta, N. 2011. Possible routes of entry into the country for African swine fever–Risk profile. *Evira Research Reports*. EVIRA.
 19. Plowright, W. 1970. Experimental infection of the Argasid tick, *Ornithodoros moubata porcinus* with African swine fever virus. *Arch. Gesamte Virusforsch.* **31** : 33–50.
 20. Sánchez-Botija, C. 1963. Reservorios del virus de la peste porcina Africana. *Investigacion del virus de la PPA en los artropodos mediante la prueba de la hemoadsorcion*. *Bull. Offic Int. Epizoot.* **60** : 895–899.
 21. Sánchez-Vizcaino, J.M., Mur, L., Bastos, A.D.S. and Penrith, M.L. 2015. New insights into the role of ticks in African swine fever epidemiology. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*. **34** : 503–511.
 22. Sánchez-Vizcaino, J.M., Mur, L., Gomez-Villamandos, J.C., Carrasco, L. 2015. An Update on the

- Epidemiology and Pathology of African Swine Fever. *Journal of Comparative Pathology*. **152** : 9–21.
23. Simeón-Negrín, R.E. and Frías-Lepoureau, M.T. 2002. Eradication of African swine fever in Cuba (1971–1980). In *Trends in Emerging Viral Infections of Swine*. Edited by Morilla A, Jin K, Zimmerman J. Ames : Iowa State University Press. pp119–124.
24. Sánchez-Vizcaíno, J.M. and Arias, M. 2012. African swine fever. In *Diseases of swine*. 10th edition. Edited by Zimmerman J, Karriker L, Ramirez A, Schwartz K, Stevenson G. Ames, Iowa : Blackwell Publishing Professional. pp396–404.
25. Sánchez-Vizcaíno, J.M., Mur, L., Martínez-López, B. 2013. African swine fever (ASF) : Five years around Europe. *Vet Microbiol*. **165** : 45–50.
26. Sánchez-Vizcaíno, J.M., Mur, L., Sánchez-Matamoros, A. and Martínez-López, B. 2014. African Swine Fever : New challenges and measures to prevent its spread. 82nd General Session OIE. World Assembly. Paris.
27. Sánchez-Vizcaíno, J.M., Mur, L. and Martínez-López, B. 2012. African Swine Fever : An Epidemiological Update. *Transboundary and Emerging Diseases*. **59** : 27–35.
28. Seifert, H.S.H. 1996. *Tropical animal health*. Dordrecht, the Netherlands, Kluwer Academic Publishers.
29. Terpstra, C. and Wensvoort, G. 1986. African swine fever in the Netherlands. *Tij. Dier.*, **111** : 389–392.
30. Wilkinson, P. J. 1984. The persistence of African swine fever in Africa and the Mediterranean. *Prev. Vet. Med.* **2**, 71–82.
31. World Organisation for Animal Health (OIE). 2015. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. OIE, Paris.

学会参加記

7th Asian Pig Veterinary Society Congress (APVS2015) 参加記

場所：フィリピン・マニラ

期間：2015年10月25日～27日

竹山夏実・堤 信幸

開催概要

7107 という数字が何を表すか、想像できるでしょうか。この数字はフィリピンを構成する島の数を示しています。とてつもない数の島だな、と思えば同じく島国と言われる日本の島の数を調べてみたら、何と 6852 という数字が出てきました。インドネシアの保有する約 1 万 7000 個には及ばないものの、いずれも多くの島が集まって成り立つ国と言うことでしょうか。フィリピンと言えばセブ島やボカライ島など、短時間のフライトで日本から行くことができる海辺のリゾート地も魅力的ですが、2015 年の

APVS はフィリピンの首都マニラで開催されました。マニラは日本で言えば本州に当たる、フィリピンの島の中で最も大きいルソン島南西に位置しており、ミンダナオ島と並んで養豚や養鶏の盛んな地域です。学会開催の 10 日ほど前にルソン島に上陸した台風 24 号の被害は日本でも報道されておりましたが、学会期前日に我々が到着したマニラの街中にはそのような面影は残っておらず、我先にと道路を急ぐ自動車やジムニー（乗り合いバス）、トライシクル（自転車タクシー）や、歩道にあふれる物売りや子供達の活気に包まれていました。1565 年から始まるスペイン植民地時代、1898 年から 48 年間のアメリカ

植民地時代を経て独立政権となった国の首都は、地区毎に様々な佇まいを見せており歴史的にも大変興味深い面がありました（写真1）。

中国、韓国、台湾、タイ、ベトナム、フィリピン、日本の7カ国で主催するAPVSですが、今回の開催で7回目となり、アメリカ大陸やヨーロッパを含めたInternational Pig Veterinary Society Congress (IPVS) の偶数年開催に対して、APVSは奇数年に行われます。IPVSと比較すると開催期間や発表演題数などの規模が小さくはありましたが、アジア各国の現状を知る良い機会となりました。学会のキーワードは“Moving As One”であり、アジア諸国が

認識を統一させ、養豚業の発展を推進していこうという Zoilo M. Lopus 大会長の訓示が冒頭挨拶に述べられました。

プログラム構成は実質2日間にわたり（表1）、午前中は大ホールにてプレナリーセッションが数演題、また初日にはアジア7カ国の養豚の現状報告がありました。午後は企業のサテライトシンポジウム（計6社）および、Break Out Sessionとして4つの小ホールに分かれて口頭発表が行われました。発表ホールとは別に広い企業展示エリアが設営され、ポスター掲示、発表はこのスペースを利用して行われました（写真2,3）。



写真1 眼下に広がるマニラ中心部の風景。奥に臨むマニラ湾に面して街が広がる。高層オフィスやマンションも立ち並ぶなか、スペイン統治時代の建物の点在する旧市街地区や露店の建ち並ぶ居住区など（写真右）、様々な面影を持つ街であった。

