

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・分担研究報告書

研究代表者 岡本宏明

平成 26 (2014) 年 3 月

目 次

. 総括研究報告			
研究代表者報告：平成 25 年度総括研究報告	(岡本 宏明)	-----	1
. 分担研究報告			
1. 国立病院共同研究・急性肝炎調査結果と A 型肝炎重症化の検討	(八橋 弘)	-----	9
2. わが国における A 型および E 型の急性肝不全の実態	(中山伸朗)	-----	11
3. 日本および近隣国における 2013 年の A 型肝炎の分子疫学的解析および A 型肝炎のリスクアセスメント	(石井孝司)	-----	15
4. A 型肝炎ウイルスに対する抗ウイルス剤の開発	(横須賀 収)	-----	18
5. 北海道地区献血者集団における HEV 感染の実態解明	(日野 学)	-----	20
6. 北海道内 HEV 感染動向及び肝疾患既往と A, E 型急性肝炎重症化に関する研究	(姜 貞憲)	-----	23
7. 岩手県を中心とした北東北地区における急性 A 型及び E 型肝炎の実態：過去 10 年間の変遷	(鈴木一幸)	-----	26
8. 東京都内の一病院で最近経験した 6 例の急性 E 型肝炎	(時田 元)	-----	29
9. 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	(新井雅裕)	-----	31
10. 三重県全域における E 型肝炎発生調査：2013 年の特徴	(中野達徳)	-----	35
11. 薬物性肝障害診断時における E 型肝炎測定系追加の必要性についての検討及び三重県北中部地域で発生している E 型肝炎、特に 3e/3sp(ヨーロッパ)株の感染源の検索について	(岡野 宏)	-----	38
12. 三重県の野生イノシシから検出された HEV subtype 3e 株について	(中野達徳)	-----	42
13. 岡山県における野生イノシシの E 型肝炎ウイルス感染状況と狩猟者の E 型肝炎認識状況について	(川上万里)	-----	45
14. 肝移植患者における E 型肝炎ウイルス感染状況の全国実態調査	(大河内信弘)	-----	48

15.	1) 不活化 E 型肝炎ワクチンの可能性の検討 2) 中国における Rat HEV の感染調査	(李 天成)	-----	51
16.	ラット HEV の培養系の確立とその意義	(高橋 雅春、 岡本 宏明)	-----	55
17.	国内感染 E 型肝炎例における HEV3 型と HEV4 型の臨床 的・ウイルス学的比較解析	(高橋 雅春、 岡本 宏明)	-----	59
18.	エクソソーム分泌経路を介した E 型肝炎ウイルス粒子の 放出機構の解析	(長嶋 茂雄、 岡本 宏明)	-----	62
.	研究成果の刊行に関する一覧表		-----	66

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常人から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型になってきている。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る。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、その感染源が木曽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'-O-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

厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業
経口感染によるウイルス性肝炎(A型及びE型)の感染防止、病態解明、
遺伝的多様性及び治療に関する研究
平成25年度分担研究報告書

国立病院共同研究・急性肝炎調査結果とA型肝炎重症化の検討

研究分担者 八橋 弘 独立行政法人国立病院機構長崎医療センター・臨床研究センター長

研究要旨：1980年から2012年に全国国立病院34施設の共同研究で登録されたA型急性肝炎1624例の発生状況と重症度の検討をした。男875例(53.9%)、年齢中央値37.0才。1994年までの発症例は全年齢を通じ毎年2-3月に集積したが、1995年以降季節集積性は消失し、通年的に散布発生した。プロトロンビン時間(PT)40%未満かつ脳症を伴う劇症型は8例(0.5%)、PT40%未満で脳症なしの重症型は64例(4.0%)、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年までの劇症および重症化率は21例/1209例(1.7%)、1995年以降は51例/406例(12.6%)と高率だった($p < 0.001$)。劇症化および重症化に寄与する因子をロジスティック回帰分析で算出、抽出因子は、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。我が国の急性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、劇症および重症例の頻度は増加している。

<研究協力者>

共同研究者

山崎一美(独立行政法人国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター 臨床疫学研究室長)

A. 研究目的

1980年から2012年までの過去33年間に、国立病院機構肝疾患ネットワーク参加33施設内において急性肝炎症例は4,966例登録されてきた。このうち散发性急性肝炎として登録された症例数は4,674例で、うちA型が1,624例(34.7%)、B型が1,363例(29.2%)、C型が407例(8.7%)、非ABC型1280例(28.0%)であった。A型肝炎は、1983年(162例)と1990年(187例)に全国的な大流行を認めたが、それ以後は減少傾向にある。

上記のような発生動向の変化がみられる中、A型肝炎の臨床像、なかでも重症化はいかに変遷しているのか不明である。

本研究では、我が国におけるA型急性肝炎の重症化の検討を行うことを目的としている。

B. 研究方法

全国33施設からなる国立病院機構肝疾患ネットワーク参加施設医療機関において、各施設に急性肝炎として入院した患者の症例登録をおこなった症例のうち、A型と診断された1,624例を対象とした。

倫理面への配慮：本研究は「疫学研究のための倫理指針」および「個人情報保護法」を順守し、患者への研究協力の説明と同意は、書面にて遂行した。

C. 研究結果

- 1) 患者背景 対象 1,624 例の背景を表 1(患者背景)に示す。
- 2) 転帰 死亡例は 2 例であった。その頻度は、総登録 1624 例においては 0.1%、劇症化 8 例においては 25%であった。それぞれ 1988 年 3 月、1991 年 1 月発症者で順に、58 才、52 才でいずれも女性であった。

3) A 型肝炎の発症年次推移と年齢および重症度の関係

図 1(A 型急性肝炎登録例の重症度と年次推移・年齢の関係)に A 型肝炎の発症年次推移と年齢および重症度の関係について示した。1980 年から 1991 年にかけて 1 年ごとに、低年齢層から高年齢層に幅広い範囲で垂直に症例の集積がみられる。集積している時期はいずれも 2 月前後であり、季節性の集積が認められている。しかし、1992 年からはややこの季節的集積性が損なわれつつあり、1995 年以降は明らかな垂直性の集積が認められなくなった。そして通年的に散布しながら発症数も減少していた。

劇症・重症化例は、1980-1994 年までに 21 例(1.7%)であるのに対し、1995-2012 年では 51 例(12.6%)と有意に効率であった($p < 0.001$)。また年齢中央値 37 歳を分割点として 2 群に分けて劇症・重症化率を検討した。37 歳以下では 24 例(2.8%)に対し、37 歳より高齢では 48 例(6.2%)と有意に高率であった($p < 0.001$)。

4) A 型急性肝炎の劇症化・重症化に寄与する因子

登録された A 型急性肝炎の劇症化および重症化に寄与する因子をロジスティック回帰モデル(ステップワイズ法)で解析した。算出結果を表 2(A 型肝炎の劇症化・重症化の寄与因子)に示す。有意な寄与因子は、1995 年以降の発症と 37 歳を超える年齢であった。性、地域性は関連しなかった。

D. 考察

全国国立病院共同研究による A 型急性肝炎登録例から発症状況を検討しながら重症化の解析を行った。

我が国の A 型急性肝炎は登録を始めた 1980 年代は、広範囲の年齢において発症するも毎年 2 月ごろを好発時期とし、季節集積性を強く認めていた。1983 年、1990 年に全国的な大流行があるが、いずれも季節集積性を損なわない。この傾向は 1995 年以降には喪失し、2012 年まで再度確認されていない。また季節性を喪失しながら、発症数は減少していた。ところが重症化率は高くなった。これは 37 歳より高い年齢の発症者が重症化しやすいことが一因であった。我が国の年齢人口構成において高齢化率が進んでいることが背景にあると考えている。今後、高齢者の A 型急性肝炎の臨床像には注意しながら病態管理する必要がある。

また HAV genotype と重症型の関係については今後検討していくことになる。

E. 結論

我が国の急性 A 型肝炎発生数は、1995 年以降季節性を失いながら減少しているが、劇症および重症例の頻度は増加している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 八橋 弘・疾患編, 第 IX 章 肝疾患, 急性肝炎(A 型肝炎, B 型肝炎, C 型肝炎, D 型肝炎, E 型肝炎). 肝臓専門医テキスト・日本肝臓学会編集, 南江堂, 東京, pp.186-190, 2013.3.30, 497 頁
- 2) 八橋 弘・IV. 肝臓(各論)/感染症, その他のウイルス肝炎(D 型肝炎, E 型肝炎, EB ウイルス, サイトメガロウイルス). 専門医のための消化器病学 第 2 版, 小俣政男・千葉勉監修, 下瀬川徹・渡辺守・木下芳一・金子周一・樫田博史編集, 医学書院, 東京, pp.363-366, 2013.10.15.

2. 学会発表

- 1) 第 100 回日本消化器病学会総会 演題採択

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

厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業
経口感染によるウイルス性肝炎(A型及びE型)の感染防止、病態解明、
遺伝的多様性及び治療に関する研究
平成25年度分担研究報告書

わが国におけるA型およびE型の急性肝不全の実態

研究分担者 中山 伸朗 埼玉医科大学 消化器内科・肝臓内科 准教授

研究要旨：平成25年度も従来の「劇症肝炎、遅発性肝不全(LOHF)」を含む「急性肝不全」の新たな診断基準に準拠して「2012年に発症した急性肝不全の全国調査」を実施し、その結果を基にA型肝炎ウイルス(HAV)およびE型肝炎ウイルス(HEV)に起因する急性肝不全症例の実態を解析した。A型の急性肝不全は、昨年より減少して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例とも肝移植が実施例され、1例が救命された。非昏睡型は内科的治療で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から2例と岩手から1例が登録され、3例ともが非昏睡型で、内科的治療により救命された。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症例において、内科的治療の予後に影響を与える基礎疾患に関して検討した。A型劇症肝炎では改めて糖尿病を有する症例で有意に予後が不良であることが示された。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と考えられた。

<研究協力者>

持田 智 埼玉医科大学 消・肝内科 教授
桶谷 真 鹿児島大学 消化器・生活習慣病
坪内 博仁 鹿児島市立病院 院長

A. 研究目的

2011年に欧米の「acute liver failure」に相当する疾患概念として、正常肝ないし肝予備能が正常と考えられる肝に肝障害が生じ、初発症状出現から8週以内に、高度の肝機能障害に基づいてプロトロンビン時間(PT)が40%以下ないしはINR値1.5以上を示すものをわが国では「急性肝不全」と定義することになって2年が経過した。薬物中毒、循環不全、悪性腫瘍の肝浸潤、代謝性、術後肝不全など、肝炎を伴わない成因の肝不全も加えられた、この新たな定義において、昏睡度以上の肝性脳症をきたし、プロトロンビン時間が40%以下を示すものと定義される劇症肝炎は、「急性肝不全・昏睡型」に含まれる。平成23年度と24年度は2010年と2011年に発症した症例を対象にして「急性肝不全」の基準に基づく全国調査を実施し、A型では従来の劇症肝炎に相当する昏睡型8例、非昏睡型が23例登録された。

平成25年度も調査対象を「劇症肝炎、遅発性肝不全(LOHF)」から新たな診断基準に準拠した「急性肝不全」に拡大した「2012年に発症した急性肝不全の全国調査」を実施し、その結果を基にA型およびE型肝炎症例の実態を解析した。

一方、従来は内科的治療で予後が良好であったA型劇症肝炎(急性肝不全・昏睡型)の救命率が、2010年以降発症の肝移植非実施例では7.1%と低率になっていた。これまでの検討で、1998-2010年の13年

間に発症し、全国調査に登録された A 型劇症肝炎症例を 2003 年までと 2004 年以降発症の 2 群に分け、背景因子を比較すると、死亡群において有意に高齢で、基礎疾患の有病率が高いことが判明した。さらに、糖尿病合併の劇症肝炎症例において内科的治療の予後が不良であることが示された。そこで本年度は 1998 年から 2012 年までの 15 年間に発症した A 型劇症肝炎症例を対象にして予後悪化に寄与する要因に関して以上の結果を検証した。

B. 方 法

A 型および E 型の急性肝不全， LOHF の実態調査

消化器病学会と肝臓学会の評議員が勤務する 525 診療科と救急医学会の会員が勤務する 482 診療科（計 731 施設）を対象として 2012 年に発症した「急性肝不全」の全国調査を実施した。その結果を基に A 型肝炎ウイルス（HAV）および E 型肝炎ウイルス（HEV）に起因する急性肝不全症例の実態を解析した。

A 型劇症肝炎症例の内科的治療の予後に寄与する要因の検討

厚生省「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究班」の全国集計に登録された HAV に起因する 1998-2012 年発症の劇症肝炎症例および LOHF 計 69 例を対象に、内科的治療の予後と各種の基礎疾患の有無に関して検討した。

統計解析には SPSS Statistics 19（IBM）を用いた。

倫理面への配慮：各施設において匿名化されたデータを集計・解析するもので、アンケート調査は埼玉医科大学倫理委員会の承認の元に実施されている。

C. 成 績

1) 2012 年に発症した A 型の急性肝不全の特徴

診断基準に合致した急性肝不全症例は 278 例が登録された。劇症肝炎症例と同じ成因による急性肝不全が 211 例、うち劇症肝炎症例に相当する昏睡型の症例は急性型 49 例、亜急性型 45 例で、LOHF 症例は 10 例であった。

A 型の急性肝不全症例数は、昨年より減少して 10 例が登録され、急性肝不全の 3.6%（10/278）、劇症肝炎症例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。登録施設の所在地は、5 例が首都圏で、その他は京都府 2 例、広島県 1 例、九州北部 2 例で、2010 年、2011 年の登録状況とほぼ同様であった。男性が 7 例、女性が 3 例で、病型は非昏睡型が 80.0%（8/10）、昏睡型が 20.0%（2/10）、年齢（平均±SD）は非昏睡型で 41.9±13.6 歳、昏睡型は京都府から登録の 56 歳と 67 歳の女性だった（表 1：HAV に起因する急性肝不全の背景因子-2012 年-）。合併症は 30.0%（3/10）に発生し、内訳は非昏睡型の 1 例と昏睡型 2 例であった。昏睡型は、2 例とも肝移植が実施例され、1 例が救命された。非昏睡型は内科的治療で 8 例全てが救命された。

病型別に背景因子の特徴を検討すると、非昏睡型 10 例では男女比は 7：1、年齢（平均±SD）は 41.9±13.6 歳で合併症数（平均±SD）は 0.1±0.4 と少なく、死亡例はなかった（表 1）。昏睡型は急性型と亜急性型 1 例例ずつで PT40%以下に低下し、いずれも従来の劇症肝炎症例の基準を満たした。2 例とも女性で、京都府から登録の 56 歳と 67 歳の女性だった。急性型 56 歳の女性に基礎疾患はなく、腎障害、消化管出血、感染症を合併したが、内科的治療でコントロールされ、生体肝移植の実施で救命された。亜急性型 67 歳の女性は高血圧症、脂質異常症を薬物治療中で、脳浮腫を併発し、肝移植実施後に感染症により死亡した。

2) 2012 年に発症した E 型の急性肝不全の特徴

2012 年に発症した E 型の急性肝不全症例は 3 例が登録され、全員が非昏睡型で、内科的治療により救

命された（表 2：HEV に起因する急性肝不全の背景因子-2012 年-）。

50 歳男性と 69 歳女性が北海道から，61 歳女性が岩手県から登録された。3 症例とも基礎疾患を有していたが，急性肝不全に伴う合併症は発生しなかった。68 歳の症例ではプロトロンビン活性が 35%まで低下したが，副腎皮質ステロイドパルス療法とトロンボモジュリンによる抗凝固療法が実施され，昏睡が出現することなく治癒した。

3) A 型劇症肝炎の内科的治療の予後に寄与する因子

厚労省「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究班」の全国集計に登録された 1998-2012 発症の劇症肝炎および LOHF 計 69 例を対象に，1998～2003 年（前期）に発症した 45 例と 2004 年以降（後期）に発症した 24 例の 2 群に分けて，背景因子と予後の各項目を表 3（A 型劇症肝炎、LOHF の背景因子-1998～2012 年-）に示す。前期は 45 例中 3 例で，後期は 24 例中 2 例で肝移植が実施された。肝移植非実施例の救命率は前期が 78.6%，後期が 59.1%で，予後は不良になっていた。

そこで肝移植非実施の 64 例を前期の 42 例と後期に発症した 22 例に区分すると（表 4：A 型劇症肝炎、LOHF の非移植例における内科的予後と背景因子），男女比は前期が 25：17 に対して，後期は 19：3 で男性が高率であった（ $p < 0.05$ ）。年齢（平均 ± 標準偏差）は前期 48.3 ± 12.9 歳，後期 56.4 ± 10.5 歳で（ $p < 0.05$ ），高齢化が見られた。基礎疾患を有する頻度は 22.0%から 57.1%に上昇していた（ $p < 0.05$ ）。基礎疾患を糖尿病，高血圧，脂質異常症，固形癌，心疾患，精神疾患に区分すると，糖尿病と高血圧の合併率にのみ変化が見られ，それぞれ前期 9.5%から後期 22.7%，4.8%から 22.7%へ高率化し，高血圧では有意差（ $p < 0.05$ ）を認めた（表 5：A 型劇症肝炎、LOHF の非移植例における合併症と内科的予後-1998～2012 年-）。

次に非移植 64 例を救命 46 例，死亡 18 例に区分すると（表 6：A 型劇症肝炎、LOHF の非移植例における内科的予後と背景因子-1998～2012 年-），男女比は生存群が 27：19 に対して，死亡群は 17：1 で，有意に男性が高率であった（ $p < 0.01$ ）。また，死亡群は年齢がより高齢で（ $p < 0.01$ ），基礎疾患の併発率も高率で（ $p < 0.05$ ），特に糖尿病は生存群（8.7%）に比して死亡群（27.8%）で多く認められた（ $p < 0.05$ ）（表 7：A 型劇症肝炎、LOHF の非移植例における合併症と内科的予後-1998～2012 年-）。また，基礎疾患の併発率は男性 39.5%（17/34）に比して女性 20.0%（4/20）と低率であった。

肝移植非実施 64 例において，主な基礎疾患の有無で死亡率を比較すると，糖尿病のみで差があり，糖尿病無の 23.6%に対して，55.6%と有意に高率であった（表 8：A 型劇症肝炎、LOHF の非移植例における糖尿病合併の有無と内科的治療による死亡率-1998～2012 年-）。

D. 考 案

2012 年に発症した A 型の急性肝不全症例の登録は，A 型劇症肝炎が 2 例，非昏睡型は 8 例の計 10 例で，昨年に比較して減少した。昨年と一昨年の急性肝不全調査では，それぞれ 2011 年発症の 15 例，2010 年発症の 16 例が登録された。保健所への届出に基づく感染症動向調査によると，A 型急性肝炎の発生数は，2010 年，2011 年，2012 年がそれぞれ 347 人，174 人，158 人であり，急性肝不全の登録は，昨年在急性肝炎の発生数に比して高率で，今年度の登録数は一昨年とほぼ同等といえよう。

2012 年発症の A 型劇症肝炎は 2 例のみで，ともに肝移植が実施された。非昏睡型の平均年齢より高齢で合併症発症も多いのは前年までと同様であるが，最近の傾向と異なり，2 例とも女性で，また A 型劇症肝炎で肝移植が実施されたのは，2004 年以降では初めてであった。非昏睡型は全例が内科的治療で救命され，予後良好であることが示された。A 型の急性肝不全に対して抗ウイルス剤など特殊な治療薬の使用はなかったが，HDF などの人工肝補助やステロイドパルス治療が実施された症例があり，これらの治療の早期開始が昏睡出現の阻止に有効か否かについては今後の詳細な検討が必要である。

