

A 型肝炎ウイルス 検出マニュアル

(第 2 版)

平成 30 年 12 月

目 次

1. 概説	3
2. 検査に関する一般的注意	5
(1) 作業上の注意	
(2) 検査材料の採取	
(3) 検査材料の輸送	
(4) 検査の判定	
3. 検査方法	6
(1) 血清学的診断 (IgM 抗体の検出)	
(2) 遺伝子診断	
(2-1) RT-PCR 法	
(2-2) リアルタイム PCR 法	
(3) ウイルス分離と抗原診断	
4. 参考文献	17
5. 連絡先	18
6. 執筆者一覧	18
7. 謝辞	18

1. 概説

A 型肝炎は A 型肝炎ウイルス (Hepatitis A Virus, HAV) によって引き起こされる急性肝炎である¹⁾。慢性化することはない、治癒後は強い免疫が残される。潜伏期間は 2~6 週であり、発熱、倦怠感等に続いて血清トランスアミナーゼ (ALT または GPT、AST または GOT) が上昇する。食思不振、嘔吐等の消化器症状を伴うが、典型的な症例では黄疸、肝腫脹、黒色尿、灰白色便等を認める。まれに劇症化し死亡する例を除き、1~2 ヶ月の経過の後に回復する (図 1)。小児の感染は不顕性であることが多いが、感染年齢が上がるにつれ、臨床症状も肝障害の程度も強くなる。成人の感染は半数以上が黄疸になる。高齢者では重症化及び死亡率の増加が報告されている²⁾。

HAV は感染者の糞便中に多量に排泄され、それが感染源となる。患者糞便への接触や汚染された飲食物を介した糞口感染で伝播するため、患者の発生は衛生環境に影響されやすい。一般に、上下水道等の衛生インフラが整備されていない発展途上国では生まれてまもなく HAV に感染するが小児は不顕性感染が多く、A 型肝炎が社会的な健康問題になることは稀である。衛生インフラの整備が偏っていたり不十分であったりすると (例: 新興国や紛争地域等) A 型肝炎発生数は増加し、大規模流行が社会問題となる。衛生インフラが整った先進諸国では A 型肝炎発生数は減少し、患者は小規模の食中毒事例やハイリスク群 (HAV 常在地への海外旅行者、男性同性愛者〈Men who have sex with men, MSM〉、ドラッグユーザー等) に集約される。先進諸国では感染機会の減少に伴い、防御抗体を持たない HAV 感受性者が増加・蓄積する。つまり、A 型肝炎が少なくなればなるほど、感染リスクが増えるというパラドックスが成立する。また感受性者の高齢化によって、重症化・死亡リスクの上昇が懸念される³⁾。

日本の A 型肝炎の発生は食品の汚染、中でも貝類の生食や調理者を発端とした報告が多く、飲食店を介した集団感染がみられる⁴⁾。海外感染例は 2~3 割を占める⁵⁾。今後ますます盛んになる国際交流や輸入食料品の増加等を見据えた A 型肝炎対策は社会的に重要な課題である。

A 型肝炎の予防には、適切な衛生管理 (食品の取扱い、二次感染防止指導等) と A 型肝炎ワクチン接種が挙げられる。国産の不活化ワクチンは 1994 年に承認され、2013 年から全年齢に適用追加された (WHO は 1 歳以上の接種を推奨している)⁶⁾。

HAV はピコルナウイルス科のヘパトウイルス属に所属する¹⁾。便に排出されるウイルスの形態は被膜を持たない直径 27nm の球形粒子である¹⁾。ゲノムは 5'末端に VPg 蛋白、3'末端にポリ A が結合した約 7.5kb のプラス鎖 RNA である。HAV 粒子の構造と性状、ゲノムの構造と機能、粒子形成等は基本的には他のピコルナウイルスと共通であるが、成熟粒子に VP4 が検出されないこと、VP1/2A 接合部が切断さ

れないまま粒子形成が進行するなどの特性がある。

HAV の自然宿主はヒトとサルに限られている。ヒトから分離された HAV の遺伝子型は I 型、II 型、III 型の 3 種類に分類され、それぞれ A、B の亜型に分かれる。遺伝子型の多様性にかかわらず、血清型は 1 つである。サルから分離された HAV は遺伝子型 IV、V、VI 型に分類される。

