

別添 4

令和 4 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業） 「野生鳥獣由来食肉の食中毒発生防止と衛生管理ガイドラインの改良に資する研究」 分担研究報告書

野生鳥獣が保有する病原微生物の汚染状況に関する研究（E 型肝炎）

分担研究者	前田 健	（国立感染症研究所・獣医科学部）
研究協力者	Milagros Virherz Mendoza	（国立感染症研究所・獣医科学部）
研究協力者	立本 完吾	（国立感染症研究所・獣医科学部）
研究協力者	奥谷 晶子	（国立感染症研究所・獣医科学部）

研究要旨：

E 型肝炎ウイルスは、ヒトに急性肝炎を引き起こすウイルスである。日本では感染した肉の摂取により HEV の人獣共通感染症報告が増えている。今回、イノシシ、シカにおける抗 HEV 抗体検出および HEV 遺伝子検出を実施し、野生動物における HEV 感染状況を調査した。さらにイノシシとシカの糞便から遺伝子を検出した。その結果、全国のイノシシにおける抗 HEV 抗体の陽性率は 13.3%で、小型個体（30kg 未満、5.8%）よりも大型イノシシ（50kg 以上、21.1%）で陽性率が高いことが確認された。さらに、HEV RNA は高齢のイノシシよりも子豚でより頻繁に検出された。イノシシの血清および糞便から HEV 遺伝子型 3（2 株）および 4（3 株）を検出した。一方、シカの HEV 感染が非常にまれなであることが再確認された。人への感染の際に感染源を明らかとするためにも、全国の野生イノシシの保有する HEV 遺伝子のライブラリー化を進める必要がある。

A. 研究目的

本研究では、野生動物の人獣共通感染症である HEV の感染リスクを評価するために、全国調査を実施した。とともに、日本における HEV 株の遺伝子型の特徴を明らかにしました。

B. 研究方法

HEV カプシドタンパクの発現：

下関で HEV 患者から得られた遺伝子（JTF-Yamagu11 株）の ORF2 蛋白発現プラスミドを 293T 細胞にポリエチレンイミンを用いてトランスフェクションした。発現の確認は抗 His-Tag 抗体で行った。トランスフェクション細胞は RIPA buffer によって 4°C1 時間処理した後、15000 回転 4°C30 分間遠心して上清を回収して、ELISA 抗原として用いた（Yonemitsu K et al., 2016）

HEV 抗体の検出：トランスフェクション細胞の抽出抗原を 5 μg/ml に希釈した後、100 μl を各ウェルに接種して ELISA を行った。ブロッキング液および抗原希釈液にはブロックエースを用いた。血清は 1：100 に希釈し、二次抗体にはペルオキシダーゼ標識 ProteinA/G を 1：20000 希釈して用いた。発色には SeraCare Life Science のペルオキシダーゼ基質キットを用いた（Yonemitsu K et

al., 2016）。

HEV 遺伝子検出：血清と糞便の懸濁液から QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いて RNA を抽出し、HEV-F1 プライマーと HEV-R2 プライマーを用いて RT-PCR を実施、更に RT-PCR 産物を、HEV-F2 プライマーと HEV-R1 プライマーを用いて Nested PCR を行い、遺伝子の検出を試みた（Yonemitsu K et al., 2016）（Li TC., 2005）

（倫理面への配慮）

該当なし

C. 研究結果

1. 野生動物の血清からの HEV 疫学調査

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実施した。これまでに 16 県のイノシシ 3370 頭と 14 道県のシカ 2158 頭を調査した。その結果、イノシシにおいては 448 頭（13.3%）が抗体陽性であった。一方、シカにおいては 1 頭（0.04%）が陽性であった。遺伝子検出に関しては、イノシシ 2158 頭中 28 頭（1.3%）、シカ 1349 頭中 1 頭（0.1%）が陽性で

あった。また、本年度はイノシシの血清検体から HEV 遺伝子型 4 株を 2 株検出した。

イノシシにおける抗体陽性率に関しては、性別における違いは認められなかったが、体重が 30 kg 以下の個体は有意に陽性率が低かった。一方、遺伝子検出率は 30 kg 以下の個体が有意に高かった。このことは、30 kg 以下の個体が E 型肝炎ウイルスに感染していること、すなわち、子豚が HEV を保有しているリスクが高いことが示された。(図 1, 図 2, 図 4)

2. 野生動物の糞便試料からの HEV ゲノム検出

イノシシとシカの糞便サンプルから HEV ゲノム検出を行った。これまでに 10 県のイノシシ 116 頭と 17 道県のシカ 288 頭を調査した。その結果、イノシシ 6 頭 (5.2%) が陽性であった。鹿の糞便サンプルはすべて HEV ゲノムに陰性であった。(図 3)

