

原 著

## 輸血による B 型肝炎ウイルス( HBV )感染例でのウイルスゲノム解析： 供血者および患者における quasispecies の解析について

塩沢理英子<sup>1)</sup> 松本千恵子<sup>1)</sup> 光永 滋樹<sup>1)</sup> 中島 一格<sup>1)</sup>  
小谷 珠華<sup>2)</sup> 千代田 晨<sup>2)</sup> 神田 和亮<sup>3)</sup> 十字 猛夫<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>日本赤十字社中央血液センター

<sup>2)</sup>長崎県赤十字血液センター

<sup>3)</sup>国民健康保険琴海町立病院外科

(平成 14 年 5 月 17 日受付)

(平成 14 年 9 月 24 日受理)

### ANALYSIS OF HEPATITIS B VIRUS ( HBV ) GENOME IN A POST-TRANSFUSION HBV INFECTION CASE : QUASISPECIES OF VIRAL GENOME IN THE DONOR AND RECIPIENT

Rieko Shiozawa<sup>1)</sup>, Chieko Matsumoto<sup>1)</sup>, Shigeki Mitsunaga<sup>1)</sup>, Kazunori Nakajima<sup>1)</sup>,  
Tamaka Kotani<sup>2)</sup>, Shin Chiyoda<sup>2)</sup>, Kazuaki Kanda<sup>3)</sup> and Takeo Juji<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Japanese Red Cross Central Blood Center

<sup>2)</sup>Nagasaki Red Cross Blood Center

<sup>3)</sup>Department of Surgery, National Health Insurance Kinkai Municipal Hospital

To investigate the homology of hepatitis B virus( HBV )genomes in a post-transfusion HBV infection case, PCR direct sequencing was performed using 340 nucleotides in the pre-S1 and pre-S2 regions of HBV DNA isolated from a recipient 's serum sample and from a donor 's stored blood sample in which HBV DNA was detected. Two different nucleotides were determined at nt 3051 ( A/G ) and nt 3117 ( G/T ) in the sequences from the donor 's blood and recipient 's serum samples. For precise analysis, the PCR products were cloned, and the DNA sequence was determined in the clones. Four and six sequences were obtained from the clones from the donor 's blood and recipient 's serum samples, respectively. These sequences slightly differed at three positions, namely nt 3051 G/A, nt 3070 G/A and nt 3117 G/T. Each sequence determined from the donor 's blood sample corresponded to one from the patient 's serum sample. However, the most predominant sequences from the donor 's blood and patient 's serum samples differed at nt 3051 ( A/G ) and nt 3117 ( G/T ). It was considered that the difference in the ratio of quasispecies between the donor and recipient resulted in a discrepancy between sequences determined by PCR direct sequencing.

**Key words** : post-transfusion HBV infection, identification of HBV genome, quasispecies, HBV pre-S region

#### はじめに

輸血によるウイルス感染のリスクは血清学的検査法の向上, さらに核酸増幅検査( NAT )の導入

により激減した<sup>1)</sup>. B 型肝炎ウイルス( HBV )感染も同様に著しく減少したが, 少数ながら現在も輸血による HBV 感染が疑われる症例が血液セン

