

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)  
**E型肝炎の感染経路・宿主城・遺伝的多様性・感染防止・診断・  
 治療に関する研究**

平成19年度  
 班友研究報告書

## 兵庫県野生猪およびアライグマにおけるHEV感染実態調査

班友 北嶋直人 市立加西病院

研究要旨: E型肝炎ウイルス(HEV)は人畜共通感染症であり、野生猪はその感染reservoirのひとつとして注目されている。兵庫県の野生猪を対象としたHEV感染実態調査を4年間にわたり実施した結果、猪にはHEVが高率に感染していること、その流行は少なくとも3年間遷延していることが判明した。2年の時を経て同一のHEVが1歳程度の若い猪に感染していたことは、未だにその正体が解明されていないHEV感染源が現時点でも存続していることを警告している。また、ペットとして輸入されたアライグマが野生化して最近その数が急増していることから、新たなreservoirの可能性について検討したが、アライグマには今のところHEVの感染は認められなかった。

### ＜共同研究者＞

安倍夏生、高橋和明、三代俊治:東芝病院  
 研究部

### A.研究目的

本邦のE型肝炎ウイルス(HEV)感染においては、その感染連鎖の中に動物が関与していることの重要性が指摘されている。豚を含む多くの動物がそのreservoirであることが証明されてきているが、最近その生息数が増加している野生猪もそのひとつであり、感染源になり得ることが各地から報告されている。

我々は平成15年度以降、兵庫県の野生猪におけるHEV感染状況に関する実態調査を毎年実施してきた。その中間結果は平成17年度の報告書に総括したが、概略は下記の通りである。平成15-16年度の調査では、猪に高率にHEVが感染していること、地域によって猪のHEV感染率に大きな差が

あること、感染率の高い地域内においても互いに隣接する二つの町でそれぞれ異なるHEVが流行していることなどが判明した。ところが平成17年度に調査した猪は、血液中のHEV RNAがすべて陰性であった。これまでのendemic areaでの積極的な狩猟がHEV感染の終息に貢献した可能性も推測され、その答えを求めて18年度以降の調査を継続した。

また、これまで調査に協力を得てきたハンターとの話し合いの場で、ペットとして輸入されたアライグマが野生化して最近その数が日本全国で急増していること、猪以上に人間の生活環境に近いところに生息して様々な被害を及ぼしていることを耳にした。以前に我々は、HEVが猪・鹿・人間と種を越えて感染していることを報告している。猪の糞便と共に環境に排泄されたHEVに同じ地域で生息しているアライグマが暴露される恐れがあることから、併せてアライグマにおけるHEV

感染実態調査も実施することとした。

## B. 研究方法

兵庫県在住のハンターの協力を得て、兵庫県中部の地域において捕獲された野生の猪およびアライグマから肝臓と血液をサンプリングした。東芝病院研究部で血清HEV-IgG抗体を測定し、HEV RNAの検出を試みた。また、検出されたHEV RNAの塩基配列を決定し、既知のものと比較した。

## C. 研究結果

<平成18年度>

猪は102頭のうち15頭(14.7%)がHEV-IgG抗体陽性であり、そのうち5頭(4.9%)は血液中からHEV RNAを検出した(表1)。HEV RNA陽性であった5頭の猪のうち、2頭は黒田庄町(2年前に5頭のHEV陽性の猪が捕獲された町)で捕獲されたが、2年前のウイルスとは全く異なるstrainであった(図1)。一方、残りの3頭はその黒田庄町から直線距離で20km以上離れた青垣町で捕獲されており、しかも2年前に黒田庄町で捕獲された5頭の猪から得られたHEVと同一のクラスターを形成していた。今回HEV陽性であった猪は、5頭すべて1歳程度の若い猪であった。

<平成19年度>

平成20年2月7日現在、検査を完了した猪35頭はすべてHEV RNA陰性であった。また、アライグマは29頭の調査を完了しており、HEV RNAおよびHEV IgG抗体はすべて陰性であった。

## D. 考察

平成17年度の調査において猪39頭すべてHEV RNA陰性であったことから、この地域の猪におけるHEV感染は一過性であり、このまま消息する可能性も期待されたが、平成18年度の調査の結果、見事にその期待

は裏切られた。平成18年度に調査した102頭のうち5頭(4.9%)でHEV RNAを検出し、猪におけるHEV感染が持続していることが判明した。

また、HEV高浸透地域である黒田庄町において、新たなHEV strainが1歳程度の若い2頭の猪から検出されたことは、この地域に未だに解明されていないHEV感染源が現存していることを意味している。さらに、2年前と同一のHEVが直線距離で20kmも離れた場所で捕獲された3頭の猪から検出され、しかもそれらがすべて1歳程度の若い猪であったことは極めて興味深い。すなわち、この3頭の猪は、2年前に黒田庄町で流行したHEVに感染した猪の生き残りではなく、新たにこの1年以内に感染したことになる。

問題の感染源は未だに不明のままであるが、近隣で飼育されていた感染猪が逃げ出して野生化した可能性が指摘されている。そうだとすれば、現時点でも感染源となっている飼育場がこの地域の近隣に現存している感染猪の供給源になっているのか、あるいは2年以上前に野生化した感染猪から周りの野生猪に猪-猪間でHEV感染が継代されている可能性が考えられる。前者であれば感染源となっている飼育場を特定することでこれ以上の感染の拡大を防げる期待が持てるが、後者であれば今後さらに広範囲に感染が拡大することが危惧される。

平成19年度の調査では今のところ、すべてHEV RNA陰性と平成17年度の調査と同様の結果であった。勿論、これをもってHEV感染がこのまま消息すると期待するのは早計であり、来年度以降の調査結果に委ねるべきであろう。

アライグマには今のところHEVの感染は認められなかったが、猪以上に人間の生活環境に近いところに生息しており、その排泄物からヒトに感染させるあるいは中間宿主になり得る危険性があり、今後も注意が必要であろう。

**E. 結論**

経年的な野生猪HEV感染実態調査において、高率にHEVが猪に感染していること、その流行は少なくとも3年間遷延していることが判明した。猪へのHEVの感染源が、現時点でも存続している可能性が高い。アライグマには今のところHEVの感染は認められなかった。

