

# E型肝炎ウイルスの環境分布に関する研究

*Study on the distribution of Hepatitis E virus in environment*

森田重光

麻布大学大学院環境保健学研究科

Shigemitsu Morita

Graduate School of Environmental Health, Azabu University

**Abstract:** Hepatitis E virus (HEV) is a single-stranded RNA virus which causes acute hepatitis accompanied by gastroenteritis. Most individuals with competent immune systems can overcome the infection within approximately one month, while pregnant women may suffer severe and fatal hepatitis with mortality rates up to 20%. In developing countries, HEV is transmitted through waters contaminated by feces from infected individuals and sometimes causes large outbreaks.

Although we have investigated the presence of HEV in environmental waters, including urban sewage and river water which may be contaminated by pig farm sewage, HEV RNA was not detected in any samples.

HEV was detected in 25 of 139 fecal specimens from pigs aged 70 to 130 days in 14 farms. Moreover, high prevalence of HEV in pig farm sewage was observed (5/6 farms), suggesting that many farms are contaminated with HEV. However, HEV was undetected in treated sewage, indicating significant removal during sewage treatment processes. Testing of environmental waters in the vicinity of pig farms showed 3 of 28 samples positive for HEV. These positive samples were all taken from the Imaike River, with concentrations of approximately  $10^2$  PDU/L.

All HEV isolates detected in the present study were sequenced and classified into G III. HEV isolates detected in environmental water samples showed high identities of 95.0 to 98.7% with HEV isolates detected in pig farm sewage, indicating that HEV contamination in the environment may be originating from pig farms.

## 1. 研究の目的

E型肝炎ウイルス (HEV) は自然宿主と考えられるブタやイノシシの肉や肝臓を非加熱で食べることにより、ヒトに伝播する。一方でHEVは腸管内でも増殖し、糞便中に多量に排出されることから、衛生状態の悪い地域では汚染された水を介し、ヒトからヒトへ糞口感染することが知られている。本研究ではブタから排出されたHEVによる水環境の汚染状況を調査した。

## 2. 方法

### 2.1 試料

#### 2.1.1 ブタ糞便試料

ブタの糞便試料は1農場につき9または10試料を個別に滅菌袋に採取し、各試料には採取日、ブタの日齢及び性別を明記した。試料は冷蔵状態で研究室に送付した。なお、試料の採取対象は90日齢付近のブタとした。

#### 2.1.2 養豚廃水試料

愛知県内の3農場 (農場D, I, X), 神奈川県内の

1農場（農場Y）及び茨城県内の2農場（農場Z, XX）において養豚廃水試料を採取した。農場Iでは計3回、農場Dでは計2回、その他の農場では各1回試料を採取した。なお、農場Iは養豚団地のなかの1棟であり、他の5農場と共有の廃水処理施設を使用している。今回調査したI農場の廃水は団地全体の計6農場から排出された混合廃水であるが、本論文では農場Iの廃水試料とした。

廃水の処理方式として、農場D及びIでは連続式活性汚泥処理、農場Xでは神奈川方式（酸化溝方式の一種）を採用している。農場Dの処理施設は最初沈殿池、連続式曝気槽（2槽）及び最終沈殿池から成り、最終沈殿池出口水を塩素消毒してから放流している。農場Iは農場Dと同様の施設に加え、曝気槽3槽及び接触曝気槽を有しており、処理水は塩素消毒後に放流している。農場Xでは回分式曝気槽及び砂ろ床を有しており、曝気処理水は塩素消毒後に砂ろ床を通して地下に浸透させている。農場Yでは処理施設を併設していないため、廃水は下水道へ直接放流している。また、農場Z及びXXは茨城県の涸沼周辺に位置しており、この地域では「茨城県生活環境の保全等に関する条例」及び「水質汚濁防止法に基づき廃水基準を定める条例」により、処理水の放流が厳しく規制されている。したがって、各農場では廃水を簡易曝気処理した後、液肥として農地に還元しており、水系への放流はない。

