

〔肝機能検査所見〕 生化学検査で総ビリルビン 9.7 mg/dL, D.Bil 7.7 mg/dL, ALT 1,067 IU/L と高値, アルブミン 3.3 g/dL, T.Chol 98 mg/dL, ChE 144 IU/L と低値を示した. 血液学的検査では血小板数のわずかな減少を認めたが, PT の延長はなかった. 尿検査で UROBIL(+), Bil(3+)であった.

〔ウイルス学的検査〕 IgM クラス HAV 抗体, HBs 抗原, IgM クラス HBc 抗体および HCV 抗体は陰性であった. 一方, IgG, IgA, IgM 各クラスの HEV 抗体が陽性であった. HEV-ORF2 領域のプライマーを用いた RT-PCR 法により, 初診時血清から HEV RNA(genotype 1<遺伝子型 1>)が検出された. genotype 1 の subgenotype 別に既知 HEV 株と比較した結果, これまでにミャンマーやインド, パキスタン, ネパールで分離されている 1a 型との類似性が最も高く, 最初の旅行地である中国での分離株(いずれも genotype 1b)とは 90.5~91.3% の一致率にすぎないことが判明した. したがって, 本症例は第二の訪問地であるネパールでの感染が疑われたことから, ネパールでの genotype 1a 分離株との一致率を年次別に比較検討した. その結果, 1987 年から 2000 年までの genotype 1a 分離株との一致率は最大でも 99.0% にすぎなかったが, 2002 年の分離株のなかには 99.8% の一致率を示すものもみられ, 2005 年の分離株 42 株中 21 株が本症例から分離された HEV 株と 100% の一致率を示した. 本症例は現地での感染症に対する知識もあり, 生ものや生水を徹底して避けていたが, たまたま, 現地で路傍の泥水を掛け合う祭りに参加して泥水を飲んでしまった事実があり, 上下水道の完備していない環境での偶発的な泥水の誤飲が感染源となった可能性が高い¹⁾.

a Problem lists

① E型肝炎の感染経路と自然経過, 診断, 予防.

b Commentary

1) E型肝炎の感染経路と HEV の genotype

HEV は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% 異なることを基準にして 1~4 までの 4 種類の genotype に大別されている(表 1). その genotype の世界的分布には明瞭な地域特異性があり, genotype 1 はアジア・アフリカ諸国の E型肝炎流行地域に分布し, genotype 2 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, genotype 3 はアフリカを除き, 世界に広く分布し, genotype 4 は中国, 台湾, タイ, インドネシアなどのアジア地域に局限している. genotype 3 と 4 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, 人獣共通感染症としての散発性 E型肝炎の原因となっているのに対して, genotype 1 と 2 はヒトのみに感染し流行性 E型肝炎の発症に関係している. したが

表 1 HEV genotype からみた E型肝炎の特徴

genotype	おもな分布地域	おもな感染様式	発展途上国	先進国	特徴
1	アジア, アフリカ	水系感染 (流行性)	主	まれ(輸入感染)	若年成人に多い 妊婦での重症化 人獣共通感染症
2	メキシコ, アフリカ*				
3	アフリカを除く 世界各地	食感染 (散発性)	まれ	主	中高年男性に多い 重症化・劇症化例は中高年男性 臓器移植患者では慢性化もある
4	中国, 台湾, 日本 (北海道), ベトナム, インド, インドネシア				

*: エジプト, チャド, ナミビア, ナイジェリア, 中央アフリカ共和国, コンゴ民主共和国

って、わが国では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見なされる genotype 3 ないし genotype 4 の HEV が分離されるのに対して、インドやネパール、バングラデシュなどの流行地で感染し帰国後に発症した輸入E型肝炎症例から HEV genotype 1 が分離されている。このような輸入感染症例は、渡航先で生水や生ものを摂取することにより流行株に感染したと推測される。中国やベトナムなどでの genotype 4 固有株に現地で感染し、日本に持ち帰るケースもある。

筆者らが解析しえた興味深い genotype 4 HEV の輸入感染例²⁾を以下に紹介する。ベトナムに家族3人で旅行し、ひとりだけ帰国後にE型肝炎を発症した事例(表2に示した症例3の56歳、男性)がある。滞在期間中、症例3ひとりの1回の例外を除いてすべて十分に加熱調理された食べ物をホテルのレストランで摂取していたが、症例3は発症の46日前にハロン湾を船で遊覧中に昼食用の食材を生簀で購入する際に生の二枚貝を漁師に勧められるまま口にしたという。A型肝炎ウイルスやノロウイルスなどが二枚貝の中腸腺で濃縮され、それらウイルスを含む貝が感染源になりうること、またヤマトシジミから HEV が分離されていることなどから、HEV に汚染された貝を生で喫食したことが HEV 感染につながったものと推測される。それを裏づける証拠として、症例3から分離された HEV はベトナムで分離されている genotype 4 株と高い一致率(98.8%)を示し、日本国内の渡航歴のないE型肝炎患者やブタから分離されている genotype 4 株との類似性が低いこと(89.8%以下)が明らかになっている。

現在、わが国におけるE型肝炎の約半数は感染源・感染経路が不明であるが、判明している範囲内では、ブタレバーやホルモン、イノシシの生肉などの食材の摂取を通じての感染が大多数を占めている。輸入感染例は阿部ら³⁾の報告では全体の8%であり、筆者らが解析した2001年1月から2009年末までのE型肝炎患者のうち、6.4%(8/125)が輸入感染例であった。内訳を表2に示すと、8人のうち、3人はバングラデシュあるいはネパールからの入国者であり、感染地は中国、バングラデシュ、ネパール、インド、ベトナムといずれもアジアのHEV 侵淫国であった。8例中5例が流行株の genotype 1 であったが、興味深いことに、残りの3例は中国とベトナムの genotype 4 土着株であった。

2) E型肝炎の自然経過

HEV 感染は通常一過性であり、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5.3%(男性7.8%、女性3.4%)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。60歳代では7.2%(男性10.4%、女性4.5%)に達する。急性肝炎を発症するのは感染者全体の約0.1%あるいはそれ以下にすぎないと推定されており、顕性感染例では2~9週(平均6週)の潜伏期を経て発症する。倦怠感や黄疸などの症状が出現し医療機関を受診する頃にはすでにトランスアミナーゼ値や総ビリルビン値が上昇

表2 E型肝炎の輸入感染例

症例	発症年・月	年齢 (歳)/性	診断	ALT (IU/L, ピーク値)	T. Bil (mg/dL, ピーク値)	HEV genotype	地域 (渡航先/出身国*)
1	2002.3	35M	AH	3,863	68.6	1	バングラデシュ*
2	2002.9	26M	AH	2,610	13.1	1	ネパール*
3	2003.6	56M	AH	997	11.9	4	ベトナム
4	2004.3	23M	FH	4,631	9.7	1	インド
5	2005.3	27M	AH	2,980	11.2	1	バングラデシュ*
6	2006.4	30M	AH	1,067	9.7	1	ネパール
7	2006.11	48M	AH	3,448	14.1	4	中国
8	2007.2	58M	AH	2,791	8.7	4	中国

し、血中のIgM, IgA および IgG クラスの HEV 抗体も陽転している。通常、ウイルス血症は発症後 17~48 日(平均 28.3 日)、糞便中への HEV 排泄は 14~33 日(平均 22.4 日)までと短い。IgM および IgA クラスの HEV 抗体濃度は徐々に低下し、2~6 か月以内にほとんどの例で陰性化するが、IgG クラスの HEV 抗体は年のオーダーで持続する。発症から約 20 年後であっても、血清中の抗体が HEV の感染を阻止しうることが、細胞培養系を用いた感染実験によって実証されている⁴⁾。

大多数の症例は発症しても 1 か月以内にトランスアミナーゼ値や総ビリルビン値が正常に復するが、10~20% の症例で黄疸の遷延(ALT 値が下降しているにもかかわらず総ビリルビン値が遅れて上昇するケース)や重症化(PT 値 40% 以下)、劇症化が認められる。輸入感染例の 8 例中 1 例は劇症肝炎症例であり、ALT のピーク値は 997~4,631IU/L、総ビリルビンのピーク値は 8.7~68.6 mg/dL と高値を示した(表 2)。インドやネパール、中国では、妊婦が流行株の HEV genotype 1 に感染した場合、多くが劇症肝炎を発症し、20~25% の症例が不幸な転帰をとり、妊娠の第 3 三半期では特に予後が悪いことが報告されている。妊婦の渡航先での HEV genotype 1 への感染には注意が必要である。

3) E 型肝炎の診断

A 型や B 型の急性肝炎の血清学的診断では、一般に酵素免疫測定法(ELISA 法)によって急性期血清で 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)が検出されているが、筆者らの検討により、E 型肝炎においては genotype の違いによらず、IgM クラス HEV 抗体測定系よりも IgA クラス HEV 抗体の測定系のほうが特異性および感度の点で優れていることが明らかにしている⁵⁾。

E 型肝炎の確定診断には、RT-PCR 法による HEV 遺伝子検出が有用であり、各 genotype 間でもよく保存された領域の塩基配列に合わせた共通のプライマーを設計し、それを用いた RT-PCR 法により HEV の遺伝子増幅検査が可能となっている⁶⁾。

