

兵庫県における HEV 感染実態調査

班友 北嶋直人 市立加西病院

研究要旨：兵庫県 E 型肝炎研究会を発足し、成因不明の急性肝炎症例の登録を開始した。10ヶ月間で15施設から34症例が登録され、このうち1例（2.9%）が E 型急性肝炎であった。感染既往の可能性が高い IgG 抗体単独陽性例は3例（8.8%）にみられた。来年度も調査を継続して、その臨床像を明らかにする予定である。また、この6年間の野生猪 HEV 感染定点観測結果を総括すると、猪417頭のうち70頭（16.8%）が HEV-IgG 抗体陽性であり、そのうち16頭（3.8%）は血液中から HEV RNA を検出した。昨年度以降、HEV RNA が陽性であった猪は1頭も見られず、HEV-IgG 抗体陽性率も経年的に低下してきている。

共同研究者

瀬尾 靖、矢野 嘉彦、林 祥剛：神戸大学
安倍夏生、高橋和明、三代俊治：東芝病院研究部

A. 研究目的

<研究1>

E 型肝炎は不顕性感染や症状が軽微な症例も多く、抗体検査が未だに保険承認されていないこともあって、その感染実態は不明な点が多い。症例の多い北海道を除けば単独で多くの症例を経験したような施設はなく、定点観測は国立病院機構共同研究班以外には実施されていない。そこで、兵庫県における E 型肝炎の感染状況、臨床像および感染ルートを明らかにする目的で、成因不明の急性肝炎症例を登録する兵庫県 E 型肝炎研究会を立ち上げた。

<研究2>

2003年以降の野生猪 HEV 感染定点観

測により、猪に HEV が高率に感染していること、その流行は少なくとも4年間遷延していること、地域によって感染率に大きな差があること、猪・鹿・ヒトの間で共通の HEV が感染していることなどが判明した。ところが2007年度に調査した猪は、血液中の HEV RNA がすべて陰性であった。このまま野生猪における HEV 感染は終息に向かうのか否か、その答えを求めて今年度も調査を継続した。

B. 研究方法

<研究1>

1) 兵庫県内診療諸施設に協力を求めて兵庫県 E 型肝炎研究会を立ち上げ、成因不明の急性肝炎症例を登録して臨床的検討を加えた。血清 2-5A 合成酵素活性 (2-5AS) は、SRL にて測定した。

2) 東芝病院研究部に血清を集積して、血清 HEV 抗体(IgG, IgA, IgM)を測定し、HEV

RNA の検出を試みた。

3) E 型肝炎と診断された症例における臨床のおよび疫学的な検討を加えた。

<研究2>

兵庫県在住のハンターの協力を得て、兵庫県中部の地域において捕獲された野生の猪から肝臓と血液をサンプリングした。東芝病院研究部で血清 HEV-IgG 抗体を測定し、HEV RNA の検出を試みた。

C. 研究結果

<研究1>

1) 兵庫県内29施設の協力が得られ、兵庫県E型肝炎研究会を発足できた。2008年4月から2009年1月までの10ヶ月間に、15施設から成因不明の急性肝炎症例34例が登録された。その臨床像(表1)は、年齢中央値61歳、男女比は12:22と女性優位であった。肝障害の程度は軽度から高度まで様々な症例が集まったが、PT40%以下の重症例はなかった。2-5ASが基準値の100 pmol/dlを越える症例は10例(29.4%)であった。

2) HEV RNA 陽性例は1例もなかったが、血清 HEV 抗体(IgG, IgA, IgM)がすべて陽性の症例を1例(2.9%)認めてE型急性肝炎と診断した。IgG 抗体単独陽性例は3例(8.8%)であった。

3) 唯一、E型急性肝炎と診断した症例は82歳、女性。AST 1281 IU/l, ALT 886 IU/l, T-Bil 4.4 mg/dl, PT 49.3%。ウルソ内服にて改善傾向を示して、1ヶ月後に正常化した。HEV 関連の採血は第36病日と回復期に実施され、HEV RNA は陰性であったが、血清 HEV 抗体(IgG, IgA, IgM)は全て陽性であり、5ヶ月後の再検で IgA, IgM 抗体価の低下を確認した。E型急性肝炎と診断後に感染源を検索するために問診を再聴取したが、豚・猪・鹿などを含む動物の生肉摂取、最近の海外渡航歴・輸血歴、ペットの飼育など想定される感染源は全て否定的であった。

<研究2>

今年度調査を行った猪88頭はすべて HEV RNA 陰性であり、7頭(8.0%)が HEV-IgG 抗体陽性であった(表2)。これまでの6年間の結果を総括すると、猪417頭のうち70頭(16.8%)が HEV-IgG 抗体陽性であり、そのうち16頭(3.8%)は血液中から HEV RNA を検出した。昨年度以降、HEV RNA が陽性であった猪は1頭も見られず、HEV-IgG 抗体陽性率も経年的に低下してきている。

D. 考察

兵庫県E型肝炎研究会は発足して期間が短いために症例登録数は少ないものの、成因不明の急性肝炎の中でE型肝炎が占める割合は2.9%と極めて低率であった。先行している北海道E型肝炎研究会の報告や国立病院機構共同研究班の全国調査と比べても低く、これまで報告されている東高西低の HEV 感染率を反映しているものと考ええる。実際に我々の施設でも、生の鹿肉摂取によるE型肝炎の集団発生を2003年に経験して以降、1例もE型肝炎症例を経験していない。

その一方で、IgG 抗体単独陽性例は8.8%にみられ、これらは感染既往の可能性が高いと考えている。これまでの報告でも IgG 抗体単独陽性例が全国的に多い一方で、E型急性肝炎症例が北海道以外では極端に少ない理由はまだ明らかにはされていない。北海道以外では HEV の中でも Genotype 3 が主体であり、その多くは症状が軽微で不顕性感染に近い形で蔓延している可能性が指摘されている。来年度以降も調査を継続することで、兵庫県におけるE型肝炎の感染実態を明らかにしていきたい。

登録された成因不明の急性肝炎34例のうち1例はE型急性肝炎であることが確定できたが、原因を特定できていない症例も多い。その中でも、特に2-5AS高値の症例の中に未

知の肝炎ウイルス症例が隠れている可能性があり、今後も積極的に症例の集積を続けていく必要がある。

昨年度以降、HEV RNA が陽性あった猪は1頭も見られず、猪における HEV-IgG 抗体陽性率も経年的に低下してきている。これまでの endemic area での積極的な狩猟が HEV 感染の終息に貢献した可能性も推測される。

E. 結論

1) 兵庫県における成因不明の急性肝炎患者34例中、1例(2.9%)がE型急性肝炎であった。

2) 野生猪には HEV が高率に感染しているが、この2年間は感染率が低下してきている。

F. 研究発表

1. 学会発表:

北嶋 直人、大瀬 貴之、岡 明彦、山谷 利幸、山邊 裕、安倍 夏生、高橋 和明、三代 俊治. 野生猪 HEV 感染定点観測:平成15-19年於兵庫県. JDDW 2008 (東京). 1 October, 2008

2. 論文発表:なし。

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。

| | | |
|-----------------|-------|----------|
| 年齢(中央値) | 61 | 9-86 |
| 性別(男/女) | 12/22 | |
| AST (IU/l) | 1,333 | 175-6780 |
| ALT (IU/l) | 1,411 | 215-8160 |
| T-Bil (mg/dl) | 4.7 | 0.6-35.0 |
| PT (%) | 83 | 41-116 |
| 2-5AS (pmol/dl) | 97 | 25-453 |

