

RT-PCR法を用いたA型肝炎ウイルスの
ウイルス血症及び糞便排泄持続期間に関する検討

四 柳 宏

①

論文題目

RT-PCR法を用いたA型肝炎ウイルスの
ウイルス血症及び糞便排泄持続期間に関する検討

氏名 四 柳 宏

目次

研究の目的と背景	1
第一部	4
要旨	5
はじめに	6
対象及び方法	7
結果	10
考察	15
第二部	17
要旨	18
はじめに	19
対象及び方法	20
結果	22
考察	28
考案とまとめ	30
参考文献	32
謝辞	38

研究の背景と目的

A型肝炎はA型肝炎ウイルス(HAV)の引き起こす感染症である。A型肝炎ウイルスは直径27nmの球形RNAウイルスであり、ピコルナウイルス科エンテロウイルス属に分類されてきたが、ウイルス粒子の強い熱抵抗性、臓器特異性、既知のピコルナウイルスとの遺伝子配列等から、現在ではエンテロウイルスとは独立したヘパトウイルスに属するとされている(1)。

A型肝炎ウイルスは当初流行性肝炎の原因ウイルスとして発見されたように、基本的には糞便中に排泄され、経口的に感染するウイルスである(fecal-oral route)。しかしながら感染後の詳細な動態については増殖、排泄ともによくわかっていない。サルを用いた感染実験では、肝細胞の他にKupffer細胞、さらに脾臓、腎臓、扁桃、腸管などでHAVが確認されており、小腸粘膜上皮細胞でウイルスの培養が可能という報告も最近あるが(2)、肝臓以外での増殖は確認されていない。また糞便、胆汁中に発症前後にウイルスとともに分泌型抗IgA抗体が検出されることから、肝臓で増殖したウイルスは胆汁から糞便に排泄されるとされているが、その期間や他の体液への排泄については十分な検討はされていない。

A型肝炎は主としてfecal-oral routeで感染するため、上下水の整備されていない環境では大流行をおこす場合があり、現在でも発展途上国ではしばしば問題となっている。一方日本においては衛生環境の整備とともにA型肝炎に罹患する者の数は次第に減ってきている(3)。厚生省などにより数回、抗体保有者数の割合が調べられているが、調査の度に若年層での抗体保有者数は減少してきており、30歳以下の年齢層ではそのほとんどがA型肝炎ウイルス抗体陰性である(4)。現在日本における感染は主として汚染された食物の経口摂取が原因であり、散発性肝炎の形をとることが多いが、小規模な集団発生はいまだに存在している(5-8)。この場合、食中毒のような飲食業者等からの感染が一つにはあるが、家族内及び施設内における二次感染も最近問題になっている(9,10)。従って患者からのウイルス排泄の経路及びその期間の検討は公衆衛生学的観点からも重

要と考えられる。

しかしながら現在までのところ、この点について十分な検討は加えられていない。検討が加えられているのは専ら糞便及び血液であるが、少数の臨床例や動物への感染実験の解析からは図1のように考えられてきた(11)。即ち、通常臨床症状の出現以前に短いウイルス血症が見られ、さらに胆汁から糞便中に数週間ウイルスが排泄されるとされているわけである。多数の臨床例の解析が今まで行われていなかったのは、非特異的症状が先行するために発症から診断までかなりの日数を要する場合が多く検体が得られにくいのに加え、ウイルスゲノムあるいはウイルス抗原の簡便で鋭敏な検査法がなかったためであった。

そこで今回多数の臨床例についてウイルス血症及び糞便中へのウイルス排泄の持続期間を調べることにした。ウイルスゲノムの検出には現在核酸の検出において最も鋭敏と考えられるPCR (polymerase chain reaction) 法を用いることとした。PCR法なしでは研究も臨床も不可能と言っても過言ではないC型肝炎ウイルス (HCV) と異なり、A型肝炎ウイルス (HAV) の場合従来研究目的でPCR法が用いられることが多かったが、今回はゲノムの検出を目的とした簡便な方法を考案し、血中及び糞便中HAV-RNAをRT-PCR法を用いて測定した。

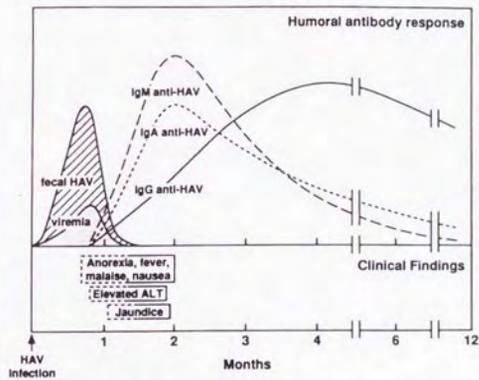


図1 A型肝炎の臨床経過。臨床症状の出現以前に短いウイルス血症が見られ、胆汁から糞便中へのウイルスの排泄がこのやや後まで数週間見られるとされている。

第 一 部

A型肝炎におけるウイルス血症の持続期間に関する検討

(本論文はJ Med Virol 40:35-38, 1993に掲載された。)

要 旨

A型肝炎ウイルス (HAV) 感染の際のウイルス血症は潜伏期に限られると言われてきた。しかしながら、ヒトのA型肝炎におけるウイルス血症の持続期間は、簡便で鋭敏な方法がなかったこともあって明確にされていなかった。患者血清中HAVゲノムを検出する目的で、5'非翻訳領域に一組のプライマーを設定し、RT-PCRを行った。この鋭敏な方法を用いても、大部分の症例では、alanine aminotransferase (ALT) のピーク時点以前でのみHAV-RNA が検出されたが、ALTのピーク時点以後もHAV-RNA が検出された症例も存在した。また、IgM-HA 抗体陽転以後も血清HAV-RNA が検出される症例も存在した。これらの結果はHAV感染におけるウイルス血症は、これまで考えられていたよりも長期間にわたり持続すること、そして血液を介した二次感染の可能性を示している。

はじめに

A型肝炎ウイルス (HAV) の体内侵入後の動態については、不明な点が多い。チンパンジーへの感染実験では、潜伏期後半にウイルス血症が数日間存在することが示されている (12, 13)。ヒトにおいても、輸血後A型肝炎の存在 (14, 15) や患者血清のマーモセットへの感染実験 (16) さらにはヒトへの感染実験 (17, 18) により、ウイルス血症が存在することがわかっている。ウイルス血症の持続期間についても、サルの場合にはマーモセットへの感染実験や cell culture isolation を用いて検討されている (12, 19) が、ヒトの場合十分な検討はなされていない。これは大部分の症例において、病気のピークを過ぎた後に診断が確定するため、診断時には既にウイルス血症は終息しているためと考えられる。さらにウイルスの存在を確認する簡便な方法が存在しなかったためと考えられる。

polymerase chain reaction (PCR) 法は、極めて少数のウイルスゲノムを検出できるため、既にB型肝炎ウイルス (20) やC型肝炎ウイルス (21) において診療及び研究に用いられてきた。我々はウイルスRNAを Reverse transcription (RT)-PCR 法を用いて検出することにより、ヒトHAV血症の持続期間について検討した。

