

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)  
「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」  
総合研究協力報告(平成 22～24 年度)

## 熊本県におけるイノシシ、シカ及びブタの E 型肝炎ウイルス汚染実態調査 (平成 22～24 年度)

研究協力者	原田誠也	熊本県保健環境科学研究所
研究分担者	田中智之	堺市衛生研究所
研究協力者	西村浩一	熊本県保健環境科学研究所
研究協力者	大迫英夫	熊本県保健環境科学研究所
研究協力者	吉岡健太	熊本県保健環境科学研究所
研究分担者	石井孝司	国立感染症研究所
研究協力者	李 天成	国立感染症研究所

### 研究要旨

Nested RT-PCR 法を用いて、熊本県内のイノシシ、シカ及びブタの E 型肝炎ウイルス (HEV) 汚染実態調査を行ったところ、イノシシ 173 頭中 13 頭 (7.5%) 及びブタ 1,634 頭中 15 頭 (0.9%) から HEV 遺伝子が検出されたが、シカ 63 頭から HEV 遺伝子は検出されなかった。イノシシから検出された HEV の遺伝子型は、地域特異的に 3 型 (G3) と 4 型 (G4) に分かれた。ブタの HEV は G3 のみで、各養豚場に特異的であった。特にブタでは、と畜検査で合格となった肝臓からも 80 検体中 2 検体 (2.5%) から HEV 遺伝子が検出された。平成 24 年 7 月 1 日から生食用牛肝臓の販売が禁止されたことで、ブタ肝臓を生食用に提供しているとの報道もあるが、ブタ肝臓から HEV に感染する可能性も高く、生食の危険性を消費者に繰り返し周知徹底する必要がある。

また、ELISA 法により、ブタ血清中の抗 HEV-IgG 抗体を調査したところ、966 頭中 695 頭 (71.9%) が陽性であった。Specific Pathogen Free (SPF) ブタと一般ブタを比較すると、SPF ブタは 101 頭中 12 頭 (11.9%)、一般ブタは 865 頭中 683 頭 (79%) が抗 HEV-IgG 抗体陽性で、抗体保有率に大きな差があった。

### A. 研究目的

E 型肝炎は、E 型肝炎ウイルス (HEV) に汚染された食品や水の飲食等に起因する経口感染症で、従来、輸入感染症として位置づけられてきた。しかし、近年、

イノシシ、シカ及びブタ等の動物からヒト由来 HEV と極めて類似するウイルスが分離され、HEV は既に日本に土着していることが明らかになった。また、これらの動物の肉や肝臓等の生食あるいは加熱不

十分な状態での喫食による国内感染事例が複数報告されていることから、E型肝炎は動物由来感染症としても重要視されている。

そこで本研究では、熊本県内で捕獲されたイノシシ、シカ及びと畜されたブタのHEV汚染実態を調査し、情報を提供することにより、これらの食肉等の喫食による健康被害の発生防止に役立てることを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 材料

平成18年度～平成24年度に熊本県で捕獲されたイノシシ173頭（筋肉130検体、肝臓153検体、血液65検体）、シカ63頭（筋肉43検体、肝臓55検体、血液26検体）、及びブタ1,634頭（廃棄肝臓183検体、合格肝臓80検体及び血液1,371検体）を検査材料とした。

### 2. Nested RT-PCR法によるHEV遺伝子検出及び塩基配列解析

イノシシ、シカ及びブタの肉や肝臓、各々約2gをペースト状にした後、PBS(-)で50%乳剤とし3,000rpmで10分間遠心した。その上清をさらに10,000rpmで10分間遠心し、得られた上清を検体とした。また、血液は30分以上室温に放置して血清を分離後、3,000rpmで10分間遠心した上清を検体とした。

次に、各々の検体100 $\mu$ lからAGPC法でRNAを抽出（最終的に50 $\mu$ lのDEPC処理水に溶解）し、Random Primerを用いてcDNAを合成した。

