

屠宰猪肝和血清中乙型肝炎病毒及戊型肝炎病毒的检测

李文贵^{1,3}, 余锐萍¹, 韦海涛², 赵景义², 刘利强¹, 李秀敏², 王英华¹, 王德成¹

(1. 中国农业大学 动物医学院, 北京 100094; 2. 北京市畜牧兽医总站, 北京 100107;

3. 云南农业大学 动物科学学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 应用 1 对乙型肝炎病毒(HBV)S 基因保守区的引物, 采用 PCR 方法从屠宰猪肝、血清中检测到了 HBV, 序列分析表明, 扩增片段与已发表的 HBV S 基因的同源性高达 98%~100%。电镜负染色样品观察结果表明, 在 HBV 表面抗原 ELISA 检测强阳性反应的血清样品中存在有形态、大小与人 HBV Dane 颗粒和小球状颗粒相似的病毒粒子。针对戊型肝炎病毒(HEV) ORF2/ORF3 重叠区设计了简并引物, 采用巢式 RT-PCR 对屠宰猪肝和血清样品进行了检测。结果表明, 部分屠宰猪肝中存在 HEV。

关键词: 猪; 乙型肝炎病毒; 戊型肝炎病毒; 电镜观察

Detection of swine hepatitis B virus and E viruses in the liver and serum in pigs in China

LI Wen-gui^{1,3}, SHE Rui-ping¹, WEI Hai-tao², ZHAO Jing-yi², LIU Li-qiang¹,

LI Xiu-min², WANG Ying-hua¹, WANG De-cheng¹

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. Institute of Beijing Animal Husbandry and Veterinary, Beijing 100107, China; 3. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: The study reported the presence of swine hepatitis B(HBV) and E(HEV) viruses in the liver and serum in pigs in China. Two primers for S gene of swine HBV were designed and synthesized according to sequences of the S genes of human HBV in the literature. Swine liver and serum samples were collected from a slaughter house. Swine S genes were amplified with RT-PCR and sequenced. Results showed that sequences of S genes of swine and human HBV viruses shared 98%~100% homology. Emission transmission electron microscopy examination of HBV-positive serum revealed presence of virus particles 40~20 nm in diameter. These particles were similar to human HBV particles in terms of both diameters and shapes. A positive serum was defined by the presence of the HBV surface antigen using the ELISA method. Responses in a nested RT-PCR assay to a pair of degenerated primers designed from ORF2/ORF3 overlapping region indicated presence of gene sequence of HEV in the liver, but not serum, in some pigs.

Key words: swine; hepatitis B virus; hepatitis E virus; electron microscopy

嗜肝 DNA 病毒科(Hepadnaviridae)有正嗜肝 DNA 病毒属(Orthohepadnavirus)及禽类嗜肝 DNA 病毒属(Avihepadnavirus)2 个属。正嗜肝 DNA 病毒属包括人乙型肝炎病毒(HBV)、灵长类嗜肝病毒和啮齿动物嗜肝病毒, 禽类嗜肝 DNA 病

毒属包括鸭乙型肝炎病毒、苍鹭乙型肝炎病毒、雪雁乙型肝炎病毒等。这些病毒的共同特点为: 基因组长 3.0~3.3 kb, 具有部分双链的环状 DNA, 外有包膜, 核心内有基因组及病毒所编码的特异 DNA 聚合酶。除病毒颗粒外, 产生大量的病毒包膜脂蛋白

收稿日期: 2007-06-11; 修回日期: 2007-10-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771588)

作者简介: 李文贵(1973-), 男, 云南昆明人, 讲师, 博士生。余锐萍为通讯作者, E-mail: sheruiping@126.com

豚科仅有很窄的宿主谱,一般可致持续病毒感染,而具有较明确的嗜肝性^[1]。资料表明,畜禽中也存在一个嗜肝病毒群。自20世纪80年代以来,国内有猪、鸡、牛、羊、犬等动物检出乙肝病毒表面抗原(HBsAg)的报道屡见不鲜,并有分离到类乙肝病毒的手足^[2-9]。2006年余锐萍等^[10-11]应用免疫组织化学方法对北京、河南等地肉联厂屠宰猪肝的人乙型肝炎病毒抗原进行检测,结果发现人乙型肝炎病毒抗原总检出率高达73%~100%。

