

**平成 30 年度戰略的監視・診斷体制整備推進委託事業
野生動物監視体制整備事業報告書**

平成 31 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

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、結核病
- ウ、ブルセラ病

(2) イノシシ（血液）

- ア、オーエスキー病（AD）
- イ、豚コレラ（CSF）

(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検証を行い、都道府県における検査の実施状況に関する調査を行った。また、シカからの検体の採材方法をまとめたマニュアルを作成した。

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

本年度のシカの調査は、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実施した。全国調査を実施した 28、29 年度と同様、大日本猟友会を通じて北海道の猟友会に依頼し、8 月下旬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

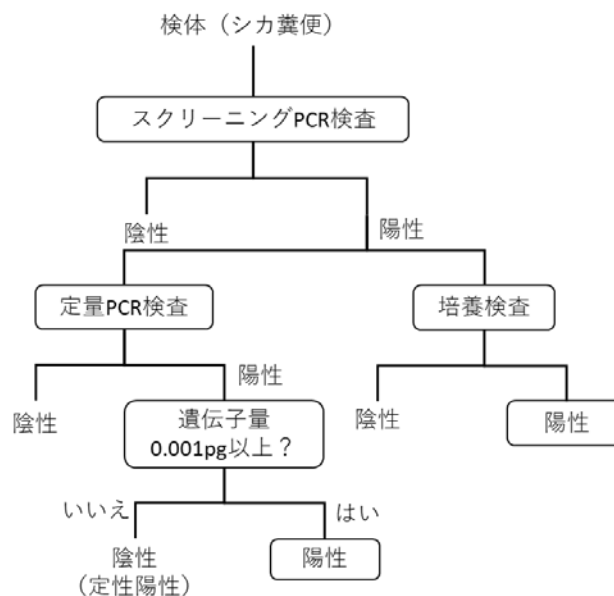
査材料の収集にあたっては、昨年度までと同様の調査票を用いて、捕獲日時、場所、捕獲方法、シカの推定年齢及び推定体重等についての情報を収集した。なお、検査材料の収集にあたっては、道内を振興局単位で分割し、シカの捕獲数が多く畜産業が盛んな地域からより多くの検体を集めることとした。

(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℃で保存した。その後、ヨーネ病及び結核病の糞便中抗原の検出並びにブルセラ病の血中抗体の検出を目的に、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

ヨ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、牛ヨ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、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（定性的には陽性）と判定した。



【図1】 ヨーネ病検査の流れ

イ、結核病

結核病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、ブルセラ病

ブルセラ病に対する抗体検査は、牛ブルセラ病の抗体検査に準じて、急速凝集反応試験によりスクリーニングを行い、スクリーニング陽性検体について補体結合反応（CF）試験により確認を行った。なお、スクリーニングにおいては、抗原：血清＝１：１で凝集が±判定以上を示した検体について、抗原：血清＝２：１で再度試験を行い、凝集を示す検体をスクリーニング陽性とした。

（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。

ヨーネ病及び結核病の検査データについては、本年度採材した結果に加えて、28年度と29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。なお、今回の解析に含めなかった、ヨーネ病と結核病の28年度、ブルセラ病の28年度と29年度の結果は、全ての検査で陰性となっている。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

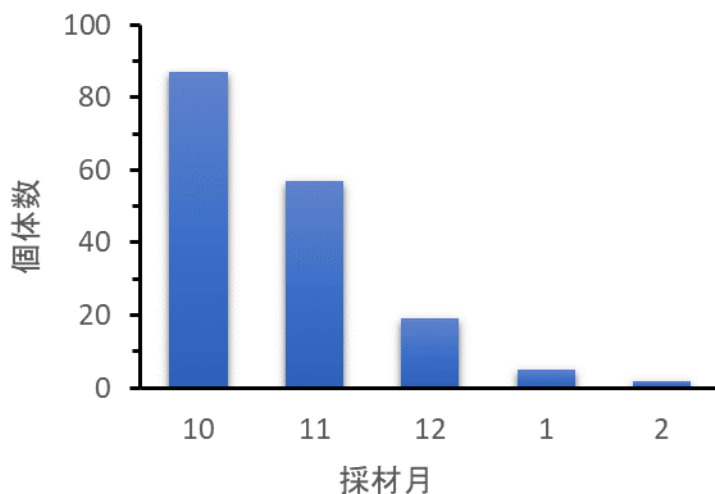
(1) 検査されたシカの概要

平成 30 年度は 170 頭のシカから検査材料を集め、そのうち、糞便の得られなかったものを除くと、ヨーネ病及び結核病の検査に用いた検査材料（糞便）は 169 検体、ブルセラ病の検査に用いた検査材料（血液）は、170 検体であった。

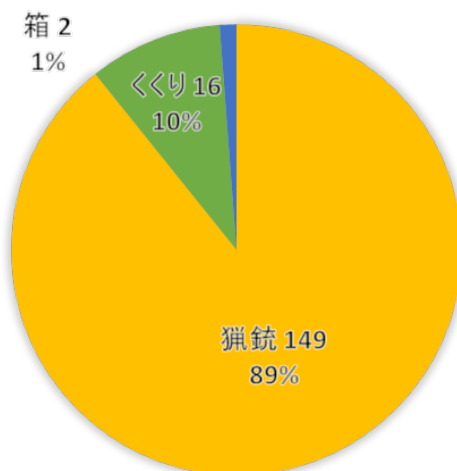
採材された 170 頭について、検査材料が採材された月ごとに採材頭数を算出したところ、北海道におけるシカの狩猟期間が 10 月以降であることから、10 月と 11 月に約 9 割が採材されていた【図 2】。捕獲から検体の採取までの日数は、全ての検体について、1 日以内であった。

採材されたシカの性別は、126 頭（71.4%）がオス、39 頭（22.9%）がメス、5 頭は不明であった。捕獲方法の内訳は、猟銃が約 9 割、くくりわなが約 1 割であった【図 3】。捕獲時期と捕獲方法の関係について検討したところ、捕獲時期にかかわらずほとんどが猟銃による捕獲であった【図 4】。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。

