

第 6 章

兵庫県に生息しているニホンジカの E 型肝炎ウイルス感染状況 (2007-2008 年)

森光 由樹^{1,2}

¹ 兵庫県森林動物研究センター

² 兵庫県立大学自然・環境科学研究所

要 点

- ・兵庫県下で収集したニホンジカ 108 頭の血清を用いて HEV の感染状況を調査した。
- ・HEV 抗体保有調査では 108 頭中 1 頭 0.9% が HEV 抗体を保有していた。
- ・HEV 遺伝子は検出されなかった。
- ・兵庫県内に生息しているシカは、これまでの報告と同様に低い感染率であった。
- ・感染率は低いものの、シカを生食しないこと、また調理する上で十分加熱処理を行い衛生面に気をつけることが必要である。

Keywords: E 型肝炎、HEV-RNA、IgG、ニホンジカ

Infection status of hepatitis E virus in deer inhabiting Hyogo prefecture, Japan

Yoshiki Morimitsu^{1,2}

¹ Wildlife Management Research Center, Hyogo

² Institute of Natural and Environmental Sciences, University of Hyogo

Abstract: Hepatitis E Virus (HEV) infection has been reported in domestic as well as wild animals such as deer. This study epidemiologically examined HEV infection among sika deer in Hyogo Prefecture. To that end, anti-HEV antibody and HEV-RNA in the sera of 108 deer were examined, revealing, one positive result. Responses to HEV antigens in the remaining 107 samples were low. Moreover, RT-PCR analysis revealed no HEV-RNA. These findings suggest that the incidence of HEV infection in sika deer inhabiting Hyogo prefecture is extremely low.

Keywords: hepatitis E, HEV-RNA, IgG, sika deer

6-1. はじめに

E 型肝炎は、E 型肝炎ウイルス (Hepatitis E virus、以下 HEV) が感染することによって引き起こされる肝炎である (Purcell and Emerson 2001)。HEV は家畜ではブタで、野生動物では、ニホンイノシシ (*Sus scrofa leucomystax*、以下イノシシ) やニホンジカ (*Cervus nippon*、以下シカ) などの種で感染が確認されている。このウイルスの大きな特徴は、肝炎ウイルスの中で唯一、人獣に共通して感染伝播を起こす人獣共通感染症である (武田 2004)。過去、日本国内において、ブタの生レバー (Yazaki et al. 2003) やイノシシ肉 (Matsuda et al. 2003; Li et al. 2005)、シカ肉 (Tei et al. 2003) を生あるいは加熱不十分な状態で喫食したことで HEV に感染した事例が報告されている。日本全国 16 地域計 976 頭のシカの HEV 感染を抗体保有率で調査した報告では、北海道 1.2% (3 頭/252 頭)、岩手県 3.1% (6 頭/191 頭)、宮城県 3.6% (4 頭/110 頭)、兵庫県 3.1% (8 頭/254 頭)、宮崎県 2.2% (2 頭/90 頭) であった (Matsuura et al. 2007)。地域によらず一定の割合で HEV 感染が認められたため、野生動物の HEV の感染状況をモニターすることは、公衆衛生の対策を講じていく上で重要である。兵庫県において上記の報告以降で集められたサンプルを用いて、ニホンジカの HEV 抗体検査および遺伝子検査による感染状況の把握を目的として血清疫学調査を行ったので報告する。

6-2. 方法

HEV の感染を IgG HEV 抗体の検出と遺伝検査により行った。HEV 抗体の検出と遺伝検査 HEV に感染した個体は、生体内の防御物質である IgA 抗体 (免疫グロブリン A)、IgM 抗体 (免疫グロブリン M)、次いで IgG 抗体 (免疫グロブリン G) が上昇する (図 6-1)。IgA および IgM 抗体は、発症後 12~24 週で陰性化するが、IgG 抗体は数年から数十年持続して検出される (李・武田 2009、図 6-1)。IgG 抗体は長期にわたり血中に現れるため感染履歴を明らかにする検査に優れた方法である。しかし IgG が産生されるまでのウインドウ期 (抗体産生が少ない時期) があり誤った結果を示す可能性も考えられたため、発症前から血清中および糞便中に存在する HEV-RNA (ウイルスそのもの) の検出も行った。HEV-RNA は、血清中では感染後約 3~8 週まで検出される。

