

Fig. 1 Standard HBsAg preparations

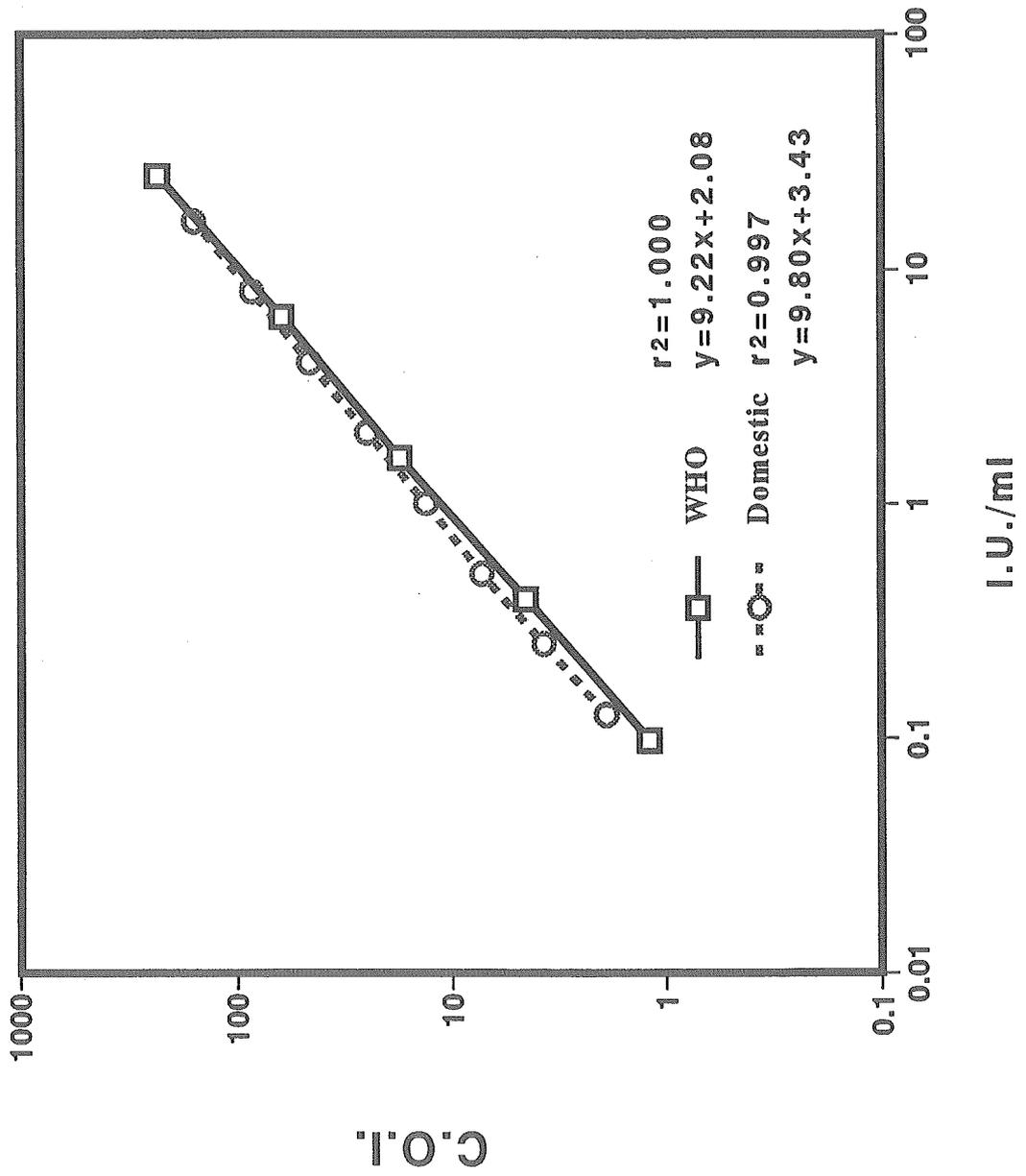


表 1 : 3種類の測定キットを用いた"ng"と"IU"の比較

Panel	member	HBsAg conc.	A社	B社	C社
FDA HBsAg	1201	1.0 ng/ml	0.13	3.6	1.87
Lot-Release Panel #12	1202	5.0-6.0	1.12	9.9	5.51
	1203	0	0.02	0.1	0.06
	1204	0.04	0.02	0.1	0.06
	1205	0.5	0.12	1.3	0.71
	1206	0	0.02	0.1	0.06
	1207	2.5-3.0	0.55	5.8	3.18
	1208	7.0-8.0	0.91	11.1	6.01
	1209	0.02	0.02	0.1	0.06
	1210	0.9	0.15	1.7	0.93
Japanese National Standard	#1	16 IU/ml	13.88	138.4	76.14
(serially diluted samples)	#2	8	6.84	75.3	41.07
	#3	4	4.03	45.1	24.57
	#4	2	2.08	26.0	14.04
	#5	1	1.05	13.6	7.33
	#6	0.5	0.55	7.4	3.98
	#7	0.25	0.29	3.7	2.00
	#8	0.125	0.15	1.9	1.03

注：測定値はすべてC.O.I. (Cut off Index)

表 2 : 3種類の測定キットを用いた"ng"と"IU"の比較 (まとめ)

Kit	Samples	Y=aX+b	r <sup>2</sup>	factor (1 ng/ml)
A社 (2step CLIA)	FDA HBsAg Lot-release panel #12 Japanese HBsAg national standard	Y=0.141X+0.070 Y=0.856X+0.198	0.8536 0.9982	1 0.165 IU/ml
B社 (2step CLEIA)	FDA HBsAg Lot-release panel #12 Japanese HBsAg national standard	Y=1.417X+1.281 Y=8.524X+4.962	0.9567 0.9938	1 0.166 IU/ml
