



国立研究開発法人
農業・食品産業技術総合研究機構

NARO

農研機構技報

Technical Report

No. 11
Jan. / 2022

特集

防ぐ



DEFENSE



History
温故知新

スマート農業技術の普及

栽培のスマート化



植物工場の環境を自動管理

NARO 植物工場「パブリカ」

NARO 植物工場「いちご」

稲作のスマート化

稲麦用収穫情報マッピングシステム

国内の 農業生産の増大

食料安全保障の確立に向けた取組

- 研究で貢献
- 輸入穀物等の安定供給の確保
- 備蓄の推進
- リスクマネジメント



- 04 特集「防ぐⅡ」
ーレギュラトリーサイエンスー
- 05 特集によせて
渡嘉敷 勝
- 06 1 正確な分子のモノサシをつくる
DNA標準物質(1分子標準物質)の開発
高島 令王奈
- 10 2 コメに含まれるヒ素・カドミウムの
同時低減技術
石川 覚 中村 乾 山口 紀子
- 14 3 現在わが国で流行している
豚熱の原因ウイルスの性状
深井 克彦
- 18 4 鳥インフルエンザウイルスの
診断技術強化と侵入経路解明
内田 裕子
- 22 5 迅速かつ高感度に口蹄疫ウイルスの検出が
可能な銀増幅イムノクロマトキットの開発
森岡 一樹
- 26 6 豚流行性下痢(PED)制御に向けたウイルス
感染動態の解明と鑑別検査手法の開発
宮崎 綾子
- 30 7 糞便の多検体処理による
牛ヨーネ病スクリーニング遺伝子検査法
川治 聡子
- 34 8 ツマジロクサヨトウの日本への侵入と初飛来の解析
大塚 彰
- 38 温故知新

食 品 安 全

行政施策

食品安全基本法
食品衛生法
飼料安全法
植物防疫法
カルタヘナ法
家畜伝染病予防法
…

植 物 防 疫

動 物 衛 生

特集

防ぐ



DEFENSE

人、動物、植物の 生命と健康を保護するために

本部 企画戦略本部
レギュラトリーサイエンス管理役

渡嘉敷 勝

TOKASHIKI Masaru



特集のテーマであるレギュラトリーサイエンス (Regulatory Science) は「規制科学」と訳されます。「規制」という言葉から、私たちの生活や行動を縛るものと考えられる人もいるかもしれませんが、実際、最近では新型コロナウイルス感染症対策として行動規制や入国規制などが発動され、多くの人々の日常生活が大きな影響を受けました。しかし、これらの規制の目的は人々の生命と健康を保護することです。規制とは、生命の安全、環境の保全、消費者の保護などの行政目的のために人々の権利や自由を制限するものです。

それでは、レギュラトリーサイエンス(規制科学)は規制とどのような関わりがあるのでしょうか。レギュラトリーサイエンスについては国内外に種々の定義があります。国内では、第4期科学技術基本計画に「科学技術の成果を人と社会に役立てることを目的に、根拠に基づいた確かな予測、評価、判断を行い、科学技術の成果を人と社会との調和の上で最も望ましい姿に調整するための科学」と定義し、「国は、科学的合理性と社会的正当性に関する根拠に基づいた審査指針や基準の策定に向けて、レギュラトリーサイエンスを充実する」とされています。レギュラトリーサイエンスが対象とする分野は多岐にわたり、医薬品、医療機器、食品、化粧品、農業などから気候変動まで、規制がかかる社会のほぼすべてがその対象となります。

レギュラトリーサイエンスの主要な手法はリスク

分析であり、主にリスク評価、リスク管理そしてリスクコミュニケーションの3要素からなります。そのうち、最も科学的寄与が大きなプロセスがリスク評価であり、生命や健康に悪影響を及ぼす因子を特定し、その影響を定量的に評価します。リスク評価の結果を基に行政部局が規制の基準値などを設定して施行することとなります。

農業分野では、農林水産省が、「レギュラトリーサイエンスは、科学的知見と、規制などの行政施策・措置との間の橋渡しとなる科学」と定義し、「食品安全、動物衛生、植物防疫などに関する問題の発生や発生後の被害拡大を防止するための施策・措置を科学的根拠に基づいて検討する際に、レギュラトリーサイエンスに属する研究の成果を活用」としています。これを筆者なりの理解でわかりやすく言えば、「人、動物、植物の生命と健康を保護する規制などの行政施策を決定する際に必要となる科学的根拠を与える科学」が農業分野のレギュラトリーサイエンスとなります。

本特集では、農研機構が取り組んでいるレギュラトリーサイエンス研究の成果のうち、食品安全関係2報、動物衛生関係5報、植物防疫関係1報を紹介いたします。先に刊行した本誌No.9での、植物防疫関係3報も参照いただけます。

農研機構は、これからも人、動物、植物の生命と健康を保護するためのレギュラトリーサイエンス研究に取り組んでいきます。

正確な分子のモノサシをつくる DNA標準物質(1分子標準物質)の開発

高島 令王奈

TAKABATAKE Reona

はじめに

テレビや新聞、インターネットのニュースなどでPCR^{*1}という言葉が頻繁に目にするようになりました。PCRとは、生物のもつ遺伝子の本体であるDNAの特定の領域を大量に増幅させる技術です。標的となる配列を挟むように2種類のプライマー^{*2}を設計し、熱変性、アニーリング^{*3}、伸長反応を繰り返すことによって、標的配列を指数関数的に増幅させることができ、高感度の検出が可能となります(図1)。PCRは、米国の分子生物学者Kary Mullisによって1983年に開発されました。Mullisはこの功績により1993年にノーベル化学賞を受賞しています。

PCRは、その高感度な検出性能を活かして、遺伝子組換え食品、品種判別・がん・感染症の検査などに幅広く用いられています。PCR検査においては、正しい結果を得るために検査機器や試薬の精度が適切に管理されていることが重要です。

PCRの技術的境界

PCR検査に限らず化学分析の世界では、偽陰性あるいは偽陰性率という言葉がよく出てきます。偽陰性率とは「陽性であることが既知の試料を陰性と判定した比率」のことをいいます¹⁾。すなわち、感染症の検査では、検体中に病原体が存在しているにもかかわらず、検査によって検出されずに陰性と判定してしまうことから、感染症の拡大につながる恐れがあります。また、食品表示においても、偽陰性による標的の見逃しがあれば、表示制度の信頼性に関わります。

一般的には、PCRは最適な条件下であれば、僅か1分子のDNAをも検出可能であると考えられており、その仮説を根拠に応用技術が開発され、検査の性能評価がなされてきました。しかしながら、実際に1分子のDNAがPCRによって検出可能であるのか、また、検出可能な場合100%の確率で検出できるのか、といった問題については全く検証されていません。

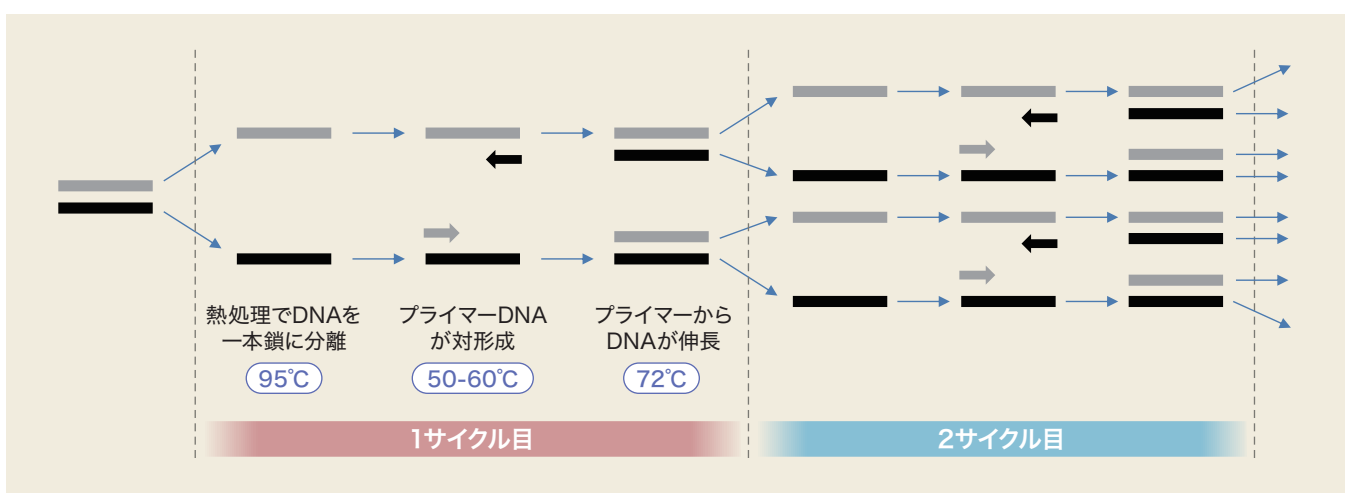
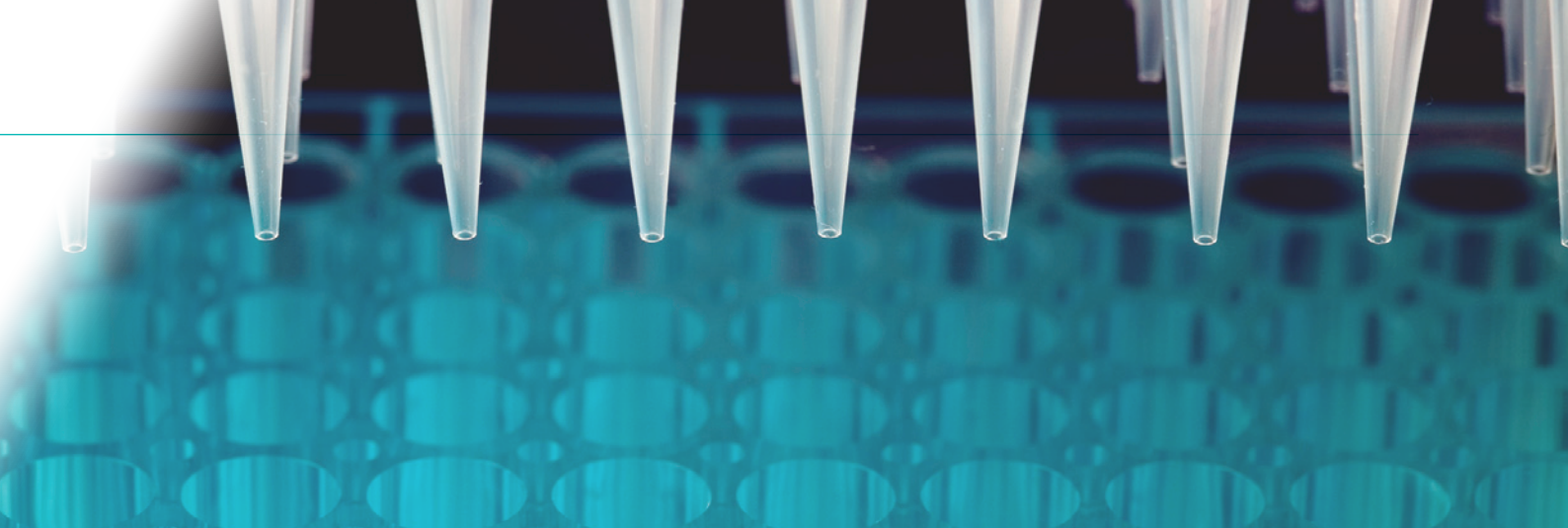


図1 PCRによるDNA増幅



PCR検査では、定量的な分析が必要とされることもあります。現在の定量法としては、DNAが増幅する様子をリアルタイムに観察することにより、一定の値に達するまでに要したPCRのサイクル数(Cq値)から元々存在していたDNAの分子数を理論的に求めるリアルタイムPCRが一般的です。さらに、リアルタイムPCRを応用して絶対定量を謳っているのがデジタルPCRです。デジタルPCRでは、DNAの希釈液を多数の微小区画に分配し、増幅微小区画数と非増幅微小区画数をカウントすることによって、溶液中のDNAを定量する技術です。このように、PCRを利用したDNA定量技術は様々な改良がなされてきたにも関わらず、DNAは何分子まで正確に定量可能であるか、という技術的な限界は検証されてきませんでした。

PCR技術が飛躍的に進化している一方で、評価手法の開発が追い付いていないことから、高感度の分析法や分析機器の能力を十分に活かし切れていないのです。PCRにおける真の定性的あるいは定量的限界が検証できていない最大の原因は、そのような検証が可能なモノサシが存在していないことにあります。

分子のモノサシ、 1分子標準物質の開発

そこで、正確な分子のモノサシをつくることを目標に、PCRの標的配列を1個単位で制御可能な標準物質(1分子標準物質)の開発を試みました。

ただし、1分子レベルのDNA標準物質を作製するには大きな壁が存在していました。これまで、DNAの種類と濃度が規定された標準物質がいくつかの企業や研究機関から提供されていますが、いずれも高濃度のもので、低濃度での検査精度を確認するためには、希釈したDNA

溶液を使う方法が一般的でした。DNAが1分子含まれる試料を調製するためにDNA溶液を限界まで希釈すると、希釈後の濃度は均等にはならないと考えられています。仮に、DNAが10分子含まれている溶液を10等分した場合、どれほど正確に分注しても、希釈後の溶液には均等に1分子ずつDNAが含まれることにはならないようです(図2)。限界希釈後の溶液中の分子数は、ポアソン分布^{※4}によって予想されます²⁾。上記のような平均1分子のDNAを含む溶液においては、計算上、実際に1分子を含む確率が36.8%、2分子を含む確率が18.4%、3分子を含む確率が6.1%、4分子以上を含む確率が1.9%、そして、DNAを含まない確率が36.8%となります(表1)。実際にポアソン分布に従うか否かについては明らかではないですが、少なくとも、濃いDNA溶液を単純に希釈するのみでは、

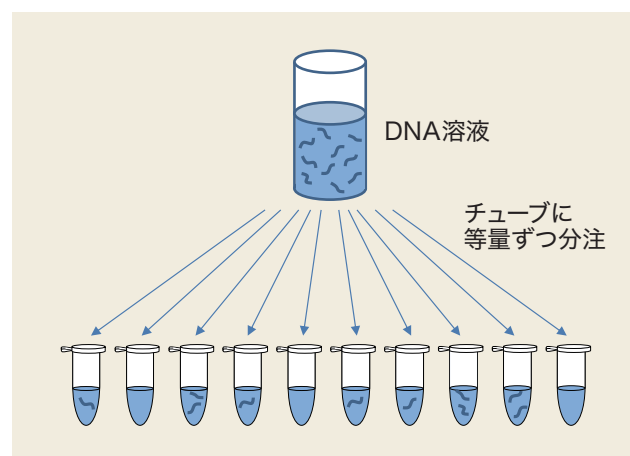


図2 DNA溶液を限界まで希釈した場合の分布を示したイメージ図

表1 DNAを平均1分子含まれるように希釈した溶液中の分子数^{※)}

DNAの分子数	0	1	2	3	4個以上
確率(%)	36.8	36.8	18.4	6.1	1.9

注)ポアソン分布により計算

DNAが正確に1分子ずつ含まれた標準物質を再現性良く、安定的に生産することは不可能でした。

このような問題を解決するために、細胞を利用することを考えました。まず、細胞のゲノムにPCRの標的配列を1対(1コピー)となるように導入します。我々ヒトを含む多くの真核生物の細胞は、両親から由来する相同染色体を1対ずつ持った2倍体細胞(2n)です。このような細胞を使用すると、最少単位が2コピーになってしまいます。そこで本標準物質では、1倍体の出芽酵母の細胞(n)を利用しました。また、真核細胞は、細胞周期によって細胞当たりの

DNA量が変わることから、細胞内のゲノムの複製が行われないように細胞周期をG1期^{※5}で停止させることにより、1細胞=1標的配列の状態を保持します。さらに、細胞をインクジェット技術によってPCRに供する容器に直接分注した後に破壊し、DNAを抽出することによって、標的配列が1個単位で制御可能な標準物質としました(図3)。導入したインクジェット技術は、細胞を安定的に吐出し、吐出した液滴中の細胞数をカウントするバイオプリンティング技術(株式会社リコー開発)です。今までDNAの数を直接数えることは不可能でしたが、本技術により標的配列を組み込んだ細胞を扱うことによって、間接的にDNAの分子数をカウントすることが可能となりました³⁾⁴⁾。農研機構、株式会社ファスマック、株式会社リコーが共同でリアルタイムPCRを用いた室間共同試験を行ったところ、1分子のDNAは92%検出可能であり、1~32分子というこれまでに無い低濃度領域において直線性を示すことが確認されました(図4)(表2)³⁾。

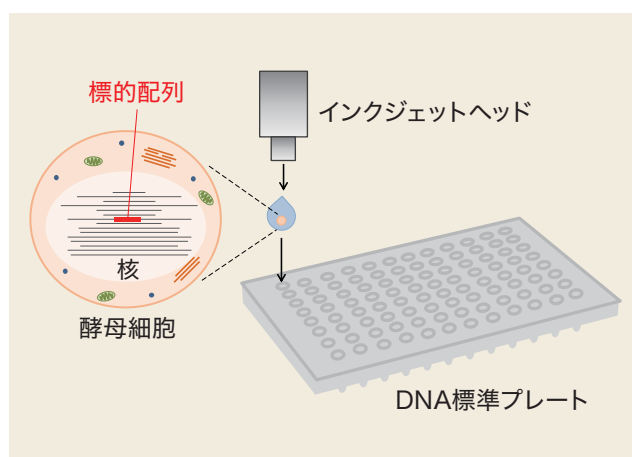


図3 新しい標準物質の作製方法を示した模式図。赤線が標的配列

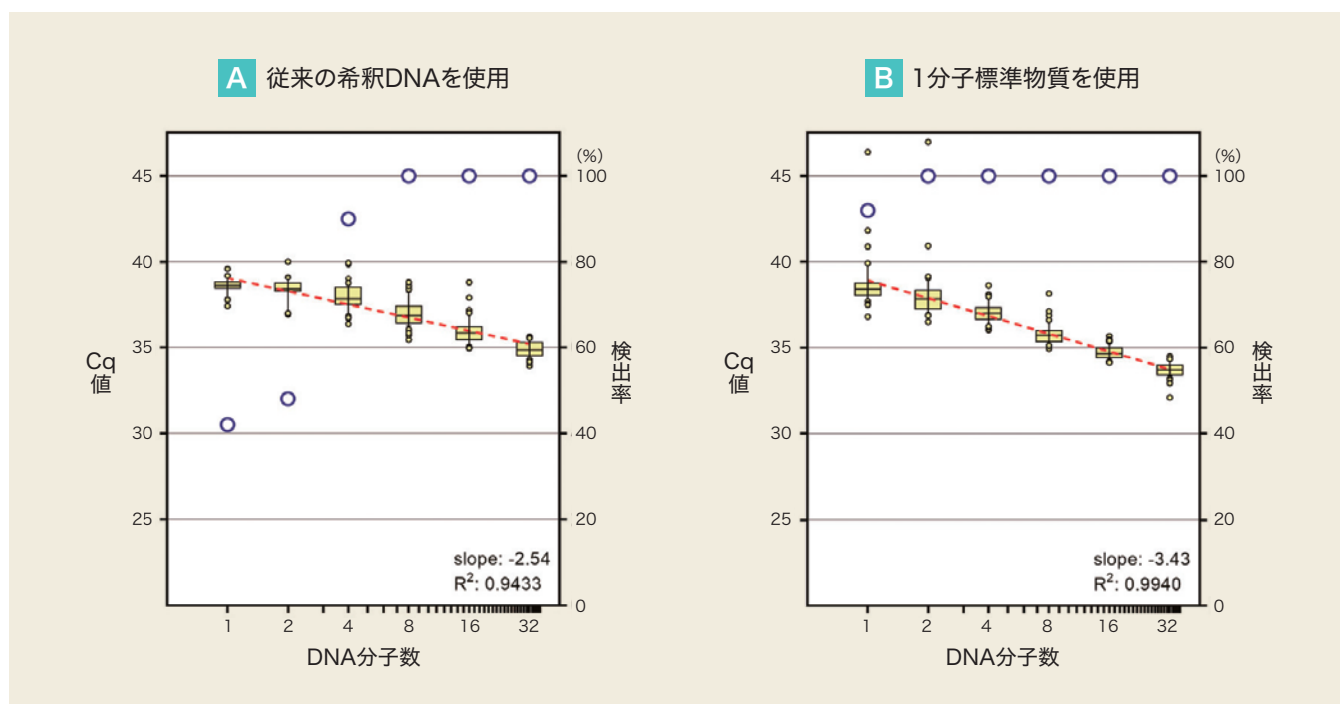


図4 リアルタイムPCR測定結果。Aは従来の希釈DNAを使用した場合、Bは1分子標準物質を使用した場合DNAの分子数が1、2、4、8、16および32個のCq値(一定の量に達するまでに要したPCRサイクル数)。白丸は検出率

