

13. Okamoto H, Fukuda M, Tawara A, Nishizawa T, Itoh Y, Hayasaka I, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M: Species-specific TT viruses and cross-species infection in nonhuman primates. *J Virol*, 74(3): 1132-1139, 2000.
14. Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Tawara A, Sugai Y, Sai T, Tanaka T, Tsuda F.: Replicative forms of TT virus DNA in bone marrow cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, in press.
15. Okamoto H, Ukita M, Nishizawa T, Kishimoto J, Hoshi Y, Mizuo H, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M.: Circular double-stranded forms of TT virus DNA in the liver. *J Virol*, 2000, in press.

肝炎ウイルスの新ヴァリエントに関する研究

三代俊治 東芝病院研究部部長

研究要旨 HBV, HCV, TTV 夫々の新ヴァリエントを同定し、完全長ゲノム塩基配列を決定し、既知株と比較した。HBV についてはチンパンジー固有のヘパドゥナウイルスとして ChHBV, HCV についてはモルダヴィア共和国住民から clade 2 内の new subtype HCV-2k (VAT96), TTV については SANBAN 族ヴァリエント及び TTV-like mini virus (TLMV) である。これら変種の発見により本種への我々の理解が深化した。

A. 研究目的

未知のヴァリエントを探し、同定し、キャラクタライズすることにより、当該ウイルス固有の性質に関する我々の理解を更に深めようという目的。

B. 研究方法

株間保存性の高いプライマーを用いてゲノム検出-->部分配列決定-->ユニークプライマーをデザインし直して long distance PCR --> 完全長塩基配列決定。

C. 研究結果

- (1) Lindsley F. Kimball Institute の Alfred Prince のラボに保存してあった 1980 年代初期の 3 頭のチンパンジー血清から、genotype E の HBV が一株、unclassified genotype の hepadnavirus が二株、採れた。後者は、完全長塩基配列を決定し既知の primate hepadnaviruses と比較することによりチンパンジー固有種であることが判明し、ChHBV と命名した [1]。
- (2) 旧ソ連邦のモルダヴィア共和国住民が保有していた HCV 株は clade 2 内の new

subtype であることが判明し HCV-2k VAT96 と命名 [2]。

- (3) 日本国健康人から SANBAN と称する TTV variant と、TTV-like mini virus (TLMV) と称する新ウイルスが採取された。後者はゲノム長が TTV より約 1kb 短く、ウィリオン径も小さかった [3,4]。

D. 考察

- (1) ChHBV は human HBV に極めて近い。恰もチンパンジーは人種の一つであるかの如きである。即ち、ヒトという生物種のオリジンと HBV というウイルス種のオリジンが重なっている。
- (2) HCV の clade 2 は全 6 clades 中で最大数の subtypes を保有しているが、今次の 2k の発見により更にその数を増した。
- (3) SANBAN や TLMV の発見により、TTV, TLMV, CAV (chicken anemia virus) を統合する super family の存在が示唆され、我々はそれをば Paracircoviridae という名で呼ぶことを提唱した。

E. 結 論

我々はまだ肝炎ウイルス全存在中の極く一部を知るに留まっていることが、かかる新種発見により再認識させられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Takahashi K, Brotman B, Usuda S, Mishiro S, and Prince AM. Full-genome sequence analyses of hepatitis B virus strains recovered from chimpanzees infected in the wild: implications for an origin of HBV. *Virology* 2000; 267: 58-64.
- [2] Samokhvalov EI, Hijikata M, Gylka RI, Lvov DK, and Mishiro S. Full-genome nucleotide sequence of a hepatitis C virus variant (isolate name VAT96) representing a new subtype within the genotype 2 (arbitrarily 2k). *Virus Genes* 2000; 20: 179-183.
- [3] Hijikata M, Takahashi K, and Mishiro S. Complete circular DNA genome of a TT virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. *Virology* 1999; 260: 17-22.
- [4] Takahashi K, Iwasa Y, Hijikata M, and Mishiro S. Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus: TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. *Arch Virol* (in press).

非 A 非 B 型肝炎の予防と疫学に関する研究班分担研究報告書

輸血に伴う TTV 感染について

分担研究者 小西奎子

国立金沢病院第 2 臨床検査科長

研究協力者 高岡幸子、前越 大

国立金沢病院臨床検査科

研究要旨：輸血後肝炎症例から、最初に発見された TTV の genotype 1 型の病原性を重視し、輸血量 10 本以下の肝炎未発症 98 例とその donor 血を対象に TTV の genotype と DNA 量を測定し、輸血に伴う TTV の感染について検討した。98 例のうち TTV 非感染者は 49 例 (50%) であり、そのうちの 16 例 32.6% に 1 型 TTV DNA が輸血後陽性化した。donor 血の検討が出来た 10 例には 1~3 本の 1 型 TTV DNA 陽性血が輸血されていた。donor 血と患者の genotype は同一か、複数の陽性血輸血例では経過中に seroconversion するものの、いずれも矛盾するものではなかった。また、輸血された TTV DNA 量と患者の TTV DNA 陽性化時期とは逆相関の関係にあった。経過中 TTV DNA 量の増加が観察され、約 70% は陰性化したのが約 30% は持続陽性で経過した。