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。急性肝炎の診断において、ルーチンに E 型の検査ができるようになることが医療現場で切望されている。

c Solution

1) ワクチンによる HEV 感染予防

E 型肝炎が発展途上国のみならず、日本、欧州、米国などの先進国でもみられ、重症化例や劇症肝炎による死亡例もあることから、E 型肝炎ワクチンのニーズは高まっている。米国のグループによって組換え ORF2 蛋白を用いた注射ワクチンの第 II 相臨床試験がネパールで実施され、95% の HEV 感染防御効果が示されている⁷⁾が、長期間持続する抗体を誘導しうることが課題であり、まだ実用化されていない。

2) 流行地での HEV 感染予防

流行地での HEV 感染の予防には、手洗いの励行に加え、清潔の保証がない飲料水(氷入り清涼飲料を含む)、非加熱の魚介類、生野菜を摂取しないことである。

文 献

- 1) 相川達也, 宮本久仁子, 上野ちさと, ほか: 分子疫学的解析により感染地を特定しえた旅行者 E 型急性肝炎の 1 例. 肝臓 2007; **48**: 15-21
- 2) 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* 2004; **42**: 3883-3885
- 3) 阿部敏紀, 相川達也, 赤羽賢浩, ほか: 本邦に於ける E 型肝炎ウイルス感染の統計学的・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 2006; **47**: 384-391
- 4) Tanaka T, Takahashi M, Kusano E, *et al.*: Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *J Gen Virol* 2007; **88**: 903-911
- 5) 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* 2005; **43**: 49-56
- 6) Inoue J, Takahashi M, Yazaki Y, *et al.*: Development and validation of an improved RT-PCR assay with nested universal primers for detection of hepatitis E virus strains with significant sequence divergence. *J Virol Methods* 2006; **137**: 325-333
- 7) Shrestha MP, Scott RM, Joshi DM, *et al.*: Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N Engl J Med* 2007; **356**: 895-903

ウイルス肝炎の疫学 3

E 型肝炎ウイルス感染

岡本宏明

おかもと ひろあき：自治医科大学 感染・免疫学講座ウイルス学部門

● はじめに

E 型肝炎は、古くから熱帯・亜熱帯地方の発展途上国における風土病としての流行性肝炎として位置付けられてきた。しかし、この疾患をめぐる状況はこの 10 年間で大きく変容した。もはや、わが国を含む先進諸国において、E 型肝炎が「流行地からのまれな輸入感染症」であるという理解では古い。すなわち、先進諸国にも原因ウイルスである E 型肝炎ウイルス (HEV) が常在し、飼育ブタや野生のイノシシなどの動物をも感染宿主としていることが明らかになるとともに¹⁻³⁾、E 型肝炎が人獣共通感染症 (動物由来感染症) のひとつとして認知されるようになった^{4,5)}。

E 型急性肝炎や劇症肝炎を惹起する、この HEV はエンベロープをもたない、直径 27~34 nm (平均 30 nm) の球形ウイルスである。その血清型は 1 種類であるが、全塩基配列の約 25% の違いによって 4 種類の遺伝子型 (1 型~4 型) に分類されている。1 型と 2 型の HEV はヒトにのみ感染し、水系感染による流行性 E 型肝炎の発症に関係しているのに対し、3 型と 4 型の HEV 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ており、人獣共通感染ウイルスとして先進諸国における散发性 E 型肝炎の原因になっている⁶⁾。

わが国でも 2001 年以降、海外渡航によらな

い E 型肝炎症例が見いだされると同時に⁷⁾、レトロスペクティブにも保存検体を用いた解析によって、それまで原因不明とされていた散发性急性肝炎および劇症肝炎の一部に HEV 感染が関係していたことが明らかになった^{8,9)}。加えて、ブタのレバーやホルモン (腸管)、イノシシやシカの肉や内臓を生、あるいは加熱不十分な状態で摂食したあとの E 型急性肝炎や劇症肝炎症例の存在が相次いで報告され^{4,5)}、HEV 感染に関わる健康危険情報が周知されるとともに¹⁰⁾、精度の高い診断法の確立へとつながった^{11,12)}。2003 年 11 月に施行された改正感染症法において、E 型肝炎は A 型肝炎と同じく四類感染症に分類され、全数把握対象疾患として診断後ただちに届け出ることが義務づけられている。E 型肝炎は急性肝炎や劇症肝炎の診断上、つねに念頭に置くべき疾患であり、本稿では、わが国における HEV 感染の現況について述べる。

● わが国における HEV の既往感染

まずはじめに、2002~2007 年の 6 年間に、全国 30 都道県で採取された 22027 例の健診検体 (男性 9686 例、女性 12341 例、20~108 歳) を用い、健常成人における HEV 感染状況の全国調査を行った成績を紹介する (表 1)¹³⁾。HEV の感染既往を示す IgG クラス HEV 抗体の陽性

表 1 わが国の健康成人における年齢・性別の IgG クラス E 型肝炎ウイルス (HEV) 抗体陽性率 (文献 13 より引用)

年齢 (歳)	合計 (人)	陽性者 (%)	男性 (人)	陽性者 (%)	女性 (人)	陽性者 (%)
20~29	1545	22 (1.4%)	540	9 (1.7%)	1005	13 (1.3%)
30~39	2400	63 (2.6%)	955	26 (2.7%)	1445	37 (2.6%)
40~49	3455	118 (3.4%)	1517	70 (4.6%) ^a	1938	48 (2.5%) ^a
50~59	4458	274 (6.1%)	2065	184 (8.9%) ^b	2393	90 (3.8%) ^b
60~69	4210	303 (7.2%)	1919	200 (10.4%) ^c	2291	103 (4.5%) ^c
70~79	4386	287 (6.5%)	2046	194 (9.5%) ^d	2340	93 (4.0%) ^d
80~89	1444	90 (6.2%)	595	62 (10.4%) ^e	849	28 (3.3%) ^e
90~108	129	10 (7.8%)	49	8 (16.3%) ^f	80	2 (2.5%) ^f
計	22027	1167 (5.3%)	9686	753 (7.8%) ^g	12341	414 (3.4%) ^g

^a $p=0.0006$; ^b $p<0.0001$; ^c $p<0.0001$; ^d $p<0.0001$; ^e $p<0.0001$; ^f $p=0.0044$; ^g $p<0.0001$

表 2 わが国の健康成人における地域別の E 型肝炎ウイルス (HEV) 抗体と HEV RNA の陽性率 (文献 13 より引用)

地域	人数	年齢 (歳) 平均±SD (範囲)	IgG クラス HEV 抗体			IgM クラス・ IgA クラス HEV 抗体	HEV RNA
			合計	男性	女性		
北海道	2135	52.0±18.9 (20~106)	159 (7.4%)	104 (11.1%)	55 (4.6%)	3 (0.14%)	0
東北	3834	54.9±15.4 (20~93)	263 (6.9%)	165 (10.3%)	98 (4.4%)	5 (0.13%)	2 (0.05%)
関東	4292	52.7±15.3 (20~96)	281 (6.5%)	198 (9.2%)	83 (3.9%)	2 (0.05%)	1 (0.02%)
中部	2921	57.2±16.7 (20~108)	180 (6.2%)	116 (9.1%)	64 (3.9%)	2 (0.07%)	0
近畿	1896	61.6±15.9 (20~97)	51 (2.7%)	32 (3.5%)	19 (2.0%)	1 (0.05%)	0
中国	2934	59.0±16.7 (20~96)	69 (2.4%)	40 (3.6%)	29 (1.6%)	0	0
四国	1837	62.2±15.9 (20~101)	56 (3.0%)	31 (4.1%)	25 (2.3%)	0	0
九州	2178	60.2±17.1 (20~97)	108 (5.0%)	67 (7.3%)	41 (3.3%)	0	0
合計	22027	56.8±16.7 (20~108)	1167 (5.3%)	753 (7.8%)	414 (3.4%)	13 (0.06%)	3 (0.01%)

率は全体で 5.3% (全 22027 例中 1167 例) であり, 換言するとわが国の健康成人の約 20 人に 1 人が HEV に対する感染既往を有することになる。その抗体陽性率は男性のほうが女性に比べて有意に高い (7.8% vs. 3.4%, $p<0.0001$)。各年齢層の IgG クラス HEV 抗体陽性率は, 20~60 歳代までは年代が高くなるにしたがって上昇する傾向を示し, 60 歳代以上では 7%前後ではほぼ一定の陽性率を示している (表 1)。特に, 60 歳代以上の男性では約 10%という高い抗体陽性率であることが判明している¹³⁾。

地域別に IgG クラス HEV 抗体陽性率を比較検討したところ, 北海道では 7.4%と最も高く, 東北, 関東, 中部ではそれぞれ 6.9%, 6.5%,

6.2%と 6%台であるのに対し, 近畿, 中国, 四国地方では 3%前後と低値を示した (表 2)¹³⁾。ブタの飼育頭数が全国で 1 位と 2 位の鹿児島県と宮崎県を含む九州地方では, これら 2 県での高い抗体陽性率 [それぞれ 12.1% (49/406), 5.3% (27/506)] が反映され, 全体として 5.0%であった。

● わが国における最近の HEV 感染

わが国ではいまだに, 保険適用になった E 型肝炎の診断用試薬が皆無の状態が続いている。そのことが大きく影響していると思われるが, 「感染症法」において四類の全数把握対象疾患に分類されていながら, 正確な実態把握には至つ

