

出國報告  
(類別：開會)

赴日本動物衛生研究部參加「研發高  
病原性豬生殖與呼吸綜合症與豬瘟  
之新型診斷方法」計畫年終會議出國  
報告

服務機關及姓名職稱：

行政院農業委員會家畜衛生試驗所	張家宜 副研究員
	鄧明中 副研究員
	黃有良 助理研究員

派赴國家：	日本
報告日期：	107年4月9日
出國期間：	107年1月28日至1月31日

## 摘要

本所與日本農研機構動物衛生研究部於 103 年針對豬瘟與高病原性豬生殖與呼吸綜合症之監測、診斷與套組研發簽訂合作備忘錄，並於 103 年 4 月起共同研提「**Development of technologies for preventing invasion and spread of transboundary animal infectious diseases**」四年合作計畫。此次應日方邀請赴日本東京進行四年計畫之執行成果報告，由張家宜副研究員進行「豬瘟與豬生殖與呼吸綜合症之診斷與防治技術」之結案報告。另外，也拜訪日方並洽談未來合作之方向與議題，雙方均有濃厚意願針對豬瘟及非洲豬瘟等重要豬隻疾病診斷與研究進行更進一步之合作。

## 目次

一、前言與目的-----	4
二、研習過程-----	5
三、研習心得-----	13
四、檢討與建議-----	13
五、致謝-----	14
六、參考文獻-----	14

## 一、前言及目的

本所與日本農研機構動物衛生研究部於 103 年針對豬瘟與高病原性豬生殖與呼吸綜合症之監測、診斷與套組研發簽訂合作備忘錄，其目的乃藉由雙方合作，分享豬瘟與高病原性豬生殖與呼吸綜合症先前研究成果，交流疾病診斷技術、生物資材及基因訊息等重要疫病防疫所需之資訊，並合作開發豬瘟抗體 **ELISA** 診斷套組，今年是本計畫的最終執行年度，應日方邀請前往日本說明計畫執行成果與研商未來合作目標。

## 二、研習過程

### (一) 行程

此次赴日本參加「研發高病原性豬生殖與呼吸綜合症與豬瘟之新型診斷方法」計畫年終會議，於抵達隔天先行參加年終會議，之後再赴筑波日本動物衛生研究部與日方洽商未來合作計畫事宜。

表 1、研習行程表

日期	行程	地點
1/28 (日)	啟程前往日本東京市	日本東京市
1/29 (一)	參加計畫年終會議	日本東京市
1/30 (二)	赴NIAH本部參加圓桌會議	日本筑波市
1/31 (三)	返台	

(二)「研發高病原性豬生殖與呼吸綜合症與豬瘟之新型診斷方法」計畫年終會議

#### 1. 參加單位

本次會議日方共有包含日本國立大學法人廣島大學、國立大學法人宮崎大學、京都府公立大學法人京都府立醫科大學、國立研究開發法人理化學研究所、國立研究開發法人農研機構生物機能利用研究部及動物衛生研究部等，而國外參與單位則包含泰國動物衛生研究所 (Thailand Nation Institute of Animal Health ; Thai-NIAH) 以及我國家畜衛生試驗所 (Animal Health Research Institute ; AHRI) 計八個單位的人員。

#### 2. 審查委員

國立大學法人鳥取大學農學部教授 伊藤壽啟

國立大學法人東京大學大學院農學生命科學研究科特任教授 小野寺節

元食品安全委員會委員長 見上彪

國立大學法人岐阜大學應用生物科學部共同獸醫學科特任教授 村上洋介

學校法人東海大學海洋學部水產學科教授 山本茂貴

農林水產省大臣官房政策課

農林水產省消費、安全局食品安全政策課

農林水產省消費、安全局畜水產安全管理課

農林水產省消費、安全局動物衛生課

#### 3. 研究領域

A. 高病原性豬生殖與呼吸綜合症 (Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus; HP-PRRSV)、豬瘟之預防入侵與防止蔓延技術之開發

B. 防止口蹄疫入侵與蔓延之技術開發

- C. 高病原性家禽流行性感冒之有效預防技術開發
- D. 闡明非典型牛海綿狀腦病(bovine spongiform encephalopathy; BSE)發病機轉及風險管理技術之開發。