輸血後経過観察された 477 例には、TTV 感染による肝炎が 4 例発症した。TTV 非感染者 50%・1 型 TTV 感染率 32.7% であったことから推測すると、1 型 TTV 感染（約 80 例）に伴う輸血後肝炎の発症率は約 5%（4 例）と推測される。

A. 研究目的

非 A~非 G 型の輸血後肝炎例から、1997 年に発見された TT ウイルス (TTV) は、少なくとも 16 種類以上の遺伝子型が存在し、変異株も多いことが明らかになった。また、日本人における汚染率は高く、血液のみならず糞便や唾液や精液、母乳などに広く分布することも判明した。それに伴い、TTV の輸血後感染症への関与や病原性について疑問視されるようになった。

今回、最初に発見された TTV の遺伝子型である genotype 1 に注目して、輸血された血液 (donor 血) と受血者 (患者) を対象に TTV DNA を測定し、TTV の輸血を介する感染の事実を明らかにした。

B. 研究方法

PHA-HCV 抗体による HCV スクリーニングが行われた 1992 年~1997 年の期間中で、輸血量 10 本以下の輸血例で、輸血後 5

カ月間以上の経過中肝炎が未発症であった（疑い例も除く—診断基準：1985 年肝炎連絡協議会に基づく）228 例中の 98 例とその donor 血を対象とした。

TTV DNA は Okamoto のプライマーによりスクリーニングを行い、更に genotype の決定とウイルス量の半定量を行った（自治医科大学予防生体にて測定）。

C. 研究結果

輸血前に TTV DNA が陽性であったものは 98 例中 49 例であり、50.0% のキャリア率であった。陰性であった 49 例のうち 26 例 (53.1%) は輸血後 TTV DNA が陽性化した。陽性化した 26 例のうち genotype が 1 型であったのは 16 例 61.5% であり、他の 10 例 (38.5%) は 1 型以外の genotype であった。genotype 1 型の感染は TTV 非感染者の 32.6% (16/49 例) にみられた (表 1)。

表1. 輸血に伴う TTV genotype 1 の感染

対象：未発症例（輸血量10本以下）98例

輸血前	
TTV DNA陽性	49例 (50.0%)
TTV DNA陰性	49例 (50.0%)
輸血後	
TTV DNA陽性化	26例 (53.1%)
genotype 1	16例 (61.5%)
non-genotype 1	10例 (38.5%)

輸血後 genotype 1 型の TTV DNA が陽性化した 16 例のうち、donor 血が完全に入手可能であったのは 14 例であり、そのうち 10 例 (71.6%) には 1 本～3 本の genotype 1 型 TTV DNA 陽性血が輸血されていた。10 例の donor 血と患者の genotype は、1a 型陽性血輸血で 1a 型の感染が 3 例、1b 型陽性血輸血で 1b 型感染が 1 例、1a+1b 型の混合型又は 1a と 1b 型陽性血の複数本輸血例において、1a 型の感染が 2 例、1b 型の感染 1 例、1a+1b の感染が 2 例であった。他の 1

例は 2 本の 1b 型陽性血と 1a+1b 型陽性血 1 本が輸血された症例で (case 655) あり、1b 型の陽性化 (輸血後 2～4 週) に始まって、1a+1b 型 (6～12 週) になり、その後 1a 型 (16 週目) に seroconversion し、陰性化した。患者の TTV DNA の genotype はいずれも donor 血の genotype と矛盾するものではなかった (図 1)。

donor 血に TTV DNA 陽性血が認められなかった 4 例は、1a 型が 1 例、1b 型が 2 例、1a 型から 1a+1b 型に seroconversion したものの 1 例であった。また、donor 血の検討が不充分であった 2 例は共に 1a 型の感染であった。

16 例のうち 10 例に $10^2 \sim 10^3$ 倍量の TTV DNA の増加が観察された。12～20 週間 TTV DNA 陽性後陰性化したものは 11 例であり、5 例 31.2% は陽性的のまま経過した (図 1)。

