

表1 シカ及びイノシシの血清における *Erysipelothrix* 属菌に対する GA 及び LA 抗体の検出

	検体数	GA 抗体					LA 抗体				
		陽性数 (%)	GM	最高値	中央値	陽性数 (%)	GM	最高値	中央値		
エゾシカ	26	26 (100)	8.00	16	8	25 (96)	14.32	128	16		
ニホンジカ	26	24 (92)	7.12	16	8	25 (96)	27.86	128	32		
イノシシ	48	45 (94)	18.7	128	16	48 (100)	33.9	128	16		
	100	95 (95)	11.6	128	8	98 (98)	25.88	128	32		

GA：豚丹毒菌生菌発育凝集、LA：豚丹毒菌ラテックス吸着凝集抗原を用いたラテックス凝集
GM：幾何平均値

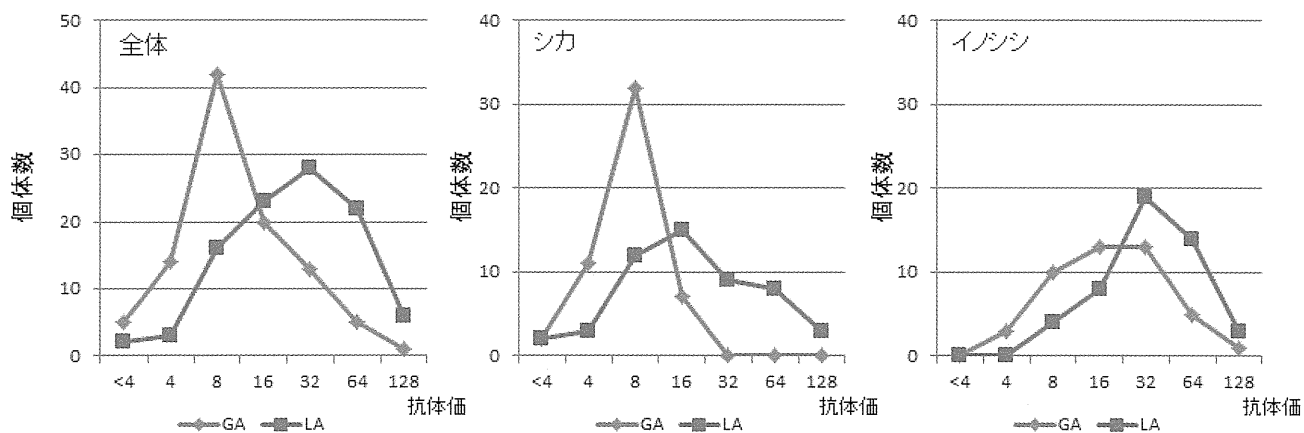


図1 シカ及びイノシシにおける *Erysipelothrix* 属菌に対する GA 及び LA 抗体の分布

GA：豚丹毒菌生菌発育凝集、LA：豚丹毒菌ラテックス吸着凝集抗原を用いたラテックス凝集
GM：幾何平均値

注) シカにおける抗体分布は、エゾシカ及びニホンジカを合計して示す。

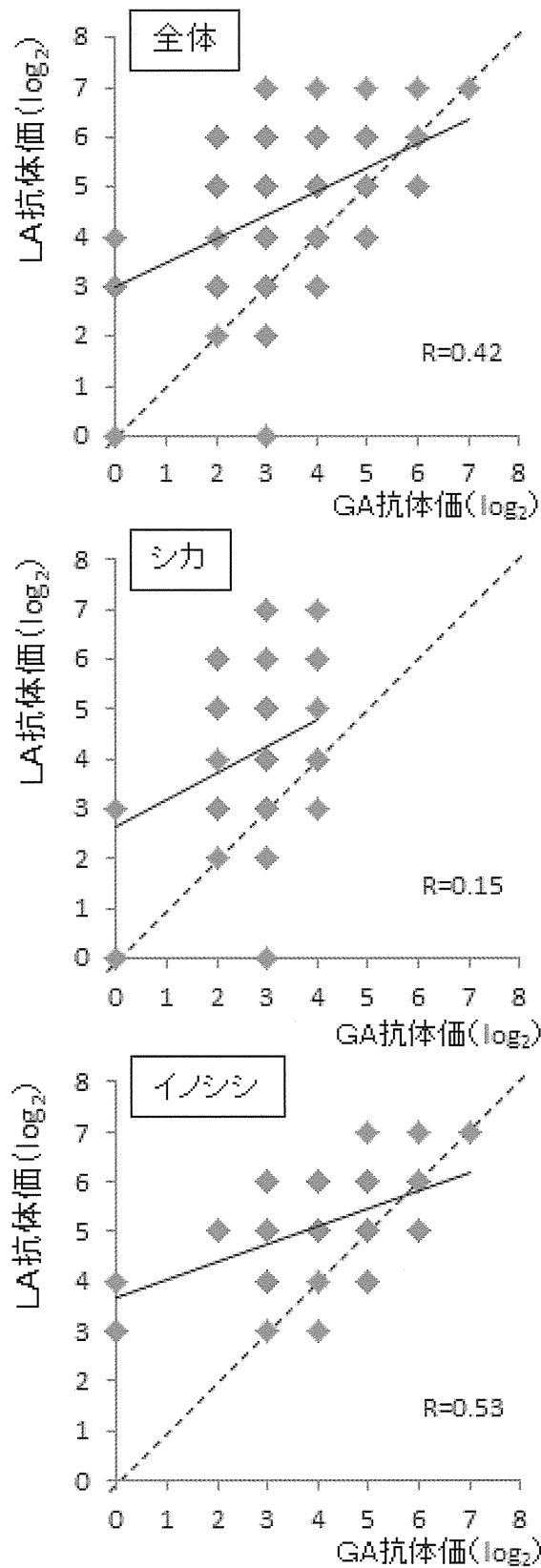


図2 GA抗体価とLA抗体価の相関性
 GA：豚丹毒菌生菌発育凝集、
 LA：豚丹毒菌ラテックス吸着凝集抗原
 を用いたラテックス凝集

表2 野生のシカ及びイノシシの血清における
GA試験及びLA試験の結果の一致度の評価

全体		GA抗体		計
		陽性	陰性	
LA抗体	陽性	94	4	98
	陰性	1	1	2
計		95	5	100

全体 κ 係数=0.26 (やや一致)

シカ		GA抗体		計
		陽性	陰性	
LA抗体	陽性	49	1	50
	陰性	1	1	2
計		50	2	52

シカ κ 係数=0.48 (中等度に一致)

イノシシ		GA抗体		計
		陽性	陰性	
LA抗体	陽性	46	3	49
	陰性	0	0	0
計		46	3	49

イノシシ κ 係数=0 (わずかな一致：判定難)

表3 シカにおける牛ウイルス性疾病の抗体検査結果

検体数	抗体陽性数 (%)				
	BLV*1	BVDV-1*2	BVDV-2*2	IBRV*2	
エゾシカ	26	0	1(1.9)	0	0
ニホンジカ	26	0	0	0	0
計	52	0	1	0	0