**F. 研究発表**

1. 論文発表:なし
2. 学会発表:なし

**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.

## II. 分担研究報告

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）  
E 型肝炎の感染経路・宿主域・遺伝的多様性・感染防止・診断・治療に関する研究  
平成 19 年度分担研究報告書

E 型肝炎ウイルスの感染培養系

分担研究者 岡本宏明 自治医科大学医学部教授

**研究要旨：**昨年度樹立することができた E 型肝炎ウイルス(HEV)の感染培養系について引き続き検討した。連続する 10 代の継代培養により、HEV ゲノム全長の約 0.3% に相当する 20 塩基に変異が出現し、野生株に比べて 10 代目の HEV(p10)の方がより活発な増殖能を示した。E 型劇症肝炎患者の糞便浮遊液を用いることにより、4 型 HEV(JE02-4970)株についても継代可能な培養系を確立することができた。以上の研究成果は、adaptation の分子機構の解明や遺伝子型別の増殖能、増殖機構の解析、および重症化、劇症化と密接な関係があるウイルス因子の解明に役立つものと期待される。

A. 研究目的

これまでに、E 型肝炎ウイルス(HEV)については、培養上清中にウイルス粒子が大量に放出され、継代可能な感染培養系が確立されていなかった。そのため、HEV の増殖機構や物理化学的性状に関する基礎的研究はほとんど進んでいないのが実情である。本研究では、効率的な HEV の感染培養系を開発すること、そしてその評価とその展開研究を実施することを目的とした。

B. 研究方法

1. 接種材料

国内感染 E 型肝炎患者由来の HEV(JE03-1760F [3 型], JE02-4970F [4 型])含有糞便浮遊液を用いた。

2. 細胞培養

PLC/PRF/5 (Alexander)細胞の monolayer を作製し、HEV を接種した。細胞培養は既報(Tanaka et al., J Gen Virol 88:903-911, 2007)に従って行い、2 日ごとに培養液の半分を新しい培養液に交換する方法で行った。

3. 継代培養

ポアサイズ 0.22  $\mu\text{m}$  のフィルターを通し、cell-free とした培養上清を、新たな細胞 monolayer に接種し、継代培養を行った。

4. HEV RNA の定量測定

QuantiTect Probe RT-PCR kit (Qiagen)を用い、

保存性の高い ORF3 領域を標的領域として real-time PCR 法により HEV RNA の定量測定を行った。

5. 塩基配列の決定

既報(Okamoto et al., Biochem Biophys Res Commun 289:929-936, 2001)に従い、HEV ゲノムの全長をカバーし、互いにオーバーラップする領域をもつ 7 つの遺伝子断片を増幅し、全塩基配列を決定した。

倫理面への配慮：研究用血清・糞便検体の採取に際して、インフォームドコンセントが得られている。そして、検体提供者は匿名化されているため、個人のプライバシーを侵害することはなく、人権上の問題は生じない。

C. 研究結果

1. 細胞培養に伴う HEV 変異

糞便浮遊液(JE03-1760F)を接種し、28 日目の培養上清から得られた HEV (p0)、その後 5 回継代培養を繰り返し培養上清から得られた HEV (p5)、更に 5 回の継代培養を続けて培養上清から得られた HEV (p10)について、全塩基配列を決定したところ、患者糞便中から分離された JE03-1760F 野生株(wt)に比べて、それぞれ 1 塩基, 9 塩基, 20 塩基の相違が認められた。p10 株に認められた 20 塩基の変異のうち、5 塩基が ORF1 あるいは ORF3 でのアミノ酸置換を伴っていた。細胞培養中の HEV の変異率は、 $1-2 \times 10^{-3}$  nucleotide substitutions

/site/year と算定された。

## 2. JE03-1760 株の cell culture-produced variants の感染性の評価

野生株 wt と継代株 p10 はともに、 $1.0 \times 10^3$  copies/well のウイルス量で接種した際には、培養上清中への子ウイルスの放出を示さなかったが、 $3.0 \times 10^3$  copies/well のウイルス量で接種すると、ともに継続的なウイルス産生を示した。しかし、wt では培養上清中の HEV RNA titer が  $10^4$  copies/ml 以上に達したのは 5 well 中 1 well に過ぎなかったのに対して、p10 では 5 well 中 4 well で  $10^4$  copies/ml 以上の増殖が認められ、一つの well (Well 2) では、 $10^8$  copies/ml に達する活発な増殖が認められた。その well 中の HEV は、 $1.0 \times 10^3$  copies/well で接種しても  $10^7$  copies/ml 以上の子ウイルスを産生することができた。

## 3. 4 型 HEV (JE02-4970F) 株による培養系の確立

E 型劇症肝炎患者から得られた糞便浮遊液を接種することにより、新たに 4 型 HEV (JE02-4970F) 株の培養系を確立することができた。JE03-1760F 株と同様に、培養上清を用いた cell-free virus の継代培養が可能であり、5 代目の継代培養において、接種後 4 日目に培養上清中で子ウイルスの出現が確認され、20 日目に  $10^7$  copies/ml に達した。3 型の JE03-1760F 株に比べてより活発な増殖能を示した。

## D. 考察

3 型 HEV (JE03-1760F) 株の培養において、passage 10 までに HEV ゲノム全長の 0.3% に相当する 20 塩基に変異が認められたが、これが adaptive mutation であるのか、それとも単なる genetic drift なのかを明らかにするために、感染性 cDNA クローンをを用いた解析を行いたいと考えている。4 型の JE02-4970 株がより活発な増殖能を示したことが劇症肝炎患者から分離された株であることと関連があるのか否か、今後の検討課題としたい。

## E. 結論

E 型劇症肝炎患者からの 4 型 HEV についても効率的な培養系を樹立することができた。先に樹立できた 3 型 HEV の培養系と組み合わせ、遺伝子型の違いを考慮に入れながら、増殖能や重症化、劇症化と密接な関係にあるウイルス因子の解明に役立てたい。

## F. 研究発表

1. Gotanda Y, Iwata A, Ohnuma H,

Yoshikawa A, Mizoguchi H, Endo K, Takahashi M, Okamoto H: Ongoing subclinical infection of hepatitis E virus among blood donors with an elevated alanine aminotransferase level in Japan. *J Med Virol* 79:734-742, 2007

