

図 3. RT-LAMP 法による検出限界の測定

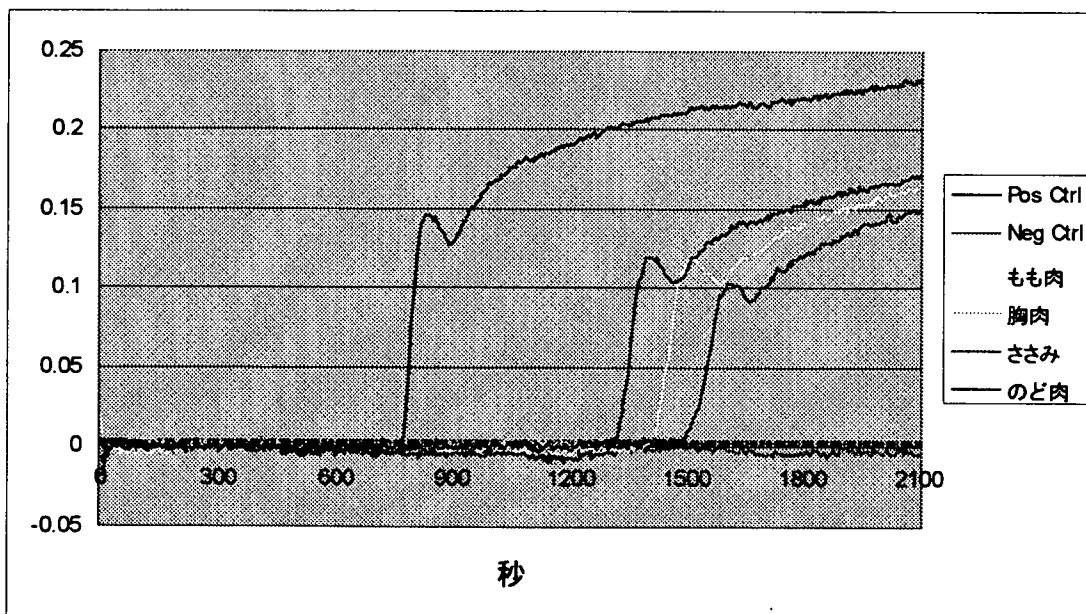
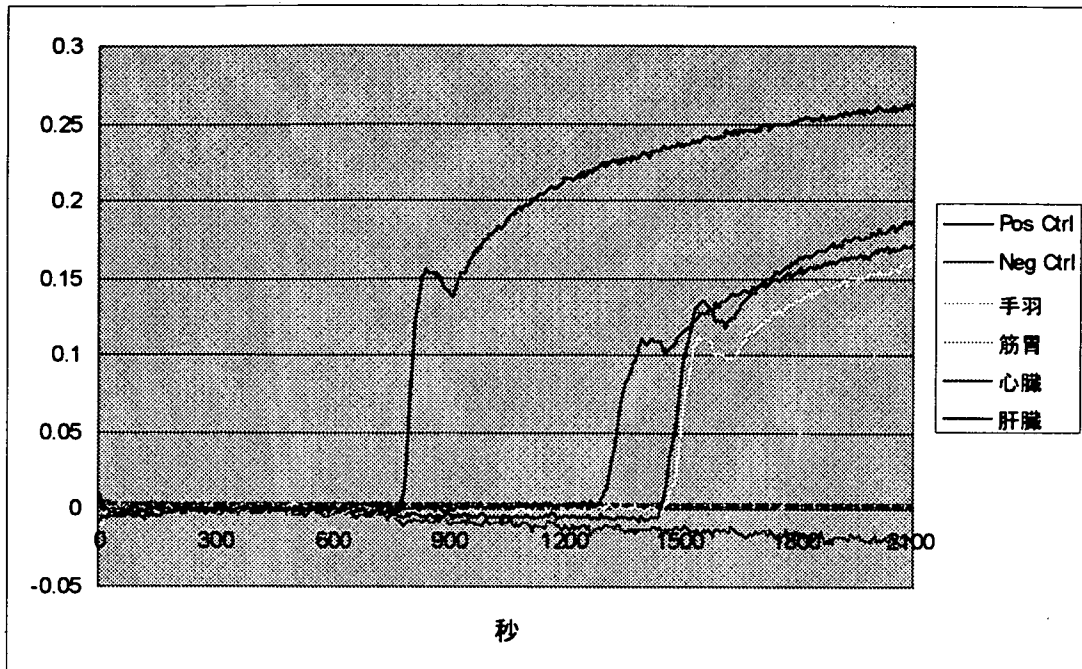


図4. RT-LAMP法による感染鶏各部位からのウイルス検出

鳥インフルエンザ簡易検査キットの反応性検討

分担研究者 棚林 清 国立感染症研究所 獣医科学部 室長

協力研究者 山本美江 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官

研究要旨：インフルエンザAおよびBウイルス抗原を検出する診断用キットは人用として国内で市販されているが、家禽用のキットは販売されていない。今年度は入手できた海外の家禽用インフルエンザ検査キットを用いて鳥類由来H5N1亜型インフルエンザAウイルスとの反応性を人用キットと比較した。ウイルスの検出感度は人用キットに比べ10倍から100倍低かったが、H5亜型も検出できることやニューキャッスル病ウイルスも同時に検出できることは迅速な高病原性鳥インフルエンザの診断時に検出感度に注意すれば利用できると考えられた。

