

E型肝炎ウイルスの遺伝子型3型株および4型株迅速鑑別検査法の開発

飯田 樹里^{1)*} 小林 悠^{1)*} 坂田 秀勝¹⁾ 松林 圭二²⁾ 佐藤進一郎¹⁾生田 克哉³⁾ 紀野 修一¹⁾

E型肝炎ウイルス(HEV)はE型肝炎の原因ウイルスである。北海道では高病原性である4型株の検出頻度が高く、また2例の輸血後感染事例が確認されたため、献血者におけるHEV核酸増幅検査を試行的に実施している。HEV陽性検体についてはRNAの定量に加えて分子系統樹解析による遺伝子型決定を行っているが、これには数日を要する。そこで3型と4型の迅速鑑別法としてマルチプレックスreal-time RT-PCR法(鑑別PCR)を開発した。3型、4型株検出用特異プローブの標識には異なる蛍光色素を用いた。鑑別PCRによる遺伝子型決定までの所要時間は約4.5時間であり、現行のHEV RNA定量検査との同時測定が可能であった。鑑別PCRの平均検出感度は、血漿1ml使用時において、3型で38IU/ml、4型で68IU/mlと推定された。またHEV陽性検体340本中297本について鑑別PCRで決定された遺伝子型は、分子系統樹解析の結果と一致した。今回開発した鑑別PCRにより、献血者本人への受診勧奨や、医療機関に対するE型肝炎に係る有用な診療情報提供が早期に可能になると考えられる。

キーワード：E型肝炎ウイルス、E型肝炎、遺伝子型、マルチプレックスreal-time RT-PCR、分子系統樹解析

*本論文に関して同等に貢献した。

はじめに

E型肝炎ウイルス(HEV)はE型肝炎の原因ウイルスとして世界的に広く分布しており、以前は輸入感染症と考えられていたが、近年では先進国においても土着株が確認されている。ヒトに感染するHEVは少なくとも1~4および7の遺伝子型に分類され¹⁾、日本では主に3型株と4型株が検出される²⁾。これらはブタやイノシシ、シカなどにも感染する人獣共通感染症であり、HEV感染動物の肉や内臓を生、あるいは加熱が不十分のまま摂取することにより感染する「食物感染」が主な感染経路と考えられている³⁾。4型は3型よりも高病原性で、北海道は国内の他の地域よりも4型株の検出頻度が高いことが知られており^{2,4)}、また2例の輸血感染が確認されたことなどから⁵⁻⁷⁾、日本赤十字社(日赤)は北海道の献血者におけるHEV感染実態を調査するため、2005年1月から20プールHEV核酸増幅検査(NAT)、2014年8月からは個別HEV NATを導入し試行的に実施している⁸⁾。

HEV陽性献血者に対しては、体調が悪くなった場合の医療機関への受診勧奨や、一定期間の献血制限に關

する通知文を送付している⁹⁾。また、HEV NAT陽性となった検体についてはin-house real-time RT-PCRによる定量(定量PCR)および分子系統樹解析による遺伝子型の決定を行っているが、遺伝子型の決定には数日を要する。そのため、遺伝子型(とくに高病原性の4型)の結果はその後の治療方針等の判断材料として有用な情報であるにもかかわらず、献血者への通知文発送時や医療機関からの問い合わせ時などに、早期の情報提供が難しいのが現状である。そこで迅速・簡易に遺伝子型3型と4型を鑑別する検査法としてマルチプレックスreal-time RT-PCR法(鑑別PCR)を開発した。

対象と方法

1. 対象

2016年1月~2018年12月までに試行的HEV NATによりHEV RNA陽性と判定された北海道内献血者の血清または血漿検体のうち340本を対象とした。なお本研究は、日赤倫理委員会による承認のもと実施した。

2. 定量PCRおよび分子系統樹解析

HEV RNA陽性検体340本について、QIAamp

1) 日本赤十字社北海道ブロック血液センター

2) 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所

3) 北海道赤十字血液センター

[受付日：2019年8月22日、受理日：2019年9月18日]

