

<短 報>

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

川上 万里<sup>1)\*</sup> 久保木 真<sup>1)</sup> 梅川 康弘<sup>2)</sup> 山本 和秀<sup>3)</sup>  
安倍 夏生<sup>4)</sup> 高橋 和明<sup>4)</sup> 三代 俊治<sup>4)</sup>

緒言：かつて本邦のE型肝炎は専ら輸入感染症と認識されていたが、日本土着の hepatitis E virus (HEV) による国内感染も存在することが判っており、阿部らの報告によれば、本邦のE型肝炎例のうち輸入感染は10%以下に過ぎず、大半は国内感染であるとされる<sup>1)</sup>。かかる状況にも拘らず、HEV診断系がわが国では依然として保険適外であるため、一般病院においては測定されないことが多い。そこで、我々は一般市中病院である当院に保存された原因不確定の急性肝障害患者の血清を用いてHEV感染急性期診断マーカー (IgM抗HEV抗体、IgA抗HEV抗体、HEV RNA) の陽性率を調べた。

方法：当院は岡山県倉敷市 (人口47.8万人) にある病床数269床の一般市中病院である。2004年1月～2007年12月の4年間に当院で経験した原因不確定の急性肝障害は25例で、このうち7例が薬剤性、2例がアルコール性、2例が自己免疫性肝炎、3例が妊娠による体重増加に伴い、2例が全身消耗性疾患随伴と暫定診断され、原因不明は9例であった。急性肝障害の定義は「急性の肝障害で、肝機能異常の持続が6カ月以内のもの」とした。血清が保存されていた22例について、IgM抗HEV抗体、IgA抗HEV抗体、HEV RNAの検出を試みた。

結果：IgM抗HEV抗体、IgA抗HEV抗体ともに陽性を22症例中2例 (9.1%) に認め、うち1例はHEV RNAも陽性であった (Table 1)。

症例1：57歳男性。S状結腸癌術歴あり。2004年4月に嘔気、食欲不振、尿濃染にて受診し、total bilirubin (TB) 3.81 mg/dl, aspartate aminotransferase (AST) 1110 IU/l, alanine aminotransferase (ALT) 1495 IU/lの肝障害を認めたため、入院した。Hepatitis A virus (HAV), hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barre virus (EBV), herpes simplex virus (HSV) 感染症は否定され、antinuclear antibody (ANA) は40倍であった。半年以内の海外渡航はなく、ブタ、イノシシ、シカの生肉の摂取もなかった。補液、ビタミン剤投与にて全身状態は改善し、10日後に退院した。保存血清より genotype 3 の HEV が検出され、ORF1 内の 326 塩基を増幅したところ、その塩基配列 (JKH-Oka04) は隣接する岡山市内で同年に発症した例 (JSS-Oka04) と 99.4% の高い一致率を示した (Fig 1)。

症例2：39歳女性。看護師。半年前からダイエット用サプリメントを内服していた。2週間前から全身倦怠感を自覚し、2005年2月子宮筋腫の術前検査にてTB 0.86 mg/dl, AST 83 IU/l, ALT 429 IU/lの肝障害を認めた。HAV, HBV, HCVの感染は否定され、ANAは20倍であった。CMV, EBV, HSV感染症については未検査であった。半年以内の海外渡航はなかった。ブタ、イノシシ、シカの生肉摂取については記載がなかった。サプリメントを中止したところ、肝障害は改善し、薬物性が疑われていた。本例の保存血清からHEV RNAは検出し得なかったが、IgM抗HEV抗体及びIgA抗HEV抗体は共に陽性であった。

考察：E型肝炎は感染予防法において4類感染症に分類されている。しかしながらその届出は徹底しておらず、届出数は論文報告数に満たない。また、その診断法が保険適外であることより診断を逸した症例の存

1) 倉敷成人病センター 肝臓病治療センター

2) 倉敷成人病センター 内科

3) 岡山大学医学部消化器・肝臓内科

4) 東芝病院研究部

\*Corresponding author: lahaina\_9pm@yahoo.co.jp

<受付日2008年7月24日><採択日2008年12月18日>

Table 1 Characteristics of 25 patients with etiology-obscure acute liver dysfunction

#	Year month	Age sex	TB (mg/dl)	PT (%)	AST (IU/l)	ALT (IU/l)	ALP (IU/l)	$\gamma$ glob (g/dl)	ANA (×)	Liver biopsy	Serum	Tentative diagnosis	Serum HEV markers
1	04Jan	31M	0.6		52	131	201	0.9	×80	-	○	alcoholic hepatitis or drug induced hepatitis	negative
2	04Mar	41F	3.0		473	604	294	1.5	×80	-	○	drug induced hepatitis	negative
3	04Apr	57M	3.8		1110	1495	873	1.3	×40	-	○	unknown	IgM, IgA, RNA positive
4	04Aug	38M	2.0	87	1087	430	370	0.5	×80	-	○	unknown	negative
5	04Sep	37M	3.9	87	788	526	1172	0.8	×80	○	○	unknown acute hepatitis	negative
6	04Dec	62F	0.6	88	246	667	774	1.1	×80	○	○	drug induced hepatitis	negative
7	04Dec	24F	0.6		146	331	369	1.2	×20	-	○	weight gained	negative
8	05Jan	47F	0.8		169	278	568	1.5	×20	-	-	drug induced hepatitis	-
9	05Feb	39F	0.9	87	83	429	595	1.2	×20	-	○	drug induced hepatitis	IgM, IgA, positive
10	05Mar	54M	5.2	100	1255	679	442	1.9	×40	-	○	unknown	negative
11	05Mar	44F	4.2	>100	1147	1163	1020		×40	-	○	unknown	negative
12	05Mar	22F	0.7		122	206	131		×40	○	○	unknown acute hepatitis	negative
13	05Mar	14F	0.6		97	98	247		-	-	○	unknown	negative
14	05Jun	22M	8.7	>100	331	792	422	0.7	-	-	○	unknown	negative
15	05Nov	31F	0.4		63	80	307	0.7	<20	-	○	weight gained	negative
16	06Jan	65F	0.9		101	168	1049	0.7	×40	-	○	exhausted disease	negative
17	06May	38M	0.8		774	1111	382	0.7	-	-	○	drug induced hepatitis	negative
18	06Jul	73F	1.9	93	1194	481	469	1.4		-	○	exhausted disease	negative
19	06Aug	20F	0.7		343	678	222	1.6	×320	-	○	unknown	negative
20	06Sep	26F	0.2	86	123	171	210		×70	-	○	autoimmune hepatitis	negative
21	07Jan	30M	0.6	96	160	331	331	1.0	×80	-	○	drug induced hepatitis	negative
22	07Mar	29F	1.0		145	120	180		×320	-	○	autoimmune hepatitis	negative
23	07Aug	29F	2.1		75	201	182	1.1		-	○	weight gained	negative
24	07Oct	25F	0.6		365	789	757	1.2	×20	-	-	drug induced hepatitis	-
25	07Nov	59M	2.3	100	739	622	778	1.1	×40	-	-	drug induced hepatitis	-

TB: total bilirubin, PT: prothrombin time, AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, ALP: alkaliphosphatase,  $\gamma$ glob: gamma-globulin, ANA: antinuclear antibody

在が推測され、本邦における発症の実態は把握できていない。過去4年間の当院での急性肝障害のうち HEV 感染症の関与を2例(3.7%)に認め、福本ら<sup>2)</sup>による過去25年における中国地方の HEV 感染症が4例であったことと比較すると、その割合は低くない。同時期に当院で経験されたウイルス性肝炎は既報<sup>10)</sup>に比し、CMV が多く、HAV、HBV が少ない傾向にあったが、HAV、HBV、HCVによる急性肝炎がそれぞれ2、2、1例であったことに比べて、E型急性肝炎の頻度は決して低くなかった(Table 2)。そのうちの1例は薬物性と暫定診断されており、HEV検査は従来の診断を覆す可能性が示唆された。薬物性肝炎や自己免疫性肝炎との鑑別を要した E型肝炎例<sup>11)</sup>も報告されており、また Daltonら<sup>7)</sup>も薬

物性肝障害と考えられていた患者血清の21.4%が HEV 陽性であったことを報告している。以上より原因の明確でない急性肝障害症例に対しては HEV 検査をする必要がある。RNAを検出した症例の塩基配列は、同年に隣市で発症した、市販の食用豚レバーからの感染例と類似しており、同様の感染経路が示唆された。

結語：当院で血清保存されていた原因不確定急性肝障害22症例中、2例で IgM 抗 HEV 抗体、IgA 抗 HEV 抗体がともに陽性であった。1例は薬物性肝障害と考えられていた。E型肝炎は一般市中病院においても遭遇の可能性が充分あり、HAV、HBV、HCVと同様のスク

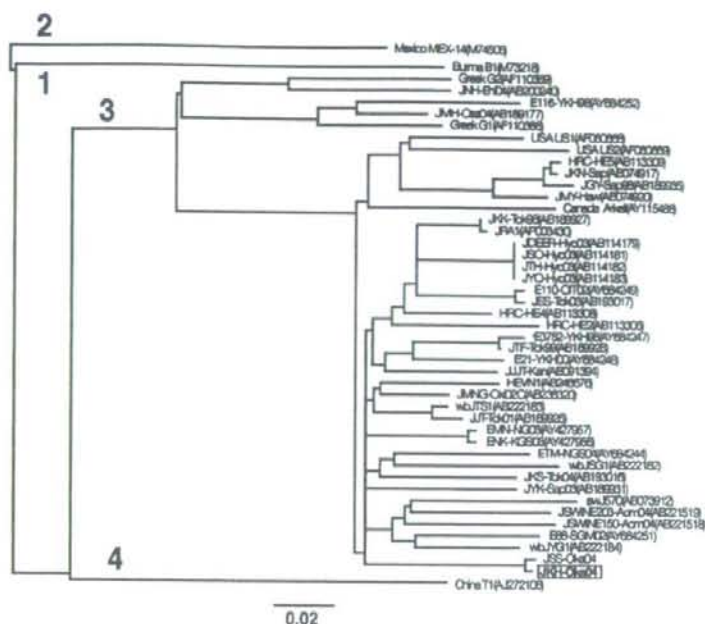


Fig. 1 Phylogenetic tree (NJ Method) based on 326 nt from open-reading frame 1. The HEV isolated in present study is shaded.

Table 2 Causes of acute liver injuries in 54 cases seen in our hospital from 2004 to 2007

Cause	No (%)
CMV	16 (29.6%)
EBV	8 (14.8%)
HAV	2 (3.7%)
HBV	2 (3.7%)
HCV	1 (1.9%)
HEV	2 (3.7%)
autoimmune	2 (3.7%)
drug induced	6 (11.1%)
alcohol	2 (3.7%)
pregnancy	3 (5.6%)
exhausted disease	2 (3.7%)
unknown	8 (14.8%)

リーニング検査がHEVにも必要であると考えられた。検査の保険適応化が急がれる。

索引用語：E型肝炎，急性肝障害，genotype

文献：1) 阿部敏紀，相川達也，赤羽賢浩，他，肝

臓 2006；47：384—394 2) 福本陽平，岸本幸広，前田直人，他，肝臓 2007；48：484—489 3) 中原徳弥，新井雅裕，岩田滉一郎，他，当院における原因不明の急性肝炎の中にみられた国内発症E型急性肝炎の検討。医学と薬学 2005；53：74—77 4) 遠藤龍人，八角有紀，片岡晃二郎，他，原因不明の急性肝炎および劇症肝炎の実態と病態。消化器科 2005；40：174—179 5) 岩室雅也，川口光彦，寺田 亮，他，肝臓 2005；46：512—515 6) Nagasaki F, Ueno Y, Kanno N, et al. A case of acute hepatitis with positive autoantibodies who actually had hepatitis E virus infection. Hepatol Res 2005; 32: 134—137 7) Dalton HR, Fellows HJ, Starbleforth W, et al. The role of hepatitis E virus testing in drug-induced liver injury. Aliment Pharmacol Ther 2007; 26: 1429—1435



英文要旨

Retrospective detection of hepatitis E virus RNA and antibodies in the sera from patients with etiology-obscure acute liver injury

Manri Kawakami<sup>1)</sup>\*, Makoto Kuboki<sup>1)</sup>,  
Yasuhiro Umekawa<sup>2)</sup>, Kazuhide  
Yamamoto<sup>3)</sup>,  
Natsumi Abe<sup>4)</sup>, Kazuaki Takahashi<sup>4)</sup>,  
Shunji Mishiro<sup>4)</sup>

We have seen 25 cases of etiology-obscure acute liver injury from January 2004 through December 2007 in our hospital, among which 22 cases could be subjected to a retrospective investigation for hepatitis E virus (HEV) infection since their sera had been cryopreserved. As a result, 2 (9.1%) of the 22 cases were positive for both IgM and IgA anti-HEV antibodies (as well as for HEV RNA in one case), suggesting HEV infection

as the cause of their liver injuries. Notably, 1 of the 2 cases had been misdiagnosed as "drug-induced hepatitis" (another one as "etiology-unknown hepatitis"). These results warrant implementation of HEV testing as a routine one in primary care settings or city hospitals like ours.

**Key words:** hepatitis E, acute liver injury, genotype

*Kanzo* 2009; 50: 151-154

- 1) Department of Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Kurashiki Medical Center
- 2) Department of Internal Medicine, Kurashiki Medical Center
- 3) Department of Gastroenterology and Hepatology, Okayama University
- 4) Department of Medical Sciences, Toshiba General Hospital

\*Corresponding author: lahaina\_9pm@yahoo.co.jp

# E型肝炎のリスクと養豚場浸潤の現状

～加熱調理で感染のリスク回避、農場では手洗い励行を～

自治医科大学 感染・免疫学講座ウイルス学部門 教授 岡本宏明

## はじめに

発展途上国や新興国、先進国を問わず、世界各地の飼養豚においてE型肝炎ウイルスの感染が蔓延している。日本もその例外ではない(表1)。

幸いにして、いまだ日本国内で豚肉摂取に起因する劇症肝炎の死亡者は出ていないが、生食のメニューを提供するレストランも増えている今、いつ、E型劇症肝炎患者が発生するか分からず、それに伴い豚肉全体に対する風評被害が起きることも懸念される。また、養豚場の従業員など、豚と直接接する機会が多いと感染のリスクも高い。ここでは、生産者が

知っておきたいE型肝炎についての正しい知識を提供する。

## E型肝炎とはどういう病気か？

ウイルス性の肝炎、人で劇症化すると死に至ることも

ウイルスが原因で起こる「肝炎」という病気には、はしかや風疹のように一時期(一過性)の感染で済む急性肝炎と、ウイルス感染が年余にわたって持続し、放置しておくとならざる慢性肝炎やC型肝炎のように肝硬変、さらには肝臓がんにつながる慢性肝炎とがある。E型肝炎は、肝炎ウイルスの一種であるE型肝炎ウイルス(HEV)の感染が原因で起こる急性肝炎であり、臓器移植患者での感染のような極めて特殊な状況でなければ、遷延・慢性化することはない。従って、一般的にE型肝炎に罹ったからといって肝硬変や肝臓がんになることはない。しかし、肝臓が一気に大きな障害を受け重症化・劇症化し、肝不全と言われる状態になると、肝臓の働きはほとんどなくなり、死に至る場合もある。

途上国では「風土病」、先進国では従来「輸入感染症」

E型肝炎について、もう少し詳しく説明する。HEVは主として肝臓で増え、胆嚢や胆管を經由して胆汁とともに十二指腸に排出されるため、E型肝炎の患者のふん便中にはHEVが混在している。そのため、衛生環境が整備されていないアジア、アフリカおよび中米に位置する熱帯・亜熱帯の開発途上地域では、河川の氾濫などによって下水が飲み水に混入し、それが原因となって大小様々な規模の流行性E型肝炎が、これまでに繰り返し発生してきた。発展途上国では今なお、E型肝炎は風土病的な存在であり、医療上・公衆衛生上の大きな問題となっている。これに対し、日米欧等の先進諸国におけるE型肝炎は、汚染地域への渡航による「輸入感染症」の1つに過ぎないとされ、患者数もそれほど多くないことから、今世紀に入るまではほとんど注目されていなかった。

表1 世界の様々な国の飼養豚でのHEV RNA陽性率と遺伝子型

国	豚週(月)齢	HEV RNA [陽性個体数/被験 個体数(%)]	豚HEVの 遺伝子型
カナダ	2ヶ月	3/6 (50)	3
米国	2~4ヶ月	34/96 (35) <sup>a</sup>	3
メキシコ	2~4ヶ月	8/125 (6) <sup>a</sup>	3
	2~4ヶ月	28/90 (31)	
オランダ	3~9ヶ月	25/115 (22) <sup>a</sup>	3
スペイン	月齢不明	6/12 (50) <sup>a</sup>	3
モンゴル	2~3ヶ月	89/243 (37)	3
中国	<3ヶ月 成豚	2/10 (20) <sup>a</sup> 3/253 (1) <sup>a</sup>	4
韓国	1~4ヶ月	3/128 (2)	3
日本	1~6ヶ月	192/2,785 (7)	3, 4
台湾	<2ヶ月 2ヶ月 3~4ヶ月 5~6ヶ月 成豚	0/11 3/67 (4) 3/255 (1) 2/112 (2) 0/76	4
ネパール	月齢不明	3/47 (6)	不明
インド	2~24週	13/284 (5)	4
タイ	1~6ヶ月	10/46 (22)	3
インドネシア	2~3ヶ月	5/101 (5)	4
ニュージーランド	7週 10週 12週	0/17 10/21 (48) <sup>a</sup> 7/7 (100) <sup>a</sup>	3

a: ふん便を用いて測定、その他は血清を用いて測定

先進国での散発性患者、豚などでの感染実態明らかに

ところが、最近になって米国で、流行地への渡航歴がない住民の1人がE型肝炎を発症し、その患者から熱帯・亜熱帯地域にはない新種のHEVが分離されたことが契機となって、他の先進国でも海外渡航に因らないE型肝炎の発症が報告されるようになった。日本でも、2001年に国内感染の散発性E型肝炎患者が認められ、動物、とくに豚での感染状況が明らかになるとともに、飼養豚およびイノシシやシカなどの野生動物の肉・内臓摂取後のE型肝炎発症事例が相次いで報告され、「人獣共通感染症」としてのE型肝炎がにわかに関心を集めることになった。

HEV感染の多くは不顕性であり、本人が気づかないうちに身体のなかに入ったウイルスが排除され、免疫を獲得する。そのため、成人の2～10%（平均5%）は過去のHEVに対する感染既往を示す抗体（正確に言うと、IgGクラスHEV抗体）を保有している。感染者の一部（恐らく、感染者全体の0.1%にも満たない人）は2～9週（平均6週）の潜伏期を経てE型肝炎と呼ばれる急性肝炎を発症する。発症時には全身の倦怠感、発熱、食欲不振、嘔吐、黄疸等の症状を示すが、自覚症状や他覚所見のみによる他の急性肝炎との鑑別は困難であり、後述のように「E型」であることを診断するための特別な検査が必要である。医療機関を受診したときには既に肝臓機能の異常を示すGOTやGPTと呼ばれる検査値や黄疸の指標となる総ビリルビン値が高くなっている。血液や便を調べるとHEVが存在することが分かる。同時に、血液中のHEV抗体（IgM、IgAおよびIgGクラスのHEV抗体）も陽性になっている。通常、1ヶ月以内に症状の軽快に伴って血液中およびふん便中のHEVは消失する。その後、IgMおよびIgAクラスのHEV抗体濃度は低下し、2～6ヶ月以内に陰性化するが、IgGクラスのHEV抗体は年のオーダーで持続する。

国内では中高齢者の発症多いが劇症化はわずか

E型肝炎は「若年成人の病気である」と言われているが、それは主としてアジア・アフリカでの集団発生や輸入感染例に基づくデータに由来する。日本でのE型肝炎は、欧米からの報告と同様に「中高年の病気」である（表2）。日本でのE型肝炎の報告例はまだまだ少なく、実態の詳細は不明であるが、自験例では、E型肝炎を発症した患者のうち、約5%が劇症肝炎と診断されている。現時点では、治療の甲斐なく予後不良の例が多い。罹患年齢が増すほど肝炎の重症度が高い傾向にある。また、HEVには1～4型までの4種類の遺伝子型があり、3型と4型が日本に上着しているが、3

表2 日本におけるE型肝炎の特徴

1. 人獣共通感染症
2. HEV感染の大多数は不顕性で、肝炎を発症するのは感染例の0.1%未満
3. 中高年の病気；年齢分布は25～86歳（平均56歳）
4. 性差：圧倒的に男性優位（男性が約80%）
5. 劇症肝炎の患者も、ほとんどが中高年の男性
6. 地域差（“西低東高”）：全国的に見られるが、E型肝炎を発症した臨床例数は北海道からの報告が圧倒的に多く、東北がそれに次ぐ
7. A型肝炎と異なり、患者発生時期に季節的な偏りがない
8. 3型HEVと4型HEVが土着しているが、4型HEVのほうが3型HEVに比べて臨床症状が強く出やすい
9. 4型HEVの相対的頻度が高い北海道での発症例が、3型HEVの多い本州以南に比べて目立つ傾向にある
10. 感染源・感染経路として、動物の肉・内臓摂取による感染が大多数を占め、輸血に伴う感染や感染動物への直接的な接触による感染もあるが、約半数の患者で感染源・感染経路は今なお不明である

型よりも4型のほうが病原性が高いという特徴がある。

なお、E型肝炎は、2003年11月5日から施行されている改正感染症法（感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律）において4類感染症に分類されており、第12条の規定により、「診断した医師の判断により、症状や所見から当該疾患が疑われ、かつ、病原体診断や血清学的診断がなされたものについて、直ちに最寄りの保健所長を経由して都道府県知事へ届け出なくてはならない」とされている。しかし、現時点では体外診断用医薬品として保険適用になったHEV抗体測定試薬やHEV RNA測定試薬は皆無であり、E型肝炎の見逃し症例が少なからず存在することが危惧される。かかる現況を踏まえ、筆者らの研究室では医療機関からの依頼に応じて抗体測定や核酸検査、遺伝子型解析を実施し、その結果を敏速にお返ししている。

国内養豚場でのHEV感染の浸透状況

全国3925頭の豚の検査で93%の農場で抗体陽性確認

冒頭でも述べたように、世界各地の飼養豚でHEVの感染が高頻度に見られることは揺ぎない事実であり、日本もその例外ではない。

日本の豚におけるHEV感染の現況を明らかにするために、北海道から沖縄まで、全国1道20県の117ヶ所の農場の1～6ヶ月齢の豚3925頭の血清について、現在および過去のHEV感染の指標となるIgGクラスHEV抗体の測定を行った。その結果、すべての道県、および全体の93%に当たる109農場



表3 北海道から沖縄までの全117農場の飼育豚における月齢別のIgGクラスHEV抗体およびHEV RNAの陽性率

月齢	IgGクラスHEV抗体の陽性率	HEV RNAの陽性率
1ヶ月齢	21/218 (10%)	0/218
2ヶ月齢	71/698 (10%)	11/378 (3%)
3ヶ月齢	509/1,060 (48%)	145/1,060 (14%)
4ヶ月齢	583/680 (86%)	34/360 (9%)
5ヶ月齢	732/883 (83%)	2/383 (1%)
6ヶ月齢	326/386 (84%)	0/386
合計	2,242/3,925 (57%)	192/2,785 (7%)

でIgGクラスHEV抗体陽性の豚の存在が確認され、豚のHEV汚染は全国規模で拡がっていることが判明している。

表3に示すように、個体ベースの抗体陽性率は1～2ヶ月齢で10%、3ヶ月齢で48%、4ヶ月齢で86%、5ヶ月齢で83%、6ヶ月齢で84%と月齢とともに高くなっていく。抗体価も月齢とともに上昇し、4ヶ月齢でピークを示し、その後は低下傾向を示した。

RT-PCR法と呼ばれる遺伝子増幅検査法を用いて、HEVが存在するかどうかの指標となる遺伝子RNAを検出すると、表3に示すように、2ヶ月齢で378頭中11頭(3%)、3ヶ月齢で1,060頭中145頭(14%)が陽性になり、その後陽性率は低下し、4ヶ月齢で360頭中34頭(9%)、5ヶ月齢で323頭中2頭(1%)が陽性であった。それに対して、1ヶ月齢の218頭および6ヶ月齢の386頭ではいずれも陰性であった。

出荷時までにはウイルスは排除されるが市販レバーで陽性も

以上の結果は、母豚からの移行抗体が消失する1～2ヶ月齢の子豚にHEVが感染し、2～4ヶ月齢で末梢血液中にHEVが見れるが、抗体が出現してくると、6ヶ月齢までにHEVは末梢血液中から排除されることを示している。肝臓はHEVが増殖する臓器であり、血液中でHEVが検出されなくとも、肝臓内には微量のウイルスが残存している可能性がある。

実際、北海道内の食料品店で販売されていた豚レバーについてHEVの有無を調べた結果、363個中7個(1.9%)が陽性と判定されたことを2003年に報告したが、Feaginsら(J Gen Virol 88:912-917, 2007)は米国の市販豚レバーについて同様の検討を行い、127個中14個(11%)からHEV RNAが検出されたことを報告している。加えて、HEV RNA陽性の豚レバー3個のうち2個は感染性を有することを豚への感染実験によって実証した。従って、市販の豚レバーは生、あるいは加熱不十分な状態で摂取した場合、HEVに感染す

る可能性があることは否定せざるを得ない。また、HEVは腸管でも増えることが知られており、“豚ホルモン”についても同様の危険性を念頭に置く必要があると思われる。

### 肥育豚が感染し精肉にウイルスが残るリスクも

上述のように、豚においてもヒトと同様にHEV感染は一過性である。HEVに感染した野生イノシシの大多数は成獣であることから、飼育豚でも感染にさらされる時期によって感染時期(ウイルス血症の時期)が規定されていると想定され、成豚であっても感染する可能性はあり得ると考えられる。表3に示した数値は全体の平均であって、個体および豚舎によってはウイルス血症の時期がと畜場に搬送される時期により近いこともあり得ると考えられる。その推測を支持するデータが、定ら(獣医公衆衛生研究2005 Vol 6-2)によって報告されている。それによると、と畜場に搬入された豚684頭のうち2頭の血清からHEV RNAが検出されたと言う。その内訳を見ると、肉眼的に発育不良が認められた豚46頭中1頭(2.2%)から検出されただけでなく、正常と見られた豚からも638頭中1頭(0.2%)で検出されたと言う。筆者らの調査では、出荷直前の6ヶ月齢の386頭の豚血清からはHEV RNAは検出されなかったが、定らのデータは、極めて低い頻度ながら、市販の豚肉がヒトでのE型肝炎の感染源となり得ることを示している。このことは、E型肝炎の感染予防の観点からも極めて重要である。正常群も発育不良群も血清中からHEV RNAが検出されたのはともに1頭ずつであったことを考慮すると、正確な陽性頻度を把握するため、今後、多くのと畜場での大規模な調査が必要であると思われる。

## 豚肉経由の健康被害事例とリスク回避の方法

### 北海道の焼肉店における集団感染事例の教訓

豚肉摂取が原因だと実証されたE型肝炎事例はまだまだない。しかし、上述のように極めて低い頻度ながら、HEVに汚染された豚肉が市場に出回る可能性は否定できない状況にある。

加藤(臨床消化器内科 12:601-606, 2006)は、北海道北見市の焼肉店で会食した13名の親類縁者中6名でHEV RNAあるいはIgMクラスHEV抗体が検出されたという集団感染事例を詳細に報告している。発端は69歳の男性(ケース1)で、2004年9月に高度肝機能異常を呈し、翌10月にE型肝炎で死亡した。患者の次男(39歳; ケース2)が同じころに献血をしたことがきっかけとなって、E型肝炎に罹患していることが判明した。聞き取り調査の結果、ケース1と

表4 ケース1とケース2を食む、焼肉店で会食した合計13名のHEVマーカーと摂取した肉の種類と量に関するアンケート調査結果

ケース	年齢/性	HEVマーカー			会食時に摂取した肉の種類と量				
		HEV RNA	IgMクラス HEV抗体	IgGクラス HEV抗体	牛肉	豚肉	豚レバー	ホルモン	鶏肉
1	69/男	+	+	+	不明	不明	不明	不明	不明
2	39/男	+	+	+	0	2	2	0	2
3	68/男	-	+	+	2	2	0	2	0
4	37/女	-	+	+	2	2	0	2	0
5	15/男	-	+	+	2	2	2	1	1
6	43/男	-	+	+	2	2	1	2	1
7	58/女	-	-	+	2	2	0	2	0
8	15/男	-	-	-	2	0	0	0	2
9	14/男	-	-	-	2	0	0	2	0
10	67/女	-	-	-	0	1	0	0	0
11	38/女	-	-	-	1	0	0	1	0
12	46/男	-	-	-	1	1	0	0	0
13	6/女	-	-	-	1	0	0	1	1

註：加藤 珂：臨床消化器内科 21(5):601-606, 2007より引用改定。  
2=多く摂取、1=少量摂取、0=摂取せず。

ケース2は同年8月に親類縁者とともに焼肉店で会食していたことが分かり、新たに4名からIgMクラスHEV抗体(現在のHEV感染状態を示す抗体)が検出された(表4)。豚肉はIgMクラスHEV抗体陽性者全員が摂取し、豚レバーは陰性者全員が摂取していなかったことから、本論文の著者は「豚肉、豚レバーが感染源となった可能性が強く疑われた」と結論している。8名中3名は豚肉を摂取していたにもかかわらず今回の感染を示す血清マーカー(HEV RNAとIgMクラスHEV抗体)は検出されなかったことから、豚肉が感染源であったと断言はできない。しかし、その可能性を完全には排除できないことから、「豚肉の安全性」を担保する対策が必要になってくる。

#### HEVは適切な加熱調理で感染性は失われる

Feaginsらは最近の論文(Int J Food Microbiol 123:32-37, 2008)のなかで、加熱調理の有用性を実証している。即ち、HEV陽性豚レバーをすりつぶして、①56℃で1時間加熱する、②191℃で5分間炒める、あるいは③5分間ボイルする、の3とおりの処理を施し、5頭ずつ豚の血管内に注射する方法で感染実験を行い、感染性の評価を行った。その結果、56℃1時間加熱処理群の5頭中4頭で感染が認められたが、残りの11頭の豚では接種後8週間、経過観察しても感染は認められなかった。従って、HEVに汚染された豚レバーでも豚肉でも、適切に調理することで感染性が失われると言える。ただ、この場合重要なことは、満遍なく全体に熱が加えられたということが大前提となっており、ブロック状

の豚肉や豚レバーの場合には、中心部まで十分に火が通る焼き方をすることが重要である。

#### 消費者に伝えるべきこと

豚レバーや豚ホルモンのみならず、豚肉も、生のままで摂取すべき食材ではないことはこれまでの説明で十分にご理解いただけたかと思う。豚由来の食品によるHEVの感染のリスクを広く、かつ正確に消費者に周知し、豚食材の取り扱い方法について注意を促すことがE型肝炎の発生を予防するうえで重要であると思われる。生の状態の豚食材と触れた箸やまな板、食器などを、加熱しないでそのまま摂取する食材と共通にしないことも感染予防上重要である。

## リスクを抱える生産現場での対策

最近では、豚を愛玩動物として飼養する人も増えてきている。また、研究施設では、捕獲された野良犬に代わる実験用中型動物として豚が多く用いられるようになってきている。そのような状況を反映して、ペットとしての豚から感染してE型肝炎を発症したと考えられる事例や、実験中の豚からのHEV感染が疑われた事例などの報告も散見される。

養豚の生産現場は、感染源となり得る豚が身近にいるという点で、大きなリスクがあると言える。しかし、基本的にHEVは経口感染するウイルスであり、口からの侵入を阻止する手だてを講じれば、感染を予防できる。即ち、作業中のマスクの着用、作業後の手洗いの励行を遵守すればよいのである。

流行性E型肝炎が問題となっているアジア、とくにインドでは1型HEVの感染が広がっており、妊婦が妊娠後期(第3期)にこの1型HEVに感染した場合に高率に重症化し、死亡率は20~50%にも達すると言われている。日本でのE型肝炎は先述のように中高年者に多く見られ、全体の約8割が男性であることから、いまだ妊婦でのE型肝炎の報告はない。先進国の土着HEV(3型、4型)でも妊婦が感染した場合に重症化するの否かは現時点では不明であるが、より安全サイドに立った対策として、可能であれば、妊婦が飼養豚に直接接することは回避したほうがよろしいかと思う。



## 総説

### E型肝炎をめぐる最近の知見 —感染培養系の確立と応用も含めて—

岡本 宏明<sup>1)</sup>

要旨：E型肝炎はアジア・アフリカの流行地域に限らず、先進国を含め広く世界各地で発生している。わが国でも3型や4型の土着HEV株による散発性E型肝炎は古くからあったが、今世紀に入ってその存在が認識された。国内の飼育ブタでHEV感染が蔓延している事実が明らかになるとともに、ブタや野生動物の肉・内臓摂食後の発症事例や劇症肝炎による死亡例の存在もあって、E型肝炎がにわかに注目を集め、診断や疫学に関する研究が急速に進んだ。その結果、本症における動物由来感染(zoonosis)の重要性が、わが国において、世界に先駆けて認知された。加えて、効率的な感染培養系も確立され、HEVのウイルス学も急速に進展しつつある。

索引用語：E型肝炎、E型肝炎ウイルス、人獣共通感染症、遺伝子型、感染培養系

#### はじめに

E型肝炎は、E型肝炎ウイルス(HEV)によって引き起こされる肝炎である。HEVは主として肝臓で増殖し、胆管を經由して腸管に排出され、糞便とともに体外に放出される。そのため、不備な衛生環境下では糞口(fecal-oral)ルートによる感染が成立・拡大しうる。アジア、アフリカおよび中米の熱帯・亜熱帯地域に位置する発展途上国では、河川の氾濫などによる水系感染にともなう大小様々な規模の流行性E型肝炎がこれまでに繰り返し発生し、現在でもなお、E型肝炎は現地の主たる風土病である。一方、日米欧等の先進諸国でのE型肝炎は、まれな「輸入感染症」の1つと理解され、かつてはほとんど注目されていなかった。ところが、1990年代末になって、流行地への渡航歴がない欧米の急性肝炎患者から新種のHEVが発見され、先進国には、輸入感染のみならず、国内感染型のE型肝炎も存在すること

が次第に明らかになった<sup>1)~3)</sup>。わが国でも2001年以降、海外渡航によらない散発性E型肝炎症例の存在が認識され<sup>4)5)</sup>、国内の養豚場のブタでHEV感染が蔓延している事実が明らかになるとともに<sup>6)</sup>、ブタや野生動物の肉・内臓摂食後のE型肝炎発症事例が相次いで報告され<sup>7)8)</sup>、かつ重症化例や劇症肝炎による死亡例の存在もあって<sup>9)</sup>、E型肝炎がにわかに注目され、診断や疫学に関する研究も急速に進展した。その結果、本症における動物由来感染(zoonosis)の重要性が、わが国において、世界に先駆けて認知された。加えて、つい最近まで、HEVの培養系がないことがウイルス学的研究を展開するうえでの大きな障壁となっていたが、現在では効率的な感染培養系も確立され<sup>10)</sup>、これまでに未解明であったウイルス本態の解析が急速に進展しつつある。本稿では、現在までに明らかにされているHEV感染の実態を概観するとともに、HEVの感染培養系の確立および

1) 自治医科大学感染・免疫学講座ウイルス学部門

Recent advances in hepatitis E: including the development and application of a robust cell culture system for HEV  
Hiroaki OKAMOTO<sup>1)</sup>

1) Division of Virology, Department of Infection and Immunity, Jichi Medical University School of Medicine  
Corresponding author: 岡本 宏明 (hokamoto@jichi.ac.jp)

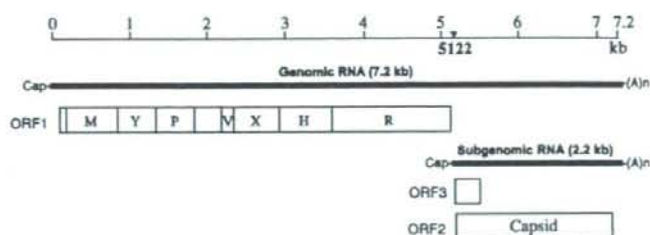


Figure 1. HEVの遺伝子構造: M, メチルトランスフェラーゼ/Y, Yドメイン/P, パパイン様プロテアーゼ/V, プロリン・リッチヒンジドメイン/X, Xドメイン/H, ヘリカーゼ/R, RNA依存性RNAポリメラーゼ/

それによって得られた新しい知見を紹介したい。

### 1 HEVのウイルス学的特徴

HEVはエンベロープを持たない直径27~34 nm (平均30nm)の小型球状粒子であり、ヘペウイルス科 (family *Hepeviridae*) のヘペウイルス属 (genus *hepevirus*) に分類されている。その仲間として、ニワトリに肝脾腫症候群を惹起するウイルスであるトリHEV (avian HEV) があり、これまでにオーストラリアや欧米で分離されている。ゲノムは5'末端にキャップ構造、3'末端にポリA配列をもつ、7.2 kilobases (kb) の1本鎖(プラス鎖)RNAである (Figure 1)。両末端の短い非翻訳領域に挟まれて、中央部分に翻訳領域 (ORF1, ORF2, ORF3) がある。ORF1はRNA依存性RNAポリメラーゼなどの非構造蛋白、ORF2はキャプシドの形成に与る構造蛋白をコードしている。ORF3は113ないし114アミノ酸からなる短い蛋白で、*in vivo*での感染に必須であることがわかっているが<sup>11)</sup>、感染細胞内での機能の詳細は不明である。感染細胞内では2.2kbのsubgenomic RNAが転写され、ORF2蛋白とORF3蛋白はこのsubgenomic RNAから翻訳されている<sup>12)</sup>。

HEVの血清型は1種類であるが、遺伝子配列の多様性が顕著であり、全塩基配列が互いに約25%異なることが基準となって1型から4型までの4種類の遺伝子型に大別されている<sup>13)</sup>。遺伝子型の世界的分布には明瞭な地域特異性があり、1型はアジア・アフリカ諸国のE型肝炎流行地域に分布し、2型はメキシコおよびナイジェリア、

ナミビア、エジプト、チャド、中央アフリカ共和国などのアフリカ諸国に分布している。一方、3型はアフリカを除き、世界に広く分布し、4型は中国、台湾、ベトナム、インド、インドネシアなどのアジア地域に局限している。1型と2型がヒトのみに感染し流行性肝炎に関係しているのに対して、3型と4型はヒトのみならずブタやイノシシなどの動物にも感染し、人獣共通感染症の原因となっている。

わが国においては、インドやネパール、中国、バングラディッシュなどの流行地で感染し帰国後に発症する「輸入」E型肝炎の患者から主として1型 (まれに現地の4型) HEVが分離されているが、渡航歴のない国内感染のE型肝炎患者からは日本固有株とみなされる3型ないし4型のHEVが分離されている<sup>14)~16)</sup>。なかには、3型と4型の重複感染例もある<sup>15)</sup>。

Balayan<sup>16)</sup>が、飲料水を介して集団感染した中央アジアの肝炎患者の急性期糞便抽出液を実験的に飲んだ後、患者回復期血清を用いた免疫電顕法によって、自らの便中からA型肝炎ウイルス (HAV) とは異なるウイルス粒子 (現在のHEV粒子) を初めて同定したのが1983年のことである。実は、それ以前にわが国に既に土着HEVが存在していたことがわかっている。すなわち、Aikawaら<sup>17)</sup>は、1982年に原因不明 (非A非B型) の急性肝炎を発症した水戸在住の38歳男性患者の保存血清から土着株と考えられる3型HEV (HE-JO-1982[AB088418]) を分離した。また、Mitsuiら<sup>18)</sup>は、1979年と1980年の2例の透



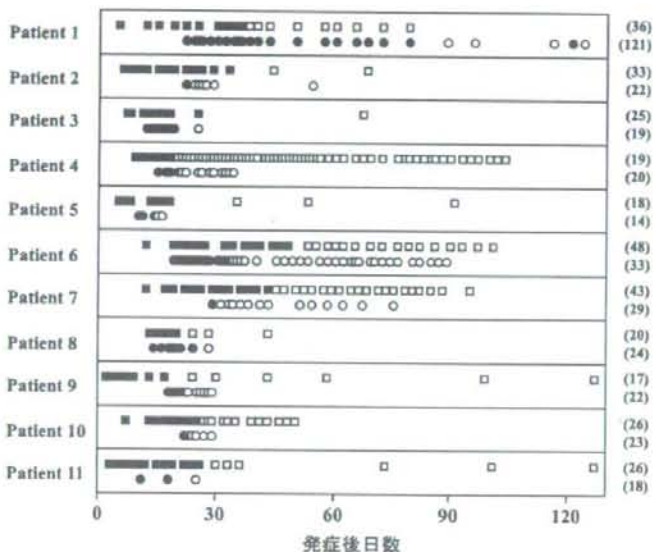


Figure 2. E型肝炎発症後の血清中および糞便中 HEV RNA の検出状況の推移: 11例のE型肝炎患者(Patient 1～Patient 11)について、上段に血清中 HEV RNA (■ [陽性], □ [陰性]), 下段に糞便中 HEV RNA (● [陽性], ○ [陰性]) の測定結果を示す。右端の ( ) 内の数値は、血清中 HEV RNA 陽性の最終日 (上段)、糞便中 HEV RNA 陽性の最終日 (下段) を示す。

析患者での不顕性 HEV 感染の存在と 3 型土着 HEV 株の同定について報告している。興味深いことに、1979 年の症例は輸血感染例であり、保存されていた 2 本のパイロットのうち 1 本から患者の HEV と塩基配列が 100% 一致する HEV が分離されている。当時既に輸血による HEV 感染があったことの直接証拠となる貴重な 1 例である。

## II E型肝炎の臨床経過と診断

HEV 感染は一過性である。臓器移植患者や化学療法が施行されている血液疾患患者でウイルス血症が 6 か月以上続いたという報告もあるが<sup>19,20</sup>、通常、感染が持続・慢性化することはない。感染の多くは不顕性であり、健康成人の 2% から 10% が過去の感染既往を示す IgG クラス HEV 抗体を保有しており、20 歳代以降、年代が上がるにつれ、抗体保有率も高くなっている。急性肝炎を発症するのは感染者全体の約 0.1% に過

ぎないと推定されており<sup>21</sup>、2～9 週 (平均 6 週) の潜伏期を経て発症する。医療機関を受診する頃には既にトランスアミナーゼ値や総ビリルビン値が上昇し、血中の IgM、IgA および IgG クラスの HEV 抗体も陽転している<sup>22</sup>。わが国の国内感染 E型肝炎症例 11 例を経時的に観察して得られたデータによると<sup>23</sup>、ウイルス血症は発症後 17～48 日 (平均 28.3 日) まで認められ、糞便中への HEV 排泄は、発症後 79 日まで認められ、さらに 121 日目に一過性に陽性になったまれな 1 例を除くと、14～33 日 (平均 22.4 日) まで認められた (Figure 2)。IgM および IgA クラスの HEV 抗体濃度は徐々に低下し、ほとんどの例で 2～6 か月以内に陰性化するが、IgG クラスの HEV 抗体は年のオーダーで持続する。後述するように、これらの抗体が感染阻止能を有することが、最近の培養系を用いた感染実験によって実証されている。

一般に A 型肝炎や B 型肝炎の血清学的診断

は、酵素免疫測定法 (ELISA 法) などによる急性期血清での IgM クラス抗体 (それぞれ IgM クラス HAV 抗体と IgM クラス HBc 抗体) の検出によって行われているが、著者らの検討により、E 型肝炎においては IgM クラス HEV 抗体測定系よりも IgA クラス HEV 抗体の測定系の方が特異性および感度の点で優れていることが明らかになっている<sup>20)</sup>。なお、E 型肝炎は、2003 年 11 月 5 日から施行されている改正感染症法 (感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律) において四類感染症に分類されており、第 12 条の規定により、「直ちに最寄りの保健所長を経由して都道府県知事へ届け出なくてはならない」とされている。しかし、現時点では体外診断用医薬品として保険適用になった HEV 抗体測定試薬や HEV RNA 測定試薬は皆無である。ウイルス肝炎が疑われる症例に対して、ルーチンに E 型肝炎の検査ができるようになる日の到来が望まれている。

### III わが国における E 型肝炎の特徴

E 型肝炎は「若年成人の病気である」といわれてきた。しかし、それは主としてアジアやアフリカでの流行例や輸入感染例に基づくデータに由来する。わが国での E 型肝炎は、英国やフランスからの報告<sup>21)22)</sup>と同様に「中高年の病気」である。

著者らは 2002 年に、A 型や B 型、C 型肝炎ウイルスの感染の証拠がなく、海外渡航歴もないことから、過去に原因不明と診断されていた 87 例の急性肝炎症例 (北海道、岩手県、福島県、東京都、山梨県の 5 施設の患者) から 11 例 (13%) の E 型肝炎患者を見出し、それら 11 例の背景を検討することにより、わが国での E 型肝炎の特徴を推測した<sup>23)</sup>。すなわち、男性優位 (男性 82%) および中高年優位 (40~71 歳、平均 52 歳) で、地域的偏りが見られる (北海道と岩手県に多い) という傾向である。この 2002 年の報告以降、急性肝炎や急性肝炎重症型、劇症肝炎を含む顕性 HEV 感染症例の蓄積により、先の推測を支持する事実が得られている。その特徴の概要を述べる。

患者は北海道から沖縄まで全国に広く認められるが、地理的分布に顕著な偏りがあり、北海道在

住の患者が全体の約 40% を占め、次いで、東北・関東地方に多い。B 型や C 型肝炎と異なり、“東高西低”である。年齢は 10 代後半から 80 代後半まで分布するが (平均 56 歳)、50 歳以上の患者が約 70% を占め、男性優位 (約 80%) である。大多数は比較的短期間のうちに軽快治癒するが、劇症肝炎による死亡例や、黄疸遷延や血液凝固能異常 (プロトロンビン活性: 40% 以下) を示す重症化例が肝炎発症例の 5~10% に認められる。

北海道では 4 型 HEV が過半数を占めるのに対して、青森県以南の地域では 3 型 HEV の感染患者が圧倒的多数を占めるという遺伝子型分布の地域性も明瞭である。1 型 HEV の侵淫国であるインドでは、妊婦ととくに妊娠第 3 期に HEV に感染した場合、劇症肝炎を発症しやすく、その致死率は 30~100% にも及ぶといわれている<sup>24)</sup>。わが国の E 型劇症肝炎による死亡例の大多数は中高年の男性で<sup>21)22)25)</sup>、これまでに妊婦の E 型劇症肝炎例は 1 例も報告されていない。重症化には、高齢であることや、生活習慣病や肝疾患などの基礎疾患の存在などの宿主側の因子も重要であるが、HEV 遺伝子型と肝炎重症度との強い相関が認められる。わが国では 3 型 HEV の感染患者の方が多くにも拘わらず、E 型劇症肝炎患者では 4 型が優位であること、さらに 3 型 HEV 感染例に比べて 4 型 HEV 感染例の方が、初診時、あるいはピーク時の総ビリルビン値やトランスアミナーゼ値が有意に高く、経過中のプロトロンビン活性の最低値は 4 型 HEV 感染例の方が有意に低いことから、遺伝子型 4 と肝炎重症化との関連性が示されている<sup>26)</sup>。加えて、阿部ら<sup>27)</sup>が報告しているように、4 型 HEV の頻度が不顕性感染群 (12% [7/59]) から急性肝炎群 (37% [48/130])、重症肝炎群 (急性肝炎重症型と劇症肝炎を含む) (74% [23/31]) の順に有意差をもって上昇していることは 4 型 HEV と肝炎重症化との関連性を強く示唆するものである。HEV ゲノムの 5' 末端から 3148 番目の塩基が U (ウラシル) に置換された 4 型 HEV が、急性肝炎患者よりも劇症肝炎患者から有意に多く分離されている<sup>28)</sup>。ウイルス側から見た重症化機序の解明は今後の HEV 研究の



重要なテーマの1つである。

#### IV わが国のE型肝炎患者における HEVの感染源・感染経路

わが国の養豚場のブタでは全国的にHEV感染が蔓延していること<sup>6)23)24)</sup>、E型肝炎患者が居住する地域の食料品店で販売されていた生の食用ブタレバーの1.9% (7/363) からHEV RNAが検出されたこと<sup>8)</sup>、野生のイノシシでもHEV感染が広く認められ<sup>33)~36)</sup>、地域によってはHEV抗体陽性率が25.5% (100/392) に達し、約3%に相当する12頭の野生イノシシからHEV RNAが検出されること<sup>40)</sup>、など動物でのHEV感染が明らかになっている。また、わが国では、ブタや野生のイノシシ、シカなどの動物の肉や内臓を摂食した後のE型肝炎発症事例が多数報告されている<sup>7)8)11)17)23)24)25)26)29)31)</sup>、E型肝炎の患者数が国内で最も多い北海道では、ブタ内臓肉を生、あるいは加熱不十分な状態で喫食し、それによってHEVに感染したと推測される患者が93% (27/29) を占めており<sup>25)</sup>、北見市の焼肉店での集団感染の事例も報告されている<sup>31)</sup>。

このように食べ物を通じてHEV感染動物から感染する (Zoonotic food-borne transmission) というルートのはかに、まれではあるが輸血感染もある<sup>18)19)42)43)</sup>。HEV感染動物との直接的な接触を含め、動物からの感染と輸血による感染が確認されているとはいえ、わが国での国内感染E型肝炎症例のなかで感染源や感染経路を特定あるいは推定できている症例は約半数に留まっている。ヤマトシジミから3型HEVが検出され<sup>44)</sup>、二枚貝を生で喫食した後のE型肝炎発症事例もあるが<sup>45)</sup>、感染予防をより確実なものにするために、感染源や感染経路の解明に向けてのさらなる疫学研究が今後も必要である。

#### V HEVの感染培養系の確立とその応用

HAVについては、1979年に培養系が確立され<sup>46)</sup>、国内でも不活化HAワクチンの製造に応用されている。しかし、HEVについてはウイルス遺伝子が同定される前の1980年代から多くの研究者によって試みられてきたが<sup>47)~50)</sup>、培養系は確立されていなかった。

2003年に1人のE型肝炎患者 (Figure 2に示したPatient 1) から高力価のHEV (JE03-1760F株 [遺伝子型3]:  $2.0 \times 10^7$  copies/ml) を含む糞便サンプルが得られたことから、それを接種材料として、ヒト、サル、ウシ、イヌ、ラット、マウスに由来する21種類の樹立細胞株でHEVが増殖可能かどうかを検討した。その結果、肝癌細胞株PLC/PRF/5 (Alexander) と肺癌細胞株A549の2種類の細胞株でHEVが効率よく増殖しうることがわかった<sup>10)</sup>。特に、PLC/PRF/5細胞では約2カ月後に培養上清中のHEVタイターが $10^8$  copies/mlに達した。さらに、培養上清中に放出された子ウイルスは感染性を有し、新たなPLC/PRF/5細胞やA549細胞への継代も可能であることがわかった。高いウイルスタイターの接種材料が得られたこと、そして、同じ遺伝子型3であっても、既知の3型HEV株には認められないユニークな変異を29カ所の塩基 (そのうち、6塩基はアミノ酸置換をともなう非同義変異) を有していたことが、世界で初めての効率的な感染培養系の確立に繋がったものと推測される<sup>31)</sup>。

##### 1. 培養系を用いたHEVの不活化について

HEV (JE03-1760F株) 含有糞便浮遊液を種々の条件で熱処理し、PLC/PRF/5細胞での感染性の有無を検討したところ、70℃、10分およびそれ以上の温度の加熱処理では不活化されるが、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残存していることがわかった<sup>10)</sup>。Feaginsらは最近、HEV陽性ブタレバーをすりつぶし、56℃で1時間加熱する、191℃で5分間炒める、あるいは5分間ボイルする、の3通りの処理を施し、5頭ずつブタの静脈内に注射する方法で感染実験を行い、加熱処理の効果を検討している<sup>31)</sup>。その結果、やはり191℃の加熱処理では接種後8週間経過観察しても感染は認められなかったが、56℃で1時間の加熱処理群の5頭中4頭で感染が認められたという。すなわち、56℃で30分~60分の熱処理では感染性が残っているが、HEVを含むブタのレバーや正肉でも70℃以上の熱を加え、適切に調理することで感染性が失われるとみなされる。ただ、

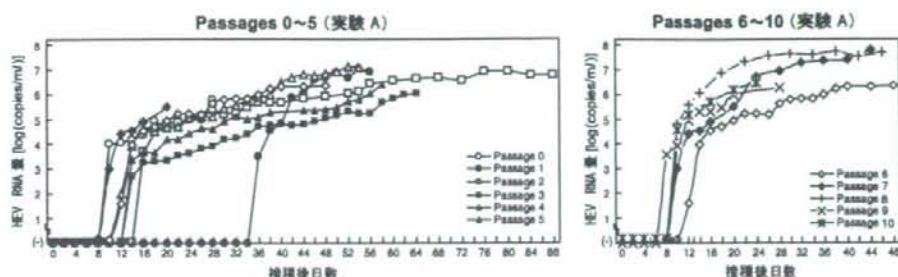


Figure 3. PLC/PRF/5細胞でのHEV (JE03-1760F株)の継代培養：培養上清中のHEV RNA量(子ウイルス量)の推移を示す。

この場合重要なことは、満遍なく全体に熱が加えられたということが大前提となっており、ブロック状の、あるいはある程度厚みのある肉やレバーの場合には、中心部まで十分に火が通る焼き方をすることが感染予防上重要である。

## 2. 培養系を用いたHEV抗体の中和能の検討

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糞便中HEVの感染を阻止しうるか否かを培養系を用いて検討したところ、患者に感染したHEVの遺伝子型が1型、3型、4型のいずれであっても、その回復期血清は、糞便浮遊液中HEV (JE03-1760F:3型)の感染を阻止しうるということがわかった<sup>10)</sup>。HEVの血清型が1種類であるというこれまでの考えを支持する結果である。また、9年前、および24年前にHEVに感染しE型肝炎を発症したことがウイルス学的に検証されている患者の血清(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9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わかった<sup>10)</sup>。これまでの「終生免疫が成立するか否かは不明」とする定説に対して、この実験結果は肝炎治療後に免疫が成立することを明確に示している。また、感染時期は不明であるが、ELISA法によってIgGクラスHEV抗体が陽性と判定された血清(OD値=1.000)についても中和能の有無を検討したところ、感染を阻止しうるということがわかった。E型肝炎の発生頻度と比べて、ELISA法によるIgGクラスHEV抗体陽性頻度が桁違い

に高いことから、抗体測定系の特異性を疑問視する報告もあるが<sup>20)</sup>、以上の結果は、著者が用いているin-house ELISAによるHEV抗体測定系の特異性を支持するものである。

## 3. 細胞培養にともなう

### HEVの馴化と遺伝子変異

野生株であるJE03-1760F株を用いて、2系列(実験Aと実験B)の継代実験を行った<sup>20)</sup>。実験Aでは、接種ウイルス量を約 $10^5$ copies/wellとしてPassage 10まで継代実験を行ったところ、前半のPassages 0~5に比べて後半のPassages 6~10の方が、接種後ウイルスが出現するまでの平均日数が約1週間短縮され(16.7日 vs. 10.0日)、培養上清中のウイルス量が $10^5$ copies/mlに達する平均日数が19日短くなった(35.2日 vs. 16.0日)(Figure 3)。また、Passage 11, Passage 12, Passage 13の継代実験では、接種ウイルス量をそれぞれ $3.0 \times 10^5$ copies/well,  $1.0 \times 10^5$ copies/well,  $3.0 \times 10^5$ copies/wellとして行ったが、wellによって増殖パターンにばらつきが見られるものの、より増殖効率の高い株を順次選別することができた。その結果、Passage 13で得られた継代株(p13/A)は野生株の30分の1のウイルス量でも感染しうるということがわかった。実験Bでも実験A同様、前半のPassages 0~5に比べて、後半のPassages 6~10の方がウイルスが出現するまでの平均日数が短くなり、2日目に検出されるようになり、培養上清中のウイルス量が $10^5$ copies/mlに達するまでの平均日数が約1週間短縮さ



Table 1. 野生株と2系列の継代株 (p13/A と p10/B) の全塩基配列の比較

塩基番号	領域	塩基			アミノ酸	
		野生株	p13/A 株	p10/B 株	アミノ酸番号	変異
61	ORF1	U	U	C	12	—
370	ORF1	C	U	C	115	—
445	ORF1	U	U	C	140	—
591	ORF1	C	U	C	189	Ala to Val
829	ORF1	C	C	U	268	—
1378	ORF1	C	C	U	451	—
1549	ORF1	U	U	C	508	—
2191	ORF1	C	C	U	722	—
2236	ORF1	C	C	U	737	—
<b>2246</b>	<b>ORF1</b>	<b>U</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>741</b>	<b>Trp to Arg</b>
2704	ORF1	U	C	U	893	—
2808	ORF1	U	U	C	928	Val to Ala
2913	ORF1	A	A	G	963	Glu to Gly
2915	ORF1	G	G	U	964	Val to Leu
2938	ORF1	C	U	C	971	—
3106	ORF1	A	G	A	1027	—
3223	ORF1	U	U	C	1066	—
3235	ORF1	C	U	C	1070	—
3453	ORF1	C	U	C	1143	Ala to Val
3475	ORF1	C	C	U		
3496	ORF1	C	U	C	1157	—
3553	ORF1	C	U	C	1176	—
3620	ORF1	U	C	U	1199	—
4015	ORF1	C	U	C	1330	—
4309	ORF1	C	C	U	1428	—
4462	ORF1	C	U	C	1479	—
5312	ORF2	U	U	C	47	—
	ORF3				51	Ile to Thr
5378	ORF2	A	G	G	69	—
	ORF3				73	Asn to Ser
5456	ORF2	C	U	U	95	—
	ORF3				99	Pro to Leu
6047	ORF2	U	U	C	292	—
6470	ORF2	C	U	C	433	—
6578	ORF2	C	U	C	469	—
6611	ORF2	C	U	C	480	—
6626	ORF2	U	C	U	485	—
6651	ORF2	G	G	R	494	Val to Ala/Thr
6652	ORF2	U	U	C	494	Val to Ala/Thr
6855	ORF2	A	A	G	562	Asn to Asp
6944	ORF2	U	U	C	591	—
7186	3'UTR	C	C	U	NA	—

れ、接種後10日目には $10^3$ copies/mlを超えるようになった<sup>33)</sup>。

実験AのPassage 13の株(p13/A株)と実験BのPassage 10の株(p10/B株)について全塩基配列を決定したところ、野生株に比べて、7226塩基(ポリA配列を除く)中、それぞれ19塩基と23塩基に相違が認められた(Table 1)。p13/A株に認められた19塩基の変異のうち、5塩基がORF1あるいはORF3でのアミノ酸置換(それぞれ3個と2個)をともなっていた。また、p10/B株に認められた23塩基の変異のうち、9塩基がORF1、ORF2およびORF3でのアミノ酸置換(それぞれ、4個、3個、2個)をともなっていた。新たに出現したウイルス変異(全長の0.3%)が継代培養にとまらぬ馴化に関与しているものと考えられる。特に、2系列の継代培養においてp13/A株とp10/B株に共通に認められた変異(いずれもアミノ酸置換をとまらぬ変異)は馴化にとまらぬHEVゲノム変異の再現性を示すものであり、効率的な増殖能や感染性に密接な関連がある、特に重要な変異として注目される。

後述のJE03-1760F株由来の感染性cDNAクローン作製技術(reverse genetics system)を用い、野生株と継代株のキメラウイルスを作製したり、共通の非同義変異である3塩基をそれぞれ置換させた組換えウイルスを用いて、増殖効率や感染効率を調べることにより馴化および効率的な増殖に関係する変異であるか否かを実証でき、より培養系に適したウイルス株、ワクチン株の樹立に向け、大きく前進できるものと期待される。

#### 4. HEVの感染性cDNAクローンを用いた

##### 感染培養系の確立とその応用

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polyA配列との間に挿入したゲノムプラスミドを構築した<sup>34)</sup>。このゲノムプラスミドから*in vitro* transcriptionによりゲノムRNAを合成し、PLC/PRF/5細胞に導入したところ、培養上清中に $10^7$ copies/ml以上の高いレベルでのHEV産生が認められた。このcDNA由来HEV(pJE03-

1760F/wt)はPLC/PRF/5細胞やA549細胞での継代培養が可能であり、糞便由来野生株JE03-1760Fと同等の増殖性を示した。また、Mutant株の作製により、ORF3蛋白がHEV粒子の細胞からの効率的な放出に関与していることが示されている。

#### おわりに

E型肝炎は世界に遍在し、わが国でも身近な疾患である。一般健康常人の2~10%がIgGクラスHEV抗体陽性であり、北海道以外の地域でも7,000人から10,000人に1人の割合でHEV RNA陽性者が見出されるという事実は、予想を遥かに超える頻度でHEV感染がおこっていることを示している。2001年以降、わが国での「国内感染型」E型肝炎の存在が認知されてからは、本来real-timeおよびprospectiveな調査に基づく患者発生動向を把握できるはずであり、さらに2003年11月5日に改正感染症法が施行され、四類感染症に分類されてからは、より精度の高い把握が可能になっているはずであるが、現実には保険適用になった診断薬が皆無であるという状態が依然として続いており、真の実態把握には至っていない。ウイルス肝炎が疑われる症例に対して、A型やB型、C型と同じようにルーチンにE型肝炎の検査ができるようになることを切に望むものである。

本稿で紹介したような、培養上清中に高濃度のHEV粒子が産生分泌される培養系が確立されたのは、世界で初めてである。JE03-1760F株のみならず、他の複数の株でも同等、あるいはそれ以上の効率で増殖が可能で、かつ連続的な継代培養を行うことができていた。また、感染性cDNAクローンの構築にも成功している。これらの培養系およびreverse genetics systemを用いることにより、これまで未解明であったHEVに関する多方面の数々の疑問に1つ1つ答を出すことが可能になったといえる。

#### 文 献

- 1) Kwo P, Schlauder GG, Carpenter HA, et al: Acute hepatitis E by a new isolate acquired in the



- United States. *Mayo Clin Proc* 72:1133-1136: 1997
- 2) Zanetti AR, Schlauder GG, Romanó L, et al: Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy. *J Med Virol* 57: 356-360: 1999
  - 3) Worm HC, Schlauder GG, Wurzer H, et al: Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Austria: sequence, phylogenetic and serological analysis. *J Gen Virol* 81: 2885-2890: 2000
  - 4) Takahashi K, Iwata K, Watanabe N, et al: Full-genome nucleotide sequence of a hepatitis E virus strain that may be indigenous to Japan. *Virology* 287: 9-12: 2001
  - 5) Mizuo H, Suzuki K, Takikawa Y, et al: Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic cases of acute hepatitis in Japan. *J Clin Microbiol* 40: 3209-3218: 2002
  - 6) Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, et al: Analysis of the complete genome of indigenous swine hepatitis E virus isolated in Japan. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 929-936: 2001
  - 7) Tei S, Kitajima N, Takahashi K, et al: Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 362: 371-373: 2003
  - 8) Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, et al: Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J Gen Virol* 84: 2351-2357: 2003
  - 9) Suzuki K, Aikawa T, Okamoto H: Fulminant hepatitis E in Japan. *N Engl J Med* 347: 1456: 2002
  - 10) Tanaka T, Takahashi M, Kusano E, et al: Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *J Gen Virol* 88: 903-911: 2007
  - 11) Graff J, Nguyen H, Yu C, et al: The open reading frame 3 gene of hepatitis E virus contains a cis-reactive element and encodes a protein required for infection of macaques. *J Virol* 79: 6680-6689: 2005
  - 12) Graff J, Torian U, Nguyen H, et al: A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J Virol* 80: 5919-5926: 2006
  - 13) Okamoto H: Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res* 127: 216-228: 2007
  - 14) Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T: Features of hepatitis E virus infection in Japan. *Intern Med* 42: 1065-1071: 2003
  - 15) Takahashi M, Nishizawa T, Yoshikawa A, et al: Identification of two distinct genotypes of hepatitis E virus in a Japanese patient with acute hepatitis who had not travelled abroad. *J Gen Virol* 83: 1931-1940: 2002
  - 16) Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, et al: Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 20: 23-31: 1983
  - 17) Aikawa T, Kojima M, Takahashi M, et al: Identification of indigenous hepatitis E virus from a Japanese patient who contracted sporadic acute hepatitis in 1982. *J Infect Dis* 186: 1535-1536: 2002
  - 18) Mitsui T, Tsukamoto Y, Yamazaki C, et al: Prevalence of hepatitis E virus infection among hemodialysis patients in Japan: evidence for infection with a genotype 3 HEV by blood transfusion. *J Med Virol* 74: 563-572: 2004
  - 19) Tamura A, Shimizu YK, Tanaka T, et al: Persistent infection of hepatitis E virus transmitted by blood transfusion in a patient with T-cell lymphoma. *Hepatol Res* 37: 113-120: 2007
  - 20) Kamar N, Selves J, Mansuy JM, et al: Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 358: 811-817: 2008
  - 21) Gotanda Y, Iwata A, Ohnuma H, et al: Ongoing subclinical infection of hepatitis E virus among blood donors with an elevated alanine aminotransferase level in Japan. *J Med Virol* 79: 734-742: 2007
  - 22) Takahashi M, Kusakai S, Mizuo H, et al: Simultaneous detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against hepatitis E virus (HEV) is highly specific for diagnosis of acute HEV infection. *J Clin Microbiol* 43: 49-56: 2005
  - 23) Takahashi M, Tanaka T, Azuma M, et al: Prolonged fecal shedding of hepatitis E virus (HEV) during sporadic acute hepatitis E: evaluation of infectivity of HEV in fecal specimens in a cell culture system. *J Clin Microbiol* 45: 3671-3679: 2007
  - 24) Ijaz S, Arnold E, Banks M, et al: Non-travel-associated hepatitis E in England and Wales: demographic, clinical, and molecular epidemiological characteristics. *J Infect Dis* 192: 1166-1172: 2005
  - 25) Mansuy JM, Peron JM, Abravanel F, et al: Hepatitis E in the south west of France in individuals who have never visited an endemic area. *J Med Virol* 74: 419-424: 2004
  - 26) Navaneethan U, Al Mohajer M, Shata MT: Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis. *Liver Int* 28: 1190-1199: 2008
  - 27) Mizuo H, Yazaki Y, Sugawara K, et al: Possible

- risk factors for the transmission of hepatitis E virus and for the severe form of hepatitis E acquired locally in Hokkaido, Japan. *J Med Virol* 76; 341-349: 2005
- 28) Matsuda H, Okada K, Takahashi K, et al: Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J Infect Dis* 188; 944: 2003
- 29) Inoue J, Nishizawa T, Takahashi M, et al: 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
- 30) Ohnishi S, Kang JH, Maekubo H, et al: A case report: two patients with fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan. *Hepatol Res* 25; 213-218: 2003
- 31) 加藤 将: 焼肉店での会食後に発生したE型肝炎集団発生. *臨床消化器内科* 21; 601-606: 2006
- 32) 阿部敏紀, 相川達也, 赤羽賢浩, 他: 本邦に於けるE型肝炎ウイルス感染の統計的・疫学的・ウイルス学的特徴: 全国集計254例に基づく解析. *肝臓* 46; 384-391: 2006
- 33) Takahashi M, Nishizawa T, Miyajima H, et al: Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus. *J Gen Virol* 84; 851-862: 2003
- 34) Takahashi M, Nishizawa T, Tanaka T, et al: Correlation between positivity for immunoglobulin A antibodies and viraemia of swine hepatitis E virus observed among farm pigs in Japan. *J Gen Virol* 86; 1807-1813: 2005
- 35) Sonoda H, Abe M, Sugimoto T, et al: 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
- 36) Takahashi K, Kitajima N, Abe N, et al: Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. *Virology* 330; 501-505: 2004
- 37) Nishizawa T, Takahashi M, Endo K, et al: Analysis of the full-length genome of hepatitis E virus isolates obtained from wild boars in Japan. *J Gen Virol* 86; 3321-3326: 2005
- 38) Tamada Y, Yano K, Yatsuhashi H, et al: Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *J Hepatol* 40; 869-870: 2004
- 39) Li TC, Chijiwa K, Sera N, et al: Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis* 11; 1958-1960: 2005
- 40) Michitaka K, Takahashi K, Furukawa S, et al: Prevalence of hepatitis E virus among wild boar in the Ehime area of western Japan. *Hepatol Res* 37; 214-220: 2007
- 41) 清水裕子, 山田雅彦, 立松英純, 他: 愛知県内で捕獲された野生イノシシ摂食後に発症したE型肝炎の4例. *肝臓* 47; 465-473: 2006
- 42) Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, et al: Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion* 44; 934-940: 2004
- 43) Matsubayashi K, Kang JH, Sakata H, et al: A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route. *Transfusion* 48; 1368-1375: 2008
- 44) Li TC, Miyamura T, Takeda N: Detection of hepatitis E virus RNA from the bivalve Yamato-Shijimi (*Corbicula japonica*) in Japan. *Am J Trop Med Hyg* 76; 170-172: 2007
- 45) Koizumi Y, Isoda N, Sato Y, et al: Infection of a Japanese patient by genotype 4 hepatitis E virus while traveling in Vietnam. *J Clin Microbiol* 42; 3883-3885: 2004
- 46) Provost PJ, Hilleman MR: Propagation of human hepatitis A virus in cell culture in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* 160; 213-221: 1979
- 47) Kane MA, Bradley DW, Shrestha SM, et al: Epidemic non-A, non-B hepatitis in Nepal. Recovery of a possible etiologic agent and transmission studies in marmosets. *JAMA* 252; 3140-3145: 1984
- 48) Arankalle VA, Ticehurst J, Sreenivasan MA, et al: Aetiological association of a virus-like particle with enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Lancet* i; 550-554: 1988
- 49) Tam AW, White R, Yarbough PO, et al: In vitro infection and replication of hepatitis E virus in primary cynomolgus macaque hepatocytes. *Virology* 238; 94-102: 1997
- 50) Huang R, Li D, Wei S, et al: Cell culture of sporadic hepatitis E virus in China. *Clin Diagn Lab Immunol* 6; 729-733: 1999
- 51) Feagins AR, Oprei SS, Guenette DK, et al: Inactivation of infectious hepatitis E virus present in commercial pig livers sold in local grocery stores in the United States. *Int J Food Microbiol* 123; 32-37: 2008
- 52) Mast EE, Alter MJ, Holland PV, et al: Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel. Hepatitis E virus Antibody Serum Panel Evaluation Group. *Hepatology* 27; 857-861:



- 1998
- 53) Lorenzo FR, Tanaka T, Takahashi H, et al: Mutational events during the primary propagation and consecutive passages of hepatitis E virus strain JE03-1760F in cell culture. *Virus Res* 137; 86-96; 2008
- 54) Yamada K, Takahashi M, Hoshino Y, et al: Con-

struction of an infectious cDNA clone of hepatitis E virus strain JE03-1760F that can propagate efficiently in cultured cells. *J Gen Virol* 90; 457-462; 2009

( 論文受領, 平成 21 年 1 月 10 日 )  
( 受理, 平成 21 年 1 月 15 日 )

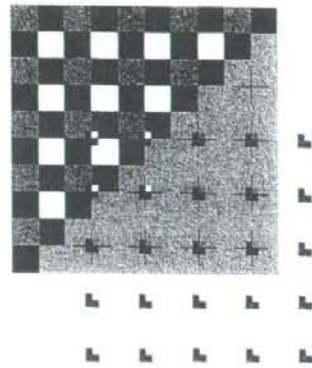
# 急性肝炎

矢野公士

国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター肝炎治療研究室長

八橋 弘

国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター治療研究部長



急性肝炎とは、ウイルスや薬物、自己免疫などの原因により肝臓にびまん性の急性炎症をひきおこす疾患であり、黄疸、倦怠感、食欲不振、発熱などの症状を呈します。急性肝炎の予後は一般に良好ですが、患者の約1～2%は劇症化し、一度劇症化すると高率に死亡にいたります。広義の急性肝炎の原因は、ウイルス性、自己免疫性、アルコール性、薬物性などさまざまですが、このなかでとくにウイルス性のものを一般に急性肝炎と呼びます(本特集の構成もそのようになっています)。表1に広義の急性肝炎の分類を示します。

これまでに確立している肝炎ウイルスには、A型肝炎ウイルス(HAV)、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、D型肝炎ウイルス(HDV)、E型肝炎ウイルス(HEV)の5種があります。サイトメガロウイルス(CMV)、EBウイルス、パルボウイルスB19などのように、他疾患の一症状として肝炎をとまなうものは肝炎ウイルスとしては取り扱わないのが一般的です。

かつては、実に多くのウイルス性肝炎が非A非B型肝炎として取り扱われていましたが、1989年、HCVの発見と抗体測定の普及にともない、その大半、とくに輸血後非A非B型肝炎の多くがC型肝炎であることが明らかになりました。一方、散発性急性肝炎

表1 急性肝炎の成因

・ウイルス性	
肝炎ウイルス	: HAV, HBV, HCV, HDV, HEV
非肝炎ウイルス	: EBV, CMV, HSV, パルボウイルス B19, アデノウイルス, エンテロウイルス, 麻疹ウイルスなど
・自己免疫性	
・アルコール性	
・薬剤性	
・その他	: 急性妊娠性脂肪肝, Reye 症候群, Wilson 病, 敗血症など

の約3割は、なおも非A非B非C型肝炎で占められており、この割合は現在も変わっていません。

HCVの発見以降、HEVの発見(1990)、G型肝炎(HGV)の報告(1996)、TTウイルスの報告(1997)、SENウイルスの報告(1999)などがなされていますが、HEV以外のウイルスは肝炎ウイルスとして確立していません。本稿では、本邦でとくに重要なA型、B型、C型、E型急性肝炎について述べます。

## 疫学

.....

1995年以後のわが国の急性肝炎の起因ウイルス別発症頻度は、A型、B型、非ABC型