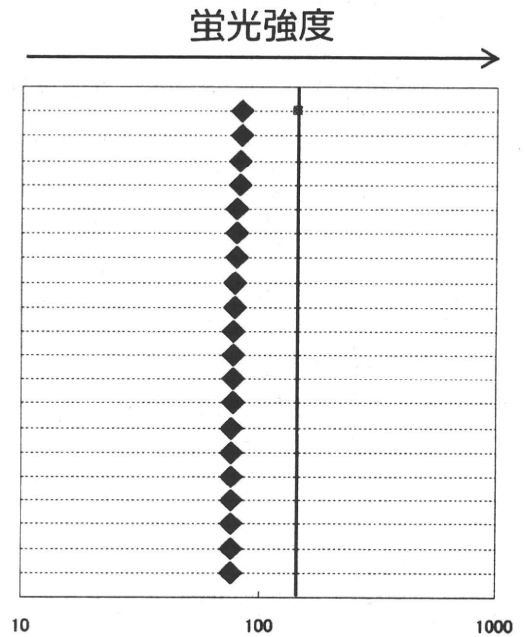


牛 廃棄腸間膜

腫瘍

候補順位	Acession No.	検出病原体候補
1	CP000661	Rhodobacter sphaeroides ATCC 17025, complete genor
2	NC_001545	Rubella virus, complete genome
3	NC_006560	Cercopithecine herpesvirus 2, complete genome
4	M80837	Clostridium perfringens type B (strain NCTC 8533) epsil
5	CT573326	Pseudomonas entomophila str. L48 chromosome, comp
6	AB211993	Human papillomavirus type 27b DNA, complete genom
7	AY826423	Sapovirus swine/OH-JJ259/00/US polyprotein gene, pai
8	AE017220	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesu
9	AY302549	Human echovirus 25 strain JV-4 complete genome
10	AP006628	Human adenovirus D, complete genome
11	NC_002067	Clostridium perfringens enterotoxin gene, complete cd
12	M98037	Bovine herpesvirus 5, complete genome
13	NC_005261	Human papillomavirus type 35 complete genome
14	M74117	Bradyrhizobium sp. ORS278, complete sequence
15	CU234118	Influenza A virus (A/black-headed gull/Sweden/5/99)(H:
16	AY684891	Cercopithecine herpesvirus 1, complete genome
17	NC_004812	Human echovirus 33 strain Toluca-3 complete genome
18	AY302556	Symbiobacterium thermophilum IAM 14863 DNA, com
19	AP006840	TPA_exp: Suid herpesvirus 1, complete genome



牛 廃棄腎臓

正常

候補順位	Acession No.	検出病原体候補
1	M80837	Clostridium perfringens type B (strain NCTC 8533) epsil
2	NC_006077	Kluyveromyces lactis mitochondrion, complete genome
3	AE017221	Thermus thermophilus HB27, complete genome
4	AE017220	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesu
5	AE004092	Streptococcus pyogenes M1 GAS, complete genome
6	EF173420	Human rhinovirus 17, complete genome
7	X61560	S.pyogenes strain MGAS156 speA gene (allele 1) for typ
8	CP000661	Rhodobacter sphaeroides ATCC 17025, complete genor
9	DQ473503	Human rhinovirus 7, complete genome
10	X53180	Clostridium butyricum gene for botulinum type E toxin,
11	AF116198	Influenza A virus (A/Chicken/NY/29878/91 (H2N2)) seg1
12	AY395706	Human papillomavirus type 62 isolate Qv18091, compl
13	NC_001576	Human papillomavirus type 10, complete genome
14	AE005174	Escherichia coli O157:H7 EDL933, complete genome
15	M35514	S.pyogenes streptococcal pyrogenic exotoxin type C (sp
16	BX248339	Mycobacterium bovis subsp. bovis AF2122/97 complet
17	L13198	Clortridium perfringens type B beta-toxin gene, comple
18	CY014993	Influenza A virus (A/fowl/Dobson/1927(H7N7)) segmen
19	AB297667	Puumala virus strain: DTK/Ufa-97 genomic RNA, Large s
20	NC_004003	Goatpox virus Pellor, complete genome

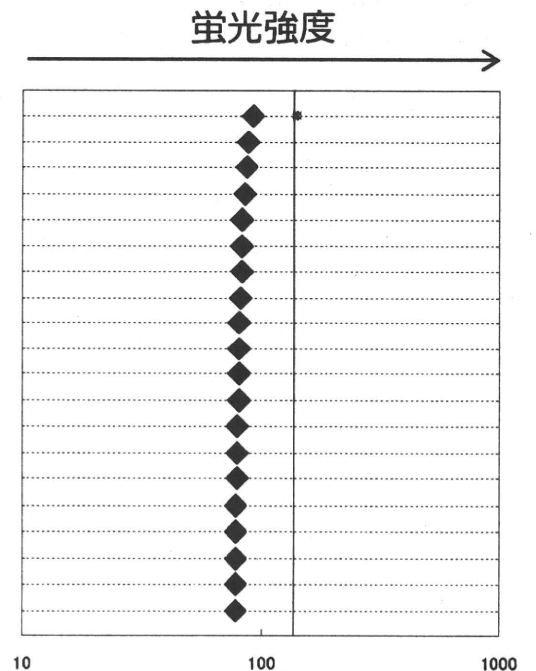
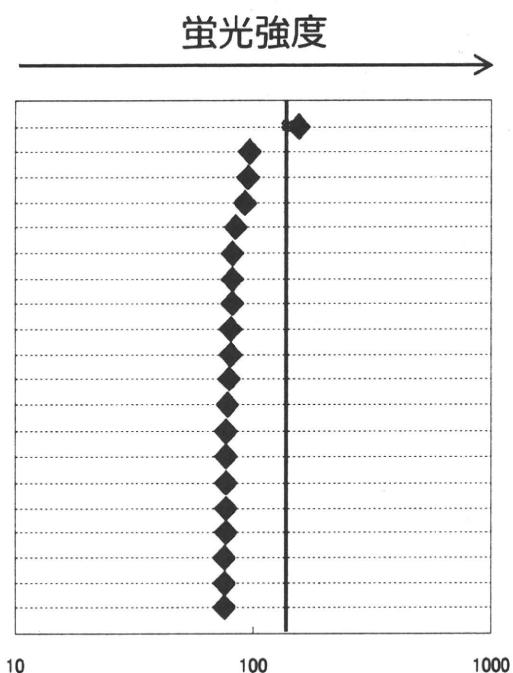


Fig. 3 続き

牛 廃棄脾臓

脾炎

候補順位	Acession No.	検出病原体候補
1	AL939114	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) complete genome; segm
2	CP000661	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17025, complete genom
3	NC_006560	Cercopithecine herpesvirus 2, complete genome
4	AY395706	Human papillomavirus type 62 isolate Qv18091, compl
5	AE017220	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Choleraes
6	D00435	Swine vesicular disease virus (STRAIN H/3 '76) genomic
7	X74483	Human papillomavirus type 56 genomic DNA
8	CP000577	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17029 chromosome 1,
9	DQ080081	Human papillomavirus type 101, complete genome
10	CP000479	<i>Mycobacterium avium</i> 104, complete genome
11	AF104263	Hepatitis D virus strain TW2667, complete genome
12	AY262282	Human papillomavirus type 18 complete sequence
13	AB037949	Hepatitis D virus genomic RNA, complete genome, isol
14	AJ400628	Human papillomavirus type 87 (candidate) complete ge
15	U31780	Human papillomavirus type 22, complete genome
16	NC_006077	<i>Kluyveromyces lactis</i> mitochondrion, complete genome
17	Y16009	<i>Clostridium perfringens</i> cpe gene
18	X03929	<i>Streptococcus pyrogenes</i> speA gene for exotoxin type A
19	AY633190	Influenza A virus (A/mallard/Alberta/203/92(H6N5)) ne
20	NC_001408	Avian leukosis virus - RSA, complete genome



