

表 III-2 地域および各動物種における *Yersinia* 属菌の菌種および血清型の分離状況

地域	動物	陽性 検体数	検体数 ^a				血清型
			<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. intermedia</i>	<i>Y. frederiksenii</i>	<i>Y. spp</i> ^b	
北海道 ^d	エゾシカ	7	3				O9
			2				O5
			1				O3
関東	イノシシ	8		1		1	
			4	4			
中国	イノシシ	6	6				UN
			3				UN
	シカ	5		1			
九州	イノシシ	8	6				UN
			1 ^c				O1,2 O1,2,3
				1	1		
	シカ	6	4			1	UN
				1			
				1			

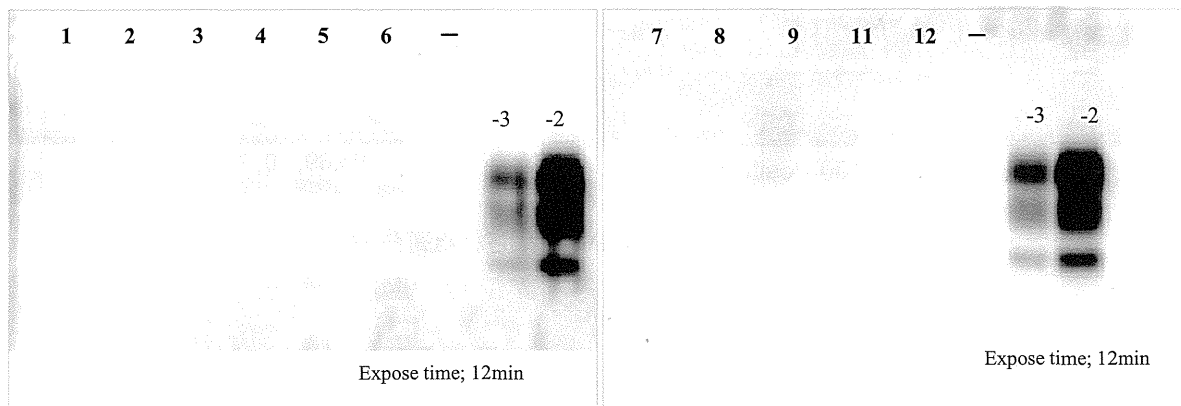
a:同一行にある検体は数は一つの検体から複数の菌種が分離されたことを示す。
 b:日水の簡易同定キット EB20 により *Y. intermedia* あるいは *Y. frederiksenii* の可能性が示唆された菌株数。
 c:同一検体から2菌株が分離され、1菌株から抗血清 O1,2 で凝集が確認され、1菌株はさらに O3 で凝集が確認された。
 d:用いた抗血清 (O1,2; O3; O5; O8 および O9) で凝集がみられなかった菌株も3菌株分離された。
 UN:用いた抗血清 (O1,2; O3; O5; O8 および O9) では凝集がみられなかった。

1.1.2 延髄からの病原体検査

鹿の慢性消耗病(chronic wasted disease; CWD)の検索を目的として、凍結したシカの頭部より、延髄を摘出し、ウエスタンブロットリング法を用いて異常プリオンの検索を行った。CWDプリオンの検索は九州地区のシカで実施したが陽性は認められていない(図 III-3)。

図 III-3 シカ延髄におけるウエスタンブロットリング法による PrP^{sc} の検出

obex



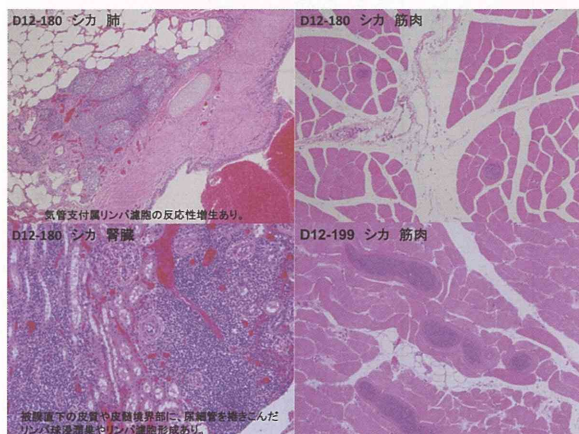
1.1.3 臓器からの病理組織検査

病理検査に用いる材料は解体後、各処理施設における衛生的処理方法にのっとり加食部分を採取した後の内臓等より、ホルマリンサンプルを採取した。解体処理施設で採取した組織をホルマリン固定し、薄切、HE染色後に検鏡し病理組織検査を行った。

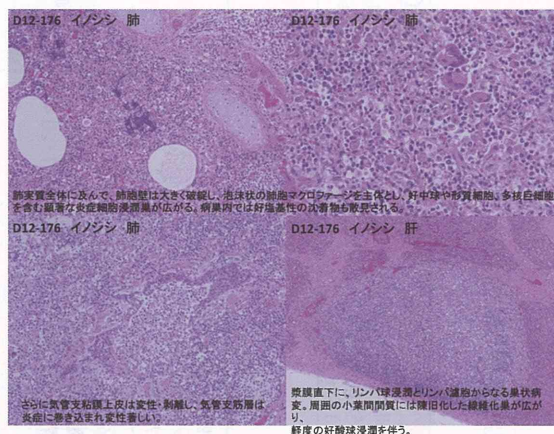
病理組織検査においては全身の筋肉内に住肉包子虫、肺気管支内に線虫、肝臓からは肝蛭虫体を検出した。また、寄生虫体は認められない場合も、病変の多くは寄生虫感染に起因する、好酸球浸潤を伴う炎症性病変が主であった。(図 III-4、)

図 III-4 病理組織所見

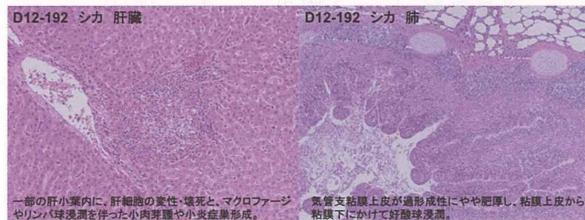
エゾシカ(北海道)



