

## 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

○原田誠也<sup>1)</sup> 西村浩一<sup>2)</sup> 李 天成<sup>3)</sup> 石井孝司<sup>3)</sup> 田中智之<sup>4)</sup> 野田 衛<sup>5)</sup>

- <sup>1)</sup>熊本県保健環境科学研究所 微生物科学部   <sup>2)</sup>熊本県健康福祉部業務衛生課  
<sup>3)</sup>国立感染症研究所 ウイルス第二部   <sup>4)</sup>堺市衛生研究所  
<sup>5)</sup>国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

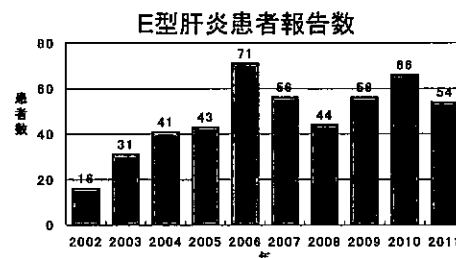
第60回 日本ウイルス学会学術集会(2012年11月, 大阪)

### 目的と意義

E型肝炎は、ヘペウイルス科(*Hepeviridae*)ヘペウイルス属(*Hepevirus*)の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、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検出され、HEVは既に日本国内に土着していることが明らかになっている。

厚生労働省の感染症発生動向調査によると、2004年以降、年間40名以上の患者発生報告があり、この中にはこれらの動物の肉や肝臓等の生食、或いは加熱不十分なままでの喫食による感染事例が数多く含まれていることから、近年は動物由来感染症としての重要性が高まっている。

本研究は、これらの獣畜の筋肉、肝臓、及び血液のHEV汚染実態調査と検出されたHEV遺伝子の分子疫学解析を実施し、HEVによる健康被害の未然防止に寄与することを目的とした。



## 材料および調査方法

### 1 検査材料

イノシシ : 142頭(筋肉100検体、肝臓108検体、血液43検体)

シカ : 61頭(筋肉41検体、肝臓54検体、血液28検体)

肥育ブタ : 1,329頭(廃棄肝臓183検体、血清1,146検体)

### 2 RT-PCR法によるHEV遺伝子検査及び塩基配列決定

- 1) 筋肉及び肝臓約2gを解剖用ハサミで細切後、PBS(-)を加えて50%乳剤とし、
- 2) 3,000rpm、10分間粗遠心。
- 3) 上清1mlを10,000rpmで10分間遠心(ただし、血清は粗遠心のみ)。
- 4) 上清100μlからAGPC法を用いてRNAを抽出し、50μlのDEPC水に溶解。
- 5) Random PrimerによるcDNA作製。
- 6) ORF2領域のプライマーセット(感染研E型肝炎検査マニュアル記載のプライマー 1st: HEV-F1/R2, Nested: HEV-F2/R1)を用いたPCRの実施。
- 7) 2%アガロースゲル電気泳動による増幅産物の確認。
- 8) PCR産物の分離・精製
- 9) ダイレクトシーケンス法による塩基配列の決定

### 2 ELISA法によるブタ血清中の抗HEV IgG抗体検査

- ・ブタ血清中の抗HEV IgG抗体を感染研が開発したELISA法により測定。

## HEV遺伝子検査結果

	イノシシ (142頭)				シカ (61頭)			
	筋肉	肝臓	血液	頭数	筋肉	肝臓	血液	頭数
検査数	100	108	43	142	41	54	26	61
陽性数	2	12	4	13	0	0	0	0
陽性率(%)	2.0	11.1	9.3	9.2	0	0	0	0

