

生環境が整っていないアジア・アフリカの発展途上国では流行性肝炎の主要な病因である。HEV は1~4型までの4種類の遺伝子型に分類され、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発展途上国での流行性E型肝炎の原因となっている。一方、3型と4型は最近の10年余りの間に新たに見出された遺伝子型であり、ヒトのみならず、飼育ブタや野生のイノシシやシカなどの動物からも3型や4型のHEVが分離されている¹⁴⁾。これら動物を感染宿主とし土着化したHEV（欧米では3型、我が国では3型と4型）がヒトへの感染源となり、散発性E型肝炎が先進国で無視できない頻度で発生している。我が国では、野生のイノシシやシカの肉・内臓、ブタのレバーやホルモン（腸管）を生や加熱不十分な状態で摂食したことが原因と考えられるE型肝炎例が相次いで報告されている¹⁵⁾。

我が国では、20歳以下の年齢層でのHEV感染はまれであり、成人のうち500万人は既感染者であると推定されている⁶⁾。また、年間約12万人の成人が新たにHEVに感染していると推定されているが、その感染のほとんどは不顕性であり、一部（数%程度）が感染後2~9週（平均6週）の潜伏期を経て、肝炎を発症する。肝炎を発症した症例での重症化率および劇症化率は高く、E型肝炎症例が国内で最も多い北海道ではそれぞれ11%、4%と報告されている⁶⁾。

免疫能が正常な宿主へのHEV感染は、一般に一過性で終息し、慢性化しない。しかし、2008年以降、フランスやドイツ、オランダ、英国、スイス、スペイン等の欧州の国々、および北米のカナダでは、臓器移植患者やその他の免疫抑制状態にある患者でのE型肝炎の慢性化が報告されている^{1~3)}。肝臓や腎臓、膵臓、心臓などの臓器移植患者、幹細胞や骨髄の移植患者、HIV感染者でのHEV感染においては、HEVが排除されずに慢性肝炎を発症し、急速に肝硬変に進展する例もあることが知られている。移植患者全体でのHEV感染率は移植後6.1年（平均値）、あるいは

8.9年（中央値）の観察期間において1.1%ないし1.3%であるが、6か月以上の血中HEV RNAの持続陽性を慢性化とすると、その頻度は57~67%と高い^{2,3,16)}。2000~2011年の1,200例の臓器（心、肺、肝、腎）移植患者のうち12例がHEVに感染し、そのうち11例（92%）が慢性化したという報告もある¹⁷⁾。我が国でも海外からの報告と同様の慢性化状況であれば対策を講じる必要があることから、厚労省の研究班「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」（研究代表者：岡本宏明）でHEV感染の慢性化についての実態調査が行われている。

2. E型急性肝炎に対する治療の現状

軽症例に対しては経過観察、あるいは症状に応じた保存的療法が行われている。劇症肝炎および劇症化が懸念される重症型症例に対して、内科的治療としては、血漿交換療法や血液濾過透析などの人工肝補助療法が行われているが、E型劇症肝炎症例での内科的救命率は低いのが現状である。劇症化例に対するIFNの臨床的評価は十分とはいえず、その位置づけも不明である。なお、欧州から、E型急性肝炎重症型の1例（図1）に対して、ribavirinを投与し、予後が良好であったことが報告されている¹⁸⁾。また、1型HEVによる“acute on chronic”肝不全の4例いずれに対してもribavirin投与（200~600mg/日、3~34週）は有効であり、重篤な副作用もなく救命できたことがインドから報告されている¹⁹⁾。当該薬剤のE型急性肝炎重症型症例に対する有用性についてのさらなるデータの蓄積が必要である。

3. 慢性HEV感染例に対する治療の現状

E型慢性肝炎の治療法として、IFN療法のみならず、ribavirin単独療法がウイルス排除に有効であることが報告されている（表1）。IFN単独投与の5例（いずれも肝臓移植患者）中4例でHEV RNAの持続陰性化が確認されている。ま

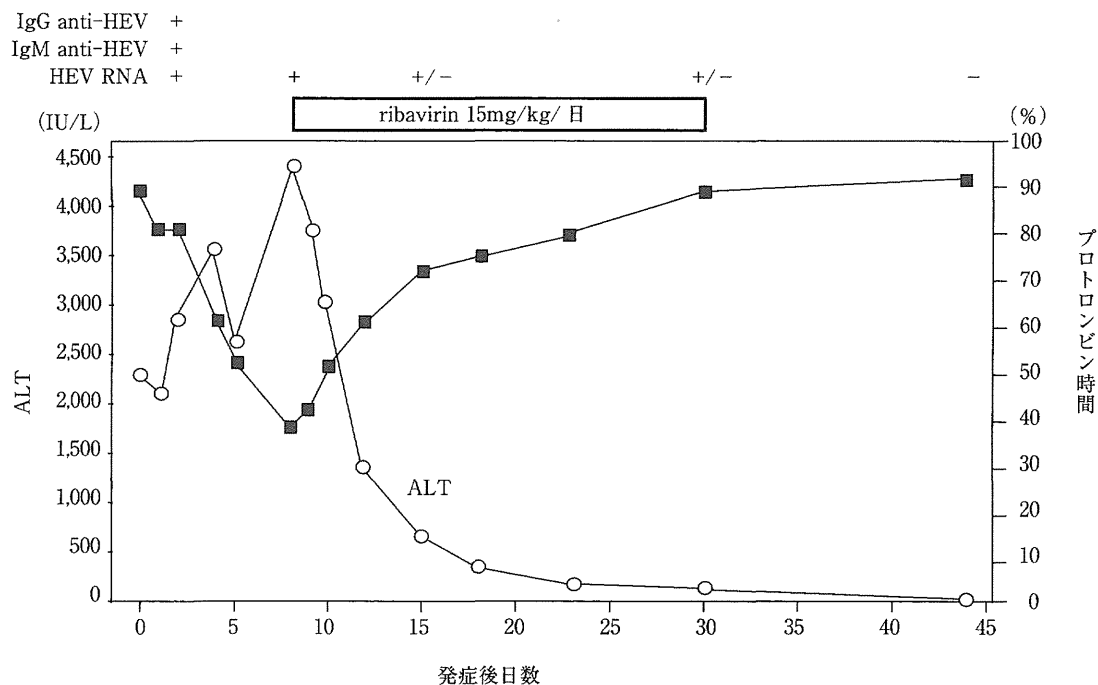


図1 E型肝炎重症型患者に対する ribavirin 単独療法
 文献18)より引用, 改変

表1 E型慢性肝炎患者に対する治療

治療薬	対象患者	投与期間	治療効果	文献
IFN 単独	肝臓移植患者 (3名)	3カ月間 (PEG-IFN α 2a)	2名が HEV RNA 陰性化, 1名が再燃	a)
	肝臓移植患者 (2名)	16週あるいは1年間 (PEG-IFN α 2b)	2名がともに HEV RNA 陰性化	b)
	白血病患者 (1名)	3カ月間 (PEG-IFN α 2b)	投与後4週目から HEV RNA が持続陰性	c)
ribavirin 単独	腎臓移植患者 (6名)	3カ月間	4名が HEV RNA 持続陰性, 2名が再燃	d)
	臓器移植患者 (7名)	5カ月間	6名が HEV RNA 持続陰性, 1名が陽性持続	e)
	様々な免疫抑制状態 にある患者 (9名)	3カ月間	9名全例が HEV RNA 持続陰性, 再燃なし	f)
	心臓移植患者 (4名)	5カ月間	3名が HEV RNA 持続陰性, 1名が陽性持続	g)
	心臓移植患者 (1名)	3カ月間	投与後1カ月から HEV RNA が持続陰性	h)
	白血病患者 (1名)	3カ月間	投与後2週目から HEV RNA が持続陰性	i)
IFN と ribavirin の併用	HIV 感染者 (1名)	PEG-IFN α を6カ月投与 後, PEG-IFN α と ribavi- rin を3カ月併用	投与終了時点では HEV RNA が微量検出さ れたが, その後, 陰性	j)

文献: a) Kamar *et al.*: *Clin Infect Dis* 50: e30, 2010, b) Haagsma *et al.*: *Liver Transpl* 16: 474, 2010, c) Alric *et al.*: *Ann Intern Med* 153: 135, 2010, d) Kamar *et al.*: *Gastroenterology* 139: 1612, 2010, e) Wedemeyer *et al.*: *Gastroenterology* 142: 1397, 2012, f) Mallet *et al.*: *Hepatology* 52: 919A, 2010, g) Fischke *et al.*: *Am J Transplant* 12: 3128, 2012, h) Chaillon *et al.*: *J Heart Lung Transplant* 30: 841, 2011, i) Alric *et al.*: *Am J Gastroenterol* 106: 1562, 2011, j) Dalton *et al.*: *Ann Intern Med* 155: 479, 2011.

