

E型肝炎ウイルスの分子疫学解析

Molecular analysis of hepatitis E virus for wild boars and domestic pigs and human samples in Miyagi.

佐々木 美江 大槻 りつ子 坂上 亜希恵 植木 洋 島山 敬

Mie SASAKI, Ritsuko OTSUKI, Akie SAKAGAMI, Yo UEKI, Takashi HATAKEYAMA

県内で確認されたE型肝炎ウイルス（HEV）患者と実態調査で検出された野生イノシシ及び肥育ブタについて分子系統解析を行った。検出されたHEV遺伝子はすべて遺伝子型G3で、野生イノシシ、肥育ブタは動物種ごとにクラスターを形成し、動物種内で感染を繰り返していることが示唆された。また、HEV患者および肥育ブタから検出されたHEV遺伝子が高い相同性を示したことによりブタ肉の喫食や接触等がHEV感染に関与している可能性が示された。今後ともHEV感染の汚染源の特定を行うとともに、患者発生との関連を明らかにすることの重要性が確認された。

キーワード：E型肝炎ウイルス；野生イノシシ；肥育ブタ；ヒト

Key words : hepatitis E virus ; wild boar ; domestic pig ; human

1 はじめに

E型肝炎ウイルス（hepatitis E virus, 以下「HEV」という。）は、直径約30 nmのエンベロープを持たない球状ウイルスである。ゲノムは全長6.9から7.2 kbのプラス鎖一本鎖のRNAであり、ヘパウイルス科Orthohepevirus属に分類される。感染経路は、HEVに汚染された水や食品などによる経口感染で、ヒトから検出される主な遺伝子型はG1からG4である。HEVに感染すると平均6週間（15～50日）の潜伏期間を経て、発熱、全身倦怠感、黄疸などの症状が現れ、急性肝炎を引き起こす。一般的にE型肝炎は慢性化することは少なく約1ヶ月で治癒するが、妊婦が感染すると劇症化しやすく、致死率が20%に達することがあるため妊娠期間中は特に注意が必要となる。感染経路は地域の衛生事情により大きく2つに分かれている。常時安全な飲料水を供給できない・トイレなどの衛生施設が整備されていない地域では飲料水の糞便汚染による感染が多く、その他の地域では、動物肉（内臓も含む）を未加熱もしくは加熱不十分で喫食することによる感染が多い。国内では従来、衛生状態の悪い地域からの輸入感染症と捉えられていたが、2003年以降、ブタ、イノシシやシカ肉およびその副産物を摂食したことによる発症事例が相次いで報告されたことから^{1,4)}、現在では人獣共通感染症と認識されている。

2003年11月の感染症法改正に伴い、E型肝炎は全数把握の四類感染症として診断後、直ちに届出が必要となり、感染症発生動向調査においてE型肝炎の患者発生状況が把握できるようになった。全国の患者報告数は2012年に100名を超えてから、その後も増加し、2018年には442名のE型肝炎患者が報告されているが、県内でも同様の傾向が認められることから、原因の特定が喫緊の課題となっている。

そこで、本研究では、県内のHEV感染の原因を探るため、県内で確認されたHEV患者および2015年から2017年に実施したHEV実態調査で検出されたHEV遺伝子について、分子疫学的解析を行ったので報告する。

2 材料及び方法

2.1 材料

2.1.1 県内のHEV患者検体

2015年4月から2019年7月に県内の医療機関においてE型肝炎と診断された30事例のうち当所に検体が搬入された4事例の血清4件、便2件を対象とした。

2.1.2 過去に検出されたヒト由来HEV遺伝子

過去に宮城県内で検出されたHEV遺伝子で、DDBJに登録されているヒト由来株1件（AB476447）を対象とした。

2.1.3 HEV実態調査

2015年10月から2017年11月に宮城県内に生息している野生イノシシ84件、野生シカ76件および畜場に搬入された6ヶ月齢肥育ブタ156件を対象とした実態調査⁵⁾で検出されたHEV遺伝子で野生イノシシ由来株8件、肥育ブタ由来株9件を対象とした。

2.2 方法

患者便は10%乳剤を作成後、9,100 × g 10分間遠心し上清をウイルス抽出液とした。RNA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い患者血清またはウイルス抽出液からRNAを抽出した。抽出したウイルスRNAは、SuperScript IV Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用い、RNA抽出液 10 μL, 5 × SS IV Buffer 4 μL, 10 mM dNTP mix 1μL, 10mM DTT 1μL, 0.1 mM Random 6 mer 0.5 μL, RNaseOUT RNase

