

原 著

広島県内産ジビエ(イノシシ及びシカ)における E型肝炎ウイルスの検出状況

鈴藤 和, 中島 安基江, 重本 直樹

Detection and molecular analysis of hepatitis E virus from wild boars and wild deer in Hiroshima Prefecture

SUZUTO Madoka, NAKASHIMA Akie and SHIGEMOTO Naoki

(Received : November 22, 2022)

In 2020, we investigated the prevalence of hepatitis E virus (HEV) using real-time RT-PCR assays among wild boars and wild deer in Hiroshima Prefecture. Samples of liver tissues and serum samples were collected from 105 wild boars and 94 wild deer. HEV RNA was detected in the liver tissues and serum samples of wild boars with a positivity rate of 2.9%. All HEV strains detected in this study belonged to genotype 3.

These study results revealed that some wild boars may carry HEV in Hiroshima Prefecture. To the best of our knowledge, this is the first report on the detection of HEV in the samples of wild animals in Hiroshima Prefecture.

Key words : hepatitis, genotype, hepatitis E virus, wild boar, wild deer

緒 言

E型肝炎は糞便中にウイルスが排出され、主に汚染された水や食品等を介して経口的に感染することから、感染症法及び食品衛生法の双方の観点から監視が重要視されている。

以前は開発途上国における水系感染による大規模な流行性肝炎の原因として考えられてきたが、2003年4月に兵庫県においてシカ肉を喫食したことによるE型肝炎の集団発生事例が発生し[1]、E型肝炎は食品由来の感染症であることが認識された。以降、国内ではブタ及びイノシシのレバーや肉を摂食したことによるE型肝炎の発症例などの事例が相次いで報告され、現在では、食中毒原因物質の一つと認識されている。また、国内では感染症法の4類感染症に指定されている。

一方、野生鳥獣は家畜と異なり生産段階での衛生管理が困難であることから、様々な病原体を保有している。近年、野生鳥獣の増加に伴い農林業、特に農産物に対する被害が深刻化しており、中でもシカやイノシシによる被害が顕著なため[2]、その個体数を適正頭数に戻す捕獲が行われている。そのような中で、捕獲

した野生鳥獣の食用としての有効利用とその衛生対策が課題となっていたが、近年、捕獲鳥獣の利活用が進み、ジビエの利用量及び利用頭数ともに増加しており[2]、以前よりも飲食店等でジビエを見かける機会も増えてきた。安心・安全なジビエ流通のため衛生管理の強化が求められる中、「食品衛生法等の一部を改正する法律(平成30年法律第46号)」及び「食品衛生法等の一部を改正する法律の施行に伴う厚生労働省関係省令の整備に関する省令(令和元年厚生労働省令第68号)」の施行により、野生鳥獣肉を処理する食肉処理施設についてもHACCPに沿った衛生管理を実施することが求められている。また、厚生労働省は野生鳥獣肉の安全性確保のため、「野生鳥獣肉の衛生管理に関する指針」(平成26年11月)を策定した。

このような取り組みにも関わらず、国内及び広島県内におけるE型肝炎の発生数は依然として増加傾向にある。今回、広島県内産ジビエの喫食によるE型肝炎への感染のリスクを明らかにする目的で、広島県内産ジビエ(イノシシ及びシカ)におけるE型肝炎ウイルス(HEV)の検出状況を調査したので、報告する。

Table 1 Primer and probe oligonucleotides used for the hepatitis E virus real-time RT-PCR assay

		Sequence (5' to 3')	Polarity ^a	Location
Primer	JV-HEV-F	GGT GGT TTC TGG GGT GAC	+	5287-5304
	JV-HEV-R	AGG GGT TGG TTG GAT GAA	-	5339-5356
Probe ^b	JV-HEV-P	FAM-TGA TTC TCA GCC CTT CGC-TAMRA	+	5310-5327

^a +, sense ; -, antisense

^b Probe is labeled with FAM reporter dye at the 5' end, and with TAMRA at the 3' end of the oligonucleotide.

