

HEV ワクチン開発研究 ～ブタ由来 HEV のラットへの感染実験～

研究分担者 大河内 信弘 筑波大学医学医療系消化器外科 教授

研究要旨：現在，E 型肝炎は人獣共通感染症として捉えられ，食肉による劇症化の報告も認められる．E 型肝炎の予防，治療法はなく，ワクチン開発が必要であるが，動物モデルは確立されていないため，ブタ糞便由来 HEV の投与によるラット感染モデルの作成を試みた．

<研究協力者>

大城 幸雄(筑波大学大学院博士課程疾患制御医学専攻)

田野井 智倫 (同上)

安江 博(独立行政法人農業生物資源研究所家畜ゲノム研究ユニット)

A. 研究目的

E 型肝炎は経口伝播型の輸入感染症として認識されてきたが，現在は人獣共通感染症として捉えられている．シカ肉やイノシシ肉の摂取により急性肝炎さらには劇症化を引き起こした報告だけでなく[1]，輸血による感染例や，薬剤性肝障害と診断された症例の約 3%に HEV 感染を認めた報告もある[2]．また，HEV 感染は慢性化しないとされてきたが，臓器移植患者での慢性化が最近欧州で相次いで報告されている[3]．免疫抑制下での HBV, HCV の再活性化が問題となっており，HEV も同様の機序で慢性化や再活性化の可能性が考えられる．E 型肝炎に対する確立した予防，治療法はなく，ワクチン開発研究に向け HEV ラット感染モデルの作成を試みた．

B. 研究方法

ラット (Wistar, 雌性, 6 週) に，ブタの糞便より分離した HEV Genotype 3JP (10⁶ 個/ml) 1ml を尾静脈投与した群を感染群(n=3; No.4~6)とし，生理食塩水 1ml を投与した群 (n=3; No.1~3) をコントロール群とした．投与後，血清 (投与前，後 1 週毎)，糞便 (投与前，後 14 日連続，以後 1 週毎)，組織 (肝臓，脾臓を投与 63 日後) を採取した．検討項目は，i) 血清の生化学検査 (AST, ALT, ALP, T-Bil)，ii) 血清の ELISA 検査 (IgG/IgM anti-HEV EIA)，iii) 血清，糞便中の HEV RNA の real time RT-PCR 検査，iv) 組織 (肝臓，脾臓) 中の HEV RNA の real time RT-PCR 検査を行った．倫理面への配慮について，ヘルシンキ宣言，疫学研究に関する倫理指針，厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針平成 15 年 7 月 30 日 (平成 16 年 12 月 28 日全部改正)」に則り提供者に対する十分な配慮を行った．筑波大倫理委員会で，研究実施計画書および説明文書・同意書の

承認を受けた後に研究を開始した．

C. 研究結果

- 各生化学検査にて，感染群とコントロール群の 2 群間で有意差は認めなかった (Fig.1) ．
- 感染群の血清 (投与後 6 週まで) での ELISA 検査では，IgG, IgM ともに HEV 抗体は陰性であった (Fig.2) ．
- 感染群の血清 (投与後 4 週まで)，糞便 (投与後まで 9 週) 検体での real time RT-PCR 検査ではいずれでも HEV RNA は検出されなかった (Fig.3) ．
- 感染群の肝臓および脾臓 (投与後 9 週) 検体での real time RT-PCR 検査ではいずれでも HEV RNA は検出されなかった (Fig.4) ．

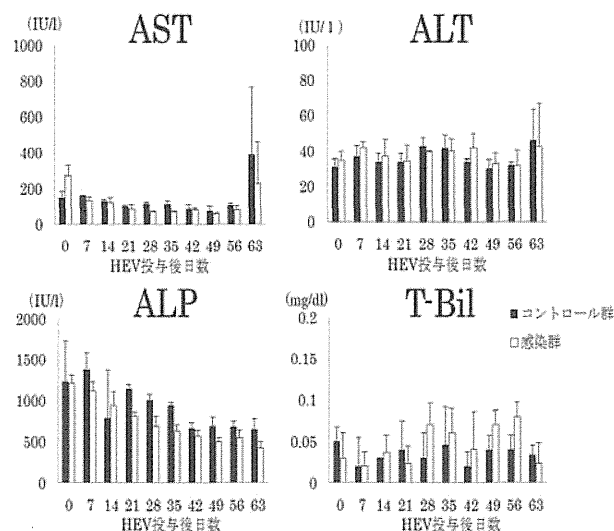


Fig. 1 生化学検査

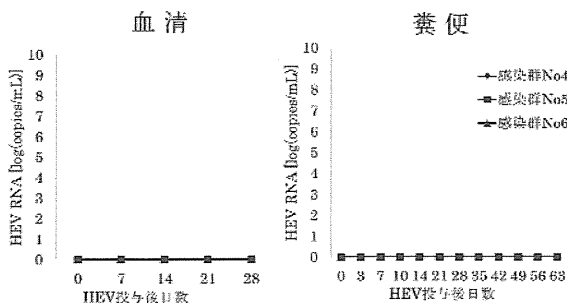


Fig. 2 血清, 糞便 real time RT-PCR

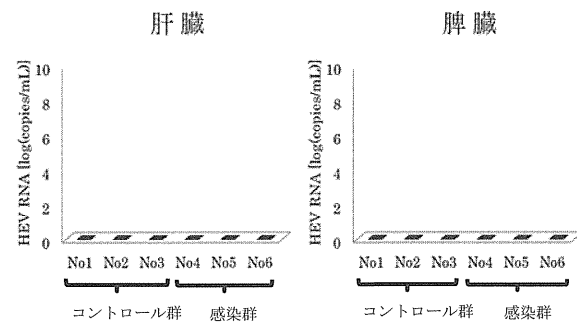


Fig. 3 組織 real time RT-PCR

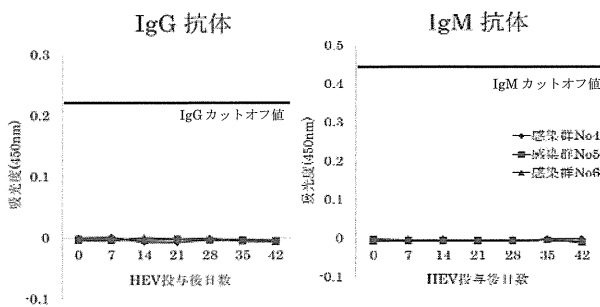


Fig. 4 ELISA

D. 考察

HEV は人獣共通感染するだけでなく異種間の感染が報告され, ブタ由来 HEV は, チンパンジー, タマリン, ミドリザル, アカゲザル, カニクイザルなどで感受性を有することが明らかとなっている[4]. 過去に HEV のラット感染実験の報告は存在するも感染成立と非成立の両方の報告がみられる[5, 6]. ブタ由来 HEV のラット感染実験の論文報告はなく, 他施設での最近の研究では, 肝臓を含めた各臓器で HEV RNA が検出されたが, HEV 抗体は陰性であった[7].

本実験にて, ブタ由来 HEV のラットへの感染は確認できなかった. 感染が成立しなかった原因として, 以下のことが挙げられる. i) ブタ HEV とヒト HEV の遺伝子相同率は高く, ORF などのアミノ酸レベルでは, 100%一致する株も含まれるのに対して[8], ラットの HEV は他の哺乳類のシ

ークエンズと相同率が 60%しかないため[7], ラット固有の新種の HEV である可能性が高い, ii) 野生ラットでの HEV 抗体保有率が 50%以上であることから[6, 9], 感染には感染経路ではなく HEV 暴露量が関連しており, 投与量, 投与回数に再考の余地がある, iii) ラットへの感染は成立しているも, PCR や ELISA 検査の検出感度以下であった可能性がある.

