

平成29年3月16日

安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究委託事業
研究成果報告書

課題番号：2604

畜産農場における食中毒菌汚染低減に向けた野生動物の侵入防止策及び衛生
害虫まん延防止策の確立

研 究 期 間：平成26年度～平成28年度（3年間）

研 究 総 括 者 名：浅井 鉄夫

試験研究機関名：家畜衛生対策研究グループ

国立大学法人 岐阜大学

国立大学法人 東京農工大学

日本獣医生命科学大学

一般財団法人 生物科学安全研究所

1 研究目的

畜産への野生動物の侵入や衛生害虫の発生・増加は、飼育されている家畜にサルモネラ、カンピロバクター等の食中毒菌及び家畜への伝染病の原因となる家畜疾病病原体を伝播するリスクを高める要因と考えられている。野生動物及び衛生害虫から食中毒菌及び家畜疾病病原体が分離されることから、生産衛生管理ハンドブック、飼養衛生管理基準等により野生動物等からの病原体の感染防止を行うこととされ、畜産農場では野生動物の侵入防止及び衛生害虫の蔓延防止に取り組んでいる。しかし、衛生対策に要するコストや費用対効果などの経済性や、市街地から離れた地域に所在する畜産農場では、農場周囲に生息する野生動物も多様であることから、十分な効果が得られていない事例もある。

そこで、野生動物及び衛生害虫がどのような病原体をどの程度保有しているのか、また、実施している対策の効果に関する詳細データを入手し、畜産農家への野生動物の侵入防止及び衛生害虫の駆除の重要性を啓発する。また、得られたデータを基に野生動物及び昆虫のそれぞれ特性を考慮した具体的な侵入防止策及び衛生害虫蔓延防止策を確立するとともに、これらの対策を実施することで、食中毒菌だけでなく家畜伝染性疾病の原因病原体の農場への侵入及び農場内伝播が防止又はその頻度が低下することで、伝染性疾病の発生率が減少し、結果として収益向上につながる可能性をあることを示すデータを入手することを目的とする。

2 研究内容

(1) 研究課題

1) 中課題 1：野生動物及び衛生害虫の食中毒菌及び家畜疾病病原体の汚染源としての危険度の評価【岐阜大 浅井】

本研究では、農場の畜舎内外に生息する野生動物及び衛生害虫から食中毒菌及び家畜疾病病原体の検索を行う。さらに、農場周辺に生息する野生動物の病原体の保有状況と比較するため、山中で捕獲した野生動物の病原体の保有状況も調査する。

・小課題 1：農場周辺に生息する野生動物及び衛生害虫の食中毒菌の保有状況調査【岐阜大 浅井、研究協力；岐阜県家畜保健衛生所】

平成 26 年度：肉牛、豚、ブロイラーを飼育する調査協力農場敷地内の畜舎内外で捕獲した、ネズミの腸内容物及び畜舎内外で採取した野鳥の糞便ならびに衛生害虫から、サルモネラ、カンピロバクター及び腸管出血性大腸菌（STEC）の分離検査を行う。採材時に野生動物の侵入及び衛生害虫の蔓延の防止策の実施状況及び効果を聞き取り調査する。

平成 27 年度：前年度の調査で野生動物や衛生害虫等から食中毒菌が分離された農場を対象に、同様の採材を複数回実施し、各細菌の分離検査を実施する。採材時に野生動物の侵入及び衛生害虫の蔓延の防止策の実施状況及び効果をより詳細に聞き取り調査する。

平成 28 年度：平成 27 年度の調査で選定した農場で、野生動物や衛生害虫等の駆除対策を実施し、畜舎内外における野生動物や衛生害虫の捕獲・野鳥の侵入状況の調査、捕獲した野生動物等の糞便からの細菌分離検査を実施し、それら結果を踏まえて駆除対策効果を検証する。

・小課題 2：山中に生息する野生動物の食中毒菌の保有状況調査 【岐阜大 浅井】

平成 26～27 年度【平成 26 年度のみに変更】：山中において捕獲したネズミ等の腸内容物と野鳥の糞便から、サルモネラ、カンピロバクター及び STEC の分離検査を実施する。

・小課題 3：肉牛及び豚農場周辺に生息する野生動物及び衛生害虫の家畜疾病病原体の保有状況調査【日獣大 青木】

平成 26 年度：中課題 1. の(1)及び(2)の調査において肉牛及び豚農場周辺で採取したサンプルを用いて、肉牛及び豚農場で慢性的に発生する重要な疾病（牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）、牛コロナウイルス（BCoV）、豚繁殖・呼吸器障害症候群ウイルス（PRRSV）、豚サーコウイルス（PCV）など）の遺伝子増幅法による病原検査を実施する。陽性検体の検出遺伝子断片の塩基配列をもとに分子系統解析を行う。

平成 27 年度：中課題 1. の(1)で肉牛及び豚農場周辺で採取したサンプルを用いて、肉牛及び豚農場で慢性的に発生する重要な疾病（牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）、豚繁殖・呼吸器障害症候群ウイルス（PRRSV）、豚サーコウイルス（PCV）、豚パルボウイルス（PPV）など）の遺伝子増幅法による病原検査を実施する。陽性検体の検出遺伝子断片の塩基配列をもとに分子系統解析を行う。平成 26 年度の結果と中課題 1. の（5）の検索で得られた結果を考慮して、必要に応じて病原検査対象種を新規追加又は削除を行うとともに、病原体の分離を試みる。

平成 28 年度：中課題 1.の小課題 1 で選定された農場で採取された新規検体における家畜疾病病原体の遺伝子増幅法による病原検査を継続する。特に、前年度までの調査結果を踏まえ、PCV2、PPV 及び BVDV を重点的に検査する。また、それらの病原ウイルスが検出された全ての検体について、ウイルス分離、詳細な疫学解析及び分子疫学解析を実施する。小課題 1 の細菌分離結果及び小課題 5 の網羅的 PCR の結果を比較し、各検査の特徴を整理する。

・小課題 4：ブロイラー農場周辺に生息する野生動物及び衛生害虫の家畜疾病病原体の保有状況調査【岐阜大 大屋】

平成 26 年度：中課題 1. の(1)及び(2)の調査においてブロイラー農場周辺で採取したサンプル（鶏、野鳥）を用いて、ニューカッスル病ウイルス（NDV）、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス（IBDV）、ヘルペスウイルス、クラミジアなど、鶏に感染する重要な病原体の遺伝子増幅法による病原検査を行う。陽性検体の検出遺伝子断片より分子系統解析を行う。必要に応じて病原体分離、抗原解析を行う。中課題 1.(1)と協力し、食中毒原因細菌の調査も行う。

平成 27 年度：ブロイラー農場周辺で採取したサンプル（鶏、野鳥）を用いて、ニューカッスル病ウイルス（NDV）、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス（IBDV）、ヘルペスウイルス、クラミジアなど、鶏に感染する重要な病原体の遺伝子増幅法による病原検査を行う。陽性検体の検出遺伝子断片より分子系統解析を行う。必要に応じて病原体分離、抗原解析を行う。平成 26 年度の結果と中課題 1. の（5）の検索で得られた結果を考慮して、必要に応じて検査項目を見直し、データを蓄積する。

平成 28 年度：ブロイラー農場周辺で採取したサンプル（鶏、野鳥）を用いて、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス（IBDV）、ヘルペスウイルス、クラミジアなど、鶏に感染する重要な病原体の遺伝子増幅法による病原検査を引き続き行う。また、豚農場周辺の野鳥よりブタクラミジアが検出されたことから、当該農場のクラミジア保有状況調査を行い、野鳥から検出されたクラミジアとの関係を考察する。

- ・小課題 5：農場周辺に生息する野生動物が保有する各種病原体のメタゲノム解析による検索【農工大 水谷】

平成 26 年度：中課題 1. の(1)及び(2)の調査で採取したネズミや野鳥のサンプルを網羅的にゲノム解析するとともに、入手次第でその他の野生動物のサンプルを同様に解析する。

平成 27 年度：中課題 1. の(1)及び(2)の調査で継続的に採材したサンプルと前年度未解析分のサンプルを前年度と同様に解析する。

平成 28 年度：網羅的検出システム（DEMBO-PCR、DEMPO-PCR）のブラッシュアップをおこないながら検体の解析をおこなう。ウイルスや細菌の分離に成功したものについては、次世代型シーケンサーを用いて全ゲノム塩基配列の決定を行う。

2) 中課題 2：農場周囲に生息する野生動物の防除法の確立【岐阜大 鈴木】

農場周辺には、山林や藪も多く野生動物の好適な生息環境となっている。そのため、農場への野生動物の侵入に伴う病原体の伝播という問題が強く懸念される。農場内に生息するネズミはドブネズミやクマネズミが主であるが、自然環境にはアカネズミ、ハタネズミなどが生息する。生息場所と深く関係するネズミの種類は、食料や病原体の保有状況に違いを生じていることが予想される。そこで、農場を中心とした環境に生息する野生げっ歯類の種類と食餌内容、さらに、食中毒菌の保有状況を調査し、ネズミ対策を実施するべき範囲を明らかにする。

