

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	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Suriki,H., 他 9 名	Analysis of cytokine production in the colon of nude mice with experimental colitis induced by adoptive transfer of immunocompetent cells from infected with a murine retrovirus.	Clinical immunology	Vol.97	33-42	2000
Saldanha,J., 他 29 名	Establishment of the first World Health Organization International standard for human parvovirus B19 DNA nucleic acid amplification techniques.	Vox Sanguinis	Vol.82	24-31	2002
水沢左衛子 他 6 名	血漿分画製剤の安全性をめぐる最近の動向	Biomedical Perspectives	Vol.10	227-232	2001

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 (国立感染症研究所感染病理部)
海老原善郎 (東京医科大学第二病理)
佐藤 正夫 (埼玉医科大学免疫学)

研究要旨 新規に発見されたヒトヘルペスウイルス 8 (HHV-8)はカポジ肉腫などの悪性腫瘍の発症と関連すると考えられている。我々は昨年度、HHV-8の血清抗体を高感度に検出するELISAを開発し、日本人健常者における感染率が1-2%程度であることを明らかにした。本年度はこの検査系を用い、HHV-8の感染疫学を調査した。様々な疾患をもった患者における感染率を検索した結果、カポジ肉腫患者の全員にHHV-8感染が見られること、同性愛エイズ患者に高頻度に感染が見られること、他の疾患では感染はまれであることが明らかになった。さらに日本国内、世界数カ国の健常者における感染率を検索した結果、カポジ肉腫の発症例が報告されている沖縄では感染率が低いこと、中国の一部の地域できわめて高い感染率が見られることなどが明らかになった。これらの事実はHHV-8の病原性と感染経路を考える上で重要な示唆を与えると考えられる。

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。HHV-8はカポジ肉腫、原発性体腔液性リンパ腫、多巣性キャッスルマン病との関連が知られるが、他の疾患については明らかな関連は知られていない。また、その感染様式や感染経路については不明な点が多い。本年度は我々が開発した血清中の抗HHV-8抗体を検出するEnzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用い、各疾患における感染率、日本、世界各地における感染率を明らかにすることによりHHV-8の感染経路や感染様式についての解明を試みた。

B. 研究方法

健常人血清および様々な疾患の患者血清をインフォームドコンセントのもと、採取した。HHV-8に

対する血清中の抗体を測定する方法としては我々が昨年度に開発したELISA系を用いた。HHV-8がコードする4つのタンパクK8.1, ORF59, ORF65, ORF73をグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST) 融合タンパク法を使い大腸菌内で人工的に合成、精製後、これを抗原タンパクとしてELISAプレートを作成した。すべての血清は55℃30分で非働化したのち、希釈溶液にて規定濃度に希釈した。希釈血清をプレートと反応させた後、酵素抗体法にて発色後、発色強度を吸光度計にて測定した。陽性、陰性の判定は蛍光抗体法などの他の方法で確認された明らかな陰性症例50例の吸光度の平均に標準偏差値の5倍を加えた数値をカットオフ値とし、この値を超えるものを陽性とした。また、陽性例、および、陽性を疑う症例 (平均+標準偏差の3倍を越えるもの) についてはHHV-8 感染細胞を用いた蛍光免疫染色法にて確認した。

実験に用いたすべての血清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. 疾患別のHHV-8陽性率

悪性リンパ腫、白血病、癌などの悪性腫瘍、悪性貧血などの血液疾患、ヘルペス等の他のウイルス疾患、脳神経疾患、代謝疾患などの患者血清につき、HHV-8血清抗体を検索した。その結果、カポジ肉腫、原発性体腔液性リンパ腫、多巣性キャッスルマン病では高い感染率を示し、あらためてこの3疾患がHHV-8感染と関連していることが示唆された。さらに同性愛HIV感染者で約6割の感染が見られた一方で、血液製剤によるHIV感染者には陽性者は認められなかった。

2. 世界各地におけるHHV-8感染率

HHV-8は健康人の一部にも感染することが明らかになっている。また、エイズと非関連のカポジ肉腫（古典的カポジ肉腫）の発症は地域により偏りがあり、風土病の性格をもつ。そこで感染経路とカポジ肉腫発症の地域差の解明のため、世界各地の健康人の血清につき、HHV-8抗体の検索を試みた。その結果、日本国内で古典的カポジ肉腫の発症例が比較的多く報告されている沖縄でもHHV-8の感染率が低いことが分かった。また、ルーマニアでは3.4%、アフリカのガーナでは32%の陽性率を示し、ヨーロッパでは低率、アフリカでは高い感染率であることが確認された。さらにわれわれは中国の新疆ウイグル地区のウイグル民族に高い感染率(47%)が見られることを明らかにした。この地域では他の地域に比べると多くの古典的カポジ肉腫の症例が存在し、HHV-8感染と疾患との関連が示唆される。

D. 考察

HHV-8の感染経路としては母子感染と性交渉を介した感染が考えられている。本実験結果から血液製剤からのHHV-8感染は否定的であることが示唆され、また、他の報告では感染者の唾液中に多くのウイルス量が検出されていることから、母子感染、性交渉を介した感染ともに、いずれも唾液が有力な感染源と考えられる。疾患との関連では既に報告されているとおり、カポジ肉腫、原発性体腔液性リンパ腫、多巣性キャッスルマン病において高頻度に陽性者が検出された。このことはここで用いた検出系が正確に働いていること、検索した範囲では他にHHV-8感

染と特異的に関連する疾患は見あたらないことを意味する。

今回の研究では中国新疆ウイグル地区にHHV-8の高い感染率が見られることが分かった。この地区はカポジ肉腫症例が多く、健康者における高いHHV-8感染率がカポジ肉腫発症の背景と見られる。新疆ウイグル地区はかつてローマと西安を結んだシルクロードの中間地点として栄えた地として知られている。我々はこの地域のHHV-8のウイルスgenotypeは地中海沿岸と台湾、日本などに多く見られるgenotypeと一致することを突き止めた。このように限られた地域の一つの民族にある一つのウイルスが高い感染率を示していることは民族の交流、風習、歴史などに深く関係する問題であり、今後の研究の成果が期待される。

E. 結論

血清中の抗HHV-8抗体を調べ、HHV-8の感染疫学を調査した。カポジ肉腫患者の全員にHHV-8感染が見られること、同性愛エイズ患者に高頻度に感染が見られること、中国の一部の地域では健康人にきわめて高い感染率が見られることなどが明らかになった。これらの事実はHHV-8の病原性と感染経路を考える上で重要な示唆を与えると考えられる。

