

表1-2 試験に供したインフルエンザウイルス簡易検出キット


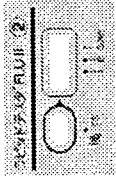




商品名 (メーカー)	形状	試料添加法 操作ステップ	判定までの 所要時間	有効期間
スタットマークインフル エンザA/B (カイノス)		滴下 1 ステップ	15分	12ヶ月
ラピッドテストFLU II (第一化学薬品)		滴下 1 ステップ	15分	14ヶ月
ラピッドテストFLUS ティック (第一化学薬品)		スティック	15分	10ヶ月
キャピリアFluA+B (日本ベクトン・ディキ ンソン)		滴下 1 ステップ	15分	21ヶ月
チェックFluA・B (アルフレックスアーマ)		滴下 1 ステップ	15分	21ヶ月
クイックチェイサー FluA, B (ミズホメデイ)		滴下 1 ステップ	15分	21ヶ月

表2：各種キットのH5N1亜型インフルエンザウイルスでの検出感度

Virus	Virus titer	BD Flu エグザマン	QuickVue ラピッド SP infllu	エスブライ インフル エンザ A& B-N	ディレクテ イジェン FluA+B	クイック インフル A・B「生 研」	ポクテムイ ンフルエン ザ A/B	スタットマ ークインフ ェンザ A/B	ラピッドテ スタ FLU II	ラピッドテ スタ FLU ス ティック	キャリアア チェック FluA+B	クイック チェイサ -FluA, B
A/duck/Hyog o/35/2001	3.5	-	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	4.5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	5.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A/blowfly/ Kyoto/93/ 2004	2.3	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT	NT
	3.3	+	+	+	+	+	+	-	-	NT	NT	NT
	4.3	+	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	-
	5.3	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+	NT	-**	-**
6.3	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-**	-**	

+

反応がやや弱かった

-**

再テスト確認済み

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

食肉に供される動物における A 群ロタウイルスの感染状況調査

分担研究者：杉山 誠 岐阜大学・院・連合獣医学研究科 教授

協力研究者：安部昌子、川口まり子、長谷部文子、伊藤直人、宮澤清志、

村瀬哲磨、坪田敏男、石黒直隆、浅野 玄（岐阜大学応用生物科学部）

伊藤 雅、山下照夫、柴 賢司（愛知県衛生研究所）

研究要旨：最近、食品由来の感染性胃腸炎が社会問題となり、問題となる病原体にノロウイルスとロタウイルスが挙げられている。従って、食肉に供される動物でのロタウイルスの動態は、公衆衛生上、極めて重要であると考えられる。そこで、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。野生のイノシシにおける本ウイルスの感染状況を把握することを目的に、愛知県および四国 4 県で捕獲されたイノシシ 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。その結果、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。抗体価の分布から、野生のイノシシでは様々なロタウイルスさらに未知の本ウイルスが流行していることが推測された。そこで、2003-06 に愛知、岐阜、群馬県で捕獲され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、岐阜県のサンプルの 1 例が陽性となった。塩基配列を解読した結果、韓国においてヤギから分離された GRV 株に最も近縁で、P 遺伝子型は P[3] と考えられた。血清疫学調査から P[3] 遺伝子型ロタウイルスの流行が推測されており、本遺伝子の検出はそれを裏付ける結果となった。昨年度実施した全国のウシにおけるロタウイルスに対する血清疫学調査（昨年度報告書）から、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ている。さらに、ウシでのロタウイルスの感染実態を調査するため、ウシの糞便より本ウイルスの検出を試みた。2006 年に岐阜県で採取されたウシの糞便 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。その塩基配列を解読した結果、米国においてウシから分離された B223 株に最も近縁で、P 遺伝子型は P[11] と考えられた。以上、食肉に供される動物における下痢症を引き起こすロタウイルスの生態が一部明らかとなった。

A. 研究目的

A 群ロタウイルスは、ヒトを含めた幼若動物の下痢症の主な病因の一つである。特に本ウ

イルスは、ヒトの冬期乳幼児下痢症を引き起こすウイルスとして知られている。ヒトでは食品が原因と考えられる集団発生例も報告されて

いる。これまでに、A 群ロタウイルスとして、哺乳類から鳥類まで15のG血清型と26のP遺伝子型のウイルスが分離されている。また、インフルエンザウイルスと同様に分節タイプのウイルスであるため、遺伝子交雑が起こりやすいとされている。このように、さまざまなタイプのロタウイルスが各種動物から分離されているものの、その感染の実態や異種動物間での感染・流行については、ほとんど明らかにされていない。そこで、今回、食肉に供される野生動物の代表であるイノシシを対象に、P 遺伝子型に特異的な抗体を検出することができるラテックス凝集 (LA) 試験を用いて、血清疫学調査を実施した。さらに、実際のウイルスの存在を調査するため、イノシシの腸管内容物からの本ウイルス VP4 遺伝子の検出を行った。

