

肝炎ウイルス研究 の今後

国立感染症研究所
ウイルス第二部
脇田 隆字

肝炎ウイルス発見の歴史

~1900		“カタル性黄疸”
1912	コケイン	感染性肝炎
1946	マッカラン	A型、B型の感染性肝炎
1965	ブルンバーグ	B型肝炎ウイルスの発見
1973	ファインストン	A型肝炎ウイルスの発見
1974	プリンストン	非A非B型肝炎
1983	バラヤン	E型肝炎ウイルスの発見
1989	ホートン	C型肝炎ウイルス遺伝子の分離

肝炎ウイルス研究における最近の問題点

A型肝炎：今年度の流行、韓国における

大流行をどう考えるか、感染源の同定

B型肝炎：定期接種への導入、抗ウイルス療法、

臨床像の変化（慢性化、再活性化）

C型肝炎：新規抗ウイルス薬の導入による治療

の変化、キャリアの高齢化

E型肝炎：人獣共通感染症、ワクチン開発

肝炎ウイルスの感染経路（予防のポイント）

A型肝炎：汚染された飲料水、食物（飲食店から拡大）

B型肝炎：母児感染（垂直感染）、血液、体液、
血液製剤、性交渉、不適切な医療行為
（水平感染）

C型肝炎：血液、体液、血液製剤、その他

E型肝炎：汚染された飲料水、食物、特にイノシシ、
豚の生食（人獣共通感染症）

肝炎ウイルス感染症の予防と治療

A型肝炎：ワクチンあり、治療薬なし

B型肝炎：ワクチン、HBIGによる感染予防可能

インターフェロン、核酸アナログによる治療

C型肝炎：インターフェロン、リバビリンに加えてDAA

の導入による治療効果の劇的改善

ワクチンなし

E型肝炎：ワクチンなし、治療薬なし

今後の肝炎ウイルス研究のテーマ

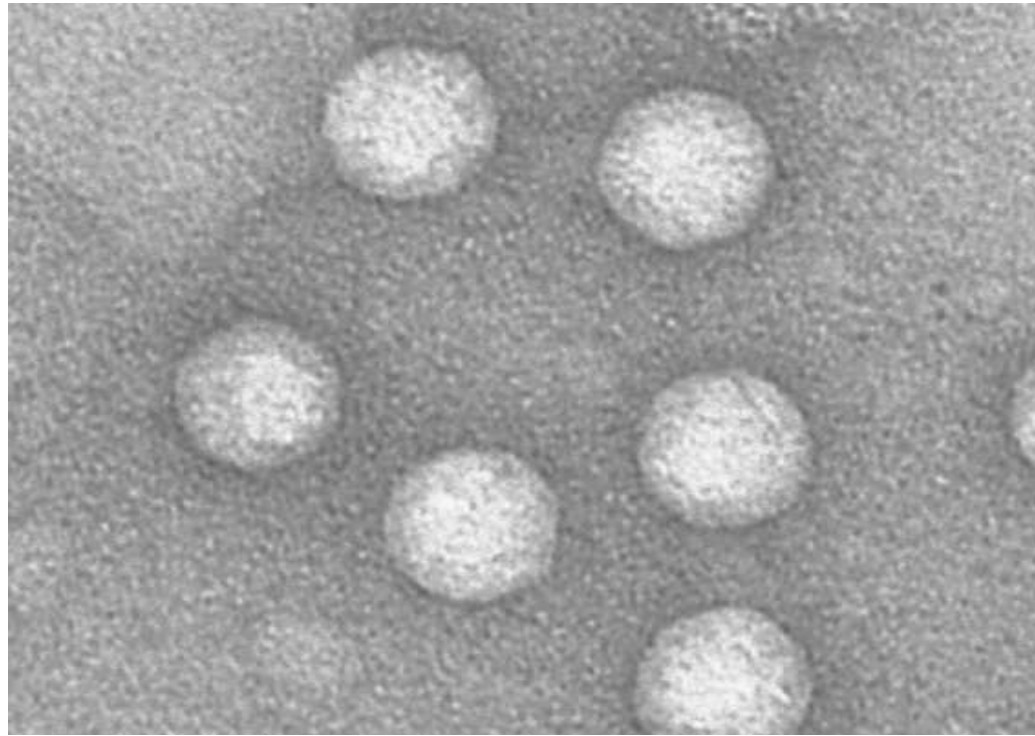
A型肝炎：分子疫学、感染源の同定

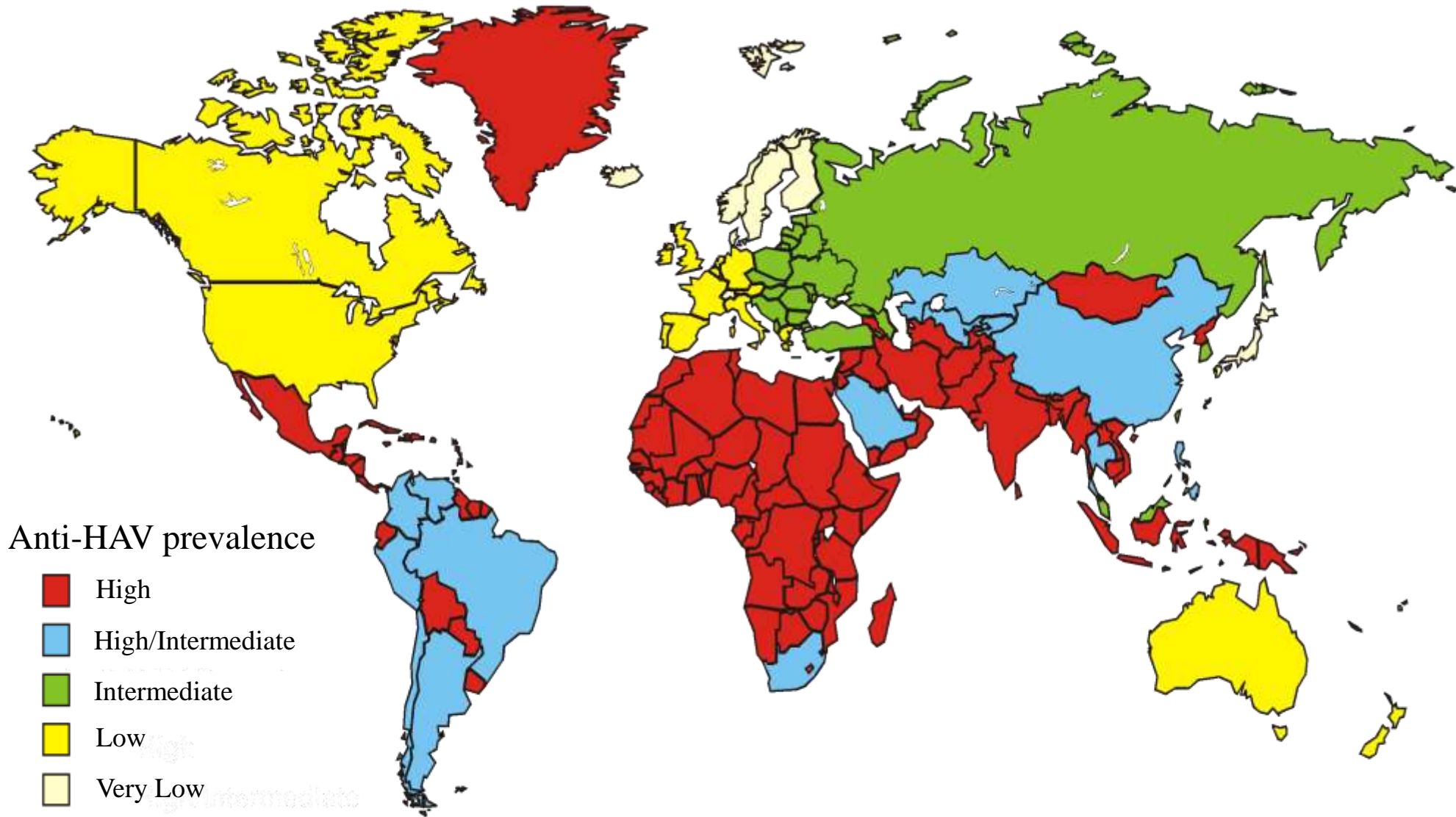
B型肝炎：ワクチン定期接種に必要な研究、
ウイルス複製機構、病原性の解明、
新規治療薬の開発

C型肝炎：ウイルス根絶に向けた研究、ウイルス複製機構、
病原性の解明、より効果が高く、副作用のない
安価な治療薬開発、ワクチンの開発

E型肝炎：ワクチン、治療薬の開発

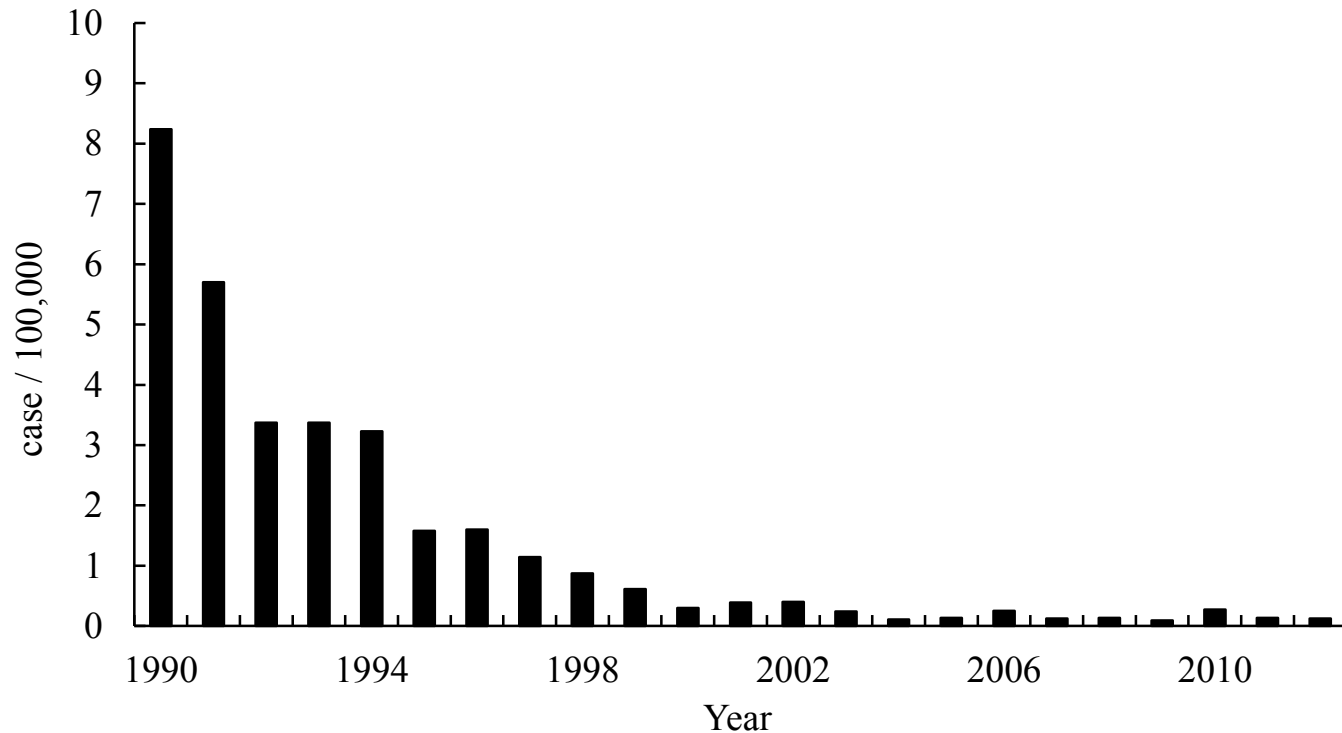
A型肝炎の分子疫学的手法による 流行状況把握と日本への流入状況の検討





A型肝炎の流行状況を示した世界地図。
 日本はA型肝炎超低頻度国。
 周辺は高頻度～中程度、または都市低頻度、地方高頻度の混合型。

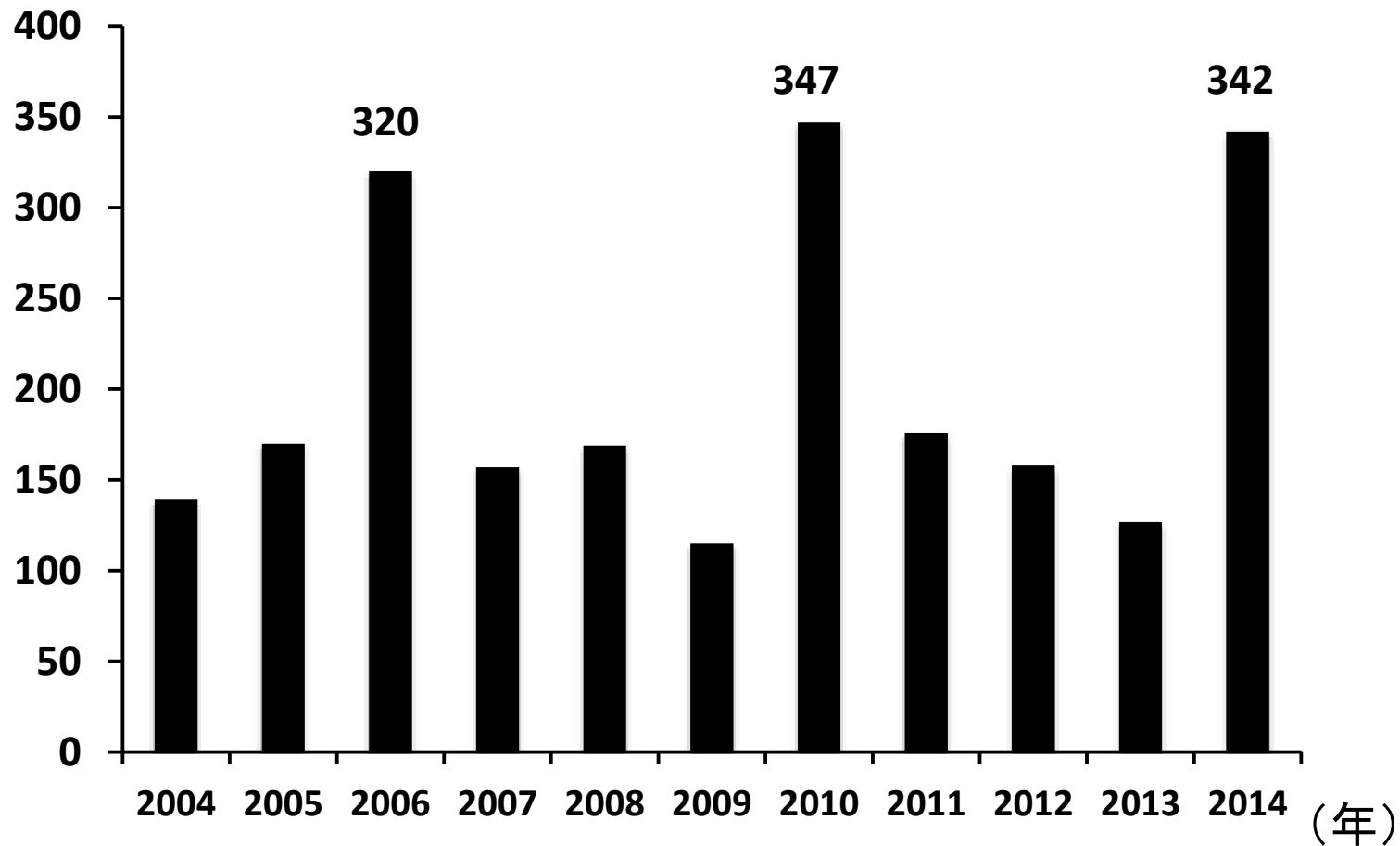
- ✓ A型肝炎ウイルス(HAV)による経口感染症。
- ✓ 急性肝炎。一度感染すると終生免疫獲得。
- ✓ 予後良好。ただし年齢とともに重症化しやすくなる。
- ✓ 潜伏期間は1ヶ月。このため原因食材の特定が困難。
- ✓ 予防は衛生管理とワクチン。



日本におけるA型肝炎患者報告数の推移

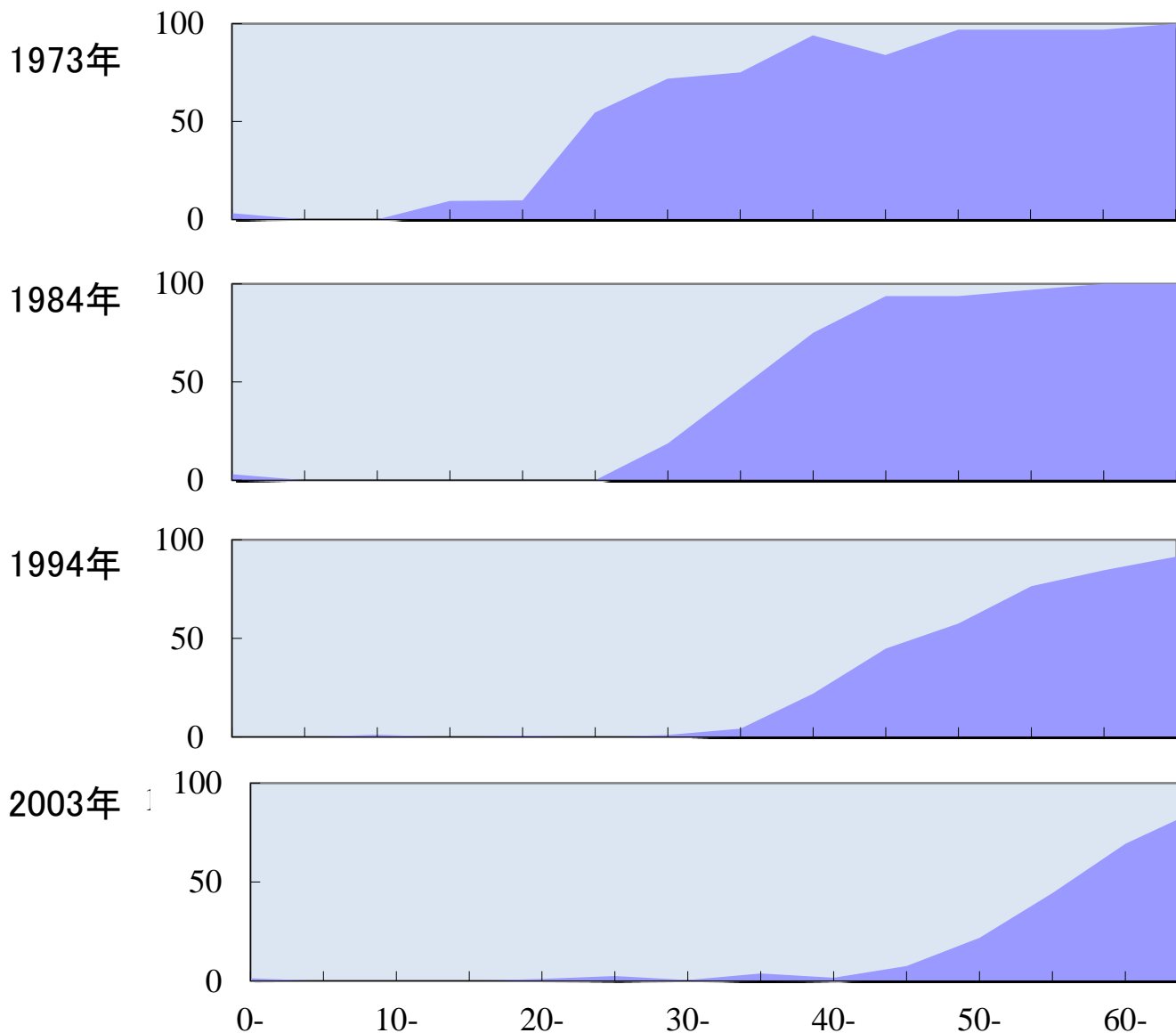
A型肝炎患者発生数の推移

(患者数)

