

の HEV 株との比較

症例 1 の HEV の塩基配列決定は自治医科大学の岡本宏明先生に依頼し、3 型 (Miyako) であることが判明した。症例 2 についても HEV の塩基配列を調べたところ、同様に 3 型 (JYU-Okio4) であった (図 1、表 1)。

これまでに沖縄県内の動物について、HEV-RNA を調査したが、2000 年に西表 (イリオモテ) の野生イノシシの 2 頭から HEV が検出され (wbOK126, wbOK128)、さらに 2002 年に沖縄本島北部で獲れたマンダースから HEV が検出された (MNG-1)。また、沖縄県中央食肉衛生検査所が豚の HEV について調査し、2004 年に沖縄本島の北部と南部の豚、計 3 頭 (いずれも 3 ヶ月齢の豚) から HEV を検出した (swOK3, swOK14, swOK32)。これらの野生動物や豚由来の HEV について塩基配列が決定されており、ヒト由来株と比較するために系統樹解析を行った。

ヒト由来の HEV 株は前述のように何れも 3 型であり、沖縄本島の豚およびマンダースの HEV 株も同様に 3 型であった。しかしながら、お互いの相同性は比較的に低く 87～89% であった。2 症例の HEV 株は宮崎産の豚の HEV 株と相同性が高く、swJ19-1 (AB094279)、swJ19-10 (AB094288) の 2 株とは各々の間で 98% 以上の高い相同性を示した (図 1、表 1)。一方、西表で獲れた野生イノシシの HEV の 2 株はいずれも 4 型であった。

D. 結語

今回の調査で沖縄県でも、国内における HEV 感染が確認された。また、イノシシやマンダースからも HEV が検出され、野生動物にも HEV が蔓延していることが明らかになった。沖縄料理によく用いられる豚肉に関しては、3 ヶ月齢の豚から HEV が検出されたが、食肉として流通している 6～7 ヶ月齢については今後調査する予定である。また、生肉を摂食する習慣のあるヤギについても今後調査する予定である。

E. 謝辞

HEV 株のデータを提供していただいた自治医科大学の岡本宏明教授と沖縄県食肉衛生検査所の研究者の方たちに、心からお礼を申し上げます。

F. 研究発表

1. 論文発表

佐久川廣、山城剛、前城達次. D 型、E 型肝炎. 日内会誌 2004; 93: 2351-236.

2. 学会発表

高木亮、仲吉朝史、佐久川廣、他. E 型急性肝炎の 1 例. 内科学会九州地方会 宮崎市、2004 年 10 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。

ELISPOT 法による HEV 特異的 T 細胞検出系の構築

班友 垣見和宏 東京大学医学部附属病院

研究要旨：E 型肝炎の疫学とウイルス学的な検討が進み、わが国における HEV 感染症の実態が明らかになってきた。HEV-RNA の検出や抗 HEV 抗体の検出に加えて、ウイルスに対する感染防御において重要な役割を担う細胞性免疫応答を解析し、E 型肝炎の病態を解明することは、診断と治療やワクチン開発に非常に重要である。ELISPOT 法によって HEV 特異的 T 細胞を検出するアッセイ系を構築した。HEV ウイルス様中空粒子を抗原として用いて、二例の急性 E 型肝炎患者の回復期 (HEV-RNA が消失し、抗 HEV 抗体が陽性) の末梢血を検討したところ、Th1 タイプの HEV 特異的な T 細胞の存在が認められた。

<協力研究者>

HEV-VLP の提供：李 天成、武田直和 (感染研)

HEV 患者末梢血：姜 貞憲 (手稲溪仁会病院)

A. 研究目的

HEV 感染における宿主の免疫応答を理解し、その病態を解明することは、HEV 感染による肝炎の診断、治療、予防 (ワクチン開発) に重要である。そこで HEV に対する細胞性免疫応答を検出するためのアッセイシステムを構築した。

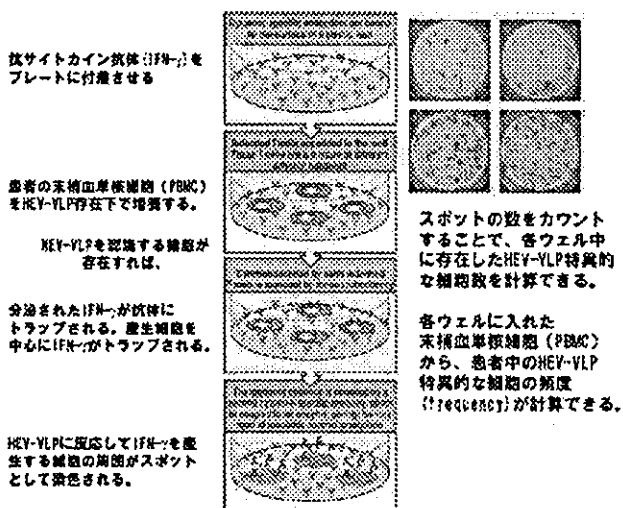
B. 研究方法

1. HEV 抗原 国立感染研の李、武田先生から提供を受けた genotype 1 の HEV ウイルス様中空粒子 (VLP) を HEV ウイルス抗原として用いた。

2. 検体 手稲溪仁会病院 姜医師から提供された急性 HEV 肝炎患者の回復期の末梢血から、lymphoprep を用いて末梢血単核細胞 (PBMC) を分離した。

3. ELISPOT (Enzyme-Linked Immunospot Assay) 法による HEV 特異的 T 細胞の検出 HEV

に反応して IFN- γ を産生する細胞を検出するために、ELISPOT 法を用いた。あらかじめヒト抗 IFN- γ 抗体を付着させた 96 穴プレートに、 1.5×10^4 , 5×10^4 , 1.5×10^5 , 5×10^5 個の PBMC を加え、10 U/ml の IL-2 存在下で 48 時間培養した。5 μ g/ml の HEV VLP を添加し、HEV を特異的に認識し反応する細胞を刺激した。HEV-VLP を認識する細胞が存在すれば、その細胞を中心として細胞の周囲に分泌された IFN- γ が抗体にトラップされる。MABTECH 社の ELISPOT キットを用いて IFN- γ

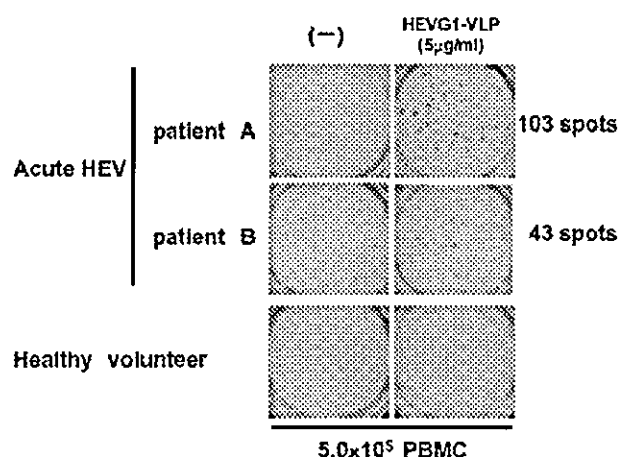


HEV 特異的 T 細胞の検出系 (ELISPOT)

を検出し、ペロキシダーゼ反応により発色させることによって HEV 特異的な IFN- γ 産生細胞をスポットとして検出し、カウントした。それぞれの条件を triplicate で培養し、スポット数を算定した。