その後、E型肝炎検査マニュアル（<http://www0.nih.go.jp/niid/referen>

ce/HE-manual.pdf）に記載されているORF2領域のプライマーセットを用いたPCR及び2%アガロースゲル電気泳動を行い、HEVの増幅バンドを確認した。増幅バンドが確認された検体についてはnestnd PCR産物を精製後、ダイレクトシークエンスにより塩基配列を決定し、遺伝子解析ソフトMEGA5.0を用いて、近隣結合法(NJ法)による分子系統樹解析を行った。

### 3. ELISA法によるIgG抗体測定

平成22年7月～平成23年9月に966頭のブタから採取した血清中の抗HEV-IgG抗体を、HEVウイルス様中空粒子(G1-sHEV-LPs)を抗原としたELISA法で測定した。なお、Cutoff値は、HEVに感染していないと推定された養豚場1施設のブタ集団の測定値(n=38,平均:0.133,SD:0.050)から(平均+3 $\times$ SD)計算し、OD値0.283以上を抗体陽性とした。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

## C. 研究結果

### 1. Nested RT-PCR法によるHEV遺伝子検出及び塩基配列解析

イノシシは173頭中13頭(7.5%)からHEV遺伝子が検出されたが、シカ63頭からは全く検出されなかった(表1)。イノシシの検体別の内訳は、筋肉130検体中2検体(1.5%)、肝臓153検体中12検体(7.8%)、及び血液65検体中4検体(6.2%)であった(表1)。また、イノシシから検出されたHEVの遺伝子型は3型(G3)及び4型(G4)で、捕獲地域による特異性

が見られた（表 2，図 1）。

一方、ブタは 1,634 頭中 15 頭（0.9%）から G3 の HEV 遺伝子が検出された。検体別の内訳は、と畜検査による合格肝臓 80 検体中 2 検体（2.5%）、廃棄肝臓 183 検体中 11 検体（6.0%）、及び血液 1,371 検体中 2 検体（0.1%）で、調査した 60 ヶ所以上の養豚場中 5 養豚場から HEV 遺伝子が検出された。なお、HEV 遺伝子が最も多く検出された廃棄肝臓 11 検体中 8 検体は同一養豚場に由来していた（表 3，4）。

HEV 遺伝子（ORF2 領域 338bp）の塩基配列を比較したところ、イノシシから検出された G3 では、人吉・球磨地域の塩基配列の相同性は 100%、G4 では天草地域の相同性は 99%以上で、人吉・球磨地域と天草地域間の相同性は 97.6%、その他の地域間の相同性は 86%以下で、ブタから検出された G3 の相同性は、同一養豚場内では 99.1%~100%、各養豚場間の相同性は 92%以下であった（図 1）。

## 2. ELISA 法による IgG 抗体測定

ブタ血清中の抗 HEV-IgG 抗体保有率は平均 71.9%であったが、養豚場間で 0~100%と大きな開きが見られた（表 5）。

Specific Pathogen Free（SPF）ブタを飼育している養豚場 5 施設の抗体保有率は、1 施設を除き 15%未満と低かった。一方、SPF ブタ以外の一般養豚場のうち、養豚場名の明らかな 20 施設の抗体保有率は、80%以上が 12 施設（60%）、60%~80%が 4 施設（20%）、及び 60%未満が 4 施設（20%）であり、SPF ブタの養豚場より抗体保有率が有意に高かった（表 5）。

## D. 考察

本研究により、熊本県内のイノシシ及びブタからこれまでに検出された HEV 遺伝子の塩基配列を解析した結果、異なる地域で捕獲されたイノシシ間での相同性は 91%以下であったのに対し、同一地域で捕獲されたものは 99%以上であり非常に相同性が高かった。ブタでもイノシシと同様な傾向が見られ、同一養豚場内のブタでは相同性が 99%以上であったのに対し、異なる養豚場間では 91%以下であった。これらのことから、イノシシでは捕獲地域毎に、ブタでは養豚場毎に非常に類似した遺伝子を有する HEV が浸淫しているか、または地域や養豚場毎に HEV 遺伝子が増変した可能性が考えられた。

