

-2) された7例は今回の検討でも全例 HCV RNAが検出された。残りの37例は HCV RNAが検出されず HCV キャリアではないと判定 (判定-3) されていたが、このうち1例は今回の検討で HCV RNA が検出された。

なお、A 地区、B 地区で判定-4 (スクリーニング検査では HCV 抗体が陽性と判定され

たが、凝集法による抗体価が 2⁵PHA 価未満あるいは 2⁴PA 価未満陰性であったため HCV キャリアではないと判定) あるいは判定-5 (スクリーニング検査で HCV 抗体が陰性) とされた検診受診者 4493 人の検体の中からは今回の検討においても HCV RNA が陽性の検体は見いだされなかった。

表-1 HCV RNAの検出による確認を行なった42検体 A地区

	No	Age sex	検診			Lumipulse	PA	AxSYM	PHA	HCV RNA S'UTR	HCV Genotype	
			EIA	iter	PHA 2 ⁿ							Amplacor
判定-2	1	77 M	+	781.1	5-13	+	69.8	13	105.87	14	+	1b/II
	2	64 F	+	620.6	5-13	+	74.4	14	89.95	16	+	1b/II
	3	63 M	+	1000<	5-13	+	72.2	12	76.42	13	+	1b/II
	4	69 F	+	144.8	5-13	+	32	15	72.33	14	+	1b/II
	5	75 M	+	1000<	5-13	+	45.1	7	54.82	13	+	1b/II
	6	66 M	+	127.1	5-13	+	3.7	4	6.2	9	+	1b/II
	7	67 M	+	1.6	5-13	+	2.1	7	3.65	9	+	1b/II
	8	54 F	+	60.6	5-13	+	3	7	3.65	9	+	1b/II
	9	60 F	+	15.9	5-13	+	1.1	5	1.45	8	+	1b/II
判定-3	10	46 M	+	171.6	5-13	-	20.9	12	43.16	13	-	-
	11	74 M	+	85.4	5-13	-	15	12	40.83	16	-	-
	12	88 F	+	56.3	5-13	-	8.2	12	22.14	15	-	-
	13	73 M	-	38	5-13	-	9.8	10	15.1	11	-	-
	14	60 M	+	451.4	5-13	-	6.2	12	13.14	12	-	-
	15	70 F	+	70	5-13	-	9.3	9	9.67	13	-	-
	16	66 M	+	66.1	5-13	-	9.3	8	8.12	11	-	-
	17	64 M	+	5.8	5-13	-	3.6	9	5.62	10	-	-
	18	70 M	+	64.9	5-13	-	3.9	8	5.22	8	-	-
	19	71 M	+	218.2	5-13	-	3.8	-	4.71	8	-	-
	20	54 F	+	34.4	5-13	-	2.7	8	4.69	10	-	-
	21	60 F	+	140.7	5-13	-	3.3	7	4.41	9	-	-
	22	60 F	+	29.1	5-13	-	3.4	7	4.22	9	-	-
	23	64 M	+	50	5-13	-	3.4	8	4.12	9	-	-
	24	70 M	+	3.1	5-13	-	1.3	7	3.77	10	-	-
	25	73 M	+	42.9	5-13	-	3.9	7	3.65	9	-	-
	26	68 F	+	32.5	5-13	-	3.8	5	2.92	8	-	-
	27	54 F	+	2.7	5-13	-	0.7	-	2.82	9	-	-
	28	82 F	+	44.3	5-13	-	2.3	4	2.82	8	-	-
	29	41 F	+	40.5	5-13	-	2.9	5	2.6	9	-	-
	30	66 M	+	5.7	5-13	-	1.4	7	2.59	8	-	-
	31	60 M	+	106	5-13	-	1.9	5	2.59	7	-	-
	32	72 F	+	34.6	5-13	-	2.3	4	2.59	8	-	-
	33	63 F	+	25.4	5-13	-	2.6	6	2.52	8	-	-
	34	55 F	+	19	5-13	-	2.6	4	2.35	7	-	-
	35	62 F	+	3	5-13	-	2.3	8	2.27	9	-	-
	36	50 F	+	1.1	5-13	-	0.8	-	1.93	7	-	-
	37	71 M	+	20.7	5-13	-	1.4	5	1.67	8	-	-
	38	82 F	+	2.2	5-13	-	0.5	-	1.63	7	-	-
	39	66 F	+	1.5	5-13	-	0.9	-	1.36	9	-	-
	40	64 F	+	28.6	5-13	-	0.7	-	1.23	6	-	-
	41	80 F	+	5.4	5-13	-	0.6	-	1.07	7	-	-
	42	74 F	+	1.5	5-13	-	0.5	-	0.92	7	-	-

表-2 検診で判定-1とされたもののHCV RNAが検出されなかった検体 B地区

No	Age sex	検診		Lumipulse	PA 2 ⁿ	AxSYM	PHA 2 ⁿ	HCV RNA S'UTR
		EIA	PHA 2 ⁿ					
1	71 M	+	13 ↑	100.0	18	162.38	19	-
2	72 F	+	13 ↑	80.8	12	81.90	16	-
3	72 M	+	13 ↑	42.5	12	91.90	15	-
4	63 M	+	13 ↑	25.4	13	50.96	15	-
5	56 M	+	13 ↑	89.4	14	65.22	15	-
6	61 M	+	13 ↑	31.6	11	35.37	11	-
7	53 M	+	13 ↑	2.7	7	4.02	9	-

表-3 HCV RNAの検出による確認を行なった44検体 B地区

No	Age	sex	検査			Lumipulse	PA 2n	AxSYM	PHA 2n	HCV RNA SUTR	HCV Genotype	
			EIA	PHA 2n	Amplacor							
判定-2	1	59	M	+	6-13	+	100	20	160.65	20	+	1b/II
	2	65	F	+	6-13	+	25.3	13	72.29	13	+	2b/IV
	3	63	F	+	6-13	+	45.1	9	67.01	13	+	1b/II
	4	67	F	+	6-13	+	59.9	12	66.44	14	+	1b/II
	5	68	M	+	6-13	+	30.0	12	59.98	14	+	2b/IV
	6	70	F	+	6-13	+	20.2	13	55.93	13	+	1b/II
	7	74	M	+	6-13	+	22.7	9	50.22	12	+	1b/II
判定-3	8	77	M	+	6-13	-	23.7	12	48.72	11	+	1b/II
	9	74	F	+	6-13	-	38.3	12	43.32	12	-	-
	10	57	F	+	6-13	-	15.0	9	19.36	10	-	-
	11	64	F	+	6-13	-	10.7	9	19.08	11	-	-
	12	68	M	+	6-13	-	10.0	12	15.53	12	-	-
	13	71	F	+	6-13	-	5.3	12	13.61	13	-	-
	14	65	F	+	6-13	-	4.9	9	12.13	10	-	-
	15	51	F	+	6-13	-	10.5	8	11.45	10	-	-
	16	52	F	+	6-13	-	4.6	9	9.45	11	-	-
	17	54	F	+	6-13	-	4.5	4	7.7	10	-	-
	18	57	F	+	6-13	-	4.6	8	7.59	9	-	-
	19	73	F	+	6-13	-	6.3	9	6.98	10	-	-
	20	68	F	+	6-13	-	4.2	8	6.22	10	-	-
	21	65	F	+	6-13	-	3.5	8	5.35	10	-	-
	22	73	F	+	6-13	-	7.7	7	5.37	9	-	-
	23	62	F	+	6-13	-	6.1	5	5.11	8	-	-
	24	77	M	+	6-13	-	2.2	7	4.52	8	-	-
	25	65	M	+	6-13	-	4.0	4	4.12	8	-	-
	26	75	M	+	6-13	-	2.0	4	3.98	9	-	-
	27	56	F	+	6-13	-	5.4	5	3.94	9	-	-
	28	62	F	+	6-13	-	2.8	4	2.67	9	-	-
	29	53	F	+	6-13	-	2.5	4	2.66	8	-	-
	30	59	F	+	6-13	-	1.8	7	2.22	8	-	-
	31	77	F	+	6-13	-	2.8	8	2.11	7	-	-
	32	60	F	+	6-13	-	1.7	4	1.98	5	-	-
	33	75	F	+	6-13	-	1.6	-	1.82	7	-	-
	34	76	F	+	6-13	-	1.8	4	1.81	6	-	-
	35	73	F	+	6-13	-	1.4	4	1.76	7	-	-
	36	76	F	+	6-13	-	1.8	-	1.6	7	-	-
	37	67	F	+	6-13	-	1.7	4	1.54	7	-	-
	38	71	F	+	6-13	-	0.9	-	1.5	6	-	-
	39	78	M	+	6-13	-	1.1	5	1.48	8	-	-
	40	67	M	+	6-13	-	1.5	4	1.45	6	-	-
	41	62	F	+	6-13	-	1.3	5	1.23	7	-	-
	42	62	F	+	6-13	-	1.2	-	1.18	6	-	-
	43	76	F	+	6-13	-	0.6	-	1.04	7	-	-
	44	69	F	+	6-13	-	0.3	-	0.28	-	-	-

