

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

奥三河及び伊那地方に生息するイノシシ、シカの E 型肝炎保有調査

分担研究者 榮 賢司（愛知県衛生研究所 微生物部部長）
協力研究者 藤浦 明、小林慎一、山下照夫、伊藤 雅、梶島由佳
（愛知県衛生研究所 微生物部）
大西健次郎、田中信治（岡崎市保健所）
藤平 昇（新城保健所設楽支所）
下平 徹（伊那保健所）

研究要旨 2003年11月から2004年1月に捕獲された愛知県東部から長野県南部に生息する野生のイノシシ、シカ及びカモシカの E 型肝炎ウイルス (HEV) に対する抗体保有状況及びウイルス保有状況を調査した。HEV に対する抗体はイノシシ 44 頭中 1 頭(2.3%)から、ウイルスは抗体を保有していたイノシシとは別の 1 頭(2.3%)から検出された。

シカ 12 頭からは抗体、ウイルス共に陰性であった。カモシカ 1 頭からのウイルス検出は陰性であった。

イノシシから検出されたウイルスは PCR 産物の遺伝子配列を調べ、既知の HEV 遺伝子と比較したところ、型に属することが判明した。

A. 研究目的

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) 食中毒の発生事例が英医学誌「THE LANCET」に掲載され、平成 15 年 8 月 1 日付けで、健感発第 0801001 号及び食安監発第 0801001 号で厚生労働省健康局結核感染症課長及び同省医薬食品局食品安全部監視安全課長から「生シカ肉を介する E 型肝炎ウイルス食中毒事例について」の通知が出された。また、9 月には医学誌「Journal of General Virology」に北海道で、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掲載され、これについては平成 15 年 8 月 19 日付けで、健感発第 0819001 号及び食安監発第 0819002 号で厚生労働省健康局結核感染症課長及び同省医薬食品局食品安全部監視安全課長から「食肉を介する E 型肝炎ウイルス感染事例について」の通知が出された。

E 型肝炎はインド、バングラデシュなどの開発途上国でしばしば流行する事が知られているが、近年、米国や日本などでも散发例が報告されるようになった。しかも海外渡航歴が全くない人が発症する例も見つかっており、また豚も HEV と同

じウイルスに感染することも解ってきた。

E型肝炎はA型肝炎と同じように口から感染する疾患で、食品や水から感染したり、動物に接触する機会の多い人が感染獣から感染する可能性がある。症状はA型肝炎と同様であるが、重症化の頻度が高く、死亡率は1~2%で、とくに妊婦は劇症化しやすく、死亡率が17~33%と報告されている。

そこで我々は国立感染症研究所と共同で、野生のシカ、カモシカ及びイノシシ等がどれくらいの割合でHEVに感染しているかを調査した。

B. 研究方法

1 材料

2003年10月4日~2004年1月10日に、長野県南部の下伊那郡ではイノシシ2頭、シカ4頭、愛知県東部山間部の南設楽郡からはイノシシ15頭、カモシカ1頭、愛知県東部市街地近郊の岡崎市からはイノシシ27頭、シカ8頭が捕獲された。

これらの動物の血清についてはHEVの抗体価測定を、糞便、血液及び肝臓についてはnested RT-PCRによるウイルス保有状況を調査した。

2 抗体測定法

抗体価の測定法はELISA法により、血液中のIgG抗体価を測定した。

ELISA法はLiらの方法(Li, T.C. J. Med. Virol., 62, 327-333, 2000)に従い、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)を抗原として使用した。

イノシシの血清抗体価測定の際の二次抗体にはKPL社製HRP-conjugated goat anti-swine IgG(H+L)(KPL Cat No.14-14-

06)を1:2,000で、シカの二次抗体はKPL社製HRP-conjugated Rabbit anti-swine IgG(H+L)(KPL Cat No.04-31-06)を1:1,000で使用した。

抗体価測定は、HEV-VLPsを固相化したホールと希釈液のみのホールにイノシシ及びシカの血清を100倍希釈して入れ、反応後それぞれにHRP結合抗ブタIgG抗体及びHRP結合抗シカ抗体を結合させ、洗浄後、オルトフェニレンジアミン(OPD)と過酸化水素によって発色させ、その吸光度(波長492nm)を測定した。

抗体価はVLPs固相化ホールの吸光度と希釈液のみのホールの吸光度の差とし、その差が0.2以上を抗体価陽性とした。

3 ウイルス検出法

糞便は10%乳剤を10,000Gで20分間遠心した上清を、血清は10倍希釈したものをRNA抽出キット(QIAamp MinElute Virus Spin Kit QIAGEN Cat.No.57704)にてウイルスRNAを抽出し水20 μ lに浮遊させた。

その5 μ lからOne-step RT-PCRキット(SuperScript One-Step RT-PCR System For Long Templates CatNo. 11922-028 Invitrogen)を用いてHEV遺伝子の1st RT-PCRを行い、更に2nd PCR(Ex Taq TAKARA Cat.No.RR001A)によって増幅を試みた。PCRに用いたのプライマーは1st PCRがHEV-F1(5'-TAY CGH AAY CAA GGH TGG CG-3')とHEV-R2(5'-YGY TGG TTRTVR TAR TCC TG-3')、2nd PCRがHEV-F2(5'-GGB GTB GCN GAG GAG GAG GC-3')とHEV-R1(5'-CGA CGA AAT YAA TTC TGT CG-3')を使用し、アガロースゲル電気泳動でPCR産物を確認した。

PCR産物は、Bio-Rad社のスピンカラムにて精製し、プロメガ社のpGEM-T vectorに組み込んだ。各陽性検体につき3クローンずつ選択し、その塩基配列を調べた。

