

## 第 6 章

# イヌジステンパーウイルスおよび日本脳炎の 抗体保有状況と課題

### 要 点

・兵庫県におけるアライグマのイヌジステンパーウイルスおよび日本脳炎ウイルスの感染歴を明らかにするため、抗体保有状況を調べた。

#### 1. イヌジステンパーウイルス

- ・アライグマ 56 頭中 19 頭 (33.9%) がイヌジステンパーウイルスに過去に感染していた。
- ・イヌジステンパーウイルス感染率に地域差が認められることから、イヌジステンパーウイルスがアライグマ間で拡大している可能性が示唆された。
- ・ジステンパーウイルスはアライグマ以外のタヌキやイタチなどの兵庫県内の野生動物にも感染している可能性があるため、野生動物の衰弱などを発見した際には、他の動物に感染を広げないように検査・隔離することが重要である。

#### 2. 日本脳炎ウイルス

- ・兵庫県のアライグマの 40.7% が日本脳炎ウイルスに対して抗体を保有していた。
- ・都道府県別、地域別の日本脳炎ウイルス抗体保有率に違いが認められた。
- ・アライグマの性別や体重別の日本脳炎ウイルス抗体陽性率に大きな違いはなかった。
- ・日本脳炎ウイルス抗体保有率における地域差は、日本脳炎ウイルスの拡大に必要な要因（蚊、ブタなど）に大きく影響を受けていると考えられる。
- ・ヒトやウマはワクチン接種を行うとともに、蚊に刺されないよう長袖・長ズボンの着用、防虫剤の使用を推奨する。

### 6-1. イヌジステンパーウイルス

#### 6-1-1. はじめに

イヌジステンパーウイルス (Canine distemper virus; 以下 CDV と略す) は風邪に類似する呼吸器症状、下痢などの消化器症状、脳炎などの神経症状、時には感染しても発症しない (不顕性感染) など多様な症状を引き起こす。感染する動物はイヌなどの食肉目やアザラシなどの海棲哺乳類などであるが、それ以外にサルなど幅広い動物種への感染も報告されている。動物種によって CDV に対する感受性が大きく異なっており、フ

レットなどは高感受性で死ぬ確率が高いといわれている。

CDV はパラミクソウイルス科のモルビリウイルス属に属する RNA ウイルスで、ヒトにはしかを引き起こす麻疹ウイルスに非常によく似ている。これらのウイルスは核酸として RNA を持っているため変異が激しく、表面にエンベロープと呼ばれる膜を有していることから様々な消毒薬で簡単にその感染性が失われる。ウイルスを含む飛沫を吸入することにより呼吸器感染するといわれている。

家庭で飼育されている犬の多くが CDV に対する予防接種を受けているため、発生数が減っているといわれているが、予防接種を受けていない野生動物では CDV の流行により、壊滅的な被害を受けることがある。1993 年から 1994 年の CDV の流行によりアフリカのセレンゲティ国立公園のライオン 3000 頭中 1000 頭が死亡し、1999 年にはカリフォルニア州の島に生息するシマハイイロギツネが 1340 頭から 150 頭にまで激減している。

本研究では国内の野生動物における CDV の感染状況を調査することを目的として、兵庫県で捕獲されたアライグマの CDV に対する中和抗体保有状況を調べた。

## 6-1-2. 調査期間と方法

**検査血清**：2005 年 2 月から 2006 年 6 月にかけて兵庫県で捕獲されたアライグマ 56 頭から血清を回収し、それを検査試料とした。捕獲個体の詳細は表 1 に示した。対象として 2006 年 6 月から 2007 年 2 月に大阪府で捕獲されたアライグマ 50 頭の血清を用いた。血清は 56°C30 分で非働化し、使用まで -20°C で保存した。

