

医薬品
医薬部外品 研究報告 調査報告書
化粧品

識別番号・報告回数		報告日	第一報入手日 2008年3月13日	新医薬品等の区分	厚生労働省処理欄
一般的名称	①献血アルブミン-Wf ②献血アルブミン(5%)-Wf ③ノイアート ④ノイアート静注用 1500 単位 ⑤ハプトグロビン注・ヨシトミ ⑥コンコエイト-HT	研究報告の 公表状況	Veterinary Science in China 2007; 37 (11): 921-925	公表国 中国	
販売名 (企業名)	①②人血清アルブミン ③④乾燥濃縮人アンチトロンビンⅢ ⑤人ハプトグロビン ⑥乾燥濃縮人血液凝固第Ⅷ因子				
研究報告の概要	<p>文献中のヒト HBV の S 遺伝子の配列に従って、ブタ HBV の S 遺伝子のための 2 つのプライマーを設計し合成した。ブタの肝臓と血清のサンプルを中国の畜殺場から集めた。次いで、RT-PCR を使って S 遺伝子を増幅し配列決定を行った。その結果、ブタとヒトの HBV の S 遺伝子の配列は 98-100% の相同性を示した。HBV 陽性血漿の発光透過型電子顕微鏡による測定の結果、ウイルス粒子は直径 20 および 40nm であることが分かった。それら粒子は、ヒトの HBV 粒子と直径と形状が類似していた。陽性血清は、ELISA 法による HBV の表面抗原の存在によって確認した。ORF2/ORF3 のオーバーラップ領域から設計された 1 対の degenerated primers に対する nested RT-PCR アッセイから、HEV の遺伝子配列はブタの肝臓には存在するが、血清には存在しないことが示唆された。</p>			<p>使用上の注意記載状況・ その他参考事項等</p> <p>代表としてノイアート（献血）の記載を示す。 2. 重要な基本的注意 (1) 本剤の原材料となる献血者の血液については、HBs 抗原、抗 HCV 抗体、抗 HIV-1 抗体、抗 HIV-2 抗体、抗 HTLV-1 抗体陰性で、かつ ALT (GPT) 値でスクリーニングを実施している。更に、プールした試験血漿については、HIV-1、HBV 及び HCV について核酸増幅検査 (NAT) を実施し、適合した血漿を本剤の製造に使用しているが、当該 NAT の検出限界以下のウイルスが混入している可能性が常に存在する。本剤は、以上の検査に適合した血漿を原料として、Cohn の低温エタノール分画で得た画分から人アンチトロンビン III を濃縮・精製した製剤であり、ウイルス不活化・除去を目的として、製造工程において 60℃、10 時間の液状加熱処理及びウイルス除去膜によるろ過処理を施しているが、投与に際しては、次の点に十分注意すること。</p>	
	報告企業の意見			今後の対応	
<p>中国の畜殺場から集めたブタの肝臓および血清からブタ B 型肝炎ウイルス、ブタ肝臓から E 型肝炎ウイルスを検出したとの報告である。 万一、ヘパリンの原料であるブタ小腸粘膜に HBV または HEV が混入したとしてもそれぞれ PRV および PPV をモデルウイルスとしたウイルスバリデーション試験成績から、ヘパリンの製造工程において十分に不活化・除去されると考えている。</p>			<p>本報告は本剤の安全性に影響を与えないと考えるので、特段の措置はとらない。</p>		

45



屠宰猪肝和血清中乙型肝炎病毒及戊型肝炎病毒的检测

李文贵^{1,3}, 余锐萍¹, 韦海涛², 赵景义², 刘利强¹, 李秀敏², 王英华¹, 王德成¹

(1. 中国农业大学 动物医学院, 北京 100094; 2. 北京市畜牧兽医总站, 北京 100107;

3. 云南农业大学 动物科学学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 应用 1 对乙型肝炎病毒(HBV)S 基因保守区的引物, 采用 PCR 方法从屠宰猪肝、血清中检测到了 HBV, 序列分析表明, 扩增片段与已发表的 HBV S 基因的同源性高达 98%~100%。电镜负染色样品观察结果表明, 在 HBV 表面抗原 ELISA 检测强阳性反应的血清样品中存在有形态、大小与人 HBV Dane 颗粒和小球状颗粒相似的病毒粒子。针对戊型肝炎病毒(HEV) ORF2/ORF3 重叠区设计了简并引物, 采用巢式 RT-PCR 对屠宰猪肝和血清样品进行了检测。结果表明, 部分屠宰猪肝中存在 HEV。

关键词: 猪; 乙型肝炎病毒; 戊型肝炎病毒; 电镜观察

Detection of swine hepatitis B virus and E viruses in the liver and serum in pigs in China

LI Wen-gui^{1,3}, SHE Rui-ping¹, WEI Hai-tao², ZHAO Jing-yi², LIU Li-qiang¹,

LI Xiu-min², WANG Ying-hua¹, WANG De-cheng¹

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. Institute of Beijing Animal Husbandry and Veterinary, Beijing 100107, China; 3. College of Animal Science and Technology,

Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: The study reported the presence of swine hepatitis B(HBV) and E(HEV) viruses in the liver and serum in pigs in China. Two primers for S gene of swine HBV were designed and synthesized according to sequences of the S genes of human HBV in the literature. Swine liver and serum samples were collected from a slaughter house. Swine S genes were amplified with RT-PCR and sequenced. Results showed that sequences of S genes of swine and human HBV viruses shared 98%—100% homology. Emission transmission electron microscopy examination of HBV-positive serum revealed presence of virus particles 40—20 nm in diameter. These particles were similar to human HBV particles in terms of both diameters and shapes. A positive serum was defined by the presence of the HBV surface antigen using the ELISA method. Responses in a nested RT-PCR assay to a pair of degenerated primers designed from ORF2/ORF3 overlapping region indicated presence of gene sequence of HEV in the liver, but not serum, in some pigs.