表2 リアルタイムPCR測定結果のまとめ^{注)}

従来の希釈DNA							1分子標準物質						
Cq値	1分子	2分子	4分子	8分子	16分子	32分子	Cq値	1分子	2分子	4分子	8分子	16分子	32分子
平均	38.55	38.36	37.95	36.96	35.93	34.85	平均	38.66	38.04	36.98	35.76	34.72	33.68
最大	39.59	40.01	39.94	38.77	38.77	35.61	最大	46.39	46.97	38.59	38.13	35.65	34.49
最小	37.40	36.92	36.35	35.43	34.94	33.92	最小	36.78	36.48	36.02	34.92	34.12	32.10
検出率	42%	48%	90%	100%	100%	100%	検出率	92%	100%	100%	100%	100%	100%

注)各分子数について48回ずつ繰り返し測定した結果

おわりに

本技術により、導入する標的配列を変えることによって、様々な検査用の標準物質を作製することが可能です。すでに株式会社リコーより「新型コロナウイルス用DNA標準プレート」という形で製品化されており、検査精度の向上を通じて感染拡大防止に寄与することが期待されています(図5)。

本標準物質は、検査分野だけではなく、研究分野においても魅力的なツールとなり得ます。PCRが発明されてから40年近くが経過しますが、PCRは1分子のDNAをどれほど正確に検出できるのか、あるいは何分子から正確に定量できるのか、といった真の技術的限界は未だに明らかになっていません。今回開発された分子のモノサシを活用していくことにより、このような問いに対する答えが得られるかもしれません。

(食品研究部門 食品流通・安全研究領域
食品安全・信頼グループ)



図5 新型コロナウイルス用DNA標準プレート
(出典:株式会社リコー)

用語解説

- ※1 **PCR** ポリメラーゼ連鎖反応(Polymerase Chain Reaction)の略、2種類のDNA断片(プライマー)とDNA合成酵素によるDNA合成反応です。この反応の繰り返しにより、DNAの特定部位を数十万倍にまで増幅させることが可能です。
- ※2 **プライマー** 核酸の生合成の開始反応に要求されるオリゴヌクレオチド分子のことです。PCRは最低一対のプライマーを用いたDNAの増幅法になります。
- ※3 **アニーリング** 言葉の原義は、金属やガラスなどを高温にして、ゆっくり温度を下げて破壊しにくい構造にすることです。PCRにおいては、一本鎖の鋳型DNAにプライマーが結合し、二本鎖を形成することに用いられます。
- ※4 **ポアソン分布** 珍しい事象が一定時間に起こる回数を表す確率分布のことです。
- ※5 **G1期** 細胞周期の間期の一時期で、DNA合成準備期のことを指します。

参考文献

- 1) 安井明美ら(2010) 食品分析法の妥当性確認ハンドブック. 株式会社サイエンスフォーラム, 東京, pp.73-106.
- 2) Sokal, R. and Rohlf, F. (2005) 生物統計学. 共立出版, 東京, pp.83-92.
- 3) Seo, M. et al. (2019) Novel Bioprinting Application for the Production of Reference Material Containing a Defined Copy Number of Target DNA. Analytical Chemistry, vol.91 (20), 12733-12740.
- 4) ニュースリリース(2018) バイオプリンティング技術によりDNA分子数を1個単位で制御.
https://jp.ricoh.com/release/2018/0604_1

コメに含まれるヒ素・カドミウムの同時低減技術

石川 覚 中村 乾 山口 紀子

ISHIKAWA Satoru NAKAMURA Ken YAMAGUCHI Noriko

はじめに

ヒ素やカドミウムは自然環境中に普遍的に存在するため、作物吸収を介して微量ながら多くの食品に含まれています。一般的な日本人の食生活では可能性は低いと考えられているものの、食品を通してヒ素やカドミウムを継続的かつ大量に摂取した場合には、健康に悪影響を及ぼす可能性があります。毒性の高い無機ヒ素とカドミウムは、食品の中でもコメから摂取する量が比較的多いとされています。コメ中の無機ヒ素とカドミウム濃度には国際的な食品の基準値(国際基準値)^{※1}が設けられています。農林水産省が公表しているコメの無機ヒ素とカドミウム濃度に関する全国実態調査¹⁾²⁾によると、日本産米における濃度は国際基準値と比較しても低い濃度であったものの、慢性的な摂取によるヒトの健康被害リスクを減らすとともに、コメやコメ関連食品の輸出拡大促進に寄与するため、コメ中の無機ヒ素とカドミウムの低減対策を続けることが重要です。

コメのカドミウム吸収抑制対策として、出穂期前後各3週間の^{たんすい}湛水管理が奨励されています。一方このような湛水管理は土壌の還元化に伴う無機ヒ素の溶出を促進す

るため、コメの無機ヒ素濃度は高まります。落水管理による土壌の酸化はヒ素溶出を抑制しますが、カドミウムが溶出しやすくなるため、コメのカドミウム濃度が高まります(図1)。このように無機ヒ素とカドミウムは、水稻栽培においてトレードオフ^{※2}の関係にあるため、両方を同時に低減するための技術開発が必要です。本稿では、現在取り組んでいる水管理・資材・品種を用いた無機ヒ素・カドミウム同時低減技術の紹介に加え、普及に向けた課題も提示しました。

水管理による無機ヒ素・カドミウム同時低減技術

3日間湛水-4日間落水を繰り返す間断灌溉(以下3湛4落)は、土壌の酸化還元に伴って溶出する無機ヒ素とカドミウムをバランス良く抑制することで、水稻による吸収を低下させる技術です³⁾(図2、図3上)。特に土壌から田面水に溶け出す無機ヒ素(溶存ヒ素)濃度を確実に低下させるには、4日間連続で土壌を乾燥させることが本技術のキーポイントです。4日間、土壌をしっかりと乾かすことで、再湛水後も土壌の還元が発達しにくくなり、溶存無機ヒ素濃度の上昇を抑制できます⁴⁾。また、一時的に上昇した

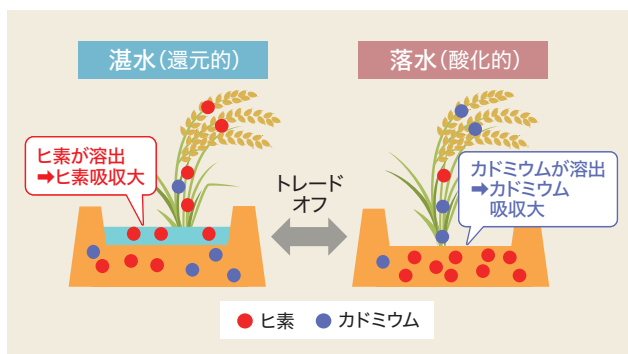


図1 水稻栽培におけるヒ素とカドミウムの関係
湛水により土壌が還元的になると、ヒ素が溶出しやすくなり、水稻のヒ素吸収が高まる。落水により土壌が酸化的になると、カドミウムが溶出し、水稻のカドミウム吸収が高まる。

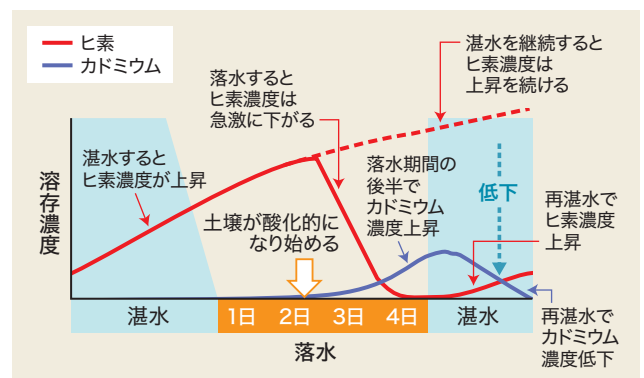
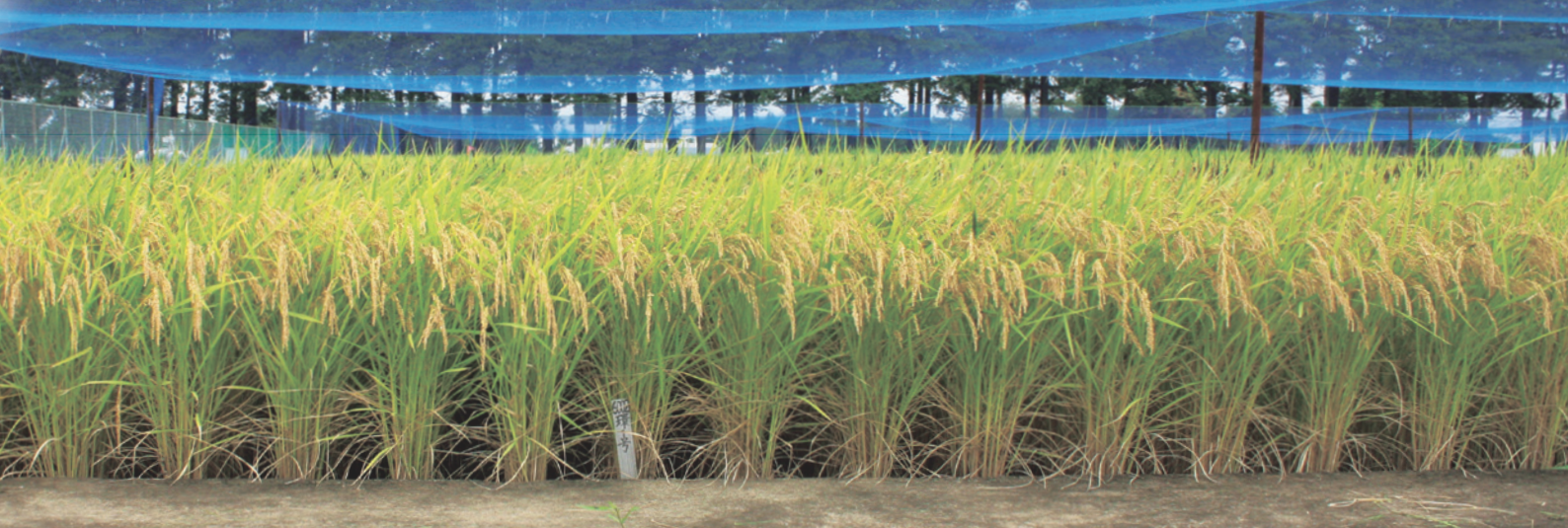


図2 水田土壌におけるヒ素とカドミウムの溶出パターン(模式図)



コシヒカリ(左)とカドミウム低吸収性の「コシヒカリ環1号」(右) (農研機構試験ほ場、茨城県つくば市)

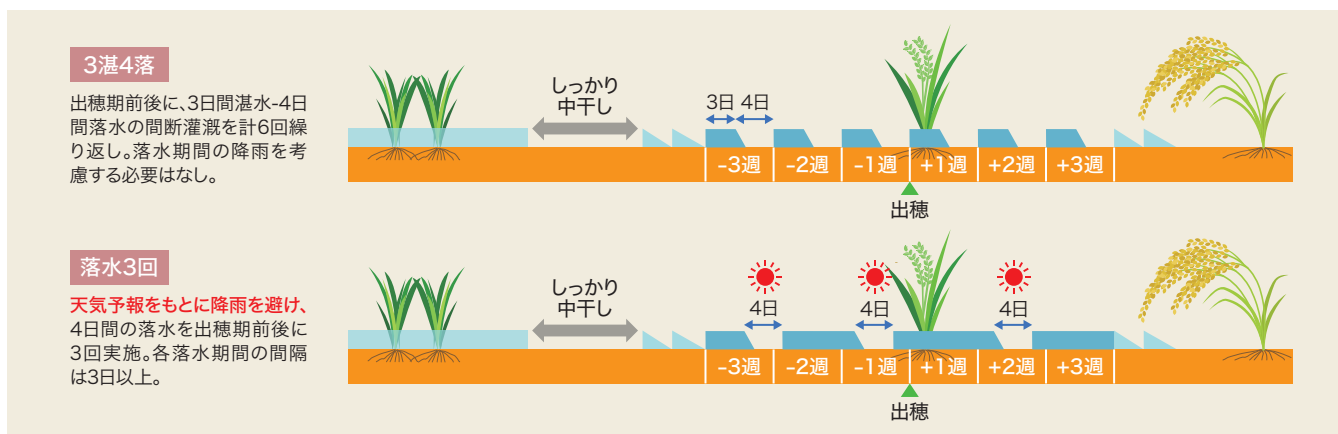


図3 コメのヒ素・カドミウム低減のための水管理方法

土壌中の溶存カドミウム濃度も、再湛水により速やかに低下します。3湛4落を出穂期前後各3週間に計6回行うと、同時期に湛水管理した場合に比べ、玄米中無機ヒ素濃度は著しく減少します(図4左)。特に湛水管理で国際基準値を超えてしまうほ場(図4左の灰色の網掛け範囲に位置するプロット)は3湛4落により、玄米中無機ヒ素濃度の低下率が平均で47%に達しました。

出穂期前後6回の3湛4落を改良した落水3回管理も試行しています。これは、天気予報をもとに降雨を避けながら、4日間連続の落水を3回行う水管理です(図3下)。落水3回管理は省力的である上、3湛4落と同等の玄米中無機ヒ素低減効果が得られます(図4左)。落水を伴う水管理は玄米のカドミウム濃度を上昇させる傾向が見られるものの、大部分のほ場で国際基準値以下に抑えることが可能です(図4右)。また、このような落水管理は精玄米重と整粒歩合にほとんどの場合影響を与えません。ただし、コメ中のカドミウム濃度が高くなりやすいほ場では、3湛4落や落水3回管理により玄米中カドミウム濃度が上昇する場合があります。コメ中のカドミウム濃度が高くなりやすい地域では、後述のカドミウム低吸収性品種の導入と落水管理

を組み合わせることが推奨されます。

なお、本水管理技術により、玄米中ヒ素濃度を確実に減らすためには、いくつか留意点があります。中干しの徹底とその後の落水管理をスムーズに実行するため、水田に溝を切り、排水口までつなげておく作業が必要です。落水3回管理は降雨を避けて落水しますが、落水期間に降雨があれば、降雨程度に応じた期間延長が必要です。

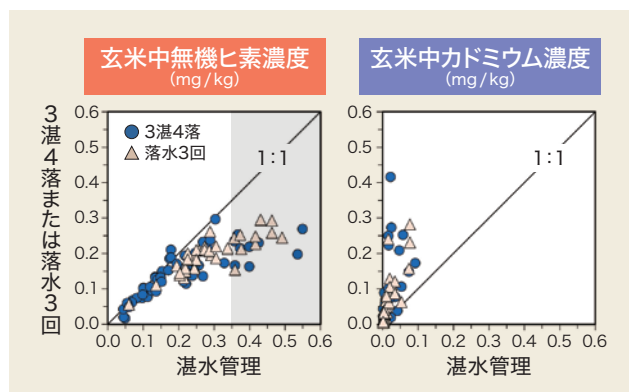


図4 3湛4落および落水3回の水管理法による玄米の無機ヒ素とカドミウム濃度への影響

3湛4落は、21地点のほ場における複数年栽培の結果。落水3回は、14地点のほ場における複数年栽培の結果。玄米無機ヒ素濃度の国際基準値は0.35 mg/kg、玄米カドミウム濃度は0.4 mg/kg。灰色に網かけした地点では湛水管理で玄米無機ヒ素濃度が0.35 mg/kgを超過。

資材による無機ヒ素低減技術

鉄を主成分とした資材(含鉄資材)の施用は、出穂期前後各3週間の湛水管理下でも土壌から溶出するヒ素量を減らし、コメの無機ヒ素濃度の低下に寄与します。これは、含鉄資材中の鉄鉱物が溶出した無機ヒ素を吸着するためであると考えられます。代かき前に10 a 当たり2 tの含鉄資材(転炉さい※3)を1回のみ施用し、湛水管理した複数の水田ほ場から収穫した玄米の無機ヒ素濃度を6年間にわたり調査しました。図5は代表的な3地点における結果です。転炉さいの施用初年目は、玄米中の無機ヒ素濃度を30～50%低減させました⁵⁾。玄米無機ヒ素濃度は登熟期の気温や中干しの強度の影響を受け、年次により変動します。そのため、資材施用に関係なく玄米無機ヒ素濃度は変動し、また資材による玄米無機ヒ素濃度の低減効果は経年的に減少する傾向がありましたが、施用から6年経過後も玄米無機ヒ素濃度を10%程度低減させる効果が持続しました。転炉さい施用による収量・品質の低下は認められませんでした。一方、転炉さいはイネの生育に有用なケイ酸も含まれているため、無機ヒ素吸収抑制以外のメリットもあります。玄米中のカドミウムは湛水管理であったため、転炉さい施用の有無にかかわらず低濃度でした。転炉さいの他に、鉄粉や褐鉄鉱を原料とする含鉄資材にも同等、あるいはそれ以上の玄米無機ヒ素濃度の低減効果がありました。しかしこれらの含鉄資材には、供給量が少なく、比較的価格が高いという問題があります。資材施用は、湛水によるヒ素濃度上昇リスクがどの程度あるのかを考慮して検討する必要があります。