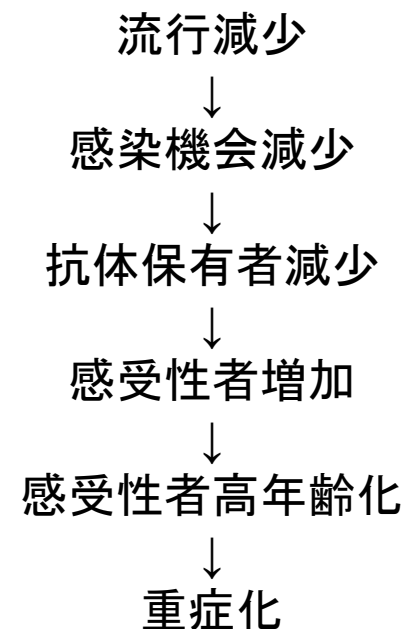


2014年は21週まで

日本におけるA型肝炎抗体保有率の変化



感受性者
抗体保有者



縦軸: 抗体保有率、横軸: 年齢

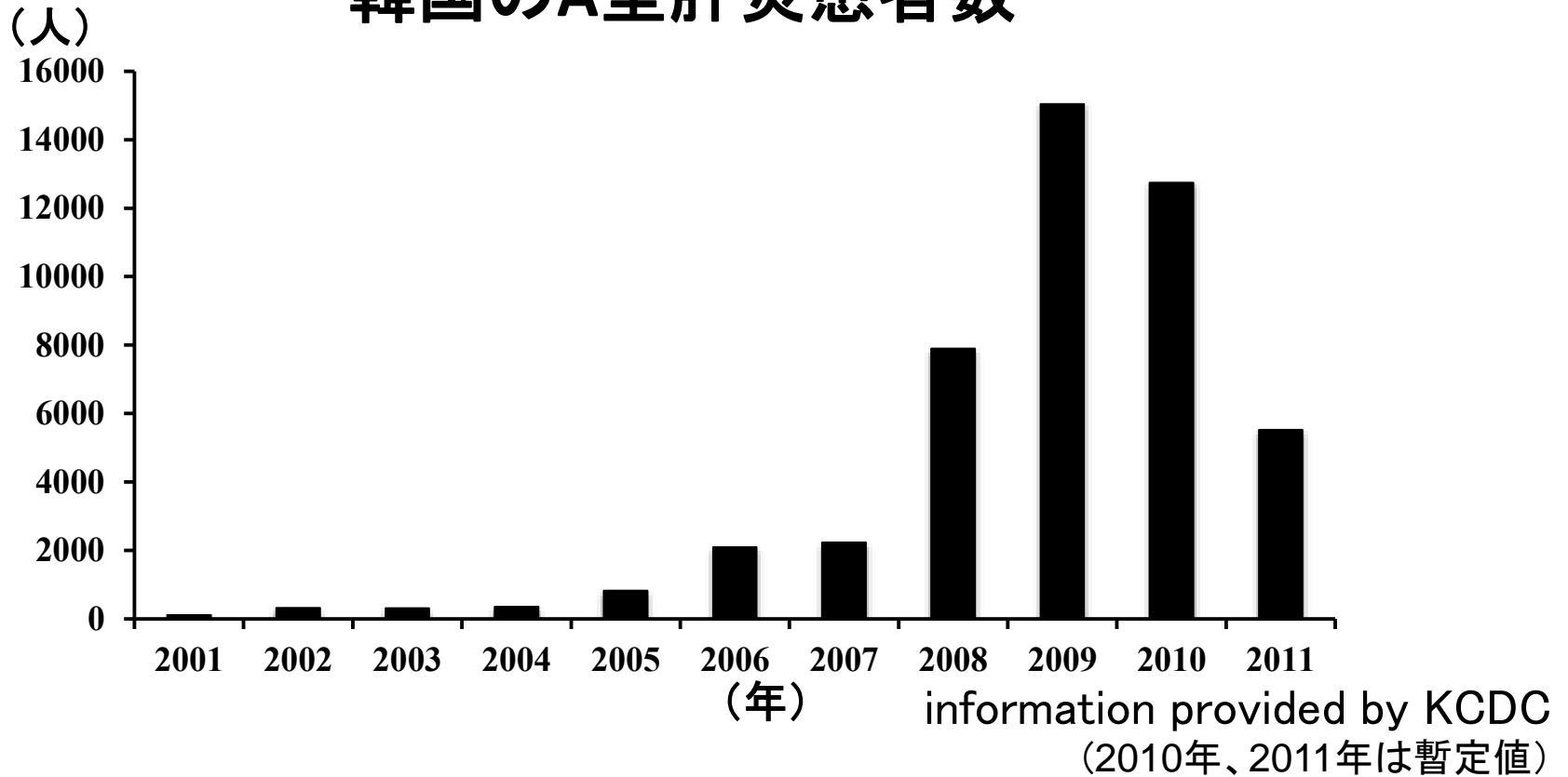
A型肝炎患者の約3割は渡航時の感染で、特にアジアでの感染例が多い。
 また、日本はアジア諸国から多くのカキ、エビなどの魚介類を輸入しているが、
 それらの海産物からHAVが検出された報告もある。

年	2008	2009	2010	2011	2012
患者報告数	169	115	346	175	158
海外感染者	61	39	52	40	49
(%)	36.1	33.9	15.0	22.9	31.0
上位渡航先※	インド*	韓国	インド	インド	フィリピン
	韓国	東南アジア	韓国	フィリピン	インド
	フィリピン	南アジア	インドネシア	韓国*	パキスタン*
	パキスタン	アフリカ	タイ	カンボジア	インドネシア
	カンボディア	南米	フィリピン	中国	エジプト*
	インドネシア	中央アジア	中国	東南アジア	ペルー*

* 集団感染(ツアー、家族内)を含む

感染症発生動向調査:2013年1月10日現在

韓国のA型肝炎患者数



- ✓ 2006年からA型肝炎患者が増加し、全国的な大流行を引き起こした。
- ✓ 本流行のGenotypeはIII Aであり、従来韓国で流行していたGenotypeであるIAとは異なっている。
- ✓ 広範囲なHAワクチン接種の徹底により、2010年以降患者数は減少傾向にある

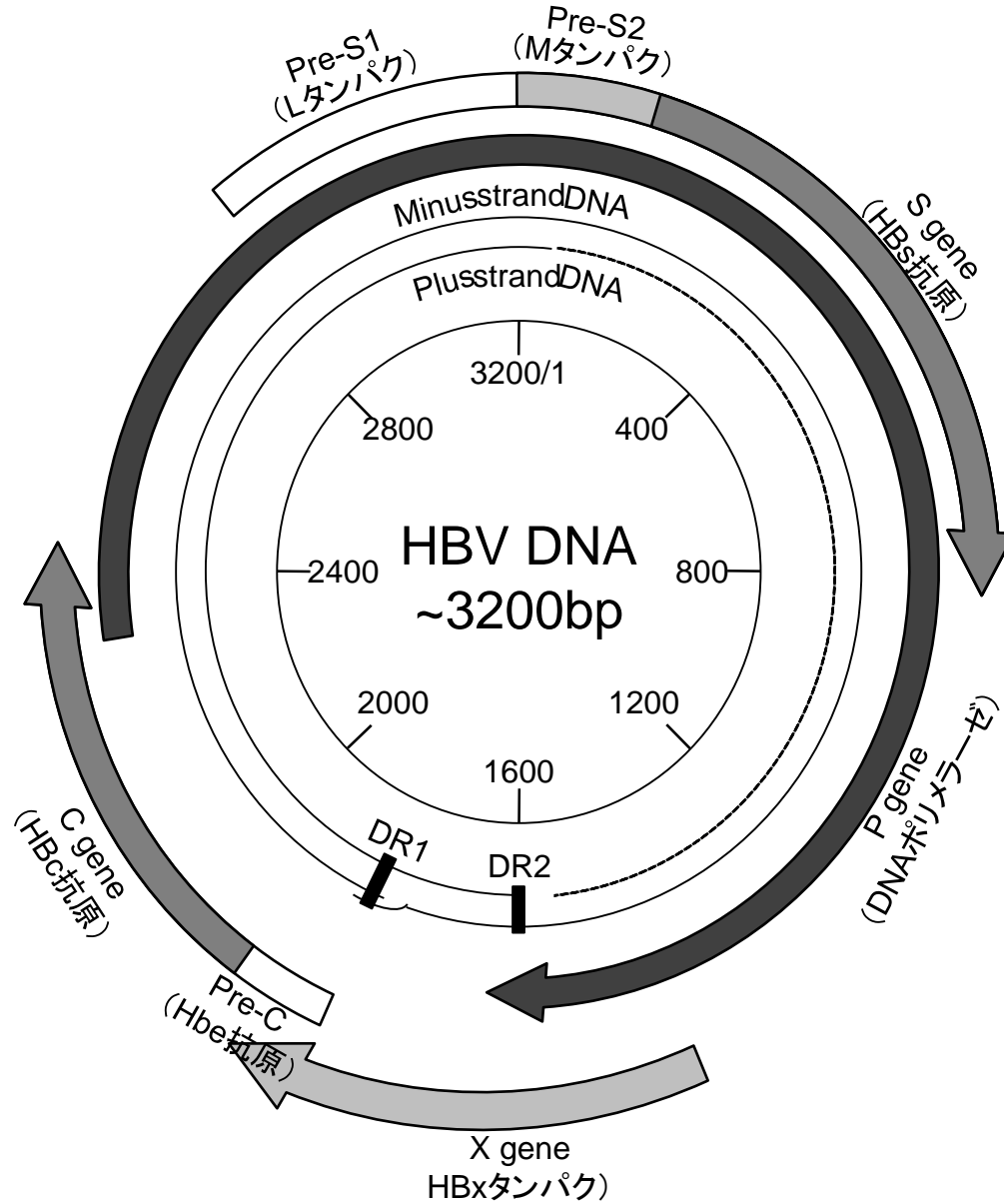
まとめ

- 分子疫学的に、日本と近隣諸国のA型肝炎流行の関連が疑われた。
- A型肝炎は潜伏期が長く、また、ウイルス分離も難しいので、原因食材および感染経路の特定は難しい。
- 発症したときにはすでに感染から1ヶ月経過しているので、患者情報から対応策を講じるのは後手に回ってしまう。
- 常日頃からの近隣諸国との情報交換は重要である。
- 近隣諸国との連携で得た情報を、食品取り扱い業者、常在地・流行地への渡航者等のハイリスク群へ積極的に発信することも重要である。

Hepatitis B Virus



Structure of HBV genome



Infectious HBV particle

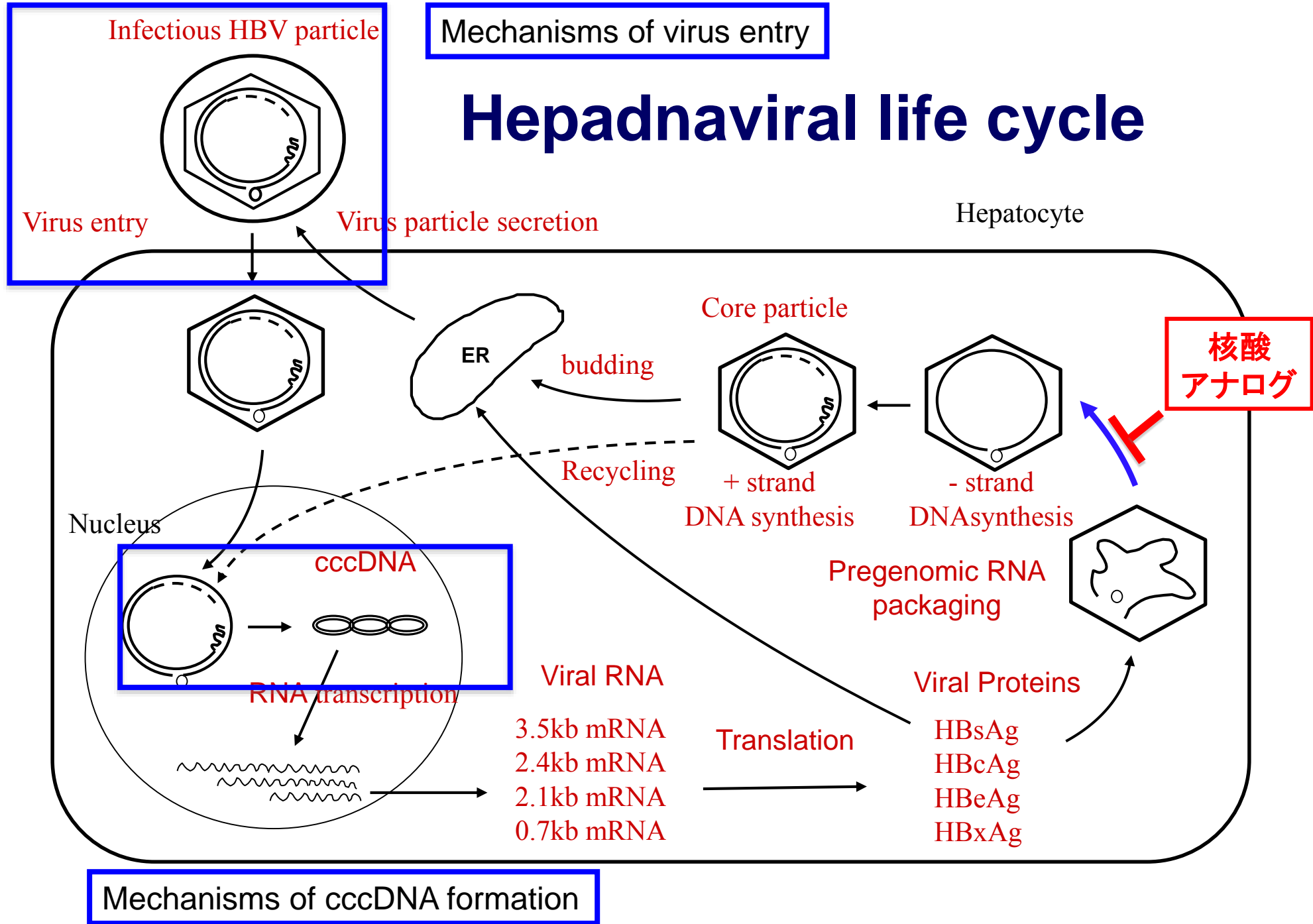
Mechanisms of virus entry

Hepadnaviral life cycle

Hepatocyte

Virus entry

Virus particle secretion



核酸
アナログ

Mechanisms of cccDNA formation

- Viral RNA
- 3.5kb mRNA
- 2.4kb mRNA
- 2.1kb mRNA
- 0.7kb mRNA

- Viral Proteins
- HBsAg
- HBcAg
- HBeAg
- HBxAg

Translation

budding

Recycling

Core particle

+ strand
DNA synthesis

- strand
DNAsynthesis

Pregenomic RNA
packaging

ER

Nucleus

cccDNA

RNA transcription

1. 小児のHBs抗原保有率調査
2. 若年層のHBc抗体保有率調査

1. 小児のHBs抗原保有率調査

本調査には以下の制限があった。

- 1) 使用可能な検体量がエンザイグノストHBsAg5.0キット規定量の半分、50 μ lである。
- 2) 検体の匿名性のため患者背景(既往歴、状態、採血前後の血清検査数値等)が不明である。

本調査の目的であるキャリア率の算定を鑑み、

- 1) については50 μ lで実施する変法のバリデーションを行い、信頼性を確認した。
- 2) については、疑陽性を避けるため、エンザイグノストHBsAg5.0キット変法でHBs抗原100mIU/ml以上の検体を抽出し、その中からHBV-genomeが検出された検体をHBs抗原陽性と判定した。

2. 若年層のHBc抗体保有率調査

- 小児のHBs抗原保有率が予想以上に高かった。
- 健康診断受診者のHBs抗体陽性率
 - 20-30代: 17%
 - 40代: 21%
 - 50代: 41%

という報告があった。

(平成25年 第49回日本肝臓学会、演題番号O-269)



もしかしたら、思っている以上に既往歴も高い?