C. 研究結果

1 血清抗体価

表1にOD値0.2以上の抗体価を示した個体を採取地域別動物別に示した。

抗体は南設楽郡で捕獲されたイノシシ1頭が陽性であった。このイノシシは2003年12月6日に新城市で捕獲された2歳、メス（体重48Kg）であった。

2 ウイルス検出

糞便及び血清からのウイルス検出結果を採取地域別動物別に示した表2に示した。

HEVに対する抗体は南設楽郡で捕獲された1頭のみ陽性であった。また、糞便及び血液のPCRによって南設楽郡で捕獲された別の1頭からHEVが検出された。

抗体陽性のイノシシはまたHEVが検出されたのは2003年12月21日に南設楽郡鳳来町で捕獲された1歳、メス（体重12Kg）であった。検出されたウイルス遺伝子は、型に属することがシーケンスによって確認された。

D. 考察

HEV抗体保有率に関する報告ではブタでは80% (USA)、30~60%(Korea)、15~38%(Kanada)、等の報告があるが、シカについては不明である。

我々の調査では本州中部のシカでは抗体保有例はなく、イノシシにおいては44頭中1頭(2.3%)が抗体を保有していた。

しかしながら今回実施したELISA法による抗体価測定においては、イノシシのほとんどの血清が希釈液のみのホールでも発色が見られ、検査法に示されたスキムミルクによる抗体のブロックが不十分であった。このことにより、HEVの抗体がマスクされ、検出されなかった可能性も否定できない。

今後イノシシの抗体測定法についても検討する必要がある。

ウイルス検出についてはnested PCRによってイノシシ1頭からウイルスが検出され、PCR産物のシーケンスの結果Genotype、型であることが判明した。

生息地域が判っている野生のイノシシからのウイルス検出は初めてのことであり、我が国にHEVが常在する事が明らかとなった。

ウイルスが検出されたイノシシは1歳と若く、抗体が見られなかったことから、感染初期であったものと思われる。

今後この地域での人及び動物の更なるHEV感染調査が必要であろうと考える。

E. 結論

愛知県東部から長野県南部地域に生息するイノシシ、シカに対するHEVの汚染状況を調査した。その結果、新城市で捕獲された2歳メスのイノシシから抗体が、鳳来町で捕獲された1歳メスのイノシシからHEVの遺伝子を確認した。

検出されたウイルスの遺伝子型は、型であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究業績

1. 論文発表

- 1) T. Yamashita, M. Ito, Y. Kabashima, H. Tsuzuki, A. Fujiura and K. Sakae. Isolation and characterization of a new species of kobuvirus associated with cattle. *J. Gen. Virol* ; 84: 3069-3077, 2003
- 2) M. Ito, T. Yamashita, H. Tsuzuki, N. Takeda, and K. Sakae. Isolation and identification of a novel human parechovirus. *J. Gen. Virol.* 85: 391-398, 2004
- 3) Shinichi Kobayashi, Katsuro Natori, Naokazu Takeda and Kenji Sakae. Immunomagnetic Capture RT-PCR for Detection of Norovirus from Foods Implicated in a Foodborne Outbreak. in press *Microbiol. Immunol* Vol.48, No.3, 2004

2. 著書

- 1) T. Yamashita and K. Sakae. Molecular biology and epidemiology of Aichi virus and other diarrhoeogenic enteroviruses. pp 645-657, in U. Dessenberger & J. Gray eds. *Perspectives In Medical Virology, 9. Viral Gastroenteritis.*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 2003

3. 学会発表

- 1) 山下 照夫、藤浦 明、椛島由佳、伊藤 雅、榮 賢司 下水中のアイチウイルスの消長と新たな遺伝子型の検出 第51回日本ウイルス学会学術集会、京都市、2003年10月。
- 2) 小林慎一、山下 照夫、藤浦 明、

榮 賢司 平成14年度の愛知県におけるノロウイルスの検出状況 第51回日本ウイルス学会学術集会、京都市、2003年10月。

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

イノシシ・シカの捕獲地域

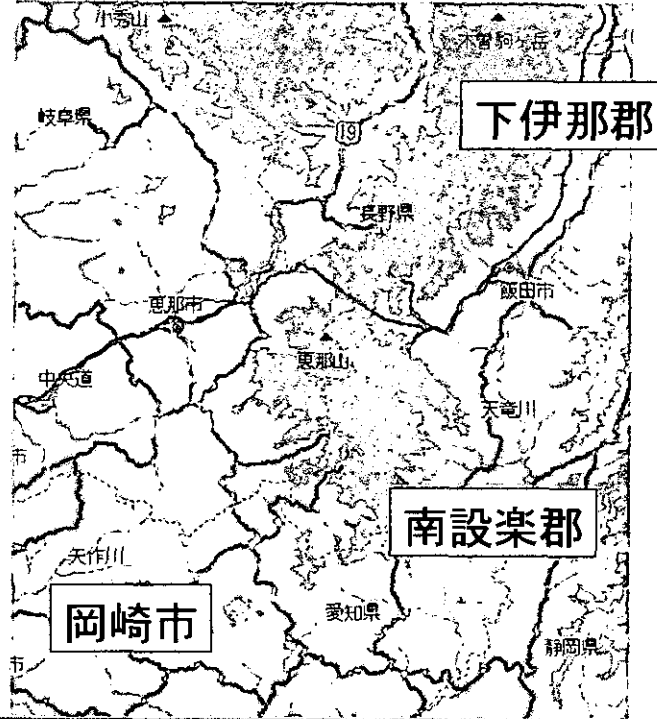


表 1 ELISA法によるHEV抗体調査

採取地域	捕獲動物	
	イノシシ	シカ
下伊那郡	0/2	0/4
南設楽郡	1/15	
岡崎市	0/27	0/8

表2 RT-PCRによるHEV検出

採取地域	捕獲動物					
	イノシシ			シカ（カモシカ）		
	糞便	血液	肝臓	糞便	血液	肝臓
下伊那郡	0/2	0/2	検査中	0/4	0/4	検査中
南設楽郡	1/15	1/15	検査中	0/1*	0/1*	検査中
岡崎市	0/27	0/27	検査中	0/8	0/8	検査中
合計	1/44	1/44		0/13	0/13	