戊型肝炎(Hepatitis E, HE)是由戊型肝炎病毒(Hepatitis E virus, HEV)感染引起的经肠道传播的急性病毒性肝炎,主要通过粪便经口传播。我国是HE高发区,被列为戊肝发病和死亡所致经济负担最严重的国家之一。有学者认为,猪是HEV主要白宿主,日本已有因食用HEV污染的猪肝导致人感染的报道。对戊肝非流行区从事与猪相关职业人群和对照人群的研究表明,从事与猪相关职业者可增加HEV感染的风险。最近又发现了一些猪HEV感染人的证据^[12-13]。总之,HB和HE严重地威胁着人类的健康,而人类病毒性肝炎的发病率还在不断上升。动物,尤其是与人类关系十分密切的猪体内的HBV和HEV带毒情况如何,它们与人的HBV和HEV的同源性怎样,都还不十分清楚。本试验应用PCR技术,在原有研究的基础上,进一步对屠宰猪血清和肝的HBV S基因、HEV RNA进行了检测,并应用免疫电镜负染色技术观察了屠宰猪血清中的HBV。

1 材料与方法

1.1 样品

屠宰猪肝、血液采自北京市某肉联厂。

1.2 酶与试剂

Trizol购自北京普博欣生物科技公司;Taq酶、dNTP购自北京博大泰克公司;Oligo(dT)、引物购自上海生工生物工程技术服务有限公司;MMLV Reverse Ace和RNA酶抑制剂为TOYOBO公司产品;NCR quick柱式DNA凝胶回收试剂盒购自新长生物技术有限公司;各种限制性内切酶、pMD18-T载体为大连宝生物工程有限公司产品。

1.3 SHBV的PCR检测

1.3.1 DNA提取 血清中DNA的提取:取猪血清100 μL加入300 μL TES裂解液(10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 5 mmol/L EDTA, 5 g/L SDS, 200 mg/L蛋白酶K),55℃消化5 h,用酚-氯仿-异戊醇抽提2~3次,取上清加1/10体积3 mol/L

NaAc,再加入2.5倍体积无水乙醇进行沉淀,用700 mL/L乙醇洗沉淀1次,干燥后溶于20 μL灭菌水中备用。

肝中DNA的提取:取新鲜肝组织标本称重约1~2 g,加液氮研成粉末,取约20 mg加入DNA提取液(0.5 mmol/L Tris-HCl, 0.02 mol/L EDTA, 10 g/L SDS, 0.01 mol/L NaCl, 500 μg/mL蛋白酶K),42~48℃过夜,用酚-氯仿-异戊醇法提取DNA。
1.3.2 PCR扩增 采用针对HBV S基因保守区设计的引物(见表1)进行PCR扩增。PCR体系:10×PCR缓冲液2.5 μL,引物HBV-FP、HBV-RP各0.5 μL,200 μmol/L dNTPs 0.5 μL, Taq酶0.5 μL(2.5 U),加灭菌水补足至25 μL。扩增条件:94℃预变性4 min;94℃30 s,58℃30 s;72℃40 s,30个循环;72℃延伸5 min。于10 g/L琼脂糖凝胶中电泳,用凝胶成像仪观察、照相。

表1 用于检测猪体内HBV和HEV的引物

Table 1 Primers used in detection of swine hepatitis B virus and hepatitis E virus

编号 No.	核苷酸序列 Nucleotide sequence	产物大小/bp Amplicon size
HBV-FP	5'-GATGTGTCTGCGGCGTTTGA-3'	281
HBV-RP	5'-CTGAGGCCCACTCCCATAGG-3'	
HE164F1	5'-GCRGTGGTTTCTGGGGTGAC-3'	164
HE164R1	5'-CTGGGMYTGGTCDXGCAAG-3'	
HE137F2	5'-GYTGATTCTCAGCCTTCGC-3'	137
HE137R2	5'-GMYTGGTCDXGCAAGHGA-3'	

