

厚生労働科学研究費補助金（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」班  
分担研究報告書

わが国のブタ、ウシおよびイノシシにおける E 型肝炎ウイルス抗体の保有状況

分担研究者：恒光 裕（動物衛生研究所 環境衛生研究室長）

**研究要旨** わが国のブタ、ウシおよびイノシシにおける E 型肝炎ウイルス（HEV）の浸潤状況を明らかにする目的で、ELISA による HEV 抗体検査を実施した。ブタにおいて 31 農場中 30 農場（97%）に HEV の浸淫が確認された。HEV 陽性豚農場での抗体陽性率は 4-5 ヶ月齢で 100%を示し、抗体価（OD 値）も 4 ヶ月齢で最も高かった。一方、母豚の抗体陽性率ならびに抗体価は肥育豚に比べて低かった。年代別ならびに地域別での抗体陽性率や抗体価に違いは認められなかった。ウシにおいては血清 400 例中 26 例（6.5%）に抗体が検出されたが、それらの抗体価は低かった。イノシシでは 83 例中 51 例（61.4%）が抗体陽性であり、高い抗体価を示す例も多数存在した。以上の結果より、HEV はわが国のブタ集団に高率に浸淫しているが、陰性農場も存在すること、ブタでの主な感染時期は 1-3 ヶ月齢であること、ブタでの感染は最近急増したのではないことなどが明らかとなった。また、一部のウシに HEV あるいは HEV-like virus の感染が起こっている可能性が示された。さらに、イノシシはブタと同様に HEV に対する感受性が高いと考えられた。

共同研究者

池田秀利（動物衛生研究所）  
勝田 賢（動物衛生研究所）  
川島健司（動物衛生研究所）  
宮崎綾子（動物衛生研究所）  
吉井雅晃（動物衛生研究所）  
山口成夫（動物衛生研究所）

シを喫食して感染、発症した例も確認された。本研究では、わが国で食肉として利用される各種家畜ならびに野生動物における HEV の感染状況を抗体検査により調査し、食品に由来する HEV 感染のリスク評価を行うことを目的とする。

**A. 研究目的**

E 型肝炎は E 型肝炎ウイルス（HEV）の感染に起因するヒトの急性肝炎であり、近年わが国固有の HEV 株によると考えられる症例が見つかっている。一方、家畜、特に豚は高い頻度で HEV に感染していることが報告され、また、野生のシカやイノシ

**B. 研究方法**

シを喫食して感染、発症した例も確認された。本研究では、わが国で食肉として利用される各種家畜ならびに野生動物における HEV の感染状況を抗体検査により調査し、食品に由来する HEV 感染のリスク評価を行うことを目的とする。

HEV 抗原は感染症研究所が作製したバキュロウイルス発現蛋白（ウイルス様粒子）を使用した。ELISA の術式は感染症研究所がヒト抗体検出で報告した方法とほぼ同様である。ただし、一部の血清材料で非特異反応が確認されたため、今回使用した被検血清はいずれも抗原固相化ウエルと抗

原非固相化ウエルの両方と反応させ、両者のOD値の差を正味のOD値として表した。また、二次血清は、KPL社のHRPO標識抗ブタIgGとHRPO標識抗ウシIgGを使用した。被検血清は200倍希釈して使用した。カットオフ値は、初乳未摂取豚血清ならびにHEV陰性農場ブタ血清を用いて決定し、OD値0.2以上を抗体陽性とした。ELISA反応の特異性は無作為に抽出した血清を用いたブロッキングテストで確認した。検査材料として、1990-2003年に6県31農場で採取されたブタ血清計1077例、3県60農場由来のウシ血清計400例、および1県3農場由来のイノシシ血清（野生イノシシを捕獲して飼育）計83例を使用した。

### C. 研究結果

ブタにおいて31農場中30農場(97%)にHEVの浸淫が確認された。HEV陽性農場での抗体陽性率は4-5ヶ月齢で100%を示し、抗体価(OD値)も4ヶ月齢で最も高かった(図1)。一方、母豚の抗体陽性率ならびに抗体価は肥育豚に比べて低かった。年代別ならびに地域別での抗体陽性率や抗体価に違いは認められなかった(図2、図3)。

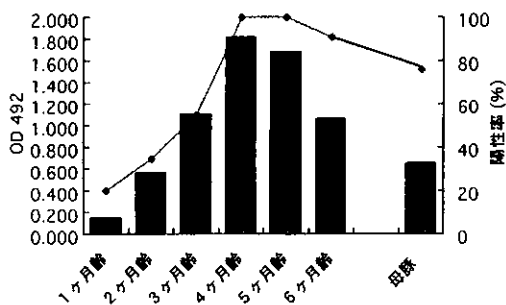


図1. ブタにおける月齢別抗体陽性率 (%;折れ線)と抗体価(OD値;縦棒)

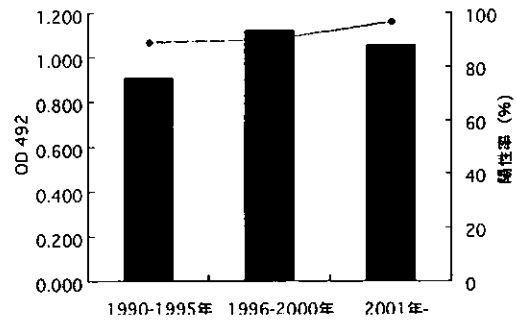


図2. 肥育末期ブタにおける年代別の抗体陽性率(%;折れ線)と抗体価(OD値;縦棒)

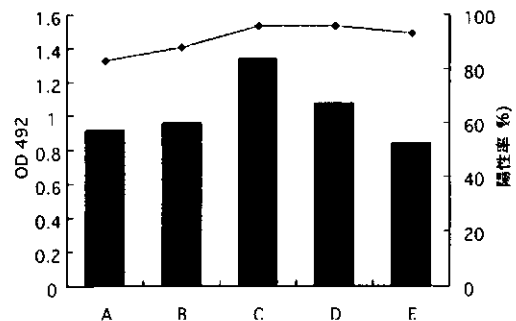


図3. 肥育末期ブタにおける県別の抗体陽性率(%;折れ線)と抗体価(OD値;縦棒)