HAV は培養細胞において増殖性であるが、培養細胞を用いた患者糞便検体からのウイルス分離には長期間かかる。また、継代培養により培養細胞に馴化した株でも、増殖速度は他のピコルナウイルスに比較して遅く、一般的に細胞変性効果 (CPE) は示さない。生物学的に野生株は肝臓に強い親和性を持っているが、他の肝炎ウイルス同様、ウイルスの増殖により細胞を殺すことはない。肝炎は宿主免疫反応を介して起きる。

HAV は酸耐性であり、熱、乾燥などにも強い。エーテルなどの脂溶性物質、界面活性剤、蛋白分解酵素などに耐性である。発症の 2 週間前から発症後 1 ヶ月程度まで便に排出されるが、胆汁、消化管内タンパク分解酵素に抵抗性なので不活化されることなく糞口感染が容易に成立する。高压滅菌、UV 照射、ホルマリン処理、塩素剤処理などで失活する⁷⁾。

なお、A 型肝炎は感染症法に基づき、医師が全ての患者の発生についてただちに届出を行う 4 類感染症に分類されている。

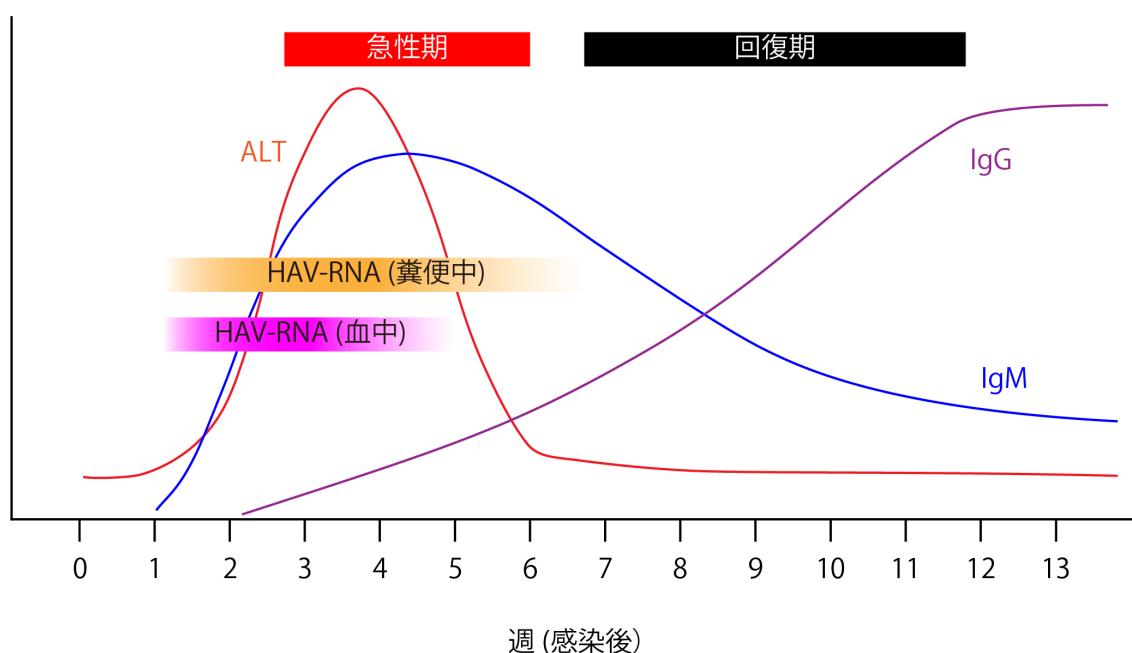


図 1 A 型肝炎の代表的な臨床経過 (文献 1 および 8 より改変)

2. 検査に関する一般的注意

(1) 作業上の注意

- ◆ 実験従事者は事前に A 型肝炎ワクチンの予防接種を済ませておくことが望ましい。
- ◆ 患者の材料の取扱いはクラス II の安全キャビネット内で行い、感染防止や病原体の拡散に注意を払うこと。

