

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

経口感染する肝炎ウイルス(A型、E型)の感染防止、  
遺伝的多様性、および治療に関する研究

平成 21 年度～平成 23 年度  
総合研究報告書

研究代表者 岡本 宏明

平成 24 (2012) 年 3 月

# 目 次

---

I. 総合研究報告(平成 21 年度～平成 23 年度)		
経口感染する肝炎ウイルス(A 型、E 型)の感染防止、 遺伝的多様性、および治療に関する研究	-----	1
研究代表者: 岡本宏明		
(資料 1) 班の構成	-----	11
(資料 2) 3 年間の研究成果の概要図	-----	15
(資料 3) A 型肝炎に関する研究成果を示したスライド (A1～A24)	-----	17
(資料 4) 「不活化 A 型肝炎ワクチンの適応拡大に関する 適応外薬の要望書」	-----	29
(資料 5) E 型肝炎に関する研究成果を示したスライド (E1～E33)	-----	33
(資料 6) 「健康危険情報通報」	-----	51
II. 研究成果の刊行に関する一覧表		
平成 21 年度	-----	57
平成 22 年度	-----	59
平成 23 年度	-----	61
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	65

## I. 総合研究報告

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）  
総合研究報告書

経口感染する肝炎ウイルス（A型、E型）の感染防止、遺伝的多様性、および  
治療に関する研究

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:**3年間の研究成果のポイントを纏めると、A型肝炎については、1) 我が国ではHAVに対する感受性者の高齢化が着実に進行しており、高齢者での重症化や流行の拡大が危惧される状況にあること、2)2010年春に広域流行、2011年春にも集団発生(患者49名:寿司店)があり、従前稀であったⅢA型HAVが2007年以降国内感染例でも散見され、定着が疑われることなどから、引き続き慎重な監視が必要であること、3) AmantadineやIFN- $\alpha$ 、IFN- $\lambda$  (IL29)が治療に有効である可能性、などが示された。E型肝炎については、1) 我が国の成人の5.3%がIgG-HEV抗体を保有し、約500万人が感染既往を有し、年間約12万人が新たにHEVに感染していると推定されること、2)Non-ABC急性肝炎の中でのE型肝炎の占める割合が増加傾向にあること[国立病院機構共同研究班の全国調査:1.7~3.4%から10%超(2000年以降)]、3)北海道でのE型肝炎の重症化率が高く[12/81(14.8%)],うち3例(3.7%)が劇症化したこと、さらに重症型4型株による小流行が発生し、監視が必要であること、4)野生イノシシから新種HEV(5型と6型)を発見できたこと、5)培養系を用い、食物媒介性E型肝炎の感染源となりうる市販ブタ肝臓や野生イノシシ肝臓のHEV感染性を証明できたこと、6)培養細胞由来の不活化HEVがウサギとラットで中和抗体を誘導できたこと、7)HEV粒子の細胞からの放出にはORF3蛋白質(特にPSAPモチーフ)などのウイルス因子やTsg101やVps4などの宿主因子が重要な働きをしており、HEVが”non-enveloped”ウイルスでありながら、多くの”enveloped”ウイルスと同じように、ESCRT輸送系と呼ばれる細胞内膜輸送系を介して放出されていることなど、ユニークなHEVの放出機構が明らかになり、感染予防や治療法確立に資する多くの成果が班員およ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 東芝病院消化器内科 副院長  
鈴木一幸 岩手医科大学 消化器・肝臓内科 教授  
横須賀收 千葉大学大学院医学研究院腫瘍内科学 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 治療研究部 部長  
日野 学 日本赤十字社血液事業本部 副本部長  
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  
桶谷 真 鹿児島大学病院 消化器センター 講師(平成21年度~平成22年度)  
中山伸朗 埼玉医科大学 消化器内科・肝臓内科 講師(平成23年度)

<研究協力者(班友)>

資料1参照。

はじめに

近年、低侵淫国におけるA型肝炎の流行が報告され、本邦でもA型肝炎ウイルス(HAV)の抗体陽性者が著しく減少し、感受性者の高齢化が進行している状況下、隣国韓国でのA型肝炎の大流行は対岸の火事として見過ごすことはできない。かかる状況を踏まえ、平成15年にスタートしたE型班の世界に誇れる研究成果を発展的に継承し、「経口感染する肝炎ウイルス(A型、E型)の感染防止、遺伝的多様性、および治療に関する研究」班(経口肝炎班)として平成21年度に矢野公士先生(独立行政法人国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター、国立病院機構長崎医療センター)によって立ち上げられたのが当班である(図1)。

矢野先生健康上の事由により、愚生岡本が平成22年度より研究代表者として引き継ぎ、早2年が過ぎ、3年間の総合研究報告書を執筆する段に至っている。その間、矢野先生から病氣療養中ながら、幾度かメールで班研究に対する思い入れや熱意を伺うことができたが、平成22年9月20日悪性リンパ腫により43歳の若さでご逝去された。今後の大いなる活躍が皆か

ら期待されていただけに、残念極まりない。八橋弘先生による追悼文(肝臓 51(11): 686-688, 2010)を拝読し、その思いを新たにした。

班員・班友を代表し、ご冥福をお祈りするとともに、衷心からの哀悼の気持ちを込めて矢野先生に本総合研究報告書を捧げる。

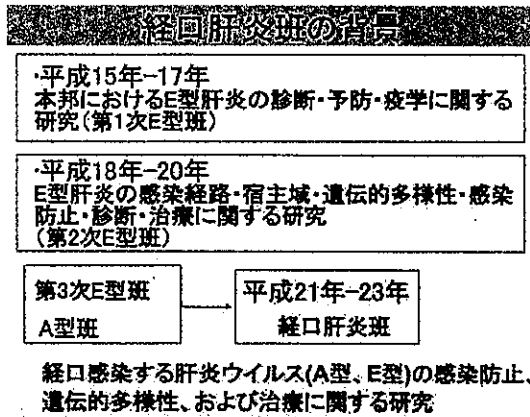


図 1. 本研究班の背景

#### A. 研究目的

A型肝炎について、発生状況のモニタリングを実施し、重症・劇症化の機序を解明する。治療法を開発する。また、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。E型肝炎について、感染経路の全解明、診断・治療・予防法の確立を目標とする。

