

「野生鳥獣の異常の確認方法等に関する研究」

山口大学：前田 健

野生鳥獣の異常の確認方法等に関する研究

分担研究者 前田 健 （山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室）
研究協力者 米満健三 （山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室）

研究要旨

E 型肝炎ウイルスに対する抗体保有状況および E 型肝炎ウイルス感染状況の調査をイノシシおよびシカにおいて継続して実施した。2016 年は 7 県のイノシシ、8 県のシカの血清を用いて実施した。5 県のイノシシ、1 県のシカから抗 E 型肝炎ウイルス抗体が検出された。山口県で捕獲されたイノシシを体重別で抗体保有率を分けた結果、30kg 以下のイノシシの抗体保有率は 31kg 以上のイノシシの抗体保有率よりも有意に低い子が示された。2 県のイノシシ、1 県のシカの血清中にウイルス遺伝子が検出された。検出された遺伝子は遺伝子型 3 に属していた。ウイルス遺伝子が検出された個体を体重別で比較すると 30kg 以下のイノシシが 16 頭中 11 頭であった。これらのことから、イノシシの多くが 30kg 前後で E 型肝炎ウイルスに感染していることが判明した。更に、本年度は野生動物の疫学調査において最大の障害となっている血清の回収に代わる手段として、回収が簡易なミートジュースを用いる抗体検出系の予備実験を行なった。更に、イノシシ及びシカにおける異常所見に関するデータも収集した。

A. 研究目的

E 型肝炎は、野生動物肉の喫食により引き起こされることが知られているが、E 型肝炎ウイルス（HEV）の自然界における感染環に関しては不明な点が多い。我々が開発したすべての哺乳動物からの抗 HEV 抗体検出系を利用して、自然界における HEV 感染環を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1) 血清資料

日本各地より狩猟および有害鳥獣として捕獲された野生獣から血清を回収した。

2) 抗 HEV 抗体の検出

2015 年に作成したマニュアルに従った。

3) 血清からの HEV 遺伝子検出

2015 年に作成したマニュアルに従った。

4) ミートジュースの回収

山口県で捕獲されたイノシシの横隔膜と心臓（図 3）を回収し、既報に従いミートジュースを回収した。簡単に述べると、約 80 g の肉サンプルを冷凍用ジッパー付き保存袋に採取し、-20 度で冷凍した。輪ゴムで肉を上部に固定し、室温で 5 時間放置し解凍すると、約 6-12ml の液体 “ミ-

トジュース” が得られる（図 4）。これを血清と同様に ELISA に供試した。ELISA には E 型肝炎の加えて日本脳炎ウイルスの抗原を用いた。

5) 野生獣における異常所見の収集

山口県で捕獲されるイノシシおよびシカに関して、解体の際に異常所見が認められた場合、写真撮影を行った。その一部は、岡林先生に病理所見を見ていただいた。

C. 研究結果

1) 2016 年は 7 県のイノシシの検査を行なった（表 1）。そのうち、香川県と岐阜県以外の 5 県のイノシシが陽性となった。これまで、11 県のうち 9 県、1164 頭中 212 頭（18.2%）が陽性となった。

2) 2016 年は 8 県のシカの検査を行なった（表 2）。そのうち、香川県のシカ 1 頭が陽性となった。これまで、11 県のうち 2 県、943 頭中 2 頭（0.2%）が陽性となった。

3) 山口県のイノシシの抗体の陽性率を体重別に比較した（図 1）。その結果、30kg 以下のイノシシの抗体陽性率は 31kg 以上のイノシシの抗体陽性率よりも有意に低いことが示された。

- 4) イノシシとシカの血清から HEV 遺伝子の検出を試みた (表 3、表 4)。その結果、イノシシは千葉県と群馬県の 2 頭から検出されたが、シカは検出されなかった。これまで、イノシシは 774 頭中 16 頭 (2.1%)、シカは 754 頭中 1 頭 (0.1%) から HEV 遺伝子が検出されている。
- 5) 検出された遺伝子の塩基配列を解析した結果、本年度の 2 検体とも遺伝子型 3 に属していた (図 2)。これまで国内で検出された遺伝子型は 3 と 4 のみである。
- 6) 遺伝子が検出されたイノシシの個体情報を比較した結果、16 頭中 11 頭 (69%) が 30kg 以下の子イノシシであった (表 5)。重要なことは 15 頭中 10 頭が既に抗体を保有していた。
- 7) イノシシ及びシカの血清より HEV 遺伝子の検出を試みた結果、イノシシからは 2.4%、シカからは 0.2% の検出率であった (表 5)。
- 8) 図 3 と 4 のようにミートジュースを回収し、ELISA に供試した。HEV に関しては血清で陰性と判定された個体 (青色) では、心臓由来ミートジュースでは 10 倍希釈で 1 頭陽性と判定されたが、横隔膜由来ミートジュースでは 10 倍で用いても全て陰性となった。一方、陽性と判定された個体では横隔膜および心臓由来ミートジュースともに 40 倍希釈で 1 頭が陰性と判定された (図 5)。日本脳炎ウイルスに関しては、血清で陰性と判定されたもの (青色) に関しては、横隔膜および心臓由来ともに 10 倍希釈で用いても全て陰性と判定された。一方、血清で陽性と判定されたもの (赤色) は、心臓由来ミートジュースで 40 倍希釈で 2 頭、20 倍希釈で 1 頭、横隔膜由来ミートジュースで 40 倍希釈で 3 頭が陰性と判定された (図 5)。
- 9) 山口県で狩猟されたイノシシ及びシカの内臓における異常所見の収集を行い、岡林先生の病理組織の所見で異常が確認されたものを掲載した (末尾)。

D. 考察

- 1) イノシシの調査により本年度は新たに愛媛県が陽性であることが判明した。これまで 11 県中 9 県のイノシシに E 型肝炎が感染していることが証明された。
- 2) これまで山口県のイノシシが陽性率が高いと考えられていたが、本年度の調査により、関東地方

の千葉県や群馬県で抗体の陽性率が高いことが判明した。

- 3) シカはほとんど感染していないことが再確認されたが、本年度は 1 頭陽性個体が存在していたことから、低い感染率ながら感染していることが再確認された。
- 4) 体重別の抗体陽性率および遺伝子検出から考えても 30kg 以下の子イノシシが HEV に感染し、抗体が陽転するリスクが高いことが判明した。
- 5) 国内の野生動物では遺伝子型 3 と 4 しか検出されていない。
- 6) ウイルス遺伝子が検出された個体の多くが抗体を保有していた。このことは、抗体が出現してもウイルスが持続して検出されていることを意味しており、E 型肝炎の持続感染により注目する必要がある。
- 7) 心臓および横隔膜由来ミートジュースが E 型肝炎のみならず日本脳炎に対する抗体の検出に有用であることが確認された。血清に比べて反応は弱いが、20 倍希釈して用いれば、100 倍希釈した血清とほぼ同じ結果が得られることが判明した。

E. 結論

- 1) 国内の多くの県で E 型肝炎ウイルスはイノシシに感染している。特に、関東近辺ではイノシシの抗体陽性率が高い可能性がある。
- 2) 30kg 以下の子イノシシが HEV に感染しているリスクが高い。
- 3) E 型肝炎ウイルスがイノシシでは持続感染している可能性がある。食肉として利用されるイノシシによく似た豚での持続感染を検討する必要がある。
- 4) 血清の回収が困難な狩猟現場では、血清ではなく心臓や横隔膜を利用して抗体検査が可能であることが期待された。

F. 健康危機情報

- 1) 野生獣肉の喫食による HEV 感染は、特に子イノシシに注意すべきである。
- 2) E 型肝炎ウイルスの持続感染の可能性をより詳細に解析する必要がある。特に、イノシシに似た豚での調査は重要であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yonemitsu K, Terada Y, Kuwata R, Nguyen D, Shiranaga N, Tono S, Matsukane T, Yokoyama M, Suzuki K, Shimoda H, Takano A, Muto M, Maeda K*. Simple and specific method for detection of antibodies against hepatitis E virus in mammalian species. *Journal of Virological Methods* 238: 56-61.

2) 米満研三・前田 健「E型肝炎患者が急増！ウイルスの危険性を知って感染予防」食と健康（日本食品衛生協会）2016. 60(12): 8-16.

2. 学会発表

1) 米満研三、南 昌平、長田奈緒、Dung Nguyen Van、
 鋤田龍星、高野 愛、下田 宙、武藤正彦、鈴木
 和男、前田 健「E型肝炎ウイルスの感染リスク
 分析」第159回日本獣医学会学術集会 2016年9
 月6-8日 日本大学（神奈川県藤沢市）

2) 米満研三、鋤田龍星、高野 愛、下田 宙、鈴木
 和男、前田 健「野生動物での調査により判明し
 たE型肝炎感染のリスク」第31回中国四国ウイ
 ルス研究会 2016年7月9-10日 鳥取大学（鳥
 取）

講演会

前田 健「イノシシ・シカによる人獣共通の主要
 感染症について」奈良県畜産協会
 2016/12/16 橿原市／リサイクル館かしは

ら

前田 健「イノシシ、シカによる人獣共通の主要
 感染症等について」岡山県畜産協会
 2016/12/12（岡山県テクノサポート岡山）

Ken Maeda “Surveillance of vector- and
 food-borne infectious diseases among
 Asian countries” 2016/11/14 CCP 2nd
 Joint Seminar (Thailand, Chonburi,
 Bangsaen Heritage hotel)

前田 健「野生鳥獣肉の衛生管理講習会」10月19
 日産業技術センター（宇部）、10月21日日置
 農村環境改善センター（長門）、10月31日萩
 市民館（萩）、11月2日健康づくりセンター
 （山口）、11月7日周南総合庁舎（周南）

前田 健「野生動物と家畜の共通感染症および人
 獣共通感染症について-E型肝炎、節足動物
 媒介感染症、オーエスキー病、狂犬病を中
 心に」群馬県畜産協会（前橋テルサ、群
 馬県）平成28年9月11日（日）

前田 健「イノシシ、シカによる人獣共通の主要
 感染症等について」平成28年度野生獣衛生
 体制整備緊急対策事業全国推進会議（東京、
 第2ダイアイシービル）2016/6/8

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
米満研三・前田 健	E型肝炎患者が急増！ウイルスの危険性を知って感染予防		食と健康	日本食品衛生協会		2016	60(12):8-16

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yonemitsu K, Terada Y, Kuwata R, Nguyen D, Shiranaga N, Tono S, Matsukane T, Yokoyama M, Suzuki K, Shimoda H, Takano A, Muto M, <u>Maeda K</u>	Simple and specific method for detection of antibodies against hepatitis E virus in mammalian species.	<i>Journal of Virological Methods</i>	238	56-61	2016

表1 イノシシの抗HEV抗体保有率

都道府県	山口			大分	愛媛	香川	兵庫	和歌山	岐阜		
年	2010-2015	2016	計	2011-2012	2016	2016	2011-2015	2007-2013	2014-2015	2016	計
検査頭数	365	95	460	46	25	16	111	88	44	32	76
陽性頭数	112	16	128	8	8	0	21	0	3	0	3
陽性率(%)	30.7	17	27.8	17	32	0	18.9	0	7	0	4

都道府県	富山			千葉			栃木	群馬			計
年	2014-2015	2016	計	2015	2016	計	2010-2012	2015	2016	計	
検査頭数	48	30	78	15	15	30	220	2	12	14	1164
陽性頭数	4	2	6	6	11	17	12	0	6	6	212
陽性率(%)	8	7	8	40	73	57	5.4	0	50	43	18.2