D 考察

C型慢性肝炎からの肝発がんへの進展がインターフェロン治療により抑制されることが明らかとなっている。このため自覚症状がないまま社会に潜在しているHCVキャリアについても、検診により積極的に拾い上げ医療の管理下に置くことの重要性が改めて認識されてきている。

HCV 検診においては効率良くHCV キャリアを拾い上げる必要があるが、これまで我々は、HCV 抗体の測定とPCR法によるHCV RNAの検出との組合せによる検診システムを提言してきた。具体的には、まずHCV 抗体陽性例に対しては、凝集法（HCV PHAあるいはHCV PA）による抗体力価の半定量的測定を行ない、抗体力価によってはPCR法によるHCV RNAの検出を追加し、HCV キャリアかHCV キャリアでないかの判定をしたうえで検診受診者に通知を行うシステムである（図-1）。しかし、凝集法によるHCV 抗

体測定を行なっている検査施設が少なく、スクリーニング検査でのHCV 抗体の測定と、二次検査の凝集法による抗体力価の測定との2回、異なる測定系でHCV 抗体を測定する必要があり煩雑であるという問題が残されていた。一方、近年、定量域の広いHCV 測定系が実用化されてきており、この測定系をHCV 検診に導入することによりこれらの問題が解決することが可能であるかを検討した。

本研究の成績から、AxSYM およびLumipulseの測定結果からHCV 抗体陽性者を、1) 抗体の測定結果でHCV キャリアと判定可能な群、2) 抗体の測定結果でHCV キャリアではないと判定可能な群および3) PCR法によるHCV RNAの検出が必要な群へのふり分けが高い精度で可能であることが明らかとなった。ふり分けの閾値の設定については更に検討をしていく必要があるが、これらの定量域の広いHCV 抗体測定系をHCV 検診へ導入することにより、検査システムの簡便に

より精度高くすることが可能と考えられる。

また、今回の検討での得られた結果とHCV検診での判定との間に一部乖離が認められた。検診時の二次検査ではPCR法によりHCV RNAが陽性と判定されたが、今回の検討ではHCV RNAが検出されなかった4検体については、いずれの抗体測定系においても抗体力価が低く、検診時のPCR法によるHCV RNA検出の際のコンタミネーションの可能性が高いと考えられた。

また、検診時の二次検査でPCR法によりHCV RNAが陰性と判定され、今回の検討ではHCV RNAが検出された1例については、異なるprimerでの複数回の検査で全てHCV RNAが検出されており、アンプリコアを用いたPCR法とRT-nested-PCR法との検出感度の差と考えられた。

また、抗体力価が高いため抗体の測定のみでHCVキャリアと判定された216例の検体のうち7検体がHCV RNAが検出されなかった。このうち2検体は検診時の抗体力価が今回の検討での抗体力価よりも高く判定されていた。また、残りの5検体については、抗体力価はいずれの抗体測定系でも高く、抗体の測定結果のみでHCVキャリアか否かの判定をすることの限界を示しているものと考えられる。しかし、検診受診者の中にインターフェロン治療中あるいは治療後の症例が混在している可能性もあり、この点については現在確認中である。

以上の成績は、HCV検診を実施するにあたり、検査施設における抗体力価判定の標準化、PCR法によるHCV RNA検出の際のコンタミネーション等の問題を解決する必要性を示唆するものと考えられた。

E 結論

定量域の広いHCV抗体測定系をスクリーニング検査に導入すると、効率良く簡便に精度高くHCVキャリアを拾い上げが可能であることが明らかとなった。

B型肝炎院内感染事例における感染源の究明に関する研究

増田邦義 兵庫県立衛生研究所微生物部長

研究要旨 平成11年5月に、兵庫県加古川市の透析医院においてB型肝炎院内感染が発覚した。当該医院で透析治療を受けていた患者のうち、院内感染が発覚した時点で既に死亡していたために血液が採取できなかった1名を除く劇症B型肝炎発症者6名全員のB型肝炎ウイルス（HBV）株のPre-S2～S領域およびX～Pre-C～C領域DNAは同じ塩基配列であり、しかも、この塩基配列は4名のキャリアのうち1名のそれとも一致していた。この結果から、発症者全員はこのキャリア由来のHBV株に感染したことがきわめて強く示唆された。当該医院における透析患者のC型肝炎ウイルス抗体陽性率は106/131（80.9%）で、きわめて高く、透析医療行為に付随した肝炎ウイルス感染が高頻度で起こっていたことが示唆された。

A. 研究目的

平成11年5月26日に兵庫県加古川市の透析医院から3名の急性B型肝炎患者が保健所に届出られ、これがB型肝炎院内感染発覚の発端となった。われわれはB型肝炎ウイルス（HBV）感染源を究明することを主な目的として、当該医院における透析患者のうち、劇症B型肝炎発症者（以下、個々の発症者はBと番号で示す）およびHBVキャリア（以下、個々のキャリアはCと番号で示す）について、HBV遺伝子の塩基配列分析を行った。また、当該医院においてHBV院内感染が起こった背景を推測するために、透析患者のHBVおよびC型肝炎ウイルス（HCV）の抗原および抗体を調べた。

B. 研究方法

本研究の内容には劇症B型肝炎発症者や

HBVキャリアなど個人のプライバシーにかかわる情報が含まれているので、報告書の記述にあたっては、これらを記号で表記し、プライバシー等の保護に配慮した。

① 肝炎ウイルス関連の抗原および抗体検査

HBVおよびHCV抗原・抗体は市販キットを用いて検査した（表1）。IgG HBcのHI抗体価の測定は、兵庫県赤十字血液センターに依頼し、赤十字血液センター法によって行った。

