

H. Yokoyama, K. Furuyama, T. Sasaki, M. Kaku, M. Yamamoto, S. Sassa. Aberrant iron accumulation and oxidized status of erythroid-specific δ -aminolevulinatase synthase (ALAS2)-deficient definitive erythroblasts.

Blood. 101:1188-1193, 2003

15. T. Suzuki, S. Saito, Y. Hirabayashi, H. Harigae, T. Ishii, T. Koderu, H. Fujii, Y. Munakata, T. Sasaki. Human parvovirus B19 infection during the inactive stage of systemic lupus erythematosus. internal Medicine. 42: in press, 2003

16. 佐々木毅

自己免疫疾患治療最近の進歩
日本医事新報 4100, 2002

17. 佐々木毅

CRP 検査の臨床的意義—適応と限界
臨床検査 46: 967-972, 2002

18. 佐々木毅

リウマチ性疾患と感染性因子
リウマチ科 27: 46-52, 2002

19. 佐々木毅

リウマチ性疾患とヒトパルボウイルス B19
リウマチ科 27: 247-254, 2002

20. 佐々木毅

第一線の実地医家のための高齢者医療
実践ガイド
免疫学的検査 19: 229-234, 2002

21. 佐々木毅

LE 細胞現象
日本内科学会雑誌 91: 41-45, 2002

B) 学会発表

1) 小寺隆雄、宗像靖彦、藤井博司、石井智徳、竹下美紀、佐々木毅
血管内皮細胞表面へパリン様五単糖に対する自己抗体による血栓症発現機序
日本免疫学会総会・学術集会 東京

12/4-6, 2002

2) 宗像靖彦、石井恵子、斉藤貴子、傅翼、小寺隆雄、佐々木毅
関節リウマチ滑膜細胞のサイトカイン産生とヒトパルボウイルス B19
日本免疫学会総会・学術集会 東京
12/4-6, 2002

3) 斉藤貴子、宗像靖彦、小寺隆雄、石井恵子、石井智徳、平林泰彦、佐々木毅
関節リウマチ例における抗ヒトパルボウイルス B19 抗体中和活性の低下
日本免疫学会総会・学術集会 東京
12/4-6, 2002

4) 石井智徳、平林泰彦、宗像靖彦、小寺隆雄、竹下美紀、藤井博司、北川良親、佐々木毅
抗核酸抗体 Fc-Fv 遺伝子の T 細胞への導入
日本免疫学会総会・学術集会 東京
12/4-6, 2002

5) 斉藤貴子、宗像靖彦、傅翼、石井恵子、佐々木毅
ヒトパルボウイルス B19 に対する未知のレセプター
第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会
札幌 10/16-18, 2002

6) 宗像靖彦、加藤一郎、斉藤貴子、小寺隆雄、傅翼、石井恵子、佐々木毅
ヒトパルボウイルス B19 の単球系細胞への感染
第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会
札幌 10/16-18, 2002

7) 石井恵子、傅翼、宗像靖彦、斉藤貴子、佐々木毅
ヒトパルボウイルス B19NS-1 をターゲットとする DNA enzyme による TNF- α の発現制御
第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会
札幌 10/16-18, 2002

8) 小寺隆雄、斉藤真一郎、佐々木毅
強皮症における Fibrillin-1 (Fbn1) 遺伝子多型性の解析
第 46 回日本リウマチ学会総会・学術集会

- 神戸 4/22-24, 2002
- 9) 齊藤芳彦、大久良晴、佐々木毅
自己抗体検査の問題点—抗 DNA 抗体と加齢—
第 46 回日本リウマチ学会総会・学術集会
神戸 4/22-24, 2002
- 10) 宗像靖彦、佐々木毅
ヒトパルボウイルス B19 持続感染と慢性
関節リウマチ・宿主における中和抗体産
生能
第 46 回日本リウマチ学会総会・学術集会
神戸 4/22-24, 2002
- 11) 加藤一郎、宗像靖彦、渡辺美紀、石井
智徳、平林泰彦、佐々木毅
リウマチ症状を呈した遷延性ヒトパルボ
ウイルス B19 感染症の一例
第 46 回日本リウマチ学会総会・学術集会
神戸 4/22-24, 2002
- 12) 石井智徳、平林泰彦、竹下美紀、小寺
隆雄、加藤一郎、佐々木毅
原発性自己免疫蛋白漏出胃腸症の 1 症例
第 46 回日本リウマチ学会総会・学術集会
神戸 4/22-24, 2002
- 13) 張替秀郎、中島修、古山和道、横山寿
行、佐々木毅、山本雅之、佐々茂
赤血球アミノレブリン酸合成酵素欠損赤
芽球における鉄代謝異常
横浜 第 64 回日本血液学会総会・第 44
回日本臨床血液学会総会 9/12-15,
2002
- 14) 亀岡淳一、山田実名美、横山寿行、木
村朋文、佐々木治、張替秀郎、宮村耕一、
佐々木毅
ヒト及びマウス骨髄間質細胞における
leptin 発現の検討
横浜 第 64 回日本血液学会総会・第 44
回日本臨床血液学会総会 9/12-15,
2002
- 15) 木村朋文、Stuart Scott, 宮村耕一、
亀岡淳一、一迫玲、佐々木毅、John
Decoteau
TGF- β による細胞周期停止経路を構成す
る要素のメチル化 (ヒト T-LBL/ALL にお
ける検討)
横浜 第 64 回日本血液学会総会・第 44
回日本臨床血液学会総会 9/12-15,
2002
- 16) 山田実名美、佐々木治、張替秀郎、亀
岡淳一、宮村耕一、佐々木毅、横澤敏也、
玉置広哉
白血病の分子モニターにおける定量的
PCR 法の標準化
横浜 第 64 回日本血液学会総会・第 44
回日本臨床血液学会総会 9/12-15,
2002
- 17) 阿部正理、亀岡淳一、山田実名美、佐々
木治、宮村耕一、張替秀郎、佐々木毅
Trisomy4 と Trisomy10 を同時に認めた
CD56 陽性 AML (M2) TLD の一例
横浜 第 64 回日本血液学会総会・第 44
回日本臨床血液学会総会 9/12-15,
2002
- 18) 木幡桂、亀岡淳一、七島勉、山田実名
美、佐々木治、宮村耕一、張替秀郎、佐々
木毅
Cyclosporine A (CYA) 投与後 PNH クローン
が顕在化し、CYA 減量中止後にその著減
を認めた再生不良性貧血の一例
横浜 第 64 回日本血液学会総会・第 44
回日本臨床血液学会総会 9/12-15,
2002
- 19) 井根省二、山田実名美、佐々木治、張
替秀郎、亀岡淳一、宮村耕一、目黒邦昭、
佐々木毅
同種腎移植後に同種骨髄移植を行った
CML の一例
横浜 第 64 回日本血液学会総会・第 44
回日本臨床血液学会総会 9/12-15,
2002
- 20) 関正則、亀岡淳一、木村朋文、横山寿
行、山田実名美、佐々木治、石澤賢一、
張替秀郎、宮村耕一、佐々木毅
CD4+CD8+T 細胞性慢性リンパ性白血病
(T-CLL) の 2 例
横浜 第 64 回日本血液学会総会・第 44
回日本臨床血液学会総会 9/12-15,

