

沖縄県のブタ、イノシシおよびマングースからの E型肝炎ウイルス遺伝子の検出とその系統解析

仁平稔, 中村正治, 平良勝也, 岡野祥, 富永正哉¹⁾, 平良雅克¹⁾, 糸数清正, 久高潤, 高橋和明²⁾, 三代俊治²⁾

Detection and Phylogenetic analysis of Hepatitis E Virus Genome in Pigs, Wild Boars and Mongooses in Okinawa Prefecture, Japan

Minoru NIDAIRA, Masaji NAKAMURA, Katsuya TAIRA, Shou OKANO, Masaya TOMINAGA¹⁾, Masakatsu TAIRA¹⁾, Kiyomasa ITOKAZU, Jun KUDAKA, Kazuaki TAKAHASHI²⁾, Syunji MISHIRO²⁾

要旨 : 2008年度に沖縄本島の2~4ヶ月齢のブタの胆汁73検体および西表島の推定で2~4歳のイノシシの血清20検体を採集し, HEV遺伝子検出を行った。結果, 15検体(20.5%)のブタからHEV遺伝子が検出された。国内の3~4ヶ月齢のブタのHEV遺伝子陽性率から沖縄本島のブタのHEV感染状況は全国と同様であると考えられた。一方, 今回の調査ではイノシシからHEV遺伝子は検出されなかったが, 西表島と沖縄本島のイノシシからは過去にHEV遺伝子が検出されており, 引き続き調査が必要であると考えられた。また, HEVリザーバーとしての可能性を指摘されているマングースについても2007~2008年度に胆汁109検体を採集し, HEV遺伝子の検出を行った。結果, 6検体(5.5%)からHEV遺伝子が検出され, このことはマングースがHEVリザーバーである可能性を支持すると考えられた。相同性および系統解析の結果, 沖縄本島のブタ, イノシシおよびマングースには遺伝子型が3型の主に2つのグループのHEVが感染していること, また, マングースとブタの間でHEVが種の壁を越えて感染している可能性が考えられた。

Key words : E型肝炎ウイルス, ブタ, イノシシ, マングース, 沖縄

I はじめに

我々は沖縄県におけるヒトのHEV浸淫状況を把握する目的で, 2005~2007年度に沖縄本島, 宮古島, 石垣島, 西表島におけるヒト血清中HEV抗体調査を酵素結合免疫測定法(ELISA: enzyme-linked immunosorbent assays)により実施し¹⁾, 2008年度はこの抗体調査の結果を基に, 沖縄県におけるヒトへのHEV感染経路の推定を目的としたアンケートについて解析を行った。その結果, ブタとイノシシが沖縄県におけるヒトへのHEV感染経路として重要と考えられることを示した。そこで2008年度はアンケートの解析に加えて, 沖縄県内のブタとイノシシにおけるHEV感染の実態を調査する目的で, ブタとイノシシからのHEV遺伝子検出およびその塩基配列についての解析を行ったので報告する。また, HEVリザーバーの可能性が示唆されているマングースについても同様の調査を行った²⁾。

II 方法

1. 材料と採集地域

2008年度に沖縄本島の17農場の2~4ヶ月齢のブタから

胆汁73検体, 西表島の推定で2~4歳のイノシシから血清20検体, 2007~2008年度に沖縄本島のマングースから胆汁109検体を集めた。これらの検体は試験に供するまで-80℃で保存した。

2. HEV遺伝子検出および塩基配列解析

各検体の140μlからQIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN, Tokyo, Japan)によりウイルスRNAを抽出後, One-Step RT-PCR kit(QIAGEN, Tokyo, Japan)でRT-PCR, Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen Corporation, California, USA)でnested PCRを, Takahashiらが報告しているプライマーを使用して実施した³⁾。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, 104~118ntのサイズのバンドを確認した。HEV遺伝子が検出された検体のウイルスRNAについては, One-Step RT-PCR kitでRT-PCR, Premix Taq(TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan)でnested PCRを, Mizuoらが報告しているORF2領域のプライマーを使用して実施した⁴⁾。nested PCR産物は2%アガロー

1) 中央食肉衛生検査所

2) 東芝病院研究部

表 1. ブタ検体からの HEV 遺伝子検出結果

農場	検体数	HEV 遺伝子検出	ORF2 領域検出
A	4	0	
B	3	1 (33.3%)	0
C	1	0	
D	1	0	
E	1	0	
F	1	0	
G	1	0	
H	31	13 (41.9%)	12
I	3	0	
J	1	0	
K	1	0	
L	4	0	
M	1	0	
N	3	0	
O	1	0	
P	12	0	
Q	4	1 (25.0%)	1
合計	73	15 (20.5%)	13

スゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、458ntのサイズのバンドを確認した。検出された HEV 遺伝子の ORF2 領域は ABI PRISM BigDye Terminator version 3.1 system および ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA)を使用して塩基配列を決定し、既報告の HEV 遺伝子との系統解析を行った。