10~30代の既往歴調査を実施した。

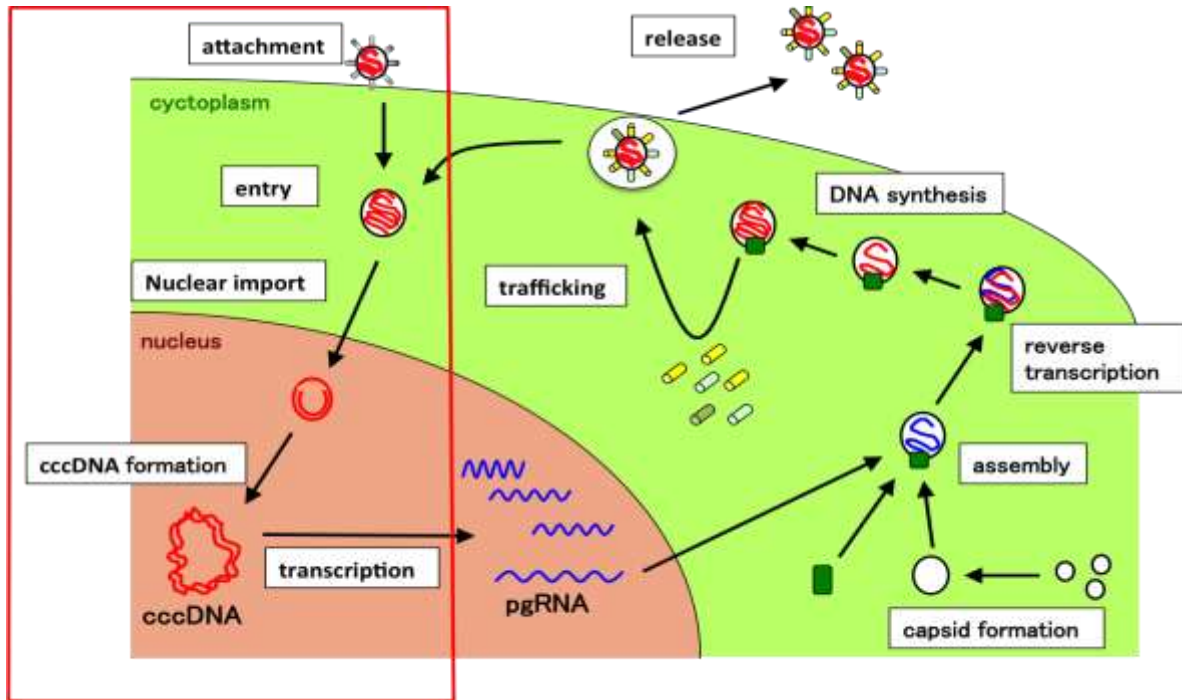
既往歴のマーカーはHBc抗体とした。

B型肝炎ウイルスの基礎研究

NTCP発現細胞を用いた初期感染機構の解析

Problems

PHH, PTH, HepaRG cells



- **Low transfection efficiency**
- **Poor reproducibility**
- **Costly and time-consuming**

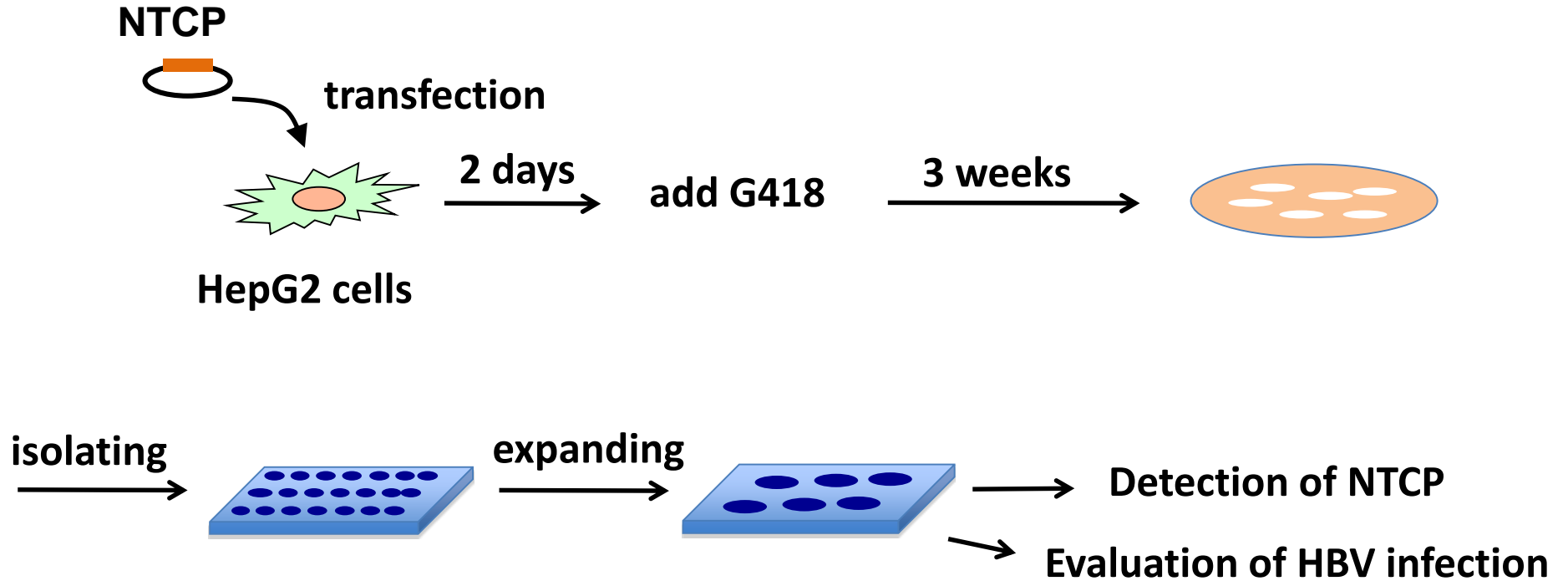
Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus

- multiple transmembrane transporter predominantly expressed in the liver
- mediates the transport of bile acids
- candidate of HBV receptor

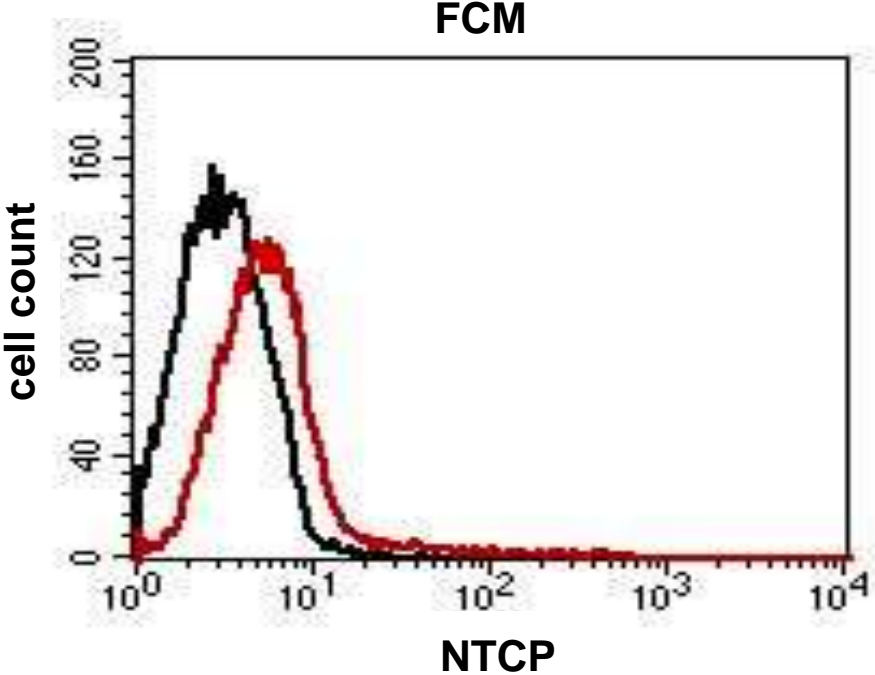
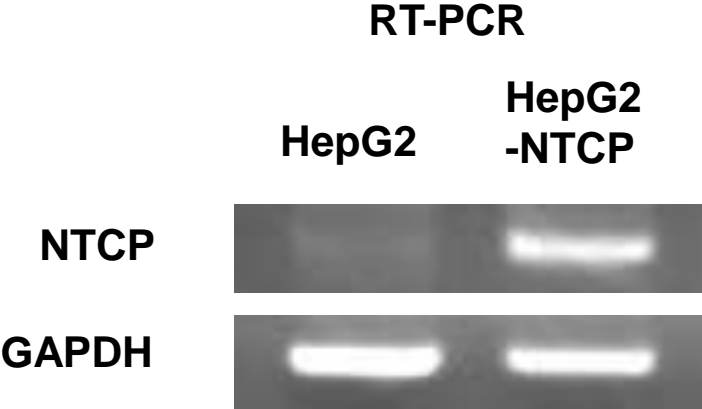
Aim

- Establishment of more useful cell line for analyzing HBV entry

Establishment of HepG2-NTCP cells



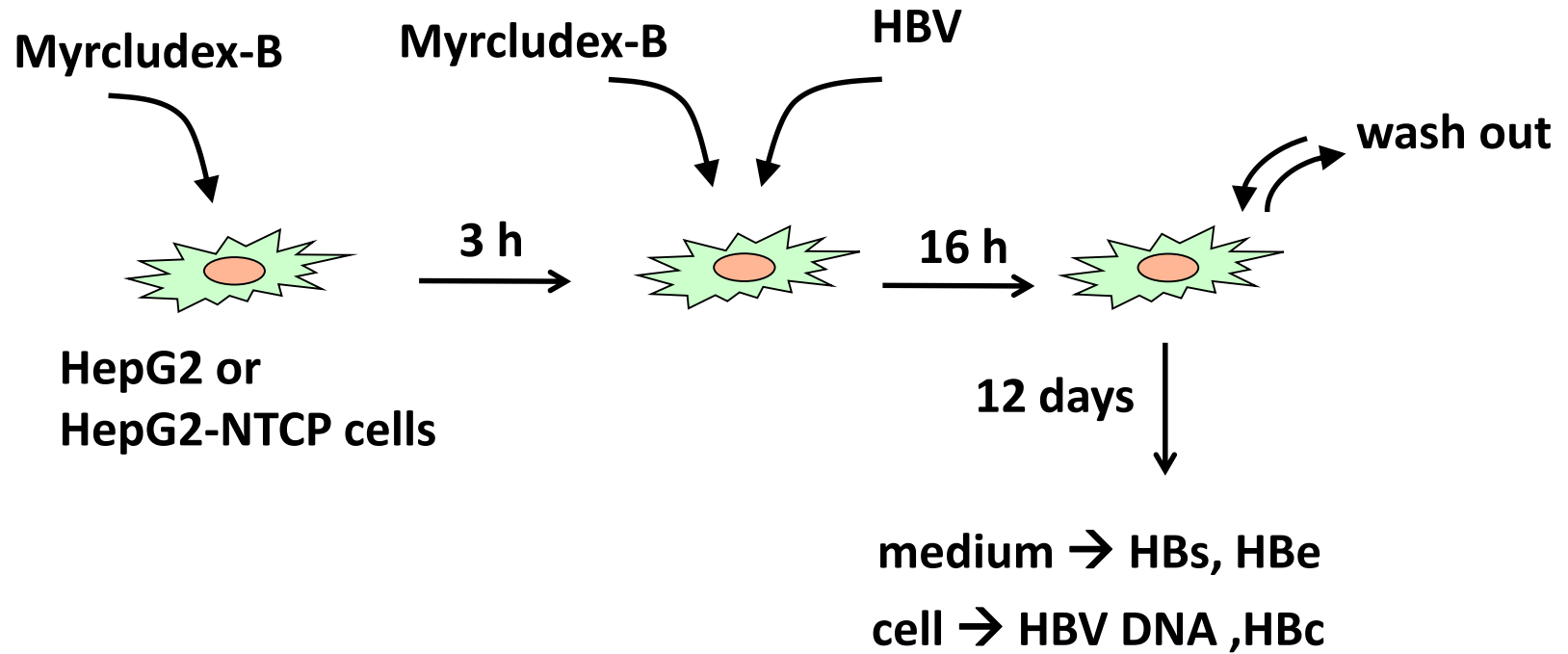
Detection of NTCP



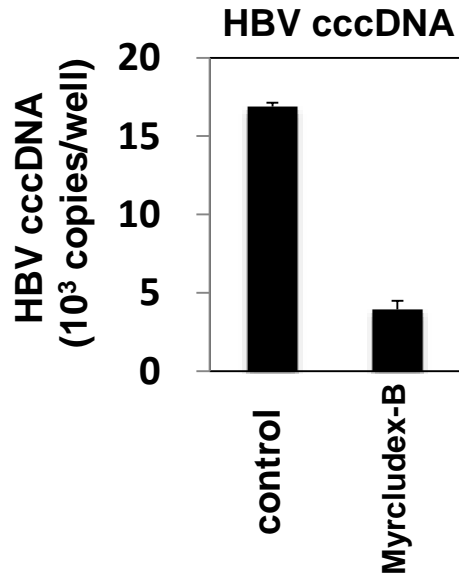
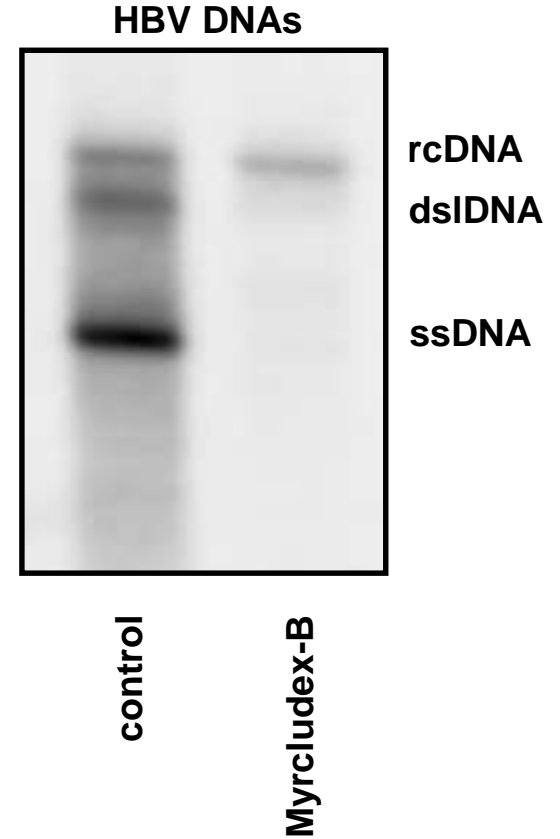
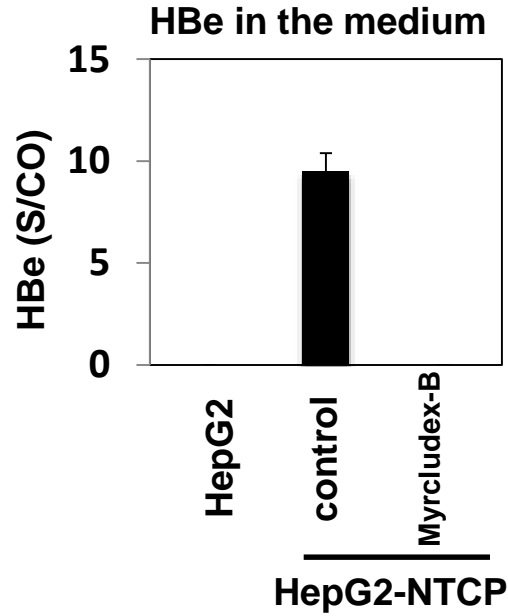
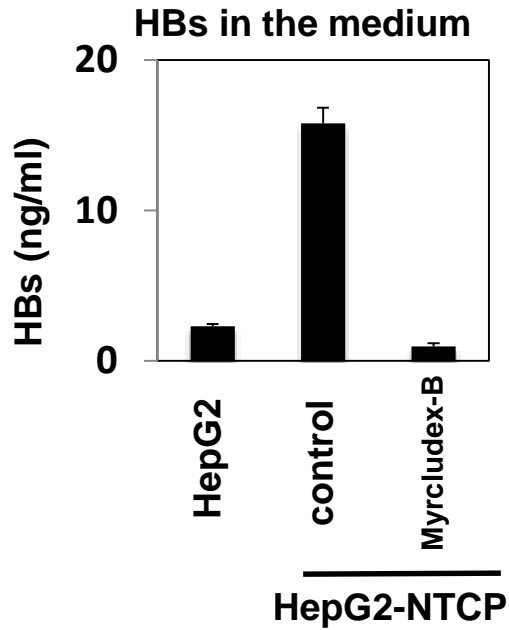
Black: HepG2

Red: HepG2-NTCP

HBV infection

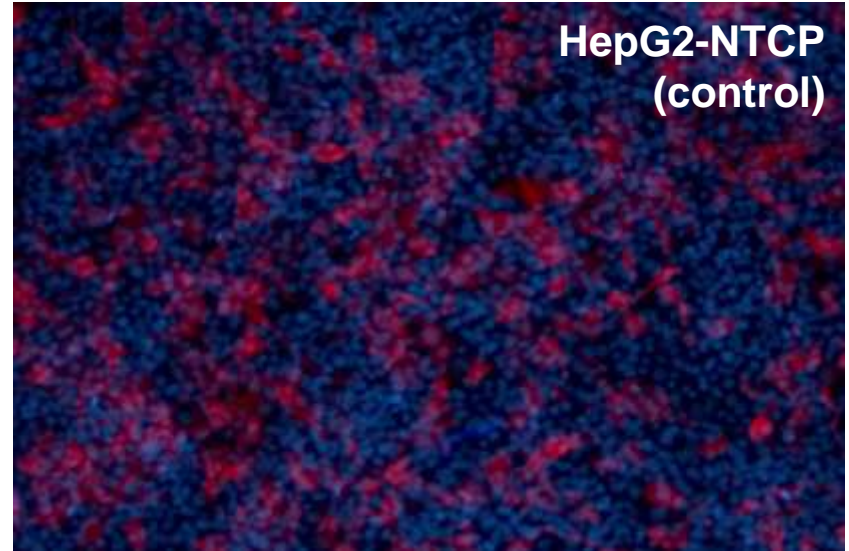
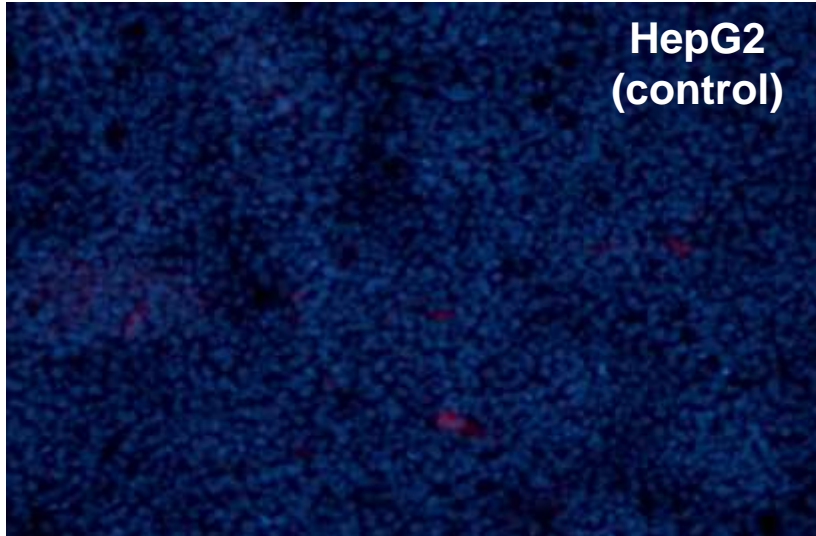


