

財団法人日中医学協会
2007年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2008 年 3 月 11 日

財団法人 日 中 医 学 協 会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 李 天成 
所属機関名： 国立感染症研究所
所属部署： ウイルス第二部 職名： 主任研究官
〒 〒208-0011
所在地： 東京都武蔵村山市学園 4-7-1
電話： 042-561-0771 内線： 357

1. 助 成 金 額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

中国における HEV の感染状況調査

3. 成果の概要 (100字程度)

中国広東省の健常人血清 3864 検体、非 A 非 B 非 C 型の原因不明急性肝炎患者の急性期血清 51 検体、および同じ地域のブタ糞便材料 80 検体を対象に HEV IgG, IgM および HE VRNA を調査した。健常人の IgG 抗体保有率は 5.6%であった。原因不明急性肝炎患者における E 型肝炎発生率が 30%であり、HEV が原因不明急性肝炎の重要な原因ウイルスであることが判明した。ヒト由来 HEV と同じ地域のブタから分離した HEV の塩基配列は極めて類似していたことから、ブタが HEV の重要な宿主であることが推測された。

※発表論文等

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 李天成 職名： 主任研究官
所属機関： 国立感染症研究所 部署： ウイルス第二部
中国側研究者氏名： 柯 昌文 職名： 所長
所属機関： 中国広東省疾病予防コントロールセンター 部署： 微生物検査所

-日中医学協会助成事業-
中国における HEV の感染状況調査

研究者氏名	李 天成
所属機関	国立感染症研究所ウイルス第二部
中国側共同研究代表者	柯 昌文 方 苓
所属機関	中国広東省疾病予防コントロールセンター

要旨

中国広東省の健康人血清 3864 検体、非 A 非 B 非 C 型の原因不明急性肝炎患者の急性期血清 51 検体、および同じ地域の養豚場から月齢の異なるブタ糞便材料 80 検体を採取し、HEV IgG, IgM および HE VRNA を調査した。広東省における健康人の IgG 抗体保有率は 5.6% であった。一方、原因不明急性肝炎患者から IgM 抗体が 17 検体 (30%) 検出され、E 型肝炎ウイルスが原因不明急性肝炎の重要な原因ウイルスであることが明らかになった。患者から分離した HEV と同じ地域のブタから分離した HEV の塩基配列は極めて類似していたことから、ブタが HEV の重要な宿主であることが推測された。

Key Words: E 型肝炎, Hepatitis E virus, Virus-like particles (VLP), ワクチン

緒言

E 型肝炎は E 型肝炎ウイルス (Hepatitis E virus, HEV) の感染によって引き起こされる急性肝炎である。E 型肝炎は糞口経路によって伝播し、東南アジアでは常時流行を繰り返している¹⁾。E 型肝炎の一つの特徴は感染妊婦の死亡率が高いことで、実に 20% に達するという報告もある²⁾。現在、HEV はへペウイルス科に分類され、唯一の属であるへペウイルス属を形成している³⁾。1991 年、Tam らによって HEV 遺伝子の全配列が解明された⁴⁾。以来、多くの株が解析され、HEV には少なくとも 4 つの遺伝子型 (Genotype) が存在することが明らかになっている。

HEV のゲノムは約 7.2Kb のプラス一本鎖 RNA で、約 7,200 塩基である。HEV の遺伝子上には 3 つのオープンリーディングフレーム (ORF1, ORF3 および ORF2) が 5' 末端から一部重複しながら配列している。ORF1 は非構造蛋白をコードする。ORF2 は 72 kDa の構造蛋白をコードする領域である。ORF3 はウイルスの複製に必須ではあるが機能はいまだ不明の蛋白をコードする。

