

NARO

農研機構技報

Technical Report

No. 15
Mar. / 2024



アニマル サイエンス

特集

Topics

- ▶ 牛疫ワクチン(LA赤穂株)
- ▶ カモ等がハス田の泥中のレンコンを食べる様子を初確認

History

温故知新

研究成果を社会実装中

農研機構では、農業・食品産業におけるSociety 5.0の実現により
目指すべき姿を達成するための研究開発を行い、社会実装に向けた取り組み

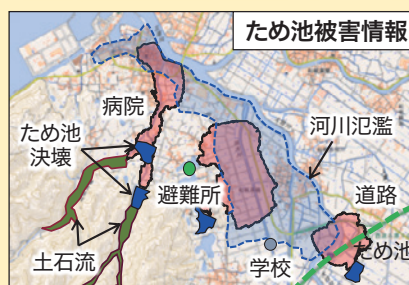
ICT水管理システム

田んぼの水管理をICTで遠隔操作・
自動制御するシステムの開発



ため池防災支援システム

ため池の決壊危険度を「見える化」し、行政機関による
速やかな情報共有、災害対応を支援するアプリの開発



全国デジタル土壌図

「土壌有機物管理ツール」などを追加した
「デジタル土壌図」の提供



天敵を活用した害虫防除技術

化学農薬の使用を減らして害虫を防除する技術

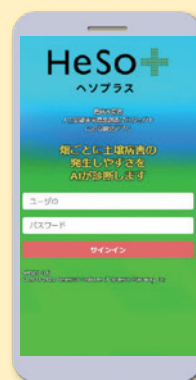
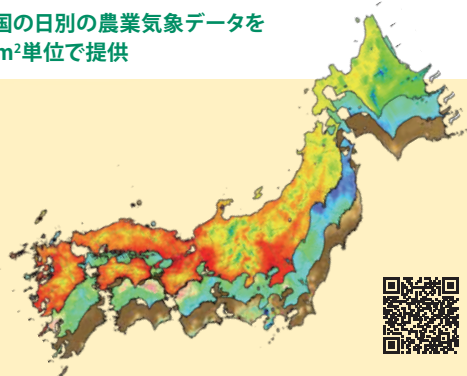


新しい土壌病害診断技術

野菜の土壌病害の発生しやすさをAIで診断できる
アプリ「HeSo+ (ヘソプラス)」を開発

メッシュ農業気象データシステム

全国の日別の農業気象データを
1km²単位で提供



を進めています。

- 衛星データ
- スマート農業
- レジリエンス
- ICT
- 気候変動適応
- AI
- 農業課題解決

Robust
Agricultural
System

04 特集「アニマルサイエンス」

05 「Farm to Consumer」の持続性を目指して
三森 真琴

06 **1** ウシ消化管内発酵由来メタンの推定方法
鈴木 知之

10 **2** 豚熱とアフリカ豚熱の
同時診断可能な遺伝子検査法
西 達也

14 **3** アフリカ豚熱ウイルスを効率よく
増殖できる細胞培養系の確立
舛甚 賢大郎

18 **4** 豚の抗病性を向上させるDNAマーカー
上西 博英

22 **5** カイコの遺伝子発現データの拡張とその利用
横井 翔 瀬筒 秀樹

26 **6** 農作物の食害痕跡から加害鳥獣の
判別につなげる鳥獣害痕跡図鑑
山口 恭弘

30 **7** 果樹園のカラス対策「くぐれんテグス君」の
簡易型「くぐれんテグスちゃん」
吉田 保志子

<トピックス>

34 ▶牛疫ワクチン(LA赤穂株)
高木 道浩

36 ▶カモ等がハス田の泥中のレンコンを食べる様子を初確認
益子 美由希

38 温故知新



アニマル

特集

サイエンス



農畜産物の生産を守り、ひとの営みを持続させるために



「Farm to Consumer」の 持続性を目指して



畜産研究部門
所長

三森 眞琴

MITSUMORI Makoto

日常の食卓を眺めてみると、植物由来の食品と動物由来の食品が並んでいます。農業はひとが必要とする衣食住を提供するための産業であり、特集のテーマであるアニマルサイエンスに関係する部分では、主に食や衣に関わる農畜産物を生産しています。

農畜産物の生産システムは地球の物質循環の中に組み込まれていて、無機物と生物との間での物質交換、つまりは土壌、空気、植物(栽培植物)、動物(家畜、昆虫等)、微生物の間での物質の移動により成立しています。例えば、空気中の二酸化炭素は植物に吸収されて炭水化物などの植物の構成成分になり、植物は草食動物、雑食動物、鳥類、昆虫の餌となり、動物の排泄物は堆肥として、再び植物に利用されます。したがって、農畜産物の生産に応じて物質循環の流れを調整し、資源を無駄なく使うことや農業から発生する温室効果ガス(GHG)の削減によって農業は持続性を確保することができます。

農林水産省は「みどりの食料システム戦略(2021年5月)」を策定して農業の持続性の強化を図っています。畜産については「持続的な畜産物生産」を図るため、「家畜の生産に係る環境負荷軽減等の展開」、「良質堆肥の生産や堆肥の広域流通・資源循環の拡大」、「国産飼料の生産・利用及び飼料の適切な調達」の推進などを進めています。家畜を健康的に飼養することで、安全・安心な畜産物を提供するとともに、国産飼料を増やすことでの国内資源の活用、生産段階での資源ロスを減らし、さらにウシのゲップに含まれるメタンや排泄物からの一酸化二

窒素などのGHGの低減を進めることで家畜生産の持続性が高まります。

特集のテーマであるアニマルサイエンスは、広くは動物学であり、コンパニオンアニマルや一般的な野生動物も含まれますが、ここでは農業に関わる動物としてウシ、ブタ、カイコ、および農作物の鳥獣害に関係する野生動物を取り上げています。農研機構ではアニマルサイエンスに関して、畜産研究部門、動物衛生研究部門、地域農業研究センター、生物機能利用研究部門で家畜、鳥獣害、家畜疾病、昆虫の研究を進めています。本特集は、アニマルサイエンスの視点として持続性を意識しています。その背景として、ウシのゲップに含まれるメタンの削減はGHG削減だけでなく、飼料エネルギーの有効利用にも効果があること、家畜の疾病対策は健康で安全な畜産物を提供するとともに生産段階での損失(家畜の死亡等)の低減につながることで、カイコはタンパク質である絹糸を生産する昆虫であり、タンパク質生産能力の多方面(医薬品、食品、化粧品など)への活用により利用性が高まる可能性があります。一方で野生動物(鳥獣)による農作物の被害が大きな問題となっています。ヒトの生活圏に近接して生活する野生動物(シカ、イノシシ、カラス等)をサイエンスの見知により制御することで、農作物の生産が守られ、ひとの営みを持続させることができます。

農研機構は、アニマルサイエンスに関する技術開発により、持続的に生産された農畜産物が消費者へきちんと届くよう、これからも取り組んでまいります。

ウシ消化管内発酵由来メタンの推定方法

鈴木 知之

SUZUKI Tomoyuki

はじめに

家畜消化管内発酵由来メタンは、日本の農林水産業からの温室効果ガス排出源のうち水田からのメタン発生に次ぐ第二の排出源となっており（燃料燃焼由来二酸化炭素を除く）、その多くはウシからの排出です。ウシをはじめとする反すう動物の場合、メタンは反すう胃^{※1}内の摂取飼料の発酵過程で生じており、これがあい気（いわゆるゲップ）とともに大気に放出されています。メタンの炭素源はウシが摂取した飼料の炭水化物ですが、炭水化物は大きく繊維とデンプン、単少糖類に分けられます。これら炭水化物は反すう胃内で短鎖脂肪酸^{※2}となり、胃壁から吸収された短鎖脂肪酸はウシの主要なエネルギー源となっています。反すう胃内での繊維の分解過程では、酢酸が多く産生されますが、この過程で水素が放出されて一部がメタン生成に利用されます。このことから、メタン排出量は炭水化物の摂取量とその種類の影響を大きく受けています。ウシからのメタン排出量は、国内の搾乳牛（二産）では502L/日、肥育牛（和牛雄1歳以上）では263L/日と見積もられていますが、この違いは主に乳牛と肉牛の炭水化物摂取量と炭水化物の種類の違いによるものです。なお、国内の飼養頭数は乳牛よりも肉牛の方が多いため、国内総メタン排出量は乳牛よりも肉牛の方が多くなっています。

ここ数年で消化管内発酵由来メタンへの世間の関心が急速に高まり、メタン抑制技術開発に対する期待も大きくなっています。抑制技術の一つとして、メタン排出量の個体差に着目した育種改良による低メタン産生牛作出のための技術開発が進められています。低メタン産生牛の育種技術開発ならびに育種事業化のためには、多頭数での個体別のメタン測定が必要になりますが、現在、国内におけるウシからのメタン排出量を定量できる施設は非常

に限られています。最も正確な測定方法は、ウシをチャンバーと呼ばれる通気を厳密に管理された施設に入れて測定するチャンバー法になりますが、国内のウシ用チャンバーは農研機構畜産研究部門にある4基のみです（図1）。一方、スニファー法¹⁾と呼ばれるメタン排出の簡易推定手法が10年ほど前にヨーロッパで開発されましたが、スニファー法で用いられる算出式が飼料構造の異なる日本のウシでも適応可能なのかは不明でした。

そこで、これまでに農研機構のチャンバーで得られた搾乳牛と肥育牛のメタンおよび飼料摂取量など関連データをデータセットとし、新たなメタン算出式を開発しました²⁾。そして、スニファー法での測定とメタン推定を行うために必要な情報をまとめた「ウシルーメン発酵由来メタン排出量推定マニュアル」³⁾を発行しました。スニファー法によるメタン排出量の推定は、(1)呼気のメタンと二酸化炭素濃度の測定、(2)測定結果の解析、(3)測定値を算出式に代入してメタン排出量を推定、の3つのステップに分けることができます。それぞれのステップについて以下、搾乳牛の場合でご紹介します。



図1 ウシ用チャンバー

メタンと二酸化炭素濃度の測定

搾乳牛の呼気ガス濃度の測定は放し飼い牛舎用搾乳ロボットで実施します（図2）。搾乳ロボットはウシが自由に



図2 搾乳ロボット内で搾乳中の乳牛
エサ箱(飼槽)の中のガスをポンプで吸引し、別室のガス分析計で濃度を分析する。

訪問し、自動で搾乳を行う搾乳施設であり、訪問を促すための配合飼料を自動で給与し、飼料摂取中に搾乳を行います。1台の搾乳ロボットで50~60頭の搾乳が可能であり、約5分の搾乳の間に呼気が含まれる頭部周辺のガスを採取しメタンと二酸化炭素濃度を測定します。ウシは1日3回前後自由にロボットを訪問し搾乳されるため、測定を数日続ければ、1日の様々な時間帯で呼気を測定することができ、測定期間中に得られた濃度を平均することにより1日の平均的なガス濃度を得ることができます。

測定システムは非常にシンプルで、搾乳ロボット内のウシの頭部付近にガス吸引口を設置し、チューブをフィルター、ポンプ、トラップを経てガス分析計につなぎます(図3)。このうちトラップはあい気発生時の高濃度なメタンの排出によって、分析計の測定範囲を超える急激な濃度上昇を抑えるために設置されています。測定上の主な注意点は二つです。一つ目は、ガス分析計の測定範囲内で、できるだけ高い濃度を得られるように吸引口の設置を行うことです。測定中の平均二酸化炭素濃度1,000ppm^{*3}以上が一つの目安となり、濃度が低いときは場合によっては風

防を設置する必要があります。一方で、ガス濃度が高すぎるとメタン、二酸化炭素の濃度が分析計の測定範囲を超える場合もあるため、高すぎず低すぎない濃度となる吸引口の設置が求められます。二つ目は吸引したガスに含まれる水分です。吸引ガスには呼気を多く含むため湿度が高く、特に温湿度が高い夏場の測定でガス分析計を空調の効いた別室に設置するとガス中の蒸気が水滴となり、これが分析計に入り込んで分析計の故障の原因となります。

設置が決まれば後はポンプと分析計を連続運転するだけです。1秒ごとのガス濃度記録を、24時間連続で7日間以上行うことを推奨しています。

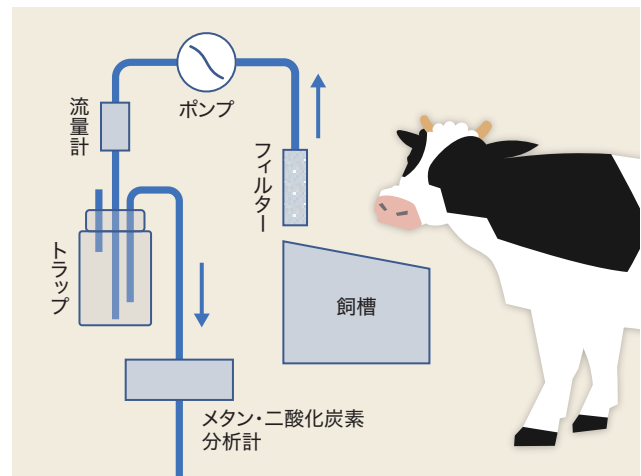


図3 搾乳中の呼気ガスの測定

測定結果の解析

ガス分析計からの出力はガス濃度だけですので、これに搾乳ロボットからの搾乳時刻とウシ番号のデータを重ねることによって、どの波形がどのウシのものなのかを判定して切り分けます(図4)。次に、大気中にはメタンが数

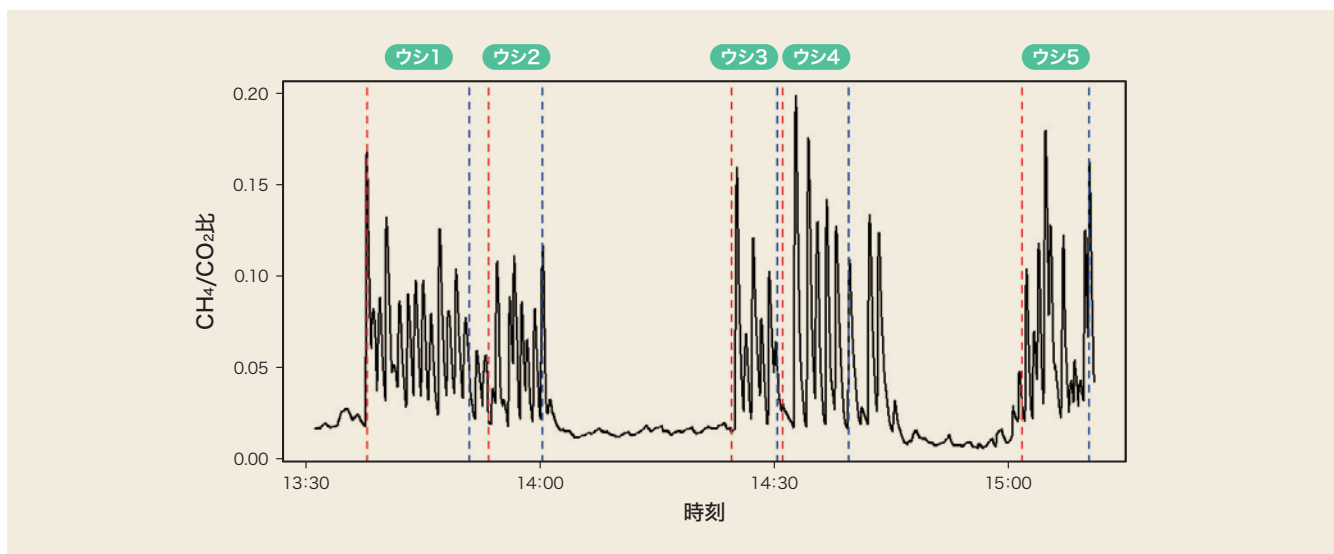


図4 搾乳ロボットで測定したメタン/二酸化炭素濃度比の推移
赤い点線はウシの搾乳ロボットへの入場、青い点線は退場を示す。

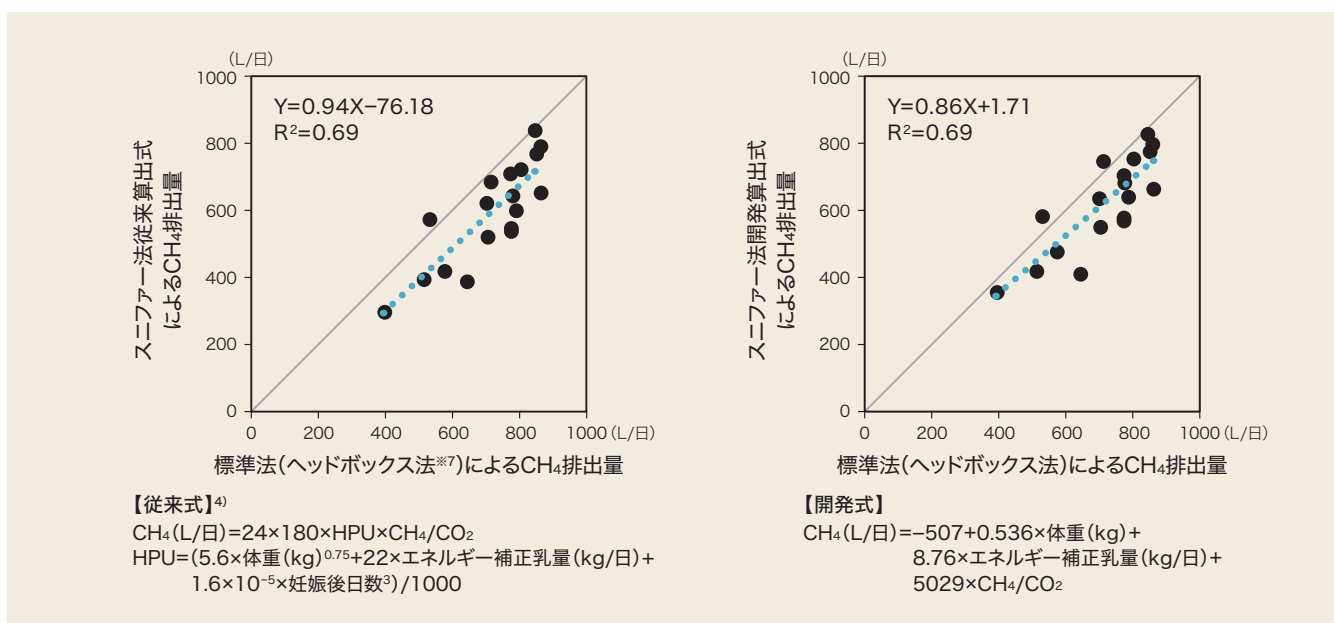


図5 従来式と開発された式で算出された乳牛における推定メタン排出量と標準法測定メタン排出量との関係

ppm、二酸化炭素濃度が400ppm前後含まれますので、ウシが搾乳されていないときのメタン、二酸化炭素の濃度をウシ呼吸測定中の1秒ごとの濃度から差し引いて、1回のロボット訪問当たりの平均メタン/二酸化炭素濃度比を求めます。最終的にはウシごとに測定期間の平均メタン/二酸化炭素濃度比を求めます。

メタン排出量の計算

測定値はメタンと二酸化炭素の濃度だけですので、こ

れを排出量にするためにはさらに乳量、乳タンパク質率、乳脂率およびウシの体重の情報が必要となり、以下の式²⁾に当てはめることによってメタン排出量を推定します。

$$\text{メタン排出量 (L/日)} = -507 + 0.536 \times \text{体重 (kg)} + 8.76 \times \text{エネルギー補正乳量 (kg/日)} + 5029 \times \text{メタン/二酸化炭素濃度比}$$

ここで、エネルギー補正乳量 (ECM) とは生乳に含まれるエネルギーで補正した乳量のことで以下の式で表されます。

$$\text{ECM (kg/日)} = \text{乳量 (kg/日)} \times (376 \times \text{乳脂率 (\%)} + 209 \times \text{乳タンパク質率 (\%)} + 948) / 3138$$