② HBs抗原サブタイプとHCVジェノタイプ

HBs抗原サブタイプはHBs AgサブタイプEIA（特殊免疫研究所）によって調べたが、EIA法で判定不能であった検体についてはS領域塩基配列から決定した。HCVジェノタイプはスマイテストHCVジェノタイプ（特殊免疫研究所）によって調べた。

表1 HBVおよびHCV抗原・抗体検査法

検査項目	キ ャ リ ア
HBs抗原・抗体	エンザイグノストHBs Agモノクローナル（デイド・ペーリング）
IgM HBc	フレライザII HBc IgM（富士レビオ）
IgG HBc	フレライザII HBc Ab（富士レビオ）
HCV抗体・抗体価	オーソ HCV Ab PA テストII （オーソ・クリニカル・ダイアグノスティクス）

③ HBV DNA の増幅

Pre-S2～S 領域 DNA の増幅は Ehata ら (J. Clin. Invest. 91: 1206, 1993) のプライマーセットを、X～Pre-C～C 領域 DNA の増幅は進藤ら (肝臓 31: 875, 1990) による 2 種のプライマーセットを用いて、常法どおり single PCR あるいは nested PCR によって行った。

④ PCR 増幅産物のクローニング

HBV DNA の Pre-S2～S 領域の PCR 増幅産物を平滑末端法によって pBluescript クローニングベクター (Stratagene) に組み込み、大腸菌に形質転換し、アンピシリン耐性の大腸菌 10 クロンづつを釣菌した。次いで、大腸菌クローンに含まれる PCR 増幅産物の塩基配列を分析した。

⑤ 塩基配列分析

塩基配列は、ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) を用いて cycle sequencing 法によって分析した。HBV DNA 塩基配列の対照データとして、GenBank 遺伝子データベースに登録されている D00630 のそれを引用した。

C. 研究結果

1. 院内感染事例の概要

平成 11 年 5 月 26 日に加古川市の透析医院より所轄保健所に 3 名の急性 B 型肝炎患者が届出られた。院内感染の疑いが濃厚であったため、5 月 28 日には院内感染調査委員会 (兵庫県) が

設置され、当該医院における B 型肝炎患者の発生状況などに関する調査が行われた。その結果、本事例では、平成 11 年 2 月から 6 月の間に、当該医院で透析治療中の患者のうち、7 名が劇症 B 型肝炎を発症し、そのうち 6 名が死亡したことが確認された (表 2)。ただし、死亡者のうち 1 名 (B7) の直接の死因は敗血症である。

なお、B6 は、発症当初は慢性 C 型肝炎とされていたが、C 型肝炎は劇症化することはほとんどないこと、および、後に IgM HBc 抗体陽性が確認されたことによって、劇症 B 型肝炎発症者として取扱われた。

2. 当該医院におけるキャリアの認識

当該医院では、事例発覚時に 3 名 (C1、C2、C3) の HBV キャリアが認識されていた。このうち、C2 および C3 は透析導入時からキャリアであることが認識されていたが、一方、C1 は、本人からの聞き取り調査で、平成 2 年 (献血時) および平成 6 年 (他病院での手術時) に HBs 抗原陽性を指摘されていた。それにもかかわらず、当該医院側の検査によれば、C1 は平成 11 年 4 月に HBs 抗原陽転となっており、それまではキャリアとして認識されていなかった。さらに、事例発覚の時点でキャリアと認識されていなかった透析患者のうち、1 名 (C4) が、後述のように、その後の PCR 検査によって新たにキャリアであることが確認された。

表 2 劇症 B 型肝炎発症者と転帰

発症者 ^a	性・年齢	発症日	転帰 (月日)
B1	M 40 歳代	^H 11. 2. 15	死亡 (2.27)
B2	M 50 歳代	11. 4. 12	死亡 (4.26)
B3	F 70 歳代	11. 5. 11	死亡 (6.25)
B4	F 60 歳代	11. 5. 11	死亡 (6.10)
B5	M 70 歳代	11. 5. 20	軽快
B6 ^b	M 40 歳代	11. 3. 21	死亡 (4. 8)
B7 ^c	M 40 歳代	11. 6. 7	死亡 (7.11)

^a 発症者は B 番号で示す。

^b 当初は慢性 C 型肝炎とされていたが、後に IgM HBc 陽性が判明したため、劇症 B 型肝炎として取り扱われた。

^c 死因は敗血症

3. B型肝炎発症者およびHBVキャリアの肝炎ウイルス関連検査

劇症B型肝炎を発症した7名のうち、B6は事例発覚時に既に死亡しており、血液検体も保存されていなかったため、血清学的、ウイルス学的検査は実施できなかった。

B6を除く6名の劇症B型肝炎発症者およびキャリア4名のHBV抗原と抗体およびHCV抗体検査結果を表3に示す。HBs抗原はB1を除く発

症者5名、C4を除くキャリア3名が陽性であった。IgM HBcは発症者6名全員が陽性であった。HBs抗原サブタイプは、C4以外はすべてadrで一致していた。C4については、HBs抗原サブタイプはEIA法では判定不能であり、後述のようにS領域DNAも増幅されなかったため決定できなかった。

HCV抗体は、B型肝炎発症者のうち4名、HBVキャリアのうち3名が陽性であった。

表3 劇症B型肝炎発症者およびHBVキャリアの抗原、抗体

発症者と キャリア	HBs 抗原	HBc 抗体 IgM/IgG	HBs 抗原 サブタイプ	HCV 抗体
B1	-	+ / +	adr b	-
B2	+	+ / +	adr	+
B3	+	+ / +	adr b	+
B4	+	+ / +	adr b	+
B5	+	+ / +	adr b	-
B7	+	+ / +	adr	+
C1 ^a	+	- / +	adr	-
C2	+	- / +	adr	+
C3	+	- / +	adr	+
C4	-	- / +	不明 ^c	+

^a HBVキャリアはC番号で示す。

^b S領域塩基配列から決定した。

^c EIA法で判定不能、S領域DNA増殖陰性のため決定不能であった。

4. 透析患者のHBc抗体とHBV DNA増幅

B型肝炎発症者および事例発覚時点でキャリアであることがわかっていた3名を除いた透析患者131名のうち40名(30.5%)がHBc抗体陽性であった。HBc抗体陽性者についてHBV DNAの増幅を試みた結果、1名(C4)からX~Pre-C~C領域DNAが増幅され、新たなキャリアの存在が判明した。

5. 発症者およびキャリア血清からのHBV DNAの増幅

劇症B型肝炎発症者およびキャリアの血清からのHBVのPre-S2~S領域およびX~Pre-C~C領域DNA断片の増幅には、報告されている種々のプライマーセットについて検討した結果、「研究方法」に述べたプライマーセットが最も有効であった。

X~Pre-C~C領域DNA(塩基番号1,618

-2,347)は発症者およびキャリアの全員の血清から増幅された。本領域DNAは、発症者6名とC1ではsingle PCRによって、また、C2、C3、C4ではnested PCRによって増幅された。Pre-S2~S領域DNA(塩基番号134~565)は、発症者6名とC1からはsingle PCRによって、C3からはnested PCRによって増幅されたが、C2およびC4からは増幅されなかった。

6. HBV DNAの塩基配列

X~Pre-C~C領域については塩基番号1,675~2,286番の612塩基の配列を比較した(図1)。発症者6名とC1のHBV株のこの領域の塩基配列は完全に一致した。このウイルス株は1,769番からの3塩基が、対照として引用したD00630のAGGとは異なって、ストップコドンであるTAGとなっており、Pre-C変異株であった。

図1 X~Pre-C~C領域 DNA (1,675-2,286番) の塩基配列(部分)

```

      1675                1699
      ↓                  ↓
Ref*: GTTCACCAGCACCATGCAACTTTTT-----ACCCACCTCTGCCTAATCATCTCCTGTTTCATGTC
B1 : .....-----T.....
B2 : .....-----T.....
B3 : .....-----T.....
B4 : .....-----T.....
B5 : .....-----T.....
B7 : .....-----T.....
C1 : .....-----T.....
C2 : .....-----A.....
C3 : .....-----T.....
C4 : .....T.....CAATTT.....A.....

