

20031120

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

本邦に於ける E 型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究

平成 15 年度 総括研究報告書

主任研究者 三代 俊治

平成 16 年 (2004) 4 月

目次

I. 総括研究報告	1
1. 班長報告（三代俊治）	2
2. 班友報告（北嶋直人，松田裕之，垣見和宏）	8
II. 分担研究報告	15
1. E型肝炎ウイルス感染の分子ウイルス学的研究（岡本宏明）	16
2. HEV ウイルス様中空粒子の抗原性（武田直和）	20
3. HEV キャプシド蛋白質を発現する形質転換植物の開発（津田新哉）	23
4. 家畜に於ける HEV 及び HEV-like virus 感染の実態把握（山口成夫）	25
5. 本邦の非 ABC 型肝炎に占める E 型肝炎の位置づけ（矢野公士）	27
6. 札幌地域における E 型急性肝炎臨床像の解明（前久保博士）	30
7. 我が国の劇症肝炎，LOHF における HEV 感染の意義：全国集計からの検討（持田 智）	33
8. HEV 抗体アッセイ系の比較検討（今井光信）	35
9. 献血者集団における HEV 感染の実態解明（山中烈次）	38
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	41
IV. 研究成果の刊行物・別刷	45

I. 総括研究報告

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）

平成 15 年度

総括研究報告書

本邦に於ける E 型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究

主任研究者 三代 俊治 東芝病院研究部長

研究要旨：三年計画初年度の、特筆すべき最大の成果は、謎だった感染経路のうち二つの経路（一つは zoonotic food-borne transmission, 今一つは blood-borne transmission）が直接証拠を以て明確にされたことにある。また、E 型肝炎は全国的に見れば稀な疾患であることが再確認されたと同時に、多発地域（北海道）に於いては原因不明（non-ABCD）急性・劇症肝炎の約 30%もが HEV に起因すると判明した。A 型肝炎に比して E 型肝炎の方が重症化（劇症化）率が高い傾向も認められた。食感染リスクとしては最大の関心事であるところのブタ肉に関しては、食肉としての出荷時（6 カ月齢）には HEV が既に消失しているとの既報（血液中の HEV を調査）に反し、糞便と肝臓中には HEV が猶残存している個体があるとの所見が得られた。また、genotype の多様性に能く対処し得る診断系とワクチンの開発に向けて、様々の系（組換バキュロウイルスで発現した VLP 等）を用いてウイルス蛋白を発現する試みも行われた。

<分担研究者（班員）>

今井光信 神奈川県衛生研究所微生物部
部長
前久保博士 手稲溪仁会病院院長
持田智 埼玉医科大学第三内科教授
岡本宏明 自治医科大学感染免疫学講座
ウイルス学部門教授
武田直和 国立感染症研究所ウイルス第
二部室長
津田新哉 農業技術研究機構中央農業総
合研究センター病害防除部ウ
イルス病害研究室主任研究官
山口成夫 農業技術研究機構動物衛生研
究所感染症研究部部長
山中烈次 日本赤十字社血液事業部品質
管理次長
矢野公士 国立病院長崎医療センター臨
床研究センター室長

<班長研究協力者（班友）>

垣見和宏 東京医科大学
北嶋直人 市立加西病院
松林圭二 日本赤十字
松田裕之 鳥取日赤病院
溝上雅史 名古屋市立大学
高橋和明 東芝病院
吉澤浩司 広島大学

A. 研究目的

三年計画初年度の研究目的として、以下の諸項目を設定した。

1. 我国に於ける HEV 感染の実態を把握する。
2. 日本土着 HEV 株の遺伝的特徴を明らかにする。

3. HEV 感染診断系の評価・改良を行う。
4. 感染経路を解明する。
5. Zoonosis 的側面の真偽を検討する。
6. 輸血を介する HEV 感染のリスク評価を行い適切な対策を立てる。
7. 有効なワクチンを開発する為の基礎研究を行う。

B. 研究方法

上記目的 1 の為には、全国集計的横断的疫学手法（矢野班員，持田班員）及び特定地域に於ける定点観測的疫学手法（前久保班員）を用いた。

目的 2 の為には、分子ウイルス学的手法を用いた（岡本班員，高橋班友，班長）。

目的 3 の為には、市販・未市販各種抗体検出系の比較試験を行った（今井班員）。

目的 4 の為には、専ら分子疫学的手法を用いた（岡本班員，高橋班友，溝上班友，班長）。

目的 5 の為には、zoonotic transmission の疑われた事例について、詳細な疫学的調査を行うと共に、分子疫学的解析を行った（北嶋班友，松田班友，高橋班友，岡本班員，矢野班員，班長）。また、飼育ブタの HEV 感染状況を分子ウイルス学的に調査した（山口班員，岡本班員）。また、猟友会の協力を得て野生ジカを捕獲し、HEV 感染状況の調査も行った（北嶋班友，高橋班友，班長）。

目的 6 の為には、輸血後 E 型肝炎の疑われた事例を詳細に調査すると同時に、献血者集団に於ける HEV 感染状況を調査した（山中班員，松林班友，岡本班員，班長，吉澤班友）。

目的 7 の為には、様々な系を用いてウイルス蛋白を発現した（武田班員，津田班員）。また、細胞性免疫応答を解析する為の基礎研

究も行った（垣見班友）。

（倫理面への配慮）

行った全ての研究は、検体提供者個人情報保護を厳守しつつ行われた。今年度の研究に於いてはヒトゲノム・遺伝子解析は行われなかったが、それを行うに際しては必ず所属機関の遺伝子解析倫理審査委員会の承認を得ること、及び、文部省・厚生労働省・経済産業省の定めた倫理指針告示第 1 号を遵守することを原則とした。

C. 研究結果

感染症制御の根幹の一つは感染経路の把握にある。その意味で、今年度の研究に於いて二つの感染経路がエビデンスを以て解明されたことは特筆に値する。以下、今年度研究の成果を項目毎に略述する。

