

図3 マルチプルアラインメント表示画面

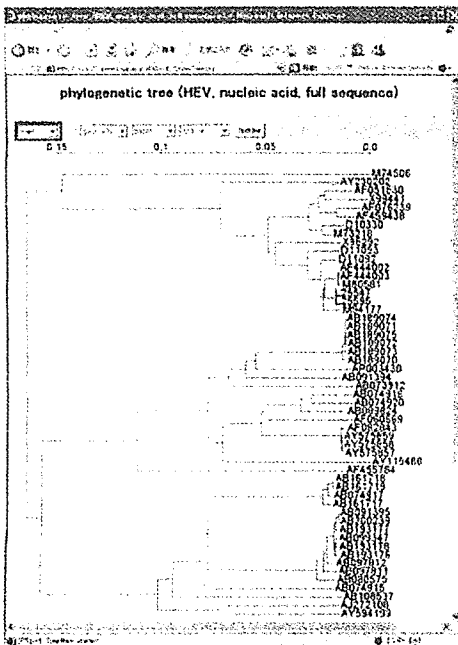


図4 進化系統樹表示画面

決)配列を示し、それ以降の行は各配列についてコンセンサスと塩基が異なる位置のみ A, C, G, T, もしくは「-」(ギャップ, その位置に塩基がないことを示す)が表示されている。系統樹表示画面(図4)はデータ抽出機能も有しており、マウスで樹の分岐点をクリックすることで、その下流にあたる全データを容易に取得することができる。データは通常、書誌情報付き(図5参照)で取得されるが、配列データのみを抽出することも可能である。

なお、HVDBは国際塩基配列データベースのリリースに合わせて、年4回更新されている。

II. HVDBの基礎となるデータバンクおよびアルゴリズム

この項のポイント

- HVDBはバイオインフォマティクスの手法をさまざまに活用して構築されている。

現在ではDNA配列の決定は特別なことではなくなり、配列データ自体は非常に勢いで蓄積され公開されている。したがってその解析が重要な課題となり、その膨大なデータを情報科学の手法とコンピュータを駆使して整理し、意味を抽出することを目的とした分野である「バイオインフォマティクス」が生まれた。HVDBもその構築にバイオインフォマティクスの手法を多用している。以下では、前項で記述したアルゴリズムなどについて概説する。

1. DNA データバンク

全世界で生成される核酸配列データを網羅的に収集し公開する組織として「国際塩基配列データベース」が設置されている。実際のデータベース運用業務は、米国・NCBI(National Center for Biotechnology Information)、欧

```

-----
LOCUS       HPESVP                7207 bp    RNA     linear   VRL 19-DEC-2000
DEFINITION  Hepatitis E structural and nonstructural protein mRNA, complete
            cds.                  ← 配列データの概要
ACCESSION   M73218                ← アクセション(管理)番号
VERSION     M73218.1
KEYWORDS    nonstructural protein; viral structural protein.
SOURCE      Hepatitis E virus     ← 生物種
            ORGANISM Hepatitis E virus
            Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; Hepeviridae;
            Hepevirus.
REFERENCE   1 (bases 1 to 7207)   ← 文献情報
AUTHORS     Tam,A.W., Smith,M.M., Guerra,M.E., Huang,C.C., Bradley,D.W.,
            Fry,K.E. and Reyes,G.R.
TITLE       Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the
            full-length viral genome
JOURNAL     Virology 185 (1), 120-131 (1991)
PUBMED     1926770
COMMENT     Original source text: Hepatitis E virus cDNA to genomic RNA.
FEATURES    Location/Qualifiers   ← 詳細な情報(遺伝子座など)
            source                1..7207
            /organism="Hepatitis E virus"
            /mol_type="genomic RNA"
            /db_xref="taxon:12461"
            CDS                   28..5109
            /note="putative"
            /codon_start=1
            /product="nonstructural protein"
            /protein_id="AAA45734.1"
            /db_xref="GI:330024"
            /translation="MEAHQFIEKPGITTAIEQAALAAANSALANAVVVRPFLSHQQIE
            ILINLMQPRQLVFRPEVFWNHPIQRVIHNELELYCRARSGRCLEIGAHPRINDPNV
            (中略)
BASE COUNT  1233 a                2312 c                1868 g                1794 t
ORIGIN      ← これ以降に核酸配列を記述
            1 aggcagacca catatgtggt cgaTgocacg gaggeccacc agtttattaa ggctcctggc
            61 atcaactactg ctattgagca ggcTgctcta gcagcggcca actctgccect ggagaatgct
            (中略)
            7141 gtgccccccct tttttctggt gottatttct catttctgag tccggegctc cctgaaaaaa
            7201 aaaaaaa
            //
-----

```

図5 書誌情報付きデータの一例

州・EBI(European Bioinformatics Institute), 日本・DDBJ(DNA Data Bank of Japan)により分担され、相互にデータが交換されているため、いずれかの機関にアクセスすることで最新データを取得できる。HVDB構築にあたっては、DDBJ³⁾より該当データを取得しており、その書誌情報付きデータの形式は図5のとおりである。

2. アラインメント

2本の核酸もしくはアミノ酸配列を、多少の挿入・欠失・置換を許しながら並置して、類似の部分配列を発見することをアラインメントと呼ぶ。同時に類似の程度がスコアとして定量化される。HVDBでは、FASTAアルゴリズム⁴⁾をベースにしたLALIGNを使用している。ある配列と、データベース中に存在する配列

の間でこのアラインメント操作を繰り返し、類似度の高い配列を抽出するアルゴリズムは相同性検索と呼ばれる。

3. マルチプルアラインメント

アラインメントを3本以上の配列について行い、全体に至適な並置状態を求めることに拡張した手法がマルチプルアラインメントである。本解析により、多数の配列にわたって類似度の高いブロックを発見することができ、これは機能的に重要な領域を発見することにつながる。HVDBでは、CLUSTALW⁵⁾を使用している。

4. 分子進化的距離

分子進化的な観点から定義された2塩基配列間の距離である。進化的に離れた配列間では変異が蓄積していることを利用し、その間の変異数をもって距離を定義するため、通常はサイト当りの塩基置換数として算出される。2配列の類似度が非常に高い(距離が短い)場合は、塩基の異なるサイトを数え上げて配列長で割り算することで良い近似となるが、一般には同一サイトに複数回生じた変異を考慮する必要があり、また、塩基種類間で置換率が異なるため、それらを反映した複数のパラメーターを導入したモデルがいくつか提案されている。HVDBでは、6パラメーター法⁶⁾が使用されている。

同様に、アミノ酸配列間でもアミノ酸間の類似度などを基準にした距離の定義が可能であり、HVDBでは木村法⁷⁾が使用されている。

5. 進化系統樹

広義には生物種の系統関係を示したグラフ全般を指すが、現在では、核酸もしくはアミノ酸配列データより計算機的に求められたグラフ、すなわち分子進化系統樹を指すことが一般的である。とくにその扱いの容易さから、推定された分子進化的距離をよく反映する樹構造を推定するアルゴリズムが使用されることが多く、HVDBでもその一法であるNeighbor-joining法⁸⁾を用いている。

III. 解析事例

この項のポイント

- HVDBを用いて新規に入手した塩基配列データを解析した結果、種間の感染と、新規サブタイプの存在を推測させる結果を得た。

HVDBでは、データの検索、解析済みデータの参照のほか、利用者が独自の解析を実行できるような機能が準備されている。ここでは事例を用いて一般的な系統解析の手法を解説する。なお、以下で述べる解析は、Webブラウザを用いてHVDBにアクセスすることですべて実行可能である。

公開後間のないHEV配列はHVDBへ未登録であるので、2005年8月公開のデータから3件(DDBJアクセッション番号：DQ145797, DQ145798, DQ145799)を選び、それらを独自に系統解析し、他のウイルス株との関係を確認した。

まず3件の新規配列それぞれをキーとして

用語解説

◆相同性検索

ある配列とデータベース中の多数の配列の各々の間でアラインメントを行い、それぞれの類似度をスコア化して上位の配列を抽出するアルゴリズムを指す。ホモロジーサーチとも呼ばれ、バイオ

インフォマティクスにおける基礎的な解析手法の一つである。BLASTがその代表として有名であるが、目的によってはFASTA、Smith-Waterman法などが使用される場合もある。

