

Fig 45

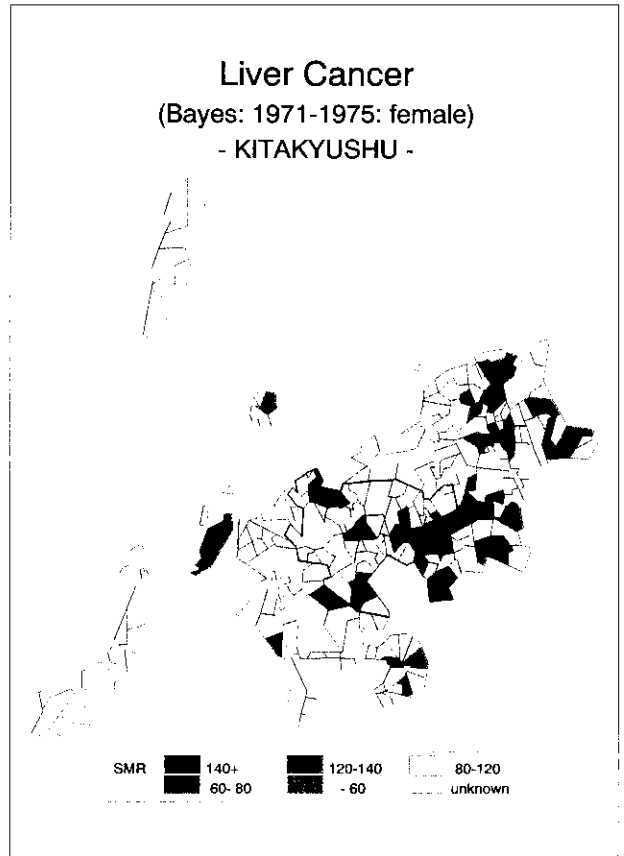


Fig 46

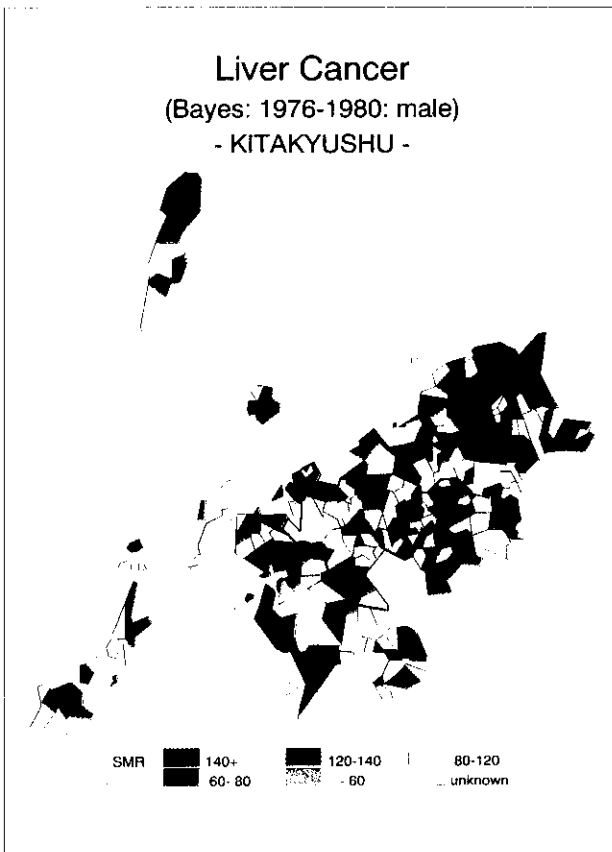


Fig 47

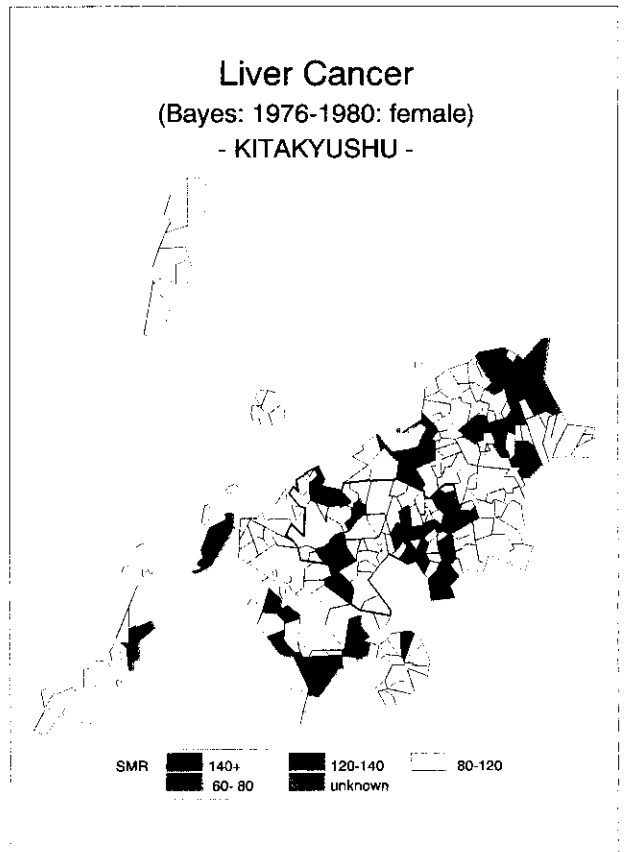


Fig 48

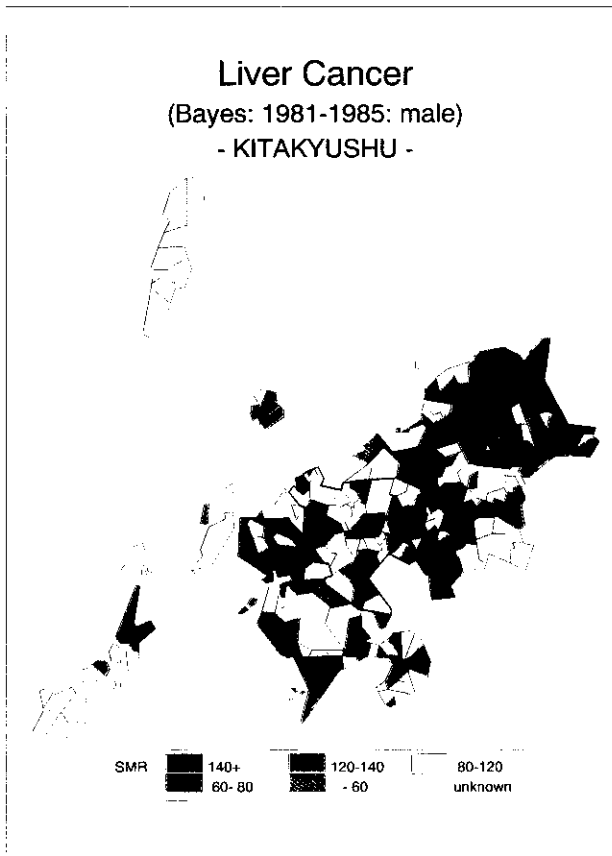


Fig 49

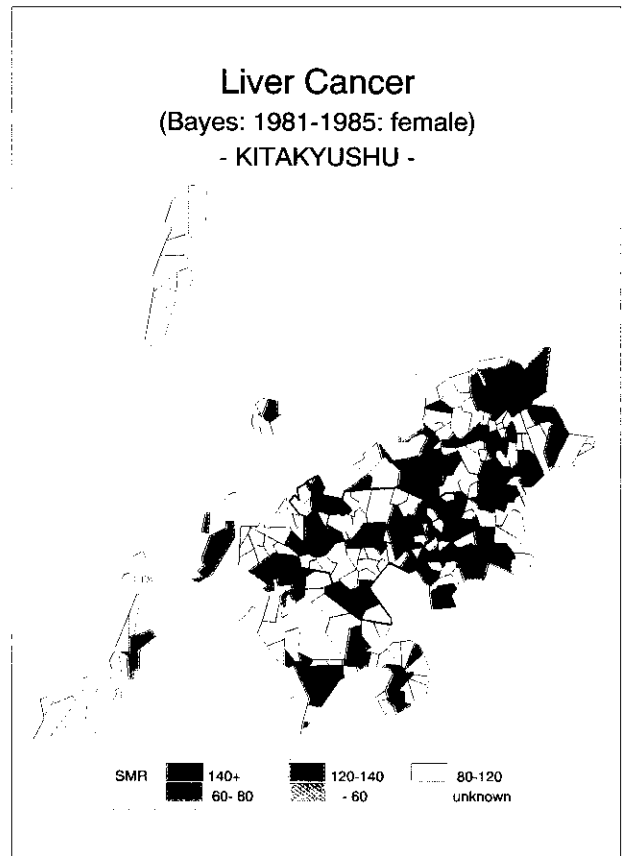


Fig 50

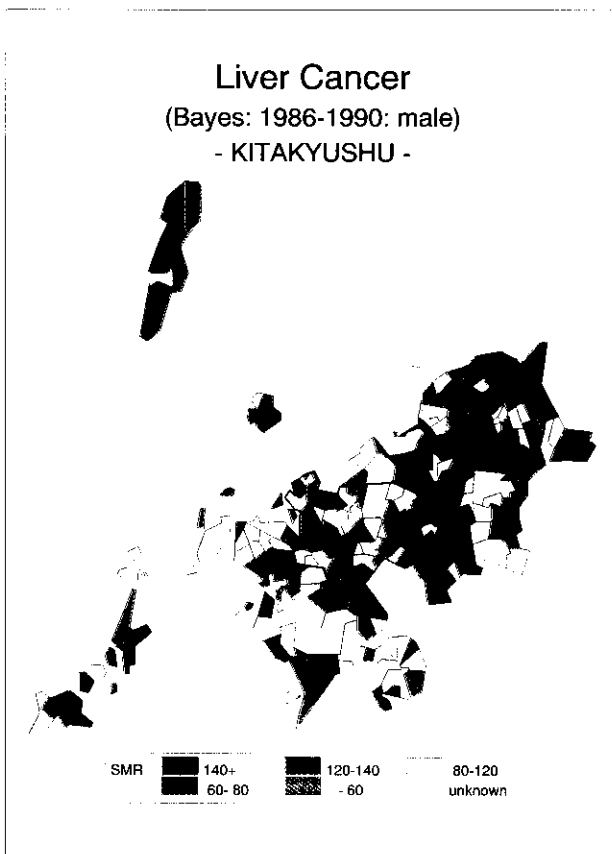


Fig 51

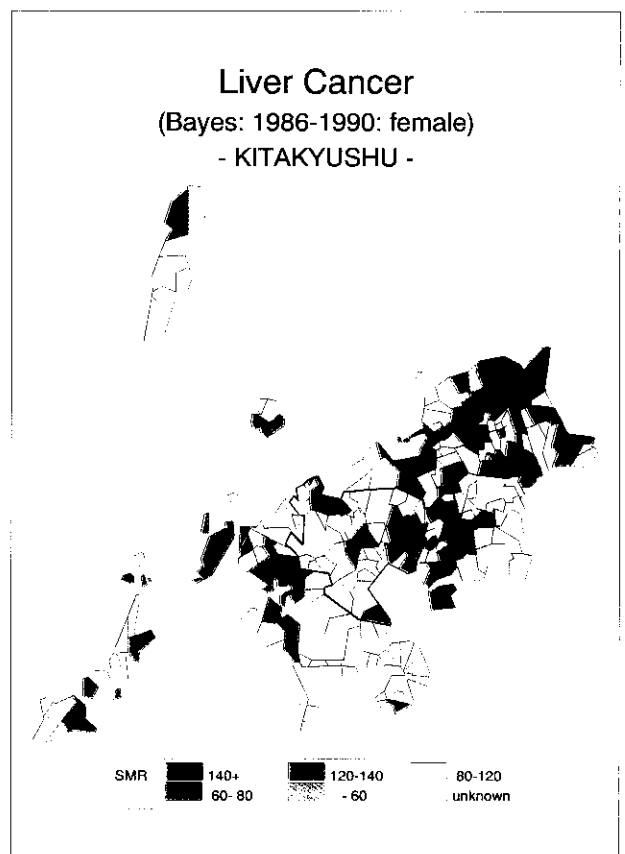


Fig 52

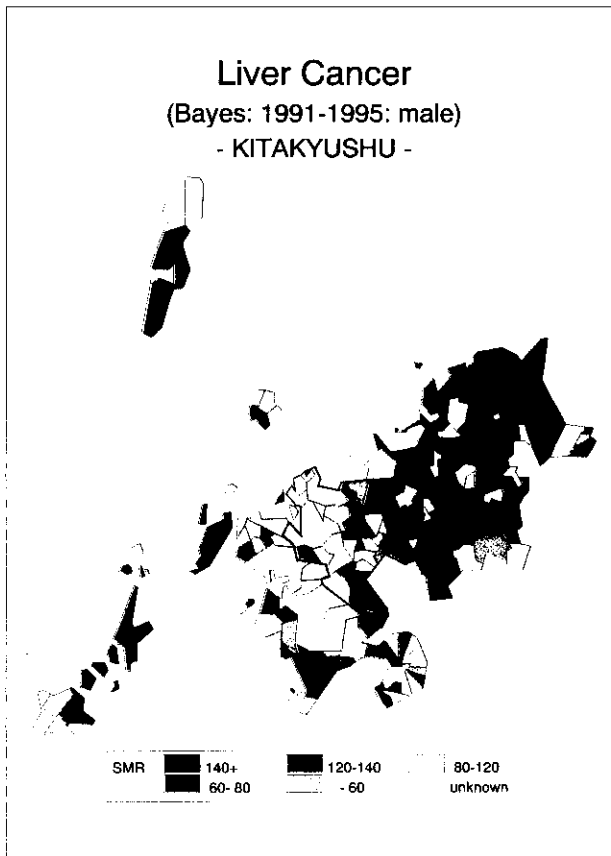


Fig 53

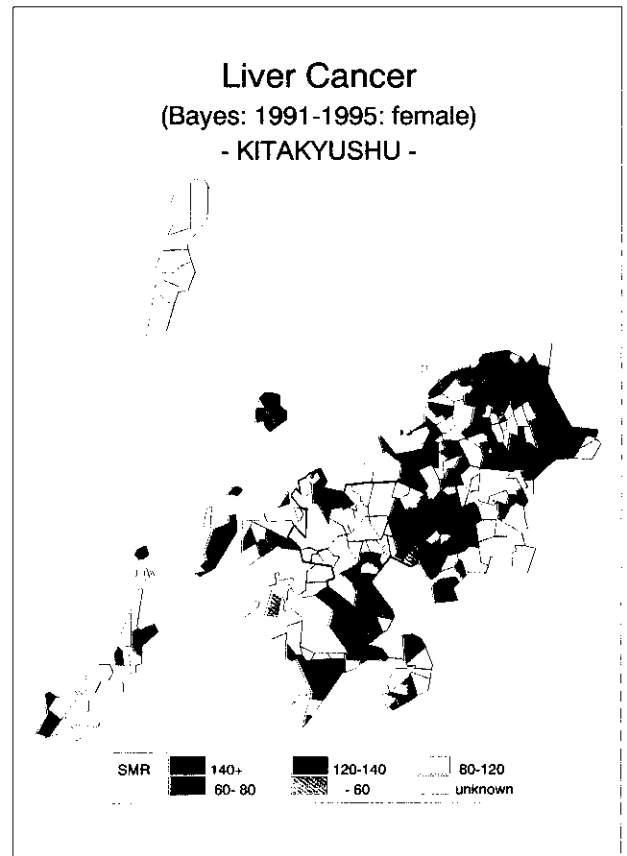


Fig 54

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
分担研究報告書

血液透析患者を対象としたHCV感染に関する前向き調査

分担研究者 田中 純子 広島大学医学部衛生学 講師
研究協力者 吉澤 浩司、片山 恵子、熊谷 純子、小宮 裕、
頼岡 徳在、広島・透析患者肝炎 study group

研究要旨