**ウイルス**：ワクチン株として広く用いられている Onderstepoort 株、遺伝子型 AsiaH/1 に属する KDK-1 株を用いた。

**細胞**：KDK-1 株の増殖には我々の作製した A72/cSLAM 細胞、ウイルス中和試験には我々の作製した CRFK/cSLAM 細胞を用いた。Onderstepoort 株の増殖・中和試験には Vero 細胞を用いた。

### ウイルス中和試験：

一次スクリーニング：100 個 (PFU) の KDK-1 を含む 100  $\mu$  l のウイルス溶液と 1:5 に 2 希釈した血清 100  $\mu$  l を混合し (血清最終希釈倍率 1:10)、37°C で 1 時間反応後、細胞に接種した。37°C で 60 分間ウイルスを吸着後、アガロスを重層した。3-4 日後に緩衝ホルマリンで細胞を固定後、生細胞を染色し、プラークを計測した。血清を含まないコントロール群と比べて 75% 以上プラークが減少しているものを CDV 抗体陽性と判

定した。

二次スクリーニング：一次スクリーニングで CDV 抗体陽性の検体について更に血清を 10 倍から 2 倍階段希釈し、一次スクリーニングと同様の実験を行い、75%プラークが減少している最大希釈倍率を中和抗体価とした。

**有意差検定**：得られたデータの解析には  $\chi^2$  検定を実施し、 $p < 0.05$  のものを有意差ありとした。

### 6-1-3. 結果と考察

#### (1) 兵庫県のアライグマの CDV 中和抗体保有率

兵庫県で捕獲されたアライグマ 56 頭中 19 頭 (33.9%) が CDV に対する中和抗体を保有していることが示された (表 1)。雌雄差や体重別の有意差は認められなかった。大阪府のアライグマは 50 頭中 15 頭 (30.0%) が CDV 抗体陽性であり、大阪府と兵庫県のアライグマの中和抗体保有率に有意差は認められなかった。

**表 1 アライグマの CDV 中和抗体保有状況**

地域	陽性個体数	陰性個体数	陽性率 (%)
A	9	1	90.0
B	0	2	0
C	6	23	20.7
D	0	1	0
E	4	10	28.6
兵庫県全体	19	37	33.9

#### (2) 地域別の中和抗体保有率の比較

地域別に比較すると、地域 A のアライグマ 10 頭中 9 頭 (90.0%) が陽性であったのに対して地域 C では 29 頭中 6 頭 (20.7%)、地域 E では 14 頭中 4 頭 (28.6%) しか陽性が認められなかった (表 1)。特に地域 C の陽性個体のほとんど (6 頭中 5 頭) が 2006 年 6 月以降の捕獲であったことは、この時期の直前にイヌジステンパーウイルスの流行があったと考えている (図 1)。地域 A ではほとんどのアライグマが陽性であったことから、調査期間 (2005 年 2 月) 以前にイヌジステンパーの流行があったと考えている (図 1)。

