

## 別紙4

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
前田 健	人獣共通感染症－病原体はいかに移動し進化するのか？		実験医学	羊土社		2015	33(17):51-56
米満研三、寺田 豊、鎌田龍星、下田 宙、高野愛、前田 健	野生動物を介した人獣共通感染症について		獣医公衆衛生研究	全国公衆衛生獣医師協議会		2015	17(2):17-21

## 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
Sakai K, Hagiwara K, Omatsu T, Hamasaki C, Kuwata R, Shimoda H, Suzuki K, Endoh D, Nagata N, Nagai M, Katayama Y, Oba M, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Mizutani T*, Maeda K*.	Isolation and characterization of a novel rhabdovirus from a wild boar (Sus scrofa) in Japan.	<i>Vet Microbiol</i>	179(3-4)	197-203	2015
Li TC, Yonemitsu K, Terada Y, Takeda N, Wakita T, Maeda K.	Ferret hepatitis E virus infection in Japan.	<i>JJID</i>	68(1)	60-62	2015

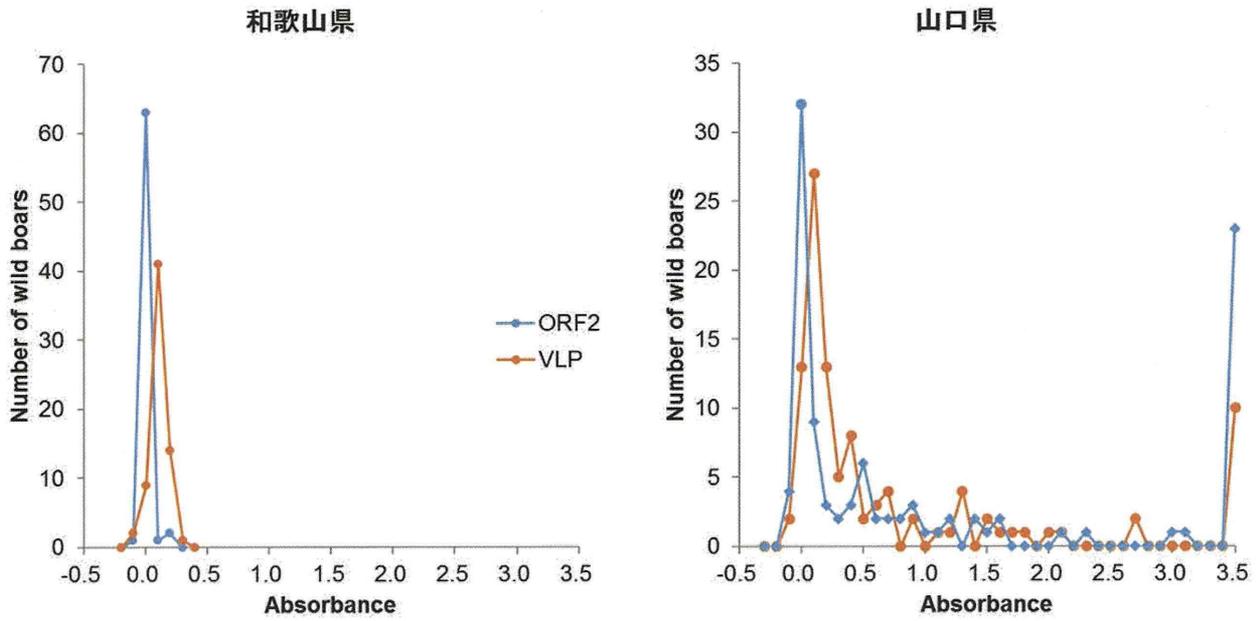


図1 全ての動物から特異的で簡易な血清診断法の開発(論文準備中)