また、地方都市の実習農場を保有する教育施設において予備実験として農場内に設置した自動撮影カメラでは、タヌキ、キツネ、イタチ、テン、アナグマ等の在来種のみならず、ハクビシンやアライグマ、ヌートリアなど外来種も撮影されている。農場内に各種野生動物が出現していることから、本研究では、野生動物の家畜衛生上の問題を明らかにし、それらの侵入防止策を確立することを目的とする。

- ・小課題 1：農場周囲に生息する野生げっ歯類の防除法の確立【岐阜大 森部】

平成 26 年度：野生ネズミの捕獲地点と農場間距離に基づき解析し、行動範囲と農場への侵入リスクを明らかにして、ネズミ対策の実施範囲を設定する。農場を中心に捕獲したネズミの種類の特定と、消化管内容物の食性解析ならびにサルモネラ、カンピロバクター、病原性大腸菌などの食中毒菌及び大腸菌の検出を行う。

平成 27 年度：26 年度の成果により、防除対策を検討する対象種が明らかになったことから、28 年度計画を前倒しして、防除策の有効性を検討する。農場内の営巣地や行動情報を明らかにし、営巣場所の撤去などの舎外ネズミ対策を実施して有効性を確認する。農場を中心とした成獣の捕獲（駆除）に取り組み、捕獲個体からの食中毒菌等の検査を行う。

平成 28 年度：27 年度の成果により、各種防鼠対策が一定の増加抑制に効果があることが確認できた。また自動撮影カメラを用いてネズミの出没状況を確認した上で効果的に防鼠対策を図る時期や場所を推定することができた。28 年度は、対策が不十分な畜舎を対象に防鼠対策を実施し、自動撮影カメラによる効果検証を行う。それらの結果を基に対策指針を作成する。

・小課題 2：農場周辺に生息する中型野生動物の行動様式と侵入防止策の検討【岐阜大 鈴木・浅野、研究協力；森元】

平成 26 年度：生態や行動・環境利用様式の解明を目的に、鈴木が在来種、浅野が外来種を中心に分担する。ただし外来種については、外来生物法の規制により放獣できないため、テレメトリー法は適用しない。農場内ならびにその周辺に複数の自動撮影装置を設置し、農地や畜舎における行動や環境利用の様式等を定量的に把握する。その上で罠による学術研究捕獲を行い、消化管内容物等を採取する。消化管内容物においては、食性解析ならびにサルモネラ、カンピロバクター、病原性大腸菌など食中毒関連細菌及び大腸菌の検出を行う。

平成 27 年度：「進捗状況・成果」に記したとおり、地方都市の実習農場を保有する教育施設（岐阜大学附属農場）においては、捕獲目的となる種ごとに適切な「罠がけ場所」を見出すことができた。そのため、27 年度の 4～5 月にかけて捕獲を実施し、消化管内容物や血液等の採取ならびにテレメトリー調査を実施する。さらに、小課題 1 の 26 年度研究により野生動物等から食中毒菌等が分離された農場等を対象に、岐阜大学附属農場と同様の研究（自動撮影カメラの設置と画像の解析ならびに捕獲による消化管内容物や血液等の採取）を計画・実施する。

平成 28 年度：岐阜大学農場においてはキツネの侵入に対する防除、鶏農場においてはイノシシの飼料タンクへの接触に対する防除を検討し、それらの効果を評価する。また、キツネ及びイノシシという獣種における特殊性を明確にし、他獣種においても応用可能なレベルでの「考え方」についてまとめる。

・小課題 3：家畜及び野生動物間の微生物伝播様式の検討【岐阜大 浅井】

平成 28 年度：前述の中課題 2. の(1)の(ア)及び(2)の(ア)の調査で得られた分離株

を用いて PFGE 等による分子疫学的解析により野生動物間の伝播と家畜保有株との関連を明らかにし、病原体の拡散リスクを推定する。

3) 中課題 3：農場に生息する衛生害虫の防除法の確立と経済効果【安全研 中村（平成 26 年度）、馬場（平成 27～28 年度）】

畜舎内に生息する衛生害虫として、ハエやガイマイゴミムシダマシなどがあげられる。ハエは病原体を機械的に媒介する代表的な衛生害虫である。その生態から主に糞便中に排泄される腸管感染症の病原体を機械的に伝播すると考えられるが、中腸内での細菌の定着が明らかにされ、広範な病原体の汚染源としてのリスクが注目されている。農場でのハエ対策に伴う食中毒菌及び家畜疾病病原体の保有状況への影響を明らかにするため、ブロイラー農場をモデルに検討する。

ハエとともに、ガイマイゴミムシダマシも同様に養鶏場などで鶏糞から発生する昆虫として知られている。ガイマイゴミムシダマシは、幼虫が鶏舎の断熱材に穿孔する被害も引き起こす一方で、鶏糞中での穿孔活動による鶏糞の乾燥促進やイエバエの卵や幼虫を捕食することにより、イエバエの発生を抑制するなど有益な側面も持ち合わせている。これまで、ハエとガイマイゴミムシダマシでは、殺虫剤感受性に違いがあり、ガイマイゴミムシダマシによる被害の程度により、殺虫剤の種類を選択することが提案されている。生産現場での衛生害虫への殺虫剤の使用状況と有効性を検討する。

- ・小課題 1：農場でのハエ対策による飼育動物における食中毒菌及び家畜疾病病原体の保有状況への影響【安全研 中村（平成 26 年度）、馬場（平成 27～28 年度）】

平成 26 年度：ブロイラー農場におけるサルモネラ及びカンピロバクターのベクターの解明を目的に、主としてハエを対象にサルモネラとカンピロバクターの保菌状況を検査し、農場におけるハエがベクターとなる伝播の関係を明らかにする。さらに、ブロイラーの育成成績とカンピロバクター及びサルモネラ汚染との関係を明らかにすることに重点を置いた試験を実施する。

平成 27 年度：試験対象を、26 年度にハエとソックススワブ（左右の長靴にそれぞれ長靴カバーを履き、それらの上に管状サポート包帯をはめて鶏舎内を歩き、盲腸便等を付着させたもの）からサルモネラやカンピロバクターが分離された農場に絞り込み、採取されたハエや糞便から分離された菌株の遺伝子型等を解析し、ハエのベクターとしての関与の詳細を明らかにする。また、協力農場と相談の上、試験的なハエ対策の実施を検討する。

平成 28 年度：酪農場のハエを薬剤、主に脱皮阻害剤（IGR 剤）でコントロールしながら、他の発生源を特定する。補助的に夏場に成虫対策を目的に殺虫剤を散布する。対策前のデータが少ないため、年度初めに対策前のデータを更に取得した上で、

対策後のデータ取得を行う。対策前後の比較として、ハエの数の変動、STEC の分離率、酪農経営、環境の一般的变化を比較する。また、乳房炎や子牛の下痢については、発生件数に加え、原因菌の特定も実施する。

・小課題 2：衛生害虫の駆除対策の構築【岐阜大 浅井】

平成 26 年度：農場におけるハエとガイマイゴミムシダマシ対策方法の実態調査するため、各種殺虫剤の使用状況、有効性、作業性及び経費等について、アンケート等による調査を行う。

平成 27 年度：平成 26 年度の結果を踏まえて、殺虫剤等によるハエとガイマイゴミムシダマシの防除対策を生産農場で実施し、それらの発生状況及び大腸菌症を指標に損害の発生状況を比較し、実現可能な害虫対策を構築する。損失（出荷時の死亡）に影響する温度モニターを実施する。

平成 28 年度：環境整備、IGR 剤、殺虫剤等によるハエの防除対策を生産農場で実施し、作業性、経費及び捕虫器による捕虫数を指標に、対策の効果を検証する。

4) 中課題 4：野生動物の侵入防止及び衛生害虫の駆除に関する経済分析【農工大 大松】

野生動物の侵入防止及び衛生害虫の駆除を確実に実施することにより、家畜伝染性疾病の原因病原体の農場への侵入及び農場内伝播が防止又は軽減され、伝染性疾病の発生率が減少し、収益向上につながると期待される。このため、中課題 1～3 での調査農場を対象として、売上や設備投資などの経営状況、家畜伝染性疾病的発生状況、及び野生動物や衛生害虫の発生状況などの土地特性等のデータを入手し、野生動物の侵入防止及び衛生害虫の駆除に係るコスト及び対策導入により得られる効果について経済学的に評価する。対策導入に伴う経営効果に関する具体的なデータを明らかにすることで、生産者の自発的な野生動物の侵入防止及び衛生害虫の駆除を促進する。