またブタでは、と畜検査で合格となった肝臓の 2.5%から HEV 遺伝子が検出された。平成 24 年 7 月 1 日から生食用牛肝臓の販売が禁止されたことで、牛肝臓の代わりにブタ肝臓を生食用として提供している飲食店があるとの報道もあり、平成 24 年 10 月 4 日付け食安監発 1004 第 1 号で、ブタ肝臓の提供に関する注意喚起も行われている。しかし、この通知を受けて行われた平成 24 年度食品、添加物等の年末一斉取締りにおける立ち入り調査では、生食用としてのブタ肝臓等の提供に対する指導が全国で 80 件も行われていた。注意喚起がまだまだ不十分であり、HEV のみならず細菌感染も含めてブタ肝臓の生食の危険性を繰り返し関係事業者及び消費者に周知徹底することが必要である。

特に、肝臓から HEV 遺伝子が検出されたブタのほとんどが少数の同一施設で飼育されていたこと、及びブタ血清中の抗 HEV-IgG 抗体の保有率が養豚場間で大き

な開きがあったことから、養豚場間の HEV 汚染の差は、飼育形態や飼育環境など複数の要因が重なり、ブタの HEV 感染の頻度や感染時期に差が生じるためであろうと推察された。

これらの科学的根拠から今後、畜産部局等とも連携を密にし、養豚場の HEV 清浄化対策を進めていかなければならないと考える。

## E. 結論

熊本県内のイノシシ、シカ及びブタの E 型肝炎ウイルス (HEV) 汚染実態調査を行ったところ、シカからは HEV 遺伝子は全く検出されなかったが、イノシシの 7.5% から HEV 遺伝子が検出された。

また、と畜検査合格の肝臓からも 2.5% から HEV の遺伝子が検出された。厚生労働省の平成 24 年度の食品、添加物等の年末一斉取締りにおける立ち入り調査では、生食用ブタ肝臓等の提供に対する指導が全国で 80 件も行われていた。ブタ肝臓から HEV に感染する可能性が高く、生食の危険性を消費者に繰り返し周知徹底する必要がある。

さらに、イノシシやブタの肉や肝臓を喫食する際には十分な加熱調理を行うとともに、調理時の二次汚染を防ぐため、他の食品との調理器具の共用を避けることも重要である。

なお、熊本県内で捕獲されたシカからは HEV 遺伝子は検出されなかったが、国内では検出事例もあることから、喫食する際には、イノシシやブタと同様、感染防止に留意して調理する必要がある。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表
  - 1) 西村浩一，原田誠也，李 天成，石井孝司，田中智之，野田 衛：熊本県におけるイノシシ，ブタ及びシカの E 型肝炎ウイルス保有状況に関する実態調査，第 32 回日本食品微生物学会学術総会，2013 年 10 月，東京都
  - 2) Tomoyuki Tanaka, Noritoshi Kitamoto, Tomoichiro Oka, Tatsuya Miyoshi, Kiyoko Uchino, Hisaaki Yoshida, Setsuko Iizuka, Yoshiharu Morino, Yasutaka Yamashita, Seiya Harada, Naokazu Takeda and Kazuhiko Katayama. Rapid Detection kit for norovirus and sapovirus with viruses specific monoclonal antibodies. The 5th China Medicinal Biotech Forum November 7-9, Beijing, China
  - 3) 原田誠也，西村浩一，李 天成，石井孝司，田中智之，野田 衛：熊本県におけるイノシシ，シカ及びブタの E 型肝炎ウイルス汚染実態調査と分子疫学解析，第 60 回日本ウイルス学会学術集会，平成 24 年 11 月，大阪市

## 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
3. その他  
なし

表1 イノシシ及びシカの HEV 遺伝子検査結果 (検体別)

