

G. 知的所有権の取得状況
なし

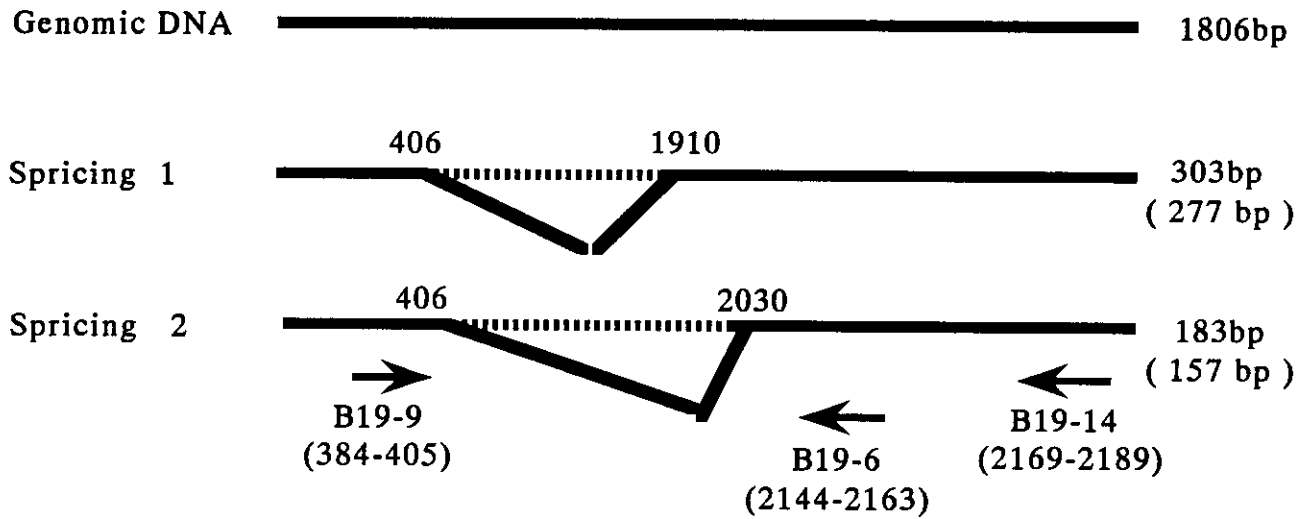


Fig.1 Spricing site of B19 RNA and PCR primer site

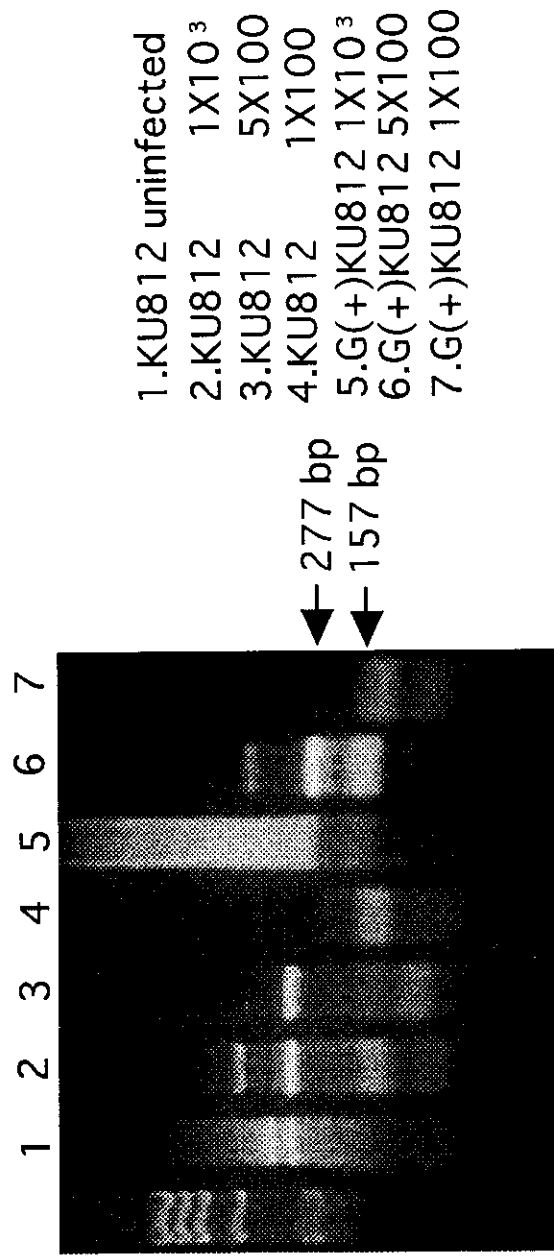


Fig.2 Frequency of infected cells on KU812 and glycoporphinA(+) KU812 by semi-nested PCR

新規に発見されたヘルペスウイルス(HHV-6,7,8)の病原性に関する研究

分担研究者 片野 晴隆 (国立感染症研究所感染病理部)
共同研究者 佐多徹太郎、後藤希代子、長谷川秀樹、倉田 毅 (国立感染症研究所感染病理部)
櫻田 紳策 (国立国際医療センター国際医療協力局)
森 茂郎 (東京大学医科学研究所人癌病因遺伝子分野)

研究要旨 新規に発見されたヘルペスウイルスであるHHV-6, 7, 8の病原性につき検討し、本年度は主にHHV-8を中心に成果を上げることができた。ひとつはHHV-8の血管内皮細胞に対する効率的な感染実験系を確立できた点である。カポジ肉腫の由来は血管内皮細胞と考えられているが、我々は初代培養の臍帯血管内皮細胞とHHV-8感染リンパ腫細胞を共培養することにより、血管内皮細胞に効率よくHHV-8が感染することを発見した。もう一つはHHV-8の初期蛋白であるK8蛋白が核内の構造物であるnuclear domain 10 (ND10)とよばれる場所でpromyelocytic leukemia protein (PML)とともに存在していることを見出したことである。これらの事実はHHV-8の潜伏感染と造腫瘍性を考える上で重要な示唆を与えたと考えられた。

A. 研究目的

HHV-6, 7はAIDS患者のリンパ球(リンパ腫)から分離されたウイルスで突発性発疹などに関係すると考えられている。HHV-8はカポジ肉腫の病原体を検索する上で発見されたウイルスである。本研究はHHV-6, 7, 8などの新規ヘルペスウイルスの病原性につき血清疫学や他の疾患との関連、その造腫瘍性を解明することを目的とする。本年度は主にHHV-8を扱い、HHV-8感染とカポジ肉腫やリンパ腫発症との関連について、ウイルスの感染機構の解明や、潜伏感染が維持される機構についての解明を試みた。

B. 研究方法

HHV-8の血管内皮細胞に対する感染実験においてはウイルスの供給源としてHHV-8感染リンパ腫細胞BCBL-1を用いた。標的細胞としてヒトの初代培養の臍帯血管内皮細胞を用い、BCBL-1と共培養した。ウイルス蛋白の発現は免疫蛍光染色で確認した。またウイルス感染の確認にウイルスゲノムの断片を増幅するPCRを用いた。

HHV-8の初期蛋白K8蛋白と細胞側因子PMLの関連を調べるためにGST融合蛋白システムを用いてリコンビナントのK8蛋白を作製し、ウサギに免疫することにより、抗K8ウサギポリクローナル抗体を開発した。

