

分子疫学によるHBV感染源調査

微生物課 安藤克幸 平野敬之 増本久人 坂本晃子 馬場喜壽

キーワード：HBV 保育所 PCR sequence 全塩基配列解析

1 はじめに

平成14年4月17日、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。

届出記載事項より保健所が届出医療機関に確認し、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sequence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。

2 材料および方法

血清：佐賀医科大学及び佐賀中部保健所で採血され、-20℃に凍結保存された試料を供試した。

HBc抗体：血清中HBc抗体の測定はマイセルanti-rHBc(PHA法)(株特殊免疫研究所 東京都)により行なった。

HBc抗体(IgM)：血清中HBc抗体(IgM)の測定はFRELIISA HBc IgM(ELISA法)(富士レビオ株 東京都)で行なった。

DNA抽出：血清中のDNAの濃縮・分離はミニスピカラムQIAamp Ultra-Sense®Virus Kit(株キアゲン 東京都)を用いてプロトコールに基づき行なった。

PCR：HBV遺伝子S領域のgeneSの増幅は進藤ら¹⁾の方法に準じ、432bpを増幅するプライマーHBVpF(5'-GGACTTCTCTCAATTTCTAGGG-3')およびHBVpR(5'-CAAATGGCACTAGTAACTGAGC-3')を用い、DNA抽出の内標準として -グロブリン遺伝子の262bpを増幅する -GF(5'-GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG-3')および -GR(5'-TGGTCTCCTTAAACCTGTCTTG-3')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およびgeneCの増幅は鍵本²⁾の方法により行なったが、sense primerについては、Okamotoら³⁾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(5'-CAGGTACAGTAGAAGAATAAGCCC-3')を用いた。増幅産物は747bpであった。

Sequence : PCR産物50 µlを1.5%のアガロースゲルで電気泳動し、目的のDNA断片をアガロースゲルから切り出し、スピнкаラムMinElute Gel Extraction-Kit(株キアゲン 東京都)を用いてDNA断片を精製した。このDNA断片約10ngをシーケンス反応の鋳型とした。primerはforward用とreverse用に、HBVpFとHBVpRおよびPCCFとPCCRを用い、BigDyeターミネーター法(Applied-Biosystems USA)によるCycle Sequence反応を行なった。そして、ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems USA)によりforward およびreverse両方向の塩基配列を解読し、S領域およびpre-C/C領域の塩基配列を決定した。

系統樹解析 : HBV塩基配列の系統樹解析はVector NTI Suite2 Ver8 (株ワールドフュージョン 東京)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、DDBJのDatabaseでBlast検索を行った。Data baseに登録された10 sequenceと3名の患者のsequenceを用いてVector NTI Suite2 Ver8により解析を行い共通な塩基配列(consensus)を得た。このconsensusから全塩基配列を正確に効率よく検出するために、Vector NTI Suite2 Ver8によりprimer設計を行った。そのprimerを使用し、annealing温度を46 ~ 56 の間で8段階に分け設定し、サーマルサイクラー(AS TEC PC-808)にてGradientsを実施した。

3 結果

HBc抗体 : マイセルanti-rHBcを用いて28検体のHBc抗体を測定したところ、表1の結果となった。

HBc抗体(IgM) : FRELISA HBc IgMを用いて28検体のIgM-HBc抗体を測定した結果、表2のとおりであった。

DNA抽出 : グロブリン遺伝子を増幅するプライマー - GFおよび - GRを内標準物質としたが、すべての検体で262塩基の特異バンドの増幅がアガロース電気泳動後のエチジウムブロマイド染色で確認された。

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1 ~ 組のprimer sets(表3)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。

4 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、以下の4つのopen reading frameから構成されている。P領域はDNA-polymeraseをコードし、S領域はウイルスの表面(surface)抗原をコードしており、C領域はウイルスの芯(core)をコードしている。X領域はウイルスの増殖に関与していると考えられている。

HBVの保有者は全世界で3億人以上、うち2億人以上がアジアに存在し、全世界を通し年間約100万人が肝炎等で死亡していると推定されている⁴⁾。また、日本ではHBV保有者は100万人以上と推定⁴⁾されており、平成15年度のB型ウイルス性肝炎による死亡者数は全国で856名、佐賀では7名であった⁵⁾。ウイルス感染が主な病因を占める肝臓癌の死亡者数については、全国で34,089名、佐賀で391名⁵⁾であり、今なお保健医療上の大きな課題の一つである。