対 象 及 び 方 法

1. 対象及び血清サンプル

IgM-HA 抗体陽性によりA型急性肝炎と診断された25例（男性12例、女性13例）、B型急性肝炎5例、非A非B型急性肝炎5例を対象とした。患者血清は測定まで-80℃で保存された。A型急性肝炎患者血清32サンプルは症状出現後2日目から164日目までのものである。陽性コントロールとしてアフリカミドリザル腎細胞中で培養されたKRM003型A型肝炎ウイルス粒子（化学血清研究所より供与）を用いた。

2. 血清ウイルスマーカー

IgM-HA 抗体、HBs抗原、HBs抗体、HBc抗体は市販のキット（ダイナボット）を用いて測定した。

3. RNA抽出及びRT-PCR 法

血清及びHAV粒子からのRNA抽出はChomczynski 及びSacchiらの方法を用いて行った(22)。100 μ lの血清から抽出されたRNAペレットは25 μ lの滅菌水に溶かした。HAVゲノムの5'非翻訳領域に一組のプライマーを設定した(A1 [sense primer] ; AGCATGGAGCTGTAGGAGTC; A3 [anti-sense primer] ; TAGAGACAGCCCTGACAATC) (23)。またJansenらに従い(24)、VP3領域にも一組のプライマーを設定した(A4 [sense primer] ; ACAGGTATACAAAGTCAG; A5 [anti-sense primer] ; CTCCAGAATGATCTCC) (図1)。anti-sense primer 及び5単位のAMV-RT (Boehringer, Mannheim, Germany) を含む30 μ lの反応液 (dNTP200 μ M, 1XPCR buffer [50mM KCl, 10mM Tris-HCl (PH8.3), 1.5mMMgCl₂, 0.001%【w/v】 gelatin]) 中でcDNAの合成を行った。95℃で20分加熱してRTを失活させた後、sense primer、PCR bufferそして2単位のAmpli Taq (Perkin Elmer Cetus Corp.)を加え全体を100 μ lとし、PCRを行った。PCRの条件は94℃1分、62℃2分、72℃1.5分で30サイクルとした。PCR産物は6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動後エチジウムブロマイド染色を行い解析した。

4. サザンブロット

PCR産物の特異性確認のため、サザンブロットを行った。産物を2%アガロースゲルで分離した後、ナイロン膜 (Nytran, Schleicher & Schuell) に転写した。プライマーA1とA3の間に位置する20塩基のオリゴヌクレオチドプローブ (A2; TCCAATCAATGCATCCACTG) を digoxigenin (Boehringer, Mannheim, Germany) でラベルし、ナイロン膜とハイブリダイゼーションさせた。

Primers and Probe

A1: 291 AGCATGGAGCTGTAGGAGTC
 A3: 562 TAGAGACAGCCCTGACAATC
 A2: 540 TCCACTCAATGCATCCACTG
 A4: 2020 ACAGGTATACAAAGTCAG
 A5: 2226 CTCCAGAATGATCTCC
 A6: 378 CACAAGGGGTAGGCTACGG

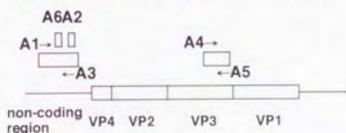


図1 HAVゲノムの構造。本実験に用いたプライマー及びプローブの位置を同時に示す。

結 果

1. PCR産物の特異性

最初にウイルス粒子を用いてRT-PCRを行った。図2は培養HAV及び患者血清から抽出したRNAを用いて行ったRT-PCRの産物を電気泳動したものである。両産物とも予想されたサイズ(272bp)であった。サザンブロットを行ったところ、両産物とも20塩基のオリゴヌクレオチドプローブと特異的に結合した(図2; 4及び5)。VP3領域のプライマーではウイルス粒子からも患者血清からもHAV-RNAは検出できなかった。(データ省略)

2. 血清中HAV-RNAの検出

血清中HAV-RNAはA型肝炎25症例中7例(28%)の、また32サンプル中8サンプル(25%)の血清から検出された。HAV-RNA陽性症例は全て女性であった。急性B型肝炎及び急性非A非B型肝炎の症例からはHAV-RNAは検出されなかった。

A型急性肝炎は通常、発熱や全身倦怠感などの感冒様症状から始まる。そのため、感冒様症状の出現した時点を臨床的発症と定義して、経過中のどの時点でHAV-RNAが出現したかを調べた。図3に示した通り、HAV-RNA陽性の検体は臨床的発症後2日目から7日目までのものであった。しかし、発症後7日目以前の検体でもHAV-RNA陰性のものもあった。

alanine aminotransferase (ALT)とHAV-RNAとの関係を代表的2症例について示したものが図4である。多くの症例において(7例中5例; 71.4%)症例1のように、HAV-RNAはALTのピーク以前にのみ検出されたが、一部の症例(7例中2例; 28.6%)においては、症例2のようにALTのピーク以後でも検出された。

IgM-HA抗体価とHAV-RNAとの関係を調べた結果を図5に示す。大部分のHAV-RNA陽性の検体は、IgM-HA抗体出現以前のものであったが、IgM-HA抗体出現以後もHAV-RNA陽性である検体も見られた。

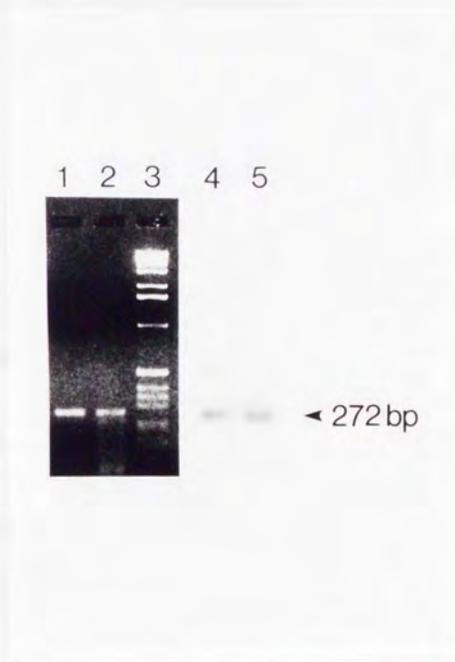


図2 HAV-RNA のPCR法による検出。患者血清 (レーン1, 4) 及び培養HAV (レーン2, 5) から抽出したRNA からcDNA合成後、PCRで増幅した。増幅された272bpのPCR産物はHAVゲノム配列特異的なプローブとハイブリダイズしている。レーン3: 分子量マーカー