品種による無機ヒ素・カドミウム同時低減技術

カドミウムをほとんど吸収しない水稻品種「コシヒカリ環1号」を落水を伴う間断灌漑で栽培すると、カドミウム低吸収性を維持したまま、コメ中の無機ヒ素濃度を減らすことができます。「コシヒカリ環1号」は2015年に種苗登録された品種で、カドミウム汚染土壌で栽培しても、ほぼ検出限界レベル(0.01 mg/kg未満)まで玄米カドミウム濃度が低下することが特徴です⁶⁾。また、育成地(茨城県つくば市)では「コシヒカリ」とほぼ同等の生育・玄米収量を示します。気候や土壌条件の異なる3地域の水田ほ場に「コシヒカリ環1号」を栽培し、落水管理との組み合わせによる玄米の無機ヒ素・カドミウム濃度の低減効果を調べました(図6)。無機ヒ素・カドミウム低減における「コシヒカリ環1号」のポテンシャルを評価するため、落水管理は水稻の生育に影響がない程度に灌漑水を制限した管理(以下節水管理)としました。同一ほ場で栽培した「コシヒカリ」と「コシヒカリ環1号」の玄米無機ヒ素濃度に違いはありませんが、節水管理は約50～70%、無機ヒ素濃度を低下させました。しかし、節水管理は「コシヒカリ」のカドミウム濃度を増加させ、特にほ場Eは大幅に基準値を超過しました。その一方、「コシヒカリ環1号」はほ場や水管理条件にかかわらず、ほとんどカドミウムが検出されませんでした。このように、「コシヒカリ環1号」はカドミウム汚染対策用に湛水管理が徹底されている地域においても、節水管理もしくは上記3湛4落のような間断灌漑との組み合わせで、大幅にコメの無機ヒ素とカドミウム濃度を減らすことが可能です⁷⁾。現在、「コシヒカリ環1号」以外のカドミウム低吸収性品種が全国的に育成されつつあるため、今

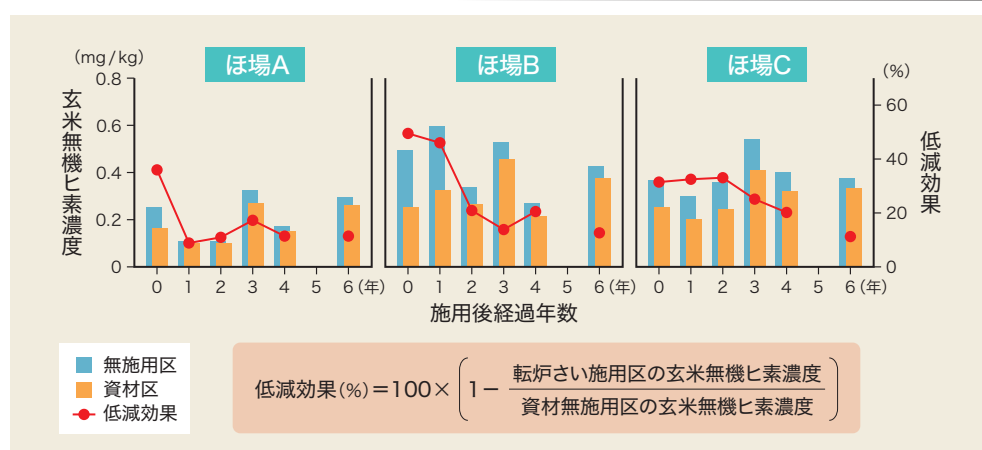


図5

転炉さいを施用した3ほ場における玄米無機ヒ素濃度の変化
水管理は、出穂期前後常時湛水管理。
転炉さいは初年目(図の0年)のみに2 t/10 a 施用。その後6年間(図の1-6年)にわたり資材の効果を調査。

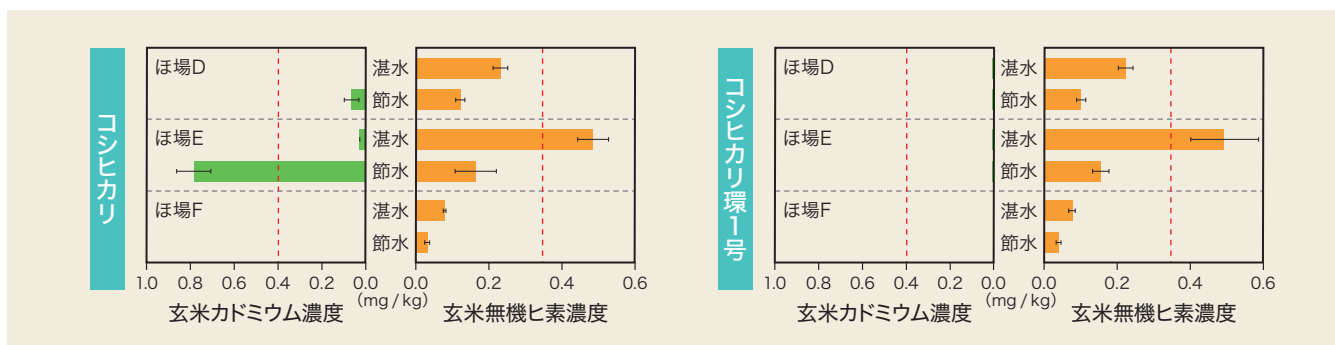


図6 コシヒカリとコシヒカリ環1号の玄米中無機ヒ素・カドミウム濃度の比較
 水管理は出穂期前後各3週間の湛水管理および灌漑水を制限した落水管理(節水管理)とした。
 図中の赤点線は、玄米無機ヒ素濃度またはカドミウム濃度の国際基準値を示す。

後地域の特性に合わせたカドミウム低吸収性品種を選択することが可能になります。なお、「コシヒカリ環1号」をベースに育成した品種は、OsNramp5というカドミウムと植物にとって必須なマンガンの輸送に関わるタンパク質の機能を欠失しているため、通常品種に比べマンガン吸収量が低下します。特に節水管理は、土壌中の溶存マンガン濃度の低下により、カドミウム低吸収性品種のマンガン不足を助長させることで、生育低下を引き起こす恐れがあるため、生育に影響を及ぼさない程度の節水条件を予め把握しておくことが、本技術のポイントになります。

(農業環境研究部門 化学物質リスク研究領域
 無機化学物質グループ)

用語解説

- ※1 **食品の国際基準値** コーデックス委員会によって設定された食品の安全に関する国際的な基準値になります。無機ヒ素は玄米で0.35 mg/kg、精米で0.2 mg/kg、カドミウムは玄米・精米で0.4 mg/kgが上限値であり、現在のところカドミウムのみ、国際基準値に準拠した国内基準値が食品衛生法の中で定められています。
- ※2 **トレードオフ** 広義的な意味として何かを得るために、別の何かを失うことで、互いに相容れない関係にあることを指します。ここでは無機ヒ素を減らす栽培管理をするとカドミウムが上昇してしまう(逆も同様)ことを意味します。
- ※3 **転炉さい** 鋼の製造過程で生じる副産物であり、鉄、アルカリ分、ケイ酸に富むため、鉄が不足した老朽化水田や酸性土壌の改良資材として使われず、転炉スラグとも呼ばれます。

参考文献

- 1) 農林水産省(2018) 我が国における農産物中のカドミウム濃度の実態。
https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/kome/k_cd/jitai_sesyu/01_inv.html (参照 2021-11-4)
- 2) 農林水産省(2020) 食品に含まれるヒ素の実態調査。
https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/kome/k_as/occurrence.html (参照 2021-11-4)
- 3) 中村乾ら(2018) 水田土壌中の溶存ヒ素およびカドミウム濃度低減のための気相率。農研機構, 研究成果情報。
https://www.naro.go.jp/project/results/4th_laboratory/niaes/2018/niaes18_s02.html (参照 2021-11-4)
- 4) 加藤英孝ら(2018) 出穂期前後の間断灌漑3湛4落による溶存および玄米ヒ素・カドミウム濃度の同時抑制(2) 間断灌漑期の溶存ヒ素・カドミウム濃度と気相率・Ehの関係。日本土壌肥料学会講演要旨集, vol.64:2.
- 5) 牧野知ら(2017) 鉄資材と湛水管理による水稻玄米中のヒ素とカドミウム濃度の同時低減技術。農研機構, 研究成果情報。
https://www.naro.go.jp/project/results/4th_laboratory/niaes/2017/niaes17_s01.html (参照 2021-11-4)
- 6) 安部匠ら(2017) カドミウム極低吸収品種「コシヒカリ環1号」の育成。育種学研究, vol.19(3), 109-115.
- 7) 石川寛ら(2016) 「コシヒカリ環1号」を用いたヒ素とカドミウムの同時低減技術の開発。農研機構, 研究成果情報。
https://www.naro.go.jp/project/results/4th_laboratory/niaes/2016/niaes16_s01.html (参照 2021-11-4)
- 8) 農研機構 農業環境研究部門(2021) コメのヒ素低減のための栽培管理技術導入マニュアル ～コメの収量・品質への影響を抑えつつ、ヒ素を低減するために～(第2版)。
https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/130313.html (参照 2021-11-4)

おわりに

今回紹介した水管理、資材、品種による無機ヒ素・カドミウム低減技術のどれを選択するか、もしくはどのように組み合わせるかは、コメのカドミウム濃度への影響を踏まえて検討する必要があります。落水処理によるコメ中カドミウム濃度上昇の懸念がない場合は、中干しを確実に実施したうえで、出穂期前後に4日間の落水処理を複数回行う水管理が有効です。一方、落水処理によるコメ中のカドミウムの濃度上昇が無視できない場合は、カドミウム低吸収性品種を、出穂期前後に4日間の落水処理を複数回行う水管理で栽培することで、コメの無機ヒ素、カドミウム濃度を低濃度に抑制することができます。地域に適したカドミウム低吸収性品種がない場合は、含鉄資材を施用し、湛水管理で栽培する対策を選択できます。本技術に関する詳細は農研機構発行の「コメのヒ素低減のための栽培管理技術導入マニュアル～コメの収量・品質への影響を抑えつつ、ヒ素を低減するために～(第2版)」⁸⁾をご覧ください。

現在わが国で流行している 豚熱の原因ウイルスの性状

深井 克彦

FUKAI Katsuhiko

はじめに

豚熱 (classical swine fever、以下CSF)^{※1}は、豚やイノシシが感染する病気であり、強い伝染力が特徴です。2018年9月にわが国では26年ぶりにCSFが発生しました¹⁾。2021年末日現在、16府県で76事例が発生し、27万頭を超える飼養豚が防疫措置対象となっています。また、CSFの発生は飼養豚のみならず、野生イノシシでも確認されており、25都府県で4千頭を超えるCSFウイルス(以下CSFV)感染イノシシが発見されています。CSFのまん延防止を目的に、2019年3月からは野生イノシシを対象とした餌ワクチンの散布が開始されるとともに、2019年10月からは飼養豚に対するワクチン接種が開始されましたが、未だ終息には至っていません。本稿では、2018年からわが国で流行しているCSFの原因ウイルスの性状を概説します。

原因ウイルスの遺伝的性状

1事例目の豚から採取した全血よりCPK細胞を用いて原因ウイルスの分離を試みました。その結果、材料接種7日目に、抗CSFVモノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法により細胞質内に特異蛍光を検出し、原因ウイルスの分離を確認しました(図1)。分離したCSFVをJPN/1/2018株と命名し、CPK細胞でさらに1回継代したウイルスを以降の性状解析に用いました。

CSFVはゲノム配列に基づいて、3種類の遺伝子型に分類されるとともに、各遺伝子型はさらに複数のサブ遺伝子型に分類されています。これらの遺伝子型やサブ遺伝子型は、発生の原因ウイルスの由来を探る上で、重要な情報となっています。そこでJPN/1/2018株のゲノム配列

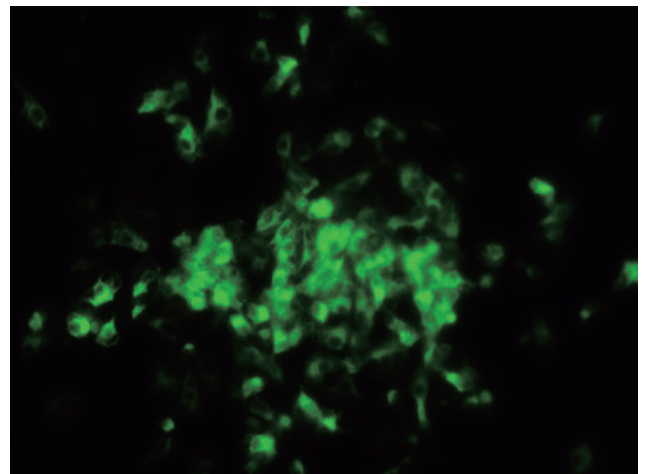


図1 CPK細胞の細胞質内に確認されたCSFVの特異蛍光像

を決定し、遺伝子データベースに登録されているCSFV株とともに遺伝子系統解析を行いました。その結果、JPN/1/2018株の遺伝子型およびサブ遺伝子型は2.1型であることがわかりました²⁾。2.1型CSFVは、近年中国など近隣諸国で発生が確認されている一方で、これまでわが国では確認されていません³⁾。このことから、今回のわが国でのCSFの発生が、中国など近隣諸国からのCSFV株の侵入に起因することが示唆されました。

表1 臨床材料からのウイルス遺伝子の検出状況

豚番号 ^{注1)}	0	1	2	3
		0	1	2
1	-/-/-/- ^{注2)}	-/-/-/-	-/-/-/-	-/+/-/-
2	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-	-/+/-/-
3	NT ^{注3)}	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-
4	NT	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-

注1) 豚1および2:ウイルス接種豚、豚3および4:同居豚

注2) 左から、血清、全血、唾液、鼻汁および糞便からのウイルス遺伝子の検出成績を表す(陽性: +、陰性: -)。

注3) 検査を実施せず



原因ウイルスの豚に対する病原性状

JPN/1/2018株の豚に対する病原性状を解析するため、感染試験を実施しました⁴⁾。具体的には、 $10^{6.5}$ TCID₅₀のJPN/1/2018株を2カ月齢の豚2頭に経口接種しました。ウイルス接種翌日に同月齢の豚2頭をウイルス接種豚と同居させました。これらの豚は2週間の試験期間中、紫斑や結膜炎を示しましたが、全頭が生残しました。また、ウイルス接種豚では、食欲低下や活力低下も確認されました(図2)。ウイルス接種豚ではウイルス接種2~3日後から白血球減少が、4~7日後から発熱が確認されました。一方、同居豚では白血球減少が2頭で確認されましたが、発熱は1頭でのみ確認されました。

血清、全血、唾液、鼻汁および糞便からのウイルス遺伝子の検出状況を表1に示しました。ウイルス接種豚ではウイルス接種3日後からウイルス遺伝子が検出され始めました。一方、ウイルス接種豚の分泌・排泄物(唾液、鼻汁および糞便)からウイルス遺伝子が検出された4~7日後から同居豚の血液材料(血清および全血)からウイルス遺伝子が検出されました。すなわち、ウイルス接種豚から同居豚への水平伝播は容易に起こることが示唆されました。



図2 活力が低下し、うずくまる豚

一方、今回感染試験に使用した豚全頭の扁桃において、蛍光抗体法により陰窩上皮細胞の細胞質に特異蛍光が確認されました(図3)。また、ELISA抗体はウイルス接種豚1頭において、試験最終日に確認されました。さらに、解剖所見として、脳髄膜の血管拡張、腎臓および膀胱の点状出血、脾臓辺縁の多巣梗塞、リンパ節の赤色化および結腸のボタン状潰瘍が確認されました。

ウイルス接種後日数/同居後日数

4	5	6	7	8	9	10	11	12	14
3	4	5	6	7	8	9	10	11	13
+/-/-/-	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+
+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+
-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-	-/+/-/-	-/+/-/-	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+
-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-	-/+/-/-	-/+/-/-	-/+/-/-	-/+/-/-	-/+/-/-	-/+/-/-	+/+/+/+

また、いずれかの材料が陽性を示した日を薄い灰色、すべての材料が陽性を示した日を濃い灰色で示す

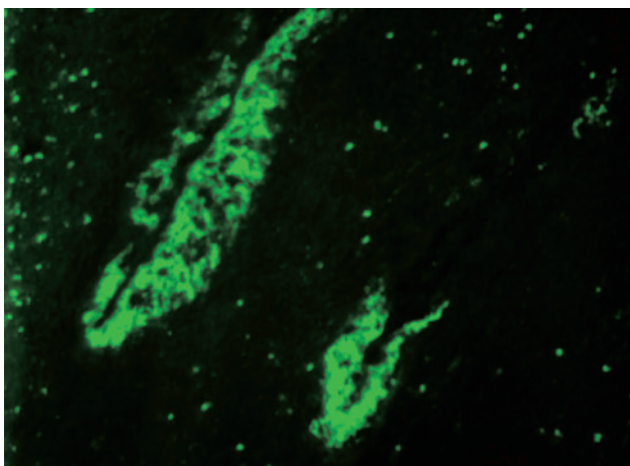


図3 扁桃陰窩上皮細胞に確認されたCSFVの特異蛍光像



図4 脾臓の出血性梗塞

原因ウイルスのイノブタに対する病原性状

前述のように、野生イノシンにおけるCSFの発生は依然として継続しています。そこで、現在流行しているCSFV株のイノシンに対する病原性状を解析する目的で、イノブタを代替動物として感染試験を実施し、豚に対する病原性状と比較しました⁵⁾。また、野生イノシンに対するCSF対策として使用されている餌ワクチンの有効性も併せて評価しました。具体的には、最初の感染試験とは異なり、11事例目の豚の血清からCPK細胞により分離したJPN/27/2019株を用いました。この理由は、11事例目の発生状況が、それ以前の事例の発生状況と比べて、臨床症状が弱く、流行しているCSFVの病原性の変化が疑われたためです。しかし予想に反して、JPN/1/2018株とJPN/27/2019株の病原性の変化を疑うような成績は得られず、また、両CSFV株の全ゲノム配列の相同性も99.8%と非常に高かったことから、両CSFV株はほぼ同一の性状であると考えられました。

$10^{6.5}$ TCID₅₀のJPN/27/2019株を経口接種したイノブタおよび豚ともに、前述の感染試験よりも若干早くかつ強く、臨床症状が確認されました。すなわち、ウイルス接種2～7日後から40℃以上の発熱や10,000個/μL以下の白血球数の減少が確認されたとともに、試験期間の1か月に表2に示すような臨床症状が確認されました。また、死亡したイノブタ2頭では、グラム陰性短桿菌を伴う重度の

化膿性組織球性気管支肺炎および壊死性腸炎、全身のリンパ節の血栓を伴う出血、小脳の出血が確認されました。抗サルモネラO抗原ポリクローナル抗体を使用した免疫染色により、死亡したイノブタ2頭の肺、脾臓、リンパ節および壊死性腸炎病変部において抗サルモネラO抗原陽性菌が確認されました。このことから、CSFV感染による免疫抑制が、サルモネラ属菌感染による敗血症を引き起こし、イノブタ2頭が死亡したと推察されました。

ウイルス遺伝子については、最初の感染試験と同様に、ウイルス接種2～3日後から試験期間を通して臨床材料中に検出されました。また抗体は、ウイルス接種10日後から試験期間を通して検出されました。

一方、餌ワクチンを投与した2週間後に同力価のJPN/27/2019株を経口接種したイノブタは、試験期間中全く臨床症状を示さず、また臨床材料からウイルス遺伝子も検出されなかったことから、JPN/27/2019株に対する餌ワクチンの有効性が示唆されました。しかし、野外においては、イノシンが餌ワクチンを採食してからウイルスに感染するまでの期間は様々であると考えられるため、さらなる検証が必要と考えられました。

表2 JPN/27/2019株を接種したイノブタおよび豚で臨床症状が確認されたウイルス接種後日数

臨床症状	イノブタ・豚番号					
	イノブタ			豚		
	4	5	6	7	8	9
食欲低下	5-14, 17, 21, 24	5-14, 17	5-14, 17	6-14, 17, 21, 24	6-14, 17, 21, 24	6-14, 17, 21
結膜炎	8-10, 12, 13	9, 10	6, 7, 9, 10, 12	6-11, 17	5-14, 17	7-11, 17
活力低下	6, 11	6	6, 11, 14	- 注1)	11, 13	7, 9, 10
パイルアップ	6, 7	6, 7	6, 7	9	9	9
目脂	9-14, 17, 21, 24	8-14, 17	6-14, 17	-	8-14, 24	6-13
鼻汁漏出	13	8-14, 17	8, 10, 12, 13	-	-	7-10
ふらつき	-	9, 10, 17	17	-	-	8-12
振戦	-	9, 10	-	17	10, 11, 13, 14, 17	9-12, 17
紫斑	17, 21	17	13, 14, 17	17, 21, 24	13, 17, 24	17
徘徊	-	17	17	-	-	-
発咳	-	-	-	17	-	6
下痢	-	-	-	-	-	10-14, 17
血便	-	-	-	-	24	-
死亡	-	19	17	-	-	-

注1) 試験期間中に確認されず

おわりに

JPN/1/2018株のゲノム解析の成績から、現在の流行株が近隣のアジア諸国からわが国に持ち込まれた可能性が示唆されました。一方、JPN/1/2018株やJPN/27/2019株の病原性状の解析成績から、個体の健康状態や農場の衛生レベルによって確認される臨床症状が様々である一方で、発熱などの症状を示す前から排泄・分泌物中にウイルスを排泄していること、ウイルス接種豚から同居豚へのウイルスの水平伝播は容易に起こることが示唆されました。すなわち、特徴ある臨床症状が必ずしも認められず、気付かないうちに農場内に感染が広範に広がっている可能性があり、養豚現場での日常的な観察をより一層徹底する必要性が示唆されました。

(動物衛生研究部門 越境性家畜感染症研究領域
海外病グループ)

用語解説

※1 豚熱 豚熱は家畜伝染病の名称変更前は豚コレラ(hog cholera)と呼ばれていた。

参考文献

- 1) Postel, A. et al. (2019) Reemergence of classical swine fever, Japan, 2018. *Emerging Infectious Diseases*, vol.25(6), 1228-1231.
- 2) Nishi, T. et al. (2019) Genome sequence of a classical swine fever virus of subgenotype 2.1, isolated from a pig in Japan in 2018. *Microbiology Resource Announcements*, vol.8(3), e01362-18.
- 3) Luo, Y. et al. (2017) Isolation and characterization of a moderately virulent classical swine fever virus emerging in China. *Transboundary and Emerging Diseases*, vol.64(6), 1848-1857.
- 4) Kameyama, K. I. et al. (2019) Experimental infection of pigs with a classical swine fever virus isolated in Japan for the first time in 26 years. *Journal of Veterinary Medical Science*, vol.81(9), 1277-1284.
- 5) Fukai, K. et al. (2020) Toward better control of classical swine fever in wild boars: susceptibility of boar-pig hybrids to a recent Japanese isolate and effectiveness of a bait vaccine. *Veterinary Research*, vol.51(1), 96.