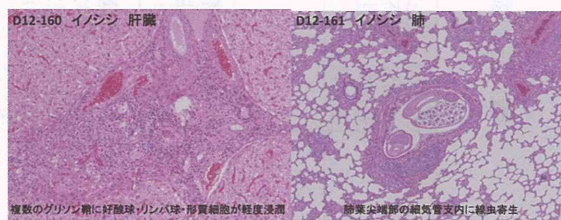
イノシシ(関東地方)



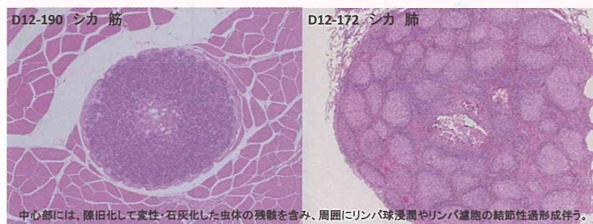
シカ(中国地方)



イノシシ(中国地方)



シカ(九州地方)



イノシシ(九州地方)

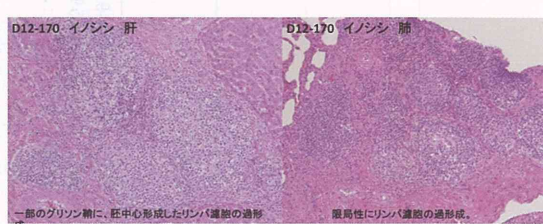


表 III-3 病理検索結果まとめ

	栃木イノシシ	大分イノシシ	山口イノシシ
骨格筋	住肉包子虫(2/62頭):3.2% 軽度の炎症性病変(1/62頭):1.6% 著変無し(59/62頭):95.2%	住肉包子虫寄生(11/49頭):22.4% 軽度の炎症性病変(2/49頭):4.1% 著変無し(36/49頭):73.5%	住肉包子虫寄生(8/18頭):44.4% 著変無し(10/18頭):55.6%
横隔膜	住肉包子虫(2/50頭):4.0% 軽度の炎症性病変(1/50頭):2.0% 著変無し(47/50頭):94.0%	×	×
心	軽度の心筋脱落・炎症(1/28頭):3.6% 著変無し(27/28頭):96.4%	住肉包子虫寄生(9/49頭):18.4% 軽度の炎症性病変(2/49頭):4.1% 著変無し(39/49頭):79.6%	×
肺	気管支内の線虫寄生(子虫、虫卵含む)(28/57頭):49.1% 気管支付属リンパ装置の濾胞過形成(10/57頭):17.5% 気管支付属リンパ装置の軽度反応性増生(18/57頭):31.6% 気管支肺炎(13/57頭):22.8% 化膿性肉芽腫性肺炎(2/57頭)(グラム陽性球菌確認):3.5% 化膿性肺炎(1/57頭):1.8% 肺出血(2/57頭):3.5% 著変無し(18/57頭):31.6%	気管支内の線虫寄生(20/49頭):40.8% 気管支付属リンパ装置の濾胞過形成(7/49頭):14.3% 気管支付属リンパ装置の軽度反応性増生(10/49頭):20.4% 気管支肺炎(16/49頭):32.7% 酵母様真菌伴う肉芽腫性肺炎(5/49頭):10.2% 肺出血(1/49頭):2.0% 著変無し(17/49頭):34.7%	気管支内の線虫寄生(10/18頭):55.6% リンパ濾胞の過形成(5/18頭):27.8% 気管支付属リンパ装置の軽度反応性増生(4/18頭):22.2% 好酸球性肉芽腫性肺炎(2/18頭):11.1% 軽度の気管支炎(6/18頭):33.3% 限局性の慢性肺炎(軽度)(1/18頭):5.6%
肝	脂肪細胞の過形成巣(1/47頭):2.1% 好酸球浸潤又は好酸球性膿瘍を伴ったリンパ球集簇巣(3/47頭):6.4% 限局性のリンパ球集簇巣(1/47頭):2.1% 著変無し(42/47頭):89.4%	軽度の慢性胆管肝炎(5/49頭):10.2% 好酸球性膿瘍・肉芽腫(3/49頭):6.1% リンパ濾胞過形成(2/49頭):50% 限局性の軽度の炎症巣(3/49頭):6.1% 著変無し(36/49頭):73.5%	肝臓の好酸球性膿瘍・肉芽腫(8/17頭):47.0% 軽度の慢性胆管肝炎(2/17頭):11.8% 著変無し(7/17頭):41.2%
腎	軽度の慢性間質性腎炎(1/53頭):1.9% 著変無し(52/53頭):98.1%	限局性のリンパ球浸潤又はリンパ濾胞形成(9/49頭):18.4% 好酸球性膿瘍とリンパ濾胞過形成(1/49頭):2.0% 限局性の慢性間質性腎炎(1/49頭):2.0% 著変無し(38/49頭):77.6%	弓状動脈に炎症を伴った間質性腎炎(1/18頭):5.6% 軽度の慢性間質性腎炎(3/18頭):16.7% 限局性のリンパ球浸潤(2/18頭):11.1% リンパ濾胞過形成(1/18頭):5.6% 化膿性腎膿瘍(1/18頭):5.6% 単純性嚢胞(1/18頭):5.6% 著変無し(10/18頭):55.6%

