

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：80106

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590825

研究課題名(和文)新規2色蛍光検出ノ型別法の確立とE型肝炎ウイルス地域流行の解析

研究課題名(英文) Sensitive detection of hepatitis E virus (HEV) using TaqMan RT-PCR and surveillance for HEV infection in Hokkaido, Japan

研究代表者

石田 勢津子 (ISHIDA, SETSUKO)

北海道立衛生研究所・感染症部ウイルスG・主幹

研究者番号：70414315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：新規に2色蛍光検出ノ型別法を開発しその有用性について検討を行った。HEV 3型と4型の型別は可能でありRT-PCR法の検出率とほぼ一致した。3型の塩基配列は系統樹上広く分散しているが、本検出法で対応可能であった。

2012年以降、検査診断薬の保険収載とともに、全国におけるE型肝炎の届出件数は急激に増加したが、北海道および札幌市において件数の変動は少なかった。2011～2013年、道南・道央地域で、互いに99～100%遺伝子配列の一致する4型ウイルス株が検出された。2009～2014年にわたって道央地域を中心に、同一と考えられる株が維持されていることが示唆された。

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). We analyzed a collection of serum samples previously confirmed HEV infection by RT-PCR. The TaqMan RT-PCR showed equivalent detection rates compared with the conventional RT-PCR.

The annual reported number of HEV infection in Japan increased twice as many since 2012 compared to those in 2004-2011 temporally coincident with the start of use of anti-HEV IgA assay. On the other hand the number of cases of HEV infection in Hokkaido has decreased gradually since 2013. Twelve strains from clinical samples those were collected between December in 2011 and December in 2013 in near regions in Hokkaido showed clustering with high similarity approximately 99-100% identity. In addition, these HEV strains were closely related to strains those were detected successively from patients in the same region in 2009.

研究分野：ウイルス学

キーワード：E型肝炎ウイルス 疫学 診断 分子疫学

1. 研究開始当初の背景

ヒトに感染する E 型肝炎ウイルス(HEV) 1～4 型のうち、日本国内で渡航歴のない症例から検出される 3 型と 4 型が土着株と考えられている(Yazaki et al., J Gen Virol, 2003)。3 型、4 型 HEV は、ヒトばかりではなくブタやイノシシ、シカなどにも感染することから、人獣共通感染症の病原体であり、食品由来感染症の原因物質ともなり得る。

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、2009～2011 年の全国都道府県別の E 型肝炎届出数において、北海道の届出数が最も多く、次いで東京都が多かった。全体的に中部から関東以北に多く関西以南では少ないという傾向は例年変わらない。人口比からみても道内での発生数は他の地域と比べて多く、北海道は E 型肝炎ウイルスの高侵淫地域と考えられてきた。

2006 年、阿部らは、国内の E 型肝炎 254 例について実態調査結果をまとめた。HEV 感染は全国でみられ、感染者は中高年(平均年齢約 50 歳)に多く男性優位であること、国内土着の遺伝子型は 3 型と 4 型であり 4 型が北海道に偏在していること、年齢と肝炎の重症度との間に相関があること、3 型よりも 4 型の方が発症・重症化しやすいこと、発生時期が無季節性であること、約 60%の症例においては感染経路が不明であること、など多くの特徴を報告している(阿部他、肝臓、2006)。

また、全国規模で実施された、過去の感染の指標となる IgG 抗体の保有状況調査においても、献血血清および健康診断受診者の血清における抗 HEV 抗体陽性率は、関東・中部以北ではそれぞれ 3～9%および 6～8%であり、近畿以西の 1～2%および 2～5%とは差異があること、また加齢により増加することが示されており(Takahashi et al., J Med Virol, 2010)、国内の地域分布における抗体保有率の偏りが見いだされていた。

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症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)。

先に我々は、E 型肝炎患者と無症状病原体保有者として届け出られたヒト、推定ウイルス保有動物であるブタとエゾシカの肝臓、さらに環境検体として下水、河川水、海水、カキについて、ウイルス保有状況の実態調査を

行った。その結果、無症状病原体保有者から検出される遺伝子型は 3 型に偏り、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 4 型が多かった。

ブタ肝臓の約 1%がウイルス陽性であり、3 型が 2 例、4 型が 2 例検出された。全てのエゾシカ肝臓はウイルス陰性であった。下水と海水各 1 検体から 3 型 HEV を検出した。

ヒトと動物、環境検体の間に遺伝子配列の類似性と地域性を見出した(Ishida et al., Arch Virol, 2012)。E 型肝炎の潜伏期間は平均 6 週間と長く感染源の追究は困難となるが、遺伝子配列の類似性をみる分子疫学的解析は、集団感染の探知や、感染源・感染経路の推測において有用である。

