

図 2. 簡略化したリスクアセスメントモデル
 (文献番号は図 1 と共通)

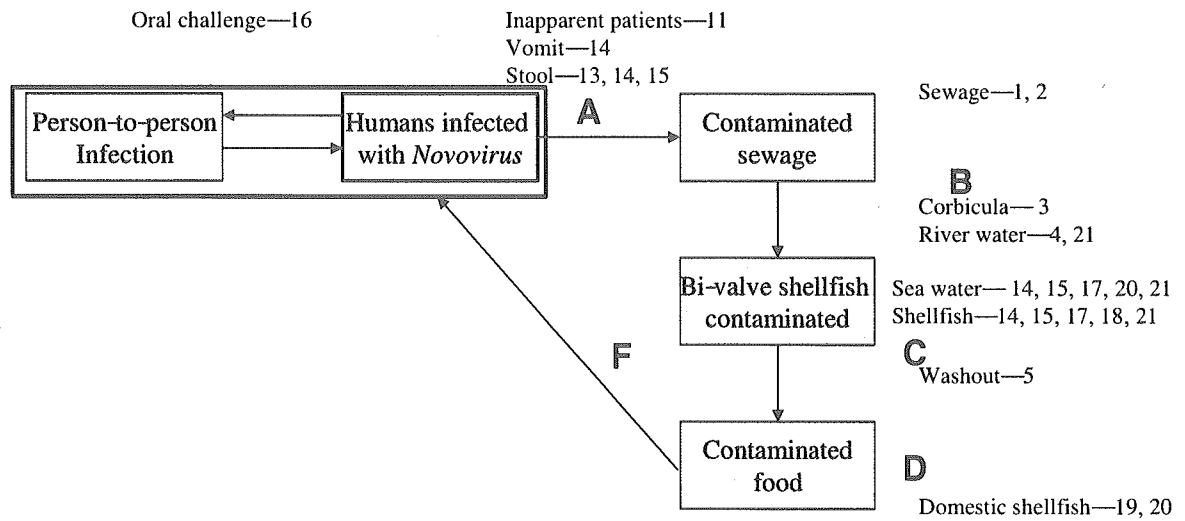
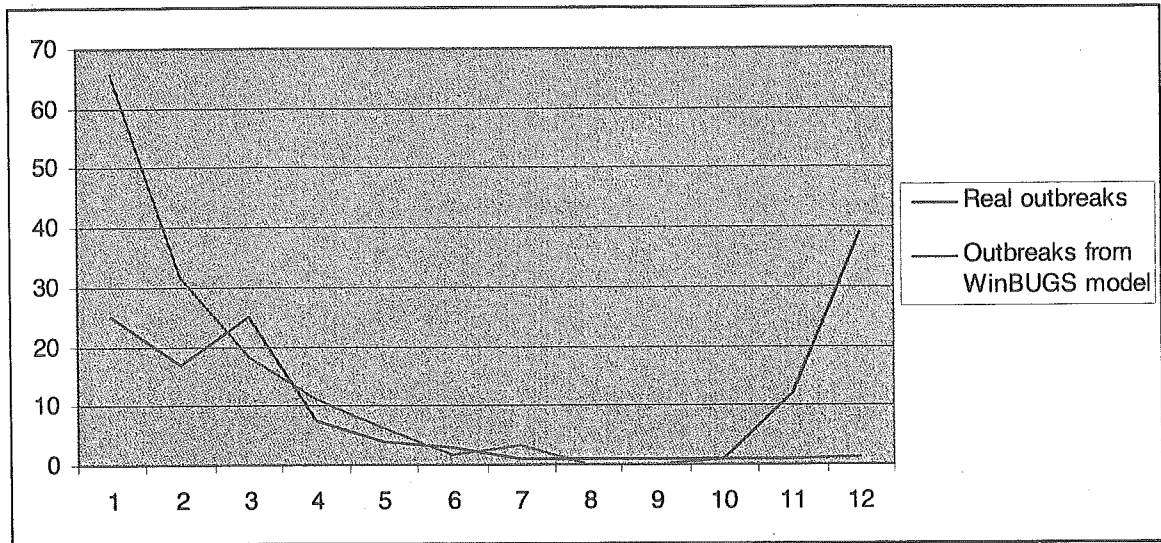


図 3. シミュレーション結果



生カキの消費量×カキの NV 量×変数＝集団発生件数として、月別に WinBUGS 上でシミュレーション。

生カキの消費量＝カキの 10 都市中央卸売市場卸売数量(月別)

生カキ消費量がカキの 10 都市中央卸売市場卸売数量に比例すると仮定

カキの NV 量＝下水処理場の処理水中の NV 量(月別)

カキの NV 量が下水処理場の処理水中の NV 量に比例すると仮定

集団発生件数＝病原微生物検出情報(月別)