表2 シカの抗HEV抗体保有率

都道府県	山口			鹿児島	大分	愛媛	香川	岐阜		
年	2010-2015	2016	計	2015-2016	2011-2012	2016	2016	2014-2015	2016	計
検査頭数	515	82	597	23	12	15	15	61	31	92
陽性頭数	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
陽性率(%)	0.2	0	0.2	0	0	0	7	0	0	0

都道府県	長野	山梨	千葉			栃木	群馬			計
年	2015-2016	2014-2015	2014-2015	2016	計	2014	2015	2016	計	
検査頭数	47	66	25	15	40	24	2	10	12	943
陽性頭数	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
陽性率(%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2

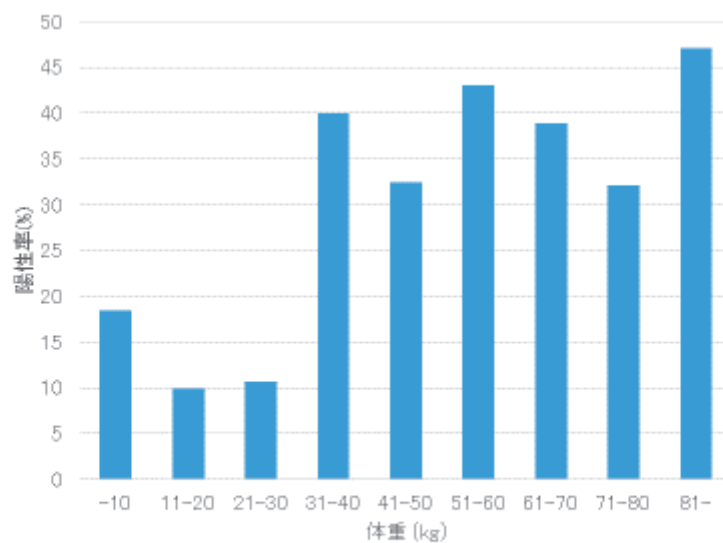


図1 イノシシ体重別抗体陽性率

表3 イノシシ血清からのHEV遺伝子検出

都道府県	山口			大分	愛媛	香川	岐阜			栃木
年	2010-2015	2016	計	2011-2012	2016	2016	2014-2015	2016	計	2011-2012
検査頭数	365	64	429	22	25	16	40	32	72	88
陽性頭数	12	0	12	0	0	0	0	0	0	0
陽性率(%)	3.3	0	2.8	0	0	0	0	0	0	0

都道府県	富山			千葉			群馬			イノシシ計
年	2014-2015	2016	計	2015	2016	計	2015	2016	計	
検査頭数	48	30	78	15	15	30	2	12	14	774
陽性頭数	0	0	0	2	1	3	0	1	1	16
陽性率(%)	0	0	0	13	7	10	0	8	7	2.1

表4 シカ血清からのHEV遺伝子検出

都道府県	山口			愛媛		香川		千葉			群馬			岐阜			山梨	計
	年	2016	計	2016	2016	2014-2015	2016	計	2015	2016	計	2014-2015	2016	計	2015			
検査頭数	510	44	554	15	15	25	15	40	2	10	12	61	31	92	25	753		
陽性頭数	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
陽性率(%)	0.2	0	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.1		

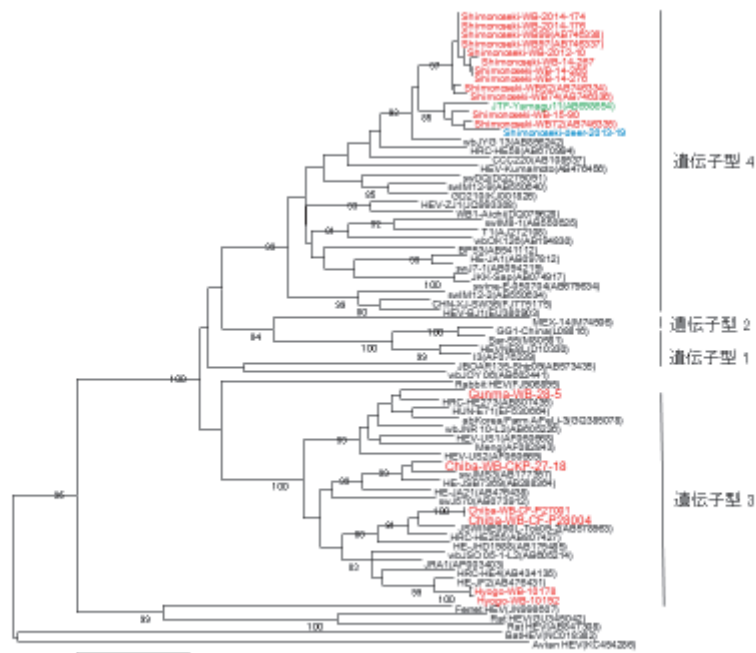


図2 ORF2 338BPで作成した系統樹

表5 HEV遺伝子陽性イノシシの個体情報

サンプル	捕獲日	性別	体重(kg)	O.D.	PCR
Shimonoseki 52	2010/11/23	♂	60	>3.50	+
Shimonoseki 72	2010/12/05	♀	26	>3.50	+
Shimonoseki 74	2010/12/11	♂	55	>3.50	+
Shimonoseki 97	2011/12/25	♀	10	>3.50	+
Shimonoseki 99	2011/12/25	♀	10	0.03	+
Shimonoseki 2012-10	2012/04/29	♂	41	N.D.	+
Shimonoseki 2014-174	2014/09/20	♀	10	-0.03	+
Shimonoseki 2014-176	2014/09/20	♂	10	0.61	+
Shimonoseki 14-265	2015/03/07	♂	27.3	0.38	+
Shimonoseki 14-267	2015/03/07	♂	23	0.03	+
Shimonoseki 14-276	2015/03/21	♂	16	2.67	+
Shimonoseki 15-90	2015/10/24	♂	25	2.54	+
Chiba CF-P27001	2015/10/01	♀	50	-0.02	+
Chiba CKP-27-18	2016/01/07	♂	30	>3.50	+
Chiba CF-P26004	2016/6/15	♀	35	1.66	+
Gunma 28-5	2016/4/14	♀	15	2.46	+

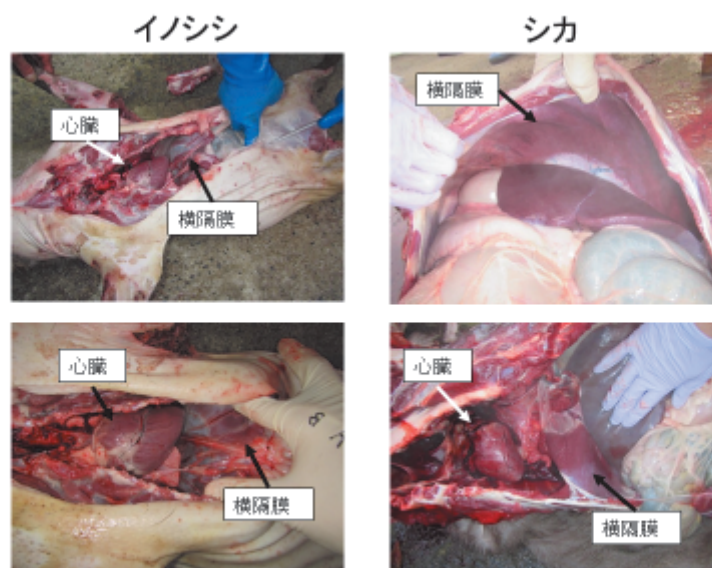


図3 イノシシ・シカ 心臓・横隔膜 採材

- ❑ 80グラムの肉サンプルを冷凍用ジッパー付き保存袋に採取し、-20℃に保存。
- ❑ 輪ゴムで肉サンプルを袋上部に固定し、5時間室温に放置し解凍する。
- ❑ 6-12mlのmeat juiceが得られる。

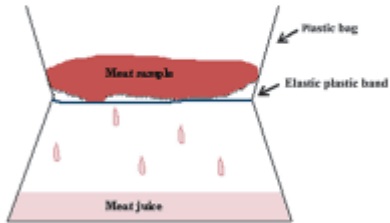


Fig. 1. Obtaining meat juice by thawing the frozen meat samples.

D. Meemken et al. / Preventive Veterinary Medicine 113 (2014) 589-598



図4 ミートジュース採取方法

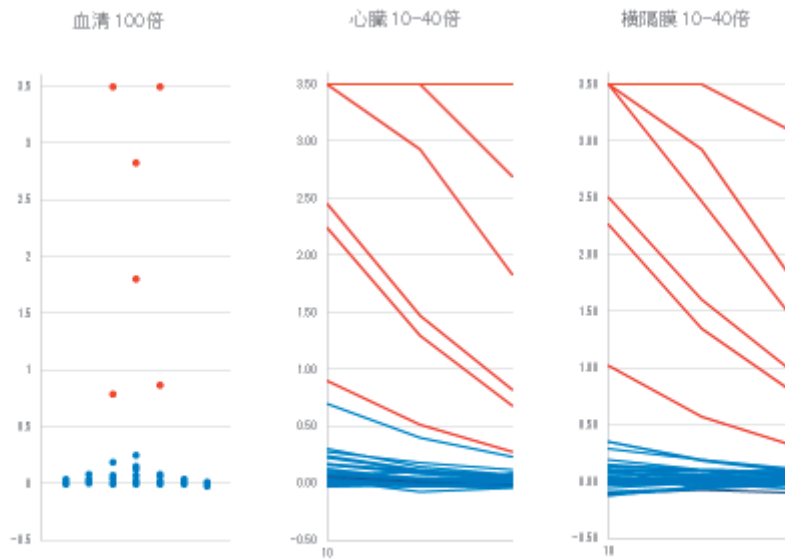


図5 ミートジュースから抗E型肝炎ウイルス抗体の検出

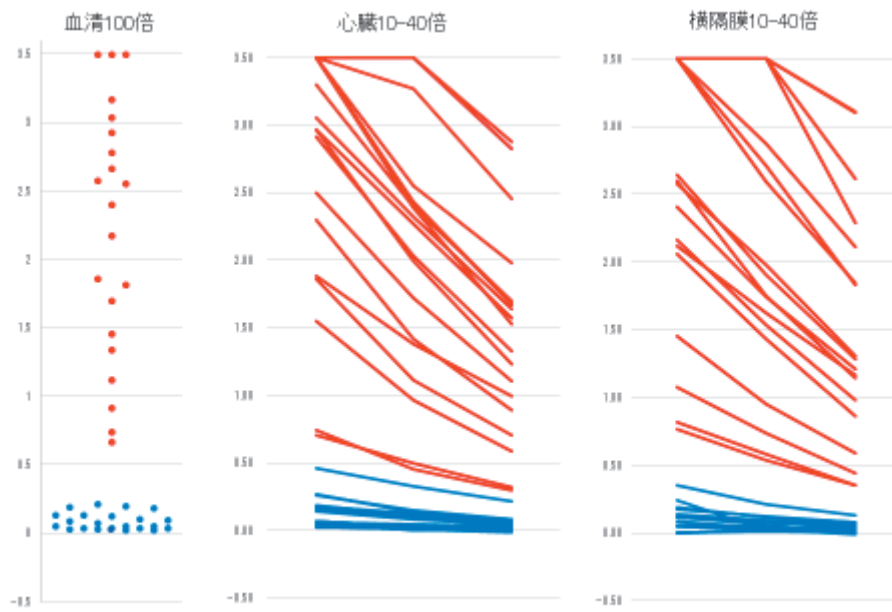


図6 ミートジュースから抗日本脳炎ウイルス抗体の検出

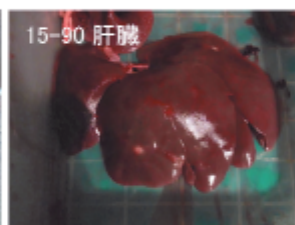
山口県のイノシシとシカで観察された病変
(岡林先生の病理所見で異常が確認された個体)

