

要 旨

【目的】E型肝炎ウイルス(HEV)はヒトの肝炎の原因ウイルスのひとつで、HEVに感染した動物の加熱不十分な内臓肉等の摂取により感染する人獣共通感染症である。HEVはここ数年、輸血による感染事例が報告されるようになり、血液製剤やヒト由来成分を原料とする医薬品の安全対策としてPCRなどの核酸増幅検査(NAT)によるHEVの高感度検出が重要となっている。NATの実施にはウイルスの標準品や参照パネルを用いた感度や精度の評価が不可欠であるが、HEVは国内外で標準品も参照パネルも作製されていない(現在、標準品は作製中)。そこで、本研究では国内6施設の共同検定により、HEV-NAT試験用国内標準パネルの作製を検討した。

【方法及び成績】HEVは4つの遺伝子型に分類されているが、国内で見られるのは3型又は4型で、4種類のクラスター(G3jp, G3us, G3sp, G4jp)に分類される。HEVパネル候補品として、国内のブタから分離された日本固有の4クラスター株について、実験感染ブタで増幅した4株とその中の1株を培養細胞で増幅したもの計5株からなるパネルを用いた。パネル候補品は分注の均一性と凍結での保存安定性、ウイルスの分散の均一性を確認した後、参加6施設で可能な限り統一した方法でのウイルスゲノム抽出とリアルタイムPCR定量を実施して各パネルのコピー数を求めた。参加施設から得られたデータのうち、ばらつきの大い1施設のデータを除いてパネルのコピー数を以下のように決定した: swJR-P5(G3jp): 5.07 ± 0.35 , swJB-M8(G3us): 5.27 ± 0.39 , swJB-E10(G3sp): 4.80 ± 0.33 , swJB-H7(G4jp): 4.91 ± 0.42 , wJB-E10cul(G3sp): 4.43 ± 0.31 (単位: log copies/ml)。

【結論】HEV-NAT試験用国内標準パネルを樹立した。本パネルは公的パネルとして、今後の公開によりHEVの検査やウイルス安全対策において幅広い活用が期待される。

E型肝炎ウイルス(HEV)について

- ヒトの肝炎の原因ウイルスの一つ
- 非エンベロープRNAウイルス
- 主な感染経路は汚染した水の摂取による経口感染で、日本では発展途上国からの輸入感染症と考えられてきた
- 最近ではブタ、イノシシ、シカ等に感染する人獣共通感染症であることが明らかになってきた
- 国内でもブタなどの生または加熱不十分な内臓肉(レバー等)の摂取により感染し、肝炎を発症する場合がある
- HEVに感染すると急性肝炎を起こし、劇症肝炎で死亡する例もあるが、感染しても発症しない不顕性感染も多いと考えられている
- 輸血によって発症するケースも報告されている
- 血清学的検査ではHEV感染の履歴は分かるがキャリアであるかの判断はできない→NAT法の有用性

HEV参照パネル作成のための共同検定

目的

■血液製剤やヒト由来成分を原料とする医薬品の安全対策としてPCRなどの核酸増幅検査(NAT)によるHEVの高感度検出が重要

■NATの感度・精度・特異性の評価に必要となるHEVの標準品は現在作製中、HEV参照パネルは作製されていないので、共同検定により参照パネルを樹立

共同検定参加施設

- 国立医薬品食品衛生研究所
- 国立感染症研究所
- 株ベネシス
- 日本製薬(株)
- 日本赤十字社
- (財)化学及血清療法研究所

共同検定の方法

■ 参照パネル候補品

国内のHEVの遺伝子型は3型又は4型で、4種類のクラスター(G3jp, G3us, G3sp, G4jp)に分類される。候補品は株ベネシスが国内のブタ糞便よりハンティングした日本固有の4クラスター株¹⁾について、実験感染ブタで増幅した4株とその中の1株を培養細胞で増幅したものの計5株からなる (Table 1, Fig.1-5)。

■ 試薬類

- qRT-PCR用プライマー、プローブ: Fig.6
- 感度検定用標準RNA: HEVの合成RNA断片 HEV PC RNA(G3jp, G3sp, G4jp用)及びHEV G3us PC RNA(G3us用)
- ウイルスゲノム抽出: QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen)
- qRT-PCR: QuantiTect Probe RT-PCR kit (Qiagen)

■ 参照パネル候補品について、分注の均一性試験と保存安定性試験を1施設で、ウイルスの分散の均一性試験を2施設で実施 (Table 2-3, Fig.7)

