

HBV の genotype と肝疾患との関連も示唆されている。HBV genotype C は他の遺伝子型と比較して肝疾患が重症であることや、genotype B では若年での肝臓癌の発生が高いこと (Kao et al. 2000)、さらに genotype C と比較して genotype B では HBeAg 陽性者が低いことが報告されている (Orito et al. 2000)。現在までに genotype G と肝病態を検討した詳細な報告はない。DDBJ/Genbank に登録された genotype G 株すべてに、preCore 領域の codon 2 に stop codon が認められ、HBeAg の分泌について genotype G 特異的な機構が備わっている可能性があるのかもしれない。現在のところ genotype G と肝疾患との関連は今だ不明瞭で今後の検討が待たれる。

HBV genotype G の core 領域には 36 塩基のヌクレオチドの挿入が認められる。HBV の個々の株において、そのゲノムに大きな遺伝子欠損や小さな遺伝子挿入の報告は認められるが (Gerken et al. 1991)、同一 genotype 内に共通して認められるこれ程大きな挿入はない。その発生の機序について、HBV genotype G に特異的に塩基の挿入が生じたのか、他の genotype において同部位の欠損が生じたのかは分からない。B 型

肝炎ウイルスはウイルス間でゲノムの recombination を生ずることが知られているが (Georgi-Geisberger et al. 1992)、我々の検索した限りでは HBV のゲノムなかにこの挿入塩基配列と高い相同性を示す領域は認めなかった。他のウイルスとの recombination か、また、ウイルス以外の遺伝子との recombination なのか、今後検討が必要である。

E. 結論

今回我々は、PCR 法にもとづいた HBV genotype G を特異的に検出する system を開発した。さらに、同法を用いて日本における HBV genotype G 感染の大規模な調査を行ったが genotype G は見い出されなかった。われわれの開発した方法を用いれば、HBV genotype G の同定が可能となり genotype G と肝疾患との関連、genotype G の地理的分布の検討などの研究に与える利益は多大であろうと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

Alignment of nucleotide sequence of X-preC/C region

	HBVHKF1	HBVHKF2	Pol stop
L13994 (A)	1519:ACGGGGGGCCACCTCTTTAC	CGGGCTCCCGCTGTGTGCCTTCTCATCTGCCGGTCCG	GGCACTTCCCTTCACCTCTGCGTTGCATGGAGACCACCGG
D23667 (B)	1519:.....G.....C.G.C..
D23684 (C)	1519:.....A.....C...G
L27106 (D)	1519:.....A.....C...TAT
X75657 (E)	1519:.....T.....C.A.
x75658 (F)	1519:.....A.....C.CTG..
AF160501 (G)	1519:.....T.....A...A.G.A...A...TC..TC
US15	1519:.....A.....A...A.G.A...A...TC..TC
US16	1519:.....T.....A...A.G.A...A...TC..TC
US17	1519:.....A.....A...A.G.A...A...TC..TC
US18	1519:.....T.....A...A.G.A...A...TC..TC

L13994 (A)	1636:TCCTGCCCAAGGCTTACATAAGAGGACTCTTGGACTCCCAAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGCCCTACTTCAAGACTGTGTGTTAAGGACTGGAGAGCTGGGGAGGAGATTA
D23667 (B)	1636:A.....G.....TT.....A.....T.G.....
D23684 (C)	1636:..T.....T.....T.....A.....T.....T.....
L27106 (D)	1636:..T.....T.....T.T.T.....A.....T.....T.....T.A.....
X75657 (E)	1636:AT.....A.CA.....A.....T.T.....A.....T.....A.....TC.....
x75658 (F)	1636:GTT.....A.CA.....A.....TT..G.CG.....T..TGGA.C.A.AA..A.....A..A.....C.....
AF160501 (G)	1636:AT.....A.G.CAG..T.....T.....GTTT.TT.....A...GGG.G...AAA...G.....T..GCT..G...A..AT.A..CA.T...TCC..
US15	1636:AT.....A.G.CAG..T.....GTTT.TT.....A...GGG.G...AAA...G.....T..GCT..G...A..AT.A..CA.T...TCC..
US16	1636:AT.....A.G.CAG..T.....GTTT.TT.....A...GGG.G...AAA...G.....T..GCT..G...A..AT.A..CA.T...TCC..
US17	1636:AT.....A.G.CAG..T.....GTTT.TT.....A...GGG.G...AAA...G.....T..GCT..G...A..AT.A..CA.T...TCC..
US18	1636:AT.....A.G.CAG..T.....GTTT.TT.....A...GGG.G...AAA...G.....T..GCT..G...A..AT.A..CA.T...TCC..

