

## 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）  
E 型肝炎の感染経路・宿主域・遺伝的多様性・感染防止・診断・治療に関する研究  
平成 18 年度分担研究報告書

## HEV の培養系の確立とその応用

分担研究者 岡本宏明 自治医科大学医学部教授

**研究要旨：**E 型肝炎ウイルス (HEV) については、これまでに効率的な培養系が確立されていなかった。今回、培養上清中に高濃度のウイルス粒子が産生され、継代可能な培養系を確立することに成功し、その感染系としての有用性の評価を行うとともに、応用研究の一部として HEV の温度感受性と HEV 抗体の中和能に関する検討を行った。

### A. 研究目的

E 型肝炎ウイルス (HEV) については、これまでに培養上清中に高濃度のウイルス粒子が産生されるような効率的な培養系が確立されていなかった。そのため、HEV の増殖機構や物理化学的性状に関する基礎的研究はほとんど進んでいないのが実情である。本研究では、効率的な HEV の感染・培養系を開発すること、そしてその評価とその展開研究を実施することを目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. 接種材料

HEV RNA titer が  $2.0 \times 10^7$  copies/ml であることが判明していた一人の国内感染 E 型肝炎患者から提供された糞便浮遊液 (JE03-1760F) を用いた。

#### 2. 細胞培養

PLC/PRF/5 (Alexander) 細胞、HepG2 細胞、Huh7 細胞、A549 細胞などを含む 21 種類の樹立細胞株について monolayer を準備し、HEV を接種した。細胞培養は常法に従って行い、2 日ごとに培養液の半分を新しい培養液に交換する方法で行った。

#### 3. 継代培養

ポアサイズ  $0.22 \mu\text{m}$  のフィルターを通した培養上清を、新たな細胞 monolayer に接種し、継代培養を行った。

#### 4. HEV RNA の定量測定

QuantiTect Probe RT-PCR kit (Qiagen) を用い、保存性の高い ORF3 領域を標的領域として real-time PCR 法により HEV RNA の定量測定を行った。

#### 5. Western blot 法

カイコ蛹で発現した精製 HEV-ORF2 抗原を免疫原として産生したマウスモノクローナル抗体 (H6210) をプローブとし、常法に従い、培養上清中の HEV ORF2 蛋白を Western blot 法により検出した。

倫理面への配慮：研究用血清・糞便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、検体提供者は匿名化されているため、個人のプライバシーを侵害することはない、人権上の問題は生じない。

### C. 研究結果

#### 1. 培養系の確立

21 種類の樹立細胞株のうち、PLC/PRF/5 細胞と A549 細胞が HEV の増殖を支持することが分かった。培養温度を  $35.5^\circ\text{C}$ 、あるいは  $37.0^\circ\text{C}$  として比較すると、 $35.5^\circ\text{C}$  の温度で、PLC/PRF/5 細胞を用いた場合に最も増殖効率が高いことから、以後の解析は PLC/PRF/5 細胞 ( $35.5^\circ\text{C}$ ) の条件で実施した。直径  $3.5 \text{ cm}$  の 6-well dish を用い、1 well あたり  $6.0 \times 10^4$  copies の HEV を接種すると接種後 12 日前後には培養上清中で HEV RNA が検出できるようになり、約 2 ヶ月後には  $10^7$  copies/ml に達することが分かった。

培養上清中の HEV RNA 量およびその経時変化は、接種ウイルス量に依存しており、 $8.6 \times 10^5$  copies/well の HEV を接種した場合には、60 日後に  $10^8$  copies/ml に達することが分かった。

また、培養上清中の HEV 粒子 (ORF2 蛋白) の存在を Western blot 法によっても確認することができた。 $65 \text{ kDa}$  と  $74 \text{ kDa}$  のバンドが観察され、後者は糖付加に起因するものと推測された。

#### 2. 培養上清中 HEV の継代培養

糞便中 HEV を接種し 28 日目の培養上清を新たな PLC/PRF/5 細胞に接種し、Passage 1 とした。その 56 日目の培養上清を継代し、Passage 2 とした。順次継代を重ね、本報告書を書いている時点(2007 年 3 月)で Passage 11 に達している。

### 3. 培養系を用いた HEV の温度感受性についての予備検討

HEV 含有糞便浮遊液を 25℃, 30 分、56℃, 30 分、70℃, 10 分、95℃, 1 分、および 95℃, 10 分の 5 種類の条件で熱処理し、感染性の有無を 50 日間の維持培養により評価したところ、70℃, 10 分、95℃, 1 分、および 95℃, 10 分の 3 条件では培養上清中で全く HEV RNA が検出されなかった。一方、25℃, 30 分では未処理のコントロールと変わらず、56℃, 30 分の条件でも感染性がまだ残っていることが分かった。

### 4. 培養系を用いた HEV 抗体の中和能に関する検討

IgM クラス HEV 抗体が高力価で検出される E 型肝炎患者回復期血清が HEV の感染を阻止しうるか否かの検討を行った。その結果、感染 HEV の遺伝子型が 1 型、3 型、4 型のいずれであっても、糞便浮遊液中 HEV (3 型)の感染が成立しないことが分かった。また、8.7 年前、および 24 年前に HEV に感染し E 型肝炎を発症した患者の血清 (IgG クラス HEV 抗体のみ陽性)の中和能についても検討した。その結果、感染後 8.7 年、あるいは 24 年経過した時点の血清であっても、中和能を保持していることが分かった。

## D. 考察

蛍光抗体法により培養細胞内の HEV 抗原を検出し、HEV の温度感受性や HEV 抗体の中和能を検討した報告はあるが (Emerson et al., J Infect Dis 192:930-933, 2005; Emerson et al., J Gen Virol 87:697-704, 2006)、今回報告したような、培養上清中に高濃度の HEV 粒子が産生分泌される培養系の確立は、世界で初めてである。この培養系を用いることにより、HEV に関する多方面の数々の疑問に一つ一つ答えを出すことが可能になったと言える。

## E. 結論

高力価の HEV を含む糞便浮遊液 ( $2.0 \times 10^7$  copies/ml)を用い、HEV の効率的な培養系を樹立することができた。

## F. 研究発表

1. Inoue J, Nishizawa T, Takahashi M, Aikawa T, Mizuo H, Suzuki K, Shimosegawa T,

Okamoto H: Analysis of the full-length genome of genotype 4 hepatitis E virus isolates from patients with fulminant or acute self-limited hepatitis E. J Med Virol 78:476-484, 2006

2. Mitsui T, Tsukamoto Y, Hirose A, Suzuki S, Yamazaki C, Masuko K, Tsuda F, Endo K, Takahashi M, Okamoto H: Distinct changing profiles of hepatitis A and E virus infection among patients with acute hepatitis, patients on maintenance hemodialysis and healthy individuals in Japan. J Med Virol 78:1015-1024, 2006
3. Inoue J, Takahashi M, Ito K, Shimosegawa T, Okamoto H: Analysis of human and swine hepatitis E virus (HEV) isolates of genotype 3 in Japan that are only 81-83% similar to reported HEV isolates of the same genotype over the entire genome. J Gen Virol 87:2363-2369, 2006
4. Inoue J, Takahashi M, Yazaki Y, Tsuda F, Okamoto H. Development and validation of an improved RT-PCR assay with nested universal primers for detection of hepatitis E virus strains of significant sequence divergence. J Virol Methods 137(2):325-333, 2006
5. Tsatsart-Od B, Takahashi M, Endo K, Agimaa D, Buyankhuu O, Okamoto H. Comparison of hepatitis A and E virus infections among healthy children in Mongolia: evidence for infection with a subgenotype IA HAV in children. J Med Virol 79:18-25, 2007
6. Tanaka T, Takahashi M, Kusano E, Okamoto H. Development and evaluation of an efficient cell-culture system for *Hepatitis E virus*. J Gen Virol 88:903-911, 2007

## 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

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
E 型肝炎の感染経路・宿主域・遺伝的多様性・感染防止・診断・治療に関する研究  
分担研究報告書

## HEV キャプシド蛋白質を発現する形質転換植物の開発

分担研究者 津田 新哉 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 中央農業総合研究センター

**研究要旨：**本研究の目的は、HEV 中間宿主である豚の飼料として利用することが考えられる「食べるワクチン」を開発するために、HEV のキャプシド蛋白質（CP）を植物細胞内で発現させ、経口で効率的に免疫を賦与するための食用ワクチンを開発することである。本年度は、昨年度構築した二つの Genotype の植物細胞発現用 HEV CP 遺伝子を形質転換したレタスを開発する。また、それら導入遺伝子をより効率的に安定して発現させるために、小胞体移行・滞留ペプチドシグナルを付加した CP 遺伝子が発現する形質転換レタスも併せて作製する。また、転写後型遺伝子サイレンシング機能を活用した高発現形質転換レタスの開発にも着手する。