この推定式はメタン測定の方法であるチャンバー法で測定されたメタンと関連データのデータセット(121例)を用いた線形回帰分析によって得られました²⁾。その推定精度は、スニファー法によるメタン/二酸化炭素濃度比を用いた従来式⁴⁾での推定メタン排出量と同程度の精度ですが、算出に使用する変数(妊娠後日数)が一つ少ないという利点があります(図5)。さらに今回提案する算出式は、国内で一般的な飼料を給与された乳牛での測定結果をデータセットとしているため、国内のメタン排出量推定に適した式と言えます。

スニファー法の弱点と今後の展開

乳牛での推定の場合、推定式の性質上、泌乳初期によくみられる体脂肪動員^{※4}が顕著なウシでは過大評価する可能性があり、泌乳後期にしばしばみられる過肥が顕著なウシでは過小評価する可能性があります。飼料の違いによるメタン排出量の違いを本方法で評価することは可能ですが、当然ですがチャンバー法に比べ精度は劣ります。

搾乳ロボットでは50~60頭の搾乳が可能であるため、一つの測定システムで多頭数の測定が可能です。ロボット搾乳の他には、繋ぎ牛舎で一般的なパイプライン搾乳^{※5}や放し飼い牛舎で一般的なパーラー搾乳^{※6}がありますが、このような飼養形態、搾乳形態での呼気ガス測定は難しいのが現状です。また、肥育牛では搾乳ロボットのような多頭数の呼気を1カ所で測定できる既存の施設がな



図6 肥育牛の飼槽での呼気ガス測定
矢印:ガス採取分析ライン

いことから、現状では飼槽での1頭ごとの測定しかできないこと(図6)、肥育牛では推定式の変数としてウシごとの飼料摂取量の情報が必要であることから、乳牛ほど効率的な測定ができません。

今回、紹介したスニファー法によるメタン排出量推定は、今までほぼチャンバー法しかなかったウシのメタン測定について、精度はチャンバー法よりも低くなりますが、多頭数の測定を可能とし、生産現場でも利用できる方法です。今後、より多くの皆様にメタン排出抑制に取り組んでいただけるよう、様々な畜種に対応した推定式、様々な飼養形態に対応した呼気測定方法を提案していきたいと考えています。

(畜産研究部門 乳牛精密管理研究領域
乳牛精密栄養管理グループ)

付記:本稿で記載された研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「農業分野における気候変動緩和技術の開発-畜産分野における気候変動緩和技術の開発-」(JP17935124)、「畜産からのGHG排出削減のための技術開発」(JPJ011299)の研究成果です。

用語解説

- ※1 **反すう胃** 反すう動物が持っている4つの胃のうち食道から続く第1、第2番目の胃の総称。
- ※2 **短鎖脂肪酸** 炭素数が6以下の脂肪酸。
- ※3 **ppm** parts per million(100万分の1)の略。10,000ppm=1%
- ※4 **体脂肪動員** 動物が生命維持、活動や生産のためのエネルギーとして体脂肪を利用すること。
- ※5 **パイプライン搾乳** 繋ぎ搾乳牛舎でつながれているウシで順番に搾乳を行い、搾られた生乳は牛舎内のパイプラインを通してタンクに集められる搾乳方式。
- ※6 **パーラー搾乳** 乳牛を搾乳時にパーラーと呼ばれる搾乳施設に集めて搾乳する方法。
- ※7 **ヘッドボックス法** 標準法の一つであり、チャンバー法はウシの体全体を換気を管理された部屋に入れるのに対し、ヘッドボックス法では頭部のみを換気を管理された箱で覆い、メタン排出量を測定する。測定原理はどちらも同じ。

参考文献

- 1) Lassen, J. et al. (2012) Accuracy of noninvasive breath methane measurements using Fourier transform infrared methods on individual cows. *Journal of Dairy Science*, vol.95(2), 890-898.
- 2) Suzuki, T. et al. (2021) Prediction of enteric methane emissions from lactating cows using methane to carbon dioxide ratio in the breath. *Animal Science Journal*, vol.92(1), e13637.
- 3) 気候変動緩和コンソーシアム(2022) ウシルーメン発酵由来メタン排出量推定マニュアル。
https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/152088.html (参照 2024-2-19)
- 4) Madsen, J. et al. (2010) Methane and carbon dioxide ratio in excreted air for quantification of the methane production from ruminants. *Livestock Science*, vol.129(1-3), 223-227.

豚熱とアフリカ豚熱の 同時診断可能な遺伝子検査法

西 達也

NISHI Tatsuya

はじめに

豚熱(Classical swine fever、以下CSF)は2018年に26年振りとなる発生が国内で確認された後も終息を見ることなく続発しています。このCSFの感染拡大には、豚だけでなく、野生動物、特にイノシシが農場へのウイルスの侵入に極めて大きく関与していることが示唆されており、現在、豚・イノシシ双方への対応が重要課題となっています¹⁾。一方、アフリカ豚熱(African swine fever、以下ASF)はCSFウイルス(CSFV)とは異なるアフリカ豚熱ウイルス(ASFV)による豚やイノシシの熱性出血性伝染病で、極めて高い致死率を特徴とします²⁾。現在、ASFの流行が世界的に進み、世界最大の養豚国である中国を含むアジアにも感染が拡大していることから、今後、日本への侵入も懸念されるため、空港検疫などの水際対策を強化する必要があります。

両ウイルスは豚に対して極めて病原性が高いことから、両疾病の速やかな摘発のため、農研機構の協力のもと、都道府県の家畜保健衛生所には遺伝子検査の体制が整備されています。しかしながら、豚およびイノシシの検査件数が日増しに増加する現状にあって、検査精度を維持しながらも、防疫措置の発動の要否を早期に判断でき、かつ検査者の労力低減に資する、迅速で省力的な遺伝子検査法の開発が求められています。そこで、農研機構とタカラバイオ株式会社は、現行の検査法における実用上の課題を克服すべく、新たな検査法の開発に取り組みました。本稿では、検体の簡易な前処理法きょうざつぷつと夾雑物による阻害を受けにくいPCR^{*}1酵素を採用した増幅反応系を組み合わせることで新たに開発した、CSFおよびASFの同時診断が可能なリアルタイムPCR検査法について紹介します。

豚熱およびアフリカ豚熱ウイルスの 従来型の遺伝子検査法

CSFVは一本鎖プラス鎖RNAウイルスであり、フラビウイルス科ペスチウイルス属に属します³⁾。ペスチウイルス属には、牛ウイルス性下痢ウイルス(Bovine viral diarrhea virus、以下BVDV)とボーダー病ウイルス(Border disease virus、以下BDV)が含まれ、それぞれ主に牛と羊に感染しますが、豚にも感染することがあります⁴⁾。CSFVゲノムの非翻訳領域の遺伝子配列は、この属のウイルスで高度に保存されており、ペスチウイルスの検出に適した標的となります⁵⁾。ペスチウイルス属のウイルスは抗原性が類似するため、蛍光抗体法(FAT)および抗原ELISAなどの抗原検査法ではCSFVをBVDVやBDVと明確に区別することは困難です。そのためCSFVを迅速かつ特異的に検出できる方法として、CSFV遺伝子に特異的に結合するプライマーおよびプローブを用いたリアルタイムPCR法が開発されているものの、国内での病性鑑定において実用に至っていませんでした⁶⁾。

ASFVは、アスファウイルス科アスフィウイルス属に分類される二本鎖DNAウイルスです⁷⁾。国際標準となる診断手法を収録した国際獣疫事務局のマニュアル⁸⁾には、推奨されるASFVの検出手法として、ウイルスが感染した細胞が豚の赤血球を吸着する現象を利用した赤血球吸着(HAD)試験、FAT、コンベンショナルPCR法、リアルタイムPCR法などが挙げられています。これらの検査法の中で、PCR法は現在、特に感染の初期段階でASFを診断するための最も検出感度^{**2)}の高い技術です⁹⁾。さらに、腐敗などによりHADやFATには適さない検体であっても、核酸の抽出・精製すること、およびPCR法を用いることでウイルス遺伝子の検出が可能です。



図2 豚熱ウイルス・アフリカ豚熱ウイルス遺伝子検出マルチプレックスリアルタイムPCR試薬群

CSFVおよびASFVに感染した豚では、感染の初期段階で血液中に大量のウイルスが検出され、感染の進行とともに扁桃、脾臓、腎臓、リンパ節などにも大量のウイルスが分布します⁹⁾¹⁰⁾。したがって、血液(血清)やこれらの臓器は、本病の診断に適した材料となります。そのため両疾病に関する特定家畜伝染病法防疫指針(以下、防疫指針)においては、これらの材料を用いて、CSFについてはVilcekら⁵⁾、ASFについてはKingら¹¹⁾が開発したPCR法を応用したコンベンショナルPCR法が一次検査法として取載され、都道府県の病性鑑定業務に広く利用されています(図1)。家畜伝染病予防法に規定される「特定症状」が認められた症例にあつては両方の検査を並行して実施することが防疫指針上で求められています。しかし、これらの検査ではRNAウイルスであるCSFVとDNAウイルスであるASFVを別個に取り扱わなければならないため手技が煩雑になること、検体から核酸(ウイルス核酸)を抽出・精製する必要があること、最終的な判定に電気泳動による増幅産物の確認および酵素処理による切断パターンの確認が必要なことから、時間を要する上に交差汚染のリスクが高いという短所がありました。

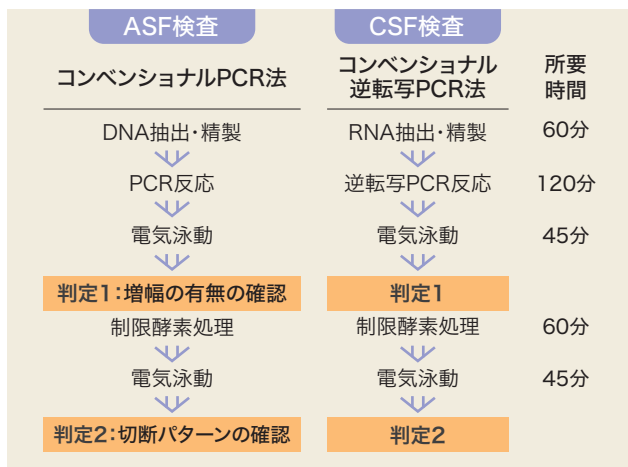


図1 従来法によるCSFVおよびASFVの遺伝子検出検査手順

豚熱およびアフリカ豚熱の迅速な遺伝子検出検査法の開発

農研機構とタカラバイオ株式会社は、従来の遺伝子検査法における上述の課題を克服する新たな検査法の開発に取り組みました。ウイルス核酸の精製を必要としないCSFおよびASFの同時検出法を開発するために、タカラバイオ株式会社が保有する遺伝子増幅技術や試料の処理にかかる技術をもとに検査系を構築するとともに、非感染および感染家畜由来の各種検体を用いて当該検査法の実証試験を実施しました。開発に当たっては、検体から核酸を精製することなく検査が可能な反応系とすること、反応時間の短いリアルタイムPCR系を採用すること、および1チューブで複数の遺伝子を同時に検出できるマルチプレックス検査系であることを目指しました。

開発した検査に用いる試薬群は、核酸を簡易に抽出する前処理試薬、PCR試薬および陽性対照DNAで構成されます(図2)。血清または臓器乳剤と簡易核酸抽出試薬を等量で混合し室温で5分反応させた後、混合液2 μ LをPCR反応(反応液量25 μ L)に供します。不純物に耐性の高い逆転写酵素および増幅酵素を採用することで、試料を簡易な前処理のみで反応に供することが可能となりました。PCR試薬には検査工程の成否の指標となる内部標準(Internal control、以下IC)としてブタの細胞で発現している遺伝子を特異的に増幅できるプライマー・プローブセットも混合しており、CSFV、ASFVおよびICをそれぞれ別の蛍光シグナルで同時に検出します。豚やイノシシから採取し、調整した新鮮な血清あるいは臓器乳剤を被検試料として本検査に供する場合、概ね2時間以内にCSFおよびASFの検査が完了します(図3)。そのため、従来の検査法でそれぞれ約6時間を要していた両疾病の検査の

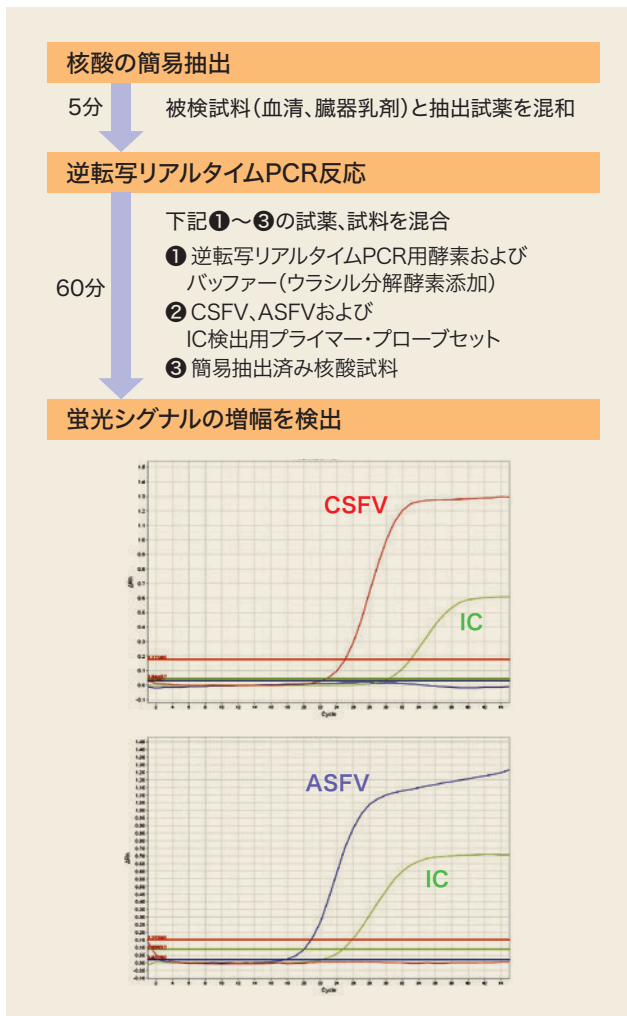


図3 核酸の簡易抽出およびマルチプレックスリアルタイムPCR反応による遺伝子検査法

時間を大幅に短縮できます。被検試料の必要量は $2\mu\text{L}$ と少量なため採材の手間も大幅に軽減でき、大規模、多検体のサーベイランスなどにも適します。また、試料の前処理が簡便なため、検査の迅速化のみならず、交差汚染や検体の取り違えのリスクが低減されます。さらに、検査用試薬にはウラシル分解酵素が添加されており、陽性対照試料などの増幅されたPCR産物の混入による誤判定のリスクも抑えられます。使用するリアルタイムPCR用機器の特性の違いにより2種類の検査用試薬から適切なものが選択できます。製品番号や仕様の詳細についてはタカラバイオ株式会社のHPを参照してください¹²⁾。

開発した遺伝子検査法の性能評価

開発した試薬群を用いた核酸の簡易抽出およびマルチプレックスリアルタイムPCR反応による遺伝子検出検査法(新規検査法)の検出感度および特異度^{*3}をCSFVおよびASFV感染動物、または非感染動物の臨床サンプルを用いて従来法と比較することにより評価しました¹³⁾。日本のCSFV分離株(CSFV/JPN/1/2018株)を実験的に感染させた豚およびイノブタ各2頭から経日的に採取した血清を新規検査法および従来法である核酸抽出精製およびコンベンショナル逆転写PCR法(Vilcekら⁵⁾)に供しました。従来法ではウイルス接種後4日目から接種豚の血清からウイルス遺伝子が検出されましたが、新規検査法ではウイルス接種後3または4日目から検出可能でした。また、実験的にCSFVを感染させた2頭のイノブタでは、従来法ではウイルス接種後5日目から血清中にウイルス遺伝子が検出されましたが、新規検査法では3または4日目から検出が可能でした。このことから、新鮮な血清を検体に用いた場合、新規検査法は従来法よりも早い段階でCSFVを検出できることが示されました。

次に、ASFVアルメニア分離株(Armenia/07)を実験的に感染させた5頭のイノシシ(2頭にウイルスを接種、未接種3頭と同居飼育)から経日的に採取した血清を新規検査法および従来法である精製核酸を用いたリアルタイムPCR法(Kingら¹¹⁾)に供しました。その結果、検査結果は両検査法で完全に一致し、ASFV接種イノシシではウイルス接種後2日目以降、またウイルス非接種の同居イノシシでは、同居開始後7日目以降の血清中にASFV遺伝子が検出されました。

これらの実験に加えて、実験感染個体および各都府県でCSFVおよびASFVの病性鑑定に供された計114頭の豚およびイノシシの血清および臓器乳剤(扁桃、脾臓、腎臓、腸管膜リンパ)計200検体(血清:144、臓器乳剤:56)を用いて新規検査法の検出感度と特異度を評価しました(表1)。その結果、血清試料を用いた場合のASFVおよびCSFV検出感度は、それぞれ100%および98.6%、特異度はそれぞれ97.1%および91.9%でした。一方、臓器乳剤試料を用いた場合のASFVおよびCSFVの検出感度および特異度は、いずれも100%でした。以上のことから、本検査法はCSFVおよびASFVを高い精度で検出できることが明らかとなりました。

本検査を実施する上で留意すべき点として、特に死亡個体から採取された試料を用いる場合には、溶血により被検試料が強い色調を帯びたり、腐敗により濁度が高まることで、蛍光シグナルの検出に阻害が見られる可能性があることが挙げられます。このような検体については、色味の影響が抑えられる程度まで検体を適度に希釈する

表1 開発したCSFVおよびASFV遺伝子検出検査リアルタイムPCR法の検出感度および特異度の評価

血清試料			新規検査法(核酸の簡易抽出およびマルチプレックスリアルタイムPCR)				検出感度	特異度
			ASFV 陽性		ASFV 陰性			
			イノシシ	豚	イノシシ	豚		
ASFV検出従来法	核酸抽出精製+リアルタイムPCR	陽性	8	9	0	1	100% (18/18)	97.1% (34/35)
		陰性	0	1	29	5		
			CSFV 陽性		CSFV 陰性		検出感度	特異度
			イノシシ	豚	イノシシ	豚		
			CSFV検出従来法	核酸抽出精製+コンベンショナル逆転写PCR	陽性	36		
陰性	2	1			27	7		

臓器乳剤			新規検査法(核酸の簡易抽出およびマルチプレックスリアルタイムPCR)				検出感度	特異度
			ASFV 陽性		ASFV 陰性			
			イノシシ	豚	イノシシ	豚		
ASFV検出従来法	核酸抽出精製+リアルタイムPCR	陽性	9	14	0	0	100% (23/23)	100% (12/12)
		陰性	0	0	0	12		
			CSFV 陽性		CSFV 陰性		検出感度	特異度
			イノシシ	豚	イノシシ	豚		
			CSFV検出従来法	核酸抽出精製+コンベンショナル逆転写PCR	陽性	14		
陰性	0	0			0	12		

(タカラバイオ株式会社の手順書に詳細が記載)か、適切なキットなどを用いて核酸を精製した後に再度本検査に供する、といった対応をすることで改善される場合があります。また、可能であれば溶血や混濁のない新鮮な血清を改めて採取し直して検査に用いることが推奨されます。

おわりに

今回我々が新たに開発した検査法は、国が定める防疫指針の診断マニュアルに記載される「遺伝子検出検査」に活用できるだけでなく、簡便で迅速にウイルス遺伝子を検出できることから、従来のPCR法に代わる検査技術として、国や都道府県の病性鑑定施設での利用を通じて国内への侵入が懸念されるASFの侵入防止や早期摘発、CSFVの効率的な検査ならびに防疫措置の実施に貢献するものと期待されます。

(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)

付記:本稿で記載された研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「安全な農畜水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業(官民・国際連携によるASFワクチン開発の加速化)」(JPJ008617.20319736)の研究成果です。本検査法の開発ならびに製品化はタカラバイオ株式会社との共同研究、研究試料は都道府県の家畜保健衛生所からの提供を受け実施されました。