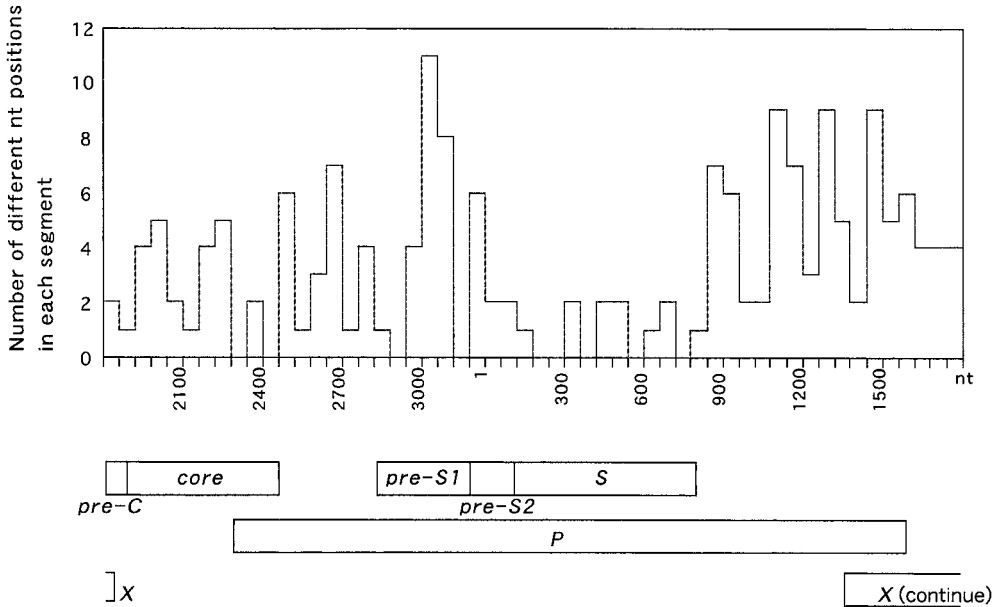


Fig. 1 Number of different nucleotide ( nt ) positions among five HBV strains that were classified into genotype C. 3215-nt HBV DNA was divided into 54 segments ( 53 segments were 60 nts in length and the last was 35 nts ) The number of different nt positions was counted in each segment. The columns at the bottom indicate the coding regions of the HBV genome.

ターに寄せられている。

日本赤十字社では1996年9月以降、献血と同時に採血された検体を保管し、後日ウイルス感染など輸血による副作用が疑われた場合には、患者に輸血されたものと同じ血液を用いて解析を行っている。輸血後HBV感染が疑われた症例では、該当する献血者の保管検体を用いて血清学的検査およびHBV DNAの検出を行い、HBV DNAが検出された場合には、患者と献血者のHBV遺伝子の相同性をPCR direct sequencing法により解析している<sup>2)</sup>。そして、患者と献血者のHBV DNA塩基配列が完全に一致すると輸血による感染の可能性が高いと判断される。

近年、HBV感染者の血液中にゲノムが少しずつ異なる複数のHBV株が存在することが報告されている<sup>3,4)</sup>。このように、少しずつ配列の異なる多数の変異体が、単一の宿主内で不均一な集合体を形成するとき、この変異体はquasispeciesと呼ばれる<sup>5)</sup>。輸血後HBV感染症例においてもこのよ

うなquasispeciesが存在するかもしれない。我々は、患者と献血者の血液中に複数のHBV DNA塩基配列が混在するように見受けられた例を経験したので、患者と献血者のHBV遺伝子の相同性をゲノムをクローニングして詳細に解析した。

### 対象および方法

#### 1. 対象症例

患者は75歳の男性で、8名の献血者から輸血を受けた。輸血から約3カ月後にHBs抗原が陽転化し、輸血後HBV感染が疑われた。輸血に使用された8名の献血者の保管検体を用いて解析を行ったところ、1名の保管検体よりHBV DNAが検出され、患者のHBV感染の原因が輸血である可能性が高いと考えられた<sup>6)</sup>。

#### 2. 相同性解析領域の選択

複数のウイルス感染者の感染源が同一か否かを、そのウイルス株間の相同性で判断するには、一般の株間で多様性が大きい領域で比較することが有効である。そこで、genotype Cで全長の配列

が報告されている5株 (accession No. M12906, V00867, X01587, X04615, X14193) について比較した。全長3215塩基を60塩基ごとに区切り, 各60塩基ごとに比較した5株の配列間で一致しなかった塩基数を数えたところ, 図1に示した通り *pre-S1* から *pre-S2* にかけて, またPの終わりからXの前半がHBV株間での多様性が大きかった。このうち前者では多様性の大きい領域の前後に相同性の保たれた領域があり, PCRの対象とするのに適当と考えられた。そこで *pre-S1* から *pre-S2* にかけてを解析領域とした。