Inhibitor (40 U/ μ L) 1 μ L, SuperScript IV Reverse Transcriptase (200 U/ μ L) 1 μ LにRNase Free dH₂Oを加えて総量20 μ Lにした後、23°C 10分、55°C 10分、80°C 10分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HEVのキャプシド蛋白Open Reading Frame 2 (以下「ORF2」という。)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、MEGA7を用いて近隣結合法 (neighbor-joining method, 以下「NJ法」という。)による分子系統樹解析を行った。

3 結果

3.1 県内のHEV患者検体

患者血清は4件すべてから、便は2件中1件 (50%) からHEV遺伝子が検出された。血清はいずれも受診時に採取されていたが、HEV陽性便は受診後9日目に、HEV陰性便は受診後28日目に採取されていた。主症状は、肝機能異常、全身倦怠感、発熱の順に多かったが、動悸という症例も存在した (表1)。

3.2 分子疫学解析

HEV遺伝子が検出されたHEV患者5件 (血清4件、便1件) および野生イノシシ8件、肥育ブタ9件について分子系統樹を作成した (図1)。その結果、HEV患者、野生イノシシ、肥育ブタから検出されたHEVの遺伝子型はすべてG3に分類され、subtype3aとsubtype3b, subtype3eおよび既知のG3のsubtypeに属しないクラスターに分類された。Subtype3aはさらに、ヒト (2019-03) と肥育ブタ (pig98, pig139, pig147, pig152, pig154, pig157) から検出された株、野生イノシシ (I55, I67, I71, I78, I81, I82, I84) から検出された株、およびヒト (2018-01, 2019-01, 2019-02) から検出された株に分類されたが、ヒトから検出された株は異なる2つのクラスター (2018-01・2019-01, 2019-02) を形成した。ヒトと肥育ブタから検出された一部の株間では、塩基配列が決定できた301ntで100%の相同性が確認されたことにより、ヒトのHEV感染の原因がブタの喫食等と関連している可能性が示唆された。一方、subtype3bは野生イノシシから検出された株が分類され、過去に宮城県内で検出されたヒト由来株 (AB476447) はsubtype3eに分類されたが、今回の調査で検出された株との関連は認められなかった。また、今回の調査ではG3の既知のsubtypeに属しないHEV遺伝子3株 (pig49, pig52, pig104) が検出された。これらの株はいずれも肥育ブタから検出された株であった。

表1 宮城県内で発生したE型肝炎事例 (n = 4)

事例No.	年齢	性別	主症状	発症日	受診日	受診日から		HEV遺伝子検出*
						検体採取までの 日数	検体の種類	
2018-01	80代	女	発熱、全身倦怠感、肝機能異常	2018年10月30日	2018年11月1日	0	血清	+
2019-01	80代	男	肝機能異常	不明	2019年4月18日	0 28	血清 便	+ -
2019-02	60代	女	動悸	2019年6月	2019年6月25日	0	血清	+
2019-03	90代	女	全身倦怠感、肝機能異常	2019年7月8日	2019年7月9日	0 9	血清 便	+ +

*+ : 検出, - : 不検出

4 考察

国内で検出されるHEVの遺伝子型はG3, G4が知られており、本研究で検出された株もすべてG3に分類された。系統解析では、野生イノシシ、肥育ブタが各々にクラスターを形成しており、各々の動物種間でHEV汚染を持続している可能性が示された。また、本研究でHEV患者と肥育ブタの塩基配列 (301nt) が100%一致していることから、ブタ肉の喫食等がヒトの感染に関与していることが示唆された。これらの関連性を明らかにするためにはHEV患者の喫食調査や行動調査など、さ

らに詳細に疫学調査を行うことが重要と思われる。また、G3に属する株でsubtypeが決定できなかったブタ由来株については今後詳細な解析が必要である。

過去に宮城県内で実施されたHEV関連調査^{5,8)}により、県内にHEVが浸淫していることが明らかになった。HEV感染のリスク低減のためには、ブタやジビエなどの食肉に加え、これまで報告のある二枚貝⁸⁾の適切な加熱処理を消費者に周知徹底する必要がある。今後は、HEV感染の汚染源の特定を行うとともに、患者発生との関連性を明確にすることが重要である。

