

図4

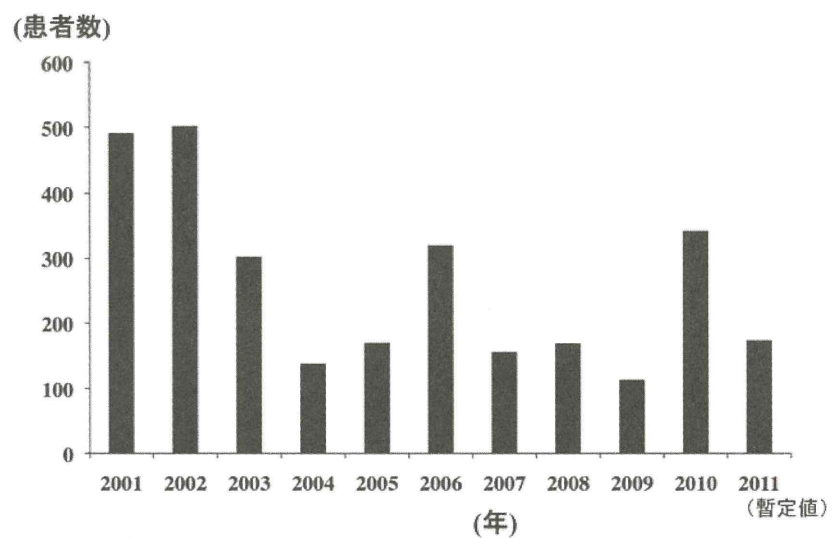
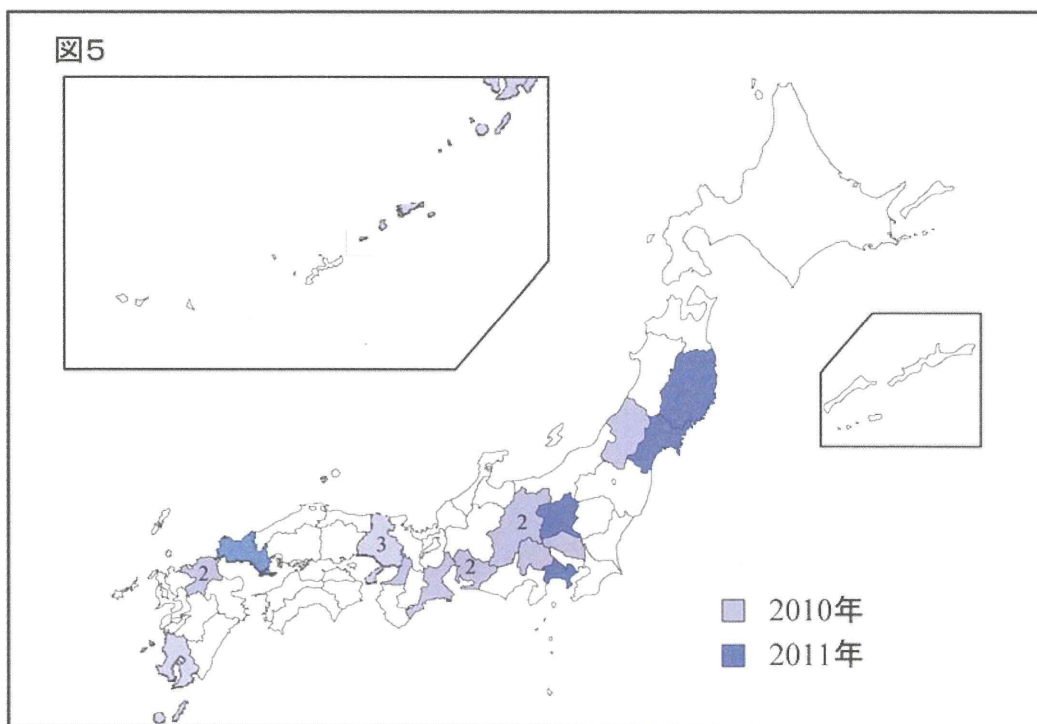


図5



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 23 年度分担研究報告書

千葉県における最近みられた A 型肝炎例の解析

研究分担者 横須賀 収 千葉大学大学院医学研究院・腫瘍内科学 教授

研究要旨：近年、A 型肝炎の発生は減少傾向であったが、千葉大学医学部附属病院消化器内科に 2010 年 3 月から 2011 年 12 月までに 6 例の A 型急性肝炎重症型が入院した。A 型肝炎ウイルス（HAV）VP1/2A 領域の解析では subgenotype IA および IIIA がそれぞれ 4 例および 2 例みられ、本邦でも HAV subgenotype IIIA が浸透している可能性が示唆された。一方、2011 年には千葉市内で、すし店が感染源となった A 型肝炎の集団発生事例がみられ、HAV subgenotype IA によるものであった。新たな治療薬剤の開発を行なうことを目的として、インターフェロン λ の HAV internal ribosomal entry-site（IRES）活性に対する抑制効果を検討したところ、インターフェロン λ 1（IL29）が HAV IRES 活性の抑制に有用であることが判明した。

<研究協力者>

神田 達郎（同腫瘍内科学、特任講師）
藤原 慶一（同腫瘍内科学、講師）
今関 文夫（同腫瘍内科学、准教授）

A. 研究目的

A 型肝炎ウイルス（HAV）は急性肝炎、時に劇症肝炎の原因となることが知られている。近年、公衆衛生環境の改善に伴い A 型肝炎の発生は減少傾向であったが、千葉大学医学部附属病院消化器内科に 2010 年 3 月から 2011 年 12 月までに 6 例の A 型急性肝炎重症型が入院した。さらに 2011 年には千葉市内で回転すし店が感染源となった A 型肝炎の集団事例が発生した。

2003 年に行なった本邦の HAV47 例におけるゲノタイプの検討では IA 44 例、IB 2 例、IIIA 1 例であった。近年韓国での流行株は IA に加え IIIA が増加していることが報告されている。そこで今回経験した症例の genotype を解析することを目的とした。

一方、HAV IRES を含む Bicistronic reporter system を用いて HAV に対する治療薬剤の開発を行なってきた。今回はインターフェロン（IFN）- λ の HAV IRES 依存性翻訳について検討した。

B. 研究方法

1. 2010 年 3 月から 2011 年 12 月までに千葉大学医学部附属病院消化器内科に入院した A

型肝炎重症型 6 例の HAV subgenotype について検討した。血清から HAV RNA を抽出後、RT-PCR にて HAV VP1/2A 領域を増幅後、直接塩基配列決定法に基づいて HAV subgenotype を決定した。

2. 2011 年に千葉市内で起きた回転すし店が感染源となった A 型肝炎集団食中毒症例のうち国立千葉医療センターおよび千葉大学医学部附属病院消化器内科に入院した 29 例の患者血清を対象とし、HAV subgenotype を決定し比較検討した。

3. HAV は IRES 依存性翻訳によりその蛋白を発現し増殖に深く関わっていることが知られている。我々の作成した HAV IRES を含む Bicistronic reporter construct を用いてインターフェロン（IFN） λ （IL28A、IL28B、IL29）の HAV IRES 依存性翻訳に対する影響を検討した。IL28A、IL28B、IL29 発現 Huh7 細胞を作成し（発現ベクターは Prof. T. Betakova, Slovak Academy of Sciences に供与していただいた）、検討した。また、IL29 と IFN- α およびアマンタジンとの併用効果に関しても Huh7 細胞を用いて検討を行なった。

倫理面への配慮：千葉大学では少数民族を含む人権に十分配慮を行なっている。臨床検体は千葉大学医学部倫理委員会の承諾を得た上で取り扱った（受付番号：1160、課題名：A 型肝炎の

重症度と A 型肝炎ウイルスゲノタイプおよび A 型肝炎ウイルス遺伝子配列の検討)。

C. 研究結果

1. 2010 年から 2011 年までの 2 年間に千葉大学医学部附属病院消化器内科に入院した A 型肝炎重症型 6 例の HAV subgenotype の解析により、4 例が subgenotype IA、2 例が subgenotype IIIA に属することが明らかとなった。
2. 2011 年 1 月から 3 月までに国立千葉医療センターおよび千葉大学医学部附属病院消化器内科に入院した A 型肝炎 29 例中 28 例が千葉市内の回転すし店に行き、そして臨床症状が出現していた。3 症例が急性肝炎重症型であった。HAV RNA は 29 例中 25 例 (86. 2%) に VP1/2A 領域における RT-PCR 法を用いて検出可能であった。全分離株は subgenotype IA に集簇し、VP1/2A 領域の 232bp の検討では 100% のホモロジーを認めた。これらは Ishii らの提唱した日本固有株 IA-1 に属していた。
3. IFN- λ 発現 Huh7 細胞に HAV IRES reporter construct を遺伝子導入したところ 48 時間後の検討で IL29 が HAV IRES 活性をより強く抑制した。また IL29 を IFN- α またはアマタジンと併用することによりさらに強く HAV IRES 活性を抑制することが明らかとなった。