	preCore start X stop
L13994 (A)	1756:GGTTAAAGGCTGTGTATTAGGAGGCTGTAGGCATAAATGGTCTGCCACCAGCACCATTCCCACTTTTCACCTCTGCCAATCATCTCTGTACATGTCCCACTGTTCAAGCCTCCAA
D23667 (B)	1756:.....T.....TT.....G.....T.....T.....
D23684 (C)	1756:.....T.A..T...C.....TT.....A..T...T.....
L27106 (D)	1756:.....A...T.A.T.A.....TT.....G..T...T.....
X75657 (E)	1756:.....A.....T...C.....T.....T.....T.....
x75658 (F)	1756:.....T.....C.....TT.....T.....T.....
AF160501 (G)	1756:.....T.AC..T.....T.....T.....T.....T.....
US15	1756:.....T.AC..T.....T.....T.....T.....T.....
US16	1756:.....T.AC..T.....T.....T.....T.....T.....
US17	1756:.....T.AC..T.....T.....T.....T.....T.....
US18	1756:.....T.AC..T.....T.....T.....T.....T.....

	Core start 36 bp insert
L13994 (A)	1876:GCTGTGCCCTTGGGTGGCTTTGGGGCATTGGA-----CATTGACCCTTATAAAGAATTTGGAGCTACTGTGGAGTTACTCTCGTTTTTGGCC
D23667 (B)	1876:.....A.....G.....T..C...T.....
D23684 (C)	1876:.....A.....G.....T..C...T.....
L27106 (D)	1876:.....A.A.....C.....C.....
X75657 (E)	1876:.....A.....T.....A.GT...T.....
x75658 (F)	1876:.....A.....TAGAACAACTTTGCCATATGGCCTTTTTGGCTTAGA.....G.....
AF160501 (G)	1876:.....A.....TAGAACAACTTTGCCATATGGCCTTTTTGGCTTAGA.....G.....
US15	1876:.....A.....TAGAACAACTTTGCCATATGGCCTTTTTGGCTTAGA.....G.....
US16	1876:.....A.....TAGAACAACTTTGCCATATGGCCTTTTTGGCTTAGA.....G.....
US17	1876:.....A.....TAGAACAACTTTGCCATATGGCCTTTTTGGCTTAGA.....G.....
US18	1876:.....A.....TAGAACAACTTTGCCATATGGCCTTTTTGGCTTAGA.....G.....

	HBVHKR2
L13994 (A)	1960:TTCTGACTTCTTCCCTCCGTAAGAGATCTCCTAGACACCGCCCTCAGCTCTGTATCGAGAAGCCTTAGAGTCCGCCGAGCATTGCTCACCTCACCATATGCACTCAGGCCAAGCCATTCT
D23667 (B)	1960:.....G..G..GC...C.....T...TG.T.....G.....A..T..T..A.....C..A.....AT..C..
D23684 (C)	1960:.....TA.TC.....C.....T.....G..G.....T..G..A...T.....A.....T.....
L27106 (D)	1960:.....C.C.....T...T.....T..G.....T..T.....T.....A.....
X75657 (E)	1960:.....A.....T...T.....G..T.....T..T.....T.....C.....
x75658 (F)	1960:.....G..AA.CC...C..T..C.....G..T..G.....A..G..A...T..A.C..CA.T...C..T.....T...T..
AF160501 (G)	1960:.....T..C..G..T..TC.T...T..C.....T...T...C..G..T.....CT.T.T...T..G.....A.....A..C.....
US15	1960:.....T..C..G..T..TC.T...T..C.....T...T...C..G..T.....CT.T.T...T..G.....A.....A..C.....
US16	1960:.....T..C..G..T..TC.T...T..C.....T...T...C..G..T.....CT.T.T...T..G.....A.....A..C.....
US17	1960:.....T..C..G..T..TC.T...T..C.....T...T...C..G..T.....CT.T.T...T..G.....A.....A..C.....
US18	1960:.....T..CT.G..T..TC.T...T..C.....T...T...C..G..T.....CT.T.T...T..G.....A.....A..C.....