Table 2 PCR condition used for the hepatitis E virus real-time RT-PCR assay

Reaction solution		PCR Condition	
Reaction volume (μl)	25	RT	50°C /30min
Primer conc. (μM)	0.6	Initial Denaturation	95°C /15min
Probe conc. (μM)	0.2	PCR Cycle	(95°C /15sec · 60°C or 56°C /1min) × 45cycles
Template volume (μl)	3		

Table 3 Characteristics of materials in this study

Facility	Location	Wild boar		Wild deer	
		Serum	Liver	Serum	Liver
A	D	42	42	43	43
B	E	37	34	1	1
C	F	0	0	50	50
Center ※1	E	24	24	2	2
	G	2	2	0	0
total		105	102	96	96

※1 Prefectural Technology Research Institute Livestock Technology Research Center

方 法

1 E型肝炎ウイルスの検査手法の確立

新しいリアルタイムPCR検査系を導入するにあたり、検査系の最適化を図る目的で、当センターの保有機器を使用し、反応条件を検討した。E型肝炎検出マニュアル(第2版)(平成31年12月, 国立感染症研究所)[3]を参考にJothikumarら[4]の報告のプライマー及びプローブを用い(Table 1), PCR機器はLightCycler480 System II (Roche Diagnostics), 試薬はQuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN)を使用した。反応条件は、アニーリング温度を60°Cと56°Cを設定し、Table 2の条件で行った。最適化の指標として国立感染症研究所から配布されたコントロールプラスミド(HEV G3)を $10^1 \sim 10^7$ コピー/μlを反応液に加え、反応を行った。

2 E型肝炎の感染状況調査

(1) 供試検体

広島県にある野生鳥獣処理加工施設または食肉処理施設のうち、広島県内の市町が設置した公設の3施設

(A施設, B施設及びC施設)と広島県立総合技術研究所畜産技術センターに検体の確保を依頼した。A施設及びB施設はイノシシ及びシカ, C施設はシカ専用の処理加工施設であり、2020年4月から2020年11月にD市, E市, F市及びG市において捕獲されたイノシシ105頭(血液105検体, 肝臓103検体), シカ94頭(血液94検体, 肝臓94検体)から検体を採取した(Table 3)。検体は採取後、検査を行うまで、血液は4°C, 肝臓は-20°Cで保存した。捕獲鳥獣については、雌雄、体重及び個体情報を記録した。

(2) HEV 遺伝子検出及び分子系統樹解析

保存材料は、血液は3,500rpm, 15分遠心し、血清を採取し、肝臓はハサミで細切し、10%乳剤を作成した。血清及び肝臓10%乳剤からQIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN)によりRNA抽出を行った後、抽出RNAをアニーリング温度を60°Cに設定したTable 2の条件でE型肝炎ウイルスのリアルタイムRT-PCR検査を行った。リアルタイムRT-PCR検査で陽性であった検体は、コンベンショナルRT-PCR検査により確認検査を実施した。コンベンショナルRT-PCR検査は、抽出RNA9.5μlを5×RT buffer 4μl, 2mM dNTPs

Table 4 Primer for the nested-PCR for hepatitis E virus ORF2 sequences

		Sequence (5' to 3') ^a	Polarity ^b	Final conc. (μM)	Product size (bp)
1st PCR	HE044	CAAGGHTGGCGYTCKGTTGAGAC	+	0.2	506
	HE040	CCCTTRTCCTGCTGAGCRTTCTC	-	0.2	
2nd PCR	HE110-2-1	GYTCKGTTGAGACCTCYGGGGT	+	0.2	457
	HE110-2-2	GYTCKGTTGAGACCACGGGYGT	+	0.2	
	HE110-2-3	GYTCKGTTGAGACCTCTGGTGT	+	0.2	
	HE041	TTMACWGTCTRGCTCGCCATTGGC	-	0.2	