A. 研究目的

2004年に日本国内において高病原性鳥インフルエンザの発生がみられたが、再び2007年にも宮崎県3農場、岡山県1農場で高病原性鳥インフルエンザが発生した。感染鶏が食鳥処理場に搬入された場合には迅速なインフルエンザウイルスの検出が重要である。現在、人用のインフルエンザ簡易診断キットは市販されているが、家禽用としての検査キットは販売されていない。一方、諸外国では家禽用インフルエンザ検査キットが販売されている。

本年度は入手できた家禽用インフルエンザ検査キットについて、H5N1亜型インフルエンザウイルスでの検出感度を市販人用検査キットと比較することを目的とした。

B. 研究方法

1. 供試ウイルス：野生カモ由来の弱毒型インフルエンザウイルス株 A/duck/Hyogo/35/01 (H5N1、兵庫 35 株) (神戸市環境保健研究所より分与) と高病原性鳥インフルエンザの発生があった養鶏場近くで採取されたオオクロバエより発育鶏卵にて分離された強毒型インフルエンザウイルス A/blowfly/Kyoto/93/2004 (H5N1、京都 93 株) は 10 日令発育鶏卵に接種して増殖させ、使用まで -80°C に分注保存した。また A/Puerto Rico/8/34 (H1N1、PR8)(国立感染症研究所ウイルス第 3 部より分与) も同様に調製した。ウイルスの感染価は MDCK 細胞を用いて Reed & Munch の方法で求めた。

2. インフルエンザ検査キット：人用インフルエンザ検査キットとして前年度まで

に調べた中から反応性の良かったエスプラインインフルエンザ A&B-N (富士レビオ) を対照として用いた。家禽用インフルエンザ検査キットは、Anigen Rapid AIV Ag/H5 AIV Ag および Anigen Rapid AIV Ag/NDV Ag (ANIMAL GENETICS 社) を用いた。前者は A 型インフルエンザ及び H5 亜型ウイルス検出がセットとなったもので、後者は A 型インフルエンザ及びニューキャスル病ウイルス(NDV)を検出するセットとなっている。

3. インフルエンザ検査キットでの反応性: リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で 10 倍段階希釈したウイルス液 100 μ l を各キット同梱されている検体処理液に加え混和後、エスプラインインフルエンザ A&B-N ではろ過フィルターを取り付けテストプレートに 2 滴滴下した。Anigen Rapid キットでは検体処理液から同梱のディスポザブルスポイトにより 4 滴をテストプレートに滴下した。各ウイルス希釈段階あたり 3 キットを用いた。標準の判定時間まで静置し、目視判定した。陽性判定の発色が見られたものを +、シグナルが見えないものを - とした。確認のため複数人で判定した。

C. 研究結果

家禽用インフルエンザ検査キットでの検出: ウイルス液を PBS にて 10 段階希釈し、希釈液から 100 μ l をそれぞれのキットの規定量の検体処理液に添加後それぞれの規定量をテストプレートに滴下し、判定した。結果の一覧を表に示した。

Anigen Rapid AIV Ag/H5 AIV Ag キットの A 型インフルエンザウイルス抗原検

出は兵庫 35 株に対して 10^{5.8} TCID₅₀、京都 93 株に対しては 10^{4.8} TCID₅₀ まで陽性シグナルが認められた。一方、エスプラインインフルエンザ A&B-N ではそれぞれ 10^{4.8} と 10^{2.8} TCID₅₀ であり、Anigen Rapid AIV Ag/H5 AIV Ag が A 型共通抗原検出では 10 倍から 100 倍検出感度が低かった。

H5 亜型抗原検出については兵庫 35 株に対して 10^{5.8} TCID₅₀、京都 93 株に対しては 10^{6.8} TCID₅₀ で反応し、A 型共通抗原検出よりも 10 倍から 100 倍感度が低かった。H1N1 亜型の PR8 株に対しては A 型共通抗原検出部では陽性であったが、H5 抗原検出部では反応しなかった。

Anigen Rapid AIV Ag/NDV Ag について兵庫 35 株、京都 93 株 10^{6.8} TCID₅₀ を反応させた時、A 型共通抗原検出部は陽性シグナルを示したのに対し、NDV 抗原検出部ではシグナルが無かった。

D. 考察

家禽等の鳥インフルエンザの簡易迅速診断用として開発された Anigen Rapid AIV Ag/H5 AIV Ag について 2 株の H5 亜型インフルエンザウイルス株での反応性を調べた。人用インフルエンザキットであるエスプラインインフルエンザ A&B-N よりは 10 倍から 100 倍 A 型共通抗原の検出感度が低く、一時スクリーニングでは本キットでは不十分であると考えられる。また、H5 亜型抗原検出が A 型共通抗原検出感度よりさらに低く、迅速に HA 亜型を調べることが出来る利便性はあるものの、使用に当たってはその感度に注意する必要がある。また、今回 NDV を用いることが出来

なかったがNDV抗原も検出する Anigen Rapid AIV Ag/ NDV Ag の NDV 抗原検出部ではインフルエンザウイルスとの交差反応は見られず鳥のインフルエンザの鑑別診断に利用できると思われる。

E. 結論

家禽用インフルエンザ検査キットを用いて鳥類由来 H5N1 亜型インフルエンザ A ウイルスとの反応性を人用キットと比較した。ウイルスの検出感度は人用キットに比べ 10 倍から 100 倍低かったが、H5 亜型も検出できることや NDV も同時に検出できることは迅速な亜型の同定や NDV との鑑別に検出感度に注意して利用できると考えられた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

山本美江、堀田明豊、藤田修、宇田晶彦、山田章雄、棚林 清。インフルエンザ迅速診断キットの鳥類由来 H5N1 亜型ウイルスでの反応性の比較。第 145 回日本獣医学会学術集会 2008 年 3 月 (麻布大)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

