

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(B)（海外学術調査）

研究期間：2017～2021

課題番号：17H04489

研究課題名（和文）ワンヘルス／エコヘルスアプローチによるブータンにおける人獣共通感染症のリスク解析

研究課題名（英文）Risk Analysis of Zoonotic Infections in Bhutan by One Health / EcoHealth Approach

研究代表者

森川 茂（MORIKAWA, SHIGERU）

岡山理科大学・獣医学部・教授

研究者番号：00167686

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,100,000円

研究成果の概要（和文）：ブータンにおける人獣共通感染症の実態を調査し以下の結果を得た。狂犬病ワクチンのイヌへの接種率がなわれているが、集団免疫を維持できないレベルの抗体陽性率であった。牛ブルセラ病の調査には日本製ELISAキットの乳汁検体への利用が可能であった。炭疽発生地域の土壌から炭疽菌の分離を試みたが成功しなかった。オオコウモリが保有する各種病原体の抗体調査の実施に向けて予備調査を実施した。ブータン南部でヤギがクリミア・コンゴ出血熱抗体を保有していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ブータンでは、インド側から各種人獣共通感染症が侵入したり、国内に生息するコウモリ由来人獣共通感染症の発生が懸念されているが、ブータンでは各種病原体の抗体調査が実施されたことはなく実態は不明である。その要因として、同国内の野生動物の分布・生態が十分調査されてこなかったことに加え、仏教的な価値観から殺生を伴う野生動物の採血が非常に困難なことが挙げられる。本研究により幾つかの人獣共通感染症のリスクがあること、オオコウモリが生息しニパウイルス感染症などのリスクがあることから、殺傷を伴わない疫学調査の手法を開発し共有できた。これらは今後の対策に資する。

研究成果の概要（英文）：We have conducted a survey of zoonotic diseases in Bhutan. Rabies vaccine program in dogs was initiated in Buhtamn, the antibody positivity rate was not high enough to maintain population immunity. The Japanese ELISA kit was found to be used for milk samples to investigate bovine brucellosis. Attempts to isolate Bacillus anthracis from soil in anthrax outbreak areas were unsuccessful. A preliminary survey was conducted to investigate various pathogens carried by flying foxes in southern Buhtan region. Goats in southern Bhutan were found to harbor Crimean-Congo hemorrhagic fever antibodies.

研究分野：人獣共通感染症

キーワード：人獣共通感染症 ブータン ワンヘルス エコヘルス

1. 研究開始当初の背景

1) ブータンにおける急激な環境変化による人獣共通感染症(ズーノーシス)の発生リスク

ブータンは長く鎖国政策を取ってきたが、20世紀後半より徐々に対外関係を拡大してきた。「国民総幸福」を基本方針とする政策により、独自の文化・環境の保全を進める一方で、近年は急速に近代化が進んでいる。国民の食生活にも変化が生じ、乳肉製品の需要が高まったことにより、外国からのヒト(観光客・労働者)や家畜・乳肉製品の流入に伴う越境性ズーノーシスの発生リスクが高まっている。また農地・宅地造成や交通網整備等による土地利用状況の変化、地球温暖化に伴う河川の氾濫の増加により、土壌中に埋められた感染症罹患動物の死体が地表に露出する事態が懸念されており、土壌常在菌等による土壌由来ズーノーシスのリスク評価も求められている。これらは、グローバル化が進む国際社会において「辺境」とされる多くの地域で進行している事態であり、新興感染症の発生源になる可能性があるが、具体的な対策は提示されてこなかった。ブータン南部はインドと国境を接しており、人獣共通感染症が侵入するリスクがあるが調査は殆ど行われていない。

