

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580427

研究課題名(和文) 家畜と野生動物間におけるE型肝炎ウイルスの感染動態の解明

研究課題名(英文) Epidemiological study on Hepatitis E virus in wild and domestic animals

研究代表者

萩原 克郎 (HAGIWARA, Katsuro)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号：50295896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：野生動物におけるE型肝炎の疫学調査を実施した。その結果、調査したエゾシカ629頭中約47%の個体の肝臓からHEV遺伝子が検出され、12%個体の糞便中にウイルス遺伝子を認めた。また、本州に生息するハクビシンについても調査を実施したところ、肝臓で53%、糞便中30%のウイルス遺伝子を検出し、これらの野生動物には常在してウイルスが感染していることが示唆された。また、シカHEVは、ブタへの感染実験で伝達可能であり、一部の個体の糞便からHEVウイルスが分離され、感染性ウイルス排泄を確認した。

研究成果の概要(英文)：We conducted an epidemiological survey of the hepatitis E virus in the wild animal. As a result, a HEV-RNA was detected in approximately 47% of individual livers out of 629 Yezo deer (*Cervus nippon yesoensis*) which we investigated and showed a viral gene in 12% more individual feces. Also, after investigating the palm civet (*Paguma larvata*) which inhabited Honshu, we detected the viral genome of 30% in feces, 53% in liver. It was suggested that a HEV habitually resided to these wild animals. Also, the deer HEV was transmitted by the experimental infection to a pig, and HEV was isolated from the feces of some individuals and confirmed infectious viral excretion from the infected deer.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用獣医学/人獣共通感染症

キーワード：E型肝炎ウイルス 野生動物 疫学調査

1. 研究開始当初の背景

E型肝炎ウイルス(HEV)は、ブタやイノシシ、野生のシカやなどの動物で感染が確認され、その動物の肉を生食(不十分な加熱処理)することによってヒトにも感染する人畜共通感染症の原因ウイルスである。E型肝炎は、HEVがヒトに感染することで発症する肝炎であるが、臨床的肝炎症状を呈するのは、ヒトのみである。HEV感受性が高くウイルス増殖性の良いブタでは臨床的肝炎は認められない。疫学的知見からHEVは、日本の養豚の大多数が感染し無症状でウイルスを長期に排泄している。また、日本赤十字社のHEV検査成績から一定のドナー血液に抗体・ウイルスが検出され、ヒトへのHEV感染が一定頻度で起こっていることを示唆している。本ウイルス感染対策には、獣医領域を含め異分野連携による対策が必要といえる。その対象動物は、ブタのみならず畜産施設に出入りする野生動物(鹿、熊、アライグマ、ドブネズミ等)にも視野を広げ、疫学調査と感染実験によるウイルス動態を明らかにしていくことが重要である。本研究は、ヒト・家畜と生息環境を共有する野生動物の感染状況を明らかにする事を目的とした。

2. 研究の目的

人獣共通感染症であるHEVに感染しウイルス増殖の良いブタを対象として炎症マーカーや免疫応答を調べ、宿主からのウイルス排泄ならびに病理学的基礎検討を実施した。さらに、ヒト・家畜と生息環境を共有する野生動物の感染状況を明らかにする目的で家畜のみならず野生動物におけるウイルス排泄動態を明らかにし、今後の公衆衛生対策としての疫学調査ならびに基礎研究を実施した。

3. 研究の方法

HEV株間における免疫病態: 家畜におけるHEV感染病原性を理解するにあたり、我が国に広く分布するウイルス遺伝子型の豚における増殖性、病原性を比較する為にブタ感染モデルを用いて実施した。:これまでに申請者が、日本国内で野外分離したGenotypeの異なるHEV株4種類HEV_{swJB-E10(G3sp)}、HEV_{swJB-M8(G3us)}、HEV_{swJB-P5(G3jp)}、HEV_{swJB-H7(G4jp)}を 10^6 copies/head/ivでブタ(SPF, 6週齢)に感染させ、HEV株の違いによる血清中サイトカイン(IFN- α , IL-1b, IL-6, IL-8)及び肝機能マーカーALTの推移を調べた。肝臓については病理学的比較解析を実施した。