4. 考察

1. 藤原ら (2003) の検討によると本邦における HAV subgenotype IIIA の頻度は 2. 1% と報告されている。今回急性肝炎重症型の 33. 3% に HAV subgenotype IIIA がみられたことにより HAV subgenotype IIIA が本邦でも広まっている可能性が示唆された。
2. 2011 年千葉市内でみられた回転すし店が感染源となった食中毒事例では HAV subgenotype IA-1 が原因ウイルスであり、分子疫学的重要性が再確認された。
3. IFN- λ は HAV IRES 活性を抑制することにより HAV に対する抗ウイルス作用を示す可能性が示唆された。

4. 結論

1. 最近経験した A 型肝炎重症型の検討から本邦でも HAV subgenotype IIIA が広まっている可能性が示唆された。
2. 千葉市内のすし店が感染源となった A 型肝炎の集団発生事例は HAV subgenotype IA

によるものであった。

3. インターフェロン λ は HAV IRES 活性の抑制に有用と考えられた。

F. 研究発表

1. 原著論文

- 1) Miyamura T, Ishii K, Kanda T, Tawada A, Sekimoto T, Wu S, Nakamoto S, Arai M, Fujiwara K, Imazeki F, Kiyohara T, Wakita T, Yokosuka O. Possible widespread presence of hepatitis A virus subgenotype IIIA in Japan: Recent trend of hepatitis A causing acute liver failure. *Hepatology Res* 2011 Dec 13. [Epub ahead of print].
- 2) Tominaga A, Kanda T, Akiike T, Komoda H, Ito K, Abe A, Aruga A, Kaneda S, Saito M, Kiyohara T, Wakita T, Ishii K, Yokosuka O, Sugiura N. Hepatitis A outbreak associated with a revolving sushi bar in Chiba, Japan: application of molecular epidemiology. *Hepatology Res* 2012 (in press).

G. 知的所有権の取得状況

今回の研究に関しては特になし

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 23 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、主に右記の如き結果を得た。(i) Hepatitis A virus (HAV) 韓国株 3 本と日本国内株 23 本の完全長乃至準完全長塩基配列を決定した；(ii) Hepatitis E virus (HEV) “New Sapporo Strain”の再流行を観測した；(iii) 山口県内の E 型肝炎症例から日本には珍しいタイプの genotype 4 HEV を検出した。

研究協力者：高橋和明、安倍夏生、藤原有希、北村珠美、鈴木美幸、橋本みちえ、SM アクバル、三代俊治（東芝病院研究部）、鄭淑香（ソウル大学）、姜貞憲（手稲溪仁会病院）、杉之下与志樹（神戸市立中央病院）、一木康則（九州厚生年金病院）、川上万里（まび記念病院）、須藤恒久（秋田大学名誉教授）、道免和文（千早病院）、賀古眞（湘南鎌倉総合病院）、加藤康幸（国立国際医療研究センター）、沖田幸祐（下関厚生病院）、北嶋直人（市立加西病院）、北海道 E 型肝炎研究会世話人及び参加施設の諸先生方、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つ。

B. 研究方法、結果、考察

1. A 型肝炎ウイルス (HAV) 日本株と韓国株の完全長ゲノム解析

日本と韓国は隣国同士であり古くから人も文物も往来頻繁にして病原体すら例外ではないと思われる。例えば近年韓国内で大流行した A 型肝炎の原因株が逸早く日本に上陸し日本国内津々浦々へと既に感染が拡大してしまった可能性もある。

然様な可能性を検証するためには両国で採取された分離株の遺伝子塩基配列を相互比較すればよいが、残念なことに従前韓国株として公開乃至報告されている HAV 塩基配列は全て、僅か数百塩基程度の長さでしかない部分配列であることが分った。

そこで我々は、ソウル大学鄭淑香先生から韓国 A 型肝炎患者由来 cDNA を 5 症例分御提供頂き、完全長 HAV genome 解析に挑んだ結果、そのうち 3 症例に於いて準完全長塩基配列を得ることが出来た。一方で

日本国内症例からは新たに 22 本の完全長乃至準完全長 HAV 塩基配列を決定した。これに昨年度の研究で決定済みの尾去沢株を加えると、此の 2 年間で合計 26 本の HAV genome について少なくとも準完全長の塩基配列が得られたことになる(内訳は Table 1、系統樹は Figure 1 を参照)。

Isolate name	Genotype	試料採取	試料提供
HA286-Aki1957	IA	1957	須藤恒久
HAJSK-Tok90	IA	1990	(自験例)
HAJYN-Tok90	IA	1990	(自験例)
HAJTK-Tok90	IA	1990	(自験例)
HAJYS-Tok90	IA	1990	(自験例)
HAJMO-Tok91	IA	1991	(自験例)
HAJKI-Tok91	IA	1991	(自験例)
HAJSN-Tok91	IA	1991	(自験例)
HAJSN-BorSap99	IA	1999	姜貞憲
HAJMT-IndOka01	IIIA	2001	川上万里
HAJKH-Tok04	IA	2004	(自験例)
HAJTM-Tok05	IA	2005	(自験例)
HAJST-Tok06	IA	2006	(自験例)
HAJYH-Tok06	IA	2006	(自験例)
HAJNS-Tok07	IIIA	2007	(自験例)
HA082-Kor07	IIIA	2007	鄭淑香
HA094-Kor07	IIIA	2007	鄭淑香
HAJSK-Tok07	IIIA	2007	(自験例)
HA510-Kor08	IIIA	2008	鄭淑香
HAJSN-Tok09	IA	2009	(自験例)
HAJKS-Fukuo10	IIIA	2010	一木康則
HAJHT-Kob10	IIIA	2010	杉之下与志樹
HAJIH-Fukuo10	IA	2010	道免和文
HAJTS-SinKan11	IA	2011	賀古 眞
HAJHI-Tok11	IIIA	2011	(自験例)
HAJXX-PapTok11	IA	2011	加藤康幸

Table 1

今回解析し得た韓国株 3 本は全て genotype IIIA であり、日本株 5 本と共に渾然一体として単一のクラスターを形成した。これにより冒頭に述べた仮説が裏付けられたかに見える。しかし事は然程単純ではない。興味深いことに、このクラスターの中には 1 本だけノルウェー株が混入していた (Figure 2 参照)。

この IIIA クラスターに属する HAV 株について、準完全長 7332 nt の identity % を求めると、日本株 vs 韓国株の 97.5~98.5% を凌駕する高度一致率 98.7~99.1% が日本株とノルウェー株の間には存在した。従来 300 nt 前後の短い塩基配列の比較のみ

からは見えて来なかった興味深い所見として注目された。

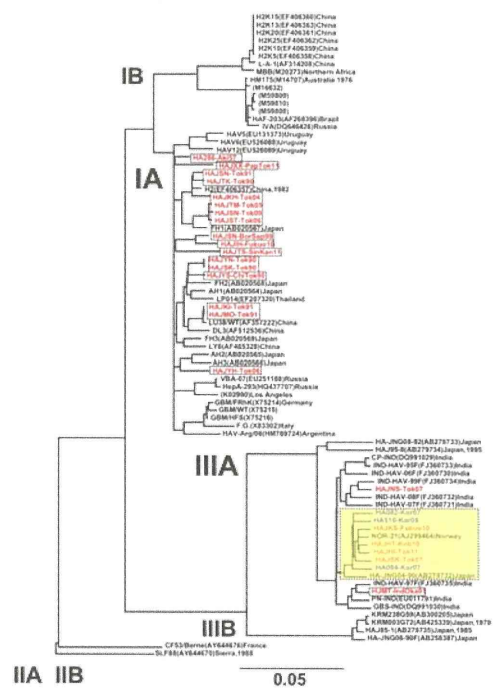


Figure 1

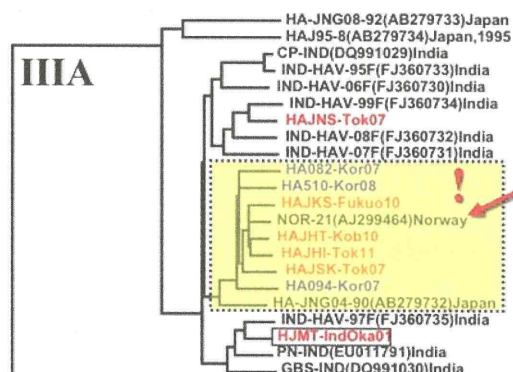


Figure 2(上記 Figure 1 の一部を拡大)

2. E 型肝炎ウイルス (HEV) genotype 4 の所謂“New Sapporo Strain”の再流行

今年度も北海道 E 型肝炎研究会(略称「道 E 研」)の参加施設から送付されて来る血清検体につき HEV antibodies (IgM, IgA, and IgG) の測定及び HEV RNA の

detection/sequencing 作業を粛々として続行して来た中で、2011年12月以降に札幌圏で発生した症例の多くが同一株に感染していることが注目された。解析の結果その株は2009年に同地区で流行した“New Sapporo Strain”の末裔であることが判明した(Figure 3 参照)。

