

1. E 型肝炎ウイルスの分子疫学およびウイルス保有状況 調査による感染経路の究明

○ 石田 勢津子 吉澄 志磨（北海道立衛生研究所 感染症部ウイルスグループ）

[研究目的]

E 型肝炎は人獣共通感染症であり、シカ肉、イノシシ肉の喫食を原因とした食中毒事例も報告されている。北海道内の患者調査においては、2009～2016 年にわたり、類似性の高い株が道央地域で集中して検出されている。先に、北海道内の推定ウイルス保有動物であるブタとシカの肝臓をそれぞれ 1 年間採取してウイルス保有状況を調査したところ、ブタ由来のウイルスと、2003～2011 年の患者血清由来のウイルスの遺伝子配列において、地域内の類似を見出した。シカ肝臓検体は全て陰性であった。さらに、下水からも患者と一致する配列が見出された。本研究では継続した調査により、道内の患者とブタ血清由来のウイルス株を、経時的、地域的、分子疫学的に比較し、感染源を推測することを目的とする。

[研究の必要性]

ヒトに感染する E 型肝炎ウイルス (HEV) 1～4 型のうち、国内で、渡航歴のない患者から検出される 3 型と 4 型が常在株と考えられている。3 型、4 型 HEV は、ヒトばかりではなくブタやイノシシ、シカなどにも感染することから、人獣共通感染症の病原体であり、食品を介した感染の原因物質ともなり得る。かつては全国総届出件数に占める北海道の報告数の多さから、北海道は HEV の高侵淫地域と考えられてきた (図 1)。北海道内の患者

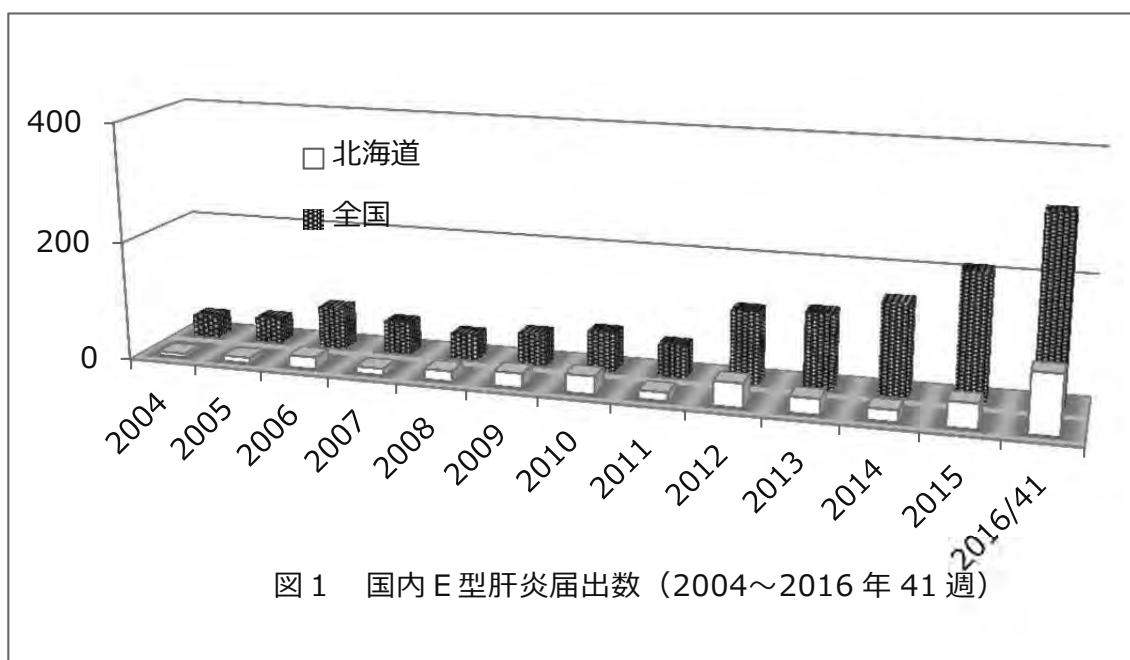


図 1 国内 E 型肝炎届出数 (2004～2016 年 41 週)

調査においても、2009～2013年にわたって類似性の高い4型株が、道央地域を中心に継続して検出されていることを報告した（石田 他、2013）。

国内のE型肝炎254例についての実態調査において、4型が北海道に偏在していること、年齢と肝炎の重症度に相関があること、3型よりも4型で発症・重症化しやすいこと、約60%の症例においては感染経路が不明であること、などの特徴が報告されている（小関他、2012）。

E型肝炎の潜伏期間は平均6週間と長く感染源の追究は極めて困難となるが、遺伝子配列の類似をみる分子疫学的解析により、集団感染の探知や、感染源・感染経路の推測が可能となる場合がある。

先に、患者とブタなど推定ウイルス保有動物、環境水から検出されるウイルス株に類似性と地域性が見られることを明らかにした（Ishida et al, 2012）。しかしながら、この推定保有動物からの検体採取は1～2年間に限られ、経時的变化を見ることはできなかった。

