

物媒介性の人獣共通感染症の一つである。毎年、アジアを中心に約 3.5-5 万件の発生報告があり、1 万人以上が本疾病により死亡していると言われている。2005 年夏には、インド北部からネパールにかけて大規模な日本脳炎の流行があり、7 千人以上の患者と約 1,500 人の死亡が確認されている。近年、日本における日本脳炎患者の発生は減少しているものの、ブタで続く高率な日本脳炎ウイルス感染、これまでとは異なる患者の年齢構成、流行ウイルスの遺伝子型の変化等、本ウイルス感染の継続や動向変化が報告されている。これまで日本では、日本脳炎の流行予測のため、本ウイルスの増幅動物であるブタを対象とした疫学調査を中心に研究が進められてきた。一方で、ブタ以外の動物、特に野生動物における日本脳炎ウイルス感染に関する情報はほとんど不明のままである。そこで今回、食肉に供され、ブタに近縁であるイノシシを対象に、中和試験による日本脳炎ウイルスに対する血清疫学調査を実施した。イノシシと同様に食肉として利用されるニホンジカ及び対照として同じ環境に生息する野生動物であるニホンザルとタヌキについても調査を行い、結果を比較した。

## B. 研究方法

### 1. A 群ロタウイルスに対する血清疫学的調査:

1997-1998 年にかけて、全国で採取されたウシの血清 343 例が LA 試験に供試された(表 1)。大腸菌で発現させ、精製したトリロタウイルス PO-13 株、ヒトロタウイルス Wa 株及びサルロタウイルス SA-11 株の GST 融合 VP8 蛋白質を抗原とした LA (各 PO-, Wa-及び SA-LA) 試験を用いて各抗体価を測定した。血清はカオリンで 1 回処理された。処理血清を 8 倍から 2 倍段階希釈し、V 字型 96 穴マイクロプレート上で各感作ラテックスを加え、1 晩放置した後、凝集像を判定した。凝集を起こす一番高い希釈倍数を各 LA 抗体価とした。8 倍以上の抗体価を有する個体

を陽性とした。

### 2. 日本脳炎ウイルスに対する血清疫学調査:

1991-2004 年にかけて、岐阜県で採取されたニホンザル 96 例及びタヌキ 40 例、兵庫、岩手、岐阜県を中心に採取されたニホンジカ 64 例、ならびに岐阜、滋賀、愛知、及び四国 4 県を中心に採取されたイノシシ 234 例の血清が、日本脳炎ウイルス JaGAr01 株を攻撃ウイルスとした中和試験に供試された(表 2)。中和試験は、培養用 96 穴マイクロプレートが用いられ、pH 7.8 の培養条件下で BHK-21 細胞への同時接種法を応用した TCID50 法により実施された。10 倍以上の抗体価を有する個体を陽性とした。

## C. 研究結果

### 1. A 群ロタウイルスに対する血清疫学的調査

各 LA 試験の結果を表 1 に示す。ウシ血清 343 例のうち、PO-, Wa-および SA-LA 試験において、それぞれ 179 例 (52.2%)、160 例 (46.6%) および 209 例 (60.9%) が抗体陽性であり、すべての LA 試験において陰性を示した血清は 98 例 (28.6%) であった(表 1)。SA-LA 試験の抗体陽性率は Wa-LA 試験の抗体陽性率に比べ有意に高かった ( $P < 0.01$ )。

各地方別では、PO-, Wa-および SA-LA 試験の抗体陽性率は、それぞれ 43.2%から 68.8%、25.0%から 70.7%および 25.0%から 81.3%であった。北海道の Wa-LA 試験における抗体陽性率 70.7%および SA-LA 試験における抗体陽性率 81.3%は、全体の Wa-LA 試験における抗体陽性率 46.6%および全体の SA-LA 試験における抗体陽性率 60.9%よりも高い傾向がみられた。

### 2. 日本脳炎ウイルスに対する血清疫学調

## 査

今回の調査において、タヌキに中和抗体保有個体は認められなかった(表2)。ニホンザルおよびニホンジカにおける中和抗体陽性率はそれぞれ4.2%および1.6%であり、両者において稀に日本脳炎ウイルス感染が成立していることが示された。これに対し、イノシシにおける中和抗体保有個体は全体の25.2%を占めることが明らかとなった。四国で採材されたイノシシにおける抗体陽性率32.7%(33/101)は、東海・近畿地方の陽性率19.5%(26/133)より高い値を示し( $P < 0.05$ )、地方間での感染状況の違いが認められた。

## D. 考察

### 1. A群ロタウイルスに対する血清疫学的調査:

各種A群ロタウイルスに対する抗血清を用いた交差LA試験の結果から、PO-LA試験はP[17]遺伝子型のトリロタウイルスの感染抗体を、Wa-LA試験はP[4]およびP[8]遺伝子型のヒトロタウイルスの感染抗体を、SA-LA試験はP[2]およびP[3]遺伝子型のサル、イヌおよびネコのロタウイルス感染抗体を検出可能であることが示されている。また、今回用いたLA試験は中和試験と同等の感度を有することが分かっている。

