

新規に保険収載された検査法 「IgA-HE 抗体価 (定性)」

Detection of IgA-class anti-HEV antibody

おか もと ひろ あき
岡 本 宏 明
Hiroaki OKAMOTO

E型肝炎の診断薬「IgA-HE 抗体価 (定性)」がわが国で初めて保険収載された。本稿では、この測定キットの有用性、測定原理・方法、およびIgAクラスのHEV抗体を測定することのメリットについて述べたい。

I. 初めて保険収載されたE型肝炎診断薬としての有用性

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。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は、E型肝炎は風土病の一つであり、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E型肝炎の流行が見られる。一方、日本を含む先進国では、10年余り前までは、E型肝炎は輸入感染症の一つであり、かつ稀な疾患として認識されていた。しかし、1997年以降、流行国への渡航歴のないE型肝炎症例が欧米等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が知られ、注目を集めることになった^{1,2)}。

わが国では2001年に初めて、国内感染型のE型肝炎症例が報告されるとともに³⁾、国内の飼育ブタでのHEV感染が蔓延状態にあることが判明した⁴⁾。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⁵⁾、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)、海外渡航歴が無いことから「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た^{6,7)}。加えて、飼育ブタや

野生のイノシシやシカなどの動物および市販ブタレバーから、E型肝炎患者由来のHEV株に酷似した遺伝子配列を持つウイルス株が分離され、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型肝炎発症事例が多数報告されている^{8~11)}。このような事実を踏まえ、厚生労働省は2003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た。そして、同年11月5日から施行された改正感染症法において、E型肝炎は四類感染症に分類され、診断後直ちに届け出ることが義務づけられるようになった。

最近の調査結果に基づき、わが国の住民の約500万人はHEVの感染既往を有し、年間約12万人が新たにHEVに感染していると推定されている¹²⁾。また、急性肝炎の患者数が年間3万人とすると、4%(40%を占める非ABC型のうち、10%)¹²⁾に相当する約1,200人がE型肝炎を発症していると想定されるが、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が皆無であるため、実際の届出件数は年間50~70件程度に過ぎない。E型肝炎診断薬の保険収載が臨床現場から切望され続け、2011年10月1日付けでようやく、それが実現された。急性肝炎(肝障害)症例において、A型、B型、C型と並んでE型の検査も同時に行うことが可能になった。これまでに北海道や北東北地域などでの研究レベルでの定点調査が行われてきたが、「IgA-HE 抗体価 (定性)」測定キットの登場によって、広く全国津々浦々の臨床現場でE型肝炎の診断が可能になり、これまで過少評価されてきたわが国におけるE型肝炎の実態がよりの確に把握され、感染源・感染

経路の更なる解明と感染予防対策の推進に大きく寄与することが期待される。

II. 本キットの測定原理・方法

ニワトリやラットからもそれぞれ固有の HEV が分離されているが^{13,14)}、ヒトの HEV は少なくとも 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¹⁵⁾。1 型と 2 型の HEV はヒトのみに感染し、流行地域での風土病としての E 型肝炎の原因となっているのに対して、3 型と 4 型はヒトのみならず、ブタやイノシシなどの動物にも感染し、「人獣共通感染型」の E 型肝炎の原因である。しかし、血清型は 1 種類であり、抗体検出に用いられる抗原の型が 1 種類でも、すべての遺伝子型の HEV 感染に由来する抗体を検出できる。

「IgA-HE 抗体価 (定性)」測定キットは酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA 法) によって、IgA クラスの HEV 抗体を検出する。測定原理の概略は以下のとおりである^{16,17)}。遺伝子型 4 の日本株 (HE-J1 株) の ORF2 (キャプシド) 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している。この HEV 抗原蛋白質は、組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したもので、マイクロプレートの各ウェルにこの精製 HEV 抗原蛋白質が固相化されている。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 mock 蛋白質 (非組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されている。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、偽陽性率は 0.32% から 0.14% に低下した。B/F 分離洗浄の後、horseradish peroxidase を標識した抗ヒト IgA マウスモノクローナル抗体を添加する。なお、IgM 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、抗ヒト IgG マウスモノクローナル抗体を加え、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 で吸光度を測定する。健常人から得られた 675 検体に

ついて測定した結果から mean + 7SD の値を求め、カットオフ値を、IgA クラス HEV 抗体測定において 0.642、IgM クラス HEV 抗体測定において 0.440、IgG クラス HEV 抗体測定において 0.175 とした。それぞれカットオフ値以上の OD 値を示した場合、陽性と判定する。「IgA-HE 抗体価 (定性)」測定キットでは、カットオフ値 0.642 に相当する値として、キットに添付された陽性コントロールの OD 値から陰性コントロールの OD 値を差し引き、それを 2 分の 1 にした値が用いられている。

