

2. 学会発表

Yersinia pseudotuberculosis の殺菌抵抗性因子（ファゴソーム・リソソーム融合阻止）の解析

塚野尋子、倉 文明、泉谷秀昌、渡邊治雄. 日本細菌学会誌 1999; 54: abstract, 日本細菌学会総会、東京

表1 ウサギ血液 MAP 中の生菌数

接種菌数 CFU/ml	時間 CFU/ml		
	5	2 4	4 8
5	0	0	0
50	0	0	0
200	0	0	0
1000	0	0	0

表2 *Yersinia enterocolitica* O:3 の温度に依存した増殖態度

培養温度	培養状態	接種量	時間 (h)
20°C	Lag phase	high dose	0.1
		low dose	6.0
	Generation time	high dose	5.0
		low dose	5.0
	stationary phase	high dose	95.1
		low dose	140.0
8°C	Lag phase	high dose	12.5
		low dose	24.0
	Generation time	high dose	17.0
		low dose	23.5
	stationary phase	high dose	318.5
		low dose	564.5
4°C	Lag phase	high dose	72.0
		low dose	96.0
	Generation time	high dose	29.0
		low dose	43.0
	stationary phase	high dose	592.0
		low dose	1300.0
0°C	Lag phase	high dose	不明
		low dose	不明
	Generation time	high dose	不明
		low dose	不明
	stationary phase	high dose	不明
		low dose	不明

表3 *Yersinia enterocolitica* の少量接種による増殖態度

	接種菌数 CFU/ml	WB 中の WBC 10 ⁶ /ml	保 存 日 数					
			CFU/ml					
			7	14	21	28	35	42
RC-MAP 24hr LPRC-MAP パフィコート	4.4	4.6	0	0	0	0	0	0
			0	0	0	0	0	0
			0	0	0	0	0	0
RC-MAP 24hr LPRC-MAP パフィコート	4.3	2.9	0	0	0	0	0	0
			0	0	0	0	0	0
			0	0	0	0	0	1.0×10
RC-MAP 24hr LPRC-MAP パフィコート	4.4	7.0	0	0	0	0	0	0
			0	0	0	0	0	0
			40	0	0	0	0	0

表4 *Yersinia enterocolitica* の中等量接種による増殖態度

	接種菌数 CFU/ml	WB 中の WBC 10 ⁶ /ml	保 存 日 数					
			CFU/ml					
			7	14	21	28	35	42
RC-MAP 24hr LPRC-MAP パフィコート	82	3.0	0	2.8×10 ⁵	3.4×10 ⁷	2.1×10 ⁷	8.1×10 ⁷	5.8×10 ⁸
			0	0	0	0	0	0
			0	0	0	7.8×10 ⁷	4.7×10 ⁸	7.4×10 ⁸
RC-MAP 24hr LPRC-MAP パフィコート	80	3.6	0	4.9×10 ⁶	2.4×10 ⁷	3.5×10 ⁷	8.7×10 ⁷	6.8×10 ⁸
			0	0	0	0	0	0
			0	0	0	5.0×10 ⁷	1.5×10 ⁸	6.0×10 ⁸
RC-MAP 24hr LPRC-MAP パフィコート	78	5.4	0	65	5.8×10 ⁷	8.8×10 ⁷	8.9×10 ⁷	5.9×10 ⁸
			0	0	0	0	0	0
			40	1.5×10 ⁴	3.4×10 ⁸	5.0×10 ⁸	6.5×10 ⁸	5.3×10 ⁸

表5 *Yersinia enterocolitica* の大量接種による増殖態度

	接種菌数 CFU/ml	WB 中の WBC 10 ⁶ /ml	保 存 日 数					
			CFU/ml					
			7	14	21	28	35	42
RC-MAP 24hr LPRC-MAP パフィコート	198	3.2	0	7.5×10 ⁵	1.2×10 ⁷	1.2×10 ⁷	1.4×10 ⁷	3.2×10 ⁸
			0	0	0	0	0	0
			0	1.8×10 ²	1.8×10 ⁸	4.0×10 ⁸	8.9×10 ⁸	3.9×10 ⁸
RC-MAP 24hr LPRC-MAP パフィコート	203	4.7	3.2×10 ²	5.0×10 ⁶	5.4×10 ⁶	5.6×10 ⁶	8.8×10 ⁶	4.6×10 ⁸
			0	0	0	0	0	0
			15	1.0×10 ⁶	7.7×10 ⁶	9.9×10 ⁶	1.3×10 ⁸	1.4×10 ⁸
RC-MAP 24hr LPRC-MAP パフィコート	220	5.0	55	2.0×10 ⁶	3.8×10 ⁶	3.8×10 ⁶	3.5×10 ⁶	2.7×10 ⁸
			0	0	0	0	0	0
			40	1.0×10 ⁶	5.9×10 ⁶	9.0×10 ⁶	1.2×10 ⁸	6.9×10 ⁸
RC-MAP 24hr LPRC-MAP パフィコート	206	5.3	0	5.1×10 ⁴	5.0×10 ⁷	1.0×10 ⁸	1.7×10 ⁸	2.6×10 ⁸
			0	0	0	0	0	0
			0	4.0×10 ³	6.1×10 ⁶	6.1×10 ⁸	8.0×10 ⁸	4.9×10 ⁸

表6 72時間及び5日保存後にフィルター濾過した製剤中の増殖態度

	接種菌数 CFU/ml	WB中のWBC 10 ⁶ /ml	保存日数					
			7	14	21	28	35	42
282 72hr LPRC-MAP 5day LPRC-MAP パフィコート	282	4.8	0	0	0	0	0	0
			0	0	0	0	0	0
			5	6.0×10 ⁵	3.8×10 ⁵	5.5×10 ⁵	6.0×10 ⁵	6.5×10 ⁵
290 72hr LPRC-MAP 5day LPRC-MAP パフィコート	290	4.1	0	0	0	0	0	0
			0	0	0	0	0	0
			55	2.4×10 ⁵	6.1×10 ⁵	6.7×10 ⁵	5.2×10 ⁵	5.2×10 ⁵
292 72hr LPRC-MAP 5day LPRC-MAP パフィコート	292	5.0	0	2.8×10 ⁶	3.0×10 ⁶	3.0×10 ⁶	1.3×10 ⁵	9.2×10 ⁵
			0	3.2×10 ⁴	4.0×10 ⁷	4.6×10 ⁷	5.0×10 ⁷	7.5×10 ⁵
			0	0	1.6×10 ⁶	4.0×10 ⁵	7.2×10 ⁵	9.9×10 ⁵
291 72hr LPRC-MAP 5day LPRC-MAP パフィコート	291	3.5	0	3.1×10 ⁵	1.0×10 ⁷	3.2×10 ⁵	1.1×10 ⁵	7.7×10 ⁵
			40	1.2×10 ⁵	2.7×10 ⁷	3.0×10 ⁵	9.1×10 ⁵	7.0×10 ⁵
			10	4.8×10 ⁵	1.7×10 ⁵	1.8×10 ⁵	2.6×10 ⁵	1.0×10 ⁵

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌（雑誌の時は雑誌名、巻号数、論文名	刊行年月日	刊行書店名	筆頭者名
Microbiology and Immunology, Vol. 40, No. 10, 773-775, Detection and identification of <i>Yersinia pestis</i> by polymerase chain reaction (PCR) using multiplex primers.	1996		Tsukano Hiroko
Microbial Pathogenesis, Vol. 27: 253-263. <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> blocks the phagosomal acidification of B10.A mouse macrophages through the inhibition of vacuolar H ⁺ -ATPase activity.	1999	academic press	Tsukano Hiroko

