

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服政策研究事業）  
令和6年度 分担研究報告書  
全国規模の肝炎ウイルス感染状況の把握及びウイルス性肝炎 elimination に向けた  
方策の確立に資する疫学研究

**HDV 診断における総合的アプローチの検討：新規抗体測定法および  
ユニバーサル HDV RT リアルタイム PCR の開発**

高橋和明<sup>1)</sup> 山本旭麻<sup>2)</sup> 山崎一美<sup>3)</sup> Ko Ko<sup>1)</sup> 東浦彰史<sup>2)</sup> 杉山文<sup>1)</sup> 坂口剛正<sup>2)</sup> 田中 純子<sup>1)</sup>

- 1) 広島大学 大学院医系科学研究科 疫学・疾病制御学
- 2) 広島大学 大学院医系科学研究科 ウィルス学
- 3) 国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター

（※本報告には、現在出願準備中の知的財産に関する秘匿情報が含まれるため、一部を黒塗りにしている。）

**研究要旨**

本研究は、D型肝炎ウイルス(HDV)感染の高感度かつ高特異性な診断法の確立を目的とし、HDV抗原(HDAg)の[REDACTED]を標的とした新規抗体検出法の開発と、HDVの全ジェノタイプ(HDV-1~8)に対応可能なユニバーサルリアルタイムRT-PCR法の有用性を検討した。免疫測定法では、従来型ELISAに加え、[REDACTED]を利用したサンドイッチELISA法により、高感度・高特異性なHDV抗体の検出が可能であった。また、リアルタイムRT-PCR法では、本研究で設計したプライマーセットが広範なジェノタイプに対応可能であることが確認された。これらの成果は、HDV感染の正確な診断と疫学的監視に貢献するものである。

**A. 研究目的**

D型肝炎ウイルス(HDV)は、B型肝炎ウイルス(HBV)との共感染または重感染によって重篤な肝疾患を引き起こす病原体である。HDVは遺伝的に多様であり、Genotype 1~8までの複数の遺伝子型が存在するため、全ジェノタイプに対応可能な診断法の開発が求められている。本研究の目的は、(1) HDV抗原の免疫学的特性を応用した高感度・高特異性な抗体検出法の確立、(2) すべてのHDVジェノタイプに対応可能なユニバーサルリアルタイムRT-PCR法の開発とその評価である。

**B. 材料と方法**

**検体**

長崎県五島列島のHBs抗原陽性患者から分離されたHDV RNA陽性検体を使用した。

**HDV抗原の発現と精製**

HDV抗原[REDACTED]の遺伝子をPCRで増幅し、[REDACTED]

[REDACTED]ベクターにクローニングした。さらに、ELISA用に[REDACTED]タグを付加した構造体も作製した。構築した発現ベクターはBL21(DE3)大腸菌株に導入し、大腸菌はLB培地で37°Cで培養し、OD600nmが0.6に達した時点で1mM IPTGを添加してタンパク質の発現を誘導した。20°Cで一晩培養後、Ni-NTAアフィニティクロマトグラフィー、透析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過によりタンパク質を精製した。

**HDV抗体測定法**

**従来型ELISA法**：精製したHDAg[REDACTED]を固相化し、ヒト血清中のHDV抗体(IgGおよびIgM)を検出。酵素標識二次抗体を用いて検出を行った。

**サンドイッチELISA法**：[REDACTED]タグを付加したHDAgを用いて、固相リガンドとトレーサリガンドは、いずれも同一の抗原に由来するものであり、抗原-抗体-抗原のサンドイッチ構造を形成し、高い特異性を目指した。

## ユニバーサル HDV RT リアルタイム PCR の開発

GenBank より HDV Genotype 1~8 の塩基配列を取得し、多重配列アラインメントにより保存領域を同定。Jackson らの既存プライマーセット (A セット) と、本研究で新規設計したプライマーセット (B~D) を用い(Fig.1)、人工合成遺伝子(HDV Genotype 1~8 および臨床検体にて検出性能(感度・特異性)を比較した。

