

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

本邦に於ける E 型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究

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

宮村遼男

（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、超速心法で濃縮し、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, Suzuki 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

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
本邦に於ける E 型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究班
分担研究報告書

HEV キャプシド蛋白質を発現する形質転換植物の開発

分担研究者 津田 新哉 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構中央農業総合研究センター

研究要旨：本研究の目的は、HEV 媒介者である豚の飼料として利用することが考えられる「食べるワクチン」を開発するために、HEV のキャプシド蛋白質を植物細胞内で発現させ、効率的に免疫性を誘導するためのウイルス様粒子を形成させる発現系を開発することである。初年度は、改良型カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターの下流に遺伝子翻訳促進効果があるとされる TMV Ω 配列と HEV キャプシド遺伝子の cDNA を組み込んだアグロバクテリウムによる植物細胞形質転換用バイナリーベクターを構築した。

共同研究者

永野 秀昭 リサーチ・レジデント

A. 研究目的

E 型肝炎は「人獣共通感染症」と認識されており、ブタなどの家畜が E 型肝炎ウイルス (HEV) に感染している場合、これを摂食したヒトが発症する場合がある。HEV キャプシド蛋白質を植物で発現させることによりワクチン効果を発揮する植物を飼料として家畜に与え、家畜の E 型肝炎ウイルスキャリア密度を低下させることで、食品を介した経口感染による E 型肝炎予防に有効な方法の一つとして期待される。

本研究の目的は、ワクチン効果のある飼料作物の開発に向けて HEV キャプシド蛋白質を発現する形質転換植物を作製し、それを飼料として家畜に与えることで家畜の免疫性を効果的に誘導するために必要であると考えられるウイルス様粒子を形成させる実験系を開発することである。

B. 研究方法

N 末端 111 アミノ酸が欠失した HEV キャプシド蛋白質を昆虫細胞で発現させるとウイルス様粒子が形成され、さらに、純化した N 末端 111 アミノ酸が欠失した HEV キャプシド蛋白質によるウイルス様粒子をサルに経口投与するとワクチン効果があると報告されている (Li et al., 1997)。このことを参考にして、N 末端 111 アミノ酸を欠失した HEV キャプシド蛋白質の cDNA を合成し、植物細胞内で発現させるためのプラスミドベクターに挿入する。ワクチン効果を期待するためには、多くのキャプシド蛋白質の蓄積量が必要と考えられるので、改変型カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーターに続いてタバコモザイクウイルス (TMV) の遺伝子翻訳促進領域を配置し (Tsuda et al., 1998)、その下流に目的遺伝子を連結させた植物-バクテリアの両方で働くバイナリーベクタープラスミドを構築する。

C. 研究結果

構築したバイナリーベクターを図 1 に示した。構築したバイナリーベクターは、エンハンサー領域をタンデムに持つ改良型カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターと、その下流に TMV の 5' 末端非翻訳領域の遺伝子翻訳促進領域である Ω 配列が存在する。その Ω 配列の下流には N 末端 111 アミノ酸を欠失した HEV 日本土着株である JSN-Sap または JRA1 の 2 系統のキャプシド蛋白質遺伝子の cDNA が配置されている。

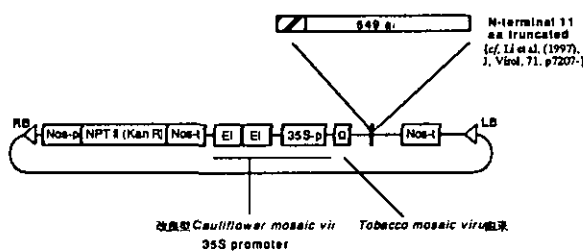


図 1 HEV キャプシド蛋白質を発現するバイナリーベクター構築図

D. 次年度計画

今後は構築した植物細胞形質転換用ベクターを用いて実際に N 末端が欠失した HEV キャプシド蛋白質が植物細胞内に蓄積するかどうか、あるいはさらにウイルス様粒子が観察されるかどうかについてアグロインフィルトレーション法 (Kubota et al., 2003) を用いて検討する。さらに、構築したバイナリーベクターの中で最も発現量の高かったベクターをアグロバクテリウムによりタバコへ遺伝子導入を図り、形質転換植物を作製していく。

E. 参考論文

Li, T.C., et al., 1997. Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J. Virol.* 71(10): 7207-7213.

Tsuda, S., et al., 1998. The application of the human hepatitis B virus core antigen from transgenic tobacco plants for serological diagnosis.

Vox Sang. 74: 148-155.

Kubota, K., et al., 2003. Tomato mosaic virus replication protein suppresses virus-targeted posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.* 77(20): 11016-11026.

F. 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

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策事業）
「本邦に於ける E 型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究」班
分担研究報告書

家畜に於ける HEV 及び HEV-like virus 感染の実態把握

分担研究者：山口成夫（動物衛生研究所 感染症研究部 部長）

研究要旨：E 型肝炎ウイルス(HEV)が我が国の養豚に広く感染していることは、様々な調査から明らかとなってきた。ブタ HEV とヒト E 型肝炎との関連性を明らかにするために、我が国の家畜における HEV の感染状況と HEV 遺伝子の多様性を更に調べる必要がある。我々は 7km～17km 離れた 3 養豚場でブタ 386 頭について糞便に排泄される HEV ゲノムの状況を調査した。2 養豚場のブタでは、HEV 排泄率が 1～3 ヶ月齢でピーク(最高 65%, 100%)に達した後に急速に減少したのに対し、1 養豚場では HEV 排泄率が低く、全体でも 5% (10/195)であった。自治医大グループが 2003 年に報告した全国 25 養豚場の調査では、食肉用出荷月齢(6 ヶ月齢)では血清中にウイルスゲノムは検出されなかったが、我々の糞便の調査では出荷月齢でもウイルスゲノムが低頻度(8%=3/36)ながら検出されるという違いが見られた。さらに同調査報告では、HEV 遺伝子が養豚場毎に異なっていたが、我々が調査した 3 養豚場は直接交流がないにも拘わらず、少なくとも 2 種類のウイルスを共有していた。よって比較的広い地域に蔓延しているウイルス株もあり得ると考えられる。