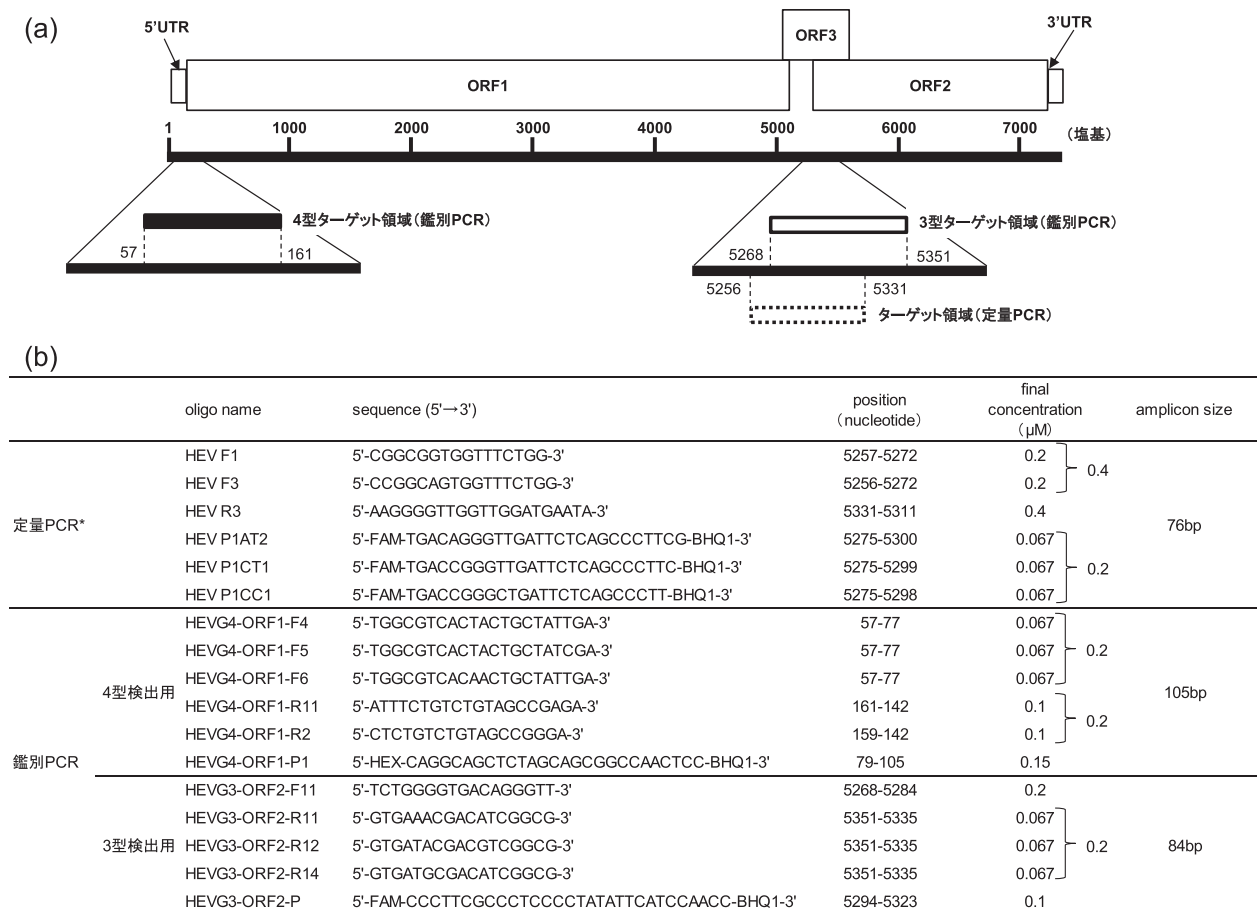


図1 定量PCRと鑑別PCRのターゲット領域およびプライマー・プローブ

(a) HEV ゲノムの構造および定量PCRと鑑別PCRのターゲット領域を示す。UTR: untranslated region, ORF: open reading frame.

(b) 定量PCRおよび鑑別PCRのプライマー・プローブについて示す。positionはHEV genotype 1 (isolate Human/Burma, GenBank accession no. M73218)に対応。bp: base pair. FAM: 6-carboxyfluorescein. HEX: hexachlorofluorescein. BHQ: black hole quencher. *: 既報⁵⁾を一部改変。

MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN) を使用して血清または血漿 0.2ml から溶出量 40μl で核酸を抽出し、そのうち 20μl を検査に使用した。なお、検体 0.2ml 使用時に検出できなかった RNA 低濃度検体については 1ml を使用した。定量PCRの検査は既報⁵⁾のプライマー・プローブ(図1b)と、増幅試薬(QuantiTect Probe RT-PCR Kit, QIAGEN), および 7500リアルタイムPCRシステム(Applied Biosystems)を使用し、50°C/30分、95°C/15分の後、94°C/15秒、60°C/1分を50サイクルで実施し特異蛍光を検出した。定量値は国内標準品の原料(JRC-HE3¹⁰⁾の10倍連続希釈液(RNA濃度: 10²⁷~10⁶⁷IU/ml)を定量用スタンダードとして、得られた検量線から算出した。この方法の検出感度は52.2 IU/mlであった⁷⁾。なお、抽出に使用する検体量を増やすことで、その量に比例して検出感度が上昇することを確認した。したがって、検体量を1mlに増やすことで、定量値も5倍となった(データ未掲載)。

同検体(340本)の分子系統樹解析は、既報⁶⁾¹¹⁾に基づきOpen Reading Frame (ORF) 1/326nt領域およびORF2/412nt領域について、1st RT-PCRおよび2nd PCRを実施し、ABI PRISM 3130xl (Thermo Fisher Scientific)を使用してdirect sequencingにより塩基配列を決定した。その後ソフトウェアMEGA 6¹²⁾を用いて、neighbor-joining methodによる分子系統樹を作成し、遺伝子型を決定した。

3. 鑑別PCRのプライマー・プローブ設計と測定

鑑別PCRの開発において、4型株の検出はORF1領域にて4型の塩基配列の保存性が高く、3型と配列が不一致となる領域をターゲットとした。また、3型株の検出はORF2/3領域にて同様にターゲット領域を選択した(図1a)。各領域において、ソフトウェア(GENE-TYX ver.14, ゼネティックス)を用いてプライマーの候補品を50セット検索し、GenBank登録株の塩基配列と相同性を確認した後、5セットずつ設計した。これら

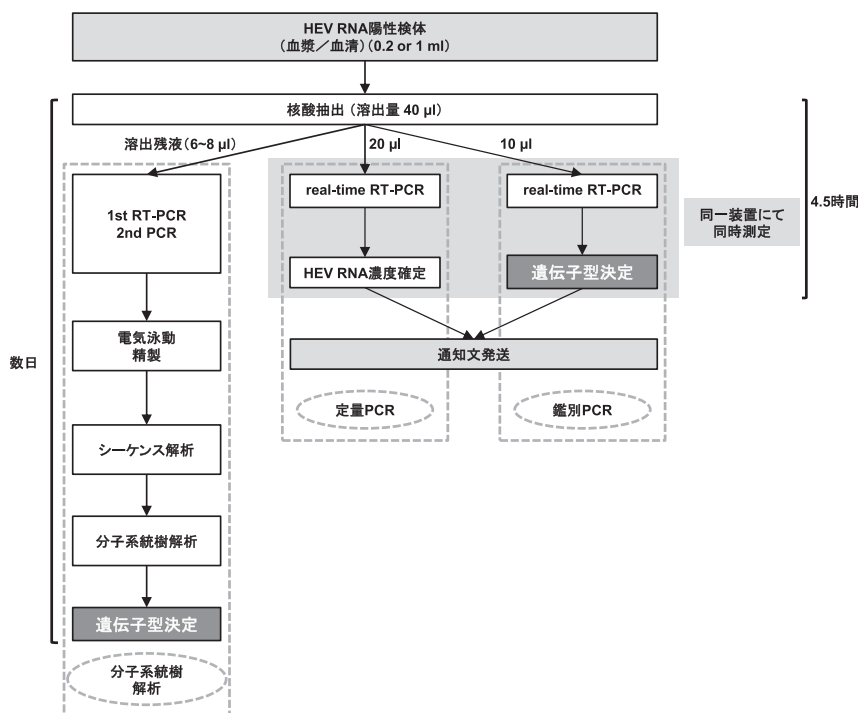


図2 分子系統樹解析と鑑別 PCR の遺伝子型決定までのフロー

「分子系統樹解析」では、定量 PCR と鑑別 PCR 後の溶出残液 (6~8µl) を使用し PCR を実施しているが、電気泳動により増幅産物が得られなかった場合は、使用検体量を増やし増幅産物が得られるまで複数回実施している。この方法によりサブジェノタイプを含めた遺伝子型を決定することができるが、操作手順が多く数日を要する。一方、迅速・簡易な遺伝子型決定を目的とし、新規開発した「鑑別 PCR」では、核酸抽出からの所要時間が約 4.5 時間と大幅に短縮できた。また、現行の定量 PCR と同一装置上で同時測定が可能となった。