透析医療施設におけるHCV感染の実態把握を広島県下の9つの透析施設の協力の下に行った。その結果、透析患者におけるHCV抗体陽性率は、20.9% (347/1,664) にのぼることが明らかとなった。また、1999年11月から3ヶ月に1回の頻度で採血し、2000年11月まで追跡したところ、途中脱落例を除いた全対象者2,042例中、初回の検査時にHCV抗体が陰性であった1,642例の中から9例 (0.55%) のHCV新規感染例を見出した。また、初回検査時にHCV RNAが検出され、低力価のHCV抗体 ($2^1, 2^5, 2^{11}$ HCV PHA価) が検出された3例は、いずれも経過観察中にHCV抗体価の上昇 (2^{13} HCV PHA価) を認め、調査開始時点がHCV感染の初期に相当していたことが明らかになった。

この成績は、透析施設では依然としてHCVの新規感染が少なからずおこっていることを示している。

A. 研究目的

血液透析患者集団におけるHCV感染の現状および新たなHCVキャリアの発生の有無を明らかにするために、広島県内の透析医療機関9施設の協力のもとに、調査を行った。

B. 研究方法

(1) 対象

広島県下の透析医療施設のうち協力の得られた9施設の全血液透析患者を対象とした。調査開始時点におけるHCV抗体陰性者数は1,642例 (男性1,203例、女性839例、平均年齢 60.8 ± 12.9 歳) であった。なお、全調査期間を通じた対象者数は2,042例であった。

