

発生地域を参考にして岩手県内の4地域(0市、S町、旧M村、I町)を選択した。この4地域において1979年、1989年、2001年および2009年に施行された一般住民検診者(30歳以上)の保存検体から無作為に抽出した延べ1951例(男性:女性=990例:961例)(1979年:1989年:2001年:2009年=277例:273例:799例:602例)を対象とした(表1)。

2. IgG-HEV 抗体の測定方法

組み換え HEV ORF2 蛋白を用いた ELISA 法により測定(自治医科大学感染・免疫学講座に依頼)した(J Clin Microbiol 43:49-56, 2005)。

C. 研究結果

1. 各地域における経年的な IgG-HEV 抗体陽性率の推移

調査したすべての年で、I町の抗体陽性率が最も高く、0市が最も低かった。全体的に、抗体陽性率はいずれの地域においても1979年から2001年にかけて上昇し、2009年には低下していた。

男女別にみると、男性が女性より有意に陽性率が高率であった。男性ではI町の抗体陽性率が最も高く、いずれの地域も全体の推移と同様に2001年にピークを示す傾向を認めた。一方、女性でも全体では2001年をピークに陽性率が上昇していたが、各地域の年次の推移には一定の傾向を認めず、I町では2009年が最も高率であった(図1)。年齢層別にみたIgG-HEV抗体陽性率の推移

対象年齢を30歳から10歳毎の各年齢層に区切って、年度毎に比較検討した(図2)。観察を開始した1979年では「30-39歳」、「50-59歳」で抗体陽性率が高い2相性の変化を示したが、他の年度では年齢と共に抗体陽性率が高くなる傾向を認め、かつどの年齢層においても2001年の抗体陽性率が最も高かった。

次に、対象を同世代(集団)とみなして経年的に30年間のIgG-HEV抗体陽性率(抗体獲得状況)を比較すると、「1979年に40-49歳」以外

の世代は2001年が最も高い。「1979年に40-49歳」の世代は2009年が最も抗体陽性率が高いが、抗体陽性率は2001年とほぼ横ばいであった(図3)。

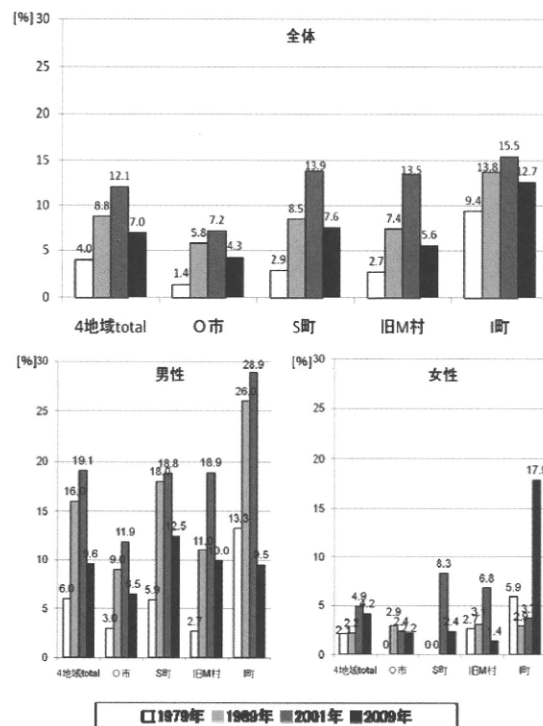


図1. 各地域における経年的なIgG-HEV抗体陽性率

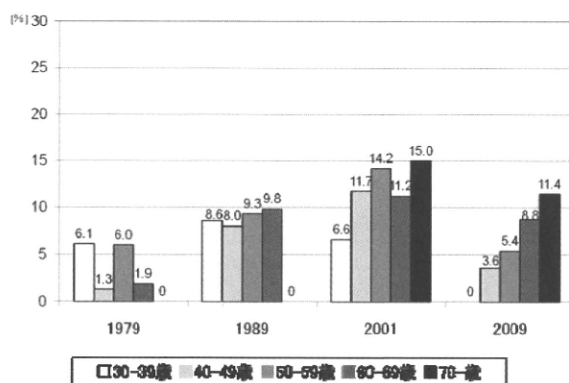


図2. 年齢層別にみた経年的IgG-HEV抗体陽性率

D. 考察

IgG-HEV 抗体陽性率に地域差がみられたが、今回の検討で抗体陽性率が最も高いI町は、畜産業の盛んな内陸の地域であり、岩手県内ではホルモンの生産地としても知られている。また、各地域における抗体陽性率は2001年をピーク

として 2009 年には低下していた。さらに、年齢層での検討でもほぼ同様の傾向を示していた。IgG-HEV 抗体陽性率が 2001 年をピークに低下傾向を認めた理由の一つとして、2001 年以降にわが国で国内感染型の E 型肝炎の存在

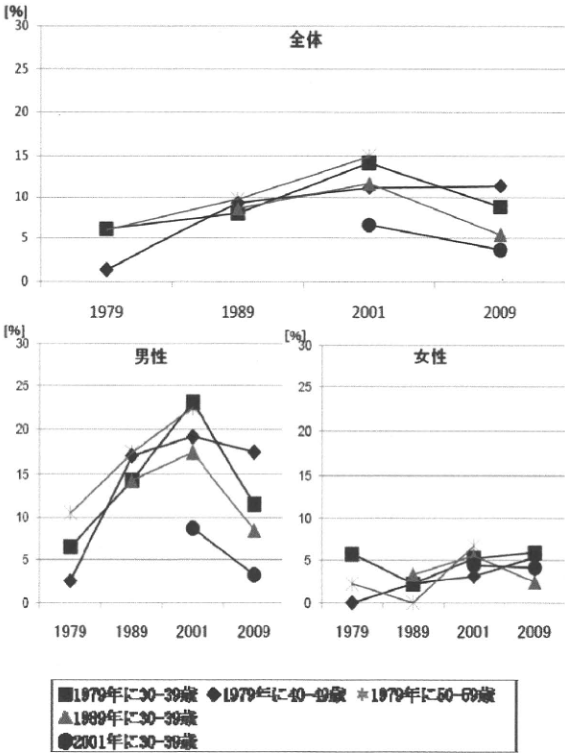


図3. 同世代別にみた経年的IgG-HEV抗体陽性率

が認知され、感染源や感染経路の調査が進み、経口感染に対する注意が周知されるようになったことが影響したことが第一に考えられる。しかし、一方で抗体獲得率が高齢になるにつれて低下する可能性も示唆されており、今後の更なる検討が必要と考えられた。性差については、食べ物の嗜好や摂取量の違いも影響しているかもしれない。また、一部の地域において女性での抗体陽性率の推移が全体と異なる傾向を示したが、その原因としてサンプリング数の問題があるかもしれない。

今回の検討結果は、岩手県における E 型肝炎の感染実態を考える上で貴重な資料となりうるものと思われ、引き続き同一地域での観察を継続したいと考えている。

E. 結論

1. 岩手県内の 4 地域における IgG-HEV 抗体の年次推移をみると、いずれの地域でも 1980 年代より IgG-HEV 抗体の陽性率は 2001 年をピークとして、その後低下傾向を示した。
2. 抗体陽性率には地域差や男女差が認められた。