表1: 成因不明急性肝炎34例の臨床像

| 調査年度 | n | HEV-RNA | Anti-HEV (IgG) |
|----------|-----|-----------|----------------|
| H15-16年度 | 141 | 11 (7.8%) | 33 (23.4%) |
| H17年度 | 39 | 0 | 13 (33.0%) |
| H18年度 | 102 | 5 (4.9%) | 15 (14.7%) |
| H19年度 | 47 | 0 | 2 (4.3%) |
| H20年度 | 88 | 0 | 7 (8.0%) |
| 合計 | 417 | 16 (3.8%) | 70 (16.8%) |

表2: 野生猪における HEV 感染実態調査

II. 分担研究報告

平成 20 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・宿主域・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

北海道地区献血者集団に於ける HEV 感染の実態解明

分担研究者：日野 学（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 尊美，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）
阿部 生馬（日本赤十字社血漿分画センター）

研究要旨

HEV 浸淫地区とされる北海道において、献血者を対象に HEV RNA スクリーニング(HEV NAT)を継続実施し、道内献血者における HEV 感染状況を調べた。本年の HEV NAT 陽性者数は 42 名(男性 33 名、女性 9 名)で、HEV NAT 陽性頻度は平均 1.6 人(男性 2.0 人、女性 0.9 人)/万人となり、男性において HEV 感染が増加傾向にあった。過去 4 年間の HEV NAT 陽性者の平均年齢は 40.8 歳(男性 41.8 歳、女性 37.9 歳)で、男女間で大きな差が見られた。また、HEV 抗体保有率は約 2 割にとどまり、感染初期の献血が多かった。陽性者から分離された HEV genotype は 3 型 vs. 4 型=130 vs. 6 で、約半数は特定の北海道 3 型クラスターに属し、体内での増殖速度は 3 型より 4 型のほうが速かった。陽性者の多くは自覚症状のないまま経過したが、約半数は ALT 値が臨床診断する上での一般的な基準値(45 IU/mL)以上に上昇し、HEV 血症は最長約 100 日間持続すると推測されたことから、輸血による HEV 感染リスクは必ずしも低くはない。さらに陽性者の約半数には zoonotic food-borne 感染が疑われたことから、今後も HEV 食物感染に対して十分注意喚起する必要がある。

A. 研究目的

本研究では①献血者集団における HEV 感染の実態を調査し、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を目的とする。

B. 研究方法

昨年に引き続き、2008 年 1 月から 12 月までの北海道内献血検体の内、血清学的感染症スクリーニング陰性で、ALT < 61IU/L の検体 264,336 本を対象とした。

HEV RNA の検査は、まず 20 プール血漿検体 265 μ L から QIAamp Virus BioRobot MDx Kit (Qiagen)を用いて核酸を抽出し、続いて ORF2/3 領域の 75 塩基をターゲットとする Real-time RT-PCR 法により、QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen)を用いて Applied Biosystems 7500 で増幅・検出した。陽性検体はさらにプールを構成する 20 検体について個別に検査を実施した。HEV RNA 陽性検体については、抗 HEV IgM 抗体および IgG 抗体を市販 ELISA 試薬(特殊免疫学研究所)で測定し、また、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は、献血前の

動物内臓肉喫食歴に関するアンケート調査を行うとともに、陽性が判明した献血から 6 ヶ月以内の遡及調査および献血後追跡調査を行った。

C. 研究結果

1. HEV 感染状況

2008 年の HEV 陽性者数は 42 名(男性 33 名、女性 9 名)、陽性頻度は献血者延べ 1 万人当たり 1.6 人(男性 2.0 名、女性 0.9 名)であった(図 1、図 2)。

2005 年から 2008 年までの 4 年間において、HEV NAT 陽性者総数は 142 名(男性 105 名、女性 37 名)に達し、献血者延べ 1 万人当たりの平均陽性者数は 1.3 人(男性 1.6 人、女性 0.9 人)となり有意な性差が認められた(図 2)。調査を開始した 2005 年には陽性頻度の男女間差は見られなかったが、その後、男性の陽性者は増加傾向を示した。一方、女性の陽性者は 2007 年に大きく減少したものの、ほぼ一定であった(図 2)。HEV 陽性者数は散発的に多数発生することもあった(2006 年 1 月: 9 例、2007 年 11 月: 8 例、2008 年 9 月: 8 例)。しかし、年間を通して見ると季節性は認められなかった

(図1)。

2. HEV NAT 陽性献血者の特徴

過去4年間のHEV NAT陽性者の平均年齢は40.8±12.0歳(男性41.8±11.1歳、女性37.9±12.1歳)で、男女間で差が見られた(表1)。

献血時には陽性者の約2割しかHEV抗体を保有しておらず、感染して間もない時期の献血であったと推測された。また喫食歴アンケートに回答した7割の陽性者のうち、さらに7割は献血前2ヶ月以内にレバーやホルモンなどの動物内臓肉を食しており、多くは「十分加熱して食べた」と回答した。

3. HEV 分離株の解析

HEV NAT陽性者から検出されたHEVは、genotype 3 (G3) vs. genotype 4 (G4) = 130 vs. 6でG3が96%を占め圧倒的に多かった(表1)。ORF2 412nt領域の分子系統樹解析の結果、G3はG4に比べて遺伝的多様性に富むが、その約半数は北海道土着株と考えられる同一クラスターに属し、各株間の相同性は94%以上であった。一方、G4の6株中5株については、独立した2つの北海道クラスターに属し、各株間の相同性は98%以上であった。他のG4の1株は北海道株と中国株が混在するグループに属した。

4. 遡及調査

遡及調査の結果、58名の陽性者には6ヶ月以内の献血履歴があり、このうち5名からは前回献血からも微量のHEV RNAが検出された。このうちの3名については、HEV RNA陽性判明時には、すでにこれら陽性血から製造された濃厚血小板製剤が3名の患者に輸血されていた。2名についてはHEVマーカーが陽転しないまま輸血後1ヶ月以内に原疾患で死亡し、HEV感染の有無は確認できなかった。他の1名は輸血後63日間経過した時点でもHEVマーカーの陽転は確認されなかったため、感染不成立と判断した。

5. 追跡調査

陽性判明後1ヵ月以内に2回以上経過観察できた陽性者は39名いた。このうち21名(54%)は経過中にALTが臨床診断する上での一般的な基準値(45 IU/L)以上に一過性に上昇した(表1)。G3感染者の多くは比較的軽微な上昇(62-382 IU/L)にとどまり不顕性感染で経過したが、1名は1,250 IU/Lにまで達した。一方、G4感染者1名は3,366 IU/Lの最高値を示し入

院加療を要した。このG4感染例では、HEV血症状態は陽性判明献血後62日間持続した。また追跡できた陽性者のうち17名は、陽性判明後、HEV RNA量の増加ピークが観察されたため、HEV倍加時間を推定することができた。G3感染例は16例で49±15 hr、G4感染例は1例で26 hrであった。