表 3 筆者らの研究室で解析しえたわが国における国内感染の E 型肝炎症例
(2010 年 5 月末現在)

地域	人数	男性	年齢 (歳) (mean±SD)	遺伝子型	
				3 型	4 型
北海道	59 (39%)	49 (83%)	55.0±13.1	13 (22%)	46 (78%)
東北	46 (30%)	38 (83%)	56.8±11.1	42 (91%)	4 (9%)
関東	23 (15%)	19 (83%)	53.1±14.9	18 (78%)	5 (22%)
中部	16 (11%)	13 (81%)	52.1±11.0	12 (75%)	4 (25%)
近畿以西	7 (5%)	7 (100%)	54.6±6.1	6 (86%)	1 (14%)
合計	151	126 (83%)	55.0±12.4	91 (60%)	60 (40%)

ていない。2003～2009 年の全国での年間の E 型肝炎患者の届出件数は 31～71 件(平均 48.1 件)に過ぎないが、これら届出症例のなかで渡航歴のない症例が約 75%を占めていることから、わが国における E 型肝炎の大多数は国内感染例であるといえる。これまでに筆者らが解析しえた国内感染 E 型肝炎症例 151 症例について集計した結果、次のような特徴が明らかになっている(表 3)。上記の HEV 抗体陽性率からみた感染状況に類似して、①E 型肝炎は全国的に発生しているが、その分布には顕著な偏りがあり、北海道の患者が全体の約 40%を占め、次いで東北地方や関東地方の患者が多く、西日本では少ない傾向がある。②患者の年齢の平均値は約 55 歳であり、50 歳以上の患者が約 70%を占める。男性患者が優位で全体の約 80%を占める。③発症時期に季節的な偏りは認められない。④遺伝子型は 3 型および 4 型で、その分布には顕著な偏りがあり、北海道では 4 型が約 80%を占めるのに対して、東北地方以南では 3 型が約 80%を占める^{14～16)}。

表 2 に示すように、現在あるいは最近の感染を示すマーカーである HEV RNA および IgM・IgA クラスの HEV 抗体の陽性率を地域別に比較した結果、北海道から中部地方までの地域では、近畿から九州地方までの地域よりも有意に高値であることが判明している [15/13182 (0.11%) vs. 1/8845 (0.01%), $p=0.0056$]¹³⁾。

● おわりに

わが国では戦後の混乱期から 60 年以上が経

過し、その間の急速な衛生環境の改善によって A 型肝炎ウイルス (HAV) の新たな感染者が激減した¹⁷⁾。それに対して、HEV 感染は減る兆候をみせていない^{18,19)}。20 歳以上の男性では 1.7～16.3% (平均 7.8%)、女性では 1.3～4.5% (平均 3.4%) が既往感染者である。不顕性感染が圧倒的に多いのは幸いであるが、E 型肝炎発症者の 10 数%は重症型であり、3～5%は劇症肝炎を発症し、ほとんどが不幸な転帰をとっているのが現状である。E 型肝炎患者の正確な把握、早期診断に基づく的確な治療と予後予測の観点からも、1 日も早く保険適用になった E 型肝炎診断薬が市販され、医療現場で使用できるようになることを望むものである。

文献

- 1) Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 9860-5.
- 2) 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* 2001; 289: 929-36.
- 3) 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* 2004; 42: 5371-4.
- 4) Tei S, Kitajima N, Takahashi K, et al. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 2003; 362: 371-3.
- 5) 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* 2003; 84: 2351-7.
- 6) Okamoto H. Genetic variability and evolution of hepa-

- titis E virus. *Virus Res* 2007 ; 127 : 216-28.
- 7) 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* 2001 ; 287 : 9-12.
 - 8) 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* 2002 ; 40 : 3209-18.
 - 9) Suzuki K, Aikawa T, Okamoto H. Fulminant hepatitis E in Japan. *N Engl J Med* 2002 ; 347 : 1456.
 - 10) 厚生労働省ホームページ「食肉を介する E 型肝炎ウイルス感染事例について」(<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2003/08/h0819-2.html>).
 - 11) 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* 2005 ; 43 : 49-56.
 - 12) Inoue J, Takahashi M, Yazaki Y, et al. Development and validation of an improved RT-PCR assay with nested universal primers for detection of hepatitis E virus strains with significant sequence divergence. *J Virol Methods* 2006 ; 137 : 325-33.
 - 13) Takahashi M, Tamura K, Hoshino Y, et al. A nationwide survey of hepatitis E virus infection in the general population of Japan. *J Med Virol* 2010 ; 82 : 271-81.
 - 14) Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T. Features of hepatitis E virus infection in Japan. *Intern Med* 2003 ; 42 : 1065-71.
 - 15) 岡本宏明. E 型肝炎の現況. *日内会誌* 2006 ; 95 : 945-51.
 - 16) 岡本宏明. わが国における E 型肝炎の現状. *臨床とウイルス* 2009 ; 37 : 345-54.
 - 17) Mitsui T, Tsukamoto Y, Hirose A, et al. Distinct changing profiles of hepatitis A and E virus infection among patients with acute hepatitis, patients on maintenance hemodialysis and healthy individuals in Japan. *J Med Virol* 2006 ; 78 : 1015-24.
 - 18) Fukuda S, Ishikawa M, Ochiai N, et al. Unchanged high prevalence of antibodies to hepatitis E virus (HEV) and HEV RNA among blood donors with an elevated alanine aminotransferase level in Japan during 1991-2006. *Arch Virol* 2007 ; 152 : 1623-35.
 - 19) Tanaka E, Matsumoto A, Takeda N, et al. Age-specific antibody to hepatitis E virus has remained constant during the past 20 years in Japan. *J Viral Hepat* 2005 ; 12 : 439-42.

綜 説

E 型肝炎をめぐって —診断法と感染培養系の確立と基礎・臨床への応用—

岡本 宏明

自治医科大学医学部 感染・免疫学講座ウイルス学部門

Hepatitis E: development of diagnostic methods and cell culture system for hepatitis E virus and their application to basic study and clinical practice

Hiroaki Okamoto

Division of Virology, Department of Infection and Immunity,
Jichi Medical University School of Medicine

SUMMARY

Hepatitis E virus (HEV) is the causative agent of acute hepatitis E, which occurs in many parts of the world. The diagnosis of hepatitis E is based on detection of the HEV genome in serum or feces by RT-PCR with primers targeting well-conserved areas or detection of newly elicited antibodies to HEV. The anti-HEV IgA assay was significantly more specific than the anti-HEV IgM assay with regard to ability to diagnose hepatitis E, indicating that anti-HEV IgA could be the first-choice marker of recent HEV infection. Recently, using fecal suspensions obtained from patients with genotype 3 HEV (the JE03-1760F strain) or genotype 4 HEV (the HE-JF5/15F strain), we developed an efficient cell culture system for HEV in PLC/PRF/5 and A549 cells, and successfully propagated six or more generations in serial passages of culture supernatant. In addition, we constructed a full-length infectious cDNA clone of the JE03-1760F strain, which can replicate efficiently in cultured cells. Using a derivative ORF3-deficient mutant, we demonstrated that the ORF3 protein of HEV is responsible for virion egress from infected cells. Various HEV strains in blood circulation were also propagated efficiently in cultured cells, allowing extended studies on viral replication specific to different HEV strains.

はじめに

1973年に流行性肝炎の原因ウイルスとしてA型肝炎ウイルス(HAV)が発見された¹⁾。それから丁度10年後の1983年に、ロシアの研究者Balayanは自らを実験台にして感染実験を行い、HAVとは異なる新たな流行性肝炎ウイルスが存在することを実証した²⁾。その当時は、腸管伝播性

非A非B型肝炎ウイルス(enterically transmitted non-A, non-B hepatitis virus)と呼ばれていたが、1990年にReyesらによってその遺伝子RNAが分離同定され、5番目の肝炎(アルファベットの5番目の"E"),あるいは"enterically transmitted"の"E"に因んで正式に「E型肝炎ウイルス(HEV)」と呼ばれるようになった³⁾。

HEVの感染は一過性であり、急性肝炎や劇症

肝炎の原因となる。HEV は肝臓で主として増殖し、循環血液中に産出されウイルス血症となると同時に、胆管を通過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、上下水道が整備されていないアジアやアフリカ、中米の発展途上国では、河川の氾濫などによって飲料水がウイルスに汚染され、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。その流行は古くからあり、学術書に記録が残っているものでも 19 世紀に遡る。現在でもなお、E 型肝炎は発展途上国では、医学的にも公衆衛生学的にも重要な風土病の一つである。そのような E 型肝炎が蔓延している流行地域を訪れ、不注意にも生水や加熱調理されていない食べ物を摂取することによって HEV に感染し、帰国後に発症する「輸入感染症」としての E 型肝炎の存在は、わが国を含む先進国で昔から知られている。しかし、稀であるということで、E 型肝炎は殆ど注目されていなかった。