昨年度、本研究において、ウシを対象に、前述の LA 試験を用いた全国的な血清疫学的調査を実施した。その結果、ウシでは、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] 遺伝子型ロタウイルスおよび P[4] あるいは P[8] 遺伝子型ロタウイルスの感染も頻繁に起こるという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指摘した。そこで、今回、健康なウシの糞便を被検材料として本ウイルスの VP4 遺伝子を検出し、非流行時におけるロタウイルスの感染実態の解明を試みた。

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

2003-04 年にかけて、愛知県および四国 4 県で捕獲されたイノシシの血清 182 例が LA 試験

に供された (表 1)。大腸菌で発現させ、精製され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。血清はカオリンと抗原非感作ラテックスによる吸収処理を各 1 回行った。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. A 群ロタウイルス VP4 遺伝子の検出と解析

臨床的に健康なウシから採取された糞便 587 例と野生イノシシの腸管内容物 135 例が供試された (表 2)。各サンプルから RT-nested PCR 法により増幅された A 群ロタウイルス VP4 遺伝子の解析を行った。

今回使用したプライマーの配列を表 3 に示した。1st step PCR に使用したプライマーは VP4-HeadF および VP4-1094R、2nd step PCR に使用したプライマーは VP4-HeadF および VP4-887R である。増幅産物の塩基配列の決定のためにプライマー VP4-8F および VP4-9R を用いた。

各サンプルの 20% 乳剤上清から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて、RNA を抽出した。SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (invitrogen) を用い、RNA から cDNA を合成した。この cDNA を鋳型に Ex Taq (TaKaRa) を用いて Nested PCR を行った。RT-nested PCR によって得られた VP4 遺伝子産物についてダイレクトシーケンシングにより塩基配列の決定を行った。遺伝子解析のために GENETYX-MAC 9.0 および Clustal X

を用いた。

C. 研究結果

1. 野生イノシシにおける A 群ロタウイルスに対する血清疫学的調査

イノシシにおける各 LA 試験陽性率を捕獲県別に表 1 に示した。イノシシ血清 182 例中、PO-、Wa-、SA-LA 試験においてそれぞれ 43 例 (23.6%)、74 例 (40.7%)、102 例 (56.0%) が抗体陽性であった。Wa-LA 試験陽性率は PO-LA 試験陽性率よりも有意に高く ($p < 0.001$)、SA-LA 試験陽性率は PO-LA および Wa-LA 試験陽性率よりも有意に高かった (それぞれ $p < 0.001$ および $p < 0.01$)。愛知県で採取された血清のみでの抗体陽性数 (率) は、PO-、Wa-、SA-LA 試験においてそれぞれ 24 例 (27.6%)、35 例 (40.2%)、47 例 (54.0%) であった。また、四国 4 県で採取された血清のみでの抗体陽性数 (率) は、PO-、Wa-、SA-LA 試験においてそれぞれ 19 例 (20.0%)、39 例 (41.1%)、55 例 (57.9%) であり、捕獲地域ごとの抗体陽性率に有意差は認められなかった。

各 LA 試験により得られたイノシシ血清の抗体価について解析を行った。Wa- および SA-LA 両試験で陽性と判定された血清 68 例では、その両抗体価間に相関係数 0.76 という強い相関関係が認められた (図 1A)。同様に、PO- および Wa-LA 両試験の抗体価間および PO- および SA-LA 両試験の抗体価間の相関関係を調べたところ、それぞれ相関係数 0.53 および 0.55 であり、中程度の相関関係は認められたが、Wa- および SA-LA 両抗体価間の相関係数には及ばなかった。さらに、イノシシ血清の採取県別に同様の解析を行った結果、愛媛県のイノシシ血清において、Wa- および SA-LA 抗体価間に相関係数 0.85 という非常に強い相関関係が認められた (図 1B)。

2. 野生イノシシからの A 群ロタウイルス VP4 遺伝子の検出と解析

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 遺伝子を対象に RT-nested PCR を行った結果、2006 年に岐阜県で採取された 1 例からロタウイルス VP4 遺伝子と予想されるシグナル (B0-5 株) が確認された (表 2)。RT-nested PCR により得られた VP4 遺伝子産物についてダイレクトシーケンシングを行い、835 ベースの塩基配列を決定した。得られた塩基配列および推定アミノ酸配列について NCBI の BLAST を用いてさまざまなウイルスとの相同率検索を行ったところ、最も高い相同性を示したのは、韓国でヤギから分離されたロタウイルス GRV 株 (P[3] 遺伝子型) であった。