C社 (2step CLIA)	FDA HBsAg Lot-release panel #12 Japanese HBsAg national standard	Y=2.527X+2.222 Y=15.394X+4.075	0.9052 0.9987	1 0.164 IU/ml

approx. conversion: 6 ng/ml = 1 IU/ml

分担研究報告書

## HEV 検出系の確立と疫学的解析

分担研究者： 池田久實（北海道赤十字血液センター 所長）  
研究協力者： 松林圭二，坂田秀勝，徳島恵里奈，佐藤進一郎，加藤俊明  
（北海道赤十字血液センター 検査部）

### 研究要旨

HEV 感染の実態は依然として不明な部分が多く疫学調査の実施と感染経路の解明が急務である。このためには大量検体処理が可能な HEV の高感度検出法の確立が重要であり、さらにウイルス動態を把握するためには定量できることが望ましい。今回構築した Real-time RT-PCR 法による HEV-RNA の検出・定量系は、ほぼすべての HEV 株に特異的な共通配列を標的としており、最小検出感度は約 10 copies/反応で定量可能範囲は  $10^1 \sim 10^9$  copies/反応（8 logs）であった（相関係数:0.999）。この方法を用いて北海道内の ALT 高値献血者 64 名を対象に HEV-RNA 検査を行ったところ、9 名（14.1%）が陽性となり、肝機能高値異常献血者の中に HEV 陽性者が少なからず存在することが明らかとなった。またその HEV-RNA タイターは  $3.8 \times 10^3 \sim 8.3 \times 10^6$  copies/mL と広範囲に分布しており ALT 値に相関していた。

今回開発した HEV-RNA の検出・定量法は、感度・特異性・定量性に優れ、大量検体処理が可能であることから、HEV の研究に有用であると考えられた。また献血者中にも HEV 陽性者が確認されたことから、今後、献血者における HEV 感染の実態調査を行う必要がある。

### A. 研究目的

近年、HEV は原因不明の急性型・劇症型肝炎症例の重要な原因ウイルスとして認識されるようになり、北海道においては輸血後 E 型肝炎と考えられる症例も確認されている。しかしながら HEV 感染の実態は未だ不明な部分が多く、疫学調査を行うとともに感染経路を解明することが急務である。このためには HEV の高感度検出法の確立が重要であり、さらにウイルス動態、臨床状態を把握するためには定量できることが望ましい。そこで、Real-time RT-PCR 法による HEV-RNA の検出・定量法の開発を行った。