F. 健康危険情報

現在のところHHV-8に関して健康危険情報として報告しなければならない情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Foreman, K.E., Friborg, J., Chandran, B., Katano, H., Sata, T., Mercader, M., Nabel, G.J. and Nickoloff, B.J. Injection of human herpesvirus-8 in human skin engrafted on SCID mice induces Kaposi's sarcoma-like lesions. *J Dermatol Sci* 26, 182-93., 2001
2. Dilnur, P., Katano, H., Wang, Z.H., Kudo, M., Osakabe, Y., Sata, T. and Ebihara, Y. Classic type of Kaposi's sarcoma and human herpesvirus 8 infection in Xinjiang, China. *Pathol Int* 51, 845-852, 2001
3. Nuvor, S.V., Katano, H., Ampofo, W.K., Barnor, J.S. and Sata, T. Higher prevalence of antibodies

to human herpesvirus 8 in HIV-infected individuals than in the general population in Ghana, West Africa. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20, 362-4., 2001

4. Katano, H., Sato, Y. and Sata, T. Expression of p53 and human herpesvirus 8 (HHV-8)-encoded latency-associated nuclear antigen (LANA) with inhibition of apoptosis in HHV-8-associated malignancies. *Cancer* 92:3076-84, 2001
5. Sakurada, S., Katano, H., Sata, T., Ohkuni, H., Watanabe, T. and Mori, S. Effective human herpesvirus 8 infection of human umbilical vein endothelial cells by cell-mediated transmission. *J Virol* 75, 7717-22., 2001
6. Sato-Matsumura, K.C., Matsumura, T., Nabeshima, M., Katano, H., Sata, T. and Koizumi, H. Serological and immunohistochemical detection of human herpesvirus 8 in Kaposi's sarcoma after immunosuppressive therapy for bullous pemphigoid. *Br J Dermatol* 145:633-7, 2001
7. Satoh, M., Toma, H., Sato, Y., Futenma, C., Kiyuna, S., Shiroma, Y., Kokaze, A., Sakurada, S., Sata, T. and Katano, H. Seroprevalence of human herpesvirus 8 in Okinawa, Japan. *Jpn J Infect Dis* 54, 125-6., 2001
8. Shimizu, S., Katano, H., Sata, T., Chen, K.R., Tagami, H., Hanabusa, H. and Shimizu, H. Absence of anti-human herpesvirus 8 antibody in 32 Japanese hemophiliacs with advanced HIV infection. *Arch Dermatol Res* 293, 380-1., 2001
9. Katano, H., Ogawa-Goto, K., Hasegawa, H., Kurata, T. and Sata, T. Human-Herpesvirus-8-Encoded K8 Protein Colocalizes with the Promyelocytic Leukemia Protein (PML) Bodies and Recruits p53 to the PML Bodies. *Virology* 286, 446-55., 2001
10. Suda, T., Katano, H., Delsol, G., Kakiuchi, C., Nakamura, T., Shiota, M., Sata, T., Higshihara, M. and Mori, S. HHV-8 infection status of AIDS-unrelated and AIDS-associated Multicentric Castleman's Diseases. *Pathol Int* 51:671-9, 2001
11. Katano, H., Sato, Y., Itoh, H. and Sata, T. Expression of human herpesvirus 8 (HHV-8)-encoded immediate early protein, open reading frame 50, in HHV-8-associated diseases. *J Hum Virol* 4, 96-102., 2001

2. 学会発表

1. 片野晴隆、佐藤由子、伊東秀記、佐多徹太郎
HHV-8関連疾患における前初期タンパク
ORF50の発現について : 第16回ヘルペスウイ
ルス研究会。大阪 2001. 10.

研究成果の刊行に関する一覧表

No.	著者	題名	雑誌名	巻頁	年
1	Foreman, K.E., Friborg, J., Chandran, B., <u>Katano, H.</u> , Sata, T., Mercader, M., Nabel, G.J. and Nickoloff, B.J.	Injection of human herpesvirus-8 in human skin engrafted on SCID mice induces Kaposi's sarcoma-like lesions.	J Dermatol Sci	26:182-93	2001
2	Dilnur, P., <u>Katano, H.</u> , Wang, Z.H., Kudo, M., Osakabe, Y., Sata, T. and Ebihara, Y.	Classic type of Kaposi's sarcoma and human herpesvirus 8 infection in Xinjiang, China.	Pathol Int	51:845-852	2001
3	Nuvor, S.V., <u>Katano, H.</u> , Ampofo, W.K., Barnor, J.S. and Sata, T.	Higher prevalence of antibodies to human herpesvirus 8 in HIV-infected individuals than in the general population in Ghana, West Africa.	Eur J Clin Microbiol Infect Dis.	20:362-4	2001
4	<u>Katano, H.</u> , Sato, Y. and Sata, T.	Expression of p53 and human herpesvirus 8 (HHV-8)-encoded latency-associated nuclear antigen (LANA) with inhibition of apoptosis in HHV-8-associated malignancies.	Cancer	92:3076-84	2001
5	Sakurada, S., <u>Katano, H.</u> , Sata, T., Ohkuni, H., Watanabe, T. and Mori, S.	Effective human herpesvirus 8 infection of human umbilical vein endothelial cells by cell-mediated transmission.	J Virol	75:7717-22	2001
6	Sato-Matsumura, K.C., Matsumura, T., Nabeshima, M., <u>Katano, H.</u> , Sata, T. and Koizumi, H.	Serological and immunohistochemical detection of human herpesvirus 8 in Kaposi's sarcoma after immunosuppressive therapy for bullous pemphigoid.	Br J Dermatol	145:633-7	2001
7	Satoh, M., Toma, H., Sato, Y., Futenma, C., Kiyuna, S., Shiroma, Y., Kokaze, A., Sakurada, S., Sata, T. and <u>Katano, H.</u>	Seroprevalence of human herpesvirus 8 in Okinawa, Japan.	Jpn J Infect Dis	54:125-6	2001
8	Shimizu, S., <u>Katano, H.</u> , Sata, T., Chen, K.R., Tagami, H., Hanabusa, H. and Shimizu, H.	Absence of anti-human herpesvirus 8 antibody in 32 Japanese hemophiliacs with advanced HIV infection.	Arch Dermatol Res	293:380-1	2001
9	<u>Katano, H.</u> , Ogawa-Goto, K., Hasegawa, H., Kurata, T. and Sata, T.	Human-Herpesvirus-8-Encoded K8 Protein Colocalizes with the Promyelocytic Leukemia Protein (PML) Bodies and Recruits p53 to the PML Bodies.	Virology	286:446-55	2001
10	Suda, T., <u>Katano, H.</u> , Delsol, G., Kakiuchi, C., Nakamura, T., Shiota, M., Sata, T., Higshihara, M. and Mori, S.	HHV-8 infection status of AIDS-unrelated and AIDS-associated Multicentric Castlemans Diseases.	Pathol Int	51:671-9	2001
11	<u>Katano, H.</u> , Sato, Y., Itoh, H. and Sata, T.	Expression of human herpesvirus 8 (HHV-8)-encoded immediate early protein, open reading frame 50, in HHV-8-associated diseases.	J Hum Virol	4:96-102	2001

