

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年度総括研究報告
(3年計画の2年目)

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：A型肝炎については、1)散発発生が主体で、患者数は低値横ばいであったが、重症化率は上昇傾向を示し、内科的治療による救命率が低下していること、2)アジアの常在・流行地域からのHAVの流入・定着が懸念されること、3)A型肝炎ワクチンが小児に適応拡大されたこともあり、渡航前の接種の必要性を広く啓発・発信するべきであること、また4)LA/SSBなどの宿主因子も治療のターゲットになりうること、などが示された。E型肝炎については、1)E型肝炎抗体診断薬の保険収載による影響と推測されるが、2013年の届け出件数は2011年に比べて倍増し、A型肝炎とほぼ同数であったこと、2)合計216例の国内感染E型肝炎症例の解析によって、4型HEVが3型HEVに比べて重症化と密接な関係にあることが確かめられ、4型HEVによる重症化率は北海道株と非北海道株とで差が見られないこと、3)北海道株とは別系統の4型HEVが野生イノシシによって維持され、東海4県に跨って広範囲に分布し、感染拡大が懸念される状況にあること、4)三重県ではヨーロッパ型(3e型)HEV株によるE型肝炎例が多く認められるが、そのHEV株が県内産ブタから分離されたこと、5)わが国でも肝移植患者での慢性HEV感染や、肝外病変としてのGuillain-Barré syndromeを併発したE型肝炎患者が認められたこと、6)カニクイザルへの接種実験によって、培養細胞由来HEVが不活化ワクチンとして応用可能であることが示唆されたこと、7)HEVが細胞内の多胞体[multivesicular body (MVB)]内腔へと出芽し、エクソソーム分泌経路を介して細胞外に放出されるというHEVの放出機構が明らかになったこと、8)培養系に於いて、IFN、リバビリン、アマンタジンの他、IFN 1-3、2'-C-methylcytidineは単剤投与でHEVの増殖を濃度依存性に抑制し、2剤併用はさらに有効であることなど、病態解明、治療法の確立や感染予防対策の構築に資する多くの成果が班員及び班友の協力によって得られた。

<研究分担者(班員)>

新井雅裕 東芝病院 院長
鈴木一幸 岩手医科大学 消化器・肝臓内科 教授
横須賀収 千葉大学大学院医学研究院 消化器・腎臓内科学 教授
八橋 弘 国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター長
日野 学 日本赤十字社 血液事業本部 副本部長
中山伸朗 埼玉医科大学 消化器内科・肝臓内科 准教授
姜 貞憲 手稲溪仁会病院 消化器病センター 主任医長
李 天成 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官
石井孝司 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長
大河内信弘 筑波大学医学医療系消化器外科 教授

<研究協力者(班友)>

石田勢津子(北海道立衛生研究所)、水尾仁志、古山準一(北海道勤労者医療協会勤医協中央病院)石田勢津子(北海道立衛生研究所)、水尾仁志、古

山準一(北海道勤労者医療協会勤医協中央病院内科)、矢崎康幸(小林病院内科)、田辺利男(道東勤労者医療協会道東勤医協ねむる医院)、後藤隆(秋田大学医学部内科学講座消化器内科学分野・神経内科学分野(第一内科))、上野義之(山形大学医学部内科学第二講座)、二宮匡史(東北大学医学部消化器内科)、中山晴夫(いわき市立総合岩城共立病院)、相川達也、津田文男(相川内科病院)、高木均(国立病院機構高崎総合医療センター)、磯田憲夫(自治医科大学消化器・肝臓内科)、高橋雅春、長嶋茂雄、西澤勉、小林富成、吉林台(自治医科大学感染・免疫学講座ウイルス学部門)、妻神重彦(公立福生病院内科)、時田元(国家公務員共済組合連合会三宿病院消化器科・臨床検査科)、佐藤幸浩(かみいち総合病院内科)、清水裕子(公立陶生病院消化器内科)、中野達徳(藤田保健衛生大学医学部七栗サナトリウム内科)、岡野宏(三重厚生連鈴鹿中央総合病院消化器内科)、川上万里(岡山済生会総合病院内科)