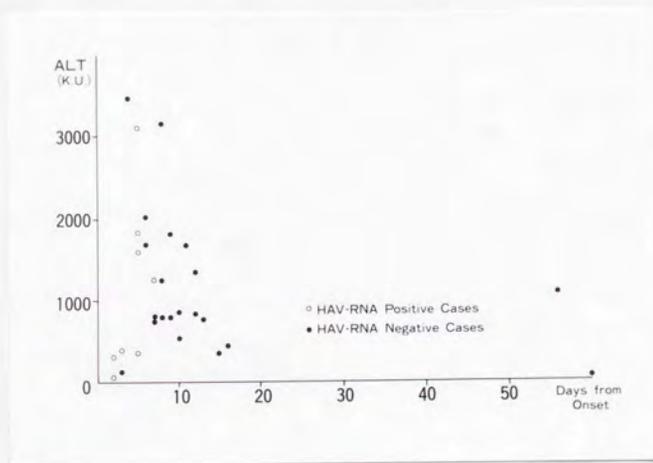


図3 血清中HAV-RNA、ALT値、A型肝炎の臨床的発症からの日数の関係。臨床的発症後2日目から7日目までの血清からHAV-RNAが検出されている。HAV-RNAの有無とALT値の間には関係は認められない。

○=HAV-RNA 陽性症例 ●=HAV-RNA 陰性症例

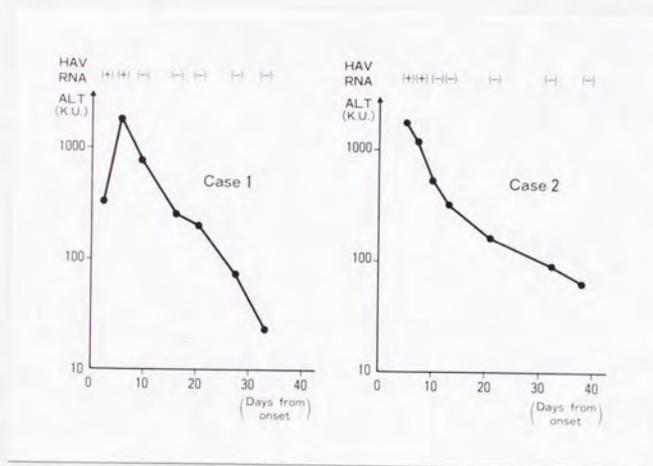


図4 HAV-RNA が血清から検出されたA型肝炎2症例の経過。7例中5例で、HAV-RNA は、Case 1の如くALT値がピークに達する時点以前のみで検出された(左図)。7例中2例で、HAV-RNA は、Case 2の如くALT値がピークに達した時点以後でも検出された(右図)。IgM-HA 抗体はこの時既に陽転化していた。

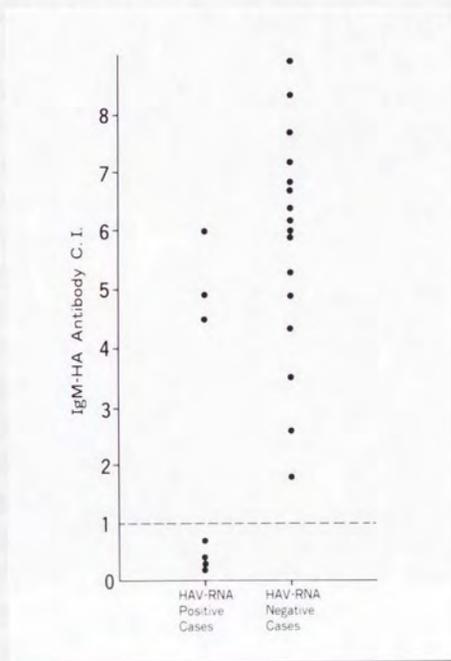


図5 血清HAV-RNA とIgM-HA 抗体価との関係。IgM-HA 抗体価は cut-off index (C.I.)で示した。IgM-HA 抗体が出現しているにもかかわらずHAV-RNA が陽性の症例が3例見られる。

考 察

本研究ではプライマーを5'非翻訳領域に設定し、HAV-RNA の検出に成功した。プライマーを5'非翻訳領域に設定したのはこの部分の塩基配列が最もよく保存されていたためである(23, 25-27)。VP3領域のプライマーではHAV-RNA の検出が不可能だったのはウイルス株間の変異のためと思われる。HAVのウイルス血症の持続期間については、チンパンジー(12,13)及びヨザル(owl monkey)(19, 28)について研究されている。これらの研究ではenzymeimmunoassay あるいはradioimmunofocus assayを用いてHAV抗原を検出している。我々がRT-PCR法を用いたのは、1)手順が簡単で動物への接種よりも結果が早く得られる。2)ウイルス蛋白ではなくウイルスゲノムそのものを検出できる。3)一般にこの方法は感度がよい。等の理由からである。

HAV-RNA のRT-PCR法による検出に関しては、血清及び糞便について既に報告がある(24, 29, 30)。両方のグループともウイルスゲノムの変異を調べるためにVP1あるいはVP3領域にプライマーを設定しており、我々がウイルスゲノムの検出を目的にプライマーを5'非翻訳領域に設定したのとは対照的である。HAV株間でのウイルスゲノム塩基配列の差はそれほど大きいものではないが、中でも5'非翻訳領域はウイルスゲノムの中で最も塩基配列の差が少ない部分である。実際今回用いたHM175株と他のウイルス株の塩基配列とは5'非翻訳領域において96%一致する(23, 25-27)。従ってこの領域はRT-PCRによりウイルスの存在の有無を検出するには最も適した部分と言える。

ヒトにおけるA型肝炎のウイルス血症は感染実験による報告(17,18)及び輸血により偶然発症した症例の報告(14,15)がある。後者は献血時潜伏期にあった供血者の血液からA型肝炎が伝播し、後に発症に到ったものである。これら輸血に使われた血液はHA抗体陰性であり、ALTの上昇も見られていない。A型肝炎におけるウイルス血症の存在は、集団発生の症例から得られた血清をマーマセットに感染させた実験からも明らかにされている(16)。これらの報告からヒトにおいてもウイルス血症が存在する

ことが証明されたが、多数の患者におけるウイルス血症の実態について検討した報告は見られない。ヒトにおけるA型肝炎ウイルス血症については、いくつかの重要な点が明らかにされなければいけない。即ち [1] ウイルス血症と肝機能、特にALTとの関係 [2] ウイルス血症と臨床症状出現からの時間との関係 [3] ヒトA型肝炎におけるウイルス血症の出現頻度である。

本研究により、[1] 臨床症状出現後、7日目までは [2] ALTがピークに達して以降も [3] IgM-HA 抗体出現後も、そして [4] 患者の約4分の1に、A型肝炎ウイルス血症が存在することが明らかになった。HAV感染におけるウイルス血症の頻度は、より早期の血清が集められればさらに高くなるであろう。これらの結果からHAVのウイルス血症は従前考えられていたよりも(31)長期間にわたって続くことがわかった。急性肝炎の患者が入院後A型肝炎と診断され、臨床症状と肝機能が改善傾向にあると、糞便以外からの二次感染には注意が払われない可能性がある。我々の結果は医療行為により、A型肝炎患者の血液から二次感染がおこる可能性、薬物常用者のまわし打ちによる感染 [疫学的には既に疑われている。(32)] の可能性を示唆するものである。

