＝短 報＝

宮城県における野生動物，ブタおよび流入下水における E型肝炎ウイルスの浸淫状況

佐々木美江^{*1}・小 泉 光^{*2}・生 島 詩 織^{*1,*3}・菅 原 直 子^{*4}・
植 木 洋^{*1}・畠 山 敬^{*1}・上 間 匡^{*5}

(^{*1}宮城県保健環境センター，^{*2}宮城県気仙沼保健所，^{*3}岐阜大学，
^{*4}宮城県東部下水道事務所，^{*5}国立医薬品食品衛生研究所)

(受付：2019年3月27日)

(受理：2019年9月2日)

Detection and Molecular Analysis of Hepatitis E Virus for Wild Boars, Wild Deer, Pigs and Sewage in Miyagi

Mie SASAKI^{*1}, Hikari KOIZUMI^{*2}, Shiori IKUSHIMA^{*1,*3}, Naoko SUGAWARA^{*4},
Yo Ueki^{*1}, Takashi HATAKEYAMA^{*1} and Masashi UEMA^{*5}

(^{*1} Miyagi Prefectural Institute of Public Health and Environment, Saiwai-cho, Miyagino-ku, Sendai 983-0836)

(^{*2} Miyagi Prefectural Kesenuma Health Center, Higashishinjo, Kesenuma 988-0066)

(^{*3} Gifu University, Yanagido, Gifu 501-1193)

(^{*4} Miyagi Prefectural Eastern sewer office, Shinshimekiri, Hebata-aza, Ishinomaki 986-0861)

(^{*5} National Institute of Health Science, Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki 210-9501)

We investigated the prevalence of Hepatitis E virus (HEV) using RT-PCR among wild boars, wild deer and pigs in Miyagi prefecture from 2015 to 2017. We conducted to detect of HEV gene from sewage from 2016 to 2018. Samples of livers were collected from 76 wild deer, 84 wild boars and 156 pigs. Ninety-one of sewage samples were collected from wastewater treatment plants. HEV gene were detected in liver samples of wild boars, wild deer and pigs with positivity of 9.5% (8/84), 0% (0/76) and 5.8% (9/156), respectively. The detection rate of HEV gene from sewage was 7.7%. All HEV strains detected in this study were belonging to genotype 3. These results from revealed that some wild boars and pigs are carrying HEV, which requires to properly process the meat sufficiently with heat in the consumption. HEV gene was detected from sewage, which suggested that symptomatic or non-symptomatic HEV infection can be grasped by monitoring HEV gene in sewage.

Key words: Hepatitis E virus, animals, sewage

緒 言

E型肝炎は、E型肝炎ウイルス（Hepatitis E virus以下、HEV）に汚染された水や食品などを介して感染する疾患である。国内では2003年以降、ブタやイノシシ、

シカ肉やそれらの副産物を喫食して感染した事例が相次いで報告^{1,6,9,17)}され、現在ではHEVは人獣共通感染症として注目されている。

近年、イノシシやシカなどの野生動物による農作物への被害の拡大に伴い、駆除した野生動物の利活用が全国的に推進されている。その一環として野生動物を喫食する機会も増えており、加熱不十分な肉を喫食することによるHEV感染が懸念される。そのような状況を背景に2015年6月に食品衛生法でブタの食肉（内臓を含む。）の生食用としての販売・提供を禁止することとなった

† 連絡先

^{*1} ☎983-0836 仙台市宮城野区幸町4丁目7-2

^{*2} ☎988-0066 気仙沼市東新城3丁目3番地3

^{*3} ☎501-1193 岐阜市柳戸1番1

^{*4} ☎986-0861 石巻市蛇田字新メ切5番地の2

^{*5} ☎210-9501 川崎市川崎区殿町3-25-26

が、その一方で依然としてE型肝炎の患者報告数は増加傾向にあり、原因の特定が喫緊の課題となっている。

HEVと同じような病態を示し経口感染するA型肝炎(Hepatitis A virus以下, HAV)の流行の疫学解析結果より、下水中から検出されるウイルス遺伝子の消長や検出された遺伝子の分子疫学的解析は、下水処理区内における感染の実態や浸淫状況を把握する上で有用な情報を提供すると報告¹⁰⁾されている。HEVもHAVと同様に便中に排泄されることから、流入下水に含まれるウイルスを検出することにより地域内流行を把握できることが知られている¹³⁾。