用語解説

- ※1 PCR 遺伝子検査法の一つでpolymerase chain reaction法の略称。標的とする遺伝子領域を挟むように一組の短い一本鎖DNA(プライマー)を設計し、これを起点にして耐熱性のDNA合成酵素を反復して作用させることにより標的遺伝子を試験管内で合成、増幅する。
- ※2 検出感度 検査において、陽性と判定されるべきものを正しく陽性と判定

する確率。

- ※3 特異度 検査において、陰性のものを正しく陰性と判定する確率。

参考文献

- 農林水産省.
<https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/csf/domestic.html>
(参照 2024-2-19)
- Blome, S. et al. (2013) Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar. *Virus Research*, vol.173(1), 122-130.
- Tautz, N. et al. (2015) The molecular biology of pestiviruses. *Advances in Virus Research*, vol.93, 47-160.
- Liess, B. and Moennig, V. (1990) Ruminant pestivirus infection in pigs. *Revue Scientifique et Technique*, vol.9(1), 151-161.
- Vilcek, S. et al. (1994) Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Archives of Virology*, vol.136(3-4), 309-323.
- Hoffmann, B. et al. (2005) Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *Journal of Virological Methods*, vol.130(1-2), 36-44.
- Alonso, C. et al. (2018) ICTV virus taxonomy profile: Asfarviridae. *Journal of General Virology*, vol.99(5), 613-614.
- 国際獣疫事務局.
https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.08.01_ASF.pdf (参照 2024-2-19)
- Yamada, M. et al. (2021) Experimental infection of pigs with different doses of the African swine fever virus Armenia 07 strain by intramuscular injection and direct contact. *Journal of Veterinary Medical Science*, vol.82(12), 1835-1845.
- Kameyama, K. 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.
- King, D.P. et al. (2003) Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *Journal of Virological Methods*, vol.107(1), 53-61.
- タカラバイオ株式会社.
https://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?catcd=B1000711&subcatcd=B1000787&unitid=U100009519
(参照 2024-2-19)
- Nishi, T. et al. (2022) Establishment of a direct PCR assay for simultaneous differential diagnosis of African swine fever and classical swine fever using crude tissue samples. *Viruses*, vol.14(3), 498.
<https://doi.org/10.3390/v14030498>

アフリカ豚熱ウイルスを効率よく増殖できる細胞培養系の確立

舂甚 賢大郎

MASUJIN Kentaro

はじめに

アフリカ豚熱(African swine fever、以下ASF)は、国境を越えてまん延し、発生国の経済および食料の安全保障に重要な影響を持ち、その防疫には国際的な協力が必要となる疾病と定義される「越境性家畜感染症」の一つです。わが国において特定家畜伝染病に指定されています¹⁾。ASFは、アフリカ豚熱ウイルス(African swine fever virus、以下ASFV)が感受性動物である豚およびイノシシに感染することで引き起こされるウイルス性の疾病です。ASFの臨床症状は多様ですが、最も認められる臨床症状は急性型です。急性型の症状の特徴として、42°C前後の持続的な高熱、食欲不振、元気消失が観察され、発症から7日前後ではほぼ100%死亡します。感染豚の体内病変として、脾臓の腫大および黒色化、内臓リンパ節の出血性病変が認められます²⁾。ASFの防疫には、ウイルスの早期検知と感染豚の摘発淘汰が重要となっています。

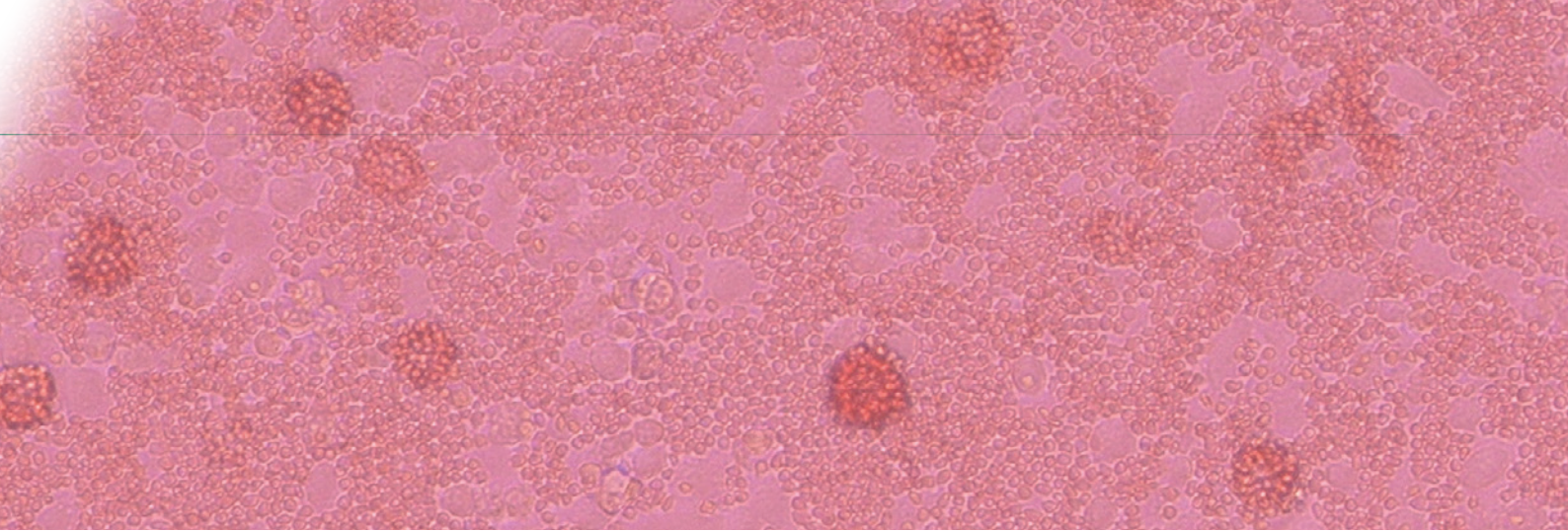
アフリカ常在の疾病であったASFは、2007年ヨーロッパに越境しました。これまでに、ヨーロッパ27カ国・地域、アジア・オセアニア19カ国・地域、南北アメリカ2カ国・地域でその発生が確認されています。ASFの発生は、養豚業界と発生国の経済に甚大な被害をもらしています³⁾。この世界規模でのASFのまん延の理由に未だ有効かつ安全なワクチンが開発・実用化されていないことがあります。日本でのASFの発生は確認されていませんが、中国、韓国をはじめとする近隣のアジア諸国でその発生は続いています。ASFはわが国への侵入を最も警戒すべき豚疾病となっています。

ASFの病原体であるASFVは、豚およびイノシシの体内に侵入すると単球^{*1}やマクロファージ^{*2}などの免疫に関わる細胞に感染して増殖します。そのためASFの診断や研究

には、豚から採取したマクロファージ初代培養細胞が用いられています。しかしながら、豚マクロファージ初代培養細胞は、不死化細胞とは異なり生体外で安定的に培養することが難しくかつ増殖しません。一方で、他のウイルス疾病に目を向けると、各々のウイルスを効率よく増殖できる不死化細胞株を基盤とするウイルス細胞培養系が確立されており、実験室内でウイルスを容易に増殖させることが可能となっています。それらは診断、研究およびワクチン開発にと広く利用されています。ASF研究およびワクチン開発を加速させるためにも、ASFVに高感受性かつウイルスの増殖効率に優れた不死化細胞株を基盤とするASFV細胞培養系の確立が強く求められています。本稿では、我々が新たに確立したASFV細胞培養系について紹介します。

不死化細胞株の探索

ASFVに容易に感染し、かつウイルスの増殖効率に優れた不死化細胞株を見出すことを目的に国内外の研究機関および細胞バンクから複数の細胞株を導入し、それらの細胞株を用いてASFVの感染試験を実施しました。しかしながら、導入した細胞株に優れた成績は得られず、新たな不死化細胞株の樹立を模索していました。同時期に農研機構 生物機能利用研究部門 動物モデル開発グループは、豚の腎臓から回収したマクロファージ様細胞に細胞の不死化を誘導する複数の遺伝子を導入・発現させることで、増殖能力のある継代培養が可能で不死化豚腎マクロファージ由来細胞株(IPKM)の樹立に成功しました⁴⁾。当該細胞株はマクロファージ細胞に特異的に認められる分化マーカーが発現しているだけでなく、その他の性状もマクロファージ初代培養細胞に非常に類似した細胞株であることがわかりました。我々は、図らずも同機構内で樹



立された不死化細胞株にその可能性を見出し、IPKM細胞を基盤とするASFV細胞培養系の確立を目指しました。

IPKM細胞株のASFVに対する特性評価

IPKM細胞株がASFV細胞培養系の基盤となる細胞株になり得るかを判断するため、IPKM細胞株のASFVに対する感受性、ウイルス増殖効率およびその他の特性について解析しました。

1 ASFV感受性

IPKM細胞株にウイルス毒性の高い流行株を含めた野外発生の強毒ASFV株とウイルス毒性の低い弱毒ASFV株をそれぞれ接種することで、IPKM細胞株のASFVに対する感受性を調べました。その結果、IPKM細胞の細胞質内にASFV感染時に認められるASFV抗原が検出されました(図1)。IPKM細胞株は、強毒株・弱毒株の両ASFV株に感受性を示すことが明らかになりました。

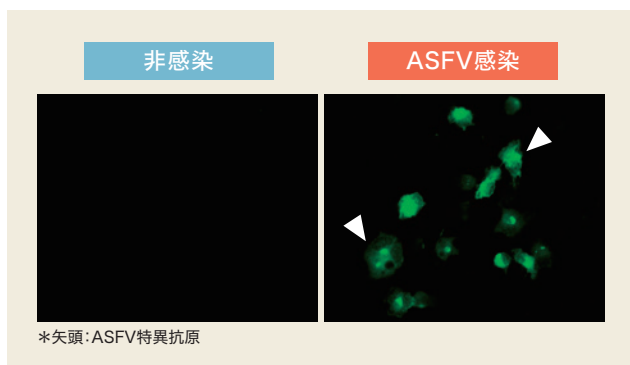


図1 ASFV抗原の検出

2 HAD反応、CPE判定

豚マクロファージ初代培養細胞にASFVの接種と同時

に豚より採取した赤血球を添加するとASFV感染時に特異的な血球吸着(Hemadsorption、以下HAD)反応が認められます。また、感染末期には細胞形状が変化する細胞変性効果(Cytopathic effect、以下CPE)を伴いながら豚マクロファージ初代培養細胞は死滅します。IPKM細胞株においてもHAD反応およびCPEが認められるかを調べました。その結果、IPKM細胞株は豚マクロファージ初代培養細胞と同様にHAD反応を示し(図2)、明瞭なCPEを伴いながら死滅しました(図3)。IPKM細胞株の特徴として、当該細胞株は単層のシート状に増殖します。この特性を活かしたプラークアッセイ法^{※3}を試みたところ、

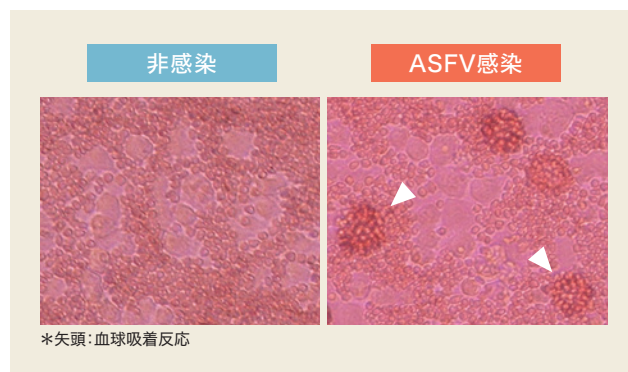


図2 血球吸着反応(HAD)

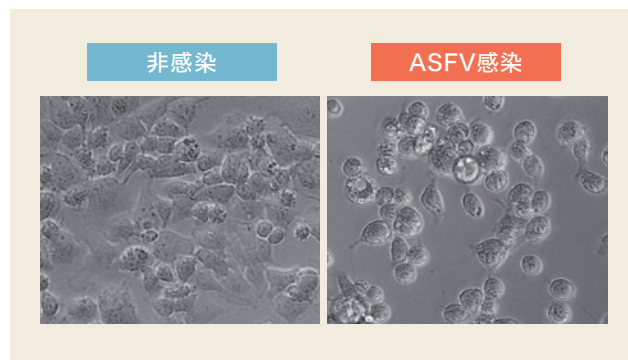


図3 細胞変性効果(CPE)

増殖能力がなく細胞間の密着性に乏しい豚マクロファージ初代培養細胞を用いた場合よりも明瞭なプラークの形成が確認されました(図4)。

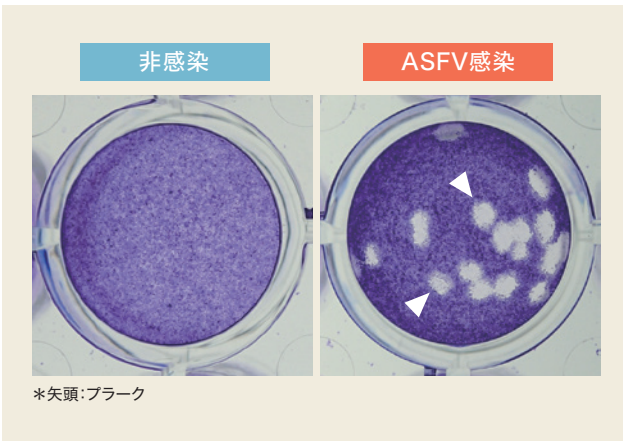


図4 プラーク形成

3 ウイルス増殖効率

IPKM細胞株のウイルス増殖効率を豚マクロファージ初代培養細胞と比較しました。IPKM細胞株は豚マクロファージ初代培養細胞と同等程度あるいはそれ以上の効率で強毒ASFV株および弱毒ASFV株を増殖させることが明らかとなりました(図5)。また、強毒ASFV株をIPKM細胞株で15代連続継代してもASFVゲノムに高頻度での塩基置換、大きな欠損および挿入はなく、ウイルスの性状

にも変化は認められませんでした。以上のことから、IPKM細胞株は、ASFV細胞培養系の基盤となる不死化細胞株として非常に適しており、豚マクロファージ初代培養細胞とは異なる優れた特性をもつ細胞株であることがわかりました⁵⁾。

ASFV細胞培養系

これまでに豚およびイノシシ由来の不死化細胞を基盤とするASFV細胞培養系はいくつか確立されています。しかし、それらの培養系で用いられている不死化細胞株は、野外発生の弱毒ASFV株に感受性を示すが、流行株を含めた野外発生の強毒ASFV株への感受性がない、またはウイルス増殖効率が非常に低いなどASFV細胞培養系の基盤となる不死化細胞としてはいくつかの問題がありました。我々は、IPKM細胞株を基盤とする新規のASFV細胞培養系の確立に成功しました⁶⁾。確立したIPKM細胞株を基盤とするASFV細胞培養系は、強毒ASFV株および弱毒ASFV株の両株に感受性を示し、ウイルス増殖効率も豚マクロファージ初代培養細胞と同等程度またはそれ以上です。本ASFV細胞培養系は、ASFVを大量にかつその性状を変化させることなく増幅できる優れたASFV培養細胞系と言えます。

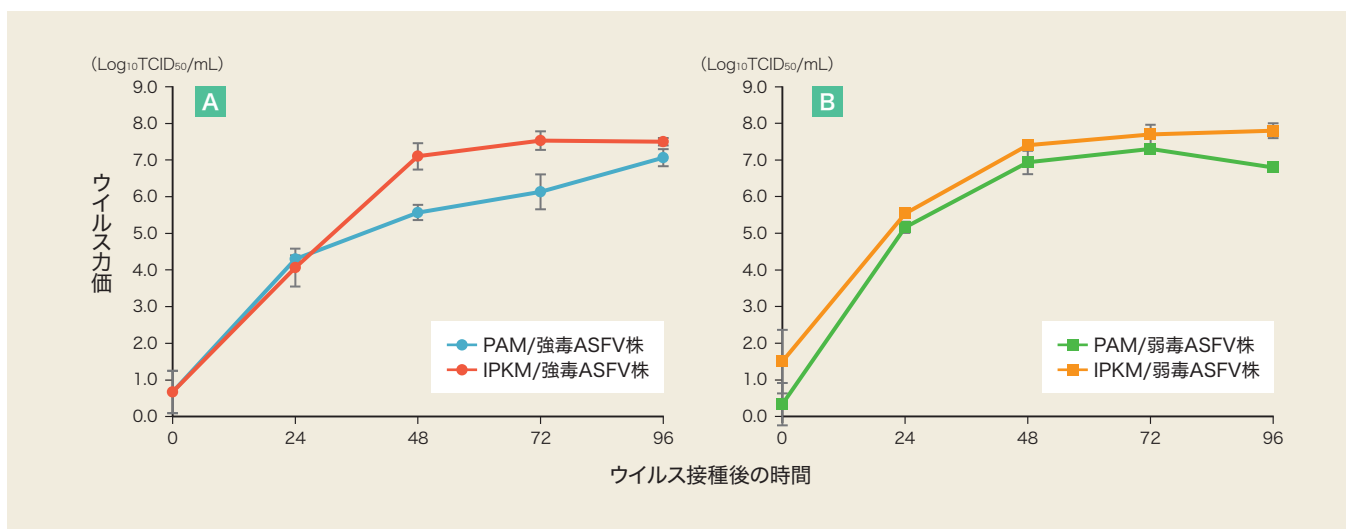


図5 豚肺胞マクロファージ初代培養細胞(PAM)とIPKM細胞株におけるウイルス増殖曲線
A 強毒ASFV株 B 弱毒ASFV株

新規ASFV細胞培養系と その有用性について

我々が新たに確立したASFV細胞培養系は、ASFVに高感受性で、明瞭なHAD反応、CPEおよびプラーク形成が認められます。この特性は、ASFの診断ツールになり得る適性を満たしています。これまでに我々は、本ASFV細胞培養系を用いることで旅客携帯品として海外から持ち込まれ空港にて取去された輸入禁止の豚肉加工品からASFVの分離に成功しています⁷⁾。本ASFV細胞培養系は、豚マクロファージ初代培養細胞を基盤とする現行のASFV細胞培養系に代わりASF診断の現場で広く利用されることが期待されます。

2007年以降のASFのヨーロッパでの流行を受けて、ASFワクチンの開発が世界各国で進められています。現在、最も期待されるASFワクチン候補として、ASFVの増殖、ウイルス複製およびウイルス毒性に関わる遺伝子を欠損させ人工的に弱毒化した遺伝子組換え弱毒ASFV株をシードウイルスとする遺伝子組換え生ワクチン^{※4)}が考えられています。遺伝子組換え弱毒ASFV株の増殖には、豚マクロファージ初代培養細胞を基盤とするASFV細胞培養系が広く用いられています。しかし、初代細胞は豚から採取する必要があり、1度に回収できる細胞数にも限りがあるため、動物福祉およびコスト面で問題が生じています。また、その生存率や品質にはばらつきがあり、遺伝子組換え弱毒ASFV株の安定かつ効率的な増殖の妨げになっています。不死化細胞であり、容易に試験管内で増殖するIPKM細胞株を基盤とするASFV細胞培養系を遺伝子組換え弱毒ASFV株の増殖に用いれば、均一の条件下で繰り返しの検討が可能となり、マクロファージ初代培養細胞を使用することで生じていた問題を解決できるだけでなく、効率面でも大幅な向上が期待できます。また、豚マクロファージ初代培養細胞を基盤とするASFV細胞培養系をワクチン開発に用いるリスクとして、マクロファージ初代細胞採取用の豚が予期せぬ病原体に感染している可能性があります。IPKM細胞株は管理された環境下で無菌的に培養されることから、生体由来の病原体が混入する心配もなく安全性にも優れています。もし、有効なワクチン候補株が開発された場合には、本ASFV細胞培養系は生体由来の病原体の混入なくASFワクチンを大量に安定して製造することに大いに活躍することが期待されます。

おわりに

ASFVの起源やその生態は未だ多くの謎に包まれたままです。我々が確立したASFV細胞培養系は、ASFVの病原因子の同定やASFVの性状解析など基礎研究分野で大きく貢献することが期待されます。農研機構内の部門間連携により確立された本技術が広く活用されASF防疫対策の一助になることを期待しています。

(動物衛生研究部門 越境性家畜感染症研究領域
海外病グループ)

用語解説

- ※1 **単球** 白血球の1種。体内に侵入した異物を捕食して分解する。また分解した一部を細胞表面に提示することで抗体の産生を促す役割も果たす。
- ※2 **マクロファージ** 白血球の1種。体内に侵入した異物を捕食して分解する役割を果たす。
- ※3 **フラクアッセイ法** シート上に培養した細胞にウイルスを接種した後、寒天ゲルで被い培養する。寒天ゲル下でのウイルス感染は近接する細胞のみに限定されウイルス感染による細胞の形状変化(細胞変性効果)が同心円状に広がり小斑点として表れる。
- ※4 **生ワクチン** 毒性や感染力を弱めたウイルスや細菌をワクチンとして用いる。

参考文献

- 1) アフリカ豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針(2020年7月1日農林水産大臣公表。2021年10月1日一部変更)。
https://www.maff.go.jp/j/syoutan/douei/katiku_yobo/k_bousi/attach/pdf/index-13.pdf
- 2) 農研機構 動物衛生研究部門(2020) 疾病情報 ASF(アフリカ豚熱)。
<https://www.naro.go.jp/laboratory/niah/asf/index.html>
- 3) 農林水産省 消費・安全局 動物衛生課(2023) アフリカ豚熱について。
<https://www.maff.go.jp/j/syoutan/douei/asf.html>
- 4) Takenouchi, T. et al. (2017) Immortalization and characterization of porcine macrophages that had been transduced with lentiviral vector encoding the SV40 large T antigen and porcine telomerase reverse transcriptase. *Frontiers in Veterinary Science*, 4, 132.
- 5) Masujin, K. et al. (2021) An immortalized porcine macrophage cell line competent for the isolation of African swine fever virus. *Scientific Reports*, 11, 4759.
- 6) 舛基賢太郎ら(2021) アフリカ豚熱ウイルスが効率よく増殖できる豚腎由来不死化マクロファージ細胞。農研機構 研究成果情報。
https://www.naro.go.jp/project/results/5th_laboratory/niah/2021/niah21_s10.html
- 7) Kameyama, K. et al. (2022) Usability of immortalized porcine kidney macrophage cultures for the isolation of ASFV without affecting virulence. *Viruses*, 14(8), 1794.

