

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：17601
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2015～2017
課題番号：15K07724
研究課題名(和文) アジアから島伝いに北上するアルボウイルス感染症の動向予察

研究課題名(英文) A trend prediction of Arbovirus infection from Asia

研究代表者

平井 卓哉 (Hirai, Takuya)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：60321668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：御崎馬の血液242サンプルを採取し、日本脳炎のHI抗体が多数(73%)検出された。一方、HI抗体価陰性の多くは3歳以下の若齢馬であった。同地域のサル、イノシシおよびブタの血清を調べたところ、イノシシおよびブタが日本脳炎の増幅動物として重要であることが示唆された。死亡した御崎馬7頭を剖検し、寄生虫性病変が5例に認められ、寄生虫感染が死因に深く関わっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Antibody against Japanese encephalitis (JE) by HI test showed many samples (73%) were seropositive in wild horse. On the other hand, most of antibody negative horses were less than three years old. Antibody against JE is also examined in wild monkeys, wild bores and pigs. The wild bores and pigs act as strong amplifier and source of infection. Seven cases of dead wild horses were examined by pathologically and parasitic arteritis was found in 5 cases. These results indicate that parasitic infection is related the cause of death in wild horse.

研究分野：獣医病理

キーワード：日本在来馬 イノシシ サル ブタ 蚊 アルボウイルス 日本脳炎 疫学調査

1. 研究開始当初の背景

1) 地球温暖化による蚊やダニなどの吸血性節足動物の生息域が北上する中、これらが媒介するアルボウイルス感染症の国内侵入が危惧されている。国内への侵入経路として、1) 季節風や航空機などによる感染蚊の侵入、2) 感染鳥類や感染患者などの入国が考えられる。九州はアジアに近く、近隣諸国から飛来する吸血性節足動物を介して、アジア流行株や新型遺伝子のアルボウイルスが侵入する可能性が懸念されており、その監視体制の確立・強化が益々重要である。

日本脳炎の地域別発生頭数を調べると、ブタでは九州・沖縄地方において最も多く発生している。地域別患者数はヒトでも九州・沖縄地方に最も多い。このことから、九州・沖縄地方が日本脳炎を含むアルボウイルスの侵入口になっていると考えられる。日本脳炎の予防接種は副作用の事例を契機に H17～H21 年度まで積極的な接種勧奨を差し控えられてきた。このため H7～H18 年度生まれの子供では予防接種(合計 4 回)が不十分になっており、今後、九州・沖縄地方において感染・発症する可能性が極めて高い。

宮崎県境から鹿児島県大隅半島は養豚密集地帯であり、東側の宮崎県串間市都井岬には御崎馬が生息している。御崎馬は半野生状態のまま管理され、国の天然記念物に指定されている。御崎馬は現在 100 頭ほど生息し、保護対策として、毎春柵に追い込みダニの駆除や血液採取を実施している。都井岬の広大な草地で御崎馬はシバを採食しているが、イノシシによるシバの掘り起しが至る所にみられる。串間市には、「イモ洗いをするサル」で有名な多数のニホンザルが生息している。イノシシやサルによる農作物被害は深刻で、当地では有害鳥獣駆除の対象とされているため、これらのサンプルを入手することが可能である。

地球温暖化に伴いアルボウイルス感染症が増加し、アジアに近い九州・沖縄における本症

の監視体制は極めて重要である。本症の代表的疾患は日本脳炎で、ブタとイノシシが増幅動物になりヒトやウマに感染する。宮崎県都井岬には、野生の御崎馬、イノシシおよびサルが多数生息し、ワクチン未接種であるため、貴重な「オトリ動物」と見なせる。また、日本在来馬 8 種のうち、5 種は九州・沖縄に生息・飼養されている。本研究では、在来馬、イノシシ、サル、ブタならびに蚊を用いて、アジア由来の日本脳炎ウイルスの動向とその病態を追跡する。

2) 日本に存在する 8 種の在来馬の中でも、都井岬の「御崎馬」は時代を経て再び野生化した貴重な存在として唯一、国の天然記念物に指定されている。この野生馬の死因については、全く調べられておらず、新たな知見が得られると思われる。

