

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名 中 村 正 治

題 目 沖縄県に棲息する野生動物が保有する E 型肝炎ウイルス及び病原性レプトスピラの疫学的及び分子疫学的研究  
(Epidemiological and Molecular Epidemiological studies of hepatitis E virus and pathogenic *Leptospira* harbored by wild animals inhabiting Okinawa Prefecture)

本研究は、沖縄県に棲息するや野生動物が保有する人獣共通感染症病原体、特に E 型肝炎ウイルス (HEV) とレプトスピラについて、その保有状況や病原体の特徴を疫学的及びは分子疫学的に解析し、ヒトへの感染防止対策に資するために実施した。

HEV の研究において、リュウキュウイノシシ 95 頭中 35 頭 (36.8%) から抗 HEV-IgG 抗体が検出されたことに加え、140 頭中 4 頭 (沖縄島 2、西表島 2) から HEV-RNA が検出され、リュウキュウイノシシが HEV のリザーバーであることを初めて明らかにした。西表島のイノシシ由来の genotype 4 HEV 株は、DNA データバンク上に 90% 以上の相同性を示す株が存在しない独特な株であった。しかし、日本土着型 HEV より、寧ろ中国株に近い特徴を有していた。これは、日本本土よりも中国に近い西表の地理的背景が関与しているかもしれない。沖縄島のイノシシ HEV は genotype 3 内の 2 つのサブグループ分類された。何れの株も ORF2 領域のアミノ酸は、我が国のヒト由来株と高い相同性を示すことから、イノシシ肉の生食は感染する危険があることが推察された。マングースの調査では、200 頭中 3 頭 (1.5%) から HEV-RNA が検出された。世界で始めて *Feliodea* の動物から HEV-RNA を検出し、HEV 保有動物の中にマングースを付け加えた。マングース由来 HEV 株 (JMNG-Okio2C) は 7236nt で構成され、全ゲノム配列に基づく分子系統樹において genotype 3 の中の日本株が集族するクラスターに分類された。一方 JMNG1-Okio5、JMNG2-Okio5 は G3 内の USA 株が混合するクラスター分類され、各々の由来が異なることが推察された。また JMNG-Okio2C は既報の沖縄のブタ由来 HEV 株と極めて近縁であった。これは、これらの動物間における種間伝播を示唆していた。

次に野生動物におけるレプトスピラ保有の現況を把握する目的で、沖縄の小型哺乳類とリュウキュウイノシシについて調査した。その結果、219 匹の小型哺乳類から 9 株 (4.1%) のレプトスピラが分離された。分離された血清型は *Javanica* 7 株、*Hebdomadis* 1 株、*Castellonis* 1 株であった。また、イノシシのレプトスピラ抗体保有率は 51% と高率であった。結果は、現在においても従前と同様に、我々の身近に病原性レプトスピラを保有する動物が存在することを示していた。また、2003 年に沖縄島北部の同一河川で発生したヒトのレプトスピラ症の集団感染は、レプトスピラを含む動物の尿で汚染された河川水に曝露されたことが発生要因であると考えられた。この結果は同地域での河川での遊泳はレプトスピラ感染のリスク要因であることを示していた。