*1 : S/P 値 0.23 以上を BLV 抗体陽性とした。

*2 : ウイルス中和抗体価 2 倍以上を各ウイルスの抗体陽性とした。

BVL : 牛白血病ウイルス、BVDV-1 : 牛ウイルス性下痢ウイルス 1 型

BVDV-2 : 牛ウイルス性下痢ウイルス 2 型、IBRV : 伝染性鼻気管炎ウイルス

「野生鳥類の生態と捕獲利用に関する調査」

日本大学：村田 浩一

研究分担者 村田 浩一 日本大学教授

研究要旨：野生カモ類の一部は、狩猟対象とされ食肉（ジビエ）としても一般流通している。しかし、国内での流通および販売に対する規制は未だ整っていない。これまでの研究から、市販の野生カモ類が病原性細菌のカンピロバクターを保菌していることが分かっている。国内の野生カモ類からは、人獣共通病原体であるトキソプラズマの抗体検出が報告されているが、食用にされている野生カモ類のトキソプラズマ感染実態については、これまで調査研究が行われていなかった。そこで本研究では、分子生物学的手法を用いて市販野生カモ類からトキソプラズマ原虫遺伝子の検出を試みた。本原虫の遺伝子は、市販カモ類の4羽（10.5%）から検出された。狩猟鳥からは検出されず、全体では4.7%（4/86）の検出率となった。インターネットを通じて市場流通している野生カモ類の約10%から人獣共通病原体であるトキソプラズマ原虫の遺伝子が検出され、とくに鳥刺しとして生食されることもある胸筋からと本原虫遺伝子が検出されたことには留意すべきである。野生カモ肉の食用には、公衆衛生および食品安全確保の観点から法的規制が必要であると考えた。

A. 研究目的

食肉利用される野生鳥類のうち、カモ類については、捕獲数が狩猟対象鳥獣の中でも最も多く、年間約24万羽と報告されている（環境省、2010）。また、野生のカモ類はカンピロバクターやサルモネラを保菌しており（川森ら、2004；農研機構、2006）、衛生上の危険性があることが示唆されている。さらに、国内の野生カモ類からはトキソプラズマ抗体が高率（22%）に検出されている（Murao *et al.*, 2008）。しかし、我が国において食用にされる野生カモ類のトキソプラズマ原虫保有実態については、これまで詳細な研究調査が行われていない。

そこで本研究では、食用に狩猟されたカモ類およびネット販売されている野生カモ類からトキソプラズマ遺伝子の検出を試みた。

本研究目的は、国内で食用に供されている野生鳥類の病原体保有実態を明らかにし、野生動物の食肉利用に対するリスク評価およびリスク回避に役立てることである。

B. 研究方法

調査項目

北海道内で狩猟された野生カモ類の肝臓の提供を受けた。検体の内訳は、コガモ（*A. crecca*）13羽、キンクロハジロ（*Aythya fuligula*）6羽、スズガモ（*Ayt. marila*）6羽、オナガガ

モ（*A. acuta*）4羽、マガモ（*A. platyrhynchos*）14羽、ヒドリガモ（*A. penelope*）5羽の計6種48羽であった。

インターネットによる食用販売を通じてカモ類の死体を入手した。検体の内訳は、カルガモ14羽42検体（各羽の脳、肝臓、胸筋：以下同）、ヒドリガモ10羽30検体、マガモ14羽42検体の計3種38羽114検体であった。野生カモ類が捕獲された地域は、茨城県、滋賀県、徳島県および鹿児島県の4県であった。各県のカモ類の種と羽数は、茨城県がカルガモ5羽とマガモ5羽、滋賀県がマガモ9羽、徳島県がカルガモ9羽、鹿児島県がヒドリガモ10羽であった。

狩猟鳥48羽および市販鳥38羽の検体試料を用いて、nested-PCR法によりトキソプラズマ原虫のITS1~5.8S rRNA遺伝子（334bp）の増幅を試みた（Gondim *et al.* 2010）。

C. 研究成果

トキソプラズマ原虫の遺伝子は、市販カモ類の4羽（10.5%）から検出された。トキソプラズマ遺伝子が増幅された検体の内訳は、徳島産カルガモ1羽の胸筋と肝臓、鹿児島産ヒドリガモ2羽の胸筋であった。狩猟鳥からは検出されず、全体では4.7%（4/86）の検出率となった。

D. 考察

インターネットを通じて市場に流通している野生カモ類の約 10%から人獣共通病原体であるトキソプラズマ原虫の遺伝子が検出された。国内で捕獲されたカモ類の高率なトキソプラズマ抗体保有の報告もあることから、カモ類におけるトキソプラズマ原虫保有はほぼ確実であると考えられた。とくに鳥刺しとして生食されることもある胸筋からと本原虫遺伝子が検出されたことに留意すべきである。

野生カモ肉の食用には、公衆衛生および食品安全確保の観点から将来的に改善すべき問題が多いと思考した。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. 高井伸二・門平睦代・青木博史・村田浩一・前田 健・小野文子・山本茂貴：野生鳥獣由来食肉の安全性確保に関する研究・日本野生動物医学会誌・18 (3)・83-86・2013.
2. 村田浩一・家畜と野生動物の間を行き来する感染症・日本野生動物医学会誌・18 (3)・87-91・2013.

2. 口頭発表

1. 村田浩一：国際的な動物園ネットワークによる野生動物感染症の早期警報システムの構築・第 19 回日本野生動物医学会大会 (2013 年 8 月 30 日、京都大学)

F. 知的財産権の出願・登録状況

とくになし。

「イノシシの生態と捕獲利用に関する調査」
・イノシシにおけるウィルス感染症の疫学調査

山口大学：前田 健

イノシシにおけるウイルス感染症の疫学調査

分担研究者 前田 健(山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室)
研究協力者 佐藤 宏(山口大学共同獣医学部獣医寄生虫病学教室)
下田 宙(山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室)
米満研三(山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室)
服部志保(山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室)

研究要旨

イノシシを中心とした野生動物における感染症の疫学調査・食肉処理の際に認められる異常例の収集・検査法の確立を実施した。その結果、1) 人獣共通感染症・食品媒介感染症として注目されている E 型肝炎ウイルスに対する抗体を日本全国 3 か所のイノシシが高率に保有していることが判明した。また、一部のイノシシからは血清中からウイルスが検出された。2) イノシシおよびシカの食肉処理の際に参考となるべき、イノシシおよびシカの外貌および内臓臓器の肉眼病変を収集した。3) イノシシおよびシカのブルセラ菌・日本脳炎ウイルス・レプトスピラに対する調査を行った。4) 日本脳炎ウイルスに対する種々の野生動物からの抗体検出系を作製し、多くの感染症に応用できることが示された。5) ブタや猟犬など様々な動物に感染するオーエスキー病ウイルスが、ブタでは撲滅に成功した地域で未だにイノシシに感染していることが示された。これらの結果により、イノシシやシカの処理の際、喫食の際、家畜を飼育の際には、細心の注意を払う必要があることが再確認された。また、多くの点で困難があった野生動物の感染症の診断に ProteinA/G と発現細胞を用いることにより大きな進歩を与えた。