下関イノシシ15-90

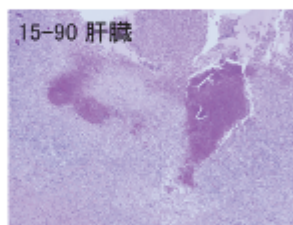
ID	動物種	捕獲年月日	捕獲地	性別	体重	体長
15-90	イノシシ	2015/10/24	豊北町	♂	25	99



15-90 全体



15-90 肝臓



15-90 肝臓



15-90 腎臓

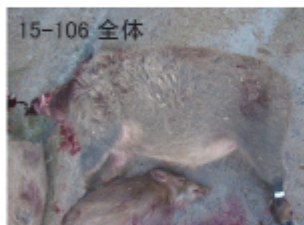


15-90 肝臓

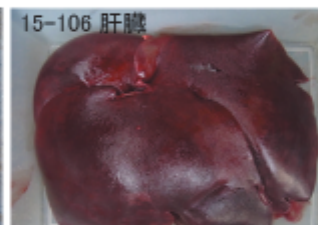
肝臓: 好酸球性退廃物を中心とし、その周囲にリンパ球・形質細胞・マクロファージの浸潤を伴った好酸球性膿瘍形成。膿瘍周囲には好酸球浸潤を伴った線維性結合組織の増生巣が広がり、線維化は周囲の小葉間にまで拡大。(好酸球性膿瘍)。

下関イノシシ15-106

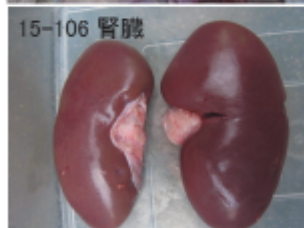
ID	動物種	捕獲年月日	捕獲地	性別	体重	体長
15-106	イノシシ	2015/12/19	豊北町	♂	120	160



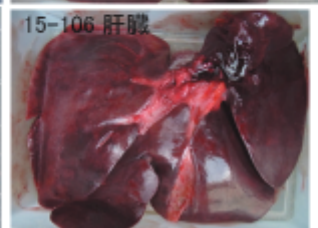
15-106 全体



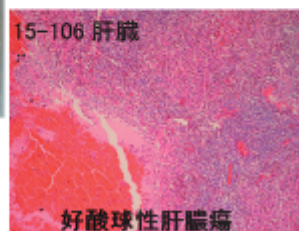
15-106 肝臓



15-106 腎臓



15-106 肝臓

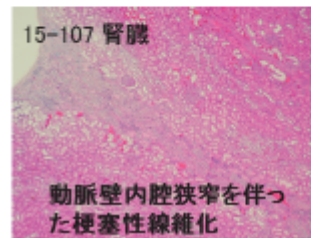
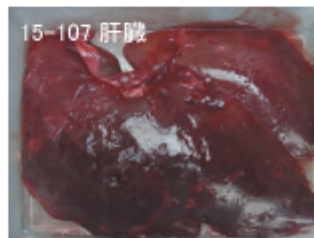


15-106 肝臓

好酸球性肝臓炎

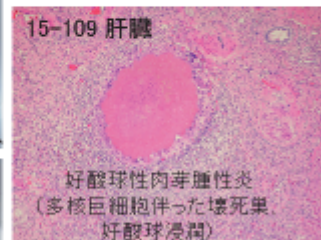
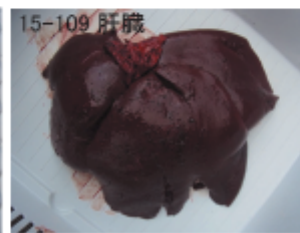
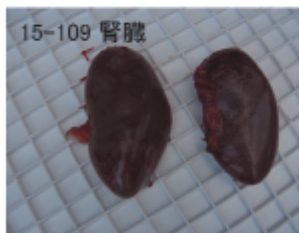
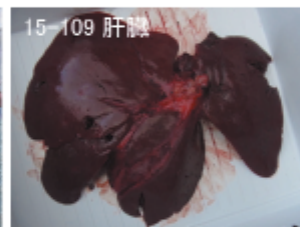
下関イノシシ15-107

ID	動物種	捕獲年月日	捕獲地	性別	体重	体長
15-107	イノシシ	2015/12/19	豊北町	♀	70	140



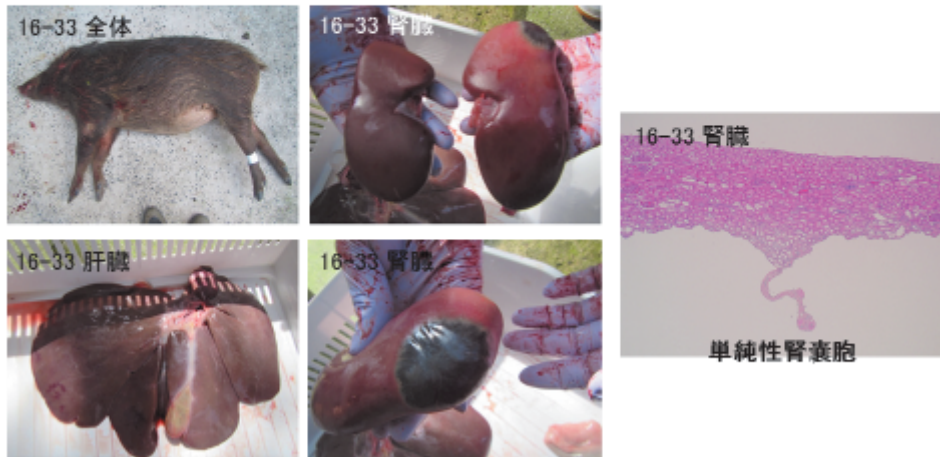
下関イノシシ15-109

ID	動物種	捕獲年月日	捕獲地	性別	体重	体長
15-109	イノシシ	2015/12/19	豊北町	♀	70	135



下関イノシシ16-33

ID	動物種	捕獲年月日	捕獲地	性別	体重	体長
16-33	イノシシ	2016/5/21	豊北町	♀	80	124



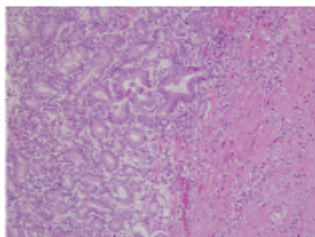
下関シカ15-93

ID	動物種	捕獲年月日	捕獲地	性別	体重	体長
15-93	シカ	2015/10/24	豊北町	♂	54	145



下関シカ15-93

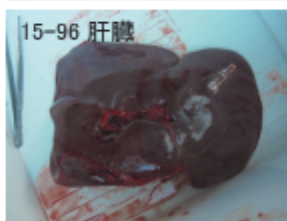
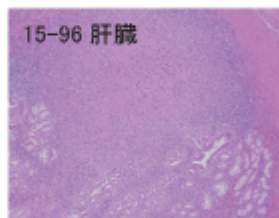
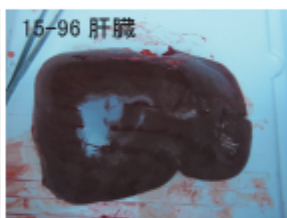
ID	動物種	捕獲年月日	捕獲地	性別	体重	体長
15-93	シカ	2015/10/24	豊北町	♂	54	145



胆管上皮の反応性増生を伴った好酸球やリンパ球形成細胞・マクロファージからなる広範な炎症病巣が形成され、周囲には炎症細胞浸潤を伴った線維性結合組織の増生巣。周辺部のグリソン鞘でも、軽度の炎症を伴った細胆管増生や線維化を伴う(重度の慢性胆管炎)。

下関シカ15-96

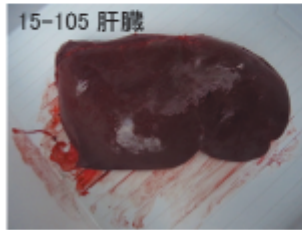
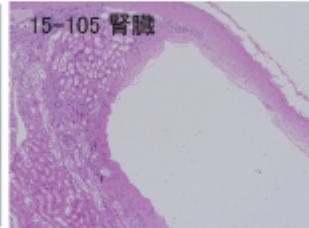
ID	動物種	捕獲年月日	捕獲地	性別	体重	体長
15-96	シカ	2015/10/31	豊北町	♂	50	137



胆管上皮の過形成を伴った、リンパ球・形質細胞・マクロファージ・好酸球の浸潤からなる広範な炎症病巣が多数形成され、周囲には結合組織が増生。グリソン鞘にはリンパ球・好酸球・マクロファージが浸潤し、軽度の線維化を伴う(重度の慢性胆管炎)。

下関シカ15-105

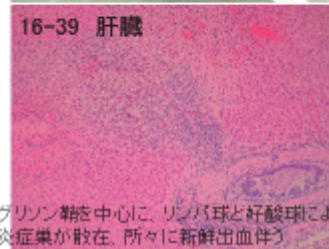
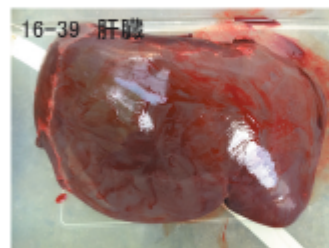
ID	動物種	捕獲年月日	捕獲地	性別	体重	体長
15-105	シカ	2015/11/28	豊北町	♀	50	140



被膜直下に、尿細管上皮様の1層の上皮細胞で覆われた大型嚢胞形成され、周囲は陳旧化した厚い結合組織で覆われる(単純性嚢胞)。この嚢胞形成により、周囲尿細管や糸球体はやや圧排されて変性。被膜直下の一部では、間質へのリンパ球浸潤や退廃物を貯留し変性した尿細管等が認められる。

下関シカ16-39

ID	動物種	捕獲年月日	捕獲地	性別	体重	体長
16-39	シカ	2016/5/28	豊田町	♂	50	128



ゲリソン鞘を中心に、リンパ球と好酸球による炎症巣が散在、所々に新鮮出血伴う。



(This is a sample cover image for this issue. The actual cover is not yet available at this time.)