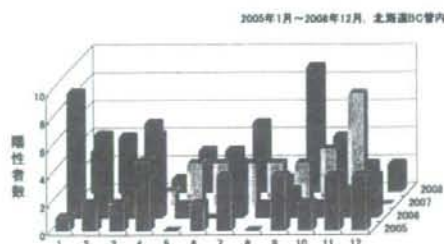


図1 HEV NAT陽性献血者の月別発生数

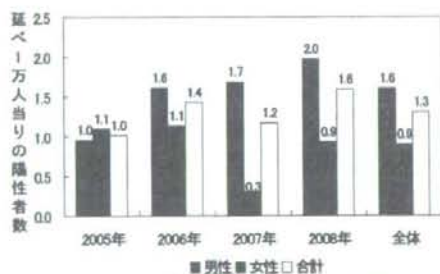


図2 HEV NAT陽性頻度の年次推移

表1 HEV NATのまとめ

| 2005年1月～2006年12月 | |
|----------------------------------|--------------------|
| 検査総数 | 1,098,989 |
| HEV RNA 陽性者数 | 142 |
| 陽性率(延べ1万人当り) | 1.3 |
| 平均年齢 | 40.8±12.0 (17-68) |
| 男性/女性 | 105/37 (2.8:1) |
| HEV RNA 濃度 (10 ⁷ /mL) | 4.9±5.7 (<2.0-6.7) |
| Genotype (G3/G4) | 130/6 |
| anti-HEV抗体 | |
| IgM(-)/IgG(-) | 109 (77%) |
| IgM(+)/IgG(-) | 2 (1%) |
| IgM(+)/IgG(+) | 24 (17%) |
| IgM(-)/IgG(+) | 7 (5%) |
| 動物内臓肉受食率 | 71/103 (69%) |
| 発症率(ALT>45 IU/L) | 21*/38** (54%) |

* ALT最高値 45-3366 IU/L

** 献血後1ヶ月以内かつ2回以上経過観察できたドナー数

D. 考察

北海道地区において、本年も42名ものHEV NAT陽性者が確認され、陽性頻度は過去最高となった。とくに男性の陽性頻度は毎年増加する傾向にあり、3年前の2倍増となっている。

過去4年間の成績を総合すると、HEV NAT陽性者総数は142名に達し、陽性頻度は約1/7700人(延べ献血者)とHCV陽性(HCV Ab陽性かつHCV RNA陽性)頻度に迫る勢いである。同一ドナーの頻回献血を考慮すると、実際の平均陽性頻度は約1/5000人となり、また2008年の男性のHEV陽性頻度は約1/3300人と推定される。一般的にHEV感染はHBVやHCVと異なって慢性化せず、またself-limitedな感染であるためヒト-ヒト感染はごく稀である。この点を考慮すると、このHEV陽性頻度は低くはなく、むしろ高いと考えられる。

また、HEV陽性献血者から分離されたHEV株の96%をG3が占め、さらにその約半数は特定の北海道G3クラスターを形成していた。一方、北海道E型肝炎研究会(「道E研」)から報告されるE型肝炎患者の分離株はG4が多く、genotypeによって顕性化、重症度が異なることが原因と考えられる。

本年はHEV pool NATのウインドウ期のHEV RNA陽性血液が輸血される事例が3件発生したが、幸い輸血感染することはなかった。現在実施しているHEV NATの検出感度から輸血されたHEV粒子は数千~1万個と推測される。実際にHEV感染が成立するには宿主側の要因が大きく関与すると考えられるが、少なくとも今回の事例では、この程度のウイルス量では感染は成立しなかったと考えられる。

一般的にはHEV感染のウイルス血症期間は約1ヶ月とされているが、HEV NAT陽性者ではHEV RNA陽性判明後、2ヶ月間にわたってHEVが検出されるケースがあった。この例では感染時期が不明であったが、HEV倍加時間をもとにウイルス血症持続期間を推定すると約100日間となり、輸血によるHEV感染リスクは必ずしも低くはないと考えられる。

HEV陽性者の多くは例年と同様に献血前に動物内臓肉の喫食歴があり、zoonotic food-borne routeによるHEV感染が強く疑われた。今後もHEV汚染肉を介したHEV食物感染に対する注意喚起が必要である。

E. 結論

1. 北海道内献血者のHEV RNA陽性率は比較的高く、特に男性においてHEV感染者は増加傾向にある。
2. 今後も北海道内献血者のHEV感染調査は継続する必要がある。
3. zoonotic food-borne routeによるHEV感染を防止するための対策が必要である。

F. 研究発表

1. 学会発表

- (1) 松林圭二, 坂田秀勝, 武田尊美, 今絵末, 阿部生馬, 佐藤進一郎, 加藤俊明, 池田久實, 第56回日本輸血・細胞治療学会総会, 福岡市, 2008年4月25日-4月27日
- (2) Ikeda H, IPFA/PEI 15th Workshop on "Surveillance and screening of blood borne pathogens", Vienna (Austria), 13-15 May 2008

2. 論文発表

- (1) Matsubayashi K, Kang JH, Sakata H, Takahashi K, Shindo M, Kato M, Sato S, Kato T, Nishimori H, Tsuji K, Maguchi H, Yoshida J, Maekubo H, Mishiro S, Ikeda H. A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route. *Transfusion*. 2008;48:1368-75.
- (2) Sakata H, Matsubayashi K, Takeda H, Sato S, Kato T, Hino S, Tadokoro K, Ikeda H. A nationwide survey for hepatitis E virus prevalence in Japanese blood donors with elevated alanine aminotransferase. *Transfusion*. 2008;48:2568-76.

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20年度
分担研究報告書

北海道におけるE型急性肝炎症例発生数の推移—道E研集積例の解析—

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型急性肝炎症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。

2008年度は、北海道E型肝炎研究会の2年間の活動により、全北海道的規模で登録されたHEV感染例を対象にE型急性肝炎症の発生頻度、臨床像を検討した。

共同研究者

狩野 吉康 札幌厚生病院
第3消化器科
水尾 仁志 札幌勤医協中央病院
内科
松居 剛志 同 消化器病センター
三代 俊治 東芝病院 研究部
岡本 宏明 自治医科大学
感染・免疫学
講座ウイルス学部門
松林 圭二 日本赤十字北海道
血液センター 検査部

B. 研究目的

北海道地区において発生するE型肝炎例の実態を解明し、各症例における臨床像とHEV感染背景を明らかにする。

C. 研究方法

- 1) 定点観測的にE型肝炎診療を継続してきた札幌市内3施設(勤医協中央病院、札幌厚生病院、手稲溪仁会病院)において、1998年から2008年迄における急性肝炎症例の検討を行った。A,B,C型肝炎virus, EB virus, cytomegalo virus感染及び明らかな薬剤性肝炎を除いた成因不明例におけるHEV感染の頻度、臨床像を検討した。
- 2) 2007年1月北海道内医療諸施設およびHEV研究施設(東芝病院研究部、自治医科大学感染・免疫学講座ウイルス学部門)間に連絡診断網(北海道E型肝炎研究会)が形成された。前者で診断した成因不明急性肝炎症例の血清を対象に、後者においてHEVRNA, anti-HEVなどHEV感染マーカーを検討した。前者では、

A. 背景

北海道・札幌ではE型肝炎孤発例の報告が多く、HEV高侵淫地域と見做されている。しかし、症例個別的又は単独施設での検討にとどまっていたため、札幌地域におけるE型肝炎の実態解明は不十分であった。さらに、札幌、函館、網走、北見市の施設には一定の症例が集積しているが、全道的範囲におけるE型肝炎の実態はほとんど究明されておらず、北海道内におけるHEV感染背景にも不明な点が多い。

HEV 急性感染が診断された症例に対し HEV 感染の背景・経路、臨床像を検討した。

- 3) 日本赤十字北海道血液センターでは献血 donor に対する HEV screening を実施し、HEV 汚染血液製剤の輸血を予防している。北海道血液センターと協力し、HEV 陽性を示した献血 donor を北海道 E 型肝炎研究会世話人施設へ紹介・診療する system を全道的範囲で構築した。献血 donor における HEV 感染症例の診療を通し、HEV 感染症の病態と HEV 感染経路の解明を試みる。