2002

- 21) Y. Munakata, T. Saito, Y. Fu, K. Ishii,
T. Sasaki
Neutralizing activity to Human
Parvovirus B19 in Sera of Patients with
B19 persistent Infection.
U. S. A. Annual Scientific Meeting,
10/24-29, 2002
- 22) T. Ishii, Y. Munakata, T. Koderu,
Y. Hirabayashi, M. Takeshita, T. Koiwa,
T. Sasaki.
Usefulness of phased tracking ultrasonic
method to assess inflammatory activity
wall in takayasu disease.
U. S. A. Annual Scientific Meeting,
10/24-29, 2002
- 23) T. Koderu, M. Takeshima, T. Saito,
S. Shibata, Y. Munakata, T. Sasaki.
Anti-Vascular pentasaccharide
autoantibody enhances the
expression of CD62 and adhesion
activity of endothelial cells.
U. S. A. Annual Scientific Meeting,
10/24-29, 2002
- 24) Y. Munakata, N. Takasawa, T. Saito,
K. Ishii, T. Sasaki. Human parvovirus
B19-transgenic mice as a model of
rheumatoid arthritis.
Bologna, Parvovirus Workshops,
8/28-31, 2002
- 25) T. Saito, Y. Munakata, Y. Fu, K. Ishii,
T. Sasaki. Neutralizing antibody
activity and persistent infection of
human parvovirus B19.
Bologna, Parvovirus Workshops,
8/28-31, 2002

ヒトパルボウイルス B19 の感染系の開発

分担研究者 岡田義昭 国立感染症研究所室長

研究要旨 ヒトパルボウイルス B19 (以下 B19 と略す) は、熱や種々の化学物質に耐性を示すため血液製剤の安全性を確保する上で重要なウイルスである。昨年度は B19 に感受性のある KU812F 細胞から効率の良いクローンを得ることに成功したが、今年度はさらに感染効率の向上を目指し、新しい高感受性クローンを得た。このクローンは安定で、少なくとも数カ月間は B19 に対する感受性は変化しなかった。また、培養上清を非感染のクローンに感染させたところ 10^4 /ml の感染価を証明することができた。この系を使うことで B19 の病原性の解析だけでなく不活化や除去法の評価などに応用できる。

G. 研究目的

B19 は envelope を持たない DNA ウイルスであるため極めて安定である。しかもウイルス血症時のウイルス量が非常に多く血液の安全性確保の面から重要なウイルスである。近年、B19 のスクリーニング法が導入され血液製剤への混入は大幅に減少した。しかし、完全に除去することは困難であり、混入してきた B19 のヒトへの感染性及び B19 の不活化・除去の評価が必要である。B19 は最近まで株化細胞を使った培養が困難であったため、骨髄細胞など一般には入手できない細胞によってしか感染性の評価はされていなかった。また、不活化・除去の評価はモデルウイルスを用いて実施されており、B19 を使った評価はできないのが現状であった。今年度の研究では、感染効率の向上を目的に、細胞のクローニングと培養上清中に産生されるウイルスを系代し、感染性ウイルス産生の検討を行った。

B. 研究方法

昨年度に行った方法に従い、KU812F 細胞に坑エリスロポイエチンリセプター-抗体を反応させ、磁気ビーズを用いてリセプター-陽性の細胞を集め、限界希釈法にてクローニングを行った。培養液には

