

**Fig. 2.** Evaluation of D1-SRIP antigen in an assay to measure the balance between neutralizing and enhancing antibodies using dengue-immune human serum samples. (A) Micrograph of K562 cells infected with D1-SRIPs or DENV-1. Cells infected with D1-SRIP (upper panels) or DENV-1 (lower panels) were immunostained with monoclonals JE-2D5 and D1-4G2, respectively. D1-SRIP or DENV-1 antigen was incubated with human serum sample no. 551 at a dilution of 1:10 or 1:640 in the absence of complement prior to infection (leftmost and second-left panels) or a control human serum sample negative for neutralizing antibodies against any DENV serotypes (second-right panels). The rightmost panels show results of mock infection. Dark staining is the result of specific immunoreactivity of D1-SRIP-infected cells with JE-2D5 antibody (upper panels) and DENV-1-infected cells with D1-4G2 antibody (lower panels). (B) Dose-dependent antibody activity curves. Curves were obtained using D1-SRIP (closed circles) and DENV-1 (open circles) antigens with four indicated serum samples and a negative control serum in the absence (C' [-]; upper panels) or presence (C' [+]; lower panels) of complement. The ordinate indicates numbers of infected cells or foci for D1-SRIP or DENV-1 antigens, respectively. Each datum represents an average of values obtained in two separate assays with SDs indicated by error bars. Dashed and dotted lines indicate cut-off values for differentiating between neutralizing and enhancing activities in assays using D1-SRIP and DENV-1 antigens, respectively. (C) Correlation between D1-SRIP and DENV-1 antigens. Individual data from eight serum samples at dilutions of 1:10–1:10,240 are plotted on the graph, with ordinate and abscissa indicating data obtained using D1-SRIP and DENV-1 antigens, respectively. Upper and lower panels correspond to comparisons in the absence and presence of complement, respectively. Solid lines are linear regression lines, with *R*-values corresponding to correlation coefficients.

was confirmed by the absence of infectivity in culture fluid of Vero or K562 cells infected with D1-SRIPs.

### 3.2. Neutralizing/enhancing antibody balance-assay evaluation of D1-SRIP antigen

The utility of D1-SRIP antigen in measurement assays of the balance between neutralizing and enhancing antibodies was evaluated using dengue-immune human serum samples. The assay system used semi-adherent K562 cells bearing FcγR, thus allowing us to measure neutralizing or enhancing antibody activities by comparing infected cell (for D1-SRIP antigen) or focus (for DENV-1 antigen) counts with those obtained without antibody. Smaller and larger counts corresponded to neutralizing and enhancing activities, respectively. Fig. 2A shows a micrograph of K562 cells infected with either D1-SRIPs or DENV-1.

As an example, the upper panels of Fig. 2B show dose (antibody dilution)-dependent antibody activity curves observed for two sera (samples no. 551 and no. 1412) in the absence of complement. In sample no. 551, neutralizing and enhancing activities were detected in dilution ranges of 1:10–1:40 and 1:640–1:40,960, respectively, in assays using either D1-SRIP or DENV-1 antigens. Similarly, curves obtained using D1-SRIP and DENV-1 antigens in sample no. 1412 were equivalent to one another. This result suggests that D1-SRIP antigen functions similarly to DENV-1 antigen in this assay system. D1-SRIP and DENV-1 antigens were also compared using another two sera (samples no. 474 and no. 1416) in the presence of complement (lower panels of Fig. 2B). Similar dose-dependent antibody activity curves were also obtained using either antigen. To further evaluate D1-SRIP antigen, four additional human serum samples were used. Data obtained using all eight samples at serum dilutions of 1:10–1:10,240 were plotted on a scatter graph (Fig. 2C). A significant correlation was observed between D1-SRIP and DENV-1 antigens in the absence and presence of complement, with correlation coefficients of 0.965 ( $P < 0.001$ ) and 0.956 ( $P < 0.001$ ), respectively.

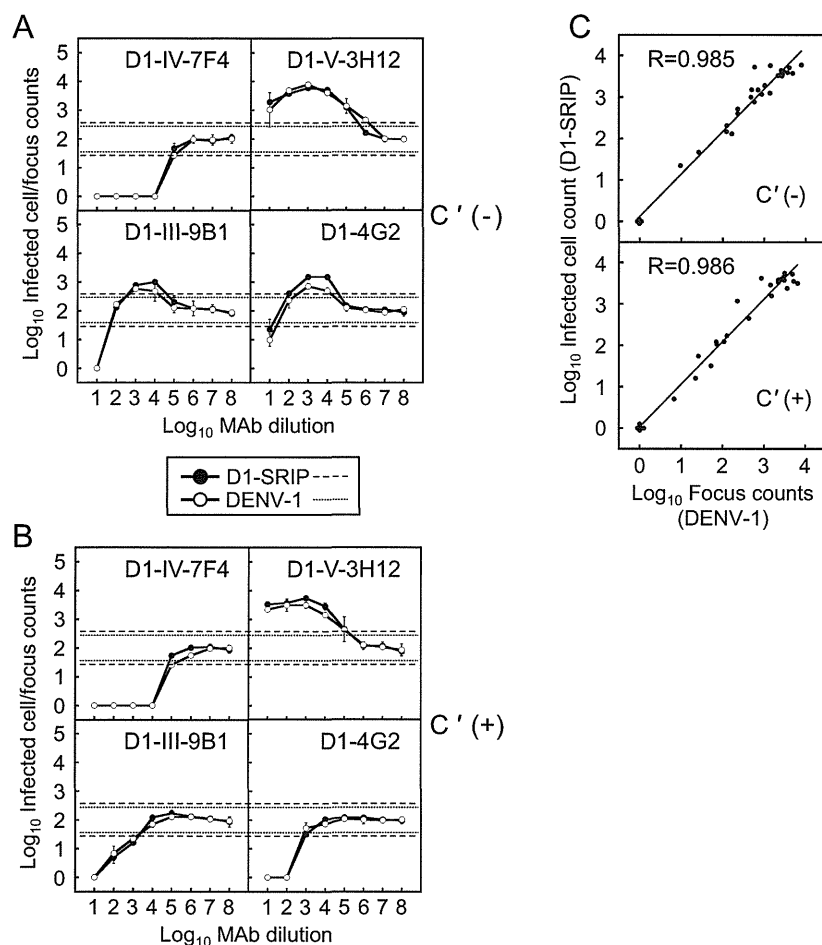
To corroborate the results obtained using human serum samples, mouse MAb were also used for comparison of D1-SRIP and DENV-1 antigens. Four MAbs reactive to DENV-1 (D1-IV-7F4, D1-III-9B1, D1-V-3H12, and D1-4G2) were subjected to the same assay system in the absence (Fig. 3A) or presence (Fig. 3B) of complement. Equivalent dose-dependent antibody activity curves were generated using D1-SRIP and DENV-1 antigens in all MAbs, both in the absence and presence of complement. Data obtained using six MAbs (including the four above-tested ones) at dilutions of 1:10<sup>1</sup>–1:10<sup>5</sup> were plotted on a scatter graph (Fig. 3C). Highly significant correlations were observed between D1-SRIP and DENV-1 antigens in the absence ( $R = 0.985$ ;  $P < 0.001$ ) or presence ( $R = 0.986$ ;  $P < 0.001$ ) of complement. These results imply that D1-SRIPs can serve as an alternate antigen to DENV-1 in assays measuring the balance between neutralizing and enhancing antibodies.

### 3.3. Neutralization-test evaluation of D1-SRIP antigen

The performance of D1-SRIP antigen in a conventional Vero-cell neutralization test was subsequently evaluated. Fig. 4A shows dose-dependent percent inhibition curves obtained with two sera (samples no. 551 and no. 1412) and two MAbs (D1-IV-7F4 and D1-4G2) when complement was absent from the virus-antibody mixture. Equivalent curves were obtained using DENV-1 and D1-SRIP antigens. To further evaluate D1-SRIP antigen, PRNT50s obtained with eight serum samples and six MAbs using DENV-1 and D1-SRIP antigens in the presence or absence of complement were plotted on a scatter graph (Fig. 4B). A significant correlation coefficient ( $R = 0.919$ ;  $P < 0.001$ ) was obtained between both antigens. This result indicates that D1-SRIP antigen can be used in place of authentic DENV-1 antigen in Vero-cell neutralization tests.