鳥インフルエンザウイルスの 診断技術強化と侵入経路解明

内田 裕子

UCHIDA Yuko

はじめに

鳥インフルエンザウイルス(avian influenza virus、以下AIV)は自然宿主の野生水禽類の中で循環・維持されるA型インフルエンザウイルス(以下influA)の総称です。その内鶏に感染すると高い致死性を示すウイルスを高病原性鳥インフルエンザウイルス(highly pathogenic AIV、以下HPAIV)と規定しています¹⁾。これらはウイルス表面の赤血球凝集素タンパク:HAとノイラミニダーゼ:NAの種類で分類され、HAはH1からH18、NAはN1からN11までの亜型が存在し、HPAIVのほとんどがH5およびH7亜型です。2003年以降、現在もオセアニア、南アメリカ大陸を除く世界で感染拡大するH5亜型HPAIVは、1996年に中国広東省のガチョウから検出されたウイルスが起源です。この系統のウイルスは2004年に初めて日本に侵入し、その後も数年に一度、本ウイルスによる農場での高病原性鳥インフルエンザ(HPAI)の発生が確認されています。本ウイルスはロシアの渡り鳥の営巣地・中継地に集合する野鳥の間で循環し、越冬のため日本に飛来する渡り鳥と共に日本国内に侵入すると考えられています。このため国内でのHPAIの発生は、渡り鳥が日本に渡る秋から帰路につく春までの期間に起こります。最も甚大な被害を受けたのは、2020年11月から2021年3月の期間で、この期間にH5N8亜型HPAIVによる発生が18県52件報告され、同時期に野鳥での同亜型HPAIVの検出も18道県58件報告されました²⁾。

本ウイルスの国内侵入を防ぐことは物理的に困難ですが、国内に侵入した際に感染拡大を防ぐことは可能です。その際に、ウイルスを確実に検出可能な技術によって早期診断し、農場への早期警戒による感染予防対策を徹底することが必要不可欠です。また、発生原因ウイルスの

遺伝子解析情報からウイルス伝播経路を推定することが可能であり、この情報を基に複数の防疫処置を組み合わせることで対策が最適化されます。本稿では、新たに提案した鳥インフルエンザ診断法およびウイルス学的解析方法について、国内で本疾病が発生した際に使用されている技術を紹介します。

鳥インフルエンザ新規遺伝子検査法

鳥インフルエンザの診断は、全国都道府県の病性鑑定家畜保健衛生所で実施されます。農場で家禽の死亡数の増加やHPAIV感染鶏の症状(図1)が見られ、簡易検査でinfluAが検出された場合、遺伝子検査を実施してH5、H7亜型のウイルスまたはその他の亜型のinfluAかを判定します。遺伝子検査は検出漏れを防止するためにリアルタイムPCR法(RT-PCR)およびコンベンショナルPCR法(ConvPCR)の2つの方法が2012年より実施されています。一方でH5亜型HPAIVは世界中での流行に伴い、遺伝子の塩基置換が頻繁に起こって蓄積するため、継続的に遺伝子検査プロトコルの有用性を評価します。その評価に加え、遺伝子診断系の感度をより向上させるために、反応系、標的遺伝子、検出領域の変更を検討し、新規

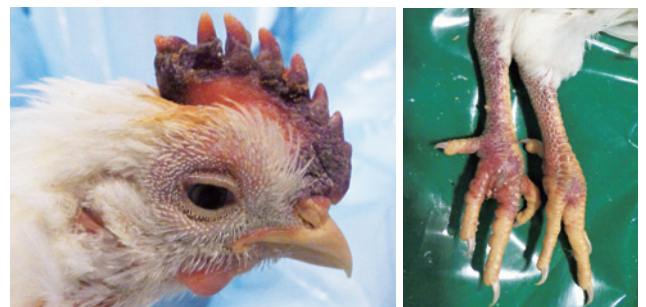


図1 高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染した鶏に現れる症状
(左:トサカのアノーゼ、右:脚部のアノーゼ)



電子顕微鏡写真：動物衛生研究部門

遺伝子検査法を確立しました³⁾。従来法では、RT-PCRおよびConvPCRともに作業工程が2段階で、調整試薬も複数種類あったことから、作業動線や操作が煩雑でした。新規法では双方の検査方法の作業工程を1段階に簡便化し、ヒューマンエラーや交差汚染による誤診断のリスクを低減できました。また、従来法のRT-PCRでは、各検査機関で使用される様々なメーカーの機器ごとに複数のプロトコルが存在し複雑な状況でしたが、新規法では統一して一つのプロトコルとし簡便な検査系が確立されました。新規RT-PCR法では従来法と比較すると2.4倍から251倍検出感度が上昇することを延べ226株のウイルスを用いて明らかにしました(表1)。新規遺伝子検査法は、農林水産省消費・安全局動物衛生課長通知(2019年9月27日)をもって、全国都道府県病性鑑定家畜保健衛生所での遺伝子検査法として採用され、2020年度の18県52事例のHPAI発生時に活用されました。

診断の準備や農場などへの警戒を呼びかける上で大変重要です。2017年以降、ロシア連邦科学研究所「基礎医学およびトランスレーショナル医療連邦研究センター」と国際共同研究を実施し、ロシアの野鳥におけるAIVの調査を実施しています。当該研究センターがロシア北部の営巣地や内陸の中継地で野鳥からAIV分離用検体を収集してAIVを分離します。その後AIVは我々に送られ、全ゲノム配列を解読し世界各地で分離・報告されているAIVの遺伝子情報と共に、検体採取場所や年月日の情報を加味した分子系統解析によりウイルスの移動軌跡を推定します。野鳥はAIVの自然宿主であるため、種々亜型のAIVが数多く得られることに加え、8つのRNA分節を保有するAIVを次世代シーケンサーで解読すると大量の遺伝子配列データが出力されるため、それらを解析可能な情報に変換するには多くの時間と労力を要します。この過

表1 新規リアルタイムPCR法の従来法からの感度上昇率

検出標的	検証ウイルス数	感度上昇倍率
A型インフルエンザ	128	251倍
H5亜型	66	99倍
H7亜型	ユーラシア系統	2.4倍
	アメリカ系統	8倍

HPAIV全ゲノム配列の解読によるウイルス移動経路の推定

HPAIVの世界的感染拡大や国内への侵入に渡り鳥の関与が示唆されている中で、渡り鳥の営巣地・中継地であるロシアでのHPAIVを含むAIVの調査による情報を蓄積することは、国内に侵入しうるHPAIVを事前に予測して

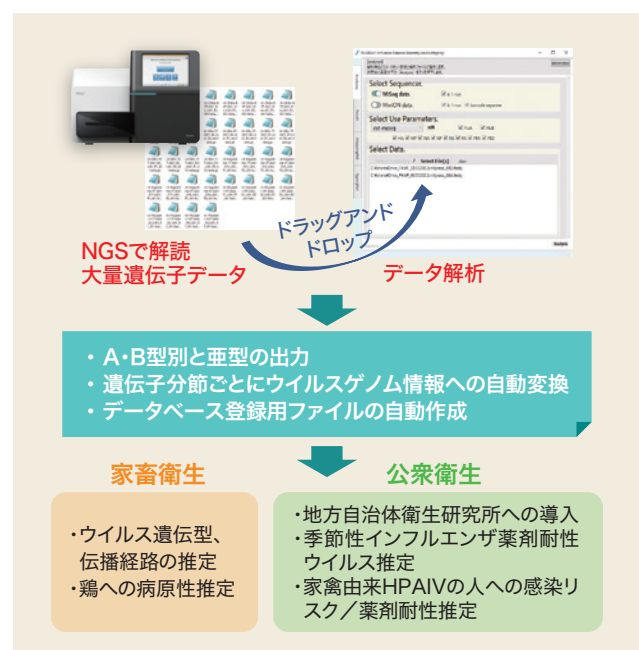


図2 解析ワークフローと活用方法

程を省力・効率化するために、大量の遺伝子配列データから全ゲノム配列を自動的に取得できる解析ソフト「FluGAS: Automatic Influenza Genome Assembly and Subtyping system」⁴⁾を民間会社と共同開発し、重要な研究成果をスピーディに得られるようになりました(図2)。2018年1月の発生ウイルス、H5N6亜型HPAIVのN6遺伝子を対象とした地理的系統解析結果から、発生株と近縁なウイルスが前年の夏にロシアに存在し、発生株

と近縁なAIVは、ユーラシア大陸内だけでなくユーラシア大陸—北アメリカ大陸間、ユーラシア大陸—アフリカ大陸間に拡散したことを明らかにしました⁵⁾(図3)。また、2020年度の発生ウイルス、H5N8亜型HPAIVは2019-2020年冬季に欧州で流行したH5N8亜型HPAIV(欧州19-20冬HPAIV)と2020年秋・冬季に欧州で流行したHPAIV(欧州20秋冬HAPIV)に由来し、ウイルスの8つの遺伝子分節の組み合わせにより5種類の遺伝子型に分類されま

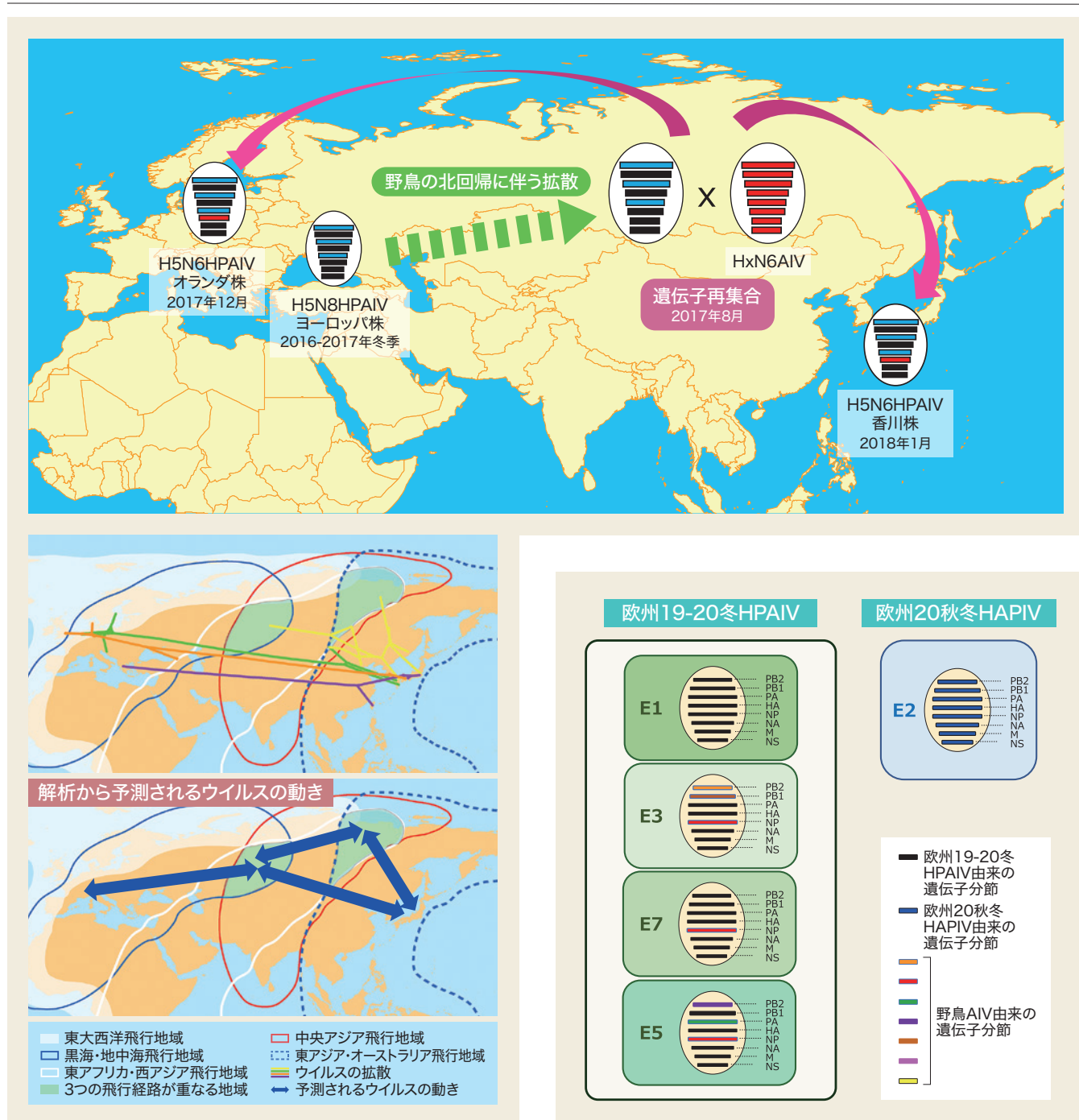


図3 鳥インフルエンザウイルスの移動経路の推定 (研究成果情報より引用)

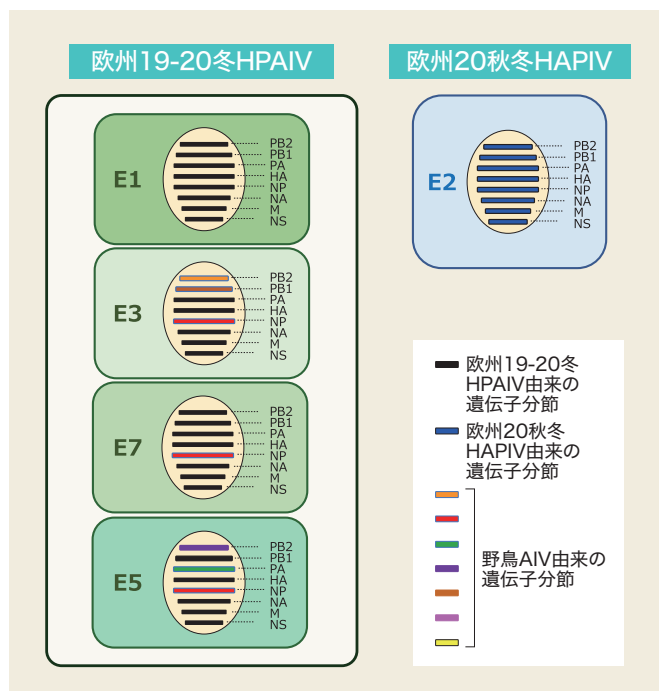


図4 2020年度国内発生H5N8亜型HPAIVの遺伝子型分類

表2 鶏へのウイルス接種試験

ウイルス名	遺伝子型	静脈内接種試験による致死率	CLD ₅₀ (log ₁₀ EID ₅₀)	ウイルス非接種鶏へのウイルス伝播率 ^{注)}
香川1例目	E1	100%	4.625	16.7%
千葉3例目	E2	100%	3.5	100%
福岡	E3	100%	2.75	83.3%
富山野鳥例	E5	100%	4.5	100%
徳島1例目	E7	100%	4.625	0%

注)伝播試験:鶏1羽に6log₁₀EID₅₀のウイルスを経鼻接種後、18時間後にウイルスを接種していない鶏6羽を同居させた

した(図4)。本調査では、国内の発生事例から同一県内で起こった続発事例で得たウイルスの地理的系統解析から農場間の遺伝子型などの関係性も考察しました²⁾。

動物へのウイルス接種試験による HPAIVの性状解析

HPAIVの感受性動物への接種試験によるウイルスの性状解析で、農場での発生要因を明らかにする重要な情報を得ることができます。これらの試験はウイルスが封じ込められる陰圧管理施設、バイオセーフティレベル3施設で実施します。HPAIVは国内で人への感染は認められていませんが、人に感染する可能性があるため、個人用防護具を装着してウイルスや感染動物を取り扱います。HPAIVの解析のための動物接種試験の種類には、HPAIVと判定するための国際機関が定めた方法による鶏への静脈内接種試験、50%鶏致死量(CLD₅₀)算出のための呼吸器経由での自然感染を想定した経鼻接種試験、そして家禽間でのウイルス伝播試験などがあります。国内でHPAIの発生が確認されると、国際機関のマニュアルに則ってウイルス液を10倍希釈して鶏の静脈内に接種し、10日以内に75%以上の致死率が確認された場合、HPAIVであると判定されます¹⁾。また発生要因ウイルスのCLD₅₀を算出して、過去の発生HPAIVのCLD₅₀と比較し、各発生を引き起こすのにどの程度ウイルス量が最低必要であるかを推定できます。伝播試験は家禽が飼育される状況下でどの程度効率的にウイルスが感染しうるかを推定できます。2020年度発生で検出された5種類の遺伝子型のウイルスを用いた上記試験の結果、すべてHPAIVであり、CLD₅₀や鶏間での伝播性が遺伝子型により異なることが示されました(表2)²⁾。