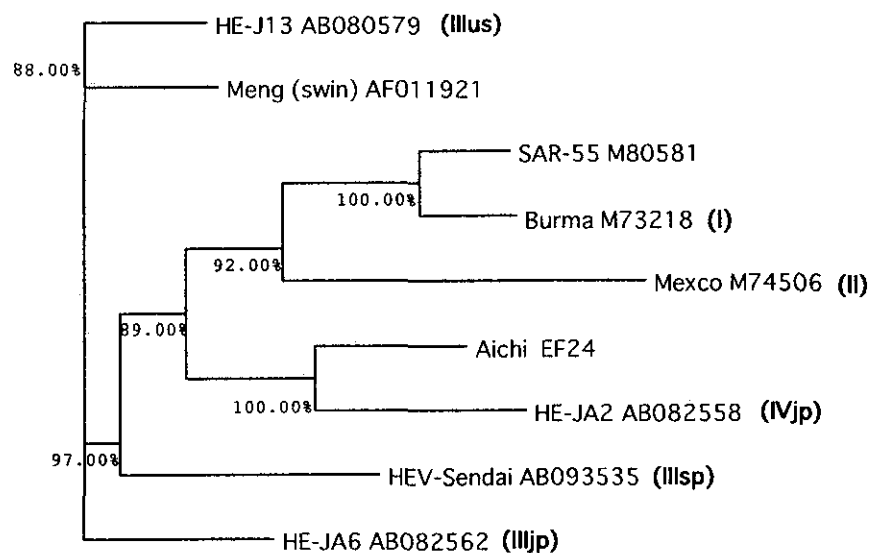
HEV抗体が検出されたイノシシ

- ・採取年月日 2003年12月 6日
- ・年 齢 2歳
- ・性 別 メス
- ・体 重 48Kg
- ・捕獲場所 愛知県新城市

HEV遺伝子が検出されたイノシシ

- 採取年月日 2003年12月21日
- 年 齢 1歳
- 性 別 メス
- 体 重 12Kg
- 捕獲場所 愛知県南設楽郡鳳来町

愛知県で検出されたHEVの系統樹解析



平成 15 年度厚生科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）
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」
野生動物における HEV 感染状況の把握

協力研究者 大瀬戸光明 愛媛県立衛生環境研究所

研究要旨 最近、シカやイノシシの肉を生食又は加熱不十分の状態で摂食し、死亡例 1 例を含む重篤な E 型肝炎を発症した事例が連続して報告された。これら野生動物の肉や内臓の食品としての安全性を評価するため、野生動物における E 型肝炎ウイルス（HEV）の感染実態の把握を試みた。今回は、愛媛県内で 2000 年 12 月から 2002 年 4 月の間に捕獲された野生タヌキの肝臓を用い、HEV-RNA を増幅する nested PCR を行ったが、供試した 30 例は全て陰性であった。

A. 研究目的

わが国での E 型肝炎患者発生報告は、感染症発生動向調査では 1999 年から 2002 年の間に 10 人以下で、年間 400 から 500 人の報告がある A 型肝炎と比べて著しく少数である。E 型肝炎の診断法が未だ十分に普及してないため、感染症発生動向調査で E 型肝炎患者発生数が把握しきれなく、実数は数倍以上あるものと考えられている。

E 型肝炎は、アフリカ、アジアの発展途上国を中心に流行しており、水系感染による大規模な集団発生がしばしば報告されている。日本や欧米では、E 型肝炎は散発的発生がみられるが、それらは E 型肝炎の流行国で感染する旅行者感染症であると考えられていた。最近、米国、および日本で海外旅行の経験が無く、国内での感染が示唆される E 型肝炎の発生

例が報告されるようになり、それぞれの国に土着の E 型肝炎ウイルス（HEV）が存在すると考えられるようになった。2003 年には国内でシカ肉やイノシシの肝臓を生食して E 型肝炎を発症した例が報告され、さらに、シカの肉と患者から検出された HEV 遺伝子の塩基配列が一致し、野生動物の肉の生食が E 型肝炎の原因であったことが証明された。また、北海道ではブタ肝臓の生食或いは加熱不十分の状態での摂食が E 型肝炎の高いリスク要因であることが示された。

我々は野生動物の HEV 感染実態を把握するため、野生動物の肝臓、血液、糞便等からの HEV-RNA の検出を意図した。今回は、愛媛県科学博物館から、2000 年から 2002 年の間に捕獲し冷凍保存されていた野生タヌキの肝臓を入手できたので、HEV-RNA の検出を試みた。検査に供した

タヌキ肝臓 30 例の nested PCR の結果は全て陰性であったが、その概要を報告する。

B. 材料と方法

材料：供試したタヌキの肝臓は、2000 年 12 月から 2002 年 4 月の間に、愛媛県内で捕獲され、愛媛県立自然科学博物館において冷凍保存されていたものを分与された。タヌキの捕獲地域を図に示した。30 例中 22 例は県東部、5 例は県中部の山間部、2 例は県南部で捕獲された。1 例は捕獲地及び捕獲月日が不明であった。

