

令和 5 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金
(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)
「ワンヘルス動物由来感染症サーベイランスの全国展開に向けた基盤構築に資する調査研究」
分担研究報告書

地域のワンヘルス推進に関する取組のモデル事例の検討に関する研究

研究分担者 香月 進 (福岡県保健環境研究所)
研究協力者 小林孝行、吉富秀亮、金藤有里、古谷貴志、濱崎光宏、芦塚由紀
江藤良樹、片宗千春、平川周作、中島 淳、石間妙子、金子洋平
更谷有哉、古賀智子、富澤 慧、戸田治孝、岡元冬樹、高橋浩司、
石橋融子、田中義人 (福岡県保健環境研究所)
宮本道彦 (福岡市保健環境研究所)
田口裕也 (北九州市保健環境研究所)
南 亮仁 (佐賀県衛生薬業センター)
吉川 亮 (長崎県環境保健研究センター)
池田 稔 (大分県衛生環境研究センター)
平野孝昭 (熊本県保健環境科学研究所)
成田 翼 (宮崎県衛生環境研究所)
園田奈央 (鹿児島県環境保健センター)
石津桃子 (沖縄県衛生環境研究所)

研究要旨：

本研究班では、2022 年度に厚生労働行政推進調査事業費補助金事業により実施された 3 つの主要なテーマ、「地域のワンヘルス推進に関する取組のモデル事例の検討」、「国内の野生動物及び愛玩動物由来感染症サーベイランスのガイダンスの作成」、「動物由来検体の検査方法の開発、国内知見の情報集約」を更に応用・展開することを目的としている。その中で、本分担研究では地域のワンヘルス推進に関する取組のモデル事例として、二つの課題「動物由来感染症起因病原体の網羅的探索」と「野生生物生息状況把握手法開発」に取り組んだ。

まず、「動物由来感染症起因病原体の網羅的探索」では、福岡県の検査において原因不明とされたマダニ媒介感染症疑い臨床検体及び、福岡県内で採取した植生マダニを対象として次世代シーケンサーを用いた病原体の網羅的検出を行った。臨床検体からは病原性が疑われるウイルス等は検出されなかったが、植生マダニから海外でヒトの感染報告のある Jingmen tick virus が検出され、福岡県での存在が明らかとなった。また、福岡県におけるワンヘルスアプローチを九州地域に展開するため、九州各県の地方衛生研究所と協力・連携し、検体の提供や動物由来感染症の調査手法の共有、情報交換を行うことで九州地域における動物由来感染症サーベイランスの強化とネットワーク構築を行った。

次に「野生生物生息状況把握手法開発」では、福岡県内における哺乳類及び鳥類を対象としたメタバーコーディング手法による網羅的な環境 DNA 調査手法の検討を進展させ、対象とする生物種に適した手法の検討を行った。哺乳類についてはその生態を考慮した環境試料の検討を実施し、鳥類については人工湿地における定点の環境 DNA 調査を実施して経時変化を解析した。環境 DNA 調査から得られた結果については、同地点で実施した個体調査等の生態観測データと照合することにより妥当性の評価を行った。

A. 研究目的

本研究班では、2022 年度に厚生労働行政推進調査事業費補助金事業により実施された 3 つの主要なテーマ、「地域ワンヘルス推進に関する取組のモデル事例の検討」、「国内の野生動物及び愛玩動物由来感染症サーベイランスのガイダンスの作成」、「動物由来検体の検査方法の開発、国内知見の情報集約」を更に応用・展開することを目的としている。この中で、本分担研究は、福岡県の 2 つのワンヘルスアプローチのモデル事業に取り組むと共に、その取組を九州地域展開することを目的とした。

B. 研究方法

①動物由来感染症起因病原体の網羅的探索

福岡県保健環境研究所にマダニ媒介感染症疑い事例として搬入され、検査で原因不明とされた 9 事例の臨床検体について、次世代シーケンサー (NGS) を用いた病原体の網羅的探索を行った。また、福岡県内でマダニ採取を行い、採取したマダニ 408 匹 99 プール検体について NGS を用いた病原体探索を実施した。また、VeroE6 細胞及び BHK-21 細胞を用いてウイルス分離を行った。検出されたウイルスについて全ゲノム解析を実施し、ウイルスの性状解析を行った。

また、動物由来感染症の調査手法の共有や情報交換を行うことで九州における動物由来感染症サーベイランスの強化とネットワーク構築を行うことを目的に九州各県の地方衛生研究所に協力を募り、九州地域で発生の多い重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) について九州各県から陽性検体および陰性検体を収集して解析を行った。解析結果や検査法を共有し、情報交換を行うことで動物由来感染症に関して九州各県で連携できる体制づくりを行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、福岡県保健環境研究所疫学研究倫理審査委員会の承認を得て実施された (許可番号：第 R5-4 号)。