I. Zoonotic food-borne transmission

野生鹿の刺身（『シカサシ』）を食べた二家族四人が E 型肝炎を発症した事例に於いて、食べた鹿肉の保存検体から回収された HEV と患者から採取された HEV が塩基配列同一のものであったという調査結果（ref-[1]及び北嶋班友の報告書 pp9-10 参照）は、from animals to humans という方向での HEV transmission を初めて証明する直接証拠を提供した（逆方向の証明は動物実験で既に示されていた）。また、野生猪のナマギモ摂取後の重症肝炎 2 例（ref-[2]及び松田班友の報告書 p11 参照）及び野生猪バーベキュー後の HEV 集団感染事例（矢野班員の報告書 pp26-28 参照）の調査結果は、いずれも間接証明ではあるが、イノシシも HEV 感染の reservoirs の一つであることを強く示唆した。また、北海道北見市に於ける E 型肝炎患者の多くが発病前に豚レバーを食しており、且つ

北海道地区で市販されている生ブタレバーの一部 (7/363, 1.9%) に HEV RNA が検出されたとの調査結果 (ref-[3]及び岡本班員の報告書 pp15-18 参照) は、これも間接証拠ではあるが、流通ルートに乗った食品を介して HEV が感染する可能性を示唆した。

2. Blood-borne transmission

松林班友等は北海道で発生した輸血後 E 型肝炎例を詳細に調査し、donor と recipient の HEV 配列の一致を確認し、以て HEV の血行感染を初めて直接証明した。岡本班員等は透析施設の保存血清を retrospective に検査し、既に 1977 年に輸血を介する HEV の感染が我国に存在したことを示した (岡本班員の報告書 pp15-18 参照)。ALT 高値によりスクリーンアウトされたドナー血の中に HEV RNA 陽性血が無視できぬ頻度で含まれていることも、松林班友により報告された (この調査は山中班員、松林班友、及び吉澤班友により続行される：山中班員の報告書 pp38-39 参照)。

3. Incidence

矢野班員等による全国 20 の国立病院急性肝炎共同研究班参加施設に於ける調査では、1990-2002 年の non-ABC の 2.9% (9/311) のみが E 型であったが、時期別に見ると、1990-1998 年が 1.7%であったのに対し、2000 年以降では 7.2%に増加していた (矢野班員の報告書 pp26-28 参照)。一方、『多発地域』である北海道札幌地区に於ける前久保班員等の調査によれば、1998-2003 年の同地区に於ける成因不明急性肝炎では 26.7% (36/135)もが E 型肝炎であり、年次変動もあり、発生率のピークは 2001 年であった (前久保班員の報告書 pp29-32 参照)。いずれの調査からも、我国に於ける E 型肝炎の

incidence は、90 年代の終わり頃から増加した傾向が示唆された。

4. Fulminant or severe acute hepatitis

持田班員等による劇症肝炎全国調査によれば、HEV は我国の劇症肝炎の極くマイナーな原因でしかないが、「E 型と判明した 4 例は全て北海道からの登録例であった」ことに鑑みて、かかる多発地域に対する重点的な取り組みの必要性が示唆された (持田班員の報告書 pp33-34 参照)。札幌地区に於ける前久保班員等による調査によれば、prothrombin time 40%以下を『重症』と定義した場合の重症化率は 16.7% (6/36)であり、これは A 型肝炎の 9.5% (2/21)を凌駕していた。岡本班員等は、国内発症例 46 例のうち 5 例 (11%) が劇症肝炎で死亡し、6 例 (13%) が重症化例だったと報告した。総じて、男性、高齢、genotype IV、酒飲み、等、が重症化に関わる因子と思われた。

5. Diagnosis

1998 年に、米国の CDC と NIH の主導する Hepatitis E Virus Antibody Serum Panel Evaluation Group が、164 本の暗号化血清検体パネルを用いて 12 種類の抗体アッセイキットの性能を検定したことがある。その結果は『惨憺たるもの』だった。肝炎を実際に起こした患者に由来する検体については或る程度の正答率を示したものの、normal population 由来の検体についてはキット間のバラツキが著明に見られたからである。本研究班に於いても同様の結果が今井班員と溝上班友から報告された。従って、一般集団に於ける抗体陽性率のデータの解釈には注意を要するし、臨床例に於いても、抗体データのみから E 型肝炎を診断するのは危険である。臨床例の診断には NAT (核酸検出検査法)

によって HEV RNA を検出するのが望ましく、高橋班友等は、genotype の多様性に能く対応する高感度高カヴァリッジ PCR 法を案出し報告した (ref-[4])。実際、持田班員の報告した E 型劇症肝炎のうちの 1 例は、この高橋の方法を以てして初めて HEV RNA を検出し得る症例であった。

抗体検出系の特異性を高める目的で、武田班員等は genotype IV に由来する virus-like particles (VLP) を新たに作製し従来の genotype I 由来 VLP と比較した。その結果、genotype 間には抗原性の異なる epitope が存在し (共通エピトープも存在)、一部のエピトープは立体構造に依存することを明らかにした (武田班員の報告書 pp19-21 参照)。

垣見班友が作成を試みた HEV に対する細胞性免疫応答検出系は、病態解明やワクチン開発の手段としてのみならず、現在行われている HEV RNA 検出や anti-HEV 検出を用いた診断の補助手段としても使用し得る (垣見班友の報告書 pp12-13 参照)。

6. Vaccine development

国産 HEV ワクチン開発を目指して長年にわたり VLP の研究を行って来た武田班員等の仕事の他に、本研究班では新たに津田班員によるアグロバクテリウムを用いた植物細胞由来 HEV キャプシド蛋白発現の仕事も edible vaccine (食べるワクチン) の開発を目指してスタートした (津田班員の報告書 pp22-23 参照)。やがてワクチンの効能評価を行う時期が到来した暁には、垣見班友が試作中の細胞性免疫応答検出系が有用になる筈である (垣見班友の報告書 pp12-13 参照)。