A. 研究目的

本研究はイノシシが保有する感染症の疫学調査を実施することを目的としている。1) 家畜伝染病予防法の届出伝染病に指定され、豚での撲滅に成功しつつあるオーエスキー病ウイルスのイノシシにおける感染状況を調査した。(図 1・2) 2) 人獣共通感染症・食品媒介感染症として注目されている E 型肝炎ウイルス(HEV)のウイルス保有状況並びに抗体保有率を調査した。3) 人獣共通感染症・食品媒介感染症を引き起こすブルセラ菌に対する抗体保有状況を調査した。4) 人獣共通感染症で様々な動物が感染に関与している日本脳炎ウイルスのイノシシや他の野生動物における感染状況を調査した。5) 野生動物由来で人獣共通感染症を引き起こすレプトスピラ菌の腎臓における感染状況の調査を行った。6) 日本脳炎ウイルスをモデルとして野生動物を含む全ての動物種での抗体検出系の作出を試みた。7) イノシシおよびシカの解体処理時の参考にするため、肉眼的に認められる病変部位の写真記録を行った。

B. 研究方法

1) イノシシにおけるオーエスキーウイルスの感染状況の調査

血清：ブタでのオーエスキー病の清浄化に成功している 3 都道府県で捕獲されたイノシシ 173 頭から回収された血清を 56°C 30 分非働化後、実験に供試。

ウイルスと細胞：ウイルスは Indiana 株、細胞はブタ由来 CPK 細胞 (動物衛生研究所より分与)

80% プラーク減数中和試験：Indiana 株と 1 : 10 希釈血清を用いて 80% プラーク減数試験を実施した。陽性個体に関しては、血清を二倍階段希釈して抗体価を求めた。

gE 抗体の検出：野生株感染個体にのみ出現する gE 抗体の検出のために IDEXX 社の gI Antibody ELISA を実施した。

2) HEV のイノシシおよびシカにおける疫学調査

HEV 検出用血清：1) 中国地方で 2009 年から 2013 年にかけて捕獲されたイノシシの血清 (180 検体)。

2) 関東地方で 2011 年と 2012 年に捕獲されたイノシシの血清 (152 検体)。

3) 九州地方で 2011 年と 2012 年に捕獲されたイノシシの血清 (46 検体)。

4) 中国地方で 2009 年から 2013 年に捕獲されたシカの血清 (209 検体)

5) 近畿地方で 2007 年から 2010 年に捕獲されたイノシシの血清 (71 検体)。

HEV 遺伝子検出：血清から QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いて RNA を抽出し、HEV-F1 プライマーと HEV-R2 プライマーを用いて RT-PCR を実施、更に

RT-PCR 産物を、HEV-F2 プライマーと HEV-R1 プライマーを用いて Nested PCR を行い、遺伝子の検出を試みた。陽性が疑われるサンプルは塩基配列を決定し、最終的に判定した。

HEV 抗体の検出：HEV のウイルス様粒子 (VLP) を大阪大学微生物学研究所の松浦善治先生より分与していただき、それを抗原として ELISA を行った。血清は 1 : 100 に希釈し、二次抗体には抗ブタ IgG 抗体を 1 : 1000 希釈で用いた。発色には Bio-Rad のパーオキシダーゼ基質キットを用いた。

HEV カプシドタンパクの発現：

下関で HEV 患者の遺伝子 (JTF-Yamagu11 株) を下に ORF2 遺伝子全長 (1-660 アミノ酸) をコードする遺伝子はプライマー Yamagu11 ORF2 1F (ClaI) ver2 (5' -GTA TCG ATC ACC ATG CGC TCT CGG GCT TT-3') と

Yamagu11 ORF2 660R-His (5' -GTA GAT CTT CAG TGA TGG TGA TGG TGA TGG TAC TCC CGG GTT TTA CCC A-3') で増幅した。N 末端領域を欠損した ORF2 をコードする遺伝子はプライマー

Yamagu11 ORF2 112F (ClaI) (5' -GTA TCG ATC ACC ATG GCT GTG GCT CCG GCC CCT-3') と

Yamagu11 ORF2 660R-His (5' -GTA GAT CTT CAG TGA TGG TGA TGG TGA TGG TAC TCC CGG GTT TTA CCC A-3') で増幅した。増幅した遺伝子は *ClaI* と *BgIII* で切断した後、pCAGGS/MCS の *ClaI* と *BgIII* サイトに挿入した。得られた発現プラスミドを 293T 細胞にポリエチレンイミンを用いてトランスフェクションした。発現の確認は抗 His-Tag 抗体で行った。トランスフェクション細胞は RIPA によって 4°C 1 時間処理した後、15000 回転 4°C 30 分間遠心して上清を回収して、ELISA 抗原として用いた。

HEV 抗体の検出：トランスフェクション細胞の抽出抗原を 5 μ g/ml に希釈した後、100 μ l を各ウェルに接種して ELISA を行った。ブロッキング液および抗原希釈液にはブロックエースを用いた。血清は 1 : 100 に希釈し、二次抗体にはペロキシターゼ標識 ProteinA/G を 1 : 10000 希釈して用いた。発色には Bio-Rad のパーオキシダーゼ基質キットを用いた。

3) イノシシおよびシカの腎臓からレプトスピラ遺伝子検出

サンプル：2013 年に中国地方で捕獲されたイノシシ 52 頭、シカ 61 頭の腎臓を供試した。

レプトスピラ遺伝子検出：マルチビーズショッカーを用いて粉碎した腎臓から DNeasy Blood &

Tissue Kit を使用し DNA 抽出した。得られた DNA をもとにプライマー OmpL1-Pr.1 と OmpL1-Pr.2 で First PCR を実施し、プライマー OmpL1-IN-F1 と OmpL1-IN-R1 で Second PCR を実施した。陽性が疑われるサンプルは塩基配列を決定し、最終的に判定した。また得られた塩基配列をもとに系統樹を作成した。

4) ブルセラに対する急速凝集反応

血清：中国地方で 2009 年から 2012 年にかけて捕獲されたイノシシ 109 頭とシカ 115 頭の血清を用いた。

急速平板凝集試験：家畜伝染病予防法に則り、ブルセラ・メリテンシスを抗原とした急速平板凝集試験を実施した (ブルセラ急速診断用菌液、化血研)。国際単位 30 単位以上を陽性と判定した。

5) 日本脳炎に対する抗体保有状況の調査

血清：中国地方で 2009 年から 2011 年にかけて捕獲されたイノシシ 63 頭と近畿地方で 2008 年から 2011 年にかけて捕獲されたイノシシ 33 頭とシカ 25 頭の血清を用いた。

80 % プラーク減数中和試験：JEV/sw/Chiba/88/2002 株を用いて 80% プラーク減数試験により中和抗体価を測定した。10 倍以上の抗体価を暫定的に陽性と判定した。

