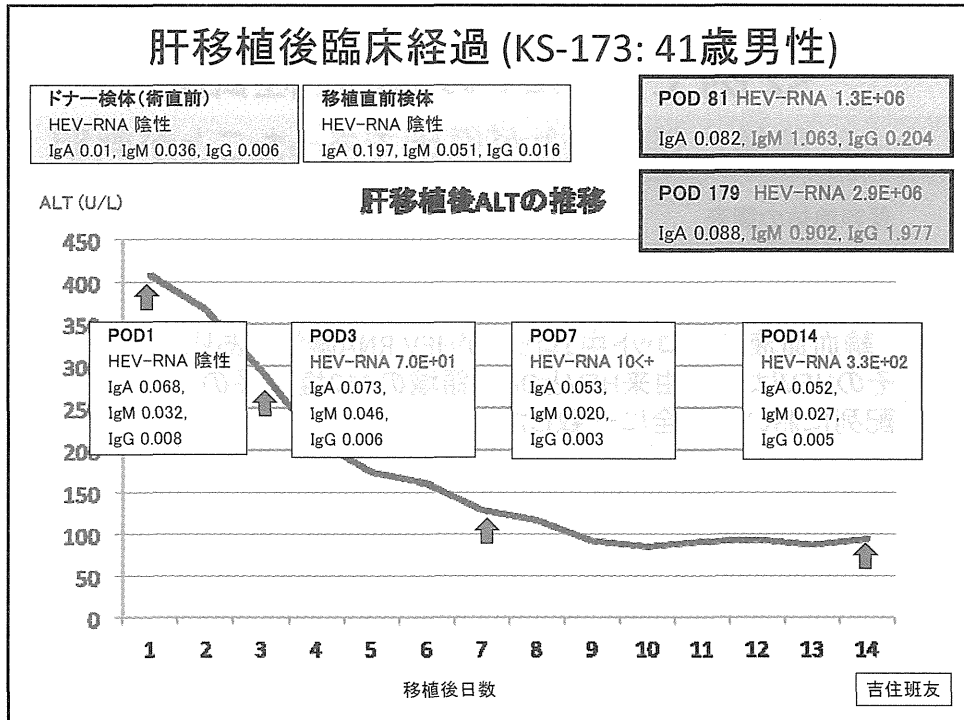


E37



E38

本調査によって浮き彫りになった問題点と それに対する対応について

- 2011年10月に保険収載された「IgA-HEV抗体検査」(は急性E型肝炎の診断を目的としたものであり、慢性E型肝炎(慢性HEV感染)の診断には役立たない。
- 一般診療においてHEV RNAの測定はできないため、慢性E型肝炎(慢性HEV感染)患者が見逃されている。
- HEV-NATスクリーニングが行われていない北海道以外の地域で輸血後HEV感染が発生し、慢性化した。

検討事項

- ・HEV RNA検査の保険収載
- ・北海道以外の地域の血液センターでの試験的個別HEV-NATによる献血者でのHEV感染の実態調査

班長

E39

<2例でのHEVの感染経路>

ともに移植に伴う輸血が原因であったことが判明

保存検体の調査

TK-072

Genotype 3

輸血血液の17ロット中1ロットがHEV RNA陽性であり、そのHEVは患者由来HEVとORF2領域の412塩基長の配列において完全に一致した。

KS-173

Genotype 3

輸血血液の26ロット中1ロットがHEV RNA陽性であり、そのHEVは患者由来HEVとORF2領域の412塩基長の配列において完全に一致した。

班長

E40

血清及び肝臓を採取したウサギ 20羽について

班長

- 血清中 IgGクラス HEV抗体陽性 : 4/20 (20%)
- 血清中ウサギ HEV RNA 陽性 : 7/20 (35%)
 - <500 copies/mL : 2検体
 - 500-1.6×10⁴ copies/mL : 5検体
- 肝臓中ウサギ HEV RNA 陽性 : 10/20 (50%)
(20% (w/v) ホモジネート)
 - <500 copies/mL : 3検体
 - 10⁵-10⁶ copies/mL : 2検体
 - >10⁷ copies/mL : 5検体