A群ロタウイルスは宿主の壁を越えて異種間感染を起こすことが次第に明らかにされつつあり、さらに人獣共通感染症の病原体としての可能性も考えられている。しかし、これまでにヒトにおいて異種間感染を確証させるウイルス株は分離されていない。また、動物のなかでA群ロタウイルスがどのような感染環を形成しているかについての研究はほとんど行われていない。そこで今回、食肉として供給されるウシについて、上述のLA試験を用いた血清疫学調査を実施した。

日本国内のウシで検出されるA群ロタウイルスの血清型は、G6P[5]およびG10P[11]を中心と

して、G血清型6、8および10とP遺伝子型1、5および11のさまざまな組み合わせで構成されると報告されている。P遺伝子型1、5および11のロタウイルスとP[2]遺伝子型のSA-11株のVP8のアミノ酸ホモロジーは80%未満であることから、今回のSA-LA試験ではウシで広く流行しているウイルスに対する抗体が十分に検出されていないと考えられた。これを前提としてウシにおける解析を行った。

ウシ血清343例のうち、PO-LA試験における抗体陽性率は52.2%(179/343)であった(表1)。陽性例の85.5%(153/179)は他のLA試験においても陽性を示した血清であり、抗体価の分布も他のLA試験の結果と差が認められなかった。このようにウシにおいてP[17]遺伝子型のトリロタウイルスの高頻度な感染が疑われたが、他のロタウイルスの感染も複雑に起こっていると考えられた。

ウシにおいてP[17]遺伝子型のトリロタウイルスが常に感染環を形成していると考えられた。牛舎は通常開放型であり、ハト等の野鳥が比較的自由に出入りできる環境にある。従ってウシの餌を目的に進入した野鳥の糞便からトリロタウイルスがウシに感染する機会は、非常に多いと考えられる。このことが、ウシにおいてPO-13株に近いP[17]遺伝子型のトリロタウイルスに対する抗体保有率が高い理由かもしれない。鳥類からのロタウイルスの分離および検出の報告は少なく、野鳥に至ってはほとんど情報が存在しない。ウシにおけるトリロタウイルスの感染環を明らかにするためには、まず野鳥におけるロタウイルスの感染実態の解明が必要なのかもしれない。

Wa-およびSA-LA試験において抗体陽性を示したウシ血清は、それぞれ160例(46.6%)および209例(60.9%)であった(表1)。SA-LA試験における抗体陽性率は、Wa-LA試験における抗体陽性率に比べ有意に高い値であっ

た。このことは、1997年および1998年のウシにおいてはSA-11株に近いP[2]あるいはP[3]遺伝子型のロタウイルス感染が頻繁に起きていたことを示唆している。通常、牛舎はネコやイヌが自由に出入り出来る環境にあるところが多い。また、放牧中にはサルなどの野生動物との間接的接触が起きる可能性も高く、ウシはペットあるいは野生動物由来ロタウイルスに感染する機会が比較的多いことが考えられる。今後、ペットおよび野生動物を含めたさまざまな哺乳動物におけるロタウイルスの感染実態を明らかにすることにより、今回の結果に対する明確な結論が導かれると考える。また、家畜としてのウシは、ヒトからの給餌等、生まれてから常にヒトとの接触がある。そのような状況のなかで、Wa株に近いP[4]あるいはP[8]遺伝子型のヒトロタウイルスの感染が高頻度で起きているのかもしれない。

ウシではSA-11株に近いP[2]あるいはP[3]遺伝子型のロタウイルスが高頻度で感染を起こしており、同時にP[17]遺伝子型のトリロタウイルスおよびP[4]あるいはP[8]遺伝子型のヒトロタウイルスの感染も頻繁に起こるといふ非常に複雑な感染環の存在が示唆された。また、このようにヒトおよびウシにおいて多様なロタウイルスによる複雑な重感染が起きている状況から、リアソートメントによる新型ロタウイルス出現の可能性も否定できない。

以上、今回の研究から、食肉の供給源であるウシにおいて様々なロタウイルスの汚染の可能性が示唆された。消費者側では、糞便に存在するウイルスの食肉への汚染による健康被害が問題となるが、現在のと畜場における衛生管理を考えると問題は少ないかも知れない。一方、と畜場に係わる人間への被害については、警戒していく必要があると考えられる。今後、実際に健康なウシの糞便中における同ウイルスの汚染に関する調査が必要である。

## 2. 日本脳炎ウイルスに対する血清疫学調査：

日本で養豚が本格的に始まったのは戦後であるにもかかわらず、国内における日本脳炎の流行は戦前から確認されている。これは、古来の日本脳炎の流行にブタ以外の動物が増幅動物として関係していたことを示唆している。これまでにサギなどの野鳥類が日本脳炎ウイルスの感染環に関わっていることが示されているが、他の野生動物に関する報告はみられない。今回、食肉として利用される野生動物の間での日本脳炎ウイルスの汚染状況を調査するために、イノシシおよびニホンジカを対象に中和試験による血清疫学調査を実施した。これら野生動物と同じ環境に生息するニホンザルおよびタヌキについても、同様な調査を実施した。

今回の調査の結果、イノシシが他の野生動物に比べ高率に日本脳炎ウイルスに感染していることが明らかとなった。その陽性率も南部に位置する四国の方が高いことが示された。同じような環境に生息する、すなわち蚊に吸血される機会が同じと考えられる野生動物の間で示された陽性率の差は、各動物の日本脳炎ウイルスに対する感受性の違いによることが推察される。イノシシは他の野生動物より高頻度で日本脳炎ウイルスに感染していることが明らかとなり、ブタと遺伝的に近縁なイノシシが日本脳炎ウイルスに対して高感受性であることが示唆された。このことから、日本で養豚が盛んになる以前は、イノシシが日本脳炎ウイルスの増幅動物となっていた可能性が考えられ、現在の日本脳炎ウイルスの感染環においてもイノシシは重要な位置付けにあることが推察された。

