

3 調査研究

3・1 報 文

1) 県内のイノシシ肉等からの E 型肝炎ウイルスの検出状況

西村 浩一 原田 誠也

要 旨

熊本県内のイノシシ及びシカ肉等からの E 型肝炎ウイルス遺伝子の検出を RT-PCR 法により行った。その結果、約 10%のイノシシが E 型肝炎ウイルスに感染していることがわかり、イノシシ肉の生食または加熱不十分の摂食により E 型肝炎に感染する可能性が高いことが示唆された。また、PCR 産物の RFLP 結果からイノシシが保有している E 型肝炎ウイルスはその地域に特有の遺伝子を持っていることが確認された。

キーワード：E 型肝炎ウイルス, イノシシ, RT-PCR, RFLP

はじめに

E 型肝炎ウイルス（以下、「HEV」と略す。）は、約 7,200 塩基の 1 本鎖(+)RNA をゲノムとする直径約 30nm の球形粒子であり、血清型は 1 種類であるが、遺伝子型としては 1 型から 4 型までの 4 種類が知られている。

E 型肝炎は、発展途上国においては水系感染で集団発生を起こすことが知られている¹⁾。しかし、先進国においては輸入感染症と考えられていたが国内感染と考えられる事例²⁾が発生し、HEVはその地域に土着していることが明らかになっている³⁾⁴⁾。

国内感染は、イノシシやシカの肉の生食²⁾または加

熱不十分のままの摂食が原因と考えられるが、本県でもイノシシやシカの肉が流通していることから、当該肉の HEV による汚染状況を調査することは、食の安全・安心の観点から非常に重要なことである。

調査方法

1 検査材料

県内の狩猟業者から買い取ったイノシシ及びシカの筋肉、肝臓及び血液 289 検体を検査材料とした。調査した検体の内訳を表 1 に示した。

2 HEV 遺伝子の抽出

表 1 調査検体数

捕獲場所	イノシシ				シカ				合計
	筋肉	肝臓	血液	計	筋肉	肝臓	血液	計	
八代・宇城地域	12	31	3	46		19	6	25	71
人吉・球磨地域	20	20	20	60	27	27	20	74	134
天草地域	40	35	9	84				0	84
計	72	86	32	190	27	46	26	99	289

表 2 HEV 遺伝子陽性数

捕獲場所	イノシシ				シカ				合計
	筋肉	肝臓	血液	計	筋肉	肝臓	血液	計	
八代・宇城地域		1		1				0	1
人吉・球磨地域	2	5	4	11				0	11
天草地域		5		5				0	5
計	2	11	4	17	0	0	0	0	17

筋肉及び肝臓は、解剖用ハサミで細切し、PBS(-)で50%乳剤とした後に、また、血液はそのままの状態です。10,000rpm, 10 分間遠心し遠心上清の 50 μ l を用いて AGPC 法により HEV の RNA 抽出を行った。抽出した RNA は 20 μ l の DEPC 水に溶解し、cDNA を作製するための鋳型として用いた。

3 RT-PCR 法による HEV 遺伝子の検出

抽出した RNA から Random primer 法で cDNA を作製し、HEV 遺伝子の ORF2 領域を増幅するプライマーセット HEV-F1 (5'-TAYCGHAAAYCAAGGHTGGCG-3') 及び HEV-R2 (5'-TGTYGGTTRTCRTARTCCTG-3') (R=A or G; Y=C or T; H=A or T or C)を用いて 1st PCR を、HEV-F2 (5'-GGBGTBGCNGAGGAGGAGGC-3') 及び HEV-R1 (5'-CGACGAAATYAATTCTGTCG-3') (B=G or T or C; N=A or C or G or T)を用いて Nested PCR を行い、電気泳動で産物の位置(1st PCR; 584bp, Nested PCR; 378bp)を確認した。1st 及び Nested PCR 反応は、96 $^{\circ}$ C 1分, 96 $^{\circ}$ C 30秒; 55 $^{\circ}$ C 45秒; 72 $^{\circ}$ C 1分を 30 サイクル, 72 $^{\circ}$ C 7分の条件で GeneAmp PCR System 9700(Applied Biosystems)を用いて行った。

4 Nested PCR 産物の RFLP

Nested PCR 産物を電気泳動した後、HEV 遺伝子の増幅産物バンドの位置をゲルから切り出し、自家製スピンカラムを用いてゲルから DNA(増幅遺伝子断片)を溶出させた後、フェノール抽出により DNA を精製した。

精製した DNA の 5 μ l を制限酵素(*Hha* I, *Sac* I 及び *Sty* I) 10U と反応させ、それぞれの制限酵素の認識部位で切断を行った。