野生動物における感染疫学: 野生動物における生息分布とHEV感染状況を調べる目的から、野生動物捕獲と収集を行い5種(シカ、アライグマ、ハクビシン、マングース、コウモリ)のサンプルを入手した。エゾシカについては、総捕獲数629頭について肝臓、直腸内容物からのHEV ORF-1領域の検出をRT-PCR法で実施した。本州で捕獲されたハクビシン30頭について、HEVの遺伝子検出を上記方法で実施した。

シカ由来HEVの家畜(ブタ)への感染伝播: HEV陽性であったエゾシカ肝臓組織を4頭のミニ豚(10週齢)に経口投与(約30g)して、定期的にブタ糞便中ウイルスの検出を試み、その後剖検し体内のウイルス分布を検査した。さらに、エゾシカ糞便サンプルからA549細胞を用いてウイルス分離を試み、培養細胞中のウイルス検出をRT-PCR法で確認し一部の遺伝子配列を確認した。

4. 研究成果

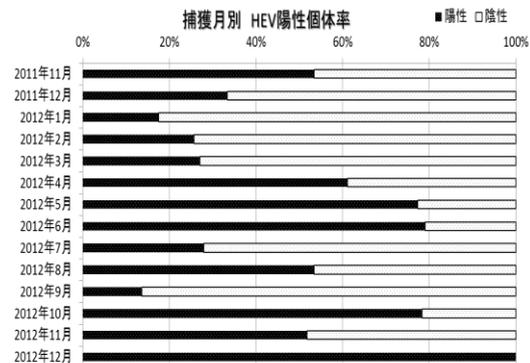
HEV株間における免疫病態: 各株間のウ

ウイルス排泄を比較した結果 HEV swJB-E10(G3sp)株が他の3株よりも1日早い2dpiで糞便内へのHEV排出が認められた。G3sp株およびG4jp株では、血中の出現が早く3dpiであった。HEV感染(4-9dpi)に伴い血中のALT値は一過性に上昇したが、いずれの株においても正常値を逸脱するに至らなかった。HEV G3usは、臓器(肝臓・消化管)での増殖レベルが高い傾向が示された。血清中サイトカインは、感染前の値と比較していずれのサイトカインも顕著な上昇は認められず炎症を示唆する結果は認められなかった。すべての感染個体(8-14dpi)の肝臓の組織において壊死病変が認められた。肝臓の壊死病変の程度はHEV株間で異なる傾向を示し(内側右葉1cm²区画における壊死病変数の平均値は9.3~16.7箇所)、G3sp株で壊死病変数(16.7)が多く観察された。ヒトにおいては、G4型の劇症肝炎罹患率が高いとの報告もあるが、本研究においてはいずれの株においても類似の所見でありHEV swJB-E10(G3sp)株がやや壊死病変数が多い傾向を示した。よって、ブタにおいては株間による大きな違いはないものと推察される。

野生動物における感染疫学：

エゾシカについては、総捕獲数629頭について肝臓、直腸内容物からのHEV ORF-1領域の検出をRT-PCR法で実施した。地域に若干の差を認めるものの約47%の個体の肝臓中にHEV遺伝子が確認された。一部、それらのサンプルについてウイルスコピー数をRT-real time PCR法で調べた結果、多くのサンプルで10²程或いはそれ以下のコピー数で比較的小さいことが明らかとなった。また、腸内容物についても検査した結果、約12%がHEV遺伝子陽性と診断された。それら個体の肝臓中ウイルスとの検出一致率は約半数であり、糞便への排

出率は肝臓中保有率に比較して、低いことが明らかとなった。これらHEV陽性率と性別及び年齢間に有意差は認められないが、季節的に5月の春と12月の冬季に陽性個体が増加する傾向を示した(下図：捕獲月別陽性率)。



これらの知見から、HEVはエゾシカにおいて常時感染サイクルが維持され当歳から感染成立する常在ウイルスである事が示された。また、4歳以上の個体でもウイルスが検出されることから、持続的に感染し抗体等の免疫が成立してもウイルス感染を繰り返す可能性が推察された。