今回の結果からイノシシにおいて日本脳炎ウイルスによるウイルス血症が起きている可能性が示唆された。イノシシの猟期は蚊が活動しない冬期に設定されているため、イノシシを介した直接の日本脳炎ウイルスによる健康被害はほとんどないと考えられる。一方で、温暖化の影響のため、蚊の活動の変

化が報告されていることから、今後もイノシシと日本脳炎ウイルスの関係について注意していく必要がある。

## E. 結論

1. 1997～1998年において、全国のウシ 343例のうち、52.2%がP[17]遺伝子型のトリロタウイルスの、46.6%がP[4]あるいはP[8]遺伝子型のヒトロタウイルスの、そして60.9%がP[2]あるいはP[3]遺伝子型のロタウイルスの感染を受けたと考えられた。ウシではヒト以外の動物由来ロタウイルスが感染環の中心となっており、これにトリロタウイルスやヒトロタウイルスの感染が高頻度で加わる非常に複雑な感染環を形成していると推測された。

2. 1991～2004年に採血されたイノシシ 234例の25.2%が日本脳炎ウイルスに対する中和抗体を保有していた。これに対し、同様な環境に生息するニホンジカおよびニホンザルにおける中和抗体保有率は、それぞれ1.6%および4.2%と低率であり、タヌキには抗体保有個体は認められなかった。この結果から、食肉に供されるイノシシが日本脳炎ウイルスに高い感受性を有し、同ウイルスの感染環に増幅動物として関わっている可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

特に無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 杉山 誠, 高木愛香, 源 宣之, 伊藤直人, 浅野 玄, 坪田敏男, 石黒直隆, 伊藤雅, 山下照夫, 榮 賢司: 国内の野生動物における日本脳炎ウイルスに対する血清疫学調査-イノシシが日本脳炎ウイルスの増幅動物である可能性-, 獣医畜産新報 4, 2006 (印刷中) .

### 2. 学会発表

1) 高木愛香, 杉山 誠, 伊藤直人, 浅野玄, 坪田敏男, 源 宣之: 国内の野生動物における日本脳炎ウイルスに対する血清疫学調査、第139回日本獣医学会学術集会、2005年4月(和光)

2) 杉山 誠, 高木愛香, 源 宣之, 伊藤直人, 浅野 玄, 坪田敏男, 石黒直隆, 伊藤雅, 山下照夫, 榮 賢司: 国内の野生動物における日本脳炎ウイルスに対する血清疫学調査-イノシシが日本脳炎ウイルスの増幅動物である可能性-, 第5回人と動物の共通感染症研究会学術集会、2005年11月(東京)

## 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

表1 ロタウイルスに対する各 LA 試験におけるウシ血清の地方別の抗体陽性率

地方	血清数	LA 試験 (%)			陰性 (%)
		PO-	Wa-	SA-	
北海道	75	58.7	70.7	81.3	16.0
東北	49	44.9	34.7	71.4	26.5
関東	38	60.5	57.9	73.7	21.1
中部	49	46.9	32.7	46.9	36.7
近畿	36	47.2	44.4	55.6	27.8
中国	20	45.0	25.0	25.0	45.0
四国	44	43.2	31.0	47.7	40.9
九州	32	68.8	53.1	50.0	31.2
全体	343	52.2	46.6	60.9	28.6

表2 各種野生動物における日本脳炎ウイルスに対する中和抗体陽性率

動物種	捕獲地	捕獲年	例数	陽性数	(陽性率)	
イノシシ	岐阜県	1991-1992	11	4		
		2003	12	2		
		計	23	6	(26.1%)	
	滋賀県	1991-1992	21	3	(14.3%)	
	兵庫県	1992	1	0	(0%)	
	愛知県	2003-2004	88	17	(19.3%)	
	徳島県	2003-2004	25	6	(24.0%)	
	高知県	2003-2004	7	0	(0%)	
	香川県	2003	29	11	(37.9%)	
	愛媛県	2003-2004	40	16	(40.0%)	
		合計	234	59	(25.2%)	
ニホンシカ	岐阜県	1991-1992	16	1		
		滋賀県	1991	2	0	
		兵庫県	1992	25	0	
		岩手県	1992	20	0	
		三重県	1992	1	0	
		計	64	1	(1.6%)	
ニホンザル	岐阜県	1991	96	4	(4.2%)	
タヌキ	岐阜県	1991-1992	36	0		
		2003-2004	4	0		
		計	40	0	(0%)	

## 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 教授  
研究協力者 鈴木 正嗣 北海道大学大学院獣医学研究科 助教授  
松浦友紀子 北海道大学大学院獣医学研究科 客員研究員

