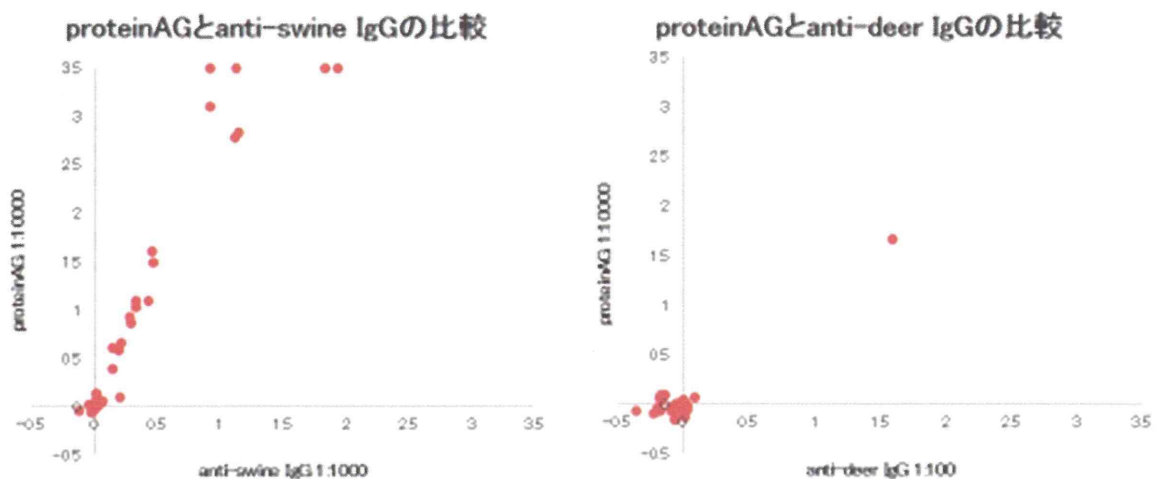


**図6 精製VLPとORF2発現細胞抽出物を用いたELISAの比較(中国地方のイノシシ)**



**図7 二次抗体にproteinAGとanti-swine IgGあるいはanti-deer IgGを用いたELISAの比較**

表4 発現タンパクとProteinA/Gを用いたELISAによるHEV抗体保有率(イノシシとシカ)

イノシシ	中国地方 九州地方 関東地方						シカ	中国地方				
	2012	2013	2011	2012	2011	2012		2009	2010	2011	2012	2013
調査数	44	32	6	40	137	15	調査数	17	43	55	30	64
陽性数	18	5	3	7	8	4	陽性数	0	1	0	0	0
陽性率	41%	16%	50%	18%	6%	27%	陽性率	0%	2%	0%	0%	0%

表5 中国地方のイノシシの月別抗体陽性率の比較

	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	計
2009年度	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	36% (4/11)	25% (1/4)	33% (5/15)
2010年度	-	-	-	-	-	-	-	62% (16/26)	71% (10/14)	-	-	-	60% (24/40)
2011年度	-	-	-	-	-	-	-	10% (1/10)	61% (11/18)	67% (10/15)	33% (2/6)	-	49% (24/49)
2012年度	0% (0/2)	0% (0/1)	-	-	-	0% (0/1)	50% (1/2)	44% (4/9)	40% (4/10)	45% (5/11)	29% (2/7)	100% (1/1)	39% (17/44)
2013年度	0% (0/2)	20% (1/5)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/2)	13% (1/8)	14% (1/7)	33% (2/6)	-	-	-	-	16% (5/32)
計	0% (0/4)	17% (1/6)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/2)	11% (1/9)	22% (2/9)	45% (23/51)	60% (25/42)	62% (16/26)	33% (8/24)	20% (1/5)	42% (75/180)

表6 血清と肝臓におけるHEV遺伝子検出  
(イノシシ)

	中国地方 血清						九州 地方 血清	関東 地方 血清	中国 地方 肝臓
	2009	2010	2011	2012	2013	計	2011- 2012	2011- 2012	2012
調査数	20	42	50	44	11	167	22	88	51
陽性数	0	3	2	1	0	6	0	0	0
陽性率 (%)	0	7	4	2	0	3.6	0	0	0

表7 血清と肝臓におけるHEV遺伝子検出  
(シカ)

