

薬剤調整等の透析準備は別室で行う。

感染性廃棄物はベッドサイドで廃棄する。

⑧院内感染対策は

リスク管理の考え方を導入する。

リスクの記載分析対策のステップを踏む

リスクはコントロールできる！

しかしながら、リスクの減少のためにどれだけのお金がかけたら良いのか？、掛けなければならないのか？という質問に、「安全のためにお金を惜しんではいけない」という紋切り型の答えでは納得を得ることことはできない。「医療の質」への国民の高い要請に真摯にこたえるために医療関係者は厳しい試練に立たされている(17, 18)。

今後、基本的な感染予防策実施を徹底するとともに、それぞれの診療内容がどの程度感染の危険を持つ行為なのか、また特定の予防措置が新規感染の予防にどの程度役立つのか、前向き経時的(prospective、longitudinal)な研究が必要である。

F. 参考文献

- 1) 小高道夫 :わが国の慢性透析療法の現況 1989年12月31日現在 日本透析療法学会
- 2) 厚生省保険医療局・エイズ結核感染症課監修 :ウイルス肝炎感染対策ガイドライン—医療機関内—改定Ⅲ版、1995.
- 3) 秋葉 隆、川口良人、黒田満彦 他 :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
- 4) 平澤由平、後藤武男: 安全な透析医療を提供するための改善勧告 平成 11年6月22日
- 5) 秋葉 隆 透析医療における標準的な透析操作と院内感染予防に関するマニュアル 平成 11年度厚生省厚生科学特別研究事業 透析医療における感染症の実態把握と予防対策に関する研究班(注)
- 6) 秋葉隆、丸茂文昭、山崎親雄、関野宏、大平整爾、岸本武利、藤見惺、大澤源吾、Held Philip

欧州・米国・日本の血液透析患者におけるC型ウイルス肝炎感染の現況と解析— DOPPS 研究より 2001年5月27-29日 第44回日本腎臓学会学術総会 P-188 第44回日本腎臓学会学術総会プログラム 75頁、2001

7) 秋葉 隆: わが国の慢性透析療法の現況 2000年12月31日現在 日本透析療法学会、2001

8) Nakayama E, Akiba T, Marumo F, Sato C. : The prognosis of anti-HCV antibody-positive patients on regular hemodialysis therapy. J Am Soc Nephrology in press, 2000.

9) Bolyard, E. A., Tablan, O. C., Williams, W. W., et al.: Guideline for infection control in healthcare personnel, 1998. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. Infect. Control Hosp.Epidemiol. 19:407-463, 1998.:

10) Jimenez DA, Sanchez-Peya J. Standard precaution in haemodialysis - the gap between theory and practice. Nephrol Dial Transplant 14:823-825, 1999.

11) Tokars JI Miller E, Alter MJ et. al. : National surveillance of dialysis-associated diseases in the United States, 1997. (<http://www.cdc.gov>)

12) Garner JS, et al: Guideline for isolation precaution in hospital、Am J Infect Control 24:24-52 1996.(<http://www.cdc.gov/ncidod/hip/isolat/isolat>)

13) Recommendation for preventing transmission of infections among chronic hemodialysis patients. CDC MMW 50(RR-5), 2001. <http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/rr/rr5005.pdf>

14) CDC, : Protection against viral hepatitis recommendations of the immunization practices advisory committee (ACIP). MMWR 34:313-45, 1988.

15) Tanaka S. et. a.: A common-source outbreak of fulminant hepatitis B in hemodialysis patients induced by precore mutant. Kidney Int. 48:4972-1978, 1995.

16) CDC: Outbreaks of hepatitis B virus infection among hemodialysis patients -California, Nebraska, and Texas MMWR 45(14):285-9, 1996 (<http://www.cdc.gov/wonder/prevgid/m0040762/entire.htm>)

17) 秋葉 隆 他: 日本の慢性透析療法を行っている施設で院内感染防止の現況-院内感染防止に関するアンケート調査より 透析会誌 8(5):847-856,1995.

18) 浅野泰、秋葉隆、日台英雄 : 1 透析施設における劇症肝炎発生調査報告 透析会誌 25(5):843-845、1995

注: 平成11年度厚生省厚生科学特別研究事業
透析医療における感染症の実態把握と予防対策に関する研究班・日本透析医会感染対策委員会・日本透析医学会総務委員会合同会議の構成

血液透析療法における感染症の実態把握と予防対策に関する研究班

主任研究者 秋葉 隆 東京医科歯科大学(当時)
分担研究者 吉澤浩司 広島大学
分担研究者 佐藤千史 東京医科歯科大学
分担研究者 山崎親雄 増子記念病院
分担研究者 秋澤忠男 和歌山県立医科大学

日本透析医学会 総務委員会 感染対策小委員会

委員長 高橋 進 日本大学
委員 西沢良記 大阪市立大学
委員 岡田一義 日本大学
委員 久保和雄 東京女子医大
委員 黒田重臣 国立大蔵病院
委員 酒井 糾 北里大学
委員 田部井薫 自治医大大宮医療センター
委員 長瀬光昌 帝京大学
委員 丹羽利充 名古屋大学
委員 長谷川廣文 近畿大学

日本透析医会 危機管理委員会 感染対策委員会
委員長 秋葉 隆 東京医科歯科大学(当時)

副委員長 杉崎弘章 心施会府中腎クリニック
担当理事 秋澤忠男 和歌山県立医科大学
委員 安藤亮一 中野総合病院
委員 佐藤久光 増子記念病院
委員 杉田和代 昭和大学藤が丘病院
委員 内藤秀宗 甲南病院
委員 松金隆夫 東葛クリニック病院

G. 成果・出版物

- 1) 秋葉隆 透析医療における院内感染防止ブライドを持って治療の質向上を らうんじ 9:8,2000
- 2) 秋葉隆 透析と劇症肝炎 日本透析医会雑誌 15(1):20-26,2000
- 3) 秋葉隆 透析施設における院内感染と最近の動向 透析ケア 6(9):14-19, 2000
- 4) 秋葉隆 慢性腎不全の治療-保存期から移植まで- III透析期腎不全 5. 高齢透析患者の問題点 日本内科学会雑誌 89(7):103-108,2000
- 5) 安藤亮一、秋葉隆 透析療法と感染対策 感染と抗菌薬 Vol.3, No.3, P289-292, 2000.
- 6) 秋葉隆、山崎親雄、秋澤忠男、佐藤千史、吉沢浩司 血液透析療法における院内感染防止対策の現況 透析会誌 33(10):1303-1312, 2000.
- 7) 秋葉隆 透析医療 透析医学はどうしたら魅力的な領域であり続けるか? 透析フロンティア 10 巻 Suppl., P535, 2000
- 8) 川嶋朗、内藤順代、鈴木浩一、田中純子、小林英雄、湯村和子、秋葉隆、二瓶宏、腎不全に対する血液浄化療法 血液濾過法と類縁治療法 Biotherapy(0914-2223)15(1): 17-23、2001.
- 9) 秋葉隆、内藤秀宗 特集 減らぬ院内感染にどう対処するか 「患者さんのため」の労を惜しむな 2 割越す HCV 陽性率への対応が重要 らうんじ No,12(2) 2001,
- 10) 秋葉隆 透析室スタッフのための院内感染

予防マニュアル（スタッフ用簡易マニュアル、
無料配布） キッセイ薬品株式会社 2001.

11) 秋葉隆 透析医療の質の担保 臨床透析
vol.17, No.5, 525-526, 2001

12) 木全直樹 菊池賢 秋葉隆 重症感染症に
対する治療の実際 腎と透析 50(5): 689-694,
東京医学社, 2001.