解読された B0-5 株の塩基配列から得られた推定アミノ酸配列 278aa (aa7-284) について進化系統学的解析を行った結果、B0-5 株は P[3] 遺伝子ロタウイルスのクラスタに位置した (図 2)。塩基配列による解析でも同様の結果が得られた。B0-5 株と他のロタウイルス 27 株の推定アミノ酸相同率を算定したところ、96.0% (GRV 株) - 43.8% (KK3 株) の相同性が確認された。P[3] 遺伝子ロタウイルス GRV および RRV との相同率は、アミノ酸配列でそれぞれ 96.0% および 89.9% であった。以上の結果から、今回検出された B0-5 株は RRV 株 および GRV 株 と同じ P[3] 遺伝子型に属していることが確認された。

3. ウシからの A 群ロタウイルス VP4 遺伝子の検出と解析

2006 年に岐阜県で採取されたウシ糞便 587 例について、A 群ロタウイルス VP4 遺伝子を対象に RT-nested PCR を行った結果、1 ヶ月齢の子牛の正常便 1 例からロタウイルス遺伝子と考え

られるシグナル(GB76株)が確認された(表2)。RT-nested PCRにより得られたVP4遺伝子産物についてダイレクトシーケンシングを行い、741bの塩基配列を決定した。得られた塩基配列および推定アミノ酸配列についてNCBIのBLASTを用いてさまざまなウイルスとの相同率検索を行ったところ、最も高い相同性を示したのは、米国でウシから分離されたロタウイルス B223株(P[11]遺伝子型)であった。

解読されたGB76株の塩基配列から得られた推定アミノ酸配列246aa(aa24-269)について進化系統学的解析を行った結果、GB76株はP[11]遺伝子ロタウイルスのクラスタに位置した(図3)。塩基配列による解析でも同様の結果が得られた。GB76株と他のロタウイルス26株の推定アミノ酸相同率を算定したところ、96.7%(B223株)～35.3%(P0-13株)の相同性が確認された。ウシ由来のP[11]遺伝子ロタウイルスB223およびA44株とのアミノ酸相同率は、それぞれ96.7%および93.5%であり、ヒト由来のP[11]遺伝子ロタウイルスI321および116E株とのアミノ酸相同率は、それぞれ88.6%および88.2%であった。以上の結果から、今回検出されたGB76株はB223株と同じP[11]遺伝子型に属していることが確認された。

D. 考察

1. 野生イノシシにおけるA群ロタウイルスに対する血清疫学的調査

今回血清が採取された愛知および四国4県のイノシシには、P[4]あるいは[8]、およびP[2]あるいは[3]遺伝子のロタウイルスが高頻度に感染していることが示唆された(表1)。P[17]遺伝子のロタウイルスの感染も、中程度の頻度で起きていることが示唆された。今回の血清疫学調査から、イノシシと同様の環境に生息する

ニホンザル、ニホンジカおよびタヌキと比較して、イノシシは各LA試験の陽性率が高い傾向にあることが示された(表4)。イノシシにおける各LA試験結果を血清採取地域別に比較したところ、愛知県および四国4県のイノシシの間には、各LA試験陽性率に有意差は認められなかった(表1)。遠隔の両県の間で陽性率に差がみられなかったことから、イノシシではロタウイルスの浸潤が、局地的ではなく、広い範囲において起きている可能性が考えられた。

また、Wa-およびSA-LA両試験で抗体陽性を示したイノシシにおいて、その両抗体価には相関係数0.76という強い相関が認められた(図1A)。この現象は愛媛県のイノシシにおいて顕著で、同県で採取されたイノシシでは、Wa-およびSA-LA両抗体価間に相関係数0.85という非常に強い相関が認められた(図1B)。以上のことから、P[4]あるいは[8]およびP[2]あるいは[3]遺伝子のVP4と80%以上のアミノ酸相同率をもつ未知のロタウイルスがイノシシの間で、特に一部地域で流行している可能性が考えられた。

以上のイノシシにおける血清疫学調査から、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た。

2. 野生イノシシからのA群ロタウイルスVP4遺伝子の検出と解析

2006年に岐阜県において採取された健康なイノシシ1例よりからロタウイルス遺伝子(B0-5株)が検出された。現在までに野生イノシシからロタウイルスを検出した報告はなく、これはイノシシのロタウイルス感染を確認した初めての例である。このB0-5株遺伝子につ

いて、解析を行った結果、塩基配列およびアミノ酸配列ともに P[3] 遺伝子のロタウイルスのクラスタに位置した (図 2)。さらに、B0-5 株と様々なロタウイルス株の VP4 アミノ酸相同率を算定した結果、P[3] 遺伝子ロタウイルス GRV 株および RRV 株と 89% 以上の相同率を示すことが明らかとなった。P 遺伝子型の型別は、同一の P 血清型の間で VP4 の推定アミノ酸配列が 89% 以上の相同率であることを基準に区別されている。以上のことから、B0-5 株は P[3] 遺伝子型に属するロタウイルスであることが明らかとなった。P[3] 遺伝子型ロタウイルスはヒトおよび多くの哺乳動物に分布しており、幅広い宿主域を持つことが知られている。実際に、B0-5 株に対して GRV 株に次いでアミノ酸相同率が高いウイルスは、タイで小児から分離された P[3] ロタウイルス CMH222 株 (95.7%) であった。