②野生生物生息状況把握手法開発

哺乳類及び鳥類を対象として、環境 DNA メタバーコーディング手法による網羅的な生態

情報の取得について、対象とする生物種に適した手法の検討を行った。哺乳類については、その生態を考慮して水以外にも落葉、低木、石・木 (拭き取り)、大気捕集による環境媒体を対象に DNA 捕集を試みた。調査は、夏季：令和 5 年 8 月、秋季：令和 5 年 11 月、冬季：令和 6 年 1 月に太宰府市内の人工林と二次林で実施した。環境 DNA 分析における哺乳類の検出には、MiMammal プライマーを用いた。なお、調査地点における哺乳類の生息状況を確認するため、自動撮影カメラ及び音声録音 (音声+超音波録音) による生態調査も併せて実施した。

また、環境 DNA 分析の精度を向上させるため、福岡県内で捕獲した哺乳類個体を用いて DNA データベースの整備を進めた。整備の対象とした哺乳類は、国際塩基配列データベースにおける登録情報が乏しい種を優先種として選出し、その捕獲を実施するとともに 12S rRNA 及び *Cytb* 領域の配列解読を試みた。

鳥類については、福岡市内の人工湿地における 2 ヶ所の池で毎月採水を行い、令和 5 年 1 月から 12 月まで通年の環境 DNA 調査を実施した。環境 DNA 分析における鳥類の検出には、MiBird プライマーを用いた。調査地点では目視観察調査が継続して実施されており、環境 DNA 分析で検出された種と目視観察された種の比較を行った。

C. 研究結果

①動物由来感染症起因病原体の網羅的探索

マダニ媒介感染症疑い事例の検査で原因不明とされた 9 事例の臨床検体について NGS を用いた病原体の網羅的探索を行ったが、病原性が疑われるウイルス等は検出されなかった。また、福岡県内で採取したマダニ 408 匹、99 プール検体について NGS による病原体の網羅的探索を行った結果、Jingmen tick virus や Dabieshan tick virus 等のウイルスが検出された。このうち Jingmen tick virus は海外でヒトの感染報告があるウイルスであり、本研究ではタカサゴキララマダニの 3 プール検体及び、キチマダニの 1 プール検体から検出され、福岡県での存在が明らかになった。また、タカサゴキララマダニの 2 プール検体について全ゲノム解析を実施し、

Jingmen tick virus の各セグメントの ORF 全長配列を取得した。得られた塩基配列から系統樹解析を行った結果、福岡県で検出された Jingmen tick virus はこれまで国内で検出されたウイルスと近縁であった。

九州における動物由来感染症サーベイランスの強化とネットワーク構築に向けて九州各県の地方衛生研究所に研究協力を呼び掛けたところ、全 8 県、9 ヶ所の地方衛生研究所の研究協力が得られた。これらの地方衛生研究所から SFTS 陽性検体を 22 検体収集し、SFTS ウイルスの全ゲノム解析を行った結果、日本系統の株に加えて中国系統の株が 2 株検出された。また、SFTS 陰性検体 43 件体について病原体の網羅的探索を行った結果、5 検体から *Rickettsia japonica* が、1 検体から SFTS ウイルスが検出された。これらの結果について九州各県の地方衛生研究所と情報共有ならびに意見交換のための研修会を開催し、九州各県で連携できる体制づくりを行った。

②野生生物生息状況把握手法開発

哺乳類の環境 DNA 調査を行うにあたり、調査地点（二次林・人工林）の哺乳類の生息状況について自動撮影カメラと音声録音を用いて生態調査を実施した。環境 DNA 調査前 4 週間のデータを解析した結果、イノシシの撮影回数が最も多く、次いでタヌキ、アナグマ、ノウサギが多く撮影されており、その他にアライグマ、ネズミ類、キツネ、ネコ、シカが撮影されていた。また、音声録音によりキクガシラコウモリ、オヒキコウモリ、ユビナガコウモリ、ヤマコウモリ、アブラコウモリ、ヒナコウモリ、ホオヒゲコウモリ属が確認された。

環境 DNA 分析の結果、イノシシやタヌキなど自動撮影カメラで撮影回数の多い種は、複数の環境媒体から高い頻度で検出された。しかし、ノウサギは撮影回数が多いいものの、どの時期・どの媒体でも DNA は検出されなかった。検査法としてノウサギが検出されにくい種なのか、環境 DNA の放出が少ないことによるのかなど、その要因については今後の検討が必要である。また、渓流水における環境 DNA の検出種数は、晴天時と比して雨天時が多く、前年度の検討と同様の傾向が確認され

た。一方、夜間 12 時間×2 日（2.5 L/min）の大気吸引による DNA 捕集では抽出された DNA 量も極めて少なく、野生哺乳類は検出できなかった。今後、長期間のパッシブサンプリングによる大気粉塵の捕集など、大気からの環境 DNA 調査に関して更なる検討を進める予定である。