1997 年アメリカで初めて豚からヒト HEV と似たウイルスが分離された⁵⁾。その後、アメリカや日本などの先進各国で E 型肝炎流行地域への海外渡航歴のない急性 E 型肝炎患者が発見された。また、豚から分離したウイルスはサルにも感染することが明らかになった。特にごく最近、日本では加熱不十分なブタの内臓、野生のシカ肉、イノシシの肝臓を喫食し、E 型肝炎を発症した例が報告されるようになった^{6, 7)}。その中には死亡例もあった。上述のことから、E 型肝炎は人獣共通感染症であることも示唆されている。

中国は HEV の流行地域であり、大きな養豚国でもある。アメリカ、台湾、日本でのブタの感染状況から中国のブタも HEV に感染されていると推測される。豚の HEV の感染状況を把握することは中国の食品衛生及び国民健康に非常に重要である。アメリカ、日本では 3 型および 4 型遺伝子 (G3 および G4) を持つ HEV が分離される。一方、中国はこれらとは異なり、主に 1 型 (G1) HEV によって引き起こされてきたが、これまでの実験結果からは、G1 HEV はブタに感染しないことが明らかになっている。さらに散发例の中に G4 HEV がしばしば報告され、今までの流行と異なり、新たな感染源が存在することも考えられる。

本研究では中国広東省を拠点にして健康人抗体保有率、非 A 非 B 非 C 型の原因不明急性肝炎患者およびブタの HEV の感染状況を調査し、この地域の HEV 流行状況を把握するとともに、E 型肝炎におけるブタの役割を調査した。

材料と方法

血清および糞便

健康人血清: 中国広東省に住む健康人の血清 3864 検体を用いた。内訳は男性が 2170 人、女性が 1694 人である。また、都会生活者は 930 人、農村生活者は 2934 人、年齢分布は 1-65 歳である。

急性肝炎患者血清および糞便: 非 A 非 B 非 C 型の原因不明急性肝炎患者 51 人の急性期血清と糞便を広東省の各病院か

ら採取した。BPS で 10% 糞便乳剤を作製し、血清とともに -20℃ に保存して HEV-IgG, IgM および HEV-RNA の検査のために用いた。

ブタ糞便材料：羅湖地域の養豚場から二ヶ月、三ヶ月、四ヶ月、五ヶ月齢のブタの糞便をそれぞれ 20 検体採取した。10% 糞便乳剤を作製し、-20℃ に保存して HEV-RNA の検査に用いた。

ELISA 法による抗 HEV IgG および IgM 抗体の検出

組換えバキュロウイルス発現システムを用いて作製した E 型肝炎ウイルス様中空粒子 (HEV VLPs) (1 μ g/ml) を 96-well のマイクロプレートに各ウェルに加え、4℃ で一晩コーティングした。使用時に 150 μ l の 5% スキムミルク入り PBS-T を加え、37℃ で 2 時間ブロッキングを行ったあと、PBS-T で 3 回洗浄した。その後、血清を 1% スキムミルク入り PBS-T で 200 倍に希釈し、100 μ l を各ウェルに加え、37℃ で一時間反応させた。PBS-T で 3 回洗浄して、1% スキムミルク入り PBS-T で希釈した抗ヒト IgG F(ab')₂-HRP あるいは抗ヒト IgM (5Fcu)-HRP を 100 μ l 各ウェルに加え、37℃ で 1 時間反応させた。同じ洗浄条件で 3 回洗浄したあと、100 μ l の OPD 発色試薬を各ウェルに加え、室温で遮光して 30 分間反応させた。50 μ l の 4N 硫酸を各ウェルに加えて反応を停止し、492 nm で OD 値を測定した。

判定基準：IgG も IgM も OD 値が 0.15 以上のときを陽性とした。この基準は抗 HEV-IgG、IgM 抗体陰性である検体の平均 OD 値プラス 3SD で算出した。