BLAST 相同性検索³⁾を実行した。その結果、これらはいずれもゲノム上の位置4.4~4.9 Kb (ORF 1の3'末端寄りのRNAポリメラーゼ領域)付近に由来することがわかった。このBLAST 検索結果を参照することで、該当新規配列のウイルス株に関する概要情報、すなわち既知のどの株にもっとも近いかという程度の情報であれば得られるのであるが、ここではさらに詳細な系統関係を確認し、さらにその信頼性

も評価するために以下の解析を進めた。

次に上記手順で判明したゲノム上の領域(4.4~4.9 Kb)に相当する既知の全データをHVDBより取得するが、これは図2の画面において領域を指定することで容易に実現できる。一方、該当新規配列は、解析に使用するためにデータベースへアップロードする必要がある。アップロード後、前述の既知データセットと結合して、解析用データセットを準備した。

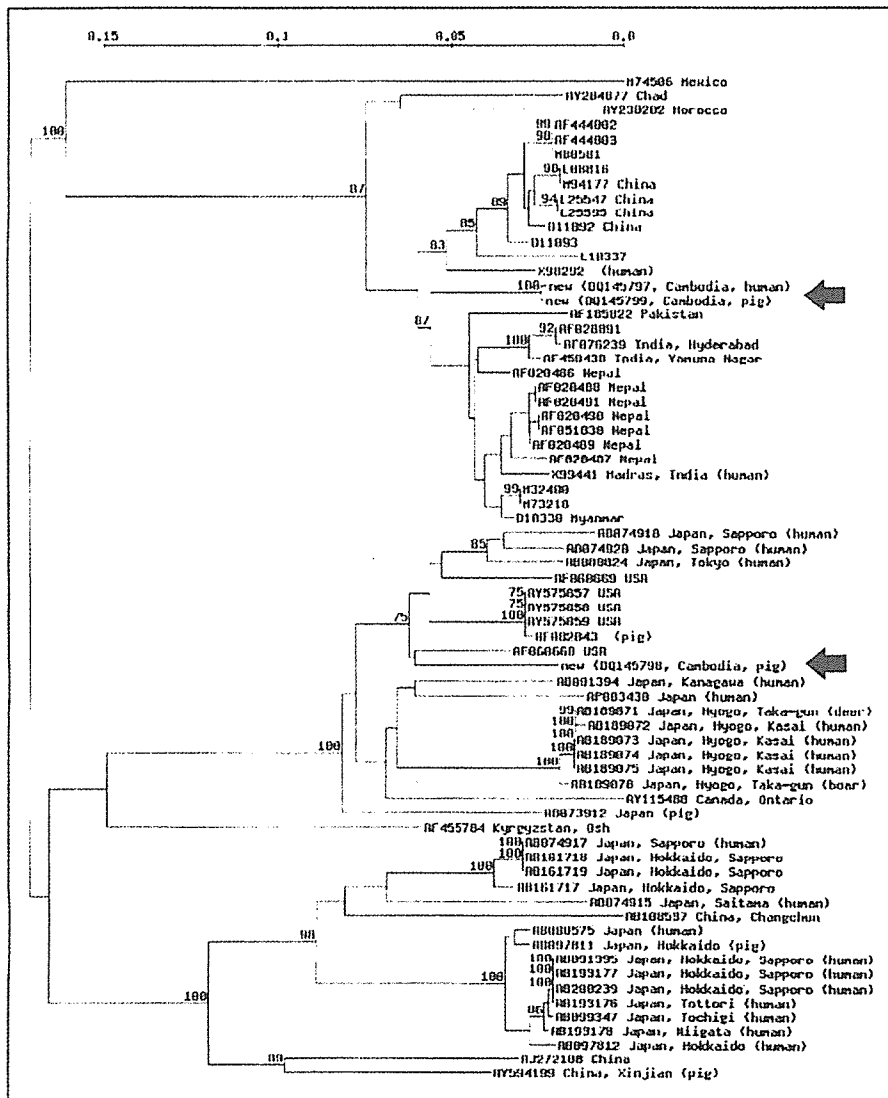


図6 解析事例：新規データの分類

ここで、準備されたデータセットに対して系統解析を実行することになるが、それはWebの該当画面より対象データセットを選択し、パラメーターを設定することで、マルチプルアライメント、分子進化距離計算、系統樹作成が自動的に実行できる。また、必要に応じてブツストラップ法¹⁰⁾による系統樹の信頼性評価も可能である。

結果を図6に示す。樹の各末梢には配列のアクセス番号(管理)番号と、サンプルの取得地域およびホストが記述されている。また、分岐点に表示された数字はブツストラップ確率であり、数値が大きいとその枝の信頼性が高いことを示している(70以上のみ表示)。

解析対象の新規配列の位置は矢印で示されており、この結果から、DQ 145797、DQ 145799は相互に非常に類似しているが、既知の株からはやや離れた関係にあることがわかった。これらの配列の書誌情報を確認すると、DQ 145797はヒト、DQ 145799はブタから得られたことが記述されており、種間感染を示していると推測される。また、DQ 145798も既知の株からやや離れている。書誌情報によるとこれらはカンボジア由来となっており、これらの結果から、未発見のサブタイプ2種がカンボジアに存在することが推測される。

おわりに

HVDBは(情報科学が専門でない)一般研究者がさまざまな視点からHEVデータを参照し、必要に応じて独自の系統解析を実行できることを目的として構築されている。実際、1997年よりHVDBで公開しているHCVを例にとると、HVDB中のデータおよび解析機能が、ウイルスタイピング用PCRプライマの設計¹¹⁾や、ウイルスタンパク質のプロセッシングとサブ

タイプの関係の解析¹²⁾など、さまざまな目的で使用されている。したがって、HEVにおいても広範な用途に応用され、有用なリソースとして機能することが期待される。

HVDBは<http://s2as02.genes.nig.ac.jp>より最新版が公開されている。

文 献

- 1) Reyes, G. R., Purdy, M. A., Kim, J. P., et al. : Isolation of cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 247; 1336-1339, 1990
- 2) Tam, A. W., Smith, M. M., Guerra, M. E., et al. : Hepatitis E virus (HEV) : molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 185; 120-131, 1991
- 3) Tateno, Y., Saitou, N., Okubo, K., et al. : DDBJ in collaboration with mass-sequencing teams on annotation. *Nucleic Acids Res.* 33; Database issue, D25-D28, 2005
- 4) Pearson, W. R. and Lipman, D. J. : Improved tools for biological sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85; 2444-2448, 1988
- 5) Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. : CLUSTALW : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22; 4673-4680, 1994
- 6) Gojobori, T., Ishii, K. and Nei, M. : Estimation of average number of nucleotide substitutions when the rate of substitution varies with nucleotide. *J. Mol. Evol.* 18; 414-423, 1982
- 7) Kimura, M. : Rate of evolution at the molecular level. *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. 65-97. Cambridge University Press, Cambridge, 1983
- 8) Saitou, N. and Nei, M. : The neighbor-joining method : A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4; 406-425, 1987
- 9) McGinnis, S. and Madden, T. M. : BLAST : at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 32; Web Server issue, W20-W25, 2004

- 10) Felsenstein, J.: Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39; 783-791, 1985
- 11) Mukaide, M., Tanaka, Y., Kakuda, H., et al.: New combination test for hepatitis C virus genotype and viral load determination using Amplicor GT HCV MONITOR test v2.0. *World Journal of Gastroenterology* 11; 469-475, 2005
- 12) Kato, T., Miyamoto, M., Date, T., et al.: Differences in hepatitis C virus core protein processing among genotypes 1 and 2. *Hepatology Research* 30; 204-209, 2004

tis Virus Database(HVDB)", which contains all the HCV and HBV sequences publicly available, and now we have made an HEV data set in the HVDB and opened it to the public. In the HVDB, all piece sequences obtained from public databases are arranged in relation to the genome sequence of HEV. Also, given in the database, are the phylogenetic relationships of each locus on the genome, including variants. Therefore, users can easily retrieve entries for specific genome types by referring to the phylogenetic relationships or those of specific loci by referring to the genome map information. The HVDB also provides users with a tool for phylogenetic analysis that can be used in combination with data retrieval tools.