E. まとめ

ブタ由来 HEV を投与しラット感染モデルの作成を試みたが感染の成立は認めなかった. 今後ワクチンの有効性の検討に必須の感染モデル作成には感受性の問題も含め, 更なる検討を要すると考えられた.

F. 研究発表

1. 第 31 回ウイルス肝炎談話会 (2012)
- 2013 年度の国内学会で発表予定

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

参考文献

1. Shuchin Tei et al. Lancet (2003)
2. Timothy J. Davern et al. Gastroenterol (2011)
3. Nassim Kamar et al. N Engl J Med (2008)
4. 李天成ら モダンメディア 50 巻 (2004)
5. Y. Maneerat et al. J M virol (1996)
6. R.H. Purcell et al. EID (2011)
7. 萩原克郎ら 酪農学園大学 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (2012)
8. Nishizawa T et al. J Gen Virol (2003)
9. Kabrane-Lazizi Y et al. Am J Trop Med Hyg (1999)

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
経口感染によるウイルス性肝炎(A型及びE型)の感染防止、病態解明、
遺伝的多様性及び治療に関する研究
平成24年度分担研究報告書

ニホンザルからのHEVの分離

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：E型肝炎は人畜共通感染である。HEVはヒト以外にもブタ、イノシシ、シカ、モングース、ウサギなどの動物から分離された。しかし、動物実験モデルとしてよく使われるサルからHEVが分離された報告がまだない。サルにおけるHEVの感染状況が未だに把握されていない。本研究では、定期健康検査のために採集したサル血清を用いて抗HEV抗体およびウイルス遺伝子を検査し、サルにおけるHEVの感染状況を調査した。さらにサル由来のHEVの感染性を細胞培養法および感染実験を用いて検討した。

〈研究協力者〉

山本博 富山大学・科学先端研究センター、准教授

鈴木樹里 京都大学・霊長類研究所 教授

石田貴文 東京大学大学院理学系研究科 准教授

武田直和 大阪大学微生物病研究所, 日本・タイ感染症共同研究センター 教授

A. 研究目的

E型肝炎ウイルス(HEV)はE型肝炎の原因ウイルスである。E型肝炎は発展途上国で常時に発生し、特に妊婦での死亡率が高いことが知られている。先進国においても、輸入感染症だけではなく、人畜共通感染症として注目されている。現在ヒトから4つの遺伝子型のHEVが分離されている。日本では主に3型及び4型であるが、これらのウイルスはブタ、イノシシなどから分離され、HEVはすでに日本に土着していることが明らかになった。サルはHEVの動物モデルとして使われているが、サルにおけるHEVの

感染状況が未だに把握されていない。本研究では、定期健康検査のために採集したサル血清を用いて抗HEV抗体およびウイルス遺伝子を検査し、サルにおけるHEVの感染状況を調査した。さらにサル由来のHEVの感染性を細胞培養法および感染実験を用いて検討し。

B. 研究方法

京大霊長類研究所の野外飼育されるサルコロンニーを対象にしてサルにおけるHEVの感染状況を調査した。A-Gはニホンザル、HとIはカニクイザルである。調査期間は2004年から2009までの6年間であった。健康診断のために採集したサル血清から抗HEV-IgG、IgM抗体とHEV RNAをELISA、RT-PCRを用いて検査した。HEV-RNA陽性のサルから糞便を採集し、抗原検出ELISA法でHEV抗原の検出を行った。さらに細胞培養法でウイルス分離し、サル由来HEVの感染性をカニクイザルへの感染実験を用いて検討した。

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

2004年にすべてのサルから抗 HEV-IgG IgM 抗体が検出されなかったが、2005年に、約2割のサルは IgG 陽性となった。一部のサルから IgM 抗体も検出された。さらに2006年に7割以上のサルから IgG 抗体検出された。2009年には抗体保有率は40%に下がった。この結果から HEV の流行は2004-2006年の間に起きたと推測した。RT-PCR を用いた HEV 遺伝子検査結果、2006年から2009年まで採取したサル M1543 の血清から HEV-RNA が検出された。さらに2009年に採取した M1543 の糞便からも HEV RNA を検出した。遺伝子型はいずれも3型であった。

サル糞便由来のウイルスを PLC/PRF/5 細胞に接種したところ、糞便中にある HEV とほぼ同じ配列を持つウイルスが分離された。サル糞便乳剤を接種したカニクイザルの血清および糞便から HEV が検出された。この結果はニホンザルから分離した HEV は感染性を持つことを示した。

D. 考察

京都大学霊長類研究所野外飼育サルコロニーにおける HEV の感染状況を6年間にわたって観察した結果、野外飼育のニホンザルでは HEV の流行が発生したことが明らかになった。自然環境においても HEV はサルに伝播することが示唆された。抗体保有状況の比較から、HEV の最初の感染は2004-2005年に D コロニーで発生し、その後、各コロニーへ伝播したことが推測された。現時点では感染源の同定はできていないが、検出された HEV は日本にも常在する3型でありながら、塩基配列はこれまでに日本で分離されたウイルス株と違いを示している。ニホンザルでは HEV の持続感染が存在する

ことが明らかになっていた。

E. 結論

自然環境においても HEV はサルに伝播する。ニホンザルから感染性を持つ HEV を分離した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Li TC, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Yasuda SP, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takeda N, Wakita T. Article title: Susceptibility of laboratory rats against genotypes 1, 3, 4, and rat hepatitis E viruses. *Vet Microbiol.* 2013, 163:54-61.

2) Tian-Cheng Li, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Shumpei P. Yasuda, Kumiko Yoshimatsu, Jiro Arikawa, Naokazu Takeda, and Takaji Wakita. Characterization of full genome of rat hepatitis E virus strain from Vietnam. *Emerg Infect Dis* 2013;19(1):115-8.

3) Pitchanee Jariyapong, Li Xing, Nienke E. van Houten, Tian-Cheng Li, Wattana Weerachatanukul, Benjamin Hsieha, Carlos G. Moscoso, Chun-Chieh Chen, Masahiro Niikura, R. Holland Cheng, Chimeric hepatitis E virus-like particle as a carrier for oral-delivery. *Vaccine* 2013; 31:417-24.

4) Hiroshi Yamamoto, Juri Suzuki, Atsushi Matsuda, Takafumi Ishida, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Adachi Isao, Takaji Wakita, Naokazu Takeda, and Tian-Cheng Li Hepatitis E Outbreak in Monkey Facility, Japan. *EID*

2012, 18 (12) 2032-2034.

5) Koma T, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Li TC, Amada T, Shimizu K, Isozumi R, Mai LT, Hoa NT, Nguyen V, Yamashiro T, Hasebe F, Arikawa J. A survey of rodent-borne pathogens carried by wild Rattus spp. in Northern Vietnam. *Epidemiol Infect* 2012; 1:1-9.