6) 日本脳炎ウイルスをモデルとして全ての動物種での抗原検出および抗体検出系の作出

血清：

1) JEV JaOH 株実験感染犬 3 頭の経過血清

2) 中部地方の施設で飼育されているニホンザル 332 頭の血清

3) 近畿地方で捕獲されたユビナガコウモリ 155 頭の血清

4) フィリピンで捕獲されたフルーツコウモリ 381 頭の血清

JEV 抗体の検出：不活化ワクチン抗原 (Beijing01、遺伝子型 III) を抗原として ELISA を行った。ブロッキング液および抗原希釈液にはブロックエースを用いた。二次抗体にはペロキシターゼ標識 ProteinA/G、HRP 標識 Anti-dog IgG、HRP 標識 Anti-dog IgM を用いた。発色には Bio-Rad のパーオキシダーゼ基質キットを用いた。

7) 解体処理の際に認められたイノシシおよびシカの肉眼所見の収集

2012-2013 年度に中国地方で捕獲されたイノシシおよびシカの解体処理に同伴し、正常および異

常所見を全て写真撮影し収集した。

(倫理面への配慮)

イノシシ・シカに関しては、狩猟期に捕獲あるいは有害鳥獣として捕獲されたものについて調べた。コウモリに関しては、都道府県知事の許可およびフィリピン政府の許可を得ている。

C. 研究結果

1) イノシシにおけるオーエスキーウイルスの感染状況の調査

3 都道府県中 2 都道府県で捕獲された計 6 頭のイノシシにオーエスキー病に対するウイルス中和抗体が存在した。一方、陽性個体が存在しない都道府県も存在した (表 1)。

ELISA によりウイルス中和抗体保有のイノシシ 6 頭はすべて gE に対する抗体を保有していた。このことは、イノシシがワクチン株ではなく野外株に感染していることを示している (表 2)。

2) E 型肝炎ウイルスのイノシシにおける疫学調査

近畿地方のイノシシ 71 頭はすべて陰性であると考えられた (図 3)。吸光度の平均値は 0.099 で標準偏差は 0.075 であった。そのため、平均値 + 3x 標準偏差である 0.324 を Cut-off 値とした。近畿地方のイノシシはすべて陰性になった。一方、中国地方のイノシシは 0.324 を超える多くの個体が認められた (図 3)。113 頭中 47 頭 (42%) が陽性となった (表 3)。性別や体重別には有意差は認められなかったが、体重が軽い個体の陽性率は低い傾向が認められた (表 3)。

血清からの遺伝子検出を試みた結果、112 頭中 4 頭 (4%) から HEV の遺伝子が検出された (表 3)。性別には有意差が認められなかったが、体重別では逆に体重が軽い個体から遺伝子が検出される経口があった (表 3)。得られた 5 検体の遺伝子から系統樹解析を行ったところ、中国地方のイノシシから検出された遺伝子は 2011 年に下関で発生した E 型肝炎患者から検出された遺伝子とともに新たなクラスターを形成した (図 4)。

簡便ですべての哺乳動物から HEV 抗体検出法の確立

これまで用いていた HEV 抗体検出用の ELISA 抗原は昆虫細胞で大量発現させたウイルス様粒子 (VLP) を精製したものであった。我々の実験の段階で精製度の低い VLP を用いると、非特異反応が高くなった。そこで、より簡便に、ロット差のない抗原の作製を試みた。HEV のカプシドタンパク (ORF2) 発現細胞を作出するために、全長の 1-660 アミノ酸と N 末端領域を欠損させた 112-660 アミノ酸を発現する発現プラスミドを作製し、293T 細

胞にトランスフェクションして、抗原の調整を試みた。C 末端領域に結合させた His-Tag に対する抗体を指標にウェスタンブロット解析を行った結果、全長と N 末端領域を欠損させた ORF2 タンパクともに発現が確認された (図 5)。しかし、これまでの報告と同様で、全長の発現量が極端に少ないことから、N 末端を欠損した ORF2 タンパク (11-660aa) を以下の実験に用いることとした。

まず、高度精製 VLP と我々が調整した発現タンパクの反応性を中国地方のイノシシの血清を用いて比較した結果、完全に検査結果が相関していた (図 6)。これは、我々が調整した発現タンパクは高度に精製された VLP と同等の抗原性を有していることが示された。この結果、非常に簡便に HEV 抗原が調整できるようになった。以下の実験では、発現細胞抽出物を ELISA 抗原として用いることとした。

次に、野生動物用の二次抗体は市販されていないものも多い。そこですべての哺乳動物の抗体に結合すると考えられる HRP 標識 ProteinA/G を二次抗体として用いた。イノシシの抗体を検出するために使用していた抗ブタ IgG 抗体やシカのための抗シカ IgG 抗体と比較した結果、ProteinA/G を用いた結果は、これまで使用していた二次抗体との反応性に違いが認められなかった (図 7)。以上の結果から、今後の哺乳動物由来抗体の検出には ProteinA/G を用いることとした。

発現タンパクと ProteinA/G を用いた ELISA による HEV 抗体保有率の調査

中国地方のイノシシ 76 頭中 23 頭 (30%)、九州地方のイノシシ 46 頭中 10 頭 (22%)、関東地方のイノシシ 152 頭中 12 頭 (8%) に HEV 陽性が認められた (表 4)。一方、中国地方のシカは 209 頭中 1 頭 (0.5%) であった (図 7、表 4)。

中国地方のイノシシの、HEV 抗体保有率を月別に比較した結果、11-1 月にかけての陽性率が高い傾向が認められた (表 5)。

HEV 遺伝子の検出を行った結果、中国地方のイノシシ 167 頭中 6 頭 (3.6%) から HEV 遺伝子が検出された (表 6)。九州地方や関東地方のイノシシの血清からは HEV 遺伝子は検出されなかった。中国地方のイノシシの肝臓 51 頭からも HEV 遺伝子の検出を試みているが、現在のところ、検出されていない (表 6)。201 頭のシカの血清を調べた結果、1 頭 (0.5%) だけが遺伝子陽性となった (表 7)。シカの肝臓からは今のところ遺伝子は検出されていない (表 7)。中国地方のイノシシとシカから検出された計 7 サンプルの遺伝子を用いて系統解析を実施した結果、すべてが下関の患者から検出された遺伝子とともに一つのクラスターを形成した (図 8)。このことは、イノシシ、シカ、ヒトに感染し

た HEV はすべて同一の由来であることが証明された。

3) イノシシおよびシカの腎臓からレプトスピラ遺伝子検出

腎臓から抽出された DNA からレプトスピラの OmpL1 遺伝子を nested PCR を実施した結果、イノシシ 52 頭中 12 頭 (23%) およびシカ 61 頭中 2 頭 (3%) からレプトスピラ遺伝子が検出された (表 8)。得られた PCR 産物から 3 個の遺伝子を検出した結果、イノシシから取れた遺伝子は *Ichterohaemorrhagiae* と *Australis*, *Hardjo* などに近い 2 タイプの遺伝子が検出された。シカから検出された遺伝子は *Canicola*, *Hardjo*, *Hebdomadis* などに近い遺伝子であった (図 8)。