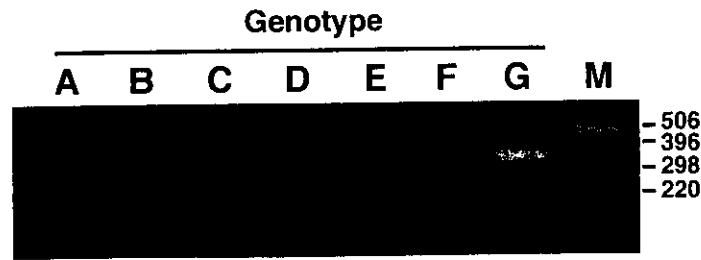
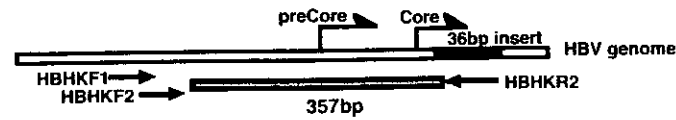


Fig.2 Detection of HBV of genotype G

Table I . Detection for HBV of genotype G in a panel of 144 sera of known genotypes

Genotype	No of Samples	Positivity of PCR	Country of Collected Sera
A	30	0	South Africa, Dominica
B	30	0	Japan
C	30	0	Japan
D	30	0	Uzbekistan, Mongolia
E	19	0	Cameroon
F	1	0	USA
G	4	4(100%)	USA

Table II . Clinical and virological characteristics of patients

No	540
Age (years, mean \pm SD)	43.2 \pm 14.3
Gender (M:F)	343:197
Diagnosis	
ASC	106
CH	252
LC	84
HCC	98
Biochemical Test	
T.Bil. (mg/dl, mean \pm SD)	0.93 \pm 1.36
ALT (IU/L, mean \pm SD)	75.8 \pm 92.4
ALP (IU/L, mean \pm SD)	260.3 \pm 163.3
γ -GTP (IU/L, mean \pm SD)	54.2 \pm 101.3
Positivity of HBeAg (%)	46.4
HBV DNA level (LGE/ml, mean \pm SD)	5.08 \pm 1.87
Genotype	
B	40
C	500
Positivity of HBV of Genotype G	0

Abbreviations: ASC, asymptomatic carrier; CH, chronic hepatitis; LC, liver cirrhosis; T.Bil., total bilirubin; ALT, alanine transaminase; ALP, alkaline phosphatase; γ -GTP, γ -glutamyl transferase; LGE, log genome equivalent

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

非A非B型肝炎の分子生物学的研究

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 非A非B型肝炎ウイルス HCV、HEV、及び TTV の遺伝子を種々の発現ベクターを用いて各種細胞で発現させた。その発現産物を用いた抗体検出系を作成したり、発現産物を用いてワクチンの開発を試みる。更に、発現産物を用いて各々のウイルスと宿主細胞の関連を調べることにより、これらのウイルスの病態を調べた。

A. 研究目的

HCV のエンベロープ抗原、HEV の中空粒子を形成し、予防ワクチンをつくる。

TTV の遺伝子発現を行い、ウイルスの性状解析、肝炎への関与を調べる。

B. 研究方法

HEV：組み換えバキュロウイルスを用いて作成した HEV 空粒子の粒子の解析を行い、本来の感染性粒子と抗原性を比較する。粒子形成のメカニズムを調べる。空粒子を抗原として抗体アッセイ系をつくる。更に、予防ワクチンの開発を行う。