7. HEV infection in swine

食用に飼育されている豚の HEV 感染状況を解明することは、zoonotic food-borne

transmission の観点からして現今最重要課題の一つである。調べた限り、我国の食用豚の 100% が生後 6 箇月の間に HEV に感染するという事実、そしてそういう状況は 10 年以上前から存在していたという事実が明らかになった (岡本班員及び今井班員の報告書 pp15-18, pp35-37 参照)。飼育豚に於ける HEV viremia は食用出荷される 6 箇月齢では既に消失しているとの既報に反して、山口班員等は、糞便中には 6 箇月齢でも猶 HEV RNA が残存している個体が存在することを報告した (山口班員の報告書 pp24-25 参照)。これは、岡本班員等による『市販ブタレバー中 HEV RNA 検出』の報告 (ref-[3]) を裏付ける所見である。

8. HEV infection in wild animals

北嶋班友、高橋班友、班長等は、兵庫県猟友会の協力を得て、2003 年度の猟期 (12 月から翌年 2 月迄) に捕獲した兵庫県の野生鹿 (Sika deer, *Cervus nippon nippon*) の血液中及び肝臓中の HEV RNA 検出を試みた。その結果、現在までに、約 100 頭中 1 頭の鹿の肝臓中に HEV RNA を検出した (血液中は陰性)。

D. 考察

二つの感染ルート (zoonotic food-borne と human blood-borne) が明確になった。そして、我国に於ける HEV の natural reservoirs として、ヒトの他に、猪・鹿・豚が存在することを我々は知った。しかし、実際の臨床例では、前久保班員の報告書 (pp29-32) の中にもある如く、猪・鹿・豚の食感染や輸血で説明し得る例は寧ろ少数派である。従って、natural reservoirs は他にも存在する可能性があるし、食肉 (や『ホル

モン』) 以外の食品が HEV 感染を媒介する可能性もあるし、food-borne 以外の感染様式をも考慮する必要がある。例えばペットとして飼育している動物との接触がヒトに HEV 感染を齎す可能性も存在し、岡本班員等は、ペット猫からの感染を疑われる一例 (ref-[5]) と日本のペット猫に於ける anti-HEV 陽性率 (ref-[6]) を報告している。

劇症化 (重症化) の因子の一つとして、特に genotype IV の中の特定のストレインが候補に挙げられている。それが本当にそうなのかどうかを知るには動物感染実験が必要である。夙に話題になって来た『妊娠時の感染と劇症化の関係』については、本研究班からはそれを支持するデータが得られていない。

診断系の不備も手伝って、我国に於いては今猶 E 型肝炎の診断が遍く行われているとは思えない状況にある。臨床家への注意喚起が更に必要であると考える。

完璧な (あるいは完璧に近い) 診断系の開発と有効なワクチンの開発の為にはまだまだ道程が遠い。基礎研究の一層の発展が望まれる。

E 型肝炎に対する特異的治療法は未だ存在しない。どこかで抗ウイルス剤が開発されている等という話も聞こえて来ない。しかし、稀ではあれ劇症肝炎で死亡する症例も存在することに鑑みれば、抗ウイルス剤の開発を企図すべきである。簡便な細胞培養系は存在しないが、多少面倒でも動物感染実験により薬効評価は可能だから、例えば siRNA を用いた HEV RNA 増殖抑制実験は直ぐにでも出来る。

E. 結論

我国に於いて E 型肝炎は稀な感染症ではあ

るが、多発地域 (特に北海道) も存在し、しかも 90 年代末からその発生率が上昇した。感染経路の全容は未だ明らかでないが、少なくとも zoonotic food-borne と human blood-borne という二つの感染ルートの存在は直接証拠を以て明確にされた。ヒト以外の HEV reservoirs としては猪・鹿・豚の存在が明らかにされたが、それ以外の動物や食品も考慮する必要がある。今後の課題は、感染経路の全容解明、診断系の改良、ワクチン開発、治療剤の開発にある。

F. 健康危険情報

鹿サシ摂取後 E 型肝炎発生例の報告 (ref-[1]) が 2003 年 8 月 1 日号の Lancet に掲載されたことを受けて、且つ翌月の JGV に豚レバー摂取と HEV 感染の関係を報告する論文が掲載される予定であることを見越し、それらの情報が国民に無用の混乱を巻き起こすことを回避する目的から、厚生労働省は本研究班 (岡本、武田班員、吉澤班友、三代班長) 及び有識者 (鈴木宏、品川邦汎、宮村達男、吉倉廣の各氏) の協力を得て、『食肉を介する E 型肝炎ウイルス感染事例について (E 型肝炎 Q & A)』 (<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2003/08/h0819-2a.html>) を同年 8 月に同省ホームページにアップロードした (巻末コピー参照)。

新聞各紙も E 型肝炎に関する記事を数多く掲載した。2002 年に於ける報道はセンセーショナルな傾向のものが多かったが、2003 年夏以降のそれは『健康危険情報』的な姿勢のものが多く見られた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 2003; 362: 371-3.
- [2] Matsuda H, Okada K, Takahashi K, Mishiro S. Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J Infect Dis* 2003; 188: 944.
- [3] Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Sasaki N, Gotanda Y, Okamoto H. 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* 2003; 84: 2351-7.
- [4] Takahashi K, Kang JH, Ohnishi S, Hino K, Miyakawa H, Miyakawa Y, Maekubo H, Mishiro S. Full-length sequences of six hepatitis E virus isolates of genotypes III and IV from patients with sporadic acute or fulminant hepatitis in Japan. *Intervirology* 2003; 46: 308-18.
- [5] Kuno A, Ido K, Isoda N, Satoh Y, Ono K, Satoh S, Inamori H, Sugano K, Kanai N, Nishizawa T, Okamoto H. Sporadic acute hepatitis E of a 47-year-old man whose pet cat was positive for antibody to hepatitis E virus. *Hepatology* 2003; 26: 237-42.
- [6] Usui R, Kobayashi E, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. Presence of antibodies to hepatitis E virus in Japanese pet cats. *Infection* 2004; 32: 57-8.
- [7] Liu Z, Chi B, Takahashi K, Mishiro S. A genotype IV hepatitis E virus strain that may be indigenous to Changchun, China. *Intervirology* 2003; 46: 252-6.
- [8] Ohnishi S, Kang JH, Maekubo H, Takahashi K, Mishiro S. A case report: two patients with fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan. *Hepatology* 2003; 25: 213-218.
- [9] 渡邊尚子, 岩田滉一郎, 中尾國明, 松本正廣, 松本裕子, 篠原照昌, 太田裕彦, 平林寧子, 高橋和明, 三代俊治. E 型肝炎ウイルス日本土着株に感染し発症したと推定される急性肝炎の 1 例. *肝臓* 2003; 44: 80-4.

