

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

「家畜の伝染病の国内侵入と野生動物由来リスクの管理技術の開発」

令和４年度 最終年度報告書

|      |                               |
|------|-------------------------------|
| 課題番号 | 18065101                      |
| 課題名  | 家畜の伝染病の国内侵入と野生動物由来リスクの管理技術の開発 |

|              |                                      |
|--------------|--------------------------------------|
| 研究実施期間       | 平成30年度～令和４年度（５年間）                    |
| 代表機関         | 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門    |
| 研究総括者        | 深井 克彦                                |
| 研究総括者<br>連絡先 | TEL : 042-321-1441                   |
|              | FAX : 042-325-5122                   |
|              | E-mail : fukai@affrc.go.jp           |
| 共同研究機関       | 沖縄県家畜衛生試験場                           |
|              | 全農飼料畜産中央研究所                          |
|              | 国立大学法人鳥取大学農学部農学部附属鳥由来人獣共通感染症疫学研究センター |
|              | 一般社団法人日本養豚開業獣医師協会                    |
|              | 株式会社微生物化学研究所                         |
|              | 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所                |

## ＜別紙様式 3＞最終年度報告書

### 1 研究目的

国内においては、高病原性鳥インフルエンザ（HPAIV）が毎年のように発生し、国外においては我が国が経験したことのないアフリカ豚熱（ASF）や未経験の血清型および系統のウイルスによる口蹄疫（FMD）の発生が継続している。このような越境性動物疾病が一度国内に侵入した場合、国内の畜産物の供給が不安定になるだけでなく、国外への輸出が制限されることによって海外における国産畜産物の競争力が低下する。

このため、本研究では、

1. 野生動物等を介した家畜伝染病の伝播リスクの評価  
により、国外から侵入する越境性動物疾病に対する野生動物や媒介昆虫の感受性を評価し、家畜に対するリスク評価を行う。
2. 伝染病の早期摘発や監視情報を活用した防疫の最適化  
により、HPAIウイルス（HPAIV）、ASFウイルス（ASFV）、FMDウイルス（FMDV）の現行検査法の有効性を検証するとともに、アルボウイルスや慢性消耗病（CWD）の新たな検査系を確立する。また、発生および拡散予測法を確立するのに必要な大規模データベースを開発し、感染拡大経路を推測する手法を開発する。
3. 伝染病発生時の危機管理技術の開発  
により、越境性動物疾病に対するワクチンや抗ウイルス薬の評価および開発に取り組む。

その結果、

1. 越境性動物疾病をはじめとする家畜伝染病の早期摘発や蔓延防止が可能になるとともに、
2. 越境性動物疾病の発生リスクを低減し、国内の畜産物の安定供給や輸出競争力強化が期待される。

## 2 研究内容

### (1) 研究課題

#### 1) 野生動物等を介した家畜の伝染病の伝播リスクの評価（深井克彦・農研機構）

本小課題においては、野生動物や家畜（禽）を用いた感染実験によってHPAIV、ASFV、FMDVに対する感受性や野生動物から家畜（禽）への伝播リスクを明らかにする。また国内のヌカカの生態を調査するとともにアルボウイルスのヌカカに対する実験感染によって媒介能を評価する。

#### (ア) 野生鳥類の高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する感受性解析および家禽へのウイルス伝播リスク評価

HPAIVに対する家禽の感受性については、これまで数多くの報告がなされている。しかしながら、野生鳥類のHPAIVに対する感受性については、野生鳥類の捕獲に規制がある上に、評価に足りる均一個体数の確保も難しいことから、その報告数は少ない。そこで、本課題では、商用目的で飼育販売されている野生鳥種を国内外から導入し、その野生鳥種についてHPAIVに対する感受性と群内におけるウイルス伝播性の評価を行うとともに、ウイルス感染時における野生鳥種の免疫応答を解析する。また、それらの野生鳥種およびニワトリ間のウイルス伝播性の評価を行うことで、家禽へのウイルス伝播リスクを明らかにする。そこで本課題では以下の項目に関する研究開発を行う。

##### ①野生鳥類におけるHPAI感受性解析

養鶏農場において鶏舎内への侵入が確認されるスズメをはじめとする留鳥やHPAIVの運び屋と考えられているカモ類を含む野生鳥種にHPAIVを感染させ、生存率や臨床徴候を観察するとともに、気管および総排せつ腔スワブからの経時的なウイルス排出量を明らかにする。また、生残個体については観察期間終了後に血清抗体の有無を確認する。これらの成績を総合的に評価し、野生鳥類のHPAIVに対する感受性を明らかにする。使用するウイルスは、近年国内において野鳥および家禽で流行したH5亜型HPAIVとする。また、対照として家禽（ニワトリ）についても同様の試験を実施する。

##### ②野生鳥類および家禽間のHPAIV伝播性解析

①の試験から感受性が明らかになった留鳥とカモ類の鳥種について、同鳥種間、留鳥とカモ類間、ならびに留鳥と家禽間のウイルス伝播性を明らかにするため、感染個体と非感染の同種または異種の鳥類の同居試験を実施する。また、①と同様に生残個体については観察期間終了後に血清抗体の有無を確認する。

##### ③野生鳥類のHPAIV感染に応答する免疫関連遺伝子の解析

①および②の試験に供試する鳥種について、鳥類由来の培養細胞（鶏胎児由来線維芽細胞等）を用いてHPAIVの増殖性およびウイルス感染時の宿主遺伝子の発現プロファイルを解析する。ニワトリにおける発現プロファイルと比較することによって、種特異的に発現する遺伝子群を解明する。また、HPAIV感染に応答するUSP18遺伝子を含む宿主遺伝子について、他鳥種における相同遺伝子をクローニングし、鳥種間における多型性やその機能について培養細胞を用いて比較解析する。

(イ) 野生哺乳動物における高病原性鳥インフルエンザウイルス感染実験および野生動物の農場周辺水場環境共有状況調査による家禽へのウイルス伝播リスク評価

冬季に国外より飛来する渡り鳥は、国内へのHPAIV侵入経路のひとつと考えられている。しかし、国内の家禽でのHPAI発生事例では、野生哺乳動物（野生動物）が関与する可能性も指摘されているものの、渡り鳥から野生動物、または野生動物から家禽への伝播の実態は不明である。一方で、小型哺乳動物は行動範囲が広く、渡り鳥を捕食する可能性もあり、かつ発生農場で目撃され、比較的頻繁に農場内や家禽舎内に侵入することから、渡り鳥と家禽を繋ぐHPAIVの伝播経路として注目されている。そこで本課題においては、イタチやテン等のイタチ科野生動物に着目し、HPAIV感染野生水禽の捕食等を介した感染と、感染イタチ科野生動物から家禽への感染についてのリスク評価を行う。また、家禽舎周辺にある溜め池等の水場にも着目し、野生動物や野鳥との水場の共有状況を明らかにするため、環境DNAを用いた検査方法を確立する。

①野生哺乳類を用いたHPAIV感染実験

国内に生息する野生イタチ科動物を捕獲して感染実験を実施し、呼吸器および自然界で想定される経口経路による感染性を評価する。ウイルスは、近年国内において野鳥および家禽において流行したH5亜型HPAIVを用いる。経口感染においては、当該ウイルスを感染させた鶏等の骨格筋を摂食させ、経時的な口腔、鼻腔および直腸スワブからのウイルス排出量および期間を明らかにする。また臨床徴候を観察するとともに抗体応答を評価する。さらに、イタチの糞便やイタチが使用した飲水からウイルス分離を行い、環境中へのウイルス排出についても検討する。観察期間終了後は剖検し、主要臓器を病理組織学的検査へ供する。なお、本感染実験は複数年（2～3年）での達成を目指す。期間内に捕獲個体数が得られない場合、捕獲（箱罟設置）場所の増数や専門業者への捕獲依頼を検討する。

イタチ科動物の感受性評価の一環として、ウイルス侵入門戸と考えられる呼吸器または消化器における、ウイルスレセプターである $\alpha 2, 3$ 結合型および $\alpha 2, 6$ 結合型シアル酸糖鎖の分布状況を解析する。また、近年のHPAIV流行株の糖鎖認識性を糖鎖アレイ等により解析するとともに、哺乳動物への増殖に関与する変異の有無を検討し、ウイルス側から感染性の評価を行う。

さらに、イタチ科の実験動物であるフェレットについても同様の感染実験を実施し、野生イタチのモデル動物としての可能性も検証する。

②環境DNAを用いた農場周辺環境への野生動物侵入状況解明技術の開発

農場周辺の溜め池等の環境水から環境DNAを調製し、各種動物の遺伝子を増幅し、次世代シーケンサーによる網羅的解析で水場を共有する動物種を決定するための実用的技術を開発する。特に農場では鶏由来のDNAが多く混入する可能性が高いことや糞尿の混入が予想されるため、それらを排除し、より効率的に水鳥や哺乳動物のDNAを増幅・検出する方法を開発する。

(ウ) アフリカ豚熱ウイルスのニホンイノシシから豚への伝播リスクの解析

ASFの防圧が困難な理由の一つとして、野生イノシシによって広範囲にウイルスの拡散が引き起こされる点が挙げられる。特に東欧諸国ではこの野生イノシシによる国境を越えたASFの発生・拡大が大きな問題となっている。一方、発生

が常在しているアフリカにおいては致死率の低いASFVが野生豚や野生イノシシの間で流行し、長期間ウイルスを排せつし続ける慢性型のASFが問題となっている。

日本に生息するASFVの野生動物宿主であるニホンイノシシの生息数や地域は近年拡大傾向を示し、田畑や養豚農家の飼料を荒らすことが問題となっている。我が国においても、万一ASFの発生が起こった場合、ニホンイノシシを介した発生拡大が懸念される。ASFに関する特定家畜伝染病防疫指針では、農場におけるニホンイノシシ等の野生動物の侵入防止の徹底について言及されているが、ASFのニホンイノシシに対する病原性や伝播リスクに関しては検証されていない。

そこで本課題では、日本におけるイノシシを介したASFVの伝播リスクを明らかにするため、近年の東欧諸国における流行株であるASFV Armenia07株についてニホンイノシシを用いた感染試験を行い、ウイルスの排泄機序や体内におけるウイルス動態および病理組織学的特徴を解析する。また、ニホンイノシシ間あるいはニホンイノシシと豚間の感染試験により、ウイルス伝播の有無や潜伏期間、水平伝播した感染動物体内におけるウイルス動態や病理組織学的特徴を評価する。これらの結果と豚を用いた感染試験結果を比較し、本ウイルスのニホンイノシシに対する病原性状を解明する。またその過程でASFの検査のための効果的な採材方法も確立する。さらにアフリカで慢性的に流行している比較的病原性の弱いASFV Kenia05株の感染試験を実施し、豚およびニホンイノシシにおけるいわゆる慢性型ASFの病態を評価する。なお、野生のニホンイノシシを捕獲し、試験に用いることは困難であるため、食用に飼育され、人との接触に慣れたニホンイノシシを試験に用いる。

#### (エ) 口蹄疫ウイルスの野生動物および家畜における病原性解析

FMDに関する特定家畜伝染病防疫指針においては農場における野生動物の侵入防止の徹底について言及されているが、野生動物におけるFMDVの病原性や伝播状況に関しては、世界的に見てもほとんど検証されていない。また当該指針においては、発生状況確認検査や清浄性確認検査として農場における臨床検査を義務付けているが、妊娠期動物の胎子の生前検査は不可能であることから、FMDVの胎子への影響や胎子の出生後の汚染源としての可能性に関しても検証されていない。

一方、これまでのFMDの病態解析において、FMDワクチンを投与後、比較的早期にFMDVに感染した豚は、ワクチン非投与豚よりもウイルスの排泄期間が延びること、およびワクチン投与後に感染した豚は、ウイルスの非構造蛋白質に対する免疫応答が弱く、感染動物と非感染動物を識別するキットで摘発できないことが指摘されている。当該指針におけるワクチンの備蓄や使用方針を改定する際には、これらの問題を慎重に考慮する必要があるため、本課題では以下の項目に関する研究開発を行う。

- ①イノシシ等の野生動物を用いたFMDVの感染試験（同種の野生動物間のみならず、家畜と野生動物間の水平伝播についても検証する）
- ②妊娠期動物や泌乳期動物を用いたFMDVの感染試験
- ③FMDワクチン投与豚を用いたFMDVの感染試験（ワクチン投与からウイルス感染までの期間および感染させるウイルス量や種類をこれまでの試験とは異なる形

で行う)

感染試験に用いるウイルス株は、近年東アジア諸国で流行し、今後我が国へ侵入する可能性のある複数の血清型、トポタイプおよび系統のものとする。また、野生動物を捕獲し、試験に用いることは困難であるため、食用に飼育され、人との接触に慣れたイノシシ等を試験に用いる。

#### (オ) アルボウイルス伝播機序と媒介節足動物の国内生息域の解明

畜産に大きな被害をもたらすアルボウイルス感染症は、ヌカカ等の吸血性の節足動物によって媒介されるが、疾病流行リスクはそれらの分布や活動時期および発生量等の生態の影響を受ける。媒介節足動物の分類学上の再整理や簡便な同定技術の開発は、生態研究を推し進める上で必須であるが、近年の分子生物学を基盤とした技術の進展によりそれらは可能となってきた。本課題では、牛へのアルボウイルス媒介能や分布域が不明な媒介節足動物による伝播機序と国内生息域を解明するため、以下の項目に関する研究開発を行う。

- ①牛のアルボウイルスの主要な媒介節足動物である*Culicoides*属ヌカカを国内各地で採集し、その種類相を明らかにする。
- ②国内に分布する*Culicoides*属ヌカカのミトコンドリア等の一部配列を明らかにし、DNAバーコーディングによる簡便な同定を可能にする。また、主要な媒介種の吸血源を分子生物学的手法により解明する。
- ③牛アルボウイルスを国内在来*Culicoides*属ヌカカに実験的に感染させ、それらの媒介能を評価する。
- ④野外で採集された*Culicoides*属ヌカカのアルボウイルス保有状況を明らかにする。

### 2) 伝染病の早期摘発や監視情報を活用した防疫の最適化（山本健久・農研機構）

本小課題では、今後発生が危惧される重要家畜伝染病について、海外流行株や国内で新たに確認された株を対象に、流行状況の実態を把握するとともに、これらの病原体の性状を明らかにし、適切な診断法を検討する。また、全国で実施されている家畜疾病サーベイランスの結果等、家畜伝染病の流行状況の解析等に必要となる多様なデータについて、これらのデータを包括的かつ集約的に収集・分析するための大規模データベースを構築する。さらに、ここから得られたデータを活用して、感染症の流行状況を解析し、発生を早期に発見できる技術を開発する。

#### (ア) 口蹄疫ウイルスの変異流行株の抗原性解析に基づく現行診断法の改良および類症疾病病原体との鑑別可能な診断法の開発

FMDについては、我が国で経験したことのない血清型や系統のウイルス株による発生が諸外国で頻発しており、また現行のワクチンバンクのワクチンに対して効果が低いウイルス株の出現が報告されている。そのため、我が国でもそれらに対応した摘発・防疫体制を構築する必要がある。また、海外ではFMDと症状だけでは鑑別しにくいセネカウイルスや水疱性口内炎ウイルス等の類似した感染症の発生報告があり、FMDとの類症鑑別の重要性が高まっている。

そこで本課題では、海外におけるFMDの最新流行株の抗原性の解析により、当該株の特性や変異の状況を解明する。またその結果を活用し、現行検査方法の有効性を検証するとともに、野生動物にも適用可能な検査方法を開発する。さらに、FMDの類症疾病病原体に対する鑑別診断法および類症水疱性皮膚病の発生初

期段階における消毒薬の効果的な使用法を確立する。具体的には、以下の項目に関する研究開発を行う。

- ①抗原変異が示唆される近年のFMDVに対する現行診断法の有効性を検証し、必要に応じて流行株に対応した診断法へ改良する。
- ②モノクローナル抗体との反応性の解析および遺伝子解析を用いて、海外流行株の抗原性状の変化を解明する。
- ③FMD類似疾病の病原体に対する鑑別診断法を開発する。
- ④FMD類似疾病の病原体に対する消毒薬の効果を検証し、これらの疾病発生時の消毒薬の効果的な使用法を確立する。

#### (イ) アフリカ豚熱の監視情報の収集と防疫の最適化

ASFは近年、アフリカおよび東ヨーロッパにおいて発生が継続している。2018年には東シベリアで初めて発生が確認され、国境を接するモンゴルおよび中国に感染が拡大する可能性が高まっている。東アジア諸国において感染が拡大した場合には我が国への侵入リスクも高まると考えられる。そこで本課題においては迅速かつ高感度な診断法である遺伝子検査法について、包括的および型特異的な手法の有効性を検証する。さらに、次世代シーケンサーによる全ゲノム解析手法を確立し、ASFV分離株の性状や遺伝子変異を明らかにする。

#### (ウ) 高病原性鳥インフルエンザの監視情報の収集と防疫の最適化

H5亜型HPAIはアジア、アフリカ、ヨーロッパおよび北アメリカ大陸にまで拡大し、ワクチンを使用した国々においてはウイルスが常在化し、日々ウイルスが進化している状況にある。また、2013年3月から中国において人に感染し、死亡させているH7N9亜型鳥インフルエンザウイルスは、2016年には高病原性化したことから、将来的に高病原性に変化する可能性を秘めた低病原性鳥インフルエンザウイルス（LPAIV）や鳥インフルエンザウイルス（AIV）についても、情報の蓄積が求められている。近年、我が国のH5亜型HPAIの家禽における発生は、野鳥によりもたらされていることが示唆されていることに加え、海外からの旅客により持ち込まれる家禽肉がウイルスに汚染している事例も報告されている。これらのことから、我が国へのHPAIV侵入の早期摘発を行うためには、世界中のHPAIVの動向を監視しておく必要がある。

そこで本課題においては海外研究機関と連携し、海外における家禽および野鳥でのHPAIの発生状況と、分離されたHPAIVの疫学情報および遺伝子情報を、研究期間の5年間を通して収集する。特にこれまでHPAIVに関する情報収集またはウイルスの導入を行っている台湾、中国、韓国、アメリカ、ロシア、ベトナムおよびカンボジアに加え、その他の国々についても、ウイルスを導入するための交流を図る。

疫学や遺伝子解析の情報を踏まえ、候補となった家禽株だけでなく野鳥株も考慮に入れたHPAIVを導入し、血清学的検査用および抗原解析用の抗血清を作製する。また、家禽類への感染試験により、病原性やウイルスの宿主体内における増殖性を解析することにより、それらの性状を明らかにする。さらに導入したウイルスについては、国内侵入時の早期摘発に備えた診断系の開発および既存の国内診断系の有効性を検証するとともに必要に応じて新たな検査系を検討し、都道府県への情報提供も行う。また、これらの検査系について、野鳥由来

HPAIVに対する適用可能性も検証する。

#### (エ) アルボウイルス感染症の監視情報の収集と防疫の最適化

海外におけるアルボウイルス感染症の発生情報を入手・分析するとともに、流行地に隣接する国内各地で得られる未同定ウイルス株の性状解析を行い、その検出法を開発するため、以下の項目等に関する研究開発を行う。

- ①海外における牛等の家畜のアルボウイルス感染症の監視状況をインターネットや文献情報から収集し、国内への侵入リスクを検証する。また、アジアやオセアニア地域の研究機関と連携して、発生情報と合わせて監視や診断体制に関する情報を入手する。
- ②国内外から入手した未解析のアルボウイルス株（主に流行性出血病ウイルスやパリアムウイルスグループ）の性状を明らかにし、それらに最適化された検出法を開発する。
- ③野外材料から分離された未同定および未分類のアルボウイルス株のゲノム構造の詳細を明らかにし、既存の検査方法が適用できない場合は新たな検出法を開発する。

#### (オ) 慢性消耗病の検査法の開発

シカ科動物の慢性消耗病（CWD）は、動物のプリオン病のひとつであり、北米を中心に感染動物数および感染地域が拡大している。また韓国においてはCWDに感染したアカシカをカナダから輸入したことでCWDが2001年に発生し、それ以降、散発的な発生を繰り返している。2016年にはノルウエーにおいて欧州初となるCWDがトナカイで摘発され、感染拡大が起こっている。ノルウエーのCWDは、異常プリオンの感染によらない、いわゆる孤発性に発生した可能性も示唆されている。国内における発生はこれまで報告されていないが、一旦発生すると根絶が困難であることから、国内監視が重要となる。

プリオン病検査における検体として、中枢神経組織、特に異常プリオン蛋白質が蓄積しやすい延髄門部を用いることが一般的である。しかし、野生シカを対象としてCWDサーベイランスを行う場合、検体採取を行う狩猟者等の肉体的負担が著しく大きく、必要な検体数を確保することが難しい。一方、他の動物のプリオン病とは異なり、CWDにおいては感染性が末梢組織、唾液や血液のみならず糞尿にも分布し、これらの部位における感染性は、CWD感染後比較的早期から検出可能であるとの報告がある。そのため、これらの体液や糞尿はCWD検査の検体として有望と考えられる。

そこで本課題においては、個体からの採取が最も簡便である糞便を検査対象とした、微量CWDプリオン検出法を開発し、CWDサーベイランスに応用することを目的とする。ただし糞便中の異常プリオン蛋白質の量は、中枢神経組織に蓄積したそれと比較して著しく低いことが予想されることから、検出法には超高感度に異常プリオン蛋白質を検出可能であることが要求される。そのため多検体測定が可能であり、バイオアッセイを上回る検出感度を持つRT-QuIC (Real Time-Quaking Induced Conversion) 法を確立する。またその過程で、RT-QuIC法においては異常プリオン蛋白質の濃縮とプリオン増幅反応阻害物質を除去するため、糞便の前処理方法についても確立する。更に検査結果の特異性を確保するため、別の試験管内プリオン増幅法であるPMCA (Protein Misfolding Cycle



Assay) 法も整備する。またその過程で、異常プリオン蛋白質の濃縮とプリオン増幅反応阻害物質を除去するため、糞便の前処理方法についても確立する。

#### (カ) 多様な家畜疾病データに基づく発生・拡散予測手法の開発

対策を実施すべき疾病の選択や具体的な対策の立案、あるいは対策の有効性評価のためには、疾病ごとに発生状況を把握し、感染拡大の様相を評価・予測することが重要である。こうした予測等を的確に実施するためには、各種サーベイランスの結果や各診断施設における疾病の把握状況等を活用する必要がある。そこで本課題においては、多様な家畜疾病データを収集・分析し、得られたデータに基づいて疾病の発生や感染拡大の状況を予測・分析する手法を開発する。

具体的には、まず、家畜疾病の発生状況の把握や流行状況の予測・分析に必要な多様なデータを効率的に収集・分析する大規模データベースを構築する。収集すべきデータとしては、家畜伝染病を対象として各都道府県の家畜保健衛生所によって実施されている各種のサーベイランスの結果や、家畜保健衛生所が日常的に行っている各種病性鑑定の結果等が含まれる。このため、各都道府県が直接接続してデータを報告することが可能なクラウドベースのデータベースシステムとする。本データベースへは、これらの業務を統括する農林水産省担当部局や、データの解析を行う農研機構動物衛生研究部門が接続できるものとする。

さらに、本データベースで得られたデータに加えて、家畜個体識別全国データベース（耳標データベース）のデータや、病原体の解析で得られる遺伝子情報をはじめとする、各種の関連データを利用して、伝染病の発生状況の把握や、流行状況の分析・予測が可能な手法を開発する。具体的には、FMD等のウイルス性感染症の流行について、各発生農場の摘発日や発症の経過、病原体の遺伝子情報等を総合的に解析し、感染拡大の経路（感染ネットワーク）を推測する手法を開発する。また、耳標データベースによる牛の移動履歴のデータとヨーネ病が摘発された牛のデータから、農場の潜在的な感染状況を推定する手法や、牛ウイルス性下痢（BVD）の持続感染牛（PI牛）の摘発状況から、PI牛による感染拡大経路を推測する手法などを開発する。