D. 研究結果

1) 最近 11 年間に於いて、在札 3 施設で診療した成因不明急性肝炎 410 症例中、E 型肝炎は 67 例(16.3%)を占め、劇症 6 例(うち死亡 3 例)を含む 18 例(26.9%)が重症例であった。2001-3 年に症例数が増加したが以後は減少に転じ、2004 年から 2008 年までの最近 5 年間では 161 例中 17 例(10.6%)とその頻度が低下した。症例数の減少にも関わらず重症例はほぼ毎年発生しているため、引き続きその動向に注目する必要がある(図 1,2)。



図1.1998-2008年において札幌市内3施設で診断された成因不明急性肝炎におけるE型肝炎の割合

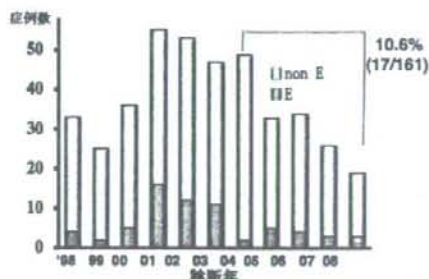
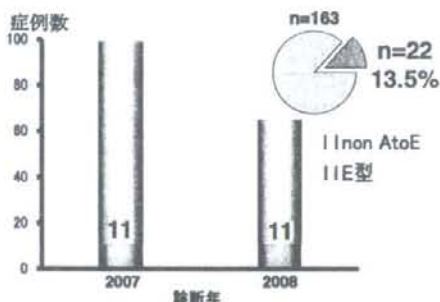


図2.1998-2008年において札幌市内3施設で診断された成因不明急性肝炎におけるE型肝炎症例数と年次別推移

- 2) 北海道 E 型肝炎研究会(道 E 研)の発足(2007 年 1 月)以来、全道 43 医療施設における E 型肝炎症例調査が進行中である。2 年間に 163 例の成因不明急性肝炎例を対象として HEV 感染マーカーの検討が行われ、22 例(13.5%)で HEV 感染が診断された(図 3)。



- 2 次調査が行われた 21 例では、これまでの報告と同様に中年以上の男性に症例が多かった(表 1)。

表1. E型急性肝炎症例の背景

| 症例数 | 21 |
|--------------|--|
| 年齢中央値, range | 54 30-70 |
| 性別、男/女 | 16/5 |
| 居住地 | 札幌 10 岩見沢 2 江別 1 網走 3 函館 3 旭川 1 |
| 飲酒歴 | なし 7 清酒3合未満/日 11 清酒3合/日、5年以上 1 不明 2 |

HEV genotype が判明した 20 例中 genotype 3 による例は 7 例、genotype 4 が 13 例であり、HEV 陽性献血 donor からの発症例は 3 例含まれていた。PT 活性が 40%以下を示す重症型は 4 例であったが劇症肝炎への進行例は認めず、合併症による死亡例は 1 名であった (表 2)。

表2. 劇症急性肝炎症例の臨床像

| 症例数 | 21 |
|------------------|----------|
| 献血 screening 陽性例 | 3 |
| HEV RNA 陽性 | 20 |
| genotype 3 / 4 | 7 / 13 |
| AST, U/L, 平均 | 2011 |
| ALT, U/L, 平均 | 2382 |
| T.bil, mg/dl, 平均 | 4.8 |
| γGTP, U/L, 平均 | 490 |
| PT, % | 78.5 |
| 重症化例 | 4, 19% |
| 劇症例 | 0 |
| 転帰 | 死亡1/生存20 |

3) 2008 年において北海道血液センターが行う献血者 HEV screening で HEV 陽性を示した donor 中、道 E 研関連施設受診例は 3 症例であり、うち 2 名は入院治療を要した。2008 年度において、道血液センターと道 E 研は緊密に協力し、感染者を紹介した医療施設に対し診療上の助言を行い、感染早期からのウイルス学的、臨床的検討を援助し、HEV 臨床研究を広げるための実践的基礎を整えた。HEV 感染病態と感染リスクに関する臨床研究上の成果は今後、各種発表の形式で客観化されることが期待される。

E. 結論

札幌市内 3 医療施設に於ける最近 5 年間、及び北海道内医療施設における最近 2 年間において、成因不明急性肝炎のうち E 型急性肝炎の占める割合は凡そ 10%台である。HEV 高侵淫地域である北海道では、道 E 研の活動により、HEV 感染例の把握、臨床像の検討および HEV 感染経路の探索が全北海道規模において進捗する事が期待される。

F. 研究発表

学会発表

1) 水尾仁志、姜貞憲、狩野吉康、古山準一、本城信吾、松居剛志、荒川智宏、岡本宏明、三代俊治 札幌市内 3 医療機関に於ける最近 10 年間の急性 E 型肝炎の変遷 第 44 回日本肝臓学会総会 2008 年 6 月 5 日、松山
2) Jong-Hon Kang, Hitoshi Mizuo, Yoshiyasu Karino, Takeshi Matsui, Jun-ichi Koyama, Shingo Honjo, Tomohiro Arakawa, Hiroaki Okamoto, and Shunji Mishiro. CLINICAL IMPACT OF HEPATITIS E VIRUS (HEV) INFECTION ON ACUTE HEPATITIS OF UNKNOWN ETIOLOGY DURING THE LAST 10 YEARS IN SAPPORO, JAPAN, The 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of the Liver Disease (AASLD 2008) December 4 2008, San Francisco, USA.

3) 姜貞憲、松居剛志、矢根圭、西森博幸、児玉芳尚、桜井康雄、辻邦彦、真口宏介、狩野吉康、荒川智宏、豊田成司、安倍夏生、高橋和明、三代俊治 E 型急性肝炎重症化予測因子の検討 日本肝臓学会大会 2008 年 10 月 1 日、東京
研究論文

Keiji Matsubayashi, Jong-Hon Kang, Hidekatsu Sakata, Kazuaki Takahashi, Motohiro Shindo, Masaru Kato, Shinichiro Sato, Toshiaki Kato, Hiroyuki Nishimori, Kunihiko Tsuji, Hiroyuki Maguchi, Jun-ichi, Yoshida, Hiroshi Maekubo, Shunji Mishiro, and Hisami Ikeda. A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route. Transfusion 2008; 48:1368-1375.

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

E型肝炎ウイルスの安定性の検討

分担研究者 李 天成（国立感染症研究所ウイルス第二部）

研究要旨：細胞培養系はウイルスの複製、増殖、感染のメカニズムの解明には欠かせない手法である。昨年度、我々はブタから分離した遺伝子型3(G3)に属するHEV株をPLC/PRF/5細胞に接種し、HEVの増殖できるウイルス株を確立した。本年度、この培養系を用いてHEVの熱に対する安定性、消毒剤や、紫外線などに対する抵抗性を検討し、ウイルスを不活かにする条件を検討した。

研究協力者

石井孝司 劉 蘭軍：国立感染症研究所
恒光 裕：動物衛生研究所

中のHEV RNA、HEV抗原をRT-PCR、ELISA法にて確認し、培養可能な系を樹立した。この培養系を用いてHEVの熱に対する安定性、消毒剤や、紫外線などに対する抵抗性を検討し、ウイルス不活化条件を検討した。

B. 研究方法

A. 研究目的

E型肝炎ウイルス（Hepatitis E virus; HEV）はE型肝炎の原因ウイルスである。現在、少なくとも四つの遺伝子型が知られている。E型肝炎の一つの特徴は感染妊婦の死亡率が高いことで、実に20%に達するという報告もある。これまで先進国においてE型肝炎は輸入感染症と思われてきたが、近年、まったく海外渡航歴のない急性E型肝炎患者が発見されるなど、日本でもすでに土着しているウイルスであることが明らかになってきた。HEVが増殖できる培養細胞系は確立されておらず、ウイルス増殖、複製機序は未だに明らかではない。また、ワクチン開発のための基盤的情報が不足しているため、HEVによる食中毒対策が困難な状況にある。今回我々はブタから分離した遺伝子型3(G3) HEVをヒト肝癌細胞PLC/PRF/5に接種し、経時的に培養上清