2. 学会発表

Mishiro S. Why hepatitis E now in Japan? US-Japan Hepatitis Panel Joint Meeting. Tokyo, Jan 12-13, 2003.

Mishiro S. Hepatitis E in Japan. 8th International Kilmer Memorial Conference. Osaka, Oct 6-9, 2003.

大西幸代, 姜貞憲, 前久保博士, 高橋和明, 三代俊治. この 3 年間に入院治療した E 型急性肝炎 14 例の検討. 第 39 回日本肝臓学会総会. 福岡 May 22-23, 2003.

三代俊治. 輸血と E 型肝炎ウイルス. 第 51 回日本輸血学会総会. 福岡 May 29, 2003.

松林圭二, 長岡康弘, 坂田秀勝, 佐藤進一郎, 高橋和明, 三代俊治, 今井光信, 武田直和, 深井寛治, 加藤俊明, 池田久實. 輸血後 E 型肝炎と考えられた 1 症例. 第 51 回日本輸血学会総会. 福岡 May 29, 2003.

大西幸代, 姜貞憲, 前久保博士, 高橋和明, 三代俊治. E 型急性肝炎は増えているか. 第 7 回日本肝臓学会大会. 大阪 Oct 15-16, 2003.

長岡康裕, 藤井重之, 永島裕之, 西家極仙, 宮島治也, 堀泰之, 西堀佳樹, 堀本正禎, 小野寺義光, 松林圭二, 加藤俊明, 池田久實, 三代俊治, 今井光信. 輸血後 E 型肝炎の検討. 第 7 回日本肝臓学会大会. 大阪 Oct 15-16, 2003.

姜貞憲, 篠原敏也, 大西幸代, 三井慎也, 宮本憲幸, 桜井康雄, 辻邦彦, 吉田純一, 前久保博士, 高橋和明, 三代俊治. 重症化 E 型急性肝炎 6 症例の肝病理組織学的検討. 第 7 回日本肝臓学会大会. 大阪 Oct 15-16, 2003.

松田裕之, 岡田克夫, 三代俊治. E 型急性肝炎: Zoonosis を示唆する新知見. 第 35 回日本肝臓学会西部会. 岡山 Nov 28-29, 2003.

姜貞憲, 三井慎也, 宮本憲幸, 桜井康雄, 辻邦彦, 真口宏介, 吉田純一, 前久保博士, 大西幸代, 荒川智宏, 狩野吉康, 豊田成司, 高橋和明, 三代俊治. E 型急性肝炎重症化例の検討. 第 35 回日本肝臓学会西部会. 岡山 Nov 28-29, 2003.

H. 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. 総括研究報告に添えて

班長研究協力者（班友）からの報告書

E 型急性肝炎における zoonosis の直接証拠

班友 北嶋直人 市立加西病院

研究要旨：E 型肝炎の感染連鎖に動物が関与（zoonosis）している可能性が、多くの間接的証拠から指摘されている。我々は今年度、鹿の生肉摂取により発生したと考えられる E 型急性肝炎集団発生例を経験した。患者血清のみならず原因と推定された鹿肉からも HEV-RNA が検出でき、genotype はいずれも III 型であった。患者血清および鹿肉から得られた HEV-RNA の塩基配列はほぼ 100% 一致しており、HEV 感染における zoonotic transmission が初めて直接証明された。

<共同研究者>

丁 秀鎮 市立加西病院
高橋和明 東芝病院研究部
三代俊治 東芝病院研究部

A. 研究目的

従来輸入感染症としてとらえられてきた E 型肝炎の中に国内固有株感染例も存在することが判明し、感染連鎖に動物が関与（zoonosis）する可能性も高くなってきた。今年度、我々は鹿の生肉摂取により発生したと考えられる急性肝炎集団発生例を経験し、HEV の関与を検討するとともに zoonosis の証明を試みたので報告する

B. 研究方法

平成 15 年 4 月に経験した原因不明の急性肝炎集団発生例 4 人において、血清中の IgM-HEV 抗体、IgG-HEV 抗体、HEV-RNA を測定した。鹿の生肉摂取が原因と推定されたため、残されていた鹿肉から HEV-RNA の検出を試み、患者血清とともに genotype および塩基配列を決定した。

C. 研究結果

集団発生した原因不明の急性肝炎（non A-C）4 人全員で、血清中の IgM-HEV 抗体、IgG-HEV 抗体、HEV-RNA が陽性であった。原因と推定された鹿肉からも HEV-RNA が検出でき、genotype はいずれも III 型であった。患者血清から得られた HEV-RNA の塩基配列は、3 名に於いて鹿肉由来のそれと 100% 一致していた（残る 1 例は 99.7%）。幸いにして 4 例とも重症化することなく回復した。

D. 考察

集団発生した E 型急性肝炎 4 例を経験した。鹿の生肉摂取が原因であり、HEV 感染における zoonotic transmission が初めて直接証明された。鹿の生肉摂取がどの程度 HEV 感染に関与しているのか今回の結果だけでは不明であり、更なる疫学調査が必要である。鹿の生肉を摂取したことのある群と食べたことのない群での HEV 感染の頻度の比較、捕獲された野生の鹿における HEV 感染の調査などを予定している。

E. 結論

E 型肝炎の感染連鎖に動物が関与し、鹿が感染 reservoir の一つであることが直接証明さ

れた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S.
Zoonotic transmission of hepatitis E virus from
deer to human beings. Lancet 2003; 362: 371-3.

2. 学会発表

北嶋直人, 丁秀鎮, 木下芳一. E 型急性肝炎
における zoonosis の関与. 日本消化器病学会
総会, 仙台市 2004 年 4 月.

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.