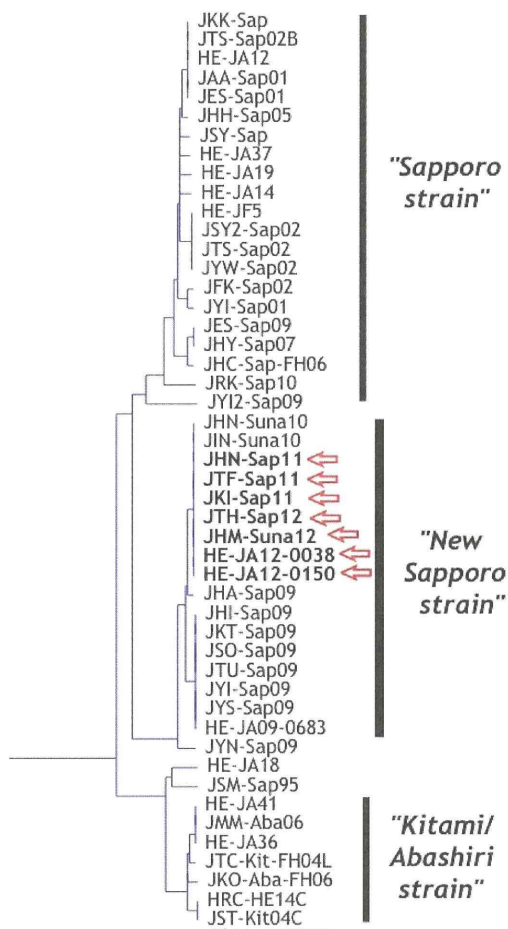


Figure 3. 矢印が今次流行からの分離株

3. HEV genotype 4 の亜型: 山口県の症例から

中部地方に存在する genotype 4 HEV が従前報告されている日本株の配列よりは寧ろ中国の上海株に似ていることを昨年度の報告で述べたが、今年度、下関厚生病院の

沖田幸祐先生の症例から分離した genotype 4 HEV は、中国の長春株に似る配列を有しており注目された。

C. 発表

1. 学会発表

- (1) 李天成, 高橋和明, 片岡紀代, 網康至, 須崎百合子, 吉崎佐矢香, 石井孝司, 脇田隆字, 三代俊治. Genotype 5 HEV 構造蛋白の発現および抗原性の解析(会議録). 日本獣医学会学術集会講演要旨集(1347-8621)152 回 Page 234 (2011.08).
- (2) 長田成彦, 加川建弘, 藤澤美亜, 広瀬俊治, 白石光一, 峯徹哉, 高橋和明, 三代俊治. 経口感染ウイルス肝炎の現状と展望: 当院における30年間にわたる経口感染する急性ウイルス肝炎の動向(会議録). 肝臓(0451-4203)52 巻 Suppl.1 Page A108 (2011.04).
- (3) 新井雅裕, 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, 中山千恵美, 中込良, 太田裕彦, 三代俊治. 経口感染ウイルス肝炎の現状と展望 急性肝炎症例および市販食品における HEV-RNA の検出から見た E 型肝炎の多様性(会議録). 肝臓(0451-4203)52 巻 Suppl.1 Page A112 (2011.04)
- (4) 新井雅裕, 手島一陽, 金原猛. 非 B 非 C 肝炎ウイルスによる肝障害 急性肝障害症例における E 型肝炎の検討(会議録). 日本消化器病学会雑誌(0446-6586)108 巻 Page A673 (2011.09)
- (5) 北嶋直人, 蓬萊亜矢, 高取健人, 佐竹信哉, 大瀬隆之, 新井雅裕, 瀬尾靖, 東健, 杉之下与志樹, 尹聖哲, 山下幸政. 兵庫県における E 型肝炎感染実態調査(会議録). 日本消化器病学会雑誌(0446-6586)108 巻 Page A957 (2011.09)
- (6) 小川浩司, 山本義也, 梅村真知子, 松林圭二, 安倍夏生, 高橋和明, 新井雅裕, 三代俊治. 2009 年秋札幌小流行由来“New Sapporo Strain”が分離された函館の E 型劇症肝炎 2 例について

- (会議録/症例報告). 肝臓(0451-4203)52 卷 Suppl.2 Page A630 (2011.09)
- (7) 三宅康広, 宮原孝治, 安中哲也, 池田房雄, 高木敏行, 高木章乃夫, 藤岡真一, 大澤俊哉, 小橋春彦, 姜貞憲, 高橋和明, 新井雅裕, 糸島達也, 山本和秀. 経口感染ウイルス肝炎の現状と展望 輸入感染症としての E 型肝炎(会議録/症例報告). 肝臓(0451-4203)52 卷 Suppl.1 Page A110 (2011.04).
- (6) 吉田行範, 志田勇人, 姜貞憲, 野村昭嘉, 新井雅裕, 高橋和明, 三代俊治. 黄疸が遷延した E 型急性肝炎重症型の一例(会議録/症例報告). 肝臓 (0451-4203)52 卷 Suppl.2 Page A630 (2011.09)
2. 論文発表
- (1) 高橋和明, 須藤恒久, 新井雅裕, 三代俊治. 1957 年“尾去沢肝炎”凍結保存 53 年目の血清から発掘した A 型肝炎ウイルス准完全長ゲノム塩基配列(原著論文). 肝臓(0451-4203)52 卷 6 号 Page 376-379 (2011.06).
- (2) 新井雅裕. 経口ウイルス肝炎感染症の最新動向と最新の診療. Medical Practice (0910-1551)28 卷 8 号 Page1355-1358 (2011.08).
- (3) 道免和文, 小野原伸也, 田中博文, 春野政虎, 下田慎治, 姜貞憲, 石井孝司, 高橋和明. 2010 年 A 型肝炎ウイルス福岡株に対する分子疫学的検討: 1999 年ボルネオ(カリマンタン)島由来株との近縁性(原著論文). 肝臓(0451-4203)52 卷 8 号 Page 497-502 (2011.08).
- (4) 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 22 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(最終報告)(原著論文). 神緑会学術誌 (0914-9120)27 卷 Page 18-21 (2011.08).
- (5) 加藤秀章, 高橋和明, 中村誠, 池内寛和, 平野敦之, 安倍夏生, 新井雅裕, 三代俊治. 野生イノシシ喫食会への参加後に発症した愛知静岡株による E 型急性肝炎の 2 例(原著論文/症例報告). 肝臓 (0451-4203)52 卷 8 号 Page 524-527 (2011.08).
- (6) Nakano T, Takahashi K, Pybus OG, Hashimoto N, Kato H, Okano H, Kobayashi M, Fujita N, Shiraki K, Takei Y, Ayada M, Arai M, Okamoto H, Mishiro S. New findings regarding the epidemic history and population dynamics of Japan-indigenous genotype 3 hepatitis E virus inferred by molecular evolution. Liver Int 2011 Dec 18 [Epub ahead of print] PMID: 22181032
- D. 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
- (以上)
-

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 23 年度分担研究報告書

北海道地区献血者集団における HEV 感染の実態解明
および関東地区献血者集団における HAV 抗体保有率調査

研究分担者 日野 学 日本赤十字社 血液事業本部

研究要旨：1) 2011 年 1-12 月に北海道内献血者 279,841 名を対象に、HEV RNA スクリーニングを実施した。陽性者数は 35 名（陽性頻度 0.013%）で zoonotic food-borne 主体の HEV 感染が定着していると推察され、今後も道内の HEV 感染動向に注視していく必要がある。2) HEV 感染初期シリーズ検体 21 例について IgM/IgA/IgG クラスの HEV 抗体を調べた結果、ALT 最高値 \geq 100IU/L の 9 例では全例で 3 種の抗体はほぼ同時期に出現し、IgA 抗体検出は E 型肝炎の診断に有用であると考えられた。また ALT 最高値 $<$ 100IU/L の 12 例中 5 例では IgA もしくは IgM が出現しなかった。3) 関東地区の献血者 1200 名について HAV 抗体を調べたところ、50 歳未満の抗体保有者はきわめて少なく HEV 抗体分布とは対照的であった。

〈研究協力者〉

松林圭二、坂田秀勝、飯田樹里、佐藤進一郎
（北海道赤十字血液センター 検査部）
広尾彰彦（日赤血漿分画センター 検査課）
内田茂治（日赤中央血液研究所 感染症解析部）

し、また、HEV RNA の定量、ORF2 412nt に基づく NJ 法による分子系統樹解析を行った。さらに陽性献血者に対しては、献血前の動物内臓肉喫食歴に関するアンケート調査を行うとともに、陽性が判明した献血から 6 ヶ月以内の遡及調査および献血後追跡調査を行った。

A. 研究目的

本研究では①献血者集団における HAV、HEV 感染の実態を調査し、②輸血用血液による HEV 感染のリスク評価を行い、③適切な対策を講じることを目的とする。

2. HEV 感染初期検体のクラス別 HEV 抗体調査

HEV NAT 陽性が判明し 1-2 か月間フォローアップできた 21 名について IgA、IgM、IgG クラスの抗 HEV をイムニス IgA anti-HEV EIA、IgG/IgM anti-HEV EIA（特殊免疫研究所）で測定した。