培養細胞への接種実験

E41

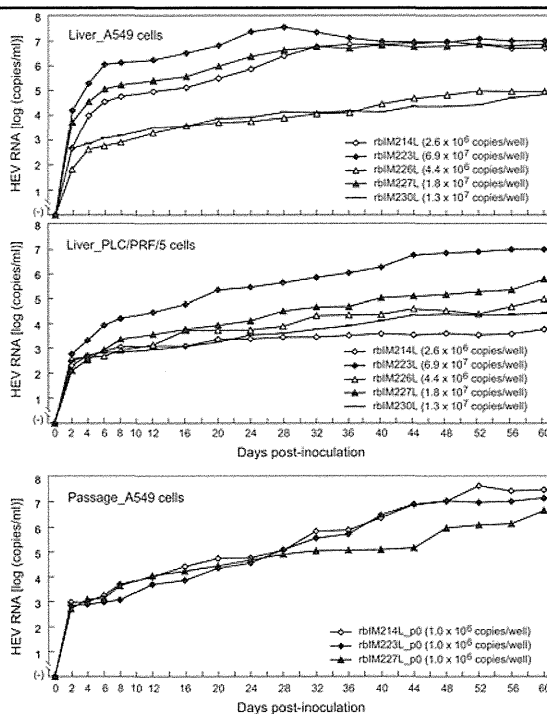
肝臓中ウサギHEVの培養

HEV RNA titer が高い肝臓
5検体のホモジネートを
A549細胞及びPLC/PRF/5細胞
に接種した。

継代培養

A549細胞培養上清中のHEV
を新たなA549細胞に接種した。

班長



E42

李班員

目的：サルにおけるHEVの感染状況調査

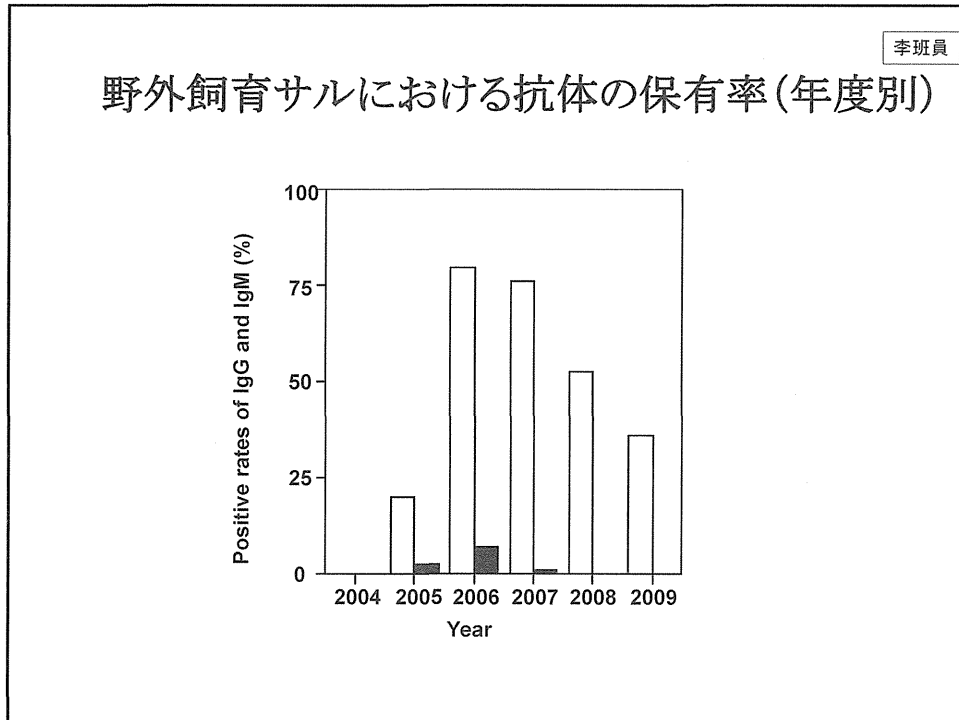
場所：京都大学霊長類研究所（犬山）

サル：野外飼育コロニー：カニクイザルとニホンザル

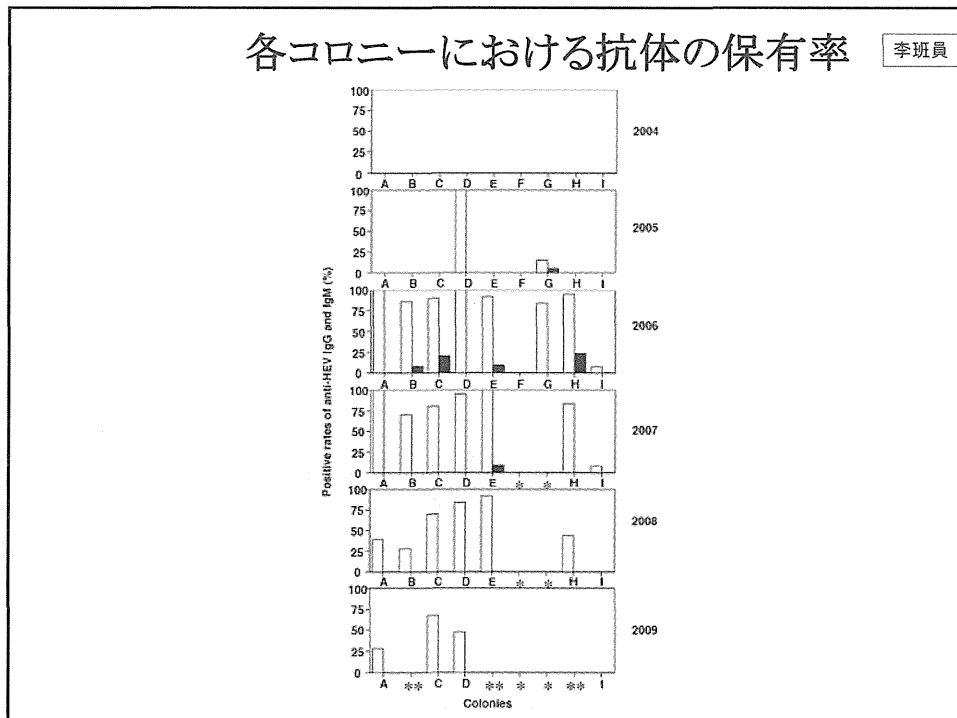
期間：2004-2009年

実験方法：抗原、抗体、HEV RNAを検査した上、培養細胞を用いてウイルスを分離し、ウイルスの感染性をカニクイザルへの感染実験で確認する。

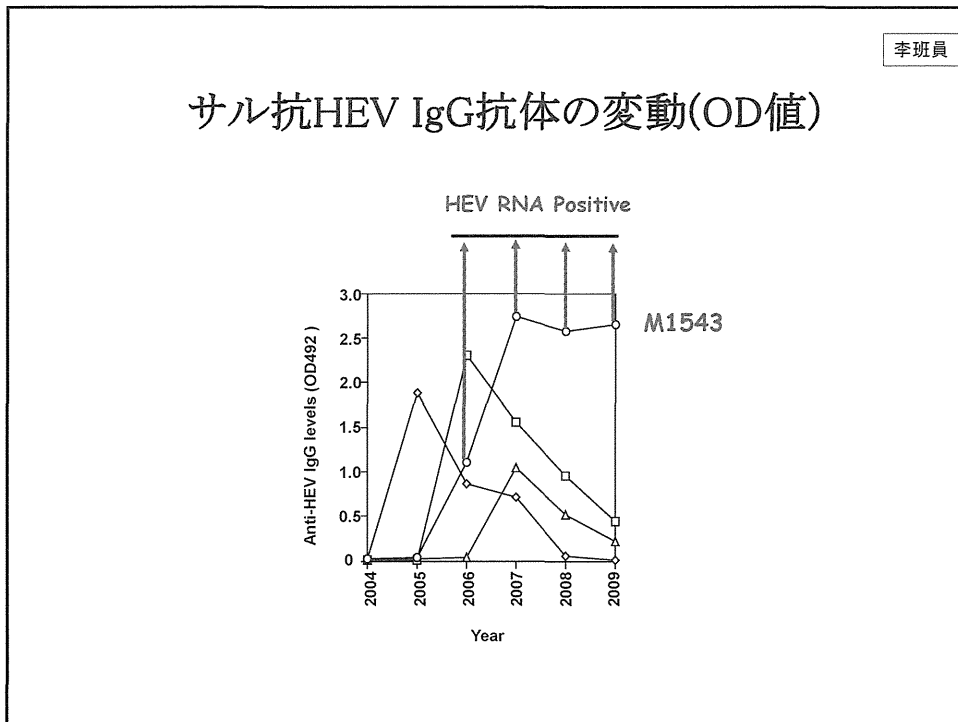
E43



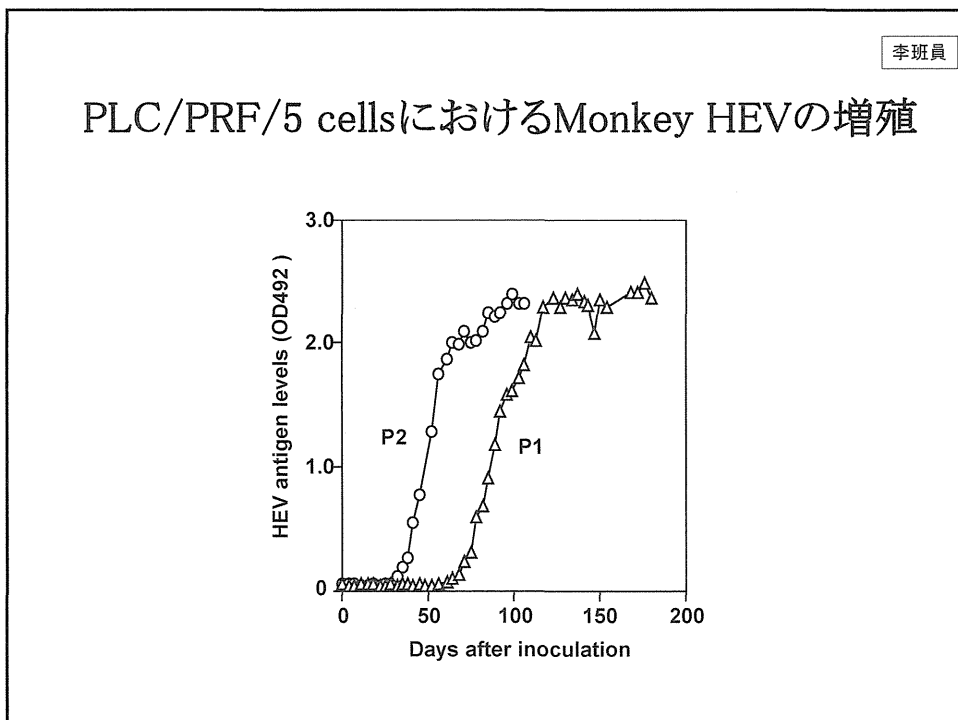
E44



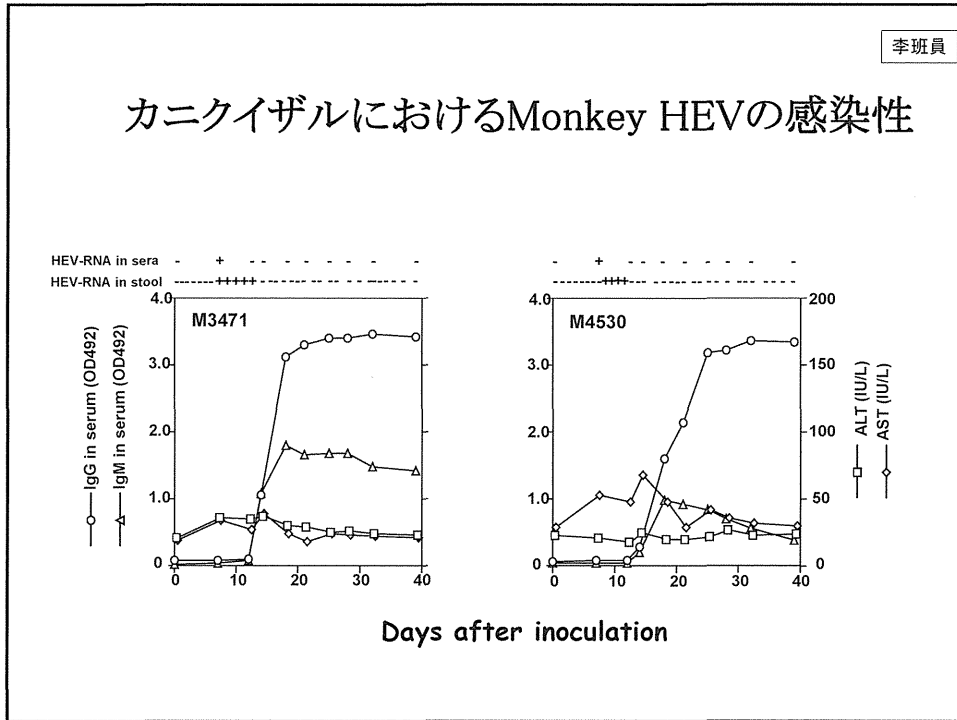
E45



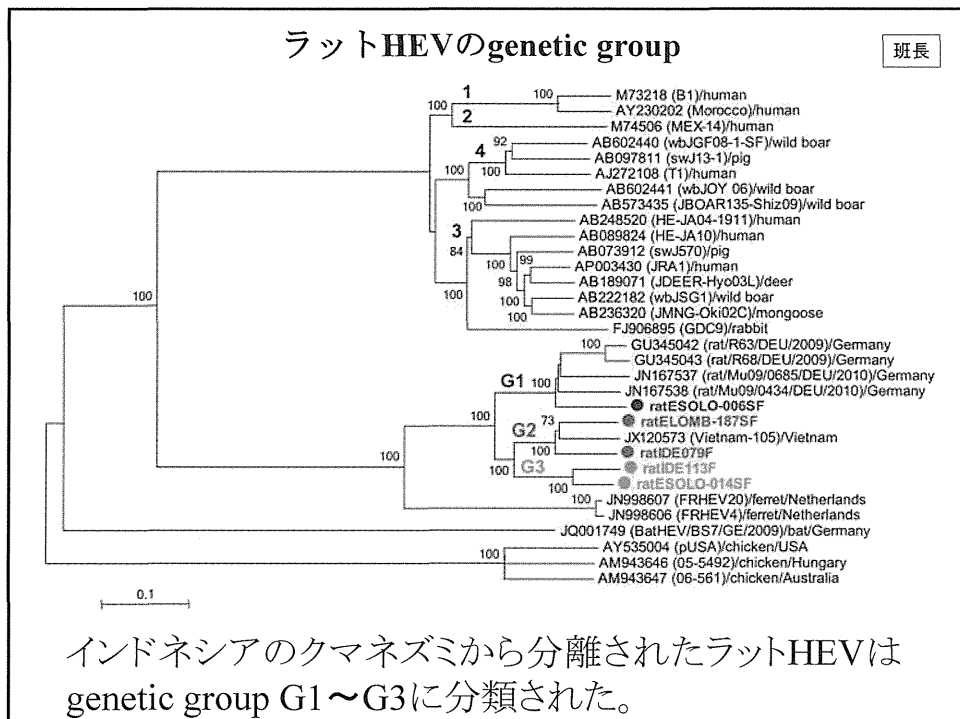
E46



E47



E48



E49

ラットHEV inoculum 班長

Genetic group G1~G3ラットHEV陽性ネズミの肝臓homogenate

Sample no.	Body weight (g)	Sex	Serum samples				Liver samples	
			Rat anti-HEV IgG (OD)	Rat HEV RNA Copies/mL	Isolate name	Genetic group	Isolate name of rat HEV	10% (w/v) liver homogenate (copies/mL)