た, 6例の腎臓移植患者における慢性E型肝炎に
 対して ribavirin 600~800mg/日の3カ月投与が

行われた結果, 6例全例で投与終了時まで
 HEV RNA の陰性化が認められ, 4例で持続陰性

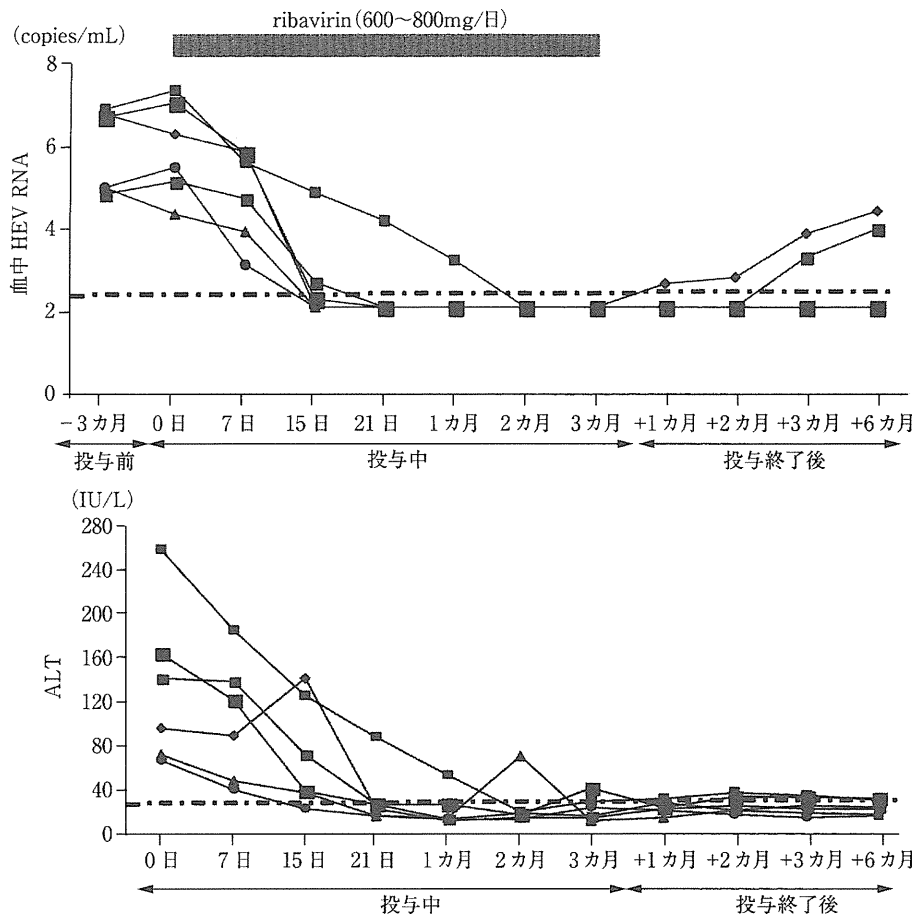


図2 6例のE型慢性肝炎患者に対する ribavirin 単独療法
文献5)より引用, 改変

となったが、2例で終了1ないし2カ月後に再燃がみられたことが報告されている(図2)⁵⁾。他の報告でも、合計22例の免疫抑制状態にある患者でのE型慢性肝炎に対して、3~5カ月間のribavirin投与が施行され、20例(91%)でHEV RNAが持続陰性となったことが記載されている。

4. E型肝炎に対する治療の展望

E型急性肝炎重症型やE型劇症肝炎に対する治療法ははまだ確立されておらず、E型劇症肝炎の内科的治療による救命率は低いままであることから、治療薬の開発は重要である。

長年、HEVの細胞培養系は確立されておらず、ウイルス増殖機構もほとんど不明のままであった。筆者らが2007年にHEVの培養系を世界に先駆

けて樹立したことで、接着、侵入、複製、放出等を含めたウイルス生活環の1つ1つを解明することが可能となり²⁰⁾、薬剤の効果を培養細胞を用いて評価することもできるようになった。実際、IFNやribavirin、またamantadineもそれぞれ単独でHEVの増殖を濃度依存性に効率よく抑制することを確認できている(図3)。HEVの増殖機構の解明はE型肝炎治療を目的とした創薬標的となる分子を同定し、制御物質を創製することにより、新規薬剤の開発にもつながりうると期待される。

おわりに

これまでA型肝炎に対しても、E型肝炎に対しても特異的な治療薬は開発されてこなかった。経過観察や症状に応じた保存的療法で十分であり、

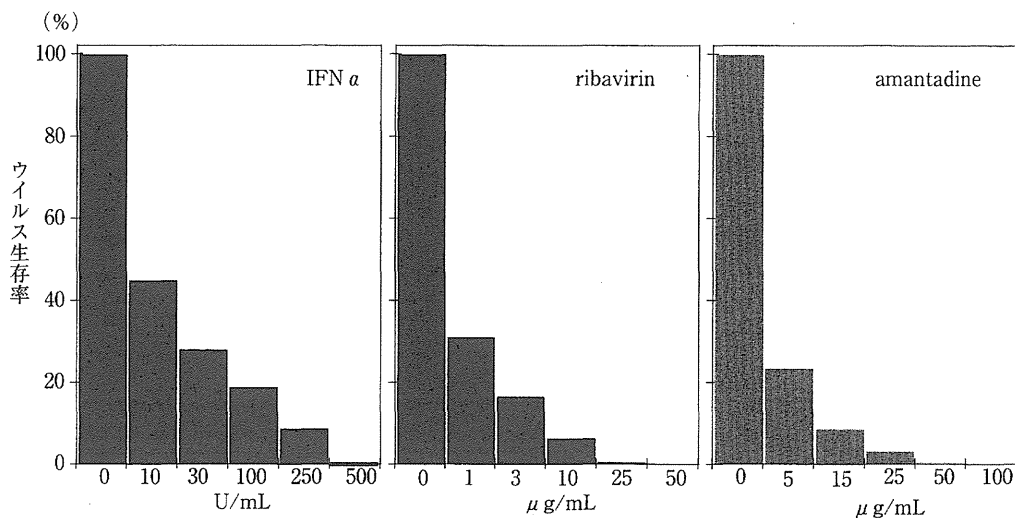


図3 培養細胞(A549細胞)を用いたE型肝炎ウイルスの増殖に対する抗ウイルス薬の効果
HEVをA549細胞に接種した後、各薬剤の入った培養液中で培養した。接種後2日目の培養上清中のHEV RNA タイターを測定し、抗ウイルス効果を評価した。
Jirintai S & Okamoto H

治療薬を必要とする患者が多くなかったことが大きな理由であり、B型急性肝炎やC型急性肝炎に対して保険適用になった抗ウイルス薬がないのと状況は似ている。しかし、高齢者でのA型急性肝炎重症型や劇症肝炎が増え、救命率が低下傾向にあること、またE型肝炎が男性の中高齢者に多く、劇症肝炎の救命率が低いこと、さらには免疫能が低下した患者でのHEV感染の高率な慢性化・急速な肝硬変への進展、加えて我が国における今後のさらなる高齢化の進行や免疫能の低下した患者の増加を考慮に入れると、A型肝炎およびE型肝炎に対する既存の抗ウイルス薬の有効性評価、新規抗ウイルス薬の開発に対するニーズは高いと考えられる。

文 献

- 1) Kamar N, Selves J, Mansuy JM *et al.*: Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 358 : 811-817, 2008.
- 2) Haagsma EB, Niesters HG, van den Berg AP *et al.*: Prevalence of hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 15 : 1225-1228, 2009.
- 3) Pischke S, Suneetha PV, Baechlein C *et al.*: Hepatitis E virus infection as a cause of graft hepatitis in

liver transplant recipients. *Liver Transpl* 16 : 74-82, 2010.

- 4) Haagsma EB, Riezebos-Brilman A, van den Berg AP *et al.*: Treatment of chronic hepatitis E in liver transplant recipients with pegylated interferon alpha-2b. *Liver Transpl* 16 : 474-477, 2010.
- 5) Kamar N, Rostaing L, Abravanel F *et al.*: Ribavirin therapy inhibits viral replication on patients with chronic hepatitis E virus infection. *Gastroenterology* 139 : 1612-1618, 2010.
- 6) 岡本宏明：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21年度～平成23年度総合研究報告書（研究代表者：岡本宏明）、平成24年3月発行
- 7) Kim YJ, Lee HS : Increasing incidence of hepatitis A in Korean adults. *Intervirolgy* 53 : 10-14, 2010.
- 8) 国立感染症センター感染症情報センター：A型肝炎2010年第1～28週（2010年7月21日時点）
<http://idsc.nih.gov.jp/disease/hepatitisA/2010week28.html>
- 9) Widell A, Hansson BG, Oberg B *et al.*: Influence of twenty potentially antiviral substances on *in vitro* multiplication of hepatitis A virus. *Antiviral Res* 6 : 103-112, 1986.
- 10) Crance JM, Leveque F, Chousterman S *et al.*: Antiviral activity of recombinant interferon-alpha on hepatitis A virus replication in human liver cells. *Antiviral Res* 28 : 69-80, 1995.
- 11) Kanda T, Yokosuka O, Imazeki F *et al.*: Amantad-

- ine inhibits hepatitis A virus internal ribosomal entry site-mediated translation in human hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 331 : 621-629, 2005.
- 12) Yang L, Kiyohara T, Kanda T *et al.* : Inhibitory effects on HAV IRES-mediated translation and replication by a combination of amantadine and interferon-alpha. *Virology* 7 : 212, 2010.
- 13) Kanda T, Wu S, Kiyohara T *et al.* : Interleukin-29 suppresses hepatitis a and C viral internal ribosomal entry site-mediated translation. *Viral Immunol* 25 : 379-386, 2012.
- 14) Okamoto H : Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res* 127 : 216-228, 2007.
- 15) 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* 37 : 345-354, 2009.
- 16) Legrand-Abbravanel F, Kamar N, Sandres-Saune K *et al.* : Characteristics of autochthonous hepatitis E virus infection in solid-organ transplant recipients in France. *J Infect Dis* 202 : 835-844, 2010.
- 17) Pas SD, de Man RA, Mulders C *et al.* : Hepatitis E virus infection among solid organ transplant recipients, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 18 : 869-872, 2012.
- 18) Gerolami R, Borentain P, Raissouni F *et al.* : Treatment of severe acute hepatitis E by ribavirin. *J Clin Virol* 52 : 60-62, 2011.
- 19) Goyal R, Kumar A, Panda SK *et al.* : Ribavirin therapy for hepatitis E virus-induced acute on chronic liver failure : a preliminary report. *Antivir Ther* 17 : 1091-1096, 2012.
- 20) Okamoto H : Efficient cell culture systems for hepatitis E virus strains in feces and circulating blood. *Rev Med Virol* 21 : 18-31, 2011.