#### B. 研究方法

発生動向と重症化リスク因子の調査、感染実態の調査、HAVならびにHEVの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、抗ウイルス剤、ワクチン開発のための予備的検討などを行う。

(倫理面への配慮)

すべての調査・研究は、個人情報保護および「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

平成21年度から平成23年度までの3年間の本研究班の研究結果の概要を資料2に示す。また、研究的成果および行政的成果をA型肝炎とE型肝炎に分けて以下に詳述する。

##### 1. A型肝炎

###### 1) 疫学と実態調査

衛生環境の改善によって、我が国の若年層で

のHAV抗体陽性率が顕著な低下傾向を示していることは既に指摘されているところであるが、2010年11月に関東圏(東京都、神奈川県、山梨県、千葉県、及び茨城県)で献血された血液を用い、各年代別・男女別に100本ずつ合計1200本を対象としてHAV抗体(IgG)を測定した。50歳未満では男女ともHAV抗体保有者はほとんどいないが、50歳代で10%、60歳代でも43%に過ぎないことが分かった(日野班員)(スライドA1: 資料2参照、以下同様)。調査対象とした集団の構成は異なるが、国立感染症研究所(感染研)による調査データ(Kiyohara et al, Microbiol Immunol 51, 185-191, 2007)と比較すると、2003年当時の陽性率を7年分高齢者側へシフトさせた陽性率にほぼ等しい値であった(スライドA2)。

HAVに対する感受性者の高齢化が着実に進んでおり、一旦国内でA型肝炎が発生すると大きな流行に進展しても不思議でない状況にあり、如何にして感染拡大を阻止するかが喫緊の重要な課題であると言える。我が国でのA型肝炎患者数(届出数)は2007年以降非常に低いレベル(年間150人前後)で推移していたが(スライドA3)、2010年春に東京都と広島県、福岡県など、全国的にA型肝炎が多発したため(スライドA4)、3月26日に感染研の感染症情報センターからアラートが発出された(スライドA5)。幸いこのdiffuse outbreakは大流行には進展しなかったが、2010年のA型肝炎患者届出数は最終的には342人に達した(スライドA3)。2010年にA型肝炎が多発した理由は、従来日本に常在していた株(IA-1型)に加え、日本ではまれであった2つのクラスターに属する株(IA-2型、ⅢA型)が新たに日本に流入してきたためであると推測された(石井班友)(スライドA6)。しかし、何故、3種類の異なるクラスターに属するHAV株によるA型肝炎がほぼ同時期に、かつ全国的に広域発生したのかは不明のままであり、今後課題を残した。

また、2011年春に患者数49名に及ぶ大きなA型肝炎集団発生事例があった(スライドA7)。これらの患者の2010年11月下旬~12月中旬における喫食状況等の調査が千葉市環境保健研究所によって行われ、患者は市内寿司店で調理、提供された寿司を喫食していたことが明らかとなった。ウイルス株は我が国に常在しているIA-1株であった(横須賀班員、石井班友)。

国立病院機構共同研究班参加33施設による急性肝炎の全国調査(1980年~2011年)において、A型肝炎の発生数は、1983年(162例)と1990

年(187例)の大流行以後、減少傾向にある。しかし2010年は上述のように、春先に多数の地域での outbreak があつたことから、直近の過去3年間(各年10例未満)に比べて増加し、21例の発生が認められた(スライドA8)。患者の平均年齢は、1980年代には34.7歳、1990年代には38.9歳、2000年代(2010年含む)には42.9歳と、高年齢化している。また、重症化例(重症型+劇症型)の頻度も、1980年代には1.9%、1990年代には2.4%であつたが、2000年代(2010年含む)には15.5%と、近年上昇している(八橋班員)。

劇症肝炎・遅発性肝不全(LOHF)の全国調査結果(1998年~2009年)、並びに2010年からは急性肝不全としての全国調査により、A型劇症肝炎の年間発症数は減少傾向にあり、2003年以降は10例以下であることが明らかにされた。高齢、男性、基礎疾患、合併症数が予後不良因子である(桶谷班員、中山班員)(スライドA9)。2010年の第10週から28週までの期間の diffuse outbreak における劇症肝炎は268例中7例(3%)あり[40代(1例)、50代(3例)、60代(3例)]、うち60代の1例が死亡した。

## 2) 感染経路

2010年のA型肝炎の報告数は、3月中旬の第10週以降急増し、第13週の27例をピークにいったん減少傾向となつたが、第18~19週は再び報告数の増加が認められた。しかし、第22週以降は週当たり報告数が10例未満で推移し、第26~27週は連続してベースラインを超えない報告数となつたため、第27週にアラート体制は解除された。2010年第28週までのA型肝炎の累積報告数は268例であり、そのうち236例(88%)が第10週~28週の症例であつた。全体の年齢中央値は47歳(5~88歳)、性別では男性153例(57%)、女性115例(43%)であり、246例(92%)が国内感染と推定または確定として報告された。経口感染と推定された199例(84%)のうち、58例(199例中29%)にカキ喫食の記載が認められたこと以外、感染経路は不明であつた。

2011年の千葉市における集団A型肝炎事例は、A型肝炎に罹患した寿司店の調理従事者により直接、または調理施設等を介して間接に汚染された食品によるものであることが明らかになつた。我が国において、過去にもA型肝炎の集団発生事例は報告されているが、今回の事例は2000年以降で最大規模のものであつた(スライドA10)。

## 3) 遺伝的多様性、遺伝子型

ヒトに感染するHAVはIA型、IB型、IIA型、IIB型、IIIA型、IIIB型の6種類の遺伝子型に分類されているが、世界的にも、また我が国でも最も高頻度に認められるHAV遺伝子型はIA型である。

