短　報

2006年3月～2008年3月に群馬県で捕獲された野生イノシシのE型肝炎ウイルス保有状況

石岡大成[1)†]　坂野智恵子[2)]　杢代俊枝[1)]　横田陽子[2)]　坂庭浩之[3)]
森田幸雄[4)]　長井　章[5)]　星野利得[1)]

1）群馬県食肉衛生検査所（〒370-1103　佐波郡玉村町樋越305-7）
2）群馬県衛生環境研究所（〒371-0052　前橋市上沖町378）
3）群馬県環境森林部自然環境課（〒371-8570　前橋市大手町1-1-1）
4）東京家政大学栄養学科（〒173-8602　板橋区加賀1-18-1）
5）群馬県保健福祉部（〒371-8570　前橋市大手町1-1-1）

（2010年3月31日受付・2010年9月14日受理）

要　　約

2006年3月～2008年3月に，群馬県における野生イノシシのHepatitis E virus（HEV）感染状況について調査した．野生イノシシ血清における抗HEV IgG陽性率およびHEV遺伝子の検出率は，それぞれ3.4％（3/87），2.1％（3/140）であった．3頭の野生イノシシからそれぞれ検出されたHEV遺伝子はすべて同一の配列を示し，それらはGⅢ型に分類された．また，過去の群馬県における調査において，肥育豚から検出されたHEV遺伝子と，その飼育場所と近接した場所で捕獲された野生イノシシから検出されたHEV遺伝子とは，遺伝学的にも比較的近縁であった．本県においても，HEV感染野生イノシシが存在することから，野生イノシシや豚の肉や内臓の生食することは，人へのHEV感染の伝播経路となりうることが示唆された．

――キーワード：抗HEV IgG抗体価，E型肝炎ウイルス，野生イノシシ．

---------- 日獣会誌　64，67～70（2011）

Hepevirus属に分類されるHepatitis E virus（HEV）は，公衆衛生上重要な疾病であるE型肝炎を人に引き起こすウイルスである［1］．HEVは，これまでアジア，アフリカ，中南米などの比較的衛生状態の良くない発展途上国で流行しており，ウイルスに汚染された飲料水がおもな感染経路であることから，多雨地域では洪水の後などに流行する［1］．

近年の報告によると，HEVは遺伝学的にGⅠ，GⅡ，GⅢおよびGⅣの4つの遺伝子型に区別され［2］，アジアやアフリカではおもにGⅠ型が，メキシコやナイジェリアではGⅡ型が流行している．わが国で検出されるHEVは，主としてGⅢおよびGⅣ型であるが，海外渡航歴のない急性肝炎患者から分離されることから［3-5］，イノシシやシカなどの野生獣畜の肉や肝臓の生食が感染源として考えられている［5, 6］．いっぽう，群馬県においては，生息数は不明であるが，有害獣畜として，近年年間約3,000頭の野生イノシシを捕獲しており（群馬県環境森林部データ），これらの野生イノシシを利用した地域振興として，野生イノシシ肉の食肉処理施設が県内に新設された．これらのことから，Sakanoら［7］が野生イノシシおよび肥育豚のHEV感染状況調査を実施し，GⅢ型のHEVを検出している．そこで今回，Sakanoらの調査を継続し，当該食肉処理施設に搬入される野生イノシシを対象として，抗HEV IgG抗体価の測定およびHEV遺伝子の検出を試みた．

材料および方法

検体：2006年3月から2008年3月まで，群馬県内で捕獲された野生イノシシ140頭の血液を滅菌遠心管に採取した．これらの血液を1,900×g，20分間遠心処理し

† 連絡責任者：石岡大成（群馬県食肉衛生検査所）
〒370-1103　佐波郡玉村町樋越305-7　　☎0270-65-2135　FAX 0270-65-2869
E-mail : ishioka-taisei@pref.gunma.jp

て得られた血清を検体として用いた．2006年3月から2007年5月に採取した87頭の血清については，抗体保有状況調査とHEV RNA遺伝子検査を，2007年6月～2008年3月に採取した53頭については，検体量が不足してためHEV RNA遺伝子検査のみを実施した．

