

図3. ウンから検出されたロタウイルスGB76株のアミノ酸配列による系統解析

※VP4遺伝子aa24-268(2246aa)の近隣接合法での1000回反復による確率(ブートストラップ値)
Group C rotavirus (Shintoku株)をoutgroupとした。

表4. イノシシと同じ環境に生息する野生動物におけるLA試験陽性率

動物種	例数	LA試験陽性率(%)			主な血清採取県(年)
		PO-	Wa-	SA-	
ニホンザル	87	27.6	13.8	63.2	岐阜(1991-92)
ニホンジカ	60	18.3	13.3	38.3	兵庫、岩手(1992)
タヌキ	39	15.4	0	23.1	岐阜、福島(1991-92)
イノシシ	182	23.6	40.7	56.0	愛知、四国(2003-04)

エゾシカにおける E 型肝炎ウイルスの疫学調査

研究分担者：岡崎克則（北海道医療大学薬学部）

研究協力者：井上恵美（北海道医療大学薬学部）

研究要旨： 2006年2月～9月、北海道日高地区で捕獲されたエゾシカ 225 頭から血清を採種し、バキュロウイルスで発現した E 型肝炎ウイルス（HEV）様粒子を抗原とした ELISA に供した。その結果、28 検体（12.4%）が抗体陽性であった。抗体陽性率は、2～5 歳にかけて加齢とともに上昇する傾向にあった。ELISA 抗体陽性血清のうち 1 検体が Western blot においても陽性反応を示した。山間部で捕獲されたシカは調査期間中ほぼ一定の割合で抗体を保有していたことから、これらの群では HEV が常在しているのかもしれない。一方、平野部では夏期に集中して抗体陽性個体の割合が増加した。平野部には養豚場が点在することから、これらの群の抗 HEV 抗体保有状況にはブタとの関連が示唆される。エゾシカが HEV に感染している可能性が示されたことから、生肉の摂取は避けなければならない。

A. 研究目的

E 型肝炎ウイルス（HEV）は感染者の糞便中に排泄され、それに汚染された水などが主な感染源で、東南アジアや中米、アフリカなど熱帯、亜熱帯地域で散発的に流行してきた。日本を始めとする先進国での E 型肝炎発症例の大部分は発展途上国で感染を受けた輸入感染であるが、近年、日本や米国などで海外渡航歴の無い E 型肝炎の散発的な発症例が報告されている。このような中、兵庫県において野生シカの生肉を感染源とする E 型肝炎患者が報告された。さらに、北海道で市販されていた豚レバーから HEV 遺伝子が検出され、食肉が日本における散

発例の原因である可能性が示された。

エゾシカはニホンジカの 1 亜種で、本州で見られる「ホンシュウジカ」とは同じ種に属する。近年、北海道ではエゾシカによる食害や衝突事故が多発し、エゾシカ有効活用推進事業の一環として肉の普及が図られている。エゾシカ肉は、ルイベ（凍結生肉の刺し身）あるいはカルパッチョとして生で食される機会も少なくなく、エゾシカにおける HEV の保有状況の解明は急務である。

昨年度の本研究では、日高地方で捕獲されたエゾシカ 31 頭中 1 頭（3.2%）が HEV に対する ELISA 抗体を保有することを示した。本年度は抗体調査を継続し、抗体陽性個体の季

節変動ならびに地理的分布を明らかにした。

B. 研究方法

1. 血清：2006年2～9月、北海道日高地方西部地域で捕獲されたエゾシカ成獣225頭の血清を試験に供した。陽性対照血清として組換えバキュロウイルス発現 HEV 様中空粒子 (VLP) 高度免疫エゾシカ血清を用いた。陰性対照は同エゾシカの免疫前血清を用いた。これらの対照血清は北海道大学大学院獣医学研究科高島郁夫博士から分与を受けた。

