

沖縄県のヒトの E 型肝炎ウイルス調査(2007)

仁平稔, 中村正治, 大野惇¹⁾, 平良勝也, 岡野祥, 糸数清正, 久高潤, 李天成²⁾

Survey of Hepatitis E Virus in Residents in Okinawa, Japan (2007)

Minoru NIDAIRA, Masaji NAKAMURA, Atsusi OHNO¹⁾, Katsuya TAIRA
Shou OKANO, Kiyomasa ITOKAZU, Jun KUDAKA, Tian-Cheng LI²⁾

要旨: 2005~2007 年度に、沖縄島、宮古島、石垣島および西表島からヒト血清 1197 検体を収集し、血清中の HEV-IgG を ELISA により検出した。調査地全体での HEV 抗体陽性率は 6.5%で、年齢の増加に連れて HEV 抗体陽性率も増加する傾向を示し、沖縄県におけるヒトの HEV 抗体保有状況の傾向は、全国と同様であると考えられた。調査地ごとの HEV 抗体陽性率は、沖縄島、宮古島、石垣島では 3.9%~6.9%と全国と同様の傾向を示したが、西表島の抗体陽性率は 28.0%と高率で、その要因として HEV 感染イノシシ肉の摂食が考えられた。西表島の HEV 抗体陽性血清から HEV 遺伝子が検出されなかったため、遺伝子解析によるこの可能性に対する検討はできなかったが、今後、県内での獣畜肉の摂食による HEV 感染の可能性について検討する必要があると考えられた。

Key words : HEV, ELISA, 沖縄島, 宮古島, 石垣島, 西表島

I はじめに

E 型肝炎は A 型肝炎に類似した急性肝炎であり、慢性化はしない。しかし、A 型肝炎に比べて致死率が高く、妊婦では 20%になるとの報告もある(1,2)。感染は主に、患者の糞便中に排出された E 型肝炎ウイルス(HEV)に汚染された水、食品を摂取することで成立する(1,2)。そのため、公衆衛生設備の不十分なアジア、アフリカなどの発展途上国では、水系感染による E 型肝炎の流行が知られていた(1,2)。一方で、公衆衛生設備の整った先進国を含めて、世界各地の家畜、野生動物での HEV 感染が確認され、HEV は動物由来感染症として重要なウイルスとなっている(1,2)。

日本国内においても、全国的にブタで HEV 感染が高頻度に認められ(3)、野生のイノシシやシカからも HEV 遺伝子および抗体が検出されている(4,5)。そして、ブタレバーの生食が原因と推定された事例や(6)、実際に野生イノシシ肉および野生シカ肉が原因食品とされた事例など(7,8)、食品を介した HEV 感染が報告されている。

沖縄県においては、2002 年に宮古島の男性 1 例、2004 年に伊江島の男性 1 例が HEV 患者と診断されており(9)、その後、2005 年に宮古島から男性 1 名の HEV 患者が報告されている。いずれも感染源は明らかになっていないが、2002 年の宮古島の症例では、ブタレバーが原因食品として疑われている(9)。県内の動物においても、ブタをはじめ、イノシシ、マンガースから HEV 遺伝子および抗体が検出されてい

る(10-13)。沖縄県は食文化として豚肉を使用した料理が多く、その消費量も多い。また、ヤギなどの生肉を好む人も多い。県内のヒトおよび動物の HEV 浸淫状況を把握することは、HEV 感染に対する有効な予防対策を考案し、県内の公衆衛生状況を向上させるために重要である。我々は、2005、2006 年度に、沖縄島、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(enzyme-linked immunosorbent assays: ELISA)により実施し、その結果を前回報告した(14)。2007 年度は、ELISA に更なる検討を加え、沖縄島を中心にヒト血清を収集し、HEV 抗体調査を実施した。更に 2005、2006 年度の検体についても再検査を実施したので報告する。

II 方法

1. ヒト血清収集方法及び収集地域

ヒト血清は、2005~2007 年度に、沖縄島、宮古島、石垣島および西表島で行われた職場および住民健康診断と、沖縄島の保健所および医療機関において、同意が得られた合計 1197 検体を収集し、-30℃で保存した。血清の収集地域、年齢群、性別については、表 1 に示す。

