

Serological evidence of infection with hepatitis E virus among wild Yezo-deer, *Cervus nippon yesoensis*, in Hokkaido, Japan

D. Tomiyama, E. Inoue, Y. Osawa and K. Okazaki *Laboratory of Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences University of Hokkaido, Ishikari-Tobetsu, Hokkaido, Japan*

Received April 2008; accepted for publication December 2008

SUMMARY. In this study, 520 serum samples from Yezo-deer in the Hidaka district, Hokkaido, Japan were examined by enzyme-linked immunosorbent assay to investigate whether the animals were infected with hepatitis E virus (HEV). The distribution of optical density values showed a bimodal pattern and 181 samples (34.8%) were deemed to be antibody-positive against HEV. At least five (2.8%) of the positive sera gave specific bands by Western blot

analysis. An age-dependent increase in prevalence of the antibodies was found among the animals. These findings indicate that Yezo-deer are a possible host for HEV infection. To avoid the risk of becoming HEV infected, the consumption of raw Yezo-deer meat must be prohibited.

Keywords: hepatitis E virus, seroprevalence, Yezo-deer.

INTRODUCTION

Hepatitis E virus (HEV) is the causative agent of acute self-limiting hepatitis in humans [17] and the sole member of the genus *Hepevirus* in the provisionally proposed family *Hepeviridae* [4]. The virus is thought to comprise a single serotype [17], although it is divided into at least four genotypes (genotypes 1–4) [19]. The majority of infections in several countries in Asia and Africa [8,25] are caused by genotype 1 and in Mexico and Nigeria by genotype 2 [3,26]. Genotype 3 HEV is widely distributed and found in the USA, Europe and Asia [7,16,18,21,23], while genotype 4 is largely confined to Asia [23,27].

Hepatitis E occurs sporadically following transmission by the fecal–oral route through sewage-contaminated water supplies in developing countries [1]. In addition, zoonotic food-borne transmission by rare meat from pig and boar has been reported in industrialized countries [5,11,28]. In Japan, direct evidence of HEV transmission from rare meat from wild deer (*Cervus nippon centralis*) to humans was provided in 2003. On this occasion, nucleotide sequencing of the virus amplified from the remaining meat matched to that from the

patient and a mini-cluster of infection was attributed to genotype 3 [22]. These facts suggest that wild deer can be one of the sources of HEV infection for humans in Japan.

Wild deer known as 'Yezo-deer' (*C. nippon yesoensis*) have inhabited Hokkaido, where hepatitis E is most prevalent in Japan. People have the opportunity to eat deer meat and liver raw (sashimi), more so in Hokkaido than other parts of Japan. In this study, serological surveillance for HEV infection among Yezo-deer was carried out in order to investigate whether the animals harbour HEV, which can potentially be transmitted to human beings.

MATERIALS AND METHODS

Serum samples

A total of 520 serum samples were collected from Yezo-deer hunted in the Hidaka district of Hokkaido from February 2006 to June 2007 and stored at -20°C until use. Out of the 520 animals, 185 (35.7%) were male and 334 (64.4%) were female. Their age and sex ratio (male/female) were as follows: less than 1 year, 35 animals (21/14); 1 year, 40 (23/17); 2 years, 123 (70/53); 3 years 134 (20/114); over 4 years, 188 (51/137). The age was estimated by the hunters. Animals older than 4 years old were dealt with collectively, as the age-estimation is difficult for this group.

Enzyme-linked immunosorbent assay

Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was carried out as described previously with slight modification

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; HEV, hepatitis E virus; HRP, horseradish peroxidase; PBS, phosphate-buffered saline; SD, standard deviation; VLPs, virus-like particles.

Correspondence: Katsunori Okazaki, Department of Immunology and Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences University of Hokkaido, Ishikari-Tobetsu, 061-0293 Hokkaido, Japan. E-mail: kokazaki@hoku-iryo-u.ac.jp

[12]. Briefly, baculovirus-expressed recombinant virus-like particles (VLPs) derived from genotype 3 [10] (50 ng/well) in 50 mM carbonate buffer (pH 9.5) was distributed to a 96-well formatted microplate (FALCON; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and incubated at 4 °C overnight. After blocking with 100 μ L of 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA, fraction V, Sigma, St Louis, MO, USA) dissolved in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, x50 μ L of serum sample, diluted 1:200 with PBS containing 0.05% Tween-20 (PBS-T) and 0.5% (w/v) BSA, was added to each well. After incubation at 37 °C for 1 h, the plate was washed four times with PBS-T. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated rabbit anti-deer IgG (H+L) (KPL, Guildford, UK) in 0.5% BSA/PBS-T (1:500 dilution) was added to the wells and incubated at room temperature for 1 h. After further washing, 100 μ L/well of substrate (FAST™ OPD; Sigma), was added and incubated for 20 min in the dark. The reaction was stopped by addition of 50 μ L of 2.5 M H₂SO₄ and the optical density was measured at 490 nm (OD₄₉₀Ag⁺). The optical density (OD₄₉₀Ag⁻) was simultaneously measured using an antigen-free coated plate. Specific binding of antibodies to the antigen was expressed by Δ OD₄₉₀ = (OD₄₉₀Ag⁺) - (OD₄₉₀Ag⁻).

Western blot analysis

Fifteen micrograms of VLPs was boiled in 125 μ L of Laemmli sample buffer [9] for 5 min and loaded onto a 1 mm thick x 70 mm width 10% (w/v) polyacrylamide gel. After electrophoresis, VLPs were electroblotted onto a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon®; Millipore, Bedford, MA, USA) [24]. After blocking with 3% BSA overnight at 4 °C, the membrane was washed once with Tris-buffered saline (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 140 mM NaCl) containing 0.05% Tween-20 (TBS-T), separated into strips parallel with the mobility of bands, and incubated with the serum samples diluted 1:100 in Can Get Signal® (Toyobo, Osaka, Japan) at room temperature for 1 h. After washing four times with TBS-T for 15 min each wash, the membranes were incubated with the HRP-conjugated rabbit anti-deer IgG (H+L) diluted with Can Get Signal® buffer at room temperature for 1 h. The enzymatic activity on the membrane was detected using western lightning chemiluminescence reagent plus (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA) as substrate. The luminescence of bands was detected by a LAS-1000 UV mini® instrument (Fujifilm, Tokyo, Japan).

RESULTS

Detection of anti-HEV by ELISA

In order to investigate the HEV infection status of Yezo-deer, 520 serum samples were collected from these animals between February 2006 and June 2007 in the Hidaka district of Hokkaido, Japan and examined by ELISA using VLPs

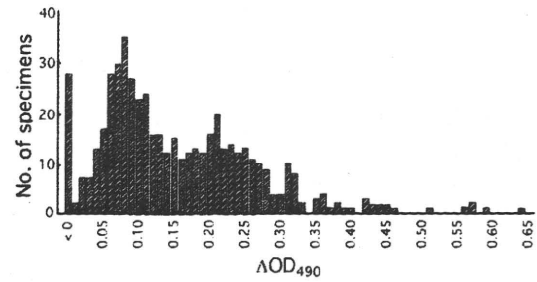


Fig. 1 Distribution of Δ OD₄₉₀ values obtained following testing of serum samples by ELISA.

as antigen. Figure 1 shows the distribution of Δ OD₄₉₀ values obtained by ELISA. The Δ OD₄₉₀ values obtained for the 520 serum samples ranged from -0.141 to 0.639. The frequency of the Δ OD₄₉₀ values showed a bimodal distribution with peaks at 0.079 and 0.207.