TTV DNA 10^2 /ml 以上の陽性血 (濃厚赤血球液 MAP) が 2 本以上輸血された 2 例は、輸血後 2 週目に TTV DNA が陽性化し、経

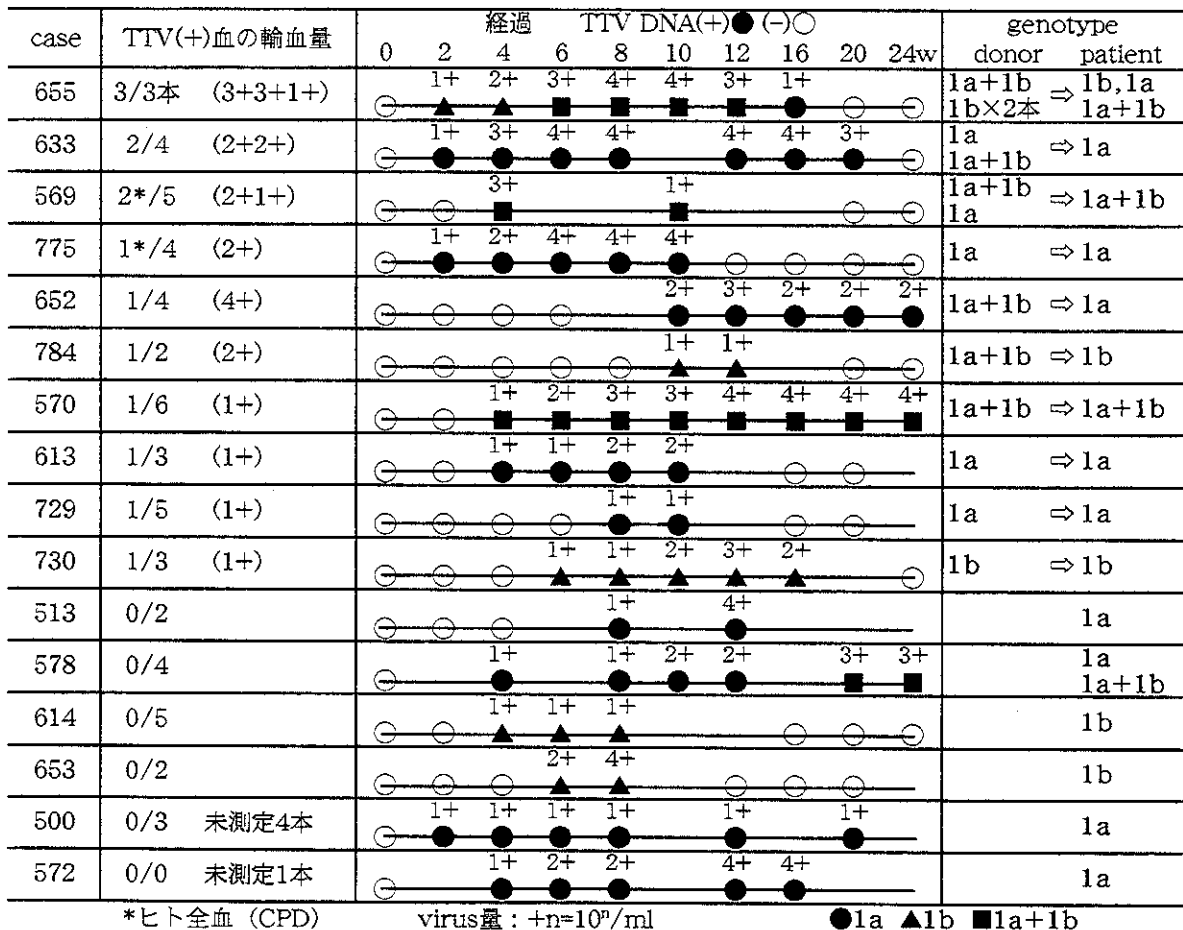


図1. TTV (genotype 1) の輸血を介する感染 —virus量と感染時期—

過に伴いウイルス量は増加し 10^4 /ml の高値を示した (case 665, 633)。 10^2 /ml DNA 量など 2 本の MAP 又は全血 (CPD) 1 本が輸血された 2 例は 2 又は 4 週目に陽性化した (case 569, 775)、 10^1 /ml DNA 量の MAP 1 本が輸血された 4 例では 4~8 週目に陽性化した。輸血された血液の TTV DNA 量と患者側の TTV DNA 陽性化時期との間には逆相関の傾向が認められた。しかし、 10^4 と 10^2 /ml 量の TTV DNA 陽性血が輸血されたが、10 週目に遅れて陽性化した 2 例 (case 652, 784) があった (図 1)。

陰性血のみ輸血の 4 例は、2 例が 4 週目に、2 例は 6 週目以降の陽性化であった。また、donor 血が不完全で TTV DNA 陽性血の輸血が確認出来なかった 2 例は 2 週目と 4 週目の早期に陽性化した。陰性血のみ輸血の 4 例については donor 血保存の影響による TTV DNA の陰性化や測定感度、及び水平感染の可能性が考えられる。

輸血後肝炎及び疑い例を除く未発症例を対象としたが、輸血後 2~12 週間に一度でも ALT 異常 (31IU/L 以上) を示した症例の有無を検討した。結果は、TTV 非感染例は 22 例中の 4 例 18.2% に non-genotype 1 型 TTV 感染例は 11 例中の 6 例 54.5%、genotype 1 型 TTV 感染例は 16 例の 2 例 12.5% に ALT 異常値を認めた。genotype 1 型 TTV の感染例に、ALT 異常が特に多くみられるとは言えなかった (表 2)。

表 2. 輸血に伴う TTV 感染例の経過 (ALT 値)

対象：輸血量10本以下のPTH未発症例		
TTVの感染	例数	ALT>30 IU/L(2~12週)
感染なし	22	4 (18.2%)
genotype 1	16	2 (12.5%)
non-genotype 1	11	6 (54.5%)

D. 考察と結論

10 本以下の輸血例において TTV の感染は 53% (26/49) にみられ、肝炎との関連において重視される genotype 1 型に限定しても 32.7% (16/49) の高率にみられた。約 20% と考えられる日本人のキャリア率からは予想