	大分シカ	山口シカ	釧路シカ
骨格筋	住肉包子虫寄生(14/28頭):50% 著変無し(14/28頭):50%	住肉包子虫寄生(24/29頭):82.8% 著変無し(5/29頭):17.2%	住肉包子虫寄生(9/15頭):60% 線虫(糸状虫様)寄生(1/15頭):6.7% 著変無し(5/15頭):33.3%
舌	住肉包子虫寄生(1/1頭):100%	×	住肉包子虫寄生(1/1頭):100%
横隔膜	住肉包子虫寄生(1/2頭):50% 著変無し(1/2頭):50%	×	住肉包子虫寄生(5/5頭):100%
心臓	住肉包子虫寄生(14/28頭):50% 著変無し(14/28頭):50%	×	住肉包子虫寄生(3/4頭):75% 著変無し(1/4頭):25%
肺	好酸球性肉芽腫性肺炎(1/28頭):3.6% 軽度の気管支肺炎(1/28頭):3.6% 軽度の気管支炎(3/28頭):10.7% リンパ濾胞の過形成(4/28頭):14.3% 変性虫体様構造物(3/28頭):10.7% 肺出血(2/28頭):7.1% 著変無し(21/28頭):75%	リンパ濾胞の過形成(1/26頭):3.8% 気管支付属リンパ装置の軽度反応性増生(2/26頭):7.7% 軽度の気管支炎(1/26頭):3.8% 小葉間結合組織での慢性炎症(1/26頭):3.8% 肺出血(6/26頭):23.0% 誤嚥性異物に寄生虫混在(1/26頭):3.8% 限局性の肺気腫(1/26頭):3.8% 著変無し(14/26頭):53.8%	気管支付属リンパ装置過形成(1/13頭):7.7% 弾創部の肺出血(2/13頭):15.4% 著変無し(10/13頭):76.9%
肝	慢性胆管炎(1/28頭):3.6% 限局性の肉芽腫性炎(2/28頭):7.1% 著変無し(25/28頭):89.3%	慢性胆管炎(8/30頭):26.7% 胆管内に肝姪や虫卵寄生(7/30頭):23.3% 好酸球性膿瘍(1/30頭):3.3% 肝包膜炎(1/30頭):3.3% 間質性肝炎(2/30頭):6.7% 軽度の小肉芽腫(2/30頭):6.7% 著変無し(19/30頭):63.3%	好酸球性膿瘍(1/14頭):7.1% 著変無し(13/14頭):92.9%
腎	限局性のリンパ球浸潤(2/28頭):7.1% 限局性の肉芽腫性炎(1/28頭):3.6% 著変無し(25/28頭):89.3%	単純性嚢胞(2/26頭):7.7% 軽度の慢性間質性腎炎(2/26頭):7.7% 限局性のリンパ球浸潤・リンパ濾胞形成(5/26頭):19.2% 水腎症(1/26頭):3.8% 著変無し(17/26頭):65.4%	著変無し(11/11頭):100%
脾	×	著変無し(3/3頭):100%	×
リンパ節	×	寄生虫寄生による反応性リンパ節炎(1/1頭):100%	悪性リンパ腫(1/1頭):100%

1.2 イノシシ・シカにおける各種感染症の検査結果

1.2.1 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

オーエスキー病とは、オーエスキー病ウイルス(PRV)を原因とした豚の病気で、本病に感染すると異常産や神経症状の発症により養豚業の生産性を低下させることから、家畜伝染病予防法の届出伝染病に指定されている。

日本におけるオーエスキー病の浸潤地域、発生状況を図 III-5に示す。日本では撲滅対策がとられており、多くの県で清浄化に成功している。

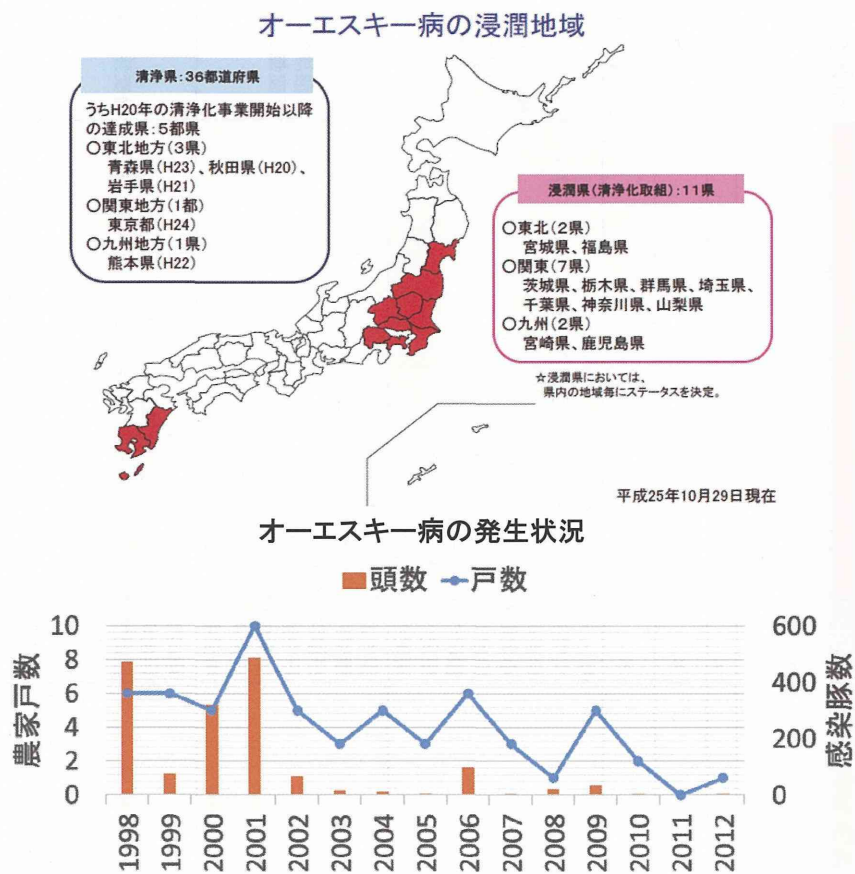


図 III-5 オーエスキー病の浸潤地域(上)と発生状況(下) ⁶⁵

イノシシにおけるオーエスキーウイルスの感染状況について検討を行った結果、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 III-4)。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 III-5)。

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

65 農林水産省 オーエスキー病について http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/eisei/e_ad/

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(図 III-5)。

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。

表 III-4 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 III-5 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

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



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 III-6 オーエスキー病に関するまとめ

1.2.2 イノシシにおける E 型肝炎ウイルスの疫学調査

イノシシにおける E 型肝炎ウイルス (HEV) の疫学調査を行った。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 III-7)。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 III-7)。113 頭中 47 頭 (42%) が陽性となった (表 III-6)。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 III-6)。

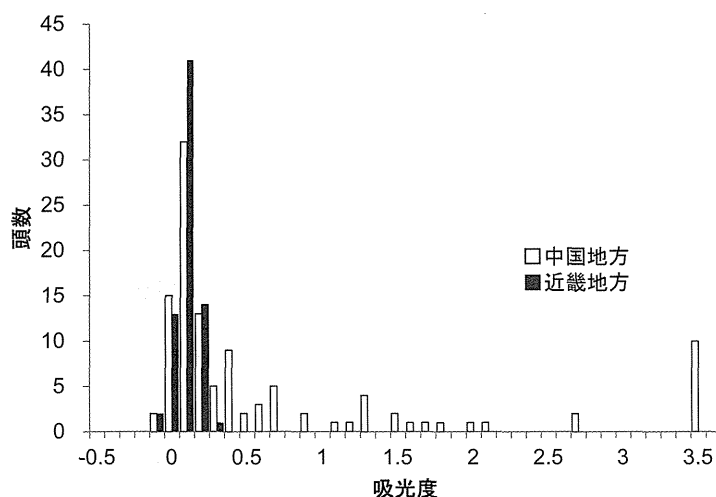


図 III-7 E 型肝炎ウイルスに対する吸光度 (中国地方と近畿地方)

表 III-6 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.