### 3) 伝染病発生時の危機管理技術の開発（内田裕子・農研機構）

本小課題においては、国外から侵入するリスクのある家畜伝染病発生時および国内で流行するにもかかわらず、適正な制御法が確立していない疾病に対する危機管理技術として、ワクチン、抗ウイルス剤または消毒薬の資材の開発を行うことを目標とする。具体的には家畜伝染病のワクチン開発に関するデータの蓄積、新たな効果的なワクチンの開発および既存ワクチンの有効性の検証を行うとともに、ワクチン接種時にその有効性が発揮されるまでに使用される消毒剤の効果的な使用方法の確立および抗ウイルス薬の開発を行うことにより、家畜伝染病のまん延防止対策の向上が図られる。

#### (ア) 新規鳥インフルエンザワクチンの開発

H5N1発生において、発生規模が大きく摘発とう汰による防疫が困難な場合、発生拡大を防ぐために摘発とう汰に加え、緊急的にワクチンの使用を検討する必要がある。緊急ワクチンネーションを実施する状況においては、摘発とう汰によ

る防疫措置に多くの人員が必要なため、より省力的に多数羽に投与可能なワクチンが求められる。先行研究で作出した組換えベクターワクチンであるrAPMV-10/HAは、点眼投与で十分な感染防御効果を示した。一方で、本ワクチンは遺伝子組換え生物であるため、使用に際し環境へのリスク評価等様々な知見を集積する必要がある。また、HPAIVは変異を起こしやすく抗原部位が変化することにより、ワクチン効果が減弱することが問題となっている。組換えベクターワクチンは、粘膜へのIgAの誘導が期待されるため、血中へのIgGの誘導を目的とする従来の不活化ワクチンと比べ、より抗原性の広いウイルス株に効果がある可能性がある。

そこで本課題では以下の項目に関する研究開発に基づき、省力的に多数羽へ投与することが可能なワクチンを開発する。

#### ①ワクチンの使用法の検討

rAPMV-10/HAについて、異なる投与経路における効果の差を検証する。その際、投与量、投与週齢および投与回数についても考慮し、ワクチンの効果的な使用方法の確立を目指す。

#### ②抗原性の異なるHPAIVに対するワクチン効果の検証

rAPMV-10/HAで免疫した鶏に、抗原性の異なるHAタンパク質を有するHPAIVで攻撃し、鶏の症状およびウイルス排せつ量からワクチンの効果を検証する。同時に、従来の不活化ワクチンで免疫した鶏でも同様の試験を行い、ワクチン効果を比較することにより、本ベクターワクチンの優位性を検証する。

また、抗原性が大きく異なるウイルス株に対しては、ベクターに組み込む抗原を変え、より流行株に近い抗原とすることにより、ワクチン効果の改善が期待できるが、そのようなウイルスを作製するためには、現在少なくとも1か月程度を要する。その期間を短縮することを目的に、挿入する抗原遺伝子を容易に変えることが可能なプラスミドを構築する。

#### ③ワクチンの安全性の検証

rAPMV-10/HAを鶏に接種し、ウイルスの排泄および症状について経過を観察する。また、組換えウイルスを接種した鶏と未接種の鶏を同居させ、未接種鶏からのウイルス排泄、抗体陽転を調べることにより、ウイルス伝播性について週齢の違いも考慮して検証する。また環境中への排泄と伝播リスクを想定し、APMV-10のマウス等の哺乳動物および野鳥におけるウイルスの感染性について検討を行う。

#### ④鶏以外の家禽に対するワクチンの検証

rAPMV-10/HAのベクターとした鳥パラミクソウイルス血清型10の鶏以外の家禽への感染性を明らかにするとともに、それらの家禽に対するワクチン効果を評価する。効果が低いと判定された場合、鳥パラミクソウイルス血清型2および6をベクターとしたワクチンについても検証を行い、鶏以外の家禽において効果的なワクチンベクターを選別する。

### (イ) ワクチン開発に資するアフリカ豚コレラウイルスの分子基盤の解析（令和元年度まで）

2007年にアフリカからユーラシア大陸コーカサス地方にASFVが侵入し、当地域および東欧を中心にまん延している。その流行株は潜伏期間が3～5日で、10日

以内に100%が死亡する強毒株として知られる。ASFの際立った特徴として感染動物の体内で抗体による中和が誘起されないため、未だワクチンが開発されておらず、コントロールは困難を極めている。そこで、本研究課題ではASFVの性状を分子生物学的に解析し、ワクチン開発につながる分子群の特定を目指す。そこで本課題では以下の項目に関する研究開発を行う。

- ①ASFV感受性細胞の選定と有用性の検討
- ②遺伝子改変用の転移ベクターの作製と組換えウイルス作出法の確立
- ③特定の遺伝子を欠損したウイルス株の作出と遺伝子の機能解析
- ④ワクチン開発に有用な(標的となる)遺伝子(群)の選定とその詳細な機能解析

#### (ウ) 口蹄疫およびアフリカ豚熱に対する効果的なまん延防止技術の検証

FMDやASFが万一国内で発生した場合、まん延を防止するために迅速かつ効果的な防疫措置を執る必要がある。FMDにおいては移動制限および摘発とう汰などが実施されるが、それでも感染拡大を抑えることが出来ない場合、殺処分を前提としたワクチン接種および抗ウイルス剤の投与を行うことがある。ただしワクチン接種は、感染後の症状や排せつを抑制する反面、免疫獲得までに数日を要する上、抗原性が異なると備蓄ワクチンが効果を示さない可能性がある。それに対して、抗ウイルス剤はウイルスの抗原性によらず即効性があり、迅速なまん延防止技術として有用である。これまでに、ピラジンカルボキサミド誘導体 T-1105が2000年日本株および1997年台湾株の感染豚における症状およびウイルス排泄を低減する効果を確認しているが、今後、我が国において口蹄疫が発生した場合の防疫対策として活用するため、近年の流行株に対する薬効評価も必要となる。さらに、より効率的な投与方法、ウイルスごとの薬効の差異やそのメカニズムの検証、および新たな抗ウイルス剤候補物質の探索が求められている。

一方、ASFに対しては、実用的なワクチンが開発されておらず、現在我が国で備蓄している防疫資材も無い。そのため、新たな抗ウイルス剤候補物質の探索や消毒方法等も含めたまん延防止技術の検証を行う。

##### ①抗ウイルス剤T-1105の薬効評価およびより効果的な使用法の検証

培養細胞におけるFMDV近年流行株の抗ウイルス剤T-1105による増殖抑制試験を行うことにより、T-1105の抗ウイルス活性を評価する。また、ウイルス接種した豚に一定頻度でT-1105を投与し、経時的に臨床症状を観察するとともに、血清、唾液および鼻汁等の臨床サンプルからウイルス感染と排泄量を解析することで、豚におけるT-1105の薬効を明らかにする。また、T-1105の薬効が低かったウイルス株に対しては、投与量や時期の条件変更により追加で評価を行い、より効果的な投与方法を確立する。さらに、発生現場で想定されるウイルス暴露後に抗ウイルス剤投与を開始した場合や、T-1105とワクチンの併用効果についても評価する。

##### ②FMDVに対するT-1105の有効性の分子基盤解析

T-1105はRNA依存性RNAポリメラーゼを阻害することでウイルスの増殖を阻害するが、その効果は2000年日本株と1997年台湾株で異なっている。そこで、抗ウイルス剤T-1105とウイルスRNAポリメラーゼとの相互作用の評価系について検証する。さらに、抗ウイルス剤の効果に差異が見られたウイルスの遺伝子配列を

次世代シーケンサーで決定し、リバーシジェネティクス実験系を用いて抗ウイルス剤の薬効に関わる遺伝子および作用メカニズムを解析する。

#### ③FMDVに対する新たな抗ウイルス剤候補物質の探索

FMDVは遺伝子変異性が高く、抗ウイルス剤に耐性化したウイルスが出現する可能性があるため、作用機序の異なる抗ウイルス剤が必要である。さらに、牛で有効性を示す抗ウイルス剤や、より宿主毒性の少ない抗ウイルス剤の開発が求められる。そのため、新たな抗ウイルス剤の候補物質を外部機関の化合物ライブラリから探索する。簡便かつ安定した結果の得られる評価実験系を確立し、化合物ライブラリから導入した試料についてスクリーニングを行う。抗ウイルス活性をもつ化合物について、培養細胞におけるFMDVの増殖抑制試験を行うとともに、宿主毒性等も含め、感受性動物への利用可能性を検証する。

#### ④ASFVに対する新たな抗ウイルス剤候補物質の探索および簡便かつ効果的な消毒薬の使用法の検証

③と同様にASFVに対する抗ウイルス剤候補物質を外部機関の化合物ライブラリから探索する。さらに、一般的な消毒薬のASFVに対する不活化効果を培養細胞および遺伝子検出系を用いて評価し、ウイルスの侵入・まん延防止のために有効な使用方法を確立する。

### (エ) ワクチンによる豚群でのインフルエンザ制御手法の確立

従来、豚インフルエンザウイルス（IAV-S）は、咳・鼻水等の呼吸器症状を呈した豚から分離されることが知られていた。しかしながら、これまでの国内外における調査により、臨床的に健康な豚の5～6%がIAV-Sを保持していることが明らかになっている。一方、現行のIAV-Sのワクチンは、およそ40年前に国内で流行していたIAV-S（古典的豚H1亜型：1979年分離株、H3亜型：1969年分離株）がワクチン株として使用されている。この状況下で、現行ワクチンで免疫した豚にワクチン製造株と抗原交差性が認められない古典的豚H1亜型ウイルスを感染させた場合、鼻腔からのウイルス排泄を抑制できないという問題が生じているとともに、近年流行しているH3亜型ウイルスやパンデミックH1亜型ウイルスに対する国産ワクチンの効果は不明である。そこで、本課題では以下の項目に関する研究開発を行う。

#### ①国内流行するIAV-Sの収集と性状解析

養豚場で呼吸器症状を呈した豚から採材した鼻腔拭い液や気管および肺組織に加えて、健康豚の鼻腔拭い液からウイルス分離を行うとともに、分離されたウイルスの次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析に基づき、IAV-Sの亜型同定や各遺伝子分節の遺伝子系統学的な分類を行うことにより、国内における流行状況を把握する。また、過去に分離・収集されたIAV-Sおよび本研究で新たに分離されたIAV-SのHAタンパク質の抗原性を解明する。

#### ②現行豚インフルエンザワクチンの効果の検証

パンデミックH1亜型ウイルスやH3亜型ウイルスに対する現行の国産ワクチンの効果を検証する。その際、安定して感染成立させるために、超音波式ネブライザを用いて霧化したIAV-Sを鼻腔から吸引させた豚から定期的に鼻腔スワブや血清を採取する。ウイルス排せつ量、抗体価の上昇等を調べ、ワクチン効果を検証する。

### ③試作ワクチンの製造と効果の検証

現行ワクチンの効果・流行状況に関する情報・抗原性・発育鶏卵における増殖性等に基づいて、H1およびH3亜型IAV-Sから新規ワクチン製造株の候補となるウイルスを複数選抜する。ネブライザ法によるウイルス攻撃を行い、定期的に鼻腔スワブや血清を採取する。ウイルス排泄量や抗体価の上昇等を調べ、ワクチン効果を検証する。また、ワクチン製造候補株によるホモの攻撃に対する防御効果を調べるとともに、最新の流行株や候補株とHAタンパク質の抗原性が異なるウイルス株についてもその効果を検証する。

## (2) 達成目標

### 1) 野生動物等を介した家畜の伝染病の伝播リスクの評価

#### (ア) 野生鳥類の高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する感受性解析および家禽へのウイルス伝播リスク評価

2種以上の野鳥に対して、近年、国内において野鳥および家禽で流行した2種以上のH5亜型HPAIVへの感受性ならびにそれらの野鳥について、同鳥種間や異鳥種間、留鳥と家禽間のウイルス伝播性を明らかにする。

上記のうち1種以上の野鳥について、HPAIV感染に応答する1種以上の宿主遺伝子について、鳥種間における多型性やその機能について明らかにする。

これらの成果は、今後、我が国に飛来する野生鳥類の種類、個体数および生息場所等の情報と合わせてHPAIの発生予察の信頼性を高め、行政部局と共有することによって、より効果的な農家への注意喚起へとつながり、農場バイオセキュリティの向上に基づく国家防疫の強化に活用できる。

#### (イ) 野生哺乳動物における高病原性鳥インフルエンザウイルス感染実験および野生動物の農場周辺水場環境共有状況調査による家禽へのウイルス伝播リスク評価

2種以上の野生イタチ科動物ならびにイタチ科実験動物のフェレットについて、HPAIVに対する感受性やこれらの哺乳類から家禽への伝播リスクを明らかにする。

養鶏農場周辺の水場を共有する動物種を決定する新たな技術を1種以上開発する。

これらの成果と、鶏舎に侵入する野生動物の種類、個体数および生息場所等の情報を合わせて、これらの野生動物によるウイルス伝播リスクを示すことにより、農家へのHPAIに対する注意喚起へとつながり、農場バイオセキュリティの向上に基づく国家防疫の強化に活用できる。

#### (ウ) アフリカ豚熱ウイルスのニホンイノシシから豚への伝播リスクの解析

近年流行している1種以上のASFV強毒株について、ニホンイノシシの感受性ならびにイノシシ間およびイノシシと豚間の水平伝播リスクを解明する。

1種以上の慢性型ASFV株について、ニホンイノシシおよび豚における病態を解明する。

これらの成果は、我が国において発生経験がないASFについて、適切な病性鑑定材料の採取・検査方法や類症鑑別に必要な臨床症状や肉眼病変に関する有用な情報となり、より迅速かつ高精度な防疫体制の構築につながる。

#### (エ) 口蹄疫ウイルスの野生動物および家畜における病原性解析

近年流行しているFMDVについて、イノシシ等野生動物や妊娠・泌乳豚の感受性、イノシシ間およびイノシシと豚間の水平伝播リスク、およびワクチン投与豚におけるウイルス排泄状況や免疫応答を解明するために、10回以上の感染試験を行う。

これらの成果は、行政部局がFMDの防疫対策の改訂を検討する際に活用可能な有用な情報となる。

#### (オ) アルボウイルス伝播機序と媒介節足動物の国内生息域の解明

*Culicoides*属ヌカカ40種程度に適用可能なDNAバーコーディング領域を標的とした分子生物学的同定法を開発し、国内のヌカカの種類相や吸血源を解明する。

国内生息ヌカカについて、新たに2種類以上のアルボウイルス媒介能と保有状況を明らかにする。

これらの成果は、ヌカカ類のモニタリングや国内におけるアルボウイルス伝播リスクの評価に活用することによって、サーベイランスや予防・防疫の体制の効率化を検討する際に有用な情報となる。また、現場での啓発活動や対策を実施する際の科学的根拠となり、アルボウイルス感染症による損耗の減少に貢献する。

### 2) 伝染病の早期摘発や監視情報を活用した防疫の最適化

#### (ア) 口蹄疫ウイルスの変異流行株の抗原性解析に基づく現行診断法の改良および類症疾病病原体との鑑別可能な診断法の開発

近年流行している30株以上のFMDVについて、抗原性や変異状況を解明するとともに、現行検査方法の家畜における有効性を明らかにするとともに、その検査の野生動物での使用法を確立する。

3種以上のFMD類症疾病の病原体に対する鑑別診断法を確立し、それらの発生初期段階における消毒薬の使用法を整備する。

これらの成果は、より特異性の高いFMD診断体制を推進していく上で有用な知見として行政部局や検査・診断担当機関にて活用できる。

#### (イ) アフリカ豚熱の監視情報の収集と防疫の最適化

近年流行している2株以上のASFVについて、包括的および型特異的な遺伝子検査手法の有効性を検証する。また、次世代シーケンサーによる全ゲノム解析手法を確立する。

これらの手法によりウイルスの系統および遺伝子変異が明らかとなり、病原株の比較検討に役立つデータを得るとともに、ウイルスの侵入経路や由来を検証していく上で有用な知見として行政部局や検査・診断担当機関に提供できる。

#### (ウ) 高病原性鳥インフルエンザの監視情報の収集と防疫の最適化

3株以上の海外における家禽および野鳥から分離されたHPAIVについて、ウイルス学的性状ならびに抗原変異の変遷を解明する。

これらの成果は、HPAIVの国内侵入よりも前にウイルスを用いて現行検査法の検証・改良を可能にすることに加え、ウイルスの性質を都道府県の家畜保健衛生所に情報提供しておくことにより、国内へのHPAI侵入時に農場での早期発見の一助となり、ウイルスの拡散を効率的に抑制可能にする。また、抗原変異の変遷を解明することにより、緊急ワクチンの為の事前準備に活用することがで

きる。

**(エ) アルボウイルス感染症の監視情報の収集と防疫の最適化**

2 件以上の海外における家畜のアルボウイルス感染症の情報から、それらの国内侵入リスクを明らかにする。

2 株以上のアルボウイルスについて新たに遺伝学的性状を明らかにし、検出法を開発する。

これらの成果は、特に国内新規のアルボウイルス感染症の検査の強化に活用されるとともに、既知のアルボウイルス感染症も含めて海外における発生動向を監視しながら防疫体制を強化することにもつながり、家畜におけるまん延防止と生産上の損耗回避が可能になる。

**(オ) 慢性消耗病の検査法の開発**

1 種以上の微量CWDプリオン検出法を確立する。またそれに伴い、必要な異常プリオン蛋白質の濃縮方法とプリオン増幅反応阻害物質の除去方法も合わせて開発する。

これらの成果により、CWDサーベイランスをより効率的に実施することが可能になり、本病の国内監視体制が向上するとともに、万一発生が確認された際の迅速な防疫対応が可能となる。

**(カ) 多様な家畜疾病データに基づく発生・拡散予測手法の開発**

国内において実施されている全ての監視伝染病のサーベイランスや各種病性鑑定の結果等を集計・分析するデータベースシステムを開発する。

2 種以上の家畜疾病について、感染ネットワーク解析手法を用いて感染拡大経路を解明する。

これらの成果により、従来十分に利用されてこなかった疾病関連データの総合的な活用が可能になり、関係部局が集計・分析結果等を即時的に参照・利用できるようになる。また、感染症の感染拡大経路を解明することにより、感染源となりやすい農場や感染しやすい農場の特徴が明らかになる。これらを統合することにより、さらなる感染の防止や将来の感染に備えた衛生対策の指導の重点化等が可能となる。

**3) 伝染病発生時の危機管理技術の開発**

**(ア) 新規鳥インフルエンザワクチンの開発**

組換え鳥パラミクソウイルスをベクターとしたワクチンについて、省力的かつ多数羽に投与可能な方法を 1 種類以上確立する。

ワクチンの安全性について、2 種類以上の週齢の鶏で評価するとともに、環境への拡散リスクも明らかにする。

抗原性の異なる 2 種類以上のウイルス株に対するワクチンについて、それらの有効範囲を、鶏および鶏以外の家禽について明らかにする。

これらの成果により、HPAIの大規模発生時に効率的かつ効果的なワクチン接種を実施することが可能になり、それ以降の国内における本病のまん延を最小限にとどめることが可能になる。

**(イ) ワクチン開発に資するアフリカ豚コレラウイルスの分子基盤の解析（令和元年度まで）**

1 株以上のASFVについて、特定の遺伝子を欠損したウイルス株の作出法を確立

する〔標的として15遺伝子以上(15ウイルス株以上)〕。増幅・回収されたウイルス株について性状解析を行い、当該欠損との関連性を明らかとすることで、ワクチン開発に有用な(標的となる)遺伝子(群)が選定される。

これらの成果は、未だ実用化されていないASFワクチン開発を推進するための基盤的な知見として活用可能となる。

#### (ウ) 口蹄疫およびアフリカ豚熱に対する効果的なまん延防止技術の検証

3株以上のFMDVについて、T-1105の薬効を評価し、株間の薬効の差異やメカニズムを解明するとともに、より効率的な投与方法を確立する。

FMDVおよびASFVについて、その感染価を50%以上抑える新たな抗ウイルス剤候補物質を選定する。

ASFVについて、一般的な消毒薬3種類以上についてASFVに対する効果を評価し、まん延防止のための有効な使用方法を確立する。

これらの成果は、多様な型のFMDVあるいはASFVに対する事前対応型の防疫対策に有効な知見として行政部局での活用が期待されるとともに、新たな抗ウイルス剤の開発に有用な基礎的な知見としても活用できる。

#### (エ) ワクチンによる豚群でのインフルエンザ制御手法の確立

2018年以降に分離されたIAV-S 20株以上について、全ゲノム解析により遺伝的背景を明らかにするとともに、それらの中から代表的な2株以上の抗原性解析を行う。

現行市販ワクチンについて、2系統(パンデミックH1およびH3亜型IAV-S)の代表的な流行株に対する効果を検証する。

H1およびH3亜型IAV-Sから新規ワクチン製造株の候補を系統別に1株程度ずつ選抜して製造した試作ワクチンの流行株に対する効果を検証し、国内流行に見合ったワクチン製造株を1つ以上提案する。

これらの成果は、より高い効果が期待できるIAV-Sワクチンの製造株の更新に繋がる知見として活用される。

### (3) 研究開発された成果の取扱い

本研究の成果を都道府県の家畜保健衛生所職員、臨床獣医師および農業従事者が参加する講習会や防疫演習等で広く普及に努めるとともに、特定家畜伝染病防疫指針改定への提言を行うことによって、関係部局の行政施策に反映され、対象となる家畜伝染病の我が国における発生リスクを低減することにつながる。

また、国内の確定診断機関として農研機構・動物衛生研究部門が担当する検査に本研究の成果を活用し、疾病発生時の防疫対応を企画・立案する農林水産省や、実際に防疫対応を行う都道府県の家畜保健衛生所と研究成果を共有することで、海外で流行している新たなウイルス株に対応した防疫体制の強化が期待できる。

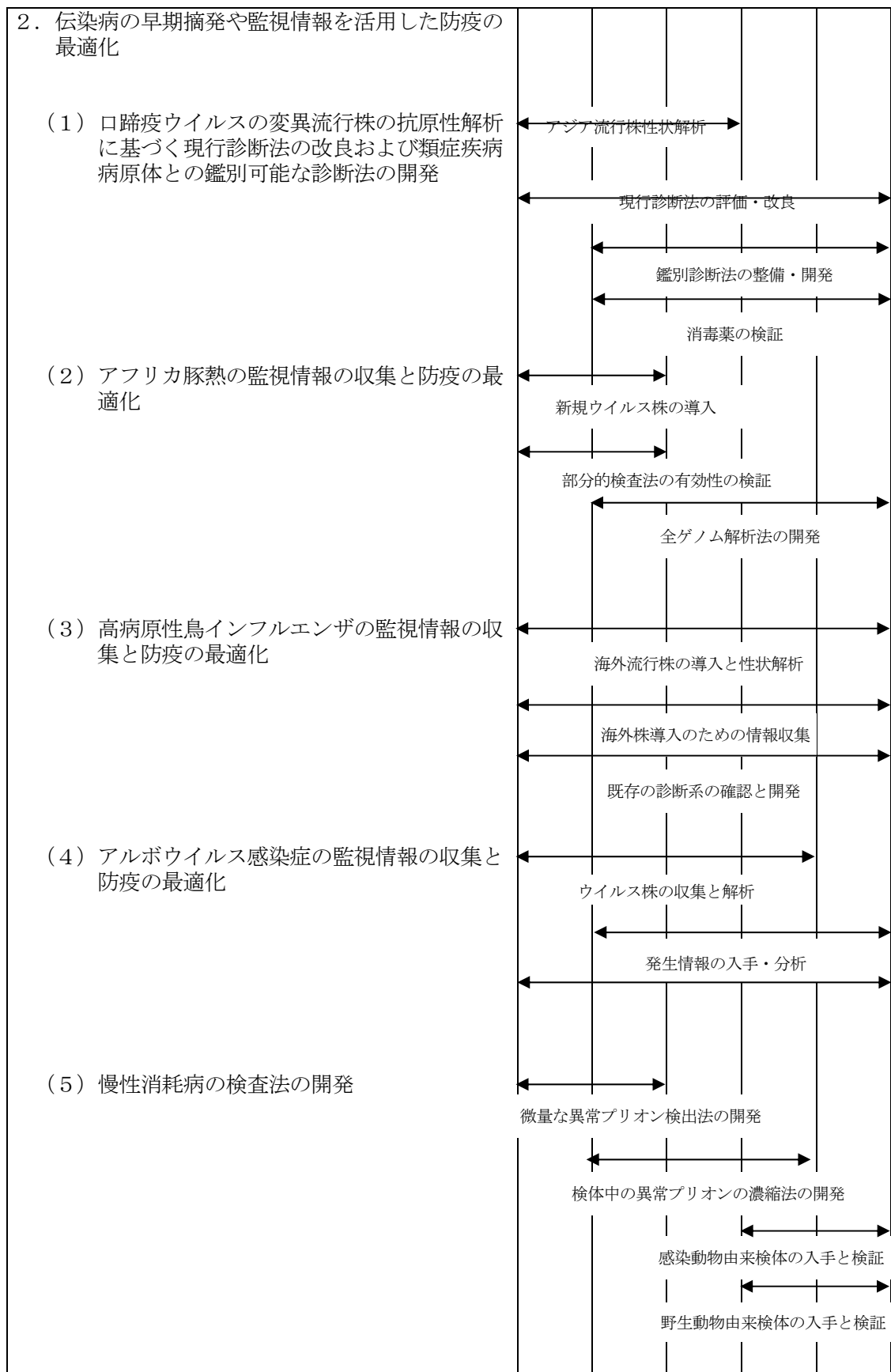
本課題において開発される家畜衛生データベースシステムは事業終了後までに農林水産省に譲渡し、都道府県、農林水産省および農研機構・動物衛生研究部門が接続して日常的に使用する報告システムとして実装されることを目指す。