1.3.3 PCR产物的克隆和测序 采用NCR quick柱式DNA凝胶回收试剂盒回收扩增片段,将其克隆至pMD18-T载体,鉴定后送北京奥科生物公司测序,用DNAMAN(version5.2.2, Lynnon biosoft)分析测序结果。2份送测片段编号分别为SHBV_bj1、SHBV_bj2。

1.4 免疫电镜负染色样品的制备

取HBV表面抗原ELISA检测强阳性和HBV PCR检测阳性反应的血清样品,4 000 r/min离心30 min,取上清液,加入适度稀释的抗HBV单克隆抗体,4℃过夜;低温15 000 r/min离心1 h,弃上清液;用少量PBS稀释沉淀;吸取少量悬液于铜网上,用10 g/L醋酸铀负染后,电镜观察。

1.5 HEV RNA的巢式PCR检测

按Trizol法提取总RNA。用Inoue等^[14]设计的巢式PCR引物(见表1)进行RT-PCR。逆转录体系:5×逆转录缓冲液6 μL,20 mmol/L Oligo(dT) 0.5 μL,10 mmol/L dNTP 2 μL,MMLV(100

U/ μ L) 1 μ L, DEPC 水 6 μ L, RNA 酶抑制剂 1 μ L; RNA 经 70 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 迅速置于冰上 10 min, 取 14 μ L 作为模板。混匀后 42 $^{\circ}$ C 1 h, 95 $^{\circ}$ C 5 min, 取 4 μ L 产物作为模板进行 PCR。PCR 体系: 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L, 20 mmol/L 引物 HE164F1、HE164R1 各 0.5 μ L, 200 μ mol/L dNTP 0.5 μ L, Taq 酶 0.5 μ L (2.5 U), 加灭菌水补足至 25 μ L。按文献[14]进行扩增, 第 1 轮扩增结束后, 取 2 μ L 作为模板进行第 2 轮扩增。最后于 20 g/L 琼脂糖凝胶中电泳, 用凝胶成像仪观察、照相。

2 结果

2.1 SHBV 检测

2.1.1 PCR 检测 从屠宰猪肝、血清中提取 DNA, 应用 HBV S 基因区引物进行 PCR 扩增, 获得的产物大小约为 300 bp, 与预期的片段大小相符 (见图 1)。

2.1.2 PCR 产物的测序结果 对 SHBV_bj1、SHBV_bj2 片段进行测序, 结果发现, 所扩增区域与 GenBank 中 HBV 毒株的同源性达 100%。两片段序列仅在第 519、520 位碱基存在差异 (见图 2)。

HBV (x04615)	GATGTGCTCGCGCGTTTTATCATATTCCTCTTCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTGGTTCTTCTGGACTACCAAGGTATGTGCCCGTTTGT
SHBV_bj1
SHBV_bj2
HBV (x04615)	CCTCTACTCCAGGAACATCAACTACCAGCACGGGACCATGCAGAACCTGCACGATTCTGCTCAAGGAACCTCTATGTTCCCTCTTGTGCTGTACAA
SHBV_bj1AG.....
SHBV_bj2GA.....
HBV (x04615)	AACCTCGGACGGAAACTGCACTTGTATCCCATCCCATCATCTGGGCTTTCGCAAGATTCCTATGGGAGTGGGCCCTCAG
SHBV_bj1
SHBV_bj2

图 2 扩增片段与 HBV X04615 株序列的同源性比较

Fig. 2 Homologous comparison of the amplified S gene of HBV with the published S gene of HBV X04615 strain

