

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25年度分担研究報告書

1. 不活化E型肝炎ワクチンの可能性の検討
2. 中国におけるRat HEVの感染調査

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：不活化E型肝炎ワクチンの可能性を検討するため、細胞培養で増殖したG1, G3, G4 HEVを加熱により不活化し、ウサギとラットに免疫し、抗体誘導能や中和活性などを解析した。さらに不活化したG1, G3, G4 HEVをカニクイザルにアジュバンドを使用しない条件で筋肉接種により、抗HEV IgG抗体が誘導された。これらのカニクイザルにG1, G3, G4 HEVを接種してもHEVの感染が成立しなかった。以上の結果は培養細胞で増殖したHEVを不活化ワクチンとして利用する可能性が示唆された。中国におけるrat HEVの感染調査ではunksはrat HEVの新たな宿主であることが明らかになった。

<協力研究者>

網康志 (国立感染症研究所・主任研究官)
須崎百合子 (国立感染症研究所・非常勤職員)
恒光裕 (動物衛生研究所・寒地酪農衛生研究領域長)
柯昌文 (中国広東CDC・微生物検定所長)

A. 研究目的

E型肝炎ウイルス (Hepatitis E virus; HEV) はE型肝炎の原因ウイルスである。現在、ヒトから少なくとも四つの遺伝子型が異なるHEV(G1-G4)は分離された。E型肝炎は途上国で多発であり、先進各国でも輸入感染症、人獣共通感染症としてしばしば発見される。E型肝炎の一つの特徴は感染妊婦の死亡率が高いことで、実に20%に達するという報告もある。E型肝炎の防止にはE型肝炎ワクチンが必要される。これまでに我々はG1, G3, G4 HEVをヒト肝癌細胞PLC/PRF/5に接種し、経時的に培養上清中のHEV RNA, HEV抗原をRT-PCR, ELISA法にて確認し、HEVを細胞培養法で大量増やすことが可能となった。この培養系を用いてHEVの熱に対する安定性、消毒剤や、紫外線などに対する抵抗性を検討し、ウイルス不活化条件を検討した。本年度、我々は細胞培養で増殖したG1, G3, G4 HEVを加熱により不活化した後ウサギとラットに免疫し、抗体誘導能や中和活性などを解析し、

不活化ワクチンの可能性を検討した。さらにアジュバンドを使わず、カニクイザルに筋肉接種により、抗HEV IgG抗体の誘導および感染防御を検討した。一方、Rat HEVは野生ラットから分離された遺伝子構造上ではヒトHEVと類似するウイルスであり、その病原性などに関する情報がまだ少ない。本年度は中国の野生ラットにおけるrat HEVの感染状況も調査した。

B. 研究方法

培養細胞で増殖したG1, G3, G4 HEVを65°C10分間熱処理したあと、それぞれ5匹ラット、三羽ウサギに大腿筋肉に三回(0, 30, 45日目)接種する。接種後、ウサギに対して経時的に採血する。ラットは三回接種後の一週間後に採血する。ELISA法で血清中のHEVに対する抗体を測定する。さらに免疫血清の中和活性を測定する。中和活性の測定：免疫血清をHEVと6ウェールプレート上で十分混合して、37°C一時間反応させた後、4°C一晩置く。翌日、PLC/PRF/5細胞を 5×10^5 /well蒔き、36°Cで培養する。その後、3日おきに培地を交換する。経時的に培養上清中の抗原を測定し、ウイルスの増殖の有無によって免疫血清の中和活性を評価する。カニクイザルを用いた感染防御の検討：不活化したG1, G3, G4 HEVをそれぞれ二頭ずつカニクイザルに大腿筋肉経由で接種し、経時的に採血

して抗体価を測定する。抗体陽性となるサルに感染性を持つ HEV を静脈から接種し、HEV の増殖を測定し、感染防御を評価する。

Rat HEV 疫学調査：中国広東省湛江市で野生ラット(713)、スunks (260)を捕獲し、血清を採取した。ELISA を用いて抗 rat HEV IgG, IgM 抗体を測定した。IgM 陽性の血清から RT-PCR 法にて HEV RNA を検出した。PCR 増幅産物を精製し、塩基配列を解析した。

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

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

感染防御：不活化した G1, G3, G4 HEV を大腿筋肉経由でカニクイザルに接種し、抗 HEV IgG 抗体が誘導された。これらのカニクイザルに G1, G3, G4 HEV を接種しても HEV の感染が成立しなかった。以上の結果は培養細胞で増殖した HEV 不活化ワクチンとして利用する可能性が示唆された。

Rat HEV の疫学調査では広東地域に棲息している野生ラットにおける抗 rat HEV IgG, IgM の陽性率はそれぞれ 23.3% (166/713)、8.3% (59/713) だった。中心地域では IgG の陽性率は 15.1% (32/212) であり、郊外の 24.1% (84/348) に比べ明らかに低かった。59 の IgM 陽性検体のうち、12 検体は rat HEV RNA が陽性だった。12 の中国株はドイツ株と異なり、インドネシア、ベトナム株と同じクラスターを構成していた。スunks における抗 rat HEV IgG, IgM の陽性率はそれぞれ 10.4% (27/260)、4.6% (12/260) だった。12 の IgM 陽性スunks 血清のうち、5 検体は rat HEV RNA が陽性だった。スunks 由来の rat HEV 遺伝子配列は当地域のラットから分離された rat HEV と極めて類似した。

D. 考察

これまでに HEV が増殖可能な培養細胞系が樹立されていないため、E 型肝炎ワクチンの研究は

主にバクテリアや組換えバキュロウイルス発現システムなどを用いた構造蛋白発現によって行われてきた。ネティブなウイルスを培養細胞系により培養できることにより不活化ワクチンの研究が可能となり、今回の研究結果は不活化ワクチンとして応用できる可能性が示された。ネティブなウイルスの使用によりもっと有効なワクチンの開発が期待できる。ただし、不活化ワクチンとして応用する場合、いかに大量精製した抗原を獲得するか、また、ウイルスの精製法、不活化の方法をさらに検討する必要がある。

Rat HEV の疫学調査結果から中国でも rat HEV が広範囲に流行していること、また、スunks は rat HEV の新たな宿主であることが明らかになった。

E. 結論

本研究では培養細胞で増殖した G1, G3, G4 HEV を不活化ワクチンとして利用する可能性が示唆されたが、ウイルスの不活化の方法、ウイルス濃縮および精製法などさらに検討する必要がある。Rat HEV はラットだけではなくスunks にも感染せいでいる。

F. 研究発表

1. 学会発表

- 1) Tingting Yang, 李天成。スペインからの E 型肝炎輸入感染症例の解析。第 54 回日本臨床ウイルス学会、2013 年 6 月、岡山。
- 2) 李天成、Tingting Yang, Wei Li, Daiwei Guan, Ling Fang, Juan Su, Changwen Ke, 武田直和、脇田隆字中国における Rat HEV の感染調査。第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月、岐阜。
- 3) 李天成、楊ていてい、片岡紀代、網康至、須崎百合子、岸田典子、白倉雅之、今井正樹、浅沼秀樹、武田直和、脇田隆字。フェレット E 型肝炎ウイルス様粒子の作製およびその応用。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月神戸。
- 4) 石井孝司、李天成、塩田智之、吉崎佐矢香、脇田隆字。E 型肝炎ウイルスレプリコンの構築とレプリコン包埋 VLP 作製の検討。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月神戸。
- 5) 塩田智之、李天成、石井孝司、吉崎佐矢香、西村順裕、清水博之、脇田隆字。E 型肝炎ウイルス感染性規定宿主因子の探索に関する研究。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11

月神戸.

6) 清水健太、濱口杉大、李天成、吉松組子、有吉紅也、有川二郎。ラット E 型肝炎ウイルスは人獣共通感染症の病原体か？第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月神戸.

7) Tian-Cheng Li, Koji Ishii, Hiroshi Yamamoto, Juri Suzuki, Atsushi Matsuda, Takafumi Ishida, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Naokazu Takeda and Takaji Wakita. An unrecognized hepatitis E outbreak in a monkey facility The 23st Conference of the Asian Pacific Association for the study of the liver. 6-10 June 2013, Singapore

2. 論文発表

1) Tomoyuki Shiota, Tian-Cheng Li, Sayaka Yoshizaki, Takanobu Kato, Takaji Wakita, and Koji Ishii. Hepatitis E virus capsid C-terminal region is essential for the viral life-cycle. J Virol. 2013, May 87:(10): 6031-6036.

2) Li TC, Ami Y, Suzaki Y, Takeda N, Takaji W. No Evidence for Hepatitis E Virus Genotype 3 Susceptibility in Rats. Emerg Infect Dis. 2013 Aug;19 (8):1343-1345.

