令和元年度戦略的監視·診断体制整備推進委託事業 (家畜伝染病診断体制強化·整備)

(4) 野生動物感染症監視体制整備

令和2年3月18日

(国)農業·食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門

Ι 事業の目的と内容

1. 目的

家畜における伝染性疾病の発生・まん延を防止するためには、家畜群への伝染性疾病の侵入を監視するとともに、家畜群に疾病が侵入した場合に早期に摘発できる検査体制を整備することが重要である。家畜群への疾病の侵入の監視においては、野生動物が家畜への疾病の侵入ルートの一つとして指摘されていること、わが国家畜群では清浄化を達成したと考えられる疾病でも、野生動物内で維持されている可能性があること等から、野生動物における家畜の伝染性疾病の浸潤状況を把握する必要がある。また、家畜群における伝染性疾病の清浄化を維持・推進するためには、野生動物における発生状況を日常的に監視することも重要である。このため、本事業では、いくつかの野生動物種を対象に、重要と考えられる家畜伝染病の浸潤状況を調査するとともに、野生動物を対象とした検査体制整備のための取組を行った。

2. 内容

2-1. 野生動物における家畜伝染病の浸潤状況の調査

捕獲された野生動物等から検査材料を採取し、家畜の伝染性疾病の感染状況を検査するとともに、得られた結果から、野生動物での疾病の感染状況を評価する。本事業ではシカ、イノシシ及び野鳥(水鳥及びハト)について、下記の疾病を対象に調査を行った。

(1) シカ(血液及び糞便)

ア、ヨーネ病

イ、結核(平成30年度採材検体の継続検査)

ウ、牛ウイルス性下痢

(2) イノシシ(血液)

ア、オーエスキー病 (AD)

イ、トキソプラズマ症

(3) 野鳥(水きん類及びハト)(糞便)

ア、ニューカッスル病(ND)

2-2. 野生のシカにおける鹿慢性消耗病(CWD)の検査体制の整備

鹿慢性消耗病(CWD)の検査において、牛海綿状脳症(BSE)の検査キットが使用可能かどうかについて昨年度に引き続き検証を行った。また、検証された検査法を用いて、都道府県におけるシカのCWDの浸潤状況について試行調査を行った。

Ⅱ 野生動物における家畜伝染病の浸潤状況の調査

Ⅱ-1. シカの調査

1. 方法

(1) 検査材料の収集

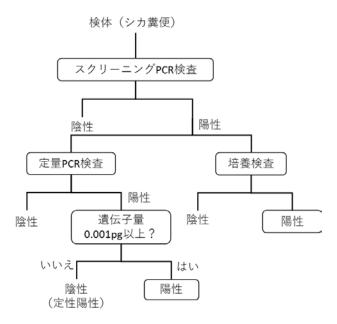
今年度から4年間で、沖縄県を除くすべての都道府県を調査できるように調査対象都道府県を選定 した。特に、牛のヨーネ病の発生が多く、シカの生息頭数も多い北海道については2年間で道内全域 を調査できるように調査対象地域を選定し、今年度は、12 府県及び北海道 7 振興局に各 10 検体を上限とし調査を実施した。調査に当たっては、全国調査を実施した平成 28-29 年度と同様、大日本猟友会を通じて各道府県の猟友会に依頼し、9 月以降に捕殺されたシカについて、検査材料(血液及び糞便)を採取し、冷蔵便にて収集した。検査材料の収集は、昨年度までと同様の調査票を用いて、捕獲日時、場所、捕獲方法、シカの推定年齢及び推定体重等についての情報を収集した。

(2) 検査の実施

送付された材料のうち血液については、動物衛生研究部門(動衛研)で血清分離後、検査の実施まで-20℃で冷凍保存した。また、糞便については-80℃で冷凍保存した。その後、糞便中のヨーネ菌抗原の検出を目的に、動衛研においてそれぞれ次の方法で検査を行った。

ア、ヨーネ病

ョーネ病に対する抗原検査は、遺伝子検出検査及び培養検査により行った【図1】。遺伝子検出検査においては、牛ョーネ病の抗原検査法に準じて、シカ糞便から DNA 抽出キット「ヨーネ・ピュアスピン」を用いて DNA を抽出し、スクリーニング PCR により遺伝子の検出を行った(リアルタイム PCR 試薬は「GeneAce RL qPCR Mix」と「ヨーネプライマーセット RL」(ターゲット遺伝子 IS900)を使用。スクリーニング PCR で陽性となった検体については、定量 PCR(リアルタイム PCR 試薬は「QuantiTect SYBR Green PCR kit」とターゲット遺伝子を IS900とするプライマーセットを使用)で検査するとともに、培養検査を行った。定量 PCR においては、検体中のヨーネ菌遺伝子が DNA 濃度 0.001 pg / well 以上である場合を陽性(定量陽性)、遺伝子が検出されたが DNA 濃度がこれより低い場合を陰性(定性陽性)と判定した。定量 PCR か培養検査のいずれかで陽性となった場合に、陽性と判定した。



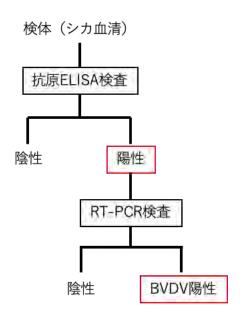
【図1】ヨーネ病検査の流れ

イ、結核

結核に対する抗原検査は、糞便を材料とした培養検査を行い、分離コロニーについて遺伝子検査により結核菌群の同定を行った。

ウ、牛ウイルス性下痢

牛ウイルス性下痢に対する抗原検査は、血液材料(血清)について、牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) の構造タンパク質である Erns を検出する抗原 ELISA キット (BVDV Ag エリーザキット, IDEXX 社) を用いて BVDV のスクリーニング検査を行い、スクリーニング陽性検体について RT-PCR により遺伝子の検出を行った。



【図2 牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) 検査の流れ】

(3) データの解析

調査票に基づくシカの推定体重等の情報について、適切な統計手法を用いて解析した。捕獲地点の位置データは、調査票に緯度・経度が小数点以下3桁以上まで記載されているものについては記載値をそのまま、ハンターマップのメッシュ番号が記載された検体については番号に該当するメッシュの重心座標の緯度・経度に変換した。位置情報が住所としてのみ記載されている検体については、ジオコーディングソフトを用いて緯度・経度情報に変換した。この際、「・・・山中」等記述があいまいであったために市町村レベルまでしか特定できなかった検体については、当該市町村の重心座標の緯度・経度をあてはめた。