AIに対する組換えベクターワクチンについては、組換え生物の第一種使用に必要な知見を集積し、共同開発企業の掘り起こしを行い、薬事申請を目指す。得られた成果については特許を取得し、実施許諾によって技術の普及を行う。



(4) 年次計画

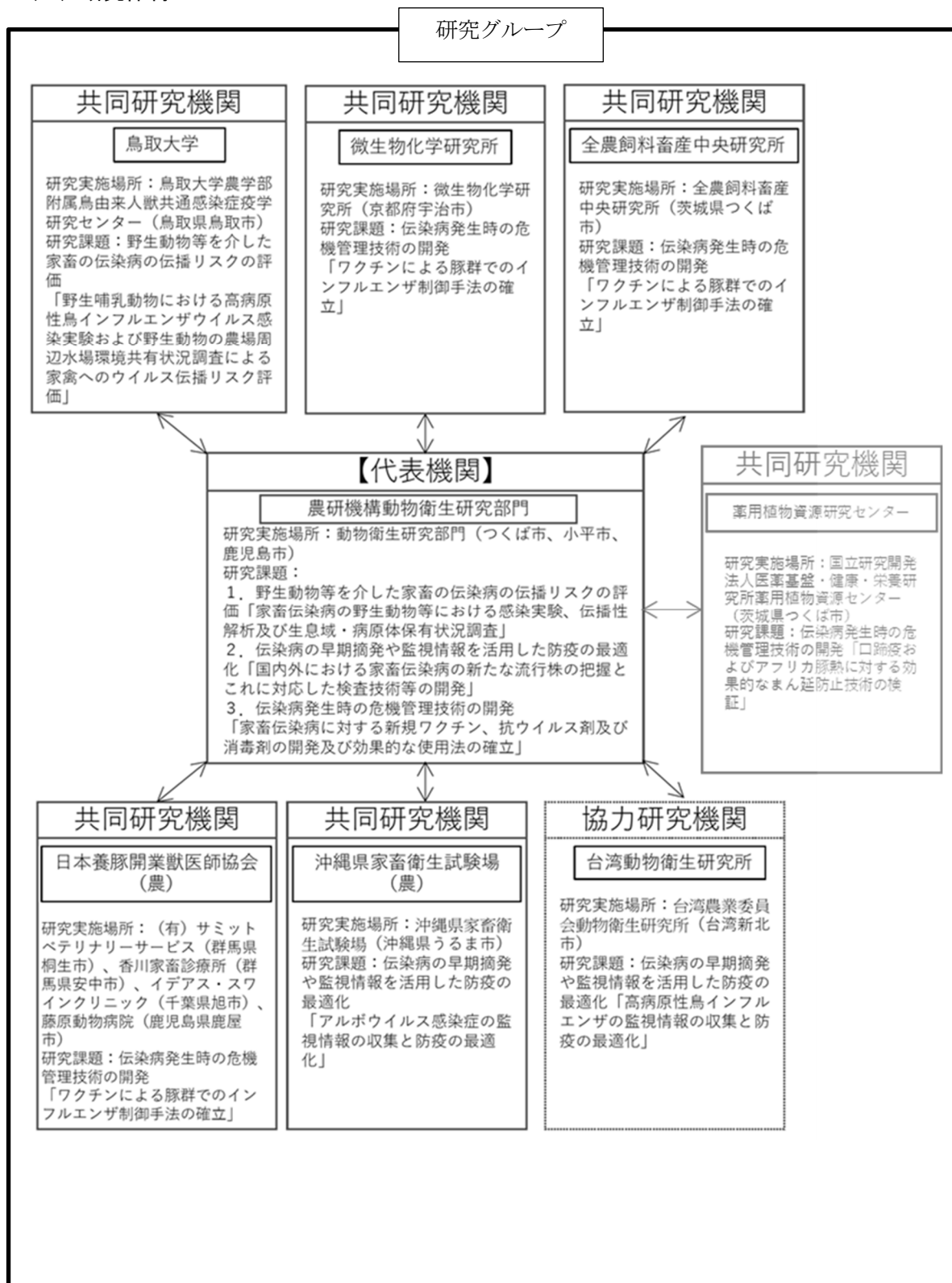
| 研究課題                                                                       | 研究年度                                                                                                                    |    |    |    |    |
|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|----|----|----|
|                                                                            | H30                                                                                                                     | R1 | R2 | R3 | R4 |
| 1. 野生動物等を介した家畜の伝染病の伝播リスクの評価                                                |                                                                                                                         |    |    |    |    |
| (1) 野生鳥類の高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する感受性解析および家禽へのウイルス伝播リスク評価                       | <p>野生鳥類における感受性解析</p> <p>HPAIV伝播性解析</p> <p>野生鳥類の感染に応答する免疫関連遺伝子の解析</p>                                                    |    |    |    |    |
| (2) 野生哺乳動物における高病原性鳥インフルエンザウイルス感染実験および野生動物の農場周辺水場環境共有状況調査による家禽へのウイルス伝播リスク評価 | <p>野生哺乳類の感受性解明</p> <p>環境DNAを用いた農場周辺環境への野生動物侵入状況解明技術の開発</p>                                                              |    |    |    |    |
| (3) アフリカ豚熱ウイルスのニホンイノシシから豚への伝播リスクの解析                                        | <p>感染豚の病原性の解析</p> <p>異なる接種経路やウイルス量を用いたニホンイノシシへの病原性解析</p> <p>イノシシ間、イノシシ豚間における感染伝播様式の解析</p> <p>イノシシにおける持続感染成立の有無の検証解析</p> |    |    |    |    |
| (4) 口蹄疫ウイルスの野生動物および家畜における病原性解析                                             | <p>イノシシ等の野生動物を用いた感染試験</p> <p>妊娠期動物やその胎児を用いた感染試験</p> <p>ワクチン投与豚を用いた感染試験</p>                                              |    |    |    |    |
| (5) アルボウイルス伝播機序と媒介節足動物の国内生息域の解明                                            | <p>同定法の開発</p> <p>国内生息域の調査</p> <p>媒介能の精査</p> <p>ウイルス保有状況の調査</p>                                                          |    |    |    |    |







(5) 研究体制



(6) 実施体制

| 研究項目                                                             | 担当研究機関・研究室   |                                | 研究担当者                                                                                                                                                                                                       | エフォート<br>(%)                                             |
|------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
|                                                                  | 機関           | 研究室                            |                                                                                                                                                                                                             |                                                          |
| 研究総括者                                                            | 農研機構動物衛生研究部門 | 疾病対策部<br>研究推進部<br>越境性家畜感染症研究領域 | ◎ 西藤岳彦<br>(～2021. 3)<br>◎ 山川睦<br>(2021. 4～<br>2022. 3)<br>◎ 深井克彦<br>(2022. 4～)                                                                                                                              | 25<br>25<br>25                                           |
| 1. 野生動物等を介した家畜の伝染病の伝播リスクの評価                                      | 農研機構動物衛生研究部門 | 越境性家畜感染症研究領域海外病グループ            | ○ 深井克彦                                                                                                                                                                                                      | 前出                                                       |
| (1) 野生鳥類の高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する感受性解析および家禽への高病原性鳥インフルエンザウイルス伝播リスク評価 | 農研機構動物衛生研究部門 | 人獣共通感染症研究領域新興ウイルスグループ          | △ 内田裕子<br>竹前喜洋<br>(～2019. 3)<br>宮澤光太郎<br>(2021. 4～)<br>常國良太<br>谷川太一朗<br>(～2021. 3)<br>峯淳貴<br>中山ももこ<br>(～2020. 3)<br>佐久間咲希<br>(2019. 10～)<br>西藤岳彦<br>(～2021. 3)<br>熊谷飛鳥<br>(2021. 4～)<br>高舘佳弘<br>(2021. 10～) | 20<br>10<br>30<br>20<br>10<br>50<br>50<br>前出<br>10<br>10 |
| (2) 野生哺乳動物における高病原性鳥インフルエンザウイルス感染実験および野生動物の農場周辺水場環境共有状況調査による家     | 鳥取大学農学部      | 農学部附属鳥由来人獣共通感染症疫学研究センター        | △ 山口剛士<br>笛吹達史<br>伊藤啓史<br>曾田公輔<br>尾崎弘一<br>伊藤壽啓<br>村瀬敏之                                                                                                                                                      | 10<br>10<br>5<br>10<br>5<br>10<br>5                      |

|                                                                              |              |                                                                                 |                                                                                                                                                          |                                                                            |
|------------------------------------------------------------------------------|--------------|---------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <p>禽への高病原性鳥インフルエンザウイルス伝播リスク評価</p> <p>(3) アフリカ豚熱ウイルスのニホンイノシシから豚への伝播リスクの解析</p> | 農研機構動物衛生研究部門 | <p>越境性家畜感染症研究領域海外病グループ</p> <p>衛生管理研究領域病理・生産病グループ</p> <p>越境性家畜感染症研究領域海外病グループ</p> | <p>△ 生澤充隆<br/>(2019. 10～)</p> <p>山田学</p> <p>深井克彦<br/>森岡一樹<br/>西達也<br/>舩甚賢太郎<br/>亀山健一郎<br/>岡寺康太<br/>(2020. 4～<br/>2021. 8)</p> <p>北村知也<br/>(2020. 4～)</p> | <p>20</p> <p>20</p> <p>前出<br/>20<br/>20<br/>20<br/>20<br/>10</p> <p>10</p> |
| <p>(4) 口蹄疫ウイルスの野生動物および家畜における病原性解析</p>                                        | 農研機構動物衛生研究部門 | <p>越境性家畜感染症研究領域海外病グループ</p> <p>衛生管理研究領域病理・生産病グループ</p>                            | <p>△ 深井克彦<br/>森岡一樹<br/>西達也<br/>川口理恵<br/>(2020. 10～)</p> <p>舩甚賢太郎<br/>亀山健一郎<br/>生澤充隆<br/>(2019. 10～)</p> <p>山田学</p>                                       | <p>前出<br/>前出<br/>前出<br/>10</p> <p>前出<br/>前出<br/>前出</p> <p>前出</p>           |
| <p>(5) アルボウイルス伝播機序と媒介節足動物の国内生息域の解明</p>                                       | 農研機構動物衛生研究部門 | <p>越境性家畜感染症研究領域疫学・昆虫媒介感染症グループ</p> <p>動物感染症研究領域ウイルスグループ</p>                      | <p>△ 梁瀬徹<br/>白藤浩明<br/>(～2021. 3)</p> <p>田中省吾<br/>室田勝功<br/>須田遊人<br/>(2020. 4～)</p>                                                                        | <p>15<br/>10</p> <p>10<br/>15<br/>10</p>                                   |
| <p>2. 伝染病の早期摘発や監視情報を活用した防疫の最適化</p>                                           | 農研機構動物衛生研究部門 | 越境性家畜感染症研究領域疫学・昆虫媒介感染症グループ                                                      | ○ 山本健久                                                                                                                                                   | 10                                                                         |

|                                                            |              |                       |                                                                                                                                                                                                             |                                                                            |
|------------------------------------------------------------|--------------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| (1) 口蹄疫ウイルスの変異流行株の抗原性解析に基づく現行診断法の改良および類症疾病病原体との鑑別可能な診断法の開発 | 農研機構動物衛生研究部門 | 越境性家畜感染症研究領域海外病グループ   | △ 森岡一樹<br>深井克彦<br>西達也<br>川口理恵<br>(2020. 10～)<br>舛甚賢太郎<br>亀山健一郎<br>山田学                                                                                                                                       | 前出<br>前出<br>前出<br>前出<br><br>前出<br>前出<br>前出                                 |
|                                                            |              | 衛生管理研究領域病理・生産病グループ    |                                                                                                                                                                                                             |                                                                            |
| (2) アフリカ豚熱の監視情報の収集と防疫の最適化                                  | 農研機構動物衛生研究部門 | 越境性家畜感染症研究領域海外病グループ   | △ 亀山健一郎<br>舛甚賢太郎<br>岡寺康太<br>(2020. 4～2021. 8)<br>北村知也<br>(2020. 4～)<br>深井克彦<br>森岡一樹<br>西達也<br>山田学                                                                                                           | 前出<br>前出<br>前出<br><br>前出<br><br>前出<br>前出<br>前出<br>前出                       |
|                                                            |              | 衛生管理研究領域病理・生産病グループ    |                                                                                                                                                                                                             |                                                                            |
| (3) 高病原性鳥インフルエンザの監視情報の収集と防疫の最適化                            | 農研機構動物衛生研究部門 | 人獣共通感染症研究領域新興ウイルスグループ | △ 内田裕子<br>竹前喜洋<br>(～2019. 3)<br>宮澤光太郎<br>(2021. 4～)<br>常國良太<br>谷川太一朗<br>(～2021. 3)<br>峯淳貴<br>中山ももこ<br>(～2020. 3)<br>佐久間咲希<br>(2019. 10～)<br>西藤岳彦<br>(～2021. 3)<br>熊谷飛鳥<br>(2021. 4～)<br>高舘佳弘<br>(2021. 10～) | 前出<br>前出<br><br>前出<br><br>前出<br>前出<br><br>前出<br>前出<br>前出<br>前出<br>前出<br>前出 |
|                                                            |              |                       |                                                                                                                                                                                                             |                                                                            |



|                               |              |                            |                                                                                                                                      |                                                      |
|-------------------------------|--------------|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| (4) アルボウイルス感染症の監視情報の収集と防疫の最適化 | 農研機構動物衛生研究部門 | 越境性家畜感染症研究領域疫学・昆虫媒介感染症グループ | △ 梁瀬徹<br>白藤浩明<br>(～2021. 3)<br>室田勝功<br>岸田なつみ<br>(～2019. 4)<br>須田遊人<br>(2019. 4～)<br>石井圭子<br>(～2022. 3)<br>銘苅裕二<br>奥村尚子<br>(2019. 4～) | 前出<br>前出<br><br>前出<br>10<br>前出<br><br>10<br>10<br>10 |
|                               | 沖縄県家畜衛生試験場   |                            |                                                                                                                                      |                                                      |
|                               | 農研機構動物衛生研究部門 | 動物感染症研究領域ウイルスグループ          | △ 岩丸祥史<br>松浦裕一<br>宮澤光太郎<br>池田圭吾<br>(2020. 10～)                                                                                       | 15<br>5<br>10<br>10                                  |
|                               | 農研機構動物衛生研究部門 | 越境性家畜感染症研究領域疫学・昆虫媒介感染症グループ | △ 山本健久<br>早山陽子<br>清水友美子<br>(～2021. 3)<br>近藤園子<br>(2021. 9～)<br>村藤義訓<br>澤井宏太郎<br>(2019. 10～)<br>山口英美<br>(2020. 1～)                    | 前出<br>30<br>5<br><br>5<br>20<br>20<br>90             |
|                               | 農研機構動物衛生研究部門 | 人獣共通感染症研究領域新興ウイルスグループ      | ○ 内田裕子                                                                                                                               | 前出                                                   |
| 3. 伝染病発生時の危機管理技術の開発           | 農研機構動物衛生研究部門 | 人獣共通感染症研究領域新興ウイルスグループ      | △ 常國良太<br>内田裕子<br>竹前喜洋<br>(～2019. 3)<br>宮澤光太郎<br>(2021. 4～)<br>谷川太一朗<br>(～2021. 3)<br>峯淳貴                                            | 前出<br>前出<br>前出<br><br>前出<br>前出<br>前出                 |

|                                                               |                   |                                            |                                                                                                                                            |                                        |
|---------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
|                                                               |                   |                                            | 中山ももこ<br>(～2020. 3)                                                                                                                        | 前出                                     |
|                                                               |                   |                                            | 佐久間咲希<br>(2019. 10～)                                                                                                                       | 前出                                     |
|                                                               |                   |                                            | 西藤岳彦<br>(～2021. 3)                                                                                                                         | 前出                                     |
|                                                               |                   |                                            | 熊谷飛鳥<br>(2021. 4～)                                                                                                                         | 前出                                     |
|                                                               |                   |                                            | 高舘佳弘<br>(2021. 10～)                                                                                                                        | 前出                                     |
| (2) ワクチン開発に資<br>するアフリカ豚コ<br>レラウイルスの分<br>子基盤の解析 (令<br>和元年度で終了) | 農研機構動物衛<br>生研究部門  | 越境性家畜感染症研<br>究領域海外病グルー<br>プ                | △ 舩甚賢太郎<br>深井克彦<br>森岡一樹<br>亀山健一郎<br>西達也<br>山田学                                                                                             | 前出<br>前出<br>前出<br>前出<br>前出<br>前出       |
| (3) 口蹄疫およびアフ<br>リカ豚熱に対する<br>効果的なまん延防<br>止技術の検証                | 農研機構動物衛<br>生研究部門  | 越境性家畜感染症研<br>究領域海外病グルー<br>プ                | △ 西達也<br>深井克彦<br>森岡一樹<br>川口理恵<br>(2020. 10～)<br>舩甚賢太郎<br>亀山健一郎<br>山田学                                                                      | 前出<br>前出<br>前出<br>前出<br>前出<br>前出<br>前出 |
|                                                               | 医薬基盤・健<br>康・栄養研究所 | 衛生管理研究領域病<br>理・生産病グループ<br>薬用植物資源研究セ<br>ンター | 渕野裕之<br>(2022. 4～)                                                                                                                         | 10                                     |
| (4) ワクチンによる豚<br>群でのインフルエ<br>ンザ制御手法の確<br>立                     | 農研機構動物衛<br>生研究部門  | 人獣共通感染症研究<br>領域新興ウイルスグ<br>ループ              | △ 峯淳貴<br>△ 竹前喜洋<br>(～2019. 3)<br>内田裕子<br>宮澤光太郎<br>(2021. 4～)<br>常國良太<br>谷川太一朗<br>(～2021. 3)<br>佐久間咲希<br>(2019. 10～)<br>中山ももこ<br>(～2020. 3) | 前出<br>前出<br>前出<br>前出<br>前出<br>前出<br>前出 |

|  |                      |                  |                     |          |
|--|----------------------|------------------|---------------------|----------|
|  | JASV                 |                  | 西藤岳彦<br>(～2021. 3)  | 前出       |
|  |                      |                  | 熊谷飛鳥<br>(2021. 4～)  | 前出       |
|  |                      |                  | 高舘佳弘<br>(2021. 10～) | 前出       |
|  |                      |                  | 香川光生                | 20       |
|  |                      |                  | 石関紗代子               | 10       |
|  |                      |                  | 早川結子                | 25       |
|  |                      |                  | 藤原孝彦                | 15       |
|  |                      |                  | 呉克昌                 | 10       |
|  |                      |                  | 大竹聡<br>(2019. 4～)   | 10       |
|  |                      |                  | 川倉裕和<br>(2019. 4～)  | 10       |
|  | 微生物化学研究<br>所<br>JA全農 | 製剤部<br><br>養豚研究室 | 田島守<br>(2019. 4～)   | 10       |
|  |                      |                  | 佐野陽之                | 10       |
|  |                      |                  | 大島翔                 | 30       |
|  |                      |                  | 木村大輔<br>千代豊         | 15<br>15 |

(注1) 研究総括者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。

#### (7) 各年度の研究費

|        |               |
|--------|---------------|
| 平成30年度 | 187,000,000 円 |
| 平成31年度 | 164,206,000 円 |
| 令和2年度  | 142,859,000 円 |
| 令和3年度  | 120,287,000 円 |
| 令和4年度  | 108,257,000 円 |

### 3 研究成果の概要

#### (1) 主な成果

##### 1) 成果の内容

複数の野生鳥種の HPAI 感受性と群内におけるウイルス伝播性及びマガモでのウイルス感染時における遺伝子解析を実施することで、野生鳥類毎の国内及び農場内への HPAI の侵入及び伝播リスクを評価することができた。

家禽舎への侵入が確認されているイタチ科野生動物が、感染野鳥の捕食などで HPAIV に感染し、家禽への感染源となる可能性を実証した。発生家禽舎付近で採取した環境水がウイルス伝播に関与する鳥類および哺乳類の検出に有用であることを示した。

現在流行している ASFV はニホンイノシシに対して豚と同等か、それ以上の病原性を示すことを明らかとした。また、ASFV 感染ニホンイノシシから豚へウイルスが伝播することを実証した。

イノシシは豚と同様の症状やウイルス排泄を示した。妊娠豚も感染・発症したが、その胎子からウイルスは検出されなかった。ワクチン接種後にウイルス接種した豚のウイルス排泄期間は延長されなかったが、抗体識別キットにより検出されない個体が確認された。

国内の *Culicoides* 属ヌカカの DNA バーコーディング領域の解析を行い、国内未記載種もしくは新種を含む、71 種の配列を得た。また、ウシヌカカがサシュペリウイルスに、シガヌカカがシャモンダウイルスに感受性を持つことを明らかにした。

導入した FMDV 流行株に対して実験室内診断法の有用性を確認し、必要に応じて改良を行い最適化した。FMD の類症水疱性疾患の診断法の整備を行った。類症水疱性疾患病原体に共通して有効な消毒法について検証した。

アフリカおよびアジアから ASFV を含む感染豚の検体を新規に導入すると共に遺伝子型の異なる ASFV 株の遺伝子型別法の有効性を確認した。また、検体前処理法の最適化により ASFV 培養上清および感染豚の乳剤を用いた全ゲノム解析を概ね達成した。

2019 年度から、RT-PCR による国内診断系をより感度の高い One step 法に移行した。近年の国内分離株の解析によって、同シーズン中に複数の遺伝子型の HPAIV が国内に侵入したこと、それらは鶏に対して異なる致死性や伝播性を示すことが明らかになった。

牛の血液やヌカカから分離されたウイルスを次世代シーケンサーによる網羅的解析に供し、新種のウイルスや国内新規のウイルスが日本に侵入していることを明らかにした。また、アルボウイルスの検出法の開発に努め、監視体制や診断の強化を図った。

微量な CWD 異常プリオン蛋白質を検出可能な PMCA を基に、シカ直腸糞を検査対象とした CWD 検査法を確立した。本法を用い、41 道府県から採材された 1173 頭分の野生シカ直腸糞を検査したが、陽性・疑陽性を示す検体は認められなかった。