今回、野生のイノシシにおいて P[3] 遺伝子型ロタウイルスの感染が起きていることが確認された。本研究の血清疫学調査の結果から、イノシシに P[2] あるいは [3] 遺伝子型ロタウイルスの流行とともにヒトで主に流行している P[4] あるいは [8] 遺伝子型ロタウイルスも 40.7% と高率に感染していることが示唆されている。今回、イノシシにおける P[3] 遺伝子型ロタウイルスの存在が証明され、血清疫学調査の結果が裏付けられることとなった。このことは、ヒトの主な流行ウイルスとなっている P[4] あるいは [8] 遺伝子型ロタウイルスもまた実際にイノシシに感染しているという可能性が否定できないことを示唆している。また、イノシシにさまざまな P 遺伝子型のロタウイルスが重感染し、新たなリアソータントウイルスを発生させる可能性も依然として存在する。以上のことから、イノシシに感染しているロタウイルス、あるいはリアソータメントにより新たに出現したウイル

スを監視することは、公衆衛生学上および家畜衛生学上、大変重要と考えられる。このため、より多くの個体数、および広い地域でのイノシシからのロタウイルスの検出および抗原的・遺伝学的解析を行うことが必要である。

2. ウシからの A 群ロタウイルス VP4 遺伝子の検出と解析

臨床的に健康な子牛 1 例よりからロタウイルス遺伝子 (GB76 株) が検出された。この GB76 株遺伝子について進化系統学的解析を行った結果、P[11] 遺伝子型のロタウイルスのクラスタに位置した (図 3)。さらに、GB76 株と様々なロタウイルス株の VP4 アミノ酸相同率を算定した結果、P[11] 遺伝子型ロタウイルス B223 株および A44 株と 89% 以上の相同率を示すことが明らかとなった。以上のことから、GB76 株は P[11] 遺伝子型に属するロタウイルスであることが明らかとなった。P[11] 遺伝子型ロタウイルスは、ウシを中心に世界的に流行しているウイルスである。これまでに日本においても全国的にウシの下痢便から分離されている。今回のサンプルは 1 ヶ月齢の健康な子牛より分離されていることから、これまでの分離ウイルスとの病原性の違いに興味もたれる。この観点から、GB76 株について、ウイルスの分離および他の遺伝子の解析を進める計画である。

一方、ウシがヒトの生活圏に深く入り込んでいるインドにおいて、下痢を発症していないヒトから P[11] 遺伝子型ロタウイルス (I16E 株および I321 株) が分離されている。このことは、このタイプのウイルスがヒトへの感染性を有している可能性を示唆するものである。前述のように、本ウイルスはインフルエンザウイルスと同様に遺伝子が分節に分かれており、交雑による組換えウイルスの出現に注意しなければ

ならないとされている。このことは、ロタウイルスの直接的な病原性だけでなく、感染したロタウイルスが新しい遺伝子の供給源として機能する可能性も考慮しなければならないことを意味する。

今回、血清疫学的に主な流行ウイルスと考えられている P[2]あるいは[3]遺伝子型のウイルスあるいは予想された遺伝子型のウイルスは検出されなかった。さらに調査を進め、ウシにおける本ウイルスの感染実態を明らかにする必要がある。

E. 結論

1. 広い地域のイノシシにおいて、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が示唆された。また、新しい P 遺伝子型のロタウイルスがイノシシの間で流行している可能性も考えられた。

2. 野生のイノシシからロタウイルスを検出し、野生のイノシシにおけるロタウイルスの感染を初めて確認した。今回検出された P[3] 遺伝子型ロタウイルスは、これまでの血清疫学調査から推測されていたイノシシにおける同遺伝子型ロタウイルスの流行を裏付けるものであった。

3. 健康な子牛の糞便より、P[11] 遺伝子型ロタウイルスを検出した。今後、本ウイルスの病原性、遺伝学的性状について更なる解析が必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Shimizu, K., Ito, N., Sugiyama, M., Minamoto, N. 2006. Sensitivity of rabies virus to type I interferon is determined by the phosphoprotein gene. *Microbiol. Immunol.* 50 (12), 975-978, 2006.

2) 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. *Virus. Res.* 123,154-160, 2007.

