

図 1. 肝移植後の臨床経過(TK-072): 研究期間全体

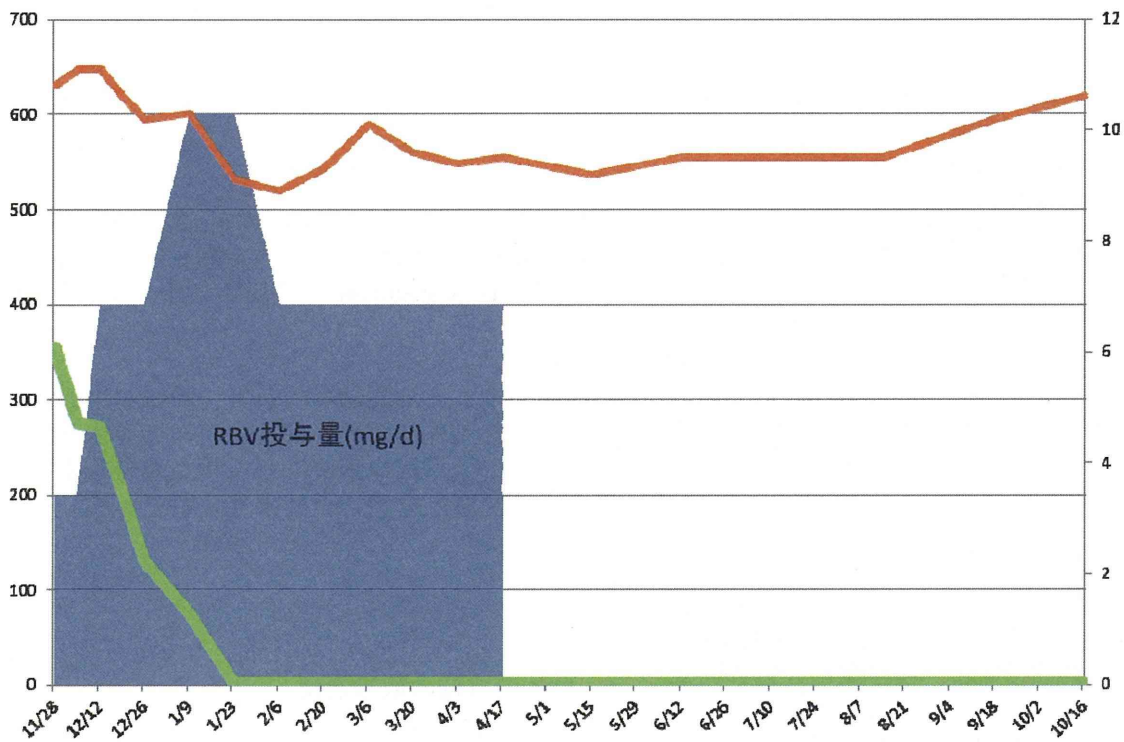


図 2. 肝移植後の臨床経過(TK-072): リバビリン投与

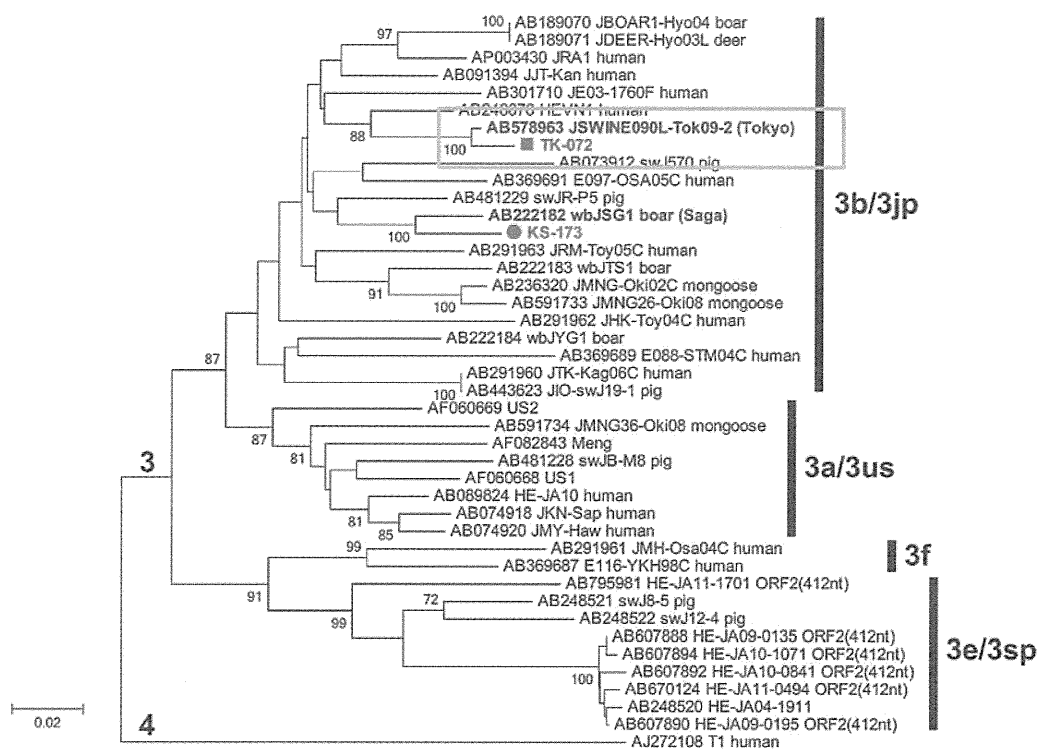


図 3. HEV の分子系統樹: ORF2 領域の 412 塩基長の配列に基づいて作成した結果、TK-072 で検出された HEV と都内の市販豚レバーから分離された HEV との一致率は 98.3%であった。

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26年度分担研究報告書

生体肝移植患者におけるE型肝炎ウイルス感染

研究協力者 (吉住朋晴) (九州大学消化器・総合外科) (診療准教授)

研究要旨：生体肝移植後外来経過観察を行っている203例を用いて生体肝移植後E型肝炎罹患の有無を検討するため、血液中のE型肝炎ウイルス(HEV)抗体(IgA, IgM, IgG)とHEV-RNAの測定を行った。HEV-IgGのみが陽性であったのは(既往感染)8例(3.9%)。1例でHEV-IgG, -IgMさらにHEV-RNAが陽性であった(0.49%)。本症例では、生体肝移植術中及び術後に赤血球濃厚液26単位、新鮮凍結血漿32単位、濃厚血小板40単位が輸血されていた。外来経過観察中の移植後81日目に上記HEV-IgG, -IgM, HEV-RNA陽性が初めて判明したため、retrospectiveに移植直前、移植1, 3, 7, 14日目のHEV抗体及びHEV-RNAを測定した。移植された肝臓からの感染を否定するため、生体ドナーの調査も行った。結果、移植3日目にHEV-RNAが陽性となり、以後HEV-RNAは持続的に陽性であった。生体ドナーからの感染は否定された。日本赤十字血液センターでの調査により、本症例に移植後1日目に投与された濃厚血小板からHEV-RNAが検出された。本症例では移植後117日目と179日目の血液でもHEV抗体、HEV-RNAはともに陽性であり、慢性感染で経過中である。

〈共同研究者〉

池上 徹 (九州大学消化器・総合外科、講師)
 調 憲 (九州大学消化器・総合外科、准教授)

A. 研究目的

当科で施行した生体肝移植症例において、生体肝移植後のE型肝炎罹患の有無を検討した。

B. 研究方法

当科で施行した成人間生体肝移植症例で、外来経過観察を行っている203例。外来にて同意を得た上で採血を施行し、得られた血液は冷凍後に自治医科大学感染・免疫学講座ウイルス学部門(岡本宏明教授)に送付した。同施設にてE型肝炎ウイルス(HEV)抗体(IgA, IgM, IgG)とHEV-RNAの測定を行った。

倫理面への配慮：本研究は九州大学倫理委員会の承認を得た後に行った(許可番号26-37)。得られた血液は、自治医科大学送付の前に連結可能匿名化を行った。

C. 研究結果

203例中、HEV-IgGのみが陽性であったのは(既往感染)8例(3.9%)であった。1例でHEV-IgG, -IgMさらにHEV-RNAが陽性であった(0.49%)。本症例は、非アルコール性脂肪肝炎による肝硬変で生体肝移植を施行。施行された輸血は移植当日が赤血球濃