B. 研究方法

1. HEV RNA スクリーニング

昨年に引き続き、2011 年 1 月から 12 月までの北海道内献血検体のうち、血清学的感染症スクリーニング陰性かつ ALT 値 61 IU/L 未満の検体 279,841 本を対象として調査した。

HEV RNA の検査は、まず 20 プール血漿検体 265 μ L から QIAamp Virus BioRobot MDx Kit (Qiagen) を用いて核酸を抽出し、続いて ORF2/3 領域の 75 塩基をターゲットとする Real-time RT-PCR 法により、QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen) を用いて Applied Biosystems 7500 で増幅・検出した。陽性検体はさらにプールを構成する 20 検体について個別に検査を実施した。HEV RNA 陽性検体については、抗 HEV IgM 抗体および IgG 抗体を IgG/IgM anti-HEV EIA（特殊免疫研究所）で測定

3. 抗 HAV IgG 抗体保有率調査

2010 年 11 月に東京都、神奈川県、山梨県、千葉県、および茨城県で献血された血液で、各年代・男女別に 100 本ずつ合計 1200 本を対象に、アキシム HA ダイナパック (ver.2) で抗 HAV IgG 抗体を測定した。

倫理面への配慮：検体はすべて匿名化されており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. HEV RNA スクリーニング

2011 年の HEV 陽性者数は 35 名（男性 25 名、女性 10 名）、陽性頻度は献血者延べ 1 万人当たり 1.25

人（男性1.38名、女性1.01名）で、有意な性差は認められなかった（図1、図2）。昨年と比較すると男性の陽性率は変わらないが、女性の陽性率は高くなった。陽性者の発生時期については、例年同様、季節性は見られず（図1）、居住地については21例（60%）を札幌市在住者が占めた。

2005年から2011年までの7年間においては、HEV NAT陽性者総数は231名（男性172名、女性59名）に達し、献血者延べ1万人当りの平均陽性者数は1.20人（男性1.42人、女性0.82人）となり有意な性差が認められた（表1）。

HEV RNA陽性判明時の抗体保有状況は例年と同様で、86%の陽性者はIgM、IgGいずれの抗体も陰性であり、献血時は感染初期であったと考えられた。献血2か月以内の内臓肉喫食歴は65%と依然として高く、1か月以内に2回以上経過観察できた陽性者では半数がALTが45 IU/L以上に上昇し軽度の肝炎症状を示した（表1）。

遺伝子型についてはHEV濃度が極めて低い1例を除き同定できた。3型30例（88%）、4型4例（12%）となり、例年通り大多数を3型が占めた（表1）。遺伝子系統解析の結果、従来通り、分離した時期、献血者の居住地に近いものほど遺伝子配列の高い類似性を示した（図3）。

12月の同日に献血してHEV陽性が判明した男女2名は海外渡航歴はなく、11月に札幌市内の同じ飲食店で会食し同じメニュー（ホルモン）を食し、男性は急性肝炎を発症した。2人から得られたORF2領域の412塩基配列（HRC-HE246, HRC-HE247）は4型で完全に一致し、内臓肉摂食による感染と推定された。この株は6月に札幌市内の献血者に見出されたHRC-HE234と99.3%の高い類似性を示したが、輸入感染症例を除く国内既報株との類似性は低く、中国株、ベトナム株に近かった（図3）。

2. HEV感染初期検体のクラス別HEV抗体調査

経過中にALT最高値が100IU/L以上を示した9例全例でIgM/IgA/IgG抗体はほぼ同時期に出現した。ALT最高値が100IU/L未満の12例については、7例でIgM/IgA/IgG抗体はほぼ同時期に出現したが、5例ではIgAあるいはIgMが出現しなかった。

3. 抗HAV IgG抗体保有率調査

50歳未満では男女ともHAV抗体保有者はほとんどいないが、50代で10%、60代で43%と高い保有率を示した（図4）。調査対象とした集団の構成は異なるが、8年前の感染研調査データ（Kiyohara, Microbiol Immunol 51, 185-191, 2007）と比較すると、当時の陽性率をちょうど8年分を高年齢者側へシフトさせた陽性率にほぼ等しかった。

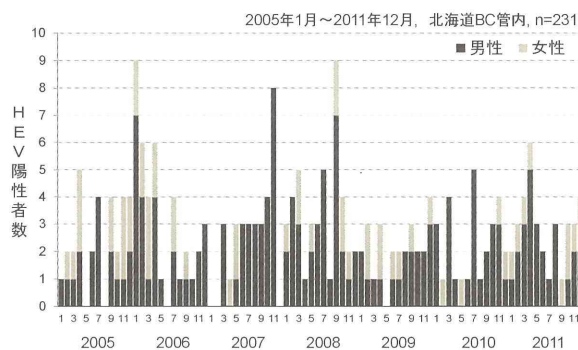


図1 HEV NAT陽性献血者の月別発生数

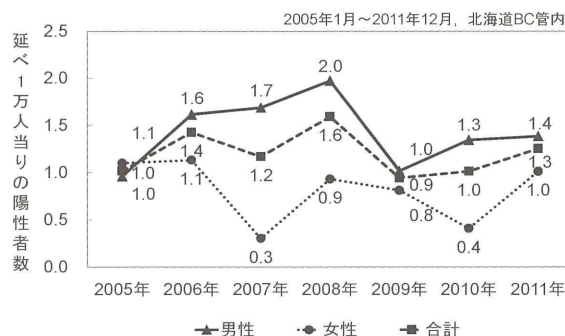


図2 HEV NAT陽性頻度の年次推移

表1 HEV RNAスクリーニングまとめ

	2011.1 - 2011.12 (1yr)	2005.1 - 2011.12 (7yr)
■ 調査期間	2011.1 - 2011.12 (1yr)	2005.1 - 2011.12 (7yr)
■ 検査総数	279,841	1,931,847
■ 陽性者数	35	231
■ 陽性率	0.013% (1/7,995)	0.012% (1/8,363)
■ 年齢	39.1+/-10.9 (20-60)	41.1+/-11.9 (17-68)
■ 男:女	25:10 (71%:29%)	172:59 (74%:26%)
■ Genotype (G3:G4)	30:4 (88%:12%)	212:17 (93%:7%)
■ Anti-HEV抗体		
IgM(-)/IgG(-)	30 (86%)	188 (81%)
IgM(+)/IgG(-)	0 (0%)	3 (1%)
IgM(+)/IgG(+)	5 (14%)	31 (13%)
IgM(-)/IgG(+)	0 (0%)	9 (5%)
■ 動物内臓肉喫食歴*	15/23 (65%)	117/166 (70%)
ALT>45 IU/L	7*/13*3 (54%)	42*/73*3 (58%)
G3:G4	6/11 (55%): 1/2 (50%)	37/66 (56%): 5/7 (71%)

