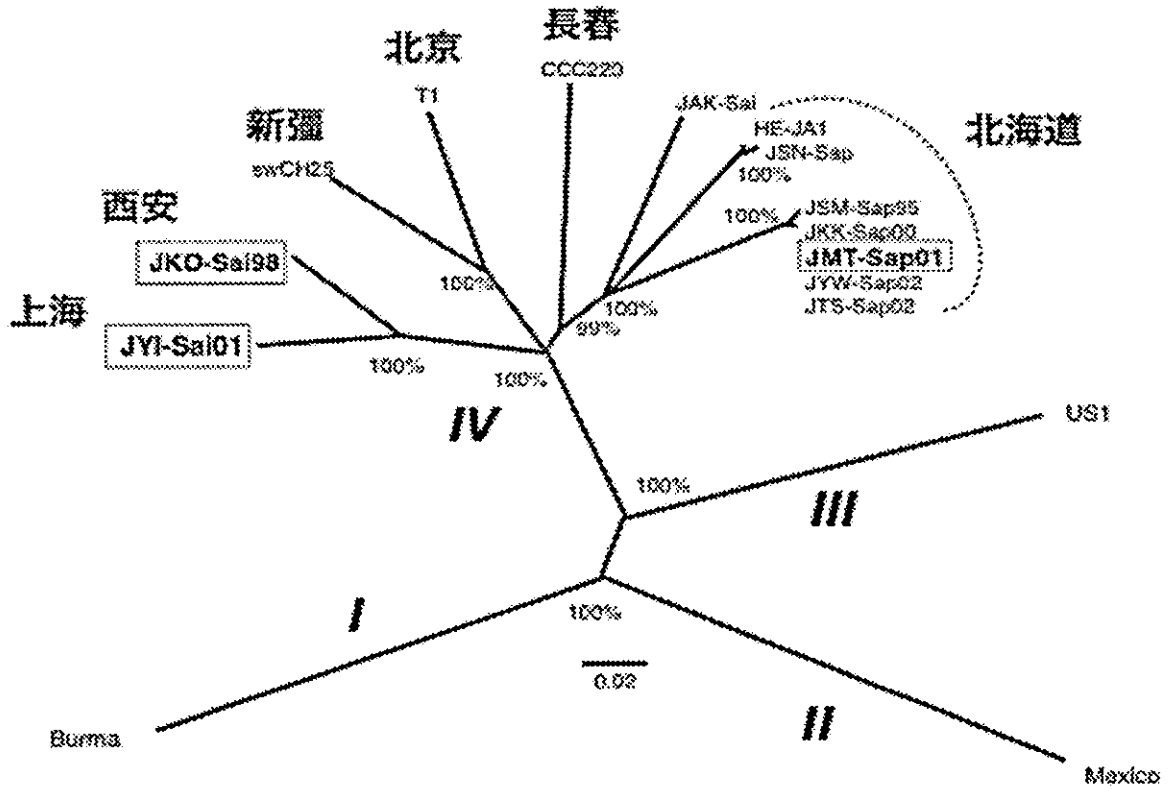


図 1.

### Phylogenetic tree(NJ) with full-genome HEV isolate



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

## 遺伝子型 3 の E 型肝炎ウイルス構造蛋白の発現

分担研究者 武田直和 国立感染症研究所

研究要旨：遺伝子型 3 の HEV VLP を作製した。N 末端から 111 アミノ酸を欠失した ORF2 を発現した場合は、これまでの遺伝子型 1 や遺伝子型 4 の場合と同様、直径 27nm の VLP であった。一方、ORF2 の全長の発現では、直径 35-38nm のネイティブなウイルス粒子とほぼ同じ直径を有する VLP が作製できた。

### <協力研究者>

李 天成、永田 典代、宮村達男（国立感染症研究所）、恒光 裕（動物衛生研究所）

### A. 研究目的

E 型肝炎ウイルス（HEV）は E 型肝炎の原因ウイルスである。現在、少なくとも四つの遺伝子型が知られている。これまで先進国において E 型肝炎は輸入感染症と思われてきたが、近年、まったく海外渡航歴のない急性 E 型肝炎患者が発見されるなど、日本でもすでに土着しているウイルスであることが明らかになってきた。HEV が増殖できる培養細胞系は確立されておらず、組換えバキュロウイルス発現システムを用いて作製されたウイルス様中空粒子（VLP）がウイルスの形態や抗原性の研究に用いられてきた。我々はこれまでに 1 型と 4 型の HEV について N 末端を欠失した構造蛋白を発現して VLP を作製し、その抗原性と免疫原性がネイティブな HEV と似ていることを明らかにした。しかしながら、これら VLP はネイティブな HEV に比べ明らかに小さなサイズの粒子であった。本研究では 3 型の構造蛋白を発現し、ネイティ

ブな HEV に近いサイズを持つ VLP の作製を試みた。

### B. 研究方法

3 型 HEV ORF2 の全長、および 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、ORF2 全長を発現する場合は感染細胞から、N 末端を欠失させた ORF2 を発現する場合は培養上清からウイルス様中空粒子（VLP）を回収し、ショ糖密度勾配遠心法、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法で精製した。発現蛋白の N 末端アミノ酸配列は Edman 法で決定した。ウサギ抗 VLP 抗体、E 型肝炎患者血清、および遺伝子型 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. N 末端から 111 アミノ酸を欠失した ORF2 の発現

これまで発現した遺伝子型 1 や遺伝子型 4 と同様、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、および 54k 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。遺伝子型 3 の VLP が作製できた。感染上清を健常人血清と遺伝子型 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. ORF2 の全長の発現

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 72k および 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 66k、および 54K のバンドが出現した。上清中からはウイルス特異蛋白は全く検出されなかった。感染 7 日目の感染細胞を回収し、細胞を破碎後、遠心上清を回収した。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 35-38nm のネイティブなウイルス粒子とほぼ同じ直径を有する中空粒子が多数観察された。

## D. 考察

遺伝子型 3 の VLP を作成することができ、遺伝子型 1 および遺伝子型 4 と合わせて 3 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、いずれの 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遺伝子型 1 VLP と遺伝子型 4 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。35-40nm の粒子の三次構造の解析により、ネイティブな HEV 構造の情報が得られることも期待できる。

## E. 結論

組換えバキュロウイルスで遺伝子型 3 の構造蛋白全長を発現することによって、ネイティブな粒子とほぼ同じ直径を持つ VLP を作製することができた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

[1] Tanaka E, Matsumoto A, Takeda N, Li T-C, Umemura T, Yoshizawa K, Miyakawa Y, Miyamura T, Kiyosawa K: Age-specific Antibody to Hepatitis E Virus Stays Constant during the Past 20 Years in Japan. *J. Viral Hepatitis* 2005; in press.