### B. 研究方法

#### 1. Real-time RT-PCR 用のプライマー・プローブのデザイン

これまで全塩基配列が知られている HEV 株 39 種類（Genotype I 18 株、Genotype II 1 株、Genotype III 11 株、Genotype IV 9 株）に共通なゲノム領域を検索し、これをターゲットとするプライマー・プローブセ

ットを ABI Primer Express によりデザインし、合成した。

#### 2. HEV-RNA の標準品の合成・定量

HEV（Genotype IV）陽性献血者血漿から抽出した RNA を鋳型として HEV ゲノム ORF1~2/3 領域（約 600 nt）を RT-PCR 法で増幅させ TA cloning によりプラスミドに導入した。これを鋳型として in vitro 転写（RNA 合成）を行い、精製後 OD<sub>260nm</sub> 吸光度測定によって RNA 濃度を求めた。これをもとに希釈系列（ $10^1 \sim 10^9$  copies/20 $\mu$ L）を作製し、Real-time RT-PCR 反応を行った。この初期既知量の対数値に対して、目的遺伝子の PCR 反応生成物量が一定値に到達するのに必要な PCR のサイクル数（Ct）をプロットし、HEV-RNA の定量用スタンダードカーブを作成した。

#### 3. ALT 高値献血者の HEV-RNA 検出・定量

2000 年 4 月～2003 年 9 月（3.5 年）の期間の北海道赤十字血液センター管内で献血した 1,213,998 名中、ALT 値が 500 IU/L 以上

を示した献血者血漿検体 64 例（男 46 名、女 18 名）を対象に HEV-RNA の検出・定量を行った。100  $\mu$ L の検体から抽出した DNA/RNA サンプル全量を用いて、合成 HEV-RNA 標準品とともに定量 RT-PCR Kit を用いて反応液 50  $\mu$ L で Real-time RT-PCR を行った。フォワードプライマー、リバースプライマー各 400nM、TaqMan プローブ 200nM、RNA サンプル 20 $\mu$ L を加え、50°C 30min、95°C 15min (RT 反応) に引き続き、94°C 15sec、62°C 1min (50 cycles) の反応条件で ABI PRISM 7700 SDS を用いて増幅・検出を行った。

### C. 研究結果

#### 1. Real-time RT-PCR 用のプライマー・プローブのデザイン

一般的な Primer Express の検索条件では既知の全 HEV 株を網羅するプライマー・プローブセットの設定は困難であった。このため、検索条件を緩めるとともに複数のプライマー・プローブセットを実際に合成して使用可能かどうか検討した結果、最終的に Forward primer (sense) 5'-CGGCGGTG-GTTTCTGG-3'、TaqMan probe (sense) 5'-FAM-TGACMGGGYTGATTCTCAGCC-CTTC -TAMRA-3'、Reverse primer (anti-sense) 5'-GGATATAATTAGGTTGGTTGG-G-3'の配列を得た (Fig.1)。

#### 2. HEV-RNA の標準品の合成・定量

589 塩基の HEV ゲノム配列を含む組み換えプラスミドを構築できた。これを鋳型として *in vitro* 転写による RNA 合成を行った結果、1014.4 $\mu$ g/mL (2.7x 10<sup>15</sup> copies/mL) の RNA が得られた。OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub> 値は 2.000 であった。この定量値をもとに作製した 10<sup>1</sup>~10<sup>9</sup> copies/反応の希釈系列について、Real-time RT-PCR 反応を行い、Ct 値と HEV-RNA 量の関係を Fig.2 に示した。

#### 3. ALT 高値献血者の HEV-RNA 検出・定量

ALT 高値異常献血者検体 64 例中 9 例 (14.1%) に HEV-RNA が確認された。陽性サンプル中の HEV-RNA 量は 3.8 × 10<sup>3</sup>~8.3 × 10<sup>6</sup> copies/mL と測定された。