の反応性を確認するため、HEV 陽性検体 12 本について、増幅試薬 (QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit, QIAGEN) を用いて融解曲線解析を行った。また、各遺伝子型に特異的な TaqMan プローブをプライマーと同様に設計し、蛍光色素は 3 型で FAM, 4 型で HEX を標識した (図 1b)。設計したプライマー・プローブを用いて、上記検体 12 本について鑑別 PCR を実施し、各遺伝子型に特異的な蛍光を検出した。なお、検査には核酸抽出液を 10µl 使用し、試薬・装置・反応条件は定量 PCR と同様に実施した。

4. 鑑別 PCR の特異性の評価

HEV RNA 陽性検体 340 本について鑑別 PCR を実施した。なお、50IU/ml 未満の低濃度検体および、血漿 0.2ml での核酸抽出時に同定できなかった検体については、血漿 1ml を使用した。また、3 型と 4 型の混合検体を調製し、鑑別 PCR を実施した (N=4)。混合検体の調製は、3 型 (10⁴ IU/ml) に対して、RNA 濃度が 10⁴, 10³, 10² IU/ml となるように 4 型を添加した。また、4 型 (10⁴ IU/ml) に対しても同様に 3 型を添加した。

5. 鑑別 PCR の検出感度測定

検出感度の評価には、北海道の献血者から分離され

る主な HEV 株のうち、3 型 4 本、4 型 3 本を選択した。詳細は、3b, 3e, および 4b 株と、3a 株は 2 種類のクラスターから各 1 株 (3a-1 および 3a-2), 4c 株は Kitami/Abashiri 株¹³⁾, Sapporo/New Sapporo 株¹⁴⁾ から各 1 株 (4c-K および 4c-S) を選択した。それぞれの検体を、HEV RNA 濃度が 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 IU/ml となるように希釈調製し、各検体 0.2ml を使用して鑑別 PCR を実施後 (N=24)、統計ソフト JMP[®]14 (SAS) を用いて、ロジスティック回帰解析の逆推定により検出感度を算出した。

結 果

1. 定量 PCR および分子系統樹解析

定量 PCR は、核酸抽出から HEV RNA 濃度決定までの所要時間が約 4.5 時間であった (図 2)。一方、分子系統樹解析による遺伝子型決定は、操作手順が多く各操作に時間がかかるため数日を要した (図 2)。定量 PCR による HEV 陽性検体 340 本の RNA 濃度分布を図 3 に示した。また、それらについて分子系統樹解析を行った結果、3 型株は 283 本 (83%)、4 型株は 48 本 (14%) であった。内訳 (同定不能を除く) は 3a : 105 本, 3

b : 139 本, 3e : 14 本, 3f : 2 本, 3i : 1 本, 4c : 43 本, および 4b : 4 本であった。遺伝子型不明となった検体 9 本 (3%) はいずれも RNA 低濃度検体 (10IU/ml 未満) であった。

2. 鑑別 PCR のプライマー・プローブの反応性確認

HEV 陽性検体 12 本 (3 型 7 本, 4 型 5 本) を用いて融解曲線解析を行った結果, 各遺伝子型に特異的なピークが認められ, 最も高濃度に検出できたプライマーセットを選択した (図 1b)。

次に, 鑑別 PCR 用に設計したプライマー・プローブの至適終濃度を検討した結果, 図 1b に示した終濃度での反応性が最も感度・特異性に優れていた (データ未掲載)。この終濃度で 3 型検出用および 4 型検出用のプライマー・プローブを全て混合し, 上記検体 12 本について鑑別 PCR を行った。その結果, 3 型 (7 本) および 4 型 (5 本) でそれぞれ特異的な蛍光が検出され, 非特異的な増幅は確認されなかった (図 4)。なお, 核酸抽出から遺伝子型決定までの所要時間は約 4.5 時間であっ

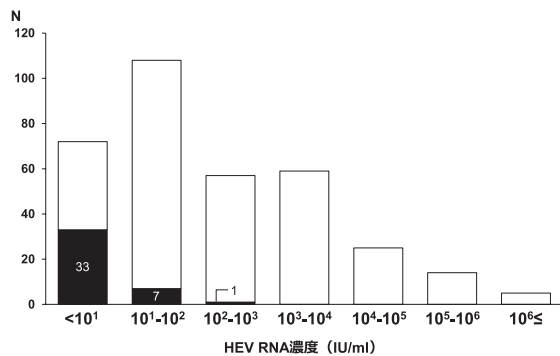


図3 定量 PCR による HEV 陽性検体 340 本の RNA 濃度分布
 □ : 鑑別 PCR により遺伝子型鑑別ができた検体 299 本。
 ■ : 鑑別 PCR で遺伝子型判定不能となった検体 41 本。