## C. 結果

### HDV 遺伝子の解析およびクローニング

検体由来の HDV RNA は全長 1,683 塩基であり、日本で報告された HDV Genotype 2 (HDV-JS 株) と 94.2% の塩基配列相同性を示した (Fig.2)。この RNA から合成した cDNA より HDAg の [REDACTED] 領域を増幅し、[REDACTED] ベクターにクローニングした。また、ELISA 用に [REDACTED] タグ付き変異体も構築した。

### HDV 抗原の発現と精製

形質転換大腸菌において発現を誘導後、タンパク質は段階的な精製により高純度で得られた (Fig.3)。この結果、ELISA 用途に適した抗原を安定的に製造できることが確認された。

### HDV 抗体測定の評価

精製 HDV 抗原 [REDACTED] を用いた従来型 ELISA 法では、HDV IgG 抗体を高感度かつ高特異性に検出可能であった (Fig.4)。サンドイッチ ELISA 法でも高い特異性と安定性が得られた。

### リアルタイム RT-PCR 法による HDV RNA 検出性能の比較

Jackson らの A セットでは、Genotype 2、3、4、および 8 に対して感度のやや低下が見られた。一方で、本研究の B セットは Genotype 1~8 すべてに対して安定した感度を示し、最も高い汎用性を有していた (Fig.5)。

臨床検体による評価でも B および C セットが高感度であり、D、A の順に感度が低下した。

## D. 考察

[REDACTED]  
を含む HDV 抗原 [REDACTED] を導入することにより、抗体との親和性の向上および背景シグナルの低減が期待された。実際に、本抗原は高純度かつ安定的に発現および精製が可能であり、抗体検出用抗原として有用であることが示された。サンドイッチ ELISA 法は、[REDACTED] の利用により抗体検出の特異性を大幅に向上させた。一方、HDV は年間  $3.18 \times 10^{-3}$  塩基置換／サイトという高い進化速度を持つため、診断法には遺伝的多様性への対応が求められる。本研究で使用したユニバーサル HDV RT リアルタイム PCR は保存領域に基づいたプライマー設計により、この多様性に対応しており、特に B セットの有用性が明らかとなった。今後もプライマーおよびプローブの定期的な見直しが不可欠である。

## E. 結論

本研究では、HDV 抗原 [REDACTED] を用いた新規抗体測定法と、HDV Genotype 1~8 に対応可能なユニバーサルリアルタイム RT-PCR 法を開発し、その有用性を実証した。これらの診断法は感度・特異性の点で優れており、HDV 感染の早期診断、治療モニタリング、公衆衛生上の疫学的監視において極めて有用である。今後は臨床検体を用いたさらなる検証や、定量性・再現性を含めた精度管理の確立が望まれる。

## F. 健康危険情報

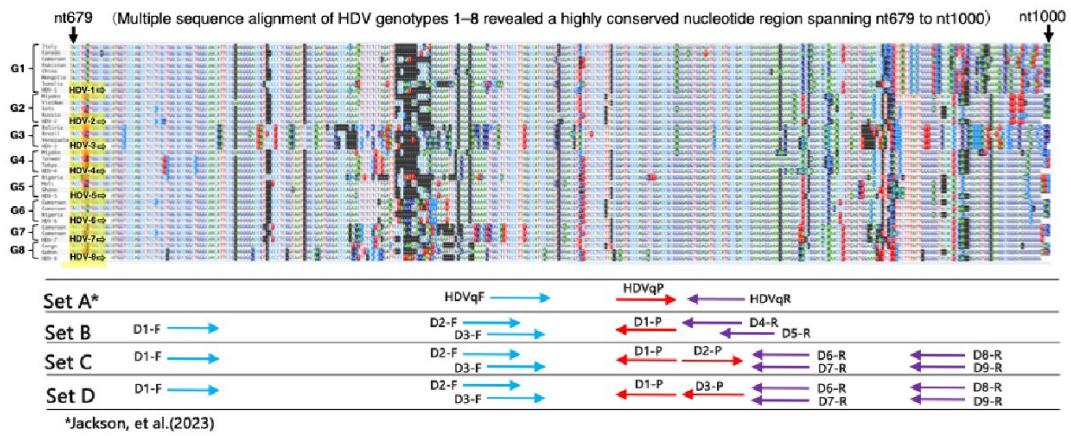
特になし。

## G. 研究発表

- 論文発表  
特になし。
- 学会発表  
特になし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

準備中。



**Fig 1** .Schematic representation of primer and probe locations in four real-time RT-PCR assays targeting HDV RNA. Set A was based on previously reported designs, while Sets B to D were newly designed in this study. Red arrows indicate TaqMan probes, blue lines indicate forward primers, and green lines indicate reverse primers. Yellow segments represent synthetic gene fragments corresponding to HDV genotypes 1–8.