■ 参照パネル候補品のコピー数を設定するため、参加6施設で統一プロトコルによりウイルスゲノムを抽出し、qRT-PCR定量を実施してパネルのコピー数を算出。6施設のデータの平均値(ばらつきの多い1施設のデータを除く)よりパネルのコピー数を決定 (Table 4)

**Fig.1 国内の代表的なHEV株の入手と
パネル作成までの流れ**

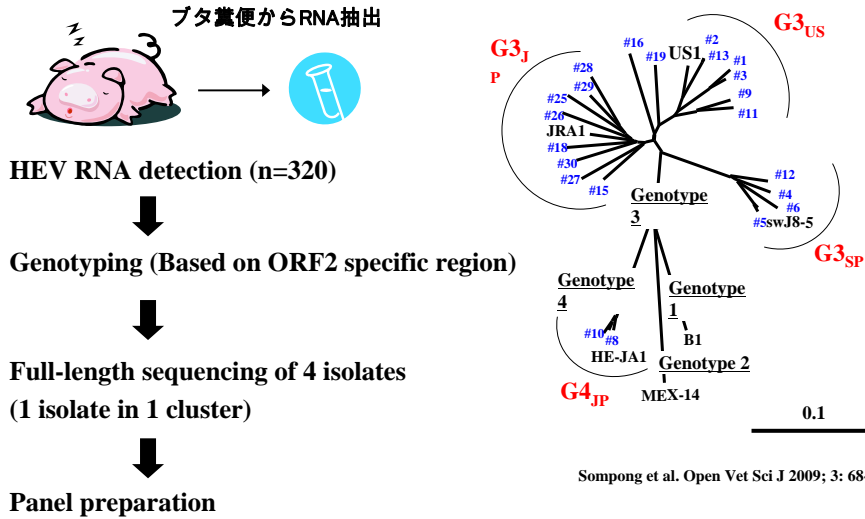
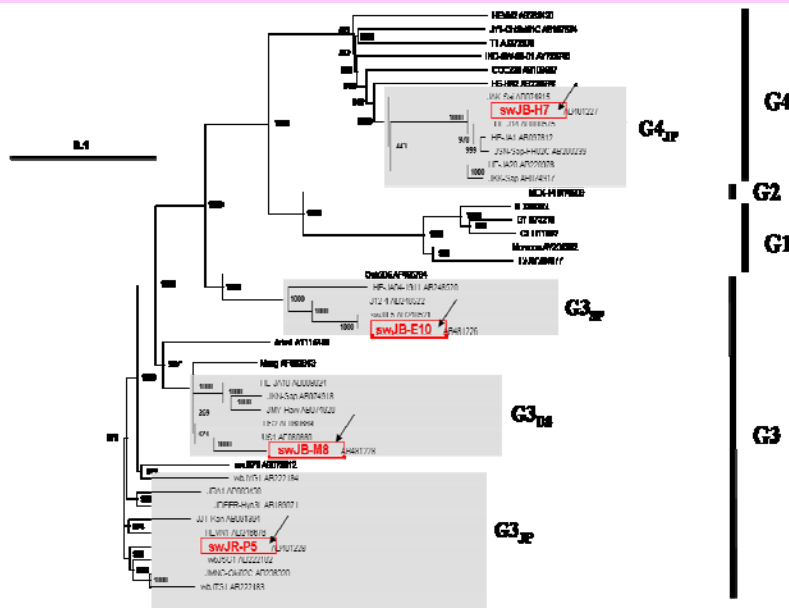


Table 1 HEV参照パネル候補品の内容

| | パネル名 | クラスター | 由来 | Accession 番号 (塩基配列) | 容量 |
|---|------------------|-------|------------------|---------------------------|------------|
| 1 | HEV swJR-P5 | G3jp | 実験感染ブタ糞便より精製 | AB481229 | 0.5ml/tube |
| 2 | HEV swJB-E10 | G3sp | 実験感染ブタ糞便より精製 | AB481226 | 0.5ml/tube |
| 3 | HEV swJB-E10cul | G3sp | E10感染A549細胞の培養上清 | - | 0.5ml/tube |
| 4 | HEV swJB-M8 | G3us | 実験感染ブタ糞便より精製 | AB481228 | 0.5ml/tube |
| 5 | HEV swJB-H7 | G4jp | 実験感染ブタ糞便より精製 | AB481227 | 0.5ml/tube |
| 6 | Negative control | - | 希釈用ヒト血清 | - | 0.5ml/tube |