抗体保有状況調査：87頭（2006年3月から2007年5月まで採材分）の血清についてELISA法により抗HEV IgGを測定した．ELISA法については，GⅠ型HEVの構造蛋白を昆虫由来細胞で発現させた抗原を用いたSakanoら［7］の方法に従って実施した．

HEV RNA遺伝子検査法および解析法：2006年3月から2008年3月採材分の血清（140頭）の140μlを逆転写PCR（RT-PCR）およびシークエンス用サンプルとし，total RNA抽出には，遺伝子抽出キット（QIAamp Viral RNA Mini kit, QIAGEN, U.S.A.）を用いた．HEV遺伝子の検出については，ORF1領域の326ntを増幅するTakahashiら［8］の方法に準じて実施した．増幅後は電気泳動により増幅産物を確認した．増幅産物の塩基配列の決定後は，分子疫学的解析を実施するために，CLUSTAL WおよびTreeExplorer（Ver. 2.12）を利用し，近隣結合（NJ）法により分子系統樹を作成した．

成　　績

野生イノシシのHEV感染状況：野生イノシシ87頭の

表1　野生イノシシの抗HEV IgG陽性率およびHEV遺伝子検出率

採材期間	性　別	サンプル数	IgG陽性数（%）	HEV検出数（%）
2006.3～2007.5	雄	32	1（3.1）	0（0）
	雌	44	2（4.5）	0（0）
	不　明	11	0（0）	0（0）
	小　計	87	3（3.4）	0（0）
2007.6～2008.3	雄	0	—[a)]	—
	雌	0	—	—
	不　明	53	NT[b)]	3（5.7）
	合　計	140	—	3（2.1）