本研究では、北海道立衛生研究所に保存されている道内数カ所で採取された6カ月齢ブタ血清中、特に患者間で類似株が検出された年の検体について重点的にウイルス保有状況を調べ、経時的、地域的、疫学的にヒト由来のウイルス株と比較することで、ヒトへの感染源としてのブタの位置づけを確認する。これらの情報は、食材のリスク評価として、安全な食品の提供と食中毒予防において有用であり、E型肝炎の予防対策に重要と考える。

[実施内容・結果]

1) 推定ウイルス保有動物、患者からのウイルス遺伝子検出

北海道立衛生研究所に保存してある6カ月齢ブタ血清のうち、近年患者届出数が多く、患者由来株間の配列類似性も高い道南・道央地域で採取された血清検体、さらにシカ由来各種検体についてE型肝炎ウイルス保有状況を調べた。道南・道央地域のうち、検体採取後の集約地をA、B、Cとした。ブタ血清では、2012年20検体(A)、2014年40(A)+40(B)検体、2015年20(A)+20(B)+15(C)検体、2016年20(A)+20(B)+15(C)検体、計210検体、7～9月に採取したものを対象とした。エゾシカ7頭の肝臓18検体、糞便7検体、血清2検体についても調査した。感染症発生動向調査により届け出られた患者及び無症状病原体保有者のウイルス遺伝子検査を行った。検体からのウイルスRNA抽出には、QIAamp Viral RNA mini Kit、RNeasy mini Kit、QIAamp MinElute Virus Spin Kit（全てQIAGEN）を使用した。cDNA合成にはSuperScript III Reverse Transcriptaseを用いた。全ての検体についてOpen reading frame(ORF)1領域に設定されたプライマーを用いてPCRを行い、動物由来の検体についてはORF1陽性となったものについて、ヒト検体では全ての検体でORF2-1領域の増幅を試みた（ORF1:Mizuo et al, 2002）、ORF2-1:Takahashi et al, 2003）。増幅されたORF2-1領域の塩基配列を決定した。

ブタ210検体中、10検体においてORF1領域が増幅され（2014年2検体、2015年3検体、2016年5検体）、このうち4検体（2014年1検体、2015年1検体、2016年2検体）でORF2-1

領域の配列を確認できた（表 1）。 ORF2 領域の異なる領域に設定されたプライマー（ORF2-2: Inoue et al, 2006）を用いて 4 検体が陽性となった。

エゾシカ 7 頭由来の検体は全て陰性であった。

届け出られたヒト血清検体については、平成 27 年度は 23 名 27 検体中、23 検体が陽性となり、9 名が 3 型、9 名が 4 型と判別され、3 検体では ORF1 陽性ではあるが型別に用いる ORF2-1 領域が増幅されなかった。4 型の 4 検体は発症時期が 2016 年 1 月末～2 月中旬と半月以内に集中し、発生地域が近いものであった。無症状病原体保有者 2 名を含む 4 検体が陰性となった。

2) ウイルス株の分子疫学的解析

ORF1 プライマーで陽性となったブタ血清 10 検体は 1 市、3 町、1 村由来であった。ORF2-1 領域の配列を確認できた 4 検体について、遺伝子型別と系統樹解析を行ったところ、全て 3 型であった。2015 年、2016 年と続いて同じ地域 C で集約されたブタ血清由来の配列は、2016 年採取の 2 検体（表 1、No. 7、8）で 412 塩基中 1 塩基の違い、2016 年 2 検体と 2015 年 1 検体（No. 10）では 2 塩基の差にとどまり、配列の高い類似を示した。2014 年の ORF2-1 プライマーで増幅された配列（No. 5）は、系統樹解析において No. 7、8 とは異なるクラスターに属していた。ブタ血清由来の配列とヒトから検出された配列を比較すると、2014 年の配列（No. 5）は 2016 年 4 月に届け出られたヒト症例由来のものと同様の 1 塩基の差異であった。さらに、2015 年の配列（No. 10）は、2016 年 2～4 月の 3 症例と一致、2016 年 7 月の 1 症例とは 1 塩基の違いにとどまり、配列の高い類似が見られた。

ヒト症例中、2016 年 1 月末～2 月中旬に発症した 4 型の 4 例は、配列の類似性も高く、焼き肉の喫食歴などが報告された症例もあったが、食中毒との判断には至らなかった。この集団とは別に、ヒト患者で 2011 年末から継続して検出される 4 型のクラスターに属す

表 1 ウイルス陽性となったブタ血清

番号	採取年/集約地	ORF1	ORF2
1	2016/A	+	-
2	2016/A	+	-
3	2015/A	+	-
4	2014/B	+	-
5	2014/B	+	+
6	2016/C	+	-
7	2016/C	+	+
8	2016/C	+	+
9	2015/C	+	-
10	2015/C	+	+

る株も見出されたが、ブタ血清からは4型株を確認できず、比較できなかった。

[考察と今後の課題]