### 3.4. Evaluation of D2- and D3-SRIP antigens

To expand the utility of SRIP antigens for dengue functional antibody assays, D2- and D3-SRIPs were evaluated for their suitability as antigens in an assay to measure the balance between neutralizing and enhancing antibodies using K562 cells. Infected cell/focus counts obtained from four serum samples (no. 553, no. 1142, no. 1417, and no. 1703) at dilutions of 1:10–1:10,240 and four mouse MAbs reactive to DENV-2 and DENV-3 (D1-III-9B1, D1-V-3H12, D1-4G2, and JE-10B4) at dilutions of 1:10–1:10<sup>5</sup> were plotted on scatter graphs (Fig. 5). A significant correlation was observed between D2-SRIP and DENV-2 antigens in serum samples and mouse MAbs, with correlation coefficients of 0.943 ( $P < 0.001$ )



**Fig. 3.** Evaluation of D1-SRIP antigen in an assay to measure the balance between neutralizing and enhancing antibodies using mouse monoclonal antibodies (MAbs). ((A) and (B)) Dose-dependent antibody activity curves. Curves were obtained using D1-SRIP (closed circles) and DENV-1 (open circles) antigens with four indicated MAbs in the absence (A) or presence (B) of complement. The ordinate indicates numbers of infected cells or foci for D1-SRIP or DENV-1 antigens, respectively. Each datum represents an average of values obtained in two separate assays with SDs indicated by error bars. Dashed and dotted lines indicate cut-off values for differentiating between neutralizing and enhancing activities in assays using D1-SRIP and DENV-1 antigens, respectively. (C) Correlation between D1-SRIP and DENV-1 antigens. Individual data from six mouse MAbs at dilutions of  $1:10^1$ – $1:10^8$  are plotted on the graph, with ordinate and abscissa indicating data obtained using D1-SRIP and DENV-1 antigens, respectively. Upper and lower panels show comparisons in the absence and presence of complement, respectively. Solid lines are linear regression lines, with  $R$ -values corresponding to correlation coefficients.

and 0.935 ( $P < 0.001$ ), respectively. Furthermore, significant correlations were observed between D3-SRIP and DENV-3 antigens using serum samples ( $R = 0.975$ ;  $P < 0.001$ ) or mouse MAbs ( $R = 0.927$ ;  $P < 0.001$ ). These results suggest that D2- and D3-SRIPs can serve as alternate antigens to corresponding authentic viruses (DENV-2 and DENV-3) in assays measuring neutralizing and enhancing antibody balance.

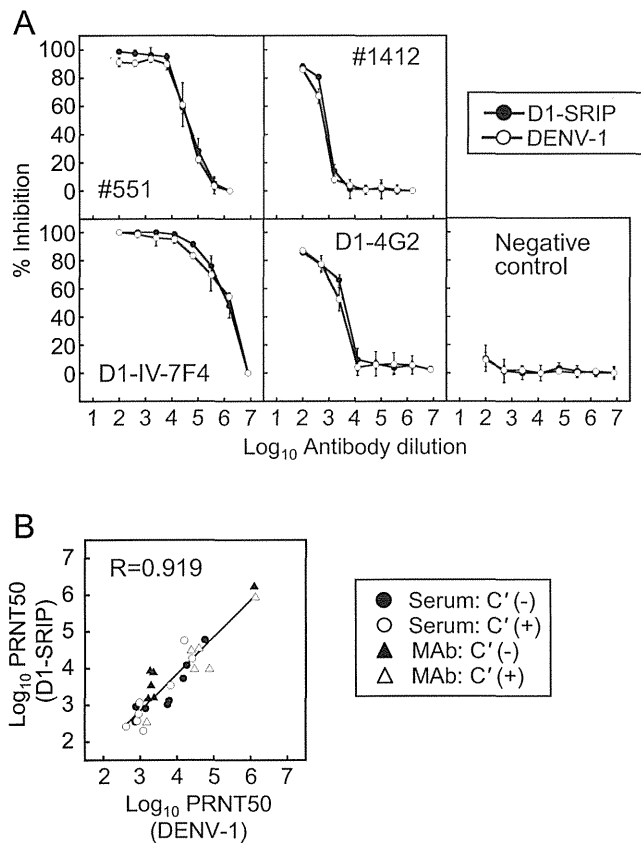
#### 4. Discussion

The first conducted efficacy trial of a dengue vaccine candidate found no significant protection against DENV-2, even though vaccinated volunteers induced neutralizing antibody against DENV-2 according to a conventional Vero-cell neutralization test [34]. To understand the discrepancy between neutralizing antibody levels and protective efficacy, the improvement of antibody assay systems has been suggested as a possible solution [35]. Compared with the use of non-expressing CV-1 cells, the use of Fc $\gamma$ -receptor-expressing CV-1 cells in an assay system reduced neutralizing antibody titers in dengue-immune sera [36]. Moi et al. [37] further showed that Fc $\gamma$ -receptor-expressing BHK-21 cells provided better reflection of in vivo antibody activity in patient sera than did a non-expressing control. We have previously used Fc $\gamma$ -receptor-bearing,

semi-adherent K562 cells to measure the balance of neutralizing and enhancing antibody activities [33]. The combination of these antibody assay systems with SRIP antigens should be a powerful tool to evaluate vaccine-induced antibody responses against antigens of a variety of serotype/genotype strains distributed worldwide.

Transfection with a plasmid expressing flavivirus prM-E genes is known to produce nucleocapsid-free, empty subviral extracellular particles (EPs) in mammalian cells [38,39]. EPs are useful as antigens in antibody binding assays, e.g., enzyme-linked immunosorbent assays [40,41]. In contrast, flavivirus SRIPs are generated by transfection with a replicon plasmid in addition to a plasmid expressing prM-E genes. SRIPs, which are infectious antigens, can be used in functional assays, which provide more important information on the protective role of antibodies than do binding assays. Furthermore, an infectious form increases antigen sensitivity; EP antigens, in fact, can be used only when the production level is as high as that of JEV.

Higher yields of D1-SRIPs were obtained using a combination of two (Set II; Fig. 1A) than three plasmids (Set I). Set II included the replicon plasmid pCMV-JErep-fullC, which contained the entire mature C. Potential reasons for this difference are: (i) increased efficiency of co-transfection in the system using a fewer number

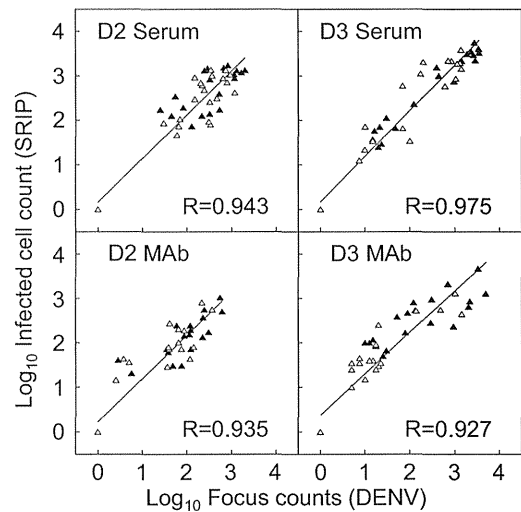


**Fig. 4.** Evaluation of D1-SRIP antigen performance in a conventional Vero-cell neutralization test. (A) Dose-dependent percent inhibition curves. Curves were obtained using D1-SRIP (closed circles) and DENV-1 (open circles) antigens with two indicated human serum samples (no. 551 and no. 1412), two mouse MAbs (D1-IV-7F4 and D1-4G2), and a human negative control serum (Negative control). All displayed results were obtained in the absence of complement. Each datum represents an average of values obtained in two separate assays, with SDs indicated by error bars. (B) Correlation between D1-SRIP and DENV-1 antigens. Individual PRNT50s obtained from eight human sera (open and closed circles) and six MAbs (open and closed triangles) in the absence (closed circles and triangles) or presence (open circles and triangles) of complement are plotted on the graph, with ordinate and abscissa indicating data obtained using D1-SRIP and DENV-1 antigens, respectively. The solid line is a linear regression line, with the *R*-value corresponding to the correlation coefficient.

of plasmids; and (ii) increased packaging efficacy for production of nucleocapsids in the Set II system, where the C protein is synthesized in close proximity to the subgenomic viral RNA. Detailed investigations should uncover the molecular mechanisms required for efficient packaging and virion particle formation in flaviviruses.

Although dose-dependent antibody activity curves obtained using D1-SRIPs and DENV-1 antigens were equivalent overall, the number of infected cells obtained using D1-SRIP antigen was greater than the number of foci obtained using DENV-1 antigen in some antibody samples. This situation occasionally occurred in an antibody dilution range showing enhancing activity, e.g., sample no. 474 at 1:2560, sample no. 1416 at 1:160–1:640 (Fig. 2B), and D1-4G2 at 1:160–1:640 (Fig. 3A). One potential explanation for this phenomenon is underestimation of the number of plaques formed by DENV-1. While one D1-SRIP infectious unit forms only a single infected cell, a unit of DENV-1 produces a focus composed of more than one infected cell in a well of limited size. In this case, infectious unit counts obtained using D1-SRIP antigen are considered more accurate.

