

## 奈良公園におけるニホンジカ *Cervus nippon* の E 型肝炎ウイルス疫学調査

萩原克郎<sup>1)</sup>, 辻 正義<sup>1)</sup>, 川淵貴子<sup>1)</sup>, 鳥居春己<sup>2)</sup>, 小林朋子<sup>3)</sup>, 浅川満彦<sup>1)</sup>, 石原智明<sup>1)</sup>

1) 酪農学園大学獣医学部 〒069-8501 北海道江別市文京台緑町 582 番地

2) 奈良教育大学 〒630-8528 奈良市高畑町

3) 京都大学ウイルス研究所感染病態研究領域 〒606-8507 京都府左京区

(2008 年 2 月 12 日受領, 2008 年 5 月 8 日採択)

### An Epidemiological Survey of Hepatitis E virus in Sika Deer, *Cervus nippon*, in Nara Park, Japan

Katsuro HAGIWARA<sup>1)</sup>, Masayoshi TSUJI<sup>1)</sup>, Takako KAWABUCHI<sup>1)</sup>, Haruki TORII<sup>2)</sup>, Tomoko Kobayashi<sup>3)</sup>,  
Mitsuhiko ASAKAWA<sup>1)</sup>, Chiaki ISHIHARA<sup>1)</sup>

1) School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Ebetsu-shi, Hokkaido, 069-8501, Japan

2) Education Center for Natural Environment, Nara University of Education,  
Takabatake-cho, Nara-shi, Nara, 630-8528, Japan

3) Kyoto University Laboratory of Viral Pathogenesis, Institute for Virus Research, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8507, Japan

**ABSTRACT.** Hepatitis E Virus (HEV) infections have been reported in deer as well as in domestic animals; however, the precise epidemiological information regarding HEV infections in the Shika Deer in Nara Park in Japan remains to be investigated. In this study, we examined the anti-HEV antibodies and HEV-RNA in sera from 173 of female sika deer in the park. The reactivity to HEV antigen in the serum samples were low levels. The detection of HEV-RNA in sera from the deer revealed no positive samples by RT-PCR analysis. In conclusion, we could not identify the HEV antibody and HEV-RNA positive individual in the sika deer which inhabited Nara Park. Therefore, the possibility of the HEV infection in the deer of the park would be extremely low.

Key words : *Cervus nippon*, Hepatitis E virus, Nara Park

*Jpn. J. Zoo. Wildl. Med.* 13(1) : 35-37, 2008

E型肝炎ウイルス(HEV)は、ブタやイノシシ、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することによってヒトにも感染する人畜共通感染症である。HEVは、急性肝炎の原因ウイルスの1つで、時には劇症化を引き起こす。A型肝炎ウイルスとともに、経口感染を引き起こすウイルスである。このウイルスの大きな特徴は、肝炎ウイルスの中で唯一人獣に共通して感染伝播を起こす点である [1, 2]。

HEVは、感染宿主の糞便中に多量に排出される。このため、上下水道の設備が十分整備されていない衛生環境の悪い地域において、食物や飲料水がHEVに汚染されることによってしばしば大規模な流行が見られてきた [3]。このような背景から、E型肝炎は開発途上国のみのものであると認識されてきたが、近年になって先進国においても途上国への渡航歴が無い人からの発症例や、野生動物、さらにはブタのような産業動物からもウイルスRNAが検出・同定されるに至り、HEVは非流行地域においても土着していることが明らかになり、先進国を含む世界全域における、大きな公衆衛生上の問題であると認識が改め

られるようになってきた [4-7]。

このように、HEVは経口伝播によってウイルス性肝炎を引き起こす人獣共通感染症であり、わが国においてもイノシシやシカといった野生動物からもウイルス遺伝子が検出され、これらの動物の生肉を食したことが原因と見られるE型肝炎の症例も報告されている [1, 2]。したがって、わが国においてもこれら野生動物に対するHEVへの公衆衛生上の対策を講じていくことは重要である。