全被害実態を把握できていると仮定

図 4. 月別のノロウイルス感染集団発生件数とカキの消費量

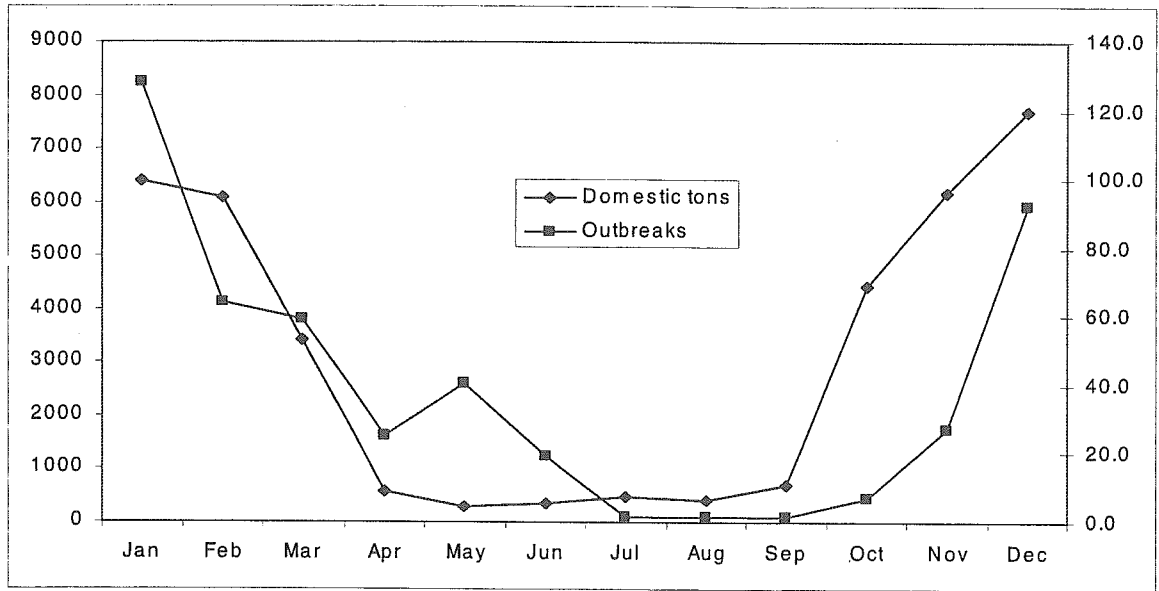


図 5. 月別のノロウイルス感染集団発生件数/カキの消費量

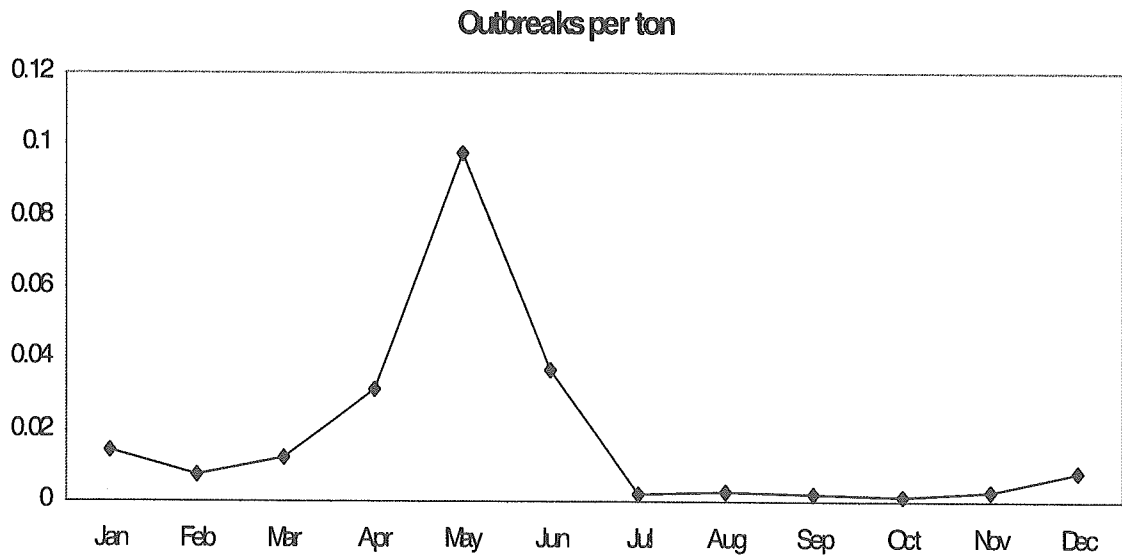


表 1. 平成 16 年食中毒事例(Norovirus のみ)

2004

Month	total cases	cases of each suspected food				
		raw oyster	cooked oyster	other seafood	non-seafood	unknown
Jan.	40	6	0	4	0	30
Feb.	33	8	1	3	1	20
Mar.	48	3	1	7	4	33
Apr.	23	2	0	2	1	18
May	17	0	1	0	0	16
Jun.	14	1	1	1	1	10
Jul.	4	0	0	0	1	3
Aug.	1	0	0	0	0	1
Sep.	2	0	0	0	0	2
Oct.	4	0	0	0	0	4
Nov.	10	0	0	0	0	10
Dec.	83	5	2	3	3	70
Total	279	25	6	20	11	217

紀伊半島における野生動物の HEV 保有調査

分担研究者 田中智之 (堺市衛生研究所)

研究協力者 三好龍也、内野清子 (堺市衛生研究所)

研究協力者 李 天成、武田直和 (国立感染症研究所 ウイルスⅡ部)

研究概要

紀伊半島において、本年度、新たな定点地区を設け、野生イノシシ、野生シカにおける E 型肝炎ウイルス(HEV)保有状況を調査研究した。その結果、野生イノシシ 36 頭、野性シカ 14 頭から HEV 遺伝子は検出されなかった。しかし、一昨年度調査から続いて HEV が検出されている一地域から捕獲された 2 頭のイノシシに、低値ながら HEV 抗体が ELISA 法で検出された。また、この地域を狩猟基地とする猟師 8 名中 1 名に HEV 抗体が検出された。この定点地区では、野生イノシシの間に HEV が恒常的に浸淫している可能性が推測された。

新たに設定した定点地区の野生のイノシシ、シカからは HEV 遺伝子は検出されなかった。この地区には交雑種イノブタ試験場がある。市場のイノブタ筋肉からは HEV 遺伝子は検出されなかったが、今後、食の安全・安心のリスクマネジメントを高める上でも、イノブタから HEV 遺伝子検索は重要である。

A. 研究目的

厚生労働科学研究費補助金(厚生労働科学特別研究事業)「食品に由来する E 型肝炎ウイルスのリスク評価に関する研究」班が平成 15 年に設立されてから、紀伊半島におけるイノシシ、シカを中心に野生動物における E 型肝炎ウイルス(HEV)保有状況を調査してきた。平成 15 年、16 年の両年度には、狩猟されたイノシシそれぞれ 1 頭から HEV 遺伝子を検出した。これらの遺伝子型はいずれも Genotype III であった。

今年度は 16 年度と同様に紀伊半島に 3 定点地区を設定し、そこで狩猟されたイノシシ、シカを対象として HEV 保有調査を行った。

定点地区はこれまでと同様に、紀北(A 地区)、紀中(B 地区)のほかに紀伊半島南部のすさみ町地区を新たな定点地区(C 地区)として加えた。A 地区は大阪府との県境に存在している。B 地区に近接してサファリパークがあり、所属動物病院とは、HEV 検査の共同研究が提携されている。C 地区には、和歌山県で開発されたイノブタ試験場がある。

これらの 3 定点地区で狩猟されたイノシシ、シカの HEV 抗原・抗体保有調査を目的とした。また、HEV のヒトとの関連性を調査する目的で定点地区で狩猟にかかわった猟師を対象に HEV 抗体検査も実施した。

B. 研究方法

材料

1. 野生動物検体

2005年11月～2005年2月にかけて狩猟されたイノシシ36頭、シカ14頭、合計50頭から採取された肝臓47検体、血液50検体を検査材料とした

(A地区：イノシシ17頭、B地域：イノシシ9頭、シカ7頭、C地区：イノシシ10頭、シカ7頭)。血液はHEV抗体測定に用い、HEV遺伝子の検出はnested RT-PCRにて行い、肝臓、血液を対象検体とした。

B地区付近のサファリパークから、日本シカ1検体が得られた。

C地区付近のイノブタ牧場のイノブタの市販筋肉1検体もnested RT-PCRによるHEV遺伝子の検出を試みた。

2. 定点地区猟師検体

各定点地区の猟師を対象に、狩猟歴、肝炎歴等のアンケートも実施した。調査に同意の得られた10人(A地区8人、C地区2人)から採血した血清10検体を検査材料とし、HEV抗体検査及びnested RT-PCRによるHEV遺伝子検出を試みた。