13) 秋葉隆 21世紀 腎不全治療の展望－合
併症とその予防－ 東腎協 No.139:2-13, 7/25
号, 2001

連絡先: 〒 162-8666 東京都新宿区河田町 8-1

東京女子医科大学腎臓病総合医療センター

秋葉 隆 tel 03-5269-7354、 fax 03-5269-7516、

e-mail takiba@kc.twmu.ac.jp

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

透析医療機関における HCV 感染に関する調査成績

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

広島県下の9つの透析医療機関の協力の下に、血液透析患者集団における HCV 感染のウイルス・血清学的調査を実施した。

1999年11月から2001年8月に至る21カ月の調査期間内に、1回以上検査を行った2,275例中、HCV抗体陽性例は607例（26.7%）、HCVキャリアは318例（14.0%）であった。調査期間内に2回以上の検査が可能であり、かつ、初回検査時にHCV抗体が陰性であった1,668例の中から、10例（0.42/100人年）のHCVキャリアの新規発生をみた。

調査期間内に3回以上の検査が可能であった、HCVキャリア272例の血中コア抗原量を測定し、経時変化を観察した結果、40歳以上の年齢集団で変動する症例が目立ち、変動幅も大きくなる傾向が認められた。この傾向は、女性に比べて男性で目立つ傾向が認められた。

A. 研究目的

透析施設における HCV 感染の実態を把握し、感染予防対策の指針を構築することを目的とする。

B. 研究方法

(1) 対象

広島県下の9つ透析医療機関の協力の下に、1999年11月から2001年8月に至る21カ月の調査期間内に、1回以上検査を行った2,275例（男性1,341例、女性934例、年齢62.0±13.1歳）を対象とした。

血中コア抗原量の測定は、調査期間内に3回以上の検査が可能であった、HCVキャリア272例（男性176例、女性96例、年齢62.0±10.4歳）を対象とした。

(2) 方法

HCV抗体の測定は、HCV PHA法により、また、HCV RNAの検出は、RT-nested PCR

法により行った。血中コア抗原量の定量は、オーソ社製のELISA法にて行った。

C. 結果と考察

(1) HCV抗体陽性率およびHCVキャリア率

各調査時点における、HCV抗体陽性率およびHCVキャリア率を表-1に示す。

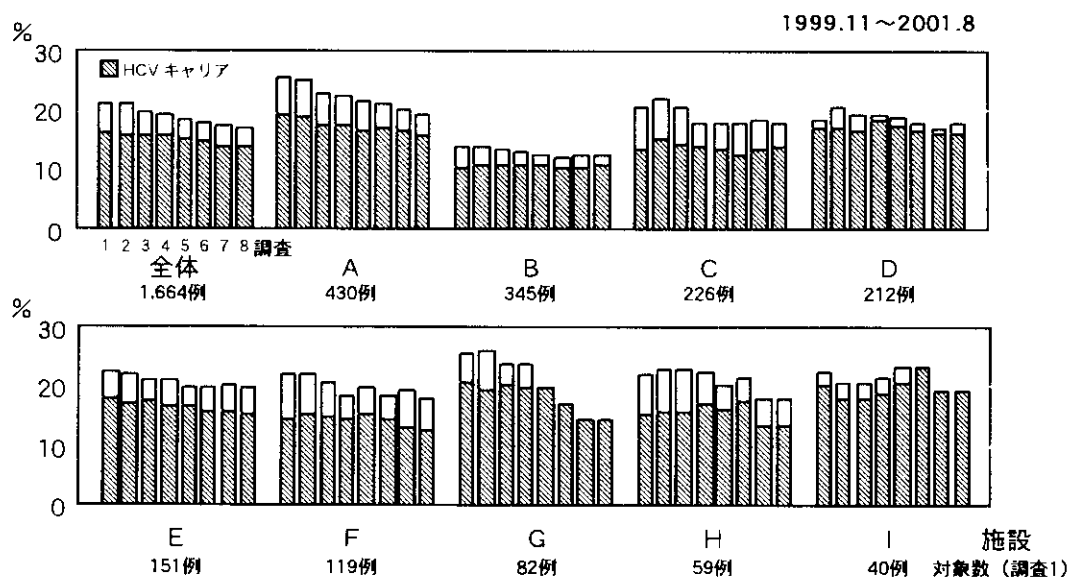
HCV抗体陽性率は、いずれの調査時点においても20%前後で、キャリア率は、15%前後であった。この成績は、日本透析医学会の調査による全国平均値とほぼ同じ値を示している¹⁾。男女別にみると、男性では女性に比べて、HCV抗体陽性率・キャリア率とも、高い傾向が認められた。

施設別にみたHCV抗体陽性率およびキャリア率を図-1に示す。HCV抗体陽性率およびキャリア率は、施設（グラフ中A～D）間で、大きな差は認められなかった。

表-1 各調査時点におけるHCV抗体陽性率
およびHCVキャリア率

調査	対象数	HCV抗体 陽性者 (%)	HCV キャリア率(%)	男			女		
				対象数	HCV抗体 陽性者 (%)	HCV キャリア率(%)	対象数	HCV抗体 陽性者 (%)	HCV キャリア率(%)
1	1,664	347 (20.9)	264 (15.9)	987	213(21.6)	167 (16.9)	677	134(19.8)	97 (14.3)
2	1,677	354 (21.1)	265 (15.8)	991	219(22.1)	169 (17.1)	686	135(19.7)	96 (14.0)
3	1,712	336 (19.6)	265 (15.5)	1,017	209(20.6)	168 (16.5)	695	127(18.3)	97 (14.0)
4	1,736	330 (19.0)	268 (15.4)	1,026	208(20.3)	171 (16.7)	710	122(17.2)	97 (13.7)
5	1,775	325 (18.3)	269 (15.2)	1,042	201(19.3)	168 (16.1)	733	124(16.9)	101 (13.8)
6	1,808	323 (17.9)	268 (14.8)	1,069	206(19.3)	172 (16.1)	739	117(15.8)	96 (13.0)
7	1,820	317 (17.4)	259 (14.2)	1,079	204(18.9)	166 (15.4)	741	113(15.2)	93 (12.6)
8	1,758	300 (17.1)	248 (14.1)	1,045	195(18.7)	159 (15.2)	713	105(14.7)	89 (12.5)

図-1 施設別にみた
HCV抗体陽性率およびキャリア率



(2) HCV キャリアの新規発生率
対象患者数 2,275 例中、2回以上の調査が可能であったのは 2,081 例で、このうち調査開始時の HCV 抗体が陰性であったのは 1,668 例であった。調査期間内における新規感染者は 10 例で、その後の経過観察により、全例キャリア化が確認された。人年法で計算すると、HCV

キャリアの新規発生率は、100 人年あたり 0.42 であった (図-2)。

図-2

調査期間中における
HCVキャリア新規発生率

1999.11- 2001.8

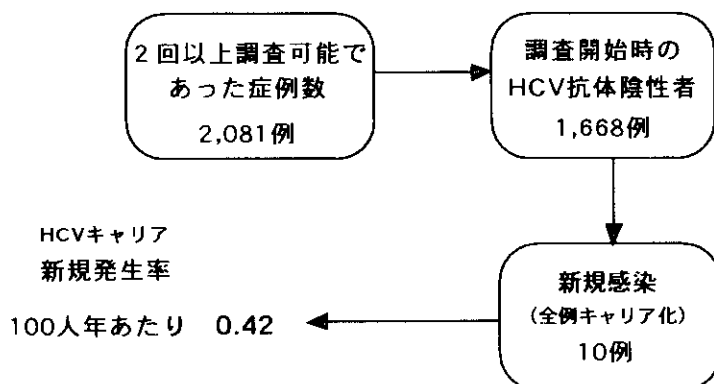


表-2に、新規感染例のHCV抗体価の変動を示す。HCV抗体が陽転した10例は、最終的には抗体価は、全て上昇していた。また、ほとんどの例で、抗体が陽転する前の時点からすでにHCV RNAが検出されていた。これは感染初期、すなわちウィンドウ期に相当する時期が捉えられていると考えられる。