本研究は沖縄に棲息する野生動物が E 型肝炎やレプトスピラ等の人獣共通感染症病原体を保有していることを明らかにすると共に、感染防止対策上有用な情報を提供した。

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	Masaji Nakamura
題 目	<p>Epidemiological and Molecular Epidemiological studies of hepatitis E virus and pathogenic <i>Leptospira</i> harbored by wild animals inhabiting Okinawa Prefecture</p> <p>(沖縄県に棲息する野生動物が保有する E 型肝炎ウイルス及び病原性レプトスピラの疫学的及び分子疫学的研究)</p>
<p>This study was performed to contribute to the control of zoonosis by analyzing zoonotic agents, especially hepatitis E virus (HEV) and pathogenic leptospira in the epidemiology and molecular epidemiology. I investigated for HEV-RNA and anti-HEV antibodies in serum samples obtained from Ryukyu wild boars living in the Okinawa Prefecture. Thirty-five (36.8%) of the 95 wild boars were positive for anti-HEV IgG, and 4 (2 from Iriomote Island and the other 2 from Okinawa Island) of the 140 boars were positive for HEV-RNA. These results suggested that Ryukyu wild boar was a reservoir of HEV. Sequence analysis of a part of ORF1 and ORF2 region indicated that the 2 isolates from the Iriomote's boars were fairly remote from known strains. In phylogenetic tree analyses, however, these isolates segregated to genotype 4, and formed a cluster with Chinese strains, rather than with Japanese ones interestingly. On the other hand, two isolates from Okinawa Island belonged to genotype 3. These wild boars HEV from Okinawa Prefecture had high amino acid identity with Japanese human HEV in a part of ORF2. This result suggests that eating uncooked wild boar meat is a risk for infection with HEV. In the investigation of mongooses on the Okinawa Island, three of 200 mongooses were positive for HEV-RNA. This is the first report from the <i>Feliodea</i> animals. The results suggest that mongoose should be added to the list of reservoir animals of HEV. Full-genome of the JMNG-Oki02C was comprised of 7236 nt, and segregates to a subgroup within genotype 3. Interestingly, this mongoose strain was closely related to a swine isolate previously reported from Okinawa, implicating the possibility of interspecies transmission between these animals. Next, to understand the present state of the distribution of leptospira in wild animals, I investigated small mammals and wild boars. Nine leptospires (4.1%) were isolated from the 219 small mammals. The serovars of the isolates were estimated as Javianica, Hebdomadis, and Castellonis. In the survey of the anti-leptospiral antibody in the wild boar, 51% of the sera demonstrated a positive reaction against leptospira antigen. The result shows that the reservoir animals of leptospira lives around our life environment. Furthermore, in 2003, an outbreak occurred in the river on the northern part of Okinawa Island, transmission was thought to occur by exposure to river water that was contaminated with the urine of infected animals. The findings indicate that recreation in rivers in this area is a significant risk factor for infection with leptospires.</p> <p>This study revealed that zoonotic agents such as HEV and leptospira were harbored by wild animals inhabiting Okinawa Prefecture and provided useful information for the prevention of zoonosis.</p>	

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	中村 正治
審査委員	主査 琉球 大学 教授 仲 田 正
	副査 琉球 大学 教授 川 本 康 博
	副査 琉球 大学 准教授 小 尾 岳 士
	副査 佐賀 大学 教授 和 田 康 彦
	副査 鹿児島 大学 教授 岡 本 新
審査協力者	
題 目	<p>沖縄県に棲息する野生動物が保有する E 型肝炎ウイルス及び病原性レプトスピラの疫学的及び分子疫学的研究</p> <p>[Epidemiological and molecular epidemiological studies of hepatitis E virus and pathogenic Leptospira harbored by wild animals inhabiting Okinawa prefecture]</p>
<p>本研究は、沖縄県に棲息する野生動物が保有する人獣共通感染症病原体、特に E 型肝炎ウイルス (HEV) とレプトスピラについて、その保有状況や病原体の特徴を疫学的及び分子疫学的に解析し、ヒトへの感染防止対策に資するために実施した。</p> <p>HEV が人獣共通感染症として科学的成績に基づき認識されたのは 2003 年であり、その歴史は非常に浅い。それゆえ、その動態および感受性動物を明白にする重要性から様々な動物種において研究がなされつつある。本研究において、我が国唯一の島嶼県である沖縄に棲息するリュウキュウイノシシおよびマングース (侵略的外来生物) で HEV の RNA 検出とその遺伝子解析および抗体調査を行い、以下の結果を得た。</p> <p>1) リュウキュウイノシシ 95 頭中 35 頭 (36.8%) から抗 HEV-IgG 抗体が検出されたことに加え、140 頭中 4 頭 (沖縄島 2、西表島 2) から HEV-RNA が検出され、リュウキュウイノシシが HEV のリザーバーであることを初めて明らかにした。</p> <p>2) 西表島のリュウキュウイノシシ由来の genotype 4 HEV 株は、DNA データバンク上に 90% 以上の相同性を示す株が存在しない独特な株であり、日本土着型 HEV より寧ろ中国株に近い特徴を</p>	

有していることを明らかとし、日本本土よりも中国に近い西表の地理的背景が関与している可能性を示した。

3) 沖縄島のイノシシ HEV は genotype 3 内の 2 つのサブグループに分類された。何れの株も ORF2 領域のアミノ酸は、我が国のヒト由来株と高い相同性を示すことから、イノシシ肉の生食は感染する危険があることを示した。

4) マングースの調査では、200 頭中 3 頭 (1.5%) から HEV-RNA を検出し、HEV 保有動物の中にマングースを付け加えた。*Feliodea* の動物から HEV-RNA の検出は世界初であった。