また、環境 DNA 分析において、検出した DNA を照合するデータベースが重要であり、DNA 配列情報が国際塩基配列データベースに登録されていない場合は他の近縁種に誤同定、または検出なしと判断されてしまう恐れがある。そのため、哺乳類を標的とした環境 DNA 分析の精度を向上させるため、福岡県内で捕獲した哺乳類個体を用いて DNA データベース整備を進めている。本研究事業により、ジネズミ、ヒミズ、アブラコウモリ、テン、ニホンアナグマ、カヤネズミ、アカネズミの 12S rRNA 及び *Cytb* 領域、ヒメネズミの 12S rRNA 領域の DNA 配列を解読した（ヒメネズミ *Cytb* 領域は解析中）。そのうち、ジネズミ、アカネズミはこれまでに登録がなかった 12S rRNA 領域の DNA 配列を取得できた。また、本研究で解読したアブラコウモリの 12S rRNA 領域は、登録されている配列と一致率が低く、これまでに登録のない地域系統配列が得られた可能性がある。一方、福岡県内に生息しており、国際塩基配列データベースの登録情報が乏しい種がまだ存在するため、捕獲調査を継続して実施する。

鳥類の環境 DNA 調査は、池水を対象として毎月採水を行い通年の結果を解析した。調査地点では目視観察による鳥類相調査も実施されていることから、環境 DNA 分析による検出種と比較を行った。その結果、池水への接触頻度の高い水禽類などの鳥類は環境 DNA の検出率が高いものの、鳥類の環境 DNA 検出種数は目視観察に比べて少なかった。一方、10 月にのみ目視観察で確認されたマガン属のヒシクイは、環境 DNA 分析においても 10 月のみ検出され、11 月には検出されなかった。池のような止水域では、不在となってから 1 ヶ月後には生体から放出された DNA が水中で分解、または土などの粒子に吸着して底層に沈殿すると考えられた。年間を通した調査の結果、渡りなどの季節性がある種は目視観察と

環境 DNA の検出が一致する傾向が示唆され、池水を環境媒体とする場合は標的種を限定することで有用な生態観測手法となり得ると考えられた。

D. 考察

地域のワンヘルス推進に関する取組のモデル事例として2つの課題に取り組んだ。「動物由来感染症起因病原体の網羅的探索」では、福岡県内に生息するマダニから Jingmen tick virus や Dabieshan tick virus 等のウイルスが検出された。また、九州各県から提供された STFS 臨床検体から日本系統の株に加えて中国系統の株が2株検出された。これら結果は、福岡県を含む九州地域の潜在的なリスクを示唆するもの考えられる。特に、ヒトに対する感染報告がある Jingmen tick virus を保有するマダニが地域に存在することや、日本系統とは異なる中国系統の SFTS が九州地域から検出された知見を九州地域の地方衛生研究所と共有することは、各県のサーベイランス体制の強化に有効であると考えられた。一方、「野生生物生息状況把握手法開発」では、環境 DNA を用いて病原体の宿主たる野生動物の生息の把握手法を検討した。これらの手法についても、九州地域の地方環境研究所等と共有・連携することによりワンヘルスアプローチを推進していくことが可能であり、今後取り組むべき課題と考えられた。

E. 結論

本分担研究では、地域のワンヘルスモデル事例として、動物由来感染症と野生動物生息状況の把握手法開発を行った。その結果、植生マダニにおけるウイルスの検出や中国系統の SFTS の検出など、地域における潜在的なリスクを探知することができた。さらに、これらの情報を九州地域の地方衛生研究所等と共有することにより、地域におけるワンヘルスの推進を図ることができた。また、野生動物生息状況の把握手法開発では、動物種に応じたサンプリング方法や解析方法などに対する知見を得たことに加え、地域の環境 DNA データベースの整備に取り組んだ。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

・更谷有哉、中島淳、平川周作、石間妙子、服部卓郎、香月進、福岡県の人工湿地における環境 DNA メタバーコーディング法を用いた鳥類調査手法の検討、伊豆沼・内沼研究報告（採録決定済、2023 年 8 月受理）

2. 学会発表

小林孝行、芦塚由紀、金藤有里、吉富秀亮、古谷貴志、濱崎光宏、田中義人、香月進、藤田龍介、福岡県におけるマダニからの Jingmen tick virus の検出、第 72 回日本衛生動物学会南日本支部大会、福岡、2023 年 10 月

・更谷有哉、中島淳、平川周作、石間妙子、服部卓郎、香月進、人工湿地における鳥類目視観察調査と環境 DNA メタバーコーディング分析の比較、日本動物学会第 94 回大会、山形、2023 年 9 月

・更谷有哉、中島淳、平川周作、石間妙子、香月進、服部卓郎、第 26 回自然系調査研究機関連絡会議（NORNAC）、三田、2023 年 11 月