* * *

ウイルス肝炎のすべて

II 経口感染するウイルス肝炎

2. E型肝炎

(4) E型肝炎ウイルス培養系

岡本 宏明*

1990年代からE型肝炎ウイルス(HEV)の培養が試みられてきたが、増殖レベルはきわめて低かった。2007年、筆者らは高力価のHEV(JE03-1760F株〔遺伝子型3型〕、あるいはHE-JF5/15F株〔4型〕)を含む糞便浮遊液を用い、肝がん細胞株PLC/PRF/5と肺がん細胞株A549での効率的なHEVの培養系を確立することに成功した。培養上清中のHEV RNA量は 10^9 copies/mLに達し、新たな細胞への継代培養も可能である。現在では、血清や肝組織中のヒトHEVのみならず、ブタや野生イノシシ由来のHEVも増殖可能である。培養系確立を契機に、HEVのユニークな放出機構が明らかになりつつある。

Key Words : E型肝炎ウイルス, 細胞培養系, HEV RNA, 感染性 cDNA クローン, 放出機構

I はじめに

E型肝炎ウイルス(HEV)は急性あるいは劇症E型肝炎の原因ウイルスであり、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。HEVは小型球状粒子であり、糞便中に存在する粒子は表面をエンベロープに覆われていないが、循環血液中の粒子は後述のように、培養上清中の粒子と同様に細胞由来の膜成分に覆われていることが最近の研究で明らかになった。

ゲノムは5'末端にキャップ構造、3'末端にポリA配列をもつ約7200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。ORF1はhelicaseやRNA polymeraseなどの非構造タンパク質を、ORF2はcapsidタンパク質をコードしている。ORF3にコードされる短いタンパク質(113~114アミノ酸残基)の機能はこれまでよくわかっていなかったが、後で述べるように、ウイルス粒子の放出に必須のタンパク質であることが判明している。ORF1タンパク質はゲノム

Culture systems for hepatitis E virus

*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 Hiroaki Okamoto

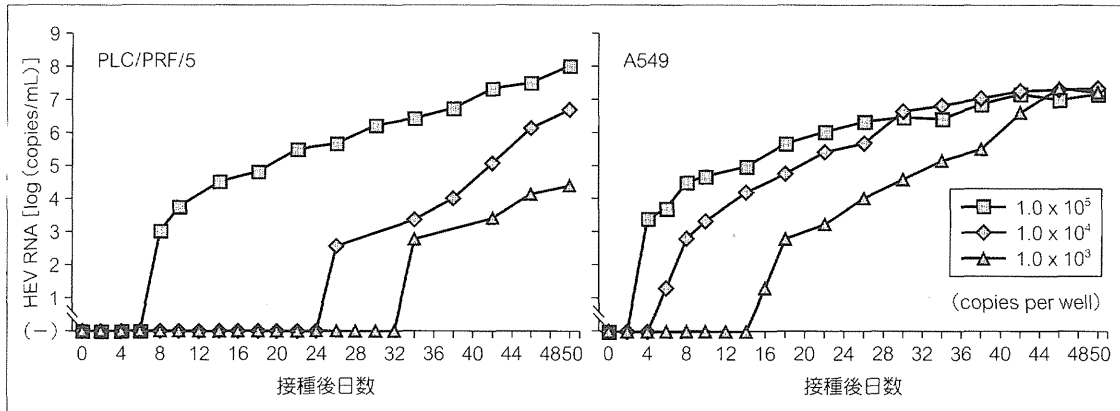


図1 糞便中3型 HEV (JE03-1760F 株) の肝がん細胞株 (PLC/PRF/5) と肺がん細胞株 (A549) での増殖異なる3種類のウイルス濃度(それぞれ、細胞数の1/10, 1/100, 1/1,000に相当するコピー数のウイルス量)で接種した場合の接種後50日までの培養上清中のHEV RNA量を示す。

HEV: E型肝炎ウイルス

(文献3, 6より)

RNAから、ORF2タンパク質とORF3タンパク質は2.2-kbのサブゲノムRNAから翻訳される¹⁾。

ニワトリやラットからもそれぞれ固有のHEVが分離されているが¹⁾、ヒトのHEVは少なくとも1~4型までの4種類の遺伝子型に分類され、わが国の土着株は3型と4型に属する²⁾。1型と2型のHEVはヒトのみに感染し、アジアやアフリカなどの浸淫地域での古くからの流行性肝炎に関係している。それに対して、3型と4型はヒトのみならず、ブタやイノシシ、シカ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。

長年、HEVの培養系がないことがウイルス学的研究を進める上での大きな障壁となっていたが、筆者らは2007年に世界に先駆けて、HEVの効率的な感染培養系を樹立することに成功した³⁾。本稿では、HEVの感染培養系の確立およびそれによってこれまでに得られている知見の概要を紹介したい。

II HEVの感染培養系の確立

HEVの培養系の樹立は1990年代初頭から多くの研究者によって試みられてきた⁴⁾。しかし、増殖効率がきわめて低く、産生された子ウイルスの継代培養も困難であり、HEV粒子の物理化学的性状の解析やウイルス学的研究に供することはできなかった。

2003年にひとりの国内感染のE型肝炎患者から高力価のHEV(3型HEV, JE03-1760F株: 2.0×10^7 copies/mL)を含む糞便サンプルが得られたことが、これから述べるHEVの培養系樹立の契機となった⁵⁾。このJE03-1760F株を、ヒトやサル、ウシ、イヌ、ラット、マウスに由来する21種類の株化細胞株に接種し増殖可能かどうかを検討した。その結果、肝がん細胞株PLC/PRF/5 (Alexander) と肺がん細胞株A549の2種類の細胞株で効率よく増殖できることがわかった(図1)³⁾⁶⁾。培養上清中に放出された子ウイルスは新たなPLC/PRF/5細胞やA549細胞でも効率よく増え、かつ連続継代も可能であ

HEV (E型肝炎ウイルス) ORFs (open reading frame)

II 経口感染するウイルス肝炎

ることがわかった。高いウイルス量の接種材料が得られたこと、そして、そのHEV株が既知の3型HEV株には認められないユニークな変異をもつ29カ所の塩基（そのうち6塩基はアミノ酸置換をとみなす非同義変異）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つながったものと推測される⁵⁾。

続いて、別のE型肝炎患者（劇症型）から得られた高力価のHEV（4型HEV, HE-JF5/15F株： 1.3×10^7 copies/mL）を含む糞便浮遊液を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⁷⁾。疫学データから、遺伝子型4と肝炎重症化との密接な関連性が示唆されているが⁸⁾、HE-JF5/15F株はJE03-1760F株と同様に培養上清中のHEVを用いた継代培養が可能であるだけでなく、より活発な増殖能を示し、劇症肝炎患者から分離された4型HEV株の活発な増殖能が本培養系で再現されたことになる。その後、培養を継続することにより、馴化株の培養上清中のHEV RNA タイターは 10^9 copies/mLに達している。

100日を越える長期間の培養においても細胞変性効果（CPE）は認められない。CPE様の細胞の変化も認められるが、ウイルス未接種の細胞でも同様の変化が観察されることから、現時点ではA549細胞とPLC/PRF/5細胞でのHEV株の培養においてCPEはないと考えている。

III 培養系が確立されてはじめて分かったHEV粒子のユニークな性状

培養上清中のHEV粒子の性状を調べる過程で、抗ORF3マウスモノクローナル抗体（mAb）を用いimmuno-capture PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法によって検討した結果、糞便中のHEV粒子と異なり、培養上清中の

HEV粒子上にORF3タンパク質が存在していることが明らかになった⁹⁾。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タンパク質は培養上清中のHEV粒子上で膜にほぼ覆われた状態で存在していることが示唆される。また、糞便中のHEV粒子を抗ORF3 mAbで捕捉できないのは、肝臓から胆管に放出され、腸管に排泄される過程で胆汁中のデオキシコール酸と膵液中のタンパク分解酵素（トリプシン）に曝され、細胞膜とともにORF3タンパク質が除去されることに起因するものと考えられる。

実際、培養上清中のHEV粒子を胆汁で処理することにより抗ORF2 mAbによってほぼ完全に捕捉されるのに対して、抗ORF3 mAbによってはまったく捕捉されなくなり、シヨ糖液中での浮上密度も処理前の1.15～1.16 g/mLから糞便中HEV粒子と同等の1.27～1.28 g/mLにシフトした¹⁰⁾。血液中のHEVも同様の処理によって同様の挙動を示した。したがって、流血中のHEVが細胞由来の膜成分に覆われ、ORF3タンパク質を担った状態で肝細胞から放出され、あたかも“enveloped”ウイルスとして存在しているのに対して、糞便中ではこれまでの教科書に記載されているように“non-enveloped”ウイルスとして存在しており、HEV粒子として生体内で2種類の存在形態があることが明らかになっている（図2）⁴⁾⁶⁾。

IV 患者血清由来HEVの培養細胞への感染と増殖

培養上清中のHEV粒子は“enveloped”ウイルス様の形態をとりながら、新たな培養細胞に感染し効率よく増えうる。血液中のHEV粒子も表面を膜成分に覆われているが、