豚の抗病性を向上させる DNAマーカー

上西 博英

UENISHI Hirohide

はじめに

豚では多くの感染症が生産性を低下させる要因となっており、養豚経営上の大きな問題となっています。感染症のいくつかは、家畜伝染予防法において指定伝染病として、防疫上の対策が必要です。感染症への対策としての抗菌剤の使用は、薬剤耐性菌の出現リスクの問題から制限する方向にあり、豚自身の遺伝的な抗病性の改良による生産性の改善が生産現場において強く求められているところです。農研機構では、これまでに豚の感染症抵抗性、すなわち抗病性との関連を示すいくつかの遺伝子配列の違い(多型)を明らかにしてきました。これらの多型の、豚の遺伝的抗病性改良の指標(DNAマーカー)としての活用について紹介します。

豚における遺伝的な抗病性の改善

豚の感染症としては、2018年に26年振りに国内に侵入し、被害額が2,153億円とも推定される豚熱(CSF)や、海外で猛威を振るい、国内への侵入が懸念されているアフリカ豚熱(ASF)があります。一方、国内でかつてより広範囲での感染が確認されており、養豚経営に大きな影響を与えている感染症として、豚繁殖・呼吸障害症候群や、マイコプラズマ性肺炎、豚胸膜肺炎などが存在します。これらの感染症は、複数の病原体に同時に感染すること(いわゆる複合感染)でより重篤化することが多く、例えば、豚サーコウイルス2型(PCV2)の感染により、他のウイルスや細菌などへの感染が起こり重症化することも知られています。

家畜の感染症対策として、ワクチンや抗菌剤などが使用されていますが、必ずしもすべての病原体に対してワクチンが効果的ではなく、また病原体の変異などによるワクチンの効果の低下の問題もあります。抗菌剤については、薬剤耐性菌の出現についての懸念が存在し、国内外で使用の制限が図られているところです。これらのことから、第三のアプローチとしての家畜自身の遺伝的な抗病性の向上が求められています。

病原体認識に影響する遺伝子の配列の違い(多型)

病原体の動物体内への侵入は、免疫細胞により検知されます。特に、パターン認識受容体と呼ばれる一群の分子は、病原体に由来する特異的な分子の「パターン」(pathogen associated molecular pattern、以下PAMP)を認識し、感染初期における免疫系の活性化において大きな役割を果たしています(図1)。脊椎動物においては、抗体やT細胞受容体など、遺伝子そのものを変化させて様々な病原体に対してフレキシブルに対応することが可能な「獲得免疫系」が存在しますが、PAMPに対応できるように用意されたパターン認識受容体は、非特異的

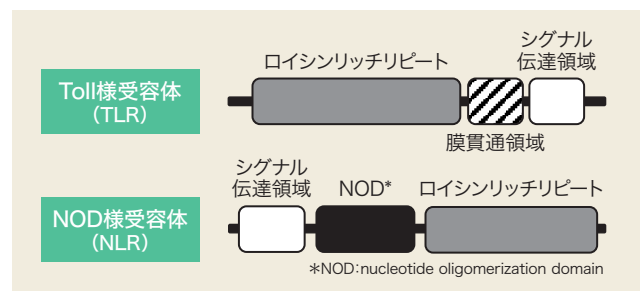


図1 パターン認識受容体の構造の概略図

特に主要なTLRおよびNLRについて示しています。TLRおよびNLRにおいては、ロイシンリッチリピートと呼ばれる特定のアミノ酸(ロイシン)を多く含む繰り返し部分が病原体由来の物質の認識に関わっています。物質の認識後に他の分子にシグナルを伝える領域も存在しています。TLRは細胞膜や細胞内の小胞の膜を貫通する形で存在し、NLRは細胞質内に存在します。



に、かつ迅速に反応する自然免疫系と呼ばれるあらかじめ用意された免疫応答のシステムの中でも重要な位置を占めるもので、獲得免疫系のシステムの効率的な発動にも関わっています。

パターン認識受容体をコードする遺伝子の多型は、ヒトやマウスを対象としたこれまでの研究から、PAMPの認識や、PAMP認識の後の細胞内のシグナル伝達などに影響し、病原体由来の物質への応答や、感染症への感受性を左右する可能性があることが知られています¹⁾。

農研機構は、国際共同研究による豚ゲノム解析に参画するとともに、その結果を活用し、農場で飼育されている豚で、豚のパターン認識受容体のPAMP認識に関連する部分の遺伝子の配列の違い(塩基置換)を数多く発見して

います²⁾。それらの塩基置換を再現した遺伝子を細胞に導入することで、病原体認識などの機能に影響を与えるものもいくつか見出しており、豚の抗病性改善のためのDNAマーカーとしての活用の可能性が期待されました³⁾⁴⁾(図2)。

遺伝子多型の豚の疾患感受性への影響

豚の免疫系遺伝子の多型が、実験室内での効果だけでなく、実際に個体としての豚で感染症の感受性への関与を確認することが、豚の抗病性改良のためのDNAマーカーとして有用性を示す上で極めて重要です。農研機構では、PCV2と他の細菌の複合感染によるとみられる死亡例が多発した豚群において、パターン認識受容体の一つであり、細菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンの分子構造を認識するNOD2(nucleotide binding oligomerization domain containing 2)をコードする遺伝子の2197番目(通常はアデニン(A))がシトシン(C)となるもの(NOD2-2197C)を持つ離乳後の子豚が、有意に死亡率が下がることを見出しています(図3)。NOD2-2197Cは、ペプチドグリカンの認識能力が向上していることが判明していますが³⁾、NOD2-2197Cを持つ子豚は、PCV2強毒株が農場でまん延している状況下では、そうでない場合と比較して成長が速いこともわかり、NOD2-2197の抗病性向上のためのDNAマーカーとしての有用性が示されました⁵⁾。その他、マイコプラズマ性肺炎や豚胸膜肺炎といった呼吸器系の感染症が流行している一般農場において、NOD2-2197Cを保有することにより、豚胸膜肺炎の重篤化が抑制されました(図4)。一方、細菌のべん毛タンパク質を認識するTLR5(toll like receptor 5)をコードする遺伝子の1205番目(通常はシトシン(C))が

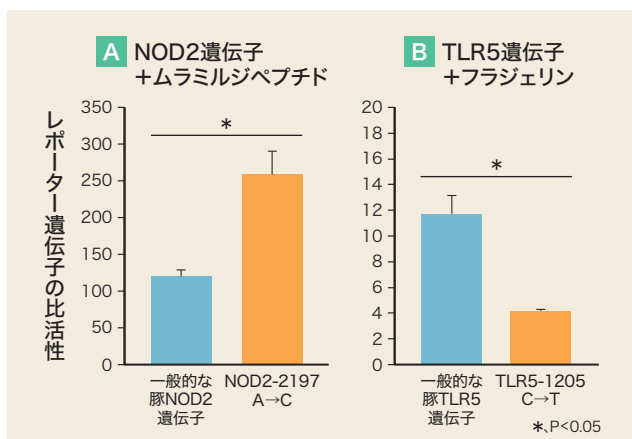


図2 豚のパターン認識受容体遺伝子の多型が病原体由来物質の認識に影響を与える例

豚で一般的に見られる遺伝型のパターン認識受容体遺伝子について、一部の豚で観察される塩基に入れ替えた場合、病原体由来物質の認識に影響を与えるかどうかを調べています。調べたい塩基を入れ替えたパターン認識受容体遺伝子を、病原体由来の物質を認識すると活性化させる遺伝子(レポーター遺伝子)とともにヒト培養細胞に導入し、レポーター遺伝子の働きを測定して塩基置換の影響を調べます。エラーバーは標準誤差を示しています。
A NOD2遺伝子の2197番目がアデニン(A)からシトシン(C)に変わると、細菌由来の細胞壁を構成するペプチドグリカンの中の重要な構造であるムラムリジペプチドに対する応答が上昇します³⁾。
B TLR5遺伝子の1205番目がシトシン(C)からチミン(T)に変わると、細菌のべん毛を構成するタンパク質(フラジェリン)に対する応答が低下します⁴⁾。

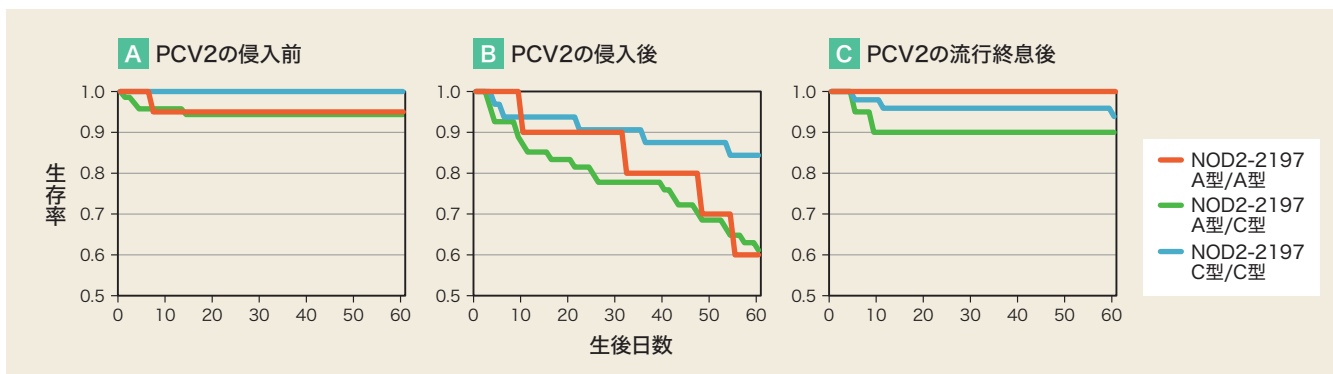


図3 強毒型の豚サーコウイルス2型(PCV2)の侵入に伴って多発した豚の死亡例とNOD2-2197の遺伝型との関連性⁵⁾
 1頭の豚は父親・母親それぞれから2つのNOD2遺伝子を受け継いでいます。PCV2の侵入前 **A**、PCV2の流行終息後 **C**にはNOD2-2197の遺伝型は特に影響を及ぼしていないようですが、PCV2侵入後 **B**には、特に離乳後(およそ生後30日目以降)においてNOD2-2197が2つともC型(変異型)を保有する豚が他の遺伝型と比較して生存率が上昇していることが確認されました(P<0.05)。

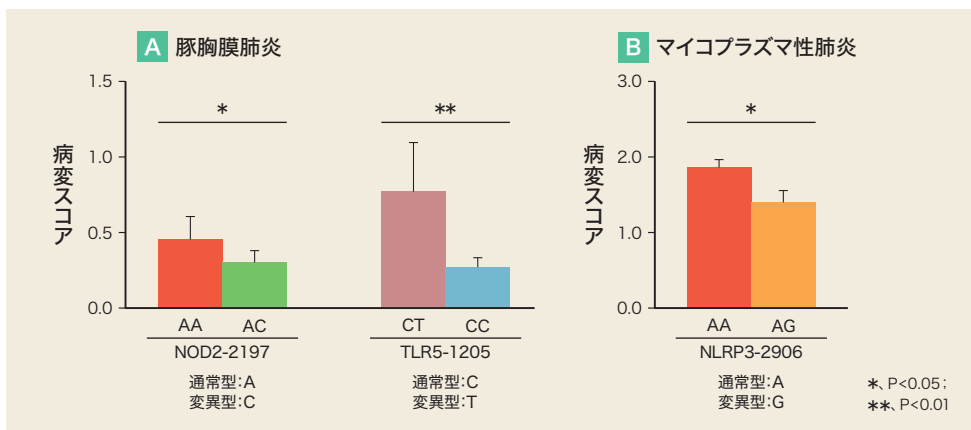


図4 豚の呼吸器感染症の重篤度と抗病性改良DNAマーカーの遺伝型の関連性
 疾患がはっきり確認された農場由来の豚のと場での肺の病変の程度(病変スコア)との関連を示しています。病原体からの刺激がより入りやすい遺伝型(NOD2-2197C、TLR5-1205CあるいはNLRP3-2906G)を持つ豚では、病変が少なくなっていることがわかります⁶⁾。エラーバーは標準誤差を示しています。
A 豚胸膜肺炎(病変スコア:最小0→最大4)とNOD2-2197、TLR5-1205の遺伝型との有意な関連性が確認されました。
B マイコプラズマ性肺炎(病変スコア:最小0→最大4.09)とNLRP3-2906の遺伝型との有意な関連性が確認されました。

チミン(T)となり、べん毛タンパク質認識能が低下するもの(TLR5-1205T)を持つ豚においては、豚胸膜肺炎が同様に重症化する傾向がありました。また、生体内での炎症反応に関わるNLRP3(NLR family pyrin domain containing 3)の2906番目(通常はアデニン(A))がグアニン(G)となり、機能が亢進するタイプを持つ豚では、マイコプラズマ性肺炎の症状が軽症化する傾向が観察されました(図4)。これらの遺伝子の効果については、集団内での感染症の症状がより重篤となる農場において顕著に観察されました⁶⁾。TLR5-1205Tを持つ豚については、サルモネラ菌の実験感染において糞便中の菌数の増加や下痢の重症化の傾向が観察されており⁷⁾、またNLRP3-2906Gを持つ豚では、ワクチン接種時の効果の増強についても確認されています⁸⁾。これらのことから、NOD2-2197だけでなく、TLR5-1205やNLRP3-2906についても、豚の抗病性を評価するためのDNAマーカーとして利用できる可能性が高いと考えられました。

豚の抗病性改良DNAマーカーとしての遺伝子多型の活用

ここで取り上げた抗病性改良への寄与が期待されるDNAマーカーについては、豚の新たな集団を作出する際に利用することができます。肉質や成長性などの他の選抜指標と同様に、抗病性改良DNAマーカーを用いて、抗病性に優れていると想定される遺伝型を保有している豚を選抜することで、抗病性の高い豚の生産が可能になるものと考えられます(図5)。岐阜県では、筋肉内脂肪が多く(いわゆる霜降り)、肉質に優れた豚の生産のための種豚集団「ポーブラウ」を作出していますが、CSFで大きな被害を受けた後の集団の復活に当たり、NOD2-2197Cと、さらにPCV2感染で斃死率の低下に寄与することが期待される第13染色体上のゲノム領域の特定遺伝型を導入して⁹⁾、抗病性の向上を図っています。

これらのDNAマーカーについては、豚の品種ごとに多型の割合が異なっていることも知られています。例えば、

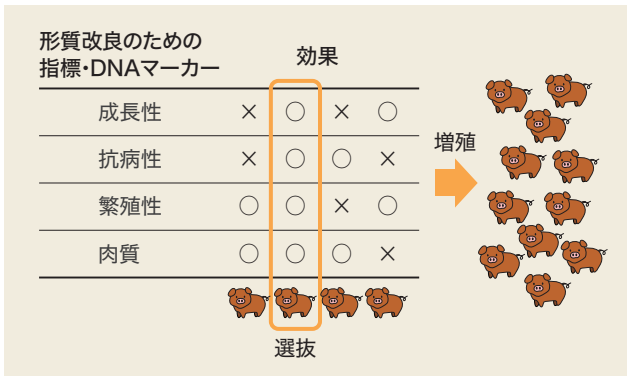


図5 DNAマーカーを用いた抗病性に関する形質の種豚への導入のイメージ
抗病性改良DNAマーカーと併せて、肉質などの他の指標やDNAマーカーで優秀な豚を選抜し増殖します。

表1 抗病性改良DNAマーカーとしての利用が期待できる遺伝子などの多型

遺伝子などの多型	確認されている効果
NOD2-2197(A/C)	C型でペプチドグリカン認識が増強 ³⁾ 。C型にPCV2感染での斃死防止効果 ⁵⁾ 、豚胸膜肺炎抑制効果も確認 ⁶⁾ 。
NOD1-1922(A/G)・2752(A/G)	1922/2752ともにG型でペプチドグリカン認識が増強 ¹¹⁾ 。2752Gはサルモネラ菌の定着抑制に関与しているとの報告 ¹²⁾ 。
NLRP3-2906(A/G)	G型に炎症応答の促進効果 ¹³⁾ 。G型の不活化ワクチン抗体応答増強効果 ⁸⁾ 、マイコプラズマ性肺炎の抑制を確認 ⁶⁾ 。
TLR5-1205(T/C)	T型でべん毛タンパク質の認識が低下 ⁴⁾ 。C型でサルモネラ菌実験感染による下痢抑制 ⁷⁾ 、豚胸膜肺炎抑制効果も確認 ⁶⁾ 。
第13染色体ウイルス抵抗性マーカー(EIR)	PCV2感染による斃死の防止効果を確認 ⁹⁾ 。

TLR5-1205Tについては、国内で供用されている豚品種では、子取り用の雌豚の生産に使用されることの多いランドレース種のみで観察され、その他の品種では海外の一部品種のみに存在すると考えられています¹⁰⁾。現時点で、抗病性改良DNAマーカーとしての利用が期待できると考えられるものについて表1にまとめました。種豚会社や一般養豚農家の方々が、ご自分で保有されている豚において、これらの抗病性改良DNAマーカーの遺伝型を判定するための受託解析についても既に実施されているところ¹⁴⁾です。

今後の展望

これまでに開発した豚の抗病性改良DNAマーカーの多くはパターン認識受容体遺伝子中に存在しています。パターン認識受容体は、比較的広範囲の病原体に対して効果を発揮するものと考えられますが、病原体の種類による

有効性の違いについて今後詳細に検討する必要があります。また、生産性向上への抗病性改良DNAマーカーの寄与についても、今後実証を行っていきたいと考えています。

さらに、疾患感受性を規定する遺伝子多型はほかにも存在が想定され、パターン認識受容体以外の免疫系遺伝子の多型も含めて、さらなる抗病性改良DNAマーカーの開発を進めていくことを計画しています。

