

200831001B

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～平成 20 年度

総合研究報告書

研究代表者

矢野 公士

平成 21 (2009) 年 3 月

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～平成 20 年度

総合研究報告書

研究代表者

矢野 公士

平成 21 (2009) 年 3 月

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 18-20 年度
総括研究報告書

目 次

班の構成	3
E 型班前身（第一次 E 型班：本邦における E 型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究）について	9
今期の E 型班（第二次 E 型班：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）3 年間の活動実績、および成果.....	13
I. 疫学と実態調査.....	16
II. 感染経路と宿主域	19
III. 遺伝的多様性、遺伝子型.....	20
IV. 感染防止、ワクチンの開発	21
V. 診断・治療・重症化予測.....	22
VI. 行政的成果.....	22
論文リスト.....	25
Selected スライドショー.....	35

班の構成

班の構成

(所属は当時、班員はアルファベット順 記載)

18年度

班長

三代俊治 東芝病院研究部

班員

金光公浩 日本赤十字社血液事業本部
姜貞憲 手稲溪仁会病院消化器病センター
溝上雅史 名古屋市立大学医学部
岡本宏明 自治医科大学感染免疫学講座
品川邦汎 岩手大学農学部獣医学科応用獣医学講座食品安全学研究室
武田直和 国立感染症研究所ウイルス第二部
坪内博仁 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科消化器疾患・生活習慣病学
津田新哉 中央農業総合研究センター病害防除部病害防除システム研究室
矢野公士 国立長崎医療センター臨床研究センター

19年度

班長

三代俊治 東芝病院研究部

班員

日野学 日本赤十字社血液事業本部
姜貞憲 手稲溪仁会病院消化器病センター
岡本宏明 自治医科大学感染免疫学講座
品川邦汎 岩手大学農学部獣医学科応用獣医学講座食品安全学研究室
武田直和 国立感染症研究所ウイルス第二部
田中靖人 名古屋市立大学医学部
坪内博仁 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科消化器疾患・生活習慣病学
津田新哉 中央農業総合研究センター病害防除部病害防除システム研究室
矢野公士 国立長崎医療センター臨床研究センター

20 年度

班長

矢野公士 国立長崎医療センター 臨床研究センター

班員

日野学 日本赤十字社血液事業本部
姜貞憲 手稲溪仁会病院病院消化器病センター
李天成 国立感染症研究所ウイルス第二部
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
桶谷真 鹿児島大学病院・消化器センター・消化器内科
田中靖人 名古屋市立大学大学院医学研究科・臨床分子情報医学
津田新哉 中央農業総合研究センター病害防除部病害防除システム研究室

班長協力者（班友） （アルファベット順。情報は 18・20 年度の報告書による。

記入漏れの際は御容赦ください。）

阿部敏樹	一心病院		病院
阿部夏生	東芝病院	加藤将	北見赤十字病院
新智文	帯広厚生	川上万里	倉敷成人病センター
相川達也	相川内科	北村庸雄	順天堂浦安病院
新井雅裕	東芝病院	北嶋直人	市立加西病院
朝比奈靖浩	武蔵野赤十字病院	前久保博士	手稲溪仁会病院
新敷吉成	富山医科薬科大学	川村欣也	浜松医科大学肝臓内科
茶山一彰	広島大学	國立裕之	静岡県立総合病院消化器科
故・原田英治	国立東京病院		
橋本直明	東京通信病院	正木尚彦	国立国際医療センター
堀亜希子	国保中央病院	松林圭二	北海道赤十字センター
依田広	京都大学	松田裕之	松田内科
市田隆文	順天堂大学	松井高峯	帯広畜産大学
石川晶久	日立総合病院	目黒高志	北海道消化器科病院
石橋大海	長崎医療センター	道堯浩二郎	愛媛大学
伊藤敬義	昭和大学	三原弘	高岡市民病院
垣見和宏	東京大学	峯村正実	富山大学
狩野吉康	J A 北海道厚生連札幌厚生	宮川浩	帝京大学溝口病院

宮路克彦	大阪医大	杉之下予志樹	京都大学
宮川侑三	宮川庚子記念研究財団	鈴木一幸	岩手医科大学第一内科
宮下憲暢	網走厚生病院	鈴木康秋	旭川佐野病院
水尾仁志	北海道勤労者医療協会勤 医協中央病院	高橋和明	東芝病院
中村正治	沖縄県中央食肉衛生検査 所	田中純子	広島大学
西口修平	大阪市大	玉田陽子	長崎医療センター
岡上武	京都府立医大	豊田一弘	九州大学
岡田克夫	鳥取県立中央病院	津田文男	東芝病院
大西幸代	公立芽室病院	渡辺精四郎	高松赤十字病院
大竹孝明	旭川医大	山田剛太郎	川崎医大
齋藤英胤	慶応大学	山際訓	新潟大学
佐賀啓良	愛育病院	山本和秀	岡山済生会病院
佐久川廣	かりゆし会ハートライフ 病院	山中太郎	板橋中央総合病院
柴田実	NTT 東日本関東病院	八橋弘	長崎医療センター
嶋村剛	北海道大学	矢崎康幸	小林病院消化器病センタ ー
清水裕子	公立陶生病院消化器内科	吉川亮	長崎県環境保健研究セン ター
		由崎直人	札幌斗南病院

E型班前身（第一次E型班：本邦におけるE型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究）について

第一次 E 型班：本邦における E 型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究について

平成 15 年・17 年に実施された、“第一次” E 型班の頃、それまで全く未知の領域であった「先進国型」E 型肝炎ウイルスについて爆発的に多くの知見が得られ、われわれの知見を広め、深めることとなった。

第一次 E 型班の成果、ないしこのころにわかったことをごく簡単にまとめると次のようになる。

1. 既に、E 型肝炎が熱帯、亜熱帯地域に限定した風土病であり、先進工業国では輸入感染症としてのみお目にかかる病気という既成概念は除かれ、先進国の非 ABC 型肝炎の原因としてとらえるべきであるとする認識が広まっていた。北海道が高浸淫地区ということもわかりつつあり、そのような状況下で第一次 E 型班がスタートした。北海道の重要性という点では、本邦における国内発症事例は圧倒的に北海道地区に多く、全国の献血ドナーの抗体、HEV-RNA スクリーニングにおいても、北海道地区における陽性率が、RNA 4.6%、IgM 3.5%、IgG 5.8%であり、他の地域と比較して圧倒的に高かったことなどから確認された。

2. それまでも、HEV が人獣共通感染症であることはささやかれてはいたものの、平成 15 年に、北嶋班友、三代班長らによって zoonotic infection であることが直接的に証明された (Tei, et al. 2003 *Lancet*)。その後も岡本班員、矢野、道堯班友らによって、全国的にブタが高率に感染していること、イノシシ肉やブタ肉を介した

mini-outbreak がおこっていること、さらには市販の豚肉レバーのバック中に HEV contamination のおこっているものがあるとの報告が相次いだ (Matsuda, et al. 2003 *J Infect Dis*, Tamada, et al. 2004 *J Hepatol*, Takahashi, et al. 2003 *J Gen Virol*, Yazaki, et al. 2003 *J Gen Virol*, Sonoda, et al. 2004 *J Clin Microbiol*)。

3. 先進工業国に蔓延している HEV は、これまで熱帯地方で問題となっていたそれとは遺伝子配列が著しく異なり、もっぱら 3 型、ないし 4 型 HEV であること。さらに、遺伝子型により virulence に差があり、4 型は 3 型よりも重症である傾向がささやかれ始めた。

4. 輸血後に E 型肝炎を発症するケースがあり (Matsubayashi, et al. 2004 *Transfusion*)、重症例も認められること。

などなど。

このように、第一次 E 型班のころは、さまざまな epoc 的な出来事、発見があり、このフィールドは新鮮な感動と驚きに満ちていた。三代班長のリードにより、日本の研究が「E 型肝炎先進国」であるインド、ネパールを凌駕し、多くの論文が世に出るところとなった。一部では、「もうこれで E 型肝炎はやり尽くされたのではないか。」というコメントすら聞かれていた。そのような中で三代班長のもと発足した第 2 次 E 型班であった。(この時点では筆者が班長を仰せつかるとは想像だにしていなかったことはいうまでもない。) しかしながら、その後の 3

年間は、それまでに得られた知見がごく僅かであり、残されたが課題がいかに膨大であるか、まだまだしなくてはならないこと

が多く残されていることを（少なくとも筆者に）教えてくれた。

今期のE型班（第二次E型班：E型肝炎の感染経路・宿主城・遺伝的多様性・
感染防止・診断・治療に関する研究）3年間の活動実績、および成果

E 型班の正式名称が、実に的確に班の全容を表現している。すなわち、研究の目的は「感染経路の全解明、診断・治療・予防法の確立」することであり、その結果、①診断系が確立・普及し、診断不明となっている多くの急性肝炎中の E 型肝炎が浮かび上がり、②輸血血液の安全性、食の安全性が

担保され、③有効な治療法が確立、普及することが期待される。その全貌解明は難解なパズルのごときなので何とか一目でその多様性と成果を認識できるように図 1 を作成した。字が小さく、また不鮮明で申し訳ないが、何卒ご容赦いただきたい。

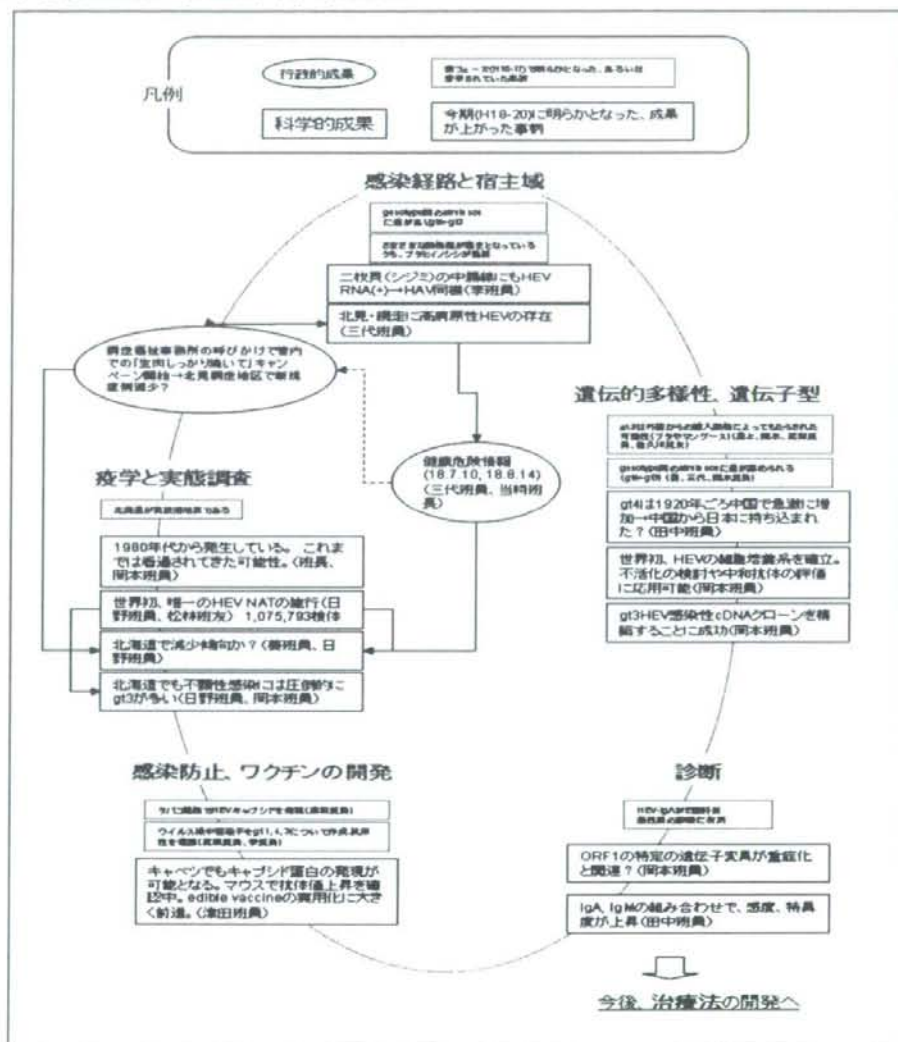


図 1. E 型班 3 年間の成果

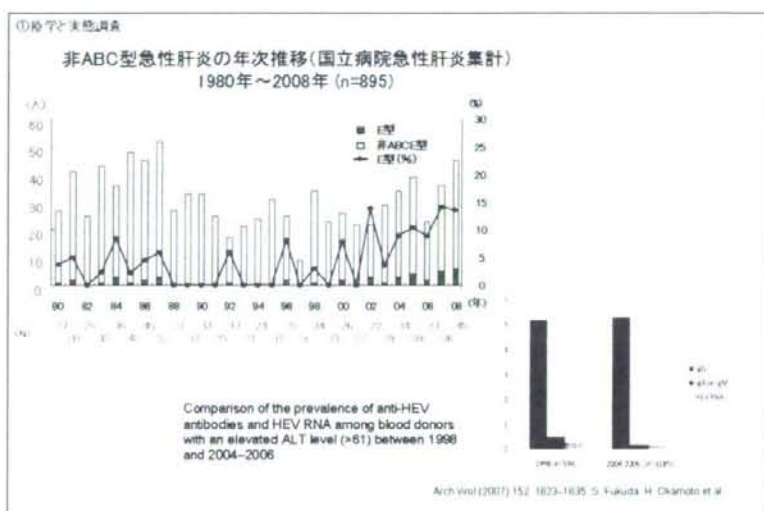


図 2

I. 疫学と実態調査

1. 図 2 左上は班長らが関与している国立病院急性肝炎共同研究班における非 A 非 B 非 C 型肝炎の推移である。横軸が年代、縦軸、白抜きの部分が非 A 非 B 非 C 型肝炎の総数でグレーの部分が血清学的に E 型肝炎と診断した実数である。E 型肝炎が学問的・社会的に話題となった昨今突然現れたわけではなく、80 年代から散発的に発生していることがわかる。岡本班員らはこのことを我が国の献血者集団において 98 年当時と 05 年（約 6-7 年後）で IgG の prevalence が全く変わらないことを示している。同様の知見は健康ボランティアを対象とした検討でも得られており、このことから、国内での

発生頻度は目に見えて変わっているわけではないといえる。すなわち、これまで多くの E 型肝炎が非 A 非 B 非 C 型肝炎の中に紛れたままで見過ごされてきたということになる。

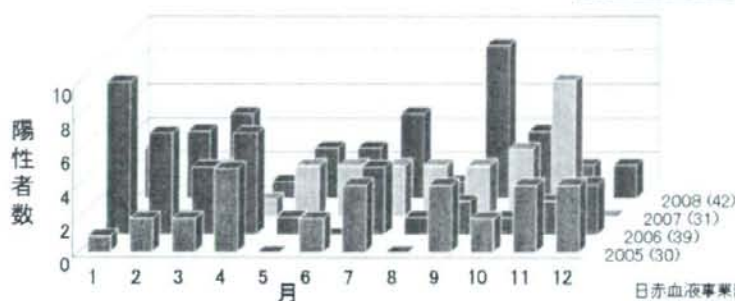
一方で、再び左上方の折れ線グラフ（E 型肝炎が非 A 非 B 非 C 型肝炎に対する割合の推移）をご覧いただき、07 年 08 年の最新状況を眺めると、10-15%に固定した感もある。このような incidental な変動は prevalence study には反映されないために、「昨今の」状況としては、何らかの事由により E 型肝炎が増加している可能性もあり、今後も注視が必要である。

HEV NAT陽性献血者の月別発生数

2005年1月～2008年12月、北海道BC管内

検査総数	1,098,989
HEV RNA 陽性者数	142
陽性率(延べ1万人当)	1.3
平均年齢	40.8±12.0 (17 - 68)
男性 / 女性	105 / 37 (2.8 : 1)
Genotype (G3 / G4)	128 / 6 (21 : 1)

No.	患者氏名	性別	生年月日	報告日	所属機関
1	田中	男性	1970年	2005年	旭川医科大学
2	山本	女性	1972年	2005年	Jikei Univ (2005/7/20)
3	佐藤	男性	2000年	2005年	日本医科大学
4	鈴木	男性	1981年	2006年	札幌医科大学(2007/11/20)
5	高橋	男性	2001年	2006年	日本医科大学
6	小林	男性	2001年	2006年	日本医科大学
7	渡辺	男性	2001年	2006年	日本医科大学
8	中村	男性	2001年	2006年	札幌医科大学
9	山崎	男性	2001年	2006年	札幌医科大学
10	佐々木	男性	2001年	2006年	札幌医科大学
11	松本	男性	2001年	2006年	札幌医科大学
12	山田	男性	2001年	2006年	札幌医科大学



日赤血液事業部 北海道血液センター
日野学 班員 松林圭二 班友

図 3

2. 一方で、北海道地区の動向を姜貞憲班員が調査を行っている。同班員が中心となって組織した「北海道 E 型肝炎研究会(道 E 研)」において、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。また、最近 11 年間において、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。

これらのことから、全国的に成因不明散発性急性肝炎の約 10-15%が E 型肝炎となりつつあり、北海道では劇症、重症例がその他の地域に比べてはるかに高い、ということがいえる。

同じ北海道で、北海道血液センターにより、世界唯一の HEV NAT スクリーニングが行われている。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 万人当りの平均陽性者数は 1.3 人(男性 1.6 人、女性 0.9 人)となった。松林班友によると以下の特徴が認められる。

①有意な性差が認められた。(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。) 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)ものの、②年間を通して見ると季節性は認められなかった。③アンケートが回収できた献血者の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、NAT陽性者から検出されたHEVは、genotype 3 vs. genotype 4 = 130 vs. 6で④genotype 3が96%を占め圧倒的に多い。道E研から報告されるE型肝炎患者の分離株はgenotype 4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。岡本班員の検討によれば、HEV感染の大多数は不顕性の経過をとり、顕性感染として急性肝炎や劇症肝炎を発症するのは全体の約0.1%に過ぎない。また、相当数が動物肉の摂食との関連が疑われるために、一昨年展開された「生肉しっかり焼いてキャンペーン」(後述)は、この地域での感染防御上なおも非常に重要な戦略である。

3. 田中班員らは中国、パキスタンにおけるHEV分子疫学調査を行い、以下の知見を得た。2002年以前は、古典的水系感染はgenotype 1によるものが多く、人動物由来感染を疑わせる散発例はgenotype 4であったが、近年ではいずれもgenotype 4による感染が増加傾向にある。一方、国境を隔てたパキスタンでは散発例においてもHEV genotype 1によるものが圧倒的に多い。パキスタンにおいては、宗教的な理由で豚などの家畜と接する機会が少ない点が、genotype 4が蔓延せず、genotype 1のみがsporadicに拡散した要因となっているかもしれない。分子進化学的手法により、パキスタンにおける主要なHEV拡散時期は1994年頃と推定された。興味深いことに、1994年12月に283人の急性肝炎患者が軍人病院に入院していたとする報告があり、パキスタンにおいて1994年にMajorなHEV outbreakがあったことを裏付ける結果と思われた。



図 4

II. 感染経路と宿主域

1. 宿主域に関する情報

これまでに、鳥類を含む、幅広い動物種で HEV 抗体の存在が確認されている。このうち HEV-RNA の存在が、少なくとも一回確認されている動物種は、ブタ、イノシシ、シカ、ネズミ、トリ (chicken)、マンダリン、シジミ、ウマの 8 種である。上図の下線部は当班より出た成果である。このうち複数の感染事例が報告されているのはブタとイノシシであり、ヒト感染へのインパクトという観点において、この 2 者が他を凌駕していることは論をまたない。ただし、たとえばマンダリンがインドから輸入されてきた際に HEV をも持ってきた、という説も成り立つし、野山で散布された HEV が河川を汚染し、シジミが HEV を保有するに至る、

とも考えられる。すでに、全国的なブタやイノシシの調査により、これらの動物の汚染状況や、少なくとも一つのルートとして 1900 年前後の英国からの輸入ブタとともに 3 型 HEV が持ち込まれたと考えられるが、現段階では、E 型肝炎ウイルスが具体的にどのようにして国内に持ち込まれ、広まっていたのかは結論付けることはできない。更なる実態調査と調査の継続が必要であろう。

2. 上述の如く、様々な species が HEV の伝播に関与していると考えられるが、日本にいつ頃入ってきて、どれくらいのスピードで広まったのか、を明らかにすることは感染対策上も非常に重要な課題である。田中班員らは分子進化の観点からこの検討を行

い、進化速度を 0.8×10^{-3} と推定し、これに基づき分岐時期を決定した。その結果、genotype 3、genotype 4 ともに約 100 年前にはすでに日本に侵入していた可能性が示唆された。その後、genotype 3 は 1920 年頃より緩やかに増加しているのに対し、genotype 4 型は最近 20 年で急激に増加し

ていることがわかった (Tanaka, et al. 2006 *J Gen Virol*)。Genotype 3 の持ち込みと緩やかな増加は英国からの大量の豚の輸入および飼養に関係しているのかもしれない。4 型の急激な増加は？いまだ謎である。

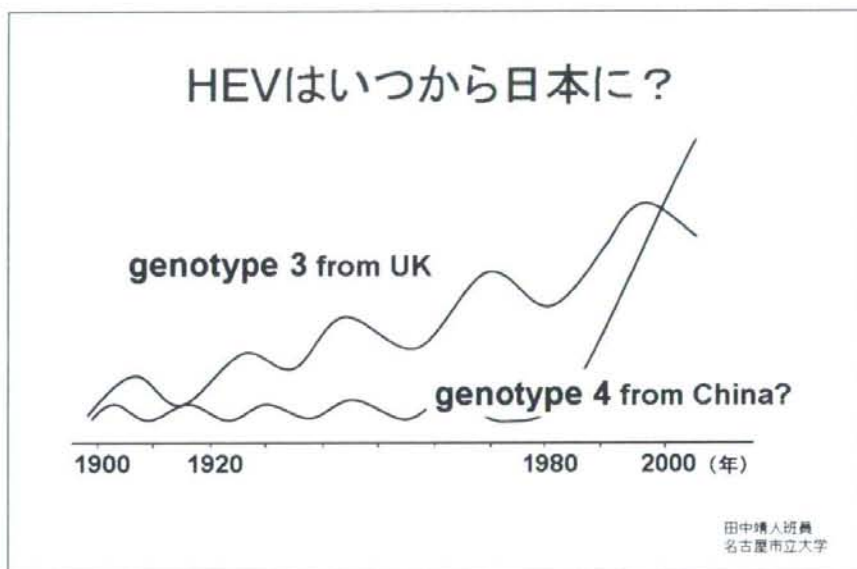


図 5

3. さらに、HEV genotype 4 の起源：中国における genotype 4 は遺伝子多様性に富み、分子時計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。

III. 遺伝的多様性、遺伝子型

以下の仕事は、本研究全般にわたる影響を与えることが予想されるため、このセクシ

ョンにのみにはめ込むのは妥当でないかもしれないが、岡本職員によって世界初の安定した HEV の細胞培養系が開発されたことは本研究班の大きな成果の一つである。

以下、1-4 に凝縮されるような、さまざまな知見が得られている。

1. 同職員は、E 型肝炎患者の糞便由来 3 型 HEV 株 (JE03-1760F) を用い、HEV の効率的で継代可能な培養系を世界で初めて確立することに成功した。

培養上清中に産出された子 HEV の継代培養を続けることによって、より優れた感染性

および増殖能を有する培養馴化株を確立できた。加えて、継代 HEV 株の全塩基配列を決定し、少ない数(0.3%)のゲノム変異によってウイルスが馴化していることを明らかにした。E 型劇症肝炎患者から得られた糞便浮遊液を接種することにより、新たに 4

型 HEV 株の培養系を確立することができた。JE03-1760F 株と同様に、培養上清を用いた cell-free virus の継代培養が可能であり、3 型の JE03-1760F 株に比べてより活発な増殖能を示した。

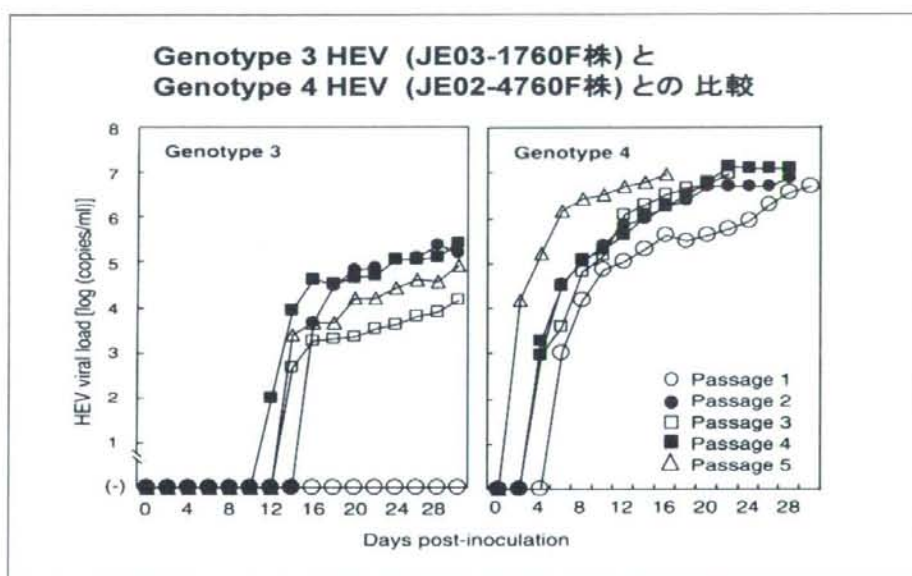


図 6

2. 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、細胞膜成分に覆われている可能性が示唆された。
3. HEV ORF3 合成ペプチドを免疫原として作製した抗 ORF3 モノクローナル抗体を用い、培養上清中の HEV 粒子表面に細胞膜成分とともに ORF3 蛋白質が存在することを明らかにした。
4. JE03-1760F 株(野生株)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。

IV. 感染防止、ワクチンの開発

1. これまでも李班員、武田元班員らにより抗原性を有する中空粒子を用いて、ワクチンの基礎検討が行われており、世界に先駆けた成果を収めてきた。これに加えて、本研究班では、前フェーズに引き続き、最も重要な reservoir と考えられるブタの感染予防を念頭に置き、「食べるワクチン」の開発に取り組んだ。津田班員は、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べく、形質転換レタスの開発を行った。

昨年までに、十分量（1～10 μ g/mg（レタス））のCPを発現するレタスの開発に成功した。ただし武田班員、李班員が昆虫細胞で中空粒子の産生に成功したような、「粒子」の形成は認められなかった。このたんぱくがマウスへの抗原性を有するか、否か、検討するため、レタス 200 mg/匹、理論上 200～2000 μ g/匹の投与が行われた。

残念ながら HEV 抗体価の上昇は確認できなかったが、今後ブタを対象とした edible vaccine の開発に大きな足がかりとなった成果である。

2. 李班員は、岡本班員らと同様に、PLC/PRF/5 (Alexander)細胞に HEV を接種し、効率的に HEV の増殖を観察できる細胞培養系を確立した。この系を用いて、李班員は詳細な安定性の検討を行った。3 型 HEV を 60 $^{\circ}$ C 10 分間、65 $^{\circ}$ C 5 分間以上の熱処理、あるいは 50 uw 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。

V. 診断・治療・重症化予測

1. 前フェーズから今フェーズにかけて、岡本班員らによって開発された IgA 測定系の有用性が報告され、目下保険適応となるべく、申請中である。現在のところ、民間検査会社での抗体測定が停止されており、事

実上、一般病院での E 型肝炎診断はストップしている。前述（非 A 非 B 非 C 型肝炎の 1 割が E 型肝炎であること）を考えれば、早期に測定系が保険収載となり一線臨床で使用されることが望まれる。

VI. 行政的成果

15 ページの成果を示すポンチ絵の中で、楢円で囲われた枠は筆者が「行政的成果」と位置付けているものである。北海道の北見網走地区で、ブタホルモンの摂食に起因すると考えられる、2004 年の北見市における集団感染事例および 2006 年の網走市における重症例が発生したこと、しかも HEV 遺伝子は genotype 4 であり、しかも互いに非常に近縁であった。重症化と関連のある HEV 株がその地の豚の中で脈々と受け継がれている可能性があり、このことを三代班長（当時）は危険情報として本省に通報している。その後のアクションは「些々やか」だったとのことではあるが、その成果もあってか、はたまた北見網走管内での独自の取組が功を奏したか、その後同地域での劇症例、重症例の発生というニュースに接したことはない。そもそも、このような研究班から斯様にタイムリーな情報が本省に通達されたこと自体が、大きな成果の一つであったと考える。

これまで、本研究班で報告された症例を集積してみると、E 型肝炎の重症・劇症例においては黄疸が遷延化し、徐々に亜急性、ないし遅発型肝不全に進行していくタイプが少なくないことが示唆されている。このことは桶谷班員らによる劇症肝炎、LOHF の全国集計 20 年度の報告によっても支持

された。すなわち、劇症肝炎、遅発性肝不全(LOHF)全国調査の集計結果をもとに2001～2007年に発症したE型例を集計し、A型およびB型急性感染例との比較解析を行ったところ、亜急性型、LOHFが全体に占める割合はA型12.7%、B型17.9%、E

型71.4%とE型は他に比べて亜急性型、LOHFを呈する比率が高かった($p<0.01$)のである。症例数は未だ7例と少ないものの、E型重症、劇症肝炎における亜急性型肝炎が他のウイルス性肝炎に比し、より多いことを示す初めての報告である。