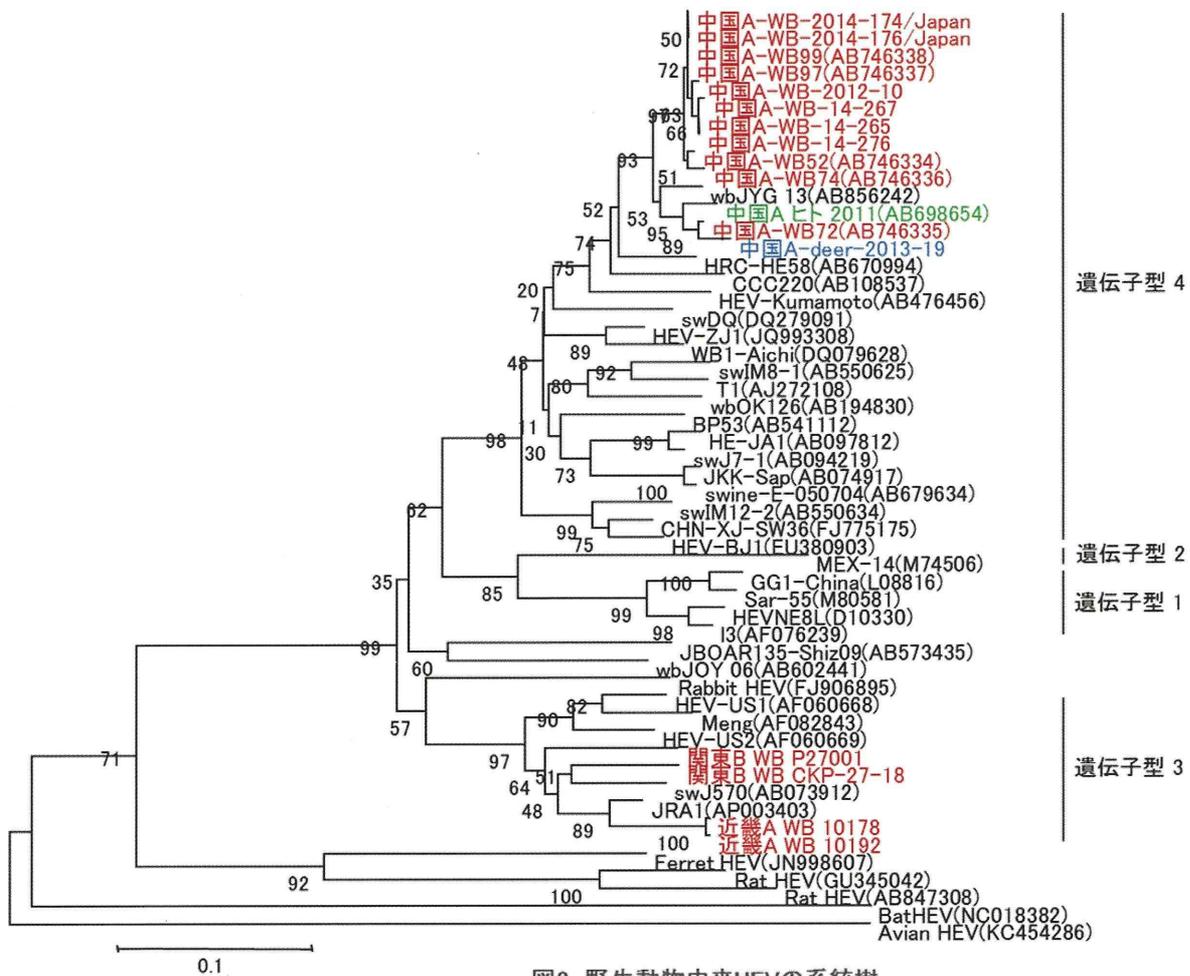


図2 野生動物由来HEVの系統樹

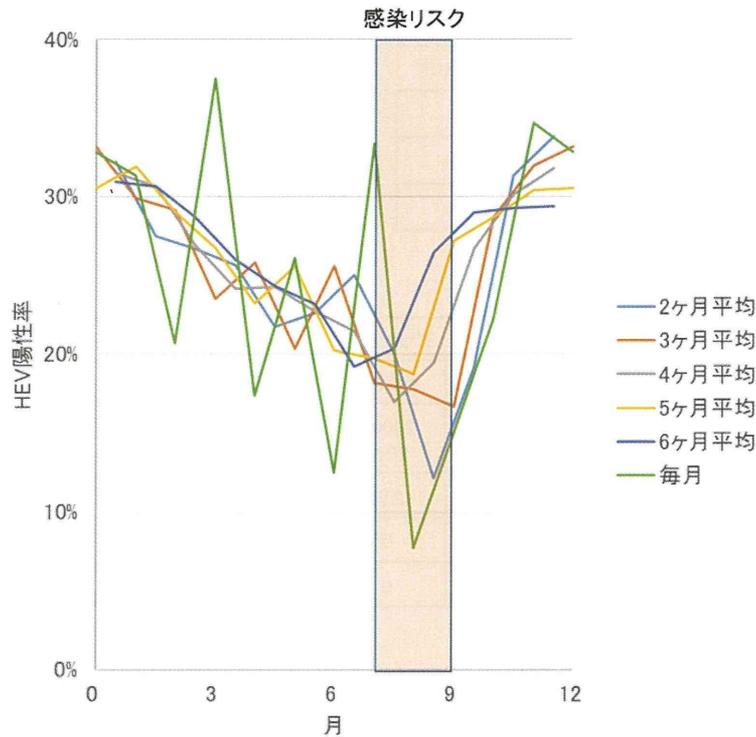


図3 イノシシにおけるHEV抗体の推移

表1 イノシシにおけるE型肝炎に対する抗体保有率

都道府県	山口							兵庫	和歌山	千葉
年	2010	2011	2012	2013	2014	2015	合計	2011-2014	2007-2013	2015
検査頭数	55	28	46	70	103	62	364	67	88	15
陽性頭数	26	10	21	15	21	8	101	8	0	5
陽性率(%)	47%	36%	46%	21%	20.4%	13%	27.7%	12	0	33

都道府県	大分			栃木				富山			岐阜			合計
年	2011	2012	合計	2010	2011	2012	合計	2014	2015	合計	2014	2015	合計	
検査頭数	6	40	46	57	148	15	220	20	28	48	19	25	44	892
陽性頭数	2	6	8	1	8	3	12	0	4	4	0	3	3	141
陽性率(%)	33	15	17	2	5	20	5.4	0	14	8	0	12	7	15.8%

表2 シカにおけるE型肝炎に対する抗体保有率

県名	山口							千葉			岐阜			栃木	大分	山梨	合計
年	2010	2011	2012	2013	2014	2015	合計	2014	2015	合計	2014	2015	合計	2014	2011-2012	2014-2015	
検査頭数	46	37	78	94	178	96	529	10	15	25	24	37	61	24	12	58	709
陽性頭数	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
陽性率(%)	0	3	0	0	0	0	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.1

表3 山口県と兵庫県での動物間のHEV抗体保有率の比較

山口県	ヒト	イノシシ	シカ	飼育犬	ヌートリア	兵庫県	イノシシ	アライグマ	タヌキ
検査頭数	24	364	529	131	24	検査頭数	67	208	65
陽性頭数	9	101	1	1	0	陽性頭数	8	0	0
陽性率(%)	38%	27.7%	0.2%	0.8%	0%	陽性率(%)	12%	0.0%	0%

表4 様々な動物におけるHEV感染

動物種	フェレット	サル		アライグマ			ハクビシン		タヌキ	
場所	日本	福岡	三重	兵庫	和歌山	群馬	兵庫	群馬	和歌山	群馬
年	2012-2014	2015	2012-2013	2008-2014	2008-2015	2013-2014	2011-2014	2013-2014	2015	2013-2014
検査頭数	47	16	48	208	211	5	65	3	19	9
陽性頭数	5	2	2	0	0	0	0	0	0	0
陽性率(%)	11	13	4	0	0	0	0	0	0	0

