

沖縄県のヒトの E 型肝炎ウイルス調査

仁平稔・平良勝也・中村正治・糸数清正・久高潤・大野惇¹⁾

要旨：沖縄本島および宮古島、石垣島、西表島の住民から収集した血清 872 検体について、酵素結合免疫測定法による E 型肝炎 (HEV) 抗体調査をおこなったところ、15 検体 (1.7%) から HEV 抗体が検出され、沖縄県においても、HEV 感染歴を持つヒトがいることが示された。各年齢群では、0～19 歳では HEV 抗体は検出されず、20～39 歳 (1.1～1.7%) と比較して、40 歳以上 (2.7～4.5%) が HEV 抗体陽性率が高い傾向を示した。男性の HEV 抗体陽性率は 1.8% で、女性は 1.6% と、性別による抗体陽性率の差は確認されなかった。各地域の HEV 抗体陽性率は、沖縄本島が 1.3%、宮古島が 2.6%、石垣島が 1.0%、西表島が 4.0% を示し、西表島が比較的高い傾向を示したが、有意な差は確認されなかった。今後は、沖縄県における HEV 浸淫状況を、より詳細に把握するとともに、感染経路の推定を行うことが重要であると考えられた。

Key words : HEV 抗体, ELISA, 沖縄住民

I はじめに

E 型肝炎は、E 型肝炎ウイルス (HEV) が経口感染することにより起こる疾患である。ヒトにおける臨床症状は、同じく経口感染することにより発症する A 型肝炎に類似した黄疸を伴う急性肝炎であり、慢性化はしない。しかし、その致死率は A 型肝炎の 10 倍であり、特に妊婦では、20% との報告もある¹⁾。E 型肝炎は、従来、水系感染が主であると考えられており、インド、中央アジア、北アフリカ、中国などで、大規模な集団発生が知られていた。一方、欧米諸国や日本などの先進国では、発生は散発的で、途上国への渡航による輸入感染例が大半を占めると考えられていた。しかし、近年、渡航歴がなく、国内で感染したとみられる患者発生が報告されている¹⁾。

国内の E 型肝炎の感染経路として、獣畜肉の摂食による経口感染が考えられている。2003 年の兵庫県での HEV 食中毒事例では野生シカ肉が、2005 年の福岡県での HEV 感染事例では野生イノシシ肉が、原因食品として特定されている^{2), 3)}。また、2004 年、2006 年の北海道の事例や、2005 年の三重県の事例では、特定には至らなかったが、ブタレバーなどが原因食品として疑われている^{4), 5)}。

沖縄県においては、2002 年に宮古島の男性 1 例、2004 年に伊江島の男性 1 例が、HEV 遺伝子および HEV 抗体が検出されたことにより、HEV 患者と診断されており⁶⁾、その後、2005 年に、宮古島から男性 1 名の HEV 患者が報告されている。いずれも感染源は明らかになっていないが、2002 年の宮古島の症例では、ブタレバーが原因食品として疑われている⁶⁾。実際に、県内のブタを始めとして、イノシシやマングースからは HEV 遺伝子および HEV 抗体が検出されている⁶⁾⁻¹⁰⁾。沖縄県は、食文化として豚

肉を使用した料理が多く、その消費量も多い。また、ヤギなどの生肉を好む人も多い。県内のヒトおよび動物の HEV 浸淫状況を把握し、E 型肝炎患者との関連性を解明するとともに、有効な予防対策を考案することは、HEV の蔓延防止ならびに E 型肝炎患者の発生防止に寄与し、県内の公衆衛生状況の向上へとつながる。今回、県内のヒトの HEV 浸淫状況を把握すべく、2005 年に沖縄本島、2006 年に沖縄本島および宮古島、石垣島、西表島のヒト血清を収集し、HEV 抗体および HEV 遺伝子の検出を実施したので報告する。