(2) 方法

調査期間は、1999年11月から2000年11月までの1年間とした。全透析患者に対し3ヶ月ごとに採血を行い (計5回)、HCV PHA法によるHCV抗体の測定、RT-nested PCR法によるHCV RNAの検出、およびHCVのgenotype (Okamotoらの方法) を決定した。

まず、5回におよぶ調査毎のHCV抗体陽性率、HCVキャリア率を算出した。また、期間内におけるHCV抗体陽転を観察し、HCVキャリア新規発生率 (罹患率) を算出した。

C. 結果と考察

(1) HCV抗体陽性率およびHCVキャリア率施設別にみた対象者数およびHCV抗体陽性率を表-1に示す。

新規の透析導入、転院、死亡などによる対象者数の増減がみられるが、全体ではHCV抗体陽性率は95%信頼区間の値でみると約17~23%であった。この値は、日本

透析医会の調査による全国平均値とほぼ同じ値を示している^{1,2)}。施設別にHCV抗体陽性率をみると、その数値に差が多少はあるが、だいたい20%前後の値を示した。

表-1 施設別にみたHCV抗体陽性率

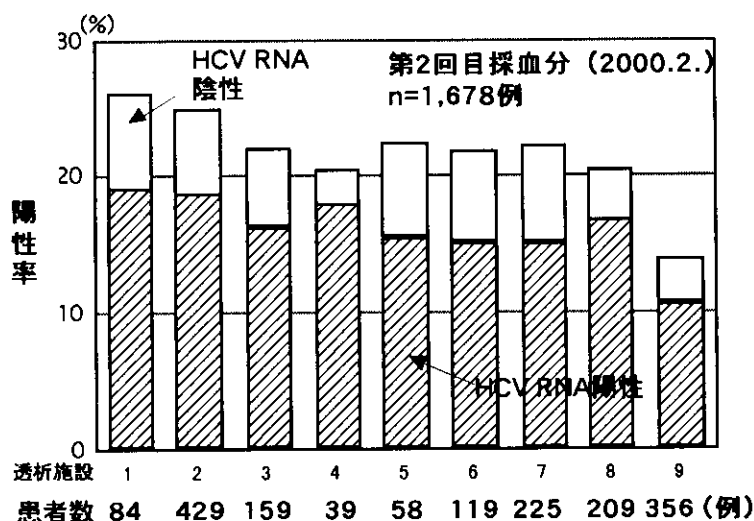
施設	第1回 1999年11月	第2回 2000年2月	第3回 2000年5月	第4回 2000年8月	第5回 2000年11月
	HCV抗体陽性数/対象数(%)	HCV抗体陽性数/対象数(%)	HCV抗体陽性数/対象数(%)	HCV抗体陽性数/対象数(%)	HCV抗体陽性数/対象数(%)
1.	21/82 (25.6)	22/84 (26.2)	20/84 (23.8)	19/81 (23.5)	17/86 (19.8)
2.	109/430 (25.3)	107/429 (24.9)	100/437 (22.9)	99/444 (22.3)	97/456 (21.3)
3.	34/151 (22.5)	35/159 (22.0)	35/167 (21.0)	36/171 (21.1)	35/177 (19.8)
4.	9/40 (22.5)	8/39 (20.5)	8/39 (20.5)	8/37 (21.6)	9/39 (23.1)
5.	13/59 (22.0)	13/58 (22.8)	13/57 (22.8)	12/53 (22.6)	10/50 (20.0)
6.	26/119 (21.8)	26/119 (21.8)	26/122 (21.3)	23/124 (18.5)	25/126 (19.8)
7.	47/226 (20.8)	50/225 (22.2)	47/229 (20.5)	42/233 (18.0)	42/236 (17.8)
8.	39/212 (18.4)	43/209 (20.6)	40/210 (19.0)	42/217 (19.4)	41/220 (18.6)
9.	49/345 (14.2)	50/356 (14.0)	49/367 (13.4)	49/376 (13.0)	49/385 (12.7)
合計	347/1,664 (20.9)	354/1,678 (21.1)	338/1,712 (19.7)	330/1,736 (19.0)	325/1,775 (18.3)
95%CI	(18.9-22.8)	(19.1-23.1)	(17.9-21.6)	(17.2-20.9)	(16.5-20.1)

第2回目の調査から得た施設別のHCV抗体陽性率とHCVキャリア率を図-1に示す。

HCV抗体陽性集団内におけるHCVキャリア率は74.3%であり、施設別にみても大きな相違は認められない。また、第2回目の

調査から判明したHCVキャリア263例のHCV genotypeをみると、II/1b型は199例(75.6%)、III/2a型は38例(14.4%)、IV/2b型は19例(7.2%)であった。

施設別にみたHCV抗体陽性率およびHCVキャリア率



(2) HCV 抗体の陽転率

死亡や転院のために調査途中から脱落した症例および、調査期間内に新たに血液透析が導入された症例、5回の調査すべてに採血可能であった症例等、対象症例の調査状況は多様であるが、すべての対象者2,042例中、2回以上の調査が可能でありかつ調査開始時点でHCV抗体が陰性であったのは1,642例であった。

この1,642症例のうち、観察期間内にHCV抗体の陽転が認められたのは9例であっ

た(表-2)。なお、いずれの症例もその後の追跡により、HCV抗体力価の上昇が認められ、HCV RNAが持続して検出されている。

これらの9例以外に、調査期間内にHCV抗体価が上昇した2例について表-3に示す。

初回の採血ではいずれもHCV抗体力価は低力価あるいは中力価を示したが、その後の追跡により、HCV抗体価の上昇がみられ、本調査開始直前に新たな感染を受け、HCV抗体価の上昇期を捉えたものと考えられた。

表-2 調査期間中にHCV抗体が陽転した9例の経過

	age sex	第1回 1999.11		第2回 2000.2		第3回 2000.5		第4回 2000.8		第5回 2000.11	
		HCV 抗体価 (2 ⁺)	HCV geno- type RNA	HCV 抗体価 (2 ⁺)	HCV geno- type RNA	HCV 抗体価 (2 ⁺)	HCV geno- type RNA	HCV 抗体価 (2 ⁺)	HCV geno- type RNA	HCV 抗体価 (2 ⁺)	HCV geno- type RNA
1.	70 F	—	+	11	+	11	+	13↑	+	13↑	+
2.	79 M	1	+	10	+	13	+	13↑	+	N.T	
3.	77 M	—	+	8	+	10	+	11	+	11	+
4.	92 F	—	+	8	+	N.T		N.T		N.T	
5.	58 F	—	—	5	+	13↑	+	13↑	+	13↑	+
6.	35 M	—	+	N.T		13↑	+	13↑	+	13↑	+
7.	70 M	—	—	—	—	—	+	11	+	11	+
8.	59 M	—	—	—	—	—	—	—	+	9	+
9.	40 M	—	—	—	—	—	—	—	—	11	+

N.T: 採血なし

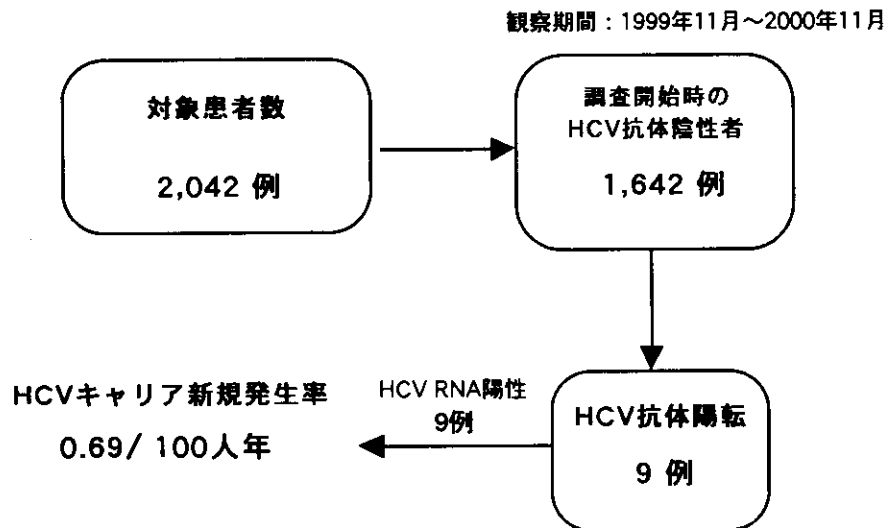
表-3 調査期間中にHCV抗体価が上昇した2例の経過

	age sex	第1回 1999.11		第2回 2000.2		第3回 2000.5		第4回 2000.8		第5回 2000.11	
		HCV 抗体価 (2 ⁺)	HCV geno- type RNA	HCV 抗体価 (2 ⁺)	HCV geno- type RNA	HCV 抗体価 (2 ⁺)	HCV geno- type RNA	HCV 抗体価 (2 ⁺)	HCV geno- type RNA	HCV 抗体価 (2 ⁺)	HCV geno- type RNA
1.	83 F	5	+	13	+	13↑	+	13↑	+	13↑	+
2.	45 M	11	+	13	+	13↑	+	13	+	13	+