A. 研究目的

経口感染によるウイルス性肝炎(A型及びE型)の動向を調査し、感染源・感染経路を明らかにするとともに、病態解明、及び治療法の確立を目指す。A型肝炎ウイルス(HAV)及びE型肝炎ウイルス(HEV)の遺伝的多様性に関する知見を蓄積し、理解を深化させる。さらに、HAVワクチンの接種対象をより明確なものとし、普及・啓発を行うと同時に、より効果的なHEVワクチンの開発を目標とする。加えて、わが国に於ける慢性HEV感染の実態とその病態を明らかにする。

B. 研究方法

A型肝炎とE型肝炎の発生動向と重症化リスク因子の調査、感染実態の調査、ヒト・動物・食品からのHAVならびにHEVの検出とウイルス株塩基配列の蒐集と解析、HEV宿主動物調査、食品媒介感染の可能性の調査、細胞培養系を用いた増殖機構の解明、抗ウイルス剤、ワクチン開発のための予備的検討などによる。

なお、すべての調査・研究は、個人情報保護及び「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」を旨とする倫理規定を遵守して行なわれた。

C. 研究結果及び考察

今年度の研究成果の概要を研究代表者、研究分担者及び研究協力者別に記すが、詳細については該当する分担研究報告(項目)及び研究成果の刊行物・別刷(項目)をご参照戴きたい。

研究代表者 (岡本宏明)

E型肝炎の臨床病態とHEV genotype : 2005年に北海道のE型肝炎患者32症例について検討し、genotype 3 HEVの感染例よりもgenotype 4 HEVの感染例で重症化の傾向が高いことを報告した(J Med Virol 76: 341-349, 2005)。それから8年余りが経過し今年度までに解析できたE型肝炎症例が200例を超えたことから、全国23都道府県の国内感染E型肝炎患者216症例を対象として、genotype 3及びgenotype 4別に臨床的・ウイルス学的特徴を比較解析した。その結果、ピークALT値、ピークAST値、ピーク総ビリルビン値はgenotype 4の方がgenotype 3よりも有意に高値を示し、プロトロンビン時間(PT)値が60%未満まで低下した症例の割合もgenotype 4 HEVの感染患者で有意に高く、genotype 4は重症化と密接な関連があることが確かめられた。また、genotype 4 HEV感染患者では発症時のHEV RNA titerが有意に高いことが分かった。以上より、genotype 4 HEV

は重症肝病態と密接に関連していることが確かになった。興味深いことに、北海道のgenotype 4と北海道以外のgenotype 4の間には重症化・劇症化に関して有意差が認められなかった。このことは、北海道以外の地域のgenotype 4 HEVの感染患者に於いても重症化率が高いことを示唆している。実際に北海道以外の地域でもgenotype 4 HEVによる劇症肝炎例が21例中4例(19%)認められた。

野生ラットにおけるrat HEVの感染状況とヒトへの感染性について : インドネシア及びわが国の野生ラットにおけるrat HEVの感染状況を明らかにするとともに、rat HEVのヒトへの感染性について検討した。インドネシアの野生ラット(クマネズミ)ではrat HEVに対するIgGクラス抗体の陽性率が37%と高く、28%の個体からGenetic group G1~G3(互いに全塩基配列が約20%異なる)に分類されるrat HEVが分離された。一方、わが国の野生ラット(クマネズミ及びドブネズミ)における抗体陽性率は約1%に過ぎず、rat HEVは検出されなかった。培養細胞への感染実験に於いて、rat 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細胞で効率よく増殖し、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、血清学的解析に於いて、インドネシア及びわが国の健康人からrat HEV型ORF2抗原に対する特異抗体が検出され、rat HEVへの感染既往を示唆する結果が得られた。以上の事柄はrat HEVが種の壁を越えてヒトに感染する可能性を示唆している。しかし、rat HEVがサルに感染しなかったという報告もあり、人獣共通感染ウイルスであるの否かについては更なる精査が必要である。