血液製剤による細菌感染の防御に関する研究

分担研究者 荒川 宜親 (国立感染症研究所・細菌・血液製剤部)

研究要旨

近年の医療の高度化にともない、輸血用保存血液や血小板液などの製剤は、免疫抑制状態の患者に投与される機会が多くなっている。汚染された製剤を介して、好中球機能の正常な患者へ仮に少量の菌が投与されても、貪食細胞等により直ちに排除され、重篤な結果に至ることは少ないと考えられる。しかし、免疫抑制在や抗癌剤などを投与されている患者では、極く少量の細菌の投与が致命的となる事態も想定される。赤血球や血小板など「生」の血球細胞を含む製剤は、薬品や加熱による滅菌が行い難いため、その製造に当たっては、血液の採取の段階から、分離、濃縮、封入、保管、輸送など全ての工程において、細菌の混入や増殖を防ぐ細心の注意が重要である。

無症状の菌血症状態の人から採取した血液が汚染の原因となることも考えられるが、一般的には採血や分取工程における汚染が最も起りやすいと考えられる。

そこで、このようなロットを構成しない製剤における無菌検査の方法について、高感度培養法などの採用を検討するとともに、分離や培養が難しい菌の検出には、抜き取り検査と近年普及が著しいPCR等によるモニタリングも検討する必要があるであろう。

A. 研究目的

ヒトの血液を原材料として作成される輸血用の赤血球液や血小板液などの製剤や、最近、骨髄移植の代替として実用化されつつある、臍帯血を原材料とした血液幹細胞液などは、細菌やウイルスなど様々な微生物による汚染の可能性が指摘されている。これらの製剤は好中球機能などの低下した易感染性の患者に投与される機会が多いため、病原微生物による汚染を可能な限り少なくする事が重要である。

これらの製剤に細菌が混入する原因として、採血時の汚染、製剤の調整中の汚染、保管中での細菌の増殖など様々な要因が考えられる。また、4℃での冷蔵保存状態でも増殖可能な細菌による汚染事故も海外ではしばしば報告されている(1)。

本研究では、血液製剤が細菌によって感染される事を防止するための要点について考察する。

B. 研究方法

内外の学術雑誌や欧米などの公的保健機関の発行する報告書などから、輸血用赤血球液、血小板液、アルブミン製剤などの細菌の汚染や、輸血後の敗血症等の報告例を検索し、その背景となった諸要因について分析を行った。

C. 研究結果

1. 菌血症を引き起こしやすい細菌

抜歯後に菌血症が発生しやすい事については古くから良く知られているが、起因菌としては、口腔常在菌や齲菌、歯周部、歯根部などの炎症の起因菌など様々なものが考えられる。例えば、*Streptococcus*

属(*S. mutans*, *S. intermedius*, *S. salivarius* など)、また、*Veillonella atypica*, *Actinomyces viscosus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Staph. aureus*, *Neisseria*属、*Corynebacterium matruchotii*などである。

さらに、コクシエラ、クラミジア、リケッチアなどの病原体やマラリア、トキソプラズマ、バベシアなどの原虫などは、菌血症を起していても無症候性の場合もあり、そのような状態の供血者から採取された血液による製剤の汚染の可能性も示唆されている。

2. 採血時の汚染を引き起こしやすい細菌

皮膚常在菌として、*S. aureus* (黄色ブドウ球菌)、*S. epidermidis* (白色ブドウ球菌)、その他のコアグラゼ陰性ブドウ球菌属(CNS)、例えば*S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*などは有名である。さらに *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium striatum*, なども主要な常在菌である。一方、皮脂を好む酵母の一種である *Pityrosporum folliculitis*, *P. ovale*, *P. orbiculare* など様々な菌種が、汚染の原因菌となりうる。

3. 製剤の調整中に汚染を引き起す可能性のある細菌

環境中に存在するあらゆる細菌が汚染の原因菌となりうる。*Serratia marcescens*, *Enterobacter agglomerans*, CNS, *Pseudomonas paucimobilis*, *Enterococcus species*などが汚染菌として報告されている。また、芽胞を形成する *Bacillus* 属や *Clostridium* 属、真菌は乾燥や高温にも耐えるため、濃縮工程や血清分離の行程で汚染する可能性がある(2)。

4. 低温保存中でも増殖する細菌

4℃程度の低温でも増殖する *Yersinia enterocolitica* や *Pseudomonas fluorescens* による汚染が内外で多数報告されている(3)。採血時やその後の工程における微量な汚染が原因と考えられる。

5. 細菌による汚染を高感度に検出する方法

a. より高感度な分離培養法の普及

現行の生物学的基準では、「50本につき少なくとも1本の割合で抽出した検体」について液状チオグリコール酸培地、あるいはソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地を用いて菌を分離することが一般法として規定されている。しかし、この方法は、必ずしも菌の分離感度が高いとは言い難い。この弱点を補うため、無菌試験用の嫌気、好気のカルチャーボトルも徐々に導入されてはいるが、接種可能なサンプルが10mlであり、検出感度の向上のため一層の改良を検討する必要がある。

b. PCR法などによる検討

血液を原材料とした製剤中の病原体の混入の有無を検出する方法として、PCR法がある。肝炎ウイルスやHIVなどのウイルスゲノムの検出法として一般的な方法となっている。しかし、細菌の検出法としては今だ一般的ではない(4, 5)。その理由は、培養法の方がより安価で簡便である事などがあげられる。しかし、細菌は人工培地で培養できないが生育している状態「viable but non-culturable (VNC) form」を呈することも多く、たとえ培養法で「陰性」であっても菌による汚染を必ずしも否定できない。特に、嫌気性菌などは分離が困難な場合も多い。事実、血液の細菌培養より16S リボゾームRNAをPCR法により検出する方が、高い検出感度が得られる事も報告されている(6)。

D. 考察

赤血球や血小板の輸血後などにみられる原因不明の一過性の発熱やその他の症状の出現には、製剤中に残存する白血球によるtransfusion associated graft-versus-host disease (TA-GVHD)やサイトカインなどの関与が指摘されている。しかし、発熱などを引き起こす他の原因として、製剤の細菌による汚染がしばしば海外で報告されてきた。細菌汚染のレベルが高く菌数が多い場合には敗血症などを呈し発見されやすいと考えられるが、汚染菌数が少ない場合には、一過性の菌血症による短時間の発熱のみで済んでしまい、原因が解明されずに終わっている事例

もあるのではないかと考えられる。したがって、これらの製剤における細菌による汚染の程度についてその検出方も含めて検討すべき時期に来ていると考えられる。

臓器移植や癌治療など高度医療や先端医療が推進される中で、免疫抑制剤や抗癌剤など好中球機能を低下させる薬剤を投与された易感染者の増加がみられるが、そのような患者への「汚染製剤」の投与は重篤な結果を招くことが想定される。したがって、血液を原材料とする製剤、特に濃厚赤血球液や血小板液など、薬剤や加熱による滅菌が不可能な製剤における無菌性を保証する新たな方法の確立が必要となっていると考えられる。