C. 研究結果

急性 E 型肝炎と診断された患者で、手稲溪仁会病院において治療を受け、経過を詳細に観察された 2 例の患者の末梢血から PBMC を分離し、HEV 特異的な免疫応答の有無を検討した。2 例とも急性肝炎の回復期で HEV-RNA が陽性から陰性へ変化し、血中に抗 HEV 抗体が検出された時期に検体が採取された。HEV-VLP を非添加のウェルでは IFN- γ の産生は認められなかった。コントロールに用いた HEV 感染の既往がないと考えられる健常者の PBMC では、HEV-VLP の有無にかかわらず、IFN- γ の産生は認められなかった。Patient A では、 5×10^5 個の PBMC において、103 個の IFN- γ のスポットが観察され、Patient B では 43 個のスポットが観察された。PBMC 中の 5000-10000 個に 1 個の



Frequency of HEV specific IFN- γ producing cells

ンパ球が HEV 特異的な T 細胞で、HEV-VLP に反応して IFN- γ を産生すると推測された。

D. 考察

急性 E 型肝炎回復期患者末梢血中に HEV ウイルス抗原特異的な Th1 タイプの T 細胞が存在すること

が確認された。Patient A は完全に急性 E 型肝炎が治癒したと考える時期に採血が行われた。メモリー T 細胞による免疫応答が検出できた。Patient B は、急性肝炎に対するステロイドの投与が行われていた。HEV-RNA が消失し、抗 HEV 抗体が検出され、ステロイドの投与が中止されてから、T 細胞の免疫応答が検出された。今後より急性期から肝炎の経過とともにどのような細胞性免疫応答が観察されるか詳細に検討することが重要であると思われる。

HEV 感染患者、HEV 既感染者、HEV 不顕性感染、同じ食肉を摂取したにもかかわらず感染にいたらなかった HEV 感染患者家族や猟友会員など、T 細胞の免疫応答の解析によって、HEV の病態解明と今後のワクチン開発のための基礎的な情報としたい。

E. 結論

1. HEV-VLP を抗原として T 細胞による HEV 特異的な免疫応答を検出できるアッセイ系 (ELISPOT 法) を確立した。

2. 急性 HEV 感染症患者の回復期 (HEV-RNA 陰性、抗 HEV 抗体陽性) の末梢血中には HEV 蛋白を特異的に認識する Th1 タイプのヘルパー T 細胞が存在した。

3. HEV 感染における様々な病期において、HEV-RNA, 抗 HEV 抗体の検出に加えて、細胞性免疫応答の解析を行うことは、HEV 肝炎の診断や病態解明、さらにワクチン開発にとって非常に重要である。

II. 分担研究報告

厚生科学研究費補助金（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

本邦の非 ABC 型肝炎に占める E 型肝炎の位置づけ

分担研究者 矢野 公士 国立病院長崎医療センター

研究要旨：毎年急性肝炎の全国調査（国立病院機構共同研究班による）を解析し、非 ABC 型と診断された症例の中から、E 型肝炎の症例を抽出し臨床的解析を加えることを本研究の目的としている。本年度は 1980-2003 年に蓄積された非 ABC 型急性肝炎 949 例中、発症後 3 ヶ月以内の保存血清が存在した 719 例を対象とし、ELISA 法にて HEV-IgM 抗体、HEV-IgG 抗体を測定した。HEV-IgM 陽性は 29 例 (4.0%)、HEV-IgG 陽性は 91 例 (12.7%)であった。このうち、HEV-IgM 単独陽性は 6 例 (6/719, 0.8%)、HEV-IgG 単独陽性は 68 例 (68/719, 9.5%)で、両抗体陽性は 23 例 (23/719, 3.2%)であった。24 年間の期間中、年次別 HEV-IgG 単独陽性率、年次別両抗体陽性率は各々 0%~20%、0%~13%の間で推移し、有意な流行の時期は認めなかった。過去 24 年間における E 型急性肝炎の感染状況は、少数ながら持続的に、散発的発生を繰り返していたと考えられた。

共同研究者

玉田 陽子 国立病院長崎医療センター
 八橋 弘 国立病院長崎医療センター
 石橋 大海 国立病院長崎医療センター

らかにし、1980-90 年代に国内で E 型肝炎の流行があったのか否か、また、健常者における説明しがたい高抗体陽性率についても考察を加えることを目的とした。

A. 研究目的

日本国内における E 型肝炎日本固有株の位置づけは未だ明確でない。国内感染例や日本固有株の報告がなされているものの、E 型肝炎が「何時」日本に持ち込まれたのか、過去に国内でも流行があったのか、といったことに関して未解決の問題が残されているからである。本研究では、昨年度の 1990-2002 年の推移に加え、観察期間を大幅に広げ、E 型肝炎発症数の年次推移を過去にさかのぼって検討することとした。このことにより、これまで本邦で非 A 非 B 非 C 型とされてきた原因不明急性肝炎に占める E 型肝炎の発生頻度を明

B. 研究方法

全国 20 の国立病院急性肝炎共同研究班参加施設において 1980-2003 年にウイルス性急性肝炎として登録された症例は 3,746 例であり、A 型 1,527 例(41.3%)、B 型 954 例(25.4%)、C 型 316 例(8.3%)、非 ABC 型 949 例(25.0%)であった。このうち、発症後 3 ヶ月以内の保存血清が存在した 719 例を対象に、コスミックコーポレーション社製 ELISA を用いて、IgG 型、IgM 型 HEV 抗体を測定した。

C. 研究結果

HEV-IgM 陽性は 29 例 (4.0%)、HEV-IgG 陽

性は 91 例 (12.7%)であった。このうち、HEV-IgM 単独陽性は 6 例 (6/719, 0.8%)、HEV-IgG 単独陽性は 68 例 (68/719, 9.5%)で、両抗体陽性、すなわち E 型急性肝炎の可能性が濃厚である症例は 23 例 (23/719, 3.2%)であった。男性 19 例、女性 4 例、平均年齢は 49 ±15.0 歳であった (図 1)。

No.	年齢	性別	居住地	海外歴	No.	年齢	性別	居住地	海外歴		
1	1980	74	男	長崎	不明	14	1992	59	男	熊本	なし
2	1981	51	男	横浜	不明	15	1995	45	女	横浜	なし
3	1981	39	男	長崎	不明	16	1995	59	男	長崎	中国
4	1983	48	男	横浜	不明	17	1998	45	男	横浜	タイ
5	1984	39	男	横浜	不明	18	2000	51	女	横浜	なし
6	1984	39	男	横浜	不明	19	2000	79	女	大分	なし
7	1984	46	男	長崎	不明	20	2002	26	男	新潟	ハワイ
8	1985	73	男	熊本	不明	21	2002	54	男	福岡	なし
9	1986	62	男	福岡	不明	22	2002	52	男	大分	なし
10	1986	21	女	熊本	不明	23	2003	22	男	新潟	イン
11	1987	53	男	福岡	不明						
12	1987	48	男	熊本	不明						
13	1987	52	男	金沢	不明						

図 1. 1980-2003 年の期間、非 ABC 型急性肝炎のうち E 型急性肝炎と考えられる症例

発生地域は関東 (16 例)、九州 (6 例) 地域に集中しており、それぞれの非 ABC 型肝炎に占める E 型急性肝炎の割合は 5.1%、2.5%であった (図 2)。

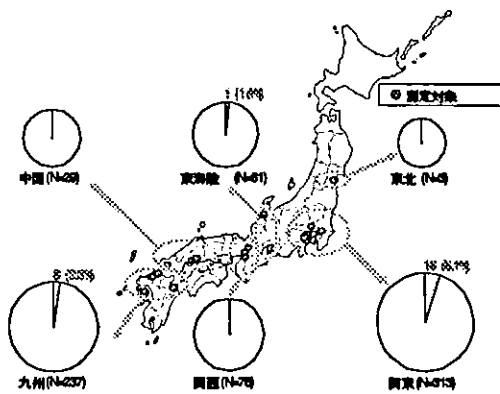


図 2.E 型急性肝炎の地理的分布

1980-2003 年の年次推移を検討 (図 3) したところ、24 年間、E 型肝炎発生率は、1980 年代は 0-8%代で推移している。また、90 年代に入ってもこのペースは変わらず、数%の間で推移しており、特別の流行の時期は認めな