研究要旨：北海道ではエゾシカ有効活用推進事業の一環としてシカ肉の普及が図られつつある。しかしながら、衛生検査等に関わる法的規制はなく、衛生管理システムの構築が急がれている。また、2003年には兵庫県において野生シカの生肉を感染源とする E 型肝炎患者例が報告された。このような状況下、エゾシカにおける E 型肝炎ウイルスの感染状況を調べるため、抗体調査を実施した。北海道日高地方で捕獲されたエゾシカ 31 頭から得た血清を組換えバキュロウイルスによって産生された E 型肝炎ウイルス様中空粒子を抗原とする ELISA に供したところ、感染が疑われる個体が 1 例認められた。本検体に関しては Western blotting によって反応特異性の確認を行うとともに、さらに多くの検体を調べる必要がある。

### 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 型肝炎発生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生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。北海道では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つつあるが、衛生検査

等に関わる法的規制はなく、衛生管理システムの構築が必要となっている。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。

2003～2005 年に道東地域のエゾシカを対照に実施した北海道大学の調査 (n=100) では、抗体陽性個体は認められていない。本研究では、道東地域とは個体群が異なる日高地方で捕獲されたエゾシカ 31 頭について HEV に対する抗体調査を実施した。

### B. 研究方法

1. 血清：2006 年 2 月、北海道日高地方で捕獲されたエゾシカ成獣 31 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。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 HRP0 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 $\mu$ l の SIGMAFAST OPD を加え、室温、暗所に 20 分放置した。2.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 $\mu$ l を加えて反応を止め、490nm における吸光度を測定した。

### C. 研究結果

図 1 に示すように、No. 365 が陰性対照に比べ明らかに高い OD 値を示した。他に 4 検体 (Nos. 339, 348, 358, 360) が陰性対照の 2 倍以上の値を示した。

### D. 考察

2006 年 2 月に北海道日高地方で捕獲されたエゾシカ成獣 31 頭のうち、少なくとも 1 頭 (3.2%) が HEV に感染していたことが示唆された。他に比較的高い OD 値を示した 4 頭を含め、Western blotting によって抗体の特異性を確認する必要がある。

各月齢層のブタ血清 1,271 例について調べた動物衛生研究所の報告では、約 66% が抗 HEV 抗体陽性であった。また国内における野生ネズミの調査では、ドブネズミ 362 匹のうち 114 匹 (31%)、クマネズミ 90 匹のうち 12 匹 (13%) から抗 HEV 抗体が検出されている。一方、道東地方のエゾシカ 100 頭では抗体は検出されず、日高地方でも抗体陽性率は低いものであった。

したがって、エゾシカの HEV 感染頻度はブタ、ドブネズミ等に比べて低いものと考えられる。

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臓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

特に無し

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Okazaki, K., Fujii, S., Takada, A., Kida, H.: The amino-terminal residue of glycoprotein B is critical for neutralization of bovine herpesvirus 1. *Virus Res.* 115, 105-111, 2006.

2) Hasebe R, Kimura T, Nakamura K, Ochiai K, Okazaki K, Wada R, Umemura T. Differential susceptibility of equine and mouse brain microvascular endothelial cells to equine herpesvirus 1 infection. *Arch. Virol.* 151, 775-786, 2006.

3) 岡崎克則: 野鳥とインフルエンザウイルス 北海道野鳥だより 141, 9-10, 2005.



4) 岡崎克則：ヘルペスウイルスの病原性発現機構「ヘルペスウイルス学-基礎・臨床研究の進歩-」 日本臨床. 日本臨床社. (印刷中) 浜)

2. 学会発表

1) 岡崎克則：仮性狂犬病ウイルス gB 糖蛋白の開裂はシンシチウム形成に関与する. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会、2005 年 11 月(横