本州で捕獲されたハクビシン30頭について、HEV遺伝子検出を上記方法で実施した(表1)。肝臓中に検出されたHEVは、約53%と比較的高率であった。それら個体の直腸内容物について調べた結果、陽性率が30%、肝臓・腸内容物ともに陽性の個体の割合は23.3%であり、エゾシカと比較してウイルス排泄個体の割合が高い事が示された。抗体陽性率は、約47%とほぼ肝臓中ウイルス陽性率と同様であった。また今回調査したハクビシンは、ヒトの居住地域で捕獲されていることから、詳細な感染経路の調査が必要である。

	肝臓	糞便
陽性	16	9
陰性	14	21
陽性率	53.3%	30.0%

検査終了していない他の野生動物は、今後

も検査を継続する予定である。

シカ HEV のブタへの感染伝播：

ミニブタに HEV 陽性肝臓を経口摂取させた 3 週後に糞便中からウイルス排出が確認された。この結果からシカ HEV がブタに感染伝播することが明らかとなった。その後、経過を追って排泄状況を確認したところ、感染後 14 日からウイルスが検出され、約 50 日以降ウイルス排泄が消失した。血清中のウイルス検出は一過性に確認された。感染 80 日後に剖検した個体の肝臓から HEV-RNA が RT-PCR 法で検出されシカ由来の HEV がブタに経口感染することが示された (下表)。

ID	Liver	MLN	spleen	serum	feces
A1	+	+	+	-	-
A2	+	+	+	+	+
Control	-	-	-	-	NT

ウイルス分離： HEV が検出されたエゾシカ糞便 20 サンプルから A549 細胞を用いてウイルス分離を試み、接種 72 日後に 10 サンプルに陽性が確認され、内 4 サンプルで持続的に感染する細胞を得た。一部 ORF1-PCR 増幅領域の配列を確認したところ 3 型と相同性が高い事が示された。

ヒトへの感染リスク検討 (エゾシカにおける寄生虫感染との関係性)：

HEV 検査と並行して寄生虫検査を実施して、肝炎とカンテツとのヒトへの感染リスクを検討した。その結果、一般線虫卵の寄生率は 95%、日本産肝蛭の寄生率は 9.5% であった。HEV の感染率と比較して低率であった事から、当該調査地域のエゾシカに関しては、ヒトへの感染リスクとして HEV が高い事が示された。

結論： エゾシカに感染している HEV は、感染性を有し家畜 (ブタ) に感染するウイルス株であることが明らかとなった。また、糞便からウイルス分離可能であったことか

ら感染性ウイルスが糞便中に排泄され、個体間の感染源になる可能性が示唆された。ヒトへの感染リスクについては、肝臓中のウイルスコピー数が低い (約 100 コピー以下) 個体が大半を占めることから、大量に生の肝臓を喫食しない限り感染リスクは低いものと考えられるが、食肉目的での解体処理においては、内蔵に用いた刀を肉の切り出しに用いない事や使用の都度煮沸 (熱湯等) によるウイルス不活化処理工程を加える必要がある。また、処理後の内蔵 (特に肝臓) には、HEV が感染していることから他の野生動物等に摂取されないよう内蔵廃棄の対応も十分に注意する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Kanai Y, Miyasaka S, Uyama S, Kawami S, Kato-Mori Y, Tsujikawa M, Yunoki M, Nishiyama S, Ikuta K, Hagiwara K. Hepatitis E virus in Norway rats (*Rattus norvegicus*) captured around pig farm. BMC Res Notes. 2012 Jan 5; 5(1): 4.
2. Hagiwara K, Kawami S, Kato-Mori Y., Kubota-Koketsu R., Tsujikawa M., Urayama T., Yunoki M., Takahashi K., Ikuta K. Protective Role of Human Intravenous Immunoglobulin from Influenza A Virus Infection in Mice. *The Open Hematology Journal*, 2012, 6, 8-11
3. Higuchi H, Gondaira S, Iwano H, Hirose K, Nakajima K, Kawai K, Hagiwara K, Tamura Y, Nagahata H. Mycoplasma species isolated from intramammary infection of Japanese dairy cows. *Vet Rec*. 2013 May 25;172 (21):557.
4. Temporal Changes in Environmental Health Risks and Socio-Psychological Status in Areas Affected by the 2011 Tsunami in Ishinomaki, Japan. Kohei Makita, Kazuto Inoshita, Taishi Kayano, Kei Uenoyama, Katsuro Hagiwara, Mitsuhiko Asakawa, Kenta Ogawa, Shin'ya Kawamura, Jun Noda, Koichiro Sera, Hitoshi Sasaki, Nobutake Nakatani, Hidetoshi Higuchi, Naohito Ishikawa, Hidetomo Iwano, Yutaka Tamura. *Environment and Pollution*. Vol. 3, No. 1; 1-20. 2014
5. 高橋一恵、大久保祐士、古木理恵、服部眞次、