4) イノシシとシカのブルセラ菌感染状況の調査

2007 年に広島県で乳牛にブルセラ菌が感染していることが報告されている。そこで、同じ中国地方のイノシシとシカにおけるブルセラ菌の感染状況の調査を実施した。スクリーニングとして、*Brucella Melitensis* を抗原として用いたブルセラ急速平板凝集試験を実施した。その結果、イノシシ 109 頭、シカ 115 頭全てが国際単位 30 単位未満であり、陰性と判定された (表 9 左)。

5) 日本脳炎ウイルスの疫学調査

国内における人での日本脳炎患者の発生は減少しているものの、2010 年愛知県で 2011 年宮崎県の牛での報告が報告されている。また、隣国の韓国では 2010 年に 26 名の患者と 7 名の死者を出している。最近の JEV の感染状況を調査する目的でシカとイノシシにおける感染状況の調査を実施した。その結果、近畿地方のイノシシは 67%、シカは 92% が陽性であり、中国地方のイノシシは何と 98% が陽性となった (表 9 右)。

6) 日本脳炎ウイルスをモデルとして全ての動物種での抗体検出系の作出

犬での検出系の確立

ヒトと同じ生活空間を共有しており、ヒトへの感染リスクを調べる上で有用な犬での日本脳炎ウイルスに対する抗体検出系を抗イヌ IgG 抗体と抗イヌ IgM 抗体を用いた場合と ProteinA/G を用いた場合を比較した。JEV JaOH 株を実験感染したビーグル犬 3 頭の経過血清を調べた結果、抗イヌ IgG 抗体と同等以上の検出感度であった (図 9)。

サルでの検出系の確立

ヒトと同様に霊長類であるサルでの日本脳炎ウイルス検出系の有用性を検討した結果、中和抗体

と有意に相関していた。そのため、中部地方のサルでの抗体陽性率を調べた結果、332 頭中 146 頭 (44%) が抗体陽性であることが判明した (図 10)。雌雄差は認められなかったが、年齢別では年齢が上がるにつれて陽性率が有意に上昇した (図 10)。この飼育施設には、国内の様々な場所からサルが導入されてきているため、純粋の中部地方のサルの陽性率が判明しないことから、本施設で産まれたサルに焦点を絞って解析した。その結果、131 頭中 35 頭 (27%) が陽性で、年齢別に分けた結果、0-3 歳は 14%、4-7 歳は 44%、8 歳以上は 74% が陽性であった (表 10)。年平均感染率は、一度感染したら一生抗体が持続すると仮定して算出した。その結果、中部地方のサルは、年平均 13% が感染していることが判明した (表 10)。

コウモリでの検出系の確立

コウモリは日本脳炎ウイルスの増幅動物である可能性が示唆されている。コウモリの日本脳炎ウイルス抗体保有率を調査した結果、和歌山県で捕獲されたユビナガコウモリ 155 頭中 142 頭 (92%) に日本脳炎の陽性が認められ、フィリピンの食果コウモリ 381 頭中 136 頭 (36%) に陽性個体が存在した (表 11)。フィリピンのオオコウモリを種別に分類した結果、ジョフロアルーセットオオコウモリの 90% が日本脳炎ウイルスに対する抗体要請であった (表 12)。地域別で分類した結果、ミンダナオ島のオオコウモリの 77% が日本脳炎ウイルスに陽性であった (図 11)。

7) 肉眼病変の収集

解体処理時に見出される異常所見の収集を目的として、中国地方でイノシシおよびシカが解体される際に同伴し、正常および異常所見を含めて肉眼所見の収集を行った (別途添付)。豚胃虫、肝蛭、白斑、出血斑、水疱、肝の寄生虫、ドロレス顎甲虫などの病変部を記録した。

D. 考察

1) イノシシにおけるオーエスキー病ウイルス感染状況の調査

オーエスキー病ウイルスはブタと同様にイノシシに潜伏感染すると考えられているため、PRV に対する抗体陽性イノシシの体内にはオーエスキー病ウイルス野生株が潜伏感染していると考えられる。このことは、ブタでの清浄化に成功している地域においても、PRV を体内に保持したイノシシが存在していることを意味しており、養豚関係者はイノシシとブタとの接触に関しては特に注意が必要であることを示唆している。更には、狩猟関係者においては、イノシシの生肉を猟犬などに与えないことが重要となる (まとめ-1)。

今後は、生産動物を予防するためにも野生動物の感染症の監視も重要である。

2) E 型肝炎ウイルスの疫学調査

中国地方のイノシシにおける E 型肝炎ウイルス感染状況

中国地方のイノシシに高い抗体保有率が存在し、4%のイノシシが血液中にウイルスを保有していることが判明した(まとめ-2)。また、イノシシから検出された遺伝子は 2011 年のヒトの患者から検出された遺伝子と非常に似ていた。そのことは、イノシシに感染している E 型肝炎ウイルスにヒトが感染したことを示している。更には、血液にウイルスが検出されるということは、筋肉を含め全身にウイルスが拡がっている可能性がある。

以上のことから、中国地方のイノシシは非常に高率に E 型肝炎ウイルスに感染しており、ヒトへの病原性も強いことが判明した。狩猟をしているヒトは血液の取扱に注意すること、イノシシ肉を消費するヒトは生食を厳禁であることが改めて示された。

簡便ですべての哺乳動物から HEV 抗体検出法の確立

精製度の高い VLP を準備するのは労力と時間がかかるため、より簡便な ELISA 抗原抽出方法を試みた結果、E 型肝炎ウイルスの ORF2 の 112-660 アミノ酸を発現する発現プラスミド pCAGGS-HEVORF2 (112-600) をトランスフェクションした 293T 細胞からの抽出物が、高度精製 VLP とほぼ同等であることが示された。更に、野生動物では二次抗体が存在しないことも多いが ProteinA/G を用いることにより、それぞれの動物種に特異的な二次抗体を準備する必要がなく、すべての哺乳動物に対して有効であることが示された。

簡便かつ網羅的な HEV 抗体検出法を用いたイノシシとシカの疫学調査

中国地方のイノシシは 30%陽性であったのに対して、九州地方のイノシシは 22%、関東のイノシシは 8%と低かったが、日本全国のイノシシに E 型肝炎のリスクがあることが確認された(まとめ-3)。しかし、HEV 遺伝子の検出率は中国地方が 4%であるのに対して、九州地方と関東地方では未だ HEV 遺伝子は検出されていないことは、やはり、中国地方のイノシシの陽性率は高いのかも知れない。中国地方のイノシシの月別陽性率を比較した結果、11 月以降に抗体陽性率が高くなっていることから、秋頃にイノシシは HEV に感染している可能性が示唆された。今後この季節性についてより詳細に検討する必要がある。