細胞内での局在を調べるため、抗PML抗体と上記抗K8抗体を用いて、蛍光免疫染色を施行した。細胞内での蛋白同士の相互関係はHHV-8感染細胞の溶解液で上記抗体を用い免疫沈降により検索した。また、*in vitro* transcriptionで合成したp53と大腸菌で作製したリコンビナントのK8を反応させ、反応液をウエスタンブロットで解析し、p53とK8蛋白の相互関係を調べた。

実験に用いた臍帯血管内皮細胞はインフォームドコンセントを得て採取されている。また、遺伝子組換え実験は当該施設(国立感染症研究所)の承認の後、遺伝子組換え実験ガイドラインに沿って行われた。

C. 研究結果

1. HHV-8の血管内皮細胞に対する効率的感染系の確立

カポジ肉腫の由来は血管内皮細胞と考えられているが、これまでのところHHV-8が血管内皮細胞に感染するためには、不死化させた血管内皮細胞に精製した多量のウイルス粒子を加える必要があった。こうした実験系は生体内ではあり得ないことで、人工的な実験系と言わざるを得ない。我々は初代培養の臍帯血管内皮細胞とHHV-8感染リンパ腫細胞を共培養することにより、血管内皮細胞に効率よくHHV-8が感染することを発見した(図1)。培養上清にウイルスを加える方法と比較すると感染細胞と直接接触させたほうが感染

効率はかなり高い。感染した血管内皮細胞はHHV-8関連蛋白であるLANA, ORF59, vIL-6を発現し、TPAの刺激でウイルスが増殖感染することも確かめた。

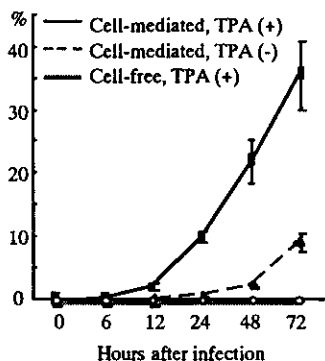


図1：HHV-8感染BCBL-1細胞とHUVECとの共培養。縦軸はHUVECのHHV-8陽性率、横軸は共培養の時間を示す。接触感染 (Cell-mediated, 実線) では72時間後に約4割のHUVECが陽性であるのに対し、ウイルス粒子感染 (Cell-free, 灰色線) では陽性細胞は認められない。

2. HHV-8の初期蛋白K8蛋白と細胞側因子PMLの関連の発見

HHV-8は他のヘルペスウイルスと異なり、感染後細胞内ですぐに潜伏感染に移行する。カポジ肉腫やHHV-8のリンパ腫にはHHV-8が常に潜伏感染していることを考えると潜伏感染が持続することはHHV-8関連悪性腫瘍の形成に必須と考えられる。他のヘルペスウイルスの場合、増殖感染になるか、潜伏感染に移行するかはウイルスの前初期蛋白、初期蛋白の役割が大きいことから、我々はHHV-8の前初期蛋白、初期蛋白と細胞側の因子の関係を調べた。免疫蛍光染色の結果、HHV-8の初期蛋白であるK8蛋白が核内の構造物であるnuclear domain 10 (ND10)とよばれる場所でpromyelocytic leukemia protein (PML)とともに存在していることを見出した (図2)。

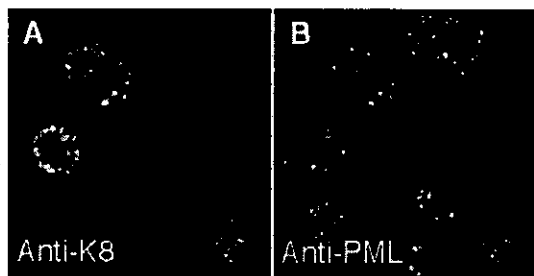


図2：HHV-8感染リンパ腫細胞TY-1におけるK8蛋白(A)とPML(B)の発現 (免疫蛍光染色)。2つの染色は点状の染まりではほぼ一致する。

この局在はK8蛋白のC末のロイシンジッパードメ

インに依存しており、この部位を欠損させるとPMLへの偏在は起きない。他のヘルペスウイルスでもPMLと局在が一致する蛋白は知られており、これらはPMLをND10から解離させる働きをもっている。我々は遺伝子導入の実験よりK8蛋白はそれらと異なり、そうした働きを持っていないことを明らかにした。また、K8蛋白はND10でp53と結合しており、この結合もK8蛋白のC末のロイシンジッパードメインに依存していることを明らかにした。さらに、K8蛋白にはp53をND10に運び込む機能があることもわかった。

D. 考察

HHV-8の腫瘍化においてその感染機構と潜伏感染が維持される機構を解明することは極めて重要である。今回の我々の研究成果から、HHV-8は感染細胞と標的細胞が直接接触することにより効率よく感染が起こることを明らかにした。感染個体内の血清中のウイルス量はそれほど高くないことから、これまでの濃縮ウイルスを振りかけての感染実験は極めて人工的な実験系であったといわざるを得ない。今回の実験系の開発で、生体内ではむしろウイルス粒子単独で標的細胞に感染することよりも細胞接触による感染が主であることが予想される。今後、このHHV-8感染血管内皮細胞を検索することはカポジ肉腫の発症機構の解明に役立つであろう。

K8蛋白とPMLの関連はHHV-8の潜伏感染維持の機構を考える上で重要な所見である。K8はEBVの転写活性化因子Ztaとホモログがあり、当初、前初期蛋白と考えられていた。しかし、その後の解析により、K8は初期蛋白で転写活性がないことがわかった。このような蛋白がどのような機能を持っているか不明であったが、今回PMLとの関連が明らかになったことにより、HHV-8が複製する際の最初の部分に関わり、PML解離の機能を持っていないことから、むしろHHV-8の増殖感染に抑制的に働いていることが考えられる。K8によるこの機能はHHV-8の潜伏感染維持に本質的なものかも知れない。そうした意味で、K8蛋白とPMLの関連はHHV-8の潜伏感染と造腫瘍性を考える上で重要な示唆を与える知見であり、今後の研究の成果が期待される。

E. 結論

HHV-8の血管内皮細胞に対する効率的な感染実験系を確立できた。また、HHV-8の初期蛋白であるK8蛋白とPMLの関連を明らかにした。これらの結果はHHV-8の潜伏感染と造腫瘍性を考える上で重要な示唆を与える知見である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Katano H, Sata T. Human herpesvirus 8 -virology, epidemiology and related diseases-. *Jpn J Infect Dis*; 53:137-55. 2000.
- (2) Kondo Y, Izumi T, Yanagawa T, Kanda H, Katano H, Sata T. Spontaneously regressed Kaposi's sarcoma and human herpesvirus 8 infection in a human immunodeficiency virus-negative patient. *Pathol Int*; 50:340-346. 2000.
- (3) Katano H, Sata T, Mori S. AIDS lymphoma: Its virological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol*:(in press). 2001.
- (4) Meng YX, Sata T, Starney FR, Voevodin A, Katano H, Koizumi H, Deleon M, De Cristofano MA, Galimberti R, Pellett PE. Molecular Characterization of Human Herpesvirus 8 Strains from Japan, Argentina, and Kuwait. *J Gen Virol*; 82: 499-506. 2001.
- (5) Tanaka S, Katano H, Tsukamoto K, Jin M, Nishihara H, Sawa H, Tarumi T, Sawada K, Sata T, Fujioka Y, Nagashima K. HHV8-negative primary effusion lymphoma in the peritoneal cavity with distinct immunohistochemical phenotype. *Pathol Int*:(in press). 2001.