Key words: swine; hepatitis B virus; hepatitis E virus; electron microscopy

嗜肝 DNA 病毒科(Hepadnaviridae)有正嗜肝 DNA 病毒属(Orthohepadnavirus)及禽类嗜肝 DNA 病毒属(Avihepadnavirus) 2 个属。正嗜肝 DNA 病毒属包括人乙型肝炎病毒(HBV)、灵长类嗜肝病毒和啮齿动物嗜肝病毒, 禽类嗜肝 DNA 病

毒属包括鸭乙型肝炎病毒、苍鹭乙型肝炎病毒、雪雁乙型肝炎病毒等。这些病毒的共同特点为: 基因组长 3.0~3.3 kb, 具有部分双链的环状 DNA, 外有包膜, 核心内有基因组及病毒所编码的特异 DNA 聚合酶。除病毒颗粒外, 产生大量的病毒包膜脂蛋白

收稿日期: 2007-06-11; 修回日期: 2007-10-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771588)

作者简介: 李文贵(1973-), 男, 云南昆明人, 讲师, 博士生。余锐萍为通讯作者, E-mail: sheruiping@126.com

颗粒不仅有很窄的宿主谱,一般可致持续病毒感染,而具有较明确的嗜肝性^[1]。资料表明,畜禽中也存在一个嗜肝病毒群。自 20 世纪 80 年代以来,国内有猪、鸡、牛、羊、犬等动物检出乙肝病毒表面抗原(HBsAg)的报道屡见不鲜,并有分离到类乙肝病毒的手稿^[2-9]。2006 年余锐萍等^[10-11]应用免疫组织化学方法对北京、河南等地肉联厂屠宰猪肝的人乙型肝炎病毒抗原进行检测,结果发现人乙型肝炎病毒抗原检出率高达 73%~100%。

戊型肝炎(Hepatitis E, HE)是由戊型肝炎病毒(Hepatitis E virus, HEV)感染引起的经肠道传播的急性病毒性肝炎,主要通过粪口传播。我国是 HE 高发区,被列为戊肝发病和死亡所致经济负担最严重的国家之一。有学者认为,猪是 HEV 主要宿主,日本已有因食用 HEV 污染的猪肝导致人感染的报道。对戊肝非流行区从事与猪相关职业人群和对照人群的研究表明,从事与猪相关职业者可增加 HEV 感染的风险。最近又发现了一些猪 HEV 感染人的证据^[12-13]。总之,HB 和 HE 严重地威胁人类的健康,而人类病毒性肝炎的发病率还在不断上升。动物,尤其是与人类关系十分密切的猪体内的 HBV 和 HEV 带毒情况如何,它们与人的 HBV 和 HEV 的同源性怎样,都还不十分清楚。本试验应用 PCR 技术,在原有研究的基础上,进一步对屠宰猪血清和肝的 HBV S 基因、HEV RNA 进行了检测,并应用免疫电镜负染色技术观察了屠宰猪血清中的 HBV。

1 材料与与方法

1.1 样品

屠宰猪肝、血液采自北京市某肉联厂。

1.2 酶与试剂

Trizol 购自北京普博欣生物科技公司;Taq 酶、dNTP 购自北京博大泰克公司;Oligo(dT)、引物购自上海生工生物工程技术有限公司;MMLV Reverse Ace 和 RNA 酶抑制剂为 TOYOBO 公司产品;NCR quick 柱式 DNA 凝胶回收试剂盒购自新长江生物科技有限公司;各种限制性内切酶、pMD18-T 载体为大连宝生物工程有限公司产品。

1.3 SHBV 的 PCR 检测

1.3.1 DNA 提取 血清中 DNA 的提取:取猪血清 100 μ L 加入 300 μ L TES 裂解液(10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 5 mmol/L EDTA, 5 g/L SDS, 200 mg/L 蛋白酶 K), 55 $^{\circ}$ C 消化 5 h, 用酚-氯仿-异戊醇抽提 2~3 次, 取上清加 1/10 体积 3 mol/L

NaAc, 再加入 2.5 倍体积无水乙醇进行沉淀, 用 700 mL/L 乙醇洗沉淀 1 次, 干燥后溶于 20 μ L 灭菌水中备用。

肝中 DNA 的提取:取新鲜肝组织标本称重约 1~2 g, 加液氮研成粉末, 取约 20 mg 加入 DNA 提取液(0.5 mmol/L Tris-HCl, 0.02 mol/L EDTA, 10 g/L SDS, 0.01 mol/L NaCl, 500 μ g/mL 蛋白酶 K), 42~48 $^{\circ}$ C 过夜, 用酚-氯仿-异戊醇法提取 DNA。
1.3.2 PCR 扩增 采用针对 HBV S 基因保守区设计的引物(见表 1)进行 PCR 扩增。PCR 体系: 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L, 引物 HBV-FP、HBV-RP 各 0.5 μ L, 200 μ mol/L dNTPs 0.5 μ L, Taq 酶 0.5 μ L(2.5 U), 加灭菌水补足至 25 μ L。扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。于 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳, 用凝胶成像仪观察、照相。

表 1 用于检测猪体内 HBV 和 HEV 的引物

Table 1 Primers used in detection of swine hepatitis B virus and hepatitis E virus

