

野生動物およびブタにおけるE型肝炎ウイルスの浸淫状況

Dedtion and Molecular analysis of hepatitis E virus for wild boars and deer and pigs in Miyagi .

佐々木 美江 今野 奈穂*1 小泉 光*2 生島 詩織*3 植木 洋 畠山 敬
Mie SASAKI, Nao KONNO, Hikari KOIZUMI, Shiori IKUSHIMA, Yo UEKI, Takashi HATAKEYAMA

平成27年から平成29年にかけて県内に生息している野生動物のイノシシ、シカおよび肥育ブタを対象にRT-PCR法でE型肝炎ウイルス (hepatitis E virus, 以下 HEV) の検出を試みた。その結果、イノシシ9.5% (8/84) , ブタ5.8% (9/156) からHEV遺伝子が検出された。分子疫学的に解析した結果、検出されたHEV遺伝子はすべて遺伝子型G3で、イノシシから検出されたHEV遺伝子は平成28年と平成29年では異なるクラスターを形成し、平成29年に検出した7株は株間で99%の相同性を示した。一方、ブタから検出された遺伝子も2つのクラスターを形成し、それぞれのクラスターで99%の相同性を示した。本調査で県内に生息する野生イノシシと肥育ブタの肝臓からHEV遺伝子が検出されたことにより、県内においてもHEVに感染するリスクがあることが示唆された。

キーワード：E型肝炎ウイルス；イノシシ；シカ；ブタ；肝臓

Key words : hepatitis E virus ; wild boar ; deer ; pig ; liver

1 はじめに

E型肝炎は、E型肝炎ウイルス (hepatitis E virus, 以下HEV) に汚染された水や食品などを介して感染する疾患である。従来、HEV感染は衛生環境の悪い発展途上国からの輸入感染症と考えられていた。しかし、平成15年以降、国内でもブタ及びイノシシのレバーや肉を摂食したことによるE型肝炎の集団発症事例^{1)~3)}や生シカ肉を介した発症例などの事例が相次いで報告され⁴⁾、現在では我が国においてもHEVは食中毒原因物質の一つと認識されている。

近年、イノシシやシカなどの野生動物による農作物への被害の拡大に伴い、駆除された野生動物の利活用が全国的に推進されている。その一環として「ジビエ」の消費拡大があるが、その一方でジビエの喫食によるHEV感染の拡大が懸念される。また、平成27年6月に食品衛生法で豚肉・肝臓の生食用としての販売・提供を禁止することとなったが、依然としてE型肝炎の患者報告数は増加傾向にあり、原因の特定が喫緊の課題となっている。そこで、県内の野生動物及びブタのHEV浸淫状況について調査を行ったので報告する。

2 調査対象及び検査方法

2.1 調査対象

平成27年10月から平成29年11月にかけて宮城県内に生息している野生動物のイノシシ、シカおよびと畜場に搬入された6ヶ月齢ブタを対象とし、HEVの臓器指向性を考慮し肝臓を検体とした。検体数は、シカ76頭、イノシシ84頭、ブタ156頭とした。

2.2 方法

2.2.1 濃縮法

採取した肝臓は、ステンレスビーズ(φ3.2mm)入りの破砕用

チューブに入れ、滅菌蒸留水2mLを加えた後、細胞破砕機で3,500rpm15秒間破砕した。破砕後、9,100×g 10分間遠心し、上清をウイルス抽出液とした。

2.2.2 HEV遺伝子検出および分子系統樹解析

ウイルスRNAの抽出にはQIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN) を用い、キットに添付のマニュアルに従ってRNAを抽出した。逆転写反応はPrimeScript RT reagent Kit (TakaRa)を用い、RNA抽出液 5μL, 5×PrimeScript Buffer 2μL, Random6mers 2μL, PrimeScriptRT EnzymeMix I 0.5μLにRNase Free dH₂Oを加えて総量10μLにした後、37°C 15分、85°C 5秒で逆転写反応を行った。1stPCR及びnested PCRではEX Taq Hot Start Version (Takara) を用い、国立感染症研究所のE型肝炎検査マニュアルに準じて実施し、HEVのキャプシド蛋白ORF2をコードしている領域を増幅した。増幅産物が確認された検体は、ダイレクトシーケンス法を用いて塩基配列を決定し、BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) による相同性検索によりウイルスの同定を行い、近隣結合法 (neighbor-joining method, 以下 NJ法) による分子系統樹解析をMEGA7で行った。