[2] Maloney BJ, Takeda N, Suzaki Y, Ami Y, Li T-C, Miyamura T, Arntzen CJ, Mason HS: Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. *Vaccine* 2005;23: 1870-1874.

[3] Takamura S, Niikura M, Li TC, Takeda N, Kusagawa S, Takebe Y, Miyamura T,

Yasutomi Y: DNA vaccine-encapsulated virus-like particles derived from an orally transmissible virus stimulate mucosal and systemic immune responses by oral administration. *Gene Ther* 2004;11: 628-35.

[4] Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, Sato S, Fukai K, Kato T, Takahashi K, Mishiro S, Imai M, Takeda N, Ikeda H: Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion* 2004;44: 934-40.

## 2. 学会発表

[1] 李天成、恒光裕、永田典代、宮村達男、

武田直和. 3 型 HEV 構造蛋白の発現と抗原性の解析. 日本ウイルス学会、第 52 回学術集会 2004 年 110 月 横浜.

[2] 影山努, 小嶋慈之, 李天成, 片山和彦, 武田直和. 蛍光プローブを用いた HEV の高感度検出法および遺伝子型識別法の開発. 日本ウイルス学会、第 52 回学術集会 2004 年 110 月 横浜.

## G. 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 中間宿主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、HEV のキャプシド蛋白質(CP)を植物細胞内で発現させ、経口で効率的に免疫を賦与するためのウイルス様中空粒子を形成させる発現系を開発することである。本年度は、前年度に構築した植物細胞形質転換用バイナリーベクターを用いて形質転換アグロバクテリウム経由で植物細胞内にて一過的に HEV CP を発現させ、その発現 CP を抗原として用いて HEV 感染患者血清による反応性を比較・検討した。

共同研究者

大西 純 リサーチ・レジデント

### A. 研究目的

ヒト E 型肝炎ウイルス (HEV) は「人獣共通感染ウイルス」であり、HEV 感染の reservoir である野生のイノシシ、シカ、または飼育ブタなどの精肉を摂食するとその後に肝炎を発症した事例が報告されている (Tei et al., 2003, Yazaki et al., 2003)。その感染経路を遮断するひとつの方法は、中間宿主となるブタなどに HEV に対する免疫を賦与することが効果的と思われる。

バキュロウイルスを用いた昆虫細胞内で発現させた組換え HEV キャプシド蛋白質 (CP) は、細胞内で集積することで球状の中空粒子を自動的に形成し、さらに、中空粒子となった組換え HEV CP をネズミに経口投与することによりワクチン効果が発揮されとの報告がある (Li et al., 1997)。

本研究では、飼育ブタの HEV 感染予防を目的とした経口ワクチンを開発するため、まずは HEV CP 遺伝子を導入した形質転換タバコを作製し、タバコ細胞で発現させた HEV CP

から成る中空粒子の生産系を開発する。本生産系は、HEV CP を発現する飼料作物の開発、さらに経口投与ワクチン飼料の創出へと繋がり、家畜の HEV 感染の reservoir 化を遮断することで精肉を介した経口感染による E 型肝炎発症の予防技術の開発を具現化するものとなる。

### B. 研究方法

#### B-1 植物細胞形質転換用バイナリーベクターの構築

これまでに、植物用高発現プロモータ (Tsuda et al., 1998) 下流に植物細胞核へ導入する遺伝子を連結した植物細胞形質転換用バイナリーベクターを開発した。さらに、転写後遺伝子サイレンシングによる外来遺伝子発現抑制を回避するために、遺伝子サイレンシング抑制用バイナリーベクターを構築した (Takeda et al., 2002)。

導入遺伝子として、Genotype III 型の JRA、Genotype IV 型の JSN から PCR 法にて増幅した HEV CP 遺伝子を用いた。HEV CP は N 末端 111 アミノ酸が欠失していても中空粒子が形成されることが知られている (Li et al.,

1997)。植物細胞内発現 HEV CP 遺伝子もその報告と同様の短い配列を用いた。また、HEV CP を植物細胞内で効率的に発現・蓄積させることを目的に、本遺伝子の 5'末端に小胞体移行シグナルペプチド配列を、3'末端に小胞体滞留シグナルペプチド配列を付加し、それをバイナリーベクターに組み込みアグロバクテリウムを形質転換した。

### B-2 アグロインフィルトレーション法による、HEV CP の一過性発現

形質転換植物個体を作成する前段階をして、今回作成したバイナリーベクターにより、JRA 並びに JSN の2種の HEV CP が植物細胞内で発現・蓄積されるかアグロインフィルトレーション法 (Kubota et al., 2003) を用いて検討した。HEV CP を有するバイナリーベクター、または遺伝子サイレンシング抑制用バイナリーベクターを有するアグロバクテリウムをそれぞれ等量混合して、タバコ植物 (*Nicotiana benthamiana*) 葉面へシリンジにて加圧注入し、植物へ接種した。接種4日後、接種葉を回収し HEV CP の発現をウェスタンブロット法にて解析した。

### B-3 植物細胞発現 HEV CP の血清学的解析

アグロインフィルトレーション法により感染植物葉に発現された HEV CP の抗原性を、E 型肝炎患者の血清とウェスタンブロット法にて反応させ、抗体のサブクラスごと (IgG、IgM、IgA) にその違いを解析した。

## C. 研究結果

### C-1 植物細胞の形質転換と HEV CP の発現

アグロインフィルトレーション法により、JRA 並びに JSN の両者の HEV CP の発現が確認された。小胞体移行シグナルペプチド配列を付加した HEV CP では、その発現量は増加し、植物細胞内において安定して蓄積してい

ることが判明した。しかし、E 型肝炎患者 IgG、IgM、IgA を用いたウェスタンブロット法による解析で、植物細胞内で発現された HEV CP は部分的に消化され、断片化されていることが判明した (図1)。

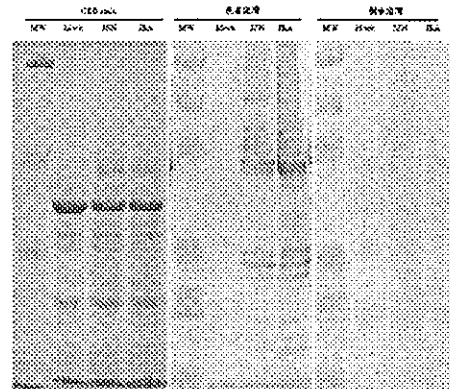


図1 タバコ HEV 抗原を用いた感染者血清のスクリーニング (Anti-human IgA 二次抗体により HEV CP を検出)