牛 廃棄心臓

心外膜炎炎症痕

候補順位	Acession No.	検出病原体候補
1	Y16009	<i>Clostridium perfringens</i> cpe gene
2	NC_004317	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7 chromosome 14, complet
3	AF419157	<i>Aeromonas hydrophila</i> isolate SSU enterotoxin (ast) ge
4	AF436130	Human papillomavirus type 74 subtype AE10, complet
5	AP007255	<i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1 DNA, complete
6	DQ186797	Bluetongue virus 9 isolate BUL1999/01 inner core struc
7	AB107799	Ibaraki virus gene for core protein VP3, partial cds, stra
8	X61560	<i>S.pyogenes</i> strain MGAS156 speA gene (allele 1) for ty
9	CU234118	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278, complete sequence
10	NC_001479	Encephalomyocarditis virus, complete genome
11	AE017220	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Choleraes
12	X77858	Human papilloma virus type 59, complete viral genom
13	DQ366347	Norovirus Hu/OsakaNI/2004/JP ORF1 and ORF2 mRNA,
14	AY684891	Influenza A virus (A/black-headed gull/Sweden/5/99(H
15	CP000086	<i>Burkholderia thailandensis</i> E264 chromosome I, compl
16	AB099607	Influenza C virus (C/Yamagata/6/2000) NS gene for nor
17	BX640415	<i>Bordetella pertussis</i> strain Tohama I, complete genom
18	AY262282	Human papillomavirus type 18 complete sequence
19	L43548	<i>Clostridium perfringens</i> alpha-toxin (phospholipase C)

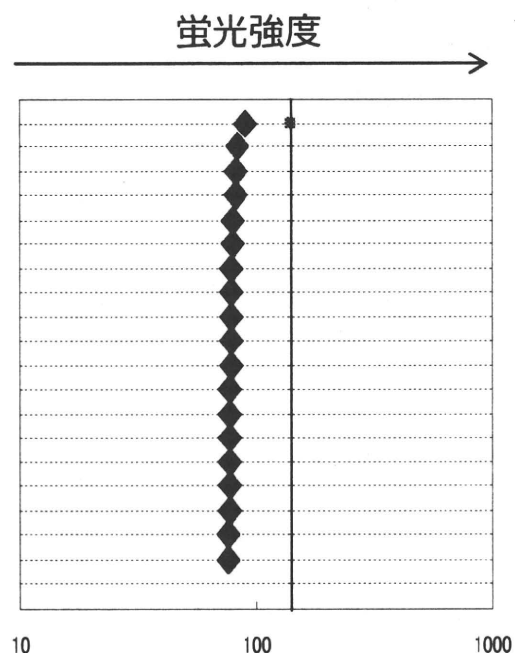
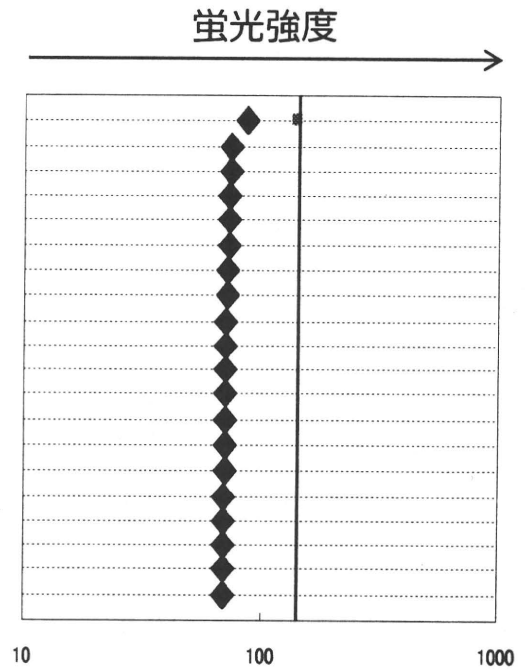


Fig. 3 続き

牛 廃棄肺

胸膜炎

候補順位	Acession No.	検出病原体候補
1	M98037	Clostridium perfringens enterotoxin gene, complete cd
2	AL939114	Streptomyces coelicolor A3(2) complete genome; segm
3	AJ224480	Clostridium botulinum gene encoding C2 toxin (compor
4	U31788	Human papillomavirus type 44, complete genome
5	CP000259	Streptococcus pyogenes MGAS9429, complete genome
6	CP000431	Rhodococcus sp. RHA1, complete genome
7	D45904	Clostridium perfringens DNA for lambda toxin (metallog
8	AY395706	Human papillomavirus type 62 isolate Qv18091, comple
9	AM039952	Xanthomonas campestris pv. vesicatoria complete genc
10	CY005359	Influenza A virus (A/laughing gull/DE/94/2000(H12N4))
11	AB080575	Hepatitis E virus genomic RNA, complete genome, isola
12	AP007255	Magnetospirillum magneticum AMB-1 DNA, complete g
13	AB027021	Human papillomavirus type 82 DNA, complete genome
14	AY302559	Human echovirus 7 strain Wallace complete genome
15	AE017220	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesu
16	CP000261	Streptococcus pyogenes MGAS2096, complete genome
17	CP000552	Prochlorococcus marinus str. MIT 9515, complete geno
18	CP000576	Prochlorococcus marinus str. MIT 9301, complete geno
19	CP000479	Mycobacterium avium 104, complete genome
20	J02615	S.aureus toxic shock syndrome toxin-1 gene, complete



正常

候補順位	Acession No.	検出病原体候補
1	CP000661	Rhodobacter sphaeroides ATCC 17025, complete genor
2	AL939114	Streptomyces coelicolor A3(2) complete genome; segm
3	AF436128	Human papillomavirus - cand89, complete genome
4	AE017221	Thermus thermophilus HB27, complete genome
5	AY684891	Influenza A virus (A/black-headed gull/Sweden/5/99(H
6	NC_007323	Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor' plasmid pXO2, cc
7	CP000555	Methylibium petroleiphilum PM1, complete genome
8	CP000038	Shigella sonnei Ss046, complete genome
9	BX248347	Mycobacterium bovis subsp. bovis AF2122/97 complet
10	AE014073	Shigella flexneri 2a str. 2457T, complete genome
11	BX640415	Bordetella pertussis strain Tohama I, complete genome
12	L16014	Salmonella typhimurium enterotoxin (stn) gene, compl
13	DQ080081	Human papillomavirus type 101, complete genome
14	M35514	S.pyogenes streptococcal pyrogenic exotoxin type C (sp
15	AJ620209	Human papillomavirus type 81 complete genome
16	CP000378	Burkholderia cenocepacia AU 1054 chromosome 1, con
17	L25372	Staphylococcus aureus exfoliative toxin A (eta), comple
18	M29171	Lmonocytogenes SH-activated hemolysin pseudogene,
19	NC_001576	Human papillomavirus type 10, complete genome
20	DQ211612	Crimean-Congo hemorrhagic fever virus strain AP92 se

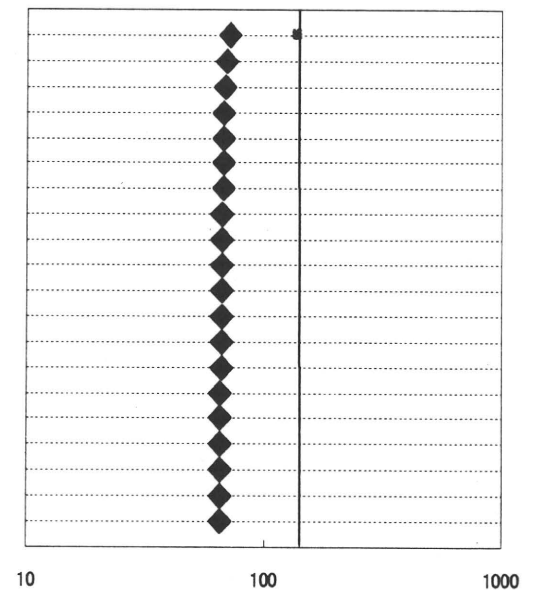


Fig. 3 続き

簡便な A 群ロタウイルス全遺伝子解析法の確立とその応用

研究分担者 杉山 誠 岐阜大学応用生物科学部 教授
研究協力者 石上暁代 岐阜大学農学部・応用生物科学部 6年生
安部昌子 岐阜大学大学院連合獣医学研究科 3年生
伊藤直人 岐阜大学応用生物科学部 准教授

