

紀伊半島大台ヶ原のニホンジカ *Cervus nippon* の日本脳炎ウイルス抗体保有状況齊藤美加¹⁾*, 荒木良太²⁾, 鳥居春己³⁾, 浅川満彦⁴⁾

1) 琉球大学大学院医学研究科・ウイルス学 〒903-0215 沖縄県西原町字上原 207

2) 自然環境研究センター 〒130-8606 東京都墨田区江東橋 3 丁目 3 番 7 号

3) 奈良教育大学自然環境教育センター 〒630-8528 奈良県奈良市高畑町

4) 酪農学園大学獣医学群獣医学類感染・病理学分野 〒069-0851 北海道江別市文京台緑町 582

[2015年1月29日受領, 2015年5月11日採択]

要約

日本脳炎ウイルス (JEV) 感染リスク評価の一環で、2009年と2010年に紀伊半島大台ヶ原で捕獲されたニホンジカ *Cervus nippon* (以下、シカ) の JEV 抗体保有状況を調査した。JEV, Oki431S 株に対し 87 頭中 9 頭 (10.3%) が、Beijing-1 株に対し 1 頭 (1.1%) が抗体を保有し、年齢階層が高くなるに従い、抗体保有率の上昇傾向がみられた。これらより、シカに JEV に対する感受性がある事、大台ヶ原で JEV 感染環が成立し、JEV の活動は低いが発見されている地域である事が強く示唆された。

キーワード：ニホンジカ, リスク評価, 日本脳炎ウイルス, 紀伊半島大台ヶ原

— 日本野生動物医学会誌 20(3) : 41-45, 2015

日本脳炎ウイルス (JEV) はヒトに脳炎を起こす蚊媒介性のフラビウイルスで、かつて大流行し、重篤な症状と後遺症のため公衆衛生上の脅威であった日本脳炎の病原体である。ウマに脳炎、ブタに死産を引き起こし、まれにウシの神経症状や、ヤギの下行性麻痺が報告されている [1, 2]。現在、日本脳炎は、家畜伝染病予防法において、流行性脳炎として馬、牛、水牛、めん羊、山羊、鹿、豚、いのししを対象動物とした家畜伝染病として指定されている。JEV は主にコガタアカイエカ *Culex tritaeniorhynchus* により媒介され、鳥類、哺乳類、爬虫類に感染する。ブタが主な増幅動物であり、サギなどの鳥類を自然界の維持動物とし、感染環が成立している [3]。ヒト、ウマなど多くの哺乳類同様、反芻動物のウシ、スイギュウ、ヤギ、ヒツジは吸血蚊の有毒化に必要な高いウイルス血症を呈さず終末宿主と考えられている [4-6]。また、コガタアカイエカはブタ、ウシ、ウマなど中大型動物に強い吸血嗜好性があり JEV の自然宿主選択の要因となっている [7, 8]。日本脳炎には特異的治療法はないため、対策はワクチンと蚊の対策による予防と対症療法である。また生態学的特徴から、JEV の分布と活動

が農業形態や温暖化など環境の変化による影響を受けやすく [9]、それゆえ、地域での監視と感染リスク評価が重要である。

三重県と奈良県の県境に位置する紀伊半島大台ヶ原では森林保全を目的に、ニホンジカ *Cervus nippon* (以下、シカ) の個体数調整が行われている [10]。全国的にもシカの個体数増加と分布域拡大がすすみ、ヒトと接触する機会が増えている。今までにシカの日本脳炎の発症報告はないが、最近、高い抗体保有率が報告され、増幅動物の可能性が示唆されたが、調査頭数が少なく不明な点も多い [11]。今回、紀伊半島大台ヶ原シカの抗体保有状況を調査し、当該地域での JEV 浸淫度を推定した。また、シカが感染源になりうるかを検討した。

紀伊半島大台ヶ原にて個体数調整のため 2009年6月から12月に31頭、2010年4月から12月にかけて56頭の計87頭のシカを捕獲し個体計測、及び、第一切歯の歯根部から年輪法 [12] を用いて年齢査定を行った (表1)。同時に採取した血清を-30℃で保管し、血清試験前に63℃、20分で非働化した [13]。血清中の JEV に対する中和抗体価を90%フォーカス減少法 (FRNT₉₀) による中和試験にて測定し、遺伝子型及び抗原性が異なる JEV2 株; laboratory 株の Beijing-1 株 (遺伝子型3型) と近年日本に分布する遺伝子型の2002年沖縄分離株 Oki431S 株 (遺伝子型1型) を用い、各株に対する抗体価を測定した [14, 15, 16]。中和抗体価<10を抗体陰性と

