

平成 16 年度 厚生労働科学研究費補助金 食の安全性高度化推進研究事業
「ウイルス性食中毒の予防に関する研究」 分担研究報告書

野生イノシシから検出された HEV genotype III の解析
ー ヒト散発性急性 E 型肝炎との関連性についての考察ー

分担研究者 田中智之 (堺市衛生研究所)

研究協力者 三好龍也、内野清子 (堺市衛生研究所)

研究協力者 安田祐子、原 猛 (和歌山労災病院消化器内科)

研究協力者 李 天成、武田直和 (国立感染症研究所 ウイルスⅡ部)

研究概要

和歌山県の定点地区において、野生イノシシ、野生シカにおける E 型肝炎ウイルス(HEV)保有状況を調査研究した。その結果、野生イノシシから採取した血液 16 検体中 2 検体から HEV-IgG 抗体が、1 頭のイノシシの肝臓、血液から HEV 遺伝子が検出された。遺伝子型は genotype III で、昨年度に同地区で検出されたものと、検索し得た塩基配列では 100%の相同性を有していた。この定点地区では、野生イノシシ間に類似の HEV が恒常的に浸淫していることが推測された。

この定点地区近隣の病院で渡航歴がなくかつ野生イノシシ、シカの生肉、生レバーの喫食歴のない2成人男子の散発性急性 E 型肝炎症例が報告された。急性期血清中から HEV 抗体とともに HEV 遺伝子 genotype III が検出された。

野生イノシシと2症例との間には明確な接点は認められていないが、今後より広範な疫学的解析が必要と考えられた。

A. 研究目的

昨年度の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」において、和歌山県の定点地区における野生イノシシの肝臓、血液から本邦では最初の E 型肝炎ウイルス(HEV)遺伝子, genotype III の検出を報告した。

今年度も同じ定点地区における野生イノシシ、シカにおける HEV の浸淫状況を調査する事を目的とした。

一方、本邦では、野生イノシシ或いは野生シカの肉やレバーの生食に関連した散発性 E 型肝炎の発生や劇症肝炎による死亡例の報告がみられている。今回、本調査研究

過程で、定点地区に近接した病院で、急性 E 型肝炎の発生がみられた。これらの症例について、HEV 遺伝子の検出と野生イノシシから検出された HEV genotype との関連性について検討した。

B. 研究方法

1. 散発性急性 E 型肝炎症例

症例 1: 38 才、男性

既往歴: 輸血歴 なし、海外渡航歴 なし

現病歴:

2004. 6.14 全身倦怠感、下痢、心窩部痛をみとめた。6.17 38.9℃の発熱があり、近医を受診した。肝機能検査の結果、GOT 648U/L, GPT 767U/L, T.Bil. 1.1mg/dl, Alk-P 416 と高値を示し、急性肝炎の診断もと、6.18 和歌山労災病院 消化器内科入院した。経過は順調で入院 35 日目に退院した(図 1)。

食事歴: 2005. 5.21 同寮(症例 2)とヤキトリ屋に行き、トリキモ刺を喫食したが、それ以外の生肉、生レバーは食べなかった。イノシシ、シカの生肉や生レバーの喫食歴はない。

症例 2: 50 才、男性

既往歴: 輸血歴 なし、海外渡航歴 なし

現病歴: 2004.6.22 37.9~38℃の発熱、近医にて投薬を受ける。6.25 解熱はするが皮疹出現したため皮膚科を受診し、黄疸を指摘された。6.25 和歌山労災病院 消化器内科受診し即入院した。入院時の肝機能検査は GOT 1069 U/L, GPT 2534 U/L, T.Bil.4.2 mg/dl であった。症例1同様に入院

後の経過は順調で入院 36 日目に退院した(図 2)。

食事歴: 症例 1 と共にヤキトリ屋に行くがトリキモ刺は食べなかった。またシカ、イノシシ生肉、生レバーの喫食歴はない。

2. 材料

(1) 調査定点地区の近隣で、2004 年 6 月 22 日に発症した急性 E 型肝炎散発例の急性期血清 2 検体(症例 2 の 6 月 25 日、及び 6 月 27 日の血清)について、HEV 抗体測定及び nested RT-PCR 法による HEV 遺伝子検出を行った。なお、症例 1 の血清は国立感染症研究所 ウイルス II 部で HEV 遺伝子の検出を試みた。

(2) 昨年度同様に 3 地域を調査研究定点とした。2004 年 11 月 18 日~2005 年 2 月 8 日にかけて狩猟されたイノシシ 19 頭、シカ 1 頭、合計 20 頭から採取された肝臓 18 検体、血液 16 検体、筋肉 2 検体を検査材料とした。血液については HEV 抗体価測定を行い、肝臓、血液、筋肉については nested RT-PCR による HEV 遺伝子の検出を試みた。

3. 血清中の HEV 抗体測定法

抗体測定は Liらの方法による ELISA 法にて、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、96 well プレートに固着し、1:200 倍希釈血清と反応させた。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) を

1:4,000 で希釈して使用した。これらの測定方法は、国立感染症研究所ウイルス第Ⅱ部作製の「E 型肝炎検査マニュアル」に準じた。

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。ELISA 法の反応性は供与された陽性コントロール、陰性コントロールの反応性で確認された。

4. HEV 遺伝子検出法

肝臓は 20%乳剤を 10,000G、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、滅菌蒸留水 20 μ l に浮遊させた。血清は無希釈で用い、同様の方法でウイルス RNA を抽出した。抽出した RNA から HEV 遺伝子検索の PCR 法は、前述の測定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ーケンスでその塩基配列を調べた。

5. 肝組織を用いた HEV 検出蛍光抗体法

HEV 遺伝子陽性の野生イノシシ肝臓凍結切片を用いて HEV 抗原の局在を検討した。凍結切片は直ちに冷アセトンにて 15 分間固定した。その後 PBS にてリンスし、李先生から与えられた HEV モノクローナル抗体 MAb133 培養上清を一次抗体として 37°C、一時間反応させた。PBS にて洗浄後、二次抗体として FITC-標識 anti-Mouse IgG にて、37°C、30 分反応させた。PBS にて洗浄後封入し、蛍光顕微鏡で観察した。

C. 研究結果

1. 急性 E 型肝炎散発例患者の結果

(1) HEV 特異 IgG 抗体価

症例 2 の 2 血清の OD 値は 1.026、1.319 といずれも高値であり、患者血清中から HEV 特異的 IgG 抗体が検出された。症例 1 においても、国立感染症研究所 ウイルスⅡ部で同様に HEV-IgG 抗体が検出されている。