3) 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.* (印刷中)

2. 学会発表

川口まり子、伊藤直人、石黒直隆、山下照夫、杉山 誠：野生イノシシにおける血清疫学調査より推測される新型 A 群ロタウイルス流行の可能性、第 142 回日本獣医学会学術集会、2006 年 9 月（山口）

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. 野生イノシシにおける各LA試験の陽性率

捕獲県	捕獲年	例数	LA試験(%)		
			PO-	Wa-	SA-
愛知県	2003-04	87	27.6	40.2	54.0
徳島県	2003-04	22	13.6	22.7	40.9
香川県	2003	29	27.6	48.3	58.6
愛媛県	2003-04	37	13.5	48.6	64.9
高知県	2003-04	7	42.9	28.6	71.4
全体		182	23.6	40.7	56.0

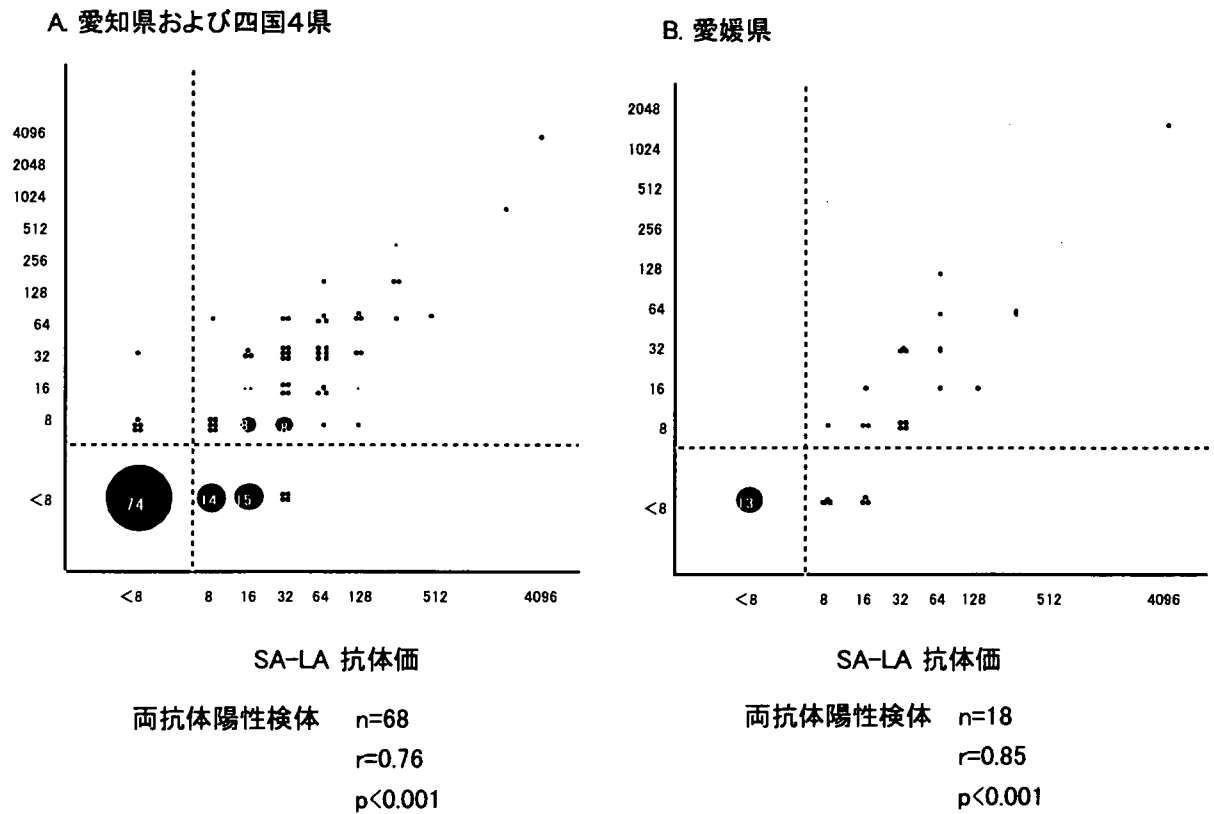


図1 Wa-およびSA-LA試験陽性イノシシ血清における両抗体価の相関

表2. ウシおよび野生イノシシからのロタウイルス遺伝子の検出

動物種	採取県	捕獲年	例数	陽性数(株名)
ウシ	岐阜県	2006	587	1 (GB76)
イノシシ	愛知県	2003-04	69	0
	岐阜県	2003-06	14	1 (BO-5)
	群馬県	2005-06	52	0

表3. VP4遺伝子検出のためのPCRおよびダイレクトシーケンシングに使用したプライマー

プライマー名(nt位置 [*])	配列
VP4-HeadF(1-26)	5'-GGCTATAAAATGGCTTCGCTCATTTA-3'
VP4-1094R(1069-1094)	5'-AATGCTTGTGARTCRTCCARTAATC-3'
VP4-887R(861-887)	5'-TCWGACCATTTATAWCCYARCCCWCC-3'
VP4-8F(22-47)	5'-ATTTATAGACARYTGCTHACAAATTC-3'
VP4-9R(794-818)	5'-TCTCTATTGTA CTGCATCTCTTTCCA-3'