3) Dawei Guan, Wei Li, Juan Su, Ling Fang, Naokazu Takeda, Takaji Wakita, Tian-Cheng Li, and Changwen Ke. Asian Musk Shrew as a Reservoir of Rat Hepatitis E Virus, China. Emerg Infect Dis. 2013 Aug;19(8):1341-1343.

4) Wei Li, Dawei Guan, Juan Su, Naokazu Takeda, Takaji Wakita, Changwen Ke, Tian-Cheng Li. High prevalence of rat hepatitis E virus in wild rats in China. Vet Microbiol. 2013 Aug 30; 165 (3-4): 275-80.

5) Yang T, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Kishida N, Shirakura M, Imai M, Asanuma H, Takeda N, Wakita T, Li TC. Characterization of Self-Assembled Virus-Like Particles of Ferret Hepatitis E Virus Generated by Recombinant Baculoviruses. J Gen Virol. 2013. 12:2647-56.

6). Tian-Cheng Li, Tingting Yang, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Masayuki Shirakura, Noriko Kishida, Hideki Asanuma, Naokazu Takeda, and Wakita Takaji. Full Genome of Ferret

Hepatitis E Virus from Laboratory Ferrets. Emerg Infect Dis. 2014. *In press*.

7) Tian-Cheng Li, Tingting Yang, Tomoyuki Shiota, Sayaka Yoshizaki, Hiromu Yoshida, Mariko Saito, Toshifumi Imagawa, Fidelino F. Malbas, Socorro P. Lupisan, Hitoshi Oshitani, Takaji Wakita, and Koji Ishii. Molecular detection of Hepatitis E virus in rivers in the Philippines. Am J Trop Med and Hyg. 2014. *In press*.

8) 石井孝司、李天成. E 型肝炎の概要および検査法. 病原微生物検出情報 35: 3-4, 2014.

9) 石井孝司、李天成、恒光裕. 人獣共通感染症としての E 型肝炎. 病原微生物検出情報 35: 4-5, 2014.

10) 原田誠也、大迫英夫、吉岡健太、西村浩一、清田政憲、李天成、石井孝司. イノシシ、シおおよびブタの E 型肝炎ウイルス感染状況調査-熊本県. 病原微生物検出情報 35: 9-10, 2014.

11) 李天成. 動物由来 E 型肝炎ウイルス; E 型肝炎ウイルスの多様性. 病原微生物検出情報 35: 10-12, 2014.

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25年度分担研究報告書

ラット HEV の培養系の確立とその意義

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: インドネシア及び我が国の野生ネズミにおけるラット HEV の感染状況を明らかにするとともに、ラット HEV のヒトへの感染性に関する検討を行った。インドネシアのクマネズミでは IgG クラスのラット HEV 抗体陽性率が 37% と高率であり、28% の個体から genetic group G1~G3 に分類されるラット HEV が分離された。一方、我が国のクマネズミ及びドブネズミにおける抗体陽性率は約 1% にすぎず、侵淫度は低いと考えられた。In vitro 感染実験において、ラット HEV はヒト肝癌由来株化細胞である PLC/PRF/5 細胞、HuH-7 細胞及び HepG2 細胞に感染し、培養上清中に高いタイターの子孫ウイルスが産出された。加えて、血清学的解析において、インドネシアの供血者及び我が国の検診受診者の一部からラット HEV 型 ORF2 抗原に対する特異抗体が検出され、ラット HEV の感染既往を示唆する結果が得られたことから、ラット HEV は種の壁を越えてヒトに感染する可能性が示唆された。

<共同研究者>

西澤 勉、長嶋茂雄、小林富成、吉林台、大西浩史、田村和子、唐吉思（自治医科大学医学 感染・免疫学講座ウイルス学部門）

Mulyanto (Immunobiology Laboratory, Faculty of Medicine, University of Mataram, Indonesia)
Suparyatmo (Department of Clinical Pathology, Moewardi Hospital, University of Sebelas Maret, Indonesia)

川上万里（岡山済生会総合病院 肝臓病センター）
角坂照貴（愛知医科大学医学部 感染・免疫学講座）

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、ウサギからも分離される。一方でヒト型 HEV に近似してい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）などからも分離されている。我々はラット HEV のヒトへの感染性について明らかにするために、ラット HEV のヒト由来株化細胞への in vitro 感染実験及び血清学的アプローチによるヒトのラット HEV 感染既往に関する検討を行った。

B. 研究方法

1) 対象

インドネシア Lombok 島及び Java 島において捕獲された野生のクマネズミ 369 頭の血清・肝臓のペア検体、日本の野生ドブネズミ及びクマネズミ 377 頭の血清を実験に供した。

2) IgG クラスのラット HEV 抗体の測定

IgG クラスのラット HEV 抗体はラット HEV 由来の組換え ORF2 タンパク質及びパーオキシダーゼを標識した抗ラット IgG 抗体を用いた酵素免疫測定法により測定した (Virus Res 179:102-112, 2014)。

3) ラット HEV RNA の測定

ラット HEV RNA は、5' 末端領域を増幅する nested RT-PCR 法 (5' terminus-PCR) により検出した。プライマーは既報 (ドイツ由来 4 株及びベトナム由来 1 株) 及び我々がインドネシアのネズミから分離し全塩基配列を決定した 2 株 (ratIDE079F, ratIDE113F) の塩基配列情報に基づいて設計した (Virus Res 179:102-112, 2014)。また、確認のために ORF1 領域 (一部 ORF2 領域を含む) にプライマーを設定した nested RT-PCR 法 (ORF1-PCR) を試行し、塩基配列 (840 塩基長) を解析した (Arch Virol 158: 87-96, 2013)。ラット HEV RNA の定量は in vitro-transcribed rat HEV RNA (ratIDE079, nt 35-375) を standard として、5' 末端領域に設定したプライマー及びプローブを用いた real-time PCR 法により測定した (Virus

表1 インドネシア及び我が国のネズミにおけるラットHEV感染マーカーの陽性率

Region	No. of sample tested	Body weight (mean ± SD g)	Rat anti-HEV IgG	Rat HEV RNA	
				5' terminus-PCR	ORF1-PCR
Lombok					
Mataram	216	111.4 ± 49.2	101 (46.8%)	54 (25.0%)	54 (25.0%)
West Lombok	17	91.6 ± 38.7	2 (11.8%)	2 (11.8%)	2 (11.8%)
Java					
Solo	136	83.6 ± 42.8	34 (25.0%)	43 (31.6%)	41 (30.1%)
Total	369	100.3 ± 48.3	137 (37.1%)	99 (26.8%)	97 (26.3%)
Japan					
Aichi	372	155.2 ± 66.8	4 (1.1%)	0	0
Others	5	?	0	0	0
Total	377		4 (1.1%)	0	0

型 ORF2 抗原による signal がヒト HEV 型 ORF2 抗原よりも高値であった場合、ラット HEV 感染既往の可能性が示唆される。

倫理面への配慮：研究用のヒト血清の採取に際して、インフォームドコンセントが得られている。そして、検体提供者は匿名化されているため、個人のプライバシー

Res 179: 102-112, 2014)。

4) ラット HEV の培養

ラット HEV 陽性のネズミの肝臓 homogenate を 10 倍希釈してヒト肝癌由来株化細胞である PLC/PRF/5 細胞、HuH-7 細胞、HepG2 細胞及びヒト肺癌由来株化細胞である A549 細胞に接種し、2 日ごとに培養上清を採取し、ラット HEV RNA titer を real-time PCR 法により測定した。

5) ヒト血清中のラット HEV 抗体の測定

インドネシアの供血者 382 例及び我が国の検診受診者 215 例の血清を対象として、ラット HEV 型 ORF2 抗原及びヒト HEV 型 ORF2 抗原を固相化した 2 種類の酵素免疫測定法により IgG クラス抗体を測定し、両者の signal を比較した。ラット HEV

を侵害することではなく、人権上の問題は生じない。

C. 研究結果及び考察

1) 野生ラットに於けるラット HEV マーカーの陽性率

インドネシアでは IgG クラスのラット HEV 抗体陽性率が 37.1% と高率に感染既往が認められた。また、369 頭中 99 頭 (26.8%) がウイルス血症の状態であり、ラット HEV の感染が蔓延していることが分かった。一方、日本の野生ネズミでは抗体陽性率は約 1% にすぎず、377 頭全てでラット HEV RNA は陰性であり、我が国のネズミにおいてラット HEV 感染の既往は認められるものの、その侵淫