(生物機能利用研究部門 生物素材開発研究領域)

用語解説

※1 コード 遺伝子は4種類の塩基を含むDNAによって構成されており、塩基の組み合わせに応じてアミノ酸が選択されタンパク質が組み立てられている。アミノ酸と対応する塩基の配列をコードと呼んでいる。

参考文献

- 1) Skevaki, C. et al. (2015) Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious diseases. *Clinical and Experimental Immunology*, vol.180(2), 165-177.
- 2) Uenishi, H. et al. (2012) Genomic survey of polymorphisms in pattern recognition receptors and their possible relationship to infections in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol.148(1-2), 69-73.
- 3) Jozaki, K. et al. (2009) Influence of polymorphisms in porcine NOD2 on ligand recognition. *Molecular Immunology*, vol.47(2-3), 247-252.
- 4) Shinkai, H. et al. (2011) Porcine Toll-like receptors: recognition of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis and influence of polymorphisms. *Molecular Immunology*, vol.48(9-10), 1114-1120.
- 5) Suzuki, K. et al. (2021) NOD2 genotypes affect the symptoms and mortality in the porcine circovirus 2-spreading pig population. *Genes*, vol.12(9), 1424.
- 6) Suzuki, K. et al. (2022) Polymorphisms in pattern recognition receptor genes are associated with respiratory disease severity in pig farms. *Animals*, vol.12(22), 3163.
- 7) Muneta, Y. et al. (2018) *In vivo* effect of a TLR5 SNP (C1205T) on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in weaned, specific pathogen-free Landrace piglets. *Microbiology and Immunology*, vol.62(6), 380-387.
- 8) Shinkai, H. et al. (2018) Q969R polymorphism in NLRP3 is associated with immune responses to vaccination against bacterial infections in pigs. *Animal Science Journal*, vol.89(8), 1043-1050.
- 9) 特開2021-171055(2021) 豚のウイルス抵抗性の判別方法、およびその利用。上西博英・松本敏美・岡村俊宏・鈴木香澄・吉岡豪・鈴木啓一。
- 10) Muneta, Y. et al. (2012) Allele-specific primer polymerase chain reaction for a single nucleotide polymorphism (C1205T) of swine Toll-like receptor 5 and comparison of the allelic frequency among several pig breeds in Japan and the Czech Republic. *Microbiology and Immunology*, vol.56(6), 385-391.
- 11) Shinkai, H. et al. (2015) Porcine NOD1 polymorphisms with impaired ligand recognition and their distribution in pig populations. *Molecular Immunology*, vol.63(2), 305-311.
- 12) Ainslie-Garcia, M. H. et al. (2018) Single nucleotide variants in innate immune genes associated with *Salmonella* shedding and colonization in swine on commercial farms. *Veterinary Microbiology*, vol.219, 171-177.
- 13) Tohno, M. et al. (2016) Identification of the Q969R gain-of-function polymorphism in the gene encoding porcine NLRP3 and its distribution in pigs of Asian and European origin. *Immunogenetics*, vol.68(9), 693-701.
- 14) 一般社団法人家畜改良事業団 家畜改良技術研究所(2022) 豚の抗病性遺伝子型検査。 http://liaj.or.jp/giken/pig_gntyp_Rdisease.html (参照 2024-2-19)

カイコの遺伝子発現データの 拡張とその利用

横井 翔

YOKOI Kakeru

瀬筒 秀樹

SEZUTSU Hideki



はじめに

カイコは絹糸を生産するための家畜化された昆虫です。卵から^ふ孵化して成虫まで1世代が50～60日かかります。幼虫期間に体長は2～3mmから50～70mmに体重は0.0003から3gに増加します。人間の身長、体重の増加率と比較するといかに増加率が大きいかわかりただけでしよう¹⁾。カイコを飼育して絹糸を生産する産業を養蚕業といいます²⁾が、この養蚕業は明治時代では日本を支える主要産業でした。このため、カイコ・養蚕業における研究開発は明治政府による試験場の設置で端を発し（現在の農研機構につながる組織）活発に行われてきており、農研機構や農研機構の前身の研究所は国内外における主要な研究機関として、長年カイコの研究を進めてきました²⁾。

カイコの研究は、当初は養蚕業に資する研究が主でした。一方、1980年から2000年にカイコの新たな有用性を見出す研究成果があげられました。その中には農研機構の前身である農業生物資源研究所の成果が含まれており、世界で初めてのカイコでの遺伝子組換え技術の開発でした。これら技術の活用によってカイコで有用タンパク質生産（新産業創出）の可能性が見出されました²⁾。具体的には絹糸の構成成分のタンパク質（フィブロインとセリシン）が合成される器官である絹糸腺（**図1**）において、遺伝子組換え技術を用いて、上記のような有用タンパク質をカイコに作らせる技術です。このような「カイコを使った有用タンパク質生産」の技術の普及のためには有用タンパク質の生産性の向上が必要です。このためには、カイコの遺伝子情報やゲノム情報が必要でした。そのため2000年代に農業生物資源研究所が中心機関となって、世界に先駆けてカイコの遺伝子情報やゲノム情報、さらにそれに付随した遺伝子発現情報の取得と整理を行い、これら

の情報をKAIKObaseというデータベースに収録し公開しました³⁾。公開されたカイコのこれらの情報はカイコのみならず、その他の様々な昆虫の研究に利用され、その研究の推進に貢献してきました²⁾。

一方、ゲノムDNAの塩基配列解読をするシーケンサーはここ10～15年で飛躍的に発展しました。これにより、塩基配列解読をするのに必要な費用は2007年に比べて2021年は10万分の1になりました。ヒトゲノムの解読に必要なコストは2007年の1,000万ドルから2021年頃には1,000ドルを切るようになりました²⁾。このようなシーケンス装置の発展を受け、農研機構は2019年に東京大学と国立遺伝学研究所と共同で高精度のカイコゲノム情報を構築しました³⁾。構築したカイコのゲノム情報を活用し、さらに先述の高性能のシーケンサーでRNA-Seq^{*1}を行うことで、特定条件下や様々な組織における個々の遺伝子の網羅的発現量データの取得が可能になりました。今回私たちは、カイコのシルク遺伝子（フィブロインとセリシン）が最も高発現しており、繭形成において重要な時期のカイコ幼虫から、様々な組織を取り出し、これらの組織のRNA-Seqを行い、mRNA配列データ、各組織の網羅的な遺伝子発現量データを得ることができました⁴⁾。これらのデータはサンプルを行った生体や組織の様々な状態を解釈する上で重要なデータとなります。このため、シーケンスに用いるサンプルの信頼性がデータの信頼性を決める一因とも言えます。このような一定の条件下で採取された、かつ信頼性の高いデータセットは、データ駆動型研究^{*2}に利用することが可能であり、従来のアプローチでは解明できなかった新たな知見を得ることが可能になりました。これらの得られた知見をもとに、現在、私たちは、カイコの有用タンパク質生産の社会実装を目標にした研究を進めています。本稿では我々が構築した遺伝子発現



データの特徴とそのデータを用いたデータ駆動型研究の一端をご紹介します。

取得した遺伝子発現データの特徴

今回私たちが取得した遺伝子発現データおよびその関連データは、質・内容、さらにデータ公開の方法などに様々な特徴があります。以下にその特徴を述べます。

1 遺伝子発現を調べた個体や組織について

カイコの一生の中で、シルク遺伝子が高発現しており、繭形成に重要な時期である5齢3日目の3匹の雄幼虫から精巣や絹糸腺(絹糸を合成する器官)を含む主要組織を、同じく3匹の雌幼虫から卵巣をサンプルとして取り出しました。さらに、絹糸腺は、絹糸腺の前部、中部、後部に分け、さらに絹糸腺の中部を3つの部位(中部絹糸腺前部、中部絹糸腺中部、中部絹糸腺後部)に分けてサンプルとして準備しました(図1)。なお、雄由来のすべての組織サンプルは同一の個体から解剖して取り出しました。同一個体由来のサンプルを用意し、サンプル名の番号で対応づけることで、同一個体内での組織間の遺伝子比較が可能になります。これらの取り出したサンプルのRNA-Seqを行いました。

2 mRNA塩基配列データの構築と新規遺伝子の同定

1で得られたRNA-seqデータを以前構築した高精度

のゲノム配列データと組み合わせてデータ解析することによって、51,925種類のmRNAの塩基配列データを構築しました³⁾。これらのデータから、これまで未同定であった新しい遺伝子を同定することに成功しました。また、それぞれの遺伝子からどのようなアミノ酸配列を持つタンパク質が合成されるかを知ることができます。同一の遺伝子でも、転写されるmRNAのバリエーションは複数あります。これらのバリエーションを知ることによって、より詳細にその遺伝子の知見を得ることができます。さらに、これまで配列決定が困難だったセリシン遺伝子群の完全な塩基配列データを得ることができました。セリシン遺伝子群は、そのアミノ酸配列構造から、繰り返し構造が多く、従来のゲノムデータやRNA-Seqデータだけではその遺伝子群の塩基配列を完全に決めることは困難でした。これらの遺伝子のアミノ酸配列構造の知見を得られることによって、従来よりも機能強化された(例えば、伸縮性や強度に優れた)シルクの創出に役に立つと期待されます。

3 信頼性が高い、網羅的遺伝子発現データの取得

1で得られたRNA-Seqデータと2で構築されたmRNA塩基配列データを用いて、全遺伝子の発現量データを上記のサンプル(中腸、卵巣、精巣、脂肪体、マルピーギ管、絹糸腺の6つの部位)において取得することができました。得られた発現量データと、公共データベースで同じ幼虫期サンプルの遺伝子発現量データを再解析して得られた発現量データを用いてそれぞれのサンプルにおける発現プロファイルの類似性を調べました。その結果、異なる個体でも、中部絹糸腺後部と中部絹糸腺中部を除いて、同じ種類のサンプルである場合は非常に発現量のプロファイルが似ていることが明らかになりました(図2)。また公共データベースから再解析したデータと比較すると、今回用意した組織と同一の組織では発現プロ

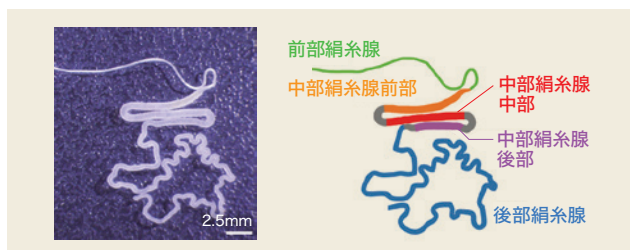


図1 カイコの絹糸腺写真(左)と絹糸腺の各部位の名称を示した図(参考文献3をもとに作成)

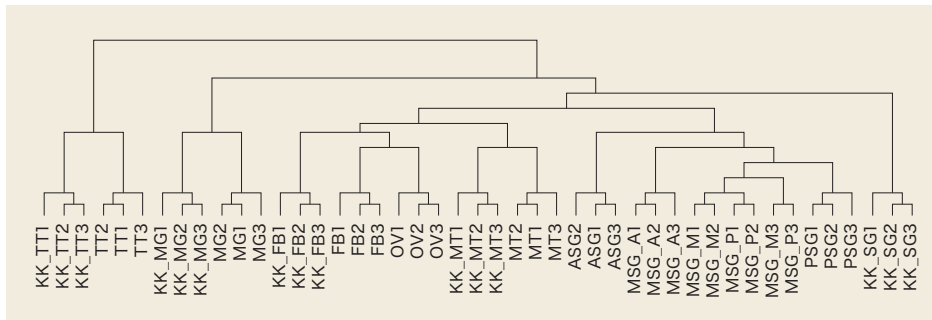


図2

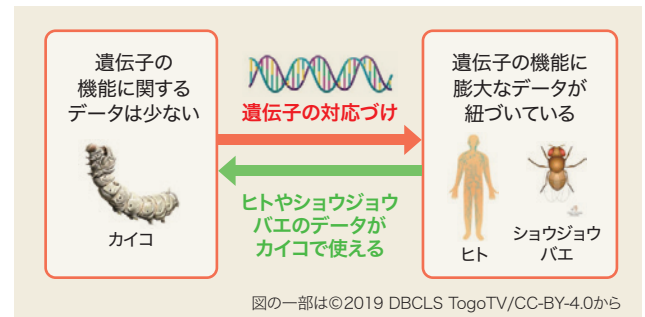
各組織の網羅的遺伝子発現量を比較し、類似しているサンプルが近くに来るように分類した図（参考文献3をもとに作成）

TT: 精巢, MG: 中腸, FB: 脂肪体, OV: 卵巣, MT: マルピーギ管, ASG: 前部絹糸腺, MSG_A: 中部絹糸腺前部, MSG_M: 中部絹糸腺中部, MSG_P: 中部絹糸腺後部, PSG: 後部絹糸腺, SG: 絹糸腺注) KK_が頭にあるサンプルは公共データベースから取得したRNA-Seqを再解析して得られた発現プロファイルを指します。サンプル名の数値はそれぞれの繰り返し実験の反復数を指します。

フィールが似ているということが明らかになりました。これは得られたデータの信頼性が高いことを示しています。

4 ヒトやショウジョウバエの遺伝子との対応づけ (データの連携)

遺伝子関連データ作成において、各々の遺伝子の機能(タンパク質の機能)を予測・付与することはデータ作成の上で重要です。遺伝子機能を付与する場合にはアミノ酸の配列の類似性を利用して付与します。例えば2種類のタンパク質のアミノ酸配列が似ているとその2種類のタンパク質の機能は同じような機能を持つことが知られています。機能が知られているハエの遺伝子Aとカイコの遺伝子Bが類似していた場合はカイコの遺伝子Bの機能は「ハエの遺伝子Aの機能と類似している」と予測しデータに付与します。このような特徴を利用して、公共データベース中に登録されているアミノ酸配列情報を利用して、それぞれの遺伝子と配列類似性が高いタンパク質を検索し、その結果からそれぞれの遺伝子の機能情報の付与を行います。これを機能アノテーションと呼びます。一般的な昆虫の遺伝子データを用いて遺伝子の機能アノテーションを行うと、遺伝子の機能情報が付与される遺伝子の割合が他のよく研究されている生物(例えば、ヒトやショウジョウバエなど)に比べると少なく、それはカイコも例外ではありません。このため、機能情報が付与されていないと、遺伝子発現情報を活用した様々な解析結果を解釈することができません。例えば、絹糸腺で発現が高い遺伝子を取り出してきた場合、それらの遺伝子群の機能が付与されていないと、絹糸腺ではどのような生命現象が起きているか、わかりません。一方、ショウジョウバエやヒトは、これまでの研究結果により膨大な知見やデータがデータベースに蓄積されています。これらの知見はそれぞれの遺伝子に付与されているIDで対応づけされています。2で構築された新規に特定された遺伝子を含むカイコのmRNA配列情報(アミノ酸配列情報)をショウジョウバエやヒトの遺伝子情報と比較して、



図の一部は©2019 DBCLS TogoTV/CC-BY-4.0から

図3 カイコ遺伝子とヒト、ショウジョウバエの遺伝子の対応づけ

対応づけを行い、カイコの遺伝子にショウジョウバエやヒトのデータに関連づけしました(図3)。塩基配列データは基本的に4種類の塩基で構成されており、アミノ酸配列も20種類のアミノ酸配列で構成されているので、異なる生物間でも比較することができます。このようにして、紐づけされた遺伝子の機能に関するデータと3で得られた網羅的な遺伝子発現量データを利用した例を紹介します。網羅的発現量データを利用して、前部絹糸腺で特に強く発現している遺伝子を集めて、その機能をヒトの遺伝子に置き換えることによって、前部絹糸腺ではシルクタンパク質が合成されている時にどのような生命現象が起きているかを調べることができました。解析の結果、生物のエネルギー源となる炭水化物の代謝に関わる遺伝子が強く働いていることが明らかになりました。得られた結果から、遺伝子組換え技術などによって炭水化物代謝を活性化させることで、シルクの生産性が向上する可能性を明らかにしました。

5 全関連データの公開(誰でも再利用可能に)

1から4で得られたすべてのデータは公共のデータベースに公開されています。この他の解析の際の関連ファイルもすべて公式のデータレポジトリに公開しており、原著論文経由で、誰でも再利用が可能です⁴⁾。一方、高度なデータ解析技術を持たなくても、遺伝子発現量データの中の特定の遺伝子の発現量を利用したいという需要はあると思われます。これらの需要に応えるため、農研機構が

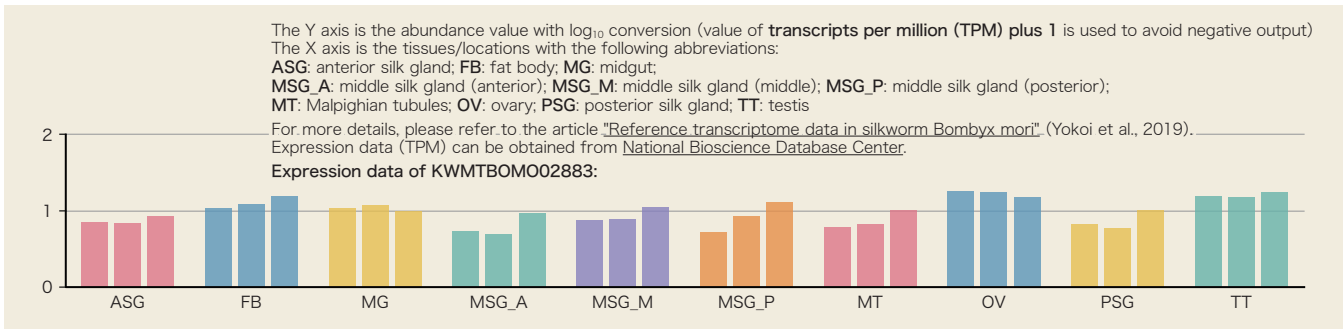


図4 KAIKObaseで利用可能な、遺伝子の組織別発現量を表示したグラフ

公開しているカイコゲノムデータベースKAIKObaseに公開データの一部(mRNA配列データと発現量データ)を収録し、データの検索・利用を可能にしています⁵⁾⁶⁾。KAIKObaseではキーワード検索などで遺伝子を検索し、その遺伝子の組織別の発現量を調べることが可能です(図4)。詳細に関してはKAIKObaseのページを参照してください。

取得した遺伝子発現データを使った データ駆動型研究の実施

以上ご紹介した遺伝子発現データを用いたデータ駆動型研究によって、新たな生物学的な知見を得ることができます。現在、私たちは、カイコによる有用タンパク質産生の社会実装を目指しており、そのためには繭の収量や有用タンパク質の産生量を高めたカイコを作成する必要があります。繭の収量などを高めるためには遺伝子改変などの技術によってシルク遺伝子の発現を上昇させることが重要です。つまり、シルク遺伝子の発現を調節している遺伝子を同定し、遺伝子改変を行うことで、シルク遺伝子の発現が上昇することが、期待されます。私たちは未知のシルク遺伝子の発現を調節する遺伝子を同定するため、先ほどの組織別の網羅的遺伝子発現量データを使って探索しました。一般的にお互いに相互作用する遺伝子は、その発現プロフィールも似ていると言われています。つまり、シルク遺伝子と似た発現プロフィールを持つ遺伝子をデータ駆動型研究で探し出せばよいわけです。本項では詳細は省略しますが、データ駆動型研究によって、シルク遺伝子と発現プロフィールが類似している遺伝子を同定し、さらに遺伝子の発現調節に関わっていると機能予測された91種類の遺伝子を候補遺伝子としました⁷⁾。さらにこの91種類の遺伝子のさらに詳細な遺伝子発現量を調べた結果13種類まで絞り込むことができました。現

在、この13種類の遺伝子が実際にシルク遺伝子の発現量調節に関与しているかを調査しています。

おわりに

現在、世界では急速にDX(デジタルトランスフォーメーション)化が進んでいると言われ、大量のデータが産生され、これらのデータを使って解析を行うことによって、新しい知見・技術が得られ、世の中の生活を変えていると言われています。生物学の分野も例外ではありません。今回の成果のように、これまでの手法では明らかにできなかった知見を得て、その知見をもとに、農業に貢献できる研究成果を発表していきたいと考えております。

(生物機能利用研究部門 昆虫利用技術研究領域
 昆虫デザイン技術グループ)
 (生物機能利用研究部門 絹糸昆虫高度利用研究領域)

用語解説

- ※1 **RNA-Seq** 生体内から取り出したRNAの塩基配列を決める手法。この手法で生み出されたデータを解析して、取り出した生体内でどのような遺伝子が働いているか(発現しているか)を網羅的に調べることができる。
- ※2 **データ駆動型研究** 事前に想定される仮説を考えずにデータを取得し、解析をすることで、仮説を導き出す方法。

参考文献

- 1)日本蚕糸学会監修(2019) カイコの実験単. NTS, 東京.
- 2)横井翔ら(2020) カイコを利用した有用物資生産の社会実装のためのAIによるスーパーカイコの作出, 日本食料工学会誌, vol.82(3), 209-213.
- 3)Kawatomo, M. et al. (2019) High-quality genome assembly of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol.107, 53-62.
- 4)Yokoi, K. et al. (2021) Reference transcriptome data in silkworm *Bombyx mori*. *Insects*, vol.12(6), 519.
- 5)KAIKObase.
<https://kaikobase.dna.affrc.go.jp/> (参照 2024-2-19)
- 6)Yang, C.c. et al. (2021) An update of KAIKObase, the silkworm genome database. *Database*, vol.2021, 2021, baaa099.
- 7)Masuoka, Y. et al. (2022) Co-expression network and time-course expression analyses to identify silk protein regulatory factors in *Bombyx mori*. *Insects*, vol.13(2), 131.

