

厚生労働科学研究費補助金

厚生労働科学特別研究事業

食品に由来するE型肝炎ウイルスの リスク評価に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

宮村 達 男

平成16（2004）年3月

目 次

I. 総括研究報告書	
食品に由来する E 型肝炎ウイルスのリスク評価に関する研究 宮村 達男	1
II. 分担研究報告書	
1. HEV ウイルス様中空粒子の抗原性 武田 直和	9
2. イノシシ及びシカにおける E 型肝炎ウイルス抗体保有状況の調査 李 天成	13
3. 食品に由来する E 型肝炎ウイルスのリスク評価に関する研究 高島 郁夫	17
4. わが国のブタ、ウシおよびイノシシにおける E 型肝炎ウイルス抗体の保有状況 恒光 裕	21
5. 野生イノシシおよび乗馬における E 型肝炎ウイルスの血清疫学およびウイルス遺伝子検出 福士 秀人	25
6. E 型肝炎ウイルスの動物宿主探索に関する調査研究 阿部 賢治	29
7. 野生イノシシ、野生シカおよびドブネズミにおける E 型肝炎ウイルス保有調査 田中 智之	35
8. 奥三河及び伊那地方に生息するイノシシ、シカの E 型肝炎保有調査 榮 賢司	41
9. 野生動物における HEV 感染状況の把握 大瀬戸 光明	49
10. 兵庫県で発生したシカ肉が原因と考えられた E 型肝炎患者の集団発生と県下野生シカの E 型肝炎ウイルス保有調査 近平 雅嗣	53
III. 研究成果の刊行に関する一覧	61
IV. 研究成果の刊行物・別冊	65
V. E 型肝炎検査マニュアル	130

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）

総括研究報告書

食品に由来する E 型肝炎ウイルスのリスク評価に関する研究

主任研究者 宮村達男 国立感染症研究所 ウイルス第二部長

研究要旨 抗体調査からイノシシ、ブタ、ウマ、ウシ、ラットが HEV あるいは HEV-like に感染しているように思われた。しかし、抗体陽性のシカはみられなかった。イノシシ、ブタ、ラットからは HEV 遺伝子も検出された。ウマ、ウシ、シカからは遺伝子が検出されなかった。検査マニュアルを作成した。

分担研究者		吉井 雅晃	動物衛生研究所
武田 直和	国立感染症研究所室長	山口 成夫	動物衛生研究所
李 天成	国立感染症研究所主任研究官	石黒 直隆	岐阜大学
高島 郁夫	北海道大学教授	山口 剛士	岐阜大学
恒光 裕	動物衛生研究所室長	丁 欣	国立感染症研究所
福士秀人	岐阜大学教授	平野 真	国立感染症研究所
阿部 賢治	国立感染症研究所主任研究官	Tran TT Huy	国立感染症研究所
田中 智之	堺市衛生研究所所長	川端 寛樹	国立感染症研究所
柴 賢司	愛知県衛生研究所部長	角坂 照貴	愛知医科大学
大瀬戸光明	愛媛県立衛生環境研究所室長	Kyaw Soe Tun	ヤンゴン総合病院
近平 雅嗣	兵庫県立健康環境科学研センター	Khin Maung Win	ヤンゴン総合病院
協力研究者		三好 龍也	堺市衛生研究所
白川 貴志	富士レビオ株式会社	吉田 永祥	堺市衛生研究所
宮腰 秀夫	富士レビオ株式会社	岩上 泰雄	堺市衛生研究所
伊藤 哲	富士レビオ株式会社	内野 清子	堺市衛生研究所
川中 正憲	国立感染症研究所室長	藤浦 明	愛知県衛生研究所
佐藤彰一郎	長野県衛生公害研究所	小林 慎一	愛知県衛生研究所
有川 二郎	北海道大学	山下 照夫	愛知県衛生研究所
小菅 正夫	旭川市旭山動物園	伊藤 雅	愛知県衛生研究所
板東 元	旭川市旭山動物園	椛島 由佳	愛知県衛生研究所
福井 大祐	旭川市旭山動物園	大西健次郎	岡崎市保健所
池田 秀利	動物衛生研究所	田中 信治	岡崎市保健所
勝田 賢助	動物衛生研究所	藤平 昇	新城保健所設楽支所
川島 健司	動物衛生研究所	下平 徹	伊那保健所
宮崎 綾子	動物衛生研究所	池田 正彦	兵庫県加西健康福祉事務所
		菊地 豊彦	兵庫県西播磨食肉衛生検査所

A. 研究目的

E 型肝炎ウイルス (HEV) が豚、牛、めん羊等に感染することは従来から指摘されていたが、2003 年 4 月に国内においてシカ肉の生食による E 型肝炎患者が発生し、その直接的因果関係が証明された事例が公表された。一方、E 型肝炎患者から検出された HEV 遺伝子と構造が極めて類似した HEV 遺伝子が、農場で飼育されている豚の血液から検出されており、豚の HEV 汚染実態調査を実施したところ、出荷時期の豚糞便からも HEV 遺伝子が検出されることが判明してきており、ヒトへの感染源として豚の関与が指摘されている。

E 型肝炎については、患者の診断体制が未整備のため、その発生の実態は把握されていないが、日本人の抗体保有率は 5%程度といわれているものの、感染原因は確認されていない。これらの状況を踏まえ、喫緊に判明した食肉に由来する E 型肝炎感染のリスクについて、これを評価し、当面の安全対策を講ずるため、食肉として利用される家畜等の抗体、ウイルスの分布調査を緊急に実施する。

B. 研究方法

(1) 動物血清等

国内のイノシシ 167 頭からの血清、北海道網走管内と群馬県尾瀬で捕獲されたそれぞれ 21 頭のシカ血清、北海道旭川市旭山動物園で飼育されているエゾシカ 8 頭からの血清、北海道大学大学院獣医学研究科公衆衛生学講座に保管されていたドブネズミとクマネズミ血清 120 例、1990-2003 年に 31 農場で採取されたブタ血清計 1077 例、60 農場由来のウシ血清計 400 例、3 農場由来のイノシシ血清 83 例、国内 5 地域で 2000 年～2002 年にかけて捕獲された野ネズミから採取された血清 507 匹分、ミャンマー、ヤンゴン市内で捕獲したドブネズミの血清 100 例、2003 年～2004 年、紀伊半島の紀南地区で狩猟されたイノシシ 9 頭、シカ 2 頭由来血清、

