

食水系感染症病原体の検査法 - 12

E型およびA型肝炎ウイルス

しん かい たか ゆき
 新 開 敬 行
 Takayuki SHINKAI

I. E型肝炎ウイルスの性状

E型肝炎ウイルス (Hepatitis E virus ; HEV) は、ヘペウイルス科 (Hepeviridae) ヘペウイルス属 (Hepevirus) という単一ウイルス族に分類されているが、今後の諸研究により分類が変更される可能性のあるウイルスである。直径30～40ナノメートル (nm) 程のエンベロップを持たない小型の球形ウイルスで、遺伝子型は現在I～IVの4つの型に分類されており、I型、II型はヒトにのみ感染するがIII型、IV型はヒトと動物の両方が感染する人獣共通感染症の原因となり得ることが特長である。一方、血清型はどの遺伝子型に感染した患者血清もこれら4種類の遺伝子型株と反応することから現在1つと考えられている¹⁾。

E型肝炎は、潜伏期が平均40日程とA型肝炎 (平均30日) よりも長めだが慢性化することは少なく、一般的に予後が良好な疾患である。また、E型肝炎の罹患率は成人に比べ子供は低く、一過性の感染症として多くの子供が不顕生感染していることが多い。しかし、A型肝炎に較べ劇症化した場合の致死率は高く、特に妊婦の場合では、20～30%の高い致死率となることが報告されている¹⁾。

2003年には国内産流通食肉 (ブタレバー) の喫食によるE型肝炎発症事例²⁾が報告され、食品衛生上の問題としても重要視されるようになった。ヒトにおけるE型肝炎の発生は、2003年11月から感染症法に基づく感染症発生動向調査において全数把握の4類感染症「E型肝炎」として診断後速やかに届出を行うよう義務付けられている。

II. 日本におけるE型肝炎の疫学

国内で検出されるHEVは輸入感染例を除き、III型とIV型のみである^{1,3)}。I型は主として欧米や中国等で、II型はメキシコで報告されている例のみである。これまで輸入感染症の1つと考えられていたE型肝炎は、近年、HEV常在地への渡航歴のない急性肝炎患者からHEV遺伝子 (III型およびIV型) が検出されたことに加え、国内産のブタからも遺伝学的に極めて類似のウイルス (III型およびIV型) が検出されたこと⁴⁾、国内での狩猟による鹿や猪等の野生動物肉の生食によるE型肝炎の発症や劇症化して死亡した事例⁵⁾や、輸血によるHEVの感染例が日本でも報告される⁶⁾など、国内での本症の発生が次々に明らかにされ、注目されるようになってきている。

三代ら⁷⁾の研究班は、2006年4月に国内外のHEV遺伝子の比較から国内で検出される遺伝子型III型、IV型のHEVは約100年前にすでに起源となるウイルスが国内への進入を果たしたことを報告しており、この原因として当時イギリスから大量に輸入された豚 (ヨークシャー種) がHEVを持ち込んだ可能性があり、その後HEVが土着化して現在に至っているとしている。

一方、感染症発生動向調査事業による2006～2009年に国内で確認されたE型肝炎患者数は、2006年46例、2007年56例、2008年46例、2009年56例と、ほぼ同規模で推移している。また、2003年に増加していた海外帰国者での感染例は、2006年以降では減少し、国内感染例が全体の78%を占めるまでに増加している。これは、E型肝炎に対する国内での検査体制が整備され、肝炎事例の正確な検査・診断が可能となったことが大きな要因としてあげられる。

食水系感染症病原体の検査法 - 12

また、国内感染例が増加していることから、HEV に対する感染防御と食品の安全性確保について、より一層注意する必要がある。

Ⅲ. E 型肝炎ウイルスの検査法

HEV の検出・診断法としては、遺伝子検出による診断、患者血清からの抗 HEV-IgM 抗体の検出が一般的である。細胞培養法による HEV 検出の試みは、これまでにウイルスの増殖レベルが低いものばかりであったが、田中ら⁸⁾により2種類の細胞株によって HEV が効率的に増殖できることが報告された。