"原因不明" 肝炎例に於ける HEV と TTV の関与：特に HEV 日本土着株 の分子疫學的研究

三代俊治（東芝病院研究部）

はじめに

我國に発生する急性肝炎の半数近くが "原因不明" とされる。Hepatitis E virus (HEV) によって惹起される E 型急性肝炎は、日本及び欧米諸国に於いて従来、主に発展途上国への旅行者が歸國後に発症する "輸入感染症" として捉えられていた。而るに、近年、海外渡航歴無くして E 型肝炎を発症する例が我國でも散見されるようになったので、"日本固有株" の存在を疑って研究を行った。また、成人にては肝炎との因果関係がほぼ否定された TTV について、小児肝炎例に於ける臨床的意義を問うた。

HEV 日本株プロトタイプ JRA1

海外渡航歴無くして E 型肝炎を発症した東京地区在住日本人男性から、HEV 全長ゲノム塩基配列（本邦初例）を得て、これを HEV-JRA1 と命名した。驚くべきことに JRA1 はアジア株の多くが所属する genotype I にはではなく、欧米株の大半が所属する genotype III の中に分類された。更に驚くべきことには、急性 E 型肝炎に於いて viremia はトランスアミナーゼのピーク時までとされていた従来の常識に反して、本例に於いては HEV viremia がトランスアミナーゼのピーク後約一カ月も持続した [ref-1]。

日本の HEV の genotypes

更に症例を 7 例（埼玉 2 例、札幌 5 例）追加して HEV ORF1 の部分配列を解析した結果、日本の HEV は "多系統 (polyphyletic)" であることが判明した。即ち、埼玉の 1 例が genotype I、

札幌の 3 例が genotype III、埼玉の 1 例と札幌の 2 例が genotype IV に属していた。同一 genotype 内では同一地域由来株同士のホモロジーが地域間のそれに較べて有意に高かったので、regional spreading の起っている可能性が示唆された [ref-2]。

小児肝炎に於ける TTV 感染の臨床的意義

TTV 感染の原因的関与を否定出来ない症例を 3 例認めた。しかし積極的肯定証明は得られなかった [ref-3]。

結語

我國に於いて HEV 感染は最早 "輸入感染症" ではない。急性肝炎を診たら HEV RNA RT-PCR and/or anti-HEV IgM class を検査すべきである。感染ルートは未だ詳らかでない。Zoonosis の可能性を含めて更なる検討が必要である。TTV の肝炎病原性は不明の墟である。

References

- [1].Takahashi K, Iwata K, Watanabe N, Hatahara T, Ohta Y, Baba K, Mishiro S. Full-genome nucleotide sequence of a hepatitis E virus strain that may be indigenous to Japan. *Virology* 2001; 287: 9-12.
- [2].Takahashi et al. *J Infect Dis* (in press).
- [3].Tajiri H, Tanaka T, Sawada A, Etani Y, Kozaiwa K, Mushiake S, Mishiro S. Three Cases with TT Virus Infection and Idiopathic Neonatal Hepatitis. *Intervirology* 2001; 44: 364-9.

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, Iwata K, Watanabe N, Hatahara T, Ohta Y, Baba K, Mishiro S	Full-genome nucleotide sequence of a hepatitis E virus strain that may be indigenous to Japan	Virology	287	9-12	2001
Tajiri H, Tanaka T, Sawada A, Etani Y, Kozaiwa K, Mushiake S, Mishiro S	Three Cases with TT Virus Infection and Idiopathic Neonatal Hepatitis	Intervirology	44	364-9	2001
Hijikata M, Mishiro S, Miyamoto C, Furuichi Y, Hashimoto M, Ohta Y	Genetic Polymorphism of the MxA Gene Promoter and Interferon Responsiveness of Hepatitis C Patients: Revisited by Analyzing Two SNP Sites (-123 and -88) in vivo and in vitro	Intervirology	44	379-382	2001
Matsushita M, Miyakawa H, Tanaka A, Hijikata M, Kikuchi K, Fujikawa H, Arai J, Sainokami S, Hino K, Terai I, Mishiro S, Gershwin ME	Single nucleotide polymorphisms of the mannose-binding lectin are associated with susceptibility to primary biliary cirrhosis	J Autoimmun	17	251-257	2001
Takahashi K, Mishiro S, Prince AM	Novel hepatitis B virus strain from a chimpanzee of Central Africa (Pan troglodytes troglodytes) with an unusual antigenicity of the core protein	Intervirology	44	321-326	2001
Takahashi K, Iwata K, Matsumoto M, Matsumoto H, Nakao K, Hatahara T, Ohta Y, Kanai K, Maruo H, Baba K, Hijikata M, Mishiro S	Hepatitis C virus (HCV) genotype 1b sequences from fifteen patients with hepatocellular carcinoma: the 'progression score' revisited	Hepatol Res	20	161-171	2001

TT ウイルス遺伝子の転写調節機構に関する研究

分担研究者 鈴木 哲朗 国立感染症研究所ウイルス第二部肝炎ウイルス室長

研究要旨

TT ウイルス (TTV) 遺伝子の転写調節機構の解析を行い、非翻訳領域 1.2kb 内に転写開始点に近接した約 110 塩基のコアプロモーターとその上流のエンハンサー領域を同定した。コアプロモーター領域について更に詳細な解析を行った結果、TATA ボックス配列の他、転写因子 USF、Sp1 結合配列が TTV 転写活性に重要であることがわかった。またゲルシフト法により実際にこの領域に USF1、USF2 が結合することを見出した。TTV は遺伝子変異が顕著で数多くの遺伝子型が報告されているが、これらの配列は各遺伝子型でよく保存されている。

A. 研究目的

肝疾患にはウイルス感染が疑われながらその原因が特定できない症例が依然として多数報告されている。TTV はその病因ウイルスの候補の一つである。ゲノム構造の特徴（環状一本鎖 DNA）から、TTV はサーコウイルス科に属すると考えられているが、分子系統解析においては既知のサーコウイルスとかけ離れていることも明らかとなっている。さらに、TTV はヒトで発見されたはじめてのサーコウイルスであり、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。本研究では、TTV 遺伝子の転写調節機構の解析を行った。