サーベイランス報告システムを開発した。遺伝子データを用いて口蹄疫の農場間の感染経路を推定した。シミュレーションモデルを用いてヨーネ病の対策を評価した。乳用牛と肉用牛の移動の特徴を明らかにした。国内で発生した CSF と HPAI の疫学解析を実施した。

rAPMV-10/HA ワクチンで省力的に多頭羽の鶏に免疫が可能な飲水投与法を確立し、ワクチン自体の鶏に対する病原性や伝播性が低いことが示された。この投与法により付与

される免疫は、抗原性の異なる HPAI ウイルスに対しても一定の防御効果があることが示された。

薬剤 T-1105 は FMD 発生時のまん延防止のために迅速な効果が期待できる優れた抗ウイルス資材であることが示された。FMDV と ASFV に対する新たな抗ウイルス剤の候補となる天然物由来化合物、植物抽出液および菌培養液を見出した。各消毒薬の ASFV 不活化能を明らかにした。

ASF ワクチンの開発については、ウイルスを効率に増やすことのできる細胞株を見出し、遺伝子組換えによる変異導入ウイルスの作製に成功した。

国内で循環している IAV-S を収集し、その遺伝的特性と抗原性を解析した。解析により分類した H1 亜型 IAV-S から試作不活化ワクチンを製造し、豚でのチャレンジ試験を行うことで、ワクチンの効果範囲を明らかにした。

## 2) 成果の活用

成果について、論文や学会発表、ウェブ等での知見の普及および啓発を行う。また、R4 年度にサーベイランス報告システムを農林水産省に移管するとともに、乳用牛や肉用牛の移動の特徴を表すデータを作成し、国際的なデータ公開サイトで公開する。

## (2) 各研究課題の成果

### 1) 小課題名：野生動物等を介した家畜の伝染病の伝播リスクの評価

#### (ア) 研究目標

本小課題においては、野生動物や家畜（禽）を用いた感染実験によって HPAIV、ASFV、FMDV に対する感受性や野生動物から家畜（禽）への伝播リスクを明らかにする。また国内のヌカカの生態を調査するとともにアルボウイルスのヌカカに対する実験感染によって媒介能を評価する。

#### (イ) 研究内容

##### (1) 野生鳥類の高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する感受性解析および家禽へのウイルス伝播リスク評価

HPAIV に対する家禽の感受性については、これまで数多くの報告がなされている。しかしながら、野生鳥類の HPAI に対する感受性については、野生鳥類の捕獲に規制がある上に、評価に足りる均一な個体数の確保も難しいことから、その報告数は少ない。そこで、本課題では、商用目的で飼育販売されている野生鳥種について国内外から導入し、その野生鳥種について HPAI への感受性と群内におけるウイルス伝播性の評価を行うとともに、ウイルス感染時における野生鳥種の免疫応答を解析する。また、それらの野生鳥種及びニワトリ間のウイルス伝播性の評価を行うことで、家禽へのウイルス伝播リスクを明らかにする。そこで本課題では以下の項目に関する研究開発を行う。

##### ① 野生鳥類における HPAI 感受性解析

養鶏農場において鶏舎内への侵入が確認されるスズメをはじめとする留鳥や HPAIV の運び屋と考えられているカモ類を含む野生鳥種に HPAIV を感染させ、生存率や臨床徴候を観察するとともに、気管と総排せつ腔スワブから経時的なウイルス排出量を明らかにする。また、生残個体については観察期間終了後に血清抗体の有無を確認する。これらの成績を総合的に評価し、野生鳥類の HPAI に対する感受性を明らかにする。使用するウイルスは、近年国内において野鳥及

び家禽で流行したH5亜型HPAIVとする。また、対照として家禽についても同様の試験を実施する。

## ②野生鳥類及び家禽間のHPAIV伝播性解析

①の試験から感受性が明らかになった留鳥とカモ類の鳥種について、同鳥種間、留鳥とカモ類間、並びに留鳥と家禽間のウイルス伝播性を明らかにするため、感染個体と非感染の同種または異種の鳥類の同居試験を実施する。また、①と同様に生残個体については観察期間終了後に血清抗体の有無を確認する。

## ③野生鳥類のHPAIV感染に応答する免疫関連遺伝子の解析

①及び②の試験に供試する鳥種について、鳥類由来の培養細胞（胎児線維芽細胞等）を用いてHPAIVの増殖性及びウイルス感染時の宿主遺伝子の発現プロファイルを解析する。ニワトリでの発現プロファイルと比較することによって、種特異的に発現する遺伝子群を解明する。また、HPAIV感染に応答するUSP18遺伝子を含む宿主遺伝子について、他鳥種における相同遺伝子をクローニングし、鳥種間における多型性やその機能について培養細胞を用いて比較解析する。

## (2) 野生哺乳動物におけるHPAIV感染実験および野生動物の農場周辺水場環境共有状況調査による家禽へのウイルス伝播リスク評価

冬季に国外より飛来する渡り鳥は、国内へのHPAIV侵入経路のひとつと考えられている。しかし、国内の家禽でのHPAI発生事例では、野生哺乳動物（野生動物）が関与する可能性も指摘されているが、渡り鳥から野生動物、また野生動物から家禽への伝播の実態は不明である。一方で、小型哺乳動物は行動範囲が広く、渡り鳥を捕食する可能性もあり、かつ発生農場で目撃され、比較的頻繁に農場内や家禽舎内に侵入することから、渡り鳥と家禽を繋ぐHPAIVの伝播経路として注目されている。そこで本課題では、イタチやテンなどのイタチ科野生動物に着目し、HPAIV感染野生水禽の捕食等を介した感染と、感染イタチ科野生動物から家禽への感染についてのリスク評価を行う。また、家禽舎周辺にある溜め池等の水場にも着目し、野生動物と野鳥との水場の共有状況を明らかにするため、環境DNAを用いた検査方法を確立する。

### ①野生哺乳動物を用いたHPAIV感染実験

国内に生息する野生イタチ科動物を捕獲して感染実験を実施し、呼吸器及び自然界で想定される経口での感染性を評価する。ウイルスは、近年、国内において野鳥及び家禽で流行したH5亜型HPAIVを用いる。経口感染では、当該ウイルスを感染させた鶏等の骨格筋を摂食させ、経時的に口腔、鼻腔及び直腸スワブから、ウイルス排出量及び期間を明らかにする。また臨床徴候を観察すると共に抗体応答を評価する。さらに、イタチの糞便やイタチが使用した飲水からのウイルス分離を行い、環境中へのウイルス排出についても検討する。観察期間終了後は剖検し、主要臓器を病理組織学的検査へ供する。なお、本感染実験は複数年（2-3年）での達成を目指す。期間内に捕獲個体数が得られない場合、捕獲（箱罠設置）場所の増数や専門業者への捕獲依頼を検討する。

イタチ科動物の感受性評価の一環として、ウイルス侵入門戸と考えられる呼吸器または消化器における、ウイルスレセプターである $\alpha 2, 3$ 結合型及び $\alpha 2, 6$ 結合型シアル酸糖鎖の分布状況を解析する。また、近年のHPAIV流行株の糖鎖認識性を糖鎖アレイ等により解析すると共に、哺乳動物への増殖に関与する変

異の有無を検討しウイルス側から感染性の評価を行う。

さらにイタチ科の実験動物であるフェレットについても同様の感染実験を実施し、野生イタチのモデル動物としての可能性も検証する。

#### ②環境DNAを用いた農場周辺環境への野生動物侵入状況解明技術の開発

農場周辺の溜め池などの環境水から環境DNAを調製し、各種動物の遺伝子を増幅し、次世代シーケンサーによる網羅的解析で水場を共有する動物種を決定するための実用的技術を開発する。特に農場では鶏由来のDNAが多く混入する可能性が高いことや糞尿の混入が予想されるため、それらを排除することにより効率的に水鳥や哺乳動物のDNAを増幅・検出する方法を開発する。

#### (3) アフリカ豚熱ウイルスのニホンイノシシから豚への伝播リスクの解析

ASFの防圧が困難な理由の一つとして、野生イノシシによって広範囲にウイルスの拡散が引き起こされる点が挙げられる。特に東欧諸国ではこの野生イノシシによる国境を越えたASFの発生・拡大が大きな問題となっている。一方、発生が常在しているアフリカにおいては致死率の低いASFVが野生豚や野生イノシシの間で流行して長期間ウイルスを排せつし続ける慢性型のASFが問題となっている。

日本に生息するASFVの野生動物宿主であるニホンイノシシの生息数や地域は近年拡大傾向を示し、田畑や養豚農家の飼料を荒らすことが問題となっている。我が国においても、万一ASFの発生が起こった場合、ニホンイノシシを介した発生拡大が懸念される。ASFに関する特定家畜伝染病防疫指針では、農場におけるニホンイノシシ等の野生動物の侵入防止の徹底について言及されているが、ASFのニホンイノシシに対する病原性や伝播リスクに関しては検証されていない。

そこで本課題では、日本におけるイノシシを介したASFVの伝播リスクを明らかにするため、近年の東欧諸国での流行株であるASFV Armenia07株についてニホンイノシシを用いた感染試験を行い、ウイルスの排せつ機序や体内でのウイルス動態、病理組織学的特徴を解析する。また、ニホンイノシシ間あるいはニホンイノシシと豚間の感染伝播試験により、ウイルス伝播の有無や潜伏期間、水平伝播した感染動物体内におけるウイルス動態、病理組織学的特徴を評価する。これらの結果と豚を用いた感染試験結果を比較し、本ウイルスのニホンイノシシに対する病原性を解明する。またその過程でASFの検査のための効果的な採材方法も確立する。さらにアフリカで慢性的に流行している比較的病原性の低いASFV Kenia05株の感染試験を実施し、豚及びニホンイノシシでのいわゆる慢性型ASFの病態を評価する。なお、野生のニホンイノシシを捕獲し、試験に用いることは困難であるため、食用に飼育され、人との接触に慣れたニホンイノシシを試験に用いる。

#### (4) 口蹄疫ウイルスの野生動物および家畜における病原性解析

FMDに関する特定家畜伝染病防疫指針では農場における野生動物の侵入防止の徹底について言及されているが、野生動物におけるFMDVの病原性や伝播状況に関しては、世界的に見てもほとんど検証されていない。また当該指針では、発生状況確認検査や清浄性確認検査として農場での臨床検査を義務付けているが、妊娠期動物の胎子の生前検査は不可能であることから、FMDVの胎子への影響や胎子の出生後の汚染源としての可能性に関しても検証されていない。

一方、これまでのFMDの病態解析において、FMDワクチンを投与後、比較的早期にFMDVに感染した豚は、ワクチン非投与豚よりもウイルスの排せつ期間が延びること、及びワクチン投与後に感染した豚は、ウイルスの非構造蛋白質に対する免疫応答が弱く、感染動物と非感染動物を識別するキットで摘発できないことが指摘されている。当該指針におけるワクチンの備蓄や使用方針を改定する際には、これらの問題を慎重に考慮する必要があるため、本課題では以下の項目に関する研究開発を行う。

- ①イノシシ等の野生動物を用いたFMDVの感染試験（同種の野生動物間のみならず、家畜と野生動物間の水平伝播についても検証する）
- ②妊娠期動物や泌乳期動物を用いたFMDVの感染試験
- ③FMDワクチン投与豚を用いたFMDVの感染試験（ワクチン投与からウイルス感染までの期間及び感染させるウイルス量や種類をこれまでの試験とは異なる形で行う）

感染試験に用いるウイルス株は、近年東アジア諸国で流行し、今後我が国へ侵入する可能性のある複数の血清型、トポタイプ及び系統のものとする。また、野生動物を捕獲し、試験に用いることは困難であるため、食用に飼育され、人との接触に慣れたイノシシ等を試験に用いる。

#### （５）アルボウイルス伝播機序と媒介節足動物の国内生息域の解明

畜産に大きな被害をもたらすアルボウイルス感染症は、ヌカカなどの吸血性の節足動物によって媒介されるが、疾病流行リスクはそれらの分布や活動時期、発生量などの生態の影響を受ける。媒介節足動物の分類学上の再整理や簡便な同定技術の開発は、生態研究を推し進める上で必須であるが、近年の分子生物学を基盤とした技術の進展によりそれらは可能となってきた。本課題では、牛へのアルボウイルス媒介能や分布域が不明な媒介節足動物による伝播機序と国内生息域を解明するため、以下の項目に関する研究開発を行う。

- ①牛のアルボウイルスの主要な媒介節足動物である*Culicoides*属ヌカカを国内各地で採集し、その生物相を明らかにする。
- ②国内に分布する*Culicoides*属ヌカカのミトコンドリア等の一部配列を明らかにし、DNAバーコーディングによる簡便な同定を可能にする。また、主要な媒介種の吸血源を分子生物学的手法により解明する。
- ③牛アルボウイルスを国内在来種の*Culicoides*属ヌカカに実験的に感染させ、それらの媒介能を評価する。
- ④野外で採集された*Culicoides*属ヌカカのアルボウイルス保有状況を明らかにする。

#### （ウ）研究結果

- （１）野生鳥類の高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する感受性解析および家禽へのウイルス伝播リスク評価
  - （１）2004年-2017年分離HPAIV 6株、 $10^6$  EID<sub>50</sub>/羽を接種したマガモは2016年兵庫株（2/5羽死亡、平均死亡日数5.65日）を除き、100%感染したが生存していた。
  - （２）前年度と異なる2004年-2017年分離HPAIV 7株、 $10^6$  EID<sub>50</sub>/羽を接種したマガモは100%感染したが生存した。マガモ排泄ウイルス量としてウイル



ス増殖曲線下面積を積分で算出すると、気管からのウイルス排泄量が2016年シーズン発生分離株で最も高い値を示した。2010年宮崎株及び2016年兵庫株の伝播試験で各ウイルスは同居マガモに100%伝播した。HPAIV感染マガモ脾臓からUSP18遺伝子をクローニングし、8種類のスプライシングバリエーションが得られた。マガモを死亡させる株と死亡させない株を接種後1日目の11臓器でのUSP18遺伝子発現は、死亡させる株で有意な発現上昇が認められた。

- (3) 2008年秋田株及び2010年富山株の伝播試験も各ウイルスは同居マガモに100%伝播した。コガモにおける2004年-2017年国内分離HPAIV 6株の感受性試験では、2010年宮崎株、2014年千葉株及び2016年兵庫株（生存率78-89%）以外は100%感染したが生存した。感染コガモのウイルス排泄は気管が主体で、2008年秋田株を除いて総排泄腔からはほとんど検出されなかった。
  - (4) 農場内・畜舎に出入りする留鳥であるスズメへの2008年秋田株の $10^4$ 、 $10^5$ 及び $10^6$  EID<sub>50</sub>接種群の感染・致死率は90-100%であったが、 $10^6$  EID<sub>50</sub>接種群で感染・ウイルス排泄して生存する個体が確認された。HPAIVに感染した際に発現誘導されるマガモUSP18は、type I interferon (IFN) 刺激下で発現誘導されるIFN誘導性遺伝子群 (ISGs) の遺伝子発現を低下させ、ウイルス増殖促進機能をもつことが認められた。
  - (5) 2008年秋田株及び2016年兵庫株のスズメへの感染試験で両株の50%鳥感染価 (BID<sub>50</sub>、致死及び血清検査の結果) は $10^{2.8}$  EID<sub>50</sub>、ムクドリでは $10^5$  及び $10^{5.9}$  EID<sub>50</sub> とスズメとムクドリではウイルス感染性に158-1259倍の差が認められた。感染したスズメがほとんど死亡する一方で、ムクドリは感染するが死亡しない個体が散見された。2008年秋田株及び2016年兵庫株の伝播試験において、ウイルス伝播率はスズメで0%及び25% (1/4羽)、ムクドリで33.3% (1/3羽) 及び0%であった。
- (2) 野生哺乳動物における高病原性鳥インフルエンザウイルス感染実験および野生動物の農場周辺水場環境共有状況調査による家禽へのウイルス伝播リスク評価
- (1) 野生のニホンイタチおよびシベリアイタチ各1匹を用いてH5N6亜型HPAIVの経鼻接種試験を実施した。環境水からの動物相解析では、ニワトリ以外の動物種DNAの検出率向上に有用なブロッキングプライマーを確立した。
  - (2) ニホンイタチのH5N6亜型HPAIV経鼻接種試験を目標数の3匹で実施した成績から、ニホンイタチがHPAIVに感受性で、感染後5~7日間、口腔および鼻腔にウイルスを排出することを示した。フェレットでは元気消失など臨床徴候を示す点でイタチ科野生動物との違いが見られたが、ニホンイタチ同様に口腔や鼻腔へのウイルス排出があることを示した。環境水からの動物由来DNA検出のPCRおよびブロッキングプライマーを用いたPCRの至適条件を明らかにした。
  - (3) シベリアイタチおよびホンドテンのH5N6亜型HPAIV経鼻接種試験成績から、これらの野生動物のHPAIV感受性が確認された。ニホンイタチの経口接種

試験では、摂食によりHPAIVに感染しうることを示した。フェレットを用いた経口接種試験で、ニホンイタチと異なり口や鼻からウイルスは検出されなかったが、摂食によるフェレットのHPAIV感染を確認した。野外の水場でセンサーカメラによる撮影と環境水からのDNA検出で動物種を比較し、DNA検出による動物相解析の限界を示した。

- (4) ニホンイタチおよびシベリアイタチの口腔または鼻腔スワブ液を用いたニワトリ接種試験により、イタチ科野生動物が排出するウイルス量でニワトリがHPAIVに感染しうることを示した。令和2年度のHPAI発生農場付近の環境水を用い野生動物相解析を実施、本法が目視で確認できなかった動物の検出に有効であることを示した。
  - (5) 2020年度に流行したH5N8亜型HPAIVの経鼻接種試験で、ニホンイタチの感染を認める一方、クマネズミでは感染の確認にいたらず、動物種によるHPAIV感受性の違いが示された。2021年度に流行したH5N1亜型HPAIVがシベリアイタチに肺炎を起こしたことから、イタチ科野生動物に対するHPAIVの病原性の変化が示唆された。令和3年度に続きHPAI発生農場近隣で採取した環境水からウイルス伝播の可能性のある鳥類および哺乳類が検出され、疫学調査における本法の実用性が示された。
- (3) アフリカ豚熱ウイルスのニホンイノシシから豚への伝播リスクの解析

(1) ASFV感染豚の病態解析

- ・ASF急性期の特徴的な病変は黒赤色を呈する脾腫、および肝リンパ節を中心とする腹腔内リンパ節の暗赤色化であることが確認された。
- ・ASF亜急性期においては腎臓病変が確認された。脾臓および腹腔内リンパ節の病変は、感染後の経過日数に伴い重度になる傾向が認められた。

(2) ASFV感染イノシシの病態解析

- ・ASFV感染イノシシは接種後5、6日目に斃死し、ASFV感染豚と同様の肉眼病変、組織病変が確認された。各臓器の組織病変、臨床経過は豚よりもイノシシで重度であり、イノシシは豚よりもASFに対する感受性が高いことが示唆された。
- ・ASFV感染臓器を経口投与したイノシシは投与後5日目には発熱を呈し、全血中にASFV遺伝子が検出され、8日前後にエンドポイントとして安楽殺された。全頭で解剖時にASFの特徴的な肉眼病変が確認された。

(3) イノシシ間、イノシシ-豚間での伝播試験

- ・同居イノシシは同居後9日目より発熱がみられ、同居後11～13日目に斃死した。同居豚では同居後9日目で発熱がみられ、試験終了までに1頭が斃死したが、残りの個体は試験終了時まで生残していた。ASFVの筋肉内接種試験では、イノシシは豚よりも病勢が強い傾向を示したが、同居による水平伝播試験においても同様の傾向が認められた。
- ・主要な感染経路である経鼻口経路では、現在流行しているASFV genotype IIについて、イノシシではウイルス血症に至るまで5日程度、発症まで7日程度が想定された。

(4) ASFV Kenya05株を用いた豚、イノシシ感染試験

- ・Kenya05株感染イノシシは9～13日目に斃死、同居豚では18日目以降発

熱を呈し、皮膚の壊死、跛行が認められた。Kenya05株感染豚は10～12日目に斃死、同居個体も13～16日で斃死し、解剖所見と合わせ、全体として経過は急性から亜急性であった。Kenya05株を用いた感染試験で強毒株よりも経過の長い病態が認められ、同居個体において慢性期に報告のある皮膚病変および跛行といった症状が確認された。

(4) 口蹄疫ウイルスの野生動物および家畜における病原性解析

(1) タイ国東南アジア地域口蹄疫レファレンス研究所から32株、ミャンマー国口蹄疫診断検査所から8株、モンゴル国中央獣医検査所から6株のFMDV株を導入し、その血清型、トポタイプおよび系統を解析した。また、作製したワーキングストックの力価は、LFBK- $\alpha_v\beta_6$ 細胞においては $10^{7.7} \sim 10^{8.8}$  50%細胞感染価 (TCID<sub>50</sub>) /mLと6株全てが高い力価であったが、IB-RS-2細胞では $10^{2.5} \sim 10^{7.8}$  TCID<sub>50</sub>/mLと各ウイルス株の力価に差が確認された。

(2) ワーキングストックの乳飲みマウスにおける50%致死量 (LD<sub>50</sub>) は、 $10^{6.63} \sim 10^{7.38}$  LD<sub>50</sub>であり、過去に豚の経口接種で病原性を示したワーキングストックと同程度のLD<sub>50</sub>を示した。また、 $10^7$  TCID<sub>50</sub>の0/TAI/315/2016株および0/MYA/5/2016株を経口接種した豚では臨床症状やウイルス排泄が確認された。

(3) 0/TAI/315/2016株を経口接種したイノシシで臨床症状およびウイルス排泄が確認された。また、接種イノシシから同居イノシシや同居豚への水平伝播も確認された。一方、妊娠約80日目の妊娠マイクロミニピッグの蹄球部に0/TAI/315/2016株を接種したところ、接種1日後から血清、口腔および鼻腔スワブ中にウイルスが検出された。また、接種3日後から蹄冠部や蹄球部に水疱形成が確認された。さらに、接種9日後から中和抗体が検出された。一方、胎子の下顎リンパ節、舌、扁桃、軟口蓋、膈帯、肝臓、心臓、脾臓、腎臓、肺、胎盤および羊水からウイルス遺伝子は検出されなかった。

(4) A/MOG/2013株を経口接種したイノシシで臨床症状およびウイルス排泄が確認された。また、接種イノシシから同居イノシシや同居豚への水平伝播も確認された。

(5) ワクチン接種3日後に0/MYA/11/2019株を接種した豚について、ウイルス排泄期間をワクチン非接種豚と比較したところ、両者に差は確認されなかった。また、ワクチン接種30日後に同株を接種した豚について、感染動物と非感染動物を識別するキットにより抗体応答を検証したところ、症状を示さなかった豚においては抗体が検出されなかった。一方、哺乳豚を用いた感染試験については、2023年2～3月に実施する予定である。

(5) アルボウイルス伝播機序と媒介節足動物の国内生息域の解明

(1) プロジェクト開始前後に採集した*Culicoides*属ヌカカのDNAバーコーディングを実施し、少なくとも71種の配列を明らかにした。そのうち少なくとも、16種は国内未記載種あるいは新種であることが示唆された。特に、はっきりとした形態的な差異が認められない個体間でDNAバーコー

ディング領域の配列が異なる例もみられ、隠蔽種が存在すると考えられた。

- (2) 吸血個体を用いた検索により、牛以外にカモシカや鳥類を吸血源として  
いる種類が確認された。
- (3) ヌカカへの接種実験によって、ウシヌカカがサシュペリウイルスに、シ  
ガヌカカがシャモンダウイルスに感受性を持つことを明らかにした。一  
方、ウシヌカカのシャモンダウイルスに対する感受性は低く、ヌカカ種  
によって媒介能が異なる可能性が示唆された。
- (4) 鹿児島で採集されたヌカカから、ディアギュラウイルスおよび新規のフ  
ラビウイルス様ウイルスが分離された。