6) Ishii K., Li T.C., Yoshizaki S., Shiota T., Kato T., Takeda N. and Wakita T. Cloning of permissive and nonpermissive human hepatoma cell lines for hepatitis E virus infection. *Hepatology International* 6: 292 (2012)

7) Tian-Cheng Li, Susumu Ochiai, Hiroaki Ishiko, Takaji Wakita, Tatsuo Miyamura and Naokazu Takeda. A retrospective study on imported hepatitis E in Japan. *Travel Med Infect Dis.* 2012 ; 10(2):80-5.

2. 学会発表

1) Tian-Cheng Li, kumiko Yoshimatsu, Shumpei P. Yasuda, Jiro Arikawa, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki Tetsuro Suzhki, Naokazu Takeda, and Takaji Wakita. Expression of rat HEV virus capsid protein and generation of the virus-like particles. The 22th Conference of the Asian Pacific Association for the study of the liver. 2012. February 16-19. Taipei.

2) Koji Ishii, Tian-Cheng Li, Sayaka Yoshizaki, Tomoyuki Shioda, Takanobu Kato, Naokazu Takeda, and Takaji Wakita. Cloning of permissive and nonpermissive human hepatoma

cell lines for hepatitis E virus infection. The 22th Conference of the Asian Pacific Association for the study of the liver. 2012. February 16-19. Taipei.

3) 李 天成、片岡 紀代、網 康至、須崎 百合子、安田 俊平、吉松 組子、有川 二郎、武田 直和、脇田 隆字。ラット E 型肝炎ウイルス様粒子の作製および粒子形成に必須な領域の同定。第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月 大阪。

4) 塩田 智之、李 天成、吉崎 佐矢香、武田 直和、脇田 隆字、石井 孝司。E 型肝炎ウイルス生活環にカプシド蛋白 C 末端 52 アミノ酸の機能解析。第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月大阪。

5) 田中聖一、山本 博、万年 和明、李天成。ニホンザルにおける E 型肝炎ウイルス感染状況。第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月 大阪。

6) 原田 誠也、西村浩一、李 天成、石井孝司、田中智之、野田衛。熊本県におけるイノシシ、シカおよびブタの E 型肝炎ウイルス汚染実態調査と分子疫学解析。第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月大阪。

7) 李 天成、安田 俊平、吉松 組子、片岡 紀代、吉崎 佐矢香、網 康至、須崎百合子、有川 二郎、武田 直和、脇田隆字。E 型肝炎ウイルスに対するラットの感受性。第 154 回日本獣医学会学術集会 2012 年 9 月 岩手。

8) 清水健太郎、李 天成、安田 俊平、吉松組子、駒 貴明、長谷部 太、山本哲、有川 二郎。ベトナムのラットおよびヒトにおけるラット E 型肝炎ウイルスの感染状況の調査。第 154 回日本獣医学会学術集会 2012 年 9 月 岩手。

9) Tian-Cheng Li, kumiko Yoshimatsu, Shumpei P. Yasuda, Jiro Arikawa, Yasushi Ami³, Yuriko Suzaki and Takaji Wakita. Characterizations of the infectivity of genotype 1, 3, 4 and rat hepatitis E viruses in laboratory rats. 14th international Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease (14th ISVHLD). June 22-25, 2012 China Shanghai.

10) Tian-Cheng Li, Kumiko Yoshimatsu, Shumpei P. Yasuda, Jiro Arikawa, Michiyo Kataoka, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Koji Ishii, Naokazu Takeda and Takaji Wakita. Antigenicity and infectivity of rat hepatitis E viruses. 第 9 回日中国際ウイルス学会. Jun 12-13. 2012. Sapporo.

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
経口感染によるウイルス性肝炎(A型及びE型)の感染防止、病態解明、
遺伝的多様性及び治療に関する研究
平成24年度分担研究報告書

ウサギ HEV 及びラット HEV の分離・解析とヒト由来培養細胞での増殖の検討

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 : E 型肝炎ウイルス (HEV) は人獣共通感染ウイルスである。我々はウサギ及びネズミ由来 HEV の遺伝的多様性及びヒトへの感染性について検討を行った。中国内モンゴル自治区のウサギからヒトの遺伝子型 3 型 HEV に近縁のウサギ HEV を分離した。このウサギ HEV はヒト由来の A549 細胞及び PLC/PRF/5 細胞で増殖することより、ウサギはヒトへの HEV 感染のリザーバーの一つである可能性が示唆された。また、インドネシアのネズミからはラット HEV の遺伝子型 1 型、2 型及び 3 型に属するウイルスを分離した。ラット HEV はヒト由来の A549 細胞及び PLC/PRF/5 細胞で増殖しないことより、ラット HEV は ヒトには感染しないと考えられた。

<共同研究者>

西澤 勉 (自治医科大学 感染・免疫学講座ウイルス学部門、講師)

吉林台 (自治医科大学 感染・免疫学講座ウイルス学部門、客員研究員)

唐吉思 (自治医科大学大学院医学研究科修士課程学生)

A. 研究目的

E 型肝炎ウイルス (HEV) はへペウイルス科に分類され、ヒトのみならず、ブタやイノシシ、シカ等からも分離され、これらの動物がヒトへの HEV 感染のリザーバーとなっている。近年、中国、アメリカ及びフランスにおいてウサギからもヒトの遺伝子型 3 型 HEV に近縁の HEV (ウサギ HEV) が分離されている。フランスではこのウサギ HEV が E 型肝炎患者から分離されたことが報告されている。

また一方で、ヒト型 HEV に類縁の関係にあるウイルスがネズミやフェレット、コウモリ、鳥 (ニワトリ) 及び魚 (マス) からも分離されている。

我々は中国内モンゴル自治区のウサギ及びインドネシアのネズミから HEV を分離し、遺伝的多様性を明らかにするとともに、ウサギ及びネズミ由来 HEV のヒトへの感染性について検討するために研究を行った。

B. 研究方法

1) 調査対象

中国内モンゴル自治区西部の農場で飼育されている 4 ヶ月齢のウサギ 20 羽の血清及び肝臓、インドネシアロンボク島及びジャワ島ソロで捕獲された野生のクマネズミ (*Rattus rattus*) 485 頭の血清を研究のために使用した。ウサギ肝臓はりん酸緩衝液を用いて 10% (w/v) ホモジネートを調製して実験に供した。

2) HEV マーカーの測定方法

IgG クラス HEV 抗体は遺伝子型 4 型ヒト HEV 由来の組換え ORF2 タンパク質 (J Gen Virol 86:1807-1813, 2005) 及びパーオキシダーゼを標識した抗ウサギ IgG 抗体または抗ラット IgG 抗体を用いた酵素免疫測定法により測定した。ヒト型 HEV 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 (412 塩基長) を解析した (J Clin Microbiol 40:3209-3218, 2002)。また、ラット HEV RNA は既報 (ドイツ由来 4 株及びベトナム由来 1 株) の塩基配列情報に基づきラット HEV ORF1 から ORF2 にかけての領域にプライマーを設定した RT-PCR 法により検出し、この領域の塩基配列 (840 塩基長) を解析した。

3) ウサギ及びネズミ由来 HEV のヒト由来細胞への接種

HEV 陽性のウサギ肝臓のホモジネート及びネズミ血清を感染源として、6 ウェルプレートで培養したヒト肺癌由来の株化細胞である A549 細胞およびヒト肺癌由来の PLC/PRF/5 細胞に接種し、2 日毎に培養上清を採取し、real-time PCR 法によ