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 III-6)。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 III-6)。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 III-8)。

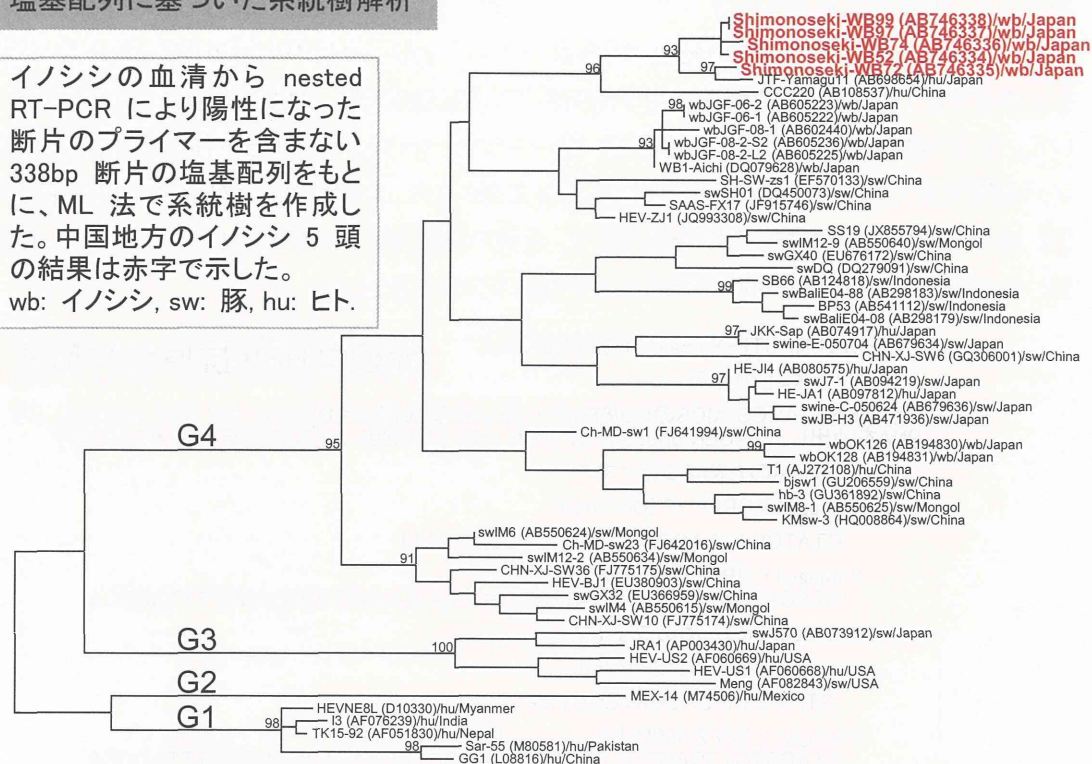
中国地方のイノシシに高い抗体保有率が存在し、4% のイノシシが血液中にウイルスを保有していることが判明した (表 III-6)。また、イノシシから検出された遺伝子は 2011 年のヒトの患者から検出された遺伝子と非常に似ていた。そのことは、イノシシに感染している E 型肝炎ウイルスにヒトが感染したことを示している。更には、血液にウイルスが検出されるということは、筋肉を含め全身にウ

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。

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。



- 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！

図 III-8 塩基配列に基づいた系統樹解析(上)、イノシシにおける E 型肝炎に関するまとめ(下)

1.2.3 簡便かつすべての哺乳動物で有効な E 型肝炎ウイルス抗体検出法の確立

これまで用いていた E 型肝炎ウイルス(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 III-9)。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。

<ul style="list-style-type: none"> • ウイルス株: JTF-Yamagu11株 (AB698654) • 発現プラスミドの作製 <p>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</p> <p>1-660AA のためのプライマー</p> <p>Yamagu11 ORF2 1F (ClaI) ver2 GTATCGATCACCATGCGCTCTCGGGCTTT</p> <p>Yamagu11 ORF2 660R-His GTAGATCTTCAGTGATGGTGATGGTACTCCCGGGTTTTACCCA</p> <p>112-660AA のためのプライマー</p> <p>Yamagu11 ORF2 112F (ClaI) GTATCGATCACCATGGCTGTGGCTCCGGCCCT</p> <p>Yamagu11 ORF2 660R-His GTAGATCTTCAGTGATGGTGATGGTACTCCCGGGTTTTACCCA</p> <ul style="list-style-type: none"> • 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 	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; background-color: #e0e0e0;">簡便な HEV 抗原の作製法</div>
---	---