### C-2 植物細胞発現 HEV CP の診断用抗原としての可能性

植物細胞内で発現した HEV CP を数名の E 型肝炎患者血清と反応させ抗体のサブクラス (IgG、IgM、IgA) ごとでの反応性を比較した。その結果、PCR 法による診断結果と概ね一致した反応性を示したが抗体のサブクラス間に反応性の違いが認められ、臨床的に重要なウイルス感染後の時期推定に利用できる検定法である可能性を示した (表1)。

表1 タバコ HEV 抗原を用いた患者血清のスクリーニング

	687	HE-8	HE-9	503	719
IgA	-	-	+	+	-
IgM	-	-	-	+	+
IgG	-	-	+	+	+

血清 687 は PCR 法による判定では陰性。その他の血清は陽性と判定されたものを用いた。

### D. 次年度計画

植物細胞内では HEV CP は発現されるものの、部分的に消化・断片化されており、高発

現プロモーターに駆動される蓄積量としては多量とは言えない。これは、植物と動物の codon usage bias、プロテアーゼ消化、およびスプライシングなどが原因と予測される。今後は HEV CP 遺伝子を植物型 codon usage へ変換し、さらにスプライシング、プロテアーゼ消化の回避を施す変異を導入し、形質転換植物体内で安定した高発現システムの構築に取り組み、ワクチン効果が期待できるウイルス様中空粒子の生産系を開発する。

#### E. 参考論文

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

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.

Takeda, A., et al., 2002. Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus. *FEBS letter*, 532: 75-79, 2002.

Tei, S., et al., 2003. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 362: 371-373.

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.

Yazaki, Y., et al., 2003. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J. Gen. Virol.* 84: 2351-2357.

#### 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

献血者集団における HEV 感染の実態解明

分担研究者 金光公浩 日本赤十字社血液事業本部

研究要旨

本研究の目的は、献血者における HEV 感染の実態を把握し、輸血による HEV 感染リスクを評価するとともに適切な HEV 輸血感染予防策を検討することである。日本赤十字社では、2002 年の輸血後 E 型肝炎症例報告を受け、2003 年 4 月から 2004 年 3 月までの 1 年間に、全国の血液センターにおいて ALT 検査のみで不合格 ( $>60$  IU/L) となった献血者を対象に、HEV-RNA、抗 HEV IgM 抗体、抗 HEV IgG 抗体について調査した。ALT  $\geq 200$  IU/L を示したすべての献血者 1389 例における各マーカーの陽性率は、それぞれ 1.1% (15 名)、1.0% (14 名)、3.2% (45 名) であった。これら陽性者は全国的に分布していたが、RNA 陽性者及び IgM 抗体陽性者は東日本に多く、IgG 抗体陽性率は北海道、関東甲信越、九州地方で全国平均を上回り、特に北海道地方はすべてのマーカーについて最高値を示した。RNA 陽性者は 30 代に多く、15 名中 14 名が男性であった。北海道の 1 例 (IV 型北海道株) 以外はすべて Genotype III 型で、一部の株には地域性が見られた。またこの調査期間中、ALT 高値献血者の HEV-RNA 検査が発端となり輸血後 E 型肝炎の 1 症例が確認された。

<研究協力者>

松林圭二, 坂田秀勝, 武田尋美, 徳島恵里奈,  
佐藤進一郎, 加藤俊明, 池田久實  
(北海道赤十字血液センター)

A. 研究目的

近年 E 型肝炎ウイルス (HEV) が、これまで原因不明とされていた急性肝炎の原因ウイルスの一つとして認識されるようになり、HEV 感染の実態も明らかになりつつある。2002 年には輸血後 E 型肝炎を確定できた世界初症例が北海道で確認され、HEV 国内感染経路の一つに血液感染ルートが存在することが明らかとなった。また、これまでの検討では北海道地区の ALT 高値献血者においては HEV 陽性率が高い可能性が示唆されている。本研究は、全国規模の HEV 疫学調査を実施

することによって献血者における HEV 感染の実態を把握し、適切な HEV 輸血感染予防策を検討することを目的とする。

本年度は ALT 高値献血者集団における全国規模の HEV 感染実態調査を行った。

B. 研究方法

1. 対象

2003 年 4 月から 2004 年 3 月までの 1 年間に、全国の各血液センターにおいて ALT 検査のみで不合格となった献血者を対象に、ALT 値が 200 IU/L 以上 (平均  $314 \pm 249$ ) の全 1389 例 (男:女 = 5.5:1、平均年齢 =  $32 \pm 11$ ) と、北海道、広島、福岡の 3 血液センターにおいて ALT 値が 61 IU/L 以上 200 IU/L 未満となった血液 1062 例の合計 2451 例を調査対象とした。



## 2. HEV-RNA の検出および塩基配列解析

血漿 200  $\mu$ L より QIAamp MinElute Virus Spin Kit を用いて抽出した核酸を、ORF1 をターゲットとしたリアルタイム RT-PCR 法により、QuantiTect Probe RT-PCR Kit を用いて ABI PRISM 7700 で HEV-RNA を検出した。RNA 陽性となった検体については、合成 HEV-RNA 標準品をスタンダードとしたリアルタイム RT-PCR 法による HEV-RNA の定量を行うとともに、ORF1 領域の塩基配列解析による分子系統樹解析を行った。

## 3. HEV 抗体の検出

国立感染症研究所 武田直和先生、李天成先生より分与していただいたバキュロウイルス発現 HEV 様中空粒子 (VLP, Genotype I 型) を固相抗原に用いた in-house ELISA キットを作製し、抗 HEV IgM 抗体および IgG 抗体を測定した。100 倍希釈した検体 50  $\mu$ L を ELISA プレートに加え、室温 1 時間放置し、洗浄バッファーにて 5 回洗浄した。次に希釈調製した HRP 標識マウス抗ヒト IgM モノクローナル抗体 (1:500) あるいは HRP 標識マウス抗ヒト IgG モノクローナル抗体 (1:3000) 50  $\mu$ L を加えて、室温 1 時間放置した後、5 回洗浄した。これに TMB 基質 50  $\mu$ L を添加して 10 分間反応させた後、1 N 硫酸 50  $\mu$ L を加えて反応を停止させ、OD<sub>450nm</sub> の吸光度を測定した。in-house ELISA のカットオフ値は暫定的に OD<sub>450nm</sub>=0.1 とし、陽性となった検体については市販の HEV 抗体キット (コスミックコーポレーション) で確認検査を行い、双方で陽性となったものを最終的に HEV 抗体陽性と判定した。