イノシシの肝の生食により感染し発症したと考えられる重症 E 型肝炎の 2 例

班友 松田裕之 鳥取赤十字病院内科

共同研究者

鳥取県立中央病院内科 岡田克夫

東芝病院研究部 三代俊治

従来本邦では E 型肝炎は輸入感染症として位置付けられていたが、近年、海外渡航歴が無く、国内で感染し発症したと考えられる散发性 E 型肝炎の報告が相次いでおり、さらには本邦土着株による感染例も報告されるに至り、本疾患が輸入感染症にとどまるものではないことが明らかになった。一方、ブタ由来 E 型肝炎ウイルスの分離など、E 型肝炎ウイルスの感染様式には、人獣共通感染症 (zoonotic transmission) の可能性を示唆する事実が相次いで報告されている。

今回我々は、捕獲したイノシシの肝の生食により同時期に感染し発症したと考えられる重症 E 型肝炎の 2 例を経験したので報告する。

症例 1 は、53 才・男性・器械工、症例 2 は、70 才・男性・花卉生産者。症例 1・症例 2 ともに、2003 年 1 月下旬から 2 月上旬にかけて数人の狩猟仲間とともに、イノシシの生肝を計 5 回食した。3 月初旬より全身倦怠感、食思不振、次いで黄疸を呈するに至り、3 月中旬近医受診、肝機能異常を指摘され、それぞれ紹介入院となった。入院時検査成績は、症例 1:AST 3,500 IU/l、ALT 2,900 IU/l、総ビリルビン(T.Bil.) 10.2 mg/dl、プロトロンビン時間 (PT) 17%、症例 2:AST 2,768 IU/l、ALT 1,986 IU/l、T.Bil. 15.5 mg/dl、PT 31%であった。IgM anti-HA、IgM anti-HBc、HCV RNA、ANA 及び anti-DNA は

双方ともに陰性であった。症例 1 は、入院時重症肝炎の様相を呈していたが、輸液のみで順調に軽快し、第 35 病日に退院した。一方、症例 2 は、第 3 病日に肝性脳症を呈し、第 8 病日には昏睡から回復したものの肝不全は進行し、出血傾向により第 34 病日に死亡した。

症例 1 では第 35 病日の回復期血清に IgM anti-HEV 及び IgG anti-HEV を認めた。同日の検体では HEV RNA は陰性であった。また、症例 2 では入院時血清中より HEV RNA が検出された。以上より、症例 1・症例 2 ともに E 型急性肝炎と診断された。双方の症例ともに、本人・家人いずれも海外渡航歴はなく、海外流行地からの帰国者との接触もなかった。症例 1・症例 2 が食したイノシシの肝については試料が残っていないため HEV RNA の検索を行うことが不可能であるが、同時期に二人が肝炎を発症していること及び潜伏期間から推測するに、今回の症例がイノシシの肝を生食したことにより E 型肝炎を発症したのと考えられ、本疾患が zoonosis であることを示唆する興味ある知見と考えられた。

論文発表 Matsuda H, Okada K, Takahashi K, Mishihiro S. ; Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild bore. J Infect Dis 188:944, 2003

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策事業）
「本邦に於ける E 型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究」班
分担研究報告書

HEV に対する細胞性免疫応答検出系の作成

班長研究協力者：垣見和宏（東京医科大学 第4内科 助手）

研究要旨：肝炎における肝障害は、ウイルスを排除しようとする宿主の免疫応答によって誘発され
ると考えられている。一般に肝炎ウイルスそのものは細胞非破壊性のウイルスであるので、ウイ
ルスが感染しても感染肝細胞は障害されない。ウイルス感染に対して細胞傷害性 T リンパ球 (CTL)
を中心とした免疫応答が誘導されてはじめて、CTL がウイルス感染肝細胞を検出することが可能に
なり、その細胞をアポトーシスに陥れて除去する。このとき傷害された肝細胞から GOT や GPT な
どの酵素が遊出して血清トランスアミナーゼ値の上昇として肝炎の病態が形成される。E 型肝炎に
おいても、このようなウイルスと宿主との相互関係が、その病態の中心であると考えられるため、
HEV ウイルスに対する CD4 陽性 T 細胞や CD8 陽性 T 細胞などによる細胞性免疫を解析することが重
要であると思われる。そこで本研究では、HEV に対する細胞性免疫応答の検出系の作成を試みた。

研究協力者

徳山 宏丈（東京医科大学 第4内科 大学院生）
古市 好宏（東京医科大学 第4内科 大学院生）

A. 研究目的

HEV に対する細胞性免疫応答の検出は、

- (1) 病態解明
- (2) HEV ワクチンの開発
- (3) 診断

の3つの分野で貢献できると期待される。HEV 感染
によって誘発される肝障害の病態を解明することで、
劇症化や重症化を防ぐための治療法の開発が期待さ
れる。HEV ワクチンの開発には抗体産生に加えて細
胞性免疫応答も重要である。

現在最も期待されるのが (3) 診断である(図 1)。
HEV 感染の診断には抗 HEV 抗体の検出と HEV-RNA
の検出が用いられている。抗 HEV 抗体検出に際して
は、血清中に存在する他のウイルス感染に対する抗
体がクロス反応を呈するために偽陽性として HEV
感染を overestimate する危険が伴う。急性肝炎が治癒
した患者から血清中の RNA が消失してしまうため
に HEV 感染患者も感染後期になってタイミングを
逃すと HEV-RNA を検出できずに HEV 感染を
underestimate する危険が存在する。このような抗
HEV 抗体陽性/HEV-RNA 陰性患者に対して HEV 特

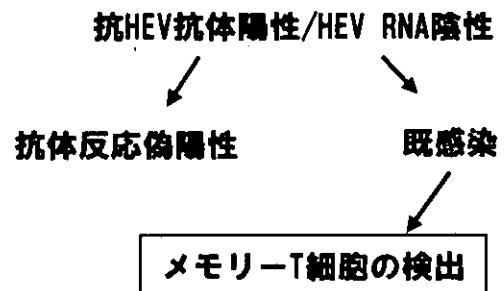


図 1. HEV に対する特異的細胞性免疫応答検出の意義

異的なメモリー T 細胞を検出することが可能になれば、HEV 既感染を証明し、診断を確定することが可能になると考えられる。そこで HEV 特異的な細胞性免疫応答検出のためのアッセイ系の作成を計画した。