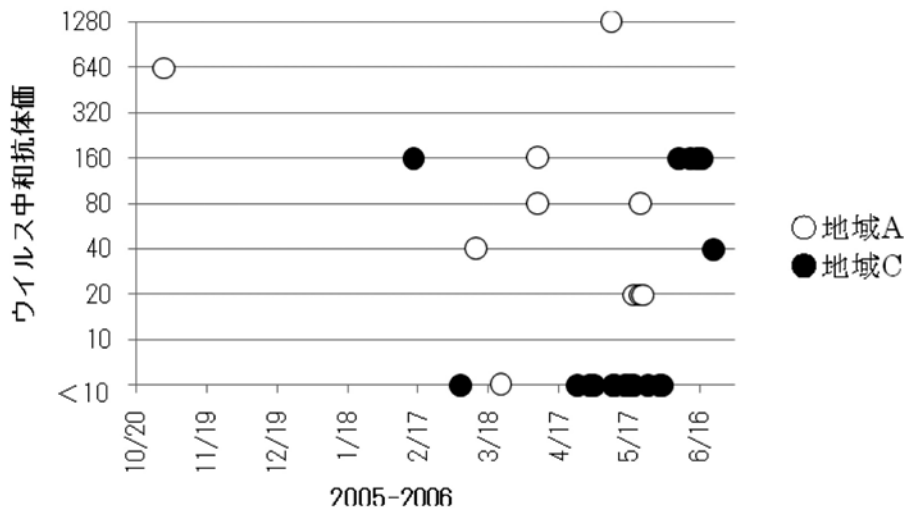


図1 地域AとCで捕獲されたアライグマのCDV中和抗体価の比較

### (3) 感染ウイルスの推定

KDK-1 に対する中和抗体を保有している個体（19頭）について、ワクチン株である Onderstepoort 株に対する中和抗体価を調べた（図2）。その結果、兵庫県のアライグマの多くが Onderstepoort 株に対する中和抗体価よりも KDK-1 株に対する高い中和抗体価を持っていた。このことは兵庫県のアライグマが KDK-1 株によく似たウイルス、すなわち近年日本国内のイヌから分離されるウイルスによく似たウイルスに感染していたことを示している。一方、大阪府のアライグマにはこのような傾向が認められなかった。

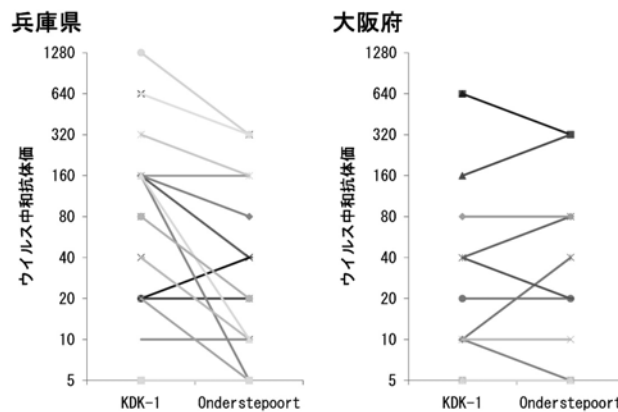


図2 CDV各株に対する中和抗体価の比較

アライグマはイヌジステンパーウイルスに感染しても比較的耐性であるといわれている。一方、タヌキやイタチなどはイヌジステンパーウイルスに高感受性である。和歌山県田辺市で2007年3月からタヌキの集団死が確認されており、我々の調査では周辺地域で捕獲される野生動物のほぼすべてがイヌジステンパーウイルスに感染している

ことが証明されている（参考資料）。和歌山県田辺市での流行は天神崎という特殊な地域での発生であったことから流行を確認することができたが、本来野生動物の病死等を確認することは非常に困難である。イヌジステンパーウイルスは人知れず野生動物で広がっている可能性がある。

和歌山県や高知県での調査では、イヌジステンパーウイルスのかなりの変異が確認されている。今後とも調査の継続が必要であると考えられた。

#### 参考資料 和歌山県田辺市周辺の野生動物における CDV 感染状況

	動物	検査頭数	抗体陽性率(%) <sup>a</sup>	死亡例 <sup>b</sup>
	アライグマ	104	51.9	
	タヌキ	19	21.1	7例
	アナグマ	2	50.0	
食肉目	イタチ	1	0	1例
	テン	1	100.0	
	チョウセンイタチ	1	100.0	
	キツネ	1	0	
偶蹄目	シカ	5	40.0	
	イノシシ	41	26.8	

a: KDK-1 株に対するウイルス中和試験で 1:10 以上のものを陽性と判定

b: ウイルス分離あるいはチェックマン CDV により CDV 感染死と確定された検体

#### 6-1-4. 結論

兵庫県の一部の地域では 2006 年以前にアライグマにイヌジステンパーウイルスが拡がっていたことがわかった。更に、2005 年末から 2006 年にかけての調査期間中にもイヌジステンパーウイルスが流行した地域があることが示された。

以上のことから、

1. アライグマの陽性率が非常に高いので、北米のようにアライグマが他の動物への感染源となる可能性が強く疑われる。野生動物をイヌジステンパーウイルス感染から守るためにもアライグマの捕獲を強化し、個体数を減少させることが必要である。
2. 衰弱した野生動物を保護する場合、イヌジステンパーウイルス感染の鑑別には「**肛門周囲の汚れ**」の確認と外傷がない場合は「**チェックマン CDV**」（アドテック株式会社・共立製薬）での簡易検査の実施が有効である。そして、他の動物へ感染を拡げないためには、感染動物を隔離することが重要となる。
3. ワクチン接種を行っている家庭犬については、感染の心配はないため、家庭飼育犬