	中国地方 血清						中国地方 肝臓		
	2009	2010	2011	2012	2013	計	2012	2013	計
調査 数	17	42	56	51	35	201	14	12	26
陽性 数	0	0	0	0	1	1	0	0	0
陽性 率(%)	0	0	0	0	3	0.5	0	0	0

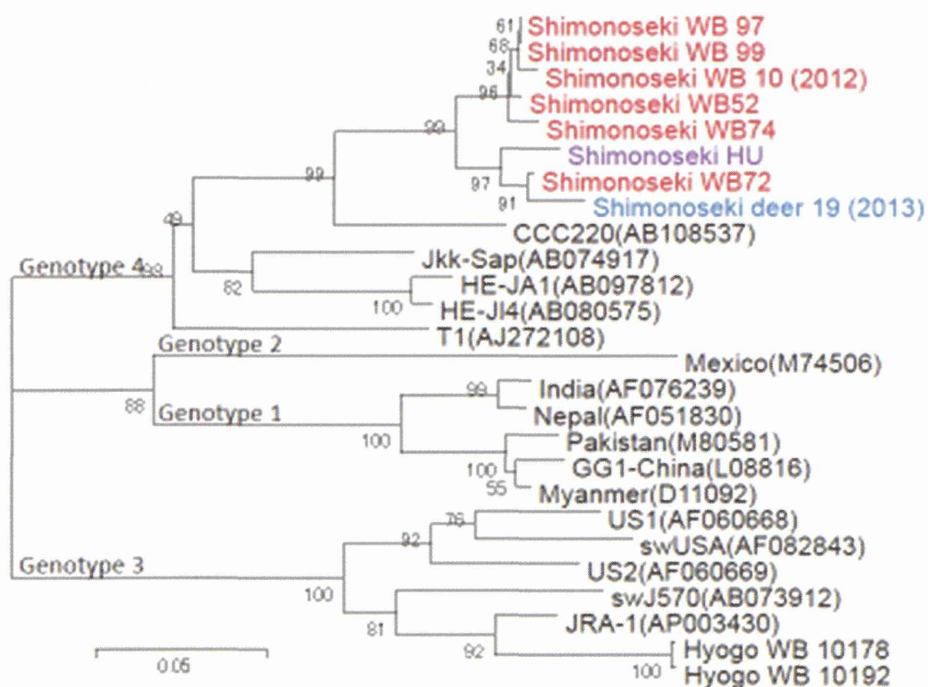


図8 中国地方のイノシシ・シカから検出された遺伝子の系統解析

イノシシ由来株は赤字、シカ由来株は青字、ヒト由来株は紫

### まとめ-3

- 抗原の調整が可能なELISA系の作出に成功
- すべての哺乳動物に応用可能なELISA系の作出に成功
- 中国地方のイノシシの40%がHEVに感染の既往歴があるにも関わらず、シカは0.5%であった。
- 九州地方のイノシシ22%、関東地方のイノシシ8%にHEV感染歴
- 秋に陽性率が高くなる傾向

#### • 狩猟をされているヒトへ

シカよりもイノシシがHEVを保有している可能性が高い

#### • 野生動物肉を消費するヒトへ

鹿肉よりも猪肉により注意

## シカとイノシシの腎臓における レプトスピラ検出率

• サンプル: 中国地方のシカ、イノシシの腎臓から抽出したDNA

• PCR

• TaKaRa Ex Taq

• Cycle

94°C 2min

94°C 1min

55°C 1min

72°C 1.5min

72°C 15min

30cycle

• プライマー

• 1<sup>st</sup> PCR → OmpL1-Pr.1 OmpL1-Pr.2

• 2<sup>nd</sup> PCR → OmpL1-IN-F1 OmpL1-IN-R1

(*L. kirschneri* serovar grippotyphosaのOmpL1遺伝子配列を基に作成したプライマー)

表8 イノシシとシカの腎臓におけるレプトスピラ遺伝子の検出

	検査頭数	陽性頭数(%)
イノシシ	52	12 (23%)
シカ	61	2 (3%)