野生イノシシからの新種HEVの発見 : これまでに静岡県及び岡山県の野生イノシシから全塩基配列がgenotype 1-4 HEVと20%以上異なる2種類の新種HEV(JBOAR135-Shiz09株とwbJOY_06株)が分離され、新しいgenotype(それぞれ暫定的にgenotype 5及びgenotype 6)への分類が提唱されている(肝臓 51:536-538, 2010, J Gen Virol 92:902-908, 2011)。今回、長野県で捕獲された野生イノシシからgenotype 1-4 HEVと22.4-28.2%異なる新種HEVを同定し、wbJNN_13株と命名した。全塩基配列を比較すると、JBOAR135-Shiz06%とは21.9%異なるが、wbJOY_06株とは19.6%の違いに留まった。HEV genotype分類の基準は未だ国際ウイルス命名委員会によって決定されていない。したがって、今後さらにデータが蓄積され、HEVゲノムの多様性についての十分な情報が集積されるまでは今回見出されたwbJNN_13を敢えてgenotype

7に分類せず、wbJOY_06のvariantの一つと看做すという考え方もありうる。いずれにしても、多様なHEVが野生イノシシに感染していることは確かである。これら野生イノシシのHEVがヒトやブタに感染しうるか否かの解明を含め、HEV遺伝子の多様性に関する知見を蓄積するために、更なる調査の継続が必要である。

エクソソーム分泌経路を介したHEV粒子の放出機構の解析：HEVの感染細胞からの放出には、multivesicular body (MVB) sortingが重要であり、粒子表面に存在する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(J Gen Virol 92: 2838-2848, 2011)。本年度の研究では、細胞内で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。薬剤及びsiRNAを用いてエクソソームの形成ならびに放出を阻害すると、ウイルスの放出が抑制され、逆に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分かった。電顕観察の結果、感染細胞の外に膜に覆われた直径約50 nmのウイルス様粒子が認められた。さらに、感染細胞のMVB内腔にも、膜に覆われたウイルス様粒子が認められた。以上の結果から、HEVはMVB内腔へと出芽し、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。このような研究成果は、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の構築に資するものと期待される。

培養細胞を用いたHEVに対する抗ウイルス薬の検討：HEVの感染培養系に於いて、ウイルス接種と同時に薬剤を添加した培養液を用いて培養した場合、IFN、リバビリン、アマンタジンの他、IFN 1-3、SNMC、さらにRNA依存性RNA polymeraseの阻害剤である2'-C-methylcytidineはそれぞれ単独でHEVの増殖を濃度依存性に抑制した。予めHEVを培養細胞に接種し、安定して増殖している状態で薬剤を含む培養液に切り換え、その効果を検討した場合には、2剤併用がより有効であり、HEV RNAの陰性化が確認された。臨床への応用が期待される。

研究分担者(八橋弘)

国立病院急性肝炎共同研究班参加 34施設による全国調査(1980年～2012年)：A型肝炎1,624例の発生状況と重症度を検討。男875例(53.9%)、年齢中央値37.0歳。1994年までの発症例は全年齢を通じ毎年2-3月にほぼ集積していたが、1995年以降季節的集積性は消失し、通年的に発生した。PT40%未満かつ脳症を伴う劇症型は8例(0.5%)

PT40%未満で脳症を伴わない重症型は64例(4.0%)であり、これら以外の通常型は1547例(95.5%)であった。死亡例は2例であり、劇症型の25%、全症例の0.1%であった。1994年までの劇症及び重症化率は21例/1209例(1.7%)、1995年以降は51例/406例(12.6%)と高率であった($p<0.001$)。劇症化及び重症化に寄与する因子は、発症年1995年以降(odds比8.1、 $p<0.001$)、高齢(odds比7.6、 $p<0.001$)であった。我が国のA型肝炎は、1995年以降季節集積性を失いながら減少しているが、劇症及び重症例の頻度は増加している。

研究分担者(中山伸朗)

2012年に発症した急性肝不全の全国調査：A型の急性肝不全は、2011年より減少して10例が首都圏以西より登録され、急性肝不全の3.6%(10/278)、劇症肝炎の成因に起因する急性肝不全症例の4.7%(10/211)を占めるに留まった。昏睡型は、2例とも肝移植が施行され、1例が救命された。非昏睡型は内科的治療により8例全てが救命された。2012年に発症したE型の急性肝不全症例は北海道(2例)と岩手(1例)から登録され、3例いずれも非昏睡型で、内科的治療により救命された。