In conclusion, our study has demonstrated the utility of D1-SRIPs as an alternative antigen to authentic DENV-1 in functional antibody assays to measure neutralizing and enhancing activities.



**Fig. 5.** Correlation between SRIP and DENV antigens in DENV-2 and DENV-3 systems. Individual infected cell/focus counts obtained in an assay to measure neutralizing and enhancing antibody balance using four serum samples at dilutions of 1:10–1:10,240 (upper panels) and four mouse MAbs at dilutions of 1:10–1:10<sup>5</sup> (lower panels) in the absence (closed triangles) or presence (open triangles) of complement are plotted on the graph. Left panels show data obtained using D2-SRIP and DENV-2 antigens; right panels indicate data obtained using D3-SRIP and DENV-3 antigens. Solid lines are linear regression lines, with *R*-values corresponding to correlation coefficients.

These antibody activities are important for evaluating coverage and safety of dengue vaccine candidates. SRIPs that cannot propagate in cells and thus may not be pathogenic to humans can be prepared more safely and securely than infectious clones. Furthermore, SRIP antigens can be easily produced by co-transfection with two plasmids, one of which contains the prM and E genes responsible for virion surface antigens. Based on nucleotide sequence information available in gene databases such as GenBank, production of SRIP antigens of a variety of serotype/genotype/subclades is simpler than production of an infectious clone or even importation of the infectious virus itself. SRIP antigens may not only assist vaccine development, but may also contribute to an understanding of dengue pathogenesis and the development of serodiagnostic systems.

#### Conflict of interest statement

None of the authors have a conflict of interest in relation to the content of the present work.

#### Acknowledgments

This work was supported in part by a grant-in-aid from the Research on International Cooperation in Medical Science program of the Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW) of Japan and the Research on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases program of the MHLW of Japan (H23-shinkou-ippan-010 and H23-seisakutansaku-ippan-002).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.06.017>.

#### References

- [1] Halstead SB. Dengue. *Lancet* 2007;370:1644–52.

- [2] Pierson TC, Diamond MS. *Flaviviruses*. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology* (sixth edition). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 747–94.
- [3] World Health Organization Fact sheet No. 117. Dengue and severe dengue. World Health Organization Fact sheet No. 117; 2013. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/index.html>) (accessed 28 February 2014).
- [4] Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott DM, Duda KA, et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol* 2014;22:138–46.
- [5] Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol* 2009;9:523–40.
- [6] Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, de Silva AM. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis* 2003;9:800–9.
- [7] Bennett SN, Holmes EC, Chirivella M, Rodriguez DM, Beltran M, Vorndam V, et al. Selection-driven evolution of emergent dengue virus. *Mol Biol Evol* 2000;20:1650–58.
- [8] Yamanaka A, Mulyatno KC, Susilowati H, Hendrianto E, Ginting AP, Sary DD, et al. Displacement of the predominant dengue virus from type 2 to type 1 with a subsequent genotype shift from IV to I in Surabaya, Indonesia 2008–2010. *PLoS One* 2011;6:e27322.
- [9] Chen S. The origin of dengue viruses caused the DF outbreak in Guangdong province, China, in 2006. *Infect Genet Evol* 2011;11:1183–7.
- [10] Tissera HA, Ooi EE, Gubler DJ, Tan Y, Logendra B, Wahala WM, et al. New dengue virus type 1 genotype in Colombo, Sri Lanka. *Emerg Infect Dis* 2011;17:2053–55.
- [11] Lee KS, Lo S, Tan SS, Chua R, Tan LK, Xu H, et al. Dengue virus surveillance in Singapore reveals high viral diversity through multiple introductions and in situ evolution. *Infect Genet Evol* 2012;12:77–85.
- [12] Normile D. Tropical medicine, Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science* 2013;342:415.
- [13] Wallace D, Canouet V, Garbes P, Wartel TA. Challenges in the clinical development of a dengue vaccine. *Curr Opin Virol* 2013;3:352–6.
- [14] Ishikawa T, Yamanaka A, Konishi E. A review of successful flavivirus vaccines and the problems with those flaviviruses for which vaccines are not yet available. *Vaccine* 2014;32:1326–37.
- [15] Pierson TC, Diamond MS. Molecular mechanisms of antibody-mediated neutralisation of flavivirus infection. *Expert Rev Mol Med* 2008;10:e12.
- [16] Morens DM, Halstead SB, Marchette NJ. Profiles of antibody-dependent enhancement of dengue virus type 2 infection. *Microb Pathog* 1987;3:231–7.
- [17] Huisman W, Martina BE, Rimmelzwaan GF, Gruters RA, Osterhaus AD. Vaccine-induced enhancement of viral infections. *Vaccine* 2009;27:505–12.
- [18] Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine* 2012;30:4301–306.
- [19] Halstead SB. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res* 2003;60:421–67.
- [20] Ministry of Economy, Trade and Industry of Japan. Security Export Control System in Japan; 2009 <http://www.meti.go.jp/policy/anpo/englishpage/overview.pdf>
- [21] United Nations. Nagoya Protocol on access to genetic resources and the fair and equitable sharing of benefits arising from their utilization to the Convention on Biological Diversity; 2011 <http://www.cbd.int/abs/doc/protocol/nagoya-protocol-en.pdf>
- [22] Kapoor M, Zhang L, Mohan PM, Padmanabhan R. Synthesis and characterization of an infectious dengue virus type-2 RNA genome (New Guinea C strain). *Gene* 1995;162:175–80.
- [23] Kinney RM, Buttrape S, Chang GJ, Tsuchiya KR, Roehrig JT, Bhamarapravati N, et al. Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. *Virology* 1997;230:300–8.
- [24] Puri B, Polo S, Hayes CG, Falgout B. Construction of a full length infectious clone for dengue-1 virus Western Pacific.74 strain. *Virus Genes* 2000;20:57–63.
- [25] Pierro DJ, Salazar MI, Beaty BJ, Olson KE. Infectious clone construction of dengue virus type 2, strain Jamaican 1409, and characterization of a conditional E6 mutation. *J Gen Virol* 2006;87:2263–8.
- [26] Suzuki R, Ishikawa T, Konishi E, Matsuda M, Watahshi K, Aizaki H, et al. Production of single-round infectious chimeric flaviviruses with DNA-based Japanese encephalitis virus replicon. *J Gen Virol* 2014;95:60–5.
- [27] Yamanaka A, Kosugi S, Konishi E. Infection-enhancing and -neutralizing activities of mouse monoclonal antibodies against dengue type 2 and 4 viruses are controlled by complement levels. *J Virol* 2008;82:927–37.
- [28] Konishi E, Kosugi S, Imoto J. Dengue tetravalent DNA vaccine inducing neutralizing antibody and anamnestic responses to four serotypes in mice. *Vaccine* 2006;24:2200–7.
- [29] Konishi E, Sakai Y, Kitai Y, Yamanaka A. Prevalence of antibodies to Japanese encephalitis virus among inhabitants in Java island, Indonesia, with a small pig population. *Am J Trop Med Hyg* 2009;80:856–61.
- [30] Yamanaka A, Kotaki T, Konishi E. A mouse monoclonal antibody against dengue virus type 1 Mochizuki strain targeting envelope protein domain II and displaying strongly neutralizing but not enhancing activity. *J Virol* 2013;87:12828–37.
- [31] Konishi E, Yagawa K, Yamanaka A. Vero cells infected with vaccinia viruses expressing Japanese encephalitis virus envelope protein induce polykaryocyte formation under neutral conditions. *Jpn J Infect Dis* 2008;61:410–1.
- [32] Konishi E, Shoda M, Ajiro N, Kondo T. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for quantifying antibodies to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein to detect subclinical infections in vaccinated horses. *J Clin Microbiol* 2004;42:5087–93.
- [33] Konishi E, Tabuchi Y, Yamanaka A. A simple assay system for infection-enhancing and -neutralizing antibodies to dengue type 2 virus using layers of semi-adherent K562 cells. *J Virol Methods* 2010;163:360–7.
- [34] Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabha S, et al. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet* 2012;380:1559–67.
- [35] McArthur MA, Szein MB, Edelman R. Dengue vaccines: recent developments, ongoing challenges and current candidates. *Expert Rev Vaccines* 2013;12:933–53.
- [36] Rodrigo WW, Alcena DC, Rose RC, Jin X, Schlesinger JJ. An automated Dengue virus microneutralization plaque assay performed in human Fc[gamma] receptor-expressing CV-1 cells. *Am J Trop Med Hyg* 2009;80:61–5.
- [37] Moi ML, Lim CK, Chua KB, Takasaki T, Kurane I. Dengue virus infection-enhancing activity in serum samples with neutralizing activity as determined by using Fc[gamma]R-expressing cells. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6:e1536.
- [38] Mason PW, Pincus S, Fournier MJ, Mason TL, Shope RE, Paoletti E. Japanese encephalitis virus-vaccinia recombinants produce particulate forms of the structural membrane proteins and induce high levels of protection against lethal JEV infection. *Virology* 1991;180:294–305.
- [39] Konishi E, Pincus S, Fonseca BA, Shope RE, Paoletti E, Mason PW. Comparison of protective immunity elicited by recombinant vaccinia viruses that synthesize E or NS1 of Japanese encephalitis virus. *Virology* 1991;185:401–10.
- [40] Konishi E, Mason PW, Shope RE. Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigens for serodiagnosis of Japanese encephalitis. *J Med Virol* 1996;48:76–9.
- [41] Chiou SS, Crill WD, Chen LK, Chang GJ. Enzyme-linked immunosorbent assays using novel Japanese encephalitis virus antigen improve the accuracy of clinical diagnosis of flavivirus infections. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:825–35.