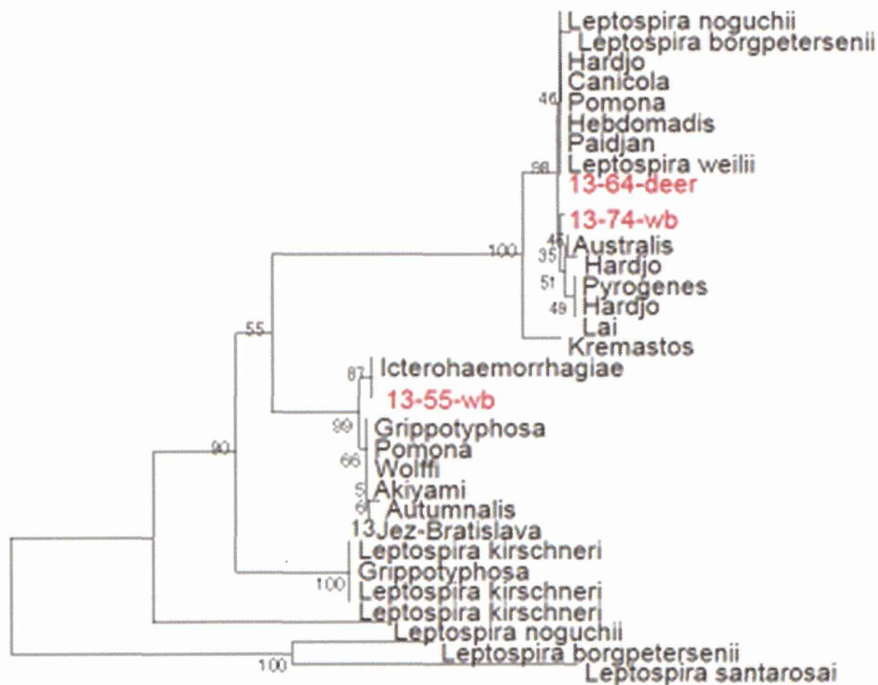


図8 イノシシとシカから検出されたレプトスピラ  
遺伝子に基づく系統解析

wb: イノシシ由来、deer:シカ由来、中国地方で検出された遺伝子は赤字

## まとめ-4

- イノシシの23%、シカの3%の腎臓からレプトスピラ遺伝子の検出
- 中国地方のイノシシには、遺伝子型1と2の両方が存在

### • 狩猟者の方への注意！

イノシシやシカの尿中にレプトスピラが出ている可能性  
傷口から侵入するので、注意！

### • 一般の方への注意！

イノシシやシカの生息地と川の下流にはレプトスピラがいる可能性  
イヌや子供の水遊びに注意！



## ブルセラと日本脳炎を調べる意義

### 2009年広島び牛にブルセラ病

#### 発生の概要●

#### ◆ 発生場所

広島県庄原市搾乳牛40頭飼養

#### ◆ 経過

9/27広島県の定期検査にてブルセラ病の疑いがある1頭を発見。(他の39頭は陰性)

9/29確定診断検査にてブルセラ病患者畜と確定。

### 2010年愛知県の牛で日本脳炎

牛での国内の発生報告数は、1951年に1頭、1952年に3頭、1955年に1頭および1996年に1頭のみとなっている。

今回、愛知県内の114ヶ月齢の繁殖和牛を、日本脳炎と診断

表9 ブルセラと日本脳炎に対するイノシシとシカにおける抗体保有率

	ブルセラ(急速凝集反応) (中国地方)		日本脳炎 (近畿地方&中国地方)			
	イノシシ	シカ	近畿地方		イノシシ (中国地方)	
			イノシシ	シカ		
検体数	109	115	検体数	33	25	63
陽性数 (30単位以上)	0	0	陽性数	22	23	62
陽性率	0%	0%	陽性率	67%	92%	98%

## 犬におけるProtein A/Gの有用性

### 間接ELISA

抗原： 不活化ワクチン抗原 (Beijing01、遺伝子型Ⅲ)

一次抗体： JEV実験感染犬の血清(x500)

二次抗体：HRP標識 Anti-dog IgG (x10000)

HRP標識 Anti-dog IgM (x10000)

HRP標識 Protein A/G (x10000)