HEV 構造蛋白遺伝子の増幅

RNA 抽出：RNAzol を用いて血清あるいは糞便から RNA を抽出し、20 μ l の滅菌蒸留水に溶かして -20℃ に凍結保存した。

cDNA の合成：抽出 RNA を 5 μ l 加え、さらに 9 μ l の滅菌蒸留水と 1 μ l の プライマー-HEV-R2 を加え、99℃ で 1 分間加熱する。その後、速やか急冷する。1 μ l の RNase inhibitor、2 μ l Reverse transcriptase buffer、1 μ l の 25mM dNTPs および 1 μ l の Avian Myeloblastosis Virus 由来逆転写酵素を加えて全量を 20 μ l とし、42℃ で 2 時間反応後、使用まで -20℃ で保存する。

PCR：cDNA を鋳型として、センスプライマー-HEV-F1：5'-TAYCGHAAYCAAGGHTGGCG-3' およびアンチセンスプライマー-HEV-R2：5'-TGYTGGTTRTCRTARTCTG-3' を用いて以下の条件下で 1st PCR を行った。95℃ で 30 秒間熱変性、55℃ で 30 秒間アニーリングおよび 72℃ で 45 秒間、伸長の各反応を 35 回繰り返した後、72℃ で 7 分間の伸長反応を行った。Nested PCR は 1st PCR 産物を鋳型にして、センスプライマー-HEV-F2：5'-GGBGTBGCNGAGGAGGAGGC-3' および Nested PCR アンチセンスプライマー-HEV-R1：5'-CGACGAAATYAATTCTGTCG-3' を用いて、同じ条件で反応した。反応産物を 2% アガロースゲルで電気泳動後、増幅した DNA 断片 (378bp) を確認した。陽性サンプルの RT-PCR 産物を精製して、塩基配列を解析し、増幅される領域の塩基配列に基づき遺伝子系統解析することによって遺伝子型を同定した。

結果

広東省における HEV 抗体保有率

健康人 3844 人の血清を用いて HEV 抗体検査の結果、215 人が HEV 抗体陽性であり、抗体の保有率は 5.6% であった。その中、男性、女性の抗体保有率はそれぞれ 5.7% と 5.4% であり、両者に有意な差はなかった ($P < 0.05$)。また、都会生活者と農村生活者の抗体保有率はそれぞれ 6.7%、5.2% であり、この場合も有意な差は認められなかった ($P < 0.05$)。年齢別の抗体保有率は 5 歳以下：2.2%、6-10 歳：3.1%、11-20 歳：3.4%、21-30 歳：8.1%、31-40 歳：9.5%、41-50 歳：13.2%、51 歳以上：17.2% であり、年齢の増加とともに抗体保有率が上がる傾向が明らかに示された (図 1)。

急性肝炎患者における E 型肝炎の検出状況

非 A 非 B 非 C 型の原因不明急性肝炎患者 51 人の急性期血清を用い、HEV IgG と IgM 抗体を検査した。その結果、17 検体は HEV IgG と IgM がともに陽性であった。つまり、この 17 人の患者は E 型肝炎であると診断できる。したがって広東省での非 A 非 B 非 C 型の原因不明急性肝炎における E 型肝炎の検出率は 30% であった。さらに急性期患者血清あるいは糞便を用いて RT-PCR 法で HEV RNA を調べた。その中患者血清 6 検体、患者糞便 3 検体から HEV RNA が検出された。遺伝子型はいずれも G4 であった。各株間のホモロジーは 82.0-92.3% であった。この結果、広東省では HEV が非 A 非 B 非 C 型原因不明急性肝炎の重要な原因ウイルスであることが明らかになった。

ブタにおける HEV 保有状況

広東省羅湖地域の養豚場から集めた 80 検体のブタ糞便から RNA を抽出し、HEV 特異的なプライマーを用いて RT-PCR 法で HEV 遺伝子の増幅をした。その結果、ブタ糞便 5 検体から HEV RNA を検出した。内訳は 3 ヶ月齢のブタからの 3 例、5 ヶ月齢のブタからの 2 例であった。塩基配列解析の結果、検出した HEV は全て G4 であった。各株間のホモロジーは 94.37-99.40% であった。

