

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：80106
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009 年度～2011 年度
 課題番号：21590725
 研究課題名（和文）新規 2 色蛍光高感度検出法の開発と E 型肝炎ウイルスの社会における循環様式の解明
 研究課題名（英文）Sensitive detection of hepatitis E virus (HEV) using TaqMan RT-PCR and molecular characterization of HEV in clinical, environmental and putative animal sources
 研究代表者
 石田 勢津子 (ISHIDA SETSUKO)
 北海道立衛生研究所感染症センター感染症部・主査（腸管系ウイルス）
 研究者番号：70414315

研究成果の概要（和文）：TaqMan RT-PCR 法を用いて E 型肝炎ウイルス (HEV) の遺伝子型 G3 と G4 を同時に検出し区別する方法を開発した。HEV を保有すると推定される感受性動物や、水などの環境検体中に HEV が存在するかどうかを RT-PCR 法により調べた。陽性検体とヒト臨床検体由来のウイルスの塩基配列に 93～100% の類似が見られたが、地域の一致はなく、推定保有動物や環境水からの伝播の可能性を考察した。

研究成果の概要（英文）：A TaqMan RT-PCR was developed to detect and classify genotypes of hepatitis E virus (HEV). Putative animal reservoirs and environmental samples were studied to investigate potential routes of transmission for indigenous HEV infection. HEV RNA was detected using RT-PCR. HEV strains derived from swine liver, environmental samples shared 93-100% sequence similarity with human HEV strains.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：社会医学、公衆衛生学・健康科学

キーワード：疫学、E 型肝炎ウイルス、診断、分子疫学

1. 研究開始当初の背景

E 型肝炎は E 型肝炎ウイルス (HEV) が主に経口感染することによっておこる疾患である。先進諸国においては輸入感染症と位置づけられてきたが、近年、E 型肝炎ウイルスは土着していると考えられるようになった。感染症法のもとで報告された全国の E 型肝炎の発生動向によると、1999 年 (4 月～) の報告数は 0 例であったが、2010 年 66 例、2012 年 (～3 月) は 38 例と報告数の増加がみられる。2010

年度の E 型肝炎ウイルス感染者の報告総数 66 例中、都道府県別では北海道 (30 例) が最も多く、次いで東京都 (8 例) であった。

感染経路としては、流行地域への渡航に伴う輸入感染、輸血感染、そして人獣共通感染として加熱不十分な感染動物 (ブタ、イノシシ、シカなど) の肉や内臓の喫食 (Takahashi et al., Virology, 2004)、の 3 つとされている。しかしながら実際に報告された感染源や感染経路 (推定または確定) 中、飲食物の

記載のないその他・不明は過半数を占め、感染予防対策のための情報は不足している。一方、推定ウイルス保有動物からの HEV 検出や、その配列と近隣の患者とのウイルス遺伝子配列の類似性が報告されている (Wenzell et al., J Clin Virol, 2011)。

潜伏期間は平均 6 週間、通常は 1 カ月間で完治し、慢性化することはない。致死率は全体で 1~2% と A 型肝炎と比較して高く、ときに劇症化して死に至ることもあり、特に妊娠第 3 半期の妊婦では致死率が 30% を超えるとの報告もある (Boccia et al., Clin Infect Dis, 2006)。

ヒトに感染する E 型肝炎ウイルスには G1~G4 の 4 つの遺伝子型が存在するが、日本国内で渡航歴のない患者やブタから検出された遺伝子型は G3 と G4 のみであり (Yazaki et al., J Gen Virol, 2003)、これらが土着のウイルスと考えられる。北海道内の全献血者を対象としたスクリーニング調査も行われ 1/8300 人 (2005 年~2007 年) 程度の陽性率であったが、輸血による HEV の感染例が国内でも報告されている (Matsubayashi et al., Transfusion, 2004)。また、献血された血液から検出される遺伝子型は G3 に偏り (松林、北海道輸血シンポジウム, 2007)、医療機関を受診して探知・報告される E 型肝炎患者から検出される遺伝子型には G4 が多い。

E 型肝炎の診断は血清や糞便からの IgM 抗体やウイルス遺伝子増幅産物の検出によるが、現在報告されている遺伝子検出法の場合、ウイルスを検出可能な期間は短く、発症から 2 週間前後とされている。また、感染疑い動物内臓などの喫食による食中毒が疑われる場合、食品や、調理場などの環境中のウイルス量はごく微量であるため、感染源、感染経路の解明が困難で、高感度の検出法とウイルス粒子の濃縮・精製法が求められている。