2) ワンヘルス/エコヘルスアプローチ

ワンヘルスとは、公衆衛生・動物衛生・環境保全が複合的に関係した諸問題について、各分野の関係者が部門横断的に連携し対応することを目指す。国際的に脅威となるズーノーシスおよび未知疾病等について、感染源(家畜の生産現場、野生動物の生息域など)～患者の診断・感染予防まで包括的に取り組むことができる。一方、エコヘルスとは、近年活発な研究領域であり、「環境」がいかにヒトの健康に影響するかを対象とする。「環境」には生態学的・物理学的から社会的・経済的環境を含み、エマージング感染症の発生要因・リスクを検証するうえできわめて有効な手段となる。例えばブータンでは、上述のグローバル化による影響のほか、敬虔な仏教国であるために防疫策として「感染リスクの高い動物(野犬・家畜等)の殺処分」が実施できない点などを、固有の社会的環境として考慮する必要がある。

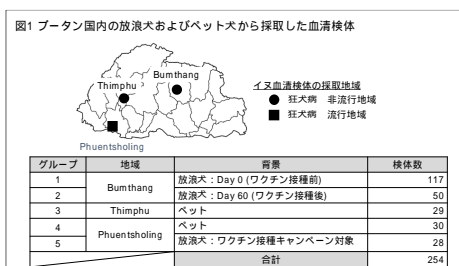
2. 研究の目的

ブータンは、近年の急速な近代化により外国からヒト・家畜・モノ・文化が流入し、生態学的・社会的環境に急激な変化が生じている。地理的にはインド・中国両大国の辺縁部、すなわち感染症監視体制が脆弱な地域に挟まれていることから、双方から把握されていない感染症が侵入しやすい。そのため、種々のズーノーシスの国内発生・侵入が懸念されるが、そのリスクは十分に解析されていない。本課題では日本・ブータンの公衆衛生・動物衛生領域が連携し、急激な環境変化がもたらす各種ズーノーシスの発生リスクを明らかにし、実効性の高い総合的な対策の提言を行い、「感染症リスク低減に直結する環境政策」研究モデルの確立を目指す。

3. 研究の方法

1) 狂犬病: ブータン国内の狂犬病非流行地域(Thimphu, Bumthang)および流行地域(Phuentsholing)において、放浪犬・ペット犬の血清を用いて中和抗体価を測定した。犬は、採取された地域や背景により5グループに分けたうえで(図1)、以下の検証を行った。

i) 単回のワクチン接種により獲得される中和抗体価の検証、ii) 過去のワクチン接種により維持されている中和抗体価の検証これらのグループの中和抗体価を比較することで、過去のワクチン接種により、感染防御に有効とされる抗体価を維持できているか検証した。



2) ブルセラ症: i) 牛ブルセラ病のサーベイランスは

主に抗体調査によって行われる。日本では血液を用いた抗体検査が用いられるが、海外ではより簡便に採取できる乳汁を用いた検査も併用されている。陽性農場における牛から採集した血清と乳汁のペアを用いて、日本製市販キットの乳汁検体に対する性能評価を行った。

3) 炭疽: i) 標準作業手順書を策定した。ii) 個人防護具の正しい装着方法の訓練、iii) 土壌からの菌の分離(模擬訓練)

4) オオコウモリが保有する各種病原体調査の基盤:

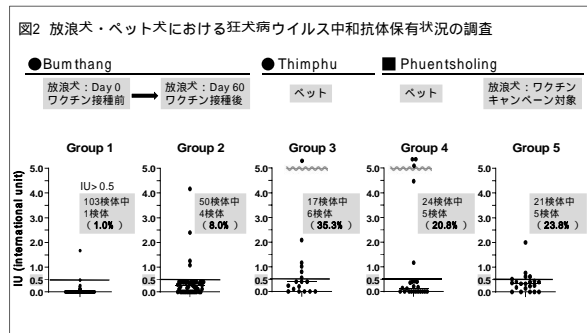
i) コウモリ抗体調査の実施に向けた予備調査: コウモリ類および採取可能な個体数の情報を得るため、かすみ網を張り採取下コウモリ種の同定とともに、雌雄・年齢層の判定、前腕長の計測を行ったうえで、リリースする。ii) コウモリ生体からの採血手法の確立: ルーセットオオコウモリを飼育し、定期的に採血を実施し、安定して検査必要量が確保できる手法を確立する。