およびカモシカファームで採取された新鮮便 1 検体、堺市内で捕獲されたドブネズミの血清 61 検体、愛媛県、香川県および岐阜県で捕獲されたイノシシの血清 30 例、馬事公苑において乗馬に用いられているウマの血清 100 例、2003 年～2004 年に長野県南部で捕獲されたイノシシの血清 2 例、シカ血清 4 例、愛知県東部で捕獲されたイノシシの血清 15 例、カモシカ血清 1 例、愛知県東部で捕獲されたイノシシの血清 27 例、シカ血清 8 例、愛媛県内で 2000 年～2002 年に捕獲された野生タヌキの肝臓を対象とした。

(2) 抗体検出 ELISA

精製した VLPs を抗原として 98 穴マイクロプレートにコーティングした。動物血清をこのマイクロプレート上で 2 倍階段希釈し、イノシシ血清には抗ブタ IgG-HRP を、ウマ血清には抗ウマ IgG-HRP ないし Protein G HRP を用いた。基質 OPD の吸光度を測定し、カットオフ値を示す最高希釈倍数の逆数を血清抗体価とした。抗体保有率の測定には被検血清は 200 倍希釈して使用した。

一部の血清材料で非特異反応が確認されたため、今回使用した被検血清はいずれも抗原固相化ウエルと抗原非固相化ウエルの両方と反応させ、両者の OD 値の差を正味の OD 値として表した。

(3) RT-PCR による HEV 遺伝子の増幅

E 型肝炎検査マニュアルに従い HEV 遺伝子の検出を行った。First PCR には HEV-F1 および HEV-R2 プライマーを Second PCR には HEV-F2 および HEV-R1 を用いた。PCR 産物は Second PCR 後に 1.5% アガロースゲルにて電気泳動を行い、常法によりエチジウムブロマイド染色後に増幅断片の移動度を陽性対照と比較した。

(4) 組換えバキュロウイルスを用いた HEV 中空粒子 (VLPs) の作製

構造蛋白領域 ORF2 の N 末端から 111 アミノ酸を欠失した領域を RT-PCR 法で増幅し、常

法どおり組換えバキュロウイルスを作製した。Th5 細胞に感染後、電気泳動による 54K 蛋白の確認と電子顕微鏡による中空ウイルス粒子の観察によって VLPs の発現を調べた。VLPs は濃縮・精製後ウサギで抗血清を作製した。

(5) シカ免疫血清の作製

VLPs 100 µl (1mg/ml) にフロイントコンプリートアジュバント 5ml を加え十分混合したものを 筋肉内に数カ所接種した。2 週間後に同様に第 2 回目の免疫を行った。さらに第 3 回目の免疫として、2 週間後に同量の VLPs にインコンプリートアジュバント 5ml を加え十分混合したものを筋肉内に接種した。その 1 週間後に全採血した。

(倫理面への配慮)

現時点ではヒト由来材料の使用やヒトを対象にした実験を予定しておらず、この項目に該当する事項はない。また、実験動物の取り扱いに際しては、各研究所の規定に従った。実験に際しても動物愛護の精神を考慮し、使用動物数、安楽死処理等については適正に実施した。

C. 研究結果

動物ごとに抗体保有率をまとめた。

(1) イノシシ

- ・ 国内で採取された血清 167 頭から IgM 抗体は全く検出されなかったが、77 頭 (46%) が IgG 抗体陽性であった。地域間に抗体保有率に有意な差が認められた。
- ・ 3 農場からの 83 例では 51 例 (61.4%) が IgG 抗体陽性であった。
- ・ 紀伊半島の 9 頭からは抗体が検出されなかった。
- ・ 愛媛県、香川県および岐阜県で捕獲されたイノシシ 30 頭のうち 5 頭 (17%) が IgG 抗体陽性であった。
- ・ 長野県、愛知県のイノシシ 44 頭では 1 頭のみ (2.3%) が IgG 抗体陽性であった。

(2) シカ

- ・ 国内 120 頭のシカは IgG 抗体が全て陰性であった。
- ・ 北海道のシカ 21 例中 3 例、群馬県のシカ 21 例中 4 例は他の血清よりも明らかに高い吸光度を示し、陽性である可能性が示唆された。
- ・ エゾシカ 8 例は陰性であった。
- ・ 紀伊半島のシカ 2 例は陰性であった。
- ・ 長野県、愛知県のシカ 12 頭からは抗体、ウイルス共に陰性であった。

(3) ブタ

- ・ 31 農場中 30 農場 (97%) に HEV の浸淫が確認された。HEV 陽性豚農場での抗体陽性率は 4-5 ヶ月齢で 100% を示し、抗体価 (OD 値) も 4 ヶ月齢で最も高かった。一方、母豚の抗体陽性率ならびに抗体価は肥育豚に比べて低かった。年代別ならびに地域別での抗体陽性率や抗体価に違いは認められなかった。以上の結果より、HEV はわが国のブタ集団に高率に浸淫しているが、陰性農場も存在すること、ブタでの主な感染時期は 1-3 ヶ月齢であること、ブタでの感染は最近急増したのではないことなどが明らかとなった。

(4) ウシ

- ・ 血清 400 例中 26 例 (6.5%) に抗体が検出されたが、それらの抗体価は低かった。一部のウシに HEV あるいは HEV-like virus の感染が起こっている可能性が示された。

(5) ウマ

- ・ ウマ血清 100 検体中 1 検体 (1%) が陽性であった。

(6) ラット

- ・ 北海道内の 6 地区で得られたドブネズミ (102 例) とクマネズミ血清 (18 例) のうちドブネズミの 7 例 (38.9%) が吸光度 0.5 以上の高い値を示し、E 型肝炎ウイルス感染が示唆された。
- ・ 日本のドブネズミ 114/362 (31.5%) 及びクマネズミ 12/90 (13.3%) で IgG 抗体が陽性であった。オキナワハツカネズミ 41 匹、

アカネズミ 12 匹、ハツカネズミ 2 匹では全例陰性であった。ドブネズミにおける抗体陽性率は、体重と共に増加した。一方ミャンマーでは、ドブネズミ 76/100 (76%)で IgG 抗体陽性を示した。

- ・ 堺市内で捕獲されたドブネズミの血清 61 検体は全て陰性であった。

動物からの遺伝子検出をまとめた

(1) シカ

- ・ 国内の IgG 抗体陰性血清 120 例からランダムに 20 頭を選択し、HEV 遺伝子を調べたが、全て陰性であった。
- ・ 愛知県のカモシカ 1 頭は陰性であった。
- ・ 長野県、愛知県のシカ 12 頭は陰性であった。
- ・ 兵庫県、京都府の市販肉 6 検体について検査したが陰性であった。
- ・ 兵庫県の 29 頭のシカの肉、肝臓、血液、直腸宿便について調べたが、すべて陰性であった。
- ・ 紀伊半島のカモシカ便 1 検体は陰性であった。