本調査では、野生動物およびブタからのHEV検出を行うとともに、宮城県内のHEV浸淫状況を広域的に把握するために下水処理施設の流入下水からの検出を試みたので報告する。

材料および方法

1. 材 料

野生動物は、2015年10月から2017年11月にかけて宮城県内で捕獲されたシカ、イノシシを、ブタは県内のと畜場に搬入された6カ月齢ブタを対象とした。検体はHEVが主に増殖する肝臓とし、シカ76件、イノシシ84件、ブタ156件を調査対象とした。これらの肝臓は採取後検査を行うまで、 -20°C で保存した。また、野生動物については捕獲時に雌雄、体重および捕獲場所、ブタについては飼育地区(県北・県南)を記録した。なお、本調査では仙台市を含む仙台地区を中心として、北を県北地区、南を県南地区として調査を実施した。

流入下水は2016年7月から2018年3月の期間に県内の下水処理施設で週1回の頻度で採取した91試料を対象とした。下水検体は、採取後直ちに -30°C で保存した。なお、本下水処理場は、沿岸部に位置し、仙台地区内の3市2町の汚水を処理している。

2. 方 法

野生動物およびブタ肝臓からのウイルス抽出は、細胞破碎法²⁰⁾で行った。すなわち、採取した肝臓約1.0 gをステンレスビーズ($\phi 3.2\text{ mm}$)入りの破碎用5 mLのチューブ(ザルスタッド株式会社)に入れ、滅菌蒸留水2 mLを加えた後、細胞破碎装置(MicroSmash MS-100, TOMY)により3,500 rpmで15秒間破碎した。破碎後、 $9,100\times g$ で10分間冷却遠心分離し、その上清をウイルス抽出液とした。

流入下水は、試料25 mLにポリエチレングリコール

6000と塩化ナトリウムをそれぞれ終濃度8%(w/v)、2.1%(w/v)になるように添加し、 4°C で1晩ゆるやかに攪拌した。攪拌した試料を $9,100\times g$ で20分間冷却遠心分離を行った。遠心分離後、上清をアスピレーターで吸引除去し、残った沈殿物に1.0 mLの滅菌蒸留水を加え、ウイルス濃縮液とした。

RNA抽出にはQIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN)を用い、キット付属のマニュアルに従ってウイルス抽出液または濃縮液からウイルスRNAを抽出した。抽出したウイルスRNAはPrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa)を用いて、逆転写反応を行った。すなわち、RNA抽出液 5 μL 、 $5\times$ PrimeScript Buffer 2 μL 、Random 6 mers 2 μL 、PrimeScriptRT EnzymeMix I 0.5 μL にRNase Free dH₂Oを加えて総量10 μL にした後、 37°C で15分間の後、 85°C で5秒間の反応条件でcDNAを作製した。1st PCR及びnested PCRはEX Taq Hot Start Version (TaKaRa)を用い、国立感染症研究所のE型肝炎検査マニュアル(平成17年4月)に準じて実施し、HEVのキャプシド蛋白Open Reading Frame 2(以下、ORF2)をコードしている領域を増幅した。増幅産物が確認された検体は、ダイレクトシーケンシング法を用いて遺伝子配列を決定し、BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)による相同性検索によりウイルスの同定を行い、MEGA7⁸⁾を用いて近隣結合法(NJ法)による分子系統樹解析を行った。統計処理ソフトはJMPを用いてPearsonの χ^2 検定で行った。