この結果は、これまで「免疫能の低下により、HCV抗体陰性または抗体価の十分な上昇を認めないキャリア状態にある」と解釈されてい

た透析患者の多くは、ウィンドウ期または感染初期の状態にあったことを示していると考えられた。

一方、この10例の他に、新規感染が疑われながらも抗体価の十分な上昇を認めない2例がみいだされており(表-3)、これらの2例は非定型的なキャリアの可能性もあることから、さらに経過観察をおこなう必要があると考えられた。

表-2

新規感染例の
HCV抗体価の変動

調査	1	2	3	4	5	6	7	8
	1999.11	2000.2	2000.5	2000.8	2000.11	2001.2	2001.5	2001.8
年齢 性	HCV	HCV	HCV	HCV	HCV	HCV	HCV	HCV
	抗体 RNA 2 ^N	抗体 RNA 2 ^N	抗体 RNA 2 ^N	抗体 RNA 2 ^N	抗体 RNA 2 ^N	抗体 RNA 2 ^N	抗体 RNA 2 ^N	抗体 RNA 2 ^N
1. 77 M	- +	8 +	10 +	11 +	11 +	12 +	11 +	11 +
2. 58 F	- -	5 +	13↑ +	13↑ +	13↑ +	13↑ +	13↑ +	13↑ +
3. 35 M	- +	採血無し	13↑ +	13↑ +	13↑ +	13↑ +	13↑ +	13↑ +
4. 79 M	1 +	10 +	13 +	13↑ +	採血無し	13↑ +	13↑ +	13↑ +
5. 70 F	- +	11 +	11 +	13↑ +	13↑ +	13↑ +	12 +	採血無し
6. 92 F	- +	8 +	死亡					
7. 70 M	- -	- -	- +	11 +	11 +	11 +	11 +	13↑ +
8. 42 M	- -	- -	- -	- +	11 +	13↑ +	13↑ +	13↑ +
9. 60 M	- -	- -	- -	- -	9 +	13↑ +	13↑ +	13↑ +
10. 49 M	- -	- -	- -	- -	- -	- -	4 +	11 +

表-3

新規感染が疑われた
2例の経過

調査	1 1999.11	2 2000.2	3 2000.5	4 2000.8	5 2000.11	6 2001.2	7 2001.5	8 2001.8
年齢性	HCV 抗体 RNA 2 ^N	HCV 抗体 RNA 2 ^N	HCV 抗体 RNA 2 ^N	HCV 抗体 RNA 2 ^N	HCV 抗体 RNA 2 ^N	HCV 抗体 RNA 2 ^N	HCV 抗体 RNA 2 ^N	HCV 抗体 RNA 2 ^N
1. 71 M	— —	— —	— —	— +	— —	— +	— +	2 +
2. 55 M	— —	— —	— —	— —	— —	— +	採血なし	採血なし