5) マングース由来 HEV 株 (JMNG-Okio2C) は 7236nt で構成され、全ゲノム配列に基づく分子系統樹において genotype 3 の中の日本株が集族するクラスターに分類された。一方、他の 2 株 JMNG1-Okio5、JMNG2-Okio5 は G3 内の USA 株が混合するクラスターに分類され、各々の由来が異なることを推察した。さらに JMNG-Okio2C は既報の沖縄のブタ由来 HEV 株と極めて近縁であったことから両動物間における種間伝播が推察された。

レプトスピラ症は古くから知られてきた人獣共通感染症であるが、その発症は現在減少傾向にある。しかし、沖縄県の発症率は全国一である。沖縄県の野生動物におけるレプトスピラ保有現況を把握する目的で、沖縄の小型哺乳類、リュウキュウイノシシおよびヒトについて調査を行い、以下の結果を得た。

1) 219 匹の小型哺乳類から 9 株 (4.1%) のレプトスピラが分離され、その血清型は Javanica 7 株、Hebdomadis 1 株、Castellonis 1 株であった。また、リュウキュウイノシシのレプトスピラ抗体保有率は 51% と高率であった。これらの結果より、現在においても従前と同様に我々の身近に病原性レプトスピラを保有する動物が存在することを示した。

2) 2003 年に沖縄島北部の同一河川で発生したヒトのレプトスピラ症の集団感染は、レプトスピラを含む動物の尿で汚染された河川水に曝露されたことが発生要因であることを示し、同地域河川での遊泳はレプトスピラ感染のリスク要因であることを示した。

以上の結果から、本研究は沖縄県の HEV の遺伝的特徴および新たな保有動物種を明らかとし、特に *Feliodea* の動物に関する HEV 研究に新たな方向性を示した。またレプトスピラ血清型分類においては環境要因および動物種要因の 2 面から興味深い成績を得ており、今後のレプトスピラ症予防に関する研究に有用な情報を示したものである。

このように、本論文は沖縄に棲息する野生動物が E 型肝炎やレプトスピラ等の人獣共通感染症病原体を保有していることを明らかにすると共に、感染防止対策上有用な情報を提供したものであり審査員一同は本論文が学位論文として十分に価値があるものと判定した。

学力確認結果の要旨	
学位申請者 氏 名	中村 正治
審査委員	主査 琉球 大学 教授 仲 田 正
	副査 琉球 大学 教授 川 本 康 博
	副査 琉球 大学 准教授 小 尾 岳 士
	副査 佐賀 大学 教授 和 田 康 彦
	副査 鹿児島 大学 教授 岡 本 新
審査協力者	
実施年月日	平成 20 年 7 月 24 日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)	
(口答・筆答)	
<p>主査、副査5名は、平成20年7月24日の公開審査会において、学位論文申請者に対し学位申請論文についての説明を求め、その内容および関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。また、口答による外国語（英語）の学力を確認した。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が大学院博士課程修了者と同等以上の学力ならびに識見を有するものと認め、博士（農学）の学位を与えるに十分な資格を有するものと認めた。</p>	

学位申請者 氏 名	中村 正治
<p>[質問 1] 植物ウイルス等では遺伝子組み換えをよく耳にするが、HEVでは起こらないのか。</p> <p>[回答 1] HEVでの同種異ウイルスの混合感染による組み換えを示す報告はなく、変異は単純な置換・欠失によるものと考えられる。</p> <p>[質問 2] マングースの行動パターンを接触率の立場から教えてほしい。当然、野生動物間の接触の方が多くと考えられるが、実際はどうであろうか。</p> <p>[回答 2] 家畜と野生動物との接触率に対して正確な回答はできないが、同地区で捕獲されたマングースから分離されたHEVの遺伝子は100%一致したことから、一定範囲内でのマングース間の接触は密であると推測できた。さらに、マングースの行動範囲はかなり広いと言われている。一方、家畜との接触が希薄であるとは考えられない。農場の衛生保持のために仕掛けられているネズミ捕りにマングースがかかっている事例が多々報告されている。また今回、沖縄県のブタから分離されたHEVと2塩基しか違いの認められなかったマングース由来のHEVが分離されたその捕獲場所の近くには大きな養豚場が存在した。塩基配列のほとんどが一致したと併せてマングースからブタあるいはブタからマングースへのウイルス伝搬は十分起こりうると思った。</p> <p>[質問 3] リュウキュウイノシシ由来HEVのRNA検出率約3%、抗体陽性率が約3分の1であったが、時間的な変動はあるのか。また本島と離島で差が認められたが、変動によるものではないか。</p> <p>[回答 3] 今回の調査に供した検体は2000年から2001年に採材されたもので、数年レベルでの変動については不明である。現在、採材を一部で継続しており、これから検査を行う予定である。本島と離島の差が変動によるものかという質問の正確な回答とは言えないが、離島での高い検出率はリュウキュウイノシシの頭数と生息密度によるものと考えている。その理由はHEV陽性農場のブタのほとんどがHEV抗体陽性であり、飼育あるいは生息密度と伝搬力には高い相関があると思われたからである。</p> <p>[質問 4] 現在、沖縄県ではHEVに対してどのような監視体制がとられているか。</p> <p>[回答 4] 特別な監視は行われていないが、八重山保健所ではパンフレットや掲示板を介してリュウキュウイノシシの生食の危険性を警告している。</p> <p>[質問 5-1] レプトスピラ症が沖縄で多いのは何故か。また、その原因は沖縄県G川でのヒトの集団発生と関連性はあるか。</p> <p>[回答 5-1] 気候的要因は十分に考えられる。なぜならレプトスピラの増殖には比較的高温が必要とされ、沖縄県は適切な温度が他県に比べ持続しているからである。また、統計的にみても全国におけるレプトスピラ症の発症は8月に圧倒的に集中していることがこれらを裏付けている。さらに大雨のタイミング等も考えられる。これらの要因がG川の集団発生に関与していたのは当然であると思われるが、さら</p>	