農作物の食害痕跡から加害鳥獣の判別につなげる鳥獣害痕跡図鑑

山口 恭弘

YAMAGUCHI Yasuhiro

はじめに

野生鳥獣による農作物の被害は全国各地で起こっており、農林水産省が取りまとめている2022年度の農作物の被害金額は約156億円、被害量は46万9千t、被害面積は3万4千haとなっています¹⁾。被害を出している鳥獣を種類別に見ると、獣ではシカ、イノシシ、サルが大部分を占め、鳥の中ではカラスが半分を占めています。興味深いことに鳥の被害金額はほぼ一貫して減少傾向にありますが、獣の方は2010年度をピークに減少傾向が続ぎ、

2018年以降は下げ止まりとなっているなど、鳥と獣で推移が違ってくるのがわかります(図1)。また、被害作物は野菜、果樹、イネ、飼料作物の順で被害金額が多いですが、その他にもムギ類、マメ類、雑穀、いも類、工芸作物と多岐にわたっています(図2)。

鳥獣害対策の第一歩は農作物を加害している鳥獣種を判別して、その種に合わせた対策をとることです。獣による被害か鳥による被害か、それだけでも対策が大きく変わってきます。獣対策なら電気柵が基本で、平面での侵入対策を考えればよいのですが、翼を持った鳥では上空か

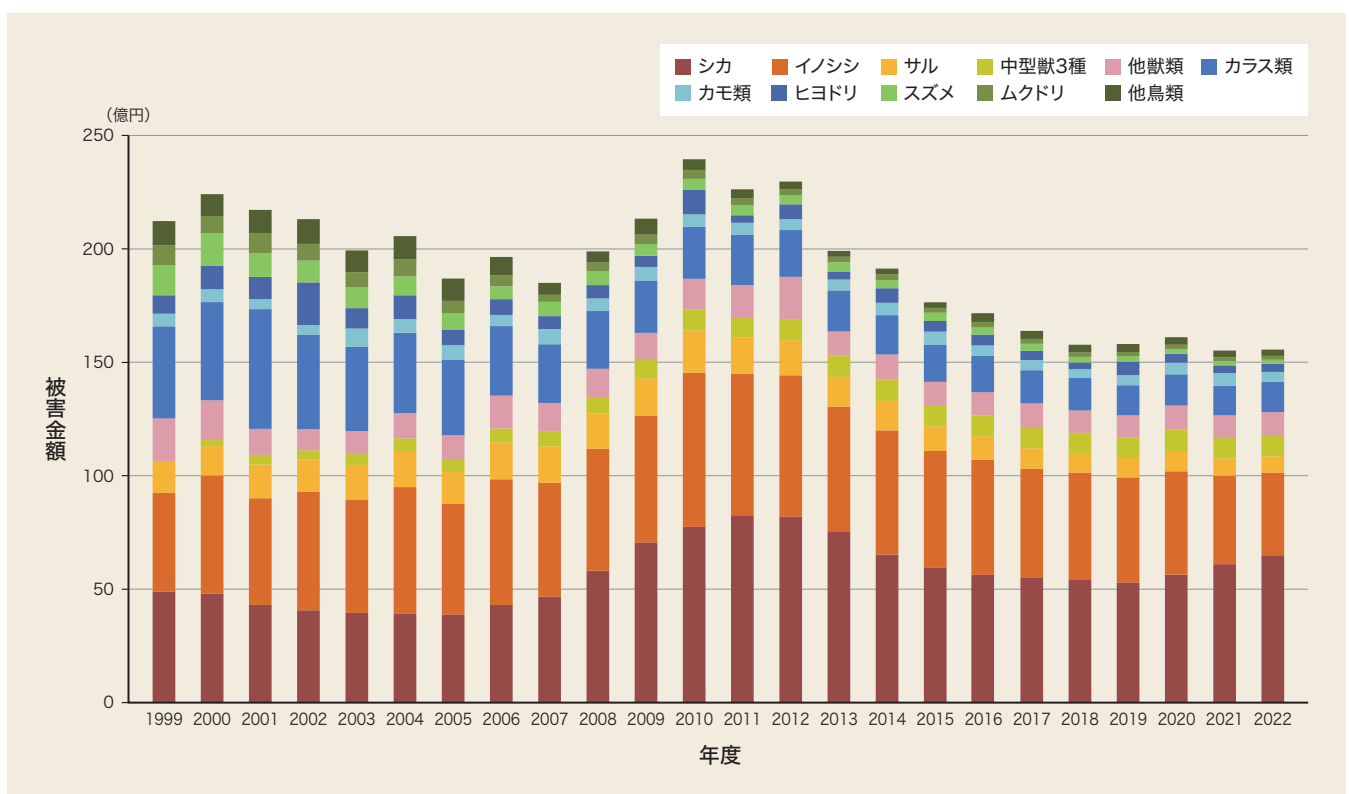


図1 鳥獣種別農作物被害金額の推移

(農林水産省農村振興局農村政策部鳥獣対策・農村環境課鳥獣対策室(2023)より作成)
 中型獣3種類(タヌキ、ハクビシン、アライグマ)は、タヌキ以外はH12(2000)年度から集計が開始された。



ナタネほ場で葉を食害するヒヨドリ

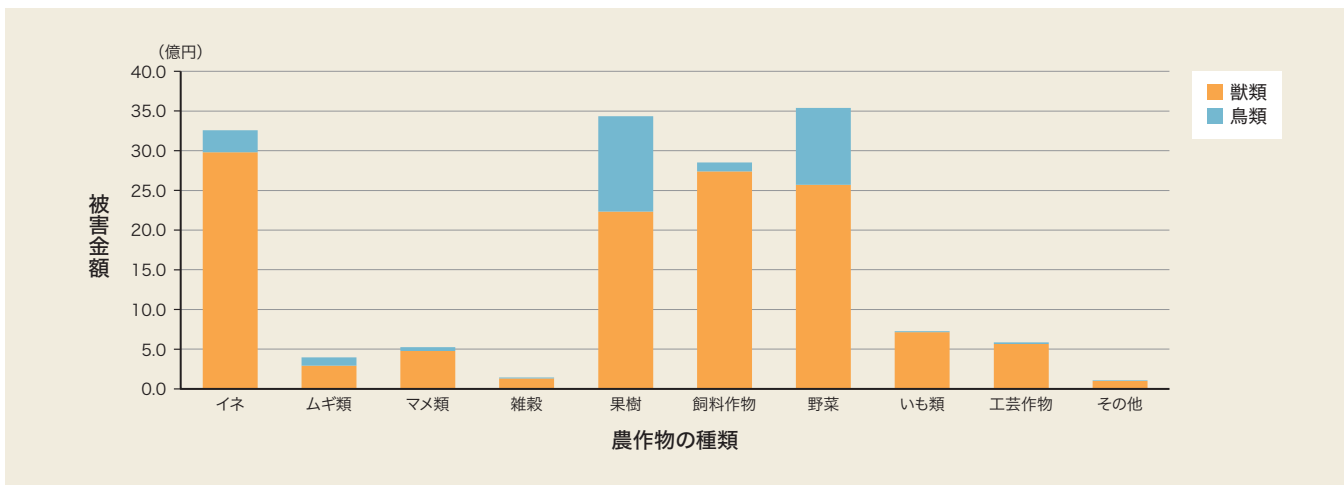


図2 鳥獣別農作物の被害金額
(農林水産省農村振興局農村政策部鳥獣対策・農村環境課鳥獣対策室(2023)より作成)

ら侵入されてしまいますし、行動範囲も大きく異なります。獣についても、シカ、イノシシ、サルそれぞれで対策方法が異なりますし、大型獣の被害を防ぐ対策で中型獣は防げません。鳥なら防鳥網を張って侵入を防ぐことが最も確実な方法になりますが、スズメ、ヒヨドリ、ハト類、カラス類など、対象種の体サイズに合わせて適切な網目の大きさの防鳥網を選ぶ必要があります。また、カラスであれば「くぐれんテグスちゃん」のようにテグス^{*1}を利用した侵入防止も考えられますが²⁾、カラス以外の種類ではテグスによる侵入防止効果はありません。加害している鳥獣種の判定を間違えたために、誤った対策をし、被害が減らないこともよくあります。

本来であれば、鳥獣が農作物を加害している現場を目視や自動撮影カメラで正確に把握することが一番良いのですが、警戒心の強い鳥獣の姿をタイミングよく捉えるのはなかなか難しいところがあります。一方、食害された農作物を目にすることは多く、これらの痕跡から加害鳥獣を

見分けることができれば、正しい対策を選択することが可能となります。そこで、鳥獣による農作物の食害の痕跡(食痕)から加害鳥獣を判別するための情報を記載した鳥獣害痕跡図鑑を作成しました³⁾。

鳥獣害痕跡図鑑の概要

生産現場において鳥獣が加害した農作物などの痕跡写真を鳥獣害対策関係者や自治体の担当者より収集しました。また、農研機構で飼育しているカラスを用いて、様々な農作物を食べさせることにより痕跡を収集しました。複数種による加害が考えられる農作物については、実際にその種類が食べている現場を見つけて、すぐ写真を撮るなどの工夫も行いました。こうして集めた痕跡写真を整理し、農作物別にまとめました。トップページを見ると、横軸に鳥類8種と獣類3種が並び、縦軸に果樹10種、穀類・マメ類4種、根菜・いも類2種、葉茎菜類6種、果菜

類3種、果実的野菜3種、その他3種を載せており、加害鳥獣と被害作物の関連を「食べる(写真あり)」「食べる(写真なし)」「食べる可能性がある」「情報なし」の4種類に区別しています(図3)。

ランク		ランクの説明
●	食べる(写真あり)	その鳥獣が該当の作物を食べることを確認し、本サイトで痕跡の写真と解説を掲載している。
○	食べる(写真なし)	その鳥獣が該当の作物を食べることについて、文献等により報告がある。本サイトでは痕跡の写真や解説は掲載していない。
△	食べる可能性がある	その鳥獣が該当の作物を食べるといふ報告を現時点で把握していないが、食べる可能性は考えられる。
	情報なし	

分類	作物名	カラス	ヒヨドリ	ムクドリ	スズメ	カモメ	キジバト	カワビ	キジ	アライグマ	ハクビシン	タヌキ
果類	柑橘類(温州みかん、ゆずなど)	●	●								○	○
	りんご	●	●	△	△						○	○
	日本なし	●	△	△	△			○		●	●	○
	西洋なし	●	○	△	△						○	△
	かぼ	●	●	●	●						○	○
	おうとう(はくらんぼ)	○	●	○	○	○					△	○
	ぶどう	●	○	○	△						●	●
	イチゴ	○	○	○	△						○	△
	ピー	○	○	○							△	○
	ブルーベリー	△	○									△
	水菓	○			○	○	○	○	○	△	○	○

図3 鳥獣害痕跡図鑑のトップページ

作物名をクリックすることで、農作物別の食害痕跡のpdfファイルを開覧することができる構成となっています。農作物別のページには、食害された作物の写真と、その痕跡から推定される鳥獣種、およびその推定の根拠が記載されています。例えば、みかんのページ(図4)には、加害種として、鳥はヒヨドリ、ハシブトガラス、ハシボソガラス、獣はハクビシンによる食痕が掲載されています。食べられた果皮にV字の切れ込みがある場合は鳥によるものと判別できます。次にその切れ込みの大きさと鳥の嘴の大きさを対応させ、小さければヒヨドリ、大きければカラスと推定します。ハシブトガラスとハシボソガラスの区別は難しいのですが、室内での採食試験からハシブトガラスの方がより大きく明瞭なV字の切れ込みがあることが多く、みかんページの写真のようにはっきりと大きなV字の切れ込みはハシブトガラスの食痕の特徴です。一方、ハクビシンの場合は、残った果皮の縁が口でかじったような痕になっており、野外での観察から、果肉部はすべて食べてしまい、果皮の一部が木に残っていることが多いという特徴になります。残念ながら多くの作物では食害が進むと、どの鳥獣種による食痕か不明になることが多くなります(図5)。また、もともと複数種による食害が考えられるため、種類が特定されないこともあり、すべての食痕から加害種を特定することはできません。食痕に残された鳥獣の唾液などのDNAから加害種を判定する技術⁴⁾が開発されつつありますので、今後、手軽に使えることが望まれます。

柑橘類(温州みかん、ゆずなど)

主な加害種:ヒヨドリ、カラス、ハクビシン、イノシシ、シカ

柑橘類を最も加害するのはヒヨドリであるが、カラスも食害する。ヒヨドリやカラスが穴を開けた痕からメジロのような小さな鳥も食害する。ムクドリは柑橘類を食害しない、獣類も好んで食する。



加害種:ヒヨドリ

果皮についているV字型の切り裂きが比較的細く、カラスよりもヒヨドリのくちばしの大きさに近く見える(カラスのくちばしは長さ5-7cm、ヒヨドリは約2.5cm)。

撮影: 西澤浩



加害種:ハシブトガラス

果皮についているV字型の切り裂きは太くて明瞭でありハシブトガラスと考えられる。

撮影: 吉田



加害種:ハクビシン

鳥のくちばしではなく、獣の口でかじったような痕が果皮に残る。また、基部が残っているのがハクビシンの特徴

撮影: 古谷益剛

図4 鳥獣害痕跡図鑑の「みかん」のページ



図5 加害種が不明な食痕の例

農作物への直接的な食痕とは異なる興味深い例もあります。鳥獣はぶどうの果実を食べますが、粒が丸ごと食べられて柄だけ残ることが多く、このような食痕からは加



図6 鳥獣害痕跡図鑑の「ぶどう」のページ

害種の識別が困難となります。しかし、ぶどうに掛けられた果実袋の破き方に鳥獣種ごとに特徴がありました(図6)。カラスは嘴で袋をつまんで破くため、袋の破れ目が鋭角な切り裂きになることが多く、一方、ムクドリは嘴で何回も袋を突いて穴を開けて、そこから嘴を差し込んで食べているので、袋に空いた穴が特徴となります。獣では、アライグマは前肢を使って袋を破るため、破け具合が乱雑で、前肢についた泥が袋にもついて汚れていることが多いのが特徴です。ハクビシンはぶどう棚や枝から体をのりだし、袋を口でくわえて上から下に引き破るため、袋の破れ目はカラスの場合より丸みを帯びることが多いです。このように鳥獣種ごとに様々な習性を持ち、食べ方も異なるので、食痕を利用して加害種を判別することが可能となります。

利用方法

この鳥獣害痕跡図鑑は農研機構のウェブサイトで公開しており、インターネットにつながる環境であれば、誰でも利用することが可能です。上述した通り、農作物別にまとめてあるので、被害を受けた農作物について、様々な鳥獣の食痕を一度に見ることが可能です。現場で写真を撮って、屋内のパソコンで痕跡図鑑の写真と見比べたり、現場

においては、タブレットで痕跡図鑑を開いて、実際の食痕と比べたりすることを想定しています。加害種が特定できたら、その種に合わせた被害対策を行うことができます。被害対策については農水省の鳥獣害被害対策コーナー(<https://www.maff.go.jp/j/seisan/tyozyu/higai/index.html>)や農研機構の動物行動管理グループ(<https://www.naro.affrc.go.jp/org/narc/chougai/>)のウェブサイトが参考になります。

農水省
鳥獣害被害対策
コーナー



農研機構
動物行動管理
グループ



おわりに

本図鑑ではこれまでに収集できた写真や情報のみ掲載しているため、その作物に係るすべての加害種を掲載できているわけではありません。掲載している鳥獣や農作物の種類についても不十分であると思います。鳥獣による被害も新たな鳥獣が加害種となったり、新たな農作物が被害を受けたりするなど、私たちも知らない被害が各地で起こっています。また、自動撮影機材の普及により、鳥獣種が加害している現場の写真や動画を撮ることが容易になってきています。このような被害情報や食害写真、動画などを随時収集し、図鑑を更新していく予定です。

(畜産研究部門 動物行動管理研究領域
動物行動管理グループ)

用語解説

※1 **テグス** ナイロン製の釣り糸。最近では、鳥害対策用のテグスも販売されている。

参考文献

- 1) 農林水産省(2023) 全国の野生鳥獣による農作物被害状況について(令和4年度)。農村振興局農村政策部鳥獣対策コーナー・農作物被害状況。https://www.maff.go.jp/j/seisan/tyozyu/higai/hogai_zyoukyou/index.html (参照 2024-1-25)
- 2) 農研機構(2021) 果樹園のカラス対策 簡易型「くぐれんテグスちゃん」標準作業手順書。https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/laboratory/naro/sop/143066.html (参照 2024-1-25)
- 3) 農研機構 鳥獣害痕跡図鑑。https://www.naro.affrc.go.jp/org/narc/chougai/sign/index_sign.html (参照 2024-2-19)
- 4) Monge, O. et al. (2020) Environmental DNA from avian residual saliva in fruits and its potential uses in population genetics. Conservation Genetics Resources, vol.12, 131-139.