方法

1. 血清中のHEV抗体測定法

抗HEV抗体測定は昨年と同様、「E型肝炎検査マニュアル」に準じた。すなわち、李らにより発現されたバキュロウイルスHEVウイルス様粒子

(HEV-VLPs)を抗原として、96wellプレートに固相した。これに1:200倍希釈血清と反応させ、標識二次抗体で検出した。抗体価はVLPs固相ウエル

の吸光度と血清希釈液のウエルの吸光度差0.2以上を抗体陽性とした。ELISA法の反応性は供与された陽性コントロール、陰性コントロールの反応性で確認された。

2. HEV遺伝子検出法

肝臓は20%乳剤を10,000G、20分間遠心した上清をRNA抽出キット(ISOGEN-LS, ニッポンジーン)にてウイルスRNAを抽出し、滅菌蒸留水30 μ lに浮遊させた。血清は無希釈で用い、同様の方法でHEV-RNAを抽出した。抽出したRNAからHEV遺伝子検索のPCR法は、前述の測定マニュアルに準じた。PCR産物は、ABI PRISM 310 Genetic Analyzerを用いたダイレクトシーケンスでその塩基配列を調べた。

3. 肝組織中のHEV検出蛍光抗体法

昨年度報告できなかったHEV遺伝子陽性イノシシの肝組織を用いて、肝組織におけるHEV局在を検討した。蛍光抗体法は昨年の方法に準じた。すなわち、肝凍結切片は直ちに冷アセトンにて15分間固定した。PBSにてリンスしHEVモノクローナル抗体MAb133培養上清を一次抗体として37 $^{\circ}$ C、一時間反応させた。洗浄後、二次抗体のFITC-標識anti-Mouse IgGにて、37 $^{\circ}$ C、30分反応させた。洗浄後封入し、蛍光顕微鏡で観察した。

C. 研究結果

1. 野生動物のHEV検査結果

(1) HEV特異IgG抗体価

イノシシから採取された血液36検体、シカから採取された血液14検体は、すべてHEV抗体陰性であった。しかし、A地区のイノシシ2頭(H17-6, H17-17)の血中抗体価のOD値は、それぞれ0.114, 0.131と値は低いものの、

直ちに抗体陰性と断定するに困難な値であったが、陽性の可能性が示唆された(表 1)。既感染による抗体価の減少期にあることも推測された。

(2) HEV ウイルス遺伝子検出

イノシシ 36 頭(肝臓 34 検体、血液 36 検体)、シカ 14 頭(肝臓 13 検体、血液 14 検体)のどの検体からも HEV 遺伝子は検出されなかった。

またイノブタ 1 検体の筋肉からは HEV 遺伝子は検出されなかった。

2. 猟師の HEV 検査結果

猟師 10 名中 A 地区の猟師 1 名(hunter A1)は ELISA 法による OD 値は 0.243 と高く、HEV 抗体陽性と考えられた(表 2)。この症例は狩猟歴 40 年、20 年前に肝炎歴の既往があり、またイノシシの生食の経験も有していた。狩猟歴 30 以上の他の三名は HEV 抗体陰性であった。また、上記の猟師一名を除いた 8 名にもイノシシの生食の経験を有していたが、HEV 抗体は検出されなかった。血中から HEV 遺伝子の検出を試みたが全て陰性であった。猟師の肝機能検査では特に異常な所見は見られなかったが、前述の猟師(hunter A1)は HCV carrier である。

3. 蛍光抗体法による肝組織内 HEV の局在

今年度の間接蛍光抗体法の結果は、昨年度と異なり、肝類洞や Kupffer 細胞に反応が認められたが肝細胞質内には陽性所見は認められなかった。肝門脈域にはリンパ球を主とした炎症性細胞の浸潤がみられ、一部では lymph follicle 様所見も見られた。病理組織学的には chronic persistent hepatitis の所見と考えられた。

D. 考察

今年度調査を行った 3 定点地区すべてにおいて、イノシシ、シカから HEV は検出されなかった。しかし、A 地区のイノシシ二頭の血中抗体価は低値であるものの、HEV 抗体陽性が強く示唆された。この地域では、一昨年度、昨年度に亘ってイノシシから HEV 遺伝子が検出されている。この地域には HEV の浸淫が示唆されており、今年度の成績もこれを裏付ける結果と思われる。

地域における HEV 浸淫を知る指標のひとつとして、地域での猟師の血中 HEV 抗体の有無を検索する方法がある。検体は少ないが、A 地区、C 地区の猟師の HEV 抗体価を検索した。その結果、A 地区の狩猟歴 40 年、60 代の男性 1 名が HEV 抗体陽性であった。イノシシ生食歴、20 年前に肝炎歴もある。しかし、狩猟歴 30 年以上の三名、イノシシ生食歴のある八名には、HEV 抗体は検出されず、必ずしも狩猟歴とイノシシ生食歴に相関は見られなかった。どのタイミングで HEV 保有イノシシの肝あるいは筋肉を生食するか、猟師が E 型肝炎に発症する重要な要因と考えられた。HEV 抗体陽性猟師の肝炎の発症原因は不明だが、HCV による可能性も否定できず、HEV との直接的な因果関係は不明である。

A 地区においては、これまでの調査で平成 15、16 年度とイノシシ 1 頭から HEV を検出している。これら 2 株の遺伝子解析の結果、ORF2 の約 2000nt の相同性は 99% 以上で非常に近縁なウイルスであった。これらの結果から A 地区では、近縁な genotype III の HEV が恒常的に浸淫している可能性が考えられる。野生動物の HEV 保有状態把握のために、今後も引き続き A 地区を中心に定点地区における HEV 保有調査を行う予定であ

る。

C 地区付近にイノブタ牧場があり、市販のイノブタ 1 検体の HEV 検査を行ったが、HEV 遺伝子は検出されなかった。検体数が少なかったこともありイノブタの HEV 保有状況については明らかにできなかった。

イノブタは、和歌山県で交雑されたイノブタで県外に流通市場されていると聞く。どの時点でリスクマネジメントを発動するかは、今後検討していかなければならないが、食の安全・安心を考える上でイノブタの HEV の保有調査は重要性が高く、来年度の主要研究課題と考えている。

HEV はイノシシの肝組織で増殖しているということは、ブタの恒光らの報告をもとに類似の解釈がなされている。我々は HEV 特異モノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法でその証明を試みているが、確証にはいたっていない。

今後は HEV 陽性のイノシシ、ブタの肝臓組織を用いて、in situ hybridization、in situ PCR による HEV の遺伝子の検出、局在の特徴などを検討し、HEV の感染病理についても解析する予定である。

E. 結論

前年度と同様に紀伊半島3定点地区における野生イノシシ、野生シカの HEV 保有状況調査を行った。合計 50 頭の野生動物から HEV 遺伝子は検出されなかった。しかし、前年に HEV 遺伝子が検出された1定点では、2頭のイノシシから、低値ながら HEV 抗体が認められた。一方、同地域での猟師8名中 1 名に HEV 抗体が検出された。