検査データについては、今年度に採材した結果に加えて、平成 28 年度から 30 年度に採材した材料 の検査結果についても併せて検討した。統計解析には R、採材地点に関する地理情報解析には QGIS を用いた。

2. 結果

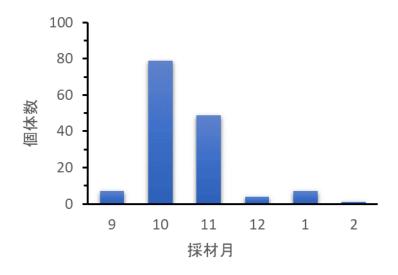
(1)検査されたシカの概要

今年度は 147 頭のシカから検査材料を集め、そのうち、ヨーネ病の検査に用いた検査材料(糞便)は 144 検体、牛ウイルス性下痢の検査に用いた検査材料(血液)は、147 検体であった。

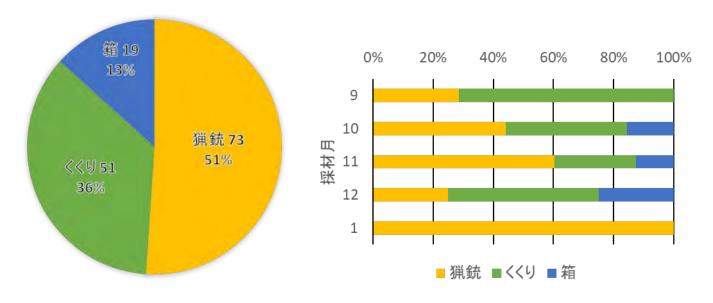
採材された 147 頭について、検査材料が採材された月ごとに採材頭数を算出したところ、検査の依頼が毎年度後半であることと、シカの狩猟期間が 10 月又は 11 月以降(地域によって異なる)であることから、10 月と 11 月に約 9 割が採材されていた【図 3 】。捕獲から検体の採取までの日数は、全ての検体について、1 日以内であった。

採材されたシカの性別は、100 頭 (68.0%) がオス、44 頭 (29.9%) がメス、3 頭は不明であった。 捕獲方法の内訳は、猟銃が約 5 割、くくりわなが約 4 割、箱わなが約 1 割であった【図 4 】。捕獲方法は、猟期との関係から捕獲された月によって異なり、 $9\sim10$ 月はわなによる捕獲が多く、11 月は 猟銃による捕獲が増加した【図 5 】。採材された月や捕獲方法について、シカの性別による違いは認められなかった。

捕獲されたシカの推定年齢を雌雄で比較したところ、オスの平均が 4.08 歳、メスの平均が 2.91 歳 とメスで有意に低かった(Wilcox test による P 値 : <0.01)【図 6 】。推定体重については、オスの平均が 75.4 kg、メスの平均が 46.2 kgとメスで有意に低かった(Wilcox test による P 値 : <0.01)【図 7 】。ただし、捕獲されたシカの年齢と体重は、多くの場合捕獲者の目測による推定値であるため必ずしも正確な値とは言えないことに注意が必要である。

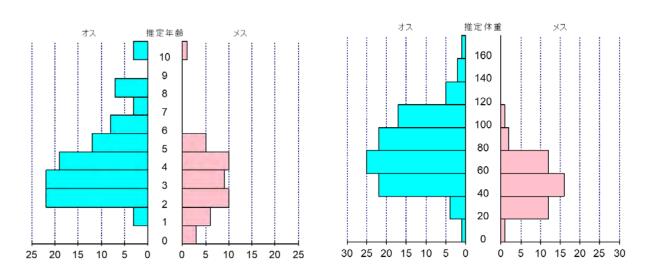


【図3】シカ検体の採材月(令和元年度)



【図4】シカ捕獲方法(令和元年度)

【図5】採材月別のシカ捕獲方法(令和元年度)



【図6】シカの性別と推定年齢

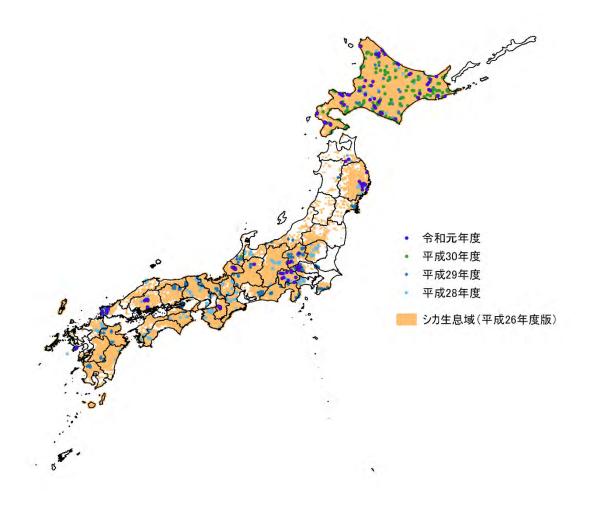
【図7】シカの性別と推定体重

(2) ヨーネ病の検査結果

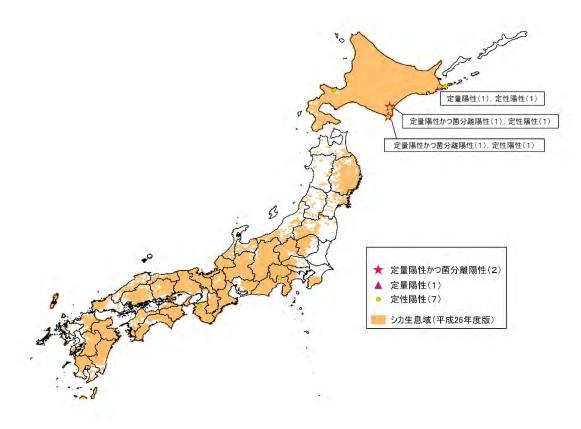
平成 28 年度から今年度にかけての、都道府県別の検査件数とその結果を表 1 に示した。平成 28 年度から今年度にかけて採材した 1,188 検体のうち、定量 PCR 検査の結果、定性陽性と判定された検体は 7 検体、定量陽性と判定された検体は 3 検体あった。また、平成 28 年度から平成 30 年度にかけて採材した 1,044 検体のうち、培養検査陽性となった検体は 2 検体あり、この 2 検体はいずれも定量陽性と判定された検体であった。今年度採材した 144 検体については、スクリーニング PCR で陽性となった検体が 2 検体あり、いずれも定量 PCR 陰性であった。これらの検体についての培養検査は現在実施中である。調査票から得られたシカの捕獲地点とヨーネ病検査結果をそれぞれ図 8 及び図 9 に示した。