2. Lorenzo FR, Tsatsralt-Od B, Ganbat S, Takahashi M, Okamoto H: Analysis of the full-length genome of hepatitis E virus isolates obtained from farm pigs in Mongolia. *J Med Virol* 79:1128-1137, 2007

3. Wibawa IDN, Suryadarma IGA, Mulyanto, Tsuda F, Matsumoto Y, Ninomiya M, Takahashi M, Okamoto H: Identification of genotype 4 hepatitis E virus strains from a patient with acute hepatitis E and farm pigs in Bali, Indonesia. *J Med Virol* 79:1138-1146, 2007

4. Fukuda S, Ishikawa M, Ochiai N, Suzuki Y, Sunaga J, Shinohara N, Nozawa K, Tsuda F, Takahashi M, Okamoto H: Unchanged high prevalence of antibodies to hepatitis E virus (HEV) and HEV RNA among blood donors with an elevated alanine aminotransferase level in Japan during 1991-2006. *Arch Virol* 152: 1623-1635, 2007

5. Takahashi M, Tanaka T, Azuma M, Kusano E, Aikawa T, Shibayama T, Yazaki Y, Mizuo H, Inoue J, Okamoto H: Prolonged fecal shedding of hepatitis E virus (HEV) during sporadic acute hepatitis E: evaluation of infectivity of HEV in fecal specimens in a cell culture system. *J Clin Microbiol* 45(11):3671-3679, 2007

6. Okamoto H: Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res* 127(2):216-228, 2007

## 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(肝炎等克服緊急対策研究事業)

## E型肝炎の感染経路・宿主体・遺伝的多様性・感染防止・診断・ 治療に関する研究

平成 19 年度  
分担研究報告書

### キメラマウスでの E 型肝炎ウイルスの増殖

分担研究者 武田直和 (国立感染症研究所)

**研究要旨** HEV をキメラマウスに接種することにより、持続的に血中及び便中からウイルスが検出された。キメラマウスは HEV に対して感受性を有する。健常のマウスは HEV に対する感受性を有しない。肝細胞だけをヒト肝細胞に置換することにより、HEV に対する感受性を持つようになったことから HEV はヒト肝細胞で増殖することが示された。免疫染色の結果もこの結論を支持した。

協力研究者 李 天成、宮村達男、脇田隆宇  
(国立感染症研究所)、岡本玲子(山口県環境  
保健センター)、有田知子(独立行政法人日本  
スポーツ振興センター)、田中靖人、溝上雅史  
(名古屋市立大学大学院医学研究科)

#### A. 研究目的

キメラマウスは肝障害マウス(B6SJL-TgN(Alb1Plau)144Bri、遺伝子型: uPA<sup>+/+</sup>)と重症複合免疫不全マウス(Fox Chase SCID C. B-17/Icr-Scid Jcl、遺伝子型: SCID)の遺伝子型を併せ持つマウスにヒト肝細胞を移植し、マウス肝細胞がヒト肝細胞に種々の程度で置換された動物(遺伝子型: uPA<sup>+/+</sup>/SCID)である。キメラマウスに定着、増殖したヒト肝細胞は移植以前の遺伝的形質および機能を有することが明らかになっている。このマウスは既に B 型肝炎ウイルス(HBV)や C 型肝炎ウイルス(HCV)の研究に利用され、検体中に含まれるウイルスの定量や、発症に必要な最小ウイルス量の定量等に応用されて

いる。本研究では、本キメラマウスの E 型肝炎ウイルス(HEV)に対する感受性について検討した。

#### B. 研究方法

ウイルス: HEV genotype 1(HEV G1)、HEV G3 および HEV G4 をカイニクイザルに静脈接種して感染させ、糞便を回収した。糞便中に排泄される HEV を real-time RT-PCR で定量後、HEV G1、G3 および G4 をそれぞれ  $3 \times 10^3$ /ml、 $3 \times 10^3$ /ml および  $3 \times 10^4$ /ml となるように希釈し、接種ウイルス液とした。

接種および材料採取: 一つの検体あたり 2 匹のキメラマウスを用いた。キメラマウス 1 匹あたりウイルス液 100  $\mu$ l を眼窩静脈叢経由で接種した。経時的に採血、採便を接種前(1 週間)と接種後 8 週まで毎週行った。また、肝臓を接種後 8 週に摘出した。

ウイルスの検出: ELISA 法、RT-PCR を用いキメラマウスの血液、糞便中に出現したウイルス抗原およびウイルス RNA の有無を調べた。

また、実験終了時に採取した肝臓を肝組織染色、免疫染色を行いウイルス抗原の局在を確認した。

その他の試験:毎週採血時にはALTとAST、および血中ヒトアルブミンを測定した。また、体重の変動を観察した。

### C. 研究結果

健常マウスの HEV に対する感受性:1 検体につき 4 ヶ月齢及び 9 ヶ月齢の健常マウス (C57BL/6) 2 匹ずつを用い、尾静脈から HEV G1、G3 および G4 ウイルス液を接種し、毎週採血、採便を行いウイルス増殖の有無を検討した。血中、便中の HEV-RNA は RT-PCR で全て陰性、血中 IgG および IgM も ELISA で全て陰性であったことから、健常マウスは HEV に対して感受性を有しないことを確認した。

キメラマウスの HEV に対する感受性:HEV G1 および G3 を接種したキメラマウスでは、4 日と 7 日目にそれぞれ 1 匹ずつ死亡した。また、HEV G3 では生存した 1 匹は感染が成立しなかった。したがって今回解析できたのは G1 接種の 1 匹と G4 接種の 2 匹である。HEV G1 を接種したキメラマウスでは、3 日目には血中にウイルス抗原と RNA が、2 日目から便中に RNA が検出され、この状態は実験終了の 8 週目まで継続して観察された。G4 を接種したキメラマウスでは 2 匹とも 1 日目には便中に RNA が検出された。血清中にはそれぞれ 1 日目と 2 日目に RNA と抗原が検出され、この状態が実験終了まで続いた。生存した 4 匹の ALT、AST に顕著な変化は見られなかった。一方、接種後のヒトアルブミンと体重は徐々に減少してゆく傾向が見られた。実験終了時に摘出した肝臓からもウイルス RNA が検出され、キメラマウスの体内で HEV が持続感染していることが確認された。