* 責任著者:

齊藤美加 (E-mail: mikas@med.u-ryuky.ac.jp)

し、抗体保有率の有意差検定は χ^2 検定にて行なった。その結果、血清 87 検体中 1 検体 (1.1%) が Beijing-1 株に対し、9 検体 (10.3%) が Oki431S 株に対し中和抗体陽性であり、Oki431S 株に対する保有率は Beijing-1 株の保有率に比べ高かった (図 1)。Beijing-1 株に対する陽性個体一頭 (抗体価 11)

表 1 捕獲個体 年齢内訳

年齢	個体数	♂	♀
0	28	12	16
1	13	8	5
2	9	3	6
3	5	3	2
4	5	1	4
5	4	1	3
6	2	1	1
7	8	2	6
8	5	1	4
9	3	2	1
10	2	0	2
11	0	0	0
12	0	0	0
13	2	1	1
14	1	0	1
計	87	35	52

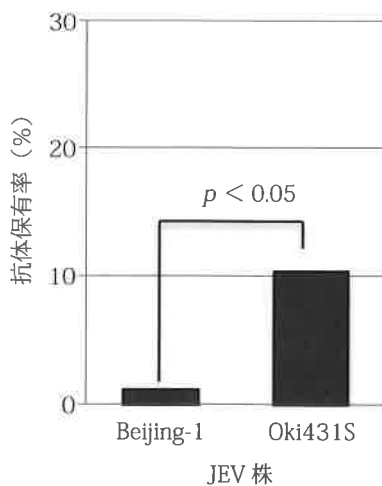


図 1 ニホンジカの日本脳炎ウイルス各株に対する中和抗体保有率
 χ^2 検定にて各株に対する保有率に有意差あり ($p < 0.05$)。

は、Oki431S 株に対しても陽性であり (抗体価 17) JEV 抗体の交差反応と考えられた。抗体価 < 10 を 5 として中和抗体価幾何平均値 \log_{10} を算出したところ、Beijing-1 株に対し 0.703 ± 0.037 、Oki431S 株に対し 0.748 ± 0.150 であり、Oki431S 株に対し高い傾向が見られた (図 2)。雌雄による抗体保有率の有意差は両株ともに認められなかった (図 3)。対象のシカは野生でありワクチン接種歴が無く、抗体陽性個体は JEV の自然感染により免疫を獲得したと考えられる。

各年齢階層群の個体数にばらつきがあるが、Beijing-1 株及び Oki431S 株に対する抗体保有率は 0 ~ 4 歳群に比し 5 ~ 9 歳群が高く、また全体に年齢階層が高くなるに伴い保有率の上昇傾向が認められた (図 4)。Beijing-1 株と Oki431S 株に対する抗体保有率はそれぞれ 2009 年が 0% と 9.7%、2010 年が 1.8% と 10.7% で捕獲年での差異は認めなかった。このことから、シカが JEV に感受性がある事、大台ヶ原は JEV の活動は低い常在している地域であることが強く示唆された。

日本では、1990 年代に JEV の主な遺伝子型が 3 から 1 にシフトし、抗原性が変化した [17, 18]。中和に用いた Oki431S 株と Beijing-1 株は異なる抗原グループに属している [17] が、交差反応があり、今回のシカ血清は Oki431S 株に強く反応し、