り培養上清中に出現する HEV progeny を経時的に測定した

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. 研究結果及び考察

1) ウサギ血清中及び肝臓中の HEV マーカーの解析

4ヶ月齢ウサギの血清中の IgG クラス HEV 抗体の陽性率は 20% (4/20)、HEV RNA の陽性率は 35% (7/20) であり、HEV RNA titer は最大で 1.6×10^4 copies/mL あった。ウサギ肝臓ホモジネートでは 10 検体 (50%) が HEV RNA 陽性で、HEV RNA titer は最大で 3.5×10^8 copies/mL の高力価を示した。得られたウサギ HEV 株は ORF2 領域の 412 塩基長における系統発生的解析により、これまでに中国及びフランスから報告されているウサギ HEV 株と同一の cluster に属し、ヒトの遺伝子型 3 型 HEV と近縁であることが示された。

2) ウサギ由来 HEV のヒト由来細胞への接種

ウサギ肝臓ホモジネートのうち HEV RNA tier が 10^7 copies/mL 以上の高力価を示した 5 検体を用いて細胞感染実験を実施した。ウサギ由来 HEV をヒト肺癌由来細胞である A549 細胞に感染させたところ、接種後 2 日目から培養上清中に progeny の産生が認められ、感染価の高かったものでは上清中の titer が 10^7 copies/mL のオーダーに達し、

60 日目まで高い titer を維持した (図 1A)。また、ウサギ由来 HEV はヒト肝癌由来細胞である PLC/PRF/5 細胞でも同様に効率よく増殖した (図 1B)。さらに A549 細胞での培養上清中のウサギ HEV を新たな A549 細胞に継代することができた。ウサギ由来の HEV がヒト由来の A549 細胞及び PLC/PRF/5 細胞で増殖することより、ウサギはヒトへの HEV 感染のリザーバーの一つである可能性が示唆された。また、培養上清中に出現した progeny には感染性があることが示された。

3) ネズミ血清中の HEV マーカーの解析

インドネシアロンボク島のクマネズミにおける IgG クラス HEV 抗体の陽性率は 35.8% (125/349)、ラット HEV 陽性率は 35.8% (125/349) は 20.3% (71/349) であり、ジャワ島 ソロのクマネズミではそれぞれ 30.9% (42/136) 及び 31.6% (43/136) であった。ヒト型 HEV RNA は検出されなかった。全塩基配列の比較に基づき、最初にドイツで発見されたラット HEV を 1 型とすると、ベトナム株は 2 型、我々がインドネシアロンボク島で最初に分離したラット HEV 株は 3 型に分類される。今回新たにロンボク島で分離された株はラット HEV の遺伝子型 2 型及び 3 型、ジャワ島ソロで分離された株は遺伝子型 1 型及び 3 型に属し、インドネシア国内におけるラット HEV の遺伝的多様性が示された (図 2)。

4) ラット HEV のヒト由来細胞への接種

ラット HEV 陽性ネズミ血清のうち、比較的ウイルス濃度が高い 2 検体をヒト由来の A549 細胞及び PLC/PRF/5 細胞に接種したが、60 日の観察期間中、培養上清に progeny は出現しなかった。この結果より、ラット HEV はヒトには感染しない可能性が示唆された。

D. 結論

中国内モンゴル自治区のウサギからヒトの遺伝子型 3 型 HEV に近縁のウサギ HEV を分離した。このウサギ HEV はヒト由来の A549 細胞及び PLC/PRF/5 細胞で増殖することより、

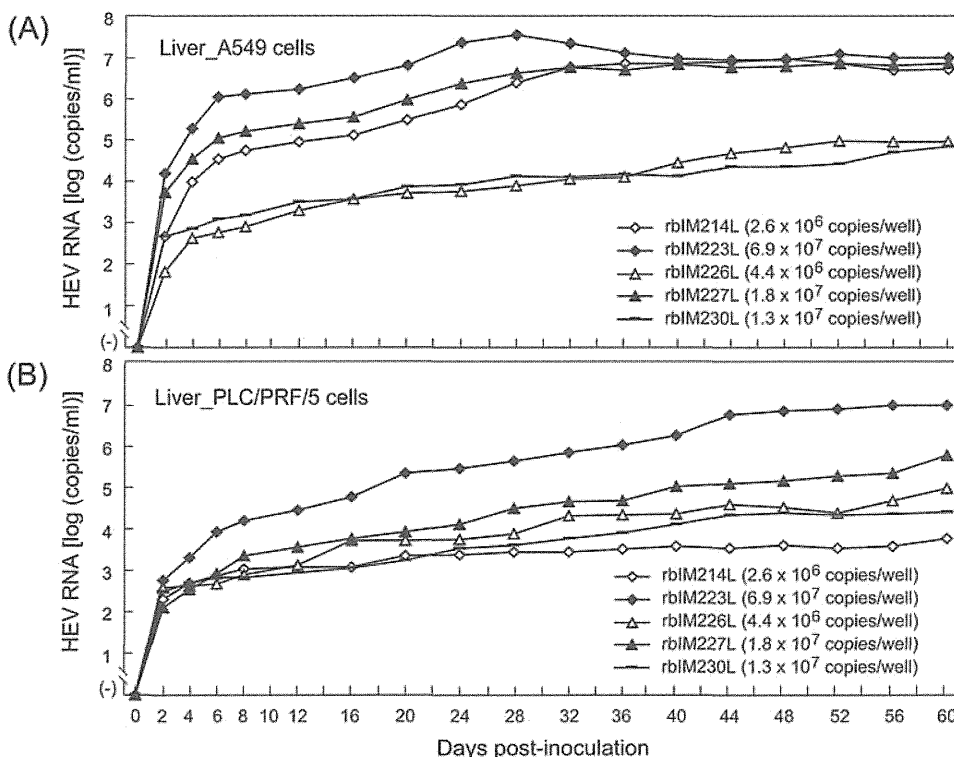


図 1. ウサギ HEV のヒト由来培養細胞 (A549, PLC/PRF/5) における増殖

ウサギはヒトへの HEV 感染のリザーバーの一つである可能性が示唆された。また、インドネシアのネズミからはラット HEV の遺伝子型 1 型、2 型及び 3 型に属するウイルスを分離した。これまでにラット HEV がヒト由来の A549 細胞及び PLC/PRF/5 細胞で増殖する証拠は得られていない。しかしながら、ラット HEV が種の壁を越えてヒト由来細胞で増殖しないことを確かにするためには、より高いウイルス力価での感染実験が必要であり、現在、肝臓を含めた新たなラット HEV 感染材料の検索を行っている。

ヒトの HEV 感染は self-limited な急性肝炎だけに留まらず、死に至る劇症肝炎や免疫抑制状態での持続感染による慢性肝炎への進行という多様な病態を辿る。HEV 感染の病理学的研究、抗ウイルス薬による治療法及びワクチンによる予防法開発等の基礎的研究を in vivo レベルで行うための HEV 感染動物モデルの樹立を目的として、rat HEV に関する研究をさらに進め、ヒトでの HEV 感染の病態理解の深化に繋げて行きたいと考えている。