研究協力者

池田秀利	(動物衛生研究所)
恒光 裕	(動物衛生研究所)
勝田 賢	(動物衛生研究所)
川島健司	(動物衛生研究所)
加藤花名子	(動物衛生研究所)
中井 泉	(動物衛生研究所)
宮崎綾子	(動物衛生研究所)
吉井雅晃	(動物衛生研究所)

B. 方法と成績

糞便中の HEV ゲノムの検出は、RT-PCR によって行った。cDNA の合成はランダムプライマーを用いて行った。PCR プライマーは他の文献を参考にして HEV の遺伝子型 I～IV の多くを検出できるように設計した。殆どのサンプルについて、HEV 遺伝子の ORF1 と ORF2 の両領域で 1st PCR と nested PCR を行って検出を試み、何れかの反応で陽性反応を示した検体を最終的に陽性と判定した。

A. 研究目的

我が国の養豚は高頻度に E 型肝炎ウイルス(HEV)に感染していることが推測される。ブタにおいては、これまで HEV と肝炎などを含む疾病との関連は認められていないが、ブタ HEV とヒト E 型肝炎との関連性を示唆する事実が徐々に増えている。本研究は我が国の家畜における HEV の感染実態を把握し、家畜 HEV 遺伝子の多様性を把握することによってヒト E 型肝炎との関連を明確にすること目的とする。

本年度は 3 養豚場においてブタ糞便中の HEV ゲノムの排泄状況を調査し、検出された遺伝子配列の多様性を解析した。

7km～17km 離れた 3 つの養豚場において、月齢の異なる 386 頭の調査を行った。HEV ゲノム検出頻度が 30%、5%、49%と農場差が見られた(図 1)。

HEV ゲノム検出頻度の高かった A, C 農場では 1～3 ヶ月齢で検出頻度にピークが見られた。ゲノム検出頻度の低かった B 農場では、ピークが明確でなかった。3 農場を通して食肉用出荷月齢である 6 ヶ月齢からも少数(8%=3/36)ながら分離された。

それぞれの農場から 8～10 サンプルを選び ORF2 の遺伝子配列を決定した。調べた HEV ゲノムはすべて遺伝子型 III に属し、更に 3 つのサブグループに分けられた。サブグループ内の核酸相同性は 97～100%で、サブグループ間の核酸相同性は 85～90%であった。

既知の HEV ゲノムとの相同性を調べると、いずれのサブグループでも 94%以下の相同性を示すヒト由来 HEV、ブタ由来 HEV しか見つからなかった。

C. 考案と結語

調査した 3 農場で HEV 感染が認められた。これは全国の養豚場が高い抗体陽性率であったという今までの他の抗体調査結果とも合致する。

糞便中の HEV ゲノムの検出頻度に農場差が見られたが、その理由は不明である。しかし、ゲノム検出頻度の低い農場は離乳後も同腹の子だけで同一豚房で飼育するという珍しい飼育方法を取っていることと関係している可能性も考えられる。HEV の清浄化策を考える上で考慮すべき点である。

自治医大グループが 2003 年に全国の 25 養豚場で行った調査報告では、出荷月齢では血清中にウイルスゲノムは検出されなかったが、我々の調査では出荷月齢でも糞便中にはウイルスゲノムが検出されるという違いが見られた。

自治医大の同調査報告では、HEV 遺伝子が養豚場毎

に異なっていたが、我々が調査した 3 養豚場は 7km ~17km 離れていて直接交流がないにも拘わらず、少なくとも 2 種類のウイルスを共有していた。このことから比較的広い地域に蔓延しているウイルス株もあり得ると考えている。

来年度は一般養豚場において、ブタを生後から経時的に HEV ゲノム排泄状況を追跡調査し、ブタでの感染実態を調べる予定である。

D. 研究発表

学会発表

- 1) 豚糞便からの E 型肝炎ウイルスゲノムの検出：中井 泉、加藤花名子、宮崎綾子、吉井雅晃、恒光裕、池田秀利：第 136 回日本獣医学会講演要旨集 p133 2003 年 10 月
- 2) 豚小集団内における E 型肝炎ウイルスの動態：宮崎綾子、加藤花名子、中井泉、吉井雅晃、恒光裕、池田秀利：第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会抄録集 p224 2003 年 10 月

図 1. 3 養豚場における糞便中 HEV ゲノム検出率

月令	糞便中 HEV ゲノム検出頻度					
	A 農場		B 農場		C 農場	
	PCR(+)/計	%	PCR(+)/計	%	PCR(+)/計	%
0	0/22	0	0/33	0	0/16	0
1	2/10	20	5/44	11	16/16	100
2	13/20	65	1/16	6	20/20	100
3	11/20	55	0/27	0	12/29	41
4	0/4	0	1/26	4	0/7	0
5	0/7	0	1/26	4	1/7	14
6	1/7	14	2/23	9	0/6	0
計	27/90	30	10/195	5	49/101	49

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
本邦に於ける E 型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究班
分担研究報告書

本邦の非 ABC 型肝炎に占める E 型肝炎の位置づけ

分担研究者 矢野 公士 国立病院長崎医療センター

研究要旨：本研究の最終目的は、疫学的な解析から本邦における E 型肝炎の実態を解明することにある。そのため、各年度毎に急性肝炎の全国調査を解析し、非 ABC 型と診断された症例の中から、E 型肝炎の症例を抽出し臨床的解析を加える予定である。初年度は、1990-2002 年に蓄積された非 ABC 型急性肝炎 458 例のうち血清が保存されていた 311 例を対象として抗体スクリーニング、ならびに HEV-RNA の検出を行った。E 型急性肝炎と診断された症例は 9 例（2.9%）であった。2000 年以降の発生率は 7.2%であり、近年増加の傾向が示唆された。また、今年度に長崎県で発生したイノシシ肉摂食に伴うと考えられる E 型肝炎の集団発生事例を解析し、間接的ながら E 型肝炎が人獣共通感染症である更なる evidence を得た。

共同研究者

八橋 弘 国立病院長崎医療センター
玉田 陽子 国立病院長崎医療センター
大黒 学 国立病院長崎医療センター
石橋 大海 国立病院長崎医療センター
矢野 右人 国立病院長崎医療センター