ウシにおいては19農場(32%)が抗体陽性となり、個体別では血清400例中26例(6.5%)に抗体が検出されたが、それらの抗体価は低かった(図4)。

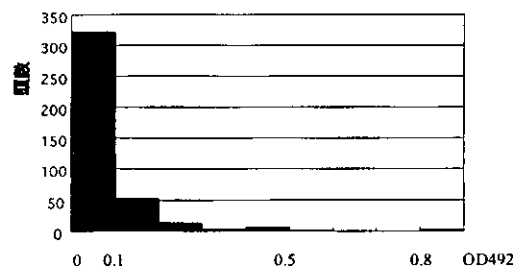


図4. ウシ血清におけるHEV抗体価の分布

イノシシにおいては、83 例中 51 例 (61.4%) が抗体陽性を示した (図 5)。また、OD 値 1 以上を示す血清が多数存在した。

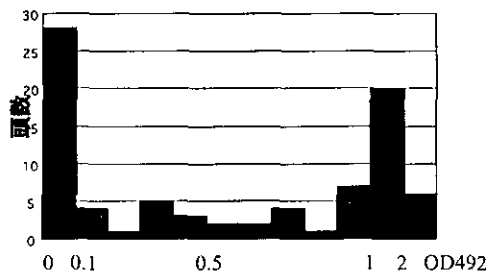


図 5. イノシシ血清における HEV 抗体価の分布

#### D. 考察

今回の調査により、HEV はわが国のブタ集団に高率に浸淫しているが、陰性農場も存在することが明らかとなった。今回確認された陰性農場は、一企業経営の SPF 農場であり、検査した同企業の他の SPF 農場は HEV 陽性であった。なぜこの農場のみが HEV 陰性であったのかは明らかではないが、HEV 清浄化実施の可能性を示唆する例として興味深い。HEV 陽性農場においては、4-5 ヶ月齢の肥育豚の抗体価ならびに抗体陽性率が最も高かった。このことは HEV の主要な感染時期が 1-3 ヶ月齢であることを示唆する。一方、6 ヶ月齢ブタならびに母豚 (15 ヶ月齢以降) での抗体価ならびに抗体陽性率は 4-5 ヶ月齢ブタと比較して低かった。このことは、母豚においては HEV の感染率が低く、感染の程度も肥育豚に比べて軽度であると考えられるよりも、若齢期 (1-3 ヶ月齢) での感染後に再感染の機会が少なく、そのため抗体価が低下して一部は抗体が陰転した結果で

はないかと推測する。6 ヶ月齢での抗体価ならびに陽性率が 4-5 ヶ月齢のそれらと比較して低値であったことが、この考えを支持する。ヒトでは少なくとも感染後数年間は抗体が検出されると報告されていることから、ブタはヒトと比較して HEV 抗体価の低下が早いとも推測される。

わが国での E 型肝炎の発生報告は北海道を中心とした北日本で多く、また、発生率は近年増加傾向にあるとも考えられている。今回の調査には北海道で飼育されているブタ血清も含まれているが、ブタにおける抗体陽性率に地域差は認められなかった。また、血清の採取時期を 1990 年代前半、1990 年代後半、および 2000 年以降と区分して抗体陽性率を比較した結果、採取時期による違いは認められなかった。これらの結果より、ブタでの HEV 感染には地域性は少なく、また、近年感染率が急増したのではないと考えられた。

ウシ血清中に HEV と反応する抗体の存在は既に報告されている。今回の調査においても低率であるが抗体陽性例が確認された。これら陽性血清は、予め HEV 抗原と反応させた後に ELISA を実施すると OD 値が低下したことから、ELISA での陽性反応は HEV 抗原との反応の結果と考えられた (データ示さず)。しかしながら、現在までウシから HEV や HEV 遺伝子は検出されていないため、今回検出された抗体は HEV 抗体なのか、HEV と交差反応性を示す HEV-like virus の抗体なのかは明らかではない。

野生イノシシの生肝臓や肉を喫食して E 型肝炎を発症した例が報告されている。今回調査したイノシシはいずれも、捕獲後に専用農場で集団飼育されており、野生のイ

ノシシとは生活環境が異なる。しかし、これら血清が高い抗体陽性率や抗体価を示したことは、イノシシはブタと同様 HEV に対する感受性が極めて高いと推測できる。このことから、イノシシの肝臓や肉の生食は禁忌と判断される。

#### **E. 結論**

今回の研究によって以下のことが確認された。

1. HEV はわが国のブタ集団に高率に浸淫しているが、陰性農場も存在する
2. ブタでの HEV の主要な感染時期は 1-3 ヶ月齢である
3. 母豚の抗体陽性率や抗体価は肥育豚に比べて低い
4. ブタでの HEV 感染率に地域差は確認されない
5. ブタでの HEV 感染は最近急増したのではない
6. ウシにおいて HEV あるいは HEV-like virus 感染の可能性がある
7. イノシシはブタと同様に HEV に対して高い感受性を有する

#### **F. 健康危険情報**

なし

#### **G. 研究発表**

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

厚生労働省科学研究費補助金(厚生労働省科学特別研究事業)

(分担)研究報告書

「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」

野生イノシシおよび乗馬における E 型肝炎ウイルスの血清疫学およびウイルス遺伝子検出

分担研究者 福士秀人 岐阜大学農学部獣医微生物学講座教授  
研究協力者 石黒直隆 帯広畜産大学獣医公衆衛生学講座教授  
山口剛士 岐阜大学農学部獣医微生物学講座助教授

研究要旨 食に供される可能性のある動物として、イノシシおよびウマにおける E 型肝炎ウイルスの検索を行った。狩猟ないし傷病野生動物保護において愛媛県、香川県および岐阜県で捕獲されたイノシシ 30 頭および馬事公苑において乗馬に用いられているウマ 100 頭について ELISA 法により抗体検出をおこなうとともに RT-PCR 法により HEV 遺伝子検出を行った。その結果、イノシシでは 5 検体 (17%)、ウマでは 1 検体 (1%) から抗体が検出された。また、イノシシ 4 検体から E 型肝炎ウイルス遺伝子が検出されたが、ウマ血清からは検出されなかった。我が国のイノシシおよびウマが HEV ないし関連ウイルスに感染していることがわかった。

#### A. 研究目的

HEV は世界的に分布し、時として流行を引き起こす。我が国における E 型肝炎は輸入感染症として考えられていたが、野生動物の肉を生で食することにより感染した症例が報告された (Tei et al. 2003)。これまでに、我が国の豚における HEV 感染が報告されているが、野生動物における実態は不明であった。食に供される動物として様々な動物があるが、今回、イノシシおよびウマに注目した。イノシシは豚の先祖動物であり、ボタン肉としてよく知られている。ウマは西日本および信州を中心にサクラ肉として生食されている。したがって、これらの動物が HEV に感染している場合、E 型肝炎の感染源となりうると考えられ、実態を明らかにすることは E 型肝炎対策上必要である。本研究ではイノシシおよびウマにおける E 型肝炎ウイルス抗体の検出ならびに血清における HEV 遺伝子を検出することにより感染状況を明らかにすることを目的とした。