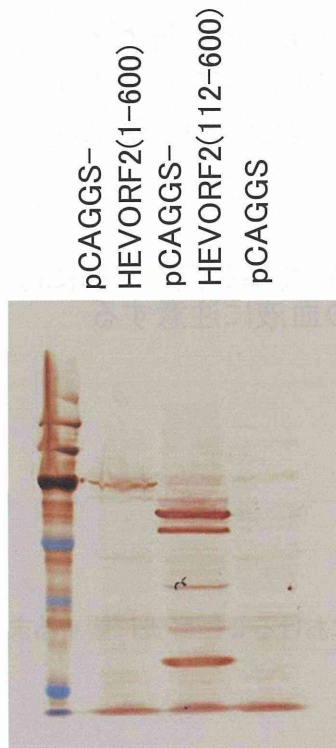


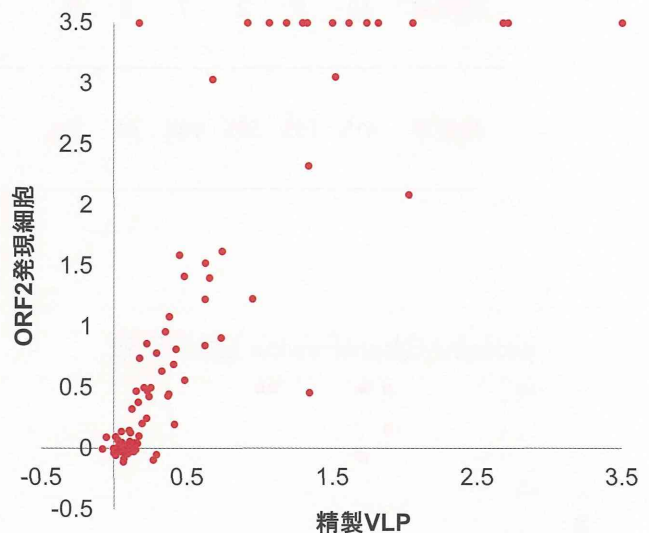
図 III-9 簡便な HEV 抗原の作製法(上)と HEV ORF2 タンパク発現と確認(左)

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 III-10)。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 III-11)。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。

結論として、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。

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)



・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)

簡易ですべての哺乳動物から HEV 抗体検出法の確立・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 およびマルチビーズ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

図 III-10 中国地方のイノシシ 2009-2011(上)、HEV 抗体検出法の確立(下)

1.2.4 発現タンパクと ProteinA/G を用いた ELISA による E 型肝炎ウイルス抗体保有率の調査

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 E 型肝炎ウイルス(HEV)陽性が認められた(表 III-7)。一方、中国地方のシカは 209 頭中 1 頭(0.5%)であった(図 III-11、表 III-7)。

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 III-8)。

表 III-7 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						シカ	中国地方					
	中国地方		九州地方		関東地方			シカ	2009	2010	2011	2012	2013
	2012	2013	2011	2012	2011	2012							
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%	

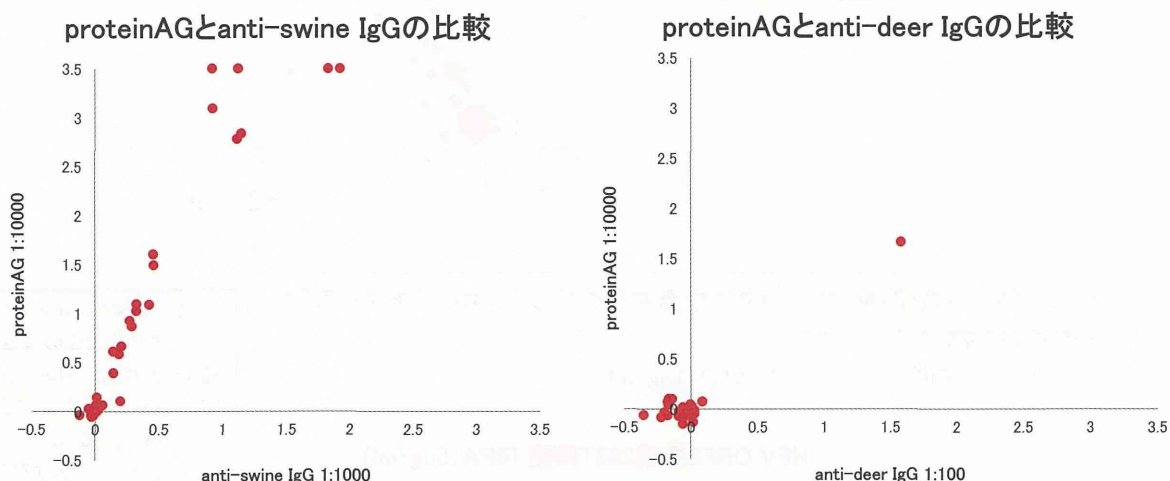


図 III-11 二次抗体に proteinAG と anti-swine IgG あるいは anti-deer IgG を用いた ELISA の比較

表 III-8 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)

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 III-9)。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 III-9)。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 III-10)。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 III-10)。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 III-12)。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。

表 III-9 血清と肝臓における HEV 遺伝子検出(イノシシ)

	中国地方						九州地方	関東地方	中国地方
	血清						血清	血清	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 III-10 血清と肝臓における HEV 遺伝子検出(シカ)