2. 研究の目的

本機関では、厚生労働省の感染症発生動向調査の一環として、全数把握疾患である E 型肝炎の発生届を受け、患者検体からの遺伝子増幅法によるウイルス検出を行っている

(Ishida et al., Jpn J Infect Dis, 2006)。E 型肝炎については、潜伏期間が長い、遺伝子増幅によるウイルス検出可能な期間が発症前後 2 週間程度に限られるなどの要因から、その探知、感染原因などの疫学調査、検体採取のタイミングが難しく、感度のよい検出法の必要性を痛感している。

また、ヒト由来の複数の陽性検体の遺伝子配列の比較により、地域内における類似を見出し、集団感染あるいは土着株の存在が示唆された。

これらのデータの蓄積から、特に患者発生が多いといわれる北海道において、患者検体

からのウイルス検出を中心に、感染源となり得る推定ウイルス保有動物や、水環境検体を含めた環境中における本疾患の原因ウイルスの存在様式を総合的に追跡し、予防対策に活用できる情報を収集することを目的とした。

方法としては、蛍光色素標識プローブを用いた高感度検出・型別法の開発と、多検体のスクリーニングによる分子疫学研究を計画した。

E 型肝炎患者や無症状病原体保持者の血清、感染源とされる感受性動物 (ブタ等) の内臓、環境由来検体中 (下水、河川水、海水等) のウイルス保有状況調査の結果からウイルスの動態を解析し、リスク評価を行う。

推定保有動物や環境検体から検出されたウイルス遺伝子の分子疫学的解析を行い、ヒト臨床検体由来の配列との類似性及びウイルスの地域的な分布から、伝播の可能性を調査する。

さらに、食品や環境からの微量ウイルス検出を目的として、ウイルス粒子の精製・濃縮法についての検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 高感度検出・型別法の開発

遺伝子配列データベースから HEV の各遺伝子型の遺伝子配列を抽出し、高度に配列の保存された領域に、すべての型に対応する共通プライマーと、型別に必要なプローブを選定した。反応条件を決定し、G3、G4 各遺伝子型陽性の検体について、検出・型別を確認する。

(2) ヒト臨床検体データの解析

無症状ウイルス保持者 (献血者) あるいは E 型肝炎患者検体について、ウイルスの遺伝子配列、遺伝子型、発症からの経過日数、重症度、肝炎指標となる酵素等の生化学的数値など臨床情報を解析し、問診時に必要な情報や適切な検体採取時期の推定など診断・予防対策に有用なデータを集積・整理する。

(3) 推定ウイルス保有動物、環境由来検体におけるウイルス保有状況調査

HEV 推定保有動物や、環境由来の検体についてウイルス検出を試み、ヒト臨床検体由来の HEV 遺伝子配列との比較から、類似性、地域的な分布など分子疫学的解析を行う。E 型肝炎患者、または献血時のスクリーニングで HEV が検出され無症状病原体保持者として届け出られたヒト由来の検体、食肉検査所や保健所から回収したブタ肝臓 (390 検体)、処理施設からのエゾシカ肝臓 (78 検体) からキットによりウイルス RNA を抽出した。環境由来検体 (954 検体) として、下水、河川水、海水、その海域に設置した調査用カキ等を 1 セットとして、2 つの異なる地区から定期的に検体を回収した。水検体は陰イオン膜への吸着と酸洗浄、アルカリ溶出後、限外ろ過によ

る濃縮操作を経てウイルスを回収し、RNA を抽出した。カキの消化腺である中腸腺ホモジネートからウイルスを濃縮し、RNA を抽出した。ヒト臨床検体と推定保有動物、環境検体について、nested RT-PCR による HEV 検出を行い、ORF2 領域の塩基配列を分子疫学的に解析した。これらの結果をもとに北海道における高発症率を説明する要因を検索し、リスク評価を行う。

(4) ウイルス粒子濃縮・精製法の検討

食品や環境検体等に含まれる微量の E 型肝炎ウイルスを効率よく濃縮するためには、特異性の高い抗原抗体結合反応を利用したウイルス粒子濃縮・精製法が有用である。抗原として用いるウイルス中空粒子作製のため、E 型肝炎ウイルス(G3)のカプシドタンパク質遺伝子の5'末端の333塩基と3'末端の159塩基を欠失させた部分を RT-PCR で増幅してバキュロウイルス発現用ベクターに組み込み、ウイルスタンパク質発現用組換えバキュロウイルスを作成した。この組換えバキュロウイルスを昆虫細胞 Sf9 に感染させて、E 型肝炎ウイルスの中空粒子を分泌させた。また、同じ領域の遺伝子を増幅して大腸菌発現用プラスミドベクター pThioHis に組み込み、大腸菌に形質転換して培養し、ヒスチジンタグ融合ウイルスタンパク質として発現させた。中空粒子を抗原としてマウスに接種し、E 型肝炎ウイルスに対する抗血清の作製を試みた。