SL006	110	F	0.327 (+)	3.0×10^2	ratESOLO-006S	G1	ratESOLO-006L	2.5×10^6
095	48	F	0.098 (-)	1.2×10^5	ratELOMB-095S	G2	ratELOMB-095L	8.3×10^7
131	158	M	2.977 (+)	1.7×10^5	ratELOMB-131S	G2	ratELOMB-131L	8.4×10^7
159	76	F	2.104 (+)	1.5×10^5	ratELOMB-159S	G2	ratELOMB-159L	9.6×10^7
213	129	F	>3.000 (+)	1.1×10^5	ratELOMB-213S	G2	ratELOMB-213L	4.8×10^8
SL010	100	F	2.762 (+)	5.0×10^4	ratESOLO-010S	G3	ratESOLO-010L	1.1×10^8
SL045	100	M	>3.000 (+)	9.7×10^3	ratESOLO-045S	G3	ratESOLO-045L	5.1×10^6
SL061	80	F	>3.000 (+)	5.5×10^3	ratESOLO-061S	G3	ratESOLO-061L	1.2×10^6

肝臓homogenateを10倍希釈して培養細胞に接種 (0.2 mL/well)
 ヒト肝癌由来株化細胞: PLC/PRF/5細胞、HuH-7細胞、HepG2細胞
 ヒト肺癌由来株化細胞: A549細胞

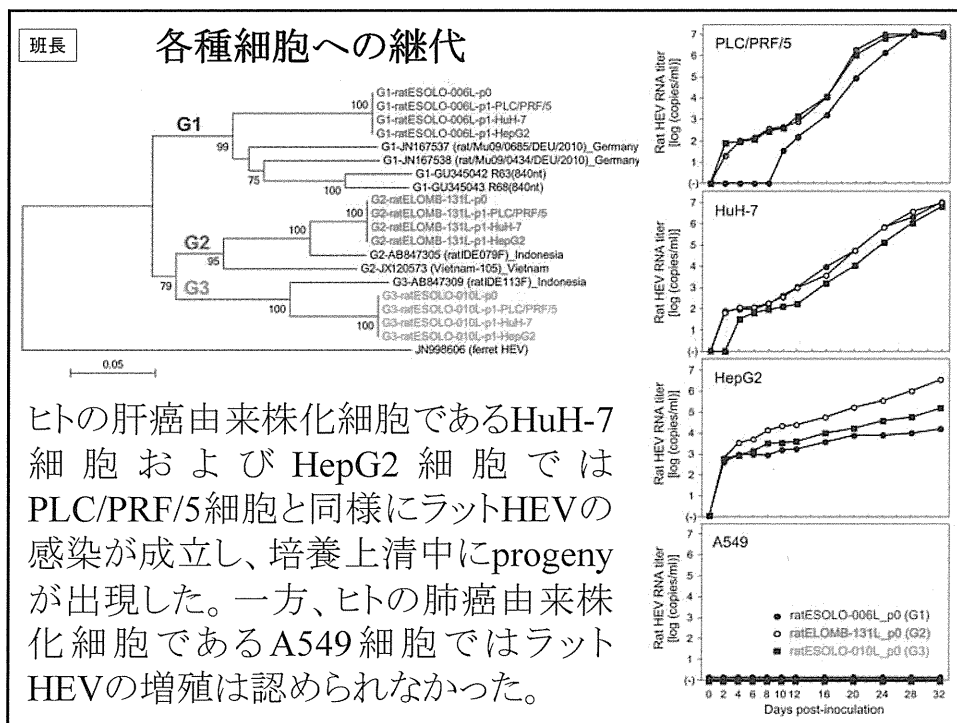
E50

PLC/PRF/5細胞への感染実験

ラットHEVはPLC/PRF/5細胞に感染し、接種後2~6日目に培養上清中にprogenyが出現し、20~24日目に 10^7 copies/mLに達した。

班長

E51



E52