また、一部の検体については神奈川県衛生研究所において、デンカ生研キット、in-house キットでも測定された。

## C. 研究結果

地域別、年代・性別の各マーカーの陽性率を図 1,2 に示す。

HEV-RNA は ALT $\geq$ 200 IU/L 献血者 1389 例中 15 例(1.1%)から検出され、200>ALT>61 IU/L 献血者 1062 例中からは検出されなかった。地域別の HEV-RNA 陽性率 (例数) は、北海道 4.6%(4)、東北 2.1%(3)、関東甲信越 1.2%(4)、中部北陸 0.5%(1)、近畿 0.4%(1)、中

国四国 0.5%(1)、九州 0.6%(1)と東日本で全国平均を上回った。北海道は、東北を除く他地域に比較し有意に高い陽性率を示した。HEV-RNA 陽性者は 1 例を除きすべて男性で 30 代に多かった。Genotype は北海道の IV 型 1 例を除きすべて III 型で、北海道と東北地区の株についてはこれまで同じ地域から得られている株と高い相同性がみられ、ブタ由来株と類似したものもあった。HEV-RNA 量は  $8.4 \times 10^7 \sim 3.3 \times 10^7$  copies/mL と広域に分布していた。また HEV-RNA 陽性者の採血日には季節的な偏りはなかった。なお HEV-RNA 陽性となった 15 名については HEV 感染源は特定できなかった。

抗 HEV IgM 抗体は ALT $\geq$ 200 IU/L 献血者からは 14 例(1.0%)が検出され、200>ALT>61 IU/L 献血者からは 1 例(0.3%)のみ検出された。地域別、年代別の分布は HEV-RNA とほぼ同様な傾向を示し、陽性者は北海道、東北地区の男性が多かった。

HEV IgG 抗体陽性率は、HEV-RNA、IgM 抗体陽性率の分布とは異なっていた。ALT $\geq$ 200 IU/L 献血者における地域別の IgG 抗体陽性率は、北海道 6.9%、関東甲信越 5.7%、九州 3.9%で、全国平均(3.2%)を上回ったが、HEV-RNA、IgM 抗体陽性率が高かった東北地区では全国平均を下回った。また年代別では、IgG 陽性率は加齢とともに増加する傾向にあり、10 代では陽性者はなく、20 代 1.5%、30 代 3.0%、40 代 7.6%、50 代 8.7%、そして 60 代では 12.5%と最も高かった。陽性者の性別は他のマーカーと同様に男性が多かった (男性:女性=42 名:3 名)。200>ALT>61 IU/L 献血者における IgG 陽性率は、北海道で 5.8%、広島県で 2.0%、福岡県・佐賀県 0.3%で、平均 2.7%で、北海道地方においては ALT $\geq$ 200 IU/L 献血者集団と 200>ALT>60 IU/L 献血者集団とでは IgG 抗体陽性率について有意差はなかった( $p=0.6905$ )。

HEV-RNA 陽性の 15 名については、10 例が IgM、IgG 共に陽性、2 例は IgM のみ陽性、3 例はいずれも検出されなかった。また遡及調査の結果、IgM のみ検出された北海道の陽性献血者 1 名は、21 日前の検査合格献血からも HEV-RNA が検出されたが、抗 HEV IgM および IgG は検出されなかった。この血液由来製剤は幸い容量規格外となり、出庫されて

いなかった。その他の HEV-RNA 陽性者の過去の血液はすべて HEV-RNA 陰性だった。

高い陽性率を示した北海道地区においては、2004 年 4 月以降も ALT $\geq$ 200 IU/L 献血者を対象とした HEV-RNA スクリーニングを継続し、2005 年 1 月末現在の該当者 68 名中 3 名から HEV-RNA が検出された。このうち 1 名については 2 週間前にも献血歴があり、この血液からも HEV-RNA が検出され、不幸にも血小板製剤として、すでに非ホジキンリンパ腫の患者に輸血されていた。この患者は輸血前の HEV マーカーはすべて陰性であったが、輸血後 22 日目から 85 日目までの約 2 ヶ月間にわたり HEV-RNA が検出され、ドナー由来の HEV 塩基配列と完全に一致した。また抗 HEV 抗体は IgM クラス抗体は輸血後 3 ヶ月間の経過観察中には検出されないままであったが、IgG クラス抗体は 67 日目に陽転化した。以上の結果より本症例は HEV 輸血感染と確定された。原因ドナーは献血の 23 日前にブタレバーを摂取していたことが確認され、これが感染源となった可能性が高いと考えられた。