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

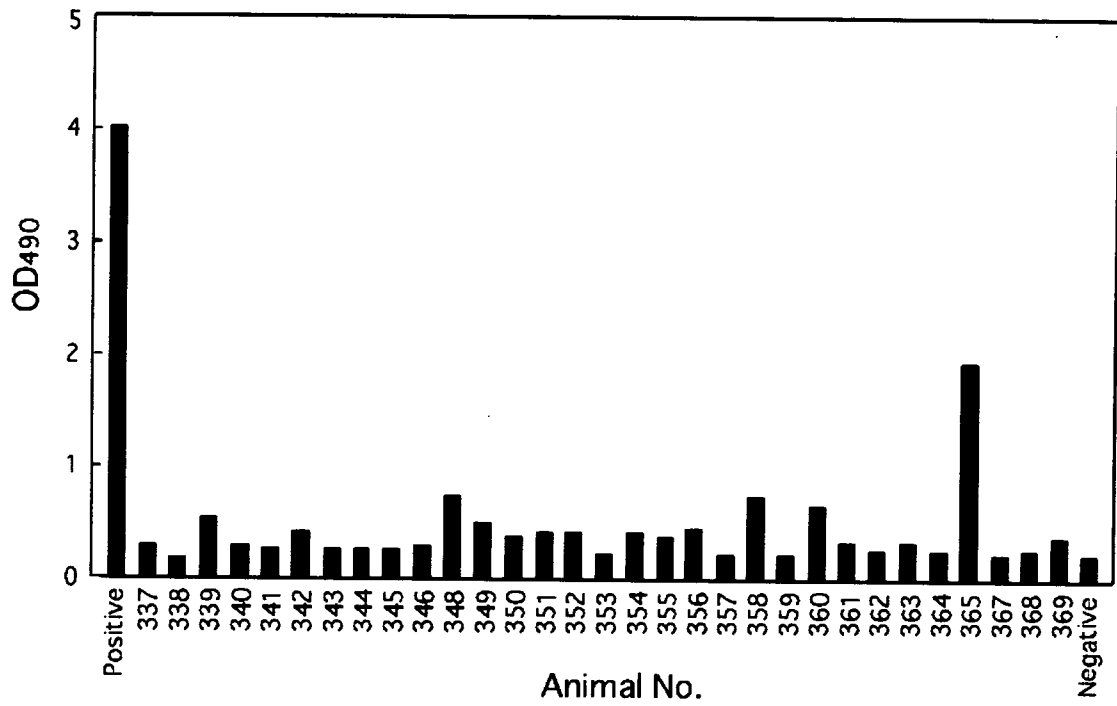


図1. エゾシカ血清中の抗 HEV 抗体の検出

HEV-VLP を抗原とした ELISA によってエゾシカ血清中の抗 HEV IgG を検出した。

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
澤邊京子, 星野啓太, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 林利彦, 津田良夫, 倉橋 弘, 棚林清, 堀田昭豊, 山田章雄, 西藤岳彦, 小渕正次, 田代真人, 小林睦生	2004 年高病原性鳥インフルエンザ国内流行地で採集されたクロバエ類からの H5N1 亜型インフルエンザウイルスの検出と分離	病原微生物検出情報	26	119-121	2005
Sawabe K., Isawa H., Hoshino K., Sasaki T., Tanabayashi K., Hotta A., Yamada A., Hayashi T., Tsuda Y., Kurahashi H., Saito T., and Kobayashi M.	Detection and isolation of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses from blow flies collected in the vicinity of an infected poultry farm in Kyoto, Japan, 2004.	Am J Trop Med Hyg			In press
Okazaki K., Fujii S., Takada A., and Kida H.	The amino-terminal residue of glycoprotein B is critical for neutralization of bovine herpesvirus 1.	Virus Res.	115	105-111	2006
Hasebe R., Kimura T., Nakamura K., Ochiai K., Okazaki K., Wada R., and Umemura T.	Differential susceptibility of equine and mouse brain microvascular endothelial cells to equine herpesvirus 1 infection.	Arch. Virol.	151	775-786	2006
岡崎克則	野鳥とインフルエンザウイルス	北海道野鳥だより	141	9-10	2005

岡崎克則	ヘルペスウイルスの病原性発現機構「ヘルペスウイルス学-基礎・臨床研究の進歩-」	日本臨床			印刷中
杉山誠, 高木愛香, 源宣之, 伊藤直人, 浅野 玄, 坪田敏男, 石黒直隆, 伊藤 雅, 山下照夫, 柴賢司	国内の野生動物における日本脳炎ウイルスに対する血清疫学調査-イノシシが日本脳炎ウイルスの増幅動物である可能性-	獣医畜産新報	4		2006 (印刷中)
Yoshii M., Kaku Y., Murakami Y., Shimizu M., Kato K., Ikeda H.	Genetic variation and geographic distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Japan.	Arch Virol.	150	2313-2324	2005
池田秀利	動物に感染している E 型肝炎ウイルス	消化器科	141	173-178	2005
Shinya K., Sutou A., Kawakami M., Sakamoto H., Umemura T., Kawaoka Y., and Ito T.	Neurovirulence of H7N7 influenza A virus: Brain stem encephalitis accompanied with aspiration pneumonia in mice.	Arch. Virol.	150	1653-1660	2005
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.	Glycoconjugate J.	23	99-104	2006

Horimoto T., Takada A., Fujii K., Goto H., Hatta M., Watanabe S., Iwatsuki-Horimoto K., Ito M., Tagawa-Sakai Y., Yamada Y., Ito H., Ito T., Imai M., Itamura S., Odagiri T., Tashiro M., Lim W., Guan Y., Peiris M., and Kawaoka Y.	The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate.	Vaccine			(in press)
Nishiguchi A., Yamamoto T., Tsytsui T., Sugizaki T., Mase M., Tsukamoto K., Ito T., and Terakado N.	Outbreak of highly pathogenic avian influenza in Japan in 2004 caused by an H5N1 subtype.	Scientific and Technical Review of the OIE	24		(in press)
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.	Delmatology			(in press)
伊藤壽啓	インフルエンザウイルスのレセプター特異性と膜	膜	30	62-67	2005
伊藤壽啓	高病原性鳥インフルエンザ発症と人への感染	食品の包装	36	84-90	2005
伊藤壽啓	インフルエンザ講座16。鳥インフルエンザとは。	インフルエンザ	6	56-59	2005
伊藤壽啓	家禽ペストとインフルエンザ。	インフルエンザ	6	5-6	2005

伊藤啓史、伊藤壽啓	インフルエンザウイルスの種間伝搬	獣医畜産新報	58	861-864	2005
伊藤壽啓	高病原性鳥インフルエンザの現状	感染症	36	in press	2006

### Ⅲ. 平成18年研究報告書

## 食肉における家畜・家禽のウイルス疾病に関する研究

主任研究者：棚林 清 国立感染症研究所獣医科学部 第三室長

研究要旨：食用に供される家畜などのウイルス性疾病について食鳥・食肉検査所などで実施可能な検査方法の開発や改良を実施し、食肉などの更なる安全性確保のために検査体制整備のための技術的基盤を提供すること、また、家畜・家禽および食世に供される野生動物等で人に感染する可能性があるウイルスとしてA群ロタウイルスやE型肝炎ウイルスなども考えられことからこれらも含め実態調査を実施することも目的として今年度は以下のような成果が得られた。