かった。唯一、北海道地区で多数症例が報告された 2002 年は 13%と最も高く、この年に西日本でも流行が起こった可能性は否定できない。

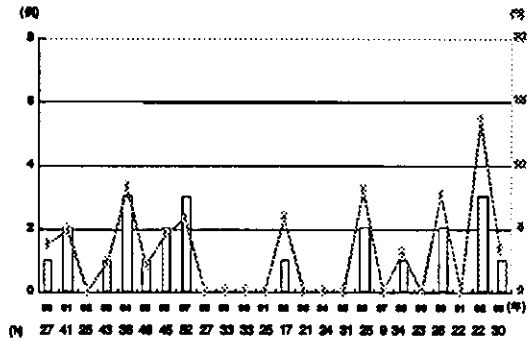


図 3. 非 ABC 型に占める E 型急性肝炎発生頻度年次推移 (棒は実数 (左軸) 折れ線は割合 (右軸) を示す)

D. 考察

これまで、散発的に日本国内の E 型肝炎症例が報告されているが、多数例、年度別発生頻度に関する知見は不足しているのが現状である。今回、全国 20 の国立病院の急性肝炎共同研究班参加施設によって集積された血清を解析することにより、疫学的な動向分析を行った。

今回の解析により、本邦においてこれまで非 ABC 型肝炎とされてきた急性肝炎症例のうち 3.2%ほどが E 型急性肝炎であることがわかった。また、既往感染と考えられる IgG 単独陽性例は 9.5%であり、日本人健常者における IgG 抗体陽性率よりもやや高い傾向にある。IgM 単独陽性例の解釈は困難であるが、IgG 出現以前の早期症例である可能性、偽陽性の可能性がある。同 ELISA 系を用いたこれまでの検討では IgM 単独陽性例からの HEV-RNA 検出例はなく、後者の可能性が高いと考えている。

これまでに報告されているように、発生例は圧倒的に男性に多く、平均年齢は 49 歳と他のどの急性肝炎のカテゴリー (A 型肝炎、B

型肝炎、C型肝炎、非 ABCD 型肝炎) よりも高いのが特徴である。

当共同研究班の地理的分布が西日本地区にシフトしており、E型肝炎多発地区とされる北海道地区の症例が正確にモニターされていないが、その中でも地理的不均一性が認められる。すなわち、九州、関東エリアに集中しており、食生活その他の環境因子の違いが要因と考えられる。家畜や野生動物などの動物からの感染が報告されており、このことと地域性との関連も否定できない。90年以前の症例については海外渡航歴が明らかにできていないが、海外渡航のエピソードはいずれの症例にも記載されておらず、多くは国内株による感染と考えている。

本研究により、E型急性肝炎の発生状況は、80年代から20余年にわたって、少数ながら持続的に、散発的発生を繰り返していたと考えられた。E型肝炎日本国内株がいつごろ、どのようにして日本国内に持ち込まれたかは明らかでないが、この発生状況から類推するに、1980年ごろには既に日本各地に振盪していたと考えられる。また、2000年以降の増加傾向は、顕著ではないが確かに認められ、今後も本研究班でモニターする必要がある。

E. 結論

1. E型急性肝炎の発生状況は、80年代から20余年にわたって、少数ながら持続的に、散発的発生を繰り返していた
2. E型肝炎は本邦においてまれな疾患ではあるが、動向については今後も本研究班でモニターする必要がある

F. 研究発表

1. 学会発表

①Koji Yano, Yoko Tamada, Hiroshi Yatsunami, Manabu Daikoku, and Hiromi Ishibashi: HEPATITIS E VIRUS AS A CAUSE OF NON-ABC ACUTE HEPATITIS IN JAPAN - 14th Biennial conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL)

New Delhi, India, December, 2004

②矢野公士、玉田陽子、八橋弘

本邦における E 型急性肝炎の実態 - 日本肝臓学会大会、福岡市 2004年11月

③玉田陽子、八橋弘、矢野公士、他 E 型肝炎診断の問題点: HEV 抗体の感度と特異性に関する検討 - 日本肝臓学会総会、浦安市 2004年6月

④矢野公士、玉田陽子、八橋弘、大黒学、石橋大海 イノシシ肉摂食による E 型肝炎集団発生 - 日本肝臓学会総会、浦安市 2004年6月

⑤矢野公士、玉田陽子、八橋弘 他 E 型急性肝炎の一例 - 第 84 回日本消化器病学会九州支部例会 福岡市 2004年12月

2. 論文発表

①Tamada Y, Yano K, Yatsunami H, Inoue O, Mawatari F and Ishibashi H Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E *J Hepatol*; 2004, 40(5):869-70.

②Masuda J, Yano K, Tamada Y, Takii Y, Ito M, Ohmagari K and Kohno S Case Report-Acute hepatitis E of a man who consumed wild boar meat prior to the onset of hepatitis in Nagasaki, Japan *Hepatol Res*; in press 2005

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請:
2. 実用新案登録:なし
3. その他:なし

E型肝炎ウイルスの進化速度と本邦における拡散時期の推定

分担研究者 溝上雅史 名古屋市立大学大学院医学研究科臨床分子情報医学

研究要旨：近年、渡航歴のない本邦固有の E 型肝炎ウイルス (HEV) による急性肝炎例が報告されているが、これらの HEV 株の起源や分岐時期に関しては不明である。今回我々は本邦の主要な genotype である III, IV の中で、HEV 全塩基配列が報告されている本邦固有株を用いて進化速度を求めた。進化速度は、 $(0.4-0.8) \times 10^{-3}$ と推定され、この進化速度に基づいて分岐時期を求めると、genotype III, IV とともに約 100 年前にすでに日本に侵入していた可能性が示唆された。その後、genotype III は 1920 年頃より緩やかに増加しているのに対し、genotype IV は最近 20 年で急激に増加していることがわかった。今回求めた拡散時期における当時の社会的背景を理解することで、HEV の拡散予防に役立つものと考えられた。

<共同研究者>

田中靖人¹、高橋和明²、三代俊治²

¹名古屋市立大学大学院医学研究科臨床分子情報医学、²東芝病院研究部

A. 研究目的

近年、渡航歴のない本邦固有の E 型肝炎ウイルス (HEV) による急性肝炎例が報告されているが、これらの HEV 株の起源や感染時期 (分岐時期) に関しては不明である。本邦における HEV の拡散時期を知るために、その変異 (進化) 速度を知ることが重要であり、今回我々はこれまでに本邦で報告された HEV 株を用いて、その進化速度を求め、本邦における分岐時期及び拡散時期を推定した。

B. 研究方法

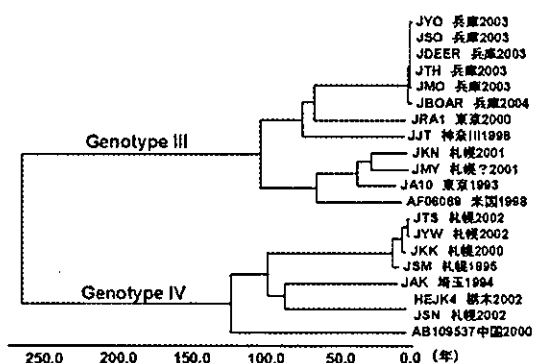
本邦の主要な genotype である genotype III, IV の中で、HEV 全塩基配列が報告され、しかもクラスターを形成している genotype III の兵庫県由来の 6 本 (JMO-Hyo03, JYO-Hyo03, JTH-Hyo03, JSO-Hyo03, JDEER-Hyo03, JBOARD04) 及び genotype