F. 健康危険情報
該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 滝川康裕, 鈴木一幸. 急性肝障害. 治療 92 (Suppl 1):920-924, 2010
- 2) 滝川康裕, 鈴木一幸, 持田智. プロトロンビン時間による肝障害の評価. 日本臨床検査自動化学会誌 35(2):192-196, 2010
- 3) 宮坂昭生, 鈴木一幸. C型肝炎ウイルスの検診－わが国の実態と課題. 総合臨床 59:623-624, 2010
- 4) Ohsawa M, Kato K, Itai K, Tanno K, Fujishima Y, Konda R, Okayama A, Abe K, Suzuki K, Nakamura M, Onoda T, Kawamura K, Sakata K, Akiba T, Fujioka T. Standardized prevalence ratios for chronic hepatitis C virus infection among adult adult Japanese hemodialysis patients. J Epidemiol 20:30-39, 2010

2. 学会発表

- 1) Takikawa Y, Wang T, Suzuki K. The plasma of acute liver failure patients promotes the proliferation of mouse liver stem/progenitor cells through ATP receptor-induced JNK activation. AASLD, Nov 2, 2010, Boston, USA.
- 2) Wang T, Takikawa Y, Satoh T, Kosaka K, Yoshioka Y, Tatemichi Y, Suzuki K. Carnosic acid protects against hepatic steatosis both *in vivo* and *in vitro*. 9th Japanese Society of Hepatology Single Topic Conference, Nov. 18, 2010, Tokyo.

- 3) Ting Wang, Yasuhiro Takikawa, Takumi Satoh, Yoshichika Yoshioka, Kunio Kosaka, Yoshinori Tatemichi, Kazuyuki Suzuki. Carnosic acid protects against obesity associated with liver steatosis in *ob/ob* mice. APASL Beijing, China, March 25-27, 2010.
 - 4) Ichiro Kumagai, Kojiro Kataoka, Yukiho Kasai, Akio Miyasaka, Ryujin Endo, Yasuhiro Takikawa, Kazuyuki Suzuki, and Shide Lin. Differences among genotype, subgenotype, and mutation of precore and corepromoter regions of hepatitis B virus in patients with self-limiting acute hepatitis both in Japan and China
 - 5) 滝川康裕、王 挺、柿坂啓介、小野寺美緒、鈴木一幸. 肝幹/前駆細胞の増殖とシグナル伝達に対する劇症肝炎血漿の影響に関する検討. 第 17 回肝細胞研究会 シンポジウム「肝幹細胞と肝再生」 2010 年 6 月 19 日, 秋田市.
 - 6) 片岡晃二郎、熊谷一郎、吉田雄一、小野寺美緒、柿坂啓介、葛西幸穂、宮本康弘、宮坂昭生、滝川康裕、鈴木一幸. 急性肝障害における HBV 肝炎の実態. 第 46 回日本肝臓学会総会 山形, 2010 年 5 月 26 日.
 - 7) 熊谷一郎、葛西幸穂、宮坂昭生、遠藤龍人、滝川康裕、鈴木一幸. B 型急性肝炎・重症肝炎の治療に核酸アナログは必要か? : 遺伝子型および遺伝子変異の有無との検討を含めて第 46 回日本肝臓学会総会 山形, 2010 年 5 月 28 日.
 - 8) 小野寺誠、菊池哲、藤野靖久、井上義博、遠藤重厚、滝川康裕、鈴木一幸. 肝炎以外の急性肝不全の実態と予後 (中毒). 第 36 回日本急性肝不全研究会 ワークショップ 1 「肝炎以外の急性肝不全」山形, 2010 年 5 月 26 日.
 - 9) 滝川康裕、鈴木一幸、持田 智、中山伸朗、桶谷 真. 肝炎以外の急性肝不全に関する全国集計. 第 36 回日本急性肝不全研究会 ワークショップ 1 「肝炎以外の急性肝不全」山形, 2010 年 5 月 26 日.
 - 10) 柿坂啓介、滝川康裕、吉田雄一、鈴木一幸. 生体肝移植ドナー肝切除後の血液検査による肝機能の経時的検討. 第 46 回日本肝臓学会総会 山形, 2010 年 5 月 27 日.
 - 11) 熊谷一郎、葛西幸穂、宮坂昭生、遠藤龍人、滝川康裕、鈴木一幸. 初感染 B 型急性肝炎に対する核酸アナログの使用適応についての検討. 第 14 回日本肝臓学会大会, 横浜, 2010 年 10 月 14 日.
 - 12) 吉田雄一、及川寛太、滝川康裕、鈴木一幸、他. 4 年後に非代償性肝硬変となり生体部分肝移植を施行した急性肝炎重症型の 1 例. 日本肝臓学会東部会, 東京, 2010 年 12 月 2 日.
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
- 特許取得: 該当なし
- 実用新案登録: 該当なし
- その他: 該当なし

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

愛知県におけるイノシシ・シカの HEV 感染について

研究協力者 加藤秀章 名古屋市立大学大学院医学研究科 講師

研究要旨： 愛知県には、本州の他の地域と異なり、遺伝子型 4 型の HEV が分布するとの報告がなされている。本研究では、愛知県に分布する HEV について遺伝子学的な検討を行いその特徴について検討を行った。愛知県にて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検出された HEV とクラスターを形成した。また、愛知・静岡株は中国上海株と同一クラスターを形成した。愛知県には本州の他の地域と異なり、遺伝子型 4 型の HEV が分布し、愛知・静岡株は中国上海株と近縁関係にあった。なぜ HEV がこの地域に本州の他の地域と異なる遺伝子型分布をするのか検討が必要である。

〈共同研究者〉

高橋 和明（東芝病院研究部）
安倍 夏生（東芝病院研究部）
新井 雅裕（東芝病院研究部）

より捕獲されたイノシシ・シカより行う。イノシシ・シカの摂食についての風評被害を生じさせぬよう研究の施行、データの扱いには十分な配慮をする。

A. 研究目的

わが国における E 型肝炎ウイルス(HEV)の遺伝子型分布は、本州では主に 3 型が分布し、4 型は多くは北海道にみられる。しかしながら、愛知県と静岡県には、本州の他の地域と異なり遺伝子型 4 型の HEV が分布することが報告されているが、その詳細については不明である。本研究の目的は、愛知県に分布する HEV について遺伝子学的な検討を行い、その分布の状況や感染の起源ならびに感染経路について検討を行うことである。

B. 研究方法

2009 年 10 月から 2010 年 3 月までの間に、愛知県山間部において捕獲されたイノシシ・シカから血液を採取し、採取された血液において、ORF1 領域に設定したプライマーを用いて RT-PCR 法にて HEV RNA の検出を行った。増幅された DNA についてダイレクトシーケンス法にて遺伝子配列を決定し、データベースに登録されている他の HEV の遺伝子配列とともに分子系統樹を作成した。