(2) HEV ウイルス遺伝子検出

症例 1 の 2 血清から HEV 遺伝子が検出された (図 1)。検出された遺伝子 (約 380bp) はダイレクトシーケンスの結果、AB189075 と約 99% の相同性であり、遺伝子型Ⅲ型に分類された。症例 2 においても同様に HEV 遺伝子 genotype III が検出されている。

2. イノシシ、シカの結果

(1) HEV 特異 IgG 抗体価

イノシシから採取された血液 16 検体中、2 検体から HEV 特異的 IgG 抗体が検出された (表 1)。

(2) HEV ウイルス遺伝子検出

イノシシ、シカから採取された肝臓 18 検体、血液 16 検体、筋肉 2 検体の HEV 検出結果を表 1 に示す。12 月 12 日に A 地区で狩猟されたイノシシ (H16A5) の肝臓、血液から HEV 遺伝子が検出された (図 2)。得られた PCR 産物 (約 380bp) のダイレクトシーケンスの結果、肝臓から検出された遺伝子配列と血液から検出された遺伝子配列は一致した。AB18005 と約 93% の相同性であり、遺伝子型Ⅲ型に分類された。

3. 蛍光抗体法による肝組織内 HEV の局在

昨年度に得られた陽性肝組織を用いて HEV の局在を間接蛍光抗体法にて検出を

試みた。肝組織は、HEV 遺伝子検出のため数回の凍結・融解を繰り返したが、組織の保存性はよく保たれていた。肝炎の所見はそれほど目立たなかった。肝細胞質内には陽性所見は認められなかったが、胆毛細管には陽性反応物質が見られた。しかし、陰性肝組織にも同様の所見が認められ、非特異的反応と考えられた。

D. 考察

昨年に設定した定点地区で野生イノシシ、野生シカにおける HEV 保有調査研究を行った。後述するが、この中のA地区から、今年度も同じ HEV III 型遺伝子が検出された。

このA地区に近隣した地域で発症した急性 E 型肝炎患者の急性期血清中からは HEV 特異的 IgG 抗体をおよび HEV 遺伝子が検出され、得られた遺伝子のシーケンス結果は、昨年度に野生イノシシから検出された HEV 遺伝子と約 88%の相同性を有していた。遺伝子型は同じⅢ型であるが、疫学的背景や遺伝子の相同性から、直接的な関連性は低いと推測された。今回の散発性 E 型肝炎感染事例では、患者らには海外渡航歴はなく、シカやイノシシの肉、レバー喫食歴もなく、また輸血歴もなく感染経路は不明であった。しかし、シカ肉の生食が原因と考えられる劇症肝炎による死亡事例から検出された株(AB189075)と今回の患者から検出された HEV 遺伝子は約 99%と高い相同性を示した。両者の関連性、感染経路について今後さらなる疫学的検討が必要である。

イノシシの HEV 保有調査については、A 地

区で狩猟されたイノシシ 17 頭中 2 頭から HEV 抗体が検出された。その内の 1 頭の肝臓と血液から HEV 遺伝子が検出された。今回検出した HEV 遺伝子(約 380bp)は、昨年度、同地区で狩猟されたイノシシから検出された HEV 遺伝子(H15A9)と一致した。検体数は少ないが、この結果は、この地区のイノシシには同じ型の HEV が恒常的に浸淫していると推測された。

HEV 特異的モノクローナル抗体培養上清を用いた間接蛍光抗体法では、イノシシ肝組織に明らかな HEV 抗原の局在は認められなかった。このモノクローナル抗体の抗体価は十分高く、肝組織での炎症所見が乏しい点から推測して HEV が既に排泄されてしまっているものと考えられた。今年度得られた陽性肝組織を用いて、再度検討する予定でいる。

HEV の自然界における宿主動物の実態、感染経路などの調査は、食の安全性を考える上においても重要で、今後も引き続きこれまでの定点地区における調査していく予定である。

さらにヒトとの関連性を含めて、定点地区のハンター達の HEV 抗体保有状況、地区におけるイノシシの生息数や狩猟されたイノシシ肉の流通状況、さらに近隣のブタなどの家畜との関連性など様々な観点からの調査を行い、広範な HEV の浸淫調査が必要である。

今回は材料が揃わなかったため情報は得られなかったが、B 定点地区近隣にはサファリパークがあり、飼育動物の予期せぬ死亡な

どの際には、HEV 調査のための材料提供が共同研究として互いに認識している。今後、他種動物における HEV 浸淫についての調査研究も行う予定でいる。

E. 結論

前年度に続き、和歌山県紀北地区から紀南地区での、野生イノシシ、野生シカにおける HEV 保有状況を行った。前年度同様に、紀北地区の野生イノシシから HEV 抗体と同時に HEV genotype III 遺伝子が検出された。

一方、近隣の病院での散発性急性 E 型肝炎患者血清中から HEV genotype III 遺伝子と抗体が検出された。両者には直接の因果関係は証明されなかったが、今後、これらの地域における広範な疫学的調査の必要性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究業績

1. 論文発表

三好龍也、李 天成、武田直和、宮村達男、田中智之：野生イノシシの肝臓、血液から E 型肝炎ウイルス遺伝子の検出。肝臓、2004. 45(9), 61-62

2. 著書

なし

3. 学会発表

伊藤 雅、三好龍也、田中智之、山下照夫、小林慎一、藤浦 明、李 天成、武田直和、宮村達男、榮 賢司. 野生動物の E 型肝炎ウイルス(HEV)および HEV 抗体保有状況. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会、2004.11.21-23, パシフィコ横浜