```

```

      1731                1769
      ↓                  ↓
Ref*: CTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCTTAGGGGCATGGACATTGACACTTCTATT
B1 : .....TA..A.....C.....
B2 : .....TA..A.....C.....
B3 : .....TA..A.....C.....
B4 : .....TA..A.....C.....
B5 : .....TA..A.....C.....
B7 : .....TA..A.....C.....
C1 : .....TA..A.....C.....
C2 : .....T.....C.....
C3 : .....TA.....C.....
C4 : .....TA.....C.....

```

```

      1965
      ↓
Ref*: AGTTGATGAATCTGGCCACCTGGGTGGGAAGTAATTTGGAAGACCCAGCATCCAGGGAATTGGTA
B1 : .....T.....A...
B2 : .....T.....A...
B3 : .....T.....A...
B4 : .....T.....A...
B5 : .....T.....A...
B7 : .....T.....A...
C1 : .....T.....A...
C2 : .....C.....A...
C3 : ..A...C...G...A.C...A...
C4 : .....A.....T.....A...

```

* Ref: D00630 (GenBank データベースから引用)

図2 Pre-S2~S領域 DNA (塩基番号 151-557番) の塩基配列 (部分)

151
↓
Ref*: TCTAGGGGGAGCACCCACGTGTCCTGGCCAAAATTGGCAGTCCCAACCTCCAATCACTCACCAA
B1 :
B2 :
B3 :
B4 :
B5 :
B7 :
C1 :
C3 : A. G. T. T. G. T..

216
↓
Ref*: CCTCTTGTCTCCAATTTGTCTGGCTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATATTCCTC
B1 : C. C.
B2 : C. C.
B3 : C. C.
B4 : C. C.
B5 : C. C.
B7 : C. C.
C1 : C. C.
C3 : G.

451 462 490
↓ ↓ ↓
Ref*: ACCTTCGGACGGAAACTGCACTTGTATTCCCATCCCATCATCCTGGGCTTTGCAAGATTCCAT
B1 : S. R.
B2 : S. R.
B3 : C.
B4 : S.
B5 : C.
B7 : S. R.
C1 : S.
C3 : S. G. T.

* Ref: D00630 (GenBank データベースから引用)

C4のHBV株は、発症者およびC1のウイルス株の塩基配列とは部分的に異なっていたが、もっとも大きな違いは1699番と1700番の間に6塩基の挿入がみられることである。C2およびC3のウイルス株の塩基配列も、発症者およびC1の株とは、部分的に異なっていた。キャリア4名のHBV株間のX~Pre-C~C領域DNAの塩基配列相同性は92.7-97.3% (表4)であり、これらのウイルス株は互いに異なっていることが示唆された。

Pre-S2~S領域については塩基番号151-557番の407塩基配列を比較した(図2)。

direct sequencingでは462番および490番に配列する2塩基が決定できない株がみられたが、この2塩基を除くと、発症者6名とC1のウイルス株の塩基配列は一致していた。このウイルス株の塩基配列は、C3の株のそれとは部分的に異なっており、両者の間の塩基配列相同性は96.8%であった。なお、C2およびC4からはこの領域のDNAは増幅されなかった。

表4 キャリア4名のHBV株間のX~Pre-C~C領域DNAの塩基配列相同性

	C2	C3	C4
C1	97.3%	94.7%	95.0%
C2	—	95.5%	95.6%
C3	—	—	92.7%

塩基番号1,657-2,286番(612塩基)の塩基配列を比較した。

direct sequencingで決定できなかった462番と490番の塩基を決定するために、発症者6名およびC1からのPCR増幅産物を大腸菌を用いてクローニングし、それぞれの大腸菌クローン中に含まれるPCR増幅産物の塩基配列を分析した(表5)。その結果、C1には、462番と490

番に配列する塩基が異なる少なくとも3種類のHBV株が存在することがわかった。一方、発症者6名全員には、C1に検出されたこの3種類のHBV株と同じ配列をもったウイルス株が、少なくとも1株は存在することが明らかになった。

表5 Pre-S2~S領域PCR産物のクローニングによって検出された462および490番の塩基

ウイルス株の由来	検出塩基(塩基番号462/490) ^a		
	G/G	G/A	C/A
B1	D	ND	D
B2	D	ND	D
B3	ND	ND	D
B4	D	D	D
B5	D	ND	D
B7	D	ND	D
C1	D	D	D

^a Dは記載した組み合わせの塩基が検出されたことを、NDは検出されなかったことを示す。

7. 透析患者のHCV抗体

劇症B型肝炎発症者とHBVキャリアを除いた、当該医院における透析患者131名中、HCV抗体陽性者は106名(80.9%)であった。また、陽性者106名のうち75名(70.8%)は2₁₃以上、また、24名(22.6%)が2₉-2₁₂(22.6%)のPA抗体価を示した。

HCV抗体陽性の透析患者のうち、カルテ調査およびわれわれの血清検査によれば、40名が当該医院における透析治療の期間中に抗体が陽転しているが、抗体陽転判明年は平成11年に集中している(図3)。当該医院は、定期的に透析患者のHCV抗体検査は行っていなかったため、判明年次に抗体が陽転したとは限らない

が、図3の結果から、平成9-10年頃以後にHCV抗体陽性者が急激に増加したことが示唆される。

8. HCVジェノタイプ

当該医院において透析開始後にHCV抗体が陽転したことが明らかな透析患者40名のうちの38名について、RT-PCR法で調べたHCVジェノタイプを表6に示す。もっとも高頻度に検出されたジェノタイプは1b(42.1%)であったが、2a、2bも検出され、また、複数のジェノタイプが検出された患者も見られた。使用したキットではDNA断片が増幅されず、ジェノタイプが決定できない例も比較的多く(26.3%)見られた。