倫理面への配慮：血液の採取は、有害鳥獣駆除に

C. 研究結果

調査期間中に捕獲された 173 頭（イノシシ 154 頭、シカ 19 頭）より血液を採取した。年齢はイノシシ 0.5-6 歳、シカ 0.5-5 歳であった。イノシシの 19 例（12.3%）に HEV RNA が検出され、シカでは陽性例は認めなかった。イノシシの体重別 HEV 陽性率の検討では 10kg 未満 0/3(0%)、10-20kg 7/45(15.6%)、20-30kg 8/29(27.6%)、30-40kg 0/14(0%)、40-50kg 1/19(5.3%)、50-60kg 1/19(5.3%)、60-70kg 0/5(0%)、>70kg 2/19(10.5%)、不明 0/1(0%)であった。年齢別 HEV 陽性率の検討では 1 歳未満 9/21(42.9%)、1-2 歳 4/44(9.1%)、2-3 歳 3/33(9.1%)、3-4 歳 1/33(3%)、4-5 歳 1/14(7.1%)、>5 歳 1/6(16.7%)、不明 0/3(0%)であった。遺伝子配列の決定できた 16 例についてデータベースに登録のある HEV 株とともに分子系統樹を作成した（図 1）。今回新たに検出された 16 株はすべて遺伝子型 4 型に分類され、過去に愛知県および静岡県で分離された HEV とクラスターを形成した。愛知・静岡株よりなるクラスターは、過去に北海道や本州の他の地域から分離され報告された HEV 株とは独立したものであった。また、

愛知・静岡株は中国上海から分離された HEV 株と同一のクラスターを形成した。愛知・静岡株よりなるクラスターを詳細に検討すると、クラスターはさらにいくつかのクラスターに分けられ、それらクラスターに属する HEV は地理的に近い場所で捕獲されたイノシシから分離されたものであった (図 2)。

D. 考察

今回、愛知県に生息するイノシシから検出された HEV は、全て遺伝子型 4 型に分類され、過去に愛知県および静岡県より報告された HEV が全て 4 型であることと一致した。愛知県および静岡県にはこの地域に土着する遺伝子型 4 型の HEV が分布することが示唆された。また、分離された HEV 株と過去の報告株から形成される遺伝子学的な近縁関係の HEV 株の集団には、中国上海から分離された HEV 株が含まれ、愛知・静岡株と中国上海株との関連が示唆された。

HEV の検出されたイノシシは 30kg 以下の 2 歳未満の小型のものが多く、このことは、多くのイノ

シシが生後 2 年以内に HEV の感染を生じていることを示唆しているものと考えられた。

今回の検討では、隣接する静岡県の天竜地区で検出された遺伝子型 5 型は検出されなかった。

E. 結論

愛知県に生息するイノシシの検討では、HEV は 2 歳以下、体重 30kg 未満の小型のイノシシからの検出率が高い傾向であった。検出された HEV は全て 4 型で、過去に愛知県および静岡県から報告された HEV 株とクラスターを形成し、また中国上海株とも近隣関係にあった。今後感染経路などさらなる検討が必要である。

F. 研究発表

なし

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

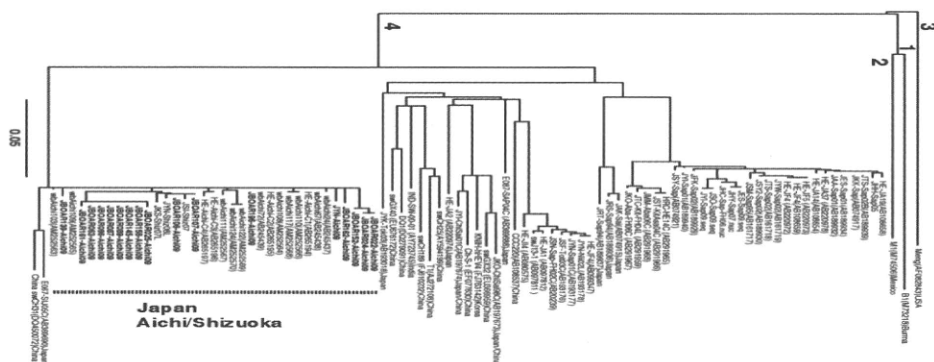


図1. Phylogenetic tree(ORF1)

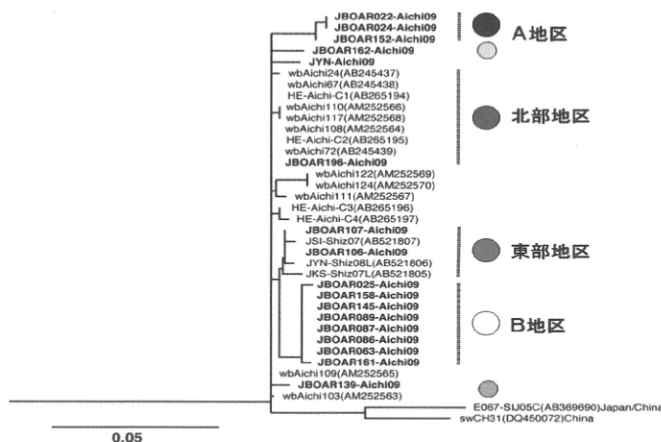


図2 愛知・静岡株の分子系統樹

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

兵庫県における HEV 感染実態調査

研究協力者 北嶋直人 市立加西病院 消化器内科

研究要旨：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。

〈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

E 型肝炎ウイルス（HEV）における国内固有株の存在が見いだされ、E 型肝炎が単なる輸入感染症ではないと認識されてから早 10 年が経過した。しかしながら、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。

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対象として感染実態調査を行った。

B. 研究方法

- 1) 期間：平成 20 年 4 月～平成 23 年 2 月。
- 2) 対象：兵庫県内の 32 病院において、成因不明の急性肝炎症例を登録して臨床的検討を行った。
- 3) 方法：血清 2-5A 合成酵素活性（2-5AS）は、SRL にて測定した。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。E 型肝炎と診断された症例に対して、疫学的検討を加えた。

倫理面への配慮：神戸大学大学院医学研究科医学倫理委員会の承認を得て実施し、血清の採取に際して文書で同意を得ている。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はなく、人権上の問題は生じない。

C. 研究結果

1) 平成 20 年 4 月から平成 23 年 2 月までの 2 年 11 ヶ月間に、成因不明の急性肝炎症例 105 例が登録された。その臨床像（表 1）は、年齢中央値 54 歳、男女比は 47：58 と女性がやや優位であった。肝障害の程度は軽度から高度まで様々な症例が集まり、そのうち PT40%以下の重症例は 9 例であった。2-5A 合成酵素活性が基準値の 100 pmol/dl を超えている症例を、102 例中 41 例（40.2%）に認めた。

2) 105 症例のうち 2 例（1.9%）が E 型急性肝炎と診断された。2 例とも、保存的治療のみで軽快した。

1 例目は 82 歳の女性で、唯一の国内感染例であった。HEV 関連の採血が第 36 病日と回復期に実施されたためか、HEVRNA 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。詳細な問診でも豚・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、感染経路を特定できなかった。

2 例目は 46 歳の男性で、中国からの輸入感染例であった（Genotype 4：中国株）。2 年程前から中国・上海駐在で、魚介類は普段からよく食べていた。発症 2 週間前に広州において、鹿や猪の肉を食べたことが確認されている。

3) IgG 抗体単独陽性例は 8 例（7.7%）であった。年齢中央値は 61 歳と高齢者に多い傾向があったが、男女比は 4：4 と差がなかった。

4) 調査可能であった 72 例の最終診断は、疑診例を含む自己免疫性肝炎 14 例（19.4%）、ウイルス性肝炎 14 例（19.4%：A 型 3 例、B 型 3 例、C 型 3 例）

など)、薬剤性肝炎 8 例 (11.1%)、アルコール性肝障害 6 例 (8.3%) などであったが、最終診断でも成因不明の症例が 27 例 (37.5%) にみられた。成因不明の症例の中に、2-5AS が 500 を超える例を 2 例認めた。

