

Abstract of Doctoral Thesis

Name Virhuez Mendoza Milagros

Title: Epidemiological studies on hepatitis E virus among wildlife and discovery of a novel rabbit HEV strain in Japan

(国内の野生動物における E 型肝炎ウイルスの疫学調査と新規ウサギ E 型肝炎ウイルスの発見)

Hepatitis E virus (HEV) is a causative agent of viral hepatitis worldwide. In developing countries, HEV causes water-borne outbreaks with high mortality rates in pregnant women. In industrialized nations, sporadic hepatitis E cases occur by consumption of infected meat, blood transfusion and organ-transplantation. In the last decade, zoonotic food-borne transmission cases have increased in developed countries and novel HEV genotypes have been detected in a large variety of domestic and wild animals, some of which showed zoonotic potential. These findings have showed that hepatitis E is not only a disease limited to water-borne epidemics in low-income countries, but also a zoonotic disease with a high risk for public health.

In 2003, Japan was the first country to report food-borne zoonotic transmission of HEV by the ingestion of game meat (Sika deer). Since then, it has been reported that human is mainly infected with HEV genotypes 3 and 4 and that the main reservoir of HEV in nature was wild boar. Despite of zoonotic transmission from game meat, HEV infection dynamics among wild or feral animals have not been fully understood in Japan. In CHAPTER 1, evaluation and characterization of HEV strains circulating among a wide variety of wild animals in Japan were performed. In CHAPTER 2, we evaluated the prevalence of rabbit HEV genome or antibodies among feral rabbits in Japan and characterized the novel rabbit HEV isolate.

CHAPTER I Nationwide survey of hepatitis E virus infection among wildlife in Japan

In this chapter, we performed a nationwide surveillance of HEV infection by using a total of 5,557 serum samples collected from 15 wild animal species in many prefectures of Japan. Detection of anti-HEV antibodies and HEV RNA was performed by using ELISA and nested reverse transcription PCR. In addition, Sika deer serum samples that were found to be positive for HEV RNA or anti-HEV antibodies, were further evaluated to confirm host mitochondrial DNA. The overall prevalence of anti-HEV antibodies in wild boars was 12.4% (294/2,375), with higher positive rates in big boars (over 50 kg, 18.4%) than in small individuals (less than 30 kg, 5.3%). In addition, HEV RNA was more frequently detected in piglets than in older boars,

(Appended form No.3)

suggesting the presence of acute HEV infection in younger population. Interestingly, our survey results indicated that HEV infection in Sika deer was a very rare event, because ratio of RNA detection and seroprevalence were very low, 0.06% (1/1688) and 0.04% (1/2,250), respectively. Japanese monkeys showed seropositive ratio of 1.4% (2/149) while the other examined wild animals were negative to HEV infection. In conclusion, wild boar, especially piglets, are at high risk of HEV infection, while other wild animals showed less risk or no risk of HEV transmission.

CHAPTER II Characterization of rabbit hepatitis E virus isolated from a feral rabbit

Rabbit hepatitis E virus (HEV) has been detected among farmed, wild and pet rabbits worldwide and recently isolated from immunocompromised patients, suggesting zoonotic transmission. Despite reports on HEV infection among domestic and wild animals in Japan, rabbit HEV has not been identified before this survey. In this study, we assessed the prevalence of HEV infection among feral rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) by detection of anti-HEV antibodies in sera and HEV RNA in fecal swabs. The prevalence of anti-HEV antibodies was 33% (20/60) and HEV RNA was detected from only one animal (1.7%, 1/58). Furthermore, one naïve rabbit was intravenously inoculated with the suspension of the HEV-positive fecal specimen. During an observation period of 21 weeks, the infected rabbit exhibited persistent HEV shedding in feces, intermittent viremia, seroconversion to anti-HEV IgM and IgG, and high alanine aminotransferase (ALT) values, indicating persistent HEV infection. The rabbit HEV isolate, named as JP-59, had a length of 7,282 bp excluding a poly (A) tail, possessed the characteristic 93 bp-insertion in ORF1 and clustered with other rabbit HEV isolates from rabbits and human origin. The JP-59 shared the nucleotide sequence identities of less than 87% with other rabbit HEVs, suggesting that a novel rabbit HEV strain was circulating in Japan.

Our research contributed to clarify HEV dynamics and circulation among wild animal species in Japan. Wild boar population must act as the main reservoir of HEV in wildlife and piglets might be a major source of HEV infection for human and the other animals. Sika deer were rarely infected with HEV, indicating less risk of HEV transmission. Feral rabbits living in the wild were susceptible to HEV infection, and the Japanese rabbit HEV isolate caused a persistent infection in a naïve rabbit. Finally, the other wild animal species showed less risk or no risk of HEV transmission.

