

＜別紙様式2＞研究実績報告書

令和5年度 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
「CSFの新たな総合的防除技術の開発」
研究実績報告書

I. 研究の進捗状況等

課題1では、イノシシの生態に関する調査を精力的に進めており、個体間接触の様式や頻度を明らかにした(課題1-1、1-2)。また、イノシシの密度推定モデルや成獣・幼獣判別モデルの開発(課題1-4)、環境材料を用いた豚熱ウイルス(CSFV)検出技術の開発(課題1-3)を行った。さらに、カメラトラップ調査やテレメトリー調査により、豚農場の周辺に生息する野生動物の出現状況や柵の通過状況などが明らかとなった(課題1-5)。課題2では、これまでに豚とイノシシから得られたCSFVのフルゲノム情報を解析し、ウイルスの侵入や事例間の関連性等を評価し、特に遠隔地での発生事例についてその由来を明らかにしてきた(課題2-1)。数理モデルを用いた解析により、豚農場におけるワクチン接種の効果や、野生イノシシにおける免疫獲得個体の密度とワクチン散布場所からの距離の関係を明らかにするとともに(課題2-3)、ワクチン散布によって増加した免疫個体の割合やワクチン散布量の目標値、成獣を対象とした免疫減衰及び経口ワクチン散布の効果等を推定する手法の検討を行った(課題2-4)。また、サーベイランスデータを用いて、CSF感染イノシシと非感染イノシシの死体の発見場所に関する地理的要因や感染イノシシと免疫イノシシの時空間的集積性を解析した(課題2-3)。イノシシの体細胞ゲノム情報に基づくマイクロサテライト分析では、推定された地理的障壁の分布と実際の海峡部や都市部の分布が一致していることが分かった(課題2-3)。さらに、海外からのASF侵入リスク評価モデルの検討や、豚農場での衛生対策に関する調査の実施・集計、衛生対策の社会経済学的な解析を実施した(課題2-2)。課題3では、CSFVのErns領域を組み替えることで、マーカー生ワクチンの開発に有用なワクチン候補株を2株作出するとともに、これら2株をブタに接種し、免疫原性、安全性、有効性を確認した(課題3-1)。豚の感染実験の結果、GPE-ワクチン株がワクチン接種豚体内において約3週間の残存性を示すこと、現在の国内流行株の豚に対する最少感染量(50%豚感染力価)が $10^{2.75}$ TCID₅₀であること、また、国内流行株の経口接種による発症防御に必要な血清中移行抗体価がGPE株に対する移行抗体価として90倍以上であることを明らかにした(課題3-2)。また、新しい遺伝子検査法であるナノポアシーケンサー(MinION)が、サンガー法と同程度の精度を維持しつつ、経費面でも遜色ないことから、サンガー法の代替法として十分に期待できることを示した(課題3-3)。さらに、物理的処置(温度及び乾燥)による指標ウイルス(CSFV/GPE⁻)の感染性持続期間の短縮または不活化条件を明らかにするとともに、化学的処置(消毒薬)による指標ウイルスの不活化条件について、有機物存在下及び消毒温度における最適な消毒薬濃度及び消毒時間を明らかにした(課題3-4)。豚農場で実施されている豚熱ワクチン接種について、全国の接種農場で得られた検査データを解析し、ワクチン接種時に移行抗体の影響がなかった個体と影響があった個体の、抗体価の分布の違いなどを検証した。また、接種時の抗体価を推定することや接種後のワクチンによる防御の獲得についてデータから判別することにより、接種条件の違いによる免疫獲得率の違いを比較した。さらに、農場内の繁殖豚の更新や、肥育豚の出荷を再現したシミュレーションモデルを構築し、接種時日齢や接種回数などの条件を変えた場合の、接種後の抗体価の動向