おわりに

我々の研究成果はHPAIVの診断技術を開発し、その診断技術を農林水産省に提案しています。また国内のHPAI発生要因ウイルスの全ゲノム配列解析を実施して遺伝的多様性や由来などを明らかにしています。さらに感受性動物へのウイルス接種試験によりそのウイルスが引き起こす病気の特徴を明らかにしています。これらの研究成果はウイルスの早期検出や発生の感染経路究明に役立てられています。今後もこれらの研究を突き詰め、HPAIの国内発生予察を可能にし、被害の最小化へ貢献することを目指します。

(動物衛生研究部門 人獣感染症研究領域
新興ウイルスグループ)

参考文献

- 1) World Organisation for Animal Health (2021) OIE Terrestrial Manual, AVIAN INFLUENZA (including infection with highly pathogenicity avian influenza viruses).
https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3_03_04_AI.pdf
- 2) 農林水産省(2021) 令和2年度における高病原性鳥インフルエンザの発生に係る疫学調査報告書。
https://www.maff.go.jp/j/syoutan/douei/tori/attach/pdf/r2_hpai_ko_kunai-270.pdf
- 3) 内田裕子ら(2019) 新規鳥インフルエンザ遺伝子診断法の確立. 農研機構 普及成果情報。
https://www.naro.go.jp/project/results/4th_laboratory/niah/2019/19_052.html
- 4) 特許第6624736号(2019) インフルエンザウイルス解析装置、インフルエンザウイルス解析方法及びインフルエンザウイルス解析プログラム。
- 5) 峯淳貴ら(2019) 渡り鳥の飛行経路に沿った鳥インフルエンザウイルスの大陸内および大陸間への拡散. 農研機構 研究成果情報。
https://www.naro.go.jp/project/results/4th_laboratory/niah/2019/niah19_s17.html

迅速かつ高感度に口蹄疫ウイルスの検出が可能な銀増幅イムノクロマトキットの開発

森岡 一樹

MORIOKA Kazuki

はじめに

口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)はわが国において特定家畜伝染病に指定されている最も重要な越境性家畜感染症(国境を越えてまん延する重要な家畜の伝染病で、防疫には国際的な協力を必要とする疾病)の一つです。感受性動物は主に牛、豚、山羊、めん羊などの偶蹄類(ひづめが偶数)の家畜で、野生動物を含む多くの動物種で感染の報告があります。原因となる口蹄疫ウイルスは伝染性が極めて強いため、防疫および清浄化には甚大な労力を要します。口蹄疫に罹患した家畜は口、鼻、蹄および乳頭の粘膜に水疱(水ぶくれ)、びらん、潰瘍(図1)を形成し、それによりエサを食べられなくなったり(摂食障害)、立ち上がれなくなったり、歩くのを痛がったりすること(運動器障害)による症状が発生し、家畜の生産性に大きく影響します。また、発生に伴う特定家畜伝染病防疫指針¹⁾に基づく防疫対策による家畜および畜産物の移動制限や輸出入停止などの対応がとられると、畜産業、さらに観光業を含めた周辺産業に甚大な経済的被害をもたらします。

2010年の国内発生では292農場に疾病が広がり、発生地域である宮崎県の被害総額は2,350億円にも及びました。現在も中東、アフリカ、わが国の周辺の東アジア、東南アジア諸国およびロシア沿海地方においては、口蹄疫の発生が続いており、わが国への再侵入が懸念されています。

開発の背景

口蹄疫の診断法にはウイルス遺伝子検査、培養細胞を用いたウイルスの分離、ウイルス抗原検査(ELISA、イムノクロマト法)、感染抗体検査などがあります。わが国で疑い事例が発生した場合は、検体を動物衛生研究部門の海外病研究施設の封じ込め施設(封じ込めレベル3ag)に緊急で持ち込み、遺伝子検査などにより4~5時間かけて確定診断します。

このため、実験室内ではなく口蹄疫の発生現場において簡易・迅速に検査する技術が関連部局より強く望まれ、口蹄疫抗原検出キットの開発に着手しました。本研究開発は農研機構、富士フイルム株式会社(以下富士フイル



図1 病変写真
A: 口腔内びらん・上皮、B: 蹄病変



ム)、日本ハム株式会社(以下日本ハム)の三者により実施され、農研機構が口蹄疫ウイルスと特異的に反応する抗体の作出、抗体の提供およびキットの実証試験を、富士フィルムが高感度化技術(図2)およびデバイスの提供を、日本ハムがキットの作製および製品化をそれぞれ担当しました。

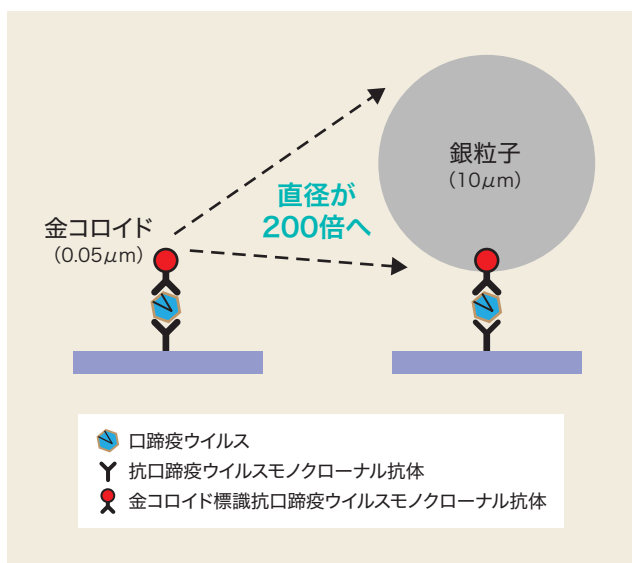


図2 ウイルス検出の高感度化の原理

口蹄疫ウイルス抗原検出銀増幅イムノクロマトキットの開発

従来の抗血清を用いた実験室内での抗原検出診断法(間接ELISA)では、口蹄疫ウイルス7血清型それぞれに対して検出を試みる必要がありましたが、本法では7血清型の共通抗原部位を認識するモノクローナル抗体を用いるため、これら7血清型すべてを一度に検出可能です。また、既存の海外市販の口蹄疫イムノクロマトキットでは、

牛の口腔周辺の水疱病変を検体として用いた場合に唾液の混入によって反応阻害が起こりますが、本キットでは検体調整液を改良することで、検体への唾液混入による反応阻害を取り除くことに成功しました(図3)⁴⁾。次に、口蹄疫の発生が続くモンゴル国において口蹄疫罹患動物の病変部の上皮乳剤を用いた実証試験を行いました(図4)。その結果、口蹄疫の遺伝子診断法陽性の検体に対して、85.4%の高い一致率を示しました(表1)。本キットは動物用体外診断用医薬品として製造販売承認され(図5、図6)、現在利用可能な防疫資材の一つとして防疫指針¹⁾の中に採録されました。今後、口蹄疫の国内防疫に有効活用され、被害の低減および食肉の安定供給への寄与が期待されます。

一方、口蹄疫が常在する東南アジア諸国などでは、診断施設や診断機器の維持や保守が困難で診断施設内

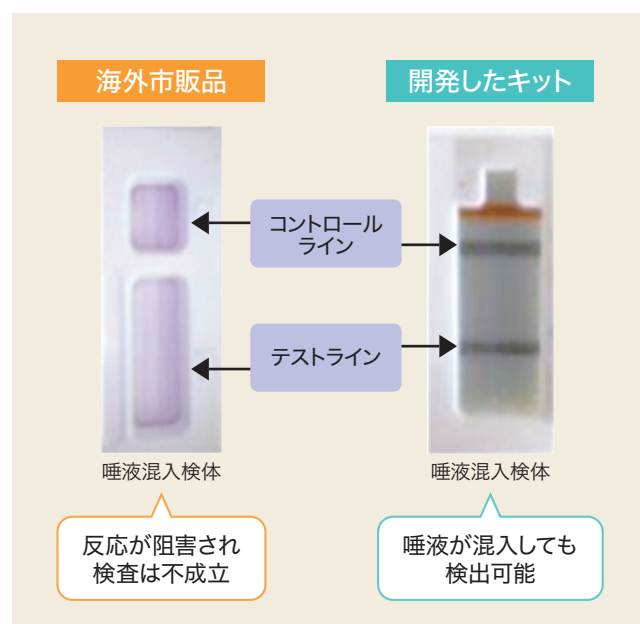


図3 唾液混入による検査への影響

銀増幅イムノクロマトキットの開発

における検査を適切に実施できないケースがあります。さらに、国土が広大な国や交通インフラの不十分な国でも、摘発の遅れや診断施設への検体搬入に時間を要することから、それぞれの地域の実情に即した実用的な診断

法が強く求められています。今回開発したキットは、これら口蹄疫常在国における検査法として非常に有用であると考えられ、当該国での疾病コントロールがわが国への口蹄疫侵入リスクの低減にもつながると期待されます。



図4 モンゴルでの実験風景と現地講習

表1 モンゴルでの野外実証試験の成績

検体	遺伝子検査	遺伝子検査	イムノクロマトキット	検出感度 (%)	特異度 (%)
	陽性	陰性	陽性		
水疱上皮 (92検体)	89	3	76	85.4% (76/89)	100% (3/3)

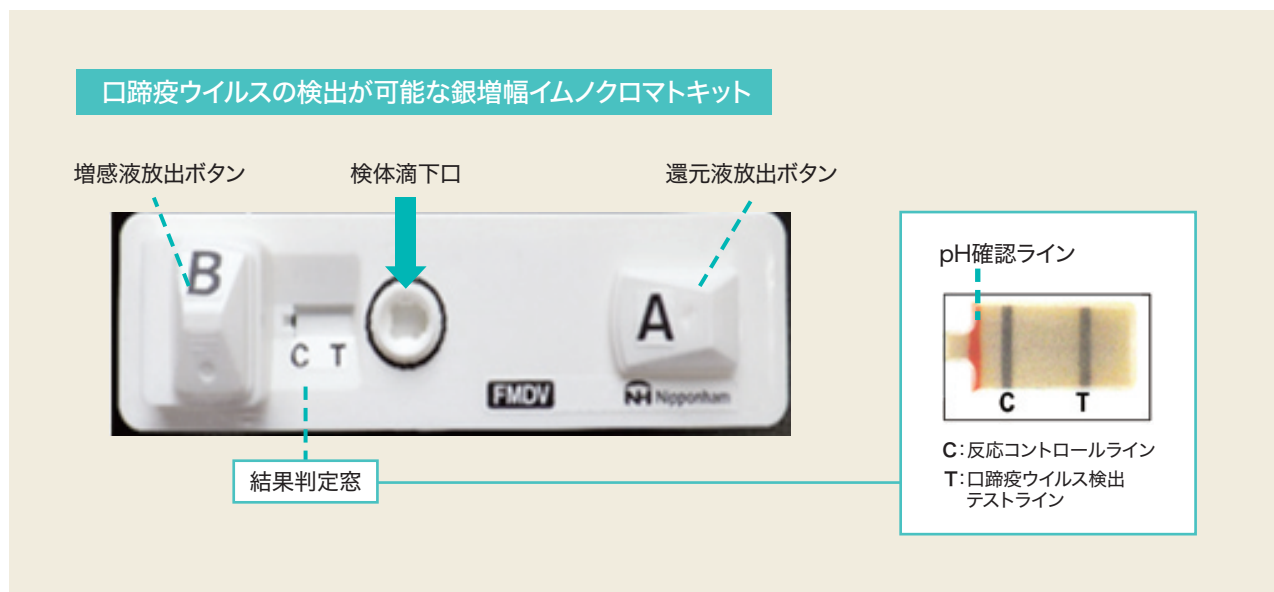


図5 キットの外観



図6 NHイムノスティック 口蹄疫（日本ハム株式会社製）
抗原検出キットの動物医薬品製造許可の薬事承認を取得。

口蹄疫ウイルス抗原検出銀増幅 イムノクロマトキットの特徴

1. 開発した口蹄疫ウイルス抗原検出銀増幅イムノクロマトキットは、特別な機器を必要とせず、野外での使用が可能です(図5)。
2. 本キットは、7タイプの口蹄疫ウイルスを検出可能で、海外市販品と比較して高い検出感度を示します。
3. 開発した検体処理液は牛唾液の混入によるイムノクロマト反応の阻害を解消することに成功しています(図3)。
4. 社会的インフラ整備の不十分な国や国土が広大な国などへの普及が見込まれ、海外の口蹄疫発生国で活用されることにより、わが国への口蹄疫侵入リスクを低減することが期待されます。

おわりに

本研究成果物である口蹄疫ウイルス抗原検出銀増幅イムノクロマトキットは、都道府県の家畜保健衛生所で保管され有事の際に活用されます。また海外への普及を試みており、特にわが国の周辺の口蹄疫常在国で活用されることによりわが国への口蹄疫侵入リスク低減につながることを期待しています。

(動物衛生研究部門 越境性感染症研究領域
海外病グループ)

参考文献など

- 1) 口蹄疫に関する特定家畜伝染病防疫指針(2019年7月1日農林水産大臣公表。2020年10月1日一部変更)
https://www.maff.go.jp/j/syoutan/douei/katiku_yobo/k_bousi/attach/pdf/index-42.pdf
- 2) 森岡一樹(2019) 口蹄疫ウイルス抗原検出イムノクロマトキットの開発. 畜産技術, 2019年8月号:23-25.
- 3) Morioka, K. et al. (2020) Development and evaluation of silver amplification immunochromatography kit for foot-and-mouth disease virus antigen detection. J. Virol. Methods 275, 113736.
- 4) 特許第6601932号(2019) 体液による抗原抗体反応阻害を防止する物質, 竹内江里、浦山佳奈、松本貴之(日本ハム株式会社)、森岡一樹、山川睦、吉田和生、菅野徹、深井克彦(農研機構)。

豚流行性下痢(PED)制御に向けたウイルス感染動態の解明と鑑別検査手法の開発

宮崎 綾子

MIYAZAKI Ayako

はじめに

豚流行性下痢 (porcine epidemic diarrhea、以下 PED) は水様性下痢、嘔吐、食欲不振などの急性胃腸炎症状を特徴とする豚のコロナウイルス感染症で、糞便を介した経口感染により伝播します。本病は若齢であるほど重篤化しやすく、哺乳豚の致死率が時に100%に達する非常に経済的被害の大きな疾病であり、国内では家畜伝染病予防法に基づく届出伝染病に指定されています。2013年10月に国内で7年ぶりに発生したPEDは約10カ月間で38都道府県にまん延し、817農場で122万頭が発症し年間出荷頭数の約2%に当たる37万頭が死亡する未曾有の流行となりました¹⁾²⁾。

2014年10月には農林水産省の疫学調査により、PEDは豚生体の移動、汚染された車両、物品または農場などで働くヒトの移動により拡大することが示唆され³⁾、同月に公表されたPED防疫マニュアルにおいて、外部から農場への侵入防止、農場内でのまん延防止、並びに農場間伝播の防止が対策の柱として示されました⁴⁾。しかし、これらの対策に不可欠である感染源としての感染豚の役割、すなわちウイルスを排泄する量やその期間などのウイルス感染動態に関する知見は十分得られておらず、PED制御上の問題となりました。また、PEDと類似した症状を示す伝染性胃腸炎 (transmissible gastroenteritis, TGE) と豚デルタコロナウイルス (porcine deltacoronavirus, PDCoV) 感染症が同時期に発生したことは防疫上の混乱を生み⁵⁾⁶⁾、PEDとこれら2つの疾病を高感度かつ効率的に鑑別できる検査手法の開発が必要となりました。

そこで、これらの問題を解決するために、2013～2014年流行株を用いた動物実験による感染豚におけるウイルスの感染動態の解明と、PEDウイルスとPED類似疾病

の原因ウイルスとの鑑別検査法を開発を行いましたのでその内容を紹介します。

ウイルス感染動態解明による PED伝播防止策の提示

PEDは図1に示した通り、感染豚が糞便中に排泄したウイルスを直接、またはウイルスに汚染された飼料、器具機材、車両などを介して間接的に感受性豚^{*1}が経口摂取することで伝播します。そこで、感染源となるリスクの高い豚を明確にするために、5日齢の初乳未摂取子豚、3週齢の離乳豚、4カ月齢の肥育豚、そして9カ月齢の未経産妊娠豚へのPEDウイルス接種試験を行いました。その結果、発症率と発症に至るまでの日数に発育ステージによる差は認められない一方で、既報と同様に致死率は若齢豚ほど高い傾向が確認されました(図2)(表1)⁷⁾⁸⁾。一方で、糞便1gあたりに含まれるウイルス遺伝子量の最高値は $10^{10.6} \sim 10^{11.6}$ コピーと発育ステージによる差が小さいことが明らかとなり⁷⁾、症状が重篤化する哺乳豚や離乳豚

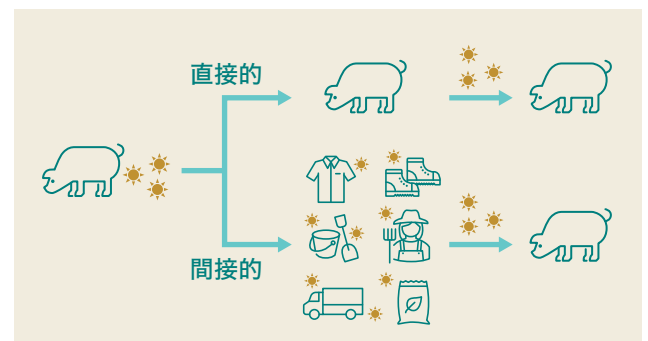


図1 PEDウイルスの伝播様式

- PEDウイルスは感染豚の糞便に大量に排泄される。
- 感受性豚は感染豚から排泄されたウイルスを直接経口摂取して感染する。
- また、ウイルスに汚染された長靴や衣類、器具機材、車両、飼料などを介して間接的に経口感染する。
- 感染豚におけるウイルス感染動態は効果的な防疫に不可欠な知見である。

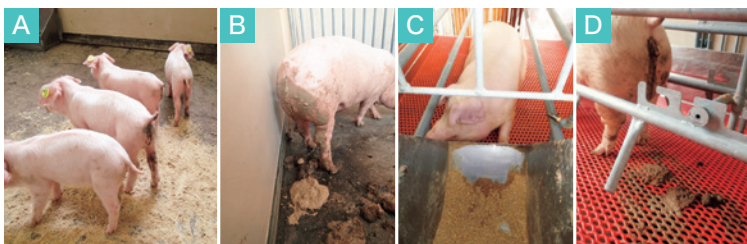
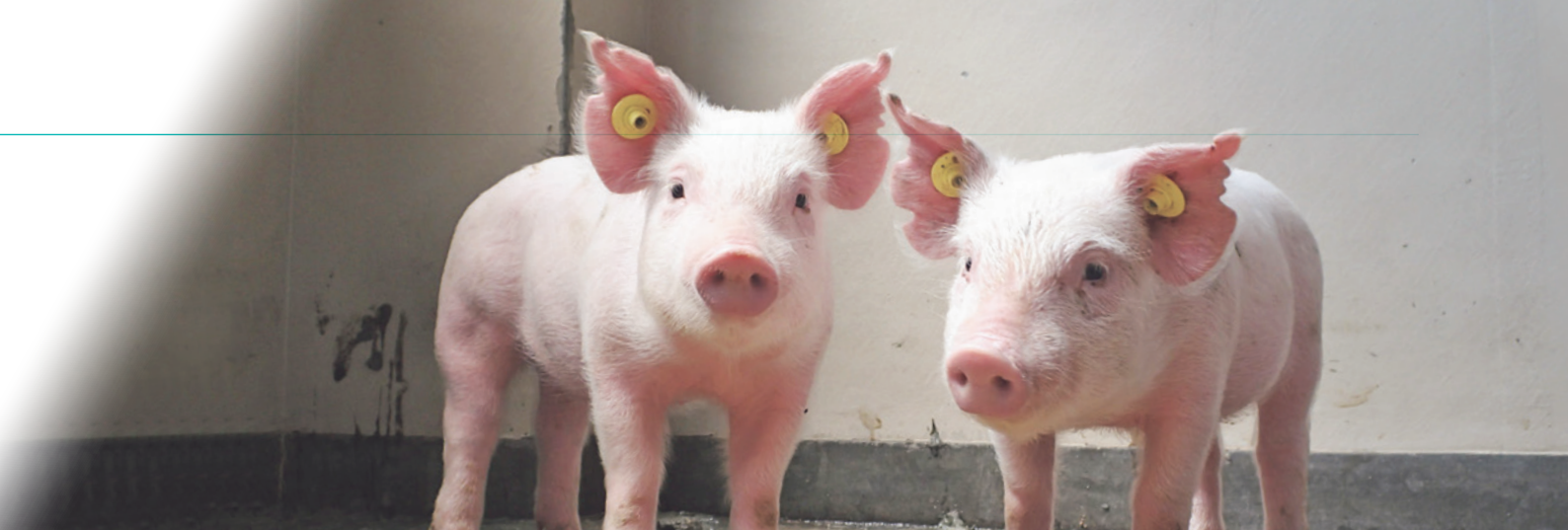