(3) HCV キャリアの血中コア抗原量

図-3に、対象とした272例全例の血中コア抗原量の変動を示す。経過観察期間内に、約16%の例で変動が認められた。

これを男女別にみると、女性に比べて男性の方が、血中コア抗原量の変動する症例が目立ち、また、高い値を示す症例数も多く認められる傾向にあった(図-4)。

次に、男性について、年齢別にみると、40歳~69歳の年齢集団で、変動する症例が目立ち、高い値を示す症例も認められた(図-5)。

一方、女性でも、その傾向は男性と同様であるが、変動の頻度も値も男性に比べて、低い傾向がみられた(図-6)。

図-3 調査期間中のHCV core 抗原量の変動

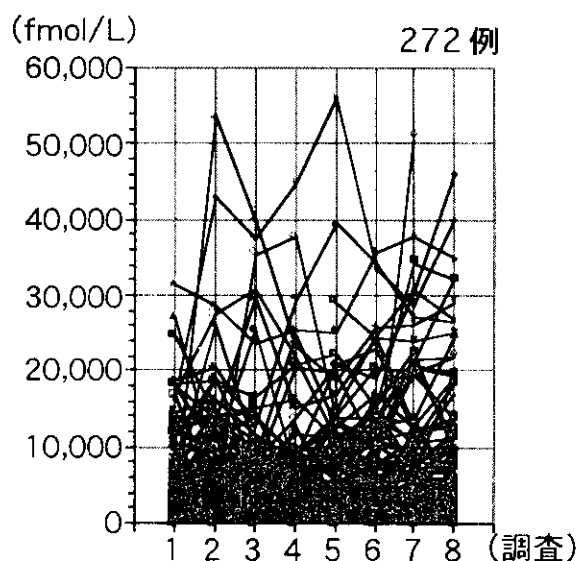


図-4 調査期間中のHCV core 抗原量の変動

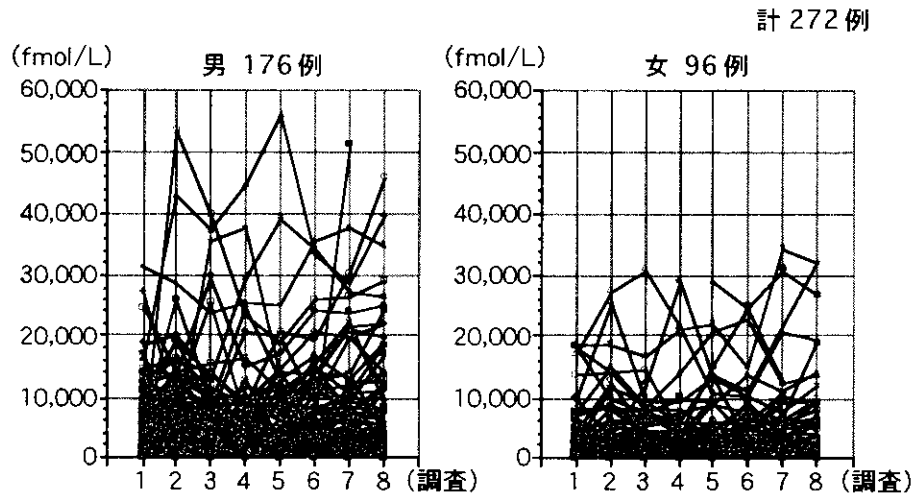


図-5 年齢別にみたHCV core 抗原量の変動

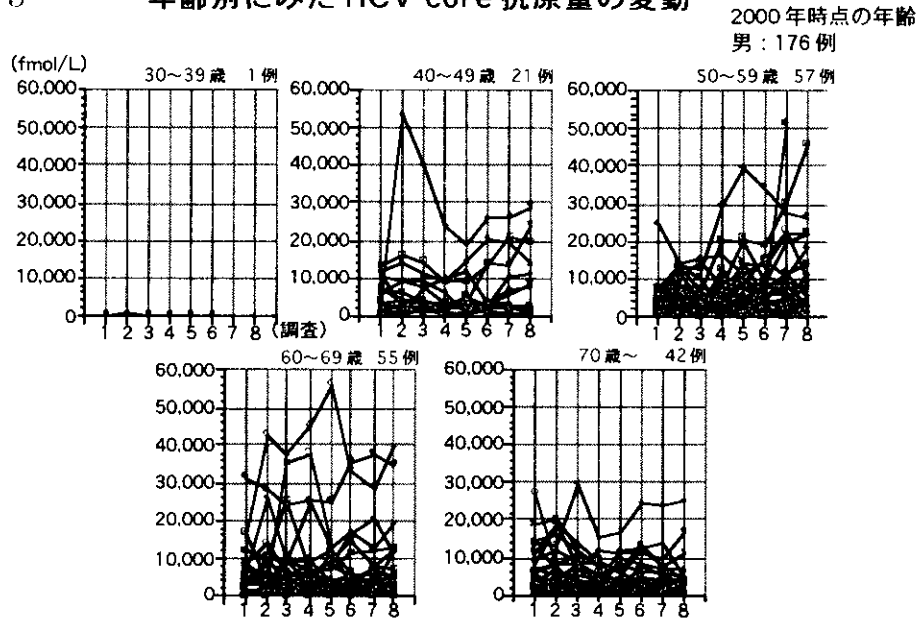
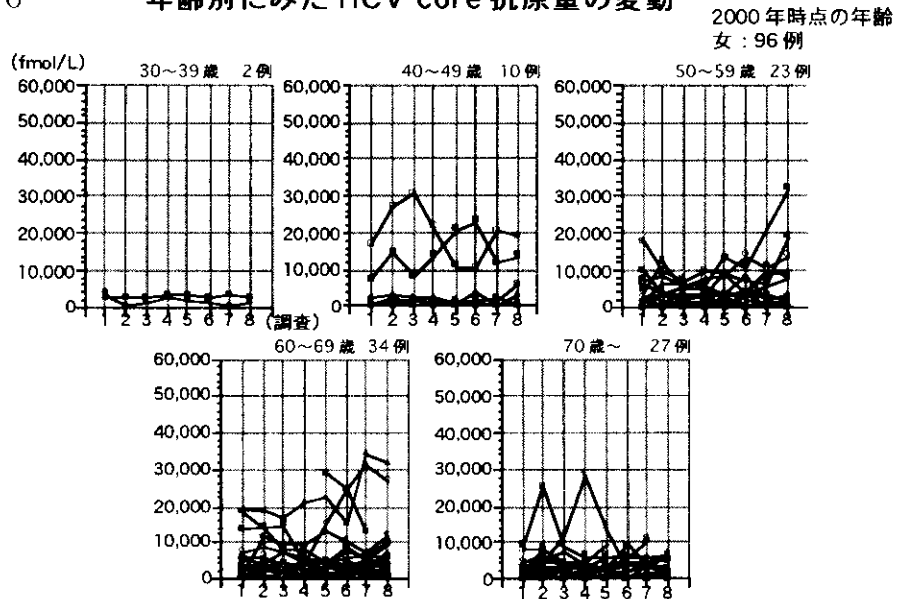


図-6 年齢別にみたHCV core 抗原量の変動



D. 結論

今回の調査により、血液透析患者集団におけるHCVキャリア率は14.0%にのぼり、透析施設では、現在もなお新規感染例が存在する(0.42/100人年)ことが明らかとなった。

また、新規感染例の経過観察により、これまで「免疫能の低下により、HCV抗体陰性または抗体価の十分な上昇を認めないキャリア状態にある」と解釈されていた透析患者の多くは、ウインドウ期または感染初期の状態にあったことが示された。

更に、HCVキャリアの血中コア抗原量は、40歳以上の年齢集団の、特に男性で、変動する例が目立つことが明らかとなった。

E. 参考文献

1) 日本透析医学会：わが国の慢性透析療法の現況. 1999.

F. 知的財産権の出願・登録

なし

厚生科学研究費補助金（疫学研究事業）
分担研究報告書

B 型肝炎ウイルス G 型に関する研究

分担研究者 溝上 雅史 名古屋市立大学大学院 臨床分子情報医学 教授
研究協力者 加藤 秀章、菅内 文中、田中 靖人、折戸 悦朗

研究要旨

近年 7 番目の遺伝子型として報告された G 型 (HBV/G) は、core 領域に 36 塩基の遺伝子挿入を有するなど特徴的なゲノム構造を有する。また、precore 領域に停止コドンを有する precore mutant である HBV/G 陽性血清中に HBeAg の検出される例があることが報告され、我々の検討においても同様の現象が認められた。感染クローンの検討によりそれらの血清中には HBV/G に precore wild である HBV/A の共感染が認められ、HBV/G 血清中に認められた HBeAg は precore wild である HBV/A によるものと考えられた。さらに、HBV/G と HBV/A の共感染時にはゲノムの recombination が高頻度に認められた。HBV/G に認められた新たな知見について報告する。

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス (HBV) は、A から G の 7 つの遺伝子型に分類され、その分布の地域特異性および肝病態との関連が示唆されている。2000 年に新たに報告された G 型 (HBV/G) (Stuyver et al., J Gen Virol, 2000) は、フランスとアメリカの B 型肝炎患者の 11% に認められると報告された。また、HBV/G は他の遺伝子型と比較して特徴的なウイルス像および臨床像を呈することが報告されたが、その詳細については不明である。本研究の目的は、この新たに報告された HBV/G のウイルス学的特徴を明確にするとともに、特異な臨床像についてその機序をあきらかとした。

B. 研究方法

サンフランシスコにて B 型肝炎患者からインフォームドコンセントの後に採取された血清 165 例を用い HBV/G 特異的 PCR 法 (Kato et al., J Virol Methods, 2001) を用いて、HBV/G 陽性血清を同定した。8 例が HBV/G 陽性であり、それらについてダイレクトシーケンス法を用いて全塩基配列を決定し、分子進化学的な検討を行うとともに、各 Open Reading Frame (ORF) の特徴をあきらかとした。

さらに、HBV ゲノムの precore から core 領域のサブクローニングをおこない感染クローンについての検討を行った。

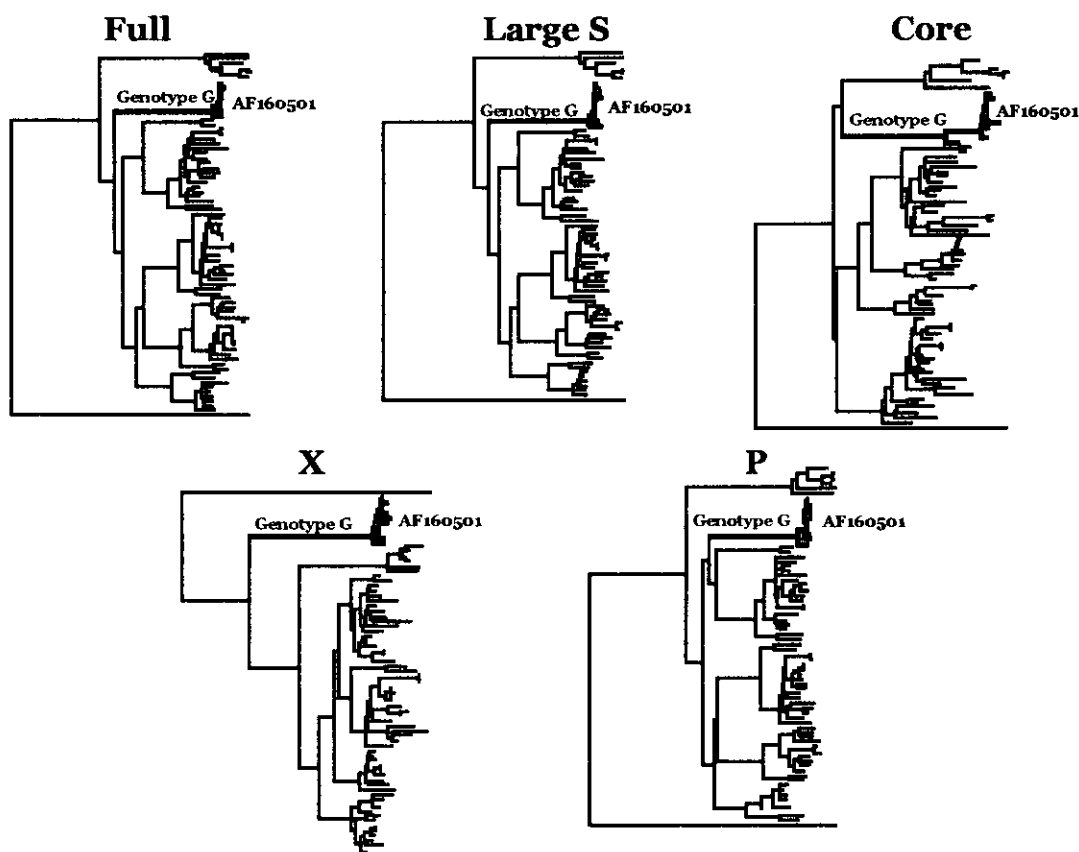


Figure 1. 全塩基配列および各 ORF ごとに作成した分子系統樹

C. 研究結果

1) HBV/G の全塩基配列の決定と各 ORF ごとの分子系統樹の作成 (Figure 1)