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

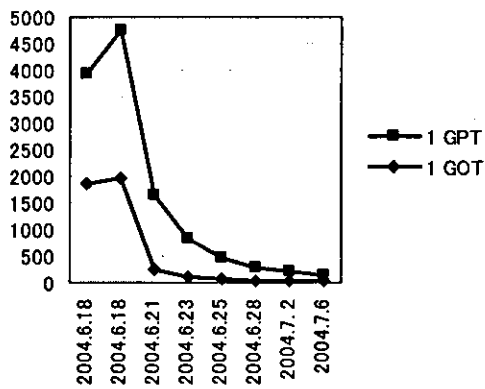
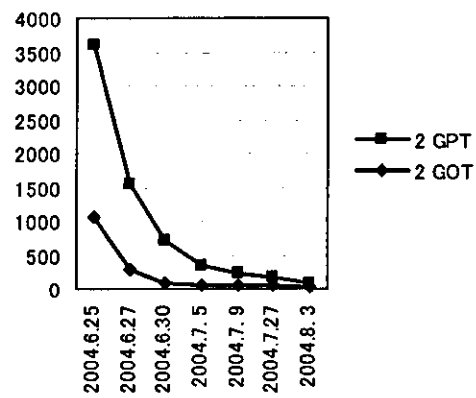
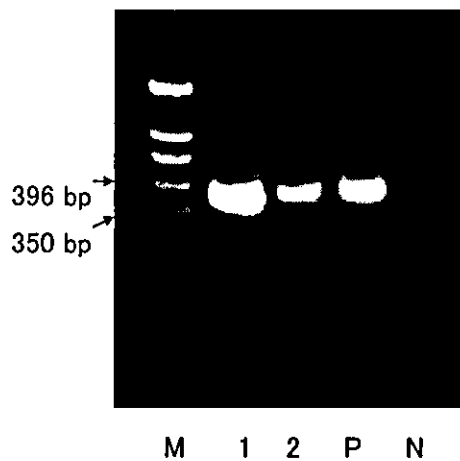


図 1. 症例 1 肝機能検査

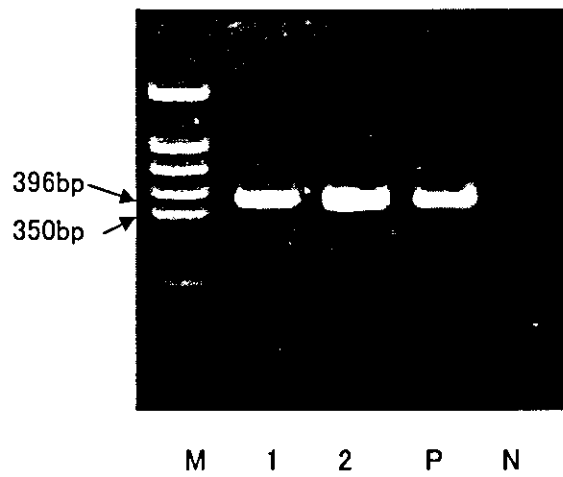


症例 2 肝機能検査



M: Marker 1: 患者 2 (6/25 血清) 2: (6/27 血清)
P: Positive control N: Negative control

図 2. E型肝炎患者のnested PCR



M : Marker 1 : H16A5 の肝臓 2 : H16A5 の血液
P : Positive control N : Negative control

図 3. H16A5 の nested PCR 結果

番号	検体番号	動物種	体重 (kg)	性別	地域	狩猟日	RT-PCR			抗体
							肝臓	血液	筋肉	ELISA
1	H16A1	イノシシ	70	オス	A	11/18	陰性	陰性		0.128
2	H16A2	イノシシ	60	オス	A	11/20	陰性	陰性		0.134
3	H16A3	イノシシ	80	メス	A	11/26	陰性	陰性		0.026
4	H16A4	イノシシ	60	メス	A	12/9	陰性	陰性		0.145
5	H16A5	イノシシ	10	メス	A	12/12	陽性	陽性		1.227
6	H16A6	イノシシ	50	オス	A	12/2	陰性	陰性		0.266
7	H16A7	イノシシ	90	メス	A	11/28	陰性			
8	H16A8	イノシシ	60	オス	A	12/28	陰性			
9	H16A9	イノシシ	85	オス	A	12/22	陰性	陰性		0.111
10	H16A10	イノシシ	60	オス	A	12/24	陰性	陰性		0.117
11	H16A11	イノシシ	20	メス	A	12/30	陰性	陰性		0.010
12	H16A12	イノシシ	20	メス	A	12/30	陰性	陰性		0.008
13	H16A13	イノシシ	60	オス	A	1/2	陰性	陰性		0.032
14	H16A14	イノシシ	100	オス	A	1/3	陰性	陰性		0.040
15	H16A15	イノシシ	40	メス	A	1/13	陰性	陰性		0.014
16	H16A16	イノシシ	80	オス	A	1/16	陰性	陰性		0.007
17	H16A17	イノシシ	100	オス	A	1/26	陰性	陰性		0.006
18	H16B1	イノシシ	60	オス	B	1/28	陰性	陰性		0.002
19	H16B2	イノシシ	不明	不明	B	2/8			陰性	
20	H16B3	シカ	不明	不明	B	2/8			陰性	

表 1 野生イノシシ、野生シカ HEV 保有状況 (RT-PCR 法、ELISA 法)

