

19. 静岡県における野生動物のE型肝炎ウイルス汚染実態に関する研究

- 小柳 純子（静岡県環境衛生科学研究所）
- 池ヶ谷朝香（静岡県環境衛生科学研究所）
- 山田 俊博（静岡県環境衛生科学研究所）
- 川森 文彦（静岡県環境衛生科学研究所）

1. 目的

近年、静岡県ではイノシシ等による農林産物への被害が深刻化しておりその駆除対策が検討される一方で、それらを地域資源として見直し、狩猟鳥獣肉（ジビエ）として有効活用する取り組みが盛んに行われている。民間並びに自治体が運営するジビエ専用の食肉加工施設の稼働によりジビエの普及拡大が図られ、獣肉利用研究会やジビエ料理教室の開催等の報道によりジビエは県民に広く知られるものとなっている。さらに、一般消費を視野に入れ、県内の大学ではジビエの非常食への応用に関する研究や、ユニークな加工製品化についての検討等も行われている。

E型肝炎は、E型肝炎ウイルス（HEV）によって引き起こされる急性肝炎で、日本をはじめ世界各地で各種動物での感染が明らかとなっており、人獣共通感染症の一つとして注目されている¹⁾。その発生は2000年以降全国で報告され、2007年以後は毎年50例前後の発生が認められている。原因はジビエの生食、あるいは加熱不十分な状態での喫食等によるものと考えられており^{2,3,4)}、本県においても年に数名の患者報告がある。2007年の患者2名は県内で捕獲されたイノシシの生肝の喫食、および2009年の患者1名はシカの生肉の喫食による感染であると推定されている⁵⁾。実際に、摂食対象動物の肉などジビエからHEVに感染する危険性があることが各県での実態調査^{6,7)}により明らかとなっており、食品衛生上の問題として危惧されている。

E型肝炎ウイルス感染を防止するため、本県では、2010年に「野生動物肉の衛生及び品質確保に関するガイドライン（ニホンジカ・イノシシ）」⁸⁾を策定し、食肉取扱者等へのジビエの衛生管理に取り組んでいる。県猟友会でもジビエの取り扱いや喫食について注意喚起を行っている。

そこで本研究は、本県で食肉利用されるイノシシにおけるHEVの保有実態を調査し食肉等の汚染の危険性について正確な把握を試みることを目的とした。

2. 材料および方法

1) 材料

2011年5月から2012年11月までに静岡県猟友会員によって捕獲されたイノシシ118頭の

血液 112 検体、肝臓 116 検体、糞便 41 検体および筋肉 29 検体を材料とした。血液検体は採取後冷蔵保存されたものを回収し、それ以外の検体は-20 で冷凍保存した。また、捕獲時にイノシシの体重を推定し、性別を確認した。

2) ELISA 法による IgG 抗体の測定

イノシシの血液を 3,000rpm で 10 分間遠心分離して血清として用いた。イノシシ血清の HEV IgG 抗体の測定は、Takahashi ら⁹⁾の方法に準じ、標識抗体を HRP 抗ブタ IgG 抗体 (KPL, Gaithersburg, MD)に変更して当所にて実施した。

3) RT-PCR 法による HEV 遺伝子検出および塩基配列解析

肝臓および筋肉は細切し、糞便は懸濁して PBS(-)で 20%乳剤とし、10,000rpm で 10 分間遠心分離後上清を採取した。

RNA 抽出は、血清および乳剤上清について市販キット (QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN)を用いて行った。HEV 遺伝子の検出は Li ら¹⁰⁾の方法に準じて、HEV 遺伝子の ORF2 領域を対象とする Nested PCR を実施した。2%アガロースゲル電気泳動で特異的バンド

(378bp)が確認された PCR 増幅産物は、市販キット (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega) を用いて精製後ダイレクトシーケンシング法により塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、分子系統樹解析により Genbank に登録されている HEV 遺伝子の塩基配列と比較した。