表 家禽用インフルエンザ検査キットの H5N1 亜型ウイルスでの反応性

| ウイルス株 | 添加ウイルス ス力価 (10°TCID ₅₀) | エスプラインイ ンフルエンザ A&B-N | Anigen Rapid | | Anigen Rapid | |
|--------------------------|---|----------------------------|-----------------|----|---------------|-----|
| | | | AIV Ag/H5AIV Ag | | AIV Ag/NDV Ag | |
| | | | AIV Ag | H5 | AIV Ag | NDV |
| 兵庫 35 株 (H5N1) 弱毒型 | 2.8 | NT | NT | NT | NT | NT |
| | 3.8 | - | - | - | NT | NT |
| | 4.8 | + | - | - | NT | NT |
| | 5.8 | + | +* | +* | NT | NT |
| | 6.8 | + | + | + | + | - |
| 京都 93 株 (H5N1) 強毒型 | 1.8 | - | - | - | NT | NT |
| | 2.8 | +* | - | - | NT | NT |
| | 3.8 | + | - | - | NT | NT |
| | 4.8 | + | + | - | NT | NT |
| | 5.8 | + | + | - | + | - |
| | 6.8 | + | + | + | + | - |
| PR8(H1N1) | 6.3 | + | + | - | + | - |

+* : 反応がやや弱かった。

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・応用生物科学部・人獣共通感染症学研究室・教授

協力研究者：安部昌子、伊藤直人、宮澤清志、村瀬哲磨、

高須正規（岐阜大学応用生物科学部）

研究要旨：平成 17～18 年度の研究結果をもとに、健康なウシにおける A 群ロタウイルスの感染動態についての調査を実施した。調査を行うにあたり、感度を上げるため、昨年度確立したロタウイルスの検出法 nested PCR の条件を再検討した。その結果、検出感度を約 100 倍上げることができた。本法を用いて、2006 年 4 月から 2007 年 6 月に採取された、岐阜県内の健康なウシから採取した糞便 2146 例について、ロタウイルス VP4 遺伝子の検出を試みた。陽性 44 例について VP4 遺伝子の塩基配列を解読した結果、検出されたウイルスの遺伝子型は P[5]、P[11]、P[14] と考えられた。さらに、同一農場で検出されたロタウイルスに遺伝子組換え体が存在し、非流行時であってもウイルス分節の組換えが起きていることが示された。以上、食肉に供される健康なウシにおいても、下痢症の起因となるロタウイルスが常在しており、感染環を形成していることが明らかとなった。

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 27 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。

昨年度、本研究において、健康なウシの糞便からロタウイルスが検出された。このことから、健康なウシが本感染症の感染源となっている可能性が考えられる。しかし、健康なウシから排泄されるロタウイルスは量的に少ないと考えられた。そこで今回、ウシ糞便からのロタウイルス検出法の条件を再検討し、より高感度な検出法の確立を試みた。さらに、この手法を用いて、健康なウシにおける本ウイルスの感染実態の解明を試みた。

B. 研究方法

1. nested PCR 条件の再検討

1st step PCR のサイクル数、2nd step PCR のサイクル数および template 量について検討を行った (表 1)。NCDV 株 (1.36×10^7 FFU/ml) を 10 倍段階希釈し、 $140 \mu\text{l}$ のウイルス液から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて、RNA を抽出した。PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) を用い、RNA から cDNA を合成し、これを用いて nested PCR の条件検討を行った。

2. A 群ロタウイルス VP4 遺伝子の検出と解析

岐阜県内の臨床的に健康なウシから採取された糞便 2146 例が供試された。糞便の採取は、2006 年 4 月から 2007 年 6 月にかけて毎月 1 回行った。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 遺伝子について分子生物学的解析を行った。

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。PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) 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. nested PCR の条件検討

それぞれの条件で行った PCR 産物の電気泳動像を図 1 に示した。既存の条件では、1st step PCR でウイルス量 1.9×10^6 FFU まで検出することができた。一方新規の条件では、既存の条件に比べて 10 倍低いウイルス量である、 1.9×10^5 FFU までしか検出することができなかった (図 1-A)。これらの PCR 産物を用いて 2nd step PCR を行ったところ、既存の条件では 1st step PCR の結果と同様の、 1.9×10^6 FFU のウイルス量までしか検出することができなかった。これに対し、新規の条件では、 1.9×10^5 FFU の濃度まで検出することができ (図 1-B)、約 100 倍の検出感度の上昇が確認された。

2. 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 4 月から 2007 年 6 月までに採取されたウシの正常便総計 2146 例についてロタウイルスの検出を試みたところ、44 例 (2.1%) からロタウイルス遺伝子と考えられるシグナルが確認された (図 2)。検出は冬期に集中して認められたものの、夏期にもわずかであるが (2 例) 検出された。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、435bp 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。その結果、最も高い相同性を示したのは、タイで分離された 61A 株 (P[5] 遺伝子型)、インドで分離された RUBV 株 (P[11] 遺伝子型) および日本で分離された Sun9 株 (P[14] 遺伝子型) であり、これらはいずれもウシから分離されたロタウイルス株であった。また、どの遺伝子型のロタウイルス株とも高い相同性を示さない株群 (P[?])