^aMix base in degenerated primers are as follows : H = A/C/T, Y = C/T/R, A = A/G/W, M = A/T, K = G/T
^b +, sense ; -, antisense

Table 5 Reaction conditions for hepatitis E virus ORF2 sequences

Reaction conditions	
RT	30°C /10min → 42°C /60min → 99°C /5min
1st PCR	Initial Denaturation : 96°C /2min → PCR Cycles : (94°C /30sec · 55°C /30sec · 72°C /75sec) × 40cycles → Final Extension : 72°C /7min
2nd PCR	Initial Denaturation : 96°C /2min → PCR Cycles : (94°C /30sec · 55°C /30sec · 72°C /75sec) × 35cycles → Final Extension : 72°C /7min

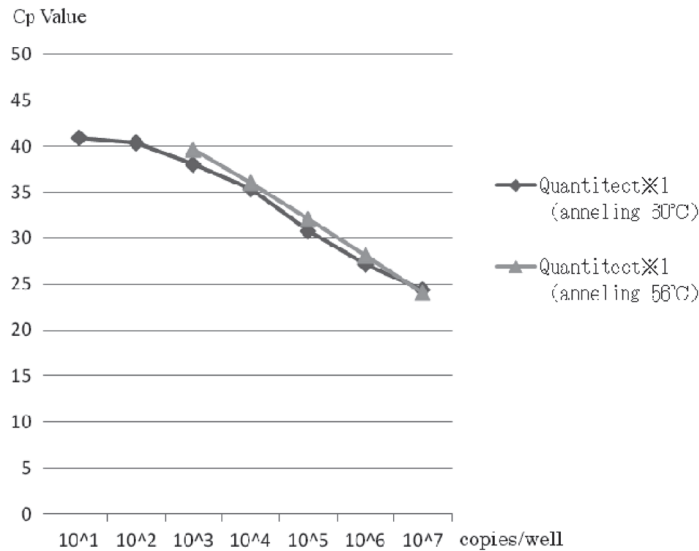


Figure 1 Comparison of the performance of real-time RT-PCR assays against serially diluted hepatitis E virus plasmids.

4μl, 50μM Random primer pd (N)₉ (タカラバイオ) 1μl, RNase Inhibitor (40U/μl) (TOYOBO) 0.5 μl, ReverTra Ace (100U/μl) (TOYOBO) 1μl を含む反応液に加え, 30°C /10分, 42°C /60分, 99°C /5分の反応を行いcDNAを合成した後, PCR試薬に TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (タカラバイオ) を使用し, Mizuoら [5] の報告の Table 4 のプライマー, Table 5 のPCR反応条件及び試薬によりNested-PCRを行った。アガロースゲル電気泳動により予測されるサイズ (1st : 506bp, 2nd : 457bp) の増幅産物が得られた検体について, ウイルスRNAの構造タンパクをコードしているORF2の一部の領域を使用して分子疫学解析を行った。増幅産物をQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を使用してPCR産物を精製し, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) によりシーケンス反応を行い,

Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) にて塩基配列を解読, 得られた塩基配列データについて, 遺伝子解析ソフトMEGA X [6] を用いて近隣結合法による遺伝子系統樹解析を行い, HEVの遺伝子型を判定するとともに, 塩基配列を過去の広島県内におけるE型肝炎ウイルス患者から検出されたHEV遺伝子と比較した。

結 果

1 E型肝炎ウイルスの検査手法の確立

新しいリアルタイムRT-PCR検査系の反応条件を検討した結果, アニール温度60°C /1minの条件下で, 最も蛍光強度が高く, 10¹コピー/μl以上の検出が可能となった (Figure 1)。