5) CCHFの家畜の血清疫学: i) 間接蛍光抗体法によるCCHF抗体検出: インドに隣接する2地域(Sarpang及びSamtse)のヤギの血清中のCCHF抗体を検出した。ii) IgG-ELISAによるCCHF抗体検出ROC解析でIF陽性検体と陰性検体のIgG-ELISAでのOD値をROC解析して、IgG-ELISAのcut off値を決定した。

4. 研究成果

1) 狂犬病:

i) 単回のワクチン接種により獲得される中和抗体価の検証: グループ 1 (Bumthang・放浪犬: ワクチン接種前) およびグループ 2 (同: ワクチン接種 60 日後) において、感染防御に有効とされる抗体価 (international unit [IU] > 0.5) に到達している検体の割合はそれぞれ 1% および 8% であった (図 2)。グループ 1 は本来、中和抗体価を保有していないはずであるが、過去に散発的に実施されたワクチン接種で獲得した抗体が残っていたと考えられた。グループ 2 では、グループ 1 と比較して全体的に抗体価が上昇していることから、ワクチン接種により中和抗体が惹起されたことは確認されたが、単回接種では感染防御に有効とされる抗体価に達することが困難な実情が明らかとなり、複数回接種の必要性が示唆された。



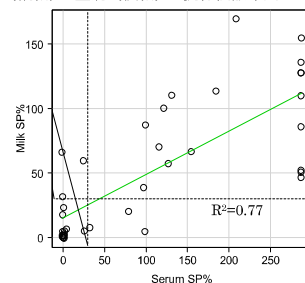
ii) 過去のワクチン接種により維持されている中和抗体価の検証: グループ 3 (Thimphu・ペット犬)、グループ 4 (Phuentsholing・ペット犬)、グループ 5 (Phuentsholing・放浪犬) において、IU > 0.5 に到達している検体の割合はそれぞれ 35.3%、20.8%、23.8% だった。国際的に、集団免疫の維持のためには 70% 以上のワクチン接種率が目標とされているが、ワクチン接種済の個体でも感染防御に有効とされる抗体価を保有する犬が上記の割合にとどまっている現状が明らかになった。これにより、ワクチン接種キャンペーンの実施にあたっては、抗体価の検証を並行して行う必要性が示唆された。また、個体数は限られているが、複数の接種歴を有する犬ほど高い抗体価を保有する傾向が確認されたことから、継続的なワクチン接種の啓発も今後の課題と考えられた。

2) ブルセラ症:

仏教国であるブータンでは、国内での家畜の屠殺は認められておらず、基本的な牛の飼養目的は牛乳生産と副産物としての堆肥生産である。首都ティンブー近郊のジャーギー種酪農家 (図 3) (ブルセラ病は発生していない; 使用頭数 17 頭うち搾乳中 4 頭) での現地調査 (2018 年 1 月) を実施した。

調査対象とした農場は、規模は小さいものの清潔に保たれており、牛体は小さいものの健康状態も良好で、丁寧に管理している印象を受けた。本調査結果から、ブータンにおけるブルセラ病対策を講じる上での障害となるポイントは、①感染牛を摘発した場合でも淘汰はできないため、感染牛となっても飼養し続ける場所が必要、②牛間での感染を広げるリスク要因となる直接交配、母子間直接の授乳も慣行的に行われている、③人への感染を防ぐために必要な生乳の加熱処理や作業者の防護は行われていない、④ワクチンや抗生物質等の動物医薬品、人工授精用精液、飼料作物の種子等の衛生関係資材のほとんどは国外から輸入された後に政府から無料で支給されている現状で、個々の農家が衛生対策費用を負担することは困難と考えられること、が考えられた。上記の状況を考慮すると、ブータンにおける牛ブルセラ病対策においては、大規模サーベイランスによる汚染農場の特定と牛や精液等の移動管理といった国際的なゴールデンスタンダードに加えて、汚染農場に対しては発症牛からの排菌と人への感染を抑制するためにワクチンを用いた対策も重要となると考えられた。また、ブータン政府獣医師への聞き取りによると、高度汚染が認められた農場については、輸入ワクチンの接種を計画しており、接種農場の全頭検査、接種後の牛の移動管理、感染牛の隔離飼育などの防疫対策を併せて検討しているとのことであった。