中国地方のイノシシが 30%であったのに対して、シカは 0.5%の抗体保有率であり、遺伝子検出率も 0.5%であった。シカから検出された遺伝子もイノシシから検出された遺伝子と同様にヒトの患者から検出された遺伝子に類似していた。このことは、シカに感染している E 型肝炎ウイルスもヒトに病気を引き起こす可能性を示している。

重要なことは、シカはイノシシほど E 型肝炎のリスクが高くないことを示している(まとめ-3)。しかし、感染していることも事実であるので、注意が必要である。

3) イノシシおよびシカの腎臓からレプトスピラ遺伝子検出

イノシシの 4 分の 1 にレプトスピラの遺伝子が検出され、シカの 3%にもレプトスピラの遺伝子が検出された。レプトスピラは傷口から侵入することも多いので、イノシシ・シカの尿に注意する。また、尿からレプトスピラが排出され、生息域の土壌および河川の下流が汚染されている可能性があるので注意を要する(まとめ-4)。

病原性に関しては不明な点も多いが、中国地方の同一生息域に住むイノシシ・シカから様々な遺伝子のレプトスピラが検出されたことは、この地域におけるレプトスピラによる病気に関しても注意が必要である。

4) イノシシとシカのブルセラ菌感染状況

中国地方のイノシシとシカにブルセラ菌が蔓延している結果は得られなかった。

5) 日本脳炎ウイルスの疫学調査

中国地方の多くのイノシシに JEV が感染していることが示された。このことは、JEV が未だに国内で蔓延していることを示している。また、近畿地方のシカにも感染していること、牛での発症が認められることから反芻獣における感染状況の把握は、感染状況の変化のみならず病原性の変化についても注意が必要であることを意味している。

6) 日本脳炎ウイルスをモデルとして全ての動物種での抗原検出および抗体検出系の作出

ProteinA/G はすべての哺乳類のイムノグロブリンに結合するといわれている。ブロッキングと抗体希釈液にはブロックエースを使用した。その結果、イヌ・サル・コウモリで有効であることが証明された。サルからは中部地方で年平均感染率が 13%であることが確認され、未だヒトへの感染のリスクが高いことが証明された。コウモリからはコウモリの感染率が高いことが再確認され、増幅動物である可能性も否定できない。

この研究で重要なことは、すべての哺乳動物で有用な抗体検出系が確立されたことであり、E型肝炎の検出系でも確認されたように、発現細胞を用いることにより、様々な感染症の疫学調査が野生動物で可能になると信じている。

7) 肉眼病変の収集

本研究班の主題である野生動物の食肉利用の際に、可能な限り早期に解体処理、可能な限り低温を維持、食用の際は十分な加熱という絶対条件以外に、解体処理の際、危険部位の除去が必要となる。食肉処理の際参考となる病変の肉眼所見の収集を行った。かなりのデータが集積されたと信じている。

E. 結論

- ・ イノシシはブタやその他の動物に危険なオースキー病ウイルスを保有
- ・ イノシシのE型肝炎ウイルスは全国共通であるとの認識が必要
- ・ シカはイノシシに比べてE型肝炎のリスクは少ない。
- ・ イノシシ・シカとも野生動物肉の生食は厳禁
- ・ 猟犬にも生肉をあげるのは危険
- ・ 野生動物の尿から排泄されるレプトスピラに汚染される土壌や河川には注意が必要
- ・ すべての哺乳動物に対する抗体検出系の確立に成功
- ・ 解体処理の際に役立つ病変写真の整備

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hara Y, Terada Y, Yonemitsu K, Shimoda H, Noguchi K, Suzuki K, Maeda K*. High Prevalence of Hepatitis E Virus in Wild Boar in Yamaguchi Prefecture, Japan. *Journal of Wildlife Diseases* (In press)

Makouloutou P, Setsuda A, Yokoyama M, Tsuji T, Saita E, Torii H, Kaneshiro Y, Sasaki M, Maeda K, Une Y, Hasegawa H, Sato H. Genetic variation of *Gongylonema pulchrum* from wild animals and

cattle in Japan based on ribosomal RNA and mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I genes. *Journal of Helminthology* 2013 87, 326-335.

Nakashima T, Kubo M, Oshita A, Katayama A, Suzuki K, Maeda, K. Complex carcinoma of the mammary gland in a free living Japanese raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides viverrinus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 2013 44(3): 749-752.

Shimoda H, Mahmoud HYAH, Noguchi K, Terada Y, Takasaki T, Shimojima M, Maeda K*. Production and characterization of monoclonal antibodies to Japanese encephalitis virus. *Journal of Veterinary Medical Science* 2013 75(8):1077-1080.

Shimoda H, Inthong N, Noguchi K, Terada Y, Nagao Y, Shimojima M, Takasaki T, Rerkamnuaychoke W, Maeda K*. Development and application of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for serological survey of Japanese encephalitis virus infection in dogs. *Journal of Virological Methods* 2013 Jan;187(1):85-89.

Sakai M, Ohno R, Higuchi C, Sudo M, Suzuki K, Sato H, Maeda K, Sasaki Y, Kakuda T, Takai S. Isolation of *Rhodococcus equi* from wild boars (*Sus scrofa*) in Japan. *Journal of Wildlife Diseases* 2012 July; 48(3):815-817.

Mahmoud HYA, Suzuki K, Tsuji T, Yokoyama M, Shimojima M, Maeda K*. Pseudorabies virus infection in wild boars in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 2011. 73(11): 1535-1537.

前田 健:「シカ肉処理の注意点1ーウイルス・細菌-」*Journal of Veterinary Medicine* (獣医畜産新報)(文永堂)2012 65(6):469-473.

Shimoda H, Nagao Y, Shimojima M, Maeda K*: Viral infectious diseases in wild animals in Japan. *Journal of Disaster Research* 2012. 7(3): 289-296.

2. 学会発表

Hiroshi Shimoda, Natnaree Inthong, Masayuki Shimojima, Tomohiko Takasaki, Worawut Rerkamnuaychoke, Ken Maeda. Establishment of

an enzyme-linked immunosorbent assay for sero-survey of Japanese encephalitis virus among dogs and its application. American Society for Virology 31st Annual Meeting (Madison, USA) 2012. July 21-25.

Shimoda H, Tamaru S, Shimojima M, Maeda K. Dogs are good sentinels for Japanese encephalitis virus infection in rural/residential areas. IUMS 2011 Sep 15 (Sapporo, Japan) 2011.