4. 研究成果

(1) 高感度検出・型別法の開発

遺伝子配列データベースから E 型肝炎ウイルスの4つの遺伝子型(G1~G4)の遺伝子配列を複数株抽出して比較することにより、高度に配列が保存された領域に、検出・型別用のプライマーと TaqManMGB プローブを設計した。リアルタイム PCR システムによる検出方法について、プライマーやプローブの濃度、サイクル数、反応温度などの条件を検討し、G3、G4 遺伝子型陽性検体を用いて型別を確認した。今後、ヒト臨床検体、推定ウイルス保有動物、環境検体など各種検体について、既存の RT-PCR 法と感度や特異性を比較し、実用性を検討する予定である。

(2) ヒト臨床検体データの解析

E 型肝炎ウイルスは経口感染する病原体であり、日本国内の感染と推定される HEV は G3 と G4 に分類される。

ORF2 領域の塩基配列により、ヒト臨床検体 42 検体 (E 型肝炎患者 31 検体、無症状病原体保持者 11 検体) からの 25 株は G4、17 株は G3 に分類された。無症状病原体保持者由来の株は 1 検体を除いて G3 に分類された。この結果より、G4 遺伝子型の感染は G3 遺伝子型感染に比べて発症しやすいこと及び献

血時のスクリーニングなどによって見出されていない G3 遺伝子型の不顕性感染が潜在している可能性が示された。これらの結果は、北海道内の献血者からの HEV 検出においては G3 優勢であるとする報告 (Sakata et al., Transfusion, 2008) や、G4 遺伝子型の症状がより重篤な傾向があるとする報告 (Ohnishi et al., Hepatol Res, 2006) と矛盾しない。

同時期、同一地域内で相同性の高い HEV 株が検出され、共通の感染源の存在を示唆したが、共通食喫食など疫学情報による裏付けは得られなかった。

E 型肝炎の潜伏期間は長く、発症、診断、届出を経てからの疫学調査による感染源の推定や、感染原因と疑われる検体の確保は困難である。感染症発生動向調査の周知、保健所と医療機関の協力体制の整備も重要と考える。

(3) 推定ウイルス保有動物、環境由来検体におけるウイルス保有状況調査

ブタ肝臓由来の4検体(1%)が HEV 陽性であり、2株は G3、他の2株が G4 と判別された。エゾシカ肝臓 78 検体はすべて陰性であった。環境検体 (954 検体) について、HEV RNA は1下水検体、1海水検体から検出された。これらの環境検体由来の HEV 株はともに G3 であった。

ブタや環境から得られた HEV 株は、ヒト臨床検体由来の配列と 93~100%の相同性を示し、系統樹上ヒトの臨床検体と近い分枝に位置づけられた。これらの結果はヒトへの HEV 感染についての関与を示唆したが、地理的な一致は見られず、長期間の調査が必要と思われた。

下水や推定保有動物、特にブタからの HEV 検出は、E 型肝炎患者由来の配列との一致、類似をも含めて、大規模の水系感染はみられない先進諸国からも報告されている (La Rosa et al., Appl Environ Microbiol, 2010, Wenzell et al., J Clin Virol, 2011)。しかしながら、ウイルス量が少ないと考えられる環境水からの検出例は少なく、海水からの検出報告はない。環境水からの HEV 検出は、感染したヒトあるいは感受性動物の潜在を示唆するものであり、貝類の生食や水遊びによる感染の可能性を示す。国内、海外において、水中のウイルスを濃縮する性質を有するシジミやカキなど貝類からの HEV 検出も報告されている (Li et al., Am J Trop Med Hyg, 2007) が、今回の調査において、カキはすべて陰性であった。環境水の汚染指標としてのウイルス分布調査は、その宿主特異性の高さにより汚染源の特定がしやすい。そのため制御する対象が明確になり公衆衛生上有益な情報として利用できる。より感度の高い検出法や、ウイルス粒子の精製・濃縮法の開発が