1957年(昭和32年)に秋田県北部の炭鉱の町、尾去沢で発生したいわゆる「尾去沢肝炎」(スライドA11)がA型肝炎であつたことはそれから22年後の1979年(昭和54年)に吉澤らによって免疫電顕法によって証明されていた(日本医事新報 No. 2888, 昭和54年9月1日)(スライドA12)。その尾去沢肝炎の患者血清が50年余りもの長い間、須藤恒久先生(秋田大学名誉教授)によって大事に保管され(スライドA13)、HAVの historical strain (Osarizawa-1957 strain)の発掘に繋がつた。全塩基配列が決定され、IA型と判明した(新井班員ら)(スライドA14)。塩基配列が決定されたHAVの最古株である。

2010年の全国的な diffuse outbreak の主要な原因となつた、東南アジア由来と考えられるIA-2株は、2011年には類似株を含めても3株のみであつた。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起こしたが、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た。IIIA型の韓国大流行株(2007~2009年)と同一クラスターに属する株は2010年に引き続き2011年も検出されており、地域的な偏りは見られていないことから、日本への定着が懸念されている(石井班員)(スライドA15)。

国立病院機構共同研究班参加施設による急性肝炎の全国調査によると、2005年以降の44例のHAV遺伝型は、海外渡航歴のある11例中3例(27%)はIA、4例(36%)はIB、4例(36%)はIIIAとばらつきが認められたが、国内感染33例では、29例(88%)がIAで、残り4例(12%)はIIIAで2009年または2010年の発生例であり(スライドA16)、VP1-2A領域の168塩基長の配列に基づく解析ではあるが、韓国大流行IIIA株と同一クラスターに属した(スライドA17)。

新井班員らは、日本(1990~2011年)および韓国(2007~2008年)にて発症した急性A型肝炎25症例(それぞれ22例と3例)(スライドA18)において、ウイルス遺伝子の完全長ないし準完全長解析を行った(スライドA18)。その結果、1990年頃の国内感染と考えられる6症例はすべて genotype IA を示したが、2007年以

降の症例ではⅢAが見られるようになったことを明らかにした。韓国でのⅢA症例の流行から、我が国へのⅢA型ウイルスの流入が推測されているが、完全長解析によると、ヨーロッパ株との近縁性も高く(スライドA19)、ウイルスの拡散・流入経路については、更なる解析が必要である(新井班員)。

#### 4) 治療、予防、重症化予測

八橋班員からの報告のように、近年我が国におけるA型肝炎患者は高齢化傾向を示し、重症化の頻度も高くなってきている。重症化例に対する特異的な治療法の開発は重要であり、治療薬候補薬剤について検討した。Amantadineは多くのDNAウイルスやRNAウイルスの増殖を抑制することが報告されているが、IFN- $\alpha$ との併用療法がHAV IRES依存性翻訳抑制、RepliconおよびHAV whole virusの増殖抑制に有用であった(スライドA20)。また、IFN- $\lambda$ にもIRES依存性翻訳抑制効果が認められ、IFN- $\lambda$ 単独よりもAmantadine、あるいはIFN- $\alpha$ との併用療法がより効果的であった(横須賀班員)(スライドA21, A22)。

パブリックコメントの機会を捉え、2009年8月14日付で医薬食品局審査管理課の「不活化A型肝炎ワクチンの適応拡大に関する適応外薬の要望書」(資料4)を提出した(矢野前班長、石井班友)。

スライドA1に示したように、現在の日本では60歳以下の人口のほとんどがHAVに対する抗体を持たず、HAVが何らかの理由で流入した場合に大きな流行となる危険性がある。2010年の広域流行、並びに2011年の千葉市での集団発生はこの危険が現実になったものと考えられる。後者の事例を教訓に、生鮮魚介類を扱う生産者や調理従事者への優先的なA型肝炎ワクチン接種が強く推奨される。

2007年以降、ⅢA型HAVの感染例が散見されるが、横須賀班員は重症化例6例中2例がⅢA型であったことから、ⅢA型HAVの感染とA型肝炎重症型との関連性を指摘した(スライドA23, A24)。今後の症例の蓄積による検証が必要である。

## 2. E型肝炎

### 1) 疫学と実態調査

日本人全体のHEV感染頻度を推測するため、健常成人を対象にした全国規模の調査を実施した。具体的には、30都道府県の20歳から108歳までの住民(22,027人:2002年1月から2007

年12月までの期間の健診受診者)を対象として血清中のIgGクラスHEV抗体、HEV RNA、およびIgGクラスHEV抗体が検出された検体についてはIgM/IgAクラスHEV抗体を測定した。その結果、HEV感染が全国的に広がっているが、明瞭な地域差があり、性差や年齢差も顕著であることがわかった(スライドE1)。すなわち、1,167例(5.3%)でIgGクラスHEV抗体が検出され、男性の方が女性に比べて有意に高い抗体陽性率を示した(7.8% vs. 3.4%,  $P < 0.0001$ )。IgGクラスHEV抗体の陽性率は20歳代では男女ともに低いが(それぞれ1.7%、1.3%)、60歳代まで緩やかに上昇を続け、男性では10.4%に達し、以後90歳未満まではほぼ横ばいの状態であった。一方、女性では低率ながら、60歳代まで徐々に上昇し、4.5%に到達したあと、徐々に下降し、80歳代では3.3%、90歳以上の年齢層では2.5%の陽性率であった(スライドE2)。50歳以上の集団では50歳未満の集団の比べて有意に高い陽性率を示した(6.6% vs. 2.7%,  $P < 0.0001$ )。また、地域別に比較すると、中部以北は近畿以南に比べ、有意に高い抗体陽性率を示した(6.7% vs. 3.2%,  $P < 0.0001$ )(スライドE3)。IgGクラスHEV抗体が検出された1,167例のうち、13例(そのうち12例が中部以北に在住)がIgMクラスHEV抗体とIgAクラスHEV抗体の両者、あるいはどちらか一方が陽性であり、比較的最近HEVに感染したと考えられたが、いずれもHEV RNAは陰性であった。一方、IgG/IgM/IgAクラスのどのHEV抗体も陰性でありながら、3例(約7,300人に1人)からHEV RNAが検出された。そのgenotypeはいずれも3型であり、中部以北(東北2例、関東1例)の居住者であった。スライドE4およびE5に示すように、地域的に見て、ブタの飼育頭数やブタ肉の消費状況とHEV感染状況とが一定の関連性が認められた。