This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the author's institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Simple and specific method for detection of antibodies against hepatitis E virus in mammalian species



Kenzo Yonemitsu^a, Yutaka Terada^a, Ryusei Kuwata^a, Dung Nguyen^a, Nobuyuki Shiranaga^b, Satomi Tono^c, Tomoka Matsukane^d, Mayumi Yokoyama^d, Kazuo Suzuki^e, Hiroshi Shimoda^a, Ai Takano^a, Masahiko Muto^f, Ken Maeda^{a,*}

^a Laboratory of Veterinary Microbiology, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Yamaguchi University, 1677-1 Yoshida, Yamaguchi 753-8515, Japan

^b Shiranaga Animal Hospital, 2-12-18 Sakuragi, Shunan, Yamaguchi 745-0806, Japan

^c Morinoiuneko Animal Hospital, 22-3 Tsunakizaka, Imosawa, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 989-3212, Japan

^d Institute of Natural and Environmental Science, University of Hyogo, 940 Sawano, Aogaki-cho, Tamba, Hyogo 669-3842, Japan

^e Hikiwa Park Center, 1629 Inari-cho, Tanabe, Wakayama 646-0051, Japan

^f Department of Dermatology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami-Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan

ABSTRACT

Hepatitis E virus (HEV) is the causative agent of hepatitis E, a food- and water-borne disease. In developed countries, consumption of meats from pigs, wild boars and deer is a major source of infection. Although HEV and HEV-related viruses have been detected in many animal species, their zoonotic potential and prevalence has not been completely understood. To detect anti-HEV antibody in mammalian species, a simple enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was established using extract from cells expressing HEV capsid protein and protein A/G as an antigen and a reagent for detection of antibody. Absorbance in the ELISA was compared with those in our previous ELISA using VLPs and anti-swine antibody, suggesting that newly established ELISA was similarly specific and sensitive as the previous ELISA. Seroprevalence of HEV infection among wild boars was examined in Yamaguchi Prefecture, confirming that 111 of 364 wild boars (30.5%) were positive for anti-HEV antibody. Next, this ELISA was applied to humans, dogs, cats, ferrets, raccoons and masked palm civets in Japan, and anti-HEV antibodies were detected in humans, ferrets, dogs and cats. This ELISA is thus useful for serological surveys and comparison of HEV infection among various mammals, including humans.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Article history:

Received 31 March 2016

Received in revised form 10 July 2016

Accepted 17 July 2016

Available online 11 October 2016

Keywords:

ELISA

Hepatitis E virus

Wild animals

1. Introduction

Hepatitis E virus (HEV) is a non-enveloped, single-stranded positive-sense RNA virus that belongs to the family *Hepeviridae*, genus *Orthohepevirus* (Smith et al., 2014). HEV is the causative agent of acute or fulminant hepatitis E in humans (Emerson and Purcell, 2007). Human HEV consists of only one serotype, but is genetically divided into at least four major genotypes (Okamoto, 2007). Infection with HEV genotypes 1 and 2 are restricted to humans and are often associated with water-borne outbreaks in developing countries (Meng, 2010; Aggarwal and Jameel, 2011). On the other hand, HEV genotypes 3 and 4 cause sporadic infections in both developing and developed countries (Meng, 2010; Aggarwal and Jameel, 2011). HEV genotypes 3 and 4 infection is recognized as zoonosis,

and the major reservoirs are pigs (*Sus scrofa domestica*), wild boars (*Sus scrofa leucomystax*) and deer (*Cervus* spp.) (Ruggeri et al., 2013). Genotypes 3 and 4 have been detected in many mammalian species, including pigs, wild boars, deer, rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), and mongooses (*Herpestes auropunctatus*) (Cossaboom et al., 2011; Geng et al., 2011; Meng et al., 1997; Nakamura et al., 2006). Recent reports have demonstrated that novel HEV or HEV-related viruses are present in other animals, including wild boars, rats (*Rattus* spp.), rabbits, ferrets (*Mustela putorius furo*), minks (*Neovison vison*), foxes (*Vulpes vulpes*) and bats (*Chiroptera* spp.) (Bodewes et al., 2013; Drexler et al., 2012; Johne et al., 2010a, 2010b; Krog et al., 2013; Lhomme et al., 2013; Raj et al., 2012; Takahashi et al., 2014). However, their zoonotic potential and prevalence in wild animals has not been completely understood (Johne et al., 2014).

In order to investigate antibodies prevalence against HEV and HEV-related viruses in wild animals, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using purified virus-like particles (VLPs) and animal-specific anti-immunoglobulins have been carried out. How-

* Corresponding author.

E-mail address: kmaeda@yamaguchi-u.ac.jp (K. Maeda).

ever, there are problems with ELISA using sera from wild animals; (1) Sera from wild animals are sometimes hemolytic, causing non-specific reactions in serological tests; (2) Secondary antibodies specific for animal species are used for detection of the antibodies in each wild animal, but secondary antibodies for some animals are not widely available; (3) As HEV does not grow efficiently in cell culture, preparation of antigens is difficult (Tanaka et al., 2007). In many laboratories, including our own, VLPs have been used as an ELISA antigen, but impurities in VLPs affect the results of ELISA. Therefore, highly purified VLPs are required for ELISA to detect antibodies specific for HEV.

In this study, we developed an ELISA using extracts from mammalian cells expressing viral protein as an antigen, and peroxidase-conjugated protein A/G as a reagent for detection of antibody. This ELISA was applied to the serosurveillance of HEV infection in humans, wild boars, ferrets, raccoons (*Procyon lotor*), masked palm civets (*Paguma larvata*), dogs (*Canis lupus familiaris*) and cats (*Felis silvestris catus*).

2. Materials and methods

2.1. Serum samples

Serum samples were collected from wild boars, ferrets, raccoons, masked palm civets, dogs and cats. A total of 519 sera from wild boars were collected in Yamaguchi (n = 364), Hyogo (n = 67) and Wakayama (n = 88) Prefectures of Japan; 47 sera from ferrets were collected in animal hospitals throughout Japan (n = 47); 208 sera from raccoons were collected in Hyogo Prefecture, Japan; 65 sera from masked palm civets were collected in Hyogo Prefecture, Japan; 170 sera from dogs were collected in Yamaguchi (n = 135) and Miyagi (n = 35) Prefectures of Japan; and 17 sera from cats were collected in Miyagi Prefecture, Japan. Serum samples were also collected from 24 hunters who hunt wild animals in Yamaguchi Prefecture, Japan under permission from the Center for Clinical Research, Yamaguchi University Hospital (Control Number: H26-116). All collected sera were stored at -20°C until use.

2.2. Construction of plasmids

Viral RNA was extracted from the serum of a patient with fulminant hepatitis E in Yamaguchi Prefecture, Japan in 2011 (Okita et al., 2012) using a QIAamp viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was transcribed using the RNA LA PCR Kit (AMV) Ver.1.1 (TAKARA, Shiga, Japan) with random 9-mer primers at 30°C for 10 min, 42°C for 30 min, 70°C for 15 min and 4°C for 5 min. Full-length and the N-terminal-truncated fragment of the HEV open reading frame 2 (ORF2) were amplified using two primer pairs, Yamagu11 ORF2 1F(Clal) (5'-GT ATC GAT CAC CAT GCG CTC TCG GGC T-3') and Yamagu11 ORF2 660R-His (5'-GT AGA TCT TCA GTG ATG GTG ATG GTG ATG GTA CTC CCG GGT TTT ACC CA-3'), for the full-length ORF2, and Yamagu11 ORF2 112F(Clal) (5'-GT ATC GAT CAC CAT GGC TGT GGC TCC GGC CCC T-3') and Yamagu11 ORF2 660R-His for the N-terminal truncated ORF2. Amplified cDNA was digested with the restriction enzymes *Clal* and *BglIII*, and was then cloned into the *Clal*-*BglIII* site of pCAGGS plasmid (Niwa et al., 1991). The resultant plasmids were designated pCAGGS-HEVcap(1-660) and pCAGGS-HEVcap(112-660).

2.3. Cells

Human embryonic kidney 293T (HEK-293T) cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS;

Thermo Fisher Scientific), 100 U/ml penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin at 37°C in 5% CO_2 .

2.4. Expression in HEK-293T cells

HEK-293T cells were transfected with plasmids, pCAGGS-HEVcap(1-660), pCAGGS-HEVcap(112-660) and pCAGGS using polyethylenimine (PEI; Thermo Fisher Scientific). Briefly, 16 μg of plasmid were mixed with 40 μl of PEI (2 mg/ml) and were transfected into HEK-293T cells in a 90-mm cell culture dish (Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan), as reported previously (Boussif et al., 1995). After 3 days post-transfection, cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and detached from the dishes with a cell scraper (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Cells were treated with 0.5 ml of RIPA buffer (1% sodium deoxycholate, 1% Triton X-100, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM sodium chloride (NaCl), 0.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid) for 1 h at 4°C . After centrifugation at $13,000 \times g$ for 30 min at 4°C , supernatant was collected and stored at -80°C until use.

2.5. Western blot analysis

Extracts of HEK-293T cells transfected with plasmids were mixed with an equal volume of $2 \times$ concentrated sample buffer (6.25 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 20% glycerol, 0.001% bromophenol blue). These samples were boiled for 3 min, placed on ice for 3 min and centrifuged at $13,000 \times g$ for 3 min at room temperature. Then, cell lysates were electrophoresed on polyacrylamide gels and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Immobilon-P; Millipore, Billerica, MA). After blocking with Tris-buffered saline (20 mM Tris-HCl and 150 mM NaCl, pH 7.5) (TBS) containing 3% gelatin (EIA Grade Reagent Gelatin; Bio-Rad, Hercules, CA) for 45 min at 37°C , the membrane was washed three times with TBS containing 0.05% Tween 20 (T-TBS). A mouse anti-His antibody (Tetra-His antibody; QIAGEN) was diluted with T-TBS containing 1% gelatin. After incubation with diluted anti-His antibody for 45 min at 37°C , the membrane was washed three times with T-TBS. Then, the membrane was reacted with peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG + A + M (Cappel Laboratories, Solon, OH) diluted in T-TBS containing 1% gelatin for 45 min at 37°C . After washing the membrane with T-TBS and TBS three times each, specific bands were visualized with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Wako, Osaka, Japan).

In order to detect the anti-HEV antibodies in animal sera, the PVDF membrane was prepared using the same method and blocked with TBS containing 1% Blockace (Dainippon Pharmaceutical, Osaka, Japan) for 2 h at room temperature. Sera and Peroxidase Conjugated Purified Recomb[®] Protein A/G (Thermo Fisher Scientific) were diluted with T-TBS containing 0.4% Blockace.

2.6. ELISA

Extracts from HEK-293T cells transfected with the plasmids, pCAGGS-HEVcap(112-660) or pCAGGS, were diluted to 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ with adsorption buffer (0.05 M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6), and were distributed at 100 μl per well into 96-well microplates (Maxisorp; Nunc, Roskilde, Denmark). After incubation at 37°C for 2 h, plates were placed at 4°C overnight. Wells were washed three times with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T), and were then incubated with 100 μl per well of 1% Blockace in PBS at 37°C for 30 min. Sera were 100-fold diluted with PBS-T containing 0.4% Blockace. Wells were washed three times with PBS-T, and then diluted sera were added to duplicate wells. After incubation at 37°C for 30 min, wells were washed three times with PBS-T and incubated with 100 μl per well of Peroxidase Conjugated Purified Recomb[®] Protein A/G diluted in PBS-T containing 0.4% Blockace at

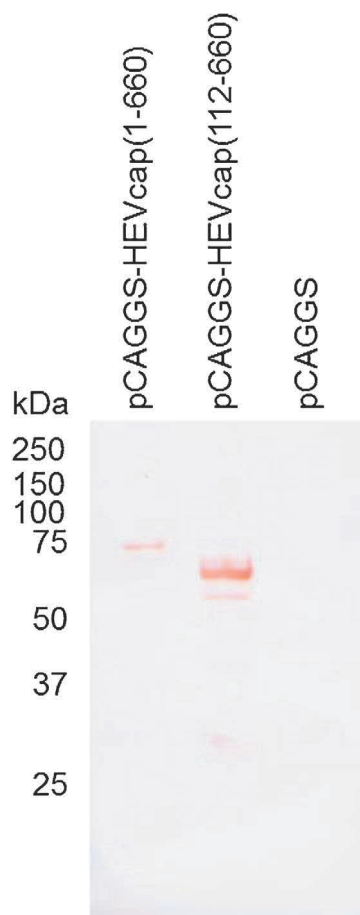


Fig. 1. Expression of HEV ORF2 protein in HEK-293T cells. The plasmids pCAGGS-HEVcap(1-660), pCAGGS-HEV(112-660) and pCAGGS were transfected into HEK-293T cells and antigens were extracted from transfected cells. Immunoblotting was carried out using anti-His-tag antibody. Molecular masses of protein markers are indicated on the left.