IV の北海道由来の 4 本 (JSM-Sap95, JKK-Sap00, JTS-Sap02, JYW-Sap02) を用いて進化速度を求めた。分岐時期の解析には、Complete genomes 20 本及び ORF1 部分配列 (326bp) 47 本を用いた。方法は、Alignment 作成後、6-parameter にて genetic distance を推定し、近隣結合法を用いて系統樹を作成した。進化速度と分岐時期は linear regression 解析及び TipDate, Genie software (Effective population size 法) を用いて推定した。

C. 研究結果

最初に分子系統樹を作成し、同一クラスター内で linear regression 解析により進化速度を推定したところ、兵庫株 genotype III 2.1×10^{-3} /site/year (synonymous)、北海道株 genotype IV 1.8×10^{-3} /site/year (synonymous) となった。All position での進化速度は $(0.4-0.8) \times 10^{-3}$ となり HCV の進化速度に類似していた。次に、この進化速度を基に分岐時期を求めると、genotype III, IV とともに約 100 年前にすでに日本に侵入し

ていた可能性が示唆された(図)。一方、本邦における HEV の拡散時期を TipDate 及び Genie を用いて検討したところ、genotype III は 1920 年頃より緩やかに増加しているのに対して、genotype IV は最近 20 年で急激に増加していることがわかった。特に、現在 HEV 感染の報告が多い札幌ではここ 10 年間で増加していることがわかった。



D. 考察

今回の解析により、HEV は 100 年以上前に genotype III と IV はすでに別れて本邦に存在していたと推定された。本邦における拡散時期については genotype III と IV とでは大きく異なり、genotype III は 20 世紀前半、genotype IV は近年北海道を中心に広がっていることが示された。今後症例数を増やし本邦における拡散時期をより正確に把握し、その当時の本邦における社会的背景を理解することで、HEV の拡散予防に役立つものと考えられた。

今回我々が用いた手法を用いれば、世界、特に衛生上問題が残る発展途上国における

HEV 拡散時期、拡散様式を把握し、HEV の拡散予防にも繋がると考える。

E. 研究発表

今回対象とした地域では、HEV 感染において鹿の生肉摂取が主要な役割を果たしていることが判明した。また、猪が HEV の reservoir であり感染源になり得ることが推測された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

[1] 田中靖人、溝上雅史. パネルディスカッション 5 : わが国における E 型肝炎の実態 : E 型肝炎ウイルスの進化速度と本邦における拡散時期の推定. 第 8 回日本肝臓学会大会. 平成 16 年 10 月 21, 22 日, 福岡 (肝臓 45 Supplement 2: A382, 2004)

[2] Kurbanov Fuat, 田中靖人、折戸悦朗、加藤孝宣、大野智義、杉原寛治、長谷川泉、藤原圭、伊藤清顕、小笹貴士、溝上雅史. E 型肝炎ウイルス抗体測定法における特異性の検討. 第 40 回日本肝臓学会総会. 平成 16 年 6 月 3-4 日, 東京 (肝臓 45 Supplement 1: A274, 2004)

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。

厚生科学研究費補助金（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

札幌地域 E 型急性肝炎における HEV 感染経路の検討

分担研究者 前久保 博士

手稲溪仁会病院 内科

研究要旨：本研究班における我々の課題は、HEV 高侵淫地域と考えられる札幌地域において E 型急性肝炎の臨床像を明らかにし、さらに HEV 伝搬経路を究明することにより、本疾患の診療及び予防に資することである。

班研究 2 年目においては、初年度に発掘し臨床像を検討した孤発性 E 型急性肝炎 37 症例を対象として患者聞き取り調査を行ない、札幌地域における E 型肝炎にたいし Zoonosis との関連性を中心に検討し、HEV 感染経路の解明を試みた。

共同研究者

姜 貞憲	手稲溪仁会病院	
	消化器病センター	
大西 幸代	同 内科	
荒川 智宏	札幌厚生病院	消化器科
狩野 吉康	札幌厚生病院	消化器科
豊田 成司	札幌厚生病院	消化器科

炎 135 症例中 E 型は 26.7% を占めたことから、札幌地域における成因不明急性肝炎では E 型が重要な位置を占めると考えられた。

本邦における E 型肝炎は、兵庫県における症例で鹿肉生食による感染が証明されて以来人獣共通感染症としてにわかに注目された。しかしながら E 型肝炎症例が多数報告される北海道ないし札幌地域における HEV の感染経路は依然として不明である。

A. 背景

2003 年度班研究において我々は札幌地域 2 施設における共同研究として、36 症例の E 型急性肝炎孤発例を新たに、或いは retrospective に診断し、その臨床像を検討した。これらのうち 6 症例 (16.7%) はプロトロンビン活性 40% 以下の重症化症例であり、うち 2 例は劇症肝炎を呈した。札幌地域では 1994 年には既に E 型肝炎症例が存在し、両施設とも 2001 年を中心とした症例数の増加を確認した。これらの孤発例は 1 例をのぞき E 型肝炎流行地域への渡航歴がなく、国内感染例と診断した。保存血清を対象に検査しえた成因不明急性肝

B. 研究目的

手稲溪仁会病院及び札幌厚生病院において感染背景を調査し、人獣共通感染の可能性を中心に HEV 伝搬経路を糾明することを目的とした。

C. 研究方法

1994 年から 2003 年迄に診療した E 型急性肝炎 37 症例を対象とし、2002 年 3 月から 2004 年 9 月までアンケート用紙 (表 1) を送付し、回収の際は患者宅訪問を行ない聞き取り調査

を行った。

表1. アンケート項目

1	急性肝炎で入院した頃から2-10週間前のことを教えてください。 魚介・肉類摂取 (特に「なまもの」生焼け) 屋内接触の機会 職場の住所、具体的な仕事の内容 生水、生食材、土に触れる機会 海外・国内旅行歴、血液感染リスク
2	日々の生活についてお答えください。 食料の買い物をする人、その場所 魚、精肉、内臓肉を食べる頻度、その調理方法 ペット飼育、野生動物との接触機会 漁師・酪農家・畜産業者・卸売り業者との接触機会 山・沢・沼・海へ行く機会 家庭菜園・園芸など土に触れる機会 幼児・子供との接触機会
3	肝炎になった時の身近な人の健康についてお答えください。 家族内発症、職場内発症の可能性 知人・友人内発症の可能性

E型肝炎の診断は、成因不明急性肝炎(non A to C 且つ CMV, EBV 急性感染除外)症例の初期血清に対して行った PCR による HEV RNA 陽性を根拠とした。A型急性肝炎 37 症例を疾患対照群とした。アンケートでは、HEV 感染後の潜伏期間を 2-8 週と想定した。

D. 研究結果

アンケートにたいする回答は対象群の 32 例 (86.5%) で得られ、うち 29 例では患者宅を訪問し聞き取り調査を行った。患者宅訪問延べ回数は 50 回で、21 例 (65.6%) に対しては複数回訪問した (表 2)。1 回の聞き取り調査に対する所要時間は 40-60 分であった。対象とした E 型 37 症例と回答が得られた 32 症例の背景に明らかな違いを認めなかった (表 2, 3)。

表2. 対象E型急性肝炎症例の背景と調査実施

症例数	37
男:女	29:8
年齢中央値	47
HEV genotype	
III:IV:III+IV	9:27:1
発症時期別症例数	
'94-00年	11
'01-03年	26
発症化症例数 (%)	6 (16.2)
アンケート回答症例数 (%)	32 (86.5)
患者宅訪問件数 (%)	29 (78.4)
平均訪問回数	5.0