#### B. 研究方法

血清：用いたイノシシおよびウマの血清を表 1 に示した。愛媛および香川の血清は狩猟の際に採取された (図 1)。岐阜県のイノシシは傷病鳥獣保護時に採血された血清である。ウマ血清は馬事公苑 (東京) で乗馬に用いられているウマから採取された。

抗体検索：感染症研究所より供与された組換え E 型肝炎ウイルス抗原を用い、ELISA 法により抗体を検出した。二次抗体として、イノシシ血清には抗ブタ IgG-HRP を、ウマ血清には抗ウマ IgG-HRP ないし ProteinG-HRP を用いた。ELISA は感染症研究所の術式に従った。

RNA の精製：各血清は 150  $\mu$ l から、TRIZOL-LS を用いて研究班マニュアルに従って RNA を精製した。

cDNA 合成：精製 RNA 10  $\mu$ l に、oligo(dT)12-18 または HEV-R2 プライマーを加え、99°C 1 分間熱変性後に cDNA の合成を行った。cDNA 合成に用いたプライ

表1. 用いた血清

動物	採取年	採取地	検体数
イノシシ	2003年	岐阜県	12
		香川県	10
		愛媛県	8
ウマ	1999年	馬事公苑	100

マーは、イノシシ血清とウマ No. 97, 98, 99 および 100 については HEV-R2 を、他の検体についてはすべて oligo(dT)12-18 (Pharmacia) を用いた。cDNA の合成は研究

班マニュアルに従い、42° C 2 時間の反応で行った。RTase のみ Cloned AMV Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用いた。PCR: 合成した cDNA を鋳型として、

国土地理院承認 平14認標 第149号

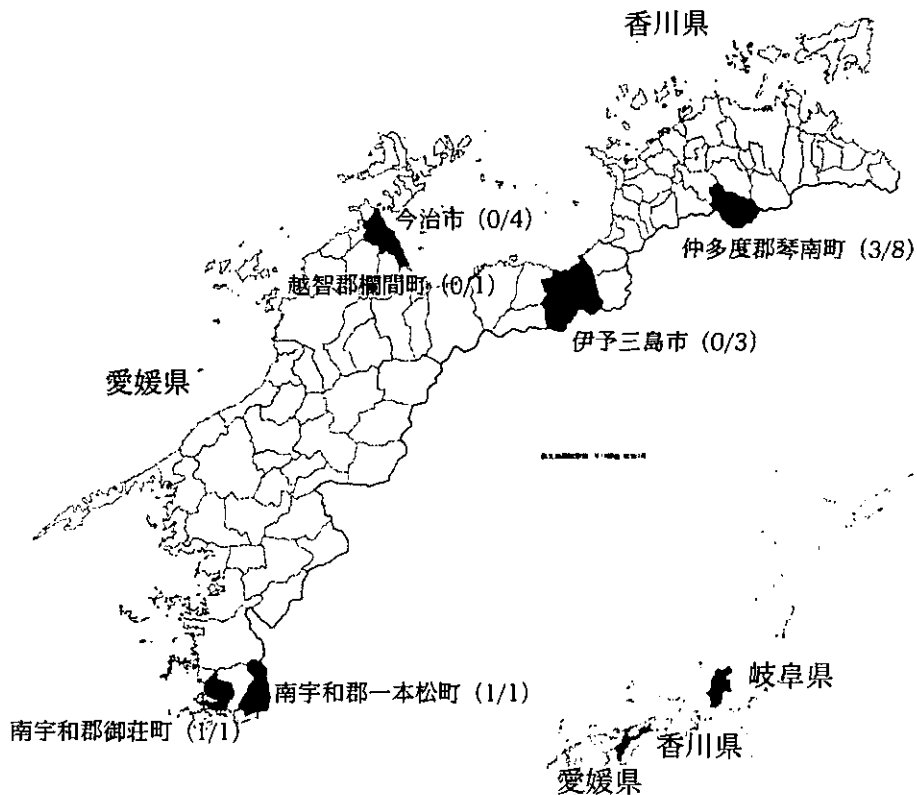


図1. イノシシ血清採取地。岐阜県、香川県および愛媛県で捕獲されたイノシシから血清を採取した。香川県および愛媛県におけるイノシシの捕獲場所を示した。括弧内は陽性数/検体数。香川県仲多度郡および愛媛県南宇和郡で捕獲されたイノシシから E 型肝炎ウイルス抗体が検出された。

Nested PCR により研究班マニュアルに従い HEV 遺伝子の検出を行った。First PCR には HEV-F1 および HEV-R2 プライマーを Second PCR には HEV-F2 および HEV-R1 を用いた。PCR 産物は Second PCR 後に 1.5% アガロースゲルにて電気泳動を行い、常法によりエチジウムブロマイド染色後に増幅断片の移動度を陽性対照とを比較した。増幅断片が認められた試料については First PCR 産物についても泳動を行った。

### C. 研究結果

#### 1. イノシシおよびウマにおける E 型肝炎ウイルス抗体

イノシシ血清 30 検体について ELISA を実施した。吸光度の分布から OD 0.3 を陽性限界とした (図 2)。ELISA は 2 回行った。2 回いずれにおいても陽性を示した検体を抗体陽性とした。その結果、香川 90, 香川 87, 香川 86, 愛媛 06 および愛媛 07 の 5 検体 (17%) が E 型肝炎ウイルス抗体陽性だった。これら陽性検体はいずれも同一ないし互いに近接

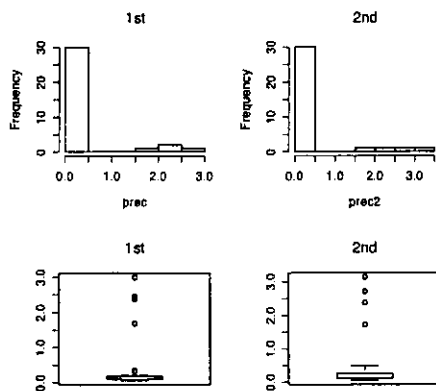


図 2. イノシシ血清 ELISA OD ヒストグラムおよび分布。上段にヒストグラム、下段に分布を示した。2 回の ELISA において、ほぼ同様の OD 分布がえられた。2 時抗体として HRP 標識抗ブタ IgG 抗体を用いた。イノシシ血清では再現性があった。OD 0.3 を陽性限界とした。