2. 学会発表

- (1) 片野晴隆、佐藤由子、倉田 毅、森 茂郎、佐多徹太郎. HHV8関連タンパクのカポジ肉腫 (KS)、原発性体液性リンパ腫 (PEL)、多巣性キャスルマン病 (MCD)における発現. 第89回日本病理学会総会 (大阪) 2000.4.
- (2) 片野晴隆. ヒトヘルペスウイルス8型 (HHV-8)の感染病理. (ワークショップ) 第40回日本リンパ網内系学会総会 (浜松) 2000.8.
- (3) 片野晴隆、後藤希代子、長谷川秀樹、倉田 毅、佐多徹太郎. HHV-8のK8蛋白は感染細胞核内のPML bodyに局在する. 第14回日本ウイルス学会総会 (三重) 2000.10
- (4) Katano H, Sato Y, Kurata T, Mori S and Sata T. Human Herpesvirus 8 infection in Primary Effusion Lymphoma, Kaposi's Sarcoma and Multicentric Castleman's Disease. XXIII International Congress of the International Academy of Pathology. (Nagoya, Japan) 2000.10.
- (5) 片野晴隆. ヒトヘルペスウイルス8型 (HHV-8)の感染病理. (シンポジウム) 第42回日本臨床血液学会総会 (倉敷) 2000.11.
- (6) 片野晴隆、岩崎琢也、倉田 毅、森 茂郎、岩本愛吉、佐多徹太郎. AIDSにおけるHHV-8感染の血清学的検討. 第14回日本エイズ学会総会 (京都) 2000.12.

別紙 5

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Katano H, Sata T.	Human herpesvirus 8 - virology, epidemiology and related diseases-	<i>Jpn J Infect Dis</i>	53	137-55	2000
Kondo Y, Izumi T, Yanagawa T, Kanda H, Katano H, Sata T.	Spontaneously regressed Kaposi's sarcoma and human herpesvirus 8 infection in a human immunodeficiency virus-negative patient.	<i>Pathol Int</i>	50	340-346	2000
Katano H, Sata T, Mori S.	AIDS lymphoma: Its virological aspects.	<i>Curr Top Microbiol Immunol</i>		(in press).	2001
Meng YX, Sata T, Stamey FR, Voevodin A, Katano H, Koizumi H, Deleon M, De Cristofano MA, Galimberti R, Pellett PE.	Molecular Characterization of Human Herpesvirus 8 Strains from Japan, Argentina, and Kuwait.	<i>J Gen Virol</i>	82	499-506	2001
Tanaka S, Katano H, Tsukamoto K, Jin M, Nishihara H, Sawa H, Tarumi T, Sawada K, Sata T, Fujioka Y, Nagashima K.	HHV8-negative primary effusion lymphoma in the peritoneal cavity with distinct immunohistochemical phenotype.	<i>Pathol Int:</i>		(in press)	2001

TTV及びHCVの変異株の診断と病原性に関する研究

三代俊治

東芝病院研究部

はじめに

2000年度に於いては主に TTV とその variants 乃至 TTV-like viruses のウイルス学的性質及び感染経路等の解明に関する研究を行なった。

(HCV については原発性肝細胞癌患者に於けるウイルスゲノム解析を行ない新知見を得たが、現在論文未発表の段階にあるので来年度報告する)。

TTVの母児感染

大阪大学小児科との共同研究により、TTV 母児感染が疑われた四症例についてウイルスゲノム解析を行なった。その結果、四症例の全てに於いて、TTV noncoding region の塩基配列が母児間で高度の一致性を示した (97.4-98.7%)。よって小児に於ける TTV 感染には母児感染が寄与している可能性が示唆された。但し、解析した四例のうち二例の小児には肝機能異常を認めたものの、その原因が TTV である証拠は得られていない。[参考文献 1]。

TTVの肝外増殖

帝京大学溝の口病院第四内科との共同研究により肝炎後再生不良性貧血 (post-hepatitic aplastic anemia) の病原として TTV が関与した疑いのある症例について解析を行なった。その結果、本症例に於いて TTV は肝内よりは骨髓内で遥かに効率よく増殖したことを示唆する所見が得られた。よって、肝炎後再生不良性貧血の原因の候補の一つとして TTV をも視野に入れて考える必要があると考えられた。[参考文献 2]。

TTV variants & TTV-like viruses

我々の研究室では夙に "SANBAN" と名付けた変異株を報告していたが、更にプロトタ

イプからの遺伝子距離がもっと離れている変異株 "YONBAN" を同定した。また、これも前年度に我々の研究室で発見して命名した "TTV-like mini virus (TLMV)" については、合計 10 本の株について全塩基配列を決定し系統解析等を行なった。その結果、TLMV は TTV とは完全に独立したウイルスであり、TTV 同様に多数の genotypes から成立していることが判明した。また TLMV は TTV と同様に健常人の多くに感染している "common virus" であって、流血中のみならず胆汁中にも排泄される故、経口感染経路も存在する可能性が示唆された。TTV, SANBAN, YONBAN, TLMV はウイルス分類学上 "新種" のウイルスであったので、これらのウイルスのタクソノミーについて International Committee for Virus Taxonomy (ICTV) から協力を依頼された。[参考文献 3,4]

文献

- [1] Tada K, Tajiri H, Kondou H, Mishiro S, and Okada S. Confirmation of mother-to-child transmission of TT virus. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19: 255-256.
- [2] Kikuchi K, Miyakawa H, Abe K, Kako M, Katayama K, and Mishiro S. Indirect evidence of TTV replication in bone marrow cells, but not in hepatocytes, of a subacute hepatitis/aplastic anemia patient. *J Med Virol* 2000; 61: 165-170.
- [3] Takahashi K, Hijikata M, Samokhvalov EI, and Mishiro S. Full or near-full length nucleotide sequences of TTV variants (types SANBAN and YONBAN) and the TTV-like mini virus (TLMV). *Intervirology* 2000; 43: 119-123.
- [4] 三代俊治. TTV-like viruses. *ウイルス* 2000; 50: 273-281.

小室班「研究成果の刊行に関する一覧表」

三代俊治

発表者	論文タイトル	発表誌	巻	ページ	年
Takahashi K, Iwasa Y, Hijikata M, 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	145	979-993	2000
Takahashi K, Hijikata M, Samokhvalov EI, Mishiro S	Full or near-full length nucleotide sequences of TTV variants (types SANBAN and YONBAN) and the TTV-like mini virus (TLMV)	Intervirology	43	119-123	2000
Samokhvalov EI, Hijikata M, Gylka RI, Lvov DK, 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	20	183-187	2000
Mulyanto, Hijikata M, Matsushita M, Ingkokusumo G, Widjaya A, Sumarsidi1 D, Kanai K, Ohta Y, Mishiro S	TT virus (TTV) genotypes in native and non-native prostitutes of Irian Jaya, Indonesia: implication for non-occupational transmission	Arch Virol	145	63-72	2000
Kikuchi K, Miyakawa H, Abe K, Kako M, Katayama K, Mishiro S	Indirect evidence of TTV replication in bone marrow cells, but not in hepatocytes, of a subacute hepatitis/aplastic anemia patient	J Med Virol	61	165-170	2000
Tada K, Tajiri H, Kondou H, Mishiro S, Okada S	Confirmation of mother-to-child transmission of TT virus	Pediatr Infect Dis	19	255-256	2000
三代俊治	TTV-like viruses	ウイルス	50	273-281	2000