表3. アンケート回答症例の背景

	A型	E型	p value*
症例数 (回答率%)	26 (68.4)	32 (86.5)	
男/女	11/15	25/7	0.0058
年齢中央値	51	42	
HEV genotype/III, IV		7, 24	
発症時期別症例数			
'94-00年	15	9	
'01-03年	11	23	0.0030
重症化症例数 (%)	3 (11.5)	6 (18.8)	0.4506

*: by χ^2 test

一方、対照とした A 型肝炎 37 症例では 26 例 (68.4%) で回答がえられた。これら対照群と比較すると、E 型症例は男性に多く、症例の多くが 2001 年から 03 年に発症しているため A 型に比べ発症時期に偏りがみられた (表 3)。

HEV の reservoir としてブタ、イノシシが注目されており、北海道からは市販ブタ肝が HEV に汚染されている可能性が示されたことから、ブタ肉及び肝、直腸等内臓肉の摂取傾向を両群で比較検討した。

E 型症例において HEV 感染潜伏期間におけるブタ内臓肉の摂取を A 型症例と比較すると、両群に差を認めなかった。さらに両群の背景の差を勘案し男性のみ、2001 年以降に限定して比較しても E 型でこれらの摂取がより多いという結果は得られなかった (表 4, 5, 6)。

表4. 潜伏期間中のブタ内臓肉*摂取

	A型(n=26)	E型(32)
レバー	6 (23.1)	8 (25.0)
直腸、結腸	13 (50.0)	16 (50.0)

表5. 潜伏期間中のブタ内臓肉*摂取 -男性-

	A型(n=12)	E型(25)
レバー	5 (41.7)	6 (24.0)
直腸、結腸	6 (50.0)	13 (52.0)

*: 内臓肉: 直腸、結腸、肝

さらに 1 ヶ月 1 回以上の摂取習慣の有無を同じく比較しても両群には差を認めなかった (表 7, 8, 9)。

表6. 潜伏期間中のブタ内臓肉*摂取 -2001-3年-

	A型(n=11)	E型(23)
レバー	3 (27.3)	5 (21.7)
直腸、結腸	7 (63.6)	8 (34.8)

*：内臓肉：直腸、結腸、肝

表7. 月1回以上のブタ肉/内臓肉*摂取

	A型(n=26)	E型(32)
精肉	24 (92.3)	28 (87.5)
レバー	9 (34.6)	10 (31.3)
直腸、結腸	9 (34.6)	14 (43.8)

*：内臓肉：直腸、結腸、肝

表8. 月1回以上のブタ肉/内臓肉*摂取 -男性-

	A型(n=12)	E型(25)
精肉	12 (100)	23 (92.0)
レバー	5 (41.7)	8 (32.0)
直腸、結腸	6 (50.0)	11 (44.0)

*：内臓肉：直腸、結腸、肝

表9. 月1回以上のブタ肉/内臓肉*摂取 -2001-3年-

	A型(n=11)	E型(23)
精肉	10 (90.9)	19 (82.6)
レバー	6 (54.5)	6 (26.1)
直腸	4 (36.4)	8 (34.8)

*：内臓肉：直腸、結腸、肝

2003年度分担研究報告書で明らかにしたように、2001-2003年では症例数が急増しており症例の性比、HEV genotype等感染の様相が著しく変化していたことから、HEV感染経路についてもそれ以前と違いが存在する可能性を考え、2000年以前と2001年以後に分けてさらに検討した。

表10. 2001年前後の症例におけるブタ肉/内臓肉*摂取

	潜伏時期		p-value by χ^2 -test
	00年以前 (n=6)	01年以後 (23)	
潜伏期間中摂取			
レバー	3 (33.3)	5 (21.7)	0.4959
直腸、結腸	7 (77.8)	9 (39.1)	0.0493
上記何れか	8 (88.9)	11 (47.8)	0.0593
月1回以上摂取			
レバー	4 (44.4)	6 (26.1)	0.3138
直腸、結腸	6 (66.7)	8 (34.8)	0.1021
上記何れか	7 (77.8)	9 (39.1)	0.0493
精肉	9 (100)	19 (82.6)	nt***

*：内臓肉：直腸、結腸、肝

***：not tested

疫学調査を行ったE型急性肝炎症例を発症年度により1994年から2000年迄と2001年から03年迄の両群に分けて検討した。94年から00年までの症例では潜伏期間における

症例ではブタ直腸、結腸の摂取頻度が高く、同時期にこれら或いは肝を摂取した頻度は01年度以降のそれよりも高かった。さらにこれら内臓肉を1ヶ月に1度以上摂取する食肉習慣があると答えた症例も00年以前でより高かった(表10)。

表11. 2000年以前におけるブタ肉/内臓肉*摂取

	A型(n=14)	E型(9)	p-value by χ^2 -test
潜伏期間中摂取			
レバー	4 (28.6)	3 (33.3)	nt***
直腸、結腸	6 (42.9)	7 (77.8)	0.0352
上記何れか	8 (57.1)	8 (88.9)	0.0352
月1回以上摂取			
レバー	3 (21.4)	4 (44.4)	0.2417
直腸、結腸	6 (35.7)	6 (66.7)	0.1470
上記何れか	6 (42.9)	7 (77.8)	0.0352
精肉	14 (100)	9 (100)	nt***

*：内臓肉：直腸、結腸、肝

***：not tested

00年以前におけるA型肝炎症例との比較では、E型では潜伏期間中及び日常の食肉習慣においてブタ内臓肉を摂取する頻度が高い傾向が示された(表11)。

E. 考察

北海道におけるE型急性肝炎に対して、HEVに汚染されたブタ肉ないし内臓肉摂取により発症する人獣共通感染症と見做す意見が存在する。2004年の北見市からの報告(加藤他肝臓45巻12号2004年)は、北海道における初のHEV集団感染の事例であるが、感染者に共通したブタ肉摂取を背景としたHEV感染の可能性を強く示唆している。しかしながら北海道内でE型肝炎症例の集積が最も多いと思われる札幌地域からはHEV感染におけるzoonotic factorが強く疑われる症例報告は未だ1例も提出されていない。

2001年以降3年間にあらたに診断されたE型肝炎症例は2000年までのそれに比べ症例数が急増した。症例背景としては女性例が、HEV genotypeではIIIが増加していた事を我々は既に報告した(第35回日本肝臓学会西部会2003年11月)。

2001年度以降におけるE型肝炎症例数の

急増は札幌地域 E 型肝炎の特徴の一つであり、HEV 感染経路を解明する上で重要な手がかりを与えている可能性がある。我々の疫学調査によれば、2000 年迄の期間では、その後と比べ、E 型症例にブタ内臓肉嗜好性がより高く、同時期の A 型症例よりもその傾向が強かった。

以上の解析結果から 2000 年以前には札幌地域においても、HEV で汚染されたブタ内臓肉の摂取により E 型肝炎が発症していた可能性が排除できない。しかしながら 01 年以降の札幌地域においては、A 型と比較して E 型症例に、ブタ内臓肉摂取頻度がより高いことは証明されず、ブタ関連 food borne transmission のみでは 01 年以降にみられる症例数の急激な増加は説明し得ない。

尤も、2001 年以降はブタ内臓肉摂取を介した HEV 感染症例が減少したと見做すことはできない。札幌地域においては、今回の疫学調査によっては捕捉できない、男性のみならず女性症例をも増加せしめるような他の感染経路を背景とする患者が増えたため、前者の比重が相対的に低下したと推測することが妥当と考えられる。

F. 結論

本年度の成果によって以下のことを確認することができる。

1. 2001 年以降に発症した E 型急性肝炎症例においては、HEV 感染と患者のブタ内臓肉摂取を直接関連づけることは困難である。
2. 2000 年迄に発症した症例では同様の関連を排除できないため、E 型急性肝炎は札幌地域においてもブタ内臓肉摂取を介した人獣共通感染症である可能性は尚存在する。

G. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 姜貞憲、三井慎也、西森博幸他
E 型急性肝炎重症化に寄与する因子の検討
第 40 回日本肝臓学会総会、浦安 2004 年 6

月

- 2) 大西幸代、姜貞憲、狩野吉康
パネルディスカッションわが国における E 型肝炎の実態 札幌地域における E 型急性肝炎疫学調査 第 8 回日本肝臓学会大会 福岡
2004 年 10 月
- 3) 姜貞憲、大西幸代、西森博幸他
札幌における E 型肝炎の臨床像 第 8 回日本肝臓学会大会 福岡 2004 年 10 月
- 4) Jong-Hon KANG, Toshiya Shinohara, Sachiyo Ohnishi et al. Histopathological analysis of sporadic hepatitis E cases in Sapporo, Japan, APASL 2004, New Delhi, India. 2004 年 12 月

2. 論文発表

- 1) S Ohnishi, J-H KANG, H Maekubo et al. A case report: two patients with fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan. Hepatol Res 2003.25; 213-218.
- 2) 大西幸代、姜貞憲、前久保博士、高橋和明、三代俊治 日本土着型 HEV による札幌地域 E 型肝炎の臨床像 日本臨床 62 巻 増刊号 8 532-535 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

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：ELISA 法による IgA クラス HEV 抗体の測定は、IgM クラス HEV 抗体よりも特異性に優れ、吸収試験も容易であることから、急性 E 型肝炎の血清診断に適していることが分かった。輸血に伴う HEV 感染が、わが国で既に 1979 年に存在していたことを実証した。わが国では HEV 汚染食物を介した zoonotic food-borne transmission が E 型肝炎の主要な原因であると推測されるが、感染源や感染ルートを特定できない E 型肝炎症例が未だ多く、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 型肝炎が少なからず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、複数種の動物を reservoir とする人畜(獣)共通感染症(動物由来感染症)であることが明らかになっている。本研究は、HEV 感染の核酸診断法および抗体測定法を確立し、ヒトおよびブタ等の動物での HEV の感染実態を把握するとともに、それら感染 HEV の特徴および感染経路を解明することを目的とする。

B. 研究方法

1. イムノグロブリン別の 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 4 の HEV ORF2 蛋白を固相抗原として、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、E 型肝炎の血清診断における特性を比較検討した。抗体測定系の特異性を高めるために、非組換え baculovirus を感染させたカイコ蛹由来する mock 蛋白を検体希釈液に添加した。また、特異性の確認のために固相に使用した抗原と同じ HEV ORF2 抗原を用い、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および肝臓から核酸を

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はなく、人権上の問題は生じない。

C. 研究結果

1. IgA クラス HEV 抗体測定による急性 E 型肝炎の血清診断

ELISA 法により、健常人 675 名の血清について IgM-HEV 抗体および IgA-HEV 抗体を測定し、mean +7SD に相当する OD 値 0.440 および 0.642 をそれぞれの cut-off 値とした。HEV RNA が検出され E 型肝炎と確定診断された 68 例の患者の初診時血清を用い、IgM-HEV 抗体と IgA-HEV 抗体を測定した結果、68 例全例で両抗体は陽性と判定された。コントロールとして用いた非 E 型の血清 2781 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・肝硬変・肝細胞癌患者の 274 検体、透析患者の 472 検体、慢性関節リュウマチ患者の 186 検体などを含む)では、16 検体で IgM-HEV 抗体が cut-off 値以上の OD 値

(0.462-2.541)を示し、別の4検体でIgA-HEV抗体がcut-off値以上のOD値(0.692-1.754)を示した。これら20検体はHEV RNAが陰性であり、3検体を除いてIgG-HEV抗体も陰性で、IgM-HEV抗体とIgA-HEV抗体の吸収試験がそれぞれ陰性であったことから、非特異反応による擬陽性と判定された。以上の結果はIgM-HEV抗体とIgA-HEV抗体を同時に測定し、両者が同時に陽性である場合に血清学的にE型肝炎と判定することになると擬陽性率がゼロ%になることを示している。IgM-HEV抗体測定では擬陽性率がIgA-HEV抗体測定に比べて4倍高く、吸収試験を行う際、IgA-HEV抗体吸収試験での3倍以上の抗原を用いても吸収がかかりにくい。したがって、1種類のイムノグロブリンについてHEV抗体を測定し急性E型肝炎の血清診断を行うにはIgA-HEV抗体が優れていると言える(研究発表1)。

2. ブタでのHEV感染

昨年度、北海道内の市販ブタ肝臓からHEV RNAが検出され(1.9%, 7/363)、E型肝炎患者の10例中9例が発症の1-2ヶ月前にブタ肝臓を摂取していたこと、そしてHEV汚染ブタ肝臓から分離されたHEVの1株と、実際にブタ肝臓を摂取したあとにE型肝炎を発症した86歳の男性から分離されたHEV株の塩基配列が100%一致していたことを明らかにし、感染源としてのブタ肝臓の重要性を報告した。その傍証として、インドネシアでのHEV抗体陽性率の調査から興味深い結果が得られた。イスラム教徒が殆どを占め、宗教上、ブタ肉を摂取しないスラバヤやロンボク島の住民ではHEV抗体陽性率がそれぞれ0.5%(2/393)、4%(17/446)と低いが、ヒンズー教徒が殆どを占め、ブタ肉や内臓を生で摂取し、儀式に際してブタの生血を飲む習慣があるバリ島の住民ではHEV陽性率が20%(54/276)と有意に高く、しかもバリ島の飼育ブタから、インドネシア固有と推測される4型HEVが分離された(研究発表5)。

3. 野生動物でのHEV感染

昨年度当研究班の班員によって、シカ生肉摂取後のE型肝炎事例(兵庫県)やイノシシの生の肝臓、あるいは焼肉を摂取した後にE型肝炎を発症した事例(鳥取県と長崎県)などが報告されたが、野

生のシカやイノシシでのHEV感染の実態は不明であった。そこで、国内11道県で捕獲された野生のシカおよびイノシシの血清と肝臓を用いHEVの感染状況を調査した。その結果、野生のシカでHEV抗体が検出されたのは2%(2/177)に過ぎず、132頭のシカ肝臓についてHEV RNAを検出したがいずれも陰性であった。また、野生のイノシシでは35頭中3頭(9%)でHEV抗体が検出された。また、HEV抗体は陰性であったが、1頭で血清と肝臓の両者からHEV RNA(遺伝子型3)が検出された(研究発表6)。

4. 二枚貝からのHEV感染の可能性

家族3人でベトナムに旅行し、ハロン湾で観光中に生の二枚貝を摂食した患者本人(56歳男性)のみが帰国後E型肝炎を発症したという典型的な「輸入E型肝炎」の事例を解析し、興味深い知見を得た。患者から分離されたHEVの遺伝子型は4型であった。これまで4型HEVはわが国のほか、中国、台湾、インド、インドネシア、ベトナムで分離されているが、Hijikataら(Intervirolgy 45:101-104, 2002)がベトナムの散発性急性肝炎患者から分離したHEV株(V091)と最も高い一致率(98.8%)を示した。また、旅行中、二枚貝を除いて食事の内容は家族3人にすべて共通であったこと、家族(妻と娘)のHEV抗体はIgGクラス、IgMクラス、IgAクラスいずれも陰性であったことから、旅行先のベトナムで発症の46日前に生で摂食した二枚貝が感染源であった可能性が濃厚であると考えられた(研究発表7)。