第 二 部

A型肝炎におけるウイルスの糞便中への持続期間に関する検討

(本論文はHepatology 24:10-13, 1996に掲載された。)

要 旨

A型肝炎ウイルス(HAV)感染における糞便へのウイルス排泄は、症状出現後短い期間で終了するとこれまで報告されてきた。糞便中のHAVを polymerase chain reaction で検出した報告は今までもいくつか見られるが、ヒト成人における糞便中へのHAV排泄持続期間については十分な記載がない。本研究では、reverse transcription- polymerase chain reaction 法を用いて散発性A型肝炎患者10人の糞便中HAV-RNA を測定した。HAV-RNA は臨床症状出現後も5人の糞便から検出された。発症から10日目以内の糞便はすべてHAV-RNA 陽性であり、糞便へのウイルス排泄期間は数日から3ヶ月までに及んだ。4人の患者で、alanine aminotransferase (ALT)のピーク後もウイルスが検出され、一人の患者ではALTが正常化した後もHAV-RNA の排泄が見られた。HAVの糞便中への排泄は、症状の消失後数ヶ月続く場合があり、こうした患者がさらにA型肝炎の感染源となる可能性があることが、これらの結果からわかる。

はじめに

A型肝炎は現在でも特に発展途上国において重要な疾病である。これらの国々においては、現在も肝炎の20-25%はA型肝炎ウイルス(HAV)によりひきおこされる(33)。HAVは主として経口感染し、散発性、流行性双方の肝炎をひきおこす。この病気の対策をたてるためには、糞便中へのHAVの排泄期間をはっきりさせることが大切である。HAVの糞便中への排泄はこれまでもいくつかの方法で調べられてきた。免疫電顕法により、HAV抗原が黄疸及びALTのピーク以前の糞便中に存在することが確認されている(34-37)。ラジオイムノアッセイやエンザイムイムノアッセイを用いると、糞便中のHAV抗原はもう少し長期にわたり検出される(38-41)。さらに鋭敏なのは、HAV-RNAをハイブリダイゼーションで検出する方法であり、ヒトHAV感染及びHAV感染実験において糞便中へのウイルス排泄持続期間が検討されている(42,43)。

現在、核酸の検出法として最も鋭敏なのはpolymerase chain reaction (PCR)法である。新生児集中治療施設(NICU)におけるA型肝炎の流行に関する最近の報告によれば、糞便中へのHAV-RNAの排泄は、これまで考えられていたのよりはるかに長い6ヶ月もの間持続したという(44)。しかしながら、新生児の場合免疫能が未熟なため、成人よりも長期にわたって糞便中へのウイルス排泄が持続している可能性がある。

本研究においては、成人A型肝炎患者の糞便中HAV-RNAをtwo stage reverse transcription (RT)-PCR法により測定した。その結果HAVの糞便中への排泄は発症後3ヶ月目まで持続する場合のあること、血清ALT値の正常化後も持続する場合のあることが判明した。

対 象 及 び 方 法

1. 対象及び糞便サンプル

IgM-HA 抗体陽性によりA型急性肝炎と診断された入院患者10例（男性6例、女性4例、 37.2 ± 12.0 歳）を対象とした。すべての患者は、発症前までは健康であり、肝疾患の既往、免疫不全は認められなかった。10人ともA型肝炎の流行している地域への旅行歴はなかった。臨床的発症後3日目から89日目までに糞便39検体、血清33検体が集められた。急性B型肝炎患者2名及び健康人2名から採られた糞便を陰性コントロールとして用いた。また陽性コントロールとしてアフリカミドリザル腎細胞中で培養されたKRM003型A型肝炎ウイルス粒子（化学血清研究所より供与）を用いた。HAV粒子の数はradioimmunofocus unitで示した。

2. 血清ウイルスマーカー

IgM-HA 抗体及び他のウイルスマーカー（HBs抗原、IgM-HBc 抗体）は市販のキット（ダイナボット）を用いて測定した。

3. RNA抽出及びRT-PCR法

血清からのRNA抽出はChomczynski 及びSacchiらの方法を用いて行った（22）。100 μ lの血清から抽出されたRNAペレットは25 μ lの滅菌水に溶かした。糞便中RNAはPBSに懸濁した10%糞便溶液400 μ lから同様の方法で抽出した。

reverse transcription 及びPCRは既報の如く行った（45）。即ち、anti-sense primer (A3; TAGAGACAGCCCTGACAATC) 及び5単位のAMV-RT (Boehringer, Mannheim, Germany) を含む30 μ lの反応液 (dNTP200 μ M, 1XPCR buffer [50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH8.3), 1.5mMMgCl₂, 0.001% [w/v] gelatin] 中でcDNAの合成を行った。95 $^{\circ}$ Cで20分加熱してRTを失活させた後、sense primer (A1; AGCATGGAGCTGTAGGAGTC)、PCR bufferそして2単位のAmpli Taq (Perkin Elmer Cetus Corp.)を加え全体を100 μ lとし、PCRを行った。PCRの条件は94 $^{\circ}$ C1分、62 $^{\circ}$ C2分、72 $^{\circ}$ C1.5分で30サイクルとした。二回目のPCRは一回目のPCR産物2 μ lにinternal anti-sense primer (A2;

TCCACTCAATGCATCCACTG) 及び sense primer (A1) 各 $1 \mu\text{M}$, dNTP $200 \mu\text{M}$, 1X PCR buffer, 2単位の Ampli Taq を加え、全体を $100 \mu\text{l}$ として一回目と同じ条件で行った。産物は6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動後エチジウムブロマイド染色を行い解析した。健康人の血清及び水を、陰性コントロールとして用いた。汚染をさけるため、すべての試薬は紫外線照射し、フィルターピペットチップ (USA/Scientific Plastics, Ocala, FL) を使用した。結果は2回以上の測定で同じ結果が得られたもののみを採用した。

4. サザンロット

PCR産物の特異性確認のため、サザンロットを行った。産物を2%アガロースゲルで分離した後、ナイロン膜 (Nytran, Schleicher & Schuell) に転写した。プライマーA1とA2の間に位置する19塩基のオリゴヌクレオチドプローブ (A6; CACAAGGGGTAGGCTACGG) を digoxigenin (Boehringer, Mannheim, Germany) でラベルし、ナイロン膜とハイブリダイゼーションさせた。

Primers and Probe

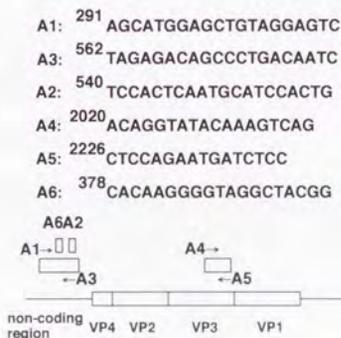


図 (9頁のものと同じ) HAVゲノムの構造。本実験に用いたプライマー及びプローブの位置を同時に示す。

結 果

1. PCR産物の特異性

最初にウイルス粒子を用いてRT-PCRを行った。図1は培養HAV及び患者糞便から抽出したRNAを用いて行ったRT-PCRの産物を電気泳動したものである。両産物とも予想されたサイズ(250bp)であった(図A; レーン1,2,3,6)。サザンブロットを行ったところ、両産物とも19塩基のオリゴヌクレオチドプローブと特異的に結合した(図B)。