(2) イノシシ

- ・ 香川県由来の 4 検体が陽性対照と同様の断片長を示した。これらの検体は抗体検索ではいずれも陰性であった。
- ・ 愛知県で捕獲された 1 頭の糞便及び血液から IV 型 HEV が検出された。ウイルスが検出されたイノシシは 1 歳と若く、抗体が見られなかったことから、感染初期であったものと思われる。
- ・ 平成 16 年 1 月に和歌山紀北地方で捕獲されたイノシシ 1 頭から「I 型 HEV が検出された。

(3) ウマ

- ・ 検索した 100 検体すべてに増幅産物は認められなかった。

(4) タヌキ

- ・ 愛媛県内で 2000 年～2002 年に捕獲された野生タヌキの肝臓 30 例は全て陰性であった。

(5) ラット

- ・ ミャンマーではドブネズミ 76/100 (76.0%) で IgG 抗体陽性を示したが、このうちの 3 例の肝組織から、PCR 法にて RNA 陽性所見が観察された。

シカ標準血清の作製

3 回免疫後の抗体価を r-HEV-VLP を用いて測定すると 50,000 倍以上の値を示した。陰性抗原に対しては明らかに低い反応を示したことから、標準血清として有効と考えられた。

Genotype 4 HEV VLP の抗原性

Genotype 4 VLP を作製した。この粒子を用いた ELISA 法によって、genotype 1、genotype 3、および genotype 4 の HEV 感染患者血清から IgG、および IgM 抗体を検出した。Genotype 4 VLP も ELISA による E 型肝炎の診断に有用であった。Genotype 1 の VLP に対する単クローン抗体を作製した。単クローン抗体を用いた解析の結果、genotype 間には抗原性の異なるエピトープが存在し、一部のエピトープは立体構造に依存することが明らかになった。

E 型肝炎検査マニュアルの作成

RT-PCR による遺伝子検出、抗体 ELISA、および抗原 ELISA について記述した。

D. 考察

(1) イノシシ

国内の 167 頭を調べた結果、約半数が HEV に暴露されていることが明らかになった。六ヶ月齢のブタでは 90%以上が HEV 抗体陽性であることが明らかになっているが、イノシシとブタは生育環境が極めて近縁な動物であり、どちらかに感染源があれば、両方が感染されることは十分考えられる。飼育されているブタと違い、野生のイノシシの年齢の把握は非常に難しいため、年齢と抗体保有率の関係の解析はできな

った。しかし、地域間でのイノシシの抗体保有率に明らかな差が見られ、保有率に影響を及ぼす要素をさらに検討する必要がある。香川県および愛媛県で捕獲されたイノシシから HEV 抗体が検出された。香川県で捕獲されたイノシシからは HEV 遺伝子断片が検出された。イノシシに HEV ないし HEV 関連ウイルス感染が存在することが示された。

(2) シカ

120 検体のシカの血清の IgG 抗体を調べたが、抗体陽性の検体は見つからなかった。さらに120検体から20検体をランダムに選択して、RT-PCR 法により E 型肝炎ウイルス遺伝子の検出を試みたが、全て陰性であった。シカ生肉の摂食が原因と思われる E 型肝炎例が報告され、シカが HEV に感染している可能性がある。しかし HEV がどのような感染経路でシカに感染するかは依然不明である。今回調査した検体の数が少なく、地域の偏りもあるので、正確な結論が出せないが、シカの HEV 抗体保有率は低いことが明らかになった。

北海道と群馬県でそれぞれ 3 例と 4 例が残りの検体に比べて高い値を示し、吸光度の分布が二峰性になった。このため、これらは非特異的な ELISA の反応によるバックグラウンドではなく、HEV に対する特異的抗体の陽性例である可能性が示唆された。しかし、加齢やその他の感染症や外傷などによって ELISA でのバックグラウンドが著明に上昇する場合のことは一般に良く認められる現象である。このため、これら検体の確定診断のためには他の方法を併用して成績を総合的に判断したり、例数を増やす等の今後の解析が不可欠で、今回の成績のみから陽性とは確定出来ない。

(3) ブタ

HEV はわが国のブタ集団に高率に浸淫しているが、陰性農場も存在することが明らかとなった。今回確認された陰性農場は、一企業経営の SPF 農場であり、検査した同企業の他の SPF

農場は HEV 陽性であった。なぜこの農場のみが HEV 陰性であったのかは明らかではないが、HEV 清浄化実施の可能性を示唆する例として興味深い。HEV 陽性農場においては、4-5 ヶ月齢の肥育豚の抗体価ならびに抗体陽性率が最も高かった。このことは HEV の主要な感染時期が 1-3 ヶ月齢であることを示唆する。一方、6 ヶ月齢ブタならびに母豚（15 ヶ月齢以降）での抗体価ならびに抗体陽性率は 4-5 ヶ月齢ブタと比較して低かった。このことは、母豚においては HEV の感染率が低く、感染の程度も肥育豚に比べて軽度であると考えられるよりも、若齢期（1-3 ヶ月齢）での感染の後に再感染の機会が少なく、そのため抗体価が低下して一部は抗体が陰転した結果ではないかと推測する。6 ヶ月齢での抗体価ならびに陽性率が 4-5 ヶ月齢のそれらに比較して低値であったことが、この考えを支持する。ヒトでは少なくとも感染後数年間は抗体が検出されると報告されていることから、ブタはヒトに比較して HEV 抗体価の低下が早いとも推測される。

今回、ブタにおける抗体陽性率に地域差は認められなかった。また、血清の採取時期による違いは認められなかった。これらの結果より、ブタでの HEV 感染には地域性は少なく、また、近年感染率が急増したのではないと考えられた。

(4) ウシ

ウシ血清中に HEV と反応する抗体の存在は既に報告されている。今回の調査においても低率であるが抗体陽性例が確認された。これら陽性血清は、予め HEV 抗原と反応させた後に ELISA を実施すると OD 値が低下したことから、ELISA での陽性反応は HEV 抗原との反応の結果と考えられた。しかしながら、現在までウシから HEV や HEV 遺伝子は検出されていないため、今回検出された抗体は HEV 抗体なのか、HEV と交差反応性を示す HEV-like virus の抗体なのかは明らかではない。

(5) ウマ

乗馬からも HEV 抗体が検出されたが、HEV 遺伝子は検出されなかった。乗馬に HEV ないし HEV 関連ウイルス感染が存在することが示された。

(6) タヌキ

検査に供したタヌキの年齢は不詳であったが、当地方においては HEV を保有しているタヌキが捕獲されることは多くないことが示唆された。しかし、捕獲された時には HEV の一過性の感染がすでにクリアーされていたことも考えられ、野生タヌキにおける HEV 感染の頻度については、今回の調査だけでは推測できなかった。今後タヌキの HEV 抗体保有状況等の調査が必要と思われる。