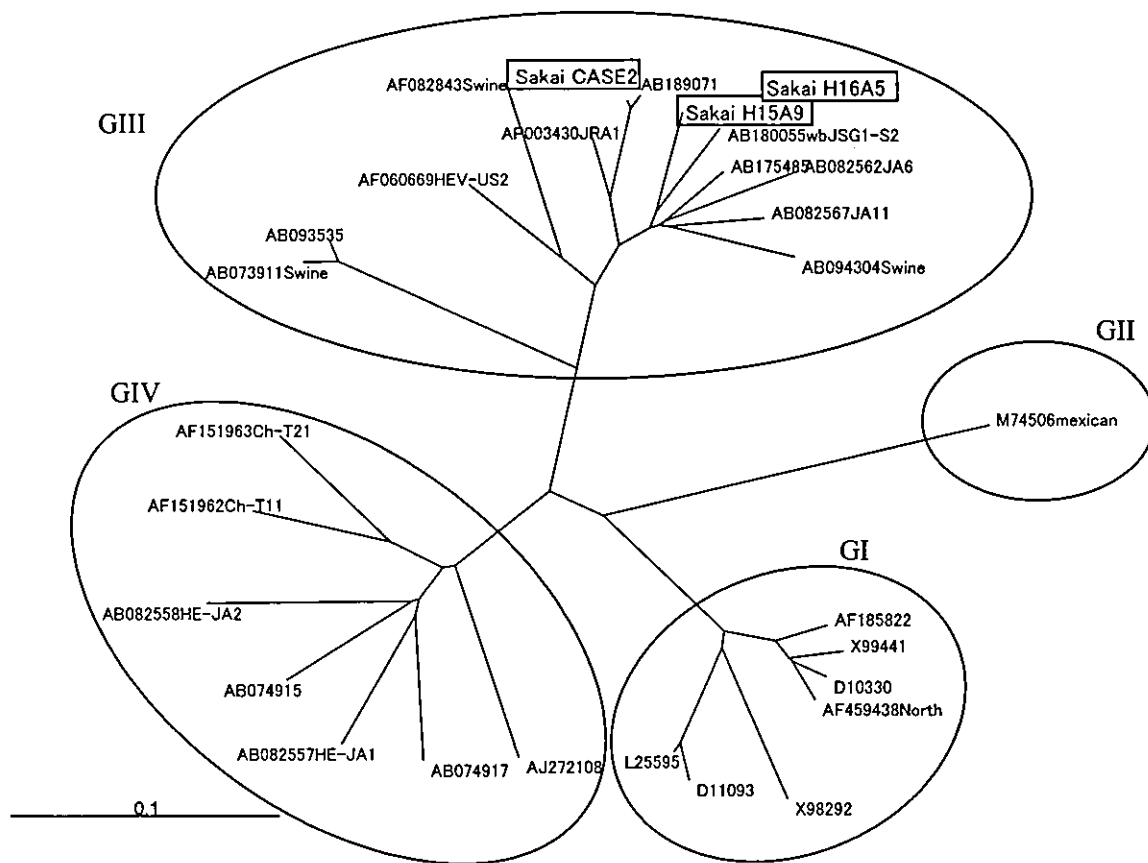


図 4. HEV 遺伝子系統樹解析(ORF2 約 340bp にて解析)

Sakai CASE2 : 急性 E 型肝炎患者

Sakai H15A9 : 平成 15 年度にイノシシから検出した HEV

Sakai H16A5 : 今回イノシシから検出した HEV

平成 16 年度厚生科学研究費補助金(食品の安全性高度化推進研究事業)
分担研究報告書

愛知県南設楽郡で捕獲されたイノシシ、シカの HEV 遺伝子検出状況と
当該地区を猟場とする猟師の HEV 抗体保有状況

分担研究者 榮 賢司 愛知県衛生研究所 微生物部部长
協力研究者 藤浦 明 愛知県衛生研究所 微生物部ウイルス疫学科長
山下照夫 愛知県衛生研究所 微生物部主任研究員
伊藤 雅 愛知県衛生研究所 微生物部技師
石山 登 新城保健所設楽支所 衛生課長

研究要旨 平成 15 年 10 月～16 年 4 月、および 10 月～12 月の 2 シーズンにわたって愛知県東部に位置する都市部近郊の岡崎市、北東部に位置する山間部の南設楽郡、およびその北部に隣接する山間部の長野県上伊那郡を中心に捕獲されたイノシシ 91 頭、カモシカ 19 頭、シカ 13 頭の E 型肝炎ウイルス(HEV)抗体保有状況と HEV 遺伝子の検出を行った。また、南設楽郡を猟場とする猟師とその家族 33 名の HEV 抗体保有状況と肝機能検査を実施し、野生動物からの HEV 感染のリスクについて検討した。

HEV 遺伝子検出ではイノシシ 91 頭中 11 頭(12.1%)が陽性で、PCR 産物の遺伝子配列はいずれも IV 型に分類された。また、HEV 抗体保有率はイノシシ 91 頭中 25 頭(27.5%)が E 型肝炎の抗体を保有していた。

猟師と家族の抗体保有状況は調査した 33 名中 4 名(12.1%)が HEV 抗体を保有していた。抗体を保有していたのはいずれも 60 歳代で、一般健康人の抗体保有率と比較しても必ずしも高いとは言えない。また、抗体陽性者には肝炎の既往歴がなく、肝機能検査の結果も良好であり、狩猟した動物からの感染の可能性は低いと思われた。

野生動物の糞便を介して原虫による水道水源の汚染があるのか否かについても検討したが、イノシシ 59 頭、カモシカ 21 頭、シカ 12 頭(合計 92 頭)からはクリプトスポリジウム(Cr)及びギアardia(Gi)は検出されなかった。

A. 研究目的

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発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、またこれらの野生動物と直接接触し、糞便や肝臓、血液にふれたり、食したりする機会の多い猟師とその家族を対象に HEV 抗体保有状況を調査した。

B. 研究方法

材料

1. 野生動物の HEV 調査

E 型肝炎の遺伝子検出には平成 15 年 10 月～16 年 4 月(03/04 期)および 16 年 10 月～12 月(04/05 期)に長野県上伊那地域(A 地区)、愛知県設楽地域(B 地区)および同県岡崎地域(C 地区)で捕獲された野生イノシシ 91 頭、シカ 13 頭、カモシカ 19 頭の肝臓、糞便、および血液を、抗体価測定には血清を材料とした。(表 1)

2. 猟師等の抗体調査

設楽地域を猟場とする猟師とその家族に HEV の抗体価測定のために採血したいとのインフォームドコンセントを書面で実施し、同意を得て署名された 33 名から採血し、HEV 抗体価測定と肝機能検査を実施した。その際に年齢、狩猟経験、シカ、イノシシの生食経験、肝炎の既往歴についてアンケートを実施した。

3. 野生動物の原虫調査

クリプトスポリジウム(Cr)及びジアルジア(Gi)の調査には平成 15 年 10 月～平成 16 年 4 月に捕獲されたイノシシ 59 頭、カモシカ 21 頭、シカ 12 頭(合計 92 頭)の糞便を検体とした。

HEV 遺伝子検出法

肝臓、糞便は 10～20%乳剤を作成し、10,000rpm、20 分遠心後の上清を、血清は原液を使用した。

RNA 抽出キットにてウイルス RNA を抽出し、水 60 μ l に浮遊させた。その 5 μ l から HEV 遺伝子の ORF1 領域と ORF2 領域に設計したプライマー(表 2)を使用し、One-step RT-PCR キットを用いて 1st RT-PCR を行い、更に 2nd PCR による nested PCR で増幅を試みた。

PCR 産物は Bio-Rad 社のスピнка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、塩基配列を決定し、系統樹解析に用いた。

抗体検出(ELISA 法)

抗体価の測定法は ELISA 法により、血清中の HEV 特異 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、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。

96well プレートに HEV-VLPs を固相化したホールと希釈液のみのホールを準備し、イノシシ及びシカの血清を 200 倍希釈して入れ、反応後それぞれにイノシシの抗体価測定用二次抗体には KPL 社製 HRP-conjugated goat anti-swine IgG(H+L) を 1:2,000 で、シカの二次抗体には KPL 社製 HRP-conjugated Rabbit anti-deer IgG(H+L) を 1:1,000 で使用した。