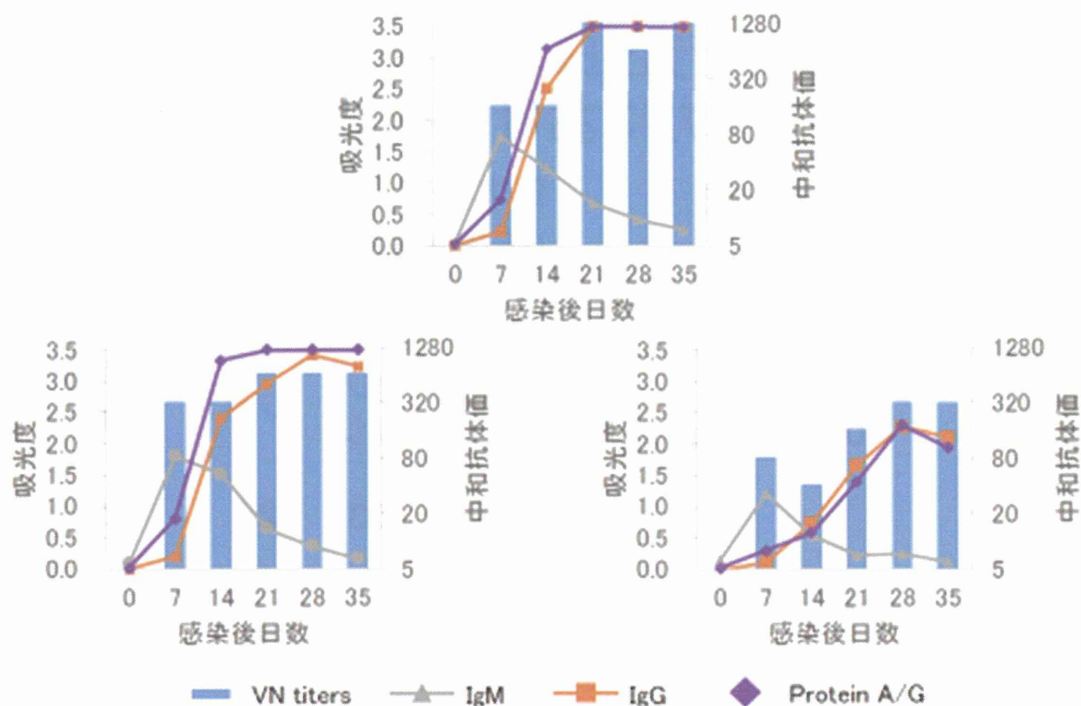


図9 JEV実験感染犬を用いたELISAの条件設定



## 猿における調査

### ELISA

抗原： 不活化ワクチン抗原 (Beijing01、遺伝子型Ⅲ)

一次抗体：中部地方で採取された332頭の猿の血清  
(x100)

二次抗体：HRP標識 Protein A/G (x20000)

### Cut-off値の設定

母親の中和抗体価が1:10未満の0歳齢(18頭)から算出

平均： 0.123 } 3S.D.= 0.444  
S.D.: 0.107 }

	性別		計
	オス	メス	
検査頭数	111	221	332
陽性頭数	48	98	146
陽性率 (%)	43	44	44

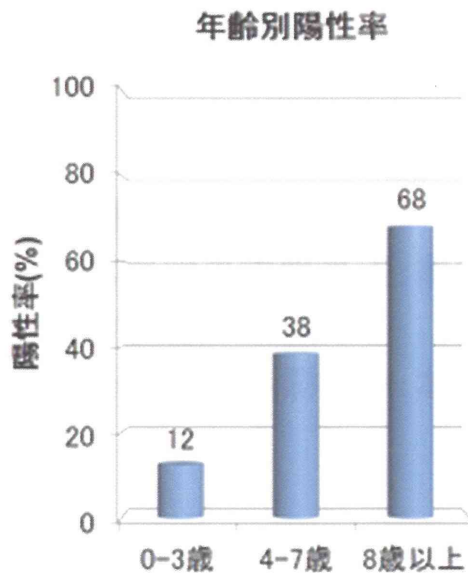


図10 中部地方の猿におけるJEV抗体保有率(全体)

表10 中部地方の猿(同一飼育施設で誕生・飼育)におけるJEV抗体保有率

	性別		年齢			計
	オス	メス	0-3歳	4-7歳	8歳以上	
検査頭数	51	57	91	18	19	131
陽性頭数	16	18	13	8	14	35
陽性率 (%)	31	33	14	44	74	27
年平均感染率 (%)	15	12	-	-	-	13

※年平均感染率は1度感染したら一生抗体が持続すると仮定して算出

## コウモリにおける調査

### ELISA

抗原: 不活化ワクチン抗原 (Beijing01、遺伝子型Ⅲ)

一次抗体: 近畿地方で採取されたコウモリの血清(155頭)  
フィリピンで採取されたコウモリの血清(381頭) } x100

二次抗体: HRP標識 Protein A/G (x20000)