2.2 HEV 的 RT-PCR 扩增

经 2 轮扩增后, 从部分猪肝组织中扩增到 1 条约 137 bp 的产物带, 与预期片段大小相符 (见图 4)。

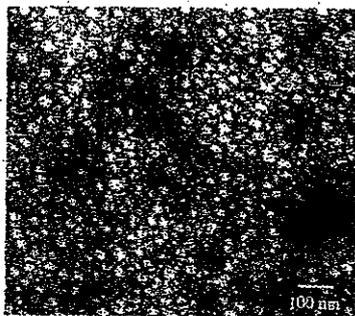


图 3 电镜下观察到的猪乙型肝炎病毒颗粒

Fig. 3 Porcine HBV particles observed by TEM

2.1.3 电镜观察 在血清负染色样品中, 见到大量的密集排列的病毒样粒子, 病毒粒子表面可见明显的表面蛋白颗粒, 但未观察到管状颗粒。根据大小不同, 这些病毒样粒子主要可分为 2 种类型, 一种直径为 40 nm 左右 (图 3 细箭头所示), 与人类 HBV 的 Dane 颗粒相类似; 另一种直径为 20 nm 左右 (图 3 粗箭头所示), 类似于人类 HBV 的小球状粒子。

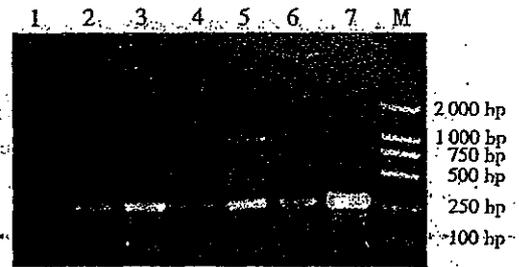


图 1 猪血清和肝中 HBV S 基因 PCR 产物的电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis of the PCR-amplified S gene of HBV from porcine livers and sera

M: DNA 分子质量标准; 1: 阴性对照; 2~4: 血清样品; 5~7: 肝样品
M: DL2000 DNA Marker; 1: Negative control; 2~4: Serum samples; 5~7: Liver samples

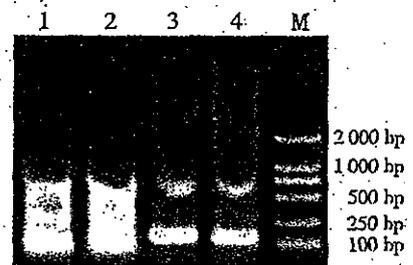


图 4 屠宰猪肝 HEV 的巢式 RT-PCR 电泳结果

Fig. 4 Electrophoresis of the nested RT-PCR-amplified fragment of HEV from porcine livers

M: DNA 分子质量标准; 1, 2: 第 1 轮扩增结果; 3, 4: 第 2 轮扩增结果
M: DL2000 DNA Marker; 1, 2: Products of the first PCR; 3, 4: Products of the second PCR

3 讨论

3.1 关于猪乙肝病毒

关于动物乙肝病毒的检测,国内已有一些报道,但有关屠宰猪体内乙肝病毒的检测鲜有报道^[15]。本试验在过去观察研究的基础上,应用 PCR 技术和透射电镜技术对屠宰猪血清和肝中 HBV 抗原进行了检测。电镜负染色样品观察结果表明,在 HBV 表面抗原 ELISA 检测强阳性反应的血清样品中存在有形态、大小与人 HBV Dnae 颗粒和小球状颗粒相似的病毒粒子。在人 HBV 携带者血清中一般以小球状颗粒为主,Dnae 颗粒较少,从本试验观察结果来看,在电镜观察的负染色样品中 Dnae 颗粒并不少(见图 3)。

目前,国外尚未见畜禽 HBV 的相关报道,国内现有的研究多采用 HBV 检测试剂进行血清标志物和相关抗原的检测,也有人对其形态和 S 区基因等进行了研究,但对于动物的 HBV 分子病毒学及其致病性、与人 HBV 之间的关系等的研究还很少。本试验应用 HBV S 区引物从屠宰猪血清、肝中检测出了预期片段,序列分析结果表明,与 HBV 同源性高达 98%~100%。虽然本试验所测片段仅占 HBV 全基因组的 9%左右,但这至少在一定程度上说明了猪 HBV 与人 HBV 有较高的同源性。

一般认为,畜禽乙肝病毒对人没有致病性,但对动物是否有致病性,经肉类食品进入人体后是否可以引起相应的免疫应答,现在尚未可知。我国约有 1.2 亿人为乙肝病毒携带者,这么高的感染率是否与畜禽乙肝病毒有某种联系,这个问题值得进一步研究。