兵庫県の北部 (但馬地域) 28 頭、中部 (北播磨、西播磨、中播磨、東播磨、丹波地域) 52 頭、南部 (神戸、阪神、淡路地域) 28 頭、計 108 頭のシカから採取した血清を用いた。使用したサンプルは 2007 年から 2008 年において、狩猟、有害駆除および学術捕獲された個体から採取された血清である。IgG HEV 抗体の検出と遺伝検査を実施した。

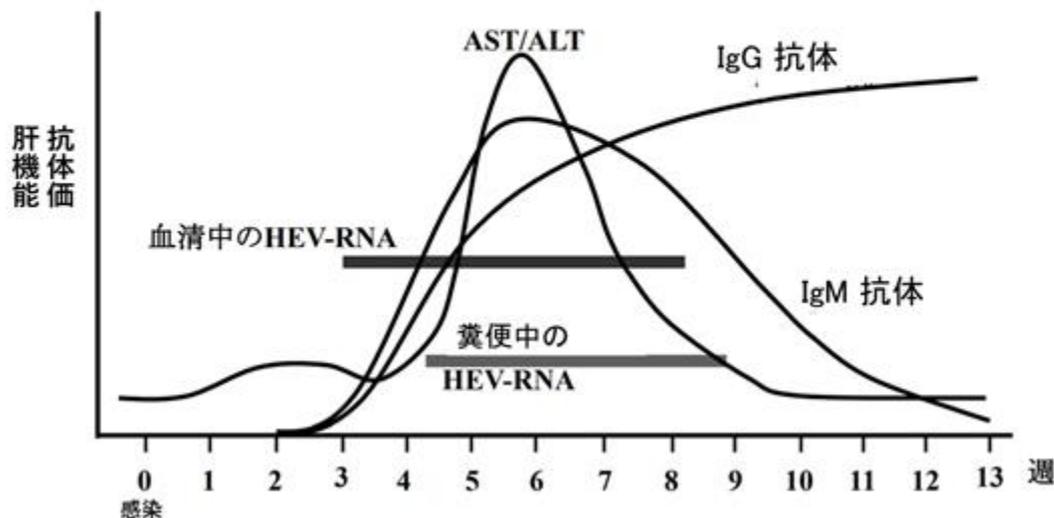


図 6-1. E 型肝炎ウイルスの HEV-RNA と抗体の推移 6 週目発症した場合の例 (国立感染症研究所 (2005) より一部改変)。

1) IgG 抗体検出 酵素結合免疫測定法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, ELISA) による診断

E 型肝炎を発症した時、HEV に対する特異的な血中 IgG 抗体の量が大量に増加する (李・武田 2009)。国立感染症研究所でマニュアル化されている方法を用いて IgG 抗体を検出した (国立感染症研究所 2005)。抗原は HEV ORF2 を組換えバキュロウイルスで発現することによって得られるウイルス様中空粒子 HEV GI virus-like particles, VLP (国立感染症研究所より分与) を用いた (Li et al. 1997)。二次抗体は、HRP-conjugated rabbit anti-Deer IgG、HRP-conjugated goat anti-Swine IgG を 1:1,000 に希釈し 100 μ l/well で使用した。OPD 緩衝液に 30%過酸化水素水と基質 (Sigma P-3804: o-phenylenediamine dihydrochloride) を加えマイクロプレートリーダー (Model680XR, Bio-Rad Laboratories 社) を用いて 492 nm の吸光度を測定した。判定は OD 値 (Optical Density: 物体の光吸収の度合を表す数値。物体中を光が通過するときの、入射光強度と透過光強度の比の対数で表す。吸収される光が多いほど抗体量は多いと判定される) が 0.2 以上の検体を陽性とした。HEV 陽性対照は、ブタで HEV 感染が明らかとなっている 4 頭の血清を同法で測定した。