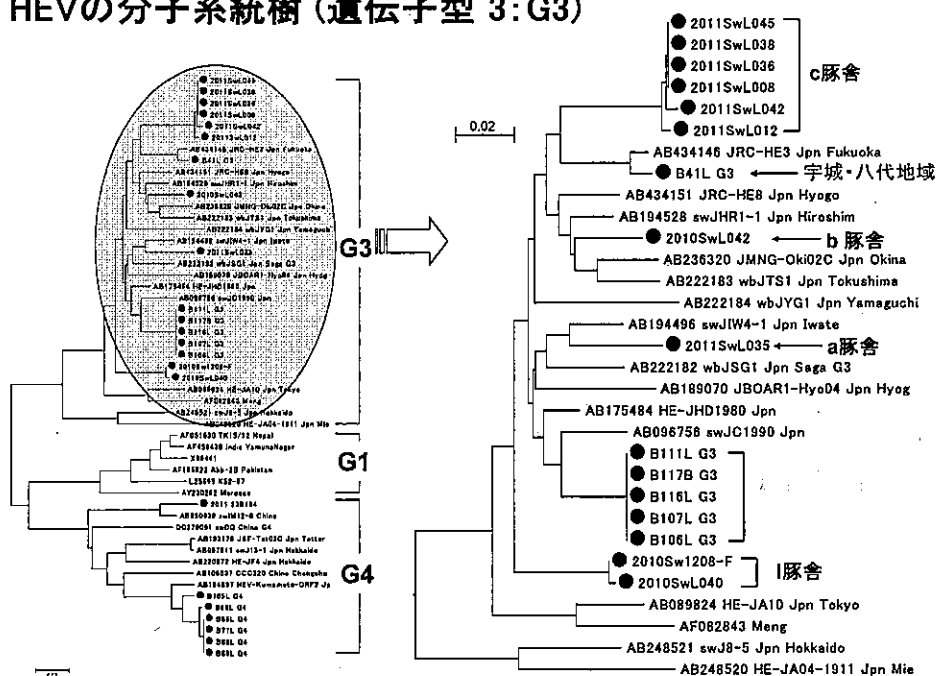
	肥育ブタ(1329頭)	
	廃棄肝臓	血清
検査数	183	1,146
陽性数	11	1
陽性率(%)	6.0	0.09

- ・イノシシ13頭(9.2%)18検体(筋肉2検体(2%)、肝臓12検体(11.1%)、及び血液4検体(9.3%))からHEV遺伝子を検出。
- ・シカからHEV遺伝子不検出。
- ・肥育ブタの廃棄肝臓11検体(6.0%)、及び血清1検体(0.09%)からHEV遺伝子を検出。

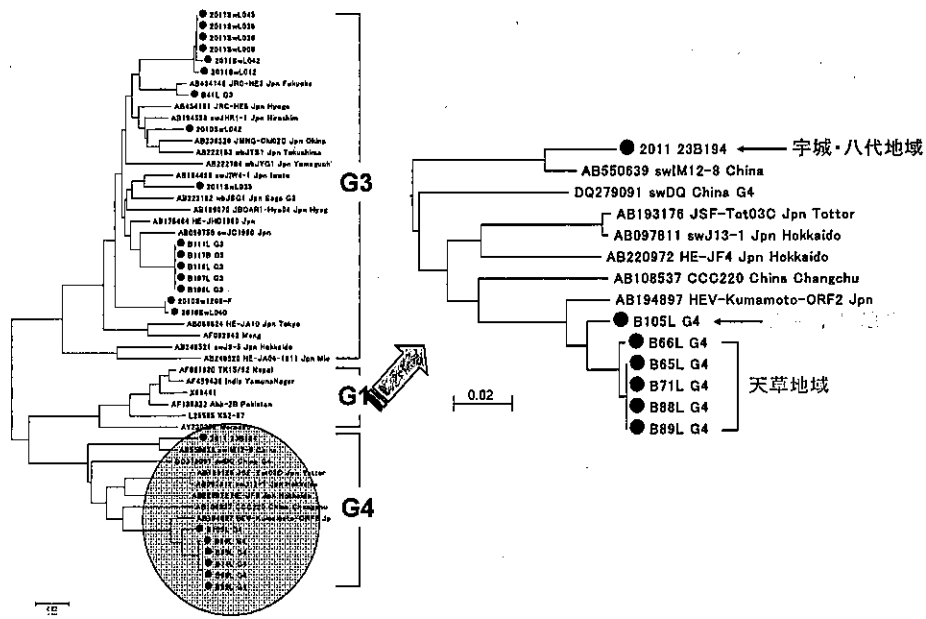
### 肥育ブタ廃棄肝臓(血清)のHEV遺伝子検査結果(豚舎別)