CPE（細胞変性効果） PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）

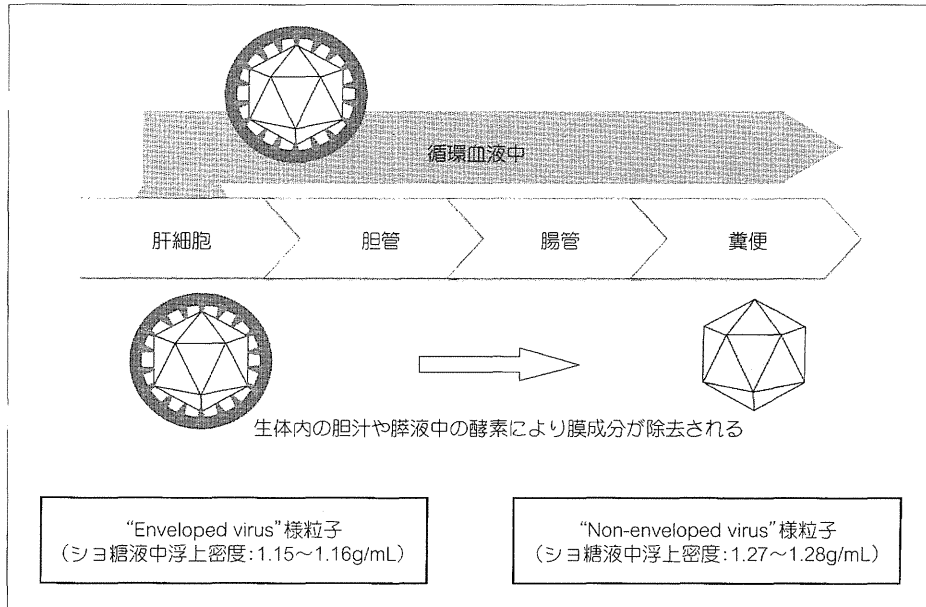


図2 HEVの生体内での動態と予想される粒子形態の模式図

生体内でのHEV粒子の2種類の存在形態を模式的に示す。肝細胞から放出されたHEV粒子は表面を細胞由来の膜成分とORF3タンパク質に覆われ、血液中ではそのままの形態で循環しているが、胆管を経由して糞便中に排出された粒子は膜成分とORF3タンパク質が取り除かれている。

HEV: E型肝炎ウイルス, ORF: open reading frame

(筆者作成)

輸血によるE型肝炎が発生している¹¹⁾¹²⁾。

そこで、血清中HEV粒子が培養細胞に感染し効率よく増殖しうるか否かを検討してみた¹³⁾。E型肝炎患者由来の急性期血清(n=32)を感染材料として接種実験を行った結果、接種ウイルス量が多いほど活発な増殖を示し、 10^6 および 10^5 copies/ウェルのオーダーの接種ではすべてのサンプルで、また、 10^4 オーダー($2.0 \sim 7.2 \times 10^4$ copies/ウェル)の接種では19検体中8検体(42%)で増殖が観察された(図3)⁴⁾¹³⁾。子ウイルスの塩基配列を決定し接種材料として用いた血清中HEVのそれと比較した結果、それぞれのサンプルについて血清中HEVと100%一致するウイルスが培養細胞で産生されたことを確認できた。

興味深いことに、HEV抗体の存否にかかわらず、血清中HEVは感染性を有している

ことがわかった。これは、血清中のHEV粒子が表面を膜成分で覆われ、キャプシドタンパク質に対する抗体(ORF2抗体)が結合しえない状態にあるため、HEV抗体共存下でもimmune complexを形成せず、“free”の状態が存在していることに起因している。このことは、HEVの感染既往者で中和抗体を保有しているヒトでも、輸血によるHEVの感染を阻止し得ない可能性を示唆しており、今後の検証が必要である⁴⁾。

V ブタおよび野生イノシシ由来HEVの培養細胞での増殖

ブタレバーやホルモン(腸管)、野生イノシシの肉や内臓を、生、あるいは加熱不十分な状態で喫食したあとのE型肝炎の発症事例が数多く報告され、E型肝炎患者から分離されるHEVと塩基配列が一致、あるいはほぼ一

II 経口感染するウイルス肝炎

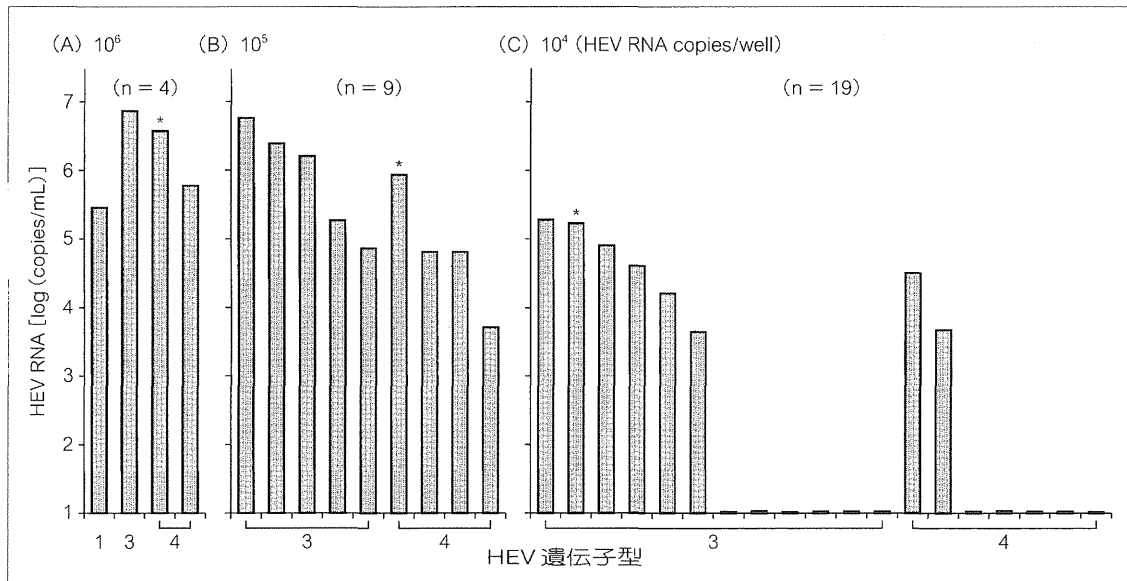


図3 血清中 HEV の PLC/PRF/5 細胞での増殖

* HEV 抗体が陰性の血清検体であることを示す

1 ウェル当たり 10^6 copies (A), 10^5 copies (B), あるいは 10^4 copies (C) のオーダーで血清中 HEV を接種し、接種後 30 日目の培養上清中で検出された HEV RNA のタイターを示す。

HEV : E 型肝炎ウイルス

(文献 4, 13 より)

致する HEV がブタやイノシシから同定されている¹⁴⁾¹⁵⁾。この事実は、これら動物に感染している HEV が種の壁を越えてヒトに感染しうること示しており、ヒト由来の培養細胞である PLC/PRF/5 細胞や A549 細胞にも感染しうると推測される。

そこで、HEV RNA が検出されたブタあるいは野生イノシシの糞便、血清、およびレバーのホモジネートをこれら培養細胞に接種してみた。その結果、サンプルの由来や遺伝子型の違いによらず、現行の培養条件では 1 ウェル当たり 2×10^4 copies 以上のウイルス量である場合には持続的な増殖を確認できることが明らかになった¹⁶⁾。

2003 年に、市販ブタレバー 363 個のうち 7 個から 3 型ないし 4 型の HEV RNA が検出され、一部の HEV はブタレバー喫食後に E 型肝炎を発症した患者の HEV とゲノム塩基配列がほぼ一致しており、ブタレバーが感染源となっている可能性が高いことを報告した¹⁵⁾。

今回、 -80°C で凍結保存してあったこれら 7 個の HEV 感染ブタレバーのホモジネートを調整し A549 細胞に接種したところ、HEV RNA タイターが比較的高かった 3 個のブタレバーの HEV が効率よく増殖し、培養上清中の HEV 量は接種後 30 日目には 10^7 ないし 10^8 copies/mL に達した(図 4A)。これは、ブタレバー内の HEV が感染性を保有していることを意味しており、加熱処理などの不活化をせずに摂取した場合には感染しうることを実証できたことになる。HEV RNA 陽性のイノシシのレバーについても同様に感染性が証明された(図 4B)。したがって、本培養系は感染性の評価にも応用可能であると言える。