III 結果

沖縄本島の 3 農場のブタ 15 検体(20.5%)、農場別では B 農場 3 検体中 1 検体(33.3%)、H 農場 31 検体中 13 検体(41.9%)、Q 農場 4 検体中 1 検体(25%)から HEV 遺伝子が検出された(表 1)。マンガースは 6 検体(5.5%)から HEV 遺伝子が検出された。西表島のイノシシからは HEV 遺伝子は検出されなかった。HEV 遺伝子が検出された検体のうち、沖縄本島の 2 農場のブタ 13 検体、マンガース 4 検体については ORF2 領域の HEV 遺伝子も検出され、これらの塩基配列を既報告の HEV 遺伝子と比較した結果、今回検出された HEV は全て遺伝子型が 3 型であり、沖縄本島でこれまでに分離されたブタ、イノシシおよびマンガース由来株は G3a と G3b の 2 つのグループを形成した(図 1)。G3a には今回

検出されたブタ由来 13 株中 12 株とマンガース由来 4 株中 2 株が属し、ブタ由来 12 株は全て同一農家から採集されており、これらの相同性は 98.8~100%を示した。G3b にはブタ由来 1 株とマンガース由来 2 株が属し、これら 3 株の相同性は 98.5~99.3%を示した。

IV 考察

今回、沖縄県のブタとイノシシにおける HEV 感染の実態を調査するため、沖縄本島の 2~4 ヶ月齢のブタおよび西表島の推定で 2~4 歳のイノシシから HEV 遺伝子検出を行った。結果、ブタの HEV 遺伝子陽性率は 20.5%(15/73)、HEV 陽性農場ごとでは 25.0~41.9%を示した。国内の 3~4 ヶ月齢のブタ血清中 HEV 遺伝子陽性率は 13~15%であり、HEV 陽性農場ごとでは 3~77%を示したことから⁵⁾、沖縄本島のブタの HEV 感染状況は全国と同様であり、国内で報告されたブタレバーが原因と推定された HEV 感染事例が⁶⁾、沖縄本島においても起こる可能性があると考えられた。一方、今回の調査ではイノシシから HEV 遺伝子は検出されなかった。ブタでは多くが出荷される 6 ヶ月齢で HEV 遺伝子がほぼ検出されなくなるため⁵⁾、イノシシにおいても狩猟により捕獲される年齢では HEV 遺伝子を保有する個体は少ないと考えられる。しかし、西表島では過去にイノシシ 29 検体中 3 検体(10.3%)、沖縄本島ではイノシシ 73 検体中 2 検体(2.7%)から HEV 遺伝子が検出されており⁷⁾、引き続き調査が必要であると考えられた。

今回は HEV リザーバーとしての可能性を指摘されているマンガースについても HEV 遺伝子の検出を行った。マンガースからの HEV 遺伝子検出報告は現在までに 1 例のみであるが²⁾、今回の調査において 109 検体中 6 検体(5.5%)から HEV 遺伝子を検出した。これらのことはマンガースが HEV リザーバーである可能性を支持すると考えられた。また、ORF2 領域の相同性と系統解析の結果から、沖縄本島のブタ、イノシシおよびマンガースには遺伝子型が 3 型の、主に 2 つのグループの HEV が感染していること、ブタとマンガースの間では HEV が種の壁を越えて感染していることが考えられた。

ヒトへの食肉を介した HEV 感染を防止するためには、喫食の際に加熱をすることが最も重要である。さらに今回の調査において、沖縄本島のいくつかの農家が農家ごとに異なる由来の HEV に汚染されていることが考えられた。HEV 遺伝子が検出されなかった農家の多くは検体数が少なく、沖縄本島内および沖縄県内の農家の HEV 汚染状況については更なる調査が必要と考えられるが、これら農家の飼育設備などの改善がブタへの HEV 感染防止となり、結果としてヒトへ