農場D及びIでは流入水及び処理水試料（一部曝気水及び最終沈殿池水試料を含む）、その他の農場では流入水試料のみ（一部曝気水試料を含む）を採取した。

### 2.1.3 環境水試料

神奈川県内の相模川水系、埼玉県内の利根川水系、愛知県内の今池川水系及び沓川水系、茨城県内の涸沼及びその周辺水域の計23地点において、計28試料を採取した。

## 2.2 HEVの定量

養豚場廃水試料及び環境水試料の一次濃縮は、陰電荷膜吸着・酸洗浄・アルカリ誘出法を用いた。すなわち、各試料に対し終濃度25 mMとなるようにMgCl<sub>2</sub>を添加した後、セルロースアセテート混合エステル製メンブレンフィルター（孔径0.45 μm；Millipore）を用いて吸引ろ過をおこない、水中のウ

イルスをフィルターに吸着させた。続いてそのフィルターを0.5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>（pH 3.0）を用いて洗浄し、最後に1 mM NaOH（pH 10.8）10 mLを用いてフィルターに吸着したウイルスを遠沈管内に誘出した。遠沈管内には中和液として50 μLの100 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>及び100 μLの100x Tris-EDTAをあらかじめ入れておいた。なお、濁質の多い流入生下水、最初沈殿池出口水、養豚場排水処理水及び一部の環境水試料は初めにGF/D（Whatman）を用いてろ過し、そのろ液を一次濃縮に供した。さらに、より濁質の多い養豚場排水流入水は3,000 rpmで15分間遠心分離の後、上清をGF/F（Whatman）を用いてろ過し、そのろ液を一次濃縮に供した。

1次濃縮の結果得られた濃縮液10 mLは遠心式フィルターユニットであるCentriprep YM-50（Millipore）を用いた2次濃縮に供した。1次濃縮液の全量をサンプルコンテナに移し3,000 rpmで10分間遠心の後、ろ液を捨て、さらに3,000 rpmで5分間遠心して1 mLを得た。

つづいて、濃縮液中のウイルス核酸をQIAamp Viral RNA mini kit（Qiagen）のスピンプロトコールに従って抽出した。RNA抽出供試量は140 μLであり抽出液60 μLを得た。RNA抽出液60 μLのうち、10 μLを逆転写反応液10 μLと混合した。

本研究ではTaqMan PCR法を用いてHEV cDNAの検出をおこなった。定量は7500 Real-Time PCR System（Applied Biosystems）を用いた。

### 2.3 ブタ由来HEVのシーケンス解析

TaqMan PCR法によりHEVが検出されたブタ糞便、養豚廃水及び環境水試料について、Li *et al.* (2005)が開発したNested-PCR法を用いて定性分析を行い、その結果得られたHEV-RNAのORF2領域に位置する378 bpの増幅産物をシーケンシングした。なお、今回用いたNested-PCR法ではHEV G I, G III及びG IVの検出が可能である。

ブタ糞便試料から検出されたHEV-RNAは、増幅産物をQIAquick PCR purification kit（Qiagen）を用いて精製した後、BigDye Terminator v 3.1 Cycle sequencing RR-100（Applied Biosystems）を用いてダイレクトシーケンスに供した。養豚廃水及び環境水試料から検出されたHEV-RNAは、増幅産物をQIAquick Gel Extraction kit（Qiagen）を用いて精製し

た後、TA クローニングベクター pCR2.1 (Invitrogen) を用いてクローニングし、BigDye Terminator v 3.1 Cycle sequencing RR-100 (Applied Biosystems) を用いてシーケンシングした。シーケンス分析には ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用い、その結果をもとに、Clustal X 及び NJplot を用いて系統樹を作成した。株間の相同性は Genetyx を用いて評価した。また、系統樹の作成時には、GenBank に登録されている HEV 株のデータを用いた。

### 3. 結果及び考察

#### 3.1 ブタ糞便からの HEV の検出状況

ブタが最も HEV に感染しやすいのは初乳抗体が体内から消失する離乳直後であることが明らかとなっている。そこで本研究では、2～4ヶ月齢のブタを対象として、糞便中の HEV 分析を行った。その結果、14 農場中 7 農場 (50%) のブタから HEV が検出された。個体別では、ブタ糞便 139 試料 (139 頭相当) のうち、25 試料 (25 頭相当, 18.0%) から HEV が検出された。14 農場中 5 農場が愛知県、5 農場が秋田県、残る 4 農場が神奈川県に位置し、陽性農場の割合 (陽性農場数/調査農場数) は愛知県が 4/5 (80%)、秋田県が 1/5 (20%)、神奈川県が 2/4 (50%) であった。