D. 考察

兵庫県における成因不明の急性肝炎症例の中で E 型肝炎は 2 例 (1.9%) と稀であり、しかもそのうち 1 例は輸入感染例であった。以前から高率な感染率が報告されている北海道とは対照的であり、国立病院機構による全国の急性肝炎継続調査での 5.6%と比較しても低率であった。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平成 15 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 7.7%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。健診受診者を対象とした全国調査での 5.3%と同等であった。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ことが明らかとなっている。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。

最終診断においても、E 型肝炎を含めた既知の病因が否定された成因不明例が 37.5%にみられた。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、今後のウイルス学的な検索が期待される。

E. 結論

兵庫県における成因不明の急性肝炎症例の中で、E 型肝炎が占める割合は極めて低率であった。

F. 研究発表：

北嶋直人, 瀬尾靖, 矢野嘉彦, 林祥剛, 安倍夏生, 新井雅裕, 高橋和明, 三代俊治. 平成 21 年度 地域医療における疾病並びに医療等に関する研究調査 兵庫県における HEV 感染実態調査(第二報)(原著論文/抄録あり). 神録会学術誌 26 : 17-20, 2010

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請：なし

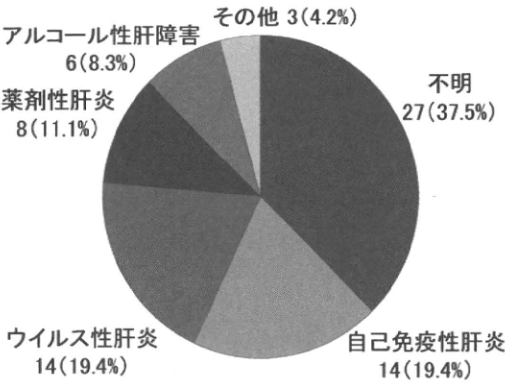
2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし

表1:成因不明急性肝炎 105 例の臨床像

年齢 (中央値)	54	9-86
性別 (男/女)	47/58	
AST (IU/l)	1,636	87-32,332
ALT (IU/l)	1,554	66-14,766
T-Bil (mg/dl)	5.2	0.4-35.0
PT (%)	76	7-116
2-5AS (pmol/dl)	164	20-4,570

図1:成因不明急性肝炎 72 例の最終診断



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

野生イノシシから分離された新規 HEV 株の解析

研究協力者 高橋雅春 自治医科大学感染・免疫学講座ウイルス学部門 講師
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： 岡山県真庭市で 2006 年 1 月に捕獲された野生のイノシシから、従来報告されている遺伝子型 1～4 型のいずれにも属さない新しい遺伝子型の HEV であると考えられる wbJOY_06 株を分離し、全塩基配列の解析を行った。本株は poly(A)を除き、全長 7,246 塩基長であり、遺伝子型 1～4 型の HEV 株との塩基配列の一致率は最大で 77.4%に過ぎなかった。また、分子系統樹上でも 1～4 型のクラスターとは独立して存在しており、新規の遺伝子型に分類されることが明らかになった。

A. 研究目的

我が国の野生のイノシシにおける E 型肝炎ウイルス（HEV）感染状況および HEV ゲノムの多様性を明らかにするための分子疫学的調査を行う中で、従来報告されている遺伝子型 1～4 型のいずれにも属さない新しい遺伝子型であると考えられる HEV 株を分離し、その全塩基配列を決定し、解析を行った。

B. 研究方法

1) 調査対象

全国で地域医療に携わっている自治医科大学卒業生医師のネットワークなどを通じて、2003～2010 年の 8 年間に 25 府県から野生のイノシシ 578 頭の検体（血清 507 検体および肝臓 552 検体）を蒐集し、本研究に供した。

2) HEV マーカーの測定方法

IgG クラス HEV 抗体は組換え HEV ORF2 タンパク質を用いた酵素免疫測定法により測定した（J Gen Virol 86:1807-1813, 2005）。HEV RNA は ORF2 領域をターゲットにした RT-PCR（ORF2-457）法により検出し、この領域の塩基配列により遺伝子型を決定した（J Clin Microbiol 40:3209-3218, 2002）。

3) 全塩基配列の決定

HEV ゲノムの両末端を除く約 7 kb はオーバーラップする 12 の断片に分けて塩基配列を決定した。5' 末端は RLM-RACE 法、3' 末端は RACE 法により塩基配列を決定した。

倫理面への配慮：本研究はヒト由来の検体を使用

していないため人権上の問題は生じない。

C. 研究結果および考察

血清が採取されたイノシシ 507 頭中 41 頭（8.1%）が IgG クラス HEV 抗体陽性率で、HEV の感染既往が認められた。また、全 578 頭中 19 頭（3.3%）で HEV RNA が陽性であった。この 19 頭中、14 頭は遺伝子型 3 型、4 頭は 4 型の HEV に感染していたが、岡山県で 2006 年 1 月に捕獲された 1 頭から分離された HEV 株は、ORF2 領域の部分塩基配列の解析により、従来報告されている 1～4 型のいずれにも属さない新しい遺伝子型の HEV である可能性が示唆され、これを wbJOY_06 株と命名し、全塩基配列を決定した（accession no. AB602441）。

wbJOY_06 株は poly(A)を除き、全長 7,246 塩基長で、5' 末端に Cap と 25 塩基長の非翻訳領域および 3' 末端に 73 塩基長の非翻訳領域があり、open reading frame 1（ORF1）、ORF2 および ORF3 はそれぞれ 1,709 アミノ酸（aa）（nt 26-5152）、660 aa（nt 5194-7173）および 112 aa（nt 5186-5521）をコードしていた。

これまでに全長塩基配列が報告されている遺伝子型 1～4 型の HEV 145 株と wbJOY_06 株の塩基配列の一致率は 1 型 73.2～74.3%（n=20）、2 型 72.9%（n=1）、3 型 72.3～74.8%（n=66）および 4 型 76.3～77.4%（n=58）で、いずれも低値であった。さらに rat HEV（n=2）および avian HEV（n=5）との一致率はそれぞれ 53.8～54.0%および 46.9～47.5%に過ぎなかった。これらの結果は wbJOY_06 株が遺伝子型 1～4 型の HEV 株、rat HEV および avian HEV とは明らかに区別されるものであることを示して