岡林佐知, 大野智恵子, 濱野正敬, 成松浩志, 小寺祐二、竹田 努、前田 健、浅川満彦、小野文子、門平睦代、高井伸二、吉川泰弘「地域別食用野生イノシシの病理組織学的検索」第19回 日本野生動物医学会 2013年8月29日～9月1日(京都)

佐鹿 万里子, 阿部 豪, 郡山 尚紀, 前田 健, 坪田 敏男「北海道のエゾタヌキにおけるイヌジステンパーウイルス感染に関する疫学調査」第29回日本霊長類学会・日本哺乳類学会 2013年度合同大会 2013年9月6日～9日(岡山)

大松 勉、酒井宏治、前田 健、片山幸枝、萩原、克郎、下田 宙、鈴木和男、遠藤大二、永田典代、佐々悠木子、長井 誠、古谷哲也、森川 茂、水谷哲也「野生イノシシから分離された新規ラプトウイルスの系統解析」第156回日本獣医学会学術集会、岐阜、2013年9月20日

下田 宙、木村菜穂、齋藤 暁、明里宏文、Natanree Inthong、Worawut Rerkamnuaychoke、下島昌幸、前田 健「飼育動物から知る日本脳炎感染リスク」第19回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会(大阪)グランキューブ大阪 2012年11月12日

下田 宙、高橋 慧、高崎智彦、近藤高志、下島昌幸、前田 健「日本脳炎ウイルス遺伝子型1に対する単クローナル抗体の作成と性状解析」第154回日本獣医学会学術集会(岩手)岩手大学 2012年9月15日

原 由香、寺田 豊、鈴木和男、沖田幸祐、下島昌幸、沖田 極、前田 健「イノシシにおけるE型肝炎ウイルス感染状況の調査」第154回日本獣医学会学術集会(岩手)岩手大学 2012年9月15日

下田 宙、木村菜穂、齋藤 暁、明里宏文、Natanree Inthong、Worawut Rerkamnuaychoke、下島昌幸、前田 健「動物から知る日本脳炎ウイルス感染のリスク」第27回中国四国ウイルス研究会(米子)米子コンベンションセンター2012年6月24日

原 由香、寺田 豊、鈴木和男、沖田幸祐、下島昌幸、沖田 極、前田 健「下関市のイノシシにおけるE型肝炎ウイルス感染状況調査」第27回中国四国ウイルス研究会(米子)米子コンベンションセンター2012年6月24日

下田 宙、高橋 慧、高崎智彦、近藤高志、下島昌幸、前田 健「日本脳炎ウイルスに対する単クローナル抗体の性状解析」第47回日本脳炎ウイルス生態学研究会(熊本) 2012.

Hassan YAH Mahmoud, 鈴木和男、下島昌幸、前田 健「イノシシのオーエスキー病ウイルス感染」第153回日本獣医学会学術集会(大宮) 2012.

長尾裕美子、下田 宙、下島昌幸、前田 健「おとり牛における日本脳炎ウイルス感染状況の調査」第46回日本脳炎ウイルス生態学研究会(石川) 2011.

下田 宙、田丸精治、下島昌幸、前田 健「イヌは日本脳炎ウイルスの感染リスクを調査するための優れた対象である」第46回日本脳炎ウイルス生態学研究会(石川) 2011.

下田 宙、田丸精治、木村菜穂、下島昌幸、前田 健「イヌは日本脳炎ウイルス感染の優れた指標」第26回中国四国ウイルス研究会(徳島) 2011.

下田 宙、田丸精治、下島昌幸、前田 健「日本脳炎ウイルスのイヌに対する感染実験：イヌは日本脳炎の安全かつ有用な調査対象」第152回日本獣医学会学術集会(大阪) 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

オーエスキー病の浸潤地域

図1 日本では

オーエスキー病撲滅対策

多くの県でオーエスキー病の清浄化に成功

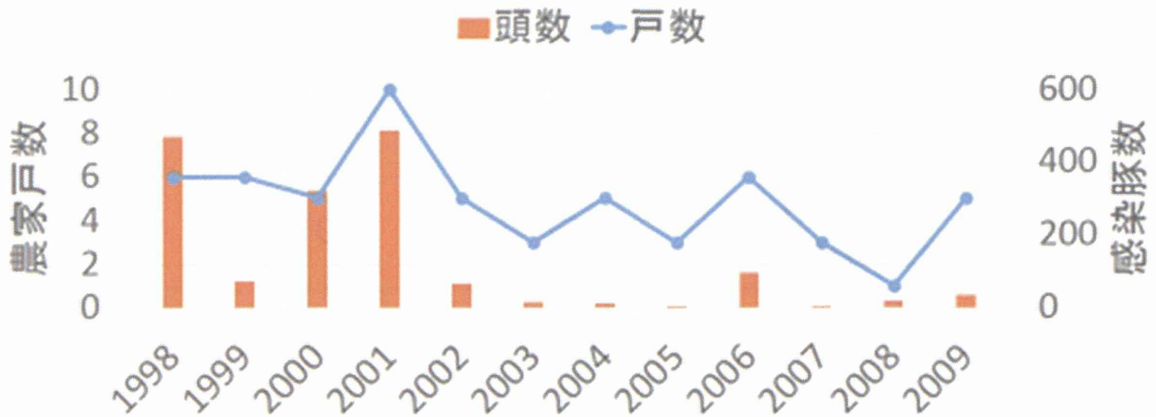
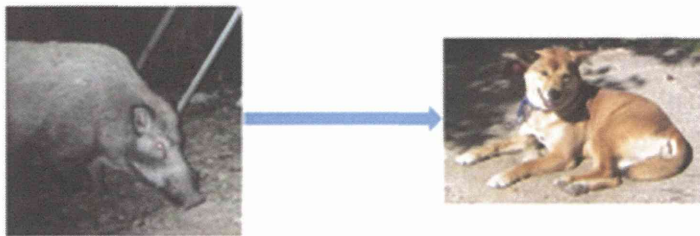


図2 イノシシからイヌへのオーエスキー病ウイルス感染

1997年、奈良県でイノシシの生肉を食べた
猟犬24頭がオーエスキー病感染により死亡



イノシシはオーエスキー病ウイルスの感染源として重要

表1 イノシシのPRVに対する中和抗体保有率

都道府 県名	採材期間	検査 血清数	PRV 陽性数	PRV 陽性率(%)
A	2009.9 -2010.10	50	2	4
B	2007.11 -2010.10	71	4	6
C	2010.1 -2010.12	52	0	0
計		173	6	3

表2 中和抗体価とgEに対する抗体

都道 府県	採取日	性別	体重	gE-ELISA ^a	中和抗 体価
A	2010/11/26	F	65kg	0.04	1:160
A	2010/10/4	F	73kg	0.19	1:80
B	2008/2/15	M	52kg	0.05	1:160
B	2008/2/19	M	53kg	0.19	1:80
B	2010/3/3	M	81kg	0.10	1:40
B	2010/2/16	M	49kg	0.15	1:80

a: ≤ 0.60 ; positive, 0.61-0.70; pseudo-positive, $0.71 \leq$; negative

まとめ-1

豚でのオーエスキー病ウイルスの撲滅に成功している
地域に生息する野生のイノシシに強毒PRV感染

ヘルペスウイルスの特徴から
抗体陽性はウイルスを生体に保持

養豚農家へ注意喚起
イノシシとの接触の機会をなくす

狩猟者へ注意喚起
イノシシの生肉を餌として与えない

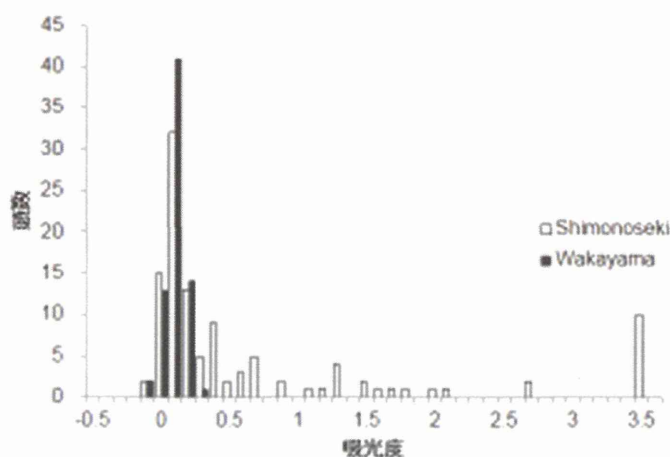


図3 E型肝炎ウイルスに対する吸光度
(中国地方と近畿地方)