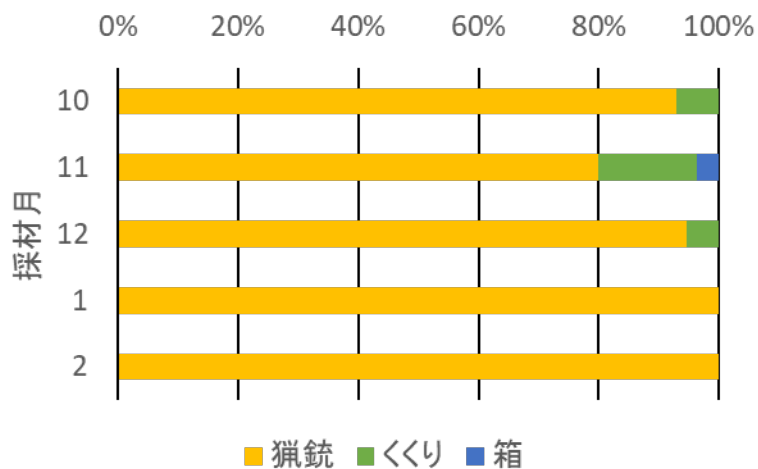
捕獲されたシカの推定年齢を雌雄で比較したところ、オスの平均が 4.17 歳、メスの平均が 3.49 歳とメスで有意に低かった（Wilcoxon test による P 値： <0.05 ）【図 5】。推定体重については、オスの平均が 90.0 kg、メスの平均が 63.6 kg とメスで有意に低かった（Wilcoxon test による P 値： <0.001 ）【図 6】。ただし、捕獲されたシカの年齢と体重は、多くの場合捕獲者の目測による推定値であるため必ずしも正確な値とは言えないことに注意が必要である。