## 特 集

## 注目したい感染症とワクチン

## A型肝炎ウイルス感染症

国立感染症研究所ウイルス第二部 石井孝司、清原知子、脇田隆宇

## 要 旨

A型肝炎はA型肝炎ウイルス (hepatitis A virus, HAV) の感染による急性肝炎で、感染者の便中に排泄されたウイルスが主な感染源となり、感染者との接触や水、食品等を介して経口的に感染する。日本を含む先進諸国では衛生環境の改善、特に上下水道の整備に伴いA型肝炎の大規模な集団発生は見られなくなってきている。しかしながら、A型肝炎の発生数の減少により抗HAV抗体陽性者が減少したため、HAVへの感受性者が人口の大多数となっており、何らかのきっかけでHAVが日本に流入した場合にA型肝炎の流行を起こす危険性はむしろ増大していると考えられる。A型肝炎は一般に予後良好な疾病ではあるが、数か月間の療養を必要とし、Quality of Lifeの損失は大きい。本稿では、今後の日本でのA型肝炎対策の参考となることを期待し、A型肝炎ウイルス感染症の概要と近年の日本での流行状況について示す。

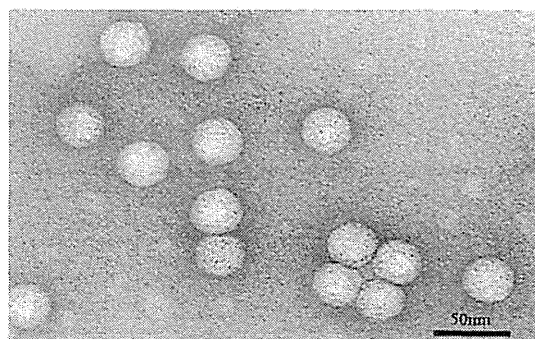
## Key words

A型肝炎、HAV、経口感染、抗体保有率、ワクチン

## はじめに

流行性の肝炎の存在は紀元前から知られていた。1947年、MacCallumは感染性の肝炎を流行性肝炎と血清肝炎の2種類に分類し、流行性肝炎をA型肝炎と命名した。1973年にFeinstoneらによって、急性肝炎症例の便検体から免疫電子顕微鏡によりHAV粒子が初めて見出された<sup>1)</sup>(図1)。

HAVはエンベロープを持たない直径27nmの小型球形ウイルスであり、ピコルナウイルス科ヘパトウイルス属に分類される。ウイルスゲノムは全



(撮影：国立感染症研究所)

図1 HAVの電子顕微鏡写真

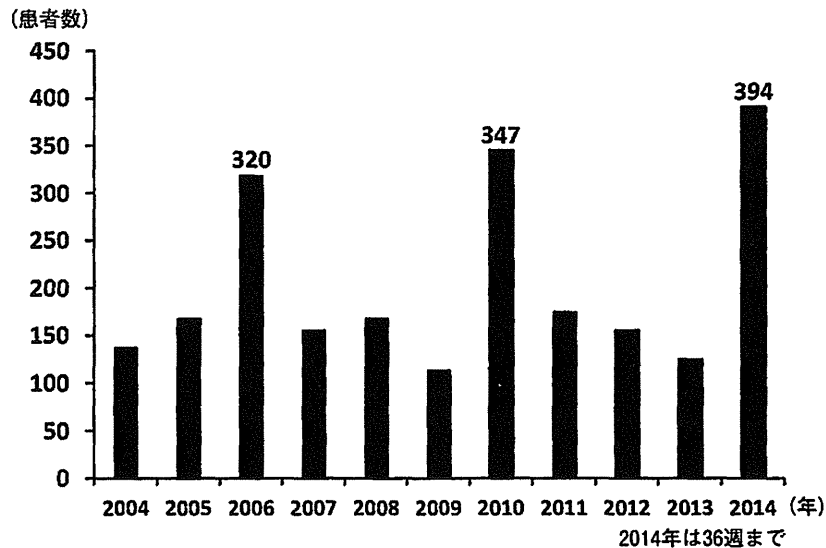


図2 2004年から2014年までの日本における急性A型肝炎患者数の推移  
(国立感染症研究所感染症疫学センターのまとめによる)

長約7500塩基のプラス鎖の一本鎖RNAであり、ゲノムの5'端にはVPgタンパクが共有結合し、3'端にはポリAをもつ。5'非翻訳領域(UTR)と3'UTRは株間でよく保存されており、この領域の高次構造がウイルスの翻訳、複製に重要であると考えられている。HAV蛋白はアミノ酸約2200分子からなる大きな1本のポリプロテインとして翻訳され、その後宿主およびウイルス自らがコードするプロテアーゼの作用を受けて成熟型の蛋白となる。

HAVのserotype(血清型)は1種類であるが genotype(遺伝子型)はI~VI型に分類され、I~III型にはそれぞれA、Bのsubgenotypeが存在する。ヒトからは主にI、III型が検出され、IA、IBは南北アメリカ、ヨーロッパ、中国、日本で多く、特にIAは世界で最も多いgenotypeである。III Aはアジア、ヨーロッパで主に見られ、III Bは日本とデンマークで検出されている。遺伝子型と病態の関連は認められておらず、異なった遺伝子型のHAVから作られたワクチンでもすべてのHAV株の感染に対して有効である。HAVは酸、有機溶媒、乾燥、熱に対して抵抗性である<sup>2)</sup>。

60℃、1時間程度の加熱では容易に不活化されず、85℃、1~2分で不活化される。

A型肝炎は患者の糞便中に排泄されたHAVによる経口感染によって広がり、時に汚染された食品や飲料水を介する集団発生がみられる。HAVは胆汁、消化管内蛋白分解酵素に抵抗性なので不活化されることなく糞便中に排出され、糞便からの経口感染が容易に成立する。日本では衛生環境の改善、特に上下水道の整備に伴いA型肝炎の大規模な集団発生は見られなくなってきているが、依然として年間100~200例前後の患者が報告されており、中には劇症肝炎症例も含まれている(図2)。感染地域の多くは国内であるが、そのほとんどは散発例で、時折小規模な集団発生が報告されている<sup>3)4)</sup>。国内での感染機会の減少により抗HAV抗体の保有率は激減し、現在では日本の人口の大部分はHAVに対する感受性者であることから、HAVの流入によるA型肝炎流行の危険性は増大しつつあると考えられる<sup>5)</sup>(図3)。また、感受性者の年齢は年々上昇し、これを反映して顕性感染しやすく重症例も多い中高年の患者数が増えていることにも注意を払う必要がある。A型肝炎