厚液20単位、新鮮凍結血漿12単位、濃厚血小板20単位。移植後1日目が新鮮凍結血漿16単位、濃厚血小板20単位。移植後2日目に新鮮凍結血漿4単位、9日目に赤血球濃厚液2単位、13日目に赤血球濃厚液4単位を輸血した(表1, 2)。

表1: 輸血の詳細

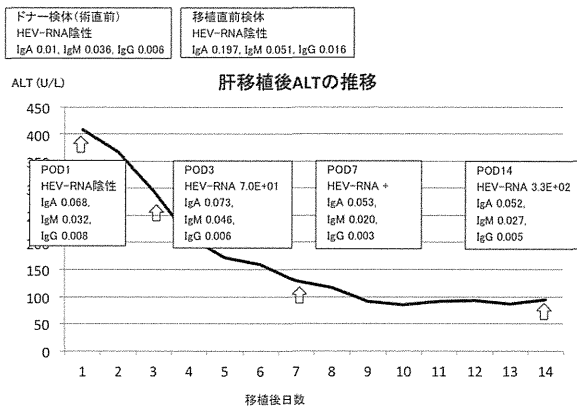
輸血日	種類	単位	ロット番号
手術日	赤血球濃厚液	2単位	5333258575
	赤血球濃厚液	2単位	5642253634
	赤血球濃厚液	2単位	5646255421
	赤血球濃厚液	2単位	5642253633
	赤血球濃厚液	2単位	5155253493
	新鮮凍結血漿	4単位	5033365354
	新鮮凍結血漿	4単位	5033365353
	濃厚血小板	10単位	5621364018
	赤血球濃厚液	2単位	5321250827
	赤血球濃厚液	2単位	5033264997
	赤血球濃厚液	2単位	5510248680
	赤血球濃厚液	2単位	5020264754
	赤血球濃厚液	2単位	5642253614
	新鮮凍結血漿	4単位	5155247562

表2: 輸血の詳細

輸血日	種類	単位	ロット番号
手術日	新鮮凍結血漿	4単位	5033365452
	濃厚血小板	10単位	5020364469
術後1日目	新鮮凍結血漿	4単位	6204356192
	濃厚血小板	10単位	5033368990
	新鮮凍結血漿	4単位	5580359072
	濃厚血小板	10単位	5020364476
	新鮮凍結血漿	4単位	5580359150
術後2日目	新鮮凍結血漿	4単位	5222350235
	新鮮凍結血漿	4単位	5101362480
術後9日目	赤血球濃厚液	2単位	5006268035
術後13日目	赤血球濃厚液	2単位	5112254264
	赤血球濃厚液	2単位	5112254256

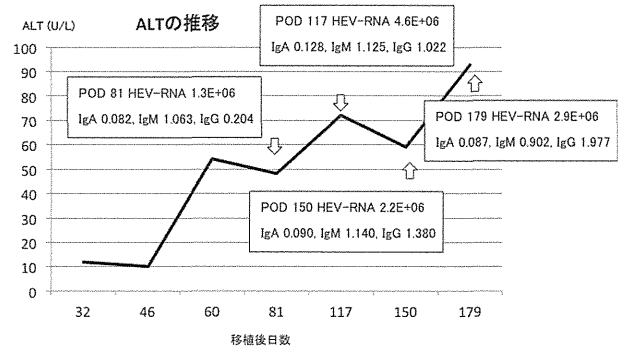
本症例では外来経過観察中の移植後 81 日目に上記 HEV-IgG, -IgM, HEV-RNA 陽性が初めて判明したため、ストックされていた検体を用い、retrospective に移植直前、移植 1, 3, 7, 14 日目の HEV 抗体及び HEV-RNA を測定した。また、移植された肝臓からの感染を否定するため、生体ドナー血液中の HEV 抗体及び HEV-RNA を測定した。その結果、本症例では、移植 3 日目に HEV-RNA が陽性となり、以後 HEV-RNA は持続的に陽性であることが確認された。また、生体ドナーは HEV 抗体、HEV-RNA とともに陰性であった (図 1)。

図 1: 術後経過



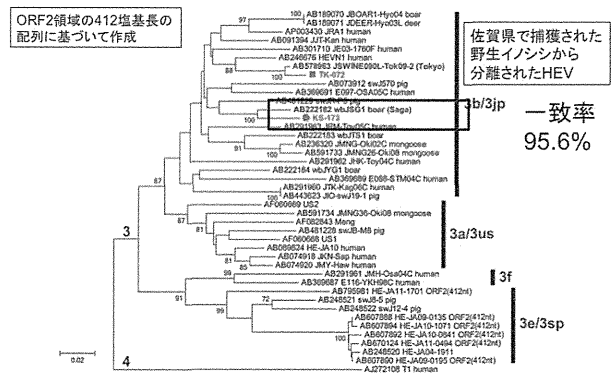
生体肝移植後 1 年間は生肉あるいは生魚の摂取は禁止している。本人への聞き取り調査でも、生肉および生魚の摂取は行われていなかった。このため、本症例では、HEV の経口感染の可能性は、ほぼ否定された。以上から、本症例における HEV 感染は輸血を介したものである可能性が高いと考えられた。福岡県赤十字血液センターでの調査により、本症例に投与された濃厚血小板 (ロット番号 5020364476) から HEV-RNA が検出された。また、本症例株と輸血株の塩基配列の比較を HEV の ORF1 領域 326 塩基長、protein-rich hinge domain (V 領域) 505 塩基長、ORF2 領域 412 塩基長で行った。ORF1 領域では本症例株で 2 カ所、輸血株で 1 カ所塩基の混在が認められたが、混在箇所側の塩基は両者で一致していた。V 領域では 2 カ所で相違が見られた。ORF2 領域は全て一致していた。輸血から得られた HEV は 3 型であった。経時的には本症例から得た移植後 117 日目、150 日目、179 日目の血液でも HEV 抗体、HEV-RNA はともに陽性であり、慢性感染の状態であると考えられた (図 2)。ORF2 領域の 412 塩基長の配列に基づいて作成された本症例から検出された HEV は 3 型で、HEV の分子系統樹から佐賀県で捕獲されたイノシシから分離された HEV と 95.6% の一致率があることが明らかになった。

図 2: 術後経過



九州に分布している HEV 株が感染源となったとして矛盾していないと考えられた (図 3)。

図 3: HEV の分子系統樹



D. 考察

生体肝移植症例の調査により移植後 HEV に感染し、慢性化した症例があることが明らかとなった。本症例では、肝逸脱酵素 (AST/ALT) が移植後 2 ヶ月目から軽度異常で経過している。異常の原因として、HEV 慢性化の可能性が否定できないため、厳密に経過観察を行い、さらに異常値を呈する場合、リバビリンを用いた治療を考慮する必要があると考えられた。

E. 結論

生体肝移植後 HEV 感染し慢性化した症例を経験した。HEV 感染経路は生体肝移植後に投与された輸血 (濃厚血小板) であった。

F. 研究発表

なし

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26年度分担研究報告書

ヒト・動物・食品からのA型及びE型肝炎ウイルス検出と塩基配列解析

研究分担者 新井雅裕 (東芝病院・研究部/消化器内科) (病院長)

研究要旨：

[1] 西アフリカのガンビア共和国に於ける HEV 感染実態調査で、リスク要因としてキリスト教(オッズ比 11.1 倍 vs イスラム教)、農業(4.8 倍 vs その他)、井戸水(2.8 倍 vs 水道水)、養豚歴(5.9 倍 vs 無し)、食豚歴(4.1 倍 vs 無し)が注目された。一方、ガンビアに於ける肝硬変急性増悪の原因が『E on B』であるとの仮説を支持する証拠は得られなかった。[2] 2014 年 4~7 月にネパールのビラトゥナガルで発生した 7000 人規模の HEV 集団感染の感染源は single source であったことが、塩基配列系統解析により示唆された(HEV genotype 1a)。此の集団感染には約 50 人の妊婦が含まれていたが妊婦死亡例は皆無だった(全体では 14 例が死亡)。[3] 本邦希有の HEV 遺伝子型「3f」による E 型肝炎例が、2014 年、埼玉と岐阜で発生した。両例とも海外渡航歴を有しておらず、輸入食品あるいは帰化株からの感染が示唆された。[4] 本年度新規に得られた HEV 株、及び前年度までに部分配列しか決定されていなかった HEV 株の完全長化を試み、総計 100 本の完全長乃至準完全長 HEV ゲノム配列を得た。