3. 結果

1) HEV 特異的 IgG 抗体の保有状況

調査した 107 頭のうち 53 頭 (49.5%) のイノシシが HEV IgG 抗体が陽性であった (表 1)。

表 1 HEV 抗体保有状況

動物種	検体数	IgG 陽性数(%)
イノシシ	107	53 (49.5%)

2) HEV 遺伝子の検出状況

HEV 遺伝子は、118 頭のうち 5 頭 (4.2%) のイノシシから検出された。2 頭は血清のみ、1 頭は血清、肝臓および糞便から、血清未採取の 1 頭は肝臓および糞便から、1 頭は血清、肝臓、糞便および筋肉から HEV 遺伝子が確認された (表 2)。

表 2 HEV 遺伝子の検出 (陽性数 / 検体数)

動物種	血清	肝臓	糞便	筋肉
イノシシ	4/112	3/116	3/41	1/29

3) HEV 遺伝子の塩基配列解析結果

イノシシから検出された HEV の遺伝子型は全て Genotype4 型であった (図 1)。同一個体の異なる検体から検出された HEV 遺伝子の塩基配列はそれぞれ 99%以上の相同性を示した。また、5頭から検出された HEV の遺伝子間の相同性は 98%以上であった。系統樹解析により、これらは以前に愛知県で検出された HEV と近縁であることが判明した。

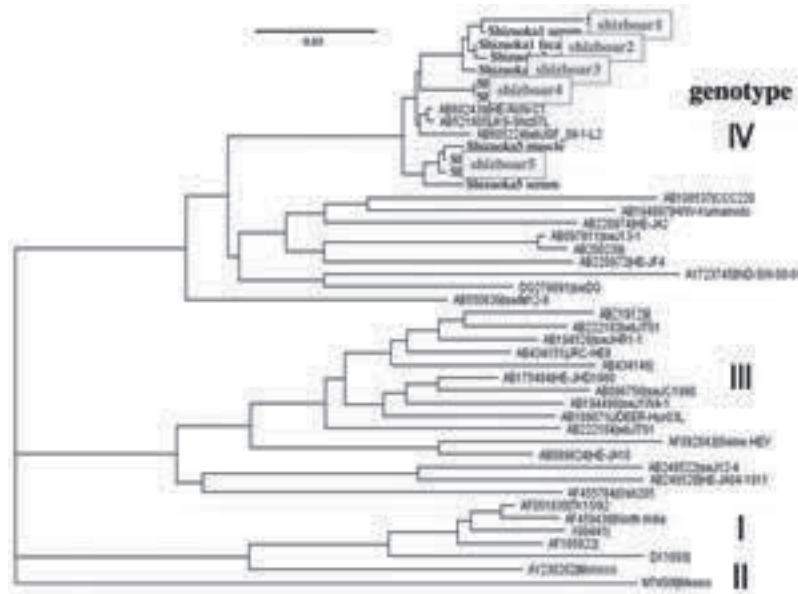


図 1 イノシシから検出された HEV 遺伝子解析結果

4. 考察

イノシシの HEV 感染事例は全国的に多数報告されている^{1,11,12)}。本調査では約 50%のイノシシが HEV 抗体を保有していたことから、HEV は本県のイノシシに高率に浸淫していることが判明した。これは、2005～2009 年に実施された県内イノシシ 140 頭における抗体調査報告 (県内全域で 34.2%、東部地区では 66.7%) と同様の高い浸淫状況を示す結果であった¹¹⁾。兵庫県や愛知県などでは、HEV は限局した地域でイノシシに浸淫していると報告されている^{13,14)}。また、Williams らは、イノシシは群生活をするため、その血縁集団の中で HEV 感染が生じていると報告している¹⁵⁾。今回材料としたイノシシは県内のいくつかの地域での有害捕獲にて得られており、それらが HEV 感染集団の一部であったために抗体保有率が高率になったとも考える。したがって、県内のイノシシにおける HEV の地理的分布を評価するためには、より広範囲の検体を得て詳細に調べる必要があると考える。