2) 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) による HEV 遺伝子検出による診断

国立感染症研究所でマニュアル化されている方法を用いて診断を行った (国立感染症研究所 2005)。RNA 抽出は QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN 社) を用いた。RNA 抽出キットで示されている方法に従い、100 μ L の血清を QIAamp スピンカラム 50 μ L の溶出バッファーにより RNA を溶出した。その後、High capacity cDNA reverse transcription kit

(Applied Biosystem 社) を用いて、方法に従い、cDNA 合成を行った。HEV ORF2 遺伝領域を増幅した。プライマーの配列は、1st PCR センスプライマー

HEV-F1:5'-TAYCGHAAAYCAAGGHTGGCG-3'、1st PCR アンチセンスプライマー

HEV-R2:5'-TGYTGGTTRTCRTARTCCTG-3' (Tam et al. 1991) を使用した。陽性対照は、ブタで HEV 感染が明らかとなっている 4 頭の RNA を用いた。

1st PCR は cDNA 溶液 5 μ L に以下の組成の反応液を 45 μ L 加えた (反応液の組成 10 x Taq buffer 4.5 μ L、HEV-F1 (100 μ L) 0.125 μ L、Taq DNA polymerase (5 U/ μ L) 0.5 μ L DDW 39.875 μ L、Total 45.0 μ L)。その後、サーマルサイクラー (Veriti200, Applied Biosystems 社) で以下の温度と時間で反応を行った。96°C 1 分間、95°C 30 秒間、55°C 45 秒間、72°C 1 分間を 30 サイクル。反応後、2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、584 bp の位置にバンドが検出された場合、陽性とした。バンドが認められなかった場合、Nested PCR を行った。Nested PCR は、センスプライマー HEV-F2:5'-GGBGTBGCNGAGGAGGAGGC-3'、アンチセンスプライマー HEV-R1:5'-CGACGAAATYAATTCTGTCTG-3' (Tam et al. 1991) を用いた。1st PCR 反応液 5 μ L を 1st PCR 反応液で使用した同じ組成のものを 45.0 μ L に加えた。サーマルサイクラーの温度設定は、1st PCR と同じ条件で行った。反応後、2%アガロースゲルにて電気泳動を行い、378 bp の位置にバンドが検出された場合、陽性とした。

6-3. 結果

HEV 抗原に対する血清 IgG 抗体を ELISA で測定した結果、1 頭が HEV 抗原に反応する IgG 抗体が高く OD 値 2.7 となり陽性と判定された。兵庫北部 0% (0 頭/28 頭)、兵庫中部 1.9% (1 頭/52 頭)、兵庫南部 0% (0 頭/28 頭) であり合計 0.9% (1 頭/108 頭) であった (表 6-1)。その他、107 検体の OD 値は平均 0.03 ± 0.05 SD とほとんど反応性を示さない低値であった。陽性対照とした HEV 感染ブタ血清 (4 頭) では OD 492 nm 測定平均値 1.23 ± 0.77 SD であった。遺伝子検査 HEV-RNA は 108 検体すべて増幅されなかった。

表 6-1. HEV に対する抗体保有率 (IgG)。

	兵庫北部	兵庫中部	兵庫南部
分析数	28	52	28
抗体陽性数	0	1	0
抗体陽性率 (%)	0	1.9	0

6-4. 考察

シカ 108 頭の HEV 疫学調査において、1 頭が陽性と判定された。RT-PCR 遺伝子検査では、検査を行ったすべての個体において目的遺伝子領域 (HEV ORF2) の増幅は認められなかった。HEV 抗体保有率は、0.9% (1 頭/108 頭) であり過去のシカ HEV 疫学調査で示された結果と同じく、HEV 抗体保有率は極めて低いことが支持された (e.g., Matsuura et al. 2007)。HEV-RNA の検査結果が全て陰性であったことからウインドウ期にあたる感染も認められないと判断された。