37 °C for 30 min. Following three washes with PBS-T, 100 μ l of substrate reagent (HRP Substrate Kit; Bio-Rad) was added to each well. After gentle shaking at room temperature for 30 min, the enzymatic reaction was stopped by adding 100 μ l of 2% oxalic acid to each well. Absorbance was measured using a spectrophotometer (Bio-Rad) at a wavelength of 415 nm. Absorbance of wells coated with extract from empty plasmid-transfected cells were subtracted from those of antigen-coated wells.

2.7. Statistical analysis

For statistical analysis, chi-squared, McNemar's and Wilcoxon signed-rank tests were performed. P values of <0.05 were considered to be statistically significant. Cohen's kappa coefficient was used to calculate agreement between assays.

3. Results

3.1. Expression of HEV capsid protein

Expression of full-length and N-terminal truncated capsid proteins in HEK-293T cells was confirmed by Western blot analysis (Fig. 1). Specific bands with molecular masses of 74 kilodaltons (kDa) and 60 kDa in cells transfected with pCAGGS-HEVcap(1-660) and pCAGGS-HEVcap(112-660), respectively, were detected using anti-His antibody, but no bands were detected in pCAGGS-transfected cells. The bands with molecular masses of less

Table 1

Comparison between this and the previous ELISA using sera from wild boars in Yamaguchi and Wakayama prefectures.

ELISA using expressed ORF2	ELISA using VLP (Hara et al., 2014)		Total
	(+)	(-)	
(+)	44	8	52
(-)	1	118	119
Total	45	126	171

than 55 kDa on N-terminal truncated protein likely represented degraded proteins. The amount of expressed N-terminal truncated protein was clearly greater than that of complete capsid protein. Therefore, HEK-293T cells expressing N-terminal truncated HEV capsid protein were extracted by TritonX-100 and sodium deoxycholate and then used as antigens for ELISA and Western blot analysis.

3.2. Establishment and evaluation of ELISA for detection of HEV-specific antibodies in wild animals

Sixty-seven sera from wild boars captured in Wakayama Prefecture, Japan, and 104 wild boars captured in Yamaguchi Prefecture, Japan, were compared using two ELISA methods; the new method established in this study and our previous method of VLPs and swine-specific secondary antibody. In Wakayama Prefecture, Japan, we did not detect any anti-HEV antibody in wild boars (Hara et al., 2014). Using this new ELISA, the average and standard deviation (S.D.) of OD values were 0.007 and 0.042, respectively. On the other hand, the average and S.D. in our previous method were 0.104 and 0.074, respectively (Fig. 2). Furthermore, samples showing absorbance of over 3.5 in this ELISA were more numerous than in our previous ELISA. The cut-off value of 0.437 was calculated by ROC analysis based on the results of this and the previous ELISA using sera from wild boars in Yamaguchi and Wakayama Prefectures. The area under curve of ROC was 0.986. The sensitivity and the specificity of newly developed ELISA were 0.978 and 0.937, respectively (Table 1). By this ELISA, additional eight wild boars were classified as positive, and one previously positive wild boar was classified as negative. The Kappa statistics for agreement between the two methods was 0.871. A conservative higher cut-off value of 0.500 was proposed for the other mammals in order to prevent false positives.

3.3. Seroprevalence of HEV infection among wild boars in Yamaguchi Prefecture

Seroprevalence of HEV among wild boars (n = 364) in Yamaguchi Prefecture, located in the western part of Japan, was examined by this ELISA (Table 2). In wild boars, 111 of 364 (30.5%) were seropositive for anti-HEV antibody. Seroprevalence in wild boars over 20 kg (35.9%) was significantly higher than that among those less than 20 kg (15%) ($P < 0.05$) and that in wild boars over 50 kg (44.1%) was significantly higher than that in wild boars less than 50 kg (23.9%) ($P < 0.05$). There were no significant differences in seroprevalence between males (30.3%) and females (32.1%).

3.4. Detection of antibodies against HEV in humans, wild boars, ferrets, raccoons, masked palm civets, dogs and cats

Sera from 24 hunters who hunt wild animals in Yamaguchi Prefecture, Japan, were tested and nine hunters (38%) were seropositive for anti-HEV antibodies. Sera from wild boars captured in Hyogo Prefecture (n = 67) and Wakayama Prefecture (n = 88) of Japan, were tested, and eight from Hyogo Prefecture (13%) and none from Wakayama Prefecture (0%) were seropositive. Forty-seven

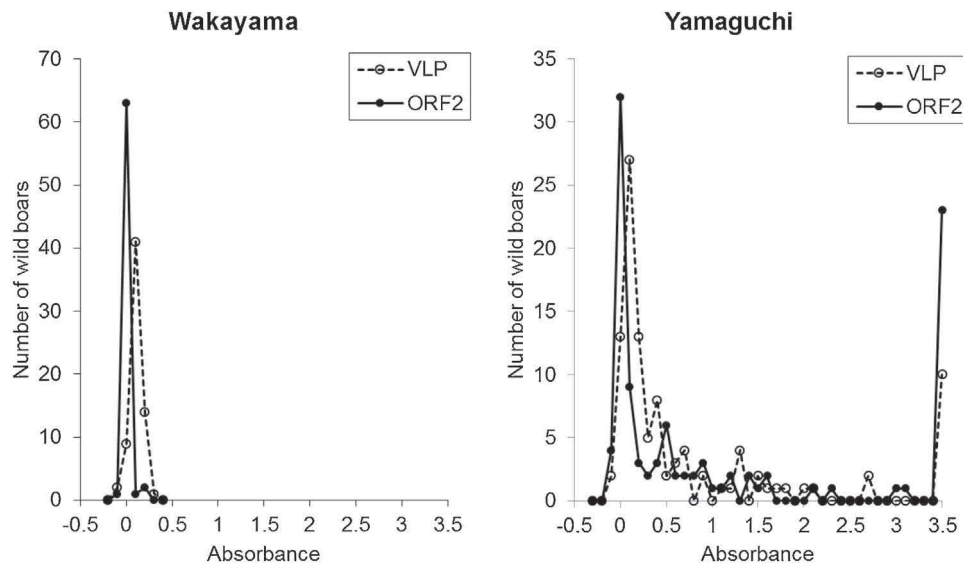


Fig. 2. Comparison of absorbance in ELISA using HEV ORF2 protein expressed in cells and VLPs as antigens. ELISA was performed using sera from 67 wild boars captured in Wakayama Prefecture, Japan, and 104 wild boars in Yamaguchi Prefecture, Japan. Black lines show the results for the new ELISA established in this study. Dotted lines show the results for our previous ELISA (Hara et al., 2014).

Table 2
Seroprevalence of HEV in wild boars in Yamaguchi Prefecture.

	Sex			Body weight (kg)				Total
	Male	Female	Unknown	<20	20–50	>50	Unknown	
Number of examined animals	142	209	13	66	135	127	36	364
Number of anti-HEV antibody positive animals	43	67	1	10	38	56	7	111
Percentage of anti-HEV antibody positive animals	30.3	32.1	8	15	28.1	44.1	19	30.5

Table 3
Seroprevalence of HEV in mammals.

Species	Place	Year	Percentage of positive animals (Number of HEV positive animals/Number of examined animals)
Human	Yamaguchi	2015	38 (9/24)
Wild boar	Yamaguchi	2010–2015	30.5 (111/364)
	Hyogo	2011–2014	13 (9/67)
Dog	Wakayama	2007–2013	0 (0/88)
	Yamaguchi	2010–2015	0.7 (1/135)
Cat	Miyagi	2015	0 (0/35)
	Miyagi	2015	12 (2/17)
Ferret	Japan	2012–2014	11 (5/47)
Raccoon	Hyogo	2008–2014	0 (0/208)
Masked palm civet	Hyogo	2011–2014	0 (0/65)

sera from ferrets were collected in animal hospitals throughout Japan. Five ferrets (11%) were seropositive for anti-HEV antibodies. Raccoons and masked palm civets were captured in Hyogo Prefecture, Japan, and all raccoons and masked palm civets were seronegative for anti-HEV antibodies. Sera from dogs were collected in Yamaguchi and Miyagi Prefectures in Japan. The results showed that one of 135 dogs in Yamaguchi Prefecture (0.7%) and none of 35 dogs in Miyagi Prefecture (0%) was seropositive for anti-HEV antibodies. In cats, two of 17 (12%) in Miyagi Prefecture, Japan, were seropositive for anti-HEV antibodies. (Table 3)

3.5. Confirmation of antibodies against HEV by Western blot analysis

To confirm the specificity of ELISA, Western blot analysis was carried out. Selected sera that were positive for anti-HEV antibody

by ELISA were used as the first antibody, and a specific protein with a molecular mass of 60 kDa was detected (Fig. 3).

4. Discussion

In this study, it was demonstrated that the newly established ELISA is useful for detection of HEV infection in various mammalian species, including humans. This ELISA using the new antigen and HRP-labelled Protein A/G was improved when compared with the previous ELISA using VLPs and animal-specific secondary antibodies (Hara et al., 2014). This novel ELISA is expected to be applicable to serological surveys of HEV infection among various wild animals.

In the previous ELISA, VLPs of HEV were expressed in insect cells infected with recombinant baculovirus expressing a truncated HEV capsid protein. VLPs were then purified from culture supernatant by polyethylene glycol precipitation and density-gradient centrifugation (Yamashita et al., 2009, Hara et al., 2014). The preparation

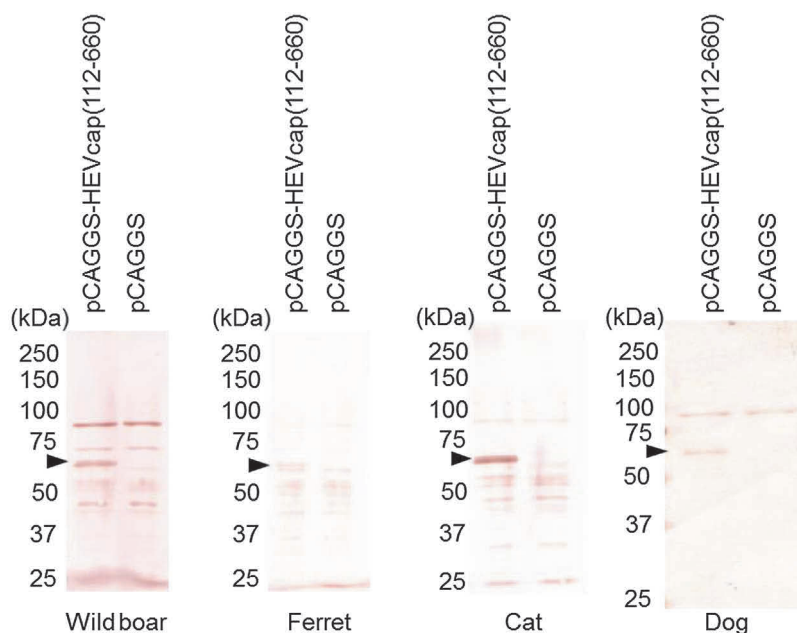


Fig. 3. Detection of anti-HEV antibodies by Western blotting. Extracts from HEK-293T cells were used as antigens for Western blotting. Sera of 12 wild boars, 2 ferrets, 2 cats and 2 dogs were used as the 1st antibody. Peroxidase Conjugated Purified Recomb[®] Protein A/G was used as a reagent for detection of antibody. Representative results are shown in this figure. Arrow heads show the expressed HEV capsid protein.

of purified VLPs is complex and time-consuming. Our procedure to prepare ELISA antigen comprises only lysis of cells transfected with the plasmid. Transfection using PEI is a recently developed and inexpensive method (Boussif et al., 1995). Furthermore, as control wells were treated with lysates of cells transfected with empty vector, the OD value of non-specific reactions could be correctly subtracted from the OD value in wells using lysates of HEV capsid-expressing cells. In fact, mean absorbance of wild boars in Wakayama Prefecture in our newly established ELISA was 0.007, but that in the previous ELISA was 0.104 (Fig. 2), indicating that our newly established ELISA can remove the non-specific reaction. In addition, OD values of HEV-positive individuals by newly established ELISA were significantly higher than those by the previous ELISA ($P < 0.05$, Fig. 2, Table 1), indicating that it is more sensitive than our previous ELISA.