3 結果

3.1 HEV遺伝子検出状況

イノシシ84件中8件 (9.5%) , ブタ156件中9件 (5.8%) からHEV遺伝子が検出された。一方、シカからはHEV遺伝子は検出されなかった (表1)。

3.2 雌雄・体重別によるイノシシのHEV検出状況

雌雄と体重を把握できた77頭のHEV遺伝子検出状況は、オス41件中5件 (12.2%) , メス36件中3件 (8.3%) からHEV遺伝子が検出された (表2)。

また、体重別では100kg以上の6件ではHEV遺伝子は検出されなかったが、50kg以上100kg未満では37頭中1頭 (2.7%) , 50kg未満では34件中7件 (20.6%) から検出され、体重の少な

*1 現 産業技術総合センター *2 現 気仙沼保健福祉事務所

*3 現 岐阜大学応用生物科学部

いイノシシからの検出率が高かった（表3）。

HEV遺伝子が検出されたイノシシ8件は、平成28年4月に1件、平成29年7月から10月に7件捕獲されており、このうち検体番号I78とI81は双方とも体重10kgで同時期にHEV遺伝子の検出が確認された（表4）。

3.3 肥育地域別ブタの検出状況

調査対象とした肥育ブタ156件中9件（5.8%）からHEV遺伝子が検出され、地域別では県北の肥育ブタが71件中6件（8.5%）、県南の肥育ブタは85件中3件（3.5%）からHEV遺伝子がそれぞれ検出された。

表1 HEV遺伝子検出状況

種類	件数 (件)	HEV 遺伝子検出数 (件)	検出率 (%)
イノシシ	84	8	9.5
シカ	76	0	0
ブタ	156	9	5.8

表2 イノシシの雌雄別HEV遺伝子検出状況

雌雄	件数(件)	HEV 遺伝子検出数 (件)	検出率(%)
オス	41	5	12.2
メス	36	3	8.3

表3 イノシシの体重別HEV遺伝子検出状況

体重 (kg)	頭数 (頭)	HEV 遺伝子検出数 (件)	検出率 (%)
100以上	6	0	0
50~100	37	1	2.7
50未満	34	7	20.6

表4 HEV遺伝子が検出されたイノシシ

検体番号	狩猟月日	性別	体重
I-71	H29.9.8	オス	8
I-67	H29.9.2	オス	10
I-78	H29.10.19	オス	10
I-82	H29.10.28	オス	20
I-31	H28.4.20	オス	25
I-81	H29.10.19	メス	10
I-84	H29.11.5	メス	10
I-55	H29.7.12	メス	50

3.4 分子系統樹解析

ダイレクトシーケンシング法でウイルスRNAの構造タンパクをコードしているORF2の一部の領域を増幅して解析した結果、イノシシ、ブタから検出されたHEVの遺伝子型はすべて3型

(G3) で、イノシシとブタのHEV遺伝子はそれぞれ2つのクラスターを形成した。

イノシシから検出されたHEV遺伝子は、平成28年に採取した1件（○）と平成29年に採取した7件（●）がそれぞれクラスター

一を形成し、平成29年に採取した7件は株間で99%の相同性を示した。

ブタから検出されたHEV遺伝子は、県南で平成28年に採取し

た2件 (△) と平成29年に採取した1件 (▲) , 県北3件 (▲) と県南3件 (▲) がそれぞれクラスターを形成し、いずれも99%の相同性を示した (図1)。