肝組織染色および免疫染色:HE 染色、

Masson 染色から白血球の浸潤が著明で、セロイドが散見された。Masson 染色では明らかな繊維化の見られる切片もあり、急性炎症後の所見と思われた。免疫染色では核はは全く染色されず、細胞質のみが一様に染色されていた。

### D. 考察

キメラマウスに導入されたのはヒト肝由来の実質細胞のみである。肝組織染色、免疫染色からも HEV のターゲットは肝実質細胞であることが示された。今後、遺伝子型 3 の HEV についても複製を確認するとともに不活化条件の検討や抗ウイルス剤のスクリーニング等を検討していきたい。

### E. 発表

#### 1. 学会発表

1. 李天成, 宮村達男, 脇田隆字, 武田直和, 2007.10. シジミからの E 型肝炎ウイルス遺伝子の検出. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
2. 李天成, 宮村達男, 脇田隆字, 武田直和, 2007.10. キメラマウスにおける E 型肝炎ウイルスの複製. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
3. 加藤花名子, 佐藤幸代, 宮崎綾子, 吉井雅晃, 土屋公幸, 仲谷淳, 鈴木和男, 樹金森弘, 李天成, 武田直和, 恒光裕, 池田秀利, 2007.9. 野生動物における抗 E 型肝炎ウイルス抗体の保有状況調査. 第 144 回日本獣医学会学術集会. 江別市

#### 2. 論文発表

- (1) Matsuura Y, Suzuki M, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I, Yokoyama M, Igota H, Yamauchi K, Ishida S, Fukui D, Bando G, Kosuge M, Tsunemitsu H, Koshimoto C, Sakae K, Chikahira M,



Ogawa S, Miyamura T, Takeda N, Li TC, 2007. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Arch Virol* 152: 1375-81.

(2) Li TC, Miyamura T, Takeda N, 2007. Detection of hepatitis e virus RNA from the bivalve yamato-shijimi (*corbicula japonica*) in Japan. *Am J Trop Med Hyg* 76: 170-2

(3) Mochizuki M, Ouchi A, Kawakami K,

Ishida T, Li TC, Takeda N, Ikeda H, Tsunemitsu H, 2006. Epidemiological study of hepatitis E virus infection of dogs and cats in Japan. *Vet Rec* 159: 853-4.

**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）  
 E型肝炎の感染経路・宿主体・遺伝的多様性・感染防止・診断・治療に関する研究  
 平成19年度 分担研究報告書

## HEV キャプシド蛋白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・食品産業技術総合研究機構 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」を開発するために、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食用ワクチンを開発することである。本年度は、昨年度から作製している二つの Genotype の CP をそれぞれ発現している形質転換したレタスから、発現量の高いレタス系統を選抜する。

### 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。

バキュウ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、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ると報告されている（Li et al., 1997）。

本研究では、飼育ブタの HEV 感染化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レタスを作製し、HEV CP を産生する飼料・食用作物を開発することで経口投与ワクチンの創出へと繋げる。すなわち、精肉を介した経口感染による E 型肝炎の伝染環を遮断することを目的としており、さらにその技術は、HEV CP 遺伝子発現形質転換レタスをヒトが直接摂食する

ことにより本病を予防できる革新的なワクチン技術の開発へと発展する。本年度は、HEV キャプシドタンパク質遺伝子を発現する形質転換レタスを選抜し、導入遺伝子の発現を確認する。

### B. 研究方法

#### HEV CP 遺伝子組換えレタスの開発

遺伝子の翻訳過程において各アミノ酸のコードン使用頻度は動物と植物間で大きく異なる。そのため、植物細胞内において動物型遺伝子の発現効率は極端に落ちる。野生型 HEV のコードンは動物型であるので、植物型に改変した同ウイルスの CP 遺伝子を植物細胞発現用プラスミドベクターに組み込み、レタスに形質転換した。レタスに導入する CP 遺伝子は、Genotype III 型の JRA、Genotype IV 型の JSN の塩基配列を基にそれぞれを植物発現用遺伝子となるよう合成オリゴ DNA をプライマーとした overlapping PCR 法で改変し、さらに遺伝子導入されたレタス細胞内において外来遺伝子を効率的に安定して発現させるため、CP 遺伝子の 5'及び 3'末端に小胞体移行・滞留シグナルペプチド配列（ER シグナル）を付加したそれぞれの HEV CP 遺伝子を構築してレタスの形

質転換に用いた (Sun et al., 2006)。

得られた形質転換レタスの上位葉を材料として、定量 PCR 法を用いて内在遺伝子 (ユビキチン) の発現量を標準として各個体の外来遺伝子の発現量を定量的に比較しながら、ゲノム DNA に導入された遺伝子のコピー数、並びに当該遺伝子の発現株または非発現株を選定した。それら形質転換個体内、発現量の高い系統を選抜し、植物体内での当該遺伝子の発現をウェスタンブロッティングで確認した。

### C. 研究結果

#### 各種 HEV CP 遺伝子を導入した形質転換レタスの作製

アグロバクテリウム法を用いてレタスを形質転換した。平成 19 年 6 月 1 日現在までに得られた形質転換レタス株数を表 1 に示した。

形質転換用バイナリーベクターには HEV CP 遺伝子と共にカナマイシン耐性遺伝子を連結しているため、外来遺伝子を導入した形質転換レタスの 1 次選抜にはカナマイシンを用いた。カナマイシンを 50mg/ml 濃度に混合した植物培地で生育可能となった形質転換当代レタスは、JRA (ER シグナル) で 58 株、JSN (ER シグナル) で 19 株、であった。それら各株の

葉片から DNA あるいは RNA を調製し、それらを鋳型にして HEV CP 遺伝子を対象とした定量的 PCR 法を実施した。DNA はゲノム中に導入された外来遺伝子のコピー数を、RNA は細胞内で発現している外来遺伝子由来の mRNA 発現量を対象に調査した。その結果、JRA (ER シグナル) では単一コピー 29 株、複数コピー 13 株、陰性反応 16 株であった。JSN (ER シグナル) では単一コピー 0 株、複数コピー 6 株、陰性反応 13 株であった。