A型劇症肝炎の予後不良因子：1998-2012年の15年間に発症し、全国調査に登録されたA型劇症肝炎69症例に於いて、内科的治療の予後に影響を与える基礎疾患について検討した結果、糖尿病を有する症例で有意に予後が不良であった。最近のA型劇症肝炎は高齢化しており、特に男性で糖尿病などの基礎疾患を有する頻度が高いことが、内科的治療による救命率が低下した要因であると考えられた。この結果により、糖尿病を有する高齢者には、A型肝炎ワクチンの接種が推奨される。

研究分担者(石井孝司)

A型肝炎患者の動向：2013年は暫定の急性A型肝炎報告数は127例であり、ここ10年では2009年について少ない報告数であった。

HAV-1A(1A-2)の追跡：2010年の広域流行の主たる原因となった株(1A-2)は2011年以降、ほとんど見られず、定着せずに消失した可能性が示唆された。しかし、フィリピンのマニラ市内の河川水から分離されたHAVは3つのクラスター(S1～S3)に属し、そのうちのS1は1A-2と一致すると考えられた。本クラスターに属するHAVはフィリピンでは現在も流行していることが強く示唆された。旅行者や食品を介した日本への流入には引き続き注意を払う必要がある。ウイルスの分子疫学的な解析は流行状況把握の上で有用であり、今後もこのようなサーベイランスを継続していくことは重要である。

HAVワクチン接種の重要性：A型肝炎は現在、

わが国では稀な疾患であるが、海外では常在、流行地域は珍しくない。多くの日本人はHAVに対する抗体を持っていないことから、渡航前にワクチンを接種するのが望ましい。わが国からの渡航者が多い東南アジア、東アジアが患者報告数も多いが、各国・地域別日本人訪問者数10万人あたりでは南アジアの感染率が高かった。A型肝炎ワクチンの供給量は年々増加しており、平成25年度には小児用の適用拡大も承認された。A型肝炎はワクチンで予防可能な疾病であることから、「出かける前の肝炎ワクチン」を、より広く発信することが必要である。また、ワクチンの接種間隔やメーカー間の互換性、効果の持続期間など、臨床データの蓄積が今後の課題である。

研究分担者(横須賀収)

HAVに対する抗ウイルス薬の検討：各種宿主細胞因子に対するsiRNAsを用いて、HAV IRES依存性翻訳及びHAVレプリコン増殖に於ける宿主細胞因子の関与について解析した結果、La/SSBの発現抑制によりHAV IRES依存性翻訳が抑制され、HAVレプリコン増殖も抑制されることが分かった。宿主細胞因子La/SSBはHAV IRES依存性翻訳及びHAVレプリコン増殖に重要な分子の一つであることが明らかになった。

研究分担者(日野学)

北海道地区献血者におけるHEV NAT：北海道に於いて2013年1月から12月にかけて血清学的感染症スクリーニング陰性かつALT<61 IU/Lを示した献血者276,477名を対象に、20プールTaqMan RT-PCRによるHEV RNAスクリーニング調査を実施した。HEV RNA陽性者数は25名(男性19名、女性6名)で陽性頻度は0.009%(男性0.011%、女性0.006%)であり、過去最低を示した2012年とほぼ同様であった。陽性者の発生時期や居住地についても例年と変わりなく、季節性は見られず、約半数が都市部に集中していた。陽性者の約7割は献血前に動物内臓肉を摂取しており、zoonotic food-borne感染が疑われた。HEV genotypeの出現パターンには道内各地域で大きな特徴がみられることから、HEV感染源は地域に密着したものと推測された。今後も道内のHEV感染動向に注目していく必要がある。

研究分担者(姜貞恵)

A型、E型肝炎の重症化因子：A型肝炎患者の宿主背景の検討により、HAV感受性年齢の上昇によるA型肝炎症例の中高齢化を背景に肝疾患既往例が増加し、急性肝炎重篤化に関与していると推測

された。E型ではgenotype 4の他に肝疾患既往が急性肝不全に関連する因子であることが示された。急性肝不全への進行に関連する可能性がある既往肝疾患としては、アルコール性肝障害、脂肪肝、非活動性HBVキャリアなどが挙げられた。それら既往肝疾患の病態、進行度と急性肝不全進行との関連は今後の重要な検討課題である。