(2) 検査材料の採取

A 型肝炎の遺伝子検査は HAV が多量に排出される発症の 2 週間前から発症後 1 週間の時期の糞便の採取が望ましい。血清または血漿でも検査可能だが糞便に比べ、血液中のウイルス量は少ない。ウイルスの遺伝子検査には発症後出来るだけ早い時期に採取された検体が適している^{9, 10)}。血漿を遺伝子診断に用いる時は、PCR 反応の妨げとなるヘパリンを抗凝固剤として使用してはならない。EDTA かクエン酸を使用する。血清学的診断のためなら、発症後数ヶ月の患者血清から IgM 抗体の検出ができる。原因と推定される食材からウイルス遺伝子の情報が得られれば感染源や感染経路の解明に非常に貴重なものとなるが、A 型肝炎は潜伏期が平均 1 ヶ月と長いので、一般的に原因食材は調査時には存在しないことが多い。いずれの場合でも検査をより正確で効果あるものにするために検体は発症後できるだけ早い時期に採取し、速やかに検査に供する。数週間検査を実施できない場合は-20℃以下で保存する。

(3) 検査材料の輸送

HAV は比較的外界の環境に抵抗性であるが、保管、輸送中の凍結融解は繰り返さないように留意する。-20℃での保管・輸送が確保できなければ、4℃で保管・輸送する。国立感染症研究所への輸送にあたっては冷却を保たれる状態で包装し、被験者の年齢、発病日、検体採取日、最近の海外渡航歴、ワクチン歴、被験者の周囲の発生状況など必要事項を記入のうえ送付する。送付先にはあらかじめ検体数、搬入日などを連絡しておくこと。

病原体等の輸送・運搬に際しては、輸送中の安全を確保し輸送業者に安心して運搬していただくため、適切な梱包および輸送方法等に留意する。

参考：国立感染症研究所バイオセーフティ管理室 HP

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/from-biosafe.html>

(4) 検査の判定

以下のいずれかの方法によって血清学的診断や病原体診断がなされたもの。

- ・血清抗体の検出

例、HAV 特異的 IgM 抗体の検出

- ・病原体の遺伝子の検出

例、RT-PCR 法による HAV 遺伝子の検出

3. 検査方法

(1) 血清学的診断 (IgM 抗体の検出)

一般の検査では A 型肝炎の診断は血中の IgM 型 HAV 抗体を検出する方法がとられている。IgM 型抗体は発症から約 1 ヶ月後にピークに達し、3~6 ヶ月後には陰性となる。重症例ほど IgM 型抗体価は高く、発症 6 ヶ月以降にも検出される例がある。また、治癒が遷延化する例では IgM 型抗体持続期間も長い。

検査診断目的には体外診断薬用の市販キットが普及している。操作および判定は各キットの取り扱い説明書にしたがって行う。

IgG 型と IgA 型抗体の測定は、臨床診断には使われていない。IgA 型抗体は感染後 1~2 年間、IgG 型抗体はさらに長期間持続する。血清疫学調査やワクチンによる抗体獲得の確認などには、全クラスの HAV 抗体を測定する競合抑制 ELISA、あるいは IgG 型抗体特異的な結合 ELISA 等が用いられる。

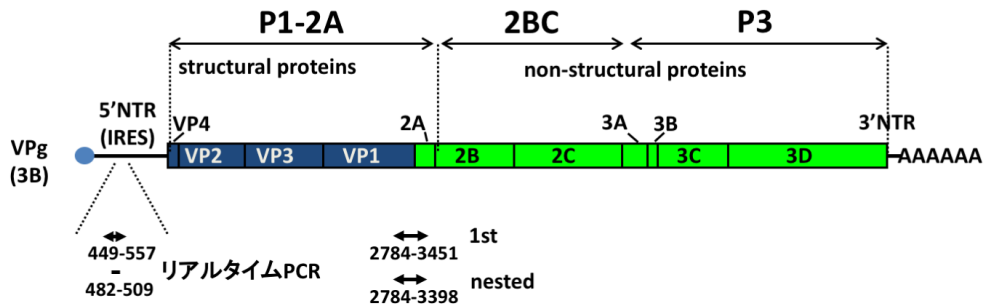
(2) 遺伝子診断

微量のHAV-RNAの検出が可能であるRT-PCR法が多くの研究室に普及している。VP1-2A領域を標的にしたRT-PCR法で増幅した産物の遺伝子解析を行えば、感染経路の推定などに役立つ。5'非翻訳領域を標的にしたリアルタイムPCR法も検査に使われている。各々のPCR法で用いられるプライマーによるHAV遺伝子の増幅領域を図2に示している。