#### 4. 高病原性豬生殖與呼吸綜合症、豬瘟之預防入侵與防止蔓延技術之開發

此領域區分為 A. HP-PRRS 與豬瘟的疫學、病態解明與有效預防方法之開發，與 B. HP-PRRS 與豬瘟的診斷法高度化等兩個次領域。

A. 於「HP-PRRS 與豬瘟的疫學、病態解明與有效預防方法之開發」次領域中有來自日方高木道浩、上西博英與泰方 NIAH Dr. Boonpornprasert Prakit 所帶領的三個研究團隊進行相關之研究，其研究成果摘錄如下：

(1) HP-PRRS geno-group A (JXA-1 like) 於 2007 至 2010 年是 HP-PRRSV 主要流行之病毒株，於 2010 年 HP-PRRS geno-group B (SX09 like) 出現後，HP-PRRS geno-group A 感染病例數逐漸下降，反之，HP-PRRS geno-group B 感染數逐漸上升。

(2) 懷孕 90 天的母豬經鼻感染 2010 年所分離之 HP-PRRS 越南株後，於感染後 11 至 17 天間會陸續出現流死產之現象，且病毒血症於感染後 1 天即出現，病毒血症之 PRRSV 力價於 5 至 10 日達到高峰，之後逐漸下降。

(3) 泰國 PRRSV 可區分為歐洲型與北美型，歐洲型 PRRSV 分佈於 A、D 與 H clade 內，北美型 PRRSV 除了有 L1、L5、L8 lineage 的 PRRSV 外，也發現有新的 lineage 之 PRRSV 出現。

(4) 泰國的豬瘟分離株主要分佈於 1.1、1.3、2.1、2.2、3.3 等基因亞型，其中 1.1 與 2.1 基因亞型之豬瘟是目前田間所流行之分離株。

(5) 5 週齡豬瘟抗體陰性健康豬感染 1.1 或 3.3 基因亞型之豬瘟分離株後 7 天即可出現病毒血症，且持續至試驗結束。

(6) 5 週齡豬瘟抗體陰性健康豬免疫 GPE-疫苗後 2 週可有效完全保護豬隻不受 2.1c 基因亞型豬瘟的感染。

B. 於「HP-PRRS 與豬瘟的診斷法高度化」次領域，有來自日本龜山健一郎、三口良二與本所張家宜副研究員所率領之團隊進行報告，其研究成果摘錄如下：

(1) 已成功表現不同瘟疫病毒(pestivirus)的 E0 與 E2 蛋白，經純化後，其 E0 蛋白於 ELISA 檢測系統中，可有效區別豬瘟 GPE- 疫苗株與牛病毒性下痢病毒(bovine viral diarrhea virus; BVDV)感染後之豬血清。

(2) 已成功將 HP-PRRSV ORF7 進行選殖與表現，經蛋白純化後，其免疫小鼠所產生之單株抗體可有效辨認日本 PRRSV 與 HP-PRRSV，但兩者間無法利用此單株抗體進行區別診斷。

(3) 本所張家宜副研究員也於此次領域內進行相關試驗結果之報告，於「豬瘟與豬生殖與呼吸綜合症之診斷與防治技術」結案報告中主要區分為台灣不同基因

型豬瘟病毒株之基因分析、台灣不同基因型豬瘟病毒株之抗原性分析、製備台灣不同基因型豬瘟病毒株豬隻抗血清與其交叉中和抗體分析、評估日方研發豬瘟抗體 ELISA 檢測試劑與 PRRSV 分子流行病學分析等，其報告內容摘錄如下：

