

野生動物等のE型肝炎ウイルスの保有状況

保科 健・飯塚節子・田原研司・小村珠喜・糸川浩司¹⁾

キーワード：ELISA、RT-PCR、E型肝炎ウイルス、IgG抗体

Detection of Hepatitis E Virus in Wild Animals Living in Shimane Prefecture

Ken HOSHINA, Setsuko IIZUKA, Kenji TABARA, Tamaki OMURA
and Hiroshi ITOGAWA¹⁾

Key words : ELISA, RT-PCR, hepatitis E virus, anti-HEV IgG

1. 目 的

従来、ヒトE型肝炎は開発途上国からの輸入感染症と認識されていたが、近年、わが国のブタや野生イノシシなどの動物がE型肝炎ウイルス（以下HEV）に感染しているとの報告^{1, 2, 3)}や、ヒトがイノシシやブタ、シカの可食部を生あるいは加熱不十分な状態で喫食したことでHEVに感染したとの報告^{4, 5, 6)}がなされるようになってきた。

一方、島根県は県内山間部で有害鳥獣として捕獲された野生イノシシの肉が地域の特産品として全国に販売されている実態を受け、2006年9月「猪肉に係る衛生管理ガイドライン」を策定し、イノシシの処理・流通・販売における衛生確保に努めている。

そこで、イノシシ肉の安全性を確保するための対策に資することを目的に、県内で捕獲されたイノシシ、シカのHEV保有状況（遺伝子検査）とHEV抗体保有状況、猟師のHEV抗体保有状況と聞き取り調査を実施した。

2. 方 法

2.1 材 料

イノシシ

2005年11月から2006年2月の間に県東部（飯南町）の猟師が捕獲したイノシシ49頭と2006年11月から2007年2月の間に県西部（浜田市、益田市）の猟師が捕獲したイノシシ55頭の糞便85検体、血液102検体及び肉104検体を検査材料とした（表1）。

検体は捕獲場所で冷蔵保存されたものを回収し、検査までは-80℃で保存した。また、捕獲時にイノシシの年齢、体重の推定、性別の確認を行った。

表1 イノシシの捕獲地域別

地区	捕獲地域	検体数	糞便	血液	肉
東部	飯南町	36	36	35	36
	出雲市	1	1	1	1
中部	美郷町	11	11	11	11
西部	江津市	1	1	1	1
	浜田市	43	26	42	43
	益田市	11	9	11	11
	不 明	1	1	1	1
合 計		104	85	102	104

シカ

2001年10月から2002年6月の間に北山山系で捕獲されたシカの血清52検体を材料とした。

猟師

県東部地区を猟場とする猟師のうち、採血協力が得られた56名の血液を採取し材料とした。

2.2 HEV遺伝子の検出

検査方法は国立感染症研究所ウイルス第2部作成のE型肝炎検査マニュアル（以下感染研マニュアル）に記載してあるRT-PCR法を基本とした。すなわち、イノシシの肉については約10gの冷凍肉を細断し、50ml遠心管に入れ自然解凍し、3000rpm、15分遠心後上清を、便については10~20%乳剤を作製し、10,000rpm、20分遠心後上清を、血清については原液を使用した。RNA抽出は各検体から市販キット（QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN）を用いてウイルスRNAを抽出後、構造蛋白領域ORF1に設計したプライマー（1stHEV-F1/R1, nestedHEV-F2/R2）を使用しOne-step RT-PCRキットを用いて1st RT-PCRを行い、更

¹⁾ 島根県健康福祉部薬事衛生課

に2nd-PCRによるnested PCRでHEV遺伝子を増幅後、PCR産物を電気泳動して目的のバンド (378bp)を確認した。

2.3 イノシシのHEV抗体の測定

イノシシの血清中のHEV特異IgG抗体の測定は国立感染症ウイルス第二部第一室に依頼した。

測定法は、Li及び榮等^{6,7)}のELISA法を基本とした。すなわち、組み換えバキュロウイルスで発現した中空粒子を固相抗原とし、抗原固相化ホールと希釈液のみのホールに血清を200倍希釈した後、標識2次抗体を反応させ、OPDと過酸化水素水によって発色させ、固相化ホールと希釈液のみのホールのOD値の差が0.2以上をHEV抗体陽性とした。