The following primers and probes were in-house designed and used for the experiment.

HDVqF;5'-TGGCTCTCCCTTAGCCATCCGA-3', (Jackson)

HDVqP;5'-CGGATGCCAGGTGGACC-3', (Jackson)

HDVqR;5'-GGTCGGCATGGSATCTCCACC-3', (Ja)

D1-1F;5'-GCGCCGGCYGGGCAAC-3',

D2-2F; 5'-GAGAGAAAACTGGCTCTCCCT-3',

D3-3F; 5'-TGGCTCTCCCTTMGCCATCC-3'

D1-P;5'-CGCGGTCCGACCTGGGCATCCG-3',

D2-P;5'-GAGGTGGAGATSCCATGCCGAC-3',

D3-P;5'-GTCGGCATGGSATCTCCACCTC-3'

D4-R; 5'-TCGGCATGGCATCTCCACCTC-3'

D5-R;5'-TTCCTCTCGGGTCGGCATG-3',

D6-R;5'-NSTYCTTCTTCCTCTTCGG-3'

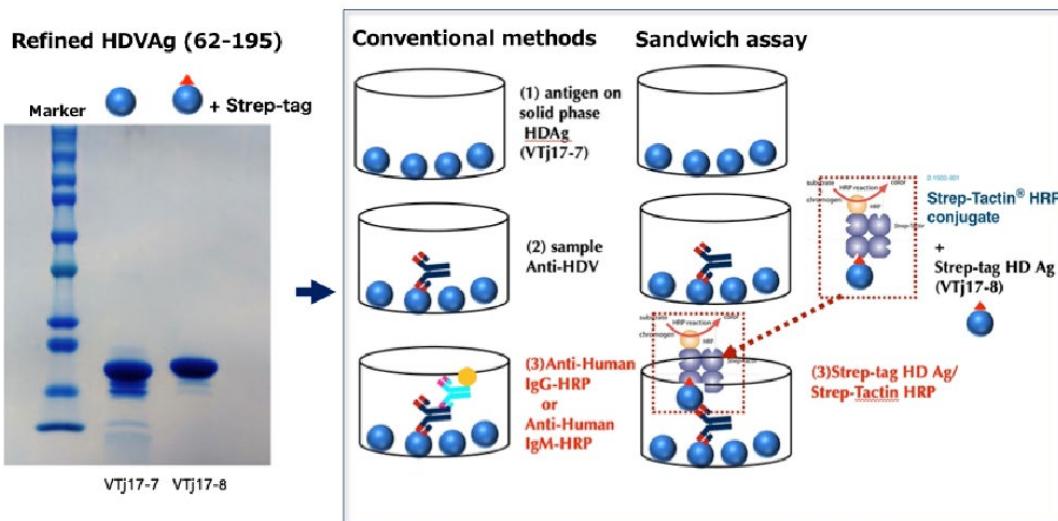
D7-R;5'-YGTCCTYCTTCCCTTCGG-3'

D8-R;5'-GAGTTGTCGWCCCCAGTGAA-3'