1) 熱安定性：培養細胞で増殖したG3 HEVを異なる温度（37℃～100℃）、異なる時間（1分から1時間まで）熱処理したあと、PLC/PRF/5細胞に接種し、培養上清を三、四日置きに採取した。細胞培養上清のウイルス抗原、およびウイルス遺伝子を測定し、ウイルスが増殖するかどうかによって感染性を評価した。

2) 消毒剤に対する抵抗性：培養細胞にて増殖したG3 HEVを異なる濃度のNaClO（62.5ppm～1000ppm）と混合して室温30分間反応させたあと、PLC/PRF/5細胞に接種し、培養上清を三、四日置きに採取した。細胞培養上清のウイルス抗原、およびウイルス遺伝子を測定し、ウイルスが増殖するかどうかによって感染性を評価した。

3) 紫外線に対する抵抗性：培養細胞にて増殖したG3 HEVをそれぞれ10,20,30,60,120分

間 50uw 強度の紫外線照射したあと、PLC/PRF/5 細胞に接種し、培養上清を三、四日置きに採取した。細胞培養上清のウイルス抗原、およびウイルス遺伝子を測定し、ウイルスが増殖するかどうかによって感染性を評価した。

C. 研究結果

G3 HEV を 60°C10 分間、65°C5 分間以上の熱処理、あるいは 50uw 強度で 30 分間紫外線照射により、PLC/PRF/5 細胞に対する感染性が消失し、これらの条件で HEV を不活化する可能性が示唆された。また、HEV は消毒剤 NaClO に対して一定の抵抗性を示したが、ウイルス増殖速度が遅くなり、感染力低下も観察された。

D. 考察

HEV が増殖可能な培養細胞の樹立によって、HEV の不活化条件、消毒薬の評価を *in vitro* で容易に検討することが可能になった。加熱によりウイルスを不活化できる根拠を見いだしたことから、今後の HEV による食中毒対策に有力な科学根拠を提供できるものと思われる。消毒剤に関して使用最適な濃度をさらに検討する必要がある。

F. 研究発表

1. 学会発表

1. Li T-C, Miyamura T, Wakita T, Takeda N: Characterization of recombinant virus-like particles of genotype 3 hepatitis E viruses. The 7th Japan-China International Conference of Virology. Tokyo. June1-3, 2008.
2. Li TC, Liu LJ, Suzuki T, Tsunemitsu H, Kataoka M, Ngata N, Takeda N, Wakita T, Miyamura T. Efficient production of type 2 porcine circovirus-like particles by a recombinant baculovirus. XIV international Congress of Virology. Turkey. Istanbul, 10-15 August 2008.

3. 山下哲生,宮崎 直幸,森 嘉生, 森石恒司, 李 天成, 宮村達男, 武田直和, 月原富武, 吉村政人, 松浦善治: 分析能 3.5A の E 型肝炎ウイルス様粒子の結晶化と X 線結晶構造解析. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会, 岡山, 2008.10.26-28.
4. 森 嘉生, 山下哲生, 嶋 亮一, 森石恒司, 李 天成, 武田直和, 松浦善治: E 型肝炎ウイルス様粒子の形成に重要なアミノ酸の同定と細胞吸着阻害モノクローナル抗体の作製. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会, 岡山, 2008.10.26-28.
5. 李 天成, 恒光 裕, 宮村達男, 脇田 隆宇, 武田直和: 培養細胞における E 型肝炎ウイルス(HEV)の増殖. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会, 岡山, 2008.10.26-28.

2. 論文発表

- (1) Wang CY, Miyazaki N, Yamashita T, Higashiura A, Nakagawa A, T-C Li, Takeda N, Xing L, Hjalmarsson E, Friberg C, Liou DM, Sung YJ, Tsukihara T, Matsuura Y, Miyamura T, Cheng RH. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of recombinant hepatitis E virus-like particle. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2008 Apr 1;64(Pt 4):318-22.
- (2) Yamamoto H, Li TC, Koshimoto C, Ito K, Kita M, Miyashita N, Arikawa J, Yagami K, Asano M, Tezuka H, Suzuki N, Kurosawa T, Shibahara T, Furuya M, Mohri S, Sato H, Ohsawa K, Ibuki K, Takeda N. Serological evidence for hepatitis e virus infection in laboratory monkeys and pigs in animal facilities in Japan. *Exp Anim.* 2008 Jul;57(4):367-76.
- (3) Gran S, Hansman, Tmoichiro Oka, T-C Li, Osamu Nishio, Mamoru Noda, and Naokazu Takeda. Detection of Human Enteric

Viruses in Japanese Clams. Journal of Food Protection. 2008 Aug; 71(8): 1689-95.

- (4) T-C Li, Yuriko Suzaki, Yasushi Ami, Hiroshi Tsunemitsu Tatsuo Miyamura, and Naokazu Takeda. Mice are not susceptible to hepatitis E virus infection The Journal of Veterinary Medical Science.2008. Dec;70(12):1359-62.
- (5) Liu LJ, Suzuki T, Tsunemitsu H, Kataoka M, Ngata N, Takeda N, Wakita T, Miyamura T, Li TC. Efficient production of type 2 porcine circovirus-like particles by a recombinant baculovirus. Arch Virol. Nov 9, 2008.
- (6) Sugitani M, Tamura A, Shimizu YK, Sheikh A, Kinukawa N, Shimizu K, Moriyama M, Komiyama K, Li TC, Takeda N, Arakawa Y, Suzuki K, Ishaque SM, Roy PK, Raihan A, Hasan M. Detection of hepatitis E virus RNA and genotype in Bangladesh. J Gastroenterol Hepatol. 2008 Dec 1.

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 20 年度

分擔研究報告書

日本のヒトと動物から採取される E 型肝炎ウイルス株の解析

分擔研究者 三代俊治 (東芝病院研究部)

研究要旨 ゲノム上の差異乃至變異が當該ウイルスの病原性や薬剤感受性等の差異乃至變化と相關することは多くのウイルスで知られているが、E 型肝炎ウイルス(HEV)にも、遺伝子型の違いによる病原性の強弱が明らかに存在する(genotype 4 > 3)。我々は數年來、日本のヒトと動物から採取される HEV 株の解析を進めて行く中で、genotype 3 であるにも拘らず広域分布性(=埼玉、京都、鳥取、岡山、香川、沖縄)と高病原性(=8 例中 PT 値 50%以下が 4 例存在し 1 例は劇症肝炎で死亡)を特徴とする一系統("JIO strain")に遭遇し、その系統に連なるヒト株 8 本とブタ株 5 本の完全長乃至準完全長ウイルスゲノム塩基配列を決定し、既知配列と比較した結果、右の所見を得た: (i) genotype 4 との間の genome recombination は無い; (ii) 通常の genotype 3 株にあるまじきアミノ酸が 18 カ所に見られる; (iii) そのうちの 3 カ所のアミノ酸は genotype 4 の其れと同一である; (iv) そのうちの 1 カ所(V239A)は *helicase domain* の中に存在する; (v) この *heN239A* は 1997 年の軽症急性肝炎症例には存在しなかったが、2000-2002 年のブタ及び 2004-2006 年の重症急性肝炎症例由来株には全て存在する。以上から我々は、*helicase domain* 上に生じた一つの missense mutation(*heN239A*)こそが従前は弱毒性であった此の genotype 3 内の一系統に高病原性を与えた原因であり、且つ、その missense mutation は養豚場のブタ集団の中で生じたものであり、且つ、その養豚場から出荷されたブタ乃至ブタ由来食品が感染源となって此の高病原性 JIO strain を日本國內に広域に分布せしめるに至った、と、bird flu のシナリオを反芻しつつ大胆に推測する。