编号 No.	核苷酸序列 Nucleotide sequence	产物大小/bp Amplicon size
HBV-FP	5'-GATGTGTCTGCGCGTTTAA-3'	281
HBV-RP	5'-CTGAGGCCACTCCCATAGG-3'	
HE164F1	5'-GCRGTGGTTTCTGGGGTGAC-3'	164
HE164R1	5'-CTGGMYTGGTDCDCGCCAAG-3'	
HE137F2	5'-GYTGATTCTCAGCCCTTCGC-3'	137
HE137R2	5'-GMYTGGTDCDCGCCAAGHGGA-3'	

1.3.3 PCR 产物的克隆和测序 采用 NCR quick 柱式 DNA 凝胶回收试剂盒回收扩增片段, 将其克隆至 pMD18-T 载体, 鉴定后送北京奥科生物公司测序, 用 DNAMAN(version 5.2.2, Lynnon biosoft) 分析测序结果。2 份送测片段编号分别为 SHBV_bj1、SHBV_bj2。

1.4 免疫电镜负染色样品的制备

取 HBV 表面抗原 ELISA 检测强阳性和 HBV PCR 检测阳性反应的血清样品, 4 000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 加入适度稀释的抗 HBV 单克隆抗体, 4 $^{\circ}$ C 过夜; 低温 15 000 r/min 离心 1 h, 弃上清液; 用少量 PBS 稀释沉淀; 吸取少量悬液于铜网上, 用 10 g/L 醋酸铀负染后, 电镜观察。

1.5 HEV RNA 的巢式 PCR 检测

按 Trizol 法提取总 RNA。用 Inoue 等^[14]设计的巢式 PCR 引物(见表 1)进行 RT-PCR。逆转录体系: 5 \times 逆转录缓冲液 6 μ L, 20 mmol/L Oligo(dT) 0.5 μ L, 10 mmol/L dNTP 2 μ L, MMLV(100

U/ μ L) 1 μ L, DEPC 水 6 μ L, RNA 酶抑制剂 1 μ L; RNA 经 70 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 迅速置于冰上 10 min, 取 14 μ L 作为模板。混匀后 42 $^{\circ}$ C 1 h, 95 $^{\circ}$ C 5 min, 取 4 μ L 产物作为模板进行 PCR。PCR 体系: 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L, 20 mmol/L 引物 HE164F1、HE164R1 各 0.5 μ L, 200 μ mol/L dNTP 0.5 μ L, Taq 酶 0.5 μ L (2.5 U), 加灭菌水补足至 25 μ L。按文献[14]进行扩增, 第 1 轮扩增结束后, 取 2 μ L 作为模板进行第 2 轮扩增。最后于 20 g/L 琼脂糖凝胶中电泳, 用凝胶成像仪观察、照相。

2 结果

2.1 SHBV 检测

2.1.1 PCR 检测 从屠宰猪肝、血清中提取 DNA, 应用 HBV S 基因区引物进行 PCR 扩增, 获得的产物大小约为 300 bp, 与预期的片段大小相符 (见图 1)。

2.1.2 PCR 产物的测序结果 对 SHBV_bj1、SHBV_bj2 片段进行测序, 结果发现, 所扩增区域与 GenBank 中 HBV 毒株的同源性达 100%。两片段序列仅在第 519、520 位碱基存在差异 (见图 2)。

HBV (x04615)	GATGTGTCTGCGGCGTTTATCATATTCCTCTTCATCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTGGTTCTTCTGGACTACCAAGGTATGTGCCCCGTTTGT
SHBV_bj1
SHBV_bj2
HBV (x04615)	CCTCTACTCCAGGAACATCAACTACCAGCAGGGACCATGCAGAACCTGCACGATTCTGCTCAAGGAACCTCTATGTTCCCTCTTGTGCTGTACAA
SHBV_bj1AG.....
SHBV_bj2GA.....
HBV (x04615)	AACCTTCGGACGGAAACTGCACTTGATTTCCCATCCCATCATCTGGGCTTTCGCAAGATTCCATGGGAGTGGGCCTCAG
SHBV_bj1
SHBV_bj2

图 2 扩增片段与 HBV X04615 株序列的同源性比较

Fig. 2 Homologous comparison of the amplified S gene of HBV with the published S gene of HBV X04615 strain

2.2 HEV 的 RT-PCR 扩增

经 2 轮扩增后, 从部分猪肝组织中扩增到 1 条约 137 bp 的产物带, 与预期片段大小相符 (见图 4)。

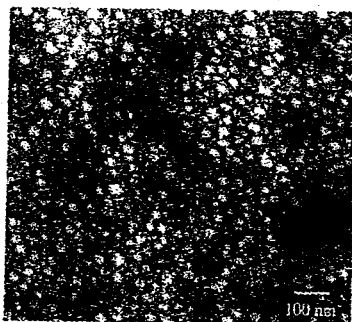


图 3 电镜下观察到的猪乙肝病毒颗粒

Fig. 3 Porcine HBV particles observed by TEM

2.1.3 电镜观察 在血清负染色样品中, 见到大量的密集排列的病毒样粒子, 病毒粒子表面可见明显的表面蛋白颗粒, 但未观察到管状颗粒。根据大小不同, 这些病毒样粒子主要可分为 2 种类型, 一种直径为 40 nm 左右 (图 3 细箭头所示), 与人类 HBV 的 Dane 颗粒相类似; 另一种直径为 20 nm 左右 (图 3 粗箭头所示), 类似于人类 HBV 的小球状粒子。