2. RT-PCRの感度

糞便中にはPCR反応を阻害する可能性のある物質が含まれている(46)。このことを確認し、糞便中のHAV-RNAを検出する我々のシステムの感度を調べるために、HAV粒子の希釈系列を作製し、健康人の糞便と混ぜ合わせた後RT-PCRを行った。図2に示した通り、HAV粒子10個を含む100 μ lのPBS溶液からHAV-RNAが検出された。糞便を加えたところ、検出感度はHAV粒子10 \cdot 個/100 μ lから10 \cdot 個/100 μ lへと低下したが、一段階のRT-PCRよりも感度は高かった(10 \cdot 個/100 μ l)(45)。

3. 糞便及び血清中HAV-RNAの検出

血清中HAV-RNAはA型肝炎10症例中6例(60%)の、また33サンプル中9サンプル(28%)の血清から検出された。また糞便中HAV-RNAはA型肝炎10症例中5例(50%)の、また39サンプル中17サンプル(47%)の糞便から検出された。急性B型肝炎及び健康人の糞便からはHAV-RNAは検出されなかった。

さらに糞便中HAV-RNAがA型肝炎のどの時期に、どれくらいの期間検出されるかを、感冒様症状の出現時を臨床的発症と定義して調べた。図3に示した通り、HAV-RNAは発症後3日目から89日目までの糞便から検出された。発症から10日目までの糞便に関しては、そのすべてからHAV-RNAが検出された。2症例においては、発症50日目以降も糞便中にHAV-RNAが検出された(症例2, 症例4)。

血清及び糞便中HAV-RNAと血清ALT値との関係を糞便中HAV-RNA陽性患者4名について示したものが図4である。症例1では、

HAV-RNA は発症後18日目まで糞便中で検出されたが、発症後24日目以降は検出されなくなっている。症例2ではALTの異常が3ヶ月以上にわたって認められ、発症後62日目時点で血清HAV-RNA は陽性だったが、71日目以降は陰性化している。しかしながら、発症後89日目でもなお、糞便中HAV-RNA は陽性であった。症例3及び4は糞便中HAV-RNA が間欠的に検出された症例である。症例3ではHAV-RNA が糞便中に発症後14, 18, 30日目の時点で検出されているものの、発症後25日目時点では検出されていない。症例4では、ウイルス血症はALTのピーク時に認められるのみである。ALTは発症後32日目の時点で正常化したものの、糞便中HAV-RNA は、発症後8, 20日目で検出され、22, 28日目で陰性化し、34, 48, 56日目で再陽性化している。



図1 糞便中HAV-RNA のPCR法による検出。A : 6%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色を行ったPCR産物。A型肝炎患者の糞便(レーン1-3)、健康人の糞便(レーン4, 5)及び培養HAV(レーン6)から抽出したRNAからcDNA合成後、PCRで増幅した。B : 増幅された250bpのPCR産物はHAVゲノム配列特異的な19塩基対のプロープとハイブリダイズしている。

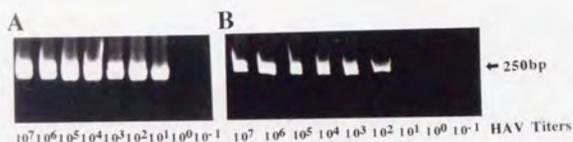


図2 RT-PCRによるHAV-RNA検出系の感度。培養HAV粒子をPBSと混ぜ合わせた後、健康人の糞便と懸濁しないもの(A)及びしたもの(B)に分けてRNAを抽出した。逆転写反応に引き続き、30サイクルのPCRを2回施行したところ、(A)の場合、 $100\mu\text{l}$ 中に10個以上のHAV粒子を含む反応液からはHAV-RNAの検出が可能であった。また10%の糞便懸濁液(B)の場合、検出感度は低下したものの、 $100\mu\text{l}$ 中に 10^2 個以上のHAV粒子を含む反応液からは、HAV-RNAの検出が可能であった。

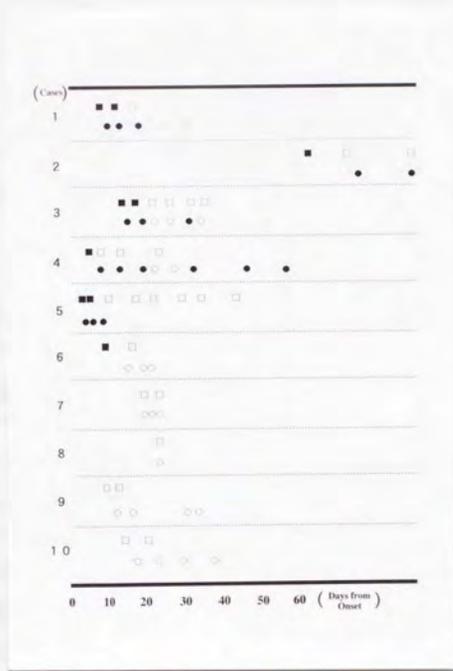


図3 HAV-RNA とA型肝炎の臨床的発症からの日数の関係。患者10人中5人は血清糞便の双方からHAV-RNA が検出されている。また一人の患者は血清のみからHAV-RNA が検出されている。

■ = HAV-RNA 陽性血清 □ = HAV-RNA 陰性血清
 ● = HAV-RNA 陽性糞便 ○ = HAV-RNA 陰性糞便

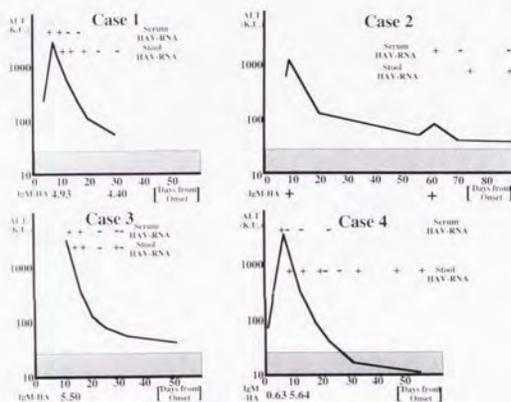


図4 HAV-RNA が糞便から検出された代表的なA型肝炎症例の経過。
 Case 1ではHAV-RNA は発症後18日目までの糞便からは検出されたものの、発症後24日目以降の糞便からは検出されていない。Case 2では、糞便中HAV-RNA は発症後89日目まで陽性であり、この間ALTの異常が持続している。Case 3は臨床的発症後30日後まで間欠的に糞便中へのHAV-RNA 排泄が見られている。Case 4も同様に間欠的に糞便へのHAV-RNA 排泄が見られるが、この患者の場合、血清ALT値が正常化した後にHAVの糞便中への排泄が再びおこっている。ALTの正常域は網線内部である。