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ってなされるが、既に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に存在する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。我々は 2 色蛍光標識プローブによるウイルス遺伝子検出・型別法を考案し、陽性コントロールにおける検出を確認した。

ウイルス粒子濃縮法の一つとして、ウイルス抗原に特異的に反応する抗体の利用が考えられる。しかし抗血清の作成には時間がかかり、得られる抗血清の量や性状もロットごとに変動しやすいという難点がある。近年、遺伝子工学的手法を用いて、比較的短期間で目的の抗原に特異的な組換え抗体を作製する方法が報告されている。この手法を用いて HEV に高い特異性を示す組換え抗体を大量に産生することが期待される。

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、遺伝子増幅法による患者検体からのウイルス検出を行っており(Ishida et al., Jpn J Infect Dis, 2006)、より高感度の検出法を必要としている。

また、ヒト由来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性を見出し、集団感染あるいは土着株の存在が示唆されていた。

それぞれの症例について臨床症状、発症日と検体採取日などのデータを蓄積し、特に患者発生が多いといわれる北海道において、ウイルス株の分子疫学的解析結果とあわせることで、E 型肝炎の実態を把握し、診断や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。

本研究では、2 蛍光色素標識プローブによる 3 型/1,2,4 型 HEV 同時検出・型別法の確立と、実用性の検討、ヒトから検出される HEV の遺伝子型と肝炎発症の関係、遺伝子配列の類似性と地域による分布など、分子疫学的解析からの感染源・感染経路の推測、特異的組換え抗体を遺伝子工学的に作製し、微量ウイルス検出のために応用することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 新規 2 色蛍光検出/型別法の確立

2005 年～2014 年 12 月に発生届を経て検査に供された血清検体等 217 検体とウイルス遺伝子陽性ブタ検体について、新規 2 色蛍光検出/型別法による遺伝子検査を行った。各検体は RT-PCR 法により陽性、陰性を判定し、陽性検体については ORF2 領域の塩基配列から遺伝子型別を行った。新規検出・型別法の有用性について RT-PCR 法による検出結果との比較検討を行った。

(2) E 型肝炎実態調査

患者または無症状病原体保有者として届け出られたヒト由来検体について RT-PCR 法によりウイルス遺伝子を検出した。血清 200 μ l から QIAamp MinElute Virus Spin Kit を用いてウイルス RNA を抽出し、ORF1 N 末端および ORF2 をターゲットとする RT-PCR を行った。HEV ORF2 検出用プライマーで増幅された産物の遺伝子配列を決定し、分子疫学的解析を行った。

発症日と検体採取日の情報が得られた 73 検体について、遺伝子検査 (ORF1 N 末端および ORF2 をターゲットとする RT-PCR) と抗体検査 (IgA 抗体, IgM 抗体) を行った。抗体検査は市販の研究用キット (IgM) と体外診断用医薬品であるキット (IgA) により行った。

(3) E 型肝炎ウイルス精製・濃縮法の確立

大腸菌や昆虫細胞を用いて 3 型 HEV のカプシドタンパクの組換えタンパク質を発現して精製し、マウスに接種して免疫した。このマウスから脾臓を摘出して、リンパ球 B 細胞を含む細胞成分を分離し、mRNA を抽出・精製した。次に RT-PCR 法で IgG 抗体の重鎖と軽鎖の可変領域遺伝子をそれぞれ増幅し、リンカーで接続して一本鎖抗体遺伝子を作成した。さらに、この一本鎖抗体遺伝子をタンパク質発現用プラスミドに組み込んで、一本鎖抗体遺伝子の cDNA ライブラリを作製した。この cDNA ライブラリから組換え一本鎖モノクローナル抗体の全長を発現するクローンをスクリーニングした。それぞれのクローンから一本鎖抗体の組換えタンパク質を発現して精製し、ウイルス抗原と反応する組換え一本鎖モノクローナル抗体を選別した。得られた組換え一本鎖モノクローナル抗体を担体に結合させて抗体ビーズを作成

し、E 型肝炎ウイルス中空粒子を懸濁した液に混和して、HEV の精製・濃縮条件を検討した。

4. 研究成果

(1) 新規 2 色蛍光検出/型別法の確立

新規 2 色蛍光検出/型別法により、3 型と 4 型の型別は可能であり、検出率は RT-PCR 法とほぼ同等であった。3 型の遺伝子配列は系統樹上広く分散していくつかのクラスターを形成しているが、本検出法で対応可能であった。4 型において、蛍光強度が低い集団がありこれらの配列中にプローブとのミスマッチを認めたが、陽性と判定可能な数値であった。3 型においても、ブタ検体で低蛍光強度を示すものがあつたが、陽性と判定できた。低値となる集団をより容易に判定できる系の検討を予定している。本検出法は、同時に 3 型と 4 型を、十分な感度で検出し、型別できる方法と考える。