表1 APVS2015 日程表

	1日目 (10月26日)	2日目 (10月27日)
8:00-9:00	Country/Region Reports (China/Japan/Korea/Philippines/Thailand/ Vietnam/Taiwan)	PRDC math does not add up: 1+1=4
9:00-10:00		Transboundary Disease Transmission and Regional Cooperation
10:15-11:15	Enhancing Herd Productivity by Veterinary Supportive Measures	Major Endemic Diseases in SouthEast Asia
11:15-12:15	A small Group Approach to Improving Farm Productivity and Herd Health in Taiwan Responsible Use of Antibiotic in Veterinary Medicine	African Swine Fever
13:30-15:15	Satellite Session (Zoetis)	Satellite Session (Ceva)
15:30-17:00	Break Out Session 1-4 (Oral presentations)	Break Out Session 1-4 (Oral presentations)
17:00-19:00	Satellite Session (Merial/Boehringer)	Satellite Session (Elanco/Hipra)



写真2 APVS2015に参加した弊所のメンバーで企業ブース入口前（左）および日生研/Supervet共同ブース前（右）にて撮影。外気温は30℃付近であり半袖でも過ごしやすいが、建物内の冷房の効きは日本以上。

アジア各国が注目する疾病

OIE ホームページ掲載のデータベースおよび各国からのレポートや、発表演題を元にして現在アジアで問題となっている疾病についてまとめました（表2）。アジア諸国で共通する疾病として、ウイルスではPRRS、PED、PCV2はいずれの国でも発生が認められ、予防を中心とした対策が図られていました。これまでアジアでワクチンが不足していたPEDに関してはアメリカより輸入したHarris Vaccineのフィリピン内における効果や、韓国が新たに開発したという不活化ワクチン等の成績が一般演題として発表されていました。細菌性疾病では、*M. hyopneumoniae*に加えてIPVSではあまり取り上げられない*A. pleuropneumoniae*もアジア地域では蔓延が認められており、国別に流行血清型は多少異なるものの、特に血清型1, 2, 3, 5, 7型に集中して報告がありました。

一方で、日本では清浄化された豚コレラや、2010年以降発生を認めていない口蹄疫については、日本以外のアジア諸国で発生が確認されているため、国を挙げての淘汰に対策を講じているようでした。中国では2012年より2020年まで中長期国家戦略として豚コレラおよびオーエスキー病の制御に乗り出しています。豚コレラや口蹄疫が発生している、あるいは危険性の高い国（APVS主催国6国全てが含まれる）からの日本への豚、生肉の輸入は、家畜伝染病予防法施行規則43条により禁止されており、同様にアメリカやヨーロッパ諸国への輸出も制限されることから、OIEリスト疾病の制御は貿易発展の為にも優先させなければならないと考えます。いち早く豚コレラや口蹄疫の清浄化を成し遂げた日本は、その戦略についてアジアの先導を切る立場となるべきかもしれません。日本では現在、公益社団法人中央畜産会や現場獣医師のもとオーエスキー病清浄化に向け防疫対策が進行しており、バリューファームコ

表2 アジア各国で発生のある豚疾病

	PRRS	PED	PCV2	口蹄疫	Aj	AP	<i>M.hyo</i>	豚コレラ	ASF
中国	○	○	○	○	◎	○	○	◎	×
韓国	○	○	○	◎	×	○	○	○	×
台湾	○	○	○	○	×	○	○	×	×
フィリピン	○	○	○	×		○	○		×
タイ	○	○	○	○	×	○	○	○	×
ベトナム	○	◎	○	◎	×	○	○	○	×
日本	○	◎	○	×	◎	○	○	×	×

○：発生（◎は各国が特に制御のために力を入れていると考えるもの）、×：2010年以降発生なし、空欄：不明

Aj: Aujeszky's disease, AP: *A. pleuropneumoniae*, *M. hyo*: *M. hyopneumoniae*, ASF: African swine fever



写真3 APVS2015が開催されたマニラ SOFITEL HOTEL (左) およびメイン会場内 (右)。Welcome reception や Plenary session などはこのメイン会場にて開催された。中央および左右2箇所のスクリーンにて発表を投影。

ンサルティングの呉先生から37県が清浄化、残る10県の清浄化に向けて尽力しているとの報告がありました。

アジアのいずれの国でもまだ発症例がないアフリカ豚コレラですが、いずれは大陸を通じての浸潤が懸念される疾病であり、感染性の高さなどからも、2014年度に報告されたOIEのリストでは全世界での死亡豚(淘汰を含む)の84%がこの疾病によるものとされ、今後のためにも獣医師および養豚業者への知識拡充が必要であると考えます。2日目のプレナリーセッションではポーランドでの発生拡大例を含めDr. G. Wozniakowskiがアフリカ豚コレラについて発表されました。アフリカ豚コレラは野生イノシシにも感染しますが、家畜豚に比べて感受性が弱いため不顕性感染となりキャリアとなったり、また複数種のダニがベクターになっており、イノシシや豚への吸血によりウイルスが感染する経路も、アフリカやユーラシア大陸にアフリカ豚コレラを広げる原因となっています。

表には掲載していませんが、大腸菌(下痢症および浮腫病)、ヘモフィルス、ストレプトコッカス、サルモネラ、インフルエンザ、ロタウイルスや豚流行性下痢(TGE)もアジア各国で散発的な発生を見せているとのことでした。

発表演題紹介

発表演題より、2点をピックアップしてご紹介したいと思います。

口頭発表にて発表のあったフィリピン Central Luzon State University の Domingo, CYJ 氏らによる“RT-LAMP based assay: Quick and economical PED surveillance and diagnostic test”では、日本の栄研化学のLAMP (Loop-Mediated Isothermal