由于 HBV 至今无法体外培养,且宿主范围非常狭窄,尚没有合适的小型动物作为动物模型供病原、发病机理、疫苗和治疗性药物的研究,加之道德等原因,非人灵长类动物模型的使用受到了限制^[1]。畜禽乙肝病毒的发现不仅将为嗜肝病毒科增加新的成员,也必将为嗜肝病毒的起源、进化、持续性感染、发病机理、慢性病毒性肝细胞癌起源等方面的研究提供研究对象。

3.2 关于戊肝病毒

很多研究表明,HE 是一种人畜共患病,经口感染,猪是重要的储存宿主。日本、印度等国家已发生多起因食用未煮熟的猪肝和猪肉而引起人感染 HEV 的报道,日本、美国的研究表明,与猪接触的职业人群的血清抗 HEV 抗体高于非职业人群,在

猪场周围的污水中能检测到 HEV 的存在^[16-18]。曹海俊等^[19]对浙江地区从事生猪屠宰和销售的职业人群的 HEV 感染情况进行了调查,结果显示,浙江省从事生猪屠宰和销售人群的阳性率为 77.25%,远远高于 1992 年全国 13 个省市 HE 血清流行病学调查的 1~59 岁人口 HEV 阳性率(17.2%)。还有报道表明,我国 4 月龄以上的猪血清抗体阳性率平均为 40%,而猪饲养员的血清抗体阳性率高达 100%;泰国 3 月龄以上的猪阳性率为 9%~20%;其饲养员的阳性率为 71%。上述研究结果说明,人的 HE 阳性检出率与从事和猪接触的相关职业有一定的关系,也说明 HE 是一种人兽互传病。

Meng^[20]曾在不同月龄的猪血清中检测出了 HEV RNA,国内外还未见有屠宰猪肝 HEV RNA 的检出报道。本试验应用 RT-PCR 方法从屠宰猪肝中扩增出了 HEV RNA,说明屠宰猪肝中也存在 HEV RNA。本实验室过去的研究表明,在屠宰猪肝中 HEV 相关抗原的阳性检出率高达 95%~100%,这是很值得注意的问题,因为从公共卫生的角度来看,屠宰猪已经进入到猪肉品生产链的末端。虽然还没有从猪胴体肉中检测到 HEV 的报道,但肝中 HEV 相关抗原的阳性检出率如此之高,无疑会对人类健康构成潜在的威胁。因此,笔者建议在屠宰猪检疫中将 HEV 列入检测项目。

参考文献(References)

- [1] 陈欣如,燕顺生,张勇. 野生动物嗜肝病毒的研究进展[J]. 地方病通报, 2006, 21(1): 89-94.
CHEN Xin-ru, YAN Shun-sheng, ZHANG Yong. Advance in hepadnaviruses in wild life[J]. *Endemic Diseases Bulletin*, 2006, 21(1): 89-94. (in Chinese)
- [2] 徐宜为,初秀. 动物的类乙型肝炎研究进展[J]. 中国兽医科技, 1993, 23(7): 16-20.
XU Yi-wei, CHU Xiu. Study progress on HBV-like virus in animals[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 1993, 23(7): 16-20. (in Chinese)
- [3] 沈柏青,任政华. 猪源乙型肝炎病毒样病毒的提纯与鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 1993(7): 7-9.
SHEN Bai-qing, REN Zheng-hua. Purification and identification of pig HBV-like virus[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 1993(7): 7-9. (in Chinese)
- [4] 律祥君,侯安祖. 黄牛感染人乙型肝炎病毒的研究[J]. 中国兽医科技, 1992, 22(4): 3-4.
LÜ Xiang-jun, HOU An-zu. Studies on human hepatitis B virus infection in farm cattle[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 1992, 22(4): 3-4. (in Chinese)
- [5] 李决,李红,张鹏举,等. PCR 和 ELISA 法检测畜禽类乙型肝炎病毒的研究[J]. 郑州牧专学报, 1997, 17(1): 21-23.