エリスロポイエチン (最終濃度 2IU/ml) を添加し、10%FCS-RPMI にて培養した。その中から赤芽球に分化傾向の強いクローンを選択した。B19 に対する感受性は昨年の研究によって血漿を 10^6 まで希釈しても検出できたクローンが得られたので、さらに高感受性の株を得るためと数多くクローン株を解析するために 10^6 、 10^7 に希釈した B19 陽性血漿を用いて感染実験を行った。感染の成立は感染後 4 日目の細胞から RNA を抽出し、15 マイクロの水に溶解後、5 マイクロを取り、Bostic (J. In999; 179: 619-626) らの報告した プライマーに、我々が昨年報告したプライマーを用いて semi-nested RT-PCR を行い、B19 由来の RNA が検出された場合を感染の成立と判断した。さらに、選択した細胞株に B19 を感染させウイルスの吸着後、十分に洗浄し培養した。培養上清を 48 時間、96 時間後に採取し、上清中に産生される感染性ウイルス量を血漿と同様に測定した。また、ウイルスを 100 倍に PBS で希釈し、4℃に保管し、感染価の減少を解析した。

C. 研究結果

顕微鏡下に自然に赤血球に分化 (脱核し、赤血球様に見える) する傾向の強い細胞株を選択し、

最終的に 8 株を詳細に解析した。感受性を反復して測定し、2つのクローンを得ることができた (fig.1 のレーン 1 と 4)。昨年分離した 3-16-14 に比較して 10 倍の高感受性を示した。また、この株にウイルスを感染させると 48 時間、96 時間後の培養上清中に各々 10^4 /ml の感染性ウイルスが分泌されていた (fig.2 は 96 時間後の上清)。また、100 倍に培養液で希釈した B19 陽性血漿は 4℃での 1 ヶ月後においても感染価は変化しなかった。

D. 考察

昨年に引き続きエリスロポイエチンリセプター陽性の細胞からクローニングを行い、感受性の高いクローンを得ることを目指した。昨年得られた株と同様に、得られた 2 株のペレットは赤色を呈していたが継代によってその性質は失われた。しかし、感受性は昨年分離した株の 10 倍を示し、安定で少なくとも 4 ヶ月以上は感受性に変化は認められなかった。実験に使用している血漿は我々の B19 検出用プライマーでは 10^{11} detection unit/ml であった。一方、この株を使用しての感染価は 10^7 - 10^8 /ml であった。 10^3 から 10^4 の差が生じる理由として、PCR によって検出されるウイルスゲノムは不完全なウイルスを含み全てを検出しますので 1 部のウイルスのみが感染性を有する可能性と感受性のある細胞でも 1 部の細胞のみで感染が成立する可能性とがあり、どちらが正しいのか現時点では判断できない。また、感染させた細胞の培養上清から感染性を有するウイルスの産生を確認することができた。細胞への吸着後、理論的にはウイルスが検出されない濃度まで洗浄した後に培養した上清であり、吸着したウイルスが細胞より剥がれて上清に出てきた可能性はあるが 10^4 の感染価を示したことから感染細胞から産生されたと考えている。

現在 5 代まで継代し、感染価を解析中である。

一方、B19 は不活化に強い抵抗を示すと言われているので、本培養系を用いてモデルウイルスでこれまで報告があった結果と比較検討している。また、ウイルスの不活化技術がなかった時代に 4℃に血漿を貯蔵した後に製剤を製造したとの記録があり、また、現在では液状製剤もあることから B19 はどれくらいまで感染力を維持可能か解析した。100 倍に培養液で希釈し、一ヶ月保存した（現在も継続中）時点では感染価の低下は認められなかった。

本培養系を使用することで B19 の感染性及び不活化の評価が可能になった。最終製剤での B19 の感染性を保証することは無理であるが、少なくとも本培養系で感染が確認できたものは感染性のウイルスが混入していることは確かである。

E. 結論

KU812F 細胞からクローニングを行い、B19 に高感受性の細胞株を得た。感染細胞から新しい感染性粒子が生産される可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

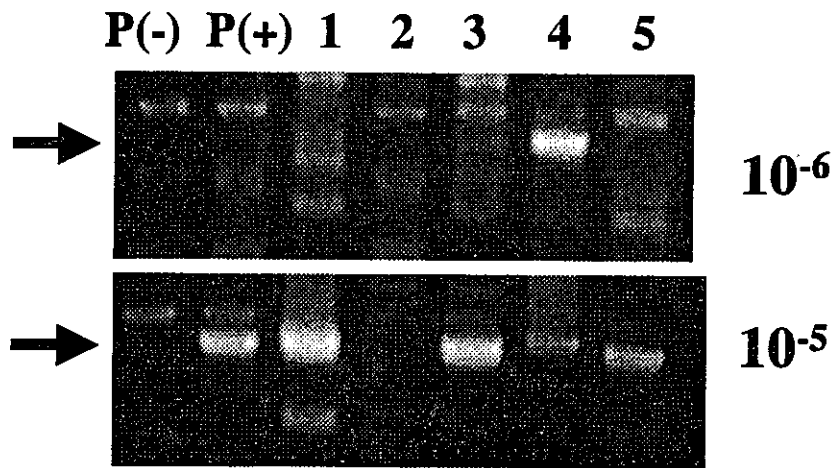
2. 学会発表

岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子：パルボウイルス B19 の感染系の確立とその応用。