低温でも増殖する *P. fluorescens* や *Y. enterocolitica* などのグラム陰性桿菌はエンドトキシンを産生するため、感染防御機能の低下した易感染者に投与された場合、ショックや多臓器不全を誘発し致命的となる場合も想定される。しかも、これらのグラム陰性桿菌では、近年耐性菌の出現も多数報告されており、敗血症を引き起こした場合、抗菌薬による治療に抵抗する事態も想定される。

以上の諸々の理由から、血液を原材料にして製造されている製剤、特に生細胞を含むため滅菌処理が困難な製剤については、血液の採取から、製造、保管など全ての段階において、無菌的視点からの一貫した管理の充実が重要となっていると考えられる。

E. 参考文献

1. Gottlieb T. Hazards of bacterial contamination of blood products. *Anaesth Intensive Care*. 21(1):20-23., 1993.
2. Shimoyama R, et al. Contamination of *Bacillus cereus* in an apheresis-derived platelet concentrate. *J Clin Apheresis*. 12(2):103, 1997.
3. Beresford AM. Transfusion reaction due to *Yersinia enterocolitica* and review of other reported cases. *Pathology*. 27(2):133-135, 1995.
4. Feng P, et al. Direct identification of *Yersinia enterocolitica* in blood by polymerase chain reaction amplification. *Transfusion*. 32(9):850-854, 1992.
5. Golbang N, et al. Sensitive and universal method for microbial DNA extraction from blood products. *J Clin Pathol*. 49(10):861-863, 1996.
6. Cursons RT, et al., The use of polymerase chain reaction to detect septicemia in critically ill patients. *Crit Care Med*. 27(5):937-940, 1999.

ヒトパルボウイルス B19 の感染性評価法の開発

分担研究者 岡田義昭 国立感染症研究所室長

研究要旨 ヒトパルボウイルス B19 (以下 B19 と略す) は種々のウイルス不活性化工程に抵抗性を示すため、血液製剤から完全に除去することは現在の技術では難しい。核酸増幅検査において陽性と判断された場合、検出された B19 が感染性を保持しているのか評価することはこれまで不可能だった。そこで、ヒト由来の株化された細胞を用いて感染性を評価する系の確立を目指した。初めに、感染細胞におけるウイルス抗原を検討した。細胞内のウイルス抗原を VP2 特異抗体を用いてフローサイトメーターで解析したが抗原陽性細胞は数万個に 1 個の割合であり、低感度であった。そこで、Bostic らが報告した、B19 の感染細胞において DNA から読まれたウイルス RNA が非構造蛋白と構造蛋白との間でスプライスされる性質を利用した RT-PCR 法、をさらに感度を向上させる検出系を確立した。このアッセイにより、これまでの DNA を検出する系に比べ、B19 由来の RNA の有無によって感染性が明確で高感度に評価可能となった。また、KU812 細胞の方がより高感受性であることが明かとなった。

G. 研究目的

B19 は envelope を持たない DNA ウイルスのため非常に安定で不活化することは難しい。さらに、viremia でのウイルス量が 10^{10} を超え、サイズも小さいため血液製剤から除去することは困難である。これまでの血液製剤の B19 混入についての核酸増幅法をもちいた報告では多くの製剤に混入していることが明らかとなった。しかし、完全に除去できない現状においては原料血に B19 陰性の血液を使用することが必要だが、世界的にみても日本赤十字社が試験的にウイルススクリーニングを導入しているにすぎない。そこで、より血液製剤の安全性を高めるために、血液及び血液製剤に混入している B19 の感染性を評価できる系の確立が必要だ。本研究では、一般的に入手可能な細胞株を用いての評価系の確立を目的とした。

B. 研究方法

B19 抗原陽性血漿 (福岡赤十字血液センター-佐藤博士より供与) 1 マイクロリットルを 1×10^6 の UT/7

細胞のペレットに接種し、4 度 C で 1 時間細胞に吸着させた。3 回洗浄後、10% FCS-RPMI 培養液にて培養した。2 日後、細胞を集め PBS で洗浄し、5.5% のホルムアルデヒドで固定後、saponin 処理を行い細胞膜を抗体が透過できるようにした。処理した細胞に B19 の VP2 特異抗体を加え、フローサイトメーターで細胞内の VP2 抗原を検出した。次に、B19 陽性血漿を PBS で $\times 10$ 、 $\times 10^3$ 、 $\times 10^5$ に希釈し、各々 10 マイクロリットルを 2×10^5 の UT/7 細胞と KU812 細胞に感染させた。細胞を洗浄し、エリスロポイエチンを 2IU/ml となるように添加した。感染 2 日後に RNA を抽出し、15 マイクロの水に溶解後、5 マイクロを取り、各々ランダムプライマーを用いた RT 反応、及び B19 特異的プライマーを用いた RT 反応を行った。PCR は Fig.1 に示したプライマーを用いた。プライマーは Bostic (J. Infect. Dis. 1999; 179: 619-626) らの報告に従った。B19 の genomic DNA と感染細胞内でスプライスされた RNA を鋳型にした DNA は

大きさが異なるので、増幅される DNA の大きさによって細胞での感染性を評価できる(fig.1)。

C. 研究結果

UT/7 細胞に x10 の血漿を感染させ、2 日後に細胞内の B19 抗原の有無を VP2 抗体を用いて検出した。二次抗体のみで染色した場合をコントロールにして解析したところ、数万個に 1 個の割合でしか VP2 抗原陽性細胞は検出されなかった。次に、B-19 由来の RNA によって感染性が評価できるか検討した。B19 陽性血漿で感染させたところ Fig.2 に示すように 262bp と 125bp のバンドが認められた。これらのバンドは非感染細胞には認められなかった。また、逆転写反応をランダムプライマーで行った場合に比較して B19 特異的プライマーを用いた方が感度は約 100 倍良かった。KU812 細胞では 10^5 に希釈した血漿でも B19 の RNA が検出できた。一方、UT/7 細胞では x10 の血漿でもバンドは認められなかった。

D. 考察

これまで B19 の DNA を検出する方法で感染性を評価しようとしたが、培養に持ち込まれたウイルスや細胞表面に付着したウイルスと増殖したウイルスとの区別が困難であった。そこで、UT/7 細胞を用いて、感染によって細胞内で合成される B19 の構造蛋白である VP2 をフローサイトメーターで検出しようとしたが、これまでの報告と異なり、数万個に 1 個しか抗原陽性細胞が検出できず、感度が非常に低いことが明らかとなった。一方、Bostic らの B19 の RNA の spricing に注目した RT-PCR 法による感染性の検討の報告はこれまでの困難さを見事に解決した。つまり、B19 が感染した細胞で合成される RNA は spricing されるので、これを鋳型にした PCR 産物は genomic

DNA より短いことになる。よって、RNA 由来とわかる。B19 は DNA ウイルスだから感染が成立しなければ B19 由来の RNA は存在しないので、この短い DNA が検出されれば感染が成立したことになる。我々はこれまでの研究から、KU812 細胞が成長因子によって赤芽球に分化し易いことを見出ししていたので、Bostic らが UT/7 細胞を用いたのに対し KU812 細胞を用いて感染性の評価を行った。結果的には 1000 倍以上 KU812 細胞の方が B19 に対して感受性が良好であった。骨髓細胞などはルーチンには利用できないが、KU812 細胞は樹立された細胞株のため、入手が容易でいつでも使用できる利点がある。今のところ、骨髓細胞との感受性の比較は行っていないが、さらに感受性を高めるために P 抗原やエリスロポイエチンリセプターの遺伝子導入等を考えている。