研究分担者(鈴木一幸)

北東北地区における急性A型及びE型肝炎の実態と時代的変遷：急性肝障害の全登録数は487例であり、ウイルス性急性肝障害と診断された135例を解析した。急性A型肝炎は10例、急性E型肝炎は23例であり、年次別症例数をみると、A型は年間0~1例、E型は年間2~4例で、経口感染によるウイルス性急性肝炎の主体はE型になってきていた。臨床病型との関連では、A型及びE型とも通常型の急性肝障害例が多く、重症型あるいは劇症化例は少数であった。GenotypeはA型ではI A型のみならずIIIA型が、E型では4型による感染例も散見されるようになってきていた。一方、感染源(推定)はA型及びE型とも不明な例が多数存在していた。生鮮食品・飲料水などの国内流通がより広範囲になってきている現況から、地域性が少なくなり、北東北地区では従来みられたgenotype以外のHAV及びHEVの感染の危険性が拡大してきている可能性が示唆された。A型、E型肝炎と診断された例については再度詳細な病歴聴取を行い感染源と感染経路の探索を今後も継続することが予防対策を構築する上で重要である。

研究協力者(時田 元)

都内のE型肝炎症例：東京都内の一病院で2012年9月から2013年6月の10ヶ月間に経験した6例の国内感染型急性E型肝炎について報告した。性別は男4例・女2例、年齢は31歳から71歳であり、患者間に接点はなかった。HEV genotypeは3jp(3b)型4例、3us(3a)型1例、4型1例であった。劇症化例はなく全例無治療で軽快したが、genotype 4の1例はgenotype 3の5例よりも重症であった。いずれも散発例で感染源も確定できなかったが、多様な料理を嗜好する現在のライフスタイルが都市部の散発性急性E型肝炎多発の一因となっている可能性が考えられた。東京都心部でもE型肝炎は決して稀な疾患ではなく、急性肝炎の原因検索には本疾患を念頭に置くべきである。

研究分担者(新井雅裕)

HEV "Aichi/Shizuoka"株の感染拡大：当初愛知県のみから報告され、"Aichi"株と仮称されたHEV genotype 4の一系統は、やがて静岡県からも

採取され、"Aichi/Shizuoka"株と改名されたが、本年度の調査研究の結果、岐阜県と三重県にも存在することが判明した。この"Aichi/Shizuoka"株の感染拡大には、愛知静岡県境付近に棲息する野生イノシシがreservoirとして大きく関与してきたが、同地域に棲息する野生イノシシの行動圏内には豚舎も存在するため、野生イノシシから飼育ブタへと"Aichi/Shizuoka"株が伝播することにより、更なる感染拡大(広域化)が危惧された。

HEV感染に伴う肝外病変としての Guillain-Barré syndrome (GBS)：福岡県で、本邦初のHEV-associated Guillain-Barré syndrome (GBS)の一症例が経験された。海外から11例のHEV感染に伴うGBS例が報告されており、わが国に於いても肝炎臨床医と神経内科医の連携による精査が必要である。

研究協力者(中野達徳)

三重県におけるE型肝炎(2013年)の疫学調査：E型肝炎の発生は5例に留まり、これまで多く確認された3e株による症例は認められなかった。3a症例と3b症例を認めたが既報の近縁株は無かった。Genotype 4による症例がはじめて確認され、このgenotype 4株は愛知県、岐阜県、静岡県で分離されるgenotype 4株に塩基配列が非常に近い株であった。愛知県、岐阜県、静岡県の野生動物関連のgenotype 4株が野生動物以外にも広がり、その感染源が木曾三川を超えて三重県に侵入していることが疑われた。三重県では感染源不明の急性E型肝炎が持続的に発生しており、HEV RNA検査を主体とした急性E型肝炎発生調査を今後も続ける必要がある。