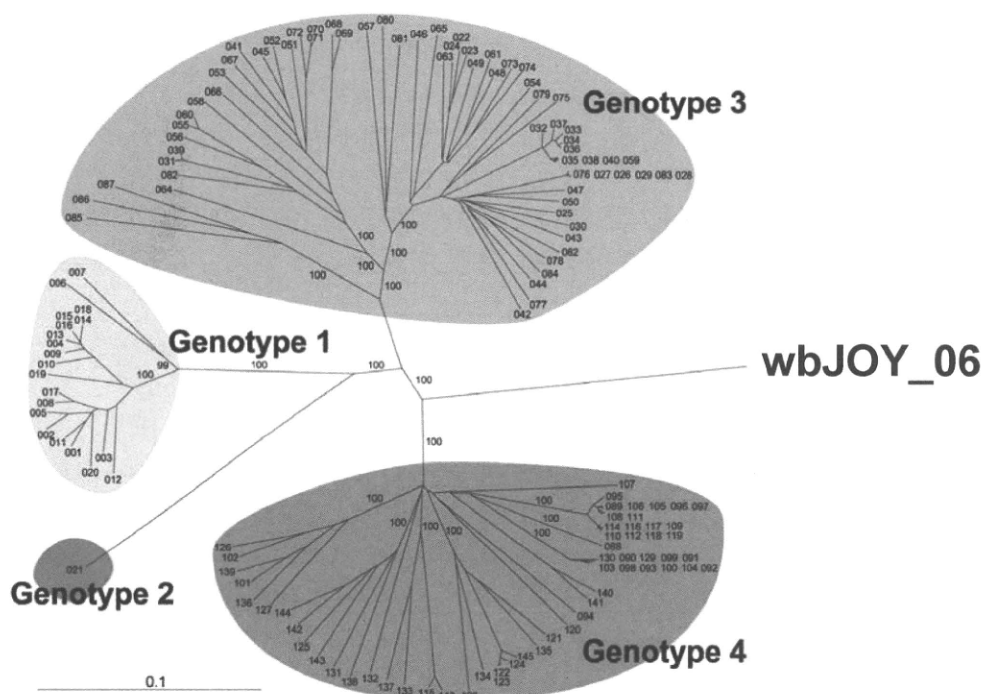


図 1. HEV の全塩基配列に基づく分子系統樹

いる。また、全長塩基配列に基づいて neighbor-joining 法により作成した分子系統樹において、wbJOY_06 株は遺伝子型 1~4 型のクラスターとは独立して位置し、新規の遺伝子型に分類されることが明らかになった (図 1)。さらに、maximum-likelihood 法による分子系統樹でも wbJOY_06 株は遺伝子型 1~4 型に属さないことが確認された。

Simplot analysis 法により、wbJOY_06 株が遺伝子型 1~4 型の HEV 株の recombinant 株である可能性は否定された。

最近、新規遺伝子型 (5 型) の HEV として、静岡県 of イノシシから分離された JBOAR-Shiz09 株に関する論文が雑誌「肝臓」の 2010 年 9 月号に発表された [肝臓 51 (9): 536-538, 2010]。当初公開された ORF1 領域の 326 塩基長 (accession no. AB573435) の配列において、JBOAR-Shiz09 株と我々の wbJOY_06 株との一致率は 79.4% であったが、本報告書の記載中 (2011 年 2 月中旬) に全長塩基配列が DNA データバンクに公開された (accession no. は AB573435 のまま変更なし)。全長塩基配列での JBOAR-Shiz09 株と wbJOY_06 株との一致率は 78.6% に過ぎないことから、両者は異なる遺伝子型、即ちそれぞれ 5 型および 6 型に分類されうると想定されるが、最終的な判断は国際ウイルス命名委員会の判断に委ねられるべきと考える。

D. 結論

我々は従来報告されている遺伝子型 1~4 型の HEV 株との全長塩基配列の一致率が 72.3~77.4% に過ぎない wbJOY_06 株を日本の野生イノシシから分離した。wbJOY_06 株は分子系統樹上で 1~4 型のクラスターに属さないこと、1~4 型の HEV 株の recombinant 株ではないことが示されたことより、これまでに未分類の新規遺伝子型の HEV 株であることが明らかになった。wbJOY_06 株が種の barrier を越えてヒトや他の動物に感染するか否かは不明であり、今後の研究により wbJOY_06 株の宿主域を明らかにする必要がある。HEV はこれまでに想定されていた以上に多様性に富み、さらに新たな遺伝子型に分類されうる未同定の HEV 株が野生のイノシシのみならず、ヒトや他の動物にも感染している可能性が考えられ、その解明のため、継続的な調査・研究が重要である。

E. 研究発表

1. Takahashi M, Nishizawa T, Sato H, Sato Y, Jirintai, Nagashima S, Okamoto H: Analysis of the full-length genome of a hepatitis E virus isolate from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype. *J Gen Virol* 92: 902-908, 2011.
2. Sato Y, Sato H, Naka K, Furuya S, Tsukiji H, Kitagawa K, Sonoda Y, Usui T, Sakamoto H, Yoshino S, Shimizu Y,

Takahashi M, Nagashima S, Jirintai, Nishizawa T, Okamoto H: A nationwide survey of hepatitis E virus (HEV) infection among wild boars in Japan: identification of boar HEV strains of 3, 4, and unrecognized genotypes. *Arch Virol* 2011, in press.

3. 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: 1112-1125, 2010.
4. Jinshan, Jirintai, Manglai D, Takahashi M, Nagashima S, Okamoto H: Molecular and serological survey of the hepatitis E virus infection among domestic pigs in Inner Mongolia, China. *Arch Virol* 155: 1217-1226, 2010.
5. 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: 269-278, 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

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

不活化 E 型肝炎ワクチンの可能性と問題点

研究分担者 李天成 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官

研究要旨：これまでに我々は遺伝子型 1、3 と 4 (Genotype 1, 3, 4; G1, G3, G4) HEV をヒト肝癌細胞 PLC/PRF/5 に接種し、経時的に培養上清中の HEV RNA, HEV 抗原を RT-PCR, ELISA 法にて確認し、HEV が増殖できる培養系を樹立した。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上で G3HEV を不活化してワクチンとして用いられる可能性を検討した。本年度、我々は細胞培養で増殖した三つ異なる遺伝子型の G1, G3, G4 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。

共同研究者

網 康志 須崎 百合子（国立感染症研究所）
恒光 裕（動物衛生研究所）

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。これまでに我々は遺伝子型 1、3 と 4 (Genotype 1, 3, 4; G1, G3, G4) HEV をヒト肝癌細胞 PLC/PRF/5 に接種し、経時的に培養上清

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上で G3HEV を不活化してワクチンとして用いられる可能性を検討した。本年度、我々は細胞培養で増殖した三つ異なる遺伝子型の 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。

B. 研究方法

培養細胞で増殖した G1, G3, G4 HEV を 65℃10 分間熱処理したあと、それぞれ 5 匹ラット、三羽ウサギに大腿筋肉に三回（0, 30, 45 日目）接種する。接種後、ウサギに対して経時的に採血する。ラットは三回接種後の一週間後に採血する。ELISA 法で血清中の HEV に対する抗体を測定する。さらに免疫血清の中和活性を測定する。中和活性の測定：免疫血清を HEV と 6 ウェールプレート上で十分混合して、37℃一時間反応

させた後、4℃一晩置く。翌日、PLC/PRF/5細胞を 5×10^5 /well 蒔き、36℃で培養する。その後、3日おきに培地を交換する。経時的に培養上清中の抗原を測定し、ウイルスの増殖の有無によって免疫血清の中和活性を評価する。

培養上清から HEV 抗原の精製およびサルへの接種：HEV が感染した細胞を大量に培養し、培養上清を集めて超遠心法により濃縮した後、塩化セシウムあるいは庶糖密度勾配遠心法によって精製する。精製したウイルスをカニクイザルに接種し、抗体の誘導および感染防御を観察する。

倫理面への配慮：本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

免疫効果：熱処理による不活化した G1, G3, G4 HEV をウサギ、ラットに接種して血中に抗 HEV IgG 抗体がともに誘導された。G3, G4 HEV と比べ、G1 HEV の抗体誘導能が有意に低かったが、誘導された抗体は HEV の PLC/PRF/5 細胞への感染を阻止することができた。この結果は、不活化 HEV によって誘導された抗体が中和活性を持つことが示唆された。