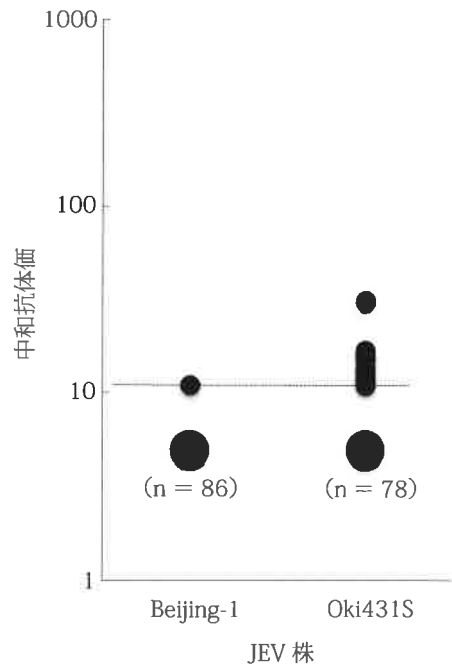


図 2 ニホンジカの日本脳炎ウイルス各株に対する中和抗体価それぞれの点は各個体の中和抗体価を表す。中和抗体価 < 10 を 5 として表示した。
括弧内は抗体価 < 10 の個体数。

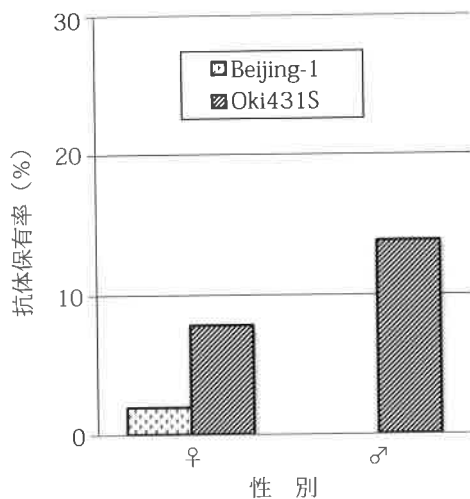


図3 性別中和抗体保有率

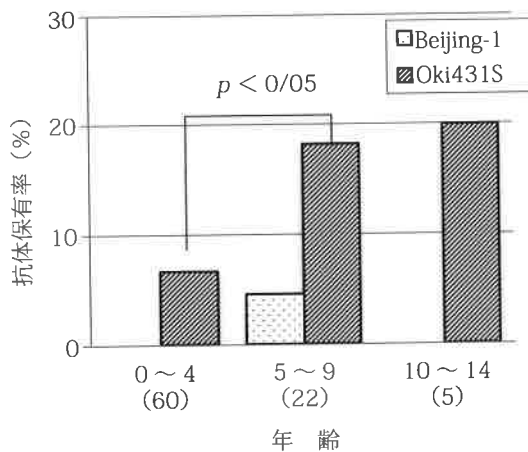


図4 年齢階層別中和抗体保有率

χ^2 検定にて各株に対する保有率に有意差あり ($p < 0.05$)。括弧内は階層群の個体数。

抗体保有率、抗体価ともに高かった。これより、近年の自然感染を把握するための疫学調査に用いる株は Oki431S 株がより適していると考えられた。

血清の保管が -80°C ではなく、ウイルス分離に適した状態ではないが、血清量が十分あった 68 検体の血清を蚊の細胞 C6/36 に接種し、分離を試みた [17] が、全て陰性であった。加えて抗体保有率、抗体価ともに低く、感染源として必要な血中のウイルス増殖を裏付ける結果は得られなかった。この結果

は、シカでの高い抗体保有率(92%)を示した米満らの報告[11]とは異なっていた。地域による浸淫度の違いと感染源の可能性を明らかにするには、異なる地域、より多くの個体を対象とし、異なる病原学的、血清学的試験の条件の結果分析による慎重な評価が必要である。

大台ヶ原でのシカ捕獲地点は標高約 1200m 地点の山間部である。また、シカの生息する町村とその 5km 周辺に豚舎はなく、ブタ-蚊-ブタの JEV 感染環は成立しない地域である。しかし、イノシシの生息が確認されており、また他地域ではイノシシに JEV 抗体 [19] と抗原 [20] が認められることから、大台ヶ原での JEV 感染環の維持にイノシシが関与している可能性がある。また、JEV 媒介能があり野生動物を吸血すると考えられているヤマトヤブカ *Aedes japonicus* [21, 22] が、1973 年の調査では、大台ヶ原において採集されている [23] ため、この種の関与も考えられる。大台ヶ原は国立公園特別保護地区に指定されており、蚊の発生時季でもある春から秋にかけて数多くの観光客が訪れるため、JEV 感染環解明を目的とした蚊、野生動物、ウイルスの生態学的調査が求められる。また、これらを通じて、JEV の土着機序の解明につながる可能性がある。