HAV, hepatitis A virus ALT, alanine aminotransferase
 K.U., Karmen units

考 察

A型肝炎の経過におけるHAVの糞便中への排泄は様々な方法で調べられてきた。免疫電顕やラジオイムノアッセイを用いて調べると、HAV抗原は発症から2週間糞便中に検出される(34-41)。乳児の場合糞便中へのHAV-RNAの排泄は6ヶ月間続く場合もあるとされているが(44)、免疫電顕やラジオイムノアッセイを用いて調べた結果では、成人における糞便へのHAV-RNAの排泄期間は乳児よりも短いと考えられる(41)。

RT-PCR法を用いて我々は血清及び糞便中HAV-RNAを検出した。以前の我々の成績によれば、A型肝炎のウイルス血症はこれまで報告されていたよりも長期にわたって、即ち臨床的発症から2-7日目までは、認められる場合がある。糞便中HAV-RNAをRT-PCRを用いて検出した報告はこれまでも見られるが(24, 47)、糞便中にPCRを阻害する物質が含まれている(46)とされているため、HAV粒子を特異抗体を用いて固相上に吸着させた後に、RNA抽出が行われている。本研究では、PBSに懸濁した10%糞便溶液からRNA抽出を行った後に2-stage RT-PCRを行ってHAV-RNAを検出している。糞便はPCRを阻害したものの、我々の方法の感度は以前報告した1-stage RT-PCRよりも良好であった(45)。

図3に示す通り、臨床的発症から10日目以内の糞便は全検体HAV-RNA陽性であり、糞便へのHAV-RNA排泄が1ヶ月以上持続(3ヶ月まで)する患者も見られた。実験結果から[1] HAVは約50%の急性A型肝炎患者の血清中で、臨床症状出現後でも検出される。[2] これらの患者において、糞便中HAV-RNAは血清HAV-RNAよりも長期にわたって検出される。ことがわかる。

A型肝炎の一部の症例は遷延した経過をとることが知られている。このような症例の場合、肝臓及び糞便中にHAV抗原が検出できる(48, 49)。今回の研究においても、症例2はALT値の異常が3ヶ月以上持続している。患者の発症早期の糞便を調べることができなかつたものの、糞便中HAV-RNAは、臨床的発症後3ヶ月後も陽性であり、これは従来報告(44)と合致した所見である。また、興味深いことに、症例4はALT値が

正常化した後も2ヶ月間HAVの糞便への排泄が見られている。さらに、本症例及び症例3では、HAVの糞便への排泄が、以前チンパンジーで見られたように間欠的に見られている(50)。従って、検体が臨床経過後期のものであっても、HAV-RNAは糞便中に検出できる可能性が充分あるということになる。A型肝炎は一過性の経過をとる病気として知られているが、本研究からわかる通り、肝機能が正常化した後でさえも、糞便中へのウイルスの排泄が見られることがある。このような患者の糞便中HAV粒子に本当に感染性があるかどうかの評価は必要としても、彼らが社会集団において二次感染源となる可能性は充分あるといえよう。

多くのA型肝炎は、ヒトとヒトとの接触を介して散発性に発生する(51)。このような感染様式の危険因子として、A型肝炎患者との同居、同性愛、幼児との接触機会の多いことが知られている。新生児治療施設からの報告では、HAV-RNAを長期にわたって排泄している新生児との接触の際に、感染防止の注意を払っていなかった職員の間でA型肝炎が流行したことが示唆されている(44)。同居している家族、入院患者、医療従事者の間でも同じ様式でHAVが伝播する可能性があることが、今回の検討からわかる。A型肝炎患者と接触する場合には、仮に回復期にあっても衛生上の注意が必要である。さらに、A型肝炎患者と緊密な接触を持つ場合には、仮に診断が数週間遅れてもHAVワクチンなどの感染防御処置が有効かつ適切なものであるとも言える。

考案とまとめ

A型肝炎は通常一過性の経過をたどるが遷延化する症例も時にある。また、劇症肝炎を引き起こす場合もある。実際我が国における平成5年度の厚生省肝炎連絡協議会の報告では劇症肝炎の100例中16例(16%)をA型肝炎が占めており、その割合が年々増える傾向にあることが知られている(52)。従ってA型肝炎は、大流行の見られる発展途上国ばかりでなく、我が国においても、現在もなお問題の疾病であり、その予防が重要であると考えられる。

我が国におけるA型肝炎は、下水道の完備もあって、最近では感染様式として施設内や家族内での二次感染が問題となることが多い。前者について、例えば奈良らの報告によれば、精神薄弱者の施設では10ヶ月間にわたって患者の発生が続いたことが指摘されている(9)。また後者について大山らはA型肝炎の1家系2家族8名に3ヶ月間にわたって患者の発生がみられたことを報告している(10)。これらの報告からは、A型肝炎患者の糞便や体液へのHAVの排泄は、従来考えられているよりもかなり長期にわたる可能性が示唆される。実際、今回の検討でわかった通り、血液でも発症から1週間後まで、糞便では発症から3ヶ月後までHAVの排泄が見られることがわかった。

A型肝炎の場合、肝機能異常が遷延する場合、さらにはALTが二峰性の変動をする場合が知られている。前者の例が第二章の症例2であり、ALTが正常化に向かう直前の時点で血清HAV-RNAが検出されており、ALTがほぼ正常化した発症3ヶ月の時点でもまだ糞便へのHAV-RNAの排泄が見られている。また井上らはA型劇症肝炎で10ヶ月間肝機能異常が遷延し、肝組織がCAH2Bである例を報告している(53)が、この症例の糞便中HAV-RNAを私が測定したところ、発症後10ヶ月の時点でもまだ陽性であった。また私の検討した症例では後者即ちALTが二峰性の変動を示す例は見られなかったが、Sjogrenらの報告によれば二峰性の変動を示す例においては、ALTの再上昇時に一致して糞便へのHAVの排泄が見られるという(49)。ALTが二峰性の変動を示す機序についてはこのようにウイル

スが長期にわたり感染している可能性の他にウイルス感染により誘発される免疫反応の関与も考えられているが(54-56)、いずれにしてもこれらの結果からは、肝機能異常が見られる時点では糞便へのHAV排泄は持続している確率が高いと考えられる。

さらに第二章の症例4が示すように、肝機能が正常化した後も糞便中にウイルスの排泄が見られる症例が存在することも判明した。このような症例で本当に肝臓内あるいは腸管等他の臓器でウイルスが増殖しているか、さらに糞便中に排泄されるHAVに本当に感染性があるかどうかは不明であるが、A型肝炎で肝機能が正常化した後でどの程度の頻度でどの位の期間、糞便中へのウイルス排泄が持続するかは、さらに症例を増やして検討する必要があると思われる。さらにA型肝炎患者の2割程度に見られる(57)不顕性感染者や健常者の中に糞便中へのウイルス排泄が見られる者があるかどうか、重要な問題である。

今回の検討で、A型肝炎のウイルス血症及び糞便へのウイルス排泄は従来考えられていたよりもかなり長期にわたる場合のあることが判明した。持続して排泄されるHAVに感染性があるかどうか否かは検討が必要であるが、特に糞便の場合は臨床的には治癒と考えられ、患者が家庭や社会に復帰する時点でもなお、HAV-RNAの排泄が続いており、二次感染源となる可能性を示すことができた。従って患者が発生した場合、接触の機会がある人は特に注意が必要だし、診断が確定した時点でA型肝炎ワクチンの接種をすることも考慮するべきだと思われる。

参 考 文 献

1. Minor PD: Picornaviridae. In: Francki RIB, Fauquet CM, Knudson DL, Brown F ed. Classification and Nomenclature of Viruses: Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Archives of Virology 1991, Supplementum 2, pp.320-326.