1. 細胞培養法

使用している細胞株は、ヒト肝癌由来の細胞株である PLC/PRF/5 (Alexander) 株とヒト肺癌由来細胞株である A549 株である。

検査方法

- ・単層培養した細胞表面を 0.2%BSA を添加した PBS (-) で3回洗う。
- ・PBS (-) で希釈し 0.22 μ m のフィルターでろ過したウイルス液 0.2ml を細胞面に接種する。
- ・室温で1時間吸着させたのち接種液を取り除き細胞維持培地 (MEM) を加える。
- ・MEM には、DMEM と 199 培地 (Gibco: インビトロジェン) を半量ずつ混ぜた培地に熱処理済みの 2%FCS と最終濃度 30mM の MgCl₂ を添加した培地を用い、5%炭酸ガス条件下で 35.5 ~ 37.0 °C

で培養を行う。

- ・培養開始翌日に細胞面を PBS (-) で5回洗い、MEM を添加し培養を続ける。
- ・培養2日目から、培養面にある MEM を毎日半量ずつ捨て、新鮮な MEM を補充し培養を継続する。

2. 遺伝子検査法

HEV 遺伝子は、3つの ORF (Open reading frame) から形成されていることが知られており、ORF1 (非構造蛋白遺伝子) および ORF2 (構造蛋白遺伝子) 遺伝子検出による判別が広く行われている。一本鎖であるウイルス RNA をテンプレートとする逆転写反応により cDNA を作成し、この cDNA と各プライマー⁹⁾を用いて一段階の PCR 法および二段階の PCR 法 (nested-PCR 法) により標的とした領域の遺伝子増幅を行う。

(1) RNA の抽出 (内臓肉、精肉)

肝臓等の肉片 100 μ g を採取し、肉片をマイクロ乳棒等ですり潰しながら RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて肉片からの RNA 液を得る。

(2) RNA の抽出 (臨床材料)

血清 500 μ L または 10%ふん便乳剤を PEG (24%ポリエチレングリコール、1.5M NaCl) と 2:1 の比率で混ぜ合わせ、4 °C で1晩反応させた後、14,000rpm 25分遠心し、この沈査から核酸抽出剤等 (セパジーン RV-R: 三光純薬、QIAamp viral RNA Mini Kit: QIAGEN) を用いて RNA を抽出する。

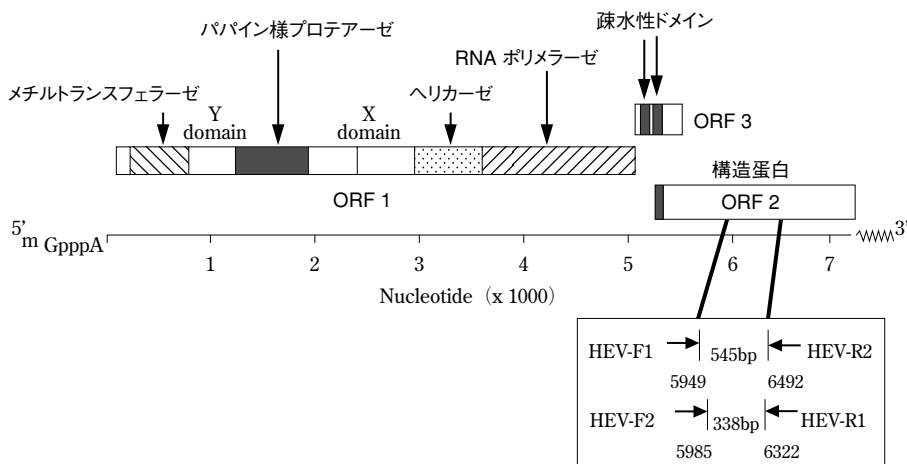


図1 E型肝炎ウイルスの遺伝子地図とプライマーによる増幅領域

1st PCR センスプライマー-HEV-F1 : 5'-TAYCGHAAAYCAAGGHTGGCG-3' (5903-5922*)
 1st PCR アンチセンスプライマー-HEV-R2 : 5'-TGYTGGTTRTCRTARTCCTG-3' (6486-6467)
 Nested PCR センスプライマー-HEV-F2 : 5'-GGBGTBGCNGAGGAGGAGGC-3' (5939-5958)
 Nested PCR アンチセンスプライマー-HEV-R1 : 5'-CGACGAAATYAATTCTGTTCG-3' (6316-6297)

図2 HEV 遺伝子 ORF-2 領域に設定されたプライマー

3. 血清検査法

ヒトの感染症としての E 型肝炎の場合、病原診断で最も多く行われているのは血清診断である。市販されている E 型肝炎ウイルス抗体検出キットで体外診断用医薬品の承認を受けた診断キットは、現在のところ 1 種類のみで、ほとんどが研究用となっているので注意が必要である。

