

## 2022年度 北陸大学特別研究助成【 連携研究 】報告書 -最終-

代表者	所属	医療保健学部	職位	教授	氏名	小宮 智義
-----	----	--------	----	----	----	-------

研究課題名	石川県内で捕獲されるイノシシの蚊媒介性ウイルスを中心とした病原体保有調査とヒトへの感染リスクに関する研究
-------	--

交付額	8,500,000	円
-----	-----------	---

### 研究成果の概要

本研究は、国内においてイノシシの農村部から都市部への出現で、イノシシが病原体の宿主や増幅動物となり得る可能性が懸念される中で、グローバル化が進む北陸地方における蚊媒介性フラビウイルスの日本脳炎ウイルス（JEV）の流行動態を、野生動物を中心にした疫学調査を行い、ヒトへの感染リスク評価と、JEVの新たな生態学について検討を行うことで生物学的意義と生態学的インパクトを明らかにすることを第一の目的とした。また、ヒトへの感染リスク評価として薬剤耐性菌保有率を指標とすることで、イノシシ本来の居住域でない都市部への侵入が頻繁に行われているかを明らかにすることとした。

本研究では、第一に、捕獲されたイノシシから、蚊やダニ媒介性ウイルスを中心に、各種ウイルスの保有調査、ウイルス分離を行った。また、JEVの生物学的および生態学的意義を、疫学及び実験的な解析により新たな増幅動物と越冬機序の解明を目指した。第二に、薬剤耐性菌保有調査を行うことで、都市部への侵入割合を調査し、ヒトへの感染リスク指標とし、第三に、ジビエ食文化としての安全性を担保する上で他のウイルス等の疫学調査を協力機関と実施した。本研究では、今までに培ってきたデータを元に、地方からの発信による、大都市への感染流行リスク回避と新たなウイルス生態学解明により、観光立国を目指す我が国とグローバル化による感染懸念を払拭し、都市部と地方における役割と、ウイルスや感染リスク病原体の生態学的発展に寄与応用できると期待した。

本研究期間の3年間で捕獲されたイノシシ血清97検体についてJEVに対する疫学調査を行った。その結果JEVの流行動態は、3年間で85頭（87.6%）の抗体陽性率が認められ、その中でも18頭（9.4%）のイノシシが中和抗体価1,000倍以上の高抗体価を示した。IgM抗体価は、2020年8月～9月に捕獲された4頭（4.1%）のみが陽性であった。JEV特異的遺伝子の検出では2022年7月に捕獲された1頭のみ陽性であった。本研究第三の目的としたジビエ食文化のヒトへのリスク調査として協力研究機関である国立感染症研究所ウイルス二部と行ったE型肝炎ウイルス（HEV）調査では、HEV特異的遺伝子検出では糞便が採取できた全26頭全てがPCR陰性で、血清中からも遺伝子検出は出来なかった。一方血清中抗体価は、測定した75頭中9頭（12%）が陽性であった。

本研究の3年間では、初期感染指標のIgM抗体検出が4.1%と、研究開始前の調査より低く、またJEV遺伝子が検出されたのは1頭のみであった。2017年度から同様の疫学調査を実施しているが、研究期間前の2年間に比べJEVおよびHEVの調査結果全ての陽性率が低い結果となった。同時期にパンデミックが起きた新型コロナウイルス流行が何らかの影響を野生動物に対しても与えているのか、年度毎の調査結果の違いが環境など何によるものか興味深く、今後も調査を継続しながら各年度の比較解析を行っていきたいと考えている。疫学調査以外では、イノシシ個体でのJEV持続感染仮説を我々が提唱していることを念頭に、リンパ節標本からの抗原検出系を確立した。また、JEV持続感染細胞から産出されるウイルスの性状解析を行い、JEVの3'NCRにアミノ酸の欠損を見出した。この欠損がウイルス増殖に関与するのかを現在の流行株と比較検討していき、JEVの越冬機序解明の一助として疫学的並びに実験的にも継続していく予定である。

薬剤耐性菌保有調査では、糞便検体数は2020年度で15検体、2021年度で8検体、2022年度で11検体が得られ、スクリーニング検査では、すべて陰性であり、2019年度に薬剤耐性菌が検出されていた地域でも薬剤耐性菌は検出されなかった。この3年間は新型コロナウイルスや豚熱が蔓延しており、ヒトの移動が制限されたことや、イノシシは豚熱により個体数が減ったことにより、ヒトとイノシシの居住域が従来と比べると離れたことが要因と考えられる。人獣共通感染症の原因となる寄生虫はブタ回虫、ドロレス顎口虫、マンソン裂頭条虫が検出されており、非加熱の肉や肝臓の摂取には注意が必要であることを改めて示唆した。