#### (エ) 研究成果の活用における留意点

特になし。

#### (オ) 研究目標の達成に当たっての問題点

- (1) 野生鳥類の高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する感受性解析および家禽  
へのウイルス伝播リスク評価  
これまで報告が少なかった野生鳥類でのHPAI感染が近年増加しており、ウイ  
ルスも変わりつつあることから、さらなる鳥種及びウイルスでの評価が求めら  
れている。
- (2) 野生哺乳動物における高病原性鳥インフルエンザウイルス感染実験および野生  
動物の農場周辺水場環境共有状況調査による家禽へのウイルス伝播リスク評価  
複数種のイタチ科野生動物が近年流行しているHPAIVに感受性を示し、ニワト  
リに感染させる量のウイルスを排出することが示されたが、家禽舎内での接  
触などによる家禽へのウイルス伝播は実証されておらず、今後、同居試験によ  
り検証する必要がある。環境DNAからの動物種検出には時間と費用を要するため、  
疫学調査への社会実装には、採水地点の選定や採水後のサンプルの保存方法な  
ど、マニュアル整備の必要がある。
- (3) アフリカ豚熱ウイルスのニホンイノシシから豚への伝播リスクの解析  
中国で発生が報告されている慢性型についての病態解析が不十分であり、株  
の入手が可能であれば今後解析を実施する必要がある。成果について、今後さ  
らに論文発表や学会発表を行う予定である。
- (4) 口蹄疫ウイルスの野生動物および家畜における病原性解析  
FMDVの胎子に及ぼす影響について十分に検証出来なかった。
- (5) アルボウイルス伝播機序と媒介節足動物の国内生息域の解明  
DNAバーコーディングにより、形態的特徴に基づく過去の記録との矛盾や、複  
数の隠蔽種の存在が明らかになった。今後、分類学的な整理、および新種の記  
載が必要になる。課題で得られた成果を、現場で役立ててもらえるような工夫  
が必要になる。ウェブ等での知見の普及、啓発を想定している。

## 2) 小課題名：伝染病の早期摘発や監視情報を活用した防疫の最適化

### (ア) 研究目標

本小課題では、今後発生が危惧される重要家畜伝染病について、海外流行株や国内  
で新たに確認された株を対象に、流行状況の実態を把握するとともに、これらの病原

体の性状を明らかにし、適切な診断法を検討する。また、全国で実施されている家畜疾病サーベイランスの結果など、家畜伝染病の流行状況の解析等に必要な多様なデータについて、これらのデータを包括的かつ集約的に収集・分析するための大規模データベースを構築する。さらに、ここから得られたデータを活用して、感染症の流行状況を解析し、発生を早期に発見できる技術を開発する。

## (イ) 研究内容

### (1) 口蹄疫ウイルスの変異流行株の抗原性解析に基づく現行診断法の改良および類症疾病病原体との鑑別可能な診断法の開発

FMDについては、我が国で経験したことのない型のウイルス株による発生が諸外国で頻発しており、また現行のワクチンバンクのワクチンに対して効果が低いウイルス株の出現が報告されている。そのため、我が国でもそれらに対応した摘発・防疫体制を構築する必要がある。また、海外ではFMDと症状だけでは鑑別しにくいセネカウイルス、水泡性口炎ウイルス等の類似した感染症の発生報告があり、FMDとの類症鑑別の重要性が高まっている。

そこで本課題では、海外におけるFMDの最新流行株の抗原性の解析により、当該株の特性や変異の状況を解明する。またその結果を活用し、現行検査方法の有効性を検証するとともに、野生動物にも適用可能な検査方法を開発する。さらに、FMDの類症水泡性疾病病原体に対する鑑別診断法及び類症水泡性疾病の発生初期段階における消毒薬の効果的な使用法を確立する。具体的には、以下の項目に関する研究開発を行う。

- ①抗原変異が示唆される近年のFMDウイルスに対する現行診断法の有効性を検証し、必要に応じて流行株に対応した診断法へ改良する。
- ②モノクローナル抗体との反応性の解析及び遺伝子解析を用いて、海外流行株の抗原性状の変化を解明する。
- ③FMD類症水泡性疾病病原体に対する鑑別診断法を開発する。
- ④FMD類症水泡性疾病病原体に対する消毒薬の効果を検証し、これらの疾病発生時の消毒薬の効果的な使用法を確立する。

### (2) アフリカ豚熱の監視情報の収集と防疫の最適化

ASFは近年、アフリカ及び東ヨーロッパで発生が継続している。2018年には東シベリアで初めて発生が確認され、国境を接するモンゴル及び中国に感染が拡大する可能性が高まっている。東アジア諸国に感染が拡大した場合には我が国への侵入リスクも高まると考えられる。そこで本課題では迅速かつ高感度な診断法である遺伝子検査法について、包括的および型特異的な手法の有効性を検証する。さらに、次世代シーケンサーによる全ゲノム解析手法を確立し、ASFV分離株の性状や遺伝子変異を明らかにする。

### (3) 高病原性鳥インフルエンザの監視情報の収集と防疫の最適化

H5亜型HPAIはアジア、アフリカ、ヨーロッパ及び北アメリカ大陸にまで拡大し、ワクチンを使用した国々でウイルスは常在化し、日々ウイルスが進化している状況にある。また、2013年3月から中国において人に感染・死亡させているH7N9亜型鳥インフルエンザウイルスは、2016年には高病原性化したことから、将来的に高病原性に変化する可能性を秘めた低病原性鳥インフルエンザウイルス（LPAIV）や鳥インフルエンザウイルス（AIV）についても、情報の蓄積が求

められている。近年、我が国のH5亜型HPAIの家禽での発生は、野鳥によりもたらされていることが示唆されていることに加え、海外からの旅客により持ち込まれる家禽肉がウイルスに汚染している事例も報告されている。これらのことから、我が国へのHPAIV侵入の早期摘発を行うためには、世界中のHPAIVの動向を監視しておく必要がある。

そこで本課題では海外研究機関と連携し、海外における家禽及び野鳥でのHPAIの発生状況と、分離されたHPAIVの疫学情報及び遺伝子情報を、研究期間の5年間通して収集する。特にこれまでHPAIVに関する情報収集またはウイルスの導入を行っている台湾、中国、韓国、アメリカ、ロシア、ベトナム及びカンボジアに加え、その他の国々についても、ウイルスを導入するための交流を図る。

疫学や遺伝子解析の情報を踏まえ、候補となった家禽株だけでなく野鳥株も考慮に入れたHPAIVを導入し、血清学的検査用及び抗原解析用の抗血清を作製する。また、家禽類への感染試験により、病原性やウイルスの宿主体内での増殖性を解析することにより、それらの性状を明らかにする。さらに導入したウイルスについては、国内侵入時の早期摘発に備えた診断系の開発及び既存の国内診断系の有効性を検証するとともに必要に応じて新たな検査系を検討し、都道府県への情報提供も行う。また、これらの検査系について、野鳥由来HPAIVでの適用可能性も検証する。

#### (4) アルボウイルス感染症の監視情報の収集と防疫の最適化

海外におけるアルボウイルス感染症の発生情報を入手・分析するとともに、流行地に隣接する国内各地で得られる未同定ウイルス株の性状解析を行い、その検出法を開発するため、以下の項目等に関する研究開発を行う。

- ①海外における牛などの家畜のアルボウイルス感染症の監視状況をインターネットや文献情報から収集し、国内への侵入リスクを検証する。また、アジア、オセアニア地域の研究機関と連携して、発生情報と合わせて監視や診断体制に関する情報を入手する。
- ②国内外から入手した未解析のアルボウイルス株(主に流行性出血病ウイルス、パリアムウイルスグループ)の性状を明らかにし、それらに最適化された検出法を開発する。
- ③野外材料から分離された未同定、未分類のアルボウイルス株のゲノム構造の詳細を明らかにし、既存の検査方法が適用できない場合は新たな検出法を開発する。

#### (5) 慢性消耗病の検査法の開発

シカ科動物のCWDは、動物のプリオン病のひとつであり、北米を中心に感染動物数及び感染地域が拡大している。また韓国ではCWDに感染したアカシカをカナダから輸入したことでCWDが2001年に発生し、それ以降、散発的な発生を繰り返している。2016年にはノルウエーで欧州初となるCWDがトナカイで摘発され、感染拡大が起こっている。ノルウエーのCWDは、異常プリオンの感染によらない、いわゆる孤発性に発生した可能性も示唆されている。国内での発生はこれまで報告されていないが、一旦発生すると根絶が困難であることから、国内監視が重要となる。

プリオン病検査における検体として、中枢神経組織、特に異常プリオン蛋白

質が蓄積しやすい延髄門部を用いることが一般的である。しかし、野生シカを対象としてCWDサーベイランスを行う場合、検体採取を行う狩猟者等肉体的負担が著しく大きく、必要な検体数を確保することが難しい。一方、他の動物のプリオン病とは異なり、CWDでは感染性が末梢組織、唾液や血液のみならず糞尿にも分布し、これらの部位における感染性は、CWD感染後比較的早期から検出可能であるとの報告がある。そのため、これら体液や糞尿はCWD検査の検体として有望と考えられる。

そこで本課題では、個体からの採取が最も簡便である糞を検査対象とした、微量CWDプリオン検出法の開発し、CWDサーベイランスに応用することを目的とする。ただし糞便中の異常プリオン蛋白質の量は、中枢神経組織に蓄積したそれと比較して著しく低いことが予想されることから、検出法には超高感度に異常プリオン蛋白質を検出可能であることが要求される。そのため多検体測定が可能であり、バイオアッセイを上回る検出感度を持つRT-QuIC(Real Time-Quaking Induced Conversion)法を確立する。またその過程で、RT-QuIC法では異常プリオン蛋白質の濃縮とプリオン増幅反応阻害物質を除去するため、糞の前処理方法も確立する。更に検査結果の特異性を確保するため、別の試験管内プリオン増幅法であるPMCA (Protein Misfolding Cycle Assay) 法も整備する。またその過程で、異常プリオン蛋白質の濃縮とプリオン増幅反応阻害物質を除去するため、糞の前処理方法も確立する。

#### (6) 多様な家畜疾病データに基づく発生・拡散予測手法の開発

対策を実施すべき疾病の選択や具体的な対策の立案、あるいは対策の有効性評価のためには、疾病ごとに発生状況を把握し、感染拡大の様相を評価・予測することが重要である。こうした予測等を的確に実施するためには、各種サーベイランスの結果や各診断施設における疾病の把握状況等を活用する必要がある。そこで本課題では、多様な家畜疾病データを収集・分析し、得られたデータに基づいて疾病の発生や感染拡大の状況を予測・分析する手法を開発する。

具体的には、まず、家畜疾病の発生状況の把握や流行状況の予測・分析に必要な多様なデータを効率的に収集・分析する大規模データベースを構築する。収集すべきデータとしては、家畜伝染病を対象として各都道府県の家畜保健衛生所によって実施されている各種のサーベイランスの結果や、家畜保健衛生所が日常的に行っている各種病性鑑定の結果などが含まれる。このため、各都道府県が直接接続してデータを報告することが可能なクラウドベースのデータベースシステムとする。本データベースへは、これらの業務を統括する農林水産省担当部局や、データの解析を行う農研機構動物衛生研究部門が接続できるものとする。

さらに、本データベースで得られたデータに加えて、家畜個体識別全国データベース(耳標データベース)のデータや、病原体の解析で得られる遺伝子情報をはじめとする、各種の関連データを利用して、伝染病の発生状況の把握や、流行状況の分析・予測が可能な手法を開発する。具体的には、FMD等のウイルス性感染症の流行について、各発生農場の摘発日や発症の経過、病原体の遺伝子情報等を総合的に解析し、感染拡大の経路(感染ネットワーク)を推測する手法を開発する。また、耳標データベースによる牛の移動履歴のデータとヨーネ

病が摘発された牛のデータから、農場の潜在的な感染状況を推定する手法や、牛ウイルス性下痢（BVD）の持続感染牛（PI牛）の摘発状況から、PI牛による感染拡大経路を推測する手法などを開発する。

#### （ウ）研究結果

##### （１）口蹄疫ウイルスの変異流行株の抗原性解析に基づく現行診断法の改良および類症疾病病原体との鑑別可能な診断法の開発

（１）ミャンマー、タイ、モンゴル、パキスタン、ガーナ等の流行株を用いた現行抗原診断法の評価を行った結果、RT-PCR（FM8-9）はすべての流行株で増幅が確認された。モノクローナル抗体（MAb）を用いたELISAとイムノクロマトグラフィーは、抗原検出系についてはすべての流行株を検出可能であったが、血清型0では0/Cathayと0/MESA/2001eの系統にVP2領域のアミノ酸置換が確認され血清型別に用いるMAbを変更した。血清型Aに関しては導入したA/GVII系統に対するMAbを新たに作出して改良を行なった。血清型SAT2ではガーナから導入した0/EA-3系統と交差反応が確認されたためMAbを変更した。

（２）FMD感染血清、ワクチン血清を用いて市販抗体検出キットの評価を行い国内発生時の抗体診断および血清サーベイランスへの活用に資する情報を収集した。血清型Aではワクチン血清および感染血清に対してIZSLERがPrioCheckより早い時期に抗体の検出が可能であった。血清型0のワクチン血清および感染血清では、PrioCheckがIZSLERより早い時期に抗体の検出可能であった。さらに抗原性の大きく異なる0/Cathayの感染血清に対しては、PrioCheckに比べてIZSLERの検出成績が著しく低く、感染牛の血清では検出率はPrioCheckの50%以下であった。非構造タンパク質抗体を検出するPrioCheck（NSP）についてはワクチン接種後の感染および発症が軽度である場合には検出感度が著しく低下するが、ワクチン非接種の発症個体の感染血清に対しては検出可能であった。

（３）FMDVの類症水疱性疾病病原体の感受性細胞についてFMDの診断に用いるLFPKで豚水疱病ウイルス、セネカウイルス、水疱性口内炎ウイルス（が増殖することが明らかとなった。この結果をもとにウイルス中和抗体測定に用いる細胞をLFPKに統一した。またRT-PCRは同一プロトコールで且つ高感度に検出できるようにPCRキットおよびプライマーの選択を行った。ランダムプライマーを用いた全ゲノム解析を可能とした。

（４）FMDの類症水疱性疾病病原体全般に有効な消毒方法の検証については塩素系、アルデヒド系、ヨウ素系、消石灰でFMDの類症水疱性疾病病原体全般に対する有効な消毒効果が確認された。逆性石鹼系およびエタノール系の消毒効果は主にエンベロープウイルスである水疱性口内炎ウイルスに限定的であった。FMDVに効果のある0.2%クエン酸は豚水疱病ウイルスとセネカウイルスには効果が確認されなかった。また、寒冷条件下ではビルコンS、アルデヒド系は高濃度であっても、著しく効果が減弱される。有機物存在下では、ヨウ素系では影響を受けやすく、塩素系はビルコンS＞ピューラックス＞クレンテの順に有機物の影響を受けやすく、アルデヒド系は使用濃度が薄いと有機物の影響を受けやすいことが明らか



となった。消石灰は有機物および冷温の影響を受けにくいことが確認された。

(2) アフリカ豚熱の監視情報の収集と防疫の最適化

- (1) 所有する4株のASFV（弱毒株Lisbon' 60 (Genotype I) および野外分離株であるE75 (Genotype I)、Armenia07 (以降 Arm/07、Genotype II) および Kenya05/Tk1 (Genotype X) の3株) からPCRにより増幅した遺伝子断片のシーケンス解析を実施し、いずれも既報と同じ遺伝子型のクラスターに含まれたことから、遺伝子型別の有効性を確認した。
- (2) ガーナで保存されていたASFVと診断された個体の検体について遺伝子検査を行い、ASFV遺伝子を含むことが確認された5検体を導入した。また、モンゴルにて採取されたASFVを含む野外発生例の生材料10検体についても導入を行った。
- (3) ウイルス培養上清から抽出したDNAを用いたNGS解析を実施し、*de novo* 解析により約19万塩基のArm/07株のコンティグが形成されたが、豚の染色体遺伝子の混入と考えられるリード数の低下により全配列を決定するには至らなかった。DNase I 処理では500U/100  $\mu$ l sampleを用いた検体においてシーケンス効率が最も向上しASFV全ゲノム配列の決定が可能となった。
- (4) 臓器乳剤に対する濃縮および核酸分解酵素処理によりシーケンス効率 (Mapped read数) で3.95倍以上向上した。特に限外濾過+DNase I 処理および超遠心+Benzonase処理ではそれぞれ18.0倍および6.7倍に向上したが、全長配列の決定には至らず、より高度な夾雑物の除去が必要であった。
- (5) HostZeroキットを用いて抽出したDNAはウイルス培養上清および臓器乳剤のいずれの検体を用いた場合でもシーケンス効率が低く、ASFVの解析には不適であった。
- (6) 臓器乳剤を密度勾配遠心して得た各分画において、ウイルス力価は約1.06g/cm<sup>3</sup>の分画にピークがあり、総蛋白量は比重が低い分画および約1.05~1.06g/cm<sup>3</sup>の分画、ASFV遺伝子コピー数は約1.03および1.06g/cm<sup>3</sup>の分画で高値を示した。この結果からASFV粒子は約1.06g/cm<sup>3</sup>の分画に精製されることが明らかとなった。
- (7) ウイルスが精製される比重約1.06g/cm<sup>3</sup>の分画 (Fr.8または9) をDNase I 処理するとNGSの解析深度および解読率 (Uniformity) が低下したが、DNase I 処理後に限外濾過膜による濃縮を実施することで、濃縮検体において解読深度の向上が確認された。

(3) 高病原性鳥インフルエンザの監視情報の収集と防疫の最適化

- (1) 2018年に動物検疫所において中国便乗客の持ち込み家禽肉類から分離されたH7N3亜型HPAIVに関して、鶏、マガモ、アヒルを用いた感染試験を実施した結果、3宿主とも接種した全羽で全身感染が認められた。感染した鶏は全羽死亡するのに対し、マガモとアヒルは感染後も生存し、無症状でウイルスを排泄した。HPAIVの国内診断系 (RT-PCR) に関して、NP遺伝子をターゲットとした既存のTwo step法とM遺伝子をターゲットとし

た新規のOne step法を比較し、One step法により診断感度が向上することを確認した。

- (2) H30年度に検討したOne step法によるRT-PCRを新規の鳥インフルエンザ遺伝子診断法として農林水産省に提案し、新規診断法に関するマニュアルが都道府県に通知された。2017-2018年にロシア、ベトナム、日本で分離されたH5亜型とH7亜型のHPAIVに対する抗血清を診断及び抗原解析用に作製した。
  - (3) 2020/21シーズン（2020年秋から2021年春まで）の国内のHPAI発生において、新規診断法（RT-PCR）が有用であることが確認できた。2020年11月に国内の家禽農場で発生したH5N8亜型HPAIVに関して全ゲノム解析及び感染試験による感受性の解析を行った。2015年に台湾にて分離されたH5N2亜型HPAIVと2019年にポーランドにて分離されたH5N8亜型HPAIVを入手し、簡易検査と遺伝子検査のどちらにおいても国内診断系が有用であることを確認、抗血清の作製と感染試験による感受性の解析を行った。
  - (4) 2021/22シーズンに国内でHPAIが発生する以前に、同年にロシアで分離されたHPAIVを入手し、国内診断系の有用性を確認した。2014年以降日本に侵入しているクレード2.3.4.4のサブクレードa（2014/15シーズン）、b（2017/18及び2020/21シーズン）及びc（2016/17シーズン）に属するウイルスについて抗原性の解析を行った結果、クレード2.3.4.4の中で、a-b間の抗原性の違いは少ないこと、cはa、bとは少し異なることが示された。2020/21シーズンに国内で分離されたH5N8亜型HPAIVは、全ゲノム解析によって5つの遺伝子型に分類された。各遺伝子型の代表株を用いた鶏の経鼻接種試験では、致死性・伝播性が遺伝子型間で大きく異なることを確認した。
  - (5) 2021/22シーズンに国内で分離されたHPAIVは、1つの遺伝子型のH5N8亜型HPAIVと3つの遺伝子型のH5N1亜型HPAIVに分類された。このうち3つの遺伝子型に関して代表株を用いた鶏の経鼻接種試験を行い、致死性および伝播性が遺伝子型の間で異なることを確認した。また、2022年9月に野鳥より分離されたHPAIVに関して全ゲノム解析を行い、2021/22シーズンに国内で流行したH5N1亜型HPAIV（鹿児島21株）と近縁であることを明らかにし、プレスリリースを行った。
- (4) アルボウイルス感染症の監視情報の収集と防疫の最適化
- (1) 2014～2019年に沖縄県で採取された牛の血液材料から、89株（少なくとも、11ウイルスを含む）のアルボウイルスを分離した。
  - (2) 次世代シーケンス解析により、7つの新種のウイルスもしくは新規の血清型と、6つの国内新規のウイルスもしくは血清型の国内への侵入を明らかにした。
  - (3) 国内で分離されたパリアムウイルスの全ゲノム解析を行い、得られた配列に基づきグループ特異的、およびチュウザンウイルスもしくはディアギュラウイルスを特異的に検出できるリアルタイムPCR法を開発した。本法による野外検体を用いた検証において、大脳欠損症を呈した子牛からディアギュラウイルスの遺伝子を検出した。

- (4) 文献情報などから、東アジア（日本、中国、韓国、台湾）で反芻獣（家畜）から検出されているアルボウイルスについて取りまとめを行った。
- (5) 慢性消耗病の検査法の開発
  - (1) CWD異常プリオン蛋白質を試験管内増幅可能なPMCA法の検出感度を検討したところ、20pg脳当量の検体からCWD異常プリオン蛋白質を検出可能であった。シカプリオン蛋白質発現遺伝子改変マウスへのCWDプリオン感染が確認された。
  - (2) RT-QuIC法のCWD異常プリオン蛋白質検出感度はPMCA法より約10倍低いことが示唆された。また糞液に含まれる RT-QuIC 法の阻害物質除去は困難であった。
  - (3) 米国コロラド州立大学からCWD感染6個体から採取された糞を入手した。これまで最適化を行ってきたPMCA法を用いた検査方法により、6検体全てからCWD異常プリオン蛋白質の検出に成功した。
  - (4) 4個体分の糞液を混和したプール検体から、PMCA法でCWD異常プリオン蛋白質を検出可能であることが明らかとなった。
  - (5) 2016-2019年度に41道府県から採材された1173検体分のシカ直腸糞を懸濁液化した。懸濁液化後、4検体ずつまとめたプール検体を作成した。プール検体を用いて、本事業で確立した検査法で検査を行った。検査した1173検体に、陽性・疑陽性は認められなかった。
- (6) 多様な家畜疾病データに基づく発生・拡散予測手法の開発
  - (1) 家畜疾病サーベイランス報告システムの開発を完了させ、運用を開始した。また、都道府県担当者向けの研修会を実施した。
  - (2) 口蹄疫の感染ネットワークの推定の結果、初発農場摘発時には少なくとも12戸の農場が感染しており、約3週間前に疾病が侵入したと推定された。感染農場全292戸中、101戸で二次感染が起きたと推定され、1戸の感染農場から生じた二次感染の戸数は中央値で2戸（範囲1-18戸）と推定された。
  - (3) 牛の移動を解析したところ、地域内移動については、乳用牛、肉用牛のいずれにおいても5月と10月に増加しており、夏季放牧の入退牧による移動と考えられた。乳用牛では主に初妊牛が夏季放牧をしていたのに対し、肉用牛では幅広い月齢で夏季放牧と考えられる移動が認められた。地域間移動については、乳用牛の移動の約9割が北海道に関わる移動であった。一方、肉用牛の地域間移動は、その39%が九州・沖縄を、35%が北海道を起点としており、この他、隣接する地域間の移動も一定の割合で認められた。
  - (4) ヨーネ病の対策については、乳用・肉用のそれぞれの飼養形態の農場を想定し、農場内の感染拡大を再現するシミュレーションモデルを用いて、現在のELISA検査に代えてPCR検査を行った場合の影響を検討した。また、発生農場で行う追加検査（51条検査）について、検査間隔を変更した場合の影響を検討した。乳用農場では、発生農場での追加検査を糞便PCRで行う場合、搾乳牛の検査も実施することが不可欠と考えられた。発生農場での追加検査の検査間隔を12ヶ月間隔にすると、伝播力を高めに想