### 3. *pre-S* 領域の semi-nested PCR

100 $\mu$ l の血清もしくは血漿検体よりスマイテスト EX-R&D (株)ゲノムサイエンス研究所)の使用説明書に従ってDNAの抽出を行った。outer PCR用プライマーとして B2974 (sense); 5'-CCAGATTGGGACTTCAACC-3' (nt 2974-nt 2992)と B17(antisense); 5'-ACACGAGCAGGG-GTCCTAGG-3' (nt 178-nt 197)を, nested PCR用プライマーとして, B2974と B16(antisense); 5'-AGTCCTCGAGAAGATTGAC-3' (nt 118-nt 136)を用いた。ヌクレオチド番号 (nt) は Ono<sup>7</sup>が報告した塩基配列に基づいた。outer PCRには血漿100 $\mu$ l由来のHBVDNAを用い, nested PCRにはouter PCR産物3 $\mu$ lを用いた。増幅はTaq polymeraseを用いた反応液50 $\mu$ lで変性94 $^{\circ}$ C 1分, アニール55 $^{\circ}$ C 1分, 伸張72 $^{\circ}$ C 1.5分 で30サイクル(最後に5分間伸張させた)反応させた。

### 4. PCR direct sequencing および genotyping

nested PCR産物をアガロースゲル電気泳動後, 検出された特異バンド(383bp)を切り出し, PCR産物を精製した。Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)を用いて, PCR産物の5'末端と3'末端の双方向からのdirect sequencingを行い, ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)により塩基配列を決定した。

HBVのgenotypeは, Usuda<sup>8)</sup>の方法に基づき, *pre-S2*領域のアミノ酸配列より推測した。

### 5. PCR産物のクローニングおよび sequencing

PCR産物をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen)を用いてプラスミドベクター(pCR 2.1-TOPO)に組み込みクローン化した後, プライマーB2974およびB16を用いてcycle sequencing法により塩基配列を決定した。Taq polymeraseのDNA合成に関する忠実性(fidelity)は高くない(突然変異出現頻度 $1 \sim 2 \times 10^{-4}$ )<sup>9)</sup>ため, PCR産物中には誤った塩基が取り込まれた分子が少数ながら存在する。従って, 75クローンのうち2クローン以上に見られた塩基置換をとりあげて塩基配列を決定した。

## 結 果

### 1. PCR direct sequencing 法による *pre-S* 領域の塩基配列

輸血から約3カ月後に採血された患者検体および献血者の保管検体より得たHBVDNAのPCR direct sequencingにより, HBV *pre-S*領域のnt 3007-nt 131(346bp)の塩基配列を決定した。患者と献血者のHBVDNA塩基配列を比較したところ, シークエンサーの機械的な判定では, nt 3051が患者はG, 献血者はA, nt 3117が患者はT, 献血者はGとなり, 双方の配列は完全には一致しなかった(図2)。しかしながら, 図3に示したように, 一致しなかった2箇所のシークエンス電気泳動パターンは, 患者, 献血者ともに小さなピークがメインピークと共に見られていて, nt 3051はGとA, nt 3117はGとTが混在していた。従って, 患者と献血者は同じ塩基配列の混在型であり, 双方の配列は一致していると結論された。

*pre-S2*領域のアミノ酸配列から推測されるHBV genotypeは, 患者, 献血者ともにgenotype Cに分類された。

### 2. クローン化DNAの塩基配列

PCR direct sequencingの結果では複数種のHBVDNA配列があり, 患者と献血者の検体とではその混在比が異なっているように見受けられたので, PCR産物をクローニングしてさらに詳しく塩基配列を解析した。患者については25クローン, 献血者については50クローンの塩基配列を決