III. 本キットの感度と特異性

現在のウイルス感染、すなわち急性期の血清診断には、通常、患者血清中の IgM クラスの抗ウイルス抗体が検出される。しかし、IgM クラス抗体測定系一般の問題点として、稀ながら非特異的反応により偽陽性となることが指摘されている。ここで、なぜ IgM クラスではなく、IgA クラスの HEV 抗体測定系が選択されたのか、その根拠となったデータを示す^{16,17)}。HEV RNA が検出され、E 型肝炎と確定診断された患者 (162 例) の血清検体において、160 例 (98.8%) が IgA クラス HEV 抗体陽性と判定された (図 1)。その内訳は、1 型 HEV 感染の E 型肝炎患者検体では 55 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 49 検体中 48 検体 (98.0%) で、また 4 型 HEV 感染の E 型肝炎患者からの 57 検体中 56 検体 (98.2%) で IgA クラス HEV 抗体が陽性と判定された。一方、IgM クラス HEV 抗体は 158 検体 (97.5%) が陽性となるに留まり、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以下の 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)、E 型肝炎確診例において、IgM クラス HEV 抗体測定系では 97.5% の感度に過ぎなかったのに対して、IgA クラス HEV 抗体測定系では 98.8% の感度であり、感度の点で IgA クラス HEV 抗体測定系の方が優れていることが分かった。他のウイルス感染症でも、たとえば A 型や B 型、C 型肝炎ウイルス感染でも、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 (Window) 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

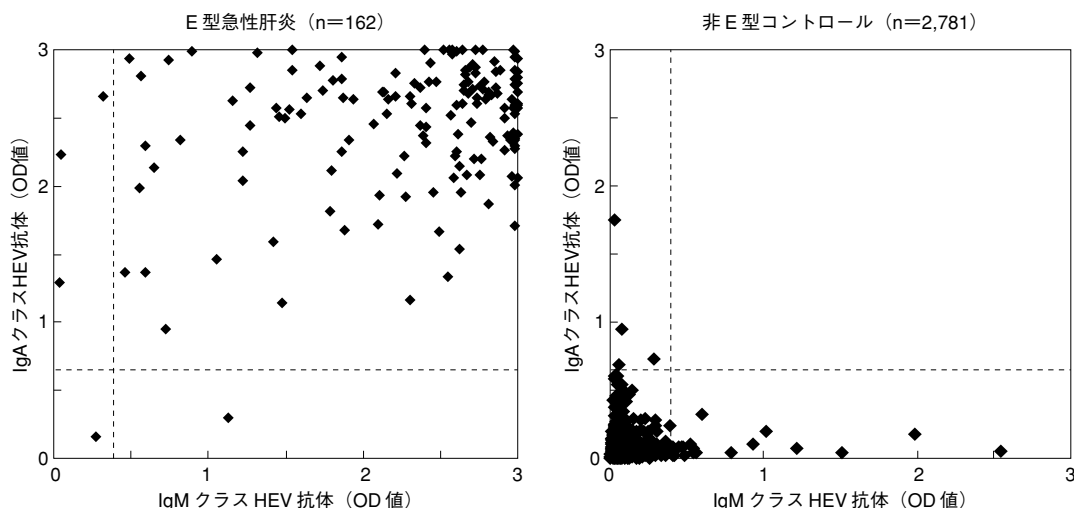


図1 IgMクラスおよびIgAクラスHEV抗体測定ELISAにおけるOD値の分布^{16,17)}
破線はカットオフ値を示す (IgMクラスHEV抗体、OD=0.440; IgAクラスHEV抗体、OD=0.642)。

表1 E型肝炎の初診時血清について測定したIgMクラス
およびIgAクラスのHEV抗体陽性率の比較^{16,17)}

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。

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低め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良く知られており、HEV感染もその例外ではない。実際、発症後7日目、ないし10日目に再測定することにより、この問題をクリアできることはシリーズ検体での測定によって確認されている。

特異性についても、IgMクラスHEV抗体測定系よりもIgAクラスHEV抗体測定系の方が優れていることを示す結果が得られている¹⁶⁾。すなわち、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・肝硬化・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抗体の吸収試験で70%以上のOD値の低下が認められなかったことから、非特異反応による偽陽性と判断された。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、両者が共に陽性である場合にE型肝炎と診断することになると偽陽性率はゼロ%、換言すると特異度は100%となることを示している。しかし、1種類のイムノグロブリンについてHEV抗体を測定し、E型肝炎の診断に用いる場合にはIgAクラスHEV抗体測定系の方がIgMクラスHEV抗体測定系よりも優れているといえる¹⁶⁾。