B. 方法と成績

HEV 特異的な細胞性免疫応答 (CD4 陽性 T 細胞や CD8 陽性 T 細胞) を効率よく検出するためには、リンパ球に HEV 抗原を提示する抗原提示細胞 (APC) が必要である。特に樹状細胞 (DC) は、生体内にお

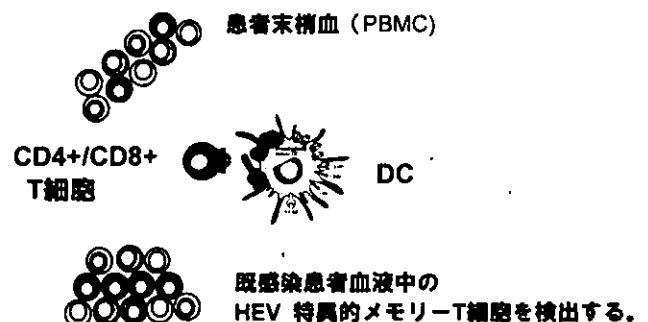


図 2. DC による HEV 特異的なリンパ球の増幅

いて professional APC として、リンパ球にウイルス抗原を提示する役割を担っていることが知られている (図 2)。そこで効率よく抗原提示能力を持つ artificial DC(DC like cell : DCLC)を作成し、ウイルス特異的な CD4 陽性 T 細胞や CD8 陽性 T 細胞を増幅してその細胞を検出することを試みた。

1. DCLC の作成

ヒトの HLA-A2 ハプロタイプを持つ乳がん細胞に抗原提示に非常に重要な働きを持つ B7 遺伝子を導入して DCLC を作成した(図 3)。

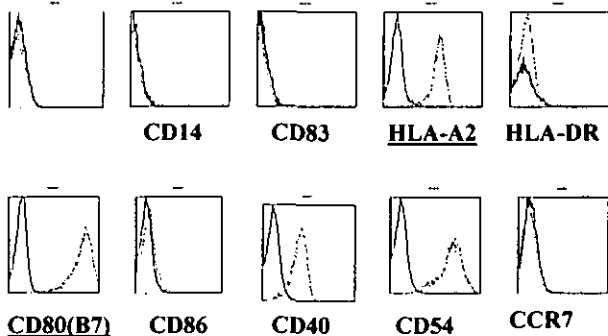


図3. DC like cell (DCLC)の表面マーカー

2. DCLC を用いたウイルス特異的な CD8 陽性 T 細胞の検出

図 3 で示すように、我々が作成した DCLC は、抗原提示に必要な MHC class I 分子の HLA-A2 と、抗原提示における costimulatory molecule である CD80 (B7) 分子を強く発現している。この DCLC が実際にウイルス特異的な T 細胞を増幅することが可能であることを検証するために、EB ウイルスに対する CD8 陽性 T 細胞の増幅能/検出能を解析した。

HLA-A2 を持つ EBV 既感染患者の末梢血中の単球を GM-CSF+IL-4 存在下に培養して誘導した DC に EBV 由来のエピトープペプチドを加えて抗原提示細胞として用いて、同じ患者のリンパ球を刺激すると効率よく EBV 特異的な CD8 陽性 T 細胞が増幅され、フローサイトメーターを用いると CD8/tetramer 染色によって右上に検出される (図 4 A)。同じ患者の末梢血をペプチドを加えた DCLC で刺激してやると図 4B に示すように実際の DC 以上に効率良く EBV 特異的な CD8 陽性 T 細胞を検出することが可能であった。

今後この細胞に HEV ORF1, ORF2, ORF3 蛋白を導

入して抗原提示細胞に用いることで、HEV 感染患者にモリー T 細胞として存在しているであろう、HEV 特異的な CD4 陽性 T 細胞 CD8 陽性 T 細胞を検出するツールとして使用していく予定である。

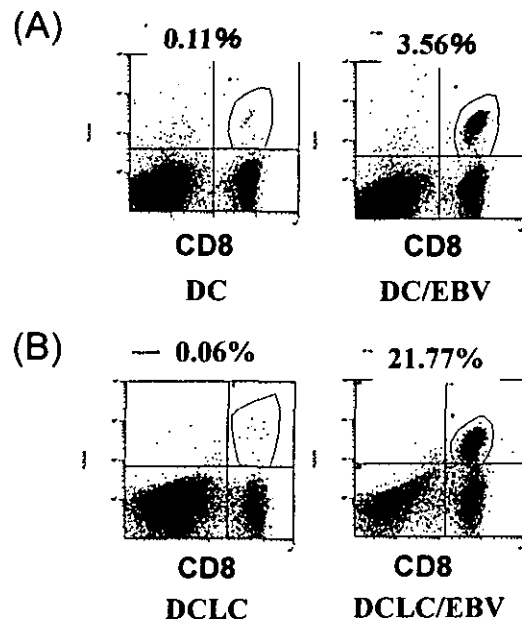


図 4. ウイルス特異的な CD8 陽性 T 細胞の検出 (A) DC を用いた増幅法。 (B) DCLC を用いた増幅。

C. 考案と結語

HEV に対する特異的な細胞性免疫応答を解析するために、サイトカインによる誘導が必要な DC の複雑な培養を避けるために DCLC を作成した。この細胞を用いることによって、非常に効率よくウイルス特異的な T 細胞を増幅し検出することができるために、今後、HEV 特異的な免疫応答の検討に用いることができると期待される。

HEV 特異的な免疫応答の検出には、抗原提示細胞の調整に加えて、HEV 抗原蛋白や、HEV 抗原発現ベクターなどが必要である。今後、本研究班の他の研究者との有機的な共同研究によって、HEV 抗原の提供を受けて、より一層確実に信頼性の高い細胞性免疫応答の検出系を構築し、HEV 感染症の病態解明、治療法の改善、ワクチン開発、診断技術の改善に貢献することを希望しています。

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）
本邦に於ける E 型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究班
分担研究報告書