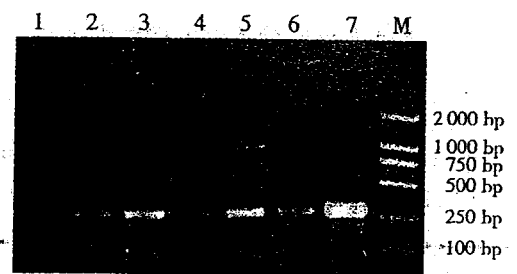


图 1 猪血清和肝中 HBV S 基因 PCR 产物的电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis of the PCR-amplified S gene of HBV from porcine livers and sera

M: DNA 分子质量标准; 1: 阴性对照; 2-4: 血清样品; 5-7: 肝样品
M: DL2000 DNA Marker; 1: Negative control; 2-4: Serum samples; 5-7: Liver samples

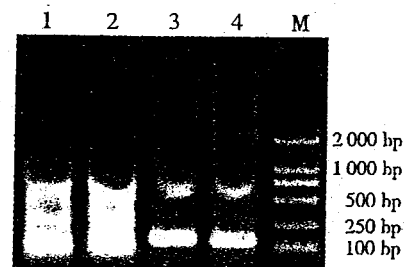


图 4 屠宰猪肝 HEV 的巢式 RT-PCR 电泳结果

Fig. 4 Electrophoresis of the nested RT-PCR-amplified fragment of HEV from porcine livers

M: DNA 分子质量标准; 1, 2: 第 1 轮扩增结果; 3, 4: 第 2 轮扩增结果
M: DL2000 DNA Marker; 1, 2: Products of the first PCR; 3, 4: Products of the second PCR

3 讨论

3.1 关于猪乙肝病毒

关于动物乙肝病毒的检测,国内已有一些报道,但有关屠宰猪体内乙肝病毒的检测鲜有报道^[15]。本试验在过去观察研究的基础上,应用 PCR 技术和透射电镜技术对屠宰猪血清和肝中 HBV 抗原进行了检测。电镜负染色样品观察结果表明,在 HBV 表面抗原 ELISA 检测强阳性反应的血清样品中存在有形态、大小与人 HBV Dnae 颗粒和小球状颗粒相似的病毒粒子。在人 HBV 携带者血清中一般以小球状颗粒为主,Dnae 颗粒较少,从本试验观察结果来看,在电镜观察的负染色样品中 Dnae 颗粒并不少(见图 3)。

目前,国外尚未见畜禽 HBV 的相关报道,国内现有的研究多采用 HBV 检测试剂进行血清标志物和相关抗原的检测,也有人对其形态和 S 区基因等进行了研究,但对于动物的 HBV 分子病毒学及其致病性、与人 HBV 之间的关系等的研究还很少。本试验应用 HBV S 区引物从屠宰猪血清、肝中检测出了预期片段,序列分析结果表明,与 HBV 同源性高达 98%~100%。虽然本试验所测片段仅占 HBV 全基因组的 9%左右,但这至少在一定程度上说明了猪 HBV 与人 HBV 有较高的同源性。

一般认为,畜禽乙肝病毒对人没有致病性,但对动物是否有致病性,经肉类食品进入人体后是否可以引起相应的免疫应答,现在尚未可知。我国约有 1.2 亿人为乙肝病毒携带者,这么高的感染率是否与畜禽乙肝病毒有某种联系,这个问题值得进一步研究。

由于 HBV 至今无法体外培养,且宿主范围非常狭窄,尚没有合适的小型动物作为动物模型供病原、发病机理、疫苗和治疗性药物的研究,加之道德等原因,非人灵长类动物模型的使用受到了限制^[1]。畜禽乙肝病毒的发现不仅将为嗜肝病毒科增加新的成员,也必将为嗜肝病毒的起源、进化、持续性感染、发病机理、慢性病毒性肝细胞癌起源等方面的研究提供研究对象。

3.2 关于戊肝病毒

很多研究结果表明,HE 是一种人畜共患病,经口感染,猪是重要的储存宿主。日本、印度等国家已发生多起因食用未煮熟的猪肝和猪肉而引起人感染 HEV 的报道,日本、美国的研究表明,与猪接触的职业人群的血清抗 HEV 抗体高于非职业人群,在

猪场周围的污水中能检测到 HEV 的存在^[16-18]。曹海俊等^[19]对浙江地区从事生猪屠宰和销售的职业人群的 HEV 感染情况进行了调查,结果显示,浙江省从事生猪屠宰和销售人群的阳性率为 77.25%,远远高于 1992 年全国 13 个省市 HE 血清流行病学调查的 1~59 岁人口 HEV 阳性率(17.2%)。还有报道表明,我国 4 月龄以上的猪血清抗体阳性率平均为 40%,而猪饲养员的血清抗体阳性率高达 100%;泰国 3 月龄以上的猪阳性率为 9%~20%,其饲养员的阳性率为 71%。上述研究结果说明,人的 HE 阳性检出率与从事和猪接触的相关职业有一定的关系,也说明 HE 是一种人兽互传病。

Meng^[20]曾在不同月龄的猪血清中检测出了 HEV RNA,国内外还未见有屠宰猪肝 HEV RNA 的检出报道。本试验应用 RT-PCR 方法从屠宰猪肝中扩增出了 HEV RNA,说明屠宰猪肝中也存在 HEV RNA。本实验室过去的研究结果表明,在屠宰猪肝中 HEV 相关抗原的阳性检出率高达 95%~100%,这是很值得注意的问题,因为从公共卫生的角度来看,屠宰猪已经进入到了猪肉品生产链的末端。虽然还没有从猪胴体肉中检测到 HEV 的报道,但肝中 HEV 相关抗原的阳性检出率如此之高,无疑会对人类健康构成潜在的威胁。因此,笔者建议在屠宰猪检疫中将 HEV 列入检测项目。

参考文献 (References)