も存在した。

解読された検出株の塩基配列から得られた推定アミノ酸配列 144aa (aa48-191) について進化系統学的解析を行った結果、検出株はそれぞれ P[5]、P[11] および P[14] 遺伝子型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。

P[11] 遺伝子型のクラスタに属した検出株群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、97% (B223 株) ~ 15.2% (Gottfried 株) の相同性が確認された。ウシ由来の P[11] 遺伝子型ロタウイルス RUBV および B223 株とのアミノ酸相同率はそれぞれ 97.2% および 97% であり、ヒト由来の P[11] 遺伝子型ロタウイルス 116E 株とのアミノ酸相同率は 83.9% であった。以上の結果から、今回検出されたこれらの株群は P[11] 遺伝子型に属していることが確認された。

P[5] 遺伝子型のクラスタに属した検出株と他のロタウイルス 27 株の推定アミノ酸相同率は、92.3% (UK 株) ~ 25.5% (P0-13 株) であった。ウシ由来の P[5] 遺伝子型ロタウイルス 61A 株およびブタ由来の P[5] 遺伝子型ロタウイルス P343 株とのアミノ酸相同率はいずれも 96.8% であった。以上の結果から、これらの株は 61A 株と同じ P[5] 遺伝子型に属していることが確認された。

P[14] 遺伝子型のクラスタに属した検出株と他のロタウイルス 27 株の推定アミノ酸相同率は、98.6% (Sun9 株) ~ 29.9% (B223 株) であった。ウシ由来の P[14] 遺伝子型ロタウイルス Sun9 株とのアミノ酸相同率は 96% であり、ヒト由来の P[14] 遺伝子型ロタウイルス PA169 株とのアミノ酸相同率は 92.7% であった。以上の結果から、これらの株は Sun9 株と同じ P[14] 遺伝子型に属し

ていることが確認された。

他のロタウイルス 27 株のいずれとも高い相同性がみられなかった株群と既知のロタウイルス株との推定アミノ酸相同率は、42.4% (NCDV 株) ~ 22.5% (P0-13 株) であった。解読された検出株の塩基配列から得られた推定アミノ酸配列 144aa (aa48-191) について進化系統学的解析を行った結果、この株群は新しいクラスタを形成した。このことから、これらの株群は新しい P 遺伝子型である可能性が示された。

D. 考察

1. nested PCR の条件検討

今回あらたに PCR サイクル数および 2nd step PCR の DNA template 量を検討することにより、従来の方法よりも検出感度を約 100 倍上げることができた (図 1)。本法は、わずかなウイルス量でも検出可能であるので、今回のような非流行時のウイルスの動態解析において非常に有用であると思われる。

2. ウシからの A 群ロタウイルス VP4 遺伝子の検出と解析

臨床的に健康なウシの糞便 2146 例を検索した結果、44 例からロタウイルス遺伝子が検出された。その多くは本感染症の流行期である冬期に集中したものであった。一方、夏期においてもわずかながら検出が認められた。このことから、ウシは感染源となるウイルスに常に暴露されている可能性が考えられた。

今回検出されたロタウイルス遺伝子について進化系統学的解析を行った結果、P[5]、P[11] および P[14] 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[5]および 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り、日本でも全国的にウシの下痢便から分離されている。今回同じ遺伝子型に属するウイルスがウシの正常便から検出されていることから、これらの株の病原性の違いに興味を持たれる。今後、検出株の更なる解析を進めていく計画である。

一方、P[14] 遺伝子型ロタウイルスは、2000 年に栃木県で初めて子牛の下痢便から分離報告があるものの、主に兎およびヒトで流行している遺伝子型のウイルスである。このようにヒトへ感染性を有し流行を起こす可能性のあるタイプのウイルスがウシの正常便から検出されたことは、公衆衛生学上重要な情報であると思われる。

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。本研究でウシの正常便から検出されたロタウイルスには、いくつかの遺伝子型が混在していた。このように限られた地域内で様々なタイプのロタウイルスが動いているという事実は、ウシにおいて遺伝子組換え体が生じる危険性を危惧させるものである。今回、途中段階の結果ではあるが、同一農場で同時期に採取されたサンプルについて、VP4 遺伝子と VP7 遺伝子の一部を解読したところ、G8P[11]と G?P[?] (新型と考えられる) ロタウイルスとこれらの組換え体と考えられる G8P[?] ウイルスが見つかった。調査期間、ウイルスの検出は全て正常便からのみであり、周辺地域においてもロタウイルスによる流行は発生していない。このことから、非流行時であってもウイルス分節の組換えが起きることが

示された。したがって、健康なウシであってもロタウイルスの感染源となるリスクがあり、遺伝子の組換え体出現も含めウイルスの動態に注意する必要がある。

E. 結論

1. nested PCR の条件を再検討することにより、ウシの糞便からの nested RT-PCR 法による A 群ロタウイルスの検出感度を約 100 倍上げることができた。

2. nested RT-PCR 法により健康なウシ 2146 例の糞便から A 群ロタウイルス遺伝子の検出を試み、44 例 (2.1%) が陽性となった。健康なウシにおける本ウイルス動態の一部を明らかにすることができた。

3. 検出されたウイルスの P 遺伝子型は、P[5]、P[11]、P[14]であった。このうち、P[14] 遺伝子型ロタウイルスは、ヒトで流行しているタイプのロタウイルスであった。

4. 同一農場で検出されたロタウイルスに遺伝子組換え体が存在し、非流行時であってもウイルス分節の組換えが起きていることが明らかとなった。

5. 以上、食肉に供される健康なウシにおける本ウイルスの感染実態が明らかになり、そのリスクを示すことができた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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. 88, 2064-2072, 2007.

2) Sugiyama, M. & Ito, N. Control of rabies: epidemiology of rabies in Asia and development of new-generation vaccines for rabies. Comp. Immunol. Microbiol. Inf. Dis. 30, 273-286, 2007.

3) 伊藤直人, 杉山 誠: 狂犬病ウイルスの病原性に関する研究の進展. ウイルス 57: 191-198, 2007.