浦山健、坂井薫、柚木幹弘、萩原克郎、生田和良、由来の異なるE型肝炎ウイルスの熱感受性の違いについて血液事業、2013; 36(3): 679-685.

6. 森昇子、三觜慶、鈴木瑞穂、萩原克郎、浅川満彦、北海道日高地方におけるエゾシカの内部寄生虫相および道内エゾシカ寄生日本産肝蛭の分布について、北海道獣医師会雑誌 2014. 58: 44-47

[学会発表] (計9件)

1. 川見祥代、柚木幹弘、山口照英、生田和良、萩原克郎、出荷豚におけるE型肝炎ウイルスの体内分布、日本獣医学会学術集会 2011年9月(大阪)
2. 鈴木瑞穂、大久保聖子、川道美枝子、萩原克郎、ハクビシン (*Paguma larvata*)におけるE型肝炎の疫学調査、日本野生動物医学会、2012年8月23日北里大学(青森)
3. 高橋一恵、大久保祐士、古木理恵、服部眞次、浦山健、坂井薫、柚木幹弘、萩原克郎、生田和良、E型肝炎ウイルス(HEV)の熱感受性の違いについて、第36回血液事業学会、2012年10月仙台(宮城)
4. 萩原克郎、山内佳奈恵、柚木幹弘、松浦善治、生田和良、E型肝炎ウイルス感染ラットモデルの検討と応用、日本ウイルス学会、2012年11月大阪府
5. 皆木隆男、井手野祥次、上田千晶、高橋一恵、浦山健、服部眞次、坂井薫、柚木幹弘、萩原克郎、生田和良、血漿分画製剤の血漿原料におけるHEV陽性率とHEV Genotype、日本ウイルス学会、2012年11月大阪府
6. 高橋一恵、浦山健、服部眞次、坂井薫、柚木幹弘、萩原克郎、生田和良、由来の異なるE型肝炎ウイルスのエタノール分画における挙動、日本ウイルス学会、2012年11月大阪府
7. 鈴木瑞穂、加藤(森)ゆうこ、浅川満彦、柚木幹弘、生田和良、萩原克郎、NAT法の違いによる野外サンプルからのE型肝炎ウイルスの検出感度の違い、日本ウイルス学会、2012年11月神戸
8. Mikihiro Yunoki, Katsuro Hagiwara, Kazuyoshi Ikuta. HEV Prevention, Inactivation and Removal Strategies. Pathogen Clean Asia Summit 2013, 15-16 May 2013 Shanghai China
9. Mikihiro Yunoki, Katsuro Hagiwara, Kazuyoshi Ikuta. Significant differences of properties between model viruses and target viruses (wild type) in HAV, HEV and B19 during manufacturing processes of plasma derivatives. Bioplasma World Asia 2013, 3-4 Sep 2013, Bali, Indonesia.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

萩原 克郎 (HAGIWARA KATSURO)

酪農学園大学 獣医学群・教授

研究者番号: 50295896

(2)研究分担者

浅川 満彦 (ASAKAWA MITSUHIKO)

酪農学園大学 獣医学群・教授

研究者番号: 30184138

(3)連携研究者

岡本 実 (OKAMOTO MINORU)

酪農学園大学 獣医学群・准教授

研究者番号: 60372877