E. 結論

感染細胞内で B19 遺伝子から転写される RNA が spricing される性質を利用して RT-PCR による B19 感染性の評価が可能になった。感染によって合成される RNA の有無によって感染性を評価するので、DNA を用いたアッセイに比べ、感染性がこれまでより明らかで、且つ、高感度に検出可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子、福島誉子、小室勝利：ヒトプリオン蛋白発現細胞株の解析。第 47 回日本ウイルス学会。1999 年。

G. 知的所有権の取得状況

なし

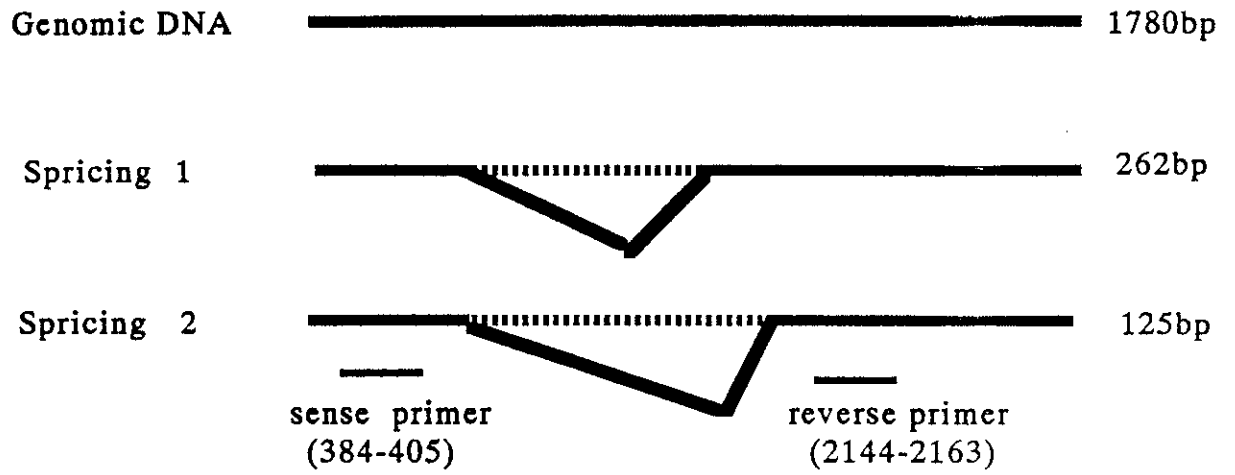


Fig.1 Spricing site of B19 RNA and PCR primer site

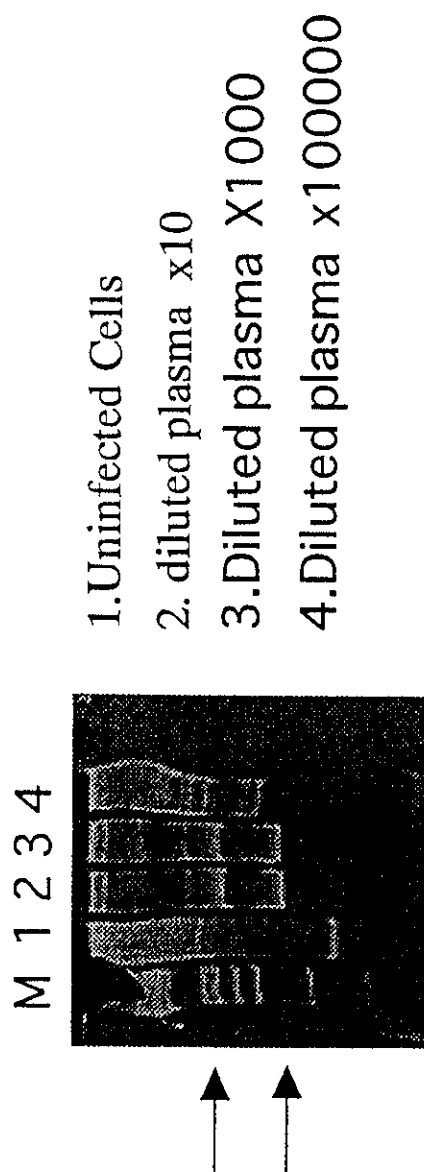


Fig.2 Detection of B19 RNA by RT-PCR

B型肝炎ウイルス核酸増幅法の品質管理と標準化に関する研究

分担研究者 水沢左衛子 国立感染症研究所

協力研究者 岡田義昭, 小室勝利 国立感染症研究所

HBV の母子感染や医療従事者の事故による感染はワクチンにより予防可能になったが、STD としての問題が残されている。我国の献血血液の HBsAg 陰性 HBV DNA 陽性率は欧米と比較して高く、輸血用血液と血液製剤のウイルス学的安全性の確保のための HBV NAT の品質管理と標準化が求められている。ヨーロッパでは 1997 年に国際共同研究 VQC Programme で HBV パネルを測定した。信頼性のある測定結果 (63%) に基づく Eurohep gtA 標準品の 95%と 50 の検出のエンドポイントは single PCR 法で 4471geq/ml と 290geq/ml、nested PCR 法で 2586geq/ml と 141geq/ml であった。また、Eurohep gtA 標準品でキャリブレートした VQC 標準品の濃度は 3×10^9 geq/ml であった。我々が参加した VQC Programme (HBV) について報告する。

A. 研究目的

我国の献血血液の HBsAg 陰性 HBV DNA 陽性率は欧米と比較して高く、輸血用血液と分画製原料血漿プールのための HBV-NAT の品質管理と標準化が求められている。ヨーロッパではコード番号をつけたウイルスのパネルを参加者が測定する方法で International VQC Proficiency Programme を数年毎に実施している。VQC program の目的は信頼性の高い測定結果にもとづいた①NAT 試験法の感度 (50%、95%検出エンドポイント) の検討、②EUROHEP HBV-DNA 標準品の濃度の推定、③EUROHEP 標準品による VQC HBV-DNA 標準品のキャリブレーション、及び④研究室の NAT 試験手技の評価等である。

B. 研究方法

HBV-DNA パネル：陽性試料 2 本 (約 4×10^7 geq/ml)、陰性試料 4 本、VQC 標準品希釈系列 11 本 (約 $10^{5.6} \dots 10^{0.4}$ geq/ml)、EUROHEP gtA 標準品希釈系列 8 本 (約 $10^{4.6} \dots 10^{0.4}$ geq/ml)。パネル 2 セットを参加者に送付し、返送された測定結果をプロビット法で解析した。解析には陽性

試料と陰性試料及び EUROHEP と VQC の希釈パネルいずれの測定にも誤りの無い測定結果のみを用いた。

(倫理面への配慮：CLB から供与された試料は、広く用いられている標準品であり、倫理面での問題は無い)。

C. 結果

60 の研究室が参加して 47 研究室から 86 組の測定結果が返送され、その 63%が陽性試料と陰性試料及び EUROHEP と VQC の希釈パネルいずれの測定にも誤りの無かった。測定法の内訳は自家法 single PCR 22, 自家法 nested PCR 27, AmpliCor Monitor 5 であった。信頼性のある測定結果にもとづく Eurohep gtA 標準品の 95%と 50 の検出のエンドポイントは single PCR 法で 4471geq/ml と 290geq/ml、nested PCR 法で 2586geq/ml と 141geq/ml であった。