共同研究者

大西 純 リサーチ・レジデント

### A. 研究目的

ヒト E 型肝炎ウイルス（HEV）は「人獣共通感染ウイルス」であり、HEV 感染の reservoir である野生のイノシシ、シカ、または飼育ブタなどの精肉を摂食するとその後に肝炎を発症した事例が報告されている（Tei et al., 2003, Yazaki et al., 2003）。その感染経路を遮断するひとつの方法は、中間宿主となるブタなどに HEV に対する免疫を賦与することが効果的と思われる。

バキュロウイルスを用いた昆虫細胞内で発現させた組換え HEV キャプシド蛋白質（CP）は、細胞内で集積することで球状の中空粒子を自動的に形成し、さらに、組換え HEV CP をネズミに経口投与することによりワクチン効果が発揮されると報告されている（Li et al., 1997）。

本研究では、飼育ブタの HEV 感染化予防を目的とした経口ワクチンを開発するため、まずは HEV CP 遺伝子を導入した形質転換レタスを作製し、HEV CP を産生する飼料・食用作物

を開発することで経口投与ワクチンの創出へと繋げる。すなわち、精肉を介した経口感染による E 型肝炎の伝染環を遮断することを目的としており、さらにその技術は、HEV CP 遺伝子発現形質転換レタスをヒトが直接摂食することにより本病を予防できる革新的なワクチン技術の開発へと発展する。

### B. 研究方法

#### HEV CP 遺伝子組換えレタスの開発

遺伝子の翻訳過程において各アミノ酸のコードン使用頻度は動物と植物間で大きく異なる。そのため、植物細胞内において動物型遺伝子の発現効率は極端に落ちる。野生型 HEV のコードンは動物型であるので、植物型に改変した同ウイルスの CP 遺伝子を植物細胞発現用プラスミドベクターに組み込み、レタスに形質転換した。レタスに導入する CP 遺伝子は、Genotype III 型の JRA、Genotype IV 型の JSN の塩基配列を基にそれぞれを植物発現用遺伝子となるよう合成オリゴ DNA をプライマーとした overlapping PCR 法で改変した（平成 17 年度報告）。さらに、遺伝子導入されたレタス細胞内

において外来遺伝子を効率的に安定して発現させるため、CP 遺伝子の 5' 及び 3' 末端に小胞体移行・滞留シグナルペプチド配列 (ER シグナル) を付加したそれぞれの HEV CP 遺伝子もレタスの形質転換に用いた。

一方、導入遺伝子の高発現レタスを獲得するためのひとつの戦略として、真核生物の細胞内遺伝子発現の過程で起こる転写後型遺伝子サイレンシング機能を活用した方法が有効と考えられる (Kubota et al., 2003)。そこで、複数の DNA コピーをゲノム上に保有することで起こる転写後型遺伝子サイレンシングを抑制するための植物ウイルス遺伝子 (HC-Pro) を発現する形質転換レタスも併せて作製した。

レタスへの形質転換は、アグロバクテリウム法を用いた (Sun et al., 2006)。形質転換効率を上げるために、キメラの解消、アグロバクテリウム感染培地の改良、植物培地の改良などを行った。

### C. 研究結果

#### 各種 HEV CP 遺伝子を導入した形質転換レタスの作製

アグロバクテリウム法を用いてレタスを形質転換した。平成 19 年 3 月 1 日現在までに得られた形質転換レタス株数を表 1 に示した。

形質転換用バイナリーベクターには HEV CP 遺伝子と共にカナマイシン耐性遺伝子を連結しているため、外来遺伝子を導入した形質転換レタスの 1 次選抜にはカナマイシンを用いた。カナマイシンを 50mg/ml 濃度に混合した植物培地で生育可能となった形質転換当代レタスは、JRA で 11 株、JRA (ER シグナル) で 58 株、JSN で 19 株、JSN (ER シグナル) で 19 株、HC-Pro で 40 株であった。それら各株の葉片から DNA あるいは RNA を調製し、それらを鋳型にして HEV CP 遺伝子を対象とした定量的 PCR 法を実施した。DNA はゲノム中に導入された外来遺伝子のコピー数を、RNA は細胞内で発現している外来遺伝子由来の mRNA 発現量を調査するために用いた。その

結果、JRA の DNA 検定では単一コピーが 1 株で複数コピーが 9 株、陰性反応が 1 株であった。同様に、JRA (ER シグナル) では単一コピー 29 株、複数コピー 13 株、陰性反応 16 株であった。JSN では単一コピー 0 株、複数コピー 14 株、陰性反応 5 株、JSN (ER シグナル) では単一コピー 0 株、複数コピー 6 株、陰性反応 13 株であった。また、HC-Pro 遺伝子では単一コピー 8 株、複数コピー 24 株、陰性反応 8 株であった。

次に、形質転換レタスから調製した mRNA を検定した。その結果、DNA 単一コピーで mRNA を発現していたのは JRA で 1 株、JRA (ER シグナル) で 22 株、HC-Pro で 2 株であった。JSN、JSN (ER シグナル) では mRNA 発現株は得られなかった。DNA 単一コピーで mRNA を発現していないのは JRA (ER シグナル) で 7 株、HC-Pro で 2 株であった。JRA、JSN、JSN (ER シグナル) では皆無であった。DNA 複数コピーで mRNA を発現しているのは JRA (ER シグナル) で 2 株、JSN で 6 株、JSN (ER シグナル) で 4 株、HC-Pro で 12 株であった。JRA では得られなかった。DNA 複数コピーで mRNA を発現していないのは JRA で 9 株、JRA (ER シグナル) で 11 株、JSN で 5 株、JSN (ER シグナル) で 2 株、HC-Pro で 3 株であった。

表 1 HEV CP 遺伝子を導入された形質転換レタス株数 (平成 19 年 3 月 1 日現在)

| 導入遺伝子        | Km <sup>r</sup> | Genomic DNA |    | mRNA |    |
|--------------|-----------------|-------------|----|------|----|
|              |                 |             | 株数 |      | 株数 |
| JRA          | 11              | 単一          | 1  | 発現   | 1  |
|              |                 |             |    | 非発現  | 0  |
|              |                 | 複数          | 9  | 発現   | 0  |
| JRA (ERシグナル) | 58              | 単一          | 29 | 非発現  | 9  |
|              |                 |             |    | 発現   | 22 |
|              |                 | 複数          | 13 | 非発現  | 7  |
| JSN          | 19              | 単一          | 0  | 発現   | 2  |
|              |                 |             |    | 非発現  | 11 |
|              |                 | 複数          | 14 | 発現   | 0  |
| JSN (ERシグナル) | 19              | 単一          | 0  | 非発現  | 0  |
|              |                 |             |    | 発現   | 6  |
|              |                 | 複数          | 6  | 非発現  | 5  |
| HC-Pro       | 40              | 単一          | 8  | 発現   | 0  |
|              |                 |             |    | 非発現  | 0  |
|              |                 | 複数          | 24 | 発現   | 4  |
|              |                 |             |    | 非発現  | 2  |
|              |                 |             |    | 発現   | 12 |
|              |                 |             |    | 非発現  | 3  |

Km<sup>r</sup>: カナマイシン耐性株数

単一: ゲノムDNA内に導入遺伝子1コピーだけが挿入された株数

複数: ゲノムDNA内に導入遺伝子が複数挿入された株数

発現: 導入遺伝子からmRNAが発現している株数

非発現: 導入遺伝子からmRNAが発現していない株数

JRA (ER シグナル) の単一コピー mRNA 発

現株は22株である(表1)。それらの細胞内で発現される mRNA の量について、同じく細胞内で発現される宿主植物のハウスキーピング遺伝子のひとつであるユビキチン (ubiquitin) の mRNA 量と比較した。その結果、発現量の最も高かった株は、56.75 倍、次いで 48.2 倍、40.64 倍であった(データ割愛)。

## E. 考察

それぞれの実験区において、HEV CP 遺伝子を導入した形質転換レタスが得られた。しかし、現在までに得られている形質転換レタスの中で、「DNA 単一コピー及び mRNA 発現」の株数が少ない、あるいは皆無の区(JRA、JSN および JSN (ER シグナル))がある。それらの区では引き続き形質転換操作を実施し、株数を増やさなければならない。既に、22 株の「DNA 単一コピー及び mRNA 発現」が得られている JRA (ER シグナル) では、レタス体内において蓄積されているタンパク質量を血清学的に検出する必要がある。また、それと同時に実験動物を使った経口での腸管免疫感作の検討に着手するべきである。

