

Tran HT-T, Ushijima H, Win KM, Luengrojanakul P, Krishna PS, Gu H, Smirnov AV, Taltavull TC, Sata T, Abe K	High prevalence of the hepatitis B virus pre-S mutant in countries where it is endemic and its relationship with genotypes and chronicity.	J. Clin. Microbiol.	41	5449- 5455	2003
Tran HT-T, Ushijima H, Quang VX, Phuong N, Li T-C, Hayashi S, Lien TX Abe K	Prevalence of hepatitis virus types B through E and genotypic distribution of HBV and HCV in Ho Chi Minh City, Vietnam.	Hepatol. Res.	26	275-280	2000
李 天成、宮村達男、 武田直和	日本における E 型肝炎	Med. Practice	21	441-444	2004
李 天成、宮村達男、 武田直和	E 型肝炎ウイルス感染と増 殖のメカニズム	Mebio	20	63-68	2003
李 天成、武田直和、 宮村達男	E 型肝炎ウイルス	血液フロン ティア	13	605-612	2003
武田直和	E 型肝炎	アニムス	29	37-41	2003
武田直和	E 型肝炎の基礎知識	保健婦雑誌	59	372-376	2003
武田直和	E 型肝炎騒動	インフェク ションコン トロール	12	1	2003
李 天成、武田直和、 宮村達男	E 型肝炎ウイルス粒子と抗 体検出系	化学療法の 領域	19	327-333	2003
李 天成、武田直和、 宮村達男	E 型肝炎	日本臨床	61	640-646	2003

20030110

以降 P.65－P.129までは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、P.61－P.63「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

E 型肝炎検査マニュアル

1. 病原体分離

E 型肝炎ウイルスが増殖可能な培養細胞系はない。RT-PCR によって HEV 遺伝子の検出を行う。増幅領域は図を参照する。

①器具、装置、試薬

マイクロピペット

マイクロチップ

マイクロチューブ

低速遠心機

遺伝子増幅装置

1st PCR センスプライマー-HEV-F1 : 5'-TAYCGHAAAYCAAGGHTGGCG-3'

1st PCR アンチセンスプライマー-HEV-R2 : 5'-TGYTGGTTRTCRTARTCCTG-3'

2nd PCR センスプライマー-HEV-F2 : 5'-GGBGTBGCNGAGGAGGAGGC-3'

2nd PCR アンチセンスプライマー-HEV-R1 : 5'-CGACGAAATYAATTCTGTCG-3'

逆転写酵素

Taq DNA ポリメラーゼ

アガロースゲル電気泳動装置

トランスイルミネータ

RNA 抽出キット

②検体の採取と試料の調製

- ・ 患者の発症直後の血清を採取する。
- ・ RNA 抽出キットの説明書に従い、100 μ l の血清から RNA を抽出する。
- ・ RNA を 10 μ l の DW に溶解する。

③検査方法

cDNA 合成

10 μ l の RNA を鋳型に、oligo (dT) 12-18 プライマーかアンチセンスプライマー-HEV-R2 を用いて cDNA を合成する。

1st PCR

センスプライマー-HEV-F1、アンチセンスプライマー-HEV-R2 を用い、以下の条件で PCR を

行う。545 ベースが増幅されてくる。

96℃, 1分

(95℃, 30秒/55℃, 45秒/72℃, 1分) x 30サイクル

72℃, 7分, その後4℃

2nd PCR

センスプライマー-HEV-F2、アンチセンスプライマー-HEV-R1 を使い、1st PCR と同じ条件で PCR を行う。338 ベースが増幅されてくる。

増幅産物の解析

アガロースゲル電気泳動で増幅産物を分離する。必要に応じ、クローニング、塩基配列決定、分子系統解析を行う。

2. 抗体検出 EIA による E 型肝炎の診断

E 型肝炎を発症した時点で、E 型肝炎ウイルスに対する特異的な血中 IgM 抗体が大量に誘導されている。診断にはこの IgM 抗体の検出が迅速、かつ最も確実な方法である。用いる抗原は ORF2 の N 末端から 111 アミノ酸を欠失させたフラグメントを組換えバキュロウイルスで発現することによって得られる中空粒子を用いる。

①器具および試薬

1. 96 穴平底プレート : IMMULON 2 (Dynatech Laboratories, Inc. USA. catalog# 011-010-3455)、あるいは MaxiSorp (Nalge NUNC International, Denmark. Catalog#439454) を用いる。
2. コーティング用緩衝液: [Sigma C-3041] で carbonate-bicarbonate 緩衝液 (pH9.6) を調製する。
3. PBS-T : 0.05% Tween20 を含む 10mM PBS を調製する。
4. 1%SM/PBS-T : 1% skim milk (DIFCO catalog#0032-17-3) を含む PBS-T を調製する。
5. 5%SM/PBS : 5% skim milk を含む 10mM PBS を調製する。
6. OPD 用緩衝液: [Sigma P-4809] で 0.05M phosphate-citrate 緩衝液 (pH5.0) を調製する。
7. OPD 溶液 : [Sigma P-3804] を OPD 用緩衝液に 0.4mg/ml となるように溶解する。