にはワクチン接種の徹底が重要である。

4. 一般人には、死亡した野生動物に安易に近づかない、触らないことを周知する。
5. 特に動物園には多くのイヌジステンパーウイルス感受性動物が飼育されているため、野生動物の侵入防止を徹底する。

## 6-2. 日本脳炎ウイルス

### 6-2-1. はじめに

日本脳炎ウイルス (Japanese encephalitis virus; 以下 JEV) は、ヒトやウマに致死的な脳炎症状を引き起こす。国内では 1940-50 年代にかけて猛威をふるい、年度によってはヒトで 5000 名以上の患者、ウマで 3000 頭以上の発症が認められている (図 3)。しかし、ヒトとウマでの発生は、その後、急激に減少し、現在ではヒトでの患者数が年間 10 名以内であり、ウマでの発生は 2003 年に 18 年ぶりの発生があった以外は全くなかった。

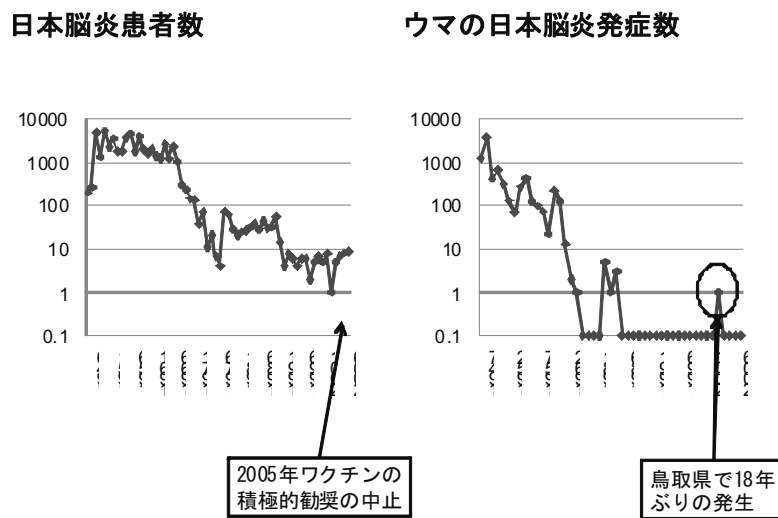


図 3 日本脳炎患者とウマの日本脳炎の発生状況

一方、国外では東南アジアを中心に年間 50,000 名の患者と 10,000 以上の死者が発生しており、依然として脅威となっている。

JEV の感染は、蚊、主にコガタアカイエカの体内で増殖したウイルス (蚊のことをベクター (運び屋) という) が、蚊の吸血時に動物の体内に侵入することにより成立する。ブタが JEV 感染蚊の吸血により感染すると血液中にウイルスが出現 (ウイルス血症) する。この JEV 感染ブタを吸血した蚊が、血液とともにウイルスを体内に取り込

むことにより、感染し、ウイルスが蚊の体内で増殖する。このブタ→カ→ブタ→カの感染が JEV の感染環の基本となっている（図 5）。

このように感染を拡大させるブタのような動物のことを増幅動物といい、ブタ以外にもトリの関与が示唆されている。一方、ヒトやウマも JEV 感染蚊の吸血により感染するが血液中にウイルスが出現しないため、これ以上感染を拡大させることがなく終末宿主といわれている。

ヒトやウマはワクチン接種により日本脳炎発症から防御され、水田で増殖するコガタアカイエカが農業形態の変化により激減し、ブタの飼育場所が都市部から隔離されつつあることから、現在 JEV の発生が激減したと考えられている。しかし、国内での日本脳炎感染の脅威は本当に軽減したのであるだろうか？我々は、特定外来種として捕獲され、比較的血清が入手しやすいアライグマの日本脳炎感染状況を調査することにより、国内での JEV 感染状況を調査した。