Confirmation of anti-HEV antibodies by Western blot analysis

In order to confirm the specificity of the reaction, 60 of the serum samples showing Δ OD₄₉₀ value higher than 0.168 by ELISA, which was the lowest value between the two peaks, were examined by Western blot analysis. As shown in Fig. 2, hyperimmune serum against HEV [12] gave a clear band at the position of 53 kDa. It was found that serum samples #50365, #50678, #50738, #50742 and #50744 gave a

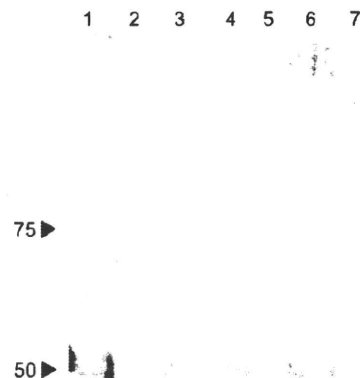


Fig. 2 Detection of anti-HEV antibodies by Western blot analysis. Specificity of the serum samples, of which Δ OD₄₉₀ values were higher than 0.168 in ELISA, was examined by Western blot analysis. Specific bands by anti-VLPs hyperimmune serum (lane 1) and by the serum sample 50365 (lane 2), #50678 (lane 3), #50738 (lane 4) and #50744 (lane 5) are shown. Serum sample #50362, of which the Δ OD₄₉₀ value was 0.049, was used as negative control (lane 6). The positions of the molecular weight markers $\times 10^{-3}$ are shown in the left-hand margin.

pronounced band at the same position. No band was found with sample #50362, the ΔOD_{490} value of which was 0.049. Serum sample #50546 showed no band, although its ΔOD_{490} value was the highest among the samples (data not shown). These findings indicate that at least live serum samples contained antibodies specific for HEV.

Prevalence of anti-HEV antibodies among Yezo-deer in Hidaka district

The ΔOD_{490} values by ELISA of #50365, #50678, #50738, #50742 and #50744 were 0.307, 0.290, 0.585, 0.206 and 0.458, respectively. In order to define the prevalence of anti-HEV antibodies, the cut-off value for the

ELISA was calculated based on the lowest ΔOD_{490} value giving a specific band by Western blot. The mean value for those less than 0.206 was calculated to be 0.051 with a standard deviation (SD) of 0.066. Therefore, the cut-off value, being the mean value plus $2 \times SD$, was set up at 0.183. Using this criterion, 181 of the 520 serum samples (34.8%) were found to be positive for anti-HEV antibodies by ELISA. Out of the 185 serum samples from male animals, 58 (31.4%) and 123 (36.7%) of the 335 samples from female ones were positive for anti-HEV antibodies, showing no significant difference in the positive rates between males and females. The seroprevalence at each shooting point marked on the centre of a grid on the map for wild life preservation and game is shown in Fig. 3.

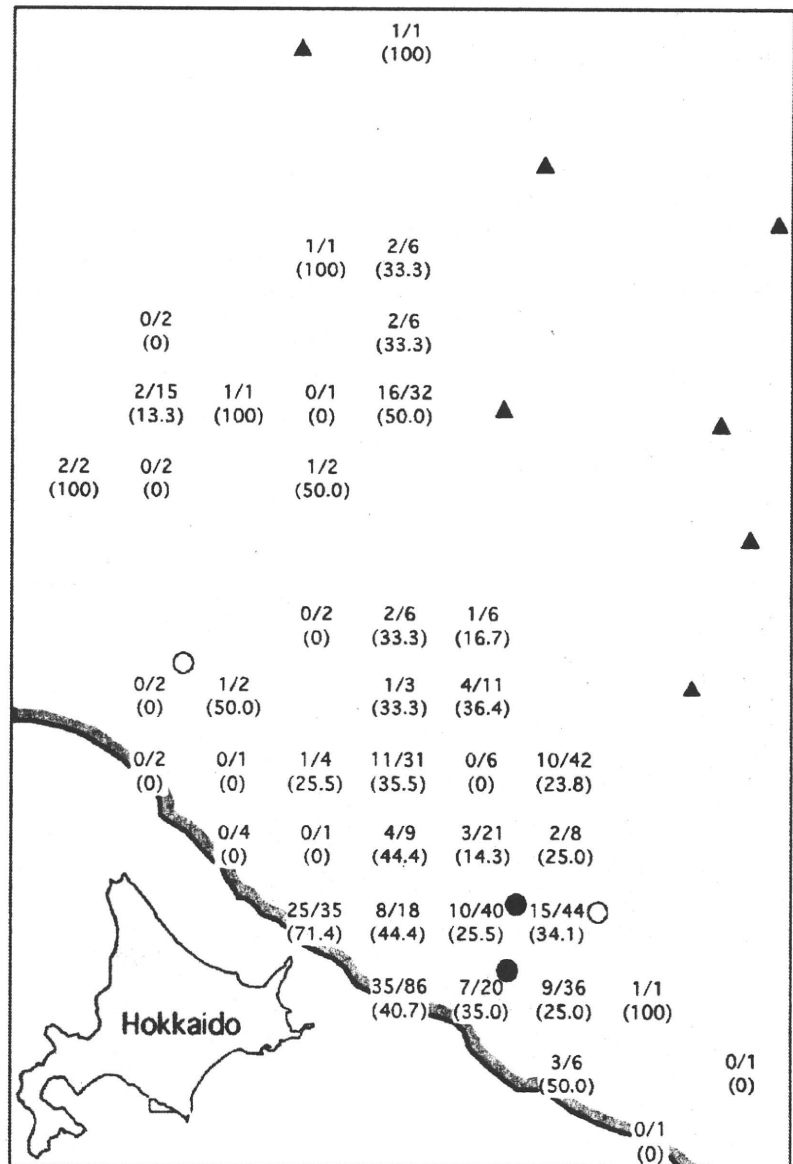


Fig. 3 Prevalence of anti-HEV antibodies among deer hunted in the surveillance area. No. of positive sample/no. of samples tested (%) is indicated on the map for wild life preservation and game. Triangles indicate the summit of a mountain of more than 1000 m above sea level. The circle indicates a pig farm. At least two of the four farms raised pigs on grazing and are indicated by solid circles.

Although no difference in positive rates was observed between upland and lowland areas, many deer were found to be positive for anti-HEV in lowlands, where pig farms are located.

Cumulative prevalence of anti-HEV antibodies with ageing

In order to study the relation between age and seroprevalence, positive rates for anti-HEV antibodies were compared among age groups. As shown in Fig. 4, nine of the 35 samples from the less than 1-year-old animals (25.7%), five of the 40 one-year-old ones (12.5%), 43 of the 123 two-year-old ones (35.0%), 58 of the 134 three-year-old ones (42.3%) and 66 of the 188 animals more than 4 years old (35.1%) were antibody-positive. A statistically significant difference was observed among 1- to 3-year-old animals and an age-dependent increase in the positive rate was found among the deer.

DISCUSSION

In this study, serological surveillance for HEV antibodies among Yezo-deer in the Hidaka district of Hokkaido, Japan was carried out to investigate whether the animals were infected by the virus. The distribution of ΔOD_{490} values by ELISA using VLPs as antigen showed a bimodal pattern, which was also observed in the main reservoir of HEV such as pigs and wild boars [2,13–15,20,29]. At least five serum samples from the ones investigated reacted with a specific band of 53 kDa in Western blots. Based on the lowest ΔOD_{490} value of a Western blot-positive sample, the cut-off value of the ELISA was determined and the prevalence of anti-HEV antibodies was examined. Comparison of the

antibody-positive rate among each age of the deer demonstrated an age-dependent increase of the seroprevalence against HEV. These findings suggest that Yezo-deer in the surveillance area were infected with HEV. It is, therefore, strongly recommended that raw meat or entrails from Yezo-deer should not be ingested to avoid a risk of infection with HEV.

Out of the 520 deer tested, 181 animals (34.8%) were found to possess anti-HEV antibodies by ELISA. The seroprevalence for HEV among deer in this study is lower than that among pigs in Japan (58.0%) [23]. Surprisingly, the positive rate was higher than that among wild boars in Japan (9–25.5%) [14,20] and much higher than that among Yezo-deer reported in a recent study, where the animals inhabiting mainly the Shiretoko district and Nakajima island in Lake Toya in Hokkaido were examined (Dr Y. Matsuura, personal communication) [12]. As shown in Fig. 3, two pig farms raised their animals by grazing in the surveillance area. It has been reported that nearly 90% of the farms in Japan raised pigs infected with HEV [23] and that the infected pigs shed the virus in their feces in large amounts for 3–4 weeks [6]. Interspecies transmission between wild boar and Honsyu-deer (*C. nippon centralis*) was also suggested in Honsyu, Japan, where wild boars and deer inhabit the same areas [20]. As neither wild boar nor grazing pigs inhabit the Shiretoko district and Nakajima island, a lower prevalence of the antibody against HEV has been demonstrated by Matsuura *et al.* [12]. It seems that the deer in the Hidaka district were infected with the virus through eating grass contaminated with feces from the virus-infected pigs.