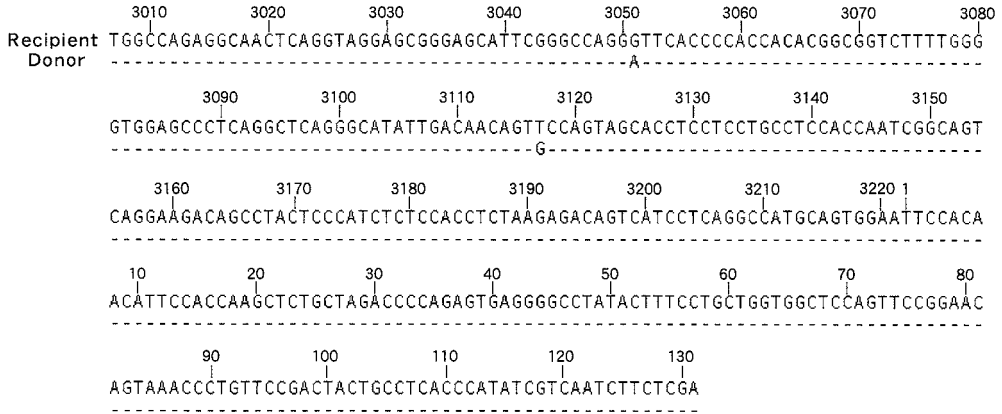


Fig. 2 DNA sequences determined by PCR direct sequencing of the pre-S1 and pre-S2 regions of HBV DNA obtained from the recipient's serum and donor's blood samples. Dashes indicate sequence identity. The two sequences differed from each other at nt 3051 and nt 3117.

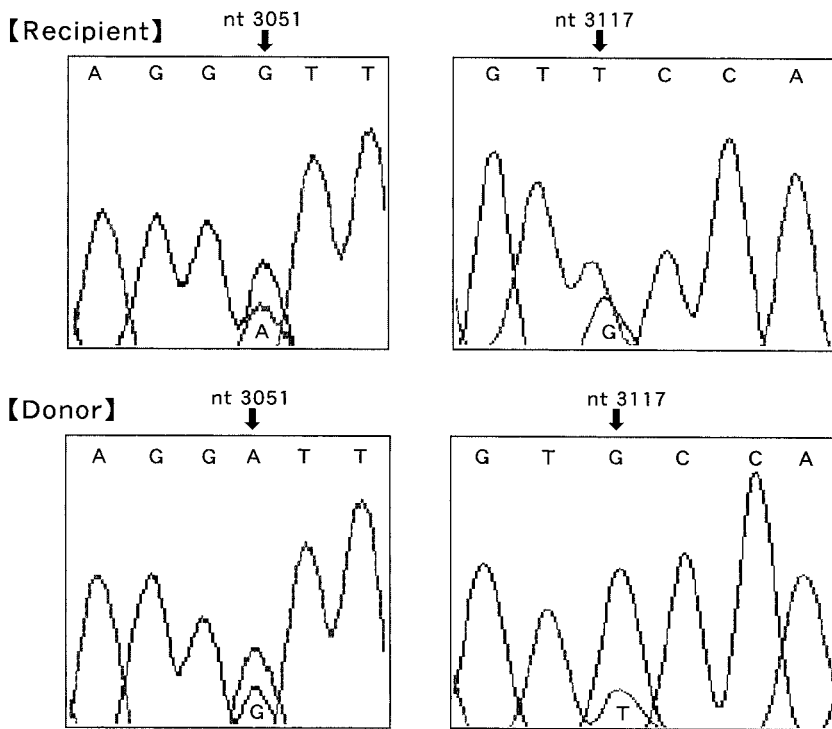


Fig. 3 Raw data of PCR direct sequencing of the pre-S1 and pre-S2 regions of HBV DNA obtained from the recipient's serum and donor's blood samples. The two sequences showed heterogeneity at nt 3051 (G/A) and nt 3117 (T/G)

定したところ、患者と献血者に共通して4種類の配列が見られ(配列1~4)、さらに患者のみに2

種類の配列(配列5~6)が見られた(図4)。それらの配列の割合は、配列1( nt 3051 : G , nt 3070 :

```

                3040          3050          3060          3070          3080
Sequence-1 GCGGGAGCAT TCGGGCCAGG GTTCACCCCA CCACACGGCG GTCTTTTGGG
Sequence-2 ----- A-----
Sequence-3 -----
Sequence-4 ----- A-----
Sequence-5 ----- A----- A-----
Sequence-6 ----- A----- A-----

                3090          3100          3110          3120          3130
Sequence-1 GTGGAGCCCT CAGGCTCAGG GCATATTGAC AACAGTGCCA GTAGCACCTC
Sequence-2 -----
Sequence-3 ----- T-----
Sequence-4 ----- T-----
Sequence-5 -----
Sequence-6 ----- T-----
    
```

Fig. 4 Sequences of cloned DNA of the pre-S1 and pre-S2 regions of HBV obtained from the recipient's serum and donor's blood samples. Dashes indicate sequence identity. Sequence 1 to sequence 4 were common to the recipient and donor. Sequences 5 and 6 were unique to the recipient.