〈研究協力者〉

高橋和明 (東芝病院・研究部、主任研究員)
アクバル (東芝病院・研究部、主任研究員)
藤原有希 (東芝病院・研究部、研究員)
矢野満美子(東芝病院・研究部、事務員)
三代俊治 (東芝病院・研究部、部長)
中野達徳 (藤田保健衛生大学)
西垣洋一 (岐阜市民病院)
加藤秀章 (名古屋市立大学)
名越澄子 (埼玉医科大学)
落合香織 (東京北医療センター)
島川祐輔 (エムアールシー・ガンビア) *
宮原麗子 (エムアールシー・ガンビア)
ハール (エムアールシー・ガンビア)
アナンタ (ネパール肝臓財団)

*島川祐輔の現在所属は INSERM

A. 研究目的

感染宿主生物(ヒトと動物)及び其れを取り巻く環境(食品を含む)から A 型及び E 型肝炎ウイルスゲノムを採取し塩基配列を解析することによ

り、両ウイルスの遺伝的多様性に関する理解の深化、感染経路の解明、感染防止対策の立案、重症化リスク予知の精度向上等に役立てることを期す。

B. 研究方法

次項(C. 研究結果及び考察及び結論)で適宜述べる。

倫理面への配慮：臨検体解析の場合、主治医から解析担当者への検体及び臨検情報等の送付乃至受け渡しに際し、被験者氏名のコード化処理が行なわれた。解析担当者から主治医への解析結果フィードバックに際してもコード化された ID が用いられた。デコード(=被験者氏名と解析データの再連結)は主治医のみの責任で行なわれた。

C. 研究結果及び考察及び結論

[1]西アフリカのガンビア共和国に於ける HEV 感染の実態調査

ガンビア(Republic of The Gambia、あるいは単に The Gambia、漢字は岡比亞)はアフリカ西海岸に位置する共和制国家である。イギリス連邦加盟国の一つであることから、当地に於ける医学的

問題は専ら英国の専門家達が管掌するところとなり、夙に 1947 年に Medical Research Council (MRC) の研究所が Gambia に開設され今日に至っている。

2014 年、我々は上記 MRC の virologist Harr Freeya Njai (以下「ハール」) と同所留学中の日本人医師島川祐輔を日本に招き共同研究を実施した。アフリカ諸国の例外に漏れずガンビアに於いても B 型肝炎ウイルス (HBV) が肝疾患の主因であることは既にわかっているため、ハールと島川と我々は、ガンビアの気候風土からして endemic であるに違いない HEV が、acute on chronic の形で慢性肝疾患の臨床像を悪化させる要因になっているという作業仮説を立て、ガンビアの急性増悪期肝硬変症例 30 例から採取した血清検体を用いて此の仮説の検証を試みた。対照として用いた血清検体は、ガンビアの一般住民 n=204 及び代償期肝硬変症例 n=174 である。

全検体について HEV RNA、IgA anti-HEV、及び IgG anti-HEV の検出を試みたが、HEV RNA 陽性は 1 例も無かった。IgA anti-HEV は全体の 1.5% が陽性であったが、群間に有意差は無かった。一方、IgG anti-HEV の陽性率は、急性増悪期肝硬変症例 (33.3%) が一般住民 (13.7%) あるいは代償期肝硬変症例 (19.0%) より有意に高率であったが、年齢及び性の調整後には有意差が消失した。即ち、「HEV の acute-on-chronic 感染がガンビアの肝硬変の急性増悪因子であるとする作業仮説」は立証されなかった。

一方で、ガンビア一般住民の IgG anti-HEV 陽性率と背景因子を対応させた解析からは、Table 1 に示す如く、示唆に富む疫学的知見が得られた。

		No. (total=204)	αHEV IgG (%)	Odds ratios adjusted for age and sex		
				OR	95% CI	P
宗教	イスラム	193	11.4	1.0		<0.001
	キリスト	11	54.6	11.1	2.9-42.6	
職業	無	59	8.5	1.0		0.02
	他	119	12.7	1.1	0.3-3.7	
	農業	26	30.8	4.8	1.3-18.1	
飲料水	水道	149	10.1	1.0		0.02
	井戸	55	23.6	2.8	1.2-6.6	
養豚歴	無	197	12.7	1.0		0.03
	有	7	42.9	5.9	1.2-29.5	
食豚歴	無	186	11.8	1.0		0.02
	有	18	33.3	4.1	1.3-12.8	

Table 1. ガンビアに於ける HEV 既往感染のリスク要因

是即ち、ガンビアに於ける見掛上の HEV 感染リスク要因は、キリスト教/農業/井戸/養豚/食豚だったという成績であるが、結局はガンビアに於いても「豚主犯説」が再現された。

[2] 2014 年 4 月にネパール東部の地方都市ビラトゥナガルで発生した E 型肝炎大流行の現地調査とウイルス株解析

2014 年 4 月の第 3 週に最初の患者がビラトゥナガル市内の病院を受診してから同年 7 月第 2 週に最後の患者が確認されるまで、合計約 7000 人の急性黄疸の患者が発生し 14 人が死亡した。患者の年齢は 13~73 歳、80% が男性であった。患者の中には 50 名の妊婦がいたが、死亡例はゼロだった。

この突然で且つ大規模な急性黄疸の集団発生は、上水道パイプラインの破損による飲料水汚染が原因であると推定された。破損汚染した上水道系を市民と共有する刑務所で 30 人の囚人と 5 人の看守が急性黄疸を発症したことも上記推定を支持した。

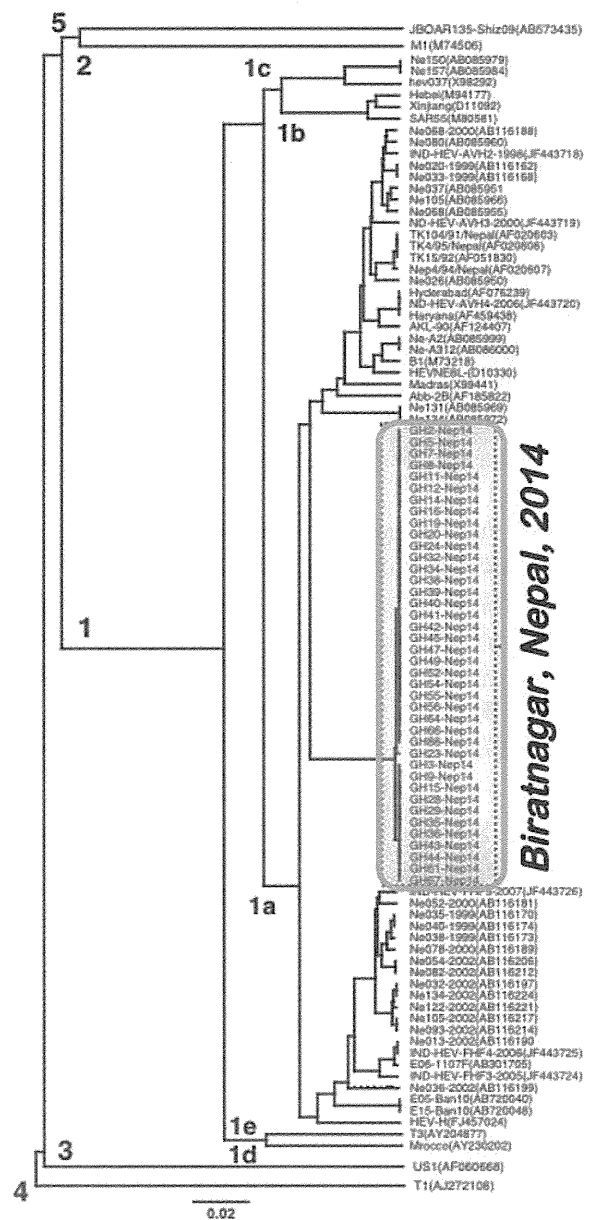


Figure 1. HEV from Biratnagar-Nepal-2014 Epidemic.