人由来 HEV とブタ由来 HEV の比較

急性 E 型肝炎患者由来 HEV とブタ由来 HEV について遺伝子系統解析法を用いて比較した。図 2 に示したように急性 E 型肝炎患者から分離した 9 株の HEV は 4 クラスターに分類された。人由来 HEV 株 China-GZ-227、China-GZ-243、China-GZ-230 はそれぞれ異なるクラスターに、China-GZ-26、China-GZ-28、China-GZ-29、China-GZ-44、China-GZ-67 および China-GZ-892 は同じクラスターに分類された。また、広東省の養豚場のブタから分離した HEV 株 (China-GZ-308-Swine、China-GZ-314-Swine、China-GZ-339-Swine、China-GZ-501-Swine、China-GZ-502-Swine) もすべてこのクラスターに分類された。患者分離株 China-GZ-227、China-GZ-243、China-GZ-230 はブタから分離株とのホモロジーは 85% 以下にとどまり、この 3 例の感染源はこの地域のブタ由来ではないことが推測される。一方、ブタ分離株のクラスターにおけるウイルス株間のホモロジーが 93.2-99.4% であり、特にブタ分離株 China-314-Swine と患者分離株 China-26 のホモロジーは高く、98.8% にも上った。ブタが保有している HEV はヒトに急性 E 型肝炎を引き起こすウイルスと極めて似ているが明らかになった。以上の結果は広東省の患者から分離した HEV が同じ G4 に属しているにもかかわらず、遺伝子が多様であること示し、異なる感染源が存在することが示唆された。さらにブタからヒト由来 HEV 株ときわめて類似するウイルスが分離されることから、ブタ由来 HEV とヒトの急性 E 型肝炎が密接に関連していることが示された。

考察

HEV はアジアにおける流行性肝炎の最も重要な病因ウイルスである。伝播は糞口経路によるが、大部分は水系感染である。1955 年ニューデリーで、共通感染源による E 型肝炎が流行したが、これは糞便で汚染された飲用上水が原因であった。この流行では黄疸性肝炎と診断された症例だけでも 29,000 人に及んだ。これに似た水系感染流行が中国新疆自治区でも報告されている⁹⁾。近年中国の衛環境は改善されて、都会では大規模な流行はほとんど報告されたことがない。ただし、散発例の報告がしばしばあり、広東省でも近年 E 型肝炎症例が増加する傾向があった。その原因を究明するうえで E 型肝炎感染源明らかにすることが必要である。

我々は HEV の構造蛋白を組換えバキュロウイルスを用いて HEV の中空ウイルス様粒子 (VLP) を作製することを世界に先駆けて成功した⁹⁾。この VLP の構造を解析し、特にその表面構造がネイティブな感染性粒子と同一の免疫原性を有していることを示した。VLP を用いて高感度の抗体検出 ELISA 系を確立し、高感度かつ大量に簡便に血中抗体の検査を可能にした¹⁰⁾。この抗体検査系を用いて広東省に生活する健常人 3864 人の血中 HEV-IgG 抗体を調べた結果、抗体の保有率は 5.6% であり、日本における抗体保有率はほとんど同じであった。年齢別抗体保有率を見ると、年齢の増加に伴い抗体保有率が高くなる傾向が見られた。20 歳以下の健常人の抗体保有率は低く、HEV に感染するリスクが高いと考えられる。

これまでに感度と特性ともに優れる診断キットがないため、非 A 非 B 非 C 型急性肝炎は原因不明肝炎と診断されたことが多い。今回我々開発した ELISA 法を用い、51 例の非 A 非 B 非 C 型急性肝炎を調べた結果、17 人の急性肝炎患者から特異的に HEV IgG と IgM が同時に検出された。HEV IgM の検出は急性 E 型肝炎の有力な根拠であるため、この方法は急性 E 型肝炎の臨床診断に非常に有用である。また、非 A 非 B 非 C 型急性肝炎には急性 E 型肝炎が 30% 占めたことから、HEV が中国では急性肝炎の重要な原因ウイルスであると考えられた。急性 E 型肝炎に有効な対策として、迅速な且つ正確な診断が必要であり、E 型肝炎を予防するには E 型肝炎ワクチンの開発も急務である。また、9 人の HEV IgM 陽性患者の血清あるいは便材料から HEV RNA が分離された。遺伝子系統解析の結果、9 株の遺伝子型はすべて G4 であった。同じ広東省の養豚場から分離したブタ HEV と高い相同性を持ち、ブタが保有するウイルスは人にも感染することが強く示唆された。つまり、今回の研究結果からも E 型肝炎が人畜共通感染症であることが示唆された。