研究要旨

TT ウイルス (TTV) は発見後3年余りの間に、その遺伝子構造、多様性等について多くの知見が得られ、また最近遺伝子産物として3種類の mRNA が報告された。しかしながら、その遺伝子発現調節機構は明らかにされていない。TTV ゲノム上 1.2 kb の非翻訳領域についてルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして転写活性を検討し、110 塩基からなるコアプロモーターエレメントを同定した。更にその上流 215 塩基領域に、方向非依存的にプロモーター活性を増強するエンハンサーエレメントが存在することを明らかにした。

1. 研究目的

急性、慢性肝炎あるいは肝硬変、肝細胞癌にはウイルス感染が強く疑われながらその病因を特定できない症例が依然として5~20%存在することが知られている。TTV は、1997年秋、我が国の非 A-G 型輸血後肝炎患者 (TT 症例) から分離された新しいウイルスである。今日までに、TTV は envelope を持たず、ウイルス遺伝子として環状一本鎖 (マイナス鎖、4 kb 長) DNA を持ち、広く世界中に分布していることなどが明らかにされている。その遺伝子構造の特徴から、TTV はサーコウイルスに最も近縁であると考えられているが、これまでヒトのサーコウイルスは同定されておらず、その感染、複製様式に関する分子ウイルス学的な解析は十分になされていない。本研究は、TTV 遺伝子の転写調節機構を明らかにすることを目的とする。

2. 研究方法

TTV 遺伝子は、東芝病院三代先生、国立国際医療センター土方先生らによって分離され分与されたクローン SANBAN を用いた (Virology 260, 17-22 (1999))。推定される非翻訳領域について種々の長さの遺伝子断片を PCR 法により作製し、ホタルルシフェラーゼレポーターベクター pGL3-Basic vector の XhoI-HindIII 部位、または pGL3-Promoter vector の BamHI 部位に挿入した。これらのコンストラクトと内部標準用 pRL-TK (HSV TK プロモーター下でウミシイタケルシフェラーゼ

を発現する) とを Lipofectamine (Gibco BRL) を利用して各種培養細胞へトランスフェクションした。24 時間後に、細胞を回収、可溶化しそのルシフェラーゼ活性をルミノメーター (Berthold) で測定した。Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて、2 種類のルシフェラーゼ (ホタル、ウミシイタケルシフェラーゼ) を連続的に定量した。各転写活性は、ウミホタルルシフェラーゼ活性 (内部標準) に対するホタルルシフェラーゼ活性の値で算出した。発現プラスミドをトランスフェクションした細胞より total RNA を調製し、TTV 転写開始部位のマッピングを 5' RACE 法 (Clontech) を用いて行った。

3. 研究結果

TTV ゲノムに存在する約 1.2 kb の非翻訳領域をホタルルシフェラーゼ遺伝子上流につないでレポーターアッセイを行うと TTV 非翻訳領域を含まない場合に比べ 100 倍以上の転写活性が認められることを昨年度報告した。そこでまず、ヒト肝臓癌由来 HepG2 細胞で TTV 遺伝子を発現させ、その転写開始部位をマッピングしたところ、ORF2 領域の 114 塩基及び 125 塩基上流の二ヶ所から TTV (SANBAN isolate) mRNA が開始されることがわかった。さらに、非翻訳領域の 5' 末端側または 3' 末端側を欠損させた種々のレポーターを構築してルシフェラーゼ活性を行ったところ、転写開始点の上流約 110 塩基の領域にコアプロモーター活性が存在することが明らか

となった。1.2 kb 非翻訳領域の部分欠損変異体を用いた実験から、コアプロモーターエレメントの上流域 215 塩基を含んだ場合、そうでない変異体に比べ TTV の転写活性は約 10 倍上昇する。そこで、この領域にエンハンサー活性が存在するかを SV40 プロモーターの増強能を指標に検討した。SV40 プロモーターをもつルシフェラーゼプラスミドのプロモーター上流またはレポーターの下流に TTV 遺伝子 215 塩基を双方向にそれぞれ挿入しルシフェラーゼ活性を測定したところ、SV40 プロモーターのみの場合に比べ約 10 倍高い活性を示すことがわかった。確かにこの 215 塩基領域がエンハンサーエレメントであることが明らかとなった。

4. 考察

TTV は DNA ウイルスでありながら、その遺伝子配列は多様性であり塩基配列が互いに 30%以上異なる分離株が多数報告されている。しかしながら、主要な読み取り枠 (ORF1, ORF2) の遺伝子構造や非翻訳領域内の GC-rich 領域、ポリ A 付加シグナルなどは各クローン間でよく保存されている。本年度の研究から、非翻訳領域内に約 110 塩基のコアプロモーターエレメントを同定することができた。遺伝子型の異なる 6 クローンについてこの領域をアラインメントしたところ、非常によく保存されていることがわかった (図 1)。この領域には転写開始部位の 30~40 塩基上流に TATA box 配列が存在するとともに、Sp1 及び USF といった転写因子の結合配列が保存されていた。今後、これらの配列が TTV の転写活性にどのような役割を果たしているのかを明らかにしていきたい。一方、このコアプロモーターエレメントの上流 215 塩基にエンハンサー活性を観察したが、データベース検索を行ったところ 10 種類以上の転写因子がエンハンサーエレメントに結合しうることがわかった。この中には肝臓特異的に発現する蛋白も含まれており、エンハンサー活性を調節する転写因子を同定することにより、TTV 遺伝子発現の組織特異性が明らかになるものと期待される。