CLB が bDNA 法を用いて EUROHEP 標準品 (4×10^9 EU/ml) でキャリブレートした VQC 標準品の相対値は 0.76、即ち 3×10^9 EU/ml であった。この値は定性法による希釈系列の測定結果 54 組をプロビ

分担研究報告書

ット法で解析した結果、及び、26組の定量法により測定した結果によっても確かめられた。また、bDNA法で測定した EUROHEP 標準品の濃度は 4×10^9 geq/ml に近い値だったので、VQC 標準品の濃度を 3×10^9 geq/ml と定めた。

D. 考察と結論

本研究の結果、Eurohep gtA 標準品の 95%検出エンドポイントは nested PCR 法で 2586geq/ml であった。これをミニプールの HBV-NAT 試験に当てはめると、500人プールでは 1.3×10^6 geq/ml 以上、50人プールでは 1.3×10^5 geq/ml 以上の陽性血漿が検出可能となる。ウインドウ期の HBV 陽性血の検出のためには、より高感度の試験法の開発と、サイズの小さいプールでの NAT 試験の実施が望まれる。

NAT 試験は測定原理が簡単であるが、63%という数字が示すように個々の研究室が信頼性の有る測定法を確立するのは一般に考えられている以上

に難しいことがうかがえる。参加した研究室は NAT 試験の手技の評価を受けるだけでなく、データの詳しい解析結果を送付される。また、VQC のパネルは CLB から購入することができるので、各研究室の NAT 試験法の改良と自己評価が可能である。1993 年の共同研究では信頼性の有る測定結果が半分に満たなかったことを考えると、継続的な共同研究による外部評価が技術向上に貢献したといえないだろうか。

E. 研究発表

P.N. Leli, H.T.M Cuypers, H.G.M. Neisters, A.A.J. van Drimmelen, W.G.V. Quint and the participants in the VQC programme. Quality assessment of Hepatitis B virus nucleic acid amplification methods, An international proficiency study. (投稿準備中)

接触及び血液由来感染症の防御対策に関する研究

(代表研究者：小室勝利)

HHV、CMV に関する研究

分担研究者	岩崎琢也	国立感染症研究所感染病理部室長
研究協力者	安藤靖恭	国立感染症研究所感染病理部 国際医療福祉大学臨床医学研究センター

研究要旨 β -ヘルペスウイルスに分類されるヒトサイトメガロウイルス (HCMV) の real-time PCR を用いた定量系の開発を試み、臨床検体での応用を確認した。具体的には、液層中にて予め試料中に混入させた SYBRGreen が結合した PCR 産物の 2 重鎖 DNA を PCR の各サイクルにおいて定量することにより、HCMV のウイルスゲノムを 1 サンプル中 10 genome copies で検出することが可能となった。この解析系を用いて HCMV 網膜炎罹患患者の前房水中の HCMV のゲノム数を検討したところ、急性期の前房水中には 3000-4000 genome copies/ μ l と非常に多量のウイルスゲノムが存在し、回復期には定量感度の 10 genome copies 未満/ μ l と著明に減少した。一方、これらの宿主の末梢血単核細胞ならびに血漿中のウイルスゲノムは定量感度以下であり、さらに 1 コピーの感度で検出できる nested PCR を用いて解析したところ、単核細胞のみにウイルスゲノムを検出した。従って、この解析系では増殖性の HCMV 感染の定量ならびにその治療効果の判定には有効であるが、潜伏性の HCMV 感染細胞の検出には不適であり、nested PCR のような煩雑な解析系の必要性を示唆している。また、

A. 研究目的

ヘルペス群ウイルス (human herpesviruses, HHV) は現在 8 種類発見されているが、共通する特徴として初感染後体内に潜伏する。本分担研究においては血液系細胞に潜伏するヘルペスウイルスを対象としている。血液中に潜伏するウイルスとしては、 β -ヘルペスウイルスのヒトサイトメガロウイルス (HCMV) (HHV5)、ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV6)、ヒトヘルペスウイルス (HHV7) と γ -ヘルペスウイルスのヒトヘルペスウイルス 8 (HHV8) ならびに Epstein-Barr ウイルス (EBV) (HHV4) がある。これらのウイルスについて血液細胞ならびに血漿中のウイルスゲノムの検出法を確立し、血液を介した感染において有用な情報を獲得し、その意義とその防止方法を確立することが目的となる。

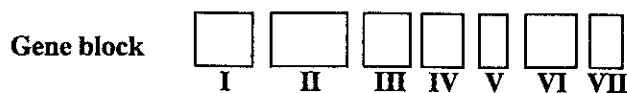
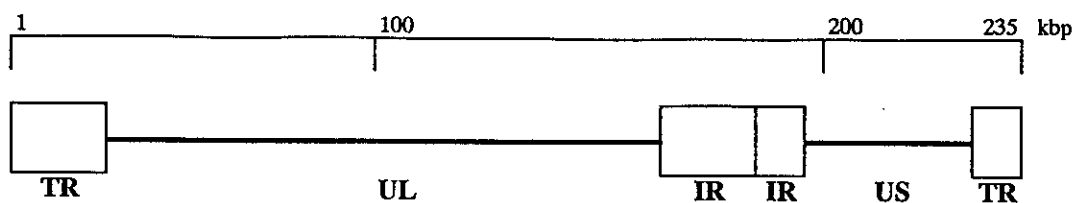
初年度と第 2 年度の解析は HHV6 の血液細胞の感染について解析を行ない、HHV6 の 10 コピーのウイルスゲノムを検出できる single

PCR による検出法を開発し、実際の臨床検体において有用であることを確認した。また、増幅産物の切断パターンにより、2 種類のサブタイプが可能であることも示した。さらに、同一サンプルについて複数回の解析を行い、その再現性とばらつき、さらには、予想外の増幅産物について、塩基配列を検討し、ウイルスゲノムあるいはヒトゲノム由来かについても検討してきた。

B. 材料と方法

ウイルス：代表的な HCMV の実験株である AD169 株を使用した。

臨床検体：臨床歴ならびに眼底所見より HCMV 網膜炎と診断された X 症例の急性期に前房水を採取した。Y 症例では回復期にも前房水を採取した。また、Z 症例において、急性期ならびに回復期に末梢血をヘパリン採取



UL55 (80722-83492)

5'-GAGGACAACGAAATCCTGTTGGGCA-3'
5'-GTTCGACGGTGGAGATACTGGTGAGG-3'

し、リンホプレップチューブ (Nycomed Pharma 細胞成分を分取した。なお、分離する前に、血漿成分をあらかじめ、遠心分離により分け、別に保存した。

核酸の抽出：DNA は SDS, EDTA の存在下で Proteinase K (Roche) 処理を行い、その後、フェノールを用いて蛋白を除去し、エタノール沈殿により精製した。

real time PCR：が報告した HCMV の B 糖蛋白 glycoprotein B の ORF 内に設計したプライマーを使用して検討した。real time PCR のための使用器具は LightCycler (Roche) であり、その使用は使用書に準じた。反応は 2 重鎖 DNA 結合色素 SYBRGreen を含む 20 μ l の系で行い、PCR の反応条件は 94 度 30 分、56 度 1 分、72 度 5 分の 45 サイクルとした。増幅産物の確認は real time の解析に加え、反応終了後 2% アガロースゲル電気泳動を定電圧の条件で行い、終了後 ethidium bromide で染色し、紫外線下で観察した。