E 型肝炎ウイルス感染の分子ウイルス学的研究

分担研究者 岡本宏明 自治医科大学医学部教授

研究要旨：ヒトおよびブタでの E 型肝炎ウイルス(HEV)の感染状況を調査するとともに、感染 HEV 株を分離し、分子ウイルス学的解析を行った。その結果、本邦の国内感染 E 型肝炎の特徴およびブタでの感染の実態が大まかながら明らかになり、食物性伝播(food-borne transmission)や血行性伝播(blood-borne transmission)がヒトでの HEV 感染に関連があることが分かった。しかしながら、感染源や感染ルートを特定できない E 型肝炎症例も未だ多く、さらなる調査解析が必要である。

A. 研究目的

近年、わが国において「輸入感染症」としての E 型肝炎のみならず、国内感染による E 型肝炎が存在することが明らかになった。その E 型肝炎症例のなかには、重症化例や劇症肝炎による死亡例もある。しかも、動物が reservoir となった人畜(獣)共通感染症(動物由来感染症)の一つである可能性が指摘されている。本研究の目的は、ヒトおよびブタ等の動物での HEV の感染実態を把握し、それら感染 HEV の特徴を明らかにするとともに、感染経路を解明することにある。

B. 研究方法

1. HEV 抗体の測定

既報 J Clin Microbiol 40:3209-3218, 2002)のごとく、カイコ蛹で発現し精製した genotype IV の HEV ORF2 蛋白を固相抗原とする ELISA 法により、IgG クラス HEV 抗体(IgG-HEV 抗体)、IgM クラス HEV 抗体(IgM-HEV 抗体)および IgA クラス HEV 抗体(IgA-HEV 抗体)を測定した。特異性の確認のために、固相に用いた HEV ORF2 抗

原および非組み換え Baculovirus を感染させたカイコ蛹に由来する mock 蛋白による吸収試験を実施した。

2. HEV RNA の測定とその塩基配列解析

ヒトあるいは動物の血清、糞便および肝臓等の臓器から核酸を抽出し、既報 J Clin Microbiol 40:3209-3218, 2002)に準拠し、あるいは若干の改良を加え、RT-PCR 法により HEV RNA を検出した。増幅した PCR 産物について、塩基配列を決定し、分子系統樹解析を行った。

倫理面への配慮：研究用血清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、検体提供者は不特定化されているため、個人のプライバシーを侵害することではなく、人権上の問題は生じない。

C. 研究結果

1. E 型肝炎症例および感染 HEV 株の特徴

入院時あるいは初診時の血清で HEV RNA および IgM-HEV 抗体が検出され、E 型肝炎と診断された 47 例の患者のうち、海外渡航歴をもつ例はわずか 1 例に過ぎなかった。渡航先はバングラディッシュで、HEV の遺伝子型は I 型であった。それに対して、残りの

46 例はすべて国内感染例であり、以下の点が国内感染の“先進国型”E 型肝炎の特徴として認められた。1) 患者は 38 歳から 86 歳(平均 59.6 歳)で、男性が 87%を占めること、2) 35 例は比較的短期間で軽快治癒したが、劇症肝炎による死亡例が 5 例、黄疸遷延や血液凝固能異常(PT :40%以下)を示す重症化例が 6 例認められたこと、そして劇症肝炎による死亡例は妊婦ではなく、いずれも男性で、年齢は 58 歳から 65 歳であったこと、3) 患者の発生時期に季節的な偏りが認められないこと、4) 20 年以上も前から、日本固有株とみなされる III 型 HEV 株による国内感染の E 型肝炎が存在していたこと、5) 感染 HEV は III 型ないし IV 型に属し、多様性に富んでいるが、分子系統樹上、III 型で 3 個、IV 型で 1 個の、少なくとも合計 4 個の日本固有株のクラスターを形成していること、などである。

2. プタでの HEV 感染の実態と感染 HEV 株の特徴

欧米などの諸外国から報告がなされているように、日本(栃木県内)のプタでも HEV 感染が高頻度に認められ、日本固有と考えられる HEV が存在することを既に報告しているが(Biochem Biophys Res Commun 289:929-936, 2001)、本研究により、生後 2 ヶ月から 6 ヶ月までの全国のプタ 2500 頭での HEV 抗体陽性率は 58% であり、月齢によってその陽性率は大きく異なることが明らかになった。すなわち、生後 2 ヶ月のプタでは 7%(37/500)であったのに対して、3 ヶ月では 40%(301/750)、4 ヶ月では 87%(433/500)、5 ヶ月と 6 ヶ月ではともに 90%(それぞれ 451/500, 226/250)の陽性率であり、殆どのプタが出荷の時期(約 6 ヶ月)までに HEV 感染を経験していることが判明した。

HEV 感染率が高いことを反映して、生後 3 ヶ月のプタ 750 頭中 113 頭(15%)で血液中から HEV が検出された。さらに 4 ヶ月のプ

タ 180 頭中 24 頭(13%)から HEV が検出され、合計 137 頭のプタ由来の HEV について遺伝子配列を解析した。その結果、遺伝子型として日本の E 型肝炎患者から分離されている HEV と同様に、III 型、あるいは IV 型に分類された。さらに詳細に解析すると、各農場の分離株ごとにクラスターを形成し、ヒト由来の HEV と同様に 4 つのクラスターに分類されることが明らかになった。ORF2 領域の 412 塩基長の配列において 100%の一致率を示すヒト由来およびプタ由来の HEV 株が見出された。ヒト由来の HEV 株(HE-JA1)は北海道在住の海外渡航歴のない散発性急性 E 型肝炎患者(55 歳男性、1997 年発症)から分離された。プタ由来の株(swJ13-1)は、北海道にある養豚場で飼育されていた生後 4 ヶ月のプタから 2002 年に分離された。それら HE-JA1 株と swJ13-1 株の全塩基配列を決定した結果、全長は 7240 塩基長(3'末端のポリ A 配列を除いて)と完全に一致し、5'非翻訳領域の 25 塩基長、3'非翻訳領域の 70 塩基長、および 3 つの open reading frame (ORF1, ORF2, ORF3)をコードしている領域の長さ(それぞれ、5121 塩基長、2022 塩基長、342 塩基長)も一致していることが分かった。そして、両分離株は全長配列において 99%もの高い一致率を示し、ORF2 および ORF3 のアミノ酸配列は 100%の一致率を示した。

