

## 経口肝炎ウイルスのウイルス分離と分子疫学調査

研究代表者	鈴木亮介	国立感染症研究所	ウイルス第二部	室長
研究協力者	李 天成	国立感染症研究所	ウイルス第二部	主任研究官
研究協力者	清原知子	国立感染症研究所	ウイルス第二部	主任研究官
研究協力者	杉山隆一	国立感染症研究所	ウイルス第二部	主任研究官
研究協力者	岩本朋忠	神戸市健康科学研究所	感染症部	部長
研究協力者	森 愛	神戸市健康科学研究所	感染症部	副部長

### 研究要旨

地方衛生研究所と国立感染症研究所は A 型肝炎ウイルス (HAV) と E 型肝炎ウイルス (HEV) の分子疫学調査について連携し、国内で流行しているウイルスのサーベイランスを行なっている。国内で検出される HEV は、遺伝子型 3 および 4 で占められているが、稀に海外で感染した事が疑われる遺伝子型 1 の報告もある。本研究では、国内での報告が稀な遺伝子型 1 の HEV に感染した患者の検体からウイルス分離を試み、感染性ウイルスの全長塩基配列情報を決定した。また分子疫学調査により 2021 年には HAV と HEV の塩基配列情報がそれぞれ 12 件および 37 件収集され、系統樹解析を行った。

### A. 研究目的

ウイルス性食中毒の原因となるウイルスの中で、肝機能障害の原因として A 型肝炎ウイルス (HAV) および E 型肝炎ウイルス (HEV) の感染が疑われる。いずれもウイルスに汚染された水や食物を介した経口感染により伝播する。E 型肝炎は、かつては発展途上国で常時散発的に発生する、衛生環境の整っていない地域の疾患と考えられていた。しかしながら、現在ではブタやイノシシなどの動物にも感染する人獣共通感染症であることが判明し、先進国内での主な感染源と考えられている。日本の E 型肝炎報告者数は 2012 年以降、年々増加している。

2020 および 2021 年は新型コロナウイルスの流行による行動様式の変化に伴い、多くの感染症の報告数が減少したが、E 型肝炎の報告数は例年と比して減少しなかった事は興味深い。加熱不十分の肉の喫食が主な原因と考えられているものの、原因が明らかでないケースも多い。

ヒト検体から同定されたウイルスの遺伝子情報は、地方衛生研究所と国立感染症研究所の連携により蓄積されているものの、食中毒の原因と疑われる食材からのウイルスの検出や同定は、食材を汚染しているウイルス量が少ない事や、食品に含まれる夾雑物が検出を妨げる事、また潜伏期間が長

いことなどから困難であり、原因食材や汚染経路が特定されることは稀である。そのため効果的な対策を取るための知見も不足している。したがって、原因が疑われる食材のみならず、幅広く環境中のウイルスを調査する事は、感染経路を理解する上で重要である。

今年度は、国内での報告が稀な遺伝子型 1 の HEV のウイルス分離を試み、感染性ウイルスの全長塩基配列情報を決定した。一方で分子疫学調査により 2021 年に HAV と HEV の塩基配列情報がそれぞれ 12 件および 374 件収集され、それらについて系統樹解析を行った。

## B. 研究方法

積極的疫学調査により E 型肝炎と診断された患者の血清および便（10%乳剤）から QIAamp Viral RNA kit（QIAGEN）を用いて RNA を抽出した。HEV ゲノムの一部（ORF2 領域）を RT-PCR により増幅した後に、得られた断片の塩基配列を決定し、遺伝子型を同定した。そのうち遺伝子型 1 と確定された便および血清検体を HEV 感染感受性細胞に添加し、長期間培養を行った。継時的に培地を交換するとともに、その培地から RNA を抽出し、HEV RNA の定量を行った。

また積極的疫学調査により得られた HAV および HEV の遺伝子情報については、MEGA（version 10.1.8）を用いて系統樹解析を行った。

## C. 研究結果

E 型肝炎の ORF2 の一部の塩基配列から、遺伝子型 1 の HEV 感染が明らかとなった患者検体について、血清および便（10%乳剤）

の HEV RNA コピー数を qPCR で測定したところ、それぞれ  $4.1 \times 10^6$  copies/mL および  $1.1 \times 10^8$  copies/mL であった。検体それぞれについて  $100 \mu\text{L}$  を、6 well plate に播種した PLC/PRF/5 細胞のサブクローンである 4-21 細胞に添加し、数日ごとに培地を置換しながら長期間培養した。培養上清中の HEV RNA を測定したところ、血清検体を感染させた細胞の培養上清中からは HEV RNA は検出されなかったが、便乳剤を感染させた細胞では感染後 17 日目に培養上清の RNA が陽性となった。その後 RNA コピー数は徐々に増加し、感染後 73 日目でピークとなり、コピー数は  $3.1 \times 10^8$  copies/mL となった。コピー数が上昇した上清から RNA を抽出し、ほぼ全長に相当する領域を 9 断片に分割して nested-RT-PCR で増幅し、塩基配列を決定した。