奈良公園およびその周辺地域に生息する天然記念物ニホンジカ *Cervus nippon* は、古くから春日大社の“神鹿”としての信仰の対象とされ、古い歴史を有している。その生息数は、市民や観光客などによる給餌や奈良の鹿愛護会による保護により増加を続け、平坦部では1200頭に達しているといわれている [8]。

そこで著者らは、シカ肉からのヒト感染事例を鑑み、ヒトとの接触の機会の多い奈良公園およびその周辺地域に生息するニホンジカを対象としてHEVの抗体検査による感染状況の把握

を目的として血清疫学調査を行った。

ニホンジカの血清サンプルは、2005年4月に、出産時の事故を防ぐ目的で奈良の鹿愛護会により奈良公園およびその周辺地域において、妊娠しているとみられることから捕獲されたメス成獣173頭から採血した。それらの血清を用いて以下に述べる抗HEV抗体の検出とリアルタイムPCR (RT-PCR) 法によるHEV-RNA検出を試みた。

ELISAによるシカ血清中の抗HEV IgG抗体の検出は、VIRAGENT HEV-Ab ヒト IgG (コスミックコーポレーション社製) kitを用いた。キットの指示通り100倍希釈した血清を反応させ、二次抗体を Peroxidase Labeled Affinity Purified Antibody to Deer IgG (H+L) produced in Rabbit (Kikegaard & Perry Laboratories, Inc.; KPL) に変えて測定し、OD450nmで測定した。HEV陽性対照としてHEV感染が明らかとなっているブタ8頭由来の血清を同様のキットで測定した。その際の2次抗体は、Peroxidase Labeled Affinity Purified Antibody to Pig IgG (H+L) produced in Rabbit (KPL) を用いた。

RNA抽出とHEV-RNAの検出は、QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN社) を用いて、検体80  $\mu$ LよりRNAを抽出した。方法はQIAGEN社プロトコールにしたがい、QIAamp スピнкаラムより50  $\mu$ Lの溶出バッファーによりRNAを溶出した。HEVゲノムの検出は5'末端領域をターゲットにした4種類のジェノタイプに対応したプライマーとプローブを用いたTaqMan法により実施した。TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit (Applied Biosystems社) に900nMプライマーHE50, 900nMプライマーHE51, 250nMプローブFHE57, 20  $\mu$ Lの抽出RNAを添加し、反応液50  $\mu$ LでApplied Biosystems 7500リアルタイムPCRシステムにより、48°C 30分, 95°C 10分, 95°C 15秒と60°C 1分42サイクルの条件で行った。プライマーとプローブの配列はプライマーHE50 (47-66: 5'-AAGGCTCCTGGCRTYACWAC-3' R:A/G, Y:T/C, W:A/T), プライマーHE51 (131-111: 5'-GCCKRACYACCACAGCAITTCG-3' K:T/G), プローブFHE57 (94-69: 5'-FAM-CGCWGCYAGAGCWGCCTGCTCAATRG-TAMRA-3') である。プライマーとプローブの番号はGenBankのaccession no.AB073912 [9]の配列番号に相当する。プローブの3'末端修飾のTAMRAはクエンチャー物質で鋳型cDNAに結合するまでは5'末端修飾の蛍光物質FAMの発色を妨害し、プローブが鋳型cDNAに結合するとポリメラーゼ反応によりプローブが分解しFAMがTAMRAから離れ蛍光を発生し、その蛍光量が増幅cDNAの量に比例する。なおRT-PCRで用いた標準RNAは、HEV株genotype3実験感染ブタ血清 [10] からQIAamp Viral RNA Mini kitを用いてtotal RNAを抽出し、HEVのORF1領域のcDNA断片をPCR法により増幅しクロー