2012 年に E 型の劇症肝炎数の登録はなく，急性肝不全症・非昏睡型 3 例でいずれもが人工肝補助やステロイドパルス療法などで救命された。リバビリンなど抗ウイルス剤を投与した症例はなかった。ところで，急性肝不全・成因不明例 66 例のうち抗 HEV 抗体や HEV-RNA など HEV ウイルスマーカー検査の実

施は 22 例に留まり，未診断の E 型の急性肝不全例の存在が疑われる。現在までの E 型の急性肝不全の登録症例は少数であるが，E 型の動向を解析するためには，データの蓄積を待たなくてはならない。

1998 年から 2012 年に発症した A 型劇症肝炎を対象にして，2003 年以前の前期と 2004 年以降の後期で肝移植非実施例の予後と背景因子を比較したが，2004 年以降に男性の比率と平均年齢が有意に高いこと，また死亡例では基礎疾患を有する症例の比率の高く，糖尿病を有する症例で有意に予後が不良であることが改めて確認された。高齢化と，特に男性の糖尿病有病率の高いことが，最近の肝移植非実施例の予後不良の要因と考えられる。今回の検討で高血圧の合併率が，2004 年以降に有意に増加していたが，症例の高齢化に随伴する事象と解釈される。今後，糖尿病を有する高齢者に HAV ワクチン接種を推奨することは，A 型劇症肝炎の予防に繋がると期待される。

E. 結 語

2012 年に発生した A 型の急性肝不全は，急性肝炎の届出数に相応の 10 例で，うち劇症化した 2 例には 2004 年以降，初めて肝移植が実施された。同年の E 型の急性肝不全は 3 例のみで，劇症化例はなかった。急性肝不全症例では HEV ウイルスマーカー検査未施行例が多く，成因不明例の中に E 型肝炎の未診断例が潜在している可能性がある。一方，1998 から 2012 年までの 15 年間に発症した劇症肝炎と LOHF 症例での検討でも，最近の A 型劇症肝炎は高齢化して，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，肝移植非実施例における救命率が低下した要因と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表：

- 1) Oketani M, Ido A, Nakayama N, Takikawa Y, Naiki T, Yamagishi Y, Ichida T, Mochida S, Onishi S, Tsubouchi H; Intractable Hepato-Biliary Diseases Study Group of Japan. Etiology and prognosis of fulminant hepatitis and late-onset hepatic failure in Japan: Summary of the annual nationwide survey between 2004 and 2009. *Hepatol Res.* 2013; 43: 97-105.
- 2) Mochida S, Takikawa Y, Nakayama N, Oketani M, Naiki T, Yamagishi Y, Fujiwara K, Ichida T and Tsubouchi H. Classification of the Etiologies of Acute Liver Failure in Japan: A Report by the Intractable Hepato-Biliary Diseases Study Group of Japan. *Hepatol Res.* (in press)
- 3) 中山伸朗，持田 智．劇症肝炎の肝移植適応ガイドライン．*Modern Physician* 2013；33：519-524．
- 4) 中山伸朗，持田 智．劇症肝炎と de novo 肝炎．*Annual Review 消化器* 2014，中外医学社，東京，2014，123-133．

2. 学会発表：

- 1) 中山伸朗，内田義人，持田 智．わが国における急性肝不全の成因別実態と治療法の現状．第 17 回 日本肝臓学会大会，東京，2013 年 10 月 9 日．
- 2) Nakayama N，Oketani M，Kawamura Y，Tsubouchi H，and Mochida S. Novel hybrid model for prediction of the outcome of patients with acute liver failure: Combination of forms of artificial neural network and decision trees. The liver meeting 2013 of AASLD (米国肝臓学会会議)，Washington DC，2. Nov. 2013.

G. 知的所有権の取得状況

特許申請：なし

実用新案登録：なし

その他：なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
経口感染によるウイルス性肝炎（A型及びE型）の
感染防止、病態解明、遺伝的多様性及び治療に関する研究
平成25年度分担研究報告書

日本および近隣国における2013年のA型肝炎の分子疫学的解析およびA型肝炎のリスクアセスメント

研究分担者 石井孝司（国立感染症研究所ウイルス第二部）

研究要旨:本研究では、2010年より全国の地方衛生研究所と共同で、A型肝炎患者の糞便または血清からA型肝炎ウイルス(HAV)ゲノムの配列を決定し、流行状況の分子疫学的解析を行っている。2010年の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による発生は、2011年、2012年には見られなかったが、2013年になって東南アジアからの輸入例2株が検出された。genotype IIIAについては2013年も引き続き検出されている。また、A型肝炎は4類感染症に分類され、すべての医師は患者が発生するたび、最寄りの保健所に届け出ることが義務づけられている。2008-2012年に届けがあったA型肝炎患者情報を集計し、各国・地域別感染リスクを検討した。

共同研究者:

清原知子（国立感染症研究所ウイルス第二部）

多田有希（国立感染症研究所感染症疫学センター）

A. 研究目的

日本は世界的に見て、最もA型肝炎の少ない地域の一つである。1990年の大流行を最後に患者数は減少し、近年の患者報告数は年間200人程度で推移している。2003年の血清疫学調査では、全人口の約88%、50歳以下の約98%はHAV感受性者であることが明らかになった。また、これまで防御抗体を持つとされてきた高年齢層でもHAV感受性者が増加しており、患者の高齢化とそれに伴う重症化も危惧される(表1:重症A型肝炎患者報告数-2008~2012年累計)。このような状況を鑑み、A型肝炎の予防についてより一層の情報発信が必要と考えられる。

我々は、国立感染症研究所感染症疫学センター、国立医薬品食品衛生研究所、および全国の地方衛生研究所と共同で、A型肝炎の全国的なサーベイランスシステムを構築し、ウイルス(HAV)ゲノムの塩基配列情報を基に分子疫学的な解析を行っている。本年は、昨年に引き続き2013年のA型肝炎の日本における発生状況について分子疫学的解析を行い、流行状況の調査を行った。また、台湾、フィリピンのA型肝炎流行状況およびウイルス浸淫状況を調査し、日本の流行株との比較を行った。また、2008-2012年のA型肝炎患者情報と各国・地域別日本人訪問者数から、渡航先別A型肝炎感染リスクを検討した。

B. 研究方法

A型肝炎患者の便乳剤または血清からRNAを抽出し、平成21年12月1日に医薬食品局食品安全部監視安全課長より通知された食安監発1201第1号「A型肝炎ウイルスの検出法について」に従い、HAVゲノムの構造/非構造領域のjunction部分の配列をRT-PCR法により増幅後決定した。これらの配列を過去のデータベースと比較し分子疫学的な解析を行なった。

フィリピン、マニラ市内の6ヶ所の河川水50ml中のウイルスを陰電荷膜に吸着させ、ビーフエクストラクト液で吸着物を抽出した。溶出液からRNAを抽出し、同様にHAVゲノムをRT-PCR法により増幅し、TAクローニングを行って各サンプルからそれぞれ6株ずつを配列決定し、日本のHAV配列との比較を行った。

感染症法の4類感染症として報告されたA型肝炎症例の報告内容(診断日、性別、年齢、感染地域等)からA型肝炎の感染リスクを調査した。本研究では、2013年1月10日現在のデータを用いた。調査期間は2008年~2012年とした。また、各国・地域別日本人訪問者数は一般社団法人日本旅行業協会のデータを使用した。

(<http://www.jata-net.or.jp/data/stats/2013/05.html>)

倫理面への配慮: 取り扱うすべての DNA および病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験施設で取り扱われる。各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、本研究では個人を特定できるデータは含まれていない。

C. 研究結果

2013 年の A 型肝炎の分子疫学的解析

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(図1: A 型、E 型肝炎患者発生数の推移、図2: 2013 年の急性 A 型肝炎発生状況「暫定報告数」)。そのうち 16 株の解析を行ったところ、IA が 13 株、IIIA が 3 株であった。図3(2013 年の日本株と台湾株)に青字で示したのが本年に検出された株である。広島市で発生した家族内感染では 6 人が感染、4 人が発症している。配列解析の結果日本に常在する IA 株 (IA-1) によると考えられる。

2010 年に multi-location outbreak の主な原因となった東南アジア由来と考えられる株(IA-2)は、2011 年、2012 年には計 1 例のみであり、2010 年の流行後は日本に定着せずほぼ消失したものと推定された。2013 年はフィリピンおよびタイから帰国した 2 例が本クラスターに属するものと考えられた。

フィリピン、台湾における HAV の配列解析

フィリピンのマニラ市内の河川 6ヶ所からすべて HAV 遺伝子が検出され、市内にウイルスが常在していることが明らかとなった。検出された HAV 株はすべて genotype IA であり、約 400bp の配列解析の結果さらに 3 つのサブクラスター (S1~S3) に分類されると考えられる(図4: 日本とフィリピンの IA 株の比較、赤と桃色で示した)。そのうちの S1 は日本で 2010 年に流行した株のクラスターと一致すると考えられる。

台湾 CDC、楊志元博士から分与された、台湾北部の A 型肝炎患者由来の HAV 配列計 10 株の解析を行った。検出された HAV は、8 株が IA、2 株が IIIA であり、系統樹解析の結果、IA のうち 3 株は日本で 2010 年に流行した東南アジア由来と考えられる株に近いと考えられた。残りの 5 株は上記の株とも日本での常在株とも異なる別のクラスターに属した(図4)。

海外感染例の解析

2008 年から 2012 年の患者報告数は、合計 963 人、年平均約 200 人であった。発症前に渡航歴があり海外感染が疑われた患者報告数は 2008-2012 年累積で 241 人(25.0%)であった。国内で multi-location outbreak があつた 2010 年(15.0%)を除くと、各年 22.9-36.1%で推移しており、A型肝炎患者のおよそ 1/4~1/3 は海外で感染したものと推察された。海外感染率をもっとも高いのは 20 代であった。また、20 代では男性患者が女性患者より有意に多かった(図5: 年齢・性別海外渡航者と感染者数)。

邦人渡航者数上位 30ヶ国の対 10 万人 A型肝炎感染率を比較すると、最も感染率が高いのはパキスタン、次いでバングラデシュ、ボリビア、インド、スリランカと南アジアに多い傾向が認められた(表 2: 邦人渡航者数上位 30ヶ国の対 10 万人感染者数)。

D. 考察

2010 年の全国的な multi-location outbreak の主要な原因となった IA-2 のクラスターに属する株は、2011 年から 2013 年まで、国内が原因と思われる報告例は 2011 年の 1 例のみであった。このクラスターに属する株は同一の感染源から何らかの理由で 2010 年に全国に拡散して広域流行をおこしたが、二次的な拡大はせず収束し、2011 年にはほぼ消失したものと推定される。2013 年の 2 例はフィリピンおよびタイからの輸入感染例と考えられる。

Genotype IIIA は今年検出された 3 株のうち、韓国で流行したクラスターに属するのは 1 株のみであった。他の 2 株はいずれも南アジアからの輸入感染例で、上記のクラスターとは異なる位置に属した。

A型肝炎は渡航者感染症でもあり、日本における A型肝炎感染者の 1/3 から 1/4 は海外での感染疑いである。各国・地域別日本人訪問者数から対 10 万人感染率を算出すると、従来、感染リスクが高いと言われてきた東南アジアよりも、パキスタン、バングラデシュ、インドなど南アジアの感染リスクの方が高い結果となった。東南アジアの衛生状態の改善とともに、東南アジア旅行者の予防意識の向上が要因と思われる。国内の感染では、40 代、50 代の感染者が多いが、海外感染率をもっとも高いのは 20 代であった。20 代の海外渡航者は女性の方が多く一方で感染率は男性が有意に高く、予防対策や好む渡航先、渡航先での行動の男女差が A型肝炎感染に関与していると考えられる。

E. 結論

2010 年の流行の主な原因となった株 (IA-2) は 2011 年以降はほとんど見られず、日本には定着せず

に消失した可能性が示唆されるが、フィリピン河川水調査の結果、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、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。台湾北部での流行株は日本の現在の常在株とは異なっており、限られたデータではあるが日本の流行との関連性はあまり高くないと思われる。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システムを継続していくことは極めて重要であると考えられる。

A型肝炎は日本では稀な病気であるが、海外では常在、流行地域は珍しくない。多くの日本人は抗体を持っていないので、渡航前にワクチンを接種するのが望ましい。これは、個人の感染を防ぐためだけでなく、渡航先の医療機関の負担を減らすためにも必要である。地域別の感染者数を比較すると、渡航者が多い東南アジア、東アジアが相対的に患者報告数も多くなるが、各国・地域別日本人訪問者数 10 万人あたりに換算すると南アジアの感染率が高かった。A型肝炎はワクチンで防ぐことができる疾病である。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。「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。

全国サーベイランス共同研究者

吉崎佐矢香、佐藤知子、島田智恵、中村奈緒美、中島一敏(国立感染症研究所) 野田 衛、上間 匡(国立医薬品食品衛生研究所) 筒井理華(青森県) 青木洋子(山形県) 関根雅夫(仙台市) 齊藤哲也(新潟市) 原 孝(茨城県) 山崎彰美(柏市) 篠原美千代(埼玉県) 新開敬行(東京都) 涌井 拓(千葉県) 清水英明(川崎市) 宇宿秀三(横浜市) 大沼正行(山梨県) 長岡宏美(静岡県) 吉田徹也(長野県) 岡村雄一郎(長野市) 小原真弓(富山県) 柴田伸一郎(名古屋市) 楠原 一(三重県) 近野真由美(京都市) 入谷展弘(大阪市) 飯島義雄(神戸市) 川西伸也(姫路市) 榊原啓子(岡山市) 榎本義正(福山市) 岡本玲子(山口県) 世良暢之(福岡県) 川本大輔(福岡市) 増本久人(佐賀県) 上村晃秀(鹿児島県)

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Li T.C., Yang, T., Shiota T., Yoshizaki S., Yoshida H., Saito M., Imagawa T., Malbas F., Lupisan S., Oshitani H., Wakita T. and Ishii K. Molecular detection of hepatitis E virus in rivers in the Philippines. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, in press.
2. Shiota T., Li T.C., Yoshizaki S., Kato T., Wakita T. and Ishii K. Hepatitis E virus capsid C-terminal region is essential for the viral life-cycle: Implication in viral genome encapsidation and particle stabilization. *Journal of Virology* 87: 6031-6036, 2013.
3. 石井孝司. A型肝炎、E型肝炎 臨床と微生物 41: 72-78, 2014.
4. 石井孝司, 清原知子. A型肝炎ワクチン *BIO Clinica* 28: 25-29, 2013
5. 石井孝司, 李天成. E型肝炎の概要および検査法. *病原微生物検出情報* 35: 3-4, 2014.
6. 石井孝司, 李天成, 恒光裕. 人獣共通感染症としての E型肝炎. *病原微生物検出情報* 35: 4-5, 2014.
7. 原田誠也, 大迫英夫, 吉岡健太, 西村浩一, 清田政憲, 李天成, 石井孝司. イノシシ、シおよびブタの E型肝炎ウイルス感染状況調査-熊本県. *病原微生物検出情報* 35: 9-10, 2014.
8. 石井孝司. E型肝炎の慢性化、肝外病変について. *病原微生物検出情報* 35: 13-14, 2014.

2. 学会発表

1. Ishii K. Epidemiological and genetic analysis of hepatitis A virus infection in Japan. 15th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim. Singapore. March 10-14, 2013
2. 清原知子, 石井孝司, 多田有希, 脇田隆字: A型肝炎のリスクアセスメント, 第17回日本ワクチン学会、平成25年11月、津
3. 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宿主因子の探索に関する研究, 第61回日本ウイルス学会、平成25年11月、神戸
4. 石井孝司, 李 天成, 吉崎佐矢香, 塩田智之, 脇田隆字: E型肝炎ウイルスレプリコンの構築とレプリコン包埋 VLP 作成の検討, 第61回日本ウイルス学会、平成25年11月、神戸

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業
経口感染によるウイルス性肝炎(A型及びE型)の感染防止、病態解明、
遺伝的多様性及び治療に関する研究
平成25年度分担研究報告書

A型肝炎ウイルスに対する抗ウイルス剤の開発

研究分担者 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

研究要旨:各種宿主細胞因子に対する siRNAs を用いて, HAV IRES 依存性翻訳および HAV レプリコン増殖に対するにおける宿主細胞因子の解析を行なった. La の発現抑制により HAV IRES 依存性翻訳抑制および HAV レプリコン増殖抑制がみられた. 宿主細胞因子 La は HAV IRES 依存性翻訳および HAV レプリコン増殖に重要な分子の一つであることを明らかにした.

<研究協力者>

神田 達郎 (千葉大学大学院医学研究院・消化器・腎臓内科学・講師)

A. 研究目的

我々はこれまでにインターフェロン・アルファ, インターフェロン・ラムダ 1 およびアマンタジンなどが A 型肝炎ウイルス(HAV) internal ribosomal entry-site (IRES)を介して, HAV に対する抗ウイルス効果を持つことを報告してきた. 今回は HAV により有効な治療法の開発を目指し, HAV 増殖に重要な宿主細胞因子を検討することを目的に以下の研究を行なった.

B. 研究方法

- 1) これまでに HAV IRES と相互作用する分子として eIF4E, PABP, La, PCBP2 (hnRNPE2), PTB (hnRNP I), GAPDH, eIF4G などが報告されている. はじめに, eIF4E, PABP, La, PCBP2 (hnRNPE2), PTB (hnRNP I), GAPDH, eIF4G など各種宿主細胞因子に対する siRNAs を作成し各分子のノックダウンを確認した.
- 2) 次に各 siRNA と HAV IRES レポーターを肝細胞に遺伝子導入しルシフェラーゼアッセイにより HAV IRES 活性を測定した. 各分子をノックダウンした場合の HAV IRES 活性に対する影響を検討した.
- 3) 前記 siRNA の HAV IRES に対する効果が見られた場合には, siRNA を HAV レプリコンとともに肝細胞に遺伝子導入し, ルシフェラーゼアッセイを用いて HAV レプリコン増殖に対する影響を検討した.
- 4) 非特異的抗 HAV 剤との併用効果も検討した.
- 5) また siRNA に代わる阻害剤を用いた検討も行なった.

倫理面への配慮: 血清の解析に関しては千葉大学医学部倫理委員会に申請し, インフォームドコンセントに係る手続きを実施し, 提供試料, 個人情報を厳格に管理保存する. また, 一般論として弱者, 女性, 少数民族の疫学調査等を行う場合は倫理上十分配慮している.