In order to apply the novel ELISA to numerous mammalian species, HRP-conjugated protein A/G was selected to detect HEV-specific antibodies. Protein A/G has been reported to have a broad binding ability for immunoglobulins of various mammals, including wild boars, monkeys, dogs, raccoons and raccoon dogs (Inoshima et al., 1999; Shimoda et al., 2013, 2014; Suzuki et al., 2015). Moreover, we demonstrated the availability of HRP-conjugated protein A/G as a reagent for detection of antibody for ELISA (Inoshima et al., 1999; Shimoda et al., 2013, 2014; Suzuki et al., 2015; Our unpublished data). Therefore, this novel ELISA could be applied to many animal species and does not require species-specific secondary antibodies. Importantly, the reactivity between antibody and protein A/G should be examined before ELISA using sera from new species.

Previously, we reported a high prevalence of HEV among wild boars in Yamaguchi Prefecture, Japan (Hara et al., 2014). In this study, further investigation was performed using the new ELISA method, indicating that 111 of 364 (30.5%) wild boars in Yamaguchi Prefecture, Japan, were seropositive for HEV. This positive rate was significantly higher than that in the other two prefectures of Japan, Hyogo Prefecture (13%) and Wakayama Prefecture (0%) ($P < 0.05$). This confirms that Yamaguchi Prefecture, Japan, is an endemic area for HEV.

We found that five of 47 (11%) ferrets tested were seropositive for HEV. Recently, it was reported that ferret HEV was detected in Japan (Li et al., 2014) and that it serologically cross-reacted with human HEV (Yang et al., 2013). Therefore, these seropositive ferrets might be infected with ferret HEV, but not human HEV. This suggests that the present ELISA also works well for investigating the seroprevalence of ferret HEV infection in ferrets.

Sera from raccoons and masked palm civets in Hyogo Prefecture, Japan, where a case of HEV contracted by consumption of deer meat was first reported in 2003 (Tei et al., 2003), were examined. Although wild boars in Hyogo Prefecture, Japan, (13%) were seropositive, all raccoons and masked palm civets were seronegative for HEV. This suggests that raccoons and masked palm civets are not reservoirs of HEV. In sera from dogs and cats, few samples were positive for HEV. This suggests that dogs and cats in Japan are also at risk for HEV infection. Animal sera positive for anti-HEV antibody by ELISA were examined by Western blotting. A specific band with a molecular mass of 60 kDa was visualized using sera from wild boars, ferrets, dogs and cats (Fig. 3). The results confirmed the ELISA data.

In conclusion, this simple and sensitive ELISA was able to detect anti-HEV antibodies in wild boars, ferrets, dogs, cats and humans. This ELISA may therefore become a powerful tool for investigation of HEV prevalence among several mammals.

Acknowledgements

We would like to thank the hunters and officers for collection of sera from wild animals, and the veterinarians at animal hospitals for collection of sera from ferrets, dogs and cats. This work was supported in part by Health and Labour Sciences Research Grants (H27-Syokuhin-Ippan-011).

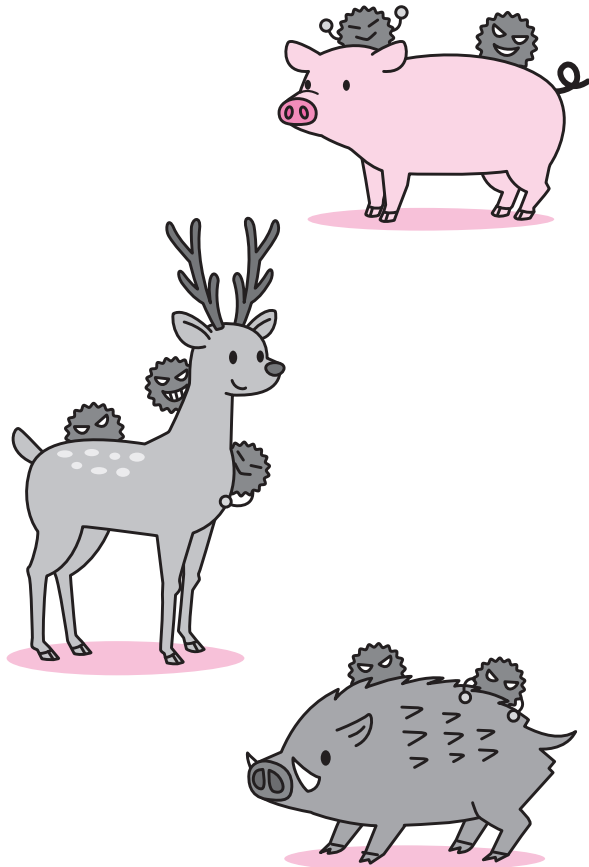
References

- Aggarwal, R., Jameel, S., 2011. Hepatitis E. *Hepatology* 54, 2218–2226.
- Bodewes, R., van der Giessen, J., Haagmans, B.L., Osterhaus, A.D.M.E., Smits, S.L., 2013. Identification of multiple novel viruses, including a parvovirus and a hepevirus, in feces of red foxes. *J. Virol.* 87, 7758–7764.

- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, J.P., 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 7297–7301.
- Cossaboom, C.M., Córdoba, L., Dryman, B.A., Meng, X.-J., 2011. Hepatitis E virus in rabbits Virginia, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 2047–2049.
- Drexler, J.F., Seelen, A., Corman, V.M., Fumie Tateno, A., Cottontail, V., Melim Zerbini, R., Gloza-Rausch, F., Klöse, S.M., Adu-Sarkodie, Y., Oppong, S.K., Kalko, E.K.V., Osterman, A., Rasche, A., Adam, A., Müller, M.A., Ulrich, R.G., Leroy, E.M., Lukashev, A.N., Drosten, C., 2012. Bats worldwide carry hepatitis E virus-related viruses that form a putative novel genus within the family Hepeviridae. *J. Virol.* 86, 9134–9147.
- Emerson, S.U., Purcell, R.H., et al., 2007. Hepatitis E Virus. In: DM, Knipe, Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, fifth edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 3047–3056.
- Geng, J., Wang, L., Wang, X., Fu, H., Bu, Q., Zhu, Y., Zhuang, H., 2011. Study on prevalence and genotype of hepatitis E virus isolated from Rex Rabbits in Beijing, China. *J. Viral Hepat.* 18, 661–667.
- Hara, Y., Terada, Y., Yonemitsu, K., Shimoda, H., Noguchi, K., Suzuki, K., Maeda, K., 2014. High prevalence of hepatitis E virus in wild boar (*Sus scrofa*) in Yamaguchi Prefecture, Japan. *J. Wildl. Dis.* 50, 378–383.
- Inoshima, Y., Shimizu, S., Minamoto, N., Hirai, K., Sentsui, H., 1999. Use of protein AG in an enzyme-linked immunosorbent assay for screening for antibodies against parapoxvirus in wild animals in Japan. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6, 388–391.
- Johne, R., Heckel, G., Plenge-Bönig, A., Kindler, E., Maresch, C., Reetz, J., Schielke, A., Ulrich, R.G., 2010a. Novel hepatitis E virus genotype in Norway rats, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1452–1455.
- Johne, R., Plenge-Bönig, A., Hess, M., Ulrich, R.G., Reetz, J., Schielke, A., 2010b. Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J. Gen. Virol.* 91, 750–758.
- Johne, R., Dremsek, P., Reetz, J., Heckel, G., Hess, M., Ulrich, R.G., 2014. Hepeviridae: an expanding family of vertebrate viruses. *Infect. Genet. Evol.* 27, 212–229.
- Krog, J.S., Breum, S.Ø., Jensen, T.H., Larsen, L.E., 2013. Hepatitis E virus variant in farmed mink, Denmark. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 2028–2030.
- Lhomme, S., Dubois, M., Abravanel, F., Top, S., Bertagnoli, S., Guerin, J.-L., Izopet, J., 2013. Risk of zoonotic transmission of HEV from rabbits. *J. Clin. Virol.* 58, 357–362.
- Li, T.C., Yonemitsu, K., Terada, Y., Takeda, N., Wakita, T., Maeda, K., 2014. Ferret hepatitis E virus infection in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 68, 60–62.
- Meng, X.J., Purcell, R.H., Halbur, P.G., Lehman, J.R., Webb, D.M., Tsareva, T.S., Haynes, J.S., Thacker, B.J., Emerson, S.U., 1997. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 9860–9865.
- Meng, X.J., 2010. Recent advances in Hepatitis E virus. *J. Viral Hepat.* 17, 153–161.
- Nakamura, M., Takahashi, K., Taira, K., Taira, M., Ohno, A., Sakugawa, H., Arai, M., Mishiro, S., 2006. Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepatol. Res.* 34, 137–140.
- Niwa, H., Yamamura, K., Miyazaki, J., 1991. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 15, 193–199.
- Okamoto, H., 2007. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res.* 127, 216–228.
- Okita, K., Takahashi, K., Harada, K., Tanioka, Y., Hirano, A., Kimura, T., Kato, A., Yamashita, S., Arai, M., Okita, K., 2012. A case of acute hepatitis E (genotype 4) after eating uncooked meat and liver of wild boar captured in Yamaguchi prefecture, with a viral genome relatively closer to a Chinese isolate than to Japanese strains. *Kanzo* 53, 534–537.
- Raj, V.S., Smits, S.L., Pas, S.D., Provacia, L.B.V., Moorman-Roest, H., Osterhaus, A.D.M.E., Haagmans, B.L., 2012. Novel hepatitis E virus in ferrets, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1369–1370.
- Ruggeri, F.M., Di Bartolo, I., Ponterio, E., Angeloni, G., Trevisani, M., Ostanello, F., 2013. Zoonotic transmission of hepatitis E virus in industrialized countries. *New Microbiol.* 36, 331–344.
- Shimoda, H., Inthong, N., Noguchi, K., Terada, Y., Nagao, Y., Shimojima, M., Takasaki, T., Rerkamnuaychoke, W., Maeda, K., 2013. Development and application of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for serological survey of Japanese encephalitis virus infection in dogs. *J. Virol. Methods* 187, 85–89.
- Shimoda, H., Saito, A., Noguchi, K., Terada, Y., Kuwata, R., Akari, H., Takasaki, T., Maeda, K., 2014. Seroprevalence of Japanese encephalitis virus infection in captive Japanese macaques (*Macaca fuscata*). *Primates* 55, 441–445.
- Smith, D.B., Simmonds, P., Jameel, S., Emerson, S.U., Harrison, T.J., Meng, X.J., Okamoto, H., Van der Poel Wim, H.M., Purdy, M., 2014. A consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J. Gen. Virol.* 95, 2223–2232.
- Suzuki, J., Nishio, Y., Kameo, Y., Terada, Y., Kuwata, R., Shimoda, H., Suzuki, K., Maeda, K., 2015. Canine distemper virus infection among wildlife before and after the epidemic. *J. Vet. Med. Sci.* 77, 1457–1463.
- Takahashi, M., Nishizawa, T., Nagashima, S., Jirintai, S., Kawakami, M., Sonoda, Y., Suzuki, T., Yamamoto, S., Shigemoto, K., Ashida, K., Sato, Y., Okamoto, H., 2014. Molecular characterization of a novel hepatitis E virus (HEV) strain obtained from a wild boar in Japan that is highly divergent from the previously recognized HEV strains. *Virus Res.* 180, 59–69.
- Tanaka, T., Takahashi, M., Kusano, E., Okamoto, H., 2007. Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *J. Gen. Virol.* 88, 903–911.
- Tei, S., Kitajima, N., Takahashi, K., Mishiro, S., 2003. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 362, 371–373.
- Yamashita, T., Mori, Y., Miyazaki, N., Cheng, R.H., Yoshimura, M., Unno, H., Shima, R., Moriishi, K., Tsukihara, T., Li, T.C., Takeda, N., Miyamura, T., Matsuura, Y., 2009. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 12986–12991.
- Yang, T., Kataoka, M., Ami, Y., Suzuki, Y., Kishida, N., Shirakura, M., Imai, M., Asanuma, H., Takeda, N., Wakita, T., Li, T.C., 2013. Characterization of self-assembled virus-like particles of ferret hepatitis E virus generated by recombinant baculoviruses. *J. Gen. Virol.* 94, 2647–2656.