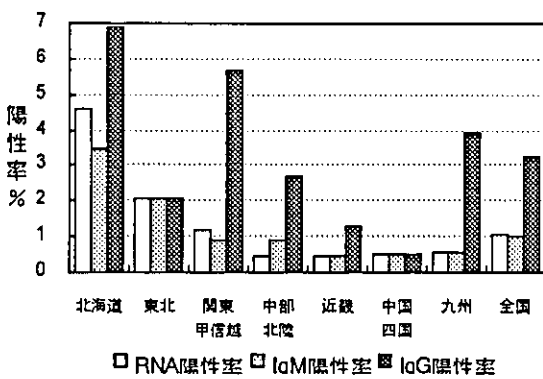


図1. ALT $\geq$ 200 献血者の地域別 HEV 陽性

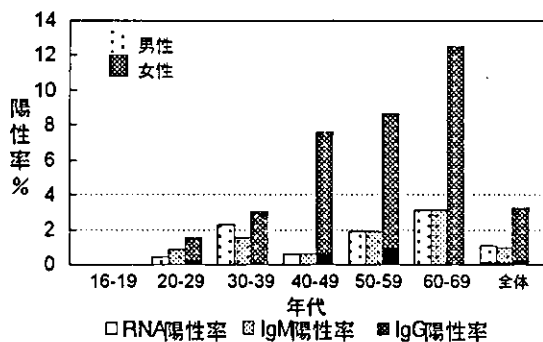


図2. ALT $\geq$ 200 献血者の性別・年代別 HEV

#### D. 考察

全血液センターの ALT 高値 ( $\geq$ 200 IU/L) 献血者全数を対象とした全国規模の調査を行った。全国的に見れば、わが国の HEV 浸淫率は HBV や HCV に比べ低いと考えられる。しかしながら、HEV 感染率はこれまで報告と同様に、地域、年齢によって大きく偏っていることが明らかとなった。特に北海道地方は他の地域に比べて感染者、既往感染者ともに多く、HEV 浸淫地区と考えられる。既往感染を示す IgG クラスの抗体保有者は、加齢とともに上昇し 60 代では 10% を超えており、過去にも HEV 感染が起きていたと考えられる。今回の調査対象とした ALT 高値献血者集団は、男性の割合が高いためか、HEV マーカー陽性者の多くは男性であったが、HEV マーカー陽性率に対する統計的に有意な性差は認められなかった ( $p=0.0987\sim 0.3893$ )。HEV-RNA 陽性となった 15 名の献血者は献血時に問診を受けていることから、少なくとも献血時には自覚症状がなかったと考えられ、不顕性感染であった可能性が高いと考えられる。また HEV-RNA 陽性者から分離された HEV ゲノムの Genotype 比率は III 型 : IV 型 = 14 例 : 1 例で、北海道内の HEV-RNA 陽性献血者の Genotype 比率も III 型 : IV 型 = 3 例 : 1 例であった。これまで北海道内の肝炎患者からは III 型よりも IV 型が多く分離されているが、不顕性感染が多いと考えられる献血者集団においてはこれと異なる結果となった。これについては、HEV Genotype と発症率・重症度の関連性を示唆している可能性が考えられる。

これまで国内で輸血による HEV 感染が確認された症例は、今回の調査期間中に判明した 1 例を含め計 4 例あるが、すべてのケースにおいて原因血は ALT 正常の合格済み検体である。今後はさらに健常献血者を対象とした HEV 感染実態調査も実施する予定である。

#### E. 結論

1. 全国の血液センターの ALT 高値異常献血者集団を対象とした HEV マーカー調査を行い、全国的には HEV 陽性率は低い、地域差や年齢差が顕著に認められた。
2. ALT 高値献血者の HEV-RNA 調査が発端となり、輸血後 E 型肝炎の 1 症例が確認された。

3. 今後、健常献血者集団についても同様な調査を行い、HEV 感染リスクを評価するとともに適切な HEV 輸血感染予防策を検討する予定である。

**F. 研究発表**

1. Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, Sato S, Fukai K, Kato T, Takahashi K, Mishiro S, Imai M, Takeda N, Ikeda H.; Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus in Hokkaido, Japan. *Transfusion*, 44, 940-943, 2004
2. 加藤将, 種市幸二, 松林圭二; 肝臓, 45 巻 12 号, 688, 2004

**G. 知的所有権の取得状況**

該当なし

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

## 診断系の評価及び改良に関する検討

（E型肝炎抗体保有状況の解析）

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）の抗体測定法を検討し、ALT 高値の献血者血清 1516 例について HEV-IgG 抗体を測定した。陰性コントロール値からカットオフ値を設定し判定した結果、89 例（5.9%）が HEV-IgG 抗体陽性であった。献血者血清で検討したところ、地域別では北海道、東京都、宮城県、愛知県で陽性率が高かった。

### <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  
 片山 丘 神奈川県衛生研究所  
 松林圭二 北海道赤十字血液センター

ELISA の検討を行った。

検査材料として、北海道、東京都、宮城県、愛知県、大阪府、岡山県、広島県、福岡県で集められた献血者血清で ALT 高値血清（ALT61 以上）の 1516 例を用いた。また IgG 抗体測定で吸光度 0.190 以上の血清については IgM 抗体の測定も行った。

### A 研究目的

HEV の抗体測定法を検討し、献血者血清を用いて HEV 抗体の吸光度分布を調べ、カットオフ値を設定し、抗体保有状況を調べる。

### C 結果

抗体測定は感染研法に準じたが、スキムミルクによるブロッキングを 37°C 2 時間さらに 4°C 一晩行い、血清およびペルオキシダーゼ標識抗体の反応時間を 2 時間としたことにより、良好な結果を得たので、以後この方法により抗体測定を行った。

### B 研究方法

抗体の測定には、HEV 中空粒子（国立感染症研究所分与）を抗原として固相化し、200 倍希釈血清を反応後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体あるいはペルオキシダーゼ抗ヒト IgM 抗体と反応させる

HEV-IgG 抗体測定を行った 1516 例の吸光度の分布を図 1 に示した。用いた陰性コントロール値からカットオフ値を吸光度

0.270 と設定した。その結果、陽性は 89 例 (5.9%)、陰性 1427 例であった。各地域別の結果を表 1 に示した。東京都 21 例 (10.0%)、宮城県 5 例 (9.6%)、愛知県 11 例 (7.2%) で抗体陽性率が高かった。北海道では ALT 値 61~199、200 以上に分けて検討した。ALT200 以上では 4 例 (6.1%) ALT 値 61~199 では 23 例 (9.4%) であった。

IgG 抗体測定で吸光度 0.190 以上の 143 例について IgM 抗体を測定し、吸光度の分布を図 2 に示した。用いた陰性コントロール値からカットオフ値を 0.1 と設定し

た。その結果 16 例 (18.0%) が IgM 抗体陽性であった。IgM 抗体は陽性数が少ないことから地域による差は見られなかった。

D 考察

北海道内で HEV に感染したブタ肝臓等の摂取による食物性伝搬の例があり、北海道での HEV 抗体陽性率と他地域との違いの有無が注目されたが、東京都、宮城県、愛知県でも陽性率が高く、今後検査数を増やし、さらに検討する必要があると思われる。またカットオフ値の設定にも、年齢や地域などの条件を加え、多くの血清を使用し検討する必要があると思われる。