平成 26 年度：調査票の作成及び基礎情報の収集するため、衛生対策の経済効果を評価するために必要となる調査項目について精査し、調査票を作成する。衛生対策導入前の経営状態について、調査票を用いて情報収集を行う。

平成 27 年度：アンケート調査については、調査項目を絞り込んだ上で、養牛・養豚農家を中心に情報収集を継続して行う。また、衛生害虫等への対策に関する支出についても情報を取集し分析を行う。病原体検出状況と生産性の関連性については、協力農家に対してサルモネラ以外の病原性微生物の検出状況についても調査を依頼し、生産性に影響の大きな病原性微生物の特定を試みる。

平成 28 年度：収集したデータを用いて、感度分析など詳細な分析を進める。27 年度に認められた農場間の差について、食鳥検査成績に関する詳細な情報収集を行うとともに、飼養形態や立地条件、衛生害虫の発生状況などと合わせて分析を進める。

(2) 年次計画

項目	平成26年度	平成27年度	平成28年度
1. 野生動物及び衛生害虫の食中毒菌及び家畜疾病病原体の汚染源としての危険度の評価			
(1) 農場周辺に生息する野生動物及び衛生害虫の食中毒菌の保有状況調査	食中毒菌検査 (岐阜大学)		
(2) 山中に生息する野生動物の食中毒菌の保有状況調査	食中毒菌検査 (岐阜大学)		
(3) 肉牛及び豚農場周辺に生息する野生動物及び衛生害虫の家畜疾病病原体の保有状況調査	牛・豚病原体検査 (日本獣医生命科学大学)		
(4) ブロイラー農場周辺に生息する野生動物及び衛生害虫の家畜疾病病原体の保有状況調査	鶏病原体検査 (岐阜大学)		
(5) 農場周辺に生息する野生動物が保有する各種病原体のメタゲノム解析による検索	メタゲノム解析 (東京農工大学)		
2. 農場周囲に生息する野生動物の防除法の確立			
(1) 農場周囲に生息する野生げっ歯類の防除法の確立	ネズミ対策の確立 (岐阜大学)		
(2) 農場周辺に生息する野生小型動物の行動様式と侵入防止策の検討	野生動物対策の確立 (岐阜大学)		
(3) 家畜及び野生動物間の微生物伝播様式の検討		分子疫学解析 (岐阜大学)	
3. 農場に生息する衛生害虫の防除法の確立と経済効果			
(1) 農場でのハエ対策による飼育動物における食中毒菌及び家	食中毒菌と病原体検査 (安全研)		

畜疾病病原体の保有状況への影響			
(2) 衛生害虫の駆除対策の検討	害虫防除法の確立（岐阜大学）		
4. 野生動物の侵入防止及び衛生害虫の駆除に関する経済分析	経済効果の解析（東京農工大学）		
所要経費（合計）	11,000 千円	10,670 千円	10,250 千円

(3) 実施体制

項目	担当研究機関	研究担当者	エフォート (%)
研究総括者	岐阜大学	浅井 鉄夫	15
1. 野生動物及び衛生害虫の食中毒菌及び家畜疾病病原体の汚染源としての危険度の評価	岐阜大学	○ 浅井 鉄夫	前出
(1) 農場周辺に生息する野生動物及び衛生害虫の食中毒菌の保有状況調査	岐阜大学	△ 浅井 鉄夫	前出
(2) 山中に生息する野生動物の食中毒菌の保有状況調査	岐阜大学	△ 浅井 鉄夫	前出
(3) 肉牛及び豚農場周辺に生息する野生動物及び衛生害虫の家畜疾病病原体の保有状況調査	日本獣医生命科学大学	△ 青木 博史	10
(4) ブロイラー農場周辺に生息する野生動物及び衛生害虫の家畜疾病病原体の保有状況調査	岐阜大学	△ 大屋 賢司	15
(5) 農場周辺に生息する野生動物が保有する各種病原体のメタゲノム解析による検索	東京農工大学	△ 水谷 哲也	10
2. 農場周囲に生息する野生動物の防除法の確立	岐阜大	○ 鈴木 正嗣	15
(1) 農場周囲に生息する野生げっ歯類の防除法の確立	岐阜大	△ 森部 絢嗣	10
(2) 農場周辺に生息する野生小型動物の行動様式と侵入防止策の検討	岐阜大	△ 鈴木 正嗣	前出
(3) 家畜及び野生動物間の微生物伝播様式の検討	岐阜大学	△ 浅井 鉄夫	前出
3. 農場に生息する衛生害虫の防除法の確立と経済効果	生物科学安全研究所	○ 中村 政幸 (～27年3月) 馬場 幸太郎 (27年4月～)	10
(1) 農場でのハエ対策による飼育動物における食中毒菌及び家畜疾病病原体の保有状況への影響	生物科学安全研究所	△ 中村 政幸 (～27年3月) 馬場 幸太郎 (27年4月～)	前出
(2) 衛生害虫の駆除対策の構築	岐阜大学	△ 浅井 鉄夫	前出
4. 野生動物の侵入防止及び衛生害虫の駆除に関する経済分析	東京農工大	○ 大松 勉	10

3 研究推進会議の開催状況

別紙の(1)のとおり。

4 研究成果の概要

I 主要な成果

(1) 成果の内容（別紙の（2）参照）

1) 野生動物及び衛生害虫の食中毒菌及び家畜疾病病原体の汚染源としての危険度の評価

野生動物及び衛生害虫が食中毒菌や家畜疾病病原体を保有し、汚染源として重要な役割を果たすことが明らかとなった。特に、ネズミやハエは、飼育動物が保有する病原体を媒介し、農場内（畜舎内、畜舎間）のまん延・拡散に関与したことが示唆された（p27～28、p59～60、p66 下線部参照）。また、キツネや野鳥など自由生活する野生動物は、農場内の病原体を拡散させるとともに、病原体を農場に持ち込む危険性があることが示唆された（p27～29、p49 二重下線部参照）。このため、農場内の食中毒菌や家畜疾病病原体分布や野生動物・衛生害虫出現状況を把握して、動物種や病原体の特性に基づく衛生対策が必要である。

2) 農場周囲に生息する野生動物の防除法の確立

野生動物の侵入防止方法は野生動物の種類によって異なるため、それぞれの行動様式に基づいて策定した（p48～49 下線部参照）。また、「エサこぼし」を野生動物の出現要因として特定されたことから（p49 波線部参照）、農場に出没する野生動物は、環境整備を含め総合的に防除することが重要となる。具体的な防除方法については、別添 1 にまとめた。

3) 農場に生息する衛生害虫の防除法の確立と経済効果

農場に生息する衛生害虫は、発生場所の衛生管理と発生した成虫の捕獲を徹底することにより、ハエが減少することが明らかとなった（p65～67 下線部参照）。また、野生動物や衛生害虫の防除対策については、効果的な防除方法を提示することで、生産者が積極的に取り組むことが期待できることを示唆した（p66～67 二重下線部参照）。具体的な IGR 剤を用いたハエ防除方法については、別添 2 にまとめた。

4) 野生動物の侵入防止及び衛生害虫の駆除に関する経済分析

肉用鶏農場の解析により食中毒菌であるサルモネラ汚染（p74 下線部参照）と家畜疾病病原体である大腸菌症やマレック病の発生は、生産性の損失となることが示唆されたため、これらの発生に伴う損失を金額ベースで試算した（p75～77 下線部参照）。その他の畜種（乳牛）においても感染症の発生が農場の生産性（乳量）に影響を及ぼし（p77 二重下線部参照）、病原体を媒介する野生動物の侵入防止及び衛生害虫の駆除は、畜産業における生産性への向上に寄与する可能性を示唆した。

(2) 成果の活用（別紙の（2）参照）

1) 野生動物対策（別添1）を用いた農家指導

農場への飼養衛生管理基準の遵守を促進するため、野生動物侵入が確認された協力農場（P-D農場）で現地検討会を実施した時に野生動物対策法に関する説明資料として使用した。今後は、野生動物の侵入が疑われた農場において、自動撮影カメラ等を利用して侵入動物を特定するとともに、具体的な対策指導に活用する。

2) IGR 剤を用いたハエ対策（別添2）を用いた農家指導。

ハエ対策を実施した農場で検査結果の報告会で説明した内容を取り纏めたもので、夏場にハエが大量発生する農場で、農場への飼養衛生管理基準の遵守を促進するために次年度以降の衛生指導する時に活用する。

II 各研究課題の成果

(1) 中課題1（野生動物及び衛生害虫の食中毒菌及び家畜疾病病原体の汚染源としての危険度の評価）の研究成果

1) 工程管理及び成果目標

工程表
① 農場の畜舎内外に生息する野生動物及び衛生害虫から食中毒菌及び家畜疾病病原体の検索と山中で捕獲した野生動物の病原体の保有状況との比較（小課題1,2,3,4及び5関連）（平成26年度）
↓
②対策実施農場の選定と防除対策の検討及びメタゲノム解析を基に、検査項目の見直しを検討（小課題1,3,4及び5関連）。（平成27年度）
↓
③防除策の有効性の検討（小課題1,3,4及び5関連）。（平成28年度）
成果目標：農場周辺に生息する野生動物及び衛生害虫の食中毒菌及び家畜疾病病原体の保有状況を明らかにし、汚染源としての危険度を評価する。