- LI Jue, LI Hong, ZHANG Peng-ju, et al. Detection of hepatitis B like virus in chicken by PCR and ELISA[J]. *Journal of Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering*, 1997, 17(1):21-23. (in Chinese)
- [6] 杜念兴, 黄吉凤. 从猪和牛检出类乙型肝炎病毒抗原和抗体[J]. *畜牧与兽医*, 2002, 34(1):3-5.
- DU Nian-xing, HUANG Ji-feng. Detection of hepatitis type B virus-like antigen and antibody from pigs and cattle[J]. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2002, 34(1):3-5. (in Chinese)
- [7] 丁壮, 金宁一, 陈创夫, 等. 羊源乙型肝炎病毒与人乙型肝炎病毒 S 基因序列同源性研究[J]. *动物医学进展*, 2001, 22(4):54-58.
- DING Zhuang, JIN Ning-yi, CHEN Chuang-fu, et al. Study on S gene sequence homologous analysis between the hepatitis B virus from sheep and human[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2001, 22(4):54-58. (in Chinese)
- [8] 丁壮, 金宁一, 陈振文, 等. 鸡源类人乙型肝炎病毒与人乙型肝炎病毒 S 基因序列分析[J]. *中国兽医学报*, 1999, 19(1):18-21.
- DING Zhuang, JIN Ning-yi, CHEN Zhen-wen, et al. S gene sequence comparison between the HBV like virus from chicken and human HBV[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 1999, 19(1):18-21. (in Chinese)
- [9] 丁壮, 王承宇, 金宁一, 等. 犬乙型肝炎病毒 S 基因遗传变异研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2003, 25(1):24-28.
- DING Zhuang, WANG Cheng-yu, JIN Ning-yi, et al. Hereditary variation in S gene sequence of hepatitis B virus from canine[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2003, 25(1):24-28. (in Chinese)
- [10] 许江城, 余锐萍, 林剑波, 等. 应用免疫组织化学方法检测屠宰猪肝脏中人乙型肝炎病毒抗原[J]. *中国兽医杂志*, 2004, 40(4):46-47.
- XU Jiang-cheng, SHE Rui-ping, LIN Jian-bo, et al. Immunohistochemistry detection of human hepatitis B virus antigen in slaughtered swine livers[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2004, 40(4):46-47. (in Chinese)
- [11] 余锐萍, 李文贵, 王英华, 等. 病毒性肝炎:值得警惕的重要人兽互传病[J]. *科技导报*, 2007, 25(4):44-52.
- SHE Rui-ping, LI Wen-gui, WANG Ying-hua, et al. Viral hepatitis: a dangerous zoonosis[J]. *Science and Technology Review*, 2007, 25(4):44-52. (in Chinese)
- [12] RENOUC J, CADRANEL J F, BOURLIERE M, et al. Possible zoonotic transmission of hepatitis E from pet pig to its owner[J]. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13(7):1094-1096.
- [13] COLISON P, KABA M, BERNITE, et al. Hepatitis E associated with surgical training on pigs[J]. *The Lancet*, 2007, 370(9591):935.
- [14] INOUE J, TAKAHASHI M, YAZAKI Y, et al. Development and validation of an improved RT-PCR assay with nested universal primers for detection of hepatitis E virus strains with significant sequence divergence[J]. *J Virol Methods*, 2006, 137(2):325-333.
- [15] 余锐萍, 郑志伟, 江维文, 等. 屠宰猪血清及肝脏中人乙型肝炎表面抗原的检测[J]. *中国畜禽传染病*, 1998, 20(增刊):160-161.
- SHE Rui-ping, ZHENG Zhi-wei, JIANG Wei-wen, et al. Detection of human hepatitis B surface antigen in serum and liver of slaughtered pigs[J]. *Chinese Journal of Animal and Poultry Infectious Diseases*, 1998, 20(Suppl):160-161. (in Chinese)
- [16] DROBENIUC J, FAVOROV M O, SHAPIRO C N, et al. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine[J]. *J Infect Dis*, 2001, 184(12):1594-1597.
- [17] MENG X J, WISEMAN B, ELVINGER F, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries[J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(1):117-122.
- [18] WU J, CHEN C, CHIANG T, et al. Potential subclinical spread of hepatitis E virus among swine, swine handlers, and different countries: a longitudinal study[J]. *J Hepatol*, 2001, 34(1):190.
- [19] 曹海俊, 王法弟, 高眉扬, 等. 生猪屠宰销售职业人群戊型肝炎病毒感染的危险因素研究[J]. *中国人兽共患病杂志*, 2004, 20(7):607-609.
- CAO Hai-jun, WANG Fa-di, GAO Mei-yang, et al. Risk of contract with hepatitis E virus in occupational populations[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2004, 20(7):607-609. (in Chinese)
- [20] MENG X J. Hepatitis E virus: cross-species infection and zoonotic risk[J]. *Clin Microbiol New*, 2005, 27(6):43-48.