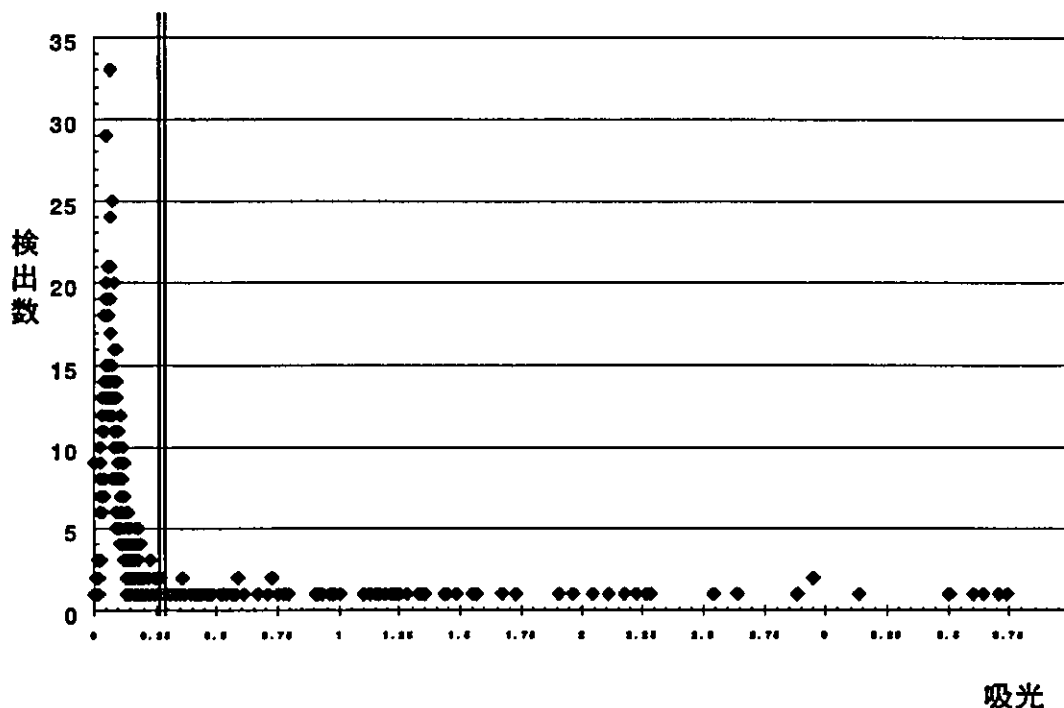


図 1 E 型肝炎 Ig G 抗体

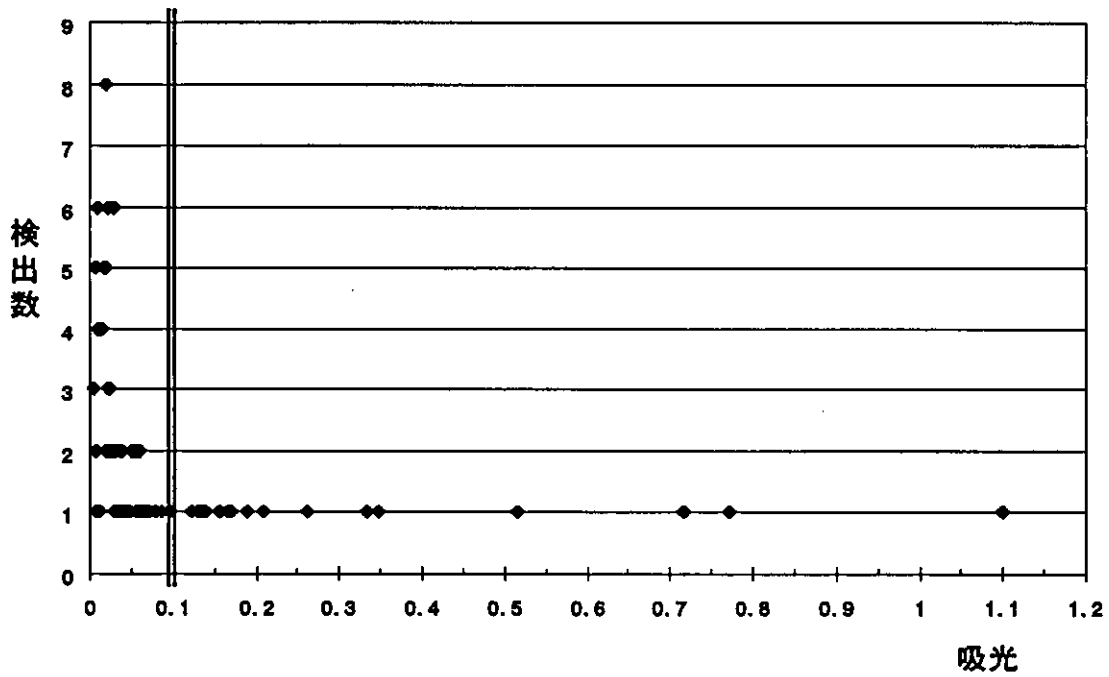


図2 E型肝炎IgM抗体

表1 E型肝炎IgG抗体陽性率

	検体数			陽性率
	総検査数	吸光度		
		<0.270	≥0.270	
東京都	210	189	21	10.0
宮城県	52	47	5	9.6
愛知県	152	141	11	7.2
大阪府	164	162	2	1.2
岡山県	38	37	1	2.6
広島県	262	252	10	3.8
福岡県	328	316	12	3.7
北海道				
H	66	62	4	6.1
L	244	221	23	9.4
合計	1516	1427	89	5.9

H : ALT ≥200  
 L : ALT 61~199

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：抗体調査によって養豚だけでなく、イノシシ、ドブネズミ、サルなどの広範囲な動物種に E 型肝炎ウイルス（HEV）、あるいは、類似した別のウイルス（HEV-like virus）が感染していると考えられる。我々は日本の一地域で捕獲されたイノシシの抗体調査を行った。抗体陽性率は 39%（174/449）で、体重や性、過去 6 年間の捕獲年度などの要因で抗体陽性率に大きな差はなかった。

<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）

A. 研究目的

抗体調査によって日本の養豚農家で飼育されているブタには E 型肝炎ウイルス（HEV）が広く浸潤していることが明らかになった。ブタ以外にも、日本の野生動物のイノシシ、ドブネズミ、サルなどで抗 HEV 抗体が検出され、広範囲な動物種にこのウイルス、あるいは、類似した別のウイルス（HEV-like virus）が感染していることが推定される。近年、イノシシ肉を食べたヒトから急性 E 型肝炎患者が出ている。イノシシは養豚と遺伝的に近い動物で日本では北海道以外の地域に生息し、現在は養豚との接触は少ないが、病原体に対する感受性においてブタと大差ない。このような状況をふまえ、イノシシの抗 HEV 抗体保有状況調査をさらに拡充し検討した。

B. 方法と成績

某県家畜保健所に保存されているイノシシ血清を調査した。抗 E 型肝炎ウイルス抗体は ELISA 法を用いて測定した。ELISA 抗原は、バキュロウイルス

ベクターにより昆虫細胞で発現された E 型肝炎ウイルス ORF2 領域蛋白で、国立感染研・武田、李氏より分与された。この測定系で OD 値 0.1 以上を陽性と判断した。