イノシシの糞便から HEV 遺伝子型 3 (2 株)、遺伝子型 4 (1 株) を検出した。

また、イノシシの糞から HEV ジェノタイプ 3 ウイルスを分離することができました。

D. 考察

HEV 疫学調査は、シカの HEV 感染が非常にまれな出来事であることを示唆しました。イノシシ、特に子豚は HEV 感染のリスクが高いが、他の野生動物は HEV 感染のリスクが低いことが示唆された。

E. 結論

この研究により、イノシシの集団が野生動物の中で HEV の主要な保菌者であることが明らかになりました。また、若いイノシシは HEV に感染する頻度が高く、子豚からの HEV 感染リスクが高いことが示唆された。シカが HEV に感染することは稀であり、HEV の感染リスクは低いですがゼロではない。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mendoza MV, Yonemitsu K, Ishijima K, Kuroda Y, Tatemoto K, Inoue Y, Shimoda H, Kuwata R, Takano A, Suzuki K, Maeda K. Nationwide survey of hepatitis E virus infection among wildlife in Japan. J Vet Med Sci. 2022 Jul 10;84(7):992-1000.
2. 前田 健「野生獣における E 型肝炎、重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) 等の浸潤状況」令和 4 年度野生獣衛生推進体制促進事業に係る普及啓発資料「野生獣と家畜の伝染病伝播防止に向けて」2023 年 5 月 p66-p71

3. 前田 健「E 型肝炎ウイルス」『生食のはなし』川本伸一、朝倉宏、稲津康弘、畑江敬子、山崎浩司編集 (朝倉書店) 2023 年 4 月 p74-75
4. 前田 健「野生鳥獣における病原ウイルスの保有状況に関する研究」食品衛生研究 2022.9. 72 (9) 11-20
5. 前田 健「One Health: 動物の感染症から考える」特集—ワンヘルスの実践と今後の可能性 ~動物・人・自然環境 (I) 一日獣会誌 75 242~245 (2022)

2. 学会発表

なし

3. 講演会

1. Ken Maeda” Recent Occurrence of Zoonosis in Japan” Joint symposium: Infectious Disease Control and One Health Approach. The 16th China-Japan-Korea Forum for Communicable Disease Control and Prevention (WEB) December 8, 2022 9:20-18:00
2. 前田 健「動物由来感染症をもっと知ってください」第 21 回分子予防環境医学研究会大会特別シンポジウム「人獣共通感染症」2022 年 2 月 8 日 (金) 13:00~17:00 (オンライン開催)
3. 前田 健「動物由来感染症を考える: One Health アプローチの重要性」東京理科大学-国立感染症研究所第 4 回感染症勉強会 2023 年 3 月 8 日 18:00- Zoom
4. 前田 健「動物由来感染症の蔓延: One Health アプローチの重要性」第 6 回獣医微生物学フォーラム特別講演 2023 年 3 月 4 日東京大学中島薫一郎記念ホール
5. 前田 健「感染症対策における One Health アプローチの重要性」第 69 回日本ウイルス学会学術集会教育セミナー 2 (共催: アドテック株式会社) 令和 4 年 11 月 14 日 12:40-13:40
6. 前田 健「動物由来感染症の情報と気を付けるべき対応」ペストコントロールフォーラム 東京都ペストコントロール協会と武蔵野市の共同開催 2022 年 9 月 WEB 開催
7. 前田 健「新興感染症の現状とその発生要因: One Health approach の重要性」日本バイオセーフティ学会 設立 20 周年記念講演 令和 4 年 9 月 9 日 (金) 11 時から 14 時ホテル プリンセスガーデン

- | | |
|---|---|
| <p>8. 前田 健「人と動物の共通感染症」ワンヘル
ス サマーセミナー飯田高原ボスコ：2022年
8月27日（土）15～16時</p> <p>9. Ken Maeda “One Health Approach” The 4th
international summer course on
sustainability of tropical animal
production. 8th July, 2022 11:00-
12:00(JP) (WEB)</p> <p>10. 前田 健「One Health の時代：基礎研究の蓄
積と多分野連携へ」第9回筑波大学・東京理
科大学合同リトリート2022年5月29日（日）
13:00～18:00 東京理科大学 生命医科学研
究所2階大講義室ハイブリッド開催（オンラ
イン開催）</p> | <p>11. 前田 健「人獣共通感染症」FETP
Introductory Course 2022 2022/04/26 会場
感染研(飯田橋オフィス)</p> <p>H. 知的財産権の出願・登録状況</p> <p>1. 特許取得
なし</p> <p>2. 実用新案登録
なし</p> <p>3. その他
なし</p> |
|---|---|

図表
(図 1)