今回の調査による血液透析患者集団におけるHCVキャリアの新規発生率を図-2にまとめて示す。調査開始時のHCV抗体陰性例は1,642例であり、このうち観察期間内にHCV抗体の陽転が認められたのは9例

であった。この9例はいずれもHCV RNAが陽性と判定され、持続して検出された。人年法を用いたHCVキャリアの新規発生率は、0.69/100人年（95%信頼区間：0.66～0.71/100人年）であった。。

図-2 血液透析患者集団におけるHCVキャリア新規発生率



D. 結論

血液透析患者集団におけるHCV感染率およびHCVキャリアの新規発生率を明らかにするために、協力の得られた9施設における全血液透析患者を対象に3ヶ月に1回の採血を行いつつ、1年間にわたって調査を行った。対象者総数は2,042例であり、HCV抗体陽性率は、17～23%であった。

一方、初回の調査時にHCV抗体が陰性であった1,642例のうち、9例にHCV抗体陽転が認められた。その後の追跡により、これらの9例ではいずれも、HCV抗体価の上昇およびHCV RNAが持続して検出され、本調査による血液透析患者集団におけるHCVキャリアの新規発生率は100人年あたり0.69（95%CI：0.66～0.71）と算出された。

また、上記の9例の他に、調査期間内にHCV抗体の上昇がみられた2例についても、HCV感染の初期像を捉えたものであることが明らかになった。

以上の成績は、透析施設では依然としてHCVの新規感染が起きていることを明らかにし、さらに、これまで、透析患者では「免疫能が低下している為、HCV抗体が陰性、あるいは低力価陽性を示すHCVキャリア状態が存在することがある」との解釈をくつがえし、これらは、「HCV感染のウィンドウ期、あるいは感染初期像の一断面を捉えたものである」ことを初めて立証したものである。

E. 参考文献

- 1) 日本透析医学会総務委員会感染対策小委員会：日本の透析施設におけるHCV感染に関する実態調査. 透析会誌 27(2):77-82, 1994.
- 2) 日本透析医学会：わが国の慢性透析療法の実況. 1999.

F. 知的財産権の出願・登録

なし

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症 [非A非B型肝炎] 研究事業）
分担研究報告書（平成10～12年度）

TTVウイルスの分子ウイルス学的解析

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(TTV)は原因不明肝疾患の起因ウイルスの候補として1997年に我が国で発見されたウイルスである。本ウイルスについての分子ウイルス学的研究を行い、以下の成果を得ることができた。1) TTVは外殻を持たない、直径30-32 nmの小型球形粒子であること、2) 約3.8 kbの環状1本鎖(マイナス鎖)DNAを遺伝子とするウイルスであること、3) TTVには少なくとも16種類(1型～16型)の遺伝子型が認められること、4) キャプシド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、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、いわゆる"quasispecies"の状態となっており、流血中でTTV粒子が免疫複合体を形成していること、5) TTVは2本鎖環状DNAを複製中間体として、肝臓や骨髄、肺などで増殖していること、を明らかにすることができた。また、6) チンパンジーに実験的にTTV(1型)を含む血清、あるいは糞便浮遊液を接種し、ヒト糞便中のTTVが血清中のTTVと同様に感染性を有することを実証できた。感染成立後、TTVの排除に伴って軽度ながら肝機能値が一過性に上昇し、同時期に肝細胞にも組織学的な変化(ballooning)が認められた。7) 主要な4種類の遺伝子型(1型～4型)に着目し、それらを個別に、あるいは纏めて検出するPCR法を用いて、TTVの感染病態について検討した結果、遺伝子型の違いによってTTVの組織親和性が異なり、臓器や組織ごとの棲み分けの現象が認められた。8) これら特定の遺伝子型のTTVは、肝機能改善の遅延や肝組織所見の進展と関連があることが示唆された。

A. 研究目的

非A-G型肝炎の起因ウイルスの候補として、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)の本態を分子生物学的、分子疫学的手法により解明し、さらにTTV感染と肝疾患との関連性を追求する。

B. 研究方法

1. 物理化学的性状の解析

塩化セシウム溶液を用いた密度勾配平衡遠心、ならびに浮上遠心を行い、TTVの浮上密度を決定した。

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。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。また、抗ヒトIgAヤギ抗血清、ないし抗ヒトIgMヤギ抗血清を用い、同様の免疫沈降を行った。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、同様の操作を行い、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 (Roche Diagnostics社)を用いて核酸を抽出し、PCRに供した。PCRはプライマーとしてNG061(5'-GGC AAC ATG YTR TGG ATA GAC TGG-3')とNG063(5'-CTG GCA TTT TAC CAT TTC CAA AGT T-3' [antisense])を用いて、35 cycles 行った。PCR productsを2% NuSieve 3:1 アガロースゲル(FMC BioProducts社)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PCR signalが殆ど認められず、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. TTV粒子の電顕観察

3名のHIV (human immunodeficiency virus type 1)感染者に由来するTTV DNA高力価陽性 (10^8 copies/ml) 血清および4名のHIV感染者に由来するTTV DNA陰性、あるいは低力価TTV DNA陽性 (10^2 copies/ml) 血清 1mlをそれぞれsize exclusion chromatography、ついで塩化セシウムを用いた超遠心分離に供した。そして、遠心分離後、TTV DNA-rich 分画、あるいはそれに相当する比重 $1.31\text{-}1.33\text{ g/cm}^3$ の分画を遠心pelletingし、電顕観察を行った。また、TTV DNA陽性の非HIV感染患者より調整した15%糞便浮遊液 (1型TTV DNA: 4×10^5 copies/ml) 440 mlを硫酸沈殿および超遠心分離に供しTTV粒子を精製したのち、ヒト血漿に由来する1型TTV粒子に対する抗体を用いて免疫電顕を施行した。

4. 全遺伝子構造の解明

プロトタイプのTTV(TA278株[1型])および、それと核酸配列が大きく異なるTTV変異株(TUS01株[11型]、TJN01株[12型]、TJN02株[13型])の全遺伝子構造を決定し、相互に比較解析することによりTTV遺伝子の特徴を明らかにした。

5. TTV遺伝子の超可変領域の解析

1型に属する3つのTTV株(TRM1, TK16, TP1-3)について、コード領域(ORF1およびORF2)全体を含む3.3kbの塩基配列を決定し、既知の同一遺伝子型の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(hyper-variable region [HVR])を含む約850塩基長の領域を*TaKaRa Ex Taq* (宝酒造)の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、プライマーNG161 (5'-GCA ACC GC A GCG GAT ATG CAA TAT CCG TTC-3' [sense])とNG063(5'-CTG GCA TTT TAC CAT TTC CAA AGT T-3' [antisense])を用い、94°C, 30秒; 60°C, 30秒; 72°C, 60秒 (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、プライマーNG152 (5'-TGC AAT ATC CGT TCG GCT CACCAC-3' [sense])とNG063を用いて25cycles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気泳動によって分離、精製し、pT7Blue T-Vector (Novagen社)に結合した後、大腸菌に形質導入した。得られたDNAクローンの塩基配列は、Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems社)を用いて反応した後、自動DNAシーケンサー(ABI PRISM 310 Genetic Analyzer :PE Applied Biosystems社)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。

6. 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%SeaKem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。

7. チンパンジー感染実験

TTV DNA(1型)が高力価(3×10^5 DNA copies/ml)で検出された原因不明の急性肝炎初期の患者血清0.5 ml、およびTTV(1型)の一過性感染例で血清中TTV DNAが高力価を示し、糞便中でもTTV

DNAが高力価で検出された患者からの15%糞便浮遊液 1ml (4×10^5 DNA copies /ml)を、それぞれチンパンジー1頭ずつ(No.228, No.234)の静脈内に接種した。両チンパンジーはこれまでにヒト血清や薬剤を用いた実験に供された既往はない。なお、糞便浮遊液は予め孔径が0.22 μ mのフィルターを2回連続して通したうえで接種材料として使用した。接種前に両チンパンジーはTTV DNA(1型)が陰性であり、また1型TTV粒子に対する抗体も陰性であることを確認した。

接種後週1回の採血によりTTV DNA(1型)および肝機能値を経時的に測定した。また、接種直前、接種後肝機能値上昇時、および肝機能値正常化時の計3回肝生検を実施した。