5. 輸血に伴うHEV感染

ALT値が61 IU/l以上の異常値を示した献血者560名についてIgM-HEV抗体およびIgA-HEV抗体を測定した結果、3名でIgMクラスおよびIgAクラスのHEV抗体が検出され、同時にHEV RNAも陽性であった。それらウイルス血症状態の献血者でのALT値は、1例では966 IU/lと極めて高い値を示していたが、残りの2例では61 IU/lと68 IU/lであり、正常上限からわずかに高い値を示すに過ぎなかった(研究発表8)。また、416名の透析患者での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。古い症

例ではあるが、輸血血液(2本)のパイロットが保存されており、患者から分離された HEV と 2 本中 1 本のパイロット血清中の HEV が 100%一致していた(研究発表9)。

D. 考察

以上の結果から、E 型肝炎の血清診断には IgA クラス HEV 抗体の測定が適していることが分かった。E 型肝炎の診断に応用し、本研究班での研究成果の蓄積に役立てたいと考えている。

豚舎という閉鎖区域で飼育されているブタと異なり、感染頻度は低いが、野生のイノシシやシカでの HEV 感染を確認できた。野生動物での感染源や感染ルートは何か、一過性感染としての HEV 感染のサイクルがどのように維持されているのかなど、今後解明されなければならない謎が多くあるが、国内に感染源としての動物が複数種存在することは確かであり、ブタやイノシシ、シカなどの動物由来 HEV 汚染食肉を生、ないし加熱不十分な状態で摂取した場合に人畜共通感染症としての HEV 感染が起こりうると言える。

牡蠣などの二枚貝を生食したあとの A 型肝炎の発症はよく知られている。HEV 感染の感染源の可能性の一つとして病歴聴取の際には「魚介類、特に二枚貝の生食の有無」も一項目加えて頂きたいと考えている。

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、地域差も明瞭であり、それが地域ごとにどの程度の頻度で起こっているかを明らかにすることは今後の重要な課題の一つである。

E. 結論

1. IgA クラス HEV 抗体の測定が急性 E 型肝炎の血清診断に有用である。
2. ブタや野生のイノシシ、シカなど複数種の動物がヒトでの HEV 感染の感染源となっている。
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。魚介類、特に二枚貝の生食の有無も病歴聴取の一項目に加え、その関与の可能性を明らかにしたい

4. 感染源や感染ルートを特定できない E 型肝炎症例が未だ多く、さらなる調査解析が必要である。

F. 研究発表

1. Takahashi M, Kusakai S, Mizuo H, Suzuki K, Fujimura K, Masuko K, Sugai Y, Aikawa T, Nishizawa T, Okamoto H: 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
2. Yamamoto T, Suzuki H, Toyota T, Takahashi M, Okamoto H: Three male patients with sporadic acute hepatitis E in Sendai, Japan, who were domestically infected with hepatitis E virus of genotype III or IV. *J Gastroenterol* 39:292-298, 2004
3. Sainokami S, Abe K, Kumagai I, Miyasaka A, Endo R, Takikawa Y, Suzuki K, Mizuo H, Sugai Y, Akahane Y, Koizumi Y, Yajima Y, Okamoto H: Epidemiological and clinical study of sporadic acute hepatitis E caused by indigenous strains of hepatitis E virus in Japan compared with acute hepatitis A. *J Gastroenterol* 39:640-648, 2004
4. Tanaka H, Yoshino H, Kobayashi E, Takahashi M, Okamoto H: Molecular investigation of hepatitis E virus infection in domestic and miniature pigs used for medical experiments. *Xenotransplantation* 11:503-510, 2004
5. Wibawa IDN, Muljono DH, Mulyanto, Suryadarma IGA, Tsuda F, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H: Prevalence of antibodies to hepatitis E virus among apparently healthy humans and pigs in Bali, Indonesia: identification of a pig infected with a genotype 4 hepatitis E virus. *J Med Virol* 73:38-44, 2004
6. Sonoda H, Abe M, Sugimoto T, Sato Y, Bando M, Fukui E, Mizuo H, Takahashi M,

- Nishizawa T, Okamoto H: Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan. *J Clin Microbiol* 42:5371-5374, 2004
7. Koizumi Y, Isoda N, sato Y, Iwaki T, Ono K, Ido K, Sugano K, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H: Infection of a Japanese patient by genotype 4 hepatitis E virus while traveling in Vietnam. *J Clin Microbiol* 42:3883-3885, 2004
 8. Fukuda S, Sunaga J, Saito N, Fujimura K, Itoh Y, Sasaki M, Tsuda F, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H: Prevalence of antibodies to hepatitis E virus among Japanese blood donors: identification of three blood donors infected with a genotype 3 hepatitis E virus. *J Med Virol* 73:554-561, 2004
 9. Mitsui T, Tsukamoto Y, Yamazaki C, Masuko K, Tsuda F, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H: 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

F. 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

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

① 我が国の劇症肝炎，LOHF における HEV 感染の実態

② 輸入感染症としての E 型急性肝炎：中国株の塩基配列の解析

分担研究者：持田 智（埼玉医科大学 消化器・肝臓内科 教授）

研究要旨：検討① 劇症肝炎，LOHF の全国集計に登録された症例を対象に，血清 HEV-RNA の測定に関する実態を明らかにする目的で，アンケート調査を実施した。未測定例との回答のあった症例では，保存血清を提供いただき，HEV-RNA を測定した。また，陽性例ではその塩基配列を解析した。劇症肝炎，LOHF でウイルス感染が明らかでない症例の比率は，2001 年 50% (54/108)，2002 年 54% (69/127)，2003 年 50% (47/94) であった。これら症例の中で，血清 HEV-RNA が測定されていたのは，2001 年 2% (1/54)，2002 年 17% (12/69)，2003 年 28% (13/47) であり，陽性であったのは 2001 年 1 例，2002 年 2 例の計 3 例で，何れも北海道からの登録例であった。IgM-HEV の測定も含めると，2003 年はウイルス感染の明らかでない症例の 40% (19/47) で HEV に関する検索が実施されていたが，陽性例は認められなかった。保存血清を用いた検討では北海道から 2001 年に登録された劇症肝炎 1 例で HEV-RNA が陽性であった。単離した HEV 株は genotype IV で，全長塩基配列を解析したところ，約 6 ヶ月前に北海道で発症した急性肝炎重症型症例から検出された株と 99.6% の相同性が認められた。劇症肝炎，LOHF の成因診断では，HEV に関する検索が普及しつつあるが，E 型症例は北海道を除くと稀と考えられる。また，今回単離された HEV 株は劇症化に関わる株である可能性があり，その特徴について更なる検討が必要である。検討② 1995 年以降に埼玉医科大学病院に入院した劇症肝炎，急性肝炎症例のうち，ウイルス感染の明らかでない 83 症例を対象に血清 HEV-RNA を測定したところ，7 例 (8%) が陽性であり，2 例では中国への渡航歴が認められた。両症例から単離した HEV 株は何れも genotype IV で，全長塩基配列を解析したところ 91.8% の相同性が認められた。分子系統樹による解析では，これらの 2 つの株は中国から報告された 3 種類の HEV 株とは異なる枝に位置していた。2 症例は 2 年 5 ヶ月の間隔において西安と上海で発症しており，病態も後者は自己免疫性肝炎に類似するなど差異が認められた。従って，これらの株は中国に広く分布している新たな HEV 株で，症例に応じて異なった肝病態を呈する可能性があると考えられた。

研究協力者

松井 淳（埼玉医科大学 消化器・肝臓内科 講師）
稲生 実枝（埼玉医科大学 消化器・肝臓内科 講師）
小池 雅美（埼玉医科大学 消化器・肝臓内科 大学院生）
藤原 研司（埼玉医科大学 消化器・肝臓内科 主任教授）
高橋 和明（東芝病院 研究部）
三代 俊治（東芝病院 研究部 部長）