フェレットにおけるferret HEVの一過性感染と持続感染

Detection of ferret HEV RNA and ALT in ferret serum samples (n=22)

Ferret No.	Days post importation					
	-17	10	109	117	130	153
4322	* 129/-	177/+	115/-			
4323	170/-	161/+	80/-			
4325	184/-	302/+	127/-			
4328	188/-	528/+	161/-	208/-		
4331	130/-	386/+	681/+	354/+		493/+
4341	220/-	121/-	71/-			
4357	203/-	135/-	193/-			
4359	246/-	147/-	422/+	257/+	213/-	115/-
4360	100/-	288/+	381/+	511/+	270/+	187/-
4372	125/-	172/+	331/+	244/+	290/+	
4374	129/-	231/+	219/+		196/+	294/+
4375	170/-	191/+	449/+	328/+	309/+	624/+
4380	148/-	245/+	505/+	464/+	407/+	547/+
4383	127/-	193/+	131/-			
4384	82/-	273/+	176/-			
4385	119/-	166/+	168/-			
4386	194/-	194/-	178/-			
4387	66/-	182/+	152/-			
4388	183/-	137/-	132/-			
4389	101/-	327/+	99/-			
4390	115/-	150/-	102/-			
4391	97/-	141/-	104/-			

肝障害を伴う

一過性感染 (n=10)

持続感染 (n=6)