Amplification) 法による PEDV 診断キット開発の成果が発表されました。LAMP 法の長所は、PCR と比較して一定温度での反応により RNA/DNA が高効率に伸長するため、ヒートブロックのみで反応が可能であり且つ反応時間を1時間未満に短縮できることです。PCR の約 1/6 のコストに抑えられることや、反応チューブの目視で(白濁あるいは蛍光検出試薬添加)陽性判定ができることも現場診断キットとして応用できる利点になります。標準遺伝子による増幅では検出感度は 0.31 pg/ μ L として算出され、豚コレラウイルス(ワクチン株)やサルモネラといった他の病原体遺伝子との交差性は否定されていました。このキットを用い、フィリピンにて2013年度に PEDV の調査を実施した結果についても報告があり、320 サンプルのうち 65.3% の糞便検体で PEDV 陽性であり、中でも 180 日齢を越える出荷直前の豚や母豚の群では 71% の豚が陽性判定となっており、フィリピンの農場における PEDV 浸潤を示していました。現在国内の市場で調査規模を拡大して、キットの精度や需要を調べているとのことでした。

ポスター発表からは、SEPPIC 社の Francois Bertrand 氏らによる“*Innovative polymeric adjuvant for PCV2 vaccination*”を紹介します。彼らは、架橋されたポリアクリル酸ポリマーをアジュバントとして用いた PCV2 ワクチンについて、安定性、安全性および有効性を報告していました。安定性試験では市販ワクチンと比較するため 4°C と 20°C で 1 年後まで保存し、外観と濃淡度の変化を観察しました。試験期間を超えて完全な安定性が確認されました。特に、20°C での加速試験では市販品が安定性を維持できなかったのに対して、ポリマーアジュバントでは安定なことが確認されました。安全性の試験では、3 週齢の豚にワクチンを投与し、体温と臨床観察を

行い、ワクチン投与後 18 週に病理組織学的検査を行いました。その結果、市販品と同程度の安全性が得られました。有効性の試験では、3 週齢の豚にワクチンを投与し、ワクチン投与後 120 日まで特異抗体と増体重を観察しました。特異抗体測定の結果より、試験期間中に自然感染が起きたと考えられましたが、平均増体重の結果より市販ワクチンと同等の結果が得られました。以上のことから、ポリマーアジュバントの利用は安全で有効で、さらに安定性の改善された PCV2 ワクチンの開発に有用であることが示唆されました。

おわりに

当研究所からは筆者 2 名が発表を行いました。1 日目の Break out Session にて竹山が“Oral delivery of enteric-coated TGE vaccine protects piglets from TGE by passive transfer of maternal antibodies”を口頭発表し、堤が“Efficacy of APM777 vaccines in pigs challenged with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2”をポスター発表しました(写真4)。ポスター掲示の位置が、偶然にもフィリピン Supervet 社と日生研株式会社が共同で出展したブースの横であったため、製品の説明に合わせて質問者が多く訪れました。

2009 年のものですが、APVS2015 大会長の Zoilo M. Lapus が養豚誌に書いた記事を見つけました。「現在のフィリピンの養豚は、70%が裏庭養豚形態となっています。このシステムでは成長段階によって飼育場所を分けることができないため、農場では広く疾病が蔓延していると考えられます。これを段階別飼育、all-in, all-out システムへと切り替えていく必要があります。(中略) バイオセキュリティの概念はほとんどの農家ではまだ理解されておらず、疾病に対する脆弱性に繋がります。」北米やヨーロッパ、日本において急速に養豚の大規模経営化が進められており、工場化された養豚を前提にして生産率を安定させるための論議が進むこともあります。アジア諸国においても経営のシステム化は進められていますが、それでも尚、移行期として様々な養豚形態が混在しているのが現状です。IPVS2014、そして本大会でも主軸に据えられてきたバイオセキュリティですが、1 つには国境をまたぐ貿易体制の観点から、そしてもう 1 つには個々の農場内の意識改革という観点から進めることが成功に繋がる道であると考えられます。



写真4 (左) Break out session にて発表した竹山研究員。座長は IPVS2012 会長を務められた韓国の Dr. Won Hyung Lee。(右) 自身のポスター前の堤研究員。ポスターは企業ブースを取り囲むように設置され、活発な討議が行われた。

Mycoplasma bovis の病原性、持続感染および播種

近内将記

Virulence, persistence and dissemination of *Mycoplasma bovis*.

Sibylle Bürki, Joachim Frey, Paola Pilo. *Vet. Microbiol.*, 2015; **179**: 15–22.

紙面の都合上、本文の一部を割愛して掲載致します。

1. 背景

Mycoplasma bovis は1961年にアメリカで初めて分離された。本菌は細胞壁を持たず *Mollicutes* 種に分類され、牛のマイコプラズマ症の原因となる。本菌に感染すると様々な慢性疾患を引き起こし、気管支肺炎、耳炎、乳房炎、生殖器疾患、関節炎、髄膜炎、角結膜炎などが挙げられる。*M. bovis* は様々な組織・臓器に障害を与えるが、健康な牛からも分離される。*M. bovis* は先進国の畜産業を脅かす主要な新生病原体の1つと位置づけられている。現在のところ、*M. bovis* 感染症の予防に有効なワクチンはなく、抗生剤治療もほとんど効果が見られず抗菌剤耐性の増加が報告されてきている。

現在、マイコプラズマの病原性についての分子メカニズムで判明していることは限られており、多因子が関わっていると推測されている。病原性の *Mycoplasma* 種は他の細菌とは異なり、*Mycoplasma pneumoniae* のような少数の例外を除けば、産生される毒素によってそれらを区別することはできない。