Fig.2 全長塩基配列に基づくHEVの遺伝子系統樹¹⁾



・国内で見出されるHEVの4種類のクラスターに属するHEVを用いてパネルを作製

Fig. 3 4つのHEV株の相同性比較¹⁾

% Identity in nucleotides

| | G3 _{JP} | G3 _{US} | G3 _{SP} |
|------------------|------------------|------------------|------------------|
| G3 _{US} | 87.4 | - | - |
| G3 _{SP} | 81.7 | 81.3 | - |
| G4 _{JP} | 75.6 | 77.4 | 75.5 |

% Identity in amino acids;

- ORF1 region -

| | G3 _{JP} | G3 _{US} | G3 _{SP} |
|------------------|------------------|------------------|------------------|
| G3 _{US} | 96.8 | - | - |
| G3 _{SP} | 93.9 | 93.6 | - |
| G4 _{JP} | 85.7 | 85.3 | 85.7 |

- ORF2 region -

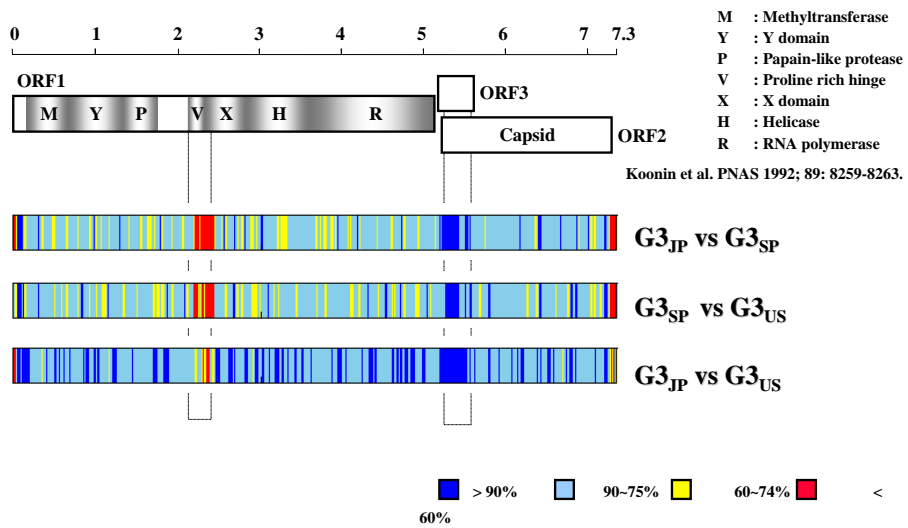
| | G3 _{JP} | G3 _{US} | G3 _{SP} |
|------------------|------------------|------------------|------------------|
| G3 _{US} | 98.5 | - | - |
| G3 _{SP} | 97.4 | 97.3 | - |
| G4 _{JP} | 91.8 | 91.5 | 92.1 |

- ORF3 region -

| | G3 _{JP} | G3 _{US} | G3 _{SP} |
|------------------|------------------|------------------|------------------|
| G3 _{US} | 96.5 | - | - |
| G3 _{SP} | 93.8 | 92.0 | - |
| G4 _{JP} | 82.5 | 83.3 | 82.5 |

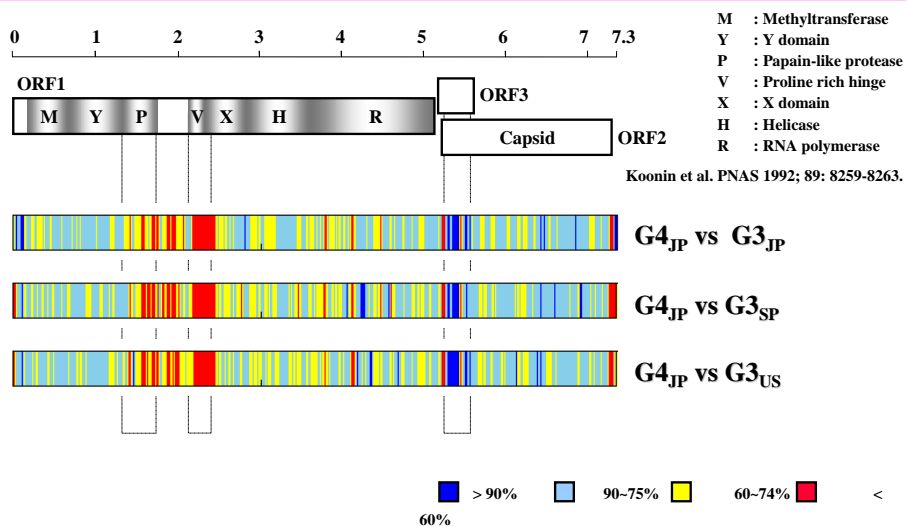
- ・ G3_{SP}に比べて、G3_{US}とG3_{JP}はやや相同性が高い傾向を示した
- ・ ORF2の保存性は高く、ウイルス構造蛋白の変異は少ないと考えられる