フェレットはE型急性肝炎や慢性肝炎の動物モデルとして応用できる可能性がある。

李班員

*ALT value (IU/L)
+, positive for ferret HEV RNA; -, negative for ferret HEV RNA

E53

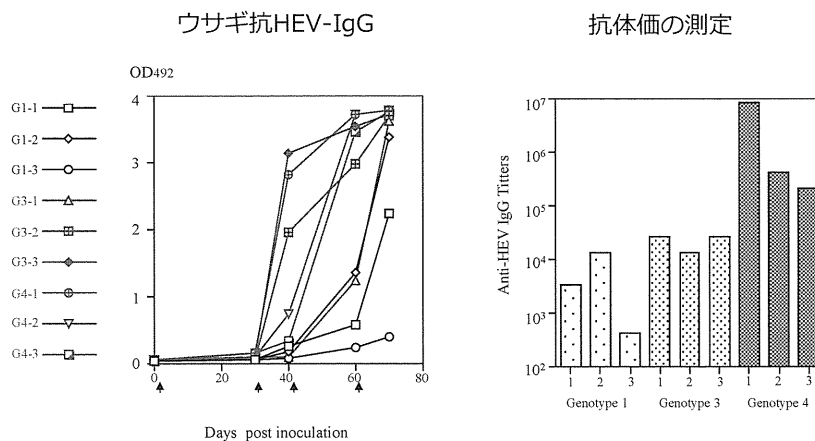
HEV不活化の条件

- ☆ 65℃, 10分間の熱処理
- ☆ 50μw、30分間の紫外線照射
- ☆ HEVを不活化する有効塩素濃度は125ppm以上である。

李班員

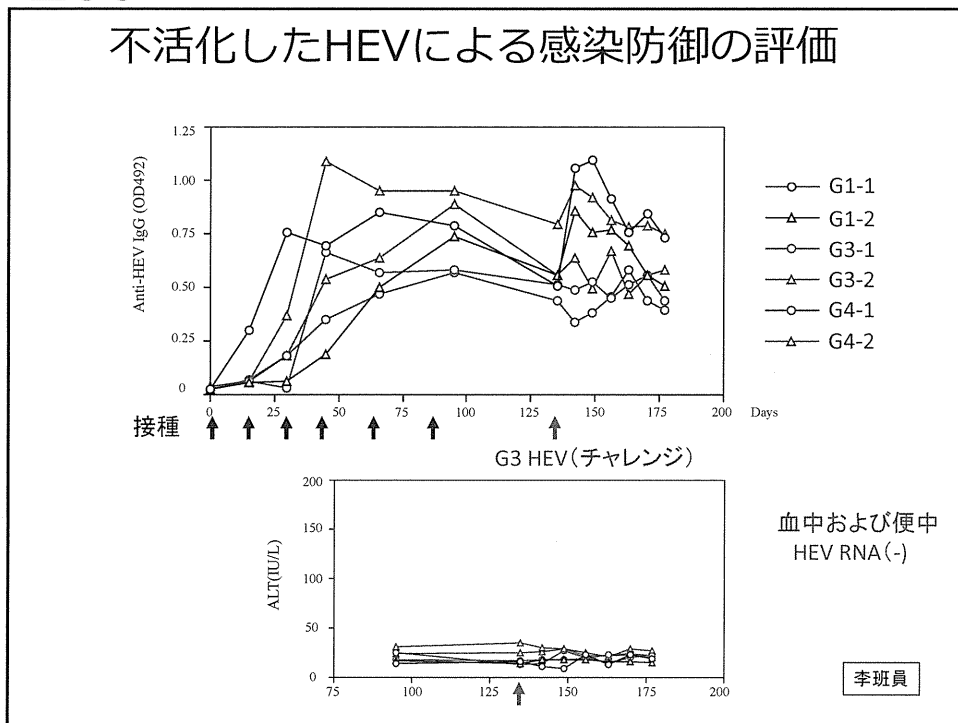
E54

ウサギにおける不活化HEVの免疫効果



李班員

E55



E56

不活化HEVワクチンについての検討のまとめ

1. 不活化したHEVをラットとウサギに接種したことにより中和抗体が誘導された。
2. 不活化したHEVの接種により、カニクイザルへのHEV感染を防いだ。

不活化ワクチンとして利用する可能性が示唆された。

問 題 点：

1. 抗体誘導能は各遺伝子型間に差が有る。
2. 不活化されたウイルスの免疫原性が弱くなる傾向が見られた。
3. 大量の精製したウイルスを獲得するのは困難である。

対策：

効率の良い抗原精製法および不活化方法の検討

李班員

E57

HEVの放出機構の解明

班長

方法

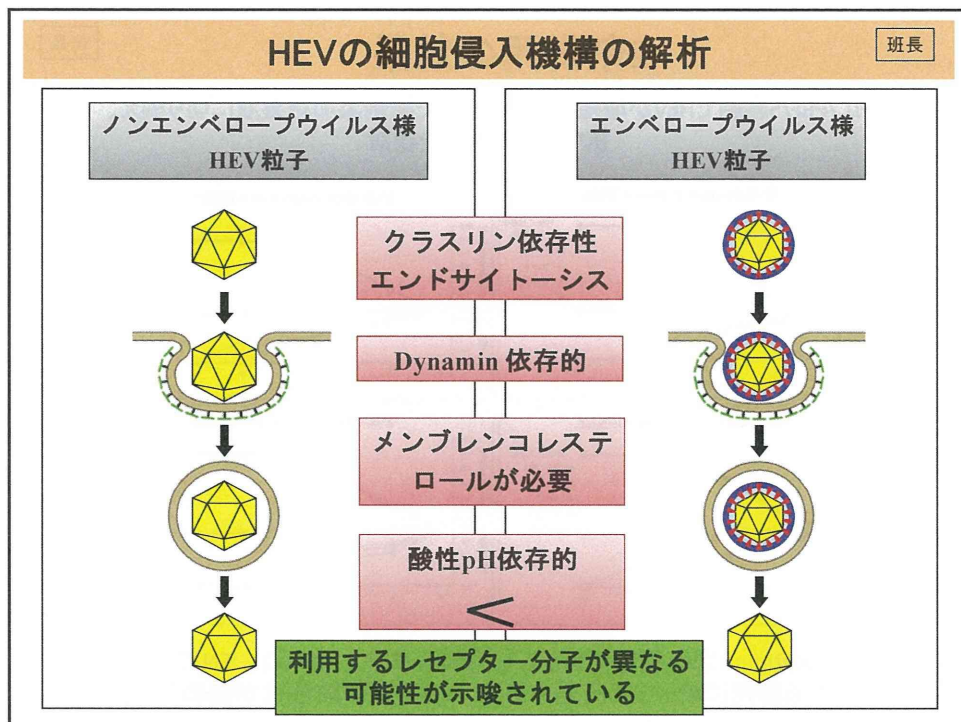
- Reverse genetics systemを利用した解析
- 各種薬剤処理による解析
- siRNAを用いた解析
- Dominant negative 変異体を用いた解析
- 蛍光免疫測定法(IFA)による局在解析
- 電顕解析

HEVはESCRT(endosomal sorting complexes required for transport)機構を利用したsortingにより多胞体(multivesicular body: MVB)内腔へと出芽し、エクソソーム分泌経路を利用して、膜に覆われた状態で細胞外へ放出されることを明らかにした。