研究要旨：人を含め動物に広く胃腸炎を起こす A 群ロタウイルスの多様性を把握するため、最近、11本のゲノム分節遺伝子各 Open Reading Frame 全長を解析対象とした遺伝子型決定法（RCWG法）が確立されている。本研究では RCWG法をもとに、各遺伝子分節の部分的遺伝子配列解析による簡便な全遺伝子解析法の開発を行った。さらに本法を応用して、同時期、同地区で肉用牛から分離された未知のロタウイルス2株の全遺伝子を解析した。その結果、VP7 遺伝子分節を除く 10 分節は同じ遺伝子型であることが明らかとなった。このことから、両株は起源が同じであり、どちらかの株で VP7 遺伝子分節にリアソートメントが起きたと推測された。さらに、1株については NSP5/6 遺伝子にレアレンジメントが起きていることも確認された。

A. 研究目的

A 群ロタウイルスは、人を含め哺乳類および鳥類に感染し急性胃腸炎を起こす。これまで、ロタウイルスのゲノムを構成する 11本の dsRNA 分節のうち VP7 および VP4 遺伝子（それぞれ G および P 遺伝子型を規定）とこれらのゲノム RNA 電気泳動（EP）パターンが分子生物学的解析に主に用いられてきた。一方、ロタウイルスは点変異の蓄積、リアレンジメント（遺伝子分節における配列の部分的な重複）、リアソートメント（分節の交換）といった複雑な機序で遺伝的多様性を獲得する。最近、ロタウイルスの多様性を把握するため、11本の遺伝子各 Open Reading Frame(ORF)全長を解析対象とした国際的基準・遺伝子型決定法（RCWG法）が確立されている。しかし、ゲノム全長約

18kbp のウイルス遺伝子を解析するには多くの手間と時間を要する。そこで、本研究では RCWG法をもとに、簡便な全遺伝子解析法の開発を試みた。さらに本法を応用して、未知のウシ由来ロタウイルス2株の全遺伝子を解析し、両株の遺伝的多様性について考察した。

B. 研究方法

各 ORF の全長ではなく、部分的領域を用いた解析法（簡便法）を確立するために、Genbank にあるロタウイルスの遺伝情報をもとに、各種ロタウイルスの 9 分節（VP1～4、6、7 および NSP1～3 遺伝子）の ORF から、RCWG法とその解析結果が一致し、かつ一度の PCR 法で増幅可能な領域を選定した。残りの 2 遺伝子分節（NSP4 および NSP5/6）については、それ

ぞれの全長が短いことから、RCWG 法に従い全 ORF を解析対象とした。これらの領域を用いた簡便法と RCWG 法による相同性および系統学的解析結果を比較し、簡便法による解析の精度を検証した。選定した解析領域が増幅できるようにプライマーを設計し、ウシ由来ロタウイルス 3 株 NCDV 株、GB12-22 株および KY2565 株を用いて動作確認を行った。そのうちの 2 株、2007 年岐阜県郡上市においてウシより分離され遺伝子性状が未知の GB12-22 株および KY2565 株について EP パターンを調べ、簡便法により全遺伝子分節を解析し、遺伝子型を推定した。

C. 研究結果

全11ゲノム分節について部分的ORFに基づく解析においても遺伝子型の判別を可能とするために、全遺伝子型を網羅するORF全長塩基配列データから、比較的遺伝的多様性の高い領域を検索し、解析領域を選別した(図1)。RCWG法により各分節遺伝子で設定された遺伝子型の基準をもとに、RCWG法で用いるORF全長および図1で示した部分的ORF領域について比較解析した。両遺伝子配列を用いて相同性および系統樹解析を行ったところ、遺伝子型別においてRCWG法と今回の部分的解析での結果がほぼ一致した。

図1で設定した部分的領域を解析するため、各分節遺伝子に対応するプライマーを設計した(表1)。ウシ由来ロタウイルス3株のVP1-4、VP6、VP7、NSP1-4を増幅したところ、それぞれ予想されるバンドの位置にシグナルが確認された(図2a-i、VP4遺伝子についてはデー

タを示していない)。また、3株のNSP5/6遺伝子に関しては、分節全長(666bp)を増幅したところ、KY2565株およびNCDV株については約600bpの位置に、GB12-22株ではそれらの株より大きい約900bpの位置にシグナルが確認された(図2j)。

動作確認を行った3株のうち、GB12-22株およびKY2565株についてEPパターンを調べた。その結果、G株がスーパーショート、K株がロングパターンと異なるEPパターンであった(図3)。

両株を簡便法により解析したところVP7分節を除く10分節は同じ遺伝子型であり(図4)、系統学的解析においても近い遺伝学的関係を示した(図5、例VP1)。一方、両株のVP7遺伝子は、GB12-22株はG8、KY2565株はG10遺伝子型と異なるタイプであった。また、VP7遺伝子の系統学的解析においても、両株は違う系統枝に属していた(図6)。

PCR法で増幅した遺伝子のバンドサイズが異なった両株のNSP5/6遺伝子について、両株の全長ORF遺伝子配列を比較した。その結果、サイズが大きかったGB12-22株では、後半部位の配列に重複が認められた(図7)。

D. 考察

これまで蓄積されているA群ロタウイルス遺伝子の情報を基に検討を行ったところ、国際基準のRCWG法に従って各分節ゲノム遺伝子の全ORF塩基配列を決定することなく、部分領域の解析で同様に遺伝子型別を推測できることが明らかとなった。そこで、ロタウイルスのゲノム遺伝子情報から各分節について全ての遺伝子型をPCR法で増幅しうるプライマーを設計し、ウシ由来ロタウイルス3株において

動作について検討を行った。いずれの株でも各分節遺伝子を増幅を確認し、これらのプライマーはロタウイルスの遺伝子解析に応用可能であると考えられた。

同時期、同地区で分離され、EP パターンが異なる GB12-22 株および KY2565 株を用いて、今回の研究で開発されたロタウイルス全遺伝子解析簡易法の応用性に関する検討を行った。全ての 11 分節遺伝子について解析した結果、10 分節の遺伝子型が同じであったことから、両株は同じ起源であると考えられた。一方、両株の VP7 遺伝子は異なるタイプであったことから、両株のいずれかのウイルスが進化の過程で VP7 遺伝子のリアソートメントを起こしたと推測することができた。GB12-22 株の NSP5/6 遺伝子には、重複配列が確認され、リアレンジメントが起きたことが明らかとなった。この両株の NSP5/6 遺伝子の長さの違いが両株の EP パターンの違いの理由であると考えられた。

本研究で開発した簡便法によりロタウイルスの遺伝的多様性を明らかにすることができた。また、起源が同じと考えられる両株にもかかわらず EP パターンと G 遺伝子型が異なることから、従来の解析法では、両株の遺伝性状は異なると判断される可能性が高い。したがって、ロタウイルスの正確な遺伝性状の把握には、全遺伝子を対象とした解析が重要であることが再確認された。

E. 結論

人に胃腸炎を起こす A 群ロタウイルスのウシにおける感染実態を詳細に検討するために、全ゲノム遺伝子の型別を可能にする簡便法を開発した。遺伝情報が未知であった 2 株のウシ由来ロタウイルスについて、同法で解析を行ったところ、両株は起源が同じと考えられるもの

の、いずれかの株でリアソートメントが起きており、リアレンジメントも確認された。従来法では、両株は異なる遺伝性状と判断される可能性が高く、本研究により全ゲノム遺伝子解析の重要性が再確認された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Susetya, H., Sugiyama, M., Inagaki, A., Ito, N., Mudiarto, G. & Minamoto, N.: Molecular epidemiology of rabies virus in Indonesia. *Virus. Res.* 135,144-149, 2008.

2) Mita, T., Shimizu, K., Ito, N., Yamada, K., Ito, Y., Sugiyama, M. & Minamoto, N.: Amino acid at position 95 of the matrix protein is a cytopathic determinant of rabies virus. *Virus. Res.* 137, 33-39, 2008.