愛知県と長野県に生息しているイノシシ、シカ、ニホンカモシカ (*Capricornis crispus*) について IgG 抗体と HEV-RNA 検査した研究では、シカ、カモシカはそれぞれ感染率が 0% であったがイノシシは 27.5% (25 頭/91 頭) と感染率が高いことが報告されている (伊藤ほか 2006)。また中国地方で捕獲されたシカおよびイノシシ調査では、シカの HEV の IgG 抗体保有率は、0.5% (1 頭/209 頭)、遺伝子検査 HEV-RNA 0.5% (1 頭/201 頭) に対して、イノシシの HEV の IgG 抗体保有率は、31% (23 頭/75 頭)、遺伝子検査 HEV-RNA 4% (6 頭/167 頭) と高いことが報告されている (米満ほか 2014)。本研究で示された抗体保有率と遺伝子検査および、過去の研究結果からシカの感染率はイノシシと比較して極めて低かった。ブタやイノシシで考えられている感染宿主ではないことが改めて確認された。

HEV 陽性になった個体の感染経路は、水系から感染した可能性が高いと考えられる。その理由として HEV は感染宿主の糞便中に多量に排出され、糞便が水系に流れた場合、飲水などで感染する (武田 2004) 可能性が高いためである。日本におけるブタの E 型肝炎抗体保有率を検査した研究では、5~6 ヶ月齢で 90% (226 頭/250 頭) との報告があり (Takahashi et al. 2003)、飼育している施設から出される畜産廃棄物と野生動物が接触して感染する可能性を危惧する報告もある (萩原ほか 2008)。兵庫県の HEV の感染経路についての詳細は不明であるが、野生動物と畜産動物とは共通する感染症が多く注意が必要である。その例として、2018 年 9 月、岐阜県の養豚場で豚コレラ (家畜伝染予防法、法定伝染病) の感染が認められている。感染は、野生イノシシから伝染した可能性が高く、その後、愛知県、滋賀県、大阪府、長野県においてブタと野生および飼育イノシシで感染が拡大している (農林水産省 2018)。2019 年 2 月時点で終息のめどが立っておらず社会問題化しつつある。イノシシを含む野生動物が養豚場に近寄らないよう柵の設置など侵入防止や、狩猟や有害駆除で捕獲した野生イノシシおよび捕獲器具の衛生管理の徹底が重要になるが対策が遅れている。今回、豚コレラが伝染し拡大した問題は野生動物管理と家畜管理、家畜伝染病を融合して対策できなかった点にある (日本獣医師会 2016)。日本獣医師会が警告しているように、今後は保全医学の概念 (人の健康を守る医学、動物の健康を守る獣医学、生態系を健全に維持する生態学など関連する分野を融合させ、これらが相互に係ることによって 問題の解決を図る科学) を、関係法令や感染拡大の予防に向けたガイドライン作成に取り入れる必要があるであろう。

前述したとおり過去、兵庫県では HEV 感染したシカ肉を生食したことでヒトへ感染した事例が報告されている (Tei et al. 2003)。その後の E 型肝炎の感染事例は主にイノシシ肉の生もしくは生焼けの事例が主であった (Masuda et al. 2005; Matsuda et al. 2003)。本結果からもシカを生で摂取しない限りヒトが感染する可能性は低いといえる。したがって、生食を避けることを徹底させることが唯一患者を発生させないためのポイントとなる。

厚生労働省は、「食肉を介する E 型肝炎ウイルス感染事例について (E 型肝炎 Q&A)」(厚生労働省 2003) および「野生鳥獣肉の衛生管理に関する指針 (ガイドライン)」(厚生労働省 2014) を掲載し、野生動物の生レバーおよび生肉の喫食を避けるよう、また十分加熱調理して喫食する必要性を示している。現在、日本全国でジビエ料理が推進されているが、シカを含む多くの野生動物は、HEV に限らず、その他人獣共通伝染病を保有している可能性があるため、上記最新の情報を熟知し十分加熱調理して喫食する必要がある。

6-5. 結論

兵庫県に生息しているシカの HEV 感染は極めて低い状況であった。シカに加えて感染率の高いイノシシについても定期的な疫学調査による HEV 感染状況をモニターしていくことが今後の状況把握として望ましい。

謝辞

研究を実施するにあたり、国立感染症研究所の李天成博士から抗原について分与いただき、分析の方法についてアドバイスいただきました。サンプル採取において兵庫県猟友会の皆様からご協力いただきました。深く感謝申し上げます。