される高い感染率である。genotype 1 型の TTV DNA 陽性血が輸血された 10 例は、全例において TTV DNA が陽性化した。その genotype は donor 血と同一か、あるいは複数の陽性血が輸血された症例においては経過中に seroconversion など変化を認めるものの donor 血と矛盾するものではなかった。また、輸血された TTV DNA の量と輸血後の陽性化時期とは逆相関の傾向にあった。TTV DNA の陽性化の時期は輸血後 2~6 週目の早期にみられるものが多く (12/16 例)、経過中 TTV DNA 量は増加し、31.2% が持続陽性で経過し、他は陰性化した。donor 血を介して TTV が感染し、感染が成立したことは明らかである。

TTV が感染し、増殖し、約 30% が持続陽性化する可能性はあるが、70% はウイルスを排除する。その間、ALT 異常を示すものは、1 型でわずかに 12.5% であり、1 型に特に多い結果ではなかった。しかし、この結果は未発症例を対象にしたものである。実際には、この観察期間中に経過観察された症例 447 例中、6 例に輸血後肝炎が発症し、疑い例が 11 例あった。輸血後肝炎 6 例中 4 例と疑い例 11 例中 3 例は TTV の感染によるものであった。

TTV 非感染例 (約 50%) の約 1/3 余りに 1 型 TTV の感染がおこると考えられることから、1 型 TTV の感染に伴う輸血後肝炎の発症率は約 5% (4 例/477 例 \times 0.5 \times 0.33) と推測出来る。

未発症例と輸血後肝炎発症例との違いの 1 つは、未発症例において TTV DNA の陽性化が早期にみられる (発症例は 6~10 週目) ことである¹⁾ が、今回の検討結果でも同様であって、2~4 週目に陽性化するものが多かった (10/16 例)。感染と発症との関係は、ウイルスの genotype や変異に加え、宿主側の要因が関与するものと考えられる。

参考文献

1) 小西奎子, 上山武史, 非 A~非 G 型輸血後肝炎例における新しい感染因子 TTV の関与. 日本臨床 57 (6): 1279-1284, 1999

厚生科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）
非A非B型肝炎の予防、疫学に関する研究班 分担研究報告書

地域住民における TTV 肝炎の疫学的検討

分担研究者 佐藤俊一 岩手医科大学副学長

研究要旨 岩手県の住民843例を対象にPCR法にてTTV-DNAを検出し、疫学的分子生物学的検討を行った。TTV-DNAはN22領域のprimerでは28.9%、非翻訳領域のprimerでは67.3%に検出された。前者を用いたPCR法ではTTV-DNAの検出頻度に地域差を認めたが、genotypeの検出頻度には明らかな差は認められなかった。またTTVの感染の有無および感染genotypeとALT異常との間にも明らかな関連は認められなかった。TTVには一般住民が広く感染しているものの、肝機能障害を起こすことは稀と考えられた。

協力研究者

石川和克 岩手県立大学看護学部教授（岩手医科大学第一内科非常勤講師）
阿部弘一 岩手医科大学第一内科講師
小山富子 岩手県予防医学協会第二臨床検査科長

genotypeが存在することが明らかとなった。

最近genotypeにより肝障害をおこす頻度に差が有ることが指摘され、TTVと肝障害との関連で注目されている(2,3)。今回われわれは一般住民におけるTTV感染の地域別頻度、genotypeの地域分布、genotypeと肝機能障害の頻度との関連について検討した。

A. 研究目的

1997年Nishizawaら1)によって新しい肝炎ウイルスの候補として発見されたTT virus (TTV)は、その後の知見の集積により、献血者や一般住民にも広く感染しているが肝障害をおこす頻度は低率であること、多数の

B. 研究方法

岩手県予防医学協会の検診を受けた岩手県の4つの自治体の住民（沿岸部W市、内陸部X市、沿岸部Y村、山間部Z村）計843例（30～87歳、平均55.0±12.6歳）を対象とした。

表1. 地域別 TTV 陽性率

	W市 (N=252)	X市 (N=174)	Y村 (N=214)	Z村 (N=203)	計
A法陽性	14.3	28.2	33.6	42.9	28.9
B法陽性	41.7	60.3	66.8	83.7	63.2
A法またはB法陽性	61.1	71.8	72.0	86.7	67.3

(%)

TTV-DNA（以下 TTV）の検出は既報の Okamotoら 4) (primer A、以下 A法) および Takahashiら 5) (primer B、以下 B法) の primerを用い PCR法により行い、A法陽性例、B法陽性例、A法またはB法陽性例、TTV陰性例の4群を設定し検討した。またA法陽性例から任意に抽出した例について、type-specific primerを用い PCR法にて TTVの genotypeを判定した。測定検体のラベルはすべて数値化し整理し、結果も個人の同定ができないようにプライバシーに配慮を行った。

C. 研究結果

1) 地域別の TTV 陽性率 (表 1)

岩手県全体として A 法陽性例は 28.9%、B 法陽性例は 63.2%、A 法または B 法陽性例は 67.3%であった。W 市 (N=252, 平均年齢 60.3 ± 11.9 歳) では A 法陽性 14.3%、B 法陽性 41.7%、A 法または B 法陽性 61.1%、X 市