定した場合に、感染拡大を十分に抑えられないと考えられた一方で、6ヶ月間隔では、現在と同等の効果が得られる可能性が示された。ただし、この場合には、検査法をELISAではなく、PCRとする必要性が示唆された。

(5) CSFに関する疫学解析については、感染イノシシからおよそ5キロまでの地域は、感染野生イノシシまでの距離と摘発地点数に応じて、28日以内に豚農場が感染するリスクが高まっていた。推定されたリスクエリアと、農場の発生はよく一致していた。

(6) 肉用鶏農場12戸の死亡羽数データを用いて、農場へのHPAIV侵入時期を農場ごとに推定したところ、各農場におけるウイルス侵入から届出までの日数は、中央値14日（最小6日、最大21日）と推定された。また、発生農場の地理的特徴を発生農場周囲5km以内に分布する非発生農場と比較し、条件付きロジスティックモデルで解析した。その結果、採卵農場と肉用農場では農場周辺に水域が分布していることが、採卵農場では飼養羽数が多いことが、肉用農場では周辺に水田が分布していることが、家きん農場でのHPAI発生リスクを高めることが示唆された。

#### (エ) 研究成果の活用における留意点

##### (5) 慢性消耗病の検査法の開発

戦略的監視事業に、改良したPMCA法によるCWDモニタリングを提案する。非定型CWD感染動物では、末梢組織からCWDプリオンが検出されない可能性が報告されており、直腸糞を検査対象とした本法では非定型CWDの検出は困難である。

#### (オ) 研究目標の達成に当たっての問題点

##### (1) 口蹄疫ウイルスの変異流行株の抗原性解析に基づく現行診断法の改良および類症疾病病原体との鑑別可能な診断法の開発

FMDV以外のVDsについて抗血清を作製する必要がある。SV-Aの牛を含めた病原性について確認する必要がある。消毒効果に関しては現場への普及を行う。

##### (2) アフリカ豚熱の監視情報の収集と防疫の最適化

部分シーケンスによる遺伝子型解析および分離ウイルスを用いた全ゲノム解析が可能となった一方、臓器乳剤等の生体材料を用いた全ゲノム解析において配列カバー率100%には至らなかった。

##### (3) 高病原性鳥インフルエンザの監視情報の収集と防疫の最適化

ロシアとの共同研究によるロシア分離ウイルスの導入が出来なくなった。野鳥の繁殖地である場所でのウイルスやその情報が入手不可能になり、国内侵入の為に国内診断法の有用性の検証や抗血清等診断ツール作製にも影響が出てくる懸念される。

##### (4) アルボウイルス感染症の監視情報の収集と防疫の最適化

気候変動などにより、アルボウイルスや媒介節足動物の分布が変化する可能性があるため、日本周辺地域での発生情報の収集や、国内への侵入を継続的に監視する必要がある。培養細胞を用いて分離できないアルボウイルスも多数存在すると考えられるため、高感度かつ網羅的な検出技術を開発して、直接、脊椎動物宿主や媒介節足動物からウイルスを検出できるようする必要がある。

##### (5) 慢性消耗病の検査法の開発

非定型CWDは水平感染を引き起こし難いと考えられているが、中枢神経を検体

として用いる従来のCWD検査の継続も必要と考えられる。

(6) 多様な家畜疾病データに基づく発生・拡散予測手法の開発

R4年度にサーベイランス報告システムを農林水産省に移管する。乳用牛や肉用牛の移動の特徴を表すデータを作成し、国際的なデータ公開サイトで公開する。

3) 小課題名：伝染病発生時の危機管理技術の開発

(ア) 研究目標

本小課題では、国外から侵入するリスクのある家畜伝染病発生時及び国内で流行するが適正な制御法が確立していない疾病に対する危機管理技術として、ワクチン、抗ウイルス剤又は消毒薬の資材の開発を行うことを目標とする。具体的には家畜伝染病のワクチン開発に関するデータの蓄積、新たな効果的なワクチンの開発及び既存ワクチンの有効性の検証を行うと共に、ワクチン接種時にその有効性が発揮されるまでに使用される消毒剤の効果的な使用方法の確立及び抗ウイルス薬の開発を行うことにより、家畜伝染病のまん延防止対策の向上が図られる。

(イ) 研究内容

(1) 新規鳥インフルエンザワクチンの開発

HPAI発生において、発生規模が大きく摘発とう汰による防疫が困難な場合、発生拡大を防ぐために摘発とう汰に加え、緊急的にワクチンの使用を検討する必要がある。緊急ワクチネーションを実施する状況では、摘発とう汰による防疫措置に多くの人員が必要なため、より省力的に多数羽に投与可能なワクチンが求められる。先行研究で作出した組換えベクターワクチンであるrAPMV-10/HAは、点眼投与で十分な感染防御効果を示した。一方で、rAPMV-10/HAは遺伝子組換え生物であるため、使用に際し環境へのリスク評価等様々な知見を集積する必要がある。また、HPAIVは変異を起こしやすく抗原部位が変化することにより、ワクチン効果が減弱することが問題となっている。組換えベクターワクチンは、粘膜へのIgAの誘導が期待されるため、血中へのIgGの誘導を目的とする従来の不活化ワクチンと比べ、より抗原性の広いウイルス株に効果がある可能性がある。

そこで本課題では以下の項目に関する研究開発に基づき、省力的に多数羽に投与することが可能なワクチンを開発する。

①ワクチンの使用法の検討

rAPMV-10/HAについて、異なる投与経路における効果の差を検証する。その際、投与量、投与週齢、投与回数についても考慮し、ワクチンの効果的な使用方法の確立を目指す。

②抗原性の異なるHPAIVに対するワクチン効果の検証

rAPMV-10/HAで免疫した鶏に、抗原性の異なるHAタンパク質を有するHPAIVで攻撃し、鶏の症状およびウイルス排せつ量からワクチンの効果を検証する。同時に、従来の不活化ワクチンで免疫した鶏でも同様の試験を行い、ワクチン効果を比較することにより、本ベクターワクチンの優位性を検証する。

また、抗原性が大きく異なるウイルス株に対しては、ベクターに組み込む抗原を変え、より流行株に近い抗原とすることにより、ワクチン効果の改善が期

待できるが現在、そのようなウイルスを作製するためには少なくとも1か月程度を要する。その期間を短縮することを目的に、挿入する抗原遺伝子を容易に変えることが可能なプラスミドを構築する。

### ③ワクチンの安全性の検証

rAPMV-10/HAを鶏に接種し、ウイルスの排せつおよび症状について経過を観察する。また、組換えウイルスを接種した鶏と未接種の鶏を同居させ、未接種鶏からのウイルス排せつ、抗体陽転を調べることにより、ウイルス伝播性について週齢の違いも考慮して検証する。また環境中への排せつと伝播リスクを想定し、APMV-10のマウス等の哺乳動物および野鳥におけるウイルスの感染性について検討を行う。

### ④鶏以外の家禽に対するワクチンの検証

rAPMV-10/HAのベクターとした鳥パラミクソウイルス血清型10の鶏以外の家禽への感染性を明らかにするとともに、それらの家禽に対するワクチン効果を評価する。効果が低いと判定された場合、鳥パラミクソウイルス血清型2および6をベクターとしたワクチンについても検証を行い、鶏以外の家禽において効果的なワクチンベクターを選別する。

## (2) ワクチン開発に資するアフリカ豚熱ウイルスの分子基盤の解析

近年、ロシアおよび東欧、中欧諸国、そして中国でASFが続発し、甚大な被害をもたらしている。その蔓延の理由の1つに未だ有効なワクチンが開発されていないことが挙げられる。現在、西欧およびアジア諸国へのさらなる拡散が懸念されており、本疾病をコントロールするためにもワクチン開発が強く望まれている。そこで、本研究課題ではASFVの性状を分子生物学的に解析し、ワクチン開発につながる分子群の特定を目指す。

### ①ASFV 感受性細胞の選定と有用性の検討

ASFV 感受性の高い細胞を選定し、ASFV の安定的な増殖に有用であるか検討する。

### ②組換え転移ベクターの作成と組換えウイルス作出法の確立

組換え ASFV 作出に必要な組換え転移ベクターを作成し、組換え ASFV の効率的な作出法を確立する。

### ③特定遺伝子欠損ウイルスの作出とその遺伝子の機能解析

ASFV ゲノムにおいて特定の遺伝子を欠損させたウイルス株を作出し、その遺伝子の機能を明らかにする。

### ④ワクチン開発に関連性にある遺伝子の選定法の確立

特定遺伝子欠損ウイルスを用いて、欠損させた遺伝子のウイルス性状（病原性等）への関与を解析するための手法を確立する。

### ⑤ワクチン開発に関連性のある遺伝子の選定とその詳細な機能解析

ASFVの特定の遺伝子について、遺伝子欠損ウイルスを用いて機能を解析する。

## (3) 口蹄疫およびアフリカ豚熱に対する効果的なまん延防止技術の検証

FMDやASFが万一国内で発生した場合、まん延を防止するために迅速かつ効果的な防疫措置を執る必要がある。FMDでは移動制限および摘発とう汰などが実施されるが、それでも感染拡大を抑えることが出来ない場合、殺処分を前提としたワクチン接種および抗ウイルス材の投与を行うことがある。ただしワクチ

ン接種は、感染後の症状や排せつを抑制する反面、免疫獲得までに数日を要する上、抗原性が異なると備蓄ワクチンが効果を示さない可能性がある。それに対して、抗ウイルス剤はウイルスの抗原性によらず即効性があり、迅速なまん延防止技術として有用である。これまでに、ピラジンカルボキサミド誘導体T-1105が2000年日本株および1997年台湾株の感染豚における症状およびウイルス排せつを低減する効果を確認しているが、今後、我が国で口蹄疫が発生した場合の防疫対策として活用するため、近年の流行株に対する薬効評価も必要となる。さらに、より効率的な投与方法、ウイルスごとの薬効の差異やそのメカニズムの検証、および新たな抗ウイルス剤候補物質の探索が求められている。

一方、ASFに対しては、実用的なワクチンが開発されておらず、現在我が国で備蓄している防疫資材も無い。そのため、新たな抗ウイルス剤候補物質の探索や消毒方法等も含めたまん延防止技術の検証を行う。

#### ①抗ウイルス剤T-1105の薬効評価およびより効果的な使用法の検証

培養細胞におけるFMDV近年流行株の抗ウイルス剤T-1105による増殖抑制試験を行うことにより、T-1105の抗ウイルス活性を評価する。また、ウイルス接種した豚に一定頻度でT-1105を投与し、経時的に臨床症状を観察するとともに、血清、唾液、鼻汁などの臨床サンプルからウイルス感染と排せつ量を解析することで、豚におけるT-1105の薬効を明らかにする。また、T-1105の薬効が低かったウイルス株に対しては、投与量や時期の条件変更により追加で評価を行い、より効果的な投与方法を確立する。さらに、発生現場で想定されるウイルス暴露後に抗ウイルス剤投与開始した場合や、T-1105とワクチンの併用効果についても評価する。

#### ②FMDVに対するT-1105の有効性の分子基盤解析

T-1105はRNA依存性RNAポリメラーゼを阻害することでウイルスの増殖を阻害するが、その効果は2000年日本株と1997年台湾株で異なっている。そこで、抗ウイルス剤T-1105とウイルスRNAポリメラーゼとの相互作用の評価系について検証する。さらに、抗ウイルス剤の効果に差異が見られたウイルスの遺伝子配列を次世代シーケンサーで決定し、リバーシジェネティクス実験系を用いて抗ウイルス剤の薬効に関わる遺伝子および作用メカニズムを解析する。

#### ③FMDVに対する新たな抗ウイルス剤候補物質の探索

FMDVは遺伝子変異性が高く、抗ウイルス剤に耐性化したウイルスが出現する可能性があるため、作用機序の異なる抗ウイルス剤が必要である。さらに、牛で有効性を示す抗ウイルス剤や、より宿主毒性の少ない抗ウイルス剤の開発が求められる。そのため、新たな抗ウイルス剤の候補物質を外部機関の化合物ライブラリから探索する。簡便かつ安定した結果の得られる評価実験系を確立し、化合物ライブラリから導入した試料についてスクリーニングを行う。抗ウイルス活性をもつ化合物について、培養細胞におけるFMDVの増殖抑制試験を行うとともに、宿主毒性等も含め、感受性動物への利用可能性を検証する。

#### ④ASFVに対する新たな抗ウイルス剤候補物質の探索および簡便かつ効果的な消毒薬の使用法の検証

③と同様にASFVに対する抗ウイルス剤候補物質を外部機関の化合物ライブラリから探索する。さらに、一般的な消毒薬のASFVに対する不活化効果を培養細

胞および遺伝子検出系を用いて評価し、ウイルスの侵入・まん延防止のために有効な使用方法を確立する。

#### (4) ワクチンによる豚群でのインフルエンザ制御手法の確立

従来、豚インフルエンザウイルス (IAV-S) は、咳・鼻水などの呼吸器症状を呈した豚から分離されることが知られていた。しかしながら、これまでの国内外での調査により、臨床的に健康な豚の 5 – 6 % が IAV-S を保持していることが明らかになっている。一方、現行の IAV-S のワクチンは、およそ 40 年前に国内で流行していた IAV-S (古典的豚 H1 亜型: 1979 年分離株、H3 亜型: 1969 年分離株) がワクチン株として使用されている。この状況下で、現行ワクチンで免疫した豚にワクチン製造株と抗原交差性が認められない古典的豚 H1 亜型ウイルスを感染させた場合、鼻腔からのウイルス排せつを抑制できないという問題が生じているとともに、近年流行している H3 亜型ウイルスやパンデミック H1 亜型ウイルスに対する国産ワクチンの効果は不明である。そこで、本課題では以下の項目に関する研究開発を行う。

##### ①国内流行する IAV-S の収集と性状解析

養豚場で呼吸器症状を呈した豚から採材した鼻腔拭い液や気管や肺組織に加え、健康豚の鼻腔拭い液からウイルス分離を行うとともに、分離されたウイルスの次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析に基づき、IAV-S の亜型同定や各遺伝子分節の遺伝子系統学的な分類を行うことにより、国内での流行状況を把握する。また、過去に分離・収集された IAV-S および本研究で新たに分離された IAV-S の HA タンパク質の抗原性を解明する。

##### ②現行豚インフルエンザワクチンの効果の検証

パンデミック H1 亜型ウイルスや H3 亜型ウイルスに対する現行の国産ワクチンの効果を検証する。その際、安定して感染成立させるために、超音波式ネブライザを用いて霧化した IAV-S を鼻腔から吸引させた豚から定期的に鼻腔スワブや血清を採取する。ウイルス排せつ量、抗体価の上昇等を調べ、ワクチン効果を検証する。

##### ③試作ワクチンの製造と効果の検証

現行ワクチンの効果・流行状況に関する情報・抗原性・発育鶏卵での増殖性等に基づいて、H1 および H3 亜型 IAV-S から新規ワクチン製造株の候補となるウイルスを複数選抜する。ネブライザ法によるウイルス攻撃を行い、定期的に鼻腔スワブや血清を採取する。ウイルス排せつ量、抗体価の上昇等を調べ、ワクチン効果を検証する。また、ワクチン製造候補株によるホモの攻撃に対する防御効果を調べるとともに、最新の流行株や候補株と HA タンパク質の抗原性が異なるウイルス株についてもその効果を検証する。

#### (ウ) 研究結果

##### (1) 新規鳥インフルエンザワクチンの開発

###### (1) rAPMV-10/HA ワクチンの飲水投与法の検討

- ①  $10^6$  EID<sub>50</sub> の rAPMV-10/HA を投与した鶏を HPAI ウイルスで攻撃した場合の生存率は、60mL、30mL および 15mL の水に溶かしてワクチン投与した群で、それぞれ 100%、80% および 60% であった。

- ② 60mL の水に溶かした rAPMV-10/HA を投与した鶏を HPAI ウイルスで攻撃



した場合に100%鶏が生存するワクチン力価は、ワクチン抗原が山口株、TG株、熊本株、香川株でそれぞれ $10^6$  EID<sub>50</sub>、 $10^7$  EID<sub>50</sub>、 $10^7$  EID<sub>50</sub>および $10^7$  EID<sub>50</sub>であった。

(2) rAPMV-10/HAワクチンの卵内投与法の検討

- ①ワクチンを投与した鶏卵の孵化率は、 $10^5$  EID<sub>50</sub>投与群で100%、 $10^6$  EID<sub>50</sub>投与群で95%であり、PBS投与群の90%と同程度であった。
- ②HPAIウイルス攻撃後の生存率は、 $10^5$  EID<sub>50</sub>投与群で100%、 $10^6$  EID<sub>50</sub>投与群で94.4%であった。
- ③ $10^6$  EID<sub>50</sub>投与群で攻撃5日後に死亡した鶏の喉頭および総排泄腔スワブのウイルス力価は、検出限界である $10^{-0.5}$  EID<sub>50</sub>/0.2mL以下であった。

(3) rAPMV-10/HAワクチンの安全性、伝播性の検証

- ① $10^6$ および $10^7$  EID<sub>50</sub>のrAPMV-10/HAを投与した鶏からは、投与後21日の観察期間中に元気の低下や呼吸器症状等を示す個体は観察されなかった。
- ② $10^6$ および $10^7$  EID<sub>50</sub>のrAPMV-10/HAを投与した鶏からは、ウイルスの排泄が確認されたのに対し、同居鶏からはいずれもウイルス排泄は確認されなかった。
- ③APMV-10に対するHI抗体は、 $10^6$  EID<sub>50</sub>のrAPMV-10/HA投与鶏と同居させた鶏から10羽中1羽検出されたが、 $10^7$  EID<sub>50</sub>投与鶏と同居した群からは検出されなかった。

(4) 抗原性の異なるウイルスに対するワクチン効果の検証

- ① $10^6$ および $10^7$  EID<sub>50</sub>の山口株の抗原を挿入したrAPMV-10/HAを投与した鶏を、TG株で攻撃した場合の生存率は30%および100%、熊本株で攻撃した場合の生存率は50%および60%であった。

(2) ワクチン開発に資するアフリカ豚熱の分子基盤の解析

(1) ASFV感受性細胞の選定と有用性の検討

不死化豚腎臓由来マクロファージ (IPKM) 細胞がASFV野外株に感受性が高く、ウイルスの増殖に適した細胞株であることを明らかにした。また、ASFVの研究に広く用いられているアフリカミドリザル腎臓細胞由来の不死化細胞 (Vero細胞、COS細胞) では不可能であったASFV野外株のブラーク法が、IPKM細胞を用いることで可能であることを明らかにした。このことは、ASFV野外株を起源とした組換えASFVの作出が可能であることを示唆し、IPKM細胞の実用性が実証された。

(2) 組換え転移ベクターの作成と組換えウイルス作出法の確立

ASFVの遺伝子改変には正確性と汎用性の観点からCRISPR/Cas9システムを用いることに決定した。本システムの確立のために、①guide RNAを発現する切断部位決定ベクター、②Cas9を発現する切断用酵素ベクター、③ゲノムDNAの二本鎖切断 (DSB) 後に相同的に選択マーカー (GFP遺伝子) を挿入する遺伝子組換えベクターの3つのベクターを構築した。

上記の遺伝子組換え用ベクターをIPKM細胞に効率的に細胞に導入するため、市販の各種Liposome製剤、Imine製剤 (化学的) および電気穿孔法 (物理的) を検討した。その結果、電気穿孔法が最も適していることが

明らかとなり、導入効率が50%以上（生存率30%以上）の高効率な導入条件を確立した。

(3) 特定遺伝子欠損ウイルスの作出とその遺伝子の機能解析

ベクター①及び③を操作し、ウイルスの増殖に非必須とされる Thymidine kinase (TK) 遺伝子を標的として組換え用ベクターを作製し、(2) で決定された手法にてIPKM細胞に導入した。次に、前培養したベクター導入済みIPKM細胞にASFV Armenia07株を接種することでTK遺伝子がGFP遺伝子に置換した遺伝子組換えASFVを得ることができた。また蛍光顕微鏡下でGFP陽性プラークの選択・単離を繰り返すことで、遺伝子組換えASFVArmenia07株の純化に成功した。

ASFVの遺伝子機能の詳細な解析には、異なる株間での性状比較も重要となる。組換えASFV Armenia07株を作製した同様の手法を用いることで、TK遺伝子がDsRed遺伝子（選択マーカー）に置換した遺伝子組換えASFV Kenya05株の作出と純化に成功した。本手法が性状の異なるASFV野外株にも使用できることを明らかにした。

(3) 口蹄疫およびアフリカ豚熱に対する効果的なまん延防止技術の検証

(1) FMDVに対する薬剤T-1105の抗ウイルス効果の評価

- ・本薬剤には感染細胞内でのFMDV増殖を強く阻害する効果が認められ、いずれの血清型のFMDVに対しても有効であることが明らかになった。
- ・本薬剤を豚に経口投与することにより、FMDV感染による水疱発現やウイルス排泄強く抑える効果が得られることが分かった。
- ・本薬剤は投与豚において投与後 1 時間以内に血液中ならびにFMDVの感染部位である咽頭およびその周辺のリンパ腺に行き渡ることが分かった。
- ・本薬剤はFMDVの感染前期の複製過程を阻害することが示された。
- ・シミュレーションの結果、発生時には摘発淘汰に加えて摘発農場周辺への抗ウイルス薬投与により、流行を小規模に抑えることが出来る想定結果が得られた。

(2) FMDVおよびASFVに対する新たな抗ウイルス剤候補物質の探索

- ・共同研究契約を締結し、植物抽出液サンプル10,000種、天然物由来化合物約600種と微生物培養液サンプル約6,000種を導入した。
- ・各ウイルスの感受性株化細胞を用いてサンプルの抗ウイルス活性と細胞毒性を同時に評価できるスクリーニング試験系を確立した。
- ・スクリーニング試験により抗ウイルス作用に優れた植物抽出液 7 種類、天然物由来化合物 5 種類、糸状菌培養液 8 種類を見出した。そのうちのいくつかはFMDVに対する抗ウイルス作用が薬剤 T-1105と同等またはそれ以上であった。
- ・抗ウイルス活性の高い植物抽出液から活性化合物を精製単離することで、最小使用量で最大のウイルス抑制効果が得られる優れた化合物を特定した。
- ・抗ウイルス活性サンプルのマウスでの無毒性量を決定した。今後、無毒性量のサンプルを投与したマウスにFMDVを接種し、抗ウイルス効果

を評価する。

(3) 市販消毒薬のASFVに対する消毒効果の評価

各消毒薬の異なる感作温度、時間および豚糞便存在中におけるASFV不活化能を明らかにした。

(4) ワクチンによる豚群でのインフルエンザ制御手法の確立

(1) 2018年度から2022年度にかけて15県43農場から鼻腔スワブ検体を7337検体採取し、613株の豚インフルエンザウイルスを分離した。また、遺伝子解析の結果613株の内112株がH1N1亜型、484株がH1N2亜型、17株がH3N2亜型であることを明らかにした。

(2) 2008年から2019年7月までに当部門で分離された豚インフルエンザウイルスについて系統解析を行い、遺伝子相同率の違いから6つのグループに分類した。

(3) (2) で分類されたグループの代表株についてHI試験で得た抗原性の違いをカートグラフィ法により解析し、外れ値を除いた抗原の重心となる値から抗原距離の近い株についてワクチン候補株として選抜した。

(4) 鳥取株を元株として作製した試作不活化ワクチンを接種した豚では4頭中4頭の感染を完全に抑える効果を確認したが、抗原性の異なる群馬株では効果を認められなかった。