【表1】シカ検体数(糞便)及びヨーネ病検査結果の概要

県名	H28年度	H29年度	H30年度	R1年度	合計	定量PC 定性陽性	CR結果 定量陽性	培養陽性
北海道	43	49	168	55	315	5	3	2
青森県	4	0	0	3	7	0	0	0
岩手県	25	0	0	10	35	0	0	0
宮城県	0	25	0	0	25	0	0	0
秋田県	0	1	0	0	1	0	0	0
栃木県	13	0	0	0	13	0	0	0
群馬県	0	25	0	10	35	0	0	0
埼玉県	0	23	0	10	33	0	0	0
千葉県	0	22	0	0	22	0	0	0
神奈川県	24	0	0	0	24	0	0	0
新潟県	0	6	0	0	6	0	0	0
富山県	6	0	0	0	6	0	0	0
石川県	0	8	1	0	9	0	0	0
福井県	0	0	0	10	10	0	0	0
山梨県	25	0	0	10	35	0	0	0
長野県	25	0	0	0	25	0	0	0
岐阜県	0	25	0	0	25	0	0	0
静岡県	0	25	0	0	25	1	0	0
愛知県	0	24	0	0	24	0	0	0
三重県	25	0	0	0	25	0	0	0
滋賀県	20	0	0	0	20	0	0	0
京都府	0	19	0	0	19	0	0	0
大阪府	25	0	0	0	25	0	0	0
兵庫県	25	0	0	0	25	0	0	0
奈良県	0	0	0	10	10	0	0	0
和歌山県	23	0	0	0	23	1	0	0
鳥取県	0	16	0	0	16	0	0	0
島根県	25	0	0	0	25	0	0	0
岡山県	0	24	0	0	24	0	0	0
広島県	25	0	0	8	33	0	0	0
山口県	0	22	0	8	30	0	0	0
徳島県	16	0	0	0	16	0	0	0
香川県	0	24	0	0	24	0	0	0
愛媛県	25	0	0	0	25	0	0	0
高知県	25	0	0	0	25	0	0	0
福岡県	20	0	0	0	20	0	0	0
長崎県	25	0	0	10	35	0	0	0
熊本県	0	18	0	0	18	0	0	0
大分県	0	25	0	0	25	0	0	0
宮崎県	25	0	0	0	25	0	0	0
鹿児島県	0	25	0	0	25	0	0	0
合計	469	406	169	144	1,188	7	3	2



【図8】シカの捕獲地点とシカの生息地域(シカ生息域は環境省のデータに基づく)



【図9】ヨーネ病検査陽性検体の地理的分布

(3) 結核の検査結果

平成 30 年度に採材された 169 検体については、遺伝子検出検査においていずれも陰性であり、また、培養検査の結果、6 検体から抗酸菌の発育を認めたものの、いずれも結核菌群ではなかった。これらのことから、169 検体いずれも結核菌群陰性と判定した。

(4) 牛ウイルス性下痢の検査結果

平成 28 年度から平成 30 年度に採材された血清 1,043 検体及び今年度に採材した 147 検体の県別、年度別の検体数の内訳を表 2 に示した。これらの検体は図 8 に示したシカ捕獲地点で採材された検体のうち検査不適であったものを除いたものとなっている。

合計 1,190 検体についてスクリーニング検査を 実施した結果、今年度に採材した 1 検体がスクリー ニング陽性となったが、この 1 検体は RT-PCR に よる遺伝子検出検査において陰性であったことか ら、1,190 検体すべてについて BVDV 陰性と判定 された。

3. 考察

ョーネ病については、平成 29 年度及び平成 30 年度の検査材料のうち、北海道の3 検体から原因菌の遺伝子が検出され、そのうちの2 検体から菌分離がなされたことから、野生シカの一部がヨーネ病に感染している可能性が示唆された。また、遺伝子検査の結果、北海道、和歌山県及び静岡県の計7 検体について、定量陽性判定に至らない量のヨーネ菌遺伝子が検出(定性陽性)され、これらの個体についても感染していた可能性がある。今回の結果は、各年度の限られた件数の検査結果に基づくものであることから、浸潤の程度及び状況については、今後、さらに調査を行う必要があるものと思われる。

結核については、平成 28 年度から平成 30 年度 にかけて採材されたすべての検体が陰性であった。 よって、これまでの調査では、結核が日本のシカに 浸潤していると考えられる結果は得られなかった。

牛ウイルス性下痢については、平成28年度から 今年度にかけて採材された検体がすべてBVDV陰 性であったことから、今回の調査からは、野生シカ にBVDVが浸潤していることを示唆する結果は得 られなかった。

【表 2】シカ検体数(血清)の概要

			双 (皿1月		
県名	H28年度	H29年度	H30年度	R1年度 	合計
北海道	43	49	167	55	314
青森県	4	0	0	3	7
岩手県	25	0	0	10	35
宮城県	0	25	0	0	25
秋田県	0	1	0	0	1
栃木県	17	0	0	0	17
群馬県	0	25	0	10	35
埼玉県	0	23	0	10	33
千葉県	0	22	0	0	22
神奈川県	24	0	0	0	24
新潟県	0	6	0	0	6
富山県	6	0	0	0	6
石川県	0	8	1	0	9
福井県	0	0	0	10	10
山梨県	25	0	0	10	35
長野県	24	0	0	0	24
岐阜県	0	25	0	1	26
静岡県	0	25	0	0	25
愛知県	0	24	0	0	24
三重県	25	0	0	0	25
滋賀県	20	0	0	0	20
京都府	0	19	0	0	19
大阪府	25	0	0	0	25
兵庫県	25	0	0	0	25
奈良県	0	0	0	10	10
和歌山県	23	0	0	0	23
鳥取県	0	16	0	0	16
島根県	25	0	0	0	25
岡山県	0	24	0	0	24
広島県	25	0	0	10	35
山口県	0	22	0	8	30
徳島県	15	0	0	0	15
香川県	0	25	0	0	25
愛媛県	25	0	0	0	25
高知県	23	0	0	0	23
福岡県	20	0	0	0	20
長崎県	25	0	0	10	35
熊本県	0	18	0	0	18
大分県	0	24	0	0	24
宮崎県	25	0	0	0	25
鹿児島県	0	25	0	0	25
合計	469	406	168	147	1,190