A型肝炎は感染後の潜伏期間が長く、その感染経路も多岐にわたることから、原因食材の検査や聞き取りによる感染源の遡り調査は非常に困難である。このような特性に対して、患者検体のHAV-RNAの検出及び遺伝子解析を行い、集団発生の動向を包括的に確認することは極めて有効である。

遺伝子検査において、コンベンショナル PCR 及びリアルタイム PCR 共に、コンタミネーションに十分注意し、陽性コントロール (PCR 増幅配列を含んだ DNA または RNA) と陰性コントロール (滅菌水) を用いることを推奨する。

PCRによるHAV増幅領域（数字はプライマー領域を含んだ長さを示す）



RT-PCR

Primer	HAV-JCT-2F	5'- GRA GAA CAG GRA AYA TTC ARA TTA G -3'	
	HAV-JCT-1R-A	5'- YTT RTC ATC YTT CAT TTC TGT CCA -3'	First PCR: 2F x 1R-A
	HAV-JCT-2R	5'- CAG THA RMA CHC CAG CAT CCA T -3'	Nested PCR: 2F x 2R

リアルタイムPCR

Primer	HAV+449	5'- AGG GTA ACA GCG GCG GAT AT -3'
	HAV-557M	5'- ACA GCC CTG ACA RTC AAT YCM CT -3'
Probe	HA+482-P	5'- FAM - AGA CAA AAA CCA TTC AAC RCC GRA GGA C - TAMRA -3'

図2 HAV 検出プライマー及びプローブの配列と増幅領域

(2-1) RT-PCR 法

(1) 器材および試薬等

- 1) 遠心分離器
- 2) ボルテックスミキサー
- 3) マイクロピペット
- 4) フィルター付きマイクロピペットチップ
- 5) マイクロチューブ
- 6) RNA 抽出キット
- 7) 純エタノール
- 8) 低速遠心機
- 9) 遺伝子増幅装置
- 10) 逆転写酵素
- 11) DNA ポリメラーゼ
- 12) アガロースゲル電気泳動装置
- 13) トランスイルミネータ

14) プライマー^{11, 12)}

First PCR		
Forward primer*	HAV-JCT-2F	5'- GRA GAA CAG GRA AYA TTC ARA TTA G -3'
Reverse primer	HAV-JCT-1R-A	5'- YTT RTC ATC YTT CAT TTC TGT CCA -3'
Nested PCR		
Forward primer*	HAV-JCT-2F	5'- GRA GAA CAG GRA AYA TTC ARA TTA G -3'
Reverse primer	HAV-JCT-2R	5'- CAG THA RMA CHC CAG CAT CCA T -3'

* First PCR と Nested PCR に用いる forward primer は同一である。

15) PCR 産物精製キット

16) サイクルシーケンシングキット

17) DNA シークエンサー

(2) 材料の前処理

血清、血漿はそのまま RNA の抽出に使用できる。糞便は 10%乳剤をつくり、RNA 抽出材料とする。貝類等の食材も 10%乳剤が RNA 抽出の出発材料である。

・糞便抽出液の作製

- ① 15 mL または 50 mL の遠心チューブに糞便の 9 倍量の PBS を加えておく。
- ② 糞便を遠心チューブにいれ、10%糞便懸濁液を作る。
- ③ 20 分攪拌する。
- ④ 3000 rpm で 20 分遠心する。
- ⑤ 上清を新しいチューブに移し、10%糞便乳剤とする。

・食品の処理

食品のウイルス標準試験法検討委員会のホームページに「一般的な食品検体からのウイルスの回収・濃縮法」標準試験法案 V1.01 として、詳細が掲載されているので参照されたい。