を推定した（課題3-5）。

1. CSF感染拡大における野生動物の役割の解明

課題1-1では、岐阜県と愛知県の実験地域で自動撮影カメラを設置し、豚農場周辺のヌタ場における野生動物の特徴を明らかにした。さらに、イノシシの接触行動や接触頻度などイノシシの生態と、地理的要因や季節的な変化、気象条件との関係性について解析を進める。また、岐阜県と愛知県で捕獲された成獣イノシシにGPS首輪を装着し、位置情報を継続して収集している。得られた位置情報を利用して、土地利用や季節的な分布の検討、現地における痕跡調査を進める。課題1-2では、栃木県の実験地域において、自動撮影カメラを用いたイノシシの調査と耳標型GPSを用いた追跡調査を実施し、収集したデータを用いて、個体間の接触様式を感染可能性に基づき類型化した。これらの調査は継続して行い、個体間接触様式の季節的変動などについての評価や行動圏解析などを行う。また、栃木県内のイノシシ肉加工施設において、イノシシ88個体分の組織試料を収集し、分析した。課題1-3では、環境材料を用いた検査により、食痕にイノシシ由来の体液等が付着していることを確認した。また、作成した唾液採材装置により採取した材料の検査と自動撮影カメラによる調査の結果、本装置にて唾液の採取が可能であることを確認した。さらに、装置表面を模したシャーレ表面に感染豚の唾液を塗布・乾燥した後、14日目までCSFV遺伝子が検出できることを確認した。これにより、作成した唾液採材装置により、イノシシから直接の採材をすることなく、環境材料としてイノシシの唾液を採取し、CSFV遺伝子の検査を実施する手法を確立出来たことから、本課題については令和4年度で終了した。課題1-4では、兵庫県の実験地域において、自動撮影カメラを用いた調査と掘り返し痕跡調査を実施した。また、カメラデータ、捕獲努力量データ、掘り返し指標を用いて3種類の密度指標の空間分布データから県域レベルでのイノシシの密度推定モデルを開発した。さらに、捕獲が密度に与える影響を推定するため、捕獲個体の画像から成獣・幼獣を判定するための深層学習を実施した。課題1-5では、岐阜県と愛知県の計4戸の豚農場において、自動撮影カメラを設置し、豚農場周辺に生息する野生動物の調査を行い、得られた静止画データを解析した。また、農場周辺で捕獲したタヌキにGPS首輪を装着し、移動情報に基づく分析を行った。腐肉食動物の生態研究では、死体区と比較用の対照区を設け、死体に誘引される種と死体を避ける種を把握した。

2. 疫学や分子疫学によるCSFの感染予測や対策の有効性の評価

課題2-1では、CSF発生農場及び感染イノシシからこれまでに得られたフルゲノム情報を用いて、ウイルスの変異状況、CSFVの日本への侵入時期、地域間への侵入経路や拡大経路を明らかにした。課題2-2では、ASFの国内侵入リスクの分析に関し、侵入リスクと暴露リスクについてモデル構造と評価方法を整理するとともに、侵入リスクおよび港湾検疫の有効性の評価方法を整理した。その結果、空港における詳細な検疫情報と、港湾における国際郵送品の検疫情報について、現時点ではリスク評価に利用できる信頼性の高い情報が得られないことが明らかとなったため、令和5年度以降の解析は見合わせることにした。また、豚農場でのCSFの発生要因、及び豚農場での衛生管理実施状況と実施に関わる意思決定構造を把握するため、CSF発生県および未発生県の豚農場へ都道府県を通して質問票を配布・回収し、その内容を解析した。衛生対策の社会経済学については、KAP、予防動機理論、ナッジの3つの理論間の関係性について整理した。課題2-3では、豚ワクチン接種後のCSF発生農場のデータと感染イノシシのデータを用いた解析により、豚農場におけるワクチン接種により、感染イノシシから豚農場への伝播率が大幅に減少したことを明らか

にした。また、ワクチン散布データとイノシシのサーベイランスデータを用いて、免疫獲得個体の密度とワクチン散布場所からの距離の関係を解析したところ、ワクチン散布地点から離れると、免疫獲得個体の密度が低下することが明らかとなった。さらに、サーベイランスデータを用いて、CSF感染イノシシと非感染イノシシの死体の発見場所に関する地理的要因を明らかにするとともに、感染イノシシと免疫イノシシの時空間的集積性を解析した。体細胞ゲノム情報に基づくマイクロサテライト分析では、算出された遺伝学的距離と地理学的距離の関係性に基いて推定した潜在的な地理的障壁がある地域が、瀬戸内海を含む海峡部のほか、平野部や都市部の分布と一致していたことが分かった。課題2-4では、イノシシのサーベイランスデータを用いて、イノシシにおけるCSFの致命率、超過死亡および回復率を推定し、岐阜県のCSF流行地域におけるワクチン散布によって増加した免疫個体の割合（免疫賦与割合）を推定した。また、日本では未知であるCSFの基本再生産数（ R_0 ：完全に感受性個体しかいない集団で、感染した一個体から生じる二次感染個体数の平均値）の値を仮定することで、ワクチン散布量の目標値を推定する手法を検討した。さらに、限られた時期（7月から11月）かつ成獣のみを対象とするものの、ワクチン散布の長期的効果の推定手法を開発した。