「DNA 単一コピー及び mRNA 非発現」株は、HEV CP 遺伝子を発現するプロモーター活性、あるいは外来遺伝子そのものに支障を生じたために起こった現象と理解できる。現に、それらの内の数株から抽出した mRNA を視覚的に検出するノーザンブロット法で解析したが、外来遺伝子が短くなっていたなどの結果が示された(データ割愛)。従って、この区の株は今後破棄する方針である。

外来遺伝子の複数コピーが導入され、かつ外来遺伝子からの mRNA が発現されているレタス株(「DNA 単一コピー及び mRNA 発現」)は、自家あるいは他家受粉で得られる後代においてサイレンシングが起こりうる等、各世代における遺伝子発現制御が不安定になる可能性がある。これらの株の使用には、十分な後代検定で安定性を実証する必要があるだろう。

一方、外来遺伝子の高度発現レタスを作製す

るため、当該 DNA の複数コピーが導入され、かつその遺伝子から mRNA が発現されていない遺伝子サイレンシング株(「DNA 複数コピー及び mRNA 非発現」)を選抜する必要がある。それらサイレンシング株では外来遺伝子が多数導入されていることによりその遺伝子発現が抑制されている。そこで、サイレンシングによる遺伝子発現抑制を解放するための HC-Pro 遺伝子を発現するレタスとそのサイレンシング株とを交雑させて雑種後代 F1 を得ることによって、HEV CP 遺伝子を高発現するレタスが得られるものと考えられる。すなわち、雑種後代 F1 では、サイレンシングにより発現抑制されていた外来遺伝子が HC-Pro 遺伝子の働きにより一気に解放され、単一コピーの株よりも遥かに高い遺伝子発現、さらに目的タンパク質が多量に蓄積するレタスが得られるものと考えられる。

## F. 参考論文

- Kubota, K., et al., 2003. Tomato mosaic virus replication protein suppresses virus-targeted posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.* 77(20): 11016-11026.
- Li, T.C., et al., 1997. Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J. Virol.* 71(10): 7207-7213.
- Sun, H-J., et al., 2006. Functional expression of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce. *FEBS Lett.* 580: 620-626.
- Tei, S., et al., 2003. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 362: 371-373.
- Yazaki, Y., et al., 2003. 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.

## 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

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

E 型肝炎の感染経路・宿主域・遺伝的多様性・感染防止・診断・治療に関する研究

平成 18 年度

分担研究報告書

## E 型肝炎ウイルス組換え中空粒子の作製とその応用

分担研究者 武田直和（国立感染症研究所）

**研究要旨：** 2003年から2006年まで日本各地で捕獲したニホンジカ976頭から血清を採取し、組換え中空粒子を抗原に用いたELISAでE型肝炎ウイルスに対するIgG抗体を調査した。25 (2.6%) 検体が抗体を保有していた。また、血清166検体、肝臓159検体、直腸糞88検体についてRT-PCRで遺伝子検出を試みたがいずれも陰性であった。これらの結果から、ニホンジカがE型肝炎ウイルスのリザーバーである可能性は低いと考えられた。

協力研究者 李 天成（国立感染症研究所）

### A. 研究目的

E 型肝炎の原因ウイルスである E 型肝炎ウイルス (HEV) はわが国においても既に土着しているウイルスである。また、わが国のブタやイノシシは高い HEV 抗体保有率を示し、これらからはヒト HEV に遺伝学的に極めて類似するウイルスも分離されている。したがって、これらの動物が HEV のリザーバーである可能性が高い。事実、直接あるいは間接的にイノシシ、ブタ、シカ由来 HEV が人に感染したとの報告もでている。これら動物における抗体保有率を調査し、感染状況を正確に把握することはヒトへの HEV 感染のリスクを評価するうえで重要である。本研究では、(1) 抗原性、免疫原性においてネイティブな HEV と同一と考えられる中空粒子を産生し、抗原性を比較する、(2) 得られた成績を基に抗体診断系の改良やワクチン開発に応用する、ことを目的とした。

### B. 研究方法

N 末端から 111 アミノ酸を欠損した HEV genotype 1、3、および 4 の構造蛋白を組換えバキュロウイルスで発現し中空粒子を作製した。塩化セシウム平衡密度勾配遠心法でこれらの中空粒子を精製し、抗体検出 ELISA の抗原として用いた。

2003～2006 年に狩猟、有害鳥獣駆除、学術捕獲により捕獲された野生ニホンジカ 976 頭から血清を採取した。また 159 頭から肝臓を、88 頭からは直腸糞を採取した。組換え中空粒子をマイクロプレートに固相化し、HRP 標識抗シカ IgG および IgM を二次抗体とした ELISA 法を確立し、シカ血清中の抗体を検出した。抗体の有無はウエスタン法で確認した。また、血清、肝臓、直腸糞から RNA を抽出し、RT-PCR 法によって HEV 遺伝子検出を行なった。

### C. 研究結果

中空粒子を抗原に用いた抗体検出 ELISA におけるカットオフ値は、IgG、IgM 共に 0.2 であった。わが国の野生シカ 976 頭について抗

体保有状況を調査したところ 25 頭 (2.6%) が IgG 抗体陽性であった。しかし、陽性検体の OD 値は全て 0.600 以下であり、抗体価も 400 倍以下であった。一頭のみが IgM 抗体も陽性であった。ELISA で検出した抗体が HEV に特異的であることは中空粒子を抗原に用いたウェスタン法で確認した。IgG 抗体保有率に地域の差は見られなかった。血清 166 検体、肝臓 159 検体、直腸糞便 88 検体から RNA を抽出し、RT-PCR 法によって HEV-RNA の有無を検査したがいずれの検体からも HEV 遺伝子は検出されなかった。

#### D. 考察

日本の野生シカにおける HEV 抗体の保有率は非常に低く、その抗体価も低いことが明らかになった。また、ウイルス遺伝子も検出されていないことから、日本のシカが HEV のリザーバーである可能性は極めて低いと思われる。しかしながら、2003 年にシカ由来 HEV が人に感染したとの報告がある。抗体保有率および HEV 遺伝子検出を継続調査し、野生シカにおける HEV の浸潤を把握する必要がある。シカの抗体検出法が確立できたことから、食品由来、人獣共通感染症におけるこれら動物のリスク評価、あるいは食品健康影響評価のための情報提供が可能になった。

#### E. 結論

日本のシカが HEV のリザーバーである可能性は極めて低いと考えられる

#### F. 発表

##### 1. 学会発表

松浦友紀子、李 天成、吉松組子、有川二郎、恒光裕、高島郁夫、鈴木正嗣、宮村達男、武田直和。日本に生息するシカの E 型肝炎ウイルス抗体保有。日本ウイルス学会、第 54 学術

集会 2006 11 月 横浜

##### 2. 論文発表

- (1) Nakai I, Kato K, Miyazaki A, Yoshii M, Li TC, Takeda N, Tsunemitsu H, Ikeda H: Different fecal shedding patterns of two common strains of hepatitis e virus at three Japanese Swine farms. Am J Trop Med Hyg 2006;75:1171-1177.
- (2) Mochizuki M, Ouchi A, Kawakami K, Ishida T, Li TC, Takeda N, Ikeda H, Tsunemitsu H: Epidemiological study of hepatitis E virus infection of dogs and cats in Japan. Vet Rec 2006;159:853-854.
- (3) Li TC, Saito M, Ogura G, Ishibashi O, Miyamura T, Takeda N: Serologic evidence for hepatitis E virus infection in mongoose. Am J Trop Med Hyg 2006;74:932-936.