<http://www.nihs.go.jp/fhm/csvdf/kentest.htm>

(3) RNA の抽出

QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN) 等の市販されているウイルス RNA 抽出キットを使用し、説明書に従い、RNA を抽出する。

検体が組織の場合は、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) 等を使用する。

・DNase 処理 (オプション)

食品等には目的とする HAV RNA 以外に、食品等に由来する様々な DNA が含まれるため、しばしば PCR で非特異的増幅反応が起こる。この様な場合には、DNase 処理を行うことで非特異的増幅反応を抑制できる。糞便および血清から

RNA を抽出した場合は、通常 DNase 処理は必要ない。

(4) RT-PCR 反応

(4-1) 1-step RT-PCR の場合

市販されている 1-step RT-PCR キットを使用し、説明書に従い、逆転写反応及び first PCR を行う。

ここでは、One-step RT-PCR kit (QIAGEN) を用いた場合を示す。

(i) 表 1 の 1-step RT-PCR 反応混合液を作製する。

表 1 1-step RT-PCR 反応混合液

試薬	1 検体当たりの使用量 [μL]
DDW	13.0
5x buffer	5.0
dNTPs	1.0
Forward primer [10 μM]	1.0
Reverse primer [10 μM]	1.0
Enzyme mix	1.0
RNA	3.0
計	25.0

(ii) 下記の条件で RT-PCR 反応を行う。

50°C 30 分

94°C 15 分

94°C 30 秒

50°C 30 秒

72°C 1 分

72°C 7 分

4°C 保存

} 45 サイクル

ただし、増幅条件はプライマー、サーマルサイクラーによって異なるので、それぞれ最適化を行うこと。

(4-2) 2-step RT-PCR の場合

1) cDNA 合成

市販されている cDNA 合成キットを使用し、説明書に従い cDNA を合成する。

ここでは、High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fisher Scientific, Cat.No. 368814) を用いて行う場合を示す。

(i) 表 2 の逆転写反応混合液を作製する。

表 2 逆転写反応混合液

試薬	1 検体当たりの使用量 [μL]
DDW	3.2
10x RT Random primer	2.0
dNTPs	0.8
10x RT buffer	2.0
RNase Inhibitor	1.0
MultiScribe TM Reverse Transcriptase	1.0
RNA	10.0
計	20.0

(ii) 下記の条件で RT 反応を行う。

25°C 10 分

37°C 120 分

85°C 5 分

4°C 保存

2) First PCR 反応

市販されている DNA ポリメラーゼを使用し、説明書に従い、first PCR を行う。
ここでは、ExTaq (TaKaRa) を用いた場合を示す。

(i) 表 3 の first PCR 反応混合液を作製する。

表 3 First PCR 反応混合液

試薬	1 検体当たりの使用量 [μL]
DDW	33.75
10x ExTaq buffer	5.0
dNTPs	4.0
Forward primer [10 μM]	1.0
Reverse primer [10 μM]	1.0
TaKaRa ExTaq	0.25
cDNA (上記 RT 反応液)	5.0
計	50.0

(ii) 下記の条件で PCR 反応を行う。

96°C 2分
94°C 30秒 }
50°C 30秒 } 40 サイクル
72°C 75秒 }
72°C 7分
4°C 保存

ただし、増幅条件はプライマー、サーマルサイクラーによって異なるので、それぞれ最適化を行うこと。

※ウイルス量の多い糞便検体の場合は、1st PCR にて十分量の PCR 増幅産物が得られることが多い。

(5) Nested PCR 反応

市販されている DNA ポリメラーゼを使用し、説明書に従い、nested PCR を行う。

ここでは、ExTaq (TaKaRa) を用いた場合を示す。

(i) 表 4 の nested PCR 反応混合液を作製する。

表 4 Nested PCR 反応混合液

試薬	1 検体当たりの使用量 [μL]
DDW	36.75
10x ExTaq buffer	5.0
dNTPs	4.0
Forward primer [10 μM]	1.0
Reverse primer [10 μM]	1.0
TaKaRa ExTaq	0.25
DNA (1st PCR 反応液)	2.0
計	50.0