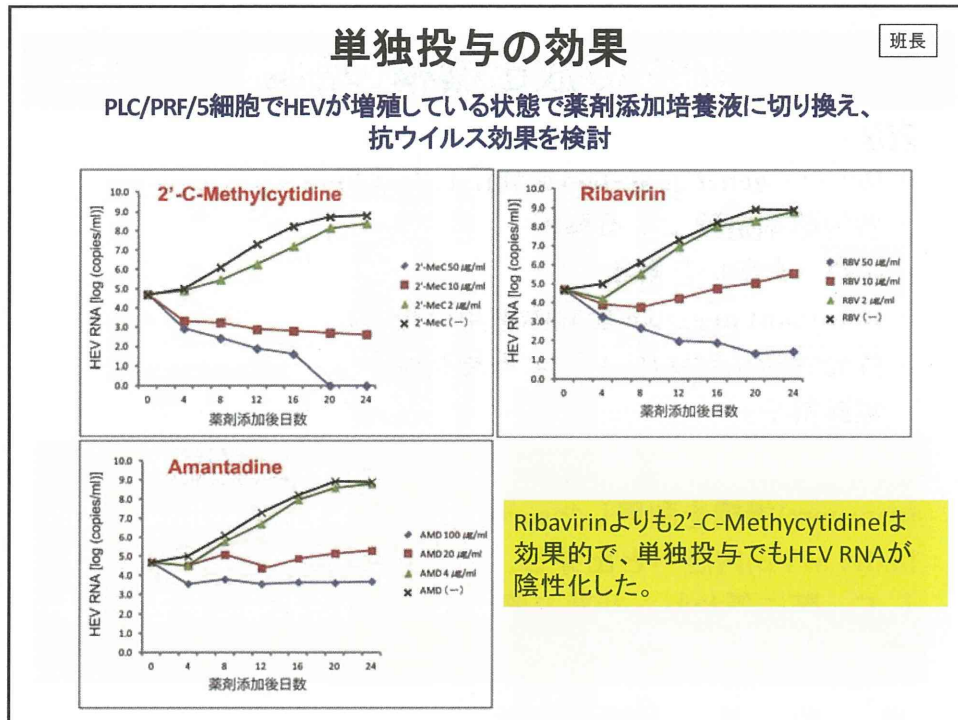
E58

HEVの細胞侵入機構の解析

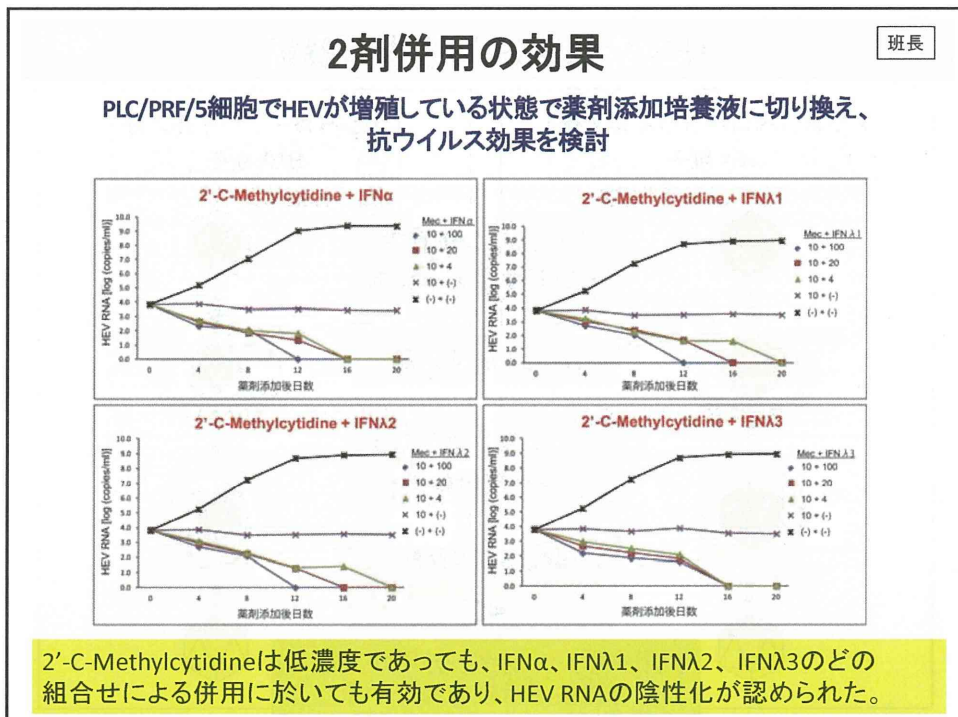
班長



E59



E60



資料5

事後評価に係る発表会で使用したスライド

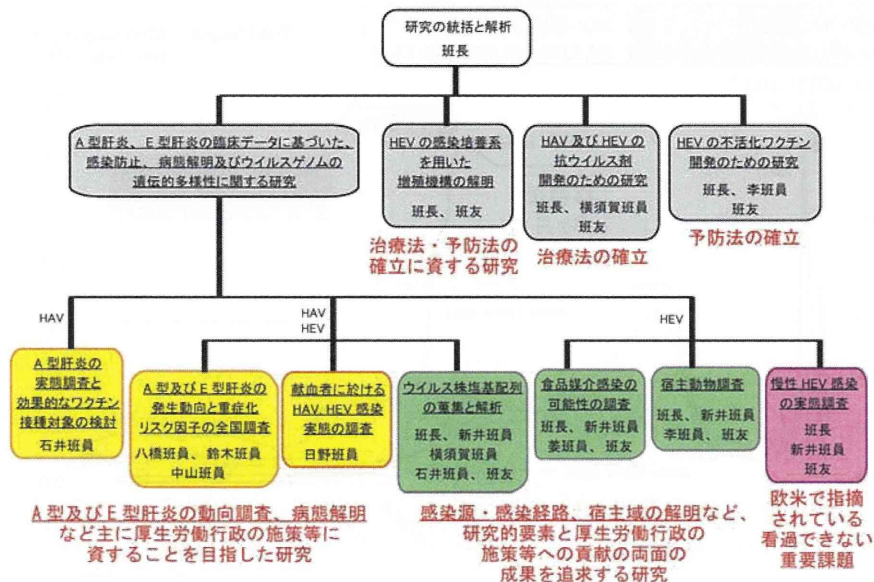
厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業 (H24~H26年度)

「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」 (H24-肝炎-一般-002)

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
 研究分担者: 新井雅裕 東芝病院消化器内科
 石井孝司 国立感染症研究所
 大河内信弘 筑波大学移植外科
 姜 貞憲 手稲溪仁会病院消化器病センター
 鈴木一幸 岩手医科大学消化器・肝臓内科
 中山伸朗 埼玉医科大学消化器内科・肝臓内科
 日野 学 日本赤十字社血液事業本部
 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
 横須賀 収 千葉大学大学院医学研究院腫瘍内科学
 李 天成 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究協力者: 全国の臨床医・獣医等多数