第 50 回日本ウイルス学会。2002 年。

H. 知的所有権の取得状況

なし



P(-): Parent cell cultured without erythropoietin

P(+): Parent cell cultured with erythropoietin

Fig.1 Selection of high sensitivity cells for B19

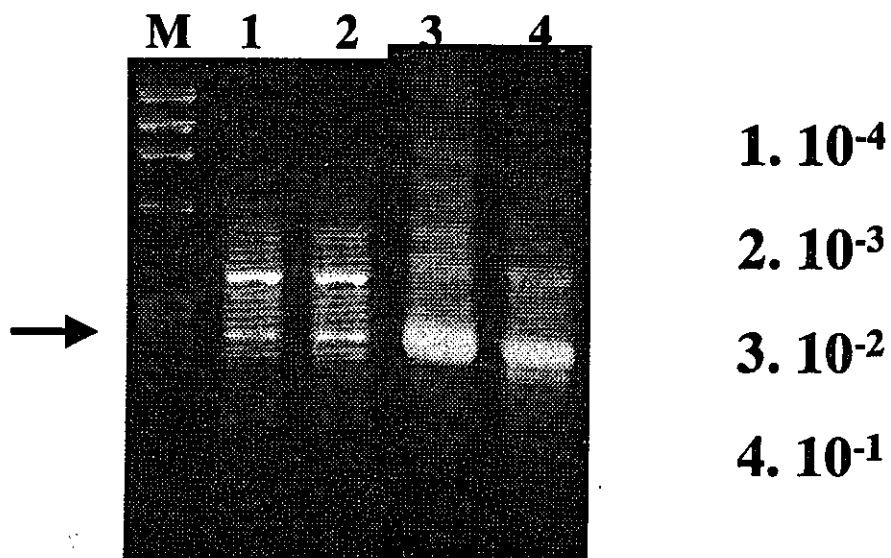


Fig.2 Infected KU812 subline products infectious B19 virions

別紙5

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

書籍

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

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
なし					

"原因不明" 肝炎例に於ける HEV の關与
三代俊治 (東芝病院研究部)

はじめに

Hepatitis E virus (HEV) によって惹起される E 型肝炎は、決して『未知の感染症』ではないが、日本にも「土着の HEV 株」が存在することは『未知』だった。昨年度の研究で我々は「日本固有株」と思われる HEV 株 (JRA1) の全長塩基配列を明らかにしたが、今年度は更に調査の網を拡げ、国内の複数施設との共同研究によって、主として従来「原因不明」とされてきた急性・劇症肝炎例を対象とする分子疫学的解析を通じて、本邦に於ける HEV 感染のリスク評価を行った。

予備的全国調査

札幌の手稲溪仁會病院との共同研究によれば、1999 年 12 月から 2002 年 11 月までの 3 年間に同病院に入院した原因不明急性肝炎 33 例中の 13 例 (39%) が HEV RNA 陽性であった。北海道血液センターとの共同研究では、ALT 値が 500 を越えたドナー 18 名中 6 名 (33%) に HEV RNA を検出し得た。

新潟大學第三内科及び埼玉醫科大學との共同研究では、同地域に於けるその数字は夫々 21%と 18%であった。

岡山の川崎醫大及び愛媛醫大第三内科の合計 44 本の原因不明例由来血清に於いては、HEV RNA 陽性例は僅かに岡山の 1 例のみであった。2%。

厚労省難治性肝疾患研究班劇症肝炎分科會から入手した「西日本に偏っている検体群」(青森 1, 埼玉 1, 神奈川 5, 長野 1, 愛知 2, 京都 1, 大阪 1, 岡山 3, 愛媛 3, 福岡 6) 総計 24 本中には HEV RNA 陽性例がゼロだった。

以上、おしなべて、東に較べて西が低率であるという傾向 (『東高西低』) が何に由来

するのか、今後の大きな研究課題の一つである。

輸血後 E 型肝炎

日赤北海道血液センターとの共同研究で、輸血後 E 型肝炎疑診例に於けるドナーとレシピエントの HEV RNA 塩基配列の解析を行った。その結果、当該例に於いては、ドナーとレシピエントの HEV RNA 塩基配列が、二つの異なる領域に於いて完全一致していた。

分画製剤中の HEV RNA の有無

日赤血漿分画センターとの共同研究で、血漿分画製剤中の HEV RNA の存在の有無を検討した。凝固因子製剤・アルブミン製剤各々数ロットを調査した結果、全て HEV RNA 陰性であった。

結語

我國に於いて、輸入感染ではない E 型肝炎の發生が看過出来ぬ頻度で存在するを知り得た。感染経路に zoonosis が関与している可能性も充分にある故、今後の研究の視野はヒト以外の動物種にも拡げる必要がある。Blood-borne の感染ルートも無視し得ない。

References

- [1]. Takahashi K, Kang JH, Ohnishi S, Hino K, and Mishiro S. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus recovered from Japanese patients with acute sporadic hepatitis. J Infect Dis 185, 1342-1345 (2002).
- [2]. Mishiro S, Takahashi K, Kang JH, Ohnishi S, and Hino K. Reply to Aikawa et al's "Identification of indigenous hepatitis E virus from a Japanese patient who contracted sporadic acute hepatitis in 1982". J Infect Dis 186, 1536-1537 (2002).