C. 研究結果

- 1) La, GAPDH, PTB, PCBP2, PABP, eIF4E, eIF4G に対するそれぞれの siRNAs を作成し Huh7 細胞に遺伝子導入した. 48 時間後に細胞蛋白を回収し, Western Blot にて各分子のノックダウンを蛋白レベルで確認した.
- 2) 各宿主細胞因子に対する siRNAs による HAV IRES 活性の変化を Huh7 細胞を用いてレポーターアッセイにより検討した. コントロール siRNA と比較すると, La に対する siRNA (La-siRNA)をレポーター-遺伝子と共に遺伝子導入した場合にのみ HAV IRES 活性が 59%と低下した. すなわち La-siRNA に

よる HAV IRES 依存性翻訳の抑制を確認した。またコントロール siRNA と比較して、La-siRNA 使用時には細胞障害性の増加が見られないことを MTS アッセイにより確認した。

- 3) La-siRNA による HAV レプリコン増殖の抑制を用いて検討した。遺伝子導入後 24-72 時間の検討では La-siRNA により HAV レプリコン増殖が 15-29% と低下した。
- 4) La-siRNA とアマンタジン 5 μ g/mL を併用することで HAV レプリコン増殖の抑制が増強することを確認した。
- 5) また JAK 阻害剤 SD-1029, AG490 により La の発現の減少がみられ、両薬剤の使用にて HAV IRES 活性の抑制を確認した。
- 6) HAV に関するウイルス感染実験を行なう準備として千葉大学に病原体等取扱変更申請を行い承認された (千大研第 13 号)。

D. 考察

HAV は急性肝炎の主要な原因の一つであり、HAV に対する抗ウイルス剤の開発は重要と考えられる。HAV そのものを標的とする Direct-acting antivirals (DAAs) および HAV 増殖に關与する宿主因子を標的とする Host-targeting agents (HTAs) により HAV 増殖の抑制がそれぞれ可能と考えられる。

HTAs の特徴としてはその抵抗性に高い遺伝的要因が關与すること、およびウイルスジェノタイプとは無関係に作用することなどが知られている。DAAs とは相補的に作用する可能性があり、両者併用により、強いウイルス増殖抑制の誘導が可能であると考えられる。

今回の検討では、宿主蛋白 La に対する siRNA により HAV IRES 依存性翻訳および HAV レプリコン増殖の抑制がみられることを確認した。

これまでに La 蛋白の発現を変化させる薬剤としては(-)-Epigallocatechin gallate, Iron chelator deferxamine (DFX), Ferric ammonium citrate, AZD1480 (Jak-Stat pathway 阻害剤), HBSC-11 などが報告されている。今回 JAK 阻害剤 SD-1029, AG490 により宿主蛋白 La の発現抑制、および HAV IRES 依存性翻訳抑制を確認した。今後は HAV ウイルスそのものに対する影響を検討する必要があると考えられた。

E. 結論

宿主細胞因子に対する siRNA を用いた検討を行なうことにより、La の HAV IRES 依存性翻訳における重要性を明らかにした。La の発現抑制により HAV IRES 依存性翻訳抑制、HAV 増殖抑制がみられた。

F. 研究発表

1. Wu S, Nakamoto S, Kanda T, Jiang X, Nakamura M, Miyamura T, Shirasawa H, Sugiura N, Takahashi-Nakaguchi A, Gono T, Yokosuka O. Ultra-Deep Sequencing Analysis of the Hepatitis A Virus 5'-Untranslated Region among Cases of the Same Outbreak from a Single Source. *Int J Med Sci.* 2013 Dec 20;11(1):60-4. Doi: 10.7150/ijms.7728. PMID: 24396287

G. 知的所有権の取得状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業
経口感染によるウイルス性肝炎(A型及びE型)の感染防止、病態解明、
遺伝的多様性及び治療に関する研究
平成25年度分担研究報告書

北海道地区献血者集団におけるHEV感染の実態解明

研究分担者 日野 学 日本赤十字社 血液事業本部 副本部長

研究要旨：北海道において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%)となり、過去最低を示した昨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。1名を除くすべてのHEV陽性者にHEV特異抗体は検出されず、ほとんどは感染初期の献血と考えられた。また、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。詳細に経過が追えた6例中4例は軽度の肝炎を発症した。陽性者のHEV遺伝子型はすべて3型で、サブタイプ3a株と3b株が約8割を占める状況は従来と変わらないが、近年、北海道士着株の割合が減少しつつある。さらに、HEV遺伝子型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。

<研究協力者>

松林圭二、坂田秀勝、吉政 隆、飯田樹里、佐藤進一郎 (日本赤十字社北海道ブロック血液センター品質部)

A. 研究目的

本研究では、献血者集団におけるHEV感染の実態を調査し、輸血用血液によるHEV感染のリスク評価を行い、適切な対策を講じることを目的とする。

B. 研究方法

昨年に引き続き、2013年1月から12月までの北海道内献血検体のうち、血清学的感染症スクリーニング陰性かつALT値61 IU/L未満の検体276,477本を対象としてHEV RNAスクリーニング(HEV NAT)調査を実施した。

HEV NAT検査は、まず20 プール血漿検体265 µLからQIAamp Virus BioRobot MDx Kit (Qiagen)を用いて核酸を抽出し、続いてORF2/3領域の75塩基をターゲットとするReal-time RT-PCR法により、QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen)を用いてApplied Biosystems 7500で増幅・検出した。陽性検体はさらにプールを構成する20検体について個別に検査を実施した。

HEV RNA陽性検体については、抗HEV IgM抗体およびIgG抗体をIgG/IgM anti-HEV EIA(特殊免疫研究所)で測定し、Real-time RT-PCR法により、HEV RNAの定量を行った。また、ORF2/412ntに基づくNJ法による分子系統樹解析をMEGA 6.0を用い、Lu(Rev. Med. Virol. 2006; 16: 5-36.)の分類法に

基づき HEV のサブタイプを調べた。さらに陽性献血者に対しては、献血前の動物内臓肉喫食歴に関するアンケート調査を行うとともに、陽性が判明した献血から 6 ヶ月以内の遡及調査および献血後追跡調査を行った。

倫理面への配慮：検体はすべて匿名化されており個人のプライバシーを侵害することはなく、人権上の問題は生じない。

C. 研究結果

2013 年の HEV RNA 陽性者数は 25 名（男性 19 名、女性 6 名）で、陽性率は献血者延べ 1 万人当たり 0.9 人（男性 1.1 名、女性 0.6 名、 $p=0.235$ ）となり、統計的な有意差はないものの、男性優位の状況は変わっていない。陽性率は過去最も低かった昨年と比較すると男女ともほぼ同様の値となった（図 1：HEV NAT 陽性率の年次推移）。陽性者の年齢は昨年の $43.5+/-10.2$ 歳から若干下降し $40.5+/-13.9$ 歳であった。陽性者の発生時期については、例年同様、季節性は見られなかった（図 2：HEV NAT 陽性者の月次発生数）。また、陽性者の居住地については約半数が都市部に集中しており、11 例（44%）は札幌市在住者であった。

HEV RNA 陽性判明時の抗体保有状況については、1 名を除くすべての陽性者からは IgM、IgG のいずれの HEV 特異抗体も検出されず、感染初期に献血したと考えられた。

献血 2 か月以内の内臓肉喫食歴は 67% と例年通り高く、献血後 1 か月以内に 2 回以上経過観察できた陽性者 6 名中 4 名が、ALT が 45 IU/L 以上となって軽度の急性肝炎症状を呈した（表 1）。

HEV NAT 調査を開始した 2005 年から 2013 年までの 9 年間においては、HEV RNA 陽性者総数は 279 名（男性 209 名、女性 70 名）に達し、献血者延べ 1 万人当たりの平均陽性者数は 1.12 人（男性 1.33 人、女性 0.77 人、 $p<0.001$ ）で有意な性差が認められた（表 1：HEV NAT スクリーニングのまとめ）。

HEV 遺伝子型・サブタイプの解析結果を図 3 と図 4 に示す。3a 型と 4c 型については、北海道由来株からのみ構成されるクラスターとその他に分けられ、それぞれ北海道型（3a-1、4c-1）と全国型（3a-2、4c-2）とした。本年分離された株 25 例はすべて 3 型で、3a-1（3）、3a-2（8）、3b（10）、3e（1）そして既報タイプに該当しないもの（3?:3）に分かれた。例年分離される 4 型株は 1 例もなかった。

過去 9 年間の HEV RNA 陽性者の道内献血者由来の HEV 株は、3a（130 例、3a-1:95、3a-2:35）、3b（107）、3e（14）、3i（1）、4b（3）、4c（15、4c-1:11、4c-2:4）、4g（1）の 7 つのサブタイプと既報のサブタイプには該当しない 3 型（3?:4）にタイピングされた。

HEV 遺伝子型・サブタイプについて道内の地方（振興局、旧支庁）別に集計した結果を図 3（HEV 遺伝子型の地理的分布）に示す。陽性者は都市部に集中しているが、特に札幌市がある石狩地方（C1）は全体の半数以上を占めている。この地区の優占株は北海道士着タイプ（北海道型）の 3a-1 型と 3b 型であるが、旭川市のある上川地方（N1）では 3b 型が、函館市のある渡島地方（S1）では全国型 3a-2 型と 3b 型が、苫小牧市・室蘭市がある胆振地方（C2）では全国型 3a-2 型であった。また、4 型株が占める割合は道内全体ではわずか 7% と少ないが、陽性率が低い道東部の網走地方（E3）では 57%、渡島地方（S1）でも 24% と高くなっている。

HEV 遺伝子型・サブタイプの占有率の年次推移を図 4（HEV 遺伝子型・サブタイプの年次推移）に示す。いずれの年も 3a 型と 3b 型が主要な株で、2010 年を除くすべての年で、これらの株が約 8 割を占めている。3a 型については、2008 年までは北海道型（3a-1）が優位な状況が続いたが、その後次第に全国型（3a-2）が増加し、2012 年には逆転して全国型が優位となり現在に至っている。また、近年、既報サブタイプに該当しない株（3?）の割合も増加傾向にあるほか、2010 年には 3e 型が多数確認され、特徴的な年となっている。

D. 考察

2013 年の北海道内献血者の HEV RNA 陽性者の発生状況や特徴は、昨年とほぼ同様で、男性優位、3 型株優位の感染状況が続いている。依然として内臓肉摂取歴を持つ陽性者の割合が多く、zoonotic food-borne 感染が定着していると考えられる。過去 9 年間の動向を解析すると、陽性率に大きな変化は見られないものの、HEV 遺伝子型の出現状況は年々変化していることが明らかとなった。また、HEV 遺伝子型の出現パターンは地域によって大きく異なることから、道内においても HEV 感染源は各地域に密着したものと考えられ、従来から感染源の一つと考えられている動物内臓肉はこれに該当すると示唆さ

れる。

E. 結論

2013年の北海道の献血者集団におけるHEV感染者の発生状況は例年と同様で、献血者にHEV感染が定着している状況は従来と変わっていないが、HEV遺伝子型の分布状況には地域性が認められ、年々変化している状況が確認された。今後もHEVの輸血感染防止のためにも、道内のHEV感染動向に注目していく必要がある。

F. 研究発表

1. 松林圭二，坂田秀勝，飯田樹里，佐藤進一郎，加藤俊明，池田久實，高本 滋，北海道内献血者におけるHEV感染の実態解明，第37回血液事業学会総会，2013年10月21日，札幌.
2. 松林圭二，北海道献血者におけるHEV感染の状況，病原体検出情報 Vol. 35, No.1 (No. 407), 7-8, 2014.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業
経口感染によるウイルス性肝炎(A型及びE型)の感染防止、病態解明、
遺伝的多様性及び治療に関する研究
平成25年度分担研究報告書

北海道内 HEV 感染動向及び
肝疾患既往と A, E 型急性肝炎重症化に関する研究

研究分担者 姜 貞憲
手稲溪仁会病院 消化器病センター

研究要旨：本研究班における我々の課題は、HEV 高侵淫地域北海道で発症する E 型急性肝炎の実態を明らかにし、肝炎重症化の病態と重症例に対する至適治療法を解明し、さらに地域における HEV 伝搬経路を究明することである。本年度は HAV, HEV 感染症の重症化について宿主因子を中心に検討した。A 型肝炎では肝疾患既往、肥満が重症化に関連し、性別（男性）も関与する可能性が示された。背景には HAV 感受性年齢階層の高齢化が存在すると考えられた。E 型では既報の如く genotype 4 HEV の感染に加え、肝疾患既往が重症化に関連した。以上から E 型肝炎のみならず A 型でも中高年症例が増加し、肝疾患既往が重症化に関連すると考えられ、治療介入をはかる際に有用な情報と推測される。

<研究協力者>

狩野 吉康 札幌厚生病院 第3消化器科
水尾 仁志 札幌勤医協中央病院 内科
松居 剛志 手稲溪仁会病院 消化器病センター
山崎 大 手稲溪仁会病院 消化器病センター
永井 一正 手稲溪仁会病院 消化器病センター
新井 雅裕 東芝病院 研究部
高橋 和明 東芝病院 研究部
岡本 宏明 自治医科大学感染・免疫学講座ウイルス学部門

A . 背景

HEV 高侵淫地域と見做されている北海道では、2007年に道内の HEV 感染診断を支援する目的で北海道 E 型肝炎研究会（道 E 研）が発足し、結果的には全道的な HEV 感染監視網としての機能も果たしてきた。2011年末に HEV 感染検査が保険収載されその診断が保険診療で可能となったため、診断支援の歴史的役割は終了した。そこで道 E 研は 2012年以降、E 型肝炎の診断支援から施設横断的に臨床研究を推進する方向へ活動の軸足を移すこととなった。

B . 研究目的

道 E 研ネットワークに参加する全道の主要医療施設で診療した E 型肝炎症例を集積し、その病態、特に重症化の背景と HEV 感染経路を究明する。また、症例の高齢化が著しい A 型肝炎の臨床像を再度検討し、A, E 型肝炎両者での比較によりそれぞれの病態に対する理解を深めることを目的とした。

C. 研究方法

道 E 研は、研究施設(東芝病院研究部、自治医科大学感染・免疫学講座ウイルス学部門)の協力の下、道内医療施設が診療する E 型急性肝炎を対象に、PCR により HEV RNA を検出、HEV genotype を決定し遺伝子系統解析による分子疫学的検討を行う。

さらに、手稲溪仁会病院消化器病センターで診療した A, E 型急性肝炎の重症化に関連する因子について患者背景を中心に検討する。

なお、急性肝不全(acute liver failure; ALF) を PT INR>1.5 または PT 活性 40%、アルコール性肝障害を清酒 3 合に相当するエタノール摂取で 5 年以上、非活動性 HBV carrier を急性肝炎診断時 HBV DNA<4Log copies/ml 且つ急性肝炎沈静化後年 2 回以上の血液検査で ALT<40IU/L と定義した。Acute on chronic liver failure は APASL の定義 (PT>1.5, 総 bilirubin > 5mg/dl) を用いた。

D. 研究結果

1) 2012-3 年における道 E 研登録症例の推移

図 1 に初診時期による各年次の道 E 研登録症例数を示す。2012 年は登録症例数が 26 例であり、同年の HEV 感染発症数の増加が際立つが、2013 年は 11 例であった。抗 HEV 抗体検査の保険収載は 2011 年末からであり、2013 年にはその事実がいよいよ周知され登録数が減ったと思われる。居住地別の症例数は札幌圏 8 例、函館 2 例、北見 1 例で、登録医療施設は 8 施設であった。病型は急性肝不全が 6 例で、そのうち 1 例は肝性昏睡を合併(劇症化)し死亡した。最近 5 年間では ALF の登録数に著変ないことから、2013 年に道 E 研への登録数は減少したものの重症例を扱う基幹医療施設からの登録は維持されていることがうかがえる。道 E 研による重症例の集積が今後もある程度可能か否かは留意が必要と思われる。

2007 年から 13 年迄に道 E 研に集積した E 型急性肝炎症例は合計 122 例となった。

2) A, E 型肝炎における肝疾患既往の意義

1998-2013 年に手稲溪仁会病院消化器病センターで診療した A 型 (n=27) 及び E 型 (n=45) 急性肝炎を対象とし、その臨床像を調べ特に ALF を呈した症例の背景因子を検討した。

表 1(A 型急性肝炎の臨床像)と表 2(E 型急性肝炎の臨床像)に示す如く A 型、E 型急性肝炎症例の年齢中央値は 44 歳、51 歳であった。E 型感染年齢は従前の報告と同様と思われるが、A 型では衛生環境の向上に伴い HAV 感受性年齢の中高年化が観察された。肝疾患既往は A 型 37%、E 型 35.6% でみられた。E 型では 4 例に肝性昏睡が合併し、2 例が死亡の転帰をたどった。

A 型で重症化(ALF)を呈した 10 例では、通常の経過を辿った 17 例に比して男性が多い傾向を認め、既往肝疾患を有する症例は 70%と多く、発症時体重及び body mass index(BMI)が高いことが示された(表 3: A 型急性肝炎による急性肝不全の臨床像)。

E 型では年齢及び性と重症化の関連は明らかではなく、他方、肝疾患既往と感染 HEV genotype 4 が ALF に関連した(表 4: E 型急性肝炎による急性肝不全の臨床像)。

A 型、E 型急性肝炎症例における既往肝疾患の頻度を図 2(A 型急性肝炎由来急性肝不全と肝疾患既往)と図 3(E 型急性肝炎由来急性肝不全と肝疾患既往)に示す。既往肝疾患の内訳は、A 型ではアルコール性肝疾患と非活動性 HBV carrier、E 型ではアルコール性と脂肪肝を合計すると肝疾患既往全体の約 6 割を占めた。

急性肝不全症例において

肝疾患既往例が占める割合は、A 型では急性肝不全の 70%を占め(図 2)、E 型でも同じく 20 例中 11 例と過半数であった(図 3)。

A 型急性肝不全のうち肝疾患既往の 7 例における既往肝疾患はアルコール性 2 例、脂肪肝 2 例、健診などの肝障害歴 2 例、非活動性 HBV carrier 1 例であった。また、E 型急性肝不全のうち肝疾患既往 11 例では、アルコール性 4 例、脂肪肝 3 例、非活動性 HBV carrier 2 例、健診肝障害既往 2 例であった。

APASL の定義に適合する acute on chronic liver failure は、A 型で 3 例(11%)、E 型では 7 例(16%)であり、これらは、図 2, 3 の如く肝疾患既往急性肝不全 A 型 10 例、E 型 20 例に包含された。Acute on chronic liver failure 合計 10 例の転帰は全例生存であり、肝疾患既往急性肝不全(A 型 7 例、E 型 11 例)の転帰とかわらなかつた。A 型 27 症例、E 型 45 例の対象では、既往肝疾患を有する症例で急性肝不全のリスクが高い可能性が示され、APASL による acute on chronic liver failure の定義を満たさない急性肝不全症例も少なくなかつた。

E. 結論

2013 年度に道 E 研に集積した HEV 感染例は急性肝不全の割合が高かった。

宿主背景の再検討により、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る。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る。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検討課題と考えられる。

F. 研究発表

1. 学会発表

1) 姜貞憲、水尾仁志、狩野吉康、高橋和明、新井雅裕、岡本宏明 遺伝子型 4 new Sapporo strain による E 型急性肝炎の臨床像と重症化因子 第 49 回日本肝臓学会総会 東京 2013 年 6 月 7 日

2) Jong-Hon Kang, Yoshiyasu Karino, Hitoshi Mizuo, Kazuaki Takahashi, Masahiro Arai, Hiroaki Okamoto, and Shunji Mishiro

Reemerging Hepatitis E Epidemic in Sapporo, Japan, Caused by a Monophyletic and Virulent HEV Strain within Genotype 4. The 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Amsterdam, 2013 年 4 月 27 日

3) Jong-Hon Kang, Yoshiyasu Karino, Hitoshi Mizuo, Takeshi Matsui, Kazuaki Takahashi, Masahiro Arai, Hiroaki Okamoto, and Shunji Mishiro. Acute hepatitis E Caused by Monophyletic HEV Strain Responsible for Remerged Epidemics in Sapporo, Japan. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of the Liver Diseases Washington DC, 2013 年 11 月 2 日

4) 姜貞憲, 松居剛志, 山崎大, 永井一正, 辻邦彦, 児玉芳尚, 桜井康雄, 真口宏介 A 型急性肝炎の重症化背景並びに Acute on Chronic Liver Failure への関与 第 40 回日本肝臓学会西部会, 岐阜、2013 年 12 月 6 日

2. 研究論文

1) 姜貞憲 E 型肝炎ウイルス 別冊日本臨床感染症症候群 (上) 病原体別感染症編 2013; 541-544.