### Cut-off値

暫定的にS/N比が2以上の個体を陽性

表11 コウモリにおける日本脳炎ウイルス  
抗体保有率(ELISA)

	ユビナガコウモリ 近畿地方(2012-2013)			食果コウモリ フィリピン(2007-2013)			
	オス	メス	計	オス	メス	不明	計
検査頭数	70	85	155	165	196	20	381
陽性頭数	63	79	142	61	67	8	136
陽性率(%)	90	93	92	37	34	40	36

※S/N比>2.0の個体を陽性とした

表12 フィリピンのコウモリにおける  
JEV抗体陽性率(種別)

種	検査頭数	陽性頭数	陽性率(%)
コイヌガオ フルーツコウモリ	132	14	11
ピロード フルーツコウモリ	104	12	12
ジョフロワルーセット オオコウモリ	105	94	90
その他	40	16	40
計	381	136	36

※S/N比>2.0の個体を陽性とした



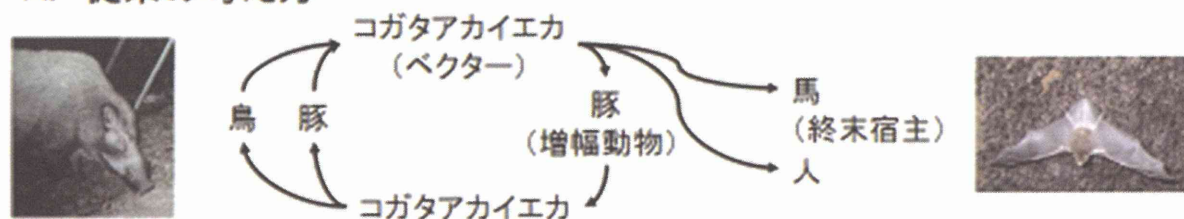
地域	検査頭数	陽性頭数	陽性率
マニラ	85	8	9%
ラグーナ	121	17	14%
ケソン	54	20	37%
ミンダナオ島	114	88	77%
パナイ島	7	3	43%



※S/N比>2.0の個体を陽性とした

図11 フィリピンのコウモリにおけるJEV 抗体保有率(地域別)

A. 従来の方



B. 最近の方

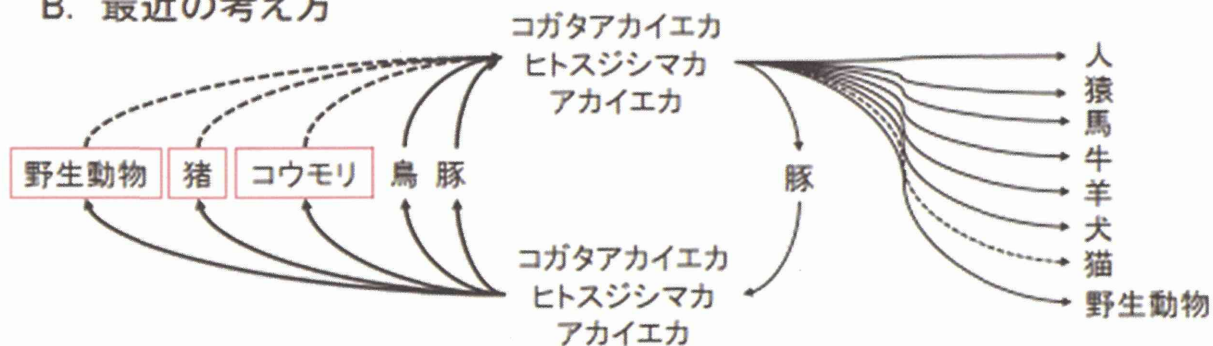


図12 JEVの感染環における野生動物の役割

## まとめ-5

- Protein A/Gを用いたELISA系の確立に成功
- 中部地方の猿において年間平均感染率が13%で、6歳では58%が感染する計算
  - 同じ霊長類である人にも感染のリスク
  - 人で発症報告が少ないのはワクチンの効果
- 多くのコウモリがJEVに感染
  - 増幅動物としての可能性

**イヌ・サル・コウモリを含むすべての  
哺乳類における抗体検出系の確立に成功**



## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
前田 健	シカ肉処理の注意点1 - ウイルス・細菌 -	鈴木正嗣、横山真弓監修	<i>Journal of Veterinary Medicine</i> (獣医畜産新報)	文永堂	東京	2012	65(6):469-473