B. 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))。

TTV 遺伝子非翻訳領域の種々の遺伝子断片をホタルルシフェラーゼレポーターベクター pGL3-Basic に挿入し、各種細胞株へ導入して 24 時間後に、細胞を回収、可溶化しルシフェラーゼ活性を測定した。また、ルシフェラーゼ遺伝子上流に SV40 プロモーターを持つ pGL3-promoter に TTV 遺伝子を挿入し発現させることによりエンハンサー活性を検討した。TTV の転写活性は、コントロールベクター pRL-TK から発現するウミシイタケルシフェラーゼ活性によって標準化した。

TTV DNA-蛋白複合体形成はゲルシフト法によって解析した。放射能標識した合成オリゴヌクレオチドを細胞の核抽出液と混合し結

合反応を行った後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、オートラジオグラフィにより DNA-蛋白複合体を検出した。

C. 研究結果

TTV 遺伝子非翻訳領域の種々の部分欠損変異体を用いた解析から、転写開始点に近接した約 110 塩基がコアプロモーター領域であることを昨年度報告した。このコアプロモーター領域の部分欠損変異体を作成しヒト肝由来細胞 HepG2、FLC4 でプロモーター活性への影響を検討したところ、コアプロモーターの 5'末端側 21 塩基を欠失させた場合にプロモーター活性が 20%以下に低下した (Fig. 1)。この領域は転写因子 USF の結合に必要なコンセンサス配列を含んでいることから、実際に TTV DNA が USF と結合するかをゲルシフト法により解析した (Fig. 2)。USF1 及び USF2 発現プラスミドをそれぞれ導入した細胞の核蛋白画分は USF 結合配列を含む合成 TTV DNA との結合を認め、コンセンサス配列を置換した変異 DNA ではこのような結合を認めなかった。

コアプロモーター内には USF 結合配列の他に転写因子 Sp1 の結合に重要なコンセンサス配列が含まれている。この領域を欠損させたところプロモーター活性が約 50%低下した (Fig. 1)。

D. 考察

TTV コアプロモーター領域には TATA ボックス配列の他、USF、Sp1 などの転写因子の結合配列が存在している。TTV は遺伝子変異が顕著で数多くの遺伝子型が報告されてい

るが、これらの配列は TTV の各遺伝子型でよく保存されている。各転写因子結合配列の欠損変異体では転写活性の顕著な低下が観察され、特に USF 結合配列の欠損では 20%以下に活性は低下した。さらにゲルシフト法により実際にこの配列に USF1、USF2 が結合することが明かとなったため、これらの転写因子により TTV の遺伝子発現が調節されていると示唆される。

一方、種々の細胞株を用いてプロモーター/エンハンサー活性を調べたところ、ヒト肝癌細胞の他、マウス肝癌細胞などでも高い活性が認められ、TTV 遺伝子の細胞選択的な発現様式が示された。エンハンサー活性を調節する転写因子を解析し、TTV 遺伝子発現の細胞選択性の機序を明らかにしていく予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsutsumi, T., Suzuki, T., Shimoike, T., Suzuki, R., Moriya, K., Shintani, Y., Fujie, H., Matsuura, Y., Koike, K., and Miyamura, T. Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor a modulates its transcriptional activity. *Hepatology* (in press).
2. 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 carboxyl terminus. *Virology* (2001) 280, 301-309.

2. 学会発表 (国際)

1. Suzuki, R., Sakamoto, S., Negishi, H., Li, J., Matsuura, Y., Miyamura, T., Suzuki, T.
Degradation Signal in the HCV core protein.
8th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, Paris, September 2001.
2. Tsutsumi, T., Suzuki, T., Moriya, K., Tomobe, K., Shintani, Y., Fujie, H., Koike, K., and Miyamura, T. Activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in the liver of hepatitis C virus core gene transgenic mice. *ibid.*
3. Sacco, R., Suzuki, R., Aizaki, H., Tsutsumi, T., Otsuka, M., Matsuda, M., Seki, N., Matsuura, Y., Suzuki, T., Miyamura, T. The tightly regulated inducible expression system of HCV proteins: The core protein modulates fas- and TNF alpha-mediated apoptosis in human liver cells. *ibid.*
4. Aizaki, H., Suzuki, T., Matsuda, M., Li, Y-W., Harada, T., Otsuka, M., Seki N., Matsuura, Y., Miyamura, T. Characterization of an human hepatoma cell line carrying entire open reading frame of the HCV genome. *ibid.*
5. Shimoike, T., Suzuki, T., Rikimaru, A., Matsuura, Y., Totsuka, A., Miyamura, T. Identification of the key determinants in HCV 5'UTR for the translational repression by the viral core protein. *ibid.*
6. Suzuki, T., and Li, J. Regulation of TT virus gene expression. The 22nd Joint Meeting of the United States-Japan Hepatitis Panels, Kobe, 2001.

Fig. 1 Deletions of the core promoter element of TTV

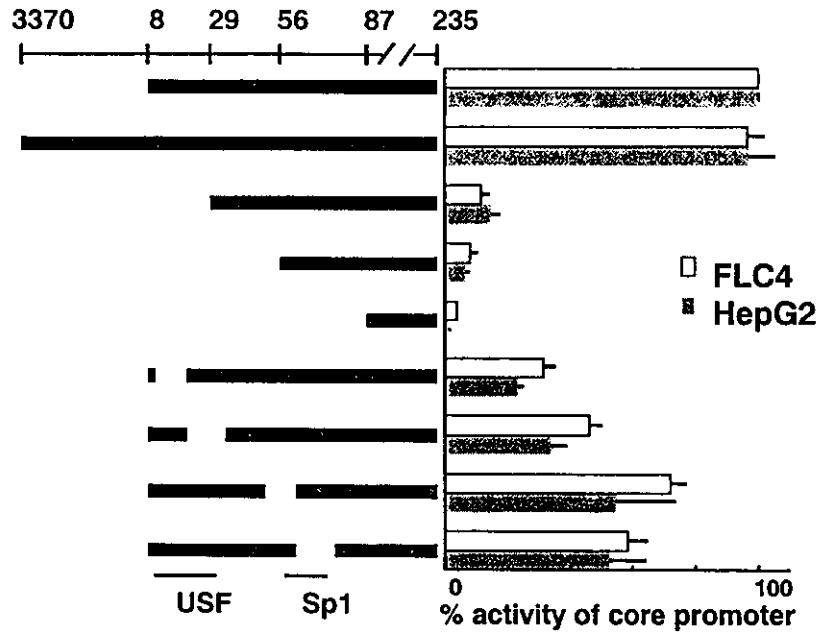
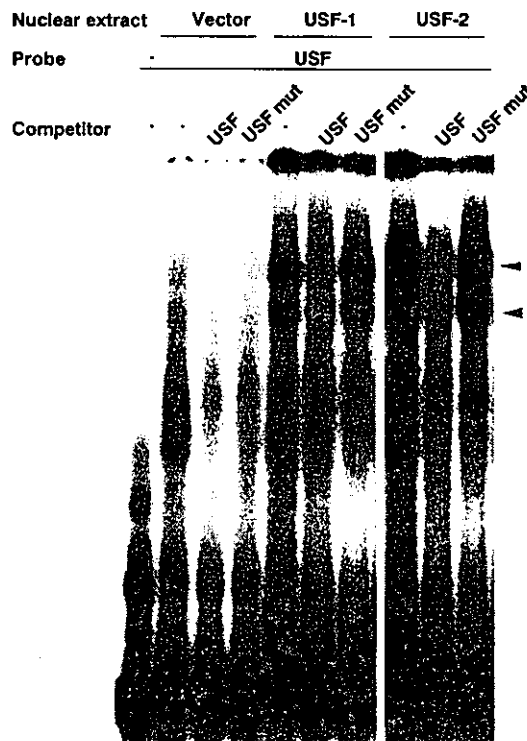