	イノシシ				シカ			
	筋肉	肝臓	血液	頭数	筋肉	肝臓	血液	頭数
検査数	130	153	65	173	43	55	26	63
陽性数	2	12	4	13	0	0	0	0
陽性率 (%)	1.5	7.8	6.2	7.5	0.0	0.0	0.0	0.0

表2 イノシシにおける HEV 遺伝子陽性検体の詳細

検体番号	個体番号	捕獲地域	部位	遺伝子型
1	1	宇城・八代地域	肝臓	G3
2	2	天草地域	肝臓	G4
3	3	天草地域	肝臓	G4
4	4	天草地域	肝臓	G4
5	5	天草地域	肝臓	G4
6	6	天草地域	肝臓	G4
7	7	人吉・球磨地域	肝臓	G4
	8		血液	G4
8	9	人吉・球磨地域	筋肉	G3
	10		肝臓	G3
	11		血液	G3
9	12	人吉・球磨地域	筋肉	G3
	13		肝臓	G3
	14		血液	G3
10	15	人吉・球磨地域	肝臓	G3
11	16	人吉・球磨地域	肝臓	G3
12	17	人吉・球磨地域	血液	G3
13	18	宇城・八代地域	肝臓	G4

表3 ブタのHEV遺伝子検査結果（検体別）

	ブタ			頭数
	合格肝臓	廃棄肝臓	血液	
検査数	80	183	1371	1634
陽性数	2	11	2	15
陽性率(%)	2.5	6.0	0.1	0.9

表4 ブタのHEV遺伝子検査結果（養豚場別）

養豚場	合格肝臓	廃棄肝臓	血液
A	26	11	
B	14 (1)	15 (8)	
C	12		
D	11	2	
E	9	1 (1)	
F	4	2 (1)	55
G	4 (1)		116 (1)
H		5	0
I			30
J			10
K			35
L			188
M			65
N			45
O			5
P			55
R			30
S			10
T		2 (1)	173 (1)
U			199
V			54
W			126
その他		145	175
合計	80 (2)	183 (11)	1371 (2)