(N=174, 平均年齢 44.4 ± 5.0 歳) では A 法陽性 28.2%、B 法陽性 60.3%、A 法または B 法陽性 71.8%、Y 村 (N=214, 平均年齢 51.7 ± 11.3 歳) では A 法陽性 33.6%、B 法陽性 66.8%、A 法または B 法陽性 72.0%、Z 村 (N=203, 平均年齢 61.0 ± 12.1 歳) では A 法陽性 42.9%、B 法陽性 83.7%、A 法または B 法陽性 86.7%であった。A 法陽性例および B 法陽性例の頻度には地域間の差を認めたが、A 法または B 法陽性例の頻度には明らかな地域間の差は認められなかった。

2) TTV 感染の有無による ALT の異常率および平均値 (表 2)

いずれの群も正常値内であったが A 法陽性で 25.2 ± 17.0 IU/l、A 法 B 法ともに陰性で 22.4 ± 12.8 IU/l と、この両群間において有意差を認めた。同様に 4 群に分類し ALT の異常率について比較検討したが、各群ともほぼ 10%前後を示し 4 群間に有意差を認めなかった。

表 2. TTV 感染の有無による ALT の異常率および平均値

	ALT 異常率 (≥40IU/l)	ALT 平均値 (IU/l)
A 法陽性	10.2 %	25.2 ± 17.0 *
B 法陽性	9.8 %	24.6 ± 17.1
A 法または B 法陽性	10.4 %	24.6 ± 17.0
TTV 陰性例	9.1 %	22.4 ± 12.8 *

* p<0.05

表 3. 地域別 genotype の頻度

Genotype	1	2	3	4	Mix
W 市 (N=13)	61.5	15.4	0	0	23.1
X 市 (N=13)	61.5	23.1	7.7	0	7.7
Y 村 (N=16)	56.3	25.0	0	0	18.8
Z 村 (N=13)	76.9	0	0	0	23.1

3) 地域別 genotype の頻度 (表 3)

TTV の genotype の測定を行った 55 例の地域別 genotype の頻度を示す。各地域とも genotype1 が 56~77% と最も高頻度であった。次いで genotype2 が Z 村を除く 3 地域で 15~25% に検出された。Genotype3 は X 市においのみ 8% に検出された。Mix (混合型) は各地域において 8~23% に検出された。Genotype4 は単独では測定されなかったが W 市と X 市の Mix の症例においてそれぞれ 1 例

ずつ検出された。Z 村では genotype2, 3 は検出されなかった。全体においては地域間で genotype の頻度に有意差は認められなかった。

4) Genotype 別の ALT 異常率 (表 4)

TTV の genotype の測定を行った 55 例の ALT 異常率を示す。ALT 異常率は genotype 1 で 54%、2 で 33%、Mix で 20% の順であった。Genotype3 は 1 例のみであったため genotype 1、2 および Mix における ALT 異常率について比較検討したが 3 群間に有意差は認められなかった。

表 4. Genotype 別 ALT 異常率

Genotype	1 (N=35)	2 (N=9)	3 (N=1)	Mix (N=10)
異常 (≥40 IU/l)	54.3	33.3	100	20.0
正常 (<40 IU/l)	46.0	66.7	0	80.0

(%)

D. 考察

今回、TTV の検出のために、N22 領域 (A 法) および非翻訳領域 (B 法) の 2 種類のプライマーを用いて PCR を行った。TTV の検出率はいずれの地域においても B 法が A 法に比して高率で B 法は A 法のほぼ 2~3 倍の検出率を示した。従って A 法または B 法陽性例は 61~87% に達し、住民のほぼ過半数が陽性となった。A 法のみ陽性例は主に genotype1~4 の感染、B 法のみ陽性例は主に genotype12~16 の感染、A 法および B 法陽性例は両者の混合感染例で有ることが指摘されている。

今回の検討では A 法または B 法陽性例の頻度には地域差は認められなかったが、A 法陽性例あるいは B 法陽性例の頻度には地域差を認めた。このことから各地域住民とも過半数は TTV に感染しているものの、感染 TTV のクローンの種類や感染クローン数には各地域住民による差が存在する可能性が示唆された。これは各地域の地勢学的差、生活習慣や文化的背景を反映している可能性が考えられる。

しかし TTV 感染の有無と ALT 異常との間には明らかな関連は認められず、また genotype1~4 と肝障害の関連も明らかではなかった。また今回対象とした 4 地域における HBs 抗原、HBs 抗体、HCV 抗体の頻度にも差は認められなかった。さらに今回対象とした W 市は TTV 陽性の劇症肝炎が高率な地域であるが 6)、一般住民の TTV 陽性率は他の地域に比して最も低率であり地域における劇症肝炎の発生頻度とその地域の住民の TTV 陽性率とは一致しない所見であった。

TTV には住民の過半数が感染しておりかつ肝機能正常例がほとんどであることから、TTV は肝障害を起こしうるウイルスではあるが多くは宿主と共存状態にあると考えられ、さらに輸血以外の感染経路の存在も想定される。今後は住民の経時的観察を継続し、TTV 陰性化例 (キャリア逸脱例) の頻度、新規感染例の頻度、肝以外の他疾患との関連の検討を含めたより広範な疫学的調査により TTV 感染の自然経過を明らかにする必要があると考えら