図2 3週齢の離乳豚、4カ月齢の肥育豚、未経産妊娠豚における PEDウイルス接種後の臨床症状
 A: 下痢により臀部が汚れた離乳豚 B: 下痢を呈する肥育豚
 C, D: 食欲不振と元気消失(C)並びに泥状の下痢便(D)を呈する未経産妊娠豚

表1 発育ステージの異なる豚における発症率、致死率、発症期間および糞便中ウイルス量の違い

	初乳未摂取子豚(5日齢)	離乳豚(3週齢)	肥育豚(4カ月齢)	未経産妊娠豚(9カ月齢)
発症率 (発症頭数/供試頭数)	100% (8/8)	100% (8/8)	100% (6/6)	100% (3/3)
致死率 (死亡頭数/供試頭数)	100% (8/8)	12.5% (1/8)	0% (0/6)	0% (0/3)
発症日 発症期間	2日目 死亡まで	2日目 5日間	2日目 4日間	2日目 5日間
糞便1g中 ウイルス遺伝子量 の最高値 [95%信頼区間]	$10^{11.3}$ コピー [$10^{10.7}$ - $10^{11.8}$]	$10^{11.6}$ コピー [$10^{11.3}$ - $10^{11.9}$]	$10^{11.0}$ コピー [$10^{10.6}$ - $10^{11.3}$]	$10^{10.6}$ コピー [$10^{10.2}$ - $10^{10.7}$]

のみならず、症状が軽度な肥育豚や妊娠豚も感染源となるリスクが高い可能性が示唆されました。肥育豚と妊娠豚の糞便排泄量は1日当たり約2〜3kgと多量であることを考慮すると、発生農場の糞便は伝播リスクの高い感染源であり、地域におけるPEDまん延防止のために排泄物処理に当たってはウイルス伝播防止に十分留意する必要があります。

また、4〜6カ月齢の豚は食肉処理場への出荷や繁殖候補豚としての販売により農場間を移動する機会が多いので農場間伝播の感染源として重要です。そこで、このような豚の伝播リスクを検討するため、実験的にウイルスを

接種した4カ月齢肥育豚における感染伝播期間を検討しました(図3)。まず、1つ目の群ではウイルス接種豚の発症翌日に健康な同居豚を導入しました(図3-1)。ウイルス接種豚ではウイルス接種後2日目より下痢や食欲不振が観察されると同時に高いコピー数のウイルスが検出されていました。ウイルス接種3日目の同居直後に同居豚では高コピー数のウイルス遺伝子が糞便で検出され、同居後1週間で感染成立を示す抗体が陽性となりました(図3-1下段)。一方で、ウイルス接種豚が回復した症状消失後2日目に健康豚を同居させた2群目では、ウイルス接種豚の糞便でウイルス遺伝子検出が継続していたものの、同居25日目まで同居豚は抗体陰性が維持され感染伝播は起きていませんでした(図3-2)。しかし、ウイルス接種後35日目(同居28日目)には同居豚の糞便中に高コピー数のウイルス遺伝子が検出され始め、その7日後には抗体陽性となり同居豚への感染伝播が確認されました(図3-2下段)。これらのことから、症状が消失して4週間が経過しても感染伝播が成立する

可能性が示され、糞便中にウイルス遺伝子が検出される間は感染伝播に警戒が必要であると考えられました。

それでは、感染豚におけるウイルス検出期間はどの程度でしょうか？ ウイルス接種豚における糞便中のウイルス遺伝子は、1群目、2群目ともに大半の豚で症状消失後は減少傾向に転じ、ウイルス接種後4週間程度で検出限界以下となりました(図3-1のpigs 9-11、図3-2のpigs 1-2)。一方で、2群目のウイルス接種豚のうち1頭の糞便ではウイルス接種後4週間が経過しても間欠的に高コピー数のウイルス遺伝子が検出され(図3-2のpig 3)、また、1群目の同居豚1頭でも同居後6週間程度が経過しても高コピー数のウイ

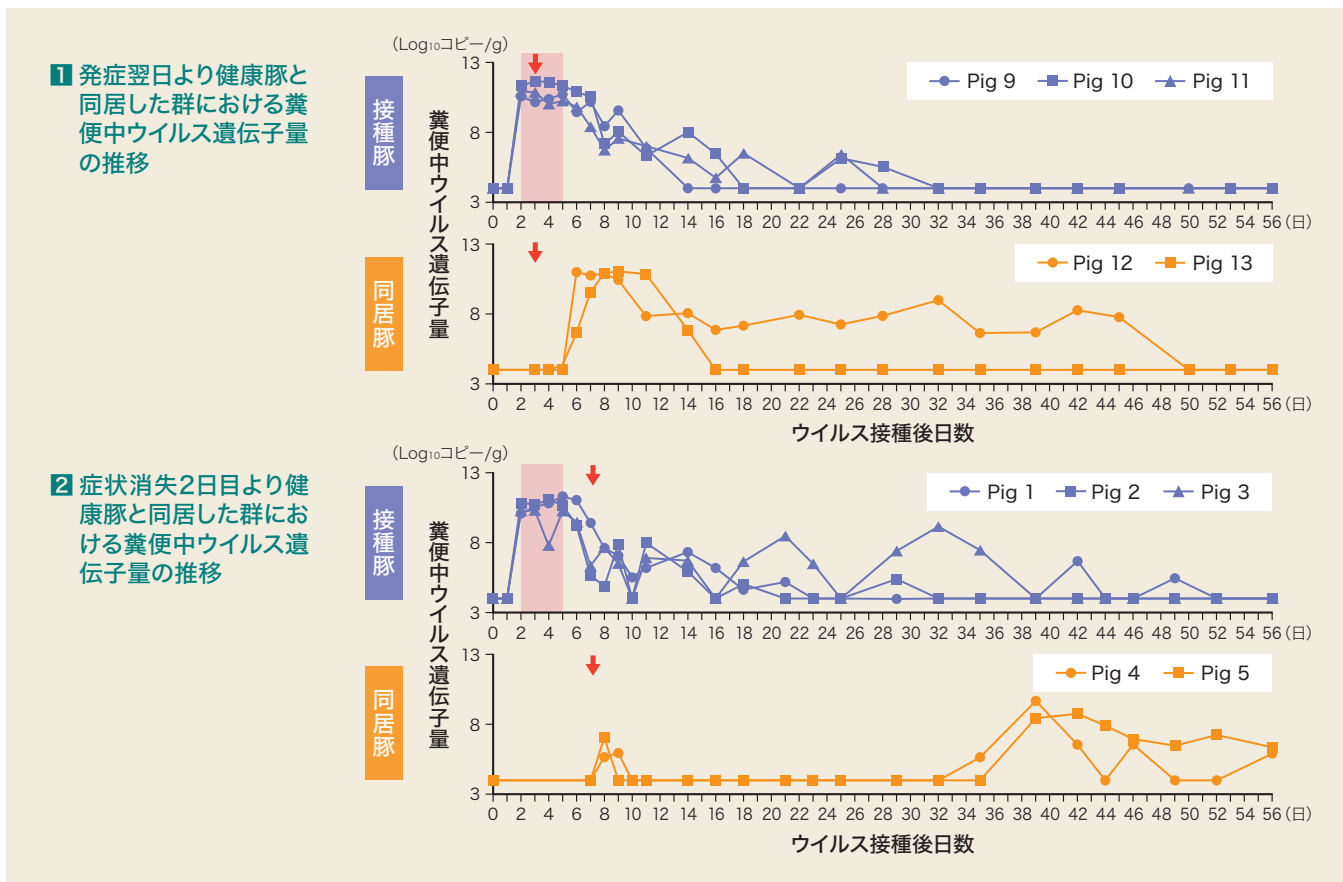


図3 ウイルス接種豚と健康豚の同居試験における糞便中ウイルス遺伝子量の推移

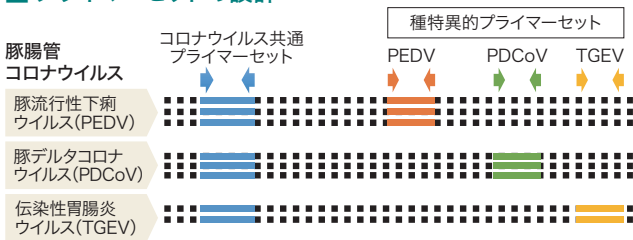
- ・赤矢印は同居開始日、ピンク色ボックスはウイルス接種豚の発症期間を示す。
- ・ウイルス接種豚の発症翌日に健康豚を同居させた群では、同居豚への感染伝播は同居後間もなく成立し、この群における糞便中ウイルス遺伝子の検出はウイルス接種後45日目まで継続した(図3-1)。
- ・ウイルス接種豚の症状消失2日後に健康豚を同居させた群では、ウイルス接種後35日目(同居後28日目)に同居豚への感染伝播が確認され、この群における糞便中ウイルス遺伝子の検出はウイルス接種後87日まで継続した(図3-2、グラフでは56日目までの結果を示す)。

ルス遺伝子が検出されました(図3-1のpig 12)。これらのことから、糞便中ウイルス遺伝子の検出期間には個体差があり、長い場合には感染後6週間程度持続する可能性が示唆されました。群として観察すると、同居直後に感染伝播した1群目ではウイルス接種後45日間(7週間)までウイルス遺伝子が検出された一方、同居後4週目に同居豚への感染伝播が確認された2群目ではウイルス接種後87日間(13週間)までとウイルス検出期間が約2倍に延長しました。これらの結果により、PED発生農場における早期清浄化とまん延防止には、ウイルス排泄が終息するまで少なくとも8週間は導入豚の隔離飼育や離乳豚の分離飼育により感受性豚の導入を停止する必要があると考えられました。同様に、農場へのPED侵入防止に向けて、PED発生地域からの外部導入豚は感染豚である可能性を考慮し少なくとも8週間は隔離飼育する必要があると考えられました。

PEDウイルス識別検査法の開発

PEDとその類似疾病であるTGEとPDCoV感染症は、いずれもコロナウイルス科に分類されるPEDウイルス(PEDV)、TGEウイルス(TGEV)、PDCoVの感染によってそれぞれ引き起こされることから、これらのウイルスをまとめて豚腸管コロナウイルスと称されます⁹⁾。これら豚腸管コロナウイルスの高感度かつ効率的な鑑別検査のために、マルチプレックスRT-PCR法^{*2}を開発しました。まず、コロナウイルス科のウイルスに広く保存されている遺伝子領域をターゲットとしてコロナウイルス共通プライマーセットを設計するとともに、PEDV、TGEV、そしてPDCoVでそれぞれ種特異的に保存されている遺伝子領域をターゲットとしてそれぞれの種特異的プライマーセットを設計しました(図4)。次に培養ウイルスを用いた条件検討により、これらのプライマーセットを混合したマルチプレックスRT-PCRを実施しました。いずれのウイルス株においてもコロナウイルス共通プライマーセットと種特異的プライマーセットによる遺伝子増幅が特異的かつ副反応なく確認され、種特異的プライマーによる遺伝子増幅産物の

1 プライマーセットの設計



2 予測される遺伝子増幅結果

豚腸管 コロナウイルス	コロナウイルス 共通 プライマーセット (676bp)	種特異的プライマーセット		
		PEDV (554bp)	PDCoV (256bp)	TGEV (353bp)
PEDV	+	+	-	-
PDCoV	+	-	+	-
TGEV	+	-	-	+

3 培養ウイルスを用いた検証

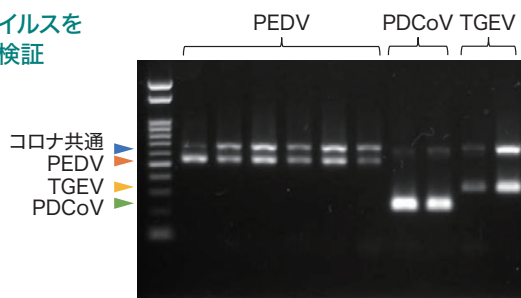


図4 豚腸管コロナウイルスの検出と識別を可能とするマルチプレックスRT-PCR法の構築

- 1 コロナウイルス間で共通して保存された遺伝子領域、並びに豚腸管コロナウイルスであるPEDV、TGEVおよびPDCoVのそれぞれで種特異的に保存された遺伝子領域をターゲットとして4種のプライマーセットを設計した。
- 2 コロナウイルス共通のプライマーセットと3種の種特異的プライマーで予測される遺伝子増幅を示す。
- 3 供試したすべてのコロナウイルスにおいてコロナウイルス共通プライマーセットで特異的遺伝子増幅が認められる。また、PEDV、PDCoVおよびTGEVではそれぞれの種特異的プライマーセットで特異的遺伝子増幅が確認される。

サイズによりPEDV、TGEVならびにPDCoVの識別が可能であることを確認しました。本検出法は豚の糞便から検出されるロタウイルスなど他のウイルスでは遺伝子増幅が確認されないことから特異度が高く、また、いずれの豚腸管コロナウイルスでも1反応当たり $10^{0.5}$ TCID₅₀まで検出可能と高感度でした。さらに、実験感染豚および野外発生例由来糞便検体でも非特異的増幅や副反応なく豚腸管コロナウイルスを識別検出することが可能であり、野外応用可能であることが確認されました。

おわりに

本稿で紹介したPEDウイルス感染動態の解明により得られた知見は農林水産省、自治体、開業獣医師、そして生

産者主催の研修会やセミナー、普及誌への掲載を通じて逐次共有されPED制御に活用されました。また、構築したPEDウイルス鑑別検査手法は、農林水産省の戦略的監視・診断体制整備推進事業にて動物検疫所および各県の家畜衛生保健所に普及され、輸入検疫、国内防疫や防疫措置の強化へと活用されています。

1980年代以降の近代養豚ではオーエスキー病、豚繁殖・呼吸障害症候群、PED、豚サーコウイルス関連疾病、豚熱など新興再興感染症の発生が続いています。今後も豚ウイルス感染症の病態解明と予防診断法の開発を継続し、研究、行政、生産者が一体となった防疫体制の構築と病気に強い養豚の実現へ貢献していきたいと思ひます。

(動物衛生研究部門 動物感染症研究領域 ウイルスグループ)

付記：本稿に記載された研究は、平成27～29年度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および平成26～27年度農研機構動物衛生研究部門重点強化研究の研究成果です。

用語解説

- ※1 感受性豚 PEDウイルスに感染し増殖できる状態の豚。
- ※2 マルチプレックスRT-PCR法 RT-PCR法とは、RNAをDNAに逆転写(reverse transcription, RT)した後にDNAポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction, PCR)により核酸を増幅する手法。コロナウイルスゲノムはRNAであるためRT-PCRにより遺伝子検出を行う。マルチプレックスRT-PCR法は、複数のプライマーセットを同一反応液内に混合することで複数標的の遺伝子を同時に検出するRT-PCR法。

参考文献

- 1) 農林水産省 消費・安全局動物衛生課(2014) 豚流行性下痢(PED)の発生状況 平成25年シーズン(H25.10.1-H26.8.31). <https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/ped/attach/pdf/ped-184.pdf> (参照 2022-1-7)
- 2) 宮崎綾子ら(2014) 豚流行性下痢(PED)の現状と学術的知見. 日本豚病研究会報, vol.64, 15-24.
- 3) 農林水産省 消費・安全局動物衛生課(2014) 豚流行性下痢(PED)の疫学調査に係る中間取りまとめ. https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/ped/pdf/ped_ekigaku_chukan.pdf (参照 2022-1-7)
- 4) 農林水産省 消費・安全局動物衛生課(2014) 豚流行性下痢(PED)防疫マニュアル. https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/ped/pdf/ped_manual_set.pdf (参照 2022-1-7)
- 5) 新楽和孝ら(2016) 豚デルタコロナウイルスの関与が疑われた下痢の発生事例. 家畜衛生学雑誌, vol.42(3), 97-104.
- 6) 農林水産省 消費・安全局動物衛生課(2016) 監視伝染病発生年報. https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/attach/pdf/kansi_densen-90.pdf (参照 2022-1-7)
- 7) Shibata, I. et. al. (2000) Isolation of porcine epidemic diarrhea virus in porcine cell cultures and experimental infection of pigs of different ages. Veterinary Microbiology, vol.72(3-4), 173-182.
- 8) 宮崎綾子ら(2015) PEDウイルスの正体、徐々に明らかに！ PEDに関する最新知見からこれからの対策を考える. Pig Journal, 10月号, pp.16-22.
- 9) Niederwerder, M. C. and Hasse. (2018) Swine enteric coronavirus disease: A review of 4 years with porcine epidemic diarrhoea virus and porcine deltacoronavirus in the United States and Canada. Transboundary and Emerging Diseases, vol.65, 660-675.