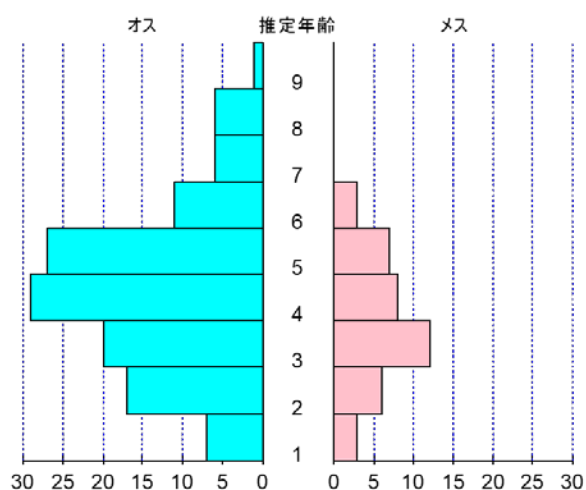
【図 2】シカ検体の採材月（平成 30 年度）



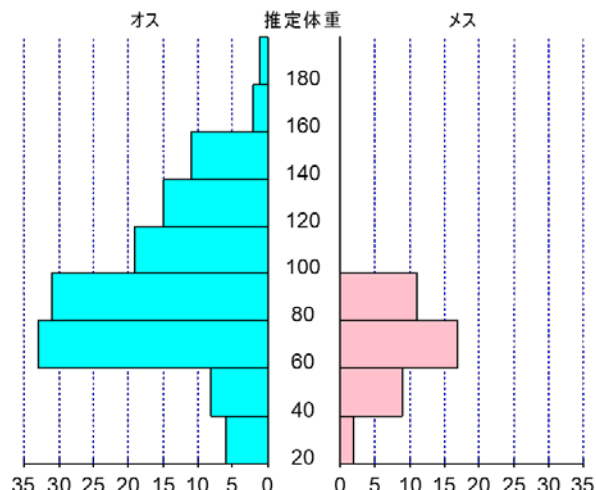
【図 3】シカ捕獲方法



【図 4】採材月別のシカ捕獲方法



【図 5】シカの性別と推定年齢



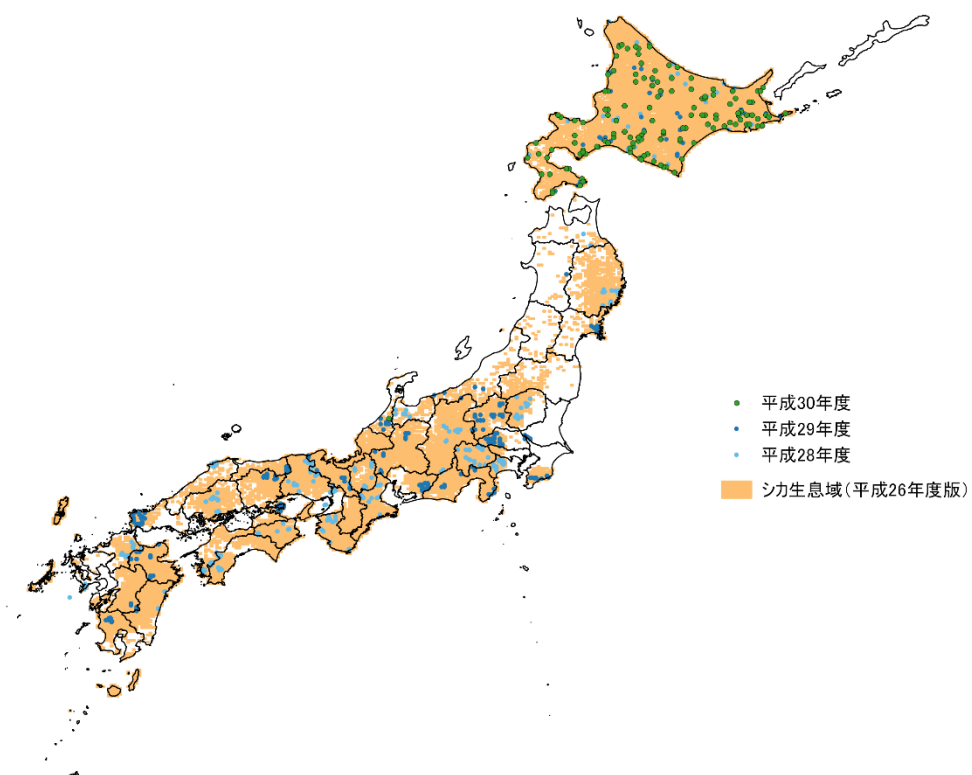
【図 6】シカの性別と推定体重

(2) ヨーネ病の検査結果

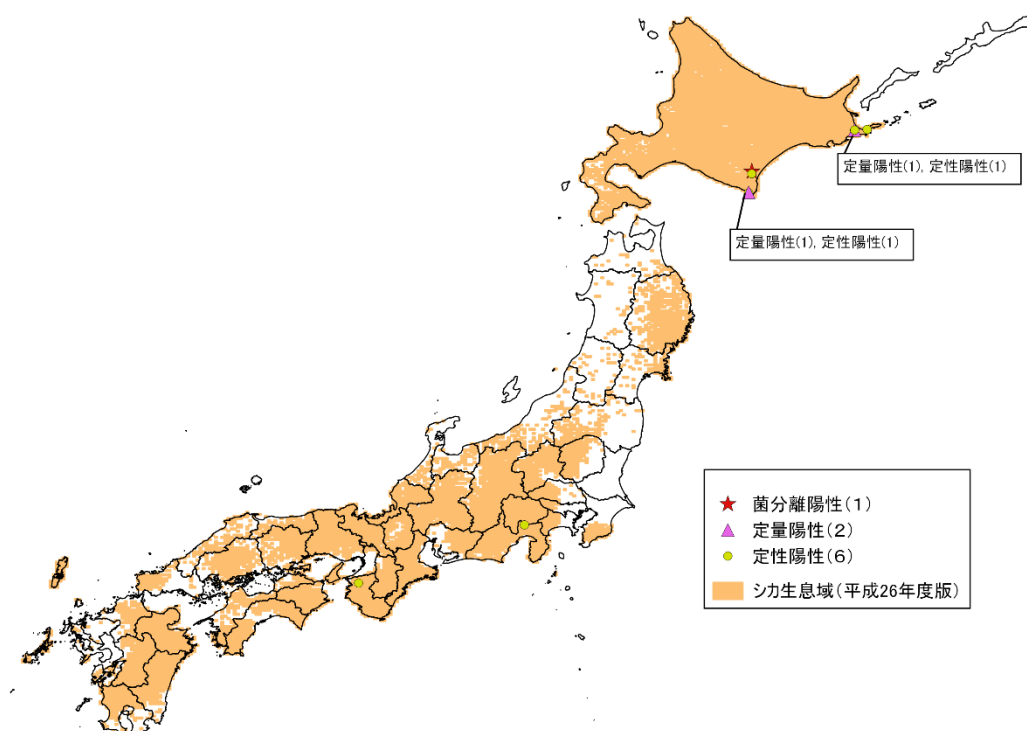
平成 28 年度から平成 30 年度における、都道府県別の検査件数とその結果を表 1 に示した。平成 29 年度に採材した 406 検体のうち、スクリーニング PCR により陽性となった 9 検体について定量 PCR を行ったところ、1 検体で陽性となり、この 1 検体でヨーネ菌が分離された。今年度採材した 169 検体については、スクリーニング PCR で 9 検体が陽性となり、このうち 2 検体で定量 PCR 陽性となった。本年度のスクリーニング PCR で陽性となった 9 検体については、今後、ヨーネ菌であるかを確認するための培養検査を行う。調査票から得られたシカの捕獲地点とヨーネ病検査結果をそれぞれ図 7 及び図 8 に示した。

【表 1】 シカ検体数及びヨーネ病検査結果の概要

県名	28年度	29年度	30年度	合計	定性陽性	定量陽性	培養陽性
北海道	43	49	168	260	7	3	1
青森県	4	0		4			
岩手県	25	0		25			
宮城県	0	25		25			
秋田県	0	1		1			
栃木県	13	0		13			
群馬県	0	25		25			
埼玉県	0	23		23			
千葉県	0	22		22			
神奈川県	24	0		24			
新潟県	0	6		6			
富山県	6	0		6			
石川県	0	8	1	9			
山梨県	25	0		25			
長野県	25	0		25			
岐阜県	0	25		25			
静岡県	0	25		25	1	0	0
愛知県	0	24		24			
三重県	25	0		25			
滋賀県	20	0		20			
京都府	0	19		19			
大阪府	25	0		25			
兵庫県	25	0		25			
和歌山県	23	0		23	1	0	0
鳥取県	0	16		16			
島根県	25	0		25			
岡山県	0	24		24			
広島県	25	0		25			
山口県	0	22		22			
徳島県	16	0		16			
香川県	0	24		24			
愛媛県	25	0		25			
高知県	25	0		25			
福岡県	20	0		20			
長崎県	25	0		25			
熊本県	0	18		18			
大分県	0	25		25			
宮崎県	25	0		25			
鹿児島県	0	25		25			
合計	469	406	169	1,044	9	3	1



【図7】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 8】 ヨーネ病検査陽性検体の地理的分布

(3) 結核病の検査結果

昨年度採材した 406 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、18 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、406 検体いずれも結核菌群陰性と判定した。今年度採材した 169 検体については、培養検査中であり、今後、分離できた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う。

(4) ブルセラ病の検査結果

ブルセラ病については、今年度検査を行った 170 検体すべてについて急速凝集反応陰性であった。

3. 考察

ヨーネ病については、昨年度及び今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 1 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計 6 検体について、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。今回の検査は、糞便中のヨーネ菌遺伝子を検出するものであり、検出個体が感染していたかは判別できないことから、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。

結核病については、昨年度採材分については、すべて陰性であり、今年度採材分については、引き続き検査を行っている。

ブルセラ病の急速凝集反応では、今年度のすべての検体が陰性であった。よって、今回の調査では、ブルセラ病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。

Ⅱ－２． イノシシの調査

1. 方法

(1) 検査材料の収集

平成 26－29 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。今年度は、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。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。

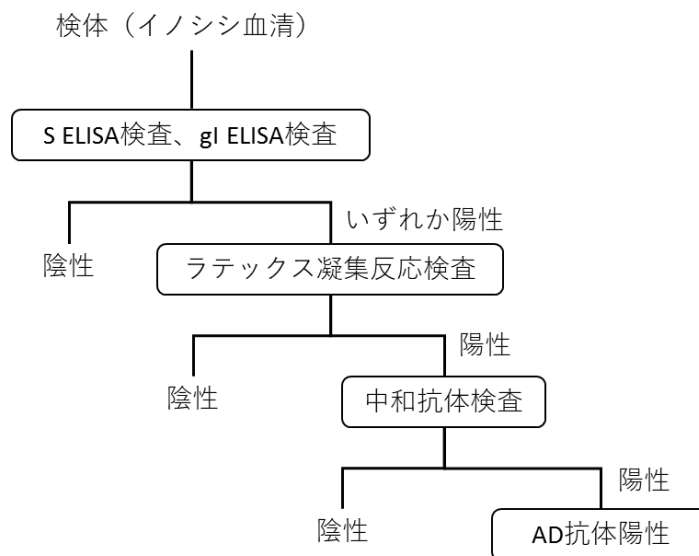
(2) 検査の実施

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 CSF の血中抗体濃度を測定することを目的に、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 9】。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。

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 9】AD 検査の流れ

イ、CSF

JNC 豚コレラエライザキットⅡを用いて検査を行い、「陽性」又は「疑陽性」の結果を示した血清検体について、ペスチウイルスを用いた中和試験を実施した。中和試験では、CSFV GPE-株、BVDV-1 Nose 株、及び BVDV-2 KX-91CP 株を用いて各ウイルスに対する中和抗体価を比較した。