2.4 ヒトのHEV抗体の測定

ヒトの血清中のHEV特異IgG抗体の測定は、感染研マニュアルに記載してあるELISA法を基本とした。すなわち、組み換えバキュロウイルスで発現した中空粒子を固相抗原とし、抗原固相化ホールに血清を200倍希釈した後、標識2次抗体を反応させ、OPDと過酸化水素水によって発色させ、OD値が0.2以上をHEV抗体陽性とした。

2.5 猟師からの聞き取り調査 (調査票は別紙のとおり)

県東部地区を猟場とする猟師56名から採血時に年齢、狩猟経験年数、イノシシの生食経験、肝炎の既往歴、渡航歴の聞き取りを実施し、HEV抗体保有状況との関連を検討した。

3. 結 果

3.1 イノシシおよびシカからのHEV遺伝子検出状況

HEV遺伝子はイノシシの糞便85検体、血液102検体及び肉104検体とシカ血清52検体からは検出されなかった (表2)。

3.2 イノシシのHEV抗体保有状況

HEV抗体はイノシシ102頭中16頭 (15.7%)が陽性であった。地区別の抗体保有率は県東部が0%、県中部が9.1%、県西部が27.8%と、県東部より県西部が高

聞き取り調査票

E型肝炎ウイルス抗体保有状況調査聞き取り票

氏名		
年齢	歳	
性別	男	女
狩猟経験年数	年	
肝炎既往歴	有 ()	無 ()
イノシシ肉食経験	有 ()	無 ()
イノシシ肉生食経験	有 ()	無 ()
海外渡航歴	有 ()	無 ()

かった。また、捕獲地域別では、美郷町の11頭中1頭 (9.1%)、浜田市の42頭中14頭 (33.3%)、益田市の11頭中1頭 (9.1%)が抗体を保有し、飯南町の35頭、出雲市と江津市の各々1頭は抗体を保有していなかった (表3)。

年齢別では、1歳未満は15頭中1頭 (6.7%)、1歳～5歳未満は76頭中15頭 (19.7%)が抗体を保有しており、5歳以上の7頭は抗体を保有していなかった (表4)。

また、イノシシの体重別HEV抗体保有状況は、体重0kg～49kgが62頭中13頭 (21.0%)、50kg～99kgが33頭中3頭 (9.1%)で、若いイノシシの方が成長したイノシシより抗体保有率は高かった (表5)。

性別では、オスが57頭中11頭 (19.3%)、メスが44頭中5頭 (11.4%)で抗体保有率に有意な差 (P<0.05)を認めなかった (表6)。

表2 イノシシおよびシカからのHEV遺伝子検出状況

動物種	地域	検体名	検査数	陽性数	
イノシシ	東 部	ふん便	37	0	
		血 清	36	0	
		肉	37	0	
	中 部	ふん便	11	0	
		血 清	11	0	
		肉	11	0	
		西 部	ふん便	36	0
			血 清	54	0
			肉	54	0
	不 明	ふん便	1	0	
血 清		1	0		
肉		1	0		
シカ	北山山系	血 清	52	0	

表3 イノシシの捕獲地域別HEV抗体保有状況

地区	捕獲地域	検体数	抗体保有数	保有率 (%)
東部	飯南町	35	0	0
	出雲市	1	0	0
中部	美郷町	11	1	9.1
	江津市	1	0	0
西部	浜田市	42	14	33.3
	益田市	11	1	9.1
	不 明	1	0	0
合 計		102	16	15.7

表4 イノシシの年齢別HEV抗体保有状況

年 齢	検体数	抗体保有数	保有率 (%)
1歳未満	15	1	6.7
1～5歳未満	76	15	19.7
5歳以上	7	0	0
不明	4	0	0

表5 イノシシの体重別HEV抗体保有状況

体重	検体数	抗体保有数	保有率(%)
0~49kg	62	13	21.0
50~99kg	33	3	9.1
100kg以上	2	0	0
不明	5	0	0

表6 イノシシの性別HEV抗体保有状況

性別	検体数	抗体保有数	保有率(%)	有意差(P)
オス	57	11	19.3	<0.05
メス	44	5	11.4	
不明	1	0	0.0	

表7 猟師の年齢別HEV抗体保有状況

年齢	検査数	抗体保有数	保有率(%)
50歳未満	5	0	0
50-59歳	15	3	20
60-69歳	15	1	6.7
70歳以上	21	3	14.3
合計	56	7	12.5