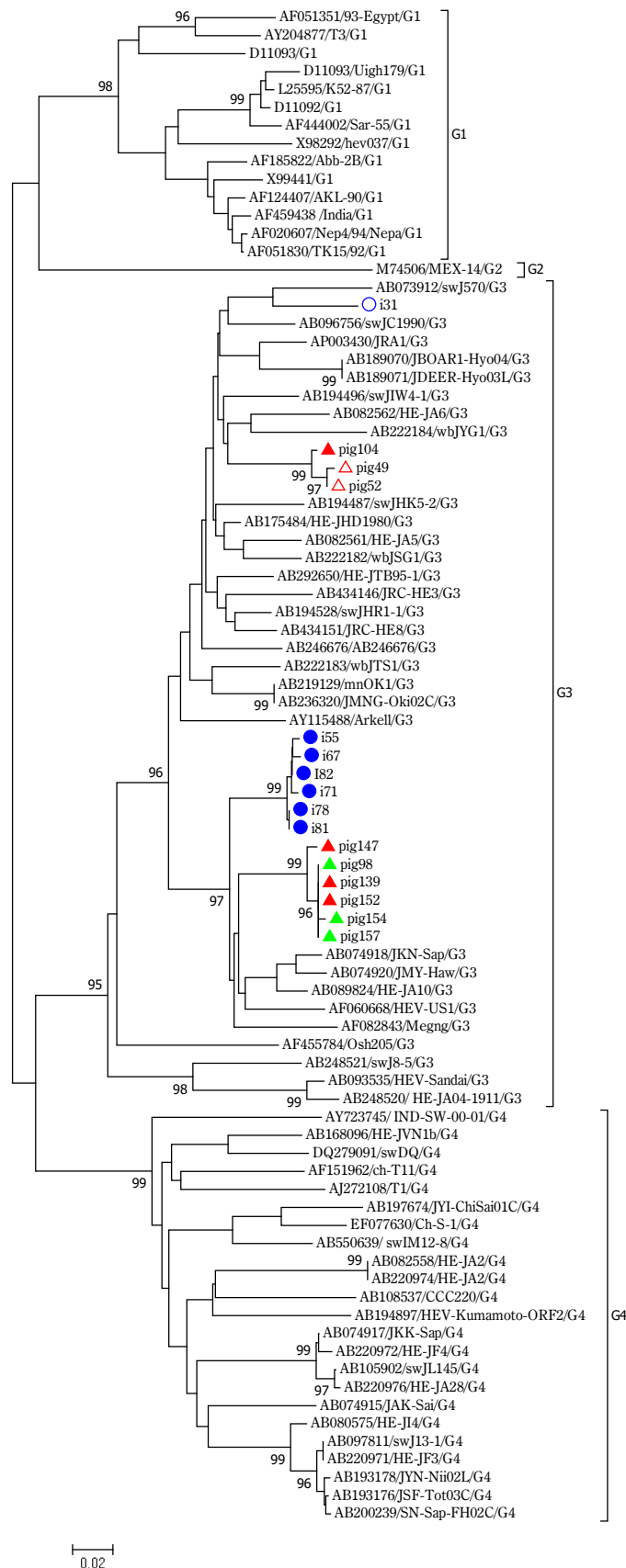


図1 イノシシ及びブタから検出されたHEVの分子系統樹解析 (NJ法) 304nt

4 考 察

過去に県内で実施したHEV調査では、植木らが家畜や愛玩動物に接触する機会の多い職業従事者のHEV抗体保有状況を⁶⁾、高橋らは肝臓に病変のあるブタ1.8%からHEV遺伝子を検出し⁶⁾、県内においてもHEVが浸淫していることを報告している。その後沖村らは、ブタと同様にHEV感染源となりうる野生動物（イノシシ・シカ）のHEV汚染実態調査を実施したがイノシシ、シカからHEV遺伝子は検出されず⁷⁾、野生動物のHEV浸淫状況については不明な部分が多かった。本調査では県内に生息する野生イノシシ9.5%からHEV遺伝子を検出したことにより、県内の野生イノシシのHEV保有状況を明らかにすることができた。他地域での野生イノシシやシカからのHEV遺伝子の検出状況については、原田らが熊本県内のイノシシ173頭、シカ63頭を対象に調査を実施した結果、イノシシ7.5%からHEV遺伝子を検出し、シカからは検出されなかったことを報告しており⁸⁾、今回の調査で確認された検出率とほぼ同じであった。