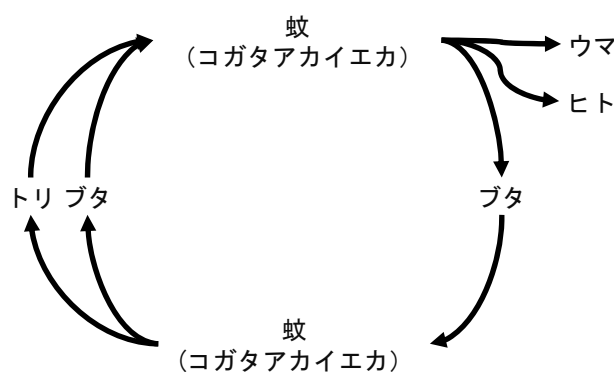


図4 日本脳炎の生活環

## 6-2-2. 調査期間と方法

**検査血清：**合計 204 頭のアライグマから血清を回収し、解析に用いた。そのうち 54 検体は 2005 年 5 月から 2006 年 6 月に兵庫県、62 検体は 2006 年 6 月から 2007 年 2 月に大阪府、68 検体は 2007 年 6 月から 2008 年 2 月に和歌山県で回収した。20 検体は 2007 年 5 月から 2007 年 9 月に北海道で回収した。すべての血清は 56℃で 30 分非働化した後ウイルス中和試験に供試した。

**ウイルス：**JEV genotype I である JEV/sw/Chiba/88/2002 株(国立感染症研究所高崎智彦先生より分与)を用いた。ウイルスの増殖には C6/36 細胞を、ウイルスの力価測定および中和試験には Vero9013 細胞を用いた。

### ウイルス中和試験：

一次スクリーニング：5倍希釈した被検血清およびコントロール 100 $\mu$ l と 100PFU のウイルスを含むウイルス希釈液 100 $\mu$ l を等量混合し、37 $^{\circ}$ Cで90分間反応させた。その後、Vero9013細胞に接種した。37 $^{\circ}$ Cで90分間ウイルスを吸着後、アガロースを重層した。4日後に緩衝ホルマリンで細胞を固定後、生細胞を染色し、プラークを計測した。血清を含まないコントロール群と比べて80%以上プラークが減少しているものを JEV 抗体陽性と判定した。

二次スクリーニング：一次スクリーニングで JEV 抗体陽性の検体について更に血清を10倍から2倍階段希釈し、一次スクリーニングと同様の実験を行い、80%プラークが減少している最大希釈倍率を中和抗体価とした。

**有意差検定**：得られたデータの解析には $\chi^2$ 検定を実施し、 $p<0.05$ のものを有意差ありとした。

## 6-2-3. 結果と考察

### (1) アライグマの JEV 中和抗体保有状況

2005年から2008年にかけて近畿地方で捕獲されたアライグマ184頭の JEV に対する中和抗体保有状況を80%プラーク減少法で調査した結果、109頭(59.2%)に1:10以上の抗体価が存在した(表2)。また、コントロールとして用いた北海道のアライグマ20頭には1:10以上のウイルス中和抗体は存在しなかった。

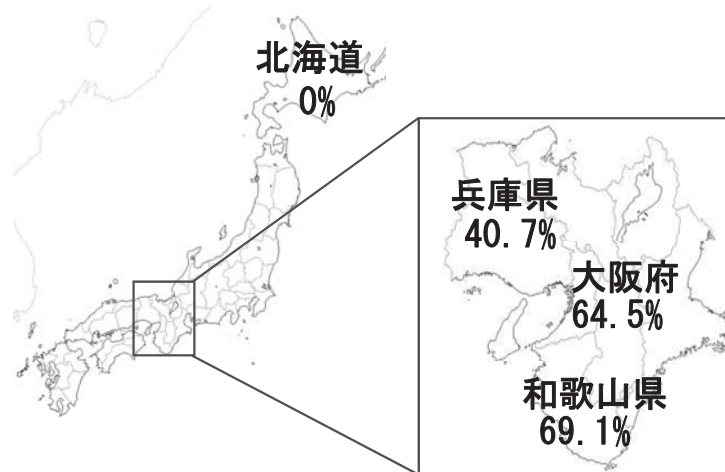
**表2 アライグマの日本脳炎ウイルス中和抗体陽性率**

捕獲場所	陽性率 (陽性頭数/検査頭数)
和歌山県	69.1% (47/68)
大阪府	64.5% (40/62)
兵庫県	40.7% (22/54)
北海道	0% (0/20)
計	53.4% (109/204)