平成14年度研究成果の刊行

研究課題名： 未知の感染症のリスク評価に関する研究
 分担研究者名： 三代俊治
 所属： 東芝病院研究部

著者	論文タイトル	誌名	巻	頁	年
Takahashi K, Kang JH, Ohnishi S, Hino K, and Mishiro S	Genetic heterogeneity of hepatitis E virus recovered from Japanese patients with acute sporadic hepatitis.	J Infect Dis	185	1342-5	2002
Mishiro S, Takahashi K, Kang JH, Ohnishi S, and Hino K.	Reply to Aikawa et al's "Identification of indigenous hepatitis E virus from a Japanese patient who contracted sporadic acute hepatitis in 1982".	J Infect Dis	186	1536-7	2002

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室長
研究協力者 李 天成 国立感染症研究所ウイルス第二部主任研究官
鈴木亮介 国立感染症研究所ウイルス第二部研究員

研究要旨 TT ウイルス (TTV) の感染増殖における宿主指向性を規定するメカニズムについては、ほとんど明らかにされていない。本研究では、種々の培養細胞株における TTV 遺伝子の転写活性を比較検討し、TTV の転写活性には細胞選択性があること、サル、マウスなどの動物種、また腎臓などの非肝臓細胞でも高い活性を示す細胞が存在すること、を明らかにした。また、非翻訳遺伝子内にコアプロモーター及びエンハンサー領域を同定してきたが、さらにエンハンサーの上流に、転写活性を負に制御するリプレッサー領域が存在する可能性が示唆された。

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。また、TTV 遺伝子は末梢血単核球や骨髓細胞でも検出されることから、肝臓以外でも増殖し感染症をひき起す可能性が考えられる。TTV はそのゲノム構造の特徴（環状一本鎖 DNA）から、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及び遺伝子発現の細胞指向性の解析を行った。

B. 研究方法

東芝病院三代先生、国立国際医療センター土方先生より分与された TTV genotype 13 クローン (SANBAN) の非翻訳領域全体あるいは部分欠損体

をホタルルシフェラーゼレポーターベクター pGL3-Basic に挿入した。ウミシイタケルシフェラーゼを発現する pRL-TK（内部標準）とともに、Lipofectamine を用いて各種細胞株へ導入し、24 時間後に回収した細胞中のルシフェラーゼ活性をルミノメーターで測定した。以下の 10 種類の細胞株を用いた：ヒト肝細胞癌 (HepG2, FLC4)、ヒト結腸癌 (Caco2)、ヒト T 細胞リンパ腫 (MOLT4)、アフリカミドリザル腎臓癌 (GL37, CV1)、マウス肝癌 (CLC7)、マウス繊維芽細胞 (Swiss 3T3)、マウス結腸癌 (CMT93)、チャイニーズハムスター卵巣癌 (CHO)。また、ルシフェラーゼ遺伝子の上流に SV40 プロモーターを持つベクター pGL3-promoter のプロモーター上流またはルシフェラーゼの下流に TTV 非翻訳領域を挿入したプラスミドを用いてエンハンサー活性を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究にもちいた実験材料は全てこれまでに確立されているものであり、臨床材料は使用していない。

C. 研究結果

TTV SANBAN 遺伝子の部分欠損変異を用いたレポーターアッセイから、非翻訳領域全長の場合に比べ、5'末端側 284 塩基を欠損させた場合の方が有意に高いルシフェラーゼ活性を示すことがわかった。この領域（エンハンサーの約 300 塩基上流。nt 3294-3010）が TTV 遺伝子発現においてリプレッサーとして働く可能性が考えられた。

また、TTV プロモーター／エンハンサー活性の細胞指向性を検討するため、非翻訳領域 1 kb を組み込んだレポーターベクターを種々の細胞株に導入しルシフェラーゼ活性を比較した。ヒト肝臓由来細胞株で高いルシフェラーゼ活性が認められたが、GL37、CLC7、CHO 細胞でも同等乃至それ以上の活性が観察された。一方、Caco2、MOLT4、CV1、Swiss3T3、CMT93 細胞におけるルシフェラーゼ活性は、ヒト肝癌細胞の 1/5 以下であった。

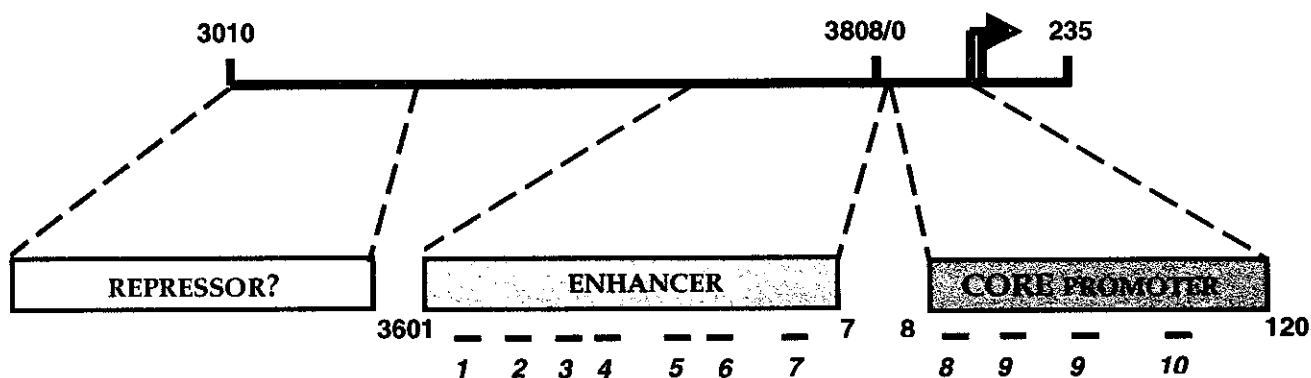
D. 考察

TTV の転写調節機構において、昨年度までに 1) 転写開始点の上流 110 塩基がコアプロモーター領域であること、2) コアプロモーター活性には、TATA ボックスの他、転写因子 USF、Sp1 結合配列が重要であること、3) コアプロモーターの上流に、方向非依存的に転写活性を増強するエンハンサー領域が存在すること、を明らかにして