我々の共同研究者 Ananta Shrestha (以下「アナンタ」) は、カトマンズからピラトウナガルへ飛び、同市内で発生した患者のうち 48 例から血清を採取した。全例について HAV RNA, HBV DNA, HEV RNA を調べたところ、陽性例は夫々 n=0 (0%)、n=1 (4%)、n=42 (87.5%) であった。(註: HBV DNA 陽性の一例は IgM anti-HBc が陰性だったので、急性黄疸の原因は HBV 以外にあると考えられた)

HEV RNA 陽性検体のうちの 40 本は HEV ORF2 内 412 nt の sequencing に供された (AB986068 ~ AB986107)。Figure 1 に示す如く今次大流行から得られた HEV 配列 40 本は全て genotype 1a に属し、且つ彼等だけから成る単一のクラスターを形成した。即ち今回の流行は単一感染源からのウイルススプレッドであったことが示唆され、上水道破損部位の修復の後に感染拡大が終熄に向かった事実とよく符合した。

[3] HEV genotype 3f の国内感染

ヨーロッパ (特にスペイン~フランス) で頻見される HEV genotype 3f が日本で見つかったのは今年が初めてではなく、2012 年に東京で (もっと前には大阪でも) みつまっているが、其の例には発病前のスペイン渡航歴 (大阪例ではタイへの渡航歴) が有った。これに対し 2014 年に埼玉と岐阜でみつかった genotype 3f 感染症例には海外渡航歴が無く、感染源と感染経路の追究が急がれる。

[4] HEV full-genome sequence 100 本

輸入感染例であれ国内土着株感染例であれ、日本国内で採取された HEV の塩基配列を完全長化する努力を続けてきたなかで、2014 年、遂に 100 本の大台に達した。新規に採れた株の出自等を知る為の参照株として役立ち得るので、御関心の向きは東芝病院研究部の高橋和明へ御一報頂き度い。

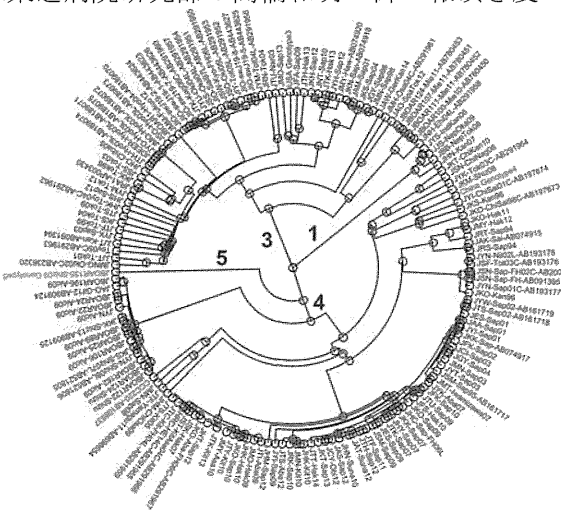


Figure 2. HEV full-genome sequences at hand

D. 研究発表

1. Ananta Shrestha, Thupten K Lama, Sneha Karki, Deepak Raj Sigdel, Utsav Rai, Shyam K Rauniyar, Mamun Al-Mahtab, Kazuaki Takahashi, Masahiro Arai, Sheikh Mohammad Fazle Akbar, Shunji Mishiro. Hepatitis E Epidemic, Biratnagar, Nepal, 2014 [letter]. *Emerg Infect Dis* 2015; 21(Apr): *in press*. http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/4/14-1512_article
2. 渡部直樹, 西垣洋一, 富田栄一, 高橋和明, 中野達徳, 鈴木祐介, 林秀樹, 渡邊諭, 加藤則廣, 内木隆文, 新井雅裕, 三代俊治. 岐阜市近郊で短期間に異なる遺伝子配列を持つ E 型肝炎ウイルス株によって発症した急性 E 型肝炎の 6 例. *肝臓* 2014; 55: 713-716.
3. 梅村真知子, 渡邊豊, 小川浩司, 山本義也, 矢和田敦, 榮浪克也, 長佐古友和, 川村直之, 工藤峰生, 松林桂二, 狩野吉康, 姜貞憲, 水尾仁志, 岡本宏明, 高橋和明, 安倍夏生, 新井雅裕, 三代俊治. 函館地区で発生した E 型急性肝炎に対する臨床的、ウイルス学的、疫学的検討: 函館 4 病院における症例探索から. *肝臓* 2014; 55: 349-359.

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26年度分担研究報告書

国内感染型 E 型肝炎 255 例の分子疫学的・分子ウイルス学的解析

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：E型肝炎の診断や治療の一助とすることを目的として、これまでに当教室で解析を行った全国29都道府県の、国内感染E型肝炎患者255症例について、分子疫学的・分子ウイルス学的特徴を検討した。E型肝炎患者は北日本に多く、関東地方以北に196症例(77%)が集中していた。また、80%が男性で、年齢は57.6±13.2歳であり、中高年の男性患者が多かった。地域ごとの原因HEVの遺伝子型は北海道地方では4型が多く約8割を占めたが、東北地方以南においては3型の方が多かった。AST、ALTおよび総ビリルビンのピーク値はいずれも遺伝子型4型感染患者の方が3型の患者よりも統計学的に有意に高値であり、PT%値が60%および40%以下まで低下する患者の割合およびE型劇症肝炎を発症する患者の割合も4型の方が3型よりも高かった。また、遺伝子型4型HEV感染患者では3型感染患者よりもHEV titerが高く、ウイルス血症の期間が長かった。以上より、4型HEVは3型HEVよりも増殖性が高く、これが4型HEV感染患者の方が臨床的に重症化し易いことと関連していると考えられた。

<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 感染・免疫学講座ウイルス学部門)

A. 研究目的

E型肝炎が稀な輸入感染症とされたのは既に過去の話であり、我が国でも土着のE型肝炎ウイルス(HEV)株が存在し、ブタやイノシシがリザーバーとなり、汚染されたレバーを加熱不十分な状態で喫食することなどによりヒトに感染する人獣共通感染症としてのE型急性肝炎が散発性に発生している。そして患者の一部は重症化・劇症化して不幸な転帰をとることが明らかにされている。現在E型肝炎は四類感染症に分類され、一般臨床の場においても急性肝炎患者に対してはA型、B型およびC型肝炎のみならず、E型肝炎も念頭にいた問診、鑑別診断が求められている。そこで、E型肝炎の診断や治療の一助とすることを目的として、これまでに当教室で解析を行った国内感染E型肝炎症例について、分子疫学的・分子ウイルス学的特徴の検討を行った。

B. 研究方法

(1) 調査対象

1979年から2014年11月までの、全国29都道府県の、国内感染E型肝炎患者255症例を対象とした。

(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

遺伝子型3型HEV感染患者群176症例および4型HEV感染患者群79症例で各種因子をMann-Whitney's U test、Chi-square test、Fisher's exact probability testおよびLogrank testにより比較し、危険率が5%未満の場合に統計学的に有意な差であると判定した。

倫理面への配慮：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。なお、本研究は自治医科大学疫学研究倫理審査委員会の承認(疫 14-82 号)を得て実施した。

C. 研究結果及び考察

(1) 国内感染 E 型肝炎患者の特徴

E 型肝炎患者数は北海道地方が最多の 71 症例 (28%) で、次いで東北地方が 63 症例 (25%)、関東地方が 62 症例 (24%) であった。解析した患者 255 症例の居住地は全国 29 都道府県に亘っているが、中部地方以北では 23 県中 20 県 (87%) であったのに対して、近畿地方以西では 24 県中 9 県 (38%) のみであった。また、患者の性別は 80% が男性で、年齢は 57.6 ± 13.2 歳 (平均値 \pm 標準偏差) であった。以上より、これまでも報告されているとおり、E 型肝炎患者は北日本に多く発生していること、中高年の男性患者が多いことが確認された。これは一般健常人での HEV 感染に関する全国調査 (J Med Virol 82:271-281, 2010) において、HEV 感染既往を示す IgG クラス HEV 抗体の陽性率が、中部地方以北において近畿地方以南よりも統計学的に有意に高いこと、男性において女性より有意に高いこと、年齢層が高いほど上昇することと一致している。E 型肝炎の発生に季節性は認められなかった。また、全 255 症例中 23 症例 (9%) は急性肝炎重症型、9 症例 (4%) は劇症肝炎と診断された。