た (図 2)。

3. 鑑別 PCR の特異性評価

鑑別 PCR と分子系統樹解析の結果が一致した検体は, 3 型が 250 本, 4 型が 47 本であった。分子系統樹解析で遺伝子型不明となった 9 検体のうち, 鑑別 PCR にて 3 型, 4 型 1 本ずつが同定された (表 1)。鑑別 PCR で判定不能となった検体 41 本中 40 本については, 定量 PCR による RNA 濃度が平均 7.4IU/ml ($<1 \sim 31.6$ IU/ml) の低濃度検体で, うち 33 本 (83%) は 10IU/ml 未満であった (図 3)。一方, 残りの 1 本は 3f で RNA 濃度は 501IU/ml であった (図 3)。また, 混合検体の測定結果を表 2 に示した。添加した RNA 濃度が低濃度 (10^2 IU/ml) の一部を除き, すべて 3 型, 4 型ともに特異性をもって検出された。

4. 鑑別 PCR の検出感度測定

検体 0.2ml 使用時に算出された検出感度を表 3 に示した。各遺伝子型の平均検出感度は, 血漿 1ml 使用時には, 3 型で 38IU/ml, 4 型で 68IU/ml と推定された (理論値)。

考 察

E 型急性肝炎の重症化には宿主側因子として高齢男性であること, 妊婦であること, および肝臓病などの基

表1 各鑑別方法における HEV 陽性検体 340 本の遺伝子型鑑別結果

鑑別 PCR	分子系統樹解析			計
	3 型	4 型	遺伝子型不明	
3 型	250	0	1	251
4 型	0	47	1	48
遺伝子型判定不能	33	1	7	41
計	283	48	9	340

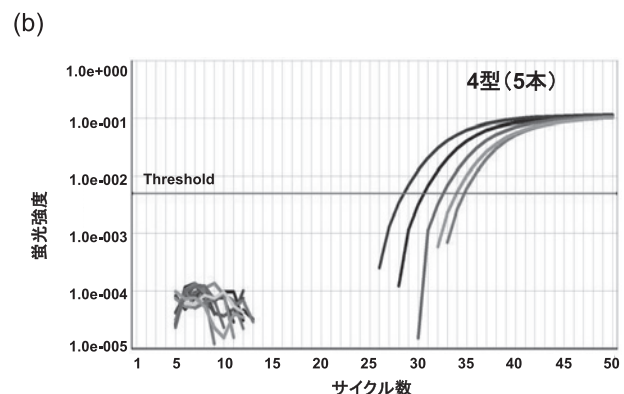
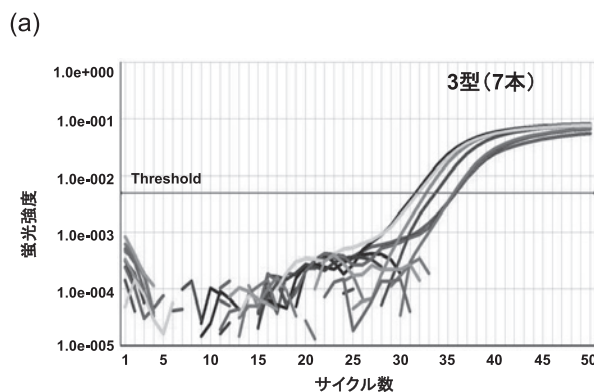


図4 鑑別 PCR における各遺伝子型の増幅曲線

3 型, 4 型にそれぞれ特異的な蛍光標識 TaqMan プローブを用いて, HEV 陽性検体について鑑別 PCR を実施し, 遺伝子型ごとに指数関数的な増幅曲線が確認された。(a) FAM : 3 型 7 本 (RNA 量 $10^{2.8} \sim 10^{4.1}$ IU/ml)。 (b) HEX : 4 型 5 本 (RNA 量 $10^{3.4} \sim 10^{4.0}$ IU/ml)。