この研究は，特定疾患対策研究事業「難治性の肝疾患に関する研究」班（戸田 剛太郎班長，藤原 研司班員）と共同で実施している。

A. 研究目的

国内固有の HEV 株による急性肝疾患が注目されている。厚生労働省「難治性の肝疾患に関する研究」

班が実施している劇症肝炎，LOHF の全国集計でも，2001 年の発症例として E 型症例が登録された¹⁾。今後，HEV-RNA の測定が普及すると，成因不明例の中から E 型症例が抽出される可能性がある。そこで，

劇症肝炎, LOHF の全国集計に登録された症例を対象に, 血清 HEV-RNA の測定に関する実態を明らかにする目的で, アンケート調査を実施した。未測定と回答のあった症例では保存血清を供与いただき, HEV-RNA を測定し, 陽性例ではその塩基配列を解析した。

また, 国内固有の HEV 株による急性肝疾患の特徴を明らかにするためには, 輸入株による症例と比較した病態の差異を, ウイルスの差異との関連で検討する必要がある。そこで, 埼玉医科大学病院に入院した急性肝炎, 劇症肝炎症例を対象に, 血清 HEV-RNA 陽性かつ海外渡航歴の認められる症例を抽出し, これら症例から単離された HEV 株の塩基配列を解析した。

B. 方法

① 2000~2003 年に発症した劇症肝炎 413 例 (急性型 202 例, 亜急性型 211 例), LOHF 37 例のうち, A, B, C 型肝炎ウイルスの感染が明らかでない 240 例 (成因不明例, 薬物性および自己免疫性も含む) を登録した施設に, 血清 HEV-RNA, IgM-HEV の測定状況をアンケート調査した。血清 HEV-RNA を測定していない場合は, 保存血清の供与を依頼し, HEV-RNA を Takahashi らの方法²⁾に従って測定した。陽性例では, 全長塩基配列を解析し, 既報例との相同性を分子系統樹により解析した。

② 1995 年以降に埼玉医科大学病院に入院した劇症肝炎, 急性肝炎症例のうち, A, B, C 型肝炎ウイルスの感染が明らかでない 83 例を対象に, 保存血清を用いて HEV-RNA を測定した。陽性例のうち, 海外渡航歴を有する症例では, 全長塩基配列を解析し, 既報例との相同性を分子系統樹により解析した。

C. 成績と考案-I : 劇症肝炎, LOHF における HEV 感染の実態

劇症肝炎, LOHF でウイルス感染が明らかでなかった症例の比率は, 2000 年 58% (70/121), 2001 年 50% (54/108), 2002 年 54% (69/127), 2003 年 50% (47/94) であった。2000 年は血清 HEV-RNA が測定されていた症例は存在しなかった。しかし, 2001 年は 2% (1/54), 2002 年は 17% (12/69), 2003 年は 28% (13/47) で血清 HEV-RNA が測定されており, 陽性であったのは 2001 年 1 例, 2002 年 2 例の計 3 例であった。2003 年は IgM-HEV を測定した症例も含めると, 40% (19/47) で HEV に関する検索が実施されていたが, 陽性例は認められなかった。血清 HEV-RNA が測定されていなかった症例で保存血清を供与いただいたのは, 2000~2002 年の症例では計

47 例 (26%) であったが, このうち陽性であったのは 2001 年に登録された劇症肝炎急性型 1 例であった。2003 年の症例に関しては, 現在, 保存血清の回収作業を進めている途中である。従って, 2000~2002 年に発症した劇症肝炎, LOHF では 356 例中 4 例 (1%) が E 型であったが, これらは何れも北海道からの登録例であった。

保存血清から単離した HEV 株 (JMT-Sap01) は genotype が IV 型であり, 全長塩基配列を解析したところ, 約 6 ヶ月前に北海道で発症した急性肝炎重症型症例から検出された株 (JKK-Sap00; AB074917) と 99.6% の相同性が認められた。領域ごとの相同性は塩基レベルでは ORF1 が 99.7%, ORF2 が 99.5%, ORF3 が 99.7% であり, アミノ酸レベルでは夫々 99.9%, 99.9%, 100% であった。分子系統樹 (図 1) では JMT-Sap01 は JKK-Sap00 とともに, 北海道からの単離株からなるクラスターの中で, 枝の 1 つを形成していた。これらの株は肝炎の重症化に関わる HEV 株である可能性がある。

D. 成績と考案-II : 中国から輸入された HEV 株における塩基配列の解析

ウイルス感染の明らかでない劇症肝炎, 急性肝炎 83 例のうち 7 例 (8%) で血清 HEV-RNA が陽性であった。その内訳は劇症肝炎 2 例, 急性肝炎 5 例で, 急性肝炎の 2 例に海外渡航歴が認められた。第 1 例は 50 歳, 男性で, 前者は 1998 年に西安へ滞在中に発症した。第 2 例は 58 歳, 男性で, 2001 年に上海に渡航し, 帰国 1 ヶ月後に発症した。ORF1 の塩基配列を解析したところ, 何れも genotype は IV 型であった。全長塩基配列の解析から, 第 1 例の HEV 株 (JKO-ChiSai98c; AB197673) は第 2 例の株 (JYI-ChiSai01c; AB197673) と 91.2% の相同性が見られることが判明した。領域ごとの相同性は, 塩基レベルでは ORF1 が 91.0%, ORF2 が 92.5%, ORF3 が 96.3%, アミノ酸レベルでは夫々 97.6%, 99.1%, 94.5% であった。

分子系統樹による検討では (図 1), JKO-ChiSai98c と JYI-ChiSai01c は日本固有株のみならず, 既報の中国株 (Beijing T1; AJ272108, CCC220; AB108537, swCH25; AY594199)^{3,4)}とも異なる枝に位置しており, これらとの相同性も塩基レベルで 81.0% から 81.8% と低かった。従って, JKO-ChiSai98c と JYI-ChiSai01c は, 中国に広く分布している新たな HEV 株である可能性があると考えられた。

両ウイルス株の単離された症例は, 病態に差異が認められた。第 2 例では, 肝炎発症時に血清 IgG 濃度が 2,300 mg/dL と高値であり, 肝組織には形質細

胞の浸潤が観察された。本症例では抗核抗体が陰性であったものの自己免疫性肝炎が疑われ、副腎皮質ステロイドを投与されていた。一方、第 1 例にはこれら免疫異常は認められなかった。KO-ChiSai98c と JYI-ChiSai01c のアミノ酸配列に相同性が高いことを考慮すると、E 型急性肝炎における肝病態の成立には、宿主要因の寄与が大きいものと推定される。しかし、一方では、両 HEV 株でアミノ酸配列に差異の認められる部分が免疫異常の成立に関与している可能性も否定できない。この点に関しては、今後の検討が必要であろう。

E. 結語

わが国の劇症肝炎、LOHF における成因診断では、HEV に関する検索が普及しつつあるが、E 型症例は北海道を除くと稀と考えられる。また、今回単離された HEV 株 (JMT-Sap01) は劇症化に関わる株である可能性があり、その特徴について更なる検討が必要である。一方、海外渡航歴のある急性肝炎症例の検討からは、中国に広く分布している可能性がある

新たな HEV 株 (JKO-ChiSai98c, JYI-ChiSai01c) が検出された。これらの株はアミノ酸配列に相同性は高いが異なった肝病態が成立しており、E 型急性肝炎の病態成立におけるウイルス側要因と宿主要因の関連を検討する際に、有用であると考えられた。

F. 参考文献

- 1) 藤原研司, 持田 智, 松井 淳. 劇症肝炎及び遅発性肝不全の全国集計 (2001 年). 厚生労働省特定疾患対策事業「難治性の肝疾患に関する研究班」平成 14 年度報告書, pp81-90, 2003.
- 2) 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: 308-318.
- 3) 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: 252-256.