a. 台灣不同基因型豬瘟病毒株之基因分析

台灣過去田間所分離之豬瘟病毒主要屬於 2.1 及 3.4 基因亞型，而常用之兔化豬瘟疫苗株則屬於 1.1 基因亞型，流行病學研究顯示，1996 年之後台灣田間就分離不到 3.4 基因亞型之豬瘟病毒，而由 2.1 基因亞型病毒株所取代。

b. 台灣不同基因型豬瘟病毒株之抗原性分析

E2 醣蛋白為豬瘟病毒誘發免疫反應最重要之結構蛋白，本所研究已找出決定 E2 醣蛋白抗原性 domain 重要之 epitope 與訂出不同基因型豬瘟病毒株之特定抗原決定位。

c. 製備台灣不同基因型豬瘟病毒株與其交叉中和抗體分析

本所已製備台灣不同基因型豬瘟病毒株之標準豬隻抗血清，並分析與不同基因型病毒株之交叉中和抗體力價，結果顯示同源型病毒株之中和抗體力價顯著高於異源型病毒株。

d. 評估日方研發豬瘟抗體 ELISA 檢測試劑

使用本所製備台灣不同基因型豬瘟病毒株之標準豬隻抗血清，與日方提供之牛病毒性下痢病毒第一型與第二型豬隻抗血清及邊境病毒(border disease virus; BDV)豬隻抗血清進行西方墨點法與 ELISA 法分析。西方墨點法結果顯示豬瘟豬隻抗血清可辨認表達豬瘟 E<sup>ms</sup> 蛋白，不會對 BVDV E<sup>ms</sup> 蛋白有交叉反應；ELISA 結果顯示表達豬瘟 E<sup>ms</sup> 蛋白對豬瘟豬隻抗血清、BVDV 豬隻抗血清與 BDV 豬隻抗血清反應無明顯差異性，後續需進一步測試反應條件。

e. PRRSV 分子流行病學

將所收集到的台灣 PRRSV 病毒株進行 NSP2、ORF5 與 ORF7 基因序列之解析，於 ORF5 與 ORF7 基因所呈現之樹狀圖分析顯示，台灣 PRRSV 田間分離株均屬於北美型，且可進一步區分為 WSV 與 MD001 等兩個病毒群，其中 WSV 病毒群與北美型 VR2332 標準株均畫分在 group 1 亞群內，MD001 病毒株則分佈在 group V、VI、VII 與 VIII 內，於 2000 年以後，田間所流行之 PRRSV 病毒株均是以 group VII 的病毒株為主，但也有少數其它 group 的 PRRSV 感染案例。於 NSP2 基因序列之分析方面，台灣田間 PRRSV 的 NSP2 基因均無 HP-PRRSV 專屬的 30 個胺基酸缺損片段，其 NSP2 的 insertion/deletion 片段區分為 5 種型態，包括標準 V 型、Taiwan type A、Taiwan type B、Taiwan type C 與 Taiwan type D 等，其中至 2002 年以後，台灣 PRRSV 田間分離株均是以 Taiwan type D 型的 insertion/deletion 片段為主。



日本 NAIH 橫山隆企劃管理部長於年終會議之致詞。



日本 NIAH 高木道浩主任研究員報告日方 PRRSV 研究成果。







日本 NIAH 龜山健一朗研究員報告日方 Pestivirus 研究成果。



本所張家宜副研究員報告我國 CSFV 與 PRRSV 研究成果。



日本 NAIH 橫山隆企劃管理部長對本所張家宜副研究員之提問。

#### 5. 防止口蹄疫入侵與蔓延之技術開發

由日本動物衛生研究部深井克彥、山田學與山川睦等研究人員所帶領之團隊進行口蹄疫之相關研究，其研究成果摘要如下：

(1) 於FMDV O/JPN/2010的牛與山羊隻感染試驗中，發現O/JPN/2010對牛與山羊均有毒力，其可照成牛與山羊產生水疱之臨床症狀，並經由接觸傳染給其它牛隻或羊隻，於病毒之檢測發現pharyngeal region含有高量之FMDV，顯示其是FMDV O/JPN/2010主要之標的組織。