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。

クリプトスポリジウム(Cr)及びジアルジア(Gi)の検査法

約 0.2g の糞便を取り、糞便希釈液を 1ml 入れ、超音波破碎装置を用いて 1 分間処理した。5,000rpm、1 分間遠心して、上清を移し、さらに 5,000rpm、1 分間遠心した。この上清を限外ろ過フィルター(MILLIPORE, Ultrafree-MC; 分子量 30,000)により 13,000rpm、20 分間処理し、約 4 倍に濃縮した。

上記の検体 0.1ml を用い、r-biopharm 製の RIDASCREEN Cr 及び Gi の 2 つのキットで、それぞれ使用書に従って検査を行った。

C. 研究結果

1. 野生動物の HEV 調査

野生動物の HEV 遺伝子の検出では、カモシカ、シカは全て陰性であった。イノシシは 03/04 期は 61 頭中 3 頭(4.9%) (表 3-1)、04/05 期は 30 頭中 8 頭(26.7%) (表 3-2) から遺伝子が検出され、2 猟期間に 91 頭中 11 頭(12.1%) が陽性であった。

イノシシから検出された HEV 遺伝子の PCR 産物の遺伝子配列を調べ、既知の HEV 遺伝子と比較した結果、愛知県で捕獲されたイノシシ(糞便、血液) 11 頭の遺伝子型はいずれも IV 型であった。

ウイルスは糞便から最も多く検出され 10 件から、血液は 5 件から検出されたが、肝臓からは検出されなかった。

抗体保有状況では 03/04 期は 61 頭中 9 頭(14.8%) (表 4-1)、04/05 期は 30 頭中 15 頭(50.07%) が抗体を保有していた。HEV 遺伝子が検出されたイ

ノシシの内2頭は抗体を保有していなかった。

ウイルスが検出されたイノシシの推定年齢は1歳から4歳、体重は12 kgから90 kgであった。

2. 猟師等の抗体調査

当該地区猟師の抗体保有状況は表6に示すとおり、50歳代が7人中0人(0%)、60歳代が14人中4人(28.6%)、70歳代が4人中0人(0%)で、合計4/33(12.1%)であった。OD値は1名のみが2.320と高い値を示した。

抗体を保有していた4人は表7に示すとおり、狩猟経験年数が34年から44年と長く、生食経験もあった。しかし肝炎の既往歴はなく、肝機能も正常であった。

3. 野生動物の原虫調査

イノシシ、カモシカ、シカ92頭すべてCr及びGiは陰性であった。

D. 考察及び結論

1. 野生動物のHEV調査

野生動物のHEV遺伝子検出及び血清抗体価測定により、イノシシ11頭からHEV遺伝子が検出された。検出されたウイルスの遺伝子型は全てIV型であった。

遺伝子が検出されたイノシシの内2頭は抗体陰性であり、感染初期であったものと思われる。

ウイルスの検出はイノシシの年齢とは関連はなく、どの年齢のイノシシでもウイルスを持っている可能性がある。

愛知県東部を中心に3ヶ所の地域でHEVの調査を行ったが、ウイルスが検出されたのは設楽地域のみであった。上伊那地域については検査頭数が少なく、実態は不明である。岡崎地域においては03/04期には設楽地域とほぼ同数の検査を実施したが検出されなかったため、04/05期は調査しなかった。しかし、抗体を保有しているイノシシが3頭いたことから、ウイルスを保有している個体が存在するものと考えられる。

設楽地域では03/04期にはウイルス検出頭数が27頭中3頭(11.1%)、抗体保有率が27頭中6頭(22.2%)であったが、04/05期にはウイルス検出頭数が30頭中8頭(26.7%)、抗体保有率が30頭中15頭(50%)と上昇しており、遺伝子検出、抗体調査共に03/04期より04/05期の方がHEVの感染イノシシが

増加していた。

2. 猟師等の抗体調査

設楽地域を猟場とする猟師とその家族のHEV抗体価測定の結果60歳代の男性4人に抗体陽性者があり、抗体保有率は28.6%であった。これら4人は狩猟経験年数も長く、シカあるいはイノシシの生食経験があった。しかしながら肝炎の既往歴はなく、肝機能も正常であった。我が国における健康者のHEV抗体保有率は1994年当時50歳代では25%程度が抗体を保有しており、2004年に調査した60歳代がこのグループに相当するが、28.6%という保有率は一般健康者の保有率と比較して特に高いとはいえない結果であった。即ち、HEVを保有しているイノシシに最もよく接触し、捕獲獣の解体や生食を経験している猟師の間においてイノシシからの感染があったとは認められない結果であった。

3. 野生動物の原虫調査

水道水源の汚染の原因としてしばしば集団下痢症の発生が見られるクリプトスポリジウムとジアルジアの宿主として、イノシシ、シカ、カモシカが関与しているか否かを調査したが、調査したイノシシ、カモシカ、シカ92頭すべてCr及びGiは陰性であり、愛知県の北東部地域においては関与が否定された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

学会発表

- 1) 山下照夫、伊藤 雅、藤浦 明、榮 賢司:東南アジアからの帰国者から分離された4種類の新型エンテロウイルス. 第52回日本ウイルス学会、横浜、2004 11月.
- 2) 伊藤 雅、三好龍也、田中智之、山下照夫、小林慎一、藤浦 明、李 天成、武田直和:野生動物のE型肝炎ウイルス(HEV)およびHEV抗体保有状況. 第52回日本ウイルス学会、横浜、2004 11月.