(ii) 下記の条件で PCR 反応を行う。

96°C 2分
94°C 30秒 }
50°C 30秒 } 35 サイクル
72°C 75秒 }
72°C 7分
4°C 保存

ただし、増幅条件はプライマー、サーマルサイクラーによって異なるので、それぞれ最適化を行うこと。

(6) PCR 産物の電気泳動

PCR 産物 10 μ L を 2.0%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色により結果を確認する。

結果の判定

- ① 陽性コントロールのバンドが認められること。
- ② 陰性コントロールのバンド (コンタミネーション) が認められないこと。
- ③ 目的とするサイズの PCR 産物であれば PCR 陽性とする (First 668 bp、あるいは Nested 615 bp)。

(7) 塩基配列の決定と系統解析

PCR 産物が電気泳動で確認できたら、市販の PCR 産物ゲル抽出精製キット (QIAquick Gel Extraction Kit、QIAGEN 等) を用いて目的とする 668 bp、あるいは 615 bp のバンドを切り出して精製する。PCR 産物が電気泳動によりシングルバンドで確認できた場合は、市販の PCR 産物精製キット (QIAquick PCR Purification Kit、QIAGEN 等) を用いて精製することもできる。

精製した RT-PCR 産物について BigDye Terminator ver.3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) 等を用いてシークエンシング反応を行い、シークエンサーで塩基配列を確認する (詳細はキットの取り扱い説明書を参照すること)。HAV-JCT-2F プライマーを用いた場合は波形データが乱れる場合があり、またプライマー直下の配列を決定する為にも、フォワードおよびリバース両方のプライマーを使用する事が望ましい。得られた塩基配列に基づき系統樹を作成し、検体の塩基配列が既知の HAV 遺伝子型に含まれることを確認する。この時、陽性コントロールのコンタミネーションでない事を確認する事が望ましい。

(8) 参照株

HAV の遺伝子型を決定する参照株に国際的な取り決めはないが、表 5 に全ゲノムの塩基配列が決定されている株について記した。遺伝子型ごとに複数の株が示されているものについては、いずれの株を用いても遺伝子型別の判定は可能である。また「HAV genotyping tool」 (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/hav/>) 等の使用も有用である。

表 5 HAV の系統樹解析に使用する参照株

遺伝子型	株名	アクセッション番号
IA	DL3	AF512536
	HAV5	EU131373
	LU38/WT	AF357222
	AH1	AB020564
	GBM	X75215
	F.G.	X83302
	LA	K02990
	FH3	AB020569
	LY6	AF485328
IB	L-A-1	AF314208
	MBB	M20273
	HAF-203	AF268396
	HM-175	M14707
IIA	CF53/Berne	AY644676
IIB	SLF88	AY644670
IIIA	IND-HAV-97F	FJ360735
	NOR-21	AJ299464
	PN-IND	EU011791
	HA-JNG08-92	AB279733
	HAJ95-8	AB279734
IIIB	JNG06-90F	AB258387
	HAJ85-1	AB279735
	KRM003G72	AB425339
	KRM238G59	AB300205
サル HAV	AGM-27	D00924

(2-2) リアルタイム PCR 法

(1) 器材および試薬等

- 1) ボルテックスミキサー
- 2) マイクロピペット
- 3) フィルター付きマイクロピペットチップ
- 4) マイクロチューブ
- 5) プレート遠心機
- 6) リアルタイム PCR 専用プレート

- 7) リアルタイム PCR 装置
- 8) リアルタイム PCR 酵素
- 9) プライマー^{13, 14)}

Forward Primer	HAV+449	5'- AGG GTA ACA GCG GCG GAT AT -3'
Reverse Primer	HAV-557M	5'- ACA GCC CTG ACA RTC AAT YCM CT -3'
Probe	HA+482-P	5'- AGA CAA AAA CCA TTC AAC RCC GRA GGA C -3' (5' 6-FAM / 3'- TAMRA)