2016年、全国的にE型肝炎届出数が増大し、特に北海道と関東圏で顕著であった(図1)。2011年10月に抗HEVIgA抗体を検出するE型肝炎診断薬が保険収載され、医療機関でのウイルス検査が容易になったこともあり、2012年以降全国の届出数は増えている。それに対し、北海道E型肝炎研究会の活動などにより、既に検査・診断ネットワークが整えられていた北海道では、2013～2014年には届出数が減少傾向を見せていたが、道央・道南地域では類似性の高い4型株が継続して検出されていた。4型は3型に比べ発症・重症化しやすいとされ、探知される例が多いと考えられるが、喫食調査においても感染源の推定は難しく、ほぼ全ての症例が原因不明とされている。2016年、農林水産省は、食品の安全確保のために、「優先的にリスク管理を行うべき有害微生物」のリストにE型肝炎ウイルスを加える方針を固めた。

2005年、推定ウイルス保有動物であるブタの肝臓の調査において、390検体中4例が陽性となり(陽性率1.0%)、その遺伝子型は3型が2例、4型が2例であった。シカ78検体は全て陰性であった(Ishida et al, 2012)。今回、患者・無症状病原体保有者の届出数の多い2015、2016年、患者間で類似した株が見出された2012、2014年の道央・道南地域のブタ血清を重点的に調査したところ、陽性率は4.8%で、全て3型であった。6カ月齢のブタではこれまで肝臓や糞便で陽性報告があったが今回は血清でもウイルス感染が継続して確認された。また、同一地域内(集約地C)のブタ由来株では配列が類似し、2015、2016年と連続して陽性となり、患者株との一致も見られた。このことから、ウイルスが地域内で保持され、ヒトへの感染原因となっている可能性が強く示唆された。今回、4型株の配列は確認できなかったが、陽性例が出現した地域において、ウイルスを保有している割合の高い2～4カ月齢のブタを対象とした場合には検出可能とも考えられる。遺伝子型別のために十分な配列が得られなかった6検体中、4検体(No. 3、5、7、8)ではORF2-2プライマーで陽性となり、ウイルスに特異的な産物が得られている。また、定量を行わなかったが、PCR産物の短いORF1領域では陽性になるもののORF2領域の検出率が低いことなどから、血清に含まれるウイルス量は検出限界に近いと考えられる。

2016年のブタにおけるウイルス陽性率の上昇がヒトの届出数の増加に寄与していると考えられることもできるが、新しい年代の検体で検出率が高いことから、保存期間の影響も考慮する必要がある。患者からのウイルス検出を開始した時期以降の、さらに、異なる地域の同一年の検体の検査を行うことで、保存による検体の劣化や、同一時期の地域によるウイルス保有状況の相違も明らかになると思われる。

牛の生レバーの生食用販売・提供が2014年7月に禁止されて以降、一部の飲食店でブタの肝臓の代替提供が判明した。サルモネラ属菌やカンピロバクター、寄生虫に感染するリスクもあることから、2015年6月、ブタ肉の生食用の販売・提供も禁止されたが、それ

以降も、全国、北海道内どちらにおいても届出数の減少は見られていない。感染能のあるウイルス粒子の確認はできていないが、血清中からウイルス遺伝子が検出されたことから、生の食肉が他の食材と触れないように注意する必要性が明らかとなった。さらに、生のブタ肉や内臓は中心部まで十分に加熱すること、生の食肉には専用の箸を使い食事用の箸とは区別することも必要である。

豚肉は生産農家から産地近郊にある食肉センター、と畜場などへ、さらに卸売業者や食肉加工業者を介して小売店、外食店などへ届けられる。海外産のものを含め、ブタ肉の流通ルートを追跡することで、より詳細に感染源・感染経路を究明することができると思われる。

E型肝炎は献血時に感染が判明するなど無症状例も多く、潜伏期間が長い。喫食歴などの疫学調査から原因を見極めることは難しいため、感染源が明らかにされ報告された事例のほとんどは、集団食中毒として探知され、複数の患者にウイルス感染が証明された事例である。本調査により、ブタ肉喫食がヒトの感染源となっていることが分子疫学的に示唆された。継続した分子疫学的解析は、患者間または推定原因食品を繋ぐ方法として有用である。感染症についての情報を収集し予防対策に反映させるためにも、感染症発生動向調査の周知、保健所と医療機関の協力体制の整備も重要と考える。

本稿を終えるにあたり、検体採取等にご協力頂きました北海道保健福祉部健康安全局ならびに各保健所、北海道E型肝炎研究会の関係者各位に深く感謝いたします。

引用文献

石田 他、道衛研所報、63、95-97 (2013)

小関 他、肝臓、53、78-89 (2012)

Ishida et al., Arch. of Virol, 157, 2363-2368 (2012)

Mizuo et al., J Clin Microbiol., 40, 3209-3218 (2002).

Takahashi et al., Intervirology, 46, 308-318 (2003).

Inoue et al., J Virol Methods, 137, 325-333 (2006)

[経費使途明細]

使途	金額
RNA抽出・精製用試薬	236,466
逆転写酵素・プライマー類	139,814
抗体検出試薬	116,640
電気泳動用試薬	7,004
振込手数料	5,076
	505,000