C. 結果

鋳型 DNA の準備：real-time PCR ではウイルスゲノムコピー数を算定するための鋳型を必要とする。最初にこの鋳型を作製した。HCMV AD169 株をヒト線維芽細胞に Multiplicity of

AS, Norway) を使用し、その使用書に従い単核 infection 3 で感染させ、感染後 72 時間の感染細胞より DNA を抽出した。この DNA を鋳型として、Mitchell ら(1994; J. Med. Virol 43: 336-40)の報告した HCMV glycoprotein B (ORF UL55)の塩基配列を増幅するオリゴヌクレオチドプライマーの組み合わせ(図 1)を使用して、95 度 0 秒、60 度 5 秒、72 度 12 秒の 25 サイクルとして、増幅した。予想サイズの 150 bp の増幅産物が得られ、この産物を PCR 精製キット(Quiagen)を使用して精製した。精製した増幅産物を pGEM-T (Promega)に TA クローニングし、大腸菌 DH5 α に形質導入し、目的の挿入配列を有した組換えプラスミドを作製した。この組換えプラスミドを精製し、一定濃度の DNA 溶液を作製し、10 ng から 1 ag までの 10 倍希釈系列を作製し、real time PCR の鋳型とした。なお、この希釈系列は分光高度計あるいはアガロースゲル電気泳動後の ethidium bromide 染色を行い、検出感度以上の濃度の希釈段階はその濃度を確認した。

また、サンプル中のヒト由来の細胞数を算定するための鋳型 DNA も作製した。ヒト β -globin 遺伝子の塩基配列を増幅するオリゴヌクレオチドプライマーの組み合わせ PC03 と PC04 (Takara)を使用して、95 度 0 秒、60 度 5 秒、72 度 12 秒の 45 サイクルとしてヒト DNA を増幅し、110 bp の予想サイズの増幅産物を

Table. Estimate of copy numbers of HCMV and β -globin in aqueous chamber fluid from patients with CMV retinitis

Case	age		retinitis	date from onset	GCV	HCMV		β -globin		
						Average	SD	Average	SD	
1	1	57	lymphoma	active	2 months	-	3545*	2103	13.59	4.68
	2			inactive	8 months	+	0**	0	0	0
2	3	40	AIDS	active	2 weeks	-	4216	1995	9.46	2.63
	4				5 weeks	+	1022	296	13.25	6.43
3	5	36		active	2 weeks	-	42	19	13.68	3.35
	6				6 weeks	+	2	2	4.6	2.52
4	7	50	CML _{post-BMT}	active	1 week	+	3	1	415.6	178
5	8	38	HD _{post-BMT}	active	3 months	+	724	221	23.79	11.37

*: Quantitation (copies)

** : Amplicon was observed in Ethidium bromide stained- agarose gel after electrophoresis.

得て、HCMV glycoprotein B 増幅産物同様に、pGEM-T に分子クローニングし、一定濃度の DNA 希釈系列を作製した。

臨床検体の解析

HCMV の増殖性感染を来している宿主由来の検体として、宿主の免疫不全状態にもなって発症する HCMV 網膜炎の罹患者の前房水を採取し、その中の HCMV のウイルスゲノムのコピー数ならびに β -globin 遺伝子のコピー数を real time PCR により解析した (表)。

実際に測定した前房水中のウイルスのコピー数は HCMV 網膜炎の急性期においては症例により異なり、3000-4000 コピー/ μ l 前後から数コピーまで種々であったが、Ganciclovir による治療後にはそのコピー数は減少したが、その程度は治療期間ならびに解析時期により異なった (表)。

これらの症例の一部で、末梢血単核細胞ならびに血漿中の HCMV ゲノム数の検討も行ったが、これらは定量範囲以下であった。ただし、1 例において、nested PCR により末梢血単核細胞中にウイルスゲノムを検出した。

D. 考察

本研究の目的は HHV の血液ならびに血液製剤を介した感染症の防御対策に有用な診断法の開発、改良、標準化である。しかしながら、実際の症例においては実際解析を行うサンプルの量と実際臨床において患者に投与される

製剤の量とが大幅に異なり、後者の方が、ウイルス自体を検出する診断、検査系においては、検体中に含まれるウイルス粒子数が非に少ない場合はどんなに高感度の方法をもちいても検体は陰性、投与される製剤は陽性ということになる。

今年度対象とした HCMV は本邦では半数以上の成人が既感染者であり、日常診療の場において、医療行為に伴って感染する機会はそのほど少なくはないといわれている。しかし、免疫学的に健全な成人においては、初感染は軽微あるいは伝染性単核球症様症状を呈するといわれ、recipient が重篤な臨床症状を来すのは、免疫能が低下した宿主の場合である。従って、現時点では、HCMV の医原性感染は移植に際してとくに問題とされている。この場合、血清中の抗 HCMV 抗体の有無により判断されており、血清抗体陰性の recipient には血清抗体陽性の組織・血液の移植・輸血においては問題が生じることが明らかにされている。

今年度は臨床検体中のウイルスゲノムの定量的解析を real time PCR を用いて確立することを目的とし、検体中に 10 コピー以上の HCMV が存在するときはほぼ確実にその量を算定することができるようになった。従って、組織・血液中にこれ以上のゲノムが存在する場合はこの方法を用いて定量できる。この方法を用いることにより retrospective ならびに prospective に輸血等に伴って recipient に入り込

んだ HCMV のウイルス量を算定することができ、最終的にどの程度のウイルス量が、どの程度免疫能が低下した宿主に持ち込まれたときに、後天性の重篤な HCMV 感染症が発生するかを想定できることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Matsuo K, Iwasaki T, Asanuma H, Yoshikawa T, Chen Z, Tsujimoto H, Kurata T, Tamura S: Cytokine mRNAs in the nasal-associated lymphoid tissue during influenza virus infection and nasal vaccination. *Vaccine* 18: 1344-1350, 2000

Yoshikawa T, Suzuki K, Ihira M, Furukawa H, Suga S, Iwasaki T, Kurata T, Asanuma K, Tanaka K, Asano Y: Human herpesvirus 6 latently infects mononuclear cells but not liver tissue. *J Clin Pathol* 52: 65-67, 1999

Iwasaki T, Tamura S, Kumasaka T, Sato Y, Hasegawa H, Asanuma H, Aizawa S, Yanagihara R, Kurata T: Exacerbation of influenzavirus pneumonia by intranasal administration of surfactant in a mouse model. *Arch Virol* 144: 675-685, 1999

Osaki M, Matsubara K, Iwasaki T, Kurata T, Nigami H, Harigaya H, Baba K: Severe aplastic anemia associated with human parvovirus B19 infection in a patient without underlying disease. *Ann Hematol* 78: 83-86, 1999

Chiba N, Iwasaki T, Mizutani T, Kariwa H, Kurata T, Takashima I: Pathogenicity of tick-borne encephalitis isolated in Hokkaido, Japan in mouse model. *Vaccine* 17: 779-787, 1999

Chen Z, Matsuo K, Asanuma H, Takahashi H, Iwasaki T, Suzuki Y, Aizawa C, Kurata T, Tamura S: Enhanced protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with both hemagglutinin- and neuraminidase-expressing DNAs. *Vaccine* 17: 653-659, 1999