*1: 一般献血者の献血前動物内臓肉喫食歴 28%

*2: peak ALT 53-362 IU/L

*3: 陽性献血後1ヶ月以内に2回以上経過観察できた陽性ドナー数

*4: peak ALT 48-3266 IU/L

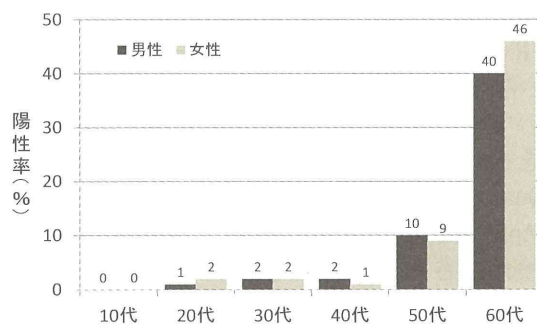


図4 男女年代別HAV抗体陽性率

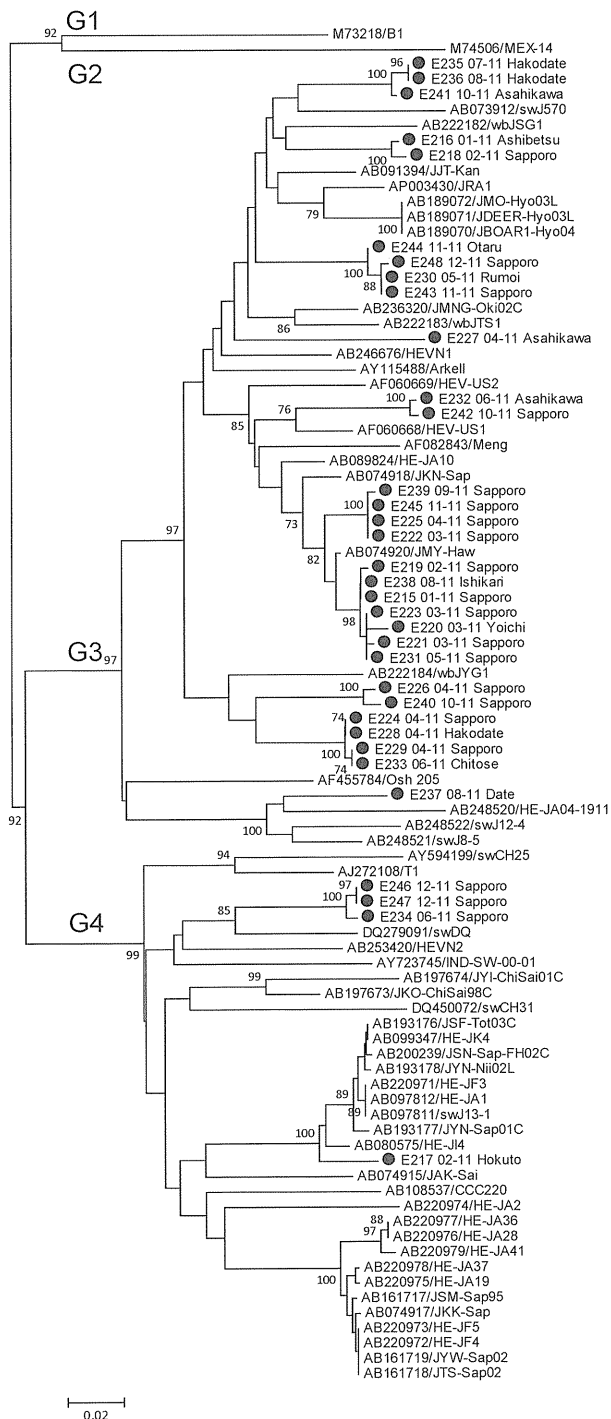


図3 平成23年に分離されたHEV配列34株の分子系統樹本研究での分離された株(●)：株名、献血月(MM-YY)、居住地(市 or 郡)

D. 考察

2011年の北海道内献血者のHEV RNA陽性率は前年に比べ若干上昇したが、これは女性の陽性率が増加したためであった。陽性者の特徴については特に変化は見られなかったが、HEV遺伝子型については、献血時期や献血者の居住地に近いほど分子系統樹上の距離も近く高い類似性がみられた。

また、感染経路については、陽性献血者の献血前の内臓肉喫食歴が高いことから、従来通り食物を介する経口感染が主流を占めていると考えられた。とくに12月に発生した2名の陽性者は同じホルモンを食して同時期に同一株に感染したことから、食材の調査はできなかったものの、同一感染源である可能性が極めて高いと考えられる。この株は中国・ベトナム株に近縁で、国内では輸入感染症例1例を除いて近縁株の登録がないことから国内では珍しい株と考えられる。しかしながらこの株は海外渡航歴のない道内献血者3名から見つかることから、すでに北海道内に定着している可能性が高い。今後も感染源・感染経路の解明が重要と考えられる。HEV感染献血者においては抗HEV IgA抗体は概ね肝炎発症時期に出現しており、イムニス IgA anti-HEV EIA はE型肝炎の診断薬として有用と考えられる。また最高ALT値が100IU/L未満の不顕性感染事例ではIgA/IgMが出現しない例も存在したが、その理由は不明である。関東地区献血者のHAV抗体保有率は50歳以下で低く、同様に経口感染するHEVの抗体分布とは対照的であった。

E. 結論

- 1) 北海道内献血者ではzoonotic food-borne主体のHEV感染が定着していると推察され、HEV輸血感染を防止するために、今後も道内のHEV感染動向に注視していく必要がある。
- 2) イムニス IgA anti-HEV EIA はE型肝炎の診断薬として有用と考えられた。
- 3) 関東地区献血者集団においてはHAV抗体保有者は50歳未満ではほとんどいなかった。

E. 研究発表

学会発表

1. H. Sakata, K. Matsubayashi, I. Abe, S. Sato, T. Kato, S. Hino and H. Ikeda, Screening for HEV RNA in blood donors in Hokkaido, Japan, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 11-16 Sep, 2011, Sapporo, Japan.
2. K. Matsubayashi, Hepatitis E virus infection and blood transfusion in Japan, 22nd ISBT Regional Congress, 20-23 Nov, 2011, Taipei, Taiwan.

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 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 23 年度分担研究報告書

北海道 E 型肝炎研究会による北海道内 HEV 感染実態の研究

分担研究者 姜 貞憲 手稲溪仁会病院 消化器病センター

研究要旨：本研究班における我々の課題は、HEV 高侵淫地域と見做される北海道で発症する E 型急性肝炎の臨床像と治療法を明らかにし、さらに HEV 伝搬経路を究明することにより、本疾患の診療及び予防に資することである。北海道 E 型肝炎研究会（道 E 研）により観察された道内 HEV 感染数は 2011 年度に初めて減少に転じたが、その背景には HEV 遺伝子型 4 による感染例の減少が存在した。ブタ内臓肉摂取による感染は重要と思われるも、その他にも感染経路の存在が想定され、その解明が求められる。

〈共同研究者〉

狩野吉康 札幌厚生病院 第 3 消化器科
水尾仁志 札幌勤医協中央病院 内科
松居剛志 手稲溪仁会病院
消化器病センター
新井雅裕 東芝病院 研究部
岡本宏明 自治医科大学
感染・免疫学講座ウイルス学部門

断を援助する。HEV 感染指標陽性例では主治医との連携の下で HEV 感染の臨床像を検討し HEV 感染経路の解明を試みる。

本研究会発足 5 年間に収集した data から北海道内における HEV 感染実態を検討した。

D. 研究結果

1) 過去 5 年間ににおける北海道内 E 型急性肝炎発生実態

2007 年 1 月から 2011 年 12 月までの 5 年間、HAV, HBV, HCV の急性感染が除外された急性肝障害 399 例が道 E 研に登録され HEV 感染指標を real time に検討した結果 81 例（19.6%）で E 型肝炎が診断された。

A. 背景

北海道は HEV 高侵淫地域と見做されているが今なお不明な点が多い。北海道における E 型肝炎の実態を解明するため、real time な HEV 感染診断支援ネットワークである北海道 E 型肝炎研究会（道 E 研）を 2007 年に発足させた。

B. 研究目的

北海道地区において発生する E 型肝炎の実態と臨床像を解明し、特に重症例に対する至適治療法を明らかにする。当該地域における HEV 感染経路を究明する。

C. 研究方法

道 E 研は、HEV 感染研究施設（東芝病院研究部、自治医科大学感染・免疫学講座ウイルス学部門）の協力の下で、非 A, B, C 急性肝障害を対象に道内医療施設における HEV 感染の早期診

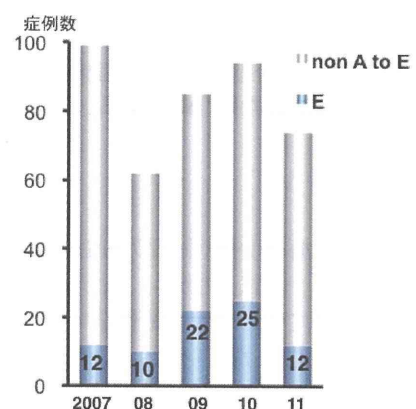


図1. 原因不明急性肝障害における E 型肝炎急性肝障害症例数の推移

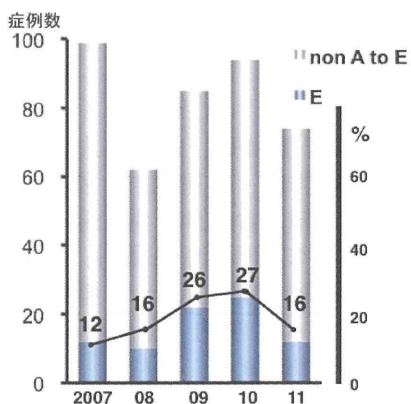


図2. 成因不明急性肝障害におけるE型急性肝炎の頻度

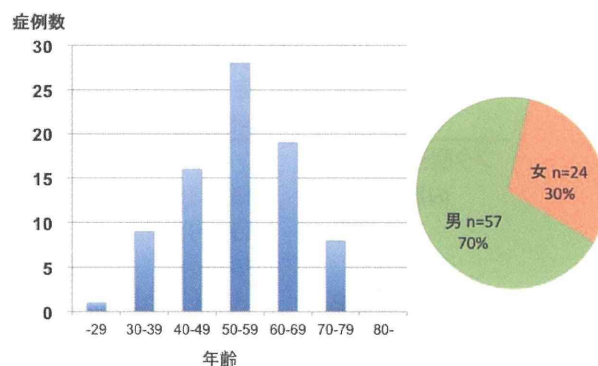


図3. 年齢と性別

2011年を含む最近5年間の年次別E型肝炎発生数の推移をみると、2007年から2010年迄の期間、症例数、登録された非ABC肝障害症例におけるHEV陽性例の頻度は何れも増加した。しかし、2011年においては、症例数は減少しその頻度も低下を示した(図2)。道E研による5年間の観察において、HEV感染者数とその非A、B、C型急性肝炎症例における割合が低下したのは初めてである。