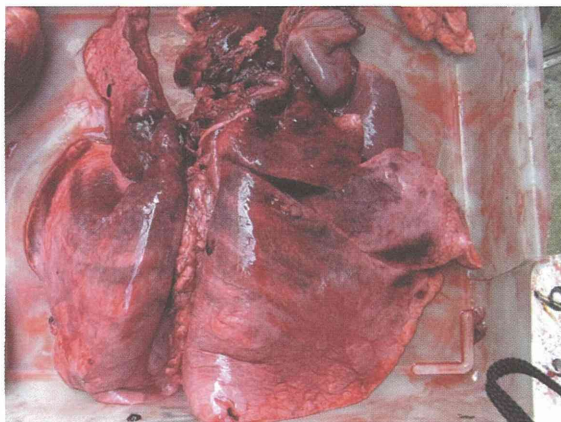
## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hara Y, Terada Y, Yonemitsu K, Shimoda H, Noguchi K, Suzuki K, <u>Maeda K</u> *	High Prevalence of Hepatitis E Virus in Wild Boar in Yamaguchi Prefecture, Japan.	<i>Journal of Wildlife Diseases</i>			In press
Makouloutou P, Setsuda A, Yokoyama M, Tsuji T, Saita E, Torii H, Kaneshiro Y, Sasaki M, <u>Maeda K</u> , Une Y, Hasegawa H, Sato H.	Genetic variation of <i>Gongylonema pulchrum</i> from wild animals and cattle in Japan based on ribosomal RNA and mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I genes.	<i>Journal of Helminthology</i>	87	326-335	2013
Nakashima T, Kubo M, Oshita A, Katayama A, Suzuki K, <u>Maeda K</u> .	Complex carcinoma of the mammary gland in a free living Japanese raccoon dog ( <i>Nyctereutes procyonoides viverrinus</i> ).	<i>Journal of Zoo and Wildlife Medicine</i>	44(3)	749-752	2013

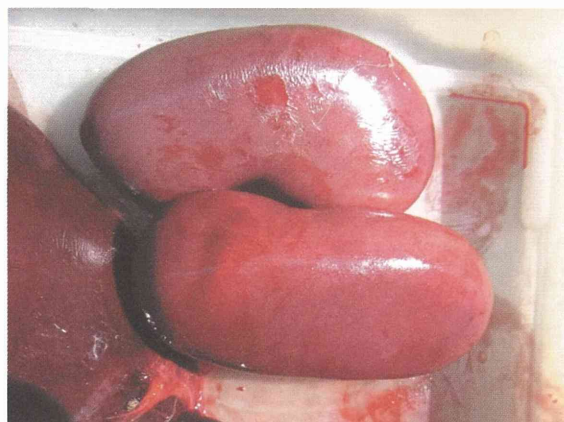
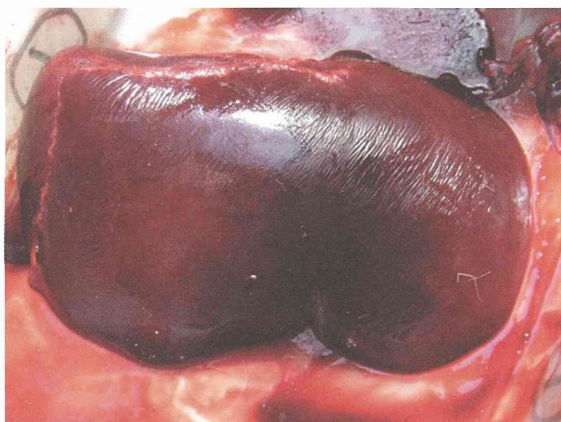
Shimoda H, Mahmoud HYAH, Noguchi K, Terada Y, Takasaki T, Shimojima M, <u>Maeda K*</u>	Production and characterization of monoclonal antibodies to Japanese encephalitis virus.	<i>Journal of Veterinary Medical Science</i>	75(8)	1077-1080	2013
Shimoda H, Inthong N, Noguchi K, Terada Y, Nagao Y, Shimojima M, Takasaki T, Rerkamnuaychoke W, <u>Maeda K*</u>	Development and application of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for serological survey of Japanese encephalitis virus infection in dogs.	<i>Journal of Virological Methods</i>	187(1)	85-89	2013
Sakai M, Ohno R, Higuchi C, Sudo M, Suzuki K, Sato H, <u>Maeda K</u> , Sasaki Y, Kakuda T, Takai S.	Isolation of <i>Rhodococcus equi</i> from wild boars ( <i>Sus scrofa</i> ) in Japan.	<i>Journal of Wildlife Diseases</i>	48(3)	815-817	2012
Shimoda H, Nagao Y, Shimojima M, <u>Maeda K</u>	Viral infectious diseases in wild animals in Japan.	<i>Journal of Disaster Research</i>	7(3)	289-296	2012
Mahmoud HYA, Suzuki K, Tsuji T, Yokoyama M, Shimojima M, <u>Maeda K*</u>	Pseudorabies virus infection in wild boars in Japan.	<i>Journal of Veterinary Medical Science</i>	73(11)	1535-1537	2011