The HVDB is valuable not only for academic purposes, such as phylogenetic analyses, but also for clinical purposes, such as diagnoses and vaccine development.

The database is publicly accessible through the following URL: <http://s2as02.genes.nig.ac.jp>

Key words : bioinformatics, phylogenetic analysis, nucleotide sequence database

**Department of Clinical Molecular Informative Medicine, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, 1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya, Aichi 467-8601, Japan*

Summary

Hepatitis E Virus Genome Database

Tadasu Shin-i* and Masashi Mizokami*

Over 1,000 Hepatitis E Virus(HEV) sequences are now publicly available, and the number of these sequences is increasing rapidly. Therefore, it is worthwhile to construct a specialized database for viral sequences and to make it accessible to researchers worldwide.

We have developed a database known as the "Hepati-

ご案内

第15回 日本癌病態治療研究会

当番世話人：生越喬二（東海大学消化器外科 教授）
 会期：平成18年6月1日（木）～6月2日（金）
 開催場所：京王プラザホテル（〒160-8330 東京都新宿区西新宿2-2-1）
 テーマ：『基礎から臨床への提言，臨床から基礎への提言』
 問合せ先：第15回研究会事務局
 〒259-1193 神奈川県伊勢原市望星台
 東海大学消化器外科
 第15回日本癌病態治療研究会 当番世話人 生越喬二
 Tel：0463-96-6163 FAX：0463-96-4120
 e-mail：ogoshi@q-life.org/jsect@q-life.org

3

E 型肝炎ウイルスの基礎

(3) E 型肝炎ウイルス感染の血清学的診断

岡本 宏明*

Key words : E型肝炎, ELISA, IgA クラス HEV 抗体, IgM クラス HEV 抗体

要旨

E 型肝炎を診断するうえでの gold standard は, RT-PCR 法による E 型肝炎ウイルス (HEV) RNA の検出である。しかし, 簡便かつ安価な ELISA 法による HEV 抗体の測定は, 臨床現場での急性肝炎の敏速な原因特定に有用である。それには一般に IgM クラス抗体が測定されるが, 非特異反応による擬陽性が問題となる。筆者らは, カイコ蛹で発現した組み換え HEV 蛋白質を固相化した ELISA 法により, IgM クラス HEV 抗体と IgA クラス HEV 抗体を測定する系を開発し, その性能を比較検討した。その結果, IgA クラス HEV 抗体測定系は感度および特異性において IgM クラス HEV 抗体測定系よりも優れていることがわかった。

E 型肝炎の流行がみられる¹⁾。一方, 日本を含む先進国での E 型肝炎は, 輸入感染症の一つであり, かつまれな疾患であることから, つい最近までそれほど重要視されていなかった。しかし, 1997 年以降, 流行国への渡航歴のない E 型肝炎症例が欧米などの先進国で存在すること, そして E 型肝炎がブタなどの動物を感染宿主とする人獣共通感染症であることを示唆する報告がなされ, 注目を集めることになった^{2)~8)}。日本では 2001 年に初めて, 海外渡航によらない国内感染型の E 型肝炎症例が報告されたが⁹⁾, その後の調査によって 1979 年にすでに国内土着 HEV による感染例が存在し¹⁰⁾, かつて A 型, B 型, C 型の肝炎ウイルスの関与が否定され (非 A 非 B 非 C 型), 海外渡航歴がないことから「原因不明の急性肝炎, あるいは劇症肝炎」と診断されていた患者のなかに少なからず E 型肝炎の患者が含まれていたことも明らかになっている^{11), 12)}。

最近国内では, 飼育ブタやイノシシ, シカなどの野生動物および市販ブタレバーの一部から, E 型肝炎患者由来の HEV 株に酷似した遺伝子配列をもつ HEV が分離され, それら動物の内臓や肉を生や加熱不十分な状態で摂取したあとの E 型肝炎発症事例が報告されてい

はじめに

E 型肝炎ウイルス (HEV) は, E 型急性肝炎 (一部は劇症肝炎) の起因ウイルスである。E 型肝炎は衛生環境が整備されていない熱帯・亜熱帯の発展途上国での風土病的疾患であり, 現在でもアジア・アフリカなどの途上国では汚染された飲料水などを介した大小さまざまな規模の

*自治医科大学医学部感染・免疫学講座ウイルス学部門
(〒329-0498 栃木県下野市薬師寺 3311-1)

る^{13)~16)}。このような事実を踏まえ、厚生労働省は平成15年8月19日に「食肉を介するE型肝炎ウイルス感染事例について」という情報を提供し(<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2003/08/h0819-2.html>)、国民に注意を喚起している。そして、平成15年11月5日から施行された改正感染症法において、E型肝炎は新4類感染症に分類され、届出が義務づけられている。しかし、E型肝炎を診断するための保険適用になった体外診断用医薬品はまったくないのが現状であり、E型劇症肝炎による死亡例も散見されるなか、臨床現場ではE型肝炎に対する簡便で特異的な血清診断法の登場が切望されている。

このような状況下で、筆者らは最近、カイコ蛹で発現したHEV ORF2蛋白質(キャプシド蛋白質)¹¹⁾を固相抗原として用いる、ELISA法によるHEV感染の血清診断法を確立した。本稿では自験例の紹介を中心に、HEV感染の血清学的診断について概説する。

I. E型肝炎の経過

この項のポイント

- HEV感染は一過性であり、持続・慢性化はない。
- IgMクラスとIgAクラスのHEV抗体は発症から2~6カ月間検出される。

HEV感染は多くの場合不顕性である。一部の感染者は2~9週(平均6週)の潜伏期を経て急性肝炎(まれに劇症肝炎)を発症する。一般に、発症した患者は全身倦怠感、発熱、食欲不振、嘔吐、発黄、褐色尿などの自覚症状を呈して医療機関を受診し、血液の生化学的検査によりトランスアミナーゼ(ALT, AST)値や総ビリルビン値の上昇を指摘され、急性肝炎と診断される。例外的に、免疫能の低下などの特殊な状況下で6カ月以上感染が続いた症例の存在も報告されているが、通常の経過では、HEV感

染は一過性であり、感染が持続・慢性化することはない。

HEV RNAの出現はHEVマーカーのなかでもっとも早く、発症に先立って末梢血中および糞便中で検出される。発症時点では末梢血中や糞便中のHEV RNAが陽性であると同時に、IgMクラスとIgAクラスのHEV抗体が血液中で検出され、IgGクラスHEV抗体も陽転していることがほとんどである。多くの場合、発症から2~3週までに末梢血および糞便中のHEVは消失する。その後、IgMおよびIgAクラスのHEV抗体濃度は低下し、発症から2~6カ月後に陰性化するが、IgGクラスの抗体は年余にわたって持続する。

II. HEVの遺伝子型と血清型

この項のポイント

- HEVは1型から4型までの4種類の遺伝子型に分類され、わが国の土着株は3型と4型に属する。
- 血清型は1種類である。

現在、HEVは遺伝子RNAの配列の違いによって四つの遺伝子型(1型~4型)に分類されている¹⁷⁾。アジア・アフリカの流行地域のHEVは1型に、メキシコやアフリカのエジプト、チャド、ナイジェリア、中央アフリカ共和国、コンゴ民主共和国、ナミビアでの流行株は2型に分類されている。1997年に海外渡航歴のない米国在住の急性肝炎患者から新種HEV株が分離されたが、それに代表される3型HEVは、世界各地での国内感染散発性E型肝炎に関係し、これまでに米国、カナダ、アルゼンチン、オーストラリア、ニュージーランド、日本を含む22カ国で分離されている。さらに、中国や台湾、ベトナム、日本などのアジアの国々では散発性E型肝炎患者から4型HEV株が分離されている。

これら4種類の遺伝子型に属するHEV株間では、全塩基配列が互いに約25%異なっているが、キャプシド蛋白質のアミノ酸配列は保存性が高く、異なる遺伝子型間でも約10%の相違にすぎない。実際、1型の組み換えHEVキャプシド蛋白質を固相抗原としてHEV抗体を測定した場合でも、3型や4型のHEVに感染したE型肝炎症例でのHEV抗体の測定が可能であり、3型や4型の組み換えHEVキャプシド蛋白質を固相抗原としてHEV抗体を測定しても、1型や3型、4型のHEVに感染したE型肝炎症例でのHEV抗体の測定が可能である。したがって、HEVの血清型は1種類であると考えられており、筆者らは国内4型HEV株のcDNAクローンから組み換えHEV蛋白質を産生し、ELISA法に用いている。