総務省が2010年4月に発表した「人口推計月報」による男女別・年齢別の人口([http://memorva.jp/ranking/japan/soumu\\_population\\_2010.php](http://memorva.jp/ranking/japan/soumu_population_2010.php))に上記データを当てはめて計算したところ、日本人成人の約500万人がHEVに対する感染既往を有するものと推定された(スライドE6)。なお、IgGクラスHEV抗体陽性血清がHEVの感染を阻止し中和活性を有することは培養系を用いた感染実験によって確かめられている(Tanaka et al. J Gen Virol 88:903-911, 2007)。

スライドE2に示したように、20歳から69歳までの間にIgG型HEV抗体陽性率が概ね直線

的に上昇し、男性では1.7%から10.4%に推移し、女性では1.3%から4.5%になることから、年間感染率は男性では $(10.4-1.7) \div 50 = 0.17\%$ 、女性では $(4.5-1.3) \div 50 = 0.06\%$ と算定された。換言すると、年間に約12万人(成人男性4.96千万人の0.17%、成人女性5.33千万人の0.06%)がHEVに感染していると推定された(班長)。

国立病院機構共同研究班参加33施設(スライドE7)による急性肝炎の全国調査(1980年～2011年)によると、E型肝炎の発生数は、2000年以前は毎年非ABC型急性肝炎の1.7～3.4%程度の低い頻度であったが、2000年以降10%内外、2005年以降はコンスタントに10%を超える頻度で発生している(スライドE8)。32年間のE型肝炎診断例59例は、男性53例(89.8%)、女性6例(10.2%)、平均年齢50.4±15.5歳であった。重症型を2例に認め、ほか57例は通常型であった。発症前約3ヵ月間の海外渡航歴を8例(13.6%)に認めた。

鈴木班員らは、岩手県を中心とする北東北地域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。2009年8月から2011年10月末までの間に、登録された急性肝障害224例について解析した結果、急性肝炎165例中77例(46.7%)が成因不明であり、そのうち10例がE型肝炎であった。したがって、全急性肝障害例に占めるE型肝炎の頻度は4.5%、急性肝炎に占める割合は6.1%、成因不明の急性肝炎に占める割合は13%であった(スライドE9)。

国内で最もE型肝炎患者の多い北海道内における地域的HEV感染診断支援ネットワークである「北海道E型肝炎研究会(道E研)」の活動により、最近5年間のHEV感染症の概要が明らかになった。HAV、HBV、HCVの急性感染が除外された急性肝障害症例399例中81例(20.3%)がE型肝炎と診断された(スライドE10)。HEV遺伝子型が決定された77例中52例(67.5%)、約2/3が4型(残りは3型)であり、北海道は国内のどの地域と比べても4型の頻度が圧倒的に高い。81例のうち、重症型が11%、劇症肝炎が4%と高率であった(スライドE11)。2004年に北見市でのHEV集団感染事例(うち1例は劇症肝炎で死亡)、2006年には網走市の劇症肝炎患者(うち1例は劇症肝炎)から分離された4型株と同系統のHEVが2009年に函館の劇症肝炎患者からも検出されたことから、道内での蔓延、広域発生が危惧され、厚労省健康危機管理調査官宛に健康危険情報を発信した(資

料6)。同年秋には新札幌4型株(new Sapporo strain)による札幌圏での小流行が確認された。11例のうち1例は重症型であり、茨城県からの旅行者も同一株に感染していたことがHEV株の分子系統解析によって判明した(相川班友)。2011年12月以降に、この新札幌4型株と同一クラスターに属するHEVが札幌圏内の7名のE型肝炎患者から分離された。新札幌株が駆逐されず札幌圏内で生き延びていたと考えられ、1名が劇症型、2名が重症型であり、病原性を増した可能性も危惧され、監視が続けられている。

北海道において、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して、2005年1月から血清学的スクリーニング陰性かつALT<61 IU/Lを示す献血者を対象にHEV RNAスクリーニング(HEV NAT)調査を実施した。2011年12月までの7年間の調査において、1,931,847名中、HEV RNA陽性者数は231名(男性172名、女性59名)であり、献血者の0.012%(1/8,363)に相当する頻度であった(スライドE12)。道E研で把握されたE型肝炎患者の2/3が4型HEVの感染例であったのに対して、献血者から見出されたHEVはわずか7%が4型であるに過ぎず、大多数(93%)が3型であった。これは、4型が3型よりも重症化との関連が深いというこれまでの研究班の成果を支持する結果である。

同じ北海道地区でも、道東の釧路や根室、特に根室では主たる産業が漁業であり、魚を中心とする食習慣を有しており、住民のHEV抗体保有率が全国平均よりも有意に低いことが明らかになった(田辺班友)(スライドE13)。

兵庫県でのE型肝炎は成因不明急性肝炎例の2.8%(3/108)であった(北嶋班友)。

劇症肝炎・遅発性肝不全(LOHF)(1998年～2009年)および2010年からの急性肝不全の全国調査の結果では、E型劇症肝炎は年間1～2例が散発的に発症しており、高齢発症、基礎疾患、亜急性型、複数の合併症が予後不良の因子と考えられた(桶谷班員、中山班員)(スライドE14)。

## 2) 感染経路と宿主域

ブタ肝臓や野生イノシシ・シカの肉や内臓が食物媒介性E型肝炎の感染源となることは既に世界的に認知されている。シカ肉やイノシシ肝臓が感染源となった事例については患者から分離されたHEVと同一のHEVが食べ残しの肉