Only five of the 60 serum samples tested, which were positive for anti-HEV antibodies by ELISA, were found to react with the antigen in Western blots. As the maximum titre of the positive samples reactive in Western blots was 1:800 (as determined by ELISA), the antibody titres in samples other than the live may be too weak to produce specific bands by Western blot. Alternatively, the deer may recognize a conformational epitope rather than a linear one, yielding no bands in Western blots.

The seroprevalence of the deer against HEV was increased in an age-dependent manner. In order to clarify the infection route of these animals, virus detection in the feces of the deer as well as of those of the pigs grazing in the pasture should be undertaken. Animals less than 1-year-old showed a higher prevalence of antibodies than 2-year-old ones. This may reflect maternal antibodies against HEV in the serum of the fawns.

We report here for the first time that Yezo-deer may be infected with HEV. The antibody-positive rate among the deer in the Hidaka district was more than 30%. As females deer were hunted more and had a higher seroprevalence rate than males, much attention should be paid to avoid the risk of acquiring HEV infection from Yezo-deer meat.

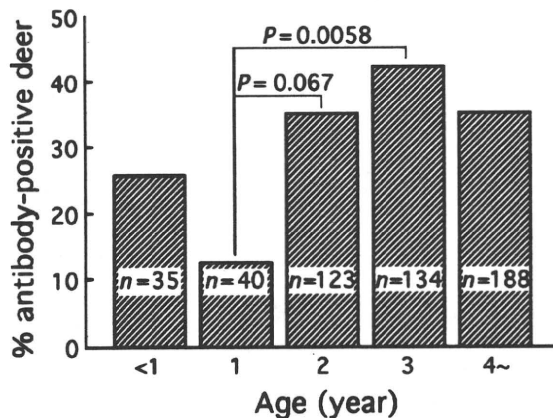


Fig. 4 Age-dependent increase in prevalence of anti-HEV antibodies. Positive rate of anti-HEV antibodies was compared by age. Statistical analysis was performed using the chi-square test. A P value of <0.05 is considered statistically significant.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Takeda (National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan), Dr Takashima (Hokkaido University, Hokkaido, Japan), and Mr Sagara (Shizunai-syokubiraku-corporation, Hokkaido, Japan) for providing VLPs, anti-HEV hyperimmune serum and Yezo-deer serum samples, respectively. We also thank Dr Nihei (Health Sciences University of Hokkaido, Hokkaido, Japan) for helpful discussions. This work was supported by a grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

REFERENCES

- Arankalle VA, Chadha MS, Tsarev SA *et al.* Seroepidemiology of water-borne hepatitis in India and evidence for a third enterically-transmitted hepatitis agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3428–3432.
- Arankalle VA, Joshi MV, Kulkarni AM *et al.* Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in different Indian animal species. *J Viral Hepat* 2001; 8: 223–227.
- Buisson Y, Grandadam M, Nicand E *et al.* Identification of a novel hepatitis E virus in Nigeria. *J Gen Virol* 2000; 81: 903–909.
- Emerson SU, Anderson D, Arankalle A *et al.* Hepevirus. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, eds. *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London, UK: Elsevier/Academic Press, 2004: 851–855.
- Feagins AR, Opriessnig T, Guenette DK, Halbur PG, Meng XJ. Detection and characterization of infectious hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J Gen Virol* 2007; 88: 912–917.
- Halbur PG, Kasorndorkbua C, Gilbert C *et al.* Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 918–923.
- Inoue J, Takahashi M, Ito K, Shimosegawa T, Okamoto H. Analysis of human and swine hepatitis E virus (HEV) isolates of genotype 3 in Japan that are only 81–83% similar to reported HEV isolates of the same genotype over the entire genome. *J Gen Virol* 2006; 87: 2363–2369.
- Kane MA, Bradley DW, Shrestha SM *et al.* Epidemic non-A, non-B hepatitis in Nepal. Recovery of a possible etiologic agent and transmission studies in marmosets. *JAMA* 1984; 252: 3140–3145.
- Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 224: 680–685.
- Li TC, Saito M, Ogura G, Ishibashi O, Miyamura T, Takeda N. Serologic evidence for hepatitis E virus infection in mongoose. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74: 932–936.
- Martelli F, Caprioli A, Zengarini M *et al.* Detection of hepatitis E virus (HEV) in a demographic managed wild boar (*Sus scrofa scrofa*) population in Italy. *Vet Microbiol* 2008; 126: 74–81.
- Matsuura Y, Suzuki M, Yoshimatsu K *et al.* Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Arch Virol* 2007; 152: 1375–1381.
- Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG *et al.* A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 9860–9865.
- Michitaka K, Takahashi K, Furukawa S *et al.* Prevalence of hepatitis E virus among wild boar in the Ehime area of western Japan. *Hepatol Res* 2007; 37: 214–220.
- Nishizawa T, Takahashi M, Endo K *et al.* Analysis of the full-length genome of hepatitis E virus isolates obtained from wild boars in Japan. *J Gen Virol* 2005; 86: 3321–3326.
- Pina S, Buti M, Cotrina M, Piella J, Girones R. HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *J Hepatol* 2000; 33: 826–833.
- Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E virus. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*, 4th edn, Vol. 2. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 3051–3061.
- Schlauder GG, Dawson GJ, Erker JC *et al.* The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolate from a patient with acute hepatitis reported in the United States. *J Gen Virol* 1998; 79: 447–456.
- Schlauder GG, Mushahwar IK. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. *J Med Virol* 2001; 65: 282–292.
- Sonoda H, Abe M, Sugimoto T *et al.* Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5371–5374.
- Takahashi K, Kang JH, Ohnishi S, Hino K, Mishiro S. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus recovered from Japanese patients with acute sporadic hepatitis. *J Infect Dis* 2002; 185: 1342–1345.
- Takahashi K, Kitajima N, Abe N, Mishiro S. Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. *Virology* 2004; 330: 501–505.
- Takahashi M, Nishizawa T, Miyajima H *et al.* Swine hepatitis E virus strains in Japan from four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus. *J Gen Virol* 2003; 84: 851–862.
- Towbin H, Staehlin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4350–4354.
- Tsarev SA, Binn LN, Gomatos PJ *et al.* Phylogenetic analysis of hepatitis E virus isolates from Egypt. *J Med Virol* 1999; 57: 68–74.
- Velázquez O, Stetler HC, Avila C *et al.* Epidemic transmission of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in Mexico, 1986–1987. *JAMA* 1990; 263: 3281–3285.
- Wang Y, Ling R, Erker JC *et al.* A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J Gen Virol* 1999; 80: 169–177.
- Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M *et al.* Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J Gen Virol* 2003; 84: 2351–2357.
- Yoo D, Willson P, Pei Y *et al.* Prevalence of hepatitis E virus antibodies in Canadian swine herds and identification of a novel variant of swine hepatitis E virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 1213–1219.

Ⅲ. 平成21年度研究報告書

食肉食鳥衛生検査における家禽・家畜等のウイルス性疾病検査に関する研究

研究代表者：棚林 清 国立感染症研究所獣医科学部 第三室長

研究要旨：食用に供される家禽や家畜などの食鳥・食肉検査でウイルス性疾病についてはその手技の煩雑性などからほとんど実施されていない。本研究では検査所の協力を得ながら実施可能な検査方法の開発・改良・検証を行いウイルス学的検査体制整備のためのマニュアル案や技術的基盤を提供すること、また、食用に供される動物を含めて実態調査を実施することも目的として平成 21 年度は以下の成果が得られた。

豚のウイルス性疾病の検査として、動物臓器の乳剤化から(RT) PCR 法での検出までの検査法の妥当性を検証するため、120 頭分の扁桃サンプルについて 10 種類のウイルス遺伝子の検出を試みた。84%(101/120)のサンプルからブタサーコウイルス 2 型、57%(68/120)からブタパルボウイルスが検出された。これは現在の野外状況から想定される頻度であり、一連の検査手法はほぼ妥当であると考えられた。

牛のウイルス性疾病検査のモデルとした牛白血病ウイルス (BLV) について廃棄された検体から得られた *env* 遺伝子断片の系統進化解析の結果、ほとんどは近縁な 2 系統のウイルスが国内に流行していることが分かった。まれに他の海外株に近縁な株も存在した。廃棄腫瘍組織 138 検体のうち *env* 遺伝子 PCR が 129 検体 (93.5%) で陽性となり RFLP 解析によって 6 群に分類された。全体の 9.1%を占める型のウイルスに感染した個体では発症が遅れる可能性が示された。