A. 研究目的

研究 1

これまで主にアジア、アフリカの衛生環境が整っていない地域に風土病として発生していた E 型肝炎は、先進国では流行地への旅行者が旅先で感染して持ち帰る「輸入感染症」と考えられていた。1990 年代に入って、米国、ヨーロッパ、さらに日本において海外旅行歴のない E 型肝炎症例が報告され、これらの症例から検出された E 型肝炎ウイルス（HEV）株の検討から、これらは先進国に固有の新しい株であることが明らかになった。E 型肝炎症例の中には劇症化例、死亡例も散見され、実態解明は急務である。しかしながら、日本国内における E 型肝炎日本固有株の位置づけは未だ明確でない。本研究では、国立病院の全国調査により得られた蓄積症例の解析からこれまで本邦で非 A 非 B 非 C 型とされてきた原因不明急性肝炎に占める E 型肝炎の役割を明らかにする。

研究 2

近年、ヒト以外の様々な動物が HEV に感染しているという報告があり、E 型肝炎は「人獣共通感染症」と認識されている。今年度、我々は長崎県内においてイノシシ肉の摂食により発生したと考えられる集団感染事例を経験した。解析の結果新しい知見を得たので、併せて報告する。

B. 研究方法

研究 1

全国 20 の国立病院急性肝炎共同研究班参加施設において 1980-2002 年にウイルス性急性肝炎として登録された症例は 3,643 例であり、A 型 1,504 例(41.3%)、B 型 924 例(25.4%)、C 型 304 例(8.3%)、非 ABC 型 911 例(25.0%)であった。1990 年-2002 年の非 ABC 型 458 例血清が保管されていた症例は 311 例であった。この 311 例を対象に、IgG 型、IgM 型 HEV 抗体を測定し、IgM、IgG の双方が陽性であった検体に関して ORF1 領域 326 塩基を標的とする nested RT-PCR を行い HEV 遺伝子の同定、分析を試みた。

研究 2

平成 15 年 3 月にイノシシ肉を焼肉にして食した 2 人が県内の病院に入院し、原因不明の急性肝炎との連絡を受けたため、この 2 症例に関して IgG 型、IgM 型 HEV 抗体を測定し、さらに nested RT-PCR を行い HEV 遺伝子の同定、分析を試みた。さらに同時期にイノシシ肉を食した 12 人に Informed Consent を得た後に調査、採血を行い上記同様の解析を行った。

C. 研究結果

研究 1

1990-2002 年の非 ABC 型肝炎 311 例に含まれる IgM 陽性例は 9 例 (2.9%)、IgG 陽性例は 57 例 (18.3%) であった。IgM 陽性 9 例の全例が IgG も陽性で E 型肝炎と診断された。渡航歴のある症例が 4 例、無い症例が 5 例であった。E 型肝炎の非 ABC 型肝炎に占める割合は 90-98 年では 1.7%であったのに対し、2000 年以降では 7.2%と有意に増加していた。

E 型急性肝炎と診断された 9 例について ORF1 領域を nested RT-PCR 法で増幅し HEV-RNA の同定を試みたところ、8 例で検出された。NJ 法で作成した系統樹解析では、渡航歴 (バングラデシュ) のある 1 例を除いて 7 例までが genotype III または IV 型であった。

No.	発症年	年齢(歳)	性	居住地域	海外渡航歴	HEV-RNA genotype
1	1999	55	男	習志野	なし	-
2	1998	45	女	横浜	なし	III
3	1991	47	男	長崎	中国	IV
4	1995	45	男	横浜	タイ	III
5	2000	51	女	横浜	なし	III
6	2000	79	女	大分	なし	III
7	2001	57	男	東京	バングラデシュ	I
8	2002	54	女	相模原	なし	III
9	2002	52	男	大分	なし	III

研究 2

症例 1、2 はともに 69 歳男性。入院時 HEV-RNA 陽性、HEV-IgG、-IgM 陽性であり、E 型急性肝炎と診断した。2 症例とも一峰性の変動を示す急性肝炎であり、特殊治療を要せず軽快した。ORF1 領域の配列による系統樹解析では、2 症例ともに genotype III 型に分類され、塩基配列は 99.4%一致していた。同時にイノシシ肉を食した 12 人中 (全て男性、年齢中央値 79 歳 (64-82))、発端となった 2 人とは別に 3 人が急性肝炎で他の病院に受診しており、いずれも HEV-IgM が陽性であった。12 人中 8 人 (66%) が IgM 抗体陽性、11 人 (92%) が IgG 抗体陽性であり、いずれも高力価であった。この時点では HEV-RNA は全症例で陰性であった。発症した 5 例は通常型急性肝炎で経過し、感染が成立したと考えられる 3 例ないし 6 例は不顕性感染であった。

Data obtained in April and May							Survey on August 26 (166 days after boar meat ingestion)						
HEV-IgG	HEV-IgM	HEV-RNA (U/mL)	ALT (mg/dL)	T.Bil (mg/dL)	Time* (Days)	Case No.	Age (year)	Sex	Dr.	ALT (U/mL)	HEV-IgG	HEV-IgM	HEV-RNA
+	+	1,112	1.8	39	1	69	M	Yes	10	+	+	-	-
+	+	751	0.9	43	2	69	M	Yes	16	+	+	-	-
-	-	290	2.6	40	3	76	M	Yes	15	+	-	-	-
-	-	531	3.9	36	4	80	M	Yes	6	+	+	-	-
-	-	312	1.2	55	5	81	M	Yes	12	+	+	-	-
-	-	-	-	-	6	80	M	No	13	+	+	-	-
-	-	-	-	-	7	64	M	No	11	+	+	-	-
-	-	-	-	-	8	81	M	No	12	+	+	-	-
-	-	-	-	-	9	76	M	No	36	+	+	-	-
-	-	-	-	-	10	75	M	No	9	+	+	-	-
-	-	-	-	-	11	82	M	No	23	+	+	-	-
-	-	-	-	-	12	80	M	No	18	-	-	-	-

D. 考察

これまで、散発的に日本国内の E 型肝炎症例が報告されているが、多数例、年度別発生頻度に関する知見は得られていない。今回、全国 20 の国立病院の急性肝炎共同研究班参加施設によって集積された血清を解析することに疫学的な動向分析を行った。