や肝臓から分離され、感染源を立証するための直接証拠が示されていた (Tei et al., Lancet 362: 371-373, 2003; Li et al., Emerg Infect Dis 11: 1958-1960, 2005)。しかし、ブタ肝臓については、北海道の市販ブタ肝臓から 1.9% (7/363) の頻度で HEV RNA が検出され、その HEV 塩基配列が道内の E 型肝炎患者から分離された HEV の塩基配列とほぼ 100% 一致したという間接証拠に留まっており、感染性があるか否かは不明であった (Yazaki et al., J Gen Virol 84: 2351-2357, 2003)。今回、凍結保存してあった HEV 陽性ブタ肝臓のホモジネートを作製し (スライド E15)、ヒト培養細胞である PLC/PRF/5 細胞および A549 細胞に接種し、ブタ肝臓由来 HEV が感染し増殖しうるかどうかを検討した。その結果、HEV RNA titer が高かった 3 検体の HEV が効率よく増殖しうるということがわかった (スライド E16)。すなわち、培養系を用いて初めてブタ肝臓の HEV 感染性を証明することができた (班長)。市販ブタ肝臓から HEV RNA が検出されることは東京都においても調べられ、新井班員はブタ肝臓/大腸の約 2% から HEV RNA が検出されたことを報告した (スライド E17)。

E 型肝炎の潜伏期は 2~9 週 (平均 6 週) と長く、発症時に過去の喫食歴を正確に聴取する事は、記憶に残るようなエピソードでもないと実際には難しい。道 E 研で調査された過去 5 年間の 81 例の E 型肝炎症例において、25 例では明らかな回答は得られず、ブタ内臓肉摂取歴は 38 例 (43%) に留まった。他方、ブタ内臓肉を摂取しないと回答した症例は僅か 15 例 (19%) であった (姜班員)。HEV NAT で陽性判定された道内献血者の献血前ブタ内臓肉摂取歴が一般献血者のそれ (28%) に比べて有意に高かったことから (70%, 117/166) (スライド E12)、北海道でブタ内臓肉摂取による HEV 感染が存在し、それが重要であるが、その他の感染経路が存在する可能性も示唆され、その解明が急がれる。

北海道以外の地域での E 型肝炎患者におけるブタ内臓肉摂取率は低く、実際、北東北地域での 10 名の E 型肝炎患者では発症前のブタ内臓肉摂取歴のある患者は認められなかった (鈴木班員)。

ヒト HEV の ORF2 抗原 (キャプシド抗原) に対する抗体測定系を用いて様々な動物血清から HEV 抗体が検出されているが、それには大きく分けて 2 種類の反応パターンがある。一つは実際にヒト HEV (人獣共通 HEV) が感染して HEV 抗体が検出される場合であり、これまでに

ブタ、野生イノシシ、シカ、マングースなどの動物からヒト HEV に対する抗体が検出され、ヒト HEV と同一クラスターに属する HEV も同定されている。飼育ブタ (特に 2~4 ヶ月齢) に次いで感染率が高いのが野生のイノシシであり、全国調査の結果、捕獲された野生イノシシの 3.3% (19/578) から 3 型 HEV ないし 4 型 HEV のゲノム RNA が検出された (スライド E18, E19)。

一方、種固有の HEV に感染しており、種固有 HEV に対する抗体でありながら、交叉反応によって、恰もヒト HEV に対する抗体が検出されているように誤認される場合がある。その代表が avian HEV であり、avian HEV はニワトリに感染するがヒトには感染しない (スライド E20)。ラットについても高頻度で HEV 抗体が検出されることから、ラットがヒトへの HEV 感染の reservoir になっている可能性が考えられていた。しかし、2010 年に Johne らは野生ラットには固有の HEV (rat HEV) が感染していることを明らかにした (J Gen Virol 91: 750-758, 2010)。それを受けて、李班員は rat HEV の中空粒子 (LPs) を作製し (スライド E21)、抗原性の解析によって、rat HEV-LPs とヒト HEV-LPs (1 型、3 型、4 型いずれも) が交叉反応を示すことを明らかにした。また、抗体検出系を確立するとともに (スライド E22)、ベトナム野生ラットから新しい遺伝子型の rat HEV を分離した (スライド E20)。したがって、ニワトリと同様、野生ラットには種特異的な rat HEV が感染しており、ヒト HEV が感染している可能性は低い、あるいは無い、と考えるのが妥当と思われる。しかし、最近、Kanai らは養豚場周辺で捕獲された約 18% (10/56) の野生ラットの肝臓や脾臓からヒト HEV (3 型) のゲノム RNA が検出されたことを報告した (BMC Res Notes 5: 4, 2012, doi:10.1186/1756-0500-5-4)。ラットには rat HEV 以外に、ヒト HEV も感染し、ヒトへの HEV 感染の source となりうるのかどうか、きちんと解明する必要がある。

最近、中国で毛皮用や食用として飼育されているウサギから新たな HEV が同定された (Zhao et al., J Med Virol 81: 1371-1379, 2009)。分子系統樹上はヒトやブタなどから分離された 3 型 HEV との類似性が高いが、ヒトに感染するかどうかはまだ分かっていない。後で述べるように、ウサギ HEV がブタや野生イノシシ由来の HEV と同じように培養細胞で効率よく増殖できることから、ヒトへ感染する可能性を念頭に置いて、精査する必要がある。

岡山県内の野外捕獲ヌートリアは HEV 抗体

陰性であった(川上班友)。

### 3) 遺伝的多様性、遺伝子型

HEV の遺伝的多様性の全体像も、また遺伝子型の数もどれくらいあるのか、まだ分かっていない。本研究期間中に静岡県(スライド E23)の野生イノシシから new genotype に属する HEV 株 (JBOAR135-Shiz09 株) を発見した(新井班員)(スライド E24)。また、岡山県(スライド E25)で捕獲された野生イノシシからも new genotype に属する HEV 株 (wbJOY\_06 株) を発見した(班長)(スライド E26)。全塩基配列を比較すると、JBOAR135-Shiz09 株と wbJOY\_06 株は互いに 78.6% の一致率に過ぎず(スライド E27)、それぞれ新たな遺伝子型(tentative に 5 型、6 型)に分類されうると考えられた。従って、更なる未同定の HEV 株の存在が示唆され、今後も HEV 遺伝子の多様性についての継続的な調査・解析が必要である。多様性の程度によっては現行の核酸検出系の見直しも必要になるかも知れない。