	中国地方						中国地方		
	血清						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

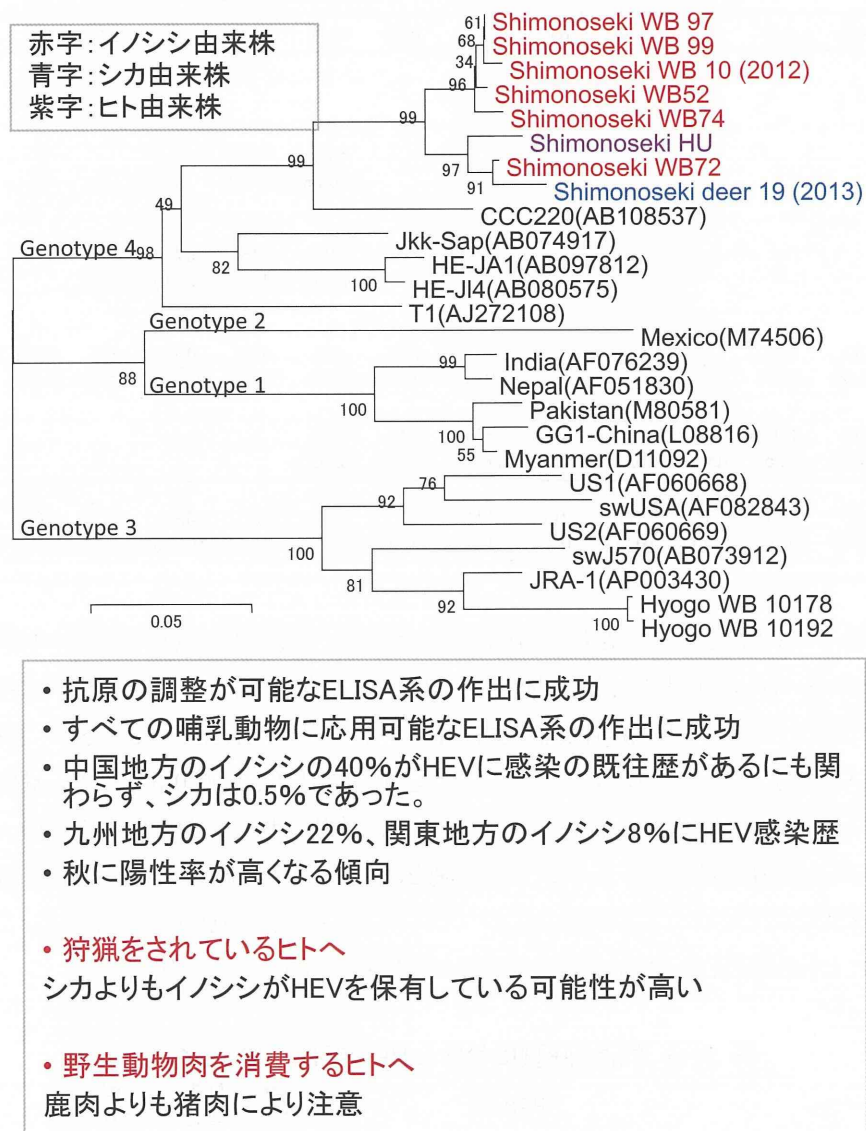


図 III-12 中国地方のイノシシ・シカから検出された遺伝子の系統解析(上)、HEVに関するまとめ(下)

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(図 III-12)。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。

結論として、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(図 III-12)。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。

1.2.5 イノシシ・シカの腎臓からのレプトスピラ遺伝子検出

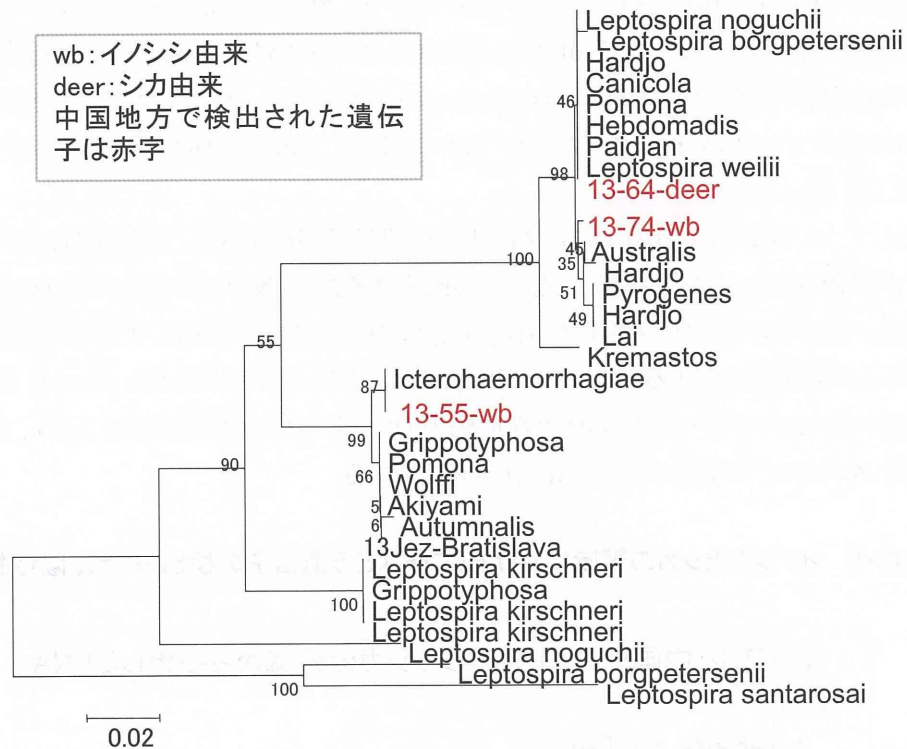
レプトスピラ症 (leptospirosis) は、病原性レプトスピラ感染に起因する人獣共通の細菌 (スピロヘータ) 感染症である。イノシシおよびシカの腎臓から抽出された DNA からレプトスピラの OmpL1 遺伝子の nested PCR を実施した結果、イノシシ 52 頭中 12 頭(23%)およびシカ 61 頭中 2 頭(3%)からレプトスピラ遺伝子が検出された(表 III-11)。得られた PCR 産物から 3 個の遺伝子を検出した結果、イノシシから取れた遺伝子は Ichterohaemorrhagiae と Australis, Hardjo などに近い 2 タイプの遺伝子が検出された。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 III-12上)。

結論として、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(図 III-12下)。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。

表 III-11 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率(上)、陽性数(下)

<ul style="list-style-type: none"> • サンプル: 中国地方のイノシシ、シカの腎臓から抽出したDNA • PCR <ul style="list-style-type: none"> • TaKaRa Ex Taq • Cycle <ul style="list-style-type: none"> 94°C 2min 94°C 1min 55°C 1min 30cycle 72°C 1.5min 72°C 15min • プライマー <ul style="list-style-type: none"> • 1st PCR → OmpL1-Pr.1 OmpL1-Pr.2 • 2nd PCR → OmpL1-IN-F1 OmPL1-IN-R1 <p>(<i>L. kirschneri</i> serovar grippotyphosa の OmpL1 遺伝子配列を基に作成したプライマー)</p>

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



- 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！

図 III-13 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(上)、まとめ(下)

1.2.6 イノシシ・シカのブルセラ菌感染状況の調査

ブルセラ症はブルセラ属菌による人獣共通感染症である。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 III-12左)。

結論として、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。

1.2.7 イノシシ・シカの日本脳炎ウイルスの疫学調査

日本脳炎は、主にコガタアカイエカによって媒介され、日本脳炎ウイルスによっておこるウイルス感染症である。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 III-12右)。

結論として、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。

表 III-12 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%

1.3 野生鳥類とくにカモ類の検査結果

(1) はじめに

野生鳥獣であるニホンジカ (*Cervus nippon*)、イノシシ (*Sus scrofa*)、マガモ (*Anas platyrhynchos*)、キジ (*Phasianus versicolor*)などは、鳥獣保護法で狩猟対象動物となっており、その一部はジビエ(野生鳥獣肉)として利用されている。近年では、国内のレストランや旅館、市町村の特産品、インターネット販売などで市販され、全国各地に流通されている。野生鳥獣肉は家畜に比べると衛生管理体制が不十分なため、野生鳥獣肉の摂取による感染症発生の報告例がある。そのため、安全、安心な野生鳥獣肉の販売を推進するためには、その流通状況や販売実態さらに人獣共通病原体の保有実態を把握することが重要である。