方法：肝臓からの RNA の抽出は、TRIZOL (Invitrogen) を用い、マニュアルに従って行った。即ち、細切した肝臓組織 100mg に TRIZOL を 750 μ l 加えホモジナイズし、遠心上清に 200 μ l のクロロホルムを加え、攪拌し、室温 10 分間静置後、遠心して水相をイソプロピルアルコール沈殿及びエタノール沈殿し、乾燥後 RNase free の蒸留水 50 μ l に溶解した。HEV-RNA 陽性の糞便材料及びサル血清（国立感染症研究所 武田博士より分与）を陽性コントロールとして同時に RNA の抽出を行った。抽出 RNA の逆転写 (RT) 及び nested PCR は、本研究班で推奨された方法に準じて行った。RT は HEV 特異プライマー-HEV-R2 を用い、42°C 1 時間反応させた。1st PCR にはプライマー-HEV-R2 及び HEV-F1 を用い、95°C 1 分の後、95°C 30 秒、55°C 45 秒、72°C 1 分を 30 サイクル後、72°C 7 分で行った。Nested PCR はプライマー HEV-F2 及び HEV-R1 を用いサーマルサ

イクラーの条件は 1st PCR と同条件で行った。

C. 結果及び考察

RT-PCR では、糞便材料及びサル血清の陽性コントロールとともに、約 360bps の PCR 産物が確認できたが、30 例のタヌキ肝臓検体からは全く遺伝子の増幅は見られなかった(表)。検査に供したタヌキの年齢は不詳であったが、当地方においては HEV を保有しているタヌキが捕獲されることは多くないことが示唆された。しかし、捕獲された時には HEV の一過性の感染がすでにクリアーされていたことも考えられ、野生タヌキにおける HEV 感染の頻度については、今回の調査だけでは推測できなかった。今後タヌキの HEV 抗体保有状況等の調査が必要と思われる。

D. まとめ

愛媛県内で捕獲された野生タヌキ 30 例の肝臓から、HEV-RNA の検出を試みたが全例陰性で、HEV を保有している野生タヌキは多くはないことが示唆された。

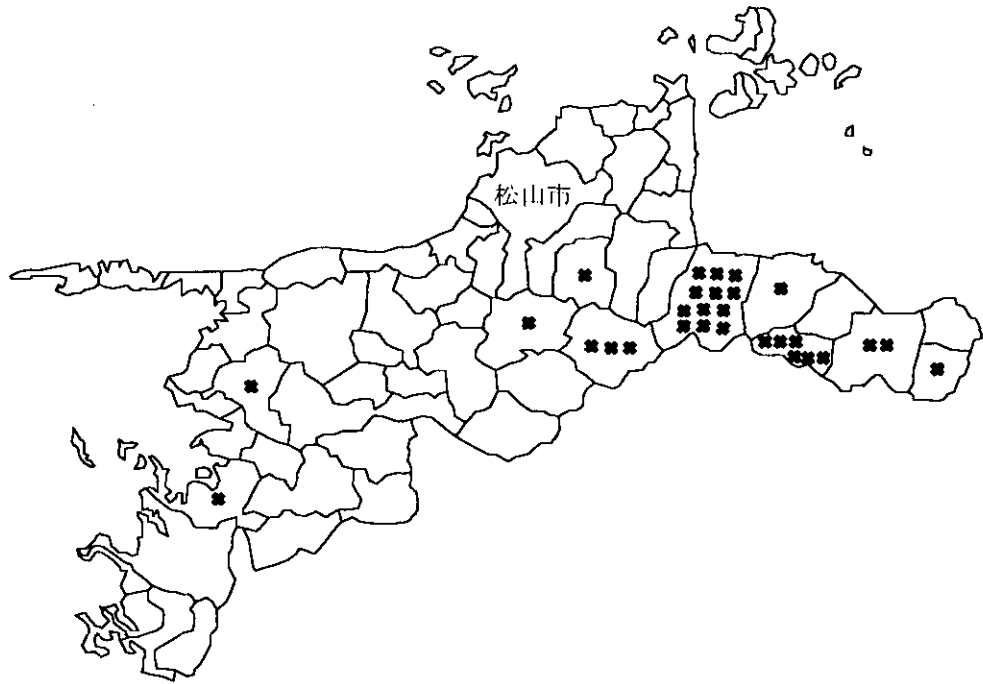


図 野生タヌキ捕獲地（2000年12月から2002年4月）

表 nested PCR による野生タヌキ肝臓からの HEV-RNA の検出

捕獲年月	検査数	nested PCR	
		陽性	陰性
2000年 12月	2	0	2
2001年 1月	2	0	2
” 2月	8	0	8
” 3月	10	0	10
” 12月	1	0	1
2002年 1月	0		
” 2月	2	0	2
” 3月	3	0	3
” 4月	1	0	1
不明	1	0	1
計	30	0	30

研究報告書

兵庫県で発生したシカ肉が原因と考えられたE型肝炎患者の集団発生と
県下野生シカのE型肝炎ウイルス保有調査

近平 雅嗣、押部 智宏（兵庫県立健康環境科学研究センター）

池田 正彦（兵庫県加西健康福祉事務所）

菊地 豊彦（兵庫県西播磨食肉衛生検査所）

研究要旨 平成15年4月に加西市内で発生した非A・B・C型肝炎患者の疫学調査を行うと共に、肝炎患者および患者らが喫食した感染源と考えられた冷凍シカ肉からE型肝炎ウイルスの検出を行った。さらに、兵庫県下で捕獲される野生シカのE型肝炎ウイルス汚染実態調査によって、食品としてのシカ肉の安全性を検証した