豚舎名	検査数	陽性数	陽性率	遺伝子型
a	1	1	100.0	G3
b	1	1	100.0	G3
c	15	8	53.3	G3
l	2(153)	1(1)	50.0(0.65)	G3
e	11	0	0.0	
f	17	0	0.0	
g	15	0	0.0	
h	16	0	0.0	
i	5	0	0.0	
j	6	0	0.0	
k	5	0	0.0	
その他	89	0	0.0	
合計	183	11(1)	6.0	

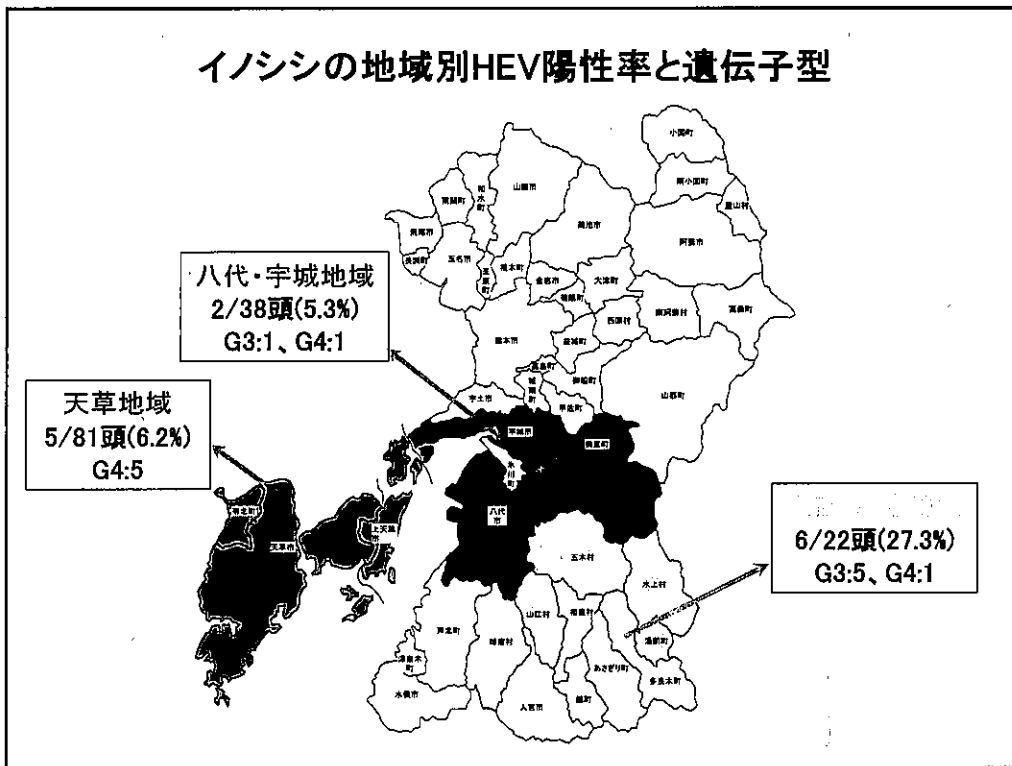
### HEVの分子系統樹(遺伝子型 3:G3)



# HEVの分子系統樹 (遺伝子型 4:G4)



# イノシシの地域別HEV陽性率と遺伝子型



## HEV遺伝子解析結果

● HEV遺伝子ORF2領域の338bpの塩基配列を比較

- ・イノシシ由来HEVはG3とG4に分類され、捕獲地域ごとに異なるクラスターを形成する傾向が見られた。
- ・G4は人吉・球磨地域と天草地域の同源性の97.6%を除くと、地域間の同源性は86%以下であったが、地域内の同源性は99%以上であった。
- ・肥育ブタの廃棄肝臓及び血清から検出されたHEV遺伝子は G3のみで、農場ごとに4つのクラスターに区分された。
- ・豚舎間の同源性は92%以下、豚舎内の同源性は99%以上であった。  
(c豚舎のブタ廃棄肝臓から検出されたHEV遺伝子の同源性は99.1%~100%、  
i養豚場のブタ血清及び廃棄肝臓から検出されたHEV遺伝子の同源性は99.7%であった。)
- ・熊本県内には遺伝的に相違があるHEVが存在しているものの、イノシシのHEVは地域毎に、ブタのHEVは養豚場毎に遺伝子同源性の非常に高いHEVが根付いていると考えられた。