E. 研究発表

1. Jirintai S, Jinshan, Tanggis, Manglai D, Mulyanto, Takahashi M, Nagashima S, Kobayashi T, Nishizawa T, Okamoto H: Molecular analysis of hepatitis E virus from farm rabbits in Inner Mongolia, China and its successful propagation in A549 and PLC/PRF/5 cells. *Virus Res* 170: 126-137, 2012
2. Mulyanto, Depamede SN, Sriadih M, Takahashi M, Nagashima S, Jirintai S, Nishizawa T, Okamoto H: Frequent detection and characterization of hepatitis E virus variants in wild rata (*Rattus rattus*) in Indonesia. *Arch Virol* 158: 87-96, 2013
3. Takikawa Y, Miyamoto Y, Onodera M, Kuroda H, Kasai K, Miyasaka A, Takahashi M, Okamoto H, Suzuki K: Icteric acute hepatitis E

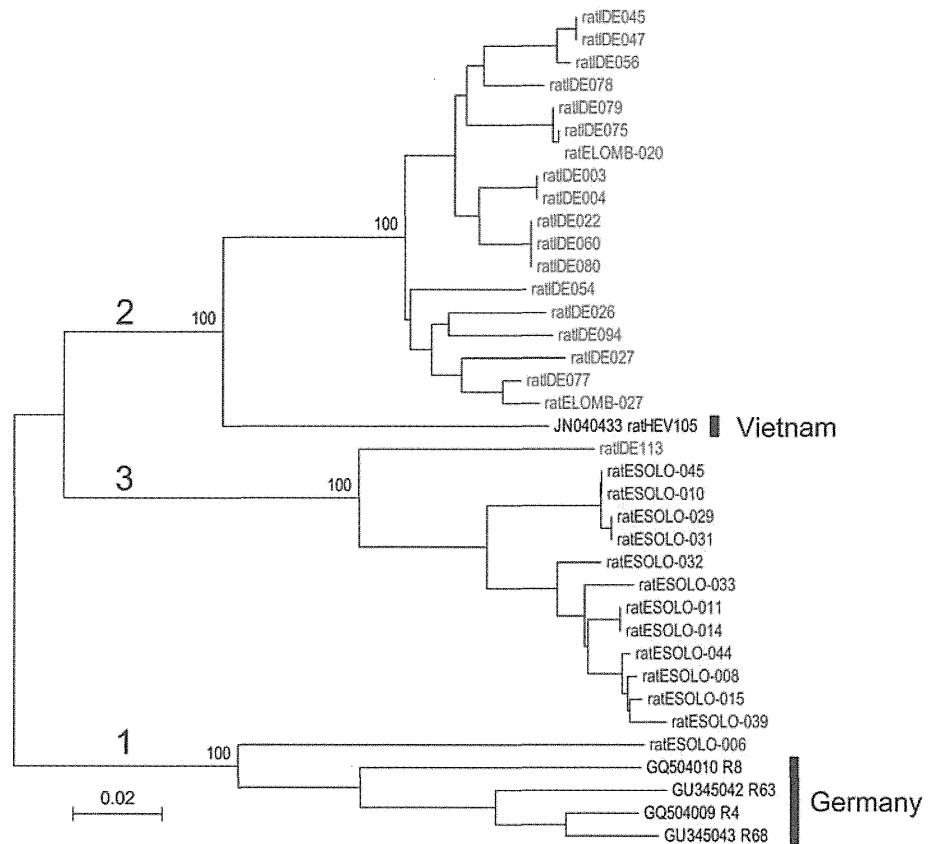


図 2 ラット HEV の分子系統樹

with no response of immunoglobulin M class anti-hepatitis E virus antibody. *Hepatol Res* 42: 1146-1149, 2012

4. Nakano T, Okano H, Kobayashi M, Ito K, Ohmori S, Nomura T, Kato H, Ayada M, Nakano Y, Akachi S, Sugimoto K, Fujita N, Shiraki K, Takei Y, Takahashi M, Okamoto H: Molecular epidemiology and genetic history of European-type genotype 3 hepatitis E virus indigenized in the centrak region of Japan. *Infect Genet Evol* 12: 1524-1534, 2012

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
経口感染によるウイルス性肝炎 (A 型及び E 型) の感染防止、病態解明、
遺伝的多様性及び治療に関する研究
平成 24 年度分担研究報告書

培養細胞から放出された E 型肝炎ウイルスの粒子表面に存在する膜成分の抗原性
ならびに粒子放出に関与する細胞内膜輸送機構の解析

研究協力者 長嶋茂雄 自治医科大学医学部 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 自治医科大学医学部 感染・免疫学講座ウイルス学部門 教授

研究要旨 : E 型肝炎ウイルス (HEV) の感染細胞からの放出には、multivesicular body (MVB) sorting 機構が重要であることが明らかとなっている。さらに、HEV はこの機構を細胞膜上ではなく、エンドソーム膜上で利用していることが示唆されている。そこで、本研究では宿主細胞に由来する粒子表面の膜成分の抗原性ならびに HEV の放出に関与する細胞内膜輸送機構について解析した。膜に覆われた HEV 粒子を特異的に認識する TA1708 抗体を作製し解析に用いた結果、ウイルス粒子の表面には脂質膜が存在し、トランスゴルジネットワーク (TGN) に由来する抗原性を有することが示唆された。また、細胞内膜輸送系を阻害することにより、ウイルス放出効率への影響を調べた結果、HEV 粒子の放出には、TGN を経由した ORF3 蛋白質の小胞輸送に加え、初期エンドソームが関与するエンドソーム輸送が重要であることが明らかとなった。

A. 研究目的

HEV はノンエンベロープウイルスでありながら、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。これまでの解析により、HEV の膜形成ならびに放出には multivesicular body (MVB) pathway が関与していることが明らかとなっている。さらに、HEV はこの機構を細胞膜上ではなく、エンドソーム膜上で利用している可能性が示唆されている。

そこで、宿主細胞に由来する粒子表面の膜成分の抗原性を明らかにすることを目的として、膜に覆われたウイルス粒子を抗原としてマウスモノクローナル抗体 (mAb) を作製し、得られた mAb の特異性ならびに認識する抗原を解析した。また、HEV の放出に関与する細胞内膜輸送系を明らかにするための検討を行った。

B. 研究方法

HEV 感受性細胞である PLC/PRF/5 細胞に JE03-1760F 株 (genotype 3) を接種し、培養上清中に産生されたウイルス粒子を精製・濃縮したものを免疫原として、mAb を作製した。得られた抗体 (TA1708 抗体) の特異性は、イムノキャプチャー RT-PCR 法により検討した。さらに、界面活性剤

(デオキシコール酸ナトリウム、ジギトニン) およびトリプシンを用いて培養上清由来の HEV 粒子を処理し、TA1708 抗体が認識する抗原性の変化を調べた。また、TA1708 抗体が認識する宿主細胞内の抗原、ならびにそれらの抗原とオルガネラマーカー蛋白質、ウイルス蛋白質 (ORF2, ORF3) との局在を蛍光抗体法により検討した。

ウイルス放出におけるエンドソーム輸送の関与については、エンドソームの移動を阻害する薬剤 (Wortmannin, U18666A) を用いて感染細胞を処理し、24 時間後の培養上清および細胞内の HEV RNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により測定することにより、ウイルス放出効率に与える影響を解析した。また、HEV 放出における Rab4 および Rab11 の必要性については、それぞれに対する siRNA をトランスフェクトした細胞にウイルスを感染させ、培養上清中および細胞内の HEV RNA 量を測定し、検討した。

倫理面への配慮: 野生型 HEV および感染性 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。また、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い、人権上の問題は生じない。