### D. 考察

従来 HEV 感染は輸入感染症との認識が強かったが、日本固有株の発見を機に原因不明の肝炎患者から相次いで HEV が確認され、

現在、HEV は急性・劇症肝炎の重要な原因ウイルスのひとつと認識されつつある。北海道では輸血を介して感染したと考えられる症例も経験した。またブタや野生動物からも高頻度に HEV が確認され、シカ肉からの直接感染例も確認されたことから人獣共通感染症としても注目されている。しかしながら HEV 感染の実態は不明な部分も多く、疫学調査を実施するとともに感染経路を解明することが急務である。このためには大量検体を処理可能な HEV の高感度検出系の確立が必要である。

今回構築した Real-time RT-PCR 法による HEV-RNA 検出系は全 Genotype の HEV において高度に保存されている ORF2/3 の一領域をターゲットとしており、全塩基配列が報告されている HEV 株 39 株のほぼすべてを検出可能であると考えられる。また合成 HEV-RNA 標準品を基にした検出感度は約 10 copies/反応と高かった。同標準品をスタンダードとした場合、10<sup>1</sup>~10<sup>9</sup> copies/反応 (8 logs) において良好な直線性 (相関係数:0.999) を示し定量性に優れていると考えられた。また増幅・検出に要する時間は 3 時間弱と従来の Nested RT-PCR—電気泳動による RNA 検出法に比べて大幅に短縮されており、さらにワンステップ法であるため用手時間はほとんどなく、大量検体を容易に処理することが可能である。

この方法を用いて北海道内の ALT 高値異常献血者 64 名における HEV-RNA 陽性率を調査した結果、9 名 (14.1%) と高頻度であることが判明し、9 割が男性であった。同じ検体群を対象に HAV-RNA、HBV-DNA、HCV-RNA の陽性率も調べたが、それぞれ 1 例 (1.6%)、11 例 (17.2%)、7 例 (10.9%) であり、HEV は HBV に次いで高い陽性率を示した。これより HEV がこれまで原因不明とされていた ALT 高値献血者の重要な原因ウイルスであることが示唆された。また、理由は不明だが、今回調査した期間においては 2001 年に陽性者が多く見出され、発生時期に偏りがあった。HEV 陽性検体の HEV-RNA タイターは 3.8 × 10<sup>3</sup>~8.3 × 10<sup>6</sup> copies/mL に分布し、ALT 値の上昇とそれによる血中ウイルス量の増加を反映していると考えられた。