鳥インフルエンザの検査について高病原性鳥インフルエンザと症状が類似するニューカッスル病迅速検査法として RT-LAMP 法を検討し、短時間 (60 分以内) に多種のニューカッスル病ウイルスを検出することが可能な RT-LAMP プライマーセットの開発に成功した。また、検体輸送培地について検討し市販品を含め冷蔵輸送すれば有効であることが分かった。さらにインフルエンザウイルスの全分節 RNA を増幅できる有用な方法を開発した。

網羅的病原体検出用マイクロアレイを用いてインフルエンザ各種亜型ウイルス株ゲノムとの反応性を検証し、亜型型別もほぼ可能であることが分かった。さらに汎用性や感度向上の改良を進める必要がある。

健康牛から分離されるロタウイルスの全分節遺伝子を解析した結果、各分節が頻繁に組換えを起こし、多様性を獲得していることが明らかとなった。健康な豚 169 例中 84 例 (49.7%) で PCR 陽性となり、本ウイルスが常在している可能性が考えられた。また、前年度、分離ウイルスを使って開発した簡便な全遺伝子解析法を牛糞便中に存在するウイルスに応用したところ、11 例中 4 例のみで解析が可能で更なる改良が必要ある。

今後はこれらの成果を踏まえ食肉食鳥検査所等での試行を通して実用可能な標準的マニュアル化を作成していく必要がある。

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	日本生命科学大学獣医学部・教授
伊藤 壽啓	鳥取大学農学部・教授
杉山 誠	岐阜大学応用生物科学部・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がウイルスの分離同定などのウイルス学的検査は煩雑で時間を要することから検査所での実施は困難でありほとんど実施されていない。本研究では、食肉などの更なる安全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最終目的としている。

本年度はウイルスゲノムをPCRやRT-PCR法などで検出する検査法の検証を目的に豚においては多種類のウイルスを、牛については牛白血病をモデルに廃棄検体での検出とより詳細な分子疫学的解析を実施した。

高病原性鳥インフルエンザが疑われる食鳥が搬入された場合は簡易診断キットによる検査を実施することとなっているが、各検査所での経験は少なく検体採取や検査実施の具体的手法を示すマニュアル案をこれまでに作成した。今年度は確定診断のための検体輸送用培地の検討やウイルスの詳細な解析のための簡易遺伝子増幅法と亜型型別法の技術開発を目的とした。また、鑑別診断が必要になるニューカッスル病ウイルスのRT-LAMP法による簡易検出法の検討を行うことを目的とした。

さらに、多種類病原体を一括して検出するマイクロアレイ法の開発改良やヒトを含め多種類の動物に胃腸炎を起こすA群ロタウイルスについて牛や豚における分子疫学的解析および簡便な全分節遺伝子解析法の検証を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1. 豚に感染するウイルスの検査法の検討：昨年度まで検討した臓器の乳剤化、ウイルス核酸の抽出、PCRによるウイルス遺伝子の検出の各過程の至適実験条件について、食肉処理場及び食肉衛生検査所の協力により得られた豚の扁桃材料120頭分を用いて、実験条件の適性を調べた。検査対象としたウイルスは3種のDNAウイルス7種のRNAウイルスとし、他の調査報告と比較検討した。

2. 牛に感染するウイルスの検査法の検討：現在国内においてヒトに健康被害を起こす牛のウイルス性疾患はないが、と畜検査の対象となっている牛白血病をモデルとして、食肉衛生検査所の協力で牛白血病また牛白血病疑いの腫瘍検体からPCRによるウシ白血病ウイルスのゲノム検出さらにそれらの分子疫学的解析ならびに遺伝子型と発症年齢との関係を解析した。

3. 鳥インフルエンザの検査手法の検討：鳥インフルエンザが疑われた場合に鑑別診断が必要となるニューカッスル病ウイルスのRT-LAMP法による検出方法を検討した。また、検体輸送のための輸送用培地の検討を行った。さらにインフルエンザウイルスが分離された場合の詳細解析のための簡易ゲノム増幅法および亜型型別法の開発を行った。

4. 病原体検出マイクロアレイ法の応用：これまでに開発した網羅的な病原体ゲノムプローブを用いた病原体検出マイクロアレイでのH5N1亜型高病原性鳥インフルエンザの起因ウイルスをはじめとする野鳥由来株、ヒト由来株等の各種亜型インフルエンザAウイルスの亜型型別が可能か検証した。

5. 簡便なA群ロタウイルス全遺伝子解析法開発と応用：健康な牛より分離された7株のA群ロタウイルスについて、11分節遺伝子ORFの塩基配列の解読と遺伝子型を決定し進化系統学的解析を行い、関連性について解析を行った。また、健康な豚の糞便からVP4 VP7 遺伝子検出を行いPおよびG遺伝子型を決定した。さらに前年度開発

した簡便な全分節遺伝子解析法を実際の糞便サンプルに応用した。

C. 研究結果

1. 豚に感染するウイルスの検査法の検討：

各種の理由で肝臓廃棄された個体 120 頭の扁桃サンプルについて、Ogawa らが報告した multiplex PCR 法で調査した結果、9 種のウイルス遺伝子のうち、ブタサーコウイルスは 84%(101/120)のサンプルから、ブタパルボウイルスは 57%(68/120)から検出された。他の 7 種のウイルス遺伝子は全く検出されなかった。単独で行った E 型肝炎ウイルス遺伝子を検出する PCR では、今のところ陽性反応はない (0/34)。検出された 2 つのウイルス遺伝子は、同個体から検出される頻度が高かった。また、廃棄理由とウイルス遺伝子の検出との関係を統計的に解析した結果、ブタサーコウイルス陽性個体は寄生虫肝炎として廃棄された個体が有意に多かったがその他の肝臓廃棄理由との関連は認められなかった。ブタパルボウイルス遺伝子はどの肝臓廃棄理由とも関連性は認められなかった。

2. 牛に感染するウイルスの検査法の検討：廃棄された腫瘍組織 50 検体から得られた BLV *env* 遺伝子 PCR 増幅 DNA 断片の系統進化解析の結果、国内外の BLV は大きく 6 群に分けられ、大部分 (49/50) は、D 群に分類され、このうち 2 系統のウイルスが我が国のウシの間で流行していることがわかった。1 検体は C 群に属しており新たなウイルス株の侵入が引き続き起きている可能性が示された。

廃棄された腫瘍組織 138 検体から、*env* 遺伝子 PCR が 129 検体 (93.5%) で陽性となり 4 種の制限酵素による RFLP 解析によって 6 群に分類された。発症年齢との関連を解析した結果、全体の 9.1%を占める型のウイルスに感染した個体では白血球の発症が遅れる可能性が示された。

3. 鳥インフルエンザの検査手法の検討：高病原性鳥インフルエンザの診断の際に症状が類似するニューカッスル病ウイルスの迅速検査法とし

て RT-RAMP 法の開発を試みた。NP と M 遺伝子をターゲットとするプライマーを設計した。NP 遺伝子では Class I、Class II のウイルスとも効率よくウイルスゲノムの検出が可能であったが、M 遺伝子では、Class II ウイルスの検出効率が悪かった。

検査所での簡易検査後の確認検査のための検体輸送用培地について生理食塩水、組織培養用培地および市販のウイルス検査用輸送培地に H5N1 亜型ウイルスを加えその安定性を調べたところ 4°C で 7 日までは感染価の低下は認められなかったが、20°C ではやや低下した。リアルタイム PCR でのゲノム検出では差がなかった。

さらに、分離ウイルスの簡易な亜型決定のためのウイルスゲノム増幅法において共通配列を含んだ 1 組のプライマー対を用いて A 型インフルエンザウイルス 8 分節の全長を増幅できることができ、HA および NA 遺伝子 DNA 断片を直接塩基配列決定し簡便に亜型を決定することができた。

4. 病原体検出マイクロアレイ法の応用：A 型ヒト由来株や鳥類由来株および B 型株 9 株についてゲノム核酸を抽出し、標識後これまでに開発したマイクロアレイに反応させたところ、すべてインフルエンザ A または B ウイルスと判定された。野生カモ由来 (H1N3) 株を除いてそれぞれの亜型特異的にシグナルが検出同定できた。