2) 姜貞憲 E 型肝炎の実態と診断法の進歩 Modern Physician 2013; 33: 511-514.

3) 姜貞憲 E 型肝炎:北海道・札幌地区での観察病原微生物検出情報月報 2014; 35: 5-7.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業
経口感染によるウイルス性肝炎(A型及びE型)の感染防止、病態解明、
遺伝的多様性及び治療に関する研究
平成25年度分担研究報告書

岩手県を中心とした北東北地区における急性A型及びE型肝炎の実態
：過去10年間の変遷

分担研究者：鈴木一幸 岩手医科大学 名誉教授
(現 盛岡大学 栄養科学部 教授)

研究要旨：岩手医大消化器・肝臓内科では岩手県を中心とした北東北地区における40医療機関と共同で急性肝障害患者のプロスペクティブスタディを行ってきている。このシステムを利用して、2004年から2013年12月末までに登録された急性肝障害例についてその成因、臨床病型を再検討し、急性A型及びE型肝炎の実態と時代的変遷を明らかにした。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、年次の症例数をみると、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障害の主体は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。遺伝子型はA型ではIA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遺伝子型以外のHAVおよびHEV感染の危険性が拡大してきている可能性が示唆された。

<研究協力者>

岩手医科大学 消化器内科・肝臓分野 教授 滝川康裕
岩手医科大学 消化器内科・肝臓分野 講師 宮坂昭生
岩手医科大学 消化器内科・肝臓分野 助教 片岡晃二郎
岩手医科大学 消化器内科・肝臓分野 助教 宮本康弘

A. 研究目的

我々は北東北地区において急性肝障害患者の登録システムを構築し、成因と予後に関する調査研究を行ってきた。E型肝炎ウイルス(HEV)による感染の血清学的診断法については血清IgA抗体の測定が平成24年度より保険承認されたが、日常診療の場では十分に普及しておらず、成因不明の急性肝障害症例におけるE型肝炎の実態(感染源または経路、臨床像、予後など)は未だ十分に明らかになっていない。一方、同じ経口感染症であるA型肝炎については北東北地域において明らかな流行性はみられていないが、E型肝炎との臨床像の差異など検討すべき課題が残されている。

本年度は、2004年より2013年12月までに登録された急性肝障害例について成因、臨床病型などを再検討し、A型(AH-A)およびE型急性肝障害(AH-E)と確定診断された症例について、年次推移、遺伝子型、臨床像、予後などを検討した。

B. 研究方法

当科では、2004年より「難治性の肝胆道疾患調査研究」班で作成した劇症化予知式に基づいて、北東

北 4 県の 40 施設と共同で、急性肝障害患者の登録、搬送システムを構築し、劇症化予知・予防に関するプロスペクティブスタディを行っている。また、2009 年 8 月からは、全急性肝障害の登録および血清保存を進め、成因ウイルスの検索などを進めている。本研究では、このシステムの調査結果を基にして行った。

対象は、2004 年 1 月から 2013 年 12 月末までの間に登録された急性肝障害 487 例のうち HAV 及び HEV による急性肝炎と診断された症例について解析した。

HAV の確定診断は IgM-HA 抗体の測定により行い、後日保存血清を用いて遺伝子型も測定した。HEV の確定診断は IgG-HEV, IgM-HEV および IgA-HEV 抗体を測定し、陽性例については HEV-RNA の測定を行い初感染か否かを判定した。また、HEV-RNA 陽性例については HEV 遺伝子型を測定した。なお、HEV の診断ならびに HAV/HEV 遺伝子型の測定は自治医科大学感染・免疫学講座に依頼して行った。

倫理面への配慮：本研究は岩手医科大学倫理委員会の研究承認を受け、また、患者情報の送付に関しては各施設で患者の承諾を得たうえで行った。

C. 研究結果

1. ウイルス性肝障害の頻度と臨床病型

対象期間内に 487 例が登録されたが、ウイルス性肝障害と判定された例は 135 例(27.7%)であった。非ウイルス性肝障害は 352 例(72.7%)であったが、このなかには自己免疫性肝炎、薬物性肝炎、肝炎以外の成因による肝障害(循環障害、アルコール性、代謝性、中毒性) 成因不明(成因検索が不十分な例も含む)が含まれる。

ウイルス性肝障害の成因別頻度では、A 型 10 例(7.3%)、B 型急性感染 25 例(18.5%)、B 型キャリアの再燃 46 例(34.1%)、B 型 de novo 4 例(3.0%)、E 型 23 例(17.3%)、その他のウイルス群(サイトメガロウイルス、EB ウイルス、パルボウイルスなど)27 例(20.0%)であり、全体としては B 型関連の急性肝障害例が半数強を占めた。

臨床病型では、急性肝障害(通常型) 314 例、急性肝不全(非昏睡型) 67 例、急性肝不全昏睡型(急性) 4 例、急性肝不全昏睡型(亜急性) 11 例、ACLF(acute on chronic liver failure)87 例、LOHF(late onset liver failure)4 例であった。

2. AH-A の臨床像

10 例の内訳を表 1 (A 型肝炎の内訳)に示す。男性 8 例、女性 2 例であり、年齢は 22 歳から 69 歳であった。臨床病型は 1 例で重症型を示したが、他は通常の急性肝障害型であった。年次の推移をみると、2004 年 1 例、2006 年 2 例、2007 年 1 例、2009 年 2 例、2010 年 1 例、2011 年 2 例、2013 年 1 例であり、観察できない年もみられた。遺伝子型では未測定 of 1 例を除き IA が 6 例、IIIA が 3 例のうち 2 例は国内感染例であった。感染源については、生カキ、レバー刺しの摂取など明らかに経口感染によると思われる例が 6 例と半数以上を占めたが、4 例は不明であった。

3. AH-E の臨床像

23 例の内訳を表 2 (E 型肝炎例の内訳)に示す。男性 18 例、女性 5 例と男性に多い傾向を示し、過去の報告と同様であった。年齢は 18 歳から 79 歳まで広く分布していた。臨床病型は通常型の急性肝障害 20 例、重症型 2 例、LOHF 1 例であった。感染源(推定)の検討では、獣肉摂取歴、湧水摂取歴を有する例をそれぞれ 5 例、2 例に認めしたが、感染源不明例が 16 例と多数を占めた。一方、遺伝子型の検討では、回復期の保存検体のみであった 1 例を除いた 22 例で測定可能であったが、3 型が 19 例、4 型が 3 例であった。また、サブタイプを検討すると、3 型ではヨーロッパ型も 4 例に認められた。年次的推移で検討すると、2007 年以前はすべて 3 型であったが、2009 年以降では 4 型が散見されるようになってきた(図 1: E 型肝炎の年次発生数と遺伝子型)。

D. 考察

過去 10 年間における北東北地区における急性肝障害の発生調査研究により、経口感染によるウイルス性急性肝障害例においては HAV よりも HEV による例が主体となってきたことが明らかとなった。また、HAV および HEV の遺伝子型では、東北地区では以前は HAV では IA が、HEV では 3 型が中心であっ

たが、近年はHAVではIIIAが、HEVでは4型が散見してきている傾向が認められた。

一方、感染源や感染経路については、依然として不明な例が多く存在している。日常生活の中で摂取している生鮮食品のなかにHAVおよびHEV感染の危険性がある食材が拡大してきている可能性があるが、それらの感染源の同定はなかなか難しいのが現状である。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の上で重要と考えられる。

E. 結論

岩手県を中心とした北東北地区における過去10年間(2004~2013)の急性肝障害例の発生状況を検討し、A型及びE型肝炎の発生数、臨床像、遺伝子型の違いなど最近の実態を明らかにした。いずれの経口感染ウイルスについても今後感染源の更なる検討が必要である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takikawa Y, Harada M, Wang T, Suzuki K. Usefulness and accuracy of the international normalized ratio and activity percent of prothrombin time in patients with liver disease. *Hepatol Res* 92-101, 2014
2. 滝川康裕、鈴木一幸. 肝疾患 急性肝不全の予後. *肝胆膵* 2013; 66: 391-393.
3. Wang T, Takikawa Y, Watanabe A, Kakisaka K, Oikawa K, Miyamoto Y, Suzuki K. Proliferation of mouse liver stem/progenitor cells induced by plasma from patients with acute liver failure is modulated by P2Y2 receptor-mediated JNK activation. *J Gastroenterol* 2014; in press.

2. 学会発表

1. 小野寺美緒、滝川康裕、柿坂啓介、片岡晃二郎、宮本康弘、黒田英克、宮坂昭生、鈴木一幸. 急性肝不全の昏睡発現率とN-アセチルシステインの昏睡発現阻止効果に関する検討. 第49回日本肝臓学会総会、2013年6月7日、東京.
2. 小野寺美緒、滝川康裕、鈴木一幸. 急性肝障害の昏睡発現予知におけるProthrombin index slopeの有用性の検討. ワークショップ2「急性肝不全の予後改善に向けた病態理解と治療の進歩」第17回日本肝臓学会大会、2013年10月9日、東京.

厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業
経口感染によるウイルス性肝炎(A型及びE型)の感染防止、病態解明、
遺伝的多様性及び治療に関する研究
平成25年度分担研究報告書

東京都内の一病院で最近経験した6例の急性E型肝炎

研究協力者 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、医長

研究要旨：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6例の急性E型肝炎を経験した。性別は男4例・女2例、年齢は31歳から71歳であった。全例国内で感染したと推定され、発症年月は2012年9月に1例、2012年12月に2例、2013年2月に2例、2013年6月に1例であった。患者間に接点はなかった。HEV genotypeは3jp型4例、3us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型の1例はgenotype 3型の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、多様な料理を志向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示唆された。東京都心部でも急性E型肝炎は決して稀な疾患ではないので、急性肝炎の原因検索にはIgA型HEV抗体測定が必須である。

<共同研究者>

中山 聡 (同消化器科、医長)
村島直哉 (同消化器科、部長)
又木紀和 (同内科、医長)
近藤壽郎 (同副院長)

A. 研究目的

2011年10月にIgA型HEV抗体の測定が保険適応になり、急性E型肝炎の診断が一般の医療機関でも可能になった。それに伴い今後本邦における急性E型肝炎の実態がより明らかになることが期待される。急性E型肝炎は以前から北海道内で多発することが知られているが、最近東京都内の一病院で6例の急性E型肝炎を経験したので報告する。

B. 研究方法

IgA型HEV抗体が測定可能になった2012年3月から2013年6月までに当院で経験したIgA型HEV抗体陽性急性肝炎6例を対象とした。入院時の保存血清を用いて、自治医科大学医学部感染・免疫学講座ウイルス学部門でHEV RNAの有無をPCR法で測定した。HEV RNAが陽性の場合、さらにORF2領域412ntの塩基配列を決定し、分子系統樹解析を行った。

倫理面への配慮：研究用の採血および血清保存に際しては、全員にインフォームドコンセントを取得した。検体は全て匿名化し、患者が特定できないようにした。したがって、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。また保存血清中にはヒトの遺伝子は含まれない。

C. 研究結果

他院からの紹介は3例あったが、紹介元でIgA型HEV抗体が測定されていた例はなかった。HCV抗体、HBs抗原、IgM型HBc抗体、IgM型HA抗体、IgM型VCA抗体またはIgM型CMV抗体陽性例は存在せず、抗核抗体も全例40倍以下であった。

初診時保存血清でHEV RNAを測定したところ、全例陽性であった。性別は男4例・女2例、年齢は31歳から71歳であった。全例国内で感染したと推定された。発症年月は2012年9月に1例、2012年12月に2例、2013年2月に2例、2013年6月に1例であった。患者間に接点はなかった。

聴き取りで発症前2週から9週の間摂取したHEV感染の可能性がある食物として、豚冷製レバ刺し、半生の豚肉、イノシシ、馬刺し、ホルモン煮込みがそれぞれ1例ずつ挙げられたが、同時摂取者が急性肝炎を発症した例はなく、摂取した食物も残っていなかった(表1:急性E型肝炎6例の推定感染経路)。

HEV genotypeは3jp型4例、3us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型の1例はpeak T-bil (16.2mg/dL)、peak AST (3542 IU/L)、peak ALT (4870 IU/L) およびPT最低値 (29%)がgenotype 3型の5例よりも重症であった(表2:急性E型肝炎6例の臨床データ)。

分子系統樹解析では症例1および症例5からそれぞれ分離されたHEV株の一致率が比較的高かった[図:ORF2領域(412nt)配列に基づくHEVの分子系統樹]が、発症時期および感染経路で両者の関連性は認められなかった。

D. 考察

東京都内の一病院だけで2012年9月から2013年6月の10ヶ月間に6例の急性E型肝炎を経験した。北海道のみならず、東京都心部でも急性E型肝炎が多数発生している実態が明らかになった。いずれも散发例で感染源も確定できなかったが、多様な料理を志向する現在のライフスタイルが都市部の散发性急性E型肝炎多発の一因となっている可能性が示唆された。

E. 結論

東京都内の一病院で最近経験した急性E型肝炎6例を報告した。東京都でも急性E型肝炎は決して稀な疾患ではないため、急性肝炎の原因検索にはIgA型HEV抗体測定が必須である。

F. 学会発表

時田 元、中山 聡、村島直哉、又木紀和、近藤壽郎、岡本宏明. 東京都内の一病院で最近経験した6例の急性E型肝炎. 第40回日本肝臓学会西部会. 2013年12月 岐阜市

G. 知的所有権の取得状況

3. 特許申請: なし
4. 実用新案登録: なし
5. その他: なし

厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業
経口感染によるウイルス性肝炎(A型及びE型)の感染防止、病態解明、
遺伝的多様性及び治療に関する研究
平成25年度分担研究報告書

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] 当初愛知縣のみから報告され“*Aichi strain*”と仮稱されたHEV genotype 4の一系統は、やがて静岡縣からも採取され“*Aichi/Shizuoka strain*”と改名されたが、本年度調査研究の結果、岐阜縣と三重縣にも存在することが判明した。この*Aichi/Shizuoka strain*の感染拡大には、愛知静岡縣境付近に棲息する野生猪がreservoirとして大きく關與して來たが、同地域に棲息する野生猪の行動圏内には豚舎も存在するゆえ、野生猪から飼育豚へと*Aichi/Shizuoka strain*が傳播することにより更なる感染拡大(広域化)の起こる危険性がある。

[2] 福岡縣で、本邦初のHEV-associated Guillain-Barré syndrome (GBS)の一症例が經驗された。海外からの既報11例と異なる特徴として、本例はGBSの典型症状の他に味覚障害も伴っていた點が注目された。肝炎臨牀家には向後、HEV感染に關係付け得るかもしれない神經所見についても、注意深い觀察を要請したい。逆に神經内科醫には、肝機能異常のあるGBSを診たら必ずHEV検査を御願いたい。

<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)
川村欣也 (浜松医療センター)
国立裕之 (京都桂病院)
加藤秀章 (名古屋市立大学)
深江治郎 (福岡大学医学部神經内科)
樋口正晃 (福岡大学医学部神經内科)

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] “HEV *Aichi/Shizuoka strain*” の感染拡大

2006年に伊藤等（肝臓 2006；47：316-317）が愛知縣棲息野生猪からの分離を報告し、次いで清水等（肝臓 2006；47：465-473）が同縣の重症肝炎患者からの検出を報告したところの HEV genotype 4 “*Aichi strain*” は、やがて 2010年に川村等（肝臓 2010；51：418-424）が静岡縣の患者からも類似株を検出したと報告するに及んで “*Aichi/Shizuoka strain*” へと改名された。HEV genotype 4 は夙に北海道の土着株として有名であったが、この “*Aichi/Shizuoka strain*” は北海道土着株とは完全に別物であり、例えば超可変領域内に 5 個のアミノ酸欠失が存在するという特徴などは寧ろ中国の genotype 4 「上海株」に類似している。

この “*Aichi/Shizuoka strain*” が、本年度の調査では、2012年に岐阜縣で發生した E 型肝炎の保存血清（JA0-Gif12）、2013年に静岡縣西部で發生した E 型肝炎症例（JKK-Shiz13）及び 2009年に採取され以後冷凍保存されていた愛知静岡縣境部棲息の野生猪 3 頭（JBOAR025-Aic09, JBOAR089-Aic09, JBOAR196-Aic09）の血清から検出された。のみならず、Database を検索したところ、本研究班の岡本班長が登録した Acc#AB824674 の配列（2012年に三重縣の E 型肝炎患者から採取）も “*Aichi/Shizuoka strain*” に属する株であることが分り、現時点で “*Aichi/Shizuoka strain*” は愛知・静岡・三重・岐阜の東海四縣に跨がって存在することが判明した。かくて、この東海土着の genotype 4 は、北海道土着の genotype 4 に匹敵する major cluster となった（Figure 1 参照）。

Figure 1. HEV ORF1 内の 326 nt で描いた系統樹

上述したように中国の上海株との近似性は明らかに存在したが、完全長乃至準完全長ゲノムで系統解析すると両者の違いが一層自明であった（Figure 2 参照）。

Figure 2. 完全乃至準完全長ゲノムに基づく HEV genotype 4 の系統樹

夙に HEV genotype 4 に属する株は genotype 3 の株より病原性が高いとされて来たが、それは主として北海道土着 genotype 4 株の感染事例を観察することにより得られた知見であった。しかし、何故か此の東海地方に土着して徐々に感染拡大しつつある HEV genotype 4 “*Aichi/Shizuoka strain*” の感染事例も、殆どが「重症度の高い急性肝炎」として報告されたものである。よって北海道土着の genotype 4 と同様に、此の “*Aichi/Shizuoka strain*” も「高病原性 HEV 株」と看做されるべきである。だとすれば積極的な感染拡大防止策が講じられなければならない。

ところが、およそ全ての病原体は（病原性の高い場合なら尚更）現状以上に感染拡大が起らないよう封じ込められなければならないが、いま我々が關心するところの HEV genotype 4 “*Aichi/Shizuoka strain*” の封じ込めについては二つ（いや三つかもしれない）の大きな問題が存在する。

第一には、この HEV 株の natural reservoir であるところの野生猪の棲息数が近年増加しつつあるらしいことである。

第二には、この HEV 株に感染している野生猪集団の棲息圏の直ぐ近く（寧ろ敢えて云うなら棲息圏内あるいは生活行動圏内）に、食用の豚を飼育する為の豚舎が（二つも）存在することである（Figure 3

参照)。ひとたび此の HEV 株が豚舎に入ってしまうと「食品流通ルートによる HEV 感染」という北海道型の感染拡大が起こる可能性がある。

Figure 3. 養豚場の近傍に高病原性 HEV に感染した野生猪が棲息するという危険きわまりない構圖

第三には、この地域には Figure 4 に示す新聞記事で報道されているような不法行為をする養豚業者が今でも存在するという事実である。これは、封じ込めの逆を行く行為であり、かかる人為が飼育豚から野生動物への HEV 傳播を媒介して来た可能性は十分にある。