この成績は、同地域に HEV の恒常的浸淫を示唆するものと考えられる。

市場流通食品であるイノブタの筋肉について HEV 遺伝子検索を試みた。検体

は少なかったが、HEV 遺伝子は陰性であった。食品のリスクマネジメントの観点から、多数検体について検出を試みる必要がある。

イノシシ肝組織における HEV 局在の検討には、間接蛍光抗体法のみならずより高感度な方法による検討が必要と考える。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究業績

1. 論文発表

なし

2. 著書

なし

3. 学会発表

三好龍也、内野清子、李 天成、武田直和、田中智之. 野生イノシシにおける E 型肝炎ウイルスの保有調査. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会、2005.11.20-22, パシフィコ横浜

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

表1 野生動物の HEV 検査結果

番号	検体番号	動物種	体重 (kg)	性別	地域	RT-PCR		抗体
						肝臓	血液	ELISA
H17-1	WbH17A1	イノシシ	100	オス	A	陰性	陰性	0.090
H17-2	WbH17A2	イノシシ	70	オス	A	陰性	陰性	0.045
H17-3	WbH17A3	イノシシ	40	メス	A	陰性	陰性	0.004
H17-4	WbH17A4	イノシシ	65	オス	A	陰性	陰性	0.010
H17-5	WbH17A5	イノシシ	60	メス	A	陰性	陰性	0.011
H17-6	WbH17A6	イノシシ	70	オス	A	陰性	陰性	0.114
H17-7	WbH17A7	イノシシ	100	オス	A	陰性	陰性	0.016
H17-8	WbH17A8	イノシシ	20	メス	A	陰性	陰性	0.006
H17-9	WbH17A9	イノシシ	60	オス	A	陰性	陰性	0.009
H17-10	WbH17A10	イノシシ	130	オス	A	陰性	陰性	0.034
H17-11	WbH17A11	イノシシ	20	メス	A	陰性	陰性	0.006
H17-12	WbH17A12	イノシシ	90	オス	A	陰性	陰性	0.007
H17-13	WbH17A13	イノシシ	40	メス	A	陰性	陰性	0.027
H17-14	WbH17A14	イノシシ	70	メス	A	陰性	陰性	0.023
H17-15	WbH17A15	イノシシ	15	メス	A	陰性	陰性	0.008
H17-16	WbH17A16	イノシシ	70	メス	A	陰性	陰性	0.007
H17-17	WbH17A17	イノシシ	80	メス	A	陰性	陰性	0.131
H17-18	WbH17B1	イノシシ	45	オス	B	陰性	陰性	0.008
H17-19	WbH17B2	イノシシ	55	メス	B	陰性	陰性	0.006
H17-20	WbH17B3	イノシシ	50	メス	B	陰性	陰性	0.017
H17-21	WbH17B7	イノシシ	8	オス	B	陰性	陰性	0.001
H17-22	WbH17B9	イノシシ	55	メス	B	陰性	陰性	0.005
H17-23	WbH17B22	イノシシ	70	メス	B	陰性	陰性	0.015
H17-24	WbH17B23	イノシシ	65	メス	B	陰性	陰性	0.018
H17-25	DeH17B24	シカ	50	オス	B	陰性	NT	NT
H17-26	DeH17B25	シカ	60	メス	B	陰性	NT	NT
H17-27	WbH17BS1	イノシシ	不明	不明	B	NT	陰性	0.003
H17-28	WbH17BS2	イノシシ	不明	不明	B	NT	陰性	0.006
H17-29	DeH17BS3	シカ	不明	不明	B	NT	陰性	0.005
H17-30	WbH17B10	イノシシ	50	メス	C	陰性	陰性	0.006
H17-31	WbH17B11	イノシシ	50	オス	C	陰性	陰性	0.006
H17-32	WbH17B12	イノシシ	60	メス	C	陰性	陰性	0.006
H17-33	DeH17B13	シカ	40	オス	C	陰性	陰性	0.006
H17-34	DeH17B14	シカ	40	メス	C	陰性	NT	NT
H17-35	DeH17B15	シカ	55	メス	C	陰性	NT	NT
H17-36	DeH17B16	シカ	50	オス	C	陰性	陰性	0.007
H17-37	DeH17B17	シカ	60	オス	C	陰性	陰性	0.009
H17-38	DeH17B18	シカ	60	メス	C	陰性	NT	NT
H17-39	WbH17B19	イノシシ	45	メス	C	陰性	陰性	0.003
H17-40	DeH17B20	シカ	45	メス	C	陰性	NT	NT
H17-41	DeH17B21	シカ	70	メス	C	陰性	陰性	0.006
H17-42	WbH17B4	イノシシ	50	メス	C	陰性	陰性	0.005
H17-43	DeH17B5	シカ	40	オス	C	陰性	陰性	0.003
H17-44	WbH17B6	イノシシ	110	オス	C	陰性	陰性	0.007
H17-45	DeH17B8	シカ	40	オス	C	陰性	陰性	0.014

H17-46	WbH17B26	イノシシ	10	オス	C	陰性	NT	NT
H17-47	WbH17B27	イノシシ	20	メス	C	陰性	NT	NT
H17-48	WbH17B28	イノシシ	40	メス	C	陰性	NT	NT
H17-49	WbH17B29	イノシシ	45	オス	C	陰性	NT	NT
H17-50	DeH17B30	シカ	30	オス	C	陰性	NT	NT

番号	検体番号	動物種	地域	材料	RT-PCR
H17-40	BoH17ino1	イノブタ	C	筋肉	陰性

表2 猟師のHEV検査結果

		年齢	性別	狩猟歴	海外渡航歴	肝炎歴	生肉(イノシシ含む)喫食歴	ELISA	RT-PCR
A地点	hunter A1	67	男	40	あり	あり(20年前)	あり	0.243	陰性
	hunter A2	58	男	35	あり	なし	あり	0.00	陰性
	hunter A3	34	男	14	なし	なし	あり	0.00	陰性
	hunter A4	64	男	3	あり	あり(40年前)	あり	0.00	陰性
	hunter A5	66	男	46	なし	なし	あり	0.00	陰性
	hunter A6	60	男	3	あり	あり(3年前)	あり	0.024	陰性
	hunter A7	36	男	3	なし	なし	あり	0.00	陰性
	hunter A8	-	男	30	あり	なし	なし	0.00	陰性
C地点	hunter C1	27	男	7	なし	なし	あり	0.00	陰性
	hunter C2	32	男	7	-	-	あり	0.00	陰性

平成 17 年度 厚生労働科学研究費補助金 (食品の安心・安全確保推進研究事業)
分担研究報告書

東海地区における動物からの E 型肝炎ウイルス検出

1. 三重県で捕獲された野生ザルおよび霊長類研究所で実験飼育されるサルの血清からの HEV 遺伝子検出
2. 愛知県内の肥育豚の血清からの HEV 遺伝子検出
3. 愛知県西三河地区の豚舎排水からの HEV 遺伝子検出