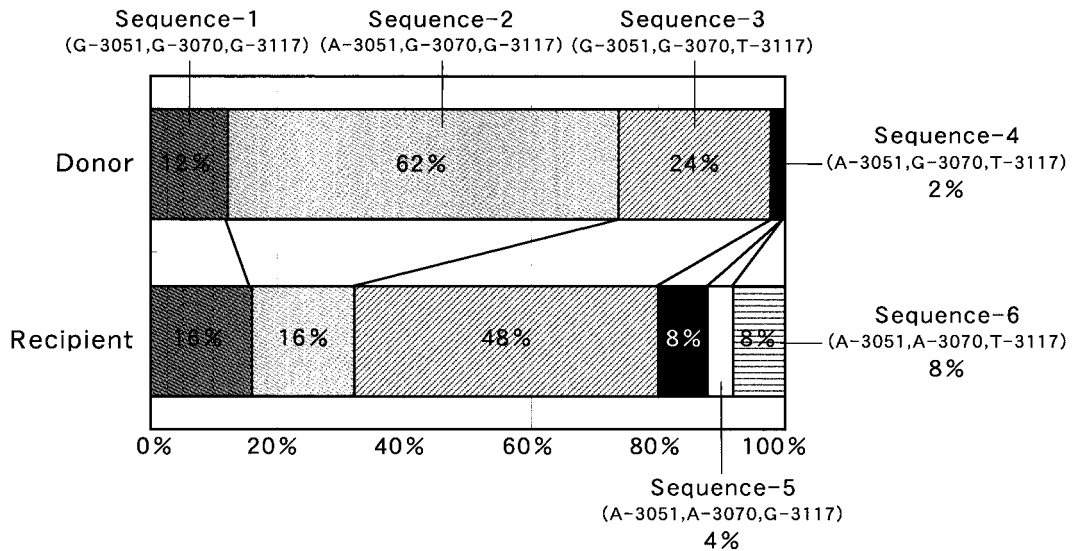


Fig. 5 Frequency of specific sequences among cloned DNA of the HBV pre-S1 and pre-S2 regions from the recipient's serum and donor's blood samples.

G, nt 3117 : G)は患者では4クローン(16%), 献血者では6クローン(12%), 配列2(nt 3051 : A, nt 3070 : G, nt 3117 : G)は患者では4クローン(16%), 献血者では31クローン(62%), 配列3(nt 3051 : G, nt 3070 : G, nt 3117 : T)は患者では12クローン(48%), 献血者では12クローン(24%), 配列4(nt 3051 : A, nt 3070 : G, nt 3117 :

T)は患者では2クローン(8%), 献血者では1クローン(2%)であった。さらに患者のみに見られた配列5(nt 3051 : A, nt 3070 : A, nt 3117 : G), 配列6(nt 3051 : A, nt 3070 : A, nt 3117 : T)はそれぞれ1クローン(4%), 2クローン(8%)であった(図5)。

## 考 察

クローニングして塩基配列を解析した結果、患者、献血者ともに nt 3051 が A の株と G の株、また nt 3117 が G の株と T の株が混在し、PCR direct sequencing の結果と矛盾しなかった。さらに患者においては、少数ながら nt 3070 が A の株も存在することがわかった。

患者および献血者の血液中には複数の HBV 株 (quasispecies) が存在し、その中の dominant (多数派) は患者では配列 3、献血者では配列 2 であり、献血者の minor (少数派) HBV 株が患者の血液中で多数派として存在していた。双方の HBV の多数派の配列が異なるために、多数派の配列しか反映しない PCR direct sequencing 法では、一見異なった配列に判定されることが考えられた。また、本症例で患者のみに見られた HBV 株 (配列 5, 6) は、患者の中で新たに変異して出現したもの、もしくは献血者の血液中にも存在するがきわめて minor な株のため今回のクローニングでは検出できなかったものと考えられた。