A. 研究目的

国内で発生するE型肝炎患者は、従来は海外における感染例で、国内での感染はないと考えられていた。しかし、最近になって東日本を中心にE型肝炎ウイルス(HEV)の国内での感染事例が相次いで報告されている。また、HEVは食肉として流通するブタ肝臓からも検出され、この中にはヒト由来ウイルスと塩基配列の類似性が高い株が存在することが示された。このことは、汚染した国内産食肉によってHEVに感染する可能性を示しており、食品の安全性に対する新たな問題となりつつある。

このような状況下で、平成15年4月に兵庫県下において非A・B・C型肝炎の集団発生があった。この事例で患者全員がシカ肉を食べていたことから、食品を介したHEVの感染による肝炎と推定された。このため、患者や原因食と考えられたシカ肉からHEV検出を試みた。さらに、このシカは兵庫県下で捕獲されていたことから、平成15年8～10月に県下で捕獲されたシカからHEVの検出を行い、シカ肉の食品としての安全性について検証する。

B. 研究方法

1. E型肝炎患者の調査

加西健康福祉事務所の食品衛生担当者が、病院担当医及び患者等から、発症状況や喫食状況について聞き取り調査を行った。

2. 検体

1) E型肝炎患者

患者血清及び便は発症後15～24日目に採取した(Fig. 1)。患者宅で冷凍保管されていた3ロットのシカ肉の提供を受けた。

2) 県下で市販されている冷凍シカ肉

厚生労働省の通達に従って県下の健康福祉事務所(保健所)による現場調査の際に、市販用に保存されていたシカ肉6検体を収去した。この内の4検体の兵庫県で、他の2検体は京都府下で捕獲されていた。

3) 県下で捕獲された野生シカ

有害鳥獣の駆除を目的に県下の農林事務所が各地の猟友会に依頼して射殺されたシカを対象とし

た。県下西播磨地区で捕獲された29頭のシカについて、猟友会から肉、肝臓、糞便、血液の提供を受けた。

猟友会からのシカ捕獲の連絡を受けて、西播磨食肉検査所の職員が現地まで出かけ、狩猟メンバーによって採取された検体を受け取り、同検査所で一時的に保存し、定期的に研究センターに搬入した。

3. 検査法

1) 患者血清及びシカ血清からのウイルスRNAの抽出

血清採取時点では患者は既に回復しており(Fig. 1)、血液中のウイルス量が極僅かであると予想されたため、ウイルスRNAの抽出に先だって、超高速遠心法によって血清中のウイルスの濃縮を行った(Fig. 2)。遠心後の沈渣からQIAamp Viral RNA mini Kit (Qiagen)でRNAを抽出した。

シカ血清は同キットの添付マニュアルに従って、140 μ lからRNAを抽出した。

2) シカ肉、シカ肝臓、患者便及びシカ糞便からのウイルスRNAの抽出

細切したシカ肉あるいは肝臓を注射用蒸留水と共にストマッカーで攪拌して10%懸濁液を作成し、この高速遠心上清(8,000rpm / 20分)を30%蔗糖液上に重層し、超高速遠心(45,000rpm / 1時間)した沈渣から上記キットでRNAを抽出した。患者便も20%乳剤を作成し、同様の方法で濃縮、RNAを抽出した。

シカ糞便では高速遠心した20%乳剤の上清から、直接RNAを抽出した。

3) RT-PCR

PCRには、Takahashiらが設計した、HEVのORF-1領域を増幅するHE5-1~6プライマーセットにより 2nd PCRまで行った(Table 1)。

HE5-1/HE5-4/HE5-5プライマーを用いてTakara One RNA PCR Kit (AMV) でRT-PCRを行い、この反応産物の一部からHE5-2/HE5-3/HE5-6プライマーで2nd PCRを行った。2nd PCRはAmpliTaq Gold(アプライド・バイオシステムズ)用いたホットスタート法で増幅した。

4) PCR増幅したDNAの塩基配列

電気泳動後のゲルでPCR増幅産物のシングルバンドを確認した場合は、精製後のDNAについてBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (アプライド・バイオシステムズ)によるダイレクトシーケンス法で、塩基配列を決定した。得られた配列はDDBJ遺伝子データベースによって、HEV遺伝子あることを確認した。

C. 研究結果

1. E型肝炎患者の発生状況

E型肝炎患者のシカ肉の喫食状況とその後の発症までの時間経過をFig.1及びTable 2に示した。患者の家族や知人でシカ肉を喫食したのは、5家族の8名であった。患者宅には3種類のシカ肉が保存されており(M1~M3)、この内のM2とM3は同一個体から切り分けられた背ロースで、M1は異なるシカの背ロースであった。M2(M3)は全員が、またM1は6名が喫食していた。M2(M3)だけを食べた2名は発症せず、M1とM2(M3)両方を食べた6名のうち4名がE型肝炎を発症した。

M1は2月に、M2(M3)は4月に喫食されており、M1を原因食と仮定した時の潜伏期間は47~71日、M2(M3)では11~22日となった。E型肝炎の平均潜伏期間とされる6週間からすると、M1が原因食肉であることが強く示唆された。

4名の患者のうち3名は発症1~3日後に入院し、10~22日で退院した。1名は通院治療によって回復した。

2. 患者及び喫食したシカ肉からのHEV遺伝子検出

E型肝炎を発症した患者4名から回復後に採取した血清と便から、PCR法によりHEV検出を試みたが、いずれの検体からもウイルスは検出されなかった。

患者宅のフリーザーに保存されていた3検体のシカ肉の検査では1検体(M1)からHEV遺伝子が検出された (Fig. 3)。このORF-1領域の増幅DNAの塩基配列(327bp)をDDBJ遺伝子データベースによって検索すると、登録番号AP003040と最もよく一致し、93.6%の一致率であった。本株の遺伝子型は国内での分離頻度が最も高いとされる「型」であった。