III. HEV感染の血清学的診断

この項のポイント

- IgAクラスHEV抗体測定系は、感度および特異度の点でIgMクラスHEV抗体測定系よりも優れている。
- 日本人でのIgA欠損の頻度は0.001%にすぎず、無視できる頻度である。

現在のHEV感染、すなわちE型肝炎の急性期には、上述のようにHEVが循環血液中に存在するが、その濃度は一般に低く、ウイルス(キャプシド)抗原そのものを検出することは行われていない。E型肝炎の血清学的診断には、酵素免疫測定法(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA法)による抗体検査が一般的である。この目的には通常、患者血清中のIgMクラスのHEV抗体が検出されるが、IgMクラスHEV抗体測定系一般の問題点として、まれながら非特異反応による擬陽性検体が存在することが指摘されている¹⁸⁾。そこで、筆者らは後述のようなエビデンスに基づき、

IgMクラスHEV抗体よりもIgAクラスHEV抗体を測定することを推奨している¹⁹⁾。一方、過去のHEV感染の有無を調べるのに、IgGクラスのHEV抗体測定が行われている。

1. HEV抗体の測定方法

筆者らが実施しているELISA法によるHEV抗体測定の概略は、以下のとおりである¹⁹⁾。遺伝子型4のHEV日本株(HE-J1株)のORF2蛋白質(550アミノ酸残基:N末端の110アミノ酸残基を欠失)を固相抗原として使用する。このHEV抗原蛋白質は、組み換えバキュロウイルスベクターを用いてカイコの蛹で発現させ、そのホモジネートの上清画分から精製して得た高純度標品である。この精製HEV抗原蛋白質を固相化したマイクロプレートの各ウェルに、あらかじめ100倍に希釈した被検血清を加え、室温で1時間反応させる。検体希釈液にはmock蛋白質(非組み換えバキュロウイルスを感染させたカイコ蛹のホモジネートから得られた上清画分)を添加することにより、非特異反応を低く抑えるべく工夫を施してある。実際、mock蛋白質を添加することにより、IgAクラスHEV抗体の測定において、擬陽性率を0.32%から0.14%に減らすことができることを確認している。

B/F分離洗浄の後、horseradish peroxidaseを標識した抗体を添加するが、IgMクラス、IgAクラス、およびIgGクラスのHEV抗体の測定には、それぞれ抗ヒトIgMマウスモノクローナル抗体(M-49)、抗ヒトIgAマウスモノクローナル抗体(A-13)、抗ヒトIgGマウスモノクローナル抗体(G-19)を加え、室温で1時間反応させる。B/F分離洗浄の後、発色基質を加え、室温・暗所で30分間静置反応させる。最後に反応停止液を加え、波長450nmで吸光度(OD)を測定する。

健康人から得られた 675 検体での測定結果から mean+7 SD の値を求め、暫定的に設定したカットオフ値は、IgM クラス HEV 抗体測定において 0.440、IgA クラス HEV 抗体は 0.642、IgG クラス HEV 抗体は 0.175 であり、それら以上の OD 値を示した場合、それぞれ陽性と判定する。

2. IgM クラス HEV 抗体測定系と IgA クラス HEV 抗体測定系の比較

1) 感 度

HEV RNA が検出され E 型肝炎と確定診断された患者 68 例(1 型 2 例, 3 型 34 例, 4 型 31 例, 3 型+4 型の重複感染 1 例)の初診時血清を用い、IgM クラス HEV 抗体と IgA クラス HEV 抗体を測定した結果、68 例全例で両抗体は陽性と判定された¹⁹⁾。ちなみに、同一検体について、アジア向けに Genlabs 社がシンガポールで販売している IgM クラス HEV 抗体測定キットを輸入業者を通じて入手し、測定してみると、わずか 61 例(89.7%)で陽性と判定できるにすぎなかった。

E 型肝炎患者検体 68 検体について、IgA クラス HEV 抗体と IgM クラス HEV 抗体の OD 値の分布を検討すると、IgA クラス HEV

抗体はカットオフ値 0.642 に対していずれも 1.000 以上の高値を示し、余裕をもって陽性と判定できているのに対して、IgM クラス HEV 抗体では、4 検体が OD 値 1.000 以下であり、そのうちの 3 検体はカットオフ値 0.440 に近い値であった(0.486, 0.556, 0.566)。

また、「イムニス IgA anti-HEV EIA 研究会」で実施された検討結果では、E 型肝炎確診例 94 例のうち 92 例(97.9%)で IgA クラス HEV 抗体が陽性と判定された²⁰⁾。その内訳を示すと、1 型 HEV 感染の E 型肝炎患者検体では 53 例全例が陽性と判定され、3 型 HEV 感染の E 型肝炎患者からの 15 検体中 14 検体(93.3%)で、また 4 型 HEV 感染の E 型肝炎患者からの 26 検体中 25 検体(96.2%)で IgA クラス抗 HEV 抗体が陽性と判定された。一方、IgM クラス HEV 抗体は 94 検体中 90 検体(95.7%)で陽性であるに留まり、1 型 HEV 感染患者では 3 検体、4 型 HEV 感染患者では 1 検体、合計 4 検体がカットオフ値未満の OD 値を示し、陰性と判定された。

以上の結果をまとめると(表 1)、血清学的診断に関して、IgM クラス HEV 抗体測定系では 97.5%の感度にすぎなかったのに対して、IgA クラス HEV 抗体測定系では 98.8%の感

表 1 E 型肝炎の初診時血清で測定した IgM クラスおよび IgA クラスの HEV 抗体陽性率の比較

遺伝子型	検体数	IgM クラス HEV 抗体陽性	IgA クラス HEV 抗体陽性
1 型	55	52(94.5%)	55(100%)
3 型	49	49(100%)	48(98.0%)
4 型	57	56(98.2%)*	56(98.2%)*
3 型+4 型	1	1(100%)	1(100%)
合計	162	158(97.5%)	160(98.8%)

*：同一検体が陰性であった。

[Takahashi, M., et al.: J. Clin. Microbiol. 43; 49-56, 2005¹⁹⁾, 飯野四郎, 他: 医学と薬学 53; 461-469, 2005²⁰⁾により作成]

度であり、感度の点でIgAクラスHEV抗体測定系のほうが優れているといえる。ほかのウイルス感染症でも、たとえばA型肝炎ウイルス(HAV)感染やB型肝炎ウイルス(HBV)感染、C型肝炎ウイルス(HCV)感染でも、感染初期にはウイルス核酸が検出されウイルス血症の状態にあっても、まだウイルス関連抗原や抗体が検出されない空白期間があることはよく知られている。したがって、162例中2例でIgAクラスHEV抗体が陰性であったとしても、本測定系の臨床的有用性を否定するものではないと考えられる。加えて、宿主免疫応答には個体差があり、発症当日あるいは3日目にカットオフ値以下の低値であっても、若干遅れて抗体価が上昇してくるケースがあることはよく知られており、HEV感染もその例外ではない。したがって、発症後7日目、ないし10日目に再測定することにより、この問題はクリアできると考えられる。

2) 特異度

次に問題になるのは特異度である。コントロールとして、非E型の血清2,781検体(A型、B型、C型急性肝炎患者の127検体、B型、C型慢性肝炎・肝硬変・肝癌患者の274検体、透析患者の472検体、非特異反応で問題となるリウマトイド因子を保有する慢性関節リウマチ患者の186検体などを含む)について測定した結果、IgMクラスHEV抗体は16検体でカットオフ値以上のOD値(0.462~2.541)を示し、別の4検体でIgAクラスHEV抗体がカットオフ値以上のOD値(0.692~1.754)を示した(図1)。これら20検体はすべてHEV RNAが陰性であり、IgMクラスHEV抗体とIgAクラスHEV抗体の吸収試験において70%以上のOD値の低下が認められなかったことから、非特異反応による擬陽性と判断された(表2)。