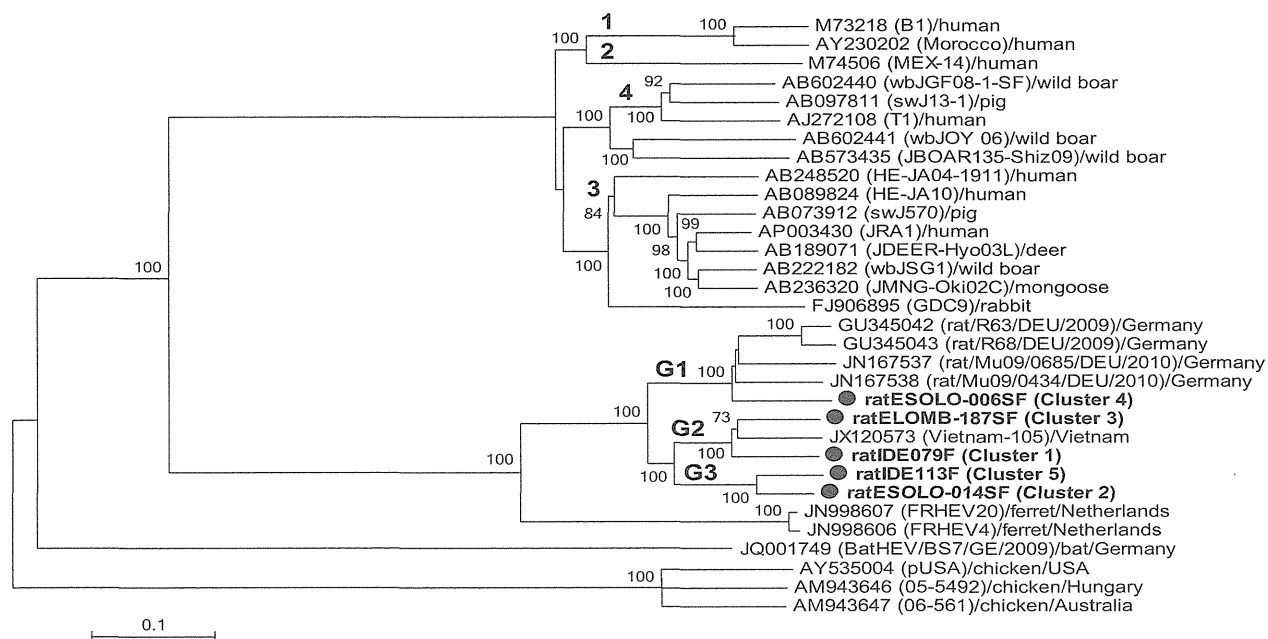


図1 ラット HEV の全長ゲノム配列による分子系統樹

度は低いと考えられた。(表1)

2) ラット HEV 株の塩基配列の解析

インドネシアのネズミから分離されたラット HEV 株は互いに全塩基配列が約 22%異なることを基準にして3つの genetic group (G1~G3)に分類された。即ち、G1はラット HEV の prototype であるドイツ株と、G2はベトナム株と近縁関係にあり、G3はインドネシアで新たに分離された genetic group である (図1)。

である肝臓 homogenate 中及び同個体の血清中のウイルスの塩基配列とそれぞれ 100%一致していることより、感染源由来の progeny が増殖していることが確認された。

次にこの progeny ウイルスを PLC/PRF/5 細胞及びやはりヒト型 HEV が効率的に増殖する HuH-7 細胞、HepG2 細胞及び A549 細胞に継代したところ、ヒトの肝癌由来株化細胞である HuH-7 細胞及び HepG2 細胞では PLC/PRF/5 細胞と同様にラット HEV

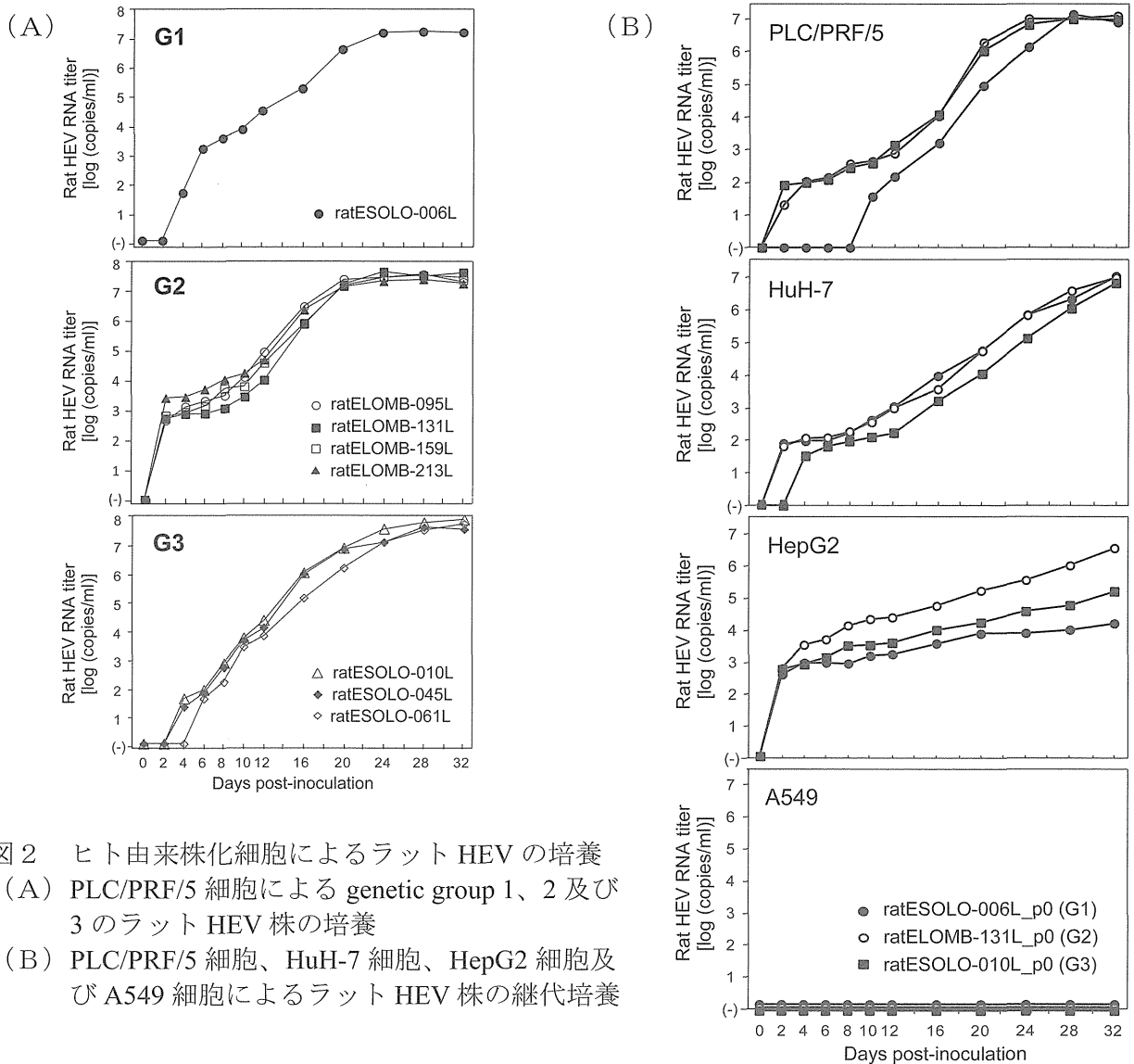


図2 ヒト由来株化細胞によるラット HEV の培養
(A) PLC/PRF/5 細胞による genetic group 1, 2 及び 3 のラット HEV 株の培養
(B) PLC/PRF/5 細胞、HuH-7 細胞、HepG2 細胞及び A549 細胞によるラット HEV 株の継代培養

3) ラット HEV の培養

ヒト型 HEV を効率的に増殖させることができるヒト肝癌由来株化細胞である PLC/PRF/5 細胞にラット HEV を接種したところ、接種後 2~6 日目に培養上清中に子孫ウイルス (progeny) が出現し、20~24 日目に 10^7 copies/mL に達した (図 2 A)。そして上清中に現れたウイルスの塩基配列は感染源

の感染が成立し、培養上清中に progeny が出現したが、ヒトの肺癌由来株化細胞である A549 細胞ではラット HEV の増殖は認められなかった (図 2 B)。

4) ラット HEV のヒトへの感染の可能性の検討

ネズミにおけるラット HEV 感染が蔓延しているインドネシアの供血者 382 例及びラット HEV の侵淫度が低い日本の検診受診者 215 例の血清につい

て、ラット HEV 型 ORF2 抗原を固相化した酵素免疫測定法で測定を行ったところ、インドネシアの方が高い signal を示すヒトの割合が多い傾向があり、吸光度 0.3 以上のヒトはインドネシアで 382 例中 54 例 (14%) であったのに対して、日本では 215 例中 2 例 (約 1%) であった。

これら吸光度 0.3 以上の 56 例について、ラット HEV 型 ORF2 抗原とヒト HEV 型 ORF2 抗原での signal を比較したところ、ラット HEV 型抗原での signal がヒト HEV 型抗原での signal の 4 倍以上を示したものが 13 例 (インドネシア 12 例及び日本 1 例) 認められ、signal 比は最大で 24.2 倍であった。これら 13 例について、ラット HEV 型抗原及びヒト HEV 型抗原による吸収試験を行ったところ、13 例いずれもラット HEV 型抗原では吸収 (88.7% inhibition 以上) がかかるものの、ヒト HEV 型抗原では吸収がかからず、得られた signal はラット HEV 型 ORF2 抗原に特異的なものであると考えられた。しかしながら、ラット HEV RNA は全例で陰性であった。