C. 研究結果

1. TA1708 抗体の特異性の解析

膜に覆われた HEV 粒子を免疫原として得られた TA1708 抗体の特異性は、イムノキャプチャー RT-PCR 法により検討した。これまでの解析により、膜に覆われた培養上清中の HEV 粒子は、ORF2 および ORF3 蛋白質に対する抗体によって捕捉されないことが明らかとなっている。一方、本研究で作製した TA1708 抗体による捕捉率は 86.8% であり、TA1708 抗体は膜に覆われた HEV 粒子を効率良く捕えることができることが分かった。また、1% デオキシコール酸ナトリウムおよび 0.1% トリプシンを用いてウイルス粒子表面に存在する膜成分および ORF3 蛋白質を取り除いた結果、ORF2 蛋白質に対する抗体で 94.4% と効率良く粒子を捕捉できるようになったのに対し、TA1708 抗体では、0.8% とウイルス粒子を捕捉することができなかった。同様に、TA1708 抗体では、膜に覆われていない糞便中の HEV 粒子を捕えることはできなかった。

次に、培養上清中の HEV 粒子を脂質特異的な界面活性剤であるジギトニンを用いて処理し、TA1708 抗体との反応性の変化を解析した。1.5% ジギトニン処理後、ショ糖密度勾配遠心により浮上密度を測定した結果、膜に覆われた HEV 粒子の比重 1.16 g/ml、膜に覆われていない粒子の比重 1.27 g/ml の中間である 1.20 g/ml にピークがシフトした。そこで、イムノキャプチャー RT-PCR 法により、1.20 g/ml のピークに含まれるウイルス粒子と TA1708 抗体との反応性を解析した。その結果、ジギトニン処理により TA1708 抗体での捕捉率が 57.2% から 9.1% に低下した。また、ORF2 および ORF3 蛋白質に対する抗体での捕捉率は、それぞれ 30.5%、56.7% と上昇した。

以上の結果から、得られた TA1708 抗体は、膜に覆われた HEV 粒子を特異的に認識することが明らかとなった。また、培養上清中に産生されたウイルス粒子表面の膜は、脂質膜であることが示された。

2. 蛍光抗体法による TA1708 抗体が認識する細胞内抗原の解析

TA1708 抗体を用いた蛍光抗体法により PLC/PRF/5 細胞を染色し、細胞内における抗原の局在を解析した。その結果、細胞膜ではなく細胞質内の核周辺部に偏在する特異的なシグナルが認められた。

次に、細胞小器官に対する抗体を用いて二重染色を行い、TA1708 抗体が認識する抗原の同定を試みた。用いた抗体は、TGN のマーカー蛋白質であ

る TGN46、シスゴルジのマーカーである Giantin、初期エンドソームのマーカーである EEA1、MVB のマーカーである CD63、後期エンドソームのマーカーである Rab7、リサイクリングエンドソームのマーカーである Rab11 に対する市販ポリクローナル抗体である。共焦点顕微鏡による観察の結果、TA1708 抗体が結合する抗原は TGN46 と共局在を示した。一方、その他のマーカー蛋白質とは明確な共局在が認められなかった。そこで、TGN のマーカー蛋白質である TGN46、TGN38、Syntaxin 6 に対する抗体を用いて、TA1708 抗体との二重染色を行った。その結果、TA1708 抗体が結合する抗原は Syntaxin 6 に比べ、TGN46 および TGN38 との間でより明確な共局在を示した。さらに、感染細胞を用いた二重染色においても、TA1708 抗体が反応する抗原は TGN46、TGN38 と共局在を示した。また、非感染細胞では、これらの抗原は核周辺に偏在していたのに対し、感染細胞では細胞質内全体に分布していた。

以上の結果から、TA1708 抗体は TGN46 や TGN38 に共通した抗原である trans-golgi network protein 2 (TGOLN2) を認識している可能性が示唆された。

3. HEV 感染細胞におけるウイルス蛋白質と TGN38 の細胞内局在

HEV 感染細胞では、TGN46、TGN38 が細胞質内全体に分布していることが明らかとなった。そこで、ウイルスの ORF2 および ORF3 蛋白質と TGN38 の細胞内局在を解析した。その結果、ORF2 および ORF3 蛋白質は、TGN38 と細胞質内で共局在を示し、小胞状の蛍光シグナルも観察された。

このことから、TGN が HEV または HEV 蛋白質の細胞内輸送に関与している可能性が示唆された。

4. 初期エンドソームおよび後期エンドソームの移動を阻害した細胞での HEV 放出効率

これまでの解析により、ORF3 蛋白質は TGN38 に加え、MVB のマーカー蛋白質である CD63 と共局在を示すことが明らかとなっている。このことから、ORF3 蛋白質は TGN を経由した小胞輸送によって、初期エンドソームを通過して MVB の膜上に輸送される可能性が考えられた。そこで、初期エンドソームのマーカー蛋白質である EEA1 と ORF3 蛋白質の細胞内局在を調べた。その結果、ORF3 蛋白質は EEA1 と共局在を示すことが明らかとなった。

次に、エンドソームの移動を阻害する薬剤を用いて、ウイルス放出効率への影響を解析した。用いた薬剤は、初期エンドソームの移動を阻害する

Wortmannin、後期エンドソームの移動を阻害する U18666A である。これらの薬剤で感染細胞を処理し、24 時間後の培養上清および細胞内の HEV RNA 量を測定した。解析の結果、Wortmannin で処理した細胞では、培養上清中に放出されるウイルス量は薬剤濃度が高くなるほど減少し、細胞内の HEV RNA 量は、薬剤濃度依存的に増加した。一方、U18666A で処理した細胞では、どの薬剤濃度においても HEV の放出効率に影響は認められなかった。また、薬剤の細胞毒性を MTS assay により調べたが、解析に用いた DMSO および薬剤濃度では、細胞への毒性は認められなかった。

以上の結果から、初期エンドソームの移動を阻害すると、ウイルスの放出が抑制されることが明らかとなった。

5. Rab4 および Rab11 に対する siRNA をトランスフェクトした細胞での HEV 放出効率

Rab4 は、細胞内のリサイクリングを制御し、Rab11 はリサイクリングの制御に加え、ゴルジ体からの分泌蛋白質の小胞輸送も制御していることが報告されている。そこで、HEV 放出におけるこれらの輸送系の関与を調べるために、siRNA を用いて細胞内の Rab4 または Rab11 をノックダウンし、ウイルスの放出効率を解析した。

Rab4, Rab11 に対する siRNA (siRab4A, siRab11A) または negative control の siRNA (NC siRNA) を細胞にトランスフェクトし、その後、ウイルスを感染させた。そして、感染 10 日後の培養上清中の HEV RNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。その結果、Rab4A をノックダウンした細胞では、negative control と同程度の効率でウイルスの放出が認められた。一方、Rab11A をノックダウンした細胞では、negative control を 100% とすると、感染 10 日目の培養上清中では 9.1% と放出効率の著しい低下が認められた。

また、siRab4A, siRab11A をトランスフェクトした細胞内の HEV RNA 量を測定した結果、NC siRNA をトランスフェクトした細胞内と同程度であった。このことから、siRNA トランスフェクションによる HEV RNA 複製への影響はないものと考えられた。