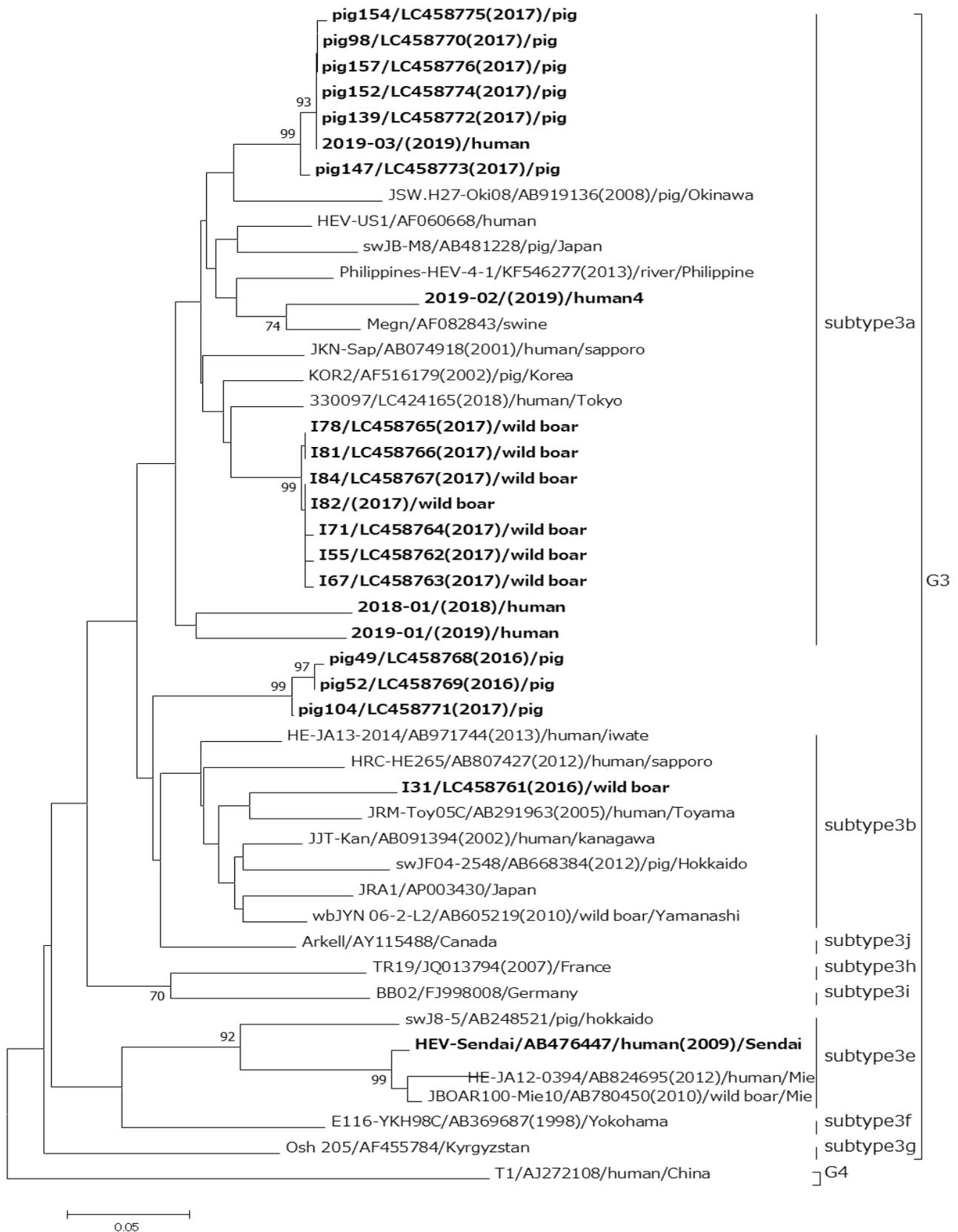


图1 HEV系統樹解析

The phylogenetic tree constructed by neighbor-joining method (Kimura 2-parameter method) based on the partial nucleotide sequence (301nt) of ORF2. HEV RNA sequenced from this study are boldfaced and tagged with isolate name, DDBJ accession numbers (collected year). An HEV G4 isolate (AJ272108) is used as an outgroup. The numbers on branches were bootstrap values (1,000 replicates; values less than 70% were not shown)

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) 佐々木美江, 今野奈穂, 小泉光, 生島詩織, 植木洋, 畠山敬: 宮城県保健環境センター年報, **36**, 43-46 (2018)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 関根雅夫: 公衆衛生情報みやぎ, **462**, 33-37 (2016)