分担研究者	榮 賢司	愛知県衛生研究所	微生物部長
協力研究者	山下照夫	愛知県衛生研究所	微生物部主任研究員
	小林慎一	愛知県衛生研究所	微生物部主任研究員
	伊藤 雅	愛知県衛生研究所	微生物部技師
	長谷川晶子	愛知県衛生研究所	微生物部技師

研究要旨

昨年度の研究報告において愛知県内で捕獲された野生イノシシ 91 頭中 11 頭 (12.1%) から E 型肝炎ウイルス (HEV) 遺伝子 genotype IV が検出され 91 頭中 25 頭 (27.5%) から HEV 抗体が検出されたことを報告した。これらのイノシシがどのような感染経路で汚染されたかについては不明であるが、特定の地域で捕獲されたイノシシから検出された HEV 遺伝子は塩基配列で 99.693%~100%、アミノ酸配列で 100% の相同性であった。わが国には、土着の HEV (G III と G IV) の存在が推測されているが、他の野生動物の HEV 保有状況についてはあまり調査されていない。実験動物では、チンパンジー、アカゲザル、カニクイザル、ミドリザル、マーモセット、リスザル等が E 型肝炎に対する感染性が報告されている。そこで今回の研究では、過去に採血され凍結保存されていた東海地区に生息する野生のサル及び実験飼育サルの血清中からの HEV 遺伝子の検出を行なったが、全て陰性であった。また、家畜の汚染状況を調査するため、愛知県内 (知多地区) の肥育豚 90 例の血清および家畜の糞便を介して排水の汚染があるか否かについて調査するため愛知県内 (西三河地区) の豚舎排水 (30ml) からの HEV 遺伝子の検出を行なったが、全て陰性であった。

A 研究目的

E 型肝炎は E 型肝炎ウイルス (HEV) の感染によって引き起こされる急性肝炎であり、近年我が国でも感染源の不明な E 型肝炎患者の報告が相次いでいる。これらの患者から検出される HEV 遺伝子には、ブタ (食用レバー) や野生イノシシ、シカから検出される遺伝子にきわめて類似するウイルスが存在する。これまでの調査

で愛知県内のイノシシが HEV に汚染されていることが確認されたが、イノシシの感染源については不明である。

そこで今回は、野生ザルおよび実験飼育されるサルの汚染状況、愛知県内の肥育豚および豚舎排水の HEV 汚染状況について調査した。

B 研究方法

材料

1. サル

1981～1991年に三重県で捕獲された野生ザル（推定年齢2～15歳）100頭から採取された血清及び1993年に霊長類研究所で飼育されるサル（ニホンザル2群、アカゲザル3群、各群6頭、タイワンザル1頭、キツネザル3頭、シロテナガザル2頭）計36頭から採取され凍結保存されていた血清を材料とした。

2. ブタ

2004年6月～2005年2月に愛知県内の養豚場で肥育されるブタ6ヶ月齢（美浜町30頭、東浦町10頭、常滑市15頭、碧南市25頭、南知多町10頭）計90頭から採取した血清を材料とした。

3. 豚舎排水

2005年2月22日に採水した愛知県西三河地区の豚舎排水30mlを材料とした。

方法

血清140 μ lを使用しRNA抽出キットにてウイルスRNAを抽出し、水60 μ lに浮遊させた。その5 μ lからHEV遺伝子のORF2領域に設計したプライマーを使用し、One-step RT-PCRキットを用いて1st RT-PCRを行い、更に2nd PCRによるnested PCRで増幅を試みた。また、豚舎排水30mlはポリエチレングリコールで濃縮し水140 μ lに再浮遊させ同様に処理した。

C. 研究結果

1. サルの調査

調査した野生ザル100頭及び実験飼育サル36頭の血清は、全てHEV遺伝子陰性であった。

また、E型肝炎と同様に経口感染するA型肝炎の抗体保有率を調べたところ、野生ザル100頭中28頭（28%）はA型肝炎に対する抗体を保有していた。一方、実験飼育サルはニホンザル2群各6頭、アカゲザル3群各6頭、タイワンザル1頭、キツネザル3頭はA型肝炎に対する抗体を保有していなかったが、シロテナガザル2頭は抗体を保有していた。

2. ブタの調査

調査した肥育豚90頭の血清は、全てHEV遺伝子陰性であった。

3. 豚舎排水

調査した排水はHEV遺伝子陰性であった。

D. 考察及び結論

サルは実験的にE型肝炎ウイルスに対して感受性が報告されていることから汚染状況を調査したが陽性例はなかった。一方、野生ザル、実験飼育サル（シロテナガザル）においてはE型肝炎と同様に経口感染するA型肝炎に対する抗体を保有している例があり過去に感染があったことがわかった。

昨年、三重県では食品に由来すると考えられるE型肝炎患者が4名報告されている（IASR Vol. 26, p267-269, 2005）原因食品については不明であるが流通する食肉や野生動物の汚染状況を調査することは意義があると考えられる。

6ヶ月齢のブタでは、90%以上がHEV抗体陽性であること、ブタでの感染時期は、1～3ヶ月齢で、出荷時にはウイルスは完全に体外に排出されていることが報告されている。これらのことより今回の調査対象である肥育豚の血清からはHEV遺伝子が検出されなかったと考えられる。

豚舎排水の調査は1回、1ヶ所からの材料でHEV遺伝子は検出されなかった。排水の調査は少なくとも1年間は継続し、複数の調査地点からの材料を定期的に調査して汚染の有無を確認する必要があると考えられた。

昨年までの研究報告で愛知県内の野生イノシシにおいてHEVの遺伝子および抗体の保有が確認され、イノシシがHEVの宿主であることが推測された。今回調査したブタ、サルは生育環境が地域、形態ともに異なることからHEVの汚染は確認されず野生イノシシの感染源との関連性はなかった。イノシシから検出されたHEV遺伝子は系統樹解析の結果、独立したクラスターを形成しており、土着のHEVの存在が推測されるが、イノシシの捕獲地域に生息する他の野

生動物や周辺地域で飼育される家畜、排泄物による水源の汚染状況については不明であった。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

学会発表

1) 山下照夫、伊藤 雅、谷口晶子、藤浦 明、
榮 賢司：新型アイチウイルス（2型）の VP1
遺伝子の検出. 第 53 回日本ウイルス学会、横
浜、2005 11月

2) 小林慎一、小原真弓、長谷川澄代、大矢英
紀、尾西 一、東方美保、猿渡正子、青木 聡、
田中保和、柴田伸一郎、中野陽子、杉山 明、
榮 賢司：平成 16 年度の東海・北陸地域にお
けるノロウイルスの検出状況と遺伝子解析. 第
53 回日本ウイルス学会、横浜、2005 11月