2) E型急性肝炎症例の背景

E型肝炎81例の背景を検査すると男女比は7対3で、年齢は50歳台を中心におよそ正規分布を示した(図3)。北海道における症例の性別比では、これ迄報告された傾向に比べ女性がやや多いと考えられる。

3) HEV遺伝子型別症例数の年次別推移

図4で示すように、HEV遺伝子型が決定された77例においては、遺伝子型4による症例が52例と全体の2/3を占めた。年次別には2007、2009、2010年に、遺伝子型3に比して遺伝子型4の増加が目立つ。また、2011年における症例の減少の背景には、遺伝子型4による症例数の減少が存在すると考えられる。他方、遺伝子型3によるE型肝炎は2007年を除くと年間5例前後存在し、2011年も同様であった。遺伝子型4によるHEV感染が重症化に関連する事はかねてから指摘されており、北海道においても同様である事は2010年度分担報告書でも示した。以上から、北海道では遺伝子型4によるE型肝炎が症例数の上でも、臨床的にも重要である事が明らかである。

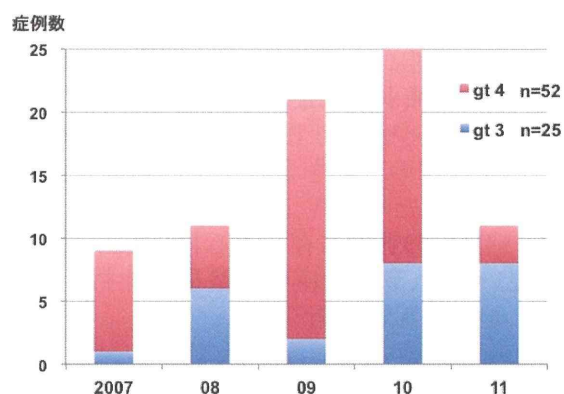


図4. HEV遺伝子型別症例数の推移

4) HEV感染経路に関する検討

道E研ではHEV感染例に対し感染経路に対する聴取を行った。現在迄明らかになっている感染経路として、ブタ内臓肉の不十分な加熱による摂取が挙げられ、重要である事に疑いはない。しかし、感染推定期間は発症前2-8週と考えられており、発症時に過去の喫食歴を正確に聴取する事は不可能である。過去5年間に診断した上記81例においても、25例では明らかな回答はえられず、ブタ内臓肉摂取歴は38例(43%)に留まった。他方、ブタ内臓肉を摂取しないと回答した症例は15例(19%)存在した。ブタ内臓肉摂取、未摂取例何れにおいても、性差には有意な統計学的差異を認めなかった。以上の事実からはブタ内臓肉摂取による感染経路が存在し重要と思われる北海道においても、その他の感染経路が存在する可能性が示唆された。

表1. HEV感染経路の検討

	症例数 n=81(%)	M / F 57/24
ブタ関連項目		
内臓肉摂取	38 (43)	27 / 11
未摂取	15 (19)	8 / 7
不明	25 (31)	20 / 5
養豚業従事	1 (1)	1 / 0
調理師	2 (3)	1 / 1

E. 結論

以上の結果からは、次の点が注目される。

2011 年度における E 型肝炎発生数は減少した。症例数減少の背景には HEV 遺伝子型 4 感染症例数の減少が挙げられる。症例数の 30% を占める女性例の一部を含むブタ内臓肉未摂取例における新たな HEV 感染経路が想定される。HEV 感染例の背後に存在する HEV 集団感染事例を見だし、新たな感染経路を解明することが差し迫った課題である。

F. 研究発表

学会発表

- 1) Jong-Hon Kang, Yoshiyasu Karino, Hitoshi Mizuo, Hiroaki Okamoto, and Shunji Mishiro, Increasing incidence of locally acquired hepatitis E in Hokkaido, the most endemic area in Japan. 46th Annual Meeting of the European Association for the Study of Liver. 2011 年 4 月 2 日 Berlin
- 2) 姜貞憲、水尾仁志、狩野吉康、岡本宏明、三代俊治 北海道における HEV 感染の実態 第 47 回日本肝臓学会総会ワークショップ 2011 年 6 月 3 日東京
- 3) 松居剛志、姜貞憲、金俊文、志田勇人、辻邦彦、真口宏介、小関至、狩野吉康 E 型急性肝炎遷延化例の検討 第 108 回日本消化器病学会北海道地方支部例会 2011 年 6 月 4 日札幌
- 4) 狩野吉康、水尾仁志、姜貞憲 北海道における E 型肝炎の実態- 4 年間の prospective study- 第 108 回日本消化器病学会北海道地方支部例会 2011 年 6 月 4 日札幌
- 5) 吉田行範、志田勇人、姜貞憲、野村昭嘉、吉田美佳、渡部直己、日下大隆 黄疸が遷延した E 型急性肝炎の 1 例 第 108 回日本消化器病学会北海道地方支部例会 2011 年 6 月 4 日札幌
- 6) 松居剛志、姜貞憲、狩野吉康 E 型急性肝

研究論文

- 1) 小関至、姜貞憲、水尾仁志、赤池淳、大村卓味、狩野吉康、松居剛志、佐賀啓良、渡辺正夫、三浦洋輔、倉敏郎、常松泉、松林圭二、坂田秀勝、岡本宏明、高橋和明、新井雅裕 2009 年秋に札幌圏で発生した E 型肝炎小流行の臨床的・ウイルス学的・分子疫学的解析 肝臓 2012; 53: 78-89
- 2) 姜貞憲 E 型肝炎の診断と治療 日本臨床 2011; 69: 588-592.

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 23 年度分担研究報告書

「岩手県を中心とした北東北における急性 E 型肝炎例の実態とその臨床像」

分担研究者：鈴木一幸 岩手医科大学 消化器・肝臓内科 教授

研究要旨：岩手医大消化器・肝臓内科では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を行ってきている。このシステムを利用して、2009 年 8 月から 2011 年 10 月末までに登録された急性肝障害例についてその成因を検索し、急性 E 型肝炎の実態とその臨床像について検討した。また、入院時の血清中のサイトカイン動態を急性 A 型および B 型肝炎例と比較検討した。急性肝障害の全登録数は 224 例であり、ウイルス性、自己免疫性、薬物性などいわゆる急性肝炎として取扱われる例は 165 例（74%）であり、非肝炎例（アルコール、循環障害、代謝性、中毒性など）は 59 例（26%）であった。急性肝炎の中で E 型肝炎（AH-E）は 10 例であり、急性肝障害全体の 4.5%、急性肝炎の 6.1%、成因不明の急性肝炎の 13%を占めた。遺伝子型の検討では 10 例中 9 例は 3 型、1 例は 4 型であった。3 型例は全例軽快したが、4 型の 1 例は高度黄疸と肝不全徴候を示した（最終的には他病院で死亡）。今回の検討では、感染源や感染経路は特定できなかった。17 種類の血清サイトカイン動態では、炎症性サイトカインの多くは EA 型肝炎に比し E 型肝炎で低く、とくに IL-7 濃度に有意差を認めた。

<研究協力者>

滝川康裕 岩手医科大学 消化器・肝臓内科 教授
宮坂昭生 岩手医科大学 消化器・肝臓内科 助教
熊谷一郎 岩手医科大学 消化器・肝臓内科 助教
王 挺 岩手医科大学 消化器・肝臓内科 助教

A. 研究目的

我々は北東北において急性肝障害患者の登録システムを構築し、成因と予後に関する調査研究を行ってきた。E 型肝炎ウイルス（HEV）による感染の血清学的診断法については血清 IgA 抗体の測定が最近になり保険承認されたが、日常診療の場では十分に普及しておらず、成因不明の急性肝障害症例における E 型肝炎の実態は未だ明らかになっていない。また、感染経路の同定、遺

伝子型による臨床像の差異、経口感染による A 型肝炎との臨床像の差異など検討すべき課題は多い。

本年度は、これまで 3 年間行ってきた急性肝障害患者の登録例について E 型肝炎の症例を集計し、さらに同じ経口感染を示す A 型肝炎と E 型肝炎の血清サイトカイン動態の差異を検討した。

B. 研究方法

当科では、「難治性の肝胆道疾患調査研究」班で作成した劇症化予知式に基づいて、北東北 4 県の 40 施設と共同で、急性肝障害患者の登録、搬送システムを構築し、劇症化予知・予防に関するプロスペクティブスタディを行っている。このシステムを利用して 2009 年 8 月からは、全急性肝障害の登録および血清保存を進め、成因ウイルスの検索を進めている。本研究では、このシステムの調査結果を基にして行った。

対象は、2009年8月から2011年10月末までの間に、登録された急性肝障害224例である。このうちHEVによる肝炎と診断された10例について患者背景、初診時や経過中のピーク値、初診時のHEVの動態（genotype、ウイルス量、抗体価など）を検討した。

HEVの確定診断については、保存血清を自治医科大学感染・免疫学講座に依頼し、HEVマーカーとしてIgG/IgM/IgAクラスHEV抗体、HEV RNA、HEV遺伝子型を測定した。