Ⅱ-2. イノシシの調査

1. 方法

(1) 検査材料の収集

平成 26-30 年度調査と同様、大日本猟友会を通じて各県の猟友会に依頼して、捕殺されたイノシシから検査材料(血液)を採取し、冷蔵便にて収集した。今年度も昨年度に引き続き、野生イノシシでオーエスキー病抗体陽性の検出された近畿地方及び九州地方に限定して調査を依頼した。ただし、30 年 9 月に岐阜県内で CSF の発生が確認され、その後周辺県の農場野生イノシシに感染が拡大したことから、農場または野生イノシシで CSF の発生が認められた地域については調査を実施しなかった。検査材料の収集にあたっては、昨年度と同じ調査票を用いて、捕獲日時、場所、捕獲方法、イノシシの推定年齢及び推定体重等についての情報を収集した。

(2) 検査の実施

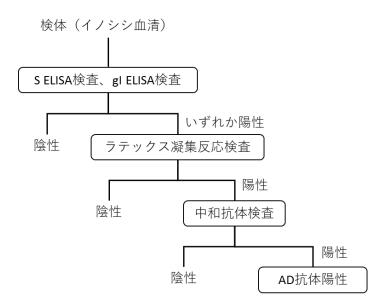
送付された材料は、動衛研で血清分離後、検査の実施まで-20℃で冷凍保存した。その後、AD及びトキソプラズマ症の血中抗体測定を行うことを目的に、動衛研においてそれぞれ次の方法で検査を行った。

ア、AD

AD に対する抗体検査は、ELISA 検査、ラテックス凝集反応検査及び中和抗体検査を用いて行った【図 10】。最初に、全ての検体について IDEXX 社製の ADV(S) エリーザキット(S ELISA)および ADV(gI) エリーザキット(gI ELISA)を用いて検査し、S ELISA については測定値が 0.4 以上のもの、gI ELISA については測定値が 0.6 以下のものをそれぞれ陽性と判定した。なお、S ELISA は、AD ウイルスの変異にかかわらず幅広く AD による抗体を検出することができるが、gI ELISA はウイルス表面糖蛋白質 gI に対する抗体を検出することから、一般的な野外ウイルス株に対しては陽性を、gI 遺伝子が欠損したワクチン株などに対しては陰性を示す。以下の表に被検血清に対する各 ELISA の反応と判定を示した。S ELISA と gI ELISA のいずれかで陽性となった検体について、ラテックス凝集反応検査を行い、40 倍希釈以上で凝集反応が認められた検体を陽性と判定した。さらに、ラテックス凝集反応検査による陽性検体について中和抗体検査を行い、中和抗体価が 2 倍以上のものを AD 抗体陽性と判定した。

【表3】ELISA 検査の結果と判定の考え方

血清	S ELISA	gI ELISA
未感染	陰性	陰性
gI 欠損株以外の AD ウイルス株	陽性	陽性
gI 遺伝子が欠損したワクチン株などの AD ウイルス株	陽性	陰性



【図 10】AD 検査の流れ

イ、トキソプラズマ症

抗 *T. gondii* 抗体検出エライザキット(PrioCHECK Toxoplasma Ab porcine)を用いて検査を行った。

(3) データの解析

調査票に基づくイノシシの年齢等の情報と各疾病の陽性率等について、それぞれ適切な統計手法を用いて解析した。捕獲地点の位置データは、調査票に緯度・経度が小数点以下 3 析以上まで記載されているものについては記載値をそのまま、ハンターマップのメッシュ番号が記載された検体については番号に該当するメッシュの重心座標の緯度・経度に変換した。位置情報が住所としてのみに記載されている検体については、ジオコーディングソフトを用いて緯度・経度情報に変換した。この際、「・・・山中」等記述があいまいであったために市町村レベルまでしか特定できなかった検体については、当該市町村の重心座標の緯度・経度をあてはめた。統計解析には \mathbf{R} 、採材地点に関する地理情報解析には \mathbf{QGIS} を用いた。

2. 結果

(1) 検査されたイノシシの概要

県別、年度別の検体数の内訳を表4に示した。検査材料は、検査に不適であったものを除くと、今年度に集めたものが306 検体で、昨年度までのものを合わせると合計1,881 検体であった。

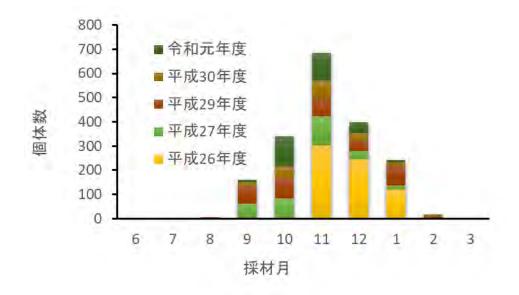
検査材料が採材された月ごとに採材 頭数を算出したところ、検査の依頼が毎 年度後半であることと、多くの地域で狩 猟期間が 11 月以降となっていることか ら、約4割が 11 月に採材されている【図 11】。

捕獲から検体の採取までの日数については、今年度採材された検体のうち、 1 検体を除いて捕獲から1日以内に採材されていた。1 検体は捕獲から4日以内に採材されていた。

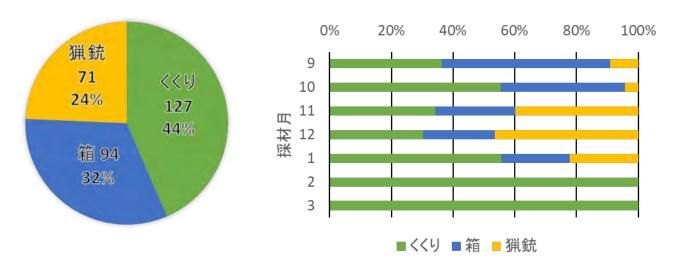
今年度採材されたイノシシの性別は、179頭 (58.5%) がオス、122頭 (39.9%) がメス、不明が5頭であった。採材時の捕獲方法は、くくりわな及び箱わなで全体の4分の3を占め、残りは猟銃による捕獲であった【図 12】。捕獲方法は、猟期との関係から捕獲された月によって異なり、9~10月にはわなによる捕獲が多く、11月以降は猟銃による捕獲が増加したが、1月以降は再びわなによる捕獲割合が増加した【図 13】。イノシシの性別については、主に採材が行われた10-11月にオスの割合がメスより多く、また、いずれの捕獲方法についてもオスの割合が多かった。