2. ELISA：抗原の VLP は、国立感染症研究所ウイルス第二部武田直和博士から分与を受けた。96 穴プレートに抗原を固相化後、3% BSA でブロック処理をした。BSA 処理のみのプレートを抗原対照とした。両プレートに 0.5% BSA を含む PBS で 1:200 に希釈した被験血清を加え、室温、1 時間反応させ、0.05% Tween20 加 PBS で洗浄した。これに HRPO 標識抗シカ IgG ウサギ抗体を加え、室温、1 時間反応させた。洗浄後、基質として 100 μ l の SIGMAFAST OPD を加え、室温、暗所に 20 分放置した。2.5M H₂SO₄ 50 μ l を加えて反応を止め、490nm における吸光度を測定した。抗原対照における吸光度との差が 0.2 以上の検体を ELISA 抗体陽性とした。

3. Western blot：HEV VLP を SDS-PAGE で分画後、PVDF 膜に転写した。BSA でブロックした後、0.5% BSA を含む PBS で 1:100 に希釈した被験血清を加え、室温、1 時間反応させた。0.05% Tween20 加 PBS で洗浄後、HRPO 標識抗シカ IgG ウサギ抗体を加え、室温、1 時間反応させた。洗浄後、基質として Western Lightning™ Chemilumi—nescence Plus (Perkin Elmer) を加え発光を検出した。

C. 研究結果

1. エゾシカの抗 HEV ELISA 抗体保有状況：

調査期間中捕獲したエゾシカ 225 頭中 28 頭 (12.4%) が抗 HEV 抗体を保有していた。内訳は、オス 75 頭中 5 頭 (6.7%) およびメス 150 頭中 23 頭 (15.3%) であった (図 1)。6 歳以降の個体が 19 頭と少なかったことから、これらを除いて抗体陽性個体の年齢分布をみると、加齢とともに陽性率が上昇する傾向が認められた (図 2)。

2. 抗 HEV ELISA 抗体陽性率の季節変動：図 3 に示すように、6 月から 8 月にかけて急激に抗体陽性率が上昇した。8 月には 60% 以上に達したが、9 月には約 12% まで低下した。

3. 抗 HEV ELISA 抗体陽性個体の地理的分布：月によって捕獲場所に偏りがあったことから、山間部と平野部に分けて抗体保有状況を調べた。その結果、山間部ではほぼ一定の頻度で抗体陽性個体が認められた。これに対し、平野部では 7～8 月に 47 頭中 12 頭 (25.5%) が陽性であった一方、2～6 月には 123 頭中 2 頭 (1.6%) が陽性を示したのみであった (表 1)。

4. Western blot による抗 HEV 抗体の確認：ELISA で抗体が検出された 28 検体を Western blot に供した。図 3 に示すように、1 検体のみが約 60kDa の位置に特異的なバンドを示した。本血清は 2 月に山間部で捕獲されたシカに由来するものであった。

D. 考察

北海道日高地方のエゾシカが抗 HEV 抗体を保有していることが明らかになった。一部の陽性検体について ELISA で定量試験を実施したところ、陽性血清では 1:10000 以上の値を示すのに対し、いずれも 1:1000 未満であった (結果示さず)。ELISA 抗体の陽性率

(12.4%) に比べ、Western blot の陽性率 (0.4%) が低いのは、抗体価が低いことによるのであろう。あるいは、自然感染では立体構造を認識する抗体が優位に誘導される可能性があり、Western blot での検出は難しいのかもしれない。

抗体陽性率は加齢とともに上昇する傾向にあった。また、山間部のシカでは調査期間を通じてほぼ一定の頻度で抗体が検出され、Western blot で抗体が検出された血清も山間部のシカに由来するものであった。これらの成績は、少なくとも山間部のエゾシカ群では HEV が常在している可能性を示している。一方、平野部では夏に陽性個体が集中した。平野部には養豚場が点在しており、一部では放牧もされている。動物衛生研究所の報告では、国内のブタ 1,271 例中約 66% が抗 HEV 抗体陽性であった。したがって、平野部のシカの抗体保有状況にはブタが何らかの関与をしているものと推察される。次年度は、エゾシカおよびこれらのブタにおける HEV の浸潤状況を調査する予定である。

1999-2005 年に報告された HEV 国内感染患者 87 例のうち、ブタ、イノシシおよびシカの肉または内蔵が感染源と推定されたものは各々 16 例 (18%)、13 例 (15%) および 7 例 (8%) であった。保存されていたイノシシ肉およびシカ肉から HEV 遺伝子が検出された例もあり、エゾシカ肉を含むシカ肉の生食は HEV 感染防止のため避ける必要がある。