今回同定された 8 strains は Stuyver らにより報告された HBV/G strain AF160501 と全塩基配列および各 ORF についてクラスターを形成した。

2) ORF の検討

全塩基配列は、Stuyver らの報告と同様に 3248 塩基と HBV 遺伝子型のなかで最も大きく、preS1 領域は 118 アミノ酸 (aa) で他の遺伝子型と比較して 1aa 短く、また、core 領域に 12aa の挿入を認めた (Figure 2) .

3) HBV/G における共感染と HBeAg

Stuyver らの報告した AF160501 は、precore 領域の codon 2 と codon 28 に停止コドンをもつ (precore mutant) ことが記されている。また、その論文の中で他の HBV/G strain も precore mutant であるが、その血清中に HBeAg の検出される例があることが記されている。今回我々が同定した 8 strains も全例 precore mutant であったのにも関わらずその血清中に HBeAg が検出された (Table) . そこで我々は、この precore 塩基配列と HBeAg 検出との矛盾について検討する

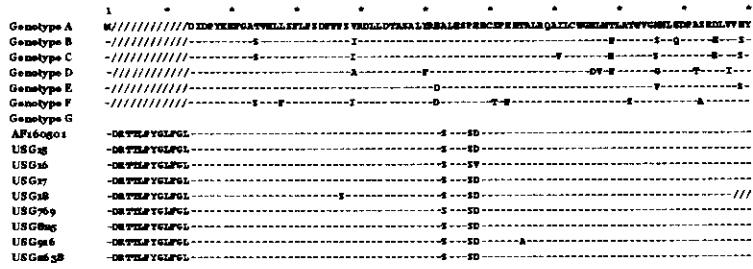


Figure 2. 各遺伝子型の Core 領域のアミノ酸配列

ために、HBV ゲノムの precore から core 領域のサブクローニングを行い各クローンの塩基配列を解析した.患者 1 におけるクローニングでは、血清中に 2 種類のクローンが検出された. ひとつは、core 領域に 36 塩基の挿入を有し、precore mutant である HBV/G と core 領域に 36 塩基の挿入を有さず precore wild である HBV/A であった. また、患者 3 においては 1 年 7 ヶ月の経過観察中に HBeAg から anti-HBe

陽性期の血清では、precore mutant の HBV/G と precore wild の HBV/A の両者が検出されたが (Figure 3a)、anti-HBe 陽性期の血清では、precore mutant の HBV/G だけが検出された (Figure 3b). すなわち、患者 3 においては感染クローンの population が HBV/A 優位であったものが HBV/G に置き換わることにより HBeAg から anti-HBe へ seroconversion を来たしたと考えられた.