酵素免疫測定法 (ELISA) を採用した国内産のキットは遺伝子型 IV 型の、海外産のキットは遺伝子型 I 型のリコンビナント抗原を用いているが、I ~ IV のどの型の血清でも反応する。血清型は一つとされているが遺伝子型間で血清反応にわずかに差異があることが判っており、将来的には血清型の再編も考えられる。

また、より高度な抗体測定法として Western blot 法による抗 HEV 抗体測定法のキットが市販されており、ORF2 遺伝子によりコードされた 3 種の構造蛋白と ORF3 遺伝子によりコードされた蛋白を抗原として使用している。

(1) ELISA 法キットを用いた検査方法

(イムニス IgA anti-HEV EIA、特殊免疫研究所)
 キットの添付書に従い、血清希釈液により血清を 101 倍希釈した後、リコンビナント抗原と 1 時間反応。反応液を取り除き、添付の洗浄液にて洗浄後、標識抗体液と 1 時間反応。再び反応液を取り除き、添付の洗浄液にて洗浄後、添付の発色液を接種し、30 分間反応させ、450nm 波長で吸光度を測定する。

(2) WesternBlot 法の検査方法

(recomBlot HEV IgG/IgM、MIKROGEN)

添付書に従い抗原を塗布したストリップ (短冊様片) を反応液に浸し、血清を添加して 2 時間反応。反応液を取り除き、洗浄液で洗浄後、標識抗体液と 1 時間反応。再び反応液を取り除き、洗浄液で洗浄後、発色液を添加してバンドの出現を確認しながら 10 分間反応させ、蒸留水で反応を止める。

IV. A 型肝炎ウイルスの性状

A 型肝炎ウイルス (Hepatitis A Virus : HAV) は、ピコルナウイルス科 (Picornaviridae)、ヘパトウイルス属 (Hepatovirus) に分類され、古くはエンテロウイルスの 1 つと考えられていたウイルスである。A 型肝炎ウイルスの形状は、エンテロウイルスの形状と似た点が多く、直径 27 ~ 30nm 程の正 20 面体であり、エンベロープを持っていない。酸に耐性であり熱や乾燥にも強くエーテル等の溶剤や界面活性剤、蛋白分解酵素などにも安定であるため環境中でも失活しにくいウイルスである。しかし、高圧蒸気滅菌、紫外線照射、塩素処理等で失活するため流行時のウイルスの消毒法は確立されているといえる。

遺伝子は、一本鎖 RNA (プラス鎖) 遺伝子を有し、VP1-2A 領域の遺伝子解析により、遺伝子型は 7 種類 9 型 (IA, IB, II, IIIA, IIIB, IV, V, VI, VII) に分類されている¹⁰⁾。一方、血清型は各遺伝子型の抗原と血清間で高い交差反応が認められていることから 1 種類とされている。

HAV は糞口感染等により伝播し、潜伏期は 2 ~ 6 週間 (平均 30 日) である。臨床症状としては、発熱、全身倦怠感等が続いて食欲不振、嘔吐などの症状とともに典型的な症例では黄疸、肝腫大、濃色尿等が顕著になる。血清トランスアミナーゼ (ALT、AST、GPT、GOT) の上昇が著しく、まれに劇症化して死亡に至る例もあるが、ほとんどの場合 1 ~ 2 カ月の経過の後に回復し、予後は良好である。

ヒトにおける A 型肝炎の発生は、2003 年 11 月から感染症法の改正に基づいて感染症発生動向調査において全数把握の 4 類感染症「A 型肝炎」として診断後速やかに届出を行うよう義務付けられている。届け出の基準は、診断した医師の判断により、症状や所見から当該疾患が疑われ、病原体診断や血清学的診断がなされたものとされている。

V. 日本における A 型肝炎の疫学

日本で検出される A 型肝炎ウイルスの遺伝子型は、これまで国内感染例では I A 型の検出例が大半を占め、Ⅲ B 型がわずかに検出されていたが、近年、海外からの輸入感染例や輸入食品由来の感染例として、これまで欧州等でよく見られたⅢ A 型¹¹⁾や中国等でみられた I B 型が検出される等、I A 型以外の遺伝子型の発生も確認されている。