(责任编辑 胡弘博)

食肉処理したブタの肝臓および血清中における B型肝炎ウイルスおよびE型肝炎ウイルス検査

ヘパドナウイルス科 (Hepadnaviridae) はオルトヘパドナウイルス属 (Orthohepadnavirus) とトリヘパドナウイルス属 (Avihepadnavirus) の2属に分類される。オルトヘパドナウイルス属にはヒトB型肝炎ウイルス (HBV)、霊長類ヘパドナウイルス、げっ歯類ヘパドナウイルスがあり、トリヘパドナウイルスにはアヒルB型肝炎ウイルス、アオサギB型肝炎ウイルス、ハクガンB型肝炎ウイルスなどがある。これらのウイルスは、ゲノム全長が3.0~3.3kbであること、一部に環状二重鎖DNA構造をとること、外側にエンベロープを有すること、またコア内部にゲノムおよびウイルスにコードされた特殊なDNAポリメラーゼを有することを共通の特徴とする。ウイルス粒子以外にも大量のウイルス外皮タンパク粒子を生成し、宿主域は極めて狭く、通常、ウイルスの持続感染を引き起こし明らかな肝向性を有する⁽¹⁾。データによれば禽獣においても肝向性ウイルス群の存在が確認されている。1980年代以降、中国においてブタ、ニワトリ、ウシ、ヒツジ、イヌなどの動物のB型肝炎ウイルス表面抗原 (HBsAg) 検出に関する報告が多くなり、各種B型肝炎ウイルスの分離が報告されるようになった^(2~9)。2006年、余銳萍^(10~11)らは免疫組織化学法を応用し、北京、河南などの食肉生産連合において豚の食肉処理およびその肝臓の解体に従事する人員のB型肝炎ウイルス抗原検査を実施した結果、B型肝炎ウイルス抗原の検出率は実に73~100%という高率に達することが明らかになった。

E型肝炎 (Hepatitis E, HE) はE型肝炎ウイルス (Hepatitis E virus, HEV) 感染により引き起こされ、腸を経由して伝播される急性ウイルス性肝炎であり、主要な伝播経路は排泄物を介した経口感染である。中国はHE高発症地域であり、E型肝炎の発症およびE型肝炎での死亡により引き起こされる経済的負担が最も深刻な国の1つに数えられている。ブタがHEVの主要な宿主であると提唱する学者も存在し、日本においてはHEVに汚染された食用ブタの肝臓からヒトへの感染が報告されている。E型肝炎非流行地域におけるブタに関連する職業の従事者群と対照群の研究では、ブタに関連する職業の従事者にHEV感染リスクの上昇が認められた。さらに、近年ではブタHEVのヒトへの感染を示す複数の証拠が発見されている^(12, 13)。つまり、HBおよびHEはヒトの健康に深刻な脅威を与える疾患であり、ヒトのウイルス性肝炎の発症率は今なお上昇し続けている。動物、とりわけヒトとの関係が緊密なブタ体内のHBVおよびHEV保有状況、ブタHBV、HEVとヒトHBV、HEVの相同性などについては未だ明らかにされていない部分が多い。本試験では既存の研究を基礎とし、PCR技術を応用し、食肉処理したブタの血清および肝臓のHBVS遺伝子、HEVRNAに対しさらなる検査を行うとともに、免疫電子顕微鏡を用いたネガティブ染色法にて食肉処理したブタ血清中のHBVの観察を行った。