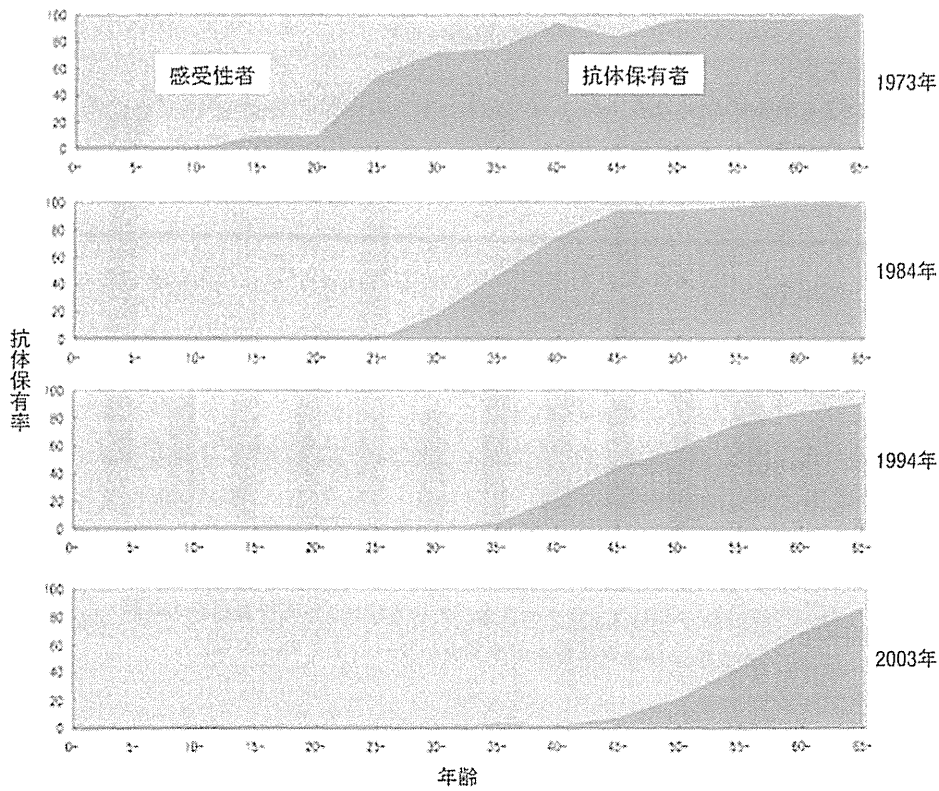


図3 HAV感受性者と抗体保有者の推移。文献<sup>5)</sup>を改変

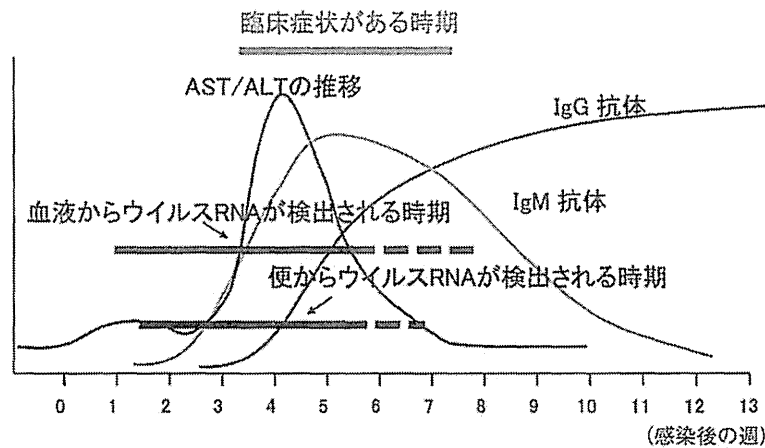


図4 A型肝炎の臨床経過。A型肝炎の潜伏期は平均約1か月である。発症後AST値とALT値は著しく上昇し、ピークに達する。この時点でIgM抗体、IgG抗体とHAV RNAはともに検出される。IgM抗体は約3か月後に消失するが、IgG抗体は長く持続する

炎は2003年11月5日の感染症法改正に伴い、単独疾患として4類感染症に分類され、現在は無症状病原体保有者を含む全診断症例の届出が義務づけられている。

国立感染症研究所感染症情報センターのまとめでは、2006年第13週から2010年第34週に報告された962例中、経口感染が疑われるのは777例(81%)であった。残りの185例の感染経路は不明である。

原因となる食品はカキやその他の魚介類が多く、特に国内経口感染例の90%以上は、カキ、寿司を含む魚介類の生食によるものと推定される。また、近年は海外感染例も増加傾向にあり、現在では2～3割を占める。

## A型肝炎の症状

HAVに感染すると約1か月の潜伏期間を経て発症する<sup>2)</sup>。典型的な症状では、黄疸、肝腫脹、黒色尿、白色便などを見る。黄疸症状の現れる前に前駆症状として突然の高熱(38℃以上)と全身の著しい倦怠感が特徴的である。小児では不顕性感染や軽症ですむことが多い。6歳以下の黄疸出現率が10%以下であるのに対して成人は40～70%が黄疸になる。成人は臨床症状も肝障害の程度も強い傾向がある。一般的に患者は高い自然治癒力を示し、比較的予後良好な疾病である。発症前から患者の糞便には多量のウイルスが排出されており、潜伏期における感染拡大の可能性があるので留意すべきである(図4)。ウイルスの排出は発症時に最多となり、発症後2週間あまりで消失すると考えられていたが、RT-PCR法による高感度遺伝子検出法を用いた最近の見解では、発症後1～2か経過してもウイルスの排出が続く可能性が示されている<sup>6)</sup>。A型肝炎に感染すると顕性、不顕性に関わらず高力価の防御抗体が産生され、終生免疫を得ると考えられている。

## 病原診断

A型肝炎の診断には血中のIgM-HAV抗体を確認する。固相化抗ヒトIgM抗体に患者血清を反応させ、さらにHAV抗原、標識HAV抗体を順次反応させる簡便なIgM捕捉キットが市販されている。IgM抗体は発症から約1か月後にピークに達し、3～6か月後には陰性となる。重症例ほどIgM抗体価は高く、発症6か月以降にも検出される例がある。また、治癒が遅延化する例ではIgM抗体の持続期間も長い。

IgGおよびIgA抗体の測定は、特殊な血清疫学調査以外には使われていない。IgA抗体は感染後1～2年間、IgG抗体はさらに長期間持続するので、一般的な血清疫学調査、免疫グロブリン(ISG)やワクチン接種対象者の選択などには、全クラスのHAV抗体を測定する競合抑制ELISAなどが用いられる。なお、検出されるHAV抗体はウイルス粒子と結合する防御抗体であり、過去の感染またはワクチン免疫を意味する。

細胞培養によるウイルス分離には長期間が必要なため、診断目的には適さない。発症ごく初期の患者糞便中には、ELISAで測定可能な量(1ml当たり $10^8$ 粒子以上)のHAVが含まれることもある。ウイルスRNAを検出するRT-PCR法では、微量のHAVの検出が可能である。発症後2週間以内の糞便検体や血液中のウイルスRNAを抽出し、RT-PCR法でcDNAを増幅して遺伝子解析を行えば、感染経路の推定などに役立つ。リアルタイムPCR法も診断に適用されている(平成14年8月16日付、食監発第0816001号)。

## 日本における流行

日本でのA型肝炎患者数は150人/年程度と近年は非常に低いレベルで推移していたが、2010年は3月から全国各地でA型肝炎が多発した。国立感染症研究所感染症情報センターのまとめでは、2010年のA型肝炎患者数は346人であった(図2)。合計61株について分子疫学的配列解析を行ったところ、2010年の流行株はgenotype IAが44株、IBが1株、ⅢAが16株であり、その大部分はIAの2つのクラスターとⅢAの1つのクラスターに分類されることが判明した。

IAのクラスターの1つは2006年に日本で滋賀、新潟などで小流行した株と類似しており、また同じクラスターに属する株が2001年から継続して検出されていることから、少なくとも10年程度前から日本に常在していた株であると推定される<sup>2)3)</sup>。一方、IAのもう1つのクラスターに属する株は



解析を行った株の過半数を占め、非常に均一性が高く、しかも2007年にドイツで確認された株と同一の配列であった<sup>7)</sup>。この株が2007年にフィリピンへ旅行し帰国直後に急性肝炎を発症した11歳の女兒から得られた株であること、このクラスターに属する日本の患者の中にフィリピンからの帰国直後に発症した事例が2例あったことから、本クラスターはフィリピンとの関連が示唆された。本クラスターに属する株は、この2010年春季の流行の後には、輸入感染例以外はほとんど確認されておらず、一過性に日本で流行した後は定着しなかったものと推察される。感染原因については、食材などが疑われるが現在まで明らかになっていない。

日本において、従来Genotype III Aに属するHAVの報告は非常に少なかったが、2010年の株の30%近くはIII Aであった。韓国では2006年からA型肝炎が大流行しており、2009年には患者数は2万人近くに達しているが、その原因となっているHAVのgenotypeはIII Aである<sup>8)</sup>。2010年に日本で検出されたIII Aの株は、この韓国で大流行したIII A株と同じクラスターに属しており、韓国での流行の原因となった株の日本への流入が示唆された。

以上の解析の結果から、2010年にA型肝炎が多発した理由は、従来日本に常在していた株に加え、フィリピン由来の可能性のある株が新たに日本で流行し、また韓国で大流行した株も一部日本に流入してきたためであると結論された<sup>7)</sup>。

2011年のはじめには千葉市およびその近辺でA型肝炎患者が多発し、最終的には49名に及ぶ大規模な集団発生事例となった。これらの患者から検出されたHAVの配列は、解析された領域はすべてほぼ同一配列であり、同一感染源からの集団発生を強く示唆するものとなった。患者発生は1月下旬に集中しており、千葉市環境保健研究所による調査の結果、同一の寿司店で喫食していたことが確認された。本寿司店の調理従事者2名からも患者のものと同じの配列を持つHAVが検出され、

うち1名は11月下旬に急性A型肝炎を発症していたことが確認されたことから、調理従事者により直接、あるいは調理施設等を介して間接的に汚染された食品(寿司)が集団感染の原因であったと結論された。なお、このウイルスは2010年のクラスターではIA-1に属しており、日本に常在している株と考えられる<sup>9)</sup>。