【表4】イノシシ検体数の概要

				(P 9X • 7 F		
県名	H26年度	H27年度	H29年度	H30年度	R1年度	合計
宮城県	0	0	39	0	0	39
福島県	0	0	32	0	0	32
茨城県	0	0	40	0	0	40
栃木県	0	3	29	2	0	34
群馬県	0	45	0	0	0	45
埼玉県	0	0	37	0	0	37
千葉県	0	0	34	0	0	34
神奈川県	0	0	36	0	0	36
新潟県	26	0	0	0	0	26
富山県	17	0	0	0	0	17
石川県	0	0	34	0	0	34
福井県	6	0	0	0	0	6
山梨県	24	0	0	0	0	24
長野県	16	0	0	0	0	16
岐阜県	38	0	0	5	0	43
静岡県	24	41	0	0	0	65
愛知県	24	0	0	0	0	24
三重県	27	49	0	40	0	116
滋賀県	20	0	0	0	0	20
京都府	16	0	0	0	38	54
大阪府	0	0	50	0	0	50
兵庫県	20	0	0	0	35	55
奈良県	28	0	0	32	40	100
和歌山県	17	0	0	31	39	87
鳥取県	25	0	0	0	0	25
島根県	21	43	0	0	0	64
岡山県	19	50	0	0	0	69
広島県	33	0	0	0	0	33
山口県	25	0	0	0	0	25
徳島県	26	35	0	0	0	61
香川県	35	0	1	2	2	40
愛媛県	15	0	0	0	0	15
高知県	22	0	0	0	0	22
福岡県	19	0	0	0	0	19
佐賀県	23	0	0	0	0	23
長崎県	25	50	0	0	0	75
熊本県	0	0	40	0	40	80
大分県	16	0	0	35	32	83
宮崎県	29	0	0	40	40	109
鹿児島県	36	0	0	0	40	76
沖縄県	28	0	0	0	0	28
合計	700	316	372	187	306	1,881
	L					



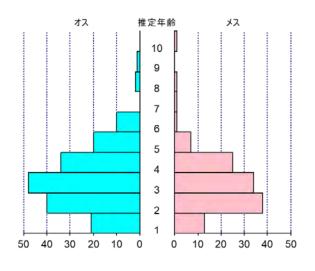
【図 11】イノシシ検体の採材月

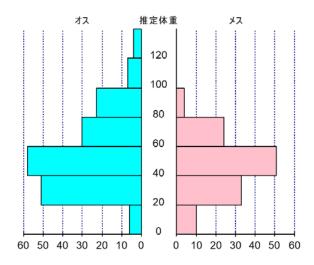


【図 12】イノシシ捕獲方法(令和元年度)

【図 13】採材月別のイノシシ捕獲方法(令和元年度)

今年度捕獲されたイノシシの推定年齢を比較したところ、オスの平均が 3.22 歳、メスの平均が 2.95 歳で有意差はなかった (Wilcox test による P 値: 0.10)【図 14】。また、推定体重を比較したところ、オスの平均が 50.9 kg、メスの平均が 43.0 kgで有意に低かった (Wilcox test による P 値: 0.03)【図 15】。ただし、捕獲されたイノシシの年齢及び体重は、多くの場合捕獲者の目測による推定値であるため必ずしも正確な値とは言えないことに注意が必要である。



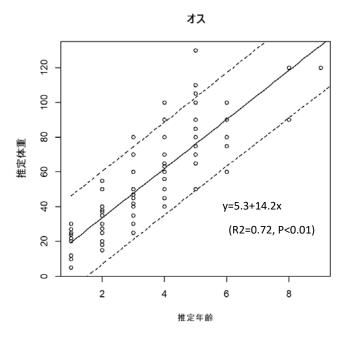


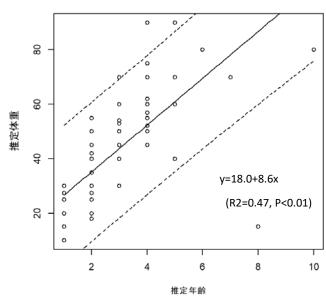
【図 14】イノシシの性別と推定年齢

【図 15】イノシシの性別と推定体重

スと

イノシシの体重は性別によって異なることに加え、成長するに応じて増大しており、一次回帰直線で1年あたりの増体量を推定したところ、今年度捕獲されたイノシシについては、オスで 14.2 kg (95%信頼区間: 12.8-15.4 kg)、メスで 8.6 kg (6.9-10.2 kg) であった【図 16、図 17】。

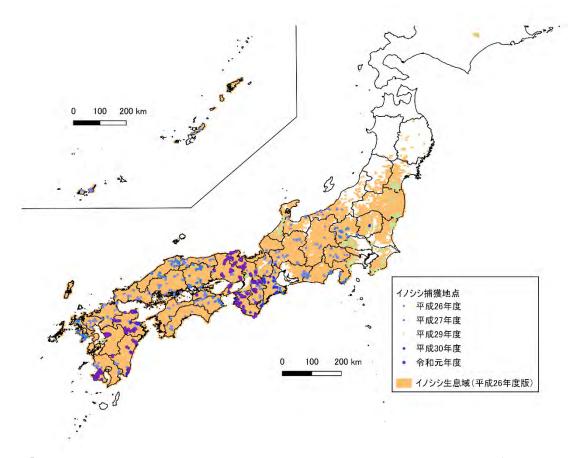




【図 16】イノシシ推定体重と推定年齢(オス)

【図 17】イノシシ推定体重と推定年齢(メス)

調査票から得られたイノシシの捕獲地点の情報をプロットした地図を図18に示した。



【図 18】イノシシの捕獲地点とイノシシの生息地域(イノシシ生息域は環境省のデータに基づく)

(2) AD の検査結果

平成30年度までの採材については、平成26年から平成29年までの3年間で、おおよそ全国を対象に調査対象とした。一方、平成30年度には、3年間の調査で陽性検体が確認されるなど、追加調査が必要と考えられた地域を調査対象としたことから、調査結果は、平成26年度から平成29年度までと、平成30年度の結果に分けて示した。

平成 26 年度から平成 29 年度の 3 年間に検査を実施した全 1,383 検体のうち、いずれかの ELISA 検査で陽性であったものが、319 検体あり、これらのうち最終的に S ELISA、gI ELISA、ラテックス凝集反応検査、中和試験のすべてで陽性となり、野外株に対する抗体陽性と判定された検体は 29 検体(三重県、奈良県、和歌山県及び宮崎県)であった【表 5-1 】。なお、平成 29 年度に採材された検体のうち、いずれかの ELISA 検査で陽性を示した 173 検体は、全てラテックス凝集反応検査で陰性を示し、AD ウイルス抗体陰性と判定された。なお、これらの検体のうち 170 検体は gI ELISA 陰性であり、S ELISA の非特異反応によるものと推定された。