VI 培養系を用いたヒト血清中 HEV 抗体の中和能の評価

患者に感染した HEV の遺伝子型が、1 型、3 型、4 型のいずれであっても、その回復期

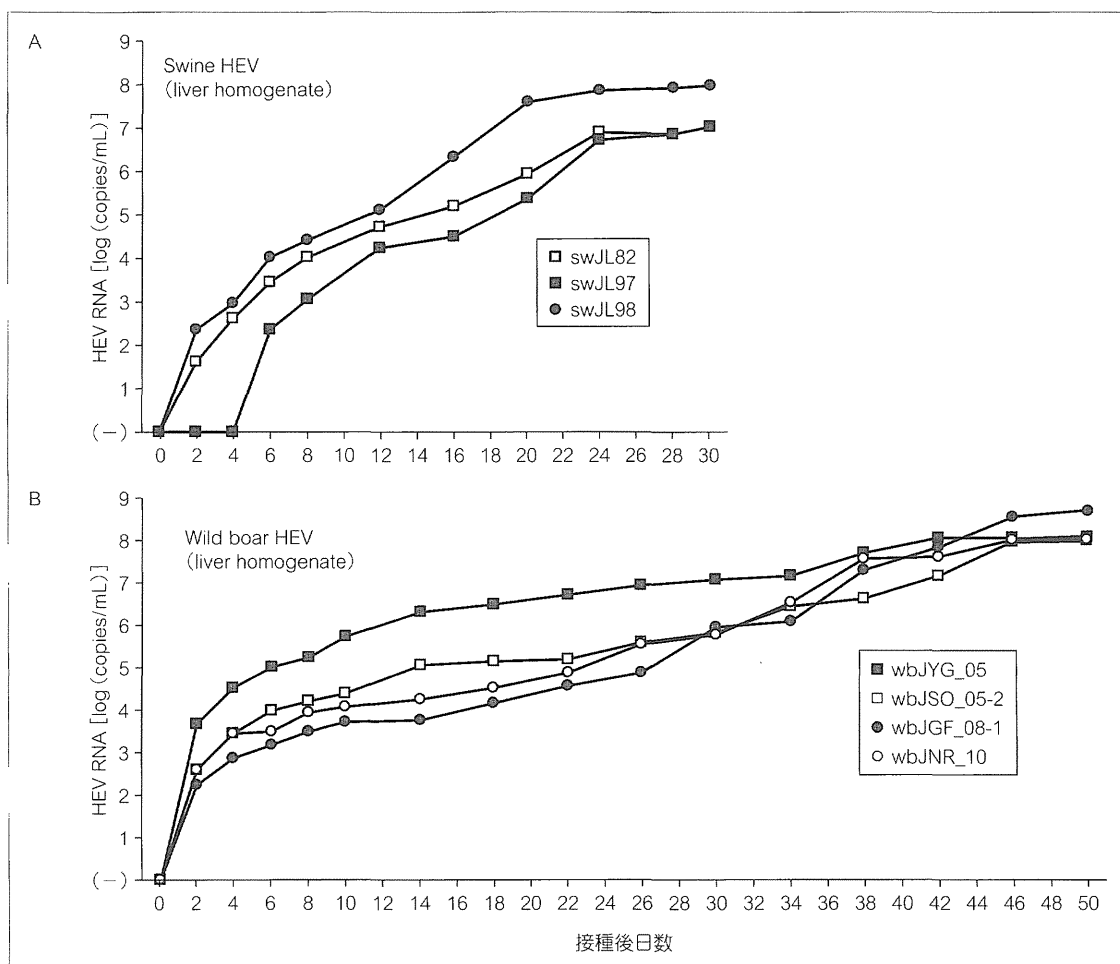


図4 ブタ (A) および野生イノシシ (B) のレバーホモジネート由来 HEV の A549 細胞での増殖

培養上清中で検出された HEV RNA のタイターの推移を示す。

HEV : E型肝炎ウイルス

(文献 16 より)

血清は糞便浮遊液中 HEV (JE03-1760F 株) の A549 細胞や PLC/PRF/5 細胞への感染を阻止しうることを確認できた³⁾。これは、HEV の血清型が 1 種類であるというこれまでの考えを支持する結果である。また、3 年前、9 年前、および 24 年前に HEV に感染し E 型肝炎を発症したことがウイルス学的に検証されている患者の血清 (IgG [免疫グロブリン G] クラス HEV 抗体のみ陽性) の中和能についても検討した。その結果、最長 24 年経

過した時点の血清であっても、中和能を保持していることがわかった (表)³⁾。感染時期は不明であるが、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法によって IgG クラス HEV 抗体が陽性と判定された血清 (OD 値 = 1.000) についても中和能の有無を検討したところ、感染を阻止しうるということがわかった。

以上の結果は、筆者らが用いている in-house ELISA による HEV 抗体測定系の特異性を支持するものであり、肝炎治癒後も長期

IgG (免疫グロブリン G) ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

II 経口感染するウイルス肝炎

表 培養系を用いた血清中 HEV 抗体の中和能の評価

接種後 日数	コントロール 血清 (陰性: 5倍希釈)	培養上清中 HEV RNA											
		HEV 抗体陽性血清 (希釈倍数)											
		発症後3年 (1,113日)			発症後9年 (3,186日)			発症後24年 (8,764日)			発症日不明		
		5倍	50倍	500倍	5倍	50倍	500倍	5倍	50倍	500倍	5倍	50倍	
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-
14	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-
20	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-

糞便由来 HEV (JE03-1760F 株) を PLC/PRF/5 細胞に接種する培養系において評価した。
HEV: E 型肝炎ウイルス

(文献3より)

にわたって HEV に対する中和能をもった抗体が流血中に存在していることを意味している。

なお、培養液中の HEV 粒子や患者流血中 HEV 粒子の培養細胞への感染は回復期血清中の HEV 抗体によって阻止されない。これは、前述のように、これら粒子の表面が膜成分によって覆われ、抗体の結合がブロックされるからである。したがって、抗体中和能の評価には糞便中 HEV 粒子か、あらかじめ界面活性剤とタンパク分解酵素で処理された培養上清中 HEV 粒子を感染材料として用いる必要がある。

VII HEV の感染性 cDNA クローンの作製とその評価

JE03-1760F 株のゲノム RNA を鋳型にして RT-PCR (逆転写ポリメラーゼ連鎖反応) 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 poly(A) 配列とのあいだに挿入したゲノムプラスミド (感染性 cDNA クローン: pJE03-1760F/wt) を作製した (図 5A)¹⁷⁾。こ

のゲノムプラスミドから *in vitro* transcription によりゲノム全長の 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 10⁷ copies/mL 以上の高いレベルでの HEV 産生が認められた。

この cDNA 由来 HEV (pJE03-1760F/wt) は新たな PLC/PRF/5 細胞や A549 細胞に感染し効率よく増殖できるだけでなく、継代培養も可能であり、糞便由来野生株 JE03-1760F と同等の増殖能をもつことが明らかになっている。

VIII 変異 HEV クローンの作製と ORF3 タンパク質の機能解析

過剰発現系での実験結果から、HEV の ORF3 タンパク質が細胞内でさまざまな働きをしている可能性が示唆されているが¹⁸⁾、生理的な条件下での機能は不明であった。感染細胞から放出された HEV 粒子上に ORF3 タンパク質が存在することがわかったことから、どのように粒子形成に当たっているかについて検討した。具体的には、pJE03-1760F

RT-PCR (逆転写ポリメラーゼ連鎖反応)

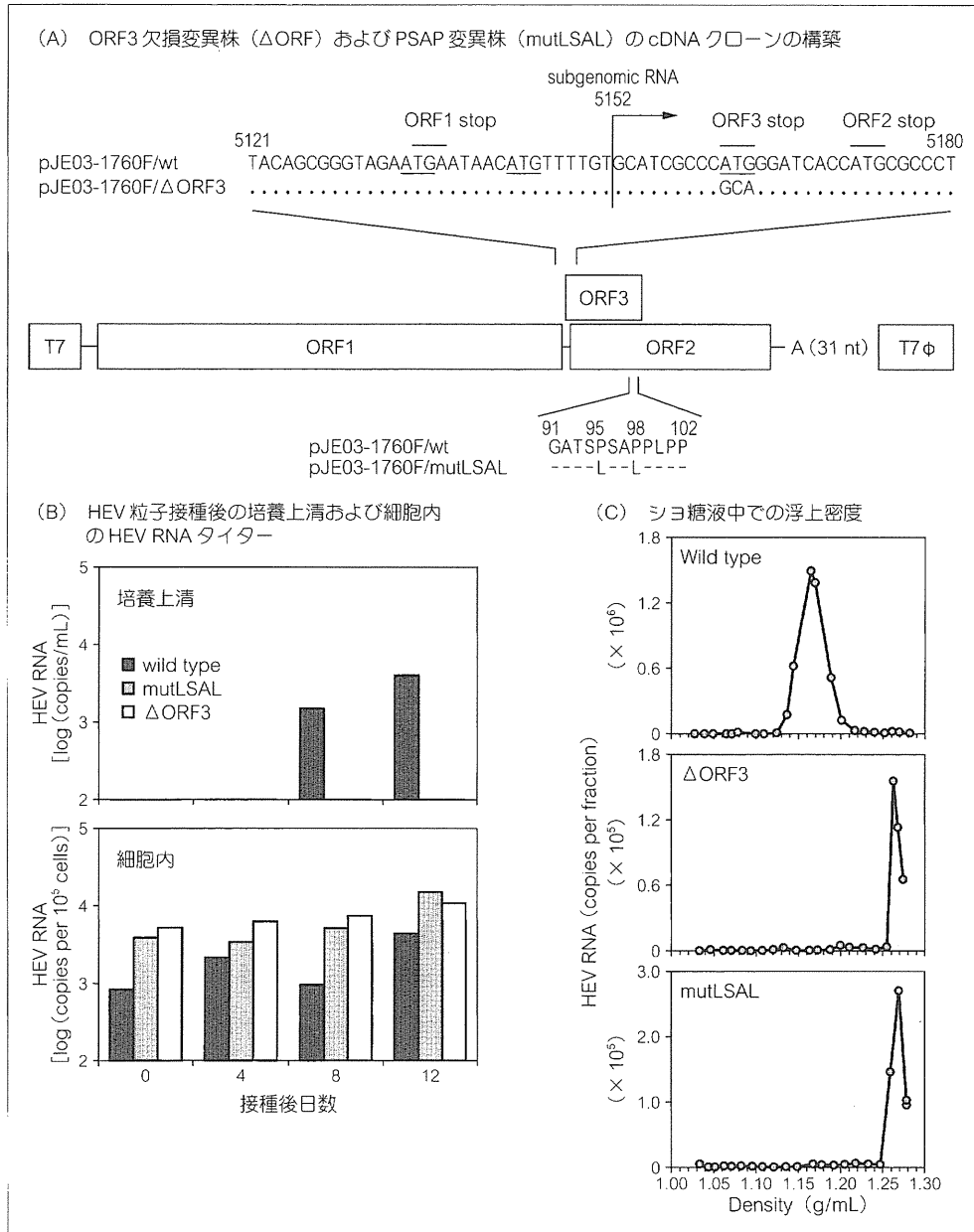


図5 ORF3 欠損変異株 (Δ ORF) および PSAP 変異株における HEV 粒子の放出効率の低下と浮上密度の変化

野生型 HEV の感染性 cDNA クローン (pJE03-1760F/wt) に 2 種類の変異を導入し、ORF3 タンパク質の HEV 粒子放出における役割を検討した結果を示す。

ORF : open reading frame, HEV : E 型肝炎ウイルス

(文献 17, 19 より)

/wt の ORF3 の ATG コドンを GCA に変異させた ORF3 欠損 cDNA クローン (Δ ORF3) を作製し (図 5A), その全長 RNA を PLC/PRF/5 細胞に transfect した¹⁰⁾。