(2) E 型肝炎実態調査

2004～2014 年の全国、東京、北海道および札幌で届け出られた E 型肝炎の件数を図 1 に示した。

2014 年の全国、北海道、札幌の件数は、151、19、5 件であった。全国総届出件数の 16～45% が北海道から、そして北海道全体の 50% 程度が札幌市から届け出られていた時期もあること、人口比からみても道内での発生数は他の地域と比べて突出していることなどから、北海道は HEV の高侵淫地域と考えられてきた。

2012 年以降全国的に届出数の急増がめだつたが、これは、2011 年 10 月に抗 HEV IgA 抗体検出用診断薬が保険収載され、医療機関や民間の検査機関におけるウイルス検査が容易になったためと考えられる。これに対して、診断薬の登場以前から診断・検査体制を整えていた北海道の届出件数に大きな変動はない。全国の件数が大幅に増大したことは、看過されていた症例が掘り起こされるようになったことを意味していると思われる。

ヒト陽性検体の遺伝子配列の比較により、2009～2013 年にわたって類似性の高い 4 型

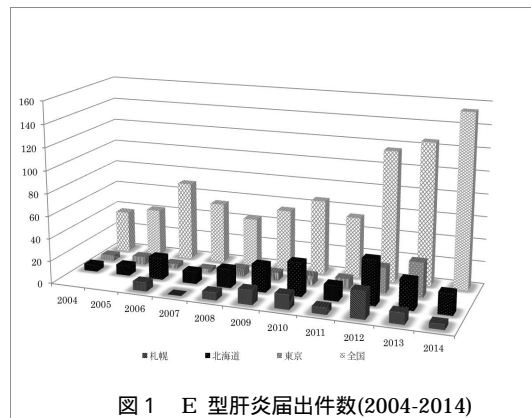


図 1 E 型肝炎届出件数(2004-2014)

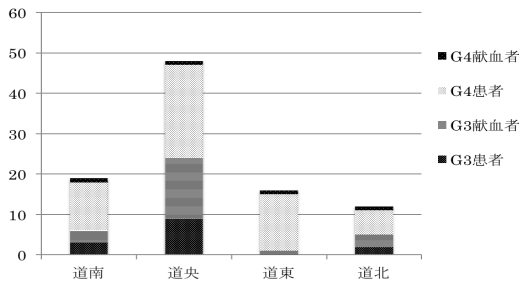


図2 献血者及びE型肝炎患者由来遺伝子型と地域分布(2004-2014)

株が道央地域を中心に継続して検出されていることが明らかとなった(道衛研所報、63、95-97、2013)。地域内における類似性から、集団感染あるいは土着株の存在が示唆され、共通の感染源の存在も考えられたが、疫学調査の結果から食中毒などを疑うには至らなかった。E型肝炎は潜伏期間が6週間程度と長い。渡航歴調査やウイルスを保有する可能性のある食品の喫食調査も行われているが、感染原因の特定は難しい状況にある。ウイルス遺伝子の分子疫学的解析による相同性の確認と、喫食調査など疫学情報による症例間の関連性追跡、感染源調査を継続することが重要と考える。

図2に2004～2014年の北海道内において、献血者と患者から検出された遺伝子型を地域別に示した。届け出があっても検体を入手できない場合もあるので単純に比較はできないが、この2、3年は特に道南、道央に発生の偏りが見られた。

4型HEVはほとんどが患者由来で重症例もあり、3型に比べて発症・重症化率が高く、北海道では4型の割合が高いとする従来の報告と一致していた。4型は系統樹において、劇症肝炎症例も含んだ一つの大きなクラスターを形成し、このクラスター内の配列は96%の相同性を示した。

3型HEVは、人口の集中する道央地域において献血者からの検出例も際立って多く、無症状あるいは軽症の感染者が相当数潜在している可能性を示した。また、系統樹上いくつかのクラスターを作り、複数の感染源を示唆する結果であった。

発症日と検体採取日の情報が得られた73検体について、病日と、RT-PCR法による遺伝子検出、IgA抗体価、IgM抗体価による判定結果を比較検討したところ、発症日から4週まではRT-PCR法でほぼ陽性となり、この期間にあっては遺伝子検出および分子疫学的解析が可能なが示された。2種類の抗HEV抗体は同様な挙動を示し、第40病日まで継続して検出できた。