きた。今年度は、非翻訳領域の 5'末端側（エンハンサーの上流域）に、プロモーター／エンハンサー活性を負に制御するエレメント（リプレッサー）が存在することを示した。また、転写活性の細胞指向性を解析し、ヒト肝癌細胞以外に、アフリカミドリザル腎臓癌、マウス肝癌、チャイニーズハムスター卵巣癌で高い活性が観察されること、ヒト細胞でも、結腸、T 細胞由来株では低活性しか認められないことが明らかとなった。GL37 細胞は、A 型肝炎ウイルスが感染増殖する細胞として知られている。サルの腎臓由来であるが、ヒト肝臓と共通の生物学的性質を有するのかもしれない。また、TTV ファミリーのウイルスは、多くの猿類から見出されているだけでなく、イヌ、ネコ、ブタなどからも分離されている。TTV 転写活性には細胞選択性があるものの、ヒト以外の数種類の動物細胞で高い転写活性を示したことは、このウイルスの宿主域の広さを反映しているものと考えられる。

図 1 に、TTV の転写調節機構に関するこれまでの知見をまとめた。エンハンサー領域の中には、SANBAN クローンだけでなく他の TTV 株でも保存されている 8 箇所の転写因子結合部位が存在する。これらの機能解析及びリプレッサーとの相互作用を解析することで、TTV 遺伝子発現の細胞選択性の機序が明らかになるものと思われる。

図 1 TTV 遺伝子の転写調節領域



1: CREB, 2: YY1, 3: GCR1, 4: TBP, 5: NRF-1, 6: ETF, 7: AP-2 α , 8: USF, 9: Sp1, 10: TATA

E. 結論

- (1) TTV 非翻訳遺伝子のエンハンサー領域の上流に転写活性を負に制御するリプレッサーが存在する可能性がある。
- (2) TTV の転写活性には細胞選択性がある。サル、マウスなどの動物種、また腎臓などの非肝細胞でも高い活性を示す細胞が存在する。

F. 健康危険情報

TTV 及びその近縁ウイルスについて、健康危険情報として報告しなければならない情報はない。

G. 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 - α modulates its transcriptional activity. *Hepatology* 35, 937-946, 2002.
2. Aizaki H., Otsuka M., Matsuda M., Li Y.W., Harada T., Kawakami H., Seki N., Matsuura Y., Miyamura T. and Suzuki T. Expression profiling of liver cell lines expressing entire or parts of hepatitis C virus open reading frame. *Hepatology* 36, 1431-1438, 2002.
3. Tsutsumi T., Suzuki T., Moriya K., Yotsuyanagi H., Shintani Y., Fujie H., Matsuura Y., Kimuta S., Koike K., and Miyamura T. Intrahepatic cytokine expression and AP-1 activation in mice with transgene for hepatitis C virus core protein. *Virology* 304, 415-424, 2002.
4. Otsuka M., Aizaki H., Kato N., Suzuki T., Miyamura T., Omata M., and Seki N. Differential cellular gene expression induced by hepatitis B and C viruses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 443-447, 2003.
2. 学会発表
 1. Suzuki, T., Suzuki, R., Matsuura, Y., and Miyamura, T. Molecular Determinants for the Subcellular Localization of HCV Core Protein. The 24th Joint Meeting of the United States-Japan Hepatitis Panels, Tokyo, 2003.
 2. Aizaki H., Suzuki T., Matsuda M., Murakami K., Ishii K., Nagamori S., Kawakami H., Ishiko H., Kawada M., Matsuura T., Hasumura S., Matsuura Y., and Miyamura T. Production and release of infectious HCV particles from persistently infected human liver cell cultures transfected with full length-HCV RNA. 9th International Meeting on HCV and Related Viruses, San Diego, USA, July 7-11, 2002.
 3. Sasano, T., Shimoike, T., Matsuura, Y., Miyamura, T., and Suzuki, T. Characteristic bases in HCV 5'UTR among genotypes identified by principal component and multidimensional scaling analyses.
 4. Suzuki R., Sakamoto, S., Tsutsumi, T., Rikimaru, A., Shimoike, T., Machida, S., Matsuura, Y., Miyamura, T., and Suzuki, T. Molecular determinants for the subcellular localization of HCV core protein.
 5. Moriishi, K., Okabayashi, T., Nakai, K., Moriya, K., Koike, K., Murata, S., Chiba, T., Tanaka, K., Suzuki R., Suzuki, T., Miyamura, T., and Matsuura, Y. Nuclear localization of HCV core protein through PA28gamma-dependent pathway.
 6. Tsutsumi, T., Matsuda M., Moriya, K., Miyoshi, H., Fujie, H., Shintani, Y., Koike, K., Suzuki, T., and Miyamura, T. Proteomics analysis of mitochondrial proteins in the liver of the hepatitis C virus core-transgenic mouse and hepG2 cells expressing the core protein.
 7. 堤武也、鈴木哲朗、森屋恭爾、新谷良澄、藤