ニングベクターpT7Blueに接続し、*in vitro*転写法によりHEV ORF1領域のRNA断片を合成し標準RNAとした。本標準RNAを用いた検出感度は一反応当りおおよそ16コピーであり、血清1mL当りに換算すると検出感度は約500コピーである。

シカ血清173検体をHEV抗原に対する血清中抗体の反応性をELISAで測定した結果、陽性対照としたHEV感染ブタ血清(8頭)ではOD450nm測定平均値 $2.23 \pm 0.87$ であったが、シカでは平均 $0.07 \pm 0.05$ とほとんど反応性を示さない低値を示した。その内訳は、測定値が0.100未満の個体が139検体、0.100以上で0.200未満が27検体、0.200以上で0.300未満が7検体存在した。

HEV抗体を測定した173検体について、RT-PCR法により、HEV-RNA (ORF1領域)の増幅を試みたが、いずれのサンプルからもHEV-RNAは増幅されなかった。

今回のHEV疫学調査において、HEV抗原に反応する抗体は調査個体173頭からは検出されなかった。今回抗体検査は、HEVに対するIgGを測定したものであり、調査対象はいずれも成獣であることから、過去にHEVに感染した経験があればELISAによる抗体反応が認められる事が期待される。ブタにおける疫学調査では、感染後200日以上経過した個体でもELISA OD450nmで0.5以上 (ELISAカットオフ値0.3)の反応性を示すことから (未発表)、当該シカにおけるHEV感染の可能性は低いものと考えられる。さらに、調査個体がHEV感染後、抗体が産生されるまでのウィンドウ期であった可能性は、血清中のHEV-RNAの検査結果が全て陰性であったことから、否定されるものと考えられた。

過去、日本国内 (兵庫県)におけるHEV感染シカ肉のヒトへの感染事例では、発病の7週間前に野外捕獲されたシカ (*Cervus nippon*) を生で食べた4人が肝炎発症し、その冷凍保存されていたシカ肉 (3頭分)のうち1頭からHEV-RNAが検出された [1]。そのHEV遺伝子のORF1領域326bpの塩基配列を比較したところ、3人の患者とシカ由来のHEVで完全に一致し、1人の患者のHEVは1塩基異なっていた。また、同県加西市で生シカ肉を食べた経験者と食べたことない各45名のHEV抗体調査 (IgG) では、その陽性率が前者で17.7% (8/45)、後者で2.2% (1/45) ( $p=0.014$ )であった [11]。これらの報告から、野生のシカにもHEVが感染する可能性が明らかとなったが、それらを生で摂取しない限りヒトが感染する可能性は低いと推察される [12]。

過去の野生シカに対する抗体調査では、北海道のエゾシカで3% (1/32)、栃木のシカで2% (1/53)で陽性個体を確認したことが報告されている [13]。高橋ら [14]は、兵庫県と北海道のシカについて抗HEV抗体を調べ、兵庫のシカで7.8% (14/180)、北海道のシカで1.3% (1/78)が陽性であったこ

とを示した。一方で、シカの HEV 抗原に対する反応性が低いことからシカにおける HEV 感染を否定する報告もある [10]。上述の感染していた野生シカの HEV 感染機序は不明であるが、シカでの HEV 陽性例が報告されていることから、シカが HEV 汚染された農場への出入りや畜産廃棄物と接触することにより、感染の可能性が危惧される。また、シカ個体間で HEV が感染伝播しているのかなど不明な点が多い。したがって、公園周囲におけるシカの生息環境の調査についても今後検討する必要がある。

今回調査した奈良公園およびその周辺で生息するシカにおいて抗体陽性個体が確認できなかったことから、それら個体が HEV を排泄している動物と間接、直接接触しない環境が確保されていることが推察される。さらに、定期的な疫学調査による HEV 感染状況をモニターしていくことが今後の状況把握として望ましいと言える。