表2 3型と4型の混合検体の鑑別 PCR 結果

添加した4型 (RNA濃度 [IU/ml])	3型 (RNA濃度: 10 ⁴ IU/ml)		添加した3型 (RNA濃度 [IU/ml])	4型 (RNA濃度: 10 ⁴ IU/ml)	
	検出結果			検出結果	
	3型	4型		3型	4型
10 ⁴	4/4*	4/4	10 ⁴	4/4*	4/4
10 ³	4/4	4/4	10 ³	4/4	4/4
10 ²	4/4	2/4	10 ²	1/4	4/4

* : 陽性数/検査数

表3 HEVの各サブジェノタイプにおける鑑別PCRの感度

	HEV 遺伝子型パネル						
	3型				4型		
	3a-1	3a-2	3b	3e	4c-K*	4c-S†	4b
0.2ml 使用時の95%検出限界 (IU/ml)	387	76	149	155	143	486	395
1ml 使用時の95%検出限界 (IU/ml, 理論値)	77	15	30	31	29	97	79
		38‡				68‡	

* : Kitami/Abashiri 株

† : Sapporo/New Sapporo 株

‡ : 各遺伝子型の平均値

礎疾患があること、ウイルス側因子として遺伝子型が4型であることなどが指摘されている²⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。北海道では、2002年と2004年に相次いで4型株による輸血後E型肝炎発症例が確認され⁵⁾⁶⁾、ALT高値(200IU/l以上)献血者を対象とした全国調査においても、4型株は北海道のみから検出された¹⁷⁾。病原性の高い4型が北海道に多く検出された状況から、北海道の献血者を対象にHEV感染実態を調査するため試行的にHEV NATを導入し、2018年までに754名の陽性者が確認された。陽性者から分離されたHEV株について分子系統樹解析を行った結果、無症候性が多いと思われる献血者では低濃度のため遺伝子型判定不能であった14株(2%)を除き、3型が656株(87%)、4型が84株(11%)であった¹⁸⁾。一方、国内のE型肝炎症例202例(3型128例、4型74例)を解析した報告⁴⁾によると、E型肝炎は3型で1例(0.8%)だったのに対し、4型では6例(8.1%)と、有意に高率に発生していた。これらの結果から、4型株は高病原性であることが示唆された。

遺伝子型の決定には、同時にサブジェノタイプの分類やウイルス株の流行状況、推定される感染経路などの情報を得るため、最終的に分子系統樹解析を行っており、今後も実施する必要がある。しかし、この方法は核酸の抽出から遺伝子型決定までに数日を要するため、献血者への受診勧奨を含む通知文の発送時や、医療機関からの問い合わせ応対時に、遺伝子型の結果が間に合わない状況であった。今回開発した鑑別PCRは遺伝子型の決定までに約4.5時間と大幅な短縮となり、さらに現行の定量PCRとの同一装置による同時測定に

より、遺伝子型とRNA定量値の情報をまとめて得ることができる(図2)。この方法により、献血者本人への受診勧奨や、医療機関に対するE型肝炎に係る有用な診療情報提供が早期に可能になると考えられる。

今回開発した鑑別PCRで判定不能であったRNA低濃度の献血者は、感染初期または回復期と考えられた。一方、HEVの感染実験による臨床経過では、感染後5~7週に黄疸等の症状が認められると報告されている¹⁹⁾。肝機能検査が高値となるような自覚症状のある患者では血液中のウイルス濃度は比較的高いと予想されるため、このような検体であれば鑑別PCRは十分な検出感度を有していると考えられる。また、3型と4型の重複感染例が報告されているが⁴⁾、混合検体の鑑別PCRでは、一方が低濃度の場合、検出感度が低くなる可能性があるものの、3型、4型ともに特異的に検出可能であると考えられた。2011年10月に抗HEV-IgAクラス抗体検出用診断薬が保険収載され、E型肝炎の診断に用いられているが、HEV-IgA抗体が検出可能な期間は限定的であるため、HEV感染の確認には、HEV RNA検査と抗体検査の併用が望ましいと報告されている²⁰⁾。今回開発した鑑別PCRは、同一装置上で現行の定量PCRとの同時測定が可能であることから、E型肝炎患者の診断法や経過観察にも有用と思われる。

鑑別PCRで判定不能となった検体は、定量PCRによるRNA濃度が1例を除き31.6IU/ml以下であり、これは鑑別PCRの検出感度以下であった。しかしながら、今回開発した鑑別PCRは北海道の献血者由来株(検出頻度順に3b, 3a, 4c, 3e, 4b)の検出を優先したため、