また、近畿地方及び九州地方に限定して採材を行った平成 30 年度の 187 検体については、S ELISA 陽性かつ gI ELISA 陽性となった 45 検体のうち、ラテックス凝集反応検査と中和試験の両方で陽性となり、AD 抗体陽性と判定された検体は 11 検体(三重県、奈良県、和歌山県及び大分県)であった【表 5-2 】。

【表 5-1 】 都道府県別 AD ウイルス野外株抗体検査結果(平成 26 年度-29 年度採材分)

II 4	10 */-	野外株抗体	re u 	陽性率95%	%信頼区間	平均との差	の有意確率
県名	検査数	陽性数	陽性率	下限	上限	P値	P<0.05
宮城県	39	0	0.000	0.000	0.090	1.000	
福島県	32	0	0.000	0.000	0.109	1.000	
茨城県	40	0	0.000	0.000	0.088	1.000	
栃木県	31	0	0.000	0.000	0.112	1.000	
群馬県	45	0	0.000	0.000	0.079	1.000	
埼玉県	37	0	0.000	0.000	0.095	1.000	
千葉県	34	0	0.000	0.000	0.103	1.000	
神奈川県	36	0	0.000	0.000	0.097	1.000	
新潟県	25	0	0.000	0.000	0.137	1.000	
富山県	17	0	0.000	0.000	0.195	1.000	
石川県	34	0	0.000	0.000	0.103	1.000	
福井県	6	0	0.000	0.000	0.459	1.000	
山梨県	24	0	0.000	0.000	0.142	1.000	
長野県	16	0	0.000	0.000	0.206	1.000	
岐阜県	38	0	0.000	0.000	0.093	1.000	
静岡県	62	0	0.000	0.000	0.058	0.643	
愛知県	24	0	0.000	0.000	0.142	1.000	
三重県	76	17	0.224	0.136	0.334	0.000	*
滋賀県	20	0	0.000	0.000	0.168	1.000	
京都府	16	0	0.000	0.000	0.206	1.000	
大阪府	50	0	0.000	0.000	0.071	0.629	
兵庫県	20	0	0.000	0.000	0.168	1.000	
奈良県	28	4	0.143	0.040	0.327	0.003	*
和歌山県	17	7	0.412	0.184	0.671	0.000	*
鳥取県	25	0	0.000	0.000	0.137	1.000	
島根県	64	0	0.000	0.000	0.056	0.647	
岡山県	69	0	0.000	0.000	0.052	0.408	
広島県	33	0	0.000	0.000	0.106	1.000	
山口県	25	0	0.000	0.000	0.137	1.000	
徳島県	61	0	0.000	0.000	0.059	0.641	
香川県	36	0	0.000	0.000	0.097	1.000	
愛媛県	15	0	0.000	0.000	0.218	1.000	
高知県	22	0	0.000	0.000	0.154	1.000	
福岡県	19	0	0.000	0.000	0.176	1.000	
佐賀県	23	0	0.000	0.000	0.148	1.000	
長崎県	75	0	0.000	0.000	0.048	0.412	
熊本県	40	0	0.000	0.000	0.088	1.000	
大分県	16	0	0.000	0.000	0.206	1.000	
宮崎県	29	1	0.034	0.001	0.178	0.459	
鹿児島県	36	0	0.000	0.000	0.097	1.000	
沖縄県	28	0	0.000	0.000	0.123	1.000	
合計	1,383	29	0.021	0.014	0.030		

※割合の信頼区間の推定と、全国平均との差の検定は二項検定による。

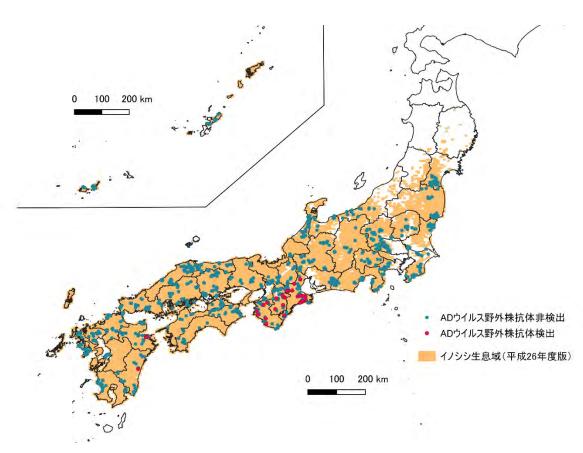
【表 5 - 2】 都道府県別 AD ウイルス野外株抗体検査結果(平成 30 年度採材分)

旧夕	県名 検査数		但此表	陽性率95%信頼区間		平均との差の有意確率	
宗 石	快直致	陽性数	物性华	下限	上限	P値	P<0.05
栃木県	2	0	0.000	0.000	0.842	1.000	
岐阜県	5	0	0.000	0.000	0.522	1.000	
三重県	40	6	0.150	0.057	0.298	0.028	*
奈良県	32	1	0.031	0.001	0.162	1.000	
和歌山県	31	1	0.032	0.001	0.167	1.000	
香川県	2	0	0.000	0.000	0.842	1.000	
大分県	35	3	0.086	0.018	0.231	0.459	
宮崎県	40	0	0.000	0.000	0.088	0.172	
合計	187	11	0.059	0.030	0.103		

[※]割合の信頼区間の推定と、全検体の平均との差の検定は二項検定による。

平成 26 年度から平成 30 年度までの調査により AD ウイルス野外株に対する抗体が認められたイノシシの捕獲地点を【図 19】に示した。

令和 1 年度に採材した 306 検体については、いずれかの ELISA 検査で陽性であったものが、127 検体あった。今後、これらの検体についてラテックス凝集反応検査及び中和抗体検査を実施する。



【図 19】AD ウイルス野外株に対する抗体を保有するイノシシの捕獲地点とイノシシの生息域

(3) トキソプラズマ症の検査結果

平成26、27、29、30年度及び令和元年度の5年間に収集された検体のうち、検査可能であった血清は1,881検体であった。このうちエライザ検査で陽性となったのは、670検体であり、全体の抗体陽性率(95%信頼区間)は35.6%(33.5-37.8)となった。府県ごとにみると0%から71.4%まで分布しており、参画41府県中10府県で全国平均と比べて有意な差が認められた【表6】。年度別の抗体陽性率は有意差が認められ(P<0.01)、平成27年度の抗体陽性率は、他年度に比べて高かった(P<0.01)【表7】。地域別の抗体陽性率は、東北・関東地方と九州・沖縄地方で高く(それぞれ46.5%、および38.9%)、他の地方は同程度であった【表8】。満2歳以上の個体の陽性率は1歳以下の個体より有意に高かった(1歳未満、満1歳、満2歳以上でそれぞれ18.5、24.0および38.1%、P<0.01)が【表9】、性差は認められなかった(P=0.46)【表10】。