(7) ラット

野生ラット (特にドブネズミ) において、HEV 感染が蔓延している可能性が示唆された。国内においては、捕獲される地域において、その感染率が異なるのは興味深い。特に沖縄ではヒトでも HEV 抗体陽性率が高いことから、野生ラットとの関連が注目される。また国内以外では、HEV 浸淫国であるミャンマーに生息する野生でも高い抗体陽性率を示した。さらにミャンマーで捕獲されたラットでは、PCR 法にて HEV RNA 陽性所見が観察された。自然界における HEV の動物宿主として、またヒトへの感染源として野ネズミを考慮する必要があると思われた。

ドブネズミとクマネズミ血清において同様に抗 HEV 抗体を測定すると、ドブネズミ血清でのみ高い (>0.5) 吸光度を示す例が 102 例中 7 例 (6.9%) で認められた。それに対してクマネズミでは 0.1~0.3 を示す例が 18 例中 2 例 (11.1%) のみであった。このような陽性率のげっ歯類種による相違が、ウイルスの感受性によるものか、母集団数の相違によるものかについてさらなる調査が必要である。また、高い吸光度を示す例と陰性例の出現分布が二つに分かれないため、それら高吸光度例が非特異反応によるものなのか特異反応によるものなのかを推

察することが出来なかった。今後、他の血清診断法、例えば、Western blotting 法の成績などと比べることにより確定診断することが必要である。

(8) シカ標準血清

VLPs に対するシカ免疫血清は高い抗体価を示したが、陰性抗原に対して低い反応しか示さず、標準免疫血清として有効であることが判明した。

(9) VLP の抗原性

Genotype 1 と genotype 4 の 2 種類の VLP を作製することができた。患者血清を用いた抗体 ELISA で抗原性を見る限り差はなさそうである。したがって、高い抗体価を持つ急性期の血清を用いた場合、どちらの VLP を用いても診断は可能と思われる。しかしながら、ホモの組み合わせに比べヘテロでは反応性が若干弱く、血清疫学を行う際、どの抗原を用いるかによって抗体価に差が生じる可能性がある。単クローン抗体では G1 VLP と G4 VLP で抗原性に差が検出されており、これが患者血清との反応性の差となっているのかもしれない。患者がどの遺伝子型のウイルスに感染していたかとも絡む問題であり、今後の課題である。

E. 結論

- ・ イノシシは抗体保有率が高く、地域間の差が存在する。III 型と IV 型の遺伝子も検出された。
- ・ HEV はわが国のブタ集団に高率に浸淫しているが、陰性農場も存在する。ブタでの HEV の主要な感染時期は 1-3 ヶ月齢である。母豚の抗体陽性率や抗体価は肥育豚に比べて低い。ブタでの HEV 感染率に地域差は確認されない。ブタでの HEV 感染は最近急増したのではない
- ・ ウシ、ウマにおいて HEV あるいは HEV-like virus 感染の可能性がある
- ・ シカからは確実な抗体は検出されなかった。

遺伝子も検出されなかった。

- ・ 野生タヌキ 30 例の肝臓から、HEV-RNA の検出を試みたが全例陰性で、HEV を保有している野生タヌキは多くはないことが示唆された。
- ・ 野生ラット種間において、HEV 感染が蔓延している可能性が示唆された。ヒトへの HEV 感染源として、今後考慮する必要があると思われる。
- ・ IV 型 VLP も ELISA による E 型肝炎の診断に有用であった。I 型の VLP に対する単クローン抗体は Genotype 間の異なるエピトープを認識した。
- ・ 検査マニュアルを作成した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Li T-C, Suzaki Y, Ami Y, Dhole TN, Miyamura T, Takeda N: Protection of cynomolgus monkeys against HEV infection by oral administration of recombinant hepatitis E virus-like particles. *Vaccine* 2004;22: 370-377.
2. Hirano M, Ding X, Li TC, Takeda N, Kawabata H, Koizumi N, Kadosaka T, Goto I, Masuzawa T, Nakamura M, Taira K, Kuroki T, Tanikawa T, Watanabe H, Abe K: Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan. *Hepatology Res* 2003;27: 1-5.
3. Hirano M, Ding X, Tran HT, Li T-C, Takeda N, RSata T, Nakamura S, Abe K: Prevalence of antibody against hepatitis E virus in various species of non-human primates: Evidence of

widespread infection in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). *Jpn. J. Infect. Dis.* 2003;56: 8-11.

4. Ding X, Li TC, Hayashi S, Masaki N, Tran TH, Hirano M, Yamaguchi M, Usui M, Takeda N, Abe K: Present state of hepatitis E virus epidemiology in Tokyo, Japan. *Hepatology Res* 2003;27: 169-173.
5. Huy TT Tran, Hiroshi Ushijima, Vo Xuan Quang, Nguyen Phuong, Tian-Cheng Li, Shigeki Hayashi, Truong Xuan Lien and Kenji Abe: Prevalence of hepatitis virus types B through E and genotypic distribution of HBV and HCV in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Hepatology Research* 2000;26: 275-280.

2. 学会発表

1. 李 天成、落合 晋、石古博昭、武田直和、宮村達男。輸入感染症としての E 型肝炎。日本ウイルス学会、第 51 回学術集会 2003 年 10 月 京都
2. 李 天成、落合 晋、永田典子、石古博昭、武田直和、宮村達男。HEV Genotype IV の構造蛋白の発現および抗原性の解析。日本ウイルス学会、第 51 回学術集会 2003 年 10 月 京都
3. 阿部賢治、平野 真、丁 欣、Tran TT Huy、佐多徹太郎、李 天成、武田直和、川端寛樹、小泉信夫、渡辺治雄、角坂照貴、後藤郁夫、増沢俊幸、中村正治、平良勝也、黒木俊郎、谷川 力：E 型肝炎ウイルスの動物宿主を探る（1）日本に生息する野ネズミ類における疫学調査と感染流行の実態、第 39 回日本肝臓学会総会、2003 年 5 月、福岡
4. 平野 真、丁 欣、Tran TT Huy、岩城陽子、佐多徹太郎、李 天成、武田直和、