ブタ糞便中の HEV 濃度を調査した結果を Fig. 1 に

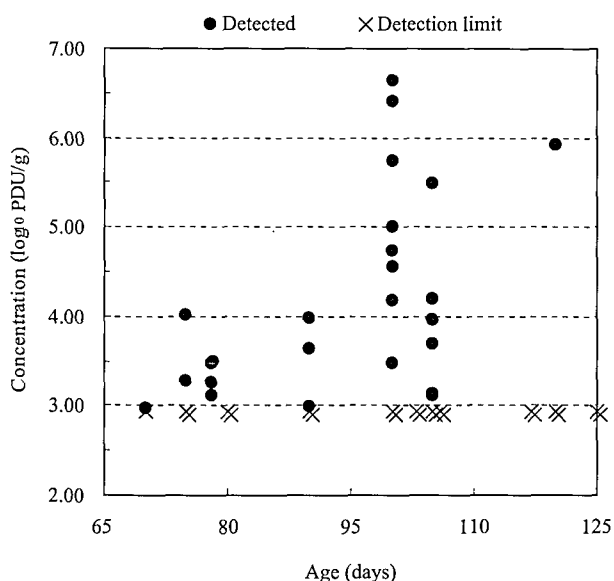


Fig. 1 HEV concentration in swine feces

示した。最も高い濃度を示した試料は農場 H で 100 日齢のブタから採取した試料 (H-3) であり、その値は  $4.45 \times 10^6$  PDU/g であった。糞便から HEV が検出されたブタと検出されなかったブタの日齢に、明確な差は認められなかった。

#### 3.2 養豚廃水からの HEV の検出状況

6 農場中 5 農場 (83.3%) の流入水から HEV が検出され、その濃度レベルは  $10^3 \sim 10^6$  PDU/L であった。農場 I では 2007 年 7 月、8 月及び 11 月の計 3 回、また、農場 D では 2007 年 7 月及び 11 月の計 2 回採水し、すべての流入水から高濃度の HEV が検出された。しかしながら、処理水からは全く HEV が検出されなかったことから、廃水処理により HEV が除去されているものと考えられた。検出下限値を用いて計算すると、廃水処理による除去率は  $0.72 \sim 5.02 \log_{10}$  であった。

#### 3.3 環境水からの HEV の検出状況

愛知県今池川の計 3 地点からのみ検出され、濃度レベルは約  $10^2$  PDU/L であった。今池川流域には少なくとも 10 箇所以上の養豚場があることが明らかになっており、それら養豚場の一部が汚染源となっている可能性が考えられた。

#### 3.4 ブタ由来 HEV のシーケンス解析

Genotype G III の系統樹を Fig. 2 に示す。本研究で検出された HEV の遺伝子型は、すべて G III であった。G III の系統樹をみると、本研究で分離された HEV 株を含め、系統樹全体において分離された地域及び宿主が混在している。ブタの糞便試料 L-8 から分離された HEV は日本で初めてヒトから分離された HEV である JRA1 株 (GenBank Accession no.; AP003430) と 93.4% の相同性を示し、また、同じくブタの糞便試料 B-8 から分離された HEV はアメリカでヒトから分離された US1 株 (GenBank Accession no.; AF060668) と 94.0% の相同性を示した。これらの結果から、本研究で分離された HEV も人獣共通に感染する可能性が高いものと考えられた。

同一農場内における株間の相同性は非常に高く (平均 98.5%)、各農場では、同一株が蔓延していると推測された。また、異なる農場から分離された株間の相同性は、同一県内の農場であっても概して 90% 以下であったが、愛知県内の近接した農場 D と農場 I から分離された HEV 株の相同性は 91.8% ~