その結果、本邦の E 型肝炎の発生頻度は非 ABC 型肝炎の 2.9%であった。米国疾病管理センターの提唱する「高浸淫」の定義が非 ABC 型肝炎の 25%以上とされていることを考えると、これは非常に低い数字であり、本邦は E 型肝炎「低浸淫国」であることがあらためて確認された。しかしながら、E 型肝炎の非 ABC 型肝炎に占める割合は 90-98 年では 1.7%であったのに対し、2000 年以降では 7.2%と有意に増加しており、今後も増加する危険性をはらんでいるといえよう。また、IgG 抗体のみが陽性で過去に感染した既往があると判断された症例が 15.4%と想像以上に高値であった。これらの症例の大部分は肝疾患の既往がないために、多くは不顕性感染であったと考えられるが、過去に本邦でも多くの感染が起っていた可能性がある

これを支持するのが、研究 2 で確認された事実である。インデックスとなった 2 人から 99.4%一致する株が検出されたことは、同一感染源による感染を示唆し、イノシシ肉を摂食した 12 人中少なくとも 8 人に HEV 感染が起こっていた。さらに IgG の抗体保有率、抗体価から類推すると 12 人中 11 人に感染が成立した可能性が高く、比較的高率に不顕性感染が起こっているのである。これまで E 型肝炎は主に水系感染と考えられてきたが、E 型肝炎低浸淫国とされる本邦において、zoonosis が伝播形態の一翼を担っていると考えられる

E. 結論

本年度の成果によって以下のことが確認された。

1. E 型肝炎は本邦においてまれな疾患では

あるが、近年増加の傾向にある。今後も本研究班でモニターする必要がある

2. E 型肝炎が人獣共通感染症であり、イノシシは reservoir 候補である

3. E 型肝炎はしばしば、不顕性感染を引き起こす

F. 研究発表

1. 学会発表

①Yano K, Tamada Y, Yatsubashi H, Daikoku M, Koga M, Ishibashi H, and Yano M
Involvement of Hepatitis E Virus Infection in non-ABC Acute Hepatitis in Japan
54th American Association for the Study of the Liver, Boston, USA

②矢野公士、八橋弘、石橋大海
本邦のウイルス性急性肝炎—疫学的変遷について— 日本肝臓学会西部会、岡山市 2003 年 11 月

③玉田陽子、八橋弘、福田実可、矢野公士、他
我が国の E 型肝炎感染に関する免疫学のおよび分子系統樹学的解析—日本肝臓学会総会、福岡市 2003 年 5 月

2. 論文発表

①Tamada Y, Yano K, Yatsubashi H, et al. An outbreak of hepatitis E in a group members who ingested wild boar meat
J Hepatol, 2004, *in Press*

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請:
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
本邦に於ける E 型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究班
分担研究報告書

札幌地域における E 型急性肝炎臨床像の解明

分担研究者 前久保 博士 手稲溪仁会病院

研究要旨：本研究班における我々の課題は、HEV 高侵淫地域と考えられる札幌地域において弧発性 E 型急性肝炎の臨床像を明らかにし、さらに HEV 伝搬経路を究明することにより、本疾患の診療及び予防に資することである。初年度における本研究の到達点は、E 型急性肝炎弧発例の発掘、集積によりその臨床的特徴を解析すること及び、E 型肝炎が人獣共通感染症である可能性をテコとして、患者聞き取り調査をもとに当該地域における土着型 HEV の感染経路に接近することである。我々は当院及び札幌厚生病院において 1994 年以降に発症した全 36 例の国内発症型 E 型肝炎症例をみいだしその臨床的解析を開始した。さらに症例数の年次別推移の検討により 2001 年度の症例数増加が明らかとなった。年間症例数に著しい偏りが存在することが判明したため、Zoonosis との関連から今後は 2001 年度を中心として感染経路の究明を進める事が焦点の急と考えられた。

共同研究者

姜 貞憲	手稲溪仁会病院 消化器病センター
大西 幸代	札幌厚生北野病院 内科
荒川 智宏	札幌厚生病院 消化器科
狩野 吉康	札幌厚生病院 消化器科
豊田 成司	札幌厚生病院 消化器科

まるため、E 型肝炎の臨床像と HEV の伝播経路に関する知見を得る上で制約が少なからず存在する。

当院では 2001 年から東芝病院研究部との共同研究として E 型肝炎に関する臨床研究に着手した。その後 2003 年 10 月迄の期間 E 型急性肝炎 14 症例を診断し、1999-2000 年度の 4 症例をさらにみい出した。これらの症例に札幌厚生病院における E 型肝炎症例を加え、札幌地域における、E 型急性肝炎散発例の臨床像とその感染経路を明らかにすることを目的とした。

B . 研究方法

手稲溪仁会病院及び札幌厚生病院における過去及び 2003 年に診療した急性肝炎全症例の成因を検討する。成因不明症例の初期血清に対し RT-PCR を行い HEV RNA の検出を試みる。HEV 陽性症例の臨床像を検討し、札幌地域に

A . 研究目的

近年、欧米や中国の E 型肝炎非流行地域において新たな HEV 株が分離報告され、2001 年日本においても国内土着株 JRA1 による最初の症例が報告された。JRA1 の報告を嚆矢として、日本国内における E 型肝炎散発例の報告があいついで行われた。しかしその多くにおいては、過去に診療した成因不明症例の記録に対する retrospective な bibliology 上の検討に留

発生した E 型急性肝炎の特徴を明らかにする。さらに、これら症例の背景を調査するため各患者宅を訪問し、その結果として各症例に共通乃至症例個別的な HEV 感染経路を明らかにする事を目指す。

C. 研究結果

手稲溪仁会病院で 1998 年 1 月以降、札幌厚生病院では 1994 年 4 月以降に診療した急性肝炎症例のうち血清が保存された成因不明例は 135 症例であった。これらの初期血清に対し行った PCR により HEVRNA が検出されたのは 36 症例 (26.7%) であった。HEV genotype は III:IV=9:26 であったが、1 例で III,IV の重複感染が認められた (図 1)。

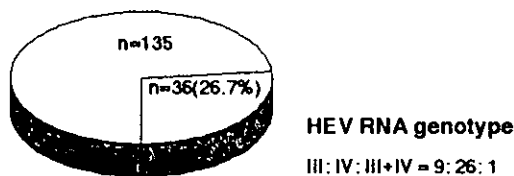


図1. 成因不明急性肝炎に於けるE型の割合とHEV RNA genotype

これら 36 症例の背景を調査した (表)。HEV 感染潜伏期間中に海外渡航歴があったのは 2 例で、渡航先は各々インドネシア、ハワイであった。インドネシアへ旅行後発症した男性症例からは genotype IV の HEVRNA が、ハワイ旅行後の女性例からは III が各々検出された。また、E 型肝炎 36 症例では血液を介した感染はみられず、知り得た範囲では家族内発症者は認めなかった。HBV 持続感染症例が 1 名存在した。Zoonosis との関連では、13 症例の患者宅訪問による聴取によれば、畜産食肉業に関連する職種の患者は存在せず、潜伏期間中にブタのレバーを摂取した症例は 2 例に留まった。