その結果, Δ ORF3 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 が検出できたにもかかわらず, 培養上清中への子ウイルスの放出は認められなかった (図 5B)。このことは, ORF3 欠損ウイルスは細胞内では増殖できても分泌能を欠

II 経口感染するウイルス肝炎

いていること、すなわち、ORF3 タンパク質がウイルス粒子の放出に重要な働きをしていることを示している。細胞破壊によって外に出た HEV 粒子に膜様構造が認められず、浮上密度も糞便中 HEV 粒子と同等であったことから (図 5C), ORF3 タンパク質は感染細胞からのウイルス粒子の放出に重要であり、粒子表面の膜形成は ORF3 タンパク質の発現に依存していることが明らかとなった。

既知の HEV 野生株間で ORF3 タンパク質のアミノ酸配列を比較すると、エンベロープウイルスの出芽に重要な L-ドメインと呼ばれるモチーフのひとつである PSAP モチーフが HEV の ORF3 タンパク質にも存在し、すべての遺伝子型で保存されている。そこで、HEV 粒子産生における PSAP 配列の機能解析を目的として PSAP モチーフの変異クローンを作製し、ウイルス産生に与える影響を検討した (図 5A)¹⁹⁾。PSAP 変異株では培養上清中へのウイルス粒子の産生量が ΔORF3 と同様、検出感度以下か微量のレベルに留まった。ORF2 に対する抗体で高い捕捉が認められたが、ORF3 に対する抗体ではデオキシコール酸ナトリウム処理の有無にかかわらず、捕捉されなかった。

これらの結果から、PSAP 変異ウイルス粒子の表面には細胞由来の膜成分および ORF3 タンパク質が存在していないことが明らかとなった。したがって、ORF3 タンパク質の PSAP モチーフは HEV の放出に重要な役割を演じていることが示唆された。PSAP モチーフは細胞内の Tsg101 というタンパク質と結合することが知られている。

興味深いことに、PSAP 変異株では細胞内での tumor susceptibility gene 101 (Tsg101) というタンパク質との結合が観察されなくなり、small interfering RNA (siRNA) を用いて Tsg101 をノックダウンすると HEV 粒子

の産生が低下した²⁰⁾。

さらに、詳細は省略するが、小胞輸送にかかわる Vps4 というタンパク質のドミナントネガティブ変異体を導入したところ、同様に放出効率が低下した。すなわち、HEV 粒子の放出には宿主側の因子として Tsg101 ならびに Vps4 が重要であることが明らかとなった。これらタンパク質は HIV などのエンベロープをもったウイルスの放出に重要な働きをしていることが知られており、エンベロープをもったウイルスの放出に重要な細胞内小胞輸送系が HEV の放出にも大きくかかわっていることを示している²³⁾。細胞表面の膜ではなく、細胞内の膜(エンドソーム膜)に覆われて出芽するらしいことも示唆されている。

IX おわりに

本稿で紹介したように、培養上清中に高ウイルス量の HEV 粒子が産生分泌され、長期間維持できる培養系が確立されたのは世界で初めてである。糞便由来の JE03-1760F 株のみならず、血清や肝臓由来、さらにはブタや野生イノシシ由来の多数の臨床材料の HEV 株や野外 HEV 株でも効率的な増殖が可能であり、連続的な継代培養を行うこともできるようになった。また、感染性 cDNA クローンの構築にも成功している。

解明されなければならないミステリアスな現象はまだたくさんあるが、確立された培養系および reverse genetics system を用いることにより、これまで未解明であった HEV に関する多方面の数々の疑問に一つひとつ答えを出すことが可能になった。応用面では、大量培養や精製方法を工夫することによるワクチンの開発や、増殖機構の解明を手がかりにした新規創薬標的の発見に向けた研究も急がれる。

Tsg101 (tumor susceptibility gene 101) siRNA (small interfering RNA)

文 献

- 1) Meng XJ, et al : Family *Hepeviridae*. "Virus Taxonomy : Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses" King AMQ, et al, ed. Elsevier Inc., United Kingdom. p1021-1028, 2012.
- 2) Okamoto H : Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res* **127** : 216-228, 2007.
- 3) Tanaka T, et al : Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *J Gen Virol* **88** : 903-911, 2007.
- 4) Okamoto H : Efficient cell culture systems for hepatitis E virus strains in feces and circulating blood. *Rev Med Virol* **21** : 18-31, 2011.
- 5) 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* **45** : 3671-3679, 2007.
- 6) Okamoto H : Hepatitis E virus cell culture models. *Virus Res* **161** : 65-77, 2011.
- 7) 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* **47** : 1906-1910, 2009.
- 8) 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* **76** : 341-349, 2005.
- 9) 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* **153** : 1703-1713, 2008.
- 10) Yamada K, et al : ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. *J Gen Virol* **90** : 1880-1891, 2009.
- 11) Matsubayashi K, et al : Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion* **44** : 934-940, 2004.
- 12) Mitsui T, et al : Prevalence of hepatitis E virus infection among hemodialysis patients in Japan : evidence for infection with a genotype 3 HEV by blood transfusion. *J Med Virol* **74** : 563-572, 2004.
- 13) 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* **48** : 1112-1125, 2010.
- 14) Tei S, et al : Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* **362** : 371-373, 2003.
- 15) 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* **84** : 2351-2357, 2003.
- 16) Takahashi H, et al : A549 and PLC/PRF/5 cells can support the efficient propagation of swine and wild boar hepatitis E virus (HEV) strains : demonstration of HEV infectivity of porcine liver sold as food. *Arch Virol* **157** : 235-246, 2012.
- 17) 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* **90** : 457-462, 2009.
- 18) Chandra V, et al : Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *J Biosci* **33** : 451-464, 2008.
- 19) Nagashima S, et al : A PSAP motif in the ORF3 protein of hepatitis E virus is necessary for virion release from infected cells. *J Gen Virol* **92** : 269-278, 2011.
- 20) Nagashima S, et al : Tumour susceptibility gene 101 and the vacuolar protein sorting pathway are required for the release of hepatitis E virions. *J Gen Virol* **92** : 2838-2848, 2011.

E型肝炎の現況と予防

自治医科大学感染・免疫学講座ウイルス学部門教授 岡本宏明



E型肝炎は古くから存在する疾患で、長い間、衛生環境が整っていない熱帯・亜熱帯地方の流行性疾患(風土病)と考えられてきました。しかし、この疾患をめぐる状況は、この10年間で大きく様変わりしました。既にわが国を含む先進諸国で、E型肝炎が「流行地からのまれな輸入感染症」であるという理解は古いものになったといえます。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、ブタや野生のイノシシなどの動物も感染宿主であることが明らかになり、人獣共通感染症(動物由来感染症)の1つとして認知されるようになったのです。加えて、長年の懸案であったHEVの感染培養系が確立され、基礎研究が進展しています。

動物肉などの摂食後の発症が多い

HEVはエンベロープを持たない、直径27~34nm(平均30nm)の球形ウイルスで、ヘパウイルス科のヘパウイルス属に分類されています。血清型は1種類ですが、全塩基配列の約25%の違いによって、1~4型の遺伝子型に分類されています。遺伝子型の分布には地域的な偏りがあります。1型はアジア・アフリカ諸国の流行地に、2型はメキシコとナイジェリア、ナミビア、エジプトなどのアフリカ諸国に分布しています。3型は世界各地ですが、4型はわが国を含め、中国、台湾、ベトナム、インド、インドネシアなどのアジア諸国に限られています。

1型と2型のHEVはヒトだけに感染し、流行性肝炎の原因となっていますが、3型と4型はヒトだけでなくブタや野生のイノシシ、シカなどの動物にも感染し、動物由来感染症として、主として先進国での散発性E型肝炎の原因となっています。

わが国の養豚場のブタでHEV感染が全国的に蔓延しています。市販の食用バラレバーの約2%からHEV-RNAが検出されています。野生のイノシシでも、約3%からHEV-RNAが検出され、地域によってはHEV抗体陽性率が20%を超えているところもあります。これらの動物からヒトHEVとの類似性が高いHEVが分離されるとともに、ブタや野生のイノシシ、シカなどの動物の肉や内臓を摂食した後の発症事例が多く報告されています。患者数が最も多い北海道では、ブタのレバーやホルモン(腸管)の生、あるいは加熱不十分な状態で摂食によるHEV感染が推測される患者が約70%を占めています。

まれですが、輸血やHEV感染動物との直接的な接触による感染もあります。しかし、国内の北海道以外の地域では渡航歴や輸血歴のないE型肝炎症例の中で、感染源や感染経路を特定あるいは推定できている症例は半数程度にすぎません。

ベトナムに家族3人で旅行中に感染し帰国後に発症した事例からは、二枚貝を生で摂食した後にベトナム

土着4型HEVが分離されています。さらに、中国では飼育ウサギからもHEVが検出されていることなどから、感染源や感染経路のさらなる解明に向けた疫学的研究が重要です。

中高年の男性に多い疾患

HEV感染のほとんどは一過性で終息し、免疫能が正常な状態では感染が慢性化することはありません。30都道府県に居住する2万2,027人の健康成人(20~108歳)を対象に疫学調査を行ったところ、HEV感染は全国的に認められ、健康成人の5.3%、すなわち約20人に1人が過去の感染既往を示すIgGクラスHEV抗体を保有していることがわかりました。HEV抗体陽性率は男性の方が女性に比べて有意に高く、年齢とともに上昇傾向を示し、50歳以上では未滿に比べて有意に高いことが明らかになりました。中部地方以北では近畿地方以南に比べて、男女ともに有意にHEV抗体陽性率が高いという結果も得られました。