Fig. 2 Binding of USF1 and USF2 to the sequence at nt 8 - 37 in the TTV promoter



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、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Hepatology (in press) Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor a modulates its transcriptional activity.	2002		Tsutsumi, T. Suzuki, T. Shimoike, T. Suzuki, R. Moriya, K. Shintani, Y. Fujie, H., Matsuura, Y. Koike, K. Miyamura, T.
Virology, 280: 301-309 Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at it's carboxyl terminus.	2001		Suzuki, R. Tamura, K. Li, J. Ishii, K. Matsuura, Y. Miyamura, T. Suzuki, T.
感染症週報, 16: 9-11 B型肝炎	2001		鈴木哲朗
感染症週報, 18: 8-11 C型肝炎	2001		相崎英樹 鈴木哲朗

PCR 法による HBV の迅速・高感度ゲノタイピング法の開発と 世界における HBV ゲノタイプ分布様式

分担研究者： 阿部賢治 国立感染症研究所 感染病理部 主任研究官

研究協力者：

内藤秀夫、丁 欣、Huy T.T. Tran、岩城陽子 早川依里子（国立感染症研究所 感染病理部）

研究要旨

6 型の主要なゲノタイプからなる HBV の型特異的なプライマーをデザインし、PCR 法による迅速でしかも高感度な HBV ゲノタイピング法を開発した。この方法を用いて 11 ヶ国から収集した大量の臨床検体に応用し、HBV ゲノタイプの地理疫学的特徴を明らかにした。

A. 目的

現在 HBV は、A～F 型の主要 6 型からなるゲノタイプが存在することが明らかとなっている。HBV 感染により引き起こされる肝病態は、ゲノタイプにより異なることが示唆されている。感染患者のウイルスゲノタイプを決定することは、病原性・感染経路・治療指針等を探る上で重要である。HBV ゲノタイプを決定するには、塩基配列を決定した後、分子系統樹解析といった複雑な手段が必要であり、大量の臨床検体解析には適していない。そこで、より簡便で、しかも高感度な HBV ゲノタイピング法の開発を目標とした。

B. 研究方法

既知の HBV A 型～F 型株の pre-S1～S 領域からゲノタイプ特異的なプライマーをデザインし、nested PCR 法にて型特異的な HBV を増幅した。すなわち、まず 1st PCR は、各ゲノタイプ共通の塩基配列からデザインしたプライマーで増幅し、次いで 2nd PCR を各ゲノタイプ特異的なプライマーで増幅した（図 1、表 1）。さらに得られた各ゲノタイプ由来 PCR 産物の塩基配列を direct sequencing 法にて決定した後、分子系統樹解析を

行い、その特異性を確認した。臨床検体は、11 개국から収集した HBV DNA 陽性血清 531 検体を対象として、PCR ゲノタイピング法を試みた。

C. 研究成果

分子系統樹解析にてゲノタイプが既に知れた検体を用いた PCR ゲノタイピングにより、期待される塩基サイズの PCR 産物が電気泳動により確認できた（図 2）。さらにこの方法を用いて、各国由来 HBV 感染血清に應用して、ゲノタイプを決定した成績を表 2 に示す。各国における主要なゲノタイプは以下の通りであった。スペイン A 型（57%）、米国 A 型および C 型（各 45%）、韓国 B 型（53%）、ベトナム C 型（57%）、日本 C 型（75%）、中国 C 型（79%）、ミャンマー C 型（95%）、ロシア D 型（62%）、エジプト D 型（100%）、ガーナ E 型（75%）、ボリビア F 型（75%）。ゲノタイプ分類不能と判断された症例が 531 例中 42 例（8%）で観察された。さらに、40 例において PCR ゲノタイピング成績と分子系統樹解析の結果を比較したところ、両者は完全に一致し、特異性が確認された。

D. 考案

HBV 感染症は、急性および慢性肝炎を引き起こし、世界における感染症の中で最も重要な疾患の一つである。その全世界における感染者数は、3億5000万人以上とも推察されている。このため、HBV 感染症対策は、緊急かつ極めて重要な課題となっている。ゲノムの特徴からウイルスの型分類を図ることは、ウイルスの流行株特定、病態との関係、ワクチン開発、治療手段の選択などを考慮する上で重要である。さらには、ワクチンや治療抵抗株の確認、感染経路、HBV 変異株の存在、またウイルスの起源や自然界での HBV 生態を知る上でも意義がある。本研究において、タイプ特異的なプライマーをデザインし、PCR 法による簡便で迅速、しかも高感度な HBV ゲノタイピング法を開発することができた。また本技術を臨床検体に応用し、その有用性および特異性を確認することができた。HBV ゲノタイプは、地域により特異的な分布様式を示した。この所見は、民族疫学と HBV の起源を考える上で興味深い。またごく最近の我々の成績では、ゲノタイプ C の HBV が肝発癌に深く関わっていると推察される成績も得られている。来年度は、近年登場した HBV ゲノタイプ G の分布様式、ゲノタイプと肝病態との関連、世界における HBV 変異株の流行様式、HBV 変異株の肝内局在様式と病態の関係に焦点をあて、さらなる検討を加えたい。これらの諸問題を明らかにすることは、成因不明とされる肝疾患の病態解明にも大きくつながる。

E. 結語

PCR 法による迅速・高感度な HBV ゲノタイピング法を開発した。本技術を臨床検体に応用して、各国における HBV ゲノタイプの分布様式を明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