- [1] 陈欣如,燕顺生,张勇. 野生动物嗜肝病毒的研究进展[J]. 地方病通报, 2006, 21(1): 89-94.
CHEN Xin-ru, YAN Shun-sheng, ZHANG Yong. Advance in hepadnaviruses in wild life [J]. *Endemic Diseases Bulletin*, 2006, 21(1): 89-94. (in Chinese)
- [2] 徐宜为,初秀. 动物的类乙型肝炎研究进展[J]. 中国兽医科技, 1993, 23(7): 16-20.
XU Yi-wei, CHU Xiu. Study progress on HBV-like virus in animals [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 1993, 23(7): 16-20. (in Chinese)
- [3] 沈柏青,任政华. 猪源乙型肝炎病毒样病毒的提纯与鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 1993(7): 7-9.
SHEN Bai-qing, REN Zheng-hua. Purification and identification of pig HBV-like virus [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 1993(7): 7-9. (in Chinese)
- [4] 律祥君,侯安祖. 黄牛感染人乙型肝炎病毒的研究[J]. 中国兽医科技, 1992, 22(4): 3-4.
LÜ Xiang-jun, HOU An-zu. Studies on human hepatitis B virus infection in farm cattle [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 1992, 22(4): 3-4. (in Chinese)
- [5] 李决,李红,张鹏举,等. PCR 和 ELISA 法检测畜禽类乙型肝炎病毒的研究[J]. 郑州牧专学报, 1997, 17(1): 21-23.

- LI Jue, LI Hong, ZHANG Peng-ju, *et al.* Detection of hepatitis B like virus in chicken by PCR and ELISA[J]. *Journal of Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering*, 1997, 17(1):21-23. (in Chinese)
- [6] 杜念兴, 黄吉凤. 从猪和牛检出类乙肝病毒抗原和抗体[J]. *畜牧与兽医*, 2002, 34(1):3-5.
DU Nian-xing, HUANG Ji-feng. Detection of hepatitis type B virus-like antigen and antibody from pigs and cattle[J]. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2002, 34(1):3-5. (in Chinese)
- [7] 丁壮, 金宁一, 陈创夫, 等. 羊源乙肝病毒与人乙肝病毒 S 基因序列同源性研究[J]. *动物医学进展*, 2001, 22(4):54-58.
DING Zhuang, JIN Ning-yi, CHEN Chuang-fu, *et al.* Study on S gene sequence homologous analysis between the hepatitis B virus from sheep and human[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2001, 22(4):54-58. (in Chinese)
- [8] 丁壮, 金宁一, 陈振文, 等. 鸡源类人乙肝病毒与人乙肝病毒 S 基因序列分析[J]. *中国兽医学报*, 1999, 19(1):18-21.
DING Zhuang, JIN Ning-yi, CHEN Zhen-wen, *et al.* S gene sequence comparison between the HBV like virus from chicken and human HBV[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 1999, 19(1):18-21. (in Chinese)
- [9] 丁壮, 王承宇, 金宁一, 等. 犬乙肝病毒 S 基因遗传变异研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2003, 25(1):24-28.
DING Zhuang, WANG Cheng-yu, JIN Ning-yi, *et al.* Hereditary variation in S gene sequence of hepatitis B virus from canine[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2003, 25(1):24-28. (in Chinese)
- [10] 许江城, 余锐萍, 林剑波, 等. 应用免疫组织化学方法检测屠宰猪肝中的人乙型肝炎病毒抗原[J]. *中国兽医杂志*, 2004, 40(4):46-47.
XU Jiang-cheng, SHE Rui-ping, LIN Jian-bo, *et al.* Immunohistochemistry detection of human hepatitis B virus antigen in slaughtered swine livers[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2004, 40(4):46-47. (in Chinese)
- [11] 余锐萍, 李文贵, 王英华, 等. 病毒性肝炎:值得警惕的重要人兽互传病[J]. *科技导报*, 2007, 25(4):44-52.
SHE Rui-ping, LI Wen-gui, WANG Ying-hua, *et al.* Viral hepatitis: a dangerous zoonosis[J]. *Science and Technology Review*, 2007, 25(4):44-52. (in Chinese)
- [12] RENOUC J, CADRANEL J F, BOURLIERE M, *et al.* Possible zoonotic transmission of hepatitis E from pet pig to its owner[J]. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13(7):1094-1096.
- [13] COLSON P, KABA M, BERNIT E, *et al.* Hepatitis E associated with surgical training on pigs[J]. *The Lancet*, 2007, 370(9591):935.
- [14] INOUE J, TAKAHASHI M, YAZAKI Y, *et al.* Development and validation of an improved RT-PCR assay with nested universal primers for detection of hepatitis E virus strains with significant sequence divergence[J]. *J Virol Methods*, 2006, 137(2):325-333.
- [15] 余锐萍, 郑志伟, 江维文, 等. 屠宰猪血清及肝脏中人乙型肝炎表面抗原的检测[J]. *中国畜禽传染病*, 1998, 20(增刊):160-161.
SHE Rui-ping, ZHENG Zhi-wei, JIANG Wei-wen, *et al.* Detection of human hepatitis B surface antigen in serum and liver of slaughtered pigs[J]. *Chinese Journal of Animal and Poultry Infectious Diseases*, 1998, 20(Suppl):160-161. (in Chinese)
- [16] DROBENIUC J, FAVOROV M O, SHAPIRO C N, *et al.* Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine[J]. *J Infect Dis*, 2001, 184(12):1594-1597.
- [17] MENG X J, WISEMAN B, ELVINGER F, *et al.* Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries[J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(1):117-122.
- [18] WU J, CHEN C, CHIANG T, *et al.* Potential subclinical spread of hepatitis E virus among swine, swine handlers and different countries: a longitudinal study[J]. *J Hepatol*, 2001, 34(1):190.
- [19] 曹海俊, 王法弟, 高眉扬, 等. 生猪屠宰销售职业人群戊型肝炎病毒感染的危险因素研究[J]. *中国人兽共患病杂志*, 2004, 20(7):607-609.
CAO Hai-jun, WANG Fa-di, GAO Mei-yang, *et al.* Risk of contract with hepatitis E virus in occupational populations[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2004, 20(7):607-609. (in Chinese)
- [20] MENG X J. Hepatitis E virus: cross-species infection and zoonotic risk[J]. *Clin Microbiol New*, 2005, 27(6):43-48.