全国イノシシHEV抗体検出、遺伝子検出

	抗体検出(ELISA)			遺伝子検出(RT-PCR)		
	検査頭数	陽性頭数	陽性率(%)	検査頭数	陽性頭数	陽性率(%)
東北A	8	0	0.0	8	0	0
関東A	91	45	49.5	91	5	5
関東B	48	20	41.7	48	1	2
関東C	220	12	5.5	0	0	0
中部A	144	8	5.6	140	0	0
中部B	202	20	9.9	202	0	0
近畿A	111	23	20.7	77	2	3
近畿B	838	56	6.7	544	0	0
中国A	838	180	21.5	729	17	2
四国A	311	27	8.7	115	0	0
四国B	136	27	19.9	136	1	1
九州A	92	17	18.5	68	2	3
九州B	5	1	20.0	0	0	0
九州C	182	6	3.3	0	0	0
九州D	47	6	12.8	0	0	0
九州E	97	0	0.0	0	0	0
計	3370	448	13.3	2158	28	1.3

(図 2)

全国イノシシHEV抗体検出、遺伝子検出

抗体検出(ELISA)

	♂	♀	記録なし	≤30	30-50	≥50	記録なし	計
検査頭数	1587	1507	276	895	1109	811	555	3370
陽性頭数	203	226	19	52	164	171	61	448
陽性率(%)	12.8	15.0	6.9	5.8	14.8	21.1	11.0	13.3

遺伝子検出(RT-PCR)

	♂	♀	記録なし	≤30	30-50	≥50	記録なし	計
検査頭数	1061	1009	88	531	781	634	212	2158
陽性頭数	18	9	1	14	8	2	4	28
陽性率(%)	1.7	0.9	1.1	2.6	1.0	0.3	1.9	1.3

(図3)

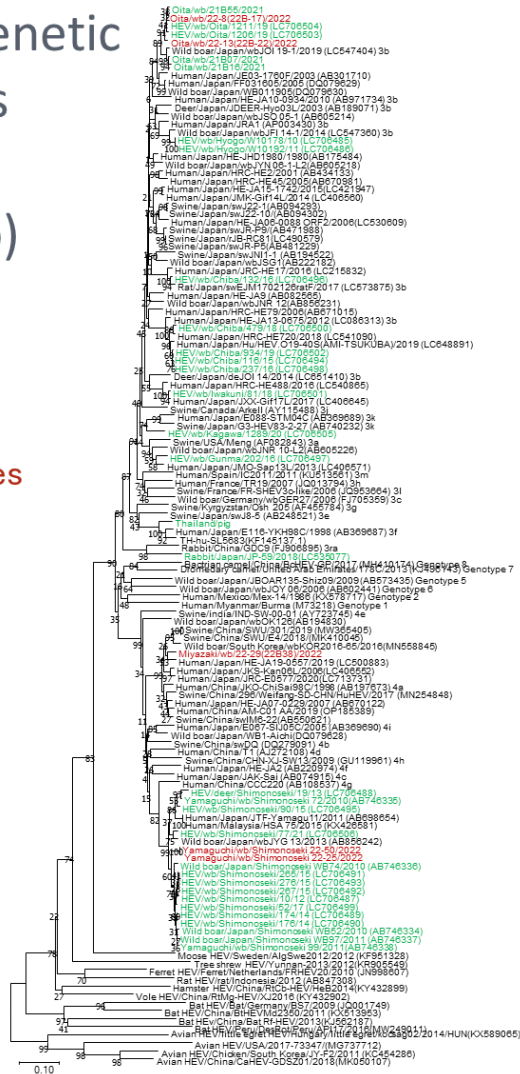
全国イノシシ遺伝子検出			
遺伝子検出(RT-PCR)			
	検査頭数	陽性頭数	陽性率(%)
鳥取	1	0	0
静岡	1	0	0
大分	62	5	8
奈良	4	0	0
山形	6	0	0
熊本	5	0	0
宮崎	18	1	6
愛媛	12	0	0
岡山	3	0	0
福岡	3	0	0
N/A	1	0	0
計	116	6	5

全国シカHEV遺伝子検出			
遺伝子検出(RT-PCR)			
	検査頭数	陽性頭数	陽性率(%)
鳥取	26	0	0
北海道	9	0	0
静岡	39	0	0
大分	33	0	0
群馬	7	0	0
奈良	51	0	0
大阪	29	0	0
宮崎	54	0	0
青森	9	0	0
愛知	7	0	0
岩手	4	0	0
京都	6	0	0
神奈川	1	0	0
兵庫	7	0	0
福岡	1	0	0
山梨	3	0	0
山形	1	0	0
N/A	1	0	0
計	288	0	0

(図 4)

Phylogenetic analysis (ORF2 338 bp)