5. 簡便な A 群ロタウイルス全遺伝子解析法開発応用：健康牛から分離されたロタウイルス 7 株の全分節遺伝子を解析した結果、各分節が頻繁に組換えを起こし、多様性を獲得していることが明らかとなった。Nested RT-PCR 法により健康な豚 169 例から VP4 遺伝子を検出したところ、84 例 (49.7%) が陽性となり、豚では、本ウイルスが常在している可能性が考えられた。また、前年度、分離ウイルスを使って開発した簡便な全遺伝子解析法を牛糞便中に存在するウイルスに応用したところ、11 例中 4 例のみで解析が可能であった。

D. 考察

豚に感染するウイルスの例として 10 種類のウイルスについてこれまでの核酸抽出、cDNA 合成に至る過程や PCR 条件が適当かを、実際に廃棄された豚の扁桃サンプルについて調べたところブタサーコウイルス 2 型とブタバルボウイルスが過去の検出率と同等に検出され、核酸抽出や cDNA 合成の条件が妥当であると考えられた。本方法では多検体の処理が可能であることや、DNA ウイルス PCR の段階でマルチプレックス PCR を応用すればさら検査の省力化が可能となる。しかし、生ワクチンが接種されるウイルス疾患については野外株との区別ができるような検出法を開発する必要がある。

牛白血病と診断された腫瘍組織 50 検体についてウイルスゲノムの *env* 遺伝子領域の系統進化解析を行ったところ、国内で流行しているほとんどのウイルスは近縁な 2 系統のウイルスであることが分かった。また、1 検体については他の株と異なる系統であり海外から新たなウイルス株の国内への侵入が起きていると推定された。また、*pg51* 領域の解析から異なる抗原性を示す株が国内にも存在する可能性がある。今後さらに多くの地域で育成された牛に由来する株の解析をして確実に診断できることを検証していく必要があると考えられる。

138 検体の廃棄腫瘍について *env* 領域の PCR では 129 検体 (93.5%) で陽性となり、ウシの全身性腫瘍の大部分が BLV 感染による地方病性牛白血病であることが確認された。また、RFLP 解析で 6 種の型に分類でき、Ⅲ型では発症が遅い可能性があると考えられた。さらに他の遺伝子領域についての解析が必要と思われる。今後これらの検査手法を食肉衛生検査でウイルス疾病検査のモデルとして試行し利用可能なマニュアルとを整備していくことが必要である。

鳥インフルエンザの検査については簡易診断キット、RT-PCR やウイルス分離同定が行われるが本疾患の類似疾患としてニューカッスル病があり、鑑別診断する必要がある。鳥由来インフル

エンザウイルスを検出する RT-LAMP 法に加えてニューカッスル病ウイルス検出のための RT-LAMP の開発を行った。NP および M 遺伝子をターゲットに有用なプライマー設計ができ簡単にかつ短時間で検出できるシステムとなった。また、検体採取現地から検査施設へ輸送する際の輸送培地 3 種類について H5N1 亜型ウイルスを用いて検証したところいづれでも冷蔵で安定に保持できることが分かった。市販品も有効であり検査所での選択が可能となる。LAMP 法、輸送培地の検証について実際の検体を模した材料でさらに検証する必要がある。インフルエンザウイルスが分離された場合はさらに亜型決定などの詳細な解析が必要となる。今回単一プライマーですべての遺伝子分節を増幅する方法が開発でき有用に活用できると考えられる。

これまでに開発した網羅的病原体アレイについて今年は各種亜型インフルエンザウイルスの型別が可能か検証した。ほぼ予定通り型別されたが一部の株では他の亜型が選択される場合がありさらにプローブ等の改良をする必要がある。また、感度等の向上を図る必要がある。

ヒトを含めた他種類の動物にから分離される A 群ロタウイルスの疫学的研究では健康牛由来株で頻繁に組換えが起きていることや健康豚からも多様なロタウイルスが常在化していることが分かった。簡易全分節遺伝子解析法では解析できる株数が少なくさらなる改良が必要である。

E. 結論

豚における PCR 検査で簡便で安定した検査システムに加え、multiplex PCR 法を組み合わせることによって、短時間に多数のウイルス遺伝子を検査できる検査系が組めることが示された。また、牛のウイルス疾患検査のモデルとした牛白血病ウイルスについては国内で遺伝的に近縁な 2 系統の BLV が流行していることがわかった。また、遺伝的に異なる群に属するウイルス遺伝子も検出された。*env* 遺伝子 RFLP 解析によって 6 群に分類できた。全体の 9.1% を占める型のウイルス

に感染した個体では白血病の発症が遅れる可能性が示された。

鳥類においてインフルエンザウイルスとの鑑別診断が必要なニューカッスル病ウイルスのNPおよびM遺伝子を効率よく検出するRT-LAMP法を開発した。しかしM遺伝子をターゲットとした場合、Class IIウイルスの検出効率が悪かった。また、検体輸送用培地について検討したところ1週間であればいずれの培地でも安定して輸送できることが分かった。さらなるウイルス解析のために1組のプライマー対を用いてA型インフルエンザウイルス8分節の全長を増幅し、簡便なHAおよびNA亜型型別法の開発に成功し、インフルエンザの遺伝子解析や疫学調査に有用である。

これまで開発してきた網羅的病原体検出用マイクロアレイは病原体の種同定に有効である可能性が示され、今後、汎用性向上の為に搭載プローブ数の増大と検出感度向上が必要と考えられる。

健康な牛に存在するロタウイルスは分節遺伝子を頻りに組換えることにより多様性を獲得していることが明らかとなった。また、健康な豚において、多様なロタウイルスが常在化していることが示された。前年度開発したロタウイルスの全分節遺伝子を解析する簡便法を野外サンプルに応用するためには、さらに改良が必要である。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Usui T, Yamaguchi T, Ito H, Ozaki H, Murase T, Ito T. Evolutionary genetics of highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses isolated from whooper swans in northern Japan in 2008. *Virus Genes*, 2009, 39: 319-323.
- 2) Tsunekuni R, Ito H, Otsuki K, Kida H, Ito T. Genetic comparisons between lentogenic Newcastle disease virus isolated from

waterfowl and velogenic variants. *Virus Genes*, 2009, 40: 252-255

- 3) Tsunekuni R, Ito H, Kida H, Otsuki K, Ito T. Increase in the Neuraminidase Activity of a Nonpathogenic Newcastle Disease Virus Isolate during Passaging in Chickens. *J Vet Med Sci.*, in press.

- 4) Shivakoti S, Ito H, Otsuki K, Ito T. Characterization of H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Isolated from a Mountain Hawk Eagle in Japan. *J Vet Med Sci.*, in press.

- 5) Shivakoti S, Ito H, Murase T, Ono E, Takakuwa H, Yamashiro T, Otsuki K, Ito T. Development of Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assay for Detection of Avian Influenza Viruses in Field Specimens. *J Vet Med Sci.*, in press.

- 6) Inoue, E., Wang, Xi., Osawa, Y., and Okazaki, K: Full genomic amplification and subtyping of influenza A virus using a single set of universal primers. *Microbiol. Immunol.* (in press)
- Abe, M., Ito, N., Morikawa, S., Takasu, M., Murase, T., Kawashima, T., Kawai, Y., Kohara, J. & Sugiyama, M.: Molecular epidemiology of rotaviruses among healthy calves in Japan: Isolation of a novel bovine rotavirus bearing new P and G genotypes. *Virus Res.* 144, 250-257, 2009.