表3 中国地方のイノシシにおけるE型肝炎ウイルスに対する抗体保有率と遺伝子検出率

	性別		体重(kg)			合計
	♂	♀	<20	20-50	>50	
ELISA	16/44 ^a (36%) ^b	31/69 (45%)	6/21 (29%)	19/45 (42%)	22/47 (47%)	47/113 (42%)
RT-PCR	2/44 (5%)	3/68 (4%)	2/21 (10%)	1/44 (2%)	2/47 (4%)	5/112 (4%)

^a 陽性頭数/検査頭数.

^b カッコ内は陽性率を示す

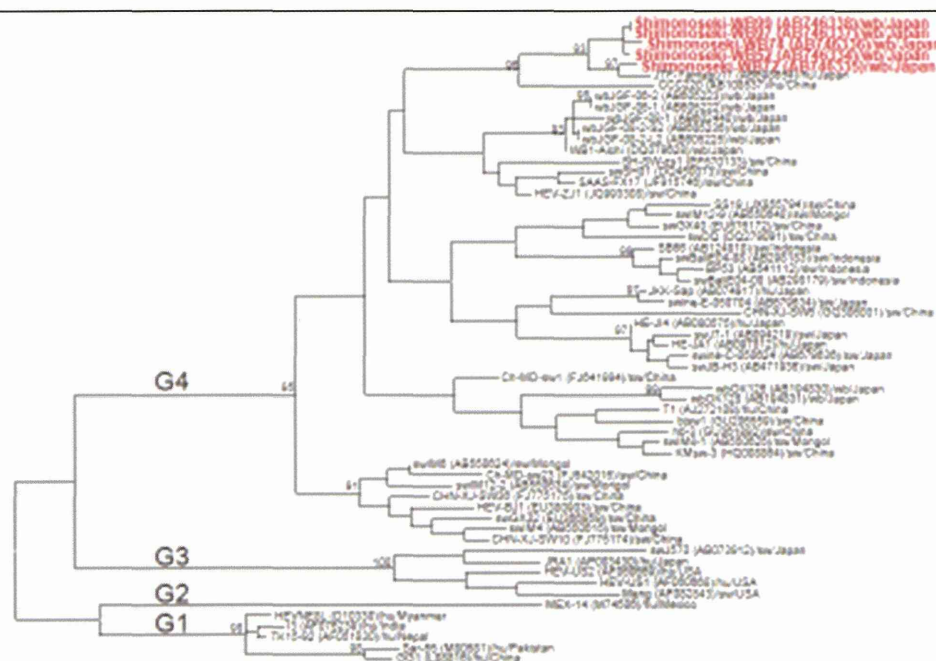


図4 塩基配列に基づいた系統樹解析

イノシシの血清からnested RT-PCRにより陽性になった断片のプライマーを含まない338bp断片の塩基配列をもとに、ML法で系統樹を作成した。中国地方のイノシシ5頭の結果は赤字で示した。

wb: イノシシ, sw: 豚, hu: ヒト.

まとめ-2

- 中国地方のイノシシの40%がHEVに感染の既往歴があった
- 中国地方のイノシシの4%の血液中にHEVが存在していた
- 中国地方のHEV患者はイノシシから感染したことが証明された

• 狩猟をされているヒトへ

中国地方のイノシシは特にE型肝炎の陽性率が高く、4%には血清にウイルスがいることから、解体時の血液に注意する

• イノシシ肉を消費するヒトへ

生食は厳禁！

簡便なHEV抗原の作製法

- ウイルス株: JTF-Yamagu11株 (AB698654)
- 発現プラスミドの作製

プラスミドpCAGGS/MCSのClaI&BglIIサイトに患者血清からQIAamp viral RNA mini kitによりRNAを抽出し、QIAGEN onestep RT-PCR kitにより増幅したORF2遺伝子をクローニング

1-660AAのためのプライマー

Yamagu11 ORF2 1F (ClaI)ver2

GTATCGATCACCATGCGCTCTCGGGCTTT

Yamagu11 ORF2 660R-His

GTAGATCTTCAGTGATGGTGATGGTACTCCCGGGTTTTACCCA

112-660AAのためのプライマー

Yamagu11 ORF2 112F (ClaI)

GTATCGATCACCATGGCTGTGGCTCCGGCCCCCT

Yamagu11 ORF2 660R-His

GTAGATCTTCAGTGATGGTGATGGTACTCCCGGGTTTTACCCA

- 293T細胞にポリエチレンイミンによるトランスフェクション

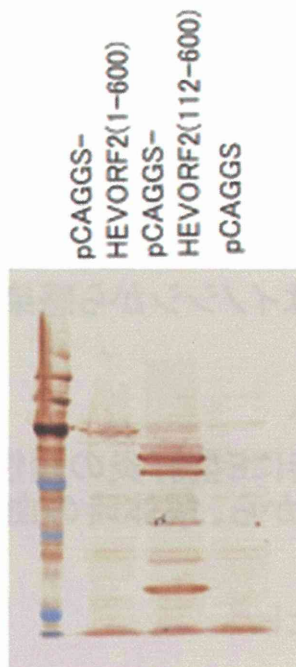


図5 HEV ORF2 タンパク発現と確認

抗His-Tag抗体で発現の確認

簡易ですべての哺乳動物からHEV抗体検出法の確立

- ・サンプル: 中国・関東・九州地方に生息するイノシシ・シカ血清および肝臓
- ・抗HEV抗体の検出: ELISA

抗原	HEV-VLP (1ug/ml)
	↓
	HEV ORF2発現293T細胞 RIPA (5ug/ml)
血清	100倍希釈
二次抗体	anti-swine IgG(1000倍希釈)
	anti-deer IgG(100倍希釈)
	↓
	proteinAG(10000倍希釈)

・HEV遺伝子検出: QIAamp viral RNA mini kitを用いて血清からRNAを抽出、QIAGEN RNeasy mini kit およびマルチピースショッカーを用いて肝臓からRNAを抽出、その後nested PCRによりORF2の遺伝子を増幅し、電気泳動で確認、バンドが見られたらシーケンスを確認