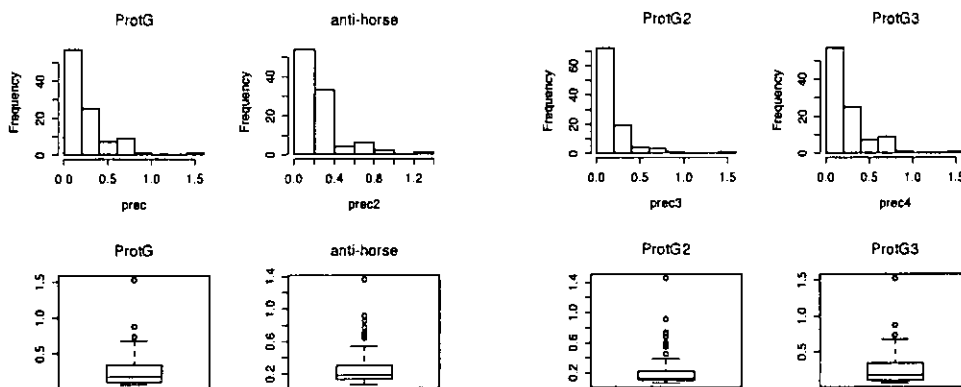


図 3. ウマ血清 ELISA OD ヒストグラムおよび分布。上段にヒストグラム、下段に分布を示した。ProtG, ProtG2, ProtG3 は HRP-標識 ProteinG による ELISA, anti-horse は HRP 標識抗ウマ IgG 抗体による ELISA の結果を示す。ウマ血清では再現性に問題があったが、OD1.0 以上を示す血清は常に一定であったことから OD1.0 を陽性限界とした。

した地域で捕獲されたイノシシであった(図1).

ウマ血清 100 検体について ELISA を実施した。ウマについては抗体検出に proteinG および抗ウマ IgG 抗体を用いた。吸光度分布から OD 1.0 を陽性限界とした(図3)。ELISA は 4 回行い、いずれにおいても OD1.0 以上を示した検体を陽性とした。その結果、1 検体 (1%) が E 型肝炎ウイルス抗体陽性だった。

## 2. イノシシおよびウマにおける E 型肝炎ウイルス遺伝子検出

イノシシおよびウマ血清から RNA を抽出し、RT-PCR 法により E 型肝炎ウイルス遺伝子の検出を試みた。

イノシシ：香川県由来の 4 検体、香川 81, 香川 82, 香川 84 および香川 88 が陽性対照と同様の断片長を示した(図4)。これらの検体は抗体検索ではいずれも陰性であった。

ウマ：検索した 100 検体すべてに増幅産物は認められなかった。

## D. 考察

香川県および愛媛県で捕獲されたイノシシから HEV 抗体が検出された。また、香川県で捕獲されたイノシシからは HEV 遺伝子断片が検出された。乗馬からも HEV 抗体が検出されたが、HEV 遺伝子は検出されな

かった。イノシシおよび乗馬に HEV ないし HEV 関連ウイルス感染が存在することが示された。

今回の結果から我が国のイノシシに広く HEV が存在していることが示唆された。抗体ないし遺伝子が検出されたイノシシの捕獲地には偏りがみられ、地域による感染状況は異なる可能性がある。今回は検出された遺伝子断片の塩基配列解読には至らなかったが、今後さらに分子レベルの解析を進め、我が国のイノシシにおける HEV の分子疫学を解明することは、人への伝播を考える上で重要な情報を提供すると考えられる。

ウマに関しては、ELISA による抗体測定の再現性に問題があったが、高い OD 値を示す検体は一定であった。この反応は HEV に特異的であると考えられるが、当該馬はこれまで健康上の問題は報告されていないとのことであったため、感染症としての意義については不明である。ウマにおける HEV ないし HEV 関連感染症については今後の検討を要する課題である。

## E. 結論

食に供される可能性のある動物 2 種、イノシシおよびウマ、について HEV ないし HEV 関連ウイルスによる感染の存在を明らかにした。HEV の生態におけるこれら動物種の意義をさらに解明することが必要である。

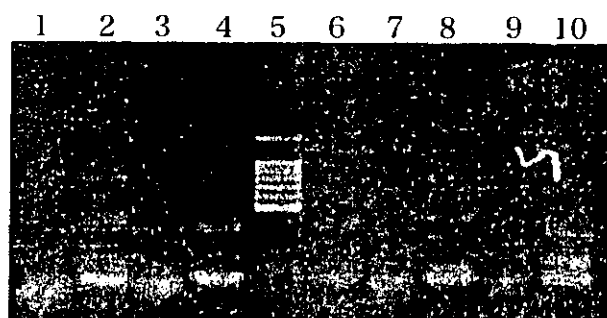


図4. HEV RT-PCR 電気泳動像。イノシシ血清より RNA を抽出し、cDNA を合成後、PCR により HEV 遺伝子の検出を行った。香川県由来血清で陽性対照とほぼ同一の大きさの産物が増幅された。

1. 香川 81 の 1st PCR; 2. 香川 81 の 2nd PCR; 3. 香川 82 の 1st PCR; 4. 香川 82 の 2nd PCR; 5. 100 bp ラダーマーカー; 6. 陽性対照; 7. 香川 84 の 1st PCR; 8. 香川 84 の 2nd PCR; 9. 香川 88 の 1st PCR; 10. 香川 88 の 2nd PCR



E 型肝炎ウイルスの動物宿主探索に関する調査研究

研究協力者 阿部賢治 国立感染症研究所 感染病理部 主任研究官  
研究協力者 丁 欣、平野 真、Tran TT Huy（国立感染症研究所 感染病理部）  
李 天成、武田直和（国立感染症研究所 ウイルス 2 部）  
川端寛樹（国立感染症研究所 細菌 1 部）  
角坂照貴（愛知医科大学 寄生虫学）  
Kyaw Soe Tun, Khin Maung Win  
（ヤンゴン総合病院 肝臓病科、ミャンマー）

**研究要旨** 自然界における E 型肝炎ウイルス（HEV）の動物宿主を探索するために、日本およびミャンマーに生息する野ネズミを対象として、その疫学調査を実施した。その結果、日本では HEV IgG 抗体がドブネズミ 114/362（31.5%）及びクマネズミ 12/90（13.3%）で陽性を示した。これに対し、マウス種では全例陰性であった。ドブネズミにおける抗体陽性率は、体重と共に増加した。一方ミャンマーでは、ドブネズミ 76/100（76%）で HEV IgG 抗体陽性を示した他、3 匹で HEV RNA 陽性を示した。以上の成績から野生ラット種間において、HEV 感染が蔓延している可能性が示唆された。自然界における HEV の動物宿主として、またヒトへの感染源として今後考慮する必要がある。