これらの結果から、発症後4週を過ぎた症例については抗体検査による診断が有効と思われる。

(3) E型肝炎ウイルス精製・濃縮法の確立 今回構築した組換え一本鎖抗体遺伝子 357

クローンをスクリーニングした結果、ウイルス抗原に反応する組換え一本鎖モノクローナル抗体を1クローン得ることができた。この組換え一本鎖モノクローナル抗体を結合したビーズとウイルス中空粒子の懸濁液を混合して37℃で1時間静置した後、遠心してビーズを回収することで、ウイルス粒子を精製できることをウエスタンブロット法で確認した。ただ、現状では抗体ビーズを用時調製する必要があるなどの改善点があるため、応用・実用化のためには更なる検討が必要と考えられる。

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10件)

Miyoshi M, Komagome R, Ishida S, Nagano H, Okano M
Epidemiology and laboratory diagnoses of rubella in Hokkaido district during the nationwide outbreak in Japan, 2011-2013, Jpn J of Infect Dis, 査読有, 67(6), 2014, 479-484

<http://doi.org/10.7883/yoken.67.479>

Miyoshi M, Komagome R, Ishida S, Kikuchi M, Sato H, Ito H, Nagano H, Okano M
Recent progress toward measles elimination in Hokkaido, Japan, during 2011-2012, Jpn J Infect Dis, 査読有, 67(4), 2014, 311-314

<http://doi.org/10.7883/yoken.67.311>

吉澄志磨, 後藤明子, 石田勢津子, 山口博美

北海道におけるノロウイルスの分子疫学病原微生物検出情報, 査読なし
35(7), 2014, p165

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/allarticle/surveillance/2297-iasr/related-articles/related-articles-413/4799-dj4132.htm>

Yamano K, Miyoshi M, Goto A, Kawase S
Time course of the antibody response in humans compared with rats experimentally infected with hepatic alveolar echinococcosis, J Helminthol, 査読有, 88, 2014, 24-31

doi: 10.1017/S0022149X12000685

石田勢津子, 吉澄志磨, 後藤明子, 長野秀樹

E型肝炎の現況と北海道におけるウイルス保有状況調査, 北海道公衆衛生学雑誌, 査読有, 27(2), 2013, 45-51

http://hpha.web.fc2.com/gakuzassi/pdf/g_78.pdf

Miyoshi M, Komagome R, Ishida S, Nagano H, Takahashi K, Okano M

Genomic characterization of echovirus 6 causing aseptic meningitis in Hokkaido,

Japan: a novel cluster in non-structural protein coding region of human enterovirus B, Arch Virol, 査読有,158(4),2013, 775-784
doi: 10.1007/s00705-012-1535-0

Goto A, Kouguchi H, Yamano K, Sawada Y
Molecular cloning and characterization of major vault protein of Echinococcus Multilocularis, Exp Parasitol, 査読有,134, 2013,102-108
doi: 10.1016/j.exppara.2013.02.015

石田勢津子, 吉澄志磨, 後藤明子, 長野秀樹

道央地域における E 型肝炎ウイルス同一系統株による連続した事例について,北海道立衛生研究所報, 査読有,63,2013,95-97

http://www.iph.pref.hokkaido.jp/Kankobutsu/Shoho/annual63/20_s03.pdf

Ishida S, Yoshizumi S, Ikeda T, Miyoshi M, Goto A, Matsubayashi K, Ikeda H
Detection and molecular characterization of hepatitis E virus in clinical, environmental and putative animal sources, Arch Virol, 査読有,157,2012,2363-2368
doi: 10.1007/s00705-012-1422-8

Miyoshi M, Komagome R, Nagano H 他 11 名
An isolated incidence of rubella outbreak at a workplace in Hokkaido, Japan, Jpn J Infect Dis, 査読有,65(1),2012, 94-97
<http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22274168>

〔学会発表〕(計 2 件)

石田勢津子, 4 類感染症届出からみた道内 E 型肝炎の現況、及び環境中の HEV 検出について,北海道 E 型肝炎研究会第 7 回学術集会, 2013 年 8 月 31 日,札幌コンベンションセンター(札幌市)

駒込理佳, 三好正浩, 長野秀樹, 石田勢津子, 岡野素彦, オセルタミビル耐性 H3N2 インフルエンザウイルスの迅速検出系の構築, 第 61 回ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月, 神戸国際会議場(神戸市)

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・ウイルスグループ主幹
研究者番号: 70414315

(2)研究分担者

吉澄 志磨 (YOSHIZUMI SHIMA)
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: 90414317

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

長野 秀樹 (NAGANO HIDEKI)

北海道立衛生研究所企画総務部・企画情報グループ主幹

研究者番号: 30189146

(3)連携研究者

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

駒込 理佳 (KOMAGOME RIKA)

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: 40414312

(4)研究協力者

松林 圭二 (MATSUBAYASHI KEIJI)

北海道ブロック血液センター品質部

研究者番号: 90533323