5. 研究発表

1. 論文発表

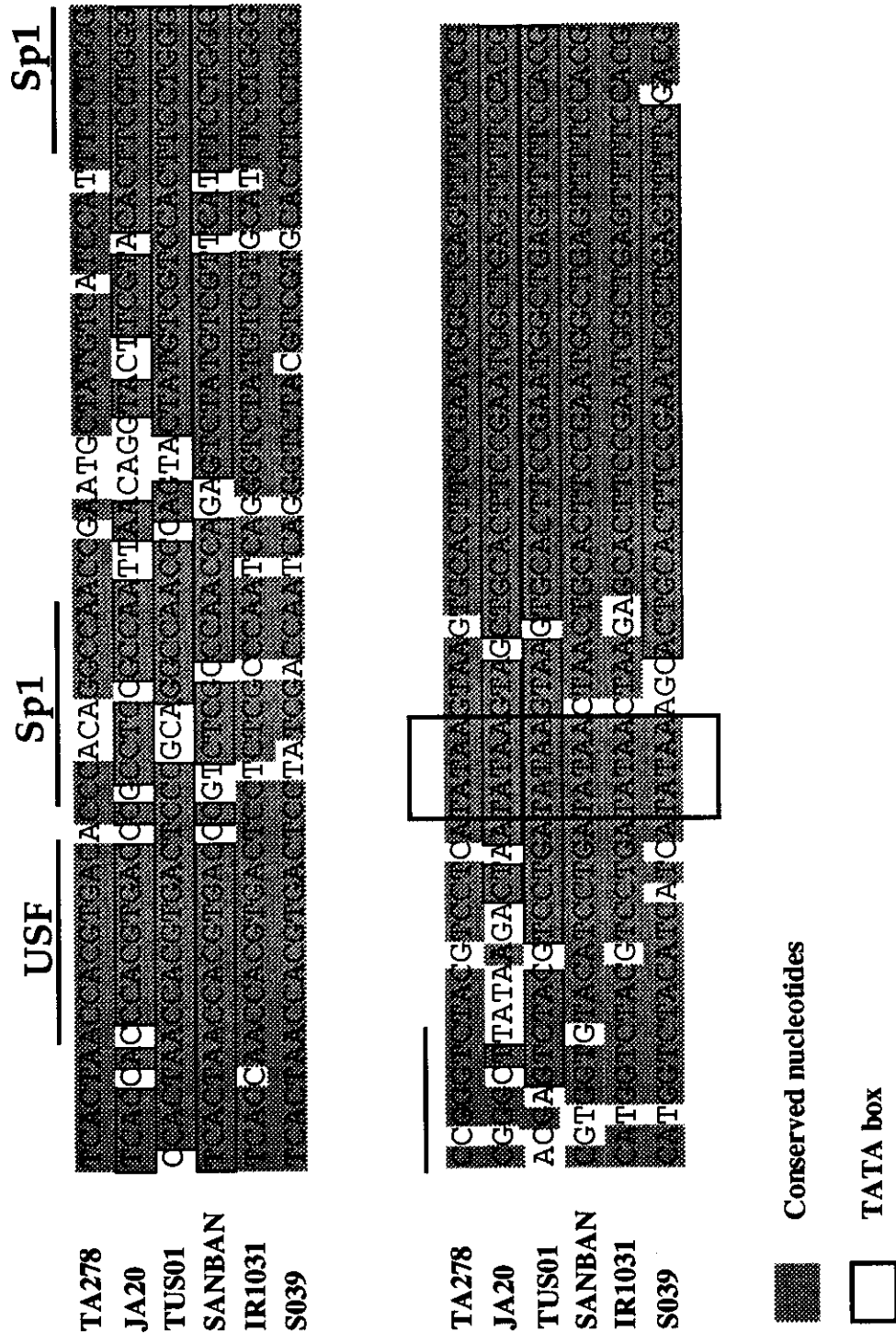
1. Tanaka, Y., Shimoike, T., Ishii, K., Suzuki, R., Suzuki, T., Ushijima, H., Matsuura, Y., and Miyamura, T. Selective binding of hepatitis C virus core protein to synthetic oligonucleotides corresponding to the 5' untranslated region of the viral genome. *Virology* 270: 229-236, 2000.
2. Takikawa, S., Ishii, K., Aizaki, H., Suzuki, T., Asakura, H., Matsuura, Y., and Miyamura, T. Cell fusion activity of HCV envelope proteins. *J. Virol.* 74: 5066-5074, 2000.
3. Suzuki, R., Tamura, K., Jin L., Ishii, K., Matsuura, Y., Miyamura, T., Suzuki, T. Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus. *Virology* (2001) in press.

2. 学会発表 (国際)

1. Suzuki, T., Li T., Tani, H., Osawa, Y., Suzuki, R., Sakae, K., Hayashi, A., Ishiko, H., Matsuura, Y., Kikuchi, S., and Miyamura, T. Detection of antibody against ORF1 protein of TTV. The 10th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Atlanta, USA, April, 2000.
2. Takikawa, S., Someya, T., Suzuki, R., Tani, H., Aizaki, H., Ishii, K., Suzuki, T., M. A., Whitt, Matsuura, Y., and Miyamura, T. Biological functions of HCV envelope proteins. International Association for the Study of the Liver, Fukuoka, June, 2000.
3. Tsutsumi, T., Suzuki, T., Shimoike, T., Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y., Fujie, H., Matsuura, Y., Koike, K., and Miyamura, T. Analysis of the genes differentially expressed in HCV core gene transgenic mice. International Association for the Study of the Liver, Fukuoka, June, 2000.
4. Aizaki, H., Nagamori, S., Kawada, M., Matsuura, T., Hasumura, S., Suzuki, T.,

- Matsuura, Y., and Miyamura, T. Propagation of hepatitis C virus in human liver cells grown in a three-dimensional radial flow culture. 7th International Meeting on Hepatitis and Related Viruses, Gold Coast, Australia, December, 2000.
5. Sacco, R., Suzuki, R., Aizaki, H., Tsutsumi, T., Suzuki, T., Matsuura, Y., and Miyamura, T. Characterization of ecdysone-inducible expression system of hepatitis C virus protein in human liver cells. *Ibid.*
 6. Suzuki, R., Suzuki, T., Matsuura, Y., and Miyamura, T. Ubiquitin-mediated degradation of HCV core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus. *Ibid.*
 7. Tsutsumi, T., Suzuki, T., Shimoike, T., Suzuki, R., Moriya, K., Matsuura, Y., Koike, K., and Miyamura, T. Hepatitis C virus core protein binds to retinoid X receptor-alpha and modulates its transcriptional activity. *Ibid.*
 8. Tsutsumi, T., Suzuki, T., Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y., Fujie, H., Koike, K., and Miyamura, T. HCV core protein modulates intrahepatic cytokine expression and activates AP-1 in transgenic mice. *Ibid.*
 9. Shimoike, T., Suzuki, T., Tanaka, Y., Matsuura, Y., Totsuka, A., and Miyamura, T. The stem-loop IIIId domain of the HCV 5'UTR is important to its translational repression by the core protein. *Ibid.*
 10. Takikawa, S., Suzuki, K., Someya, T., Tani, H., Suzuki, R., Suzuki, T., Miyamura, T., and Matsuura, Y. Production of human monoclonal antibodies against HCV envelope proteins by transgenic mice with human immunoglobulin loci. *Ibid.*

Fig. 1 Alignment of putative core promoter elements in TTV isolates



研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Tanaka, Y., Shimoike, T., Ishii, K., Suzuki, R., Suzuki, T., Ushijima, H., Matsuura, Y., and Miyamura, T.	Selective binding of hepatitis C virus core protein to synthetic oligonucleotides corresponding to the 5' untranslated region of the viral genome	Virology	270	229-236	2000
Takikawa, S., Ishii, K., Aizaki, H., Suzuki, T., Asakura, H., Matsuura, Y., and Miyamura, T.	Cell fusion activity of HCV envelope proteins	J. Virol.	74	5066-5074	2000
Suzuki, R., Tamura, K., Jin L., Ishii, K., Matsuura, Y., Miyamura, T., Suzuki, T.	Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus	Virology	74	in press	2001

Simian TTV の分離とゲノム構造の特徴

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

協力研究者 稲見知子 日本大学医学部第三内科
中村 伸 後藤俊二 京都大学霊長類研究所

研究要旨

ヒト以外の各種霊長類における TT ウイルス (TTV) の感染実態を分子疫学的に検討した。その結果、TTV DNA (5'UTR) は、チンパンジー 87/98 (89%)、カニクイザル 3/21 (14%)、日本ザル 1/89 (1%)、アカゲザル 2/127 (1.6%) の血清中に検出された。さらに 5'UTR における分子系統樹解析では、ヒト TTV とは明らかに異なる集簇を形成したために simian TTV (s-TTV) と仮に命名した。チンパンジー由来 s-TTV から 1 株を選び、全長遺伝子の塩基配列を決定し、s-TTV CH65-1 とした。CH65-1 は、環状構造をとり、3899 nt の塩基と三つの ORF (ORF1: 765 aa, ORF2: 134 aa, ORF3: 111 aa) から構成されていた。また、114 nt からなる GC-rich 領域が 3'UTR 終末部に存在した。全塩基レベルでヒト TTV と比べると、48-54% と低い相同性を示した。以上の成績から、サル類に特有に感染している TTV が存在することが確認できた。

