

栃木県内で捕獲された野生動物の細菌及びウイルスの血清学的調査について

微生物部

中島 亜子 江原 栞 酒井 麻衣 関口 明子¹

水越 文徳² 船渡川 圭次 桐谷 礼子

(1 現食肉衛生研究所) (2 現生活衛生課)

要旨

栃木県内の動物由来感染症のリスク評価を目的に、県内で捕獲された野生動物(シカ、イノシシ)を対象として以下の抗体保有状況の調査を実施した。平成28(2016)年～平成30(2018)年に捕獲されたシカ61検体、イノシシ152検体の血漿を用い、野兎病菌、E型肝炎ウイルス(HEV)、重症熱性血小板減少症候群ウイルス(SFTSV)に対する抗体検査を行った。その結果、野兎病菌に対する抗体がイノシシ2検体から検出された。SFTSV、HEVに対する抗体は検出されなかった。

キーワード：野生動物、重症熱性血小板減少症候群(SFTS)、E型肝炎、野兎病

1 はじめに

近年、農作物や生活環境保護の観点から捕獲した野生動物の食材としての利用が進み、ジビエを一般の人が口にす機会が増加している。シカやイノシシといった野生動物は食事・水・生息環境等についてヒトによる管理はされておらず、HEV、腸管出血性大腸菌、旋毛虫(トリヒナ)等の病原体を保有している可能性がある。そのため、ジビエ喫食やジビエ解体処理を原因とした動物由来感染症に感染する危険性が増加している。ジビエ喫食を原因としてE型肝炎やトリヒナ症など、ジビエ解体処理を原因として野兎病が挙げられる。その他、野生動物の狩猟作業中やヒトの生活圏内に侵入した野生動物に付着したマダニにより重症熱性血小板減少症候群(SFTS)などのダニ媒介感染症に感染する危険性もある。

今回、栃木県内で捕獲されたシカ、イノシシを対象として野兎病、E型肝炎、SFTSの3つの動物由来感染症について抗体検査を行い、結果が得られたので報告する。

2 材料と方法

2.1 材料

平成28(2016)年～平成30(2018)年の間に栃木県内で捕獲されたシカの血漿61検体、イノシシの血漿152検体を対象とした。抗体価測定には、血液検体を1000rpm、20分、4℃で遠心分離して得た血漿を用いた。

2.2 野兎病菌

国立感染症研究所獣医学部から配布された野兎病菌の微量凝集反応のプロトコールに従った。方法は以下のとおり。

① 血清の希釈

50μl以上の検体を、56℃で30分非動化处理。非動化検体及び陽性、陰性対照血清を生理食塩水で5倍希釈し、96wellプレートにアプライ後、2倍段階希釈で640倍まで希釈した。

② 抗原液の調整

野兎病血清検査用菌液を生理食塩水で3倍希釈し、抗原液のOD560値が1になるように調整した。0.25%サフラニン溶液を加え、菌液を染色した。

③ 感作

①のプレートに25μl/wellずつ②で調整した菌液を添加後、37℃で16～20時間静置した。

④ 判定

強陽性、弱陽性、陰性対照のwellの凝集像と比較し判定した。完全凝集が観察されたwellの希釈倍数の逆数が抗体価とし、急性期と回復期血清の凝集価が4倍以上となったものを陽性とした。

2.3 E型肝炎ウイルス

IgG/IgM anti-HEV EIAキットのELISA法プロトコールに従った。方法は以下のとおり。

① 検体の希釈、添加

検体を希釈液で101倍希釈した。陽性、陰性コントロール及び希釈した検体をHEV抗原固相プレートに50μl/wellずつアプライし、15～30℃で1時間静置した。

② 酵素標識モノクローナル抗体の添加

プレートをマイクロプレートウォッシャーを用い、well内容物を除去後、洗浄液で5回洗浄した。洗浄後、酵素

標識モノクローナル抗体を 100 μ l/well ずつアプライし、15~30 $^{\circ}$ Cで1時間静置した。

③ 酵素基質の添加

プレートマイクロプレートウォッシャーを用い、well 内容物を除去後、洗浄液で5回洗浄する。洗浄後、酵素基質を 50 μ l/well ずつアプライし、15~30 $^{\circ}$ Cの暗所で1時間静置した。静置後、反応停止液を 50 μ l/well ずつアプライした。