結 果

1. 野生動物およびブタからのHEV遺伝子検出

本調査ではイノシシ84件中8件[検出率: 9.5%, 95% confidence interval (CI): 4.9~17.7% (以下、同様)], ブタ156件中9件(5.8%, 95% CI: 3.1~10.6%)からHEV遺伝子が検出された。一方、シカからはHEV遺伝子は検出されなかった(Table 1)。

2. 雌雄・体重別によるイノシシのHEV遺伝子検出

雌雄と体重の明らかな77件のHEV遺伝子検出状況は、オス41件中5件(12.2%, 95% CI: 5.3~25.5%), メス36件中3件(8.3%, 95% CI: 2.9~21.8%)からHEV遺伝子が検出され、雌雄による有意差は見られなかった($p=0.718$)。体重別では100 kg以上の6件ではHEV遺伝子は検出されなかったが、50 kg以上100 kg未満では37件中1件(2.7%, 95% CI: 0.5~13.8%), 50 kg未満では34件中7件(20.6%, 95% CI: 10.3~36.8%)から検出さ

Table 1. Prevalence of HEV RNA in our samples

Samples	No. of sample examined	No. of HEV RNA positive	% (95% CI ^a)
Wild boar	84	8	9.5 (4.9-17.7)
Wild deer	76	0	0
Pig	156	9	5.8 (3.1-10.6)

^a Confidence interval assessed through univariate Poisson regression.

Table 2. HEV RNA presence in wild boars by sex and weight groups

Items		No. of wild boar	No. of HEV RNA positive	% (95% CI) ^a	<i>p</i> ^a
Sex	male	41	5	12.2 (5.3–25.5)	0.718
	female	36	3	8.3 (2.9–21.8)	
Weight ^b	< 50	34	7	20.6 (10.3–36.8)	< 0.001
	50 to < 100	37	1	2.7 (0.5–13.8)	
	≥ 100	6	0	0	
	total	77	8	10.4 (2.0–12.6)	

^a Confidence interval and *p*-value assessed through univariate Poisson regression.

^b Weight range (kg)

れ、体重50 kg未満のイノシシからのHEV遺伝子の検出率が有意に高かった ($p < 0.001$) (Table 2). HEV遺伝子が検出されたイノシシ8件は、2016年4月に1件 (検体番号 I31), 2017年7月から10月に7件 (検体番号 I55, I67, I71, I78, I81, I82, I84) が捕獲されており、このうち検体番号 I78とI81は双方とも体重10 kgで同時期にHEV遺伝子の検出が確認された。

3. 肥育地域別ブタのHEV遺伝子検出

調査対象としたブタ156件のうち地域別では県北のブタが71件中6件 (8.5%, 95% CI: 3.9–17.2%), 県南のブタは85件中3件 (3.5%, 95% CI: 1.2–9.9%) からHEV遺伝子がそれぞれ検出されたが地域による差は認められなかった ($p = 0.189$).

4. 流入下水のHEV遺伝子検出

91試料中7試料 (7.7%, 95% CI: 3.8–15.0%) からHEV遺伝子が検出された。検出された時期は、2016年8月24日 (Fig. 1のSW8, 以下同じ), 9月7日 (SW10), 9月21日 (SW12), 2017年4月5日 (SW40), 7月19日 (SW55), 8月9日 (SW58), 11月1日 (SW70)で継続性はなく間歇的に検出された。