また、「イムニス IgA anti-HEV EIA 研究会」で実施された検討結果でも、1,001検体の健常人検体において、IgAクラスHEV抗体はいずれもカットオフ値以下のOD値を示し非特異反応は認められなかったのに対して、IgMクラスHEV抗体は1検体がカットオフ値を大きく上回るOD値(1.320)を示した。この検体はIgMクラスHEV抗体の吸収試験が陰性であり、IgGクラスHEV抗体とIgAクラスHEV抗体がともにカットオフ値以下のOD値を示した(それぞれOD値は0.028, 0.021)。また、HEV RNAも陰性であったことから、IgMクラスHEV抗体測定の特異反応と判定された。

以上の結果は、IgMクラスHEV抗体とIgAクラスHEV抗体を同時に測定し、両者がともに陽性である場合に血清学的にE型肝炎と診断することになると擬陽性率は0%、換言すると特異度は100%となることを示している。加えて、IgMクラスHEV抗体測定では、IgAクラスHEV抗体測定に比べて擬陽性率

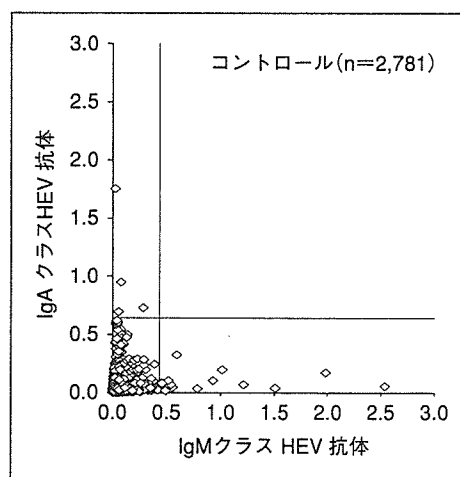


図1 コントロールの2,781検体でのIgMクラスHEV抗体とIgAクラスHEV抗体のOD値の分布
(Takahashi, M., et al.: J. Clin. Microbiol. 43: 49-56, 2005¹⁹⁾より引用)

表2 コントロール検体での IgM クラス HEV 抗体と IgA クラス HEV 抗体の測定
—特異度の比較

対象	検体数	擬陽性検体数(特異度)		
		IgM クラス HEV 抗体	IgA クラス HEV 抗体	両者陽性
ALT 正常献血者	675	1 (99.9%)	1 (99.8%)	0 (100%)
健常人	1,001	1 (99.9%)	0 (100%)	0 (100%)
急性肝炎 (A 型・B 型・C 型)	127	4 (96.9%)	2 (98.4%)	0 (100%)
慢性肝疾患 (B 型・C 型)	274	2 (99.3%)	0 (100%)	0 (100%)
透析患者	472	2 (99.6%)	0 (100%)	0 (100%)
原発性胆汁性肝硬変	147	4 (98.6%)	0 (100%)	0 (100%)
慢性関節リウマチ	186	3 (98.4%)	0 (100%)	0 (100%)
病院患者	900	0 (100%)	1 (99.9%)	0 (100%)
合計	3,782	17 (99.6%)	4 (99.9%)	0 (100%)

[Takahashi, M., et al.: J. Clin. Microbiol. 43; 49-56, 2005¹⁹⁾, 飯野四郎, 他: 医学と薬学 53; 461-469, 2005²⁰⁾により作成]

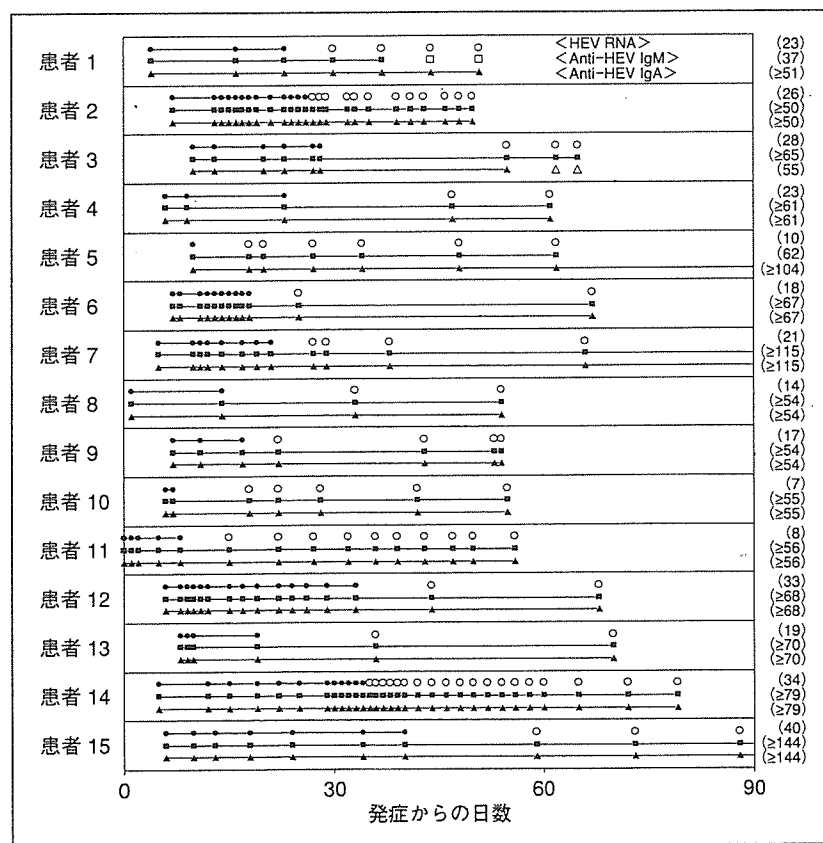


図2 E型肝炎患者15症例での HEV RNA と IgM クラス HEV 抗体,
IgA クラス HEV 抗体の検出の推移
[Takahashi, M., et al.: J. Clin. Microbiol. 43; 49-56, 2005¹⁹⁾より引用]

が4倍以上高く〔0.45% (17/3,782) vs. 0.11% (4/3,782)〕, 吸収試験を行う際, IgAクラスHEV抗体吸収試験での3倍以上の抗原を添加しても吸収がかかり難い。したがって, どちらか一方を選ぶ場合には, IgAクラスHEV抗体測定系のほうがIgMクラスHEV抗体測定系よりも適しているといえる。

3) 抗体持続陽性期間

E型肝炎発症からの抗体持続陽性期間, すなわち発症後いつ頃まで抗体測定によって診断可能であるかをIgMクラスHEV抗体とIgAクラスHEV抗体について, 経時的な測定が可能であった15症例を対象として比較検討した。図2に示すように, 免疫応答の強さには個人差があると考えられるが, 12症例については50日から144日までの観察期間内で最後まで検出され, IgMクラスHEV抗体とIgAクラスHEV抗体の持続陽性期間に差は認められなかった。残りの3例のうち, 2例ではIgMクラスHEV抗体のほうが早期にカットオフ値以下となったが, あとの1例では逆にIgAクラスHEV抗体のほうが先に陰性化しており, 経過においてもIgMクラスHEV抗体とIgAクラスHEV抗体とで顕著な差異はみられず, IgAクラスHEV抗体測定は急性期のE型肝炎の診断に適していると考えられる。

3. IgAクラスHEV抗体測定系のメリットとデメリット

ウイルス感染症の感染初期(急性期)の血清診断にはIgMクラスの抗体を測定するか, ペア血清を用いてIgGクラスの抗体を測定し, 4倍以上の抗体価の上昇を目安にしているが, 後者では常に抗体を少なくとも2回測定しなければならないという難点がある。しかも, クリアカットに判定できないことが多い。そのため, 通常はIgMクラスの抗体をワンポイントで測

定し, 急性期診断が行われている。しかし, IgMクラスの抗体測定系一般の問題点として, 非特異反応の存在が指摘されており, 上述のように, IgMクラスHEV抗体測定系では0.45% (17/3,782)の非特異検体が認められた。それに対して, IgAクラスHEV抗体測定系では0.11% (4/3,782)にすぎなかったということは, E型肝炎ではないのに, 誤ってE型肝炎と診断してしまうケースがIgMクラスの抗体測定では4倍も多いということである。また, 擬陰性率もIgMクラスHEV抗体測定系に比べてIgAクラスHEV測定系では少ないこともすでに示したとおりであり(2.5% vs. 1.2%), 感度と特異性がともに優れている点がE型肝炎の血清診断におけるIgAクラスHEV抗体測定のメリットといえる。ヒトIgAに関して, 擬陰性に繋がりを欠損例や低下例(正常の1/100以下の量)の存在が知られているが, その頻度は日本人においてきわめて低く, 93,020人の健常献血者のうちわずかに4人(0.004%)にすぎず, 6,800人の入院患者を対象とした調査でもわずか1人(0.01%)にすぎないことが明らかにされている²¹⁾。欠損例に限定するとその頻度は0.001%にすぎないことから, ほぼ無視できる頻度であると考えられ, IgAクラスHEV抗体測定系のデメリットとはいえない。