図3 透析患者におけるHCV抗体陽転者の推移

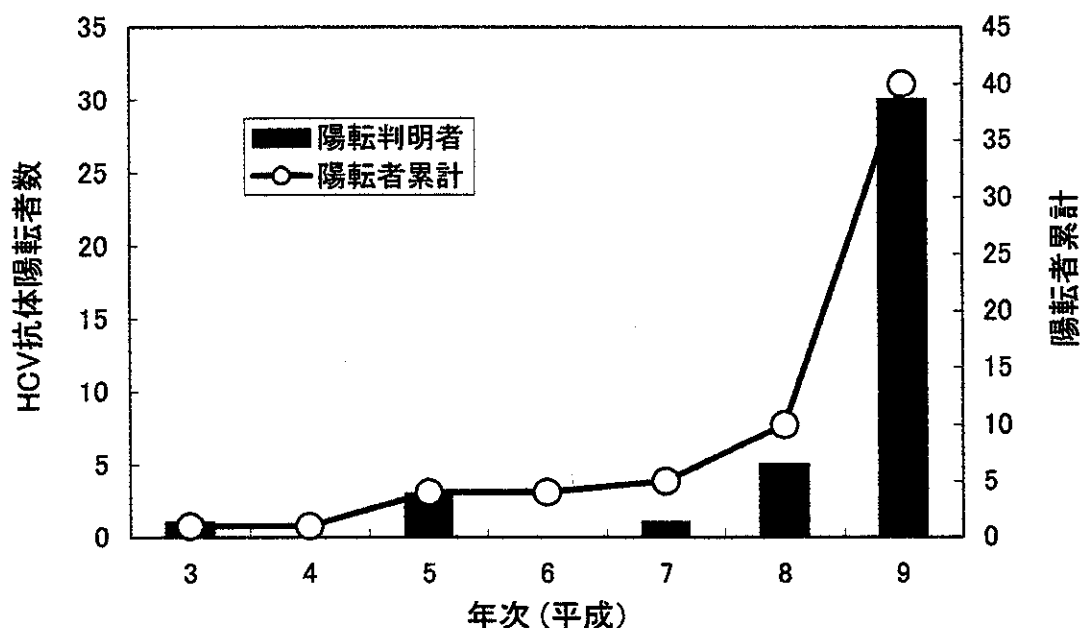


表6 透析患者のHCVジェノタイプ

ジェノタイプ	患者数	(%)
1b	16	(42.1)
2a	2	(5.3)
2b	6	(15.8)
1b、2a	2	(5.3)
1b、2b	1	(2.6)
型別不能	10	(26.3)

当該医院において透析治療中にHCV抗体が陽転したことが明らかな38名について検査した。

D. 考察

本院内感染事例における劇症 B 型肝炎発症者 6 名と HBV キャリア 4 名のウイルス株の X～Pre-C～C 領域および Pre-S2～S 領域 DNA の塩基配列分析の結果から、感染経路は不明であるが、発症者全員は C1 由来の HBV 株に感染したものと判断される。

ここでの調査および検査結果から推察する限り、この HBV 院内感染事例には 2 つの原因が考えられる。第 1 はキャリアの認識である。感染源となった C1 は、平成 2 年には HBs 抗原陽性であることを自覚していたが、カルテ調査では、院内感染が発覚した時点の約 1.5 ヶ月前に HBs 抗原が陽転したことであり、当該医院では、それまではキャリアとして認識されていなかった。したがって、当該医院の C1 への不十分な問診とともに、検査を受注した臨床検査所の検査精度の悪さが院内感染の大きな要因の一つであったことが考えられる。

院内感染の原因として考えられることの第 2 は、透析患者の HCV 抗体陽性率がきわめて高いこと、および、当該医院における透析治療中に HCV 抗体が陽転した患者から検出された HCV は特定のジェノタイプに集中する傾向がなく、複数のジェノタイプが検出された患者も存在したことである。透析患者の HCV 抗体陽性率は 20～25% であるとされているので、当該医院における陽性率 80.9% は異常に高い数値であり、当該医院においては透析医療に伴う HCV 感染が日常的に起こっていたことを示唆している。また、HCV 抗体陽転者から検出された HCV ジェノタイプが特定の型に集中していなかったという事実は、当該医院の透析室に設置されている 50 ベッドのいろいろな場所で感染が起こったことを示唆している。これらの事実に加えて、HBV の感染価が HCV のその 100 倍以上高いとされていることから判断すると、当該医院では、透析医療行為により日常的に HBV 院内感染が起こる可能性が高い状況にあったものと考えられる。

E. 結論

兵庫県加古川市の透析医院で発生した HBV 院内感染事例では 7 名が劇症 B 型肝炎を発症したが、これら発症者は、当該医院で治療を受けていた透析患者のうちの 1 名のキャリアに由来するウイルス株に感染したことが明らかになった。当該医院における透析患者の HCV 抗体陽性率はきわめて高く (80.9%)、透析医療に付随する院内感染が起こりやすい状況にあったものと考えられた。

慢性血液透析医療機関におけるC型肝炎ウイルス感染の実態調査

分担研究者 守屋尚

広島大学医学部衛生学

協同研究者 小宮裕¹⁾、熊谷純子¹⁾、片山恵子¹⁾、田中純子¹⁾、頼岡徳在²⁾

1) 広島大学医学部衛生学、2) 同第2内科

研究要旨

現在12施設の協力を得て血液透析医療機関におけるHCV感染の予備的調査を行った。調査開始時の断面調査では慢性血液透析患者1665例のうち369例22.2%がHCV抗体陽性であった。また、先行して一部の施設で行ったHCVの新規感染（incidence）の有無をみるための調査で、HCV抗体が陰性の240例を1年間追跡したところ6例の新規感染例を見いだした（2.5/100人年）。この感染率は一般健常者集団における新規感染率と比較して著しく高率であり、今後、施設の前向き調査を継続し、新規感染率の実態把握を継続するとともに、新たな感染防止策の確立を図る必要があると考えられた。

A.研究目的

血液透析施設におけるB型劇症肝炎の集団発生がみられ、また当該施設ではHCVの感染も極めて高率であることが明らかとなっている¹⁾。一般的な血液透析医療機関におけるHCV感染の実態把握を目的として調査を行った。

B.研究方法

協力が得られた12の血液透析施設の慢性血液透析患者1665例を対象とした。その内訳は男性990例、女性675例、平均年齢は60.3±12.9歳であった。1999年11月から3ヶ月毎に採血を行い、HCV抗体の測定およびHCV RNAの検出を行なった。また、一部の施設においては先行して1998年8月および1999年8月の時点においても検体を採取

しており、両時点での検体採取が可能であった症例を対象とした新規感染の有無についての調査も併せて行なった。

HCV抗体はPHA法により測定し、HCV RNAの検出は5'UTRをprimerとしたnested-RT-PCR法により行なった。

C.研究結果

1.断面調査

対象1665例のうち369例（22.2%）がHCV抗体陽性であり、このうち255例が抗体価が2¹³PHA価以上の高力価陽性例であった。施設別の抗体陽性率は5.1%から31.7%に分布していた（表-1）。年齢階級別にみると、60歳代が最も高い陽性率を示しているものの、40歳代あるいは50歳代との間に大きな差は認められなかった（表-2）。血

液透析導入時期の調査が可能であった322例について透析導入からの年数別に抗体陽性率をみると、透析年数が長くなるに従って抗体陽性率が高くなっており、導入から

20年以上経過した群ではHCV抗体陽性率が約90%であった。また透析導入からの年数が5年未満の群においてもHCV抗体陽性率が20%を超えていた(図-1)。

表-1 血液透析患者における施設別にみたHCV抗体陽性率

1999年 12透析施設

施設	年齢 (歳, mean±SD)	対象者数 (人)	陽性者数 (人)	陽性率 (%)	高力価陽性者数 (人)	陽性者中の高力価 占有率 (%)
A	59.6±11.0	82	26	31.7	16	61.5
B	60.0±12.1	430	115	26.7	86	74.8
C	61.3±11.5	151	36	23.8	27	75.0
D	60.6±11.6	119	27	22.7	19	70.4
E	57.0±11.6	40	9	22.5	8	88.9
F	62.7±13.3	59	13	22.0	5	38.5
G	60.7±13.1	184	40	21.7	28	70.0
H	59.1±13.9	226	48	21.2	31	64.6
I	71.7±11.7	52	11	21.2	7	63.6
J	58.2±13.3	254	40	15.7	25	62.5
K	68.2±11.8	29	2	6.9	1	50.0
L	56.8±14.5	39	2	5.1	2	100.0
全体	60.3±12.9	1,665	369	22.2	255	69.1

