

経口肝炎ウイルスの濃縮法の検討と環境調査

研究代表者 鈴木亮介 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長
研究協力者 李 天成 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官
研究協力者 清原知子 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官
研究協力者 杉山隆一 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官
研究協力者 小林さくら 国立感染症研究所ウイルス第二部 協力研究員
研究協力者 小宮智義 北陸大学医療保健学部 教授
研究協力者 阿部冬樹 静岡県環境衛生科学研究所

研究要旨

昨年度に条件検討を行った抗 HEV ウサギ血清およびパンソルビンを用いた HEV 濃縮法を用い、E 型肝炎の原因食材と疑われるイノシシ肉から HEV の検出を試みたが、検出には至らなかった。捕獲された野生イノシシ 86 頭の血清から HEV IgG 抗体および HEV ゲノムの検出を試みた。抗体陽性の個体はあったものの、ウイルス遺伝子は検出されなかった。便検体からの検出方法について 2 種類のキットを用いた検討を行った。A 型肝炎ウイルスについてもウイルスの濃縮が可能な抗血清を得るために、異なる免疫プロトコルでウサギを免疫し、HAV に対して感染中和活性を持つ血清を作製した。

A. 研究目的

ウイルス性食中毒の原因となるウイルスの中で、肝機能障害の原因として A 型肝炎ウイルスおよび E 型肝炎ウイルスの感染が疑われる。いずれもウイルスに汚染された水や食物を介した経口感染により伝播する。E 型肝炎は、かつては発展途上国で常時散发的に発生する、衛生環境の整っていない地域の疾患と考えられていた。しかしながら、現在ではブタやイノシシなどの動物にも感染する人獣共通感染症であることが判明し、先進国内での主な感染源と考えられている。日本の E 型肝炎報告者数は 2012 年

以降、年々増加している。2020 年は新型コロナウイルスの流行による行動様式の変化に伴い、多くの感染症の報告数が減少したが、E 型肝炎の報告数は例年と変わらなかった事は興味深い。加熱不十分の肉の喫食が主な原因と考えられているものの、原因が明らかでないケースも多い。

ヒト検体から同定されたウイルスの遺伝子情報は、地方衛生研究所と国立感染症研究所の連携により蓄積されているものの、食中毒の原因と疑われる食材からのウイルスの検出や同定は、食材を汚染しているウイルス量が少ない事や、食品に含まれる夾

雑物が検出を妨げる事、また潜伏期間が長いことなどから困難であり、原因食材や汚染経路が特定されることは稀である。そのため効果的な対策を取るための知見も不足している。

昨年度は、食中毒原因ウイルスの1つであるE型肝炎ウイルスについて、高感度検出法の確立のための抗体を用いたE型肝炎ウイルスの濃縮条件の検討を行なった。今年度はこの方法を用い、原因食材と疑われたイノシシ肉からのHEV検出を行った。また捕獲された野生イノシシ86頭の血清からHEV IgG抗体およびHEVゲノムの検出を試みた。さらに便検体からの検出方法について2種類のキットを用いた検討を行った。A型肝炎ウイルスを濃縮するための抗血清を作製した。

B. 研究方法

積極的疫学調査によりE型肝炎の原因として疑われたイノシシ肉が得られた。この肉汁約25mLから、抗HEVウサギ血清およびパンソルビンを用い、濃縮操作を行った。濃縮サンプルからRNAを抽出し、リアルタイムPCRを行った。

イノシシ86頭の血清について、HEV IgGおよびHEVゲノムの測定を行った。

便検体からのHEV遺伝子抽出方法について、使用するキットによって抽出効率に違いがあるかどうかを確認した。

A型肝炎ウイルスの濃縮が可能な抗血清を得るために、異なる免疫プロトコルでウサギを免疫し、血清の感染中和活性を評価した。

C. 研究結果

E型肝炎の原因食材と疑われるイノシシ肉の肉汁に界面活性剤存在下で抗HEVウサギ血清およびパンソルビンを加えてHEVの濃縮操作を行い、RNAを抽出し、リアルタイムPCRを行ったが、ウイルス核酸は検出されなかった。

2017-2019年に捕獲されたイノシシ86頭の血清のHEV IgGを測定した。22頭(26%)が陽性で、性別での陽性率はオスの31%に対し、メスは17%であった。また体重20kg未満の幼獣で30%、成獣の24%が陽性であり、抗体価の高い個体は幼獣に多く認められた。一方でHEV核酸の検出も試みたが、ウイルス核酸は検出されなかった。

便検体からの検出方法には、使用するキットによって抽出効率に違いがあるという報告(分担研究者 藤井克樹の報告書参照)があったため、HEV患者の便検体24例から、Direct-zol RNA kit (ZYMO Research)とQIAamp Viral RNA kit (QIAGEN)を用いて核酸を抽出し、リアルタイムPCRを行った。今回用いた検体については両キットの抽出によるコピー数は高い相関が認められた。

異なる免疫プロトコルでウサギにHAV抗原を免疫し、血清の感染中和活性を評価した。一方のプロトコルで、高い中和活性が認められた。

D. 考察

E型肝炎の原因食材と疑われるイノシシ肉の肉汁より抗HEVウサギ血清およびパンソルビンを用い、濃縮操作を行った。RNA抽出し、1 stepリアルタイムRT-PCRを行ったが、ウイルス核酸は検出されなかった。今回の事例だけでは、濃縮が適切に

行われなかったのか、食材中のウイルス量が十分でなかったのかについて明らかでないため、抽出法の可否を検証するには、さらに多くの事例で検証する必要がある。

イノシシ 86 頭の血清のうち、22 頭(26%) が HEV IgG 陽性であった。したがって、過去に一過性に感染するケースは少なくないと考えられる。一方で HEV 核酸は検出されなかった。野生動物において HEV がどのように伝播しているのか、今後も調査が必要と思われる。

異なる免疫プロトコルでウサギに HAV 抗原を免疫したところ、一方の個体で HAV に対する感染中和活性を示した。今後、この血清を用いて感染性のウイルスが濃縮されるかどうかを、次年度に検討する。

E. 結論

昨年度に条件検討を行った HEV 濃縮法を用い、原因食材と疑われるイノシシ肉から HEV の検出を試みたが、検出には至らなかった。引き続き疑い食材を集め、濃縮法の検証を行う必要がある。イノシシ 86 頭の血清から HEV IgG 抗体および HEV ゲノムの検出を試みたが、ウイルス遺伝子は検出されなかった。便検体からの検出方法の検討を行い、現行の抽出法に問題はないと考えられた。A 型肝炎ウイルスについて濃縮が可能な抗血清を得るためにウサギに免疫し、HAV に対して感染中和活性を持つ血清を得た。今後の食中毒原因ウイルスの

感染制御に向け、検査法をさらに一般化し、地衛研等にも提供可能なものにする事が期待される。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

(英文)

1. Koga M, Lim LA, Ogishi M, Satoh H, Kikuchi T, Adachi E, Sugiyama R, Kiyohara T, Suzuki R, Muramatsu M, Koibuchi T, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H. Comparison of clinical features of hepatitis A in people living with HIV between pandemic in 1999-2000 and that in 2017-2018 in a metropolitan area of Japan. Jpn J Infect Dis. 2020. 73:89-95.

(和文)

2. 山下信子、鈴木亮介: ウイルス性食中毒. 小児科. 2020. Vol.61. p363-368.

学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

該当なし