研究協力者: 高橋和明、安倍夏生、橋本みちえ、SMF アクバル(東芝病院研究部)、加藤孝宣(元東芝病院研究部、現国立感染症研)、新井雅裕(東芝病院消化器内科)、岡本宏明(自治醫大ウイルス)、川上万里(倉敷成人病センター内科)、佐久川廣(ハートライフ病院内科)、持田智(埼玉醫大消化器肝臓内科)、松田裕之(松田内科クリニック)、杉之下与志樹(京都大學消化器内科)、渡邊精四郎(香川県立中央

病院)、山本和秀(岡山大學消化器内科)、谷口美幸、金守良(神戸朝日病院)、川村欣也(浜松医科大学第二内科)、北嶋直人(加西市立加西病院内科)、森宏光(長野赤十字病院消化器内科)、大西幸代(公立芽室病院)、井上和明(昭和大学藤ヶ丘病院)、他

A. 研究目的

我々は、數々の研究協力者と共同し、日本

国内に在住乃至棲息するヒト乃至動物から採取せられる HEV 株の塩基配列を解析し、以て感染経路や株間病原性差異等の解明の一助と為すことを目的として研究を実施して来ている。本年度の研究成果としては、例えば本邦で初めて経験された妊婦重症感染例の解析を擧げることできるが、それは既に論文として公開されているので其れ(江林他、*肝臓* 2009; 50: 60-64 別刷添付)を讀んで頂くこととし、本報告書では、現時点では論文未公開 (Takahashi et al. EID 2009 in press) の、「分布の広域性」と「病原性の高さ」を兼ね備えた“J10 strain”と仮稱する genotype 3 内の一系統に関する解析結果について報告する。

B. 研究方法

ORF2 部分塩基配列の一時スクリーニングで genotype 3 の傘下に極めてコンパクトなクラスターを形成 (稿末の Figure 1b 参照) した 8 本のヒト株と 5 本のブタ株 (Table 1 参照) について、完全長乃至準完全長 HEV ゲノム塩基配列を決定した。

C. 研究結果

決定した塩基配列 (Figure 1a の box 内) の DDBJ/EMBL/GenBank accession number は、ヒト株 8 本が AB291951-7/AB291960 であり、ブタ株 5 本が AB443623-7 であり、全て既に公開されている。

先ず、ゲノム全長に亘る既知 genotype 4 配列との fragment-by-fragment comparison から、J10 strain が genotype 3 と 4 との間での recombination product ではないことが確認された。

次に、既知 genotype 3 配列との比較から、通常の genotype 3 には希有だが此の一群の HEV 株 (J10 strain) の間では 50%以上共有

されているアミノ酸が ORF1 内に 12 カ所、ORF2 内に 3 カ所、ORF3 内にも 3 カ所みつかった。

そのうち、此の J10 strain と genotype 4 との間で共有されているアミノ酸が 3 箇所に存在した (いずれも ORF1 内) が、最も注目されたのは *helicase domain* の中に存在する *heN239A* であった。即ち、通常の genotype 3 では V であるところの *helicase* 第 239 残基が、最も古く採取された 1 本以外の全ての J10 strain に於いて genotype 4 と同じ A に變化していたからである (Table 1 参照)。これは、もともとは *helicase* aa 239 が V であった J10 strain に missense mutation が起こって *helicase* 第 239 残基=A に變異したことを想像させる。

| 年 | 地域 | 診断 | PT% | <i>heN239A</i> |
|------|-----|-----|-----|----------------|
| 1997 | 埼玉 | AH | 100 | (-) |
| 2000 | 宮崎 | - | - | (+) |
| 2002 | 豚 | - | - | (+) |
| | n=5 | | | |
| 2004 | 鳥取 | AH | 92 | (+) |
| 2004 | 沖縄 | AH | 46 | (+) |
| 2004 | 岡山 | AH | 75 | (+) |
| 2005 | 鳥取 | ASH | 34 | (+) |
| 2005 | 沖縄 | AH | 92 | (+) |
| 2006 | 香川 | AH | 45 | (+) |
| 2006 | 京都 | FH | 27 | (+) |

Table 1. Subjects and the mutation

AH=急性肝炎、ASH=急性肝炎重症型、
FH=劇症肝炎；FH 例は死亡

D. 考察

以上から我々は、HEV genome の *helicase domain* 上に生じた一つの missense mutation (*heN239A*)こそが従前は弱毒性であった此の genotype 3 内の一系統に高病原性を与えた原因であり、且つ、その missense mutation は養豚場のブタ集団の中で生じたものであり、且つ、

その養豚場から出荷されたブタ乃至ブタ由来食品が感染源となって此の高病原性 J10 strain を日本國內に広域に分布せしめるに至った、と、bird flu のシナリオを反芻しつつ大胆に推測する。この speculation の正否は無論今後の in vitro 実験等で検証されねばならない。

E. 発表

1. 学会発表

- (1) 川村欣也(浜松医科大学第2内科), 小林良正, 早田謙一, 住吉信一, 川田一仁, 高橋百合美, 牧野さつき, 則武秀尚, 三代俊治. シカの生肉摂取による感染が疑われる E 型急性肝炎の 1 例(会議録/症例報告). 日本消化器病学会雑誌 105 巻臨増大会 PageA864 (2008.09)
- (2) 三代俊治(東芝病院研究部). ゲノムからみた感染症: 肝炎ウイルス・ゲノム考(会議録). 感染症学雑誌 82 巻 5 号 Page495 (2008.09)
- (3) 北嶋直人(加西市立加西病院内科), 大瀬貴之, 岡明彦, 山谷利幸, 山邊裕, 安倍夏生, 高橋和明, 三代俊治. 兵庫県野生猪およびアライグマにおける HEV 感染実態調査(会議録). 肝臓 49 巻 Suppl.2 PageA558 (2008.09)
- (4) 森宏光(長野赤十字病院消化器内科), 今井隆二郎, 三枝久能, 金児泰明, 原悦雄, 松田至晃, 和田秀一, 清澤研道, 高橋和明, 三代俊治. 当院における E 型肝炎の検討(会議録/症例報告). 肝臓 49 巻 Suppl.2 PageA558 (2008.09)
- (5) 芦田久美代(公立社総合病院内科), 川上万里, 前田佳子, 大竹啓夫, 安倍夏生, 高橋和明, 三代俊治. 中国単身赴任者に発症した急性 E 型肝炎の一例(会議録/症例報告). 肝臓 49 巻 Suppl.2 PageA558 (2008.09)
- (6) 山本義也(函館市立函館病院消化器病センター・消化器科), 林秀幸, 中井正人, 小川浩司, 山本文素, 畑中一映, 片桐雅樹, 成瀬宏仁, 松林圭二, 池田久實, 姜貞憲, 安倍夏生, 高

橋和明, 三代俊治. 全経過で HEV markers を観察しえた HEV 陽性献血者急性 E 型肝炎の一例(会議録/症例報告). 肝臓 49 巻 Suppl.2 PageA557 (2008.09)