高力価: 2¹³以上

表-2 血液透析患者における
年齢階級別にみたHCV抗体陽性率

1999年 12透析施設

年齢階級 (歳)	対象者数 (人)	陽性者数 (人)	陽性率 (%)	95%信頼区間 (%)	高力価陽性者数 (人)	陽性者中の高力価 占有率 (%)
20-29	19	1	5.3	0.0~15.3	1	100.0
30-39	76	8	10.5	3.6~17.4	5	62.5
40-49	228	46	20.2	15.0~25.4	39	84.8
50-59	483	109	22.6	18.8~26.3	76	69.7
60-69	443	119	26.9	22.7~31.0	87	73.1
70-79	302	68	22.5	17.8~27.2	39	57.4
80-	114	18	15.8	9.1~22.5	8	44.4
全体	1,665	369	22.2	20.2~24.2	255	69.1

高力価: 2¹³以上

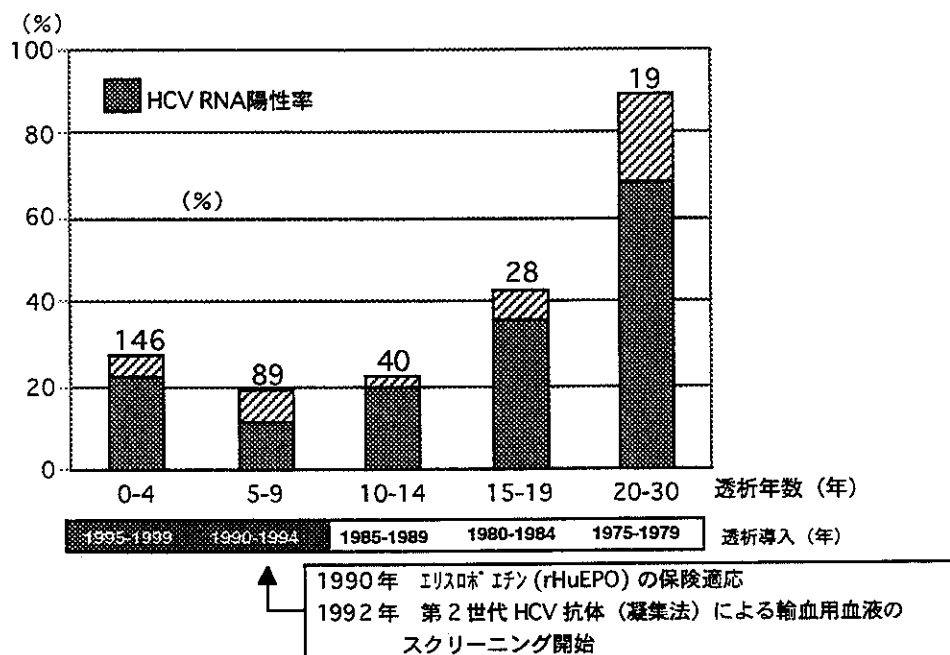


図-1 透析年数別HCV抗体陽性率およびHCV RNA陽性率
対象者数 322人

2.新規感染率

331例で1998年8月と1999年8月との2点で検体採取が可能であった。331例中1998年8月の時点でHCV抗体が陰性であったのは240例であり、このうちの6例が、1999年8月の時点でHCV抗体の陽転が確認された。陽転者の抗体力価は5例が 2^{13} PHA価以上、1例は 2^{10} PHA価であった。人年法による抗体の陽転率を算出すると100人年あたり2.5であった(図-2)。

また陽転した6例のうち5例は陽転が確認された検体中にHCV RNAが検出され、またこの時点でHCV RNAが検出されなかった残りの1例についても翌月に再採血した検体中にはHCV RNAが検出された。また陽転者6例の調査開始時点(1998年8月)の検体についてみるとこのうちの1例(症例2)はこの時点では抗体は陰性であったがHCV RNAは検出された。

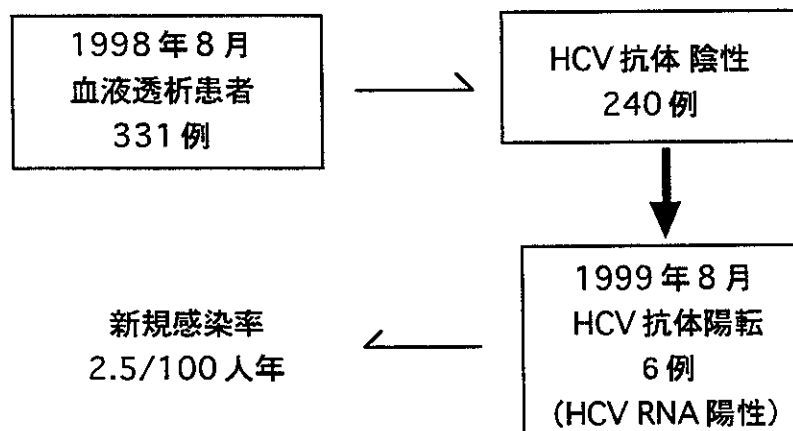


図-2 血液透析患者におけるHCV新規感染率
1998年8月-1999年8月

表-3 HCV抗体が陽転した6例のHCV関連マーカー測定結果

症例	性別	年齢 (歳)	透析歴 (年)	1998年8月			1999年8月				1999年9月(再採血)			
				HCV PHA 2 ⁺	HCV RNA	core Ag fmol/L	HCV PHA 2 ⁿ	HCV RNA	Geno- type	core Ag fmol/L	HCV PHA 2 ⁿ	HCV RNA	Geno- type	core Ag fmol/L
1) H.H.	M	53	2	-	-	N.T.	13 ↑	N.T.	1b/ II	35,205	13 ↑	+	1b/ II	11,445
2) N.O.	M	77	1	-	+	3,657	13 ↑	N.T.	1b/ II	8,209	13 ↑	+	1b/ II	8,953
3) O.I.	M	56	10	-	-	N.T.	13 ↑	N.T.	1b/ II	1,555	13 ↑	+	1b/ II	4,688
4) U.Y.	M	61	6	-	-	N.T.	13 ↑	N.T.	1b/ II	127	13 ↑	+	1b/ II	86
5) M.Y.	F	45	3	-	-	N.T.	13 ↑	N.T.	1b/ II	-	13 ↑	+	1b/ II	-
6) K.S.	F	50	2	-	-	N.T.	10	-	N.T.	-	8	+*	1b/ II	-

*: 血清 10 μl で、検出不能
100 μl で、検出可能

D. 考察

現在のわが国の一般健常者集団における水平感染によるHCVキャリアの新規発生は10万人年あたり1.70~3.48と極めて低率に過ぎないことが明らかとなっている^{2) 3)}。しかし、昨年のはじめにB型劇症肝炎の集団発生みだ血液透析施設ではHCVの感染率は極めて高い値(80%)を示すことが明らかとなった。このことから、本研究は肝炎ウイルスの感染事故等の問題を抱えていない一般的な透析施設の協力により開始したものである。今回は、調査開始後間もない中間的な成績ではあるが、慢性血液透析患者におけるHCVの新規感染率は2.5/100人年と一般健常者集団に比べて高い値を示す施設が存在することが明らかとなった。また、エリスロポエチンが臨床応用され輸血を受ける回数も減り、かつ輸血用血液に対するHCV抗体測定によるスクリーニング検査が実施され、輸血に伴うHCV感染の可能性がないと考えられる透析導入から5年未満の群においてもHCV抗体陽性率が20%を超えていることが明らかとなった。以上の成績は、透析患者集団では輸血以外の経路によるHCVの新たな感染が現在も存在