れる。

E. 結論

岩手県の4地域の住民を対象にPCR法にてTTV-DNAを検出し、疫学的分子生物学的検討を行い以下の結果を得た。

- 1) 岩手県住民の過半数がTTVに感染していた。
- 2) TTVの感染率には地域差が認められた。
- 3) TTV感染の感染クローンの種類やクローン数の地域による差が示唆されたが、genotypeの頻度には少数例の検討ではあったが明らかな地域差は認められなかった。
- 4) TTVの感染の有無および感染genotypeとALT異常との間には明らかな関連は認められなかった。
- 5) TTVには一般住民が広く感染しているものの、肝機能障害を起こすことは稀と考えられた。

F. 文献

- 1) Nishizawa et al. : BBRC 241, 92, 1997
- 2) 岡本宏明 : 日本臨床 57, 1239-1249, 1999
- 3) 岡本宏明 他 : 内科. 84, 204-212, 1999
- 4) Okamoto et al. : Hepatol Res 10, 1, 1998
- 5) Takahashi et al. : Hepatol Res 12, 233, 1998
- 6) 鈴木一幸 他 : 肝臓. 39,410,1998.

B型肝炎ウイルスの genotype とその臨床的意義に関する研究

分担研究者 溝上雅史 名古屋市立大学医学部輸血部助教授

研究要旨 HBV の genotype を測定したところ genotype C が本邦の major type であったが、沖縄では genotype B が主でありこのことが沖縄の肝臓の発生率の低さに関与している可能性が考えられた。また、世界各地に A から D までの genotype が存在したが、新しい genotype の存在の可能性も考えられた。

A. 研究目的

現在、本邦における B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染者は約 200 万人と想定されるが的確な治療法はまだない。一方、HBV は世界各地に 6 つの遺伝子型 (genotype) が存在し、その世界的分布・感染様式・特に臨床像が異なることが知られている。そこで、今回本邦および世界各地より HBV の検体を集め genotype の検討をおこなった。

B. 研究方法

北大から琉球大学までの 12 大学より HBsAg 陽性検体 476 検体を集め、RLFP 法で HBV の genotype 分類を行った。また、モンゴル、韓国、中国の南寧、シベリアのカムチャカとアルタイ、中央アジアのウズベキスタン、中東のイスラエル、アフリカのケニアより集めた 350 検体につき genotype 分類をおこなった。

C. 研究結果

本邦では、genotype A が 2%、genotype B が 13%、genotype C が 81%、genotype D が 0.5% で、genotype C が major であった。地域的には、沖縄は 67%、東北地方は 19% が genotype B であるのに対し、他地域では genotype C が 90% 以上であり大きく異なっていた。そこで、genotype B と C の臨床 data を比較したところ、genotype C は、genotype B に比較して有意に無症候性が多く、

HBe 抗原陽性率と HBV-DNA 量が有意に低かった。世界的には、韓国と中国は genotype C が、ケニアとドミニカでは genotype A が、モンゴル、カムチャカ、アルタイ、ウズベキスタン、イスラエルでは genotype D が major であった。また、モンゴル、カムチャカ、アルタイ、ウズベキスタンには判定不能例が約 10% 存在した。

D. 考案

我々は HBV の genotyping 法を開発し、日本各地の HB carrier の genotype を測定した。その結果 genotype C が日本における主であるが、沖縄においては genotype B が major であった。沖縄では HB carrier 率は全国平均の 2 倍にも達しているが、HBV による肝臓発生率は一番低い。また、臨床的比較から genotype B は genotype C より HBe 抗原陽性率が低く、病態も無症候性が多かった。これらのことから genotype B は genotype C より容易に HBe 抗原から HBe 抗体に変化しやすく、その結果無症候性 carrier が多くなり、沖縄における肝臓の発生率が低下したとが考えられる。今後は、genotype B の HBe 抗原から HBe 抗体への seroconversion について検討する必要があると思われる。

世界各地の HBV 検体を測定したところ、東アジアでは genotype C が、北と中央アジアでは genotype D が、アフリカでは genotype A

が、中米では genotype A が major type として存在した。今後は各地域の genotype とその臨床 data を比較すべきと思われた。また約 10% の genotype 判定不能例が存在し、新しい変異か新しい genotype の存在疑われ、これらに対する検討が必要であると思われた。

E. 結論

本邦の HBV は genotype C が major であるが、沖縄では genotype B が主であり、このことが沖縄の肝癌の低さに関与していると考えられた。また世界各地に A から D までの genotype が存在したが、それ以外にも新しい genotype が存在する可能性も考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Mizokami M. et al: FEBS Lett 450:66-71, 1999.

2. 学会発表

Mizokami M. et al: AASLD. Dallas USA, 1999年11月.