最近まで、遺伝子検査方法の欠如や限られた研究手技が、牛マイコプラズマ症に有効な治療法や予防法の確立に欠かせない *M. bovis* の発病病理と病原性因子を研究する妨げになっていた。しかし、ランダムトランスポゾン変異により *M. bovis* の変異株が最近作出されたり、*M. bovis* の染色体外で増殖する新たなプラスミドが報告されてきており、これら技術の利用や更なる改良によって、近い将来には *M. bovis* と宿主の相互作用について詳細な情報を得ることができるだろう。

このレビューでは *M. bovis* の病原性メカニズムについて最新の知見を概説し、①他の微生物との相互作用、②抗原性変異、③付着、④細胞侵入、⑤宿主免疫機構の変調、⑥バイオフィーム形成と二次代謝産物について考察する。

2. 他の微生物との相互作用

牛の自然感染例において、*M. bovis* は重度の肺病巣からしばしば他の微生物とともに検出されるため、それらの相互作用が推察される。*M. bovis* とともに最も一般的に検出される微生物は *Pasteurella multocida*、*Mannheimia haemolytica*、*Histophilus somni*、BRSV、BHV-1、BVDV、PIV3 が挙げられるが、研究報告によっては相反する結果が出ている。

M. bovis の自然感染では滲出性気管支肺炎を起こし、時折広範な乾酪性壊死巣を伴うが、実験感染では無症状性の肺炎や自然感染例よりは軽度の肺病変となる。それゆえ、*M. bovis* が原因となる重度の肺病変は *M. bovis* と飼養管理で問題になる他の病原微生物との相互作用の結果と推察できる。さらに、牛の日齢や免疫状態などの個体差が病気の進行に重要である。その理由として、*M. bovis* の単独感染でも幼牛では肺炎が起こるが、フィードロットの成牛に典型的な重度の壊死性病変を起こすにはウイルスや細菌との相乗作用が必要であることが挙げられる。

具体的には、*M. bovis* は *H. somni*、*M. haemolytica* や *P. multocida* などの細菌と相互作用する可能性がある。これは牛呼吸器疾患の実験的作出で、子牛に *M. bovis* を投与した後に *P. multocida* を感染させると重度な症状を示すことから分かった。他の研究では、*H. somni*、*M. haemolytica* あるいは *P. multocida* による組織傷害により、*M. bovis* 感染の症状が発現すると考察している。これらの場合、*M. bovis* は *Pasteurellaceae* が形成した一次病変が抗生物質や宿主免疫の作用によって治癒することを妨げていると考えられた。またもう一つの研究では、肥育牛から検出される *M. bovis* と *H. somni* の間には有意な関連があり、*H. somni* 感染例の80%で *M. bovis* が陽性であったのに対し、*M. bovis* と BVDV もしくは *M. haemolytica* の間には有意な関連性はなかった。

BVDVとの共感染はウイルスの免疫抑制作用により、より重度の呼吸器疾患になることが分かったが、肥育牛ではBVDVと *M. bovis* の関連性に相反する報告もある。BRSVと *M. bovis* の共感染に関しては、*M. bovis* の単独感染と比較して、臨床症状は有意に増加しない。興味深いことに、古典的な *M. bovis* 病変を作出するために実施された BHV-1 と *M. bovis* の共感染実験では、6～8ヶ月齢の肥育牛に *M. bovis* に特徴的な乾酪状壊死巣を伴う気管支肺炎が形成されたが、*M. bovis* 単独感染では小さな肺病変のみであった。しかも BHV-1 と *M. bovis* との共感染の方が死亡率も高く、共感染による重度な相乗作用を示した。

3. 抗原性変異

M. bovis の抗原プロファイルは変化に富み、それは菌株に非依存性であることが観察されている。この性状は他の数種の *Mycoplasma* 種で明らかになっているような膜表面リポタンパク質の相 (ON-OFF) と大きさの変化が高頻度に起きていることを示唆している。*M. bovis* 菌株の抗原的多様性は分離される地域や臓器、あるいは個々の菌株によって起こる病型などには関連せず、同一株のサブクローン間での変動によるものである。この多様性はいくつかの主要な両親媒性の膜タンパク質に基づくもので、主要な免疫原として作用する交差反応性エпитープを含むことが分かった。高頻度に起こる抗原性シフトは *in vitro* で同種の *M. bovis* 抗体存在下で影響を受けることが確認されている。これらの要点は、この抗原性シフトが *M. bovis* の宿主免疫からの回避を可能にする菌株の多様性維持に役立っているというこれまでの憶測を裏付けている。それ故、宿主による本菌の除去能力は不十分となり慢性疾患に導いている。

M. bovis の基準株である PG45 のサブクローンを用いた抗原解析では、抗原の発現と分子量のレベルで大きく変化することが分かった。これらの抗原は相および大きさの変異体の可変膜表面リポタンパク質 (Vsps) のファミリー (a family of phase and size variant variable membrane surface lipoproteins) に属する。PG45 株においては、このファミリーは13種の異なった、単一コピーの *vsp* 遺伝子を構成し、それは一つの染色体群の中の *vsp* 領域に組み込まれている。この約 23 kb の遺伝子座は IS4 や IS30 などの可動遺伝因子に高い相同性を持つ、更に二つの