これまでも病原微生物の感染診断にIgAクラス抗体の測定が行われてきた。実際, クラミジア(*Chlamydia trachomatis*や*Chlamydia pneumoniae*など)の感染症では保険適用になったIgAクラスの抗体検査試薬が市販されており, 肝炎ウイルス研究の分野でも, HAVやHBV, HCVに対する抗体検査としてIgAクラスHAV抗体や, IgAクラスHBc抗体, IgAクラスHCVコア抗体などの臨床的意義が検討されている^{22)~24)}。これまでは,

IgM クラスの抗体とほぼ同等の性能か、あるいは補足的な性能ということで IgA クラスの肝炎ウイルス抗体が表舞台に登場することはなかったが、HEV 感染の血清診断においては、上述のように IgM クラスの抗体測定系よりも感度と特異度の両者で明らかに優っている。さらに、IgA クラス HEV 抗体測定系は、特異性を確認するための吸収試験も容易に実施可能であるというメリットもある。したがって、IgA クラス HEV 抗体測定系のデメリットは、感染初期(急性期)の血清診断法として、現時点では単に「馴染みが薄い」ということにすぎない。

おわりに

本稿では、自験例に基づき、E 型肝炎の血清診断法として IgM クラス HEV 抗体測定系よりも IgA クラス HEV 抗体測定系のほうが、感度と特異度の両者で優れていることを述べた。医療現場には「IgA クラス抗体測定系」を感染初期(急性期)の血清診断に用いるということに些か躊躇される先生もおられるとは思われるが、さらにデータを積み上げ、ポピュラーな検査法として定着し、わが国における HEV 感染症の的確な診断と予防法確立に向けた実態把握に役立つよう努力したいと考えている。

文 献

- 1) Purcell, R. H. and Emerson, S. U. : Hepatitis E virus. Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., et al.(eds.) : *Fields Virology*(4th ed.). 3051-3061, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2001
- 2) Smith, J. L. : A review of hepatitis E virus. *J. Food Prot.* 64 ; 572-586, 2001
- 3) Meng, X.-J. : Swine hepatitis E virus : cross-species infection and risk in xenotransplantation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 278 ; 185-216, 2003
- 4) Okamoto, H., Takahashi, M. and Nishizawa, T. : Features of hepatitis E virus infection in Japan. *Intern. Med.* 42 ; 1065-1071, 2003
- 5) Takahashi, M., Nishizawa, T., Miyajima, H., et al. : Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus. *J. Gen. Virol.* 84 ; 851-862, 2003
- 6) 三代俊治 : 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」平成 15 年度総括研究報告書。平成 16 年 4 月(主任研究者三代俊治)
- 7) 三代俊治 : 本邦における E 型肝炎。 *治療学* 38 ; 964-967, 2004
- 8) 岡本宏明 : 人獣共通感染症の起因ウイルスとしての E 型肝炎ウイルス。 *最新医学* 59 ; 1673-1679, 2004
- 9) Takahashi, K., Iwata, K., Watanabe, N., et al. : Full-genome nucleotide sequence of a hepatitis E virus strain that may be indigenous to Japan. *Virology* 287 ; 9-12, 2001
- 10) Mitsui, T., Tsukamoto, Y., Yamazaki, C., et al. : 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
- 11) Mizuo, H., Suzuki, K., Takikawa, Y., et al. : Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic cases of acute hepatitis in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 40 ; 3209-3218, 2002
- 12) Suzuki, K., Aikawa, T. and Okamoto, H. : Fulminant hepatitis E in Japan. *N. Engl. J. Med.* 347 ; 1456, 2002
- 13) Tei, S., Kitajima, N., Takahashi, K., et al. : Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 362 ; 371-373, 2003
- 14) Matsuda, H., Okada, K., Takahashi, K., et al. : Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J. Infect. Dis.* 188 ; 944, 2003
- 15) Yazaki, Y., Mizuo, H., Takahashi, M., et al. :

- 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, 2003
- 16) Tamada, Y., Yano, K., Yatsushashi, H., et al. : Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *J. Hepatol.* 40; 869-873, 2004
 - 17) Emerson, S. U., Anderson, D., Arankalle, A., et al. : Hepevirus. Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., et al. (eds.) : *Virus Taxonomy : Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* 853-857, Elsevier/Academic Press, 2005
 - 18) 三代俊治 : E型肝炎研究これからの課題. *肝臓* 45; 177-185, 2004
 - 19) Takahashi, M., Kusakai, S., Mizuo, H., et al. : Simultaneous detection of immunoglobulin 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
 - 20) 飯野四郎, 狩野吉康, 前久保博士, 他 : E型急性肝炎の血清診断におけるIgAクラス抗HEV抗体測定用試薬「イムニスIgA anti-HEV EIA」の有用性の検討. *医学と薬学* 53; 461-469, 2005
 - 21) Ozawa, N., Shimizu, M., Imai, M., et al. : Selective absence of immunoglobulin A1 or A2 among blood donors and hospital patients. *Transfusion* 26; 73-76, 1986
 - 22) 菅 充生, 赤保内良和, 嵐 方之, 他 : A型肝炎におけるIgA型抗体の動態. *肝臓* 23; 9-14, 1982
 - 23) Suga, M., Arima, K. and Yachi, A. : Detection of IgM, IgA, and IgG antibodies to preS2 antigen in hepatitis B virus infection. *Digestion* 50; 153-161, 1991
 - 24) Nomura, M., Imai, M., Tsuda, F., et al. : Immunoglobulin A antibody against hepatitis B core antigen in the acute and persistent infection with hepatitis B virus. *Gastroenterology*

89; 1109-1113, 1985

Summary

Serological Diagnosis of Hepatitis E Virus Infection

Hiroaki Okamoto*

Detection of the hepatitis E virus (HEV) RNA by reverse transcription (RT)-PCR is the gold standard for diagnosis of hepatitis E. However, from a clinical point of view, serological diagnosis of hepatitis E by detection of specific antibodies against HEV (anti-HEV) is cheaper and more time-saving. We developed an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system to detect IgM and IgA classes of anti-HEV using purified recombinant ORF2 proteins expressed in the pupae of silkworms as an antigen probe, and evaluated the specificity and sensitivity of these two assays. Among the 162 patients with hepatitis E, 158 (97.5%) had anti-HEV IgM, while 160 (98.8%) had anti-HEV IgA. Among the 3,782 control subjects, 17 (0.45%) had anti-HEV IgM alone and 4 (0.11%) had anti-HEV IgA alone. Periodic serum samples obtained from 15 patients with hepatitis E were tested for HEV RNA, anti-HEV IgM, and anti-HEV IgA. Although HEV RNA was detectable in the serum until 7 to 40 (21.4 ± 9.7) days after disease onset, both IgM and IgA anti-HEV antibodies were detectable until 37, 55, or 62 days after disease onset in 3 patients and up through the end of the observation period (50 to 144 days) in 12 patients. Obtained results indicate that anti-HEV IgA is useful for serological diagnosis of hepatitis E with increased sensitivity and specificity and has a comparable duration of positivity with that of anti-HEV IgM.