結果及び考察

1 RT-PCR 法による検査

289 検体を検査した結果を表 2 に示した。HEV 遺伝子は、シカ 99 検体(46 頭)からは検出されなかったが、

イノシシ 190 検体(118 頭)中 17 検体(12 頭)から検出された。HEV 遺伝子が検出された部位は肝臓が 11 検体と一番多かった。また、筋肉、肝臓及び血液が揃った 20 頭のイノシシのうち、2 頭で筋肉、肝臓及び血液の全てから、1 頭で肝臓及び血液から HEV 遺伝子が検出された。

本県内のイノシシにおける HEV 保有率は 10.2%であった。一方、福岡県保健環境研究所の調査では、福岡県内のイノシシの HEV 保有率は 12.8%であったと報告している⁵⁾。このことから、九州地区のイノシシは 10%程度の割合で HEV に感染していると推測された。

2 RFLP 法による Nested PCR 産物の切断解析

Nested PCR 産物の制限酵素 *Hha* I, *Sac* I 及び *Sty* I による切断解析の結果を図 1 及び表 3 に示す。切断パターンは図 1 及び表 3 に示すとおり、*Hha* I が A, B 及び C の 3 種類、*Sac* I と *Sty* I は A 及び B の 2 種類に分類された。*Hha* I ではパターン A は切断なし、パターン B は同じ程度のサイズ(約 190bp)に切断、パターン C は約 210bp 及び 170bp の 2 本に切断された。*Sac* I ではパターン A は切断なし、パターン B は約 250bp 及び 120bp の 2 本に切断された。また、*Sty* I では約 330bp と泳動像でははっきりしないが約 50bp に切断された。表 3 に示すように、*Hha* I, *Sac* I 及び *Sty* I を用いた RFLP により、本県で確認された HEV 遺伝子は八代・宇城地域のイノシシが AAA、天草地域のイノシシが主に BBB 及び人吉・球磨地域のイノシシが CAA の 3 種類のパターンに分類された。

日本で分離され全塩基配列が解読されている HEV のうち 45 株(遺伝子型 G3;30 株及び G4;15 株, Accession No.; AB073912, AB074915, AB074917, AB074920, AB089824, AB091394, AB091395, AB097811, AB097812, AB099347, AB189070, AB189071, AB189072, AB189074, AB193177, AB193178, AB200239, AB220971, AB220972,

AB220975, AB220978, AB220979, AB222182, AB222183, AB222184, AB236320, AB248520, AB248521, AB248522, AB291951, AB291952, AB291953, AB291954, AB291957, AB291958, AB291959, AB291960, AB291961, AB291962, AB291963, AB291964, AB291965, AB291967, AB292955, AB292956)の本調査で実施したNested PCR 増幅領域の *Hha* I, *Sac* I 及び *Sty* I での切断サイズを調べたところ、

それぞれ表 4~6 のとおりであった。

表 4~6 に示すように HEV の genotype 3 及び genotype 4 は、*Hha* I によりそれぞれ 10 種類及び 6 種類、*Sac* I により 3 種類及び 2 種類、*Sty* I により 2 種類及び 4 種類の切断パターンがあることが確認された。特に、*Hha* I は 6 塩基を認識する *Sac* I 及び *Sty* I と違い 4 塩基を認識するため切断箇所が必然的に多くなっている。