正常組織



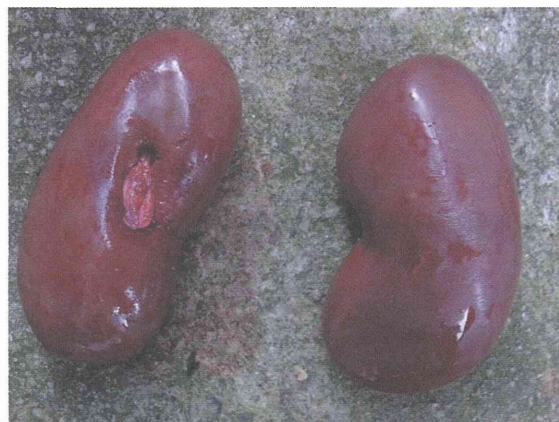
2013/4/28(豊北町)  
シカ、オス、23.5kg、110cm  
肺、肝臓、腎臓



2013/5/5 (豊北町)  
シカ、メス、44kg、推定115cm  
肝臓、腎臓

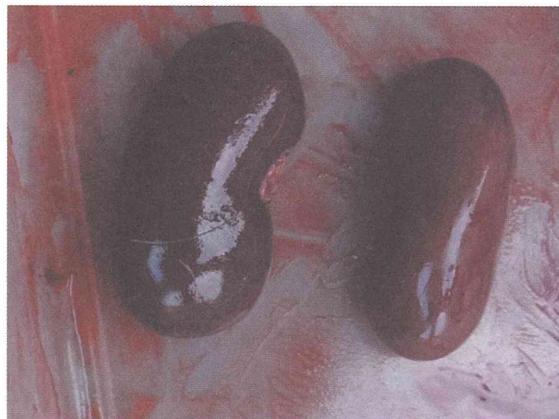


2013/9/14 (豊北町)  
シカ、オス、38kg、126cm  
肝臓、腎臓





2013/9/28 (豊田町)  
シカ、オス、54kg、142cm  
肝臓、腎臓



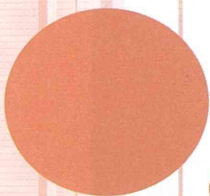
2013/9/14 (豊北町)  
イノシシ、メス、12.5kg、75.5cm  
肝臓、腎臓







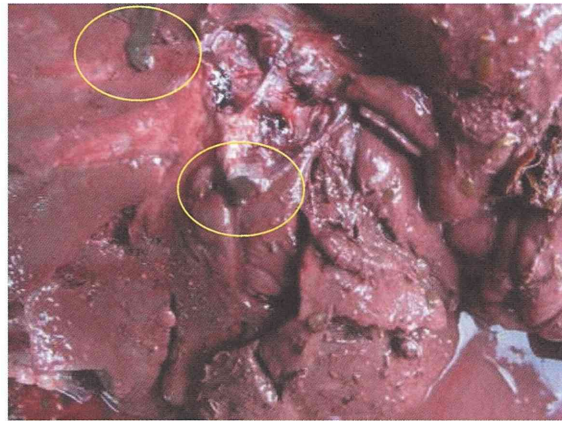
2013/11/2 (豊北町)  
イノシシ、メス、52kg  
肝臓、腎臓



病変部位



2012/10/7 (豊田町)  
イノシシ、メス、38kg、102cm  
肝臓、肝蛭



2012/10/14 (豊北町)  
シカ、オス、70kg、149.2cm  
肺に白色の結節、肝に水泡性変化