**A. 研究目的**

感染経路が不明な国内における E 型肝炎患者発生の感染源を究明するために、自然界における HEV の動物宿主を探り、ヒト肝炎との関連を探索することを目的とした。本研究では、国内に加えて HEV 浸淫地域であるミャンマーに生息する野ネズミにおける HEV 感染の可能性について調査した。

**B. 研究方法**

国内では 5 地域（沖縄、宮崎、愛知、神奈川、東京）で 2000 年～2002 年にかけて捕獲された野ネズミから採取された

血清 507 匹分を調査対象とした。ネズミ種は、以下の 5 種よりなる。ラット種：①ドブネズミ（*Rattus norvegicus*）362 匹、②クマネズミ（*Rattus rattus*）90 匹、マウス種：③オキナワハツカネズミ（*Mus caroli*）41 匹、④アカネズミ（*Apodemus speciosus*）12 匹、⑤ハツカネズミ（マウス種：*Mus musculus*）2 匹である。またミャンマーでは、ヤンゴン市内で捕獲したドブネズミ 100 匹を対象とした。HEV 抗体測定は、李らにより開発されたウイルス様中空粒子（カプシド領域）を用いた ELISA 法で行った。二次抗体として抗ラット IgG または抗マウ

ス IgG 血清を用いて、HEV IgG 抗体を検出した。陰性コントロールとして SPF ラット血清、また陽性コントロールとして HEV 蛋白で免疫したマウス血清を用いた。

### C. 研究結果

まず国内ラット類では、HEV IgG 抗体がドブネズミ 114/362 (31.5%) 及びクマネズミ 12/90 (13.3%) で陽性を示した。ドブネズミにおける陽性率は、クマネズミと比べ有意に高率であった ( $p<0.001$ )。これに対し、マウス種では全例陰性であった。ドブネズミにおける感染率は、体重と共に増加した。つまり、体重 100g 以下では 16%であったが、101~200g で 34.2%、201g 以上では 44.9%と急激に上昇した。これは、加齢と共に感染率も上昇することを示唆する所見である。さらに、日本各地で捕獲された場所別における感染率をみると、最も高いのは沖縄 (19/44; 43%) で、次いで愛知 (97/313; 31%)、東京 (4/24; 17%)、神奈川 (4/36; 11%)、宮崎 (1/35; 3%)と続いた。宮崎における低陽性率は、幼獣の割合 (91.4%) が高かったためと思われる。また、愛知県名古屋市における調査で、港近辺で捕獲されたラットでの感染率 (42/94; 44.7%) が市街地中心部 (56/219; 25.6%) のそれよりも有意 ( $p<0.005$ ) に高かった。一方ミャンマーでは、ドブネズミ 76/100 (76%) で HEV IgG 抗体陽性を示した。この中で OD492 値=2.0<のものが 34 匹 (34%) で存在した。さらに、IgG 抗体強陽性を示した 3 例の肝組織から、PCR 法にて HEV RNA 陽性所見が観察された。

### D. 考察

最近、海外渡航歴がない E 型肝炎患者の国内発生の散発例が相次いで報告されている。これら国内患者の感染経路として水系は考えにくく、不明のままである。その候補として近年注目されているのが、動物由来の可能性である。まず候補に上がったのが、ブタである。Okamoto らの報告では、国内の 2~3 ヶ月齢のブタ 2500 頭を調べた結果、その 58%が HEV 抗体陽性で、そのうち約 15%に PCR 法でウイルス RNA が検出されている。興味あるのは、ブタ由来 HEV の遺伝子構造が、ヒト HEV と高い類似性を示すことである。しかし、未だ直接の因果関係を示す証拠は得られていない。ブタ以外の家畜では、家禽からも HEV 類似遺伝子が分離されている。またごく最近では、野生鹿肉を摂取しての感染例も報告されている。自然界での HEV reservoir を決定することは、ヒト E 型肝炎の感染防御対策を確立する上で重要である。本研究において、野生ラット (特にドブネズミ) において、HEV 感染が蔓延している可能性が示唆された。国内においては、捕獲される地域において、その感染率が異なるのは興味深い。特に沖縄ではヒトでも HEV 抗体陽性率が高い (未発表成績) ことから、野生ラットとの関連が注目される。また国内以外では、HEV 浸淫国であるミャンマーに生息する野生でも高い抗体陽性率を示した。さらにミャンマーで捕獲されたラットでは、PCR 法にて HEV RNA 陽性所見が観察された。今後 sequence による HEV ゲノムの確認とその特徴解析を計画している。以上の成績から、自然界における HEV の動物宿主として、またヒトへの感染源

として野ネズミを考慮する必要があると思われた。

## E. 結論

野生ラット種間において、HEV 感染が蔓延している可能性が示唆された。ヒトへの HEV 感染源として、今後考慮する必要があると思われる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yoko Iwaki, Naoto Aiba, Huy Thien Tuan Tran, Xin Ding, Shigeki Hayashi, Yasuyuki Arakawa, Tetsutaro Sata and Kenji Abe: Simian TT virus (s-TTV) infection in patients with liver diseases. *Hepatology Research* 25: 135-142, 2003
- 2) Huy TT Tran, Hiroshi Ushijima, Vo Xuan Quang, Nguyen Phuong, Tian-Cheng Li, Shigeki Hayashi, Truong Xuan Lien and Kenji Abe: Prevalence of hepatitis virus types B through E and genotypic distribution of HBV and HCV in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Hepatology Research* 26: 275-280, 2003
- 3) Xin Ding, Young Nyun Park, Teresa Casanovas Taltavull, Swan N. Thung, Xiaoming Jin, Yi Jin, Nguyen Sao Trung, Yoshihiro Edamoto and Kenji Abe: Geographic characterization of hepatitis virus infections, genotyping of hepatitis B virus, and p53 mutation in hepatocellular carcinoma analyzed by in situ detection of viral genomes from

carcinoma tissues: Comparison among six different countries. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 56: 12-18, 2003