8.末梢血単核球における遺伝子型別のTTV DNAの検出

ALT値が正常で、HBs抗原とHCV抗体がともに陰性である健常人108例(31.9 \pm 12.7歳[範囲16-69歳]: 男性57例、女性51例)を対象とした。抗凝固剤としてEDTA液(全血10 mlに対して、0.5 M EDTAを50 μ l)を添加し、以下のように全血10mlから血漿と末梢血単核球を遠心分離した。すなわち、680 x g, 25 $^{\circ}$ Cで10分間遠心し、上清の血漿を分取したのち、全量が25 mlになるようにDulbecco's PBS(-)を加え、浮遊させた。それを、25mlのFicoll-Paque(Pharmacia社)に重層し、680 x g, 25 $^{\circ}$ Cで20分間遠心して末梢血単核球を分離した。その後、50 mlのPBS(-)で3回洗滌して、1 mlのPBS(-)に浮遊させた。その5分の1量ずつ(全血2ml相当)を5本のmicrotubeに分取し、以下のDNA抽出に供した。

血漿50 μ lから、High Pure Viral Nucleic Acid Kitを用いて核酸を抽出し、PCRに供した。上述の全血2mlに由来する末梢血単核球を遠心pelleting(10,000 rpm, 2分間)し、上清を除いたのち、DNAzol reagent(Gibco-BRL社)を800 μ l加え、室温で2分間vortexingしたのち 100%のethanolを400 μ l加え、十分に混和した。染色体由来の糸状DNAを除去したのち、20 $^{\circ}$ Cで遠心pelleting(15000rpm, 15分間)し、75% ethanolを用いて2回リンスしたのち、pelletsを風乾し、200 μ lのTE bufferに溶解した。その1/20量(10 μ l: 全血100 μ l相当)をPCRに供した。

9. 型特異的プライマーを用いたTTVの遺伝子型分類

TTVには1型から16型までの少なくとも16種類の遺伝子型が認められるが、主要な4種類(1型~4型)について、それぞれ型特異的プライマーを設計し、個別にPCR法によって遺伝子型分類を行った。すなわち、プライマーペアNG059(5'-ACA GAC AGA GGA GAA GGC AAC ATG-3')-NG063(5'-CTG GCA TTT TAC CAT TTC CAA AGT T-3')の増幅産物(286bp)を鋳型として、Perkin-Elmer AmpliTaq Gold(Roche Molecular Systems社)を用いて25サイクルのPCR(95 $^{\circ}$ C, 30秒 [first cycle: 追加9分間]; 58 $^{\circ}$ C, 30秒; 72 $^{\circ}$ C, 40秒 [last cycle: 追加7分間])を4種類別々に行った。1型, 2型, 3型, および4型のtypingにそれぞれプライマーペアとしてNG162(5'-CTA CCT CTA TGG GCA GCA GC-3')-NG165(5'-AAA GCC TTT TGT GGG GTC TG-3')、NG198(5'-CTG TGG ATA GAC TGG CTA AC-3')-NG174(5'-ACA CAT CTG CAG TTG TGT TC-3')、NG193(5'-CAT AGA CAT GAA CGC CAG AG-3')-NG180(5'-GTG GGT CGT TGG TGT CTA TC-3')、NG177(5'-GCA TAT ACG ACC CCT CTA AG-3')-NG178(5'-GGA CGA AGC CCC AGT TGT CA-3')を用い、それぞれ2~4% NuSieve3:1 GTGアガロースゲルでの電気泳動により150bp, 161bp, 74bp, 195bpのバンドを観察し判定した。

倫理面への配慮: 本研究において研究対象者の血液および糞便サンプルを使用するにあたり、人権擁護上の配慮が十分になされ、対象者に一切の不利益や危険性がないことについてインフォームドコンセントを得ており、倫理面での問題はないと判断した。また、動物の飼育および感染実験は三和化学研究所霊長類パーク(運営管理者・早坂郁夫)に委託し、動物愛護の精神に則り実施されたものである。

C. 研究結果

1.TTVのウイルス学的な特徴

TTVは、塩化セシウム溶液中での浮上密度が1.31-1.35g/cm³のDNAウイルスであり、界面活性剤(Tween 80)処理によっても浮上密度に変化が認められないことから、外殻を持たないウイルスであることが示された。

TTV DNA高力価陽性の血清3検体について免疫沈降反応を行った結果、これら血清中のTTV粒子は、IgGと結合し免疫複合体を形成していることが分かった。そのため、血清中のTTV粒子は電顕的に、TTV DNA-richの遠心分画試料(1.31-

1.33 g/cm³) 中で直径30-32 nmの球状粒子からなる凝集塊として捕らえられた。それに対して、コントロールとしてのTTV DNA陰性、ないし低力価陽性の血清計4検体ではそのようなウイルス様粒子は認められなかった。一方、糞便中のTTV粒子は主としてfree virionsとして存在しており、電顕的に直径30-32 nmの単独の球状粒子として観察されたが、TTV粒子に対する特異抗体を反応させた免疫電顕を施行することにより、haloを伴い等間隔で凝集した粒子塊として認められた。

プロトタイプTTV(TA278株[1型])の全塩基配列を決定し、TTVの遺伝子は約3.8kbの1本鎖(マイナス鎖)DNAで、環状構造をとっていることが明らかになった。ウイルス蛋白をコードしうる主要な読み取り枠(ORF)として、長いORF(ORF1)と短いORF(ORF2)の2つが認められた。これらのORFはともにゲノムDNAの相補鎖、すなわちプラス鎖に認められ、プロトタイプTTVのTA278株では、ORF1は770アミノ酸残基、ORF2は120アミノ酸残基をコードしていた。ORF1は構造蛋白としてのキャプシド(capsid)蛋白を担っているものと考えられた。そのN末端(約100アミノ酸残基)には、B型肝炎ウイルス(HBV)のコア蛋白のC末端やC型肝炎ウイルス(HCV)のコア蛋白のN末端と同様に、アルギニンに富むドメインが認められた。ORF2はウイルス複製や発現の調節に必要な非構造蛋白を担っているものと考えられた。

2. TTVゲノムの多様性とその核酸検出

TTVはDNAウイルスであるにも拘わらず、RNAウイルスに匹敵するほど、遺伝子変異が顕著であることが分かった。そして、コード領域の部分塩基配列の比較によって、ウイルスDNAの配列が30%以上異なる変異ウイルス株が多数存在し、少なくとも16種類の遺伝子型に分類できることが明らかになった。TA278株(1型)と核酸配列が大きく異なるTTV変異株(TUS01株[11型])の全遺伝子構造を決定し、両者を比較解析した結果、非翻訳領域(untranslated region[UTR])は83%のホモロジーを示し保存性が高いが、ウイルス蛋白をコードする遺伝子領域は55%の一致率を示すに過ぎず、保存性が低く、変異に富んでいることが分かった。このTUS01株ではORF1は761アミノ酸残基、ORF2は156アミノ酸残基をコードしており、TA278株とのアミノ酸レベルでのホモロジーはそれぞれ37%、39%に過ぎなかった。また、12型のTJN01株、13型のTJN02株もTA278株

とのホモロジーが著しく低く、またTUS01、TJN01、TJN02の3者間の比較においても、核酸配列ならびにアミノ酸配列の一致率はそれぞれ65%以下、55%以下であった。

以上の結果は、PCR法によるTTV DNAの検出において、標的領域の選定、すなわちプライマーの設定の仕方が極めて重要であることを意味している。実際、1型に合わせて作製した非翻訳領域のプライマーを用いたPCR(UTR PCR)では、各種遺伝子型のTTV全てをほとんど漏れなく検出可能であるため、一般健康人でも90%以上の頻度で陽性と判定された。それに対して、翻訳領域内に位置するN22領域(1型と2型の配列)に由来するプライマーを用いたPCR(N22 PCR)では、1型~4型を主体とする特定の遺伝子型のTTVを検出し、一般健康人での陽性率は我が国では約10~20%であり、米国や英国では数%であった。

1型のTTVが検出された5つの血清検体について、N22 PCR法でのTTV DNA titerとUTR PCR法でのTTV DNA titerを比較した結果、N22 PCR法では $10^2 \sim 10^4$ /mlに分布し、UTR PCR法では全体的にやや高く $10^2 \sim 10^5$ /mlに分布した。そして、N22 PCR法でのtiterとUTR PCR法でのtiterが一致した検体は5検体中1検体に過ぎず、残りの4検体はUTR PCR法での定量結果の方が10倍から100倍高い値を示した。そこで、このような相違が認められた理由を明らかにすべく、保存性の高い非翻訳領域に設定したプライマーセットを用いて翻訳領域全体をカバーする3.3kbのlong-PCRを行い、その増幅産物をプラスミドベクターに挿入してクローン化したのち、N22領域に相当する部位の塩基配列を決定した。その結果、それぞれの血清検体には1型TTVのほかに、それと塩基配列が47~53%相違し、遺伝子型を異にする変異株が少なくとも1種類から2種類混在していることがわかった。そして、それら変異株の方が10倍から100倍titerが高いために、恰もUTR PCR法の方が10倍から100倍検出感度が高いように見誤る可能性があった。実験的に、1型TTV DNAクローン(約3.2 kb)を鋳型として、UTR PCRとN22 PCRでの検出感度を比較した結果、ともに数コピーまで検出可能で同等の感度を示し、両PCR法による検出率の違いはプライマーの遺伝子型特異性に起因することが実証された。