Evaluation of HBV infection in HepG2-NTCP cells

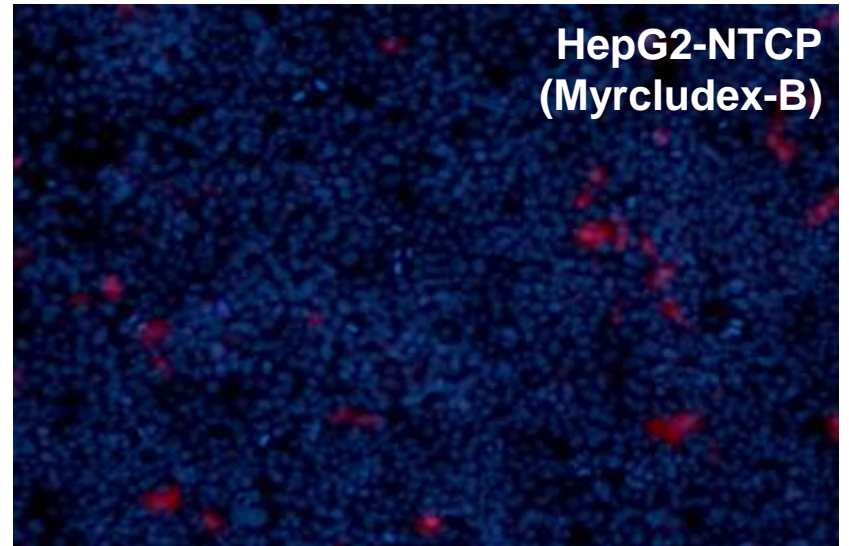


Detection of HBV positive cells

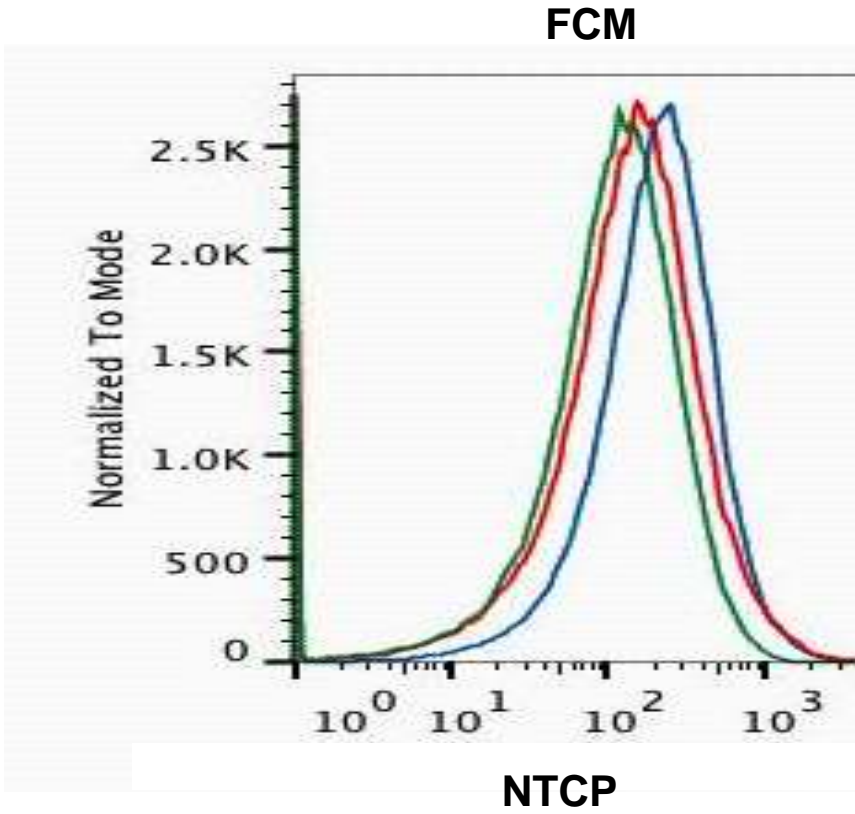
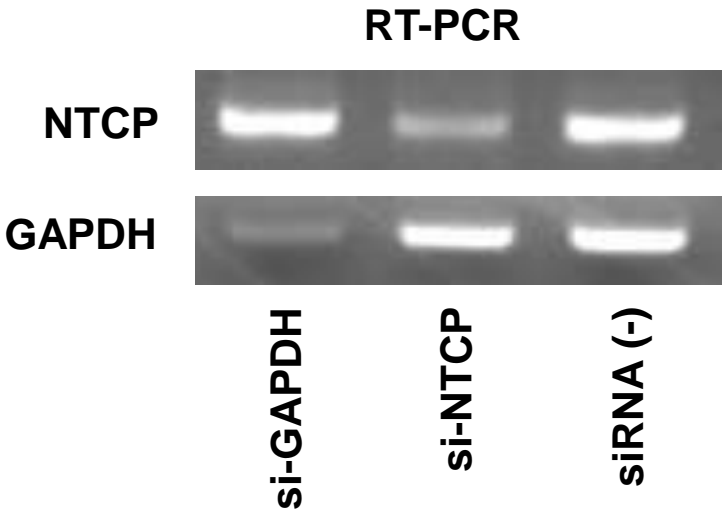
HBc



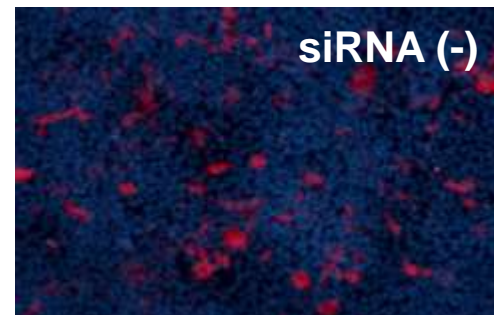
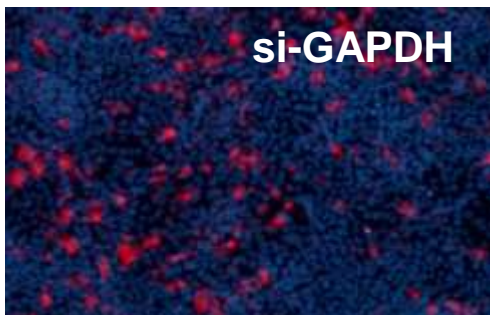
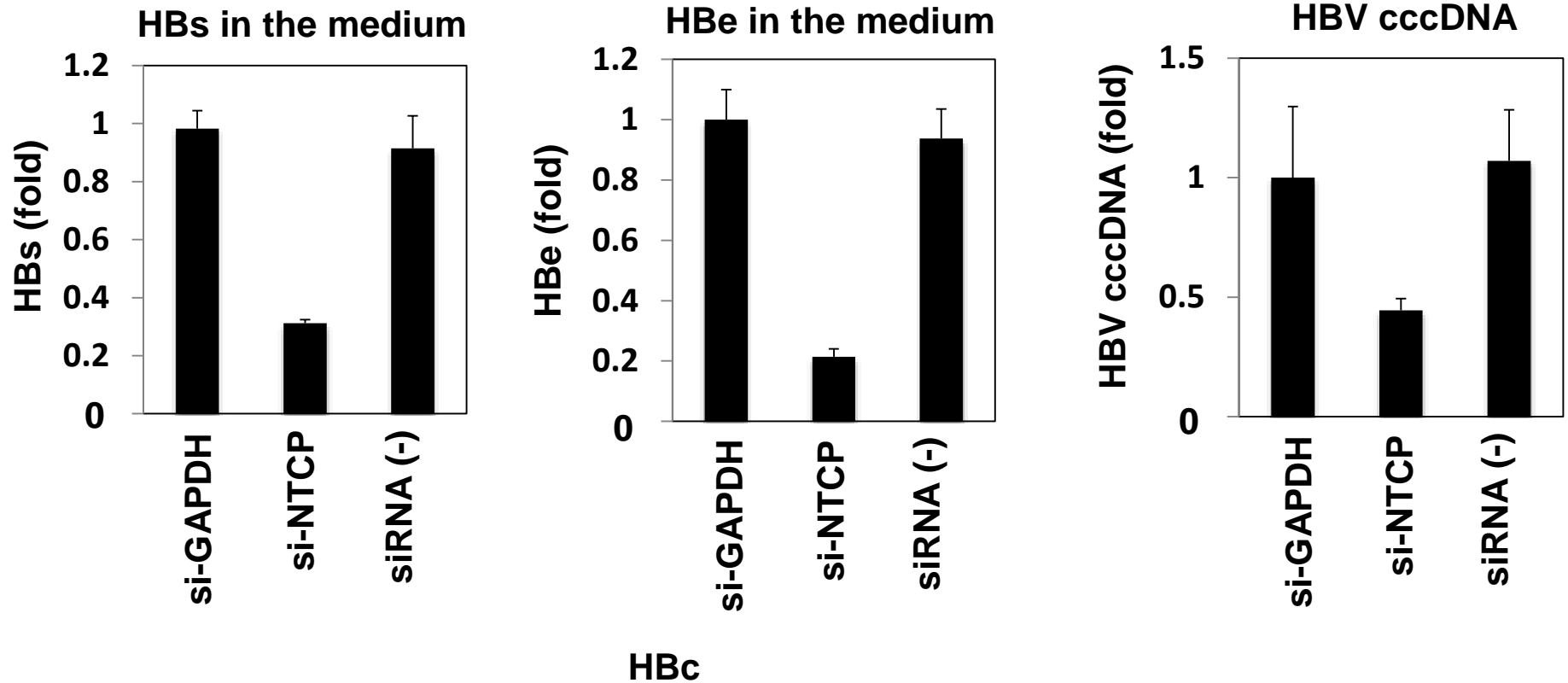
Red:HBc
Blue:DAPI



Detection of NTCP

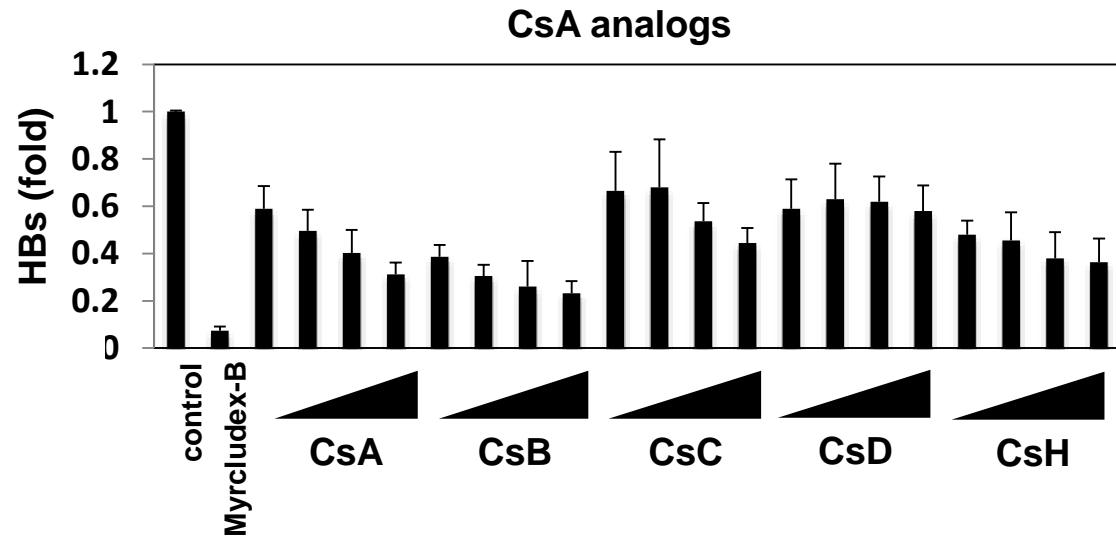
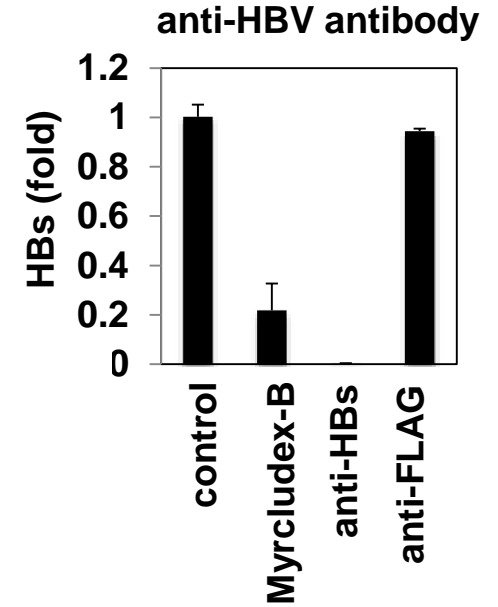
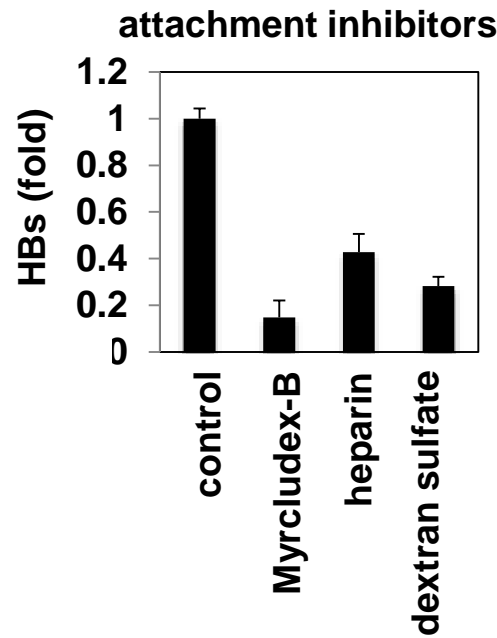
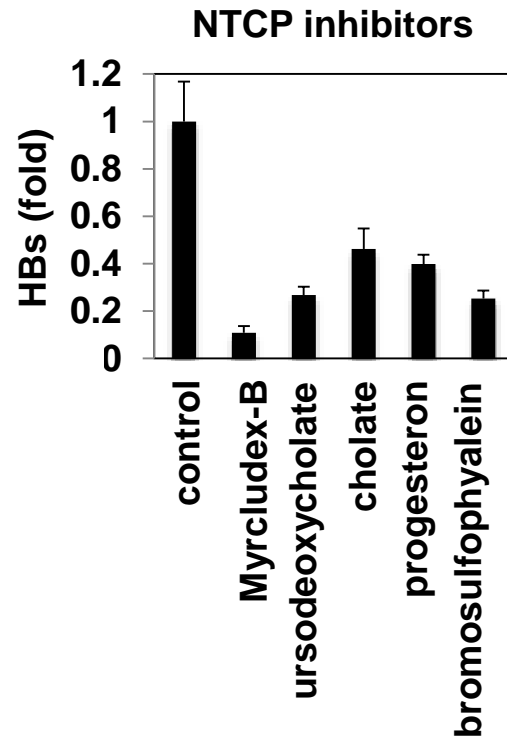


HBV infection was mediated by NTCP in HepG2-NTCP cells

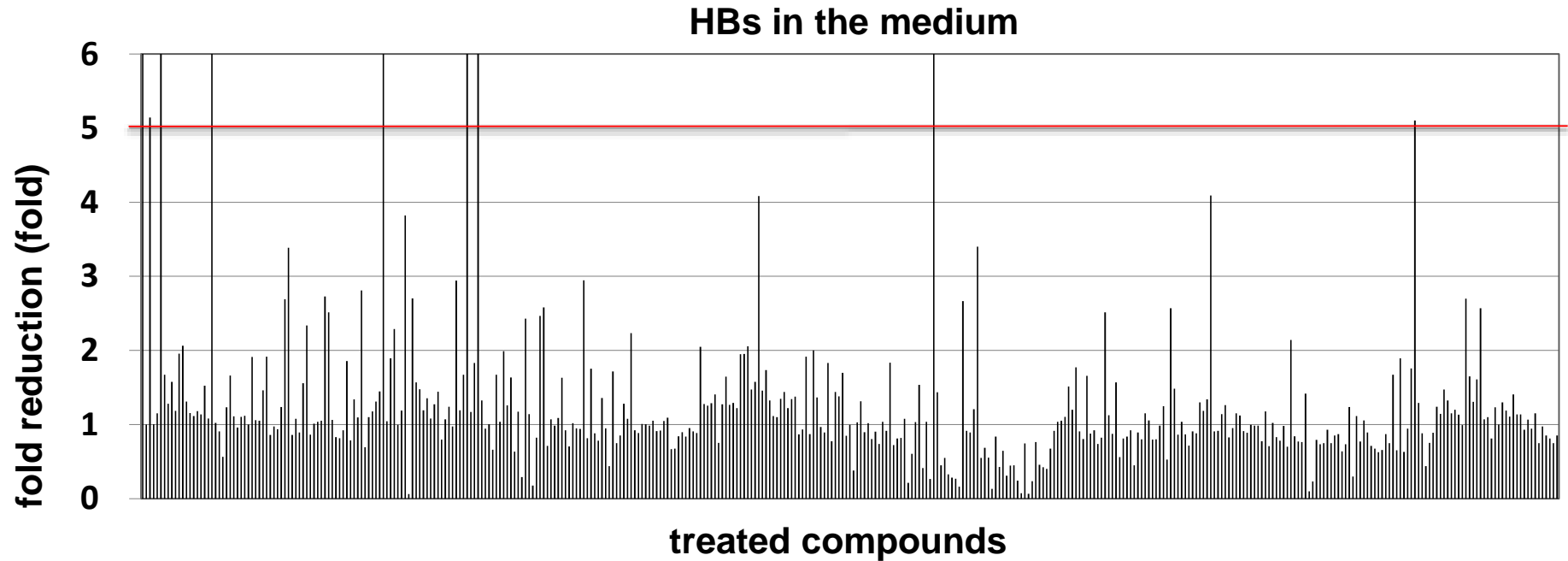


Red: HBc
Blue: DAPI

Evaluation of anti-HBV compounds in HepG2-NTCP cells



Screening for compounds inhibiting HBV infection using HepG2-NTCP cells



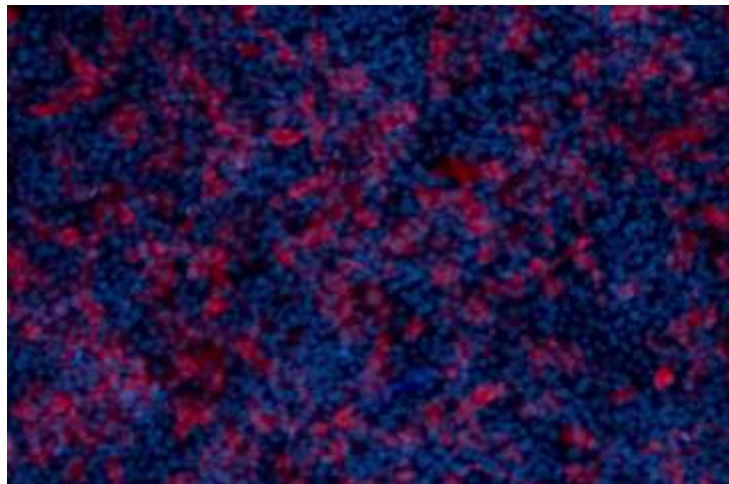
**Selleckchem
(FDA-approved chemical library)
414 compounds**



reduced HBs protein : (< 1/5 fold) : 6

Summary

- We established HepG2-NTCP cells that were susceptible for HBV infection
- HepG2-NTCP cells are useful for screening of anti-HBV compounds