一方、患者等が入院した病院での検査では、HEV・IgMが陽性となった4名の血清及び我々がHEVを検出した同じロットのシカ肉から、HEV遺伝子をPCR法で検出し、これらの塩基配列はほぼ一致したと報じている。

3. 市販シカ肉のHEV遺伝子検索

兵庫県では平成15年8月の厚生労働省通達により、同年9月に市販シカ肉の実態調査と共に、取去検査によってHEVの存在を確かめた。6検体の市販肉について検査したが、どの検体からもHEV遺伝子は検出されなかった(Table 3)。これら6検体のうち県内で捕獲されたのは4検体、他の2検体は京都府下で捕獲されたシカであった(Fig. 5)。

4. 兵庫県における野生シカの捕獲状況

Fig. 4に兵庫県下での野生シカの捕獲頭数を示した。これは平成2年度からの集計であるが、捕獲頭数は平成7～9年に減少傾向を示した以外は毎年増加していた。総捕獲数は平成10年の8,985頭から平成14年には12,035頭へと増加した。この間の狩猟目的別捕獲数をみると、猟期を設定した狩猟での捕獲は7,212頭から8,186頭へと

13.5%(974頭)の増加であったが、有害捕獲目的では1,773頭から3,849頭へと2,076頭の増加で、これは117.1%の増加率であった。特にこの間の有害鳥獣としての捕獲頭数が急増しており、これは、野生でシカが増加しているか、あるいは餌を求めて人里近くへ移動していることが、その大きな理由と思われる。

一方、県下で販売されるシカ肉は5.500トンとされており、今回の食中毒の原因となった背ロースは通常生で喫食される。背ロースは、シカ肉の中では最も好まれて喫食される部位であることから、捕獲時には優先的に採取され、流通することが考えられる。このため、シカ肉の全流通量における背ロースの割合は、かなり高いことが予想される。従って、HEVに感染したシカが捕獲された場合には、背ロースを介して多くのヒトに感染することが考えられる。

5. 兵庫県西播磨地区における野生シカのE型肝炎ウイルス保有調査

西播磨地区の揖保川流域を主たる狩猟域とする猟友会の協力を得て、県農林事務所が定期的に行う有害鳥獣事業によって捕獲されたシカについてHEV検出を試みた(Fig. 5)。同地域では29頭のシカの肉、肝臓、血液、直腸宿便について調べたが、すべての検体からHEV遺伝子は検出されなかった。

本地域で捕獲したシカは1～8歳(平均年齢 5.6歳)で、雄24頭、雌は5頭であった。

HE5-2/HE5-3/HE5-6プライマーを用いたnested PCR後の電気泳動では、2検体の肝臓で増幅目的DNAとほぼ同じ泳動位置(365bp)にバンドが検出された。確認のために、このDNAの塩基配列を調べたところ、シカ細胞由来の配列であった。このため、本プライマーセットを動物臓器、少なくともシカの肝臓に適用する場合には、増幅DNAの塩基配列解析などによる確認が必要と思われた。

D. まとめ

- ・ 兵庫県で4名の非A・B・C型肝炎患者が発生し、担当病院の検査では患者全員からHEV・IgM陽性であった。
- ・ 患者の回復期の血清及び便からE型肝炎ウイルスは検出されなかった。
- ・ 患者らが食べ、原因食と考えられたシカ肉からE型肝炎ウイルス(HEV)を検出した。このウイルスは遺伝子型が「J」型であった。
- ・ 担当病院の検査で、4名のE型肝炎患者からHEVが検出され、これらのウイルスは喫食したシカ肉から検出したHEVとPCR増幅したDNAの塩基配列がほぼ一致した。
- ・ 県下で販売される6検体のシカ肉の検査ではHEVは検出されなかった。
- ・ 兵庫県西播磨地区で捕獲した29頭のシカのHEV汚染実態を調査したが、ウイルスは検出されなかった。
- ・ 今後、兵庫県下全域にわたってシカのHEV汚染調査を行う。