稀な株は濃度にかかわらず検出が難しい可能性がある。本検討で用いた 3f は RNA 濃度が 501IU/ml であったが、鑑別 PCR では検出できなかった。3f 株は主に欧州や南米で検出されるが、北海道はもとより国内でも検出されることは極めて稀である²¹⁾。今回分離された 3f については、3f に特異的なプライマーおよび 3 型検出用プローブを用いて PCR を実施し、検出できることを確認した（データ未掲載）。また、HEV の変異速度は HCV と同程度に速いことが報告されており²²⁾、同じサブジェノタイプであっても塩基配列は多様である。したがって、鑑別 PCR は国内で高頻度に検出される HEV 株に対応しているものの、国内での検出が珍しい株も含め、検出しにくい株が存在することが考えられる。これらについては、分子系統樹解析による分類や地域性、検出頻度などから、迅速簡易検査法である鑑別 PCR で対応すべきかどうかを検討する必要がある。これとは別に、核酸増幅検出装置の仕様によって PCR 反応に差が認められる可能性があるため、その場合は至適条件等の再検討が必要である。

輸血後 HEV 感染の抜本的な防止対策は、すべての献血血液に対する HEV スクリーニングの導入である。そのため、日赤は 2020 年度中に HEV NAT の全国導入を予定している。今後、全国における 3 型および 4 型の分布が明らかとなり、HEV 感染実態の解明が期待される。北海道外の 4 型についてはイノシシから分離された Aichi/Shizuoka 株などが報告されており²³⁾、これ以外にも他地域から検出される可能性が十分に考えられる。全国導入後の鑑別 PCR の有用性や運用方法等について、引き続き検証していく必要がある。

結 論

HEV 遺伝子型の 3 型と 4 型を鑑別可能なマルチプレックス real-time RT-PCR 法を開発した。この方法は同一装置上で同時に現行の定量 PCR の測定も可能であった。今後、献血者の診療情報提供に寄与するとともに、E 型肝炎患者の診断にも有用な方法として期待される。

著者の COI 開示：著者は日本赤十字社職員である。

本論文の内容の一部は、第 67 回日本輸血・細胞治療学会学術総会（2019 年、熊本）において発表した。

文 献

1) Purdy MA, Harrison TJ, Jameel S, et al: ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepeviridae. *J Gen Virol*, 98: 2645—2646, 2017.

2) 阿部敏紀, 相川達也, 赤羽賢浩, 他: 本邦に於ける E 型肝炎ウイルス感染の統計学的・疫学的・ウイルス学的特徴: 全国集計 254 例に基づく解析. *肝臓*, 47: 384—391, 2006.

3) Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, et al: Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J Gen Virol*, 84: 2351—2357, 2003.

4) Takahashi M, Okamoto H: Features of hepatitis E virus infection in humans and animals in Japan. *Hepatol Res*, 44: 43—58, 2014.

5) Matsubayashi K, Kang JH, Sakata H, et al: A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route. *Transfusion*, 48: 1368—1375, 2008.

6) Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, et al: Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion*, 44: 934—940, 2004.

7) Satake M, Matsubayashi K, Hoshi Y, et al: Unique clinical courses of transfusion-transmitted hepatitis E in patients with immunosuppression. *Transfusion*, 57: 280—288, 2017.

8) 松林圭二: 北海道内献血者における HEV 感染の状況. 病原微生物検出情報 (IASR), 35: 7—8, 2014. <https://www0.niid.go.jp/niid/idsc/iasr/35/407j.pdf> (2019 年 7 月現在).

9) E 型肝炎ウイルス検査の結果についてのお知らせ. https://www.bs.jrc.or.jp/hkd/hokkaido/donation/m2_02_03_05_00001323.html (2019 年 7 月現在).

10) Baylis SA, Blümel J, Mizusawa S, et al: World Health Organization International Standard to harmonize assays for detection of hepatitis E virus RNA. *Emerg Infect Dis*, 19: 729—735, 2013.

11) Mizuo H, Suzuki K, Takikawa Y, et al: Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic cases of acute hepatitis in Japan. *J Clin Microbiol*, 40: 3209—3218, 2002.

12) Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al: MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30: 2725—2729, 2013.

13) 菅原伸明, 矢和田敦, 高橋和明, 他: 劇症 E 型肝炎: “Kitami/Abashiri strain” が検出された第 3 例目. *肝臓*, 50: 473—474, 2009.