HCV：E1 及び E2 を種々の発現系で発現させ、粒子をつくる。HCV の E1、E2 の合成、プロセシング、そして粒子形成における ER 膜上での存在様式を明らかにする。又、コア蛋白との相互作用、糖鎖の付加についての検討を行い、成熟粒子の形成のメカニズムを調べる。

TTV：TTV の ORF を種々の発現系で発現させ、その蛋白を用いて患者血清との反応を Western 法で調べることにより、肝炎との関わりを明らかにする。

（倫理面への配慮）

直接患者材料を出発材料とする場合や、患者の抗体検査をする場合は必ずインフォームドコンセントを得る。又、検査によって得られた情

報については、患者への人権に対して万全の配慮を行う。

C. 研究結果

(1) HEV の中空粒子を用いて抗原とし、HEV に対する抗体検出 ELISA を確立した。CDC の Mast らによって構築されていたパネル血清を用いて、IgM、IgG の陽性カットオフ値を決めた。IgM の上昇は肝炎の発症とはほぼ同時にみられ、それから急速に減退した。高力価の IgG 抗体は4年以上も持続した。日本の健常者における抗体陽性率には地域差（1.9～14.1%）があった。中国北部の黒竜江省においては、急性非A非B非C型肝炎患者の10.8%に抗E型IgM抗体が検出された。これに対し、韓国の肝炎患者から抗IgM抗体は検出されなかった。しかし信州大との共同研究で、近年の海外渡航歴のない患者にIgG、IgM抗体陽性例が見つかった。中空粒子をアジュバンドなしでマウスを免疫し、血中IgG抗体の誘導をみた。また、このマウスでは腸管IgA抗体も誘導された。

(2) HCV エンベロープ蛋白の小胞体残留シグナルを同定した。エンベロープ蛋白（E1、E2）を細胞表面に発現するキメラエンベロープを作製した。そのキメラエンベロープを恒常的に発現する細胞株を樹立した。この細胞株を用いて高感度なエンベロープによる

細胞融合アッセイ系を構築した。又、キメラエンベロープを持ったシールドタイプ VSV を作製した。

- (3) TTV の ORF1 蛋白の N 末端側を欠失させてバキュロウイルスベクターで発現、部分精製して TTV に対する IgG 抗体を検出する ELISA を構築した。

D. 考察

- (1) HEV の中空粒子を用いた抗体検出系を確立した。まず CDC で有しているパネル血清を用いて、その有用性を確認した。HEV 特異的 IgM、IgG 抗体の検出が可能となった。HEV にはいくつかの遺伝子型のあることが知られているが、ウイルスの増殖系がないので血清型を分けることができない。しかし、いままで調べた限りでは世界のいろいろなところで分離された HEV 株に対する抗体を検出し得る。日本には HEV は常在しないと考えられており、時に発生する E 型肝炎は常在国からの外国人か、常在国帰りの日本人に限られている。しかし健康日本人の IgG 抗体の分布を見ると、その抗体陽性率はいままで考えられた以上に高く、かつて HEV が予想した以上に広く浸淫していたことを示唆している。この抗体検出系を用いて、HEV の血清疫学を開始した。いずれも調査数が少なく、対象とした患者の解析も十分でないが、非 A 非 B 型 C 型肝炎患者の血中には抗 HEV 抗体を見出すことができる。HEV の中空粒子のワクチンとしての可能性は高い。アジュバントなしで経口投与しても、血中抗体と糞便中の IgA 抗体を誘導できた。食べるワクチンとしての可能性が考えられる。
- (2) HCV の E1、E2 は各々 N 末端側で結合する。HCV は CD81 だけではないレセプターを介して細胞に結合し、エンドサイトーシスにより侵入すると考えられた。この細胞融合活性を阻止したり、シールドタイプ VSV の感染を阻止する活性をみることによって、抗体のスクリーニングをすることができる。