- 中村 伸、阿部賢治：E 型肝炎ウイルスの動物宿主を探る（2）各種霊長類における疫学調査とニホンザルにおける感染流行。第 39 回日本肝臓学会総会、2003 年 5 月、福岡
5. 丁 欣、平野 真、Tran TT Huy、伊藤玲子、早川依里子、佐多徹太郎、李 天成、武田直和、山口真理、薄井 貢、正木尚彦、林 茂樹、阿部賢治：東京地域における HEV 感染の実態と予防対策の必要性。第 39 回日本肝臓学会総会、2003 年 5 月、福岡
 6. Huy TT Tran, Xin Ding, Eriko Hayakawa, Tetsutaro Sata, Hiroshi Ushijima and Kenji Abe: Geographic distribution of HBV genotypes A through G in 13 countries: International collaborative survey. 第 39 回日本肝臓学会総会、2003 年 5 月、福岡
 7. 菊地 馨、島袋容司樹、宮城政剛、慶田喜秀、丁 欣、阿部賢治：沖縄県における肝疾患例の E 型肝炎ウイルス感染の血清疫学的検討。第 39 回日本肝臓学会総会、2003 年 5 月、福岡
 8. 寺澤総介、伊藤玲子、丁 欣、阿部賢治：消化器症状と原因不明の急性肝炎と診断された小児における E 型肝炎ウイルスの関わり。第 39 回日本肝臓学会総会、2003 年 5 月、福岡
 9. 小松陽樹、十河 剛、野崎昌俊、乾 あやの、藤澤知雄、李 天成、丁 欣、阿部賢治：小児における E 型肝炎ウイルス抗体保有率の検討。第 39 回日本肝臓学会総会、2003 年 5 月、福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）
「食品に由来する E 型肝炎ウイルスのリスク評価に関する研究」
分担研究報告書

HEV ウイルス様中空粒子の抗原性

分担研究者 武田直和（国立感染症研究所）

研究要旨 Genotype 4 VLP を作製した。この粒子を用いた ELISA 法によって、genotype 1、genotype 3、および genotype 4 の HEV 感染患者血清から IgG、および IgM 抗体を検出した。Genotype 4 VLP も ELISA による E 型肝炎の診断に有用であった。Genotype 1 の VLP に対する単クローン抗体を作製した。単クローン抗体を用いた解析の結果、genotype 間には抗原性の異なるエピトープが存在し、一部のエピトープは立体構造に依存することが明らかになった。

協力研究者

李 天成（国立感染症研究所）
白川貴志、宮腰秀夫、伊藤 哲
（富士レビオ株式会社）

A. 研究目的

E 型肝炎（HEV）には少なくとも 4 つの遺伝子型（genotype）が存在する。血清型は全て同一であろうと推測されているが、明確な実験データはない。Genotype 間の構造蛋白のホモロジーは核酸で 80% 前後、アミノ酸レベルで 90% 以上である。HEV の血清型に違いがあれば、抗体検査やワクチンの開発で問題が生じる可能性がある。これまでに genotype 1 の HEV を用いてウイルス様中空粒子(VLP)を発現した。本研究では genotype 4 の VLP を発現し、genotype 1 と genotype 4 の抗原性を比較検討した。

B. 研究方法

中国へ旅行し、帰国して 2 ヶ月後に発

症した急性肝炎患者血清中に genotype 4 の遺伝子を同定した。ORF2 の N 末端から 111 アミノ酸を欠失した領域を RT-PCR 法で増幅し、常法どおり組換えバキュロウイルスを作製した。昆虫細胞を MOI:10 で感染後、培養上清からウイルス様中空粒子（VLP）を回収し、精製した。ウサギ抗 VLP 抗体、E 型肝炎患者血清、および genotype 1 に対する単クローン抗体を用い、免疫電子顕微鏡、ELISA 法等で抗原性を比較した。

C. 研究結果

1. Genotype 4 VLP の発現

はじめに SDS-PAGE および患者血清を用いたウエスタンブロット法で発現蛋白を解析した。組換えバキュロウイルス感染細胞内には感染 2 日目に、非感染細胞やバキュロウイルス野生株感染細胞では検出されない分子量 58k のバンドが出現した。発現は 5 日目にプラトーに達し、7～8 日目には 58k 以外に 57k、56k、およ

び 54K のバンドが出現した。上清中には感染後 4 日目から 57k、56k、および 54K のバンドが出現し、これらの発現は 7 日目にプラトーに達した。感染 7 日目の上清を回収し、超遠心法で濃縮し、その沈査を電子顕微鏡で観察したところ、直径約 27nm の中空粒子が多数観察された。Genotype 4 の VLP が作製できた。感染上清を健常人血清と genotype 4 HEV 感染患者血清と反応後、電子顕微鏡で観察したところ、患者血清でのみ凝集塊が観察された。したがって VLP はネイティブな HEV と同じ抗原性を有する粒子であった。

2. Genotype 1 VLP と genotype 4 VLP の抗原性

Genotype 1 VLP (G1 VLP) および genotype 4 VLP (G4 VLP) を抗原に用い、E 型肝炎患者血清との反応を抗体 ELISA で比較した。RT-PCR によってそれぞれ genotype 1、3 および 4 の遺伝子が検出されているそれぞれ 3 人の患者血清 (G1 血清、G3 血清、および G4 血清) を用いた。IgG の検出では、G1 血清、G3 血清とも 3 人とも G1 VLP と G4 VLP に対する反応性に差はなく、G4 血清において 3 人中 2 人で G1 VLP に対する反応性が G4 VLP に対するそれに比べ 1 希釈 (2 倍) 低い値が得られた。IgM の検出においてもほぼ同様であって、G4 血清においてのみ、3 人中の 1 人の反応性が G1 VLP で G4 VLP に比べ 1 希釈 (2 倍) 低い値が得られた。したがって、抗体 ELISA で見る限り、G1 VLP と G4 VLP に明瞭な抗原性の差は検出されなかった。これを確認するために HEV 感染患者から経時的に採取した血清を用いて抗体 ELISA で G1

VLP と G4 VLP の反応性を比較した。一人ずつの患者血清を用いたが、これらの患者の急性期血清からはそれぞれ genotype 1 と genotype 4 のウイルス遺伝子が検出されている (G1 患者血清、G4 患者血清)。その結果、G4 患者血清では G1 VLP と G4 VLP での抗体価は完全に一致した。一方、G1 患者血清では G4 VLP の反応性が G1 VLP に比べ急性期の血清で 1 希釈 (2 倍) 低く出る傾向が見られた。

3. VLP と単クローン抗体との反応

Genotype 1 の VLP に対する単クローン抗体を作製した。構造蛋白のカルボキシ末端を認識する 4 種類の単クローン抗体 (Mab131、Mab223、Mab218、Mab124) と G1 および G4 VLP の反応性を VLP を抗原に用いた抗体 ELISA で比較した。Mab131 では G1 VLP と G4 VLP で差がなかった。エピトープマッピングから、Mab131 が認識する領域は Genotype 1 と genotype 4 でアミノ酸配列が共通に保存されていた。残りの 3 種類の抗体は G4 VLP に対して全く反応しなかった。Mab223 と Mab218 が認識する領域のアミノ酸配列は Genotype 1 と genotype 4 で大きく異なっており、抗原性が異なる原因と考えられた。また、Mab124 が認識する領域のアミノ酸配列に差はなく、抗原性の違いは立体構造に依存していることが示唆された。