Figure 4. 愛知県内養豚場汚水の不法投棄を報じた毎日新聞の記事

<http://headlines.yahoo.co.jp/hl?a=20140121-00000034-mai-soci>

上述した三つの問題に對して、HEV 感染拡大防止の観点から、具体的にどう對處すべきかは既に自明であるが、敢えて喫緊の對策をひとつ擧げるなら「少なくとも養豚場周囲に棲息する野生猪については、棲息頭数の削減を目指す」という戦略である。即ち、

[HEV-endemic area での積極的狩獵]

[棲息頭数削減]

[猪口密度減少]

[その地域の猪に於ける HEV 感染率の低下]

[その地域の猪に於ける HEV 感染の終熄]

この圖式は嘗て兵庫縣で成功したことがある戦略である（北嶋直人. 厚労科研肝炎等克服緊急對策研究事業: 本邦に於ける E 型肝炎の診斷・予防・疫学に關する研究. 平成 17 年度総括研究報告書 pp18-19）。

[2] “HEV-associated Guillain-Barré syndrome” 本邦初例（福岡大学神経内科）

筋力低下と四肢のしびれを主訴に福岡大学神経内科に来院した 49 歳男性。神経學的所見はギランバレー症候群（以下 GBS）に合致していたが肝機能異常を認めため、主治醫の樋口正晃は GBS の先行感染（trigger）として肝炎ウイルス感染を疑って検査したところ、HBsAg と anti-HCV は陰性だったが、IgA anti-HEV が陽性と判明。しかし時は既に入院後 2 週間経過しており、HEV RNA titer が非常に低くなっていたが、HEV genome 5' 高度保存領域の約 70 nt の検出には（追試にも）辛うじて成功した（Figure 5 参照）。Genotype は 3 型であったが、増幅し得たのが高度保存領域であった故、subgenotype は判定不能であった。

Figure 5. HEV 感染の証明. 惜しむらくは入院時（2012.10.26）の血清が保存されていなかったこと

海外からの既報 11 例と異なる特徴として、本例は GBS の典型症状の他に味覚障害（dyageusia）を伴っていた點が注目された（Higuchi et al. Dysgeusia in Guillain-Barré syndrome associated with acute hepatitis E: case report and literature review. *submitted*）。

肝炎臨牀家には向後、HEV 感染に關係付け得るかもしれない神経所見についても、注意深い觀察を要請したい。逆に神経内科醫には、肝機能異常のある GBS を診たら必ず HEV 検査の實施を御願いたい。

本邦に HEV-GBS が本例一例しか存在しないとは到底思えないからである。

D. 研究発表

2. 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: 287-98.
3. Harun-Or-Rashid M, Akbar SM, Takahashi K, Al-Mahtab M, Khan MS, Alim MA, Ekram AR, Khan MM, Arai M, Mishiro S. Epidemiological and molecular analyses of a non-seasonal outbreak of acute icteric hepatitis E in Bangladesh. *J Med Virol* 2013; 85: 1369-76.
4. Masaaki Higuchi, Jiro Fukae, Jun Tsugawa, Shinji Ouma, Kazuaki Takahashi, Shunji Mishiro, Yoshio Tsuboi. Dysgeusia in Guillain-Barré syndrome associated with acute hepatitis E: case report and literature review. (submitted).
5. 高橋 和明, 藤原 有希, アクバル・S.M.F., 新井 雅裕, 三代 俊治. 血中の A 型肝炎ウイルス粒子には脂質膜エンベロープが存在する. *肝臓* 2013; 54: 396-398.
6. 新井 雅裕, 手島 一陽, 金原 猛, 高橋 和明, 安倍 夏生, 三代 俊治. 都内一般病院で経験した急性肝炎症例および市販食品からの多様な HEV-RNA の検出. *病原微生物検出情報* 2014; 35: 8-9.
7. 深江治郎他. 急性 E 型肝炎に伴って Guillain-Barré 症候群を発症した一例. (2013 年 6 月 29 日、佐賀大学医学部講堂、第 202 回日本神経学会九州地方会)

E. 知的所有権の取得状況

6. 特許申請：なし
7. 実用新案登録：なし
8. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業
経口感染によるウイルス性肝炎(A型及びE型)の感染防止、病態解明、
遺伝的多様性及び治療に関する研究
平成25年度分担研究報告書

三重県全域におけるE型肝炎発生調査：2013年の特徴

研究協力者 中野達徳 藤田保健衛生大学七栗サナトリウム・内科 准教授

研究要旨：2011年8月より三重県内19の主要医療機関の協力を得て三重県全域におけるE型肝炎の発生調査を開始した。過去にも溯り2004年から2012年までの8年間に三重県内で発生したE型肝炎症例を36例確認した。そのうち19例で原因となったE型肝炎ウイルス(HEV)の遺伝子配列が解析でき、日本では比較的稀な subtype 3e による急性肝炎が13例(68%)を占めていた。2013年はE型肝炎の発生は5例にとどまった。これまで多く確認した subtype 3e 株による症例は認めなかった。subtype 3a 症例と3b 症例を認めたが既報の近縁株は無かった。2013年の大きな収穫は桑名市で genotype 4 による症例を確認したことである。さらにこの 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。三重県桑名市は愛知県、岐阜県と木曾三川を境界として接しており、この地で愛知県、岐阜県、静岡県で分離される株に塩基配列が非常に近い株によるE型肝炎が発生したのは特に興味深い。しかし、愛知県、岐阜県、静岡県の genotype 4 株はいずれも野生動物関連株であり、桑名の症例は野生動物との関連が確認できなかった。また、この症例は発症前に愛知県、岐阜県、静岡県で外食したことも無く、三重県内で感染したことが疑われる。これらの調査結果から、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る。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型肝炎発生調査は今後も続ける必要があると思われる。

<共同研究者>

岡野 宏 (鈴鹿中央総合病院・消化器内科、医長)
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)
三代 俊治(東芝病院・研究部、部長)
新井 雅裕(東芝病院・消化器内科、院長・部長)
高橋 和明(東芝病院・研究部、主任研究員)

A. 研究目的

我々は2004年から2012年までの8年間に三重県内で発生したE型肝炎症例を県内主要医療機関の医師と協力して36例確認していた(図1：三重県の保健所管区別E型肝炎発生状況と genotype)。そのうち19例で原因となったE型肝炎ウイルス(HEV)の遺伝子配列が決定されてきた。その遺伝子型(genotype)の大きな特徴は、日本では比較的稀な subtype sp/3e 型(以降 subtype 3e)が13例(68%)を占めていたことであった。特に2012年には年間に過去最高の12例の発生があり、遺伝子型が判明した7例中4例が subtype 3e であった。2013年も同様に subtype 3e によるE型肝炎が多く発生するのか、別の傾向が現れるのかを継続調査するとともに、遺伝子解析から感染源、感染経路を検索することを目

的として三重県内での E 型肝炎の発生調査を継続した。

B. 研究方法

三重県全域の 19 主要医療機関の協力を得て調査を継続している（図 2：三重県全域における E 型肝炎発生調査協力医療機関）。これらの医療機関にて急性肝障害患者の発生とともにこの調査への症例登録をしていただき、血清は自治医科大学医学部感染・免疫学講座ウイルス学部門または東芝病院研究部に送付していただいた。それぞれの研究室にて HEV 抗体検査、HEV-RNA 検査を行い、HEV-RNA 陽性の場合には遺伝子配列決定を試み、BLAST search と分子進化系統樹により、genotype と subtype の決定と、既報の HEV 株との関連を検討した。また、患者からは個人情報への守秘に注意を払いつつ、2 カ月以内の野生動物肉の摂食歴、豚内臓肉、豚肉、豚肉加工品などの喫食歴、渡航歴、輸血歴、多種の動物種との接触歴などを詳細に聴取した。HEV 遺伝子配列の解析と詳細な患者情報から感染源、感染経路の特定に努めた。

倫理面への配慮：この調査研究は藤田保健衛生大学七栗サナトリウム倫理委員会の承認を得た。各医療機関からの情報により、他の協力施設には患者が特定できないように配慮した。

C. 研究結果

2013 年 1 月から 12 月までに 6 医療機関から 29 例の急性肝障害の登録があった。このうち 5 例が HEV 抗体検査と HEV-RNA 検査により、急性 E 型肝炎と診断された（図 1）。このうち 4 例が HEV-RNA 陽性で遺伝子配列解析が可能であった。保健所管区別の急性 E 型肝炎発生状況と genotype は、桑名で genotype 4 症例が 1 例、四日市で不明 1 例、鈴鹿で subtype us/3a 型（以降 subtype 3a）1 例、津で subtype jp/3b 型（以降 subtype 3b）1 例と subtype 3a 症例 1 例で、subtype 3e は認めなかった。HEV-RNA 陽性の 4 例では ORF2 領域の 412 塩基配列を決定し、BLAST search と分子進化系統樹解析で近縁株を検索した（図 3：三重県の急性 E 型肝炎から分離された HEV 株）。Subtype 3a の 2 例と subtype 3b の 1 例には特別な近縁株は存在しなかった。ところで、愛知県、岐阜県の野生動物から非常に塩基配列が相似した HEV genotype 4 株がこれまで検出されている。また愛知県、静岡県で捕獲された野生動物肉喫食後に急性 E 型肝炎を発症した症例からも同様の genotype 4 株が検出されており、愛知県、岐阜県、静岡県の野生動物には非常に近縁関係にある genotype 4 株が蔓延していることが示唆されている。桑名の急性 E 型肝炎症例から分離された HEV genotype 4 株は系統樹の中でこの愛知県、岐阜県、静岡県の野生動物関連の genotype 4 株のクラスターに含まれ、近縁関係にあった（図 3、図 4：Genotype 4 愛知、岐阜、静岡株クラスター拡大図）。ただし、桑名の症例は農業を営む 69 歳の男性で野生動物肉喫食歴は無く、発症前の 2 ヶ月間は愛知県、岐阜県、静岡県での外食の経験が無いどころか、行ったことも無かった。豚肉の喫食歴はあったが、豚レバー、豚ホルモンは食べたことがなく、野生動物、豚との接触歴も無かった。喫食した豚肉は自宅で調理して食べたもので、桑名市内のスーパーマーケット 2 軒で購入した。一軒は三重県内に 13 店舗を展開するチェーン店。もう一軒は東海地区を中心に広く展開する大手スーパーマーケットであった。

D. 考察

2012 年には三重県内で過去最高の 12 例の急性 E 型肝炎症例を認めたが、2013 年は 5 例にとどまった。これまで多く確認した subtype 3e 株による症例は認めなかった。Subtype 3a 症例と 3b 症例を認めたが既報の近縁株は無く、これらの感染源、感染経路は今後の調査によって明らかにされるのを待たねばならない。2013 年の大きな収穫は桑名市で genotype 4 症例を確認したことである。2012 年にも genotype 4 症例を鈴鹿で確認しているが、この症例は愛知県内で捕獲されたイノシシの喫食歴があり、この症例の genotype 4 株は愛知県で捕獲されたイノシシから分離された HEV 株と近縁関係にあり、三重県で感染したとは考えにくい。三重県桑名市は愛知県、岐阜県と木曾三川を境界として接しており、この地で愛知県、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による E 型肝炎が発生したのは特に興味深い。しかし、愛知県、岐阜県、静岡県の genotype 4 株はいずれも野生動物関連株であり、桑名の症例は野生動物との関連が確認できなかった。また、この症例は発症前の 2 ヶ月間に愛知県、岐阜県、静岡県での外食歴もなかった。それどころか、これらの県へ行ったことさえなかった。そのため、三重県内で感染したことが疑われる。これらの調査結果から、愛知県、岐阜県、静岡県の野

生動物に蔓延している 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る。しかしながら、スーパーマーケットで購入した豚肉からの感染を疑ったとした場合には、桑名の症例のように野生動物とは関連のない genotype 4 株による急性 E 型肝炎症例が東海地区や三重県でもっと多く発生していても不思議ではなく、スーパーマーケットの豚肉を感染源と断定するわけにはいかない。感染源、感染経路の同定には、さらなる症例の蓄積と新しい工夫が必要と考えられる。

E. 結論

三重県では感染源不明の急性 E 型肝炎が毎年発生している。感染源・感染ルートを解明し、今後の発生を予防するために HEV-RNA 検査を主体とした急性 E 型肝炎発生調査は今後も続ける必要があると思われる。

F. 研究発表

各症例につき国内学会等で発表予定

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業
経口感染によるウイルス性肝炎(A型及びE型)の感染防止、病態解明、
遺伝的多様性及び治療に関する研究
平成25年度分担研究報告書

薬物性肝障害診断時におけるE型肝炎測定系追加の必要性についての検討及び三重県北中部地域で発生しているE型肝炎、特に3e/3sp(ヨーロッパ)株の感染源の検索について

研究協力者 岡野 宏 三重県厚生連鈴鹿中央総合病院 消化器内科医長

研究要旨： 現在薬物性肝障害診断基準に含まれていないE型肝炎測定の必要性について当院の症例で検討した。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、薬物性肝障害の可能性が高いと診断される結果となった。また点数分布も薬物性肝障害例と有意差はなかった。既往で畜肉の喫食は1例のみであり喫食歴でのE型肝炎の鑑別は困難であった。またE型肝炎未測定時には、薬物性肝障害例の1割強にE型肝炎が含まれる可能性が考えられた。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型肝炎測定系を使用してE型肝炎の除外診断を行うことが必要と考えられた。また三重県北中部地域で発生しているE型肝炎の感染源の検索を前回に引き続き行った。四日市市で購入した豚レバーの解析では4例の3a/3us株が検出されたが3e/3sp株は検出されなかった。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豚レバー85検体からHEV2株が検出されており、内1株は3e/3sp株であった。分与提供されたRNA抽出物を再度解析し、このHEV株は三重県北中部地域で発生していた3e/3sp株と99%以上の塩基配列の一致率であることが確認された。以上の結果から三重県で発生している3e/3sp株によるE型肝炎例も、感染源は豚であることが確認された。

<共同研究者>

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)
高橋 雅春 (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)
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)
中野 達徳 (藤田保健衛生大学七栗サナトリウム・内科 准教授)

A. 研究目的

1)臨床現場で遭遇する急性肝障害症例の内、薬物性肝障害は代表的な疾患の一つであるが、診断のための特異的なマーカーはなく、診断基準に従って各種ウイルス性肝炎を除外する必要がある。2013年現在E型肝炎はルーチンの除外項目に含まれていないが、現在の診断基準ではE型肝炎が薬物性肝障害と誤診される可能性があるため、現行の診断基準にE型肝炎測定系をルーチンで加える必要性についてE型肝炎症例と薬物性肝障害例との比較検討を行った。

2)2004年以降三重県北中部地域で発生してきたE型肝炎例は大部分が感染源不明の散発性急性E型肝炎例であった。前回報告した研究では、三重県北中部地域で購入した豚レバーから検出された3jp型のHEVが、鈴鹿市で2012年に発生した一部のE型肝炎例から検出されたHEVと遺伝子配列が高い相同性を示したことから北中部地域で発生しているE型肝炎例の一部は、感染源を豚とすることが推測された。しかし残りのE型肝炎例特に2004年に報告されて以来継続的に発生が認められている3e/3sp株由来のE型肝炎例については依然感染源不明であった。このためHEV3e/3sp株の感染源についてさらなる検索を行った。

B. 研究方法

薬物性肝障害診断時におけるE型肝炎測定系追加の必要性の検討においては以下の方法で行った。2003年10月～2012年9月の108か月間、三重県鈴鹿市の鈴鹿中央総合病院消化器内科を受診し、入院または外来で精査加療を受けた199例の急性肝障害症例の内、急性E型肝炎と診断された13例と薬物性肝障害と診断された61例を対象とした。急性E型肝炎の診断は、HEV IgM抗体陽性、HEV IgA抗体陽性、HEV RNA陽性の各項目のいずれかを、または複数使用して陽性反応を認めた症例を急性E型肝炎と診断した。薬物性肝障害の診断は、DDW-J2004薬物性肝障害ワークショップにおいて提示された診断基準により除外診断とスコアリングを行って診断した。一部の症例ではエコー下肝生検を行い診断した。E型肝炎、薬物性肝障害症例共に、他のウイルス性肝疾患、自己免疫性肝疾患、胆道系疾患、ショック肝については血清学的検査、画像診断等に除外した。E型肝炎症例13例を薬物性肝障害として疑ったと仮定し、DDW-J2004薬物性肝障害ワークショップにおいて提示された診断基準によりスコアリングを行い点数化した。薬物内服歴のない急性E型肝炎症例については使用可能な項目のみでスコアリングを行った。薬物性肝障害群と急性E型肝炎群間の比較には、Fisher's exact test、Student's t-test、及びMann-Whitney U testを使用し、 $p < 0.05$ を有意差ありと判断した。

三重県北中部地域で発生しているE型肝炎、特に3e/3sp(ヨーロッパ)株の感染源の検索については以下の方法で行った。鈴鹿市北部に隣接する四日市市で、2012年7月から2013年3月までの期間に、市販されている豚レバー計50個を購入しHEVの検出を行った。購入した豚レバーを、約10 mm³程度の小片とし、10個程度を専用チューブ内に冷凍保存した。保存した豚レバー小片は自治医科大学医学部感染・免疫学講座ウイルス学部門に送られ、同施設でHEVの検出・解析が行われた。検出されたHEV株は、ORF2領域の412塩基の配列が決定され、さらに決定された塩基配列を利用してgenotypeおよびsubgenotypeを決定し、既報株と比較した。

次にインターネットにて「三重県」と「E型肝炎」をキーワードとして過去の研究発表の検索を行い、過去に我々以外に畜産物とE型肝炎との関係について行われた研究成果を抽出し、発表者にメールにて問い合わせを行い、さらに詳細な内容と検体資料の分与を依頼した。また提供された内容と分与された資料を用いて、我々が有する結果比較検討を行った。

倫理面への配慮：1)E型肝炎症例と薬物性肝障害症例のデータは全て番号による匿名化を行った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。2)HEV検出に使用した豚レバーについては、市販されている豚レバーのみを購入した。今回の研究目的のための屠畜、解体は行っていない。また分与された検体も、三重県内の農場で廃棄処分となった豚レバーを使用していることを確認している。

C. 研究結果

薬物性肝障害症例とE型肝炎症例を比較検討するに当たり、国立感染研究所感染症疫学センターのホームページ(<http://www.nih.go.jp/niid/ja/from-idsc.html>)へアクセスし、2006年以降に4類感染症として報告された全国のE型肝炎数とA型肝炎数を年次別に累計したところ、2006年～2011年では全国のE型肝炎の報告数は、同じ年のA型肝炎に比して20%～30%程度の報告数であった。しかし2012年はA型肝炎の73%にまで増加しており、さらに2013年のE型肝炎報告数は126例で、A型肝炎の127例とほぼ同数となった事が判明した(表1：2006年から2013年までの本邦におけるA型肝炎及びE型肝炎症例報告数比較)。

2003年10月～2012年9月の期間に当院で発生した急性肝障害199例であり、内急性E型肝炎は計13例発生、薬物性肝障害は計61例であった。薬物性肝障害61例は、肝細胞障害型が42例、胆汁鬱滞型

が5例、混合型が14例であった。急性E型肝炎13例は、女性は1例のみであった。また急性E型肝炎症例は、受診時点で10例が薬物服用の既往を、急性E型肝炎発症3か月前までの海外渡航歴を2例(中国、米国)で認めた。急性E型肝炎13例中イノシシ肉、鹿肉、豚レバーの摂取歴を認めた症例は1例のみであった(表2: E型肝炎例と薬物性肝障害例の畜肉及び海産物喫食歴比較)。