Infectious HBV particle

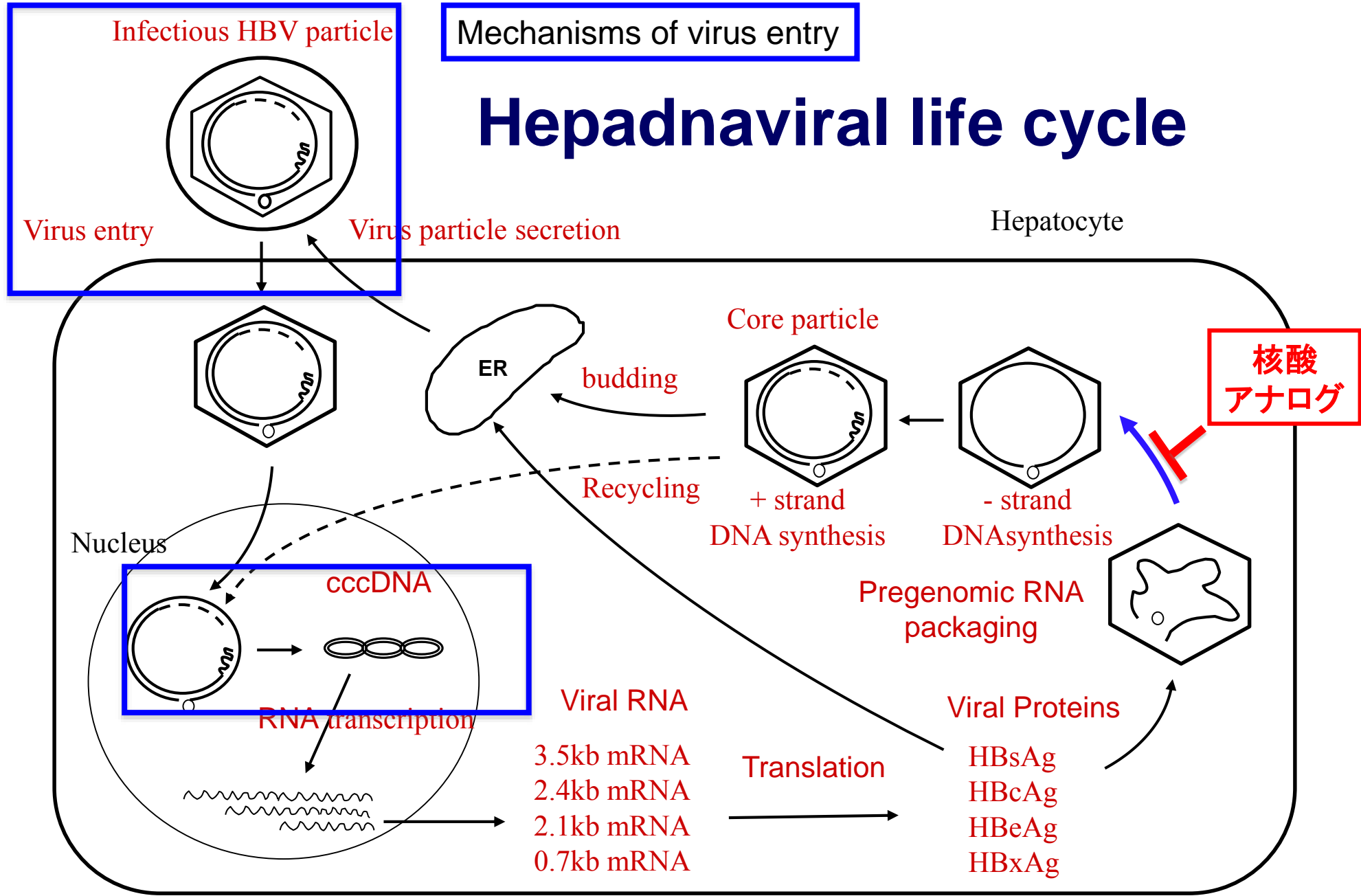
Mechanisms of virus entry

Hepadnaviral life cycle

Hepatocyte

Virus entry

Virus particle secretion



核酸
アナログ

Mechanisms of cccDNA formation

Hepatitis C virus

Family: Flaviviridae

Genus: Hepacivirus

Virus particle: Enveloped virus, spherical

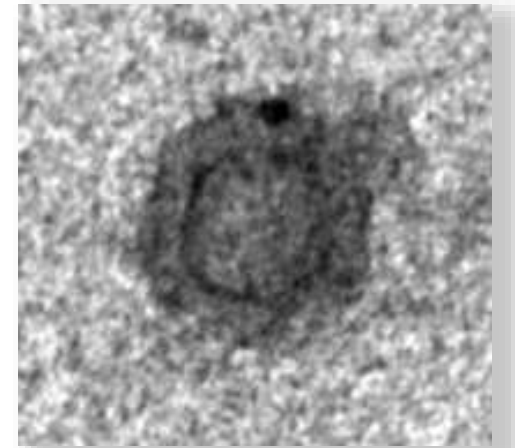
Virus genome: positive single strand RNA, ~9.6 kb

Stable 2nd structures in 5' and 3'UTR

Long ORF encoding ~3,000 aa

Virus proteins: 10 proteins processed
by host and viral proteases

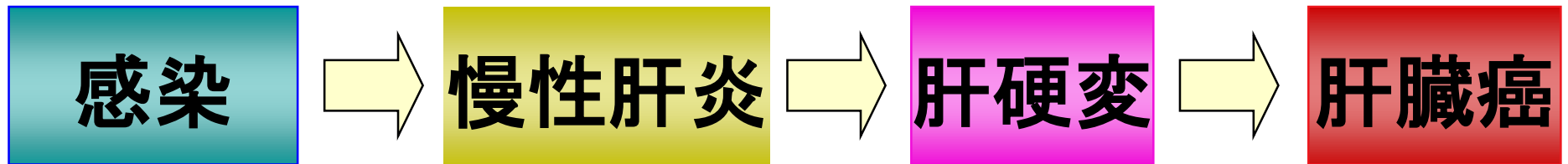
Pathogenesis: hepatitis, cirrhosis, hepatocellular carcinoma
metabolic syndrome, etc



HCV感染症

- ・日本では100万人の感染者
- ・世界では17,000万人の感染者

HCVの臨床経過



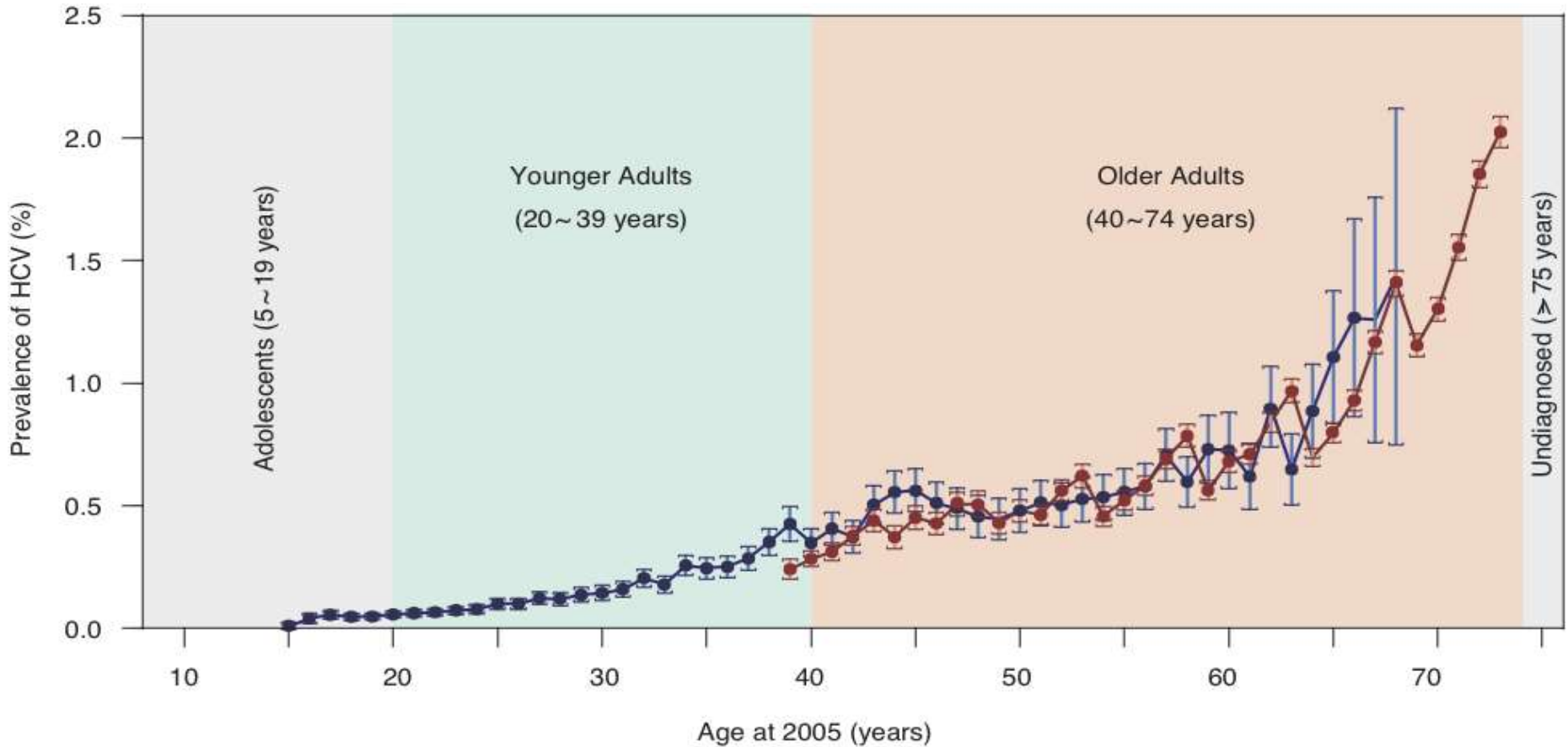
慢性化 → 癌化
10-30年

- ・検診による感染者のスクリーニング
- ・より効果の高い治療法の開発

C型肝炎ウイルス感染症の治療

1. インターフェロンおよびリバビリン
2. 約50%の患者に有効 (→70-80%へ改善)
3. 抗NS3、抗NS5A薬、抗NS5B薬が開発中
(2011年9月に最初の抗NS3薬が承認)

我が国の年齢別HCV抗体陽性率



初回献血者

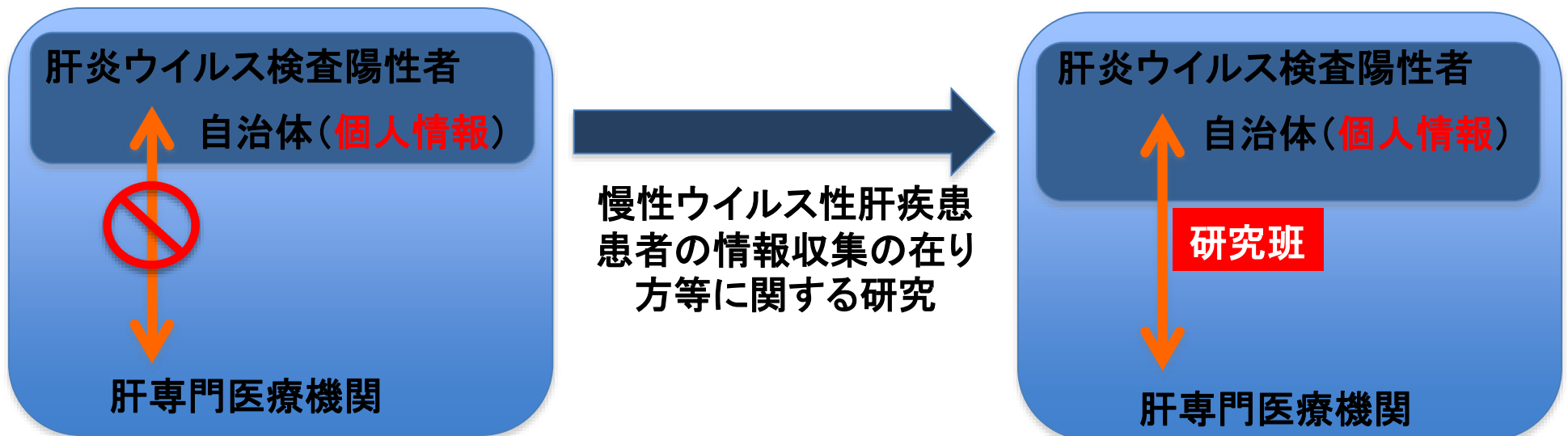
節目検診

肝炎ウイルス検査促進

節目健診の対象者の約3割しか検査を受けていない

治療促進: 医療費助成

受診者の約1%が検査陽性だが、専門医療機関受診はHBV約6割、HCV約7割と低値、
受診したHCV陽性者のうち約3割しかIFN治療を受けていない



陽性者フォローアップシステム

陽性者の個人情報自治体が保管

自治体(保健所)

個々の陽性者の現状を把握

ナンバーリングした
封筒送付
(受診勧奨)

同意した肝炎ウイルス検診陽性者

ナンバーリングした
調査票返送
医学的な相談
苦情

厚労省感染研 事務局

肝炎診療連携拠点病院
(分担研究者)

追跡システムの人的・予算負担

ナンバーリングした
アンケート解析結果

宛名書き以外の事務代行

切手付き送付用封筒

- (1) アンケート用紙
- (2) 受診勧奨を呼びかける手紙
- (3) 肝炎診療相談室の相談体制のリスト
- (4) 専門医療機関リスト
- (5) 日本肝臓学会専門医リスト
- (6) 切手付き返信用封筒

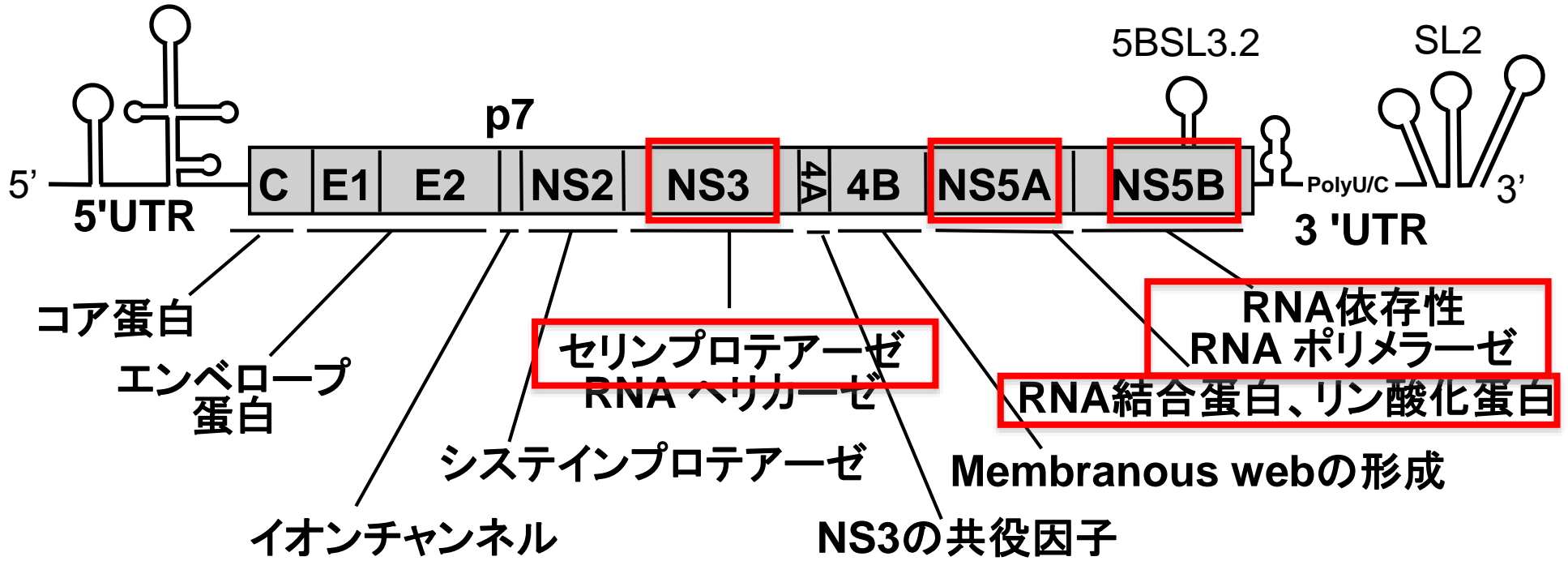
(1) 肝炎検診陽性者の個人情報取り扱いやフォローアップに伴う人的・予算的な問題等を解決でき、多くの自治体が導入しやすい「陽性者フォローアップシステム」の構築が必要