### (2) JEV 中和抗体保有率の都道府県別の比較

地域別に比較すると兵庫県のアライグマの JEV 抗体保有率(40.7%)は大阪府(64.5%)や和歌山県(69.1%)のものよりも有意に低いことが示された( $p<0.05$ ) (表2、図5)。





### (3) JEV 中和抗体保有率の地域別の比較

兵庫県の地域別の JEV 抗体保有率を地域別で比較した (図 6)。地域 B は 14 頭中 10 頭 (71.4%) の高い JEV 抗体保有率であったのに対して、地域 A は 40 頭中 12 頭 (30.0%) の JEV 抗体保有率であった。地域 A と地域 B の抗体保有率を比較すると、地域 B は有意に JEV 抗体保有率が高いことが示された。この地域差に関しては現在不明であるが、今後蚊の分布やブタの飼養頭数と比較する必要がある。

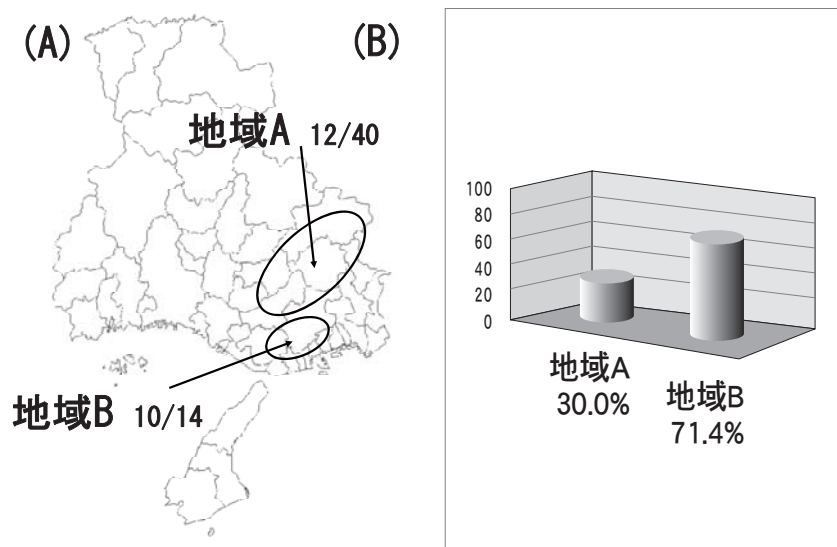


図 6 兵庫県における地域別の JEV 抗体陽性率

### (4) JEV 抗体価の個体毎の検討

兵庫県では体重 0.95kg と 0.90kg の新生児がともに 1:1280 のウイルス中和抗体価を

有していた(表 3)。和歌山県でも体重 2.05kg と 2.3kg の同時期に捕獲された幼獣で 1:2560 と 1:5120 の高いウイルス中和抗体価が認められている。これら新生児に認められた母親からの母乳を介した移行抗体の可能性が考えられる。

**表 3 アライグマの日本脳炎ウイルス中和抗体価**

捕獲場所	ウイルス中和抗体価										
	<1:10	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120
兵庫県	32	6	4	3	2	3	1	0	2	1	0
大阪府	22	13	10	6	4	4	3	0	0	0	0
和歌山県	21	10	13	4	7	3	3	1	1	3	2
北海道	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