2. 学会発表

1) 石上暁代、安部昌子、伊藤直人、高須正規、村瀬哲磨、岡田伸隆、杉山 誠：A 群ロタウイルスの遺伝的多様性とその獲得メカニズム。第 146 回日本獣医学会学術集会（2008 年 9 月、宮崎）

2) 安部昌子、伊藤直人、高須正規、村瀬哲磨、杉山 誠：岐阜県内の牛における A 群ロタウイルスの動態調査・新型ロタウイルスの検出。第 146 回日本獣医学会学術集会（2008 年 9 月、宮崎）

3) 安部昌子、伊藤直人、高須正規、杉山 誠：牛の正常便からの A 群ロタウイルスの検出とその分布。第 56 回日本ウイルス学会学術集会（2008 年 10 月、岡山）

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 本研究に用いたプライマー

分節	プライマー名	方向 ^{*1}	配列(5'→3')	位置 ^{*2} (nt)
VP1	VP1_333F	F	tgagttagattatgaaaataa	333-353
	VP1_950_R	R	aaccagtcctgtatcat	950-934
VP2	GEN_VP2Fc	F	ggctattaaaggYtcaatggcgtacag ^{*3}	1-27
	VP2_588R	R	ttattttcaactgccatc	588-569
VP3	VP3_1850F	F	ataggtaactaatgtagagaa	1850-1869
	GEN_VP3Rc	R	ggtcacatcatgactagtgtg	2591-2571
VP4	VP4-HeadF	F	ggctataaaatggcttcgctcattta	1-26
	VP4-887R	R	tcWgaccatttataWccYaRcccWcc ^{*3}	887-862
NSP1	NSP1_1105F	F	caaatggaaatgttgacattg	1105-1126
	bov_5r1	R	ggatccggtcacattttatgc	1585-1565
VP6	VP6_696F	F	cttctaccagatgcagaaa	696-714
	GEN_VP6R	R	ggtcacatcctctcact	1356-1340
NSP3	NSP3_408F	F	gagttccaggtaaatacatc	408-429
	NSP3_endR	R	ggtcacataacgccccta	1074-1057
NSP2	NSP2_270F	F	caatgtttaataaagtggc	270-288
	GEN_NSP2R	R	ggtcacataacgctttc	1059-1042
VP7	VP7_headF	F	ggctttaaagagagaatttcc	1-22
	VP7_611R	R	cccattgatatccatttatttg	611-590
NSP4	GEN_NSP4F	F	ggcttttaaagttctgttcc	1-21
	GEN_NSP4R	R	ggWYacRYtaagaccRttcc ^{*3}	751-732
NSP5	GEN_NSP5F	F	ggcttttaaagcgtacag	1-18
	GEN_NSP5R	R	ggtcacaaaacgggagt	666-650