次に、形質転換レタスから調製した mRNA を検定した。その結果、JRA (ER シグナル) において DNA 単一コピーで mRNA を発現していたのは 22 株であった。JSN (ER シグナル) では mRNA 発現株は得られなかった。次に、JRA (ER シグナル) において DNA 単一コピーで mRNA を発現していなかったのは 7 株であった。JSN (ER シグナル) では皆無であった。また、JRA (ER シグナル) において DNA 複数コピーで mRNA を発現しているのは 2 株、JSN (ER シグナル) で 4 株であった。JRA (ER シグナル) において DNA 複数コピーで mRNA を発現していないのは 11 株、JSN (ER シグナル) で 2 株であった。

表 1 HEV CP 遺伝子を導入された形質転換レタス候補株数

導入遺伝子	Kn <sup>r</sup>	Genomic DNA		mRNA	
			株数		株数
JRA (ERシグナル)	58	単一	29	発現	22
					非発現
		複数	13	発現	2
					非発現
JSN (ERシグナル)	19	単一	0	発現	0
					非発現
		複数	6	発現	4
					非発現

ERシグナル：小胞体移行シグナル

Kn<sup>r</sup>：カナマイシン耐性株数

単一：ゲノムDNA内に導入遺伝子 1 コピーだけが挿入された株数

複数：ゲノムDNA内に導入遺伝子が複数挿入された株数

発現：導入遺伝子から mRNA が発現している株数

非発現：導入遺伝子から mRNA が発現していない株数

一連の検定で得られた形質転換レタスを自家受粉させ次世代 (T1) の種子を採取した。それらをカナマイシン含有 MS 寒天培地で発芽させ、その後鉢上げしてプランターで育成した (図1)。それらから葉を採取して E 型肝炎患者血清を用いてウェスタンブロッティングを実施した。検定した形質転換レタス JRA (ER シグナル) 単一コピーの 22 株の内 5 株が、JSN (ER シグナル) の複数コピー 4 株の内 3 株から目的とするタンパク質が検出された。それらの内、最も反応強度が強かった 4 系統 (JRA-11-2、JRA-11-6、JSN-41-22、JSN-41-24) のブロッティングパターンを図2に示した。

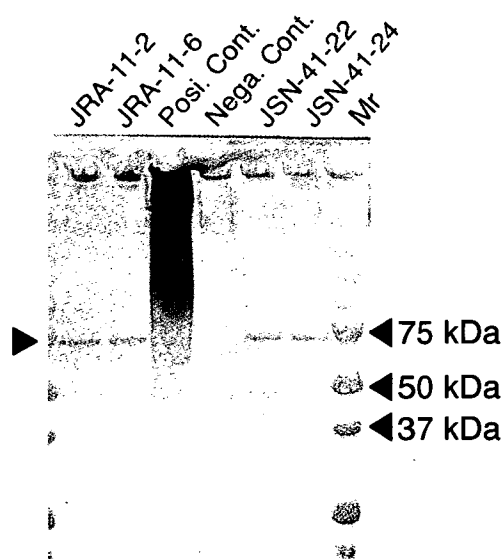


図2 HEV のキャプシドタンパク質を発現する形質転換レタスのウェスタンブロッティング。レーンには系統名、Posi. Cont. はアグロインフイルトレーション発現タンパク質、Nega. Cont. は非形質転換レタス、Mr は分子量マーカーを示す。

## E. 考察

それぞれの遺伝子型において、HEV CP 遺伝子を導入した形質転換レタスが得られた。しかし、現在までに得られている形質転換レタスの中で、「DNA 単一コピー及び mRNA 発現」の株数が少ないので、引き続き当該遺伝子発現レ



図1 HEV-JRA (ER シグナル) のキャプシドタンパク質を発現する形質転換レタス (JRA-11-2)

タスの作製を継続する必要がある。一方、図2で示したとおり、既に当該タンパク質を発現する形質転換レタスが得られていることから、本研究課題の目的である実験動物の消化管経路での免疫感作能について早急に検討する必要がある。

外来遺伝子の複数コピーが導入され、かつ外来遺伝子からの mRNA が発現されているレタス株 (「DNA 単一コピー及び mRNA 発現」) は、自家あるいは他家受粉で得られる後代においてサイレンシングが起こりうる等、各世代における遺伝子発現制御が不安定になる可能性がある。これらの株の使用には、十分な後代検定で安定性を実証する必要がある。

一方、外来遺伝子の高度発現レタスを作製するため、当該 DNA の複数コピーが導入され、かつその遺伝子から mRNA が発現されていない遺伝子サイレンシング株 (「DNA 複数コピー及び mRNA 非発現」) を選抜する必要がある。それらサイレンシング株では外来遺伝子が多数導入されていることによりその遺伝子発現が抑制されている。そこで、サイレンシングによる遺伝子発現抑制を解放するために、植物ウイルスが保有する HC-Pro 遺伝子を発現するレタスとそのサイレンシング株とを交雑させた雑種後代 F1 を得ることにより、HEV CP 遺伝子を高発現するレタスが得られるものと考えられる。すなわち、雑種後代 F1 では、サイレンシングにより発現抑制されていた外来遺伝子が HC-Pro 遺伝子の働きにより一気に解放さ

れ、単一コピーの株よりも遥かに高い遺伝子発現、さらに目的タンパク質が多量に蓄積するレタスが得られるものと考えられる。

#### F. 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.

Sun, H-J., et al., 2006. Functional expression of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce. *FEBS Lett.* 580: 620-626.