表5 血清中のHEV遺伝子検出

動物種	イノシシ												
場所	山口							大分	栃木	富山	千葉	岐阜	合計
年	2010	2011	2012	2013	2014	2015	合計	2011-2012	2011-2012	2014-2015	2015	2014-2015	
検査頭数	62	29	48	66	98	15	318	22	88	48	15	40	531
陽性頭数	3	2	1	0	2	3	11	0	0	0	2	0	13
陽性率	5%	7%	2%	0%	2%	20%	3.5%	0%	0%	0%	13%	0%	2.4%

動物種	シカ										
場所	山口							千葉	岐阜	山梨	合計
年	2010	2011	2012	2013	2014	2015	合計	2014-2015	2015	2015	
検査頭数	45	37	78	78	64	12	314	25	61	25	425
陽性頭数	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
陽性率	0%	0%	0%	1%	0%	0%	0.3%	0%	0%	0%	0.2%

表6 野生動物HEV遺伝子陽性個体の個体情報

イノシシ	捕獲年	整理番号	捕獲日	性別	推定体重(kg)	OD値	PCR
山口イノシシ	2010	下関イノシシ52	2010/11/23	♂	60	>3.50	+
山口イノシシ	2010	下関イノシシ72	2010/12/05	♀	26	>3.50	+
山口イノシシ	2010	下関イノシシ74	2010/12/11	♂	55	>3.50	+
山口イノシシ	2011	下関イノシシ97	2011/12/25	♀	10	>3.50	+
山口イノシシ	2011	下関イノシシ99	2011/12/25	♀	10	0.03	+
山口イノシシ	2012	下関イノシシ2012-10	2012/04/29	♂	41		+
山口イノシシ	2014	下関イノシシ2014-174	2014/09/20	♀	10	-0.03	+
山口イノシシ	2014	下関イノシシ2014-176	2014/09/20	♂	10	0.81	+
山口イノシシ	2015	下関イノシシ14-265	2015/03/07	♂	27.3	0.38	+
山口イノシシ	2015	下関イノシシ14-267	2015/03/07	♂	23	0.03	+
山口イノシシ	2015	下関イノシシ14-276	2015/03/21	♂	16	2.87	+
山口シカ	2013	下関2013-19	2013/05/12	♀	40	-0.06	+
千葉イノシシ	2015	千葉2015 CF-P27001	2015/10/01	♀	50	-0.02	+
千葉イノシシ	2016	千葉2015 CKP-27-18	2016/01/07	♂	30	>3.50	+

表7 山口県のイノシシのHEV抗体保有率の月別比較

	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
2010	18% (2/11)	25% (1/4)	-	-	-	-	-	-	-	-	58% (15/26)	57% (8/14)
2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10% (1/10)	50% (9/18)
2012	60% (9/15)	33% (2/6)	-	50% (1/2)	0% (0/1)	-	-	-	0% (0/1)	50% (1/2)	44% (4/9)	40% (4/10)
2013	36% (4/11)	29% (2/7)	100% (1/1)	0% (0/2)	0% (0/5)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/3)	13% (1/8)	22% (2/9)	27% (4/15)	14% (1/7)
2014	8% (1/13)	20% (1/5)	38% (3/8)	20% (3/15)	30% (3/10)	0% (0/4)	44% (4/9)	13% (1/8)	25% (2/8)	20% (1/5)	20% (2/10)	0% (0/8)
2015	0% (0/1)	0% (0/7)	29% (2/7)	0% (0/4)	43% (3/7)	33% (1/3)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/3)	18% (2/11)	0% (0/5)	0% (0/10)
計	31% (16/51)	21% (6/29)	38% (6/16)	17% (4/23)	26% (6/23)	16% (1/8)	33% (4/12)	8% (1/13)	15% (3/20)	22% (6/27)	35% (26/75)	33% (22/67)
6ヶ月平均				4-9月 19.2% (19/99)						10-3月 30.9% (82/265)		
4ヶ月平均	2-5月 24.2% (22/91)				6-9月 17.0% (9/53)				10-1月 31.8% (70/220)			
3ヶ月平均	2-4月 24.2% (16/68)			5-7月 25.6% (11/43)			8-10月 16.7% (10/60)			11-1月 33.2% (64/193)		