(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 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 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) 検査されたイノシシの概要

県別、年度別の検体数の内訳を表2に示した。検査材料は、検査に不適であったものを除くと、平成26年度に集めたものが698検体、平成27年度に集めたものが312検体、平成29年度に集めたものが372検体、平成30年度に集めたものが187検体で合計1,569検体であった。

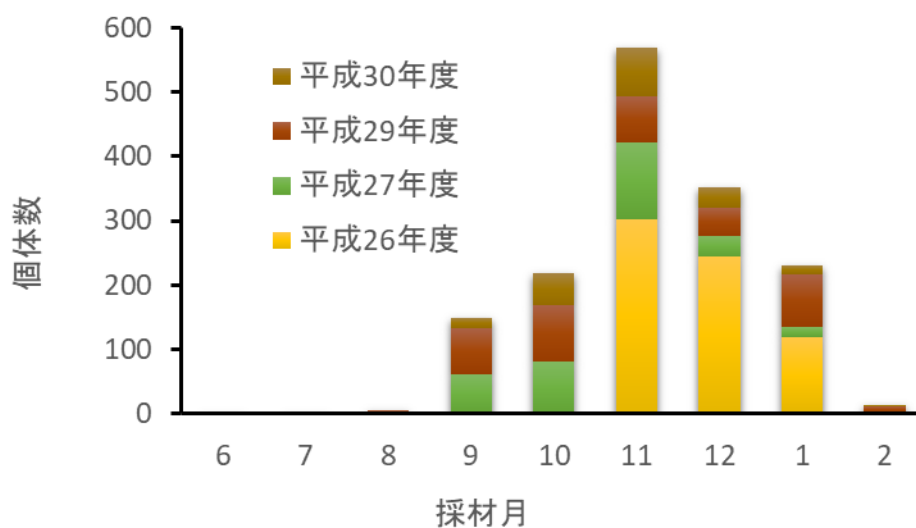
検査材料が採材された月ごとに採材頭数を算出したところ、検査の依頼が毎年度後半であることと、多くの地域で狩猟期間が11月以降となっていることから、約4割が11月に採材されている【図10】。

捕獲から検体の採取までの日数については、今年度採材されたすべての検体について、捕獲から1日以内に採材されていた。

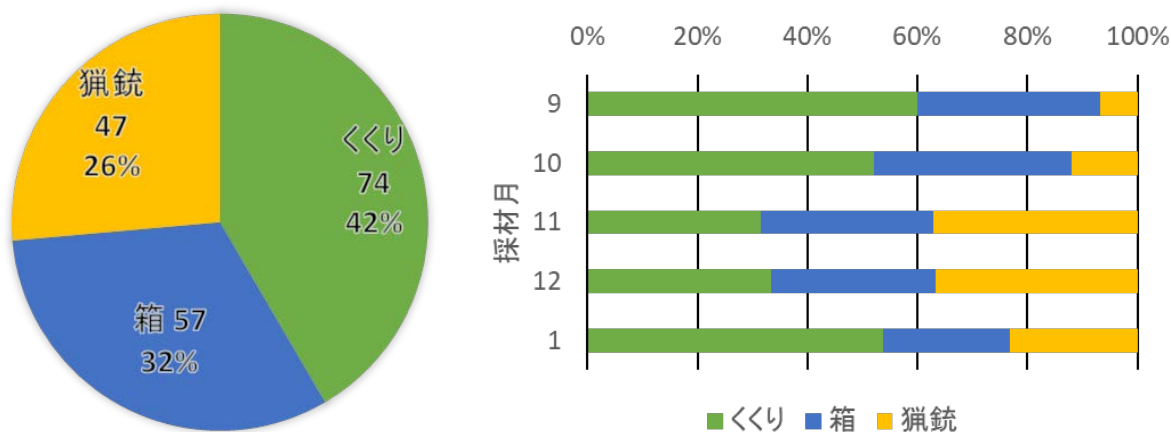
今年度採材されたイノシシの性別は、92頭（49.2%）がオス、86頭（46.0%）がメス、不明が9頭であった。採材時の捕獲方法は、くくりわな及び箱わなで全体の4分の3を占め、残りは猟銃による捕獲であった【図11】。捕獲方法は、猟期との関係から捕獲された月によって異なり、9～10月には罠による捕獲が多く、11月以降は猟銃による捕獲が増加した【図12】。イノシシの性別については、採材された月や捕獲方法による違いは認められなかった。

【表2】イノシシ検体数の概要

県名	26年度	27年度	29年度	30年度	合計
宮城県	0	0	39		39
福島県	0	0	32		32
茨城県	0	0	40		40
栃木県	0	2	29	2	33
群馬県	0	45	0		45
埼玉県	0	0	37		37
千葉県	0	0	34		34
神奈川県	0	0	36		36
新潟県	25	0	0		25
富山県	17	0	0		17
石川県	0	0	34		34
福井県	6	0	0		6
山梨県	24	0	0		24
長野県	16	0	0		16
岐阜県	38	0	0	5	43
静岡県	24	38	0		62
愛知県	24	0	0		24
三重県	27	49	0	40	116
滋賀県	20	0	0		20
京都府	16	0	0		16
大阪府	0	0	50		50
兵庫県	20	0	0		20
奈良県	28	0	0	32	60
和歌山県	17	0	0	31	48
鳥取県	24	0	0		24
島根県	21	43	0		64
岡山県	19	50	0		69
広島県	33	0	0		33
山口県	25	0	0		25
徳島県	26	35	0		61
香川県	35	0	1	2	38
愛媛県	15	0	0		15
高知県	22	0	0		22
福岡県	19	0	0		19
佐賀県	23	0	0		23
長崎県	25	50	0		75
熊本県	0	0	40		40
大分県	16	0	0	35	51
宮崎県	29	0	0	40	69
鹿児島県	36	0	0		36
沖縄県	28	0	0		28
合計	698	312	372	187	1,569