E 型急性肝炎の重症化は、prothrombin time 比活性で 40% 以下の症例を重症例と定義した場合、36 例中 6 例、16.7% でみられた。これらのうち 1 例に HBV 持続感染且つアルコール多飲を認めた。重症型 6 症例中 2 例が劇症肝炎へ進行した。1 例は内科的治療により救命し、

残る 1 例は生体部分肝移植が施されたが術後死亡した。

図 2 に札幌 2 施設における E 型急性肝炎の年次別症例数の推移を示す。遡及可能な 1994 年から既に年間 1-2 例の症例が存在しており、両施設共に 2001 年に症例数の急激な増加を認めた。症例数を 1999 年以前と 2000 年以降とで分けると前者では 8 例、後者では 28 例であった。

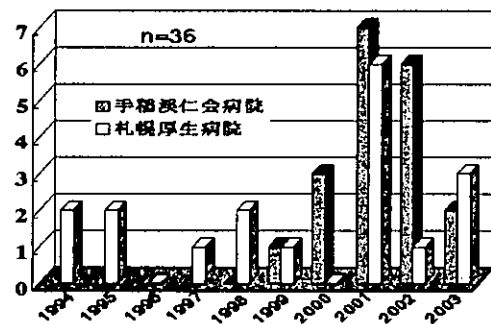


図2. E型急性肝炎症例数の年次別推移

D. 考察

これ迄の報告から札幌(乃至北海道)は HEV 高侵淫地域である可能性があるため、札幌の 2 施設における E 型急性肝炎の検討を行った。2 施設の成因不明急性肝炎症例の保存血清を対象としたところ、1/4 以上が HEV 感染によることが判明した。従って少なくとも最近 10 年間に限ると、札幌は HEV 高侵淫地域であると結論付けることができるかも知れない。症例数は 2000 年以降に著しく偏っており、最近 4 年間の症例数は 1999 年以前の 6 年間の 3 倍以上であった。1997 年以前の 4 年間は札幌厚生病院の症例のみであることを勘案しても、最近 4 年間における症例数の増加が札幌を HEV 高侵淫地域たらしめている。HEV genotype は III, IV が 1 対 3 の割合であり、III が多い本州からの報告とは異なっていた。本州に比べ札幌地域に症例が多いことが事実とするならば、そのことと genotype IV による感染が多いことが関連するか否かは今後の感染経路探索の進捗により明らかにされるかも知れない。

全 36 症例のうちで海外渡航歴を有する症例

が2例存在した。インドネシアではE型肝炎のoutbreakが報告されているが、その際のHEV genotypeはIであることが知られており、ハワイからは現在のところE型肝炎症例の報告はない。以上から、2症例とも、札幌で感染後に旅行し、帰国後に発症した可能性が排除できない。従って36症例のE型急性肝炎は全例が国内(あるいは当該地域)において循環するHEV感染に因ると考えられた。

HBV持続感染にアルコール多飲を伴う症例でのHEV重複感染例が存在し、重症化を呈した。E on B等慢性肝疾患におけるE型肝炎の発症は重篤な肝不全を惹起する可能性が示された。少なくとも札幌では慢性肝疾患における急性増悪に際しては、原疾患の病態変化の他にHEVの新たな感染可能性を考慮する必要がある。

13症例の聞き取り調査ではHEV感染に直接的なZoonotic factorが存在するのは、ブタレバーの摂取歴がある2例のみであった。以前から、札幌地域で発症するE型症例には、兵庫県における鹿生肉や、鳥取及び長崎県における猪肉摂取による症例のように、HEV感染野生動物の肉を食べることで発症する例は存在しないと考えられた。しかし我々の調査により、市販ブタレバーなど畜産製品摂取による感染でさえも札幌地域においては決して主要なHEV伝搬経路たりえないことが明らかになりつつある。今後は残る24例のE型肝炎症例及び対照としてのA型肝炎症例における肉食習慣及び潜伏期間における食肉機会に対する調査を迅速に行う一方、2001年度を中心とするE型症例数の増加を説明しうる札幌地域における食肉流通上の変化に関する調査が必須と考える。

E. 結論

本年度の成果によって以下のことを確認することができる。

1. 過去10年間の札幌地域における成因不明急性肝炎のおよそ1/4はHEV感染によると考えられた。

2. 2003年迄に発症した36例のほぼ全例が地域土着性のHEV感染による。

3. 札幌地域においてE型肝炎は1994年には既に存在した。

4. 札幌地域におけるE型肝炎は2001年を中心として症例数が急激に増加していた。

5. E型肝炎の重症例は全体の16.7%でみられた。

6. 現在のところ発症に直接関与する主要なZoonotic factorは不明である。

F. 研究発表

1. 学会発表

1) 大西幸代、姜貞憲、前久保博士、高橋和明、三代俊治

この3年間に入院治療したE型急性肝炎14例の検討 第39回日本肝臓学会総会、福岡 2003年5月

2) 大西幸代、姜貞憲、前久保博士、高橋和明、三代俊治

E型急性肝炎は増えているか 第7回日本肝臓学会大会 大阪 2003年10月

3) 姜貞憲、篠原敏也、大西幸代、他
重症化E型急性肝炎6症例の肝病理組織学的検討 第7回日本肝臓学会大会 大阪 2003年10月

4) 大西幸代、姜貞憲、狩野吉康

ワークショップ急性肝炎の変遷

札幌地域におけるE型急性肝炎症例の検討 第35回日本肝臓学会西部会 岡山 2003年11月

5) 姜貞憲、三井慎也、宮本憲幸、他

E型急性肝炎重症化例の検討

第35回日本肝臓学会西部会 岡山 2003年11月

2. 論文発表

なし

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

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策事業）
「本邦に於ける E 型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究」班
分担研究報告書