※1 F : フォワードプライマー R : リバースプライマー

※2 WC3 株に基づく塩基配列番号

※3 Y : c/t、W : a/t、R : a/g

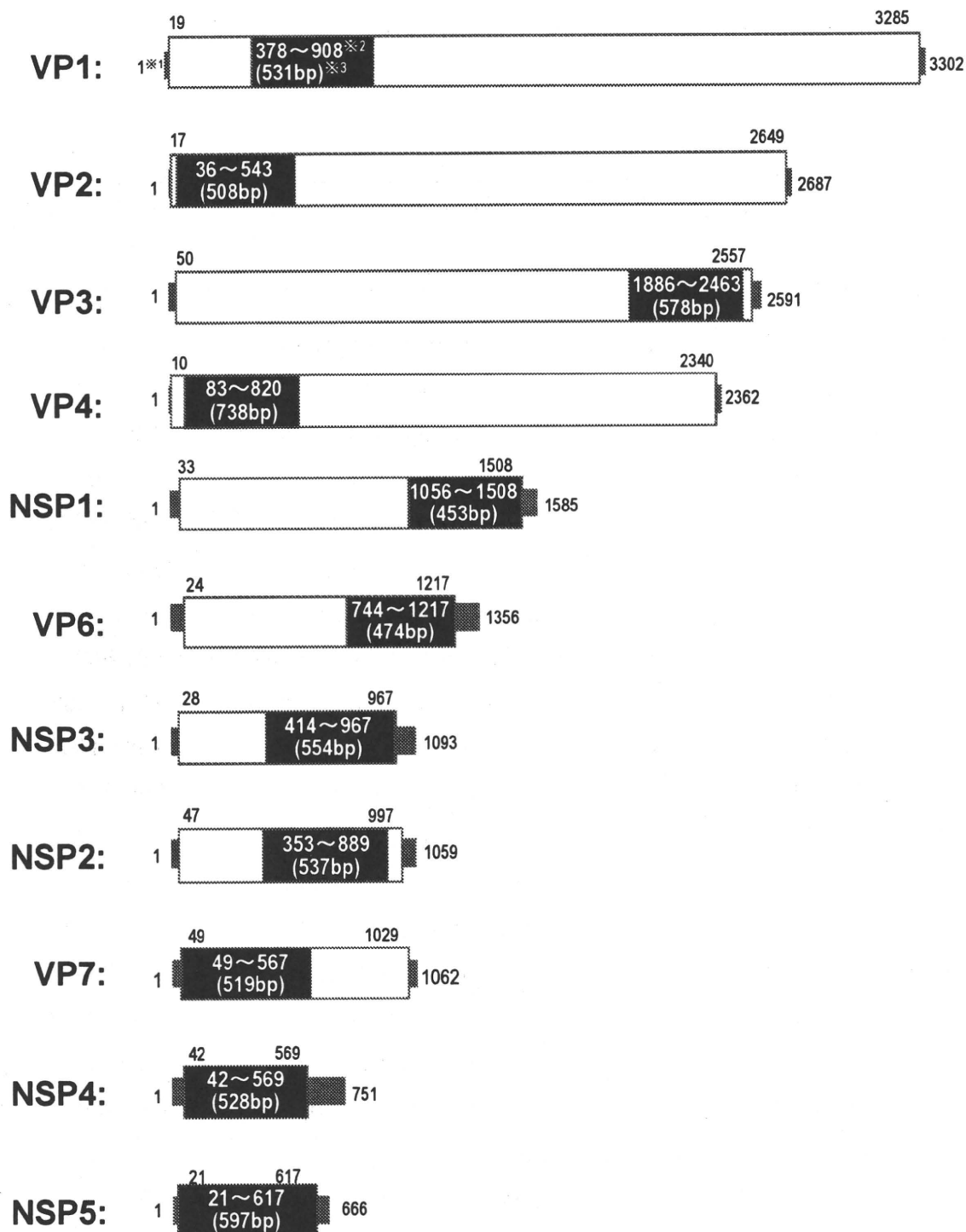


図1 本研究における各遺伝子分節の解析部位

: 解析部位、
 : ORF
 : 非コード領域

※1: WC3株に基づいた塩基配列番号

※2: 解析部位の塩基配列番号

※3: 解析部位の大きさ

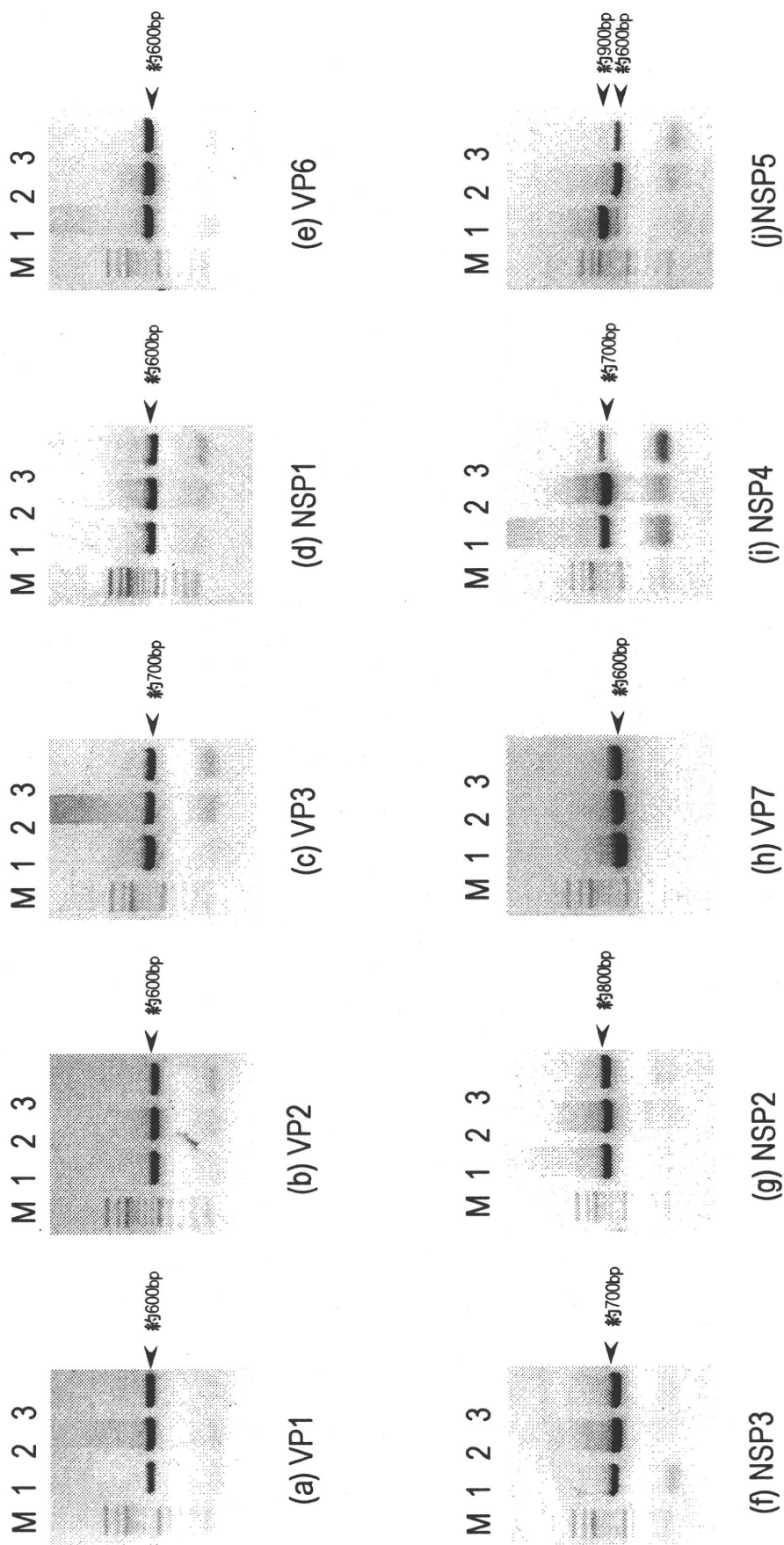


図2 設計プライマーおよび引物プライマーを用いたロタウイルスRT-PCR産物の電気泳動像

M: 100bpマーカー 1: GB12-22株 2: KY2565株 3: NCDV株

GB12-22株 KY2565株

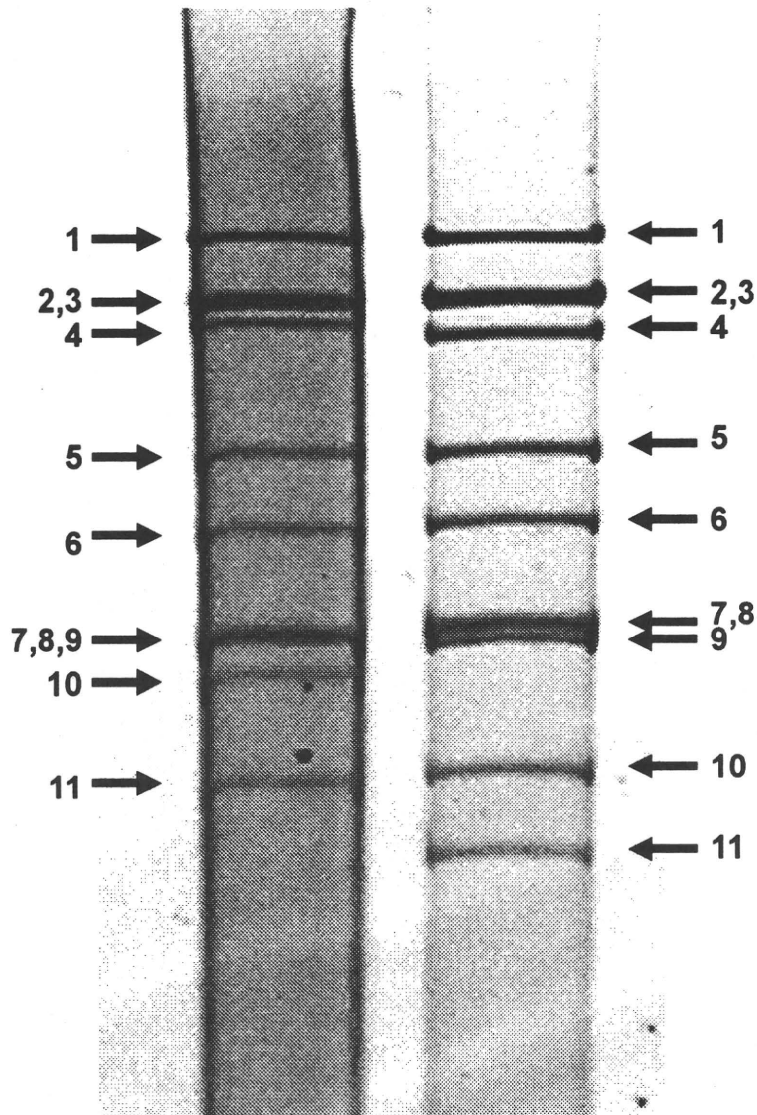


図3 ウシロタウイルス2株のPAGEにおけるRNA泳動パターン

両株の抽出RNAの10%ポリアクリルアミド電気泳動像

→ RNA分節のバンド

GB12-22株