ところが、1990 年代末になって、米国で初めて海外渡航歴がない急性肝炎患者から新種 (3 型) の HEV が発見され⁴⁾、国内感染型の E 型肝炎がヨーロッパや南米、オセアニアの国々にも存在することが次第に明らかにされた。わが国でも 2001 年以降、海外渡航によらない散発性 E 型肝炎症例の存在に気付かれるとともに^{5, 6)}、国内の飼育ブタで HEV 感染が蔓延状態にあり⁷⁾、野生のイノシシやシカでも感染が見られることが明らかになった^{8, 9)}。加えて、ブタのレバーやホルモン、イノシシやシカの肉や内臓を生あるいは加熱不十分な状態で食べた後の E 型肝炎の発症事例が相次いで報告され^{8, 10)}、劇症化による死亡例もあることが分かった¹¹⁾。その結果、人獣共通感染症としての E 型肝炎が俄に注目を集めることになり¹²⁾、HEV 感染の疫学や診断法、ならびにウイルスゲノムに関する研究がこの 10 年間で大きく進展した。加えて、長年懸案であった HEV の感染培養系も確立され¹³⁾、HEV の基礎研究が急速に進展することが期待されている。

1. ウイルス学的特徴

HEV はヘペウイルス科 (family *Hepeviridae*) のヘペウイルス属 (genus *hepevirus*) に分類されている。糞便や胆汁中に存在する HEV 粒子はエンベロープに覆われていない小型の球状粒子 (直径 27~34 nm: 平均 30 nm) である。それに対して、血液中の HEV 粒子は培養細胞から放出された粒子と同じように、細胞由来の膜に覆われている。ゲノムは 5' 末端にキャップ構造、3' 末端にポリ A 配列を持つ、約 7,200 塩基長の 1 本鎖 (プラス鎖) RNA であり、3 つの open reading frame (ORFs: ORF1, ORF2, ORF3) を有する。helicase や RNA polymerase などの非構造蛋白を担う ORF1 蛋白はゲノム RNA から翻訳される。660 アミノ酸残基からなる capsid 蛋白である ORF2 蛋白、および 113/114 アミノ酸残基からなる短いリン酸化蛋白である ORF3 蛋白は 2.2 kb のサブゲノム RNA から翻訳される (図 1)。

HEV の血清型は 1 種類であるが、全塩基配列が互いに約 25% 異なっていることを基準にして 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¹⁴⁾。1 型と 2 型の HEV はヒトのみに感染し、古くから知られているアジア・アフリカ・中米の浸淫地域での流行性肝炎の原因となっている。それに対して、3 型 HEV はアフリカを除く世界各地に、4 型 HEV は中国や台湾、ベトナム、インドネシアなどのアジア地域に分布し、ヒトのみならずブタやイノシシ、シカ、ウサギ^{7, 8-10, 15)}などの動物にも感染している。そのため、非流行地域である欧米では 3 型、わが国では 3 型あるいは 4 型 (稀に両者) の HEV による、人獣共通感染症としての散発性 E 型肝炎が発生している¹⁴⁾。

2. E 型肝炎の病態

最近、臓器移植患者や化学療法を受けている血液疾患患者での HEV 感染の慢性化および急速な線維化による肝硬変への進展が報告されている¹⁶⁻¹⁸⁾。しかし、免疫能が正常な個体での HEV 感染は慢性化することはなく、一過性のウイルス

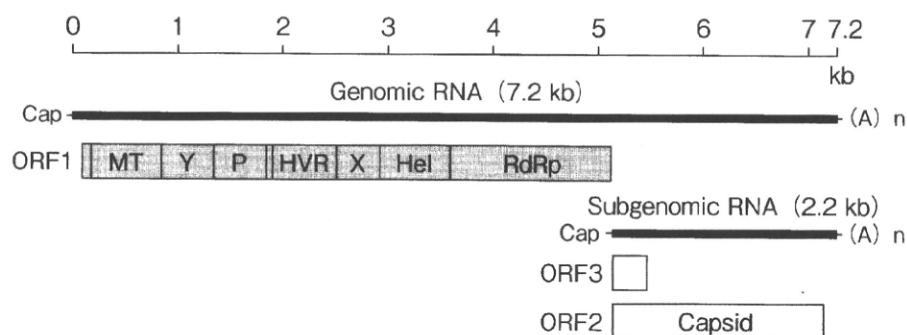


図1 HEVの遺伝子構造

MT, methyltransferase; Y, Y domain; P, papain-like protease;
HVR, hypervariable region; X, X domain; Hel, helicase;
RdRp, RNA-dependent RNA polymerase

血症と糞便中へのウイルス排泄，およびトランスアミナーゼ値の異常上昇の後，臨床的に治癒することがE型肝炎の特徴である。HEV感染の殆どは不顕性であり，肝炎を発症するのは感染者全体の0.1%に満たない¹⁹⁾。

患者は北海道から沖縄まで全国に広く分布しているが，西日本に少ない傾向があり，北海道在住の患者が全体の約40%を占め，次いで，東北や関東地方に多い。年齢は10歳代から80歳代に分布するが，平均は約55歳であり，50歳以上の患者が約70%を占める。しかも男性優位(約80%)である²⁰⁾。アジアやアフリカでの流行例や輸入感染例のデータから，これまでE型肝炎は「若年成人の病気である」と言われてきたが，わが国での国内感染型のE型肝炎は，英国やフランス，ドイツからの報告と同様に，「中高年の男性の病気」であると言っても過言ではない²⁰⁾。肝炎を発症しても，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(数%)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。

インドやネパールなどのE型肝炎の流行地域(1型HEVの浸淫地域)では，妊婦が特に妊娠後期(第3三半期)にHEVに感染した場合，劇症肝炎を発症し易く，HEV感染妊婦での劇症肝炎による致死率は25-50%にも及ぶと言われているが²¹⁾，

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，これまでに3型や4型のHEVによる妊婦のE型劇症肝炎例は1例も報告されていない²²⁾。

重症化には，年齢(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，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²³⁾。

わが国では3型HEVの感染患者の方が多いにも拘らず，E型重症・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，4型と肝炎重症化との関連性が示唆されている^{23, 24)}。

3. E型肝炎の診断法の開発と臨床応用

著者らのHEV研究は，2000年3月に「海外渡航歴のないE型急性肝炎の1例」^{25, 26)}を経験したことが契機となっているが，上述の疫学データを得るため，先ず抗体測定系および核酸検出系を開発するところから始まった。

1) HEV抗体測定系の開発とその応用

研究を始めた当時，Genlabs社がアジア向けにシンガポールで販売していたIgMクラスHEV抗体測定キットを輸入業者を通じて購入し，後述のRT-PCR法により核酸レベルでE型肝炎と診断された68例の初診時血清について検査してみると，わずか61例(89.7%)でIgMクラスHEV抗体が陽性と判定されるに過ぎなかった²⁷⁾。組換えバキュロウイルスを用いてカイコの蛹で発現した精製ORF2蛋白(4型HEV株，HE-J1)をマ

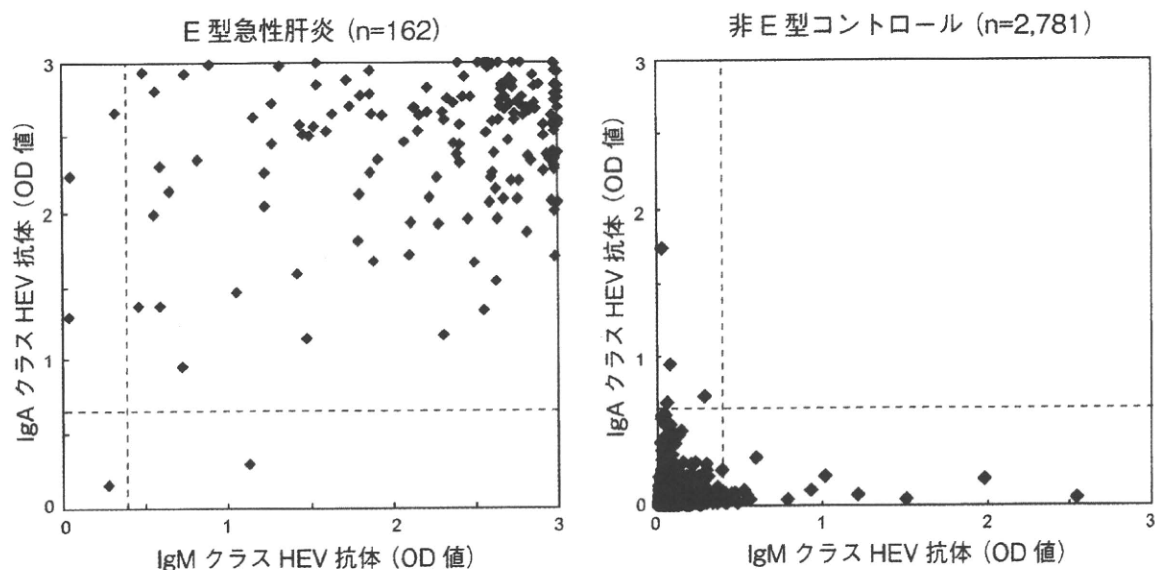


図2 IgMクラスおよびIgAクラスHEV抗体測定ELISAにおけるOD値の分布

破線はカットオフ値を示す (IgMクラスHEV抗体, OD=0.440; IgAクラスHEV抗体, OD=0.642)。

マイクロプレートに固相化し、酵素免疫測定法 (ELISA法) によるIgG, IgM, IgAクラス別のHEV抗体測定系を開発し、その性能を比較検討した^{6, 28)}。ELISA法による測定系を開発する際に特に問題になるのが、非特異反応による偽陽性検体の存在であるが、検体希釈液にmock蛋白 (非組換えバキュロウイルスを感染させたカイコ蛹のホモジネートから得られた上清画分) を添加することにより、非特異反応を低く抑えることができた。健常成人から得られた675検体での測定結果からmean + 7SDの値を求め、暫定的に設定したカットオフ値は、IgGクラスHEV抗体測定において0.175, IgMクラスHEV抗体測定では0.440, IgAクラスHEV抗体測定では0.642であった。それらカットオフ値以上のOD値を示した場合に、それぞれ陽性と判定する。約2万人の健常成人に由来する血清検体を用い、吸収試験も実施しながら特異性を評価した結果、IgGクラスHEV抗体の偽陽性率は僅か0.1% (20/20,860) と算定された²⁹⁾。