Fig.4 同じGenotypeのクラスター間の保存性比較¹⁾



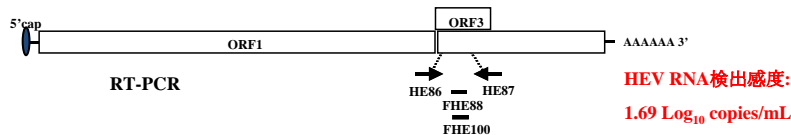
- 同様にORF1 Vの保存性は低く、ORF2/3重複部位はよく保存されていた
- G3_{JP}とG3_{US}は、G3_{SP}と比べて全体的に保存性が高い傾向であった

Fig.5 異なるGenotypeのクラスター間の保存性比較¹⁾



- ORF1 VだけでなくORF1 P (papain-like protease region) の保存性も極めて低かった。
- ORF2/3重複部位の狭い領域で、非常に保存性が高い領域が確認された。

Fig.6 HEV qRT-PCR用primer, probeとデータベース配列との一致率



HEV RNA検出感度:
1.69 Log₁₀ copies/mL

| 種類 | 名称 | サイズ | 配列番号 | 配列 |
|---------------------------------|--------|-------|-----------|------------------------------------|
| Sense primer ²⁾ | HE86 | 18mer | 5286-5303 | 5'-GGTGGTTTCTGGGGTGAC-3 |
| Antisense primer ²⁾ | HE87 | 18mer | 5355-5338 | 5'-AGGGGTTGGTTGGATGAA-3' |
| Probe ²⁾ (swJB-M8以外) | FHE88 | 18mer | 5309-5326 | 5'-FAM-TGATTCTCAGCCCTTCGC-TAMRA-3' |
| Probe (swJB-M8用) | FHE100 | 18mer | 5309-5326 | 5'-FAM-TGATTCCAGCCCTTCGC-TAMRA-3' |

| sense primer HE86 | Sequence number (%) |
|-------------------------|---------------------|
| GGT GGT TTC TGG GGT GAC | 169 (94.4) |
| A. | 9 (5.0) |
| A. | 1 (0.6) |

| Antisense primer HE87 | Sequence number (%) |
|-------------------------|---------------------|
| TTC ATC CAA CCA ACC CCT | 173 (96.6) |
| T | 4 (2.2) |
| . C | 1 (0.6) |
| T | 1 (0.6) |

| probe FHE88 | Sequence number (%) |
|-------------------------|---------------------|
| TGA TTC TCA GCC CTT CGC | 165 (92.2) |
| C | 3 (1.7) |
| C | 2 (1.1) |
| T | 1 (0.6) |
| A | 2 (1.1) |
| C | 1 (0.6) |
| C C | 1 (0.6) |
| T | 1 (0.6) |
| C | 1 (0.6) |
| Y | 1 (0.6) |
| T | 1 (0.6) |