3. CSFの防疫対策の検証と開発

課題3-1では、CSFウイルスとその他の各種ペスチウイルスのウイルス遺伝子の相同性解析より、マーカー生ワクチンの開発に有用な E^{ms} 蛋白質の領域を同定し、この蛋白質をコードする4つのペスチウイルスのウイルス遺伝子の人工合成とクローニングに成功した。このうち2つのペスチウイルス（vGPE⁻/PAPeV E^{ms} およびvGPE⁻/PhoPeV E^{ms} ）について、感染性ウイルスの回収に成功した。この組換えウイルス（vGPE⁻/PAPeV E^{ms} およびvGPE⁻/PhoPeV E^{ms} ）を豚に接種することにより、国内流行株の感染による発症、およびウイルス排泄は既存ワクチンGPE⁻と同等に抑えられることが明らかとなった。さらに、ワクチン免疫豚の血清を用いて、市販のELISA検査キットによりワクチン株の増殖による抗体と攻撃株の増殖による抗体を識別できるか否かを評価した。課題3-2では、感染実験の結果、GPE⁻ワクチン株がワクチン接種豚体内において約3週間の残存性を示すこと、また、現在の国内流行株の豚に対する最少感染量（50%豚感染力価）が $10^{2.75}$ TCID₅₀であることが分かった。一方、国内流行株の経口接種による感染・発症防御に必要な移行抗体価については、GPE⁻株に対する移行抗体価が90倍以上の豚は原則的に発症防御されることが分かった。課題3-3では、各都道府県から動衛研に送付された野生イノシシ検体を使い、ナノポアシーケンサー（MinION）がサンガー法と同程度の精度を維持しつつ、簡便・迅速に豚熱国内流行株と経口生ワクチン株を識別でき、経費面でも遜色ないことから、ナノポアシーケンサーがサンガー法の代替法として十分に期待できることが示唆された。最終目標であるナノポアシーケンサーの豚熱遺伝子診断への応用は検証できたことから、当初の計画通り、本課題については令和3年度で終了した。課題3-4では、指標ウイルス（CSFV/GPE⁻株）を用いて、物理的処置（加温及び乾燥）した後のウイルス活性の変化を明らかにした。逆性石けん類3種、ハロゲン類（塩素系）2種、アルデヒド類2種の各消毒薬について、擬似粘液又は糞便溶解液と混合した高力価及び低力価の指標ウイルスを完全に不活化する各種消毒薬の濃度、温度、消毒時間を明らかにした。また、豚農場における間接伝播要因の推定のため、豚農場環境における指標ウイルスになると推察する候補ウイルスを14種選定し、ウイルス遺伝子検出法を設定した。豚農場等における病

原ウイルスの間接伝播要因の推定するための指標ウイルス14種の検出系を確立し、岐阜大学及び豚農場の協力により得た、豚舎内外環境スワブ、ぬた場由来材料、野生動物由来材料について指標ウイルス分布状況を調査した。課題3-5では、豚農場で実施されている豚熱ワクチン接種について、全国の接種農場で得られた検査データを解析し、各農場の初回接種においては、接種時の日齢にかかわらず高い抗体陽性率が得られる一方、抗体を獲得した母豚から生まれた子豚の接種においては、接種後の抗体陽性率が比較的low、また、接種日齢が早いほど低下する傾向があることを明らかにした。また、肥育豚のワクチン接種前の中和抗体価と、推定された抗体の半減期（10.9日）に基づいて、ワクチン接種時の抗体価を推定した結果、接種時抗体価が低いほど抗体獲得率が高い傾向にあることを明らかにした。さらに、ワクチン接種後の接種農場における抗体獲得状況を推定するシミュレーションモデルを構築するとともに、農林水産省が調査した母豚とその子豚のS/P比および中和抗体価のデータを用いて、S/P比から中和抗体価を、また中和抗体価からもS/P比を推定する方法を開発した。開発した方法を使用説明や技術的説明資料を含めた解析ツールとしてまとめ、農林水産省を通じて全国に配布した。全国の接種農場の状況が多様化しており一定の傾向を見いだすことが難しくなっていること、解析ツールを配布し成果の活用を達成したことから本課題は令和5年度で終了とする。