E. 結論

野生のエゾシカが HEV に感染している可能性が示された。ヒトへの感染を防ぐため、生食を避ける必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Okazaki, K: Proteolytic cleavage of glycoprotein B is dispensable for in vitro replication but required for syncytium formation of pseudorabies virus. J. Gen. Virol. (in press)

2. 学会発表

井上恵美、富山大輔、岡崎克則 「エゾシカにおける E 型肝炎ウイルス抗体の検出」第 54 回日本ウイルス学会 (11 月 19 日、名古屋市)

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

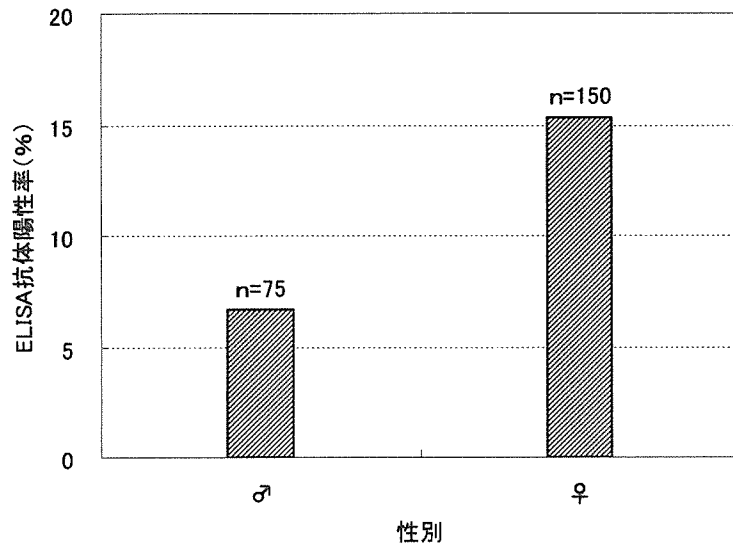


図 1. 抗 HEV ELISA 抗体保有状況における性差

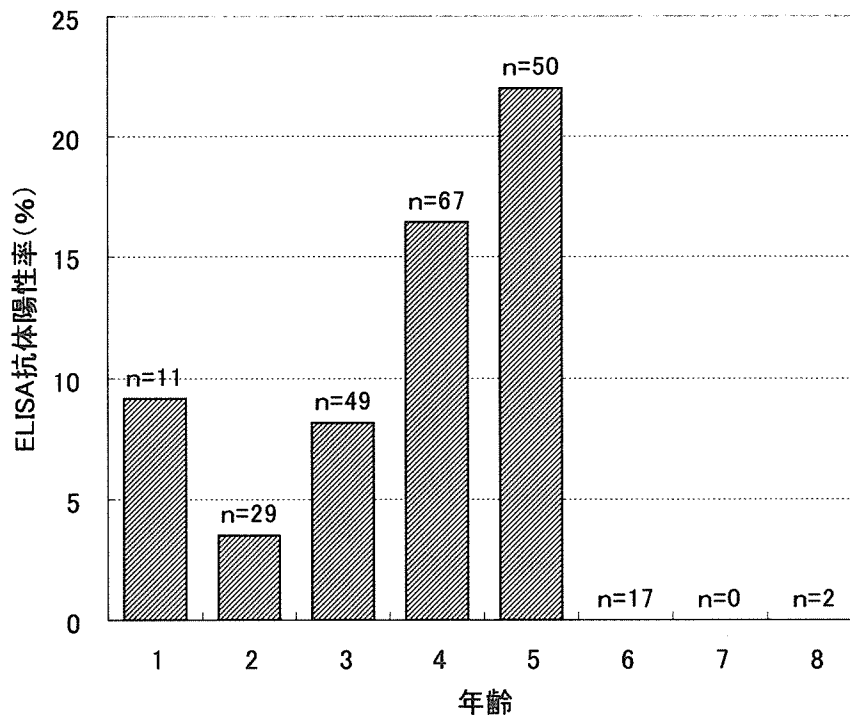


図 2. 抗 HEV ELISA 抗体陽性個体の年齢分布

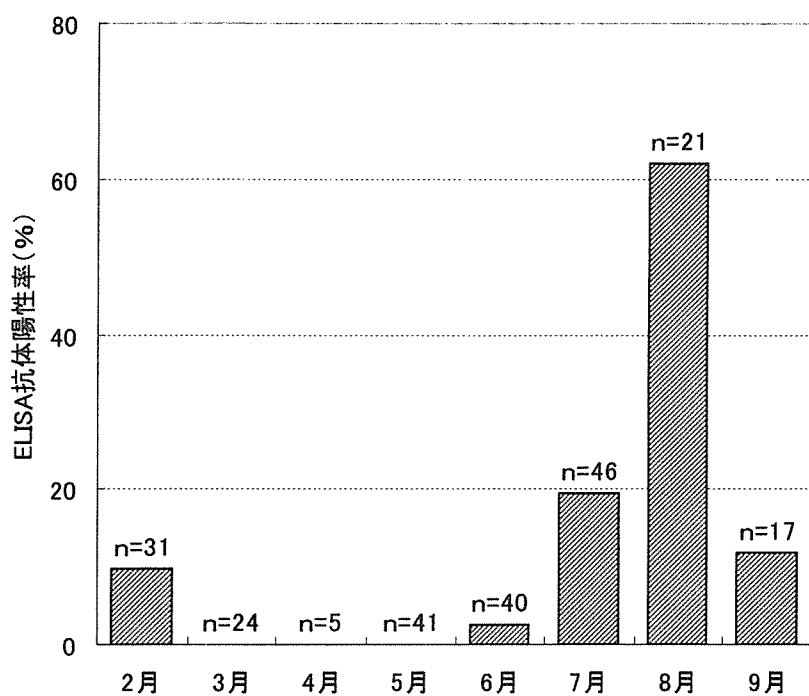


図3. 抗HEV ELISA抗体陽性率の季節変動

表1. 抗HEV ELISA抗体陽性個体の地理的分布

月	ELISA抗体陽性数／捕獲頭数 (%)	
	山間部	平野部
2	2／12 (16.7)	1／19 (5.3)
3	0／0 (—)	0／24 (0)
4	0／0 (—)	0／5 (0)
5	0／0 (—)	0／41 (0)
6	0／6 (0)	1／34 (2.9)
7	4／17 (23.5)	5／29 (17.2)
8	7／14 (50.0)	6／7 (85.7)
9	1／6 (16.7)	1／11 (9.1)