3) 伊藤 雅、山下照夫、谷口晶子、榮 賢司：
臨床検体からの Human parechovirus (HPeV) 属の
検出. 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005
11月

4) 本郷美那子、李 天成、伊藤 雅、榮 賢
司、宮村達男、武田直和：イノシシおよびヒト
由来 Genotype4 HEV の構造蛋白の発現及び抗
原性の解析. 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、
2005 11月

5) 伊藤 雅、山下照夫、藤浦 明、榮 賢司：
野生動物の E 型肝炎ウイルス (HEV) および HEV
抗体保有状況. 平成 17 年度 日本獣医師会学
会年次大会、つくば、2006 3月

G. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

	採血地	採取年	検査数	HEV遺伝子検出	HAV抗体検出
野生サル	三重県	1981～1991年	100	0	28
実験飼育サル	愛知県(霊長類研究所)	1993年	36	0	2*

*シロテナガザル

平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
「ウイルス性食中毒の予防に関する研究」班
分担研究報告書

E 型肝炎ウイルス感染豚肝臓中の感染ウイルス量

分担研究者：恒光 裕（動物衛生研究所 複合感染症研究室長）

研究要旨：豚肝臓における E 型肝炎ウイルス（HEV）の感染量を明らかにするため、2 つの感染実験を行った。最初の実験は、ノトバイオート豚で 2 代継代した豚由来 HEV（遺伝子型 3）含有肝臓を 10(1)、10(3)、10(5)および 10(7)倍に希釈して乳剤を調整し、各 1ml を生後 3 日齢のノトバイオート豚 1-3 頭（計 8 頭）に静脈内投与した。HEV を 10(1)あるいは 10(3)希釈投与した豚では、ウイルス RNA が糞便ならびに血清中に投与後 7 日（7PID）-14PID から検出された。両希釈とも血清中 IgG 抗 HEV 抗体ならびに糞便中 IgA 抗 HEV 抗体は 21-28PID より検出された。HEV を 10(5)希釈投与した豚では、糞便中の RNA は 10-14PID より検出されたが、血清中の RNA はほとんど検出されなかった。HEV 抗体は、血清中 IgG が 28-35PID より検出されたが、糞便中 IgA は検出されなかった。HEV を 10(7)希釈投与した豚では、糞便ならびに血清中にウイルス RNA は検出されず、抗体応答も認められなかった。臓器中の HEV RNA は、10(5)希釈投与豚まで肝臓を含む多くの臓器で検出されたが、10(7)希釈投与豚では臓器中にウイルス RNA は全く検出されなかった。これらの結果から、実験に使用した肝臓中には、0.1g あたり約 10(6)50%豚感染量の HEV が含まれることが明らかとなった。また、ウイルス投与量の減少により感染時期の遅延やウイルス血症の軽減が起こる可能性が示唆された。2 つ目の実験として、一食肉処理場で採取した HEV（遺伝子型 3）RNA 陽性の肝臓 1 例の 10%乳剤 1ml を生後 3 日齢のノトバイオート豚 2 頭に静脈内投与した。その結果、糞便ならびに血清中にウイルス RNA やウイルス抗体は全く検出されず、当該肝臓 0.1g 中に感染に必要な量のウイルスは確認できなかった。

共同研究者

池田秀利（動物衛生研究所）
宮崎綾子（動物衛生研究所）
吉井雅晃（動物衛生研究所）
神山麻理子（動物衛生研究所）
勝田 賢（動物衛生研究所）
川寫健司（動物衛生研究所）
加藤花名子（動物衛生研究所）
山口成夫（動物衛生研究所）

A. 研究目的

E 型肝炎は E 型肝炎ウイルス（HEV）の感染に起因するヒトの急性肝炎であり、近年わが国固有の HEV 株によると考えられる症例が多数認められている。一方、豚は高頻度で HEV に感染していることが報告され、豚レバーを喫食して感染・発症したと考えられる例が確認されている。本年度の研究では、ノトバイオート豚で継代した豚由来 HEV を含む肝臓 1 例ならびに食肉処

理場で採取した HEV RNA 陽性肝臓 1 例中の感染性ウイルス量をノトバイオート豚を用いた感染実験により明らかにし、非加熱豚レバー摂取による HEV 感染のリスク分析を行うことを目的とする。

B. 研究方法

感染実験 1

生後 3 日齢のノトバイオート子豚計 8 頭を実験に使用した。これらの豚は妊娠末期豚の子宮摘出により入手し、ビニールアイソレーター内で飼育した。投与材料はノトバイオート豚で 2 代継代した豚由来 HEV Highland 株（遺伝子型 III）を含む肝臓乳剤を使用した。肝臓乳剤は 10(1)、10(3)、10(5)および 10(7)倍に PBS で希釈し、各 1ml を 1-3 頭の子豚に静脈内投与した。ウイルス投与後 5-7 週間、糞便材料を週 2 回、血清材料を週 1 回採取した後、解剖検査して主要臓器等を採取した。採取した糞便は 10%乳

剤に、臓器、小腸内容(SIC)、大腸内容(LIC)、胆汁および尿は20%乳剤にそれぞれ調整後、RNAを市販のRNA抽出キット(TRIZOL-LS; Invitrogen)で抽出した。血清は希釈せずにそのままRNAを抽出した。

HEV RNAの定量は、TaqMan MGBプローブ法により実施した。プライマーならびにプローブはHEV Highland株のORF2領域の塩基配列を元に以下の通り設計した；フォワードプライマー(5'-TCTGCACTTTACTGGTACGAATGG-3')、リバープライマー(5'-GCCAAGAAGCGTATCAGCT-AGGTT-3')、TaqMan MGBプローブ(TGTTAAGGCAATGCCAC-3')。定量PCRは、当該ORF2領域を含むPCR産物(cDNA)のコピー数を算出してスタンダードとし、TaqMan EZ RT-PCRキット(Applied Biosystems)を用いてマニュアル通りに実施し

た。

HEV抗体の測定は、Liらの報告したウイルス様粒子(VLP)を抗原としたELISA法で実施し、血清材料は200倍希釈、糞便は10%乳剤で使用した。なお、HRPO標識抗豚IgGならびに抗豚IgA抗体はKPL社の製品を用いた。

感染実験2

一食肉処理場で出荷豚より採取した肝臓中、Nested PCR法でHEV(遺伝子型3)RNA陽性を示した1材料を投与材料とした。この肝臓10%乳剤1mlを生後3日齢のノトバイオト豚2頭に静脈内投与した。ウイルス投与後4週間、糞便材料を週2回、血清材料を週1回採取し、HEV RNAをNested PCR法で、HEV抗体をELISA法で測定した。