地域ごとの原因 HEV の遺伝子型の分布を比較すると、北海道地方では 4 型が 71 症例中 56 症例 (79%) で多かったが、東北地方以南においては 3 型の方が多かった。

(2) 遺伝子型 3 型および 4 型 HEV 感染患者における臨床的特徴の比較

遺伝子型 3 型 HEV 感染患者群 176 症例および 4 型 HEV 感染患者群 79 症例で年齢および男女の割合に有意な差は認められなかった。一方で、AST、ALT および総ビリルビンのピーク値はいずれも遺伝子型 4 型感染患者の方が 3 型の患者よりも統計学的に有意に高値であり、PT% 値が 60% および 40% 以下まで低下する患者の割合も 4 型感染患者の方が有意に高かった。また、E 型劇症肝炎を発症する患者の割合も 4 型の方が 3 型よりも高かった。これらは 4 型 HEV の感染患者の方が 3 型の患者よりも臨床的に重症化しやすいことを示している。

(3) 遺伝子型 3 型および 4 型 HEV 感染患者にお

けるウイルス学的特徴の比較

発症後 10 日以内の血清中の HEV RNA titer は 4 型 HEV の感染患者の方が 3 型感染患者よりも高値であった。また、末梢血中の HEV RNA 陽性持続期間は 4 型 HEV の感染患者の方が 3 型感染患者よりも長かった。以上より、遺伝子型によるウイルス増殖性の差が臨床的重症度の差に関連していると推察された。

D. 結論

国内感染 E 型肝炎の原因 HEV の遺伝子型は 4 型および 3 型であり、北海道地方では 4 型が多く、東北地方以南では 3 型が多かった。遺伝子型 4 型 HEV 感染患者の方が 3 型患者よりも臨床的に重症化し易いことが明らかになった。4 型 HEV 感染患者では 3 型感染患者よりも HEV RNA titer が高く、ウイルス血症の期間が長いことより、4 型 HEV の増殖性の高さが重症化と関連していると考えられた。

E. 研究発表

1. Jirintai S, Tanggis, Mulyanto, Suparyatmo JB, Takahashi M, Kobayashi T, Nagashima S, Nishizawa T, Okamoto H: Rat hepatitis E virus derived from wild rats (*Rattus rattus*) propagates efficiently in human hepatoma cell lines. *Virus Res* 185: 92-102, 2014
2. Nagashima S, Jirintai S, Takahashi M, Kobayashi T, Tanggis, Nishizawa T, Kouki T, Yashiro T, Okamoto H: Hepatitis E virus egress depends on the exosomal pathway, with secretory exosomes derived from multivesicular bodies. *J Gen Virol* 95(10), 2166-2175, 2014
3. 藤本信乃、石田聡、中野達徳、北川良子、樋口国博、泉道博、中川直樹、相川竜一、足立幸彦、高橋雅春、竹井謙之、岡本宏明: 三重県で発生した野生動物摂食歴のない 4 型 E 型肝炎ウイルス愛知静岡株による急性 E 型肝炎の 1 例 *肝臓* 55(7): 405-408, 2014

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26年度分担研究報告書

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

研究分担者 李天成

所属機関・部署・職位 国立感染症研究所 ウイルス第二部 李天成

研究要旨：フェレットE型肝炎ウイルス(Ferret HEV)は最近オランダのフェレットから検出された新型HEVであるが、遺伝子配列以外のFerret HEVに関する情報がほとんどない。本研究では、本ウイルスの疫学調査、病原性と抗原性の解析を目的とし、Ferret HEVの構造蛋白を組換えバキュロウイルスで発現し、ウイルス様粒子の作製に成功した。ferret HEVはG1, G3, G4およびrat HEVとの交叉反応があるにもかかわらず、G3 HEVに対する中和活性を示さなかったことから、G1-4 HEVと血清型が異なる可能性が示唆された。Ferret HEV-LPsを用いて抗体検出ELISA法を樹立した。抗体および遺伝子検査の結果は実験用フェレットだけではなく、ペットとして飼われているフェレットにもferret HEV感染が広がっていることが示唆された。実験動物やペットなどの衛生管理に当たってはferret HEVの感染を十分考慮する必要がある。

<研究協力者>

網 康至 (国立感染症研究所・動物管理室主任研究官)

須崎百合子 (国立感染症研究所・非常勤職員)

片岡紀代 (国立感染症研究所・感染病理部・研究員)

吉崎佐矢香 (国立感染症研究所・ウイルス第二部・実験補助員)

脇田隆字 (国立感染症研究所・ウイルス第二部・部長)

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。これまでヒトから4つの遺伝子型の異なるHEVが同定されているが、近年、ヒト以外の動物からも新しいHEVが続々発見され人畜共通感染症として注目されている。フェレ

ットE型肝炎ウイルス(Ferret HEV)は最近オランダのフェレットから検出された新型HEVであるが、遺伝子配列以外のFerret HEVに関する情報がほとんどない。本研究では、本ウイルスの疫学調査、病原性と抗原性の解析を目的とし、Ferret HEVの構造蛋白を組換えバキュロウイルスで発現し、ウイルス様粒子の作製をし、診断法の樹立を試みとともにFerret HEVの疫学調査を行った。

B. 研究方法

全長およびNあるいはC末端、さらに両端を欠失したferret HEV ORF2をRT-PCR法で増幅した。定法どおり作製した組換えバキュロウイルスを昆虫細胞Tn5細胞に感染させ、構造蛋白を発現してウイルス様粒子(ferret HEV-LPs)を作製した。ferret HEV-LPsを用いて抗体検出ELISA法を樹立し、ferret HEVの抗原性を既知のG1, G3, G4

および rat HEV の抗原性と比較した。また、実験用フェレットおよびペットとして飼われているフェレットサンプルを採集し、ferret HEV に関する疫学調査を行った。

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

全長 ferret HEV ORF2 を持つ組換えバキュロウイルスに感染された昆虫細胞から構造蛋白が検出されたが、ウイルス様粒子を確認することができなかった。ただし、N 末端から 112aa、C 末端から 47aa を欠失した ferret HEV ORF2 を持つ組換えバキュロウイルスを感染した Tn5 細胞培養上清から直径約 24nm の ferret HEV-LPs を大量に得た。抗 ferret HEV-LPs 抗体は G1, G3, G4, rat HEV との交叉反応を示したが、G3 HEV の PLC/PRF/5 細胞への感染を中和しなかった。また、実験用フェレットから ferret HEV-LPs を抗原とした抗体検出 ELISA 法によって抗 ferret HEV IgG および IgM 抗体が検出された。さらに日本国内でペットとして飼われているフェレットからも遺伝子配列が異なるウイルスが検出された。

D. 考察

Ferret HEV-LPs の作製に成功した。ferret HEV は G1, G3, G4 および rat HEV との交叉反応があるにも関わらず、G3 HEV に対する中和活性を示さなかったことから、G1-4 HEV と血清型が異なる可能性が示唆された。また、実験用フェレットでは ferret HEV 感染が稀ではないし、フェレットの感染がペットフェレットにも確認された。実験動物やペットの衛生管理に当たっては

ferret HEV の感染を十分考慮する必要がある。

E. 結論

Ferret HEV は従来ヒト由来 HEV と血清型が異なるウイルスである。Ferret HEV の感染が地域と関係なくフェレットの間に広がっている。ヒトや動物などにおける ferret HEV に対する感受性を究明するのは急務である。

F. 研究発表

1. 学会発表

1) 李天成、網康至、須崎百合子、浅沼秀樹、岸田典子、白倉雅之、武田直和、脇田隆字。フェレット E 型肝炎ウイルスの病原性と E 型肝炎動物モデル。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月横浜。

2) 塩田智之、李天成、吉崎佐矢香、西村順裕、清水博之、下島昌幸、西條政幸、脇田隆字、石井孝司。E 型肝炎ウイルス感染性規定因子候補に関する研究。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月横浜。

3) 李天成、米満研三、寺田豊、片岡紀代、網康至、須崎百合子、岸田典子、白倉雅之、浅沼秀樹、前田健、武田直和、脇田隆字、Ferret HEV 抗体検出系の樹立およびその疫学調査、第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月 北海道

4) Reimar Johne, Tingting Yang, Sayaka Yoshizaki, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Koji Ishii, Kei Haga, Tomofumi Nakamura, Susumu Ochiai, Wakita Takaji, Tian-Cheng Li. Establishment of a reverse genetics system for rat hepatitis E virus. 25th

Annual Meeting of the Society for Virology, 18-21 March 2015 in Bochum, Germany.