非A非B型肝炎ウイルスの分子ウイルス学的研究

分担研究者 宮村達男 国立感染症研究所ウイルス第二部長

研究要旨

HCV, HEV, TTV の遺伝子を種々の発現ベクターを用いて細胞で発現させ、その発現蛋白を解析することにより、各々のウイルスと宿主細胞の関連をしらべた。

A. 研究目的

(1) 非A非B型肝炎のうち、C型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルスの空粒子を作成し、高感度の診断系や予防ワクチンをつくる。

(2) TTV の遺伝子発現実験を行い、ウイルスとしての性状解析、肝炎との関わりをしらべる。

B. 研究方法

HCV, HEV, TTV の遺伝子のうち、ウイルス粒子を構成する構造蛋白コード領域を組込んだ組換えバキュロウイルスを作り、昆虫細胞で発現させ、細胞内で産生されるウイルス蛋白を解析する。又、コード領域に一部欠失を導入するなどして改変を行い、培養液中に粒子を効率よく放出させる系を作り上げる。又、粒子形成に不可欠な領域を決定する。得られた粒子をクライオ電顕を用いて構造解析すると共に、その免疫原性をしらべ、病態に対応した感度の高い抗原抗体検出系を作る一方、ワクチン化をめざす。

C. 研究結果

(1) HEV 遺伝子の ORF2 の N 末端を欠失させて、昆虫細胞で発現させて得た蛋白は、中空粒子として回収され、感染性のある真の粒子と区別できない抗原性をもっていた。この中空粒子の構造を解析した（文献8, 9, 12）。

(2) HCV のコア蛋白には調節蛋白としての多くの機能があることがわかった（文献2, 3, 4, 6, 10）。

(3) 組換えバキュロウイルスを用いて HCV のエンベロープ蛋白をもつ細胞株を樹立した。更

に、この細胞から出芽して HCV エンベロープ蛋白をその表面に持つシュードタイプウイルスを複製した（文献13）。

(4) TTV の ORF1 を昆虫細胞で発現させた。

D. 考察

(1) HEV の中空粒子の産生は、その純度、大量発現、免疫原性、いずれをとっても画期的である。本年度はその粒子構造を明らかにした。これから粒子構造をとるのに必要な領域を決め、又、組換えワクチンとしての可能性を追求する。

(2) HCV コア蛋白の発現は、最終的に肝発癌にいたる重要な役目を果たしているが、その過程には脂肪代謝、細胞骨格の形成など多くの細胞の相互関係の集積がある。一方、HCV コア蛋白は調節蛋白として自己の複製機構にも重要な意味を持ち、持続感染の成立にも関わっていると考えられる。

(3) HCV エンベロープのもつ融合能を利用して、細胞のレセプター探しが可能となった。

(4) TTV の ORF1 にコードされると思われる蛋白を得ることができたが、その同定はまだできていない。TTV 感染患者血清を用いてしらべているが、TTV の遺伝子多型性により容易ではない。

E. 結論

(1) HEV の感染性粒子と、構造的にも抗原的にも同一の性質をもつ中空粒子を、大量に産生させることができた。我が国における HEV 感染状況を調査する抗体測定系を確立した。

- (2) HCV コア蛋白の多機能を示した。
- (3) HCV エンベロープに細胞と融合する機能のあることを示した。
- (4) TTV の ORF1 を発現させた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Amano, H., Morikawa, S., Shimizu, H., Shoji, I., Kurosawa, D., Matsuura, Y., Miyamura, T., and Ueda, Y. Identification of canary poxvirus thymidine kinase gene and insertion of foreign genes. *Virology* 256, 280-290, 1999.
2. Fujie, H., Yotsuyanagi, H., Moriya, K., Shintani, Y., Tsutsumi, T., Takatayama, T., Makuuchi, M., Matsuura, Y., Miyamura, T., Kimura, S., and Koike, K. Steatosis and intrahepatic hepatitis C virus core protein in chronic hepatitis. *J. Med. Virol.* 59, 141-145, 1999.
3. Sabile, A., Perlemuter, G., Bono, F., Kohara, K., Demaugre, F., Kohara, M., Matsuura, Y., Miyamura, T., Brechot, C., and Barba, G. Hepatitis C virus core binds to apolipoprotein AII and its secretion is modulated by fibrates. *Hepatology* 30, 1064-1076, 1999.
4. Suzuki, R., Suzuki, T., Ishii, K., Matsuura, Y., and Miyamura, T. Processing and functions of hepatitis C virus proteins. *Intervirology* 42, 145-152, 1999.
5. Nishimura, Y., Kamei, A., Uno-Furuta, S., Tamaki, S., Kim, G., Adachi, Y., Kuribayashi, K., Matsuura, Y., Miyamura, T., and Yasutomi, Y. A single immunization with a plasmid encoding factor 1-alpha promoter elicits HCV-specific cytotoxic T- lymphocytes (CTL). *Vaccine* 18, 675-680, 1999.
6. Shimoike, T., Mimori, S., Tani, H., Aizaki, H., Matsuura, Y. and Miyamura, T. Specific interaction of HCV core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *J. Virol.* 73, 9718-9725, 1999.
7. Koike, K., Shimotohno, K., Okada, S., Okamoto, H., Hayashi, N., Ueda, K., Kaneko, S., Koike, K., Yokosuka, O., Chiba, T., Marusawa, H., Hino, O., Ueda, T., Omata, M., Juji, T., Nojiri, N., Takada, K., Miyamura, T., Osuga, T., and Ito, Y. Survey of HBV co-infection in hepatitis C virus- infected patients suffering from chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma in Japan. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 1270-1272, 1999.
8. Xing, L., Kato, K., Li, T. C., Takeda, N., Miyamura, T., Hammer, L., and Cheng, R. H. Recombinant hepatitis E capsid protein self-assembles into a dual- domain T=1 particle presenting native virus epitopes. *Virology* 265, 35-45, 1999.
9. Li, F., Riddell, M. A., Seow, H. F., Takeda, N., Miyamura, T., and Anderson, D. A. Recombinant subunit ORF2.1 antigen induces antibody against immunodominant epitopes in the hepatitis E virus capsid protein. *J. Med. Virol.* 60, 379-386, 2000.
10. Tanaka, Y., Shimoike, T. Ishii, K., Suzuki, R., Suzuki, T., Ushijima, H., Matsuura, Y., and Miyamura, T. Selective binding of HCV core protein to synthetic oligonucleotides. *Virology* (in press).
11. Satoh, O., Imai, H., Yoneyama, T., Miyamura, T., Utsumi, H., Inoue, K., and Umeda, M. Membrane structure of hepatitis B virus surface antigen particle. *J. Biochem.* (in press).
12. Li, T. C., Shinzawa, H., Ishibashi, M., Sata, M., Mast, E. E., Miyamura, T., and Takeda, N. A new enzyme-linked immunosorbent assay by using recombinant empty virus-like particles in the detection of antibodies to hepatitis E virus. *J. Med. Virol.* (in press).
13. Takigawa, S., Ishii, K., Aizaki, H., Suzuki, T., Asakura, H., Matsuura, Y., and Miyamura, T. Cell fusion activity of HCV envelope proteins. *J. Virol.* (in press).