一方、厚生労働科学研究によると、と畜場に搬入されたブタの肝臓の2.5～6.0%からHEV遺伝子が検出されている⁸⁾。本調査で確認された肥育ブタからのHEV遺伝子検出率は5.8%であることから、これまでの報告と同程度の検出率であった。

野生イノシシからのHEV遺伝子検出率は雌雄の差は見られなかったが、体重別では50kg未満の個体で検出率が高くなる傾向が見られた。野生のイノシシは一般にオス成体の体重が50kg以上と言われていることを考慮すると、成体に達する前の50kg未満のイノシシからの検出率が20.6%と高く、さらにHEV遺伝子検出例の87.5% (7/8) が体重50kg未満であったことより、イノシシについても生後1～3ヶ月でHEVが水平感染⁹⁾すると言われているブタと同じように、幼体の時期に感染している可能生が示唆された。

本調査で県内に生息する野生イノシシと肥育ブタからHEV遺伝子が検出されたことにより、これらの動物を介しHEVに感染するリスクが示された。リスクを回避するためには、適切な前処理や、調理時の十分な加熱を厳守することが重要になる。さらには、汚染源を明らかにし、汚染経路を遮断する事が抜本的には肝要である。今後、野生イノシシや肥育ブタのHEV感染の汚染源の特定を行うとともに、関係機関と協力して、HEVによる健康被害の予防について県民へ啓発する必要がある。

5 謝 辞

本調査を実施するにあたり協力いただいた宮城県猟友会 気仙沼支部 菅原安雄氏、河北支部 三浦信昭氏、伊具支部 斎藤謙一氏、小野昭一氏、仙台食肉卸売市場株式会社 土井和敏氏並びに関係機関の皆様に深謝いたします。

参考文献

- 1) 石田勢津子, 吉澄志磨, 三好正浩, 奥井登代, 岡野素彦, 米川雅一: 病原微生物検出情報, **26**, 266-267 (2005)
- 2) H.Matsuda, K.Okada, K.Takahashi, S.Mishiro, *J Infect Dis*, **188**, 944 (2003)
- 3) 江藤良樹, 石橋哲也, 世良暢之, 千々和勝巳: 病原微生物検出情報, **26**, 265-266 (2005)
- 4) T.Shuchin, N.Kitajima, K.Takahashi, S.Mishiro: *Lancet*, **362**, 371-373 (2003)
- 5) 植木洋, 菊地奈穂子, 山木紀彦, 後藤郁男, 沖村容子, 秋山和夫: 宮城県保健環境センター年報, **23**, 40-42 (2005)
- 6) 高橋伸和, 植木洋, 佐藤千鶴子, 齋藤直, 小野聡美, 小川修平, 齋藤紀行, 鈴木寿郎, 御代田恭子: 公衆衛生情報みやぎ, **369**, 9-10 (2007)
- 7) 沖村容子, 高橋由理, 阿部美和, 植木洋, 佐藤由紀, 菅原優子, 御代田恭子: 公益財団法人 大同生命厚生事業団 (第16回地域保健福祉助成) 報告集, 15-17 (2009)
- 8) 原田誠也, 田中智之, 西村浩一, 大迫英夫, 吉岡健太, 石井孝司, 李天成: 厚生科学労働研究費補助金 (食品の安全確保推進研究事業) 「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」, 255-262 (2012)
- 9) 恒光裕: 厚生科学労働研究費補助金 (厚生労働科学特別研究事業) 「食品に由来するE型肝炎ウイルスのリスク評価に関する研究」, 21-24 (2003)