3. TTVの遺伝子型と肝障害

既知のウイルスのなかには、たとえばヒトパ

ピローマウイルス(human papillomavirus:HPV)のように、数多くの遺伝子型に分類され、その型の違いによって病原性や臓器指向性などが大きく異なることが明らかにされているウイルスがある。HPVは塩基配列が互いに10%以上異なることを基準にして分類され、現在までに80種類以上の遺伝子型が見出されている。このウイルスは正常婦人の約10%で感染が認められるが、16型や18型、31型、45型は子宮頸癌との密接な関連が指摘され、高危険型(high-risk type)として型別に検出されている。TTVに関しては、上述のように30%以上の塩基配列の違いを分類の基準として、すでに16種類の遺伝子型が見いだされているが、今後さらに数多くの遺伝子型が見出されるものと予測されている。どのTTV遺伝子型が肝疾患と関連性が深いかを明らかにすることは、このウイルスの本態を理解するうえで極めて重要であるが、最初に原因不明の輸血後肝炎例から見いだされたTTVの遺伝子型である1型は、*a priori*にその候補として注目に値する。実際、原因不明の輸血後肝炎患者の5例中3例で、ALT値の変動と並行してTTV DNAが検出され、その3例に感染したTTVの遺伝子型はいずれも1型であった。1型は世界各地に広く分布するTTVの代表的な遺伝子型であり、2型~4型もそれに次いで多く見出されている。

手術時の輸血に伴うTTVの感染状況を主として1型~4型のTTVを検出するN22 PCR法によって調査した結果、37例中18例で輸血後にTTV DNAが陽転し、経過中のピークALT値が非感染者に較べて有意に高い値を示していること(67.3±48.7 vs. 31.8±23.8 IU/l; p<0.005)、そして輸血後肝炎と診断された4例はいずれもTTV DNA陽転例であったことが明らかになった(4/18 vs. 0/19; p<0.05)。また、既知の肝炎ウイルスの感染が認められない一般供血者を対象としてTTV DNAを検出した結果、肝機能異常群の方が正常群に比べて有意に高い陽性率を示しているが明らかになり(91/581[15.7%] vs. 62/280[22.1%]; p<0.02)、1型~4型を含む特定の遺伝子型のTTV感染と肝障害との関連性が示唆された。

慢性アルコール性肝疾患患者(43例)を対象として禁酒後の肝機能の改善の度合いを、N22 PCR法で検出されるTTVの感染群(17例)と非感染群(26例)に分けて比較したところ、感染群で肝機能の改善に遅延が認められ、その改善率は非感染群に比べて有意に低いことが分かった。また、

NASH(nonalcoholic steatohepatitis)を含む非アルコール性(過栄養性)の脂肪肝患者(38例)において、N22 PCR法によるTTV陽性群(18例)と陰性群(20例)に分けて比較した結果、肝細胞での脂肪沈着の程度それ自体には違いが認められないが、肝細胞の壊死や炎症が中等度から顕著に見られる例がTTV陽性群に有意に多く認められ、線維化の程度が顕著である例もTTV陽性群に有意に多いことが分かった。

4. 1型TTVの初感染例におけるTTV抗体の測定

1型TTVの一過性感染が認められた非A-G型輸血後急性肝炎例において、1型TTV粒子に対する抗体を免疫沈降法とPCRを応用して測定した結果、ALTの正常化とTTV DNAの陰性化に伴って、通常のウイルス感染と同様に、宿主免疫応答の現れとしてIgMクラス、次いでIgGクラスの1型TTV粒子に対する抗体が産生されていることが分かった。そして、IgMクラスの抗体は短期間で消失したのに対して、IgGクラスの抗体は少なくとも4年間持続陽性であった。

5. TTVの超可変領域とquasispecies

1型に属する6つのTTV株 (TA278, TRM1, TK16, TP1-3, GH1, HCVCH1)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した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、少なくとも3.3年から7.5年間持続感染している例ではHVRに種々のアミノ酸変異が認められるTTV DNA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、慢性感染例では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HVR配列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。

6. 肝臓、骨髄および肺での増殖型TTV DNAの検

出

アガロースゲル電気泳動によって、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、骨髄および肺から得られた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が処理後に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-distance PCRを、"slower-migrating" TTV DNAをtemplateとして施行したところ、完全長に相当する3.8 kbのPCR productsが得られた。この結果は、肝臓、骨髄および肺で検出された2本鎖TTV DNAが環状で、しかもその長さがウイルス粒子内のTTV DNAと同様に3.8 kbであることが意味している。

以上の結果から、TTVは複製中間体としての環状2本鎖DNAを介して、肝臓や骨髄、肺で増殖していることが明らかになった。

7. チンパンジーにおけるTTV感染と肝機能異常

肝炎急性期の患者血清を接種したチンパンジーNo.228では、接種後5週目よりTTV DNA (1型)が陽転し、12-13週でピークに達して血中TTV DNA (1型)の titerは 10^4 /mlの値を示した。その後、急激にTTV DNA titerが下降し、16週目以降は陰性となった。肝機能値(ALT値)は接種前より14-24 IU/lの間で推移していたが、TTV DNAの陰性化と一致して一過性に軽度ながら上昇し17週目に40 IU/l、18週目に34 IU/lの異常値を示した。翌19週目から観察最終時点(現時点で49週)まではそれ以前と同様に、15-24 IU/lの値を示している。接種直前と、接種後24週目のTTV DNA (1型)が陰性でALT値も正常値に復したポイントでは肝組織所見は正常であった。しかし、接種後18週目の丁度ALTが異常値を示したポイントでは、肝細胞の腫脹や類洞の不規則化、狭小化が認められた。感染材料中のTTVと、TTV DNA titerが最高値を示した接種後12週目のチンパンジー血清中の

TTVの塩基配列を決定し比較した結果、完全に一致していることが確かめられた。

糞便浮遊液を接種したチンパンジーNo.234では接種後7週目よりTTV DNA (1型)が陽転した。TTV DNA titerの上昇は緩徐であり、14-16週にピーク値の 10^3 copies/mlに達した。その後、徐々にTTV DNA titerは下降し、接種後20週目に一旦陰性化した。21週目より再び陽性となり、緩やかにtiterが上昇する傾向を示し、33週目まで検出された。感染材料である糞便浮遊液中のTTVと、TTV DNA titerが最高値を示した接種後15週目のチンパンジー血清中のTTVの塩基配列を決定し比較した結果、完全に一致していることが確認された。したがって、糞便中に排泄されたTTVは血清中のTTVと同様に感染性を有していることが初めて実証された。

8. 血漿と末梢血単核球におけるTTV遺伝子型の比較

N22 PCR法によってTTVを検出したところ、血漿では19%(20/108)の陽性率であったのに対して、末梢血単核球内では42%(45/108)で陽性であった。血漿中と末梢血単核球内のTTVがともに陽性であった20例について、両者の遺伝子型を測定し比較した結果、血漿中に認められず、末梢血単核球でのみ検出される遺伝子型があることが分かった。すなわち、血漿中のTTVは1型や2型が多く認められたのに対して(90%[18/20])、末梢血単核球内では3型や4型のTTVの陽性頻度が高いことが明らかになった(60%[12/20])。さらに、末梢血単核球でのみTTVが検出された25例について遺伝子型を調べた結果、64%(16/25)の例で3型、ないし4型TTVが陽性であることが分かった。

D. 考察

本研究において、TTV粒子は外殻を持たない直径30-32 nmの球状粒子として初めて電子顕微鏡下で捕らえられた。免疫複合体として存在する流血中のTTV粒子は様々な大きさの凝集塊として観察され、free virionsとして存在する糞便浮遊液中のTTV粒子は単独の粒子として観察された。HIV感染患者はHIVと同時に様々な血液伝播性ウイルスに重感染していることが知られていることから、当該血清サンプル中で観察されたウイルス粒子とTTVとの関連性については極めて慎重であるべきと考えられる。しかし、TTVが高力価で感染している患者3名の、しかもTTV

DNA-richの遠心分画(1.31-1.33 g/cm³)にのみ観察されたこと、同様のウイルス粒子がTTV DNAが高力価陽性の非HIV感染患者の糞便中でも認められ、遺伝子型特異TTV抗体を用いた免疫電顕法によりhaloを伴った粒子凝集像が見られたことは、本研究において観察されたウイルス粒子がTTV粒子であることを強く支持している。