Fig. 1 E型肝炎患者の発症経過

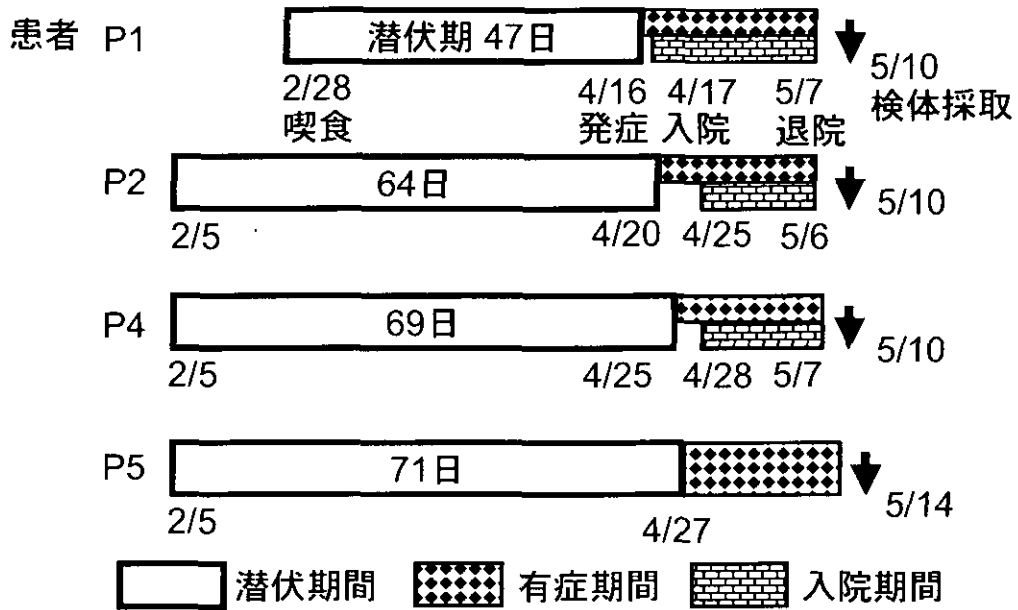


Fig. 2 E型肝炎ウイルスの検査法

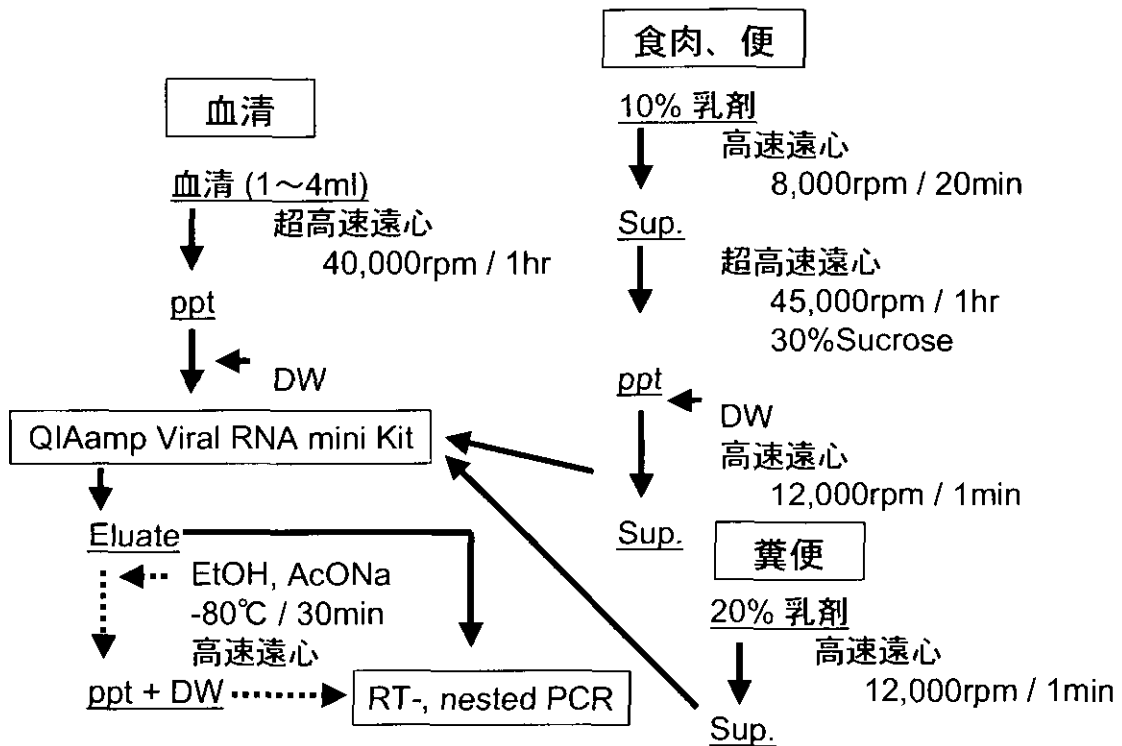


Fig. 5 E型肝炎患者の発生地と供試したシカの捕獲地

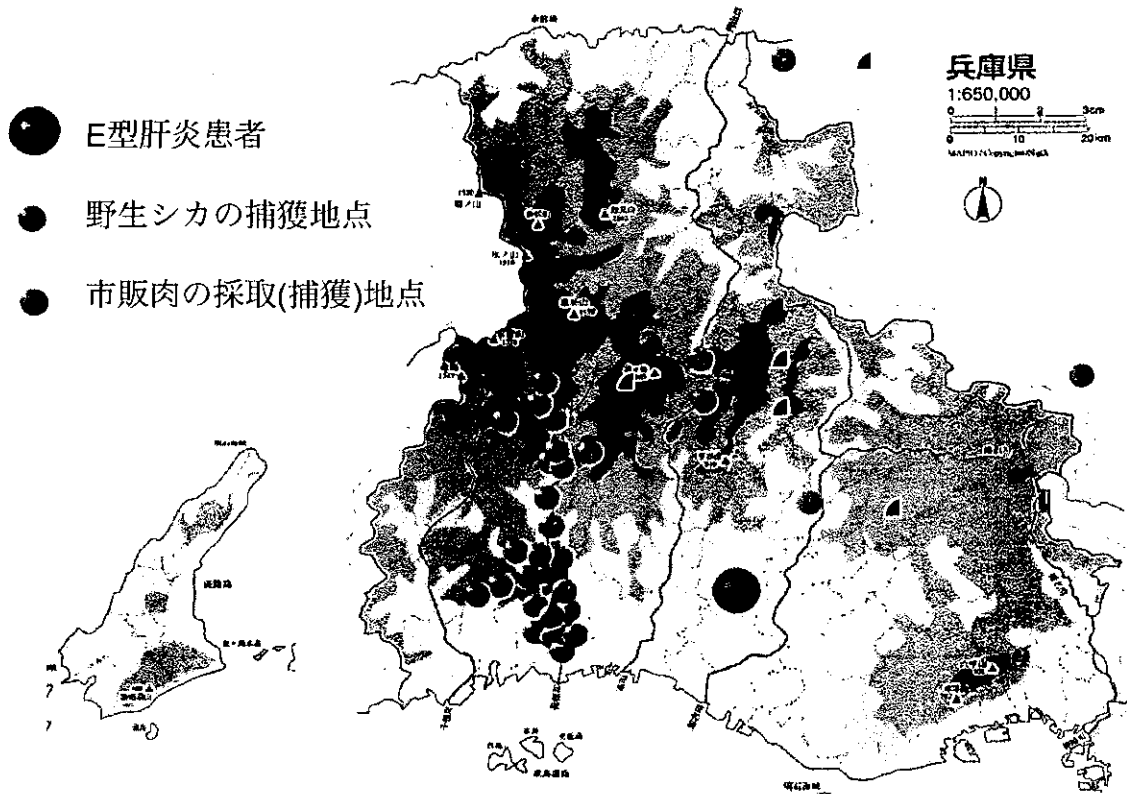


Table 1 E型肝炎ウイルスの検出に用いたプライマー

HE5-1	5' - TCGATGCCATGGAGGCCCA - 3'
HE5-2	5' - GCCYTKGCGAATGCTGTGG - 3'
HE5-3	5' - TCRAARCAGTARGTGCGGTC - 3'
HE5-4	5' - TCRAARCAGTARGTGCGGTC - 3'
HE5-5	5' - CATYGCCTCSGCAACATCGG - 3'
HE5-6	5' - TYAAAACAGTAGGTTCGATC - 3'

Table 2 E型肝炎患者の発生とシカ肉の喫食日

家族 ・ 人数	喫食者	発症	シカ肉 (個体 & 喫食日)				
			M1		M2 & M3		
			2 / 5	2 / 28	4 / 5	4 / 7	4 / 13
A (3)	P1	4/16		○	○	○	
B (2)	P2	4/20	○		○	○	○
	3		○		○	○	○
C (6)	P4	4/25	○		○	○	○
D (7)	P5	4/27	○		○		
	6		○		○		
E (2)	7				○	○	
	8				○	○	○

Table 3 E型肝炎ウイルスの検査結果と検体の種類

	PCR検査結果(陽性数 / 検査数)				
	筋肉	肝臓	血液	便	個体
野生シカ (西播磨地区)	0 / 29	0 / 29	0 / 29	0 / 29	0 / 29
収去検体	0 / 6	-	-	-	0 / 6
合計	0 / 35	0 / 29	0 / 29	0 / 29	0 / 35

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Li T-C, Suzuki Y, Ami Y, Dhole TN, Miyamura T, Takeda N	Protection of cynomolgus monkeys against HEV infection by oral administration of recombinant hepatitis E virus-like particles.	Vaccine	22	370-377	2004
Tran H TT, Ushijima H, Quang VX, Win KM, Luengrojanakul P, Kikuchi K, Sata T, Abe K	Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups.	J. Gen. Virol.	85	283-292	2004
Hirano M, Ding X, Li TC, Takeda N, Kawabata H, Koizumi N, Kadosaka T, Goto I, Masuzawa T, Nakamura M, Taira K, Kuroki T, Tanikawa T, Watanabe H, Abe K	Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan.	Hepatol. Res.	27	1-5	2003
Hirano M, Ding X, Tran HT-T, Li T-C, Takeda N, RSata T, Nakamura S, Abe K	Prevalence of antibody against hepatitis E virus in various species of non-human primates: Evidence of widespread infection in Japanese monkeys (<i>Macaca fuscata</i>).	Jpn. J. Infec. Dis.	56	8-11	2003