2. 研究の目的

本研究では御崎馬、イノシシ、サル、ブタ、蚊を用いて日本脳炎の感染状況や病態との関連性を明らかにし、アジアから侵入するアルボウイルス感染症対策を展開するための基盤とする。

1) 御崎馬、イノシシ、サル、ブタの血清を用いて日本脳炎の抗体検査を実施し、各動物の感染状況を明らかにする。また、御崎馬、イノシシ、サル、ブタの血清および蚊を用いて日本脳炎の遺伝子検査を実施する。陽性例はシーケンス解析を実施し、ウイルス株の由来を明らかにする。

2) 日本在来馬 8 種の内 5 種(対州馬、御崎馬、トカラ馬、宮古馬および与那国馬)が九州・沖縄地方に飼養・放牧されており、それらの多くでワクチンは未接種である。これらの在来馬の血清を用いて日本脳炎を中心に抗体検査を実施し、感染状況を明らかにする。

3) 御崎馬が死亡した場合には剖検を行い、日本脳炎の感染状況や死因を明らかにする。

3. 研究の方法

宮崎県都井岬に生息している御崎馬、イノシ

シ、サル、ブタを用いて日本脳炎の抗体保有率、日本脳炎ウイルスの検出状況および遺伝的性状を明らかにする。また、他の日本在来馬における日本脳炎を中心に抗体検査を実施し、感染状況を調べる。また、死亡した御崎馬の死因を究明する。これらを明らかにするために、以下の研究項目を実施する。

1) 御崎馬を用いた日本脳炎の抗体検査および遺伝子検査

毎年5月末もしくは9月末に約100人の関係者が参加し、御崎馬を柵に追い込む馬追いが行われる。この馬追は主にダニと寄生虫の駆除、ならびに血液採取を目的に実施されている恒例行事である。本研究ではこの時に採取した血清を用いて抗体検査(HI抗体価)を実施する。また、RNAを抽出後、日本脳炎の遺伝子検出を行う。陽性例はシーケンス解析を実施する。

2) イノシシ・サル血液を用いた日本脳炎の抗体検査および遺伝子検出

都井岬は観光地になっており、イベント会場周辺の野芝草地においてイノシシによる掘り起しが目立っている。また、都井岬周辺においてイノシシやサルによる農作物被害が報告されており、串間市猟友会によって毎年多数が捕獲されている。本研究では捕獲されたイノシシやサルの血清を得る。これらのサンプルを用いて上記1)と同様に日本脳炎の抗体検査、遺伝子検出、シーケンス解析を行う。

3) ブタ血清を用いた日本脳炎の抗体検査および遺伝子検出

対象とするブタは都井岬周辺の養豚場で飼養されている肥育豚(約6ヶ月齢)とする。肥育豚は一般的に日本脳炎のワクチン未接種である。5月~9月にかけてこれらのブタの血清を鹿児島県北部の屠畜場にて採取する。採取した血清サンプルを用いて上記1)と同様に日本脳炎の抗体検査、遺伝子検出、シーケンス解析を行う。

4) 蚊を用いた日本脳炎の遺伝子検出

蚊の採取は5月~10月まで都井岬にある御崎馬の水飲み場周囲(5~10ヵ所)とする。蚊は猪口鉄工所製電池式ライトトラップ(ドライアイス併用)で採取する。捕獲した蚊はRNAを抽出し、上記と同様に日本脳炎の遺伝子検出を行う。

5) 他の日本在来馬の血清を用いた日本脳炎等の抗体検査と遺伝子検査

九州・沖縄地方に飼養・放牧されている日本在来馬(対州馬、トカラ馬、宮古馬、与那国馬)の血清は、日本在来馬を研究対象としている共同研究者より分与してもらう。これらの血清を用いて上記と同様に日本脳炎の抗体検査と遺伝子検査を実施する。