D. 結論

ラット HEV は種の壁を越えてヒトの肝癌由来株化細胞である PLC/PRF/5 細胞、HuH7 細胞及び HepG2 細胞に感染し、増殖する。また、インドネシアの供血者及び我が国の検診受診者の一部においてラット HEV の感染既往を示唆する結果が得られた。今後さらに検討を継続し、ラット HEV が人獣共通感染ウイルスであるのか否かを明らかにする予定である。

E. 研究発表

1. Takahashi M, Okamoto H: Features of hepatitis E virus infection in humans and animals in Japan. *Hepatol Res* 44: 43-58, 2014.
2. Takahashi M, Nishizawa T, Nagashima S, Jirintai S, Kawakami M, Sonoda Y, Suzuki T, Yamamoto S, Shigemoto K, Ashida K, Sato Y, Okamoto H. Molecular characterization of a novel hepatitis E virus (HEV) strain obtained from a wild boar in Japan that is highly divergent from the previously recognized HEV strains. *Virus Res* 180:59-69, 2014.
3. Mulyanto, Suparyatmo JB, Andayani IG, Khalid, Takahashi M, Ohnishi H, Jirintai S, Nagashima S, Nishizawa T, Okamoto H. Marked genomic heterogeneity of rat hepatitis E virus strains in Indonesia demonstrated on a full-length genome analysis. *Virus Res* 179:102-112, 2014.
4. Mulyanto, Wibawa ID, Suparyatmo JB, Amirudin R, Ohnishi H, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. The complete genomes of subgenotype IA hepatitis A virus strains from four different islands in Indonesia form a phylogenetic cluster. *Arch Virol*. 2013 Nov 9. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24212885.
5. Watanabe S, Isoda N, Ohtake T, Hirokawa T, Morimoto N, Aoki K, Ohnishi H, Takahashi M, Sugano K, Okamoto H. Full genome analysis of Philippine indigenous subgenotype IA hepatitis A virus strains from Japanese patients with imported acute hepatitis A. *Hepatol Res*. 2013 Apr 2. doi: 10.1111/hepr.12124. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23607583.
6. Okano H, Takahashi M, Isono Y, Tanaka H, Nakano T, Oya Y, Sugimoto K, Ito K, Ohmori S, Maegawa T, Kobayashi M, Nagashima S, Nishizawa T, Okamoto H: Characterization of sporadic acute hepatitis E and comparison of hepatitis E virus genomes in acute hepatitis patients and pig liver sold as food in Mie, Japan. *Hepatol Res* (DOI: 10.1111/hepr.12216).
7. Nagashima S, Takahashi M, Jirintai S, Tanggis, Kobayashi T, Nishizawa T, Okamoto H: The membrane on the surface of hepatitis E virus particles is derived from the intracellular membrane and contains trans-Golgi network protein 2. *Arch Virol* (DOI 10.1007/s00705-013-1912-3).
8. Okano H, Nakano T, Sugimoto K, Takahashi K, Nagashima S, Takahashi M, Arai M, Okamoto H: High genomic similarity between European type hepatitis E virus subgenotype 3e strains isolated from an acute hepatitis patient and a wild boar in Mie, Japan. *Hepatol Res* (DOI: 10.1111/hepr.12155).
9. 高橋雅春、岡本宏明: 人獣共通感染症としての E 型肝炎. *G. I. Research* 21, 532-539, 2013.

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25年度分担研究報告書

国内感染E型肝炎例におけるHEV3型とHEV4型の臨床的・ウイルス学的比較解析

研究協力者 高橋雅春 自治医科大学 感染・免疫学講座ウイルス学部門 講師
研究代表者 岡本宏明 自治医科大学 感染・免疫学講座ウイルス学部門 教授

研究要旨：我々は2005年に北海道のE型肝炎患者32症例について検討し、遺伝子型3型よりも4型で重症化の傾向が強いことを報告した。それから8年余りが経過し症例が蓄積された今年度、全国23都道府県の、国内感染E型肝炎患者216症例及び献血者や検診受診者等の不顕性HEV感染例40例を対象として、3型及び4型HEV感染患者の臨床的・ウイルス学的比較解析を行った。その結果、Peak ALT値、peak AST値、peak 総ビリルビン値は4型の方が3型よりも有意に高値を示し、PT値が60%未満まで低下した症例の割合も4型で有意に高く、4型HEV感染患者は3型よりも重症度が高いことが確かめられた。患者ごとの血清中のHEV RNA titerの経時的な推移の解析より、4型HEV感染患者では3型よりも発症時のHEV RNA titerが高い傾向が認められた。また、4型HEV感染患者では、劇症・重症型肝炎群で急性肝炎群よりもHEV RNA titerが急速に低下する傾向が認められた。以上より、4型HEVは重症病態と密接に関連していることが確かになった。

〈共同研究者〉

西澤 勉、長嶋茂雄、小林富成、吉林台、大西浩史、田村和子、唐吉思（自治医科大学 感染・免疫学講座ウイルス学部門）

A. 研究目的

我々は2005年に北海道のE型肝炎患者32症例について解析し、遺伝子型3型よりも4型で重症化の傾向が強いことを報告した(J Med Virol 76: 341-349, 2005)。そこで、8年以上が経過して解析できた症例がさらに蓄積された現時点において、全国規模で3型及び4型HEV感染患者の臨床的・ウイルス学的特徴を比較解析することを本研究の目的とした。

B. 研究方法

1) 調査対象

1979年から2013年7月までの、全国23都道府県の、国内感染E型肝炎患者216症例、及び献血者や検診受診者等から見い出された不顕性HEV感染例40例を対象とした。

2) HEV マーカーの測定方法

IgGクラスHEV抗体は組換えHEV ORF2タンパク質を用いた酵素免疫測定法により測定した(J Clin Microbiol 43: 49-56, 2005)。HEV RNAはORF2

領域をターゲットにしたRT-PCR(ORF2-457)法により検出し、この領域の塩基配列により遺伝子型を決定した(J Clin Microbiol 40:3209-3218, 2002)。また、HEV RNA titerの定量はreal-time PCR法により測定した(Arch Virol 153:657-666, 2008)。

3) 統計学的解析

Mann-Whitney's U test、Chi-square test、Fisher's exact probability testにより、危険率が5%未満の場合に統計学的に有意であると判定した。

倫理面への配慮：研究用血清の採取に際して、インフォームドコンセントが得られている。そして、検体提供者は匿名化されているため、個人のプライバシーを侵害することはなく、人権上の問題は生じない。

C. 研究結果及び考察

1) 地域ごとの国内感染E型肝炎患者の特徴

患者は北日本に多く、男性・中高年齢者で優位であった。診断の内訳は急性肝炎が185症例、重症型が23症例、劇症型が8症例であった。原因HEVの遺伝子型は3型が141症例、4型が75症例であった。また、北海道では4型が多く、その他

表1 地域ごとの国内感染 E型肝炎患者の特徴

Region	N	Male	Age (years)		Diagnosis			HEV genotype	
			Mean ± SD	Range	AH	AHS	FH	3	4
Hokkaido	66	54 (82%)	56.5 ± 13.0	25 - 86	56	7	3	14	52
Tohoku	60	48 (80%)	56.5 ± 12.1	18 - 82	50	7	3	52	8
Kanto	48	35 (73%)	58.0 ± 15.1	28 - 83	42	4	2	41	7
Chubu	17	14 (82%)	52.7 ± 11.0	28 - 71	17	0	0	12	5
Kinki	17	16 (94%)	58.8 ± 10.7	36 - 77	12	5	0	17	0
Chugoku	2	1 (50%)	73.5 ± 12.0	65 - 82	2	0	0	2	0
Kyushu/Okinawa	6	6 (100%)	62.5 ± 10.4	48 - 73	6	0	0	3	3
Total	216	174 (81%)	57.0 ± 12.9	18 - 86	185	23	8	141	75

の地域では3型が多かった(表1)。

2) 遺伝子型3型及び4型 HEV 感染患者の臨床的特徴の比較

Peak ALT 値、peak AST 値、peak 総ビリルビン値は、いずれも統計学的有意差をもって4型の方が3型よりも高値を示した。また、劇症化した症例及びPT値が60%未満まで低下した症例の割合も4型で有意に高かった(表2)。国内感染の4型について、北海道株とその他の地域の株との間の差は認められなかった。また、国内感染の3型 HEV の subgenotype として、3jp (3b) 型、3us (3a) 型、3sp (3e) 型があるが、これらの subgenotype 間では臨床的・ウイルス学的に有意な差は認められなかった。以上より、北海道の遺伝子型4型 HEV のみが重症化と関連しているのではなく、4型は3型よりも重症化の傾向が強いことが全国規模で確認された。