必要と思われる。

(4) ウイルス粒子濃縮・精製法の検討

昆虫細胞及び大腸菌の発現系を用いた組換えウイルスタンパク質は、ウエスタンブロット法により発現が確認された。大腸菌を用いた発現系では、組換えウイルスタンパク質をヒスチジンタグ融合タンパク質精製用カラムに結合させて高塩濃度 (1M NaCl) のバッファーで溶出することで、不純物の少ない組換えウイルスタンパク質を効率よく精製することができた。昆虫細胞を用いた発現系においても、ウエスタンブロット法によって培養上清中への組換えウイルスタンパク質の分泌は確認されたものの、量が少なく電子顕微鏡で中空粒子の形態を確認するには至らなかった。また、中空粒子を抗原としてマウスに接種し、E 型肝炎ウイルスに対する抗血清の作製を試みたが、抗原量が少なかったため十分な力価の抗血清を得ることはできなかった。今後、ウイルス様粒子の効率的な産生と抗血清作製を予定している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Miyoshi M, Yoshizumi S, Ishida S, Komagome R, Nagano H, Kudo S, Okano M, Usefulness of the rapid determination system of viral genome sequences in human stool specimens, *J Virol Methods*, 査読有, 179, 2012, 256-260, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22123408>
- ② 吉澄志磨、後藤明子、石田勢津子、野田 衛、二枚貝関連の食中毒疑い事例における各種胃腸炎ウイルスの関与-北海道、病原微生物得検出情報、査読無、32、2011、361-363、<http://idsc.nih.go.jp/iasr/32/382/dj3827.html>
- ③ Miyoshi M, Yoshizumi S, Jinushi M, Ishida S, Okui T, Okano M, Shouji M, Tanaka S, Saigusa J, Mori A, Tanabe H, Yamaguchi R, Nishimura Y, Shimizu H, A Case of Paralytic Poliomyelitis Associated with Poliovirus Vaccine Strains in Hokkaido, Japan, *Jpn J Infect Dis*, 査読有, 63, 2010, 216-217, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20495280>
- ④ Miyoshi M, Yoshizumi S, Kanda N, Karino T, Nagano H, Kudo S, Okano M, Ishida S, Different genotypic sapoviruses detected in two simultaneous outbreaks of gastroenteritis among schoolchildren in the same school district in Hokkaido, Japan, *Jpn J Infect Dis*, 査読有, 63, 2010, 75-78, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20093770>
- ⑤ Nishimura N, Nakayama H, Yoshizumi S, Miyoshi M, Tonoike H, Shirasaki Y, Kojima K, Ishida S, Detection of noroviruses in fecal specimens by direct RT-PCR without RNA purification, *Journal of Virological Methods*, 査読有, 163, 2010, 282-286, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19878699>

[学会発表] (計 6 件)

- ① 石田 勢津子、北海道における HEV 感染の概況について、第 29 回ウイルス肝炎談話会、平成 23 年 11 月 19 日、自治医大 (栃木県下野市)
- ② 吉澄志磨、後藤明子、石田勢津子、田中智之、野田 衛、二枚貝の喫食のみられた食中毒疑い事例における各種胃腸炎ウイルスの関与について、第 32 回日本食品微生物学会学術総会、平成 23 年 10 月 7 日、タワーホール船堀 (東京)
- ③ 石田 勢津子、北海道における HEV 感染の概況について、北海道 E 型肝炎研究会第 5 回学術集会、平成 23 年 9 月 10 日、札幌医大 (札幌市)
- ④ Ishida S, Yoshizumi S, Ikeda T, Miyoshi M, Goto A, Matsubayashi K, Ikeda H, Kudo S, Detection and molecular characterization of hepatitis E virus in clinical and environmental samples and in putative animal reservoirs, 国際ウイルス学会議 (International Union of Microbiological Societies 2011 Congress), 平成 23 年 9 月 13 日, (ポスター), 14 日 (口演), 札幌コンベンションセンター (札幌市)
- ⑤ Miyoshi M, Yoshizumi S, Ishida S, Komagome R, Nagano H, Kudo S, Okano M, Usefulness of the rapid determination system of viral genome sequences in human stool specimens, 国際ウイルス学会議 (International Union of Microbiological Societies 2011 Congress), 平成 23 年 9 月 15 日, 札幌コンベンションセンター (札幌市)
- ⑥ 中山博之、吉澄志磨、三好正浩、西村直行、石田勢津子、糞便直接 RT-PCR 法によるサポウイルス RNA 検出法の開発、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、平成 21 年 10 月 26 日、都市センターホテル (東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 勢津子 (ISHIDA SETSUKO)

北海道立衛生研究所感染症センター感染症部・主査 (腸管系ウイルス)

研究者番号：70414315

(2) 研究分担者

吉澄 志磨 (YOSHIKAZUMI SHIMA)

北海道立衛生研究所感染症センター感染症部・研究職員

研究者番号：90414317

三好 正浩 (MIYOSHI MASAHIRO)

北海道立衛生研究所感染症センター感染症部・主査 (ウイルス感染症)

研究者番号：50414321

工藤 伸一 (KUDO SHINICHI)

北海道立衛生研究所感染症センター微生物部・部長

研究者番号：00414318

(2009年度～2010年度)

(3) 連携研究者

松林 圭二 (MATSUBAYASHI KEIJI)

北海道赤十字血液センター検査部・検査三課長

研究者番号：90533323

後藤 明子 (GOTO AKIKO)

北海道立衛生研究所感染症センター感染症部・研究職員

研究者番号：60414322

(2010年度～2011年度)