(2) リアルタイム RT-PCR 反応

(2-1) 1-step リアルタイム RT-PCR の場合

1) リアルタイム RT-PCR 反応および蛍光強度測定

使用機器に適合した市販されているリアルタイム PCR 酵素を使用し、説明書に従い、リアルタイム PCR を行う。

ここでは、機器として 7500 Fast Real-Time PCR system を、試薬として TaqMan Fast virus 1-step Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いた場合を示す。

(i) 表 6 のリアルタイム PCR 反応混合液を作製する。

表 6 リアルタイム PCR 反応混合液

試薬	1 検体当たりの使用量 [μL]
DDW	5.9
Forward primer [10 μM]	1.8
Reverse primer [10 μM]	1.8
Probe [10 μM]	0.5
TaqMan Fast virus 1-step Master Mix	5.0
RNA	5.0
計	20.0

(ii) 下記の条件で RT-PCR 反応を行う。

50°C 5分

95°C 20秒

95°C 3秒

60°C 30秒 } 40 サイクル

ただし、増幅条件はプライマー、プローブ、使用機器、使用酵素によって異なるので、それぞれ最適化を行うこと。

陽性コントロールを 10^7 から 10^0 コピーに希釈した標準サンプルによる検量線を作成し、サンプルの初期濃度 (コピー数) を算出する。

(2-2) 2-step RT-リアルタイム PCR の場合

1) cDNA 合成

cDNA の調製は既出の方法で行う。

2) リアルタイム PCR 反応

使用機器に適合した市販されているリアルタイム PCR 酵素を使用し、説明書に従い、リアルタイム PCR を行う。

ここでは、機器として 7500 Fast Real-Time PCR system を、試薬として TaqMan Universal Master mix (Thermo Fisher Scientific) を用いた場合を示す。

(i) 表 7 のリアルタイム PCR 反応混合液を作製する。

表 7 リアルタイム PCR 反応混合液

試薬	1 検体当たりの使用量 [μL]
DDW	13.0
Forward primer [10 μM]	2.0
Reverse primer [10 μM]	2.0
Probe [4 μM]	3.0
TaqMan Universal Master Mix	25.0
cDNA (RT 反応液)	5.0
計	50.0

(ii) 下記の条件で PCR 反応を行う。

50°C 2分

95°C 10分

95°C 15秒

56°C 2分

50 サイクル

ただし、増幅条件はプライマー、プローブ、使用機器、使用酵素によって異なるので、それぞれ最適化を行うこと。

陽性コントロールを 10^7 から 10^0 コピーに希釈した標準サンプルによる検量線を作成し、サンプルの初期濃度 (コピー数) を算出する。

(3) 判定

サンプルのコピー数が 2 ウェル共に 10 コピー以上の時に陽性とする。判断が困難なときは再検し判定する。

(注) HAV 検出プライマー及びプローブについて

過去の検出マニュアル等で使用されてきたプライマー及びプローブを表 8 に示した。ここに記載されているプライマー及びプローブの各セットを用いることで、HAV の検出は可能であるが、一部検出できない株が存在することが明らかとなって

きた。本検出マニュアルにおいて示すプライマー及びプローブは、検出感度の改良と分子疫学的解析能の向上を図る為に新たに設計されたものであり、今後の検査においては、本検出マニュアルに示したプライマー及びプローブの使用を推奨する。詳細は「食品衛生検査指針 微生物編 改訂第2版 2018」を参照。

表 8 HAV 検出プライマー及びプローブ

*1	名称	配列	位置*2	参考文献
F	HAV+2799	5'- ATT CAG ATT AGA CTG CCT TGG TA -3'	2,798-2,820	13
R	HAV-3273	5'- CCA AGA AAC CTT CAT TAT TTC ATG -3'	3,295-3,272	
F	HAV+2907	5'- GCA AAT TAC AAT CAT TCT GAT GA -3'	2,906-2,928	
R	HAV-3162	5'- CTT CYT GAG CAT ACT TKA RTC TTT G -3'	3,185-3,161	
P	HAV+3129-P	5'- CCA TAT AAA GAA CTG AGA TTA GTT GGG AAR CAA AGA YTC AAG TAT GC -3'	3,128-3,177	
F	HAV+449	5'- AGG GTA ACA GCG GCG GAT AT -3'	449-468	
R	HAV-557	5'- ACA GCC CTG ACA RTC AAT YCA CT -3'	557-535	
P	HA+482-P	5'- AGA CAA AAA CCA TTC AAC RCC GRA GGA C -3'	482-509	
F	HAV-JCT-2F	5'- GRA GAA CAG GRA AYA TTC ARA TTA G -3'	2,784-2,808	
R	HAV-JCT-1R-A	5'- YTT RTC ATC YTT CAT TTC TGT CCA -3'	3,451-3,428	
R	HAV-JCT-2R	5'- CAG THA RMA CHC CAG CAT CCA T -3'	3,398-3,377	
R	HAV-557M	5'- ACA GCC CTG ACA RTC AAT YCM CT -3'	557-535	14