5. 分子疫学的解析

ダイレクトシーケンス法でウイルスRNAの構造タンパクをコードしているORF2の一部の領域を増幅して解析した分子系統樹をFig. 1に示す。イノシシ、ブタ、流入下水から検出されたHEVの遺伝子型はすべて3型 (G3)で、イノシシ1件 (I31), と流入下水1件 (SW55)がSubtype3b, ブタ3件 (pig49, pig52, pig104)を除いた、他すべてはSubtype3aと分類された。さらにSubtype3aと分類されたイノシシ、ブタおよび流入下水のうち2017年に採取したイノシシ7件 (I55, I67, I71, I78, I81, I82, I84), 2017年4月5日と同年11月1日に採取した流入下水から検出された2件 (SW40, SW70), ブタ (pig98, pig139, pig147, pig152, pig154, pig157) と流入下水 (SW10, SW12) の8件で三つクラスターを形成した。

考 察

過去に宮城県内で実施されたHEV関連調査により、家畜や愛玩動物に接触する機会の多い職業従事者の

HEV抗体保有率が19.4%であったこと¹⁹⁾, と畜検査時に肉眼で肝臓に病変が確認されたブタ1.8%からHEV遺伝子が検出されたこと¹⁶⁾, 野生動物 (イノシシ30頭・シカ14頭) の肝臓からは検出されなかったこと¹²⁾ などが確認されている。さらに、仙台市内で実施された流通食品を対象とした調査において、ホンビノス貝3件中1件 (33.3%), 国産しじみ15件中3件 (20%) からHEV遺伝子が検出されたこと¹⁵⁾ が報告されており、県内にHEVが浸淫していることが確認されている。

今回は、より詳細に県内のHEV浸淫状況を把握するため、野生動物 (イノシシ、シカ) およびブタの追加調査を行い、仙台地区内の汚水を処理している下水処理施設の流入下水からのHEV遺伝子検出を試みた。

本調査では、県内に生息するシカからはHEV遺伝子は検出されなかったが、イノシシ9.5%からHEV遺伝子が検出された。原田ら³⁾ は熊本県内のイノシシ173頭、シカ63頭を対象に調査を実施し、イノシシ7.5%からHEV遺伝子が検出され、シカからは検出されなかったことを報告している。同様の結果が本調査でも確認され、本県でもイノシシがHEVに感染していることが明らかとなった。

イノシシのHEV遺伝子検出率について雌雄の差は認められなかった。一方、体重別の検出率では50 kg未満の個体が高く (20.6%), さらにHEV遺伝子検出例の87.5% (7/8) は体重50 kg未満であった。一般に、オス成体の体重は50 kg以上と認識されていることから⁴⁾, 本調査により本県におけるイノシシは幼体の方がHEV保有率の高いことが明らかとなった。中根ら¹¹⁾ はイノシシ推定体重別のHEV検出割合について、体重40 kg未満の個体群で有意に陽性率が高かったことを報告している。これらのことを考慮すると、生後1から3カ月に水平感染すると報告されている¹⁸⁾ ブタと同様にイノシシについても幼体の時期に感染している可能性が示唆された。

ブタを対象としたHEV調査では、原田ら³⁾ がと畜検査で合格となったブタの肝臓2.5%からHEV遺伝子が検出されたことを報告している。また、佐々木ら¹⁴⁾ は6カ月齢ブタではHEVは検出されず、3カ月齢のブタ糞

Fig. 1. Phylogenetic analysis of HEV strains from wild boars, pigs and sewage.

The phylogenetic tree constructed by Neighbor-Joining method (Kimura 2-parameter method) based on the partial nucleotide sequence (301nt) of ORF2. HEV RNA sequenced from this study are boldfaced and tagged with isolate name, DDBJ accession numbers, (collected year), country or city. An HEV G4 isolate (AB369688) is used as an out-group. The numbers on branches were bootstrap values. (1,000 replicates; values less than 70% were not shown.)