これまでに中国で大流行を引き起こした HEV は G1 であったし、散発例でも G1 が多かった。しかし、今回散発例から検出した HEV とブタから分離した HEV は全部 G4 であった。また、日本で検出された中国からの輸入感例も主に G4 であった。これらの結果は中国における散発例の急性 E 型肝炎を引き起こすウイルスの遺伝子型が G4 に変わってきたとも考えられる。G1 と G4 HEV の大きな違いとして、宿主の違いが挙げられる。G1 はヒトにしか感染しないのに対して、G4 はヒトにもブタにも感染する。G4 HEV 肝炎の増加はブタ由来 HEV と関連する可能性が高い。今後も、さらに多くの臨床検体およびブタ糞便を採取して検討する必要がある。

参考文献

- 1) Jameel S, et al.: Enteric non-A, non-B hepatitis: epidemics, animal transmission, and hepatitis E virus detection by the polymerase chain reaction. J. Med. Virol. 1992;37(4):263-270.

- 2) Khuroo MS, et al: Incidence and severity of viral hepatitis in pregnancy. Am. J. Med. 1981;70:252-255.
- 3) Emerson SU, et al: Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV. London: Elsevier/Academic Press. 853-857.
- 4) Tam AW, et al: Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. Virology 1991;185(1):120-131.
- 5) Meng XJ, et al: A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997;94:9860-9865.
- 6) Tei S , et al: Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. Lancet 2003;362(9381):371-373.
- 7) T-C Li, et al.: Zoonotic foodborne transmission of Hepatitis E virus. Emerg Infect Dis. 2005;11:1958-60.
- 8) Purcell RH: 1996. Hepatitis E virus, p. 2831-2843. In B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), Fields virology, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- 9) T-C, Li., et al. Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. J Virol. 1997;71:7207-7213.
- 10) T-C Li, et al: An empty virus-like particle-based enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to hepatitis E virus. J Med Virol 2000;62:327-333.