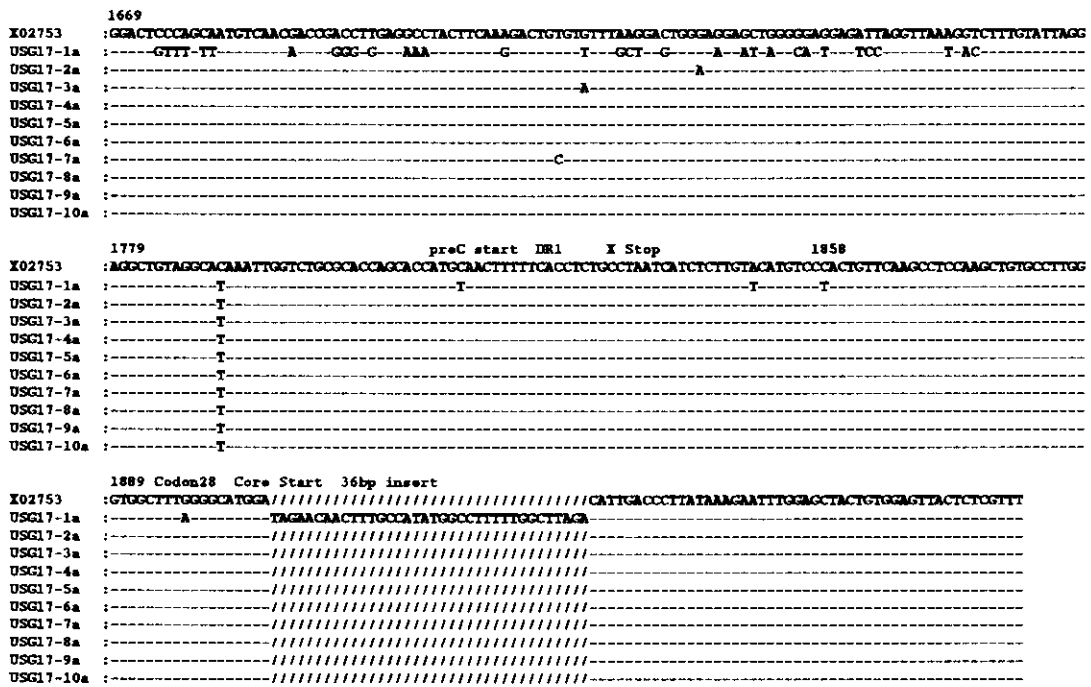


Figure 3a. HBeAg 陽性期における precore/core 領域におけるクローニング

```

1669
X02763 :GGACTCCCGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCCTACTTCAAGACTGTGAGTTTAAAGACTGGGAGGACTGGGGGGAGATTAGGTTAAAGTCTTTGATATAG
AF160501 :-----GTTT-TT-----A---GGG-G---AAA-----G-----T---GCT--G---A---AT-A---CA-T---TCC---T-AC-----
USG17-1b :-----GTTT-TT-----A---GGG-G---AAA-----G-----T---GCT--G---A---AT-A---CA-T---TCC---T-AC-----
USG17-2b :-----GTTT-TT-----A---GGG-G---AAA-----G-----T---GCT--G---A---AT-A---CA-T---TCC---T-AC-----
USG17-3b :-----GTTT-TT-----A---GGG-G---AAA-----G-----T---GCT--G---A---AT-A---CA-T---TCC---T-AC-----
USG17-4b :-----GTTT-TT-----A---GGG-G---AAA-----G-----T---GCT--G---A---AT-A---CA-T---TCC---T-AC-----
USG17-5b :-----GTTT-TT-----A---GGG-G---AAA-----G-----T---GCT--G---A---AT-A---CA-T---TCC---T-AC-----
USG17-6b :-----GTTT-TT-----A---GGG-G---AAA-----G-----T---GCT--G---A---AT-A---CA-T---TCC---T-AC---A-----
USG17-7b :-----GTTT-TT-----A---GGG-G---AAA-----G-----T---GCT--G---A---AT-A---CA-T---TCC---T-AC---A-----
USG17-8b :-----GTTT-TT-----A---GGG-G---AAA-----G-----T---GCT--G---A---AT-A---CA-T---TCC---T-AC---A-----
USG17-9b :-----GTTT-TT-----A---GGG-G---AAA-----G-----T---GCT--GC---A---AT-A---CA-T---TCC---T-AC-----
USG17-10b :-----GTTT-TT-----A---GGG-G---AAA-----G-----T---GCT--G---A---AT-A---CA-T---TCC---T-AC-----

1779                                preC start                                X stop                                1858
X02763 :AGGCTGTAGGACACAAATGTGCTGGCCACCAACCAATGCACACTTTTCCACCCTGCGCTATATCATCTCTTGTACATGTGCCACTGTTCAAGCCTCCAGCTGTGCCTTGG
AF160501 :-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----
USG17-1b :-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----
USG17-2b :-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----
USG17-3b :-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----
USG17-4b :-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----
USG17-5b :-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----
USG17-6b :-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----
USG17-7b :-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----
USG17-8b :-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----
USG17-9b :-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----
USG17-10b :-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----

1889 Codon28 Core start 36bp insert
X02763 :GTGGCTTGGGGCGCTGGA//////////CATGTGACCTTATAAAGATTGGAGCTACTGTGGAGTTACTCTCGTTT
AF160501 :-----A-----TAGACAACTTTGCCATATGCCCTTTTGGCTTAGA-----G-----
USG17-1b :-----A-----TAGACAACTTTGCCATATGCCCTTTTGGCTTAGA-----G-----
USG17-2b :-----A---G---TAGACAACTTTGCCATATGCCCTTTTGGCTTAGA-----G-----
USG17-3b :-----A-----TAGACAACTTTGCCATATGCCCTTTTGGCTTAGA-----G-----
USG17-4b :-----A-----TAGACAACTTTGCCATATGCCCTTTTGGCTTAGA-----G-----
USG17-5b :-----A-----TAGACAACTTTGCCATATGCCCTTTTGGCTTAGA-----G-----
USG17-6b :-----A-----TAGACAACTTTGCCATATGCCCTTTTGGCTTAGA-----G-----
USG17-7b :-----A-----TAGACAACTTTGCCATATGCCCTTTTGGCTTAGA-----G-----
USG17-8b :-----A-----TAGACAACTTTGCCATATGCCCTTTTGGCTTAGA-----G-----
USG17-9b :-----A-----TAGACAACTTTGCCATATGCCCTTTTGGCTTAGA-----G-----
USG17-10b :-----A-----TAGACAACTTTGCCATATGCCCTTTTGGCTTAGA-----G-----

```

Figure 3b. HBeAg 陰性期における precore/core 領域におけるクローニング

また、HBe 抗原陽性であった他の HBV/G 陽性血清においても同様に HBV/A の共感染が認められた。

Table. HBV/Gにおけるprecore塩基配列とHBeAg

Patient	HBsAg		preS2	HBeAg	PreC sequence	
	Serotype	Serotype		(O.D.)	Codon 2	Codon 28
1	adv	bksu(g)		+ (>7.0)	TAA	TAG
2	adv	bksu(g)		+ (>7.0)	TAA	TAG
3a	adv	bksu(g)		+ (>7.0)	TAA	TAG
3b	adv	bksu(g)		-(0.003)*	TAA	TAG
4	adv	bksu(g)		+ (>7.0)	TAA	TAG
5	adv	bksu(g)		+ (>7.0)	TAA	TAG
6	adv	bksu(g)		+ (>7.0)	TAA	TAG
7	adv	bksu(g)		+ (>7.0)	TAA	TAG
8	adv	bksu(g)		+ (>7.0)	TAA	TAG

*Anti-HBe (+)

の両者の塩基配列を有する recombinant が認められた。この知見を確認するために同患者において preS 領域のサブクローニングを行った。Precore 領域での検討と同様に HBV/G クローンと HBV/A クローンの他に HBV/G と HBV/A の両者の遺伝子配列を有する recombinant が認められた。HBV/G と HBV/A の共感染の際にはゲノムの recombination が高頻度に生ずることがあきらかとなった。

4) HBV/G と HBV/A の共感染とゲノムの recombination
 HBV/G と HBV/A の共感染が認められた患者 1 の血清中には、HBV/G と HBV/A

D. 考察および結論
 今回同定された HBV/G は Stuyver らの報告と同様に core 領域に特徴的な 36 塩基の遺伝子挿入を有し、このことは

厚生科学研究費補助金（疫学研究事業）
分担研究報告書

日米における HCV の拡散時期の違い

分担研究者 溝上 雅史 名古屋市立大学大学院 臨床分子情報医学 教授
研究協力者 田中 靖人、花田幸作、Shih IWK, Alter HJ、五條堀孝

研究要旨

日米における肝細胞癌の頻度の違いの一因として、我々は以前より感染時期の違いを唱えてきた。従来解析では不十分であり、今回我々は日米の C 型肝炎ウイルス (HCV) 株の相違を明らかにするために、アメリカ NIH の Dr. Alter HJ の協力を得て長期経過観察 (10 年以上) されているシリーズ血清を用い、日米における HCV の遺伝子レベルでの特徴及び進化速度、拡散時期を比較検討したので報告する。

A. 研究目的

日米における肝細胞癌の頻度の違いとして、環境因子やヒト遺伝子の相違の他に我々は以前より感染時期の違いを唱えてきた。すでに我々も含めて複数の施設より HCV の進化速度は報告されているが、いずれも比較した期間、領域が不十分であり、これを補うために、アメリカ及び日本における長期経過観察 (10 年以上) されている HCV 患者のシリーズ血清を用い、HCV の分子時計さらには日米における分岐時期や拡散時期を推定することを目的とした。

B. 研究方法

アメリカ NIH にて C 型肝炎患者 10 人から書面上でのインフォームドコンセントの後に採取されたシリーズ血清 36 サンプルを主に用い解析を行った。HCV core, E1, E2, NS5B 領域の PCR、シーケンスを決

定し、分子進化学的な検討を行った。解析には、複数の方法を用いて系統樹を作成し、遺伝子距離を基に **regression analysis** を行い、HCV の分子時計を求めた。さらに利用可能であったデータも加え系統樹を再度作成し、この分子時計を用いて、日米の HCV 分岐時期さらには臨床に関連すると思われる拡散時期に関して解析を行った。

C. 研究結果

HCV genotype 1a のアメリカ株及び genotype 1b の日本株のシーケンス結果を基に、近隣結合法にて系統樹を作成した (Fig. 1)。同一個体内においてはそれぞれ独立した cluster を形成し (左図)、さらにアメリカの genotype 1a、日本の genotype 1b グループはそれぞれ異なる先祖 (丸印) より分岐していることが示された。 (右図)。これらの系統樹をもとに、

横軸にサンプル採取年、縦軸に推定される先祖配列からの遺伝的距離をとり、regression analysis を行った (Fig. 2)。その傾きが進化速度と定義され、個人における進化速度すなわち分子時計は統計学的に有意に成立した (左図)。さらに解析可能な HCV genotype 1a のアメリカ株を用いて同様の regression analysis を行ったところ、平均の分子時計も有意に成立し、HCV アメリカ株の先祖の分岐時期は 1910 年頃と推測された。同様の解析を日本株においても行った所 1880 年頃と推定され、

日本ではアメリカより早い時期に HCV が持ち込まれた事が証明された。

さらに我々は、日米における HCV の拡散時期を推定するために effective population size の解析をウイルス進化に応用した。すなわち、前述した日米の系統樹を基にして解析を行い、日米における HCV 感染数の増加を相対的に比較検討した。アメリカにおける HCV の増加は 1960 年代に始まり、日本と比較して少なくとも 30 年は遅いことが示された (Fig. 3)。