KY2565株

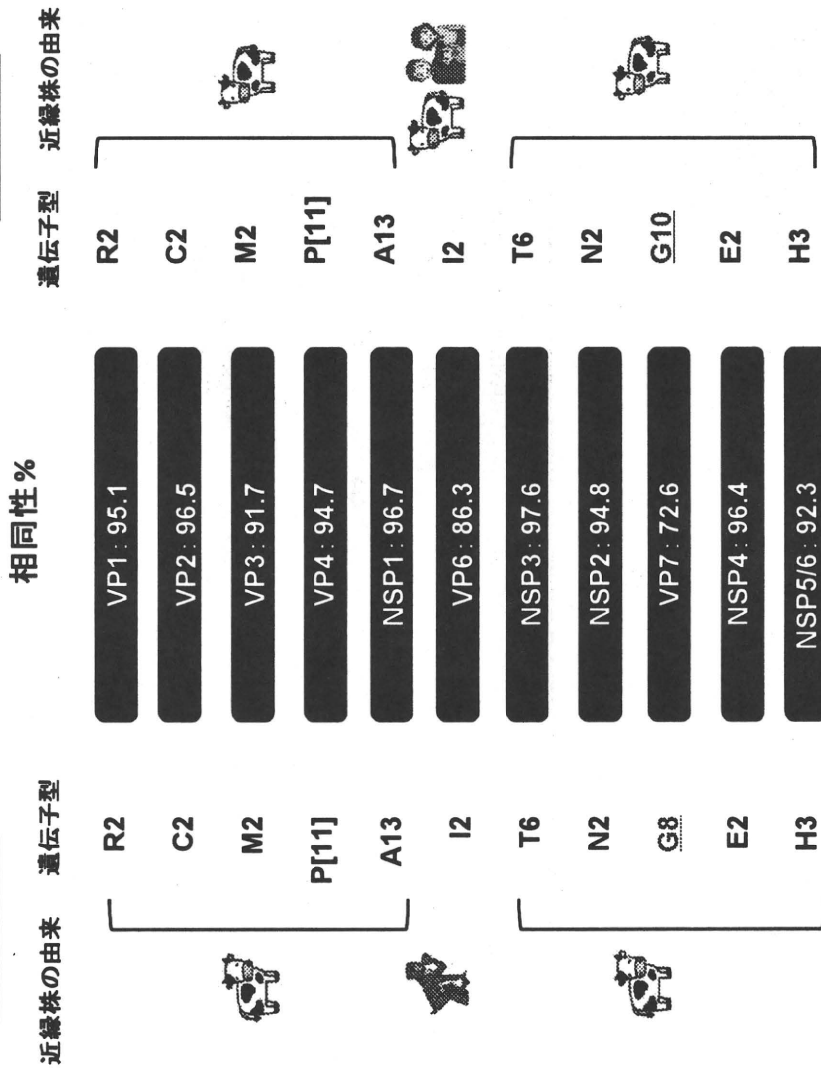


図4 GB12-22株とKY2565株の各遺伝子の相同性および系統樹解析結果

VP7遺伝子は72.6%と低い相同性を示し、異なるG遺伝子型だった。

系統解析における各分節の近縁株の由来を示した。それぞれ  :ウシ  :サル  :ヒトを表す。

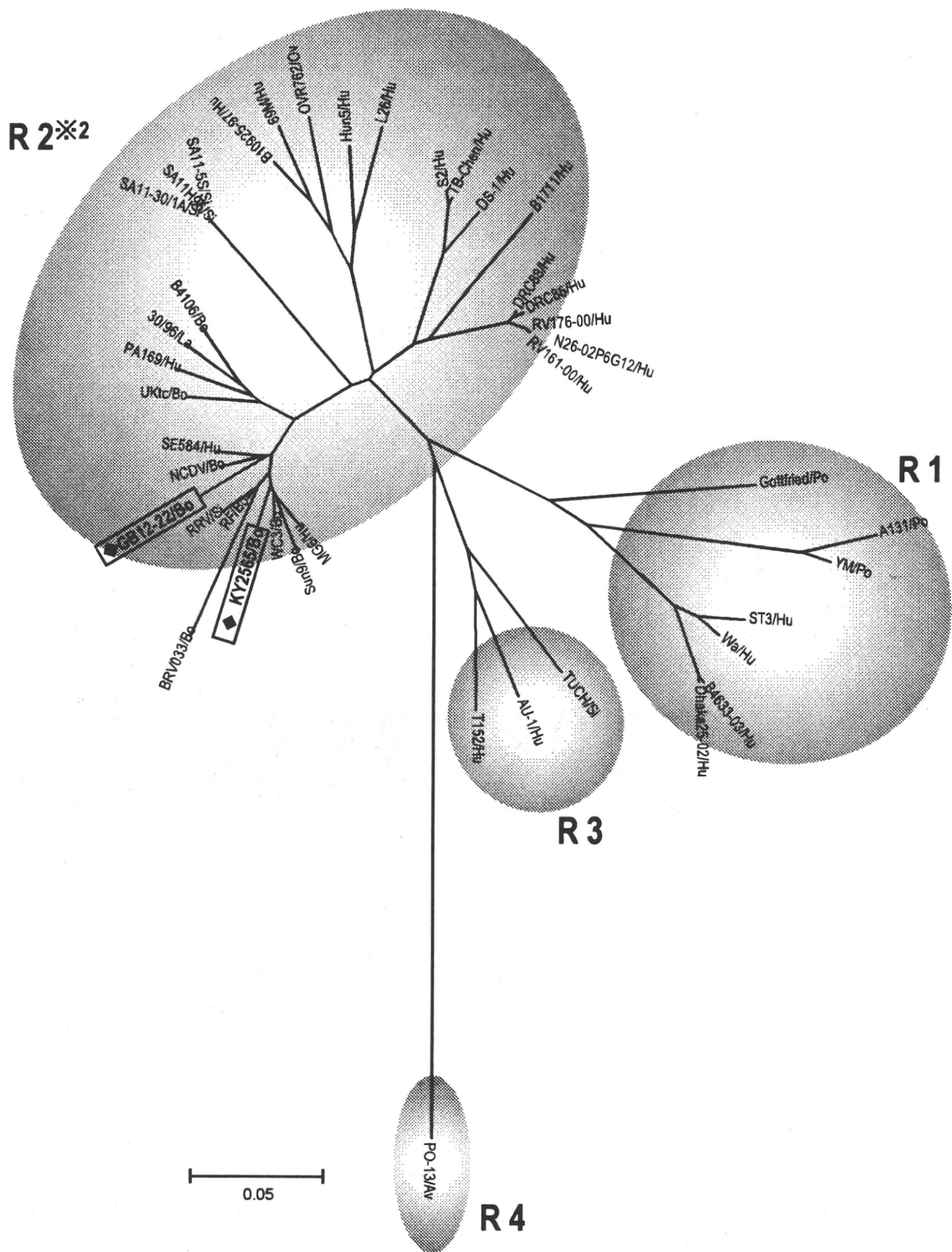


図5 GB12-22株とKY2565株および各種ロタウイルスの
VP1遺伝子に基づく系統樹

※1 株名/由来 (Hu: ヒト, Bo: ウシ, Si: サル, Po: ブタ, Ov: ヒツジ,
La: ウサギ, Av: 家禽)

※2 遺伝子型

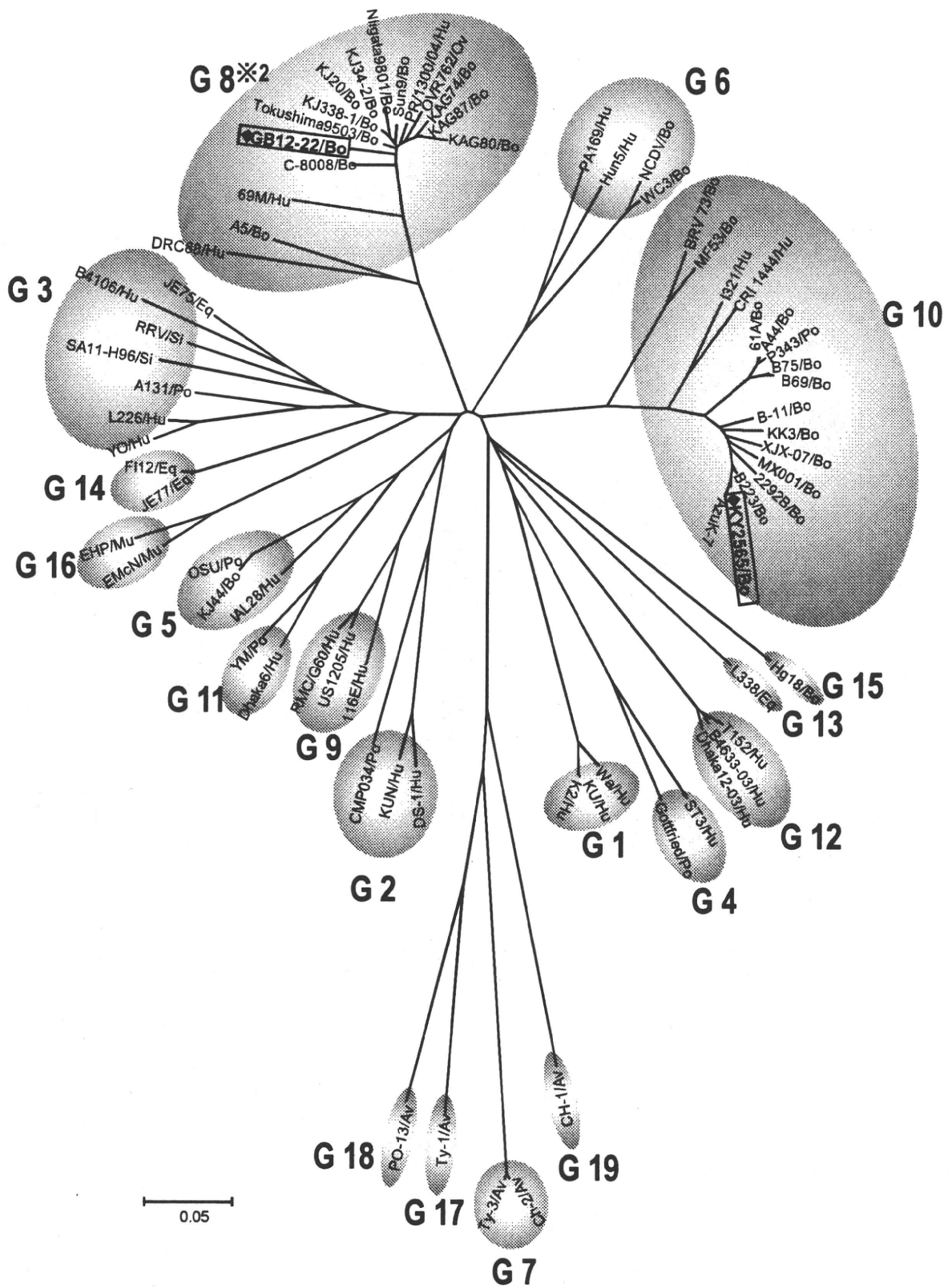


図6 GB12-22株とKY2565株および各種ロタウイルスの
VP7遺伝子に基づく系統樹

※1 株名/由来(Hu:ヒト、Bo:ウシ、Si:サル、Po:ブタ、Eq:ウマ、Ov:ヒツジ、
Mu:ネズミ、Av:家禽)