- 1) 捕獲されたイノシシ（一部はイノシシと養豚との交雑種であるイノブタの可能性もある）の保存血清 449 サンプル中、174 サンプル（39%）が抗体陽性と判定された（図 1）。ちなみに、同じ抗体検出系で行った調査では日本の一般的養豚農家では 6 ヶ月齢豚で 80%以上の抗体陽性率であった。調査したイノシシ血清の中には、非常に高い抗体価もみられたが、これは養豚の高抗体価に匹敵する。この抗体保有率と抗体価の分布から、野生イノシシ集団にも E 型肝炎ウイルスが高率に感染していると考えられた。
- 2) ヒトでは加齢に伴い抗 E 型肝炎ウイルス抗体陽性率が上昇することが報告されている。日本の野生ドブネズミ、ニホンザルにも抗 E 型肝炎ウイルス抗体が検出され、抗体保有率と加齢との相関が認められている。調査したイノシシ個体の体重分布は 20kg～175kg で、大まかに 1 才弱以上の年齢だったと推定される。しかし、このサンプルに関しては、体重と抗体陽性率や抗体価との明確な相関は見られなかった（表 1）。
- 3) 抗体陽性率は平成 10 年度から平成 15 年度まで 33%～49%の範囲にあり、大きな変化はないと判断した（表 2）。
- 4) 抗体陽性率はオスでは 37%（22/60）、メスでは 40%（27/67）で差はなく、また抗体陽性個体における平均抗体価でもオスでは  $1.12 \pm 1.25SD$ 、メスでは  $0.83 \pm 0.74SD$  と有意な差はなかった。

### C. 考案と結語

今回調査した地域のイノシシ抗体陽性率は 39% (174/449)であった。イノシシの体重から推定して1歳弱以上の個体サンプルと考えられる。体重、性、捕獲年度などで、抗体陽性率が大きく変わることはなかった。高密度飼育している日本の一般養豚では6ヶ月齢で80%以上の抗体陽性率を示す状況と、単独生活するとされる日本イノシシの生態を対比すると、予想以上の抗体保有率である。今回の調査結果から、野生イノシシがHEVに感染する時期、感染経路などを推定するデータは得られなかった。

### 和文解説

- 1) E型肝炎ウイルスの概要:池田秀利、恒光 裕:動物衛生研究所ホームページ  
[http://www.niah.affrc.go.jp/disease/HEV/swine\\_hev2.html](http://www.niah.affrc.go.jp/disease/HEV/swine_hev2.html) 2004年12月
- 2) 豚のE型肝炎ウイルス:池田秀利:日本豚病研究会報46巻18-21 2005年2月

### D. 研究発表

図1 イノシシの抗E型肝炎ウイルス抗体価の分布

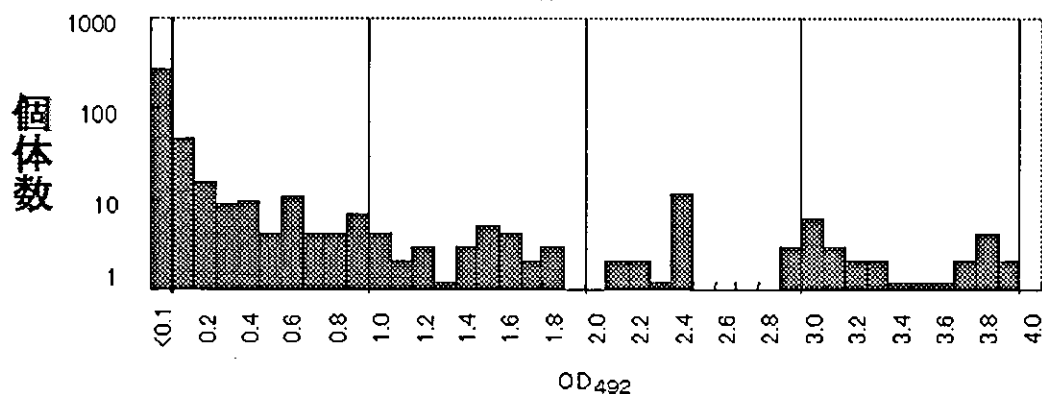


表1

体重(kg)	抗体陽性率
20-39	24% (6/25)
40-59	35% (15/43)
60-79	58% (19/33)
80-99	45% (9/20)
100-	33% (4/12)
合計	39% (53/133)

表2

年度	陽性率
平成10	34% (20/58)
平成11	35% (36/102)
平成12	33% (28/84)
平成13	41% (51/125)
平成14	49% (32/65)
平成15	47% (7/15)
合計	39% (174/449)



### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

平成 16 年度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』

研究成果の刊行に関する一覧表

## 1. Original articles: (班員・班友を下線で示す；筆頭著者 alphabet 順)

Fukuda S, Sunaga J, Saito N, Fujimura K, Itoh Y, Sasaki M, Tsuda E, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H: Prevalence of antibodies to hepatitis E virus among Japanese blood donors: identification of three blood donors infected with a genotype 3 hepatitis E virus. *J Med Virol* 73:554-561, 2004

Koizumi Y, Isoda N, sato Y, Iwaki T, Ono K, Ido K, Sugano K, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H: Infection of a Japanese patient by genotype 4 hepatitis E virus while traveling in Vietnam. *J Clin Microbiol* 42:3883-3885, 2004

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: 370-7.

Maloney BJ, Takeda N, Suzaki Y, Ami Y, Li T-C, Miyamura T, Arntzen CJ, Mason HS: Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. *Vaccine* 2005;23: 1870-1874.

Masuda J, Yano K, Tamada Y, Takii Y, Ito M, Ohmagari K and Kohno S Case Report-Acute hepatitis E of a man who consumed wild boar meat prior to the onset of hepatitis in Nagasaki, Japan *Hepatology Res* ; in press 2005

Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, Sato S, Fukai K, Kato T, Takahashi K, Mishiro S, Imai M, Takeda N, Ikeda H. Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion* 2004; 44: 934-40.

Mitsui T, Tsukamoto Y, Yamazaki C, Masuko K, Tsuda E, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H: Prevalence of hepatitis E virus infection among hemodialysis patients in Japan: evidence for infection with a genotype 3 HEV by blood transfusion. *J Med Virol* 74:563-572, 2004

Sainokami S, Abe K, Kumagai I, Miyasaka A, Endo R, Takikawa Y, Suzuki K, Mizuo H, Sugai Y, Akahane Y, Koizumi Y, Yajima Y, Okamoto H: Epidemiological and clinical study of sporadic acute hepatitis E caused by indigenous strains of hepatitis E virus in Japan compared with acute hepatitis A. *J Gastroenterol* 39:640-648, 2004

Shrestha SM, Shrestha S, Tsuda E, Nishizawa T, Takahashi M, Gotanda Y, Okamoto H. Genetic changes in hepatitis E virus of subtype 1a in patients with sporadic acute hepatitis E in Kathmandu, Nepal, from 1997 to 2002. *J Gen Virol* 2004; 85: 97-104.

Sonoda H, Abe M, Sugimoto T, Sato Y, Bando M, Fukui E, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H: Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan. *J Clin Microbiol* 42:5371-5374, 2004

Surya IGP, Kornia K, Suwardewa TGA, Mulyanto, Tsuda F, Mishiro S. Serological markers of hepatitis B, C, and E viruses and human immunodeficiency virus type-1 infections in pregnant women in Bali, Indonesia. *J Med Virol* 2005; 75: 499-503.