- 江肇、三好秀征、松浦善治、小池和彦、宮村達男. C型肝炎ウイルスコア遺伝子トランスジェニックマウスの肝臓内における mitogen-activated protein kinase の活性化の検討. 第 38 回日本肝臓学会総会, 2002 年 6 月, 大阪.
8. 堤 武也, 鈴木哲朗, 森屋恭爾, 新谷良澄, 藤江 肇, 三好秀征, 松浦善治, 小池和彦, 宮村達男. C型肝炎ウイルスコア遺伝子トランスジェニックマウスの肝臓内における MAPK の活性化の検討. 第 61 回日本癌学会総会. 2002 年 10 月, 東京.
9. 町田早苗, 石井孝司, 鈴木亮介, 赤塚俊隆, 鈴木哲朗, 宮村達男. 弱毒ワクシニアウイルス DIs を用いた C型肝炎ウイルス構造蛋白の発現. 第 50 回日本ウイルス学会総会. 2002 年 10 月, 札幌.
10. 村上恭子, 染谷友美, 根岸英雄, 石井孝司, 岩堀 徹, 相崎英樹, 鈴木哲朗, 宮村達男. HCV レプリコン活性に関与する宿主因子の検索. 同上.
11. 鈴木亮介, 坂本真一郎, 堤 武也, 下池貴志, 松浦善治, 宮村達男, 鈴木哲朗. C型肝炎ウイルスコア蛋白質の細胞内局在を規定するシグナルの解析. 同上.
12. 堤 武也, 松田麻未, 森屋恭爾, 三好秀征, 藤江 肇, 新谷良澄, 小池和彦, 鈴木哲朗, 宮村達男. C型肝炎ウイルスコア蛋白発現細胞におけるミトコンドリア蛋白のプロテオミクス解析. 同上.
13. 森石恒司, 中井康介, 鈴木亮介, 鈴木哲朗, 宮村達男, 松浦善治. PA28 γ による C型肝炎ウイルスコアタンパク質の核局在と核移行. 第 25 回日本分子生物学会. 2002 年 12 月, 横浜.
14. 亀岡洋祐, Persad Amanda, 小池和彦, 堤 武也, 松浦知和, 須藤 勉, 井出達也, 田中一雄, 佐田通夫, 日野邦彦, 神代正道, 橋本雄之, 宮村達男, 鈴木哲朗. G型肝炎ウイルス

感染を制御する宿主遺伝要因の探索. 同上.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

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
T. Suzuki	The ubiquitin system and oocyte maturation	H. Miyamoto N. Manabe	Reproductive Biotechnology			2002	53-57

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Tsutsumi T., Suzuki T., Shimoike T., Suzuki R., Moriya K., Shintani Y., Fujie H., Matsuura Y., Koike K., Miyamura T.	Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor - α modulates its transcriptional activity.	Hepatology	35	937-946	2002
Aizaki H., Otsuka M., Matsuda M., Li Y.W., Harada T., Kawakami H., Seki N., Matsuura Y., Miyamura T. Suzuki T.	Expression profiling of liver cell lines expressing entire or parts of hepatitis C virus open reading frame.	Hepatology	36	1431-1438	2002
Tsutsumi T., Suzuki T., Moriya K., Yotsuyanagi H., Shintani Y., Fujie H., Matsuura Y., Kimuta S., Koike K., Miyamura T.	Intrahepatic cytokine expression and AP-1 activation in mice with transgene for hepatitis C virus core protein.	Virology	304	415-424	2002
Otsuka M., Aizaki H., Kato N., Suzuki T., Miyamura T., Omata M., Seki N.	Differential cellular gene expression induced by hepatitis B and C viruses.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	300	443-447	2003

HBV pre-S 遺伝子変異株の流行様式の解明－世界 10 ヶ国における比較研究

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：

1. Huy T.T. Tran、丁 欣、岩城陽子（国立感染症研究所 感染病理部）
2. Teresa Casanovas Taltavull: Hospital of Bellvitge, Barcelona, Spain
3. Khin Maung Win: Yangon General Hospital, Yangon, Myanmar
4. Vo Xuan Quang and Nguyen Phuong: Cho Ray Hospital, Ho Chi Minh City, Vietnam
5. Kwang-Hyub Han: Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea
6. Andrei V. Smirnov: Russian State Medical University, Moscow, Russia
7. Pairoj Luengrojankul: Mahidol University Siriraj Hospital, Bangkok, Thailand
8. Pradeep Krishna Shrestha: Tribhuvan University Teaching Hospital, Katmandu, Nepal
9. Hongxi Gu: Harbin Medical University, Harbin, China
10. Abdel Rahman El-Zayadi: Cairo Liver Center, Cairo, Egypt
11. La Fuente Zerain: Japanese Hospital, Santa Cruz, Bolivia
12. William Ampofo: University of Ghana, Legon, Ghana
13. Koichi Ishikawa: National Institute of Infectious Diseases, Tokyo
14. Shigeki Hayashi: National Disaster Medical Center, Tokyo
15. Naohiko Masaki and Chiaki Miyoshi: International Medical Center of Japan, Tokyo
16. Alfred M. Prince: The New York Blood Center, New York, U.S.A.