2. HEV 抗体検出方法

血清中の HEV-IgG を、Li らの方法(15)および病原体検査マニュアル(16)を参考に、ELISA により検出した。2007 年

1)福祉保健部薬務衛生課 2)国立感染症研究所ウイルス第二部

表 1. ヒト血清の収集地域, 性別, 年齢群ごとの検体数

収集地域	性別	年齢群							全体
		0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-	
沖縄島	男	106	59	95	88	45	26	22	441
	女	99	75	109	72	26	24	17	422
宮古島	男	0	0	12	22	10	15	10	69
	女	0	0	20	12	10	11	10	63
石垣島	男	0	0	12	9	10	10	10	51
	女	0	0	10	10	11	10	10	51
西表島	男	0	1	9	10	9	10	11	50
	女	0	0	10	10	10	10	10	50
合計	男	106	60	128	129	74	61	53	611
	女	99	75	149	104	57	55	47	586
	合計	205	135	277	233	131	116	100	1197

度は、2006年度の検体のいくつかについて、国立感染症研究所ウイルス第2部に同方法によるHEV-IgG検出を依頼し、その結果を基に、抗原および二次抗体の濃度を検討した。検討した結果を図1に示す。この結果により、抗原は国立感染症研究所ウイルス第2部より分与された中空粒子(17)を2μg/mlに希釈し、二次抗体はperoxidase-conjugate goat IgG fraction to human IgG F(AB')₂ (Cappel, Aurora, Ohio.)を1,000倍希釈し、使用することとした。

3. HEV 遺伝子検出方法

HEV-IgG陽性となった血清については単独で、陰性となった血清については10検体を1プールにし、RNA抽出キット(QIAamp Viral RNA Mini kit, QIAGEN, Tokyo, Japan)を使用してウイルスRNAを抽出後、One-Step RT-PCR kit(QIAGEN, Tokyo, Japan)とTakahashiらが

報告しているプライマーを使用して(18)、RT-PCRを実施した。さらに、得られたPCR産物について、Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen Corporation, California, USA)とTakahashiらが報告しているプライマーを使用して(18)、nested PCRを実施した。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。

III 結果

1. ヒト血清中のHEV抗体調査結果

ELISAにより得られたOD値の分布を図2に示す。病原体検査マニュアルよりcut off値を0.20とした結果(16)、今回の調査地におけるヒトのHEV抗体陽性率は、6.5%(78/1197)であった。年齢群ごとのHEV抗体陽性率を図3に示す。39歳以下の1.0~7.7%に対し、40歳以上では11.2~17.0%と、高齢者ほど抗体陽性率が高くなる傾向を示した。性別ごとのHEV抗体陽性率は、男性が6.5%(40/611)、女性が6.5%(38/586)で、差は見られなかった。

2. 調査地別のヒト血清中のHEV抗体調査結果

調査地別のHEV抗体陽性率は、沖縄島3.9%(34/863)、宮古島6.8%(9/132)、石垣島6.9%(7/102)、西表島28.0%(28/100)を示した。西表島のHEV抗体陽性率が他の調査地と比較して有意に高かった(p<0.0001, χ^2 test)。宮古島、石垣島では、19歳以下の検体は収集できず、西表島においても19歳の検体が1検体のみで、それはHEV抗体