HEVに感染しても、急性肝炎を発症するのは感染者全体の0.1%程度と推定されています。E型肝炎は、2~9週(平均6週)の潜伏期を経て発症します。症状は、他の急性肝炎と同様にかぜ様症状、全身倦怠感、食欲不振、悪心・嘔吐、発熱、黄疸、褐色尿などで、症状から原因を鑑別するのは困難です。多くは安静・補液などの治療で比較的短期間のうちに軽快治癒しますが、劇症肝炎による死亡例や黄疸遷延、血液凝固能異常(プロトロンビン活性40%以下)を示す重症例も認められます。

一般に、A型肝炎やB型肝炎の血清学的診断は、急性期血清での酵素結合免疫吸着測定(ELISA)法による

〈表〉すぐ実行可能なHEVの感染予防対策

<ul style="list-style-type: none"> 調理時の交叉汚染の可能性もあることから、生のまま摂取する食材を扱う「まな板」や「包丁」、「箸」などを動物の生肉・内臓と共通にしない 動物の生肉・内臓を摂取する場合には、中心部まで十分に火が通るような焼き方を 温度と時間：56℃で1時間加熱しても不十分 中心部まで十分に火が通るようにし、70℃、10分以上の加熱処理が必要

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)の検出によって行われています。E型肝炎の血清診断でも、これまでIgMクラスのHEV抗体測定系が主として紹介されてきましたが、IgMクラス抗体の測定系の問題点として、リウマチ因子などを含む臨床検体での非特異反応による偽陽性があります。われわれの検討では、E型肝炎ではIgAクラスHEV抗体の測定系の方が特異度、感度ともに優れていることが明らかになっています。

2003年11月から施行された改正感染症法によりE型肝炎が4類感染症に分類され、診断後に直ちに届け出ることが義務付けられていますが、保険適用になったE型肝炎の診断薬が最近(2011年10月)までありませんでした。大手検査センターの検査受託が開始されたのは早いところで2011年12月、遅いところでは今年4月からということもあります。したがって、現在までに把握されている数は氷山の一角との可能性もあります。

70℃、10分以上の加熱処理を

劇症化・重症化例、死亡例もあることから、HEV感染を阻止・制御するためのワクチンの開発が重要です。E型肝炎の組み換え蛋白質ワクチンの研究が進められており、中国では最近、大腸菌でつくったE型肝炎ワクチンが認可されました。流行地でのHEV感染予防には、手洗いの励行に加え、生水、生野菜、魚介類など加熱調理されていない食べ物を不用意に摂取しないことです。

国内での感染予防には、今のところエビデンスに基づいた正確な情報を国民に提供するための広報・啓発活動が最も効果的であると考えられます。最近われわれが確立したHEVの細胞培養系を用い、ウイルスの不活化条件を検討した結果、70℃、10分ないしはそれ以上の加熱調理では不活化されますが、25℃、30分では未処理のコントロールと変わらず、56℃、30分の条件でも感染性が残存することがわかりました。Feaginsらは、HEV陽性バラレバーをすりつぶし、①56℃で1時間加熱する②191℃で5分間炒める③5分間ボイルするの3通りの処理を行い、5頭ずつ



ブタの血管内に注射する方法で感染実験を行い、感染性の評価を行ったところ、56℃、1時間加熱処理群の5頭中4頭で感染が認められましたが、残りの11頭では感染は認められませんでした。

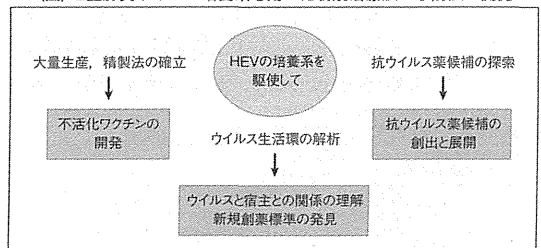
これらの結果から、気付かずにHEV感染動物の肉や内臓が摂食される場合でも、適切に加熱処理されることで感染性が失われると考えられます。しかし、これは全体に熱が加えられることが前提であり、中心部まで十分に火が通るような焼き方をしなければなりません。また、生の状態の肉や内臓と触れたまな板や包丁、箸などを加熱しないでそのまま摂取する食材と共通にしないことも感染の予防には重要です(表)。

不活化ワクチンの開発に向けた研究へ

1990年代から多くの研究者によって、HEVの培養が試みられてきましたが、増殖レベルは極めて低いものにとどまっていた。最近、われわれは高力価のHEV[JEO3-1760F株(遺伝子型3型)あるいはHE-JF5/15F株(4型)]を含む糞便濾液を用い、肝がん細胞株PLC/PRF/5と肺がん細胞株A549での効率的なHEVの培養系を確立することに成功しました。現在、血清や肝臓由来、さらにはブタや野生のイノシシ由来の多数の臨床材料のHEV株などでも効率的な増殖が可能で、連続的な継代培養を行うこともできるようになりました。また、HEVのユニークな放出機構も徐々に明らかになりつつあります。

効率的なHEVの感染培養系が確立されたことで、これまで未解明であったHEVに関する多岐にわたる疑問に、1つ1つ答えを出すことが可能になりました。応用面では、大量培養や精製方法を工夫することによる不活化ワクチンの開発や、増殖機構の解明を手がかりにした新規創薬標的の発見にも期待されます(図)。

〈図〉E型肝炎ウイルス培養系を用いた新規治療法・予防法の開発



(表、図とも岡本宏明氏提供)

八橋 弘, 玉田陽子, 長岡進矢,
小森敦正, 阿比留正剛

国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター

1 はじめに

急性肝炎とは、主に肝炎ウイルスが原因で起こる急性のびまん性疾患で、黄疸、食欲不振、嘔気嘔吐、全身倦怠感、発熱などの症状を呈する。肝炎ウイルスとしては、A、B、C、D、E型の5種類が確認されている。感染経路は、A型とE型が経口感染、B型、C型、D型は血液、体液で感染する経血液感染である。D型急性肝炎は、その診断そのものが困難で正確な感染状況は把握されていないがHBVと共存した形でしかウイルスが存在しえないこと、感染者そのものが少ないことから、日本では極めて稀と考えられている。急性肝炎の予後は一般に良好だが、急性肝炎患者の約1～2%の患者は劇症化し、一度劇症化すると高率に死亡する。

本稿では、過去30年の本邦のウイルス性急性肝炎の変遷について、散発性、輸血後に区分して概説するとともに、トピックスとして、最近のA型肝炎、B型急性肝炎の発生動向についても紹介する。

2 国立病院機構肝疾患ネットワークでのウイルス性急性肝炎の発生動向調査

全国31施設からなる国立病院機構肝疾患ネットワークでは、多施設共同研究（課題名：国立病院機構共同臨床研究、本邦におけるウイルス性急性肝炎の発生状況と治療法に関する研究：主任研究者、八橋弘）としてウイルス性急性肝炎の発生動向についての調査を行っている。

本研究班での具体的な調査方法とは、まず、単

年度ごとの前向き観察研究として、毎年1月1日から12月31日までの期間、各施設に急性肝炎として入院した患者の症例登録を行い、各起因ウイルス別の症例数とその頻度について集計を行う。集計上、ウイルス性急性肝炎は、感染経路から大きく輸血後半年以内に発症した輸血後とそれ以外の散発性の2群に分類し、さらに起因ウイルスとしてA型、B型、C型、非ABC型肝炎の4群に分類し、さらに非ABC型肝炎症例の中からHEV抗体とHEV-RNAの検出を行ってE型肝炎の診断を行っている。

3 散発性急性肝炎の変遷

1980年から2010年までの過去31年間、上記研究班参加施設で散発性急性肝炎として登録された症例数は4,524例で、うちA型が1,612例(35.6%)、B型が1,294例(28.6%)、C型が385例(8.5%)、非ABC型が1,233例(27.3%)であった¹⁾(表1)。また同期間内に、保存血清を用いてHEV抗体とHEV-RNAの検出を行った非ABC型肝炎症例955例中56例(5.9%)をE型肝炎と診断した。

過去31年間の集計結果を、単純に頻度の高いものから並べるとA型、B型、非ABC型、C型の順となるが、本邦のウイルス性急性肝炎の発生頻度は時代とともに変化している。その変化の一番の要因は、A型肝炎の発生動向が、過去31年間に大きく変化していることである。図1に示すように、A型肝炎に関しては1983年(162例)と1990

表1 散発性急性肝炎の型別年次推移（1980～2010年，31施設）

年	A型	B型	C型	非ABC型	計
80	44 (30.6)	55 (38.2)	16 (11.1)	29 (20.1)	144
81	50 (33.4)	42 (28.0)	17 (11.3)	41 (27.3)	150
82	37 (28.2)	55 (42.0)	13 (9.9)	26 (19.8)	131
83	162 (57.7)	51 (18.1)	16 (5.7)	52 (18.5)	281
84	57 (32.8)	66 (37.9)	9 (5.2)	42 (24.1)	174
85	33 (20.9)	51 (32.3)	18 (11.4)	56 (35.4)	158
86	65 (33.5)	54 (27.8)	21 (10.8)	54 (27.8)	194
87	31 (17.9)	62 (35.8)	18 (10.4)	62 (35.8)	173
88	86 (45.3)	46 (24.2)	17 (8.9)	41 (21.6)	190
89	122 (51.9)	47 (20.0)	16 (6.8)	50 (21.3)	235
90	187 (65.8)	39 (13.7)	14 (4.9)	44 (15.5)	284
91	115 (55.8)	37 (18.9)	15 (7.3)	37 (18.0)	204
92	77 (54.6)	27 (19.1)	9 (6.4)	28 (19.9)	141
93	84 (52.8)	27 (17.0)	16 (10.1)	32 (20.1)	159
94	64 (49.6)	23 (17.8)	13 (10.1)	29 (22.5)	129
95	40 (33.6)	24 (20.2)	17 (14.3)	38 (31.9)	119
96	20 (26.7)	22 (29.3)	3 (4.0)	30 (31.9)	75
97	49 (43.4)	25 (22.1)	9 (8.0)	30 (26.5)	113
98	30 (21.9)	37 (27.0)	7 (5.1)	63 (46.0)	137
99	52 (43.3)	27 (22.5)	7 (5.8)	34 (28.3)	120
00	15 (17.7)	34 (39.0)	8 (9.2)	30 (35.3)	87
01	39 (30.0)	45 (34.6)	17 (13.1)	29 (22.3)	130
02	45 (38.5)	29 (24.8)	8 (6.8)	35 (29.9)	117
03	23 (22.5)	31 (30.4)	12 (11.8)	36 (35.3)	102
04	14 (11.0)	60 (47.2)	11 (8.7)	42 (33.1)	127
05	12 (9.8)	39 (34.8)	8 (7.1)	53 (47.3)	112
06	19 (17.8)	49 (45.8)	11 (10.3)	28 (26.2)	107
07	6 (5.9)	49 (48.0)	7 (6.9)	40 (39.2)	102
08	5 (4.6)	45 (41.7)	6 (5.6)	52 (48.1)	108
09	8 (7.0)	53 (46.1)	17 (14.8)	37 (32.2)	115
10	21 (19.8)	43 (40.6)	9 (8.5)	33 (31.1)	106
計	1,612 (35.6)	1,294 (28.6)	385 (8.5)	1,233 (27.3)	4,524