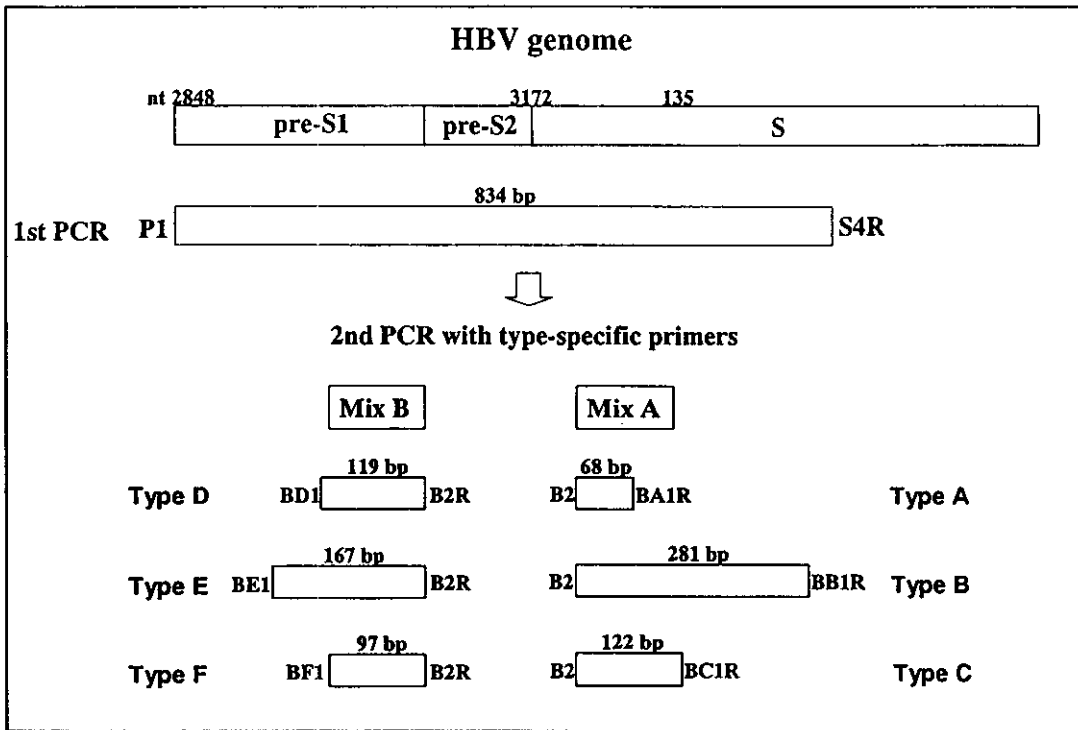
- 1) Hideo Naito, Shigeki Hayashi and Kenji Abe: Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by polymerase chain reaction using type-specific primers. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 362-364, 2001
- 2) Hideo Naito and Kenji Abe: Genotyping system 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* 91: 3-9, 2001
- 3) Kazuhiko Nakai, Khin Maung Win, San San Oo, Yasuyuki Arakawa and Kenji Abe: Molecular characteristic-based epidemiology of hepatitis B, C and E viruses and GB virus C/hepatitis G virus in Myanmar. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 1536-1539, 2001
- 4) Kenji Abe: Review: GB virus-C/Hepatitis G virus. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 54:55-63, 2001
- 5) Eriko Hayakawa, Yoshihiro Edamoto, Ding Xin, Huy Thien Tuan Tran, Yohko Iwaki, Yuko Sato, Tetsutaro Sata and Kenji Abe: Detection of TT virus DNA in human bile juice. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 54: 127-128, 2001

2. 学会発表

- 1) 内藤秀夫、阿部賢治：PCR 法による HBV の簡便・迅速ゲノタイピング法の開発と地理疫学調査への応用。第 37 回日本肝臓学会総会、2001 年 5 月、横浜
- 2) 稲見知子、小原 隆、森山光彦、荒川泰行、阿部賢治：チンパンジーより分離された simian-TTV の全長鎖遺伝子のクローニングとその遺伝的特徴。第 37 回日本肝臓学会総会、2001 年 5 月、横浜

- 3) 相羽直人、枝元良広、木内哲也、田中紘一、阿部賢治：肝疾患患者におけるヒトパルボウイルス B19 感染の意義。第 37 回日本肝臓学会総会、2001 年 5 月、横浜
- 4) 相羽直人、西村裕之、荒川泰行、阿部賢治：ボウシテナガザルからのヘパドナウイルスの分離とゲノムの特徴。第 37 回日本肝臓学会総会、2001 年 5 月、横浜
- 5) Huy TT Tran, Hiroshi Ushijima, Shigeki Hayashi, Vo X. Quang, Nguyen Phuong, Truong X. Lien, Tran V. Be, Hideo Naito, Naoto Aiba, Xin Ding Tetsutaro Sata and Kenji Abe: Prevalence of HBV, HCV, HEV and GBV-C/HGV in Ho Chi Minh City, Vietnam. 第 5 回日本肝臓学会大会、2001 年 10 月、京都
- 6) 中井和彦、Khin Maung Win、San San Oo、許斐奈美、内藤秀夫、稲見知子、相羽直人、荒川泰行、阿部賢治：ミャンマーにおける肝炎ウイルス B, C, E および GBV-C/HGV の分子疫学的特徴。第 5 回日本肝臓学会大会、2001 年 10 月、京都