Ding X, Li TC, Hayashi S, Masaki N, Tran HT-T, Hirano M, Yamaguchi M, Usui M, Takeda N, Abe K:	Present state of hepatitis E virus epidemiology in Tokyo, Japan.	Hepatol. Res.	27	169-173	2003
Iwaki Y, Aiba N, Tran HT-T, Ding X, Hayashi S, Arakawa Y, Sata T, Abe K	Simian TT virus (s-TTV) infection in patients with liver diseases.	Hepatol. Res.	25	135-142	2003

Ding X, Park YN, Taltavull TC, Thung SN, Jin Xiaoming, YJ, Trung NS, Edamoto Y, Abe K	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.	Jpn. J. Infec. Dis.	56	12-18	2003
Moriyama M, Taira M, Matsumura H, Aoki H, Mikuni M, Kaneko M, Shioda A, Iwaguchi K, Arai S, Ichijima S, Iwasaki H, Tanaka N, Abe K, Arakawa Y	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
Ding X, Gu H, Zhong Z-H, Zilong X, Tran HT-T, Iwaki Y, Li T-C, Sata T, Abe K	Molecular epidemiology of hepatitis viruses and genotypic distribution of hepatitis B and C viruses in Harbin, China.	Jpn. J. Infec. Dis.	56	19-22	2003
Tran HT-T, Ushijima H, Ngoc TT, Hayashi S, Sata T, Abe K	Recombination of genotypes B and C in hepatitis B virus isolated from a Vietnamese patient with fulminant hepatitis.	Jpn. J. Infec. Dis.	56	35-37	2003
Abe K, Kiuchi T, Aiba N, Tran HT-T, Ding X, Yamaguchi M, Sata T, Tanaka K	Complete nucleotide sequence of hepatitis B virus isolated from two infants with fulminant hepatitis.	Jpn. J. Infec. Dis.	56	38-39	2003
Aiba N, Nishimura H, Arakawa Y, Abe K	Complete nucleotide sequence and phylogenetic analyses of hepatitis B virus isolated from two pileated gibbons.	Virus Genes	27	219-226	2003
Moriyama M, Mikuni M, Longren W, Zhao Z-Y, Xueqing W, Oshiro S, Matsumura H, Aoki H, Ichijima S, Iwasaki H, Tanaka N, Abe K, Arakawa Y	Epidemiology of SEN virus infection among patients with hepatitis B and C in China.	Hepatol. Res.	27	174-180	2003