## ブタの抗HEV IgG抗体検査結果(飼育形態別)

一般豚

豚舎名	検査数	陽性数	陽性率(%)
O	5	0	0.0
P	5	0	0.0
A	34	1	2.9
R	40	11	27.5
D	81	62	76.5
E	174	143	82.2
F	20	17	85.0
G	35	30	85.7
H	153	140	91.5
I	133	123	92.5
W	30	28	93.3
J	91	85	93.4
S	5	5	100.0
T	9	9	100.0
その他	50	29	58.0
合計	865	695	79.0

SPF豚

豚舎名	検査数	陽性数	陽性率(%)
K	11	0	0.0
B	40	2	5.0
L	15	1	6.7
M	30	4	13.3
N	5	5	100.0
合計	101	12	11.9



飼育形態	検査数	陽性数	陽性率(%)
一般豚	865	683	79.0
SPF豚	101	12	11.9
合計	966	695	71.9

・一般豚とSPF豚では、SPF豚の抗体陽性率が低かったが、平均71.9%が陽性で、豚舎よる違いも大きい。

### HEV抗体調査結果(豚舎/年度別)

豚舎名	2010年			2011年			陽性率 (平均)
	検査数	陽性数	陽性率	検査数	陽性数	陽性率	
A	29	0	0.0	5	1	20.0	2.9
B	10	0	0.0	30	2	6.7	5.0
C	5	4	80.0	5	3	60.0	70.0
D	46	30	65.2	35	32	91.4	76.5
E	115	93	80.9	59	50	84.7	82.2
F	5	3	60.0	15	14	93.3	85.0
G	5	4	80.0	30	26	86.7	85.7
H	79	66	83.5	74	74	100.0	91.5
I	90	81	90.0	43	42	97.7	92.5
J	72	67	93.1	19	18	94.7	93.4

・2年間採血することができた豚舎の年別の陽性率を比較すると、陽性率の低い豚舎は両年とも低く、高い豚舎は両年とも高かった。

### 考 察

- ・本研究により、熊本県で流通しているイノシシ及びブタの肝臓、血液、筋肉からHEV遺伝子が検出された。
- ・特にイノシシは、肝臓以外に筋肉部分もHEVに汚染されている可能性があり、筋肉部分の生食または加熱不十分での喫食により、HEVに感染する危険性が示唆された。
- ・本年7月1日からの生食用牛レバーの販売禁止により、豚レバーを生食用として提供している飲食店があるとの一部報道もあるが、本研究からも分かるように豚レバーはHEV汚染の可能性もあることから、生食の危険性について十分に周知する必要がある。
- ・食品を介したHEVの感染防止には、十分な加熱調理を心がけるとともに、調理時の二次汚染防止のため、他の食品との調理器具(包丁、まな板等)の共用を避けることが重要である。

## まとめ

- 1 イノシシ13頭(9.2%)18検体(筋肉2検体(2%)、肝臓12検体(11.1%)、及び血液4検体(9.3%))からHEV遺伝子が検出された。
- 2 シカからはまったくHEV遺伝子は検出されなかった。
- 3 肥育ブタの廃棄肝臓11検体(6.0%)、及び血清1検体(0.09%)からHEV遺伝子が検出された。
- 4 イノシシから検出されたHEVの遺伝子型はG3及びG4であったが、ブタからはG3のみであった。
- 5 HEV遺伝子の解析結果から、イノシシのHEVは地域毎に、ブタのHEVは豚舎毎にクラスターを形成した。
- 6 ブタの抗HEV IgG抗体保有率の平均は71.9%であり、豚舎間で0~100%と大きな差が見られた。

本研究の一部は、平成22~24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「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」の補助を得て実施。