G. 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

表1 HEV 調査対象

捕獲動物	頭数	採取年月	推定年齢	推定体重
イノシシ	61	平成15年10月～平成16年4月	0才～8才	5kg～105kg
	30	平成16年10月～12月		
シカ	12	平成15年10月～平成16年1月	3才～7才	35kg～100kg
	1	平成16年11月		
カモシカ	19	平成15年12月～平成16年3月	0才～6才	12kg～38kg

表2 HEV 遺伝子検出用プライマー

ORF1	1st PCR	HEV-1-1 5'-TCG ATG CCA TGG AGG CCC A-3'
		HEV-1-4 5'-CAT HGC CTC SGC RAC ATC RG-3'
	2nd PCR	HEV-1-2 5'-GCC YTK GCG AAT GCT GTG G-3'
		HEV-1-3 5'-TYR AAR CAG TAR GTK CGR TC-3'
ORF2	1st PCR	HEV-F1 5'-TAY CGH AAY CAA GGH TGG CG-3'
		HEV-R2 5'-YGY TGG TTR TVR TAR TCC TG-3'
	2nd PCR	HEV-F2 5'-GGB GTB GCN GAG GAG GAG GC-3'
		HEV-R1 5'-CGA CGA AAT YAA TTC TGT CG-3'

表3-1 HEV 遺伝子検出結果(03/04期)

平成15年10月～16年4月採取		イノシシ			シカ			カモシカ		
採取地域		糞便	血液	肝臓	糞便	血液	肝臓	糞便	血液	肝臓
長野 愛知	A 上伊那地域	0/2	0/2	0/2	0/4	0/4	0/4	-	-	-
	B 設楽地域	2/27*	2/27*	0/27	-	-	-	0/19	0/19	0/19
	C 岡崎地域	0/32	0/32	0/32	0/8	0/8	0/8	-	-	-
*1例は糞便、血液ともに陽性		3/61			0/12			0/19		

表3-2 HEV 遺伝子検出結果(04/03期)

平成16年10月～12月採取		イノシシ			シカ		
採取地域		糞便	血液	肝臓	糞便	血液	肝臓
愛知	B 設楽地域	8/27*	3/30*	NT/27	0/1	0/1	0/1
*3例は糞便、血液ともに陽性		8/30			0/1		

表4-1 HEV感染イノシシー覧(2003/04シーズン)

No.	捕獲年月	推定年齢	体重	捕獲地域	抗体価		遺伝子型	
					OD at 492nm	ORF1	ORF2	
3	H15.10	0	6kg	C 岡崎市	0.243	-	-	
6	H15.11	5	100kg	C 岡崎市	1.643	-	-	
7	H15.11	4	52kg	C 岡崎市	0.234	-	-	
12	H15.12	4	105kg	B 新城市	0.533	-	-	
13	H15.12	2	48kg	B 新城市	0.923	-	-	
24	H15.12	1	12kg	B 鳳来町	(0.123)	IV	IV	
51	H16.1	2	45kg	B 鳳来町	0.29	-	-	
52	H16.1	2	40kg	B 鳳来町	0.313	-	-	
54	H16.1	4	60kg	B 鳳来町	1.347	IV	IV	
59	H16.2	3	38kg	B 鳳来町	1.4	IV	IV	

表4-2 HEV感染イノシシー覧(2004/05シーズン)

No.	捕獲年月	推定年齢	体重	捕獲地域	抗体		遺伝子型	
					OD at 492nm	ORF2		
102	H16.11	1	7kg	B 新城市	1.832	-	-	
103	H16.11	1	35kg	B 鳳来町	2.506	-	IV	
104	H16.11	4	80kg	B 鳳来町	1.484	-	-	
105	H16.11	4	55kg	B 新城市	0.424	-	-	
106	H16.11	1	30kg	B 鳳来町	0.915	-	-	
108	H16.11	3	53kg	B 鳳来町	2.489	-	IV	
109	H16.11	2	30kg	B 鳳来町	0.32	-	IV	
110	H16.11	1	28kg	B 鳳来町	2.151	-	IV	
111	H16.11	3	60kg	B 鳳来町	2.533	-	IV	
112	H16.11	4	70kg	B 鳳来町	0.226	-	-	
116	H16.11	2	30kg	B 鳳来町	2.439	-	-	
117	H16.11	3	50Kg	B 鳳来町	0.055	-	IV	
119	H16.12	1	6Kg	B 鳳来町	2.491	-	-	
122	H16.12	3	90Kg	B 鳳来町	2.637	-	IV	
123	H16.12	3	55Kg	B 鳳来町	2.203	-	-	
124	H16.12	1	20Kg	B 鳳来町	2.559	-	IV	

表6 猟師等の年齢別 HEV 抗体保有状況

年齢区分	検査数	抗体陽性者数	抗体保有率
50歳代	7	0	0%
60歳代	14	4	28.6%
70歳代	4	0	0%
不明	8	0	0%
合計	33	4	12.1%

表7 HEV 抗体保有者のプロフィール

No.	年齢	狩猟経験	肝炎既往	生食経験	OD 値	総ビリルビン	GOT	GPT	γ-GTP
1	69歳	34年	なし	あり	2.320	0.4	19	17	45
2	65歳	34年	なし	あり	0.346	0.7	22	19	68
3	65歳	44年	なし	あり	0.201	0.6	41	16	49
4	63歳	40年	なし	あり	0.178	0.6	35	31	31

表8 アンケート結果及び肝機能検査結果

年代	調査人数	抗体陽性者数(%)	狩猟期間(平均)	生食経験有	肝炎既往有	総ビリルビン(平均)	GOT(平均)	GPT(平均)	γ-GTP(平均)
70歳代	4	0(0)	41	3	0	0.5	27	13	44
60歳代	14	4(28.6)	37	13	3	0.6	26	19	46
50歳代	7	0(0)	30	6	1	0.7	20	19	47
不明	8	0(0)	-	-	-	0.7	23	17	41
合計	33	4(12.1)	36	22	4	0.6	24.2	17.5	44.6

平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）
「ウイルス性食中毒の予防に関する研究」班
分担研究報告書

E 型肝炎ウイルス実験感染豚臓器中のウイルス量

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：豚における E 型肝炎ウイルス（HEV）の体内分布を明らかにするため、ノトバイオート豚計 10 頭に豚由来 HEV（遺伝子型 III）を静脈内接種し、ウイルス接種後 1 週より 1-2 頭ずつ 1 週間隔で解剖後（最長 7 週まで）、臓器中の HEV RNA 量をリアルタイム PCR 法で測定した。接種後 1 週より肝臓、胆汁、腸管、腸内容等でウイルス RNA が検出され、接種後 2 週以降は検査したほとんどの臓器ならびに血清からウイルス RNA が検出された。ウイルス RNA 量はいずれの接種後週においても肝臓ならびに胆汁が最も多く、回腸、結腸および大腸内容でも比較的多量に検出された。これら臓器中の RNA 量は接種後 2-4 週でピークを示した。肝臓では接種後 4 週で最も高値を示し、以降徐々に減少したが、接種後 7 週においても最高値の 1/4 程度の RNA 量が検出された。一方、血清ならびに筋肉中の RNA 量はこれら臓器に比べてはるかに少なかった。以上の結果より、HEV に感染した豚では、HEV は感染後 2-4 週において最も多量に肝臓ならびに腸管中に含まれること、少なくとも感染後 7 週まではこれら臓器中からウイルスが検出される場合があることが明らかとなった。また、HEV は肝臓だけでなく、腸管でも増殖している可能性が示唆された。