三重県内の E 型肝炎患者 8 例及び野生イノシシ 1 頭からわが国では稀な 3 型(ヨーロッパ型)HEV を分離した(中野班友、岡野班友)。

### 4) 感染防止、ワクチン開発

培養細胞由来の HEV を用い、不活化の条件を検討した結果、①60°C で 15 分間、65°C で 10 分間以上の熱処理、②50 $\mu$ w 強度で 30 分間の紫外線照射、③125ppm 以上の濃度の消毒剤 NaClO で 30 分処理、が有効であることが分かった。一方、HEV はアルコールやクロロホルムに対する抵抗性を示すことも分かった(李班員)。

培養細胞で増殖した HEV を 65°C で 10 分間熱処理したあと、ウサギとラットにそれぞれ接種し、経時的に採血して、ELISA 法で血清中 HEV に対する抗体、さらに免疫血清の中和活性を測定した。その結果、ウサギとラットの両者の血中に IgG クラスの HEV 抗体が誘導された(スライド E28)。誘導された抗体は PLC/PRF/5 細胞への HEV の感染を阻止することが明らかになった(スライド E29)。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を示唆しており、今後、ウイルスの大量培養や精製条件を検討し、サルを用いた感染防御を検討する予定である(李班員)。

### 5) 診断、治療

診断法は 2005 年に開発されたものであるが(Takahashi et al., J Clin Microbiol 43: 49-

56, 2005)、その後も研究班から絶えず E 型肝炎診断薬の必要性を示すデータを発信し続けてきたことの成果として、2011 年 10 月に初めて E 型肝炎の体外診断薬(HE-IgA 定性)が保険収載された(スライド E30)。これまで北海道(姜班員)や北東北(鈴木班員)、全国国立病院(八橋班員)などで重点定点監視が行われ、特定地域や特定医療機関での動向は把握されてきたが、我が国全体での E 型肝炎発生数は過少評価されてきたことは誰もが認めるところである。その意味では、我が国における E 型肝炎の疫学は今正にスタートラインに立ったと言える。今後は、全国津々浦々で E 型肝炎の診断が可能になり、全数把握に近づけるものと期待される。また、薬物性肝障害や自己免疫性肝炎などと誤診された症例に対する不適切な治療も回避でき、E 型肝炎に対する早期の的確な治療と予後予測が可能になると期待される。加えて、感染源・感染経路の同定、並びにそれに基づく感染予防対策の構築にも資するものと期待される。

検査センターでの E 型抗体検査の受注が始まったことの影響かは定かでないが、本年 9 週目(3 月 4 日)までの届け出件数は A 型肝炎が 21 件であるのに対して、E 型肝炎はそれよりも 9 件も多く、30 件に達しており、昨年までは見られなかった逆転現象が起こっている。

### 6) E 型肝炎ウイルス培養系の高効率化と感染培養系を用いた増殖機構の解明

PLC/PRF/5 細胞と A549 細胞を用い、遺伝子型の違いに因らず、また血清や糞便、肝臓などの臨床材料の種類に因らずにヒト HEV を効率よく増殖できる感染培養系を確立できた(スライド E31)。培養上清中に放出される子ウイルスは  $10^9$  copies/ml を超えるウイルス量に達することを確認した。また、長期間の supernatant passage あるいは cell passage によって培養細胞に馴化した HEV 株を得ることができた。さらに、ヒト HEV のみならず、ブタイノシシ、ウサギ由来の HEV も種の壁を越えて PLC/PRF/5 細胞や A549 細胞で効率よく増殖できることを観察した(スライド E32)。

感染性 cDNA クローンをを用いた増殖機構に関する研究成果として、HEV のユニークな放出機構が明らかになった。すなわち、ORF3 蛋白質が HEV 粒子の細胞からの放出に重要な役割を果たし、放出された粒子(培養上清・血清)の表面には細胞膜成分と ORF3 蛋白質が存在すること、加えて ORF3 蛋白質が PSAP モチーフを介して小胞輸送関連因子 Tsg101 と結合し、細胞内

膜輸送系を利用して粒子が細胞外に放出されることを明らかにした(スライド E33)。

#### D. 結論

##### A 型肝炎について

- 1) 我が国では HAV に対する感受性者の高齢化が一層進んでおり、高齢者における HAV 感染の重症化、大流行への進展がさらに危惧される状況にある。
- 2) 2010 年春に広域流行、並びに 2011 年春に寿司が感染源となった集団発生(患者 49 名)があった。幸い大きな流行には進展しなかったが、医療機関からの迅速な届出、関係機関の情報共有、感染予防対策の周知徹底などが感染拡大の防止に有用であると考えられる。
- 3) 従前、我が国では IA 型 HAV の感染が殆どであったが、2007 年頃より IIIA 型が散見されるようになった。隣国韓国での 2007 年からの IIIA 型 HAV による大流行を踏まえると、韓国からの流入・定着が危惧されるが、HAV 株の流入・拡散の経路については引き続き解析が必要である。
- 4) A 型劇症肝炎は発生数が明らかに減少しているが、高齢、男性、基礎疾患、合併症数が予後不良因子であり、予後不良例は寧ろ増加している。
- 5) A 型肝炎に対する有効な特異的治療法の候補として、アマンタジン、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\lambda$  (IL29) が HAV IRES 活性を強く抑制することを見出した。そして、それらの併用によってさらに強く HAV IRES 活性が抑制されることが明らかとなった。

##### E 型肝炎について

- 1) HEV 感染の全国調査(健康成人 22,027 人)を行った結果、IgG クラス HEV 抗体保有率が 5.3%(男性 7.8%、女性 3.4%)であることが判明した。国内で約 500 万人が HEV 感染既往を有し、年間約 12 万人が HEV に新規に感染していると推定された。
- 2) 非 ABC 型急性肝炎の中での E 型肝炎の占める割合が増加傾向にある[国立病院機構の全国調査:1.7%~3.4%から 10%超(2000 年以降)]。
- 3) 国内で E 型肝炎の患者数が最も多い北海道では、赤十字血液センターでの献血者を対象とした HEV-NAT と道 E 研による流行監視が行われている。HEV-NAT は 2005 年 1 月から継続して行なわれ、過去 7 年間で約 8,000