急性E型肝炎症例で、E型肝炎の検査を施行しなかった場合、結果として8例の急性E型肝炎例が薬物性肝障害と誤診される事が疑われ、これら8例の急性E型肝炎例が69例の薬物性肝障害に含まれたとした時、当院の全薬物性肝障害症例中に11.6%の、本来E型肝炎である、薬物性肝障害誤診例が含まれる事が考えられた。

急性E型肝炎13例と薬物性肝障害61例(Dの両群間の患者の年齢比較を行った時、患者の年齢中央値はE型肝炎例と薬物性肝障害例で、それぞれ62±11才、57±17才で、両群間で有意差を認めなかった。また両群で51才以上がそれぞれ85%、70%と多数例を占めた。E型肝炎例は、薬物性肝障害例に比して男性が多数を占め、またALT最高値、ALP最高値は高値となる傾向であったT-Bil最高値及びPT最低値においては両群間に有意差を認めなかった(表3: E型肝炎例と薬物性肝障害例との男女比較及び採血データ比較)。またT-Bil最高値は、T-Bil値3.0mg/dl以下がE型肝炎症例で13例中8例(61.5%)、薬物性肝障害例が61例中45例(73.4%)となり、両群とも不顕性黄疸例が半数以上を占めた。

両群で、現行の薬物性肝障害スコアリングシステムによる点数差を検討したところ、E型肝炎例は全例5点以上、平均値は7±1.2、薬物性肝障害例は平均値6.4±1.2点となり、両群間に有意差は認められなかった。薬物性肝障害例を肝細胞障害型42例で再度比較した時の平均値も6.6±1.2点で、E型肝炎例との有意差は認められなかった。

また薬物性肝障害と診断された61例中、血清学的にE型肝炎感染を除外出来ていない25症例を除いた36例で再度E型肝炎13例との比較を行ったところ、E型肝炎例の男女比とALT最高値の有意差は変わらなかったが、ALP最高値は有意差が認められなくなった。一方スコアリングの点数比較は両群間で有意差を認めないままであった(表4: HEV陰性薬物性肝障害36例とE型肝炎例との比較)。

HEV感染源検索目的で購入された50個の豚レバー(No.194~243)中、4個の豚レバー(No.204, 205, 220, 228)よりHEVが検出された(swJLMie204, swJLMie205, swJLMie220, swJLMie228)。全豚レバーにおけるHEV陽性率は8%であった。しかし検出された4例のHEV株中に3e/3sp株は確認されず、4例とも3a/3us株であった。No.204とNo.205とは遺伝子配列は100%、No.220とNo.228とは99.7%一致し、各々同一クラスターに属すると考えられた。しかし今回の検索では3e/3sp株や3b/3jp株は検出されなかった。また2013年には三重県鈴鹿市と津市で発生したE型肝炎症例から3a/3us株が検出されたが、これらとの遺伝子相同性は低く関連性はないと考えられた。

次に、インターネットの検索で、平成19年度日本獣医公衆衛生学会(近畿)において、三重県科学技術振興センター保健環境研究部の赤地重宏氏により、三重県内の農場から得られた、と畜豚廃棄肝臓より検出されたE型肝炎ウイルスの報告がなされていたことを確認した。赤地氏に連絡をとり、豚レバー85検体から2株のHEV(No.37, No.80)が検出されていた事を確認した。赤地氏より提供されたORF2領域の塩基配列を確認したところ(No.37 300塩基配列、No.80 276塩基配列)No.37のHEVの300塩基配列は、2004年に三重県のE型肝炎患者から初めて検出され、

これまで繰り返し分離されてきた3e/3sp株と99.3%(298/300)の一致率であることが確認された。このため我々は赤地氏及び三重県科学技術振興センター所長に許可を頂き、検出に使用した豚レバーRNA抽出物85検体を分与して頂き、再度HEV ORF2の412塩基配列の解析を行った。解析では85検体からHEVが検出されたのは2検体で、No.37とNo.80で先の結果と同一であった。No.37のHEVは3e/3sp株に属し、既報の3e/3sp株(三重県E型肝炎症例: HE-JA04-1911, HE-JA09-0135, HE-JA09-0195, HE-JA11-0494 および愛媛県症例 JNH-Ehi04L_Ehime)と99.2%の一致率を認めた。またその他の三重県E型肝炎症例3e/3sp株とも、HE-JA10-1071が99.0%、HE-JA10-0841、HE-JA12-0394が98.7%、HE-JA12-0752が98.5%、HE-JA12-0546、HE-JA12-0647が98.3%と高い相同性を認めた。これらの結果をもとに分子系統樹を作成したところ、No.37HEV(swJ-Mie37L)株は三重県3e/3sp株と同一クラスターを形成することが認められた。

D. 考察

1) E型肝炎の報告数は2012年以降増加し、2013年はA型肝炎とほぼ同数となっていることが認められた。E型肝炎例と薬物性肝障害例との比較検討では、男女比、ALT値最高値で差が認められたが、それ

以外の項目では有意差は認められなかった。両群とも黄疸を呈する症例が少なかった。また現在使用されている薬物性肝障害スコアリングシステムでは、両群で有意差を認めず、E型肝炎例は全例5点以上の数値となり、「薬物性肝障害の可能性が高い」結果となった。このためE型肝炎測定を行わなかった時、薬物性肝障害例の約1割に、E型肝炎例が含まれている可能性が示唆された。

2) 三重県北部地域である四日市市内で購入された豚レバー50個からは、4個の豚レバーからHEVが検出されたがいずれも3a/3us株であり、3e/3sp株は確認されなかった。しかし平成19年(2007年)に行われた三重県科学技術振興センター保健環境研究部の資料の豚レバーRNA抽出検体から3e/3sp株が検出され、三重県3e/3sp株E型肝炎症例のHEVと塩基配列が99%以上の一致を認めた。以上より2004年以来継続して三重県北中部地域で発生している3e/3sp株E型肝炎の感染源として、三重県内の豚が関与していることが確認された。

E. 結論

1) E型肝炎の診断は、E型肝炎測定系を使用することで初めて可能であり、E型肝炎感染を疑わず測定を行わなかった際、薬物性肝障害と誤診する可能性があることが考えられた。またE型肝炎測定系が保険収載されて以来、E型肝炎の報告例は着実に増加しており、本邦でも稀な疾患ではないことが考えられた。以上の結果より、現在使用されている薬物性肝障害スコアリングシステムにE型肝炎測定系(HEV-IgA抗体)を加え、スコアリングの段階でE型肝炎の除外診断を行うことが必須であると思われる。

2) これまで三重県北中部地域で継続して発生していた3e/3sp株によるE型肝炎例も、前回報告した一部の3b/3jp株と同様に感染源は豚であることが確認された。これらのE型肝炎例はいずれも直接豚レバーの摂取を行っておらずE型肝炎ウイルス感染に至った経路は不明である。今後は三重県内でのE型肝炎ウイルスの感染経路の特定に向けた検索が必要と考えられる。

F. 研究発表

8. 第49回日本肝臓学会総会シンポジウム2

薬物性肝障害診断スコアリングにおけるE型肝炎の診断マーカー追加の必要性についての検討

1) 鈴鹿中央総合病院 消化器内科

2) 藤田保健衛生大学七栗サナトリウム内科

3) 自治医科大学医学部 感染・免疫学講座ウイルス学部門

岡野 宏 1) 2) 中野達徳 3) 岡本宏明

9. 第99回日本消化器病学会総会ポスター

当院における経口感染ウイルス性肝炎(A型、E型)症例の検討

1) 鈴鹿中央総合病院 消化器内科

2) 自治医科大学医学部 感染・免疫学講座ウイルス学部門

岡野 宏 1) 熊澤広朗 1) 竹内俊文 1) 磯野功明 1) 田中宏樹 1) 石原禎子 1)

新田真吾 1) 松崎晋平 1) 佐瀬友博 1) 斎藤知規 1) 向 克巳 1) 西村 晃 1)

長嶋茂雄 2) 高橋雅春 2) 岡本宏明 2)

3. 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.

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.

Hepatology Res. 2013 Aug 8. doi: 10.1111/hepr.12216. [Epub ahead of print]

4. 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.

Okano H, Nakano T, Sugimoto K, Takahashi K, Nagashima S, Takahashi M, Arai M, Okamoto H.

Hepatology Res. 2013 May 2. doi: 10.1111/hepr.12155. [Epub ahead of print]

G. 知的所有権の取得状況

4. 特許申請：なし

5. 実用新案登録：なし

6. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業
経口感染によるウイルス性肝炎(A型及びE型)の感染防止、病態解明、
遺伝的多様性及び治療に関する研究
平成25年度分担研究報告書

三重県の野生イノシシから検出されたHEV subtype 3e株について

研究協力者 中野達徳 藤田保健衛生大学七栗サナトリウム・内科 准教授

研究要旨：三重県では毎年野生イノシシ 5000 頭あまりが捕獲され、多くが食用とされており、三重県内のイノシシの HEV 感染の実態を調査することは急務であった。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。HEV-RNA は 144 頭中 7 頭 (4.9%) で陽性であった。このうち 6 例が subtype 3e であった。本報告が日本で subtype 3e がイノシシから検出された初の報告である。世界から報告されている多くの HEV genotype 3 株と本報告の三重県の HEV 株を ORF2 301nt の分子系統樹で解析したところ、三重県のイノシシからの subtype 3e 5 株は非常に類似した塩基配列で 93% の bootstrap 値でクラスターを形成し、上流ではフランスの人から分離された株と 77% という高い bootstrap 値でクラスターを形成した。この系統樹の構造から、日本のこのクラスターの subtype 3e 株はヨーロッパから侵入したことが強く示唆された。MCC tree からは日本へ subtype 3e 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。HEV subtype 3e は一般にヨーロッパで広く検出される株であり、ヨーロッパから日本へ 1960 年代に大型豚の種豚の大量輸入とともに日本へ侵入したという報告がある。私達の解析でも 1960 年代に subtype 3e は日本へ侵入してきており、それはヨーロッパからであることが示唆された。これまでの報告と本報告から 1960 年代に大型豚の種豚の輸入とともに日本へ侵入した subtype 3e 株は初め日本の豚の間で広まったと考えられ、その subtype 3e 株が日本の野生のイノシシから検出されたことは、豚から野生イノシシの方向へ subtype 3e が伝播したことを示唆する。

<共同研究者>

三代 俊治(東芝病院・研究部、部長)
新井 雅裕(東芝病院・消化器内科、院長・部長)
高橋 和明(東芝病院・研究部、主任研究員)
岡野 宏 (鈴鹿中央総合病院・消化器内科、医長)
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)

A. 研究目的

野生イノシシが E 型肝炎ウイルス (HEV) に感染しており、ヒトがそれを生食したことにより E 型肝炎を発症したことを証明した報告が多々ある。三重県でも毎年イノシシ 5000 頭あまりが捕獲され、多くが食用とされている。三重県では南部のシカ 4 頭の HEV 感染状況が調査されたことはあるが、イノシシに限れば調査は皆無であった。また、地域によってイノシシに感染している HEV の遺伝子型 (genotype や subtype) が異なり、これによっても HEV 感染の臨床像に違いが出る可能性もある。本研究では三重県の野生イノシシの HEV-RNA 陽性率と、感染していた HEV の遺伝子型を調査した。

B. 研究方法

2008 年 10 月から 2012 年 3 月までに三重県中部の、津市、松阪市、奥伊勢地方、志摩地方で捕獲された野生イノシシ 144 頭の血清を材料とした (図 1: 対象とした三重県の野生イノシシ)。HEV-RNA は ORF1 の 5' 末端の領域を標的とした高感度 nested PCR 法にて検出した。さらに、HEV-RNA 陽性検体は genotype の検索のため ORF1 の 326 塩基または ORF2 の 412 塩基を増幅し、既報の HEV sequence とともに系統樹

解析を行った。さらに可能であった検体に対しては HEV full genome の塩基配列を決定し系統樹解析を行った。

また、日本土着 HEV 株のうち検体採取日が判明している株とともに分子進化学とベイズ統計学を統合した方法によりスケールが時間である maximum clade credibility tree (MCC tree) を作成し、三重県の野生イノシシへの HEV 感染拡大の歴史を解析した。これらの計算には Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Tree (BEAST) というソフトを用いた (<http://evolve.zoo.ox.ac.uk/>)。

C. 研究結果

HEV-RNA はイノシシ 144 頭中 7 頭 (4.9%) で陽性であった。このうち 2 例では ORF2 領域の部分塩基配列のみ、1 例では ORF1 と ORF2 の部分塩基配列が、4 例で full ORF 領域の塩基配列を決定できた (表 1: HEV-RNA 陽性例)。

日本の野生動物由来株または野生動物肉摂取後 E 型肝炎患者から分離された株と本報告の三重県の HEV 7 株の系統樹解析では subtype 3b, genotype 4 が検出された都道府県が多かったのに対して subtype 3e が検出されたのは三重県と愛媛県のみであり (図 2: 日本の野生動物由来株または野生動物肉摂取後 E 型肝炎患者から分離された株による系統樹、図 3: 都道府県別野生動物由来 HEV 株の type) さらに愛媛県の subtype 3e はイノシシ肉喫食後に E 型肝炎となった症例から検出されているが、その周囲で捕獲されたイノシシからは subtype 3e は検出されていない。すなわち、本報告は日本で subtype 3e 株を野生イノシシから検出した初の報告である。

図 4 [三重県のイノシシの subtype 3e 株と世界の株の関係 (ORF2 301nt)] は世界から報告されている多くの HEV genotype 3 株と三重県の subtype 3e 株の ORF2 301nt の分子系統樹解析である。この解析では以下のことが示された。三重県のイノシシから分離された subtype 3e 5 株は非常に類似した塩基配列を持ち、93% の bootstrap 値でクラスターを形成し、その上流では宮城県の人、栃木県の豚、三重県の人、愛媛県の人から分離された株と 94% の bootstrap 値でクラスターを形成した。またその上流ではフランスの人から分離された株と 77% という比較的高い bootstrap 値でクラスターを形成した。この系統樹の構造から、日本のこのクラスターの subtype 3e 株はヨーロッパから侵入したことが強く示唆された。

MCC tree からは日本へ subtype 3e が侵入したのは 1966 年頃で、以降日本の各地に拡散し、三重県のイノシシの間で広まったのは 2009 年頃と推測された (図 5: HEV subtype 3e が日本に拡散した時期を示す MCC tree)。

D. 考察

HEV subtype 3e は一般にヨーロッパで広く検出される株である。ヨーロッパから日本へ 1960 年代に大型豚の種豚が大量に輸入されたという事実がある (20 世紀における日本のブタ改良増殖の歩み、丹羽太左衛門著より)。私達の解析では 1960 年代に subtype 3e は日本へ侵入してきており、それはヨーロッパからであることが示唆された。これらの事実と解析結果からは HEV subtype 3e は 1960 年代に大型豚の種豚の輸入とともに日本へ侵入したと考えられ、初めは日本の豚の間で広まったと考えられる。その subtype 3e 株が日本の野生のイノシシから検出されたことは、豚からイノシシの方向へ subtype 3e が伝播したことを示唆する。豚にもイノシシにも HEV が感染することは知られているが、豚からイノシシへ広まったのか、イノシシから豚へ広まったのかを示した調査報告は海外でも日本でも無い。本報告の解析結果は豚からイノシシへという方向をはじめて示した。具体的にどのような機序で HEV の伝播が起こったのかは本解析だけでは不明だが、他の報告や報道と合わせて考察すれば、マンガースや野ネズミなどの小動物が養豚場に忍び込み HEV を含んだ糞便を野生界に持ち込んでイノシシが感染したり、養豚場から逃げた豚が野生返りして HEV を野生界に持ち込んだり、養豚場の糞便などの廃棄物や排液が漏れ出したり不法投棄され野生界に HEV が拡散した、などのシナリオが考えうる。これ以上野生動物に HEV を感染させないようにするには、養豚場の豚や豚の糞便を野生界と接触させないようにすることが重要と考えられる。

ただし、この結果と考察は私達が三重県で検出した一部の subtype 3e 株に対して当てはまる結果であり、ヨーロッパではもともと subtype 3e HEV はイノシシ起源なのか豚起源なのかは不明である。また、他の subtype, genotype についても豚からイノシシへ伝播したのか、イノシシから豚へ伝播したのかは今後解明されるべき課題である。

E. 結論

三重県の野生イノシシから subtype 3e HEV が検出され、豚からイノシシへ伝播したことが示唆された。

F. 研究発表

Nakano, T., Takahashi, K., Arai, M., Okano, H., Kato, H., Ayada, M., Okamoto, H., Mishiro, S. 2013. 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* 18, 287-298.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業
経口感染によるウイルス性肝炎(A型及びE型)の感染防止、病態解明、
遺伝的多様性及び治療に関する研究
平成25年度分担研究報告書

岡山県における野生イノシシのE型肝炎ウイルス感染状況と
狩猟者のE型肝炎認識状況について

研究協力者 川上万里 岡山済生会総合病院 肝臓病センター 医長

研究要旨:岡山県における野生イノシシのE型肝炎ウイルス(HEV)感染率を調べるため、岡山県猟友会の協力のもとに2011年11月から2013年3月に県内で捕獲された野生イノシシから採取した血液についてHEV抗体およびHEV RNAを測定したところ、HEV抗体あるいはHEV RNAが陽性で感染が確認されたものが14.2%であった。HEV RNAが検出された6頭のイノシシから分離されたHEVのgenotypeは日本固有の3型(3jp型)が4頭(新見地区)とヨーロッパ型の3型(3sp型)が2頭(吉備中央町)であった。更に猟友会会員にアンケート調査を行い、野生イノシシの喫食状況とE型肝炎に対する認識を調べたところ、イノシシ肉の喫食歴は主に猟にて全員が有し、58%が「美味である」と嗜好していた。E型肝炎の情報はHEVが国内土着株であることが公表された2003年以降に「マス・メディア」「猟友会」を介して入手されていたが、「イノシシ喫食に抵抗がある」と答えた率は、「肝炎」「死亡例」の情報入手群においても過半数には至らなかった(41.7%、45.0%)。喫食変化はそれぞれ53.2%、43.6%に認め、主に「加熱処理」であった。手袋の常用は43.3%に認めたが、情報入手者に多いわけではなかった。情報源では「マス・メディア」は過半数に喫食に抵抗を与え、喫食変化を7割に認めたが、狩猟グループ毎に喫食法や手袋着用には集積があり、情報の発信や予防指導は「マス・メディア」のみではなく、狩猟グループ毎に行う必要があると考えられた。

<共同研究者>

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)

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)

A. 研究目的

ヒトへのE型肝炎ウイルス(HEV)感染リスクのあるイノシシ・シカ・ブタなどの肉や内臓の喫食時には加熱処理を施すなどの注意喚起を行っているが、これら動物の実際の感染率は明確に判明していない。昨今野生動物による農作物被害による損失額は年々増加し、これら「害獣」の駆除対策に各都道府県が取り組んでいる。岡山県でのイノシシの捕獲数は2010年に20,617頭、2011年に15,312頭、2012年に15,387頭で、そのうち7,000頭以上が狩猟により捕獲された。これらの肉を用いた「ジビエ料理」を地域振興に利用する兆しがあるが、その取扱いについては注意する必要があると思われる。そこで岡山県猟友会の協力のもとに捕獲したイノシシから採血を行い、HEV感染率について調べた。またこれら野生動物との接触が最も高いと思われる猟友会に所属する狩猟者を対象にE型肝炎に対する認知度を調査し、感染の予防へつながる啓蒙法について検討した。