2014年の全国におけるA型肝炎の報告数は、第36週までに41都道府県から累積394例となり、ここ10年ではすでに最も発生数の多い年となっている(図2)。第8週から宮城県を中心とした限局的な流行が見られたが、その後、西日本を中心とした報告が多くなり、全国のピークであった第9～10週において、九州および瀬戸内地方から全体の約7割が報告されたものの、報告は西日本にとどまらず、関東から東北まで広く患者発生が見られた。流行状況把握のためA型肝炎患者159例の糞便または血清からHAVゲノムの配列を決定し、流行状況を分子疫学的に解析したところ、遺伝子型の内訳は、IAが137例、III Aが18例、IBが4例であった。宮城県を中心とした第8週からの流行の遺伝子型はIII Aで、韓国で流行したIII Aと近縁であった。また、ほぼすべての株が同一配列であったことから、単一の感染源からの小流行と考えられた。一方、IAのうち約75%にあたる103例は、遺伝子配列解析を行った領域の配列はほぼ完全に同一であり、しかも宮城県から鹿児島県まで広範囲に渡り同時期に検出されるという非常に特異な特徴を示した(この原因となった株を広域型と呼ぶ)。広域型は日本に常在していると考えられるIA-1クラスターに属し、本株による症例は第7～11週に集中した一峰性であった(図5)。このように、2014年春季のA型肝炎の流行は、その60%以上が同一の株を原因とするものであったことが分子疫学的解析で明らかとなった。このような流行の特徴から、おそらく限局された地域で同一時期にこの広域型HAVに汚染された食材などが短期間に全国規模で流通し、同一株による全

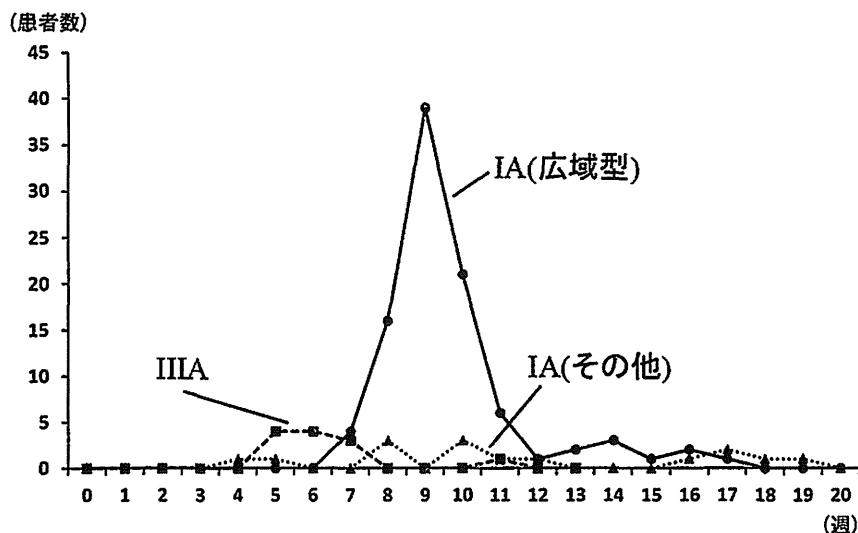


図5 2014年第20週までの遺伝子型別患者発生数。IA (広域型)、IA (その他)、IIIAについて示した

国的な流行を発生させたものと推察される。

### おわりに

いまから60年前にはA型肝炎常在国であった日本も、上下水道の整備など公衆衛生環境の改善により、現在では世界で最もA型肝炎の少ない国の1つになっている。しかしながら、そのために皮膚にも現在ではHAVに対する抗体を持たない感受性者が大多数となっており、何らかのきっかけでA型肝炎が流行を起こす危険性は、以前と比べむしろ増大していると考えられる。2014年の流行はその典型である。また、2010年の日本全国での広域流行は韓国、フィリピンからの新たな株の流入が原因と考えられ、海外からの流入の危険も現実のものであることを示している。さらに、重症化しやすい高齢者でも感受性者が増加していることにも今後は注意を払う必要がある。幸い、A型肝炎は安全でかつ効果の高いワクチンがすでに実用化されている。今後は感染源や感染経路対策だけでなく、個人の積極的な予防対策、感染症に対する意識の向上が望まれる。特に、A型肝炎流行地への渡航者、医療従事者、介護従事者、生鮮魚介類を扱う生産者や調理従事者、高齢者などへ

のA型肝炎ワクチン接種を積極的に推奨すべきと思われる。

謝辞：日本におけるHAVの分子疫学的解析は、日本全国の地方衛生研究所、保健所の先生方との共同研究であり、この場を借りて深く感謝申し上げます。

### 文 献

- 1) Feinstone SM, et al : Hepatitis A : detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science* 182 : 1026-1028(1973)
- 2) Fiore AE. : Hepatitis A transmitted by food. *Clinical Infectious Diseases* ; 38 : 705-715 (2004)
- 3) 長谷川嘉子、ほか：A型肝炎ウイルスによる食中毒事例—滋賀県IASR Vol.27 p341-342, <http://idsc.nih.gov.jp/iasr/27/322/kj3221.html> : 2006年
- 4) 新潟市保健所、ほか：A型肝炎ウイルスによる食中毒事例—新潟市・新潟県 IASR Vol. 27 p178, <http://idsc.nih.gov.jp/iasr/27/317/pr3171.html> : 2006年
- 5) Kiyohara T et al. : Shifting seroepidemiology of hepatitis A in Japan, 1973-2003. *Microbiology and Immunology* 51 : 185-191(2007)
- 6) 四柳宏、HAV-RNA検出法 : *日本臨床* ; 62 (S8)

(2004)

- 7) Ishii K et al. : Epidemiological and genetic analyses of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. *Journal of Clinical Virology* 53, 219-224(2012)
- 8) Lee H et al. : Genetic Analysis of Hepatitis A

Virus Strains That Induced Epidemics in Korea during 2007-2009 *Journal of Clinical Microbiology* 50 : 1252-1257(2012)

- 9) 横井 一、ほか : A型肝炎ウイルスによる食中毒事例—千葉県IASR Vol. 32 p78-79, <http://idsc.nih.go.jp/iasr/32/373/pr3733.html> : 2011年

## 環境中 A 型肝炎ウイルス遺伝子の検出と分子疫学的应用

石井孝司 国立感染症研究所 ウイルス第二部

### 〔論文要旨〕

A 型肝炎は A 型肝炎ウイルス (hepatitis A virus, HAV) の経口感染により引き起こされる疾患で、患者の排泄物や汚染された飲食物が感染源となる。感染者から排泄された HAV は環境水中に放出されるため、地域における流行状況を把握する手段の 1 つとして、環境水中の HAV の検出は有用と考えられる。しかしながら環境水中に放出される HAV は通常は低濃度であり、水環境中のウイルスを測定するためにはウイルスを濃縮する必要がある。本稿では、膜を用いたウイルス濃縮法の概要と、この手法を用いた HAV の環境水からの検出、分子疫学的解析への応用について述べる。

Key words : A 型肝炎ウイルス 環境水 陰電荷膜 系統樹解析

### 1. はじめに

A 型肝炎は HAV の感染による急性肝炎で、感染者の便中に排泄されたウイルスが主な感染源となり、感染者との接触や水、食品等を介して経口的に感染する。日本を含む先進諸国では衛生環境の改善、特に上下水道の整備にともない A 型肝炎の大規模な集団発生は見られなくなってきている。しかしながら、A 型肝炎の発生数の減少により抗 HAV 抗体陽性者が減少したため、HAV への感受性者が人口の大多数となってきており、何らかのきっかけで HAV が日本に流入した場合に A 型肝炎の流行をおこす危険性はむしろ増大していると考えられる。

感染者から排泄された HAV は環境水中に放出されるため、地域における流行状況を把握する手段の 1 つとして、環境水中の HAV の検出は有用と考えられる。しかしながら環境水中に放出される HAV は通常は低濃度であり、水環境中のウイルスを測定するためにはウイルスを

濃縮する必要がある。濃縮法が満たすべき条件としては、1) 簡便で経済的である、2) 安定した回収率と高い濃縮倍率が達成できる、3) 大量の水を短期間で処理できる、といったものが挙げられる。現在、ウイルス濃縮法として主流となっているのは膜にウイルスを吸着させて誘出する方法である。

### 2. 膜を用いたウイルス濃縮法

ウイルス粒子は一般に中性域ではマイナスに帯電していることが多く、2 価以上の陽イオン存在下では陰電荷膜によく吸着する。また酸性下ではプラスに帯電していると考えられ、陰電荷膜によく吸着する<sup>1)</sup>。しかしながら蛋白質系の有機物が多く含まれる場合にはあまり陰電荷膜に吸着しない。この性質を利用し、ウイルスを陰電荷膜に吸着させ、ウイルスを濃縮し誘出する方法が開発されている。試料を pH3.5 に調整し、0.05M になるように MgCl<sub>2</sub> を加え、ニトロセルロース系の HA 膜を通してウイルスを膜