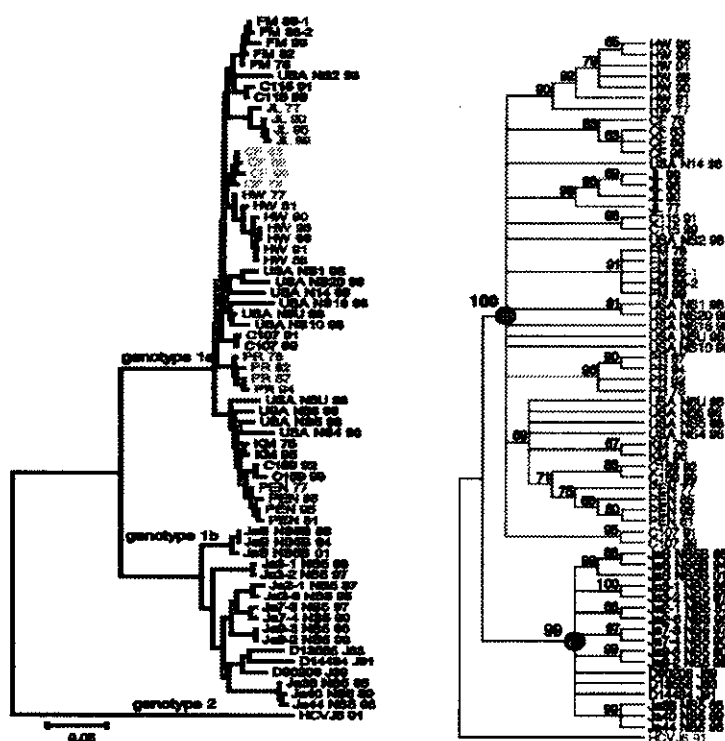


Figure 1. 近隣結合法にて作成した分子系統樹。丸印は genotype 1a (アメリカ) と genotype 1b (日本) の分岐時期。配列名の末尾は分離年を表し、図中の数字は bootstrap 値を示す。

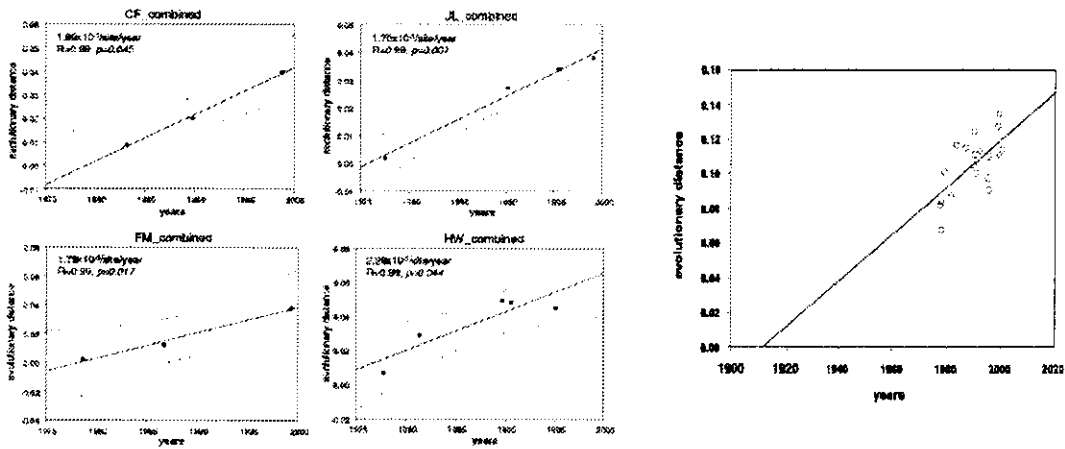


Figure 2. 遺伝子距離を用いた regression analysis。個人における分子時計(左)とすべてのアメリカ株を用いた平均の分子時計および推測される分岐時間(右)。

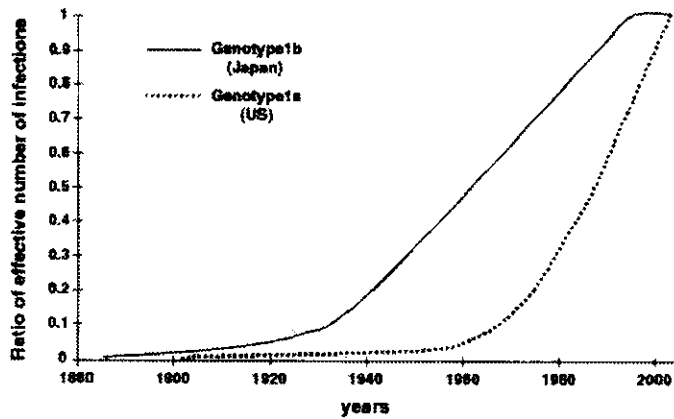


Figure 3. 日米における相対的 HCV 感染者数の推移 (Effective population size)

D. 考察および結論

現時点における日米の肝細胞癌患者の頻度の違いを単純に感染時期の違いと考え、我々の解析結果より、今後 20-30 年でアメリカにおける肝細胞癌患者は急増することが推測される。しかし、感染時期以外の因子に関して今後の検討が待たれる。

E. 研究発表

- 1) Tanaka Y. *et al.* Timing the Ancestry of Hepatitis C Virus Genotype 1a Strains in the United States. 52nd AASLD, Dallas, 2001.
- 2) Tanaka Y. *et al.* Search for the Ancestry of Hepatitis C Virus Genotype 1a Strains in the United States and Genotype 1b Strains in Japan by Molecular Clocking. Submitting, 2002.

厚生化学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）
C型肝炎の自然経過および介入による影響等の評価を含む疫学的研究班
分担研究報告書

B型肝炎ウイルスのハイブリッド遺伝子型：Genotype B/C recombination

分担研究者：溝上雅史 名古屋市立大学大学院臨床分子情報医学
研究協力者：菅内文中、加藤秀章、田中靖人、折戸悦朗

研究要旨：アジア地域における B 型肝炎ウイルスのハイブリッド遺伝子型（B/C recombinant HBV 株）について分子疫学的検討とその臨床的意義について検討した。70本の全塩基配列株を用いた系統樹解析と274本の血清を対象とした RFLP 法より、B/C recombinant HBV 株 (Ba)は日本以外のアジアの国に広く分布し、non-recombinant HBV 株 (Bj)は日本に特有な株であることが判明した。また、その遺伝子型 C への recombination は precore/core 遺伝子に限局して発生していた。臨床背景を一致させた case-control study から non-recombinant HBV 株 (Bj)は B/C recombinant HBV 株 (Ba)と比較して早期に HBe 抗原から e 抗体へセロコンバージョンを起こすことが示唆され、両者の HBV 株における病原性の相違が示唆された。

A. 研究目的

現在までに B 型肝炎ウイルス(HBV)は遺伝子型として A から G までの7型に分類されており、各世界の地域におけるその遺伝子型の分布には地域特異性が存在する。HBV 遺伝子型と宿主の病態との関連について注目されているが、同じ遺伝子型でありながら地域によりその臨床像の相違も報告されている。近年 HBV の遺伝子型 B について日本と台湾からその臨床像について相反する報告がなされた。我々はこの原因についてハイブリッド遺伝子型の存在に注目し、アジア地域における B/C recombinant HBV 株について分子疫学的検討とその臨床的意義について検討した。

B. 研究方法

対象 HBV 全塩基配列決定のためアジア各地域の遺伝子型 B を呈する慢性 B 型肝炎患者から採集された 38 本 (中

国 7, 香港 3, 日本 19, 台湾 4, タイ 3, ベトナム 2) の血清を対象にした。また 32 本の遺伝子型 B HBV の全塩基配列を international DNA database から得た。