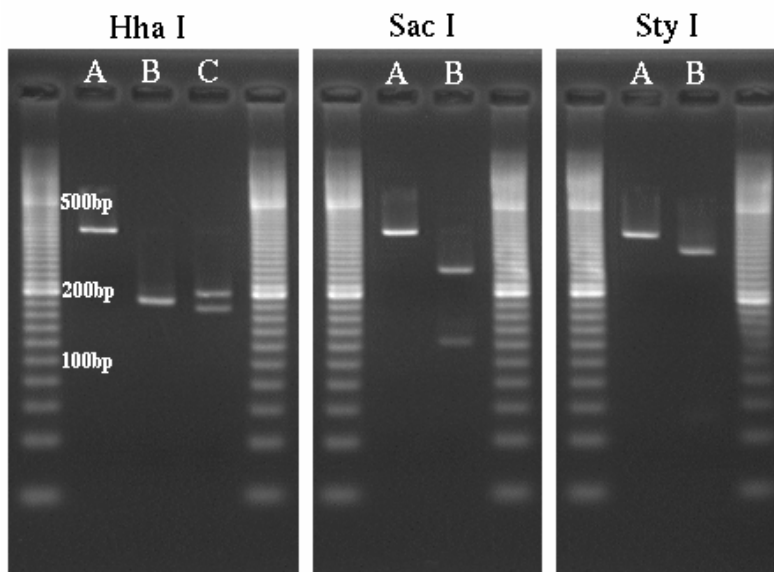


図 1 制限酵素による切断解析結果

表 3 制限酵素による切断パターン

個体 番号	部位	制限酵素			パターン	捕獲地域
		<i>Hha</i> I	<i>Sac</i> I	<i>Sty</i> I		
1	肝臓	A	A	A	AAA	八代・宇城地域
2	肝臓	B	B	B	BBB	天草地域
3	肝臓	B	B	B	BBB	天草地域
4	肝臓	B	B	B	BBB	天草地域
5	肝臓	B	B	B	BBB	天草地域
6	肝臓	B	B	B	BBB	天草地域
7	肝臓	B	B	B	BBB	人吉・球磨地域
7	血液	B	B	B	BBB	人吉・球磨地域
8	筋肉	C	A	A	CAA	人吉・球磨地域
8	肝臓	C	A	A	CAA	人吉・球磨地域
8	血液	C	A	A	CAA	人吉・球磨地域
9	筋肉	C	A	A	CAA	人吉・球磨地域
9	肝臓	C	A	A	CAA	人吉・球磨地域
9	血液	C	A	A	CAA	人吉・球磨地域
10	肝臓	C	A	A	CAA	人吉・球磨地域
11	肝臓	C	A	A	CAA	人吉・球磨地域
12	血液	C	A	A	CAA	人吉・球磨地域

表4 *Hha* I による切断パターン

genotype	切断サイズ	株数
G3	127, 115, 96, 40	2
	175, 107, 96	1
	175, 109, 94	1
	175, 117, 86	1
	203, 167, 8	1
	203, 175	7
	211, 127, 40	1
	211, 167	12
	251, 127	1
	切断なし	3
G4	129, 117, 72, 63, 2	1
	164, 124, 63, 23, 2, 2	6
	187, 175, 14, 2	1
	187, 94, 70, 23, 2, 2	1
	189, 124, 63, 2	5
	189, 187, 2	1

また, *Sac* I 及び *Sty* I が genotype 3 と genotype 4 で同じサイズに切断されることがあるのに対して, *Hha* I では同じサイズに切断されることがないことがわかった。このことは, *Hha* I を用いる RFLP を利用して HEV の genotype 3 と genotype 4 を区別できる可能性を示している。

表4に示した切断パターンと本県で検出された HEV 遺伝子の *Hha* I での切断パターンとを比較すると, genotype 3 で切断されない例はパターン A に, 211bp 及び 167bp の 2 本に切断される例はパターン C に, genotype 4 の 189bp, 187bp, 2bp はパターン B に該当するのではないかと考えられる(それぞれの切断例は表4中に網掛けで示した)。これらことから, HEV 遺伝子 PCR 産物の RFLP で確認されたパターン AAA 及び BBB は genotype 3, パターン CAA は genotype 4 の HEV ではないかと推定された。

まとめ

本調査により, イノシシの 10%程度が HEV に感染していることが確認された。さらに, HEV 遺伝子は肝臓及び血液に加え筋肉からも検出され, 生食又は加熱不十分な肝臓以外の食肉部位を摂取することでも HEV の感染を受ける可能性があることがわかった。

今回の調査では, シカ肉から HEV 遺伝子は検出されなかったが, わが国においては過去にシカからの感染事例もあり, 今後も, シカ肉の調査を引き続き行う

表5 *Sac* I による切断パターン

genotype	切断サイズ	株数
G3	230, 148	4
	253, 125	1
	切断なし	25
G4	253, 125	8
	切断なし	7

表6 *Sty* I による切断パターン

genotype	切断サイズ	株数
G3	330, 48	9
	切断なし	21
G4	282, 48, 48	3
	282, 96	4
	330, 48	7
	切断なし	1

ことにしている。

また, Nested PCR 産物の RFLP で genotype の判定ができることが示唆されたが, 今後, 本県で検出された HEV 遺伝子のシーケンスを行うことによりこのことを確認する予定である。

謝辞

本調査に協力していただいた八代保健所, 人吉保健所及び天草保健所の諸氏に心より感謝します。

文献

- 1) Hazel T. Maila, Sheila M. Bowyer, and Robert Swanepoel: *J. Gen. Virol.*, 85, 89-95 (2004).
- 2) Hiroyuki Matsuda, Katsuo Okada, Kazuaki Takahashi, and Shunji Mishiro: *J. Infect. Dis.*, 188, 944 (2003).
- 3) Tsutomu Nishizawa, Masaharu Takahashi, Hitoshi Mizuo, Haruko Miyajima, Yuhko Gotanda, and Hiroaki Okamoto: *J. Gen. Virol.*, 84, 1245-1251 (2003).
- 4) Tsutomu Nishizawa, Masaharu Takahashi, Kazunori Endo, Shinji Fujiwara, Nobuo Sakuma, Fumiaki Kawazuma, Hirotsugu Sakamoto, Yukihiro Sato, Masashi Bando, and Hiroaki Okamoto: *J. Gen. Virol.*, 86, 3321-3326 (2005).
- 5) 石橋哲也, 中山志幸, 江藤良樹, 世良暢之, 千々和勝己: 福岡県環境研究所年報, 35, 90-92(2008).