抗HBc抗体価ではcase13、10、6、28、18、20、25、21、23、1、2、4、5および7が12管以上の高抗体価であり(表1)、抗HBc(IgM)抗体価はcase4、5が陽性であり、case10、11、25、7および8が高値であった。(表2)

これらの抗体価検査は慢性肝炎(キャリア)の急性発症と一過性感染時の急性B型肝炎との鑑別のために行ったが、表1および表2の結果からcase13、19、29、17、20、21、22、26および27は感染の時点から6ヶ月以上経過しておりcase15は一年以上経過していること、case6、28、18、4および8はキャリアであること(case1および2はキャリアになる可能性あり)、case10、11、25、23、4、5、7および8は6ヶ月未満の経過であることが明らかとなった。

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領域を増幅・解析ターゲットとした。ABI310による遺伝子解析では、geneSのPCR産物は432bpであり、gene pre-C/Cでは747bpであったため、61cmのlong capillaryを用いることにより解析可能であった。

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(図1および2)。

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、全塩基配列の解析を行い、慎重に判断することも必要であると思われた。

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、今後の分子疫学による感染源調査等に十分活用できることが確認された(図3)。

また、Gradientsによる解析の結果、I~X組のプライマーを用いて同時に増幅する場合、最適なannealing温度は51℃であった(図4)。

文献

- 1) 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
- 2) 鍵本聖一：日本臨牀、53(増刊号下巻)、310-315、1995
- 3) Okamoto H. et al: J Gen Virol、69、2575-2583、1988
- 4) 財団法人ウイルス肝炎研究財団：ウイルス肝炎感染対策ガイドライン第III版、1995
- 5) 厚生労働省：平成15年度人口動態統計調査、2003

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		

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. : $\overline{ABC}=0.0230$

カットオフ値 : 0.1920

P.C. : $\overline{DEF}=0.5917$

表3 全塩基配列検出のための primer sets(~X)

Primer sets : 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 : 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 : 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

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

Contains region of the molecule from 1114 to 1433

Sense Primer:

GCCTTTCTGTGTAACAA

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 : 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 : 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

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 : 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 : 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:

GTAGAAGAATAAGCCAGT

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:

CCTTGACTCATAAGGTGGGAA

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

Primer set X : 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:

GGGTTGAAGTCCAATC

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 : 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