三重県内の野生イノシシにおけるHEV感染調査：2008年10月から2012年3月までに三重県で捕獲された野生イノシシ144頭の血清を収集した。7頭(4.9%)からHEV RNAが検出され、6頭のHEVは3e型であった。本報告が本邦で3e HEVがイノシシから検出された初の報告である。分子系統樹で解析したところ、三重県のイノシシからの3e HEVはヨーロッパから侵入したことが強く示唆され、日本へ3e HEVが侵入したのは1966年頃で、以降日本の各地に拡散し、三重県の野生イノシシの間で広まったのは2009年頃と推測された。

研究協力者(岡野 宏)

三重県内のブタレバーからのHEVの検出：三重県内の市販ブタレバー243個(2011年7月から2013年3月の期間に購入)のうち4.9%に相当する12個からHEVが検出されたが、3a(3us)あるいは3b(3jp)型に分類され、県内のE型肝炎患者から最

も多く分離されている3e(3sp)型は認められなかった。しかし2007年に行われていた、三重県科学技術振興センター保健環境研究部による三重県内農場から回収されたブタレバー85検体中2検体からHEVが検出されており、内1株は3e株であった。この3e HEV株は三重県内E型肝炎患者から分離された3e株と99%以上の塩基配列の一致率であり、三重県で発生している3e株によるE型肝炎の原因HEVを県内産ブタが保有していたことが確認された。

薬物性肝障害とHEV感染：薬物性肝障害の診断基準に含まれていないE型肝炎マーカー測定の必要性について検討した。E型肝炎13例は全例、薬物性肝障害スコアリングで5点以上となり、E型肝炎マーカーの測定を行わなければ、薬物性肝障害と診断された可能性が高いことが示された。また、診断時にE型肝炎マーカーの測定が行われず、薬物性肝障害と診断されていた症例69例中8例(11.6%)はその後E型肝炎であることが判明した。以上の結果から薬物性肝障害診断時には、スコアリングの段階でE型肝炎マーカーを測定し、E型肝炎の除外診断を行うことが重要である。

研究協力者(川上万里)

岡山県の野生イノシシにおけるHEV感染調査：2011年11月から2013年3月の期間に、岡山県内で捕獲された野生イノシシ(134頭)から採取した血液についてHEV抗体及びHEV RNAを測定したところ、それぞれ11.2%と4.5%の陽性率であった。HEV genotypeは4頭が日本固有の3型(3b/3jp型)で、残りの2頭がヨーロッパ型の3型(3e/3sp型)であった。

狩猟者における野生イノシシの喫食状況とE型肝炎に対する認識調査：岡山県内猟友会会員(62名)を対象として、野生イノシシの喫食状況とE型肝炎に対する認識状況についてのアンケート調査を行った。全員がイノシシ肉の喫食歴を有し、58%が「美味である」と回答した。E型肝炎についての情報は「マス・メディア」や「猟友会」を介して約70~80%の会員に届いていたが、「イノシシ喫食に抵抗がある」と答えた率は、「肝炎」「死亡例」の情報入手群に於いても過半数には至らなかった。「加熱処理」等の喫食変化及び手袋の常用は約40~50%に認められるに過ぎなかった。狩猟グループ毎に喫食法や手袋着用には偏りがあり、情報の発信や予防法の周知には「マス・メディア」のみではなく、狩猟グループ毎に行う等の工夫が必要であると考えられた。

研究分担者(大河内信弘)

肝移植症例での HEV 感染調査：国内 8 施設の肝移植後患者合計 947 人について HEV 抗体測定を行った。IgM 及び IgA クラスの HEV 抗体は全例で陰性であったが、IgG-HEV 抗体は 31 人 (3.3%) から検出された。最も IgG-HEV 抗体価が高かった 1 例から HEV RNA が検出され、少なくとも 4 ヶ月間 HEV RNA が持続陽性であることを確認した。20 施設の約 2700 例を対象とした調査を目標として、調査継続中である。

研究分担者(李天成)

培養細胞由来 HEV の不活化ワクチンとしての検討：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 genotype 1, 3, 4 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 genotype 1, 3, 4 HEV を 6 頭のカニクイザル(各 2 頭)にアジュバンドを使用しない条件で 6 回筋肉内接種し、IgG-HEV 抗体の誘導を確認した。これらのカニクイザルに感染性 HEV を接種しても ALT の上昇、血液及び糞便中での HEV RNA の陽転化は認められず、HEV の感染が成立しないことが分かった。以上の結果から、培養細胞で増殖した HEV の不活化ワクチンとしての応用可能性が示唆された。