2. 学会発表

- 1) 高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)オオハクチョウ分離株の起源に関する分子系統解析. 笛吹達史、山口剛士、伊藤啓史、尾崎弘一、村瀬敏之、伊藤壽啓. 第147回日本獣医学会学術集会 2009年4月(宇都宮)
- 2) ベトナム北部の野鳥から分離されたH9N2亜型鳥インフルエンザウイルスの性状解析. 中村保紀、大槻公一、常國良太、村瀬敏之、小野悦郎、

伊藤壽啓、山口剛士、伊藤啓史、尾崎弘一、笛吹達史、中森純也、Lien Phuong Song、Quynh Mai Le Thi、山城哲、森田公一、高桑弘樹。第 147 回日本獣医学会学術集会 2009 年 4 月 (宇都宮)

3) ベトナム北部から分離されたニューカッスル病ウイルスの性状解析。常國良太、大槻公一、村瀬敏之、小野悦郎、伊藤壽啓、山口剛士、伊藤啓史、尾崎弘一、笛吹達史、中森純也、Lien Phuong Song、Quynh Mai Le Thi、山城哲、森田公一、高桑弘樹。第 147 回日本獣医学会学術集会 2009 年 4 月 (宇都宮)

4) 高病原性トリインフルエンザウイルスの病原性と M2 蛋白の関わり。藤本佳万、富田めぐみ、伊藤啓史、伊藤壽啓。第 147 回日本獣医学会学術集会 2009 年 4 月 (宇都宮)

5) 野生水禽由来鳥インフルエンザウイルスの鶏雛気囊継代による病原性の獲得。富田めぐみ、藤本佳万、伊藤啓史、伊藤壽啓。第 147 回日本獣医学会学術集会 2009 年 4 月 (宇都宮)

5) 井上恵美、浅野逸郎、王笑峰、大澤宜明、岡崎克則：単一のプライマー対による A 型インフルエンザウイルス亜型型別法の開発 第 129 回日本薬学会 2009 年 3 月 (京都)

6) 松村佳子、井上恵美、室内友恵、大澤宜明、岡崎克則：ウシの全身性腫瘍検体からの牛白血病ウイルス遺伝子の検出とその系統進化解析 第 148 回日本獣医学会 2009 年 10 月 (鳥取)

7) 松村佳子、室内友恵、井上恵美、大澤宜明、岡崎克則 ウシ腫瘍組織からの牛白血病ウイ

ルス DNA の検出と系統進化解析 第 57 回日本ウイルス学会 2009 年 10 月 (東京)

8) 井上恵美、前河耕平、大澤宜明、岡崎克則 単一のプライマー対による A 型インフルエンザウイルスゲノム全長増幅法の開発と DI 遺伝子の検出 第 57 回日本ウイルス学会 2009 年 10 月 (東京)

9) 安部昌子、伊藤直人、高須正規、村瀬哲磨、杉山 誠：健康な牛における A 群ロタウイルスの遺伝子動態解析。第 148 回日本獣医学会学術集会 2009 年 9 月 (鳥取)

10) 森川繁樹、安部昌子、伊藤直人、杉山 誠：イノシシとブタに常在する A 群ロタウイルスの遺伝的関連性。第 148 回日本獣医学会学術集会 2009 年 9 月 (鳥取)

11) 安部昌子、伊藤直人、杉山 誠：自然界における A 群ロタウイルスの動態：牛正常便由来ロタウイルスの遺伝的解析。第 57 回日本ウイルス学会学術集会 2009 年 10 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. その他出願中：特願 2009-25818 「病原体を検出するためのマイクロアレイ又はそれを含むキット」宇田晶彦他

豚に感染するウイルスの検出法に関する研究

分担研究者 池田 秀利 日本獣医生命科学大学

研究要旨：現在、食肉・食鳥処理場において仮に病原性ウイルス感染を疑うと体が発見されても、望診、触診などの検査以外に詳細な検査は行っていない。安全な畜産食品を市場に供給するには、より科学的な検査方法を導入することが望ましい。このような状況下で、本研究は食肉・食鳥処理場でも実行可能な、簡便で迅速なウイルス検査方法の確立を目指している。本年度は昨年度までに条件検討してきた、動物臓器の乳剤化からPCR法でウイルス核酸を検出するまでの検査法の妥当性を検証するため、実際に某食肉処理場で得られた120頭分の扁桃サンプルについて10種類のウイルス遺伝子の検出を試みた。その結果、84%(101/120)のサンプルからブタサーコウイルス2型、57%(68/120)からブタパルボウイルスが検出された。これは現在の野外状況から想定される頻度であり、一連の検査手法はほぼ妥当であると考えられた。

A. 研究目的

本研究の目的は全国の食肉・食鳥処理場で実施可能な簡便で安定した結果が得られる病原体検査法を探ることである。

食肉用動物のウイルス感染症は、必ずしも肉眼的な病変を伴わないこともある。よって、解体処理された臓器の望診、触診等の検査だけではなく、臓器中にウイルス病原体の存在を証明する検査法が望ましい。一般的なウイルス学的検査法で感染性ウイルスを検出するには、煩雑な手技と幾つかの設備機器が必要で、時間もかかる。従って、我々は食肉・食鳥処理場でも実行可能なウイルス学的検査としてPCR検査法を用いることにした。更に、その検査法は全国的に安定したPCR検査結果が得られることが重要であると考え、昨年度まで我々は、市販の機器を利用した検査システムの構築

をし、臓器の乳剤化、ウイルス核酸の抽出、PCR法によるウイルス遺伝子の検出、の各過程の至適実験条件を検討してきた。

今年度はこれまで検討してきた種々検査条件に加え、最近発表された（Ogawaら、2009）3種のブタDNAウイルスと6種のブタRNAウイルスをそれぞれ1本の反応チューブで行えるmultiplex PCR法を取り入れて、実際に食肉処理場で得られた120の扁桃材料について、ウイルス遺伝子検出を試み、今までの検査システムへの適合性を調べた。

B. 研究方法

1) 臓器材料

2008年某県の協力によって某食肉処理場で3回に分けて採材した臓器を用いた。臓器は肝臓廃棄となった個体の肝臓、血液（凝固血液）、扁桃を採取し、約24時間氷冷保存して運搬した後、乳剤化し、-80

℃に保存した。今年度使用したブタ扁桃乳剤は、約1年間-80℃保存してあった乳剤を用いた。

2) 動物臓器の乳剤化

臓器の乳剤化は昨年度まで行った条件検討データを基に、小遠心管にブタ肝臓約100mgと生理食塩水又は細胞培養用培地0.9mlと細胞破碎用ビーズを加え、Tomy社臓器破碎装置で激しく振盪する方法を採った。ビーズは今回は直径5mmジルコニアビーズ2個を用いた。臓器乳剤を8,000xgで5分間遠心し、上清をウイルス検査材料とした。

2) ウイルス核酸の抽出

ウイルス核酸の抽出には、Precision社製自動核酸抽出機を使用し、核酸抽出はGC series Magstration-MagaZorb RNA Common Kitを用いた。手法はキットに添付されているプロトコールに従った。なお、このキットは組織RNA抽出用に作られているが、通常のDNAウイルスやRNAウイルスの核酸がともに抽出されることは以前確認してある。

抽出されたウイルスDNAとRNAを含む混合核酸液の一部をinvitrogenのSuperscript 1st-strand Synthesis kitを用いてランダムプライマーでcDNAを合成反応処理した。次に、このDNAウイルスのDNAとRNAウイルスのcDNAが混在する反応液を原材料としてPCRを行った。

3) ウイルス核酸の検出

今回のブタ臓器サンプルについては、4種のRNAウイルス（豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス（PRRSV）、日本脳炎ウイルス（JEV）、豚流行性下痢ウイルス（PEDV）、豚ロタウイルス（PoRV-A）、伝染性胃腸炎ウイルス（TGEV）、ゲタウイルス（GETV）、E型肝炎ウイルス（HEV））と、6種のDNAウイルス（豚サーコウイルス2型（PCV2）、オーエウキーウイルス（SuHV-1）、豚パルボウイルス（PPV））について検出を試み

た。

ウイルス核酸の検出にはウイルス特異的なPCRプライマーを用いたPCR法を行った。HEVを除く、6種のDNAウイルスと3種のRNAウイルスについては、Ogawaらが発表したmultiplex PCR法（J Virol Methods. 160: 210-4. 2009）を採用し、2本の反応チューブでDNAウイルス用PCRとRNAウイルス用PCR反応を行った。HEVについては多様なHEV株を検出するmixed primers（Nakai et al. 2006）を用いたRT-PCR法を採用し、別に単独の反応チューブで行った。

C. 研究結果

1. ウイルス遺伝子検出率

120頭の扁桃サンプルについて、Ogawaらが報告したmultiplex PCR法で調査した結果（図1）、9種のウイルス遺伝子のうち、2種が高率に検出された。すなわち、ブタサーコウイルスは84%（101/120）のサンプルから、ブタパルボウイルスは57%（68/120）から検出された（表1）。他の7種のウイルス遺伝子は全く検出されなかった（表1）。

単独で行ったE型肝炎ウイルス遺伝子を検出するPCRでは、今のところ陽性反応はない（0/34）。

検出された2つのウイルス遺伝子は、同個体から検出される頻度が高いのが注目された。例えば、ブタパルボウイルス陽性個体68頭は全てブタサーコウイルス陽性個体であった（ $\chi^2=29.5$, $p<0.001$ ）。これについては、農場ごとの清浄性の違いの問題、検査の技術的な問題、など今後の検証すべき課題である。