果樹園のカラス対策「くぐれんテグス君」の簡易型「くぐれんテグスちゃん」

吉田 保志子

YOSHIDA Hoshiko

はじめに

収穫期の果樹は野生鳥獣による被害を受けやすく、中でもカラスによる果樹被害金額は約7.5億円にのぼり(2022年度農林水産省統計)、鳥類による果樹被害の約63%、鳥獣全体でみても22%をカラスが占めます。カラスによる果樹の被害を効果的に防ぐことは、農作物の鳥獣害を減らしていくために重要です。

カラスによる果樹の被害対策には、防鳥網を全面に設置して侵入を阻止することが確実ですが、防鳥網を設置する資材費や施工費は高額であり、積雪や強風に弱いため維持管理も大きな問題となります。防鳥網より簡易な対策としてテグスの設置が行われる場合もありますが、確実な対策となっていませんでした。そこで、飼育下のカラスで試験を行ってテグスなどの糸状の障害物の設置間隔とカラスの侵入行動の関係性を明らかにし¹⁾²⁾、テグスと防鳥網を組み合わせたカラス侵入抑制技術「くぐれんテグス君」を2011年度に徳島県と共同で開発しました³⁾⁴⁾。「くぐれんテグス君」は、周囲を囲む外周柵のある果樹園におい

て、弾性ポールを用いてテグスを1m間隔で果樹園の天井部に張り、テグスと外周柵の間の空間を防鳥網でふさぐことで、カラスの侵入を効果的に抑えるものです(図1)。

しかし、「くぐれんテグス君」は側面部の防鳥網の設置に脚立が必要であること、防鳥網が強風に弱いことなどが課題になっていました。そこで、側面部の防鳥網をテグスに変えるために、側面部に設置するテグスの適切な間隔について飼育下のカラスで試験を行い、脚立をまったく使わずに設置できる簡易型「くぐれんテグスちゃん」を開発しました⁵⁾⁶⁾(図2)。「くぐれんテグスちゃん」のカラス侵入抑制効

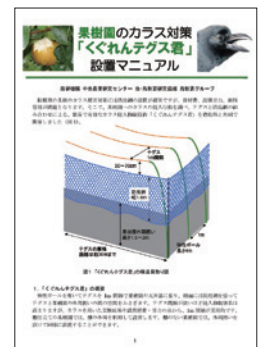


図1 「くぐれんテグス君」設置マニュアル

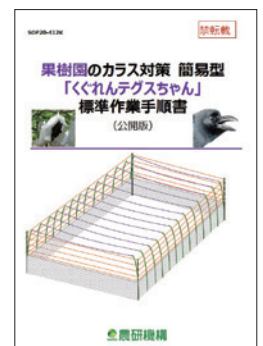
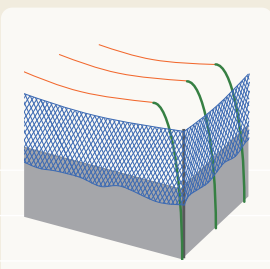
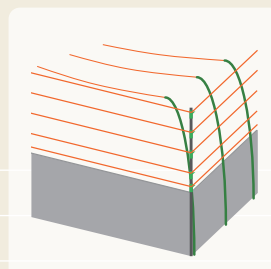


図2 「くぐれんテグスちゃん」標準作業手順書

表1 「くぐれんテグス君」と「くぐれんテグスちゃん」の比較

	くぐれんテグス君 (2011年度)	くぐれんテグスちゃん (2021年度)
	上面のテグスと側面の防鳥網を組み合わせ	上面・側面ともにテグス
特徴・改良点	 <ul style="list-style-type: none"> ● 防鳥網の設置に脚立が必要 	 <ul style="list-style-type: none"> ● 脚立を使わず地上作業のみで設置 ● 防鳥網を使わないため風に強い
設置作業時間	24時間/30a	19.5時間/30a
カラス侵入抑制効果	ほぼ同等	ほぼ同等
資材費	ほぼ同等	ほぼ同等



カキ園への「くぐれんテグスちゃん」設置（広島県東広島市 果樹茶業研究部門 安芸津ブドウ・カキ研究拠点）

果と資材費は「くぐれんテグス君」と同等で、設置する際に脚立を使わないため安全であり、設置の作業時間は約2割削減できます(表1)。今回は、開発した「くぐれんテグスちゃん」の概要と、テグス設置によるカラス侵入対策の基礎となる、飼育下試験でわかったカラスの行動特性を紹介します。

「くぐれんテグスちゃん」の概要

開発した「くぐれんテグスちゃん」では、防鳥網の代わりに0.5m間隔の4本と果樹園の外周柵上15cmに1本の、合計5本のテグスを張って、果樹園の側面部を囲みます。側面部のテグスを張るための支柱には、立てる前にテグスの受け具をあらかじめ付けておくことで、脚立を使わずに作業できるようにしました。

■ 設置の手順

まず天井部のテグスを張ります。これは既開発の「くぐれんテグス君」と手順や構造は同じです。長さ4mの弾性ポール(トンネル栽培用のFRP支柱)を、1m間隔で果樹園の向かい合う2辺に立て、弾性ポールの先端近くにテグス

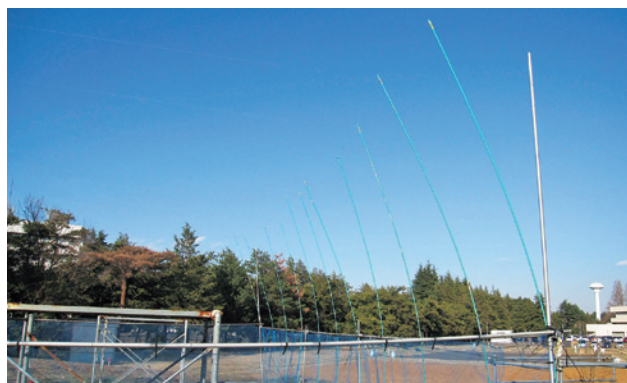


図3 弾性ポールの先端近くにテグスを止め、弾性ポールが軽くしなる程度に張る

を止めて、弾性ポールが軽くしなる程度に張ります(図3)。

続いて側面部のテグスを張るための支柱を用意します。農業ハウス用金属パイプの直径19mm(打ち込み用)と直径22mm(被せ用)を組にして使います。打ち込み用支柱を果樹園の四隅、および四辺上では互いの間隔が20mを超えない位置に、地上高1m程度まで打ち込みます。テグス受け具(22mmパイプ用の腕付きパッカーの先端を5mm程度切り落としたもの)を、被せ用支柱1本につき5個、立てる前の支柱に取り付け位置を測って付けます(図4)。

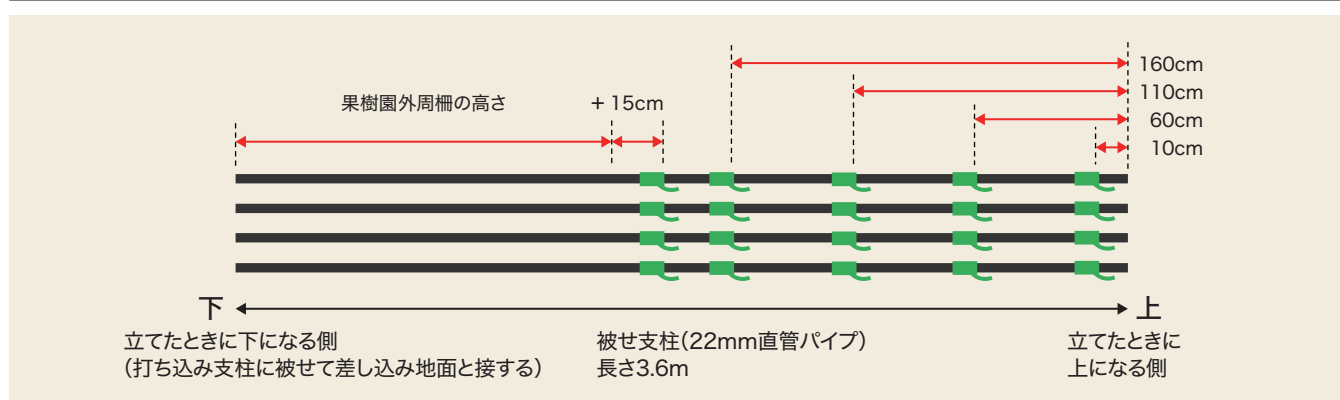


図4 支柱を揃えて並べ、寸法の位置にテグス受け具を取り付ける

テグス受け具を取り付けた被せ用支柱を、打ち込み用支柱に被せて差し込んで立て、5段のテグスを上から順に張ります。テグスは手製のY字竿で持ち上げ、受け具の腕の中へテグスを落とし込むように入れます(図5)。テグスは連続させず段ごとに切ったほうが作業しやすく、各段について始端と終端を22mmパイプ用ハウスパッカーを使って手元の高さで支柱に止めます。

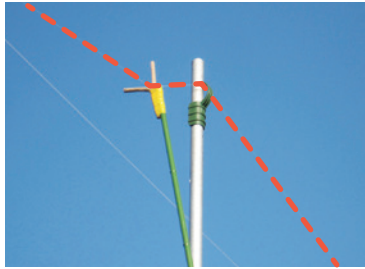


図5 Y字竿でテグスを持ち上げ、受け具の腕の中に落とし込むように入れる。図中の赤い点線は作業中のテグスの位置を示している。左側の白い線は、先に張った上面のテグス。

■ 資材費・作業時間・維持管理

30m×100m(30a)の果樹園に設置する場合の資材費は15.4万円程度(2021年資材費での試算⁵⁾)で、堅固な常設型の防鳥網に比べて大幅に少なく済みます。設置作業時間は2~3人で19.5時間/30aで、「くぐれんテグス君」に比べて2割の作業時間削減となります。

使用するテグスは、透明ナイロン釣り糸の20号(線径0.74mm)前後が適しています。細いテグスは野鳥が絡まる事故が起こりやすく、劣化も早いので適しません。資材の耐用年数は、弾性ポールが4~5年以上、テグスが2~3年です。強風でテグスが枝などに擦れて切れることがあり、年間にテグス数本程度の張り直しは必要ですが、張り直しの作業もすべて地上から行うことができ、脚立は不要です。

テグスに対するカラスの行動特性

鳥の侵入を防ぐために糸やワイヤーを張る方法は、ごみ処理場や養魚池などで行われてきましたが、その効果は鳥の種類や場所の条件によってまちまちで、安定した対策にはなっていませんでした。また、張る間隔と侵入抑制効果の関係を試験によってしっかり検討してから設置した例はこれまでほとんどありませんでした。

そこで私たちは、カラス対策に有効なテグス設置方法を開発するために、飼育下のカラスを用いた試験で、糸状の障害物の設置間隔を段階的に変えたときの侵入抑制効果を調べました。カラスは警戒心が強いので、野外では糸を1本張る程度でも警戒して来なくなったり、環境中に存在する食物量の変動によって侵入意欲が変わったりする可能

性があり、張る間隔と侵入抑制効果の関係を調べる試験は野外では困難です。飼育下の試験を行うことで、一定に保った条件のもとで定量的な評価をすることができました。

■ 方法

広さ40m×60m、高さ12mの大型ケージで、ハシブトガラス12羽、ハシボソガラス3羽を飼育して試験を行いました。ケージ内に11m×20m、高さ1.6mの試験枠を金属パイプで組み、側面には防風網を張って横からは入れないようにしました(図6)。この試験枠の上面に、見えやすい障害物として緑色の針金、見えにくい障害物として透明のテグスを使い、設置間隔を週ごとに段階的に変えて、カラスの出入りを録画により解析しました。試験時間中は試験枠内のみに餌を置いて、餌を取るためには針金やテグスの間を通らなければならないようにし、また餌の消費量でも侵入抑制効果を評価しました。

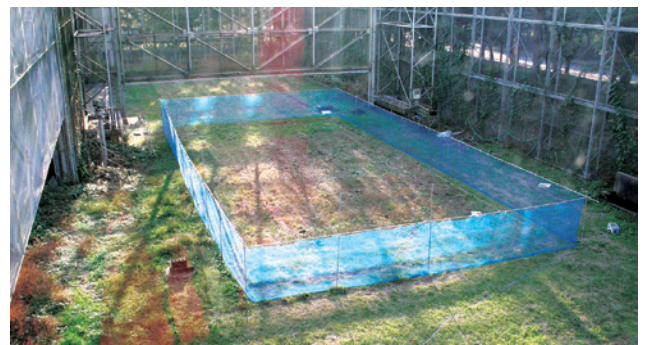


図6 上面からの侵入抑制を調べるための試験枠を大型ケージ内に設置した様子

■ 結果

試験の結果を図7に示します。緑色針金では設置間隔を狭めていったときの侵入回数の減少は緩やかで、1m間隔でも2.5m間隔以上と大きな違いが無く、0.5mでやや減少し、0.25mまで狭めるとかなり減少しました。一方、透明テグスでは5.5m間隔で侵入回数はかなり減少し、それを2.75mに半減させても変わらず、1m間隔では大きく減少しました。透明テグス1m間隔での侵入回数は、針金0.25m間隔での侵入回数より少なくなりました。餌の消費量も、侵入回数と概ね対応して減少していました。カラスが翼を広げたときの両端までの長さ(翼開長)は1m前後なので、1m間隔に張った針金やテグスを避けて飛ぶためには、飛ぶ方向や角度、羽ばたきのタイミングを調整する必要がありますと考えられます。針金は見えやすいので1m間隔でも避けて飛ぶことが簡単であったのに対して、透明

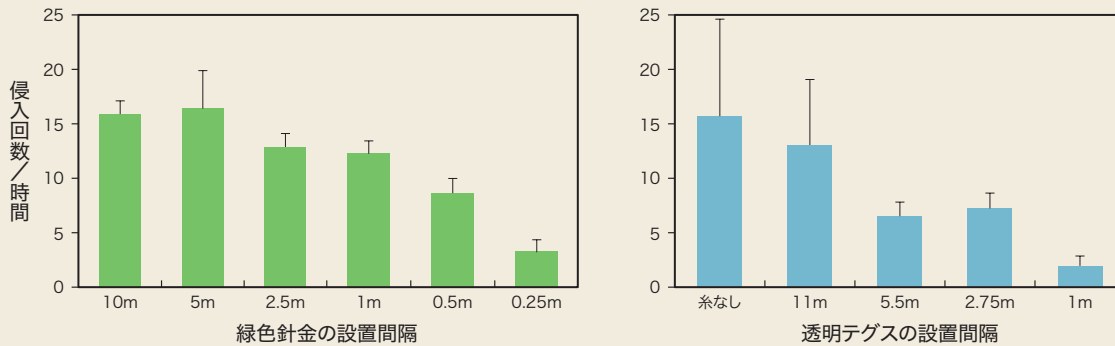


図7 緑色針金または透明テグスの設置間隔とカラス侵入回数の関係
針金は試験枠の短辺と平行に張り、テグスは試験枠の長辺と平行に張ったため、設置間隔の数値が異なる。
週ごとに設置間隔を変更して4回ずつ実施した平均と標準偏差を示す。

テグスは見えにくいために避けにくく、カラスが侵入をためらったのだと考えられます。これらの結果から、果樹園の上面に張るテグスは1m間隔が実用であると判断しました。

果樹園の側面に張るテグスの適切な間隔を決めるための試験では、試験枠の高さを上に伸ばし、上面に防鳥網を張って上から入れないようにしました。側面にできた隙間に張るテグスの間隔を週ごとに変えて同様に試験を行い、0.5m間隔に加えて外周柵への止まりを防ぐために柵上0.15mに1本を張ることが実用であるという結果を得ました。

おわりに

本稿では、カラスの行動特性の解明をもとに開発した、果樹園におけるテグスを使ったカラス侵入抑制技術を紹介しました。障害物に対する動物の行動特性を定量的に把握することが、有効な対策技術の開発につながることを示す有意義な成果と言えます。設置がより安全で簡易な「くぐれんテグスちゃん」によって、カラスによる果樹の被害減少に寄与できれば幸いです。「くぐれんテグスちゃん」には、標準作業手順書⁵⁾に加えて、作業のポイントをわかりやすく実演した動画⁷⁾(図8)もあります。



図8 果樹園のカラス対策「くぐれんテグスちゃん」設置手順動画の一場面

なお、テグスを使った対策は、警戒心が強いカラスには有効ですが、カラス以外の鳥種は警戒心が少なくテグスを気にしないため、あまり効果がありません。また、カラスの場合も、畜舎や生ごみ集積所のような、カラスが好む食物が豊富に存在する場所では、テグスを張っても侵入されてしまうため、防鳥網などで完全にふさぐ必要があります。

(畜産研究部門 動物行動管理研究領域
動物行動管理グループ)

参考文献

- 1) Yoshida, H. et al. (2019) Effective line installation technique for preventing crow intrusion into orchards. *Applied Entomology and Zoology*, vol.54(4), 399-408.
- 2) 吉田保志子(2019) 圃場の上から飛来侵入するカラスを防ぐには透明のナイロン釣り糸を1m間隔で平行に張る. 農研機構 研究成果情報. https://www.naro.go.jp/project/results/4th_laboratory/carc/2019/carc19_s14.html (参照 2024-2-19)
- 3) 吉田保志子(2011) テグスと防鳥網の組み合わせで果樹園へのカラス侵入を抑える「くぐれんテグス君」. 農研機構 普及成果情報. https://www.naro.go.jp/project/results/laboratory/narc/2011/420d0_01_56.html (参照 2024-2-19)
- 4) 農研機構(2018) 果樹園のカラス対策「くぐれんテグス君」設置マニュアル. http://www.naro.affrc.go.jp/org/narc/chougai/wildlife/kugutegu_mannual_2018.pdf (参照 2024-2-19)
- 5) 農研機構(2021) 果樹園のカラス対策 簡易型「くぐれんテグスちゃん」標準作業手順書. https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/laboratory/naro/sop/143066.html (参照 2024-2-19)
- 6) 吉田保志子(2020) 果樹園のカラス対策「くぐれんテグス君」の簡易型「くぐれんテグスちゃん」. 農研機構 普及成果情報. https://www.naro.go.jp/project/results/4th_laboratory/carc/2020/20_064.html (参照 2024-2-19)
- 7) 農研機構(2022) 脚立を使わず簡単・安全に設置できる果樹園のカラス対策「くぐれんテグスちゃん」設置手順動画. <https://www.youtube.com/watch?v=hVS1pAahcOQ> (参照 2024-2-19)

牛疫ワクチン(LA赤穂株)



動物衛生研究部門 疾病対策部 高木 道浩
TAKAGI Michihiro

■ 牛疫

牛疫は牛や水牛、めん羊、山羊、豚などの偶蹄類動物が牛疫ウイルスに感染し、急性の発熱や下痢などの症状を呈し、感染力や致死率が極めて高く、特に牛や水牛では多くが死亡します(図1)。しかし、国際機関による牛疫根絶計画を進め、2011(平成23)年にFAO*¹とWOAH*²(当時はOIE*³)は牛疫の撲滅を宣言しました。この撲滅には日本が開発した牛疫ワクチンが大きく貢献しています。



図1 牛疫を発症した牛

■ 牛疫ワクチン開発と現在

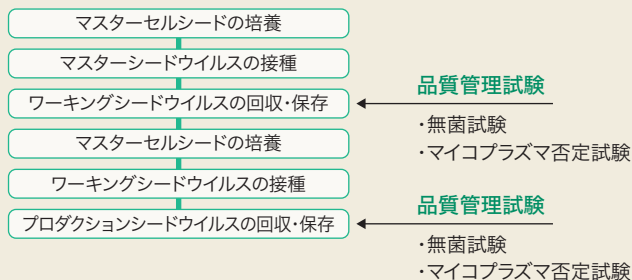
1871(明治4)年に牛疫予防に関する太政官布告第276号以降、牛疫の予防に関する試験が実施されていました。当時、日本への牛疫の侵入のほとんどが朝鮮半島からであったことから1911(明治44)年には釜山に農商務省牛疫血清製造所が設立され、牛疫免疫血清接種法に使用する免疫血清を製造していました。1917(大正6)年には同所にて蠣崎千晴博士により世界初の牛疫不活化ワクチンが開発されました。しかし、製造には牛が用いられていたため、1935(昭和10)年頃から野外株である強毒牛疫ウイルス釜山株を家兎への実験的感染試験が始められ、1938(昭和13)年に中村稔治博士が継代して弱毒化した牛疫家兎

化ウイルス「中村III株」(lapinizedの頭文字“L”を取って、L株と呼ぶ)を作出、897代以上継代したものが親株となっています。しかし、L株は朝鮮牛や黒毛和牛に対しては感受性があったため、戦後、農研機構動物衛生研究部門の前身である家畜衛生試験場の赤穂支場(昭和27年～昭和31年)にてさらに家兎で29代、鶏胎(発育鶏卵)(avianizedの頭文字“A”を取って、LA株と呼ぶ)で456代継代した、より高度に弱毒化された株となるLA赤穂株が1957(昭和32)年に作出されました。赤穂支場が廃場となり、LA赤穂株は家畜衛生試験場本場(現在の小平海外病研究拠点)へと移され、発育鶏卵に接種してLA生ワクチンを製造、緊急用として備蓄していました。その後、量産が容易で保存や熱に安定したワクチンを製造するために組織培養ワクチンの開発を進め、1970(昭和45)年頃から現在の製造法としてLA赤穂株をアフリカミドリザル腎継代細胞であるVero細胞で培養し、力価調整をした培養ウイルス液に安定剤を添加、凍結乾燥後、窒素を充填して密栓し、溶解用液と共に牛疫組織培養予防液(牛疫ワクチン)として製造販売承認を1972(昭和47)年に取得、2018(平成30)年にシードロット製剤*⁴(牛疫ワクチン(シード))として承認されています。