今回、シカの JEV 抗体保有率により推定する浸淫度は、近畿地区で行われた米満ら [11] や紀伊半島の Ohno ら [19] の野生動物の抗体保有率調査のそれより明らかに低く、JEV 感染リスク評価の指標としての信頼性の継続調査が望まれる。しかし、シカが JEV に自然感染し、年齢階層が高くなるに従い抗体保有率に上昇がみられたことから、シカの抗体保有状況が森林等野外での JEV の浸淫度を反映している事が示された。シカ生息数の低減に向けた個体数調整により今後も多くの捕獲が行なわれるとともに、周辺地域では狩猟獣として持続的に捕獲される事が見込まれる事から、検体が広域的かつ安定的に供給されることのできる貴重な研究対象種の一つと位置づけられる。

謝 辞

本研究にご協力いただいた、琉球大学大学院医学研究科ウイルス学教室、只野先生はじめ皆様に深謝いたします。また、琉球大学女性研究者支援事業による研究補助員宝川氏、伊佐氏、玉城氏、木下氏に感謝いたします。本研究で使用したシカ血清は環境省近畿地方環境事務所委託事業である平成 21 年度大台ヶ原ニホンジカ個体数調整業務、平成 22 年度大台ヶ原ニホンジカ個体数調整業務により捕獲された個体から採取されました。また、本研究の一部は、学術振興会科学研究費基金基盤 C (No.23510030) および文部科学省私立大学戦略拠点事業(酪農学園大学大学院 2013 年~2017 年)の助成を受け遂行しました。

引用文献

1. 農林省家畜衛生試験場, 家畜衛生研究のあゆみ. 1963, 家畜衛生試験場: 東京都. p. 18-26.
2. Kako N, Suzuki S, Sugie N, Kato T, Yanase T, Yamakawa M, Shirafuji H. 2014. Japanese encephalitis in a 114-month-old cow: pathological investigation of the affected cow and genetic characterization of Japanese encephalitis virus isolate. *BMC Vet Res* 10: 63.
3. Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. 2004. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med* 10: S98-109.
4. Mackenzie JS, Williams DT, Smith DW. 2007. Japanese encephalitis virus: The geographic distribution, incidence, and spread of a virus with a propensity to emerge in new areas. In *Emerging Virus in Human Population* (Tabor E ed.), pp. 201-268. Elsevier, B.V, Netherland.
5. Shimoda H, Tamaru S, Morimoto M, Hayashi T, Shimojima M, Maeda K. 2011. Experimental infection of Japanese encephalitis virus in dogs. *J Vet Med Sci* 73: 1241-1242.
6. Ilkal M, Dhanda V, Rao B, George S, Mishra A, Prasanna Y, Gopalkrishna S, Pavri KM. 1988. Absence of viraemia in cattle after experimental infection with Japanese encephalitis virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82: 628-631.
7. Mitchell CJ, Chen PS, Boreham PF. 1973. Host-feeding patterns and behaviour of 4 *Culex* species in an endemic area of Japanese encephalitis. *Bull World Health Organ* 49: 293-299.
8. 野村幸男. 1955. 富山市内及び周辺地区の蚊に関する研究 第2報: 昭和28年夏季における蚊の発生状況と動物嗜好性並びに昨年度との比較について. *金沢大学十全医学会雑誌* 57: 1550-1564.
9. 上村 清. 1998. 日本脳炎媒介蚊の発生動態に関する研究. *衛生動物* 49: 181-185.
10. 樋口高志, 樋口香代. 2009. 森林生態系保全再生の取り組み. 大台ヶ原の自然誌—森の中のシカをめぐる生物間相互作用 (柴田叡弐, 日野輝明 編), pp.234-244. 東海大学出版会, 秦野.
11. 米満研三, 服部志保, 鈴木絢子, 浜崎千菜美, 下田 宙, 前田 健. 2014. ニホンイノシシのウイルス感染症. *兵庫ワイルドモノグラフ* 6: 93-105.
12. 大泰司紀之. 1990. 歯の年輪による哺乳類の年齢査定. *哺乳類科学* 30: 19-21.
13. 石井慶蔵. 1987. 補体結合反応. ウイルス実験学 総論 (国立予防衛生研究所学会 編), pp.226-259. 丸善, 東京.
14. Okuno Y, Igarashi A, Fukai K. 1978. Neutralization tests for dengue and Japanese encephalitis viruses by the focus reduction method using peroxidase-anti-peroxidase staining. *Biken J* 21: 137-147.
15. Saito M, Nakata K, Nishijima T, Yamashita K, Saito A, Ogura G. 2009. Proposal for Japanese encephalitis surveillance using captured invasive mongooses under an eradication project on Okinawa Island, Japan. *Vector Borne Zoonotic Dis* 9: 259-266.
16. Santaella J, McLean R, Hall JS, Gill JS, Bowen RA, Hadow HH, Clark L. 2005. West Nile virus serosurveillance in Iowa white-tailed deer (1999-2003). *Am J Trop Med Hyg* 73: 1038-1042.
17. Saito M, Taira K, Itokazu K, Mori N. 2007. Recent change of the antigenicity and genotype of Japanese encephalitis viruses distributed on Okinawa Island, Japan. *Am J Trop Med Hyg* 77: 737-746.
18. Ma SP, Yoshida Y, Makino Y, Tadano M, Ono T, Ogawa M. 2003. Short report: a major genotype of Japanese encephalitis virus currently circulating in Japan. *Am J Trop Med Hyg* 69: 151-154.
19. Ohno Y, Sato H, Suzuki K, Yokoyama M, Uni S, Shibasaki T, Sashika M, Inokuma H, Kai K, Maeda K. 2009. Detection of antibodies against Japanese encephalitis virus in raccoons, raccoon dogs and wild boars in Japan. *J Vet Med Sci* 71: 1035-1039.
20. Nidaira M, Taira K, Itokazu K, Okano S, Kudaka J, Nakamura M, Ohno A, Takasaki T. 2008. Detection of Japanese encephalitis virus genome in Ryukyu wild boars (*Sus scrofa riukiuanus*) in Okinawa, Japan. *Jpn J Infect Dis* 61: 164-165.
21. 上村 清. 1976. 日本産蚊科各種の解説. 蚊の科学 (佐々 学 編), pp. 150-288. 北隆館, 東京.
22. Takashima I, Rosen L. 1989. Horizontal and vertical transmission of Japanese encephalitis virus by *Aedes japonicus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 26: 454-458.
23. Tanaka K, Mizusawa K, Saugstad ES. 1979. A Revision of the Adult and Larval Mosquitoes of Japan (Including the Ryukyu Archipelago and the Ogasawara Islands) and Korea (Diptera: Culicidae). *Contrib. Amer. Ent. Inst.* 16: 987.