引用文献

萩原克郎, 辻正義, 川淵貴子, 鳥居春己, 小林朋子, 石原智明 (2008) 奈良公園におけるニホンジカ *Cervus nippon* の E 型肝炎ウイルス疫学調査. 日本野生動物医学会誌, 13: 35-37
伊藤雅, 小林慎一, 山下照夫, 長谷川晶子, 榮賢司 (2006) 野生動物からの E 型肝炎ウイルス (HEV) と HEV 抗体の検出および猟師らの HEV 抗体保有状況. 肝臓, 47: 316-318
国立感染症研究所 (2005) 「E 型肝炎検査マニュアル」

<https://www0.niid.go.jp/niid/reference/HE-manual.pdf>, 2019 年 2 月 7 日確認
厚生労働省 (2003) 「E 型肝炎ウイルスの感染事例 (E 型肝炎 Q&A)」

<https://www.mhlw.go.jp/houdou/2003/08/h0819-2a.html>, 2019 年 1 月 7 日確認

厚生労働省 (2014) 「野生鳥獣肉の衛生管理に関する指針 (ガイドライン).」

<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzendu/0000065509.pdf>, 2019年1月7日確認

Li TC, Yamakawa Y, Suzuki K, Tatsumi M, Razak MA, Uchida T, Takeda N, Miyamura T (1997) Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *Journal of Virology*, 71: 7207–7213

Li TC, Chijiwa K, Sera N, Ishibashi T, Etoh Y, Shinohara Y, Kurata Y, Ishida M, Sakamoto S, Takeda N, Miyamura T (2005) Hepatitis E Virus transmission from wild boar meat. *Emerging Infectious Diseases journal*, 11: 1958–1960

李天成, 武田直和 (2009) E型肝炎ワクチン. *日本消化器病学会雑誌*, 106: 195–200

Masuda J, Yano K, Tamada Y, Takii Y, Ito M, Omagari K, Kohno S (2005) Acute hepatitis E of a man who consumed wild boar meat prior to the onset of illness in Nagasaki, Japan. *Hepatology Research*, 31: 178–183

Matsuda H, Okada K, Takahashi K, Mishiro S (2003) Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *Journal of Infectious Diseases*, 188: 944

Matsuura Y, Suzuki M, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I, Yokoyama M, Igota H, Yamauchi K, Ishida S, Fukui D, Bando G, Kosuge M, Tsunemitsu H, Koshimoto C, Sakae K, Chikahira M, Ogawa S, Miyamura T, Takeda N, Li TC (2007) Prevalence of antibody to hepatitis e virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Archives of Virology*, 152: 1375–1381

日本獣医師会 (2016) 第4章 野生動物の感染性疾患. 日本獣医師会職域総合部会野生動物対策検討委員会報告 保全医学の観点を踏まえた野生動物対策の在り方, 78–104. 日本獣医師会, 東京

農林水産省 (2018) 「『農林水産省豚コレラ防疫対策本部』における対応方針の追加について」 <http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/douei/180918.html>, 2019年2月21日確認

Purcell RH, Emerson SU (2001) Hepatitis E virus. In: Knipe DM and Howley PM (eds), *Fields Virology vol. 1*, 3051–3061. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia

Takahashi M, Nishizawa T, Miyajima H, Gotanda Y, Iita T, Tsuda F, Okamoto H (2003) Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus. *Journal of General Virology*, 84: 851–862

武田直和 (2004) E型肝炎. (日本獣医師会 編) 共通感染症ハンドブック, 84–85. 日本獣医師会, 東京

Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, Reyes GR (1991) Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*, 185: 120–131

- Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S (2003) Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 362: 371–373
- Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Sasaki N, Gotanda Y, Okamoto H (2003) Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *Journal of General Virology*, 84: 2351–2357
- 米満研三, 服部志保, 鈴木絢子, 浜崎千菜美, 下田宙, 前田健 (2014) ニホンイノシシのウイルス感染症. 「兵庫県におけるニホンイノシシの管理の現状と課題」, 兵庫ワイルドライフモノグラフ, 8: 93–105