【表 6 】 抗トキソプラズマ原虫抗体検査結果 (平成 26、27、29、30 年度および令和元年度の 5 年分の合計)

旧力	+ <u></u>	75 14 */-	陽性率	95%信	頼区間	平均との差	の有意確率
県名	検査数	陽性数	物性学	下限	上限	P値	P<0.05
宮城県	39	19	0.487	0.324	0.652	0.10	
福島県	32	13	0.406	0.237	0.594	0.58	
茨城県	40	25	0.625	0.458	0.773	< 0.01	*
栃木県	34	9	0.265	0.129	0.444	0.29	
群馬県	45	18	0.400	0.257	0.557	0.54	
埼玉県	37	17	0.459	0.295	0.631	0.23	
千葉県	34	14	0.412	0.246	0.593	0.48	
神奈川県	36	23	0.639	0.462	0.792	< 0.01	*
新潟県	26	5	0.192	0.066	0.394	0.10	
富山県	17	0	0.000	0	0.195	< 0.01	*
石川県	34	4	0.118	0.033	0.275	< 0.01	*
福井県	6	0	0.000	0	0.459	0.10	
山梨県	24	7	0.292	0.12	0.511	0.67	
長野県	16	3	0.188	0.4	0.456	0.20	
岐阜県	43	11	0.256	0.135	0.412	0.20	
静岡県	65	40	0.615	0.486	0.733	< 0.01	*
愛知県	24	7	0.292	0.126	0.511	0.67	
三重県	116	34	0.293	0.212	0.385	0.17	
滋賀県	20	5	0.250	0.087	0.491	0.36	
京都府	54	11	0.204	0.106	0.335	0.02	*
大阪府	50	14	0.280	0.162	0.425	0.30	
兵庫県	54	26	0.481	0.343	0.622	0.06	
奈良県	100	27	0.270	0.186	0.368	0.08	
和歌山県	87	32	0.368	0.267	0.478	0.82	
鳥取県	25	10	0.400	0.211	0.613	0.68	
島根県	65	22	0.338	0.226	0.466	0.80	
岡山県	69	22	0.319	0.212	0.442	0.62	
広島県	33	6	0.182	0.07	0.355	0.04	*
山口県	25	10	0.400	0.211	0.613	0.68	
徳島県	61	23	0.377	0.256	0.51	0.79	
香川県	40	7	0.175	0.073	0.328	0.02	*
愛媛県	15	6	0.400	0.163	0.677	0.79	
高知県	22	8	0.364	0.172	0.593	1	
福岡県	19	6	0.316	0.126	0.566	0.81	
佐賀県	23	5	0.217	0.075	0.437	0.20	
長崎県	75	44	0.587	0.467	0.699	< 0.01	*
熊本県	80	25	0.313	0.213	0.426	0.48	
大分県	83	29	0.349	0.248	0.462	1	
宮崎県	109	35	0.321	0.235	0.417	0.48	
鹿児島県	76	28	0.368	0.261	0.487	0.81	
沖縄県	28	20	0.714	0.513	0.868	< 0.01	*
合計	1881	670	0.356	0.335	0.378		

※割合の信頼区間推定と、全国平均との差の検定は二項検定による。

【表7】 年度別抗トキソプラズマ原虫抗体検査結果

	陽性数	陰性数	合計	陽性率
平成 26 年度	216	485	701	0.308
平成 27 年度	141	175	316	0.446
平成 29 年度	143	229	372	0.384
平成 30 年度	61	126	187	0.326
令和元年度	109	196	305	0.357
合計	670	1211	1881	0.356

全体のカイ二乗検定 P<0.01

【表8】 地域別抗トキソプラズマ原虫抗体検査結果

	陽性数	陰性数	合計	陽性率
東北・関東	138	159	297	0.465
甲信越•中部	111	260	371	0.299
近畿•中国	185	397	582	0.318
四国	44	94	138	0.319
九州·沖縄	192	301	493	0.389
合計	670	1211	1881	0.356

全体のカイ二乗検定 P<0.01

【表9】 年齢層別抗トキソプラズマ原虫抗体検査結果

	陽性数	陰性数	合計	陽性率
1歳未満	10	44	54	0.185
満1歳	63	199	262	0.240
2歳以上	578	939	1517	0.381
合計	651	1182	1833	0.355

*年齢が判明した個体のみ

1歳以下と2歳以上をまとめたカイ二乗検定 P<0.01

【表 10】 性別抗トキソプラズマ原虫抗体検査結果

	陽性数	陰性数	合計	陽性率
オス	361	684	1045	0.345
メス	286	501	787	0.363
合計	647	1185	1832	0.353

*性別が判明した個体のみ。カイ二乗検定 P=0.46

3. 考察

(1) AD について

平成 26-29 年度の調査で、近畿地方及び九州地方において野外株に対する抗体を保有するイノシシが確認され、これらの地域を対象に実施した平成 30 年度調査でも、同様の傾向が確認された。このことから、これらの地域のイノシシ群内において ADV が定着していることが考えられる。今後は、これらの地域での感染の動向を監視するとともに、これらの地域の周辺地域においても継続した調査を行い、感染イノシシの分布拡大の可能性を監視していく必要があると考えられた。

(2) トキソプラズマ症について

今回の検査の結果、約35%の検体が抗体陽性となったことから、我が国の野生イノシシは高い頻度で T. gondii への感染履歴があり、シストを保有している可能性が示された。年度別の抗体陽性率は、特に平成27年度で高く、地域別では東北・関東地方が高かった。この理由は、本事業では年度ごとの参加府県が異なること、また各年度の収集検体数に偏りがあることが影響している可能性がある。これまで各年の調査対象地域は、AD陽性イノシシの検出状況に基づいて選定されているため、今後、トキソプラズマ症の浸潤状況の把握を念頭に置いた調査対象地域の選定についても検討する必要があるだろう。

1歳未満で 20%弱の個体が抗トキソプラズマ抗体を保有していたことから、母子感染が起こっている可能性が示唆され、また、加齢個体ほど抗体陽性率が高かったことから、母子感染以外の経路での感染も起こっていることが示唆された。本調査では具体的な感染経路を明らかにすることはできないため、具体的な感染機序の解明については、他に調査等を行って明らかにする必要がある。トキソプラズマ症は人獣共通感染症であり、ヒトが感染しても多くの場合症状を示さないが、後