我が国の劇症肝炎，LOHF における HEV 感染の意義：全国集計からの検討

分担研究者：持田 智（埼玉医科大学 消化器・肝臓内科 教授）

研究要旨：急性肝不全の成因としての E 型肝炎の意義を明らかにする目的で，劇症肝炎，LOHF の全国集計に登録された症例を対象に，保存血清を供与いただき HEV-RNA を測定した。A, B, C 型肝炎ウイルスの感染が明らかでない症例は，2000~2001 年には 124 例が登録されており，うち 1 例で HEV-RNA が測定されて E 型であることが判明していた。HEV-RNA が未測定 of 123 例中 37 例（30%）で血清を供与いただき，新たに測定したところ 1 例が陽性であった。一方，2002 年には同様の症例が 69 例登録された。うち 11 例（16%）では既に HEV-RNA が測定されており，2 例が陽性であることから E 型と診断されていた。未測定 of 58 例中 13 例（22%）で保存血清を供与いただいたが，これらは全例 HEV-RNA が陰性であった。以上の検討から E 型と判明した 4 症例は，全て北海道からの登録例であった。また，保存血清で HEV-RNA 陽性であった症例は genotype IV であり，ORF-1 の塩基配列を一部解析したところ，ほぼ同時期に札幌地区で発症した急性肝炎重症型症例から検出された株と一致していた。肝炎重症化に関与する HEV 株の可能性があり，その全塩基配列の解析を進めている。

研究協力者

松井 淳	（埼玉医科大学 消化器・肝臓内科 講師）
稲生 実枝	（埼玉医科大学 消化器・肝臓内科 助手）
小池 雅美	（埼玉医科大学 消化器・肝臓内科 大学院生）
藤原 研司	（埼玉医科大学 消化器・肝臓内科 主任教授）

この研究は，特定疾患対策研究事業「難治性の肝疾患に関する研究」班（戸田 剛太郎班長，藤原 研司班員）と共同で実施している。

A. 研究目的

国内固有の HEV 株による急性肝疾患が注目されている。厚生労働省「難治性の肝疾患に関する研究」班が実施している劇症肝炎，LOHF の全国集計でも，2001 年の発症例として E 型症例が登録された¹⁾。今後，HEV-RNA の測定が普及すると，成因不明例の中から E 型症例が抽出される可能性がある。そこで，劇症肝炎の成因としての E 型肝炎の意義を明らかにする目的で，劇症肝炎，LOHF の全国集計に登録された症例を対象に，保存血清を供与いただき HEV-RNA を測定した。

B. 方法と成績

まず，2000~2001 年に発症した劇症肝炎，LOHF 229 例のうち，A, B, C 型肝炎ウイルスの感染が明らかでない 124 症例（成因不明例，薬物性および自己免疫性も含む）を登録した施設に，保存血清の有無を問い合わせた。このうち 1 例は既に HEV-RNA が測定されており，陽性であったことから E 型症例とし

て登録されていた¹⁾。しかし，他の 123 例は HEV-RNA が未測定であり，このうち 45 例（37%）で保存血清供与の申し出をいただいた。12 月末日までに 37 例（82%）の検体が埼玉医科大学に届き，東芝病院の primer を用いて RT-PCR を実施したところ，1 例のみが陽性であることが判明した。

2002 年には劇症肝炎 117 例，LOHF 10 例が登録され，そのうち A, B, C 型肝炎ウイルス感染の認められなかった症例は 69 例であった。このうち 11 例（16%）では既に HEV-RNA が測定されており，2 例が陽性であったことから，E 型に分類されていた²⁾。未測定 of 58 例中 25 例（43%）で保存血清供与の申し出をいただき，13 例（52%）で HEV-RNA を測定したが，これらは全例が陰性であった。

C. 考案と結語

E 型と判明した 4 症例は，全て北海道からの登録例であった（図 1）。HEV の国内固有株による急性肝疾患は北海道に多いことが知られているが，重症例に限定するとその地域的偏在はより顕著になる可能

性がある。また、保存血清で HEV-RNA 陽性であった症例は genotype IV であり、ORF-1 の塩基配列を一部解析したところ、ほぼ同時期に札幌地区で発症した急性肝炎重症型症例から検出された株と一致していた。肝炎重症化に関与する HEV 株の可能性があり、その全塩基配列の解析を進めている。