- (7) 大西幸代(公立芽室病院), 菊地英豪, 森谷満, 田中俊英, 宮本光明, 辻村和樹, 水野孝子, 林敏博, 安倍夏生, 高橋和明, 三代俊治. 十勝芽室における E 型肝炎ウイルス抗体保有率(会議録). 肝臓 49 巻 Suppl.2 PageA557 (2008.09)
- (8) 川上万里(倉敷成人病センター内科), 梅川康弘, 久保木真, 山本和秀, 安倍夏生, 高橋和明, 三代俊治. 原因未同定のまま血清が保存された急性肝障害例からの HEV 感染の掘り起こし(会議録). 肝臓 49 巻 Suppl.2 PageA557 (2008.09)
- (9) 姜貞憲(手稲溪仁会病院 消化器病センター), 松居剛志, 矢根圭, 西森博幸, 児玉芳尚, 桜井康雄, 辻邦彦, 真口宏介, 狩野吉康, 荒川智宏, 豊田成司, 阿部夏生, 高橋和明, 三代俊治. E 型急性肝炎重症化予測因子の検討(会議録). 肝臓 49 巻 Suppl.2 PageA557 (2008.09)
- (10) 金守良(神戸朝日病院), 谷口美幸, 井本勉, 金啓二, 林祥剛, 安倍夏生, 高橋和明, 三代俊治. 在日日本人、コリアン、在中國中国人、コリアンにおける E 型肝炎ウイルス感染率に関する疫学的研究(会議録). 肝臓 49 巻 Suppl.2 PageA518(2008.09)
- (11) 水尾仁志(北海道勤医協中央病院 内科), 姜貞憲, 狩野吉康, 本城信吾, 松居剛志, 荒川智宏, 岡本宏明, 三代俊治. 札幌市内 3 医療機関に於ける最近 10 年間の急性 E 型肝炎の変遷(会議録). 肝臓 49 巻 Suppl.1 PageA155 (2008.04)

2. 論文発表

- (1) 江林明志, 井上和明, 高橋和明, 渡邊綱正, 山田雅哉, 安田宏, 三代俊治, 与芝真彰. イ

- ンドから帰国直後に重症 E 型肝炎を発症した日本人妊婦の 1 例. 肝臓 2009; 50(2): 60-64
- (2) 川上万里, 久保木眞, 梅川康弘, 山本和秀, 安倍夏生, 高橋和明, 三代俊治. 原因不確定の急性肝障害における hepatitis E virus 感染の有無の検討. 肝臓 2009; 50(3) in press
- (3) 加藤孝宣, 高橋和明. E 型ウイルス性肝炎(解説). Medical Technology 2008; 36(9): 971-974
- (4) Kazuaki Takahashi, Hiroaki Okamoto, Netsumi Abe, Manri Kawakami, Hiroyuki Matsuda, Satoshi Mochida, Hiroshi Sakugawa, Yoshiaki Suginoshita, Seishiro Watanabe, Kazuhide Yamamoto, Yuzo Miyakawa, Shunji Mishiro. A Virulent Strain (J10) of Hepatitis E Virus Genotype 3 in Japan: Analysis of Complete or Near-Complete Sequences of Human and Swine Isolates. Emerging Infectious Diseases 2009 (in press)
- (5) Miyuki Taniguchi, Soo Ryang Kim, Shunji Mishiro, Kazuaki Takahashi, Myung Hee Shin, Haesun Yun, Man Suk Park, Li, Zhongmin, Kim Mi kyung, Fang Jinnv, Yoshitake Hayashi. Epidemiology of hepatitis E in Northeastern China, South Korea and Japan. Journal of Infection 2009 (in press)
- (6) Matsubeyashi K, Kang JH, Sakata H, Takahashi K, Shindo M, Kato M, Sato S, Kato T, Nishimori H, Tsuji K, Meguchi H, Yoshida J, Maekubo H, Mishiro S, Ikeda H. A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route. Transfusion 2008 Jul; 48(7): 1368-75
- (7) Toyoda H, Honda T, Hayashi K, Katano Y, Goto H, Kumeda T, Takahashi K, Abe N, Mishiro S, Takamatsu J. Prevalence of hepatitis E virus IgG antibody in Japanese patients with hemophilia. Intervirology 2008; 51(1): 21-5

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請：有り

出願番号：P2008324630

出願日：2008年12月19日

発明名称：HEVに感染した対象における肝炎が重症化する可能性を予測する方法、そこにおいて使用されるプローブセットおよびプライマーセット

出願手続：TS60 株式会社 東芝

契約相手：K017 厚生労働省

契約名称：厚生労働科学研究

共願社：TS64, K017 東芝ビジネスアンドライフサービス株式会社, 厚生労働省

2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし

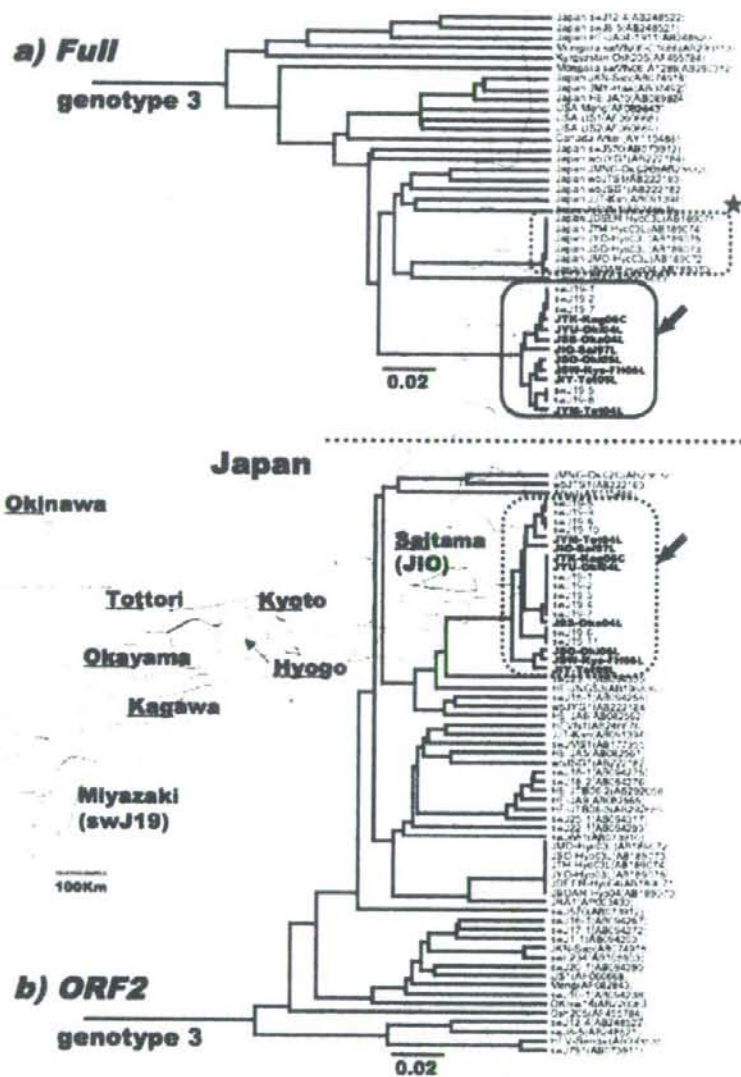


Figure 1. 分子系統樹

上圖に於いてOkinawa, Kagawa, Okayama, Tottori, Kyoto, Saitamaはhuman isolates、Miyazakiはswine isolates.