2. 学会発表

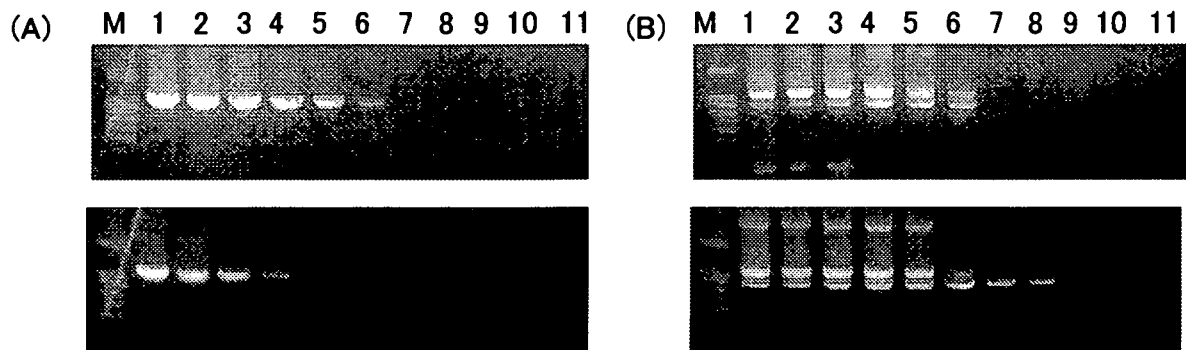
1) 安部昌子、長谷部文子、伊藤直人、野村亜利、前田昌美、高須正規、村瀬哲磨、宮澤清志、杉山誠: 成牛における A 群ロタウイルスの動態調査、第 144 回日本獣医学会学術集会、2007 年 9 月 (江別)

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nested PCRの検討条件

| | 既存法 | 新規法 |
|---------------|-----------|-----------|
| 1st step PCR | | |
| サイクル数 | 50 cyle | 30 cyle |
| 2nd step PCR | | |
| サイクル数 | 50 cyle | 25 cyle |
| DNA template量 | 2 μ l | 1 μ l |



1.2%アガロースゲル

M:100bpラダーマーカー

レーン1~10:NCDV株(1.9×10^6 FFU)の10倍段階希釈液 レーン11:H₂O

レーン1: 1.9×10^6 FFU レーン2: 1.9×10^5 FFU レーン3: 1.9×10^4 FFU

レーン4: 1.9×10^3 FFU レーン5: 1.9×10^2 FFU レーン6: 1.9×10^1 FFU

レーン7:1.9FFU レーン8: 1.9×10^{-1} FFU レーン9: 1.9×10^{-2} FFU

レーン10: 1.9×10^{-3} FFU

図1 nested-PCRの条件検討

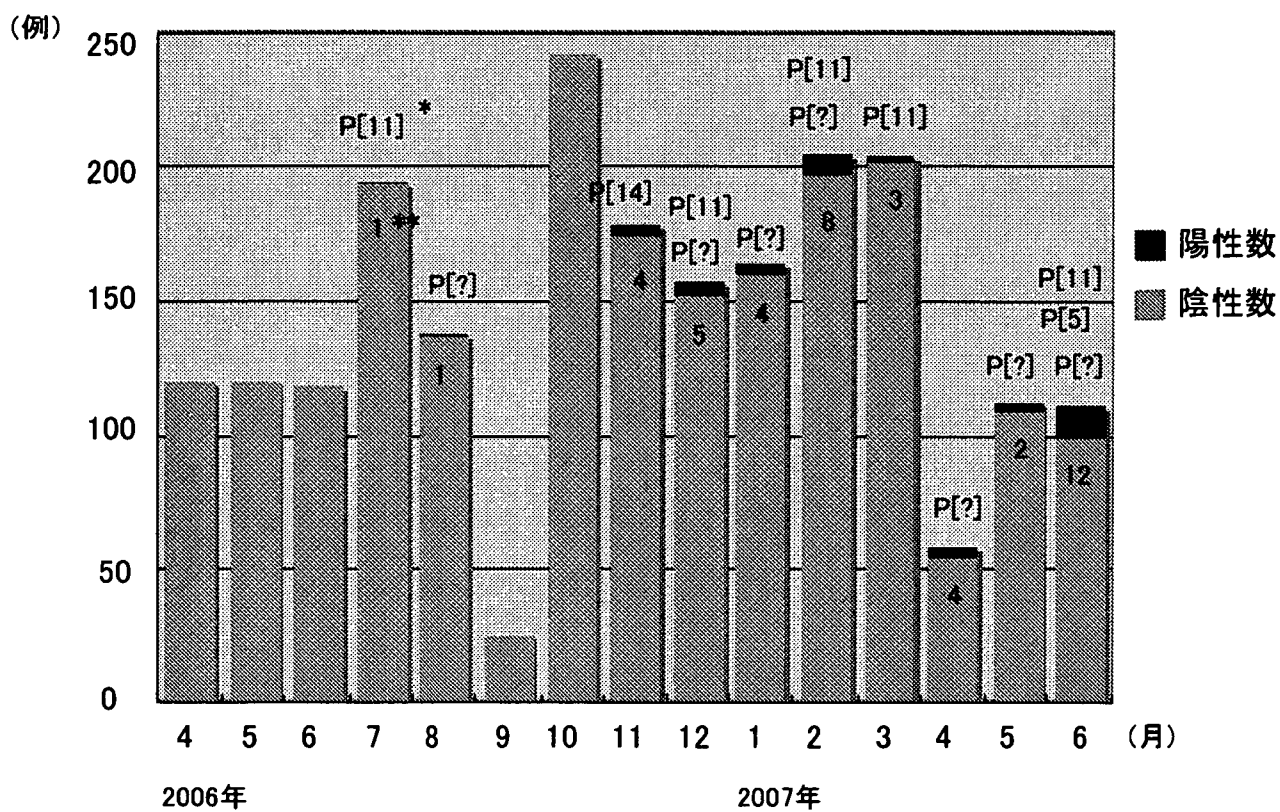
(A) 1st PCR産物の電気泳動像。

上段:サイクル数50 下段:サイクル数30

(B) 2nd PCR産物の電気泳動像。

上段:サイクル数50、template量2ul

下段:サイクル数25、template量1ul



総計2146例中 陽性44例(2.1%)