a）該当せず　　b）試験せず

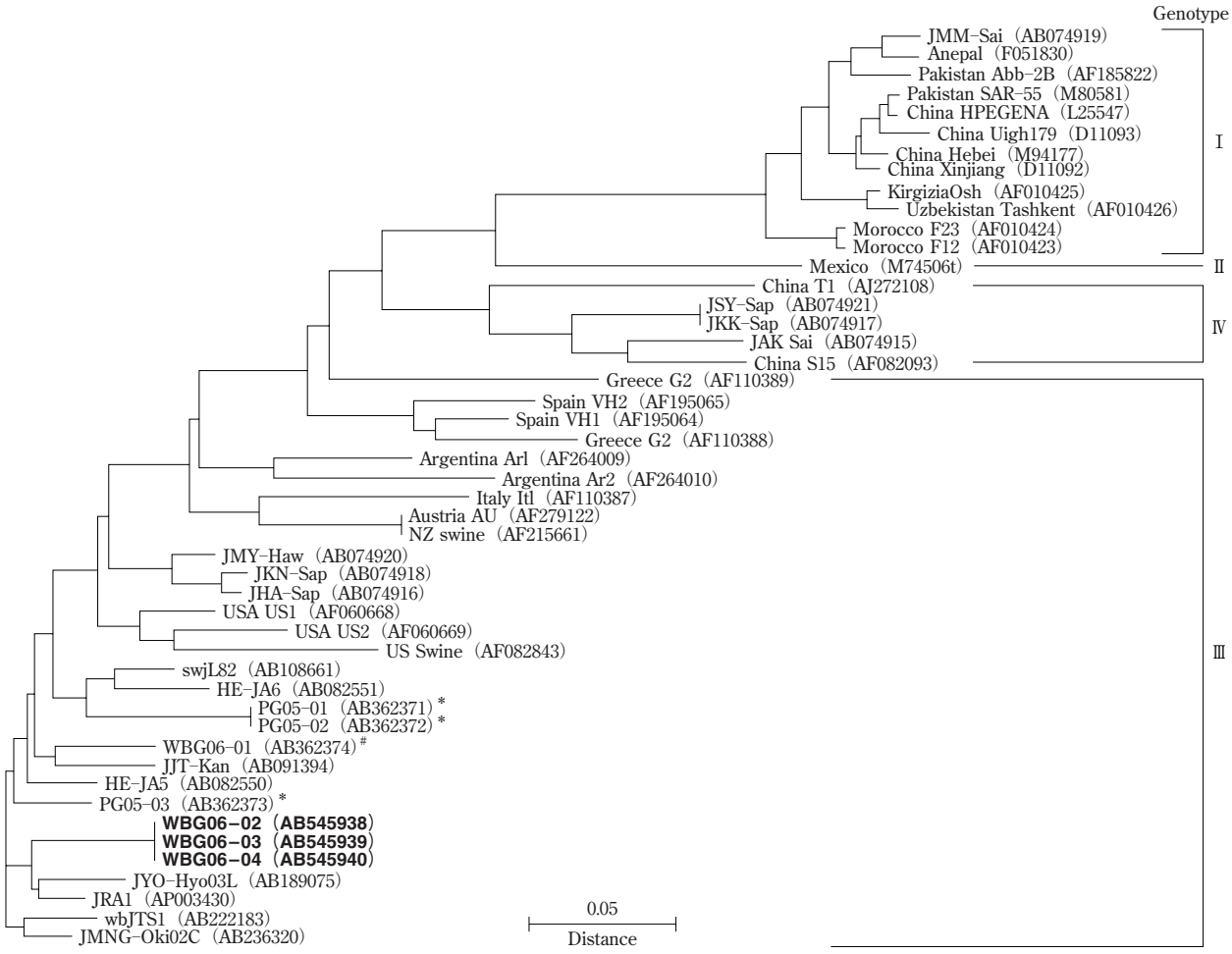

図1　ORF1領域（326nt）に基づく分子系統樹

＊および#は，Sakano（2009）ら［7］の報告で，それぞれ肥育豚および野生イノシシから検出されたHEV遺伝子；太字は本研究で野生イノシシから検出されたHEV遺伝子

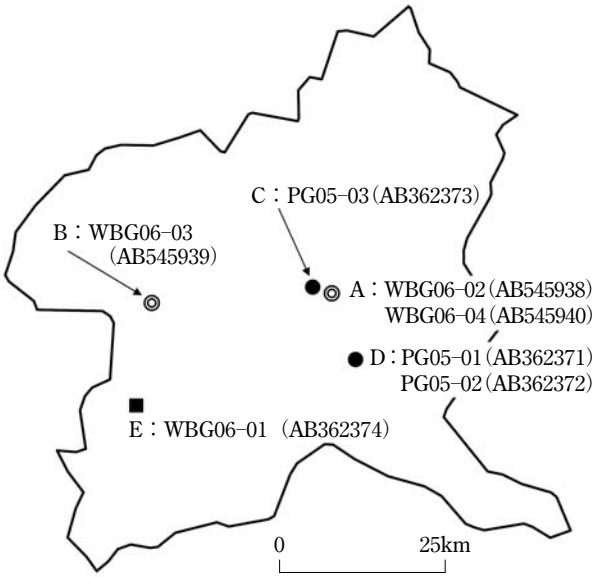

図2　HEV遺伝子が検出された野生イノシシおよび豚の捕獲場所

◎のAとBは本調査でHEVが検出された野生イノシシの捕獲場所，Sakano（2009）ら［7］の報告で●のCとDはHEVが検出された豚の飼育場所，■はHEVが検出された野生イノシシの捕獲場所

血清中，3頭（3.4％）が抗HEV IgG陽性を示した（表1）．また，140頭中3頭（2.1％）からHEV遺伝子が検出された．HEV遺伝子が検出された3頭の野生イノシシについては，個体番号を，それぞれWBG06-02（雌，体重53kg），WBG06-03（雄，体重74kg），およびWBG06-04（雄，体重45kg）とした．

