

分子疫学によるB型肝炎Outbreakにおける感染源調査

佐賀県衛生薬業センター 安藤 克幸、島 あかり、吉武 俊一、角 典子

はじめに

佐賀県S市内のA病院から佐賀中部保健所に急性ウイルス性肝炎(B型)患者の発生届出があった。保健所が調査したところ患者の通園するC保育所内に複数の肝炎感染者がいることが判明した。

このためC保育所園児、卒園児、職員および保護者に対する聞き取り調査を実施した。この結果から、270名のHBs抗原、HBs抗体、AST及びALT等の血液検査を佐賀医科大学付属病院で実施することが決定され、当センターでは28名の疑感染者について詳細な検討を行なった。

また、佐賀県および国立感染症研究所の職員により疫学調査も平行して行なわれた。

HBVキャリアの急性発症と急性B型肝炎患者の一過性感染時との鑑別を行なうため、HBc抗体価およびHBc(IgM)抗体価を測定した。さらに、HBV 遺伝子の特定領域を比較・解析するためPCRおよびsequenseを行った。そして、ウイルスDNAの全塩基配列を解析することにより、ウイルス株間の相同性について詳細に検討するため、primer設計も実施した。

材料および方法

血清：佐賀医科大学他で採血され、-30℃に凍結保存された試料を供試した。

HBc抗体：血清中HBc抗体の測定はPHA法により行なった。

HBc抗体(IgM)：血清中HBc抗体(IgM)の測定はELISA法で行なった。

DNA抽出：血清中のDNAの濃縮・分離はQIAamp Ultra-Sense®Virus Kitで行なった。

PCR：HBV遺伝子S領域のgeneSの増幅は進藤ら[3]の方法に準じ、432bpを増幅するプライマーHBVpF及びHBVpRを用い、DNA抽出の内標準としてβ-グロブリン遺伝子の262bpを増幅するβ-GF及びβ-GRの2プライマーを用いて行なった。

pre coreおよびcore(pre-C/C)領域のgene pre-C及びgeneCの増幅は鍵本[1]の方法により行なったが、sense primerについては、Okamotoら[2]のprimerを変更して、5'末端側の3番目にT塩基を加えたPCCF(5'-TCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGC-3')を用いた。antisense primerはPCCRを用いた。増幅産物は747bpであった。

Sequence：BigDye Terminator(v1.1)法により行なった。

系統樹解析：HBV塩基の系統樹解析はVector NTIを用いて近隣結合法(N-J)で行なった。

primer設計：PCRで検出後、解析した3名の患者の塩基配列を基に、Data baseでBlast検索を行った。Data baseに登録された10 sequenseと3名の患者のsequenseを用いてVector NTIにより解析を行い共通な塩基配列(consensus)を得た。このconsensusを基にprimer設計を実施した。

[技術資料]

成 績

HBc抗体：表1 **HBc抗体(IgM)**：表2

DNA抽出：グロブリン遺伝子を確認した。

PCR：HBV遺伝子S領域を増幅するプライマーHBVpFとHBVpR、およびpre-C/C領域を増幅するプライマーPCCFとPCCRを用いて検体のウイルス遺伝子を増幅した結果、28検体のうち10検体からそれぞれ432塩基と747塩基の特異バンドの増幅が確認された。

系統樹解析：Sequence後の系統樹解析の結果、PCR陽性の検体のうち9検体が同一の塩基配列と推定され、1検体が異なる塩基配列であった。

primer設計：解析されたconsensusの塩基配列を基に設計したI～X II組のprimer setsは、10検体すべてのサンプルで陽性を示し、3,000強の塩基配列を解析可能であった。

(表3)

考 察

HBVはHepadona virusに分類されるDNAウイルスで、そのDNAは部分2本鎖の環状構造からなる約3,200の塩基をもち、4つのopen reading frameから構成されている。