II 材料および方法

(1) ヒト血清収集方法及び収集地域

ヒトの血清は、2005 年に 354 検体、2006 年に 518 検体、合計 872 検体を集めた。血清は、沖縄県内の各保健所や市町村自治体、職場で行われる健康診断および医療機関受診の際に、医師、看護師らの協力を得て、同意書を取り集めた。血清の収集地域、性別、年齢群などについては、表 1 に示した。

(2) HEV 抗体検出方法

血清 872 検体は HEV-IgG を、2006 年に集められた 518 検体については HEV-IgM を、Li らの方法¹¹⁾ および病原体検査マニュアル¹²⁾ を参考に、酵素結合免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assays : ELISA) により検出した。抗原には、国立感染症研究所ウイルス第 2 部より分与された HEV 中空粒子¹³⁾ を使用した。二次抗体には、HEV-IgG 測定に peroxidase-conjugate goat IgG

1) 沖縄県福祉保健部薬務衛生課

表 1. 収集された血清の採血地域、性別、年齢群ごとの数

採血地域	性別	年齢群							全体
		0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-	
沖縄本島	男	73	45	52	61	29	11	9	280
	女	69	67	63	46	12	12	5	274
宮古島	男	0	0	10	15	10	15	10	60
	女	0	0	10	15	10	11	10	56
石垣島	男	0	0	12	9	10	10	10	51
	女	0	0	10	10	11	10	10	51
西表島	男	0	1	9	10	9	10	11	50
	女	0	0	10	10	10	10	10	50
合計	男	73	46	83	95	59	45	40	441
	女	69	67	93	81	43	43	35	431
	合計	142	113	176	176	102	88	75	872

fraction to human IgG F(AB')₂ (Cappel, Aurora, Ohio.)を、HEV-IgM 測定に peroxidase-conjugate goat affinity purified antibody to human IgM(5FC μ) (Cappel, Aurora, Ohio.)を使用した。492nm の OD 値を測定し、ブランクを引いた OD 値が 0.2 以上のものを陽性とした。

(3)HEV 遺伝子検出方法

HEV 抗体陽性となった血清について、RNA 抽出キット (QIAamp Viral RNA Mini kit, QIAGEN, Tokyo, Japan) を使用して、ウイルス RNA を抽出後、One-Step RT-PCR kit(QIAGEN, Tokyo, Japan)と Takahashi らが報告しているプライマーを使用して¹⁰⁾、RT-PCR を実施した。さらに、得られた PCR 産物について、TaKaRa EX Taq(TaKaRa Bio Inc., Otsu, Japan)と Takahashi らが報告しているプライマーを使用して¹⁰⁾、nested PCR を実施した。nested PCR 産物は、3%アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、104~110nt のサイズのバンドを確認した。

III 結果

(1)HEV 抗体検出

HEV-IgG は 872 検体中 15 検体(1.7%)から検出された。

HEV-IgM は 518 検体全てから検出されなかった。HEV 抗体陽性を示した 15 検体の年齢、性別および採血地域を表 2 に、各年齢群の HEV 抗体陽性率について図 1 に、各地域の HEV 抗体陽性率について図 2 に示した。0~19 歳においては HEV 抗体は検出されず、20~29 歳の HEV 抗体陽性率は 1.7%(3/176)、30~39 歳は 1.1%(2/176)、40~49 歳は 4.0%(5/102)、50~59 歳は 4.5%(3/88)、60 歳以上は 2.7%(2/75)を示した。各地域の陽性率は、沖縄本島が 1.3%(7/554)、宮古島が 2.6%(3/116)、石垣島が 1.0%(1/102)、西表島が 4.0%(4/100)を示した。また、性別ごとの陽性率は、男性が 1.8%(8/441)、女性が 1.6%(7/431)を示した。

(2)HEV 遺伝子検出

HEV 抗体陽性となった 15 検体全てから、HEV 遺伝子は検出されなかった。

IV 考察

872 名中 15 名から HEV 抗体が検出されたことから、沖縄県においても、HEV 感染歴を持つヒトがいることが示された。沖縄県全体での HEV 抗体陽性率は 1.7%で、各年齢群では、0~19 歳で HEV 抗体は検出されず、20~39 歳