天性免疫不全症候群 (AIDS) 発症者などでは重篤化する場合があり、また、妊婦が感染すると流死産や胎児の先天異常の原因となることが知られている。今回の調査で、野生イノシシにおける高い感染率が示唆されたことから、イノシシの捕獲・解体処理時の適切な衛生管理や、喫食時の十分な加熱調理の重要性が示された。また、この高い感染率に鑑み、養豚場においては引き続き豚の感染リスクに留意してバイオセキュリティを維持・向上させていく必要があると考えられた。

Ⅱ-3. 野鳥の調査

1. 計画

(1) 野鳥におけるニューカッスル病ウイルス (トリパラミクソウイルス1型) 保有状況の調査 ア、野鳥糞便からのニューカッスル病ウイルス分離

各都道府県家畜保健衛生所を中心にニューカッスル病ウイルスの検査を目的とした採材を実施する。採材した糞便は動物衛生研究部門に送付し、発育鶏卵を用いてニューカッスル病ウイルスを対象とした分離検査を実施する。5 羽分の糞便を1 本の試験管に採材し1 検体とする。ハト糞便については原則的に年2 回採材する(場所によっては採取状況や天候によって必ずしも採材できない場合もありうる)。水禽糞便については渡り鳥が飛来する10 月以降2 月まで2 ないし3 回実施する【表11、12】。水禽糞便においても採取状況や天候によって必ずしも採材できない場合もありうる。

イ、分離ウイルスの同定および培養

発育鶏卵で分離されたウイルスを、標準診断法である抗ニューカッスル病ウイルス免疫血清を用いた鶏赤血球凝集抑制試験(HI)にてニューカッスル病ウイルスと同定する。ニューカッスル病ウイルスと同定された検体は、以下の性状解析に用いるため発育鶏卵を用いて継代培養を実施する。

(2) 分離されたニューカッスル病ウイルスの性状解析

分離されたニューカッスル病ウイルスについて、本ウイルスの病原性に深く関与しているとされる F 蛋白開裂部位の遺伝子解析を実施する。この遺伝子解析結果を既知のニューカッスル病ウイルスやワクチン株と比較し、野鳥が保有するウイルスの遺伝学的特徴を明らかにする。

2. 成果

(1) 成果の内容

ア、ハト糞便からの分離状況

2019 年 9 月から 2020 年 2 月までの期間中、全国 12 県から 62 検体が送付された【表 11】。これらの検体からニューカッスル病ウイルスは分離されなかった。

イ、水きん糞便からの分離状況

2019 年 10 月から 2020 年 2 月までの期間中、全国 12 県から 68 検体が送付された【表 12】。これらの検体からニューカッスル病ウイルスは分離されなかった。

(2) 成果の活用

今年度収集したサンプルから病原性ニューカッスル病ウイルスは分離されなかった。しかし、海外ではニューカッスル病の発生が散発していることから、ウイルス侵入の可能性は否定できない。今後も継続的なサーベイランス及びワクチンを中心とした防疫対策が必要であることを示唆する。

【表 11】野鳥におけるニューカッスル病ウイルス保有状況調査(ハト)

都道府県名			採材時期			- 計
10 担	2019.9	2019.1	2019.12	2020.1	2020.2	āl
茨城			3	3		6
埼玉			3		3	6
福井		3			3	6
山梨					3	3
大阪				1	1	2
和歌山		3			3	6
岡山			3		3	6
香川			3		3	6
福岡			3		3	6
大分	3	3				6
熊本				3		3
鹿児島			3		3	6
計	3	9	18	7	25	62

【表 12】野鳥におけるニューカッスル病ウイルス保有状況調査(水きん)

都道府県名	採材時期					
	2018.10	2018.11	2018.12	2019.1	2019.2	計
岩手		3				3
山形		3				3
福島		5	3	3		11
茨城			3	3	3	9
栃木		3				3
千葉	2	2		3		7
山梨			3	3	3	9
大阪				1	1	2
和歌山					3	3
香川		3	3			6
福岡			3			3
宮﨑			3	3	3	9
計	2	19	18	16	13	68

Ⅲ 野生のシカにおける鹿慢性消耗病(CWD)の検査体制の整備

ア 鹿慢性消耗病 (CWD) の検査方法の検討

鹿慢性消耗病(CWD)の検査において、我が国で用いられている牛海綿状脳症(以下「BSE」という。)の ELISA キット(製造販売業者:株式会社ニッピ、製品名:BSE 検査キットII 及び ELISA 試薬・前処理器材セット)が使用可能かどうかを平成 30 年度に引き続き検証した。兵庫県において、昨年度と本年度に採材されたシカ脳合計 102 検体から、GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kits(シグマ)を用いて DNA を抽出後、

-8F (5'-TCTAGCTGTCATATGAAGAAGCGACCAAAACCTGG-3')

788R (5'-AGCTGTGGATCCTCATCATGCCCCCCTTTGGTAATAAG-3')

のプライマーセットを用いて、シカプリオン蛋白質遺伝子の遺伝子型を決定した。その結果、ELISA キットで用いられている抗体の抗原決定基も含め、アミノ酸置換を伴う遺伝子多型は認められなかった。このことから、シカの CWD に対しても BSE 検査用の市販の ELISA キットが利用できることが確認された。

イ 検査の実施

北海道から 100 検体、兵庫県から 44 検体の合計 144 検体を収集し、アで検証した ELISA キットを用いて検査を行った。北海道の検体については、再委託先の北海道大学が検体の採材と ELISA、ウエスタンブロット検査を行った。その結果、全検体の ELISA の値はカットオフ値を下回り、陰性と判定された。また、同じ検体について、ウエスタンブロット法を用いて検査を行ったところ、異常プリオン蛋白質特有のシグナルは検出されず、全ての検体が陰性と判定された。

ウ 都道府県における CWD 検査の試行調査

有害鳥獣駆除等で捕獲された鹿の検査を都道府県の家畜保健衛生所において実施可能かどうかについて検証するため、愛媛県と岡山県の家畜保健衛生所の協力を得た。BSE エライザキット (BSE 検査キット II 及び ELISA 試薬・前処理器材セット)を両県に送付し、ELISA 検査の実施を依頼した。愛媛県では3検体、岡山県では5検体を検査した結果、検体の ELISA 値はカットオフ値を下回り、陰性と判断された。また、両県の検査担当者に聞き取りを行ったところ、検査実施の際には特段問題はなかったとの回答を得た。