(5) 鳥取株を元株として作製した試作不活化ワクチンを接種した豚で、鳥取株と抗原性の近い株を使ってチャレンジ試験を行ったところ、免疫群の方が非免疫群よりも優位にウイルス排泄量が少ないことを確認した。

(6) 鳥取株とは遺伝的に分類の異なる株について試作不活化ワクチンを製造し、その効果範囲を検証中である。

(エ) 研究成果の活用における留意点

(3) 口蹄疫およびアフリカ豚熱に対する効果的なまん延防止技術の検証

本課題で見出した抗ウイルス活性サンプルについて感受性動物(牛および豚)における薬物動態や薬効の評価を行うことにより、新たな抗ウイルス剤の開発が可能となる。ASFVの防疫対策に有効な知見として行政部局での活用が期待される。

(オ) 研究目標の達成に当たっての問題点

(1) 新規鳥インフルエンザワクチンの開発

国内においてHPAIウイルスに対するワクチンの使用をしていないことから、本ベクターワクチンの実用化にはHPAIウイルス以外の抗原をベクターに挿入したワクチンについても検討する必要がある。

(2) ワクチン開発に資するアフリカ豚熱ウイルスの分子基盤の解析

ASFVの増殖技術及び効率的な組換えASFV作出技術を開発したことから、ASFVワクチン開発に向けた研究を一層加速させる必要がある。

(3) 口蹄疫およびアフリカ豚熱に対する効果的なまん延防止技術の検証

薬剤T-1105の抗ウイルス資材としての備蓄および使用については行政部局との協議が必要である。

(4) ワクチンによる豚群でのインフルエンザ制御手法の確立

今後も国内に循環する IAV-S を把握し、適正なワクチンの選抜、効果の検証を行いワクチン選定に資するデータを得る必要がある。

#### 4 研究成果の発表

別添のとおり。

#### 5 研究期間中に生じた問題、今後の課題等

##### 1) 小課題名：野生動物等を介した家畜の伝染病の伝播リスクの評価

###### (1) 野生鳥類の高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する感受性解析および家禽へのウイルス伝播リスク評価

これまで報告が少なかった野生鳥類でのHPAIV感染が近年増加しており、ウイルスも変わりつつあることから、さらなる鳥種及びウイルスでの評価が求められている。

###### (2) 野生哺乳動物における高病原性鳥インフルエンザウイルス感染実験および野生動物の農場周辺水場環境共有状況調査による家禽へのウイルス伝播リスク評価

複数種のイタチ科野生動物が近年流行しているHPAIVに感受性を示し、ニワトリに感染させる量のウイルスを排出することが示されたが、家禽舎内での接触などによる家禽へのウイルス伝播は実証されておらず、今後、同居試験により検証する必要がある。環境DNAからの動物種検出には時間と費用を要するため、疫学調査への社会実装には、採水地点の選定や採水後のサンプルの保存方法など、マニュアル整備の必要がある。

###### (3) アフリカ豚熱ウイルスのニホンイノシシから豚への伝播リスクの解析

中国で発生が報告されている慢性型についての病態解析が不十分であり、株の入手が可能であれば今後解析を実施する必要がある。成果について、今後さらに論文発表や学会発表を行う予定である。

###### (4) 口蹄疫ウイルスの野生動物および家畜における病原性解析

FMDVの胎子に及ぼす影響について十分に検証出来なかった。

###### (5) アルボウイルス伝播機序と媒介節足動物の国内生息域の解明

DNAバーコーディングにより、形態的特徴に基づく過去の記録との矛盾や、複数の隠蔽種の存在が明らかになった。今後、分類学的な整理、および新種の記載が必要になる。課題で得られた成果を、現場で役立ててもらえるような工夫が必要になる。ウェブ等での知見の普及、啓発を想定している

##### 2) 小課題名：伝染病の早期摘発や監視情報を活用した防疫の最適化

###### (1) 口蹄疫ウイルスの変異流行株の抗原性解析に基づく現行診断法の改良および類症疾病病原体との鑑別可能な診断法の開発

FMDV以外の水疱性疾病病原体について抗血清を作製する必要がある。セネカウイルスの牛を含めた病原性について確認する必要がある。消毒効果に関しては現場への普及を行う。

###### (2) アフリカ豚熱の監視情報の収集と防疫の最適化

部分シーケンスによる遺伝子型解析および分離ウイルスを用いた全ゲノム解析が可能となった一方、臓器乳剤等の生体材料を用いた全ゲノム解析におい

て配列カバー率100%には至らなかった。

(3) 高病原性鳥インフルエンザの監視情報の収集と防疫の最適化

ロシアとの共同研究によるロシア分離ウイルスの導入が出来なくなった。野鳥の繁殖地である場所でのウイルスやその情報が入手不可能になり、国内侵入の為に国内診断法の有用性の検証や抗血清等診断ツール作製にも影響が出てくることが懸念される。

(4) アルボウイルス感染症の監視情報の収集と防疫の最適化

気候変動などにより、アルボウイルスや媒介節足動物の分布が変化する可能性があるため、日本周辺地域での発生情報の収集や、国内への侵入を継続的に監視する必要がある。培養細胞を用いて分離できないアルボウイルスも多数存在すると考えられるため、高感度かつ網羅的な検出技術を開発して、直接、脊椎動物宿主や媒介節足動物からウイルスを検出できるようする必要がある。

(5) 慢性消耗病の検査法の開発

非定型CWDは水平感染を引き起こし難いと考えられているが、中枢神経を検体として用いる従来のCWD検査の継続も必要と考えられる。

(6) 多様な家畜疾病データに基づく発生・拡散予測手法の開発

R4年度にサーベイランス報告システムを農林水産省に移管する。乳用牛や肉用牛の移動の特徴を表すデータを作成し、国際的なデータ公開サイトで公開する。

3) 小課題名：伝染病発生時の危機管理技術の開発

(1) 新規鳥インフルエンザワクチンの開発

国内においてHPAIウイルスに対するワクチンの使用をしていないことから、本ベクターワクチンの実用化にはHPAIウイルス以外の抗原をベクターに挿入したワクチンについても検討する必要がある。

(2) ワクチン開発に資するアフリカ豚熱ウイルスの分子基盤の解析

ASFワクチン開発を一層加速させるため、令和元年度をもって本実施課題を終了し、関連する研究内容（ASFVタンパク質の性状解析や検査技術の開発等）と併せて、新規研究プロジェクトでワクチン開発を実施することとした。

(3) 口蹄疫およびアフリカ豚熱に対する効果的なまん延防止技術の検証

薬剤T-1105の抗ウイルス資材としての備蓄および使用については行政部局との協議が必要である。

(4) ワクチンによる豚群でのインフルエンザ制御手法の確立

今後も国内に循環する IAV-S を把握し、適正なワクチンの選抜、効果の検証を行いワクチン選定に資するデータを得る必要がある。

## 研究成果一覧

課題番号 18065101

課題名 家畜の伝染病の国内侵入と野生動物由来リスクの管理技術の開発

## 成果等の集計数

| 課題<br>番号 | 学術論文 |    | 学会等発表(口頭<br>またはポスター) |    | 出版<br>図書 | 国内特許権等 |    | 国際特許権等 |    | PCT | 報道件<br>数 | 普及しう<br>る成果 | 発表会の<br>主催(シン<br>ポジウム・<br>セミナー<br>等) | アウト<br>リーチ活<br>動 |
|----------|------|----|----------------------|----|----------|--------|----|--------|----|-----|----------|-------------|--------------------------------------|------------------|
|          | 和文   | 欧文 | 国内                   | 国際 |          | 出願     | 取得 | 出願     | 取得 |     |          |             |                                      |                  |
| 18065101 | 1    | 38 | 38                   | 9  | 9        | 0      | 1  | 0      | 0  | 0   | 8        | 1           | 0                                    | 0                |

## (1)学術論文

区分:①原著論文、②その他論文

| 整理番<br>号 | 区分 | タイトル                                                                                                                                                                                                       | 著者                                                                                                                | 機関名                         | 掲載誌                                   | 掲載論文のDOI                     | 発行<br>年 | 発行<br>月 | 巻<br>(号)   | 掲載<br>ページ     |
|----------|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|------------------------------|---------|---------|------------|---------------|
| 1        | ①  | 日本のCSF発生に伴う被害額の推定                                                                                                                                                                                          | 澤井宏太郎、早山陽子、清水友美子、村藤義訓、山本健久                                                                                        | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 獣医疫学雑誌                                | doi:<br>10.2743/jve.24.113   | 2020    | 12      | 24<br>(2)  | 113-<br>121   |
| 2        | ①  | Early pathogenesis of the foot-and-mouth disease virus O/JPN/2010 in experimentally infected pigs                                                                                                          | Yamada M, Fukai K, Morioka K, Nishi T, Yamazoe R, Kitano R, Shimada N, Yoshida K, Kanno T, Sakamoto K, Yamakawa M | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Journal of Veterinary Medical Science | doi:<br>10.1292/jvms.17-0683 | 2018    | 8       | 80<br>(4)  | 689-<br>700   |
| 3        | ①  | Comparative evaluation of two ELISA kits for detecting antibodies to a nonstructural protein of foot-and-mouth disease virus using serum samples collected from naturally and experimentally infected cows | Fukai K, Nishi T, Shimada N, Morioka K, Yamada M, Yoshida K, Yamakawa M                                           | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Journal of Veterinary Medical Science | doi:<br>10.1292/jvms.17-0662 | 2018    | 11      | 80<br>(10) | 1624-<br>1630 |
| 4        | ①  | Pathogenesis of the attenuated foot-and-mouth disease virus O/JPN/2000 in experimentally infected pigs                                                                                                     | Yamada M, Fukai K, Morioka K, Nishi T, Yamazoe R, Kitano R, Shimada N, Yoshida K, Kanno T, Sakamoto K, Yamakawa M | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Journal of Veterinary Medical Science | doi:<br>10.1292/jvms.18-0377 | 2018    | 11      | 80<br>(11) | 1669-<br>1675 |

|    |   |                                                                                                                                                        |                                                                                                                                 |                             |                                     |                                      |      |    |        |           |
|----|---|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|------|----|--------|-----------|
| 5  | ① | Comparative pathogenicity of H5N6 subtype highly pathogenic avian influenza viruses in chicken, Pekin duck and Muscovy duck                            | Uchida Y, Mine J, Takemae N, Tanikawa T, Tsunekuni R, Saito T.                                                                  | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Transboundary and Emerging Diseases | doi: 10.1111/tbed.13141              | 2019 | 3  | 66 (3) | 1227-1251 |
| 6  | ① | Reverse transcription-PCR using a primer set targeting the 3D region detects foot-and-mouth disease virus with high sensitivity                        | Nishi T, Kanno T, Shimada N, Morioka K, Yamakawa M, Fukai K                                                                     | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Transboundary and Emerging Diseases | doi: 10.1111/tbed.13202              | 2019 | 7  | 66 (4) | 1776-1783 |
| 7  | ① | Genetic determinants of virulence between two foot-and-mouth disease virus isolates which caused outbreaks of differing severity                       | Nishi T, Morioka K, Saito N, Yamakawa M, Kanno T, Fukai K                                                                       | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | mSphere                             | doi: 10.1128/mSphere.00294-19        | 2019 | 8  | 4 (4)  | e00294-19 |
| 8  | ① | Reconstructing a transmission network and identifying risk factors of secondary transmissions in the 2010 foot-and-mouth disease outbreak in Japan     | Hayama Y, Firestone SM, Stevenson MA, Yamamoto T, Nishi T, Shimizu Y, Tsutsui T                                                 | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Transboundary and Emerging Diseases | doi: 10.1111/tbed.13256              | 2019 | 9  | 66 (5) | 2074-2086 |
| 9  | ① | A novel H7N3 reassortant originating from the zoonotic H7N9 highly pathogenic avian influenza viruses that has adapted to ducks.                       | Nakayama M., Uchida Y., Shibata A., Kobayashi Y., Mine J., Takemae N., Tsunekuni R., Tanikawa T., Harada R., Osaka H., Saito T. | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Transboundary and Emerging Diseases | doi: 10.1111/tbed.13291.             | 2019 | 11 | 66(6)  | 2342-2352 |
| 10 | ① | Horizontal transmission of foot-and-mouth disease virus O/JPN/2010 among different animal species by direct contact                                    | Fukai K, Nishi T, Morioka K, Yamada M, Yoshida K, Yamakawa M                                                                    | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Transboundary and Emerging Diseases | doi: 10.1111/tbed.13344              | 2020 | 1  | 67 (1) | 223-233   |
| 11 | ① | Estimation of infection risk on pig farms in infected wild boar-Epidemiological analysis for the reemergence of classical swine fever in Japan in 2018 | Hayama Y, Shimizu Y, Murato Y, Sawai K, Yamamoto T                                                                              | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Preventive Veterinary Medicine      | doi: 10.1016/j.prevetmed.2019.104873 | 2020 | 2  | 175    | 104873    |

|    |   |                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                  |                             |                                       |                                   |      |    |          |           |
|----|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|------|----|----------|-----------|
| 12 | ① | PrPSc with seeding activity extensively overlaps with proteinase-resistant PrPSc rather than infectious PrPSc                                        | Iwamaru Y, Matuura Y, Miyazawa K                                                                                                                 | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Pathogens                             | doi: 10.3390/pathogens 9030241    | 2020 | 3  | 9 (3)    | 241       |
| 13 | ① | Endemic and emerging arboviruses in domestic ruminants in East Asia                                                                                  | Yanase T, Murota K, Hayama Y                                                                                                                     | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Frontiers in Veterinary Science       | doi: 10.3389/fvets.2020.00168     | 2020 | 4  | 7        | 168       |
| 14 | ① | Genetic characterization of influenza A viruses in Japanese swine in 2015 to 2019                                                                    | Mine J, Uchida Y, Takemae N, Saito T                                                                                                             | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Journal of Virology                   | doi: 10.1128/JVI.02169-19         | 2020 | 7  | 94 (14)  | e02169-19 |
| 15 | ① | Epidemiology of classical swine fever in Japan—a descriptive analysis of the outbreaks in 2018–2019                                                  | Shimizu Y, Hayama Y, Murato Y, Sawai K, Yamaguchi E, Yamamoto T                                                                                  | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Frontiers in Veterinary Science       | doi: 10.3389/fvets.2020.573480    | 2020 | 9  | 7        | 573480    |
| 16 | ① | Evaluation of sampling methods for effective detection of infected pig farms during a disease outbreak                                               | Murato Y, Hayama Y, Shimizu Y, Sawai K, Yamamoto T                                                                                               | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | PLoS ONE                              | doi: 10.1371/journal.pone.0241177 | 2020 | 10 | 15 (10)  | e0241177  |
| 17 | ① | Identification and characterization of a novel orbivirus, Yonaguni orbivirus, isolated from cattle on the westernmost island of Japan                | Murota K, Suda Y, Shirafuji H, Ishii K, Katagiri Y, Suzuki M, Kobayashi D, Isawa H, Tanaka S, Yanase T                                           | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Archives of Virology                  | doi: 10.1007/s00705-020-04803-3   | 2020 | 12 | 165 (12) | 2903-2908 |
| 18 | ① | Experimental infection of pigs with different doses of the African swine fever virus Armenia 07 strain by intramuscular injection and direct contact | Yamada M, Masujin K, Kameyama K, Yamazoe R, Kubo T, Iwata K, Tamura A, Hibi H, Shiratori T, Koizumi S, Ohashi K, Ikezawa M, Kokuho T, Yamakawa M | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Journal of Veterinary Medical Science | doi: 10.1292/jvms.20-0378         | 2020 | 12 | 82 (12)  | 1835-1845 |



|    |   |                                                                                                                                                                                       |                                                                                           |                             |                                    |                                   |      |    |         |           |
|----|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|------|----|---------|-----------|
| 19 | ① | Quantitative analysis of infection dynamics of foot-and-mouth disease virus strain O/CATHAY in pigs and cattle                                                                        | Nishi T, Morioka K, Kawaguchi R, Yamada M, Ikezawa M, Fukai K                             | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | PLoS ONE                           | doi: 10.1371/journal.pone.0245781 | 2021 | 1  | 16 (1)  | e0245781  |
| 20 | ① | Genomic analysis of putative novel serotypes of Tibet orbivirus isolated in Japan                                                                                                     | Suda Y, Murota K, Shirafuji H, Yanase T                                                   | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Archives of Virology               | doi: 10.1007/s00705-021-04966-7   | 2021 | 4  | 166 (4) | 1151-1156 |
| 21 | ① | First outbreak of an H5N8 highly pathogenic avian influenza virus on a chicken farm in Japan in 2020                                                                                  | Sakuma S, Uchida Y, Kajita M, Tanikawa T, Mine J, Tsunekuni R, Saito T                    | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Viruses                            | doi:10.3390/v13030489             | 2021 | 3  | 13 (3)  | 489       |
| 22 | ① | Region-wise analysis of dairy cow movements in Japan.                                                                                                                                 | Murato Y, Hayama Y, Shimizu Y, Sawai K, Yamaguchi E, Yamamoto T                           | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | BMC Veterinary Research            | doi: 10.1186/s12917-021-03008-3   | 2021 | 9  | 17      | 305       |
| 23 | ① | Isolation of <i>Culicoides</i> - and mosquito-borne orbiviruses in the southwestern islands of Japan between 2014 and 2019                                                            | Murota K, Ishii K, Mekaru Y, Araki M, Suda Y, Shirafuji H, Kobayashi D, Isawa H, Yanase T | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Vector-Borne and Zoonotic Diseases | doi: 10.1089/vbz.2021.0001        | 2021 | 10 | 21 (10) | 796-808   |
| 24 | ① | Comparative susceptibility of the common teal ( <i>Anas crecca</i> ) to infection by high pathogenic avian influenza virus strains isolated in Japan in 2004-2017.                    | Tanikawa T, Sakuma S, Yoshida E, Tsunekuni R, Nakayama M, Kobayashi S                     | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Veterinary Microbiology            | doi: 10.1016/j.vetmic.2021.109266 | 2021 | 12 | 263     | 109266    |
| 25 | ① | Comparative susceptibility of mallard ( <i>Anas platyrhynchos</i> ) to infection with high pathogenicity avian influenza virus strains (Gs/Gd lineage) isolated in Japan in 2004-2017 | Tanikawa T, Fujii K, Sugie Y, Tsunekuni R, Nakayama M, Kobayashi S                        | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Veterinary Microbiology            | doi: 10.1016/j.vetmic.2022.109496 | 2022 | 9  | 272     | 109496    |

|    |   |                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                         |                             |                                |                                      |      |    |        |           |
|----|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|------|----|--------|-----------|
| 26 | ① | Ubiquitin-specific protease 18 in mallard ( <i>Anas platyrhynchos</i> ) interferes with type I interferon-mediated inhibition of high pathogenicity avian influenza virus replication  | Tanikawa T, Fujii K, Sugie Y, Tsunekuni R                                                                                                               | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Virology                       | doi: 10.1016/j.virol.2022.10.001     | 2022 | 10 | 577    | 32-42     |
| 27 | ① | Risk of transmission of foot-and-mouth disease by wild animals: infection dynamics in Japanese wild boar following direct inoculation or contact exposure                              | Fukai K, Kawaguchi R, Nishi T, Ikezawa M, Yamada M, Seeyo KB, Morioka K                                                                                 | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Veterinary Research            | doi: 10.1186/s13567-022-01106-0      | 2022 | 10 | 53 (1) | 86        |
| 28 | ① | Estimation of introduction time window of highly pathogenic avian influenza virus into broiler chicken farms during the 2020-2021 winter season outbreak in Japan                      | Hayama Y, Sawai K, Murato Y, Yamaguchi E, Yamamoto T                                                                                                    | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Preventive Veterinary Medicine | doi: 10.1016/j.prevetmed.2022.105768 | 2022 | 11 | 208    | 105768    |
| 29 | ① | Administration of the antiviral agent T-1105 fully protects pigs from foot-and-mouth disease infection                                                                                 | Nishi T, Fukai K, Masujin K, Kawaguchi R, Ikezawa M, Yamada M, Nakajima N, Komeno T, Furuta Y, Sugihara H, Kurosaki C, Sakamoto K, Morioka K            | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Antiviral Research             | doi: 10.1016/j.antiviral.2022.105425 | 2022 | 12 | 208    | 105425    |
| 30 | ① | Extended application of the rapid post-mortem test kit for bovine spongiform encephalopathy to chronic wasting disease                                                                 | Matsuura Y, Miyazawa K, Horiuchi M, Suzuki A, Yokoyama M, Imamura M, Ikeda K, Iwamaru Y.                                                                | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Microbiology and Immunology    | doi: 10.1111/1348-0421.12968         | 2022 | 3  | 66(5)  | 212-215   |
| 31 | ① | Genetically diverse H5N1 and H5N8 high pathogenicity avian influenza viruses affected wild waterfowl and poultry on the Izumi plain, Japan in November 2021.                           | Okuya K, Mine J, Tokorozaki K, Kojima I, Esaki M, Miyazawa K, Tsunekuni R, Sakuma S, Kumagai A, Takadate Y, Kikutani Y, Matsui T, Uchida Y and Ozawa M. | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Emerging Infectious Diseases   | doi: 10.3201/eid2807.212586          | 2022 | 7  | 28(7)  | 1451-1455 |
| 32 | ① | Comparative susceptibility of mallard ( <i>Anas platyrhynchos</i> ) to infection with high pathogenicity avian influenza virus strains (Gs/Gd lineage) isolated in Japan in 2004-2017. | Tanikawa T., Fujii K., Sugie Y., Tsunekuni R., Nakayama M., Kobayashi S.                                                                                | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Veterinary Microbiology        | doi: 10.1016/j.vetmic.2022.109496    | 2022 | 9  | 272    | 109496    |

|    |   |                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                           |                             |                                     |                                 |      |   |         |           |
|----|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|------|---|---------|-----------|
| 33 | ① | Genetics of Japanese H5N8 high pathogenicity avian influenza viruses isolated in winter 2020–2021 and their genetic relationship with avian influenza viruses in Siberia. | Mine J, Tsunekuni R, Tanikawa T, Uchida Y, Dubovitskiy N, Derko A, Sobolev I, Shestopalov A, Sharshov K, Saito T                                          | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Transboundary and Emerging Diseases | doi: 10.1111/tbed.14559         | 2022 | 9 | 69(5)   | 2195–2213 |
| 34 | ① | Genetically diverse H5N1 and H5N8 high pathogenicity avian influenza viruses affected wild waterfowl and poultry on the Izumi plain, Japan in November 2021.              | Okuya K, Mine J, Tokorozaki K, Kojima I, Esaki M, Miyazawa K, Tsunekuni R, Sakuma S, Kumagai A, Takadate Y, Kikutani Y, Matsui T, O Uchida Y and Ozawa M. | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Emerging Infectious Diseases        | doi: 10.3201/eid2807.212586     | 2022 | 5 | 28(7)   | 1451–1455 |
| 35 | ① | Near-complete genome sequences of three foot-and-mouth disease virus O/ME-SA/Ind-2001e isolates obtained from cattle and pigs in Thailand in 2016                         | Fukai K, Nishi T, Kato T, Kawaguchi R, Seeyo BS, Morioka K                                                                                                | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Microbiology Resource Announcements | doi: 10.1128/mra.01110–22       | 2023 | 1 |         | e0111022  |
| 36 | ① | Whole-genome sequence analysis of a novel orthobunyavirus isolated in Japan in the 1980s.                                                                                 | Yanase T, Murota K, Suda Y                                                                                                                                | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Archives of Virology                | doi: 10.1007/s00705–022–05639–9 | 2023 | 1 | 168 (2) | 67        |
| 37 | ① | Region-wise analysis of beef cow movements in Japan                                                                                                                       | Murato Y, Hayama Y, Kondo S, Sawai K, Yamaguchi E, Yamamoto T                                                                                             | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Frontiers in Veterinary Science     | doi: 10.3389/fvets.2023.1012978 | 2023 | 1 | 10      |           |
| 38 | ① | Different Infectivity and Transmissibility of H5N8 and H5N1 High Pathogenicity Avian Influenza Viruses Isolated from Chickens in Japan in the 2021/2022 Season.           | Takadate Y., Tsunekuni R., Kumagai A., Mine J., Kikutani Y., Sakuma S., Miyazawa K., Uchida Y.                                                            | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Viruses                             | doi.org/10.3390/v15020265       | 2023 | 1 | 15(2)   | 265       |
| 39 | ① | Usability of Immortalized Porcine Kidney Macrophage Cultures for the Isolation of ASFV without Affecting Virulence                                                        | Kameyama K., Kitamura T., Okadera K., Ikezawa M., Masujin K., Kokuho T.                                                                                   | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | Viruses                             | doi: 10.3390/v14081794          | 2022 | 8 | 14(8)   | 1794      |