表2. HEV-IgG 陽性検体の性別、年齢および採血地域

	性別	年齢	採血地域
1	男性	28	沖縄本島
2	男性	52	沖縄本島
3	男性	67	沖縄本島
4	女性	25	沖縄本島
5	女性	28	沖縄本島
6	女性	35	沖縄本島
7	女性	44	沖縄本島
8	男性	54	宮古島
9	女性	43	宮古島
10	女性	46	宮古島
11	男性	38	石垣島
12	男性	49	西表島
13	男性	50	西表島
14	男性	51	西表島
15	女性	77	西表島

と比較して、40歳以上の抗体陽性率が高い傾向を示した。なお、HEV-IgM は検出されなかった。国内の健常者を対象とした HEV 抗体調査によると、HEV-IgG 陽性率は、地域差があり 1.9~14.1%で、年齢別には 20 歳以下が 0.4%と低く、20 歳以上では年齢が上がるに連れて高率となる傾向を示した^{11),15)}。また、HEV-IgM 抗体陽性率は 0.1%であった¹¹⁾。これらのことから、沖縄県の HEV 抗体保有状況は、全国的に抗体陽性率の低い地域に分類されるが、その傾向は全国と同様であると考えられた。しかし、今回の調査では、男性と女性の HEV 抗体陽性率がほぼ同率であったが、国内で報告されている HEV 患者数、そして、ALT 検査不合格となった献血者を対象とした HEV 抗体調査において、HEV 抗体陽性となった数は、女性に比べて男性が多いとの報告がある^{16) - 18)}。今回、性別差が確認されなかったのは、調査対象が健常者であったこと、もしくは、40 歳以上の検体数が少なかったことなどが考えられる。

各地域の抗体保有状況では、地域間での有意な差は

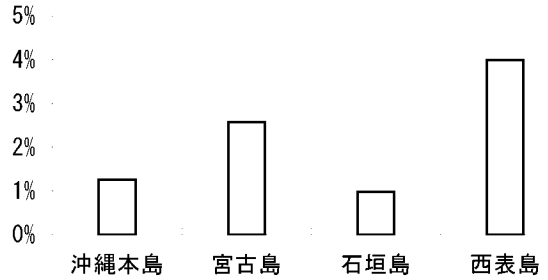


図1. 沖縄県における各年齢群の HEV 抗体陽性率

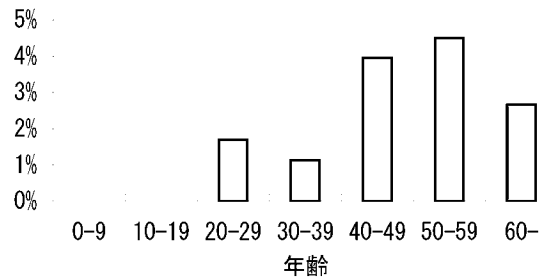


図2. 沖縄県における各地域の HEV 抗体陽性率

認められなかったが、西表島の抗体陽性率が、他の3つの地域より比較的高い値を示した。西表島では、イノシシ肉を生で食べる習慣があるが、西表島のイノシシの13%から HEV 遺伝子が検出された報告があり⁷⁾、また、第36回沖縄県獣医学会において、西表島のイノシシの70%から HEV-IgG が検出されたとの報告がなされている。このことから、西表島住民の HEV 感染源の一つとして、野生イノシシ肉の摂食が考えられた。この仮説は、西表島住民の血清から HEV 遺伝子を検出し、その塩基配列を、西表島のイノシシから検出された HEV 遺伝子の塩基配列と比較することで検討できると考えられる。他の地域においても、ヒト血清からの HEV 遺伝子の塩基配列を、沖縄県の獣畜から検出された HEV 遺伝子の塩基配列と比較することで、感染源を推定できると考えるが、今回、HEV 遺伝子が検出されなかったため、これらの検討はできなかった。