安定したPCR検査結果を得るために、市販の機器や試薬を利用した検査システムを構築することを目指し、肝臓の臓器乳剤からDNAウイルスとRNAウイルスの遺伝子を検出する効率について、4種の市販DNA/RNA抽出キットを種々の条件で比較検討した。DNAウイルス（豚パルボウイルス）の場合、調べた3種のDNA/RNA抽出キットはPCRでの遺伝子効率において大きな差はなかった。RNAウイルス（E型肝炎ウイルス）の場合、P社の「細胞又は組織サンプルからのトータルRNA精製用キット」が、種々の臓器濃度条件下でも安定した結果が得られ、迅速で簡便で信頼性の高いウイルス遺伝子抽出系に適していると考えられた。

多種類の病原体ゲノムを一括して検出するマイクロアレイ法への応用を検討している。本検出法では多量の検体核酸が求められることから、4種類のWhole genome amplification (WGA)法と2種類の細菌DNAを用いて偏り無く核酸を増幅する方法を検討しOmniPlex WGA法による核酸増幅が最適であることが示唆された。さらに鳥インフルエンザウイルス検出のためのプローブ設計をすることが出来た。

家禽の高病原性鳥インフルエンザについて検査所等でも実施可能な市販の人用インフルエンザ診断キットについて検討した。高病原性インフルエンザウイルスとの反応性を調べたところキットにより検出感度に大きな差があることが明らかになった。また、鶏肉の乳剤を混入させても非特異的反応は認められなかった。しかし、検出感度は人インフルエンザウイルスに比べがかなり低く鳥インフルエンザに応用することは可能であるが鳥類由来ウイルスに応用するに当たっては注意が必要である。迅速高感度診断法としてのLAMP法を引き続き検討した。本研究で設計したA型インフルエンザウイルスに共通のMPプライマーを用いたときは $10^2$ EID<sub>50</sub>/0.1mlであった。RT-PCR法に比べ、RT-LAMP法は等温で反応が進み、検出も黙視で行えることから、現段階ではこのRT-LAMP法がもっとも有効な迅速診断法であると考えられた。

食用として供される家畜や野生動物におけるA群ロタウイルスについて感染状況の調査を実施した。野生のイノシシで23.6%にP[17]遺伝子型のトリロタウイルス、40.7%にP[4]あるいは[8]遺伝子型のヒトロタウイルス、また56.0%がP[2]あるいは



[3] 遺伝子型のロタウイルスの抗体が検出され、1例からはVP4 遺伝子が陽性となった。ウシについては昨年度の血清疫学調査で様々なロタウイルスが流行していることが推測されたため、糞便からのウイルス検出を試み 587 例のうち子牛の正常便 1 例からロタウイルス VP4 遺伝子が検出された。

北海道ではエゾシカ有効活用推進事業の一環としてシカ肉の普及が図られつつあり、エゾシカにおける E 型肝炎ウイルス抗体調査を実施した。エゾシカ 225 頭の抗体検査の結果、28 検体 (12.4%) が抗体陽性であり、陽性率は、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。

#### 分担研究者

岡崎 克則 北海道医療大学薬学部・教授  
池田 秀利 動物衛生研究所人獣感染症研究  
チーム長  
伊藤 壽啓 鳥取大学農学部獣医学科・教授  
杉山 誠 岐阜大学大学院連合獣医学研究  
科・教授

#### A. 研究目的

と畜検査及び食鳥検査は、望診、触診等を基本とした検査実施要領に基づき行われている。異常を発見した場合には、必要に応じてさらに精密な検査を行うこととしている。しかし、2004 年には、高病原性鳥インフルエンザが発生し、り患した食鳥が搬入された食鳥処理場における食鳥検査によって疾病を確認することができなかったという事例が発生した。ウイルス疾病に対しては、通常の検査以外に精密な検査が必要になる。また、異常が認められた個体や群のウイルス学的検索は通常の検査では迅速性や経済性から実施しにくい。本研究では食用に供される家畜などのウイルス性疾病について実施可能な検査方法の開発や改良を実施し、食肉などの更なる安全性確保のために検査体制整備のための技術的基盤を提供することを目的とした。また、食肉等に関連して人に感染する可能性があるウイルスとして A 群ロタウイルスや E 型肝炎ウイルスなども考えられること

からこれらも含め実態調査を実施することも目的とした。

#### B. 研究方法

1. ブタに感染するウイルスの PCR 法のための条件検討：ブタ肝臓乳剤の上清を検査材料としてウイルス核酸の抽出方法について市販の 4 つの核酸抽出キットを比較検討した。ウイルス核酸の検出は RNA ウイルスである E 型肝炎ウイルス (HEV)、DNA ウイルスのブタパルボウイルス (PPV) を用いた。

2. 多種類の病原体を一括して検出するためのマイクロアレイ法の応用：検体中に存在する病原体核酸を偏り無く増幅する核酸増幅法の検討を実施した。さらに報告されているすべての鳥インフルエンザウイルスを検出するためのプローブ設計を試みた。