④ 吸光度の測定

OD450 値及び OD630 値における吸光度を測定した。[各吸光度-ブランク well の吸光度]の平均値(Net OD 値)を算出し、算出したカットオフ値以上のものを陽性とした。

2.4 SFTS ウイルス

国立感染症研究所獣医学部から配布された SFTS ウイルスの ELISA 法プロトコールに従った。方法は以下のとおり。

① 抗原のコーティング

SFTS 抗原(SFTS-inf-Huh7 cell lysates)、mock 抗原(mock-inf-Huh7 cell lysates)を PBS(-)で 800 倍希釈し、96well プレートにそれぞれ 100 μ l/well ずつ分注、4 $^{\circ}$ Cで1晩静置した。

② 抗原のブロッキング

0.05%Tween20 加 PBS (PBS-T)で1回洗浄し、20%Blocking-One in D2W を 100 μ l/well ずつ分注、室温で1時間静置した。

③ 血清の希釈

検体を PBS(-)で 10 倍希釈後、56 $^{\circ}$ Cで 30 分非動化処理した。10 倍非動化検体を 5%Blocking-One/PBS-T(diluent)で 10 倍希釈し、100 倍希釈の検体とした。

④ 抗原抗体反応

②のプレートを PBS-T で1回洗浄し、100 倍希釈検体を1検体につき 4well に 100 μ l/well ずつアプライし、室温又は 37 $^{\circ}$ Cで1時間静置した。

⑤ 二次抗体による反応

二次抗体(Protein A/G-HRPO)を diluent で 20000 倍希釈し、100 μ l/well ずつ分注し、室温で 30 分静置した。PBS-T で3回洗浄し、ABTS 発色剤を 100 μ l/well ずつ分注し、室温で 30 分静置した。

⑦ 吸光度の測定

OD405 値及び OD490 値における吸光度を測定した。SFTS 抗原に対する OD405 値(2well の合計)- mock 抗原に対する OD405 値(2well の合計)/2 を算出した。OD 値が 0.5 以上を陽性とした。

3 結果と考察

3.1 野兔病

今回、野兔病菌に対する抗体保有率はシカ 0%、イノシシ 1.3%であった(表 1)。野兔病は、野兔病菌に感染した野ウサギやげっ歯類等との接触、ダニ・アブ等の節足動物による刺咬により感染する。野兔病は東北・関東を中心に発生がみられ、過去には栃木県からも感染者の報告がある。日本では 1924 年~1994 年までに 1372 例の患者報告があり、その後減少傾向を示した。1999 年の千葉県での発生を最後に報告がなかったが、2008 年に青森県、福島県、千葉県で 5 例の患者報告があった¹⁾。

近年、日本において野兔病は稀な感染症だが、野兔病菌の感染力は極めて高く、目などの粘膜・皮膚の細かい傷だけでなく、健康な皮膚からも侵入する。栃木県内のイノシシが抗体を保有していたことから、野兔病菌は県内の野生動物間で維持されていると考えられる。また、野兔病はヒトが海外の発生地で感染する可能性や、生物テロに使用される可能性のある病原体として二種病原体に指定されるなど、留意すべき感染症の1つである。ヒトが野外レクリエーションで野山に入る機会も増加していることから、今後も監視及び、死体を含め野ウサギやげっ歯類等との接触は避けること、ダニや昆虫の刺咬を防ぐこと、生水の飲用をしないこと等感染予防対策が必要である。

3.2 E 型肝炎

今回、E 型肝炎ウイルスに対する抗体保有率はシカ、イノシシともに 0%であった(表 1)。E 型肝炎はこれまで衛生環境が整っていない発展途上国の疾患と考えられていたが、近年、米国や日本において海外渡航歴のない E 型肝炎症例が報告された²⁾。E 型肝炎ウイルスは、ブタ、イノシシなどの動物にも感染し、これらの肉や内臓を生食あるいは加熱不十分なままで摂食することによって、ヒトに感染することが明らかになっている。

一部で肉を生で食す文化のある日本では、生肉を介して E 型肝炎ウイルスに感染する危険性は高いと考えられる。日本においてもシカ、イノシシなどの野生動物の肉や内臓などは、加熱を十分にして喫食することが感染を防ぐ上で重要である。