Detection of hepatitis A virus in sewage and application for molecular epidemiological analysis

Koji ISHII, Virology II, National Institute of Infectious Diseases

別刷請求先：石井孝司 〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4-7-1 国立感染症研究所 ウイルス第二部

Tel : 042-848-7037 Fax : 042-561-4729 E-mail : kishii@nih.go.jp

に吸着させた後、蛋白など有機物を含む少量の溶出液でウイルスを溶出させる。膜からの溶出にはビーフエキストラクト溶液（中性～弱アルカリ性）を用いる方法が確立されている。ビーフエキストラクト溶液を用いる利点は感染性のウイルスを回収できる点であるが、核酸検出のみを目的とするならば、強アルカリ性の溶出液でも構わない。濃縮、誘出されたウイルス液は、ポリエチレングリコールを用いた濃縮沈殿法、抗原抗体反応を用いた精製法などでさらに二次的に濃縮することも可能である（図1）。

近年、陰電荷膜にウイルスを吸着させた後、酸性の洗浄液を用いて膜を洗浄することにより、陽イオン-ウイルス複合体を構成している陽イオンを誘出し、ウイルスを直接陰電荷膜に吸着させる手法が確立されている（酸洗浄法<sup>2)</sup>）。この手法では、誘出にアルカリ溶液を使用し、ウイルス粒子に膜と同じ陰電荷を持たせて誘出させる（図2）。この濃縮法は、誘出液に無機アルカリ溶液を使用するため、限外ろ過膜で二次濃縮が容易に行える。海水からのウイルス濃縮も可能であるといった優れた性質を持つ。

### 3. A型肝炎ウイルスの概要

HAVはピコルナウイルス科ヘパトウイルス属に分類される。A型肝炎は患者の糞便中に排泄されたHAVによる経口感染によって広がり、時に汚染された食品や飲料水を介する集団発生がみられる。HAVのserotype(血清型)は1種類であるがgenotype(遺伝子型)はI～IV型に分類され、I～III型にはそれぞれA、Bのsubgenotypeが存在する。ヒトからは主にI、III型が検出される。

日本では衛生環境の改善、特に上下水道の整備にともないA型肝炎の大規模な集団発生は見られなくなってきているが、依然として年間100～200例前後の患者が報告されており、中には劇症肝炎症例も含まれている（図3）。感染地域の多くは国内であるが、そのほとんどは散発例で、時折小規模な集団発生が報告されている<sup>3,4)</sup>。国内での感染機会の減少により抗HAV抗体の保有率は激減し、現在では日本の人口の大部分はHAVに対する感受性者であることから、HAVの流入によるA型肝炎流行の危険性

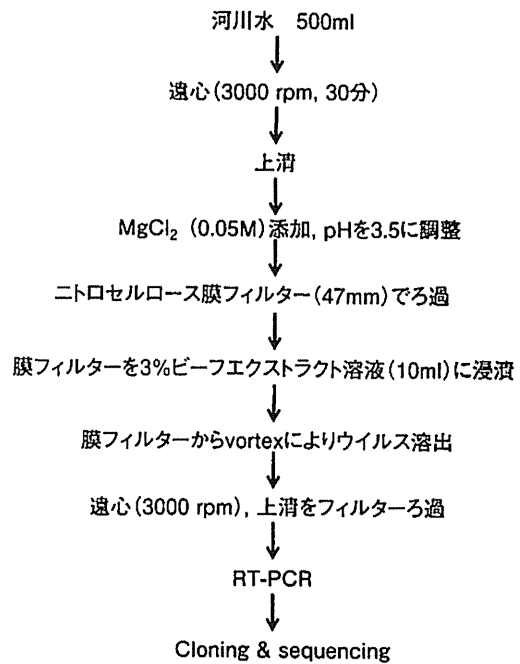
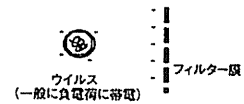


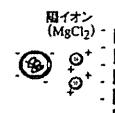
図1 河川水からのウイルス濃縮フローチャート

#### 1. 通常の状態(中性)



#### 2. MgCl<sub>2</sub>添加(膜への吸着)

(ウイルス-陽イオン複合体は膜に吸着する)



#### 3. 酸での洗浄工程

(ウイルスは正に帯電し、膜に直接吸着する)



#### 4. 誘出工程

(アルカリ条件ではウイルスは再び負に帯電し、膜から誘出される)



図2 陰電荷膜を用いたウイルス吸着、濃縮の模式図  
陰電荷膜にウイルスを吸着させた後、酸性の洗浄液を用いて膜を洗浄することにより、陽イオン-ウイルス複合体を構成している陽イオンを誘出し、ウイルスを直接陰電荷膜に吸着させる。洗浄後にアルカリ溶液を使用し、ウイルス粒子に膜と同じ陰電荷を持たせて誘出させる。

は増大しつつあると考えられる<sup>5)</sup>。また、感受性者の年齢は年々上昇し、これを反映して顕性感染しやすく重症例も多い中高年の患者数が増

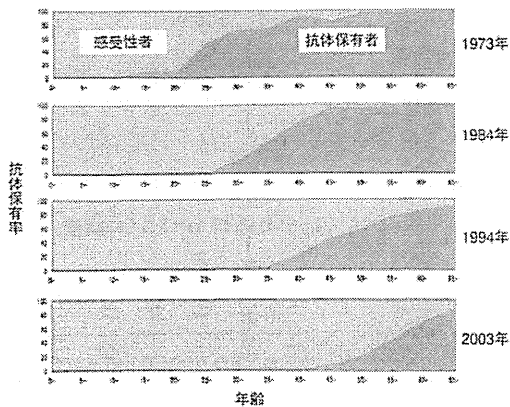


図3 HAV感受性者と抗体保有者の推移

えていることにも注意を払う必要がある。A型肝炎は2003年11月5日の感染症法改正にともない、単独疾患として4類感染症に分類され、現在は無症状病原体保有者を含む全診断症例の届出が義務づけられている。

#### 4. 日本におけるA型肝炎の2010年の流行

日本でのA型肝炎患者数は150人/年程度と2007年以降非常に低いレベルで推移していたが、2010年は3月から全国各地でA型肝炎が多発した。国立感染症研究所感染症情報センター（現・感染症疫学センター）のまとめでは、2010年のA型肝炎患者数は347人であった（図4）。私たちは、全国の地方衛生研究所と共同でA型肝炎患者由来の検体からHAVゲノムの検出を試み、得られた塩基配列情報を基に分子疫学的な解析を行った<sup>6)</sup>。合計61株について配列解析を行ったところ、2010年の流行株はgenotype IAが44株、IBが1株、III Aが16株であり、その大部分はIAの2つのクラスターとIII Aの1つのクラスターに分類されることが判明した。

IAのクラスターの1つ（IA-1）は2006年に日本で滋賀、新潟などで小流行した株と類似しており、また同じクラスターに属する株が2001年から継続して検出されていることから、少なくとも10年程度前から日本に常在していた株であると推定された<sup>3,4)</sup>。一方、IAのもう1つのクラスターに属する株は解析を行った株

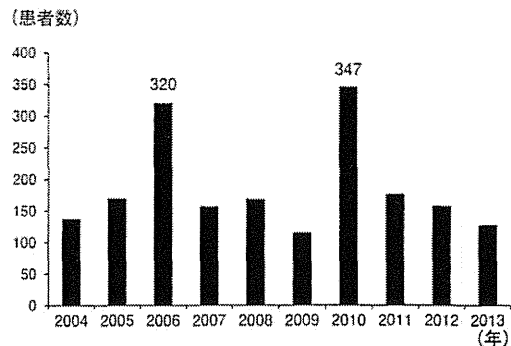


図4 2004年から2013年の日本におけるA型肝炎患者数の推移

の過半数を占め、非常に均一性が高く、しかも2007年にドイツで確認された株（HAV-DE-2007/08-196、IA-2中に赤太字で示した株）と同一の配列であった。この株が2007年にフィリピンへ旅行し帰国直後に急性肝炎を発症した11歳の女児から得られた株であること、このクラスターに属する日本の患者の中にフィリピンからの帰国直後に発症した事例が2例あったことから、本クラスターはフィリピンとの関連が示唆された。

しかしながら、フィリピンにおけるA型肝炎の状況についてはあまり調査が行われておらず、フィリピンのA型肝炎患者からの検体の採取も困難であるため、フィリピンでのA型肝炎の流行状況については非常に情報が少なかった。フィリピンの首都マニラ市の人口は、広域を含めると1,000万人を超えるが、下水処理設備等は整っておらず、生活排水を直接河川や海に放出している地区が大部分である。そのため、河川水はマニラ市域の生活排水をかなりよく反映しているものと考えられたため、患者からの検体採取に代えて河川水からのHAVの検出を試みた。