3. 市販の人インフルエンザ用診断キットについて H5N1 亜型高病原性ウイルス株を用いて各種市販キットの検出感度、操作性並びに鶏肉を混入した時の反応性を比較した。

4. 鳥インフルエンザウイルスを検出する迅速高感度診断法としての LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法を確立するために作製した鳥インフルエンザウイルスに共通の MP プライマーと市販のプライマーおよび通

常の RT-PCR 法との検出感度や操作性について比較検討した。

5. A 群ロタウイルスに対する血清疫学的調査およびウイルス遺伝子検出：イノシシの血清 182 例についてトリ、ヒト、およびサルロタウイルスの GST 融合 VP8 蛋白質を抗原とした各抗体価を測定した。さらに臨床的に健康なウシの糞便 587 例と野生イノシシの腸管内容物 135 例について A 群ロタウイルス VP4 遺伝子の検出を行った。

6. エゾシカにおける E 型肝炎ウイルスの感染状況を調べるために 225 頭から得た血清について組換えバキュロウイルスによって産生された E 型肝炎ウイルス様中空粒子を抗原とする ELISA およびウエスタンブロット法による測定を実施した。

### C. 研究結果

1. ブタに感染するウイルスの PCR 法のための条件検討：肝臓の臓器乳剤から DNA ウイルスと RNA ウイルスの遺伝子を検出する効率について、4 種の市販 DNA/RNA 抽出キットを種々の条件で比較検討した結果、DNA ウイルス（豚パルボウイルス）の場合、調べた 3 種の DNA/RNA 抽出キットは PCR での遺伝子効率において大きな差はなかった。RNA ウイルス（E 型肝炎ウイルス）の場合、P 社の「細胞又は組織サンプルからのトータル RNA 精製用キット」が、種々の臓器濃度条件下でも安定した結果が得られ、迅速、簡便で信頼性の高いウイルス遺伝子抽出系に適していると考えられた。

2. 多種類の病原体を一括して検出するためのマイクロアレイ法の応用：4 種類の Whole genome amplification (WGA) 法と 2 種類のバクテリア (*F. tularensis* 及び *E. coli*) を用いて偏り無く核酸を増幅する方法を簡易的に

検討した。その結果、OmniPlex WGA 法又は Phi29 DNA ポリメラーゼを用いた増幅法では、高い増幅効率と殆ど偏り無い増幅が確認された。DOP-PCR において高い増幅率が認められたが、他の WGA 法よりも激しく偏った増幅が観察された。これらの産物を Alex660 蛍光色素でラベル化しマイクロアレイで 2 種類のバクテリア特異的検出を試みた結果、OmniPlex WGA 法を用いた増幅産物において特異的かつ均一なシグナルが強く検出された。以上の結果から、病原体を検出するためのマイクロアレイには、OmniPlex WGA 法による核酸増幅が最適であることが示唆された。

さらに、鳥インフルエンザウイルスに対するプローブ設計を行い、60 種類の HA 遺伝子を標的としたマイクロアレイプローブは鳥インフルエンザウイルスに対して 96%の検出網羅率を示し、40 種類の NA 遺伝子を標的としたマイクロアレイプローブは 98%の検出網羅率を示した。

3. 現行の人用インフルエンザ診断キットの鳥インフルエンザウイルス検出への応用

市販の鶏肉を用いて作成した 10%乳剤に既知の感染価の H5 ウイルスを混合し、人用インフルエンザ診断キットによる検出限界を測定した結果、 $10^6$  EID<sub>50</sub>/ml で、PBS 希釈ウイルス液の場合とほぼ同程度であった。しかし、その検出限界値 (HAU 換算で約 13 HAU) は人インフルエンザウイルスに対するそれ (0.16 HAU) に比べて明らかに低かった。一方、鶏肉乳剤のみによる非特異陽性反応は認められなかった。

11 種類の市販キットの高病原性ウイルス株との反応性は  $10^{6.3}$  TCID<sub>50</sub> のウイルスを 8 種のキットで検出可能であったが、3 種のキットではシグナルが観察されなかった。6 種のキットでは  $10^{3.3}$  TCID<sub>50</sub> の、2 種は  $10^{4.3}$  のウイルスを検出できた。いずれのキットでも  $10^{2.3}$  TCID<sub>50</sub> のウイルスは検出できなかった。

4. LAMP 法による鳥インフルエンザウイルスを

検出する迅速高感度診断法の確立：RT-PCR法およびRT-LAMP法についてそれぞれ検出感度を調べた結果、RT-PCR法では $10^2$ EID<sub>50</sub>/0.1ml、RT-LAMP法では市販のH5プライマーを用いたとき $10^3$ EID<sub>50</sub>/0.1ml、本研究で設計したA型インフルエンザウイルスに共通のMPプライマーを用いたときは $10^2$ EID<sub>50</sub>/0.1mlであった。

5. A群ロタウイルスに対する血清疫学的調査およびウイルス遺伝子検出：ウシとイノシシについて、A群ウイルスの感染状況についての調査を行った。野生のイノシシ182例について、P遺伝子型特異抗体検出法により血清疫学調査を実施した結果、23.6%のイノシシがP[17]遺伝子型のトリロタウイルスの、40.7%がP[4]あるいは[8]遺伝子型のヒトロタウイルスの、56.0%がP[2]あるいは[3]遺伝子型のロタウイルスの感染を受けたと考えられた。またイノシシの腸管内容物135例からロタウイルスVP4遺伝子の検出を試みたところ、1例が陽性となった。