● 2022 samples



Genotype 3

- 38 Oita/wb/21B55/2021
 - 39 Oita/wb/22-8(22B-17)/2022
 - 41 HEV/wb/Oita/1211/19 (LC708504)
 - 94 HEV/wb/Oita/1206/19 (LC708503)
 - 89 Oita/wb/22-13(22B-22)/2022
 - 98 Wild boar/Japan/wb/JOI 19-1/2019 (LC547404) 3b
 - 98 Oita/wb/21B07/2021
 - 98 Oita/wb/21B16/2021
- 大分
- 63 Human/Japan/JRA1 (AP003430) 3b
 - 69 Wild boar/Japan/wb/JFI 14-1/2014 (LC547360) 3b
 - 99 HEV/wb/Hyogo/W10178/10 (LC706485)
 - 100 HEV/wb/Hyogo/W10192/11 (LC706486)
- 兵庫
- 10 Human/Japan/JRC-HE17/2016 (LC215832)
 - 100 HEV/wb/Chiba/132/16 (LC706498)
 - 94 Rat/Japan/SWE/JM1702126rat/2017 (LC573875) 3b
 - 27 Human/Japan/HE-JA9 (AB082665)
 - 27 Wild boar/Japan/wb/JNR 12(AB856231)
 - 27 Human/Japan/HE-JA13-0675/2012 (LC086313) 3b
 - 24 HEV/wb/Chiba/479/18 (LC706500)
 - 100 Human/Japan/HRC-HE720/2018 (LC541090)
 - 94 Human/Japan/Hu/HEV/O19-40S(AMI-TSUKUBA)/2019 (LC648891)
 - 68 HEV/wb/Chiba/116/15 (LC706494)
 - 76 HEV/wb/Chiba/237/16 (LC706498)
- 千葉
- Deer/Japan/de/JOI 14/2014 (LC851410) 3b
 - 55 Human/Japan/HRC-HE488/2016 (LC540865)
 - 100 HEV/wb/Iwakuni/81/18 (LC706501)
 - 94 Human/Japan/JXX-Gif17L/2017 (LC406645)
- 山口(岩国)
- 90 Human/Japan/E088-STMO4C (AB369689) 3k
 - 74 Swine/Japan/G3-HEV83-2-27 (AB740232) 3k
 - 41 HEV/wb/Kapawa/1289/20 (LC706505)
 - 41 Swine/USA/Meng (AF082843) 3a
 - 94 Wild boar/Japan/wb/JMO-Sap13L/2013 (LC406571)
 - 58 HEV/wb/Gunma/202/16 (LC706497)
 - 58 Human/Japan/JMO-Sap13L/2013 (LC406571)
- 香川
群馬

Genotype 4

- 100 Swine/China/SWU/301/2019 (MW365405)
 - 95 Swine/China/SWU/E4/2018/(MK410045)
 - 26 Wild boar/South Korea/wb/KOR2016-65/2016(MN558845)
 - 36 Miyazaki/wb/22-29(22B38)/2022
 - 36 Human/Japan/HE-JA19-0557/2019 (LC500883)
 - 36 Human/Japan/JKS-Kan06L/2006(LC406552)
 - 36 Human/Japan/JRC-E0577/2020(LC713731)
- 宮崎
- 97 HEV/deer/Shimonoseki/19/13 (LC706488)
 - 55 Yamaguchi/wb/Shimonoseki 72/2010(AB746335)
 - 86 HEV/wb/Shimonoseki/90/15 (LC706495)
 - Human/Japan/JTF-Yamagu11/2011 (AB698654)
 - 100 Human/Malaysia/HSA 75/2015 (KX426581)
 - 37 HEV/wb/Shimonoseki/77/21 (LC706506)
 - 75 Wild boar/Japan/wb/JYG 13/2013 (AB856242)
 - 99 Yamaguchi/wb/Shimonoseki 22-50/2022
 - 100 Yamaguchi/wb/Shimonoseki 22-25/2022
 - Wild boar/Japan/Shimonoseki WB74/2010 (AB746336)
 - 60 HEV/wb/Shimonoseki/265/15 (LC706491)
 - 41 HEV/wb/Shimonoseki/276/15 (LC706493)
 - 87 HEV/wb/Shimonoseki/267/15 (LC706492)
 - 78 HEV/wb/Shimonoseki/10/12 (LC706487)
 - HEV/wb/Shimonoseki/17/14 (LC706489)
 - HEV/wb/Shimonoseki/176/14 (LC706489)
 - 36 HEV/wb/Shimonoseki/176/14 (LC706490)
 - 31 Wild boar/Japan/Shimonoseki WB52/2010 (AB746334)
 - 27 Wild boar/Japan/Shimonoseki WB97/2011 (AB746337)
 - 36 Yamaguchi/wb/Shimonoseki 99/2011(AB746338)
- 山口
(下関)