図 4 日本製牛ブルセラ病抗体 ELISA キットを用いた乳汁 (縦軸) と血清 (横軸) の抗体価散布図



陽性農場個体の血清・乳汁検体を用いて日本製牛ブルセラ病抗体 ELISA キットの評価を行ったところ、血清検体と乳汁検体の判定結果は高い相関を見せた (図 4)。本結果は、別途海外での陽性検体を用いた成績

(https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/regulatory_science/pdf/2605.pdf) と合わせて、乳汁検体を用いた検査法が実用に足るレベルであることを示した。また、本検査法のバルク乳への適応性は 10 頭未満の集乳に限られるが、バケツ集乳 (4-5 頭) を行っているブータンの酪農場においての適用可能性は十分にあることから、省力的に陽性農場を摘発するためのサーベイランスとしてバルク乳を用いた抗体検査は有望な選択肢となると考えられた。

3) 炭疽:

英訳した標準作業手順書はブータン NCAH のスタッフと共有した。

個人防護具の装着については比較的容易に習得できたが、脱着する際に汚染箇所に触らないようにするため特に丁寧な作業が必要であることが確認できた。土壌掘削時の作業員への暴露予防措置の徹底のために、汚染ゾーンと非汚染ゾーンの区分けが重要であることがわかった。

土壌から掘削機を用いて穴をあけ、土壌を採取した。土壌は砂のように粘性が低い場合もあり、粉塵を吸い込む可能性があることが確認された。今回は、模擬訓練であったため完全な个人防护具を装着していなかったが、実際に炭疽菌汚染の可能性がある土壌を採取する場合には感染防御対策を丁寧に実施していく必要がある。今回土壌から分離されたコロニーはその形状および性状から枯草菌やセレウス菌であると思われた。

また、炭疽が発生した Haa District において、模擬訓練で行った採取方法により、炭疽患者埋却場所から土壌を採取し、炭疽菌の分離を試みた。しかしながら、炭疽菌は分離されなかった(図5)。ブータンでの炭疽発生は散発的であるため、発生が報告されたら即時対応できるように分離培養用選択培地を常に使用可能な状態に整備している。



図5 . 炭疽菌分離の試み

4) オオコウモリが保有する病原体の調査基盤:

i) コウモリ抗体調査の実施に向けた予備調査:

・ブータン南部国境付近の Phuentsholing 郊外において、地域住民からコウモリの目撃情報を集め、調査地点を選定した。調査地点の中で、果樹の配置や、地面に落ちているペレット(オオコウモリが食べた果実の繊維質を吐き出したもの)の分布から、かすみ網を張る地点を選定した。

・夜間の1時間の間に、かすみ網にかかったコウモリ8匹を採取し(図6)、種の同定とともに、雌雄の判定、前腕長の計測を行った(表1)。

・採取されたコウモリは、いずれも *Cynopterus sphinx* (英名: Greater shortnosed fruit bat、和名: コバナフルーツコウモリ) だった。同種は、過去にベトナムにおける調査で NiV 抗体を保有していることが確認されたことから、ブータンにおける調査の対象種となり得ると考えられた。一方、インドにおける NiV の主要な自然宿主は *Pteropus medius* (英名: Greater Indian fruit bat、和名: インドオオコウモリ) であることから、同種の目撃情報を国立公園のレンジャーから集めたが、現時点で同種のブータン国内における生息状況は明らかになっていない。

・この予備調査により、コウモリの採取、コウモリ生体からの採血、種同定等、抗体調査の実施に必要な一連の技術的基盤が整備された。

・また、調査地点のレイアウト(かすみ網の設置地点、採血の実施地点など)、必要資材、人員の配置、調査スケジュール等、コウモリ抗体調査の実施計画の立案に必要な情報が整理された。

ii) コウモリ生体からの採血手法の確立:

・国立感染症研究所・動物実験施設において、飼育したルーセットオオコウモリ2羽から定期的に採血を実施し、安定して検査必要量が確保できる手法を検討した。

・その結果、腿間膜に沿って走行する両側の uropatral vein、または飛膜に沿って走行する両側の wing vein から、安定して 500 μ L 程度の血液が採取できることがわかった。また、両方の血管から採血するための適切なコウモリ保定方法についても確立することができた。

(図7)

・複数回の採血を実施することによって、各種抗体検査において陰性対照として利用可能なコウモリ血清を十分量確保することができた。

・本課題により、オオコウモリ生体から、安定して検査必要量を確保するための採血方法が確立できたほか、コウモリの保定・採血および止血に必要な資機材に関する情報を得ることができた。これにより、ブータンの仏教的価値観と両立する形で、コウモリ類の保有する病原体の抗体調査を実施するための技術的基盤が整備された。

5) CCHF の家畜の血清疫学:

i) 調査地域:

図6 かすみ網で採取された *Cynopterus sphinx*

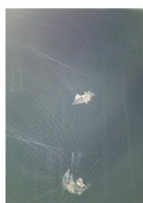


表1 予備調査で採取されたコウモリ類

ID	種名(英名)	学名	性別	年齢層	前腕長(mm)
1	Greater shortnosed fruit bat	<i>Cynopterus sphinx</i>	male	adult	69.4
2	Greater shortnosed fruit bat	<i>Cynopterus sphinx</i>	female	adult	71.5
3	Greater shortnosed fruit bat	<i>Cynopterus sphinx</i>	male	adult	66.5
4	Greater shortnosed fruit bat	<i>Cynopterus sphinx</i>	male	adult	65.5
5	Greater shortnosed fruit bat	<i>Cynopterus sphinx</i>	male	adult	67.4
6	Greater shortnosed fruit bat	<i>Cynopterus sphinx</i>	male	adult	68.9
7	Greater shortnosed fruit bat	<i>Cynopterus sphinx</i>	female	adult	72.4
8	Greater shortnosed fruit bat	<i>Cynopterus sphinx</i>	male	adult	68.4

図7 左側Uropatral veinからの採血

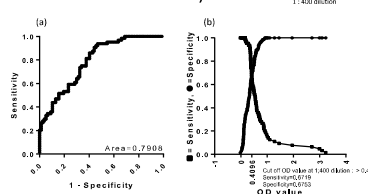


インドとの国境に隣接した Sarpang と Samtse で飼育されているヤギの血清を用いて血清疫学を行った。Sarpang は 2015 年の調査で CCHF 抗体陽性率が 38%と報告されている。

ii) IF による CCHF 特異抗体の検出：IF 抗体陽性検体が検出された。

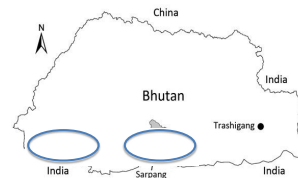
iii) IgG-ELISA による CCHF 特異抗体の検出と ROC 解析：IF 陽性検体と陰性検体の IgG-ELISA での OD 値を ROC 解析した結果、400 倍希釈血清での cut off 値=0.41 で感度 67%、特異度 68%となった（図 8）。この結果、234 頭のヤギの内 116 頭（49.6%）が CCHF 抗体陽性と判断された。過去の調査で 38%抗体陽性と報告された Sarpang では 50.6%、インドの endemic 地域に近い Samtse では 43.8%が抗体陽性であった（図 11）。この結果、インドから輸入されたヤギに伴い *Hyalomma* 種のマダニが持ち込まれ、CCHF ウイルス感染が家畜で継続して起きていると考えられ、ヒトへの感染リスクがあることが分かった。リスクをより詳細に解析するために、これらの地域以外の家畜の血清疫学山田からの CCHF ウイルス遺伝子検出を行う必要がある。また、ヒトの血清疫学や有症患者がいるかなどの調査も必要である。

図8 ROC analysis



ROC (a) and TG-ROC (b) analyses of the CCHF-IgG-ELISA. ROC and TG-ROC curves were analyzed and drawn using Starflex software. The area under the ROC curve is 0.7908, which indicates the 0.158 for a given probability distinguishing between goat with CCHF antibody and those without antibody (a). The most optimal sensitivity (67.5%) and specificity (67.5%) are obtained when the cutoff value is set at 0.4105 of OD.