しているあることを示しているものといえる。

慢性血液透析患者は毎週数回の観血的処置を受ける集団であり、透析を受けるたびに血液の付着した廃棄物を出すことから周囲へ汚染がおこる可能性が高く、更にこの集団内のHCVキャリア率が20%前後と極めて高いことから、慢性血液透析を施行している施設においては特別な感染防止対策のためのガイドラインが必要であると考えられる。今後、12施設全ての前向き調査を継続し、HCV感染の実態を継続して把握するとともに、新たな感染防止策の確立を図るための基礎となるデータの収集を行なう予定である。

E 結論

慢性血液透析患者1665例におけるHCV抗体陽性率は22.2%であった。先行して一部の施設で行なった新規感染に関する予備的調査から、血液透析患者におけるHCV新規感染率は2.5/100人年であったことから、今後前向き調査を継続して行なうとともに感染防止対策の見直しを行なうための基礎となるデータの収集を行なう予定である。

参考文献

- 1) 兵庫県 B 型肝炎院内感染調査報告書 平成 12 年 2 月 院内感染調査委員会
- 2) Fumiko Sasaki, Junko Tanaka, Takashi Moriya, Keiko Katayama, Masataka Hiraoka, Kyuji Ohishi, Hideki Nagakami, Shunji Mishiro, Hiroshi Yoshizawa.
Very low incidence rates of community-acquired hepatitis C virus infection in company Employees, long-term inpatients, and blood donors in Japan. J Epidemiology 6,198-203,1996
- 3) 田中英夫 他 献血者集団における HCV 新規肝炎率の推計 厚生省非 A 非 B 型肝炎研究班 平成 9 年度 研究報告書 29-31、1997

TTウイルスについての分子ウイルス学的研究

分担研究者: 岡本宏明 自治医科大学予防生態学助教授

研究要旨

TTウイルスはDNAウイルスでありながら、遺伝子の多様性が顕著であり、構造蛋白をコードすると想定されるORF1に超可変領域(HVR)が認められる。急性感染例ではウイルスクローンが均一であるのに対して、慢性感染例ではHVRに種々の変異を有するクローンが混在し、"quasispecies"の状態となっており、流血中で免疫複合体を形成していることを明らかにした。また、TTウイルスは2本鎖環状DNAを介して、肝臓および骨髄で増殖していることを明らかにした。

A. 研究目的

非A-G型肝炎の候補ウイルスとして、1997年に原因不明の輸血後肝炎患者の血清中から分離同定したTTウイルス(TTV) (Nishizawa et al, Biochem Biophys Res Commun 241: 92-97, 1997)の特性を分子ウイルス学的手法により解明する。今年度は特に、超可変領域のTTV感染における意義を明らかにし、ウイルスの増殖部位を解明する。

B. 研究方法

1. 超可変領域の解析

TTVには少なくとも16種類のgenotypeが認められるが、プロトタイプである1a型のTTVについて解析した。1a型に属する3つのTTV分離株 (TRM1, TK16, TP1-3)について、ORF1およびORF2全体を含む3.3kbの塩基配列を決定し、既知の同一genotypeのTTV株とORF1およびORF2の

アミノ酸配列を比較解析することにより高変異領域を検索した。

ORF1の中央部に見出された超可変領域(hypervariable region[HVR])を含む約850塩基長の領域を*TaKaRa Ex Taq* (TaKaRa Shuzo Co.) 存在下で下記のプライマーを用いて増幅した。すなわち、1st PCR (35 cycles)は、primer NG161(5'-GCAACCGCAGCGGATATGCAATATCCGTTC-3' [sense])とNG063(5'-CTGGCATTTTACCA TTTCCAAAGTT-3' [antisense])を用い、94℃, 30 s; 60℃, 30 s; 72℃, 60 s (last cycleでは7分の追加)の条件で行った。2nd PCR は、1st PCRと同じ条件で、primer NG152(5'-TGCAATATCCGTTCGGCTCACAC-3' [sense])とNG063を用いて25 cycles 行った。1st PCR productsの長さは865bpであり、2nd PCR productsの長さは849bpである。

2nd PCR productsをアガロースゲル電

電気泳動によって分離、精製し、pT7Blue T-Vector (Novagen Inc., Madison, WI) に結合した後、大腸菌に形質導入した。この大腸菌より精製したDNAをtemplateにし、genotype 1a-specific primers: NG164(5'-GG ATATGTAGAATTTTGTGCA-3' [sense])とNG165(5'-AAAGCCTTTTGTGGGGTCTG-3'[antisense])とPerkin-Elmer AmpliTaq DNA polymerase(Roche Molecular Systems)を用いたPCR (95°C, 2 min に引き続き、20 cycles の 95°C, 30 s; 58°C, 30 s; 72°C, 60 s の反応)によって、genotype 1aのinsert TTV DNAを有するクローンであることを確認した。得られたDNAクローンの塩基配列は、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems)を用いて反応した後、automatic DNA sequencer(ABI PRISM 310 Genetic Analyzer :PE Applied Biosystems)によって解析した。各検体につき10クローンずつの塩基配列を決定した。

2. 免疫複合体の検出

前処理として、被検血清を冷却微量遠心機にて6200 x g で5分間遠心分離した。沈殿物を含まないように上清のみを採取し、生理的食塩水(生食)で20倍に希釈したのち、その50 μ lに、同様に前処理した抗ヒトIgGヤギ抗血清(ICN/CAPPEL社)を50 μ l加え混合した。37°Cで30分間反応させたのち、6200 x gで5分間の遠心操作を行い、沈殿物と上清に分画した。沈殿物には100 μ lの生食を加え、1分間攪拌したのち再遠心した。遠心後の上清を捨て、残った沈殿物を100 μ lの生食に溶解し、これを沈殿分画とした。コントロールとして、抗ヒトIgGヤギ抗血清の代わりに、正常ヤギ血清を検体に加え、同一

操作を行い、上清分画と沈殿分画を得た。

上清および沈殿の各分画(それぞれ、100 μ l)からHigh Pure Viral Nucleic Acid Kit (Boehringer Mannheim)を用いて核酸を抽出し、PCRに供した。PCRは上述のように、primersとしてNG061(5'-GGCAA CATGYTRTGGATAGACTGG-3')とNG063を用いて、35 cycles 行った。PCR productsを2% NuSieve 3: 1 agarose gelの電気泳動にて分離し、目的とするバンド(271bp)の濃度をdensitometerで測定し、各検体の沈殿分画と上清分画より得られたPCR productsの吸光度を測定した。

正常ヤギ血清を用いた免疫沈降で沈殿分画にPCRsignalがほとんど認められず、かつ抗ヒトIgGヤギ抗血清による沈殿分画のPCR signalが上清のそれよりも強い場合、IgG結合TTV粒子、すなわち免疫複合体の存在を示すものと判定した。