## 野生動物の E 型肝炎ウイルス (HEV) 検査プロトコール

### <検査法>

PCR を用いた HEV 遺伝子の検出

ELISA を用いた抗 HEV 抗体の検出

### <遺伝子検出>

E 型肝炎の遺伝子検出は血清または肝臓からの nested PCR を実施する。

### 必要な試薬

QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Catalog#52906)

QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN, Catalog#210212)

RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Catalog#74106)

エタノール (99.5)

$\beta$ -mercaptoethanol

1st センスプライマー (F1) 5' -TAYCGHAAAYCAAGGHTGGCG-3'

1st アンチセンスプライマー (R2) 5' -TGYTGGTTRTCRTARTCCTG-3'

2nd センスプライマー (F2) 5' -GGBGTBGCNGAGGAGGAGGC-3'

2nd アンチセンスプライマー (R1) 5' -CGACGAAATYAATTCTGTCTG-3'

KOD -plus- ver2 (TOYOBO, Catalog#KOD-211)

RNase フリー水 (Sigma-Aldrich, Catalog#3315959001)

1.5 %アガロースゲル

### 必要な器具

1.5ml チューブ

マイクロピペット

マイクロチップ

PCR 用チューブ

### 必要な機械

小型遠心機

サーマルサイクラー

電気泳動装置

トランスイルミネーター

<血清から HEV 遺伝子検出>

(1) RNA 抽出 kit の説明書に従い、140  $\mu$ l の血清から QIAamp viral RNA mini kit により RNA を抽出する。

(2) QIAGEN onestep RT-PCR kit を用い、1st PCR を行う

マスターミックスの作製

試薬	一検体あたり	n 検体
RNase フリー水	14.0 $\mu$ l	14 x (n+1)x1.1
5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	5.0 $\mu$ l	5 x (n+1)x1.1
dNTP Mix	1.0 $\mu$ l	1 x (n+1)x1.1
1st センスプライマー (F1) 10 $\mu$ M	1.5 $\mu$ l	1.5 x (n+1)x1.1
1st アンチセンスプライマー (R2) 10 $\mu$ M	1.5 $\mu$ l	1.5 x (n+1)x1.1
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1.0 $\mu$ l	1 x (n+1)x1.1
合計	24.0 $\mu$ l	24x(n+1)x1.1

マスターミックスを作製し、24  $\mu$ l ずつ PCR チューブに分注する。

マスターミックスに抽出した RNA 1  $\mu$ l を添加する。

下記反応条件にて RT-PCR 反応を行う。

50°C	30 分	
95°C	15 分	
94°C	1 分	} 40 サイクル
55°C	1 分	
72°C	1 分	
72°C	10 分	
4°C	$\infty$	