## 謝 辞

本調査に当たり、財団法人・奈良の鹿愛護会の通常業務の捕獲時に全面的な協力を得た。HEV の抗体検査ならびに遺伝子検出に関して、(株)ベネシス辻川宗男博士および柚木幹弘博士の協力を得た。これらの方々のご協力に深謝します。本研究は、環境省地球環境研究総合推進費 (F-062)、文部科学省科学研究費 (18510205) および同省ハイテクリサーチ研究助成 (酪農学園大学) の一部を受けた。

## 要 約

E型肝炎ウイルス (HEV) は、家畜のみならずシカにもその感染が報告されている。一方、奈良公園に生息する天然記念物ニホンジカ *Cervus nippon* の HEV に関する疫学的知見は、報告されていない。そこで、当公園に生息する 173 頭 (成獣メス) を対象に、血清中の HEV 抗体と HEV-RNA の検査を行った。ELISA では、全ての個体が HEV 抗原と反応性を示さない低値を示し、いずれの血清中からも HEV-RNA 遺伝子は検出されなかった。以上、今回調査したニホンジカには、HEV 抗体陽性個体は確認されず HEV に感染していない個体群であることが推察された。

キーワード: *Cervus nippon*, E型肝炎ウイルス, 奈良公園

## 引用文献

1. Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S. 2003. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* Aug 2; 362 (9381): 371-373.
2. Matsuda H, Okada K, Takahashi K, Mishiro S. 2003. Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J Infect Dis* 188: 944.
3. Purcell RH, Emerson SU. 2001. Animal models of hepatitis A and E. *ILAR J* 42: 161-177.
4. Smith JL. 2001. A review of hepatitis E virus. *J Food Prot* 64: 572-586.
5. Meng XJ. 2003. Swine hepatitis E virus: cross-species infection and risk in xenotransplantation. *Curr Top Microbiol Immunol* 278: 185-216.
6. Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T. 2003. Features of hepatitis E virus infection in Japan. *Internal medicine* 42: 1065-1071.
7. Takahashi M, Nishizawa T, Miyajima H, Gotanda Y, Iita T, Tsuda F, Okamoto H. 2003. 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 (Pt 4): 851-862.
8. 鳥居春己. 2006. 奈良公園シカの栄養診断. 奈良県教育委員会天然記念物「奈良のシカ」総合調査報告書 15-19.
9. Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Fukai K, Muramatsu U, Yoshikawa A. 2001. Analysis of the complete genome of indigenous swine hepatitis E virus isolated in Japan. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 929-936.
10. Hagiwara K, Iwabu Y, Kanai Y, Miyasho T, Daidoji T, Yunoki M, Tsujikawa M, Ohkubo Y, Yasue H, Ikuta K. 2007. Distribution and Propagation of Hepatitis E Virus in Experimentally Infected Swine. *The Open Veterinary Science Journal* 1: 1-6.
11. Tei S, Kitajima N, Ohara S, Inoue Y, Miki M, Yamatani T, Yamabe H, Mishiro S, Kinoshita Y. 2004. Consumption of uncooked deer meat as a risk factor for hepatitis E virus infection: an age- and sex-matched case-control study. *J Med Virol* 74: 67-70.
12. Matsuura Y, Suzuki M, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I, Yokoyama M, Igota H, Yamauchi K, Ishida S, Fukui D, Bando G, Kosuge M, Tsunemitsu H, Koshimoto C, Sakae K, Chikahira M, Ogawa S, Miyamura T, Takeda N, Li TC. 2007. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Arch Virol* 152: 1375-1381.
13. Sonoda H, Abe M, Sugimoto T, Sato Y, Bando M, Fukui E, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. 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.
14. 高橋和明, 安倍夏生, 道堯浩二郎, 北嶋直人, 松井高峯, 津田新哉, 新井雅裕, 三代俊治. 2007. 動物種の如何を問わず E 型肝炎ウイルス抗体を検出し得る簡便 ELISA 法. *肝臓* 48: 338-340.