(2)学会等発表(口頭またはポスター)

| 整理番号 | タイトル                                                                                                                                                           | 発表者名  | 機関名                         | 学会等名                                                                                 | 発行年  | 発行月 |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------|-----|
| 1    | 2018年に家禽及び野鳥から分離されたH5N6亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの性状解析                                                                                                                 | 中山ももこ | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 第161回日本獣医学会学術集会                                                                      | 2018 | 9   |
| 2    | 2012-2018年の国内豚インフルエンザ流行株の遺伝子解析及び抗原性解析                                                                                                                          | 竹前喜洋  | 農研機構動物衛生研究部門、鳥取大学           | 第161回日本獣医学会学術集会                                                                      | 2018 | 9   |
| 3    | 農場内感染シミュレーションモデルを用いたヨーネ病サーベイランスの有効性の評価                                                                                                                         | 山本健久  | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 第161回日本獣医学会学術集会                                                                      | 2018 | 9   |
| 4    | 鳥インフルエンザ発生に係る水辺の影響の統計的解析                                                                                                                                       | 清水友美子 | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 第161回日本獣医学会学術集会                                                                      | 2018 | 9   |
| 5    | Evaluation of the efficiency of environmental sampling in the national surveillance for <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i> in Japan | 山本健久  | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | The 15th International Symposium of Veterinary Epidemiology and Economics (ISVEE 15) | 2018 | 11  |
| 6    | Reconstructing a transmission network and identifying risk factors of secondary transmissions in the 2010 foot-and-mouth disease epidemic in Japan             | 早山陽子  | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | The 15th International Symposium of Veterinary Epidemiology and Economics (ISVEE 15) | 2018 | 11  |
| 7    | Simulation-based decision support tool for planning control strategies of Classical Swine Fever in Japan                                                       | 早山陽子  | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | The 15th International Symposium of Veterinary Epidemiology and Economics (ISVEE 15) | 2018 | 11  |

|    |                                                                                                                                         |       |                             |                                                                                      |      |    |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------|----|
| 8  | Matched case-control study of the influence of inland waters surrounding poultry farms on avian influenza outbreaks: 2004-2017 in Japan | 清水友美子 | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | The 15th International Symposium of Veterinary Epidemiology and Economics (ISVEE 15) | 2018 | 11 |
| 9  | シミュレーションを用いたヨーネ病サーベイランスの評価                                                                                                              | 山本健久  | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 北海道ヨーネ病事例検討会                                                                         | 2019 | 1  |
| 10 | 牛個体識別全国データベース(耳標DB)を用いた乳用種雌牛の農場間移動に関する分析                                                                                                | 村藤義訓  | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 第54回獣医疫学会学術集会                                                                        | 2019 | 3  |
| 11 | 日本の豚コレラ発生事例に関する全ゲノム情報に基づく分子疫学解析                                                                                                         | 山本健久  | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 第162回日本獣医学会学術集会                                                                      | 2019 | 9  |
| 12 | 野生イノシシから豚農場への豚コレラ感染確率の推定                                                                                                                | 早山陽子  | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 第162回日本獣医学会学術集会                                                                      | 2019 | 9  |
| 13 | 豚舎内におけるサンプリング手法が疾病の摘発確率に及ぼす影響                                                                                                           | 村藤義訓  | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 第162回日本獣医学会学術集会                                                                      | 2019 | 9  |
| 14 | 日本の豚コレラ発生に伴う被害額の推定                                                                                                                      | 澤井宏太郎 | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 第162回日本獣医学会学術集会                                                                      | 2019 | 9  |
| 15 | 野生動物の鶏舎内侵入と高病原性鳥インフルエンザウイルス伝播の可能性                                                                                                       | 山口剛士  | 鳥取大学農学部                     | 第162回日本獣医学会学術集会                                                                      | 2019 | 9  |
| 16 | 野生イタチ類およびフェレットを用いたH5N6亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス感受性評価                                                                                           | 笛吹達史  | 鳥取大学農学部                     | 第162回日本獣医学会学術集会                                                                      | 2019 | 9  |

|    |                                                                                                                                                                        |        |                             |                                                       |      |   |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-----------------------------|-------------------------------------------------------|------|---|
| 17 | 養鶏場周辺環境における野生動物相解明のための環境DNAメタバーコーディングおよびブロッキングPCRの確立                                                                                                                   | 山口剛士   | 鳥取大学農学部                     | 第162回日本獣医学会学術集会                                       | 2019 | 9 |
| 18 | 国内で分離された高病原性鳥インフルエンザウイルスに対するマガモの感受性.                                                                                                                                   | 谷川 太一朗 | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 第33回インフルエンザ研究者交流の会                                    | 2019 | 6 |
| 19 | Effectiveness of commercial disinfectants to foot-and-mouth disease virus and other vesicular disease viruses                                                          | 川口理恵   | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 3rd Scientific Meeting on FMD between RRLFMD and NIAH | 2020 | 2 |
| 20 | Evaluation of foot-and-mouth disease virus antigen detection and serotyping silver amplification immunochromatography kits using epidemic strains in pool 2 and pool 5 | 森岡一樹   | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 3rd Scientific Meeting on FMD between RRLFMD and NIAH | 2020 | 2 |
| 21 | Genetic and virulence characterization of O/ME-SA/Ind-2001e FMDV isolated in Thailand in 2016                                                                          | 深井克彦   | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 3rd Scientific Meeting on FMD between RRLFMD and NIAH | 2020 | 2 |
| 22 | 山形県で採集された <i>Culicoides</i> 属ヌカカのDNAバーコーディングおよび吸血源の探索                                                                                                                  | 梁瀬徹    | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 第72回日本衛生動物学会大会                                        | 2020 | 4 |
| 23 | 沖縄県八重山諸島における牛アルボウイルスサーベイランスと新規オルビウイルスのゲノム解析                                                                                                                            | 室田勝功   | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 第72回日本衛生動物学会大会                                        | 2020 | 4 |
| 24 | ホンドテン ( <i>Melumps melumps</i> ) による高病原性鳥インフルエンザウイルス伝播リスクの評価                                                                                                           | 笛吹達史   | 鳥取大学農学部                     | 第163回日本獣医学会学術集会                                       | 2020 | 9 |
| 25 | 数理モデル解析の実際ーヨーネ病を例にー                                                                                                                                                    | 山本健久   | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 第163回日本獣医学会学術集会                                       | 2020 | 9 |

|    |                                                          |       |                                     |                         |      |    |
|----|----------------------------------------------------------|-------|-------------------------------------|-------------------------|------|----|
| 26 | アフリカ豚熱ウイルスの豚およびニホンイノシシへの病原性                              | 生澤充隆  | (国研)農業・食品産業技術<br>総合研究機構動物衛生研究<br>部門 | 令和2年度家畜衛生研修会(病<br>理部門)  | 2020 | 10 |
| 27 | 高病原性鳥インフルエンザウイルスの野生動物による伝播                               | 山口剛士  | 鳥取大学農学部                             | 鶏病研究会岐阜県支部鶏病技<br>術研修会講演 | 2020 | 11 |
| 28 | 2020-2021年冬季に、日本に拡散した5つのH5N8亜型高病原性<br>鳥インフルエンザウイルスの遺伝的背景 | 峯淳貴   | (国研)農業・食品産業技術<br>総合研究機構動物衛生研究<br>部門 | 第164回日本獣医学会学術集<br>会     | 2021 | 9  |
| 29 | 2020年度国内発生H5N8亜型高病原性鳥インフルエンザウイル<br>スの鶏に対する病原性の比較         | 佐久間咲希 | (国研)農業・食品産業技術<br>総合研究機構動物衛生研究<br>部門 | 第164回日本獣医学会学術集<br>会     | 2021 | 9  |
| 30 | 昨シーズンに国内で分離された高病原性鳥インフルエンザウイ<br>ルスの遺伝子解析の総括と家禽での発生の特徴    | 内田裕子  | (国研)農業・食品産業技術<br>総合研究機構動物衛生研究<br>部門 | 第164回日本獣医学会学術集<br>会     | 2021 | 9  |
| 31 | 肉用鶏農場における高病原性鳥インフルエンザの侵入時期の推<br>定                        | 早山陽子  | (国研)農業・食品産業技術<br>総合研究機構動物衛生研究<br>部門 | 第164回日本獣医学会学術集<br>会     | 2021 | 9  |
| 32 | 国内の牛の移動データを用いた乳用種雌牛の地域間移動シミュ<br>レーション                    | 村藤義訓  | (国研)農業・食品産業技術<br>総合研究機構動物衛生研究<br>部門 | 第164回日本獣医学会学術集<br>会     | 2021 | 9  |
| 33 | 2020年度の高病原性鳥インフルエンザ発生に関わる地理的要<br>因の検討                    | 山口英美  | (国研)農業・食品産業技術<br>総合研究機構動物衛生研究<br>部門 | 第164回日本獣医学会学術集<br>会     | 2021 | 9  |
| 34 | 南西諸島で採集されたCulicoides属ヌカカのDNAバーコーディン<br>グ                 | 梁瀬徹   | (国研)農業・食品産業技術<br>総合研究機構動物衛生研究<br>部門 | 第74回日本衛生動物学会大会          | 2022 | 4  |

|    |                                                                                                                                       |      |                                     |                                                                             |      |   |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|------|---|
| 35 | 2021年度家禽発生高病原性鳥インフルエンザウイルスの鶏に対する感染性と伝播性                                                                                               | 高館佳弘 | (国研)農業・食品産業技術<br>総合研究機構動物衛生研究<br>部門 | 第35回インフルエンザ研究者交<br>流の会                                                      | 2022 | 7 |
| 36 | Case-control study of geographical risk factors for highly<br>pathogenic avian influenza on chicken farms in Japan in 2020 to<br>2021 | 山口英美 | (国研)農業・食品産業技術<br>総合研究機構動物衛生研究<br>部門 | 16th International Symposium<br>of Veterinary Epidemiology and<br>Economics | 2022 | 8 |
| 37 | Region-wise analysis of dairy and beef cow movements in Japan                                                                         | 村藤義訓 | (国研)農業・食品産業技術<br>総合研究機構動物衛生研究<br>部門 | 16th International Symposium<br>of Veterinary Epidemiology and<br>Economics | 2022 | 8 |
| 38 | 国内の肉用繁殖雌牛の農場間移動に関する分析                                                                                                                 | 村藤義訓 | (国研)農業・食品産業技術<br>総合研究機構動物衛生研究<br>部門 | 第165回日本獣医学会学術集<br>会                                                         | 2022 | 9 |
| 39 | 2021-2022年シーズンに日本に拡散した3つのH5亜型高病原性<br>鳥インフルエンザウイルスの遺伝的背景                                                                               | 峯淳貴  | (国研)農業・食品産業技術<br>総合研究機構動物衛生研究<br>部門 | 第165回日本獣医学会学術集<br>会                                                         | 2022 | 9 |
| 40 | 2021年度家禽発生H5N8亜型及びH5N1亜型高病原性鳥インフ<br>ルエンザウイルスの鶏に対する感染性及び伝播性                                                                            | 高館佳弘 | (国研)農業・食品産業技術<br>総合研究機構動物衛生研究<br>部門 | 第165回日本獣医学会学術集<br>会                                                         | 2022 | 9 |
| 41 | 2021年シーズンの発生の特徴と家禽から分離された高病原性鳥<br>インフルエンザウイルスの性状解析                                                                                    | 内田裕子 | (国研)農業・食品産業技術<br>総合研究機構動物衛生研究<br>部門 | 第165回日本獣医学会学術集<br>会                                                         | 2022 | 9 |
| 42 | 抗ウイルス剤T-1105の口蹄疫ウイルスに対する薬効機序の解<br>析                                                                                                   | 西達也  | (国研)農業・食品産業技術<br>総合研究機構動物衛生研究<br>部門 | 第165回日本獣医学会学術集<br>会                                                         | 2022 | 9 |
| 43 | 鳥パラミクソウイルスを用いた新規ベクターワクチンの開発                                                                                                           | 常國良太 | (国研)農業・食品産業技術<br>総合研究機構動物衛生研究<br>部門 | 動物用ワクチン・バイオ医薬品<br>研究会2022年度シンポジウム                                           | 2022 | 9 |



|    |                                                                                                                                                |      |                             |                   |      |    |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-----------------------------|-------------------|------|----|
| 44 | Infectivity and transmissibility of H5N8 and H5N1 high pathogenicity avian influenza viruses isolated from chickens in Japan in 2021/22 season | 高館佳弘 | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 第69回日本ウイルス学会学術集会  | 2022 | 9  |
| 45 | Detection of chronic wasting disease prion seeding activity in feces with PMCA—Application to CWD monitoring in Japan                          | 岩丸祥史 | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | アジア太平洋プリオン研究会2022 | 2022 | 12 |
| 46 | 2018年に鹿児島県で採取したヌカカから分離される新規フラビウイルス様ウイルスの性状解析                                                                                                   | 室田勝功 | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 第75回日本衛生動物学会      | 2023 | 4  |
| 47 | ヌカカが媒介する多様なウイルス                                                                                                                                | 梁瀬徹  | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 第75回日本衛生動物学会      | 2023 | 4  |

### (3) 出版図書

区分: ①出版著書、②雑誌(学術論文に記載したものを除く、重複記載をしない。)、③年報、④広報誌、⑤その他

| 整理番号 | 区分 | 著書名(タイトル)                                        | 著者名      | 機関名                         | 出版社      | 発行年  | 発行月 |
|------|----|--------------------------------------------------|----------|-----------------------------|----------|------|-----|
| 1    | ④  | 技術の窓(口蹄疫ワクチンを投与した牛や豚はウイルスに感染しても無症状だがウイルスを排泄している) | 深井克彦     | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 日本政策金融公庫 | 2018 | 12  |
| 2    | ④  | 技術の窓(口蹄疫ウイルス感染動物とワクチン接種動物を識別できる市販キットの比較)         | 深井克彦     | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 日本政策金融公庫 | 2019 | 12  |
| 3    | ④  | 畜産技術(近年流行しているアフリカ豚熱ウイルスの豚およびニホンイノシシへの病原性)        | 山田学、生澤充隆 | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 畜産技術協会   | 2020 | 8   |
| 4    | ④  | 技術の窓(新規鳥インフルエンザ遺伝子診断法の確立)                        | 内田裕子     | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 日本政策金融公庫 | 2020 | 12  |
| 5    | ④  | 技術の窓(2020年度に流行した高病原性鳥インフルエンザウイルスの特徴)             | 内田裕子     | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 日本政策金融公庫 | 2021 | 4   |
| 6    | ④  | 2020年及び2021年シーズンにおける高病原性鳥インフルエンザウイルスの性状解析        | 内田裕子     | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 畜産技術協会   | 2021 | 7   |
| 7    | 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の解明                      | 内田裕子     | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 技報       | 2022 | 4   |

|   |   |                                        |         |                                     |                           |      |    |
|---|---|----------------------------------------|---------|-------------------------------------|---------------------------|------|----|
| 8 | ④ | 畜産技術(独自に進化した多型の豚インフルエンザウイルスが日本で流行している) | 峯 淳 貴   | (国研)農業・食品産業<br>技術総合研究機構動物<br>衛生研究部門 | 畜産技術<br>協会                | 2022 | 9  |
| 9 | ④ | ニュースレター(鳥パラミクソウイルスを用いた新規ベクターワクチンの開発)   | 常 國 良 太 | (国研)農業・食品産業<br>技術総合研究機構動物<br>衛生研究部門 | 動物用ワクチ<br>ン・バイオ医<br>薬品研究会 | 2022 | 12 |

(4)国内特許権等

区分:①育成者権、②特許権、③実用新案権、④意匠権、⑤回路配置利用権

| 整理番 | 区分 | 特許権等の名称        | 発明者          | 権利者                     | 機関名                                 | 出願番号                           | 出願年月日     | 取得年月      |
|-----|----|----------------|--------------|-------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------|-----------|
| 1   | ①  | 組み換え鳥パラミクソウイルス | 常國良太<br>西藤岳彦 | (国研)農業・食品産業<br>技術総合研究機構 | (国研)農業・食品産業<br>技術総合研究機構動物<br>衛生研究部門 | 特願2019-510375<br>(特許第6573746号) | 2018/9/21 | 2019/8/23 |

(5)国際特許権等

区分:①育成者権、②特許権、③実用新案権、④意匠権、⑤回路配置利用権

| 整理番<br>号 | 区分 | 特許権等の名称 | 発明者 | 権利者<br>(出願人等) | 機関名 | 出願番号 | 出願年月日 | 取得年月<br>日 | 出願<br>国 |
|----------|----|---------|-----|---------------|-----|------|-------|-----------|---------|
| 1        |    | 該当なし    |     |               |     |      |       |           |         |

## (6)報道等

区分:①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映、④その他

| 整理番号 | 区分 | 記事等の名称                                                            | 機関名                         | 掲載紙・放送社名等   | 掲載年月日      | 備考 |
|------|----|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-------------|------------|----|
| 1    | ①  | ASFウイルスはニホンイノシシにも感染し 豚と同様の症状と病変を引き起こす                             | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 農研機構プレスリリース | 2020/2/17  |    |
| 2    | ①  | 日本最西端の島で新規の節足動物媒介(アルボ)ウイルスを発見                                     | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 農研機構プレスリリース | 2020/11/16 |    |
| 3    | ①  | 大陸を渡ったH5N8亜型 高病原性鳥インフルエンザウイルス                                     | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 農研機構プレスリリース | 2020/11/25 |    |
| 4    | ①  | 今季国内初発の高病原性鳥インフルエンザウイルスの病原性解析                                     | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 農研機構プレスリリース | 2020/12/14 |    |
| 5    | ①  | 今季国内の高病原性鳥インフルエンザウイルスの遺伝的多様性                                      | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 農研機構プレスリリース | 2021/3/10  |    |
| 6    | ①  | 2021年シーズン国内発生高病原性鳥インフルエンザウイルスの特徴                                  | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 農研機構プレスリリース | 2022/9/20  |    |
| 7    | ①  | 2022年9月神奈川県の高病原性鳥インフルエンザウイルスの特徴                                   | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 農研機構プレスリリース | 2022/11/1  |    |
| 8    | ①  | 2022年シーズン高病原性鳥インフルエンザ ウイルスの遺伝的特徴<br>3つの遺伝子グループが早期から同時期・広範囲に国内侵入 - | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 農研機構プレスリリース | 2023/2/9   |    |

(7) 普及に移しうる成果

区分: ①普及に移されたもの・製品化して普及できるもの、②普及のめどがたったもの、製品化して普及のめどがたったもの、③主要成果として外部評価を受けたもの(複数選択可)。

| 整理番号 | 区分 | 成果の名称                                                                            | 機関名                         | 普及(製品化)<br>年月 |   | 主な利用場面                            | 普及状況                                              |
|------|----|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|---------------|---|-----------------------------------|---------------------------------------------------|
| 1    | ①  | 「鳥インフルエンザ遺伝子検査用試薬 リアルタイム PCR 法操作マニュアル H5, H7, M 検査系」<br>「ウイルス遺伝子検出検査(RT-PCR 検査)」 | (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 | 2019          | 9 | 都道府県家畜保健衛生所に於ける高病原性鳥インフルエンザの遺伝子診断 | 農林水産省消費・安全局動物衛生課課長通知(元消安第2275号)<br>全都道府県病性鑑定施設で使用 |

(8) 行政が活用しうる成果

区分: ①行政がすでに活用した成果、②行政が活用する目途がたった成果

| 区分 | 成果の内容                  | 主な利用場面          | 活用状況                                                |
|----|------------------------|-----------------|-----------------------------------------------------|
| ①  | 令和2年度HPAI疫学調査報告書(参考資料) | 国内におけるHPAIの防疫活動 | 農林水産省におけるHPAI疫学調査チーム検討会等に活用。調査内容は農水省HP上に公表(2021年9月) |
| ①  | 令和3年度HPAI疫学調査報告書(参考資料) | 国内におけるHPAIの防疫活動 | 農林水産省におけるHPAI疫学調査チーム検討会等に活用。調査内容は農水省HP上に公表(2022年9月) |

(9) 研究推進会議等の開催実績

区分: ①推進会議、②現地検討会、③その他

| 区分 | 推進会議の名称       | 年月日        | 開催場所            | 参加者数 | 消費・安全局担当官の出席有無 | 主な議題及び決定事項           |
|----|---------------|------------|-----------------|------|----------------|----------------------|
| ①  | 平成30年度第1回推進会議 | 平成30年8月29日 | 秋葉原UDXカンファレンス6階 | 53   | 有              | 各実施課題の研究計画(キックオフ会議)  |
| ①  | 平成30年度第2回推進会議 | 平成31年1月25日 | 秋葉原UDXカンファレンス6階 | 50   | 有              | 各実施課題の進捗状況報告と次年度研究計画 |

|   |              |            |                            |    |   |                      |
|---|--------------|------------|----------------------------|----|---|----------------------|
| ① | 令和元年度第1回推進会議 | 令和元年9月3日   | 秋葉原UDXカンファレンス6階            | 52 | 有 | 各実施課題の進捗状況報告と次年度研究計画 |
| ① | 令和元年度第2回推進会議 | 令和2年1月24日  | 秋葉原UDXカンファレンス6階            | 53 | 有 | 各実施課題の進捗状況報告と次年度研究計画 |
| ① | 令和2年度第1回推進会議 | 令和2年8月27日  | Skype for businessによるWeb会議 | 50 | 有 | 各実施課題の進捗状況報告と次年度研究計画 |
| ① | 令和2年度第2回推進会議 | 令和3年1月22日  | Skype for businessによるWeb会議 | 53 | 有 | 各実施課題の進捗状況報告と次年度研究計画 |
| ① | 令和3年度第1回推進会議 | 令和3年10月1日  | Microsoft TeamsによるWeb会議    | 55 | 有 | 各実施課題の進捗状況報告と次年度研究計画 |
| ① | 令和3年度第2回推進会議 | 令和4年1月31日  | Microsoft TeamsによるWeb会議    | 55 | 有 | 各実施課題の進捗状況報告と次年度研究計画 |
| ① | 令和4年度第1回推進会議 | 令和4年10月11日 | 秋葉原UDXカンファレンス6階            | 50 | 有 | 各実施課題の進捗状況報告と次年度研究計画 |
| ① | 令和4年度第2回推進会議 | 令和5年2月17日  | 秋葉原UDXカンファレンス6階            | 50 | 有 | 各実施課題の進捗状況報告         |

(10)発表会の主催(シンポジウム・セミナー等)の状況

| 整理番号 | 発表会の名称 | 機関名 | 開催場所 | 年月日 | 参加者数 | 備考 |
|------|--------|-----|------|-----|------|----|
| 1    | 該当なし   |     |      |     |      |    |

(11)アウトリーチ活動の状況

区分:①一般市民向けのシンポジウム・講演会及び公開講座・サイエンスカフェ等、②展示会及びフェアへの出展・大学及び研究所等の一般公開への参画、③その他(子供向け出前授業等)

| 整理番号 | 区分 | アウトリーチ活動 | 機関名 | 開催場所 | 年月日 | 参加者数 | 主な参加者 | 備考 |
|------|----|----------|-----|------|-----|------|-------|----|
| 1    |    | 該当なし     |     |      |     |      |       |    |