B. 研究方法

2011年11月から2013年3月の冬季に行われた岡山県猟友会の狩猟にて捕獲されたイノシシの屠殺時に採取した血液を冷凍し、自治医科大学感染・免疫学講座ウイルス学部門にてそのHEV抗体およびHEV RNAおよびgenotypeを測定した。また猟友会会員に対してアンケート調査を行い、イノシシ肉の嗜好、喫食状況、E型肝炎の認識、E型肝炎の判明後の接触状況の変化、情報入手の方法などを調べた。

倫理面への配慮：今回の調査では個人のプライバシーを侵害することはなく、人権上の問題は生じない。

C. 研究結果

イノシシのHEV感染状況について(図1：岡山県内の野生イノシシにおける地域別HEV感染率)

採血されたイノシシは岡山市10頭、吉備中央町30頭、真庭市40頭、鏡野町1頭、笠岡市3頭、浅口市5頭、新見市41頭、高梁市4頭の計134頭であった。このうちHEV抗体陽性であったのは15頭(11.2%)で、吉備中央町2頭、新見市13頭であった。HEV RNA陽性は6頭(4.5%)で、吉備中央町2頭、新見地区4頭に認めた。HEVのgenotypeは、新見市では日本固有の3型「3jp型」であったが、吉備中央町ではヨーロッパ型の3型「3sp型」であった。

アンケート調査について

アンケートは猟友会会員に対して160枚配布し、62名の回答を得た(回収率38.8%)。対象者年齢は40-89歳で60歳以上が47名(75.8%)であり、狩猟歴30年以上が回答者の62.3%を占めた。

イノシシ肉喫食歴は全員が有し、喫食回数は回答者58名中42名(72.4%)が年10回以上を占めた。イノシシ肝の喫食歴は回答者60名中39名(65.0%)が有し、イノシシの喫食について回答者59名中36名(61.0%)が「美味」「好む」、3名(5.1%)が「どちらでもない」、2名(3%)が「嫌い」と答えた。これら肉の入手先は回答者59名中56名(94.9%)が「猟」であった。

「野生動物を介した肝炎の存在」「E型肝炎の病名」「野生動物喫食による死亡例の存在」はそれぞれ80.0%(回答者60名中48名)、66.7%(回答者60名中40名)、67.8%(回答者59名中40名)が認知しており、情報入手年度は2003年が最多であった(22.5%)であった。また入手先(複数回答)は「マス・メディア」25名、「猟友会」19名、「知人」7名であった。

イノシシ喫食は「肝炎」の情報入手者のうち回答者47名中20名(42.6%)が「抵抗ある」と答え、情報入手がなかった者の回答者4名中1名(25.0%)を上回ったが、有意差はなかった。また、情報入手者のうち回答者47名中25名(53.2%)に喫食変化を認め、「加熱処理」22名(88.0%)「喫食なし、喫食回数減少」5名(20.0%)であった(複数回答)。「死亡例」の情報入手者では回答者39名中17名(43.6%)が「抵抗ある」と答え、情報入手がなかった者の回答者11名中4名(36.4%)を上回ったが、有意差はなかった。「死亡例」の情報入手者のうち回答者39名中23名(59.0%)に喫食変化を認め、「加熱処理」21名(91.3%)「喫食なし、喫食回数減少」3名(13.0%)であった。

手袋の常用は回答者60名中26名(43.3%)に認めた。「肝炎」情報入手者では48名中18名(37.5%)に認めたが、情報の入手がなかった群では回答者11名中6名(54.5%)に認めた。同様に「死亡例」情報入手者では40名中15名(37.5%)に認めたが、情報を入手していなかった群では回答者17名中10名(58.8%)に認め、いずれも情報入手群のほうが低率であった。

情報源による影響を検討すると、「マス・メディア」では回答者24名中13名(54.2%)「猟友会」では回答者18名中8名(44.4%)「マス・メディア」「猟友会」重複は10例中6例(60.0%)が「抵抗あり」と答え、それぞれ回答者24名中17名(70.8%)、15名中9名(60.0%)「マス・メディア」「猟友会」重複は10例中6例(60%)に喫食変化を来していた。「喫食変化」「手袋使用」について猟友会の所属グループ毎に検討すると、group A、group Bでは喫食変化に、group Dでは喫食法、手袋の着用ともに偏りがあり、所属グループの影響があることが示唆された(図2：猟友会の所属グループによるイノシシ喫食・手袋着用状況)。

D. 考察

2011年11月から2013年3月の冬季に行われた二期にわたる調査で岡山県内の野生イノシシにおけるHEV感染率は14.2%で、他県からのこれまでの報告とほぼ同様であった。現行感染を示すHEV RNAの検出を4.5%に認め、今後も感染が拡大することが予想された。HEV genotypeは地域ごとに一致しており、集団内での感染が維持されていると考えられた。吉備中央町でヨーロッパ型の3型「3sp型」が検出さ

れ、この集団への感染源として輸入ブタの存在が示唆された。

岡山県猟友会会員に対してのアンケート調査より、猟友会会員の6割がイノシシ肉を「美味である」と評していることもあり、地域振興の手段として推奨されている「ジビエ料理」の普及とともに今後もその喫食が拡大することが示唆されるが、その扱いには十分な注意を要すると思われる。

また、アンケート調査より、死亡例を含む「E型肝炎」の情報は、国内土着型のウイルスであることが公表された2003年の入手者が最多であり、情報の伝達は比較的速やかであったものと考えられた。「肝炎」「死亡例」の情報入手群に抵抗を感じた率、喫食変化を来した率は高かったものの半数に満たず、また手袋の着用は情報入手がなかった群より低率であり、十分な注意喚起には至っていないと考えられた。

情報の入手先は「マス・メディア」、「猟友会」に多く、喫食法の変化に寄与したと考えられたが、グループ毎に喫食法や手袋着用が偏在しており、所属グループも影響を来すものと考えられた。害獣としてイノシシの駆除を推奨するにあたり、猟友会会員の高齢化が危惧されているが、アンケート対象者も60歳以上が高率であったことよりも長年の慣習も無視できないと考えられた。狩猟者における危険情報の発信は「マス・メディア」のみではなく、狩猟グループ毎への直接指導なども要すると考えられた。

E. 結論

岡山県における野生イノシシのHEV感染率は対象となった134頭中22頭(11.2%)であった。6頭(4.5%)からHEV RNAが検出され、そのgenotypeは日本固有の3型(3jp型)のほか、国内では比較的稀なヨーロッパ型の3型(3sp型)を認めた。猟友会会員の8割はE型肝炎の情報を得ていたが、喫食変化や手袋着用は半数に満たず、啓蒙は充分ではないと考えられた。今後の情報発信手段としては「マス・メディア」のほか個々の狩猟グループへも必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Takahashi M, Nishizawa T, Nagashima S, Jirintai S, Kawakami M, Sonoda Y, Suzuki T, Yamamoto S, Shigemoto K, Ashida K, Sato Y, Okamoto H. Molecular characterization of a novel hepatitis E virus (HEV) strain obtained from a wild boar in Japan that is highly divergent from the previously recognized HEV strains. *Virus Res* 180: 59-69, 2014.

2) 川上万里、藤岡真一、足立卓哉、大澤俊哉、糸島達也. 薬物性肝障害の診断が経過中に覆った症例. *肝胆膵* 68: 285-290, 2014.

2. 学会発表

川上万里, 高橋雅春, 岡本宏明, 足立卓哉, 藤岡真一, 大澤俊哉, 糸島達也. 岡山県内狩猟者の「E型肝炎」の認識調査. 第17回日本肝臓学会大会. 東京 2013.10.9-10. *肝臓* 53 (Supple.2): A553, 2013.

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

厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業
経口感染によるウイルス性肝炎(A型及びE型)の感染防止、病態解明、
遺伝的多様性及び治療に関する研究
平成25年度分担研究報告書

肝移植患者におけるE型肝炎ウイルス感染状況の全国実態調査

研究分担者 大河内 信弘 筑波大学医学医療系消化器外科 教授

研究要旨：E型肝炎はこれまで発展途上国に多く、不顕性感染かまたは一過性感染として終息すると考えられてきた。しかし、欧米や日本でも人獣共通感染症として土着していること、化学療法施行中や臓器移植後などの免疫抑制下における慢性化移行が明らかになるなど、この10年余りでE型肝炎についての理解は大きく変容した。これまでにわが国における臓器移植患者のE型肝炎ウイルス(HEV)感染についての全国規模調査は未施行である。そこでわれわれは、わが国の肝移植患者におけるHEV感染状況の実態把握を目的に、全国の肝移植患者を対象として抗HEV抗体、HEV-RNA測定を施行した。これまでの結果では、肝移植患者の3.3%で抗HEV-IgG抗体陽性を認め、血中HEV-RNA陽性1例の報告があった。

<研究協力者>

大城幸雄(筑波大学医学医療系消化器外科 講師)
稲垣勇紀(筑波大学大学院博士課程疾患制御医学専攻)

A. 研究目的

わが国では、E型肝炎は2011年のHEV-IgA抗体検査の保険収載以降、感染の報告が倍増している。これまでは多くが急性の一過性感染で終息すると考えられてきたが、近年、化学療法施行中やHIV感染患者といった免疫抑制状態において慢性化の報告が相次いでいる。さらに、臓器移植後の患者においてもE型肝炎が慢性化を来すという報告が散見される(Nassim Kamar, et al: N Engl J Med. 2008)。肝移植後患者では経過観察中に原因不明の肝障害を認める患者が約10%存在し、背景として免疫抑制剤やステロイドを使用している。したがって、肝移植後の肝障害にHEV感染が潜伏している可能性は否定できない。しかし、本分担研究において平成24年度に全国の肝移植施設に行った調査では、E型肝炎検査を実施した経験のある施設は8%に過ぎないことが明らかとなった。

そこでわれわれはわが国の肝移植患者におけるHEV感染実態の解明のため、全国規模でHEV抗体測定検査を行うこととした。

B. 研究方法

わが国の肝移植施設である、東北大、東京大、京都大、大阪大、広島大、九州大、長崎大、筑波大の計8施設において、過去に肝移植術を受け外来通院中である患者947人を対象とした。対象患者について外来通院時の定期採血を行う際に血清を提供して頂き、全例に各種抗HEV抗体(IgA/IgM/IgG)測定、64例に血中HEV-RNA測定を行った。なお、測定は自治医科大学医学部感染・免疫学講座ウイルス学部門にて行った。

倫理面への配慮：ヘルシンキ宣言、疫学研究に関する倫理指針、厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針平成15年7月30日(平成16年12月28日全部改正)」に則り提供者に対する十分な配慮を行った。筑波大倫理委員会、研究実施計画書および説明文書・同意書の承認を受けた後に研究を開始した。

C. 研究結果

各施設の肝移植後患者合計 947 人の抗体測定を行った。抗 HEV-IgG 抗体陽性者数は 31 人 (3.3%) であり、IgA, IgM 抗体陽性者は 0 人であった。IgG 抗体陽性者については、平均年齢: 55.1 (5-73) 歳、移植後期間: 79.3 (8-237) か月、移植後に肝障害を認めたのは 13 人であった。

血中 HEV-RNA を測定した 64 例において、陽性者は認めなかった。

1 参加施設より血中 HEV-RNA 陽性の現行感染例 (60 歳女性、関東在住、原発性胆汁性肝硬変に対して肝移植後 8 か月) の報告があった。少なくとも約 4 か月間の RNA 持続陽性を認めており嚴重にフォローアップ中である。

D. 考察

HEV の多くは経口的に感染し、小腸粘膜上皮から門脈を通過して肝臓に至り肝炎を起こす。HEV 感染防御機構は IgA, IgM, IgG 抗体の獲得免疫が知られているが終生免疫が成立するかは議論がある。HEV はレセプターを介して腸管上皮細胞に感染すると推測されるが、自然免疫についても明らかではない。

既報では、わが国の 50 - 59 歳の健常人 (男性 46%/女性 54%) における抗 HEV-IgG 抗体保有率は 6.1% (男性 8.9%, 女性 3.8%) と報告されており (Takahashi M, et al: J Med Virol. 2010), 肝移植後患者の抗体保有率 3.3% (平均年齢 55.1 歳, 男性 56.7%/女性 43.3%) は、年齢・性別比を考慮すると健常人と比較して低い傾向にある。欧米では臓器移植患者の陽性率は 11.6%、健常者の陽性率は 21% と報告されている。臓器移植患者、健常者とも欧米と比較してわが国の陽性率は低く、また、欧米もわが国も、免疫抑制剤投与による抗体産生能低下が関与している可能性が考えられた。

抗体陽性者の感染時期、経路、特にドナー肝の関与は現在調査中であるが、過去の報告では HEV 感染ルートは加熱不十分な豚の内臓や肉の喫食が 31% と最多である。免疫抑制剤を内服している肝移植後患者はこれらの喫食を控えるなど感染機会が減少したため陽性率が低下した可能性が考えられた。

E. 結論

これまでの調査では、現時点において肝移植後患者における抗 HEV-IgG 抗体保有率は 3.3% であった。また、947 例中 1 例で HEV 現行感染が明らかとなった。今後さらなるサンプルの蓄積を予定している。

F. 研究発表

1. 田野井智倫, 大城幸雄, 服部眞次, 竹内 薫,
永田恭介, 安江 博, 岡本宏明, 大河内信弘.

ブタ由来 E 型肝炎ウイルス (HEV) のラットへの感染実験 ~ E 型肝炎ワクチン開発に向けて ~.
第 49 回日本肝臓学会総会. 2013 年 6 月 7 日.

2. 田野井智倫, 大城幸雄, 岡本宏明, 大河内信弘.

わが国の肝移植患者における E 型肝炎の感染状況と慢性化の実態調査 ~ 第 1 次全国アンケート調査報告 ~. 第 49 回日本肝臓学会総会. 2013 年 6 月 7 日.

3. 田野井智倫, 大城幸雄, 稲垣勇紀, 福永 潔,

岡本宏明, 大河内信弘. わが国の肝移植患者における E 型肝炎抗体検査の実態調査. 第 31 回日本肝移植研究会. 2013 年 7 月 4 日.

4. 大城幸雄, 井出野祥次, 服部眞次, 浦山 健,

坂井 薫, 安江 博, 長利 卓, 竹内 薫,

永田恭介, 大河内信弘. ヒト初代培養肝細胞におけるブタ E 型肝炎ウイルス (HEV) の感染様式の検討とシーケンス解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 2013 年 11 月 10 日

5. 稲垣勇紀, 大城幸雄, 田野井智倫, 岡本宏明,

大河内信弘. 肝移植後患者における E 型肝炎ウイルス感染の疫学調査. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 2013 年 11 月 10 日.

6. 稲垣勇紀, 大城幸雄, 田野井智倫, 岡本宏明,

大河内信弘. 肝移植後患者における E 型肝炎ウイルス感染の現状と問題点. 第 75 回日本臨床外科学会総会. 2013 年 11 月 21 日.

7. 稲垣勇紀, 大城幸雄, 長谷川直之, 福田邦明,

安部井誠人, 西 雅明, 岡本宏明, 大河内信弘.

茨城県南地域で発生した E 型肝炎 5 症例の検討. 第 40 回日本肝臓学会西部会. 2013 年 12 月 7 日.

G. 知的所有権の取得状況

3. 特許申請：なし
4. 実用新案登録：なし
5. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業
経口感染によるウイルス性肝炎(A型及びE型)の感染防止、病態解明、
遺伝的多様性及び治療に関する研究
平成25年度分担研究報告書

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

研究分担者 李天成 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官

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

< 研究協力者 >

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

A. 研究目的

E型肝炎ウイルス（Hepatitis E virus; HEV）はE型肝炎の原因ウイルスである。現在、ヒトから少なくとも四つの遺伝子型が異なるHEV(G1-G4)は分離された。E型肝炎は途上国で多発であり、先進各国でも輸入感染症、人獣共通感染症としてしばしば発見される。E型肝炎の一つの特徴は感染妊婦の死亡率が高いことで、実に20%に達するという報告もある。E型肝炎の防止にはE型肝炎ワクチンが必要される。これまでに我々はG1, G3, G4 HEVをヒト肝癌細胞PLC/PRF/5に接種し、経時的に培養上清中のHEV RNA, HEV抗原をRT-PCR, ELISA法にて確認し、HEVを細胞培養法で大量増やすことが可能となった。この培養系を用いてHEVの熱に対する安定性、消毒剤や、紫外線などに対する抵抗性を検討し、ウイルス不活化条件を検討した。本年度、我々は細胞培養で増殖したG1, G3, G4 HEVを加熱により不活化した後ウサギとラットに免疫し、抗体誘導能や中和活性などを解析し、不活化ワクチンの可能性を検討した。さらにアジュバンドを使わず、カニクイザルに筋肉接種により、抗HEV IgG抗体の誘導および感染防御を検討した。一方、Rat HEVは野生ラットから分離された遺伝子構造上ではヒトHEVと類似するウイルスであり、その病原性などに関する情報がまだ少ない。本年度は中国の野生ラットにおけるrat HEVの感染状況も調査した。

B. 研究方法

培養細胞で増殖したG1, G3, G4 HEVを65 10分間熱処理したあと、それぞれ5匹ラット、三羽ウサギに大腿筋肉に三回（0,30,45日目）接種する。接種後、ウサギに対して経時的に採血する。ラットは三回接種後の一週間後に採血する。ELISA法で血清中のHEVに対する抗体を測定する。さら

に免疫血清の中和活性を測定する。

中和活性の測定：免疫血清を HEV と 6 ウェールプレート上で十分混合して、37℃ 一時間反応させた後、4℃ 一晩置く。翌日、PLC/PRF/5 細胞を 5×10^5 /well 蒔き、36℃ で培養する。その後、3 日おきに培地を交換する。経時的に培養上清中の抗原を測定し、ウイルスの増殖の有無によって免疫血清の中和活性を評価する。

カニクイザルを用いた感染防御の検討：不活化した G1, G3, G4 HEV をそれぞれ二頭ずつカニクイザルに大腿筋肉経由で接種し、経時的に採血して抗体価を測定する。抗体陽性となるサルに感染性を持つ HEV を静脈から接種し、HEV の増殖を測定し、感染防御を評価する。

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

倫理面への配慮：本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

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

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

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

D. 考察

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

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

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 学会発表

- 1) Tingting Yang, 李天成. スペインからの E 型肝炎輸入感染症例の解析. 第 54 回日本臨床ウイルス学会、2013 年 6 月、岡山.
- 2) 李天成, Tingting Yang, Wei Li, Daiwei Guan, Ling Fang, Juan Su, Changwen Ke, 武田直和、脇田隆字中国における Rat HEV の感染調査. 第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月、岐阜.
- 3) 李天成、楊ていてい、片岡紀代、網康至、須崎百合子、岸田典子、白倉雅之、今井正樹、浅沼秀樹、武田直和、脇田隆字。フェレット E 型肝炎ウイルス様粒子の作製およびその応用。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月神戸。
- 4) 石井孝司、李天成、塩田智之、吉崎佐矢香、脇田隆字。E 型肝炎ウイルスレプリコンの構築とレプリコン包埋 VLP 作製の検討。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月神戸。
- 5) 塩田智之、李天成、石井孝司、吉崎佐矢香、西村順裕、清水博之、脇田隆字。E 型肝炎ウイルス感染性規定宿主因子の探索に関する研究。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月神戸。
- 6) 清水健太、濱口杉大、李天成、吉松組子、有吉紅也、有川二郎。ラット E 型肝炎ウイルスは人獣共通感染症の病原体か？第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月神戸。
- 7) Tian-Cheng Li, Koji Ishii, Hiroshi Yamamoto, Juri Suzuki, Atsushi Matsuda, Takafumi Ishida, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Naokazu Takeda and Takaji Wakita. An unrecognized hepatitis E outbreak in a monkey facility The 23st Conference of the Asian Pacific Association for the study of the liver. 6-10 June 2013, Singapore