表記上の明確化を図るため成果目標を見直した。なお、見直しにあたっては、平成28年度第2回研究推進会議（平成28年12月7日開催）で研究課題運営チームと合意済み。

2) 各工程の進捗状況及び成果

【工程表の①】

31農場（牛17農場、豚7農場、鶏7農場）で野生動物及び衛生害虫を捕獲し、食中毒菌及び家畜疾病病原体の検索を実施（図1小課題1,3,4及び5）。

- サルモネラが3農場（鶏2農場及び牛1農場）で捕獲したハエから分離された。STECが牛2農場で捕獲したハエから分離された（図2 小課題1 26年度）。
- 牛舎や豚舎のネズミの糞から牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）、豚パルボウイルス（PPV）及び豚サーコウイルス2型（PCV2）の遺伝子が検出された。（図3 小課題3 26年度）。特に、豚舎内で捕獲したネズミ糞便から検出されたBVDVは、国内に古くから広く分布するBVDV-1a亜型に分類されることが分子系統樹から判明した。このことから、ネズミの行動範囲内での牛の飼育状況を調査する必要がある（小課題3 26年度）。
- 豚舎内で捕獲したハエ、アブ及びネズミから検出されたPCV2は、分子疫学解析から豚農場との関連が認められ、これらが媒介することが示唆された。また、異なる農場で採取した株間での遺伝近縁性が示唆され（PCV2-1A）、地域内で流行するPCV2の存在が示唆された（図4-5 小課題3 26年度）。
- 農場周辺に生息するネズミ等から分離されたサルモネラおよび大腸菌（合計6株）に

ついて次世代型シーケンサーを用いたメタゲノム解析をおこなった。その結果、ひとつの菌株あたり 400 万以上のリード数が得られ、どの菌株についてもゲノムのほぼ全長の塩基配列を解読することに成功した。次世代型シーケンサーでは塩基配列の決定に限界のある領域（リピート配列など）については今後 PCR などを用いて補完する必要がある（図 6-7 小課題 5 26 年度）。

- 牛舎や豚舎のネズミの糞について、当センターが開発したウシ下痢症の原因病原体 20 種類（ウイルス、細菌、原虫）を同時に高感度で検出する方法（Dembo-PCR）を用いた解析により、BVDV や *Salmonella* Typhimurium が検出された（図 6-7 26 年度）。

山中（岐阜及び長野）で捕獲した小型げっ歯類 49 匹から食中毒菌の検索を実施（小課題 2）カンピロバクター、サルモネラ及び STEC は、山中で捕獲したネズミから分離されなかった（図 8 小課題 2 26 年度）。



畜舎に生息する衛生害虫（ハエ）及び野生動物（ネズミ）は食中毒菌と家畜疾病病原体を腸管に保菌もしくは付着しており、畜舎内および畜舎間の病原体の伝播に関与している可能性が明らかになった（26 年度）。

図 1

捕獲された衛生害虫およびネズミの検体数

	肉用牛		豚		肉用鶏		合計
	内	外	内	外	内	外	
ハエ ^a	17	11	7	5	2	4	46
アブ ^a	3	1	1	2		4	11
ガイマイゴミムシ ^a					3	1	4
ネズミ	6 ^a		4		1	1	12 ^b

a 複数をつる

b クマネズミ 11、ハツカネズミ 1



写真：ガイマイゴミムシ（農研機構 HP より）
体長 5～6 mm、穀類を食害する害虫だが、
鶏糞に大発生するとイエバエの天敵となるため、
生物学的防除に使われる。
一方、カンピロバクターを媒介するとの報告がある。

図 2

サルモネラ

農場	畜種	検体	血清型など
A	肉用鶏	ハエ(畜舎内)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Manhattan
B	肉用牛	ハエ(畜舎外)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>
C	肉用鶏	ハエ(畜舎外)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Manhattan

志賀毒素産生性大腸菌(STEC)

農場	畜種	検体	血清型	stx1	stx2
B*	肉用牛	ハエ(畜舎外)	O157		+
D	肉用牛	ハエ(畜舎内)	不明	+	+

* 農場Dはサルモネラが分離された農場Bと同一

図 3

ネズミ糞便から検出された病原体遺伝子(詳細)

場所	畜種	月日	場所	病原体
農場RS-B-E	肉牛	7.25	舎内	PPV
農場RS-P-C	豚	9.18	舎内	PCV-2.1
農場RS-P-G	豚	9.19	舎内	PCV-2.1
				BVDV-1a

- 牛舎内ネズミから豚病原体
⇒ 近くで豚を飼育か？

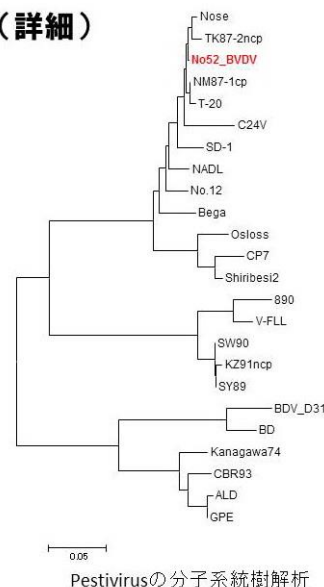


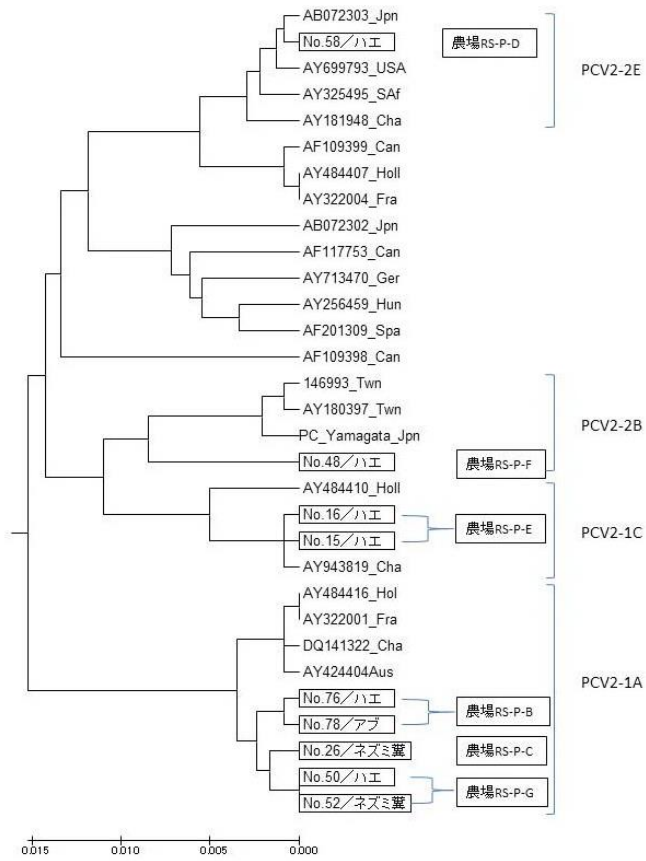
図 4

豚舎由来ネズミ糞便・昆虫からのPCV-2遺伝子検出

場所	採取日	検体番号	舎内外	検体種類	PCR増幅	遺伝子型
農場RS-P-B	11.4	76	内	ハエ	+	PCV-2.1A
		78	外	アブ	+	
		77	外	ハエ	—	
農場RS-P-C	9.18	26	内	ネズミ糞	+	PCV-2.1A
		27	内	ハエ	—	
		28	内	アブ	—	
農場RS-P-D	10.1	58	内	ハエ	+	PCV-2.2E
		59	内	ネズミ糞	—	
農場RS-P-E	8.25	15	内	ハエ	+++	PCV-2.1C
		16	外	ハエ	+	
農場RS-P-F	9.19	46	外	アブ	—	PCV-2.2B
		47	内	ハエ	—	
		48	内	ハエ	+	
		49	内	ネズミ糞	—	
農場RS-P-G	9.19	50	内	ハエ	++	PCV-2.1A
		52	内	ネズミ糞	++	
		51	外	ハエ	—	