5) Tian-Cheng Li, Yang T, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Kishida N, Shirakura M, Imai M, Asanuma H, Takeda N, Wakita T. Characterization of Self-Assembled Virus-Like Particles of Ferret Hepatitis E Virus Generated by Recombinant Baculoviruses. International Union of Microbiological Societies (IUMS 2014) July 27-August 1, 2014, Canada.

6) Tian-Cheng Li, Kaori Ochiai, Tingting Yang, Sayaka Yoshizaki, Koji Ishii, Naokazu Takeda and Takaji Wakita. Characterization of a case of hepatitis E that imported from Spain. The 10st Asia Pacific Travel Health Conference (APTHC 2014 Conference). May 8-10, 2014. Vietnam.

7) Tian-Cheng Li, Tingting Yang, Sayaka Yoshizaki, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Koji Ishii, Kei Haga, Tomofumi Nakamura, Susumu Ochiai, Wakita Takaji, . Reimar Johne, Characterization of Self-Assembled Virus-Like Particles of Ferret Hepatitis E Virus Generated by Recombinant Baculoviruses. The 10th China-Japan International Conference of Virology. August 24-27, 2014. Changchun China.

2. 論文発表

1) Tian-Cheng Li, Yang T, Yoshizaki S, Ami

Y, Suzaki Y, Ishii K, Haga K, Nakamura T, Ochiai S, Takaji W, Johne R. Construction and characterization of an infectious cDNA clone of rat hepatitis E virus. J Gen Virol. 2015 Jan 29.

2) Tian-Cheng Li, Sayaka Yoshizaki, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Tingting Yang, Naokazu Takeda, and Wakita Takaji. Monkeys and rats are not susceptible to ferret hepatitis E virus infection. Intervirology. 2015, *In press*.

3) Liu X, Saito M, Sayama Y, Suzuki E, Malbas FF, Galang HO, Furuse Y, Saito M, Tian-Cheng Li, Suzuki A, Oshitani H. Seroprevalence and molecular characteristics of hepatitis E virus in household-raised pig population in Philippines. BMC Vet Res. 2015 Jan 27;11(1):11.

4) Tian-Cheng Li, Kenzo Yonemitsu, Yutaka Terada, Naokazu Takeda, Wakita Takaji and Ken Maeda. Ferret hepatitis E virus infection in Japan. JJID 2015. 68.1.

5) Shiota T, Tian-Cheng Li, Yoshizaki S, Kato T, Wakita T, Ishii K. Establishment of Hepatitis E virus infection-permissive and -nonpermissive human hepatoma PLC/PRF/5, subclones. Microbiol Immunol. 2014 Dec 10.

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. 2014.20
(4), 709-712.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請：無し
2. 実用新案登録：無し
3. その他：

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26年度分担研究報告書

E型肝炎ウイルス遺伝子における5'非翻訳領域の構造と機能の解析

研究協力者 小林富成 自治医科大学医学部 感染・免疫学講座 ウイルス学部門 助教
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)は人獣共通感染症であるE型肝炎の原因となるRNAウイルスである。本研究は、申請者らが確立したHEVの感染培養系と無細胞タンパク質翻訳系を用いて、未だ解明されていないHEVの複製機構に影響する5'非翻訳領域の変異を見出し、5'非翻訳領域のHEV増殖における機能を明らかにすることで、E型肝炎撲滅に向けた研究基盤の構築を目的とした。変異導入cDNAクローンに由来する完全長RNAをPLC/PRF/5細胞にtransfectし、増殖効率への影響を検討した結果、5'UTRのステム構造、バルジ構造のいずれかの構造が欠けてもHEVの増殖が抑制されたことから、5'UTRの2次構造がHEVの増殖に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、構造だけではなく塩基配列も増殖の効率に影響していることが示唆された。

<共同研究者>

高橋雅春、長嶋茂雄、吉林台、西澤勉(自治医科大学医学部 感染・免疫学講座 ウイルス学部門)

A. 研究目的

E型肝炎ウイルス(HEV)はE型肝炎の原因となる1本鎖(+鎖)RNAウイルスである。HEVのゲノムRNAの5'末端には25塩基からなる非翻訳領域(UTR)が存在し、3塩基対のステム構造(nt 1-3: nt 22-24)、6塩基対のステム構造(nt 4-9: nt 14-19)、4塩基対のループ構造(nt 10-13)、2塩基のバルジ構造(nt 20-21)からなる二次構造を形成していると予測されているが、その機能は未だ不明である。本研究は、5'UTRに変異を導入し、それぞれの変異がHEVの増殖に与える影響を解析することにより、HEVの増殖における5'UTRの機能を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

HEV感染性cDNAクローン(pJE03-1760F)を用いて5'UTRの構造ごとに塩基配列を置換・欠損させて、塩基対や二次構造を壊した変異体、または塩基対や二次構造を保持させたまま塩基を置換した変異体を構築した。変異体の増殖効率はリアルタイムRT-PCR法で解析した。また、A549細胞を用いて変異体の子ウイルスの感染性と増殖効率を解析した。さらに、変異体のウイルスタンパク質

(ORF2)の細胞内発現レベルをIFA法により解析した。

倫理面への配慮:野生型および感染性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が侵害されることは無く、人権上の問題は生じない。

なお、本研究における遺伝子組換え実験は自治医科大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認(許可番号:H26-76)および文部科学大臣の確認(24受文科振第2658号)を得て行った。

C. 研究結果

5'UTRのほぼ全長(nt 1-22)を欠く変異体は増殖しなかった。そこで、6塩基対のステム構造の塩基配列をそれぞれ相補的な配列に置換し、塩基対を保持した変異体を作成したところ、野生型と同等の増殖効率を示した。一方、ステム構造の6塩基対のペアをすべて壊した変異体は増殖しなかった。さらに、6塩基対のステム構造を維持したまま塩基配列を置換し、GCペア数を変えた変異体を作成した。GCペアが4つの野生型と比較すると、GCペアが3つの変異体は増殖効率が1/6に、GCペアが2つの変異体は1/20に低下した。6塩基対

を全て GC ペアにした変異体は予想に反し、野生株以上の増殖効率を示すことはなかった。次に、2塩基ずつ変えて塩基対を形成できないようにした変異体を6種類構築した。中央の2塩基対を置換した変異体では増殖は認められず、他の変異体でも増殖効率は明らかに低下した。ループ構造では塩基配列を置換しただけの変異体は野生型と同等の増殖効率を示したが、構成する4塩基をすべて欠損させた変異体は増殖効率が1/100~1/500に減少した。バルジ構造の2塩基を欠損させた変異体は増殖しなかった。3塩基対のステム構造を変異させると、野生型に比べて増殖効率は1/20~1/40に減少した。変異体のウイルスタンパク質(ORF2)の細胞内発現レベルをIFA法により定量的に検討した結果、培養上清中のHEV RNA titerとほぼパラレルな関係にあることが分かった。次に、増殖が確認された変異体のウイルスをA549細胞に接種し、感染性と増殖効率を解析したところ、これらの変異体はいずれも感染性を有し、増殖効率についても上記RNA transfection実験で得られた結果が再現された。

D. 考察

5' UTRのステム構造を維持したままGCペア数を変化させるとHEVの増殖効率が低下したことから、野生株が保有している5' UTRの構造及び塩基配列がHEVにとって最も適しているものと考えられた。