さらに、E型肝炎発症時からのIgMクラスHEV抗体とIgAクラスHEV抗体の持続陽性期間を、長期経過観察が可能であった15症例について比較検討した (図2)¹⁶⁾。12症例については50日から144

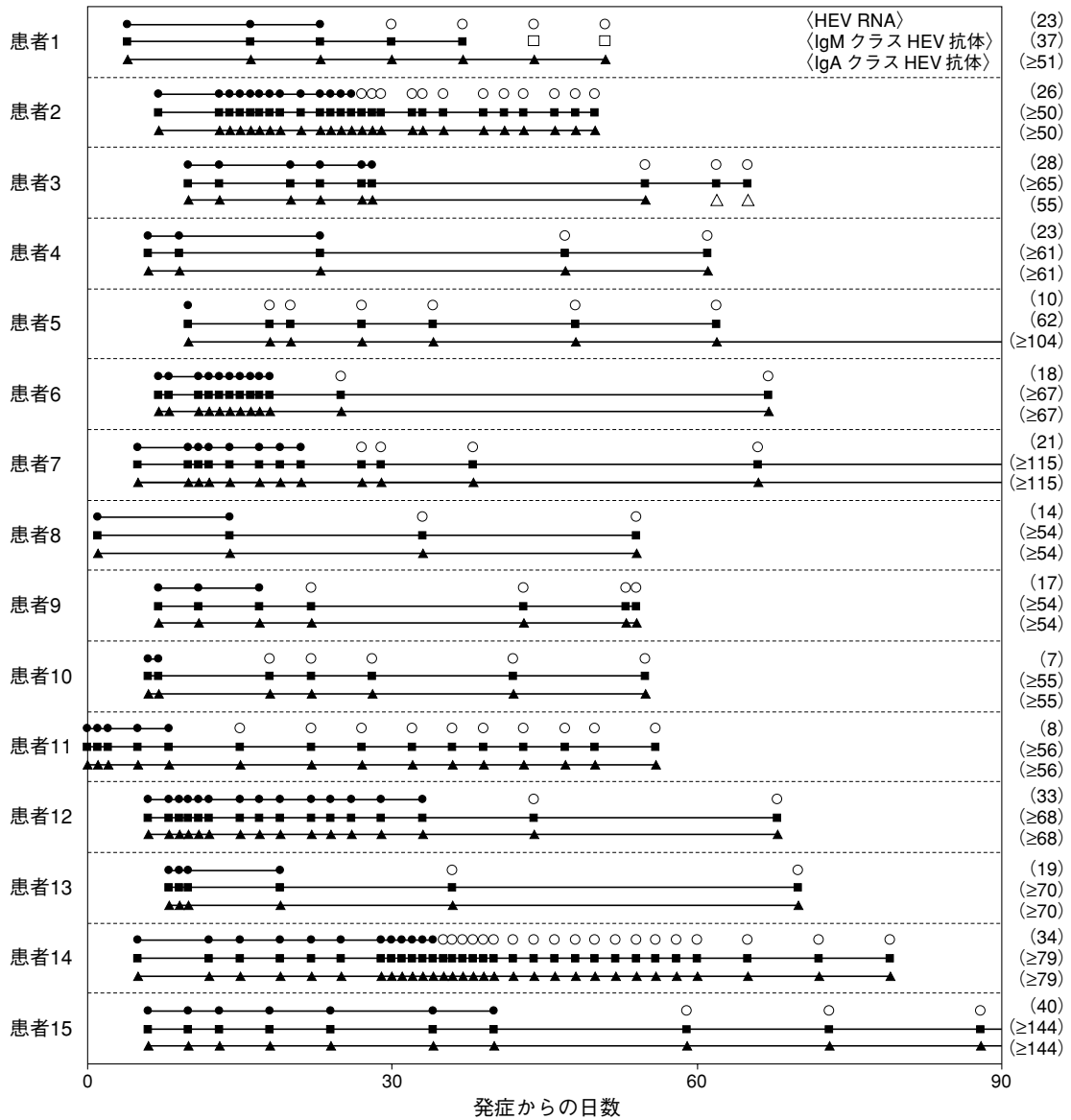


図2 E型肝炎患者15症例での発症後のHEV RNAとIgMクラスHEV抗体、IgAクラスHEV抗体の検出の推移¹⁶⁾

() 内の数値は、最後に陽性と判定された発症後の日数を示す。

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抗体の方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抗体の方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見られず、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判断された。