Table 6 Prevalence of HEV RNA in this study

Facility	Location		No. of sample examined		No. of sample examined	No. of HEV RNA positive	Positive rate (%)
A	D	Wild boar	42	Serum	42	0	0.0
				Liver	42	0	0.0
		Wild deer	43	Serum	43	0	0.0
				Liver	43	0	0.0
B	E	Wild boar	37	Serum	37	0	0.0
				Liver	34	0	0.0
		Wild deer	1	Serum	1	0	0.0
				Liver	1	0	0.0
C	F	Wild deer	50	Serum	50	0	0.0
				Liver	50	0	0.0
Center ^{*1}	E	Wild boar	24	Serum	24	3	12.5
				Liver	24	3	12.5
	G	Wild boar	2	Serum	2	0	0.0
				Liver	2	0	0.0
Total		Wild boar	105	Serum	105	3	2.9
				Liver	102	3	2.9
		Wild deer	94	Serum	94	0	0.0
				Liver	94	0	0.0

*1 Prefectural Technology Research Institute Livestock Technology Research Center

Table 7 Characteristics of wild boars tested in this study

Items		No. of wild boar	No. of HEV RNA positive	Positive rate (%)
Sex	Male	58	2	3.5
	Female	47	1	2.1
	Total	105	3	2.9
Weight ^{*1}	< 50	80	0	0.0
	50 to < 100	22	2	9.1
	≥ 100	2	1	50.0
	ND ^{*2}	1	0	0.0
	Total	105	3	2.9

*1 Weight range (kg)

*2 ND: Not tested because carcass was considered non-conforming and rejected

2 E型肝炎の感染状況調査

供試検体について、リアルタイム RT-PCR 検査法により E 型肝炎の保有状況を検査したところ、E 市で捕獲されたイノシシ 3 頭（血清 3 検体、肝臓 3 検体）から E 型肝炎ウイルスが検出された（Table 6）。E 型肝炎ウイルスが検出された 3 頭（検体番号 192, 193, 197）はいずれも広島県立総合技術研究所畜産技術センターにおいて 2020 年 10 月から 11 月に捕獲された個体であり、捕獲場所における陽性率は 12.5%（3/24）（頭数ベース）、鳥獣種別でイノシシにおける陽性率は 2.9%（3/105）（頭数ベース）であった（Table 6）。陽性となったイノシシ 3 頭はいずれも成獣で、雄が 2 頭、雌が 1 頭、体重別には 50kg 以上 100kg 未満が 2 頭、100kg 以上が 1 頭で、外観上異常が無く、1 頭は痩せていたが、2 頭は肉質も良好であった（Table 7）。一方、シカからは E 型肝炎ウイルスは検出されなかった。これら

の結果については、3 市の関係課に情報提供するとともに、広島県健康福祉局食品生活衛生課へ報告した。

分子疫学解析の結果、広島県内で捕獲されたイノシシから検出された E 型肝炎ウイルスの遺伝子型はいずれも 3 型（Genotype 3）であり、検出された E 型肝炎ウイルス遺伝子は同一のクラスターを形成し、100% の相同性を示した（●印, Figure 2）。得られた塩基配列を、過去に広島県の患者から検出された E 型肝炎ウイルス遺伝子と比較した結果、同年に広島県内で発生した E 型肝炎による食中毒と疑われる事例において患者から検出された E 型肝炎ウイルス（○印, Figure 2）と同様の 3 型に属し、87% の相同性を示した。また、2019 年における広島県の E 型肝炎患者から検出された E 型肝炎ウイルス（△印, Figure 2）とは遺伝子型が異なった。