Research note Virology

**Prevalence of Japanese encephalitis virus antibody in sika deer (*Cervus nippon*)
in Odaigahara, Kii Peninsula, Japan**

Mika SAITO¹⁾ *, Ryota ARAKI²⁾, Harumi TORII³⁾, Mitsuhiko ASAKAWA⁴⁾

1) Department of Microbiology and Oncology, Graduate School of Medicine, University of the Ryukyus,
Nakagami, Okinawa 903-0215, Japan

2) Japan Wildlife Research Center, Sumida, Tokyo 130-8606, Japan

3) Center for Natural Environment Education, Nara University of Education, Nara, Nara 630-8528, Japan

4) Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069-0851, Japan

[Received 29 January 2015; accepted 11 May 2015]

ABSTRACT

Sero-epidemiological study of Japanese encephalitis virus was conducted on sika deer (*Cervus nippon*) captured in Odaigahara, a forested area, on Kii peninsula, Japan, in 2009 and 2010. Nine (10.3%) out of 87 deer had neutralizing antibodies against Japanese encephalitis virus (JEV) Oki431S strain, belonging to genotype 1, a widely circulating genotype in Japan, and one (1.1%) had that against JEV Beijing-1 strain, vaccine strain, genotype 3. Prevalence rates of JEV Oki431S antibody tended to increase with age and reached 20%. This result indicates that deer are sensitive to JEV, and also strongly suggests that Odaigahara is a JEV-endemic area, with rather low virus activity.

Key words: sika deer, risk assessment, Japanese encephalitis virus, Odaigahara

— *Jpn J Zoo Wildl Med* 20(3) : 41-45, 2015

*Corresponding author :

Mika SAITO (E-mail: mikas@med.u-ryukyu.ac.jp)