D. 考察

Genotype 1 と genotype 4 の 2 種類の VLP を作製することができた。患者血清を用いた抗体 ELISA で抗原性を見る限り差はなさそうである。したがって、高い抗体価を持つ急性期の血清を用いた場合、

どちらの VLP を用いても診断は可能と思われる。しかしながら、ホモの組み合わせに比べヘテロでは反応性が若干弱く、血清疫学を行う際、どの抗原を用いるかによって抗体価に差が生じる可能性がある。単クローン抗体では G1 VLP と G4 VLP で抗原性に差が検出されており、これが患者血清との反応性の差となっているのかもしれない。患者がどの遺伝子型のウイルスに感染していたかとも絡む問題であり、今後の課題である。

E. 結論

Genotype 4 VLP も ELISA による E 型肝炎の診断に有用であった。Genotype 1 の VLP に対する単クローン抗体は Genotype 間の異なるエピトープを認識した。

F. 研究発表

1. 学会発表

李 天成、落合 晋、石古博昭、武田直和、宮村達男。輸入感染症としての E 型肝炎。日本ウイルス学会、第 51 回学術集会 2003 年 10 月 京都

李 天成、落合 晋、永田典子、石古博昭、武田直和、宮村達男。HEV Genotype IV の構造蛋白の発現および抗原性の解析。日本ウイルス学会、第 51 回学術集会 2003 年 10 月 京都

2. 論文発表

Li T-C, Suzaki Y, Ami Y, Dhole TN, Miyamura T, Takeda N: Protection of cynomolgus monkeys against HEV infection by oral administration of recombinant

hepatitis E virus-like particles. Vaccine 2004;22: 370-377.

Hirano M, Ding X, Li TC, Takeda N, Kawabata H, Koizumi N, Kadosaka T, Goto I, Masuzawa T, Nakamura M, Taira K, Kuroki T, Tanikawa T, Watanabe H, Abe K: Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan. Hepatol Res 2003;27: 1-5.

Hirano M, Ding X, Tran HT, Li T-C, Takeda N, RSata T, Nakamura S, Abe K: Prevalence of antibody against hepatitis E virus in various species of non-human primates: Evidence of widespread infection in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). Jpn. J. Infec. Dis. 2003;56: 8-11.

Ding X, Li TC, Hayashi S, Masaki N, Tran TH, Hirano M, Yamaguchi M, Usui M, Takeda N, Abe K: Present state of hepatitis E virus epidemiology in Tokyo, Japan. Hepatol Res 2003;27: 169-173.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）
「食品に由来する E 型肝炎ウイルスのリスク評価に関する研究」
分担研究報告書

イノシシ及びシカにおける E 型肝炎ウイルス抗体保有状況の調査

分担研究者 李 天成（国立感染症研究所）

研究要旨 E 型肝炎ウイルス（HEV）の Virus-like particle (VLP)を用いた ELISA 法によって、わが国のイノシシ及びシカにおける HEV 抗体保有率を調べた。合計 167 頭のイノシシを用い、血清中の IgG 抗体と IgM 抗体を調べた。IgM 抗体は全く検出されなかったが、77 頭（46%）で IgG 抗体を検出した。地域間で抗体保有率に有意差があることが明らかになった。また、120 頭のシカ血清では IgG 抗体は検出されなかった。このうちの 20 頭について血清中の HEV 遺伝子を調べたが、いずれも陰性であった。

協力研究者

川中正憲、武田直和、宮村達男

（国立感染症研究所）

恒光 裕（動物衛生研究所）

佐藤彰一郎（長野県衛生公害研究所）

るため、イノシシとシカの HEV 抗体とウイルス保有状況を調査した。

A. 研究目的

近年、我が国では輸入感染例だけでなく、固有の E 型肝炎ウイルス HEV によると考えられる E 型肝炎症例が見つかってきている。ブタが予想以上に高い頻度で (HEV)III 型と IV 型に感染していることも判明してきた。日本の野生ラット（ドブネズミ及びクマネズミ）では 13.3~31.5% が、ニホンザルでは 36% が抗体を持っていることがこれまでの調査で明らかになった。また、野生のシカを喫食し、感染、発症した例も報告された。本研究では我が国における HEV の自然宿主はなにか？また各種家畜、野生動物における感染状況はどのようなものであるのか？を明らかにす

B. 研究方法

HEV ミャンマー株の構造蛋白を組換えバキュロウイルスを用いて昆虫細胞で発現し、産生された中空ウイルス様粒子（VLP）を用いて抗体検出 ELISA 系を作出した。この抗体検出系は感度が高く、大量にかつ簡便に血中抗体を検索するのに適している。各地域で捕獲したイノシシ及びシカの血清中の HEV 抗体を測定した。さらに RT-PCR 法により HEV 遺伝子の検出を試みた。

C. 研究結果

1. イノシシの抗体保有率

1996 年の三重県(30 頭)、1997~1998 年の沖縄県(63 頭)、2000 年の宮崎(46 頭)、三重(9 頭)、富山(7 頭)、熊本(7 頭)、鹿児島(5 頭)の合計 167 頭のイノシシの血

清を用いた。イノシシ血清中の IgG 抗体と IgM 抗体を調べた結果、IgM 抗体は全く検出されなかった。77 頭 (46%) のイノシシの血清から IgG 抗体が検出された。地域ごとの抗体保有率は三重県 15.4% (6/39)、沖縄県 61.5% (40/63)、宮崎県 50% (23/46)、富山県 71.4% (5/7)、熊本県 28.6% (2/7)、鹿児島県 0% (0/5) であった。三重県と宮崎、三重と沖縄、沖縄と宮崎の間に抗体保有率に有意な差が認められた。

2. シカの抗体保有率

今回調査した 120 頭のシカは IgG 抗体が全て陰性であった。これらの血清からランダムに 20 頭を選択し、HEV 遺伝子を調べたが、これらも全て陰性であった。

D. 考察

167 頭のイノシシの抗体保有率を調べた結果、約半数が HEV に暴露されていることが明らかになった。六ヶ月齢のブタでは 90%以上が HEV 抗体陽性であることが明らかになっているが、イノシシとブタは生育環境が極めて近縁な動物であり、どちらかに感染源があれば、両方が感染されることは十分考えられる。飼育されているブタと違い、野生のイノシシの年齢の把握は非常に難しいため、年齢と抗体保有率の関係の解析はできなかった。しかし、地域間でのイノシシの抗体保有率に明らかな差が見られ、保有率に影響を及ぼす要素をさらに検討する必要がある。