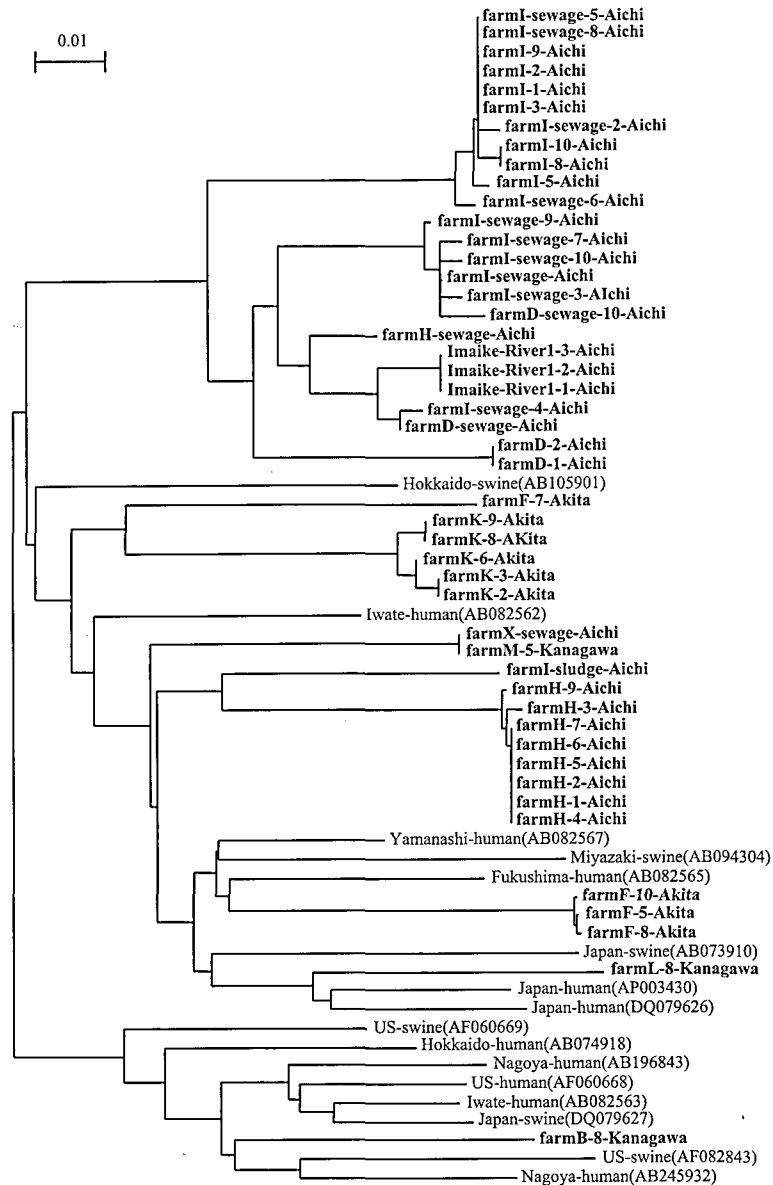


Fig. 2 A phylogenetic tree of HEV GIII

92.5%と高かった。したがって、農場Dと農場Iで検出されたHEVの起源は同じである可能性が高いと考えられる。

今池川の3地点から検出されたHEV株をクローニングし、シーケンシングした結果、すべて同一の塩基配列を示し、地点別あるいは同一地点における株の多様性は観察されなかった。この株と農場D及びIから検出されたHEV株との相同性は90%以上であった。また、農場D及びIの廃水処理施設の流入水から検出されたHEV株とは95.0~98.7%という高い相同性を示した。河川水から分離されたHEVは農場DやI由来ではないものの、これら2農場の近隣

に位置する他の農場由来である可能性が考えられた。

#### 4. 要約

- 1) ブタ糞便試料の18.0% (n = 139) からHEVが検出され、濃度範囲は $10^3 \sim 10^6$  PDU/gであった。
- 2) 6農場中5農場の養豚廃水からHEVが検出された一方で、処理後の養豚廃水からはHEVが全く検出されなかった。
- 3) 検出されたHEVはすべてG IIIに分類された。
- 4) 河川水から分離されたHEVは、河川流域に位置する養豚場の廃水から分離されたHEVと95%以上の相同性を示した。