*:P遺伝子型
 **:陽性サンプル数

図2 健康な牛糞便からのロタウイルスの検出(RT nested-PCR)

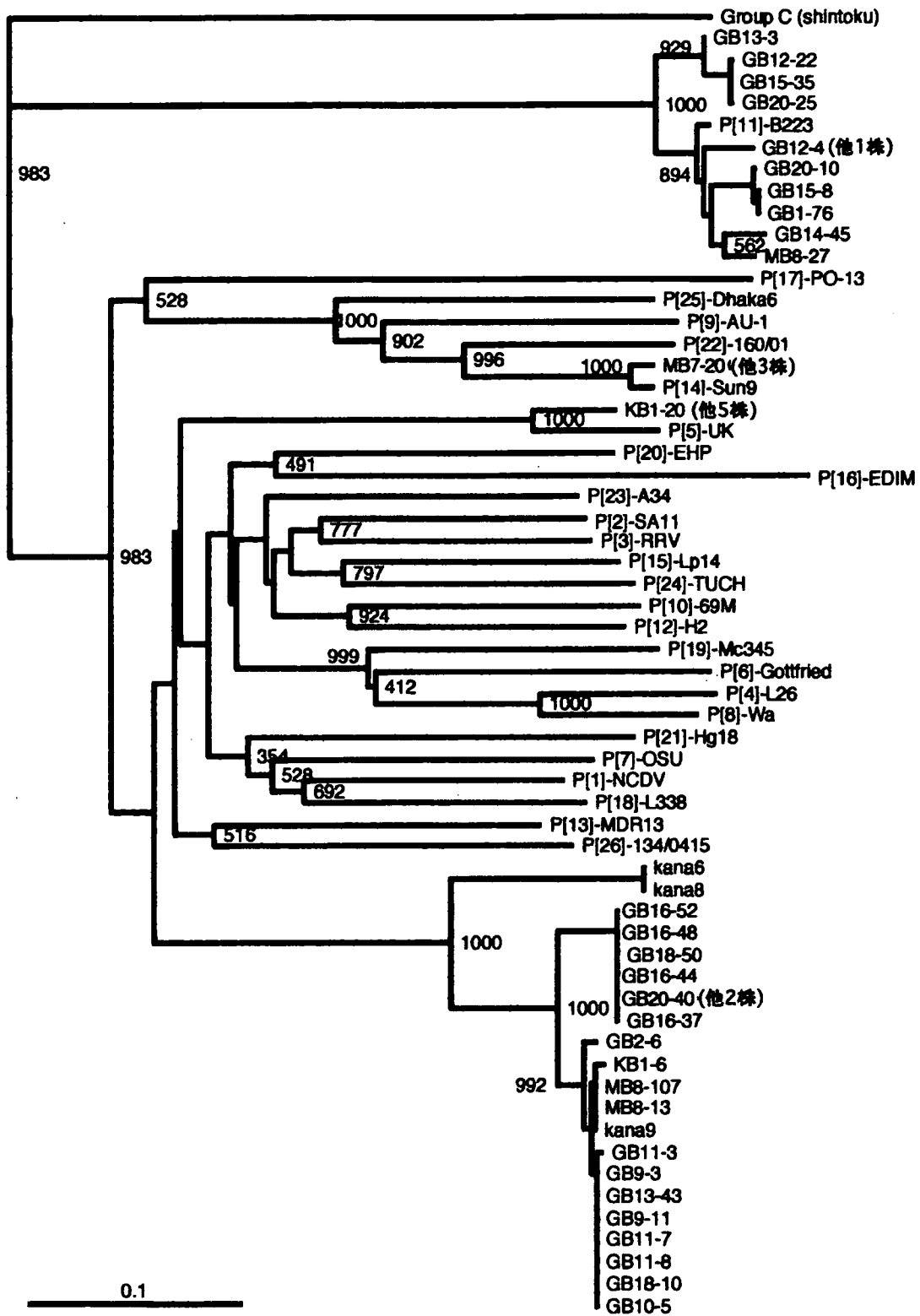


図3 ウシから検出されたロタウイルスのアミノ酸配列による系統解析

* VP4遺伝子aa48-191(144aa)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。

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：大澤宜明、井上恵美（北海道医療大学薬学部）

研究要旨： 2007年4月～2008年1月、北海道日高地区で捕獲されたエゾシカ321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、22検体（6.9%）が抗体陽性であった。抗体陽性率と年齢に相関は認められなかったが、昨年同様、0歳の群が比較的高い値を示した。この成績は、移行抗体の影響を示しているのかもしれない。調査域には養豚場が点在し、少なくとも2件は放牧養豚を実施している。日高地区のエゾシカの抗HEV抗体保有状況にはブタとの関連が強く示唆される。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、2006年2月～9月に日高地区で捕獲されたエゾシカ225頭についてバキュロウイルスで発現したHEV様粒子を抗原としたELISAに供し、28頭（12.4%）が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、抗体陽性個体の年齢ならび