A. 研究目的

近年輸血後非 A-非 G 型肝炎患者血清から新たなヒト DNA ウイルスとして TT ウイルス (TTV) が分離された。現在 TTV は、動植物に感染する *Circoviridae* に最も近いものと考えられている。ヒト以外の動物における TTV の疫学を調べることは、ウイルスの起源、自然界における TTV の生態、また動物モデルを確立する上で重要である。そこで今年度の研究課題は、ヒト以外の各種霊長類における TTV の感染実態を分子疫学的に調査することを目的とした。

B. 研究方法

スクリーニング: 25 種 608 例からなる各種霊長類の血清を用いて、ヒト TTV の 5'末端領域に設定したプライマー (Takahashi ら) による PCR 法にて TTV DNA を検出した。また得られた PCR 産物の塩基配列を direct sequence 法にて決定した後、分子系統樹解析を実施した。

s-TTV 全長鎖ゲノムのクローニング: s-TTV 陽性を示したチンパンジー 1 例 (西アフリカ産) を選び、その全長遺伝子のクローニングを試みた。全長をヒト TTV のゲノム構造をもとに三つのフラグメントに分け、nested PCR にて増幅した。うち一つのフラグメントは、inverted PCR からなる。PCR 産物を用いてサブクローニングを行い、塩基配列を決定した。得られた全長遺伝子は、データベース由来ヒト TTV との比較に加えて、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行った。

C. 研究成果

TTV DNA は、チンパンジー 87/98 (89%)、カニクイザル 3/21 (14%)、日本ザル 1/89 (1%)、アカゲザル 2/127 (1.6%) の血清中に検出された (表 1)。チンパンジーとカニクイザル由来 TTV ゲノムの塩基配列を調べた結果、この 2 種間では 80-100% の相同性を

認めたのに対して、ヒト TTV とは 24-33% と低い相同性を示した。この領域から得られた塩基配列をヒト TTV と比較したところ、サル特有の配列が観察された。さらに分子系統樹解析では、ヒト TTV とは明らかに異なる集簇を形成した (図 1)。この事実から、ヒト TTV とは区別するため仮に simian TTV (s-TTV) と命名した。さらに、TTV と s-TTV の関連を詳細に検討するために、チンパンジー由来 s-TTV の全長遺伝子を決定し、s-TTV CH65-1 と命名した (DDBJ/EMBL/GenBank accession No. AB037926)。CH65-1 は、環状構造をとり、3899 nt の塩基と三つの ORF (ORF1: 765 aa, ORF2: 134 aa, ORF3: 111 aa) から構成されていた (図 2)。また、ヒト TTV 同様に 114 nt からなる GC-rich 領域が 3'UTR 終末部に存在した。ヒト TTV ゲノムに存在する TATA box 等の consensus sequence も比較的良く保存されていた。ヒト TTV と full genome で比較した結果、塩基レベルで 48-54% と低い相同性を示した。さらに分子系統樹解析を実施したところ、full genome においてもヒト TTV とは異なる成績が得られた。これに対し、ORF 1 領域における解析では、ヒト TTV とは比較的近縁関係に位置した。

D. 考案

ヒト以外の霊長類においても、TTV が自然感染していることが証明された。特にチンパンジーにおける高い感染率 (89%) は注目すべき所見である。対象としたチンパンジーは、いずれも西アフリカ産である。興味ある所見は、分離されたサル由来 TTV ゲノムの特徴が、ヒト TTV とは異なった点である。特に 5'UTR における塩基配列を比較した場合、s-TTV に特異的な配列が存在した。しかし、全塩基配列で見た場合、基本的構築はヒト TTV と同様であった。現在、s-TTV に特異的なプライマーを設計し、PCR 法による s-TTV 測定系の確立を目指している。この方法を用いて、ヒトにおける s-TTV の感染実態を分子疫学的に調査し、疾患との関連を追及することであ

る。この成果は、来年度に報告したい。TTVはDNAウイルスでありながら、強いゲノムバリエーションが特徴である。ゲノタイプも現在まで少なくとも16種類以上あるとされており、今後も多くの変異株あるいは類似株が分離されることが考えられる。今回分離できたs-TTVも、広義にはTTV super familyに属すものである。s-TTVの存在は、TTVの起源、生態、病態との関連を考える上で実に興味深い所見である。

E. 結語

ヒト以外の霊長類に特有に感染していると思われるTTVを分離し、そのゲノム特徴からs-TTVと命名した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) Nami Shibahara, Mitsuhiko 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* 7: 43-50, 2000
- 3) 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
- 4) Tomoko Inami, Nami Konomi, Yasuyuki Arakawa and Kenji Abe: High prevalence of TT virus DNA in human saliva and semen. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 2407-2408, 2000
- 5) Nami Konomi, Mari Yamaguchi, Hideo Naito, Naoto Aiba, Takahide Saito, Yasuyuki Arakawa and Kenji Abe: Simultaneous detection of hepatitis B, C and G viral genomes by multiplex PCR method. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 53: 70-72, 2000
- 6) Tomoko Inami, Takashi Obara, Mitsuhiko Moriyama, Yasuyuki Arakawa and Kenji Abe: Full-length nucleotide sequence of a simian TT virus isolate obtained from a chimpanzee: Evidence for a new TT virus-like species. *Virology* 277: 330-335, 2000

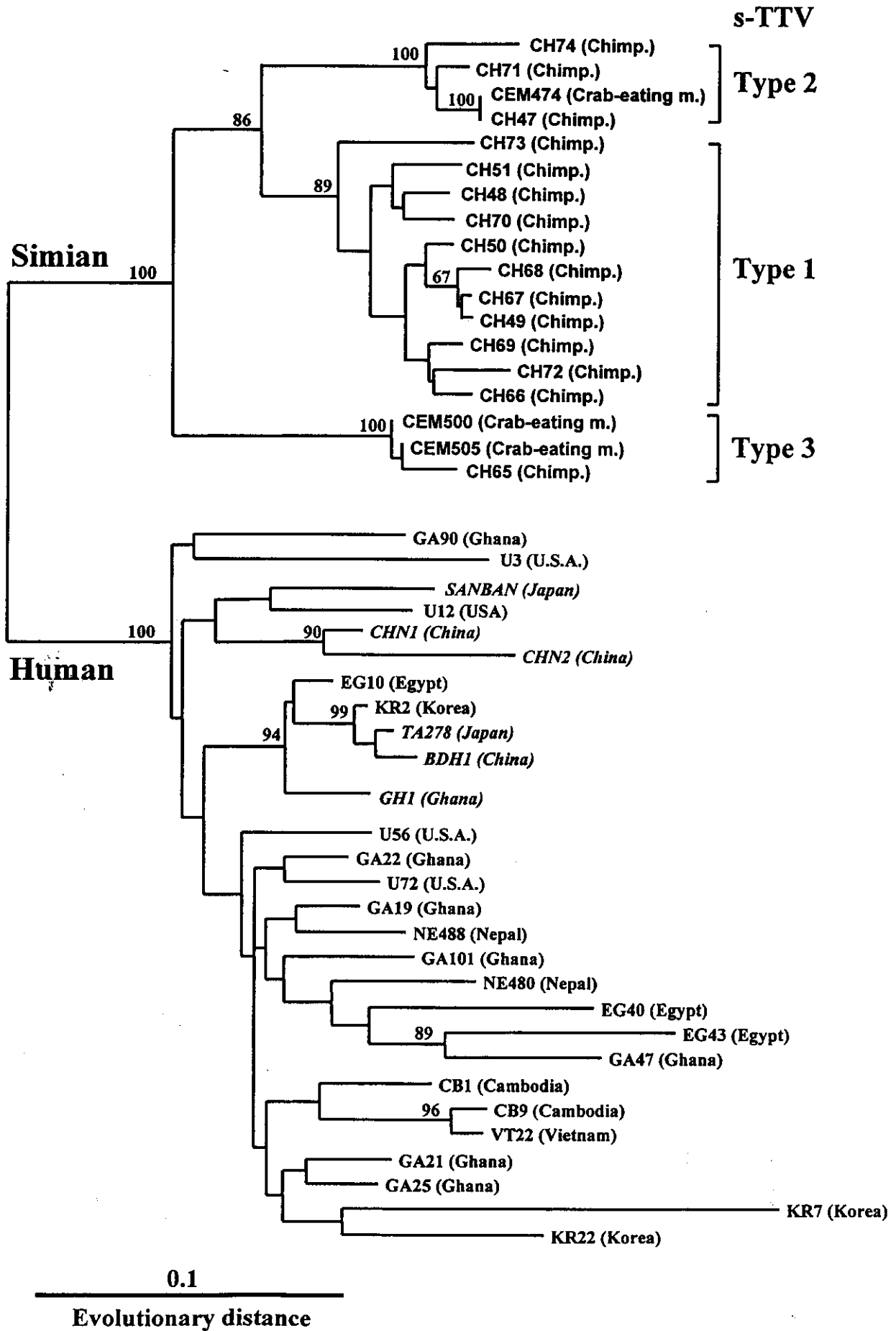
- 7) Hideo Naito, Shigeki Hayashi and Kenji Abe: Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by polymerase chain reaction using type-specific primers. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 362-364, 2001
- 8) Hideo Naito and Kenji Abe: Genotyping system of GBV-C/HGV type 1 through type 4 by polymerase chain reaction using type-specific primers and geographic distribution of viral genotypes. *Journal of Virological Methods* (in press)