年（187例）に流行を認めるも、それ以後は減少傾向にある。1980～1989年，1990～1999年，2000～2009年と10年ごとに集計を行うと，図1の円グラフに示すように，A型肝炎の発生頻度は，1980～1989年には38%，1990～1999年には48%であったが，2000～2009年には17%へと減少している。1995年以後，1983年と1990年に確認されたA型肝炎の流行が認められていない点が，わが国の散発性急性肝炎の特徴と言える。

近年のA型肝炎の発生数の減少に伴い，2000年以後のわが国の散発性急性肝炎の発生頻度は，図1の円グラフに示すように，頻度の高いものからB型，非ABC型，A型，C型の順となっている。

4 A型肝炎の最近の動向

A型肝炎の主な感染媒体は汚染された水および食

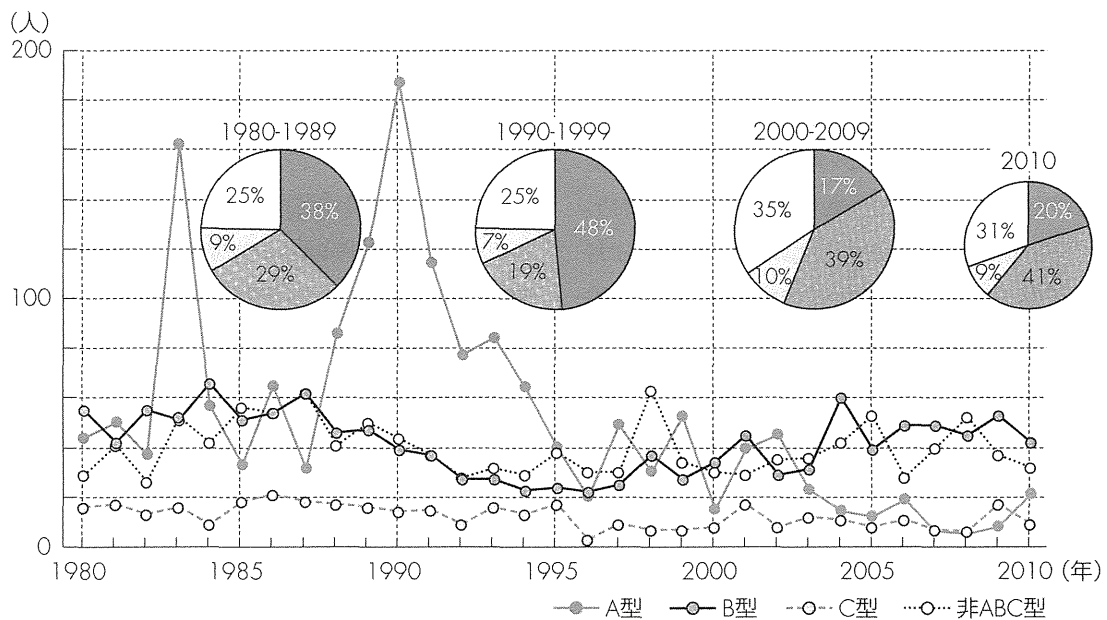


図1 ●散発性急性肝炎の型別年次推移 1980～2010年 (n = 4,524 31施設)

注: A型肝炎は1983年と1990年に流行が見られたが、それ以後の流行はなく、減少傾向が持続している¹⁾。

べ物であり、わが国では貝類（生牡蠣）の生食後の感染事例が多く報告されているが、国外ではレタス、グリーンオニオンなど生鮮野菜や冷凍イチゴなど輸入生食材が感染源となった集団発生例が報告されている。また家族内での感染事例が多いこともA型肝炎の特徴であり、1983年と1990年の流行時には、家族全員がA型肝炎に罹患するという事例がしばしば経験された。また、A型肝炎は、冬から春にかけて多発するなど季節性が見られたが、最近では冷凍食品の普及、食物の流通システムの変更の反映からか、夏の時期の感染事例も珍しくなく、従来ほどの季節性がなくなっている。

なお、本研究班でのA型肝炎の発生数は、2007年から2009年の3年間は、毎年10例未満で推移していたが、2010年には21例の発生数で増加していた¹⁾。感染症研究所の調査においても2010年春にかけてのA型肝炎の小流行が確認されている²⁾。

HAV遺伝子型はI型、II型、III型の3種類に分類され、更にそれぞれが、A、Bの亜型に分けられている²⁾。わが国に常在するHAVの遺伝子型はIA型である。しかし2010年には、西日本を中心

とする小流行が認められ、この年のA型肝炎患者のHAV遺伝子型は、わが国には常在しないIIIA型が約30%を占めていた²⁾。韓国では2008年からIIIA型のA型肝炎の流行が認められており、2010年の小流行は、韓国でのA型感染がわが国へ拡大した可能性があるも、具体的な感染経路は不明である。また、A型肝炎の発生事例の最近のトピックスとして、2010年12月から2011年1月にかけて、千葉県において飲食店（寿司店）を原因施設とするA型肝炎の集団発生が報告されている³⁾。

幼少期にA型肝炎に感染した場合、感染例の多くは不顕性感染で感染が終息するとともに、中和抗体であるHA抗体を獲得し、A型肝炎に2度感染することはない。わが国においては、1945年以前（第二次世界大戦前）の出生者は100%に近いHA抗体陽性率を示すも、それ以後に出生した者でのHA抗体陽性率は10%に満たないことが確認されている。これは、過去に本ウイルスは日本に常在するも衛生環境の改善とともに劇的にA型肝炎ウイルス感染の発生が激減したためと考えられる。1945年以後の戦後生まれの日本人のHA抗体

保有率が10%に満たないという事実は、これよりも若い世代でHA抗体を保有していない者は誰しもが、A型肝炎に罹患する可能性があるということの意味する。今後、意図しない衛生環境の悪化や食物の流通経路の変化により、A型肝炎が日本において大流行する可能性は否定できない。2011年3月11日の東日本大震災、津波などの被害により、被災地では一時的な衛生環境の低下によるA型肝炎の流行も危惧されたが、幸いなことに2011年12月までの時点まで、これらの地域でのA型肝炎の流行は確認されていない。

5 輸血後急性肝炎の動向

1980年から2010年までの過去31年間、上記研究班参加施設で輸血後急性肝炎として登録された症例数は290例で、うちB型が23例(7.9%)、C型が205例(70.7%)、非ABC型が62例(21.4%)であった(表2)。図2に示すように、1990年を境界として、全ての輸血後急性肝炎で発生数が激減

し、その状況が2010年まで持続している。

1989年のHCV抗体が発見されるまで、わが国では、輸血例の約20%の症例において急性肝障害が認められたが、これらの症例は除外診断によって非A非B型急性肝炎と、その当時は診断されていた。HCV抗体の測定が可能となってから、輸血後非A非B型急性肝炎の症例のうち肝機能障害が持続する例の多くが、輸血後C型肝炎であったことが判明した。上記研究班のデータも、輸血後非A非B型急性肝炎と診断していた症例の保存血清を用いての検討により、過去31年間の輸血後のC型急性肝炎と非ABC型肝炎の動向を再検討したものである。

輸血や血液製剤によるHCV感染対策として、日本赤十字社では輸血血液に対するスクリーニング法として1989年から世界で初めてHCV抗体検査(C100-3抗体)を導入し、さらに1992年からは、より高感度である第2世代のHCV抗体診断試薬に変更し、1999年からは核酸増幅検査(Nucleic acid Amplification Test: NAT検査)によるHCV-RNA検出法を導入してきた。わが国では、これら

表2 輸血後急性肝炎の型別年次推移(1980～2010年, 31施設)

年	B型	C型	非ABC型	計	年	B型	C型	非ABC型	計
80	0	14	6	20	95	1	1	0	2
81	3	19	3	25	96	0	0	0	0
82	4	13	3	20	97	1	0	0	1
83	2	15	10	27	98	0	1	2	3
84	2	19	4	25	99	0	0	0	0
85	0	15	8	23	00	1	1	1	3
86	2	20	7	29	01	0	0	0	0
87	1	17	2	20	02	0	1	0	1
88	3	28	3	34	03	0	1	0	1
89	1	22	4	27	04	0	0	0	0
90	2	8	2	12	05	0	0	0	0
91	0	7	1	8	06	0	0	0	0
92	0	1	5	6	07	0	0	0	0
93	0	1	1	2	08	0	0	0	0
94	0	0	0	0	09	0	1	0	1
					10	0	0	0	0
計	23 (7.9)	205 (70.7)	62 (21.4)	290					