Key words : hepatitis E, ELISA, anti-HEV IgA, anti-HEV IgM

**Division of Virology, Department of Infection and Immunity, Jichi Medical University School of Medicine, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke-shi, Tochigi 329-0498, Japan*

4

人獣共通感染症としての E 型肝炎

(1) ブタにおける E 型肝炎ウイルス感染

高橋 雅春* 岡本 宏明*

Key words : E 型肝炎, 人獣共通感染症, ブタレバー

要旨

世界各地のブタ同様、わが国のブタでも E 型肝炎ウイルス (HEV) (遺伝子型 3 型と 4 型の土着株) の感染が蔓延状態にある。ブタからヒトへの HEV 感染を示す直接的な証拠は得られていないが、実験的にブタからチンパンジーへの感染が立証され、ヒト HEV と塩基配列が 100% 一致する HEV 株がブタから分離されていること、E 型肝炎患者が多い北海道では大多数の患者が発症 1~2 カ月前にブタレバーやホルモンの摂食既往を有し、市販のブタレバーから 1.9% (7/363) の頻度で HEV が検出されていることなどから、ブタの肉や内臓を生、あるいは加熱不十分な状態で摂食した場合に HEV に感染する危険性があることは間違いない。

ない E 型肝炎患者が報告された¹⁾。その患者から分離された E 型肝炎ウイルス (HEV) は、それまでにアジア、アフリカおよび中米の E 型肝炎流行地域で分離された株とは遺伝子配列が約 25% も異なる新種であった。

同年、Meng らは米国のブタから HEV と非常に類似したウイルスを分離した²⁾。そしてこのブタ由来の HEV 株の遺伝子配列は、前述の米国の患者由来の HEV 株と近縁なものであった。この発見をきっかけとして、台湾、スペインおよび日本などでもそれぞれの地域の E 型肝炎患者およびブタから近縁な HEV 株が分離された^{3)~5)}。また、ブタ由来の HEV は実験的にチンパンジーに感染し、ヒト由来の HEV は実験的にブタに感染すること⁶⁾、養豚従事者は対照群と比較して HEV 抗体陽性率が高いことなどが示され³⁾、先進諸国にも固有の HEV 株が存在し、ブタなどの動物をリザーバーとする人獣共通感染ウイルスとして散発的な急性および劇症 E 型肝炎の原因となっていることが明らかにされた^{7)~9)}。

はじめに

E 型肝炎は衛生環境が整備されていない開発途上国において流行発生する肝炎で、上下水道が完備された先進国では輸入感染症の一つとして渡航歴がある急性肝炎患者にまれにみられる程度であると考えられていたが、1997 年、米国において E 型肝炎の流行地域への渡航歴の

*自治医科大学医学部感染・免疫学講座ウイルス学部門
(〒329-0498 栃木県下野市薬師寺 3311-1)

I. わが国のブタにおける HEV 感染の現況

この項のポイント

- わが国のブタでの HEV 感染は全国的に蔓延しており、6 カ月齢ブタの 84% が感染既往を有する。
- 2~4 カ月齢の子豚の末梢血中に HEV が現れるが、6 カ月齢までに血中から消失する。

1. HEV 抗体の測定

わが国のブタにおける HEV 感染の現況を明らかにするために、北海道から沖縄まで、全国 1 道 20 県の 117 の農場の 1~6 カ月齢のブタ 3,925 頭の血清について酵素免疫測定法により IgG クラスの HEV 抗体の測定を行った^{10),11)}。

その結果、すべての道県、および全体の 93% にあたる 109 農場で IgG クラスの HEV 抗体陽性のブタの存在が確認され、ブタの HEV 汚染は全国規模で拡がっていることが明らかになった。抗体陽性率は 1~2 カ月齢で 10%、3 カ月齢で 48%、4 カ月齢で 86%、5 カ月齢で 83%、6 カ月齢で 84% と月齢とともに上昇し、全体では 57% であった(表 1)。また、HEV 抗体価も月齢とともに上昇し、4 カ月齢でピークを示し、その後は低下する傾向が認められた。

2. HEV RNA の検出

これらのブタのうち 2,785 頭について RT-PCR 法により血清中の HEV RNA の検出を行ったところ、表 1 に示すように 1 カ月齢ではすべて HEV RNA 陰性であるが、2 カ月齢で 378 頭中 11 頭(3%)、3 カ月齢で 1,060 頭中 145 頭(14%) が陽性になり、その後陽性率は低下し、4 カ月齢で 360 頭中 34 頭(9%)、5 カ月齢で 383 頭中 2 頭(1%) および 6 カ月齢ではすべて陰性であった^{10),11)}。

表 1 北海道から沖縄の全 117 農場の飼育ブタにおける月齢別の IgG クラス HEV 抗体および HEV RNA の陽性率

月齢	IgG クラス HEV 抗体 陽性率	HEV RNA 陽性率
1 カ月齢	21/218(10%)	0/218
2 カ月齢	71/698(10%)	11/378(3%)
3 カ月齢	509/1,060(48%)	145/1,060(14%)
4 カ月齢	583/680(86%)	34/360(9%)
5 カ月齢	732/883(83%)	2/383(1%)
6 カ月齢	326/386(84%)	0/386
合計	2,242/3,925(57%)	192/2,785(7%)

(Takahashi, M., et al.: J. Gen. Virol. 84; 851-862, 2003¹⁰⁾, Takahashi, M., et al.: J. Gen. Virol. 86; 1807-1813, 2005¹¹⁾により作成)

3. ブタにおける HEV 感染の動態

以上の結果は母ブタからの移行抗体が消失する 1~2 カ月齢の子豚に HEV が感染し、2~4 カ月齢で末梢血中に HEV が現れるが、抗体を獲得し 6 カ月齢までに HEV は末梢血中から排除されることを示している。また、HEV 感染により、ヒトでの感染と同様にブタでも IgM および IgA クラスの HEV 抗体が血清中に一過性に現れるが、IgM クラスの HEV 抗体の反応性はきわめて悪い。それに対して、IgA クラスの HEV 抗体は IgM クラス HEV 抗体よりも良好な反応性を示し、血清中での HEV RNA の出現に相関することが明らかになっている¹¹⁾。

ブタにおいてもヒトと同様に個体レベルでは HEV 感染は一過性である。しかしながら、豚舎という閉鎖区域内において HEV 感染ブタから排泄されたウイルスが感受性のある子豚に新たに感染することにより、豚舎レベルで感染環が長期にわたって維持されていると考えられる。いつごろからわが国のブタに HEV 感染が拡がったのかは現在のところ明らかにされてい

ないが、ブタの保存血清を用いた retrospective な検討により、すでに 1990 年にはわが国のブタに土着 HEV (3 型) が感染していたことが明らかになっている¹²⁾。

II. ブタから分離された HEV の分子ウイルス学的検討

この項のポイント

- わが国のブタに感染している HEV の遺伝子型は 3 型か 4 型である。
- わが国のブタから、E 型肝炎患者由来の HEV 株と塩基配列が 100% 一致する HEV 株が分離されている。

1. 日本由来 HEV 株の系統発生的解析

HEV の遺伝子型として、これまでに 1~4 型の 4 種類が報告されている¹³⁾。わが国のブタから分離された HEV は 3 型または 4 型に属している。

図にヒトおよびブタから分離された HEV 株の分子系統樹を示す。日本の国内感染 E 型肝炎患者およびブタ由来の HEV 株は、図中にバーで示したように系統発生的なクラスターを形成する。すなわち、日本の 3 型 HEV は日本由来株のみからなる群(便宜的にクラスター 3j-1 とする)、米国株に近縁の群(同 3j-2)およびスペインなどヨーロッパの分離株に近い群(同 3j-3)に細分されることが考えられる。また、日本の 4 型 HEV は中国株や台湾株と区別される固有のクラスター(同 4j)を形成している。同様にほかの地域のヒトとブタ由来の HEV 株もそれぞれの地域ごとにクラスターを形成していることがわかる。すなわち、米国、スペインでは 3 型、台湾では 4 型のなかにそれぞれクラスターを作っている。これは各地域においてヒトとブタが近縁な HEV 株に感染していることを示しており、ブタとヒトの種を越えた HEV 感染の存在を強く示唆するものである。

2. ヒト由来株とブタ由来株の相同性

わが国のヒト由来 HEV 株とブタ由来 HEV 株の ORF 2 領域の塩基配列(412 塩基)での相同性の比較において、クラスター 3j-1 では最大 98.8%(HE-JA 9 株 vs. swJ 18-3 株)、クラスター 3j-2 では最大 100%(HE-JA 4 株 vs. swJL 234 株)、クラスター 3j-3 では最大 98.3%(HEV-Sendai 株 vs. swJ 791 株)、クラスター 4j では最大 100%(HE-JA 1 株 vs. swJ 13-1 株および HE-JA 18 株 vs. swJL 145 株)の一致率の組み合わせが認められている(図)。