E型肝炎と確定診断された患者162例 (上述の68例を含む) の初診時血清を用い、IgMクラスHEV抗体とIgAクラスHEV抗体を測定した結果、IgAクラスHEV抗体は160例 (98.8%) で陽

性と判定されたのに対して、IgMクラスHEV抗体は158検体 (97.5%) で陽性となるに留まった (図2)^{28, 30)}。また、コントロールとして、非E型の血清2,781検体 (A型, B型, C型急性肝炎患者の127検体, B型, C型慢性肝炎・肝硬変・肝癌患者の274検体, 透析患者の472検体, 非特異反応で問題となるリウマトイド因子を保有する関節リウマチ患者の186検体などを含む) について測定した結果、IgMクラスHEV抗体は16検体でカットオフ値以上のOD値 (0.462 - 2.541) を示し、別の4検体でIgAクラスHEV抗体がカットオフ値以上のOD値 (0.692 - 1.754) を示した²⁸⁾。これら20検体はすべてHEV RNAが陰性であり、IgMクラスHEV抗体とIgAクラスHEV抗体の吸収試験で70%以上のOD値の低下が認められなかったことから、非特異反応による偽陽性と判断された。したがって、E型肝炎の血清診断には感度の点でも特異度の点でも、IgAクラスHEV抗体測定系の方がIgMクラスHEV抗体測定系よりも優れていることが明らかになった^{27, 28, 30)}。また、抗体持続陽性期間においても、IgMクラスHEV抗体とIgAクラスHEV抗体とで顕著な差は見られず、IgAクラスHEV抗体測定は急性

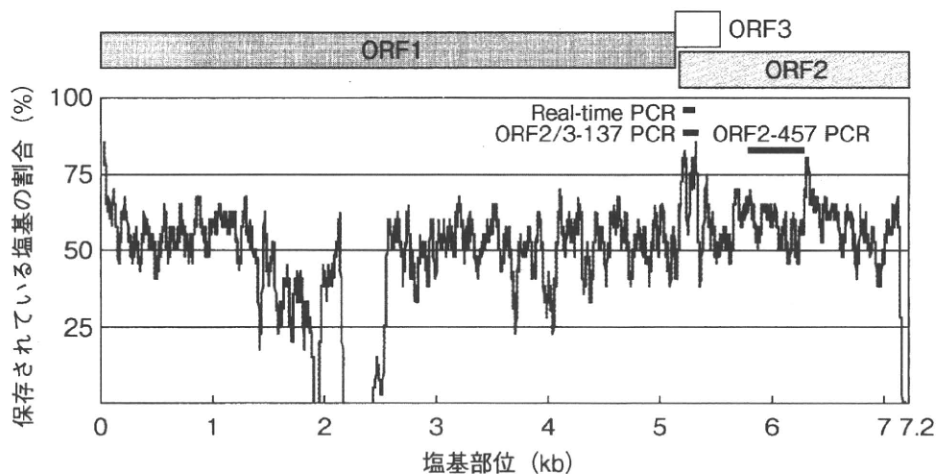


図3 保存されている塩基の分布と HEV RNA 検出用 RT-PCR の標的領域

期の E 型肝炎の血清診断に適していると考えられる²⁸⁾。

2) HEV RNA 測定系の開発とその応用

HEV は異なる遺伝子型の分離株間で全塩基配列が 23.6–27.7% 異なっている¹⁴⁾。そのため、RT-PCR 法によって全ての分離株を逃すことなく検出するためには、高保存域の遺伝子配列に基づいたプライマーの設定が重要であり、最も高感度の定性測定系として ORF2 と ORF3 のオーバーラップ領域を標的領域にした nested RT-PCR (ORF2/3-137PCR) の系を確立した (図3)³¹⁾。低ウイルス量の検体での HEV RNA の検出に適していることが確かめられている。しかし、この ORF2/3-137PCR では 2nd PCR 産物の両末端のプライマー配列を除いた塩基配列が 97 塩基長と短いため、遺伝子型分類は出来ても、分離株の分子系統解析には必ずしも適さない。そこで、“degenerate primer” と呼ばれるミックス塩基を含んだプライマーを用い、ORF2 領域の中央部を標的領域とした nested RT-PCR (ORF2-457PCR) を行い、HEV RNA の検出と分子系統解析に供している⁶⁾。この ORF2-457PCR によって 500 株以上の HEV 配列 (412 塩基長) を決定し、データベースに登録している。感度的には、ORF2/3-137PCR の方が ORF2-457PCR よりも 2–3 倍優

っているが、検体量を増やすことにより実用的には殆ど問題にならない³¹⁾。

塩基配列の保存性が最も高い ORF2/3 オーバーラップ領域から、プライマーとプローブをデザインし、ORF2/3-137PCR とほぼ同等の感度を有する real-time RT-PCR 法による HEV RNA 定量測定系を作製した¹³⁾。

E 型肝炎患者の血清中や糞便中の HEV RNA を定量測定することにより、高力価の HEV を含む糞便検体を見出すことができ、HEV の感染培養系の確立に繋がった。

4. HEV の感染培養系の確立とその評価

培養系は、ウイルスの感染・複製・粒子形成機構の解析などの基礎的研究、治療法や予防法の開発などに重要であり、HEV についても、ウイルス遺伝子が同定される前の、腸管伝播性非 A 非 B 型肝炎ウイルスと呼ばれていた頃 (1980 年代) から多くの研究者によって試みられてきた^{32–38)}。しかし、つい最近まで効率的な培養系の確立には誰も成功していなかった。

偶然 1 人の E 型肝炎患者から 2.0×10^7 copies/ml という高力価の HEV (JE03-1760F 株 [3 型]) を含む糞便サンプルが得られたことが HEV の培養系樹立の契機となった³⁹⁾。その糞便浮遊液を接種材料として、肝癌細胞株の HepG2 細胞や Huh7 細胞などを含む 21 種類の株化細胞株において増殖可能かどうかを検討した結果、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 JE03-1760F 株が効率よく増殖しうることが分かった¹³⁾。培養上清中に放出された HEV のウイルス量が 10^8 copies/ml にまで達し、活発なウイルス増殖が見られること、培養上清中の子ウイルスが新たな細胞へ感染し、そ

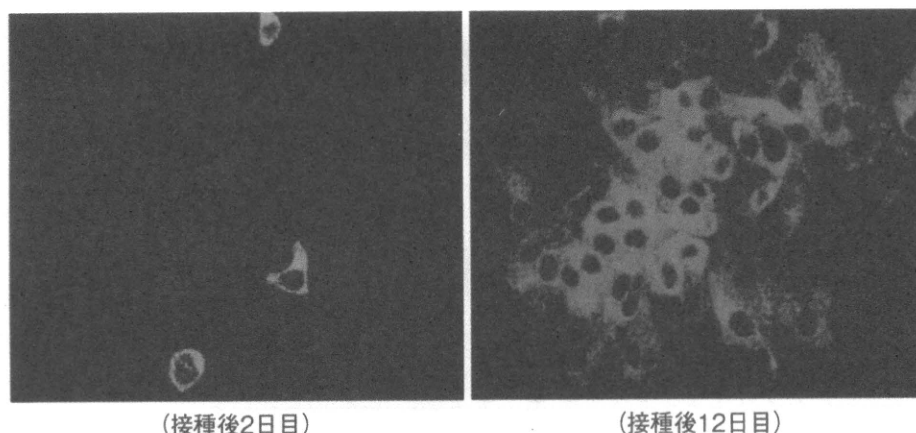


図4 PLC/PRF/5細胞でのHEV (ORF2) 抗原の検出

抗ORF2マウスモノクローナル抗体 (H6225) を用いて、免疫蛍光抗体法により細胞内のORF2抗原を検出した。接種後12日目に明瞭な感染の拡大が認められた。

の感染がさらに拡大しうること (図4)、そして繰り返し継代培養が可能であることが、それまでに報告されていたHEVの培養系と大きく異なる点である。元々並外れて活発な増殖能を持つ特異なHEV株であり、既知の3型HEV株には認められないユニークな変異を29箇所の塩基 (そのうち、6塩基はアミノ酸置換を伴う非同義変異) 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³⁹⁾。