以降のページは雑誌／図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍または雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	執筆者氏名	
1) 肝がん白書 平成11年度報告書. p23-32. 肝炎ウイルスキャリアの動向	1999	吉澤浩司	1
2) 医学と薬学. 41. p5-18. 肝炎ウイルス感染率の推移	1999	吉澤浩司	13
3) Medical Practice. 19. p1429-1433. わが国における急性ウイルス肝炎の発生状況	1999	田中純子、吉澤浩司	29
4) Archives of Virology. 144. p1299-1308. Clinical implications of mutations C-to-T1653 and T-to-C/A/G1753 of hepatitis B virus genotype C genome in chronic liver disease	1999	K.Takahashi, Y.Ohata, K.Kanai, Y.Akahane, Y.Iwasa, K.Hino, N.Ohno, H.Yoshizawa, and S.Mishiro	35
5) 血液事業 Blood Programme. 22. p409-417. 献血を契機に発見され、4年以上の追跡が可能であった HCV キャリア献血者 253 例の解析	1999	水井正明、山口和美、鈴木佳寿美、梅谷直子、増島永子、佐伯昌与、高松清美、船津理恵、小西真理恵、藤近和子、入江充、立野順子、宗像壽子、片山恵子、守屋尚、田中純子、吉澤浩司	45
6) 化学療法の領域. 15. p361-368 ウイルスキャリアの発見と対策	1999	田中純子、守屋尚、片山恵子、吉澤浩司	55
7) メディコピア. 39. p83-95. 日本人の HCV 感染	1999	田中純子、守屋尚、水井正明、吉澤浩司	65
8) Intervirology. 42. p153-158. Epidemiology of Hepatitis C Virus in Japan	1999	T.Moriya, T.Koyama, J.Tanaka, S.Mishiro, H.Yoshizawa	79
9) 広島医学. 52. p1053-1057. 検診で発見された HCV キャリアを対象とした腹部超音波検診	1999	守屋尚、田中純子、片山恵子、舛田一成、中西敏夫、中村就一、吉澤浩司	85
10) J Hepatol 30: 205-212, 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.	1999	Ikeda H, Takasu M, Inoue K, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M.	91
11) J Med Virol 57: 252-258, Distinct genotypes of a nonenveloped DNA virus associated with posttransfusion non-A to G hepatitis (TT virus) in plasma and peripheral blood mononuclear cells.	1999	Okamoto H, Kato N, Iizuka H, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M.	99
12) J Virol Methods 77: 199-206, Determination of antibodies to TT (TTV) virus and application to blood donors and patients with posttransfusion non-A to G hepatitis in Japan.	1999	Tsuda F, Okamoto H, Ukita M, Tanaka T, Akahane Y, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M.	107
13) J Infect Dis 179(5): 1245-1248, Excretion into bile of an novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non-A to G hepatitis.	1999	Ukita M, Okamoto H, Kato N, Miyakawa Y, Mayumi M.	115
14) Transfusion 39:522-526, Infection by an unenveloped DNA virus associated with non-A to G hepatitis in Japanese blood donors with or without elevated ALT levels.	1999	Itoh K, Hirakawa K, Okamoto H, Ukita M, Tanaka H, Sawada N, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M.	119
15) J Med Virol 58: 196-200, Effect of interferon on a nonenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic hepatitis of unknown etiology.	1999	Akahane Y, Sakamoto M, Miyazaki Y, Okada S, Inoue T, Ukita M, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M.	125
16) Virology 259: 428-436, Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated by PCR with primers from coding and noncoding regions.	1999	Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M.	131