ウシでは様々なロタウイルスが流行していることが推測されたことから、ウシ糞便の遺伝子検出を行ったところ587例のうち牛の正常便1例からロタウイルスVP4遺伝子が検出された。

6. 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。

#### D. 考察

家畜等の食肉からの病原体検出で用いられ

るPCR検査におけるブタ肝臓の臓器乳剤からDNAウイルスとRNAウイルスの遺伝子を検出する効率について、4種の市販DNA/RNA抽出キットを種々の条件で比較検討した。DNAウイルス(豚パルボウイルス)の場合、調べた3種のDNA/RNA抽出キットはPCRでの遺伝子効率において大きな差はなかった。RNAウイルス(E型肝炎ウイルス)の場合、P社の「細胞又は組織サンプルからのトータルRNA精製用キット」が、種々の臓器濃度条件下でも安定した結果が得られ、迅速で簡便で信頼性の高いウイルス遺伝子抽出系に適していると考えられた。

マイクロアレイ法は多種類の病原体ゲノムを一括して検出することが可能と考えられる有用性が期待されるが、これに用いる核酸増幅法としてOmniPlex WGA法による核酸増幅が最適であることが示唆された。さらに鳥インフルエンザウイルス検出のためのプローブ設計をすることができたが、他の多くのプローブ設計をすすめる必要がある。

家禽の高病原性鳥インフルエンザについて検査所等でも実施可能な市販の人用インフルエンザ診断キットについて高病原性インフルエンザウイルス株との反応性を調べたところキットにより検出感度に大きな差があることが明らかになった。一方、糞便や鶏肉の混入でも非特異的反応は認められなかった。しかし、検出感度は人インフルエンザウイルスに比べがかなり低く鳥類由来ウイルスに応用するに当たってはキットの選択と更なる改良の必要がある。

迅速高感度診断法としてのLAMP法を引き続き検討した。本研究で設計したA型インフルエンザウイルスに共通のMPプライマー-T-PCR法に比べ、RT-LAMP法は等温で反応が進み、検出も黙視で行えることから、現段階ではこのRT-LAMP法がもっとも有効な迅速診断法であると考えられた。

食用として供される家畜や野生動物におけ

るA群ロタウイルスについて感染状況の調査で、広範囲のイノシシにさまざまなP遺伝子型のロタウイルスが高率に感染していること、さらにイノシシにおいて新しいP遺伝子型のロタウイルスが流行している可能性が示唆されウイルス遺伝子も初めてが検出された。また、ウシでもロタウイルス遺伝子が検出され病原性などさらに解析する必要がある。

エゾシカにおけるE型肝炎ウイルス抗体調査で225頭の抗体検査の結果、28検体(12.4%)が陽性でありエゾシカでの感染と生息域のブタとの関連についてさらに調査する必要がある。これらの研究成果は食肉などの更なる安全性確保のための検査体制整備のための技術的基盤としての情報として公衆衛生行政に貢献するものと考えられる。

#### E. 結論

食用に供される家畜・家禽のウイルス疾病の検査において簡便で信頼性の高いウイルス学的検査の一つであるPCR検査法における検体の乳剤化さらにRNAおよびDNA抽出のためのキットの選択ができ、今後の食肉・食鳥検査所での検査技術に有用な基礎的技術資料となる。また、多数の病原体を一括して検出するマイクロアレイは有用と考えられるがさらに実施可能な技術となるような方法の確立が必要である。

鳥インフルエンザ検査においての有用な簡易検査キットの候補が選択できたが感度が低く改良が望まれる。またLAMP法による鳥インフルエンザウイルスの検出方法を開発でき他のウイルス株での検証をして食鳥検査所での検査にも応用可能になるようにする必要がある。食肉に供されるウシ、イノシシでのロタウイルスがまた、エゾシカでのE型肝炎ウイルスの感染が起きていることがあることがわかったがさらに詳細に調査する必要がある。

#### F. 健康危険情報

特に無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

##### 2. 学会発表

1) 吉井雅晃、山岸健、宮崎綾子、加藤花名子、池田秀利、恒光裕：豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス日本分離株のPCR法による亜型識別 第142回日本獣医学会学術集会 2006

2) M. Yoshii, A. Miyazaki, K. Kato, H. Ikeda, T. Okinaga, H. Tsunemitsu : Evolutionary dynamics of North American-type PRRSV into three subtypes characterized by two deletional mutations in Nsp2 gene. International PRRS Symposium 2006.

3) Ito, T. : DIFFERING POTENTIAL OF AVIRULENT WATERFOWL ISOLATES FOR BECOMING HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA VIRUSES BY PASSAGING IN CHICKENS. 第1回国際人獣共通感染症学会総会, ソウル, 2006. 1. 19

4) Ito, T. : Different potential of avirulent waterfowl isolates to become highly pathogenic avian influenza virus by passaging in chickens. Second Japan-China Bilateral Symposium on Avian Influenza, Tokyo. 2007. 2. 6-7

5) Ito, T., Ito, H., and Otsuki, K. : DIFFERING POTENTIAL OF AVIRULENT WATERFOWL ISOLATES FOR BECOMING HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA VIRUSES BY PASSAGING IN CHICKENS, Asian Research Forum on Emerging