6) 御崎馬の死因調査

御崎馬の死亡が発見された場合には剖検を実施し、病理組織学的検査、上記ウイルスの遺伝子検査を行い、死因を明らかにする。

4. 研究成果

1) 御崎馬を用いた日本脳炎の抗体検査および遺伝子検査

3年間で御崎馬の血液 242 サンプルを採取し、日本脳炎の HI 抗体が 177 サンプル(73%)検出された。検出抗体はすべて感染抗体であり、多くの馬が日本脳炎の抗体を保有していることが明らかになった。一方、HI 抗体価陰性の多くは 65 サンプルであり、それらの内 43 例(66%)は 3 歳以下の若齢馬であった。今後、これらの陰性馬が感染すれば、発症する可能性が考えられた。また、242 サンプルを用いて日本脳炎の PCR を実施し、28 例でウイルス遺伝子が検出された。しかし、シーケンス解析は困難であった。

2) イノシシ・サル血液を用いた日本脳炎の抗体検査および遺伝子検出

イノシシの血液 69 例を用いて日本脳炎の HI 抗体価を調べたところ、53 例(77%)が陽性を示した。一方、サルでは 70 例の血液を用いて日本脳炎の HI 抗体価を調べ、21 例(30%)が陽性を示した。これらの結果から、イノシシの日

本脳炎の抗体保有率は、サルのものより高いことが明らかになった。イノシシの血液を用いて日本脳炎の PCR を実施し、12 例でウイルス遺伝子が検出された。また、サル血液を用いて日本脳炎の PCR を実施し、3 例でウイルス遺伝子が検出された。しかし、イノシシおよびサルのシークエンス解析は困難であった。

3) ブタ血清を用いた日本脳炎の抗体検査および遺伝子検出

ブタの血液 89 例を用いて日本脳炎の HI 抗体価を調べたところ、59 例 (66%) が陽性を示した。これらの結果から、日本脳炎の抗体保有率は、イノシシ、ブタ、サルの順で高いことが示された。ブタの血液を用いて日本脳炎の PCR を実施し、6 例でウイルス遺伝子が検出されたが、シークエンス解析は困難であった。

4) 蚊を用いた日本脳炎の遺伝子検出

毎年 7 月、8 月、9 月の 3 回、3 年間で合計 9 回ライトトラップで蚊を多数採取し、日本脳炎の PCR を実施したが、ウイルスは検出されなかった。

5) 日本在来馬 8 種の内 5 種 (対州馬、御崎馬、トカラ馬、宮古馬および与那国馬) が九州・沖縄地方に飼養・放牧されており、それらの多くでワクチンは未接種である。日本在来馬について日本脳炎の HI 抗体価を調べたところ、対州馬 10 例中 8 例、与那国馬 9 例中 6 例、宮古馬 10 例中 1 例が陽性であった。比較のために、中部地方に飼育されている木曽馬 9 例を調べたところ 7 例が陽性であった。宮古馬で抗体陽性例がなかった理由については不明であった。

6) 御崎馬の死因調査

御崎馬の死亡馬 7 頭 (11 ヶ月齢、1 歳、10 歳 2 頭、15 歳、16 歳、18 歳) について病理検査を実施した。4 例 (11 ヶ月齢、10 歳、16 歳、18 歳) には寄生虫性病変が消化管および前腸間膜動脈に認められ、これらが死因と考えられた。回腸血黒症が 3 例 (11 ヶ月齢、15 歳、18 歳) にみられた。高齢馬 1 例 (15 歳) には横隔膜破裂が認められ、これは急崖からの落下が推測された。

その他、高齢馬の 1 例 (16 歳) に関節病変がみられた。これは御崎馬が急峻な丘を移動するため、環境的要因も影響していると考えられた。若齢馬の 1 頭 (1 歳) には直腸破裂および続発性腹膜炎が観察された。10 歳の他の 1 例には食道閉塞を伴う誤嚥性肺炎が認められ、これらが死因と考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

伊藤宗磨、平井卓哉、堀井洋一郎、山口良二

野生馬の死因に関する病理学的研究

第 159 回日本獣医学会学術集会

2016 年 9 月 6 日 ~ 8 日

日本大学

〔その他〕

ホームページ等

http://www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~vet/Vet_path/index.html

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

平井 卓哉 (HIRAI, Takuya)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号 : 60321668

(2) 研究分担者

小林 郁雄 (KOBAYASHI, Ikuo)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号 : 20576293

(3) 研究分担者

高須 正規 (TAKASU, Masaki)

岐阜大学・農学部・准教授

研究者番号 : 00503327