- ほとんどが畜舎内
- 関連サンプルで検出される傾向

図 5



PCV-2の分子系統樹と分子疫学的解析

図 6

サンプル #25のリアルタイムPCR解析

Target	Ct	+
① BVDV	38.2	+
Borovirus		-
Coronavirus		-
Group A rotavirus		-
Group B rotavirus		-
Group C rotavirus		-
STeV		-
Mammalian reovirus		-
SVV		-
SeMV-1		-
Adenovirus		-
S. Dublin		-
S. Enteritidis		-
② S. Typhimurium	34.1	+
Mycobacterium avium		-
subsp. paratuberculosis		-
Clostridium perfringens		-
Cryptosporidium parvum		-
Salmonella coli		-
S. aureus		-
S. bovis		-
③ ACTIN (GenA)	18.2	+
④ ACTIN (GenB)	27.9	+
⑤ ACTIN (High purity)	31.2	+
ACTIN (Naga)		-



BVDV (+)

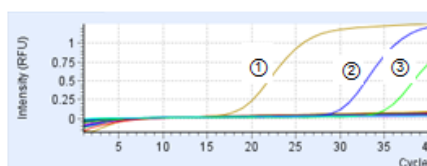
Salmonella Typhimurium (+)

- コンベンショナルPCRで検査項目に入れていなかったサルモネラ属菌を検出
- コンベンショナルRT-PCRで検出できなかったBVDVを検出

図 7

サンプル#52のリアルタイムPCR解析

Target	Ct	
BVDV	—	—
Borna disease virus	—	—
Coronavirus	—	—
Group A rotavirus	—	—
Group B rotavirus	—	—
Group C rotavirus	—	—
StxV	—	—
Mammalian reovirus	—	—
SuV	—	—
Borna	—	—
Adenovirus	—	—
S. Dublin	—	—
S. Enteritidis	—	—
S. Typhimurium	—	—
Mycobacterium avium	—	—
subsp. paratuberculosis	—	—
Clostridium perfringens	—	—
Cryptosporidium parvum	—	—
Escherichia coli	—	—
Salmonella	—	—
BoV	—	—
① ACTIN (合成DNA)	18.0	+
② ACTIN (Queen)	29.2	+
③ ACTIN (high purity)	34.4	+
ACTIN (No gel)	—	—



すべて陰性

□ コンベンショナルRT-PCRで検出された
BVDVは検出されず

図 8：山中で捕獲された小型げっ歯類は、畜舎に生息するネズミ（クマネズミやドブネズミ）と種構成が異なる（中課題 2-1 参照）。

山中の小型げっ歯類からの食中毒菌の検索

県	採材日	検査頭数	種類(頭数)	陽性頭数		
				STEC	Salmonella	Campylobacter
長野	8/19～20	12	アカネズミ (10) ヒメズ (2)	0	0	0
	9/19～20	21	ヒメネズミ (5) アカネズミ (4) トガリ (3) ヒメズ (3) ハタネズミ (2) ヒメヒメズ (2) アズミトガリ (1) ミスラモグラ (1)	0	0	0
岐阜	10/16	～	ヒメズ (5)	0	0	0
	10/17	9	ヒメネズミ (3) アカネズミ (1)			
長野	11/12	～	ヒメズ (3)	0	0	0
	11/14	7	ハタネズミ (3) ヒメネズミ (1)			
計		49		0	0	0

【工程表②】

平成 26 年度の調査で食中毒菌や家畜疾病病原体遺伝子が検出された 5 農場と衛生対策を実施している 3 農場等を選定し、複数回（2～3 回）調査した。ネズミ、ハエ、アブ、ガイマイゴミムシダマシを昨年と同様に採取し、野生動物・野鳥の糞便等については、新鮮便を対象に検査した（図 9 小課題 1 27 年度）。

- 今年度の調査では、STEC は全ての検体から分離されなかったが、サルモネラとカンピロバクターは、衛生害虫、野生動物及び野鳥から分離され、この中で、野鳥の糞便からサルモネラやカンピロバクターが高率に分離された（図 10 小課題 1 27 年度）。
- 牛農場：平成 26 年 11 月、平成 27 年 5 月に *S. Typhimurium* によるサルモネラ症が発生した牛農場（B-L）で採材した野鳥の糞便から *S. Typhimurium*、*S. Infantis* 及び *C. jejuni* が分離された（小課題 1 図 10 27 年度）。その他の 2 農場では、いずれの材料からも食中毒菌は分離されなかった。B-L 農場では、設置した定点カメラにより、牛舎へのキツネ及びカラスの侵入が観察されたことから、ネットによる侵入防止を行っているため、継続的に定点カメラによる観察を行っている（図 11 小課題 1 27 年度）。
- 豚農場：野生動物が多く認められる豚農場(P-D)では、*Salmonella*(O4:i:-)がハエ、アブ、ネズミ（捕獲個体の腸内容物）、野鳥及び野生動物の糞便から分離され、*C. coli* がハエ、ネズミ（捕獲個体の腸内容物）及びネズミ（落下便）から分離され、*C. jejuni* が野鳥及び野生動物の糞便から分離された。その他の 2 農場では、いずれの材料からも食中毒菌は分離されなかった（図 13 小課題 1 27 年度）。
- 鶏農場：昨年度サルモネラ（*S. Manhattan*）が分離された C-B 農場では、食中毒菌は分離されなかった。C-F 農場では、昨年度と同じ血清型のサルモネラ（*S. Manhattan*）がハエから分離された（図 14 小課題 1 27 年度）。
- 選定された牛 3 農場及び豚 3 農場で採取された 116 検体のうち、豚農場由来のハエから豚サーコウイルス 2 型（PCV2）及びパルボウイルス（PPV）の遺伝子が増幅（一部精密検査中）された。また、豚舎周辺で採取された野鳥糞便から PPV 及び豚赤痢菌が、キツネ糞便から PPV の遺伝子が増幅された（一部精密検査中）。（図 15 小課題 2 27 年度）
- ハエから PCV2 が検出された農場は昨年度に続く検出であり、分子系統解析から遺伝的に非常に近縁であることが示され、農場内に PCV2 が維持されている可能性が疑われた。（図 16 小課題 2 27 年度）
- PPV が検出された検体（ハエ、野鳥、キツネ）は全て同一農場（P-D 農場）に由来し、増幅遺伝子の塩基配列は 100%一致した。野鳥及び野生動物による農場外からの侵入、ハエによる農場内の慢性汚染が疑われた。（図 17 小課題 2 27 年度）。
- PCV2 及び BVDV の遺伝子が検出された検体について、培養細胞を用いた活性ウイルス分離を試みたが、いずれも検出されなかった。ウイルス粒子数が少ないこと、検体処理や培養方法などの影響が考えられた（図 18 小課題 2 27 年度）
- 鶏農場に生息する衛生害虫・野鳥からは、調査対象とした鶏の病原体遺伝子は検出されなかった（小課題 3 平成 27 年度）。
- 豚農場で採材された野鳥から、ブタクラミジア（*Chlamydia suis*）遺伝子が検出された（図 19 小課題 3 平成 27 年度）。
- 牛舎や豚舎の周辺に生息する野生動物や昆虫類を対象に各種病原体を網羅的に検出で

きるリアルタイム PCR システム（ウシ用：DEMBO-PCR、ブタ用：DEMPO-PCR）を用いて解析した（図 20-21 小課題 4 平成 27 年度）。ハエ、アブ、ゴキブリ（卵）、ネズミ腸内容物および糞便、キツネ糞便、野鳥糞便（このなかには糞便の由来が不確かなものも含む）等について実施したところ、細菌ではサルモネラ・パスツレラ、ウイルスではヘルペスウイルス・A 群ロタウイルス・ブタ血球凝集性脳脊髄炎ウイルスが陽性となる結果を得た（図 22-24 小課題 4 平成 27 年度）。

↓

畜舎に生息するネズミの他、農場へ侵入する野鳥やキツネなどの野生動物や衛生害虫（ハエ、アブ）ごとに保有する病原体の傾向が認められ、それらの感染経路や定着性が関与することが示唆された（27 年度）。

図 9

平成27年度対象農場

◎対象農場：県内8農場(各家畜保健衛生所管内 2農場)

平成26年度に、本事業で食中毒菌や家畜疾病病原体遺伝子が検出された農場、その他疾病発生の対策を実施している農場等

畜種	農場	平成26年度の検査結果	その他の選定理由等
牛	B-E	PPV遺伝子検出(ネズミ)	
	B-M	未検出	過去に呼吸器病発生あり
	B-L	(調査対象外)	H26サルモネラ症発生
豚	P-B	PCV遺伝子検出(ハエ)	
	P-G	BVD遺伝子検出(ハエ)	
	P-D	未検出	周辺に野生動物が多い
鶏	C-B	S. Manhattan分離(ハエ)	
	C-F	S. Manhattan分離(ハエ)	

図 10

検査材料別の分離状況

検査材料	検体数	STEC	サルモネラ	カンピロバクター
ハエ	71	－	4 (5.6%)	7 (9.9%)
アブ	9	－	1 (11.1%)	－
ガイマイゴミ ムシダマシ	4	－	－	－
その他昆虫	4	－	－	－
ネズミ(糞便含む)	21	－	4 (19.0%)	3 (14.3%)
野鳥糞便	12	－	5 (41.7%)	3 (25.0%)
野生動物糞便	8	－	2 (25.0%)	1 (12.5%)
合計	129	0 (0%)	16 (12.4%)	14 (10.9%)