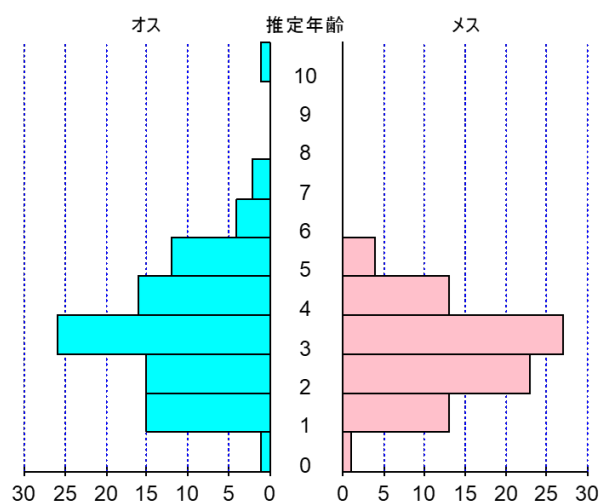
【図 10】イノシシ検体の採材月



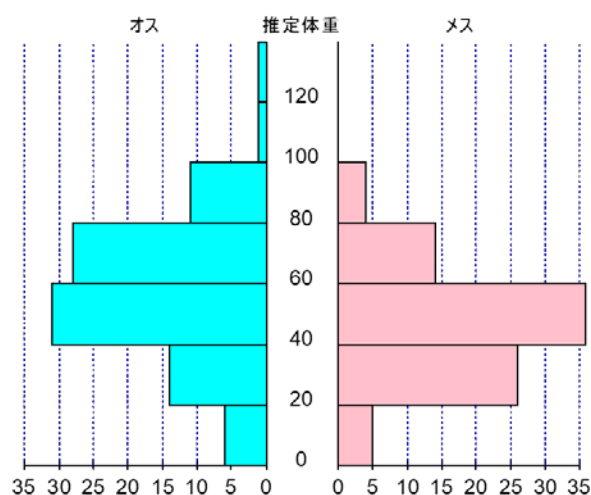
【図 11】イノシシ捕獲方法（平成 30 年度）

【図 12】採材月別のイノシシ捕獲方法（平成 30 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 3.21 歳、メスの平均が 2.62 歳で有意に低かった（Wilcox test による P 値： <0.05 ）【図 13】。また、推定体重を比較したところ、オスの平均が 51.5 kg、メスの平均が 43.1 kgで有意に低かった（Wilcox test による P 値： <0.01 ）【図 14】。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。

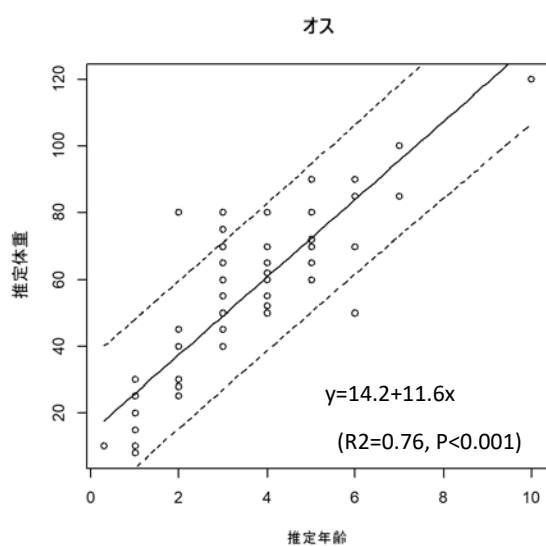


【図 13】イノシシの性別と推定年齢

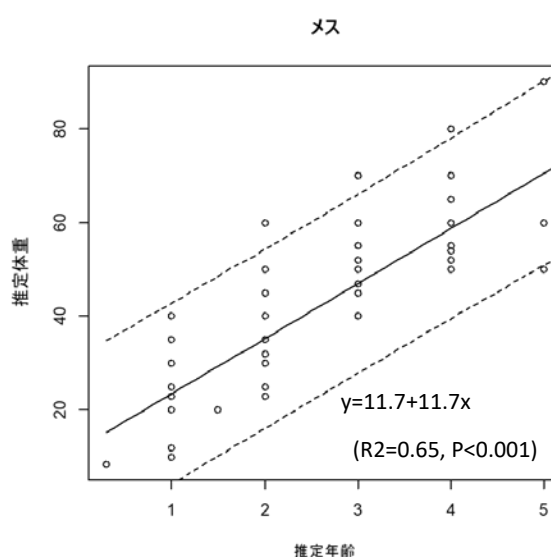


【図 14】イノシシの性別と推定体重

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歳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 11.6 kg (95%信頼区間：10.3-13.0 kg)、メスで 11.7 kg (9.8-13.7 kg) であった【図 15、図 16】。