表8 猟師からの聞き取り調査結果

聞き取り内容	HEV抗体を保有していない者(N=49)	HEV抗体を保有している者(N=7)	合計(N=56)
狩猟歴10年以上	40(81.6%)	7(100%)	47(83.9%)
イノシシの生食経験	19(38.8%)	5(71.4%)	24(42.9%)
肝炎罹患歴	3(6.1%)	2(28.6%)	5(8.9%)
渡航歴	19(38.8%)	2(28.6%)	22(39.2%)

3.3 猟師のHEV抗体調査と聞き取り調査結果

東部地区を猟場とする猟師の抗体保有者は56名中7名(12.5%)で、年齢別では50歳未満が5名中0名(0.0%)、50歳~59歳が15名中3名(20.0%)、60歳~69歳が15名中1名(6.7%)、70歳以上が21名中3名(14.3%)で、年齢別の抗体保有率に大きな差を認めなかった(表7)。

また、猟師の平均狩猟歴は27年であったが、0年~60年と幅広く、10年以上の猟師が47名(83.9%)と全体の8割以上を占めていた。イノシシ肉の喫食経験は1名を除いてほぼ全員に認められ、その内イノシシ肉の生食は56名中24名(42.9%)と約半数が経験していた。また、肝炎既往者は6名(10.7%)、渡航歴は観光目的でハワイ、韓国、中国、グアム島等に22名(39.3%)が旅行していた。

抗体を保有していた猟師7名については50歳~59歳が3名、60歳~69歳が1名、70歳以上が3名で、狩猟歴は全員が10年以上、イノシシの生食経験者は5名、肝炎既往者は2名、海外渡航歴はハワイや台湾へ2名が観光目的で旅行していた(表8)。

4. 考 察

過去、E型肝炎はアメリカ、日本、ヨーロッパ等の先進国では散発的に発生し、その大半は国外で感染した後発症した輸入感染症と考えられてきた。しかし、2003年に兵庫県で野生ニホンジカの肉を食べて感染した事例⁴⁾、同年に鳥取県で野生イノシシの生の肝臓を食べて2名が感染してその内の1名が死亡した事例⁵⁾、2005年に福岡県で野生イノシシの肉を食べて感染した事例等⁶⁾の全く渡航歴のない患者の報告があり、従来、非流行地と思われていたわが国においても既にHEVが土着していることが明らかとなり、人畜共通感染症として関心が高まっている。

野生イノシシからのHEV遺伝子の検出に関してこれまでに兵庫県で7%、和歌山県で11%、愛知県で12.1%と報告^{2, 7, 8)}されているが、今回調査した島根県で捕獲されたイノシシの検体からはHEV遺伝子は検出されなかった。また、松浦ほか⁹⁾は2003年から2006年までの間に島根県で捕獲されたイノシシの血清45検体、肝臓50検体についてHEV遺伝子の検出を実施し、全ての検体からHEV遺伝子を検出しなかったと報告している。

一方、野生イノシシのHEV抗体保有率に関してこれまでに和歌山県で11%、兵庫県で27%、愛媛県で19%、宮崎県で20%と報告^{2, 8, 10, 11)}されているが、今回の我々の結果も15.7%とほぼ同率であった。このことから、島根県もHEVに感染したイノシシが全国と同程度に生息していることが推察されたが、抗体を保有していたイノシシは5歳未満であるにもかかわらず、HEV遺伝子が検出されなかったことから、イノシシにHEVが感染したのは極若い時期で、また、何らかの感染源が本調査の5年以内に存在していたものと推察された。従って、今後も食用として継続して捕獲するならば定期的にHEV保有状況を調査することが望ましいと考える。

次に、イノシシのHEV浸淫状況についてであるが、兵庫県、愛知県等で限局した地域で浸淫していると報告^{7, 9)}している。今回の調査結果でも、イノシシの抗体保有率が飯南町は0%、美郷町及び益田市は9.1%、浜田市は33.3%と地域間に差が認められ、HEVは島根県全体に浸淫しているのではなく、限局した地域に浸淫していると推察された。しかし、本調査は県内の一部の地域で捕獲されたイノシシを対象としており県内のHEVの地理的分布を評価するためには、今後より詳細に調査を実施する必要がある。また、松浦ほか⁹⁾が報告しているように、群生活している血縁野生イノシシ集団の中で感染を拡げている。従って、このような集団を捕獲した場合は抗体保有率が高率となるため、今後調査を実施する時は捕獲したイノシシの疫学調査を