さらに、入院時の保存血清を用いて17種類の血清サイトカイン濃度を急性A型およびB型肝炎例と比較検討した。サイトカインの測定はBio-Rad社(米国)のBio-Plex human cytokine 17-plex panelを用いて測定した。血清サイトカイン濃度の正常値域は当科のYasumiらの報告(Hepatol Res 2007; 37:248)に準じた。

倫理面への配慮：本研究は岩手医科大学倫理委員会の研究承認を受け、また、患者情報の送付に関しては各施設で患者の承諾を得たうえで行った。

C. 研究結果

1. HEV肝炎の頻度

対象期間に、224例が登録され、肝炎以外の成因(循環障害、アルコール性、代謝性、中毒性)による肝障害例59例(26%)を除く165例(74%)が急性肝炎症例であった(表1)。

急性肝炎165例中77例(46.7%)が成因不明であり、そのうち10例がE型肝炎で

表1. 急性肝障害例の成因別頻度

	生存	死亡	計	小計
HAV	5	0	5	
急性HBV	14	1	15	
HBV Carrier	13	3	16	
HEV	9	1	10	
その他のウイルス(EBV, CMV, HSV, 他)	12	1	13	
薬物性	27	0	27	
自己免疫性	12	0	12	
成因不明	65	2	67	165 (74%)
アルコール	14	2	16	
循環障害	8	2	10	
代謝性	3	0	3	
中毒性	2	0	2	
悪性腫瘍浸潤	0	2	2	
追跡調査不十分	26	0	26	59 (26%)
計	210	14	224	(100%)

あった。したがって、全急性肝障害例に占めるE型肝炎の頻度は4.5%、急性肝炎に占める割合は6.1%、成因不明の急性肝炎に占める割合は13%であった。

2. AH-Eの臨床像

10例の臨床的背景を表2に示す。男性7例、女性3例であり、年齢は18歳から74歳であった。入院加療した症例が6例、外来フォローで経過した症例が4例であった。黄疸が軽微でPTが保たれている症例は外来での経過観察がなされることが多く、初診時の血液検体の保存がなければE型肝炎として診断されない可能性もあった。入院症例では高度の黄疸が遷延しPTが40%以下まで低下した1例の遺伝子型は4型であった。なお、本例は本人および家族が積極的な治療を希望せず、紹介先の病院に転院

表2. HEV急性肝炎10例の臨床的背景

症例	年齢	性	入院	予測劇症化確率(%)	最高TB (mg/dl)	最高ALT (IU/L)	最低PT (%)	DLST	遺伝子型	転帰
1	57	男	無	1.0	2.1	2214	100	+	3us	生存
2	53	男	有	0.9	1.7	1821	100	-	3us	生存
3	59	女	有	6.6	2.8	4215	72.0	-	3jp	生存
4	51	男	有	7.6	23.9	1356	89.5	+	3jp	生存
5	74	男	無	1.6	5.2	625	100	-	4	生存
6	18	女	有	14.7	4.5	1820	40.8	-	3jp	生存
7	75	男	有	2.8	12.8	1120	92	+	3jp	生存
8	42	男	無	0.4	3.9	3019	86.0	n. t.	3jp	生存
9	72	男	有	69.8	23.4	601	31.0	-	4	死亡
10	50	女	無	0.1	2.5	1360	100	n. t.	3us	生存

表3. 成因別にみた急性肝炎の血清サイトカイン濃度

	NR* (pg/ml)	AH-E n=13	AH-A n=9	AH-B n=14	P
IL-1 β	<2.0	0.22 [0.22-0.26]	0.5 [0.22-1.36]	0.22 [0.22-0.22]	0.164
IL-2	<2.0	0.3 [0.3-0.52]	0.3 [0.3-39.1]	0.3 [0.3-1.91]	0.467
IL-4	<2.0	0.03 [0.03-0.12]	0.09 [0.03-1.48]	0.06 [0.03-0.27]	0.436
IL-5	<2.0	0.2 [0.2-0.2]	0.2 [0.2-0.66]	0.2 [0.2-0.2]	0.084
IL-6	<2.0	5.74 [0.17-24.87]	18.17 [2.32-28.21]	4.54 [0.17-15.05]	0.201
IL-7	<14.5	4.64 [1.41-5.97]	8.74 [4.98-13.18]	2.69 [1.47-5.32]	0.006
IL-8	<2.0	15.67 [9.79-36.67]	34.13 [14.11-52.76]	22.91 [13.07-37.13]	0.444
IL-10	<2.0	3.58 [0.2-10.52]	14.04 [2.73-20.59]	4.84 [2.68-7.76]	0.357
IL-12	<2.0	0.33 [0.33-9.81]	7.04 [0.33-21.22]	0.33 [0.33-3.67]	0.140
IL-13	<2.0	0.24 [0.24-1.97]	0.24 [0.24-0.53]	0.24 [0.24-0.24]	0.296
IL-17	<2.0	0.72 [0.72-0.72]	0.72 [0.72-0.72]	0.72 [0.72-0.72]	1.000
TNF- α	<2.0	0.45 [0.45-1.45]	4.53 [0.45-14.89]	0.96 [0.45-3.96]	0.235
G-CSF	<2.0	1.15 [0.22-2.62]	5.55 [0.7-7.0]	0.80 [0.11-2.06]	0.091
GM-CSF	<2.0	0.35 [0.35-0.35]	0.35 [0.35-0.35]	0.35 [0.35-0.35]	0.837
IFN- γ	<2.0	11.47 [0.53-15.91]	21.78[0.53-816.21]	25.97 [0.85-63.87]	0.226
MCP-1	<174.8	57.65 [14.71-199.13]	98.64 [29.18-353.46]	66.06[4.19-82.37]	0.119
MIP-1 β	<159.3	142.1 [96.67-204.91]	193.84 [121.81-234.51]	190.52 [87.02-271.31]	0.655

* Yasumi Y, et al. Hepatol Res2007; 37:248.

Median [25-75 percentile].

P : Kruskal-Wallis test

したが最終的に肝不全で死亡している。

遺伝子型では10例中9例(90%)が3型、1例が4型であった。また、10例中1例では、IgG/IgM/IgAクラスのHEV抗体が全経過中いずれも陰性でありHEV RNAのみが検出された症例。また、他の1例ではIgMクラス抗体が全経過中陰性を示した(表2の症例6,9)。

感染源および感染経路について検討したが、1例において沢水の習慣的飲水を認められたが、明らかなものは特定できなかった。

3. 血清サイトカイン動態

急性A,BおよびE型急性肝炎例の血清サイトカイン濃度を表3に示した。経口感染をしめすA型肝炎とE型肝炎の間で有意差を認めたサイトカインはIL-7であった。炎症性サイトカインであるIL-6,IL-8,IL-12,TNF α などはA型肝炎で高い傾向を示したが、変動域が大きく有意差は認めなかった。

D. 考察

今回の検討により、急性肝炎の約6%、成因不明の急性肝炎例の13%がHEV感染であることが明らかとなった。この成績は他の報告頻度とほぼ同様と考えられるが、E型肝炎の診断法としての血清IgA抗体の測定が普及すればこの頻度は高くなる可能性がある。しかし、我々が経験した症例のよ

うに血清IgAあるいはIgM抗体が全経過中に陰性を示す例も稀に認めることより、獣肉などの摂食などにより強くHEVの感染が疑われる例については最終確認としてHEV RNAの測定が必要となるものと考えられる。

一方、HEVの感染源や感染経路については、今回経験した症例では明らかにすることは出来なかった。本邦でこれまで感染源として報告されている野性のイノシシやシカ肉の摂取、豚レバー・ホルモン摂取などの摂取歴があればE型肝炎を疑う契機になるが、それ以外の場合には感染源や感染経路の同定が難しく、日常生活の中で摂取している食品・飲料水などにHEV感染の危険性がある可能性もある。E型肝炎と診断された例については再度詳細な病歴聴取を行い感染源と感染経路の探索する努力を継続する必要がある。

経口感染するHAVとHEVでは臨床像の違いとして、前者では発熱や消化器症状などの自覚症状が強いことが知られている。これらの臨床徴候の差異にはサイトカインの反応性が深く関与している可能性があると考え検討したところ、いわゆる炎症性サイトカインの濃度はA型肝炎で高い傾向を認め、とくにIL-7濃度では有意差を認めた。IL-7はT細胞(CD4)およびB細胞のアポトーシスに関与していることよりIL-7を含

めたサイトカインネットワークの反応性がHAVとHEVの免疫反応が異なる可能性が示唆された。

E. 結論

急性肝炎におけるE型肝炎の頻度を明らかにしたが、新たな感染源の同定は出来なかった。また、血清サイトカイン動態はA型肝炎とE型肝炎では異なる可能性を示した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 論文発表

1) Kuroda H, Takikawa Y, Onodera M, Kakisaka K, Yoshida Y, Kataoka K, Sawara K, Miyamoto Y, Oikawa K, Endo R, Suzuki K. Serial changes of liver stiffness measured by acoustic radiation force impulse imaging in acute liver failure: A case report. J of Clin Ultrasound 2012; 40:99-104.