発症後30日以内及び10日以内の血清を確保できた213症例及び166症例について4型及び3型 HEV 感染者における急性期の HEV RNA titer を比較したところ、統計学的有意差を持って4型の HEV RNA titer が3型よりも高いことが明らかになった(表3)。

E型肝炎の病態を劇症肝炎、重症型肝炎、急性肝炎及び不顕性感染の4

表2 遺伝子型3型及び4型 HEV 感染患者における臨床的特徴の比較

Feature	Patients with HEV		P value
	Genotype 3 n=141	Genotype 4 n=75	
Age	56.8 ± 13.1	57.5 ± 12.7	NS
Male	109 (77.3%)	65 (86.7%)	NS
Fulminant hepatitis	1 (0.7%)	7 (9.3%)	0.0048
Peak ALT	2235 ± 1748	3074 ± 1901	0.0002
Peak AST	2090 ± 2156	2648 ± 2119	0.0149
Peak T.Bil	6.5 ± 7.9	10.1 ± 8.1	<0.0001
Lowest PT			
<60%	26 (18.4%)	28 (37.3%)	0.0023
<40%	16 (11.3%)	13 (17.3%)	NS

表3 遺伝子型3型及び4型 HEV 感染患者における HEV RNA titer の比較

	Patients with HEV		P value
	Genotype 3 n=139	Genotype 4 n=74	
0-30 days after onset			
HEV RNA (copies/mL)			
Mean ± SD	1.9 x 10 ⁶ ± 1.1 x 10 ⁷	2.6 x 10 ⁶ ± 1.1 x 10 ⁷	0.0069
Median	4.7 x 10 ⁴	1.8 x 10 ⁵	
0-10 days after onset			
HEV RNA (copies/mL)			
Mean ± SD	1.3 x 10 ⁶ ± 3.8 x 10 ⁶	3.4 x 10 ⁶ ± 1.3 x 10 ⁷	0.0049
Median	7.4 x 10 ⁴	4.4 x 10 ⁵	

つに分類して HEV 遺伝子型との関連性について検討したところ、4 型は 3 型よりも重症度が高いことが明らかになった (表 4 : $P < 0.0001$, Mann-Whitney's U test)。また、4 型は 3 型よりも顕性化率が高いこと [75/78 (96.2%) vs. 141/178 (79.2%), $P = 0.0006$, Chi-square test]、顕性 E 型肝炎患者において、4 型は 3 型よりも重症化率及び劇症化率が高いことが示されました [それぞれ 16/75 (21.3%) vs. 15/141 (10.6%), $P = 0.0328$ 及び 7/75 (9.3%) vs. 1/141 (0.7%), $P = 0.0048$, Chi-square test]。

3) 遺伝子型 3 型及び 4 型 HEV 感染患者の HEV RNA titer の推移の比較

E 型肝炎患者ごとに血清中の HEV RNA titer の経時的な推移をプロットし、一次回帰直線の y-切片 (発症時のウイルス titer の推定値) 及び傾き (ウイルス titer の経時的な低下率) を計算して集計を行った。その結果、4 型では 3 型よりも y-切片の値が有意に高く、発症時の HEV titer が高い傾向が認められた ($P = 0.0046$, Mann-Whitney's U test)。また、4 型 HEV 感染患者では、一次回帰直線の傾きが劇症・重症型肝炎群で急性肝炎群よりも急であり、HEV RNA titer が急速に低下する傾向が認められた ($P = 0.0437$, Mann-Whitney's U test)。これは劇症及び重症型 E 型肝炎症例では細胞障害性 T 細胞等によって HEV 感染肝細胞が排除されることにより、HEV の増殖の場が急速に減少することに因るものと考えられた。

D. 結論

HEV の遺伝子型は肝炎重症化の重要なウイルス因子であり、4 型 HEV は 3 型よりも初診時のウイルス titer が高く、重症病態と密接に関連していることが確かになった。

E. 研究発表

1. Takahashi M, Okamoto H: Features of hepatitis E virus infection in humans and animals in Japan. *Hepatol Res* 44: 43-58, 2014.
2. Takahashi M, Nishizawa T, Nagashima S, Jirintai S, Kawakami M, Sonoda Y, Suzuki T, Yamamoto S, Shigemoto K, Ashida K, Sato Y, Okamoto H. Molecular characterization of a novel hepatitis E virus (HEV) strain obtained from a wild boar in Japan that is highly divergent from the previously

表 4 HEV 遺伝子型と病態との関連性

Severity \ Genotype	Genotype 3 (n = 178)	Genotype 4 (n = 78)
Fulminant hepatitis	1 (0.6%)	7 (9.0%)
Acute hepatitis severe type	14 (7.9%)	9 (11.5%)
Acute hepatitis	126 (70.8%)	59 (75.6%)
Subclinical infection	37 (20.8%)	3 (3.8%)
<i>P</i> value	< 0.0001 (Mann-Whitney's U test)	

recognized HEV strains. *Virus Res* 180:59-69, 2014.

3. Mulyanto, Suparyatmo JB, Andayani IG, Khalid, Takahashi M, Ohnishi H, Jirintai S, Nagashima S, Nishizawa T, Okamoto H. Marked genomic heterogeneity of rat hepatitis E virus strains in Indonesia demonstrated on a full-length genome analysis. *Virus Res* 179:102-112, 2014.
4. Mulyanto, Wibawa ID, Suparyatmo JB, Amirudin R, Ohnishi H, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. The complete genomes of subgenotype IA hepatitis A virus strains from four different islands in Indonesia form a phylogenetic cluster. *Arch Virol*. 2013 Nov 9. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24212885.
5. Watanabe S, Isoda N, Ohtake T, Hirose T, Morimoto N, Aoki K, Ohnishi H, Takahashi M, Sugano K, Okamoto H. Full genome analysis of Philippine indigenous subgenotype IA hepatitis A virus strains from Japanese patients with imported acute hepatitis A. *Hepatol Res*. 2013 Apr 2. doi: 10.1111/hepr.12124. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23607583.
6. Okano H, Takahashi M, Isono Y, Tanaka H, Nakano T, Oya Y, Sugimoto K, Ito K, Ohmori S, Maegawa T, Kobayashi M, Nagashima S, Nishizawa T, Okamoto H: Characterization of sporadic acute hepatitis E and comparison of hepatitis E virus genomes in acute hepatitis patients and pig liver sold as food in Mie, Japan. *Hepatol Res* (DOI: 10.1111/hepr.12216).
7. Nagashima S, Takahashi M, Jirintai S, Tanggis, Kobayashi T, Nishizawa T, Okamoto H: The membrane on the surface of hepatitis E virus particles is derived from the

intracellular membrane and contains trans-Golgi network protein 2. Arch Virol (DOI 10.1007/s00705-013-1912-3).

8. Okano H, Nakano T, Sugimoto K, Takahashi K, Nagashima S, Takahashi M, Arai M, Okamoto H: High genomic similarity between European type hepatitis E virus subgenotype 3e strains isolated from an acute hepatitis patient and a wild boar in Mie, Japan. Hepatol Res (DOI: 10.1111/hepr.12155).
9. 高橋雅春、岡本宏明: 人獣共通感染症としての E 型肝炎. G. I. Research 21, 532-539, 2013.

E. 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25年度分担研究報告書

エクソソーム分泌経路を介したE型肝炎ウイルス粒子の放出機構の解析

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 が重要であり、粒子表面の膜成分がエンドソーム膜に由来していることを明らかにしてきた。本研究では、エンドソーム膜を獲得した成熟ウイルス粒子の放出機構について、エクソソーム分泌経路の役割を中心に解析した。エクソソームの形成ならびに放出を阻害した結果、ウイルスの放出が抑制された。一方、エクソソームの放出を促進すると、ウイルスの放出が促進されることが明らかとなった。電子顕微鏡による解析の結果、感染細胞外に膜に覆われた直径約50 nmのHEV粒子が観察された。さらに、感染細胞のMVB内腔にも、膜に覆われたウイルス粒子が認められた。以上の結果から、HEVはMVB内腔へと出芽し、成熟ウイルス粒子がエクソソーム分泌経路を介して細胞外に放出されることが明らかとなった。

A. 研究目的

E型肝炎ウイルス(HEV)はノンエンベロープウイルスでありながら、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が存在している。これまでの解析により、感染細胞からのHEVの放出にはmultivesicular body (MVB) pathwayが重要であり、粒子表面の膜成分がエンドソーム膜に由来していることが明らかとなっている。さらに、ウイルス粒子の放出にはエクソソーム分泌経路が関与していることが示唆されている。