Kobayashi M, Nagata S, Iwasaki T, Yanagihara K, Saitoh I, Ihara S, Fukui Y: Dedifferentiation of adenocarcinomas by activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Nat Acad Sci USA*. 96: 4874-4879, 1999

Sato Y, Asahi Y, Iwasaki T, Matsukura T, Kurata T, Sata T: Detection of adeno-associated virus type 2 in patients with viral infection. *Jpn J Infect Dis* 52: 50-51, 1999

東南アジアにおける新型 G 型肝炎ウイルス株の分離と全長鎖ゲノムの解析

分担研究者 阿部賢治 国立感染症研究所 感染病理部 主任研究官

研究要旨

世界各国における G 型肝炎ウイルス (HGV) の分子疫学調査から、従来のゲノタイプ分類には属さない新たな HGV 株をミャンマー人とベトナム人患者血清から分離し、ゲノタイプ 4 型と命名した。さらに、ミャンマーとベトナム由来でゲノタイプ 4 型を示す HGV2 株を選択し、全長鎖ゲノムの塩基配列を決定した。HGV 4 型は、ミャンマーとベトナムにおいて高率に感染者が存在した。

A. 研究目的

世界十数カ国との共同研究から、地理的要因の違いによる各種肝炎ウイルスの分子疫学と病態の関連を検索することを目的とする。本年度は、G 型肝炎ウイルス (HGV) の分子疫学調査から、ミャンマー、ベトナムにおいて、従来のゲノタイプ分類には属さない新しい HGV 株を分離することができたので、その分子生物学的特徴を解析した。

B. 研究方法

ミャンマーおよびベトナム人由来の血清より分離された HGV 株の 5'UTR 領域の塩基構造を決定し、分子系統樹解析によりゲノタイプ分類を行った。その結果から、ゲノタイプ 4 型に分類された一群よりミャンマー株およびベトナム株を各々 1 株ずつ選択し、全長遺伝子クローニングの対象とした。ミャンマー株は 29 才女性由来で HCV との重複感染例、ベトナム株は 17 才女性由来で HBs 抗原陽性例である。両者共に HIV 無症候性キャリアーである。これら HGV 遺伝子のクローニングのため、全長を 9 つのフラグメントの分け、nested RT-PCR 法にて各領域を増幅後、PCR 産物を pBluescript II SK(-) vector (Stratagene 社、米国) の Eco RV site に組み込み、サブクローニングを行った。3'UTR 領域は poly-A polymerase による Adenosine の付加後、RACE 法にて増幅した。得られた塩基配列をもとに木村の 8 パラメーター法で遺伝的距離を確定し、近隣接合法を用いて分子系統樹解析を実施した。この解析に際しては、database より入手した既知の全長遺伝子からなる HGV 株 (28 株) を含めて分子系統樹解析を行った。

C. 研究成果

5'UTR の終末部を除くほぼ全長 HGV 遺伝子を 2 株分離することができ、ミャンマー株を HGV-MY14、ベトナム株を HGV-VT48 と各々命名した。両者共に 9228 nt よりなり、2842 個のアミノ酸をコードする polyprotein を有していた。また 2 株共 16 aa からなる短いコア領域を有していた。3'UTR は HGV-MY14 は 313 nt、HGV-VT48 は 315 nt からなり、末端にはいずれも poly A は存在しなかった。HGV-MY14 と

HGV-VT48 の全長塩基レベルでの相対率は 86%、アミノ酸レベルでは 96% であった。4 型株の既知の HGV 株 (1~3 型) に対する塩基の相対率は 78~84%、アミノ酸レベルでは 92~93% であったが、3 型株に対してより高い相対性を示した。また既知の HGV 株 28 株を加えた全長遺伝子領域における分子系統樹解析においても HGV-MY14 および HGV-VT48 は従来の分類には属さず、新たな分類 (4 型) であることが確認された (図 1)。さらに 4 型株はミャンマーとベトナムにおいてのみ、その存在が確認された。

D. 考案

HGV は他の肝炎ウイルス (HBV、HCV) 同様にゲノタイプが存在し、地理的に特徴ある分布を示すことが明らかにされている。つまり、現在まで 1 型から 3 型までその存在が確認されており、1 型はアフリカ、2 型は欧米、3 型はアジア地域に多く流行している。今回世界 10 カ国以上における HGV の分子疫学調査から、従来の 3 型からなるゲノタイプ分類には属さない新たな HGV を分離することができた。興味あるのは、この新型株はミャンマー、ベトナムにおいてのみ出現したことである。このことから、恐らく 4 型株は東南アジアに広く分布する流行株であることが推察される。この点については、今後更に対象国や症例数を増やし追跡調査を進めたい。この成績は、自然界における HGV の生態、ウイルスの起源、民族疫学、感染経路などを知る上で興味深い。このような新たなウイルスバリエーションの存在は、肝疾患との関連という観点から検討することも今後必要である。またウイルスの疫学を分子レベルで解析することは、今後の流行予測や感染防御対策を講じる上でも重要である。

E. 結語

ミャンマー人とベトナム人血清から新たなゲノタイプに属す HGV を分離し、4 型とした。さらに、ゲノタイプ 4 型に属す HGV 2 株の全長鎖ゲノムのクローニングを実施した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahide Saito, Koh-ichi Ishikawa, Mubarak Osei-Kwasi, Tamiko Kaneko, James A. M. Brandful, Victor Nuvor, Simeon Aidoo, William Ampofo, Frank A. Apeageyi, Jane E Ansah, Yaw Adu-Sarkodie, Francis K. Nkrumah and **Kenji Abe**: Prevalence of hepatitis G virus and characterization of viral genome in Ghana. *Hepatology Research* 13: 221-231, 1999
- 2) Thomas D. Schiano, Maria Isabel Fiel, **Kenji Abe**, Swan N. Thung and Henry C. Bodenheimer: Absence of hepatitis G virus within liver tissue of patients undergoing liver transplantation for cryptogenic cirrhosis. *Transplantation* 67: 1193-1197, 1999
- 3) Hideo Naito, Khin Maung Win and **Kenji Abe**: Identification of a novel genotype of hepatitis G virus in Southeast Asia. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 1217-1220, 1999
- 4) Takashi Segawa, Mitsuhiro Moriyama, **Kenji Abe** and Yasuyuki Arakawa: Semiquantitative HCV-RNA assay using an amplisensor analyzer. *Nihon University Journal of Medicine* 40: 351-361, 1999
- 5) Abdel Rahman El-Zayadi, **Kenji Abe**, Osaima Selim, Hideo Naito, Georg Hess and Adham Ahdy: Prevalence of HGV viraemia among blood donors, health care personnel, chronic non-B non-C hepatitis, chronic hepatitis C and hemodialysis patients in Egypt. *Journal of Virological Methods* 80: 53-58, 1999
- 6) **Kenji Abe**, Tomoko Inami, Kazue Asano, Chiaki Miyoshi, Naohiko Masaki, Shigeki Hayashi, Ko-ichi Ishikawa, Yutaka Takebe, Khin Maung Win, Abdel Rahman El-Zayadi, Kwang-Hyub Han and David Y. Zhang: TT virus infection is widespread in the general populations from different geographic regions. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 2703-2705, 1999
- 7) Nami Konomi, Chiaki Miyoshi, Carlos La Fuente Zerain, Tian-Cheng Li, Yasuyuki Arakawa and **Kenji Abe**: Epidemiology of hepatitis B, C, E and G virus infection and molecular analysis of hepatitis G virus isolates in Bolivia. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 3291-3295, 1999
- 8) Hideo Naito, Shigeki Hayashi and **Kenji Abe**: The entire nucleotide sequence of two hepatitis G virus isolates belonging to a novel genotype: Isolation in Myanmar and Vietnam. *Journal of General Virology* 81: 189-194, 2000
- 9) Nami Shibahara, Mitsuhiro Moriyama, **Kenji Abe**, Tanaka Naohiko and Yasuyuki Arakawa: Biochemical and virological response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C, co-infected with hepatitis G virus. *Journal of Viral Hepatitis* (in press)
- 10) **Kenji Abe**, Tomoko Inami, Koichi Ishikawa, Shin Nakamura and Shunji Goto: TT virus infection in nonhuman primates and characterization of the viral genome: Identification of simian TT virus isolates. *Journal of Virology* 74: 1549-1553, 2000