#### 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)

## E型肝炎の感染経路・宿域・遺伝的多様性・感染防止・診断・ 治療に関する研究

平成18年度

分担研究報告書

### HEV genotype 4 の起源

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: 昨年までに我々は本邦の主要なgenotypeである3型, 4型ともに約100年前にすでに日本に侵入していた可能性を報告した。分子進化学的解析により3型の起源はUKからの豚の輸入と関連していることが示唆されたが、4型の起源は不明であった。今回、genotype 4の起源を明らかにするため、同じくgenotype 4が多い中国固有の株と比較検討した。中国におけるgenotype 4は遺伝子多様性に富み、molecular clockに基づいた解析により、その拡散時期は1920年頃と推定された。札幌におけるgenotype 4型は最近20年で急激に増加していることを考えると、genotype 4の起源は中国である可能性が示唆された。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。

共同研究者氏名

田中靖人<sup>1</sup>、高橋和明<sup>2</sup>、三代俊治<sup>2</sup>

<sup>1</sup>名古屋市立大学大学院医学研究科臨床  
分子情報医学、<sup>2</sup>東芝病院・研究部

#### A. 研究目的

- (1) 札幌に多く存在し、重症化に寄与する genotype 4 の起源を明らかにするため、同じく genotype 4 が多い中国固有の株と比較する。我が国における genotype 4 の感染ルーツや拡散時期を予測する。
- (2) HEV データベースの充実化を図る。HEV 遺伝子情報の共有を可能するだけでなく、系統解析を Web 上で容易にできるように設定し、その広報活動を行う。

#### B. 研究方法

本邦の主要な genotype である genotype 3 型, 4 型の中で、3 型は日本全土に散見する

が、4 型は北海道(札幌)に圧倒的に多く、しかも重症化に寄与している。分岐時期の解析には、昨年までに報告している日本株及び中国(上海)との共同研究により新たに得られた 21 本の配列を用いた。GDD モチーフを含む RNA polymerase 領域 821 bp の塩基配列を決定し、分子進化学的解析を行った。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

- (1) 中国における genotype 4 は遺伝子多様性に富み、molecular clock に基づいた解析により、その拡散時期は 1920 年頃と推定された(図1)。札幌における genotype 4 型は

最近 20 年で急激に増加していることを考えると、genotype 4 の起源は中国である可能性が高い。

## (2) 肝炎データベース

(<http://s2as02.genes.nig.ac.jp>) の一部として HEV データベースを完成させた。現在までの登録配列は、1611 エントリー、全塩基配列の登録も 80 本に上っている。具体的に行った点は、

a) 肝炎ウイルス遺伝子情報の網羅的収集 (国際データベースとのリンク)

b) データを遺伝子座、系統関係の両面から整理

- 配列マップ
- マルチプルアラインメント
- 特定 genotype データの再解析
- 分子進化系統樹
- 宿主／地域分布と系統関係の相互参照

c) データ解析のプラットフォームとして利用可能

- ブーツストラップ解析
- genotype 推定
- 相同性検索 (BLAST / FASTA)

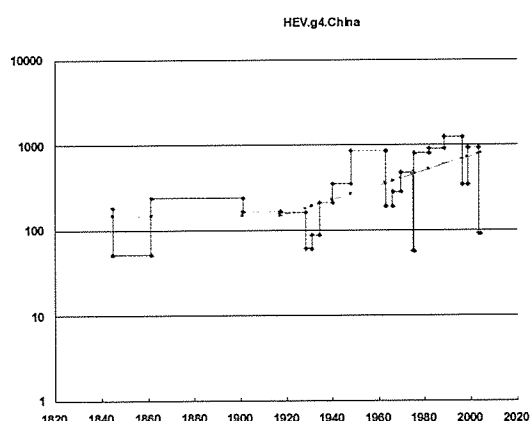


図1: HEV genotype 4 の拡散時期

## D. 考察

中国における genotype 4 は遺伝子多様性

に富み、その拡散時期は1920年頃と推定された。札幌における4型は最近20年で急激に増加していることを考えると、genotype 4 の起源は中国である可能性が示唆された。我が国への感染ルートは不明であるが、genotype 4 は近年北海道を中心に広がっており、劇症肝炎症例が散見されている。今後症例数を増やし各地域におけるHEV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。

また、HEVデータベースの充実化により、様々なHEV遺伝子情報が共有可能となった。また、データベース上の解析ソフトを用いて、ヒト以外のHEV配列を解析することにより新たな感染ルートの解明や感染様式・拡散時期が明らかとなる。行政的にもHEVの拡散防止に貢献できると思われる。

## G. 研究発表

1. 論文発表: (1) Tanaka Y et al. Molecular tracing of Japan-Indigenous hepatitis E viruses. J. Gen Virol 87(Pt 4):949-954. 2006.

(2) E型肝炎ウイルス・ゲノムデータベース 新井理、溝上雅史. 臨床消化器内科 21(5):561-568, 2006.

2. その他の発表:肝炎データベース (<http://s2as02.genes.nig.ac.jp>) の公開

## H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
**E 型肝炎の感染経路・宿主域・遺伝的多様性・感染防止・診断・治療に  
 関する研究**

**2006 年度分担研究報告書**

**北海道における HEV 伝搬経路の解明**

分担研究者 姜 貞憲  
 手稲溪仁会病院 消化器病センター

**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北海道において発症する 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。

網走市において HEV に感染した E 型肝炎重症化例などを診断し、それらに共通する HEV 感染背景を究明しえた。今後も個別的症例における感染経路を究明し、不顕性感染例を含んだ集団感染事例を発掘することにより、北海道における HEV 伝搬経路の全体像が解明されることが期待される。

**共同研究者**

前久保博士 手稲溪仁会病院 内科  
 松居 剛志 手稲溪仁会病院  
                   消化器病センター  
 宮下 憲暢 網走厚生病院 消化器科  
 佐賀 啓良 愛育病院 消化器科  
 狩野 吉康 札幌厚生病院 第 3 消化器科  
 豊田 成司 同上

共通する感染契機を明らかにする。

**C. 研究方法**

2006 年 3 月に札幌および網走市内で発症した E 型肝炎 3 症例の感染背景を精査しその共通性を究明し、さらに、周辺の HEV 不顕性感染者を探し出すため、感染契機を共有する対象を設定し、HEV 感染マーカーを精査した。

E 型肝炎の診断は、PCR による HEVRNA 陽性、recombinant 抗原を用いた抗 HEV IgG, IgM に対する ELISA (東芝病院研究部) に拠った。

**D. 研究結果**

厚生労働省 E 型肝炎班研究は 2003 年度から開始されたが、同年から当院及び札幌厚生病院で診断した E 型急性肝炎は 15 例であり、2006 年度に診断した症例は 3 例であった(図 1)。これら 3 名中 1 名(56 歳男性)が劇症肝炎として、3 月初旬手稲溪仁会病院消化器病センターで入院治療を受けたが、ほぼ同時期に札幌市内の愛育病院消化器科にも 58 歳男性が入院、肝性脳症は免れたものの重症 E 型肝炎を呈した。病歴聴取

**A. 背景**

北海道は日本国内における HEV 高侵淫地域と見做されている。事実、2003-2005 年の 3 年間に少なからぬ症例が見いだされ、その一部は劇症肝炎に進行し死亡例も報告された。しかしながら、HEV 感染契機が判明した事例はごく一部にとどまるうえ、肝炎重症化の背景には不明な点が多い。

**B. 研究目的**

北海道地区において発生する E 型肝炎孤発例の背景に存在する感染経路を解明するため、各症例における HEV 感染背景を精査し、集団感染的事例を発掘し

により、これら2名は2006年2月1日に網走市内の飲食店に同席し会食していたことが判明した。さらに同時期に網走厚生病院へ入院中であった53男性もE型肝炎と診断され、病歴からは本症例も先の2名と同席した可能性が濃厚であった。以上から診療施設は異なるものの、同一の会食により3名のE型肝炎症例が発症した

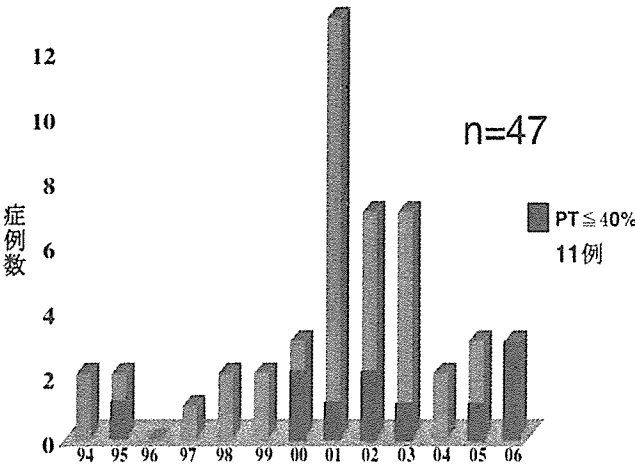


図1. 札幌市内2施設におけるE型急性肝炎症例の年次別推移

可能性が強く示唆されたため、会食に同席した11名について7月以降に抗HEV IgG, IgMが検討されうち1名で両者の陽性が確認された。以上から、本事例では3名のE型肝炎症例と1名の不顕性感染者が発見された。会食ではブタ直腸(ホルモン)およびレバーが供されており、これらの摂取がHEV感染の共通した背景と考えられた(表1)。これら3例の血清から検出されたHEV株は、2004年北見におけるHEV集団感染事例で同定された株と塩基配列上相同性が極めて高いことが明らかになった。