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病原性細菌やトキソプラズマ原虫の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、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を用いて食中毒菌であるサルモネラおよびカンピロバクターの分離とトキソプラズマ遺伝子の検出を試みた。

(2) 材料と方法

北海道内で狩猟された野生カモ類の消化管(胃および腸)の提供を受けた。検体の内訳は、コガモ (*A. crecca*) 13 羽、ハシビロガモ (*A. clypeata*) 1 羽、キンクロハジロ (*Aythya fuligula*) 12 羽、スズガモ (*Ayt. marila*) 6 羽、オナガガモ (*A. acuta*) 4 羽、マガモ (*A. platyrhynchos*) 15 羽、ヒドリガモ (*A. penelope*) 7 羽の計 7 種 58 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 15 羽、ヒドリガモ 10 羽、マガモ 16 羽の計 3 種 41 羽であった。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 6 羽、滋賀県がマガモ 10 羽、徳島県がカルガモ 10 羽、鹿児島県がヒドリガモ 10 羽であった。

狩猟鳥 58 羽および市販鳥 41 羽の試料を用いて、定法により食中毒細菌であるサルモネラとカンピロバクターを対象とした分離培養を試みた。確認のため各菌種における特定遺伝子領域の PCR 増幅も行った。なお、鳥類の解剖と試料採取は P2 レベルの実験室内で行い、防疫処置等は環境省の『野鳥における高病原性鳥インフルエンザに係る対応技術マニュアル』に従った。すなわち、死体もしくは試料到着時に高病原性鳥インフルエンザ (HPAI) の簡易検査を実施すると共に、簡易検査陽性であった場合には外部機関へ PCR 検査およびウイルス分離による判定を依頼することにした。

狩猟鳥 48 羽および市販鳥 38 羽の試料を用いて、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)。

(3) 結果

狩猟者および業者から取り寄せた 8 種 99 羽から細菌分離を試みた結果、狩猟鳥のコガモ 1 羽および市販カモ類のうちカルガモ 1 羽（茨城県産）とマガモ 2 羽（滋賀県産）から *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* が分離された。狩猟鳥における陽性率は 1.7%、市販鳥では 7.3%であった。なお、サルモネラは分離されなかった。

簡易検査で HPAI ウイルス擬陽性を示した試料は、インターネット販売されているマガモ 1 羽（茨城県産）とカルガモ 1 羽（徳島県産）からの計 2 検体であった。簡易検査で陰性であったマガモ 1 羽（滋賀県産）の試料を用いた PCR 検査で陽性を示したが、ウイルス培養および遺伝子解析により低病原性鳥インフルエンザウイルスであると判定された。

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。狩猟鳥からは検出されず、全体では 4.7%の検出率となった。

(4) 考察

狩猟者による個人供用とはいえ、食中毒菌であるカンピロバクターの保菌が確認されたことから、野生カモ類の食用については十分に留意すべきであると考えた。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 7%からカンピロバクターが検出され、低病原性鳥インフルエンザウイルス保有が確認されたことから、その食用のみならず流通経路に対しても監視が求められる。市販カモ類の約 10%からトキソプラズマ原虫の遺伝子が検出され、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感染は確実であると推察された。

以上のことから、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考えた。



2. 年齢判定の方法について

2.1 シカの年齢判定法

シカの年齢判定は、枝角の生え方や第一切歯の歯冠部の磨滅によっても、おおまかな年齢判定は可能である。しかしながら、枝角はオスのみ存在するためメスに使用できず、枝角の生え方では、4歳以上の枝分れが同じになるため成熟個体の年齢推定が難しくなる。また、歯の磨滅には性差や食物によって磨滅のスピードが異なるため正確な年齢判定に適さない。そこで、今回のシカの年齢判定はシカの歯根部のセメント質に形成される第2セメント質の年輪による年齢判定方法を行う。第2セメント質は、セメント質に分泌される沈着層であり、栄養状態によって厚さや構成が異なる。餌が豊富で栄養状態がよい夏場では分泌が盛んとなるため第2セメント質の層は厚くなる、一方栄養が乏しくなる冬場では分泌物が少なく沈着層の幅が狭くなる。また、冬の層は、石灰化が強くなるため染色によって濃染色されやすい。このようなセメント質の性質を用い年齢判定を行う。

年齢判定には第1切歯を用いた。第1切歯を下顎から抜歯し、10%ホルマリン液で固定後、脱灰液に浸したのち、アルコール系列で脱水、パラフィンで包埋し25 μ mの厚さの薄切し切片標本作製した。切片標本はヘマトキシリン・エオジン染色を施したのち、顕鏡しセメント質のヘマトキシリンに濃染された層を数えた。第1切歯は乳歯時期がおよそ1年、その後永久歯が萌出する。歯根部のセメント質の年輪は、その年の冬から形成されるため、捕獲日または処理日を参考にし、年輪層の一つ加えた数を年齢とした。

第1切歯のセメント質に形成される年輪

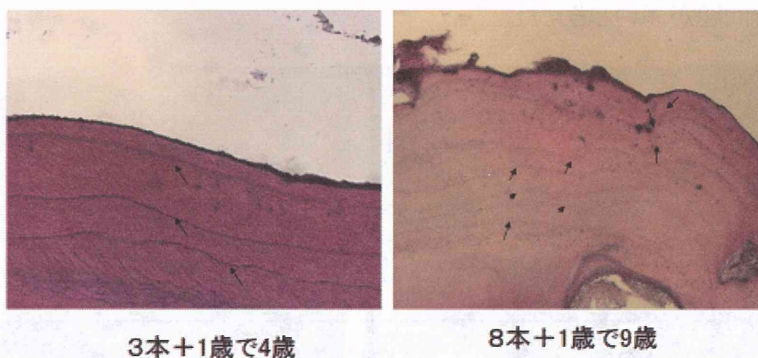


図 III-14 第一切歯のセメント質に形成される年輪

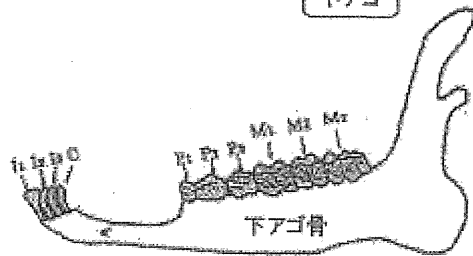
2.2 歯式によるニホンジカの年齢査定の手法(2才まで)