続いて、同じように 1.3×10^7 copies/ml という高力価のHEVを含むE型劇症肝炎患者から得られた糞便浮遊液をPLC/PRF/5細胞やA549細胞に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⁴⁰⁾。JE03-1760F株と同様に、培養上清を用いた継代培養が可能であるだけでなく、6代目の継代培養において、接種後2日目に培養上清中で子ウイルス (HE-JF5/15F_p6) の産出が確認され、ウイルスタイトーは10日目に 1.5×10^8 copies/ml に達した (図5)。継代培養を繰り返すことにより、HEV株が培養細胞に馴化し、感染性や増殖効率が高まることが期待される。実際、野生株のHE-JF5/15F_wtでは6-ウェルプレートの1ウェル当たりの接種ウイルス量を 1.0×10^4 copies 以下にすると、HEVの増殖が認められなかったが、6代目の継代株HE-

JF5/15F_p6では100分の1量の 1.0×10^3 copies を接種した場合であっても、6ウェル中2ウェルで継続的なウイルス増殖が観察された。また、1ウェルあたり 1.0×10^5 copies のウイルス量で接種した場合、HE-JF5/15F_wtでは培養上清中のHEV RNA タイトーが 10^4 copies/ml に達するのに35日を要したのに対して、HE-JF5/15F_p6ではわずか5日であった。HE-JF5/15F_wtとHE-JF5/15F_p6の全塩基配列を決定し比較すると、7,239塩基中10塩基 (0.14%) に置換が認められ、HE-JF5/15F_p6は既知の4型HEV株に認められないユニークなアミノ酸残基への置換を3箇所に獲得していることが分かった。具体的には、ウイルス複製に関わるRNAポリメラーゼのアミノ酸 (ORF1の1,617番目のアミノ酸) でのValからIleへの変異、キャプシド蛋白の565番目および653番目での、それぞれAlaからVal、LysからGluへの変異が認められ (表1)、これらの変異が培養細胞への馴化に深く関連しているものと推測された⁴⁰⁾。

上述のように、疫学データから遺伝子型の4型と肝炎重症化との密接な関連性が示唆されているが、急性肝炎患者に由来する3型のJE03-1760F株に比べて劇症肝炎患者に由来する4型のHE-JF5/15F株の方が、接種後より早期に子ウイル

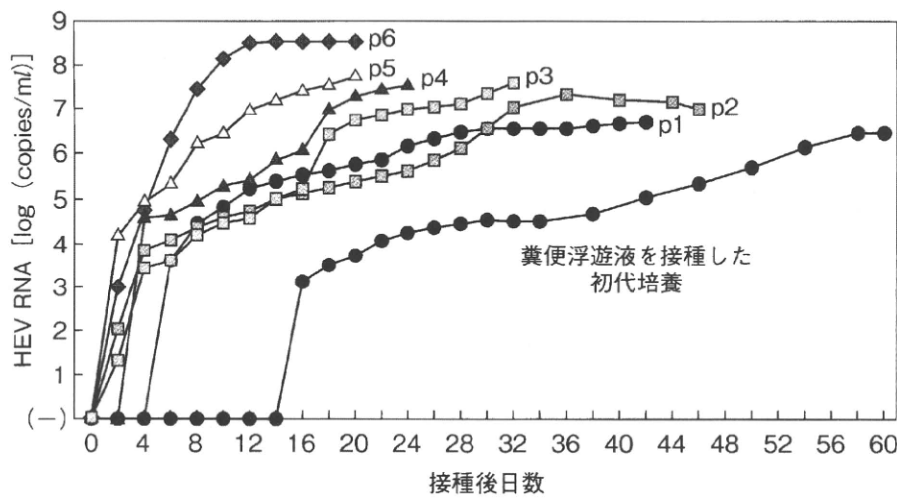


図 5 E 型劇症肝炎患者由来糞便浮遊液を接種材料とした 4 型 HEV (HE-JF5/15F) の初代培養と培養上清を用いた 6 回の継代培養 (p1-p6)

接種後最長 60 日目までの培養上清中の HEV RNA タイターの推移を示す。

スを産出し、培養上清中の HEV RNA タイターも早期にかつ高い値を示し、明瞭に活発な増殖能を有することは、E 型肝炎の重症化にウイルス因子が関わっていることを示すものであり、興味深い。

最近、糞便中の HEV のみならず、患者血清中の HEV も 10^5 copies/ml 以上のタイターであれば、PLC/PRF/5 細胞や A549 細胞で効率よく増殖し、その培養上清を用いた継代培養も可能で

あることを明らかにした⁴¹⁾。このことで多くの HEV 株について増殖能を含むウイルス学的特徴を培養系で評価できるようになり、本培養系の応用の幅が大きく広がったと言える。

5. HEV の感染培養系を用いた基礎研究への応用

継代培養を継続することにより、野生株 HEV

表 1 野生株 HE-JF5/15F_wt と 6 代目の継代株 HE-JF5/15F_p6 の全塩基配列の比較

塩基部位	遺伝子領域	塩 基						アミノ酸	
		wt	p6	下記塩基を持った既知 4 型 HEV 株数 (全 33 株)				部位	置換
				G	A	U	C		
355	ORF1	U	C	3	9	18	3	110	-
1450	ORF1	A	<u>U</u> *	21	12	0	0	475	-
2174	ORF1	U	C	0	1	12	20	717	Phe → Leu
2269	ORF1	A	G	10	21	1	1	748	-
2518	ORF1	U	<u>A</u>	1	0	21	11	831	-
3238	ORF1	A	G	2	31	0	0	1071	-
4874	ORF1	G	<u>A</u>	33	0	0	0	1617	Val → Ile
6549	ORF2	U	U/C	11	0	16	6	454	-
6881	ORF2	C	<u>U</u>	0	0	0	33	565	Ala → Val
7144	ORF2	A	<u>G</u>	0	33	0	0	653	Lys → Glu

* 既知 4 型 HEV 株に認められない変異に下線を付した。

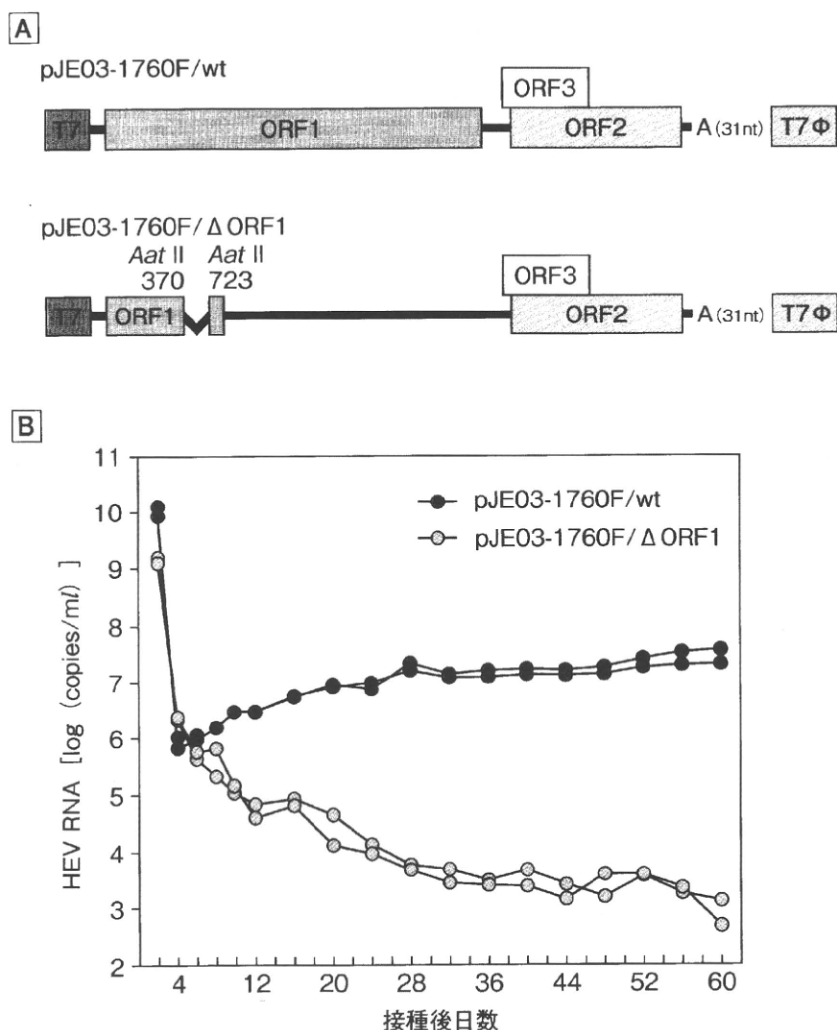


図6 JE03-1760F株の感染性cDNAクローンの作製

A HEV JE03-1760F株のcDNAコンストラクト：末端にT7プロモーターとT7ターミネーターを含む完全長cDNAをプラスミドベクターに挿入し、感染性cDNAクローン(pJE03-1760F/wt)を作製した。また、複製不能の陰性コントロールとして、ORF1欠損クローン(pJE03-1760F/ΔORF1)を作製した。

B PLC/PRF/5細胞への完全長RNAの導入と培養上清中のHEV RNAタイターの推移：in vitro transcriptionにより完全長HEV RNAを合成し、人工的にPLC/PRF/5細胞に導入した。2日ごとに半量ずつ培養液を交換しながら、培養上清中のHEV RNAタイターの変化を経時的に観察した。野生株クローンでは6日目以降、子ウイルスの産生を示すHEV RNAタイターの上昇を示した。