HE-JA 1 株および swJ 13-1 株について、HEV ゲノムの全塩基配列を決定して解析を行った。その結果、両者のゲノムは全長が 7,240 塩基長で、5'非翻訳領域が 25 塩基長、3'非翻訳領域が 70 塩基長、そして三つの open reading frame(ORF 1, ORF 2, ORF 3)、それぞれ 5,121, 2,022 および 342 塩基長について同じ長さであり、全長の塩基配列は 99% の一致率を示した。また、ORF 2 および ORF 3 タンパク質のアミノ酸配列は 100% の一致率を示した。ORF 2 タンパク質は capsid を形成することより、両者の抗原性はまったく同じであると考えられる¹⁴⁾。

3. HEV 株の地域差

興味深いことに HEV の侵淫地域であるインドおよび中国では流行性 E 型肝炎患者由来の HEV 株は 1 型であるのに対してブタからは 4 型が分離され、タイでは流行性 E 型肝炎患者由来の HEV 株は 1 型であるのに対してブタからは 3 型が分離されている^{15),16)}。また、メキシコでは流行性 E 型肝炎患者由来の HEV 株は 2 型であるのに対してブタからは 3 型が分離されている¹⁶⁾。

これまでにブタから分離されている HEV 株は世界的に 3 型または 4 型である。衛生状態が

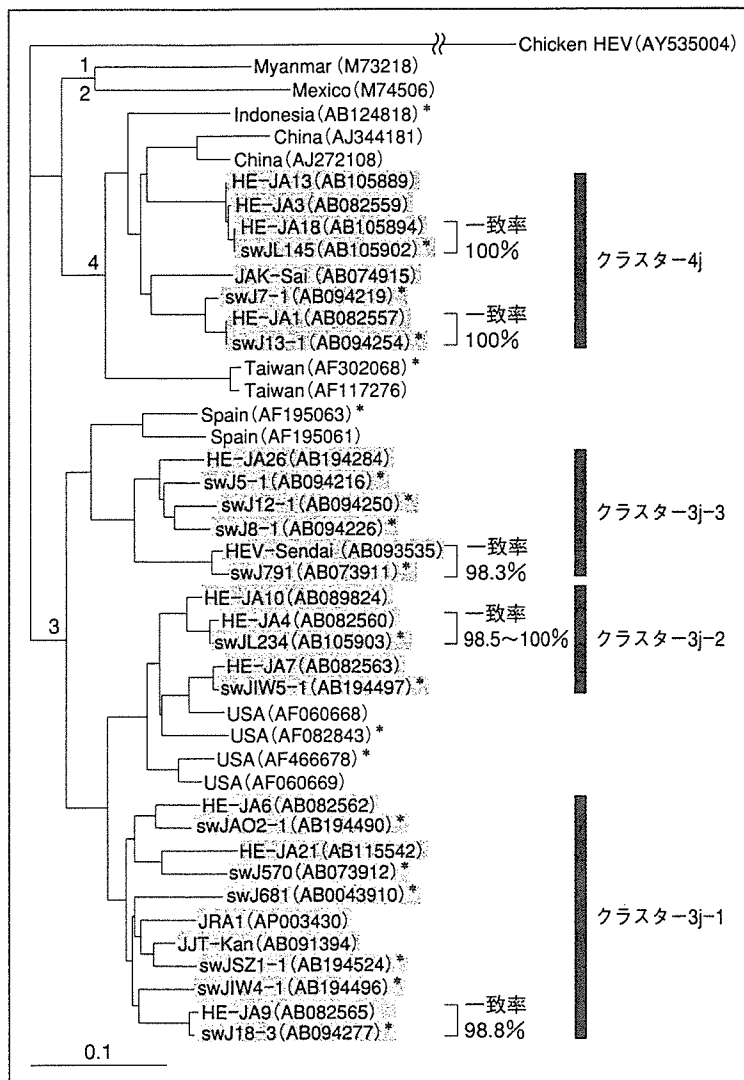


図 HEV open reading frame 2 領域の 298 塩基に基づく分子系統樹
日本のブタおよび国内感染の E 型肝炎患者由来の HEV 株を青枠
で示した。また、ブタ由来の HEV 株に*を付した。

良好でない途上国においては、1 型あるいは 2 型の HEV の水系感染による流行性 E 型肝炎が目立つのに対して、先進諸国では衛生環境の整備により E 型肝炎の流行はなくなったが、人獣共通感染症としての 3 型および 4 型の HEV による E 型肝炎が散発的に発生しているものと考えられる。

III. ブタとヒトを結ぶもの

この項のポイント

- 食肉用として出荷される 6 カ月齢のブタの肝臓には HEV が残存していることがある。
- ブタの内臓を加熱不十分な調理で摂食することにより HEV に感染する危険性がある。

1. 感染経路の検索

これまで述べてきたように、わが国のブタで

は全国的に広く HEV 感染が蔓延しており、ブタおよび E 型肝炎患者から分離された HEV 株のなかには遺伝子配列が互いに 100%一致するものもあり、種を越えて HEV が感染していることを示唆している。また、インドネシアではブタの摂食をタブーとするイスラム教徒の多い Lombok および Surabaya の住民では IgG クラスの HEV 抗体陽性率がそれぞれ 4% および 0.5% と低いのにに対して、住民の多くがヒンズー教徒でブタの肉や内臓を食する習慣のある Bali では HEV 抗体陽性率が 20% と高いことが示されている¹⁷⁾。これらはいずれも E 型肝炎が人獣共通感染症であり、ブタがヒトへの HEV の感染源になっている可能性を強く示唆するものである。

しかしながら、E 型肝炎を発症した患者のなかで、ブタとの濃厚な接触をきっかけに感染したと推測される患者はまれであり、直接的な接触以外の感染経路が存在しないかどうか、新たな感染経路の存在の可能性に関心がもたれていた。

北海道はわが国でもっとも E 型肝炎の患者数が多い地域であり、道内の二つの病院で 2001 年および 2002 年の急性および劇症肝炎患者 38 症例を精査したところ、10 症例 (26%) が E 型肝炎であると診断された。このうちの一人暮らしの高齢の男性患者が「ブタのレバーを近所の食料品店で購入し、自分ではじめてレバニ

ラ炒めを調理し、発症の 19~25 日前の 7 日間続けて食べた」との情報に注目し、急性および劇症肝炎患者でのブタレバーの摂食状況について、共同研究者である主治医に聞き取り調査を実施していただいた。その結果、E 型肝炎患者 10 症例中 9 症例が発症の 2 週間から 2 カ月前にブタレバーを食べていたのに対して、非 E 型急性肝炎症例のうち調査できた 22 症例はいずれも発症前にブタレバーを食べていなかった (表 2)¹⁸⁾。

また、さらに症例数を増やし、北海道内の E 型肝炎患者 27 名についての聞き取り調査では、25 名 (93%) が発症前 1~2 カ月にブタのレバーまたはホルモン(腸管)を食べており(なかには生、あるいは加熱が不十分なレア状態を好む患者もいた)、ブタの内臓の摂食が HEV 感染のリスクファクターとなっている可能性が示唆された (表 2)¹⁹⁾。

2. ブタレバーからの HEV 検出

北海道内の E 型肝炎患者の居住地の 25 の食料品店で 2 カ月間数個から数十個ずつ 14 回に分けて購入したブタレバーを、その都度宅配便で自治医大まで送ってもらい、合計 363 個のブタレバーから HEV RNA の検出を試みた。その結果、7 個 (1.9%) のブタレバーから HEV RNA が検出され、ブタレバー由来の HEV 株には北海道内の E 型肝炎患者から分離された

表 2 北海道の E 型肝炎患者におけるブタ内臓の摂食状況

報告者	急性肝炎症例	症例数	発症前 2 週~2 カ月における摂食者		
Yazaki, et al. ¹⁸⁾	E 型	10	レバー	9 (90%)	p < 0.0001*
	非 E 型**	22	レバー	0	
Mizuo, et al. ¹⁹⁾	E 型	27	レバー	20 (74%)	
			ホルモン	18 (67%)	
			レバーまたはホルモン	25 (93%)	

* : Fisher の直接確率計算法 ** : A 型, B 型, C 型, サイトメガロウイルス, EB ウイルスなど