ORFs を含んでいる。*vspA*、*vspB*、*vspC*、*vspE*、*vspF*、*vspG*、*vspH*、*vspI*、*vspJ*、*vspK*、*vspL*、*vspM*、*vspN* および *vspO* をエンコードする ORFs は、それらの推定タンパク質である VspA、VspB、VspC、VspE、VspF、VspG、VspH、VspI、VspJ、VspK、VspL、VspM、VspN および VspO などと一緒に同定された。*vsp* 領域の仲間推定上のリポタンパク質として位置づけられ、脂肪酸やシステイン残基と同様、両親媒性を有している。*vsp* 遺伝子は5'末端に非翻訳配列を持ち、2組のカセットに分けられる。1つ目 (cassette I) はすべての *vsp* 遺伝子で99%相同性があり、リボソーム結合部位をエンコードする。2つ目 (cassette II) は cassette I の上流に位置し、より可変性である。この配列に続いて、菌株間で98～99%の相同性を持ち前駆リポタンパク質シグナルペプチドを含むN末端領域からなるORFがある、一方、VspsのC末端領域は膜表面に露出している。数種類のVspsを共発現することで *M. bovis* は異なる特異的な構造と抗原性を持つ表面モザイクを形成する。*vsp* 遺伝子の共発現は1分離株で2つの遺伝子に局限し、残りの *vsps* 遺伝子は転写されない。*vspA* と *vspO* 間で遺伝子間組み換えが起こると *vspC* になる。これは *vspA* と *vspC* は共発現しないことを示しており、*vspA* と *vspB* を共発現している菌株では *vspC* が欠如し、VspA と VspC のタンパク構造が類似していることを示している。*vspC* は *vspO* に由来する高度に保存された cassette I のN末端と *vspA* に由来する cassette II の可変性C末端から成るキメラ産物であり、また *vspC* そのものが相と大きさの変異を起こすため抗原多様性をさらに増加させる。VspCタンパクを発現する分離株は *vspA*、*vspM*、*vspN* および *vspO* 遺伝子が欠損しているため、それらの遺伝情報は得られない。そのため、truncated *vsp* 領域を持っている VspC 変異体が *in vivo* で存続できるかは懐疑的である。

抗原の多様性は特異的な反復構造の中での挿入や欠損による結合パターンの変化 (high-frequency size variation) も含み、それぞれ VspA には10個、VspB には9個、VspC には5個の異なった大きさのバリエーションができる。18種類の多様な反復構造がPG45株のすべての *vsp* 遺伝子の中で発見されており、それらはN末端からC末端に及んでアミノ酸構造や大きさを異にしている。これら構造の何種類かは1つの遺伝子上に存在するが、他の構造は数種類の全く別のVspsの中に存在して反復性を変化させるタンデム領域として配列し、80%に上るタン

パク質を包含する。cassette I内の特異的 *vsp* 挿入シーケンス (*vis*) を含む反復配列に重複や挿入、欠損などの遺伝子組み換えが起きやすい。これらの反復配列と共に高度に保存された cassette I内に存在する特異的 *vsp* 反転配列はリコンビネーションの重要な標的になり、それらドメインの複製や反転、欠損などに導く。更に、高度に保存された cassette II はいくつかの VspA に対する活性プロモーターとして作用し、下流に位置する遺伝子発現を調節する。抗原発現における高頻度の相変動は染色体のリコンビネーションによる表面抗原の獲得あるいは消失に導く。これらの変動は *in vitro* では $10^{-2} \sim 10^{-3}$ per cell per generation の確率で起きる。遺伝子レベルでの再配列は染色体 DNA の *Hind* III 消化によって可視化でき、VspA と VspC の ON および OFF バリエーションを比較するとそれぞれの断片長が異なっていた。

Vsp の発現や大きさの変動は実験感染した子牛の気道内でも明らかになった。さらに、VspA、VspB、VspC タンパク質領域に存在する反復配列と反応する 1E5 モノクローナル抗体を用いた検査で *M. bovis* 野外分離株 250 株の内の 98.5% に発現していることが判明した。*vsp* パターンと表現型である VspA 抗原プロファイルの相違はとて複雑であるが、それらに関するある研究では、野外分離株間に共通の由来を示す関連性が示された。基準株 PG45 株と *M. bovis* 野外株を比較すると、*vsp* 反復配列と株特異的の反復配列内には著しい変動が見られる。これは特定の菌株それぞれの抗原性状を明らかにするもので *vsp* レポートリーが拡大することになる。注目すべきは、野外分離株 *M. bovis* 2610 と中国株 Hubei-1 である。前者は接着因子として働く全く新しい VspA ファミリーをエンコードし、後者は PG45 株では保存されている N 末端タンパク領域と

上流の DNA 配列を欠いているが、付着性を示す可変性表面リポタンパク質 A (VpmaX) を発現している。PG45 株 (13 個の *vsp* 関連 ORFs を保有) と中国 HB0801 株 (6 個の *vsp* 関連 ORFs を保有) の *vsp* 領域の *vsp* 遺伝子数は、N および C 末端が保存された構造であるにもかかわらず、かなり異なる。この *vsp* 遺伝子と反復配列の高度な変異はそれぞれの株ごとに宿主からの異なる選択圧を受けることによって起こっている可能性があり、*M. bovis* の多様性を増加させている。

4. 付着

付着はマイコプラズマ感染の第一ステップとなる。それ故、菌体細胞膜上に発現しているアドヘシンは宿主細胞に直接触れるため非常に重要となる。宿主細胞への密着はマイコプラズマが増殖するためにも必要である。マイコプラズマはゲノムが小さいゆえに、基本的な生合成経路関連遺伝子群が欠損しており、そのため宿主からアミノ酸や核酸、脂質など菌の生存に欠かせない基本的栄養素を獲得するために宿主細胞との密着が必須となる。この必須物質を得るために、マイコプラズマと宿主細胞膜との融合が、細胞内・膜成分の交換を可能にしていると唆された。面白いことに、*M. bovis* には主要なアドヘシンが一極に集積するための構造物として機能する末端小器官の存在が明らかにされてない。従って、*M. bovis* のアドヘシン様物質は膜タンパク質の形で菌体表面に拡散しているものと思われる。

in vitro assay では、*M. bovis* PG45 株の牛胎子肺細胞 (EBL) への付着は温度依存性があり、37°C で最大となることが分かった。細胞受容体への結合許容量は、EBL 細胞で MOI 225:1、牛気管上皮 (BBE) で 100:1 であった。