が培養細胞に馴化し、それに伴ってゲノムRNAに変異が出現することを既に示した。逆に人為的にゲノムRNAに変異を導入することができれば、HEV遺伝子の機能解析や個々の“自然発生(naturally occurring)”の変異のウイルス学的意

義の解明も可能となる。そこでJE03-1760F株の感染性cDNAクローンを作製した⁴²⁾。具体的には、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T7ターミネーターとの間に挿入したゲノムプラスミドを構築した(図6A)。このゲノムプラスミドからin vitro transcription法により完全長のHEV RNAを合成し、5'末端にキャップを付加したのち、PLC/PRF/5細胞に導入したところ、培養上清中に 10^7 copies/mlを超える高いレベルでのHEV産生が認められた(図6B)。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と同等の増殖能を示すクローン化HEVを作ることができた。

HEVの3つのORFのうち、ORF3にコードされた蛋白の機能の詳細は不明であり、粒子形成に与っているか否かについても分かっていなかった。そこで、ORF3の開始コドン(ATG)をGCAに変異させた、ORF3欠損cDNAクローン(ΔORF3)(図7A)を作製し、その全長RNA

をPLC/PRF/5細胞にtransfectした。その結果、ΔORF3ウイルスでは細胞内で野生株pJE03-1760F/wtと同等レベルのHEV RNAが検出されたにも拘らず、培養上清中への子ウイルスの放出は殆ど認められなかった(図7B)⁴³⁾。加えて、抗

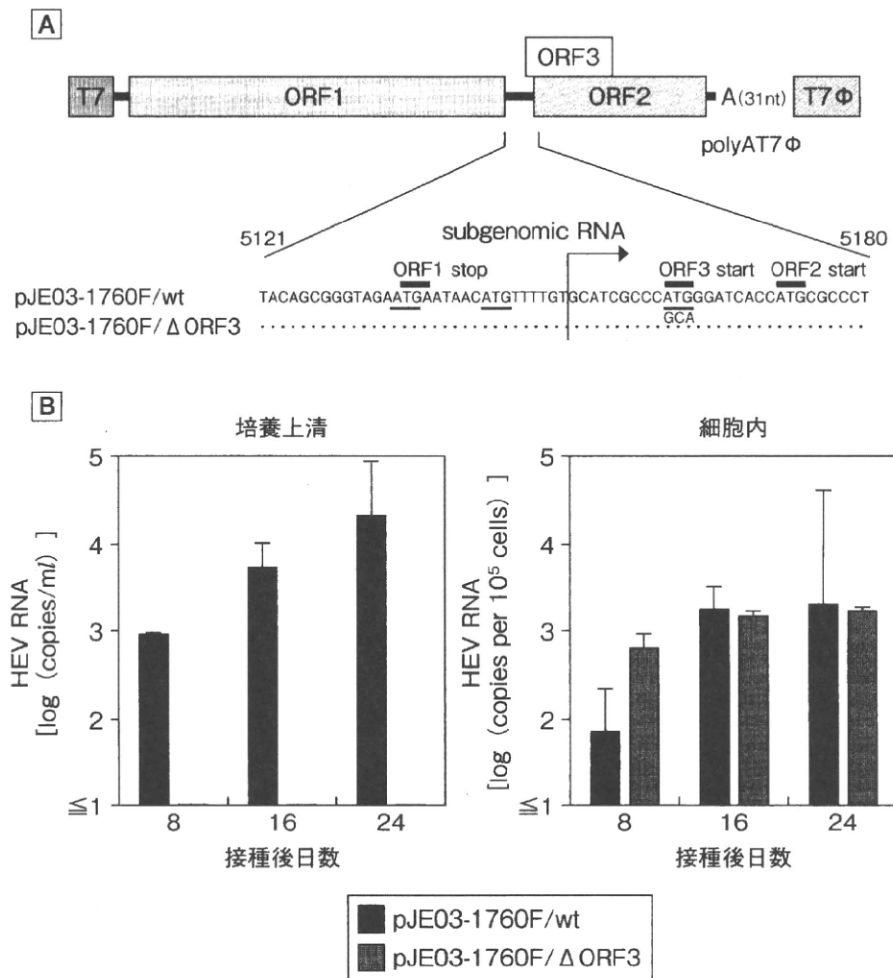


図7 ORF3 欠損クローンの作製と評価

A ORF3 欠損クローンの作製: ORF3 の開始コドン(ATG)を GCA に変異させたクローン(pJE03-1760F/ΔORF3)を作製し, *in vitro* transcription により合成した完全長 RNA を PLC/PRF/5 細胞に導入し, 得られた子ウイルスを A549 細胞に接種した。

B 接種後 8, 16, 24 日目の培養上清中および細胞内の HEV RNA タイターを測定した。細胞内では野生株とΔORF3 について同等の増殖パターンが認められたが, 培養上清中ではΔORF3 に由来する HEV RNA は検出されなかった。

ORF3 mAb (TA0536) を用いた immuno-capture PCR 法によって検討した結果, 糞便中の HEV 粒子と異なり, 培養上清中と血清中の HEV 粒子上には ORF3 蛋白が存在していることが明らかになった^{41, 43, 44}。界面活性剤非存在下での捕捉率は数%に過ぎず, 種々の界面活性剤による処理によって捕捉率は約 100%に達することから, ORF3 蛋白は培養上清中や血清中の HEV 粒子上で細胞由来の膜にほぼ覆われた状態で存在しているものと考えられる。また, 糞便中の HEV 粒子

を抗 ORF3 mAb で捕捉できなかったのは, 肝臓から胆管に放出され, 腸管に排泄される過程で胆汁や膵液に曝され, 細胞膜とともに ORF3 蛋白が除去されることに起因するものと考えられた。実際, 培養上清中の HEV 粒子を界面活性剤 (0.1% NP-40) と蛋白分解酵素 (0.1% プロナーゼ E) で処理することにより, 抗 ORF2 mAb によって粒子はほぼ完全に捕捉されるのに対して, 抗 ORF3 mAb では全く捕捉されなくなり, ショ糖液中での浮上密度も処理前の 1.15–1.16 g/ml から糞便

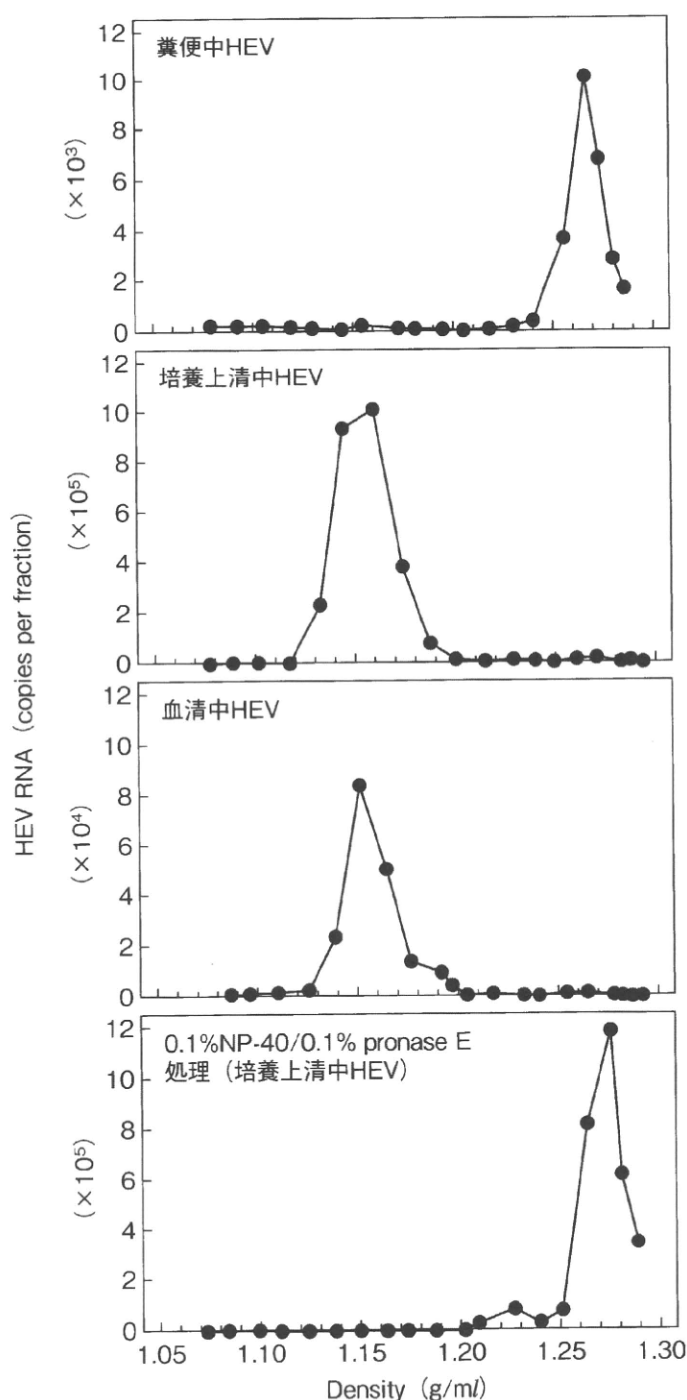


図8 密度勾配平衡遠心法によるHEV粒子のショ糖液中での浮上密度

中HEV粒子と同等の1.27–1.28 g/mlにシフトした(図8)。

以上の結果から、HEVは細胞由来の膜に覆われ、ORF3蛋白を担った状態で感染細胞から放出され、血中(培養上清中)では“エンベロープに覆

われた”ウイルスとして存在し、糞便中では“エンベロープを持たない”ウイルスとして存在することが示された。また、ORF3欠損ウイルスは細胞内では増殖できても分泌能を欠いていることが分かった。ORF3蛋白は細胞内でさまざまな機能を発揮する multifunctional protein であると看做されているが⁴¹⁾、本研究の結果は、ORF3蛋白が構造蛋白でもあり、感染細胞からの放出に重要な役割を果たしていることを示している。