*1 F: フォワードプライマー、R: リバースプライマー、P: プローブを表す。

*2 HAV AH1/Japan 株 (Accession No. AB020564) の配列に基づく。

(3) ウイルス分離と抗原診断

培養細胞によるウイルス分離には長期間の作業が必要なため¹⁵⁾、診断目的には適さない。発症のごく初期の患者糞便中には、ELISA で測定可能な量 (1 mL 当たり 10^8 粒子以上) の HAV が含まれることもあるが、感度が低いため、抗原診断法も一般的な検査法として用いられない。

4. 参考文献

1. Hollinger FB and Martin A: Hepatitis A virus. Fields Virology (6th Edition); pp 550-581, Knipe DM, Howley PM et al (eds), Lippincott Williams & Willkins, Philadelphia, PA, 2013.
2. Fiore AE: Hepatitis A transmitted by food: Clinical Infectious Disease 38: 705-715, 2004.
3. Kiyohara T, et al.: Shifting seroepidemiology of hepatitis A in Japan, 1973-2003. Microbiol Immunol 51; 185-191, 2007.
4. Ishii K. et al: Epidemiological and genetic analysis of a 2014 outbreak of hepatitis A in Japan. Vaccine 33: 6029-6036, 2015
5. 清原知子: A型肝炎抗体保有率からみた疫学. 医学のあゆみ 262(14): 1264-1269, 2017.
6. 医薬品インタビューフォーム「エイムゲン」2018年7月改訂.
7. World Health Organization, Department of Communicable Disease Surveillance and Response: Hepatitis A. 2000. Available at <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsredc2007/en/index.html>
8. 四柳宏: HAV-RNA 検出法. ウイルス性肝炎. 日本臨床、468-473, 2004.
9. 西尾治: 糞便及び食品中のA型肝炎ウイルスの検査法について. 食監発第0816001号、平成14年8月16日.
10. 戸塚敦子: A型肝炎ウイルスRNAのRT-PCR法による検出法. 肝炎ウイルス検査法マニュアル、平成14年7月.
11. 平成21年12月1日食安監発1201第1号「A型肝炎ウイルスの検出法について」
12. Ishii K, et al: Vaccine, 33 (45), 6029-2036,2015.
13. 厚生労働科学研究費補助金「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」平成23年度総括・研究分担報告書, 89, 2012.
14. 石井孝司ら: IASR, 35, 154-156 (2014)
15. 戸塚敦子: Hepatitis A virus (HAV). ウイルス実験プロトコール、監修: 永井美之、石浜明、編集: 小林信之、長田恭介、メジカルビュー社、79-89, 1995.

5. 連絡先

陽性コントロールが必要な機関は、国立感染症研究所 疫学センター 第六室に分与を依頼する。（担当：岡本貴世子 k-okmt@niid.go.jp）

プライマーおよびプローブ、その他の問い合わせは、国立感染症研究所 ウイルス第二部 第五室まで。（担当：鈴木亮介 ryosuke@niid.go.jp）

6. 執筆者一覧

国立感染症研究所

清原知子、杉山隆一、吉崎佐矢香、
石井孝司、鈴木亮介

7. 謝辞

本検査マニュアルの作成にあたり、ご意見、ご協力を頂きました以下の先生方に深謝致します。（敬称略）

大阪健康安全基盤研究所
川崎市健康安全研究所
長野県環境保全研究所

山元誠司、改田 厚
駒根綾子、清水英明
塚田竜介