1 材料および方法

1.1 サンプル

食肉処理したブタの肝臓および血液は、北京の某食肉生産連合にて採集を行った。

1.2 酵素および試薬

Trizol は北京普博欣生物科学技術公司より購入した。Taq 酵素、dNTP は北京博大泰克公司より購入した。Oligo(dT)、プライマーは上海生工生物工程科学技術サービス有限公司より購入した。MMLV Révertra Ace および RNA 酵素阻害剤は TOYOBO 社(東洋紡)の製品とした。NCR quick カラム式 DNA ゲル回収試薬キットは新長江生物科技有限公司より購入した。各種制限酵素、pMD18-T キャリヤーは大連宝生物工程有限公司の製品とした。

1.3 SHBV の PCR 検査

1.3.1 DNA 抽出 血清中の DNA 抽出：ブタの血液 100 μ L を採取し、TES 分解液 300 μ L(10mmol/L Tris-HCl、pH8.0、5mmol/L EDTA、SDS 5g/L、プロテイナーゼ K 200mg/L)中に加え、55 $^{\circ}$ C 下にて 5 時間消化を行い、フェノール-クロロフォルム-イソアミルアルコールを用いて 2~3 回抽出を行った。その後、上澄みを採取し 1/10 体積の 3mol/L NaAc および 2.5 倍体積の無水エチルアルコールを順次加えて沈殿を行い、エチルアルコール 700mL/L を用いて沈殿を 1 回洗浄し、乾燥後に滅菌水 20 μ L 中に溶解し保存した。

肝臓中の DNA 抽出：新鮮な肝臓組織標本約 1~2g を秤量し、液体窒素を加えて粉末状にしたものを、約 20mg 採取して DNA 抽出液(0.5mmol/L Tris-HCl、0.02mol/L EDTA、SDS 10g/L、0.01mol/L NaCl、プロテイナーゼ K 500 μ g/mL)中に加え、42~48 $^{\circ}$ C 下にて一晩静置した。その後、フェノール-クロロフォルム-イソアミルアルコールを用いて DNA の抽出を行った。

1.3.2 PCR による増幅 HBV S 遺伝子保存領域をターゲットとして設計されたプライマー(表1を参照のこと)を用いて PCR による増幅を行った。PCR システム：10 \times PCR 緩衝液 2.5 μ L、プライマー-HBV-FP、HBV-RP 各 0.5 μ L、200 μ mol/L dNTPs 0.5 μ L、Taq 酵素 0.5 μ L(2.5U)に滅菌水を加え 25 μ L とした。増幅条件：94 $^{\circ}$ C 下にて 4 分間予備変性を行った後、94 $^{\circ}$ C 下にて 30 秒、58 $^{\circ}$ C 下にて 30 秒、72 $^{\circ}$ C 下にて 40 秒の変性を 30 サイクル行った。さらに 72 $^{\circ}$ C 下にて 5 分間伸張を行い、アガロースゲル 10g/L 中にて電気泳動を行い、ゲルイメージングシステムを用いて観察および画像の記録を行った。

1.3.3 PCR 生成物のクローンおよびシークエンシング NCR quick カラム式 DNA ゲル回収試薬キットを用いて回収した増幅断片のクローンを pMD 18-T キャリヤーに吸着させ、評定を行った後、北京奥科生物公司に送付してシークエンシングを行い、DNAMAN(version5.2.2、Lynnon biosoft)を用いてシークエンシング結果に対する分析を行った。増幅断片 2 サンプルの番号はそれぞれ SHBV_bj1、SHBV_bj2 とした。

1.4 免疫電子顕微鏡を用いたネガティブ染色サンプルの調製

ELISA 法にて HBV の表現抗原に強陽性を示す血清サンプルおよび HBV PCR 検査にて陽性反応を示す血清サンプルを採取し、4000r/分にて 30 分間遠心分離を行い、上