(2) 於FMDV緊急疫苗免疫效力的模擬試驗發現，牛與豬免疫於攻毒前3或30天先行免疫一劑O Manisa 疫苗，之後再以FMDV O/JPN/2010-1/14C進行攻毒，結果發現，所有免疫30天隻動物均無任何水疱之症狀，但在病毒檢測方面，所有免疫與沒有免疫動物均可檢出病毒，但在疫苗免疫牛隻的病毒量與時間均顯著較沒有免疫牛隻來的低與短，但在免疫與沒有免疫的豬隻之間則沒有顯著性差異，這些結果顯示，再緊急使用O Manisa 疫苗的情況下，動物仍可感染FMDV O/JPN/2010-1/14C，但其不會有症狀，可是仍可持續排毒。

(3) 於豬隻經口或鼻感染不同劑量之 FMDV O/JPN/2010 試驗中發現，豬隻經口感染  $10^3$  TCID<sub>50</sub> O/JPN/2010 即會發病，經鼻感染部分則需  $10^6$  TCID<sub>50</sub> O/JPN/2010 方可成功感染豬隻，進一步比較經口與鼻感染  $10^6$  TCID<sub>50</sub> O/JPN/2010 豬隻病程時，發現經口感染可較早於鼻腔分泌物、口水、糞便與血清中檢出病毒，顯示經口感染是 FMDV 主要的感染路徑。

(4) 於 3 種市售口蹄疫 NSP-ELISA 檢測套組敏感性與特異性的比較試驗中發



現，在沒有感染與免疫的動物樣品中，NSP-ELISA 檢測套組的特異性顯著高於 liquid-phase blocking ELISA (LPBE)，但其 NSP-ELISA 敏感性則比 LPBE 低，且無法樣其它研究報告所提的可檢出田間感染 FMDV 之動物，因此，可能不適用於施行“vaccination-to-kill”或 “vaccination-to-live”政策之國家。

### (三) 赴 NIAH 參加未來合作之圓桌會議

日本 NIAH 邀請泰國動物衛生研究所與本所人員洽商未來四年之合作方向，會議由日本 NIAH 橫山隆企劃管理部長主持，與會人員包含筒井俊之領域長、川瀨健司上席研究員、國保健浩組長、高木道浩主任研究員、龜山健一朗研究員，還有泰國 NIAH Dr. Prakit Boonpornprasert、Dr. Tapanut Songkasupa 與本所張家宜副研究員、鄧明中副研究員與黃有良助理研究員等人，會議針對現行已合作之 CSFV 與 PRRSV 等相關議題進行討論外，也針對其它危害豬隻之疾病進行多方面之探討。目前規劃仍以危害豬隻甚巨之豬瘟以及非洲豬瘟快速區別診斷技術開發、病原基本特性研究以及防治技術開發等議題為主，其他如重大危害仔豬健康之豬流行性下痢(PED)、高病原性豬生殖與呼吸綜合症，或不易與口蹄疫區別之豬矽尼卡谷病毒感染症等，都可能是未來雙方、或三方合作之焦點。



於日本 NIAH 會議室舉行之未來合作圓桌會議，與會人員包括日本 NIAH、Thai-NIAH 與本所同仁等。



圓桌會議後之合影，左起國保健浩組長、黃有良助理研究、筒井俊之領域長、Dr. Prakit Boonpornprasert、張家宜副研究員、鄧明中副研究員、Dr. Tapanut Songkasupa、橫山隆企劃管理部長、川寫健司上席研究員、高木道浩主任研究員、龜山健一朗研究員。