本研究ではHEV粒子の放出におけるエクソソーム分泌経路の役割を、分子生物学的手法ならびに電子顕微鏡を用いた形態学的な解析により検討した。

B. 研究方法

ウイルス放出におけるエクソソーム分泌経路の関与については、エクソソームの放出を促進する薬剤(Bafilomycin A1)または阻害する薬剤(GW4869)を用いてJE03-1760F株(genotype 3)を接種したPLC/PRF/5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解析した。用いた薬剤の細胞毒性は、MTS試験により検討した。また、HEV放出におけるRab27AおよびHrs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、培養上清および細胞内のHEV RNA量を測定し、検討した。

HEV感染細胞におけるウイルス蛋白質(ORF2, ORF3)と宿主蛋白質(Rab27A, Hrs, CD63)の局在は、蛍光抗体法により解析した。検出に必要なORF2およびORF3蛋白質に対する一次抗体は、既報のマウスモノクローナル抗体であるH6225抗体、TA0536抗体をそれぞれ用いた。宿主蛋白質に対する一次抗体は、市販のウサギポリクローナル抗体を使用した。

電子顕微鏡用超薄切片は、HEV感染細胞を用いて作製した。最初に、2.5%グルタルアルデヒドを用いて前固定を行い、その後、1%四酸化オスミウムで後固定を行った。エタノール希釈系列で脱水後、エポン樹脂に包埋し、60-90 nmの切片を作製した。観察は、2%酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色を施し、透過型電子顕微鏡を用いて、加速電圧80 kVで行った。免疫電子顕微鏡法には、試料をLR White樹脂に包埋し、超薄切片を作製後、ORF2蛋白質に対するH6225抗体を反応させた。その後、金コロイド(直径12 nm)標識二次抗体を反応させ、2%酢酸ウラニルとクエン酸鉛による二重染色を施し、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

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く、人権上の問題は生じない。

C. 研究結果

1. エクソソームの放出を促進または阻害する薬剤が HEV の放出に与える影響の解析

これまでの解析により、MVB のマーカー蛋白質である CD63 と ORF3 蛋白質は細胞質内で共局在を示すこと、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することから、HEV は MVB sorting の機構を細胞膜上ではなく、エンドソームの膜上で利用し、ウイルス粒子表面の膜成分が、エンドソーム膜に由来していることが明らかとなっている。さらに、HEV 粒子の放出には、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り、後期エンドソームの移動は関与していないことが示された。これらの知見から、エンドソーム内腔へと出芽したウイルス粒子は、細胞内の輸送系であるエクソソーム分泌経路を利用して細胞外へと放出されることが考えられた。

そこで、エクソソームの放出に影響を与える薬剤を用いて、ウイルス放出効率への影響を解析した。用いた薬剤は、エクソソームの放出を促進する Bafilomycin A1、エクソソームの放出を阻害する GW4869 である。これらの薬剤で HEV 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 を定量した。解析の結果、Bafilomycin A1 で処理をした細胞では、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増加し、細胞内の HEV RNA 量は、薬剤濃度依存的に減少した。一方、GW4869 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 は、濃度依存的に増加した。また、薬剤の細胞毒性を MTS 試験により検討したが、解析に用いた DMSO および薬剤の濃度では、細胞への毒性は認められなかった。

以上の結果から、エクソソームの放出を促進するとウイルスの放出が促進され、エクソソームの放出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り、ウイルス放出におけるエクソソーム分泌経路の関与が示唆された。

2. Rab27A または Hrs 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

Rab27A は、MVB と細胞膜との融合の制御（エクソソームの分泌）に関与していることが報告さ

れている。また、Hrs は MVB の形成に必要であることに加え、MVB 内の膜内小胞（エクソソーム）の形成にも関与していることが報告されている。最初に、ORF3 蛋白質と Rab27A または Hrs の細胞内局在を蛍光抗体法により解析した。その結果、ORF3 蛋白質は Rab27A、Hrs と細胞質内で共局在を示すことが明らかとなった。そこで、HEV 放出におけるエクソソームの形成ならびに放出機構の関与を調べるために、siRNA を用いて細胞内の Rab27A または Hrs をノックダウンし、ウイルスの放出効率を解析した。

Rab27A、Hrs に対する siRNA (siRab27A, siHrs) 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、Rab27A 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 16.1% と放出効率の低下が認められた。同様に、Hrs をノックダウンした細胞においても、感染 10 日目の培養上清中では 11.5% と放出効率の著しい低下が認められた。また、siRab27A, siHrs 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、エクソソームの形成ならびに放出を阻害すると、HEV の放出が抑制されることが明らかとなった。このことから、HEV の放出にはエクソソーム分泌経路が関与していることが示された。

3. 透過型電子顕微鏡を用いた HEV 感染細胞の形態解析

JE03-1760F 株を接種した PLC/PRF/5 細胞、HepG2 細胞および A549 細胞を用いて超薄切片電子染色標本を作製し、透過型顕微鏡による形態学的な解析を行った。PLC/PRF/5 細胞を観察した結果、ウイルス感染細胞の周辺に遊離した状態で存在する HEV 粒子を認めた (図 1A 矢印, 1B)。これらのウイルス粒子は、直径が約 50 nm の球状粒子で、外膜 (エンベロープ) に包まれ、電子密なコアを包含したヌクレオカプシドを有していた。外膜を除いたウイルス粒子の直径は約 30-35 nm と推測され、これまでに報告されている糞便中の HEV 粒子の大きさと一致していた。また、HEV 感染 HepG2 細胞および A549 細胞を用いた超薄切片標本においても、細胞外に同様のウイルス粒子が観察された。これらのウイルス粒子においても、

その表面に明瞭な膜構造が認められた。一方、対照である非感染細胞では、同様のウイルス粒子は観察されなかった。

次に、HEV 感染 PLC/PRF/5 細胞の内部を観察した結果、細胞質内に多数の小胞を有する MVB が認められた。さらに、その内部には 40-100 nm の大きさの膜内小胞と共に、膜に覆われた HEV 粒子が認められた (図 1C 矢印, 1D)。これらのウイルス粒子も、エンベロープ様の膜に覆われ、コアを有する球状粒子であり、その大きさは細胞外の HEV 粒子と一致していた。同様に、HepG2 細胞および A549 細胞においても、MVB 内腔に膜内小胞と共存する膜に覆われた HEV 粒子が観察された。一方、対照である非感染細胞では、MVB 内にウイルス様粒子は観察されなかった。

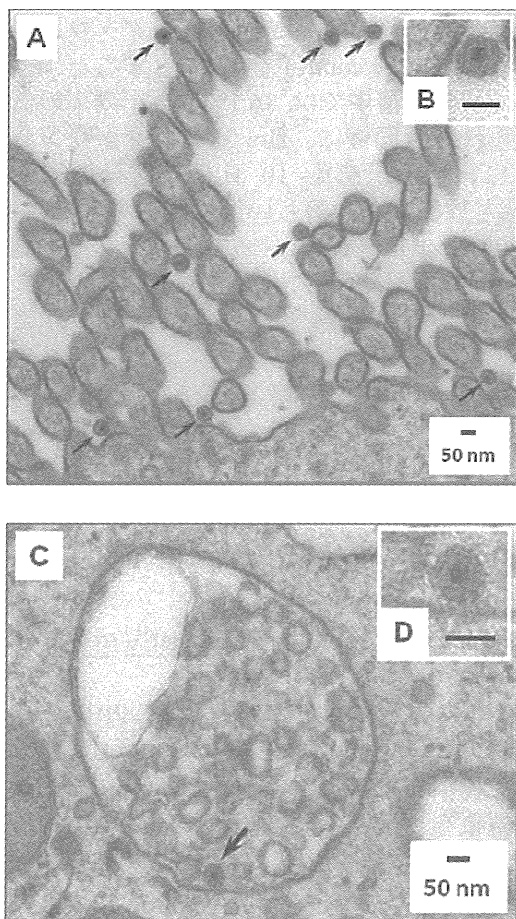


図 1 HEV 感染細胞の超薄切片電子染色像
矢印は膜に覆われた HEV 粒子を示す。

4. 免疫電子顕微鏡法ならびに蛍光抗体法による HEV 粒子の検出

電子顕微鏡による形態学的な解析により、MVB 内腔に膜に覆われた HEV 粒子が観察された。そこで、HEV の ORF2 蛋白質に対する H6225 抗体を用

いて、免疫電子顕微鏡法によるウイルス粒子の同定を試みた。その結果、MVB 内腔に存在するウイルス様粒子に金コロイドの結合が認められた (図 2, 矢印)。しかしながら、金コロイドの集簇は観察されなかった。これは、固定またはウイルス粒子が膜に覆われていることに起因する抗原性の減弱によるものと考えられた。

そこで、蛍光抗体法によりウイルス蛋白質 ORF2, ORF3, MVB のマーカー蛋白質である CD63 の細胞内局在を解析した。その結果、これらの蛋白質は細胞質内で共局在を示し、小胞状のシグナルが観察された。