山梨県 シカ肉の衛生および品質の確保に関するガイドライン 参考資料に掲載の歯式にいおるニホンジカの年齢査定の手法

3. 歯式によるニホンジカの年齢査定の手法 (2才まで)

ニホンジカにおける歯の萌出・交換時期

	年齢	歯式									
1年目	6月	0ヶ月									
	7月	1ヶ月									
	8月	2ヶ月									
	9月	3ヶ月	<div style="border: 1px dashed black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> 生後3ヶ月(反すう消化管の形成と歯の萌出までの期間)は母乳で生育 </div>								
	10月	4ヶ月	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%;"></td> <td style="width: 25%; text-align: center;">n1 n2 n3</td> <td style="width: 25%;"></td> <td style="width: 25%;"></td> </tr> <tr> <td style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">i1 i2 i3</td> <td style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; text-align: center;">c p1 p2 p3</td> <td style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; text-align: center;">M1</td> <td style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;"></td> </tr> </table>		n1 n2 n3			i1 i2 i3	c p1 p2 p3	M1	
		n1 n2 n3									
i1 i2 i3	c p1 p2 p3	M1									
11月	5ヶ月	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%;"></td> <td style="width: 25%; text-align: center;">n1 n2 n3</td> <td style="width: 25%;"></td> <td style="width: 25%;"></td> </tr> <tr> <td style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">i1 i2 i3</td> <td style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; text-align: center;">c p1 p2 p3</td> <td style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; text-align: center;">M1</td> <td style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;"></td> </tr> </table>		n1 n2 n3			i1 i2 i3	c p1 p2 p3	M1		
	n1 n2 n3										
i1 i2 i3	c p1 p2 p3	M1									
12月	6ヶ月										
2年目	1月	7ヶ月									
	2月	8ヶ月									
	3月	9ヶ月									
	4月	10ヶ月									
	5月	11ヶ月									
	6月	0ヶ月	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%;"></td> <td style="width: 25%; text-align: center;">c p1 p2 p3 M1</td> <td style="width: 25%;"></td> <td style="width: 25%;"></td> </tr> <tr> <td style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">i1 i2 i3</td> <td style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; text-align: center;">c p1 p2 p3 M1</td> <td style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; text-align: center;">M2</td> <td style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;"></td> </tr> </table>		c p1 p2 p3 M1			i1 i2 i3	c p1 p2 p3 M1	M2	
	c p1 p2 p3 M1										
i1 i2 i3	c p1 p2 p3 M1	M2									
7月	1ヶ月										
8月	2ヶ月										
9月	3ヶ月	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%;"></td> <td style="width: 25%; text-align: center;">c p1 p2 p3 M1 M2</td> <td style="width: 25%;"></td> <td style="width: 25%;"></td> </tr> <tr> <td style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">i1 i2 i3</td> <td style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; text-align: center;">c p1 p2 p3 M1 M2</td> <td style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; text-align: center;">M2</td> <td style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;"></td> </tr> </table>		c p1 p2 p3 M1 M2			i1 i2 i3	c p1 p2 p3 M1 M2	M2		
	c p1 p2 p3 M1 M2										
i1 i2 i3	c p1 p2 p3 M1 M2	M2									
10月	4ヶ月										
11月	5ヶ月										
12月	6ヶ月	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%;"></td> <td style="width: 25%; text-align: center;">c p1 p2 p3 M1 M2</td> <td style="width: 25%;"></td> <td style="width: 25%;"></td> </tr> <tr> <td style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">i1 i2 i3</td> <td style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; text-align: center;">c p1 p2 p3 M1 M2</td> <td style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; text-align: center;">M2</td> <td style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;"></td> </tr> </table>		c p1 p2 p3 M1 M2			i1 i2 i3	c p1 p2 p3 M1 M2	M2		
	c p1 p2 p3 M1 M2										
i1 i2 i3	c p1 p2 p3 M1 M2	M2									
3年目	1月	7ヶ月									
	2月	8ヶ月									
	3月	9ヶ月									
	4月	10ヶ月									
	5月	11ヶ月									
	6月	0ヶ月	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%;"></td> <td style="width: 25%; text-align: center;">c p1 p2 p3 M1 M2</td> <td style="width: 25%;"></td> <td style="width: 25%;"></td> </tr> <tr> <td style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">i1 i2 i3</td> <td style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; text-align: center;">c p1 p2 p3 M1 M2</td> <td style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; text-align: center;">M3</td> <td style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;"></td> </tr> </table>		c p1 p2 p3 M1 M2			i1 i2 i3	c p1 p2 p3 M1 M2	M3	
	c p1 p2 p3 M1 M2										
i1 i2 i3	c p1 p2 p3 M1 M2	M3									
7月	1ヶ月	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%;"></td> <td style="width: 25%; text-align: center;">c p1 p2 p3 M1 M2 M3</td> <td style="width: 25%;"></td> <td style="width: 25%;"></td> </tr> <tr> <td style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">i1 i2 i3</td> <td style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; text-align: center;">c p1 p2 p3 M1 M2 M3</td> <td style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; text-align: center;">M3</td> <td style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;"></td> </tr> </table>		c p1 p2 p3 M1 M2 M3			i1 i2 i3	c p1 p2 p3 M1 M2 M3	M3		
	c p1 p2 p3 M1 M2 M3										
i1 i2 i3	c p1 p2 p3 M1 M2 M3	M3									



l...門歯、c...犬歯、P...小白歯、M...大白歯、小文字は乳歯、大文字は永久歯を表す。
 の網かけ部は歯の萌出、または永久歯に交換した場所を示す。
 注: 萌出、交換時期は地域によって差がある場合がある。

出展: 大桑司紀之(1980)遼跡出土ニホンジカの下顎骨による性別・年齢・死亡季節査定法
 考古学と自然科学, 13:51-74

図 III-15 歯式によるニホンジカの年齢査定⁶⁶

66山梨県 シカ肉の衛生および品質の確保に関するガイドライン
<http://www.pref.yamanashi.jp/chikusan/documents/documents/venison.pdf>