- 4) Mitsuhiro Moriyama, Masaaki Taira, Hiroshi Matsumura, Hiroshi Aoki, Morio Mikuni, Miki Kaneko, Atsuo Shioda, Kayo Iwaguchi, Shinobu Arai, Sagiri Ichijima, Hiroko Iwasaki, Naohide Tanaka, Kenji Abe and Yasuyuki Arakawa: Genotype analysis, using PCR with type-specific primers, of hepatitis B virus isolates from patients coinfecting with hepatitis delta virus genotype II from Miyako Island, Japan. *Intervirology* 46: 114-120, 2003
- 5) Makoto Hirano, Xin Ding, Huy Thien-Tuan Tran, Tian-Cheng Li, Naokazu Takeda, Tetsutaro Sata, Shin Nakamura and Kenji Abe: Prevalence of antibody against hepatitis E virus in various species of non-human primates: evidence of widespread infection in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). *Japanese Journal of Infectious Diseases* 56: 8-11, 2003
- 6) Makoto Hirano, Xin Ding, Tian-Cheng Li, Naokazu Takeda, Hiroki Kawabata, Nobuo Koizumi, Teruki Kadosaka, Ikuo Goto, Toshiyuki Masuzawa, Masaji Nakamura, Katsuya Taira, Toshiro Kuroki, Tsutomu Tanikawa, Tetsutaro Sata, Haruo Watanabe and Kenji Abe: Evidence for widespread infection of

- hepatitis E virus among wild rats in Japan. *Hepatology Research* 27: 1-5, 2003
- 7) Xin Ding, Hongxi Gu, Zhao-Hua Zhong, Xu Zilong, Huy Thien-Tuan Tran, Yohko Iwaki, Tian-Cheng Li, Tetsutaro Sata and Kenji Abe: Molecular epidemiology of hepatitis viruses and genotypic distribution of hepatitis B and C viruses in Harbin, China. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 56: 19-22, 2003
  - 8) Huy Thien-Tuan Tran, Hiroshi Ushijima, Trinh Thi Ngoc, Shigeki Hayashi, Tetsutaro Sata and Kenji Abe: Recombination of genotypes B and C in hepatitis B virus isolated from a Vietnamese patient with fulminant hepatitis. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 56: 35-37, 2003
  - 9) Kenji Abe, Tetsuya Kiuchi, Naoto Aiba, Huy Thien-Tuan Tran, Xin Ding, Mari Yamaguchi, Tetsutaro Sata and Koichi Tanaka: Complete nucleotide sequence of hepatitis B virus isolated from two infants with fulminant hepatitis. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 56: 38-39, 2003
  - 10) Naoto Aiba, Hiroyuki Nishimura, Yasuyuki Arakawa and Kenji Abe: Complete nucleotide sequence and phylogenetic analyses of hepatitis B virus isolated from two pileated gibbons. *Virus Genes* 27: 219-226, 2003
  - 11) Xin Ding, Tian-Cheng Li, Shigeki Hayashi, Naohiko Masaki, Tran TT Huy, Makoto Hirano, Mari Yamaguchi, Mitsugu Usui, Naokazu Takeda and Kenji Abe: Present state of hepatitis E virus epidemiology in Tokyo, Japan. *Hepatology Research* 27: 169-173, 2003
  - 12) Mitsuhiro Moriyama, Morio Mikuni, Wu Longren, Zhao Zi-Yi, Wang Xueqing, Shuh Oshiro, Hiroshi Matsumura, Hiroshi Aoki, Sagiri Ichijima, Hiroko Iwasaki, Naohide Tanaka, Kenji Abe and Yasuyuki Arakawa: Epidemiology of SEN virus infection among patients with hepatitis B and C in China. *Hepatology Research* 27: 174-180, 2003
  - 13) Tran TT Huy, Hiroshi Ushijima, Khin Maung Win, Pairoj Luengrojanakul, Pradeep Krishna Shrestha, Hongxi Gu, Andrei V. Smirnov, Teresa Casanovas Taltavull, Tetsutaro Sata and Kenji Abe: High prevalence of the hepatitis B virus pre-S mutant in countries where it is endemic and its relationship with genotypes and chronicity. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 5449-5455, 2003
  - 14) Tran TT Huy, Hiroshi Ushijima, Vo Xuan Quang, Khin Maung Win, Pairoj Luengrojanakul, Kaoru Kikuchi, Tetsutaro Sata and Kenji Abe: Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two

- subgroups. Journal of General Virology 85: 283-292, 2004
2. 学会発表
- 1) Masahiko Sugitani, A. Sheikh1, Kenji Abe, Toshio Shikata, Shin Nishimura and K. Mizuno: Analysis of nucleic and amino acids sequence in HVR-1 of HCV in chimpanzee reinfection experiments. 11th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Diseases, April 2003, Sydney, Australia.
  - 2) Masahiko Sugitani, Kenji Abe, Toshio Shikata, Shin-ichiro Nishimura and Kyosuke Mizuno. Immune response against non-structure, core and hypervariable region 1 of HCV in chimpanzees - twice reinfected with the same strain of HCV. 10th International meeting on hepatitis C virus and related viruses, December 2003, Kyoto, Japan
  - 3) 阿部賢治、平野 真、丁 欣、Tran TT Huy、佐多徹太郎、李 天成、武田直和、川端寛樹、小泉信夫、渡辺治雄、角坂照貴、後藤郁夫、増沢俊幸、中村正治、平良勝也、黒木俊郎、谷川 力：E 型肝炎ウイルスの動物宿主を探る（1）日本に生息する野ネズミ類における疫学調査と感染流行の実態。第 39 回日本肝臓学会総会、2003 年 5 月、福岡
  - 4) 平野 真、丁 欣、Tran TT Huy、岩城陽子、佐多徹太郎、李 天成、武田直和、中村 伸、阿部賢治：E 型肝炎ウイルスの動物宿主を探る（2）各種霊長類における疫学調査とニホンザルにおける感染流行。第 39 回日本肝臓学会総会、2003 年 5 月、福岡
  - 5) 丁 欣、平野 真、Tran TT Huy、伊藤玲子、早川依里子、佐多徹太郎、李天成、武田直和、山口真理、薄井 貢、正木尚彦、林 茂樹、阿部賢治：東京地域における HEV 感染の実態と予防対策の必要性。第 39 回日本肝臓学会総会、2003 年 5 月、福岡
  - 6) 岩城陽子、丁 欣、Huy TT Tran、佐多徹太郎、荒川泰行、阿部賢治：日本人肝臓組織からの新種 Helicobacter 遺伝子の分離。第 39 回日本肝臓学会総会、2003 年 5 月、福岡
  - 7) Huy TT Tran, Xin Ding, Eriko Hayakawa, Tetsutaro Sata, Hiroshi Ushijima and Kenji Abe: Geographic distribution of HBV genotypes A through G in 13 countries: International collaborative survey. 第 39 回日本肝臓学会総会、2003 年 5 月、福岡
  - 8) Huy Tran, Hiroshi Ushijima, Makoto Hirano, Xing Din, Yoko Iwaki, Trinh Thi Ngoc, Shigeki Hayashi and Kenji Abe: Characteristic of basal core promoter and pre-core stop codon mutation of HBV isolated in Vietnam. 第 39 回日本肝臓学会総会、2003 年 5 月、福岡
  - 9) 菊地 馨、島袋容司樹、宮城政剛、慶田喜秀、丁 欣、阿部賢治：沖縄県における肝疾患例の E 型肝炎ウイルス感染の血清疫学的検討。第 39 回日本肝臓学会総会、2003 年 5 月、福岡
  - 10) 寺澤総介、伊藤玲子、丁 欣、阿部賢