プライマーとプローブ配列領域をGenBankに登録されている179株の配列と比較し、一致した株の数と、不一致株の配列と数を示した

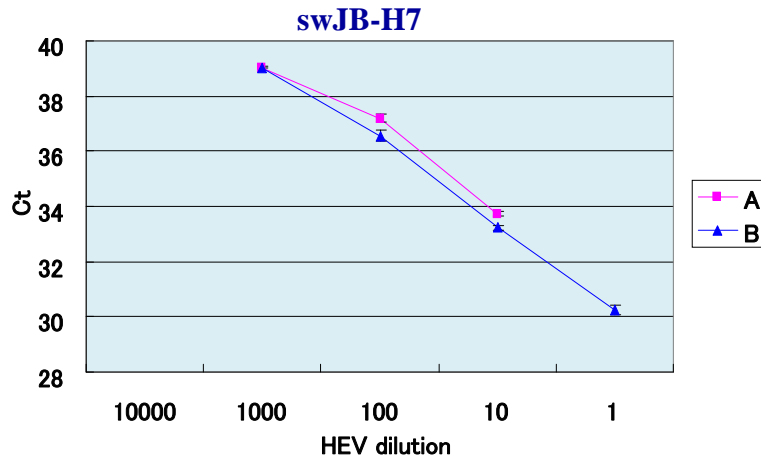
Table 2 HEVパネル候補品の分注の均一性試験

単位 : Log₁₀ copies/mL

| パネル名 | 平均±SD (n=5) | 最大値 | 最小値 |
|-------------|-------------|------|------|
| swJR-P5 | 5.27±0.16 | 5.40 | 5.00 |
| swJB-E10 | 4.83±0.09 | 4.97 | 4.76 |
| swJB-E10cul | 4.37±0.04 | 4.41 | 4.31 |
| swJB-M8 | 5.39±0.06 | 5.47 | 5.33 |
| swJB-H7 | 4.83±0.13 | 4.97 | 4.62 |

・パネル候補品が均一に分注されていることを確認

Fig. 7 HEVパネル候補品の分散の均一性試験



A: HEV原液よりRNAを抽出後に10倍希釈液を調製し、qRT-PCRを実施
 B: HEVの10倍希釈液からHEV RNAを抽出し、qRT-PCRを実施

・パネル候補品はウイルスが凝集せず均一に分散していることを確認

Table 3 HEVパネル候補品の安定性

| パネル名 | HEVゲノム濃度 HEV-RNA (Log ₁₀ copies/mL) | | | | | | 凍結 融解2回 | 凍結 融解3回 |
|-------------|---|---------------|---------------|----------------|----------------|----------------|------------|------------|
| | 0ヶ月目 (n=5) | 1ヶ月目 (n=2) | 8ヶ月目 (n=2) | 13ヶ月目 (n=2) | 19ヶ月目 (n=2) | 25ヶ月目 (n=2) | | |
| swJR-P5 | 5.27±0.16 | 5.19 | 5.04 | 4.86 | 4.96 | 4.91 | 5.23 | 5.35 |
| swJB-E10 | 4.83±0.09 | 4.83 | 4.62 | 4.58 | 4.41 | 4.31 | 4.85 | 4.82 |
| swJB-E10cul | 4.37±0.04 | 4.52 | 4.22 | 4.21 | 4.16 | 4.41 | 4.39 | 4.54 |
| swJB-M8 | 5.39±0.06 | 5.40 | 5.23 | 5.16 | 5.09 | 5.06 | 5.37 | 5.33 |
| swJB-H7 | 4.83±0.13 | 5.06 | 4.65 | 4.63 | 4.55 | 4.55 | 4.88 | 5.03 |
| Neg.Con | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - | - |

保存温度: -80°C

ND: Not detected

・何れのパネルも0ヶ月目の測定値の±1.0 Log₁₀以内であり、-80°Cでの保存安定性及び凍結融解での安定性を確認

Table 4 HEV参照パネルのコピー数の決定

単位 : Log₁₀ copies/mL

| | パネル名 | クラスター | パネルのコピー数 * |
|---|------------------|-------|-------------|
| 1 | HEV swJR-P5 | G3jp | 5.07 ± 0.35 |
| 2 | HEV swJB-E10 | G3sp | 4.80 ± 0.33 |
| 3 | HEV swJB-E10cul | G3sp | 4.43 ± 0.31 |
| 4 | HEV swJB-M8 | G3us | 5.27 ± 0.39 |
| 5 | HEV swJB-H7 | G4jp | 4.91 ± 0.42 |
| 6 | Negative control | - | - |

* : 6施設のデータからばらつきが多い1施設のデータを除いた平均値より算出

結 論

- HEVのNAT試験評価用国内参照パネルを樹立した
- 本パネルは公的パネルとして、今後の公開によりHEVの検査やウイルス安全対策において幅広い活用が期待される

参考文献:

1. Urayama T. et al.: Full-length sequences of one genotype 4 and three genotype 3 hepatitis E virus in fecal samples from domestic swine in Japan, *The open veterinary science Journal*, 4, 11 (2010)
2. Jothikumar N. et al.: A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus, *J. Virol. Methods*, 131, 65 (2006)

*** HEV参照パネルの分与をご希望の方はご連絡ください ***
国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部
内田 恵理子 (uchida@nihs.go.jp)