#### (5) 性別・体重別の JEV 抗体保有率の比較

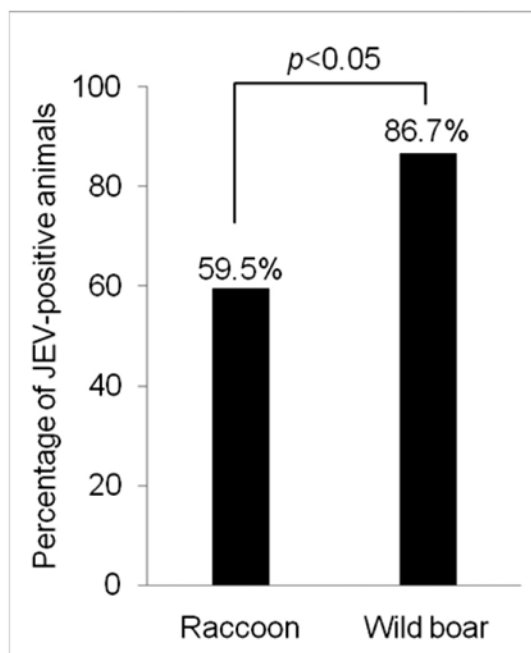
近畿地方の兵庫県、大阪府、和歌山県の 184 頭の性別と体重別の JEV 抗体陽性率を比較した(表 4)。日本脳炎に対する抗体保有率に性別、体重別の違いは認められなかった。

**表 4 アライグマ(兵庫、大阪、和歌山)の性別および体重別による日本脳炎抗体保有率の比較**

	性別		体重(kg)		計
	オス	メス	-3.9	4.0-	
陽性頭数	56	53	34	75	109
検査頭数	103	81	56	128	184
陽性率(%)	54.9	65.4	60.7	58.6	59.2

## 6-2-4. 結論

兵庫県のアライグマの日本脳炎に対する抗体保有率は 40.7%であった。この陽性率は他県と比較して有意に低い。しかし、兵庫県の地域別に比較した場合、地域により陽性率が異なっていることが示され、一部地域では依然として日本脳炎ウイルスが存在していることが確認された。兵庫県での日本脳炎患者や馬での発生は認められていないが、ウイルスはヒトの生活圏に侵入している可能性がある。参考資料は和歌山県で同時期に捕獲されたアライグマとイノシシの日本脳炎抗体保有状況を比較したものであるが、イノシシはアライグマよりも有意に JEV 抗体陽性率が高く、ブタと同様に日本脳炎の増幅動物になる可能性が危惧される。今後は、アライグマで調査を継続して状況を監視すると共に、イノシシでの調査を実施する必要がある。



参考資料 同時期に和歌山県で捕獲されたアライグマとイノシシの JEV 抗体保有率の比較

以上のことから、

1. ヒトやウマへの日本脳炎ワクチン接種は重要である（現在、ヒト用の新規ワクチンが開発中である）。
2. 日本脳炎ウイルスは感染蚊によって媒介されることから、蚊への対策が重要である。夏場でも長袖、長ズボンの着用や防虫剤をつけて屋外に出ることは有効な対策となる。
3. アライグマでの調査は、「ワクチン未接種」、「年間を通じて調査可能(特定外来種)」、「比較的ヒトの生活空間に近い」など、日本脳炎ウイルスの監視に有効なものとなる。今後も調査の継続と、アライグマ以外のイノシシなどでの調査の実施が必要である。

## 謝辞

大阪府の検体は宇仁茂彦先生（大阪市立大学医動物学教室）と柴崎高宏先生（大阪府動物愛護畜産課）に提供していただきました。和歌山県のデータは鈴木和男先生（田辺市ふるさと自然公園センター）との共同研究です。北海道の検体は佐鹿万里子先生（帯広畜産大学獣医内科学教室）に提供していただきました。望月雅美先生（共立製薬株式会社）には「チェックマン CDV」および研究用ウイルスを提供していただきました。尚、ジステンパーウイルスについては、山口大学農学部獣医微生物学教室の中野仁志君と亀尾由紀さんとともに日本脳炎については、大野 佳君とともに実施しました。また、日本脳炎研究の一部は厚生労働省科学研究費補助金と山口大学 YU-VIC 実用化研究（シーズ育成）助成プログラムからの助成金で実施しました。