便からのHEV検出率(33.0%)が最も高くなったと報告している。日本の飼育ブタにはHEVが広く浸淫しており、HEV感染は群飼段階の1から3カ月齢のブタで集中して水平感染していると考えられている⁵⁾。本調査では6カ月齢のブタの肝臓5.8%からHEV遺伝子が検出されたが、県内の飼育地域による検出率に差は認められず、群飼時期等の飼育状況の違いによるものと推察された。市場に出荷する時期の6カ月齢のブタでもHEVが検出されていることから、食用肉として流通することも考えられ、調理が不適切であった場合には喫食者が感染する可能性も指摘される。さらに、仙台市内で流通していた二枚貝からHEVが検出されたことから、HEV感染のリスク低減のためにはブタなどの食肉および二枚貝の適切な加熱処理を消費者に周知徹底していく必要がある。

流入下水については91試料中7試料(7.7%)からHEV遺伝子が検出されたが、検出時期の季節性や継続性は認められなかった。一般に、下水には生活用水やヒトの排泄物などヒトと関わりのあるさまざまな汚水が流入しており、あらゆる腸管系病原微生物が存在している。本調査で対象とした下水処理施設は10万m³/日の汚水流入量があるが、畜産廃水などの流入がないため、流入下水から検出されたHEV遺伝子がブタ由来の可能性は著しく低いと考えられる。また、調査期間中に処理区域内で報告されたHEV患者は1名であり、患者由来の可能性は低いが、HEV感染の不顕性感染は60から70%と報告^{2,7)}されていることを考慮すると、処理区域内のヒト由来のHEVを捉えていることも示唆される。不顕性感染は臨床的症状を発症せず医療機関では見つけられないため、市中で発生しているHEV感染の把握には流入下水を対象とした継続的な調査が有効と考えられた。

日本土着のHEVの遺伝子型はG3, G4が知られており、本調査で検出された株もすべてG3に分類された。系統解析では、イノシシ、ブタ、流入下水から検出された各々の株ごとでクラスターが形成されており、イノシシはイノシシの間で、ブタはブタの間でHEV汚染を持続している可能性が示された。流入下水はヒトのHEV感染を反映していることを考えると、ブタ肉等の喫食がヒトに関与していることも推察される。HEV患者の喫食調査等、さらに詳細な調査が必要であると思われる。

宮城県では、これまで確認されていたブタに加えて今回新たにイノシシもHEV感染していることが明らかになり、流入下水から検出されたHEV遺伝子は処理区域内で発生しているヒトのHEV感染との関与が考えられることから、ヒトにHEVが浸淫している可能性が示唆された。HEV感染のリスクを回避するためには、イノシシなどジビエを処理する際には器材の洗浄消毒を適切に行うことや、食肉の調理時には十分に加熱することが重要である。今後、イノシシやブタのHEV感染の汚染源の特定を行うとともに、患者発生との関連を明らかにすることの重要性が確認された。

謝 辞

本調査を実施するにあたり協力いただいた宮城県猟友会(気仙沼支部、河北支部、伊具支部)、仙台食肉卸売市場株式会社ならびに関係機関の皆様に深謝いたします。本調査のうち、流入下水に関しては平成30年度厚生科学研究費補助金・食品の安全確保推進研究事業「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」によって行いました。