☒ 1



☒ 2

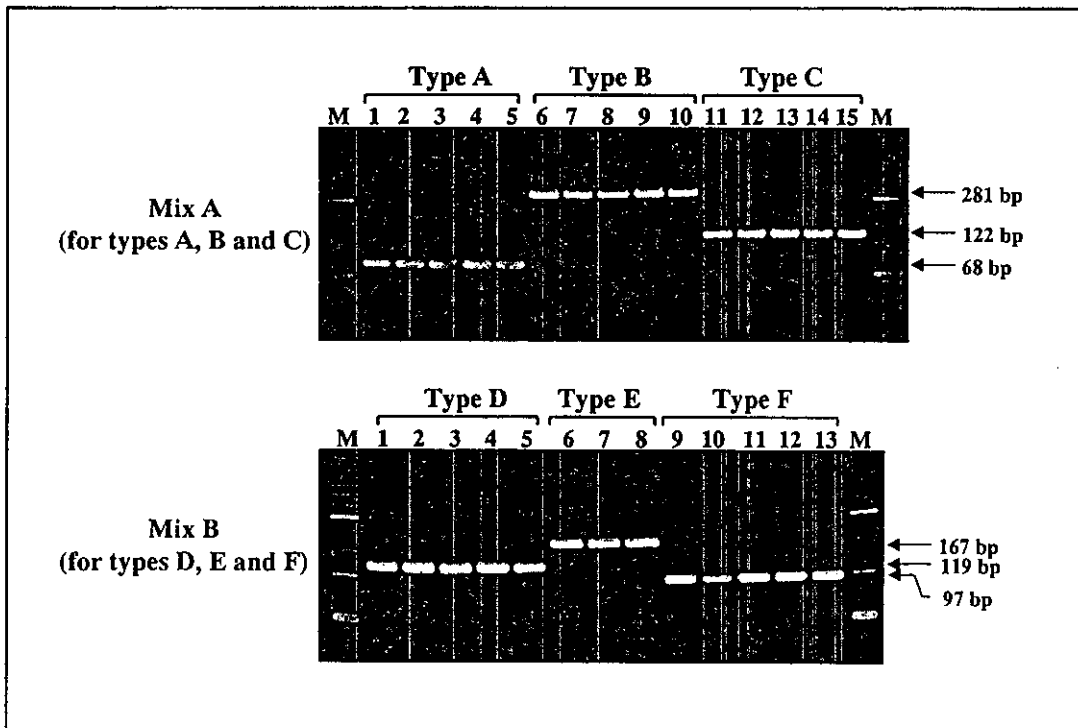


表 1

Primer sequences used for HBV genotyping by nested PCR	
Primer	Sequence* (specificity/polarity)
<1st PCR>	
P1**	5'-TCA CCA TAT TCT TGG GAA CAA GA-3' (nt 2823-2845; universal/sense)
S4R	5'-AGA AGA TGA GGC ATA GCA GC-3' (nt 417-436; universal/antisense)
<2nd PCR>	
Mix A	
B2	5'-GGC TCM AGT TCM GGA ACA GT-3' (nt 67-86; types A to E-specific/sense)
BA1R	5'-CTC GCG GAG ATT GAC GAG ATG T-3' (nt 113-134; type A-specific/antisense)
BB1R	5'-CAG GTT GGT GAG TGA CTG GAG A-3' (nt 324-345; type B-specific/antisense)
BC1R	5'-GGT CCT AGG AAT CCT GAT GTT G-3' (nt 165-186; type C-specific/antisense)
Mix B	
BD1	5'-GCC AAC AAG GTA GGA GCT-3' (nt 2979-2996; type D-specific/sense)
BE1	5'-CAC CAG AAA TCC AGA TTG GGA CCA-3' (nt 2955-2978; type E-specific/sense)
BF1	5'-GYT ACG GTC CAG GGT TCA CA-3' (nt 3032-3051, type F specific, sense)
B2R	5'-GGA GGC GGA TYT GCT GGC AA-3' (nt 3078-3097; types D to F-specific/antisense)
*M=A or C, Y=C or T **Lindh M. et al.: J. Virol. Methods 72: 163-174, 1998	

表 2

Genotypic distribution of HBV among different countries, determined by PCR using the type-specific primers								
Country	n	Genotype						
		A	B	C	D	E	F	UC
Spain	46	26 (57)	0	0	17 (37)	0	1 (2)	2 (4)
U.S.A.	11	5 (45)	1 (10)	5 (45)	0	0	0	0
Korea	17	0	9 (53)	8 (47)	0	0	0	0
Vietnam	89	0	36 (40)	51 (57)	0	0	0	2 (3)
Japan	105	5 (4.8)	15 (14)	79 (75)	0	0	0	5 (4.8)
China	107	3 (2.8)	3 (2.8)	85 (79)	6 (5.6)	0	0	10 (9.3)
Myanmar	65	0	0	62 (95)	0	0	0	3 (5)
Russia	77	4 (5.2)	0	0	48 (62)	5 (6.5)	0	20 (26)
Egypt	2	0	0	0	2 (100)	0	0	0
Ghana	4	1 (25)	0	0	0	3 (75)	0	0
Bolivia	8	1 (17)	0	0	1 (17)	0	6 (75)	0
Total	531	45 (8.5)	64 (12)	290 (55)	74 (14)	8 (1.5)	7 (1.3)	42 (8)
UC=unclassified								

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者	論文タイトル	発表誌	巻	ページ	年
Hideo Naito, Shigeki Hayashi and <u>Kenji Abe</u> :	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
Hideo Naito and <u>Kenji Abe</u>	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
Kazuhiko Nakai, Khin Maung Win, San San Oo, Yasuyuki Arakawa and <u>Kenji Abe</u>	Molecular characteristic-based epidemiology of hepatitis B, C and E viruses and GB virus C/hepatitis G virus in Myanmar.	Journal of Clinical Microbiology	39	1536-1539	2001
<u>Kenji Abe</u>	Review: GB virus-C/Hepatitis G virus.	Japanese Journal of Infectious Diseases	54	55-63	2001
Eriko Hayakawa, Yoshihiro Edamoto, Ding Xin, Huy Thien Tuan Tran, Yohko Iwaki, Yuko Sato, Tetsutaro Sata and <u>Kenji Abe</u>	Detection of TT virus DNA in human bile juice.	Japanese Journal of Infectious Diseases	54	127-128	2001

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 13 年度 分担研究報告

分担研究計画

献血者における Human herpes virus 8 (HHV-8) 抗体陽性率と
その輸血感染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	丹羽尋美・宮崎 孔	同上	検査部
	佐藤進一郎・加藤俊明	同上	検査部

研究要旨

HHV-8 の輸血感染リスクに関しては、未だ明らかにされていない。そこで献血者における HHV-8 抗体陽性率とその輸血感染リスクの指標として頻回輸血患者の陽性率について調査した。HHV-8 抗体スクリーニングは、国立感染症研究所で PEL 患者から樹立した HHV-8 感染細胞株 (TY-1) を用いて免疫蛍光抗体法 [IF (TY-1)] により実施し、その陽性検体は市販の IF (KS-1) 法と ELISA 法で確認した。健常献血者検体 91 例中 8 例 (8.8%) が IF (TY-1) 陽性を示し、このうち 1 例 (1.1%) が IF (TY-1) / IF (KS-1) / ELISA の 3 法陽性となった。また、他の IF (TY-1) 陽性は、HBV 陽性献血者検体 55 例中 3 例 (5.5%)、HCV 陽性献血者検体 55 例中 3 例 (5.5%)、TP 陽性献血者検体 55 例中 4 例 (7.3%)、HIV 自己申告者 55 例中 5 例 (9.1%) であったが、3 法陽性例は認められなかった。一方、頻回輸血患者検体 64 例中 6 例 (9.4%) が IF (TY-1) 陽性を示し、このうち 2 例 (3.1%) が IF (TY-1) / IF (KS-1) / ELISA の 3 法陽性となった。これら 3 種類の HHV-8 抗体検査法における乖離原因は不明であったが、IF (TY-1) における陽性率は各群で明らかな差を認めなかった。また、3 法陽性率は健常献血者群 (1.1%) に比べ、頻回輸血患者群 (3.1%) が若干高い傾向を示したが、有意差は認められなかった。更に献血者における IF (TY-1) 陽性例の年齢・性別には一定の傾向は認められなかった。