以上の結果は、MVB 内腔に HEV 粒子が存在することを示唆するものである。今後は、さらに詳細な電子顕微鏡解析により、MVB 内腔への出芽ならびに膜融合による HEV 粒子の細胞外への放出過程の解析を進める予定である。

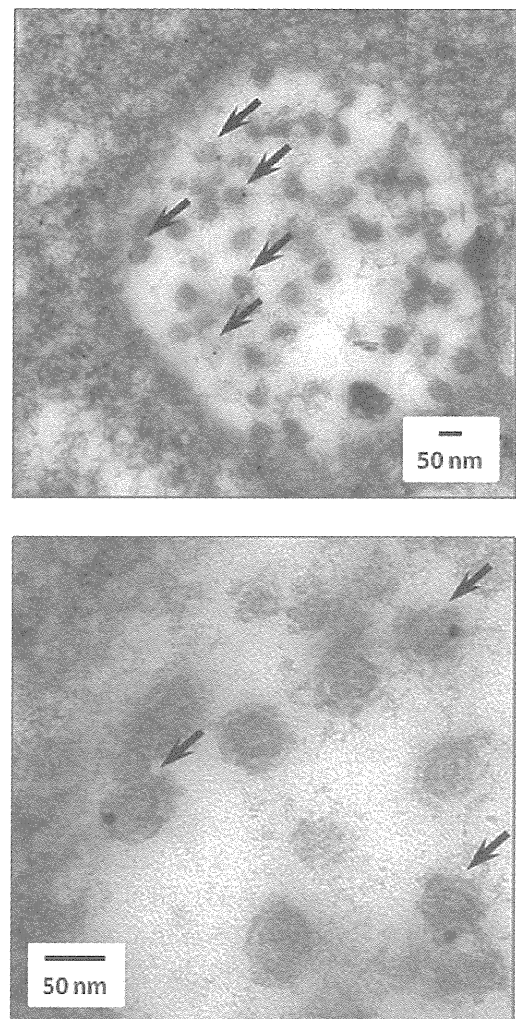


図 2 ORF2 蛋白質に対する抗体を用いた LR White 樹脂包埋切片の免疫電子顕微鏡像
矢印は金コロイドが結合したウイルス粒子を示す。

D. 考察

HEV はノンエンベロープウイルスであるため、糞便中のウイルス粒子は膜に覆われていない。しかしながら、血清中ならびに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。これらの知見は、ウイルス粒子の比重ならびに粒子表面の抗原性の解析から得られた結果である。本研究では、電子顕微鏡を用いることにより、膜に覆われた HEV 粒子を形態学的に初めて証明することができた。これらのウイルス粒子は形態が異なるものの、ともに培養細胞への感染性を有することから、細胞への吸着に関与するレセプターならびに侵入経路の違いが考えられ、その解明は HEV の生活環を理解するうえで重要であると思われる。

これまでの解析により、HEV 粒子の放出には、トランスゴルジネットワークを経由した 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ている。一方、後期エンドソームの移動は、HEV の放出に無関係であることから、成熟ウイルス粒子は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ていた。本研究において、MVB 内腔への出芽機構ならびにエクソソーム分泌経路を介したウイルス放出機構が明らかとなり、HEV のユニークな生活環の解明が大きく前進したと考えられる。C型肝炎ウイルス (HCV) においては、感染細胞に由来するエクソソームが、HCV の感染を媒介していることが報告されている。今後は、より詳細に HEV とエクソソーム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、抗ウイルス薬の開発など疾患の制圧に寄与することが期待される。

E. 結論

本研究により、培養細胞から放出された HEV 粒子が膜に覆われていることが、形態学的に初めて明らかとなった。また、感染細胞の MVB 内腔には、膜内小胞 (エクソソーム) と共に膜に覆われた HEV 粒子が存在することから、MVB 内腔への出芽による膜形成機構が示された。さらに、HEV 粒子の放出には、エクソソーム分泌経路が関与していることが明らかとなり、成熟ウイルス粒子はこの放出経路を利用して、宿主細胞に障害を与えずに細胞外へ放出されると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takahashi M, Nishizawa T, Nagashima S, Jirintai S, Kawakami M, Sonoda Y, Suzuki T, Yamamoto S, Shigemoto K, Ashida K, Sato Y, Okamoto H. Molecular characterization of a novel hepatitis E virus (HEV) strain obtained from a wild boar in Japan that is highly divergent from the previously recognized HEV strains. *Virus Res* 180: 59-69, 2014
2. Mulyanto, Suparyatmo JB, Andayani IG, Khalid, Takahashi M, Ohnishi H, Jirintai S, Nagashima S, Nishizawa T, Okamoto H. Marked genomic heterogeneity of rat hepatitis E virus strains in Indonesia demonstrated on a full-length genome analysis. *Virus Res* 179: 102-112, 2014
3. Nagashima S, Takahashi M, Jirintai S, Tanggis, Kobayashi T, Nishizawa T, Okamoto H. The membrane on the surface of hepatitis E virus particles is derived from the intracellular membrane and contains trans-Golgi network protein 2. *Arch Virol*. 2013. (In press)
4. Okano H, Takahashi M, Isono Y, Tanaka H, Nakano T, Oya Y, Sugimoto K, Ito K, Ohmori S, Maegawa T, Kobayashi M, Nagashima S, Nishizawa T, Okamoto H. Characterization of sporadic acute hepatitis E and comparison of hepatitis E virus genomes in acute hepatitis patients and pig liver sold as food in Mie, Japan. *Hepatol Res*. 2013. (In press)
5. Okano H, Nakano T, Sugimoto K, Takahashi K, Nagashima S, Takahashi M, Arai M, Okamoto H. A high genomic similarity between European type hepatitis E virus subgenotype 3e strains isolated from an acute hepatitis patient and a wild boar in Mie, Japan. *Hepatol Res*. 2013. (In press)

2. 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. 細胞内膜輸送系を利用した E 型肝炎ウイルスの放出機構の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 2013 年 11 月, 神戸.
2. 小林富成、高橋雅春、長嶋茂雄、西澤勉、吉林台、岡本宏明. E 型肝炎ウイルスの複製機構に関与する 5'非翻訳領域の構造と機能に関する研究. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 2013 年 11 月, 神戸.

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 25 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>Takahashi M</u> , <u>Nishizawa T</u> , <u>Nagashima S</u> , <u>Jirintai S</u> , <u>Kawakami M</u> , Sonoda Y, Suzuki T, Yamamoto S, Shigemoto K, Ashida K, <u>Sato Y</u> , <u>Okamoto H</u>	Molecular characterization of a novel hepatitis E virus (HEV) strain obtained from a wild boar in Japan that is highly divergent from the previously recognized HEV strains	Virus Research	180	59-69	2014
Mulyanto, Suparyatmo JB, Andayani IG, Khalid, <u>Takahashi M</u> , <u>Ohnishi H</u> , <u>Jirintai S</u> , <u>Nagashima S</u> , <u>Nishizawa T</u> , <u>Okamoto H</u>	Marked genomic heterogeneity of rat hepatitis E virus strains in Indonesia demonstrated on a full-length genome analysis	Virus Research	179	102-12	2014
<u>Nagashima S</u> , <u>Takahashi M</u> , <u>Jirintai S</u> , <u>Tanggis</u> , <u>Kobayashi T</u> , <u>Nishizawa T</u> , <u>Okamoto H</u>	The membrane on the surface of hepatitis E virus particles is derived from the intracellular membrane and contains trans-Golgi network protein 2	Archives of Virology	DOI:10.1007/s007 05-013-1912-3 http://link.springer.com/article/10.1007/s00705-013-1912-3 [Epub ahead of print]		In Press
Mulyanto, Wibawa ID, Suparyatmo JB, Amirudin R, <u>Ohnishi H</u> , <u>Takahashi M</u> , <u>Nishizawa T</u> , <u>Okamoto H</u>	The complete genomes of subgenotype IA hepatitis A virus strains from four different islands in Indonesia form a phylogenetic cluster	Archives of Virology	DOI:10.1007/s007 05-013-1874-5 http://link.springer.com/article/10.1007/s00705-013-1874-5 [Epub ahead of print]		In Press
<u>Okano H</u> , <u>Takahashi M</u> , Isono Y, Tanaka H, <u>Nakano T</u> , Oya Y, Sugimoto K, Ito K, Ohmori S,	Characterization of sporadic acute hepatitis E and comparison of hepatitis E virus genomes in acute hepatitis patients and	Hepatology Research	DOI:10.1111/hepr. 12216 http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/hepr.12216/pdf [Epub ahead of		In Press