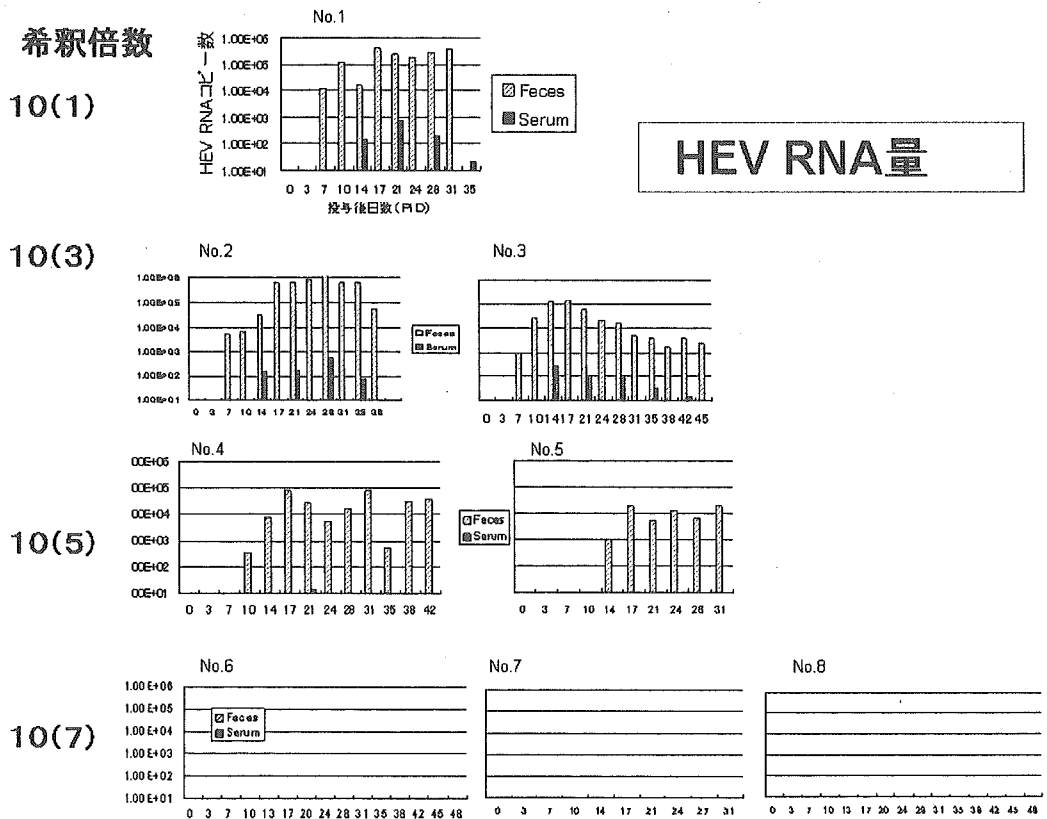


図1. HEV実験感染豚の糞便ならびに血清中のHEV RNA量

C. 研究結果

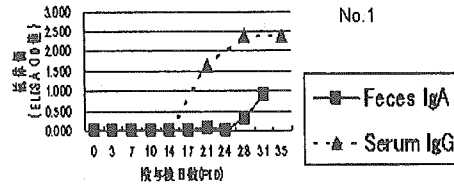
感染実験 1 (図 1、図 2)

いずれの豚においても臨床症状は認められず、血清中 ALT と総ビリルビン値も正常範囲であった。HEV を 10(1)あるいは 10(3)希釈投与した豚において、糞便中のウイルス RNA は投与後 7 日 (7PID) から、血清中のウイルス RNA は 14PID から検出され、検出される RNA 量は希釈間で大きな違いは認められなかった。両希釈とも血清中 IgG 抗 HEV 抗体は 21PID より、糞便中 IgA 抗 HEV 抗体は 28PID より検出された。HEV を 10(5)希釈投与した豚では、糞便中の RNA は 10-14PID より検出されたが、血清中の RNA はほとんど検出されなかった。HEV 抗体は、血清中 IgG が 28-35PID より検出され

たが、糞便中 IgA は検出されなかった。HEV を 10(7)希釈投与した豚では、糞便ならびに血清中にウイルス RNA は検出されず、抗体応答も全く認められなかった。臓器中の HEV RNA は、10(5)希釈投与まで肝臓を含む多くの臓器で検出され、希釈間で大きな違いは認められなかった。一方、10(7)希釈投与した豚では臓器中にウイルス RNA は全く検出されなかった。これらの結果から、今回感染実験に使用した肝臓中には、0.1g あたり約 10(6)50%豚感染量(PID50)の HEV が含まれることが明らかとなった。また、投与ウイルス量の減少により感染時期の遅延やウイルス血症の軽減が起こる可能性が示唆された。

希釈倍数

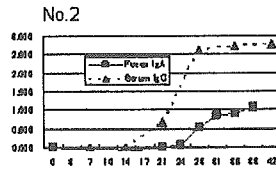
10(1)



No.1

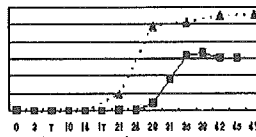
HEV抗体価

10(3)

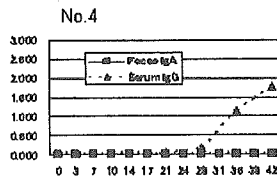


No.2

No.3

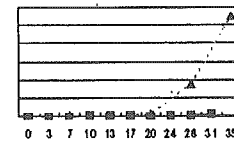


10(5)

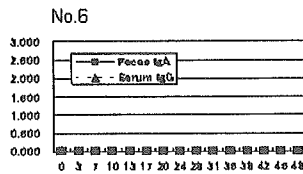


No.4

No.5

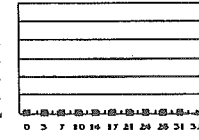


10(7)



No.6

No.7



No.8

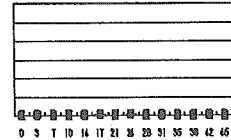


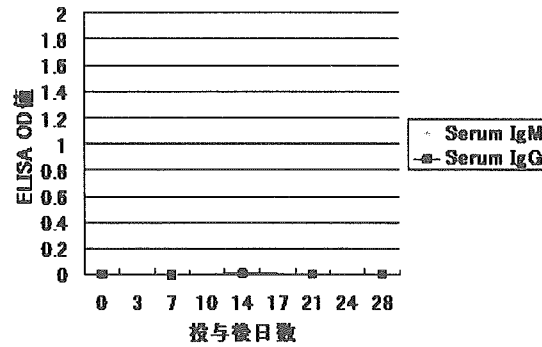
図2. HEV実験感染豚の糞便ならびに血清中のHEV抗体価

感染実験 2 (図 3)

観察期間中、いずれの豚においても臨床症状は認められず、血清中 ALT と総ビリルビン値も正常範囲であった。また、いずれの糞便ならびに血清からもウイルス RNA

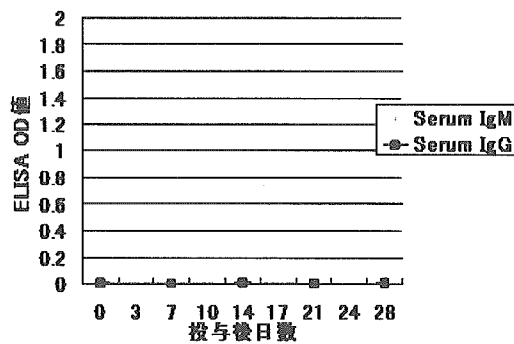
ならびにウイルス抗体は全く検出されなかった。これらの結果から、今回の肝臓 0.1g 中には感染に必要な量のウイルスは確認できなかった。