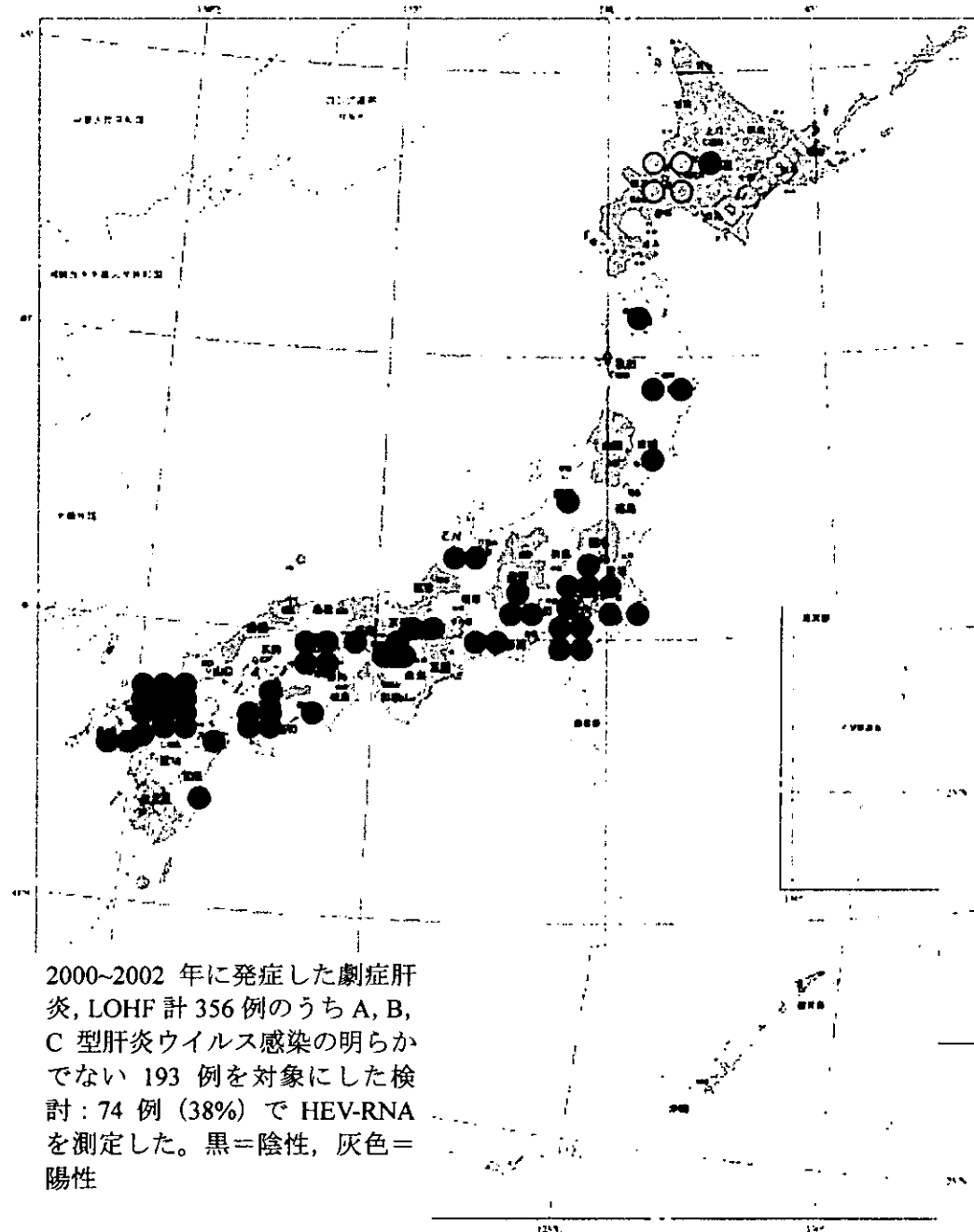
C. 参考文献

1) 藤原研司, 持田 智, 松井 淳. 劇症肝炎及び遅

発性肝不全の全国集計 (2001 年). 厚生労働省特定疾患対策事業「難治性の肝疾患に関する研究班」平成 14 年度報告書, 印刷中, 2003.

2) 藤原研司, 持田 智, 松井 淳. 劇症肝炎及び遅発性肝不全の全国集計 (2002 年). 厚生労働省特定疾患対策事業「難治性の肝疾患に関する研究班」平成 15 年度報告書, 印刷中, 2004.

図 1. 我が国における劇症肝炎, LOHF における HEV 感染の実態



厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

本邦に於ける E 型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究班

分担研究報告書

HEV 抗体アッセイ系の比較検討

分担研究者 今井 光信 神奈川県衛生研究所

研究要旨： E 型肝炎ウイルス（HEV）の血清学的、疫学的な解析に必要な抗体測定法の検討を行った。本年度は ELISA 法における、抗原、標識抗体、反応条件等の比較検討を行い、デンカ生研で開発中の方法を一部変更した方法で、ALT 高値献血者集団（ALT>60、220 例）の吸光度分布を調べ、カットオフを設定した。この集団の IgG 抗体陽性率は 10.0% (22/220) で、IgM 抗体陽性率は 1.8% (4/220) であった。IgM 抗体陽性 4 例中 3 例は IgG 抗体も陽性であった。今後、検査対象を増やし、全国レベルでの地域別、年齢別、性別等の吸光度分布について調べたい。また、ヒトの抗体測定法と同様にブタの抗体測定法についても条件検討を行い、感染研の方法を用いて子豚（5 ヶ月齢未満、20 頭）、肥育豚（5 ヶ月齢から 8 ヶ月齢、360 頭）の吸光度を調べ、カットオフを設定した。豚は生後 2 ヶ月で IgM 抗体が産生され、3-4 ヶ月で IgG 抗体が高値になった。

共同研究者

古屋 由美子	神奈川県衛生研究所
佐藤 利明	神奈川県衛生研究所
嶋 貴子	神奈川県衛生研究所

A. 研究目的

E 型肝炎ウイルス（HEV）の抗体測定法を検討する。ELISA 法において、抗原、標識抗体、反応条件等について比較検討を行い、適当な方法、反応条件を選ぶ。その方法を用いて、献血者集団の吸光度分布を調べ、カットオフを設定する。

また、ヒトの抗体測定法と同様にブタの抗体測定法についても条件検討を行い、適当な方法、反応条件を選び、カットオフを設定する。

B. 研究方法

B-1 ヒト抗 HEV 抗体

抗体測定のため、HEV 中空粒子（国立感染症研究所分与）を抗原として、ELISA の検討を行った。現在、研究用に市販されている ELISA キット、開発中の ELISA キット及び研究室で作成した ELISA がある。それらを用いて反応性を比較し、適当な方法、反応条件について検討した。

検査材料として、ALT 高値献血者血清（ALT>60、220 例）を用いた。

B-2 豚抗 HEV 抗体

豚の抗体測定法の検討も、子豚血清（20 頭）、肥育豚血清（5-8 ヶ月齢、360 頭）を用いて行った。肥育豚血清は 1992 年度 100 頭、1994 年度、1996 年度、1998 年度、2000 年度、各 20

頭及び2002年度160頭から採取したものである。

C. 研究結果

C-1 ヒト抗HEV抗体

ヒトIgG抗体の測定には、感染研法を用いて、各種の検討を行った。この方法の反応系は「固相抗原-検体IgG-抗ヒトIgG標識抗体」である。感染研法で使用している標識抗体の濃度を濃くして、陽性の吸光度を高め、さらに馬血清を添加して、非特異吸着を減らすことを試みた。これらの結果から、感染研の方法について標識抗体濃度4000倍、馬血清10%添加した条件が適当と思われた。

感染研法で用いた抗原、反応系と同様の方法がデンカ生研でキットとして開発中だったので併用して検討を行った。陽性の吸光度を高めるため、振とうし、感染研法とデンカ法の反応性を調べた。おそらく、使用標識抗体の違いによるものと考えられるが、デンカ生研の系は振とうすることで反応性を高めることができた。この系について、さらに反応性を高める検討を行った。用いた条件の中で、抗原抗体反応については、37℃、1時間振とうし、標識抗体はデンカ生研のキット添付の2倍(1:10)相当を用いた方法が実用的と思われた。この方法で献血者集団の吸光度分布を調べ、カットオフ値を暫定的に0.200と設定した。