特集
1

E型肝炎患者が急増！ ウイルスの危険性を 知って感染予防



米満 研三
前田 健

豚やイノシシ、シカなどの肉を生で食べることで感染するE型肝炎の患者が近年急増し、今年はすでに過去最多となっています。妊娠後期の妊婦では特に重症化しやすく、危険な感染症といえます。そこで、E型肝炎ウイルスの特徴や発症した際の症状・治療法を紹介するとともに、食品等事業者や消費者が実施すべき予防策について詳しく解説します。

E型肝炎ウイルスとは

E型肝炎ウイルスはヒトにE型

肝炎を引き起こすウイルスで、感染症法において四類感染症に指定されています。E型肝炎ウイルスは初めて発見されてから33年、人獣共通感染症として認識されてから13年しか経っていない新興ウイ

ルスです。

今回の特集ではE型肝炎ウイルスについて、発見の歴史から、ウイルスの特徴、感染症としての特徴、食品等事業者や消費者が注意すべき点などについてまとめたいと思います。

E型肝炎ウイルス発見の歴史

1955年にインドで発生した肝炎の集団感染事例をはじめとして、アジア、アフリカ、ラテンアメリカにおいて肝炎の集団感染が報告されてきました。当時、原因となる病原体は明らかにされておらず、経口伝播型非A非B型肝炎

と呼ばれていました。この病原体こそが現在、先進国を含め世界中で公衆衛生上の問題となっているE型肝炎ウイルスでした。E型肝炎ウイルスは1983年にアフガニスタンでソビエト軍兵士の間で発生した原因不明の流行

性肝炎の原因ウイルスとして発見され、遺伝子は1990年に初めて報告されました。その後長らく、E型肝炎ウイルスは衛生環境の悪い発展途上国において、ふん便中に排出されたウイルスによって汚染された水を介して感染するウイルスとして考えられてきました。日本を含む先進国においては、発展途上国で感染する輸入感染症（旅行者感染症）として認識されてきました。しかし近年、海外渡航歴のない国内感染のE型肝炎が報告され、それらが動物由来感染であることが示唆されました。初めて動物からE型肝炎ウイルスが検出されたのはアメリカの豚での調査で、1997年に報告されました。豚由来ウイルスとヒト由来ウイルスの遺伝的な近縁性と間接的な証拠から、E型肝炎ウイルスは人獣共通感染症であることが予想されました。さらに日本国内の養豚における調査でも広くこ

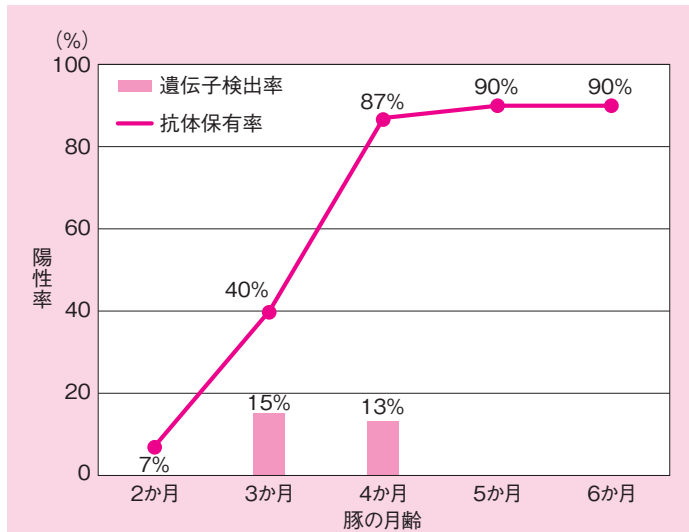


図1 豚におけるE型肝炎ウイルス遺伝子検出率と抗体保有率

Takahashi M, *et al.* Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus. *J Gen Virol.* 2003 Apr;84(Pt 4):851-62.

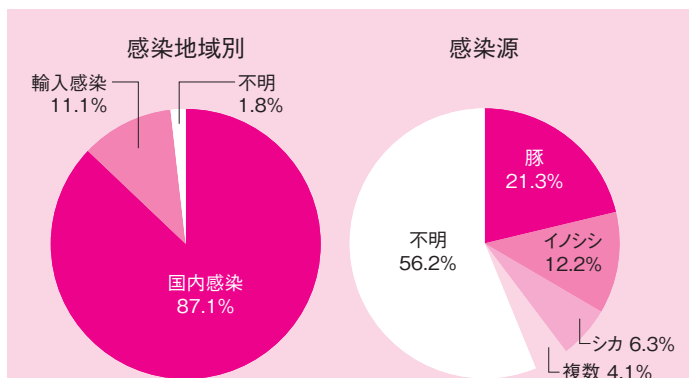
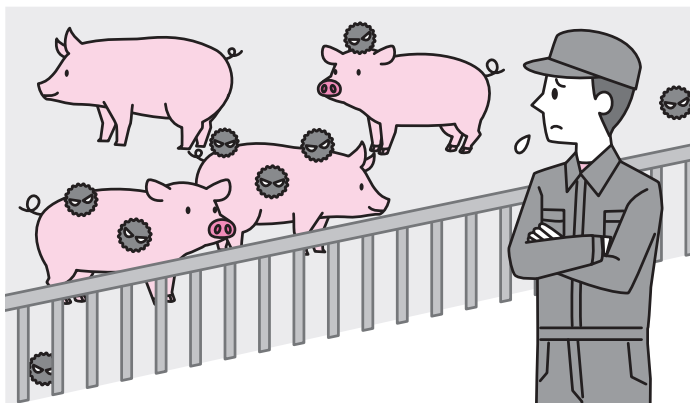


図2 国内感染例の感染地域、感染源別の比較

Kanayama A, *et al.* Epidemiology of domestically acquired hepatitis E virus infection in Japan: assessment of the nationally reported surveillance data, 2007-2013. *J Med Microbiol.* 2015 Jul;64(7):752-8.



のウイルスが蔓延^{まんえん}していることが明らかになりました。国内25か所の養豚場のE型肝炎ウイルスの抗体保有状況と遺伝子保有状況を調べた報告では、すべての農場で抗体陽性の豚が見つっています。5〜6か月齢の豚の抗体保有率は90%にも達し、3〜4か月齢の豚

からはウイルスの遺伝子も検出されました(図1)。その後、2003年に兵庫県で発生したシカ肉からの感染事例により、E型肝炎ウイルスが人獣共通感染症であると直接的に証明されました。同じ年に、北海道の市販豚生レバーから1・9%の割合

でウイルスが検出されたとの報告もあり、市販されている食肉も感染ルートの一つになる可能性があります。現在、日本におけるE型肝炎は多くが国内感染であり、食肉に由来する人獣共通感染症であると認識されています(図2)。

E型肝炎ウイルスの特徴

E型肝炎ウイルスはへペウイルス科に分類されている、エンベロープ（ウイルスを覆う膜状の構造のこと）をもたない小型球形のプラス一本鎖RNAウイルスです。へペウイルス科にはヒトに感染するE型肝炎ウイルスのほか、イノシシ、フェレット、ラット、コウモリなどから発見されている、E型肝炎ウイルスに近縁なウイルスが含まれます。これら近縁ウイルスのヒトへの感染性などはまだ明らかになっていません。

ヒトに感染するE型肝炎ウイルスの遺伝子型として、1型から4型までが知られています（表1）。1型と2型は発展途上国における水系感染による集団感染の原因ウイルス、3型と4型は先進国を含

め世界中で食肉由来感染の原因ウイルスとして報告されています。3型と4型のE型肝炎ウイルスは、ヒトのほか豚、イノシシ、シカ、マングースなどから検出の報告があり、それらの動物の肉やふ

ん便などを介してヒトが感染するものと考えられます。われわれの研究結果から、日本で狩猟されたイノシシの18・7%が抗体を保有していることがわかりました。また、2・4%のイノシシからはウイルスの遺伝子も検出されました（表2）。自然界においてはイノシシがウイルスの保有宿主として重要な働きをしていると予想されます。

表1 E型肝炎ウイルスの遺伝子型による違い

	感 染	分 布	伝 播
遺伝子型1	ヒトのみ	発展途上国	ふん便に汚染された水を介して
遺伝子型2			
遺伝子型3	ヒト、ブタ、イノシシ、シカなど	先進国を含め世界中	動物の肉などを介して
遺伝子型4			

表2 日本のイノシシおよびシカにおけるE型肝炎ウイルス感染状況

	イノシシ		シカ	
	抗体保有率	遺伝子検出率	抗体保有率	遺伝子検出率
検査頭数	1031	672	826	505
陽性頭数	193	16	1	1
陽性率	18.7%	2.4%	0.1%	0.2%

E型肝炎ウイルスがエンベロープをもたない小球形ウイルスであることは前述しましたが、エンベロープをもたないウイルスは一般的に消毒薬や熱に抵抗性があると考えられます。E型肝炎ウイルスは熱抵抗性があり、多くのウイルスが不活化される56℃30分の加熱でも感染性は完全になくならないことがわかっています。E型肝炎ウイルスの不活化には70℃10分以上

の加熱が有効という報告があります。食品衛生法に基づく「食品、添加物等の規格基準（昭和34年厚生省告示第370号）」では、牛の肝臓または豚の食肉で食品を製造、加工または調理する場合、工程中において「中心部の温度を63℃で30分以上加熱するか、又はこれと同等以上の殺菌効果を有する方法で加熱殺菌しなければならぬ」と定めています。

ウイルスの遺伝子を検出する方法、E型肝炎ウイルスに対する抗体を検出する方法がよく使われています。感染症法に基づく届出基準としても、ウイルスの遺伝子検出、IgM抗体もしくはIgA抗体の検出と定められています。現在のところ、E型肝炎の特異的な治療は存在せず、対症療法により回復を待ちます。劇症化した場合は症状に応じた治療が必要となります。

E型肝炎の症状、

診断、治療、予防

E型肝炎ウイルスに感染しても多くの人は不顕性感染となり、症状を示す人は多くありません。E型肝炎ウイルスに感染すると2〜8週間（平均6週間）の長い潜伏期の後、全身の倦怠感、腹痛、食欲不振、肝腫大、黄疸といった急性肝炎の症状を呈します。発症し

ても多くの人は安静にすることで回復し、ウイルスは体から排除されます。しかし、劇症肝炎に発展し死にいたる場合もあります。また妊娠後期の妊婦では重症化しやすく、致死率が高いという報告もあります。

E型肝炎の診断は、E型肝炎ウ

E型肝炎のワクチンはまだ開発されていません。予防のためには豚、イノシシ、シカの肉を生で食べないことが大事です。E型肝炎ウイルスは加熱することで感染性を失いますので、しっかりと火を通して食べましょう。また、肉を切った包丁やまな板は洗わずに使いまわしてはいけません。E型肝炎ウイルスの流行している衛生環境の悪い地域に行く場合は、生水や加熱されていない食材を摂取しないように気をつけましょう。

特集
1

E型肝炎患者が急増!