にG川はテレビ放送でキャンプスポットとして紹介され、これも集団発生の重要な要因であったと思われる。これまでの農業型の発症からレクリエーション型の発症への移行は、このようなアウトドアレジャーの普及による要因も含んでおり、集団発生の危険性を高めていることも質問の回答ではありませんが、付け加えておきます。

[質問 5-2] 本土でも気温の高い時期や地域もあるが、そのような地域は発症が多いのか。

[回答 5-2] 間接的な回答ではあるが、沖縄県はレプトスピラ症に対する住民意識が高いことも発症件数が多いことにつながっていると思われる。すなわち、他県ではレプトスピラ症であってもレプトスピラ症と診断されなかった場合が多かったのではないかと。レプトスピラ症を発症した患者に対して2003年に届出義務が法律で定められて以降、本土の内では高温地域の宮崎県で比較的多くの発症が報告されている。今後、本質問に対する情報はより正確に得られていくと思う。

[質問 6] HEV genotypeとヒトに対する病原性に関係は示されているのか。

[回答 6] genotype 4 に病原性が高い傾向があることが示されています。さらに、これらの中、ORF1のRNAヘリカーゼをコードする領域の1塩基が変異したタイプで病原性が強かったことが報告されています。もちろん、HEV研究に適した細胞系が確立されていませんので、*in vitro*系でこの病原性を生理・生化学的に証明した報告はありません。

[質問 7] レプトスピラ症の治療薬にブタやウシではストレプトマイシンが絶対的な信頼を得ている。ヒトに対してはどのような抗菌性薬剤が使用されているか。

[回答 7] ヒトに対してもストレプトマイシンが本症に対して強い抗菌作用を有し、信頼されている薬剤であることに変わりはない。しかし、ストレプトマイシンはアミノグリコシド系抗生物質であり、第VIII脳神経障害や腎毒性を有することから臨床症状にあわせて、 $\beta$ -ラクタム系やテトラサイクリン系等が最初に適用される場合が多い。

[質問 8] リュウキュウイノシシのHEV-RNA保有率は、沖縄島北部地域よりも西表島のイノシシの方が高い値を示しており、それに関しては地理的・歴史的な背景があると考察しているが、具体的にはどのようなルートで、どのくらいの期間を経ての伝播の可能性があると考えているのか

[回答 8] 西表島のリュウキュウイノシシから多く検出されたのと同じ genotype4 株は中国には存在するが、沖縄県以外の日本では検出されていない。それに加え、西表島は沖縄島よりも地理的に中国側に近く、この genotype4 株は中国との歴史的な交流の中で人あるいは動物を介して西表島に入ってきたものと考えられる。また、沖縄島よりも西表島の方がリュウキュウイノシシの個体密度が大きく、リュウキュウイノシシ同士の接触が多いため伝播速度が速いとも考えられる。さらに、リュウキュウイノシシが沖縄に入ってきた年代は約 150 万年前と言われており、その頃は沖縄と中国がまだ陸続きであった。その頃すでに HEV が存在したかどうかについては不明だが、直接 HEV を保有したリュウキュウイノシシが西表島に入ってきた可能性も考えられる。