※2 遺伝子型

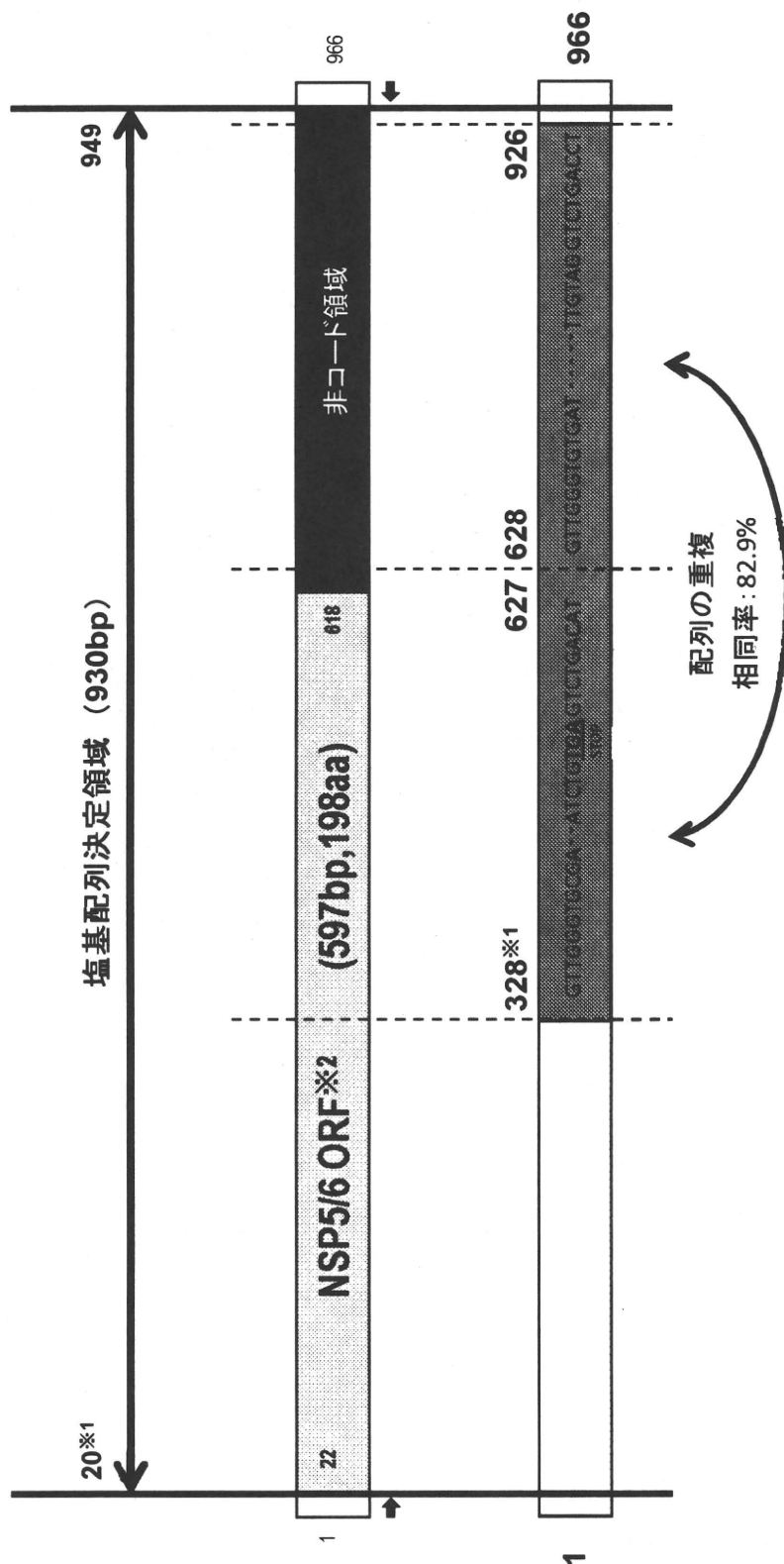


図7 GB12-22株 GB12-22 リアレンジメントNSP5/6遺伝子

■ : 重複領域 □ : NSP5/6 ORF

→ : プライマー(GEN_NSP5F、表1) ← : プライマー(GEN_NSP5R)

※1 ウシロタウイルスVMRI株に基づく塩基配列番号

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320頭の血清からRNAを抽出し、E型肝炎ウイルス（HEV）ORF2領域を標的としたRT-PCRによりHEV遺伝子の検出を試みた。その結果、1検体（0.3%）でHEV遺伝子断片の増幅が認められた。その塩基配列から本ウイルスは北海道で分離されたブタのHEVに近縁であり、Genotype 3に属するものと考えられた。エゾシカがHEVに感染していることが確認されたことから、HEV感染を防ぐためエゾシカ肉の調理には十分な加熱をする必要がある。

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となり、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の感染状況の解明は急務である。

そこで、我々は日高地区で捕獲されたエゾシカについて血清疫学調査を実施し、当該地域のエゾシカの10～30%が抗HEVIgG抗体を保有していることを示した。ヒトではIgM抗体あるいはウイルスRNAの検出をもってHEV感染が診断されることから、本年度は抗体調査に供したエゾシカ血清からのHEV遺伝子の検出を行い、エゾシカのHEV感染を証明することを試みた。

B. 研究方法

1. 血清およびHEV : 2007年4~2007年12月、北海道日高地方で捕獲されたエゾシカ320頭の血清を試験に供した。年齢は、0歳:23頭、1歳:25頭、2歳:87頭、3歳:61頭、4歳以上:123頭、不明:1頭であった。年齢はエゾシカを捕獲した猟師が判断した推定年齢に従った。4歳以上では年齢の推定が困難なため、一群としてまとめた。陽性対照として、北海道のブタから分離された Genotype 3 HEVswJB-M8株に実験感染したブタの糞便から精製したHEV粒子を用いた。これは酪農学園大学萩原克郎博士から分与を受けた。

2. RNA抽出 : FUJIFILMのQuickGene RNA tissue kit S IIおよびQuickGene-Mini 80を用いた。

3. nested PCR : HEV ORF2領域に相補的なプライマーRV1 (5'-CCYTTATCYTGGTGNGCRTTCTC-3')およびSuperScript IIを用いてcDNAを得た。これを鋳型にプライマー対FW1 (5'-AATTAYGCYAGTAYCGBGKKG-3')/RV1およびTaq DNA polymeraseを用いてPCRを行った。nested PCRでは、プライマー対Fw2 (5'-GTHATGCTYTYGATYCATGGVT-3')/Rv2 (5'-YGCCGACGAAATCAATTCTGTGTC-3')を用いた。反応条件は、何れも95°Cで7分間加熱後、94°C 1分、56°C 1分、72°C 2分を35サイクル行った後、72°Cに7分間放置とした。

4. サザンハイブリダイゼーション : Terminal deoxynucleotidyl transferaseを用い、陽性対照から増幅されたDNA断片をDIGで標識した。nested PCRの産物をアガロースゲル電気泳動で分画し、アルカリ変性後、キャピラリートランスファーによってHybond N膜に転写した。DIG標識プローブと反応させ、洗浄後、AP標識