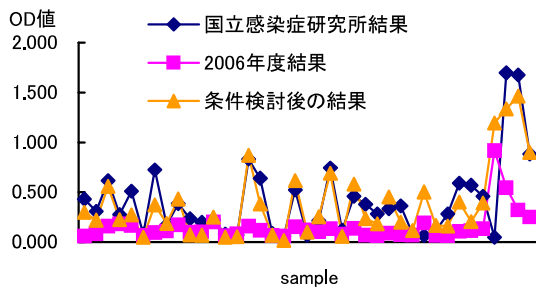


図 1. ELISA の抗原および二次抗体濃度の検討後の結果

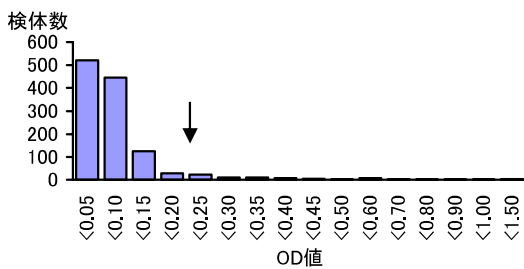


図 2. ELISA による OD 値の分布

横軸は OD 値, 縦軸はその OD 値の検体数を示す。
矢印は cut off 値を示す。

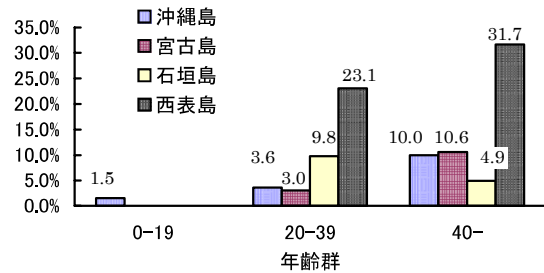


図 4. 調査地別の年齢群ごとの HEV 抗体陽性率

年齢群は 0-19 歳, 20-39 歳, 40 歳以上の 3 つに分けた。
グラフ中の数字はそれぞれの HEV 抗体陽性率(%)を示す。

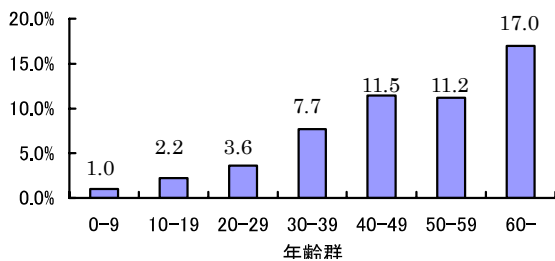


図 3. 調査地全体の年齢群ごとの HEV 抗体陽性率

グラフ中の数字はそれぞれの HEV 抗体陽性率(%)を示す。

表 2. 調査地別の性別ごとの HEV 抗体陽性率

	男	女
沖縄島	3.6% (16/441)	4.3% (18/422)
宮古島	5.8% (4/69)	7.9% (5/63)
石垣島	9.8% (5/51)	3.9% (2/51)
西表島	30.0% (15/50)	26.0% (13/50)

陰性であった。20 歳以上の HEV 抗体陽性率では、沖縄島 5.5%(29/524)、西表島 28.3%(28/99)を示した。20 歳以上の HEV 抗体陽性率でも、西表島が他の調査地と比較して有意に高かった(p<0.0001, χ^2 test)。年齢群ごとの HEV 抗体陽性率を図 4 に示す。沖縄島、宮古島および西表島では、高齢者ほど抗体陽性率が高くなる傾向を示した。しかし、石垣島では、その傾向は見られなかった。性別ごとの HEV 抗体陽性率を表 2 に示す。各調査地で有意な差は見られなかった。

3. ヒト血清中からの HEV 遺伝子検出

HEV 抗体陽性血清 78 検体中 77 検体および HEV 抗体陰性血清 1119 検体中 1112 検体からの 112 プールから、HEV 遺伝子検出を実施したが、いずれの検体からも HEV 遺伝子は検出されなかった。HEV 抗体陽性血清 1 検体および HEV 抗体陰性血清 7 検体は、血清量不足のため、実施できなかった。

IV 考察

今回の調査により、沖縄県内に HEV 感染歴を持つヒトがいることが示された。調査地全体での HEV 抗体陽性率は 6.5%で、年齢の増加に連れて HEV 抗体陽性率も増加する傾向を示した。また、男女間での HEV 抗体陽性率に差はなか

った。日本人の健常者を対象とした HEV 抗体調査によると、HEV-IgG 陽性率は地域差があり 1.9~14.1%で、年齢の増加に連れて HEV 抗体陽性率も増加する傾向を示していることから(15)、沖縄県におけるヒトの HEV 抗体保有状況の傾向は、全国と同様であると考えられた。しかし、日本における HEV 患者数は、男性が女性に比べて多いことが報告されている(2)。今回、性別差が確認されなかったことから、沖縄においては HEV への暴露機会に性別差がない可能性が考えられるが、これについては更なる検討が必要である。

4 つの調査地全てで HEV 感染歴を持つヒトがいることが示された。HEV 抗体陽性率は、沖縄島、宮古島、石垣島では 3.9%~6.9%と、全国と同様の傾向を示したが、西表島の抗体陽性率は 28.0%と高率であった。西表島では野生イノシシが狩猟され、食されている。これまでに国内において、野生イノシシからの HEV 遺伝子および抗体検出が報告されており、イノシシ肉を原因とした HEV 感染事例も報告されている。また、石垣島の狩猟者の HEV 抗体調査においても、HEV 抗体陽性率が 25%を示したとの報告があり、要因として、捕獲したイノシシの生肉摂取が考えられている(19)。西表島のイノシシからも HEV-RNA 検出の報告がなされていることから(10)、イノシシの喫食が西表島の高率な HEV 抗体陽性率の要因と考えられた。しかし、西表島のヒト血清か