(3) TOYOBO KOD -plus- ver2 により nested PCR を行う。

マスターミックスの作製

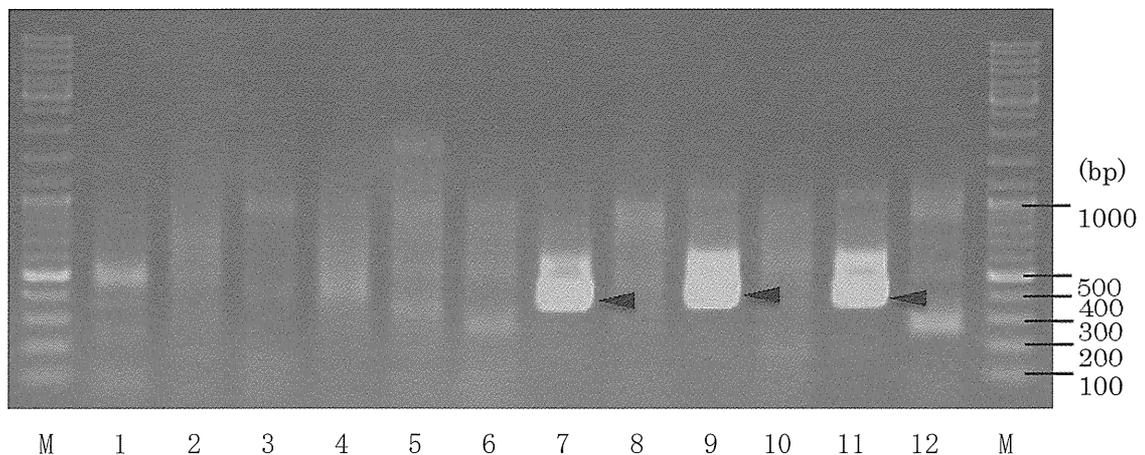
試薬	一検体あたり	n 検体
RNase フリー水	15.5 $\mu$ l	15.5 x (n+1)x1.1
10 $\times$ Buffer for KOD -Plus- Ver. 2	2.5 $\mu$ l	2.5 x (n+1)x1.1
2mM dNTPs	2.5 $\mu$ l	2.5 x (n+1)x1.1
25mM MgSO <sub>4</sub>	1.5 $\mu$ l	1.5 x (n+1)x1.1
2nd センスプライマー (F2) 10 $\mu$ M 10 $\mu$ M	0.75 $\mu$ l	0.75 x (n+1)x1.1
2nd アンチセンスプライマー (R1) 10 $\mu$ M	0.75 $\mu$ l	0.75 x (n+1)x1.1
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	0.5 $\mu$ l	0.5 x (n+1)x1.1
合計	24.0 $\mu$ l	24x(n+1)x1.1

24  $\mu$ l ずつ PCR チューブに分注する。  
 マスターミックスに 1st PCR 反応液 1  $\mu$ l を添加する。  
 下記反応条件にて PCR 反応を行う。

94°C	2分	} 40 サイクル
98°C	10 秒	
55°C	30 秒	
68°C	1分	
4°C	$\infty$	

反応液 10  $\mu$ l を 2 %アガロースゲル電気泳動する。  
 陽性の場合、378 bp の位置に特異バンドが検出される。

<電気泳動像の例> (7、9、11 レーンが陽性、Mはマーカー)



(4) 陽性バンドは、2nd センスプライマー (F2) と 2nd アンチセンスプライマー (R1) を用いて塩基配列を解読し、HEV の遺伝子であることを確認する。  
 得られた塩基配列を下に、遺伝子型 1~7 までの配列と比較し、遺伝子型を決定する。

	株名	Accession 番号
HEV 遺伝子型 1	Burma	M73218
HEV 遺伝子型 2	Mexico	M74506
HEV 遺伝子型 3	Meng	M74506
HEV 遺伝子型 4	T1	AJ272108
HEV 遺伝子型 5	JBOAR135-Shiz09	AB573435
HEV 遺伝子型 6	wbJOY_06	AB602441
HEV 遺伝子型 7	DcHEV-178C	KJ496143

#### <肝臓から HEV 遺伝子検出>

(1) 肝臓からの RNA 抽出には RNeasy mini kit を用いる

肝臓片 30mg をマルチビーズショッカーでホモジェナイズした後、kit の説明書通りに RNeasy mini kit により RNA 抽出を行う。

(2) 1st PCR、nested PCR、塩基配列の解読を血清の時と同様に行う。

#### <抗体検出>

E 型肝炎ウイルスの ORF2 タンパク (カプシドタンパク) を発現させた細胞溶解液を抗原とした ELISA を行う。二次抗体として protein A/G を用いる。

#### HEV ORF2 発現 plasmid の構造

哺乳動物細胞用の発現ベクターである pCAGGS の *ClaI*-*Bgl*II サイトに遺伝子型 4 の HEV である JTF-Yamagu11 株 (AB698954) の N 末端領域を欠損した ORF2 遺伝子を挿入して、発現プラスミドとした (HEVcap112-pCAGGS)。コントロールとして pCAGGS を用いた。