2. Lemon SM: Hepatitis A- an overview. In: IX Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease 1996.(Abstract), 5

3. 国立病院急性肝炎研究班資料(未公開)

4. 森次保雄ほか: A型肝炎の血清疫学調査:1994年の献血者を対象に. 厚生省非A非B型肝炎研究班 平成6年度研究報告書: 23-25.

5. 瀬戸山浩ほか: 福岡県筑後地方に多発したA型肝炎の検討. 肝臓 1981;22:1386-1392.

6. Fujiyama F, et al: An epidemic of hepatitis A relates to ingestion of raw oysters. Gastroenterol Jpn 1985;20:6-13.

7. 奈良秀八洲ほか: 青森県に流行したA型肝炎についての疫学的研究. 肝臓 1984;25:1377-1384.

8. 早川みち子ほか: 兵庫県南部加古川流域における1990年のA型肝炎の流行に関する調査検討. 肝臓 1992;33:901-904.

9. 奈良秀八洲ほか: ある施設に集団発生したA型肝炎について. 肝臓 1978;19:9-21.

10. 大山正巳ほか: A型肝炎の家族内発生. 日消誌 1980;77:1108-1112.

11. Stapleton JT, Lemon SM: Hepatitis A and hepatitis E. In: Hoeprieh PD, Jordan MC, Ronald AR eds. Infectious Diseases. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1995:790-800.

12. Cohen JI, Feinstone S, Purcell RH: Hepatitis A virus infection in a chimpanzee: Duration of viremia and detection of

virus in saliva and throat swabs. *J Infect Dis* 1989;5:887-890.

13. Hollinger FB, Bladley DW, Maynard JE, Dreesman GR, Melnick JL: Detection of hepatitis A viral antigen by radioimmunoassay. *J Immunol* 1975;115:1464-1466.

14. Hollinger FB, Khan NC, Oefinger PE, Yawn DH, Schmulen AC, Man GR, Melnick JL: Posttransfusion hepatitis type A. *J of Am Med Assoc* 1983;250:2313-2317.

15. Sherertz RJ, Russell BA, Reuman PD: Transmission of hepatitis A virus by transfusion of blood products. *Arch Intern Med* 1984;144:1579-1580.

16. Barker LF, Wong DC, Dienstag JL, Feinstone SM, Lorenz PE, Peterson MR, Purcell RH, Rosen MW: Serologic and animal inoculation studies of a communal outbreak of viral hepatitis, type A. *Am J Med Sci* 1977;134:80-84.

17. Krugman S, Ward R, Giles JP: The natural history of infectious hepatitis. *Am J Med* 1962;32:717-728.

18. Boggs JD, Melnick JL, Conrad ME, Felsher BF: Viral hepatitis: Clinical and tissue culture studies. *J of Am Med Assoc* 1970;214:1041-1046.

19. Lemon SM, Stapleton JT, Leduc JW, Taylor D, Marchwicki R, Binn LN: Cell-culture-adapted variant of hepatitis A virus selected for resistance to neutralizing monoclonal antibody retains virulence in owl monkeys. In: Zuckerman AJ ed. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. New York: Alan R. Liss, 1988:70-73.

20. Kaneko S, Miller RH, Feinstone SM, Unoura M, Kobayashi K, Hattori N, Purcell RH: Detection of hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis using the polymerase chain reaction assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:312-316.

21. Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Tanaka T, Sugai Y, Akahane Y, Machida A, Mishiro S, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M: Detection of hepatitis C virus RNA by a two-stage polymerase chain reaction with two pairs of primers deduced from the 5'-noncoding region. *Jpn J Exp Med* 1990;60:215-222.

22. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt Biochem* 1987;162:156-159.

23. Cohen JI, Ticehurst JR, Purcell RG, Buckler-White A, Baroudy BM: Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: Comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornavirus. *J Virol* 1987;1:50-59.

24. Jansen RW, Siegel G, Lemon SM: Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2867-2871.

25. Jansen RW, Newbold JE, Lemon SM: Complete nucleotide sequence of a cell culture-adapted variant of hepatitis A virus: Comparison with wild-type virus with restricted capacity for in vitro replication. *Virology* 1988;163:299-307.

26. Najarian R, Caput D, Gee W, Potter SJ, Renard A, Merryweather J, Nest GV, Dina D: Primary structure and gene organization of human hepatitis A virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:2627-2631.

27. Paul AB, Tada H, von der Helm K, Wissel T, Kiehn R, Wimmer E, Dienhardt F: The entire nucleotide sequence of the genome of human hepatitis A virus (isolate MBB). *Virus Res* 1987; 8: 153-171.

28. Lemon SM, Binn LN, Marchwicki R, Murphy PC, Ping LH, Jansen RW, Asher LVS, Stapleton JT, Taylor DG, Leduc JW: In vivo replication and reversion to wild-type of a neutralization-resistant antigenic variant of hepatitis A virus. *J Infect Dis* 1990;161:7-13.

29. Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, Totsuka A, Nainan OV, Siegl G, Margolis HS, Isomura S, Ito K, Ishizu T, Moritsugu Y, Lemon SM: Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol* 1992;73:1365-1377.

30. Robertson BH, Khanna B, Nainan OV, Margolis HS: Epidemiologic patterns of wild-type hepatitis A virus determined by genetic variation. *J Infect Dis* 1991; 163: 286-292.

31. Zakim D, Boyer TD. *Hepatology*, 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1990:926-927.

32. Widell A, Hansson BG, Moestrup T, Nordenfelt E: Increased occurrence of hepatitis A with cyclic outbreaks among drug addicts in a Swedish community. *Infection* 1983; 11:198-200.

33. Sherlock S, Dooley J. *Virus Hepatitis*. In: Sherlock S, Dooley J, eds. *Diseases of the Liver and Biliary System*. Ninth Ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1993:266-269.

34. Dienstag JL, Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. Fecal shedding of hepatitis-A antigen. *Lancet* 1975; 1:765-767.