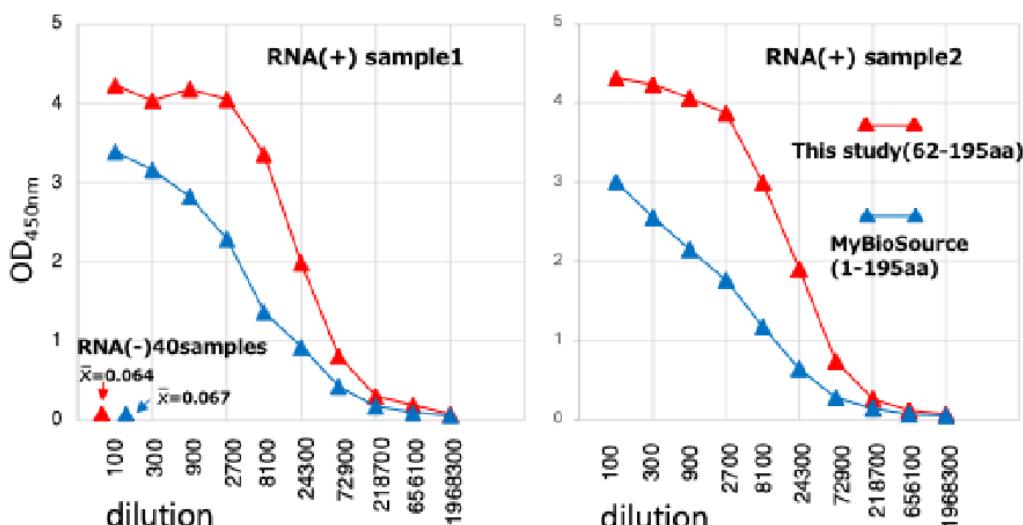
D9-R;5'-CTTCCACTCCTCGAGTGTAC-3'

1993-1994 Academic Year

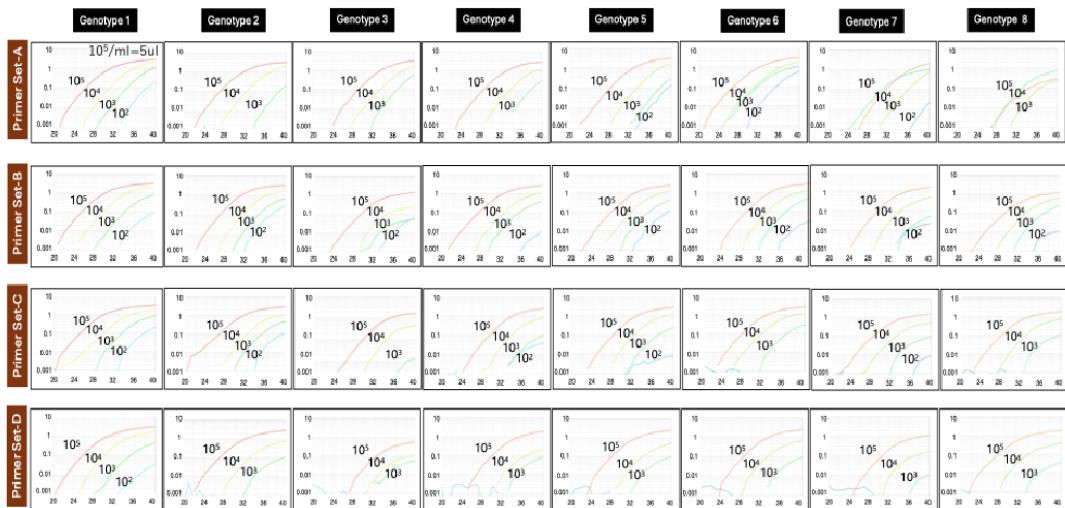
**Fig 2.** Phylogenetic analysis of HDV RNA (1,683 nucleotides) isolated from HBsAg-positive serum samples collected in the Goto Islands, Nagasaki Prefecture. Sequence alignment with reference strains representing all known HDV genotypes classified the isolate as genotype 2, showing 94.2% nucleotide identity with the Japanese HDV-JS strain.



**Fig 3.** Amplification of the gene segment encoding HDV antigen [REDACTED] from genotype 2 HDV RNA was followed by recombinant protein expression in *E. coli* with either a [REDACTED]. The expressed proteins were purified using affinity chromatography, ion exchange, and gel filtration. These antigens served as the basis for developing ELISA assays for anti-HDV antibody detection.



**Fig 4.** Comparative IgG reactivity analysis using the truncated HDV antigen [REDACTED] expressed in this study (red triangles) and a commercially available full-length antigen (aa 1–195; blue triangles). Differences in signal intensity reflect variations in epitope presentation and antibody binding affinity, contributing to the assessment of antigen specificity.



**Fig 5.** Comparison of HDV RNA Detection Sensitivity Using Four Universal Primer Sets (Sets A–D) Across HDV Genotypes G1–G8: Evaluation by Serial Dilution of Synthetic HDV Genomic Constructs