同様にIgM抗体の測定にも、反応系として「固相抗原-検体IgM-抗ヒトIgM標識抗体」を用いて、標識抗体濃度の検討、非特異吸着を減らす検討を行った。また、「固相抗ヒトIgM抗体-検体IgM-抗原-抗HEV標識抗体」の系(デンカ生研)も検討した。陽性の吸光度を高めるため、振とうし、感染研法とデンカ法の反応性を調べた。反応系の違いか、或いは使用標識抗体の違いによるものと考えられるが、デンカ生研の系は振とうすることで反応性を高めることができた。この系について、さらに反応性を高める検討を行った。用いた条件の中で、抗原

抗体反応については、37℃、1時間振とうし、標識抗体はデンカ生研で使用している濃度(1:20)を用いた方法が実用的と思われた。この方法で献血者集団の吸光度分布を調べ、カットオフ値を暫定的に0.200と設定した。

献血者集団のIgG抗体陽性率は10.0%(22/220)であった。(図1)

献血者集団のIgM抗体陽性率は1.8%(4/220)であった。陽性4例中3例はIgG抗体も陽性であった。

C-2 豚抗HEV抗体

豚の抗体測定法として、IgM抗体の測定には、国立感染症研究所の方法を用い、HRP標識抗体は当所のものを使用した。この方法で子豚集団の吸光度分布を調べ、カットオフ値を暫定的に0.400と設定した。

子豚集団のIgM-ELISAの吸光度は、生後30日頃は0.4以下であったが、生後60日頃では0.4以上に上昇し、生後90日頃には0.8以上、生後120日頃には1.3以上に上昇した。

肥育豚集団のIgM-ELISAの吸光度は、すべて0.9以上であった。IgM抗体陽性率は100%(20/20、2002年採血)であった。

IgG抗体の測定には、国立感染症研究所の方法を用いた。この方法で子豚集団の吸光度分布を調べ、カットオフ値を暫定的に0.400と設定した。

子豚集団のIgG-ELISAの吸光度は生後60日頃までのIgG抗体については、10頭中8頭は0.4以下であったが、2頭は0.5から0.7であった。この2頭は62日令では0.3以下になっていた。子豚は生後60日頃までは1以下であったが、生後100日頃以降では3以上に上昇した。

5ヶ月齢から8ヶ月齢の豚の集団のIgG-ELISAの吸光度は、1以上であった。IgG抗体陽性率は100%(360/360)であった。

D. 考察

抗 HEV 抗体検出のため、HEV 中空粒子を抗原とした ELISA について、条件検討を行い、デンカ生研で開発中の方法を一部変更して抗体を測定した。献血者集団の IgM 抗体陽性 4 例中 3 例は IgG 抗体も陽性であった。今後、調査対象を増やし、地域別、年齢別、性別等に分けた集団の吸光度分布について解析したい。

豚は生後 2 ヶ月で IgM 抗体が産生され、3-4 ヶ月で IgG 抗体が高値になった。生後 60 日頃に IgG-ELISA の吸光度が 0.5 から 0.7 であった 2 頭は、36 日後、0.3 以下になっていたので移行抗体を持っていた可能性が考えられた。

5 ヶ月齢から 8 ヶ月齢の豚では、IgM 抗体も IgG 抗体も高値であり、肥育豚はすべて感染を経験した後、肉として出荷されていると考えられた。肥育豚が IgM 抗体、IgG 抗体ともに 100% 陽性である結果は現在も 10 年前も同様であり、最近 10 年間に大きな変化はないと思われた。

E. 研究発表

1. 学会発表

なし

2. 論文発表

なし

F. 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(肝炎等克服緊急対策事業)
「本邦に於けるE型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究」班
分担研究報告書

献血者集団におけるHEV感染の実態解明

分担研究者 山中 烈次(日本赤十字社 事業局血液事業部)

研究概要

平成14年7月に手術中に輸血を受けた患者さんがE型肝炎を発症した事例があり、輸血に用いた血液の保管検体1本からHEV-RNAが検出された。現在、日本赤十字社では平成15年3月から平成16年3月に献血され、肝機能検査(ALT)のみが高く、不適となった一部の献血者血液を対象にHEV-RNAとHEV-IgM、HEV-IgGを測定中であり、その陽性率から輸血用血液のリスク評価ができるものと考えている。

目的

平成14年7月に手術中に輸血を受けた患者さんがE型肝炎を発症した事例があり、輸血に用いた23本の血液の保管検体(平成8年9月から全献血者の血液の一部を冷凍保管している)を調べた結果、1本からHEV-RNAが検出された。

日本赤十字社では、献血時には問診・検診により献血者の健康状態等を確認し、献血血液のALT、血清学的検査、HIV-1、HBV、HCVの核酸増幅検査(NAT)を実施している。

HEVはA型肝炎ウイルスと同様に経口感染するが、疫学的にまだ十分調査されていない。本研究では全国の血液センターで献血された血液でALTが高く、不適となった一部の血液を対象にHEV-RNAの陽性率とHEV-IgM、HEV-IgGの陽性率の全国実態調査と輸血用血液のリスク評価を行い、適切な対策を立てることを目的とする。

方法

HEV-RNAとHEV-IgM、HEV-IgGを測定する血液は、HBV、HCV、HIV等の血清学的

検査とNATに合格し、ALTのみが高く、不適となった献血者血液を対象としている。対象血液は、ALT値が61～99 IU/Lと100～199 IU/Lとなった血液については、北海道、広島県、福岡県の血液センターで毎月15本ずつ、また、ALT値が200 IU/L以上の血液については、全国の血液センターで凍結した血漿バッグの状態を確保している。

血漿バッグは全国の血液センターから定期的に全国7つある基幹センターに送付した後、30～37℃で融解後に検査用検体(1.8ML×3本、30ML×1本)に分注したのち、北海道センター1か所で管理している。血漿バッグの確保期間は平成15年3月から平成16年3月までとしている。

結果

ALT高値の血漿の確保状況(平成15年3月から平成15年10月)は表1のとおりである。

現在、これらのALT高値検体についてHEV-RNAとHEV-IgM、HEV-IgGについて測定中である。

表 1. HEV 感染マーカー調査のための ALT 高値ドナー血漿の確保状況
(平成 15 年 3-10 月)

ALT (IU/L)	本数	ALT (IU/L)	本数
61 - 99	313	600 - 699	9
100 - 199	305	700 - 799	5
200 - 299	610	800 - 899	4
300 - 399	110	900 - 999	5
400 - 499	31	1000 -	19
500 - 599	22		
合計			1433