中国における rat HEV：中国における rat HEV の感染調査によって、rat HEV は野生ラットのみならず、スunksにも感染していることが明らかになった。

D. 結論

A 型肝炎について

- 1) HAV に対する感受性者の高齢化が進んでおり、小流行が大流行に拡大する危険性を常に孕んでいる状況にあることに変わりはないが、幸い今年度も散発発生例が主体であり、A 型肝炎の患者数は低値横ばいであった。季節的集積性も消失している。しかし、劇症及び重症例の頻度が上昇していることは懸念材料である。
- 2) 2010 年の広域流行の主要な原因となった東南アジア由来と考えられる株(IA-2)による発生は 2013 年には見られなかった。しかし、フィリピンにおける河川水調査の結果、このクラスターに属する HAV はフィリピンでは現在も常在しており、流行の原因となっていることが強く示唆された。一方、韓国由来と考えられる A 型は 2013 年にも検出され、わが国への定着が懸念された。引き続き慎重な監視が重要である。
- 3) 海外では A 型肝炎の常在、流行は珍しくない。

平成 25 年度は小児用の適用拡大も承認された。したがって、渡航前に小児も含め A 型肝炎ワクチンを接種することが望ましい。「出かける前のワクチン接種の徹底」を広く発信することが必要である。

- 4) A 型劇症肝炎は高齢化しており、特に男性で糖尿病などの基礎疾患を有する頻度が高いことが、内科的治療による救命率が低下した要因であり、HAV 抗体陰性の糖尿病を有する高齢者には A 型肝炎ワクチンの接種が推奨される。
- 5) A 型肝炎に対する有効な特異的治療法として、La/SSB などの宿主因子も候補となりうることが示唆された。

E 型肝炎について

- 1) E 型肝炎診断薬(HE-IgA 抗体定性)が 2011 年 10 月に保険収載されたことが主たる要因と推測されるが、2013 年の E 型肝炎の年間届け出件数は A 型肝炎とほぼ同数(それぞれ 126 件、127 件)であり、2006-2011 年の平均届け出件数の 2 倍以上であった。
- 2) 国内で E 型肝炎の患者数が最も多い北海道では、道 E 研による流行監視と赤十字血液センターでの献血者を対象とした HEV NAT 検査が継続して行なわれている。2007 年から 2013 年までの期間に E 型肝炎症例 122 例が登録され(最近は、重症例が相対的に多く登録されやすい傾向にあること否めないが)、そのうち 36 例(29.5%)が急性肝不全と診断された。Genotype 4 に加え、アルコール性肝障害、脂肪肝、HBV キャリア、肝障害指摘歴などが重症化要因として指摘された。
- 3) 一方、2013 年 1 月から 12 月までの北海道内献血者を対象とした HEV RNA スクリーニング(HEV NAT)調査では、過去 8 年間で最も低い陽性率となった昨年とほぼ同様で、陽性率は 0.009% (25/276,477)であった。Genotype 3 が大多数を占め、男性が優位で、約 7 割の陽性者が動物内臓喫食歴を有していた点は例年と変わりがなかった。HEV genotype の分布パターンには道内各地域で特徴がみられることから、HEV 感染源は地域に密着したものと推測された。今後も道内の HEV 感染動向に注目していく必要がある。
- 4) 2005 年に北海道の E 型肝炎患者 32 症例について検討し、genotype 3 よりも genotype 4 で重症化の傾向が高いことを報告した(J Med Virol 76: 341-349, 2005)。今年度、全国 23 都道府県の国内感染 E 型肝炎患者 216 症例を対象として、HEV genotype と臨床病態との関

連性を再検討した結果、genotype 4 HEV は重症肝病態と密接に関連していることが確認された。興味深いことに、北海道の genotype 4 と北海道以外の genotype 4 の間には重症化・劇症化に関して有意差が認められなかった。このことは、北海道以外の地域の genotype 4 HEV の感染患者に於いても重症化率が高いことを示唆している。