以上の結果から、HEV の放出にはリサイクリング機構ではなく、ゴルジ体からの分泌蛋白質の小胞輸送が関与していることが示唆された。

D. 考察

本研究により、HEV の粒子表面には TGN に由来する抗原である TGOLN2 が存在していることが示唆された。さらに、ORF3 蛋白質が MVB のマ

ーカーである CD63 と共局在を示すこと、感染細胞内には培養上清中の粒子と同様の抗原性を示す膜に覆われたウイルス粒子が存在していること(未発表データ)から、粒子表面の脂質膜は細胞膜ではなく、細胞質内のエンドソーム膜に由来すると考えられた。また、後期エンドソームの移動を阻害しても HEV の放出に影響がないことから、HEV は細胞質内のエンドソーム膜に出芽し、エクソソーム分泌経路を利用して細胞外に放出されることが示唆された。今後は、ウイルス放出とエクソソーム分泌経路の関連性を明らかにすることが重要となる。E 型肝炎に対する特異的な治療法が確立されていない現状にあって、HEV の放出機構が明らかとなれば、抗ウイルス剤の開発など特異的な治療法の確立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、感染細胞から放出された HEV 粒子の表面には脂質膜が存在し、TGN に由来する抗原 (TGOLN2) を有している可能性が示された。また、HEV 粒子の放出には、TGN を経由した ORF3 蛋白質の小胞輸送に加え、初期エンドソームが関与するエンドソーム輸送が重要であることが明らかとなった。

F. 研究発表

学会発表

1. 長嶋茂雄、高橋雅春、吉林台、西澤勉、小林富成、岡本宏明. 培養細胞から放出された E 型肝炎ウイルスの粒子表面に存在する膜成分の抗原性の解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 2012 年 11 月, 大阪.

論文発表

1. Jirintai S, Jinshan, Tanggis, Manglai D, Mulyanto, Takahashi M, Nagashima S, Kobayashi T, Nishizawa T, Okamoto H. Molecular analysis of hepatitis E virus from farm rabbits in Inner Mongolia, China and its successful propagation in A549 and PLC/PRF/5 cells. *Virus Res.* 170:126-137, 2012.
2. Mulyanto, Depamede SN, Sriasih M, Takahashi M, Nagashima S, Jirintai S, Nishizawa T, Okamoto H. Frequent detection and characterization of hepatitis E virus variants in wild rats (*Rattus rattus*) in Indonesia. *Arch Virol.* 158:87-96, 2013.

G. 知的所有権の取得状況

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

平成 24 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
「経口感染によるウイルス性肝炎(A 型及び E 型)の感染防止、病態解明、
遺伝的多様性及び治療に関する研究」

研究成果の刊行に関する一覧表

1. 雑誌(原著論文)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Jirintai S</u> , Jinshan, Tanggis, Manglai D, Mulyanto, <u>Takahashi M</u> , <u>Nagashima S</u> , <u>Kobayashi T</u> , <u>Nishizawa T</u> , <u>Okamoto H</u>	Molecular analysis of hepatitis E virus from farm rabbits in Inner Mongolia, China and its successful propagation in A549 and PLC/PRF/5 cells	Virus Research	170(1-2)	126-37	2012
<u>Nakano T</u> , <u>Okano H</u> , Kobayashi M, Ito K, Ohmori S, Nomura T, Kato H, Ayada M, Nakano Y, Akachi S, Sugimoto K, Fujita N, Shiraki K, Takei Y, <u>Takahashi M</u> , <u>Okamoto H</u>	Molecular epidemiology and genetic history of European-type genotype 3 hepatitis E virus indigenized in the central region of Japan	Infection, Genetics and Evolution	12(7)	1524-34	2012
<u>Nakano T</u> , <u>Takahashi K</u> , Pybus OG, Hashimoto N, Kato H, <u>Okano H</u> , Kobayashi M, Fujita N, Shiraki K, Takei Y, Ayada M, <u>Arai M</u> , <u>Okamoto H</u> , <u>Mishiro S</u>	New findings regarding the epidemic history and population dynamics of Japan-indigenous genotype 3 hepatitis E virus inferred by molecular evolution	Liver International	32(4)	675-88	2012
<u>Takikawa Y</u> , <u>Miyamoto Y</u> , Onodera M, Kuroda H, Kasai K, <u>Miyasaka A</u> , <u>Takahashi M</u> , <u>Okamoto H</u> , <u>Suzuki K</u>	Icteric acute hepatitis E with no response of immunoglobulin M class anti-hepatitis E virus antibody	Hepatology Research	42(11)	1146-9	2012
Mulyanto, Depamede SN, Sriasih M,	Frequent detection and characterization of hepatitis E virus	Archives of Virology	158(1)	87-96	2013

<u>Takahashi M</u> , <u>Nagashima S</u> , <u>Jirintai S</u> , <u>Nishizawa T</u> , <u>Okamoto H</u>	variants in wild rats (<i>Rattus rattus</i>) in Indonesia				
<u>Yamamoto H</u> , <u>Suzuki J</u> , <u>Matsuda A</u> , <u>Ishida T</u> , <u>Ami Y</u> , <u>Suzaki Y</u> , <u>Adachi I</u> , <u>Wakita T</u> , <u>Takeda N</u> , <u>Li TC</u>	Hepatitis E virus outbreak in monkey facility, Japan	Emerging Infectious Diseases	18(12)	2032-4	2012
<u>Li TC</u> , <u>Ami Y</u> , <u>Suzaki Y</u> , <u>Yasuda SP</u> , <u>Yoshimatsu K</u> , <u>Arikawa J</u> , <u>Takeda N</u> , <u>Wakita T</u>	Characterization of full genome of rat hepatitis E virus strain from Vietnam	Emerging Infectious Diseases	19(1)	115-8	2013
<u>Jariyapong P</u> , <u>Xing L</u> , <u>van Houten NE</u> , <u>Li TC</u> , <u>Weerachatanukul W</u> , <u>Hsieh B</u> , <u>Moscoco CG</u> , <u>Chen CC</u> , <u>Niikura M</u> , <u>Cheng RH</u>	Chimeric hepatitis E virus-like particle as a carrier for oral-delivery	Vaccine	31(2)	417-24	2013
<u>Li TC</u> , <u>Yoshizaki S</u> , <u>Ami Y</u> , <u>Suzaki Y</u> , <u>Yasuda SP</u> , <u>Yoshimatsu K</u> , <u>Arikawa J</u> , <u>Takeda N</u> , <u>Wakita T</u>	Susceptibility of laboratory rats against genotypes 1, 3, 4, and rat hepatitis E viruses	Veterinary Microbiology	163(1-2)	54-61	2013
<u>Koma T</u> , <u>Yoshimatsu K</u> , <u>Yasuda SP</u> , <u>Li TC</u> , <u>Amada T</u> , <u>Shimizu K</u> , <u>Isozumi R</u> , <u>Mai LT</u> , <u>Hoa NT</u> , <u>Nguyen V</u> , <u>Yamashiro T</u> , <u>Hasebe F</u> , <u>Arikawa J</u>	A survey of rodent-borne pathogens carried by wild <i>Rattus</i> spp. in Northern Vietnam	Epidemiology and Infection			In Press
<u>Miyashita K</u> , <u>Kang JH</u> , <u>Saga A</u> , <u>Takahashi K</u> , <u>Shimamura T</u> , <u>Yasumoto A</u> , <u>Fukushima H</u> , <u>Sogabe S</u> , <u>Konishi K</u> , <u>Uchida T</u> , <u>Fujinaga A</u> , <u>Matsui T</u> , <u>Sakurai Y</u> , <u>Tsuji K</u> , <u>Maguchi H</u> , <u>Taniguchi M</u> , <u>Abe N</u> , <u>Fazle Akbar SM</u> , <u>Arai M</u> , <u>Mishihiro S</u>	Three cases of acute or fulminant hepatitis E caused by ingestion of pork meat and entrails in Hokkaido, Japan: Zoonotic food-borne transmission of hepatitis E virus and public health concerns	Hepatology Research	42(9)	870-8	2012
<u>Nidaira M</u> , <u>Takahashi K</u> ,	Detection and phylogenetic analysis	The Journal of Veterinary	74(12)	1665-8	2012