検出されたHEV遺伝子の分子疫学的解析：日本および国外で検出されたHEVのORF1領域における分子系統樹を図1に示した．これらのHEV遺伝子は，4種の遺伝子型に分類されることが報告されており［2］，今回3頭の野生イノシシから検出された遺伝子WBG06-02，WBG06-03およびWBG06-04の配列（それぞれのGenBank Accession番号は，AB545938，AB545939およびAB545940）は，すべて同一であり，遺伝子型はすべてGⅢ型に分類された．

考　　察

今回の調査において，野生イノシシにおけるIgG陽性率は3.4％（3/87），HEV遺伝子（GⅢ型）検出率は2.1％（3/140）であった．2004年9月～2006年3月に捕獲された野生イノシシの血清で実施したSakanoら［7］の報告では，それぞれ，4.5％（4/89）および1.1％（1/89）であったことから，今回の調査時期についても，Sakanoら［7］の調査時期とほぼ同様の状況であったということが明らかとなった．いっぽう，Sonodaら［9］は，野生イノシシの抗HEV IgG陽性率は8.6％（3/35），HEV遺伝子（GⅢ型）の検出率は2.9％（1/35）であると報告し，Machitakaら［10］は，それぞれ，25.5％（100/392）および3.1％（12/392）であると報告している．Sakanoら［7］および今回の調査におけるIgG陽性率およびHEV遺伝子の検出率が，これらの報告よりも低い値を示したことから，本県における野生イノシシのHEV感染率は，2004年～2008年までは，他の地域よりも比較的低い状態で維持されていることが示唆された．しかしながら，わが国におけるHEV GⅢ型は，種々の動物から非常に多く検出されており［3-5, 11］，今回検出されたHEV遺伝子もすべてGⅢ型であったことから，野生イノシシとの過度の接触，肉および内臓の生食は，人へのHEVの感染源となりうることが示唆された．また，Sakanoら［7］の調査では，IgG陽性率は肥育豚で高い傾向を示したが，豚の飼育形態の多くは数10頭単位の集団方式であることから，肥育豚はHEVに集団感染し，さらには潜在的なリザーバーとしての役割を果たしていることが危惧された［12, 13］．

いっぽう，Sakanoら［7］の調査では，肥育豚からHEV遺伝子（GⅢ型）を検出している（AB362373）が，今回の調査でHEV遺伝子が検出された野生イノシシのうちの2頭（WBG06-02およびWBG06-04）は，この肥育豚の飼育場所と非常に近接した地域で捕獲されており（図2），採材時期に数年の時間差があるにもかかわらず，遺伝学的にも比較的類縁であった．これらのことから，野生イノシシおよび豚の相互接触の要因が環境中に存在することが考えられた．また，地理的に離れた場所から検出されたHEV遺伝子も同一であったことから，野生イノシシが住みかや餌を求めて移動することと関連があるものと考えられたが，詳細については今後の調査が必要であると思われた．

以上のことから，人へのHEV感染を防止するためには，野生イノシシおよび人の感染源に関するより詳細なかつ継続的な調査が必要であり，さらには，野生イノシシなどの肉や内臓の生食防止に関する啓発活動を行うことが重要である．今後は，これらの調査とあわせて，シカに関する調査も実施する意向である．

引　用　文　献

［1］Emerson SU, Purcell RH : Hepatitis E virus, Fields Virology, Knipe DM, et al eds, 5th ed, 3047-3058, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia (2007)

［2］Schlauder GG, Mushahwar IK : Genetic heterogeneity of hepatitis E virus, J Med Virol, 65, 282-292 (2001)

［3］Mizuo H, Suzuki K, Takikawa Y, Sugai Y, Tokita H, Akahane Y, Itoh K, Gotanda Y, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H : Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic cases of acute