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

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

-----

厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)

## E型肝炎の感染経路・宿主城・遺伝的多様性・感染防止・診断・ 治療に関する研究

平成 19 年度

分担研究報告書

### E型肝炎ウイルスの分子進化 Anti-HEV IgA 抗体の有用性

分担研究者 田中靖人 名古屋市立大学大学院医学研究科臨床分子情報医学

#### 研究要旨

昨年から継続して 821nt の塩基配列を収集し系統解析を行った結果、中国における 4 型は遺伝子多様性に富み、human 株と swine 株が混在していた。その拡散時期は 1920 年頃と推定され、4 型の起源である可能性が示唆された。系統解析の結果から感染経路は、日本・中国ともに豚との接触(経口摂取も含む)が主体であることが推定された。こうした研究は、衛生上問題が残る発展途上国における HEV 拡散時期、拡散様式を把握し、HEV の拡散予防にも繋がると考える。

急性肝炎患者 81 例、慢性肝炎患者 121 例(一部シリーズ検体)の保存血清を用いて HEV 抗体の有用性を検討した。HEV IgM 抗体は疑陽性がみられ、anti-HEV IgA 抗体測定系の方が、感度、特異度ともに優れており、スクリーニング検査に適していることが示された。

#### 共同研究者氏名

溝上雅史<sup>1</sup>、高橋和明<sup>2</sup>、三代俊治<sup>2</sup>、  
矢野公士<sup>3</sup>

<sup>1</sup>名古屋市立大学大学院医学研究科臨床分子情報医学、<sup>2</sup>東芝病院・研究部、  
<sup>3</sup>長崎医療センター

#### A. 研究背景・目的

(1) 本邦の主要な genotype である genotype 3 型, 4 型の中で、3 型は日本全土に散見するが、4 型は北海道(札幌)に圧倒的に多く、しかも重症化に寄与している。

(2) GDD モチーフを含む RNA

polymerase 領域 821 nt の塩基配列を用いた系統解析により得られたトポロジーは、全塩基配列に基づいた系統樹のトポロジーに類似していた。そこで、データベース及び研究協力者より得られた 821nt の塩基配列をすべて用いて系統解析を行う。世界中から分離された HEV 株と比較することで、わが国の土着株の特徴を明らかにする。

(3) 昨年から引き続き、HEV データベースの充実化を図る。HEV 遺伝子情報の共有を可能するだけでなく、系統解析を Web 上で容易にできるように設定し、その広報活動を行う。

(4) Anti-HEV IgA 測定系の有用性を検証する。

## B. 研究方法

(1) 系統解析に用いた 821nt の塩基配列：昨年までに報告している日本株及び中国（上海）との共同研究により得られた中国株を含めて、1 型 (n=23)、2 型 (n=1)、3 型 (n=60)、4 型 (n=87) である。方法は、Alignment 作成後、6-parameter にて genetic distance を推定し、近隣結合法を用いて系統樹を作成した。進化速度と分岐時期は linear regression 解析及び TipDate, Genie software (Effective population size 法) を用いて推定した。

(2) Anti-HEV IgA 測定系の検討；81 人の急性肝炎患者血清、コントロールとして 112 人の慢性肝炎患者血清を用いた。anti-HEV IgG, IgM, IgA を測定し、RT-PCR 法により HEV-RNA を検出した。

## C. 研究結果

(1) 系統解析の結果、本邦の 3 型土着株は多様であったが、UK などの欧米株と近縁関係にあることがわかった。一方、4 型は札幌クラスター (n=38)、札幌以外の日本クラスター (n=15)、中国クラスター (n=20)、その他 (n=14) の少なくとも 4 つのグループに分類された。昨年も報告しているが、中国における 4 型は遺伝子多様性に富み、human 株と swine 株が混在していた。molecular clock に基づいた解析により、その拡散時期は 1920 年頃と推定された。札

幌における 4 型の遺伝子多様性は少なく、最近 20 年で急激に増加していることがわかった。系統解析の結果から感染経路は、日本・中国ともに豚との接触（経口摂取も含む）が主体であることが推定された。

## (2) 肝炎データベース

(<http://s2as02.genes.nig.ac.jp>) の一部として HEV データベースを完成させた。現在までの登録配列は 2069 エントリー、全塩基配列の登録も 81 本に上っている。具体的に行った点は、

- a) 肝炎ウイルス遺伝子情報の網羅的収集（国際データベースとのリンク）
- b) データを遺伝子座、系統関係の両面から整理

- 配列マップ
- マルチプルアラインメント
- 特定 genotype データの再解析
- 分子進化系統樹
- 宿主／地域分布と系統関係の相互参照

## c) データ解析のプラットフォームとして利用可能

- ブーツストラップ解析
- genotype 推定
- 相同性検索（BLAST / FASTA）

(3) 急性肝炎患者 (n=81)：IgG 抗体は 8/81 (9.9%)、IgM 抗体 6/81 (7.4%)、IgA 抗体は 3/81 (3.7%) 陽性であった。IgA 抗体陽性 3 例中 2 例は HEV-RNA 陽

性であり、残りの1例も入院後35日目の検体であったので、急性E型肝炎は否定できなかった。一方、IgM抗体のみ陽性であった3例は、HEV-RNAは陰性で、それぞれA型肝炎、EBV感染、CMV感染と診断された。IgM抗体疑陽性の可能性が示唆された。次に、慢性肝疾患患者112例の検討を行った。IgG抗体陽性4例、IgM抗体陽性2例認められたので、過去の保存検体を用いて経時的に(6-10ポイント)HEV抗体及びHEV-RNAを測定した。すべてのポイントでIgA抗体及びHEV-RNAは検出されなかった。以上の結果より、anti-HEV IgA抗体の感度、特異度ともにIgM抗体に比べて優れており、スクリーニング検査に適していることが示された。

#### D. 考察

HEVスクリーニング系の確立は重要であり、今回の結果からanti-HEV IgA測定系の有用性が確認された。実際の臨床の場で使うためには、HEV-RNA測定と合わせて早期保険収載が望まれる。

分子進化学的手法を用いると、その地域におけるHEV感染時期、さらにその当時の社会的背景から感染・拡散様式も推測可能である。今年度は症例数を増やして検討した結果、中国における4型は遺伝子多様性に富み、その拡散時期は1920年頃と推定された。札幌における4型は最近20年で急激に増加していることを考えると、4型

の起源は中国である可能性が示唆された。現時点では、我が国への感染ルートは不明であるが、中国との共同研究を継続することにより、明確にしたいと考えている。こうした研究は、衛生上問題が残る発展途上国におけるHEV拡散時期、拡散様式を把握し、HEVの拡散予防にも繋がると考える。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Elkady A, **Tanaka Y**, Kurbanov F, Hirashima N, Sugiyama M, Khan A, Kato H, Okumura A, Mizokami M. Evaluation of anti-hepatitis E virus (HEV) immunoglobulin A in a serological screening for HEV infection. *J Gastroenterol.* 42(11):911-7. 2007.