培養上清に分泌したウイルス抗原を超遠心法で濃縮を試みたが、濃縮効率は低かった。遠心前に比べ遠心後の上清中の抗原量がほとんど変わらなく、遠心法によるウイルスの濃縮が困難であった。十分な精製したウイルスが確保できなかったのでサルへの接種および感染防御実験を実施しなかった。

D. 考察

これまでに HEV が増殖可能な培養細胞系が樹立されていないため、E 型肝炎ワクチンの研究は主にバクテリアや組換えバキュロウイルス発現システムなどを用いた構造蛋白発現によ

って行われてきた。ネティブなウイルスを培養細胞系により培養できることにより不活化ワクチンの研究が可能となり、今回の研究結果は不活化ワクチンとして応用できる可能性が示された。ネティブなウイルスの使用によりもっと有効なワクチンの開発が期待できる。ただし、不活化ワクチンとして応用する場合いくつかの問題点が解決しなければならないことも分かった。まず、免疫効果が遺伝子型によって異なることである。どの遺伝子型の株を使うか検討する必要がある。また、大量精製した抗原を獲得するにはウイルスの精製法、あるいは不活化条件をさらに検討する必要がある。

今後、大量培養や精製条件など検討した上サルを用いて感染防御をさらに検討する必要がある。

E. 結論

本年度の研究では培養細胞で増殖した 3 つの遺伝子型 HEV を不活化ワクチンとして利用する可能性が示唆されたが、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。

F. 研究発表

1. 学会発表

1) 李天成、方苓、網康至、須崎百合子、武田直和、脇田隆字。不活化 E 型肝炎ワクチンの検討。日本ウイルス学会、第 58 回学術集会 2010 年 11 月 徳島

2) 石井 孝司、吉崎 佐矢香、杉山 奈央、加藤 孝宣、李 天成、武田 直和、脇田 隆字 E 型肝炎ウイルスの感染性を規定する宿主側因子の探索第 58 回日本ウイルス学会学術集会。2010 年 11 月 徳島

3) Tian-cheng Li, Lanjun Liu, Sayaka Yoshizaki, Koji Ishii, Tatsuo Miyamura, Naokazu Takeda, Takaji Wakita. The stability and inactivation of Hepatitis E

virus grows in cell culture. The 9th international symposium on positive strand RNA viruses. 2010 May 17-23. Atlant.

4) Tian-Cheng Li, Koji Ishii, Naokazu Takeda, and Takaji Wakita. The stability and inactivation of Hepatitis E virus grown in cell culture. The 21th Conference of the Asian Pacific Association for the study of the liver. 2011. February 17-20. Bangkok.

5) Tian-Cheng Li, Shili Song QiFa Yang, Koji Ishii, Naokazu Takeda, and Takaji Wakita. A cell culture system for hepatitis E virus. The 8th China-Japan International Conference of Virology. 2010. July 4-7. Harbing

2. 論文発表

1) Xing L, Wang JC, Tian-Cheng Li, Yasutomi Y, Lara J, Khudyakov Y, Schofield D, Emerson SU, Purcell RH, Takeda N, Miyamura T, Cheng RH. Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. J Virol 85(2): 1117-1124, 2011

2) Tian-Cheng Li, Xing L, Mayazaki N, Simon MN, Wall JS, Moore M, Wang CY, Takeda N, Wakita T, Miyamura T, Cheng RH. Structure of hepatitis E virion-sized particle reveals an RNA-dependent viral assembly pathway. J Biol Chem 285(43):33175-33183, 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

HEV の放出機構の解析

研究協力者 長嶋茂雄 自治医科大学感染・免疫学講座ウイルス学部門 講師
 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： HEV はノンエンベロープウイルスでありながら、培養細胞および血清由来の HEV 粒子の表面には、細胞由来の膜成分および ORF3 蛋白質が存在することが明らかにしてきた。本研究では、ORF3 蛋白質に認められる PSAP モチーフにアミノ酸置換を導入し、ウイルス粒子の形成ならびに放出への影響を解析した。PSAP モチーフを持たない変異ウイルスの粒子表面には、細胞由来の膜成分および ORF3 蛋白質が存在していないことが明らかとなった。また、この変異ウイルスは、培養細胞からの放出が阻害されたこと、さらに変異型 ORF3 蛋白質は、宿主蛋白質である Tsg101 との結合能を欠いていたことから、このモチーフ配列がエンベロープウイルスの出芽に関与している L-ドメインとしての機能を有している可能性が示唆された。

A. 研究目的

E 型肝炎ウイルス (HEV) はノンエンベロープウイルスとされているが、培養細胞から放出されたウイルス粒子の表面には細胞由来の膜成分および ORF3 蛋白質が存在している。また、血清中のウイルス粒子においても同様の結果が得られ、HEV は生体内で 2 つの異なる粒子形態をとることが示されている。これまでの解析により、ORF3 蛋白質は感染細胞からのウイルス粒子の放出に重要であり、粒子表面の膜形成は ORF3 蛋白質の発現に依存していることが明らかとなった。既知の HEV 野生株間で ORF3 蛋白質のアミノ酸配列を比較した所、エンベロープウイルスの出芽に重要な L-ドメインの 1 つである PSAP モチーフが HEV の ORF3 蛋白質にも存在し、すべての遺伝子型で保存されていた。また、遺伝子型 3 型のいくつかの株では、2 つの PSAP 配列が存在した。そこで、HEV 粒子産生における PSAP 配列の機能解析を目的として本研究を行った。

B. 研究方法

JE03-1760F 株 (遺伝子型 3 型) 由来の感染性 cDNA クローン (pJE03-1760F/wt) の ORF3 蛋白質に存在する 2 つの PSAP モチーフに、① 1 つ目の PSAP (aa 86-89) のみを置換 (mutPLAP/PSAP)、② 2 つ目の PSAP (aa 95-98) のみを置換 (mutLSAP,

mutPSAL, mutLSAL)、③ 両方の PSAP を置換 (mutPLAP/LSAL) するような部位特異的変異を導入した (図 1)。これらの変異体の RNA transcripts を PLC/PRF/5 細胞にトランスフェクト、または産生されたウイルスを PLC/PRF/5 細胞に接種し、培養上清および細胞内の HEV RNA titer をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。また、産生されたウイルス粒子をショ糖密度勾配遠心ならびに immunocapture RT-PCR に供した。ウイルス蛋白質の検出は、ウェスタンブロット法または蛍光抗体法により、蛋白質間の相互作用は共免疫沈降法により解析した。

pJE03-1760F/wt

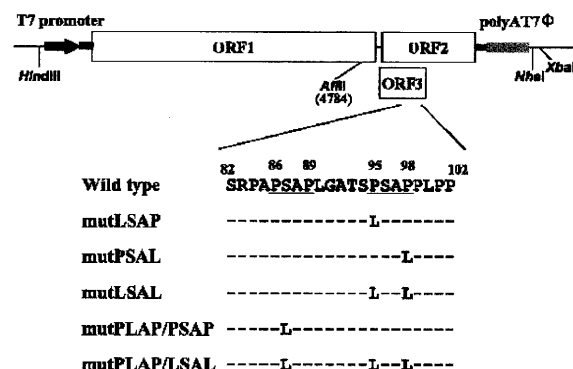


図 1 感染性 cDNA クローン (pJE03-1760F/wt) の ORF3 蛋白質に存在する 2 つの PSAP モチーフに導入したアミノ酸変異とその変異体