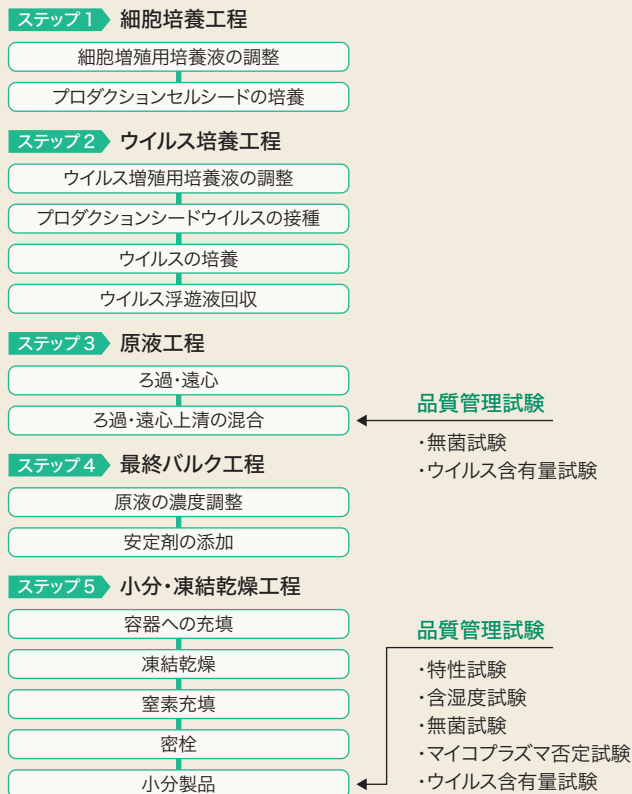
■ 牛疫ワクチン(シード)の製造方法

動物用医薬品である牛疫ワクチンは「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」に基づいて定められた「動物医薬品の製造管理及び品質管理に関する省令(GMP省令)」を遵守し、「牛疫組織培養予防液製品標準書」に従って製造しています。具体的な製造工程を図2に示しました。まず、始めにマスターシードウイルスから製品の製造に使用するためのプロダクションシードウイルスまでVero細胞を用いて増やす工程があります。この間、それぞれに増やしたウイルスは定められた品質管理試験を実施し、それに適合しなければなりません。次に、このプロダク

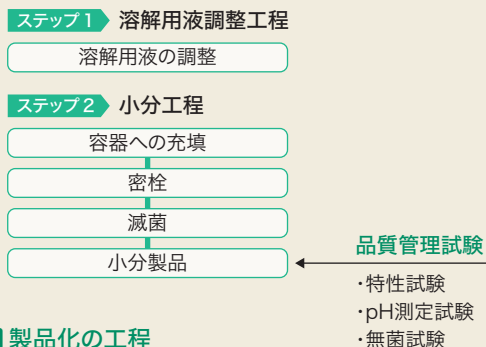
1 シードウイルスの継代及び保存の工程



2 乾燥ワクチンの工程



3 溶解用液の工程



4 製品化の工程

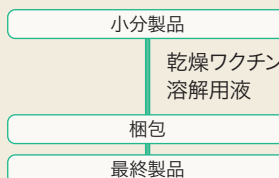


図2 牛疫生ワクチンの製造工程

シードウイルスとVero細胞を用いてウイルスを増やし、ウイルス浮遊液を回収、ろ過・遠心によりワクチン原液ができます。ここでウイルス含有量試験を実施し、原液の濃度調整を行い、安定剤を添加した物が最終バルクとなります。この最終バルクをバイアル瓶に小分け、凍結乾燥、窒素を充填して密栓し、小分製品となります。また、この凍結乾燥したウイルスを溶解するための溶解用液をバイアル瓶に充填、密栓、滅菌した小分製品を作ります。これらの小分製品の品質管理試験に合格して、



図3 牛疫ワクチン

梱包、最終製品となります。この最終製品は動物医薬品検査所にて国家検定を受け、合格して製品となります(図3)。

牛疫ワクチンは現在も隔年で10万頭分を国家備蓄のために製造しています。また、このLA赤穂株は2016年にWOAHよりワクチン製造用株として認定され、農研機構動物衛生研究部門はFAOとWOAHから承認されたワクチン製造施設として緊急時に備えた牛疫ワクチンの製造と備蓄の役割を担っています。

用語解説

- ※1 **FAO** Food and Agriculture Organization of the United Nations (国際連合食糧農業機関)
- ※2 **WOAH** World Organisation for Animal Health (国際獣疫事務局)
- ※3 **OIE** Office International des Epizooties (国際獣疫事務局)
- ※4 **シードロット製剤** 単一培養で得られた特定のウイルス、細胞等の均一な浮遊液であり、その遺伝的性質が十分に安定した条件で保存されているものを用いて製造されるワクチン。

TOPICS

カモ等がハス田の泥中のレンコンを食べる様子を初確認

—夜間に生じる「カモ被害」の実態の把握に向けて—

畜産研究部門 動物行動管理研究領域

益子 美由希

MASHIKO Miyuki

■ 全国一のレンコン産地で問題が

先が見通せる縁起物として、正月のおせち料理にも欠かせないレンコン。農研機構のある茨城県つくば市からも程近い霞ヶ浦周辺は、全国のレンコン出荷量の半分以上を生産する日本一の産地となっています。ここで長年の問題となっているのが、カモ等によるレンコン食害です。被害額は、鳥類による全国の農作物被害額の約1割を占める年間約2.5億円(2022年度)にのぼっています。

レンコンは水が張られたハス田の泥中にあり、食害は夜間に生じるため、その様子を直接確かめることが極めて困難です。秋～冬の収穫の際、泥中から掘り上げたレンコンにえぐられた傷があって出荷できなくなる場合があります(図1)、夜間のハス田でカモ等の群れが見られることなどから「カモ被害」と広く認識されてきましたが、実際にどの種が、どのようにレンコンを食害しているかは長らく確かめられていませんでした。対策として多くのハス田に防鳥網が設置されていますが、カモ等の侵入を防ぐことは難しく、野鳥が網に引っかかって死ぬ事故(羅網死^{※1})が多発し、環境保全上の問題にもなっています。

レンコンを食害する種や採食行動を明らかにすることは、被害の実態を把握し、効果的な対策を計画・実行していく上で不可欠です。



図1 カモ等に食べられたとみられるレンコン

外からの力加わったことによる傷や欠損が見られ、黒紫に変色している。茨城県土浦市内にて、農家の収穫に立ち会って回収したもの。

■ 「レンコン食害試験」で加害鳥を突き止める!

そこで、収穫後のハス田に試験的にレンコンを設置し(図2左)、夜間の様子を動画撮影して調べました。すると、マガモ^{※2}とオオバン^{※3}の2種が、頭を水中に浸したり倒立を繰り返したりして、泥中のレンコンを食べる様子が観察されました(図3A)。途中、マガモは脚で泥を掘ったり(図3B)、オオバンは潜水したりしてレンコンを食べる行動も見られました。翌朝回収すると、レンコンが食べられた範囲の泥面はすり鉢状に掘られており、その底(水面下約40cm)よりも深くにはレンコンが残っていました(図2右)。

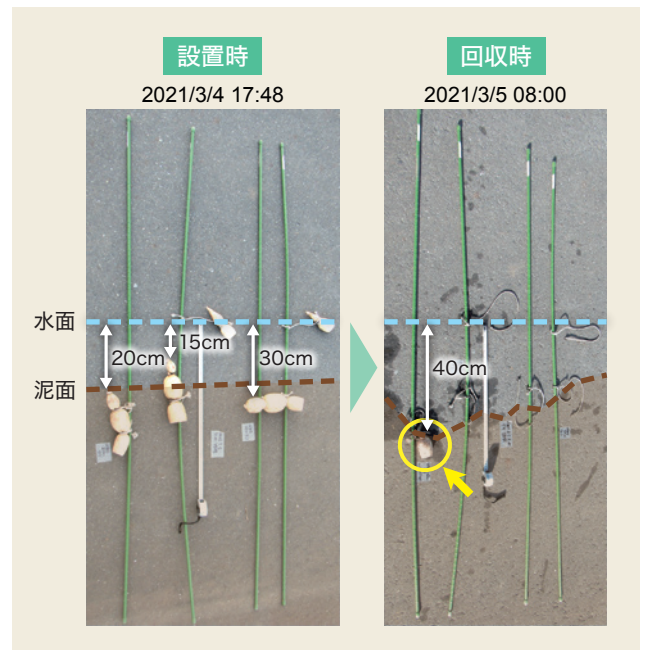


図2 1回の試験で設置・回収したレンコンの様子

日没前に、新鮮で傷のないレンコンを支柱に紐で結わえ、収穫後のハス田(茨城県土浦市内)に挿して固定(左)。翌朝回収すると(右)、泥がすり鉢状に掘られ(泥面の破線)、水面下40cmよりも深い一節(矢印)が残った以外は食べられて無くなっていった。なお、栽培されるレンコンは泥中で水平方向に伸びるが、カモ等がどの程度の深さまで食べるか確かめる目的で垂直方向でも設置した。また、水面のレンコンは、収穫後のハス田に浮いていることがある収穫残さのレンコンを模して設置した。

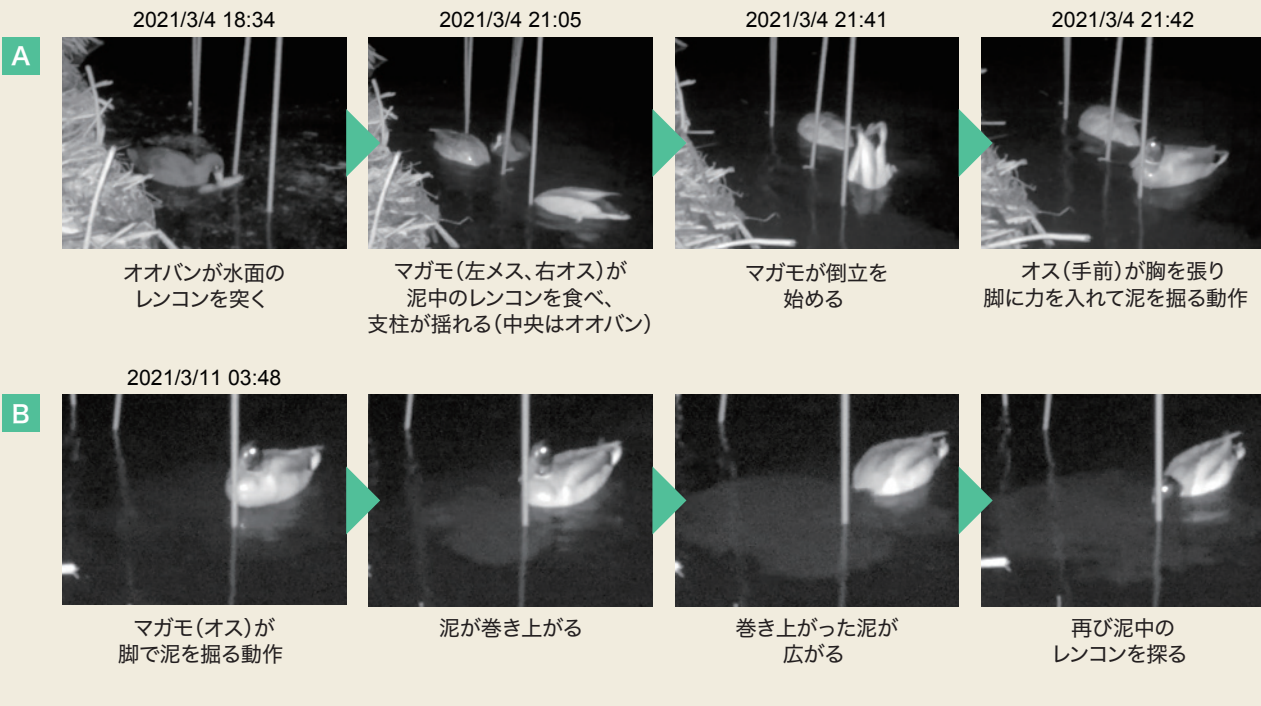


図3 マガモとオオバンの採食行動の様子

A マガモとオオバンがレンコンを食べる様子。図2に示した試験回の動画から、最初から泥中深くにあるレンコンを狙って食べるのではなく、浅い位置のレンコンから順に食べていった。

B マガモが脚で泥を掘る様子。動作が鮮明に映った別の試験回の動画から。

動画はこちらから見るができます。
https://www.naro.affrc.go.jp/org/narc/chougai/wildlife/video_j.html



レンコンを設置する深さを変えながら試験を16回行った結果、浅い位置のレンコンほど食害を受けやすいことがわかりました。水面下20cmまでのレンコンは完食、40cmまでは食べられにくくなるもののマガモの泥掘りやオオバンの潜水で採食可能で、40cmより深いものは採食されませんでした。

一方で、他に撮影された5種のカモでは、水面や畦上に設置したレンコンを食べる行動が一部の種で観察されたものの、いずれも泥中のレンコンを食べる様子は確認されませんでした。これら5種は撮影された個体数が少なかったため、さらに調査が必要ですが、ハス田には他にもウキクサ類、プランクトンといったカモの餌となる生物が豊富に存在することから、泥中のレンコンは食害しないカモにとっても、ハス田が好適な採食場所となっていると考えられます。

■ 今後に向けて

水が張られたハス田の泥中にある“見えない”レンコンを、平たい嘴のカモが本当に食べるのか、これまでは疑問視する声もありましたが、今回、レンコン食害を引き起こすカモ等の種やその採食行動が初めて明らかになりました。加えて、レンコンを食害しないカモもハス田を訪れていることがわかってきました。

従来用いられている防鳥網は野鳥の生息環境に影響することから、今回得られた知見を踏まえたより効果的な対策手法の開発が望まれます。レンコン被害の軽減と鳥類の生

息環境の保全を両立できる技術の確立に向け、現場の生産者や自治体などと協力し、実証試験を進めています。

用語解説

- ※1 **羅網(らもう)死** 防鳥網の網に野鳥が引っかかって死ぬこと。防鳥網で鳥と作物を物理的に遮断することは鳥害対策の基本で、最も効果的な方法だが、鳥が通り抜けられるような大きさの網目や細い糸、網がたるんでいる場合等では、鳥が引っかかる事故が生じやすくなる。
- ※2 **マガモ** カモ目カモ科の水鳥。大部分のマガモは日本に冬に渡ってくる。霞ヶ浦で越冬するカモ類は毎年十数種、7万羽前後が報告されるが、マガモはそのうち3~5万羽を占め最も個体数が多い。
- ※3 **オオバン** ツル目クイナ科の水鳥で、カモ(カモ目カモ科)の仲間ではない。近年全国的に個体数が増加し、霞ヶ浦周辺では一年中生息している。茨城県では2013年度以降、カモ類と分けてバン類によるレンコン被害も報告されており、2022年度は約0.8億円となっている。

参考文献

- 1) 益子美由希ら(2022) 泥中のレンコンはカモ類等の食害を受ける:実地試験による確認. 日本鳥学会誌, vol.71(2), 153-169.
- 2) 茨城県(2023) 野生鳥獣による農作物被害対策に関するお知らせ. 茨城県農林水産部農村計画課.
<https://www.pref.ibaraki.jp/nourinsuisan/nokan/katsei/choju.html> (参照 2024-2-14)
- 3) 農林水産省(2023) 全国の野生鳥獣による農作物被害状況について(令和4年度). 農村振興局農村政策部鳥獣対策コーナー・農作物被害状況.
https://www.maff.go.jp/j/seisan/tyozyu/higai/hogai_zyokuyou/index.html (参照 2024-1-25)
- 4) 益子美由希ら(2023) カモ類等によるレンコン食痕の形状と劣化の経過. 日本応用動物昆虫学会誌, vol.67(1), 1-13.

温故知新

>> 古きをたず(温)ねて新しきを知る



天然色素または遺伝子組換え技術によって着色された様々なカイコの繭(左)と、眼が白い突然変異を持つカイコの成虫(右)
(いずれも撮影は、カイコの飼育支援を行っている技術支援部 中央技術支援センター 古橋 紗瑛)

カイコ産業と研究の略史

SEZUTSU Hideki 瀬筒 秀樹

カイコ(蚕)を育ててシルクをとる養蚕は、5,000年以上前に中国で始まり、2,000年ほど前に日本に伝わったとされています。日本の養蚕は、江戸時代から盛んになり、明治時代になると政府が外貨獲得のために養蚕・製糸業を奨励し、明治～大正時代の最も主要な産業として経済発展を支えてきました。1929年には養蚕農家戸数は221万戸となり、1930年の繭生産量は40万tに達し、世界を席巻しました。しかし、第二次世界大戦の影響、国際価格競争、及び化学繊維の普及等によって衰退し、2022年には養蚕農家戸数はわずか163戸、繭生産量は51tとなり、従事者の超高齢化も進んで国内養蚕業は待った無しの状況です。しかし近年、世界人口増加による繊維不足や、国際的サプライチェーンの不安定さ、そして石油由来繊維の環境負荷が懸念されるため、天然繊維であるシルクは世界的に見直されつつあり、日本でも新たに大規模養蚕を開始する試みがいくつか行われています。

日本ではカイコの研究も盛んに行われ、優れた研究が多くなされてきました。外山亀太郎博士は、1906年に動物で初めてメンデル遺伝を発見し、また、カイコの一代雑種の特性が優れていることを示し、数年の間に全国へ普及させました。他にも例えば、鈴木義昭博士は、カイコを用いて真核生物で初めてmRNAを単離し、古市泰宏博士と三浦謹一郎博士は、新型コロナウイルスワクチンにも応用されるmRNA

のキャップ構造を発見する等、カイコは日本の遺伝学や分子生物学等の発展に貢献しました。

カイコの産業利用研究は、1878年に内藤新宿試験場 蚕業試験掛が設置されて始まり、1911年に原蚕種製造所、1937年に蚕糸試験場、1988年に蚕糸・昆虫農業技術研究所となり、2001年に農業生物資源研究所に統合され、現在は農研機構へと研究が引き継がれています。その中で、2000年に田村俊樹博士によってカイコの遺伝子組換え技術が確立され、カイコ産業の可能性は大きく広がりました。すなわち、遺伝子組換えカイコによる高機能繊維の開発が可能となり、最初に技術確立の目安として蛍光タンパク質を融合したカラーシルク(写真)が作られました。現在は高品質な超極細・高染色性シルク等が開発されています。また、医薬品原薬を遺伝子組換えカイコで大量に作る技術の開発が進み、骨粗しょう症診断薬等が既に実用化されています。さらに現在、動物感染症予防のために、シルクの難消化性を活かして胃で分解されずに腸に届く経口シルクワクチンの開発が行われ、鶏で感染予防効果が示されており、手間のかかる注射作業が不要なワクチンの開発に期待が寄せられています。農研機構は、これまでに培かれた養蚕技術や研究を基に、カイコ産業と研究の新たな歴史を作っています。

(生物機能利用研究部門 絹糸昆虫高度利用研究領域)

Editor's Note

編集後記

いつも「農研機構技報」をご愛読いただきまして、ありがとうございます。

本第15号の特集は「アニマルサイエンス」です。農業・畜産現場が抱える課題・問題点を解決する、新しい研究成果を取りまとめました。皆様のお役に立てましたでしょうか。

「アニマルサイエンス」に関連する刊行物として、農研機構では「農研機構技報」のほかに「130周年記念誌」や「NIAHニュース」を発行しています。これまでの農研機構の取り組みや、最新の研究成果・活動を紹介していますので、ぜひ、以下のリンクよりご覧ください。

本号も最後までお読みいただき、誠にありがとうございました。

(編集委員長)

130周年
記念誌



NIAH
ニュース



農研機構技報

NARO Technical Report No.15

2024年3月15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 

農研機構は「みどりの食料システム戦略」を推進しています

<https://www.maff.go.jp/j/kanbo/kankyo/seisaku/midori/>



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。



農研機構



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