今回の調査で 4.2%のイノシシから HEV 遺伝子が検出されたことから、本県のイノシシが HEV に感染している実態が確認された。可食部位である肝臓および筋肉が HEV に汚染されていることが判明したことから、イノシシの肝臓および筋肉の生食あるいは加熱不十分な状態での摂食によって HEV に感染する危険性があることを営業者および消費者に周知する必要がある。さらに、調理器具の共用を避けてジビエから他の食品への二次汚染を防止し、喫

食の際には十分な加熱調理を行うことを広報することは重要であると考え。また、糞便から HEV 遺伝子が検出されたことから、HEV を保有するイノシシの活動により環境中への HEV 汚染が拡大する可能性があると考えられる。猟友会員およびジビエ処理施設の作業員などに対しては、イノシシから HEV に感染する可能性があることを周知し、イノシシのと殺および解体時の血液および糞便の取り扱いについて注意喚起する必要があると考える。

今回の調査では、5 頭のイノシシから検出された HEV 遺伝子間の塩基配列は 98%以上の相同性を示し、過去に近隣の愛知県で報告された HEV と近縁であった。このことから、本県のイノシシに浸淫している HEV は近接環境で生活圏が交差するイノシシの間で伝播され継代されている可能性があると思われる。したがって、今後、本県のイノシシが保有する HEV の由来調査を継続して行っていくことは、公衆衛生上極めて重要であると考え。

4. 参考文献

- 1) 恒光裕他：動物での E 型肝炎ウイルスの感染状況. IASR. 26, 269-70 (2005)
- 2) Matsuda, H. et al : Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from wild boar. J. Infect. Dis. 188, 944 (2003)
- 3) Tei, S. et al. : Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. Lancet. 362, 371-3 (2003)
- 4) Sonoda, H. et al. : Prevalence of hepatitis E virus (HEV) Infection in wild boars and deer and genetic identification of genotype 3 HEV from a boar in Japan. J. Clin. Microbiol. 42, 5371-4 (2004)
- 5) 川村欣也他：静岡県西部地域で発生したシカ生肉またはイノシシ生肝摂食後の E 型急性肝炎 3 例. 肝臓. 51, 418-24 (2010)
- 6) 田村務他：新潟県のと畜場出荷豚及び農場における豚の E 型肝炎ウイルスの保有状況. 新潟県保健環境科学研究所年報. 23, 103-5 (2008)
- 7) 保科健他：野生動物等の E 型肝炎ウイルスの保有状況. 島根県保環所報. 50, 70-3 (2008)
- 8) 静岡県/農山村共生課ホームページ
<http://www.pref.shizuoka.jp/sangyou/sa-325/>
- 9) Takahashi, M. et al. : Swine hepatitis E virus strains in Japan from four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus. J. Gen. Virol. 84, 851-62 (2003)
- 10) Li, TC. Et al. : Detection of hepatitis E virus RNA from the bivalve Yamato-Shijimi (Corbicula Japonica) in Japan. Am. J. Trop. Med. Hyg. 76, 170-2 (2003)
- 11) 武田直和：食品媒介ウイルス感染症. 日本食品微生物学雑誌. 25, 1-6 (2008)
- 12) 川本歩他：ヒト、ブタ、イノシシにおける E 型肝炎ウイルスの感染状況. 鳥取県衛生環境研究所報. 45, 1-3 (2005)
- 13) 榮賢司：厚生労働科学研究補助金 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)
- 14) 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うるのか？」班 研究成果報告書. 19-24 (2008)
- 15) Williams TP. et al. : Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. J. Clin. Microbiol. 39, 3040-46 (2001)

5. 経費使途明細

費目		内訳	金額 (円)
支出	消耗品	二次抗体	19,845
		Anti-HEV EIA Kit	231,000
		ピペットチップ	6,405
		固形飼料 MF	9,240
	シーケンスサンプル受託解析		33,516
収入	利息	銀行利息	6
		計	300,000