##### 2. その他の発表

Elkady A, **Tanaka Y**, Kurbanov F, Khan A, Sugiyama M, Mizokami M. Evaluation of anti HEV-IgA as a serological screening test for diagnosis of HEV infection in acute hepatitis patients. 14<sup>th</sup> Japan-Korea Hepatitis Meeting. June 16-17 2007, Fukuoka.

#### 肝炎データベース

(<http://s2as02.genes.nig.ac.jp>)  
の公開

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。



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)

## E型肝炎の感染経路・宿主城・遺伝的多様性・感染防止・診断・治療 に関する研究 平成19年度 分担研究報告書

### 北海道地区献血者集団に於ける HEV 感染の実態解明

分担研究者：日野 学（日本赤十字社 血液事業本部）

研究協力者：松林 圭二，坂田 秀勝，今 絵未，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）  
阿部 生馬（日本赤十字社血漿分画センター）

#### 研究要旨

わが国では輸血を介した E 型肝炎ウイルス (HEV) 感染事例が複数確認され、輸血による HEV 感染リスクが問題視されている。このため献血者における HEV 感染の実態について明らかにし、適切な HEV 感染防止対策を講じる必要がある。北海道地区は E 型肝炎症例報告数が多く、また輸血を介した HEV 感染事例も確認されていることから、2005 年から 20 プール HEV NAT スクリーニングを開始し 2007 年も継続して実施した。本年は陽性者数 (31 名)、陽性頻度 (1.2/万人) と、ともに前年 (同 39 名、1.4/万人) を下回ったが、依然として高い値を示しており、とくに今年は陽性者数、陽性頻度ともに男性優位 (男 28 vs 女 3、陽性率：男性 1.7/万人 vs 女性 0.3/万人) の傾向が顕著に認められた。3 年間の成績を総合すると、陽性者数 100 名 (男 72 vs 女 28) で男性が多く、陽性頻度は 1.2/万人となった。陽性頻度には地域差が認められ、胆振、上川支庁で高値を示したが、E 型肝炎患者の届出数が多い網走支庁では低かった。陽性者の HEV 遺伝子型は 3 型が大多数を占め、4 型はわずかに約 6% であった。また、陽性者をフォローしたところ、HEV 血症状態が約 2 ヶ月間以上も持続するケースがあり、さらに陽性者の約半数には軽微ながらも ALT 値の上昇が確認されることから、HEV が輸血を介して感染し、E 型肝炎を発症するリスクは低くはないと考えられた。しかしながら同時期、同地域で発生した陽性献血者の HEV 株は比較的高いゲノム相同性を示し、さらに、HEV 陽性者の多くは献血前に動物内臓肉の喫食歴があることから、HEV NAT 陽性者の多くは汚染内臓肉を摂取して HEV に感染した可能性が示唆された。このため HEV 感染を食品衛生の問題として捉え、HEV 感染そのものを無くすための食物感染防止策を早急に講じる必要がある。

#### A. 研究目的

わが国の一般献血者を含む健常者における HEV 感染の実態については一部の調査しかなく、不明な点が多い。本研究では①献血者集団における HEV 感染の実態を早急に調査し、②輸血用血液による HEV 感染のリスク評価を行い、③適切な対策を講じることを目的とした。今年度は昨年に引き続き陽性率が高い北海道地区に限定して研究的 HEV NAT スクリーニングを実施し、一般献血者における HEV 感染の実態を調査した。

#### B. 研究方法

北海道内で 2007 年 1 月から 12 月までに献血し血清学的スクリーニング陰性で、ALT ≤ 60

の検体 265,660 本を対象とした。

HEV RNA の検出は、まず 20 プール血漿検体 265 μL から QIAamp Virus BioRobot MDx Kit (Qiagen) を用いて核酸を抽出し、ORF2/3 領域の 75 塩基をターゲットとするリアルタイム RT-PCR 法により、QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen) を用いて Applied Biosystems 7500 リアルタイム PCR システムで増幅および検出をした。陽性時はプールを構成する 20 検体について個別に検査を実施した。HEV RNA 陽性検体については、抗 HEV IgM 抗体および IgG 抗体を市販試薬 (コスミック) を用いて測定し、また HEV RNA の定量、分子系統樹解析を行った。さらに陽性献血者に対しては、献血前の動物内臓肉喫食歴に関するアン

ケート調査を行うとともに、陽性が判明した献血から6ヵ月以内の遡及調査および献血後追跡調査を行った。

C. 研究結果

2005年から2007年までの3年間のHEV NAT陽性者と発生頻度を表1に示す。2007年のHEV陽性者数は31名(男性28名、女性3名)でその陽性頻度は献血者延1万人当たり1.2人と高い値を示した。特に男性の陽性率は同1.68人と依然として高く、女性の同0.30人と顕著な差が見られた(p=0.001)。

この3年間のHEV NAT陽性者総数は100名(道内在住97名、道外在住3名)に達し、平均陽性頻度は1.2/1万人で、男性同1.4人、女性同0.9人と有意な性差が見られた。HEV NAT陽性者数の年次推移を表1に示す。HEV NATスクリーニングの対象者は、2005年1月から2006年2月までは全献血者で、その後は血清学的検査合格かつALT<61 IU/Lの献血者のみとなった。平均陽性率は1.0/1万人で、男女間の差は認められなかった。2006年以降は検査対象者が減少したが、陽性者数は前年の1.3倍の39名となり、平均陽性率は1.4/1万人と増加した。しかし陽性頻度が増加したのは男性のみで、女性では変化しなかった。2007年は総陽性者数が31名と減少したが、平均陽性率1.2/1万人と高値を維持した。この年は前述したように陽性頻度の男女差がさらに拡大した。

HEV発生状況については3年間を通して季節性はなく散発的である。2006年1月と2007年11月には集団発生も起きている。3年間のHEV NAT陽性者数と道内保健所へのE型肝炎患者届出数とを支庁別に集計したものを図2に示す。いずれの数値も道内で地域差が見られ、HEV NAT陽性者の約半数は人口・献血者の多い石狩支庁(札幌地区)に集中し、保健所届出数は約半数を網走支庁が占めていた。さらにそれらの発生頻度についてみると、NAT陽性頻度(実献血者1万人当たりのHEV NAT陽性者数)に関しては、胆振、上川支庁で高く、また保健所届出頻度(人口1万人当たりの届出数)は網走支庁が顕著に高かった(図3)。