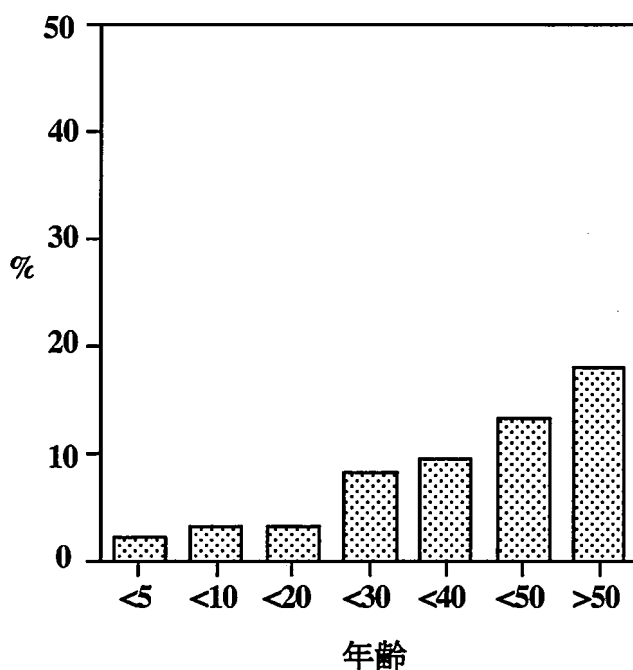


図1：各年齢層における抗体保有率

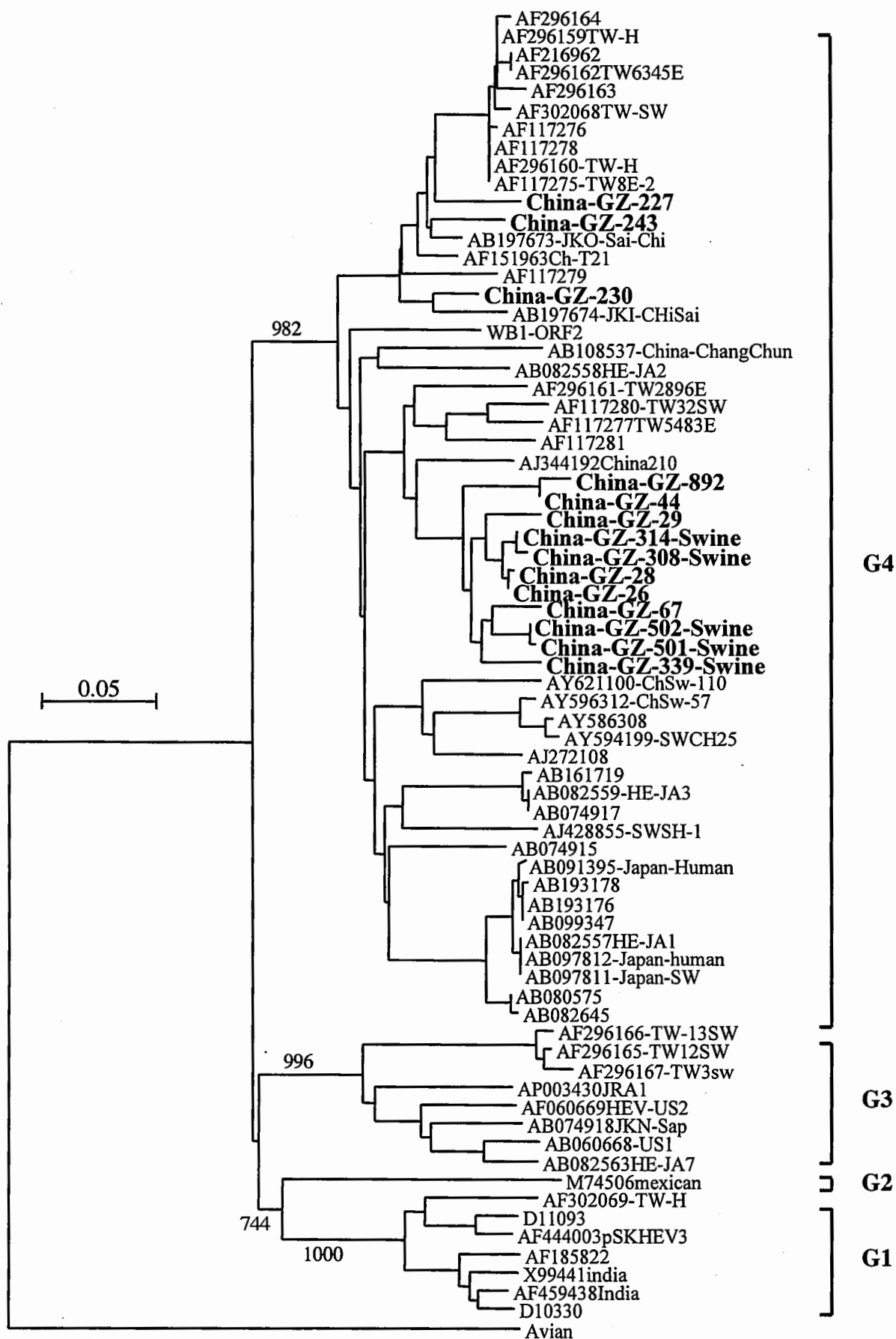


図 2 : HEVの系統樹 ORF2の一部塩基配列 (338bp) に基づく系統樹。

作成日 : 2008年3月10日