hepatitis in Japan, J Clin Microbiol 40, 3209–3218 (2002)
[4] Takahashi K, Iwata K, Watanabe N, Hatahara T, Ohta Y, Baba K, Mishiro S : Full-genome nucleotide sequence of a hepatitis E virus strain that may be indigenous to Japan, Virology, 287, 9–12 (2001)
[5] Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S : Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings, Lancet, 362 (9381), 371–373 (2003)
[6] Masuda J, Yano K, Tamada Y, Takii Y, Ito M, Omagari K, Kohno S : Acute hepatitis E of a man who consumed wild boar meat prior to the onset of illness in Nagasaki, Japan, Hepatol Res, 31, 178–183 (2005)
[7] Sakano C, Morita Y, Shiono M, Yokota Y, Mokudai T, Sato-Motoi Y, Noda A, Nobusawa T, Sakaniwa H, Nagai A, Kabeya H, Maruyama S, Yamamoto S, Sato H, Kimura H : Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars (Sus scrofa leucomystax) and pigs in Gunma Prefecture, Japan, J Vet Med Sci, 71, 21–25 (2009)
[8] Takahashi M, Nishizawa T, Yoshikawa A, Sato S, Isoda N, Ido K, Sugano K, Okamoto H : Identification of two distinct genotypes of hepatitis E virus in a Japanese patient with acute hepatitis who had not travelled abroad, J Gen Virol, 83, 1931–1940 (2002)
[9] Sonoda H, Abe M, Sugimoto T, Sato Y, Bando M, Fukui E, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H : Prevalence of hepatitis E virus (HEV) Infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan, J Clin Microbiol, 42, 5371–5374 (2004)
[10] Michitaka K, Takahashi K, Furukawa S, Inoue G, Hiasa Y, Horiike N, Onji M, Abe N, Mishiro S : Prevalence of hepatitis E virus among wild boar in the Ehime area of western Japan, Hepatol Res, 37, 214–220 (2007)
[11] Nishizawa T, Takahashi M, Endo K, Fujiwara S, Sakuma N, Kawazuma F, Sakamoto H, Sato Y, Bando M, Okamoto H : Analysis of the full-length genome of hepatitis E virus isolates obtained from wild boars in Japan, J Gen Virol, 86 (PT 12), 3321–3326 (2005)
[12] Leblanc D, Ward P, Gagné MJ, Poitras E, Müller P, Trottier YL, Simard C, Houde A : Presence of hepatitis E virus in a naturally infected swine herd from nursery to slaughter, Int J Food Microbiol, 117, 160–166 (2007)
[13] Takahashi M, Nishizawa T, Miyajima H, Gotanda Y, Iita T, Tsuda F, Okamoto H : Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus, J Gen Virol, 84, 851–862 (2003)

Detection and Genomic Analysis of Hepatitis E Virus Isolates from Wild Boars in Gunma Prefecture, Japan

Taisei ISHIOKA*†, Chieko SAKANO, Toshie MOKUDAI, Yoko YOKOTA, Hiroyuki SAKANIWA, Yukio MORITA, Akira NAGAI and Toshie HOSHINO

** Gunma Meat Inspection Laboratory, 305–7 Higoshi, Tamamura, Sawa, 370–1103, Japan*

SUMMARY

The prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars in Gunma Prefecture, Japan was serologically and genetically examined from March 2006 to March 2008. The positive detection rates of IgG antibodies against HEV and HEV RNA in wild boars were 3.4% (3/87) and 2.1% (3/140), respectively. A phylogenetic analysis revealed that all of the HEV ORF1 genes detected in the present study showed the same sequences and belonged to genotype Ⅲ. In addition, in a phylogenetic analysis, HEV genes detected from fattening pigs in the past study in Gunma Prefecture exhibited a significant vicinal character to those from the wild boars in this study that inhabited an area neighboring the HEV RNA-positive pig in the prior study. In Gunma Prefecture, HEV is comparatively widespread in wild boars, and uncooked meat or liver may be a potential vehicle for transmitting HEV to humans. —— Key words : anti-HEV IgG, hepatitis E virus, wild boar.

† *Correspondence to : Taisei ISHIOKA (Gunma Meat Inspection Laboratory)*
305–7 Higoshi, Tamamura, Sawa, 370–1103, Japan
TEL 0270–65–2135 FAX 0270–65–2869 E-mail : ishioka-taisei@pref.gunma.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 64, 67～70 (2011)