(About 800 words in English)

学位論文審査の結果の要旨

氏名	Virhuez Mendoza Milagros
審査委員	主査：国立感染症研究所獣医科学部 獣医科学部長 前田 健
	副査：山口大学 教授 水野 拓也
	副査：山口大学 教授 早坂 大輔
	副査：鹿児島大学 教授 小原 恭子
	副査：山口大学 准教授 下田 宙
題目	Epidemiological studies on hepatitis E virus among wildlife and discovery of a novel rabbit HEV strain in Japan (国内の野生動物における E 型肝炎ウイルスの疫学調査と新規ウサギ E 型肝炎ウイルスの発見)
審査結果の要旨： E 型肝炎ウイルス (HEV) は、ウイルス性肝炎の原因ウイルスである。発展途上国では、HEV は水を介して大流行を引き起こし、妊婦での死亡率が高い。先進国では、汚染した食肉の摂取、輸血、臓器移植によって散発的に E 型肝炎が発生している。HEV は家畜あるいは野生獣肉の摂取により感染する食品媒介性動物由来感染症であるにもかかわらず、国内の野生動物における HEV の感染動態は十分に把握されていない。 本研究では、第 1 章でイノシシおよびシカを含む野生動物における HEV の分布を明らかにし、第 2 章では、日本国内のウサギからウサギ HEV を発見し、そのウイルスの性状解析を実施した。 第 1 章 野生動物における E 型肝炎ウイルス感染に関する全国調査 15 種の野生動物から採取した合計 5,557 検体の血清を用いて、国内における HEV 感染の疫学調査を実施した。イノシシにおける抗 HEV 抗体の保有率は 12.4% (294/2,375) であり、30kg 未満のイノシシ (5.3%) よりも 50kg 以上のイノシシ (18.4%) で高い陽性率が認められた。HEV 遺伝子は成イノシシよりも子イノシシから高頻度に検出され、幼齢期における HEV 感染が示唆された。一方、シカでは遺伝子検出率 0.06% (1/1688)、抗体保有率 0.04% (1/2250) と極めて低く、HEV 感染が非常に稀であることが示唆された。また、ニホンザルの抗体保有率は 1.4% (2/149) であり、他の野生動物では陰性であった。	

以上より、イノシシ、特に子イノシシは HEV 感染リスクが高いが、他の野生動物は HEV 感染リスクが低いか、あるいは全くないことが明らかとなった。

第 2 章 ウサギから検出された新規ウサギ E 型肝炎ウイルスの性状解析

ウサギ E 型肝炎ウイルス (HEV) は、世界各地で養殖ウサギ、野生ウサギ、ペットウサギから検出され、近年では免疫不全患者からも分離され、動物由来感染症であることが示唆されている。国内では家畜および野生動物の HEV 感染が報告されているが、ウサギの HEV はこれまで確認されていなかった。本研究では、国内の野ウサギ (*Oryctolagus cuniculus*) の HEV 感染状況を検討した。抗 HEV 抗体は 33% (20/60)、HEV 遺伝子は 1.7% (1/58) から検出された、さらに、実験的に 1 羽のウサギに HEV 陽性個体の糞便検体の懸濁液を静脈内接種し 21 週間経過を観察した。その結果、感染ウサギは糞便中への HEV の持続的な排出、断続的なウイルス血症、抗 HEV IgM 抗体および IgG 抗体の上昇、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) の上昇、HEV の持続感染が示唆された。本ウサギ HEV は、ポリ A 配列を除いた長さが 7,282bp で、ORF1 に 93bp の特徴的な挿入を有し、系統解析により海外のウサギ HEV と同じクラスターを形成していた。しかし、他のウサギ由来 HEV と塩基配列の相同性が 87%以下であり、新規のウサギ HEV であることが示唆された。

本研究は、イノシシが自然界における HEV の主要な保有宿主であることを明らかにした。シカは HEV にほとんど感染しておらず、シカから人への HEV 感染リスクは低いことが明らかとなった、また、野生ウサギからウサギ HEV を発見し、人への感染のリスクについても調査する必要性が示された。以上により、HEV の国内における分布並びに感染環を明らかにし、動物由来感染症のリスク評価に大きく貢献した。

以上により、本論文は博士 (獣医学) の論文として、妥当なものであると判断された。