一方、感染症発生動向調査¹²⁾による 2006～2009 年に国内で確認された A 型肝炎患者数は、2006 年 224 例、2007 年 157 例、2008 年 170 例、2009 年 115 例であり、増減を繰り返しながら推移している。また、2003 年以降の推定感染地について東京都を例に見てみると、国外感染例の 44 例 (35%) に対し、国内感染例は 82 例 (65%) にまで増加している。上下水道等の水環境の整備により戦後、国内での感染は大幅に減少したが、交通機関の充実により、海外からの新鮮な食品を介して国内で感染する機会が増加していることが推察され、国内外での HAV に対する感染防御と食品の安全性確保について、より一層注意する必要がある。

VI. A 型肝炎ウイルスの検査法

HAV の検出・診断法としては、遺伝子検出による診断、患者血清からの抗 HAV-IgM 抗体の検出が一般的である。

1. 細胞培養法

欧米では猿腎臓細胞由来である Frhk-4 細胞を用いた分離培養法が最も多く用いられている。この細胞の特色は HAV による細胞変性効果 (CPE) を確認することができる点であり、HAV 分離に使用される BSC-1、AGMK 等の細胞では CPE が出現せずウイルス増殖の確認ができないため、抗原補足 ELISA 法や定量性の遺伝子検査等によって HAV の増殖を確認する必要がある。一方、わが国での HAV 分離に用いられている細胞は、AGMK 細胞の変異細胞である GL37-21 細胞であり、培養期間中に現れる CPE

は軽微ではあるが確認ができる。しかし、GL37-21 細胞による HAV 増殖は遅く、通常のウイルス分離に比べ 2 倍以上の培養期間を要するため、ウイルス分離による病原診断には適していない。

検査方法

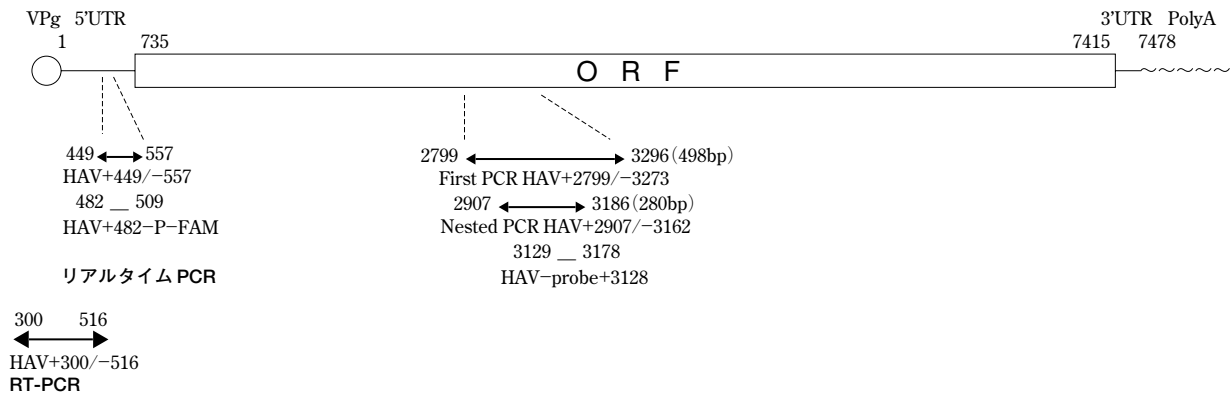
- ・単層培養した細胞表面を PBS (-) で洗う。
- ・MEM で希釈し 0.22 μ m のフィルターでろ過したウイルス液 0.2ml を細胞面に接種。
- ・室温で 1 時間吸着させたのち接種液を取り除き細胞維持培地 (MEM) を加える。
- ・MEM には、イーグル処方 of MEM (日水製薬) に熱処理済みの FCS を 20% 量添加した培地を用いる。
- ・5% 炭酸ガス条件下で 35.5～37.0℃ で培養を行う。
- ・培養 2 日目から、培養面にある MEM を 3 日に 1 回、新鮮な MEM と交換し培養を継続する。

2. 遺伝子検査法

HAV の遺伝子は、一本鎖の RNA であることから PCR 法による検査には逆転写反応による cDNA の作成が必要である。RT-PCR 法およびリアルタイム PCR 法については、平成 14 年 8 月 16 日付「ふん便及び食品中の A 型肝炎ウイルスの検査法について」、食監発第 0816001 号にて厚生労働省から示されている。また、平成 21 年 12 月 1 日付で国立医薬品食品衛生研究所において食品中の A 型肝炎ウイルスの検出法について検討した「A 型肝炎ウイルス検出法」食安監発 1201 第 1 号が改訂および追補版として示された。