図 11

牛農場の食中毒菌分離結果

農場	採材 月	検査 材料	採取 場所	検体数	STEC	サルモネラ	カンピロ バクター
B-L	8月 10月	ハエ	畜舎内	1	－	－	－
		ハエ	畜舎外	1	－	－	－
		アブ	畜舎内	1	－	－	－
		アブ	畜舎外	1	－	－	－
		野鳥糞便	畜舎内	2	－	S.Typhimurium (2検体) S. Infantis(1検体)	C. Jejuni (1検体)
		野鳥糞便	畜舎外	2	－	－	－
		キツネ糞便	畜舎内	1	－	－	－
		キツネ糞便	畜舎外	1	－	－	－

★平成26年11月、平成27年5月にサルモネラ症が発生した農場
発症牛から分離されたサルモネラと同一血清型が野鳥から分離された。

図 12

野生動物・野鳥対策

B-L農場(牛)



図 13

豚農場の食中毒菌分離結果

農場	採材月	検査材料	採取場所	検体数	STEC	サルモネラ	カンピロバクター
P-D	9月 10月 11月	ハエ	畜舎内	41	-	<i>Salmonella</i> (O4:i:-) (3検体)	<i>C.coli</i> (7検体)
		アブ	畜舎内	1	-	<i>Salmonella</i> (O4:i:-)	-
		ネズミ	畜舎内	6	-	<i>Salmonella</i> (O4:i:-) (3検体)	<i>C.coli</i> (2検体)
		ネズミ糞便	畜舎内	2	-	-	<i>C.coli</i> (1検体)
		野鳥糞便	畜舎外	6	-	<i>Salmonella</i> (O4:i:-) (1検体) <i>S.infantis</i> (1検体) <i>S.arizonae</i> (1検体)	<i>C.Jejuni</i> (2検体)
		野生動物糞便(キツネ等)	畜舎外	5	-	<i>Salmonella</i> (O4:i:-) (2検体)	<i>C.Jejuni</i> (1検体)

★昨年度の検査では対象菌は分離されていないが、今年度は*Salmonella*(O4:i:-)、カンピロバクターが多数の検査材料から分離された。

図 14

鶏農場の食中毒菌分離結果

農場	採材月	検査材料	採取場所	検体数	STEC	サルモネラ	カンピロバクター
C-B	8月 10月	ハエ	畜舎内	3	-	-	-
		ハエ	畜舎外	1	-	-	-
		アブ	畜舎外	1	-	-	-
		ガイマイゴミ ムシダマシ	畜舎内	1	-	-	-
		ガイマイゴミ ムシダマシ	畜舎外	1	-	-	-
		ガ	畜舎内	3	-	-	-
C-F	9月 1月	ハエ	畜舎内	1	-	S. Manhattan	-
		ガイマイゴミ ムシダマシ	堆肥舎	2	-	-	-

★C-B農場は、昨年度サルモネラ(S. Manhattan)が分離されていたが、今年度は検出されず。

★C-F農場は、昨年度と同じ血清型のサルモネラが分離された。

図 15

平成27年度の継続調査(牛・豚)

◎6農場116検体

番号	農場	畜種	採付時期	付料	備考
PCV2	RS2	RS-P-B	豚	8月 畜舎外/堆肥舎/ハエ	
PPV	RS68	RS-P-D	豚	9月 畜舎外/堆肥舎D横/野鳥糞	Sal.分離
PPV	RS69	RS-P-D	豚	9月 畜舎外/堆肥舎D横/野鳥糞	Sal., C.分離
PPV	RS84	RS-P-D	豚	10月 畜舎外/離乳舎D/ハエ	C.分離
PPV	RS125	RS-P-D	豚	11月 畜舎外/堆肥舎D横/野鳥糞	
PPV	RS126	RS-P-D	豚	11月 畜舎外/飼育舎飼料タンク下/野鳥糞	Sal., E.分離
PPV	RS127	RS-P-D	豚	11月 畜舎外/肥育舎D入口/中型野生動物糞	
豚赤痢	RS124	RS-P-D	豚	11月 畜舎外/堆肥舎D付近/野鳥糞	C.分離

※Sal.:サルモネラ菌, C.:カンピロバクター属菌, E.:大腸菌

※検査検査中:シーケンスによる遺伝子配列が未確定のもの。

図 16

PCV2の分子系統樹解析（H26-27検出検体）

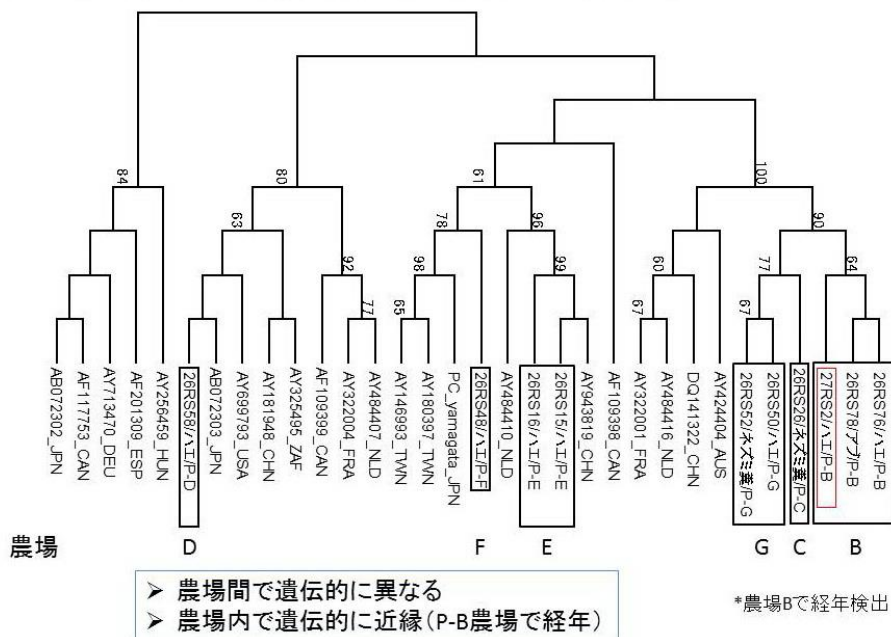


図 17

PPVの遺伝子解析（H27検出検体）

- RS-P-D農場
- いずれも野鳥糞便由来乳剤から検出

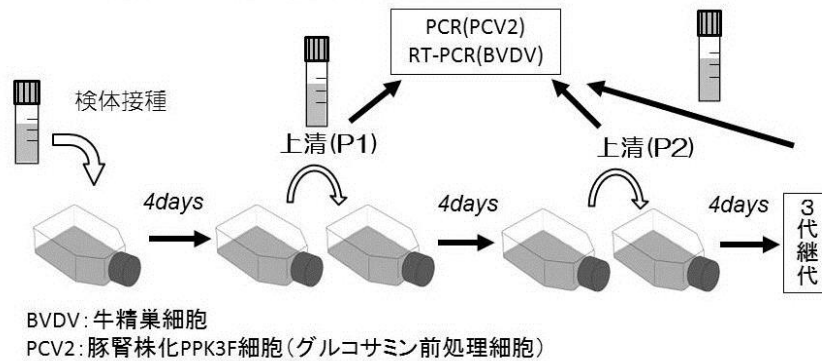
RS68	1	CACAGAAGCAACAGCAATTAGGCCAGCTCAGGTAGGATATAATACACCATACATGAATTTTGAATACTCC	70
RS69	1	CACAGAAGCAACAGCAATTAGGCCAGCTCAGGTAGGATATAATACACCATACATGAATTTTGAATACTCC	70
RS125	1	CACAGAAGCAACAGCAATTAGGCCAGCTCAGGTAGGATATAATACACCATACATGAATTTTGAATACTCC	70
RS126	1	CACAGAAGCAACAGCAATTAGGCCAGCTCAGGTAGGATATAATACACCATACATGAATTTTGAATACTCC	70
Kresse	1	CACAGAAGCAACAGCAATTAGGCCAGCTCAGGTAGGATATAATACACCATACATGAATTTTGAATACTCC	70
NADL2	1	CACAGAAGCAACAGCAATTAGGCCAGCTCAGGTAGGATATAATACACCATACATGAATTTTGAATACTCC	70
RS68	71	AATGGTGGACCATTTCTAACTCCTATAGTACCAACAGCAGACACACAATATAATGATGATGAACCAATG	140
RS69	71	AATGGTGGACCATTTCTAACTCCTATAGTACCAACAGCAGACACACAATATAATGATGATGAACCAATG	140
RS125	71	AATGGTGGACCATTTCTAACTCCTATAGTACCAACAGCAGACACACAATATAATGATGATGAACCAATG	140
RS126	71	AATGGTGGACCATTTCTAACTCCTATAGTACCAACAGCAGACACACAATATAATGATGATGAACCAATG	140
Kresse	71	AATGGTGGACCATTTCTAACTCCTATAGTACCAACAGCAGACACACAATATAATGATGATGAACCAATG	140
NADL2	71	AATGGTGGACCATTTCTAACTCCTATAGTACCAACAGCAGACACACAATATAATGATGATGAACCAATG	140
RS68	141	GTGCTATAAGATTACAAATGGGTTACCAACATGGACAATTAAACCATCTTCACAAGAGCTAG	203
RS69	141	GTGCTATAAGATTACAAATGGGTTACCAACATGGACAATTAAACCATCTTCACAAGAGCTAG	203
RS125	141	GTGCTATAAGATTACAAATGGGTTACCAACATGGACAATTAAACCATCTTCACAAGAGCTAG	203
RS126	141	GTGCTATAAGATTACAAATGGGTTACCAACATGGACAATTAAACCATCTTCACAAGAGCTAG	203
Kresse	141	GTGCTATAAGATTACAAATGGGTTACCAACATGGACAATTAAACCATCTTCACAAGAGCTAG	203
NADL2	141	GTGCTATAAGATTACAAATGGGTTACCAACATGGACAATTAAACCATCTTCACAAGAGCTAG	203