これまで、献血者の保管検体から HBV DNA が検出された場合には、PCR direct sequencing 法により患者と献血者の HBV DNA 塩基配列を比較し、輸血との因果関係を判断してきた。しかし、本症例のように献血者では minor な株であった HBV が、患者では優勢になる場合も考えられる。以前にも我々は、輸血による感染と考えられた例で、献血者の血液中では minor であった HBV 株が患者では多数派として検出された症例を経験している<sup>11)</sup>。従って、輸血後 HBV 感染症例の解析において、PCR direct sequencing 法で患者と献血者由来の HBV DNA 塩基配列が一致をみない場合は、HBV の quasispecies を詳細に解析する必要があると思われる。

minor な HBV 株の選択的な感染については、院内感染<sup>3)12)13)</sup>や出生時の垂直感染<sup>4)14)</sup>での報告があり、新生児劇症 B 型肝炎は変異株の選択的な感染に関係している<sup>4)</sup>という報告もある。今回の症例は、輸血による HBV 感染においても同様に minor な HBV 株の選択的感染例があることを示している。

謝辞：本報告を行うにあたり、情報の収集を行って下さいました長崎県赤十字血液センター医薬情報担当の井上純子様へ感謝いたします。

## 文 献

- 1) Japanese Red Cross NAT Screening Research Group : The first large-scale nucleic acid amplification testing ( NAT ) of donated blood using multiplex reagent for simultaneous detection of HBV, HCV, and HIV-1 and significance of NAT for HBV. *Microbiol Immunol*, 45( 9 ) : 667-672, 2001.
- 2) Matsumoto, C., et al. : Analysis of HBV infection after blood transfusion in Japan through investigation of a comprehensive donor specimen repository. *Transfusion*, 41( 7 ) : 878-884, 2001.
- 3) Ngui, S.L., Teo, C.G. : Hepatitis B virus genomic heterogeneity : variation between quasispecies may confound molecular epidemiological analyses of transmission incidents. *J Viral Hepat*, 4( 5 ) : 309-315, 1997.
- 4) von Weizsacker, F., et al. : Selective transmission of variant genomes from mother to infant in neonatal fulminant hepatitis B. *Hepatology*, 21( 1 ) : 8-13, 1995.
- 5) Domingo, E., et al. : The quasispecies ( extremely heterogeneous ) nature of viral RNA genome populations : biological relevance a review. *Gene*, 40( 1 ) : 1-8, 1985.
- 6) 千代田 農, 他 : 低濃度 HBV キャリア血液による感染. *日本輸血学会雑誌*, 47( 6 ) : 845-848, 2002.
- 7) Ono, Y., et al. : The complete nucleotide sequence of the cloned hepatitis B virus DNA ; subtype adr and adw. *Nucleic Acid Res*, 11( 6 ) : 1747-1757, 1983.
- 8) Usuda, S., et al. : Serological detection of hepatitis B virus genotypes by ELISA with monoclonal antibodies to type-specific epitopes in the preS2-region product. *J Virol Methods*, 80( 1 ) : 97-112, 1999.
- 9) Tindall, K.R., Kunkel, T.A. : Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry*, 27( 16 ) : 6008-6013, 1988.
- 10) Keohavong, P., Thilly, W.G. : Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80( 23 ) : 9253-9257.
- 11) 松本千恵子, 他 : 重篤な B 型肝炎における HBV ゲノムの解析 ( 第 2 報 ). *日本輸血学会雑誌*, 43( 2 ) : 195, 1997.
- 12) Ngui, S.L., et al. : Selective transmission of hepatitis B virus after percutaneous exposure. *J Infect Dis*, 181( 3 ) : 838-843, 2000.
- 13) Zuckerman, M.A., et al. : Investigation of hepatic

tis B virus transmission in a health care setting :  
application of direct sequence analysis. J Infect  
Dis, 172( 4 ) : 1080 - 1083, 1995.  
14 ) Raimondo, G., et al. : Is the course of perinatal

hepatitis B virus infection influenced by genetic  
heterogeneity of the virus? J Med Virol, 40( 2 ) :  
87 - 90, 1993.

---