A. 研究目的

Human herpes virus 8 (HHV-8) は、1994 年に Chang らによって AIDS 患者のカポジ肉腫の組織片から検出されたヘルペスウイルスファミリーに属するウイルスであり、リンパ球に感染する。健常者では HHV-8 に感染しても病気は起こさないが、免疫系機能が低下した患者においてはカポジ肉腫 (KS) や primary effusion lymphoma (PEL) 等を発症することが知られている。HHV-8 の主な感染経路は性行為であると報告されているが、HHV-8 はリンパ球中に潜んでいること、また静注薬物常用者において HHV-8 抗体陽性率が高いこと、更に HHV-8 は臓器移植によって伝播することが報告されていることから、血液を介して感染する可能性が考えられている。しかしながら、現在まで輸血により HHV-8 感染が伝播したとの報告はない。

そこで、我々は各種献血者集団における HHV-8 抗体陽性率とその輸血感染リスクの指標として頻回輸血患者の陽性率について調査した。

B. 研究方法

B-1 検体

北海道内で献血した、B 型肝炎ウイルス (HBV)、C 型肝炎ウイルス (HCV)、梅毒 (TP)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、ヒト T 細胞向性ウイルス (HTLV-I) 等のウイルスマーカーがすべて陰性の健常献血者検体 91 例、肝炎ウイルスキャリアである HBV DNA 陽性献血者検体 55 例及び HCV RNA 陽性献血者検体 55 例、更に性行為感染症のハイリスクグループと考えられる梅毒 (TP) 抗体陽性献血者検体 55 例及び HIV リスクの自己申告者検体 (献血後に HIV 感染リスクの可能性のあることを連絡してきた献血者) 55 例 (HIV-RNA 陰性) を対象とした。また、これまでに血小板輸血を繰り返し受けている頻回輸血患者検体 64 例を対象として用いた。

B-2 IF (TY-1) 法

国立感染症研究所より譲渡された、PEL 患者から樹立した HHV-8 陽性細胞 TY-1 を用いた IF を同研究所からのプロトコールに基づいて実施した

。tetradecanoylphorbol acetate を 20ng/ml を加え 37°C で 48 時間培養した TY-1 をスライドガラスに固定したものを使用した。このスライドガラスに 1% BSA-PBS で 40 倍希釈した被検血清を 10 μ l/well 分注し、37°C で 1 時間インキュベートした。PBS で洗浄後、FITC 標識抗ヒト IgG を 10 μ l/well 分注し、37°C で 30 分インキュベートした。PBS で洗浄後、0.05 % エバンスブルー溶液で 5 分間染色し、精製水で洗浄後、蛍光顕微鏡で特異蛍光を観察した。

この IF (TY-1) 法を用いて一次スクリーニングを行い、陽性となった検体について、再度 IF (TY-1) 法で確認検査を実施した。さらに以下の方法を用いて確認検査を行った。

B-3 IF (KS-1) 法

IF (TY-1) 陽性検体について、市販の HHV-8 IF 試薬 (Biotrin) を添付文書に従って、以下のとおりに実施した。洗浄用溶液で 40 倍希釈した被検血清を 20 μ l/well 分注し、37°C で 30 分インキュベートした。PBS で洗浄後、エバンスブルーを含む FITC 標識抗ヒト IgG を 20 μ l/well 分注し、37°C で 30 分インキュベートした。洗浄用溶液で洗浄後、蛍光顕微鏡で特異蛍光を観察した。

B-4 ELISA 法

IF (TY-1) 陽性検体について、市販の HHV-8 抗体 ELISA 試薬 (栄研) を添付文書に従って、以下のとおりに実施した。緩衝液を 100 μ l ずつ分注したウェルに陽性コントロール、陰性コントロールを各々 3 ウェルに 100 μ l ずつ分注する。同様に緩衝液を 100 μ l ずつ分注したウェルに、検体希釈用液で 101 倍に希釈した検体を 100 μ l ずつ分注し、30°C で 16

時間インキュベートした。マイクロプレート洗浄後、ブランク以外のウェルに酵素標識抗体を 100 μ l ずつ分注し、30°C で 1 時間インキュベートした。マイクロプレート洗浄後、全ウェルに基質液を 100 μ l ずつ分注し、遮光して室温で 30 分インキュベートした。その後、反応停止液を 100 μ l ずつ分注し、マイクロプレートリーダーを用いてブランクを対照として波長 492nm の吸光度を測定した。カットオフ値は陰性コントロールの 10 倍とした。

C. 研究結果

健常献血者検体 91 例中 8 例 (8.8%) が IF (TY-1) 陽性を示した。このうち 1 例 (1.1%) が IF (TY-1) / IF (KS-1) / ELISA の 3 法共に陽性となったが、2 例 (2.2%) は IF (TY-1) / IF (KS-1) 陽性、1 例 (1.1%) は IF (TY-1) / ELISA 陽性、4 例 (4.4%) が IF (TY-1) 単独陽性を示した。HBV 陽性献血者では検体 55 例中 3 例 (5.5%) が IF (TY-1) 単独陽性を示した。同様に HCV 陽性献血者検体 55 例中 3 例 (5.5%) が IF (TY-1) 単独陽性を示した。TP 陽性献血者検体 55 例中 4 例 (7.3%) が IF (TY-1) 単独陽性を示した。HIV 自己申告者 55 例中 5 例 (9.1%) が IF (TY-1) 陽性を示し、このうち 2 例 (3.6%) が IF (TY-1) / IF (KS-1) 陽性、3 例 (5.5%) が IF (TY-1) 単独陽性を示した (Fig. 1, Table 1)。一方、頻回輸血患者検体 64 例中 6 例 (9.4%) が IF (TY-1) 陽性を示した。このうち 2 例 (3.1%) が IF (TY-1) / IF (KS-1) / ELISA の 3 法共に陽性となったが、2 例 (3.1%) が IF (TY-1) / IF (KS-1) 陽性、他の 2 例 (3.1%) は IF (TY-1) 単独陽性を示した (Fig. 1, Table 1)。

Fig 1. Anti-HHV-8 seropositive rates in various groups