2. 論文発表

- 1) Tomoyuki Shiota, Tian-Cheng Li, Sayaka Yoshizaki, Takanobu Kato, Takaji Wakita, and Koji Ishii. Hepatitis E virus capsid C-terminal region is essential for the viral life-cycle. J Virol. 2013, May 87:(10): 6031-6036.
- 2) Li TC, Ami Y, Suzaki Y, Takeda N, Takaji W. No Evidence for Hepatitis E Virus Genotype 3 Susceptibility in Rats. Emerg Infect Dis. 2013 Aug;19 (8):1343-1345.
- 3) Dawei Guan, Wei Li, Juan Su, Ling Fang, Naokazu Takeda, Takaji Wakita, Tian-Cheng Li, and Changwen Ke. Asian Musk Shrew as a Reservoir of Rat Hepatitis E Virus, China. Emerg Infect Dis. 2013 Aug;19(8):1341-1343.
- 4) Wei Li, Dawei Guan, Juan Su, Naokazu Takeda, Takaji Wakita, ChangWen Ke, Tian-Cheng Li. High prevalence of rat hepatitis E virus in wild rats in China. Vet Microbiol. 2013 Aug 30; 165 (3-4): 275-80.
- 5) Yang T, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Kishida N, Shirakura M, Imai M, Asanuma H, Takeda N, Wakita T, Li TC. Characterization of Self-Assembled Virus-Like Particles of Ferret Hepatitis E Virus Generated by Recombinant Baculoviruses. J Gen Virol. 2013. 12:2647-56.
- 6). Tian-Cheng Li, Tingting Yang, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Masayuki Shirakura, Noriko Kishida, Hideki Asanuma, Naokazu Takeda, and Wakita Takaji. Full Genome of Ferret Hepatitis E Virus from Laboratory Ferrets. Emerg Infect Dis. 2014. *In press*.
- 7) Tian-Cheng Li, Tingting Yang, Tomoyuki Shiota, Sayaka Yoshizaki, Hiromu Yoshida, Mariko Saito, Toshifumi Imagawa, Fidelino F. Malbas, Socorro P. Lupisan, Hitoshi Oshitani, Takaji Wakita, and Koji Ishii. Molecular detection of Hepatitis E virus in rivers in the Philippines. Am J Trop Med and Hyg. 2014. *In press*.
- 8) 石井孝司、李天成. E 型肝炎の概要および検査法. 病原微生物検出情報 35: 3-4, 2014.
- 9) 石井孝司、李天成、恒光裕. 人獣共通感染症としての E 型肝炎. 病原微生物検出情報 35: 4-5, 2014.
- 10) 原田誠也、大迫英夫、吉岡健太、西村浩一、清田政憲、李天成、石井孝司. イノシシおよびブタの E 型肝炎ウイルス感染状況調査-熊本県. 病原微生物検出情報 35: 9-10, 2014.
- 11) 李天成. 動物由来 E 型肝炎ウイルス; E 型肝炎ウイルスの多様性. 病原微生物検出情報 35: 10-12, 2014.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業
経口感染によるウイルス性肝炎(A型及びE型)の感染防止、病態解明、
遺伝的多様性及び治療に関する研究
平成25年度分担研究報告書

ラット HEV の培養系の確立とその意義

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

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

<共同研究者>

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

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

川上万里（岡山済生会総合病院 肝臓病センター）

角坂照貴（愛知医科大学医学部 感染・免疫学講座）

A. 研究目的

E 型肝炎ウイルス(HEV)はヘペウイルス科に分類され、ヒトのみならず、ブタやイノシシ、シカ、ウサギからも分離される。一方でヒト型 HEV に近似しているウイルスがネズミやフェレット、コウモリ、鳥（ニワトリ）及び魚（マス）などからも分離されている。我々はラット HEV のヒトへの感染性について明らかにするために、ラット HEV のヒト由来株化細胞への in vitro 感染実験及び血清学的アプローチによるヒトのラット HEV 感染既往に関する検討を行った。

B. 研究方法

1) 対象

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

2) IgG クラスのラット HEV 抗体の測定

IgG クラスのラット HEV 抗体はラット HEV 由来の組換え ORF2 タンパク質及びパーオキシダーゼを標識

した抗ラット IgG 抗体を用いた酵素免疫測定法により測定した (Virus Res 179:102-112, 2014)。

3) ラット HEV RNA の測定

ラット HEV RNA は、5' 末端領域を増幅する nested RT-PCR 法 (5' terminus-PCR) により検出した。プライマーは既報 (ドイツ由来 4 株及びベトナム由来 1 株) 及び我々がインドネシアのネズミから分離し全塩基配列を決定した 2 株 (rat IDE079F, rat IDE113F) の塩基配列情報に基づいて設計した (Virus Res 179:102-112, 2014)。また、確認のために ORF1 領域 (一部 ORF2 領域を含む) にプライマーを設定した nested RT-PCR 法 (ORF1-PCR) を試行し、塩基配列 (840 塩基長) を解析した (Arch Virol 158: 87-96, 2013)。ラット HEV RNA の定量は in vitro-transcribed rat HEV RNA (rat IDE079, nt 35- 375) を standard として、5' 末端領域に設定したプライマー及びプローブを用いた real-time PCR 法により測定した (Virus Res 179: 102-112, 2014)。

4) ラット HEV の培養

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

5) ヒト血清中のラット HEV 抗体の測定

インドネシアの供血者 382 例及び我が国の検診受診者 215 例の血清を対象として、ラット HEV 型 ORF2 抗原及びヒト HEV 型 ORF2 抗原を固相化した 2 種類の酵素免疫測定法により IgG クラス抗体を測定し、両者の signal を比較した。ラット HEV 型 ORF2 抗原による signal がヒト HEV 型 ORF2 抗原よりも高値であった場合、ラット HEV 感染既往の可能性が示唆される。

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

C. 研究結果及び考察

1) 野生ラットに於けるラット HEV マーカーの陽性率

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

2) ラット HEV 株の塩基配列の解析

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

3) ラット HEV の培養

ヒト型 HEV を効率的に増殖させることができるヒト肝癌由来株化細胞である PLC/PRF/5 細胞にラット HEV を接種したところ、接種後 2~6 日目に培養上清中に子孫ウイルス (progeny) が出現し、20~24 日目に 10^7 copies/mL に達した (図 2：ヒト由来株化細胞によるラット HEV の培養)。そして上清中に現れたウイルスの塩基配列は感染源である肝臓 homogenate 中及び同個体の血清中のウイルスの塩基配列とそれぞれ 100% 一致していたことより、感染源由来の progeny が増殖していることが確認された。

次にこの progeny ウイルスを PLC/PRF/5 細胞及びやはりヒト型 HEV が効率的に増殖する HuH-7 細胞、HepG2 細胞及び A549 細胞に継代したところ、ヒトの肝癌由来株化細胞である HuH-7 細胞及び HepG2 細胞では PLC/PRF/5 細胞と同様にラット HEV の感染が成立し、培養上清中に progeny が出現したが、ヒトの肺癌由来株化細胞である A549 細胞ではラット HEV の増殖は認められなかった (図 2)。

4) ラット HEV のヒトへの感染の可能性の検討

ネズミにおけるラット HEV 感染が蔓延しているインドネシアの供血者 382 例及びラット HEV の侵淫度が低い日本の検診受診者 215 例の血清について、ラット HEV 型 ORF2 抗原を固相化した酵素免疫測定法で測定を行ったところ、インドネシアの方が高い signal を示すヒトの割合が多い傾向があり、吸光度

0.3以上のヒトはインドネシアで382例中54例(14%)であったのに対して、日本では215例中2例(約1%)であった。

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

D. 結論

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

E. 研究発表

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

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請: なし

2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業
経口感染によるウイルス性肝炎(A型及びE型)の感染防止、病態解明、
遺伝的多様性及び治療に関する研究
平成25年度分担研究報告書

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

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

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

<共同研究者>

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

1) 調査対象

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

2) HEV マーカーの測定方法

IgG クラス HEV 抗体は組換え HEV ORF2 タンパク質を用いた酵素免疫測定法により測定した (J Clin Microbiol 43: 49-56, 2005)。HEV RNA は ORF2 領域をターゲットにした RT-PCR (ORF2-457)法により検出し、この領域の塩基配列により遺伝子型を決定した (J Clin Microbiol 40:3209-3218, 2002)。また、HEV RNA titer の定量は real-time PCR 法により測定した (Arch Virol 153:657-666, 2008)。

3) 統計学的解析

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

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

C. 研究結果及び考察

1) 地域ごとの国内感染 E 型肝炎患者の特徴

患者は北日本に多く、男性・中高年齢者で優位であった。診断の内訳は急性肝炎が 185 症例、重症型が 23 症例、劇症型が 8 症例であった。原因 HEV の遺伝子型は 3 型が 141 症例、4 型が 75 症例であった。また、北海道では 4 型が多く、その他の地域では 3 型が多かった（表 1：地域ごとの国内感染 E 型肝炎患者の特徴）。

2) 遺伝子型 3 型及び 4 型 HEV 感染患者の臨床的特徴の比較

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

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

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

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

E 型肝炎患者ごとに血清中の HEV RNA titer の経時的な推移をプロットし、一回帰直線の y-切片（発症時のウイルス titer の推定値）及び傾き（ウイルス titer の経時的な低下率）を計算して集計を行った。その結果、4 型では 3 型よりも y-切片の値が有意に高く、発症時の HEV titer が高い傾向が認められた（ $P = 0.0046$, Mann-Whitney's U test）。また、4 型 HEV 感染患者では、一回帰直線の傾きが劇症・重症型肝炎群で急性肝炎群よりも急であり、HEV RNA titer が急速に低下する傾向が認められた（ $P = 0.0437$, Mann-Whitney's U test）。これは劇症及び重症型 E 型肝炎症例では細胞障害性 T 細胞等によって HEV 感染肝細胞が排除されることにより、HEV の増殖の場が急速に減少することによるものと考えられた。

D. 結論

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

E. 研究発表

1. Takahashi M, Okamoto H: Features of hepatitis E virus infection in humans and animals in Japan. *Hepatol Res* 44: 43-58, 2014.

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

E. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業
経口感染によるウイルス性肝炎(A型及びE型)の感染防止、病態解明、
遺伝的多様性及び治療に関する研究
平成25年度分担研究報告書

エクソソーム分泌経路を介したE型肝炎ウイルス粒子の放出機構の解析

研究協力者 長嶋茂雄 自治医科大学医学部 感染・免疫学講座ウイルス学部門 講師
研究代表者 岡本宏明 自治医科大学医学部 感染・免疫学講座ウイルス学部門 教授

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

A. 研究目的

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

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

B. 研究方法

ウイルス放出におけるエクソソーム分泌経路の関与については、エクソソームの放出を促進する薬剤(Bafilomycin A1)または阻害する薬剤(GW4869)を用いてJE03-1760F株(genotype 3)を接種したPLC/PRF/5細胞を処理し、24時間後の培養上清および細胞内のHEV RNA量をリアルタイムRT-PCR法により測定することにより解析した。用いた薬剤の細胞毒性は、MTS試験により検討した。また、HEV放出におけるRab27AおよびHrsの必要性については、それぞれに対するsiRNAをトランスフェクトした細胞にウイルスを感染させ、培養上清および細胞内のHEV RNA量を測定し、検討した。

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

電子顕微鏡用超薄切片は、HEV感染細胞を用いて作製した。最初に、2.5%グルタルアルデヒドを用いて前固定を行い、その後、1%四酸化オスミウムで後固定を行った。エタノール希釈系列で脱水後、エポキシ樹脂に包埋し、60-90 nmの切片を作製した。観察は、2%酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色を施し、

透過型電子顕微鏡を用いて、加速電圧 80 kVで行った。免疫電子顕微鏡法には、試料をLR White樹脂に包埋し、超薄切片を作製後、ORF2蛋白質に対するH6225抗体を反応させた。その後、金コロイド（直径 12 nm）標識二次抗体を反応させ、2%酢酸ウラニルとクエン酸鉛による二重染色を施し、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

倫理面への配慮：野生型 HEV および感染性 cDNA クローンが由来する糞便検体の採取に際して、インフォームドコンセントが得られている。また、検体提供者は匿名化されているため、個人のプライバシーを侵害することはない。また、検体提供者は匿名化されているため、個人のプライバシーを侵害することはない。また、検体提供者は匿名化されているため、個人のプライバシーを侵害することはない。

C. 研究結果

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

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

そこで、エクソソームの放出に影響を与える薬剤を用いて、ウイルス放出効率への影響を解析した。用いた薬剤は、エクソソームの放出を促進する Bafilomycin A1、エクソソームの放出を阻害する GW4869 である。これらの薬剤で HEV 感染細胞を処理し、24 時間後の培養上清および細胞内の HEV RNA を定量した。解析の結果、Bafilomycin A1 で処理をした細胞では、培養上清中に放出されるウイルス量は薬剤濃度が高くなるほど増加し、細胞内の HEV RNA 量は、薬剤濃度依存的に減少した。一方、GW4869 で処理した細胞では、培養上清中に放出されるウイルス量は、薬剤濃度が高くなるほど減少し、細胞内の HEV RNA は、濃度依存的に増加した。また、薬剤の細胞毒性を MTS 試験により検討したが、解析に用いた DMSO および薬剤の濃度では、細胞への毒性は認められなかった。

以上の結果から、エクソソームの放出を促進するとウイルスの放出が促進され、エクソソームの放出を阻害するとウイルスの放出が抑制されることが明らかとなり、ウイルス放出におけるエクソソーム分泌経路の関与が示唆された。

2. Rab27A または Hrs に対する siRNA をトランスフェクトした細胞での HEV 放出効率

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

Rab27A、Hrs に対する siRNA (siRab27A, siHrs) または negative control の siRNA (NC siRNA) を細胞にトランスフェクトし、その後、ウイルスを感染させた。そして、感染 10 日後の培養上清中の HEV RNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。その結果、Rab27A をノックダウンした細胞では、negative control を 100%とすると、感染 10 日目の培養上清中では 16.1%と放出効率の低下が認められた。同様に、Hrs をノックダウンした細胞においても、感染 10 日目の培養上清中では 11.5%と放出効率の著しい低下が認められた。また、siRab27A, siHrs をトランスフェクトした細胞内の HEV RNA 量を測定した結果、NC siRNA をトランスフェクトした細胞内と同程度であった。このことから、siRNA トランスフェクションによる HEV RNA 複製への影響はないものと考えられた。

以上の結果から、エクソソームの形成ならびに放出を阻害すると、HEV の放出が抑制されることが明らかとなった。このことから、HEV の放出にはエクソソーム分泌経路が関与していることが示された。

3. 透過型電子顕微鏡を用いた HEV 感染細胞の形態解析

JE03-1760F 株を接種した PLC/PRF/5 細胞、HepG2 細胞および A549 細胞を用いて超薄切片電子染色標

本を作製し、透過型顕微鏡による形態学的な解析を行った。PLC/PRF/5 細胞を観察した結果、ウイルス感染細胞の周辺に遊離した状態で存在する HEV 粒子を認めた (図 1)。それらのウイルス粒子は、直径が約 50 nm の球状粒子で、外膜 (エンベロープ) に包まれ、電子密なコアを包含したヌクレオカプシドを有していた。外膜を除いたウイルス粒子の直径は約 30-35 nm と推測され、これまでに報告されている糞便中の HEV 粒子の大きさと一致していた。また、HEV 感染 HepG2 細胞および A549 細胞を用いた超薄切片標本においても、細胞外に同様のウイルス粒子が観察された。これらのウイルス粒子においても、その表面に明瞭な膜構造が認められた。一方、対照である非感染細胞では、同様のウイルス粒子は観察されなかった。

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

図 1 HEV 感染細胞の超薄切片電子染色像

矢印は膜に覆われた HEV 粒子を示す。

4. 免疫電子顕微鏡法ならびに蛍光抗体法による HEV 粒子の検出

電子顕微鏡による形態学的な解析により、MVB 内腔に膜に覆われた HEV 粒子が観察された。そこで、HEV の ORF2 蛋白質に対する H6225 抗体を用いて、免疫電子顕微鏡法によるウイルス粒子の同定を試みた。その結果、MVB 内腔に存在するウイルス様粒子に金コロイドの結合が認められた (図 2, 矢印)。しかしながら、金コロイドの集簇は観察されなかった。これは、固定またはウイルス粒子が膜に覆われていることに起因する抗原性の減弱によるものと考えられた。

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

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

図 2 ORF2 蛋白質に対する抗体を用いた LR White 樹脂包埋切片の免疫電子顕微鏡像

矢印は金コロイドが結合したウイルス粒子を示す。

D. 考察

HEV はノンエンベロープウイルスであるため、糞便中のウイルス粒子は膜に覆われていない。しかしながら、血清中ならびに培養細胞から放出されたウイルス粒子の表面には細胞由来の膜成分および ORF3 蛋白質が存在している。これらの知見は、ウイルス粒子の比重ならびに粒子表面の抗原性の解析から得られた結果である。本研究では、電子顕微鏡を用いることにより、膜に覆われた HEV 粒子を形態学的に初めて証明することができた。これらのウイルス粒子は形態が異なるものの、ともに培養細胞への感染性を有することから、細胞への吸着に参与するレセプターならびに侵入経路の違いが考えられ、その解明は HEV の生活環を理解するうえで重要であると思われる。

これまでの解析により、HEV 粒子の放出には、トランスゴルジネットワークを経由した ORF3 蛋白質の小胞輸送に加え、初期エンドソームが関与するエンドソーム輸送が重要であることが明らかとなっている。一方、後期エンドソームの移動は、HEV の放出に無関係であることから、成熟ウイルス粒子はエクソソーム分泌経路を利用して細胞外に放出されることが示唆されていた。本研究において、MVB 内腔への出芽機構ならびにエクソソーム分泌経路を介したウイルス放出機構が明らかとなり、HEV のユニークな生活環の解明が大きく前進したと考えられる。C 型肝炎ウイルス (HCV) においては、感染細胞に由来するエクソソームが、HCV の感染を媒介していることが報告されている。今後は、より詳細に

HEV とエクソソームの関連性を明らかにすることが重要となる。E 型肝炎に対する特異的な治療法が確立されていない現状にあって、HEV の放出機構が明らかとなれば、抗ウイルス薬の開発など疾患の制圧に寄与することが期待される。

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

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

G. 知的所有権の取得状況

なし

平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業
「経口感染によるウイルス性肝炎(A 型及び E 型)の感染防止、病態解明、
遺伝的多様性及び治療に関する研究」

研究成果の刊行に関する一覧表

1. 雑誌(原著論文)

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

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

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

2. 総説

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

司, 田中智之, 野 田 衛					
李 天成	動物由来 E 型肝炎ウイルス; E 型肝炎ウイルスの多様性	病原微生物検出 情報	35(1)	10-2	2014
石井孝司	E 型肝炎の慢性化、肝外病 変について	病原微生物検出 情報	35(1)	13-4	2014