

# 学 位 論 文 要 旨

氏名 米満 研三

題 目 : Establishment of ELISA for hepatitis E virus and the epidemiological studies  
(E 型肝炎ウイルスの ELISA 系の開発と疫学調査)

## 論文要旨 :

E 型肝炎はウイルス性の急性肝炎であり、E 型肝炎ウイルス(HEV)の感染によって引き起こされる。ヒトに感染する HEV の主な遺伝子型として、遺伝子型 1 から 4 が知られている。遺伝子型 1 と 2 はヒトにのみ感染し、発展途上国において糞口経路により伝播し、しばしば大規模な流行が発生している。遺伝子型 3 と 4 はブタ肉などの喫食に起因する人獣共通感染症として知られており、日本も含め世界中で散発的な発生が認められる。

近年、HEV やその関連ウイルスが様々な動物種から検出されている。ヒトに感染する HEV に近縁なウイルスがウサギ、マングース、イノシシ、ラクダなどから、また、HEV 関連ウイルスがフェレット、ラット、コウモリ、ニワトリなどから見つかっている。

本研究では、様々な動物における HEV の感染状況や、動物からヒトへの感染リスク、HEV の自然界における生態を解明することを目的として、HEV に対する抗体を検出する簡便かつ安価な検査系を確立し、疫学調査を実施した。

### 第 1 章 全ての動物種に適用可能である簡便・特異的な抗 HEV 抗体検出系の確立

本章では、様々な動物種において血清疫学調査を行うために、すべての動物種に適用可能な抗 HEV 抗体を検出するための ELISA 診断系の構築を行った。

HEV の ORF2 タンパク質をコードする遺伝子を pCAGGS プラスミドにクローニングした。プラスミドを導入した HEK293T 細胞の溶解液を ELISA に用いる抗原とした。また、様々な動物種に適用するために、抗体検出試薬として protein A/G を使用した。

山口県および和歌山県のイノシシ検体を使用し、従来用いていた HEV のウイルス様粒子を抗原とした ELISA と比較した結果、新規に作製した ELISA は高い感度・特異度を有していることがわかった。山口県のイノシシは 364 頭中 111 頭(30.5%)が陽性であることがわかった。さらに新規作製した ELISA を用いて抗体検出を実施したところ、日本の狩猟者、イヌ、ネコ、フェレットから抗 HEV 抗体が検出された。

本研究において作製された ELISA は、遺伝子導入した細胞を溶解するだけで抗原を作製できることから、従来の方法に比べて非常に安価・簡便に抗原作製が可能である。また、protein A/G を使用することで様々な動物種において適用可能であることが示された。

## 第 2 章 Meat juice からの抗ウイルス抗体検出系の確立

野生動物における各種感染症の感染状況を行う上で、血清疫学調査が最も効率的な方法である。しかし、血清収集には分離のための機器が必要であり、野生動物の血清の回収を行うことは容易ではない。本章では、血清に代わる材料として、筋肉からの滲出液である Meat juice を用いた抗体検出法を確立し、その評価を行なった。抗 HEV 抗体検出に加え、日本脳炎ウイルス(JEV)についても抗体検出を実施した。

山口県のイノシシ 48 頭から血清、心臓、横隔膜を回収した。心臓及び横隔膜は冷凍後、解凍することにより Meat juice を得た。抗 HEV 抗体の検出には、新規作製した ELISA を実施した。抗 JEV 抗体検出には、JEV 感染細胞溶解液を抗原とした ELISA を行なった。一次抗体として血清及び Meat juice を使用し、抗体検出試薬として protein A/G を使用した。

ELISA を実施した結果、Meat juice から抗 HEV および JEV 抗体の検出に成功した。心臓及び横隔膜から回収した Meat juice を用いた ELISA の吸光度は、血清を用いた ELISA の吸光度とよく相関した。Meat juice を 20 倍希釈で用いた時の吸光度が血清 100 倍希釈の吸光度と類似していた。