豚No.1



RT-PCR	糞便	-	-	-	-	-	-	-	-
	血清	-	-	-	-	-	-	-	-

豚No.2



RT-PCR	糞便	-	-	-	-	-	-	-	-
	血清	-	-	-	-	-	-	-	-

図3. 食肉処理場由来肝臓(HEVのPCR陽性)を接種した豚のHEVRNAならびにHEV抗体検査成績

D. 考察

Mengらのグループは、3-4週齢のSPF豚で継代したHEVの感染量は糞便0.1g中10(4.5)PID50であったと報告している(Halbur et al, Journal of Clinical Microbiology, 39: 918-923, 2001)。今回の実験1で使用した豚肝臓中のHEV感染量は肝臓0.1g中10(6)PID50という結果となり、感染性ウイルス量が10倍以上高値を示した。

肝臓中の感染性ウイルス量が糞便中のそれより高値を示した理由は明らかではないが、可能性として、1) 肝臓には糞便よりも多くのウイルスが含まれる、2) ノトバイオート豚はSPF豚よりもHEVの感受性が高い、3) 豚の日齢による感受性の違い(3日と3-4週齢)が考えられた。我々は昨年度の当該事業成績として、HEV感染豚の肝臓中には筋肉や他の臓器に比べて多量のウイ

ルス RNA が含まれることを報告しており、今回の成績においても、ある時期の豚肝臓中には比較的多量の感染性ウイルスがふくまれていることが示唆された。

今回の成績により、投与ウイルス量が少なくなることにより感染時期の遅延やウイルス血症の軽減が起こる可能性が示唆された。野外の豚では血清からの HEV 検出率は糞便からのそれに比べて非常に低い。その理由として、野外では暴露されるウイルス量が多くない例も多数存在するためとも考えられた。

感染実験 1 の肝臓中の RNA 量は、cDNA コピー数を RNA コピー数として計算した場合に 10(7)ゲノムコピー/0.1g であった。よって、静脈内接種では最小数十個のウイルスで感染が成立すると推測された。

感染実験 2 では、出荷豚から検出された HEV 遺伝子陽性肝臓の感染性は確認されなかった。感染性が認められなかった理由としては、接種材料中に含まれるウイルス粒子数が少なかったことに起因するかもしれない。当該肝臓乳剤から抽出した RNA において、HEV 遺伝子は 1stPCR では検出されず、Nested PCR ではじめて検出された。このことは、当該肝臓中のウイルス量は多くないことを意味する。一方、他の理由として、HEV が肝臓乳剤調整時に肝臓にふくまれる血液由来の中和抗体により不活化された可能性も考えられる。豚の主要な感染時期は 1-3 ヶ月齢であることから、多くの豚は出荷時点（6 ヶ月齢）では既に中和抗体を有していると考えられる。今回の接種量は 1ml と少量であったことから、今後感染性ウイルスの有無を確認するためには、もっと大量に接種する必要があると考えられた。

E. 結論

今回の研究によって以下のことが確認された。

1. HEV 実験感染豚 1 頭の肝臓 0.1g 中には 10(6)50%豚感染量の HEV が含まれていたことが明らかとなった。このことから、豚肝臓中には比較的多量の感染性ウイルスが含まれている可能性が示された。

2. HEV の暴露量が少なくなることにより感染時期の遅延やウイルス血症の軽減が起こる可能性が示唆された。

3. HEV の静脈内接種では最小数十個のウイルスで感染が成立すると推測された。

4. HEV 遺伝子が陽性を示した出荷時の肝臓 1 例は、豚への感染性は確認できなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

和文解説

1) 恒光 裕. 動物での E 型肝炎ウイルス感染. 病原微生物検出情報 26: 269-270, 2005

2) 恒光 裕. E 型肝炎. 全国家畜畜産物衛生指導協会. 印刷中

学会発表

1) 恒光 裕、勝田 賢、川島健司、神山麻理子、小野寺利幸、庄司智太郎、池田秀利、宮崎綾子、吉井雅晃、李天成、武田直和. ノトパイオート豚での E 型肝炎ウイルスの実験感染. 第 140 回日本獣医学会学術集会. 2005 年 9 月 29 日. 講演要旨 P105

誌上発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし

2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

ウイルス性食中毒の予防に関する研究

家畜の抗体調査と汚染実態調査

分担研究者 有川二郎 北海道大学医学研究科附属動物実験施設 教授

研究要旨：

兵庫県で捕獲された日本シカの肉を原因とする E 型肝炎ウイルス (HEV) 感染を示唆する事例が報告され、野生シカにおける HEV 感染実態の解明が必要である。一方、北海道に生息するエゾジカは本州のシカとは異種ではあるが、食用としても利用されており、HEV を保有しているか否かを明らかにする必要があると考えられる。また、本州においては家畜ブタの HEV 抗体陽性率が高いことが報告されている。また、北海道は E 型肝炎患者の報告が比較的多いと考えられていることから、ブタでの HEV 流行の疫学調査は公衆衛生上重要である。本研究では日本シカ、および北海道で得られたエゾジカ、家畜ブタ、ウシの血清中の抗 HEV 抗体を検出することによって、日本のシカ類や家畜における血清疫学調査を行った。また、エゾジカからは肝臓・直腸糞・胆汁の採材も行い、PCR によるウイルス遺伝子検出も試みた。

A. 研究目的

E 型肝炎はかつて経口型、水系、流行性非 A 非 B 型肝炎と呼ばれていた。インドや中国で引用水を介した数万人規模の大流行を起こしたことが知られている。しかし、我が国では、東北・北海道に発生が多い傾向はあるものの、全国的に散発的に発生が認められている。このことは日本での E 型肝炎ウイルス (HEV) の感染ルートがこれまでに知られているような大規模な水系感染では無いことを示している。

近年、日本国内では野生のシカやイノシシの肉による E 型肝炎の罹患事例が報告されるようになった。このことから E 型肝炎が一種の人獣共

通感染症である可能性が議論されるようになった。また、散発例の感染源として豚肉の摂食による可能性も議論されている。そこで、ウイルス性食中毒の原因ウイルスであると考えられる HEV について、野生動物であるシカおよび家畜であるブタおよびウシにおける疫学的研究を開始した。

B. 研究方法

ELISA には国立感染症研究所の李天成博士より分与された組換え精製ウイルス粒子様抗原を用いた。また、李博士より分与された、ORF2 を発現する組み換え Baculovirus を用いて診断用