文 献

- 1) 江藤良樹, 石橋哲也, 世良暢之, 千々和勝巳: 野生イノシシ肉からのE型肝炎ウイルス(HEV)感染症事例-福岡県. 病原微生物検出情報, **26**, 265-266 (2005).
- 2) Gillois, Y., Abravanel, F., Miura, T., Pavio, N., Vallant, V., et al.: High proportion of asymptomatic infections in an outbreak of hepatitis E associated with a spit-roasted piglet, France, 2013. Clin. Infect. Dis., **62**, 351-357 (2016).
- 3) 原田誠也, 田中智之, 西村浩一, 大迫英夫, 吉岡健太, 石井孝司, 李 天成: 厚生科学労働研究費補助金(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」, 255-262 (2012).
- 4) 飯島正広: イノシシ. 日本哺乳類大図鑑. 土屋公幸監修, p. 34-41, 偕成社, 東京 (2010).
- 5) 石井孝司, 李 天成, 恒光 裕: 人獣共通感染症としてのE型肝炎. 病原微生物検出情報, **35**, 4-5 (2014).
- 6) 石田勢津子, 吉澄志磨, 三好正浩, 奥井登代, 岡野素彦, 米川雅一: E型肝炎ウイルスの集団感染事例. 病原微生物検出情報, **26**, 266-267 (2005).
- 7) 石田勢津子, 吉澄志磨, 三好正浩, 奥井登代, 岡野素彦, 米川雅一: 北海道内献血者におけるHEV感染の状況. 病原微生物検出情報, **35**, 7-8 (2014).
- 8) Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K.: MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution, **33**, 1870-1874 (2016).
- 9) Matsuda, H., Okada, K., Takahashi, K., Mishihiro, S.: Severe Hepatitis E Virus Infection after Ingestion of Uncooked Liver from a Wild Boar, J. Infect. Dis., **188**, 944 (2003).
- 10) 三好龍也, 内野清子, 岡山文香, 芝田有理, 吉田永祥, 小林和夫, 左近直美: 臨床検体および下水検体を用いた堺市内のA型肝炎の流行解析. 病原微生物検出情報, **36**, 6-7 (2015).
- 11) 中根邦彦, 伊藤寛将, 磯谷建治, 板倉裕子, 糟谷慶一, 小林慎一: 2010年4月から2014年11月の岡崎市におけるジビエ(イノシシおよびシカ)のE型肝炎ウイルス感染状況調査. 食品衛生学雑誌, **56**, 252-255 (2015).
- 12) 沖村容子, 高橋由理, 阿部美和, 植木 洋, 佐藤由紀, 菅原優子, 御代田恭子: E型肝炎ウイルスの肥育豚への汚染経路解明を目的とした野生動物のHEV保有状況調査. 公益財団法人 大同生命厚生事業団(第16回地域保健福祉助成)報告集, 15-17 (2009).
- 13) Rodriguez-Manzano, J., Miagostovich, M., Hundesa, A., Clemente-Casares, P., Carratala, A., et al.: Analysis of

- the evolution in the circulation of HAV and HEV in eastern Spain by testing urban sewage samples. *J. Water Health*, **8**, 346–354 (2010).
- 14) Sasaki, Y., Haruna, M., Uema, M., Noda, M., Yamada, Y.: Prevalence and Phylogenetic Analysis of Hepatitis E Virus among Pigs in Japan. *J. Infect. Dis.*, **71**, 75–78 (2018).
 - 15) 関根雅夫: 仙台市内流通食品等のA型肝炎ウイルス等腸管系ウイルスによる汚染状況の実態調査. 公衆衛生情報みやぎ, **462**, 33–37 (2016).
 - 16) 高橋伸和, 植木 洋, 佐藤千鶴子, 齋藤 直, 小野聡美, 小川修平, 齋藤紀行, 鈴木寿郎, 御代田恭子: と畜場に搬入された豚におけるE型肝炎ウイルスの保有状況. 公衆衛生情報みやぎ, **369**, 9–10 (2007).
 - 17) Tei, S., Kitajima, N., Takahashi, K., Mishiro, S.: Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet*, **362**, 371–373 (2003).
 - 18) 恒光 裕: 厚生科学労働研究費補助金 (厚生労働科学特別研究事業)「食品に由来するE型肝炎ウイルスのリスク評価に関する研究」, 21–24 (2003).
 - 19) 植木 洋, 菊地奈穂子, 山本紀彦, 後藤郁男, 沖村容子, 秋山和夫: 宮城県におけるE型肝炎ウイルスの浸淫状況調査. 宮城県保健環境センター年報, **23**, 40–42 (2005).
 - 20) Ueki, Y., Sano, D., Yo, Toru., Watanabe, T., Akiyama, K., Omura, T.: Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters. *Water Research*, **39**, 4721–4280 (2005).