※塩基配列番号はNCDV株のVP4遺伝子に基づいた。

R: A+G W: A+T Y: C+T H: A+C+T

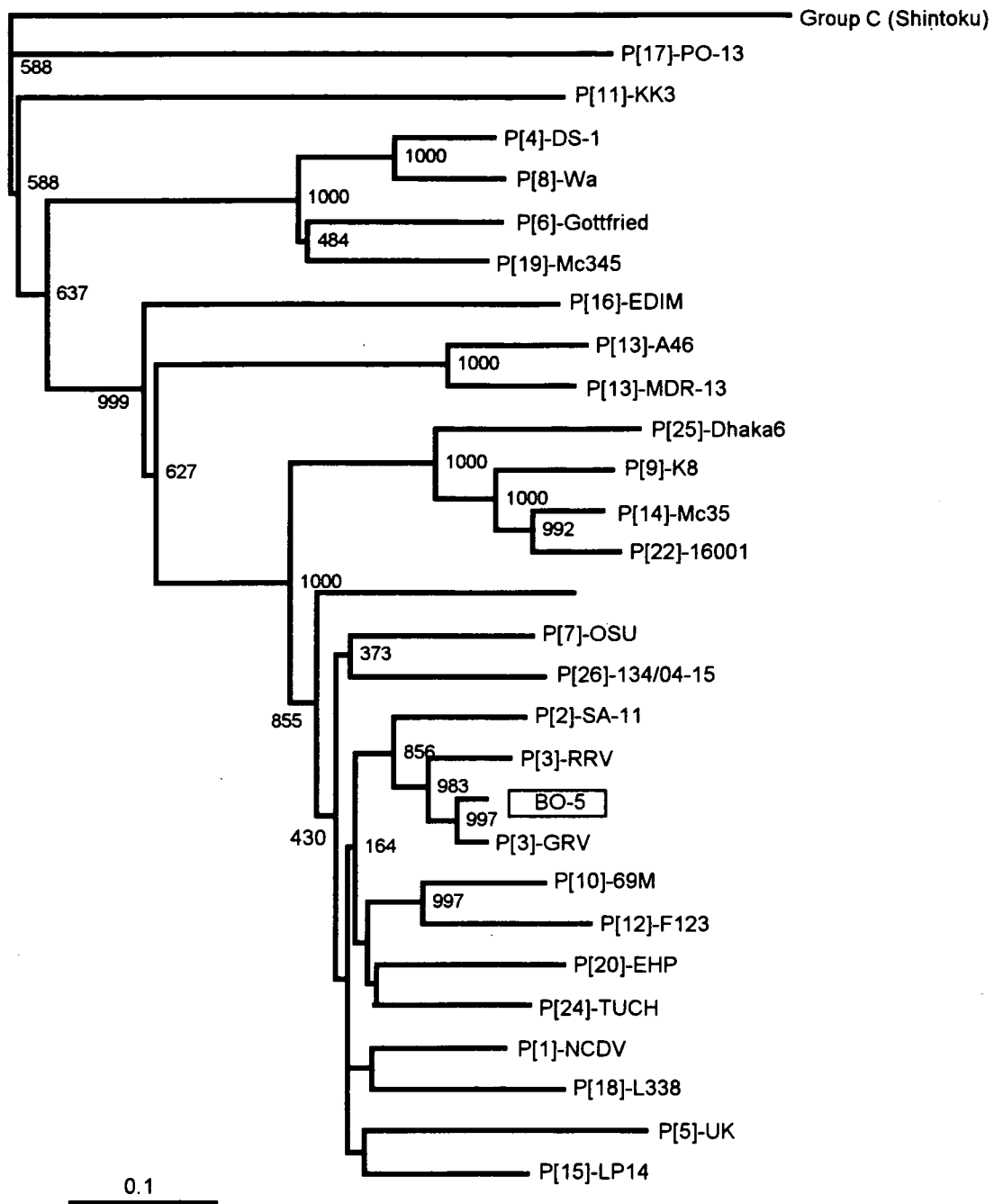


図2. イノシシから検出されたロタウイルスBO-5株のアミノ酸配列による系統解析

※VP4遺伝子aa7-284(278aa)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。

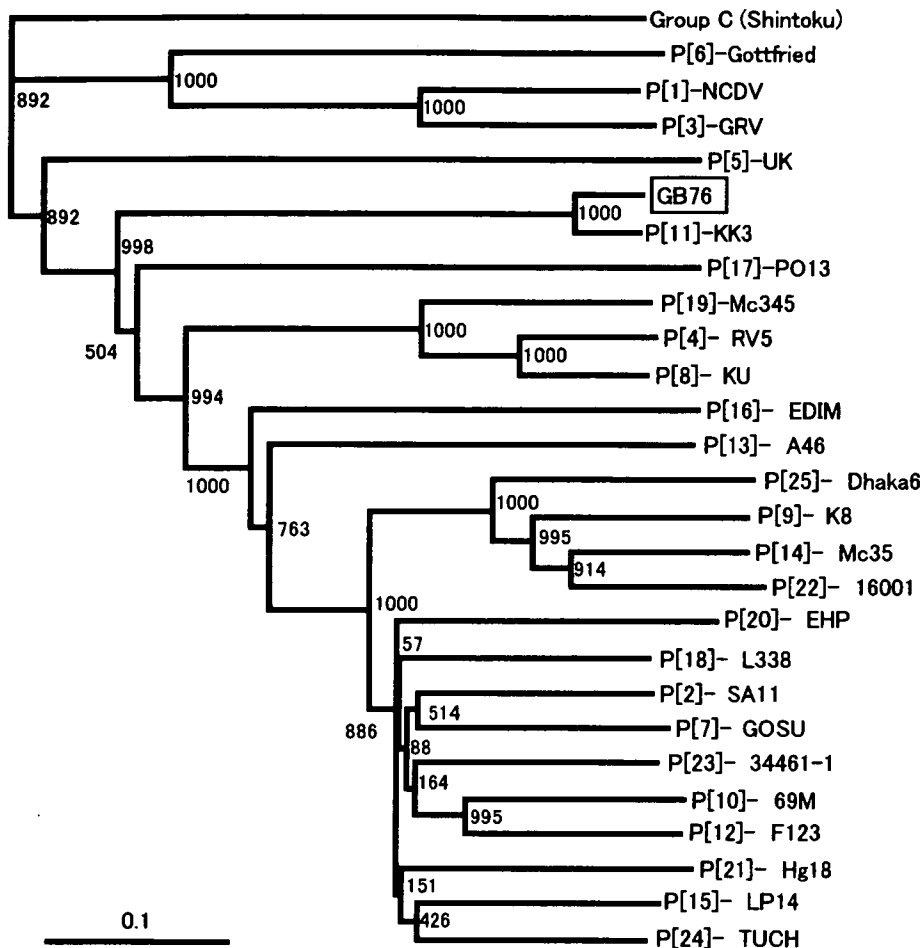


図3. ウシから検出されたロタウイルスGB76株のアミノ酸配列による系統解析

※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。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