IV. 本キットの長所と短所

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。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知られており、上述の結果と文献¹⁷⁾に示された結果を合わせると、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) に過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 IgA クラスの抗体測定では 4 倍も少ないということである。また、偽陰性率も 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通りであり (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 抗体測定系、すなわち本キットの長所といえる。

ヒト IgA の欠損例や低下例 (正常の 100 分の 1 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極めて低く、93,020 人の健常献血者のうちわずかに 4 人 (0.004%) に過ぎず、別の 6,800 人を対象とした調査でもわずか 1 人 (0.01%) に過ぎないことが明らかにされている¹⁸⁾。欠損例に限定するとその頻度は 0.001% に過ぎないことから、偽陰性に繋がる頻度はほぼ無視できると考えられ、本キットの短所とはいえない。

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来た。実際、クラミジア (*Chlamydia trachomatis* や *Chlamydia pneumoniae* など) の感染症では IgA クラスの抗体検査試薬が保険収載されており、肝炎ウイルス研究の分野でも、A 型や B 型、C 型肝炎ウイルス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¹⁹⁻²¹⁾。これまでは、IgM クラスの抗体とほぼ同等か、あるいは補足的な性能として評価され、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性の両方で明らかに優っている。したがって、IgA クラス HEV 抗体測定系の短所は、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」ということぐらいである。

おわりに

E 型肝炎を診断するうえでの gold standard は RT-PCR 法による 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原因特定に有用である。「IgA-HE 抗体価 (定性)」測定キットの保険収載によって、E 型肝炎の早期の的確な診断と予防法確立に向けた実態把握の進展が期待される。また、薬物性肝障害や自己免疫性肝障害と診断された症例の中に、HEV マーカーの検査によって、E 型肝炎と確定診断される症例が稀ならず認められることは事実であり²²⁻²⁴⁾、本キットの登場によって、誤診並びに誤診に基づく不適切な治療を回避することも可能となった。

文 献

- 1) Kwo PY, Schlauder GG, Carpenter HA, et al. Acute hepatitis E by a new isolate acquired in the United States. *Mayo Clin Proc* **72** : 1133-1136, 1997.
- 2) Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** : 9860-9865, 1997.
- 3) 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.
- 4) Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, et al. Analysis of the complete genome of indigenous swine hepatitis E virus isolated in Japan. *Biochem Biophys Res Commun* **289** : 929-36, 2001.
- 5) 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.
- 6) Suzuki K, Aikawa T, Okamoto H. Fulminant hepatitis E in Japan. *N Engl J Med* **347** ; 1456, 2002.
- 7) 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.
- 8) Tei S, Kitajima N, Takahashi K, et al. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* **362** : 371-373, 2003.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) Tamada Y, Yano K, Yatsushashi H, et al.: Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *J Hepatol* **40** : 869-873, 2004.
 - 12) 岡本宏明. 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「経口感染する肝炎ウイルス (A型、E型) の感染防止、遺伝的多様性、および治療に関する研究」平成21年度～平成23年度総合研究報告書, 平成24年3月 (研究代表者 岡本宏明).
 - 13) Haqshenas G, Shivaprasad HL, Woolcock PR, et al. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *J Gen Virol* **82** : 2449-2462, 2001.
 - 14) Johne R, Plenge-Bönig A, Hess M, et al. Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J Gen Virol* **91** : 750-758, 2010.
 - 15) Okamoto H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res* **127** : 216-28, 2007.
 - 16) 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.
 - 17) 飯野四郎、狩野吉康、前久保博士、ほか.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.
 - 18) 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.
 - 19) Yoshizawa H, Itoh Y, Iwakiri S, et al. Diagnosis of type A hepatitis by fecal IgA antibody against hepatitis A antigen. *Gastroenterology* **78** : 114-118, 1980.
 - 20) 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.
 - 21) Sato S, Fujiyama S, Tanaka M, et al. IgM and IgA antibodies generated against hepatitis C virus core antigen in patients with acute and chronic HCV infection. *Dig Dis Sci* **39** : 2022-2031, 1994.
 - 22) Nagasaki F, Ueno Y, Kanno N, et al. A case of acute hepatitis with positive autoantibodies who actually had hepatitis E virus infection. *Hepatol Res* **32** : 134-137, 2005.
 - 23) Dalton HR, Fellows HJ, Stableforth W, et al. The role of hepatitis E virus testing in drug-induced liver injury. *Aliment Pharmacol Ther* **26** : 1429-1435, 2007.
 - 24) Davern TJ, Chalasani N, Fontana RJ, et al. Drug-Induced Liver Injury Network (DILIN). Acute hepatitis E infection accounts for some cases of suspected drug-induced liver injury. *Gastroenterology* **141** : 1665-1672, 2011.