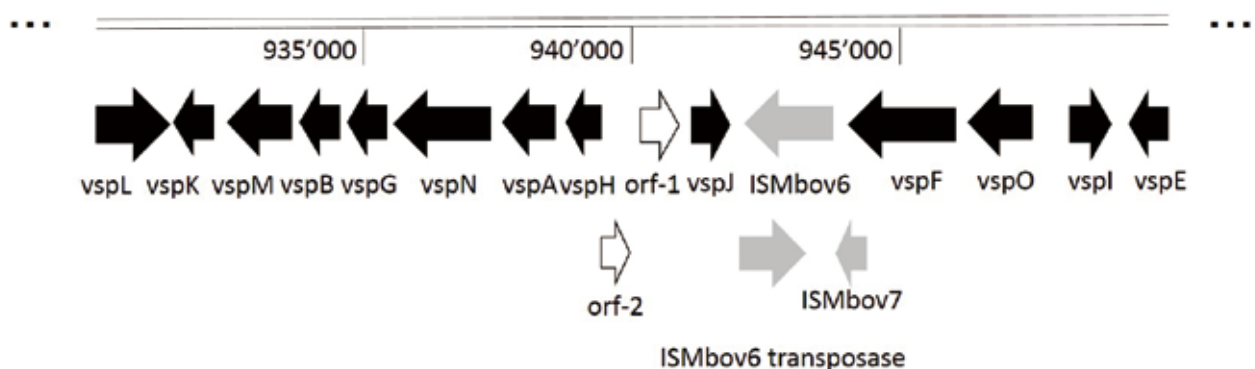


Fig.1 *M. bovis* の基準株である PG45 の *vsp* 領域。Wise ら (2011) が解析した PG45 株 (CP002188.1; phenotype VspO ON) の全ゲノムシーケンスを Snap Gene® Viewer 2. 3. 2 Software を用いてイメージ化。

細胞付着率の大きな変動 (3.4 ~ 19.1%) は菌株が分離された臓器に関係がなく、試験に用いた宿主細胞の種類で決まっていた。付着率は病原性株と比べて、病原性のないもしくは低い株で顕著に低下した。また、付着率は上皮細胞と比較して、線維芽細胞の株化細胞と初代 BBE でより低下した。*M. bovis* の菌株は *in vitro* で継代を続けると付着能が低下していくようである。

M. bovis の付着はタンパク質の相互作用によって起こるため、*M. bovis* のトリプシン処理により付着が部分的に減少する。*M. bovis* のタンパク質中のシリアル酸残基は細胞付着におけるある役割を持っていることが分かった。

M. bovis の 32 kDa 膜表面タンパク質である P26 は EBL 細胞への主要なアドヘシンであることが分かったが、4F6 モノクローナル抗体を P26 に反応させた場合、BBE 細胞への付着性は減少しなかった。*M. bovis* のもう一つの付着因子は細胞膜関連の解糖酵素 α -エノラーゼであり、これはプラスミノーゲンとの結合によって EBL 細胞に付着する。実際に、プラスミノーゲンで EBL 細胞を前処理すると *M. bovis* の付着率が 11.9% まで増加した。*M. bovis* を低濃度のトリプシンで前処理するとタンパク分解活性と EBL への付着率が増加することから、微量のトリプシンによる部分消化で活性化される他のタンパク分解酵素も付着に関与していることが示唆されている。

ウエスタンブロットで宿主細胞と Vsps が結合することから、Vsps もまた *M. bovis* の細胞付着性に役割を担っていることが分かった。さらに、細胞付着実験で精製した Vsps を添加すると *M. bovis* の細胞付着性は減少し、Vsps は実験の間は宿主細胞に結合し続けた。この結果は、Vsps の反復領域由来のオリゴペプチドが *M. bovis* PG45 株の EBL 細胞への部分的な細胞付着阻止能を持っていたことから証明された。*M. bovis* の特異モノクローナル抗体 1E5 と 4D7 (抗 Vsp A、B、C 共通エピトープ)、2A8 (抗 VspC)、9F1 (抗 VspF) がマイコプラズマの Vsps 結合部位に結合するかどうかを調べた結果、これらの抗体が Vsps の付着部位に結合して *M. bovis* PG45 と 0435 株の付着を部分的に阻害することがわかった。しかし、付着阻止は使用した cell line に依存していた。Vsps の反復配列の挿入や欠損による表面抗原の変異は、新たな抗原エピトープの付加あるいは欠損を生じ、その結果細胞付着性の強弱やリガンドの増減が起こることになる。

5. 細胞侵入

子牛に *M. bovis* を感染させると、マイコプラズマはマクロファージや神経細胞、肝細胞、胆管上皮細胞、腎尿細管上皮、顔面神経の軸索などの細胞質で検出された。*M. bovis* 抗原はさらに単球やリンパ節、まれに細気管上皮細胞でも検出された。貪食細胞内で *M. bovis* が生存していることは、貪食過程である変化により存続している可能性を示している。

in vitro assay による実験において、*M. bovis* Mb1 株は牛赤血球を始め、T 細胞、B 細胞、単球、NK 細胞など様々な末梢血単核細胞 (PBMC) に感染することが明らかとなった。使用した細胞種や感染時間に依存して、*M. bovis* の細胞質内局在が異なることが判明した。*M. bovis* は細胞膜のサイトゾル側の空胞様構造物内に拡散して分布していた。*M. bovis* は PBMC の細胞種によって、侵入菌数に違いが見られ、これは *M. bovis* の付着と侵入に必要な受容体が異なるためか、あるいは *M. bovis* が細胞の種類によって異なるシグナルを誘導してしまうために、起きていると思われる。