- 5) HEV genotype 4 の一系統が、愛知県、静岡県、岐阜県、三重県の 4 県に跨って広域分布していることが判明した。愛知静岡県境付近に棲息する野生イノシシが reservoir として大きく関与してきたが、同地域に棲息する野生イノシシの行動圏内には豚舎も存在するため、野生イノシシから飼育ブタへこの HEV 株が伝播することにより、更なる感染拡大(広域化)が危惧される。
- 6) HEV genotype 3 の中でも 3e 型はわが国では稀である。その 3e 型が E 型肝炎患者の約半数から分離されている三重県に於いて、99%以上の塩基配列の一致率を示す HEV が県内産ブタから分離された。感染源となる HEV をブタが保有していたことが明らかになった。感染経路については今後更なる調査が必要である。
- 7) 野生ラットに感染している rat HEV が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、効率よく増殖した。培養上清中に高いタイトーの子孫ウイルスが産出され、その継代培養も可能であった。血清学的解析に於いて、ヒト血清から rat HEV 型 ORF2 抗原に対する特異抗体が検出され、rat HEV への感染既往を示唆する結果が得られた。rat HEV がサルに感染しなかったという報告もあり、rat HEV が人獣共通感染ウイルスであるのか否か、今後の更なる検討が必要である。
- 8) 肝移植患者における慢性 HEV 感染例がわが国でも認められた。引き続き、実態解明と慢性 HEV 感染の病態解析が必要である。
- 9) 薬物性肝障害の診断は原則、除外診断による。診断時に E 型肝炎マーカーを測定しないと、薬物性肝障害例の約 1 割(8/69)が E 型肝炎であるにも関わらず、見逃されていることが分かった。したがって、薬物性肝障害診断時には、HEV 抗体検査も同時に行われることが推奨される。
- 10) 西欧では HEV 感染に伴う神経障害や再生不良性貧血などの肝外病変の報告があったが、わが国でも Guillain-Barré syndrome (GBS) の一症例が見出された。見逃されている可能性が

十分にあり、肝炎臨床医と神経内科医の連携による精査が必要である。

- 11) 精製法及び不活化法の検討が必要であるが、カニクイザルへの接種実験によって、培養細胞由来 HEV が不活化ワクチンとして応用可能であることが示唆された。
- 12) HEV は細胞内の multivesicular body (MVB) 内腔へと出芽し、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。このような研究成果は、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の構築に資するものと期待される。
- 13) HEV の感染培養系に於いて、IFN、リバビリ、アマンタジンの他、IFN 1-3、SNMC、さらに RNA 依存性 RNA polymerase の阻害剤である 2'-C-methylcytidine はそれぞれ単独で HEV の増殖を濃度依存性に抑制した。また、2 剤併用はより有効であり、HEV RNA の陰性化も可能であった。臨床への応用が期待される。

E. 健康危険情報
なし

F. 研究発表

論文発表、総説：

- 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* 2014; 180:59-69.
- 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* 2014; 179:102-112.
- 3) 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]
- 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 Aug 8. doi: 10.1111/hepr.12216. [Epub ahead of print]
- 5) Nakano T, Takahashi K, Arai M, Okano H, Kato H, Ayada M, Okamoto H, Mishiro S. Identification of European-type hepatitis E virus subtype 3e isolates in Japanese wild boars: molecular tracing of HEV from swine to wild boars. *Infect Genet Evol* 2013; 18: 287-298.
- 6) Takahashi M, Okamoto H. Features of hepatitis E virus infection in humans and animals in Japan. *Hepatol Res* 2014; 44(1):43-58.
- 7) 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* 2013 May 2. doi: 10.1111/hepr.12155. [Epub ahead of print]
- 8) Watanabe S, Isoda N, Ohtake T, Hirosawa 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]
- 9) 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 Nov 13. [Epub ahead of print]
- 10) 岡本宏明. E型肝炎の感染源となりうる食品の留意点. *日本医事新報* 2013; 4655(7/13): 67-69.
- 11) 岡本宏明. E型肝炎ウイルス. *実験動物ニュース*. 2013; 62(4):74-77.
- 12) 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* 2013; 21(6): 532-539.
- 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