35. Rakela J, Mosley JW. Fecal excretion of hepatitis A virus in humans. *J Infect Dis* 1977; 135:933-938.

36. Flehmig B, Frank H, Frosner GG, Gerth HJ. Hepatitis A-virus particles in stools of patients from a natural hepatitis outbreak in Germany. *Med Microbiol Immunol* 1977; 163: 209-214.

37. Locarnini SA, Gust ID, Ferris AA, Stott AC, Wong ML. A prospective study of acute viral hepatitis with particular reference to hepatitis A. *Bull WHO* 1976; 54:199-206.

38. Hall WT, Bradley DW, Madden DL, Zimmerman DH, Brandt DE. Comparison of sensitivity of radioimmunoassay and immune electron microscopy for detecting hepatitis A antigen in fecal extracts. *Proc Soc Exp Biol Med* 1977; 155:193-198.

39. Frohner GG, Overby LR, Flehmig B, Gerth HJ, Haas H, Decker RH, Ling CM, Zuckerman AJ, Frohner HR. Seroepidemiological investigation of patients and family contacts in an epidemic of hepatitis A. *J Med Virol* 1977; 1: 163-173.

40. Coursaget P, Maupas P, Hibon P, Lesage G, Hubert M.

Hepatitis A diagnosis in man: radioimmunoassay for hepatitis A antigen detection in faeces. *J Med Virol* 1980;6:53-60.

41. Coulepis AG, Locarnini SA, Lehmann NI, Gust ID. Detection of hepatitis A virus in the feces of patients with naturally acquired infections. *J Infect Dis* 1980;141:151-156.

42. Carl M, Kantor RJ, Webster HM, Fields HA, Maynard JE. Excretion of hepatitis A virus in the stools of hospitalized hepatitis patients. *J Med Virol* 1982;9:125-129.

43. Tassopoulos NC, Papaevangelos GJ, Ticehurst JR, Purcell RH. Fecal excretion of Greek strains of hepatitis A virus in patients with hepatitis A and in experimentally infected chimpanzees. *J Infect Dis* 1986;154:231-237.

44. Rosenblum LS, Villarino ME, Nainan OV, Melish ME, Hadler SC, Pinsky PP, Jarvis WR, Ott CE, Margolis HS. Hepatitis A outbreak in a neonatal intensive care unit: risk factors for transmission and evidence of prolonged viral excretion among preterm infants. *J Infect Dis* 1991;164:476-482.

45. Yotsuyanagi H, Iino S, Koike K, Yasuda K, Hino K, Kurokawa K. Duration of viremia in human hepatitis A viral infection as determined by polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1993;40:35-38.

46. Wilde J, Eiden J, Yolken R. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. *J Clin Microbiol* 1990;28:1300-1307.

47. Monceyron C, Grinde B. Detection of hepatitis A virus in clinical and environmental samples by immunomagnetic separation and PCR. *J Virol Methods* 1994;46:157-166.

48. Fagan E, Yousef G, Brahm J, Garelick H, Mann G, Wolstenholme A, Portmann B, Harrison T, Mowbray JF, Mowat A, Zuckerman A, Williams R. Persistence of hepatitis A virus in fulminant hepatitis and after liver transplantation. *J Med Virol* 1990;30:131-136.

49. Sjogren MH, Tanno H, Fay O, Sileoni S, Cohen BD, Burke DS, Feighny RJ. Hepatitis A virus in stool during clinical relapse. *Ann Intern Med* 1987;106:221-226.

50. Bradley DW, Gravelle CR, Cook EH, Fields RM, Maynard JE. Cyclic excretion of hepatitis A virus in experimentally infected chimpanzees: biophysical characterization of the associated HAV particles. *J Med Virol* 1977;1:133-138.

51. Lemon SM. The natural history of hepatitis A: the potential for transmission of blood or blood products [review]. *Vox Sang* 1994;67 (Suppl 4):19-23.

52. 佐藤俊一:劇症肝炎分科会.厚生省肝炎連絡協議会 平成6年度研究報告書:15-16.

53. Inoue K et al: Chronic hepatitis A associated with persistent replication of hepatitis A virus. (submitted)

54. Vento S, Garofano T, Diperrì G, Dolci L, Concia E, Bassetti D. Identification of hepatitis A as a trigger for autoimmune chronic hepatitis type 1 in susceptible individuals. *Lancet* 1991; 337 : 1183-7.

55. Rahaman SM, Shira P, Koff RS. Idiopathic autoimmune chronic hepatitis triggered by hepatitis A. *Am J Gastroenterol* 1994;89:106-8.

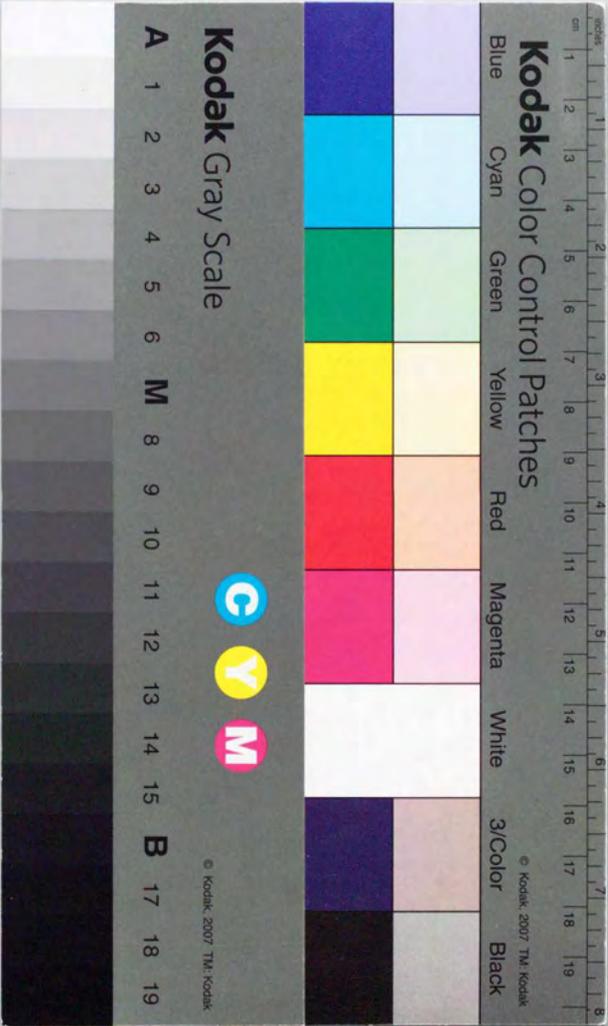
56. Glikson M, Galun E, Oren R. Relapsing hepatitis A: Review of cases and literature survey. *Medicine* 1992;71:14-23.

57. 佐田通夫:A型肝炎の流行施設における不顕性感染についての検討. *肝臓* 1984;22:933-42.

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始御指導頂きました東大第一内科小池和彦先生、聖マリアンナ医大飯野四郎教授に深謝致します。また論文をまとめるにあたって御指導頂きました黒川清教授に感謝申し上げます。





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

C Y M

© Kodak, 2007 TM, Kodak