TTVは、全遺伝子構造が決定された結果、ヒトDNAウイルスとしてこれまでのウイルスにない1本鎖環状構造を有するユニークなウイルスであることが明らかになった。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、数多くの遺伝子型が認められるだけでなく、HCVやHIVのエンベロッ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、急性感染ではTTVクローンが均一であるのに対して、持続感染状態では、HVRに種々の変異を有するTTVクローンが混在し、quasispeciesの状態となっていることが分かった。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。

TTVが胆汁中や糞便中에서도検出され、また疫学的に輸血歴のない供血者や患者でも高率にTTVに感染していることが示され、これまで経口感染の可能性が示唆されていたが、チンパンジーへの接種実験によって、糞便中のTTVが感染性を有することが実証され、輸血以外の感染ルートが存在が初めて裏付けられた。これまでのチンパンジーへのTTV感染実験の報告(Mushahwar et al. Proc Natl Acad Sci USA 96: 3177-3182, 1999)では2頭のチンパンジーに接種し、1頭(CH314)は93日目(14週目)より陽転し、残りの1頭(CH306)では149日目(21週目)より陽転し、ともに一過性で肝機能異常は認められなかったと記載されている。しかし、本研究においては接種後5~7週という早い時期にウイルス血症が観察され、TTVの排除の時期に一致して軽度ながら肝機能異常と肝細胞のballooningという組織学的な変化が観察されたことは、TTVが肝障害を惹起するウイルスであることを示している。肝障害の出現の有無やウイルス血症成立の時期の違いが

TTV株やウイルス量、また宿主側の因子に起因するのかを明らかにすることは、今後の検討課題として重要である。

血清中と末梢血単核球内のTTVの遺伝子型に違いが見られ、末梢血単核球にのみ存在するTTV遺伝子型があるという結果は、遺伝子型の違いによってTTVの組織親和性が異なり、臓器や組織ごとの棲み分けの可能性を示唆するとともに、血清中から排除されたあとも一部のTTVは末梢血単核球内に潜伏感染し、reservoirとしての役目を果たす可能性をも示している。

E. 結論

- 1) TTVは、エンベロップを持たない、直径30-32 nmの小型球状粒子であり、約3.8kbの1本鎖環状DNAをゲノムとし、これまでのヒトウイルスにない新規ウイルスであることが明らかになった。
- 2) TTVにはDNAウイルスであるにも拘わらず数多くの遺伝子型が認められるが、主要な4種類の遺伝子型(1型~4型)に属するTTVの感染は、肝機能改善の遅延や肝組織所見の進展と関連性があることが示唆された。
- 3) TTV感染では遺伝子型の違いによって、臓器や組織ごとの棲み分けの可能性を示唆された。
- 4) 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、quasispeciesの状態で存在していることが明らかになった。
- 5) TTVは2本鎖環状DNAを介して肝臓や骨髄、肺で増殖していることが明らかになった。
- 6)チンパンジー感染実験により、糞便中のTTVが感染性を有することを実証した。
- 7) チンパンジーへの感染成立後、TTVの排除に伴って、肝機能異常と肝細胞の腫脹という組織学的な変化が観察されたことから、TTVが肝炎を惹起しうるウイルスであると考えられた。

F. 研究発表(論文発表)

1. Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, Ukita M, Ikeda H, Iizuka H, Miyakawa Y, Mayumi M: Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatology* 10: 1-16, 1998
2. Okamoto H, Akahane Y, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. Fecal excretion of a non-enveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A - G hepatitis. *J Med Virol* 56:

128-132, 1998

3. Tanaka H, Okamoto H, Luengrojanakul P, Chainuvati T, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M: Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A to G hepatitis in hepatitis patients and healthy blood donors in Thailand. *J Med Virol* 56: 234-238, 1998
4. Fujiwara T, Iwata A, Iizuka H, Tanaka T, Okamoto H: Transfusion transmitted virus (letter). *Lancet* 352: 1310, 1998
5. 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
6. 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
7. 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-ransfusion non-A to G hepatitis in Japan. *J Virol Methods* 77: 199-206, 1999
8. 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
9. 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
10. 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
11. 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
12. 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
13. 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
14. 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
15. 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
16. Ishikawa T, Hamano Y, Okamoto H: Frequent detection of TT virus in throat swabs of pediatric patients. *Infection* 27: 298, 1999.
17. 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
18. 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* 270: 657-662, 2000.
19. 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* 74(11): 5161-5167, 2000
20. Ukita M, Okamoto H, Nishizawa T, Tawara A, Takahashi M, Iizuka H, Miyakawa Y, Mayumi M: The entire nucleotide sequences of two distinct TT virus (TTV) isolates (TJN01 and TJN02) remotely related to the original TTV isolates. *Arch Virol* 145 (8):1543-1559, 2000
21. Okamoto H, Takahashi M, Kato N, Fukuda M, Tawara A, Fukuda S, Tanaka T, Miyakawa Y,

- Mayumi M: Sequestration of TT virus of restricted genotypes in peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* 74(21):10236-10239, 2000
22. Okamoto H, Nishizawa T, Tawara A, Peng Y, Takahashi M, Kishimoto J, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M: Species-specific TT viruses in humans and nonhuman primates and their phylogenetic relatedness. *Virology* 277(2):368-378, 2000
23. Tawara A, Akahane Y, Takahashi M, Nishizawa T, Ishikawa T, Okamoto H: Transmission of human TT virus of genotype 1a to chimpanzees with fecal supernatant or serum from patients with acute TTV infection. *Biochem Biophys Res Commun* 278(2):470-476, 2000
24. Okamoto H, Nishizawa T, Tawara A, Takahashi M, Kishimoto J, Sai T, Sugai Y: TT virus mRNAs detected in the bone marrow cells from an infected individual. *Biochem Biophys Res Commun* 279(2):700-707, 2000
25. Itoh Y, Takahashi M, Fukuda M, Shibayama T, Ishikawa T, Tsuda F, Tanaka T, Nishizawa T, Okamoto H. Visualization of TT virus particles recovered from the sera and feces of infected humans. *Biochem Biophys Res Commun* 279(2):718-724, 2000
26. Tsuda F, Takahashi M, Nishizawa T, Akahane Y, Konishi K, Yoshizawa H, Okamoto H: IgM-class antibodies to TT virus (TTV) in patients with acute TTV infection. *Hepato Res* 19:1-11, 2001
27. Tokita H, Murai S, Kamitsukasa H, Yagura M, Harada H, Tawara A, Takahashi M, Okamoto H: Influence of TT virus on the clinical course of alcoholic liver disease. *Hepato Res* 19:180-193, 2001
28. Tokita H, Murai S, Kamitsukasa H, Yagura M, Harada H, Hebisawa A, Takahashi M, Okamoto H: Influence of TT virus on the histopathological features of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepato Res*, 2001, in press.
29. Tokita H, Murai S, Kamitsukasa H, Yagura M, Harada H, Hebisawa A, Takahashi M, Okamoto H: Influence of TT virus on the histopathological features of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepato Res*, 2001, in press
30. Tokita H, Murai S, Kamitsukasa H, Yagura M, Harada H, Takahashi M, Okamoto H: Influence of TT virus infection on the thrombocytopenia of patients with chronic liver disease. *Hepato Res*, 2001, in press
31. Shibayama T, Masuda G, Ajisawa A, Takahashi M, Nishizawa T, Tsuda F, Okamoto H: Inverse relationship between the titre of TT virus DNA and the CD4 cell count in patients infected with HIV. *AIDS*, 2001, in press

HCV 感染に於ける宿主因子に関する研究

班友 三代俊治 東芝病院研究部部長

はじめに

Hepatitis C virus (HCV) の感染により惹起される病態の全てをウイルス側因子のみで説明することは恐らく不可能である。全く同一のウイルス株に感染しても、感染個体が同一でない限り病態表現型に著しい差異の生じる可能性がある。本年度の研究で我々が宿主因子を探った動機はここにある。

自己抗体の出現に關与する宿主遺伝子

HCV 感染に伴って anti-LKM1 抗体の出現する例が散見される。帝京大學溝の口病院第四内科との共同研究に於いて我々は、C 型慢性肝炎患者を anti-LKM1 抗体の陰陽により二群に分ち、CYP2D6 (anti-LKM1 抗体の標的蛋白をコードする遺伝子) の遺伝子型を両群間で比較したところ、allele *1 の頻度は抗体陽性群の方が有意に高く (0.80 vs 0.43) , allele *10 のそれは逆の關係にあった (0.05 vs 0.39) 。 [参考文献 1].