Ogura G, Taira K, Okano S, Kudaka J, Itokazu K, <u>Mishiro S</u> , <u>Nakamura M</u>	of hepatitis E viruses from mongooses in Okinawa, Japan	Medical Science			
<u>Ishida S</u> , Yoshizumi S, Ikeda T, Miyoshi M, Goto A, <u>Matsubayashi K</u> , Ikeda H	Detection and molecular characterization of hepatitis E virus in clinical, environmental and putative animal sources	Archives of Virology	157(12)	2363-8	2012
Tominaga A, <u>Kanda T</u> , Akiike T, Komoda H, Ito K, Abe A, Aruga A, Kaneda S, Saito M, <u>Kiyohara T</u> , Wakita T, <u>Ishii K</u> , <u>Yokosuka O</u> , Sugiura N	Hepatitis A outbreak associated with a revolving sushi bar in Chiba, Japan: Application of molecular epidemiology	Hepatology Research	42(8)	828-34	2012
Yan J, <u>Kanda T</u> , Wu S, Imazeki F, <u>Yokosuka O</u>	Hepatitis A, B, C and E virus markers in Chinese residing in Tokyo, Japan	Hepatology Research	42(10)	974-81	2012
<u>Kanda T</u> , Wu S, <u>Kiyohara T</u> , Nakamoto S, Jiang X, Miyamura T, Imazeki F, <u>Ishii K</u> , Wakita T, <u>Yokosuka O</u>	Interleukin-29 suppresses hepatitis A and C viral internal ribosomal entry site-mediated translation	Viral Immunology	25(5)	379-86	2012
<u>Nakayama N</u> , <u>Oketani M</u> , Kawamura Y, Inao M, Nagoshi S, Fujiwara K, <u>Tsubouchi H</u> , <u>Mochida S</u>	Algorithm to determine the outcome of patients with acute liver failure: a data-mining analysis using decision trees	Journal of Gastroenterology	47(6)	664-77	2012
小畑達郎, 巽 亮二, 竹本隆博, 田中俊樹, 平田邦明, 関岡敏夫, 竹田彬一, 石金正裕, 横田和久, 名取洋一郎, 池谷敬, 古川恵一, <u>川上万里</u> , <u>高橋雅春</u> , <u>岡本宏明</u>	A型肝炎ウイルスの分子系統解析により感染時期・地域が推定された輸入A型肝炎の2例	肝臓	53(11)	754-62	2012
石綿 翔, <u>高木 均</u> , 星野 崇, 長沼 篤, 坂本直美, 小板橋絵里, 相馬宏光, 乾正幸, 工藤智洋, 小川 晃, 田原博貴, 金古美恵子, <u>岡本宏明</u>	薬物性肝障害との鑑別を要したE型肝炎の1例	日本消化器病学会雑誌	109(4)	624-9	2012
小川浩司, 山本義	2010年函館地区で発症	肝臓	53(4)	206-15	2012

也, 梅村真知子, 姜貞憲, 坂田秀勝, 松林圭二, 高橋和明, 新井雅裕, 三代俊治	し, 09 年秋札幌小流行起因 "new Sapporo strain" が分離された E 型劇症肝炎の 2 例				
沖田幸祐, 高橋和明, 原田克則, 谷岡ゆかり, 平野厚宜, 木村輝昭, 加藤 彰, 山下智省, 新井雅裕, 沖田 極	既報日本株よりは中国長春株に近い塩基配列の genotype 4 HEV が検出された山口県内イノシシ肉生食後 E 型急性肝炎の 1 例	肝臓	53(8)	534-7	2012

2. 総説

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Okamoto H</u>	Culture systems for hepatitis E virus	Journal of Gastroenterology	48(2)	147-58	2013
<u>岡本宏明</u>	E型肝炎の現状と今後の戦略	日本医事新報	4621(11/17)	71-7	2012
<u>岡本宏明</u>	E型肝炎ウイルス感染の現状と対策	血液事業	35(1)	228-9	2012
<u>岡本宏明</u>	新規に保険収載された検査法「IgA-HE抗体価(定性)」	モダンメディア	58(6)	182-7	2012
<u>岡本宏明</u>	抗肝炎ウイルス薬：A型肝炎，E型肝炎	臨床と微生物	40(1)	57-63	2013
<u>岡本宏明</u>	E型肝炎ウイルス培養系	化学療法の領域	28(S-1)	1022-31	2012
<u>岡本宏明</u>	シリーズ感染症 プライマリーケア どうアプローチするか 第33回 E型肝炎の現状と予防	Medical Tribune	45(25)	38	2012
<u>八橋 弘, 玉田陽子, 長岡進矢, 小森敦正, 阿比留正剛</u>	急性肝炎の変遷	わが国における急性肝炎の現状 全国調査 2008-2011		13-9	2012
<u>玉田陽子, 八橋 弘</u>	A型肝炎の現状と今後の展望 —診療のすすめかた—	Medical Practice	30(2)	236-41	2013
<u>石井孝司, 清原知子</u>	A型肝炎ワクチン	BIO Clinica	28(4)	321-5	2012
<u>石井孝司</u>	A型肝炎/E型肝炎ウイルス	小児科臨床	65 (増刊号)	1380-90	2012
<u>姜 貞憲</u>	E型急性肝炎	わが国における急性肝炎の現状 全国調査 2008-2011		40-5	2012
<u>姜 貞憲</u>	E型肝炎は増えているか —どのように診療するか—	Medical Practice	30(2)	243-8	2013
<u>八橋 弘, 玉田陽子, 長岡進矢, 阿比留正剛</u>	わが国におけるウイルス性急性肝炎の動向	化学療法の領域	28(S1)	917-24	2012
<u>藤原慶一, 神田達郎, 横須賀 収</u>	A型肝炎のウイルス学	化学療法の領域	28(S1)	966-74	2012
<u>玉田陽子, 八橋 弘</u>	A型肝炎の臨床経過と特徴	化学療法の領域	28(S1)	975-82	2012
<u>石井孝司, 脇田隆字</u>	海外におけるA型肝炎集団発生 —わが国への警鐘—	化学療法の領域	28(S1)	984-92	2012
<u>李 天成</u>	E型肝炎のウイルス学とワクチン開発	化学療法の領域	28(S1)	1001-8	2012
<u>姜 貞憲</u>	日本におけるE型肝炎発生の動向	化学療法の領域	28(S1)	1009-15	2012

新井雅裕	人獣共通感染症としてのE 型肝炎	化学療法の領域	28(S1)	1016-21	2012
------	---------------------	---------	--------	---------	------

註：上記は2012年4月1日以降2013年2月28日までに刊行された研究業績であり、研究代表者（班長）を二重下線、研究分担者（班員）を一重下線、研究協力者（班長付き及び班員付き）を一重破線で示した。

IV. 研究成果の刊行物・別刷