5' UTRのステム構造やバルジ構造を壊して、ウイルスが増殖しなかった変異体において、無細胞タンパク質合成系を用いて、変異体の翻訳活性を解析したところ、ほぼ全長(nt 1-22)を欠いた変異体を除く変異体でウイルスタンパク質の発現が確認されたことから、5' UTRの二次構造は翻訳以降の過程でウイルスの複製に関与していると考えられた。

E. 結論

5' UTRのステム構造、バルジ構造のいずれかが欠けてもHEVの増殖が抑制されたことから、5' UTRの二次構造がHEVの増殖効率に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、構造だけではなく塩基配列も増殖の効率に影響しており、ステム構造の中央の2つのGCペアがウイルスの複製において特に重要な役割を果たしていることが示唆された。

F. 研究発表

学会発表

1. 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5'非翻訳領域におけるステム構造変異の増殖効率への影響. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月, 横浜.
2. 長嶋茂雄、吉林台、小林富成、唐吉思、高橋雅春、西澤勉、岡本宏明. E型肝炎ウイルスの細胞侵入機構の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月, 横浜.
3. 唐吉思、吉林台、高橋雅春、長嶋茂雄、小林富成、西澤勉、岡本宏明. ウサギE型肝炎ウイルスの培養細胞への馴化に伴うゲノム変異の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月, 横浜.

論文発表

1. Jirintai S, Tanggis, Mulyanto, Suparyatmo JB, Takahashi M, Kobayashi T, Nagashima S, Nishizawa T, Okamoto H. Rat hepatitis E virus derived from wild rats (*Rattus rattus*) propagates efficiently in human hepatoma cell lines. *Virus Res.* 185: 92-102, 2014.
2. Nagashima S, Jirintai S, Takahashi M, Kobayashi T, Tanggis, Nishizawa T, Kouki T, Yashiro T, Okamoto H. Hepatitis E virus egress depends on the exosomal pathway, with secretory exosomes derived from multivesicular bodies. *J Gen Virol.* 95: 2166-2177, 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26年度分担研究報告書

E型肝炎ウイルスの細胞侵入機構の解析

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)はノンエンベロープウイルスでありながら、培養上清および血清由来のHEV粒子の表面には、ウイルスのORF3蛋白質ならびに宿主細胞のエンドソームに由来する膜成分が存在している。さらに、これらのHEV粒子は回復期血清の存在下でも培養細胞への感染性を有していることを明らかにしてきた。本研究では、異なる粒子形態をとるHEVの細胞侵入機構を解析した。クラスリン依存性エンドサイトーシスを阻害した結果、膜の有無に関わらず細胞内へのウイルスの侵入効率が低下した。また、これらのエンドサイトーシスは粒子形態に関わらず dynamin ならびにメンブレンコレステロールが重要であることが明らかとなった。さらに、HEVの細胞内侵入は、エンドソーム内の酸性pH依存的事であることが明らかとなったが、その依存性は膜に覆われたウイルス粒子でより強く、膜に覆われていない粒子では、pHに依存しない別の機構の存在が示唆された。

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、糞便中に排泄されたウイルス粒子は、エンベロープに覆われていない。我々は、培養上清および血清由来のHEV粒子の表面には、宿主細胞のエンドソームに由来する膜成分が存在することを見出した。このことから、HEVは生体内では2つの異なる粒子形態をとることが明らかとなった。さらに、これらのHEV粒子は共に培養細胞への感染性を有していることが明らかとなっている。しかし、HEVの細胞侵入機構は解明されておらず、血清中や培養上清中のHEV粒子が何故、糞便中のHEV粒子と同等の感染性を有するのかが分かっていない。そこで、本研究では異なる粒子形態をとるHEVの細胞侵入機構を解析した。

B. 研究方法

JE03-1760F株(genotype 3)を接種したPLC/PRF/5細胞の培養上清を膜に覆われたHEVとして用いた。膜に覆われていないHEV粒子は、培養上清由来のHEV粒子をデオキシコール酸ナトリウムとトリプシンで処理し、粒子表面の膜成分およびORF3蛋白質を除去することにより作製した。

ウイルスの細胞侵入阻害剤として、sucrose, genistein, 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride (EIPA), wortmannin, methyl- β -cyclodextrin (M β CD),

dynasore, bafilomycin A1, ammonium chlorideを用いた。これらの薬剤でPLC/PRF/5細胞を前処理した後、粒子形態の異なるウイルスを接種し、4日後の細胞内のHEV RNA量をリアルタイムRT-PCR法を用いて測定することによりウイルスの細胞侵入効率を解析した。また、HEVの細胞内侵入におけるclathrin heavy chain (CHC), caveolin-1 (Cav-1), VAMPase, dynamin 2 (DNM2)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量を測定することにより検討した。

倫理面への配慮:野生型HEV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なく、人権上の問題は生じない。

C. 研究結果

1. 薬剤によりエンドサイトーシスを阻害した細胞でのHEVの細胞侵入効率

エンドサイトーシスを阻害する薬剤を用いて、HEVの細胞侵入への影響を解析した。用いた薬剤は、クラスリン依存性エンドサイトーシスを阻害するsucrose、カベオラ依存性エンドサイトーシスを阻害するgenistein、マクロピノサイトーシスを

阻害する EIPA、マクロピノサイトーシスとファゴサイトーシスを阻害する wortmannin である。これらの薬剤で細胞を処理した後、粒子形態の異なる 2 種類のウイルスを接種し、4 日後の細胞内の HEV RNA を定量した。解析の結果、sucrose で処理をした細胞内の HEV RNA は、コントロールと比較すると、膜の有無に関わらず、薬剤濃度依存的に減少することが明らかとなった。一方、genistein で処理をした細胞では、粒子形態に関わらず細胞内の HEV RNA 量に違いは認められなかった。同様に、EIPA、wortmannin で処理をした細胞においても、細胞内の HEV RNA 量はコントロールと同程度であった。また、薬剤の細胞毒性を MTS assay 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、粒子形態の違いに関わらず、HEV の細胞内侵入にはクラスリン依存性のエンドサイトーシスが関与していることが示唆された。また、マクロピノサイトーシスおよびファゴサイトーシスは、HEV の細胞侵入に関与していないことが明らかとなった。

2. CHC または Cav-1 に対する siRNA をトランスフェクトした細胞での HEV の細胞侵入効率

HEV の細胞侵入には、クラスリン依存性のエンドサイトーシスが関与していることが示唆された。そこで、HEV の細胞内侵入におけるクラスリン依存性エンドサイトーシスの関与を明らかにするために、siRNA を用いて CHC または Cav-1 をノックダウンし、ウイルスの侵入効率を解析した。

CHC, Cav-1 に対する siRNA (siCHC, siCav-1) 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、粒子形態の異なる HEV を感染させた。そして、感染 10 日目までの培養上清中の HEV RNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。その結果、Cav-1 をノックダウンした細胞での HEV の増殖は、膜の有無に関わらず negative control と同程度であり、ウイルスの増殖に影響は認められなかった。一方、CHC をノックダウンした細胞では、HEV の粒子形態に関わらず negative control を 100% とすると、感染 10 日目の培養上清中では 3% 前後とウイルス増殖効率の著しい低下が認められた。また、ウイルス感染細胞に CHC に対する siRNA をトランスフェクトすることにより、ウイルスの放出ならびに RNA 複製への影響を検討したが、影響は認められなかった。

以上の結果から、HEV の細胞内侵入には、膜の有無に関わらず、クラスリン依存性のエンドサイトーシスが関与していることが明らかとなった。

また、HEV の細胞内への侵入にはカベオリンは必要ではなく、カベオラ依存性のエンドサイトーシスは関与していないことが示された。

3. HEV の細胞内侵入における dynamin の重要性

次に、HEV の細胞内侵入における dynamin (エンドサイトーシスの小胞分離に機能する酵素) の重要性について解析を行った。Dynamin の活性を阻害する薬剤である dynasore を用いて、dynamin 依存性なエンドサイトーシスを阻害した細胞にウイルスを接種した結果、細胞内の HEV RNA は、コントロールと比較すると、膜の有無に関わらず薬剤濃度依存的に減少することが明らかとなった。同様に、DNM2 に対する siRNA (siDNM2) を用いて dynamin 依存性なエンドサイトーシスを阻害した細胞においても、HEV の粒子形態に関わらず、negative control を 100% とすると、感染 10 日目の培養上清中では 3% 前後とウイルス増殖効率の著しい低下が認められた。