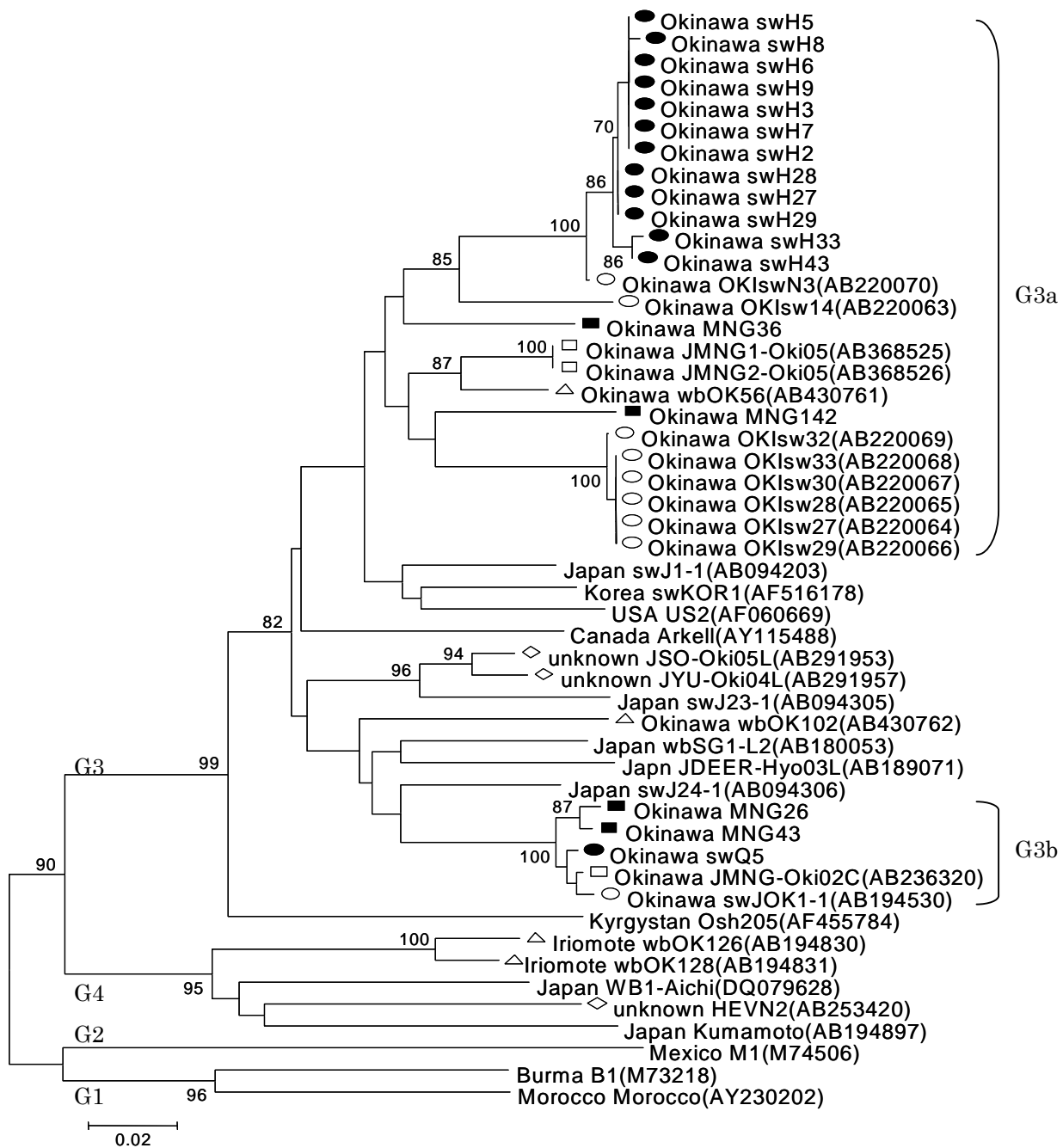


図 1. ORF2 領域の一部 412nt をもとに作製された系統樹

株名の前に分離された国名を、沖縄県において分離された株は島名を記した。G1~4 はそれぞれ遺伝子型 1~4 を、G3a,b は沖縄本島において分離された株で構成された 2 つのグループを示す。沖縄県において分離された株については、○をブタ由来、□をマングース由来、△をイノシシ由来、◇をヒト由来として示し、それぞれの黒塗りが今回の調査で分離された株を示す。今回の調査で分離されたブタ由来株の株名の H および Q は農家を示す。

の HEV 感染防止へ繋がると考えられた。その改善点としてブタの糞便の適切な処理と共に、マングースとブタの間で HEV が伝播している可能性が考えられたことから、農場内およびその近辺へのマングース侵入防止が重要と考えられた。

<謝辞>

イノシシ血清の採集に協力していただいた西表島の猟友会の方々、並びにマングース胆汁を分与していただいた琉球大学農学部生産環境学科の小倉剛先生に心より感謝いたします。

V 参考文献

- 1) 仁平稔, 大野惇, 平良勝也ら(2008): 沖縄県のヒト及び動物の E 型肝炎ウイルスに関する疫学調査(2007). 平成 19 年度衛生科学調査研究報告書, 1-8
- 2) Nakamura, M., Takahashi, K., Taira, K., et al.(2006): Hepatitis E Virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan : Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepatology Res.*, 34, 137-140
- 3) Takahashi, K., Kang, J.H., Ohnishi, S., 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
- 4) Mizuo, H., Suzuki, K., Takikawa, Y., et al. (2002): Polyphyletic Strains of Hepatitis E Virus Are Responsible for Sporadic Cases of Acute Hepatitis in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 3209-3218
- 5) Takahashi, M., Nishizawa, T., Miyajima, H., et al.(2003): Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of hepatitis E virus. *J. Med. Virol.*, 84, 851-862
- 6) Yazaki, Y., Mizuo, H., Takahashi, M., et al.(2003): Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J. Gen. Virol.*, 84, 2351-2357
- 7) 中村正治(2006): 沖縄県のブタ, イノシシおよびマンダリンにおける 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