治：消化器症状と原因不明の急性肝炎  
と診断された小児における E 型肝炎ウ  
イルスの関わり。第 39 回日本肝臓学  
会総会、2003 年 5 月、福岡

11) 小松陽樹、十河 剛、野崎昌俊、乾 あ  
やの、藤澤知雄、李 天成、丁 欣、  
阿部賢治：小児における E 型肝炎ウイ  
ルス抗体保有率の検討。第 39 回日本  
肝臓学会総会、2003 年 5 月、福岡

12) 大城戸健二、福島暁子、中村仁美、森  
山光彦、荒川泰行、阿部賢治：当院に  
入院した非 A-C 型肝疾患症例におけ  
る HEV 感染の現状。第 7 回日本肝臓  
学会大会、2003 年 10 月、大阪

厚生労働科学研究費補助金（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」  
分担研究報告書

野性イノシシ、野性シカおよびドブネズミにおける E 型肝炎ウイルス保有調査

分担研究者 田中智之（堺市衛生研究所）

協力研究者 三好龍也、吉田永祥、岩上泰雄、内野清子（堺市衛生研究所）

**研究要旨** 2003 年 12 月 14 日～2004 年 1 月 28 日にかけて、紀伊半島の和泉山脈から南方の紀南地区で狩猟されたイノシシ、シカ、およびカモシカファームで採取された新鮮便検体を用いて E 型肝炎ウイルス保有状況を調査した。また、堺市内で捕獲されたドブネズミ *Rattus norvegicus* 血清 61 検体を用いて、同様にウイルス保有状態を調査した。

ドブネズミを含めたどの検体からも HEV 抗体は検出されなかった。しかし、イノシシー頭(11.1%)の血清から HEV 遺伝子が検出された。検出された遺伝子塩基配列を解析した結果、既知の HEV 遺伝子、HE-JA6 AB082562, 「」型に属するものであることが判明した。

#### A. 研究目的

これまで E 型肝炎はネパール、インド、バングラデシュなどの開発途上国で、しばしば流行することが知られていた。ヒマラヤ山系の雪解けに伴う大洪水の後でしばしば見られることから、E 型肝炎は水系感染によるものと考えられていた。本邦においても、これまで地域的流行として報告されていた「猿島肝炎」や「清水肝炎」が E 型肝炎事例の可能性が考えられていた。

しかし、平成 15 年兵庫県におけるシカ肉の生食を原因とする E 型肝炎ウイルス（HEV）食中毒の発生事例や北海道で、市販の豚の肝臓から HEV が検出されたこと、さらに E 型肝炎に罹患した人が豚の肝臓を食べていたとの報告が相次いでなされ、これまでの E 型肝炎に対する知識

の変革が求められ、にわかにホットな食品由来感染症となった。E 型肝炎は A 型肝炎同様に 1～2 ヶ月で治癒する急性肝炎であるが、低頻度ながら劇症肝炎を起こし、その死亡率は 1～2%に達すると言われている。さらに、その発症機序は不明だが、妊婦の劇症肝炎では、死亡率が 10～30%の高率に報告されている。

厚生労働省健康局から様々な通達がなされ、本邦における E 型肝炎の実態把握、予防措置が急務となってきた。

今回、厚生労働科学特別研究事業の立ち上げに伴い、我々は国立感染症研究所と共同研究のもとで、野生イノシシ、野性のシカ、一部カモシカ、それにドブネズミを対象として HEV 保有調査を行った。

## B. 研究方法

### 1 材料

2003年12月14日～2004年1月28日にかけて、紀伊半島の和泉山脈から南方の紀南地区(図1)で狩猟されたイノシシ9頭、シカ2頭、およびカモシカファームで採取された新鮮便1検体、合計12検体を用いた。イノシシ全頭とシカ1頭は血液、肝臓を検査対象とした。もう1頭のシカは血液のみである。

ドブネズミ *Rattus norvegicus* は、1998年から、外部寄生虫調査、クリプトスポリジウム保有調査、O157、赤痢菌、サルモネラおよびエルシニアを主とした細菌学的検査を目的に、堺市内で捕獲され、採血できた血清61検体を用いた。これらの血清は $-40^{\circ}\text{C}$ に保存されていたものを一度の融解で抗体測定にした。

ドブネズミの血清についてはHEV抗体価測定を、イノシシ、シカ、およびカモシカの血清、肝臓、糞便についてはnested RT-PCRによるHEV遺伝子の保有状況を調査した。

### 2 抗体測定法

抗体測定はLiらの方法に従いELISA法を用いて、血清中HEV特異IgG抗体価を測定した。即ち、研究班長から供給されたバキュロウイルス発現E型肝炎ウイルス様粒子(HEV-VLPs)を抗原として、96wellプレートに固層し、1:200倍希釈血清と反応させた。測定方法は、国立感染症研究所ウイルス「部」マニュアルに準じた。

イノシシ血清に対する二次抗体にはICN社製HRPO-conjugated rabbit anti-swine IgG(whole molecule)(ICN Cat #55826)、ラットに対する二次抗体はICN

社製HRPO-conjugated goat anti-rat (no cross to mouse)(ICN Cat#55781)をそれぞれ1:4,000で希釈して使用した。

抗体価はVLPs固相ウエルの吸光度と血清希釈液のウエルの吸光度差0.2以上を抗体価陽性とした。試供された陽性コントロール、陰性コントロールで反応性を確認した。

### 3 ウイルス検出法

糞便検体は10%乳剤を10,000Gで20分間遠心した上清をRNA抽出キット(ISOGEN-LS, ニッポンジーン)にてウイルスRNAを抽出し水20 $\mu\text{l}$ に浮遊させた。血清は無希釈で用い、同様にウイルスRNAを抽出した。肝臓は20%乳剤を10,000Gで20分間遠心した上清から、同様にRNAを抽出した。抽出したRNAからHEV遺伝子検索のPCR法は、国立感染症研究所「ウイルス」部のマニュアルに準じた。