表1. 網走市内飲食店で会食後発症したE型急性肝炎3例の臨床像

|               | 53歳 男性    | 58歳 男性 | 56歳 男性      |
|---------------|-----------|--------|-------------|
| 診断施設所在地       | 網走        | 札幌     | 札幌          |
| 主訴            | 黄疸、全身倦怠感  | 食欲不振   | 発熱          |
| 推定感染時期        | 2月1日又は15日 | 2月1日   | 2月1日        |
| 発症時期          | 3月25日頃    | 3月初旬   | 3月3日頃       |
| 推定潜伏期間        | 5又は7週     | 4週     | 4週          |
| 受診時期          | 4月4日      | 3月8日   | 3月10日       |
| 感染から診断まで      | 7又は9週     | 5週     | 5週          |
| ALT (IU/l)    | 929       | 5297   | 4468        |
| T.Bil (mg/dl) | 12.6      | 2.6    | 10.3        |
| PT (%)        | 74        | 38     | 16.6        |
| HEV genotype  | 4         | 4      | 4           |
| 既往肝疾患         | なし        | なし     | HBV carrier |
| 飲酒歴           | 週3回       | 毎日     | 週3回         |
| 病型            | 通常型       | 重症型    | 劇症化         |
| 予後            | 生存        | 生存     | 生存          |

## E. 考察

網走市と北見市が地理的に近接することから、このたびの網走市におけるHEV感染事例が2004年に発生した事例と同一の背景を有することが示唆された。即ち、ブタ内臓肉摂取を契機とする人獣共通感染症としてのHEV感染が、同地区において再現されたものと推察された。同様の事例が2年の間隔をおいて反復されたことから、HEVにより汚染された食肉が同地域において流通している可能性とともに、食肉流通の精査によって地域的なHEV伝搬経路の全貌を更に解明しう方向性が示された。また、04年8月およびこの度の症例から分離されたHEV株(北見-網走株)の感染により、確認されたHEV感染者12名(うち不顕性感染6名、肝炎発症6名)中劇症肝炎2例(うち死亡1例)、重症型急性肝炎1例が発症していたことから、発症者中の重症化率が極めて高いことが注目される。現在までHEV遺伝子型3に比べ遺伝子型4が重症化に関連することが指摘されてきたが、HEV遺伝子型4においても、北見-網走株のごとく重症化により強く関連するvirus側の因子が存在する可能性が示された。

肝炎重症化に関連しうるHEV北見-網走株が3度目の集団発症的事例を招来させる事態を未然に阻止するため、北見網走地区におけるHEV汚染食肉流通経路の精査は、同地域における公衆衛生上の重要且つ緊急の課題として提起されている。

## F. 結論

HEV高侵淫地域である北海道において、特に北見網走地域におけるHEV感染は人獣共通感染症を背景とした、食肉のHEV汚染により発生している可能性が濃厚である。

## G. 研究発表

### a)学会発表

1) 宮下憲暢、安本篤史、福島 拓、曾我部 進、中井義仁、小西康平、内田多久實、藤永 明、姜 貞憲、佐賀 啓良、高橋 和明、三代 俊治

同時期、同一地域において同一株により発症したE型急性肝炎の3例

WS 我が国のE型肝炎の疫学的動向

第36回日本肝臓学会東部会

2006 年 12 月 8 日東京

2)姜 貞憲

HEV 感染症の現況

第 12 回北海道肝移植適応研究会

2007 年 3 月 3 日札幌

b)論文発表

1)大西幸代、姜 貞憲、荒川 智宏、狩野 吉康、豊田  
成司、前久保 博士

札幌地域 E 型肝炎症例における HEV 感染リスクアンケート調査 肝臓 2006;47:163-164.

(2) Ohnishi S, Kang JH, Maekubo H, Arakawa T, Karino Y, Toyota J, Takahashi K, Mishiro S. Comparison of clinical features of acute hepatitis caused by hepatitis E virus (HEV) genotypes 3 and 4 in Sapporo, Japan. Hepatol Res. 2006; 36: 301-7.

(3)姜 貞憲 HEV 感染者の病態-急性肝炎を中心に-輸血におけるスクリーニング・診断技術-その成果と展望-平成 17 年度北海道輸血療法検討会 Proceeding 121-131.

#### H. 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

平成 18 年度 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）  
「E 型肝炎の感染経路・宿主体・遺伝的多様性・感染防止・診断・治療に関する研究」  
班  
分担研究報告書

## 献血者の HEV 感染調査

分担研究者：金光公浩（日本赤十字社 血液事業本部）

研究協力者：松林圭二，坂田秀勝，武田尋美，今絵未，徳島恵里奈，  
佐藤進一郎，加藤俊明，池田久實（北海道赤十字血液センター）  
江村博行（日本赤十字社血漿分画センター）

### 研究要旨

輸血を介した E 型肝炎ウイルス（HEV）感染事例および E 型肝炎発症事例が国内外で複数例確認され、輸血による HEV 感染リスクが問題視されている。このため献血者における HEV 感染の実態について明らかにし、適切な HEV 感染防止対策を講じる必要がある。今回、全国規模の献血者の HEV 抗体陽性頻度調査と、北海道地区および東京地区の HEV RNA 陽性頻度調査を行った。北海道、宮城、東京、愛知、大阪、岡山、福岡の各基幹血液センターにおいて、各年代・性別 150 名ずつ計 12,600 名の ALT 正常かつ感染症スクリーニング検査陰性の献血者について HEV 抗体（IgM、IgG）を測定した。この結果、IgM 陽性者はほとんどいなかったが、IgG 抗体陽性者は加齢とともに増加し、性差、地域差が認められ、女性より男性が、西日本より東日本が有意に高い傾向が認められた。特に東京（8.6%）、宮城（4.4%）、北海道（3.9%）で全国平均（3.4%）を上回っていた。北海道内献血者の 2006 年の HEV NAT スクリーニング陽性者は 39 名（男性 27 名、女性 12 名）で HEV RNA 陽性頻度は約 1/7,000 と前年同様、高い陽性率を示し、同地区において HEV 感染が恒常化していることが再確認された。HEV RNA 陽性者の多くは Genotype 3 に感染しており、IgM、IgG のいずれの HEV 抗体も検出されなかったことから、感染して間もない時期の献血であったと考えられた。IgG 抗体陽性率が最も高かった東京地区において、献血者 44,332 名を対象に HEV RNA を調べたところ、3 名の HEV RNA 陽性者が確認され、同地区の陽性率（約 1/15,000）は北海道地区の約半分であった。両地区の HEV RNA 陽性者の半数以上は献血前に生・生焼けのレバー、ホルモン等の喫食歴があり、これら内臓肉の摂取と HEV 感染との因果関係が改めて強く示唆された。今後 zoonotic food-borne 感染を根本的に断つための国家的対策を講じることが何よりも重要である。

### A. 研究目的

わが国の一般献血者を含む健常者における HEV 感染の実態についてはごく一部の調査しか行われておらず、不明な点が多い。このため、①献血者集団における HEV 感染の実態を早急に調査し、②輸血用血液による HEV 感染のリスク評価を行い、③適切な対策を講じることが必要であり、これを本研究の目的とする。

肝機能異常献血者を対象とした全国規模の HEV 感染率調査の結果、HEV 感染は全国に広がっていることが確認された。このため、今年度は健常献血者を対象とした全国規模の HEV 抗体調査を行うとともに、昨年度

に引き続き、陽性率が高い北海道地区に限定して研究的 HEV NAT スクリーニングを試行し、一般献血者における HEV 感染の実態を調査した。

### B. 研究方法

#### 1. 全国健常献血者の HEV 抗体調査

2005 年 12 月から 2006 年 2 月までの 3 ヶ月間に北海道、宮城県、東京都、愛知県、大阪府、岡山県、福岡県の全国 7 ヶ所の基幹血液センターにおいて、ALT 正常かつ感染症血清学的検査陰性の献血者（以下、健常献血者）を、10 歳代から 60 歳代の男女それぞれ 150 名、総計 12,600 名分の検査済み検体を

確保し、HEV-IgM 抗体および HEV-IgG 抗体を測定した。抗体検査は李天成先生（国立感染症研究所）より供与された HEV Genotype 1 VLP を固相抗原とした自家製 ELISA キットでスクリーニングし、陽性例については市販 ELISA キット（Viragent HEV-Ab human IgM, IgG, コスミックコーポレーション）で確認検査を行った。

## 2. HEV NAT スクリーニング

北海道内で 2006 年 1 月から 2 月までに献血した全数と、3 月から 12 月までに献血した健常献血者合計 273,733 名、さらに、東京地区で 2006 年 5 月から 7 月までの 3 ヶ月に献血した健常献血者 44,332 名を対象とした。

現行 NAT スクリーニング (HBV、HCV、HIV-1) の検査済み 20 プール血漿検体 425  $\mu$ L (あるいは 265  $\mu$ L) から BioRobot 9604 QIAamp DNA Blood Kit (あるいは QIAamp Virus BioRobot MDx Kit) (Qiagen) を用いて核酸を抽出し、ORF2/3 領域の 75 塩基をターゲットとしたリアルタイム RT-PCR 法により、QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen) を用いて Applied Biosystems 7500 リアルタイム PCR システムで HEV RNA を検出した。HEV RNA 陽性検体については、抗 HEV IgM 抗体および IgG 抗体の測定、HEV RNA の定量、分子系統樹解析を行った。さらに陽性献血者に対して喫食歴に関するアンケート調査を行うとともに、献血後追跡調査を行った。