(责任编辑 胡弘博)

食肉処理したブタの肝臓および血清中における B 型肝炎ウイルスおよび E 型肝炎ウイルス検査

ヘパドナウイルス科 (Hepadnaviridae) はオルトヘパドナウイルス属 (Orthohepadnavirus) とトリヘパドナウイルス属 (Avihepadnavirus) の 2 属に分類される。オルトヘパドナウイルス属にはヒト B 型肝炎ウイルス (HBV)、霊長類ヘパドナウイルス、げっ歯類ヘパドナウイルスがあり、トリヘパドナウイルスにはアヒル B 型肝炎ウイルス、アオサギ B 型肝炎ウイルス、ハクガン B 型肝炎ウイルスなどがある。これらのウイルスは、ゲノム全長が 3.0~3.3kb であること、一部に環状二重鎖 DNA 構造をとること、外側にエンベロープを有すること、またコア内部にゲノムおよびウイルスにコードされた特殊な DNA ポリメラーゼを有することを共通の特徴とする。ウイルス粒子以外にも大量のウイルス外皮タンパク粒子を生成し、宿主域は極めて狭く、通常、ウイルスの持続感染を引き起こし明らかな肝向性を有する⁽¹⁾。データによれば禽獣においても肝向性ウイルス群の存在が確認されている。1980 年代以降、中国においてブタ、ニワトリ、ウシ、ヒツジ、イヌなどの動物の B 型肝炎ウイルス表面抗原 (HBsAg) 検出に関する報告が多くなり、各種 B 型肝炎ウイルスの分離が報告されるようになった^(2~9)。2006 年、余鋭萍^(10~11)らは免疫組織化学法を応用し、北京、河南などの食肉生産連合において豚の食肉処理およびその肝臓の解体に従事する人員の B 型肝炎ウイルス抗原検査を実施した結果、B 型肝炎ウイルス抗原の検出率は実に 73~100% という高率に達することが明らかになった。

E 型肝炎 (Hepatitis E, HE) は E 型肝炎ウイルス (Hepatitis E virus, HEV) 感染により引き起こされ、腸を経由して伝播される急性ウイルス性肝炎であり、主要な伝播経路は排泄物を介した経口感染である。中国は HE 高発症地域であり、E 型肝炎の発症および E 型肝炎での死亡により引き起こされる経済的負担が最も深刻な国の 1 つに数えられている。ブタが HEV の主要な宿主であると提唱する学者も存在し、日本においては HEV に汚染された食用ブタの肝臓からヒトへの感染が報告されている。E 型肝炎非流行地域におけるブタに関連する職業の従事者群と対照群の研究では、ブタに関連する職業の従事者に HEV 感染リスクの上昇が認められた。さらに、近年ではブタ HEV のヒトへの感染を示す複数の証拠が発見されている^(12, 13)。つまり、HB および HE はヒトの健康に深刻な脅威を与える疾患であり、ヒトのウイルス性肝炎の発症率は今なお上昇し続けている。動物、とりわけヒトとの関係が緊密なブタ体内の HBV および HEV 保有状況、ブタ HBV、HEV とヒト HBV、HEV の相同性などについては未だ明らかにされていない部分が多い。本試験では既存の研究を基礎とし、PCR 技術を応用し、食肉処理したブタの血清および肝臓の HBV S 遺伝子、HEV RNA に対しさらなる検査を行うとともに、免疫電子顕微鏡を用いたネガティブ染色法にて食肉処理したブタ血清中の HBV の観察を行った。

1 材料および方法

1.1 サンプル

食肉処理したブタの肝臓および血液は、北京の某食肉生産連合にて採集を行った。

1.2 酵素および試薬

Trizol は北京普博欣生物科学技術公司より購入した。*Taq* 酵素、dNTP は北京博大泰克公司より購入した。Oligo(dT)、プライマーは上海生工生物工程科学技術サービス有限公司より購入した。MMLV Reverta Ace および RNA 酵素阻害剤は TOYOBO 社(東洋紡)の製品とした。NCR quick カラム式 DNA ゲル回収試薬キットは新長江生物科技有限公司より購入した。各種制限酵素、pMD18-T キャリヤーは大連宝生物工程有限公司の製品とした。

1.3 SHBV の PCR 検査

1.3.1 DNA 抽出 血清中の DNA 抽出：ブタの血液 100 μ L を採取し、TES 分解液 300 μ L(10mmol/L Tris-HCl、pH8.0、5mmol/L EDTA、SDS 5g/L、プロテイナーゼ K 200mg/L)中に加え、55 $^{\circ}$ C 下にて 5 時間消化を行い、フェノール-クロロフォルム-イソアミルアルコールを用いて 2~3 回抽出を行った。その後、上澄みを採取し 1/10 体積の 3mol/L NaAc および 2.5 倍体積の無水エチルアルコールを順次加えて沈殿を行い、エチルアルコール 700mL/L を用いて沈殿を 1 回洗浄し、乾燥後に滅菌水 20 μ L 中に溶解し保存した。