Meat juice を用いた抗体検出の結果から、Meat juice にはおよそ血清の 5 分の 1 の濃度の抗体が存在していることが示された。Meat juice は特別な施設や機器がなくても容易に得られ、ELISA による抗体検出に有用であることがわかった。

## 第 3 章 日本全国のイノシシ・シカの E 型肝炎ウイルス感染状況調査

本章では、日本のイノシシ、シカにおける HEV 感染状況調査を実施した。日本全国から集められた血清を用い、ELISA による抗体検出、RT-PCR による HEV 遺伝子検出を行った。

イノシシ 1556 頭中 258 頭(16.6%)が抗 HEV 抗体陽性となった。HEV 遺伝子はイノシシ 1072 頭中 20 頭(1.9%)から検出された。シカは 1282 頭中 3 頭(0.2%)が抗体陽性であった。低い抗体陽性率にも関わらず、1 頭のシカからは HEV 遺伝子が検出された。血清および肝臓検体から、PLC/PRF/5 細胞を用いたウイルス分離を試みた結果、千葉県のイノシシの検体から HEV の分離に成功した。

以上の結果から、日本のイノシシは抗体、遺伝子ともに陽性率が高く、HEV の主要なレゼルボアであると再確認された。日本のシカはほとんど感染していないことがわかったが、1 頭からは遺伝子が検出されたことから、HEV の感染源として注意する必要があると考えられる。

本研究で、抗 HEV 抗体を検出するための新規 ELISA が確立され、その有用性が示された。ELISA 抗原の作製は従来の方法に比べて非常に簡便であり、また、様々な動物種に適用可能であった。また、Meat juice からの抗ウイルス抗体検出に成功し、血清との高い相関が示された。Meat juice を使用することでこれまで検体収集の難しかった動物種、地域においても抗体検出が可能となった。最後に、イノシシ、シカにおける全国的な感染状況調査の結果から、イノシシが日本における HEV の主要なレゼルボアであると再確認された。

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	米満 研三
審査委員	主査：山口大学 教授 前田 健
	副査：山口大学 教授 岩田 祐之
	副査：山口大学 教授 佐藤 宏
	副査：山口大学 准教授 下田 宙
	副査：鹿児島大学 准教授 安藤 匡子
題目	Establishment of ELISA for hepatitis E virus and the epidemiological studies (E 型肝炎ウイルスの ELISA 系の開発と疫学調査)
審査結果の要旨： E 型肝炎はウイルス性の急性肝炎であり、E 型肝炎ウイルス(HEV)の感染によって引き起こされる。ヒトに感染する HEV の主な遺伝子型として、遺伝子型 1 から 4 が知られている。遺伝子型 1 と 2 はヒトにのみ感染し、発展途上国において糞口経路により伝播し、しばしば大規模な流行が発生している。遺伝子型 3 と 4 はブタ肉などの喫食に起因する人獣共通感染症であり、日本も含め世界中で散発的な発生が認められる。近年、HEV やその関連ウイルスが様々な動物種から検出されている。ヒトに感染する HEV に近縁なウイルスがウサギ、イノシシ、ラクダなどから、また、HEV 関連ウイルスがフェレット、ラット、コウモリ、ニワトリなどから見つかっている。本研究では、様々な動物における HEV の感染状況や、動物からヒトへの感染リスク、HEV の自然界における生態を解明することを目的として、HEV に対する抗体を検出する簡便かつ安価な検査系を確立し、疫学調査を実施した。  第 1 章 全ての動物種に適用可能である簡便・特異的な抗 HEV 抗体検出系の確立 本章では、様々な動物種において血清疫学調査を行うために、すべての動物種に適用可能な抗 HEV 抗体を検出するための ELISA 診断系の構築を行った。HEV の ORF2 タンパク質をコードする遺伝子を pCAGGS プラスミドにクローニングした。プラスミドを導入した IIEK293T 細胞の溶解液を ELISA に用いる抗原とした。また、様々な動物種に適用するために、抗体検出試薬として protein A/G を使用した。山口県および和歌山県のイノシシ検体を使用し、従来用いていた HEV のウイルス様粒子を抗原とした ELISA と比較した結果、新規に作製した ELISA は高い感度・特異度を有していることがわかった。山口県のイノシシは 364 頭中 111 頭(30.5%)が陽性であることがわかった。さらに新規作製した ELISA を用いて抗体検	