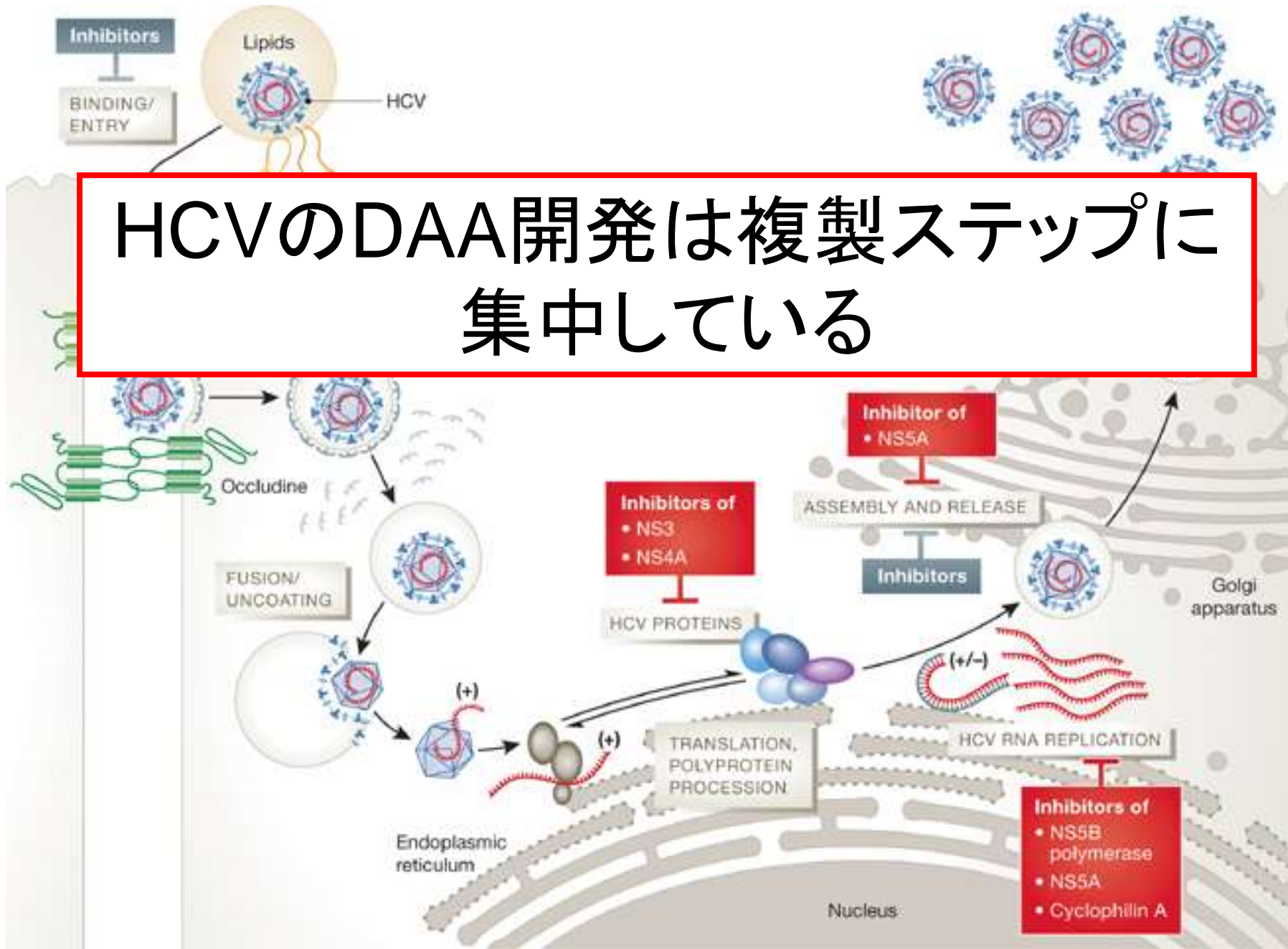
(2) モデル地区での検討により、本システムは有効に機能していると考えられた。

(3) 本システムは、陽性者にオーダーメイドな受診勧奨・情報提供が可能である。

新規抗HCV薬の開発

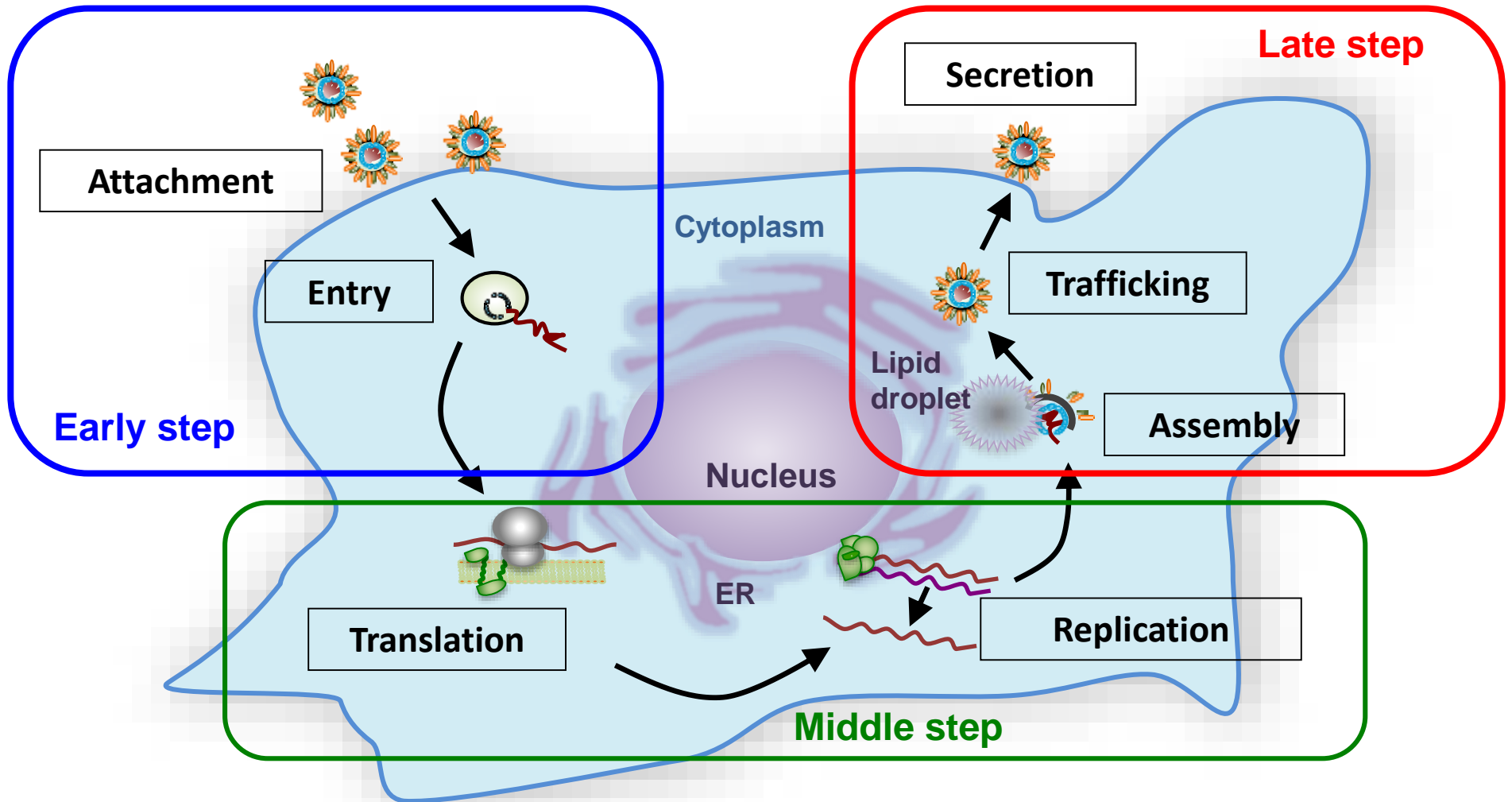
HCVのゲノム構造





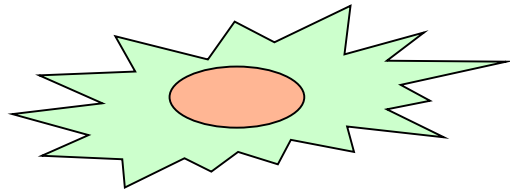
HCVのDAA開発は複製ステップに集中している

Life cycle of hepatitis C virus (HCV)



C型肝炎ウイルスの生活環を標的とした抗ウイルス薬スクリーニング

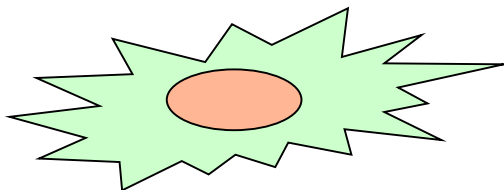
Huh-7-25 cells, deficient for CD81 expression



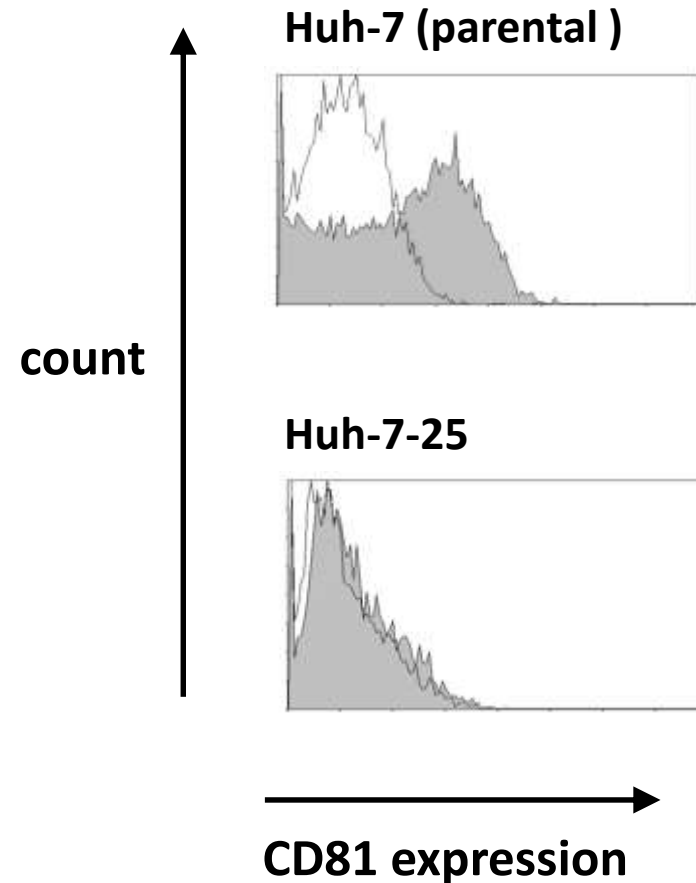
Huh-7 cells



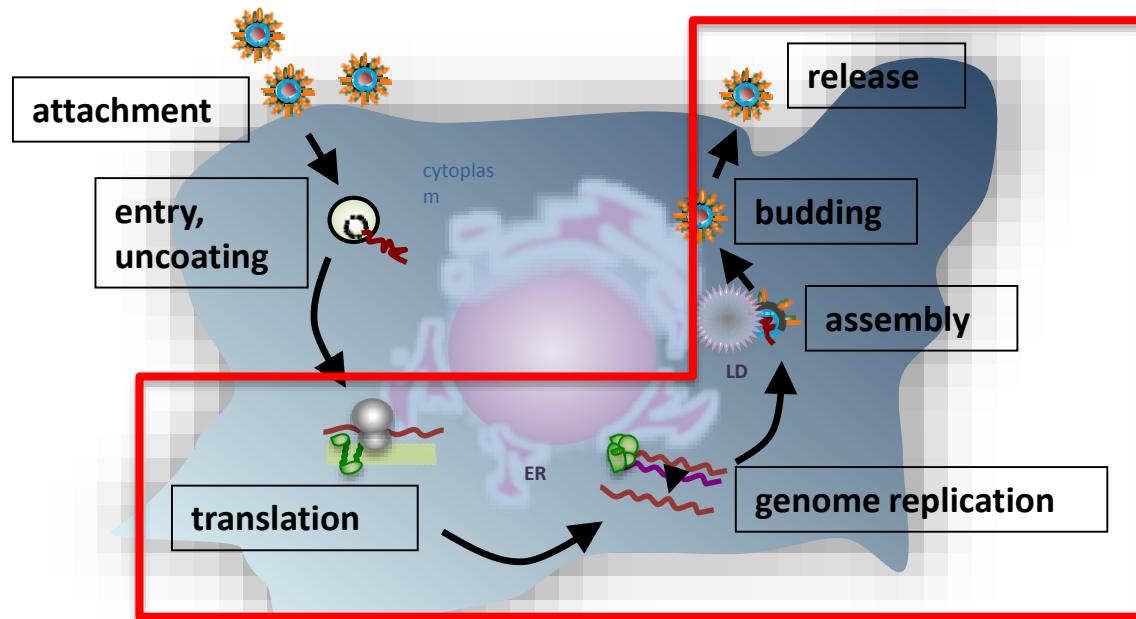
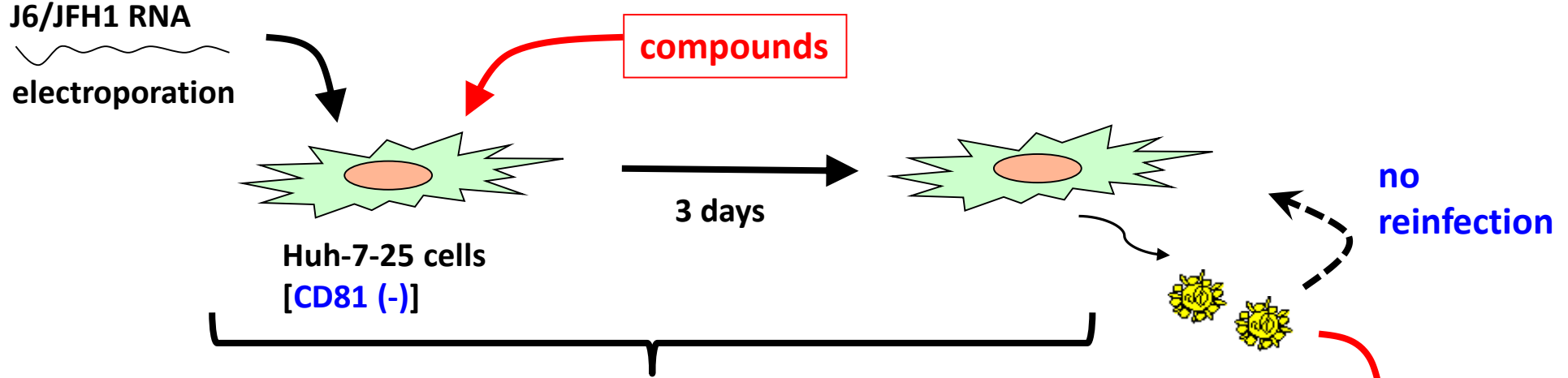
single-cell cloning



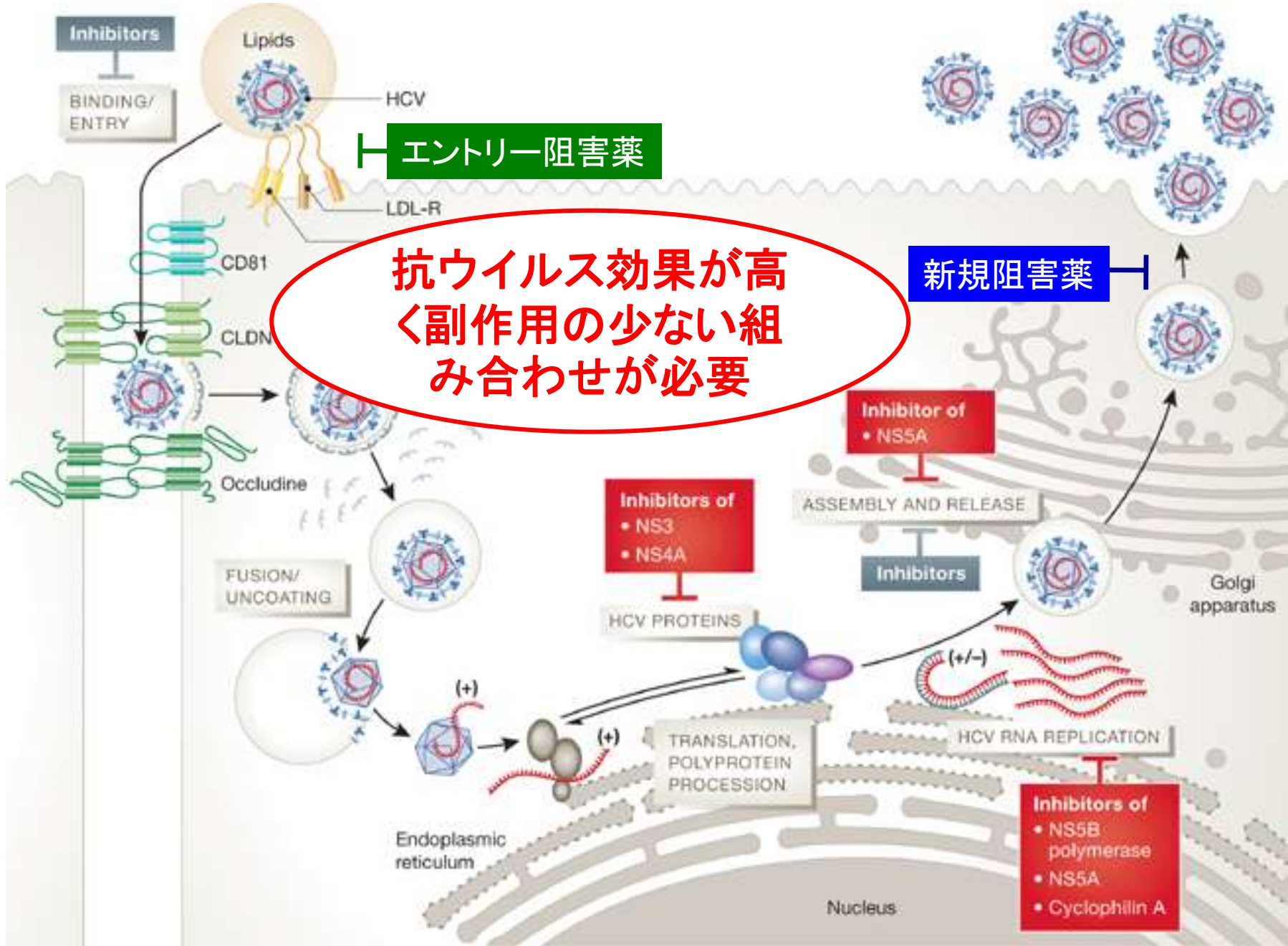
Huh-7-25 cells [CD81 (-) cells]



Screening system using Huh-7-25 cells

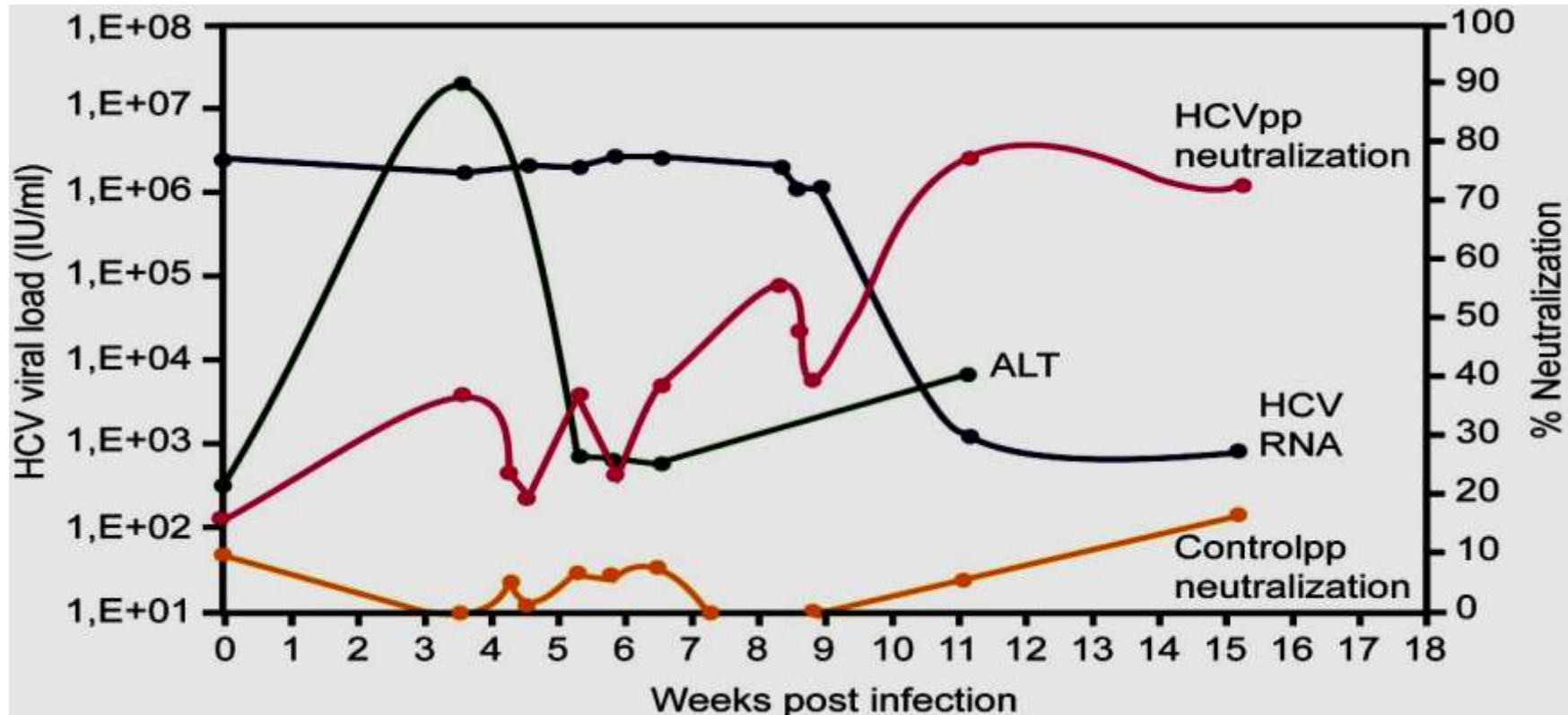


middle to late steps
(translation ~ release)