14) 小関 至, 姜 貞憲, 水尾仁志, 他: 2009 年秋に札幌圏で発生した E 型肝炎小流行の臨床的・ウイルス学的・分子疫学的解析. *肝臓*, 53: 78—89, 2012.

- 15) Hamid SS, Atiq M, Shehzad F, et al: Hepatitis E virus superinfection in patients with chronic liver disease. *Hepatology*, 36: 474–478, 2002.
- 16) Berglöv A, Hallager S, Weis N: Hepatitis E during pregnancy: Maternal and foetal case-fatality rates and adverse outcomes-A systematic review. (in press) *J Viral Hepat*, 2019.
- 17) Sakata H, Matsubayashi K, Takeda H, et al: A nationwide survey for hepatitis E virus prevalence in Japanese blood donors with elevated alanine aminotransferase. *Transfusion*, 48: 2568–2576, 2008.
- 18) 平成30年度第4回血液事業部会運営委員会(平成31年2月20日開催)資料2-2, 試行的HEV-NAT実施状況について.
<https://www.mhlw.go.jp/content/11121000/000480575.pdf> (2019年7月現在).
- 19) 感染症の話 E型肝炎. *IDWR*, 6(13): 8–11, 2004.
<http://idsc.nih.gov.jp/idwr/kanja/idwr/idwr2004-13.pdf> (2019年7月現在).
- 20) 石田勢津子, 吉澄志磨, 松林圭二, 他: E型肝炎届出基準検査法についての検討. *肝臓*, 60: 23–30, 2019.
- 21) Nakano T, Takahashi M, Takahashi K, et al: Hepatitis E virus subtype 3f strains isolated from Japanese hepatitis patients with no history of travel to endemic areas — The origin analyzed by molecular evolution. *Virology*, 513: 146–152, 2018.
- 22) Takahashi K, Toyota J, Karino Y, et al: Estimation of the mutation rate of hepatitis E virus based on a set of closely related 7.5-year-apart isolates from Sapporo, Japan. *Hepatol Res*, 29: 212–215, 2004.
- 23) 川村欣也, 小林良正, 高橋和明, 他: 静岡県西部地区で発生したシカ生肉またはイノシシ生肝摂食後のE型急性肝炎3例. *肝臓*, 51: 418–424, 2010.

DEVELOPMENT OF A MULTIPLEX REAL-TIME REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION ASSAY FOR RAPID DISCRIMINATION BETWEEN HEPATITIS E VIRUS GENOTYPES 3 AND 4

Juri Iida^{1)*}, Yu Kobayashi^{1)*}, Hidekatsu Sakata¹⁾, Keiji Matsubayashi²⁾, Shinichiro Sato¹⁾, Katsuya Ikuta³⁾ and Shuichi Kino¹⁾

¹⁾Japanese Red Cross Hokkaido Block Blood Center

²⁾Japanese Red Cross Society, Blood Service Headquarters, Central Blood Institute

³⁾Japanese Red Cross Hokkaido Blood Center

Abstract:

Hepatitis E virus (HEV) is the causative agent of hepatitis E. Highly pathogenic HEV genotype 4 strains are frequently detected, with two cases of transfusion-transmitted hepatitis E confirmed in 2002 and 2004 in Hokkaido, Japan. Therefore, HEV nucleic acid amplification tests (NATs) have been implemented on a trial basis in Hokkaido since January 2005. HEV RNA-positive samples are quantitatively assayed for HEV RNA and are genotyped using phylogenetic analysis, which takes several days. We developed a multiplex real-time reverse transcription (RT) polymerase chain reaction (PCR) assay to rapidly discriminate between genotypes 3 and 4 (D-PCR). Different fluorescent dyes were used to label specific probes to genotypes 3 and 4. This method required only approximately 4.5 hours for genotyping by D-PCR, and quantification of HEV RNA could be performed simultaneously. The average sensitivity of D-PCR was inferred to be 38 IU/ml for genotype 3 and 68 IU/ml for genotype 4 when using 1 ml of plasma. The genotypes determined by D-PCR for 297 of 340 HEV RNA-positive samples were consistent with those determined by phylogenetic analysis. The D-PCR method established in the present study promptly provides blood donors and medical institutions with useful medical information related to hepatitis E.

Keywords:

hepatitis E virus, hepatitis E, genotype, multiplex real-time RT-PCR, molecular phylogenetic tree analysis

*These authors contributed equally to this work.