3. 肝臓および骨髄での複製中間体の検出

肝臓および骨髄細胞から抽出したDNAサンプルを1%アガロースの水平ゲルで泳動分離し、ゲル全長115mmを5mm間隔で23個のスライスに切断した。得られた各ゲルスライスからDNAを抽出し、PCR法によりTTV DNAを増幅したのち、3%アガロース(NuSieve 3:1)の垂直ゲルで泳動し、各ゲルスライス別のPCR signalの強さ(バンドの濃さ)を比較した。その結果、TTV DNAは1.7kbから6.8kbの範囲で検出されたことから、1.7kbから6.8kbの範囲を2.5 mm間隔で20個のゲルスライスに切断し、DNAの長さおよび1本鎖であるか、2本鎖であるかをこの範囲で詳細に解析した。

C. 研究結果

1. TTVの超可変領域(HVR)とquasispecies

今回3.3 kbの塩基配列を決定した1a型に属する3つのTTV分離株 (TRM1, TK16, TP1-3)と既知の3つの分離株(TA278, GH1, HCVCH1)を含む合計6つのTTV株についてORF1およびORF2のアミノ酸配列を対比した結果、ORF2ではほぼ均一であるのに対して、ORF1では中央部に集中して変異が多く認められる領域が3ヶ所あり、超可変領域 (HVR1, HVR2, HVR3)と見なすことができた。その高変異領域のアミノ酸配列を患者血清から分離された10個ずつのTTV DNAクローンについて比較解析した結果、TTVの急性感染3例ではいずれも得られた10クローンがほぼ均一であることが分かった。それに対して、同じgenotypeのTTVに少なくとも3.3年から7.5年持続感染している例(非A-G型の慢性肝疾患例)ではHVRに種々のアミノ酸変異が認められるTTVDNAクローンが混在し、いわゆるquasispeciesの状態になっていることが分かった。しかも、TTVが血中でIgGと結合し、免疫複合体を形成して存在していることが判明した。経時的な観察により、持続感染状態でのquasispecies complexityは連続的に推移しており、C型肝炎ウイルス(HCV)やヒト免疫不全ウイルス(HIV)のエンベロープのHVRに見られる変化と同じような変化がTTVでも認められることが分かった。

2. 肝臓および骨髄での増殖型TTV DNAの検出

アガロース電気泳動によって、血中ウイルス粒子のTTV DNAは2.0-2.5kbの領域に泳動されることが分かった。それに対して、肝臓および骨髄から得られたTTV

DNAは2.0-2.5kbの領域の他に、3.5-6.1kbの領域にも泳動された。前者の"faster-migrating" TTV DNAはS1ヌクレアーゼで消化されたことから1本鎖であり、後者の"slower-migrating" TTV DNAはS1ヌクレアーゼに抵抗性を示し、制限酵素で消化されたことから2本鎖であることが分かった。また、ゲノム全体のなかで1ヶ所のみ切断しうる制限酵素で処理したのち、電気泳動により分離した結果、処理前には3.5-6.1 kbの領域で検出されたTTV DNAが3.7-4.0 kbの領域で検出された。さらに、sense primerの5'末端をnt 211に、antisense primerの5'末端をnt 210に設定しゲノムDNAの完全長を増幅しうるinverted long-distancePCRによって、"slower-migrating" TTV DNAをtemplateとして3.8kbのPCR productsが増幅されたことから、肝臓および骨髄で検出された2本鎖TTV DNAは環状で、しかも長さがウイルス粒子内のTTV DNAと同様に3.8 kbであることが明らかになった。

したがって、TTVは複製中間体としての環状2本鎖DNAを介して、肝臓と骨髄で増殖していることが判明した。

D. 考察

本年度の研究によって、TTVはDNAウイルスでありながら顕著な遺伝的多様性を示し、数多くのgenotypeが認められるだけでなく、HCVやHIVのエンベロープ蛋白に見られるように、キャプシド蛋白の遺伝子(ORF1)の中央部に超可変領域(HVR)を有することが明らかになった。そして、持続感染状態では、TTVが流血中でIgGと結合し免疫複合体を形成し、quasispeciesの状態で存在していることがわかった。今後は、遺伝子型の違いや

TTV DNA量に加え、quasispeciesの有無やその程度を手掛かりとして、TTV感染と疾患との関連性を追求することができるものと期待される。また、TTVの増殖部位が明らかになり、2本鎖環状DNAを介して肝臓および骨髄で増殖していることが分かった。ウイルスの増殖部位と疾患の場を単純に結びつけることは出来ないが、ウイルス感染に対する生体反応の場となりうるという観点から、TTV感染と疾患との関連性を解明するうえでの突破口の一つになりうるものと考えられた。

E. 結論

TTVは超可変領域(HVR)を有すること、そして、持続感染状態では流血中でIgGと結合し免疫複合体を形成し、quasi-speciesの状態で存在していることが分かった。また、TTVは2本鎖環状DNAを介して肝臓および骨髄で増殖していることが明らかになった。

F. 研究発表 (論文発表)

1. Ikeda H, Takasu M, Inoue K, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M.: Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) in the patients with acute or chronic liver disease of unknown etiology and in those positive for hepatitis C virus RNA. *J Hepatol* 30: 205-212, 1999
2. Okamoto H, Kato N, Iizuka H, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M.: Distinct genotypes of a nonenveloped DNA virus associated with posttransfusion non-A to G hepatitis (TT virus) in plasma and peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol* 57: 252-258, 1999
3. Tsuda F, Okamoto H, Ukita M, Tanaka T, Akahane Y, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M.: Determination of antibodies to TT virus and application to blood donors and patients with post-transfusion non-A to G hepatitis in Japan. *J Virol Methods* 77: 199-206, 1999

4. Ukita M, Okamoto H, Kato N, Miyakawa Y, Mayumi M.: Excretion into bile of an unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non-A to G hepatitis. *J Infect Dis* 179(5):1245-1248, 1999

5. Itoh K, Hirakawa K, Okamoto H, Ukita M, Tanaka H, Sawada N, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M.: Infection with an unenveloped DNA virus associated with non-A to G hepatitis in Japanese blood donors with or without elevated ALT levels. *Transfusion* 39:522-526, 1999

6. Akahane Y, Sakamoto M, Miyazaki Y, Okada S, Inoue T, Ukita M, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M.: Effect of interferon on a nonenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic hepatitis of unknown etiology. *J Med Virol* 58: 196-200, 1999

7. Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M.: Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated by PCR with primers from coding and noncoding regions. *Virology* 259: 428-436, 1999

8. Okamoto H, Nishizawa T, Ukita M, Takahashi M, Fukuda M, Iizuka H, Miyakawa Y, Mayumi M.: The entire nucleotide sequence of a TT virus isolate from the United States (TUS01): comparison with reported isolates and phylogenetic analysis. *Virology* 259: 437-448, 1999

9. Okamoto H, Ukita M, Nishizawa T: A novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non-A to G hepatitis. *Intervirology* 42: 196-204, 1999

10. Nishizawa T, Okamoto H, Tsuda F, Aikawa T, Sugai Y, Konishi K, Akahane Y, Ukita M, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M.: Quasispecies of TT virus (TTV) with sequence divergence in hypervariable regions in the capsid protein in chronic TTV infection. *J Virol* 73(11): 9604-9608, 1999.

11. Itoh K, Takahashi M, Ukita M, Nishizawa T, Okamoto H: Influence of primers on the detection of TT virus DNA by polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 180: 1750-1751, 1999.

12. Ishikawa T, Hamano Y, Okamoto H: Frequent detection of TT virus in throat swabs of pediatric patients. *Infection* 27: 298, 1999.