増幅遺伝子領域の塩基配列は8-9月期と11月期で完全一致

図 18

PCV2およびBVDV陽性検体からのウイルス分離

- 検体: ①PCV2遺伝子検出 10検体
 ②BVDV遺伝子検出 1検体
 ③ウイルス陰性乳剤+指示ウイルス添加(約10TCID₅₀又は100FFU)



結果: 野外検体からは活性ウイルス分離されず

図 19

カラスより検出されたクラミジアの系統樹

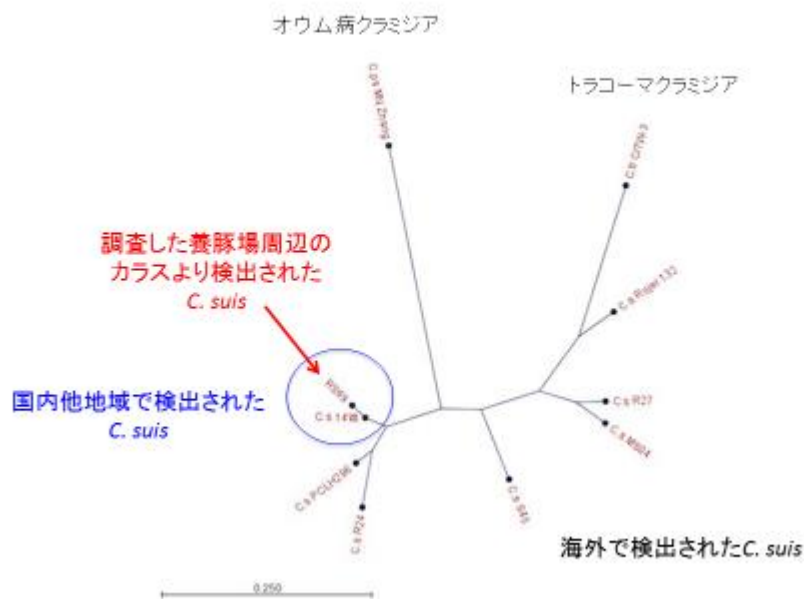


図 20

ウシ下痢症網羅的診断系のプライマー＆プローブ

✓計19種の病原体を対象

ウイルス 11種

細菌 5種

原虫 3種

Target name	
Bovine viral diarrheal virus	BVDV
Bovine enterovirus	BEV
Bovine coronavirus	BCoV
Group A rotavirus	RVA
Group B rotavirus	RVB
Group C rotavirus	RVC
Bovine torovirus	BTov
Mammalian orthoreovirus	MRV
Bovine leukemia virus	BLV
Bovine herpes virus-1	BoHV-1
Bovine adenovirus	BAV
Salmonella Dublin	S. Dublin
Salmonella Enteritidis	S. Enteritidis
Salmonella Typhimurium	S. Typhimurium
Mycobacterium avium, spp. paratuberculosis	MAP
Enterotoxigenic Escherichia coli	ETEC
Cryptosporidium Spp.	Cry. Spp.
Eimeria zuernii	E.zuernii
Eimeria bovis	E.bovis

図 21

ブタ病原体網羅的診断系のプライマー＆プローブ

✓計22種の病原体を対象

ウイルス 12種

細菌 9種

原虫 1種

Target name	
Porcine circovirus 2	PCV2
Suid herpesvirus 1 (Aujeszky's disease virus)	SuHV-1
Suid herpesvirus 2 (Porcine cytomegalovirus)	SuHV-2
Hemagglutinating encephalomyelitis virus	HEV
Influenza A virus	InfuA
Mammalian orthoreovirus	MRV
Porcine reproductive and respiratory virus US	PRRSV-US
Porcine reproductive and respiratory virus EU	PRRSV-EU
Porcine respiratory coronavirus	PRCoV
Porcine Epidemic Diarrhea Virus	PED
Porcine group A rotavirus	PorVA
Porcine deltacoronavirus	PDCoV
Actinobacillus pleuropneumoniae	A.pleuro
Bordetella bronchiseptica	B.branch
Haemophilus parasuis	H.parasuis
Pasteurella multocida	P.mult
Pasteurella multocida toxigenic	P.mult tox
Streptococcus suis	S.suis
Mycoplasma hyopneumoniae	M. hyopneumoniae
Mycoplasma hyarhinis	M. hyarhinis
Mycoplasma hyosynoviae	M. hyosynoviae
Cryptosporidium Spp.	PRuV

図 22

ウシ・ブタ病原体網羅的診断系の応用（結果）

◎平成27年10月期(20検体)

ウシ由来材料

病原体	陽性数	検体番号	農場	材料	備考
BEV	3	RS89, 92 & 93	RS-B-E	ハエ	
S.Dublin	2	RS71 & 72	RS-B-L	キツネ糞便	
	2	RS87 & 94	RS-B-E	ネズミ腸内容	

BEV:牛エンテロウイルス (ssRNA/env-)

ブタ由来材料

病原体	陽性数	検体番号	農場	材料	備考
SuHV-2	7	RS79-85	RS-P-D	ハエ	RS84: PPV, <i>C.coli</i> RS79-82: <i>C.coli</i>
PoRVA	8	RS79-86	RS-P-D	ハエ・アブ	RS84: PPV, <i>C.coli</i> RS79-82: <i>C.coli</i> RS86: <i>Sal.</i>
HEV	1	RS84	RS-P-D	ハエ	RS84: PPV, <i>C.coli</i>

SuHV-2 豚サイトメガロウイルス (dsDNA/env+), PoRVA: A群豚ロタウイルス (dsRNA/env-)

HEV: 豚赤血球凝集性脳脊髄炎ウイルス (ssRNA/env+)

図 23

ウシ・ブタ病原体網羅的診断系の応用（結果）

◎平成27年11月期(33検体)

ブタ由来材料

病原体	陽性数	検体番号	農場	材料	備考
SuHV-2	1	RS98	RS-P-B	ゴキブリ卵?	
SuHV-2	2	RS115 & 117	RS-P-D	ハエ	
PoRVA	13	RS105, 108, 111 RS114-123	RS-P-D	ハエ	RS118: <i>C.coli</i> RS122: <i>Sal.</i> RS120: <i>C.coli</i>
<i>P.multocida</i>	1	RS127	RS-P-D	キツネ糞	PPV疑

SuHV-2 豚サイトメガロウイルス (dsDNA/env+), PoRVA: A群豚ロタウイルス (dsRNA/env-)

HEV: 豚赤血球凝集性脳脊髄炎ウイルス (ssRNA/env+)

図 24

各検査の検出結果の比較

検体番号	数	PCR	DEMBO/PO	菌分離	農場	材料
RS71, 72 RS87, 94	4		S.Dublin		牛: RS-B-L 牛: RS-B-E	キツネ糞 キツネ糞
RS89, 92, 93	3		BEV		牛: RS-B-E	ハエ

検体番号	数	PCR	DEMBO/PO	菌分離	農場	材料
RS98	1		SuHV-2		豚: RS-P-B	ゴキブリ卵
RS83, 85 RS115, 117	4		SuHV-2, PoRVA		豚: RS-P-D	ハエ
RS79, 80, 81, 82	4		SuHV-2, PoRVA	<i>C.coli</i>	豚: RS-P-D	ハエ
RS105, 108, 111, 114, 116, 119, 121, 123	8		PoRVA		豚: RS-P-D	ハエ
RS86 RS122	2		PoRVA	<i>Sal.</i>	豚: RS-P-D	アブ ハエ
RS118, 120	2		PoRVA	<i>C.coli</i>	豚: RS-P-D	ハエ
RS102, 103, 104	3			<i>Sal., C.coli</i>	豚: RS-P-D	ネズミ糞内容
RS125	1	PPV			豚: RS-P-D	野鳥糞
RS126	1	PPV		<i>Sal.</i>	豚: RS-P-D	野鳥糞
RS127	1	PPV疑		<i>P.multicida</i>	豚: RS-P-D	キツネ糞
RS84	1	PPV	SuHV-2, PoRVA, HEV	<i>C.coli</i>	豚: RS-P-D	ハエ
RS124	1	豚赤痢		<i>C.coli</i>	豚: RS-P-D	カラス糞