2.11. インドに隣した2. 域でCCHFがヤギに感染



Locations in Bhutan where serum samples were collected: from goats (triangles) and cattle (square and circle). The shaded area shows the collection areas of Sarpang district and Samtse district, where samples from goats were collected.

CCHFVH やL の輸入F V C でブータンF 侵入B 定T B ているとS えられる

5. 新型コロナウイルス感染症のパンデミックによる影響：

当初は平成 29 年度から令和 3 年度までの 5 年間の研究計画で開始されたが、平成 31 年度・令和元年度に新型コロナウイルス感染症のパンデミックによりブータンへの渡航が不可能となった。最終年度の令和 4 年度にはブータンへの渡航が可能になったが、ブータンでは滞在税が導入され、200 米ドル/日/人が課せられることになったため、予算の観点から派遣人数絞って渡航した。結局、初年度に渡航して研究打合せを行い、翌年に渡航して調査を行ったうえで、令和 4 年度末に再度渡航して研究成果のとりまとめと今後の共同研究に関して取りまとめることができたが、当初の予定と比較して現地での調査が極めて限定的になったため、当初の計画を完全に実施することができなかった。しかし、人獣共通感染症の現状と問題点は、共有することができ、今後の対策を講じる上での基盤が構築できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 4. Daniel Oluwayelu, Babak Afrough, Adebowale Adebisi, Anitha Varghese, Park Eun-Sil, Shuetsu Fukushima, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo, Eric Neumann, Shigeru Morikawa, Roger Hewson, and Oyewale Tomori	4. 巻 26(4)
2. 論文標題 Prevalence of Antibodies to Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Ruminants, Nigeria, 2015	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Emerg Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 744-747
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3201/eid2604.190354	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>新型コロナウイルス感染症のパンデミックによる影響： 本研究は、当初は平成29年度から令和3年度までの5年間の研究計画で開始されたが、平成31年度・令和元年度に新型コロナウイルス感染症のパンデミックが始まり、ブータンへの渡航が不可能となった。その後もパンデミックが継続したため、研究が実施できず研究期間の延長を申請した。最終年度の令和4年度にはブータンへの渡航が可能になったが、ビザなどの取得に問題が生じ、令和4年末に予定していた渡航は中止せざるを得なかった。また、ブータンでは滞在税が導入され、200米ドル/日/人が課せられることになったため、予算の観点から派遣人数絞って令和5年に渡航することができた。結局、初年度に渡航して研究打合せを行い、翌年に渡航して調査を行ったうえで、令和4年度末に再度渡航して研究成果のとりまとめと今後の共同研究に関して取りまとめることができたが、当初の予定と比較して現地での調査が極めて限定的になったため、当初の計画を完全に実施することができなかった。しかし、人獣共通感染症の現状と問題点は、共有することができ、今後の対策を講じる上での基盤が構築できた。</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	上野 勇一 (UENO YUICHI) (00548208)	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・研究員 (82111)	
研究分担者	奥谷 晶子 (OKUTANI AKIKO) (60392320)	国立感染症研究所・獣医科学部・主任研究官 (82603)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	加来 義浩 (KAKU YOSHIHIRO) (70392321)	国立感染症研究所・獣医科学部・主任研究官 (82603)	
研究分担者	前田 健 (MAEDA KEN) (90284273)	国立感染症研究所・獣医科学部・部長 (82603)	
研究分担者	大崎 慎人 (OOSAKI MAKOTO) (80355164)	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・ユニット長 (82111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関