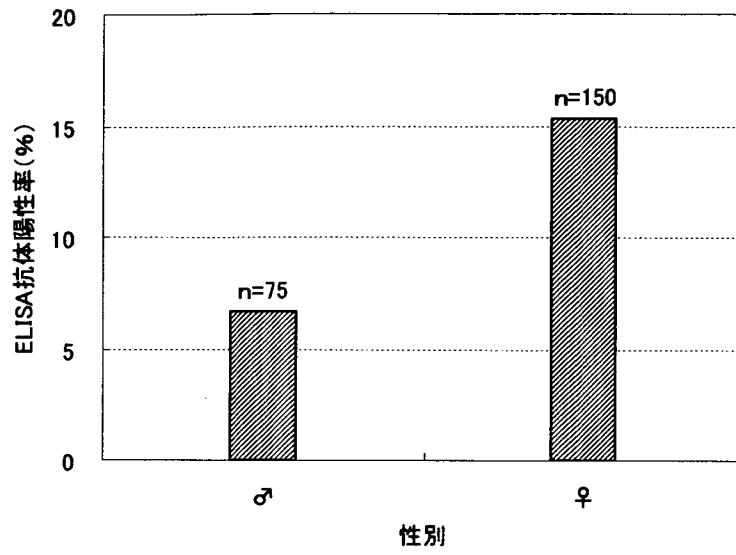


図 1. 抗 HEV ELISA 抗体保有状況における性差

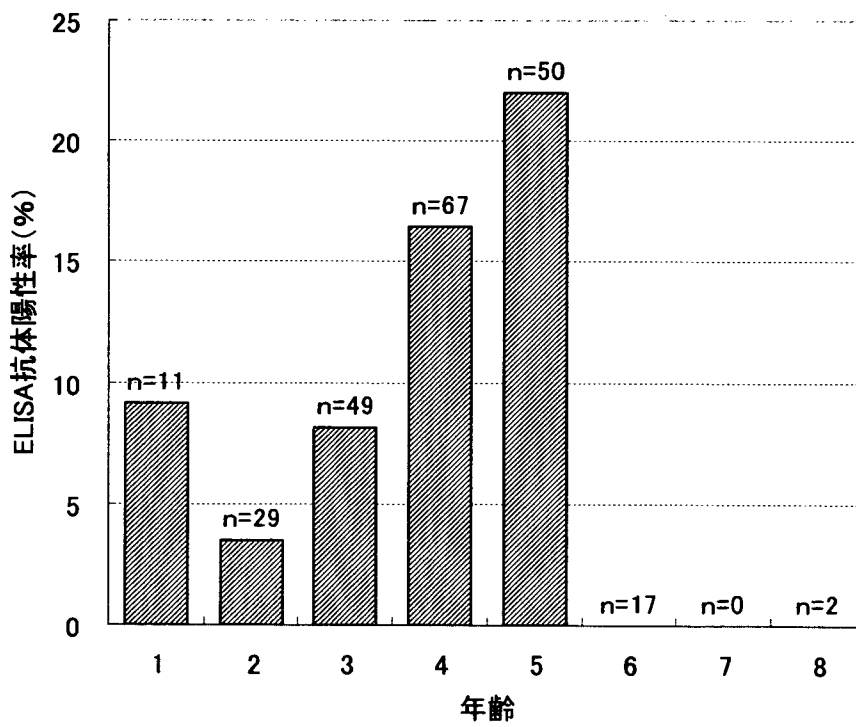


図 2. 抗 HEV ELISA 抗体陽性個体の年齢分布

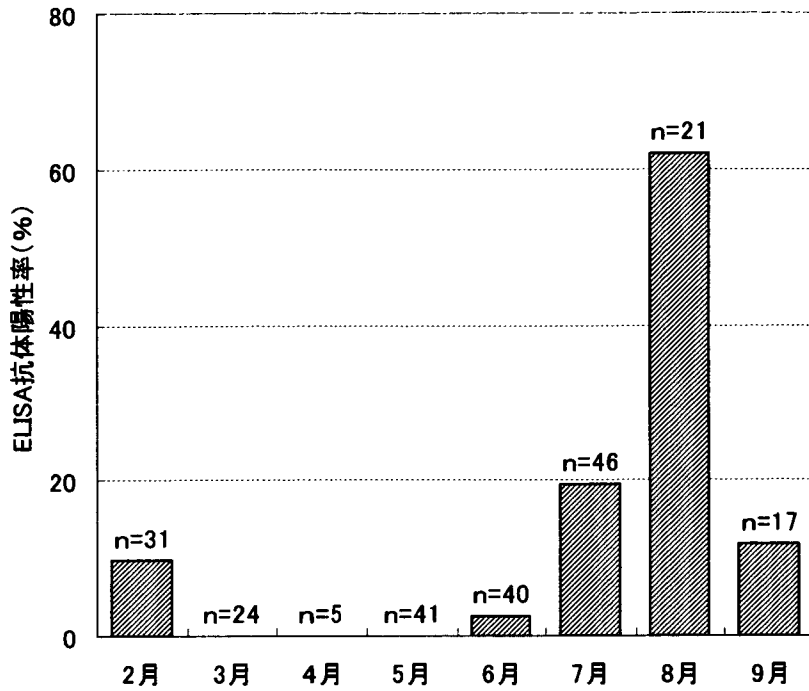