Maegawa T, Kobayashi M, <u>Nagashima S</u> , <u>Nishizawa T</u> , <u>Okamoto H</u>	pig liver sold as food in Mie, Japan		print]		
<u>Okano H</u> , <u>Nakano T</u> , Sugimoto K, <u>Takahashi K</u> , <u>Nagashima S</u> , <u>Takahashi M</u> , <u>Arai M</u> , <u>Okamoto H</u>	High genomic similarity between European type hepatitis E virus subgenotype 3e strains isolated from an acute hepatitis patient and a wild boar in Mie, Japan	Hepatology Research	DOI:10.1111/hepr. 12155 http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/hepr.12155/pdf [Epub ahead of print]		In Press
<u>Watanabe S</u> , <u>Isoda N</u> , Ohtake T, Hirosawa T, Morimoto N, Aoki K, <u>Ohnishi H</u> , <u>Takahashi M</u> , Sugano K, <u>Okamoto H</u>	Full genome analysis of Philippine indigenous subgenotype IA hepatitis A virus strains from Japanese patients with imported acute hepatitis A	Hepatology Research	DOI:10.1111/hepr. 12124 http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/hepr.12124/pdf [Epub ahead of print]		In Press
<u>Nakano T</u> , <u>Takahashi K</u> , <u>Arai M</u> , <u>Okano H</u> , Kato H, Ayada M, <u>Okamoto H</u> , <u>Mishiro S</u>	Identification of European-type hepatitis E virus subtype 3e isolates in Japanese wild boars: molecular tracing of HEV from swine to wild boars	Infection, Genetics and Evolution	18	287-98	2013
Harun-Or-Rashid M, <u>Akbar SM</u> , <u>Takahashi K</u> , Al-Mahtab M, Khan MS, Alim MA, Ekram AR, Khan MM, <u>Arai M</u> , <u>Mishiro S</u>	Epidemiological and molecular analyses of a non-seasonal outbreak of acute icteric hepatitis E in Bangladesh	Journal of Medical Virology	85(8)	1369-76	2013
Shiota T, <u>Li TC</u> , Yoshizaki S, Kato T, Wakita T, <u>Ishii K</u>	The hepatitis E virus capsid C-terminal region is essential for the viral life cycle: implication for viral genome encapsidation and particle stabilization	Journal of Virology	87(10)	6031-6	2013
<u>Li TC</u> , Yang T, Shiota T, Yoshizaki S, Yoshida H, Saito M, Imagawa T, Malbas FF, Lupisan SP, Oshitani H, Wakita T, <u>Ishii K</u>	Molecular detection of hepatitis E virus in rivers in the Philippines	American Journal of Tropical Medicine and Hygiene			In Press
<u>Li TC</u> , <u>Ami Y</u> , <u>Suzaki Y</u> , Takeda N, Wakita T	No evidence for hepatitis E virus genotype 3 susceptibility in rats	Emerging Infectious Diseases	19(8)	1343-5	2013

Guan D, Li W, Su J, Fang L, Takeda N, Wakita T, <u>Li TC</u> , <u>Ke CW</u>	Asian musk shrew as a reservoir of rat hepatitis E virus, China	Emerging Infectious Diseases	19(8)	1341-3	2013
Yang T, Kataoka M, <u>Ami Y</u> , <u>Suzaki Y</u> , Kishida N, Shirakura M, Imai M, Asanuma H, Takeda N, Wakita T, <u>Li TC</u>	Characterization of self-assembled virus-like particles of ferret hepatitis E virus generated by recombinant baculoviruses	Journal of General Virology	94(Pt 12)	2647-56	2013
Li W, Guan D, Su J, Takeda N, Wakita T, <u>Li TC</u> , <u>Ke CW</u>	High prevalence of rat hepatitis E virus in wild rats in China	Veterinary Microbiology	165(3-4)	275-80	2013
<u>Oketani M</u> , Ido A, <u>Nakayama N</u> , <u>Takikawa Y</u> , Naiki T, Yamagishi Y, Ichida T, <u>Mochida S</u> , Onishi S, <u>Tsubouchi H</u> ; Intractable Hepato-Biliary Diseases Study Group of Japan	Etiology and prognosis of fulminant hepatitis and late-onset hepatic failure in Japan: Summary of the annual nationwide survey between 2004 and 2009	Hepatology Research	43(2)	97-105	2013
Wu S, Nakamoto S, <u>Kanda T</u> , Jiang X, Nakamura M, Miyamura T, Shirasawa H, Sugiura N, Takahashi-Nakaguchi A, Gono T, <u>Yokosuka O</u>	Ultra-deep sequencing analysis of the hepatitis A virus 5'-untranslated region among cases of the same outbreak from a single source	International Journal of Medical Sciences	11(1)	60-4	2014
<u>Takikawa Y</u> , Harada M, Wang T, <u>Suzuki K</u>	Usefulness and accuracy of the international normalized ratio and activity percent of prothrombin time in patients with liver disease	Hepatology Research	44(1)	92-101	2014
Wang T, <u>Takikawa Y</u> , Watanabe A, Kakisaka K, Oigawa K, <u>Miyamoto Y</u> , <u>Suzuki K</u>	Proliferation of mouse liver stem/progenitor cells induced by plasma from patients with acute liver failure is modulated by P2Y ₂ receptor-mediated JNK activation	Journal of Gastroenterology	DOI:10.1007/s00535-013-0927-6 http://link.springer.com/article/10.1007/s00535-013-0927-6 [Epub ahead of print]		In Press
高橋和明、藤原希、 <u>アクバル SM F</u> 、 <u>新井雅裕</u> 、 <u>三代俊治</u>	血中のA型肝炎ウイルス粒子には脂質膜エンベロープが存在する	肝臓	54(6)	396-8	2013

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>Takahashi M,</u> <u>Okamoto H</u>	Features of hepatitis E virus infection in humans and animals in Japan	Hepatology Research	44(1)	43-58	2014
<u>岡本宏明</u>	E型肝炎の感染源となりうる食品と留意点	日本医事新報	4655(7/13)	67-9	2013
<u>岡本宏明</u>	E型肝炎ウイルス	実験動物ニュース	62(4)	74-7	2013
<u>高橋雅春,</u> <u>岡本宏明</u>	人獣共通感染症としてのE型肝炎	G.I. Research	21(6)	532-9	2013
<u>八橋 弘</u>	急性肝炎（A型肝炎，B型肝炎，C型肝炎，D型肝炎，E型肝炎）	肝臓専門医テキスト		186-90	2013
<u>八橋 弘</u>	その他のウイルス肝炎（D型肝炎，E型肝炎，EBウイルス，サイトメガロウイルス）	専門医のための消化器病学		363-6	2013
<u>石井孝司,</u> <u>清原知子</u>	A型肝炎ワクチン	BIO Clinica	28(4)	321-5	2013
<u>石井孝司</u>	A型肝炎，E型肝炎	臨床と微生物	41(1)	72-8	2014
<u>姜 貞憲</u>	E型肝炎ウイルス（E型肝炎）	別冊 日本臨床感染症症候群 第2版（上）		541-4	2013
<u>姜 貞憲</u>	E型肝炎の実態と診断法の進歩	Modern Physician	33(4)	511-4	2013
<u>川上万里,</u> <u>藤岡真一,</u> <u>足立卓哉,</u> <u>大澤俊哉,</u> <u>糸島達也</u>	薬物性肝障害の診断が経過中に覆った症例	肝胆膵	68(2)	285-90	2014
<u>滝川康裕,</u> <u>鈴木一幸</u>	急性肝不全の予後	肝胆膵	66(3)	391-8	2013
<u>中山伸朗,</u> <u>持田 智</u>	劇症肝炎の肝移植適応ガイドライン	Modern Physician	33(4)	519-24	2013
<u>石井孝司,</u> <u>李 天成</u>	E型肝炎の概要および検査法	病原微生物検出情報	35(1)	3-4	2014
<u>石井孝司,</u> <u>李 天成,</u> <u>恒光 裕</u>	人獣共通感染症としてのE型肝炎	病原微生物検出情報	35(1)	4-5	2014
<u>姜 貞憲</u>	E型肝炎：北海道・札幌地区での観察	病原微生物検出情報	35(1)	5-7	2014
<u>松林圭二</u>	北海道内献血者におけるHEV感染の状況	病原微生物検出情報	35(1)	7-8	2014
<u>新井雅裕,</u> <u>手島一陽,</u> <u>金原 猛,</u> <u>高橋和明,</u> <u>安倍夏生,</u> <u>三代俊治</u>	都内一般病院で経験した急性肝炎症例および市販食品からの多様なHEV-RNAの検出	病原微生物検出情報	35(1)	8-9	2014
<u>原田誠也,</u> <u>大迫英夫,</u> <u>吉岡健太,</u> <u>西村浩一,</u> <u>清田政憲,</u> <u>李 天成,</u> <u>石井孝</u>	イノシシ、シカおよびブタのE型肝炎ウイルス感染状況調査—熊本県	病原微生物検出情報	35(1)	9-10	2014