2. 学会発表

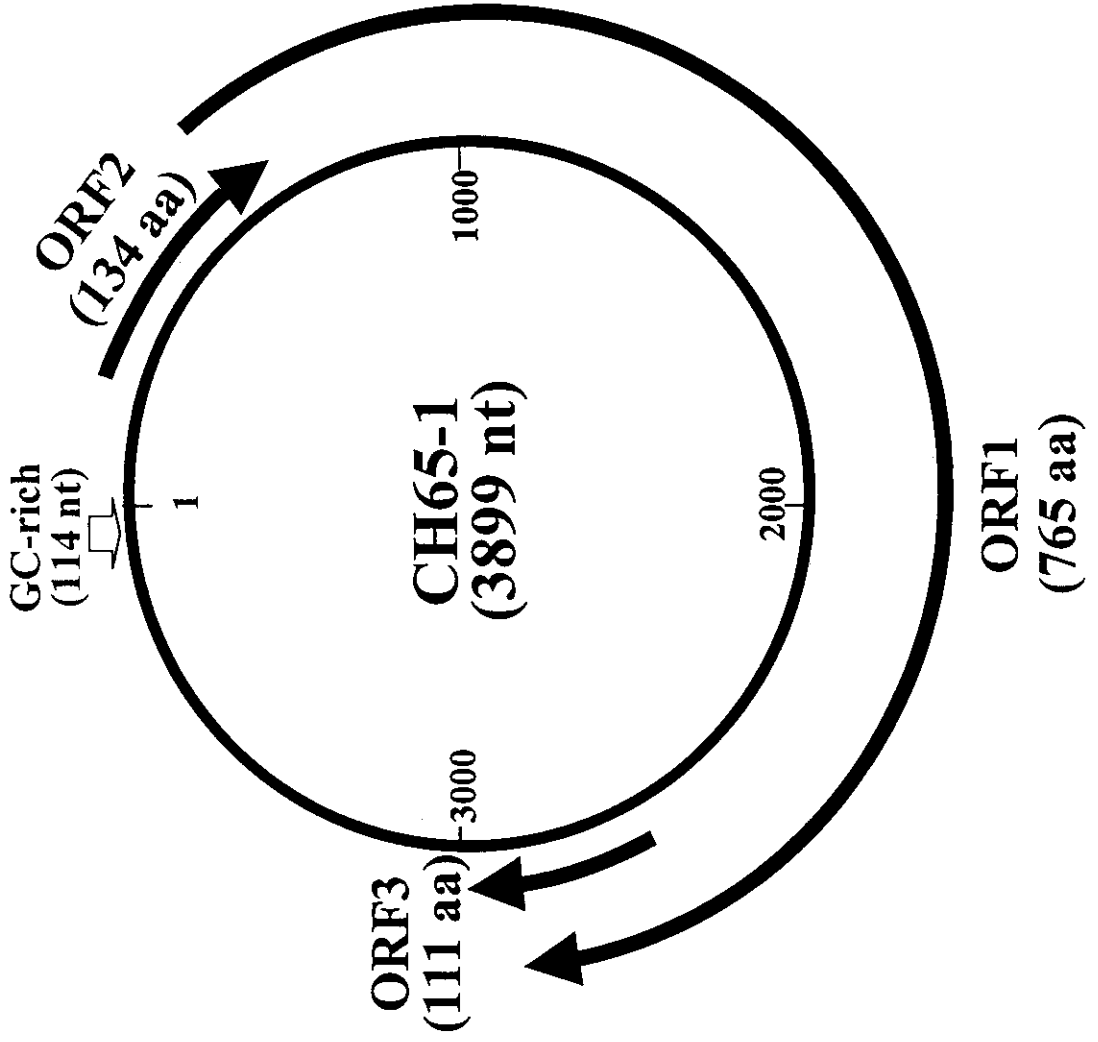
- 1) 正木尚彦、林 茂樹、Binaya L. Shrestha、内藤秀夫、阿部賢治: ネパール国における肝疾患の実態とその対策. 日本消化器病学会総会、2000年4月、新潟
- 2) 内藤秀夫、林 茂樹、倉田 毅、阿部賢治: PCR法によるG型肝炎ウイルスの簡便なゲノタイプ分類法の開発. 第89回日本病理学会総会、2000年4月、大阪
- 3) 稲見知子、荒川泰行、中村 伸、後藤俊二、阿部賢治: 各種霊長類におけるTTV DNAの検出とsimian-TTVの分離. 第89回日本病理学会総会、2000年4月、大阪
- 4) 相羽直人、西村裕之、荒川泰行、倉田 毅、阿部賢治: ボウシテナガザルからのB型肝炎ウイルスゲノムの分離. 第89回日本病理学会総会、2000年4月、大阪
- 5) 枝元良広、谷 昌尚、小堀 一郎、阿部賢治: HBs抗原陰性HCV陽性肝癌におけるHBVの関与. 第89回日本病理学会総会、2000年4月、大阪
- 6) 齋藤貴秀、森山光彦、荒川泰行、石川晃一、Francis K. Nkrumah、阿部賢治: ガーナのHIV感染者におけるHGV感染の分子疫学的特徴. 第34回日本肝臓学会東部会、2000年11月、東京
- 7) 伊藤健治、梶浦 工、阿部賢治: HBVに対するエタノールの作用(1) S抗原ならびにHBV-DNAへの影響. 第16回日本環境感染学会総会、2001年2月、東京
- 8) 梶浦 工、伊藤健治、阿部賢治、臼田定和、三代俊治: HBVに対するエタノールの作用(2) pre-S2抗原への影響. 第16回日本環境感染学会総会、2001年2月、東京