図1 S領域の進化系統樹

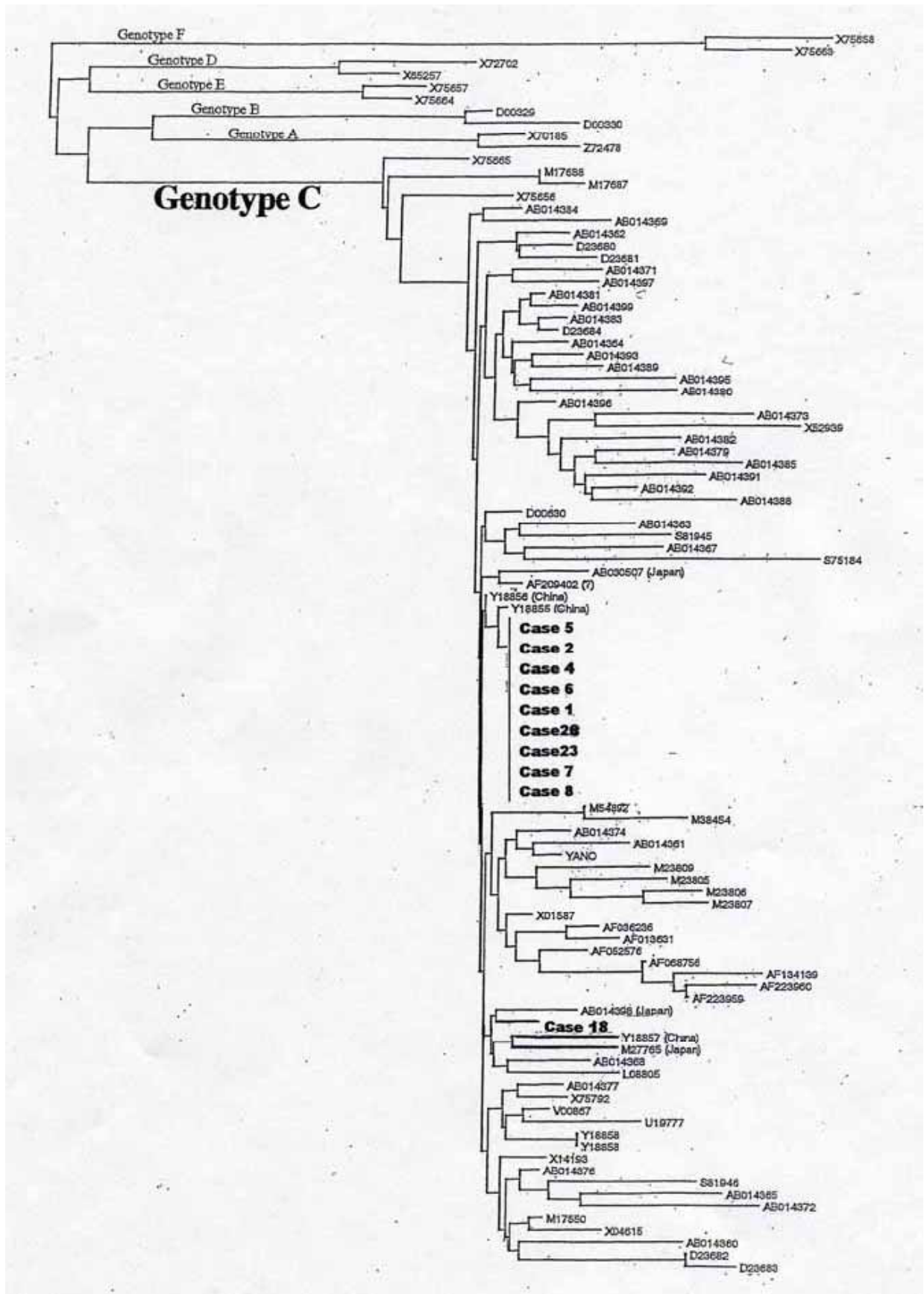


図2 Pre core/Core領域の進化系統樹

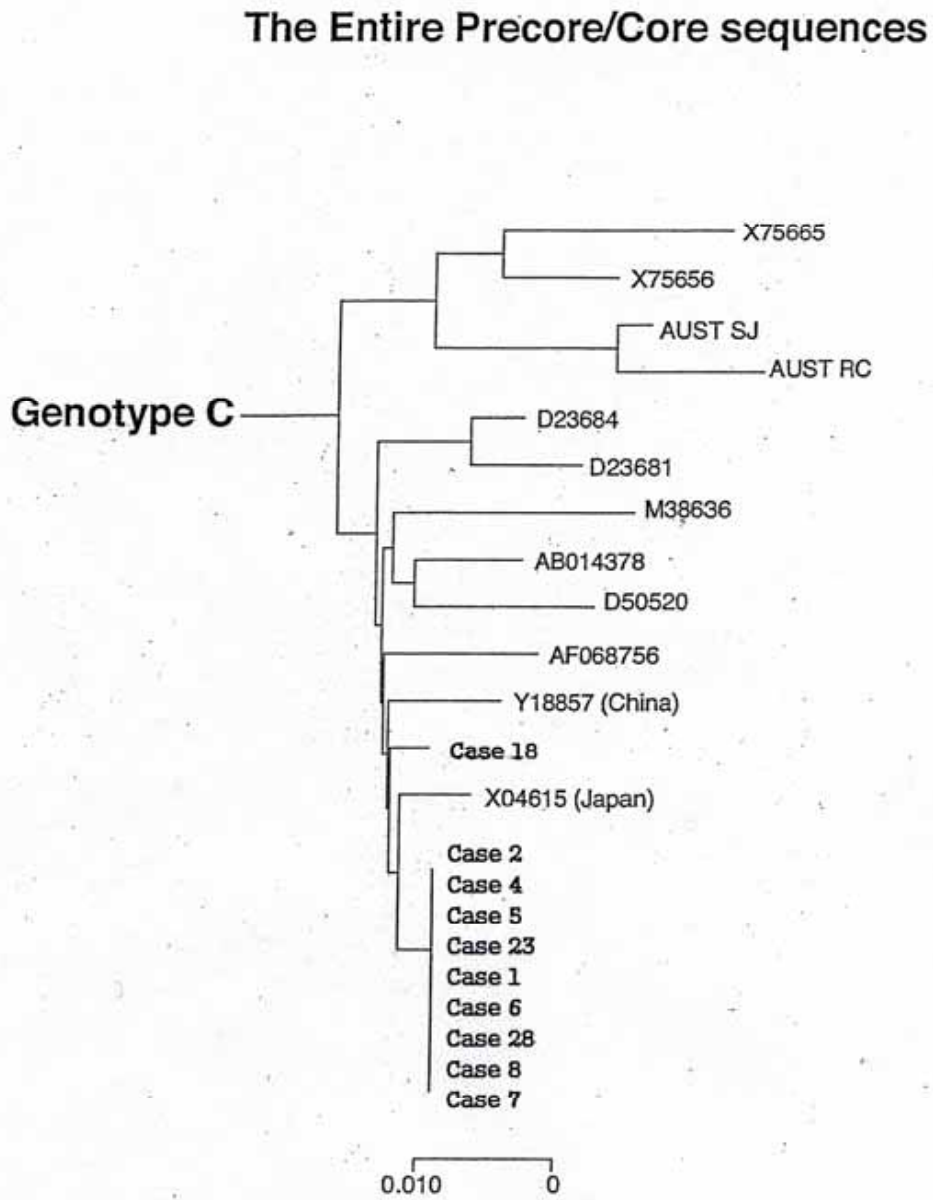