今回の調査によって、沖縄県内にも HEV 感染歴を持つヒトがいることが示された。今後は、検査法の検討と40歳以上の年齢群の調査を充実させることで、沖縄県における HEV 浸淫状況を、より詳細に把握する必要がある。また、HEV 遺伝子検出以外に、職種や動物との接触、ど

のような種類の肉をどのように食べているか、渡航歴などについてのアンケート実施など、HEV 感染経路の推定を行うことが重要であると考えられる。

<謝辞>

今回、調査を実施するにあたり、ヒト血液の採集に御協力を頂いた各医療機関、検査機関および市町村自治体の方々に深謝いたします。また、HEV 中空粒子を分与していただいた、国立感染症研究所ウイルス第2部の李天成先生に深謝いたします。

V 参考文献

- 1) 武田直和ら(2002):E型肝炎. 病原微生物検出情報. Vol. 23, No. 11 : 275-276
- 2) 福永真治ら(2005):冷凍生シカ肉を原因とするE型肝炎ウイルスによる食中毒事例と県下野生シカのHEV保有調査—兵庫. 病原微生物検出情報. Vol. 26 No. 10 : 264-265
- 3) 江藤良樹ら(2005):野生イノシシ肉からのE型肝炎ウイルス(HEV)感染事例—福岡県. 病原体検出情報. Vol. 26, No. 10 : 265-266
- 4) 石田勢津子ら(2005):E型肝炎ウイルスの集団感染事例—北海道. 病原体検出情報. Vol. 26, No. 10 : 266-267
- 5) 中野陽子ら(2005):4例のE型肝炎の発生事例と検出ウイルスの系統解析—三重県. 病原体検出情報. Vol. 26, No. 10 : 267-269
- 6) 佐久川廣(2005):沖縄県内で発症したE型肝炎の2例と動物由来のHEV株. 本邦に於けるE型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究, 平成16年度総括研究報告書. 22-23
- 7) 中村正治(2006):西表(イリオモテ)の野生リュウキウイノシシから検出された genotype 4 HEV. 肝臓. 47, 3 : 161-162
- 8) Nakamura, M. et al. (2006): Hepatitis E Virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan : Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. Hepatol. Res. 34 : 137-140
- 9) 中村正治(2006):沖縄県のブタ, イノシシおよびマングースにおけるHEV調査. 本邦に於けるE型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究, 平成17年度総括研究報告書. 15-17
- 10) 武田直和(2006):沖縄県に生息するマングースのE型肝炎ウイルス抗体保有状況. 本邦に於けるE型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究, 平成17年度総括研究報告書. 31-32
- 11) Li, T. C. et al. (2000): Empty Virus-like Particle-based Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Antibodies to Hepatitis E Virus. J. Med. Virol. 62 : 327-333
- 12) 地方衛生研究所全国協議会, 国立感染症研究所(2003):急性ウイルス性肝炎. 病原体検出マニュアル. 291-295
- 13) Li, T. C. et al. (1997): Expression and Self-Assembly of Empty Virus-Like Particles of Hepatitis E Virus. J. Virol. Vol. 71, No. 10 : 7207-7213
- 14) Takahashi, K. et al. (2003): Full-Length Sequences of Six Hepatitis E Virus Isolates of Genotypes III and IV from Patients with Sporadic Acute or Fulminant Hepatitis in Japan. Intervirology. 46 : 308-318
- 15) 国立感染症研究所(2005):A型肝炎・E型肝炎. 病原体検出情報. Vol. 23, No. 11 : 271-272
- 16) 金光公浩(2007):献血者集団におけるHEV感染の実態解明. 本邦に於けるE型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究, 平成16年度総括研究報告書. 52-55
- 17) 佐久川廣ら(2004):D型・E型肝炎. 日本内科学会雑誌. 93 : 2351-2356
- 18) 国立感染症研究所(2005):E型肝炎. 病原体検出情報. Vol. 26, No. 10 : 261-262