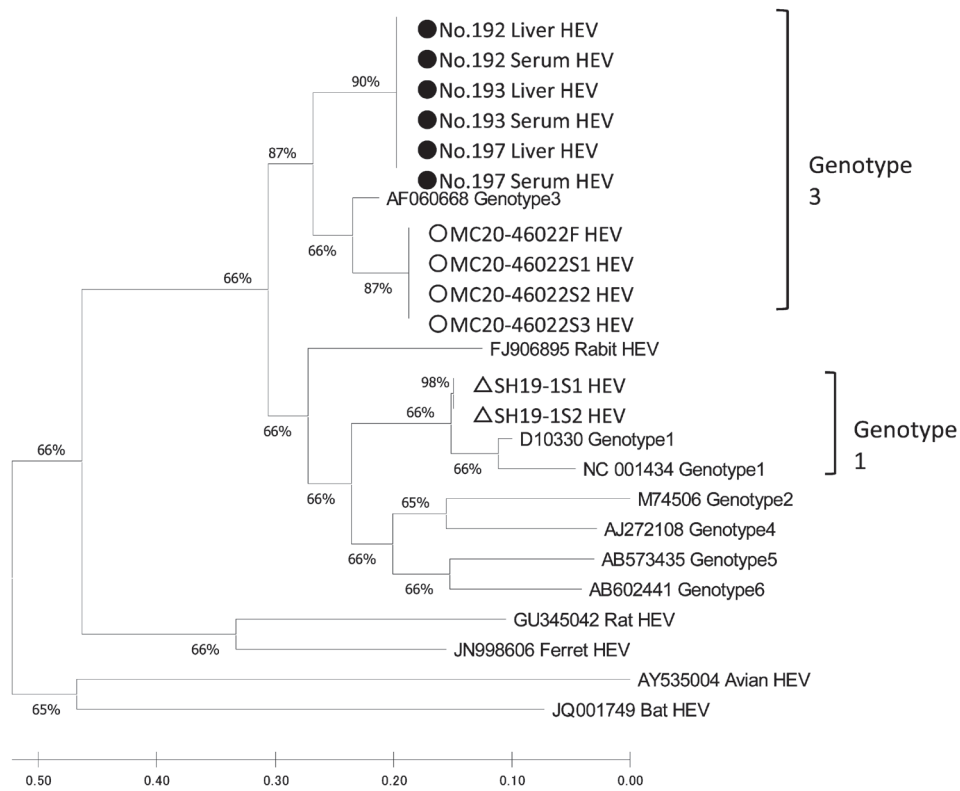


Figure 2 Phylogenetic analysis of HEV strains from wild boars. The phylogenetic tree was constructed by Neighbor-Joining method based on the partial nucleotide sequence (301nt) of ORF2 region.

考 察

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2.9%からHEV遺伝子が検出された。厚生労働科学研究班による研究において、イノシシ2,375頭中294頭(12.4%)がHEVに対する抗体を保有していたのに対して、シカは2,250頭中1頭(0.04%)が抗体を保有していた[7]のみであったことから、自然界のHEVの保有動物はイノシシであると推測されている。また、原田ら[8]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。今回、本調査でも同様の結果が確認され、広島県においてもイノシシがHEVに感染していることが明らかとなった。HEV遺伝子の陽性率については、他県の報告では宮城県では野生イノシシから9.5%(8/84頭)、野生シカから未検出(0/76頭)[9]であり、過去の厚生労働科学研究班による研究においても、イノシシから4.5%(5/112頭)、2.2%(6/277頭)、シカから0.5%(1/201頭)

[10]と、地域により陽性率に差はあるものの、概ねイノシシでの陽性率は数%から10%で、今回の調査結果もこれらの傾向に合致するものであった。

また、厚生労働科学研究班による研究において、イノシシを性別で比較した結果、雌雄間で抗HEV抗体保有率(雄12.1%、雌13.6%)に有意差は存在せず[7]、今回、本調査でも同様の結果が確認された。一方、体重別に調査したところ、厚生労働科学研究班による研究においては、抗体保有率は年齢依存的に有意に上昇するが、遺伝子検出率は年齢依存的に有意に減少しており、このことはイノシシにおいては幼獣の頃にHEVに感染し、年齢が上昇するにつれて感染しにくいことを示しているが[7]、今回の調査でのHEV陽性個体はいずれも50kgを超えており、成獣であった。群における個体数が少ない場合、E型肝炎ウイルスがさほど蔓延しておらず、成獣において新規感染する可能性があったと推測されるが、陽性個体数が少ないため、明確には分からなかった。