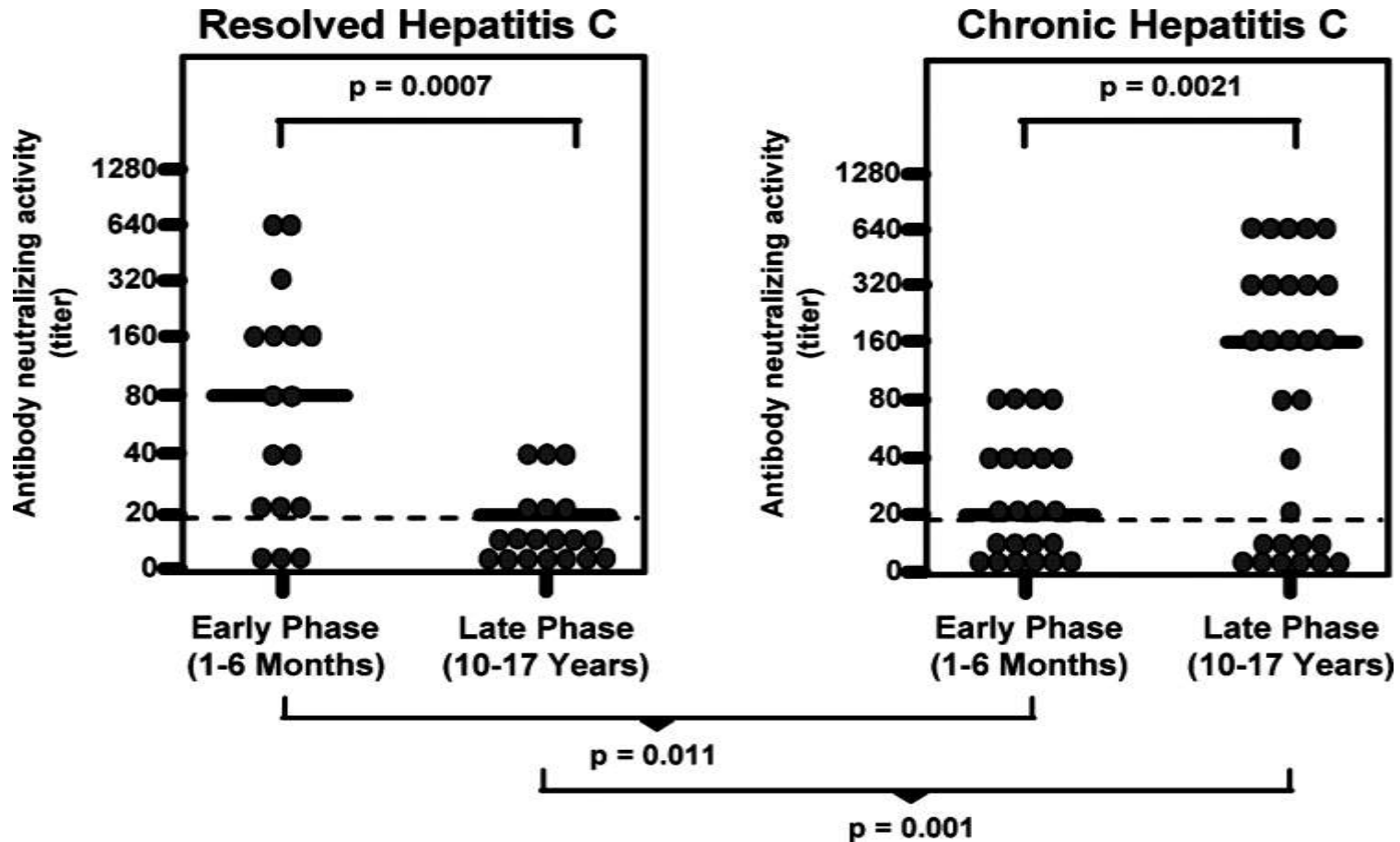
培養細胞由来HCV粒子ワクチンの免疫 によるHCV感染阻害活性の誘導

急性C型肝炎における感染制御と中和抗体



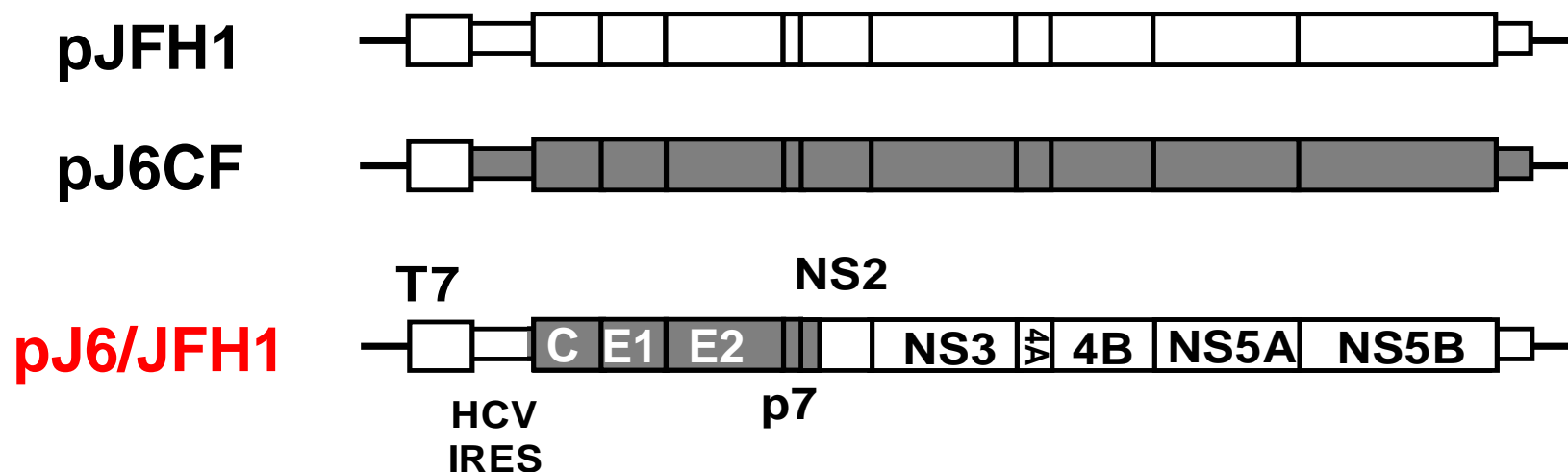
Lavillette D, JVI 2005
Houghton M Nature 2005

急性C型肝炎から回復した患者と 持続感染化した患者の中和抗体価



Pestka, Jan M. et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 6025-6030

感染性HCV粒子の作製



合成RNAをHuh7細胞へトランスフェクション

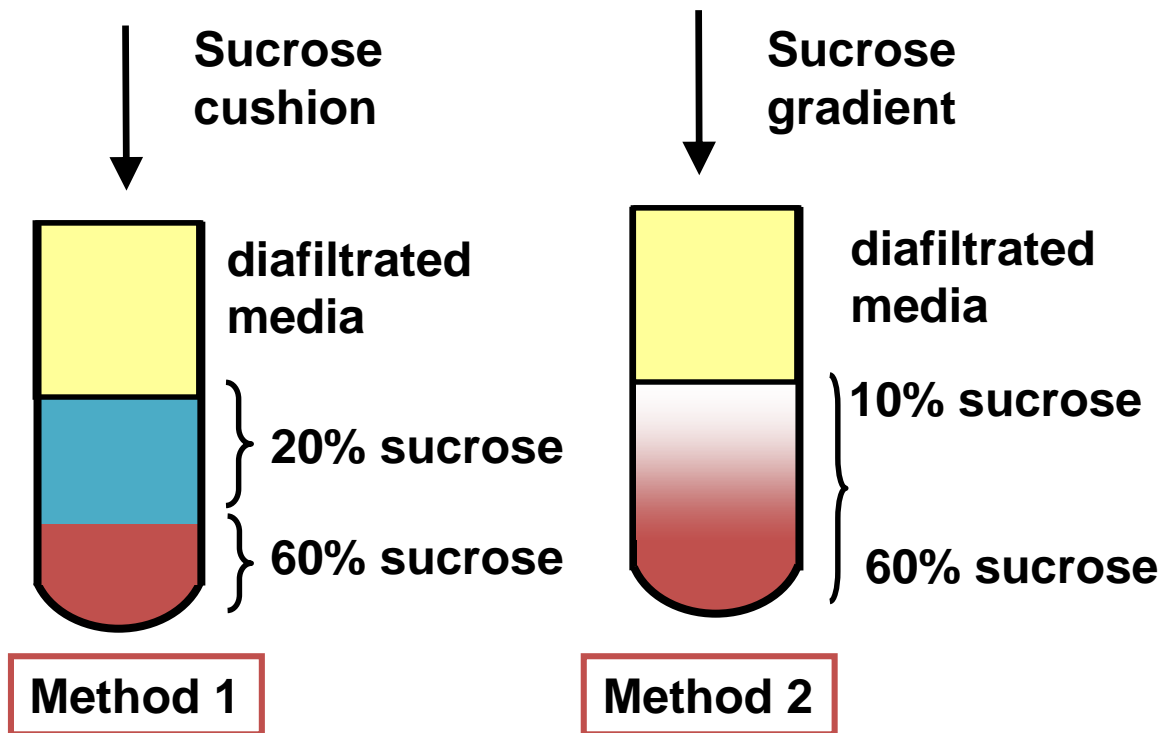
CellSTACK™ (Corning社)による
大量培養

培養上清(感染性HCV粒子)



HCVの精製

Hollow Fiber (500 K MWCO) diafiltration



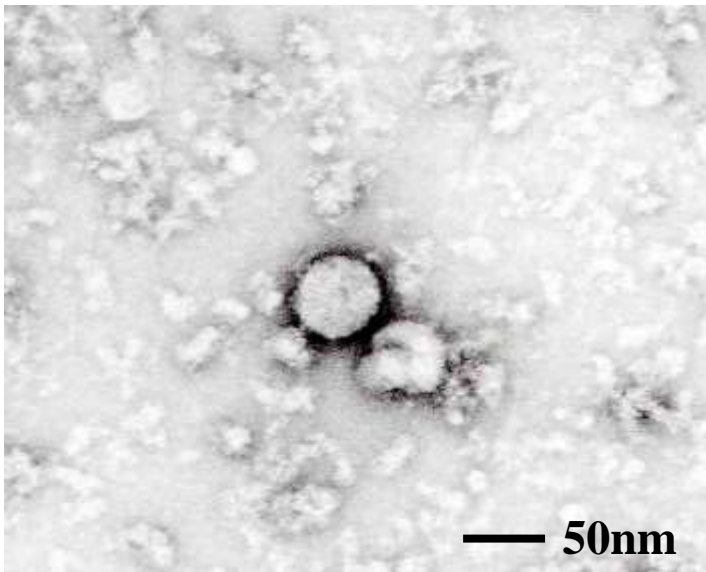
→ 28,000 rpm (SW28),
4°C, 4h

→ 1mL フラクション

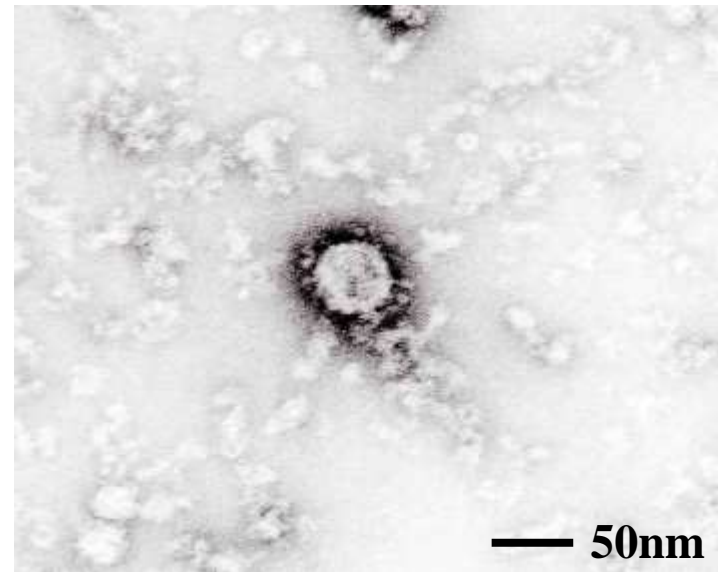
- ① HCV-RNA
② HCV-core
③ infectivity
④ total protein

Electron microscopic analysis of purified HCV particles

JFH-1

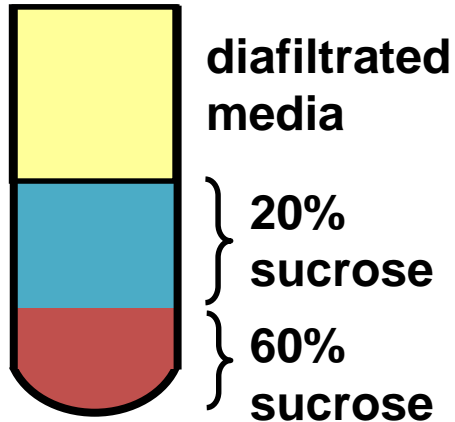


J6/JFH-1



negative staining of purified HCV particles

シヨ糖密度による分画精製 (sucrose cushion)



28k rpm, 4h
4°C
(SW28 rotor)

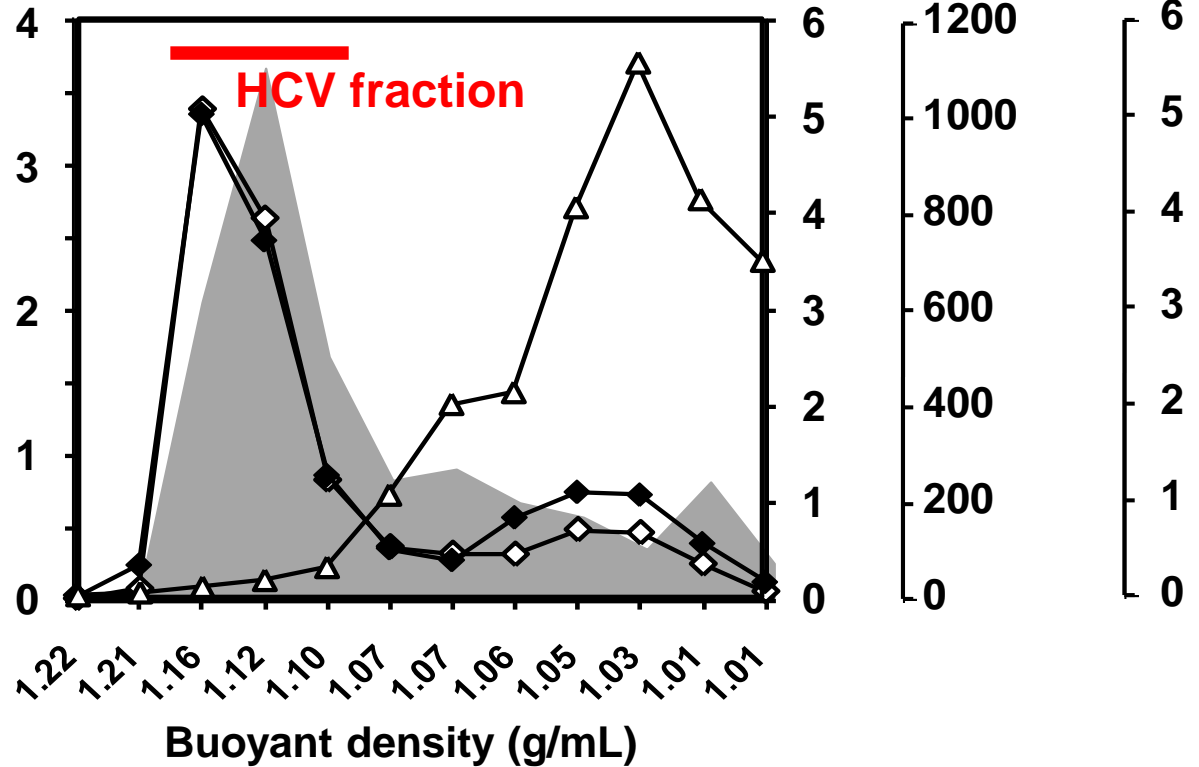
HCV-core
HCV-RNA
Infectivity
Total protein

HCV-RNA
($\times 10^9$ copies/mL)

HCV-core
(nM)

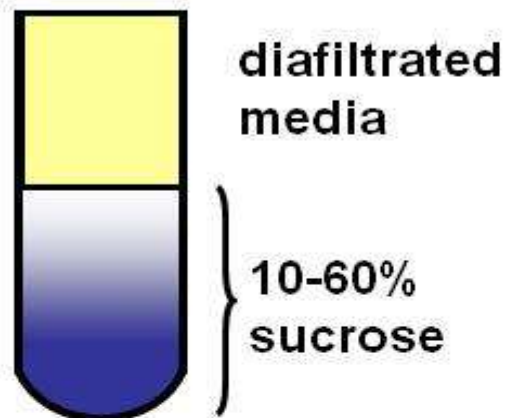
Protein
($\mu\text{g/mL}$)

infectivity
($\times 10^6$ FFU/mL)



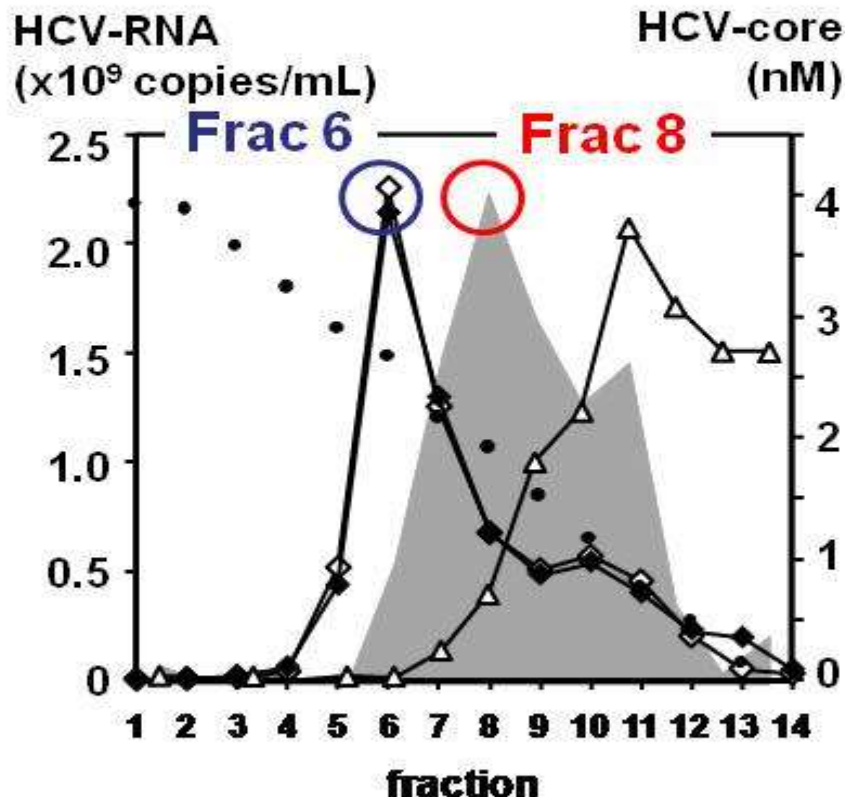
◇ HCV-RNA ◆ HCV-core ■ infectivity ▲ protein