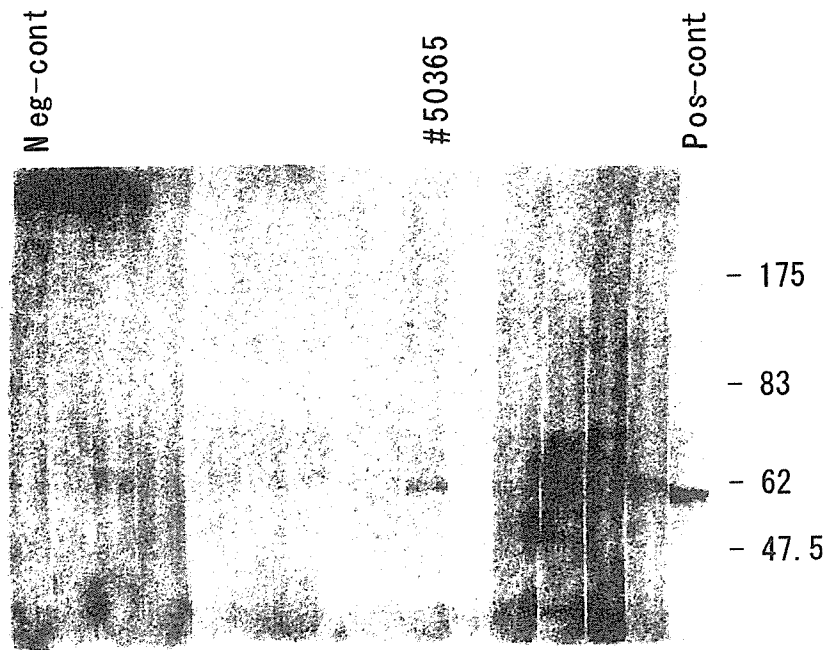


図 4. Western blot による抗 HEV 抗体の確認

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻	ページ	出版年
Nakai I, Kato K, Miyazaki A, Yoshii M, Li TC, Takeda N, Tsunemitsu H, Ikeda H.	Different fecal shedding patterns of two common strains of hepatitis e virus at three Japanese Swine farms.	<i>Am J Trop Med Hyg</i>	75	1171-1177	2006
Mochizuki M, Ouchi A, Kawakami K, Ishida T, Li TC, Takeda N, Ikeda H, Tsunemitsu H.	Epidemiological study of hepatitis E virus infection of dogs and cats in Japan.	<i>Vet Rec</i>	159	853-854.	2006
Kogure, T., Suzuki, T., Takahashi, T., Miyamoto, D., Hidari, K.I.P.J., Chao-Tan, G, Ito, T., Kawaoka Y., and Suzuki, Y.	Human trachea primary epithelial cells express both sialyl-2-3-Gal receptor for human parainfluenza virus type 1 and avian influenza viruses, and sialyl-2-6-Gal receptor for human influenza viruses.	<i>Glycoconjugate J.</i>	23	99-104	2006
Ito H., Ito T., Hikida, M., Yashiro, J., Otsuka, A., Kida, H., and Otsuki K.	Outbreak of highly pathogenic avian influenza in Japan and anti-influenza virus activity of povidone-iodine products.	<i>Dermatology</i>	212 (suppl 1)	109-112	2006
Horimoto, T., Takada, A., Fujii, K., Goto, H., Hatta, M., Watanabe, S., Iwatsuki-Horimoto, K., Ito, M., Tagawa-Sakai, Y.,	The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate.	<i>Vaccine</i>	24	3669-3676	2006

Yamada, S., Ito, H., Ito, T., Imai, M., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Lim, W., Guan, Y., Peiris, M., and Kawaoka, Y.					
Yamana, H., Ito, H., Ito, T., Murase, T., Motoike, K., Miyoshi, N., Wakabayashi, K., and Otsuki, K.	Strong Antiviral Activity of Heated and Hydrated Dolomite -Preliminary Investigation.	<i>J. Vet. Med. Sci.</i>			In press
伊藤壽啓	高病原性鳥インフル エンザの現状	感染症	36	1-6	2006
伊藤啓史、伊藤壽啓	インフルエンザウイ ルスの種間伝播	獣医畜産新報	58	861-864	2006
伊藤壽啓	高病原性鳥インフル エンザ	カレントテラ ピー	24	17-20	2006
伊藤壽啓	「人獣共通感染症」高 病原性鳥インフルエ ンザ-病原性と生態	生物の科学遺 伝	別 冊 No. 19	45-49	2006
伊藤壽啓	高病原性鳥インフル エンザ「進化でどこま でわかるか？」	生物の科学遺 伝	別 冊 No. 20		印刷中
Shimizu, K., Ito, N., Sugiyama, M., Minamoto, N.	Sensitivity of rabies virus to type I interferon is determined by the phosphoprotein gene.	<i>Microbiol. Immunol.</i>	50	975-978	2006
Shimizu, K., Ito, N., Mita, T., Yamada, K., Hosokawa-Muto, J., Sugiyama, M. & Minamoto, N.	Involvement of nucleoprotein, phosphoprotein, and matrix protein genes of rabies virus in virulence for adult mice.	<i>Virus. Res.</i>	123	154-160	2007

Borghan, M. A., Mori, Y., El-Mahmoudy, A-B., Ito, N., Sugiyama, M., Takewaki, T. & Minamoto, N.	Induction of Nitric Oxide Synthase by Rotavirus Enterotoxin NSP4: Implication for Rotavirus Pathogenicity.	J. Gen. Virol.			In press
Okazaki, K	Proteolytic cleavage of glycoprotein B is dispensable for in vitro replication but required for syncytium formation of pseudorabies virus.	J. Gen. Virol.			in press