3.3 SFTS

今回、SFTS ウイルスに対する抗体保有率はシカ、イノシシともに0%であった(表1)。SFTSはダニ媒介感染症だが、イヌやネコなどの身近な伴侶動物からヒトへの直接感染も確認されている³⁾。イヌ、ネコがSFTS ウイルスに感染し発症すると、発熱、白血球・血小板減少などの症状を呈し、致死率はネコで60%、イヌで29%と致死的多い⁴⁾。これらのイヌやネコに噛まれたり、直接触れることでSFTS ウイルスに感染し発症、死亡したヒトの事例が確認されている³⁾。イヌやネコだけでなく、野生動物ではシカ、イノシシ、家畜では中国や韓国においてウシ、ブタ、ヒツジ等の感染が明らかとなっている⁴⁾。

2013年5月から開始された厚生労働科学研究の「SFTS(重症熱性血小板減少症候群)制圧に向けた総合研究」⁵⁾において、栃木県内で採取したマダニからSFTS ウイルス遺伝子が検出されている。SFTSの感染予防のためには、マダニに刺されないための予防対策、中国や西日本などの流行地では原因不明の病気のイヌやネコと接触しないこと、また動物取扱関係者は普段からの予防対策を実施することが重要である。

表1 シカ及びイノシシの抗体検査結果

動物種	検体数	抗体陽性数(抗体陽性率%)		
		野兎病菌	HEV	SFTSV
シカ	61	0(0%)	0(0%)	0(0%)
イノシシ	152	2(1.3%)	0(0%)	0(0%)
計	213	2(0.9%)	0(0%)	0(0%)

4 まとめ

栃木県内において捕獲されたシカ、イノシシの血漿を用いて3つの動物由来感染症に対する抗体価を測定した。抗体は病原体に罹患後に出現し、長期間継続するため現在又は過去の感染指標⁶⁾となる。2014年の動物におけるSFTS ウイルス感染状況の国内調査で、ニホンジカの抗体陽性率とヒト患者数には正の相関関係があることが明らかとなっている⁷⁾。このことより、動物由来感染症のリスク評価をする上で野生動物の抗体価を調査することは有用である。

抗体陽性率はそれぞれ、シカは野兎病0%、E型肝炎0%、SFTS0%、イノシシは野兎病1.3%、E型肝炎0%、SFTS0%であった。今回の調査結果から、これらの動物由来感染症について栃木県内のヒトへの感染リスクは低いと考えられた。しかし、ジビエを食品として利用する場合には、捕獲、処理、加工、流通、消費の各段階で衛生的に処理することや、調理時の十分な加熱処理や器具の消毒など取扱いには注意する必要がある。また、野外活動をする際には、SFTS以外のダニ媒介感染症を防ぐためにもマダニに刺されないよう予防対策が必要である。

このような調査を通じて県内にある、又はこれから侵入の可能性のある病原体を監視することは重要である。今後とも監視を継続していくとともに、県内の動物由来感染症対策や県民への啓発に寄与したいと考える。

5 謝辞

野生動物の血液検体の採材にあたり、丸山哲也様(現栃木県自然環境課)、野澤努様(元宇都宮大学)に御協力いただきました。

野生動物の抗体検査にあたり、前田健先生(現国立感染症研究所獣医科学部)、堀田明豊先生(現国立感染症研究所獣医科学部)、木村昌伸先生(元国立感染症研究所獣医科学部)に御協力いただきました。この場を借りて心から感謝を申し上げます。

6 参考文献

- 1) 野兎病について、厚生労働省、<https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou06/> (最終閲覧日:2020年9月7日)
- 2) 国立感染症研究所、人獣共通感染症としてのE型肝炎、病原微生物検出情報、35、4-5、2014。
- 3) 国立感染症研究所、重症熱性血小板減少症候群(SFTS)、2019年6月現在、病原微生物検出情報、40、111-112、2019。
- 4) 国立感染症研究所、SFTS発症動物について(ネコ、イヌを中心に)、病原微生物検出情報、40、118-119、2019。
- 5) 厚生労働省健康局結核感染症課、重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルスの国内分布調査(第二報)について(情報提供)、2014。
- 6) 庵原俊昭、抗体検査:目的・結果・次にすることは、小児感染免疫、vol.23 No.1、89-95。
- 7) 国立感染症研究所、動物におけるSFTSウイルス感染状況、病原微生物検出情報、37、51-53、2016。