研究計画の概要



慢性HEV感染の実態調査

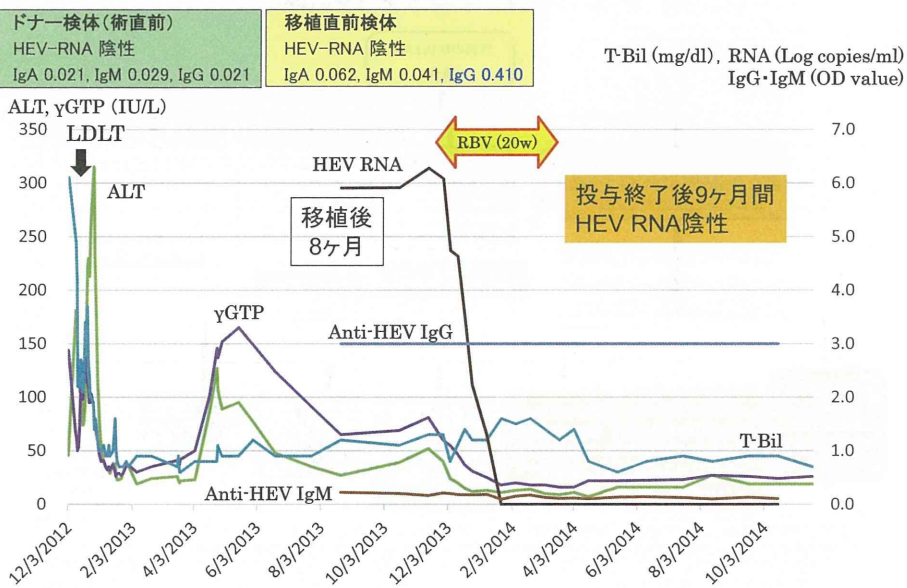
国内の肝移植患者1,839例(17施設)について
HEV抗体検査とHEV RNA測定を実施

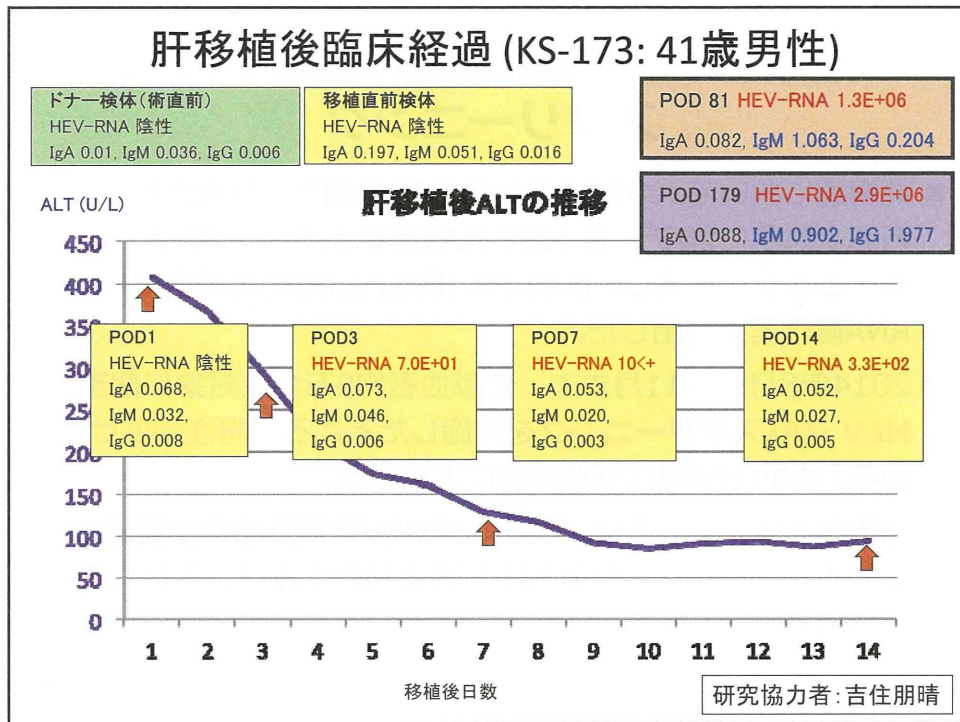
IgG-HEV抗体: 50/1,839 (2.7%)
IgM-HEV抗体: 1/1,839 (0.05%)
IgA-HEV抗体: 0/1,839
HEV RNA: 2/1,583 (0.13%)

・本調査により、我が国での少なくとも2例の慢性HEV感染患者の存在が明らかになった。

大河内班員・班長

肝移植後臨床経過 (TK-072: 59歳女性)





<2例でのHEVの感染経路>

ともに移植に伴う輸血が原因であったことが判明

保存検体の調査

TK-072

Genotype 3

輸血血液の**17ロット中1ロット**がHEV RNA陽性であり、そのHEVは患者由来HEVと一致した。

KS-173

Genotype 3

輸血血液の**26ロット中1ロット**がHEV RNA陽性であり、そのHEVは患者由来HEVと一致した。

北海道の献血者におけるHEV NAT スクリーニング

- 北海道において2005年1月からの10年間で、献血者約270万名を対象に**20プール HEV NAT法**によるHEV RNAスクリーニングを実施し、**0.011% (約1/9,000)**の頻度でHEV RNA陽性者を見出した。
- 2014年8月から11月まで、全献血者約9万名を対象に**個別 HEV NATスクリーニング**を実施したところ、**陽性頻度は同年1月から7月までの約4倍**に上昇した。
- 道内献血者においては依然として**HEV不顕性感染が蔓延**していると推察され、**今後もHEV感染動向に注目していく必要がある**。

日野班員

不活化HEVワクチンの検討

加熱処理によって不活化した培養細胞由来HEVのカニクイザルへの接種実験によって、genotype 1, 3, 4のいずれにおいても、genotype 3 HEVの感染を防御しうることを明らかにした。

効率の良い抗原精製法及び不活化方法の更なる検討が課題

李班員

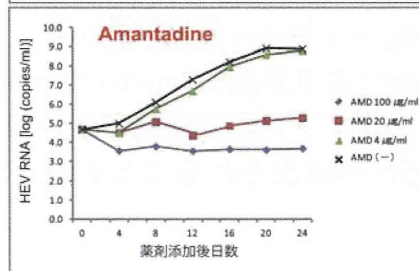
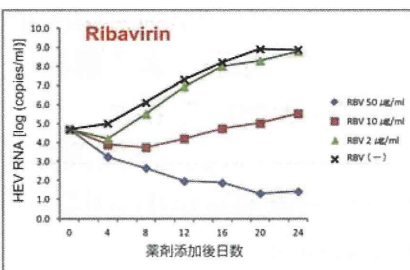
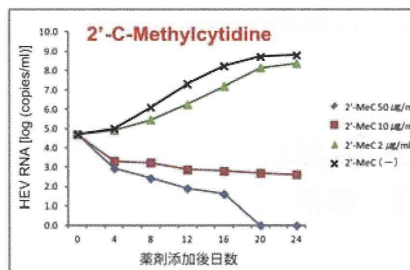
E型肝炎の抗ウイルス薬開発に向けた基礎検討