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）
神山麻理子（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）

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多数認められている。一方、豚は高頻度で HEV に感染していることが報告され、豚レバーや野生動物の肉や内臓を喫食して感染・発症したと考えられる例も確認された。本年度の研究では、HEV を実験感染させた豚におけるウイルスの体内分布を調査し、豚肉ならびに豚内臓肉摂取による HEV 感染のリスク分析を行うことを目的とする。

B. 研究方法

生後 3-30 日齢のノトバイオート子豚 10

頭を実験に使用した。これらの豚は妊娠末期豚の子宮摘出により入手し、ピニールアイソレーター内で飼育した。これらに豚由来 HEV Highland 株（遺伝子型 III；HEV 含む肝臓 10%乳剤）を 1 ml 静脈内投与し、ウイルス投与後 1 週より 1-2 頭ずつ 1 週間隔で解剖（最長 7 週まで）して主要臓器等を採取した。採取した臓器、小腸内容（SIC）、大腸内容（LIC）、胆汁および尿は 20%乳剤に調整後、RNA を市販の RNA 抽出キット

（TRIZOL-LS；Invitrogen）で抽出した。血清は希釈せずにそのまま RNA を抽出した。

HEV RNA の定量は、TaqMan MGB プローブ法により実施した。プライマーならびにプローブは HEV Highland 株の ORF2 領域の塩基配列を元に以下の通り設計した；フォワードプライマー（5'-TCTGCACTTACTGGTACGAATGG-3'）、リバースプライマー（5'-GCCAAGAAGCGTATCAGCTAGGTT-3'）、TaqMan MGB プローブ（TGTTAAGGCAATGCCAC-3'）。定量 PCR は、当該 ORF2 領域を含む PCR 産物（cDNA）のコピー数を算出してスタンダードとし、TaqMan EZ RT-PCR キット（Applied Biosystems）を用いてマニュアル通りに実施した。

C. 研究結果

コピー数が明らかな HEV cDNA を 10 倍段階希釈して検量線を作成した結果、相関係数 $R^2 > 0.98$ での回帰式 $Y = -4.2865X + 43.474$ が得られた (図1)。検出限界は 10HEV

cDNA コピー数/反応であった。なお、検査材料中の HEV RNA 量は検量線で算出される cDNA コピー数を RNA コピー数として表示した。

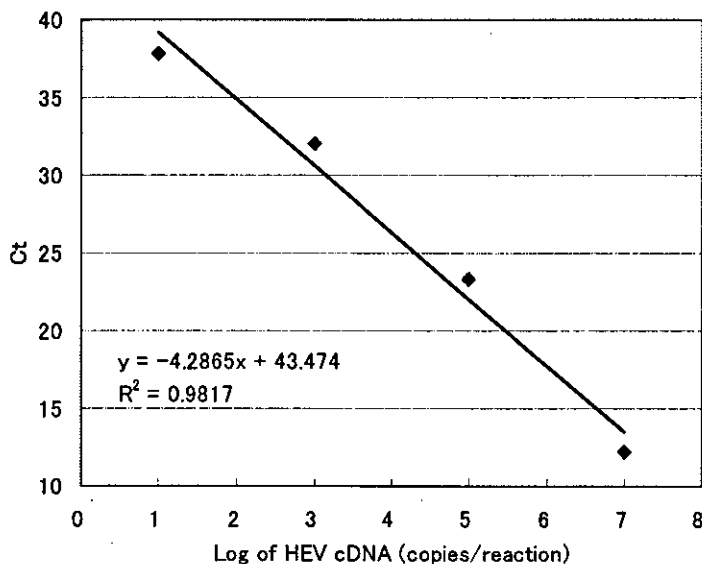


図1. HEV cDNAコントロールによる検量線

材料中のウイルス RNA はウイルス接種後 1 週より、肝臓、胆汁、SIC、LIC、結腸、回腸等で検出された。接種後 2 週以降はほとんどの臓器ならびに血清でウイルス RNA 陽性を示した (図2、図3)。ウイルス RNA 量はいずれの接種後週においても肝臓ならびに胆汁が最も多く、次いで、回腸、結腸、LIC 等の消化管でも多量に検出され

た。これら臓器中の RNA 量は接種後 2-4 週で最高値を示し、以降徐々に減少した。肝臓においては接種後 4 週で最も高値を示し、接種後 7 週においても最高値の 1/4 程度の RNA 量が検出された。一方、血清ならびに筋肉中の RNA 量はこれら臓器中の量に比べてはるかに少なく、肝臓との比較では数十~数千分の一程度の量であった。