## 研究成果

### ①研究成果の学術的意義および社会的意義

本研究期間の3年間で捕獲されたイノシシ血清97検体についてJEVに対する疫学調査を行った。全国的なイノシシに豚熱の感染発生が認められる中で捕獲制限がされており、石川県も2021年4月から捕獲が中止されたが8月から再開し、捕獲されるイノシシ頭数が減少しながら石川県内では捕獲が継続的に出来た。

その結果JEVの流行動態は、3年間で85頭（87.6%）の抗体陽性率が認められ、中でも18頭（9.4%）のイノシシが中和抗体価1,000倍以上の高抗体価を示した。IgM抗体価は、2020年8月～9月に捕獲された4頭（4.1%）のみが陽性であった。JEV特異的遺伝子の検出では2022年7月に捕獲された1頭のみ陽性であった。本研究第三の目的としたジビエ食文化のヒトへのリスク調査として協力研究機関である国立感染症研究所ウイルス二部と行ったE型肝炎ウイルス（HEV）調査では、HEV特異的遺伝子検出では糞便が採取できた全26頭全てがPCR陰性で、血清中からも遺伝子検出は出来なかった。一方血清中抗体価は、測定した75頭中9頭（12%）が陽性であった。本研究の3年間は、初期感染指標のIgM抗体検出が4.1%と、研究開始前の調査より低く、またJEV遺伝子が検出されたのは1頭のみであった。

薬剤耐性菌保有調査では、糞便検体数は2020年度で15検体、2021年度で8検体、2022年度で11検体が得られ、スクリーニング検査では、すべて陰性であり、2019年度に薬剤耐性菌が検出されていた地域でも薬剤耐性菌は検出されなかった。この3年間は新型コロナウイルスや豚熱が蔓延しており、ヒトの移動が制限されたことや、イノシシは豚熱により個体数が減ったことにより、ヒトとイノシシの居住域が従来と比べると離れたことが要因と考えられる。人獣共通感染症の原因となる寄生虫はブタ回虫、ドロレス顎口虫、マンソン裂頭条虫が検出されており、非加熱の肉や肝臓の摂取には注意が必要である。

近年の地球温暖化や交通網のグローバル化により、病原体媒介蚊の分布域拡大および活動期間の長期化が予想され、これに伴う蚊媒介性ウイルスの流行拡大が懸念されている。特に温暖化の影響によって媒介動物の国内土着により輸入感染症でなくなる日も近い将来見据えて行く必要も考えられる。

一方、本研究で対象にしたJEVは媒介蚊がヒトへの感染には必須であるため、その流行は蚊の活動期間の間に起きるものと考えられてきた。しかし、国内に土着しているJEVが何故冬を越しているかは未だ解決されていない。我々がイノシシからのJEVに対する初感染を示唆したことより（komiya, T. et al. 2019, J.Vet.Sci.）、本地方をモデルとしたJEVの生態、特にウイルスの越冬機序の解明を継続している疫学調査と確立された持続感染系ウイルスの比較を行うことは、新たな試みであり、その成果を報告し続けている。同時にJEVを対象として行った本研究材料から、新たなウイルスの疫学調査研究を他の機関と行うことでネットワークのさらなる構築も計画している。

研究代表者が本学に着任し、金沢医科大学や石川県環境センターらと蚊媒介性ウイルスを話題に、分担研究者である金沢医科大学名誉教授（現自然史研究センター副理事）の竹上先生を初めとしてウイルス自然史研究会を立ち上げた。石川県から発信できる特色を生かし、年2回程度の研究会を行っている。グローバル化が進む観光都市石川県金沢市でのマズギャザリングと感染症が論じられる中で、自然豊かな観光都市への病原体侵入程度を模索することは、未だ行われていなく、初めての地方モデルとなり得る。そのため、通年捕獲されたイノシシを材料に、蚊媒介性ウイルスを中心とした調査検討を行い、疫学的、ウイルス生態学的にも有意義な結果が得られ、継続することは必須であるものとする。

県内大学や行政機関と連携し、我が国全体を見ながら、石川県内の動向を位置づけ、観光都市としての病原体侵入リスト並びに感染リスクを考えて行くことで、全国に先駆けての初めての試みとなったものと考えている。

### ②研究成果の展開および社会への還元

得られた研究成果は、協力研究機関からのデータが全て出揃うのを待ち紙上発表をしていく予定でいる。本研究で得られた成果は、一般の方々に向けてもわかりやすいように、また感染リスクはあるものの食文化には影響がない事など安全性とウイルスの環境における自然史として、石川県自然史研究センターでの報告およびシンポジウムも計画している。

本研究で得られた材料を元に、ヒトに病原性を示すウイルスを中心とした新種のウイルスに対する抗体調査を共同研究機関と行い始めている。さらに、今後病原体のみならずイノシシの起源に関する動物固体に関する研究も計画している。このように、本研究で得られた貴重な材料を元に、新たな研究体制のネットワーク構築も視野に入れながら今後も継続していく予定でいる。