人に 1 人の頻度で計 231 名の HEV RNA 陽性者(3 型、93%; 4 型、7%)が見いだされた。2007 年以降の道 E 研の調査により、非 ABC 型急性肝障害患者 399 名中 81 名(20.3%)が E 型肝炎であることが分かった。4 型 HEV 感染例が約 3 分の 2 を占め、重症型が 11%、劇症肝炎が 4%と高い頻度で認められた。

- 4) 岩手県を中心とした北東北地区では A 型肝炎よりも E 型肝炎の発生件数が 2 倍となっており、E 型肝炎は成因不明急性肝炎の 13% を占めた。
- 5) 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。測定法自体は 2005 年に開発されたものであるが、その後も診断薬の必要性を示すデータを研究班から絶えず発信し続けてきたことの成果であると言える。E 型肝炎診断薬の保険適用によって、全国津々浦々での E 型肝炎の診断、症例の発掘、実態把握が可能になると思われる。
- 6) 野生イノシシから 2 種類の新たな遺伝子型に分類される新種 HEV [JBOAR135-Shiz09(5 型), wbJOY\_06(6 型)]を同定した。
- 7) 培養細胞由来の HEV を加熱によって不活化し、ウサギとラットに免疫したところ、中和抗体を誘導しうることが示唆された。
- 8) 組換えバキュロウイルス発現システムを用いて世界初 rat HEV-LPs(中空粒子)の作製に成功し、抗体検出 ELISA 法を樹立した。
- 9) 細胞培養系を用いて、市販ブタ肝臓内 HEV の感染性を証明した。現行の培養系は、感染性の評価に供することも可能であることが分かった。
- 10) 上述のブタ由来 HEV 以外にも、野生イノシシやウサギ由来の HEV も種の壁を越えて、ヒト株化細胞である A549 細胞や PLC/PRF/5 細胞に感染し、効率よく増殖して子ウイルスを産生しうることが明らかになった。人獣共通感染ウイルスである HEV の特性が培養系で再現されたことになる。
- 11) HEV の放出機構に関する研究において、ORF3 蛋白質が HEV 粒子の細胞からの放出に重要な役割を果たし、ORF3 蛋白質上の PSAP モチーフ配列が、“enveloped”ウイルスの出芽に関与している L-ドメインと同様の機能を有していることが分かった。HEV は“non-enveloped”ウイルスでありながら、細胞内膜輸送系を巧みに利用した極めてオリジナリティの高い放出機構を有しており、HEV の新規創薬標的になりうるもの

と考えられた。

E. 研究発表

論文発表、総説：

<平成 21 年度>

- 1) Tanaka T, Takahashi M, Takahashi H, Ichiyama K, Hoshino Y, Nagashima S, Mizuo H, Okamoto H: Development and characterization of a genotype 4 hepatitis E virus cell culture system using a HE-JF5/15F strain recovered from a fulminant hepatitis patient. *J Clin Microbiol* 47:1906-1910, 2009.
  - 2) Inoue J, Ueno Y, Nagasaki F, Akahane T, Fukushima K, Kogure T, Kondo Y, Kakazu E, Tamai K, Kido O, Nakagome Y, Ninomiya M, Obara N, Wakui Y, Takahashi M, Okamoto H, Shimosegawa T: Sporadic acute hepatitis E occurred constantly during the last decade in northeast Japan. *J Gastroenterol* 44:329-337, 2009.
  - 3) Takahashi K, Okamoto H, Abe N, Kawakami M, Matsuda H, Mochida S, Sakugawa H, Suginoshi Y, Watanabe S, Yamamoto K, Miyakawa Y, Mishihiro S: Virulent strain of hepatitis E virus genotype 3, Japan. *Emerg Infect Dis* 15:704-709, 2009.
  - 4) Yamada K, Takahashi M, Hoshino Y, Takahashi H, Ichiyama K, Nagashima S, Tanaka T, Okamoto H: ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. *J Gen Virol* 90:1880-1891, 2009.
  - 5) Inoue J, Takahashi M, Mizuo H, Suzuki K, Aikawa T, Shimosegawa T, Okamoto H: Nucleotide substitutions of hepatitis E virus genomes associated with fulminant hepatitis and disease severity. *Tohoku J Exp Med* 218:279-284, 2009.
  - 6) Davaalkham D, Enkhoyun T, Takahashi M, Nakamura Y, Okamoto H: Hepatitis A and E virus infections among children in Mongolia. *Am J Trop Med Hyg* 81: 248-251, 2009.
  - 7) Ichiyama K, Yamada K, Tanaka T, Nagashima S, Jirintai, Takahashi M, Okamoto H: Determination of the 5'-terminal sequence of subgenomic RNA of hepatitis E virus strains in cultured cells. *Arch Virol* 154:1945-1951, 2009.
  - 8) Takahashi M, Tamura K, Hoshino Y, Nagashima S, Yazaki Y, Mizuo H, Iwamoto S, Okayama M, Nakamura Y, Kajii E, Okamoto H: A nationwide survey of hepatitis E virus infection in the general population of Japan. *J Med Virol* 82:271-281, 2010.
  - 9) 高橋雅春, 岡本宏明. 肝・胆道系症候群(第2版) その他の肝・胆道系疾患を含めて肝臓編(上)【感染症 ウイルス性肝炎 E型肝炎. 日本臨床 別冊肝・胆道系症候群 I, p31-37, 2010
  - 10) 岡本宏明. 【肝炎】 わが国における E 型肝炎の現状. *臨床とウイルス* 37(4): 345-354, 2009
  - 11) 岡本宏明. 医師からみたズーノーシス 飼い主・動物医療従事者の感染予防のために(第12回) E型肝炎 医師からみた E型肝炎. *SA Medicine* 11(5): 76-81, 2009
  - 12) 岡本宏明. 【肝疾患診療の新しい展開】 E型肝炎の現状とワクチン開発. *日本医師会雑誌* 138(6): 1095-1099, 2009
  - 13) 岡本宏明. 肝炎シリーズ E型肝炎の現況とその予防. *感染制御* 5(3): 251-254, 2009
- <平成 22 年度>
- 14) Takahashi M, Tanaka T, Takahashi H, Hoshino Y, Nagashima S, Jirintai, Mizuo H, Yazaki Y, Takagi T, Azuma M, Kusano E, Isoda N, Sugano K, Okamoto H. Hepatitis E virus (HEV) strains in serum samples can replicate efficiently in cultured cells despite the coexistence of HEV antibodies: characterization of HEV virions in blood circulation. *J Clin Microbiol* 48(4):1112-1125, 2010
  - 15) Jinshan, Jirintai, Manglai D, Takahashi M, Nagashima S, Okamoto H. Molecular and serological survey of hepatitis E virus infection among domestic pigs in Inner Mongolia, China. *Arch Virol* 155(8):1217-1226, 2010
  - 16) Nagashima S, Takahashi M, Jirintai, Tanaka T, Yamada K, Nishizawa T, Okamoto H. A PSAP motif in the ORF3 protein of hepatitis E virus is necessary