2. 学会発表

- 1) T Inami, Y Arakawa, **K Abe**: TTV infection is widespread in the general population worldwide. 50th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, November 1999, Dallas, U.S.A.
- 2) N Konomi, C Miyoshi, CLF Zerain, Y Arakawa, **K Abe**: Prevalence of hepatitis virus type B, C, G and E among a healthy population in Bolivia. 50th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, November 1999, Dallas, U.S.A.
- 3) H Naito, S Hayashi, KM Win, **K Abe**: The entire nucleotide sequence of two HGV isolates belonging to a novel genotype: Isolation in Myanmar and Vietnam. 50th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, November 1999, Dallas, U.S.A.
- 4) H Naito, S Hayashi, **K Abe**: Genotyping system of HGV by PCR using genotype-specific primers. 50th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, November 1999, Dallas, U.S.A.
- 5) Y Edamoto, T Inami, T Kiuchi, Y Inomata, K Tanaka, K Abe: Detection of parvovirus B19 DNA in liver from infants with fulminant hepatic failure. 50th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, November 1999, Dallas, U.S.A.

- 6) Y Edamoto, M Tani, O Kobori, K Abe: Detection of HBV genome from HBsAg-negative patients with hepatitis C virus-associated liver cancer. 50th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, November 1999, Dallas, U.S.A.
- 7) 許斐奈美、荒川泰行、阿部賢治: HBV、HCV、HGVを同時に検出できるMultiplex PCRの試み. 第35回日本肝臓学会総会、1999年6月、東京
- 8) 内藤秀夫、阿部賢治: G型肝炎ウイルスゲノタイプ4型の分離とその全長遺伝子のクローニング. 第35回日本肝臓学会総会、1999年6月、東京
- 9) 稲見知子、荒川泰行、阿部賢治: TTVの地理疫学的特徴とゲノタイプの分布. 第35回日本肝臓学会総会、1999年6月、東京
- 10) 林 茂樹、Vo Xuan Quang、Nguyen Thi Thu Lien、正木尚彦、内藤秀夫、阿部賢治: ベトナム国ホーチミン市チョーライ病院における肝疾患の実態. 第3回日本肝臓学会大会、1999年10月、広島
- 11) 稲見知子、荒川泰行、中村 伸、後藤俊二、阿部賢治: 各種霊長類におけるTT virus DNAの検出とゲノムの解析. 第33回日本肝臓学会西部会、1999年12月、富山

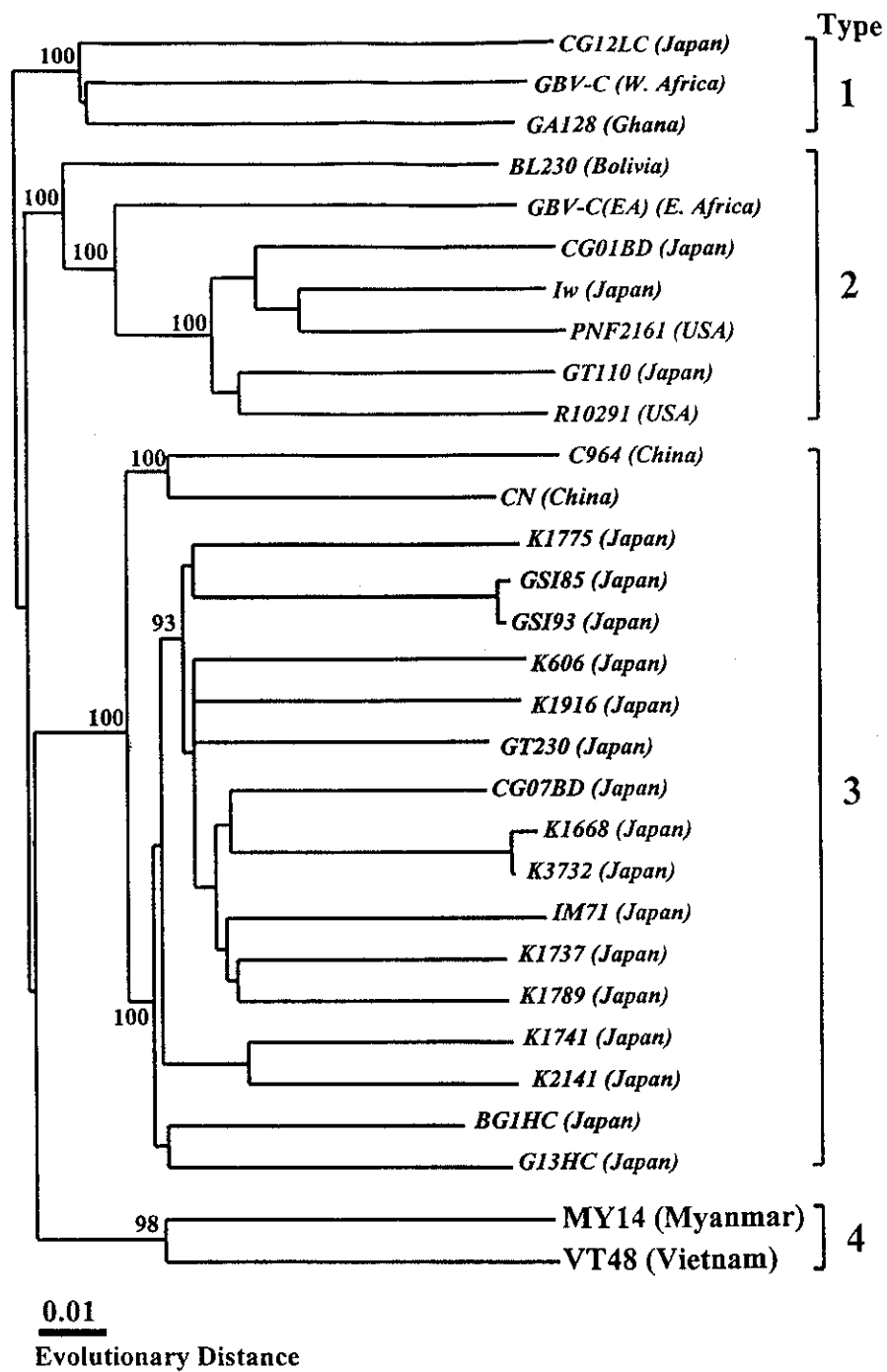


図1 全長遺伝子からなる HGV ゲノムの分子系統樹解析所見と 4 型株の位置関係