図 3. 抗 HEV ELISA 抗体陽性率の季節変動

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)

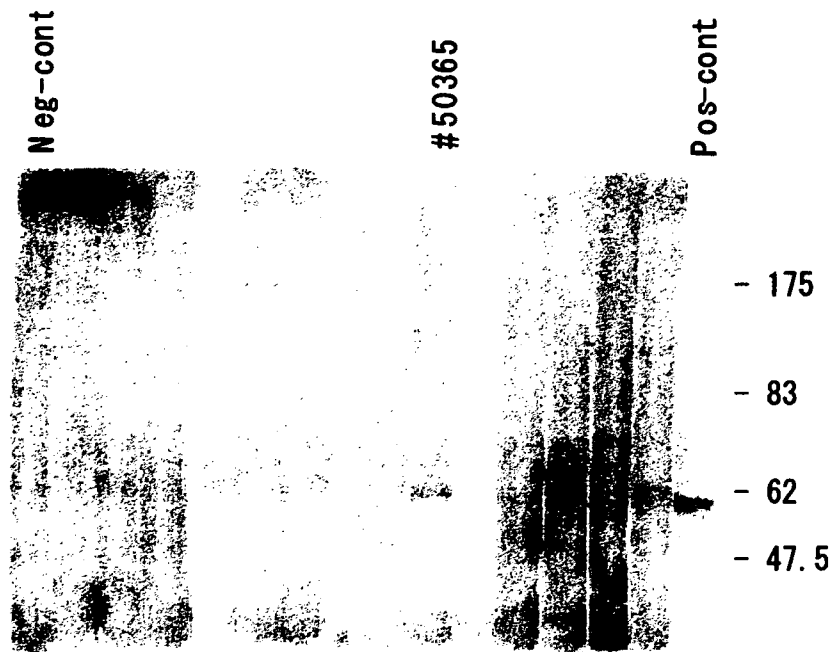


図 4. Western blot による抗 HEV 抗体の確認

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