ウイルスの危険性を知って感染予防

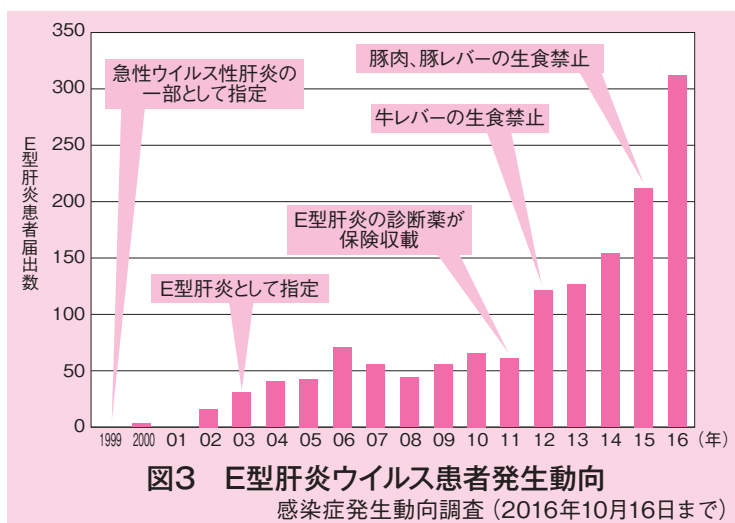
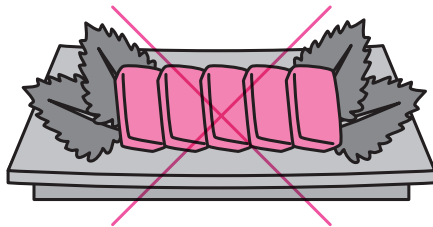
なぜE型肝炎患者が増えているのか

1999年以降のE型肝炎患者の届出数の推移をみますと、近年患者数が急増していることがわかります(図3)。E型肝炎患者数の増加は日本だけに限った話ではなく、ドイツやフランスなどの国においても同様の傾向がみられます。

日本で患者数が増加している理由としては、E型肝炎についての知識が医師や患者に広がったこと、2011年にE型肝炎の抗体検査が保険適用になったことで検査数が増加したことなどが考えられます。また、2012年7月から牛のレバーを生食用として販売・提供することが禁止されたため、豚の生レバーの消費が増えたことで患者が増えたことも考えら

れます。牛レバーの生食が禁止されてから3年後の2015年6月

~~牛~~ 生レバー ~~豚~~ 生肉 ~~豚~~ 生レバー



に豚肉・豚レバーの生食用としての販売・提供も禁止されました。しかし、2016年は10月16日までの患者数です。2015年の患者数を上回っており、どのような経路で感染しているのかを解明していく必要があります。

E型肝炎ウイルス感染事例

わが国におけるE型肝炎ウイルス感染事例として、豚肉、イノシシ肉、シカ肉に由来する感染事例が報告されています(表3、図2)。表にまとめた事例のなかから、いくつかを詳しくみてみましょう。

2003年の兵庫県のシカ肉に由来する感染例は、E型肝炎の発症と食肉との関連が初めて直接的に証明された事例です。冷凍シカ肉を生で食べた2家族4名がE型肝炎を発症し、患者から得られたウイルスの遺伝子配列と冷凍庫に残っていたシカ肉から得られた遺伝子配列が一致しました。ウイルスが検出されたシカ肉を食べなかった2名と、少量しか食べなかった1名は感染しませんでした。

2003年の長崎県の事例で

は、バーベキューでイノシシ肉を喫食した13名中少なくとも8名がウイルスに感染し、うち5名がE

型肝炎を発症しました。感染疑いの人も含めると11名に感染した可能性があり、E型肝炎の10名以上の集団感染の初めての事例となりました。感染者は肉の生食こそしていませんでしたが、生焼けの肉や、生肉に触れた箸やトングから感染したと考えられます。

表3 E型肝炎ウイルスの感染事例

時期	場所	感染源	概要
2003年3月	鳥取県	イノシシの生レバー	4~6週間前にイノシシの生レバーを食べた2名が感染
2003年4月	長崎県	イノシシ肉	約40日前にイノシシ肉を食べた8名が感染
2003年4月	兵庫県	シカの生肉	6~7週間前にシカの生肉を食べた4名が感染
2004年6月	愛媛県	イノシシ肉	約1か月前に食べたイノシシ肉から感染
2004年9月	北海道	豚レバー(?)	5週間前に豚レバー(?)を食べた5名が感染、うち1名死亡
2005年3月	福岡県	イノシシ肉	52日前に食べたイノシシ肉から感染
2011年3月	山口県	イノシシの生肉、生レバー	4週間前に食べたイノシシの生肉、生レバーから感染

Matsuda H, *et al.* Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J Infect Dis* 2003;188:944.
 Tamada Y, *et al.* Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *J Hepatol*. 2004 May;40(5):869-70.
 Tei S, *et al.* Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet*. 2003;362:371-373.
 Inoue G, *et al.* A case of acute hepatitis E developed in a housewife who had cooked and eaten wild boar meat a month before. *Kanzo* 2006;47:459-464.
 Kato M, *et al.* A mini-outbreak of HEV infection in those who enjoyeYakiniku party: one died of fulminant hepatitis. *Kanzo* 2004;45:688.
 Li TC, *et al.* Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis*. 2005 Dec;11(12):1958-60.
 Okita K, *et al.* A case of acute hepatitis E(genotype 4)after eating uncooked meat and liver of wild boar captured in Yamaguchi prefecture, with a viral genome relatively closer to a Chinese isolate than to Japanese strains. *Kanzo* 2012;53:534-537.



食品等事業者や消費者が注意すべき点

ここまで、E型肝炎ウイルスの歴史や特徴、感染事例をみてきましたが、生活のなかで私たちが注意すべき点を最後にまとめたいと思います。

食品等事業者が注意すべきこと

は、手袋の着用をすることです。手袋を着用することにより狩猟者がE型肝炎ウイルスの感染から予防されているというデータが海外から報告されています。

消費者として気をつけなければいけないことは、まず、豚、イノシシ、シカの肉、レバーを生で喫食しないことです。いくら新鮮な肉であろうとも、ウイルスに汚染されている可能性を考えて調理し

正しい知識で感染予防

今回、E型肝炎ウイルスについて今までわかっていることを簡単にまとめました。日本においてE

ましよう。しっかりと火を通すことでE型肝炎ウイルスは不活化されます。特にブロック肉などを調理する場合は、中心部まできちんと火が通るまで加熱する必要があります。また、生肉に触れた調理器具は使いまわさず、手指はよく洗いましよう。一般的な食中毒予防の意識をもって生活することで、E型肝炎ウイルス感染も予防できると考えられます。消費者に食肉を販売・提供する事業者は、消費者に対して、加熱用であること、十分な加熱をしなければ食中毒の危険があることを情報提供することが必要です。

型肝炎ウイルスは、豚やイノシシなどが保有している食肉に由来する感染症であることがわかってい

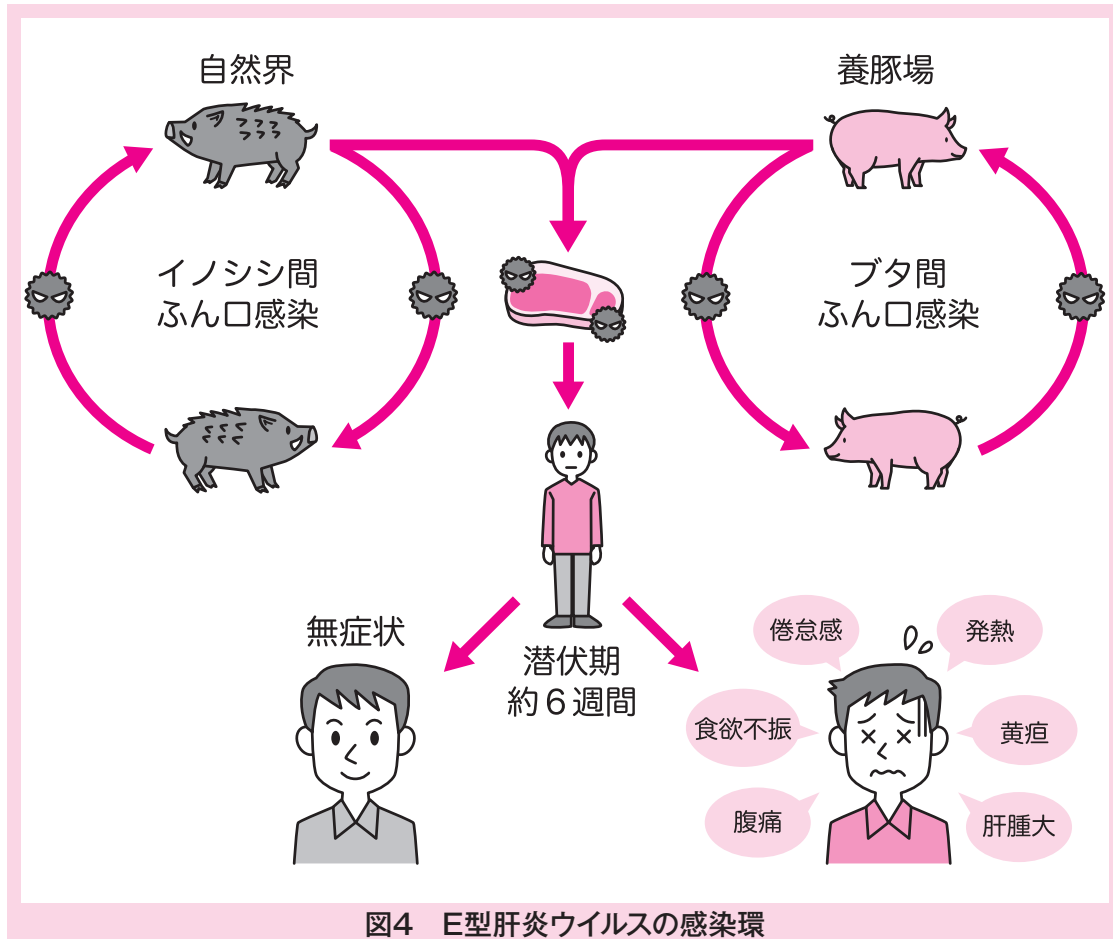


図4 E型肝炎ウイルスの感染環

ただけたかと思えます（図4）。このウイルスは発見されて間もないウイルスであり、まだ解明されていないことが非常に多いです。今後の研究により、ウイルスの新たな感染経路や、自然界のなかでのウイルスの動態などが明らかになっていくでしょう。しかし、感染予防という点では、よく加熱すること、生肉の取扱いに気をつけることが大事ということは明らかです。E型肝炎ウイルスについての正しい知識をもって、感染予防に努めましょう。

山口大学共同獣医学部
 獣医学科獣医微生物学教室
 教授 まえだ けん
 博士課程 よねみつ けんぞう