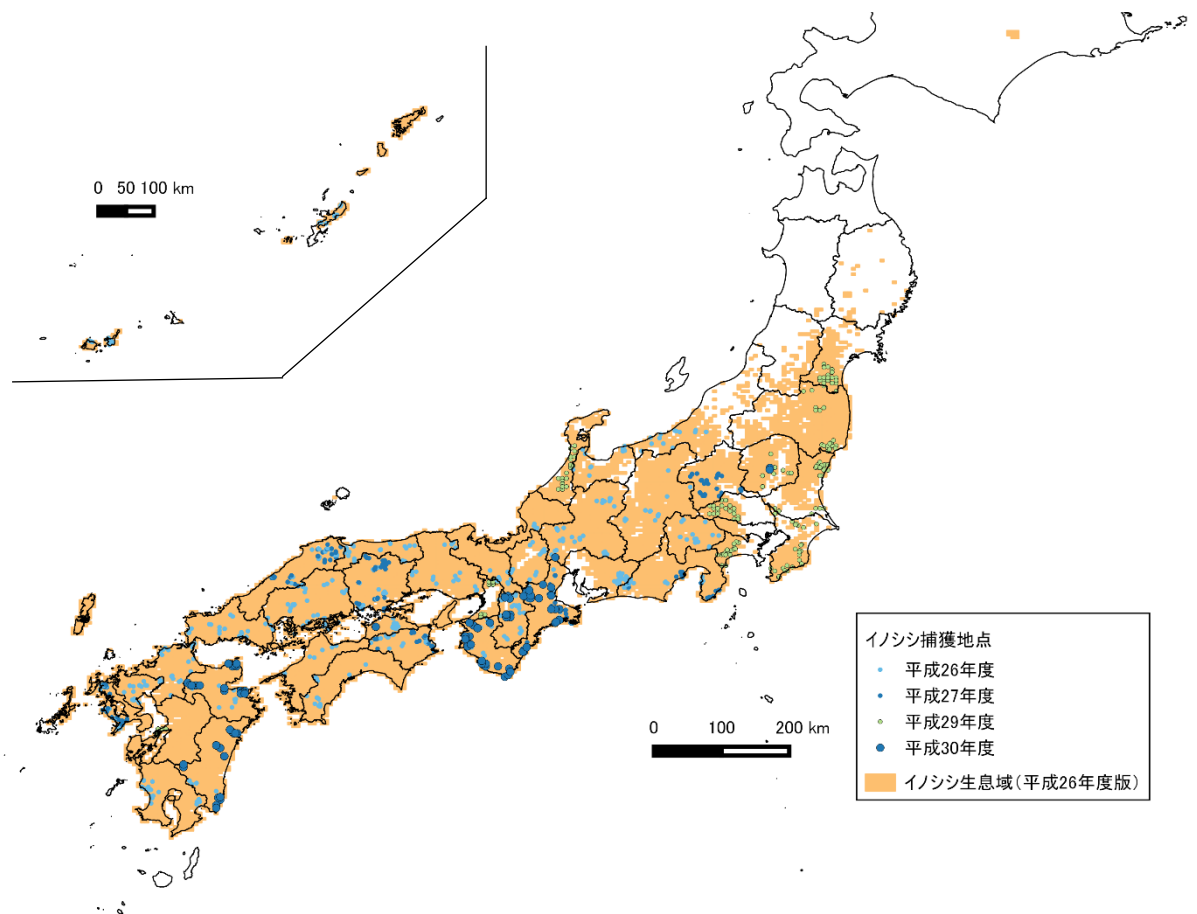


【図 15】イノシシ推定体重と推定年齢(オス)



【図 16】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 17 に示した。



【図 17】 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

AD については、昨年度採材分の検体のうち、ELISA 検査（スクリーニング）において、S ELISA 及び gI ELISA の両方で陽性であった 2 検体と、今年度採材した 187 検体について継続検査中であり、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。

（３）CSF の検査結果

平成 26・27 年度、平成 29 年度及び平成 30 年度に収集した血清検体すべてについて ELISA 検査を行った結果、「陽性」又は「疑陽性」を示した検体が 3 検体あり、これらについて中和試験を行ったところ、いずれも CSFV よりも BVDV-1 に対して 4 倍以上高い中和抗体価を示したことから、これらの陽性検体は、牛ウイルス性下痢・粘膜病ウイルス（BVDV）の感染による擬陽性と考えられた。

3. 考察

(1) AD について

昨年度採材分及び今年度採材分の継続検査の結果が得られ次第、近畿地方及び九州地方における浸潤状況の評価を行う。

(2) CSF について

平成 26 年度から平成 30 年度にかけて採材された検体中、ELISA 検査陽性又は疑陽性となった検体はいずれも CSFV よりも BVDV-1 に対して高い中和抗体価を示したことから、これらの検体で検出された抗体は豚コレラウイルスではなく BVDV 感染によるものと考えられた。なお、BVDV は豚およびイノシシに対する病原性は知られていない。以上のことから、今回の調査では、CSF が日本のイノシシに浸潤していたと考えられる結果は得られなかった。

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）。水きん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３、４】。水きん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

2018年８月から2019年３月までの期間中、全国１４県から76検体が送付された【表３】。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

2018年１０月から2019年２月までの期間中、全国１３県から96検体が送付された【表４】。これらのうち、2018年１２月１８日に栃木県で採材された水禽類由来糞便から２株の血球凝集性ウイルスが分離され、NDV抗原検出簡易キットで陽性であった。この検体はHI試験によりNDVと同定された。これらのウイルスのF蛋白開裂部位のアミノ酸配列(113番目から117番目)を推定した結果、２株の配列は同一であり、RQER・Lで非病原性株（弱毒型）の配列であった。またF遺伝子を用いた分子系統解析の結果、Class Iの系統に属していた【図18】。

（２）成果の活用

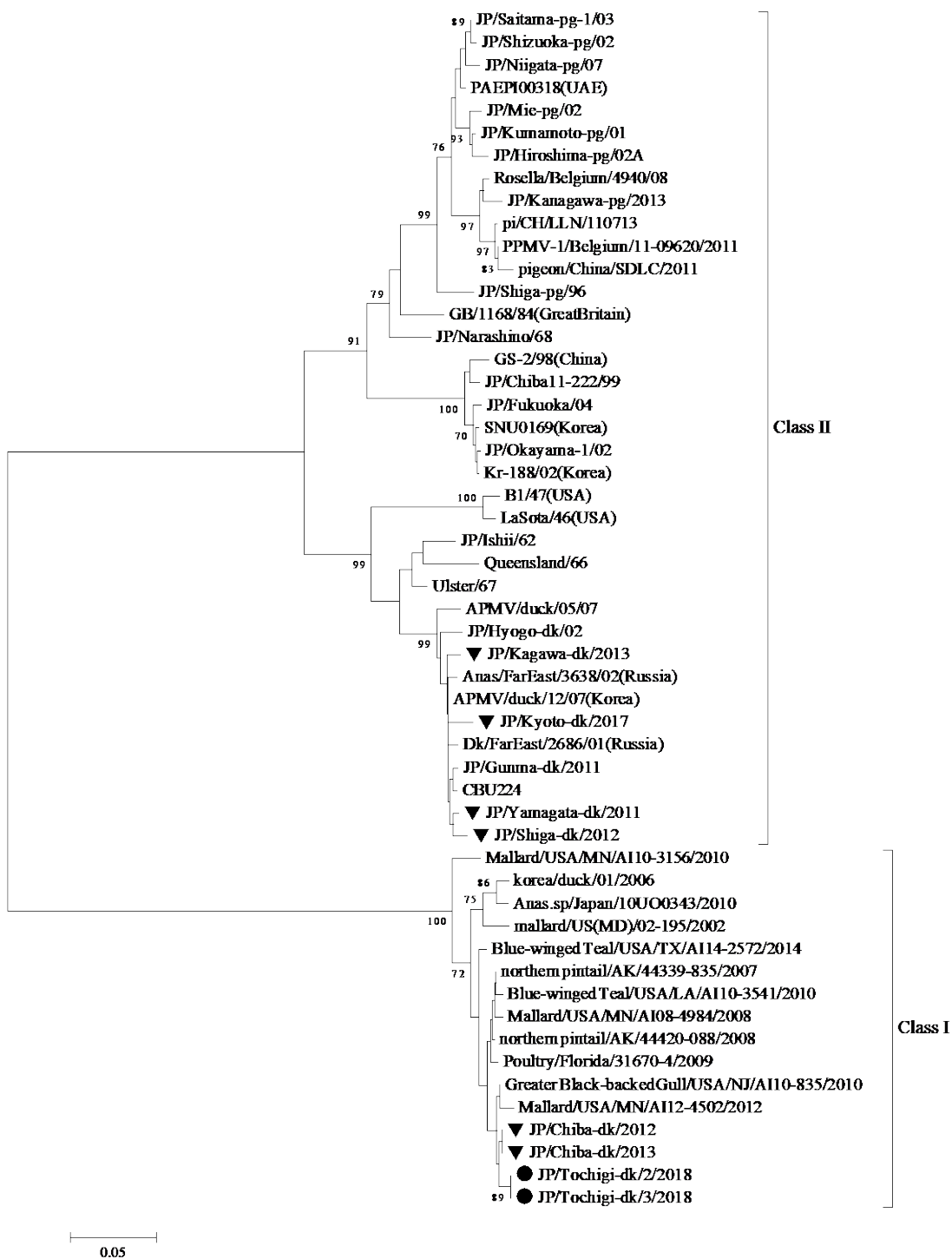
今年度収集したサンプルから病原性ニューカッスル病ウイルスは分離されなかった。しかし、海外ではニューカッスル病の発生が散発していることから、ウイルス侵入の可能性は否定できない。今後も継続的なサーベイランス及びワクチンを中心とした防疫対策が必要であることを示唆する。