(Takahashi et al. EID in press)

E型肝炎ウイルスの感染培養系を用いた基礎研究

分担研究者 岡本宏明（自治医科大学医学部教授）

研究要旨：培養上清中のHEV粒子は血清中HEV粒子と同様に、シヨ糖液中での浮上密度が1.15 g/mlと軽く、糞便中のHEV粒子(1.26-1.27 g/ml)と異なって、その表面に細胞膜成分とともにORF3蛋白質を有していること、そしてそれら細胞膜成分とORF3蛋白質は界面活性剤と蛋白分解酵素による処理によって除かれ、糞便中HEV粒子様の浮上密度を有する粒子に変わることが明らかになった。また、糞便由来野生株(JE03-1760F)と同等の感染性と増殖能を有する感染性cDNAクローンを構築することができた。加えて、ORF3蛋白質を産生できない変異株(Δ ORF3)では、細胞内での増殖は野生株と同等でありながら、培養上清中への子ウイルスの放出がほとんど認められないことが明らかになったことから、ORF3はHEV粒子の放出に必須であると考えられた。以上の研究成果は、増殖機構や放出機構のさらなる解明に役立つものと期待される。

A. 研究目的

これまでに、E型肝炎ウイルス(HEV)については、培養上清中にウイルス粒子が大量に放出され、継代可能な感染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応用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

国内感染E型肝炎患者由来のHEV(JE03-1760F [3型]含有糞便浮遊液を用いた。

2. 細胞培養

PLC/PRF/5 (Alexander)細胞、あるいはA549細胞のmonolayerを作製し、HEVを接種した。細胞培養は既報(Tanaka et al., J Gen Virol 88:903-911, 2007)に準拠して行った。また、ポアサイズ0.22 μ mのフィルターを通し、cell-freeとした培養上清を、新たな細胞monolayerに接種し、継代培養を行った。

3. 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 RT-PCR法によりHEV RNAの定量測定を行った。

4. 抗HEVマウスモノクローナル抗体の作製

カイコ蛹で発現したORF2蛋白およびORF3のC末端アミノ酸に相当する24-mer合成ペプチドを免疫原として、既報(Usuda et al., J Immunol Methods 87:203-210, 1986)に従い、抗ORF2、抗ORF3マウスモノクローナル抗体(mAb)を作製した。

5. 浮上密度の測定

常法に従い、SW28あるいはSW60ローターを用い、シヨ糖密度勾配平衡遠心法によりHEV粒子の浮上密度を測定した。

6. Immuno-capture PCR法によるHEV粒子の捕捉率の測定

予めbiotin化した抗ORF2、抗ORF3 mAbsをstreptavidinが固相されたimmunoplateに結合させ、それら抗体に捕捉されたHEV粒子のRNAをreal-time RT-PCR法により測定し、捕捉率を算定した。

7. 感染性HEV cDNAクローンの作製

JE03-1760F株のゲノムRNAを鋳型にして、RT-PCR法によりゲノム全長をカバーするcDNA断片を増幅し、そのcDNA断片をT7プロモーターとpoly(A)配列との間に挿入したゲノムプラスミド(pJE03-1760F/wt)を構築した(図1)。In vitro transcriptionにより全長RNAを合成し、5'末端にキャップを付加したのち、PLC/PRF/5細胞に導入した。また、増殖能を欠くnegative controlとしてORF1にframeshift変異を入れた Δ ORF1、および

ORF3 の ATG コドンを GCA に変異させた ORF3 欠損クローン (Δ ORF3) も同時に作製し、PLC/PRF/5 細胞への transfection を行った。

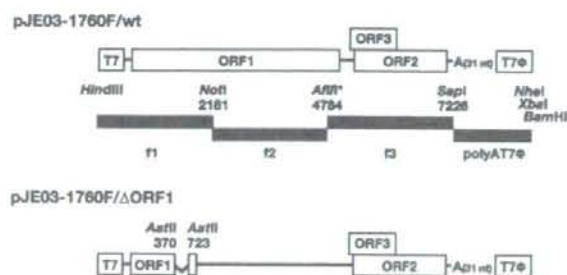


図1. HEV (JE03-1760F株) の感染性 cDNA クローンの構築

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なく、人権上の問題は生じない。

C. 研究結果

1. 抗 ORF2、抗 ORF3 mAb の作製

抗 ORF2 mAb として 9 種類、抗 ORF3 mAb として 10 種類の抗体が得られ、いずれも Western blotting や IFA (immunofluorescence assay) 法による HEV 抗原の特異的な検出に有用であることが分かった。中でも、抗 ORF2 mAb の H6225 抗体は、遺伝子型の違いによらず、糞便中 HEV 粒子を効率よく捕捉できることが分かった。また、培養系を用いた感染中和実験によって、H6225 には糞便中 HEV 粒子の感染を阻止する中和活性があることを確認することができた。

2. HEV 粒子の浮上密度

糞便中の HEV 粒子は既報のごとく、シヨ糖液中での浮上密度が 1.26-1.27 g/ml と重いものに対して、培養上清中の HEV 粒子は血清中 HEV 粒子と同様に浮上密度が 1.15 g/ml と軽いことが分かった。

デオキシコール酸ナトリウム (DOC-Na) とトリブシンで処理する前には、抗 ORF2 mAb (H6225) と抗 ORF3 mAb (TA0536) の 2 種類の mAbs による培養上清中 HEV 粒子の捕捉率は共に約 3% に過ぎなかったが、DOC-Na で処理することによって 2 種類の mAbs の捕捉率はそれぞれ 97%、66% まで上昇した。トリブシン処理を行うと、DOC-Na 処理の有無に拘わらず、抗 ORF3 mAb は HEV 粒子を捕捉できなくなった。さらに、DOC-Na とトリブシンによる処理を受けた培養上清中 HEV 粒子

の浮上密度は 1.15 g/ml から 1.24-1.25 g/ml へとシフトした。血清中の HEV 粒子も、DOC-Na とトリブシンによる処理に対して培養上清中 HEV 粒子と同様の挙動を示した。それに対して、糞便中の HEV 粒子には処理前後での違いは全く認められなかった。

3. HEV の感染性 cDNA クローンの構築

In vitro で合成したゲノム RNA を PLC/PRF/5 細胞に導入したところ、 Δ ORF1 では子ウイルスの産生が認められなかったのに対して、野生株の pJE03-1760F/wt では培養上清中に 10^7 copies/ml 以上の高いレベルで HEV の産生が認められた。この cDNA 由来 HEV は PLC/PRF/5 細胞や A549 細胞で継代可能であり、それぞれの細胞において糞便由来野生株 JE03-1760F と同等の増殖性を示すことが分かった (図 2)。

また、 Δ ORF3 では細胞内で pJE03-1760F/wt と同等レベルの HEV RNA が検出できたにも拘わらず、培養上清中への子ウイルスの放出はほとんど認められなかった。

D. 考察

これまで、ORF3 蛋白が粒子形成に与っているか否かについては不明であった。しかし、抗 ORF3 mAbs を用いた immuno-capture PCR 法によって検討した結果、ORF3 蛋白が培養上清中や患者血清中の HEV 粒子の表面上に存在していることが明らかになった。界面活性剤非存在下での捕捉率は数%に過ぎず、種々の界面活性剤による処理によって捕捉率は約 100% に達することから、ORF3 蛋白は HEV 粒子上で膜にほぼ覆われた状態で存在しているものと考えられた。また、糞便中の HEV 粒子を抗 ORF3 mAbs で捕捉できなかったのは、肝臓から胆管に放出され、腸管に排泄される過程で胆汁中のデオキシコール酸と膵液中の蛋白分解酵素 (トリブシン) に曝され、細胞膜とともに ORF3 蛋白が除去されることに起因するものと考えられた。

E. 結論

HEV (JE03-1760F 株) の感染性 cDNA クローンを作製し、reverse genetics system による HEV の感染培養系を構築することができた。