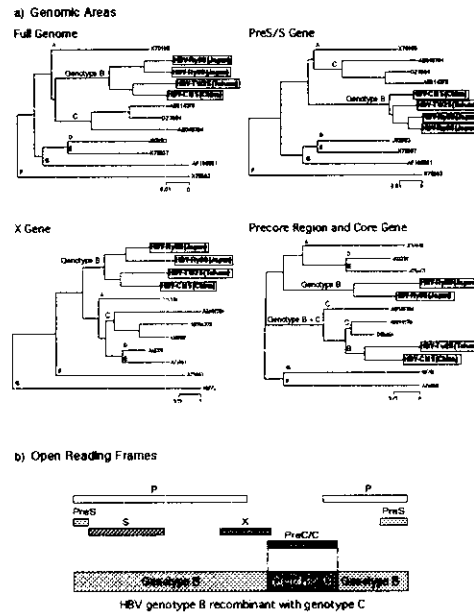
さらにアジアの各地域から遺伝子型 B を呈する 274 本 (中国 20, 香港 45, 台湾 32, タイ 30, ベトナム 30, アメリカ-アジア人種 20) の血清を慢性 B 型肝炎患者から採集し、B/C recombinant HBV 株の分布について検討した。

方法 患者血清より DNA を抽出後、polymerase chain reaction (PCR)法にて HBV-DNA を増幅し、直接塩基配列法にて HBV 全塩基配列を決定した。これら決定された38本の塩基配列は、DNA database 登録全塩基配列 HBV 株 (約 3200bp) 32本とアライメントを作成し、遺伝子進化距離、系統樹、ブー

ツストラップの分子進化学的手法を用い解析した。全ての分子進化学的解析は国立遺伝学研究所（三島）のプログラム『ODEN』を使用した。

C. 結果、考案

中国、香港、インドネシア、日本、台湾、タイ、ベトナムから分離された HBV 株を含む合計 70 本の genotype B HBV 株の全塩基配列を用いた系統樹を作成した。合計 70 本の HBV 株は一本の genotype B の枝に分類された。さらに同様に合計 70 本の genotype B HBV 株の precore/core 領域をもとに形成した系統樹を作成した。Genotype B は大きく 2 つに分類された。すなわち、日本からの分離株のみで形成される genotype B グループの枝と、遺伝子型 C と同じ枝に分類されるグループに分類された。これら日本以外のアジアの国々に広く分布する genotype B HBV 株は遺伝子型 C への recombinant genotype であることが示唆された。この recombinant Genotype の明らかな地域特異性分布から、我々は non-recombinant genotype B を Bj、recombinant genotype B グループを Ba と命名した。図に以上の内容を 4 本の代表 genotype B を使用して示した。全塩基配列、PreS/S 遺伝子、X 遺伝子では、これらの HBV 株は同じ genotype B の枝に分類されるも、precore/core 遺伝子領域においては、genotype C とクラスターされる recombinant genotype B 株が存在することが示されている。

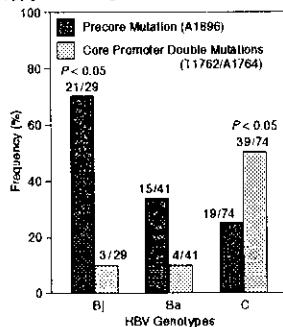


Non-recombinant genotype B (Bj) と recombinant genotype B (Ba) における genotype C との遺伝子距離の比較において、precore/core 遺伝子領域において両者の genotype C に対する遺伝子距離は、明らかな相違を示していることが確認された。以上の結果よりアジア地域には 2 種類の genotype B が存在することが明らかになった。すなわち、precore/core 遺伝子領域が遺伝子型 C へと変化している recombinant genotype B (Ba)。真の genotype B である non-recombinant genotype B (Bj) である。

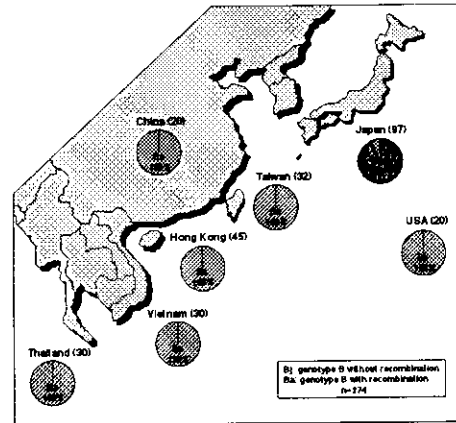
B/C recombinant genotype を示した全ての株の全塩基配列の検討から、B/C recombination 株の遺伝子型 C への 5' 端と 3' 端の break point は precore/core 遺伝子領域全体を含む 1740-1838 番目から 2443-2485 番目であることが統計学的に明らかとなった。precore/core 遺伝子領域に局限した recombination events であることは宿主との免疫反応を考慮するうえで興味深い事実である。HBV の recombination 遺伝子型株の発生機序については HIV virus におけるその機序から推測すれば、HBV の持つ逆転写過程との関連が予想されるが明

らかではない。今後の検討が必要である。

本検討で用いた 70 本の遺伝子型 B を用いてコアプロモーター変異とプレコアストップ変異の頻度について検討した(図)。コアプロモーター変異の頻度は genotype Ba と Bj の両者に差を認めなかったが、プレコアストップ変異は genotype Bj に高頻度に認められた。このことから我々はこの 2 種類の genotype B についてさらなる分子疫学的調査を加え、その臨床的意義について検討した。



我々はアジアにおける recombinant genotype の分布について、多数の検体を用いて検討するため、先の 70 本の genotype B HBV 株の全塩基配列から genotype Ba と Bj を判別するために有用と考えられる遺伝子多形部位検索制限酵素を用いた PCR-RFLP 法を開発した。図に中国、香港、台湾、タイ、ベトナム、アメリカ-アジア人種から採集した 274 本の検体を対象とした genotype B/C recombinant 株の地域分布について示す。recombinant genotype B (Ba) は日本以外のアジアの国に広く分布しており、日本においてはわずか 7% に認めるのみであった。逆に non-recombinant genotype B (Bj) は日本に特有な genotype B であることが明らかとなった。



Genotype Ba と Bj におけるプレコアストップ変異の頻度の相違から、HBe 抗原陽性率に焦点をあてた臨床的検討をおこなった。274 検体から臨床像を一致させた genotype Bj44 例と genotype Ba46 例を抽出し HBe 抗原陽性率について検討した(表)。肝疾患患者における genotype Ba の HBe 抗原陽性率は genotype Bj に比較して明らかに高く、また各遺伝子型における HBe 抗原陽性者の平均年齢は genotype Bj、Ba、C の順で明らかに高年齢となっていた(表 1)。さらに各遺伝子型における HBe 抗原陽性率と年齢との関係を検討した(図)。全ての遺伝子型で加齢とともに HBe 抗原陽性率が低下することが示されているが、その HBe 抗原陰性化率は genotype C、Ba に比して genotype Bj で著明であることが示されており、30 代と 50 代に有意差を認めた。このことは genotype C、Ba に比して genotype Bj は HBe 抗体への seroconversion の時期がより若年であることが示唆された。

	Genotypes of HBV			Differences
	Bj (n = 44)	Ba (n = 46)	C (n = 47)	
年齢	41.2 ± 13.9	41.7 ± 14.6	42.8 ± 12.6	NS
男性	30 (68%)	28 (61%)	27 (57%)	NS
ALT (U/L)	71.1 ± 98.2	76.9 ± 87.1	73.1 ± 98.9	NS
無症候性キャリアー	20 (45%)	26 (56%)	22 (47%)	NS
HBeAg 陽性率 (合計)	14 (32%)	17 (37%)	25 (53%)	P < 0.05
(無症候性キャリアー)	6/20 (30%)	6/26 (23%)	9/22 (40%)	P < 0.05
(肝疾患患者)	8/24 (33%)	11/20 (55%)	16/25 (60%)	P < 0.05
HBeAg 陽性平均年齢	27.9 ± 6.9	35.2 ± 14.8	44.4 ± 12.6	P < 0.05