我々は、フィリピン熱帯医学研究所（Research Institute of Tropical Medicine, RITM）に感染症研究国際ネットワーク推進プログラム（J-GRID）の研究拠点を持つ東北大学押谷研究室と共同で、マニラ市内および郊外の6ヶ所から河川水約500mlを採取し、上記の陰電荷膜法を

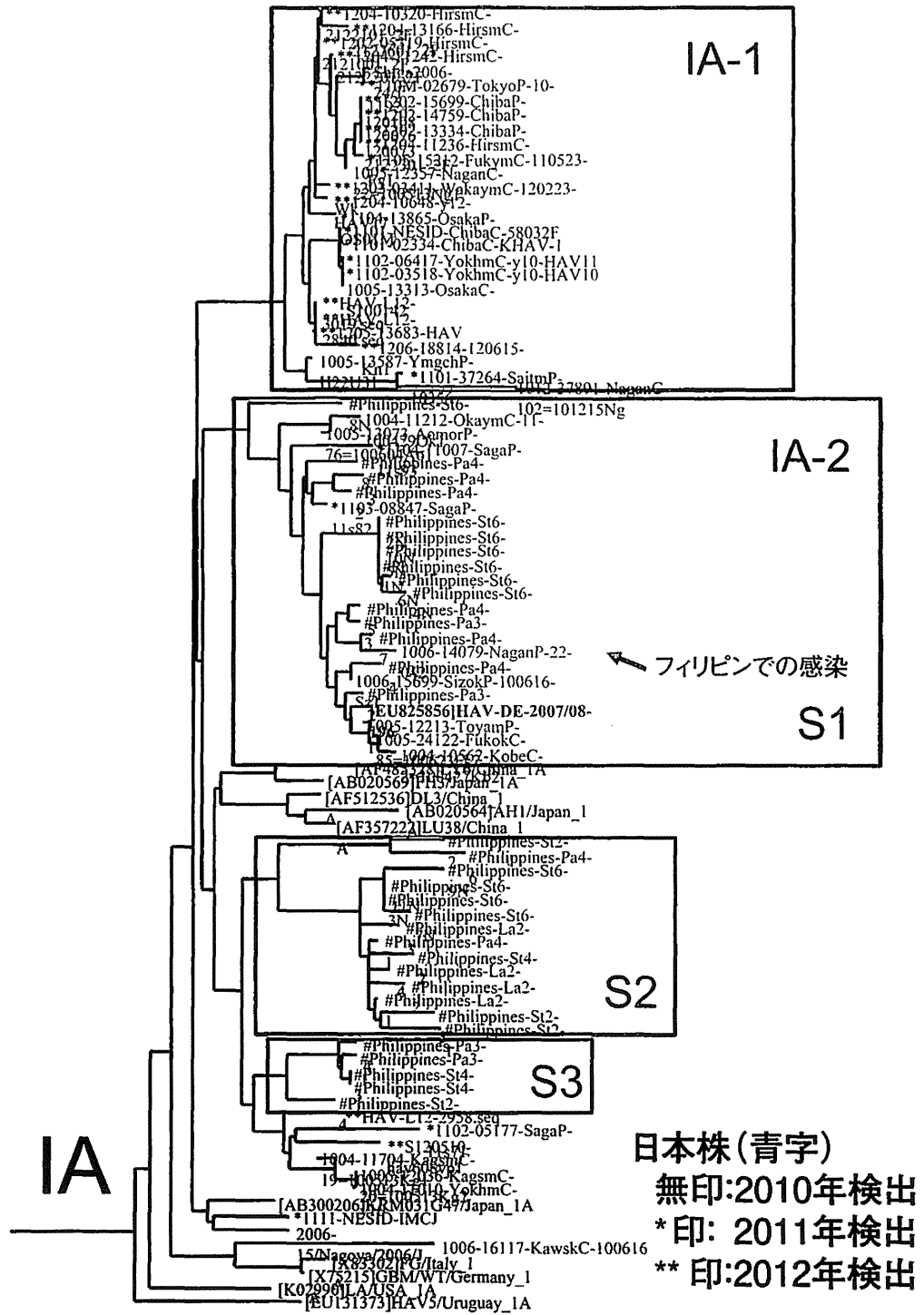


図5 日本のA型肝炎患者のHAVとフィリピン河川水のHAVの系統樹による比較  
 選伝子型IAのみを示した。解析領域は構造/非構造ジャンクション領域568塩基を用いた。  
 青字が日本株、赤字がフィリピン株である。

用いてウイルス濃縮を行った。陰電荷膜に吸着させたウイルスをビーフエクストラクト液で濃縮、誘出した後、QIAGEN Viral Mini Kit を用いて RNA を抽出し、HAV 特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った。

その結果、すべての検体から HAV 遺伝子を増幅することができた。増幅された HAV 配列の系統樹解析を行った結果、フィリピン河川水から検出された HAV 遺伝子はすべて subgenotype IA に分類され、さらに3つのクラスター(S1～S3)に分類することができた。さらに、そのうちの S1 は日本で2010年に流行した IA-2 と同じクラスターに分類された(図5)。以上の結果から、IA-2 に属する株は、フィリピンの HAV と何らかの関連があることが強く示唆された。感染原因については、食材などが疑われたが現在まで明らかになっていない。

以上の解析の結果から、2010年に A 型肝炎が多発した理由の1つとして、従来日本に常在していた株に加え、フィリピン由来の可能性のある株が新たに日本に流入し流行したためであると推定された<sup>6)</sup>。

## 5. おわりに

以上のように、生活排水が多量に流入していると考えられるフィリピンの河川水から、陰電荷膜法を用いて HAV を効率よく濃縮することができ、人検体の収集が困難な状況においても周辺地域における HAV の存在状況について推定することが可能であった。このように陰電荷膜法は環境水試料を対象とした場合でも有効なウイルス濃縮手段であるといえる。

いまから60年前には A 型肝炎常在国であった日本も、上下水道の整備など公衆衛生環境の改善により、現在では世界でも最も A 型肝炎の少ない国の1つになっている。しかしながら現在では抗体を持たない HAV 感受性者が大多数となっており、何らかのきっかけで HAV が日本に流入した場合に A 型肝炎の流行をおこす危険性は、以前と比べむしろ増大していると考えられる。また、重症化しやすい高齢者でも

感受性者が増加していることにも今後は注意を払う必要がある。2010年の日本全国での広域流行はフィリピンなどからの新たな株の流入が原因と考えられ、日本においてもこのような危険が現実のものであることを示している。幸い、A 型肝炎は安全でかつ効果の高いワクチンがすでに実用化されている。今後は感染源や感染経路対策だけでなく、個人の積極的な予防対策、感染症に対する意識の向上が望まれる。特に、A 型肝炎流行地への渡航者、医療従事者、介護従事者、生鮮魚介類を扱う生産者や調理従事者、高齢者などへのワクチン接種を積極的に推奨すべきと思われる。

## 参考文献

- 1) Matsuura, K, Hasegawa S, Nakayama T, Morita O, Uetake H : Viral pollution of the rivers in Toyama city. *Microbiol Immunol* 28 : 575-588, 1984
- 2) 片山浩之, 嶋崎明寛, 大垣真一郎 : 陰電荷膜を用いた酸洗浄・アルカリ誘出によるウイルス濃縮法の開発. *水環境学雑誌* 25 : 469-475, 2002
- 3) 長谷川嘉子, 松本文美絵, 田中千香子, 大内好美, 林 一幸, 澤 英之, 西田直子 : A 型肝炎ウイルスによる食中毒事例—滋賀県. *IASR Vol.27* : p.341-342, 2006年  
<http://idsc.nih.go.jp/iasr/27/322/kj3221.html>
- 4) 新潟市保健所, 新潟市衛生試験所, 新潟県福祉保健部, 新潟県保健環境科学研究所 : A 型肝炎ウイルスによる食中毒事例—新潟市・新潟県. *IASR Vol.27* : p.178, 2006年  
<http://idsc.nih.go.jp/iasr/27/317/pr3171.html>
- 5) Kiyohara T, Sato T, Totsuka A, Miyamura T, Ito T, Yoneyama T : Shifting seroepidemiology of hepatitis A in Japan, 1973-2003. *Microbiol Immunol* 51 : 185-191, 2007
- 6) Ishii K, Kiyohara T, Yoshizaki S, Wakita T, Shimada T, Nakamura N, Nakashima K, Tada Y, Noda M : Epidemiological and genetic analyses of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. *J Clin Virol* 53 : 219-224, 2012