IFN 治療感受性に關係する遺伝子

C 型慢性肝炎患者に於ける IFN 治療予後の最も優れた予測因子は viral load, 第二位は genotype であるとされている。しかし例えば viral load が低く且つ viral genotype が 2a であっても予測通りの著効を得ない例も少なからずある故に、宿主因子の介在を疑った。1970 年代に発見されたマウスの Mx 遺伝子は、インフルエンザウイルスに対する感染抵抗性を担う蛋白 (一種の GTPase) をコードするものであるが、その後の研究によりヒトにも相同の遺伝子 (MxA) が存在し、主に single-stranded negative-sense RNA をゲノムとして持つウイルスに対する生体防御に關わるものであることが判明した。また、MxA は IFN-inducible genes の一種であることも分かった。我々はヒト MxA 遺伝子プロモーター内部に single nucleotide polymorphism (SNP) を認め、マイナス 88 位の塩基が T である方が G である場合よりも in vitro での reporter gene expression 効率が高いという知見を得た。一方 in vivo でも、C 型慢性肝炎患者を IFN 治療有効群と無効群の二群に分けて比較するに、後者に有意に GG homozygosity rate が高いという結果を得た。この關係は HCV genotype が 1b であるか 2a 乃至 2b であるかを問わず不変であった。よって、MxA gene promoter SNP を調べることにより IFN 治療予後推測の精度を更に向上せしめ得るとの示唆を得た [参考文献 2].

文献

[1] Hijikata M, Miyakawa H, Matsushita M, Kako M, Ohta Y, Mishiro S. CYP2D6

polymorphism and the presence of anti-LKM-1 in patients with chronic hepatitis C. BBRC 2000; 270: 922-926.

[2] Hijikata M, Ohta Y, Mishiro S. Identification of a single nucleotide polymorphism in the MxA gene promoter (G/T at nt -88) correlated with the response of hepatitis C patients to interferon. Intervirology 2000; 43: 124-127.

付記：

倫理面の配慮について

書面によりインフォームドコンセントを取った上でサンプルを採取し遺伝子解析を行なった。データ公表に際しては unlinked anonymity (連結不可能匿名化) の原則を貫いた。

特許

MxA promoter SNP については特許化作業が進行中である。

輸血後肝炎の発生状況と TTV の関与について

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：ALP・AST・ALT・LDH・ γ -GTP の 5 項目で輸血後肝炎の追跡調査を行った。2000 年 1 月以降、輸血後 3 カ月間以上経過観察可能であった 106 例における肝炎発症は、1982 年 2 月改定の診断基準で確診 1 例 0.94%、1996 年 3 月設定の基準で 2 例 1.89%であった。輸血量は平均 6.0 本であった。2 例は非 B 非 C であり、ともに TT Virus (N22 プライマー) の感染があった。1 例は、 10^3 コピー/ml の 1 型 TTV DNA 陽性 MAP 2U が輸血されて発症した。輸血を介する TT Virus の感染率は genotype 1 型で 44.1%であり、その肝炎発症率は 6.7%であった。

A. 研究目的

2000 年 1 月以降における輸血後肝炎発生状況をモニターし、輸血を介する TT Virus の感染と肝炎発症への TT Virus の関与について検討した。

B. 研究方法

2000 年 1 月から 10 月までに、当院において輸血され、3 カ月間以上経過観察された 106 例を対象にした。輸血前に HBs 抗原・抗体及び HBe 抗体と HCV 抗体を測定し、ALP・AST・ALT・LDH・ γ -GTP の 5 項目で経過観察した。輸血後肝炎（以下 PTH）の診断は、1985 年 2 月改定のものとして 1996 年 3 月に設定されたものの両者の基準に従じた（厚生省肝炎研究連絡協議会）。

TTV DNA は N22 (Okamoto's) プライマーによりスクリーニングを行い、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学分子ウイルス研究部にて測定された）。

輸血を受けた全ての患者に対し、経過観察の必要性和受診日等を記載した検診カードを渡し、自発的な受診を促し、3 カ月間以上経過観察された症例を対象とした。

C. 研究結果

1. 輸血後肝炎の発生状況

2000 年 1 月から 10 月の間に輸血された 106 例の肝炎発症は、1985 年 2 月改定の診断基準で確診例が 1 例 0.94%であり、1996 年 3 月に設定された基準では 2 例 1.89%であった（表 1）。106 例の平均輸血量は 6.0 本である。

2. 2 例の輸血後肝炎と TT Virus との関連

1996 年設定の診断基準でのみ PTH と診断された Case 2242 は、輸血後 8 週目に ALT 74 IU/l の異常値を呈し、9~12 週の 3 週間にわたって ALT 110~147 IU/l の肝機能異常が続いた。TTV DNA は輸血前陰性で、12 週目・ALT 147 IU/l のピーク時に陽性であったことから、TTV の関与が示唆された。genotype は 2 型であった。

両診断基準で PTH と診断された case 2295 には genotype 1a 型の感染があった。症例は 81 歳の女性で、虚血性心疾患があり、強度の貧血のため MAP 3 本 6 U が輸血された。また、3 月 24 日の血糖値が 309 mg/dl であり、コントロール不良の糖尿病が基礎疾患としてあった。経過を図 1 に示した。輸血後 3 週目に ALT 208 IU/l の異常を示し、一旦 92 IU/l に軽減したが、4 週目に 141 IU/l、5 週目には 375 IU/l のピークを示し、8 週目 58 IU/l

と経過して、肝機能は正常に戻った。TTV DNA は輸血前陰性であり、ALT の上昇と共に陽性化し、 10^3 コピー/ml まで増加し、肝機能の正常化と共に陰性化した。genotype は 1a 型であった。

輸血された3本の donor 血のうち1本が TTV DNA 陽性であった。ウイルス量は 10^3 コピー/ml であり、genotype は 1a 型であった。

3. 輸血に伴う TT Virus の感染状況

2000年1月～9月までの間で TTV DNA の検索が出来た98例は、33例33.7%が輸血前 TTV DNA 陽性であった。陰性であった65例のうち34例について経過を検討した。34例のうち、TTV DNA が陽性化したのは22例64.7%であった。そのうち genotype 1 型であったものは15例であり、genotype 1 型に限っても44.1%の陽性化率であった(表2)。輸血量は、12例の非感染例が 3.67 ± 2.67 本であるのに対し、TTV (N22) 感染例22例は 7.26 ± 7.34 本、genotype 1 型感染の15例は 8.56 ± 8.48 本と有意に多かった。

D. 考察とまとめ

2000年(平成12年)には、1985年の診断基準で1例0.94%の確診例が、1996年の診断基準で2例1.89%の輸血後肝炎が発症した。2例はいずれも非B非C型であった。当院においては、PHAによるHCV抗体のスクリーニングが開始された1992年以降にはB型とC型の輸血後肝炎は発症していない。2例のうちの1例は、血清の保存が不十分で、TTV DNA の経過は明らかではないが、輸血前陰性

であり、肝機能異常のピーク時に陽性であったことからTTVの関与を疑った。他の1例にはdonor血と同一の1a型の感染がみられた。ALTの経過と並行してTTV DNAが陽性化し、増加して、ALTの正常化と共に陰性化したことから、輸血を介して、TT Virusが感染し、肝炎が発症したと考えられる。 10^3 コピー/mlの2単位400ml採血のMAPが輸血され発症したことから、MAPの血液量約260mlから考えて、 10^5 コピー前後にTT Virusの感染doseがあると推測される。

輸血対象患者のTTVキャリア率は33.7%と高い。平均年齢が65歳前後と高齢であることや輸血を受けるまでの医療行為などの水平感染の機会が多いことが推測される。

平均6本の輸血におけるTT Virus (N22) の感染率は64.7%であり、genotype 1 型に限っても44.1%と高いが、感染例の輸血量は、非感染例の平均3.7本に対し、7.3本あるいは8.6本と多い。

TTV (N22) の感染では22例中の2例9.1%に肝炎が発症した。genotype 1 型に限ってみた場合の発症率は6.7%(1/15例)であった(表2)。これまで、輸血対象者のキャリア率と感染率と輸血後肝炎発症率から推計した1型TT Virusの感染に伴う肝炎発症率5%¹⁾に近似した発症率であった。

文献

1) 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肝炎の予防、疫学に関する研究 平成11年度報告書81-83、2000

表1. 輸血後肝炎発症状況(2000年1月～10月)

追跡例 平均輸血量(6.0本)	PTH診断基準	
	1985年改定	1996年設定
106例	1例(0.94%)	2例(1.89%)
	case 2295	case 2242・2295

case 2242 : TTV genotype 2 の感染

case 2295 : TTV genotype 1a の感染

診断基準

1985年改定 : 輸血後1週間以後にALTの正常上限値の2倍以上の上昇が3週間以上にわたり、且つ一旦5倍を超える場合

1996年設定 : 輸血後2週間以降にALT 100 IU/L以上の肝機能異常が初発し、継続的に2週間以上に及んだ場合