## C. 研究結果

### 1. 全国健常献血者の HEV 抗体調査

対象検体 12,600 例のうち、IgM 陽性者は 13 例 (0.10%)、IgG 陽性者は 431 例 (3.4%) であった。IgG 陽性例について年代および性別で集計した結果を図 1 に示す。全体的には抗体陽性率は男性 (3.9%) のほうが女性 (2.9%) よりも有意に高く ( $p=0.0017$ )、また加齢とともに増加する傾向が認められ、男性では 60 代に、女性では 50 代にピークが認められた。20 代までは女性のほうが高かったが 30 代以降は逆に男性のほうが高く、特に 60 代では男性は 8.8% の高値を示し、同年代女性 (4.0%) の 2 倍以上高かった。しかし、地域ごとに陽性率を見てみると、陽性率が最も高い東京地区では加齢とともに陽性率が上昇し、男女とも 50 代でピークが見られ、男性で 17.3%、女性で 18.0% と調

査した群の中でそれぞれ最高値を示した。一方、北海道地区では、陽性率には大きな年齢差は見られなかった。

次に地域別に集計した結果を図 2 に示す。IgG 抗体陽性率は地域差が大きく、最も高い東京で 8.6%、最も低い岡山では 1.1% と顕著であった。東日本と西日本に分けると、東日本で 5.6%、西日本で 1.8% となり、東日本で有意 ( $p<0.0001$ ) に HEV IgG 抗体陽性率が高かった。

## 2. HEV NAT スクリーニング

2005 年 1 月から 2006 年 12 月までの 2 年間に北海道地区の試行的 HEV NAT スクリーニングによって判明した月別陽性者数を図 3 に示す。2005 年には 30 名 (男性 17 名、女性 13 名) の陽性者が確認され、陽性率は  $1/9,848$  人であった。一方、2006 年の陽性者は 39 名 (男性 27 名、女性 12 名) おり、陽性率は  $1/7,019$  人であった。2 年間を通してほぼ毎月陽性者が確認され、陽性率は変動していた。2005 年 9 月から 2006 年 4 月にかけての陽性率は比較的高く、特に 2006 年 1 月には 9 名の陽性者が確認され、この月の HEV RNA 陽性率は  $1/2,596$  人と最高値を示した。

2006 年の HEV NAT スクリーニング陽性者 39 名について詳細を表 1 に示す。性別は男：女 = 28 : 11 で、平均年齢は  $43 \pm 13$  歳であった。Genotype 4 が検出された例は 3 例 (7.7%) のみで、それ以外の 36 名 (92.3%) はすべて Genotype 3 であった。これら HEV RNA 陽性者から分離された HEV 株について分子系統樹解析したところ、献血時期あるいは居住地に近い陽性献血者は、系統樹上でも近い位置関係にあった。HEV 抗体検査については IgM、IgG とともに陰性が 29 名 (74.4%)、IgM のみ陽性が 1 名 (2.6%)、IgG のみ陽性が 2 名 (5.1%)、IgM、IgG とともに陽性が 7 名 (17.9%) であった。喫食歴に関しては、アンケート調査票が回収できた 31 名中、19 名 (61.3%) が献血前の 2 ヶ月以内に動物内臓肉を摂取していたが、12 名 (38.7%) には動物内臓肉の喫食歴はなかった。

一方、地区別の HEV IgG 抗体陽性率が最も高かった東京地区では HEV RNA 陽性頻度調査の結果 3 名の陽性者が確認され、陽性頻度は  $1/14,777$  人と北海道地区の約半分であった (有意差なし)。HEV RNA 陽性者から検出された HEV はいずれも Genotype

3で、HEV抗体はIgM、IgGのいずれも検出されなかった。またアンケート調査できた2名については献血前に内臓肉を摂取したことが確認された。

調査期間中、HEV NAT スクリーニング結果が判明する前に、1名のHEV陽性献血者(表1, No.6)由来の血小板濃厚製剤がHCV感染による肝硬変を患った60代女性に投与された。この献血者の献血時のHEV RNA濃度は3.7 log copies/mLで、HEV Genotypeは3型であった。この患者について、輸血後89日目までフォローしたが、RNA、IgM、IgGのいずれのHEVマーカーも陽転しなかった。

表1 HEV NAT陽性献血

| 調査期 |    |    |     |                  |           |          | 2006年1月1日～12月31日採 |    |    |     |                  |           |          |   |   |    |   |
|-----|----|----|-----|------------------|-----------|----------|-------------------|----|----|-----|------------------|-----------|----------|---|---|----|---|
| No. | 年齢 | 性別 | ALT | HEV抗体<br>IgM IgG | 内臓<br>肉摂取 | 供製<br>結剤 | No.               | 年齢 | 性別 | ALT | HEV抗体<br>IgM IgG | 内臓<br>肉摂取 | 供製<br>結剤 |   |   |    |   |
| 1   | 22 | F  | 12  | -                | -         | 3        | ●                 | X  | 21 | 30  | F                | 14        | -        | - | 3 | ●  | X |
| 2   | 68 | M  | 23  | -                | -         | 3        | ●                 | X  | 22 | 38  | M                | 45        | +        | + | 3 | ●  | X |
| 3   | 36 | M  | 42  | -                | -         | 3        | ●                 | X  | 23 | 21  | M                | 26        | -        | - | 3 | ●  | X |
| 4   | 53 | M  | 238 | +                | +         | 3        | ●                 | X  | 24 | 28  | M                | 14        | +        | + | 3 | X  | X |
| 5   | 31 | M  | 43  | -                | -         | 3        | ●                 | X  | 25 | 46  | M                | 19        | -        | - | 3 | ●  | X |
| 6   | 48 | M  | 25  | -                | -         | 3        | ND                | ●  | 26 | 62  | M                | 27        | -        | - | 3 | ●  | X |
| 7   | 52 | M  | 25  | -                | -         | 3        | ●                 | X  | 27 | 17  | M                | 33        | -        | - | 3 | X  | X |
| 8   | 39 | F  | 22  | -                | -         | 3        | ND                | X  | 28 | 34  | F                | 10        | -        | - | 3 | X  | X |
| 9   | 25 | M  | 32  | -                | -         | 3        | ●                 | X  | 29 | 21  | F                | 27        | -        | - | 3 | X  | X |
| 10  | 39 | F  | 35  | -                | +         | 3        | ●                 | X  | 30 | 49  | M                | 46        | +        | - | 3 | ●  | X |
| 11  | 57 | M  | 13  | -                | -         | 3        | ND                | X  | 31 | 62  | M                | 18        | -        | - | 3 | ●  | X |
| 12  | 40 | F  | 172 | +                | +         | 4        | X                 | X  | 32 | 44  | F                | 14        | -        | - | 3 | X  | X |
| 13  | 39 | M  | 28  | -                | -         | 4        | ●                 | X  | 33 | 68  | M                | 15        | -        | - | 3 | X  | X |
| 14  | 58 | M  | 22  | -                | -         | 3        | X                 | X  | 34 | 29  | M                | 22        | -        | - | 3 | ND | X |
| 15  | 45 | M  | 30  | -                | -         | 3        | ●                 | X  | 35 | 48  | M                | 58        | -        | - | 3 | X  | X |
| 16  | 46 | F  | 15  | -                | -         | 3        | ND                | X  | 36 | 54  | M                | 18        | -        | - | 3 | ND | X |
| 17  | 50 | F  | 29  | -                | -         | 3        | ND                | X  | 37 | 43  | M                | 55        | +        | + | 3 | X  | X |
| 18  | 54 | M  | 47  | +                | +         | 4        | ●                 | X  | 38 | 60  | M                | 46        | +        | + | 3 | X  | X |
| 19  | 40 | M  | 12  | -                | -         | 3        | ND                | X  | 39 | 47  | M                | 40        | +        | + | 3 | ●  | X |
| 20  | 31 | F  | 16  | -                | -         | 3        | X                 | X  |    |     |                  |           |          |   |   |    |   |