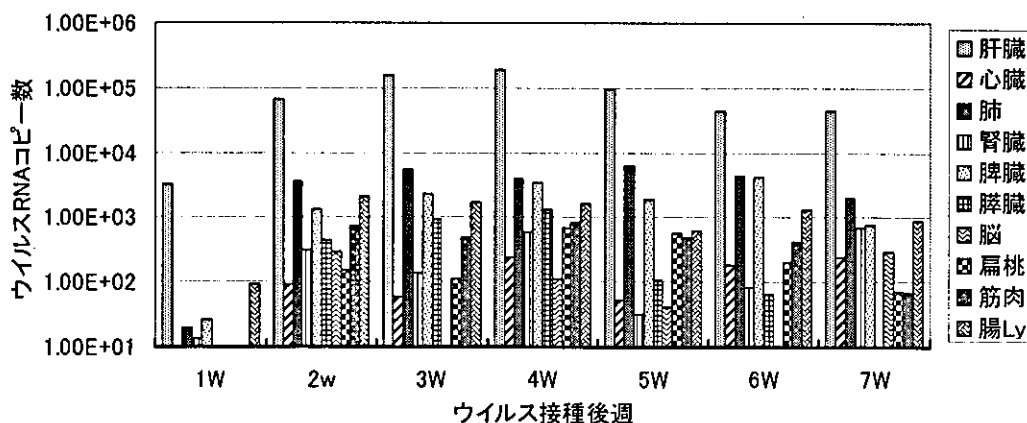


図2. HEV実験感染豚臓器中(肝臓、心臓、肺、腎臓、脾臓、膵臓、脳、扁桃、筋肉、腸管膜リンパ節)のHEV RNA量

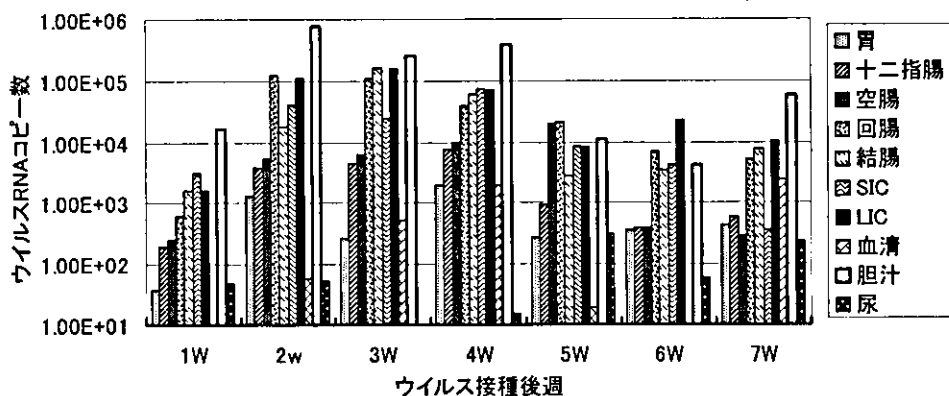


図3. HEV実験感染豚臓器中(胃、十二指腸、空腸、回腸、結腸、SIC、LIC、血清、胆汁、尿)のHEV RNA量

D. 考察

今回の実験により、過去の報告と同様、豚でのHEVの主要な感染部位は肝臓であり、肝臓で増殖したウイルスは胆のうで濃縮され、胆汁とともに消化管に移行して糞便中に排泄されることを確認した。また、ウイルスRNAは腸内容だけでなく、腸管、特に回腸ならびに結腸でも多量に検出されたことから、HEVは肝臓だけでなく腸管でも増殖している可能性が示唆された。

肝臓をはじめとする多くの臓器においてHEV RNAはウイルス接種後7週でも検出された。このことは、感染後2ヶ月程度は豚の体内にウイルスを保有していると推測される。豚でのHEVの主要な感染時期は1-3ヶ月齢であり、出荷月齢である6ヶ月齢の豚ではウイルスは既に体内から完全に排除されていると一般に考えられている。しかし、3-4ヶ月齢で感染した場合、感染から出荷まで2-3ヶ月しかないことから、出荷時にウイルスを保有する豚が存在する可能性はあると今回の成績から考えられた。ただし、今回の実験においてウイルスRNAとして検出されたHEVが感染性を有するかどうかは不明である。

ウイルスRNAは肝臓と胆汁で最も多量に検出され、回腸や結腸でも比較的多量に検出された。一方、筋肉中のウイルスRNA量は肝臓と比べて数十～数千分の一程度の量であった。このことから、豚食品においてHEVが含まれる可能性は、豚正肉よりも

豚レバーならびに豚腸管のほうが高いと推測された。

E. 結論

今回の研究によって以下のことが確認された。

1. 豚でのHEVの主要な感染部位は肝臓であり、肝臓で増殖したウイルスは胆のうで濃縮され、胆汁とともに消化管に移行して糞便中に排泄される
3. 臓器中のHEV RNA量はウイルス接種後2-4週で最高値を示し、以降徐々に減少した
4. 血清ならびに筋肉中のHEV RNA量は肝臓や腸管中の量に比べてはるかに少なく、肝臓との比較では数十～数千分の一程度の量であった
5. 出荷時にHEVを保有する豚が存在する可能性はあり、豚食品においてHEVが含まれる危険性は、豚正肉よりも豚レバーならびに豚腸管のほうが高いと推測される

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

和文解説

1) E型肝炎ウイルスの概要: 池田秀利, 恒光裕: 動物衛生研究所ホームページ
http://www.niah.affrc.go.jp/disease/HEV/swine_hev2.html 2004年12月

2) 豚の E 型肝炎ウイルス感染: 恒光 裕:
All about SWINE: 25, 3-8: 2004 年 9 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
3. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）
分担研究報告書

ウイルス性食中毒の予防に関する研究

家畜の抗体調査と汚染実態調査

分担研究者 有川二郎 北海道大学医学研究科附属動物実験施設 教授

研究要旨：

兵庫県で捕獲された日本シカの肉を原因とする HEV 感染を示唆する事例が報告され、野生シカにおける HEV 保有実態の解明が必要である。一方、北海道に生息するエゾジカは本州のシカとは異種ではあるが、食用としても利用されており、HEV を保有しているか否かを明らかにする必要があると考えられる。本研究では日本シカ、エゾジカの血清中の抗 HEV 抗体を検出することによって、日本のシカ類の血清疫学調査を行った。また、エゾジカから肝臓・直腸糞・胆汁の採材も行い、PCR によるウイルス遺伝子検出も試みた。

A. 研究目的

E 型肝炎はかつて経口型、水系、流行性非 A 非 B 型肝炎と呼ばれていた。インドや中国で引用水を介した数万人規模の大流行を起こしたことが知られている。しかし、我が国では、東北・北海道に発生が多い傾向はあるものの、全国的に散発的に発生が認められている。このことは日本での E 型肝炎ウイルスの感染ルートがこれまでに知られているような大規模な水系感染では無いことを示している。

近年、日本国内では野生のシカやイノシシの肉による E 型肝炎の罹患事例が報告されるようになった。このことから E 型肝炎が一種の人獣共通感染症である可能性が議論されるようになった。また、散発例の感染ルートとして畜産製品による可能性も議論されている。そこで、ウイ

ルス性食中毒の原因ウイルスであると考えられる E 型肝炎 (HEV) のについて、特に野生動物における疫学研究の分野に関する研究を開始した。

B. 研究方法

ELISA には国立感染症研究所の李天成先生より分与された、精製ウイルス粒子様抗原を用いた。また、李先生より ORF2 を発現する組み換え Baculovirus を分与して頂き、これを用いて診断用抗原を調整し Western Blot (WB) を行った。また、シカの陽性血清を得るために、精製ウイルス粒子様抗原をエゾシカに免疫し標準陽性血清を得た。PCR Primer は李先生より分与のセット、Okamoto らのセット (BBRC 2001)、さらに兵庫県の日本シカの肉より増幅された配列をもとに設計したセットを用いた。