今回の調査で、HEV陽性個体3頭の肝臓及び血清から検出されたHEV遺伝子の塩基配列を比較した結果、相同性は100%と非常に高く、陽性個体は短期

間に同一地域で捕獲されたイノシシであったことから、捕獲地域において非常に類似した遺伝子を有するHEVが浸潤している可能性が考えられた。

また、2019年に広島県内で発生したE型肝炎患者には直近にインドへの渡航歴が有り、野生鳥獣肉の喫食歴は無かったが、2020年に広島県内で発生したE型肝炎による食中毒と疑われる事例では、患者にはイノシシの精肉及び内臓の喫食歴があった。2020年のE型肝炎患者から検出されたHEVと本調査で検出されたHEVとは塩基配列が異なったが、遺伝子型は3型に属したことから、広島県内のイノシシにおいて3型のE型肝炎ウイルスが浸潤している可能性が考えられた。

ま と め

今回初めて広島県内で捕獲されたイノシシ及びシカのE型肝炎ウイルスの保有状況調査を実施し、広島県内に生息する野生イノシシがE型肝炎ウイルスを保有していることが明らかになり、保有している遺伝子型は3型であった。国際的な食の安全管理強化の流れを受けて、2021年6月までにジビエ処理施設を含むすべての食品等事業者がHACCPに沿った衛生管理の実施が義務づけられることになった。食品の国際的な衛生管理手法であるHACCPの導入により、国内産ジビエが将来的に衛生管理の厳しい海外でも受け入れやすくなる可能性もある。E型肝炎ウイルスの感染リスクを回避するためには、適切な前処理や、調理時の十分な加熱が重要になるが、今回の調査により県内に生息する野生イノシシを介してE型肝炎に感染するリスクが示されたことから、E型肝炎ウイルスによる健康被害の予防について、関係機関と協力し県民に対するより一層の周知徹底が重要であると思われた。

文 献

- [1] 福永真治, 押部智宏, 他. 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-兵庫県. 病原微生物検出情報. 2005, 26, 264-265.
- [2] 農林水産省. “捕獲鳥獣のジビエ利用を巡る最近の状況(令和4年8月)”. <https://www.maff.go.jp/j/nousin/gibier/suishin.html>, 2022-10-1.
- [3] 国立感染症研究所. E型肝炎検出マニュアル(第2版)(平成30年12月). <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/HEV181207.pdf>, 2018-12-7.
- [4] Jothikumar N, Cromeans TL, et al. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for

rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. J Virol Methods. 2006, 131, 65-71.

- [5] Mizuo H, Suzuki K, et al. Polyphyletic strains of hepatitis E virus are 17 responsible for sporadic cases of acute hepatitis in Japan. J Clin Microbiol. 2002, 40, 3209-3218.
- [6] Kumar S, Stecher G, et al. : MEGA X : Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol Biol Evol. 2018, 35 (6), 1547-1549.
- [7] 前田健. 野生鳥獣における病原ウイルスの保有状況に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進事業研究推進事業)野生鳥獣由来食肉の安全性の確保とリスク管理のための研究(平成30年~令和2年度): 令和2年度における食品衛生にかかわる分野の報告. 食品衛生研究. 2022, 72, 11-20.
- [8] 原田誠也, 田中智之, 他. 厚生科学労働研究補助金(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」. 2012, 255-262.
- [9] 佐々木美江, 小泉光, 他. 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. 日本食品微生物学会雑誌. 2019, 36 (4), 159-164.
- [10] 高井伸二. “平成23~25年度厚生労働科学研究「野生鳥獣由来食肉の安全性確保に関する研究」”. <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzentu/0000052751.pdf>, 2020-10-27.