に地理的分布を明らかにした。

B. 研究方法

1. 血清：2007年4～2008年1月、北海道日高地方西部地域で捕獲されたエゾシカ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、1%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および0.05%Tween20を含むPBSで1：200に希釈した被験血清を加え、37℃、1時間反応させ、0.05%Tween20加PBS（PBST）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・1のSIGMAFAST OPDを加え、室温、暗所に20分放置した。2.5M H₂SO₄ 50・1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（ΔOD）が0.288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PBST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。PBST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™ Chemiluminescence Plus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321頭中22頭（6.9%）が抗HEV抗体を保有していた。2007年4月～6月の内訳では、オス35頭中5頭（14.3%）およびメス79頭中23頭（10.1%）であった（図1）。また年齢別では、0歳、16頭中2頭（12.5%）；1歳、5頭中0頭（0%）；2歳、26頭中4頭（15.4%）；3歳、19頭中1等（5.3%）；4歳以上、48頭中6等（12.5%）であった（図2）。
2. 抗HEV ELISA抗体陽性率の季節変動：図3に示すように、2007年4月から7月は高い陽性率を示した。8月以降は低く、10月～2008年1月には陽性血清は検出されなかった。
3. 抗HEV ELISA抗体陽性個体の地理的分布：捕獲地点が明らかな2007年4月～6月の検体について検討した。山岳部では19頭中1頭（5.3%）、平野部では95頭中12頭（12.6%）エゾシカが抗HEV抗体を保有していた（図4）。
4. Western blotによる抗HEV抗体の確認：ELISAで抗体が検出された22検体をWestern blotに供したが、特異的なバンドを示すものはなかった。

D. 考察

北海道日高地方のエゾシカの 6.9%が抗 HEV 抗体を保有することが示された。陽性率は昨年度の報告 (12.4%) に比べ低かったが、ELISA の cut-off 値を高く設定したためと考えられる。新たな cut-off 値は、2007 年 6 月までに得られたすべての血清 520 検体中、Western blot で陽性を示した 4 検体中の最も低い ΔOD 値を下回る ΔOD 値の (平均値) + (2 x SD) により求めた。昨年度は、ELISA 陽性 28 検体中 1 検体が Western blot で陽性を示したが、本年度は Western blot 陽性検体は認められなかった。高度免疫血清に比べ、感染抗体では立体構造依存性の抗原決定基が優勢なのかもしれない。

昨年度とは異なり、抗体陽性率が加齢とともに上昇する傾向は認められなかった。一方、昨年同様 0 歳 (昨年は数え年で標記したので 1 歳) の群が高い陽性率を示した。これらの成績は、移行抗体の影響を示したものかもしれない。また、平野部で捕獲されたエゾシカは山岳部のシカの保有率に比べ抗体保有率が高かった。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、この地域のエゾシカの抗 HEV 抗体保有状況にはブタの関与が強く示唆される。エゾシカへの感染経路を明らかにするため、家畜保健所を介してこれらの養豚場での調査を申し込んだがこれまでのところ実現していない。

E. 結論

日高地方のエゾシカは継続的に抗 HEV 抗体を保有していることが確かめられた。北海道のエゾシカが HEV に感染している可能性が示されたことから、エゾシカ肉の生食は避ける必要がある。

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. 88, 1859-1865 (2007)

2. 学会発表

- 1) 大澤宜明、黒田和道、芝田敏克、原田勇一、井上恵美、岡崎克則、清水一史 「サリチル酸ナトリウムによるインフルエンザウイルス mRNA 核外輸送に対する阻害機構の解明」第 55 回日本ウイルス学会 (10 月 21 日、札幌市)
- 2) 富山大輔、川口紘史、浅野逸郎、井上恵美、岡崎克則 「エゾシカにおける E 型肝炎ウイルスの血清疫学調査」第 55 回日本ウイルス学会 (10 月 23 日、札幌市)