出を実施したところ、日本の狩猟者、イヌ、ネコ、フェレットから抗 HEV 抗体が検出された。本研究において作製された ELISA は、遺伝子導入した細胞を溶解するだけで抗原を作製できることから、従来の方法に比べて非常に安価・簡便に抗原作製が可能である。また、protein A/G を使用することで様々な動物種において適用可能であることが示された。

## 第 2 章 Meat juice からの抗ウイルス抗体検出系の確立

野生動物における各種感染症の感染状況を行う上で、血清疫学調査が最も効率的な方法である。しかし、血清収集には分離のための機器が必要であり、野生動物の血清の回収を行うことは容易ではない。本章では、血清に代わる材料として、筋肉からの滲出液である Meat juice を用いた抗体検出法を確立し、その評価を行なった。抗 HEV 抗体検出に加え、日本脳炎ウイルス(JEV)についても抗体検出を実施した。山口県のイノシシ 48 頭から血清、心臓、横隔膜を回収した。心臓及び横隔膜は冷凍後、解凍することにより Meat juice を得た。抗 HEV 抗体の検出には、前章で作製した ELISA を用いた。抗 JEV 抗体検出には、JEV 感染細胞溶解液を抗原とした ELISA を行なった。一次抗体として血清及び Meat juice を使用し、抗体検出試薬として protein A/G を使用した。ELISA を実施した結果、Meat juice から抗 HEV および JEV 抗体の検出に成功した。心臓及び横隔膜から回収した Meat juice を用いた ELISA の吸光度は、血清を用いた ELISA の吸光度とよく相関した。Meat juice を 20 倍希釈で用いた時の吸光度が血清 100 倍希釈の吸光度と類似していた。Meat juice を用いた抗体検出の結果から、Meat juice にはおよそ血清の 5 分の 1 の濃度の抗体が存在していることが示された。Meat juice は特別な施設や機器がなくても容易に得られ、ELISA による抗体検出に有用であることが確認された。

## 第 3 章 日本全国のイノシシ・シカの E 型肝炎ウイルス感染状況調査

本章では、日本のイノシシ、シカにおける HEV 感染状況調査を実施した。日本全国から集められた血清を用い、ELISA による抗体検出、RT-PCR による HEV 遺伝子検出を行った。イノシシ 1556 頭中 258 頭(16.6%)が抗 HEV 抗体陽性となった。HEV 遺伝子はイノシシ 1072 頭中 20 頭(1.9%)から検出された。シカは 1282 頭中 3 頭(0.2%)が抗体陽性であった。1 頭のシカからは HEV 遺伝子が検出された。血清および肝臓検体から、PLC/PRF/5 細胞を用いたウイルス分離を試みた結果、千葉県イノシシの検体から HEV の分離に成功した。以上の結果から、日本のイノシシは抗体、遺伝子ともに陽性率が高く、HEV の主要なレゼルボアであると再確認された。日本のシカはほとんど感染していないことがわかったが、1 頭からは遺伝子が検出されたことから、HEV の感染源として注意する必要があると考えられた。

本内容は、HEV の検査法に革新的な進歩をもたらすと同時に、開発された検査法を用いた結果、野外における HEV のレゼルボアを確定することに成功した。今後の HEV の対策に重要な手法と知見となる。

以上により、本論文は博士（獣医学）の論文として、妥当なものであると判断された。