一方、120 検体のシカの血清の IgG 抗体を調べたが、抗体陽性の検体は見つからなかった。さらに 120 検体から 20 検体をランダムに選択して、RT-PCR 法によ

り E 型肝炎ウイルス遺伝子のを試みたが、全て陰性であった。シカ生肉の摂食が原因と思われる E 型肝炎症例が報告され、シカが HEV に感染している可能性がある。しかし HEV がどのような感染経路でシカに感染するかは依然不明である。今回調査した検体の数が少なく、地域の偏りもあるので、正確な結論が出せないが、シカの HEV 抗体保有率は低いことが明らかになった。

E. 結論

イノシシは抗体保有率が高く、地域間の差が存在する。シカからは抗体も遺伝子も検出されなかった。

F. 研究発表

1. 学会発表

李 天成、落合 晋、石古博昭、武田直和、宮村達男。輸入感染症としての E 型肝炎。日本ウイルス学会、第 51 回学術集会 2003 年 10 月 京都

李 天成、落合 晋、永田典子、石古博昭、武田直和、宮村達男。HEV Genotype IV の構造蛋白の発現および抗原性の解析。日本ウイルス学会、第 51 回学術集会 2003 年 10 月 京都

2. 論文発表

Li T-C, Suzaki Y, Ami Y, Dhole TN, Miyamura T, Takeda N: Protection of cynomolgus monkeys against HEV infection by oral administration of recombinant hepatitis E virus-like particles. Vaccine 2004;22: 370-377.

Hirano M, Ding X, Li TC, Takeda N,

Kawabata H, Koizumi N, Kadosaka T, Goto I, Masuzawa T, Nakamura M, Taira K, Kuroki T, Tanikawa T, Watanabe H, Abe K: Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan. *Hepatol Res* 2003;27: 1-5.

Hirano M, Ding X, Tran HT, Li T-C, Takeda N, RSata T, Nakamura S, Abe K: Prevalence of antibody against hepatitis E virus in various species of non-human primates: Evidence of widespread infection in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). *Jpn. J. Infec. Dis.* 2003;56: 8-11.

Ding X, Li TC, Hayashi S, Masaki N, Tran TH, Hirano M, Yamaguchi M, Usui M, Takeda N, Abe K: Present state of hepatitis E virus epidemiology in Tokyo, Japan. *Hepatol Res* 2003;27: 169-173.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）
食品に由来する E 型肝炎ウイルスのリスク評価に関する研究
分担研究報告書

分担研究者 高島 郁夫 北海道大学大学院獣医学研究科 教授
協力研究者 有川 二郎 北海道大学大学院医学研究科附属動物実験施設 教授

研究要旨 飼育エゾシカを用いて、組み換え E 型肝炎ウイルス様粒子(r-HEV-VLP)に対する免疫血清を作成した。3 回免疫後の抗体価を r-HEV-VLP を用いて測定すると 50,000 倍以上の値を示した。陰性抗原に対しては明らかに低い反応を示したことから、標準血清として有効と考えられた。北海道と群馬県で捕獲されたシカの血清それぞれ 21 例および旭川市旭山動物園で飼育されているエゾシカ 8 例について r-HEV-VLP を抗原として 200 倍血清でスクリーニングしたところ、北海道の 3 例と群馬県の 4 例は他の血清よりも明らかに高い吸光度を示し、陽性である可能性が示唆された。北海道内の 6 地区で得られたドブネズミ (102 例) とクマネズミ血清 (18 例) 合計 120 例について 100 倍血清で抗 r-HEV-VLP 抗体を測定するとドブネズミの 7 例が吸光度 0.5 以上の高い値を示した。以上の様に、シカとネズミ血清には r-HEV-VLP に対して ELISA で高い値を示すものがあり、E 型肝炎ウイルス感染が示唆された。今後、ELISA の陽性限界の策定、他の血清診断法との併用による確定診断が必要と考えられた。

A. 研究目的

わが国の野生動物や家畜における E 型肝炎ウイルスの流行状況を明らかにすることを目的として、シカとネズミ血清を対象に抗体検出法を確立するとともにスクリーニングを実施する。

B. 研究方法

1. シカ免疫血清の作成

エゾシカ 1 歳、雄 1 頭を用いて免疫血清を作成した。組み換え E 型肝炎ウイルス様粒子(r-HEV-VLP)は国立感染症研究所武田直和博士より分与を受けた。第 1 回目の免疫は r-HEV-VLP100 μ l (1mg/ml) にフロイントコンプリートアジュバント 5ml を加え十分混合したものを筋肉内に数カ所接種した。2 週間後に同様にして第 2 回目の免疫を行った。さらに第 3 回目の免疫として、2 週間後に同量の r-HEV-VLP にイ

ンコンプリートアジュバント 5ml を加え十分混合したものを筋肉内に接種した。その 1 週間後に全採血した。プレ血清と各免疫前の血清も採取した。本免疫血清の作成には、旭川市旭山動物園、小菅正夫、板東元、福井大祐氏の協力を得た。

2. シカ血清

北海道網走管内と群馬県尾瀬で捕獲されたそれぞれ 21 頭のシカ血清を用いた。また、北海道旭川市旭山動物園で飼育されているエゾシカ 8 頭からも採血し血清を得た。北海道の血清は平成 12 年に採取され北海道大学大学院獣医学研究科生態学教室に保管されていたものであり、群馬県の血清については安富舞氏（日本獣医畜産大学大学院獣医学研究科博士課程 1 年）と群馬県勢多東猟友会により平成 15 年に採取・提供された。旭山動物園の採血では同園の小菅正夫、板東元、福井大

祐氏の協力を得た。

3. ドブネズミとクマネズミ血清

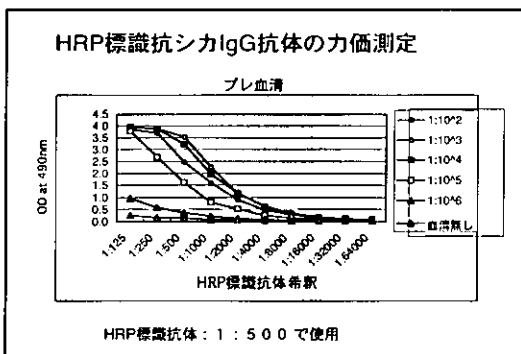
北海道大学大学院獣医学研究科公衆衛生学講座に保管されていたドブネズミとクマネズミ血清(道内6地区で平成14年10月捕獲)120例を用いた。

4. ELISA法

1) 抗シカIgG抗体の力価測定

KPL社製 HRP labeled anti deer igG(H+L) rabbit を二次抗体として用いた。シカ血清を carbonate buffer で階段希釈した後、直接ELISAプレートに入れて固相化した。これに階段希釈した抗シカ IgG 抗体を加えたあと常法通り発色させた。発色には OPD を用い、490 nm の吸光度を測定した。