おわりに

E型肝炎は2003年11月から「感染症法」の四類感染症に分類され、診断後直ちに届け出ることが義務付けられていながらも、依然として保険適用になったE型肝炎の診断薬が一つもないという状況が続いている。しかし、故飯野四郎先生が製造承認のための臨床性能試験の世話人の労をとって下さっていた診断薬「イムニス IgA anti-HEV EIA」が申請から大分時間が経過したが、今年の7月8日付けで認可されたと聞いている。待望の国内初の診断薬の登場によってE型肝炎の正確な診断・実態把握が可能となり、医療現場でのE型急性・劇症肝炎の早期診断、早期治療に役立つものと期待される。

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。HEVも基礎研究を推進するうえでようやくウイルス学の土俵に上がることが出来たと言える。糞便由来のJE03-1760F株やHE-JF5/15F株のみならず、血清中の多くのHEV株も効率的な増殖が可能で、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クローンも構築することができた。これらの培養系およびreverse genetics systemを用いることにより、HEVの生活環の解明、有効

な抗ウイルス薬のスクリーニングや不活化ワクチンの開発など、これまでに培養系がないために殆ど手付かずであった研究の促進になるものと大いに期待される。

謝 辞

本研究は臨床の数多くの先生のご協力・ご支援の元に進行しているものであり、末筆ながらご協力下さっている全国の先生に深謝申し上げます。恩師・真弓忠先生(現, 自治医大名誉教授)のお教を忘れることなく、今後も臨床例から多くを学ばせて頂き、研究で得られた成果をいち早く医療現場に還元したいと考えております。

参 考 文 献

- 1) Feinstone SM, *et al.*: Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science* 1973; **182**: 1026-1028.
- 2) Balayan MS, *et al.*: Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 1983; **20**: 23-31.
- 3) Reyes GR, *et al.*: Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 1990; **247**: 1335-1339.
- 4) Kwo PY, *et al.*: Acute hepatitis E by a new isolate acquired in the United States. *Mayo Clin Proc* 1997; **72**: 1133-1136.
- 5) Takahashi K, *et al.*: Full-genome nucleotide sequence of a hepatitis E virus strain that may be indigenous to Japan. *Virology* 2001; **287**: 9-12.
- 6) Mizuo H, *et al.*: Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic cases of acute hepatitis in Japan. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 3209-3218.
- 7) Takahashi M, *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* 2003; **84**: 851-862.
- 8) Tei S, *et al.*: Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 2003; **362**: 371-373.
- 9) Sonoda H, *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* 2004; **42**: 5371-5374.
- 10) Yazaki Y, *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* 2003; **84**: 2351-2357.
- 11) Suzuki K, *et al.*: Fulminant hepatitis E in Japan. *N Engl J Med* 2002; **347**: 1456.
- 12) Okamoto H, *et al.*: Features of hepatitis E virus infection in Japan. *Intern Med* 2003; **42**: 1065-1071.
- 13) Tanaka T, *et al.*: Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *J Gen Virol* 2007; **88**: 903-911.
- 14) Okamoto H: Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res* 2007; **127**: 216-228.
- 15) Zhao C, *et al.*: A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China. *J Med Virol* 2009; **81**: 1371-1379.
- 16) Kamar N, *et al.*: Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med*. 2008; **358**: 811-817.
- 17) Ollier L, *et al.*: Chronic hepatitis after hepatitis E virus infection in a patient with non-Hodgkin lymphoma taking rituximab. *Ann Intern Med*. 2009; **150**: 430-431.
- 18) Haagsma EB, *et al.*: Chronic hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2008; **14**: 547-553.
- 19) Gotanda Y, *et al.*: Ongoing subclinical infection of hepatitis E virus among blood donors with an elevated alanine aminotransferase level in Japan. *J Med Virol* 2007; **79**: 734-742.
- 20) 岡本宏明: 医学と医療の最前線 E型肝炎の現況. 日内会誌 2006; **95**: 945-951.
- 21) Patra S, *et al.*: Maternal and fetal outcomes in pregnant women with acute hepatitis E virus infection. *Ann Intern Med* 2007; **147**: 28-33.
- 22) 相川達也ほか: 本邦初の妊婦に於ける3型土着株によるE型肝炎. 肝臓 2009; **50**: 163-165.
- 23) Mizuo H, *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* 2005; **76**: 341-349.
- 24) 阿部敏紀ほか: 本邦に於けるE型肝炎ウイルス感染の統計学的・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 2006; **47**: 384-391.
- 25) 佐藤 慎ほか: 海外渡航歴のないE型急性肝炎の1例. 肝臓 2002; **43**: 332-335.
- 26) Takahashi M, *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* 2002; **83**: 1931-1940.
- 27) 岡本宏明: E型肝炎ウイルスの基礎 (3) E型肝炎ウイルス感染の血清学的診断. 臨牀消化器内科 2006;

- 21: 569-577.
- 28) Takahashi M, *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* 2005; **43**: 49-56.
- 29) Takahashi M, *et al.*: A nationwide survey of hepatitis E virus infection in the general population of Japan. *J Med Virol* 2010; **82**: 271-281.
- 30) 飯野四郎ほか: E型急性肝炎の血清診断におけるIgAクラス抗HEV抗体測定試薬「イムニスIgA anti-HEV EIA」の有用性の検討. *医学と薬学* 2005; **53**: 461-469.
- 31) Inoue J, *et al.*: Development and validation of an improved RT-PCR assay with nested universal primers for detection of hepatitis E virus strains with significant sequence divergence. *J Virol Methods* 2006; **137**: 325-333.
- 32) Kazachkov YA, *et al.*: Hepatitis E virus in cultivated cells. *Arch Virol* 1992; **127**: 399-402.
- 33) Huang R, *et al.*: Hepatitis E virus (87A strain) propagated in A549 cells. *J Med Virol* 1995; **47**: 299-302.
- 34) Tam AW, *et al.*: In Vitro propagation and production of hepatitis E virus from in vitro-infected primary macaque hepatocytes. *Virology* 1996; **215**: 1-9.
- 35) Meng J, *et al.*: A new PCR-based seroneutralization assay in cell culture for diagnosis of hepatitis E. *J Clin Microbiol* 1997; **35**: 1373-1377.
- 36) Huang R, *et al.*: Cell culture of sporadic hepatitis E virus in China. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; **6**: 729-733.
- 37) Wei T, *et al.*: 93G, a novel sporadic strain of hepatitis E virus in south China isolated by cell culture. *J Med Virol* 2000; **61**: 311-318.
- 38) Emerson SU, *et al.*: Putative neutralization epitopes and broad cross-genotype neutralization of Hepatitis E virus confirmed by a quantitative cell-culture assay. *J Gen Virol* 2006; **87**: 697-704.
- 39) Takahashi 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* 2007; **45**: 3671-3679.
- 40) Tanaka T, *et al.*: Development and characterization of a genotype 4 hepatitis E virus cell culture system using a HE-JF5/15F strain recovered from a fulminant hepatitis patient. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 1906-1910.
- 41) Takahashi M, *et al.*: 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* 2010; **48**: 1112-1125.
- 42) Yamada K, *et al.*: Construction of an infectious cDNA clone of hepatitis E virus strain JE03-1760F that can propagate efficiently in cultured cells. *J Gen Virol* 2009; **90**: 457-462.
- 43) Yamada K, *et al.*: ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. *J Gen Virol* 2009; **90**: 1880-1891.
- 44) Takahashi M, *et al.*: Monoclonal antibodies raised against the ORF3 protein of hepatitis E virus (HEV) can capture HEV particles in culture supernatant and serum but not those in feces. *Arch Virol* 2008; **153**: 1703-1713.
- 45) Chandra V, *et al.*: Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *J Biosci* 2008; **33**: 451-464.

著者紹介



岡本宏明 (おかもと ひろあき)

1979年 東北大学医学部卒業

1979年—1984年 いわき市立総合磐城共立病院
内科 (臨床研修医・内科医員)

1983年 自治医科大学 (予防生態学) 研究生

1985年 自治医科大学 (予防生態学) 助手

1987年 自治医科大学にて医学博士の学位取得

1987年 自治医科大学 (予防生態学) 講師

2000年 自治医科大学 (分子病態治療研究センター・分子ウイルス学研究部) 助教授

2003年—現在 自治医科大学 (感染・免疫学講座ウイルス学部門) 教授

2003年—現在 自治医科大学大学院医学研究科博士課程 (分子ウイルス学) 教授

2006年—現在 自治医科大学大学院医学研究科博士課程 (人間生物学系) 主任教授

自治医科大学医学部

感染・免疫学講座ウイルス学部門

〒329-0498 栃木県下野市薬師寺 3311-1

E-mail: hokamoto@jichi.ac.jp