- for virion release from infected cells. *J Gen Virol* 92(Pt 2):269-278, 2011
- 17) Okamoto H. Efficient cell culture systems for hepatitis E virus strains in feces and circulating blood. *Rev Med Virol* 21(1):18-31, 2011
- 18) 相川達也, 池澤和人, 間宮孝, 上野ちさと, 和田由美子, 島田沙香, 津田文男, 高橋雅春, 岡本宏明. 札幌圏内小流行4型HEV株が検出された茨城県内 E 型肝炎の 1 例. *肝臓* 51(10): 579-581, 2010
- 19) 岡本宏明. E 型肝炎ウイルスの感染培養系. *ウイルス* 60(1): 93-104, 2010
- 20) 岡本宏明. E 型肝炎の輸入感染症例. 症例から学ぶウイルス肝炎の治療戦略. 診断と治療社 p178-182, 2010
- 21) 岡本宏明. E 型肝炎ウイルス感染. *治療学* 44(9): 974-977, 2010
- 22) 岡本宏明. E 型肝炎をめぐる- 診断法と感染培養系の確立と基礎・臨床への応用-. *Minophagen Med Rev* 55(3): 207-218, 2010
- 23) 岡本宏明. E 型肝炎の現況. *総合臨牀* 60(1): 95-101, 2011
- 24) 高橋雅春, 岡本宏明. E 型肝炎. 肝・胆道系症候群 (第 2 版). 別冊日本臨牀. 日本臨牀社 p31-37, 2010
- 25) 横山孝二, 岡本宏明. B/C 型以外のウイルス肝炎. *周産期医学* 41(2): 225-229, 2011
- <平成 23 年度>
- 26) Takahashi M, Nishizawa T, Sato H, Sato Y, Jirintai, Nagashima S, Okamoto H. Analysis of the full-length genome of a hepatitis E virus isolate obtained from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype. *J Gen Virol* 92(Pt 4):902-908, 2011
- 27) Nagashima S, Takahashi M, Jirintai S, Tanaka T, Nishizawa T, Yasuda J, Okamoto H. Tumour susceptibility gene 101 and the vacuolar protein sorting pathway are required for the release of hepatitis E virions. *J Gen Virol* 92(Pt 12):2838-2848, 2011
- 28) Sato Y, Sato H, Naka K, Furuya S, Tsukiji H, Kitagawa K, Sonoda Y, Usui T, Sakamoto H, Yoshino S, Shimizu Y, Takahashi M, Nagashima S, Jirintai, Nishizawa T, Okamoto H. A nationwide survey of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars in Japan: identification of boar HEV strains of genotypes 3 and 4 and unrecognized genotypes. *Arch Virol* 156(8): 1345-1358, 2011
- 29) Takahashi H, Tanaka T, Jirintai S, Nagashima S, Takahashi M, Nishizawa T, Mizuo H, Yazaki Y, Okamoto H. A549 and PLC/PRF/5 cells can support the efficient propagation of swine and wild boar hepatitis E virus (HEV) strains: demonstration of HEV infectivity of porcine liver sold as food. *Arch Virol* 157(2): 235-246, 2012
- 30) Okamoto H. Hepatitis E virus cell culture models. *Virus Res* 161(1):65-77, 2011
- 31) Anderson DA, Okamoto H, Emerson SU, Jameel S, Harrison TJ, Arankalle VA, Meng XJ. *Hepeviridae*. In: Andrew M.Q. King, Michael J. Adams, Eric B. Carstens, and Elliot J. Lefkowitz, editors, *Virus Taxonomy*. Oxford: Elsevier, 2011, pp. 1021-1028.
- 32) 田辺利男, 水尾仁志, 矢崎康幸, 高橋雅春, 岡本宏明. 北海道東部の釧路市および根室市における E 型肝炎ウイルス感染の疫学調査 感染の地域差と食文化の相違について. *肝臓* 52(9): 567-574, 2011
- 33) 岡野宏, 中野達徳, 松崎晋平, 佐瀬友博, 齋藤知規, 向克巳, 西村晃, 伊藤圭一, 白木克哉, 竹井謙之, 岡本宏明. 三重県内で発生した稀な 3 型(ヨーロッパ型)E 型肝炎ウイルスによる散発性急性肝炎の 4 症例. *肝臓* 52(5): 295-302, 2011
- 34) 小関 至, 姜 貞憲, 水尾仁志, 赤池 淳, 大村卓味, 狩野吉康, 松居剛志, 佐賀啓良, 渡辺正夫, 三浦洋輔, 倉 敏郎, 常松 泉, 松林圭二, 坂田秀勝, 岡本宏明, 高橋和明, 新井雅裕. 2009 年秋に札幌圏で発生した E 型肝炎小流行の臨床的・ウイルス学的・分子疫学的解析. *肝臓* 53(2): 78-89, 2012
- 35) 岡本宏明. 【新時代のウイルス性肝炎学 基礎・臨床研究の進歩】 E 型肝炎 E 型肝炎ウイルスのウイルス学的特徴. *日本臨牀* 69(増刊 4) 新時代のウイルス性肝炎学. p579-587, 2011
- 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