Prevalence of TTV DNA in various nonhuman primates

Common name	Species name	Place of capture	Number positive/tested
<i>Apes</i>			
Chimpanzee	<i>Pan troglodytes</i>	West Africa	87/98 (89%)
Orangutan	<i>Pongo pygmaeus</i>	Southeast Asia	0/7
Crab-eating monkey	<i>Macaca fascicularis</i>	Southeast Asia	3/21 (14%)
Japanese monkey	<i>Macaca fuscata</i>	Japan	1/89 (1.1%)
Rhesus monkey	<i>Macaca mulatta</i>	Southeast Asia	2/127(1.6%)
Stump-tailed monkey	<i>Macaca arctoides</i>	Southeast Asia	0/4
Assamese monkey	<i>Macaca assamensis</i>	India	0/3
Bonnet monkey	<i>Macaca radiata</i>	India	0/2
Pig-tailed monkey	<i>Macaca nemestrina</i>	Indonesia	0/4
Taiwan monkey	<i>Macaca cyclopis</i>	Taiwan	0/1
Vervet monkey	<i>Cercopithecus aethiops</i>	Africa	0/45
de Brazzas' monkey	<i>Cercopithecus neglectus</i>	Africa	0/6
Blue monkey	<i>Cercopithecus mitis stuhlmanni</i>	Africa	0/22
Sykes' monkey	<i>Cercopithecus mitis kolbi</i>	Africa	0/86
Hamadryas baboon	<i>Papio hamadryas</i>	Africa	0/6
Anubis baboon	<i>Papio anubis</i>	Africa	0/43
Yellow baboon	<i>Papio cynocephalus</i>	Africa	0/5
Gray-cheeked mangabey	<i>Cercocebus albigena</i>	Africa	0/13
Patas monkey	<i>Erythrocebus patas</i>	Africa	0/2
<i>New-World monkeys</i>			
Night monkey	<i>Aotus trivirgatus</i>	South America	0/6
Brown capuchin	<i>Cebus apella</i>	South America	0/9
Squirrel monkey	<i>Saimiri sciureus</i>	South America	0/1
Black-handed spider monkey	<i>Ateles geoffroyi</i>	South America	0/1
<i>Prosimii</i>			
Ring-tailed lemur	<i>Lemur catta</i>	South America	0/2
Thick-tailed bush baby	<i>Galago crassicaudatus</i>	Southeast Asia	0/2



Genome structure of s-TTV



研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名 巻頁数 論文名)	刊行年月	刊行者氏名	執筆者氏名
1. 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	2000		Abe K, et al
2. Biochemical and virological response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C, co-infected with hepatitis G virus. Journal of Viral Hepatitis 7: 43-50, 2000	2000		"
3. 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	2000		"
4. High prevalence of TT virus DNA in human saliva and semen. Journal of Clinical Microbiology 38: 2407-2408, 2000	2000		"
5. Simultaneous detection of hepatitis B, C and G viral genomes by multiplex PCR method. Japanese Journal of Infectious Diseases 53: 70-72, 2000	2000		"
6. Full-length nucleotide sequence of a simian TT virus isolate obtained from a chimpanzee: Evidence for a new TT virus-like species. Virology 277: 330-335, 2000	2000		"
7. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by polymerase chain reaction using type-specific primers. Journal of Clinical Microbiology 39: 362-364, 2001	2000		"
8. Genotyping system of GBV-C/HGV type 1 through type 4 by polymerase chain reaction using type-specific primers and geographic distribution of viral genotypes. Journal of Virological Methods 91: 3-9, 2001	2000		"

厚生科学研究「新興・再興感染症研究事業」
未知の感染症のリスク評価に関する研究班

平成 12 年度 分担研究報告

分担研究計画

献血血液における low viremic HBV carrier の残存リスクに関する研究

分担研究者	池田久實	北海道赤十字血液センター	所長
研究協力者	佐藤進一郎・伊原弘美	同上	検査部
	酒谷真一・加藤俊明	同上	検査部

研究要旨

北海道内の献血血液における low viremic HBV carrier の残存リスクを調査した。献血者 540,161 例について現行の血清学的 HBV スクリーニングと高感度な化学発光免疫測定法 (CLIA 法)による HBs 抗原スクリーニングの並行試験を実施した。高感度 HBs 抗原スクリーニングによってのみ検出された 65 例 (0.01%)の HBs 抗原弱陽性例うち、47 例 (0.009%)は血清学的 HBV マーカーの成績から持続感染者と考えられ、そのうち 39 例 (0.007%)に HBV DNA が検出された。一方、HI 法による HBc 抗体検査で輸血使用不可と判定された献血血液のうち 1,103 例に nested PCR を実施した結果、12 例 (0.01%)に HBV DNA が検出され、持続感染者と考えられた。これらの HBV DNA 量はいずれも 100 copies/mL 未満と極めて微量であった。このような low viremic HBV carrier の感染リスクを確実に排除するためには、核酸増幅検査の実施だけではなく、血清学検査として高感度 HBs 抗原スクリーニングの導入と HBc 抗体スクリーニングの継続の実施が必要である。

A. 研究目的

輸血用血液スクリーニングとして、ミニプール検体を用いたウイルス (HBV, HCV, HIV-1)の核酸増幅検査 (以下ミニプール NAT)を導入したことにより、多くの window period (WP)感染例や一部の HBV mutant を検出することができるようになり、その安全性は極めて高くなった。しかし、ミニプール NAT は血液中に存在するウイルスゲノム量が減少しているような持続感染者の検出にはあまり適していない。なぜならば、検体をプールすることでウイルスゲノムが希釈され、それによってミニプール NAT の検出感度が低下するからである。一方、血清学検査はウイルス感染により生体内で増幅された免疫反応を検出する方法であるため、持続感染者の検出に優れている。特に血中ウイルスゲノム量が減少しているような low viremic carrier の検出には血清学検査が有用と考えられる。本研究は高感度 HBs 抗原スクリーニングを用いて、献血血液における low viremic HBV carrier の残存リスクを明らかにして、今後の血清学スクリーニング検査の意義を明確にすることを目的とした。

B. 研究方法

B-1 検体

1994 年 8 月 9 月、1996 年 6 月、1997 年 1 月

2 月、1997 年 6 月 2000 年 3 月の各期間に北海道内で献血した 540,161 例を対象とした。

B-2 現行献血者 HBV スクリーニング

現行の献血者 HBV スクリーニング検査は日本赤十字社業務標準に従い、HBs 抗原検査を逆受身赤血球凝集試験(RPHA 法)、HBc 抗体検査を赤血球凝集抑制試験(HI 法)、HBs 抗体検査を受身赤血球凝集試験(PHA 法)で実施した。RPHA 法が 4 倍以上、あるいは HI 法が 32 倍以上でかつ PHA 法が 16 倍 (日赤標準 HBs 抗体)未満の血液を輸血使用不可と判定した。

B-3 高感度 HBs 抗原スクリーニング

化学発光免疫測定法 (chemiluminescent immunoassay, CLIA, PRISM system, Dainabot)を用いて献血者の HBs 抗原スクリーニングを実施した。その他に HBc 抗体、HBe 抗原、HBe 抗体検査法として、酵素免疫測定法 (microparticle enzyme immunoassay, MEIA, AxSYM system, Dainabot)を用いた。試薬及び機器の取り扱い、判定基準はメーカーの添付文書に従った。

B-4 HBV DNA 検査

献血者検体および患者検体の HBV DNA 検査は、S 領域のプライマー及び C 領域 primer を用いて nested PCR 法 (日赤標準法)で実施した。使用検体量 0.1mL 及び 1.0mL それぞれについて nested PCR