興味深いことに、*M. bovis* は乳房の腺房細胞内には見つからないが、蛍光・透過型電子顕微鏡を用いた著者らの *in vitro* の研究では、初代牛胎子鼻甲介細胞の細胞質内に病原性 *M. bovis* が認められた。

このように、上皮細胞や免疫細胞への *M. bovis* の侵入は宿主内の感染部位とは異なる場所に病原菌を播種させ、抗生剤治療による *M. bovis* のコントロールを阻害すると思われる。*M. bovis* が牛の様々な細胞内で持続感染する分子機構を解析するために更なる研究が必要である。

6. 宿主免疫機構の変調

マイコプラズマの膜タンパク質は宿主免疫機構と直接相互作用するため、とても重要である。*M. bovis* と宿主細胞の相互作用は細胞種や PBMCs のサブセットに依存しているようである。van der Merwe と共同研究者は T 細胞、T ヘルパー細胞、細胞傷害性 T 細胞、NK 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞などの INF- γ の誘導を観察したが、単球、樹状細胞、もしくは B 細胞では測定出来なかった。同様に、*M. bovis* が PBMCs のアポトーシスを誘導することに関しては議論的となっている。*in vitro* 条件下で、*M. bovis* によるリンパ球のアポトーシス誘導が報告さ

れているが、牛の単球に感染するとアポトーシスの過程が遅延するという報告もある。さらに、*M. bovis* による宿主免疫機構の抑制だけでなく、活性化を示唆する報告がある。免疫刺激はマクロファージやT細胞、あるいは補体の活性化によって、更には免疫反応を亢進するサイトカインの発現によっても起こるようである。免疫抑制は抗炎症性サイトカインやIL10などのケモカインの発現によって、またINF- γ やTNF- α などの炎症性サイトカインの発現を抑制することによっても起きると推測されている。IL10は適応免疫反応に移行する際に、Tヘルパー細胞 type2 (Th2)を発現させ、IgG1の強発現とオプソニン化や免疫力の抑制へと誘導する。宿主免疫系の抑制はリンパ球増殖の下方制御やマイコプラズマリンパ抑制タンパク (mycoplasmal lympho-inhibitory protein) と称されるもの、あるいは植物性凝集素に対するリンパ球増殖反応との干渉によって起こり得る。それによって、リンパ球の増殖は下方制御されるが、それらのサイトカイン発現は変わらない。*M. bovis* はリンパ球数を減少させることで免疫反応を抑制するものと思われる。*M. bovis* が宿主免疫反応を抑制するもう一つの戦略は好中球に結合して酸化的バーストを妨げることである。このような*M. bovis* による宿主免疫反応の変調は感染牛の体内で本菌が長期間生存するとともに全身性に播種されるなどの事実と一致する。

7. バイオフィーム形成と二次代謝産物

バイオフィーム形成は環境中や宿主体内での細菌の生存と疾病の慢性化に役立つ。また、宿主組織では貪食細胞を誘引して、ライソゾーム酵素や活性酸素種 (ROS)、活性窒素種 (RNS) などが放出され宿主細胞傷害が起こるため、これらの状況下では貪食作用は役に立たなくなる。バイオフィーム形成は、*M. bovis* を含む数種類の *Mycoplasma* 種の病原性の有無に関係なく、バイオフィームを産生する。バイオフィーム形成の初段階としてカバースリップへの付着が観察されることから、*Mycoplasma* 種の宿主細胞への付着は病原性発揮のために必須となる。*in vitro* での増殖において、バイオフィーム形成の程度は *M. bovis* 株によって様々であり、Vsp や分子量の違いと関連する。Vsp は付着に関連するとされているので、Vsp パターンによって付着能は異なり、バイオフィーム形成能も変わることになる。バイオフィームの産生は環境ストレスや宿主防御に対して細菌の抵抗性を増大させる。バイオフィームを形成する *M. bovis* 株は熱や乾燥により抵抗性で環境中での生存を可能にしているが、フルオロキノロン系やテトラサイクリン系抗生物質の最小発育阻止濃度 (MIC) における変化はない。

Mycoplasma 種の病原性にそれらの二次代謝産物が関係していることが知られている。過酸化水素産生はいくつかの *Mycoplasma* 種の主要な病原因子であり、細胞死や線毛運動の阻止、脂肪の過酸化な