糞便の多検体処理による 牛ヨーネ病スクリーニング遺伝子検査法

川治 聡子

KAWAJI Satoko

はじめに

ヨーネ病(paratuberculosis-Johne's disease)は、結核菌と同じ抗酸菌に分類されるヨーネ菌の感染によって起こる牛、めん羊、山羊など反すう動物の慢性消化器感染症です。ヨーネ病を発症すると、慢性の頑固な下痢を起こして痩せていき、乳牛では泌乳量が低下するなど、畜産農家に大きな経済的被害をもたらします(図1)。有効な治療法あるいは感染を防ぐワクチンがなく、家畜伝染病予防法において家畜伝染病(法定伝染病)に指定され、感染牛の摘発淘汰による清浄化対策が進められています。国内では、1998年から搾乳牛および種雄牛などを対象に定期的な全頭検査が行われていますが、現在も年間800頭前後の発生があり、北海道を中心に全国的に報告されています。

ヨーネ菌に感染した牛は、数年間全く症状を示さないことが多いのですが、その間も糞便中に菌を排出することがあり、無症状排菌牛と呼ばれています。ヨーネ病が発生した農場における牛群は、氷山に例えられるように、少数

の発症牛と大多数の無症状排菌牛で構成されていると言われています¹⁾(図2)。ヨーネ病発生農場における現行の清浄化対策は、抗体検査を用いて感染牛のふるい分け(スクリーニング)を行っていますが、抗体検査で摘発されるのは発症期に近い感染後期であり、無症状排菌期や潜伏期に検出するのは困難です(図2)。そのため、抗体陰性の排菌牛が摘発されずに農場内へ感染を広げ、対策が長期化することが問題となっています。そこで、ヨーネ菌排菌牛を早期に摘発し、効率良く牛群検査を行うために、糞便の多検体処理による「ヨーネ病スクリーニング遺伝子検査法」を開発しました²⁾。

ヨーネ病スクリーニング遺伝子検査法

糞便の多検体処理による「ヨーネ病スクリーニング遺伝子検査法」は、複数の牛由来の糞便をまとめる(=プール)ことにより検査を省力化し、感度の高い遺伝子検査で効率良く感染牛をスクリーニングする方法です。プールされた糞便は濃縮して検査されるため、その感度は個体ごと



図1 重度に削瘦したヨーネ病発症牛

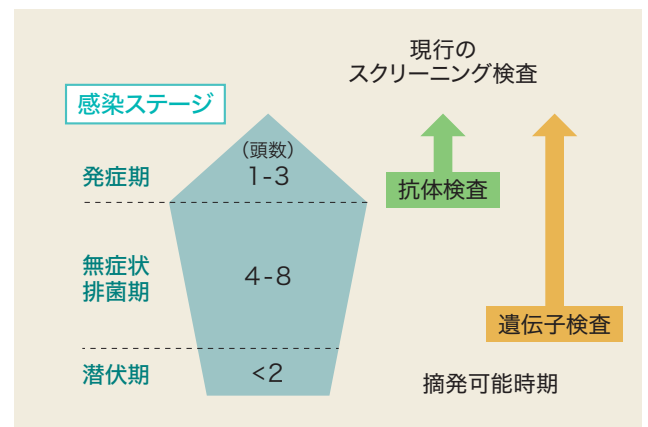


図2 ヨーネ病発生農場における牛群構成¹⁾と感染牛の摘発

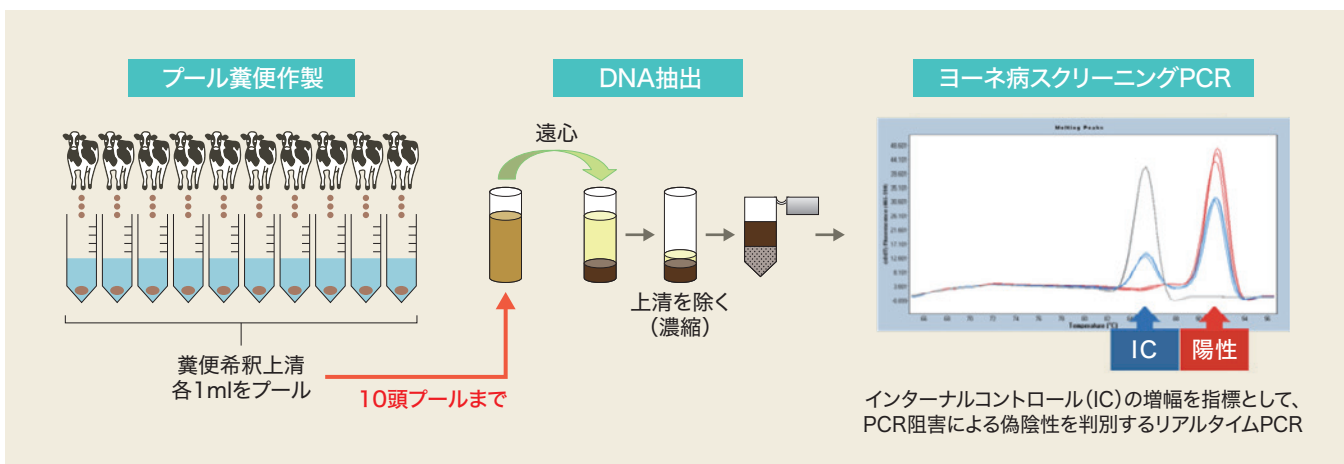


図3 プール糞便を用いたヨーネ病スクリーニング遺伝子検査法

に検査を行うのと同様であり、最大10頭分の遺伝子検査を一度に行うことが可能です(図3)。一方、濃縮された糞便検体を用いるプール糞便検査の場合、糞便中に含まれる様々なPCR阻害物質の影響でPCR反応が阻害され、偽陰性となる可能性を考慮する必要があります。検査結果が偽陰性でないことを確認するために、インターナルコントロール※1(IC)を用いてリアルタイムPCR※2を行うこととし、陰性検体においては、ICの増幅が認められればPCR反応は阻害されていなかったと判断されます(図3)。

濃縮された糞便からも精製度の高いDNAが回収できるDNA抽出キット、ならびにヨーネ菌遺伝子を検出するPCR検査キットを民間企業と共同で開発し、製品化しました(図4)。また、これら検査法のマニュアルについては、農研機構動物衛生研究部門のウェブサイトにおいて公開しています³⁾。

ヨーネ病スクリーニング遺伝子検査法の活用による農場清浄化対策

ヨーネ病発生農場(12農場)において、全頭(計2,654頭)に従来の抗体検査と開発した遺伝子検査によるスクリーニングを行い、牛群のスクリーニング検査法としての有用性を比較しました²⁾。その結果、スクリーニング遺伝子検査によって最終的にヨーネ病患者と診断される個体は、抗体検査の10倍にもなり、多数の抗体陰性排菌牛が検出されました(図5)。ヨーネ菌感染牛における糞便中への排菌は、抗体検査で陽性になる半年～1年ほど前から



図4 DNA抽出キット(上)とPCR検査キット(下)

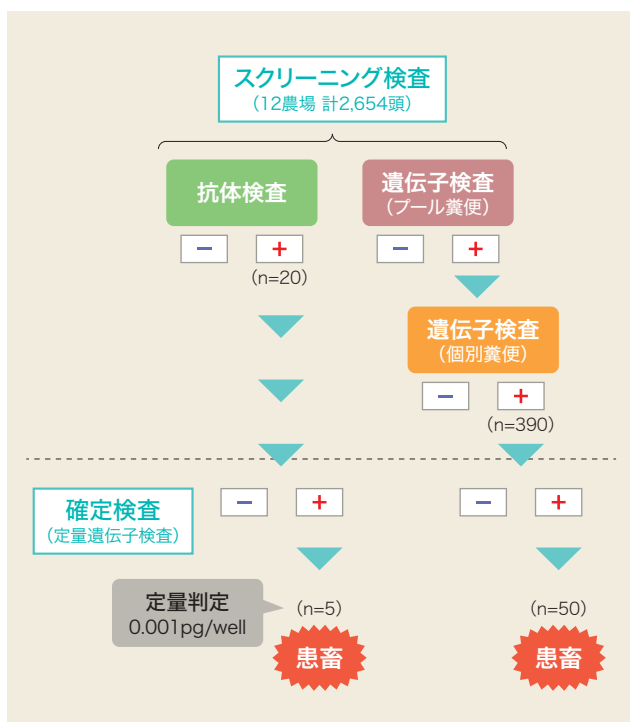


図5 ヨーネ病発生農場におけるスクリーニング検査法の比較

始まると考えられており、スクリーニング遺伝子検査の導入は排菌牛の早期摘発に有効であることが明らかとなりました。

「牛のヨーネ病防疫対策要領⁴⁾」に基づく現行のヨーネ病防疫対策において、発生農場は定期的な牛群検査により最低3年間継続して陰性が確認された場合に、清浄農場に復帰することが認められます。スクリーニング遺伝子検査を導入したある1農場において、スクリーニング遺

伝子検査を実施しなかった場合を想定し、その後の状況をシミュレーションしたところ、3年後には高い確率で農場内に排菌牛が残っていると試算され、対策が長期化していた可能性が示唆されました(図6)⁵⁾。ヨーネ病発生農場においては、感染牛に起因する直接的な損失(生産性の低下による損失や患畜の淘汰にかかる損失など)だけでなく、牛の移動など、まん延防止のための様々な制約を受けるため、早期の清浄化が望まれます。この農場では、スクリーニング遺伝子検査を導入し、感染ステージのより早い段階で感染牛を摘発できたことにより、農場内での感染拡大が抑えられ、短期間で清浄化を達成することができたと考えられます。

プール糞便による検査の効率化と農場汚染度

複数の糞便をプールして検査を行うことにより検査数が減少し、効率的な牛群検査が可能となります。ヨーネ病清浄農場(7農場)において10頭を上限にプール糞便によるスクリーニング遺伝子検査を行ったところ、個体ごとに検査を実施する場合に比べて1/10程度の検査数で農場の清浄性を確認することができました²⁾。しかしながら、プール糞便検査で陽性になると、陽性個体を特定するために追加で個体別の遺伝子検査が必要となるため、汚染度の高い牛群では検査数の減少/省力化につながらないことも予想されます。上述したヨーネ病発生農場(12農

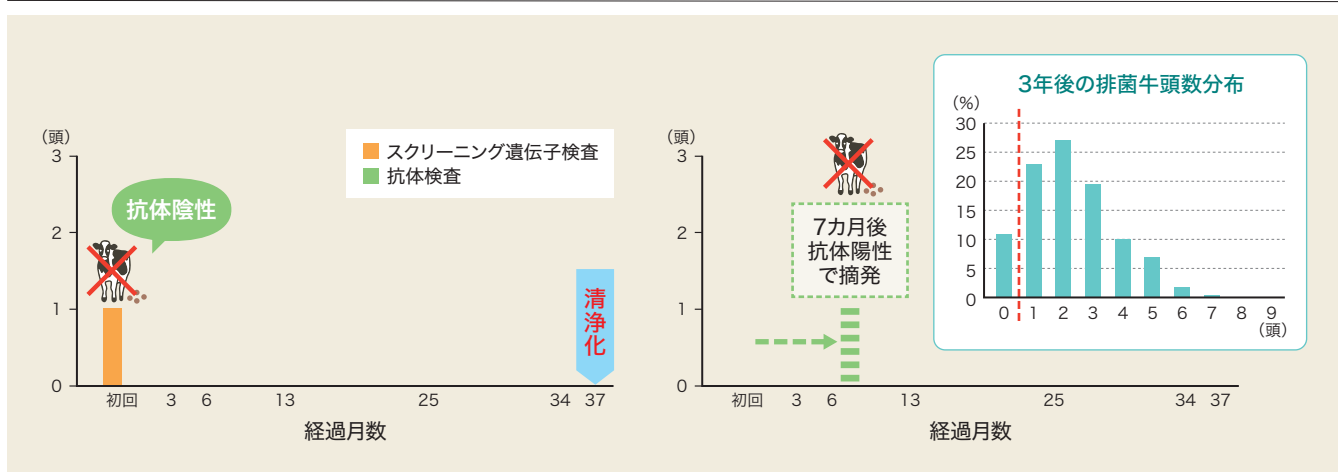


図6 【左】ヨーネ病清浄化達成1農場における検査経過
初回の全頭検査で1頭の抗体陰性排菌牛が摘発されましたが、その後は全頭陰性となり、3年間で清浄化を達成しました。
【右】スクリーニング遺伝子検査未実施のシミュレーション
本農場において、スクリーニング遺伝子検査を導入せず、抗体陰性排菌牛の摘発が遅れた場合、88.9%の確率で3年後も農場内に排菌牛が残っていると予想されました。

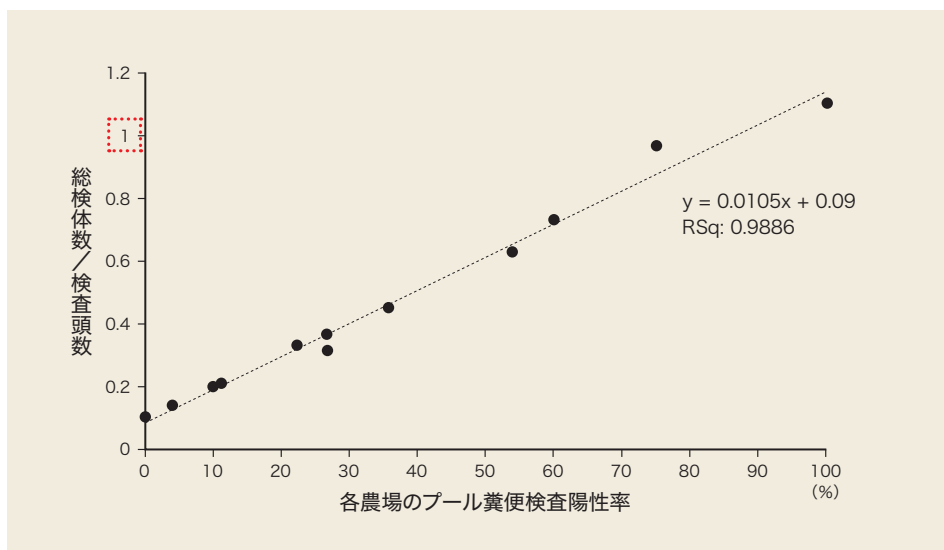


図7
プール糞便検査の陽性率と検査数

場)でプール糞便による牛群のスクリーニングを行うと、プール糞便検査の陽性率が最終的な検査数に直接影響することが示されました(図7)。遺伝子検査は感度が高く、環境がヨーネ菌によって高濃度に汚染された農場では、ほとんどの個体が陽性となることもあります。そのような牛群でプール糞便を用いたスクリーニング遺伝子検査を実施しても、省力化にならないだけでなく、どの個体が真の感染・排菌牛であるか特定することは困難です。プール糞便検査の陽性率が高い農場では、発症牛および抗体陽性牛を優先的に淘汰した後に、洗浄・消毒などにより環境中ヨーネ菌の影響を抑えてから再検査を行うことが重要です。プール糞便検査の陽性率は、農場の汚染状況の指標として捉えることもでき、陽性率の低下は清浄化が進んでいることを反映していると考えられます。

おわりに

ヨーネ病スクリーニング遺伝子検査の導入は、特にヨーネ病発生農場において、排菌牛の早期摘発に有効であり、農場内の感染拡大防止ならびに清浄化の促進に貢献することが期待されます。また、プール糞便を用いて検査を行うことにより、特にヨーネ病清浄農場や汚染度の低い農場において、効率的な牛群検査を進めることが可能です。なお、ヨーネ病は家畜伝染病予防法で規定された法定伝染病であり、病気の診断は公的機関によって承認された検査法を用いて行う必要があります。ヨーネ病スクリーニング遺伝子検査については、現在、民間企業と共

同で薬事申請の準備を進めており、将来的にはヨーネ病検査の公定法として普及することを目指しています。

(動物衛生研究部門 動物感染症研究領域 細菌グループ)

付記：本稿で紹介した内容は、農林水産省「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業(実用技術開発ステージ)」ならびに農研機構生研支援センター「革新的技術開発・緊急展開事業(うち経営体強化プロジェクト)」の支援を受けて実施されました。

用語解説

- ※1 **インターナルコントロール** PCRにおける反応阻害の影響を確認するために、あらかじめ反応液に一定量添加される鑄型DNA。インターナルコントロールの増幅が認められればPCR阻害はなかったと判断される。
- ※2 **リアルタイムPCR** PCRによる遺伝子増幅を経時的(リアルタイム)にモニターし解析する方法。

参考文献

- 1) Magombedze, G. et al. (2013) Evaluation of the "iceberg phenomenon" in Johne's disease through mathematical modelling. PLOS ONE, 8:e76636.
- 2) Kawaji, S. et al. (2020) A novel real-time PCR-based screening test with pooled fecal samples for bovine Johne's disease. Journal of Clinical Microbiology, 58(12), e01761-20.
- 3) 農研機構動物衛生研究部門(2018) ヨーネ病スクリーニング遺伝子検査法. https://www.naro.go.jp/laboratory/niah/disease/files/NIAH_yone_poolscreening_180201.pdf (参照 2022-1-4)
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知(2013) 牛のヨーネ病防疫対策要領. <https://www.maff.go.jp/j/syoutan/douei/johne/attach/pdf/johne-3.pdf> (参照 2022-1-4)
- 5) 生物系特定産業技術研究支援センター(2020) 革新的技術開発・緊急展開事業(うち経営体強化プロジェクト)研究成果パンフレット「ヨーネ病スクリーニング遺伝子検査を用いた効果的な農場清浄化対策」. https://www.naro.go.jp/laboratory/brain/h27kakushin/chiki_2020_result-k039-t01.pdf (参照 2022-1-4)

ツマジロクサヨトウの 日本への侵入と初飛来の解析

大塚 彰

OTUKA Akira

はじめに

ツマジロクサヨトウというガの一種がいます(図1)。成虫は体長約20mm、体重100mg程度のチョウ目ヤガ科の昆虫で、80種以上の寄主植物が知られていますが、特にトウモロコシなどイネ科植物によく寄生します。トウモロコシの株では幼虫が抽出中の若い柔らかい葉を好んで食べて加害します(図2)。ツマジロクサヨトウの原産地は南北アメリカ大陸の熱帯、亜熱帯地域です¹⁾。この虫は長距離を移動する性質があり、北アメリカ大陸ではテキサス州やフロリダ州の南部以南で越冬した個体群が春以降大陸を北上し、夏季にはカナダ南部まで到達し、秋には南部の越冬地に戻ると考えられています¹⁾。

ところが本種は2016年にアフリカ大陸の西部で初めて確認された後、翌年には同大陸の広い範囲に分散しました¹⁾。2018年夏にはアジア地域で初めてインドで発生が確認され、2019年1月には中国南西部で発生が確認されました¹⁾。驚くほどの速さで分布域を拡大したツマジロクサヨトウは、さらに2019年6月には台湾と韓国で発生が

確認され、7月には遂に鹿児島県で日本初の発生が確認されました。この年は西日本や関東と東北地方の合計21県で発生が確認され、青森県が一番北でした²⁾。その後本種は2019～2020年の冬季には中国南部と台湾で越冬するようになりました。そのため2020年からは、沖縄県では周年でフェロモントラップでの誘殺があるようになりました。九州本土では3月から誘殺が始まり、初夏から梅雨時期を中心に飛来するようになりました。2020年は42道府県で発生が確認されました²⁾。

2020年までに国内で発生が確認された寄主植物はトウモロコシ(飼料用、観賞用およびスイートコーン)、ソルガム(飼料用、緑肥用および防風用)、さとうきび、えん麦(飼料用)、ハトムギ、もちきび、ショウガおよびイネ科牧草です²⁾。この内畜産が盛んな九州では飼料用トウモロコシが春と夏に2回栽培され、特に夏作でツマジロクサヨトウの被害が目立ちます。これは飛来したツマジロクサヨトウが夏から秋にかけて増加するからです。

ツマジロクサヨトウは新規に侵入した害虫であるため、東アジアでどのように発生し、移動しているかについての移動実態の解明が必要です。ここでは日本に初めて飛来した2019年の初期の飛来事例についてその飛来源や飛来実態を推定し、飛来源での発生状況がわかりましたので紹介します。なおこの解析は中国の南京農業大学、韓国の国立農業科学院と共同で行った研究に基づきます。

2019年6～7月の国内での発生状況

2019年は中国や台湾、韓国でのツマジロクサヨトウの発生情報が随時日本へ入ってきていましたので、長距離移動性を持つ本種が日本へ飛来するだろうことが高い蓋然性を持って予想されていました。そのため同年6月から