感染症発生動向調査において 2021 年の E 型肝炎の報告数は 452 例であった。このうち、ウイルス遺伝子情報が明らかになったものは、遺伝子型 3 が 32 件、遺伝子型 4 が 5 件であった。食中毒が関連したと考えられる 7 件を除き、配列や地域、発生時期について集中した事例はなかった。一方で遺伝子型 4 の 4 検体は配列の相同性が高く、同一クラスターに分類されたものの、共通する感染源情報はなく、関連については不明であった。

A 型肝炎については 2021 年の報告数はわずかに 71 例で、過去最少となった。このうちウイルスの配列情報が得られたのは 12 例で、10 例は比較的近い配列を示した事から、共通した汚染源の存在が示唆されたが、同定には至らなかった。

#### D. 考察

遺伝子型 1 の HEV が国内で報告されることは稀である。本研究でウイルス分離の由来となった E 型肝炎患者はインドから日本に移動して約 3 週間後に発病したため、国内ではなくインドで感染した可能性が強く疑われる。全長の塩基配列を用いた系統樹解析により、遺伝子型 1 の中でも比較的新しく分類されたサブタイプ g である事が判明した。また ORF の 1 つである ORF4 が、これまで報告されているものより短い特徴を持つ事が明らかになった。分離された遺伝子型 1 の HEV は培養細胞で効率的に感染、増殖が可能であるため、今後の HEV 研究に利用される事が期待される。

一方で 2021 年の国内の E 型肝炎の届け出数は 452 人と例年並みであったのに比べ、A 型肝炎はわずかに 71 例と減少した。同じ経口肝炎ウイルスでも、コロナ禍での人々の生活様式の変容による影響は異なることは興味深く、感染経路の違いを示唆している可能性が考えられた。

#### E. 結論

国内で報告が稀な遺伝子型 1 の HEV のウイルス分離を行い、感染性ウイルスの全長塩基配列情報を決定した。このウイルスはサブタイプ g に分類され、またインド由来である可能性が考えられた。培養細胞で感染増殖が可能な株であるため、今後の HEV 研究への利用が期待される。

2021 年の A 型肝炎の報告数が過去最少であった一方で、E 型肝炎の報告数は例年並みであった。またその遺伝子型は 3 および 4 で占められていた。今後の食中毒原因ウイルスの感染制御に向け、継続的な分子疫学

調査が必要であるとともに、環境調査の重要性が認識された。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

(英文)

1. Sun L, Li Y, Misumi I, González-López O, Hensley L, Cullen JM, McGivern DR, Matsuda M, Suzuki R, Sen GC, Hirai-Yuki A, Whitmire JK, Lemon SM. IRF3-mediated pathogenicity in a murine model of human hepatitis A. *PLoS Pathog.* 2021 17(9):e1009960.

(和文)

1. 鈴木亮介、李天成、塩田智之：「創薬研究者がこれだけは知っておきたい最新のウイルス学」第 1 章 第 3 節「E 型肝炎ウイルスの感染増殖系」。2021. 8 月 p25-31.
2. 杉山隆一、李天成、鈴木亮介、石井孝司、村松正道. 病原微生物検出情報 (IASR)、2021、Vol. 42、No. 12、わが国の E 型肝炎分子疫学情報 (2016~2021 年第 42 週)

##### 学会発表

1. レポーター遺伝子を持つ組換え A 型肝炎ウイルスを用いた抗ウイルス低分子化合物の探索、鈴木亮介、松田麻未、西山直子、小林さくら、鈴木祐成、結城 (平井) 明香、山根大典、村松正道. 第 68 回日本ウイルス学会学術集会 2021/11/16-18, 国内, 口頭.
2. A 型肝炎ウイルスにおける新規抑制剤の開発、鄭シン、史紹春、鈴木亮介、結城 (平井) 明香、若江 亨祥、劉慶博、

- |  |                   |
|--|-------------------|
| 宋少江, 村松正道、第 68 回日本ウイルス学会学術集会 2021/11/16-18, 国内, ポスター.  | 1. 特許取得<br>該当なし   |
| 3. 低分子化合物ライブラリーを用いた HEV 増殖阻害物質の探索. 杉山隆一、石井孝司、鈴木亮介、脇田隆字、村松正道. 第 68 回日本ウイルス学会学術集会 2021/11/16-18, 国内, ポスター. | 2. 実用新案登録<br>該当なし |
|  | 3. その他<br>該当なし    |

H. 知的財産権の出願・登録状況