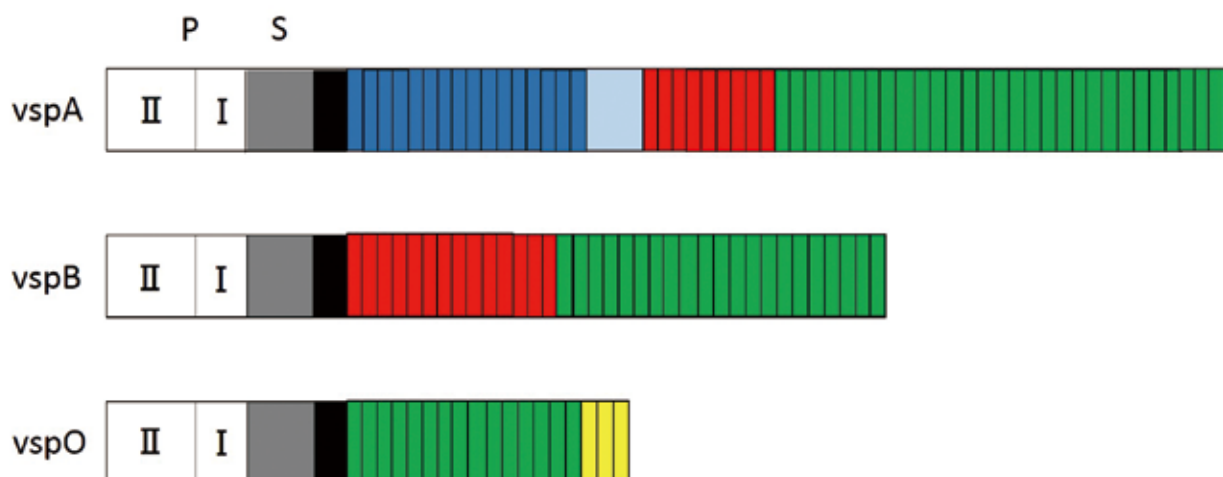


Fig.2 *M. bovis* PG45 株の *vspA*、*vspB* および *vspO* 遺伝子の簡略化した構造的特徴。白色ブロック (P) は ATG コドンの上流に位置する高度に保存された 150 bp の非翻訳 5- 末端領域を示し、これは 2 つの cassette に分画される。1 つ目 (cassette I) は推定上のリボソーム結合部位を含み、2 つ目 (cassette II) は *vspA* の一般的な活性化プロモーターとして働く。*vsp* シグナルペプチドをコードする 75bp の高相同性 DNA 配列は灰色ブロック (S) とそれに続く黒色ブロックで示し、これらはすべての *vsp* 遺伝子で保存されている。カラーブロックは N 末端から C 末端に伸長する反復コード配列を示す。これらの反復領域は異なる *vsp* 遺伝子間で共有 (青色、赤色と暗緑色ブロック) あるいは *vsp* 特異的である (水色と黄色ブロック)。

どを起こす。過酸化水素の産生は、剖検材料から分離された全ての *M. bovis* で確認されている。また、ROS や RNS は好中球やマクロファージの動員・刺激後に検出されている。マイコプラズマが産生する過酸化水素と白血球由来の ROS/RNS の組合せにより、肺に重度かつ典型的な乾酪壊死病変が形成されるものと思われる。*M. bovis* 基準株と野外株の *in vitro* での過酸化水素産生量を測定すると、その産生量は菌株により異なっていた。NADH の酸化より産生される過酸化水素量は $0 \sim 1.1 \text{ mol H}_2\text{O}_2/\text{mol O}_2$ と株ごとに様々で、これは NADH の酸化により水あるいは過酸化水素が産生されたことによるものと思われた。また、*in vitro* で継代するほど過酸化水素の産生量は減少したが、酸化物の割合に変化はなかった。これは、*M. bovis* 株を長期継代した場合、32kDa のタンパク質が消失し、培養液中の過酸化水素の産生量も 50% 減少したことにより証明された。しかし、L- α -glycerophosphate (GP) を酸化させた株は存在しなかったことから、発酵能とアルギニン加水分解能を持たない *M. bovis* 株はすべて glycerophosphate oxidase (GlpO) を欠損していることが明らかになった。

8. 結論

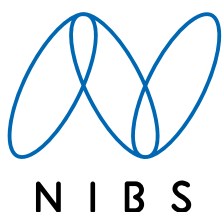
今回のレビューで *M. bovis* の多くの病原因子を紹介してきたが、それらの中で可変性表面リポタンパク質が最も盛んに研究されている。可変性表面リポタンパク質は宿主免疫からの回避に重要な役割を有し、適応進化においては *Mycoplasma* 種の限られたゲノム量を補っている。そして、これらの表面抗原のいくつかはマイコプラズマの宿主細胞への付着に関わっており、感染の成立に欠かせないものである。Vsps 以外の病原因子についてはあまり研究されていないが、今後新しい分子解析技法が進歩すれば本菌の病原性発揮に関わるメカニズムの理解が一層進むであろう。バイオフィーム形成は *M. bovis* の宿主内での持続感染や環境中での生存に欠かせない。*M. bovis* の過酸化水素のような代謝産物による宿主細胞傷害についての更なる研究は混合感染や宿主の免疫応答の変調に関わる分子過程を理解するのに価値がある。最後に、*M. bovis* の牛細胞への侵入と細胞内での生存は宿主内での播種と持続感染の原因になり、*M. bovis* 感染症の薬剤治療やワクチン接種に対する抵抗性に導いているのかも知れない。

編集後記

今年度の編集委員で行ってまいりました編集作業は、今号をもって終了させていただきます。この1年は私たち編集委員にとって大変貴重な経験となりました。不慣れなことから行き届かない点が多い中、皆様には多大なるご協力を賜り、またあたたかく見守って頂きましてありがとうございました。心より感謝申し上げます。次年度は、手島香保、今井孝彦、近内将記が編集を担当致します。

読者の皆様におかれましては、季節柄どうかご自愛下さい。今後とも、引き続き日生研たよりをご愛読賜りますよう、宜しくお願い申し上げます。

日生研たより 昭和30年9月1日創刊(隔月1回発行)
 (通巻597号) 平成28年2月25日印刷 平成28年3月1日発行(第62巻第2号)
 発行所 一般財団法人 日本生物科学研究所
 〒198-0024 東京都青梅市新町9丁目2221番地の1
 TEL: 0428(33)1520(企画学術部) FAX: 0428(33)1036
 http://nibs.lin.gr.jp/
 発行人 草薙公一
 編集室 委員/今井孝彦(委員長)、大嶋 篤、手島香保
 事務/企画学術部
 印刷所 株式会社 精興社
 (無断転載を禁ず)



—— テーマは「生命の連鎖」——
 生命の「共生・調和」を理念とし、生命体の豊かな明日と、研究の永続性を願う気持ちを快いリズムに整え、視覚化したものです。カラーは生命の源、水を表す「青」としています。

表紙題字は故中村稔治博士の揮毫