詳細に実施する必要がある。

シカについては2003年に兵庫県において生肉の喫食を原因とする食中毒事例が報告されているが、その後の同地域でのシカ139頭を対象とした福永ほか¹²⁾の調査や全国15カ所で捕獲されたシカ417頭を対象とした松浦ほか¹³⁾の調査でもHEV遺伝子は検出されておらず、シカにおけるHEV感染は非常に稀なものと推察される。

ヒトに関するHEV抗体について、武田ほか¹⁴⁾が1993年にわが国の一般健康者におけるHEV抗体保有率は5.4% (49/900)で、年齢層によって大きな差があり、29歳以下が0.4%、30歳代が6.2%、40歳代が16%、50歳代が23%と、高齢になるほど抗体保有率が高くなっていると報告している。

また、2004年に榮ほか⁷⁾は愛知県の猟師とその家族を対象に抗体保有状況を調査しており、50歳代で12.1%であったと報告している。我々が実施した県東部地区を猟場とする猟師のHEV抗体保有率は12.5%で、猟師のほとんどが50歳以上であったことから、同年代(武田ほかの調査の40歳代以上に相当)の一般健康者、愛知の猟師とその家族と比較し、特に高い値であるとは言えない結果であった。

HEVは熱に弱く加熱すれば死滅するが、今回の聞き取り調査で抗体保有者にイノシシ肉の生食経験者が71.4%と多く、イノシシ肉を介してHEVに感染した可能性は否定できない。しかし、東部で捕獲されたイノシシは抗体を保有していなかったことからイノシシから感染した可能性は高くないと推察された。

E型肝炎は2003年の感染症法改正で全数把握の4類感染症に位置づけられ、全国で感染事例の報告がなされているが、県内の医療機関でE型肝炎の検査を実施することは稀であり、今後はE型肝炎の早期発見、早期治療を目的に、検査体制の構築を行う必要があると考えられた。

5. まとめ

1. イノシシ104頭の肉、糞便及び血清とシカ52頭の血清からはHEV遺伝子を検出されなかった。
2. イノシシのHEV抗体保有状況調査から、島根県でもHEVのイノシシへの浸淫が認められたが、浸淫地域は限局したものであることが推察された。
3. 島根県東部の猟師の12.5%がHEV抗体を保有しており、過去にHEVに感染したことが疑われた。

以上のことから、イノシシの肉の衛生的な取り扱い、喫食する際の十分な加熱等感染予防の啓発活動を行い、E型肝炎の感染を未然に防止する必要がある。

謝 辞

この調査を実施するにあたり、国立感染症研究所ウイルス第二部武田直和先生、李天成先生に抗体の測定及びご指導をいただきましたことを深謝致します。

また、イノシシの検体を提供頂いた飯南町の猟友会会長藤原國利様と猟友会の皆様方、浜田市の近重秀友様、細木康智様、益田市の森本守様に深謝致します。

参考文献

- 1) 山口成夫：厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業「本邦に於けるE型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究」班 平成16年度総括研究報告書, 59 (2005)
- 2) 北嶋直人：厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業「本邦に於けるE型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究」班 平成16年度総括研究報告書, 17 (2005)
- 3) 佐久川廣：厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業「本邦に於けるE型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究」班 平成16年度総括研究報告書, 22 (2005)
- 4) Tai, S. et al.: The Lancet, 362, 371 (2003)
- 5) Matsuda, H. et al.: J. Infect. Dis., 188, 944(2003)
- 6) Li, T. -C. et al.: Emerging Infect. Dis., 11, 1958 (2005)
- 7) 榮賢司：厚生労働科学研究費補助金 食の安全性・高度化推進研究事業「ウイルス性食中毒の予防に関する研究」班 平成16年度総括・分担研究報告書, 27-32 (2005)
- 8) 三好龍也ほか：肝臓, 45, 509 (2004)
- 9) 松浦友紀子：平成16～19年度科学研究費補助金「野生のニホンジカは人あるいは他の動物種の感染源になり得るのか？」班 研究成果報告書, 19-24 (2008)
- 10) 道堯浩二郎：厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業「本邦に於けるE型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究」班 平成16年度総括研究報告書, 20-21 (2005)
- 11) Sonoda, H. et al.: J. Clin. Microbiol., 42, 5371 (2004)
- 12) 福永真治ほか:IASR26.264 (2005)
- 13) Matsuura, Y. et al.: Arch. Virol., 152, 1375(2007)
- 14) 武田直和ほか：IASR, 23, 271 (2002)