### 三、研習心得

本次會議共有包含日方廣島大學、宮崎大學、京都醫科大學、理化學研究所、生物機能利用研究部及動物衛生研究部等，而國外參與單位則包含泰國動物衛生研究所以及我國畜衛生試驗所計八個單位的人員。審查委員除農林水產省相關課室之官員外，另包含東京大學、鳥取大學、岐阜大學以及東海大學等學有專精之教授擔任。日方所主導之本項研究計畫主題為『防止海外重要家畜疾病入侵與蔓延防治技術之開發』，其中又分為四個研究項目分別為 A) 高病原性豬生殖與呼吸綜合症、豬瘟之預防入侵與防止蔓延技術之開發，B) 防止口蹄疫入侵與蔓延之技術開發，C) 高病原性家禽流行性感冒之有效預防技術開發，D) 闡明非典型牛海綿狀腦病 (BSE) 發病機轉及風險管理技術之開發。這些重要的疾病，在日方有系統的整合研究資源下，許多研究成果如：可區別不同瘟疫病毒之豬瘟抗體 ELISA 診斷套組開發，非典型 BSE 診斷技術之開發、以及利用基因工程分析 O 型口蹄疫病毒之毒力基因 (5'UTR、IRES、VP4,2) 等，都是目前國內防治或預防重要疾病所需之重要關鍵知識與技術，參加本次會議可謂成果豐碩。

### 四、檢討與建議

1. 本計畫雖已於 107 年 3 月 31 日終止，而目前我方與日方於合作議題上獲致良好成果，我方共獲得高病原性豬生殖與呼吸綜合症之臨床診斷技術以及其他瘟疫病毒於豬隻感染之高免血清，可作為將來診斷套組開發以及區別診斷之

標準品使用。鑑於雙方仍有濃厚意願針對豬瘟及非洲豬瘟診斷與研究進行更進一步之合作，爰應續與日方洽談下一階段之合作計畫。

2. 日方針對口蹄疫病毒於不同動物之感染劑量、跨物種傳播模式亦進行非常詳盡之研究。此外，並應用分子基因學技術嘗試探討 O 型口蹄疫病毒之毒力基因。我國口蹄疫清除在即，口蹄疫的防治技術與研究更不能中斷與鬆懈，建議可針對口蹄疫議題，邀請日方專家分享其研究成果，希望能有助於我國之口蹄疫防治技術及撲滅措施之落實。

## 五、致謝

感謝日本 NIAH 提供相關經費赴日參加相關會議。特別感謝川畠健司上席研究員、高木道浩主任研究員、國保健浩組長、龜山健一郎在此次赴日期間所提供之協助。

## 六、參考文獻

1. Hiroyuki Onozato, Katsuhiko Fukai, Rie Kitano, Reiko Yamazoe, Kazuki Morioka, Manabu Yamada, Seiichi Ohashi, Kazuo Yoshida, Toru Kanno. 2014. Experimental infection of cattle and goats with a foot-and-mouth disease virus isolate from the 2010 epidemic in Japan. *Arch Virol* 159:2901–2908.
2. Katsuhiko Fukai, Kazuki Morioka, Hiroyuki Onozato, Kazuo Yoshida, Kenichi Sakamoto. 2013. Comparative Evaluation of Three Commercial ELISA Kits for Detection of Antibodies to a Nonstructural Protein of Foot-and-Mouth Disease Virus. *J. Vet. Med. Sci.* 75(6): 693–699.
3. Katsuhiko Fukai, Manabu Yamada, Kazuki Morioka, Seiichi Ohashi, Kazuo Yoshida, Rie Kitano, Reiko Yamazoe, Toru Kanno. 2015. Dose-dependent responses of pigs infected with foot-and-mouth disease virus O/JPN/2010 by the intranasal and intraoral routes. *Arch Virol* 160:129–139.
4. Katsuhiko Fukai, Tatsuya Nishi, Nobuaki Shimada, Kazuki Morioka, Manabu Yamada, Kazuo Yoshida, Kenichi Sakamoto, Rie Kitano, Reiko Yamazoe, Makoto Yamakawa. 2017. Experimental infections using the foot-and-mouth disease virus O/JPN/2010 in animals administered a vaccine preserved for emergency use in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 79(1): 128–136.