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

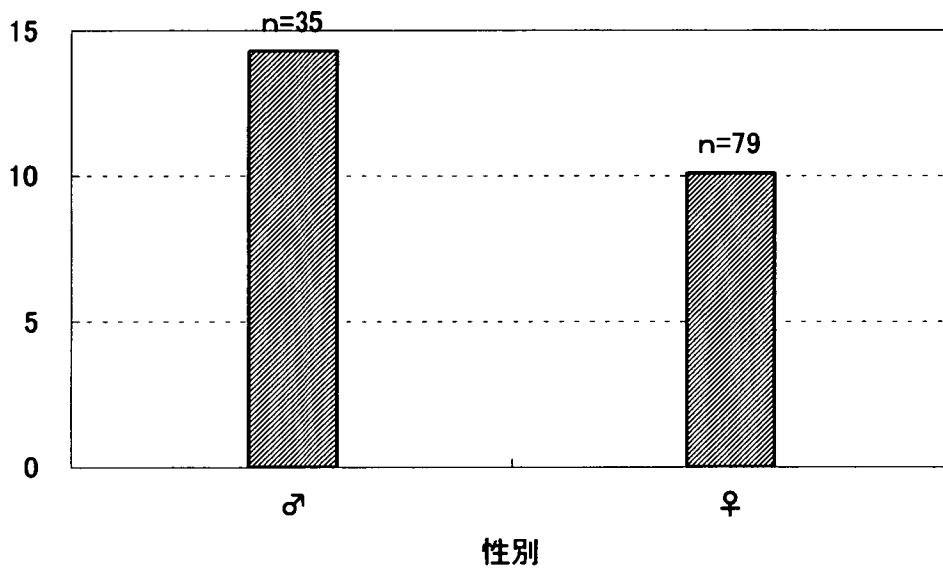


図1. 抗HEV 抗体保有状況の性差

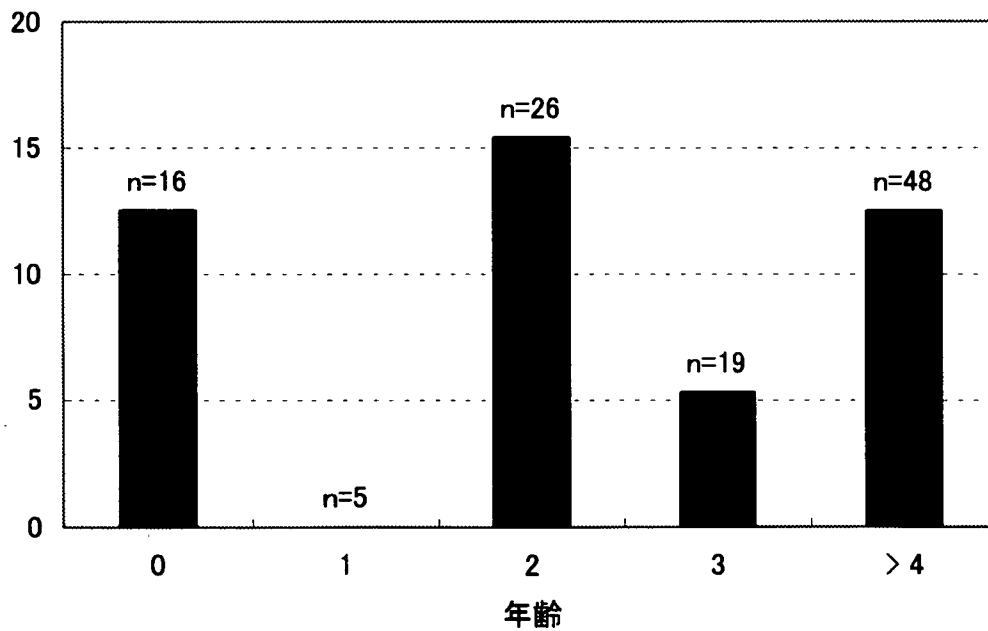


図2. 抗HEV 抗体陽性個体の年齢分布

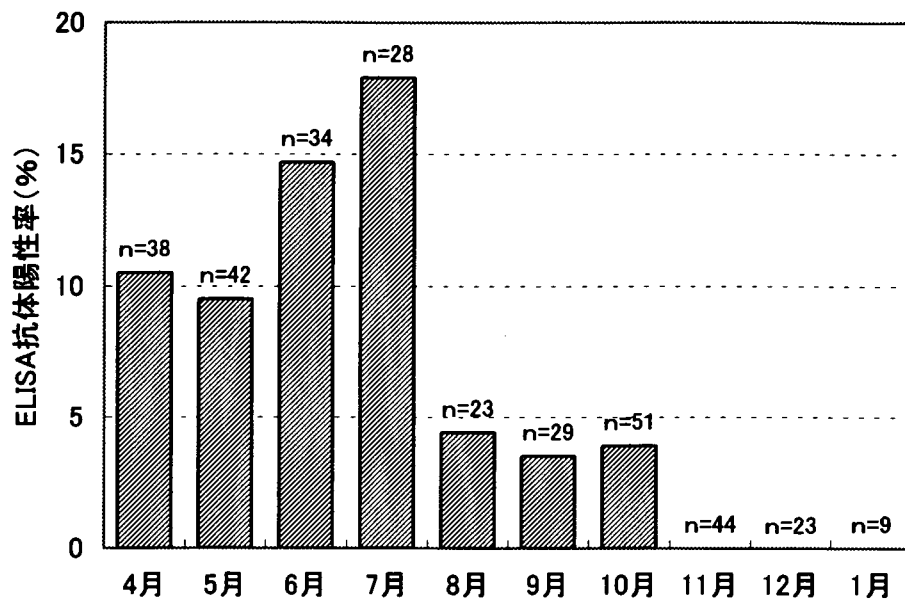


図3. 抗HEV抗体陽性率の季節変動

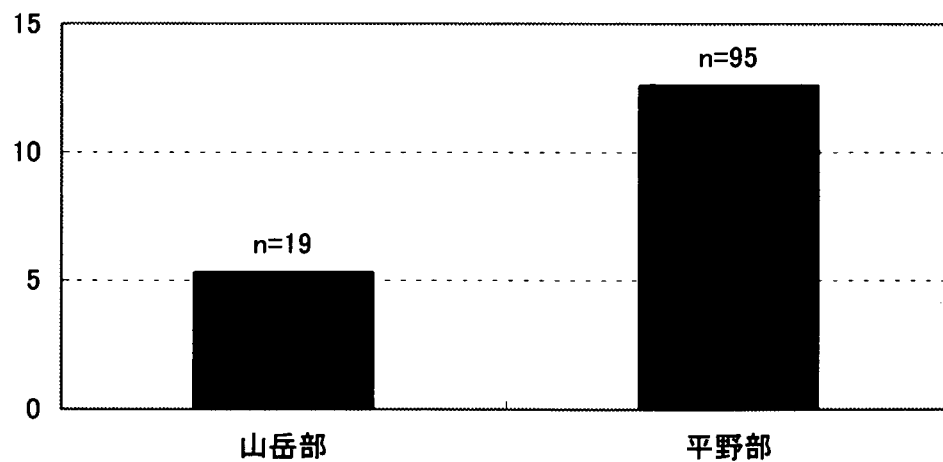


図4. 抗HFV抗体陽性個体の分布