括弧内はHEV遺伝子陽性数を示す。

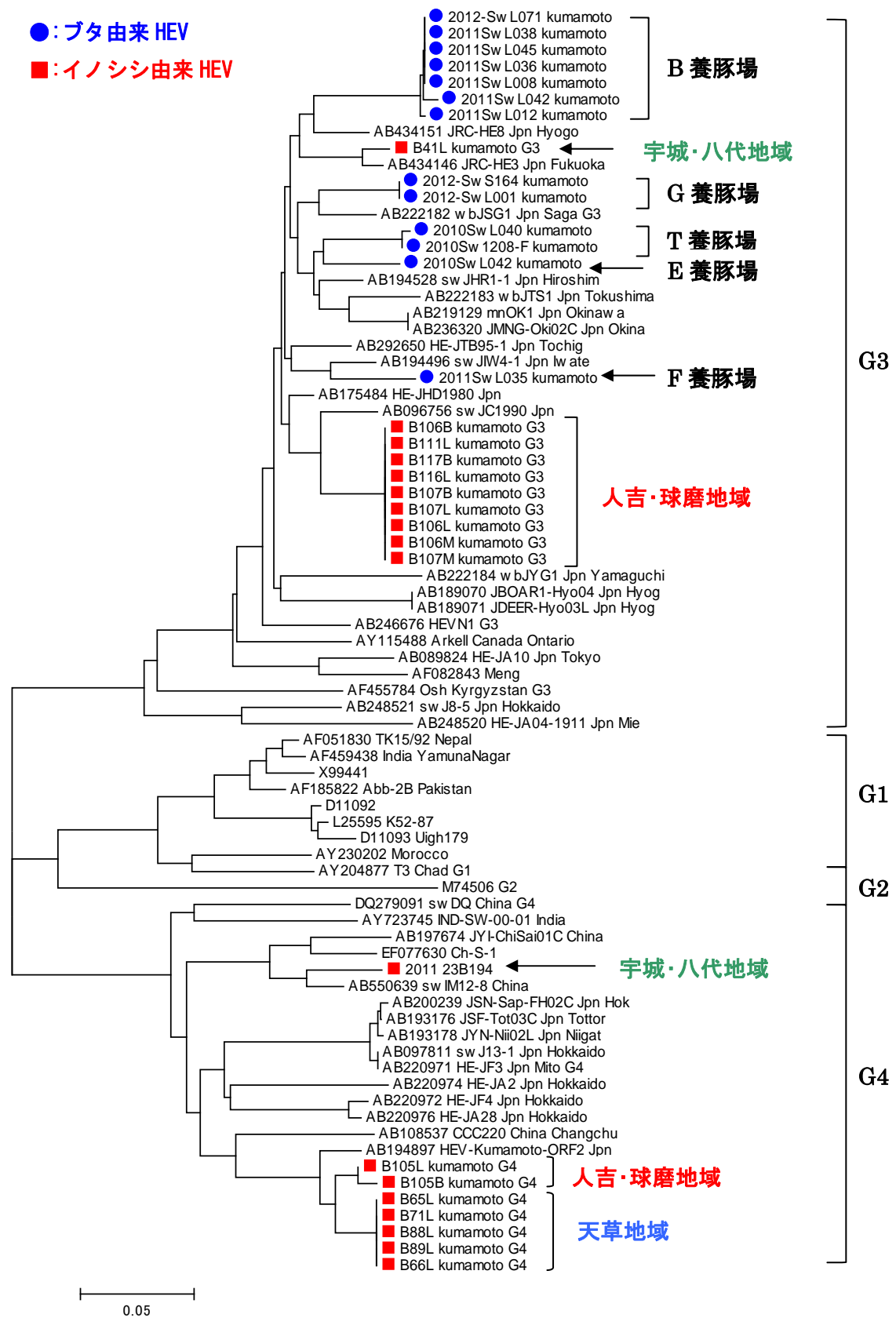


図1 イノシシ及びブタから検出されたHEVの分子系統樹 (NJ法)

表5 ブタのHEVに対する特異的IgG抗体保有率

養豚場	2010			2011			計	
	陰性	陽性	保有率	陰性	陽性	保有率	検査数	保有率
a (SPF)	10		0.0%	28	2	6.7%	40	5.0%
b (SPF)				26	4	13.3%	30	13.3%
c (SPF)				14	1	6.7%	15	6.7%
d (SPF)	11		0.0%				11	0.0%
e (SPF)					5	100.0%	5	100.0%
f	22	93	80.9%	9	50	84.7%	174	82.2%
g	13	66	83.5%		74	100.0%	153	91.5%
h	9	81	90.0%	1	42	97.7%	133	92.5%
i	5	67	93.1%	1	18	94.7%	91	93.4%
j	16	30	65.2%	3	32	91.4%	81	76.5%
k	29	11	27.5%				40	27.5%
l	1	4	80.0%	4	26	86.7%	35	85.7%
m	29		0.0%	4	1	20.0%	34	2.9%
n				2	28	93.3%	30	93.3%
o	2	3	60.0%	1	14	93.3%	20	85.0%
p	1	4	80.0%	2	3	60.0%	10	70.0%
q	3	7	70.0%				10	70.0%
r	5		0.0%				5	0.0%
s	1	4	80.0%				5	80.0%
t	1	4	80.0%				5	80.0%
u					5	100.0%	5	100.0%
v	2	3	60.0%				5	60.0%
w					5	100.0%	5	100.0%
x				5		0.0%	5	0.0%
y		4	100.0%				4	100.0%
不明	1	4	80.0%	10		0.0%	15	26.7%
合計	161	385	70.5%	110	310	73.8%	966	71.9%