倫理面への配慮: 感染性 cDNA クローンが由来する糞便検体の採取に際して、インフォームドコンセントが得られている。そして、検体提供者は匿名化されているため、個人のプライバシーを侵害することはなく、人権上の問題は生じない。

C. 研究結果

1. PSAP 配列に導入したアミノ酸置換がウイルス産生に与える影響

遺伝子型 3 型である JE03-1760F 株由来の感染性 cDNA クローンの ORF3 蛋白質に認められる 2 つの PSAP 配列にアミノ酸置換を導入し、どちらか一方、または両方の配列を置換した 5 つの変異体を作製した (図 1)。これらの変異 RNA を PLC/PRF/5 細胞にトランスフェクトし、培養上清中のウイルス RNA をリアルタイム RT-PCR 法により定量した。どちらか一方の PSAP 配列を置換した 4 つの変異体 (mut $\underline{\text{L}}$ SAP, mut $\underline{\text{P}}$ SAL, mut $\underline{\text{L}}$ SAL, mut $\underline{\text{PL}}$ AP/PSAP) は、すべて野生型と同じ効率で培養上清中にウイルスを産生した。一方、両方の PSAP を置換した変異体 (mut $\underline{\text{PL}}$ AP/ $\underline{\text{L}}$ SAL) では、培養上清中へのウイルス粒子の産生量が Δ ORF3 (ウイルスの放出が阻害されている ORF3 蛋白質欠失変異体) と同程度まで減少した。

2. 変異ウイルス粒子の浮上密度の解析

培養上清中に産生された変異ウイルス粒子を用いて、ショ糖密度勾配遠心により浮上密度を測定した。これまでの解析により、膜のある野生型 (培養上清および血清中の粒子) は比重 1.16 g/cm^3 を示し、膜のない Δ ORF3 (糞便中の粒子) では 1.27 g/cm^3 を示すことが分かっている。どちらか一方の PSAP モチーフを置換した変異体はすべて野生型と同じ 1.16 g/cm^3 にピークが認められた。一方、両方の PSAP 配列を置換した mut $\underline{\text{PL}}$ AP/ $\underline{\text{L}}$ SAL では、膜に覆われていない Δ ORF3 と同じ 1.27 g/cm^3 にピークを示した。

このことから、mut $\underline{\text{PL}}$ AP/ $\underline{\text{L}}$ SAL RNA から産生されたウイルス粒子は膜に覆われていない可能性が示唆された。

3. mut $\underline{\text{PL}}$ AP/ $\underline{\text{L}}$ SAL RNA から産生されたウイルス粒子の抗原性の解析

培養上清に産生されたウイルス粒子を用いてウェスタンブロット法により、ORF2 および ORF3 蛋白質の検出を試みた。野生型では ORF2, ORF3 蛋白質ともに検出されたが、mut $\underline{\text{PL}}$ AP/ $\underline{\text{L}}$ SAL では ORF2 蛋白質は検出されたが、ORF3 蛋白質は検出されなかった。

そこで、immunocapture RT-PCR 法により、粒子

表面の抗原性について解析を行った。同様の方法で、デオキシコール酸ナトリウム処理による抗原性の変化についても検討を行った。膜に覆われている野生型では、ORF2 および ORF3 蛋白質に対する抗体で粒子を捕捉できないのに対し、mut $\underline{\text{PL}}$ AP/ $\underline{\text{L}}$ SAL では ORF2 に対する抗体で高い捕捉が認められた。一方、ORF3 に対する抗体では、デオキシコール酸ナトリウム処理の有無に関わらず、捕捉されなかった。これらの結果から、この変異ウイルス粒子の表面には、細胞由来の膜成分および ORF3 蛋白質が存在していないことが明らかとなった。

一方、ウェスタンブロット法、免疫蛍光抗体法による解析の結果、ORF3 蛋白質の発現は野生型と変異体とで違いは認められなかった。このことから、mut $\underline{\text{PL}}$ AP/ $\underline{\text{L}}$ SAL では PSAP モチーフを置換したことにより、膜に覆われていないウイルス粒子が産生されたと考えられた。

4. PSAP モチーフを持たない変異ウイルスの培養細胞での増殖能の解析

培養上清中の変異ウイルスを PLC/PRF/5 細胞に接種し、その増殖能を解析した。mut $\underline{\text{PL}}$ AP/ $\underline{\text{L}}$ SAL RNA から産生された変異ウイルスは、野生型と同等の効率的な細胞内への侵入および RNA 複製が認められた。しかしながら、培養上清においては、野生型で接種後 8 日目からウイルス RNA が検出され、その後、RNA titer の上昇が認められたのに対し、mut $\underline{\text{PL}}$ AP/ $\underline{\text{L}}$ SAL では、12 日目でもウイルス RNA がほとんど検出されなかった。以上の結果から、mut $\underline{\text{PL}}$ AP/ $\underline{\text{L}}$ SAL では、ウイルス粒子の放出が阻害されていることが明らかとなった。

5. ORF3 蛋白質と Tsg101 との相互作用の解析

L-ドメインである PSAP モチーフは、細胞内の tumor susceptibility gene 101 (Tsg101) と結合することが報告されている。この点について野生型および PSAP モチーフを持たない変異型 ORF3 蛋白質を細胞内に発現させ、相互作用の解析を行った。Tsg101 に特異的な抗体を用いて共免疫沈降を行った結果、野生型の ORF3 蛋白質は Tsg101 と共沈したが、PSAP モチーフを持たない変異型 ORF3 蛋白質では共沈が認められなかった。以上の結果から、ORF3 蛋白質は Tsg101 との結合能を有し、その結合には PSAP モチーフが重要であることが示唆された。

D. 考察

HEV の細胞培養系および感染性 cDNA クローン

を用いたリバースジェネティクスによる解析により、細胞から放出されたウイルス粒子の表面には細胞由来の膜成分が存在し、肝細胞から胆管に放出され、腸管に排出されるまでに、生体内の胆汁や膵液中の酵素により分解されるというユニークな動態を示すことが明らかとなってきた。

本研究により、感染細胞からの放出に関わるウイルス側のモチーフとして、ORF3 蛋白質に認められる PSAP モチーフが重要であることが明らかとなった。また、宿主側の因子として Tsg101 の関与が示唆された。この宿主蛋白質は multivesicular body (MVB) sorting の初期過程で働く endosomal sorting complex required for transport (ESCRT)-I 複合体の構成因子の 1 つであり、HIV などのエンベロープウイルスの出芽に重要であることが報告されている。

これまでに得られた知見から、HEV の放出機構には多くのエンベロープウイルスで報告されている MVB pathway を利用している可能性が強く示唆される。また、感染培養系においても細胞変性効果が認められないこと、長期間の培養が可能であることから、他のエンベロープウイルスとは異なる極めてオリジナリティの高い放出機構を有している可能性が高い。今後、細胞内での動態を詳細に解析することにより、病原性発現機序の解明や感染予防法の確立、治療戦略の創出に向けた新たな研究基盤を構築できるものと期待される。

E. 結論

本研究により、JE03-1760F 株の ORF3 蛋白質に認められる 2 つの PSAP モチーフのうち、少なくとも 1 つの PSAP 配列が、膜に覆われたウイルス粒子の形成に重要であることが明らかとなった。また、PSAP モチーフを持たない変異ウイルスは、培養細胞からの放出が阻害されたこと、さらに変異型 ORF3 蛋白質は、宿主蛋白質である Tsg101 との結合能を欠いていたことから、このモチーフ配列がエンベロープウイルスの出芽に関与している L-ドメインとしての機能を有し、HEV の放出に細胞内膜輸送系である MVB sorting が関与している可能性が示唆された。

F. 研究発表

学会発表

1. 長嶋茂雄、高橋雅春、田中利典、吉林台、西澤勉、岡本宏明. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会. 2010 年 11 月 徳島.