以上の結果より、本法は HEV の疫学調査をはじめ、ウイルス動態や増殖メカニズムなどの基礎研究、治療のモニタリングに

有用であると考えられた。今後、献血者におけるHEV疫学調査を実施する必要がある。

E. 結論

Real-time RT-PCR 法による HEV-RNA の検出・定量系を確立し、これを用いて北海道内 ALT 高値異常献血者を対象に調査した

ところ高い HEV 陽性率が確認された。

F. 研究発表

該当なし

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

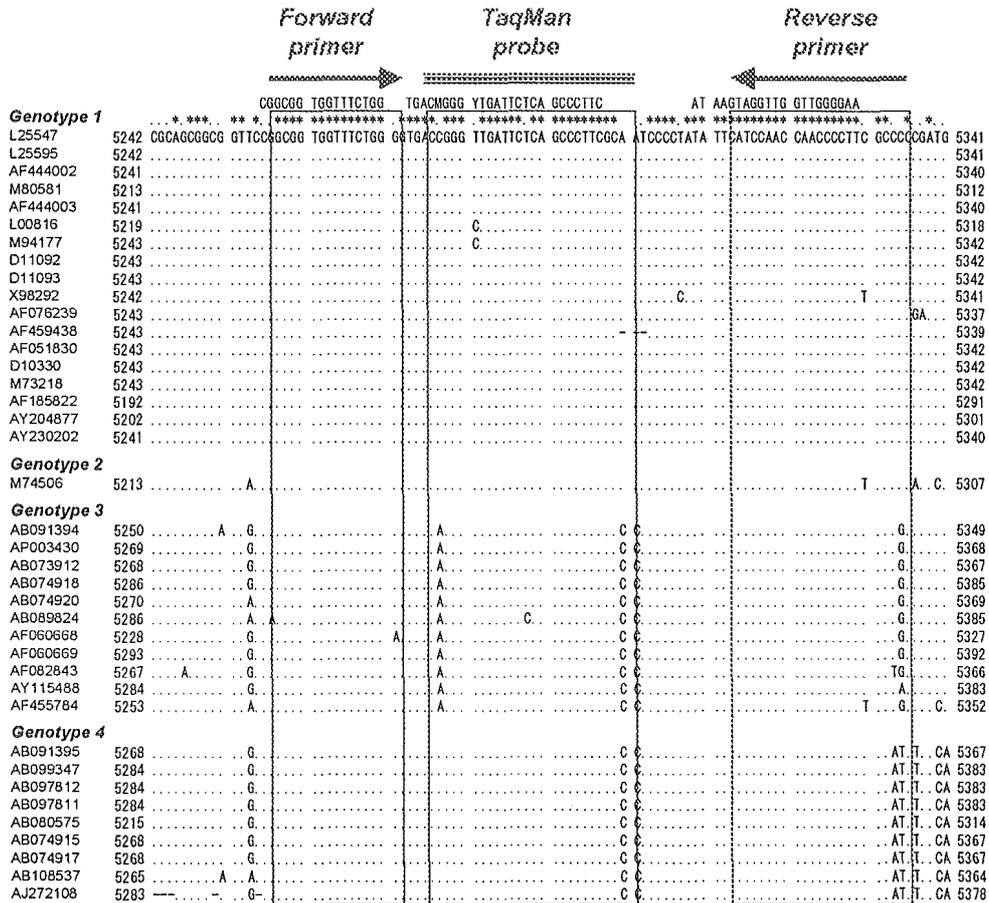


Fig 1. HEV-RNA 検出用プライマー・プローブの塩基配列

左端から各株の Accession No.、塩基開始位置、塩基配列、塩基終了位置を示す。L25547 株の塩基配列と相同であればドット (.), 異なればその塩基、欠失していればハイフオン (-) で示す。L25547 株塩基配列の上段は全株間における塩基の相同性を表しており、該当塩基が全株において一致していれば\*, そうでなければドット (.) で示している。最上段に今回使用したプライマー・プローブ配列を示す。M: A or C, Y: T or C.

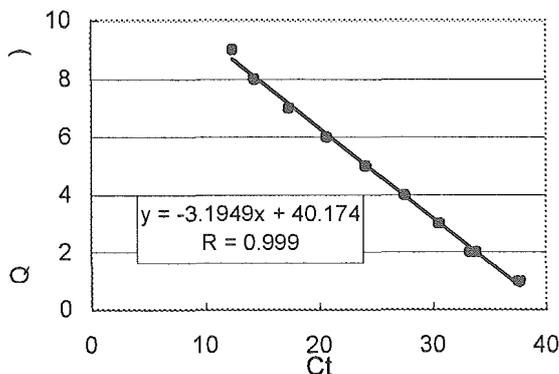


Fig 2. 合成 HEV-RNA 標準品の標準曲線

Table 1 HEV-RNA 陽性献血者の内訳

No.	Date (y.m.)	Age (yr)	Sex	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	RNA (cp/mL)
1	2000.12	29	M	767	522	3.8 E+5
2	2001.03	30	M	506	235	9.8 E+4
3	2001.04	40	M	1,470	1,579	8.3 E+6
4	2001.07	47	M	713	338	1.2 E+5
5	2001.10	62	M	2,080	1,355	1.9 E+6
6	2001.10	39	M	641	410	1.3 E+5
7	2001.11	48	M	740	282	3.8 E+3
8	2003.02	39	F	578	548	1.5 E+6
9	2003.07	35	M	575	245	1.1 E+5

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
岡田義昭、 奥山堅司、 水沢左衛 子、他。	血漿分画製剤の安 全性	山本保博 監修	血漿分画製剤 の安全性；臨 床マニュアル アルブミン	メディカ ルレビュー社	東京	2003	191

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
なし					

20031267

以降 P26－P31までは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので  
P25「研究成果の刊行に関する一覧」をご参照ください