【表 3】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
	2018.8	2018.10	2018.11	2018.12	2019.1	2019.2	2019.3	
栃木			3			3		6
群馬		3						3
埼玉		3				3		6
福井	3				3			6
山梨				3			3	6
静岡		3	3					6
大阪				3				3
和歌山			3			1		4
岡山					3		3	6
香川			3			3		6
福岡				3		3		6
熊本				3		3		6
大分					3	3		6
鹿児島					3	3		6
計	3	9	12	12	12	22	6	76

【表 4】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					計
	2018.10	2018.11	2018.12	2019.1	2019.2	
岩手		3				3
山形			3			3
福島	3	3		3		9
栃木	3		3		3	9
千葉	4	4		4		12
山梨	3			3	3	9
静岡		3	3	3		9
大阪			3	3		6
和歌山			3		3	6
島根		3	3		3	9
香川		3	3		3	9
福岡		3				3
宮崎			3	3	3	9
計	13	22	24	19	18	96



【図 18】 F 遺伝子を用いた分子系統樹。今回分離された株は●で示した。以前の調査で分離されたウイルスは▼で示した。わが国の家禽由来病原性株の多くは Class II Genotype VII、ハト由来病原性株の多くは Class II Genotype VI に属する。主要なワクチン株（B1）は Class II Genotype II に属する。

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について検証するために、感度及び特異性について以下の検査を実施し分析を行った。

（ア）感度測定のためのスパイク試験

CWD 感染シカ脳乳剤（US#1-1+#1-2）をスパイク材料として用いた。この感染脳乳剤を、正常鹿の脳乳剤で 2 倍階段希釈を行った。この際、正常シカ脳乳剤は 3 個体から作成し、希釈系列は各個体ごとに作成した。作成したスパイク脳乳剤を ELISA キットを用いて測定を行ったところ、検出限界は 0.625 mg 感染シカ脳当量（感染脳乳剤の 1/16 倍希釈）であった【図 19】。

（イ）特異性確認のための ELISA 検査

H30 年度の事業で収集した野生鹿の延髄（北海道（52 検体）、兵庫県（50 検体）、合計 102 検体）に対して、ELISA キットを用いて検査を行った。その結果、全ての検体の ELISA の値はカットオフ値を下回り、陰性と判定された【表 5】。再委託先の北海道大学が、北海道の検体の採材と ELISA 検査を行った。

イ 検査の実施

今年度の事業で収集した野生鹿の延髄（北海道（56 検体）、兵庫県（50 検体）、合計 106 検体）に対して、ウェスタンブロット法を用いて CWD 検査を行った。その結果、全ての検体は陰性と判定された【表 5】。再委託先の北海道大学が、北海道の検体の採材とウェスタンブロット検査を行った。

ウ 鹿慢性消耗病（CWD）の検査体制の整備

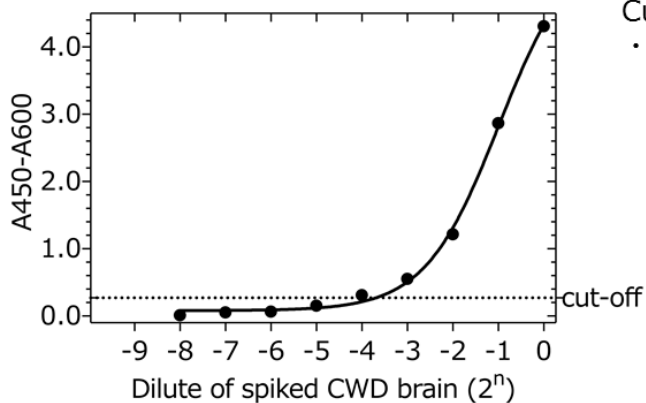
鹿の検体（脳）採材法をまとめたマニュアル案を作成した。また、採材過程を撮影した映像資料を作成した。

エ 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について都道府県における CWD 検査の実施可能性の検証のため、愛媛県と岡山県の協力を得た。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）及び採材用シリンダーを愛媛県家畜病性鑑定所 ならびに岡山家畜保健衛生所に送付し、CWD 検査試行を依頼した。両県ともに採材と検査の試行に成功し、愛媛県 3 検体ならびに岡山県の 5 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【表 5】。

【図 19】

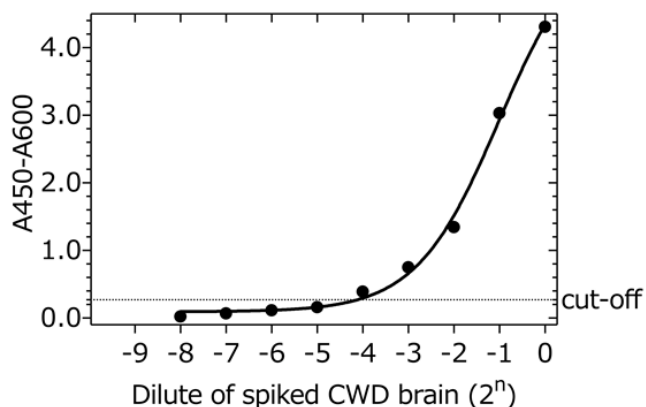
CWD検査におけるニッピブルの検証



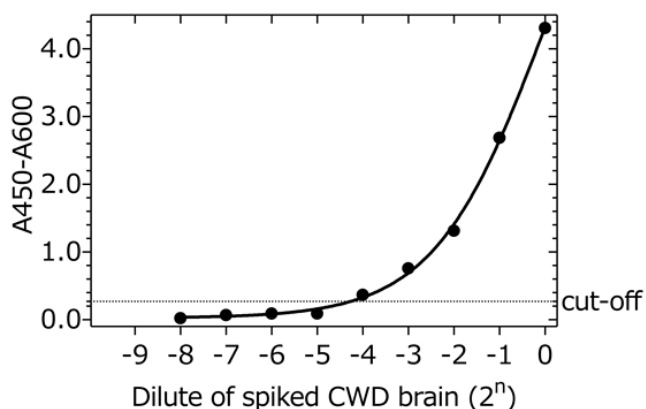
Cutoff値の算出

$$\begin{aligned} & \cdot [\text{陰性コントロールの吸光度(平均値)}] + 0.3 \\ & = 0.303 \end{aligned}$$