ら HEV 遺伝子が検出されなかったため、西表島のイノシシ由来 HEV 遺伝子塩基配列との相同性解析は行えず、この可能性に対する検討はできなかった。

石垣島では年齢に伴った HEV 抗体陽性率の増加はみられず、また、いずれの調査地でも性別による HEV 抗体陽性率の有意な差はみられなかった。これらについては更に検体数を増やした検討が必要である。また、宮古島、石垣島では、19 歳以下の検体を収集することができず、西表島ではその年齢群は 1 検体のみであった。特に HEV 抗体陽性率の高い西表島において、全国的に HEV 抗体陽性率が低い若齢層の抗体陽性率を検討することは、西表島と他地域における HEV への感染経路の違いを検討するうえで重要であると考えられる。

2002 年に報告された宮古島の症例では、ブタレバーが原因食品として疑われている(9)。石垣島の狩猟者における高率な HEV 抗体陽性率の要因は、捕獲したイノシシの生肉摂取によることを示唆する報告がある(19)。今回の調査では、イノシシの食文化がある西表島の HEV 抗体陽性率が高い値を示した。今回、HEV 遺伝子は検出されず、遺伝子解析による感染経路の推定はできなかったが、今後、県内での獣畜肉の摂食による HEV 感染の可能性について検討する必要があると考えられた。

V 参考文献

- 1) Emerson, S.U. and Purcell, R.H. (2007): Hepatitis E Virus. p.3047-3058. In Knipe D.M., Howley, P.M. (ed.), Fields Virology. Fifth ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
- 2) National Institute of Infectious Diseases and Tuberculosis and Infectious Diseases Control Division, Ministry of Health, Labour and Welfare (2005): Hepatitis E as of August 2005, Japan. Infect. Agents Surveillance Rep., 26, 261-262
- 3) 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
- 4) Sonoda, H., Abe, M., Sugimoto, T., et al.(2004) : 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
- 5) Michitaka, K., Takahashi, K., Furukawa, S., et al.(2007): Prevalence of hepatitis E virus among wild boar in the Ehime area of western Japan. Hepatol. Res., 37, 214-220
- 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) Li, T.C., Chijiwa, K., Sera, N., et al.(2005): Hepatitis E Virus Transmission from Wild Boar Meat. Emerg. Infect. Dis., 11, 1958-1960
- 8) Tei, S., Kitajima, N., Takahashi, K., et al.(2003): Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. Lancet, 362, 371-373
- 9) 佐久川廣(2005) : 沖縄県内で発症した E 型肝炎の 2 例と動物由来の HEV 株。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 16 年度総括研究報告書. , 22-23
- 10) 中村正治, 平良勝也, 大野惇ら(2006) : 西表(イリオモテ)の野生リュウキュウイノシシから検出された genotype 4 HEV. 肝臓. 47, 161-162
- 11) 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. Hepatol. Res., 34, 137-140
- 12) 中村正治(2006) : 沖縄県のブタ, イノシシおよびマンガースにおける 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
- 13) Li, T.C., Saito, M., Ogura, G., et al.(2006): Serologic Evidence for Hepatitis E Virus Infection in Mongoose. Am. J. Trop. Med. Hyg., 74, 932-936
- 14) 仁平稔, 平良勝也, 大野惇ら(2007) : 沖縄県のヒトの E 型肝炎ウイルス調査。沖縄県衛生環境研究所報. 41, 45-48
- 15) Li, T.C., Zhang, J., Shinzawa, H., et al.(2000): Empty Virus-like Particle-based Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Antibodies to Hepatitis E Virus. J. Med. Virol., 62, 327-333
- 16) 地方衛生研究所全国協議会, 国立感染症研究所(2003) : 急性ウイルス性肝炎。病原体検出マニュアル. 291-295
- 17) Li, T.C., Yamakawa, Y., Suzuki, K., et al.(1997): Expression and Self-Assembly of Empty Virus-Like

Particles of Hepatitis E Virus. *J. Virol.*, 71, 7207-7213

- 18) 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
- 19) 林純(2007): 沖縄県八重山地区狩猟者における E 型肝炎
ウイルス(HEV)感染状況 - 同地区一般住民との比較 - .
E 型肝炎の感染経路・宿主域・遺伝的多様性・感染防止・
診断・治療に関する研究. 平成 18 年度総括研究報告書. ,
18-21