#### <試薬および器具>

##### 抗原作製

精製プラスミド (HEVcap112-pCAGGS と pCAGGS)

Polyethyleneimine (PEI) (Boussif et al., 1995)

90mm 細胞培養用シャーレ (住友ベークライト, Catalog#MS-13900)

細胞培養メディアウム (DMEM に 10% FCS、100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin)

Opti MEM (Thermo Fisher Scientific, Catalog#31985-070)

RIPA バッファー (1% デオキシコール酸 Na、1% Triton X-100、10mM Tris-HCl pH7.4、150mM NaCl、0.5mM EDTA)

HEK 293T 細胞 (ATCC no. CRL-3216)

CO<sub>2</sub> 培養器

##### ELISA

コーティングバッファー (0.05 M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6)

PBS-T (PBS に 0.05% Tween20)

Block Ace (雪印メグミルク)

HRP 標識 protein A/G (Thermo Fisher Scientific, Catalog#32490)

96 穴平底プレート MaxiSorp (Nalgen NUNC International, Catalog#439454)

2% シュウ酸溶液

陽性血清

陰性血清

## プレートリーダー

### <操作>

#### ELISA 抗原作製 (プラスミドのトランスフェクション)

- ① トランスフェクションの前日に HEK 293T 細胞を  $4 \times 10^5$  cells/ml の濃度で 90mm 細胞培養用シャーレに播種し、16-24 時間培養する。
- ② 16  $\mu$ g のプラスミドに Opti MEM を加えて 1ml とし、vortex した後 5min 室温インキュベート。
- ③ 40  $\mu$ l の PEI (2 mg/ml) に Opti MEM を加えて 1ml とし、vortex した後 5min 室温インキュベート。
- ④ ②と③の反応液を混ぜ、vortex した後 15min 室温インキュベートし、①の細胞に滴下する。
- ⑤ 4 時間後に、培養液を交換し 3 日間培養する。
- ⑥ 細胞を PBS で 2 回洗い、セルスクレーパーで細胞を剥がし、1.5ml チューブに集める。
- ⑦ 1500rpm、室温、5 分間遠心し、細胞沈渣を回収。
- ⑧ 細胞ペレットに RIPA バッファー 0.5ml を加え、1 時間、4°C で反応させる。
- ⑨ 15,000rpm、4°C、30min 遠心した後、上清を新しいチューブに移し、-80°C で保存する。

#### ELISA

- ① トランスフェクトした HEK 293T 細胞溶解液 (HEVcap112-pCAGGS と pCAGGS の 2 種類) をコーティングバッファーで 5  $\mu$ g/ml に希釈し、96 ウェルプレートの各ウェルに 100  $\mu$ l 加え、37°C に 2 時間置いた後、4°C に一夜置く。
- ② PBS-T で 3 回洗浄 (1 回目はリンス、2, 3 回目は 5 分間振とう) し、1% Block Ace in PBS を 200  $\mu$ l 加え、37°C に 30min 置く。
- ③ PBS-T で 3 回洗浄し、0.4% Block Ace in PBS-T で 100 倍希釈した血清を 100  $\mu$ l 加え、37°C に 30min 置く。
- ④ PBS-T で 3 回洗浄し、0.4% Block Ace in PBS-T で 20,000 倍希釈した HRP 標識 protein A/G を 100  $\mu$ l 加え、37°C に 30min 置く。
- ⑤ PBS-T で 3 回洗浄し、発色液 (Bio-Rad HRP) 100  $\mu$ l 加え、30min 室温で振とうする。
- ⑥ 反応停止液 (2% シュウ酸溶液) を 100  $\mu$ l 加え、プレートリーダーで 415nm の吸光度を測定する。
- ⑦ HEVcap112-pCAGGS 導入細胞抽出物を貼り付けたウェルの吸光度と pCAGGS 導入細胞抽出物を貼り付けたウェルの吸光度の差を求め、0.5 以上のものを陽性とする。

### <発色後の ELISA プレートの例>