肝臓中の DNA 抽出：新鮮な肝臓組織標本約 1~2g を秤量し、液体窒素を加えて粉末状にしたものを、約 20mg 採取して DNA 抽出液(0.5mmol/L Tris-HCl、0.02mol/L EDTA、SDS 10g/L、0.01mol/L NaCl、プロテイナーゼ K 500 μ g/mL)中に加え、42~48 $^{\circ}$ C 下にて一晩静置した。その後、フェノール-クロロフォルム-イソアミルアルコールを用いて DNA の抽出を行った。

1.3.2 PCR による増幅 HBV S 遺伝子保存領域をターゲットとして設計されたプライマー(表 1 を参照のこと)を用いて PCR による増幅を行った。PCR システム：10 \times PCR 緩衝液 2.5 μ L、プライマー-HBV-FP、HBV-RP 各 0.5 μ L、200 μ mol/L dNTPs 0.5 μ L、*Taq* 酵素 0.5 μ L(2.5U)に滅菌水を加え 25 μ L とした。増幅条件：94 $^{\circ}$ C 下にて 4 分間予備変性を行った後、94 $^{\circ}$ C 下にて 30 秒、58 $^{\circ}$ C 下にて 30 秒、72 $^{\circ}$ C 下にて 40 秒の変性を 30 サイクル行った。さらに 72 $^{\circ}$ C 下にて 5 分間伸張を行い、アガロースゲル 10g/L 中にて電気泳動を行い、ゲルイメージングシステムを用いて観察および画像の記録を行った。

1.3.3 PCR 生成物のクローンおよびシークエンシング NCR quick カラム式 DNA ゲル回収試薬キットを用いて回収した増幅断片のクローンを pMD 18-T キャリヤーに吸着させ、評定を行った後、北京奥科生物公司に送付してシークエンシングを行い、DNAMAN(version5.2.2、Lynnon biosoft)を用いてシークエンシング結果に対する分析を行った。増幅断片 2 サンプルの番号はそれぞれ SHBV_bj1、SHBV_bj2 とした。

1.4 免疫電子顕微鏡を用いたネガティブ染色サンプルの調製

ELISA 法にて HBV の表現抗原に強陽性を示す血清サンプルおよび HBV PCR 検査にて陽性反応を示す血清サンプルを採取し、4000r/分にて 30 分間遠心分離を行い、上

澄みを採取した後、適切に希釈を行った抗 HBV 単クローン抗体中に加え、4℃下にて一晩静置した。その後、低温下において 15000r/min にて 1 時間遠心分離を行い、上澄みを廃棄し、少量の PBS を用いて沈殿の希釈を行った。少量の懸濁液を銅メッシュに吸着させ、ウラニルアセテート 10g/L を用いてネガティブ染色を行った後、電子顕微鏡による観察を行った。

1.5 ネステッド PCR 法を用いた HEV RNA の検出

Trizol 法に照らして総 RNA を抽出した。Inoue ら⁽¹¹⁾の設計によるネステッド PCR プライマー(表 1 を参照のこと)を用いて RT-PCR を行った。逆転写システム: 5×逆転写緩衝液 6 μ L、20mmol/L Oligo(dT)0.5 μ L、10mmol/L dNTP 2 μ L、MMLV(100U/ μ L)1 μ L、DEPC 水 6 μ L、RNA 酵素阻害剤 1 μ L とした。70℃下にて 5 分間変性を行った RNA を採取し、速やかに氷上に 10 分間静置した後、採取した生成物 14 μ L をテンプレートとした。さらに 42℃下にて 1 時間、95℃下にて 5 分間混合し、得られた生成物 4 μ L をテンプレートとして PCR を行った。PCR システム: 10×PCR 緩衝液 2.5 μ L、20mmol/L プライマー HE164F1、HE164R1 各 0.5 μ L、200 μ mol/L dNTP 0.5 μ L、Taq 酵素 0.5 μ L(2.5U) に滅菌水を加え、25 μ L とした。文献[14]に照らして増幅を行い、第 1 サイクルの増幅終了後に 2 μ L を採取し、これを第 2 サイクルの増幅におけるテンプレートとした。最後にアガロースゲル 20g/L 中にて電気泳動を行い、ゲルイメージングシステムを用いて観察および画像の記録を行った。

2 結果

2.1. SHBV 検査

2.1.1 PCR 検査 食肉処理したブタの肝臓、血清中より DNA を抽出し、HBV S 遺伝子領域のプライマーを用いて PCR による増幅を行った結果、獲得された生成物のサイズは 300bp であり、予測断片のサイズと近似するものであった(図 1 を参照のこと)。

2.1.2 PCR 生成物のシーケンシング結果 SHBV_bj1、SHBV_bj2 の各断片に対するシーケンシングを行った結果、すべての増幅領域および GenBank 中における HBV ウイルス株の相同性は 100%に達することが明らかになった。両断片の序列はわずかに 519、520 位の塩基に差異が認められるのみであった(図 2 を参照のこと)。

2.1.3 電子顕微鏡による観察 血清のネガティブ染色サンプルに大量かつ密集した配列のウイルス様粒子が観察され、ウイルス粒子表面には鮮明な表面タンパク粒子が認められたものの、管状粒子は認められなかった。これらウイルスはそのサイズに基づき 2 種類に分けることができ、うち一方は、直径が約 40nm(図 3 中、細矢印にて表示)であり、ヒト HBV の Dane 粒子と類似する。もう一方は直径約 20nm(図 3 中、太矢印にて表示)であり、ヒト HBV の小球状粒子と類似する。