感染培養系において、
IFN α 、IFN λ 1、IFN λ 2、IFN λ 3、リバビリン、
アマンダジン、2'-C-methylcytidineは
それぞれ単独でも濃度依存的に
HEVの増殖を抑制しうることを明らかにした。

班長

単独投与の効果

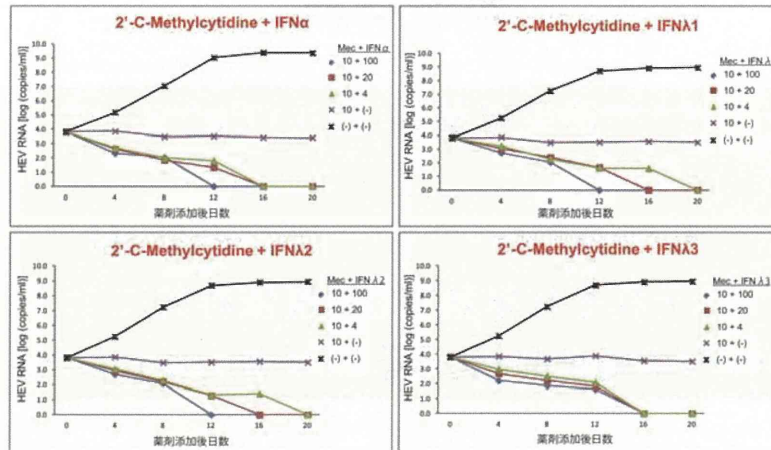
PLC/PRF/5細胞でHEVが増殖している状態で薬剤添加培養液に切り換え、
抗ウイルス効果を検討



Ribavirinよりも2'-C-Methylcytidineは効果的で、単独投与でもHEV RNAが陰性化した。

2剤併用の効果

PLC/PRF/5細胞でHEVが増殖している状態で薬剤添加培養液に切り換え、抗ウイルス効果を検討



2'-C-Methylcytidineは低濃度であっても、IFN α 、IFN Δ 1、IFN Δ 2、IFN Δ 3のどの組合せによる併用に於いても有効であり、HEV RNAの陰性化が認められた。

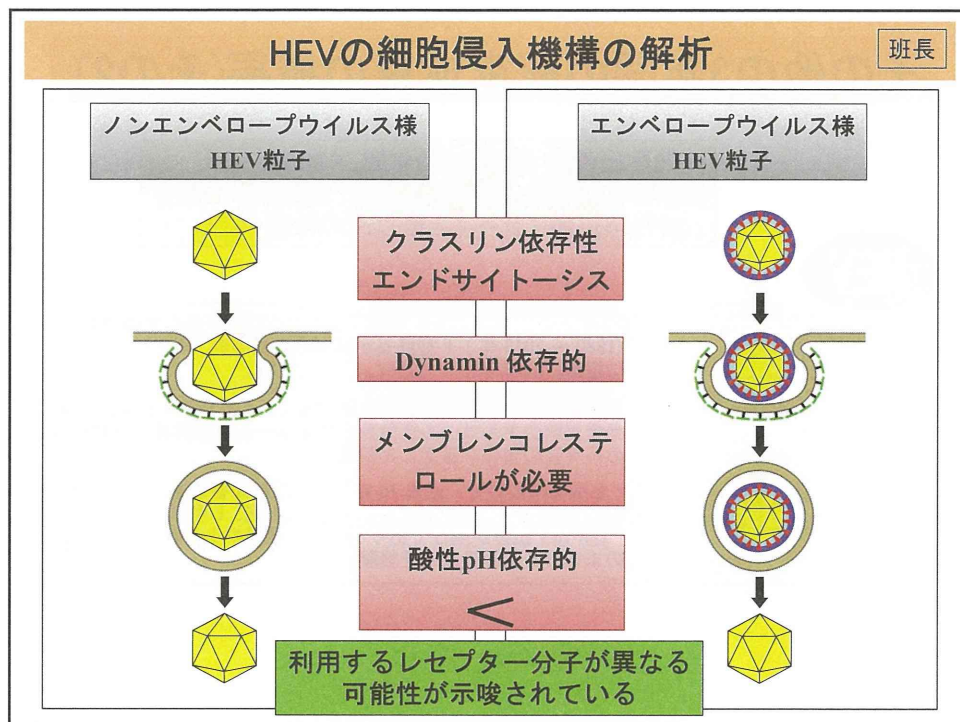
HEVの放出機構の解明

班長

方法

- ・ Reverse genetics systemを利用した解析
- ・ 各種薬剤処理による解析
- ・ siRNAを用いた解析
- ・ Dominant negative 変異体を用いた解析
- ・ 蛍光免疫測定法(IFA)による局在解析
- ・ 電顕解析

HEVはESCRT(endosomal sorting complexes required for transport)機構を利用したsortingにより多胞体(multivesicular body: MVB)内腔へと出芽し、エクソソーム分泌経路を利用して、膜に覆われた状態で細胞外へ放出されることを明らかにした。



その他の3年間の研究成果の概要(その1)

HAV

2012-2014年のHAV分離株の解析 (石井班員)

A型肝炎の動向 (八橋班員)

A型肝炎の重症化因子 (中山班員・姜班員)

抗ウイルス薬の開発 (横須賀班員)

- ・ 2010年の広域流行以降、韓国由来ⅢA型の土着化が懸念。
- ・ 2014年春の全国的流行ではIA型の同一土着株が大多数。流行拡大阻止のため、注意深い継続的な監視が必要。
- ・ 外食頻度と海外旅行がHAV感染の危険因子。ワクチン接種を含めた重点的な対応が必要。

国立病院機構共同研究班33施設による急性肝炎の全国調査(1980～2013年)：2007年以降、A型肝炎の患者数は低値横ばい。しかし、2006年以降、ⅢA型及び重症化の頻度が有意に上昇。

- ・ 男性、高齢、糖尿病・慢性肝障害の合併が予後不良因子。
- ・ HAV抗体陰性の高齢者にはHAワクチン接種が推奨される。

IFNλ (IL29) 及び宿主因子のLa/SSBに対するsiRNAとJAK阻害剤 (AG490, SD-1029) はHAVに対する抗ウイルス効果を示し、治療への応用が期待される。