論文発表

1. 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 92:269-278, 2010.
2. Takahashi M, Nishizawa T, Sato H, Sato Y, Jirintai, Nagashima S, Okamoto H: Analysis of the full-length genome of a hepatitis E virus isolate from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype. J Gen Virol 92: 902-908, 2011.
3. 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 48:1112-1125, 2010.
4. Jinshan, Jirintai, Manglai D, Takahashi M, Nagashima S, Okamoto H: Molecular and serological survey of the hepatitis E virus infection among domestic pigs in Inner Mongolia, China. Arch Virol 155: 1217-1226, 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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

平成 22 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）
「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」

研究成果の刊行に関する一覧表

1. 原著論文（研究代表者、分担研究者および研究協力者を下線で示す）
- 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) Miyahara K, Miyake Y, Yasunaka T, Ikeda F, Takaki A, Iwasaki Y, Kobashi H, Kang JH, Takahashi K, Arai M, Yamamoto K. Acute hepatitis due to hepatitis E virus genotype 1 as an imported infectious disease in Japan. Intern Med 49(23): 2613-2616, 2010
- 5) Khan A, Tanaka Y, Kurbanov F, Elkady A, Abbas Z, Azam Z, Subhan A, Razza S, Hamid S, Jafri W, Shih J, Xia N, Takahashi K, Mishihiro S, Mizokami M. Investigating an outbreak of acute viral hepatitis caused by hepatitis E virus variants in Karachi, South Pakistan. J Med Virol 83(4):622-629, 2011
- 6) Kanda T, Jeong SH, Imazeki F, Fujiwara K, Yokosuka O. Analysis of 5' nontranslated region of hepatitis A viral RNA genotype I from South Korea: comparison with disease severities. PLoS One 5(12):e15139, 2010
- 7) Yang L, Kiyohara T, Kanda T, Imazeki F, Fujiwara K, Gauss-Muller V, Ishii K, Wakita T, Yokosuka O. Inhibitory effects on HAV IRES-mediated translation and replication by a combination of amantadine and interferon-alpha. Virol J 7:212, 2010
- 8) Kanda T, Imazeki F, Nakamoto S, Okitsu K, Fujiwara K, Yokosuka O. Internal ribosomal entry-site activities of clinical isolate-derived hepatitis A virus and inhibitory effects of amantadine. Hepatol Res 40(4):415-423, 2010
- 9) Kanda T, Gauss-Muller V, Cordes S, Tamura R, Okitsu K, Shuang W, Nakamoto S, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Hepatitis A virus (HAV) proteinase 3C inhibits HAV IRES-dependent translation and cleaves the polypyrimidine tract-binding protein. J Viral Hepat 17(9):618-623, 2010

- 10) Takeda H, Matsubayashi K, Sakata H, Sato S, Kato T, Hino S, Tadokoro K, Ikeda H. A nationwide survey for prevalence of hepatitis E virus antibody in qualified blood donors in Japan. Vox Sang 99(4):307-313, 2010
- 11) Xing L, Li TC, Mayazaki N, Simon MN, Wall JS, Moore M, Wang CY, Takeda N, Wakita T, Miyamura T, Cheng RH. Structure of hepatitis E virion-sized particle reveals an RNA-dependent viral assembly pathway. J Biol Chem 285(43):33175-33183, 2010
- 12) Xing L, Wang JC, Li TC, Yasutomi Y, Lara J, Khudyakov Y, Schofield D, Emerson SU, Purcell RH, Takeda N, Miyamura T, Cheng RH. Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. J Virol 85(2):1117-1124, 2011
- 13) 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
- 14) 高橋和明, 寺田修三, 國立裕之, 新井雅裕, 三代俊治. 従前未知の遺伝子型“genotype 5”を代表すると思われる野生猪由来 E 型肝炎ウイルス塩基配列. 肝臓 51(9): 536-538, 2010
- 15) 寺田修三, 國立裕之, 高橋和明. イノシシ肝の喫食による重症 E 型肝炎の一例. 治療学 44(9):1046-1049, 2010
- 16) 川村欣也, 小林良正, 高橋和明, 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, 中村浩淑, 安倍夏生, 新井雅裕. 静岡県西部地区で発生したシカ生肉またはイノシシ生肝摂食後の E 型急性肝炎 3 例. 肝臓 51(8): 418-424, 2010
- 17) 北嶋直人, 瀬尾靖, 矢野嘉彦, 林祥剛, 安倍夏生, 新井雅裕, 高橋和明, 三代俊治. 平成 21 年度 地域医療における疾病並びに医療等に関する研究調査 兵庫県における HEV 感染実態調査(第二報). 神緑会学術誌 26:17-20, 2010

2. 総説（研究代表者、分担研究者および研究協力者を下線で示す）

- 1) Okamoto H. Efficient cell culture systems for hepatitis E virus strains in feces and circulating blood. Rev Med Virol 21(1):18-31, 2011
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 岡本宏明. E 型肝炎ウイルス感染. 治療学 44(9): 974-977, 2010
- 6) 岡本宏明. E 型肝炎をめぐる－診断法と感染培養系の確立と基礎・臨床への応用－. Minophagen Med Rev 55(3): 207-218, 2010
- 7) 岡本宏明. E 型肝炎の現況. 総合臨床 60(1): 95-101, 2011
- 8) 高橋雅春, 岡本宏明. E 型肝炎. 肝・胆道系症候群（第2版）. 別冊日本臨床. 日本臨床社 p31-37, 2010
- 9) 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

- 10) 八橋弘, 矢野公土, 玉田陽子. A型肝炎. 臨床消化器内科 25(11): 1501-1506, 2010
- 11) 八橋弘, 矢野公土, 玉田陽子. A型肝炎ウイルス感染. 治療学 44(9): 967-969, 2010
- 12) 滝川康裕, 鈴木一幸. 急性肝障害. 治療 92 (Suppl 1): 920-924, 2010
- 13) 滝川康裕, 鈴木一幸, 持田智. プロトロンビン時間による肝障害の評価. 日本臨床検査自動化学会会誌 35(2):192-196, 2010
- 14) 神田達郎, 横須賀収. 乾燥A型肝炎ワクチン. 肝胆膵 61(6):1095-1099, 2010
- 15) 姜貞憲. E型肝炎. 臨床消化器内科 25(11): 1521-1525, 2010
- 16) 姜貞憲, 駒場福雄. E型肝炎の国内での感染症例. 症例から学ぶウイルス肝炎の治療戦略. 診断と治療社 p183-186, 2010
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 桶谷 真, 坪内博仁. 劇症肝炎. 治療学 44(9): 978-980, 2010