抗DIG抗体を用いてプローブを検出した。

5. 塩基配列の決定 : RT-PCR産物をリン酸化し、pBluescript II KS (+)のEcoRV切断部位にクローニングした。複数のクローンについてT7およびT3プロモータープライマーを用いて挿入断片の塩基配列を決定し、2本鎖両鎖の配列が完全に一致することを確認した。

C. 研究結果

1. エゾシカ血清からのHEV遺伝子の検出 : 調査期間中捕獲したエゾシカ320頭中1頭(0.3%)の血清から陽性対照と同位置に泳動されるDNA断片が検出された。サザンハイブリダイゼーションで陽性シグナルを示したことからHEV遺伝子と考えられた(図1)。

2. エゾシカ由来HEV遺伝子の塩基配列 : 図2に示すように、北海道のブタから分離されたHEVswJB-M8株とは320塩基中2塩基の置換が認められた(図2)。塩基ホモロジーは99.4%であり、アミノ酸の置換は予想されなかった。系統進化解析の結果、エゾシカ由来HEVはGenotype 3に属するものと考えられた。

D. 考察

北海道日高地方で捕獲されたエゾシカの血清中にHEV遺伝子を見出した。陽性対照として用いた北海道のブタ由来HEVとは、調べた320塩基中2塩基の置換しか認められなかった。検体との混交を否定するため、検体および陽性対照について複数クローンの解析を行い、全く同一の塩基置換を確認した。本研究で標的としたORF2領域はHEV株間でよ

く保存されており、5年を隔ててヒトおよびブタから分離された株間の塩基配列が完全に一致した例も報告されている。本調査域内には放牧養豚場が点在している。国内の養豚場のほとんどでHEV感染豚が認められることならびにウイルス感染豚は3-4週に渡り大量のウイルスを排泄することから、エゾシカは放牧養豚場のブタから感染した可能性が極めて高い。

エゾシカ血清のウイルス遺伝子陽性率は0.3%であった。これまでの抗体調査の結果、日高地方のエゾシカの10~30%が抗HEV IgG抗体を保有することが分かっている。また、抗体陽性率は加齢とともに上昇する傾向にある。一方、国内のブタの抗HEV IgG抗体保有率および血中のウイルス遺伝子陽性率は、各々平均で58%および10%とされている。ブタは1歳未満の肥育豚の比率が大きいためウイルス陽性率は高くなるが、エゾシカでは3歳以上の個体が約60%を占めていたため遺伝子陽性率は低くなるものと考えられる。

E. 結論

日高地方のエゾシカがHEV遺伝子を保有していることがわかった。HEVの感染源となる危険性があることから、エゾシカ肉の生食は厳に慎むべきである。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tomiya, D., Inoue, E., Osawa, Y., and Okazaki, K: Serological evidence of infection with hepatitis E virus among wild Yezo-deer, *Cervus nippon yesoensis*, in Hokkaido, Japan. *J. Viral Hepat.* (in press)

2. 学会発表

- 1) 川口紘史、井上恵美、大澤宜明、岡崎克則 エゾシカ血清からのE型肝炎ウイルスRNAの検出 第56回日本ウイルス学会 岡山市 2008年10月
- 2) 井上恵美、浅野逸郎、川口紘史、松村佳子、室内友恵、大澤宜明、岡崎克則 A型インフルエンザウイルス共通プライマーを用いたHAおよびNA亜型遺伝子型別法の開発 第56回日本ウイルス学会 岡山市 2008年10月

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

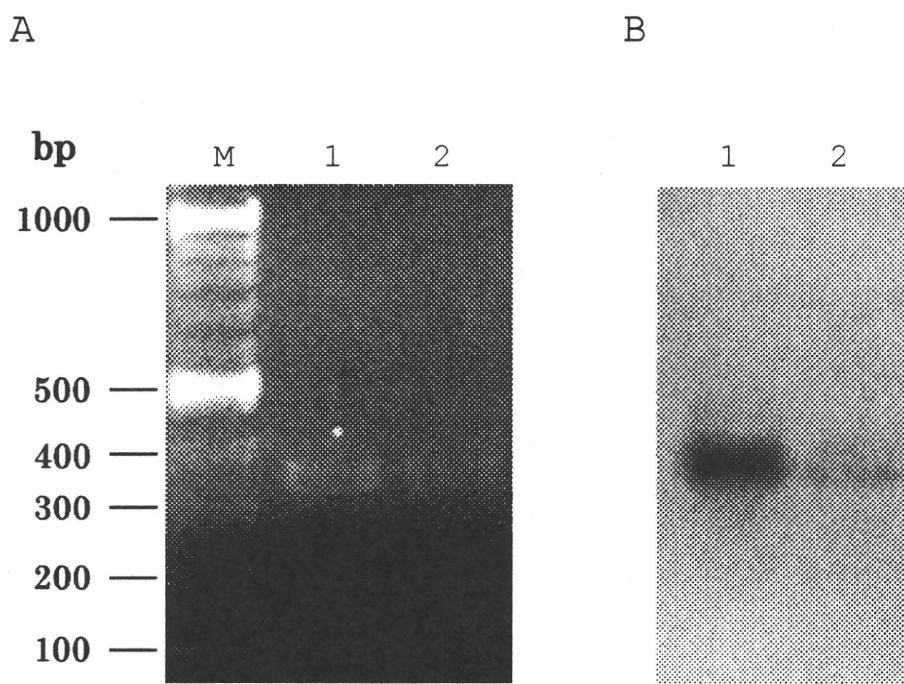


図1. nested PCRによるHEV遺伝子の増幅 (A) とサザンハイブリダイゼーションによる相同性の検出 (B). レーン1, ブタ由来HEV swJB-M8株; 2, エゾシカ血清#50831. MはDNAサイズマーカーを示す。

#50831	1	CCCCTGTTAACTCCTACACTAATACACCTTATACTGGTGCATTGGGGCTCCTTGATTTTG	60
swJB-M8		-----	
HE-JI3C		-----T-----C-----C-----	
#50831	61	CATTGGAACCTGAATTTAGAACTTGACACCCGGGAATACCAACACCCGTGCTCCCCGGT	120
swJB-M8		-----	
HE-JI3C		-----	
#50831	121	ATACTAGCACAGCTCGCCACCGGTGCGTCGCGGTGCTGATGGGACAGCAGAGCTTACCG	180
swJB-M8		-----A	
HE-JI3C		-----C-----T---C---A	
#50831	181	CCACAGCAGCCACACGTTTCATGAAAGATCTGCATTTTACTGGCACGGACGGTGTTGGTG	240
swJB-M8		-----A-----	
HE-JI3C		-----A-----	
#50831	241	AGGTGGGTCGTGGTATTGCCCTGACACTGTTTAATCTTGCTGACACGCTTCTTGCCGGTT	300
swJB-M8		-----	
HE-JI3C		-----	
#50831	301	TACC	304
swJB-M8		----	
HE-JI3C		----	

図2. HEV ORF2 領域塩基配列の比較. エゾシカ血清由来#50831 と陽性対照として用いたブタ由来 swJB-M8 株および日本のヒト由来 HE-JI3C 株の塩基配列を比較した。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshii M, Okinaga T, Miyazaki A, Kato K, Ikeda H, Tsunemitsu H	Genetic polymorphism of the nsp2 gene in North American type porcine reproductive and respiratory syndrome virus.	Arch Virol	153 (7)	1323-1334.	2008
Tomiyama D, Inoue E, Osawa Y, and Okazaki, K	Serological evidence of infection with hepatitis E virus among wild Yezo-deer, <i>Cervus nippon yezoensis</i> , in Hokkaido, Japan.	J Viral Hepat			in press
Ito T	Outbreaks of highly pathogenic avian influenza in Japan.	Glob Env Res	12 (1)	15-20.	2008
Motoike K, Hirano S, Yamana H, Onda T, Maeda T, Ito T, and Hayakawa M	Antiviral activities of heated dolomite powder.	Biocontrol Sci	13 (4)	131-138	2008