【工程表③】

平成 27 年度の調査で選定した 8 農場のうち、野生動物と衛生害虫の対策に協力可能な 6 農場（牛 3、豚 2、鶏 1 農場）を対象に実施した（図 25 小課題 1 28 年度）。対策は捕獲（出現）状況および病原体保有状況に合わせて選択した（図 26,27 小課題 1 28 年度）。

- 防除対策前、対策 1 ヶ月後及び対策 2~3 ヶ月後に衛生害虫、野生動物等のサンプルを収集するとともに、飼育動物との関連を明らかにするため環境ふき取り（主に床スワブ）を実施した。食中毒菌の検索は、表に示した 313 検体を用いた（図 28 小課題 1 28 年度）。
- カンピロバクターは、牛 B-L 農場の対策前のふき取り材料 1 検体から *Campylobacter jejuni* が分離されたが、それ以外からは分離されなかった。一方、豚 P-D 農場の対策前及び対策後のふき取り材料及び対策前のハエ 2 検体から *C. coli* が分離された。カンピロバクターはすべて畜舎内サンプルから分離され、豚農場では対策前後で継続的に拭取り材料で認められたことから、家畜間で伝播していると考えられた（図 29 小課題 1 28 年度）
- STEC は、牛 B-L 農場では農場内に同時期に複数の毒素遺伝子型が認められた。畜舎内のネズミやアブから、環境ふき取りから同一の毒素遺伝子の STEC が分離されたことから、ネズミや昆虫が媒介する可能性も示唆された。一方、対策後は畜舎内スワブのみで分離されたことから、家畜間で伝播していると考えられた（図 30 小課題 1 28 年度）
- サルモネラは豚 P-D 農場において対策前後で環境ふき取りとネズミから、鶏 C-B 農場では継続的にふき取り材料から同一の血清型が分離された。豚 P-D 農場や牛 B-L 農場では、野生動物やハエから異なる血清型が分離された。このことから、野生動物やハエは農場内感染環を形成するだけではなく、外部からの侵入に関わる可能性が示された（図 31 小課題 1 28 年度）

選定された豚 2 農場及び牛 3 農場で採取された対策前後総数 296 検体（衛生害虫 88 検体、畜舎環境スワブ 170 検体、ネズミ糞 14 検体および野生鳥獣糞 24 検体）のうち、豚 P-D 農場のハエ及びスワブから PCV2 及び PPV の遺伝子が、豚 P-G 農場のネズミ糞及び鱗翅目昆虫から PPV の遺伝子が増幅された。うち 3 検体は PCV2 と PPV の両方が検出された。ウイルスは分離されなかった。牛 3 農場からは検査対象とした病原体は検出されなかった。（図 32、33 小課題 3 平成 28 年度）

- 豚 P-D 農場で検出された PCV2 はすべて畜舎内採材検体から検出され、1 検体は平成 26 年度に検出されたハエ由来ウイルスと同じ PCV2-2E 亜型であったが、他 11 検体は PCV2-2B 亜型であった。（図 34 小課題 3 平成 28 年度）
- 豚 P-D 農場で検出された PPV は全て畜舎内に由来し、豚 P-G 農場では 1 検体が畜舎

内、2検体が畜舎外に由来する採材検体であった。PCR増幅産物（約200塩基）の解析では、豚P-D農場ではふき取り及びハエ由来株の配列は同一であったが、使用ワクチン株の配列とは異なった。また、P-G農場ではワクチン株と同じもの

（28RS215；畜舎外）と異なるものが混在していた。（図35 小課題3 平成28年度）

- 豚P-D農場では、衛生害虫等対策によってPCV2検出数が10検体から1検体まで減少した。PPV検出数は、対策前に10検体であったが、対策後1ヶ月に6検体に減少し、対策後2ヵ月後に再び15検体に増加した。豚P-G農場では、対策後1ヵ月の1検体からPPVが検出され、対策後2ヵ月で3検体に増加した。（図36 小課題3 平成28年度）

平成28年度は、これまでと同様にブロイラー農場周辺で採取した17サンプル（床スワブ、昆虫）における、IBDV、IBV、ヘルペスウイルス、クラミジアなどの遺伝子検査を引き続き行った。これに加え、昨年度、養豚場周辺の野鳥より、ブタクラミジア（*Chlamydia suis*）を検出したため、豚農場の59サンプル（床スワブ、昆虫、野鳥・キツネ・ネズミの糞）におけるクラミジア検査も実施した。

- ブロイラー農場周辺のサンプルからは主要なウイルス遺伝子は検出されなかった（図37 小課題4 平成28年度）。
- 養豚場周辺のクラミジア調査では、床スワブ4サンプルよりクラミジア遺伝子が検出された（図38 小課題4 平成28年度）。クラミジアの遺伝子型別に用いられるompA遺伝子配列解読の結果、これらはいずれも*C. suis*であることが明らかとなった。*C. suis*は他のクラミジアと異なり、*tetC*をもつことにより薬剤耐性を獲得している株があることが欧米で報告されている。今回検出されたサンプルからは*tetC*は検出されなかった。
- 27年度に農場周辺の野鳥から検出されたものと今年度床スワブより検出されたものは、同じクレードに配置されず、野鳥から検出された株は別のクレードとの中間位置に配置された。今回、床スワブから検出された*C. suis*について、野鳥から検出されたものとの直接的な因果関係は認められなかった。（図39 小課題4 平成28年度）
- 当該農場周辺では、原因は不明であるものの秋口に流産が見られるとのことである。床スワブから*C. suis*遺伝子が検出されたことから、流産の原因候補の一つとして考える必要があるのかもしれない。培養細胞・発育鶏卵を用いて、遺伝子が検出された野鳥、床スワブから*C. suis*は分離できなかった。

牛3農場、豚2農場を対象に防除対策を行い、衛生状態の改善がみられるかどうかリアルタイムPCRを用いて評価した。防除対策前にdembo-PCR（牛舎）、dempo-PCR（豚

舎)、pan-salmonella-PCR(鶏舎)を用いて網羅解析を行い、対策1か月と2か月後には対策前に陽性であった項目について解析した(図40 小課題5 平成28年度)。

- 牛舎では対策前にBVDV、BEV、BToV、BAdV、*Salmonella*、*Cryptosporidium*が検出され、対策に効果があったと考えられる病原体はなかった(図41 小課題5 平成28年度)。農場間で検出される病原体と検出件数に差があった。
- 豚舎では対策前にP-D農場において、PCV2、PCMV、*H. parasuis*、*S. suis*、PHEV、RVA、SDVが検出されたが、対策後はどの病原体の検出件数は減少していた(ただし、減少程度の差はあった)(図42 小課題5 平成28年度)。しかし、1か月後に一旦減少しても2か月後に検出件数が増加している病原体もあった。RVAについては遺伝子型を特定できたものはG3とG9であった。G9はこの農場内で蔓延しているウイルス、G3は対策後1から2か月の間に侵入したウイルスであることが示唆された。P-G農場では対策前にはどの病原体も検出されず、対策後に*H. parasuis*が1例検出されただけであった。
- 鶏舎では*Salmonella*が検出されなかったが、一部の検体では培養で陽性になったものがあつたことから、Pan-salmonella-PCRには改良が必要かもしれない(図43,44 小課題5 平成28年度)。
- 以上の結果から、今回用いたリアルタイムPCR系は防除対策を評価できたが、ウイルス分野や細菌分離とセットで実施すべきであると考えられた。

【追】

牛B-L農場は、平成26年度に牛サルモネラ症(*S. Typhimurium*)が発生したため調査対象農場として追跡調査を実施した。平成27年度は分離されたが、28年度は分離されなかった。平成26年度と平成27年度に分離された株を用いて、反復配列多型解析(multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis; MLVA)による分子疫学解析を実施した。

- PFGE解析(XbaI)ではH26,H27牛および野鳥由来株は同じクラスターに分類された(93%以上)。MLVAプロファイルに基づく系統樹解析ではH27牛由来3株は同一プロファイルで、H26牛由来株及び野鳥由来2株と異なるプロファイルを示した。(図45 小課題1 平成28年度)
- 以上の成績から、同一クローンではない(遺伝子型が同じではない)が、血清型やPFGE型が同一で類似した株である。野鳥が*S.Typhimurium*を媒介する可能性については注意が必要である。