シヨ糖密度による分画精製 (sucrose gradient)



28k rpm, 4h
4°C
(SW28 rotor)

HCV-core
HCV-RNA
Infectivity
Total protein



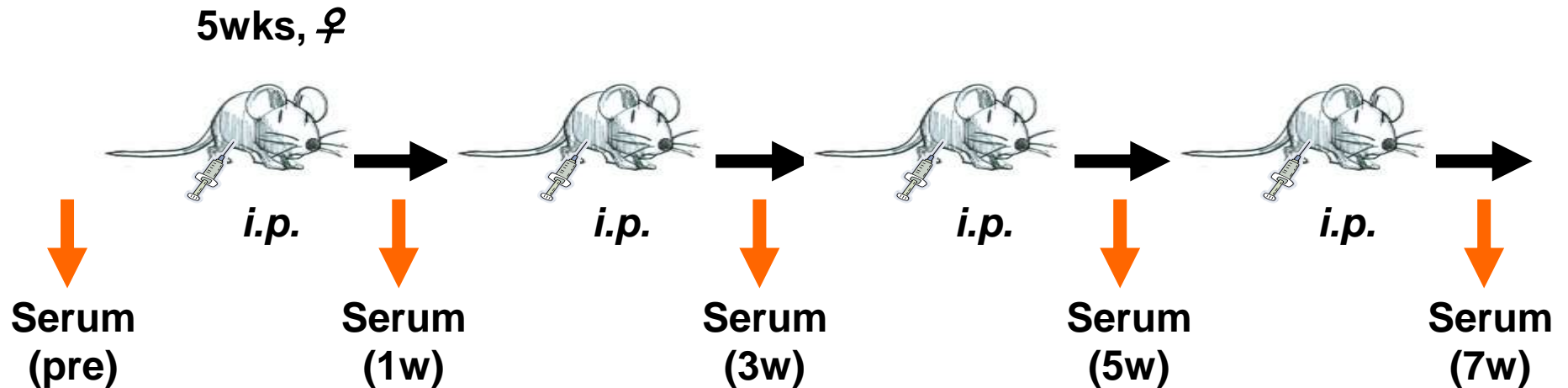
◇ HCV-RNA ◆ HCV-core ■ specific infectivity ▲ protein ● buoyant density

マウス(BALB/c, n=3)免疫スケジュール

Sample

1. Saline
2. Sucrose Cushion J6/JFH-1 (2 pmol HCV-core/head)
3. Sucrose Cushion J6/JFH-1 (5 pmol HCV-core/head)
4. Sucrose Gradient J6/JFH-1 **Frac 6** (2 pmol HCV-core/head)
5. Sucrose Gradient J6/JFH-1 **Frac 8** (2 pmol HCV-core/head)

Adjuvant: Sigma Adjuvant system (MPL)



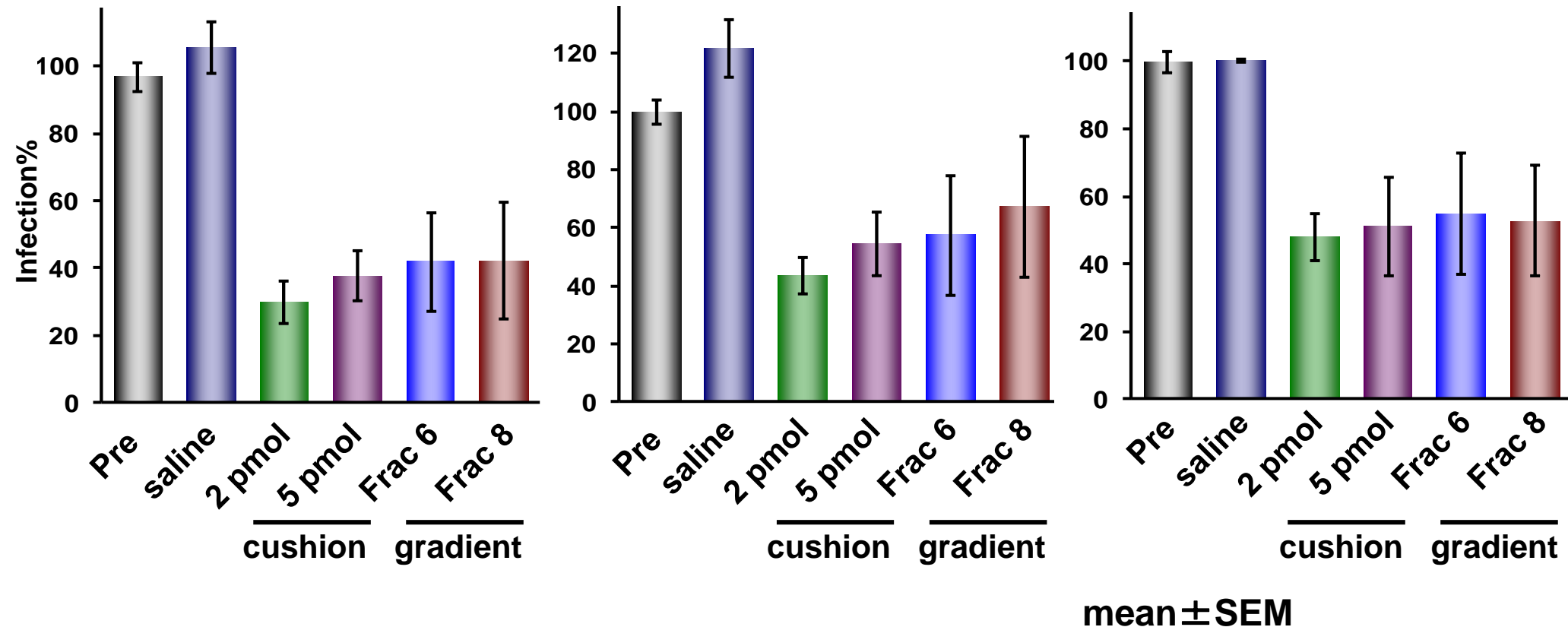
HCV感染阻害活性の評価 (HCVpp)

マウス血清 **1:100** での感染阻害活性

J6CF (genotype 2a)

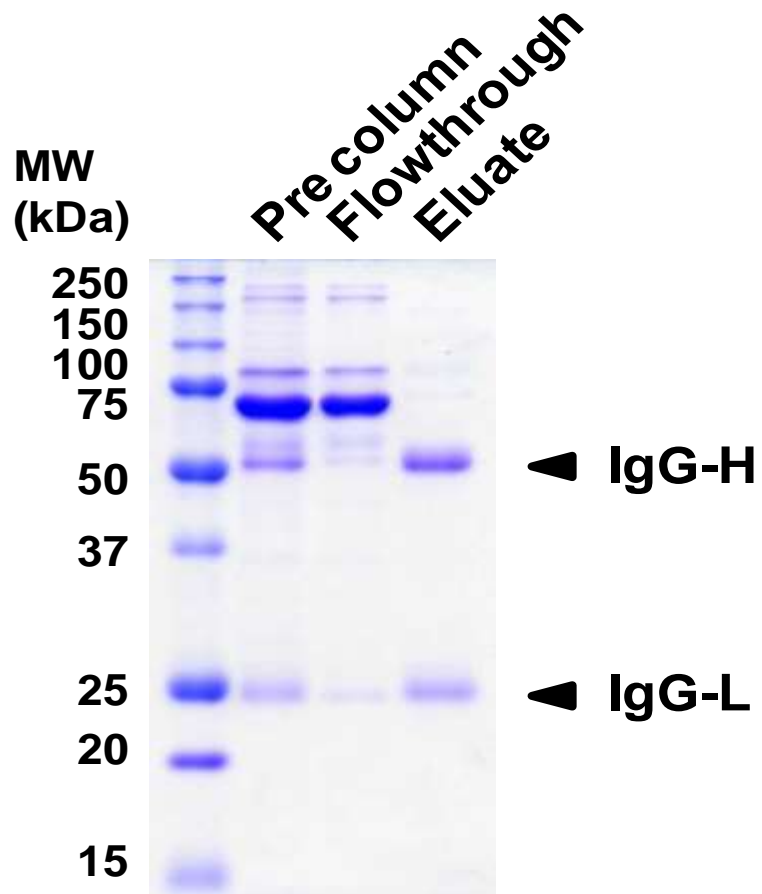
H77 (genotype 1a)

TH (genotype 1b)

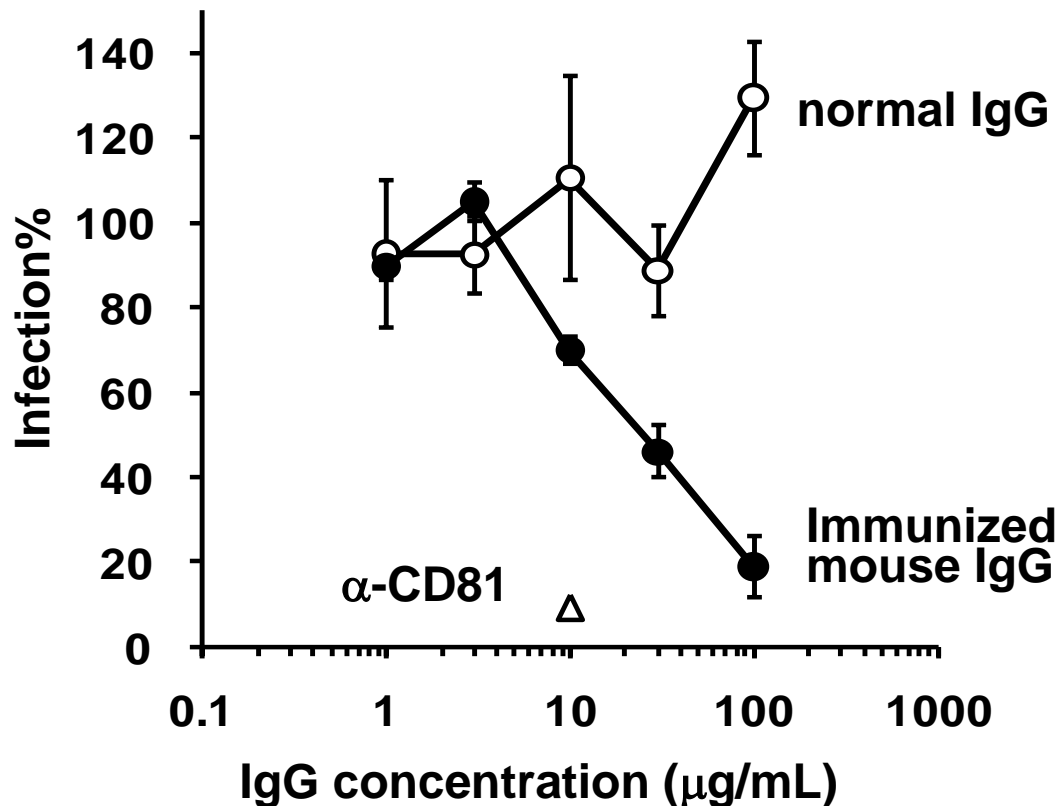


精製HCV粒子免疫マウス血清は異なる遺伝子型のHCV
感染阻害活性を示した

IgGの精製とHCV感染阻害活性の測定

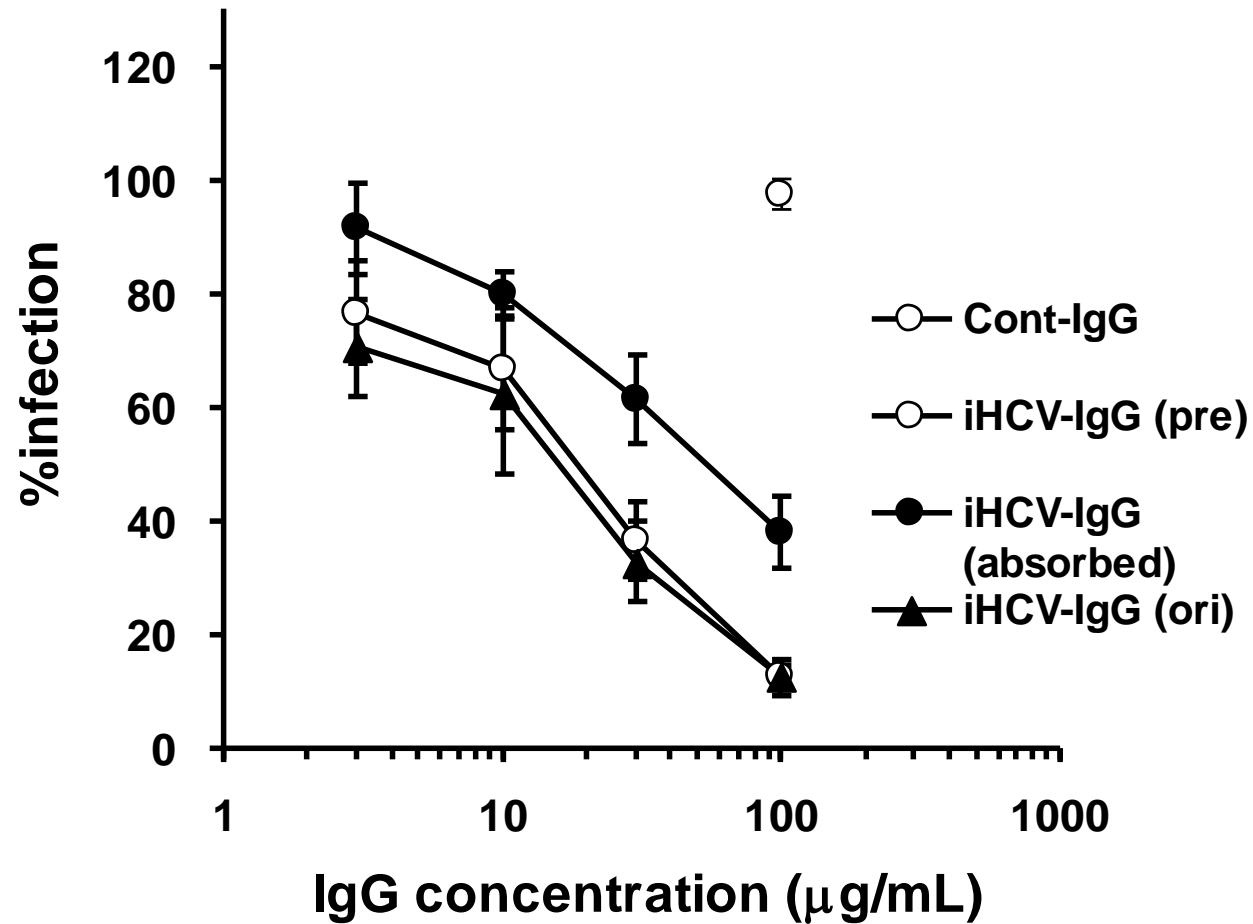


HCV(J6/JFH-1) inhibition



HCV粒子免疫マウス血清由来 IgG は感染中和作用を示した

Inhibitory effect of E1E2-absorbed iHCV-IgG in vitro



HCV protection assay using uPA/SCID mice

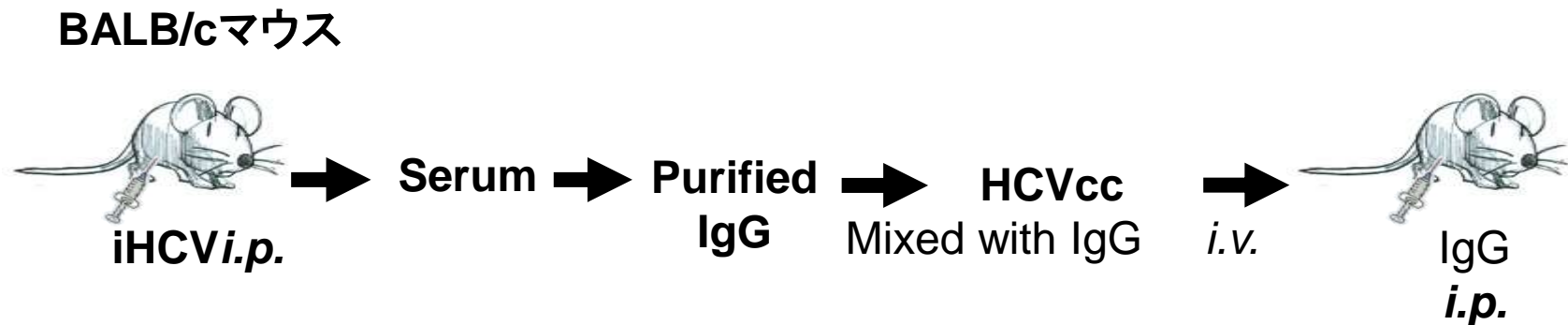
Ab induction (BALB/c)

1. Saline
2. Sucrose Cushion J6/JFH-1 (2 pmol HCV-core/head)

Adjuvant: Sigma Adjuvant system (MPL)

HCV challenge (uPA/SCID)

1. J6/JFH-1HCVcc+control IgG
2. J6/JFH-1HCVcc+immunized mouse IgG



HCV protection assay using uPA/SCID mice

Serum HCV RNA titration by RTD-RT-PCR after HCVcc (10^3 copy/head) inoculation

Group		Day 0	Day 7	Day 14	Infected mice
IgG from Vaccinated mice	Exp 1	ND	ND	ND	0/6=0%
		ND	ND	ND	
		ND	ND	ND	
	Exp 2	ND	ND	ND	
		ND	ND	ND	
		ND	ND	ND	
IgG from control mice	Exp 1	ND	3.8×10^6 copy/ml	4.7×10^5 copy/ml	4/6=66.7%
		ND	1.3×10^7 copy/ml	2.9×10^6 copy/ml	
		ND	ND	ND	
	Exp 2	ND	3.6×10^5 copy/ml	1.8×10^6 copy/ml	
		ND	ND	ND	
		ND	2.7×10^5 copy/ml	3.1×10^6 copy/ml	

まとめ

- HCV粒子を限外濾過膜およびシヨ糖密度遠心で、高純度に精製した
- 精製HCV粒子の免疫マウスの血清には抗エンベロープ抗体が誘導され、HCV感染阻害活性も有していた。また精製IgGには感染中和活性をみとめた
- HCV粒子は組換えE2タンパク質よりも抗体誘導能が高い
- ヒト肝細胞キメラマウスによる感染防御実験により、生体での感染防御抗体を誘導したことが示唆された