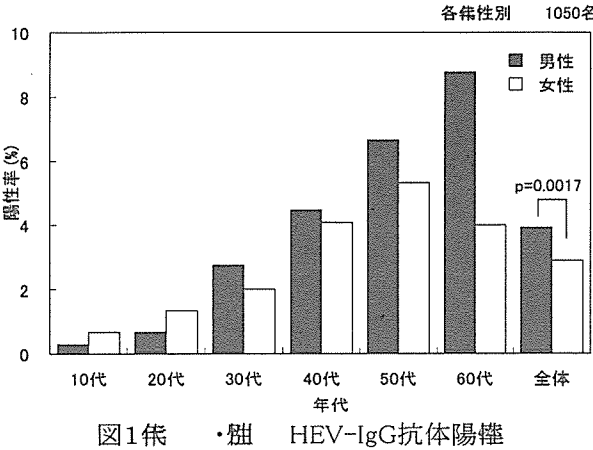


図1 性別・年齢別 HEV-IgG抗体陽性率

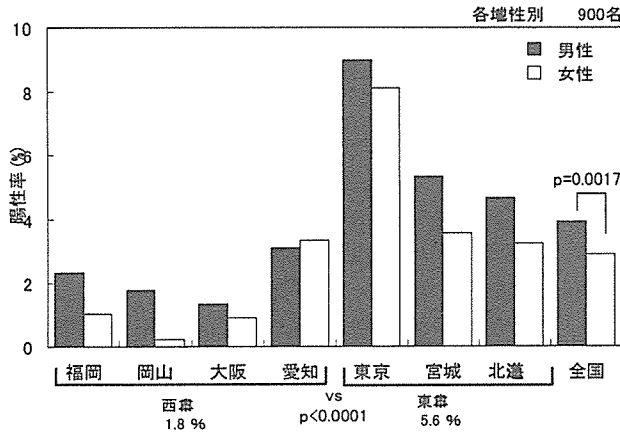


図2 地域別 HEV-IgG抗体陽性率

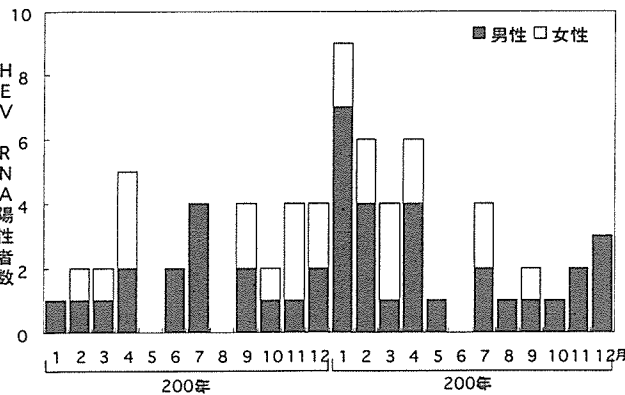


図3 HEV-RNA陽性献血者数

D. 考察

これまで健康人におけるHEV感染調査はごく限られた地域のごく限られた人数でしか調査されていなかった。今回の健康献血者を対象とした全国規模のHEV抗体陽性頻度調査によって、HEV感染は全国に蔓延していることが再確認され、さらに抗体陽性率は年齢、性別、地域によって大きく異なることが明らかとなった。性差については男性のほうが女性よりも有意に高く、また地理的間差は東日本と西日本では顕著であった。さらに抗体陽性率は加齢とともに増加していることから、数十年以上前からHEVは国内に定着していたと予想された。最もHEV抗体陽性率が高かった東京地区は大阪地区の約6倍高い値を示していた。すでに国立感染症研究所によって国内3県のHEV抗体陽性率が調査され、地域差が大きいことが報告されている。今回の調査はこれを裏付ける結果となった。この地域差の理由については、1つには調査対象数が少なすぎたことも考えられるが、これまで言われているように、東西日本の食文化の違い、つまり東日本の豚肉文化と西日本の牛肉文化が背景にあるのかもしれない。しかし詳細は不明である。また、北海道地区はE型肝炎患者報告数が国内で最も多いのにもかかわらず、抗体陽性率がそれほど高くなかった点については、北海道にはGenotype 4が偏在することが第一の理由として考えられる。2005年から2006年の2年間に、北海道地区のHEV NATスクリーニングで見つかったHEV RNA陽性者69名のうちGenotype 4感染者は4例(5.8%)であったが、これまで行った全国献血者調査

においては道外の献血者からは 1 例も見つかっていない。一方、北海道内の E 型肝炎患者の約半数は Genotype 4 に感染していることから、同遺伝子型は Genotype 3 より重症化傾向が強く顕在化しやすいとも考えられる。

北海道地区の 2006 年の HEV RNA 陽性献血者は、前年に比べて 9 名増加し、陽性率は約 7,000 人に 1 人と前年同様高い値を示しており、HEV は同地区において完全に定着し circulate していると考えられた。陽性者の 9 割以上はほとんどが不顕性感染で経過する Genotype 3 に感染していた。また 7 割以上が HEV 抗体を持たないことから、多くは感染後間もない時期に献血したと考えられ、輸血用血液からの HEV の排除には HEV NAT スクリーニングが有効であることが再確認できた。また、追跡調査できた陽性者は一部に ALT 値の軽微な上昇が認められるものの、全員重篤な肝炎を発症することなく HEV 抗体が陽転化しており、HEV 感染者のほとんどは不顕性感染の経過を辿ると考えられた。

今回、抗体陽性率が最も高かった東京地区において一部の献血者を対象に HEV RNA 調査を行ったところ、北海道地区の約半数の陽性率が確認され、東京地区にも HEV 感染が恒常化していることが判明した。北海道、東京のいずれの地区においても HEV RNA 陽性者の半数以上は献血前にレバーやホルモンなどの動物内臓肉を食しており、これらの食材の摂取と HEV 感染とが密接に関わっていることが改めて強く示唆された。従って zoonotic food-borne 感染を根本的に防止するための国家的対策を早急に講じることが今後何よりも重要な課題と考えられる。

一方、調査期間中、HEV RNA 陽性血が 1 名の患者に輸血されたが感染は確認されなかった。患者の原疾患は HCV による肝硬変を患っており、血中には多量の HCV RNA が確認されたが、HEV RNA は検出されず、HEV 抗体も 3 ヶ月間陽転することはなかった。輸血された製剤中の HEV 量は少なくなかったにもかかわらず、なぜ HCV と重複感染しなかったか大変興味深い、理由は不明である。

北海道地区における研究的 HEV NAT スクリーニングは、2005 年 1 月から 2006 年 2 月までは北海道赤十字血液センター（札幌市）で実施していたが、NAT 検査に時間を要していたため、ごく稀に有効期限の短い一

部の血液製剤が、結果判明前に出庫されるケースがあった。このため、翌 3 月からは、日本赤十字社血漿分画センター（千歳市）へ HEV NAT 検査を技術移管し、HBV、HCV、HIV の NAT スクリーニングと並行して迅速に検査する体制を整備した。これにより HEV NAT の結果が判明する前に輸血用血液製剤が出庫されることはなくなった。

## E. 結論

1. 献血者の HEV 抗体陽性率は加齢とともに増加し、性差、地域差が認められ、女性より男性が、西日本より東日本が有意に高い傾向が認められた。
2. 2006 年の北海道内献血者の HEV RNA 陽性率は約 7000 人に 1 人と前年同様に高く、HEV 感染は恒常化している。
3. 東京地区の献血者の HEV RNA 陽性頻度は約 1 万 5 千人に 1 人で同地区にも HEV 感染が恒常化している。
4. zoonotic food-borne 感染を根本的に防止するための国家的対策を早急に講じることが今後何よりも重要である。

## F. 研究発表

### 1. 学会発表

- (1) 松林圭二, 坂田秀勝, 徳島恵里奈, 田中聖子, 佐藤進一郎, 加藤俊明, 池田久實  
北海道地区における試行的 HEV プール NAT スクリーニングの実施  
第 54 回日本輸血学会総会, 大阪市, 2006 年 6 月
- (2) 武田尋美, 松林圭二, 坂田秀勝, 徳島恵里奈, 中内健太, 佐藤進一郎, 加藤俊明, 池田久實, 金光公浩  
全国の健常献血者における HEV 抗体調査  
第 30 回日本血液事業学会総会, 札幌市, 2006 年 10 月
- (3) 本間淳, 伊藤篤子, 増田優子, 竹内次雄, 山本哲, 坂田秀勝, 松林圭二, 佐藤進一郎, 加藤俊明, 池田久實  
北海道内 4 例目の輸血後 E 型肝炎ウイルス感染事例

第30回日本血液事業学会総会, 札幌市,  
2006年10月

- (4) 坂田秀勝, 松林圭二, 徳島恵里奈, 深井寛治, 佐藤進一郎, 加藤俊明, 池田久實  
HEV RNA陽性献血者血液を輸血された  
患者症例の解析  
第30回日本血液事業学会総会, 札幌市,  
2006年10月