CWD 検出限界 : 0.625 mg 当量
(0.3125 mgで陰性)



CWD 検出限界 : 0.625 mg 当量
(0.3125 mgで陰性)



CWD 検出限界 : 0.625 mg 当量
(0.3125 mgで陰性)

$A_{450} - A_{600}$

判定基準

Positive sample : 4.17

Negative sample : 0.003

- ・ 陽性 : [検体吸光度] $\geq$ [Cutoff値](0.303)
- ・ 陰性 : [検体吸光度] $<$ [Cutoff値](0.303)
- ・ 再検査 : 陽性 + 検体 (吸光度 $\geq$ Cutoff値 $\times$ 0.9 (0.27))

ELISA検出系の確認

- ・ 陰性コントロールの吸光度(平均値) $\leq 0.20 \rightarrow 0.003$ **OK**
- ・ [陽性コントロールの吸光度] - [陰性コントロールの吸光度(平均値)] $\geq 1.20 \rightarrow 4.167$ **OK**

【表 5】

平成30年度 CWD検査まとめ														
	個体番号	捕獲地	WB結果	ELISA結果		個体番号	捕獲地	WB結果	ELISA結果		個体番号	捕獲地	WB結果	ELISA結果
1	1	兵庫県	陰性	陰性	26	26	兵庫県	陰性	陰性	51	1	北海道	陰性	陰性
2	2	兵庫県	陰性	陰性	27	27	兵庫県	陰性	陰性	52	2	北海道	陰性	陰性
3	3	兵庫県	陰性	陰性	28	28	兵庫県	陰性	陰性	53	6	北海道	陰性	陰性
4	4	兵庫県	陰性	陰性	29	29	兵庫県	陰性	陰性	54	8	北海道	陰性	陰性
5	5	兵庫県	陰性	陰性	30	30	兵庫県	陰性	陰性	55	11	北海道	陰性	陰性
6	6	兵庫県	陰性	陰性	31	31	兵庫県	陰性	陰性	56	12	北海道	陰性	陰性
7	7	兵庫県	陰性	陰性	32	32	兵庫県	陰性	陰性	57	13	北海道	陰性	陰性
8	8	兵庫県	陰性	陰性	33	33	兵庫県	陰性	陰性	58	14	北海道	陰性	陰性
9	9	兵庫県	陰性	陰性	34	34	兵庫県	陰性	陰性	59	15	北海道	陰性	陰性
10	10	兵庫県	陰性	陰性	35	35	兵庫県	陰性	陰性	60	17	北海道	陰性	陰性
11	11	兵庫県	陰性	陰性	36	36	兵庫県	陰性	陰性	61	19	北海道	陰性	陰性
12	12	兵庫県	陰性	陰性	37	37	兵庫県	陰性	陰性	62	20	北海道	陰性	陰性
13	13	兵庫県	陰性	陰性	38	38	兵庫県	陰性	陰性	63	21	北海道	陰性	陰性
14	14	兵庫県	陰性	陰性	39	39	兵庫県	陰性	陰性	64	22	北海道	陰性	陰性
15	15	兵庫県	陰性	陰性	40	40	兵庫県	陰性	陰性	65	23	北海道	陰性	陰性
16	16	兵庫県	陰性	陰性	41	41	兵庫県	陰性	陰性	66	25	北海道	陰性	陰性
17	17	兵庫県	陰性	陰性	42	42	兵庫県	陰性	陰性	67	26	北海道	陰性	陰性
18	18	兵庫県	陰性	陰性	43	43	兵庫県	陰性	陰性	68	27	北海道	陰性	陰性
19	19	兵庫県	陰性	陰性	44	44	兵庫県	陰性	陰性	69	29	北海道	陰性	陰性
20	20	兵庫県	陰性	陰性	45	45	兵庫県	陰性	陰性	70	30	北海道	陰性	陰性
21	21	兵庫県	陰性	陰性	46	46	兵庫県	陰性	陰性	71	31	北海道	陰性	陰性
22	22	兵庫県	陰性	陰性	47	47	兵庫県	陰性	陰性	72	32	北海道	陰性	陰性
23	23	兵庫県	陰性	陰性	48	48	兵庫県	陰性	陰性	73	33	北海道	陰性	陰性
24	24	兵庫県	陰性	陰性	49	49	兵庫県	陰性	陰性	74	34	北海道	陰性	陰性
25	25	兵庫県	陰性	陰性	50	50	兵庫県	陰性	陰性	75	35	北海道	陰性	陰性
	個体番号	捕獲地	WB結果	ELISA結果		個体番号	捕獲地	WB結果	ELISA結果					
76	36	北海道	陰性	陰性	101	64	北海道	陰性	陰性					
77	37	北海道	陰性	陰性	102	65	北海道	陰性	陰性					
78	38	北海道	陰性	陰性	103	66	北海道	陰性	NT					
79	39	北海道	陰性	陰性	104	67	北海道	陰性	NT					
80	40	北海道	陰性	陰性	105	68	北海道	陰性	NT					
81	41	北海道	陰性	陰性	106	69	北海道	陰性	NT					
82	42	北海道	陰性	陰性	107	1	愛媛県	NT	陰性					
83	43	北海道	陰性	陰性	108	2	愛媛県	NT	陰性					
84	44	北海道	陰性	陰性	109	3	愛媛県	NT	陰性					
85	46	北海道	陰性	陰性	110	岡山H30-1	岡山県	NT	陰性					
86	47	北海道	陰性	陰性	111	岡山H30-2	岡山県	NT	陰性					
87	49	北海道	陰性	陰性	112	岡山H30-3	岡山県	NT	陰性					
88	50	北海道	陰性	陰性	113	岡山H30-4	岡山県	NT	陰性					
89	51	北海道	陰性	陰性	114	岡山H30-5	岡山県	NT	陰性					
90	52	北海道	陰性	陰性										
91	53	北海道	陰性	陰性				NT:試験なし						
92	54	北海道	陰性	陰性										
93	55	北海道	陰性	陰性										
94	56	北海道	陰性	陰性										
95	57	北海道	陰性	陰性										
96	58	北海道	陰性	陰性										
97	59	北海道	陰性	陰性										
98	60	北海道	陰性	陰性										
99	62	北海道	陰性	陰性										
100	63	北海道	陰性	陰性										