2.2 HEV の RT-PCR による増幅

2 サイクルの増幅を行い、ブタの一部肝臓組織中より増幅された約 137bp の帯状生成物のサイズは予測断片サイズと一致するものであった(図 4 を参照のこと)。

3 考察

3.1 プタの B 型肝炎ウイルスについて

動物の B 型肝炎ウイルスの検出については中国においても複数の報告がされているが、食肉処理したブタ体内の B 型肝炎ウイルスの検出に関する報告は稀有なケースである⁽¹⁵⁾。本試験では既存の研究を基礎としつつ、PCR 技術および透過電子顕微鏡技術を応用し、食肉処理したブタの血清および肝臓中の HBV 抗原に対する検査を行った。電子顕微鏡を用いてネガティブ染色サンプルを観察した結果、ELISA 法にて HBV の表現抗原に強陽性を示す血清サンプルに、ヒト HBV の Dane 粒子および小球状粒子に形態およびサイズの類似するウイルス粒子の存在が認められた。ヒト HBV キャリアの血清中においては、通常、小球状粒子が多数を占め、Dane 粒子は少数であるが、本試験では電子顕微鏡による観察を行ったネガティブ染色サンプル中に数多くの Dane 粒子が存在する結果となった(図 3 を参照のこと)。

現在、海外において禽獣の HBV に関する報告はなく、中国においては HBV 検査試薬を用いた血清マーカーおよび関連抗原の検査、ならびにウイルスの形態および遺伝子の S 領域などに対する研究に従事する研究者は存在するものの、動物の HBV に対する分子ウイルス学およびその病原性に関する研究、ヒトの HBV との関連性に関する研究は非常に少ない。本試験において HBV S 領域のプライマーを用いてブタの血清および肝臓中より予測断片を検出し、シーケンシング分析を行った結果、HBV の相同性は実に 98~100%に達することが明らかになった。本試験において検出を行った断片の占める割合は HBV 全遺伝子の約 9%に過ぎないが、少なくとも一定レベルにおいてブタ HBV とヒト HBV が高い相同性を有することを証明した。

一般的には、禽獣の B 型肝炎ウイルスはヒトに対する病原性を持たないと認識されているが、動物に対する病原性の有無、ならびに食肉および食肉加工製品を介して人体に摂取された後にこれに対する免疫反応を引き起こす可能性の有無については、現在もなお不明である。中国には 1.2 億人の B 型肝炎キャリアが存在すると見られ、この高い感染率に禽獣の B 型肝炎ウイルスが何らかの関連を持つか否かについては、今後さらに研究を進める価値がある。

HBV は現在においても体外での培養が不可能であり、また宿主領域が極めて狭いことから、適切な小型動物を動物モデルとした病原、発症機序、ワクチンおよび治療薬に対する研究はなく、さらに倫理的理由からヒトを除く霊長類動物モデルの使用は制限を受ける⁽¹⁾。禽獣の B 型肝炎の発見は、肝向性ウイルス学に新たな研究対象を追加するのみならず、肝向性ウイルスの起源、進化、持続感染、発症機序、慢性ウイルス性肝細胞ガンの起源など各方面の研究に新たな研究対象を提供する。

3.2 E 型肝炎について

多数の研究を通じ、HE は人畜共通感染症であること、経口感染すること、またブタが重要なウイルスキャリアであることが明らかになった。日本、インドなどでは加

熱不十分な食用ブタレバーおよびブタ肉の摂取による HEV 感染が報告されている。日本、米国の研究においてはブタと接触する職業に従事する人員群の血清抗 HEV 抗体はその他職業に従事する人員群よりも高く、また養豚場周辺の汚水中から HEV が検出されたことも明らかになった^(16~18)。曹海俊⁽¹⁹⁾らが、浙江地域においてブタの食肉処理および販売に従事する人員群の HEV 感染状況について調査を行った結果、浙江省にてブタの食肉処理および販売に従事する人員群の 77.25%が HEV 陽性であり、1992 年に全国 13 省および市において実施された HE 血清流行病調査中の 1~59 歳人口に占める陽性率(17.2%)をはるかに上回ることが明らかになった。さらに別の報告では、中国の月齢 4 ヶ月以上のブタにおける血清抗体陽性率の平均が 40%にのぼり、ブタの飼育者の血清抗体陽性率に至っては 100%に達することも明らかになっている。その他タイでは、月齢 3 ヶ月以上のブタにおける陽性率が 9~20%に達し、ブタの飼育者の陽性率は 71%にのぼる。上記の研究結果は、ヒトの HE 陽性検出率とブタに接触する職業への従事者の間に一定の関連性があること、ならびに HE は人畜相互間の感染症であることを証明するものである。

かつて Meng⁽²⁰⁾は異なる月齢のブタ血清から HEV RNA の検出を行ったが、中国内外において食肉処理したブタの肝臓から HEV RNA の検出を行ったという報告はない。本試験では RT-PCR 法を用いて食肉処理したブタ肝臓中の HEV RNA の増幅を行った結果、食肉処理したブタの肝臓中にも HEV RNA の存在が確認された。本試験室における過去の研究において食肉処理したブタ肝臓中の HEV に関連を有する抗原の陽性検出率が 95~100%と高率にのぼることが明らかになり、また食肉処理したブタが精肉製品生産網の末端に組み込まれていることを考慮すると、公衆衛生の見地からも、この問題は決して放置できない問題である。現在のところ、ブタの生肉中より HEV が検出されたという報告はなされていないものの、肝臓中の HEV に関連する抗原の陽性検出率が上記のように高いことが、人体の健康に対する潜在的な脅威となることは確実である。以上より、筆者は食肉処理したブタの検疫において HEV を検査項目として採用することを提案する。