Takahashi K, Kitajima N, Abe N, Mishiro S. Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. *Virology* 2004; 330: 501-5.

Takahashi K, Toyota J, Karino Y, Kang JH, Maekubo H, Abe N, Mishiro S. Estimation of the mutation rate of hepatitis E virus based on a set of closely related 7.5-year-apart isolates from Sapporo, Japan. *Hepatol Res* 2004; 29: 212-215.

Takahashi M, Kusakai S, Mizuo H, Suzuki K, Fujimura K, Masuko K, Sugai Y, Aikawa T, Nishizawa T, Okamoto H: Simultaneous detection of immuno-globulin A (IgA) and IgM antibodies against hepatitis E virus (HEV) is highly specific for diagnosis of acute HEV infection. *J Clin Microbiol* 43:49-56, 2005

Takamura S, Niikura M, Li TC, Takeda N, Kusagawa S, Takebe Y, Miyamura T, Yasutomi Y: DNA vaccine-encapsulated virus-like particles derived from an orally transmissible virus stimulate mucosal and systemic immune responses by oral administration. *Gene Ther* 2004;11: 628-35.

Tamada Y, Yano K, Yatsunami H, Inoue O, Mawatari F and Ishibashi H Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E *J Hepatol*; 2004, 40(5):869-70.

Tanaka E, Matsumoto A, Takeda N, Li T-C, Umemura T, Yoshizawa K, Miyakawa Y, Miyamura T, Kiyosawa K: Age-specific Antibody to Hepatitis E Virus Stays Constant during the Past 20 Years in Japan. *J. Viral Hepatitis* 2005: in press.

Tanaka H, Yoshino H, Kobayashi E, Takahashi M, Okamoto H: Molecular investigation of hepatitis E virus infection in domestic and miniature pigs used for medical experiments. *Xenotransplantation* 11:503-510, 2004

Tei S, Kitajima N, Ohara S, Inoue Y, Miki M, Yamatani T, Yamabe H, Mishiro S, Kinoshita Y. Consumption of uncooked deer meat as a risk factor for hepatitis E virus infection: an age- and sex-matched case-control study. *J Med Virol* 2004; 74: 67-70.

Usui R, Kobayashi E, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. Presence of antibodies to hepatitis E virus in Japanese pet cats. *Infection* 2004; 32: 57-8.

Wibawa IDN, Muljono DH, Mulyanto, Suryadarma IGA, Tsuda F, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H: Prevalence of antibodies to hepatitis E virus among apparently healthy humans and pigs in Bali, Indonesia: identification of a pig infected with a genotype 4 hepatitis E virus. *J Med Virol* 73:38-44, 2004

Yamamoto T, Suzuki H, Toyota T, Takahashi M, Okamoto H: Three male patients with sporadic acute hepatitis E in Sendai, Japan, who were domestically infected with hepatitis E virus of genotype III or IV. *J Gastroenterol* 39:292-298, 2004

新井雅裕, 橋本直明, 宮川浩, 阿部敏紀, 山中太郎, 柴田実, 安倍夏生, 高橋和明, 三代俊治. 京浜地区 E 型肝炎国内感染例 10 例の疫学的特徴と HEV 分離株塩基配列. *肝臓* 2005 in press.

加藤将, 種市幸二, 松林圭二. 焼肉店での会食後に発生した E 型肝炎ウイルス集団感染：うち 1 例は劇症肝炎で死亡. *肝臓* 2004; 45: 688.

北嶋直人, 高橋和明, 安倍夏生, 三代俊治. 本邦に棲息する野生猪の HEV 感染に関する実態予備調査. *肝臓* 2004; 45: 557.

三好龍也, 李天成, 武田直和, 宮村達男, 田中智之. 野生イノシシの肝臓、血液から E 型肝炎ウイルス遺伝子の検出. *肝臓* 2004; 45: 509-516.

## 2. Reviews: (班員・班友を下線で示す；筆頭著者 alphabet 順)

池田秀利. 豚の E 型肝炎ウイルス. *日本豚病研究会報* 2005; 46: 18-21.

大西幸代, 姜貞憲, 前久保博士, 高橋和明, 三代俊治. 日本土着型 HEV による札幌地域

- E型肝炎の臨床像. 日本臨牀 2004; 62(suppl): 532-5.
- 岡本宏明. 人畜共通感染症としてのE型肝炎. Pp524-31.
- Mishihiro S. Hepatitis E virus infection in Japan. In International Kilmer Conference Proceedings (vol. VIII). Polyscience, Canada 2004 pp241-6.
- 三代俊治. E型肝炎. 日本食品微生物学会雑誌 2004; 21: 94-8.
- 三代俊治. E型肝炎ウイルス. In Annual Review 消化器, 中外医学社 2004 pp31-5.
- 三代俊治. E型肝炎ウイルス. 内科 2004; 93: 295.
- 三代俊治. E型肝炎研究これからの課題. 肝臓 2004; 45: 177-85.
- 三代俊治. E型肝炎の疫学. 日本臨牀 2004; 62(suppl): 520-3.
- 三代俊治. HEV 遺伝子の構造と機能. 日本臨牀 2004; 62(suppl): 504-13.
- 三代俊治. HEV 遺伝子の変異と多様性. 日本臨牀 2004; 62(suppl): 514-9.
- 三代俊治. 我国に於いて近頃目覚ましき動物から人への感染. ウイルス 2004; 54: 243-8.
- 三代俊治. 四類感染症: E型肝炎. 日本医師会雑誌 2004; 132(suppl): 102-3.
- 三代俊治. 動物からヒトへの感染症の現況と対策: E型肝炎ウイルス. 臨牀と研究 2004; 81: 1595-9.
- 三代俊治. 本邦におけるE型肝炎. 治療学 2004; 38: 964-7.
- 三代俊治. E型肝炎ウイルス感染 - it's omnipresent!. Hepatoday 2005 No.8 6-7.
- 佐久川麿、山城剛、前城達次. D型、E型肝炎. 日内会誌 2004; 93: 2351-236.
- 武田直和、李天成、宮村達男. HEV 粒子の構造. 日本臨牀 2004; 62(suppl): 501-3.
- 武田直和、李天成、宮村達男. HEV 抗体の検出法. 日本臨牀 2004; 62(suppl): 542-5.
- 武田直和、李天成、宮村達男. E型肝炎ワクチン. 日本臨牀 2004; 62(suppl): 548-53.