3. 食用プタ肝臓からの HEV RNA の検出：食物性伝播による E 型肝炎

北海道の札幌市と北見市の 2 ヶ所の市中病院において、2001 年 1 月から 2002 年 12 月までの 2 年間に散発性急性肝炎例が 38 例あり、そのうちの 3 例が A 型肝炎、5 例が B 型肝炎、1 例が C 型肝炎であった。残りの 29 例の非 A 非 B 非 C 型急性肝炎例のうち、34%に相当する 10 例が E 型肝炎であった。そして、それら E 型肝炎患者では肝炎発症の潜伏期間に相当する 1~2 ヶ月前に、10 例中 9 例

がブタの肝臓を摂取していたのに対して、同時期の 22 例の非 E 型急性肝炎患者には 1 例もそのような既往はなかったことから(90% vs. 0%, $P < 0.0001$)、ブタの肝臓が感染源となっている可能性が強く示唆された。患者が摂取したブタ肝臓は残っていなかったが、9 例中 8 例は自宅近くの食料品店から購入したブタ肝臓を摂取したというインタビュー結果に基づき、患者が居住する地域の食料品店で販売されている食用ブタ肝臓の 363 個について RT-PCR 法によって HEV RNA を検出した。その結果、7 個(1.9%)で HEV RNA が陽性であることが判明し、そのうちの 3 つの HEV 株の塩基配列は北海道在住の E 型肝炎患者から分離された HEV 株と極めて高い類似性を示すことが分かった。

4. 供血者血清中での HEV RNA の検出：血行性伝播による E 型肝炎

供血者での HEV 抗体の陽性頻度には地域による顕著な差異が認められる。HEV 抗体陽性頻度の高い地域の一つである栃木県内の供血者を対象として調査した結果、ALT 値が 61 IU/l 以上の供血者(560 例)の中から、HEV RNA 陽性例が 3 例(いずれも男性)見出された。また、透析患者での 1977 年からの保存検体を用いた調査により、輸血に伴う HEV 感染は国内ですでに 1979 年に起こっていたことが明らかになった。

D. 考察

以上の結果から、日本国内ではブタが HEV の主要な reservoir の一つであり、北海道内での E 型肝炎については HEV に汚染されたブタ肝臓等の摂取による食物性伝播の可能性が濃厚であると考えられた。また、輸血に伴う HEV 感染も存在することが明らかになった。しかしながら、東北地方および関東地方で見出された E 型肝炎患者の殆どにおいて、

発症前のブタ肝臓あるいはシカ、イノシシ等の野生動物の内臓肉の摂取の既往や輸血の既往が認められないことから、未だ認識できていない感染経路からの HEV 感染が存在することは確かである。E 型肝炎の重症例や劇症肝炎による死亡例があることから、さらなる感染経路の解明が急がれる。

また、感染様式の一つとして血行性感染が存在することが明らかとなったが、それがどの程度の頻度で起こっているか、また供血者での HEV 感染のスクリーニング検査が必要であるか否かを明らかにすることは今後の重要な課題である。

E. 結論

1. 日本国内において、国内感染型の E 型肝炎が「輸入感染症」としての E 型肝炎よりも遥かに多く認められ、しかも 20 年以上も前から、日本固有株による感染例が存在していたことが明らかになった。
2. 人畜共通感染症として、ブタが HEV の主要な reservoir の一つであることが明らかになった。
3. 食物性伝播(food-borne transmission)や血行性伝播(blood-borne transmission)がヒトでの HEV 感染に関連があることが明らかになった。
4. しかしながら、感染源や感染ルートを特定できない E 型肝炎症例も未だ多く、さらなる調査解析が必要である。

F. 研究発表

1. Tokita H, Harada H, Gotanda Y, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H: Molecular and serological characterization of sporadic acute hepatitis E in a Japanese patient who was infected with hepatitis E virus of genotype III in 1993. *J Gen Virol* 84:421-427, 2003
2. Shrestha SM, Shrestha S, Tsuda F, Nishizawa T, Gotanda Y, Takeda N,

- Okamoto H: Molecular investigation of hepatitis E virus infection in patients with acute hepatitis in Kathmandu, Nepal. *J Med Virol* 69:207-214, 2003
3. Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H: Identification of a genotype III swine hepatitis E virus that was isolated from a Japanese pig born in 1990 and that is most closely related to Japanese isolates of human hepatitis E virus. *J Clin Microbiol* 41:1342-1343, 2003
 4. Takahashi M, Nishizawa T, Miyajima H, Gotanda Y, Iita T, Tsuda F, Okamoto H: Swine hepatitis E virus strain in Japan form for phylogenetic groups comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus. *J Gen Virol* 84:851-862, 2003
 5. Nishizawa T, Takahashi M, Mizuo H, Miyajima H, Gotanda Y, Okamoto H: Characterization of Japanese swine and human hepatitis E virus isolates of genotype IV with 99% identity over the entire genome. *J Gen Virol* 84:1245-1251, 2003
 6. Kuno A, Ido K, Isoda N, Satoh Y, Ono K, Satoh S, Inamori H, Sugano K, Kanai N, Nishizawa T, Okamoto H: Sporadic acute hepatitis E of a 47-year-old man whose pet cat was positive for antibody to hepatitis E virus. *Hepatology* 37:237-242, 2003
 7. Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Nishizawa T, Sasaki N, Gotanda Y, Okamoto H: 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
 8. Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T: Features of hepatitis E virus infection in Japan (review). *Intern Med* 42:1065-1071, 2003
 9. Shrestha SM, Shrestha S, Tsuda F, Nishizawa T, Takahashi M, Gotanda Y, Okamoto H: Genetic changes in hepatitis E virus of subtype 1a in patients with sporadic acute hepatitis E in Kathmandu, Nepal, from 1997 to 2002. *J Gen Virol* 85:97-104, 2004
 10. Usui R, Kobayashi E, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H: Presence of antibodies to hepatitis E virus in Japanese pet cats. *Infection* 32:57-58, 2004
- 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