シカ血清の濃度が充分量である場合、抗シカ IgG 抗体は、500 倍希釈までほぼ同じ吸光度を示したことから 500 倍希釈で二次抗体を使用することとした。



2) ELISA法

ELISAにはr-HEV-VLP(1ug/ml)を100ul/well加えて抗原を固相化した。シカ血清は1:200倍で、ネズミ血清は1:100倍でスクリーニングした。OPDで発色させ、490nmにおける吸光度

を測定した。

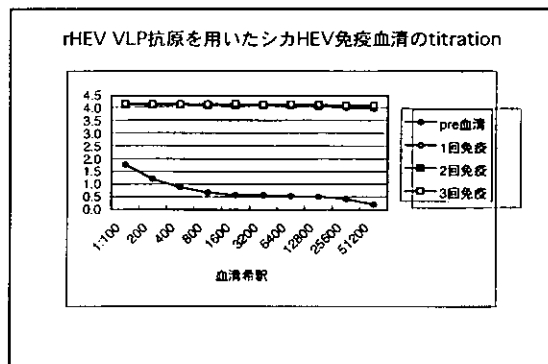
ELISAによる抗体測定手順

1. Coating a well with rHEV VLP (1ug/ml), 100ul/well at 4C overnight.
2. Wash with PBS-T 3 times.
3. Blocking with 3% BSA in PBS (200ul/well) at 37C for 1hr.
4. Wash with PBS-T 3 times.
5. Add serum sample in ELISA buffer, 100ul/well at 37 C for 1hr.
6. Wash with PBS-T 3 times.
7. Add HRP-anti deer IgG rabbit (1:500), 100ul/well at 37C for 1hr.
8. Wash with PBS-T 3 times.
9. OPD (Sigma) (100ul/well) at room temp. for 30 min at dark box.
10. Add 2.5N H2SO4 (50ul/well), at room temp. for 10 min.
11. Measure absorbance at 490 nm.

C. 成績

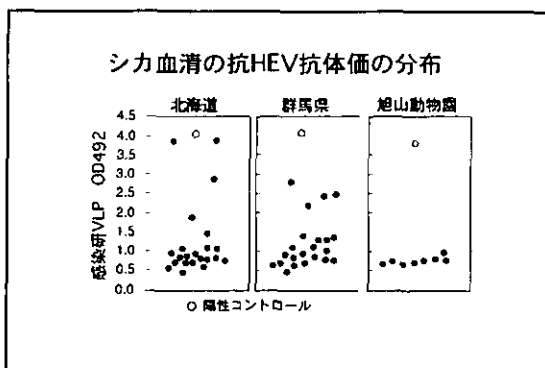
1. r-HEV-VLP 免疫血清の抗体価測定

一回、二回、三回免疫血清のいずれも4.0以上の高い吸光度を50,000倍希釈以上でも示した。一方、免疫前血清に対しては低い値しか示さず、r-HEV-VLPに対して高い抗体価が作られていることが確認された。



2. シカ血清の抗体価測定

北海道、群馬県及び旭山動物園のシカ血清を200倍でスクリーニングすると、北海道のシカ血清では3例が、群馬県のシカ血清では4例が残りの血清群に比べて高い価を示すという二峰性の分布を示し、陽性である可能性が示唆された。旭山動物園由来のシカ血清は全例低い値を示した。



3. ネズミ血清の抗体価測定

北海道のドブネズミとクマネズミ血清、それぞれ 102 例と 18 例について抗 r-HEV-VLP 抗体を測定すると、ドブネズミ血清の 7 例が 0.5 以上の高い吸光度を示したが、クマネズミ血清では 0.1~0.3 を示す例が 2 例のみで残りは <0.1 以下の低い値を示すにとどまった。

Place (2002.10.31)	Species of animals	Number of sera	OD at 450nm				
			<0.1	0.1-0.2	0.2-0.3	0.3-0.5	0.5<
Otaru	<i>R.norvegicus</i>	37	22	8	2	1	4
	<i>R.rattus</i>	18	16	1	1	0	0
Rumoi	<i>R.norvegicus</i>	35	19	9	2	3	2
Ishikari	<i>R.norvegicus</i>	5	5	0	0	0	0
Wakkanai	<i>R.norvegicus</i>	9	6	1	1	1	0
Hanasaki	<i>R.norvegicus</i>	13	11	0	0	1	1
Kushiro	<i>R.norvegicus</i>	3	3	0	0	0	0
Subtotal	<i>R.norvegicus</i>	102	66	18	5	6	7
	<i>R.rattus</i>	18	16	1	1	0	0
Total		120	82	19	6	6	7

D. 考察

r-HEV-VLP に対するシカ免疫血清は、r-HEV-VLP に対して高い抗体価を示したが、陰性抗原に対して低い反応しか示さず、標準免疫血清として有効であることが半明した。

北海道と群馬県でそれぞれ捕獲されたシカ血清について抗 r-HEV-VLP 抗体を測定すると、それぞれ 3 例と 4 例が残りの検体に比べて高い値を示し、吸光度の分布が二峰性になった。このため、それぞれの 3 例と 4 例は非特異的な ELISA の反

応によるバックグラウンドではなく、HEV に対する特異的抗体の陽性例である可能性が示唆された。しかし、加齢やその他の感染症や外傷などによって ELISA でのバックグラウンドが著明に上昇する場合のあることは一般に良く認められる現象である。このため、これら検体の確定診断のためには他の方法を併用して成績を総合的に判断したり、例数を増やす等の今後の解析が不可欠で、今回の成績のみから陽性とは確定出来ない。

一方、ドブネズミとクマネズミ血清において同様に抗 r-HEV-VLP 抗体を測定すると、ドブネズミ血清でのみ高い (>0.5) 吸光度を示す例が 102 例中 7 例 (6.9%) で認められた。それに対してクマネズミでは 0.1~0.3 を示す例が 18 例中 2 例 (11.1%) のみであった。このような陽性率のげっ歯類種による相違が、ウイルスの感受性によるものか、母集団数の相違によるものかについてさらなる調査が必要である。また、高い吸光度を示す例と陰性例の出現分布が二つに分かれないため、それら高吸光度例が非特異反応によるものなのか特異反応によるものなのかを推察することが出来なかった。今後、他の血清診断法、例えば、Western blotting 法の成績などと比べることにより確定診断することが必要である。

E. 結論

r-HEV-VLP を抗原とする ELISA でシカとネズミ血清中の抗 HEV 抗体測定系が確立した。今後、それぞれの動物種血清での陽性と陰性を区別する cut off 値の設定と Western blotting 法など ELISA 以外の血清診断法の併用による確定診断法の確立が必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし