

201030022A

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

経口感染する肝炎ウイルス(A 型、E 型)の感染防止、
遺伝的多様性、および治療に関する研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡本宏明

平成 23 (2011) 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

経口感染する肝炎ウイルス(A 型、E 型)の感染防止、
遺伝的多様性、および治療に関する研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡本宏明

平成 23 (2011) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告		
研究代表者報告：平成 22 年度の研究成果の纏め	(岡本 宏明)	1
II. 分担研究報告		
1. 国立病院急性肝炎共同研究班における A 型肝炎、E 型肝炎の動向	(八橋 弘)	7
2. HAV, HEV による劇症肝炎の治療法と予後	(桶谷 眞)	10
3. ヒト・動物・食品からの A 型及び E 型肝炎ウイルス検出と塩基配列解析	(新井雅裕)	13
4. 日本における 2010 年春季の A 型肝炎の分子疫学的解析	(石井孝司)	17
5. A 型肝炎の重症化例の塩基配列および治療に関する研究	(横須賀 収)	20
6. 北海道 E 型肝炎研究会による HEV 感染実態の研究	(姜 貞憲)	22
7. 北海道 E 型肝炎研究会症例報告：2010 年春に函館地区で発症し、” 09 年秋札幌小流行” 起因 new Sapporo strain が分離された E 型肝炎 2 重症例について	(小川浩司、 梅村真知子)	26
8. 献血者集団における HEV 感染実態の解明	(日野 学)	28
9. 北東北における急性肝障害登録システムから発見された急性 E 型肝炎の検討	(鈴木一幸)	31
10. 過去 30 年間の岩手県における E 型肝炎既感染率の動向	(鈴木一幸)	35
11. 愛知県におけるイノシシ・シカの HEV 感染について	(加藤 秀章)	39
12. 兵庫県における HEV 感染実態調査	(北嶋 直人)	41
13. 野生イノシシから分離された新規 HEV 株の解析	(高橋 雅春、 岡本 宏明)	43
14. 不活化 E 型肝炎ワクチンの可能性と問題点	(李 天成)	46
15. HEV の放出機構の解析	(長嶋 茂雄、 岡本 宏明)	49
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		53
IV. 研究成果の刊行物・別刷		57
V. 班会議プログラム		303

I. 総括研究報告

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）
経口感染する肝炎ウイルス（A 型、E 型）の感染防止、遺伝的多様性、および
治療に関する研究
平成 22 年度総括研究報告書

研究代表者 岡本宏明 自治医科大学 感染・免疫学講座ウイルス学部門 教授

研究要旨：研究成果のポイントを纏めると、A 型肝炎については、1) 今年度春期に報告件数が例年よりも多く、広域アウトブレイクへの進展が危惧されたが、幸い拡大しなかった。しかし、分離株のなかには韓国での大流行と関連の深いⅢA 株も含まれていたことから、引き続き慎重な監視が必要であること、2) Amantadine と IFN- α の単独療法よりも併用療法が IRES 依存性 HAV IRES 依存性翻訳抑制および増殖抑制に有効であること、などが示された。E 型肝炎については、1) Non-ABC 急性肝炎の中での E 型肝炎の占める割合が増加傾向にあること〔北海道：11%（2007 年）から 27%（2010 年）；国立病院機構共同研究班の全国調査：5.7%から 10%超（2000 年以降）〕、2) 北海道での E 型肝炎の重症化率が高く〔12/69（17.4%）〕、うち 3 例（4.3%）が劇症化したこと、3) 国内で約 500 万人が HEV 感染既往者であり、年間抗体陽転率（男性 0.17%，女性 0.06%）から年間約 12 万人が HEV に新規に感染していると推定されること、4) 新種の HEV（5 型と 6 型）が野生イノシシから分離し、全塩基配列を決定できたこと、5) 加熱によって不活化された HEV をウサギとラットに免疫したところ、中和活性を有する HEV 抗体が産生されたこと、6) 血清中および培養上清中の HEV 粒子は胆汁中や糞便中の HEV 粒子とは異なり、表面に ORF3 蛋白質を担い、細胞由来の脂質膜に覆われていること、7) HEV 粒子の細胞からの放出には ORF3 蛋白質が重要な役割を果たし、ORF3 蛋白質上の PSAP モチーフに変異を導入すると小胞輸送関連因子の Tsg101 との結合能を失い、HEV 粒子の放出が阻害されることなど、数多くの成果が班員・班友の協力によって得られた。

＜研究分担者（班員）＞

新井雅裕 東芝病院消化器内科 副院長
鈴木一幸 岩手医科大学 消化器・肝臓内科 教授
横須賀收 千葉大学大学院医学研究院腫瘍内科学 教授
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 部長
日野 学 日本赤十字社血液事業本部 副本部長
桶谷 眞 鹿児島大学病院 消化器内科 講師
姜 貞憲 手稲溪仁会病院消化器病センター 主任医長
李 天成 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官

＜研究協力者（班友）＞

三代俊治（東芝病院研究部）、高橋和明（東芝病院研究部）、神田達郎（千葉大学大学院医学研究院腫瘍内科学）、松林圭二（北海道赤十字血液センター検査部）、石井孝司（国立感染症研究所ウイルス第二部）、玉田陽子（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）、高橋雅春（自治医科大学感染・免疫学講座ウイルス学部門）、長嶋茂雄（自治医科大学感染・免疫学講座ウイルス学部門）、狩野吉康（札幌厚生病院消化器科）、水尾仁志（北海道勤労者医療協会勤医協

中央病院内科）、加藤秀章（名古屋市立大学大学院医学研究科）、中野達徳（藤田保健衛生大学医学部七栗サナトリウム内科）、北嶋直人（市立加西病院消化器科）、松浦善治（大阪大学微生物病研究所分子ウイルス分野）、脇田隆字（国立感染症研究所ウイルス第二部）、田中靖人（名古屋市立大学ウイルス学）、相川達也（相川内科病院）、矢崎康幸（小林病院消化器病センター）、磯田憲夫（自治医科大学消化器・肝臓内科）、井上淳（東北大学消化器内科）、佐藤幸浩（かみいち総合病院内科）、岡野宏（鈴鹿中央総合病院消化器内科）、川上万里（まび記念病院内科）、依田 広（京都大学消化器内科）、吉川 亮（長崎県環境保健研究センター研究部保健科）、国立裕之（京都桂病院消化器内科）、嶋村 剛（北海道大学第一外科（臓器移植医療部）

A. 研究目的

A 型肝炎について、発生状況のモニタリングを実施し、重症・劇症化の機序を解明する。治療法を開発する。また、ワクチンの接種対象をより明確なものとし、普及・啓発を行う。E 型肝炎について、感染経路の全解明、診断・治療・予防法の確立を目標とする。

B. 研究方法

発生動向と重症化リスク因子の調査、感染実態の調査、HAV ならびに HEV のウイルス株塩基配列の蒐集と解析、HEV 宿主動物調査、食品媒介感染の可能性の調査、抗ウイルス剤、ワクチン開発のための予備的検討などによる。

なお、すべての調査・研究は、個人情報保護および「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」を旨とする倫理規定を遵守して行なわれた。

C. 研究結果及び考察

今年度の研究成果の概要図を図 1 に示した。以下に、研究代表者、研究分担者および研究協力者別に研究結果の要旨を記すが、詳細については該当する研究報告書(項目 II)および研究成果の刊行物・別刷(項目 IV)をご参照戴きたい。

研究代表者(岡本宏明)

- (1) 昨年度報告した HEV 感染の全国調査[30 都道府県在住の健常成人 22,027 人：全体の 5.3%(男性 7.8%、女性 3.4%)]の結果を更に詳細に検討したところ、HEV 感染既往を有する日本人は約 500 万人と推定された。また、年間抗体陽転率(男性 0.17%、女性 0.06%)から年間約 12 万人が HEV に新規に感染していると推定された。
- (2) 2003 年から野生イノシシでの HEV 感染の全国調査を実施しているが、捕獲された 578 頭のイノシシのうち、19 頭(3.3%)から HEV が検出された。14 株は遺伝子型が 3 型に、4 株は 4 型に分類され、1 株(wbJOY_06)は既知のいずれの遺伝子型にも属さない新種の HEV であることが分かった。wbJOY_06 株は、既知の HEV 株(1 型～4 型、n=145)と全塩基配列において 72.3-77.4%の一致率に過ぎなかった。また、5 型に分類されうる新規 HEV として昨年度新井班員・三代班友らによって報告された JBOAR135-Shiz09 (AB573435)とも 78.6%の一致率に過ぎず、wbJOY_06 株が 6 型の prototype であることが示唆された。
- (3) E 型肝炎患者由来の糞便中 HEV のみならず、患者急性期血清中の HEV も遺伝子型の違いに因らず、PLC/PRF/5 細胞と A549 細胞の両方で効率よく増殖しうることを、加えて、血清中および培養上清中の HEV 粒子は胆汁中や糞便中の HEV 粒子と異なり、表面に ORF3 蛋白質を担い、細胞由来の脂質膜に覆われていること、すなわち、生体内には形態の異なる 2 種類の HEV 粒子が存在することを明らかにした。
- (4) HEV の放出機構：ORF3 蛋白質が HEV 粒子の細胞からの放出に重要な役割を果たし、ORF3 蛋

白質上の PSAP モチーフに変異を導入すると支小胞輸送関連因子 Tsg101 との結合能を失い、HEV 粒子の放出が阻害されることを明らかにした。このモチーフ配列が、“enveloped”ウイルスの出芽に関与している L-ドメインと同様に機能を有している可能性が示唆され、HEV の極めてユニークな放出機構の解明が進行している。

研究分担者(八橋弘)

1980 年～2010 年の期間に実施した国立病院機構 31 施設での急性肝炎の全国調査において、A 型肝炎 1,612 例および非 ABC 型肝炎と診断された 1,233 例(輸血後発生は除く)が対象：

A 型肝炎は 1990 年以降減少傾向にあり、2007 年から 2009 年の 3 年間は毎年 10 例未満であったが、2010 年は 21 例の発生を認めた。HAV genotype は IA、あるいは IIIA であった。

保存血清のある非 ABC 型急性肝炎 955 例を対象として HEV-IgM 抗体と HEV-IgG 抗体を測定したところ、56 例(5.9%)が E 型と判定された。非 ABC 型急性肝炎の中の E 型肝炎の頻度は、1980 年代、1990 年代では毎年 10%未満で推移するも、2000 年代では 10%を越える発生頻度であった。

研究分担者(桶谷真)

劇症肝炎・LOHF の全国調査結果(1986-2009 年)をもとに、A 型および E 型劇症肝炎の臨床背景、治療法、予後について解析した。近年の A 型劇症肝炎は、高齢化、男性患者の増加、合併症関連死の増加などの傾向がみられ、救命率は低下していた。A 型劇症肝炎に対する治療では血漿交換と血液濾過透析による人工肝補助療法が約 80%に実施されていた。ステロイド治療は約 60%に実施されていたが、救命率の改善には寄与していなかった。インターフェロン(IFN)治療の施行率は 17%と少なかったが、施行例の救命率は 87%と非施行例の 60%と比べ有意($p=0.033$)に高かった。E 型劇症肝炎に対する治療では、ステロイド、IFN、シクロスポリン A などが投与されていたが、その有効性は明らかでなかった。HAV、HEV による劇症肝炎の救命率の向上のためには、有効な抗ウイルス療法の確立が重要と思われた。

研究分担者(横須賀収)

HAV に対する amantadine と IFN- α の併用による増殖抑制効果を検討した。HAV internal ribosomal entry site (IRES)を含む Bicistronic constructs および HAV replicon を用いて検討したところ、それぞれの単独療法より併用療法の方が効果的に HAV IRES 依存性翻訳抑制および HAV 増殖の抑制することが可能であった。5' 非翻訳領域は抗ウイル

HAV

抗ウイルス剤の開発
(横須賀班員)

2010 年春期 HAV 株の解析
(石井班員)

A 型劇症肝炎の動向
(桶谷班員)

A 型急性肝炎の動向
(八橋班員)

尾去沢肝炎の HAV 解析
(新井班員)

平成 22 年度の研究成果の概要

Amantadine と IFN α の単独療法より併用療法の方が効果的にウイルス増殖を抑制した。韓国株に対しても有効。5' 非翻訳領域は抗ウイルス剤の標的の一つの候補であることを再確認。

2010 年春期は例年よりも報告件数が多かったが、幸い広域アウトブレイクには進展しなかった。しかし、HAV 株の一部はⅢA 型で、韓国の大流行株 (2008 ~ 2009 年) と同じクラスターに属したことから、引き続き慎重な監視が必要。

劇症肝炎・遷延性肝不全 (LOHF) の全国調査結果 (1998 ~ 2009 年) : A 型劇症肝炎は減少傾向。高齢、男性、基礎疾患、合併症数が予後不良因子。IFN 投与例での救命率が有意に高い。

国立病院機構共同研究班 28 施設による急性肝炎の全国調査 (1980 ~ 2010 年) : 1990 年以降減少傾向。2010 年は 2007~2009 年の 3 年間に比べて 2 倍以上。遺伝子型は I A とⅢA。

1957 年の「尾去沢肝炎」の患者保存血清中の HAV について塩基配列を決定 (塩基配列を解読された世界最古の HAV 株)。

HEV

感染培養系を用いた研究成果
(班長、李班員)

新種 HEV 株の同定と全塩基配列決定 (班長、新井班員)

HEV 感染の全国調査
(班長、日野班員)

E 型劇症肝炎の動向
(桶谷班員)

E 型急性肝炎の動向
(八橋班員)

北海道 E 型肝炎研究会
(道 E 研) による流行監視
(姜班員)

北海道地域の献血者に
於ける HEV-NAT の継続
(日野班員)

北東北に於ける急性肝障害
登録システムによる成因調査
(鈴木班員)

- ・ E 型肝炎患者由来の糞便中 HEV のみならず、血清中 HEV も遺伝子型の違いに因らず、効率よく PLC/PRF/5 細胞および A549 細胞で増殖可能であることを明らかにした (班長)。
- ・ ORF3 蛋白質が HEV の細胞からの放出に必須であり、放出された HEV 粒子 (培養上清・血清) の表面に細胞膜成分と ORF3 蛋白質が存在すること、ORF3 蛋白質の PSAP モチーフに変異を導入するとウイルス産生能が失われることを明らかにした (岡本)。
- ・ 培養細胞由来 HEV を加熱により不活化したのち、ウサギとラットに免疫し、不活化ワクチンとして利用可能であることが示唆する結果を得た。しかし、ウイルスの濃縮や精製法についての検討が必要 (李班員)。

- ・ 昨年度に静岡県内の野生イノシシから回収された新種 HEV (5 型 : JBOAR135-Shiz09) について全塩基配列を決定 (新井班員)。
- ・ 岡山県内の野生イノシシから分離された新種 HEV (wbJOY-06) の全塩基配列を決定。JBOAR135-Shiz09 株と全長配列において 78.6% の一致率 (班長)。

- ・ 全国調査 [30 都道府県在住の約 2.2 万人 (20 ~ 108 歳)] : 5.3% (男性 7.8%、女性 3.4%) が IgG-HEV 抗体を保有。国内の HEV 感染既往者は 500 万人、年間新規感染者は 12 万人と推定。年間抗体陽転率は男性 0.17%、女性 0.06%。(班長)。
- ・ 全国調査 [8 センターの約 1.3 万人 (16 ~ 69 歳)] : 3.4% (男性 3.9%、女性 2.9%) が IgG-HEV 抗体を保有 (日野班員)。

劇症肝炎・LOHF の全国調査結果 (1986 ~ 2009 年) : E 型劇症肝炎は年間 1 ~ 2 例が散発発症。高齢が予後不良因子。有効な抗ウイルス療法の確立が重要。

国立病院機構共同研究班 31 施設による急性肝炎の全国調査 (1980 ~ 2010 年) : E 型肝炎が非 ABC 肝炎の 5.6% (2000 年以降は 10.7%) に相当。

- ・ 2007~2010 年の 4 年間で急性肝障害 340 例のうち 69 例 (20.3%) が E 型 (11%, 18%, 25%, 27% と年々上昇)。4 型 70%。
- ・ 函館地区において、新札幌 4 型株による 2 例の劇症肝炎発生。

献血者 277,025 名 (2010 年 1 月 ~ 2010 年 12 月) における HEV RNA 陽性者は、28 名 [0.010% (男性 0.013%、女性 0.004%)]。献血前の動物内臓喫食率は 71%。

2009 年 8 月から 2010 年 11 月までに登録された急性肝炎症例 94 例中 6 例 (6.4%) が E 型であり、成因不明肝障害例の約 12% を占めた。

図 1. 平成 22 年度の研究成果の概要

ス剤の標的の一つの候補であることが再確認された。

研究分担者(新井雅裕)

感染宿主(ヒトと動物)から肝炎ウイルスゲノムを採取し塩基配列を解析する作業を今年度も続行した結果、次の成果が得られた。

- (1) 1957 年に秋田県で発生した所謂「尾去沢肝炎」の患者血清冷凍保存検体 16 本中 8 本から HAV のゲノム RNA を検出し、そのうちの 1 本から得られた HAV 株(HA286-Aki57)についてほぼ完全長の塩基配列(7406 nt)を決定した。これは「塩基配列を解読された世界最古の HAV 株」である。
- (2) (ii) 静岡県天竜地区の山林に棲息する野生イノシシから検出され「新種の HEV (most likely “HEV genotype 5”)である可能性が高い」と昨年報告した HEV 株(JBOAR135-Shiz09)の完全長塩基配列を決定できた。

研究分担者(姜貞憲)

2007 年に発足した、北海道 E 型肝炎研究会の活動により北海道内の HEV 感染の実態が徐々に解明されつつある。最近 4 年間に発生した北海道内非 A, B, C 急性肝障害症例における HEV 感染頻度炎の臨床像を検討した結果、北海道では HEV 感染例が現在なお増加中であることが判明した。加えて、重症化率が高く[12/69 (17.4%)、うち 3 例(4.3%)が劇症型]、E 型肝炎重症例に対する至適治療法の確立が求められる。

北海道 E 型肝炎研究会症例報告(小川浩司、梅村真知子): 2010 年春、函館地区において E 型劇症肝炎が 2 例発生した(1 例生存、1 例死亡)。分離同定された HEV 株は genotype 4 に属し、2009 年秋に発生した E 型肝炎札幌圏小流行起因 “new Sapporo strain” と近縁であった。

研究分担者(日野学)

北海道において 2010 年 1 月から 12 月にかけて血清学的スクリーニング陰性かつ ALT<61 IU/L を示す献血者 277,025 名を対象に HEV RNA スクリーニング(HEV NAT)調査を実施した。HEV RNA 陽性者数は 28 名(男性 24 名、女性 4 名)で、HEV NAT 陽性頻度は 0.010%(男性 0.013%、女性 0.004%)であった。陽性頻度は昨年と同等で、男性優位、3 型株優位の傾向も例年と変わらず、昨年懸念された重症 4 型株の感染拡大は起きなかった。献血前の動物内臓肉喫食率は 7 割であり、例年同様、HEV 感染との関連性が示唆された。今回は 4.6 log copies/ml もの HEV を含む血小板製剤が HEV 感染既往のない患者に輸血される事例が起きたが感染は成立しなかった。同様な事例は過去にも 4 例あ

り、HEV の感染性・感染メカニズムを知る上で重要な症例と考えられた。

研究分担者(鈴木一幸)

北東北地区における 40 医療機関と共同で急性肝障害患者のプロスペクティブスタディーを行っている。このシステムを利用して、急性 E 型肝炎の実態を明らかにするため、2009 年 8 月から 2010 年 11 月までの 16 ヶ月間に 111 例の急性肝障害が登録され、急性肝炎は 94 例であった。さらにその中で急性 E 型肝炎(AH-E)は 6 例(6.4%)であった。6 例中 1 例は HEV genotype 4 であったが、劇症化せず外来経過観察のみで自然軽快した。

岩手県内の特定 4 地域における一般住民検診者延べ 1951 例を対象に、過去 30 年間(1979-2009 年)にわたる HEV の感染率(IgG-HEV 抗体陽性率)を検討した。全体の抗体陽性率は、観察開始時期(1979 年)は 4.0%であったが 1989 年 8.8%、2001 年 12.1%と上昇し、2009 年には 7.0%と低下を示した。また、男女間では、男性の抗体陽性率が女性よりも高く、2001 年をピークとして低下しており、この傾向はいずれの地域でも同様であった。

研究分担者(李天成)

細胞培養で増殖した三つ異なる遺伝子型 1 型、3 型と 4 型(G1, G3, G4)の HEV を加熱により不活化した後、ウサギとラットに免疫し、抗体誘導能や中和活性などを解析し、不活化ワクチンの可能性および問題点を検討した。血中に抗 HEV IgG 抗体がともに誘導された。誘導された抗体は HEV の PLC/PRF/5 細胞への感染を阻止し、中和活性を持つことが示唆された。培養上清に分泌されたウイルス抗原の濃縮が困難であり、十分な精製したウイルスが確保できなかったことからサルへの接種および感染防御実験を実施しなかった。ウイルスの濃縮や精製法などさらに検討する必要がある。

研究協力者(石井孝司)

わが国での A 型肝炎の届出患者数は 2007 年以降低いレベル(150 人/年程度)で推移していたが、2010 年は 3 月から全国各地で A 型肝炎が多発し、最終的には年間 342 人の患者発生の届出があった。全国の地方衛生研究所と共同で、A 型肝炎患者の糞便または血清から HAV ゲノムの配列を決定し、流行状況を分子疫学的に解析した。その結果、2010 年の流行株は genotype IA の 2 つのクラスターと IIIA の 1 つのクラスターに大部分が分類されることが判明した。A 型肝炎が多発した理由は、従来日本に常在していた株に加え、東南アジア由来と考えられる株が新たに日本で流行し、また韓国で大流行した株も一部日本に侵淫してきたためであると考えられた。

研究協力者(加藤秀章)

愛知県で捕獲されたイノシシ 154 頭、シカ 19 頭につき RT-PCR 法にて HEV RNA の検出を行った。19 例のイノシシにおいて HEV RNA が検出され、遺伝子配列の決定できた 16 例について、過去に報告された HEV 株を用いて分子系統樹を作成した。今回検出された HEV は全て 4 型で、過去に愛知県および静岡県においてヒトやイノシシから検出された HEV 株および中国上海株と同一クラスターに属した。

研究協力者(北嶋直人)

兵庫県における E 型肝炎の感染状況を明らかにするために、成因不明の急性肝炎症例を集積した。2 年 10 ヶ月間で 105 症例が登録され、このうち E 型急性肝炎は 2 例 (1.9%) であり、兵庫県における急性肝炎の中で E 型肝炎が占める割合は極めて低率であることが確認された。

D. 結論

A 型肝炎について

- 1) A 型肝炎は今年度春期に例年よりも報告件数が多く、広域アウトブレイクへの進展が懸念されたが、幸い拡大しなかった。しかし、分離された HAV 株のなかには韓国での IIIA 型流行株と同じクラスター属する株も含まれていたことから、引き続き慎重な監視が重要である。
- 2) A 型劇症肝炎は発生数が明らかに減少しているが、高齢、男性、基礎疾患、合併症数が予後不良因子であり、予後不良例は寧ろ増加している。
- 3) Amantadine と IFN- α のそれぞれの単独療法よりも併用療法の方が効果的に IRES 依存性翻訳および HAV 増殖を抑制できることが分かった。
- 4) 1957 年に発生した「尾去沢肝炎」の患者保存血清から HAV (IA 型) を分離し、塩基配列を決定した。これは塩基配列を解読された世界最古の HAV 株である。

E 型肝炎について

- 1) 非 ABC 型急性肝炎の中での E 型肝炎の占める割合が増加傾向にある[北海道: 11%(2007 年)から 27%(2010 年); 国立病院機構の全国調査: 5.7%から 10%超(2000 年以降)]。
- 2) E 型肝炎の患者数が国内で最も多い北海道では、道 E 研による流行監視と赤十字血液センターでの献血者を対象とした HEV NAT 検査が継続して行なわれている。函館地区で、前年度に札幌圏での非集団的小流行の原因となった新札幌 4 型株による 2 例の劇症肝炎患者が発生した。HEV RNA 陽性献血者は例年とほぼ同様の 28 名 (0.01%) であった。

- 3) 昨年度報告した HEV 感染の全国調査[30 都道府県在住の健康成人 22,027 人; 全体の 5.3%(男性 7.8%、女性 3.4%)]の結果を更に詳細に検討したところ、国内で約 500 万人が HEV 感染既往を有すると推定された。また、年間抗体陽転率(男性 0.17%、女性 0.06%)から年間約 12 万人が HEV に新規に感染していると推定された。
- 4) 2003 年から実施している野生イノシシでの HEV 感染の全国調査のなかで、岡山県のイノシシから新種の HEV (wbJOY_06) が回収された。wbJOY_06 株と既知の HEV 株(1 型~4 型, n=145)との全塩基配列についての一致率は 72.3~77.4%に過ぎなかった。また、昨年度新井班員・三代班友らによって報告された新規 HEV [JBOAR135-Shiz09 (5 型)]とも 78.6%の一致率に過ぎず、wbJOY_06 株が 6 型の prototype であることが示唆された。
- 5) 加熱によって不活化された培養細胞由来の HEV をウサギとラットに免疫したところ、HEV の PLC/PRF/5 細胞への感染を阻止しうる中和抗体を誘導しうることを示唆された。
- 6) 血清中および培養上清中の HEV 粒子は胆汁中や糞便中の HEV 粒子と異なり、表面に ORF3 蛋白質を担い、細胞由来の脂質膜に覆われていること、すなわち、生体内には形態の異なる 2 種類の HEV 粒子が存在することを明らかにした。
- 7) HEV の放出機構に関する研究において、ORF3 蛋白質が HEV 粒子の細胞からの放出に重要な役割を果たし、ORF3 蛋白質上の PSAP モチーフ配列が、“enveloped” ウイルスの出芽に関与しているリードメインと同様の機能を有している可能性が示唆された。次年度も、このユニークな HEV の放出機構の解明を継続して行なう予定である。

E. 研究発表

論文発表、総説:

- 1) Takahashi M, Tanaka T, Takahashi H, Hoshino Y, Nagashima S, Jirintai, Mizuo H, Yazaki Y, Takagi T, Azuma M, Kusano E, Isoda N, Sugano K, Okamoto H. Hepatitis E virus (HEV) strains in serum samples can replicate efficiently in cultured cells despite the coexistence of HEV antibodies: characterization of HEV virions in blood circulation. J Clin Microbiol 48(4):1112-1125, 2010
- 2) Jinshan, Jirintai, Manglai D, Takahashi M, Nagashima S, Okamoto H. Molecular and serological survey of hepatitis E virus infection among domestic pigs in Inner

Mongolia, China. Arch Virol 155(8):1217-1226, 2010

- 3) Nagashima S, Takahashi M, Jirintai, Tanaka T, Yamada K, Nishizawa T, Okamoto H. A PSAP motif in the ORF3 protein of hepatitis E virus is necessary for virion release from infected cells. J Gen Virol 92(Pt 2):269-278, 2011
- 4) Okamoto H. Efficient cell culture systems for hepatitis E virus strains in feces and circulating blood. Rev Med Virol 21(1):18-31, 2011
- 5) 相川達也, 池澤和人, 間宮孝, 上野ちさと, 和田由美子, 島田沙香, 津田文男, 高橋雅春, 岡本宏明. 札幌圏内小流行4型HEV株が検出された茨城県内E型肝炎の1例. 肝臓 51(10): 579-581, 2010
- 6) 岡本宏明. E型肝炎ウイルスの感染培養系. ウイルス 60(1): 93-104, 2010
- 7) 岡本宏明. E型肝炎の輸入感染症例. 症例から学ぶウイルス肝炎の治療戦略. 診断と治療社 p178-182, 2010
- 8) 岡本宏明. E型肝炎ウイルス感染. 治療学 44(9): 974-977, 2010
- 9) 岡本宏明. E型肝炎をめぐってー診断法と感染培養系の確立と基礎・臨床への応用ー. Minophagen Med Rev 55(3): 207-218, 2010
- 10) 岡本宏明. E型肝炎の現況. 総合臨牀 60(1): 95-101, 2011
- 11) 高橋雅春, 岡本宏明. E型肝炎. 肝・胆道系症候群 (第2版). 別冊日本臨牀. 日本臨牀社 p31-37, 2010
- 12) 横山孝二, 岡本宏明. B/C型以外のウイルス肝炎. 周産期医学 41(2): 225-229, 2011

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

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）
経口感染する肝炎ウイルス（A 型、E 型）の感染防止、遺伝的多様性、および
治療に関する研究
平成 22 年度分担研究報告書

国立病院急性肝炎共同研究班における A 型肝炎、E 型肝炎の動向

研究分担者 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 部長

研究要旨：1980 年～2010 年の期間に実施した国立病院機構 31 施設での急性肝炎の全国調査の中から、A 型肝炎 1,612 例および非 ABC 型肝炎と診断した 1,233 例（輸血後発生は除く）を対象として解析をおこなった。A 型肝炎は 1983 年（162 例）と 1990 年（187 例）に流行を認めるも、その後は減少傾向にある。2007 年から 2009 年の 3 年間は毎年 10 例未満であったが、2010 年は 21 例の発生を認めた。2010 年の A 型肝炎 13 例に対して HAV 遺伝子型の解析をおこなったところ 11 例は HAV genotype 1A、2 例は genotype 3A であった。非 ABC 型急性肝炎 1233 例中、保存血清のある 955 例を対象として HEV-IgM 抗体と HEV-IgG 抗体を測定したところ、両抗体陽性は 56 例（5.9%）であった。非 ABC 型急性肝炎の中の E 型肝炎の頻度は、1980 年代、1990 年代では毎年 10%未満で推移するも、2000 年代では、0%から 29%の間で変動し、2005 年以降は毎年 10%を越える発生頻度であった。

＜共同研究者＞

玉田 陽子（国立病院機構長崎医療センター
臨床研究センター、流動研究員）

石橋 大海（同、センター長）

A. 研究目的

経口感染する A 型肝炎ウイルスおよび E 型肝炎ウイルスによる急性肝炎の発生動向を明らかにするため、定点観測的におこなわれている急性肝炎流行調査のデータをもとに検討をおこなった。

B. 研究方法

全国 31 施設の国立病院急性肝炎共同研究班参加施設において 1980 年～2010 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 4,524 例で、A

型 1,612 例、B 型 1,294 例、C 型 385、非 ABC 型 1,233 例であった。

診断は、A 型は IgM-HA 抗体陽性、B 型は HBsAg 陽性および IgM-HBc 抗体陽性、C 型は HCV-RNA 陽性、非 ABC 型は上記のいずれも陰性を確認しおこなった。薬物、アルコール、自己免疫性肝炎、非肝炎ウイルス性肝炎（EB、CMV、HSV など）は除外した。重症度の分類では、PT 値 40%以下かつ脳症Ⅰ度までを重症型、PT 値 40%以下かつ脳症Ⅱ度以上を劇症型、それ以外を通常型とし

た。

A 型肝炎は、年次別に発生数の集計をおこなった。E 型肝炎は、発症後 3 ヶ月以内の保存血清が存在した 955 例を対象に、ELISA 法にて HEV-IgG 抗体、HEV-IgM 抗体を測定した。両抗体陽性であるものを E 型急性肝炎例と判定した。

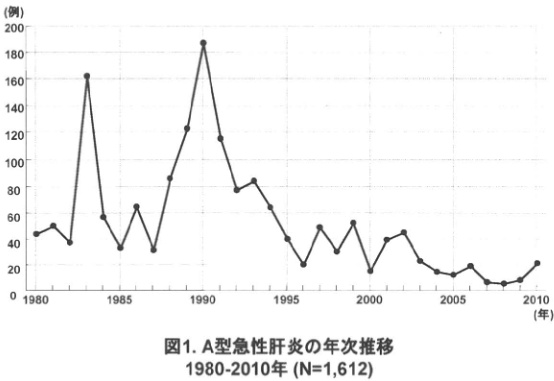
倫理面への配慮：研究用血清の採取に際して、インフォームドコンセントが得られている。検体提供者は匿名化されているため、個人のプライバシーを侵害することではなく、人権上の問題は生じない。

C. 研究結果

1980 年～2009 年の調査期間中、A 型肝炎は 1,612 例で、男性 867 例（53.8%）、女性 745 例（46.2%）、平均年齢は 37.6 ± 12.9 歳であった。重症型 54 例（3.3%）、劇症型 8 例（0.5%）であった。死亡例は 2 例（0.1%）だった。

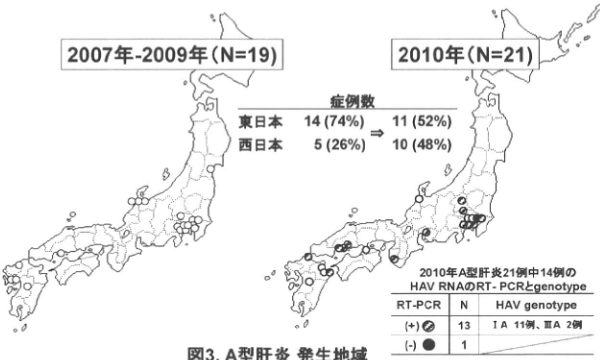
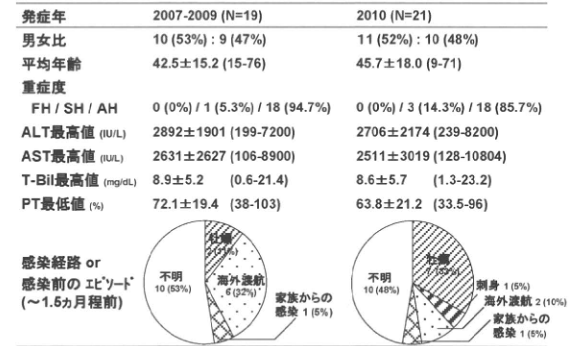
年次別発生数では、1983 年と 1990 年にそれぞれ 162 例、187 例と流行を認めたが、以後減少傾向で、2007 年から 2009 年の 3 年間は毎年 10 例未満の発生数であった（図 1）。2010 年は、21 例の発生を認め直近の過去 3 年間に對しやや増加していたものの、2006 年の 19 例と同程度にとどまった。2010 年発生 21 例の A 型肝炎

炎の特徴を調べるため、2007 年から 2009 年までの計 19 例との患者背景の比較をおこなった (図 2)。男女比、平均年齢、重症化頻度、肝機能検査値、感染前のエピソードについて、いずれも両群間に有意な差を認めなかった。一方、発生地域は、過去 3 年間では東日本が 74%を占めていたが、2010 年は東日本 52%、西日本 48%と、やや西日本へシフトしていた (図 3)。2010 年発生の 21 例中、14 例の肝炎初期血清が保存されており、VP1/2A junction 領域における



RT-nested PCR により 13 例の HAV RNA を検出できた。ダイレクトシーケンシングによる塩基配列決定および系統樹解析により、11 例は genotype I A、2 例は genotype IIIA に分類された。

一方、非 ABC 型急性肝炎で血清保存のあった 955 例中、HEV-IgG 抗体および HEV-IgM 抗体の両方が陽性であったのは 56 例 (5.9%) で、HEV-IgG 抗体のみ陽性は 80 例 (8.4%)、HEV-IgM 抗体のみ陽性は 8 例 (0.8%)、残り 811 例 (84.9%) は両抗体ともに陰性であった。E 型急性肝炎と診断した 56 例は、男性 51 例 (91.1%)、女性 5 例 (8.9%)、平均年齢 49.5 ± 15.3 歳であった。非 ABC 型急性肝炎に占める E 型肝炎の発生頻度は、1980 年代と 1990 年代では毎年 10%未満であったが、2000 年代では 0%から 29%と振幅が大きくなり、2005 年以降は、毎年 10%を超えていた。2010 年は非 ABC 型急性肝炎 28 例中 3 例



が E 型肝炎で、10.7%の発生頻度であった。31 年間の E 型肝炎診断例 56 例のうち、重症型を 1 例に認めたが、ほかは全例通常型であった。解析可能であった 41 例の HEV genotype は、1 型 6 例 (14.6%)、3 型 28 例 (68.3%)、4 型 7 例 (17.1%) であった。重症化した 1 例は 1 型であった。発症 1-2 ヶ月前の海外渡航歴の有無と HEV genotype、genotype 内サブグループの解析結果から、国内感染は 44 例 (78.6%) と考えられ、輸入感染は 12 例 (21.4%) と考えられた。各々、平均年齢は 52.8 ± 13.7 歳、 37.3 ± 15.5 歳であった ($P < 0.0013$)。

D. 考察

1980 年～2009 年の期間中、本邦の A 型肝炎の発生数は、1983 年と 1990 年の流行以後、近年徐々に減少してきていたが 2010 年は前 3 年間に對しやや増加の傾向を示した。この動向は、1999 年からの感染症研究所への届出数による感染症発生動向調査の結果とほぼ相関している。2008 年以降、韓国では A 型肝炎の大規模流行が続いていることから、本邦への感染拡大が懸念されたが、国立病院機構での発生頻度調査によると、2010 年の A 型肝炎発生はいわゆる小流行にとどまり、大流行には至っていなかった。

感染症研究所が発する病原微生物検出情報 (2010 年 10 月号) によれば、2010 年の A 型肝炎症例より得られた HAV59 株の解析で、71.2% が HAV genotype I A、1.7% が I B (エジプト・トルコ渡航歴あり)、27.1% が IIIA と報告されている。

本研究での遺伝子型解析結果では、2010 年発症例 13 例中 11 例 (84.6%) が genotype I A、2 例 (15.4%) が genotype IIIA であり、同様の genotype 分布であった。発症前の明らかな海外渡航歴を有する症例は 2 例 (1 例はインドネシア、1 例はタイ) で、いずれも I A に分類された。

E 型肝炎は、2000 年代以降本邦でも注目が集まり、症例報告が相次いでなされているが、

本研究では、多数例、年度別発生頻度に関する知見を得るために、国内 31 施設において定点観測的に症例の登録および解析をおこなっている。1980 年代、1990 年代では、E 型肝炎の発生頻度は、毎年非 ABC 型急性肝炎の 10%未満の頻度であったが、2000 年代以降は各年 0%から 29.0%と発生頻度の振幅が大きくなり、2005 年以後は、毎年 10%を越える発生頻度であった。

E. 結論

1、A 型肝炎は 1983 年と 1990 年の流行以後、減少傾向である。2010 年は、直近の過去 3 年に対しやや増加していたものの、小流行にとどまった。

2、E 型肝炎は、非 ABC 型急性肝炎の 5.9%を占める。2005 年以降は、10%を越えている。

F. 研究発表

1. 学会等発表：

- 1) Tamada Y, Yano K, Yatsushashi H, Ishibashi H.

Acute viral hepatitis A and E in Japan
United-States Japan Cooperative Medical
Science Program workshop on Enteric Viral
Hepatitis A and E in Asia, Yokohama, Japan,
2010. 09.08

2. 論文発表、総説：

- 1) 八橋弘，矢野公士，玉田陽子.

【急性肝障害 薬物性肝障害とウイルス肝炎】 急性肝障害を起こす疾患 ウイルス性急性肝障害とその治療 A 型肝炎.
臨床消化器内科 25(11): 1501-1506, 2010

- 2) 八橋弘，矢野公士，玉田陽子.

【ウイルス肝炎 治療の現状と新しい戦略】
ウイルス肝炎の疫学 A 型肝炎ウイルス感染.

治療学 44(9): 967-969, 2010

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事業）
経口感染する肝炎ウイルス（A 型、E 型）の感染防止、遺伝的多様性、および
治療に関する研究
平成 22 年度分担研究報告書

HAV、HEV による劇症肝炎の治療法と予後

研究分担者：桶谷 眞
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 講師

研究要旨：1986 年以降 2009 年までの A 型劇症肝炎および遅発性肝不全 (LOHF) の臨床背景、治療法、予後について解析した。近年の A 型劇症肝炎は、高齢化、男性患者の増加、合併症関連死の増加などの傾向がみられ、救命率は低下していた。A 型劇症肝炎に対する治療では血漿交換と血液濾過透析による人工肝補助療法が約 80% に実施されていた。ステロイド治療は約 60% に実施されていたが、救命率の改善には寄与していなかった。インターフェロン (IFN) 治療の施行率は 17% と少なかったが、施行例の救命率は 87% と非施行例の 60% と比べ有意 ($p=0.033$) に高かった。E 型劇症肝炎に対する治療では、ステロイド、IFN、シクロスポリン A などが投与されていたが、その有効性は明らかでなかった。HAV、HEV による劇症肝炎の救命率の向上のためには、有効な抗ウイルス療法の確立が重要と思われた。

共同研究者

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 教授
井戸章雄 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 准教授
宇都浩文 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 講師
森内昭博 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 助教

A. 研究目的

1990 年以降に A 型急性肝炎の大流行はなく、A 型劇症肝炎の患者数も、全体的に減少傾向にある。また、その患者背景にも変化がみられている。A 型および E 型劇症肝炎に対しては、人工肝補助療法、成因に対する治療、合併症対策などの治療が行われているが、その有効性は明らかにされていない。今回、A 型および E 型劇症肝炎の臨床背景、

治療法、予後について解析した。

B. 研究方法

例年実施される劇症肝炎および遅発性肝不全 (LOHF) の全国調査結果をもとに、1996 年以降に発症した A 型劇症肝炎の臨床背景、治療法、予後を解析した。また、2001 年以降の E 型劇症肝炎の治療法を調査した。2003 年以前は埼玉医科大学、岩手医科大学により集計されたデータを用いた。

(倫理面の配慮)

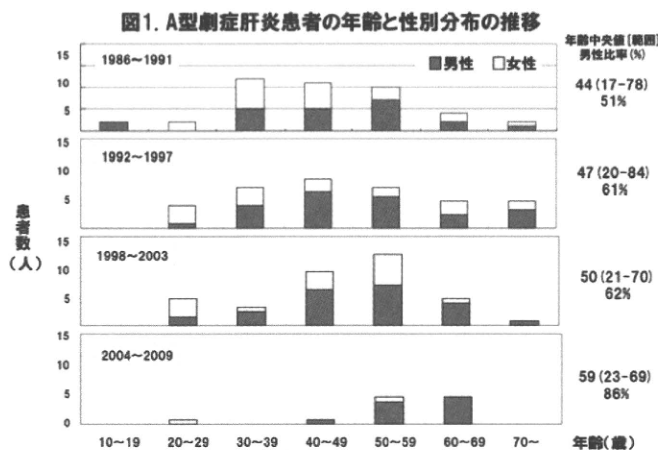
劇症肝炎・LOHF 全国調査は匿名化されたデータを集計解析するもので、既に鹿児島大学大学院の疫学研究等研究倫理委員会の承認を得て実施されている。

C. 研究結果

(1) A 型劇症肝炎の動向

A 型劇症肝炎は 1998～2003 年の 6 年間で 45 例、2004 年～2009 年で 14 例の登録が見られた。内科的治療による救命率を比較すると、1998～2003 年

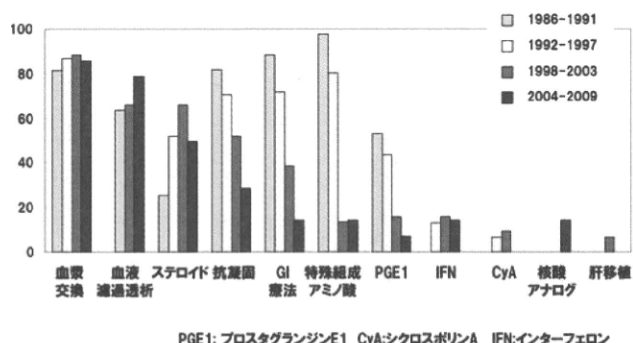
では79%であったが、2004年～2009年では57%と低下傾向にあった。1996年以降のA型劇症肝炎の動向を解析した(図1)。1986～1991年では発症年齢の中央値が44歳、男性比率が51%であったが、1992年以降は徐々に高齢化し、男性の占める比率が上昇していた。2004～2009年では年齢の中央値は59歳、男性比率は86%であった。



(2) A型劇症肝炎の予後不良因子

A型劇症肝炎を生存群(41例)、死亡群(15例)、肝移植群(3例)にわけ、臨床背景を比較した。年齢の中央値は生存群51歳、死亡群59歳、肝移植群48歳で、生存群に比べ死亡群が有意に高齢であった($p=0.0100$)。また、男女比は死亡群で男性の比率が高かった($p=0.0105$)。基礎疾患を有する割合は、生存群20%に対し死亡群57%と死亡群で有意に高率であった($p=0.0148$)。薬物服用歴を有する割合も死亡群で高い傾向をみとめたが、有意差はみられなかった。合併症数は生存群0.9個に対し死亡群では3.5個と死亡群で有意に高値であった。

図2. A型劇症肝炎における各治療法の実施率の推移



った($p<0.0001$)。

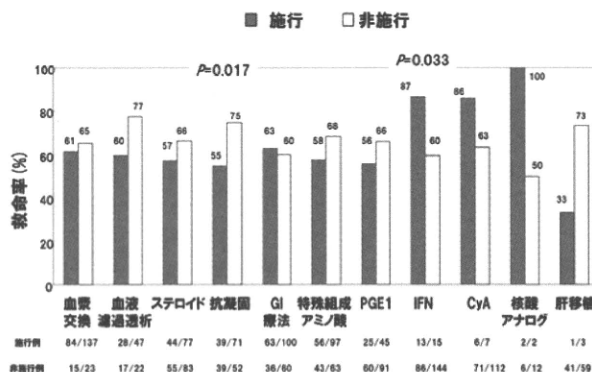
(3) A型劇症肝炎の合併症

A型劇症肝炎の合併症頻度は感染が35%、脳浮腫が26%、消化管出血が23%、腎障害が38%、DICが32%、心不全が11%であった。合併症頻度はB型劇症肝炎とほぼ同程度であった。2004～2009年の症例の死因に占める肝不全死と合併症などの肝不全死以外の比率をみると、B型では79%対21%に対し、A型では33%対67%と肝不全死以外の死因の比率が高率であった。肝不全死以外の死因が占める比率は1992年以降上昇傾向であった。

(4) A型劇症肝炎の治療

A型劇症肝炎に対する各治療法の実施率を図2に示す。血漿交換、血液濾過透析は全体の80%に実施されていた。近年は抗凝固療法、グルカゴン-インスリン(GI)療法、特殊組成アミノ酸療法、プロスタグランジンE1(PGE1)療法の実施率は低下している。副腎皮質ステロイドは1986年以降、施行率は上昇傾向にあったが、近年は約50%にとどまっている。1998年以降、インターフェロン(IFN)は17%に、シクロスポリンA(CyA)は12%に実施されていた。各治療法の施行例と非施行例の救命率を比較した(図3)。血液濾過透析、副腎皮質ステロイド、抗凝固療法ではむしろ非施行例の救命率が高く、合併症の影響が示唆された。CyAは施行例の救命率が86%と非施行例の63%より高かったが、有意差はみられなかった。IFNは非施行例の60%に対し施行例では87%と、施行例の救命率が有意に高値であった($p=0.033$)。A型劇症肝

図3. A型劇症肝炎における各治療法の救命率



炎に対する肝移植例は3例しかなく、そのうち救命例は1例しかなかった。

(5) E型劇症肝炎の治療

E型劇症肝炎7例に対しては全例に血漿交換療法が、6例に血液濾過透析が行われていた。副腎皮質ステロイドが5例、IFNが2例、CyAが3例に実施されていた。それぞれの治療が単独あるいは併用で実施されており、各治療法の有効性評価は困難であった。

D. 考察

我が国におけるA型劇症肝炎は1990年の大流行以降、徐々に高齢化し、男性患者の増加傾向がみられた。A型劇症肝炎の予後不良因子は、高齢、男性、基礎疾患、合併症と考えられた。合併症では感染、脳浮腫、消化管出血、腎障害、DICなどが多く、合併症が死因となる割合が高かった。近年のA型劇症肝炎に対する内科的治療による救命率の低下は、これらの予後不良因子を有する患者群の増加と関連していることが推測された。

A型劇症肝炎に対する治療法の推移をみると、近年血漿交換と血液濾過透析による人工肝補助療法は高率に実施されていた。成因治療としては副腎皮質ステロイドが全体の約60%に施行されていたが、その有効性は明らかでなく、むしろ感染など合併症の誘因となっている可能性も考えられた。IFN療法は統計学的に有効性が示唆されたが、その実施率は約20%にとどまっていた。IFN療法が合併症の少ない症例に用いられた可能性もあり、有効性についてはさらに検討が必要である。また、CyAなどの免疫抑制療法についても、その有効性をさらに検証する必要がある。

一方、E型劇症肝炎に対する治療法は症例数が少なく、その解析は困難であった。副腎皮質ステロイド、CyA、IFNなどがそれぞれ単独あるいは併用で用いられていた。HEVについては最近慢性HEV感染に対するリバビリンの有効性が報告され、注

目されている。今後は、HEVにおける抗ウイルス療法の有効性をさらに検証する必要があると思われる。

E. 結語

本邦におけるA型劇症肝炎は、患者の高齢化、死因に関連する合併症の増加などその背景は変化している。A型劇症肝炎の治療ではIFNなど抗ウイルス療法の有用性が示唆されるものの、その実施率は低かった。今後、HAVおよびHEVによる劇症肝炎の予後の改善のためには、成因治療としての有効な抗ウイルス療法の確立が重要と思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表：

- 1) Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Changing etiologies and outcomes of acute liver failure: A perspective from Japan. J Gastroenterol Hepatol 26(Suppl 1):65-71, 2011.
- 2) 桶谷 真, 井戸 章雄, 坪内 博仁. 劇症肝炎治療の現況. Annual Review 消化器 2011, 中外医学社 p160-165, 2011
- 3) 桶谷 真, 井戸章雄, 坪内博仁. 劇症肝炎の現況. 総合臨牀 60(1):117-122, 2011
- 4) 桶谷 真, 坪内博仁. 劇症肝炎 治療学 44(9):978-980, 2010

2. 学会発表：

- 1) 森内昭博, 桶谷 真, 井戸 章雄, 坪内博仁. 全国調査からみた劇症肝炎の治療法の変遷 第46回日本腹部救急医学会総会 富山 2010年3月18日-19日)

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）
経口感染する肝炎ウイルス（A型、E型）の感染防止、遺伝的多様性、および治療に関する研究
平成 22 年度
分担研究報告書

ヒト・動物・食品からの A 型及び E 型肝炎ウイルス検出と塩基配列解析

研究分担者 新井雅裕（東芝病院研究部/消化器内科）

研究要旨 感染宿主(ヒトと動物)から肝炎ウイルスゲノムを採取し塩基配列を解析する作業を今年度も続行した結果、右に特記する収穫が得られた。(i) 1957年に秋田県で発生した所謂「尾去沢肝炎」の患者血清冷凍保存検体 16 本中 8 本から hepatitis A virus (HAV) の genomic RNA を検出し、そのうちの 1 本から得られた HAV 株(HA286-Aki57)に於いては、ほぼ完全長の塩基配列(7406 nt)を決定し得たが、これは我々がデータベースを調べた限りに於いて「塩基配列を解読された世界最古の HAV 株」である；(ii) 静岡県天竜地区の山林に棲息する野生イノシシから検出され「新種の hepatitis E virus (most likely “HEV genotype 5”）」である可能性が高い」と昨年報告した HEV 株(JBOAR135-Shiz09)の完全長塩基配列を決定することが出来た(total 7267 nt; 5'UTR=1...25, ORF1=26...5152, ORF2=5149...7173, ORF3=5183...5521, 3'UTR=7174...7250, polyA=7251...7267; DDBJ/EMBL/GenBank accession AB573435)。

共同研究者:高橋和明、安倍夏生、橋本みちえ、SM
アクバル、三代俊治(東芝病院研究部)、須藤恒久(秋
田大学名誉教授)、川上万里(まび記念病院)、国立裕
之(京都桂病院)、寺田修三(焼津市立総合病院)、加
藤秀章(名古屋市立大学)、中野達徳(藤田保健衛生
大学)、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)、他

A. 研究目的

感染宿主(ヒトと動物)及び其れを取り巻く環境(食
品を含む)から A 型及び E 型肝炎ウイルスゲノムを採
取し塩基配列を解析することにより、両ウイルスの遺
伝的多様性に関する理解の深化、感染経路の解明、
感染防止対策の立案等に役立てることを主目的とし
て本研究を行ったが、新種や珍種の発見も勿論目的
の一部である。

B. 研究方法、結果、考察

1. 尾去沢肝炎(1957 年)の原因となった A 型肝炎 ウイルスの遺伝子解析

我々は、数多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
HAV 株及び 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。本年度もそれを
地道に続行していたところ突如豫想だにせざる幸運
に恵まれ、無慮 53 年前(昭和 32 年)に秋田県尾去沢
町で発生した伝染性肝炎(所謂「尾去沢肝炎」)の患
者検体を多数入手するところとなった。

これら検体の一部は今から約 30 年前(昭和 54 年)
に東京都臨床医学総合研究所の吉澤浩司等が自ら
の開発した免疫電顕法を用いて A 型肝炎ウイルス抗
体陽性反応を確認していたので、尾去沢肝炎=A 型

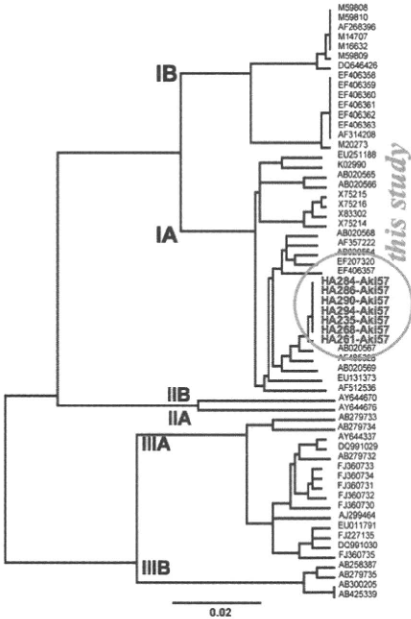
肝炎との示唆が得られてはいた(須藤恒久、日沼頼夫、吉澤浩司、津田文男、真弓忠、1957 年尾去沢肝炎の回顧的研究-A 型肝炎流行のウイルス学的確認とその意義-、日本医事新報 No.2888 昭 54.9.1 日)が、ウイルス分離あるいはゲノム検出等の直接証拠は未見のまま今日に至っていた。

そもそも尾去沢肝炎の報告者であって且つ偶然の機会から今回の解析対象検体を我々に提供してくれることになった須藤恒久の筆によれば「...血清等は、私が秋田大学を 1992 年に定年退官した後、恙虫病や日本紅斑熱などの重要血清と一緒に、自宅の冷凍庫にそのまま保存しておりましたので、尾去沢血清は採取後 53 年になる訳ですが、果たしてどういう状態であるか大変気になって居り...」(出典:須藤恒久から川上万里に宛てた 2010 年 7 月 10 日付の手紙)という不安含みの長期保存検体群であったが、その中から、可及的病初期に近い採血であること/凍結融解の履歴が可及的少ないこと/比較的保存量が多いことという 3 つの条件に適合した 16 検体を選び、PCR で HAV RNA の検出を試みたところ、Table 1 に示す如く 8 検体が HAV RNA positive であった。

“尾去沢肝炎” 2010 年回顧的解析血清送付一覧							
須藤恒久 H22-7-22							
S番号	年齢	性	発症月日	採血月日	採血 病日	1978年 HAV抗体	2010年 HAV-RNA
1	199	9	F	1957.7.19	1957.7.20	2	+
2	229	8	M	1957.6.29	1957.7.5	7	+
3	235	6	M	1957.7.9	1957.7.11	3	+
4	237	10	M	1957.7.10	1957.7.13	4	+
5	261	10	F	1957.8.17	1957.8.22	6	+
6	268	6	F	1957.9.2	1957.9.5	4	+
7	270	9	F	1957.9.4	1957.9.9	6	+
8	272	8	F	1957.9.5	1957.9.11	7	+
9	283	6	F	1957.9.29	1957.10.2	4	+
10	284	11	F	1957.9.28	1957.10.3	6	+
11	286	8	M	1957.10.1	1957.10.4	4	+
12	290	7	F	1957.9.26	1957.10.1	6	+
13	291	5	F	1957.9.28	1957.10.1	4	+
14	293	6	F	1957.9.26	1957.10.2	7	+
15	294	7	M	1957.9.30	1957.10.3	4	+
16	299	6	M	1957.10.8	1957.10.15	8	+

Table 1

更に、そのうちの 7 検体に於いては HAV genome の P3C region 内 359-nt sequence が解読可能となり、既知配列と共に系統樹を描くと genotype IA の傘下にコンパクトなクラスターを形成した(Figure 1)。



Phylogenetic tree of HAV based on 359-nt sequence within P3C

Figure 1

更にそのうちの 1 本(sample No.286)に於いては 5' end の数十塩基を除くほぼ完全長の塩基配列を決定し得た(Figure 2; isolate name HA286-Aki57; データベース未登録)。

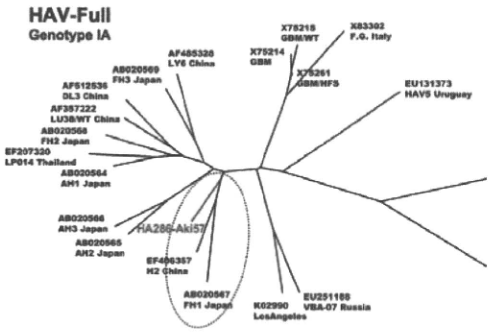


Figure 2

我々がデータベースを探索した限りでは(by NCBI taxonomy browser)、これまで最古の HAV sequence は Costa Rica で採取された CR326 という株であって、その採取年は 1960 年と記載されている(followed by 1970s の米国株や豪州株等)。

ひるがえって我等が尾去沢肝炎は其の 3 年前、1957 年の「事件」だったから、最古株の冠をコスタリカから奪い取ったことになる。

2. HEV genotype 5

前年度からの宿題として残されていた静岡県天竜地区棲息野生イノシシ由来 JBOAR135-Shiz09 株の HEV genome 完全長化に成功し DDBJ に登録後即公開された (Figure 3) (accession AB573435)。

```
AB573435      7267 bp    RNA      linear    VRL 17-FEB-2011
Hepatitis E virus genomic RNA, complete genome, isolate:
JBOAR135-Shiz09.
AB573435
AB573435.2

Hepatitis E virus
Hepatitis E virus
Viruses: ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage: Hepeviridae:
Hepevirus.
1 (bases 1 to 7267)
Mishiro, S. and Takahashi, K.
Direct Submission
Submitted (28-JUL-2010) to the DDBJ/EMBL/GenBank databases.
Contact: Shunji Mishiro
Toshiba General Hospital, Department of Medical Sciences: 6-3-22
Higashi Oh-i, Shinagawa-ku, Tokyo 140-8522, Japan
2
Takahashi, K., Terada, S., Kokuryu, H., Arai, M. and Mishiro, S.
A wild boar-derived hepatitis E virus isolate presumably
representing so far unidentified "genotype 5"
Kanzo 51, 536-538 (2010)

Location/Qualifiers
1..7267
/collected_by="Hiroyuki Kokuryu"
/collection_date="01-Feb-2009"
/country="Japan:Shizuoka, Tenryu"
/db_xref="taxon:12461"
/host="Sus scrofa leucomystax"
/isolate="JBOAR135-Shiz09"
/isolation_source="serum from a wild boar"
/mol_type="genomic RNA"
/notes="new genotype (most likely G5)"
/organism="Hepatitis E virus"
```

Figure 3

Infectious RNA の分子構築も完了したので次年度には愈々感染実験を開始することになる。

C. 発表

1. 学会発表

- (1) 安倍夏生, 高橋和明, 三代俊治, 桑原祥浩, 上田成子. 市販豚レバーおよび大腸における E 型肝炎ウイルスの分子疫学的研究(会議録). 日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集 99 回 Page66(2010.04)
- (2) 宮原孝治, 三宅康広, 安中哲也, 池田房雄, 高木章乃夫, 岩崎良章, 小橋春彦, 高橋和明, 姜貞憲, 山本和秀. 輸入感染症としての E 型肝炎
- 肝炎 ネパール人留学生の 1 例(会議録/症例報告). 日本消化器病学会雑誌(0446-6586)107 巻臨増総会 PageA399(2010.03)
- (3) 手島一陽, 金原猛, 高橋和明, 安倍夏生, 三輪純, 松原康朗, 田代淳, 田上大祐, 太田裕彦, 三代俊治, 新井雅裕. 原因不明の急性肝障害に占める急性 E 型肝炎の割合と臨床経過に関する検討(会議録). 肝臓(0451-4203)51 巻 Suppl.2 PageA605(2010.09)
- (4) 小関至, 姜貞憲, 狩野吉康, 赤池淳, 大村卓味, 松居剛志, 佐賀啓良, 代田充, 水尾仁志, 渡辺正夫, 三浦洋輔, 倉敏郎, 常松泉, 松林圭二, 池田久實, 岡本宏明, 高橋和明, 安倍夏生, 新井雅裕, 三代俊治. "Kitami/Abashiri strain" の近縁株による札幌圏内 E 型肝炎小流行(会議録). 肝臓 (0451-4203)51 巻 Suppl.1 PageA216 (2010.04)
- (5) 小川浩司, 藤澤倫子, 佐野逸紀, 井上弘行, 山本文泰, 畑中一映, 山本義也, 片桐雅樹, 成瀬宏仁, 工藤和洋, 下山則彦, 姜貞憲, 安倍夏生, 高橋和明, 新井雅裕, 三代俊治. E 型劇症肝炎の 1 剖検例(会議録/症例報告). 道南医学会大会並びに総会プログラム・抄録集 63 回 Page43(2010.11)
- (6) 瀬尾圭, 田中晃久, 上司裕史, 矢倉道泰, 高橋和明, 三代俊治. 感染経路不明の急性 E 型肝炎の一例(会議録/症例報告). 肝臓(0451-4203) 51 巻 Suppl.3 PageA790(2010.10)
- (7) 村上昌, 齋藤吉史, 屋良昭一郎, 木戸こずえ, 伊藤真典, 平山剛, 岩本淳一, 池上正, 本多彰, 松崎靖司, 安倍夏生, 三代俊治. 当初アセトアミノフェンによる薬物性肝障害と考えられた E 型急性肝炎の 1 例(会議録/症例報告). 肝臓 (0451-4203)51 巻 Suppl.3 PageA790(2010.10)
- (8) 中野達徳, 高橋和明, 三代俊治. 分子進化学と統計学を駆使した日本固有 genotype 3 E 型肝炎ウイルスの日本への侵入時期と感染拡大状況の解析(会議録). 肝臓(0451-4203)51 巻 Suppl.2