日本ではHBV保有者は100万人以上と推定されており、今なお保健医療上の大きな課題の一つである。

抗HBc抗体価と抗HBc(IgM)抗体価により、慢性肝炎(キャリア)の急性発症と一過性感染時の急性B型肝炎との鑑別が可能であった。

PCRおよびSequense後の系統樹解析では、精度を向上させるためにHBV遺伝子のS領域(geneS)とpre-C/C領域(gene pre-C/C)の2領域が増幅可能であった。

塩基配列解析後の系統樹解析では、geneSおよびgene pre-C/Cの2領域とも、9検体が同一の塩基配列と推定され、1検体が異なる塩基配列であった。

HBVの全塩基3.2kbpのうちS領域およびPre c/c領域の約1.2kbpのみをターゲットとすることによっても、かなりの精度で解析を行うことは可能であったが、HBVの感染源調査では人権等の問題もあり、全塩基配列の解析結果により、慎重に判断するが必要であった。

このため、HBV全塩基配列を解析するためのprimer設計を行い、B型肝炎罹患患者血清からのHBV遺伝子の検出を試行した結果、全てのprimer setsで目的のバンドが確認され、分子疫学による感染源調査に活用できることが確認された。

疫学的には、今回のHBV Outbreakの事例では、発生の探知から終息の確認に至るまでに約2年の長時日を要する事例であったことと、HBVキャリアと園児が集団生活する施設では、標準予防策のみでは感染を防御できないことも判明した。

そして、感染予防対策としてのワクチン接種の重要性もあらためて認識された事例であった。

文 献

[1] 鍵本聖一：日本臨牀、53(増刊号下巻)、310-315(1995)

[2] Okamoto H. et al: J Gen Virol、69、2575-2583(1988)

[3] 進藤道子、奥野忠雄、新井賢、松本昌之、武田誠、加嶋敬、島田守、宗川吉汪：肝臓、31(8)、875-880 (1990)

[技術資料]

表 1 HBc 抗体価測定結果

| 番号等 | HBc抗体価(2 ⁿ) | HBc-IgM 抗体価 | 系統樹解析 |
|--------|-------------------------|-------------|-------|
| case13 | >12 | | |
| case14 | - | | |
| case15 | < 2 | | |
| case 9 | < 2 | | |
| case10 | >12 | 高値 | |
| case11 | <10 | 高値 | |
| case 6 | >12 | | 同一 |
| case12 | < 2 | | |
| case28 | >12 | | 同一 |
| case19 | <11 | | |
| case29 | < 9 | | |
| case17 | < 9 | | |
| case18 | >12 | | 異なる |
| case20 | >12 | | |
| case16 | <10 | | |
| case25 | >12 | 高値 | |
| case21 | >12 | | |
| case22 | <11 | | |
| case26 | <10 | | |
| case27 | <10 | | |
| case23 | >12 | 高値 | 同一 |
| case 1 | >12 | | 同一 |
| case 2 | >12 | | 同一 |
| case 4 | >12 | 陽性 | 同一 |
| case 5 | >12 | 陽性 | 同一 |
| case 7 | >12 | 高値 | 同一 |
| case 8 | >12 | 高値 | 同一 |
| caseMT | < 5 | | |

[技術資料]

表 2 HBc 抗体(IgM)抗体価

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|
| A | | case13 | case28 | case21 | case 5 |
| | 0.0190 | 0.0180 | 0.0070 | 0.0310 | 0.6240 |
| B | | case14 | case19 | case22 | case 7 |
| | 0.0270 | 0.0190 | 0.0190 | 0.0240 | 0.1750 |
| C | | case15 | case29 | case26 | case 8 |
| | 0.0230 | 0.0150 | 0.0200 | 0.0600 | 0.1160 |
| D | | case 9 | case17 | case27 | caseMT |
| | 0.5860 | 0.0120 | 0.0260 | 0.0480 | 0.0340 |
| E | | case10 | case18 | case23 | |
| | 0.6060 | 0.1110 | 0.0360 | 0.1320 | - |
| F | | case11 | case20 | case 1 | |
| | 0.5830 | 0.1770 | 0.0310 | 0.0320 | - |
| G | | case 6 | case16 | case 2 | |
| | - | 0.0330 | 0.0250 | 0.0510 | - |
| H | | case12 | case25 | case 4 | |
| | - | 0.0160 | 0.1240 | 0.6680 | - |