図2 飼料用トウモロコシに寄生したツマジロクサヨトウの幼虫



図1
ツマジロクサヨトウのオス成虫（撮影：真田幸代氏）
体長は20mm、翅を開いた時の幅は30～40mm程度。

表1 幼虫発見の状況と飛翔軌道解析の対象期間

場所	幼虫発見日	齢	発見時の齢を起点とし有効積算温度で推定した飛来時期	飛翔軌道解析に用いた解析対象期間
鹿児島県南九州市	2019/6/27	5～6	2019/6/6～11	2019/5/27～6/13
大分県豊後大野市	2019/7/12	5～6	2019/6/20～25	2019/6/7～27
熊本県あさぎり町	2019/7/11	5～6	2019/6/17～23	2019/6/7～25
宮崎県都城市	2019/7/12	5～6	2019/6/16～21	2019/6/6～23
鹿児島県中種子町	2019/7/3	5～6	2019/6/14～19	2019/6/4～21
沖縄県恩納村	2019/7/11	5～6	2019/6/27～30	2019/6/17～7/1

全国の病害虫防除所などが発生調査を実施したところ、鹿児島県では6月下旬から主に飼料用トウモロコシでツマジロクサヨトウと思われる幼虫が見つかり、その同定作業が進められ、7月上旬に日本で初めてツマジロクサヨトウの発生が確認されました。その後7月上旬までに宮崎県、熊本県、長崎県で、7月中旬までに大分県、沖縄県で幼虫の発生が確認されました。

これらの幼虫はその大きさ(3～4cm)から5、6齢幼虫と推定され、気温のデータを用いて有効積算温度を計算し、時間を遡って飛来時期を推定しました。例えば6月27日に最初の幼虫が見つかった鹿児島県南九州市では6月6～11日が飛来時期と推定されました。同様に大分県豊後大野市では7月12日に幼虫が確認され、6月20～25日が飛来時期と推定されました。その他の主な幼虫の発見状況と推定された飛来時期を表1に示します。

飛来源の推定³⁾

こうした飛来時期にツマジロクサヨトウが発生していた中国からの飛来があったかを調べて、飛来源を推定しました。飛来は幼虫が見つかった地点の上空から後退飛翔軌道を計算して調べました。この時軌道の条件としては

①海面から500～2250mまで250m間隔で8つの高度を設定し、解析対象期間の各日ごと1時間おきに計算、②各高度の風速ベクトルにツマジロクサヨトウの飛翔速度3.0m/sを風の方向に付加、また③南京農業大学での予備的な室内実験でツマジロクサヨトウは気温が13.8℃以下になると飛翔を停止しましたので、各高度の気温がそれ以下になった場合は軌道を停止させ、④ヤガ類は日没後に飛び立つ性質がありますので、軌道はその時間帯で終了させ、その到達点から飛来源を推定しました。

このようにして飛翔軌道を求めた結果、最初に幼虫が確認された南九州市については6月7～8日に中国の広東省、福建省、浙江省、江西省、安徽省から東シナ海を越えて南九州市へ到達する軌道が見つかりました(図3)。飛翔時間は平均で22～30時間、距離にすると約800～2000kmと推定されました。

また豊後大野市への飛来について解析しましたが、想定された飛来時期(6月20～25日)には中国からの軌道(もしくは気流)は見つかりませんでした。そこでツマジロクサヨトウの成虫は飛来後10日間生存、産卵することができるとして飛来期間を6月10～27日に拡大して軌道を探しましたが、それでも見つかりませんでした。さらに3日前まで期間を拡大したところ、6月7日に中国の福建省など

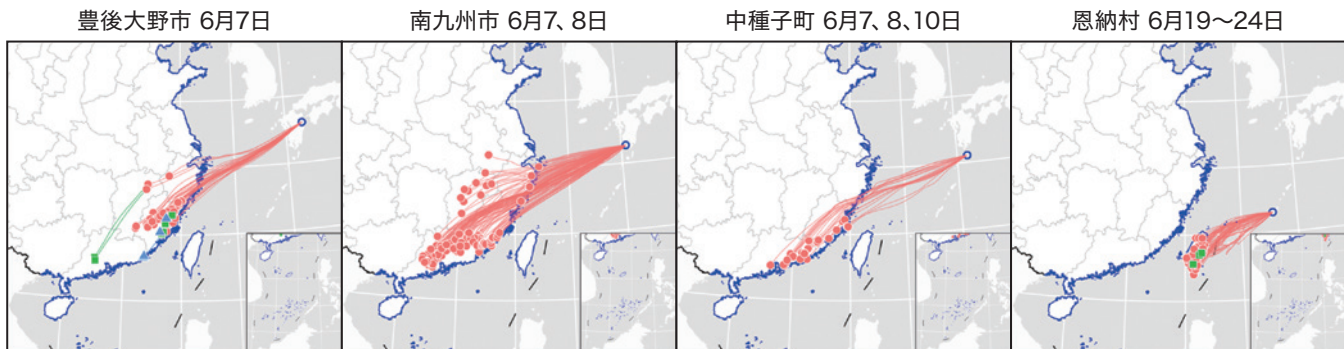


図3 推定されたツマジロクサヨトウの後退飛翔軌道 (Wu et al., Insect Science, 2021: CC BY)

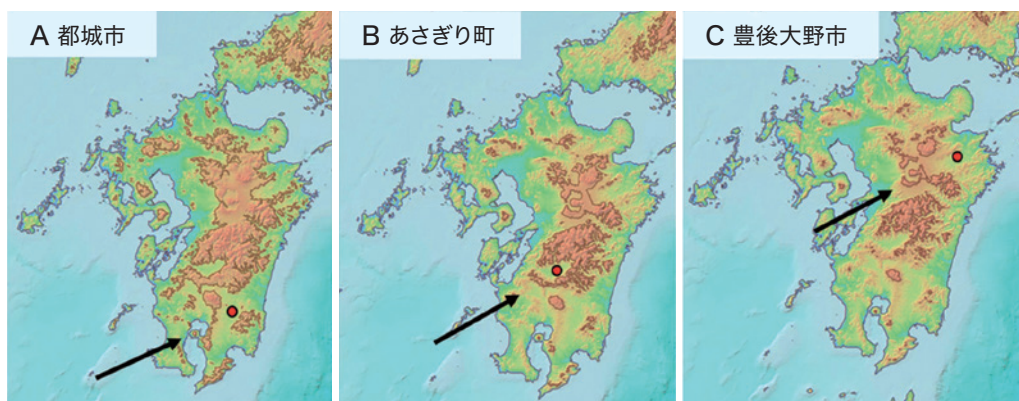


図4 ツマジロクサヨトウの飛来方向と地形 (Wu et al., Insect Science, 2021: CC BY)
赤い丸は幼虫の発生地点、矢印は推定された飛来侵入方向を表す。

から到達する軌道が見つかりました(図3)。すなわち、豊後大野市の幼虫は親成虫が飛来後13日ほど経ってから産卵した次世代個体だと考えられました。同様に熊本県あさぎり町では6月7～8日に福建省、江西省などから、宮崎県都城市では6月7～9日に福建省、広東省などから、鹿児島県中種子町では6月7、8、10日に福建省や広東省から飛来し、沖縄県恩納村では6月19～24日に台湾から飛来したと推定されました(図3)。九州本土各地では同時期に中国南部から飛来したと推定されました。

飛来時の高度³⁾

この研究ではツマジロクサヨトウが海外から飛来する場合の高度についても推定しています。都城市、あさぎり町、豊後大野市(図4の赤丸)ではツマジロクサヨトウが同時期に南西方向(図4の矢印)から飛来したと推定されたので、地形を調べました。すると南西側にそれぞれ標高400m、650m、800mの山がありますので、ツマジロクサヨトウはそれを越える高度で飛来したことになります(図4)。中国へ到達した軌道ではこうした標高より高い軌道が見つかりましたので、この点でも解析の妥当性が示されています。このようなツマジロクサヨトウの飛翔高度について

の解析は初めてで、高度に関する知見は今後飛来を予測する技術を開発する上で重要となります。

飛来源の発生状況³⁾

飛来解析ではツマジロクサヨトウが6月7日に福建省、広東省、浙江省、江西省などから飛来したと推定されましたが、これらを飛来源と推定するには、この時期に成虫が実際に発生していたかを確認する必要があります。中国ではツマジロクサヨトウの侵入後、全国で発生調査が行われ、各省で幼虫の発生が確認されました(図5)。赤い三角は5月22日以前に見られた地点の一部を示しています。飛来源と推定されたすべての省では幼虫が発見されています。さらに幼虫の発生日と幼虫の齢から有効積算温度を用いて、これらの幼虫の羽化日を計算しました。すると広東省では5月20日より前に羽化していたと推定され、福建省、江西省や浙江省の一部と安徽省の一部では6月5日より前までに羽化していたと推定されました。また同様に台湾では6月20日までに成虫が発生していたと推定されました。すなわち、飛来源と推定された中国南部や台湾には飛来があった時期に成虫が発生していたことを示唆しており、飛来源としてよいことがわかりました。

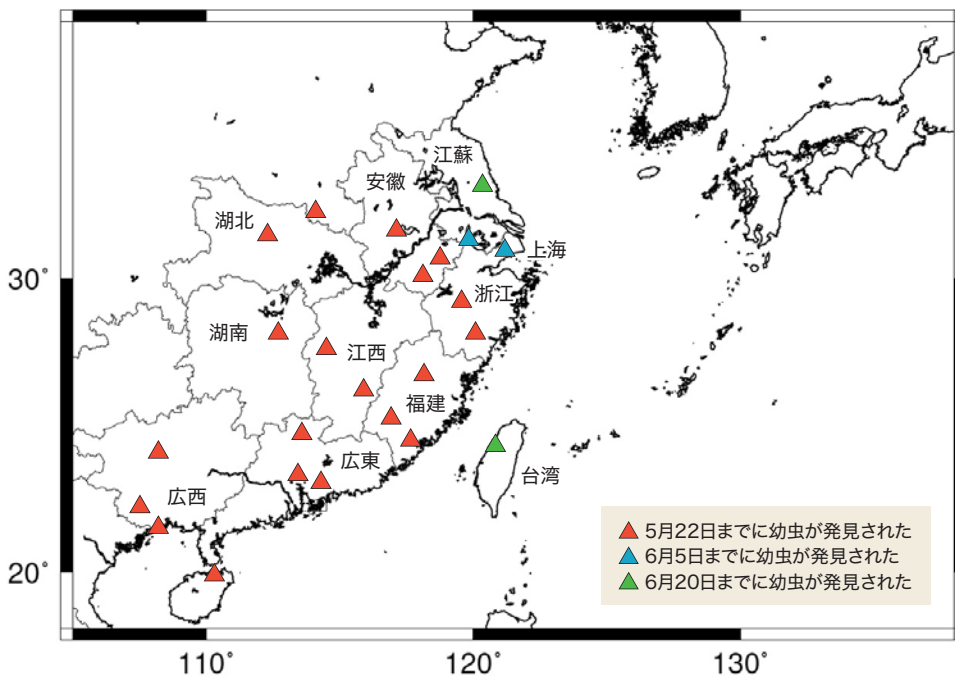


図5 中国、台湾での幼虫の発見時期

おわりに

中国、台湾、日本での発生状況および飛翔軌道の解析から、ツマジロクサヨトウが2019年に日本に初めて飛来した際の時期と経路、飛来源や飛翔高度が推定され、飛来実態がわかってきました。中国の南部の複数の省にまたがる広い地域が飛来源と推定され、当時の天気図を参照すると前線を伴った低気圧が九州の北部を東へ通過していました。これはイネウンカ類やハスモンヨトウなど移動性の農業害虫が飛来する気象条件によく似ており、ツマジロクサヨトウもこうした低気圧の南側にできる強い南西風を利用して、東シナ海を越えて飛来することがわかってきました。上述したようにその推定移動距離は1,000kmを越えることもあり、これまでツマジロクサヨトウは1回の移動で500km程度移動すると考えられてきましたが、この研究によってそれを遥かに上回る距離を移動できることが示唆されました。現在こうした飛来実態に基づいてツマジロクサヨトウの飛来予測技術を開発しており、今後海外飛来の早期警戒と適期防除が実現されると期待されます。

またこの研究で特徴的なのは侵入と発見の経緯です。通常新規害虫はその発生が確認されてから初めて侵入がどのように起こったかを検討し始めるのが一般的ですが、ツマジロクサヨトウの日本へ侵入については予め東アジアでの分布拡大の情報がリアルタイムで共有され、飛

来によって起こるだろうと予測されていました。そのため侵入直後の発生調査が可能となり、実際に幼虫の発生が迅速に確認できました。このことでその後の飛来の実態解明がやりやすく、上記の様に大変明瞭な侵入実態を明らかにすることが可能となったのです。この例から言えることは、越境性害虫の管理では国を越えて害虫の発生情報や防除技術の情報を共有していくことが重要ということです。農研機構では東アジア各国の研究機関と協力関係を構築して、害虫管理に関する様々な共同研究を推進しています。気候変動下で昆虫も移動実態や発生状況が変化してきており、これまでとは違う地域に飛来が起こったり、新しい害虫が飛来したりと考えられますので、今後とも国際協力を進めながら東アジア全体で移動性害虫を適切に管理していくことが重要です。

(植物防疫研究部門 基盤防除技術研究領域
海外飛来性害虫・先端防除技術グループ)

参考文献

- 1) 松村ら (2019) ツマジロクサヨトウの中国における分布拡大と日本への侵入警戒. 植物防疫, vol.73(7), 434-438.
- 2) 農林水産省 (2021) 「ツマジロクサヨトウ」防除マニュアル (第2版). https://www.maff.go.jp/j/syoutan/syokubo/keneki/k_kokunai/attach/pdf/tumajiro-150.pdf (参照 2021-12-1)
- 3) Wu, M.-F. et al. (2021) Overseas immigration of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), invading Korea and Japan in 2019. *Insect Science*, DOI 10.1111/1744-7917. 12940.

温故知新

>> 古きをたず(温)ねて新しきを知る

現在、農研機構が製造・保管する海外向け緊急備蓄用LA赤穂株牛疫生ワクチン



世界で唯一の
牛疫ワクチン製造機関として
世界に貢献する



牛疫(ワクチンシードなど)の所持施設として国際機関による
認証を受けた農研機構牛疫ワクチン製造施設(つくば)

牛疫ワクチン略史

KOKUHO Takehiro 國保 健浩

Editor's Note

編集後記

農研機構技報11号では、「防ぐ」¹として「レギュラトリーサイエンス(規制科学)」として分類される研究で開発された技術を集めて紹介しています。まず、規制の対象となる物質や微生物などを遺伝子レベルで検査するのに有効なモノサシとなるDNA標準物質、人体に悪影響を及ぼすイネのカドミウム・ヒ素の低減化栽培技術を紹介しています。

また、家畜感染症による農業上の被害を防ぐための技術開発5件を技報で初めて取り上げました。これらの感染症は国外から日本に伝わる越境性のものが含まれます。研究開発を行った動物衛生研究部門は令和3年に創設100周年を迎えました。

さらに、植物防疫に関しては、国外から飛来してくる移動性病虫の飛来源・飛来実態の解析結果を紹介しています。

このようにレギュラトリーサイエンスでは、国境を越えて伝染・飛来する越境性の病原ウイルスや病害虫が対象となることが多く、農研機構では国外の研究機関や国際機関との連携を積極的に進めています。また、農水省の関連行政部局とも連携しながら研究が進められており、本号の一部の記事は農林水産省の関連部局にも査読いただいております。本誌面を借りてお礼申し上げます。

(編集委員長)

牛疫は、反芻家畜や野生反芻獣が感染する致死性の高いウイルス性の伝染病です。中東、西アジアに起源を持つ病気で、既に紀元前20世紀頃の遺物にも記録があります。18世紀の欧州の大流行では2億頭もの牛が失われました。この時代、牛は役畜として飼われており、多数の牛の喪失は農業の停滞を通じて飢饉に直結しました。牛疫は、家畜衛生分野の「1丁目1番地」と呼ぶべき疾病で、家畜衛生法制や関連の行政組織は本病の根絶を目指して整備されてきたと言っても過言ではありません。家畜伝染病予防法(1951)は本病の予防のために発布された太政官布告(1871)がそもそもの始まりですし、昨年創立100周年を迎えた動物衛生研究部門の源流は牛疫の調査のために農商務省(当時)に設置された獣疫調査室(1892)です。海外でも世界初の獣医学校(リヨン、1762)や政府獣医当局の設置(英国、1866)など、牛疫対策のために教育、研究、行政機関の充実が図られてきました。少し時代は下がりますが、1924年の国際獣疫事務所(OIE、パリ)の設立も欧州での再発を奇貨とするものでした。その後、2001年のケニアでの感染例を最後に牛疫の発生は途絶え、国連主導による長期・大規模なサーベイランス活動を経て、2011年に自然界からの根絶が宣言されました。

長きにわたる牛疫撲滅の物語において、前述のような社会制度の整備以上に重要な役割を果たしてきたのがワクチンであることは疑いようがなく、その発展には多くの日本人が力を尽くしてきました。農商務技官として世界初の牛

疫ワクチン(1917)を開発した蠣崎先生や、先生の下で弱毒牛疫ウイルス(L株、1938)の作出に成功し、生ワクチンの実用化を果たした中村先生^{*1,2}をはじめとする多くの研究者の努力によって、20世紀後半までには東アジア、東南アジアから牛疫が駆逐されました。その後数十年をかけて、南アジア、西アジアおよびアフリカの牛疫も根絶に至りましたが、この根絶には英国人のPlowright博士が作出したアフリカ系の弱毒株を用いた生ワクチン(1959)が利用されました。国産のL株は、その後さらに高度な弱毒化が図られ、現在も「LA赤穂株」として農研機構が製造する緊急備蓄用ワクチンのシードとして利用されています。筆者らはLA赤穂株の遺伝学的、ウイルス学的特性の解析を進めるとともに、国際標準株としての登録を提案し、2016年に掲載が承認されました^{*3}。別途取得した「牛疫所持施設」の国際認証と併せて、農研機構は現在世界で唯一の牛疫ワクチン製造機関として国連の要請に基づく緊急用備蓄ワクチンの製造・保管を行っており、“ポスト牛疫”時代の世界の清浄性維持に貢献しています。

(動物衛生研究部門 越境性家畜感染症研究領域)

*1 故中村稔治(なかむらじゅんじ)先生は弱毒牛疫生ワクチン開発の業績により、2011年国連食糧農業機関(FAO)から表彰されています。

*2 中村稔治(1975) 一獣疫研究者の歩み、岩波書店。

*3 OIE: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Rinderpest (infection with rinderpest virus) (version adopted in May 2018)

https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standard/s/tahm/3.01.19_RINDERPEST.pdf

農研機構技報

NARO Technical Report No.11

2022年1月31日発行

発行者/久間和生

発行所/農研機構 広報部広報戦略室(編集委員会事務局)

〒305-8517 茨城県つくば市観音台3-1-1

製作協力・印刷/株式会社アイワット

非売品



技報
バックナンバー

本誌研究内容に関するお問合せは

<https://prd.form.naro.go.jp/form/pub/naro01/research>



『農研機構技報』NARO Technical Report 読者アンケートのお願い

ご意見・ご感想をお聞かせください

<https://prd.form.naro.go.jp/form/pub/naro01/ntr>



*本誌掲載の記事・写真・イラストの無断転載・複写を禁じます。



この冊子は、グリーン購入法適合の用紙を使用しています