以上の結果から、HEV は膜の有無に関わらず、dynamin 依存性なエンドサイトーシスにより細胞内に侵入することが明らかとなった。

4. HEV の細胞内への侵入におけるメンブレンコレステロールの必要性

ウイルスの細胞内侵入には、細胞表面のコレステロールが必要であることが報告されている。そこで、M β CD を用いて細胞表面のコレステロールを除去した細胞にウイルスを接種し、HEV の細胞内侵入におけるメンブレンコレステロールの必要性を検討した。解析の結果、M β CD で処理をした細胞内の HEV RNA は、コントロールと比較すると、膜の有無に関わらず、薬剤濃度依存的に減少することが明らかとなった。また、薬剤処理をした細胞に外来性のコレステロールを添加して感染を行った結果、HEV の細胞侵入効率が上昇した。

以上の結果から、HEV の細胞内侵入には、膜の有無に関わらず、メンブレンコレステロールが必要であることが明らかとなった。

5. HEV の細胞内侵入における酸性 pH の依存性

最後に、HEV の細胞内侵入における酸性 pH の依存性について検討を行った。Bafilomycin A1 または ammonium chloride を用いて、エンドソーム内の酸性化を阻害した細胞にウイルスを接種した結果、細胞内の HEV RNA は、コントロールと比較すると、薬剤濃度依存的に減少した。また、細胞侵入効率の阻害は、膜に覆われたウイルス粒子により強く認められた。同様に、VATPase に対する siRNA (siVATPase) を用いてエンドソームの酸性

化を阻害した細胞においても、膜に覆われたウイルス粒子では、negative control を 100% とすると、感染 10 日目の培養上清中では 3% とウイルス増殖効率の著しい低下が認められた。一方、膜に覆われていない HEV 粒子においても、ウイルス増殖効率の低下が認められたが、膜に覆われた粒子と比較すると 23.4% と高い増殖効率を示した。

以上の結果から、HEV の細胞内侵入は、エンドソーム内の酸性 pH 依存性であることが明らかとなった。また、pH の依存性は膜に覆われた粒子でより強い傾向を示し、膜に覆われていない粒子では、pH に依存しない別の機構の存在が示唆された。

D. 考察

本研究により、HEV の細胞内侵入には粒子表面の膜の有無に関わらず、クラスリン依存性のエンドサイトーシスが関与していることが明らかとなった。また、HEV の細胞内への侵入には、メンブレンコレステロール、dynamamin が重要であり、エンドソーム内の酸性 pH 依存性であることが示された。今回の解析において、HEV の粒子形態による侵入機構の相違は、酸性 pH の依存性においてのみ認められた。これらの相違は、細胞内に侵入したウイルス粒子の脱殻過程にあると考えられ、膜に覆われていない HEV 粒子では、酸性 pH に依存しない別の機構により細胞質内にゲノム RNA が放出されていることが示唆された。

ウイルスと受容体との結合にはウイルスの粒子構造が大きく影響している。最近得られた知見として、siRNA を用いて HEV のレセプター候補蛋白質をノックダウンした細胞に粒子形態の異なる HEV を接種した結果、膜に覆われていない粒子ではウイルスの増殖に影響は認められなかったが、膜に覆われた HEV 粒子において、ウイルスの増殖効率が低下することを見出した。このことから、膜に覆われた HEV 粒子と膜に覆われていない HEV 粒子では、利用するレセプター分子が異なることが示唆された。今後は、より詳細に HEV の細胞侵入に関与するレセプターについて解析を進める予定である。

感染の初期過程は、それぞれのウイルスに固有の宿主域や標的組織を決定するために重要な役割を果たしている。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 の感染初期過程が明らかになれば、抗ウイルス剤の開発など特異的な治療法の確立に向けた新たな研究基盤を構築できるものと考えられる。また、宿主細胞との相互作用についての理解の深化により、有効性の高い HEV ワクチンの開発に資することが期待される。

E. 結論

ノンエンベロープ様の HEV 粒子とエンベロープウイルス様の HEV 粒子は、どちらも受容体を介したクラスリン依存性エンドサイトーシスにより、宿主細胞に侵入することが明らかとなった。また、これらのエンドサイトーシスは膜の有無に関わらず、dynamamin ならびにメンブレンコレステロールが重要であることが示された。さらに、HEV の細胞内侵入は、エンドソーム内の酸性 pH 依存性であることが明らかとなったが、その依存性は膜に覆われたウイルス粒子で強く、膜に覆われていない粒子では、pH に依存しない別の機構の存在が示唆された。

F. 研究発表

学会発表

1. 長嶋茂雄、吉林台、小林富成、唐吉思、高橋雅春、西澤勉、岡本宏明. E 型肝炎ウイルスの細胞侵入機構の解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 2014 年 11 月, 横浜.
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 5' 非翻訳領域におけるステム構造変異の増殖効率への影響. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 2014 年 11 月, 横浜.
3. 唐吉思、吉林台、高橋雅春、長嶋茂雄、小林富成、西澤勉、岡本宏明. ウサギ E 型肝炎ウイルスの培養細胞への馴化に伴うゲノム変異の解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 2014 年 11 月, 横浜.

論文発表

1. Jirintai S, Tanggis, Mulyanto, Suparyatmo JB, Takahashi M, Kobayashi T, Nagashima S, Nishizawa T, Okamoto H. Rat hepatitis E virus derived from wild rats (*Rattus rattus*) propagates efficiently in human hepatoma cell lines. *Virus Res.* 185: 92-102, 2014.
2. Nagashima S, Jirintai S, Takahashi M, Kobayashi T, Tanggis, Nishizawa T, Kouki T, Yashiro T, Okamoto H. Hepatitis E virus egress depends on the exosomal pathway, with secretory exosomes derived from multivesicular bodies. *J Gen Virol.* 95: 2166-2177, 2014.

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 26 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
Jiang X, <u>Kanda T</u> , Wu S, Nakamoto S, Saito K, <u>Shirasawa H</u> , <u>Kiyohara T</u> , <u>Ishii</u> <u>K</u> , <u>Wakita T</u> , <u>Okamoto H</u> , <u>Yokosuka O</u>	Suppression of La antigen exerts potential antiviral effects against hepatitis A virus	PLoS One	9(7)	e10199 3	2014
Jiang X, <u>Kanda T</u> , Nakamoto S, Saito K, Nakamura M, Wu S, Haga Y, Sasaki R, Sakamoto N, <u>Shirasawa H</u> , <u>Okamoto H</u> , <u>Yokosuka O</u>	The JAK2 inhibitor AZD1480 inhibits hepatitis A virus replication in Huh7 cells	Biochemical and Biophysical Research Communications	DOI: 10.1016/j.bbrc.201 5.02.058. http://ac.els-cdn.co m/S0006291X150 02867/1-s2.0-S000 6291X15002867 [Epub ahead of print]		In press
Mulyanto, Wibawa ID, Suparyatmo JB, Amirudin R, Ohnishi H, <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	159(5)	935-45	2014
Watanabe S, <u>Isoda</u> <u>N</u> , Ohtake T, Hirosawa T, Morimoto N, Aoki K, Ohnishi H, <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	44(3)	270-9	2014
<u>Suzuki K</u> , <u>Kataoka</u> <u>K</u> , <u>Miyamoto Y</u> , <u>Miyasaka A</u> , <u>Kumagai I</u> , <u>Takikawa Y</u> , <u>Takahashi M</u> , <u>Okamoto H</u>	Clinical and molecular analyses of sporadic acute hepatitis A and E and the specific viral genotypes isolated in Iwate and three neighboring prefectures in the northern part of	Hepatology Research	DOI: 10.1111/hepr.1240 6 http://onlinelibrary .wiley.com/doi/10. 1111/hepr.12406/e pdf [Epub ahead of print]		In press