N.C. : ABC=0.0230

カットオフ値 : 0.1920

P.C. : DEF=0.5917

[技術資料]

表 3 全塩基配列検出のための primer sets(I ~ X II)

Primer sets I : Product of length 343

Contains region of the molecule from 1 to 343

Sense Primer:

CTCCACAACATTCCACCAA

Length: 19 Tm: 48.5 C GC: 47.4

dH: -136.4 kcal/mol dS: -350.7 cal/mol dG: -30.1 kcal/mol

Antisense Primer:

GGTTGGTGAGTGATTGGA

Length: 18 Tm: 45.1 C GC: 50.0

dH: -127.1 kcal/mol dS: -327.3 cal/mol dG: -27.7 kcal/mol

Antisense Primer - R:

CCAACCACTCACTAACCT

Length: 18 Tm: 45.1 C GC: 50.0

dH: -127.1 kcal/mol dS: -327.3 cal/mol dG: -27.7 kcal/mol

Primer sets II : Product of length 335

Contains region of the molecule from 295 to 629

Sense Primer:

GTGTCCTGGCCAAAATTC

Length: 18 Tm: 47.2 C GC: 50.0

dH: -138.5 kcal/mol dS: -358.3 cal/mol dG: -29.9 kcal/mol

Antisense Primer:

CGAAAGCCCAGGATGATG

Length: 18 Tm: 51.0 C GC: 55.6

dH: -141.2 kcal/mol dS: -361.7 cal/mol dG: -31.6 kcal/mol

Primer sets III : Product of length 331

Contains region of the molecule from 563 to 893

Sense Primer:

TGTTGCTGTACAAAACCTTC

Length: 20 Tm: 45.2 C GC: 40.0

dH: -144.0 kcal/mol dS: -376.9 cal/mol dG: -29.8 kcal/mol

Antisense Primer:

CCAATTACATATCCCATG

Length: 18 Tm: 39.9 C GC: 38.9

dH: -132.9 kcal/mol dS: -350.4 cal/mol dG: -26.6 kcal/mol

[技術資料]

Primer sets IV : Product of length 329

Contains region of the molecule from 844 to 1172

Sense Primer:

AAAACCAAACGTTGGGGC

Length: 18 Tm: 52.2 C GC: 50.0

dH: -152.7 kcal/mol dS: -393.4 cal/mol dG: -33.6 kcal/mol

Antisense Primer:

AGACCTGACCGTTGCCGG

Length: 18 Tm: 55.6 C GC: 66.7

dH: -145.9 kcal/mol dS: -369.8 cal/mol dG: -33.9 kcal/mol

Primer sets V : Product of length 320 (rating: 153)

Contains region of the molecule from 1114 to 1433

Sense Primer:

GCCTTTCTGTGTAAACAA

Length: 18 Tm: 40.0 C GC: 38.9

dH: -131.7 kcal/mol dS: -346.7 cal/mol dG: -26.6 kcal/mol

Antisense Primer:

GGGACGTAGACAAAGGAC

Length: 18 Tm: 43.4 C GC: 55.6

dH: -133.3 kcal/mol dS: -347.5 cal/mol dG: -27.9 kcal/mol

Primer sets VI : Product of length 333 (rating: 126)

Contains region of the molecule from 1387 to 1719

Sense Primer:

TGTGCTGCCAACTGGATCCT

Length: 20 Tm: 55.3 C GC: 55.0

dH: -149.5 kcal/mol dS: -380.4 cal/mol dG: -34.3 kcal/mol

Antisense Primer:

CACAGTCTTTGAAGTATG

Length: 18 Tm: 33.5 C GC: 38.9

dH: -119.2 kcal/mol dS: -316.5 cal/mol dG: -23.1 kcal/mol

Primer sets VII : Product of length 321

Contains region of the molecule from 1654 to 1974

Sense Primer:

ATAAGAGGACTCTTGGACTCTC

Length: 22 Tm: 45.4 C GC: 45.5

[技術資料]

dH: -154.0 kcal/mol dS: -406.1 cal/mol dG: -31.1 kcal/mol

Antisense Primer:

GGAAAGAAGTCAGAAGGC

Length: 18 Tm: 43.1 C GC: 50.0

dH: -135.4 kcal/mol dS: -354.1 cal/mol dG: -28.0 kcal/mol

Primer sets VIII : Product of length 333

Contains region of the molecule from 1900 to 2232

Sense Primer:

CATGGACATTGACCCGTAT

Length: 19 Tm: 47.5 C GC: 47.4

dH: -139.7 kcal/mol dS: -361.5 cal/mol dG: -30.1 kcal/mol

Antisense Primer:

CCAAAAGTAAGACAGGAA

Length: 18 Tm: 39.2 C GC: 38.9

dH: -132.7 kcal/mol dS: -350.7 cal/mol dG: -26.4 kcal/mol

Primer sets IX : Product of length 339

Contains region of the molecule from 2165 to 2503

Sense Primer:

GTCAATGTTAATATGGGCCT

Length: 20 Tm: 45.9 C GC: 40.0

dH: -153.0 kcal/mol dS: -402.4 cal/mol dG: -31.2 kcal/mol

Antisense Primer:

GTAGAAGAATAAAGCCCAGT

Length: 20 Tm: 42.4 C GC: 40.0

dH: -151.3 kcal/mol dS: -402.1 cal/mol dG: -29.6 kcal/mol

Primer set X : Product of length 317

Contains region of the molecule from 2457 to 2773

Sense Primer:

CCTTGGACTCATAAGGTGGGAA

Length: 22 Tm: 54.6 C GC: 50.0

dH: -167.5 kcal/mol dS: -432.8 cal/mol dG: -36.7 kcal/mol

Antisense Primer:

ATGCCAGCCTTCCACAGAGT

Length: 20 Tm: 53.5 C GC: 55.0

dH: -151.5 kcal/mol dS: -388.3 cal/mol dG: -33.9 kcal/mol

[技術資料]

Primer set X I : Product of length 314

Contains region of the molecule from 2675 to 2988

Sense Primer:

GCCCTTAGATAAAGGCAT

Length: 18 Tm: 43.5 C GC: 44.4

dH: -146.5 kcal/mol dS: -386.4 cal/mol dG: -29.5 kcal/mol

Antisense Primer:

GGGGTTGAAGTCCCAATC

Length: 18 Tm: 48.6 C GC: 55.6

dH: -140.1 kcal/mol dS: -361.4 cal/mol dG: -30.6 kcal/mol

Primer sets X II : Product of length 286

Contains region of the molecule from 2927 to 3212

Sense Primer:

ATCACCAGTTGGACCCTG

Length: 18 Tm: 47.0 C GC: 55.6

dH: -131.2 kcal/mol dS: -337.2 cal/mol dG: -28.9 kcal/mol

Antisense Primer:

CACTGCATGGCCTGAGGA

Length: 18 Tm: 52.3 C GC: 61.1

dH: -133.9 kcal/mol dS: -339.1 cal/mol dG: -31.0 kcal/mol

Sense Primer—R:

TAGTGGTCAACCTGGGAC

Length: 18 Tm: 47.0 C GC: 55.6

dH: -131.2 kcal/mol dS: -337.2 cal/mol dG: -28.9 kcal/mol