2. ウイルス遺伝子検出と肝臓廃棄理由との関連

検査した臓器は、何らかの理由で肝臓廃棄された個体の扁桃である。その廃棄理由

とウイルス遺伝子の検出との関係を統計的に解析した。

ブタサーコウイルス陽性個体は寄生虫肝炎として廃棄された個体が有意に多かった ($\chi^2=5.3$, $P=0.02$) が、その他の肝臓廃棄理由 (肝炎、間質性肝炎、肝包膜炎、内臓全廃) との関連は認められなかった (表 2)。

ブタパルボウイルス遺伝子はどの肝臓廃棄理由とも関連性は認められなかった (表 3)。

D. 考察

昨年度までは臓器乳剤の作成から、ウイルス核酸抽出、PCR反応までの過程を最適化する検討を行ってきた。今年度はPCR反応段階において複数のウイルス遺伝子検出を1本のチューブで遺伝子増幅できるmultiplex PCR方法が発表されたため(Ogawaら、2009)、この方法が我々が一昨年食肉処理場で採剤した臓器サンプルでどの程度適応できるかを検証した。

120頭分の扁桃サンプルを検査した限りでは、multiplex PCR反応でしばしば観察されるアガロース上のDNAスメアは殆ど見られなかった (図1)。図1で僅かに見られたスメアは、DNAウイルスの陽性コントロールとして用いたPCV2サンプルとの反応で見られたが (図1、左から3レーン目)、このPCV2サンプルは他のサンプルとは異なりPCV2ウイルス感染細胞の凍結融解液で未精製核酸あることが関係していると思われる。従って、全体的な結論として、Ogawaらの報告したmultiplex PCR法は、我々の臓器乳剤作成、核酸抽出法と併用できる、より省力化可能な有力な方法であろうと考えられる。

今回検討したmultiplex PCR法は限られた時間で多数の病原体を検査できる利点があるが、今後更に別の手法を組み合わせる

ことによって、検査時間の短縮、簡便性を増すことも可能であろう。例えば、検査するウイルス遺伝子が限定すればone-step RT-PCR法などは、現プロトコールでは抽出したウイルス核酸全体についてcDNA合成している時間と煩雑さを軽減できるであろう。

今回の検査結果では、ブタサーコウイルス2型とブタパルボウイルスのみが高頻度に検出され、他のウイルスは検出されなかった。PCR検査で検出されるウイルス遺伝子は、感染性ウイルスの存在を示すと考えて良いが、流行している野外ウイルスと接種した生ワクチン由来ウイルスの2つの可能性がある。ブタサーコウイルス2型は一般養豚場に常在化していて、生ワクチンは市販されていないため、野外流行ウイルスであろうと考えられる。一方、ブタパルボウイルスは、生ワクチンが一般的に使用されていることや、一般養豚場のワクチン非接種豚でも抗体保有率が高いという報告もあり、検出されたウイルス遺伝子は野外株、ワクチン株の両方の可能性がある。しかし、成豚はパルボウイルスに感染しても発症しないため一般には肥育豚に生ワクチンを接種することは少ないと予想されることや、移行抗体が数ヶ月続き感染防御し出荷豚時期に移行抗体が途絶えて自然感染をしている可能性も十分に考えられるので、野外株感染の可能性が高いのかも知れない。いずれにしても、それらの可能性を検証するには、PCR産物の核酸配列を決定しワクチン株や日本での流行株との比較が必要であろう。

ブタサーコウイルスについては、昨年度も肝臓から別のprimerを用いたPCR法で検出を試み、32%(38/120)が陽性であった。これは、今年度の同個体の扁桃での検出率84%(101/120)より低いが、PCR法の違い、検査臓器の違い、など一概に比較できない。いずれの結果もこのウイルスが一般養豚場

に高度に浸潤していることを示している。

今回の食肉処理場検査材料で高頻度に検出されたブタサーコウイルス2型とブタパルボウイルスは共にヒトへの感染性はなく市場に供給されても全く問題ない。しかし、E型肝炎ウイルスの様に食肉用家畜には顕著な病変を作らないが、食品を介してヒトに感染すると肝炎などの病原性を示す病原体は存在する。従って、社会的に畜産食品の安全性への要求が増してくれば、食肉処理場段階での病原体検査体制を強化する必要に迫られるであろう。そのためにも、適切な検査体制を推進する必要がある。

E. 結論

昨年まで条件検討を行ってきた簡便で安定した検査システムに加え、最近発表された、多数のウイルス遺伝子を1本の反応チ

ューブで遺伝し増幅できるmultiplex PCR法を組み合わせることによって、短時間に多数のウイルス遺伝子を検査できる検査系が組めることが示された。

F. 健康危険情報

なし

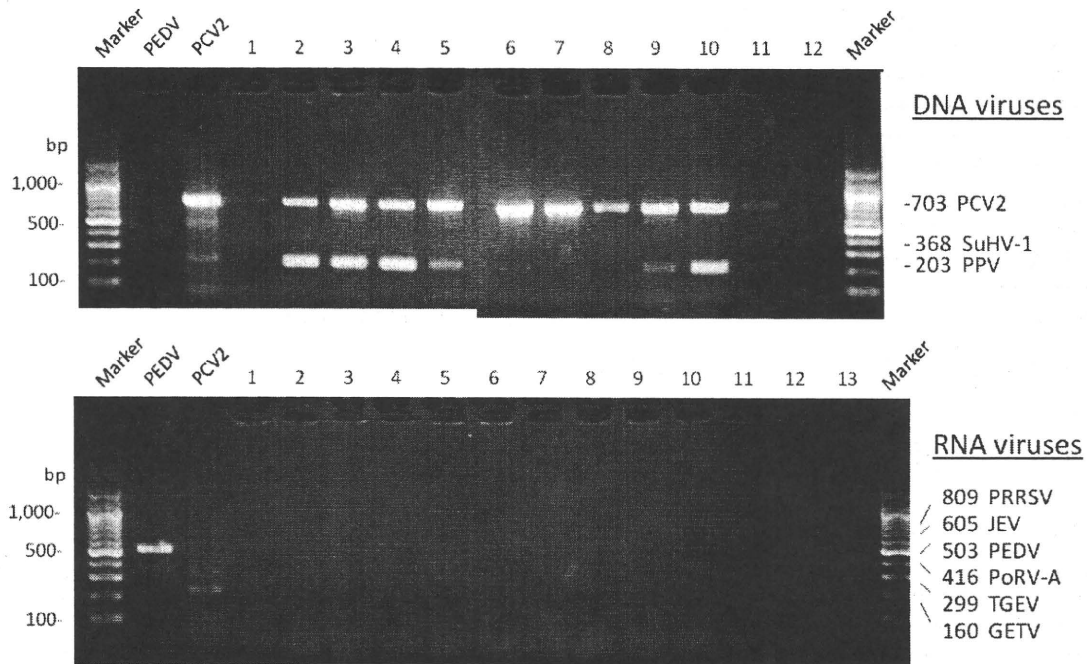
G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

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



Ogawaらの報告したmultiplex PCR法 (2009) で行った豚12頭の扁桃の検査結果。陽性コントロールとして、RNAウイルスである豚流行性下痢ウイルス (PEDV) とDNAウイルスである豚サーコウイルス 2 型 (PCV2) を置いた。上のゲル写真はDNAウイルスのmultiplex PCRの結果、下のゲル写真はRNAウイルスのmultiplex PCRの結果である。それぞれの写真の右側にはそれぞれのウイルスのPCR断片の期待されるサイズ (bp) を記載した。DNAウイルスは豚サーコウイルス 2 型 (PCV2)、オーエウキーウイルス (SuHV-1)、豚パルボウイルス (PPV) である。RNAウイルスは豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス (PRRSV)、日本脳炎ウイルス (JEV)、豚流行性下痢ウイルス (PEDV)、豚ロタウイルス (PoRV-A)、伝染性胃腸炎ウイルス (TGEV)、ゲタウイルス (GETV)、E型肝炎ウイルス (HEV) である。