2) Miyasaka A, Kumagai I, Abe K, Suzuki K: Viral decline over 48h and HCV amino acid mutations are related to efficacy of PEG-IFN/ribavirin. Hepatogastroenterol 2011; 29:115-116.

3) Ting Wang, Takikawa Y, Satoh T, Yoshioka Y, Kosaka K, Tatemichi Y, Suzuki K. Carnosic acid Prevents obesity and hepatic steatosis in ob/ob mice. Hepatol Res 2011; 41:87-92.

2. 学会発表

1) 熊谷一郎、宮坂昭生、阿部弘一、小山富子、滝川康裕、鈴木一幸、岡本宏明. 急性肝障害におけるE型肝炎の実態と岩手県における疫学調査. 2011年6月, 第47回日本肝臓学会総会, 東京

2) 黒田英克、滝川康裕、及川寛太、柿坂啓介、片岡晃二郎、宮本康弘、佐原 圭、遠藤龍人、増田友之、鈴木一幸. 急性肝炎におけるVirtual Touch Tissue Quantification (VTTQ)を用いた肝硬度の推移とその測定意義. 2011年6月, 第47回日本肝臓学会総会, 東京.

3) 片岡晃二郎、滝川康裕、小野寺美緒、柿坂啓介、宮本康弘、及川寛太、熊谷一郎、黒田英克、宮坂昭生、鈴木一幸. 成因不明の急性肝障害の実態: 北東北急性肝炎登録システムからの検証. 2011年6月, 第47回日本肝臓学会総会, 東京.

4) 宮本康弘、滝川康裕、鈴木一幸. 北東北における急性肝炎の実態. 2011年12月, 第39回日本肝臓学会西部会, 岡山.

5) 宮本康弘、滝川康裕、小野寺美緒、柿坂啓介、片岡晃二郎、及川寛太、熊谷一郎、渡辺雄輝、鈴木一幸. 急性肝炎における肝萎縮の客観的評価法の検討. 2011年4月, 第108回日本内科学会総会, 東京.

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23年度分担研究報告書

分子進化学を駆使した日本土着 genotype 3 HEV の起源、日本への侵入時期、感染拡大の歴史の解析と今後の感染拡大防止策の提案

研究協力者 中野達徳 藤田保健衛生大学七栗サナトリウム 内科 准教授

研究要旨：日本土着のE型肝炎ウイルス(HEV)の中で最も多い genotype 3 型 HEV の遺伝子配列を解析することにより、HEV の日本での感染拡大の歴史と要因を推測し、今後の感染拡大防止策を提案しようと考えた。Hepatitis Virus Database から分離時期が明確な HEV genotype 3 遺伝子配列を抽出し、分子進化学とベイズ統計学を統合した方法にて解析した。日本土着の genotype 3 HEV は日本固有株でほぼ占められる subtype 3b、新大陸で分離される株と関連した subtype 3a、ヨーロッパで分離される株と近縁の subtype 3e に分類された。3b は 1900-1950 年頃、3a、3e は 1960 年頃に日本に侵入したと考えられ、いずれも 1960-1980 年の間に急速に感染数が増加したと推測された。1960-1980 年には日本の養豚業の効率化と大規模化が実践され、これが日本の genotype 3 HEV の感染数の急速な増加につながったと推測された。養豚場での徹底した衛生管理が今後の HEV 感染拡大の予防につながると考えられた。

<研究協力者>

東芝病院 研究部	三代 俊治
東芝病院 研究部	高橋 和明
東芝病院 研究部	新井 雅裕
自治医科大学	岡本 宏明
東京逡信病院	橋本 直明

Database (<http://s2as02.genes.nig.ac.jp/index.html>) を利用して最も多くの塩基配列が決定されている領域である ORF2 の (5994-6294: 301nt) 約 1400 配列と ORF1 の (104-390: 287nt) 約 500 配列の中から genotype 3 配列のみ抽出して、同一感染源と判明した同一配列、同じ養豚場から抽出された同一配列などは除き、系統樹を作成し、Lu ら (Rev Med Virol 2006) の subtyping に従い外国株との関連を検討することにより日本土着株にはどのような株が存在するかを検討した。

A. 研究目的

HCV、HIV、HAV、influenza virus などの RNA ウイルス遺伝子配列の解析から、当該ウイルスの感染拡大状況を過去に遡って明らかにする試みがなされてきた。HEV では Tanaka ら (J Gen Virol) が 2006 年に日本土着株の感染拡大状況の解析を発表したが、より信頼性を増した分子進化学とベイズ統計学を統合した方法が開発され、さらには、より多くの HEV 遺伝子配列が DNA データベースに蓄積された。

以上を背景に今回我々は、日本に土着した HEV genotype 3 株の感染拡大の歴史を再解析し、その感染拡大の原因、経路を推測し、今後の感染拡大防止策を提案しようと考えた。

B. 研究方法

まず、分子系統樹解析から日本土着 genotype 3 株の定義を検討した。Hepatitis Virus

次に、日本土着株のうち検体採取日が判明している株のみを抽出し、分子進化学とベイズ統計学を統合した方法により感染拡大の歴史を解析した。すなわち、分子進化系統樹解析において塩基置換モデルの変数 (GTRモデルでは 9 個) を固定せず、前分布を与え、それぞれを変動させ、時間の概念も考慮させ、最良の系統樹に近づくように 1 億回系統樹を作成し、1 万回に 1 回 sampling して 1 万個の系統樹を得た。1 万個の系統樹を統合してできた系統樹は maximum clade support phylogeny と呼ばれ、スケールは時間である。また、この 1 万個の系統樹の分岐の仕方を解析した Bayesian Skyline plot (BSP) から HEV 感染数の変動を推

定した。これらの計算には Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Tree (BEAST) というソフトを用いた (<http://evolve.zoo.ox.ac.uk/>)。分子時計をできるだけ安定させるために、東芝病院と東京通信病院で近年経験した急性E型肝炎患者より分離された genotype 3 株を解析に含めた。

倫理面への配慮：東芝病院と東京通信病院の急性 E 型肝炎患者からはインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

日本土着の genotype 3 HEV は大きく 3 つの系統に分かれた。すなわち、日本で最も多く分離され、日本固有株でほぼ占められる subtype 3b、日本で 2 番目に多く分離され、アメリカ、カナダなど新大陸で分離される系統と複雑に関連した subtype 3a、日本では比較的稀でヨーロッパで分離される系統と近縁の subtype 3e に分類された。maximum clade support phylogeny と BSP から 3b は 1930 年頃 (95%CI:1900-1950 年)、3a、3e は 1960 年頃に日本に侵入したと考えられ、いずれも 1960-1980 年の間に急速に感染数が増加したと推測された。

D. 考察

Genotype 3 HEV の主要な reservoir は豚であることが知られており、日本での genotype 3 HEV の感染拡大には日本の養豚業の歴史が関連していることが Tanaka らによって示唆されていた。本研究の genotype 3 HEV 遺伝子の解析は、日本の養豚業の歴史と発展に非常に良く相応しており、解析結果が養豚業の歴史により裏付けされ、新しく、詳しい日本での genotype 3 HEV 感染拡大の歴史が解明された。すなわち、3b は日本に固有で 1900-1950 年の間に起源し最も古く、当時の日本政府の富国強兵政策により始まった養豚業の発展のため、欧米から頻繁に輸入された種豚とともに侵入した系統と考えられる。系統樹からは起源となった国は不明であったが、太平洋戦争 (1941-1945 年) 以前に日本に侵入した株のうち、戦中、戦後の養豚業の壊滅的打撃をくぐりぬけて生き残った株が、戦後に日本固有株として日本中に広まったと考えられる。1960 年以降、養豚業は戦前とは比較できないほどに急速に成長した。すなわち、効率の良い大型種種豚が大量に欧米から輸入され、日本全土での豚の総飼育頭数は急増し、また急速に大規模経営化し、養豚家 1 軒当たりの飼育頭数は戦前の 2 頭以下から約 800 頭へと変化した。本研究の解析結果は、3a は 1960 年

以降の新大陸からの大型種種豚の輸入により、また 3e は 1960 年以降のヨーロッパからの大型種種豚輸入により日本に侵入したことを示唆した。

Subtype 3b、3a、3e いずれの系統の増加にも、1960 年以降の養豚業における総飼育頭数の急増と大規模経営化が HEV の豚同士での感染機会を増加させたことが深く関与していると推測された。

E. 結論

大規模化された養豚場での徹底した衛生管理により、豚同士の HEV 感染を防止し、養豚場内で HEV を継代培養しないことが、HEV の人への感染拡大防止につながると考えられた。

F. 研究発表

1. Nakano T, Pybus OG, Kato T, Takei Y, Okamoto H, Mishiro S, et al. New findings regarding the epidemic history and population dynamics of Japan-indigenous genotype 3 hepatitis E virus inferred by molecular evolution. *Liver Int* 2012, in press.

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

ORF2 maximum clade support phylogeny