3. 血清検査法

A 型肝炎ウイルスの感染確認として臨床で行われる検査は、抗 HAV-IgM 抗体の測定および確認である。近年、国内で使用されている抗体測定キットは大手の検査センター等が保有している汎用の酵素抗体測定機 (ARCHITECT[®]、AxSYM[®] : アボットジャパン (株)、ルミパルス[®] : 富士レビオ (株) 等) で使用するイムノアッセイ検査用のキットが主流であり、実験室レベルで少人数の抗体を測定するキットは海外製 (WA-1196 : Beijing WANTAI Biological Pharmacy Enterprise Co.Ltd 等) の研究用キットの



RT-PCR			
〈Primer〉	HAV+300	5'-GCT GTA GGA GTC TAA ATT GGG GAC-3'	HAV-516 5'-ACT CAA TGC ATC CAC TGG ATG AG-3'
RT-PCR、マイクロプレートハイブリダイゼーション			
〈Primer〉	HAV+2799	5'-ATT CAG ATT AGA CTG CCT TGG TA-3'	
	HAV+2907	5'-GCA AAT TAC AAT CAT TCT GAT GA-3'	
	HAV-3162	5'-CTT CYT GAG CAT ACT TKA RTC TTT G-3'	
	HAV-3273	5'-CCA AGA AAC CTT CAT TAT TTC ATG-3'	
〈Probe〉	HAV-Probe +3129	5'-Biotin-CCA TAT AAA GAA CTG AGA TTA GAA GTT GGG AAR CAA AGA YTC AAG TAT GC-3'	
リアルタイムPCR			
〈Primer〉	HAV+449	5'-AGG GTA ACA GCG GCG GAT AT-3'	
	HAV-557	5'-ACA GCC CTG ACA RTC AAT YCA CT-3'	
〈Probe〉	HAV+482-P-FAM	5'-FAM-AGA CAA AAA CCA TTC AAC RCC GRA GGA C-TAMRA-3'	

図3 A型肝炎ウイルスの遺伝子地図とプライマーによる増幅領域

みとなってしまった。海外製のキットは、酵素抗体法 (ELISA) によるものが多く、感度と特異性は国内販売されていた国産キットと同等であることから使用に問題はない。また、迅速な抗体測定が可能なイムノクロマト (IC) 方式での IgM 抗体測定キットも研究用ながら販売されており、吸光度測定等の機器がない場合でも抗体の確認をすることができる。しかし、検出感度は ELISA 法に比べ、低下することから使用時には注意が必要である。

文 献

- 1) 国立感染症研究所：感染症の話「E型肝炎」、IDWR, **13** (6) : 8-10, 2004.
- 2) Yasuyuki Yazaki, Hitoshi Mizuo, Masaharu Takahashi, Tsutomu Nishizawa, Nobuhiko Sasaki, Yuhko Gotanda and Hiroaki Okamoto : Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *Journal of General Virology*, **84** : 2351-2357, 2003.
- 3) 国立感染症研究所：「E型肝炎2005年8月現在」、IASR, **26** (10) : 261-262, 2005.
- 4) Nishizawa, T., Takahashi, M., Mizuo, H., Miyajima, H., Gotanda, Y. & Okamoto, H.: Characterization of Japanese swine and human hepatitis E virus isolates of genotype IV with 99% identity over the entire genome. *Journal of General Virology*, **84** : 1245-1251, 2003.
- 5) Shuchin Tei, Naoto Kitajima, Kazuaki Takahashi, Shunji Mishiro : Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet*, **362** : 371-373, 2003.
- 6) Keiji Matsubayashi, Yasuhiro Nagaoka, Hidekatsu Sakata, et al.; Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. ; *Transfusion*, **44** : 934-940, 2004.
- 7) 三代俊治、他. 本邦に於ける E 型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究. 厚生労働科学研究 2004 ; 200400676A
- 8) Toshinori Tanaka, Masaharu Takahashi, Eiji Kusano and Hiroaki Okamoto : Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus, *Journal of General Virology*, **88** : 903-911, 2007.
- 9) E型肝炎検査マニュアル 平成17年4月 国立感染症研究所
- 10) Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, et al.: Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *Journal of General Virology*. **73** : 1365-1377, 1992.
- 11) 関根雅夫、他. 病原微生物検出情報. **24** : 162-163, 2003.
- 12) 感染症発生動向調査資料, 2006-2009.