図3 Primer sets I~XIIによる電気泳動像

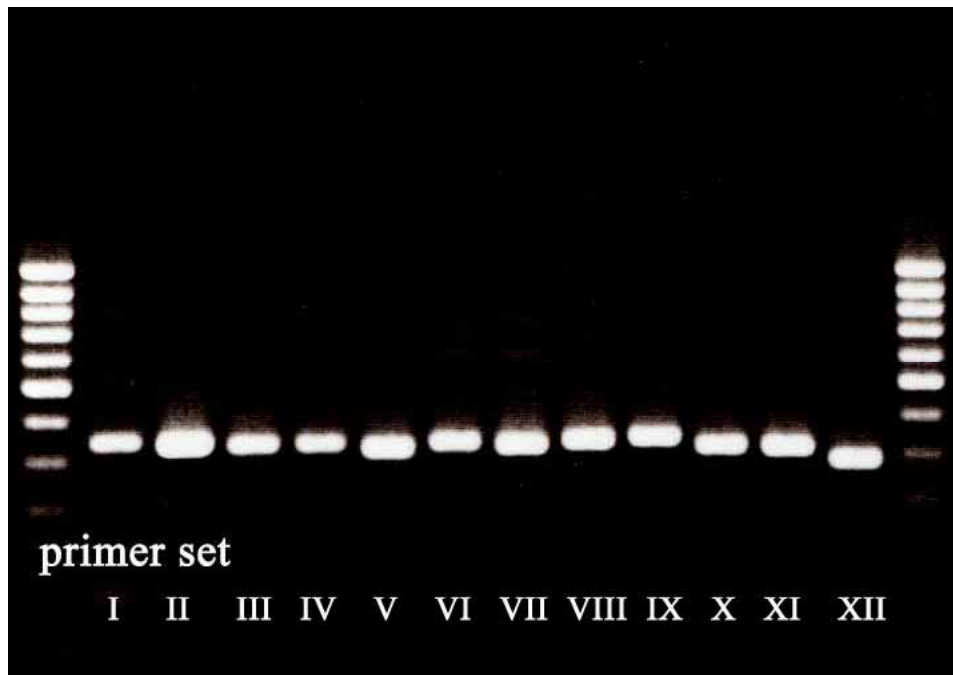


図4 Primer sets I~XIIにおけるGradientsによるannealing温度の設定