- (3) TTV の ORF1 を発現させて得た蛋白は血中抗体と反応する。種々の肝疾患例について、肝機能、TTV DNA とあわせて、この抗体を経時的にモニターすることにより、TTV 感染と肝疾患の因果関係を明らかにする途がひらけた。

E. 結論

- (1) HEV については中空粒子を用いて抗体検出系を確立した。パネル血清を用いてその有用性と正当性を示し、血清疫学を開始した。我が国における E 型肝炎は、海外の常在国からの持ち込み例である。
- (2) HCV については産生された E1、E2 抗原を用いて粒子形成のモデルをつくった。また細胞表面に産生された E1、E2 抗原は、細胞の HCV レセプター探索の有力な手段である。
- (3) TTV については ORF1 の発現を試みており、蛋白の産生はみられたが、その意味付けや、これを用いた抗体検出系の正当性検討には未だ至っていない。

F. 健康危険情報

急性の非 A 非 B 非 C 型肝炎の原因因子として HEV が関わっている例が、少数例ではあるが認められた。しかし、その例はいずれも海外で感染し、我が国で発症したものであり、我が国における感染の広がり、臨床的には示されていない。

TTV については、輸血により肝炎を発症しているという直接的証拠は得ることができなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Utama, A., Shimizu, H., Morikawa, S., Hasebe, F., Morita, K., Igarashi, A., Hatsu, M., Takamizawa, K., and Miyamura, T. Identification and characterization of the RNA helicase activity of recombinant Japanese encephalitis virus NS3 protein.

- FEBS Letters 465, 74-78, 2000.
2. 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.* 127, 543-550, 2000.
 3. Kamei, A., Tamaki, S., Taniyama, H., Takamura, S., Nishimura, Y., Kagawa, Furuta, S-U., Kaito, M., Kim, G., Toda, M., Matsuura, Y., Miyamura, T., Adachi, Y., and Yasutomi, Y. Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by an intrahepatic inoculation with an expression plasmid. *Virology* 273, 120-126, 2000.
 4. Utama, A., Shimizu, H., Hasebe, F., Morita, K., Igarashi, A., Shoji, I., Matsuura, Y., Hatsu, M., Takamizawa, K., Hagiwara, A., and Miyamura, T. Role of the DexH motif of the Japanese encephalitis virus and hepatitis C virus NS3 proteins in the ATPase and RNA helicase activities. *Virology* 273, 316-324, 2000.
 5. Li, T. C., Shinzawa, H., Ishibashi, M., Sata, M., Mast, E. E., Miyamura, T., and Takeda, N. An empty virus-like particle- based enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to hepatitis E virus. *J. Med. Virol.* 62, 327-333, 2000.
 6. Aizaki, H., Saito, S., Ogino, T., Miyajima, N., Matsuura, Y., Miyamura, T., and Kohase, M. Suppression of interferon induced antiviral activity in cells expressing hepatitis C virus NS5A protein. *J IFN Research.* 20, 1111-1120, 2000.
 7. Tani, H., Ushijima, K., Miyamura, T. and Matsuura, Y. Characterization of cell surface determinants important for baculovirus infection. *Virology* 279, 343-353, 2001.
 8. Suzuki, R., Tamura, K., Li, J., Ishii, K., Matsuura, Y., Miyamura, T. and Suzuki, T. Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at its carboxy terminus. *Virology* 280, 301-309, 2001.
 9. Li, T. C., Takeda, N., and Miyamura, T. Oral administration of hepatitis E virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *Vaccine* (in press).
 10. Tanaka, E., Takeda, N., Li, T-C., Orii, K., Ichijo, T., Matsumoto, A., Yoshizawa, K., Iijima, T., Takayama, T., Miyamura, T., and Kiyosawa, K. Seroepidemiological study of hepatitis E virus infection in Japan using a newly developed antibody assay. *J. Gastroenterology* (in press).
2. 学会発表
省略
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
1. 特許取得
E型肝炎ウイルス遺伝子とその利用法
出願 平成9年2月28日
公開 平成10年9月8日
(特開平 10-234383)