## 主な発表論文等

### 論文

Komiya,T., Honda-Okubob,Y., Baldwin,J., Petrovsky,N. An Advax-adjuvanted inactivated cell-culture derived Japanese 2 encephalitis vaccine induces broadly neutralising anti-fla-3 vivirus antibodies and cellular immunity and provides single 4 dose protection.Vaccines,2021.9,1235

Komiya,T., Toriniwa, H. Characterization of Japanese encephalitis virus isolated from persistently infected cells.TropicalMed. 2023. in press

Sato H, Norimatsu Y, Irino S, Nishikawa T. Efficacy of the Antigenicity-Retaining Ability of Fixative Solutions for Liquid-Based Cytology: Immunocytochemistry of Long-Term Storage. Acta Cytol.;65(6):510-521.2021.

佐藤妃映, 玉野裕子, 佐々木規雄, 吉野敦子, 迫 欣二, 坂根潤一, 浅野敦. 2021年度中部圏支部病理細胞検査研修会における免疫染色サーベイの実施報告. 医学検査. 71(3); 470-484.2022

佐藤妃映, 横田憲治, 渡辺朱理, 苔口進, その他. 尿沈渣標本中に出現する顆粒状物質と尿路細菌叢との関連について. 日本防菌防黴学会誌. 48(12);623-628.2020

松村隆弘,平田基裕,金森隆樹,林晃司,川井孝太,長嶋和子,井上佳,星雅人：中部圏医療施設における寄生虫検査の現状.日本臨床寄生虫学会誌 2022;33(1):84-86.

松村隆弘：寄生虫検査のために遺伝子検査はどこまで必要なのか？. 日本臨床検査医学会誌 2023; 71(3):151-155.

### 学会発表

Komiya,T., Naohoko, Y., Toriniwa,H., Takegami,T., Seroepidemiological survey of Japanese encephalitis virus in wild boars in Japan, 2017-2019. 30th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease. April, 2020. Paris.Komiya,T. Japanese encephalitis vaccine. Biologics Manufacturing Japan & Vaccine World Japan 2021. September 2021. Sigpore (Web)

小宮智義,松村隆弘,近藤由萌,竹上勉,中山哲夫. 2017年から2021年までに石川県で捕獲されたイノシシにおける日本脳炎ウイルスの血清疫学調査. 第69回日本ウイルス学会.香川県. 2022年11月.

佐藤妃映. 北陸大学の教育への取り組みと教員からみた学生像. 令和4年度日臨技中部圏支部医学検査学会（第60回）. 2022年10月8日～10月9日

佐藤妃映, 玉野裕子, 佐々木規雄, 吉野敦子, 迫欣二, 坂根潤一, 浅野敦. 2021年度中部圏支部病理細胞検査研修会における免疫染色サーベイの実施報告. 令和3年度日臨技中部圏支部医学検査学会（第59回）. 2021年9月25日～10月24日（Web開催）

佐藤妃映, 玉野裕子, 佐々木規雄, 吉野敦子, 迫 欣二, 坂根潤一, 浅野敦. p53 抗体サーベイ結果報告. 2021年度中部圏支部病理細胞検査研修会. 2021年7月4日～7月19日（Web開催）

佐藤妃映, 則松良明, 西川武. シュアパス-LBC法を用いた免疫細胞化学染色における抗原保持能力に関する検討. 第62回日本臨床細胞学会総会. 2021年6月18日～7月11日（Web開催）

則松良明, 川西なみ紀, 佐藤妃映, 西川武, 二村 梓, 品川明子, 黒川哲司, 矢納研二. WS LBC標本作製システムにおける標本品質から見た問題点. 第62回日本臨床細胞学会総会. 2021年6月18日～7月11日（Web開催）

松村隆弘,平田基裕,金森隆樹,林晃司,川井孝太,長嶋和子,井上佳,星雅人：中部圏支部臨床一般部門寄生虫検査アンケート報告 第2報. 第71回日本医学検査学会. 2022.

松村隆弘,平田基裕,金森隆樹,林晃司,川井孝太,長嶋和子,井上佳,星雅人：中部圏医療施設における寄生虫検査の現状. 第33回日本臨床寄生虫学会大会. 2022.

## 組織

氏名	所属	役割
◎ 小宮 智義	医療保健学部・教授	研究統括・ウイルス関連研究実施
松村 隆弘	医療保健学部・助教	イノシシ材料採取、薬剤耐性菌検出他
佐藤 妃映	医療保健学部・教授	イノシシ組織の病理学的検索
濱田 敏彦	医療保健学部・教授	イノシシの病理、生理学的検索
竹上 勉	石川県自然史センター副理事長 金沢医科大学名誉教授	情報分析とウイルス自然史研究会などの情報発信
村上 学	金沢医科大学・准教授	蚊の捕集、ウイルス分離
中山 哲夫	北里大学大村智記念研究所名誉教授	ウイルス遺伝子検索（動物感染実験含）