②方法

1. 中空粒子をコーティング用緩衝液で 1 µg/ml となるように希釈する。96 穴平底プレ

ートの各ウェルに 100 μ l 加え、4℃ に一夜置く。

2. 各ウェルの液を除き、150 μ l の 5%SM/PBS を加える。37℃ に 1 時間、あるいは 4℃ に一夜置く。
3. 各ウェルの液を除き、PBS-T で 6 回洗浄する。
4. 患者血清を 1%SM/PBS-T で 1:200 に希釈し、100 μ l 加える。37℃ に 1 時間置く。
5. 各ウェルの液を除き、PBS-T で 6 回洗浄する。
6. 各ウェルに HRP-conjugated goat anti-human IgM ([Cappel catalog#55255] を 1%SM/PBS-T で 1:10,000 に希釈したもの) を 100 μ l 加える。37℃ に 1 時間置く。
7. 各ウェルの液を除き、PBS-T で 6 回洗浄する。
8. OPD 溶液に 30%過酸化水素水を 0.04% (v/v) 加える (OPD 溶液 12.5 ml に対して 30% 過酸化水素水を 5 μ l 加える)。各ウェルに 100 μ l 加え、室温に 30 分置く。
9. 4N 硫酸を各ウェルに 50 μ l 加え、反応を停止する。
10. 492nm の吸光度を測定する。

③判定

OD 値が 0.2 以上の検体を陽性とする。

3. 抗原検出 EIA による E 型肝炎の診断

①試薬および器具

1. 96 穴平底プレート : IMMULON 2, Dynatech Laboratories, Inc. USA. catalog# 011-010-3455、あるいは MaxiSorp, (Nalge NUNC International, Denmark. Catalog#439454) を用いる。
2. コーティング用緩衝液: [Sigma C-3041] で carbonate-bicarbonate 緩衝液 (pH9.6) を調製する。
3. PBS-T : 0.05% Tween20 を含む 10mM PBS を調製する。
4. 1%SM/PBS-T : 1% skim milk (DIFCO catalog#0032-17-3) を含む PBS-T を調製する。
5. 5%SM/PBS : 5% skim milk を含む 10mM PBS を調製する。
6. OPD 用緩衝液 : [Sigma P-4809] で 0.05M phosphate-citrate 緩衝液 (pH5.0) を調製する。
7. OPD 溶液 : [Sigma P-3804] を OPD 用緩衝液に 0.4mg/ml となるように溶解する。

②方法

1. ウサギ血清および組換え中空粒子免疫ウサギ血清をコーティング用緩衝液で 1:10,000 に希釈する。96 穴平底プレートの各ウェルに 100 μ l 加え、4℃ に一夜置く。

2. 各ウェルの液を除き、150 μ l の 5%SM/PBS を加える。37°C に 2 時間、あるいは 4°C に一夜置く。
3. 各ウェルの液を除き、PBS-T で 6 回洗浄する。
4. 10% 患者便材料の遠心上清を 1%SM/PBS-T で適当に希釈し、100 μ l 加える。37°C に 1 時間置く。
5. 各ウェルの液を除き、PBS-T で 6 回洗浄する。
6. 組換え中空粒子免疫モルモット血清を 1%SM/PBS-T で 1:10,000 に希釈し、100 μ l 加える。37°C に 1 時間置く。
7. 各ウェルの液を除き、PBS-T で 6 回洗浄する。
8. 各ウェルに HRP-conjugated rabbit anti-guinea pig IgG ([Cappel catalog#57001] を 1%SM/PBS-T で 1:2,000 に希釈したものを) 100 μ l 加える。37°C に 1 時間置く。
9. 各ウェルの液を除き、PBS-T で 6 回洗浄する。
10. OPD 溶液に 30%過酸化水素水を 0.04% (v/v) 加える (OPD 溶液 12.5 ml に対して 30% 過酸化水素水を 5 μ l 加える)。各ウェルに 100 μ l 加え、室温に 30 分置く。
11. 4N 硫酸を各ウェルに 50 μ l 加え、反応を停止する。
12. 492nm の吸光度を測定する。

③判定

検体の OD 値が 0.2= or 小、かつ、組換え中空粒子免疫ウサギ血清での OD 値とウサギブレ血清での OD 値の比が 2.0= or 小の場合、陽性とする。

(4) 引用文献

1. Li T-C, Shinzawa H, Ishibashi M, Sata M, Kisoon K, Mast EE, Miyamura T, Takeda N: A Empty Virus-like Particle-based Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Antibodies to Hepatitis E Virus. *J. Med. Virol.* 2000;62: 327-333.
2. Xing L, Kato K, Li T, Takeda N, Miyamura T, Hammer L, Cheng H: Self-assembled recombinant hepatitis E virus particle is a T=1 dual-domain capsid presenting native virus epitopes. *Virology* 1999;265: 34-45.
3. Li TC, Yamakawa Y, Suzuki K, Tatsumi M, Razak MA, Uchida T, Takeda N, Miyamura T: Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J Virol* 1997;71: 7207-13.

(5) 行政検査依頼先

武田 直和

国立感染症研究所ウイルス第二部第一室

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1

電話 042-561-0771 内線 357

ファックス 042-561-4729

メール ntakeda@nih.go.jp

(6) 執筆者一覧

李 天成 国立感染症研究所ウイルス第二部

武田 直和 国立感染症研究所ウイルス第二部

RT-PCRによるHEV遺伝子の増幅