HEV NAT陽性者のまとめを表2に示す。性別については、男:女=72:28と男性が多く、また平均年齢は41±12.5歳であった。検出されたHEVのgenotypeは3型が92例、4型が6例(石狩支庁3名、渡島、胆振、網走各支庁1名)、ウイルス量が極微量のために判別できなかったものが2例あった。また、同地域、同時

期に発生した陽性者の多くはHEVゲノム配列に高い相同性が認められた。陽性判明時のHEV抗体検査結果はIgM、IgGともに陰性が74名、IgMのみ陽性が2名、IgGのみ陽性が6名、IgM、IgGともに陽性が18名であった。喫食歴に関しては、アンケート調査に回答した78名中、59名(76%)が献血前の2ヶ月以内にホルモンやレバーなどの動物内臓肉を摂取していた。

過去6ヵ月以内の献血歴があった39名については、いずれの保管検体からもHEV抗体は検出されなかった。また、陽性判明後1ヵ月以内に2回以上フォローできた陽性者23名中13名(57%)は経過中にALTが60 IU/L以上に上昇した。このうち12名は3型株に感染しており、多くは比較的軽度の上昇(62-382 IU/L)にとどまったが、1名は1,250 IU/Lにまで達した。一方、4型株に感染した1名は3,366 IU/Lの最高値を示した。陽性者のHEV血症状態は陽性判明後2ヶ月以上も持続するケースがあった。一方、3名の陽性者は陽性判明後、1年~1年半経過するとHEV IgG抗体が陰性化した。

表1 HEV NAT陽性者年次推移

	北海道 管内											
	2005年			2006年			2007年			合計		
	男	女	計	男	女	計	男	女	計	男	女	計
検査	177,177	118,271	295,448	187,507	108,181	273,688	188,348	99,312	285,660	511,032	323,764	834,796
陽性数	17	13	30	27	12	39	28	3	31	72	28	100
陽性率(%)	1.0	1.1	1.0	1.6	1.1	1.4	1.7	0.3	1.2	1.4	0.9	1.2

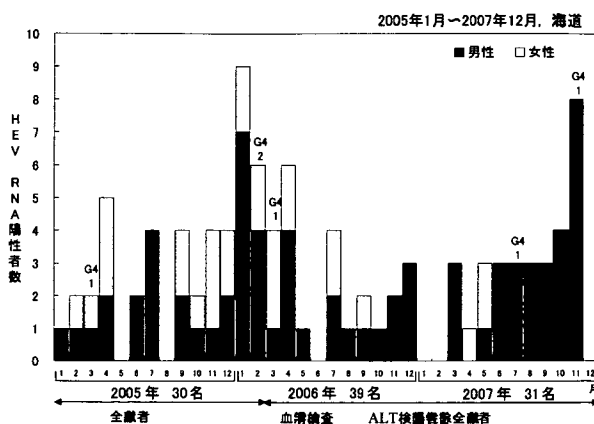


図1 HEV NAT陽性者年次推移



HEV NAT 陽性者の7割以上からはHEV抗体は検出されなかった。このため、HEV感染者の排除にはHEV抗体スクリーニングは有効とは言えず、HEV NATがより適していると考えられる。この導入には莫大なコストが掛かるが、輸血用血液へのHEVの混入はほぼ完全に「水際」で防止することが可能である。しかしながら、それ以前にHEV感染そのものを無くす抜本的な対策を講じる必要がある。当研究班の調査研究により、わが国の主要なHEV感染経路は食物感染であり、HEV感染は食品衛生の問題であることが明らかとなっている。今回の調査でもHEV NAT陽性者の7割以上が献血前に動物内臓肉を摂取しており、また同時期、同地域で発生した陽性者のHEV株は比較的高いゲノム相同性を示していた。さらにその一部はブタ由来株とも高い相同性を示していた。つまりHEV NAT陽性者の多くは、HEV感染動物の内臓肉を摂取して集団感染している可能性がある。従ってこの食品衛生上の問題を改善しない限り、わが国のHEV感染状況は改善されない。事実、この3年間、北海道内献血者におけるHEV陽性頻度はそれほど変わっていないのである。

HEV感染源となる汚染食肉が市場に出回らないよう、食物感染防止策を早急に講じるべきであろう。

## E. 結論

1. 北海道内献血者のHEV RNA陽性率は高く、HEV感染は恒常化している。
2. 北海道内献血者のHEV感染は男性優位の傾向が見られる。
3. 輸血によるHEV感染リスクは低くはない。
4. HEV感染を根本的に防止するための食品衛生上の対策を早急に講じるべきである。

## 研究発表

### 1. 学会発表

- (1) 松林圭二, 坂田秀勝, 武田尋美, 今絵未, 佐藤進一郎, 加藤俊明, 池田久實, 第55回日本輸血・細胞治療学会総会, 2007年5月31日 - 6月2日
- (2) Ikeda H, Sakata H, Matsubayashi K, Kon E, Tokushima E, Tanaka S, Sato S, and Kato T, HEV screening for blood donors, The XVIIth Regional Congress of the ISBT, Europe, Madrid (Spain), 23 - 27 June 2007
- (3) 松林圭二, 坂田秀勝, 武田尋美, 今絵未, 佐藤進一郎, 加藤俊明, 池田久實, 道内献血者におけるE型肝炎ウイルスNATスクリーニング, 第19回北海道輸血シンポジウム, 札幌市, 2007年6月29 - 30日
- (4) 松林圭二, 坂田秀勝, 徳島恵里奈, 田中聖子, 佐藤進一郎, 加藤俊明, 池田久實, HEV RNA陽性献血者血液を輸血された患者症例の解析, 第31回日本血液事業学会総会, 高松市, 2007年10月3 - 5日
- (5) 松林圭二, 献血者におけるHEV浸淫状況, 第1回北海道E型肝炎研究会学術集会, 札幌市, 2007年10月27日
- (6) Matsubayashi K, Takeda H, Sakata H, Kon E, Sato S, Kato T, Hino S, Tadokoro K, and Ikeda H, Prevalence of Anti-Hepatitis E Virus among Japanese Blood Donors, The XVIIIth Regional Congress of the ISBT, Asia, Hanoi (Vietnam), 10 - 13 November 2007

## G. 知的所有権の取得状況

該当なし