PCR産物は、ABI PRISM 310 Genetic Analyzerを用いたダイレクトシクエンスを用い、その塩基配列を調べた。

## C. 研究結果

### 1 血清抗体価

イノシシ血清にはOD値0.2以上の抗体価を示した検体は見られなかった。ドブネズミ血清では1検体が40倍希釈でOD値0.104, 200倍希釈でOD値0.054を示す以外は高値例は見られなかった(表1)。

### 2 HEVウイルス遺伝子検出

肝臓及び血清からのウイルス検出結果を表1に示す。血液のPCRによって平成16年1月28日に和歌山紀北地方で捕獲されたイノシシ1頭からHEVが検出され



た(図 2)。検出された HEV 遺伝子はシークエンスの結果、HE-JA6 AB082562 と近縁の」型に属することが確認された(表 2)。

カモシカ便検体から HEV 遺伝子は検出されなかった。

#### D. 考察

食を介する E 型肝炎の発症事例は、わが国の「食の安全」にとって、食習慣の落とし穴とも言うべき極めて重大な問題を提示した。その原因食材が野性イノシシやシカの筋肉や肝臓の生食に由来している。野性イノシシの多くは、ブタとの交雑種、いわゆるイノブタの野性化であるとの報告もある。

ブタのわが国における HEV 抗体保有率は不明であるが、アメリカの 80%、韓国の 30~60%、カナダの 15~38%、台湾 37%、タイ 40-90%、ベトナム 36% の抗体保有率の報告をみても同程度の HEV 浸淫度が推測されても不思議ではない。

そのような状況のもと、イノシシの肝臓の生食によって E 型肝炎の発症が見られたことは一理があろう。

今回の我々の紀伊半島における HEV 保有調査で、検査検体は少ないが、イノシシ 9 頭中 1 頭に HEV 遺伝子が検出された。遺伝子型は日本で検出されている」型であった。この班の班会議においても愛知県から同様に IV 型 E 型肝炎ウイルスの報告があり、本邦のイノシシにおいても、HEV の浸淫が広範に存在していることが推測される。これらが、ブタ由来か否かについては、今後、更なる遺伝子学的解析が必要である。

検索しえたシカの血液、肝臓およびカ

モシカの糞便からは HEV ウイルス遺伝子は検出されなかった。

一方、国内各地に生息するドブネズミにも 31.5%、クマネズミに 13.3%の HEV 抗体保有率が報告されている。Maryland 77%、ハワイ 90%という驚異的な抗体保有率の報告もある。

我々の堺市内で捕獲されたドブネズミには一例の抗体保有も見られなかった。しかし、HEV の水系汚染が推測されるなら、今後もこの調査研究は継続しなければならないだろう。

前方視野的視点に立って、食の安全に関する調査研究は必要である。とくに、本邦では昔より、貴重な動物性蛋白源として、トリ、ブタは言うに及ばず、野性のイノシシやシカを捕獲し食材とした。この習慣がある限り、ブタ、イノシシ、シカのみならず対象家禽を拡大して、調査研究がなされなければならない。加えてヒトにおける広範囲な HEV 抗体調査も並行して行わなければ、本邦における真の HEV 浸淫度は解明できないだろう。

#### E. 結論

和歌山県紀北地区から紀南地区にかけて生息するイノシシ、シカに対する HEV 保有状況を調査した。その結果、紀北地区で捕獲されたイノシシから HEV 遺伝子が検出された。ウイルスの遺伝子型」型であった。

謝辞: ドブネズミ捕獲にご協力いただいた堺市保健所生活衛生センターの皆様に感謝いたします。

**F. 健康危険情報**

なし

**G. 研究業績**

1. 論文発表

HEV 関連論文なし

2. 著書

HEV 関連論文なし

3. 学会発表

HEV 関連論文なし

**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

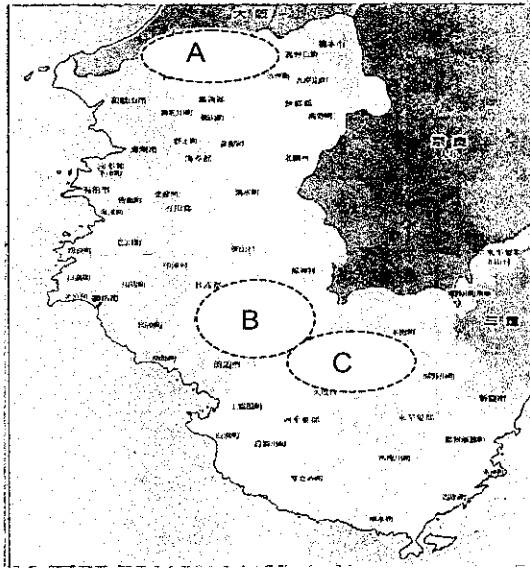
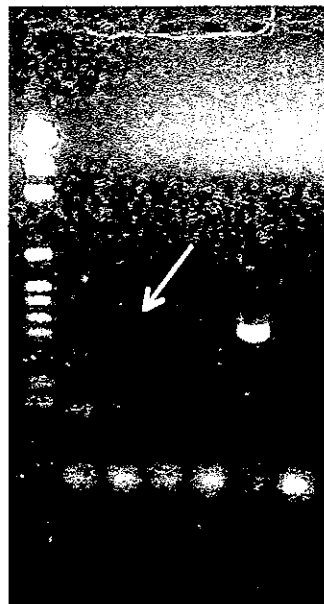


図1. 紀伊半島における野生イノシシ狩猟地域

A: 阪南・岩出粉川地域、 B: 田辺・電神地域、  
 C: 中辺路・本宮地域



イノシシ	#8	#9	#8	#9	PC	NC
	血液	血液	肝臓	肝臓		

図2. HEV nested PCR

表 1. 捕獲地域別 HEV 検出状況

狩猟地域 材料	A 地域		B 地域		C 地域		
	血液	肝臓	血液	肝臓	血液	肝臓	糞便
イノシシ 9 頭	1/4	0/4	0/3	0/3	0/2	0/2	0
シカ 2 頭	0	0	0	0	nt/1	0/2	0
カモシカ 1 頭	0	0	0	0	0	0	0/1

- 肝臓、糞便は RT-PCR による HEV 遺伝子検出施行
- 血液は RT-PCR と HEV 抗体測定を施行
- nt: HEV 抗体検査未施行

表 2. HEV 遺伝子系統樹解析