- (5) 松林圭二, 坂田秀勝, 徳島恵里奈, 田中聖子, 佐藤進一郎, 加藤俊明, 池田久實  
HEV RNA陽性献血者血液を輸血された  
患者症例の解析  
第30回日本血液事業学会総会, 札幌市,  
2006年10月

**G. 知的所有権の取得状況**

該当なし

厚生科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)  
E型肝炎の感染経路・宿主域・遺伝的多様性・感染防止・診断・治療に関する研究

平成18年度  
分担研究報告書

## 本邦における E 型肝炎の動向と特徴

分担研究者 矢野 公士 国立病院機構 長崎医療センター

研究要旨: 1980 年来毎年国立病院機構共同研究班による急性肝炎の全国調査を解析し、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症例数の動向および臨床的解析を行っている。2006 年は新たに 26 例の非 ABC 型を含む、95 例の急性肝炎が登録された。1980～2006 年の非 ABC 型急性肝炎 1069 例中、発症後 3 ヶ月以内の保存血清が存在した 813 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 40 例 (4.9%)、HEV-IgG 陽性は 105 例 (12.9%)であった。このうち、HEV-IgM 単独陽性は 8 例 (8/813, 9.8 %)、HEV-IgG 単独陽性は 73 例 (73/813, 9.0%)で、両抗体陽性は 32 例 (32/813, 3.9%)であった。27 年間の期間中、年次別非 ABC 型に占める E 型肝炎発生率は、0～13%で推移し、有意な流行の時期は認めなかったものの、非 ABC 型肝炎に占める E 型肝炎の割合は最近 3 年間で 10%前後と比較的高値で安定してきており、今後も注意を要すると考えられた。

### 共同研究者

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

班は今期においても基本的にこの調査を継続し、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らかにすることを目的とする。

### A. 研究目的

これまでに我々は急性肝炎共同研究班の登録保存血清をもちいて、1980～2005 年の E 型肝炎発症数を調査してきた(本研究班の前フェーズ分担研究)。しかしながら、2000 年以降 E 型肝炎が増加傾向にあるのか否かなど、継続的に調査を続けなければ解決しない問題点も明らかになった。また、本邦において北海道は E 型肝炎多発地区とされ、疫学、臨床データが蓄積されつつあるが、その他の地域に関しては症例数が少なく、動向を探るためのデータは本調査が唯一である。本研究

### B. 研究方法

全国 26 の国立病院急性肝炎共同研究班参加施設において 1980～2006 年に散発性ウイルス性急性肝炎として登録された症例は 4,081 例であり、A 型 1,571 例(38.5%)、B 型 1096 例(26.9%)、C 型 345 例(8.5%)、非 ABC 型 1069 例(26.2%)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 813 例(今年度追加例が 26 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。両抗体陽性であるものを E 型急性肝炎の可能性が

濃厚であると判定した。

### C. 研究結果

E 型急性肝炎の可能性が濃厚である症例は昨年報告に 2 例を加え 32 例 (32/813, 2.5%) であった。男性 28 例、女性 4 例、平均年齢は 50.0±13.7 歳であった (図 1)。

| 1980年 - 2006年 E型肝炎症例 |      |        |   |      |       |     |      |        |   |      |           |
|----------------------|------|--------|---|------|-------|-----|------|--------|---|------|-----------|
| No.                  | 発症月  | 年齢 (歳) | 性 | 居住地域 | 海外渡航歴 | No. | 発症月  | 年齢 (歳) | 性 | 居住地域 | 海外渡航歴     |
| 1                    | 1980 | 14     | 男 | 札幌   | 不明    | 17  | 1988 | 45     | 男 | 埼玉   | タイ        |
| 2                    | 1981 | 51     | 男 | 横浜   | 不明    | 18  | 2000 | 51     | 女 | 横浜   | 国内渡航      |
| 3                    | 1981 | 38     | 男 | 札幌   | 不明    | 19  | 2000 | 49     | 女 | 大阪   | 国内渡航      |
| 4                    | 1983 | 48     | 男 | 横浜   | 不明    | 20  | 2002 | 26     | 男 | 東京   | パプアニューギニア |
| 5                    | 1984 | 39     | 男 | 横浜   | 不明    | 21  | 2002 | 54     | 男 | 札幌   | 国内渡航      |
| 6                    | 1984 | 35     | 男 | 横浜   | 不明    | 22  | 2002 | 52     | 男 | 大阪   | 国内渡航      |
| 7                    | 1984 | 46     | 男 | 札幌   | 不明    | 23  | 2003 | 22     | 男 | 東京   | インド       |
| 8                    | 1985 | 13     | 男 | 新潟   | 不明    | 24  | 2004 | 44     | 男 | 札幌   | 中国        |
| 9                    | 1985 | 62     | 男 | 札幌   | 不明    | 25  | 2004 | 34     | 男 | 埼玉   | 国内渡航      |
| 10                   | 1986 | 21     | 女 | 新潟   | 不明    | 26  | 2004 | 55     | 男 | 札幌   | 中国        |
| 11                   | 1987 | 53     | 男 | 札幌   | 不明    | 27  | 2005 | 52     | 男 | 札幌   | 国内渡航      |
| 12                   | 1987 | 48     | 男 | 新潟   | 不明    | 28  | 2005 | 68     | 男 | 岐阜   | 国内渡航      |
| 13                   | 1987 | 52     | 男 | 金沢   | 不明    | 29  | 2005 | 55     | 男 | 大阪   | 国内渡航      |
| 14                   | 1992 | 55     | 男 | 新潟   | 国内渡航  | 30  | 2005 | 54     | 男 | 東京   | 中国        |
| 15                   | 1996 | 45     | 女 | 横浜   | 国内渡航  | 31  | 2006 | 60     | 男 | 東京   | 国内渡航      |
| 16                   | 1996 | 58     | 男 | 札幌   | 中国    | 32  | 2006 | 50     | 男 | 横浜   | 国内渡航      |

図 1. 1980～2006 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

地理的分布に関しては、昨年までと同様、関東および九州に隔たった傾向を示しており、2006 年の 2 例とも、関東地域に発生していた。

1980～2006 年の年次推移 (図 3) の検討では、E 型肝炎発生率は 1980 年代から 0～13% 台で推移し、多発した時期は認めていない。しかしながら、2004 年以降は 10% 前後で症例発生頻度が一定化してきている。

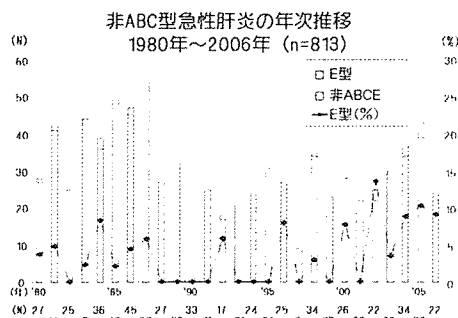


図 2. 非 ABC 型に占める E 型急性肝炎発生頻度年次推移。(棒は実数 (左軸) 折れ線は割合 (右軸) を示す)

さらに本年度は、これまで ORF1 領域の 317 塩基で決定していた領域を広げ、RdRNA polymerase 領域を含む RF1 領域の 821 塩基ないし全塩基長の増幅を行い、系統樹を作成する方法論を取り入れた (三代、高橋両先生のご指導による)。これによって、例えば中国と日本の genotype IV の違いがはっきりと浮かび上がるなど、より詳細な解析が可能となった。さらに、この領域を用いることによって溝上班員らによる分子時計の応用が可能となり、解析に向けて準備中である。

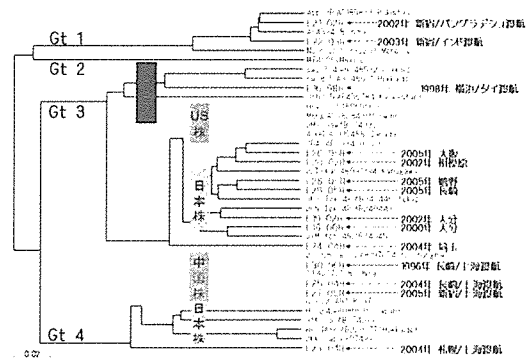


図 3. ORF1 領域 821 塩基を用いた分子系統樹

### 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 (唯一、班長を中心に本年度まとめられた本邦例の報告「肝臓 47 巻 8 号 384・391, 2006」が先進国 E 型肝炎のデモグラフィを観察できるものであろう)。そこで、本研究のような定点観測の症例集積は極めて重要な意味を持つと考えられる。本研究の参加施設は西日本偏在傾向があり、E 型肝炎流行地域とされる北海道からの参加は 1 施設のみで、北海道全域をカバーしていない。いうなれば、E 型肝炎の発生頻度という点から見れば、日本の中でも、また、世界の先進国からしても特異と思われる北海道地域を除いた、日本における E 型肝炎発生頻度とその推移、と位置付けるの