表 1

	陽性頭数/検査頭数 (%)
DNAウイルス	
PCV2 : porcine circovirus type 2 豚サーコウイルス2型	101/120 (84)
SuHV-1 : suid herpesvirus 1 オーエスキーウイルス(届)	0/120 (0)
PPV : porcine parvovirus 豚パルボウイルス	68/120 (57)
RNAウイルス	
PRRSV : porcine reproductive and respiratory syndromevirus 豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス(届)	0/120 (0)
JEV : Japanese encephalitis virus 日本脳炎ウイルス(法)(人獣)	0/120 (0)
PEDV : porcine epidemic diarrhea virus 豚流行性下痢ウイルス(届)	0/120 (0)
PoRV-A : porcine rotavirus A 豚ロタウイルス	0/120 (0)
TGEV : transmissible gastroenteritis virus 伝染性胃腸炎ウイルス(届)	0/120 (0)
GETV : getah virus ゲタウイルス	0/120 (0)
HEV : hepatitis E virus E型肝炎ウイルス	0/34 (0)

表2 ブタサーコウイルス2型の遺伝子検出 (PCV2-PCR) と肝臓廃棄理由の関連性の検定

		PCV2-PCR			χ^2 値	P値 ^a	
		+	-	計			
寄生虫肝炎	+	46	1	47	5.320	0.021	有意
	-	62	11	73			
肝炎	+	27	4	31	0.269	0.604	有意差なし
	-	74	15	89			
間質性肝炎	+	15	1	16	1.272	0.259	有意差なし
	-	86	18	104			
肝包膜炎	+	9	1	10	0.279	0.598	有意差なし
	-	92	18	110			
内臓全廃	+	9	3	12	0.841	0.359	有意差なし
	-	92	16	108			

^aイエーツの補正P値、又はフィッシャーの直接確率P値(*)

表3 ブタバルボウイルスの遺伝子検出 (PPV-PCR) と肝臓廃棄理由の関連性の検定

		PPV-PCR			χ^2 値	P値 ^a	
		+	-	計			
寄生虫肝炎	+	23	24	47	2.319	0.128	有意差なし
	-	46	27	73			
肝炎	+	21	10	31	1.272	0.259	有意差なし
	-	50	39	89			
間質性肝炎	+	12	4	16	2.527	0.112	有意差なし
	-	56	48	104			
肝包膜炎	+	7	3	10	0.790	0.374	有意差なし
	-	61	49	110			
内臓全廃	+	5	7	12	1.222	0.269	有意差なし
	-	63	45	108			

^aイエーツの補正P値、又はフィッシャーの直接確率P値(*)

我が国における牛白血病ウイルスの分子疫学

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： 1999年に牛白血病の届出が義務化されて以来、その報告数は増加し続け、と畜場における発見も増加の傾向にある。症例の大部分を占める地方病性牛白血病は、牛白血病ウイルス(BLV)による感染症であり、その拡散を防ぐためにはウイルスの疫学調査が重要である。そこで本研究では、我が国で流行しているBLVの遺伝的背景を明らかにするため、食肉衛生検査所において廃棄された牛白血病検体からBLV *env* 遺伝子を増幅して系統進化解析を行った。その結果、遺伝的に近縁な2系統のBLVが我が国のウシの間に流行していることがわかった。また、他の国内分離株とは異なりアメリカ分離株に近縁な遺伝子が検出されたことから新たなウイルス株の侵入が引き続き起きている可能性が示された。

A. 研究目的

ウシの白血病は、疫学および臨床病理学的所見から地方病型および散発型に分類されている。後者の病因は不明であるが、地方病性牛白血病は牛白血病ウイルス(BLV)による感染症で、全国的に増加の傾向にある。BLVはレトロウイルス科、デルタレトロウイルス属に分類され、成人T細胞白血病の原因であるヒトTリンパ球向性ウイルスに近縁であるが、ヒトへの感染はない。しかしながら、発症牛の腫瘍は全身に及び、食肉検査においては全廃棄処分となることから、経済的損失が大きい感染症の一つとされる。そこで本研究では、食肉衛生検査所において廃棄された牛白血病検体からBLV *env* 遺伝子を増幅して系統進化解

析を行った。得られる成績を以て我が国で流行しているBLVの遺伝的背景を明らかにし、地方病性牛白血病の防除に資することを目的とした。

B. 研究方法

1. 腫瘍組織：2008年4月～2009年8月、茨城県県西および県北食肉衛生検査所、群馬県食肉衛生検査所、静岡県東部食肉衛生検査所、栃木県県北食肉衛生検査所ならびに横浜市食肉衛生検査所において牛白血病と診断され、廃棄された腫瘍組織50検体を用いた。検体供試牛の飼養地を図1に示す。

2. 核酸抽出：QuickGene DNA tissue kit S (FUJIFILM)を用い、添付のマニュアルに従って3-10 mgの組織片から抽出した。最

最終的に 200 mL の添付 buffer を用いて溶出し、20-300 ng/mL の DNA 溶液を得た。

3. PCR : OIE の診断マニュアルに準じ、gp51 領域をコードする遺伝子を標的とした PCR を行い、440 塩基を増幅した。即ち、精製水 22.75 mL、5 X GoTaq Flexi buffer (Promega) 10 mL、10 mM dNTPs mix 4 mL、10 pmol/mL プライマー OBLV1A (5'-CTTTGTGTGCCAAGTC TCCCAGATACA-3') および OBLV6A (5'-CCAACATATAGCACAGTCTGGGAA GGC-3') 各 2 mL、DNA 溶液 5 mL を混和し、最後に 25 mM MgCl₂ 4 mL および 5 units/mL GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega) 0.25 mL を加えた。反応は、94°C/45 秒、60°C/60 秒、72°C/90 秒を 5 回、次いで、94°C/45 秒、55°C/60 秒、72°C/90 秒を 30 回繰り返した後、72°C に 7 分間放置した。

4. 塩基配列の決定および解析 : PCR 産物を OBLV1A、OBLV6A、OBLV3 (5'-CTGT AAATGGCTATCCTAAGATCTACTGGC-3') および OBLV5 (5'-GACAGAGGGAACCCAGT CACTGTTCAACTG-3') プライマーを用いたダイレクトシークエンスに供し、塩基配列を決定した。得られた配列を国内外の BLV 遺伝子とともに UPGMA 法に供し、系統樹を作成した。

C. 研究結果

1. BLV env 遺伝子の系統進化解析 : 腫瘍検体から約 450 塩基の env 遺伝子断片を増幅して塩基配列を決定し、プライマー部分を除く 346 塩基について国内外の BLV 遺伝子とともに UPGMA 法に供した。図 2 に示すように、国内外の BLV は大きく 6 群に分けることができた。今回検出された env 遺伝子の大部分 (49/50) は、他の国内分離株

と同様 D 群に分類された。この群にはブラジル、オーストラリア、イラン、韓国、アメリカおよびウルグアイで分離された株も含まれた。また、#12 と同じ配列を示すものならびに #5 と同じ配列を示すものが多数検出され、この 2 系統のウイルスが我が国のウシの間で流行していることがわかった。一方、北海道で約 3 年間、その後栃木県で約 2 年半飼養されたウシから検出された #60 は、C 群に属していた。この群には南北米で分離されたウイルスが属すことから、新たなウイルス株の侵入が引き続き起きている可能性が示された。

B および、E、F 群には、それぞれヨーロッパ、中南米およびイランの分離株が含まれた。A 群にはブラジルとイタリアの分離株が含まれた。これらは分岐後の遺伝的距離が離れていることから、A 群は南米とヨーロッパのサブグループに分けられる可能性がある。

2. gp51 の抗原性の比較 : 今回調べた 346 塩基領域は gp51 の中和抗体認識部位 2 ヶ所および T 細胞エпитープ 1 ヶ所をコードする。そこで、50 検体の塩基配列からアミノ酸配列を推定し、gp51 に抗原性の変化が生じる可能性を調べた。図 3 に示すように、第 1 中和抗体認識部位にはアミノ酸変異は認められなかった。一方、第 2 中和抗体認識部位では多様性が確認された。#52 では中性アミノ酸グルタミンから塩基性アミノ酸リジンへの置換が、#60、#65、#81 では疎水性アミノ酸アラニンから親水性アミノ酸スレオニンへの置換が認められた。遺伝的にも異なる群に属する #60 では、さらに中性アミノ酸アスパラギンから酸性アミノ酸アスパラギン酸への置換も認められた。また、#72 では塩基性ヒスチジンから極性チロシンへの置換、#133 では疎水性の減少を伴うイソロイシンからバリンへの置換が認められた。したがって、これらの 6 株ではウイルス中和抗体との反応性に変異が