研究要旨

HBV pre-S 変異株の流行実態を世界 10 ヶ国との共同研究から実施した。その結果、HBV 浸淫地域である東南アジア諸国で高い頻度で HBV 変異株が流行している実態が明らかとなった。

A. 目的

HBV 変異株の流行様式を明らかにすることは、病態との関連やワクチンによる予防対策、治療手段、あるいは安定した血清診断法を確立する上で重要である。我々は肝炎ウイルス感染症の国際比較を推進しているが、その一環として世界 10 カ国との共同研究から HBV pre-S 領域変異株の流行様式を検討することを目的とした。

B. 研究方法

日本、韓国、中国、ベトナム、ミャンマー、ネパール、米国、スペイン、ボリビア、ガーナの 10 カ国から収集した HBV 陽性血清計 126 例を対象

とした。血清 100 μ l から核酸を抽出した後、HBV pre-S1～S 領域を PCR 法にて増幅した。得られた PCR 産物を用いてダイレクトシーケンスを行い、塩基配列を決定した。

C. 研究成果

検索した 126 例中 26 例（20.6%）に pre-S deletion を伴った HBV 変異株が観察された。国別では、ベトナム 53.6% (15/28)、ミャンマー 23.3% (7/30)、中国 50% (1/2)、ネパール 33.3% (1/3)、韓国 14.3% (1/7)、ガーナ 9.1% (1/11) の検出率であった。日本、米国、スペインでは観察されなかった。疾患別にみると、肝硬変、肝癌例が HBV 変異株の 58% を

占めた。欠損アミノ酸数は、1~30個と幅広く認められ、その多くは pre-S2 領域(88.5%)に出現した他、2例が pre-S1、2例が pre-S1 と pre-S2 両領域に出現した(図1)。興味あることに、pre-S2 開始コドンにおける変異が 27%(7/26)に観察された。1例は ATG の欠損、6例はメチオニン置換を伴った変異であった。HBV ゲノタイプとの関連では、タイプ C で最も高率(84.6%)に出現した。

D. 考案および結語

本研究は更に参加国を増やして現在進行中であるが、今までの成績から東南アジア諸国では HBV pre-S deletion mutant 株が流行している実態が明らかとなった。特に肝硬変、肝癌患者で多く検出されたことや、ゲノタイプ C で高率に検出された事実は、変異株と肝病態との関連を考える上で注目すべき所見である。また、pre-S1、pre-S2 抗原含有第三世代ワクチンに対する逃避株との関連で今後検討する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) William Ampofo, Nicholas Nii-Trebi, Justina Ansah, Kenji Abe, Hideo Naito, Simeon Aidoo, Victor Nuvor, James Brandful, Naoki Yamamoto, David Ofori-Adjei and Koichi Ishikawa: Prevalence of blood-borne infectious diseases in blood donors in Ghana. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 3523-3525: 2002
- 2) Kenji Ito, Takumi Kajiura and Kenji Abe: Effect of ethanol on antigenicity of hepatitis B virus envelope proteins. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 55: 117-121, 2002
- 3) Yi Jin, Kenji Abe, Yuko Sato, Kiyoshi Aita, Hiroshi Irie, Junji Shiga: Hepatitis B and C virus infection and p53 mutations in human hepatocellular carcinoma in Harbin, Heilongjian Province, China. *Hepatology Research* 24:

379-384, 2002

- 4) Morio Mikuni, Mitsuhiro Moriyama, Naohide Tanaka, Kenji Abe, Yasuyuki Arakawa: SEN virus infection does not affect the progression of non-A to -E liver disease. *Journal of Medical Virology* 67: 624-629, 2002
- 5) Yoko Iwaki, Naoto Aiba, Huy Thien Tuan Tran, Xin Ding, Shigeki Hayashi, Yasuyuki Arakawa, Tetsutaro Sata and Kenji Abe: Simian TT virus (s-TTV) infection in patients with liver diseases. *Hepatology Research (in press)*
- 6) Xin Ding, Young Nyun Park, Teresa Casanovas Taltavull, Swan N. Thung, Xiaoming Jin, Yi Jin, Nguyen Sao Trung, Yoshihiro Edamoto and Kenji Abe: Geographic characterization of hepatitis virus infections, genotyping of hepatitis B virus and p53 mutation in hepatocellular carcinoma analyzed by *in situ* detection of viral genomes from carcinoma tissues: Comparison in six different countries. *Japanese Journal of Infectious Diseases (in press)*
- 7) Makoto Hirano, Xin Ding, Huy TT Tran, Tian-Cheng Li, Naokazu Takeda, Tetsutaro Sata, Shin Nakamura and Kenji Abe: Prevalence of antibody against hepatitis E virus in various non-human primates- evidence of widespread infection among Japanese monkeys. *Japanese Journal of Infectious Diseases (in press)*
- 8) Xin Ding, Hongxi Gu, Zhao-Hua Zhong, Xu Zilong, Huy Thien-Tuan Tran, Yohko Iwaki, Tian-Cheng Li, Tetsutaro Sata and Kenji Abe: Molecular epidemiology of hepatitis viruses and genotypic distribution of hepatitis B and C viruses in Harbin, China. *Japanese Journal of Infectious Diseases (in press)*

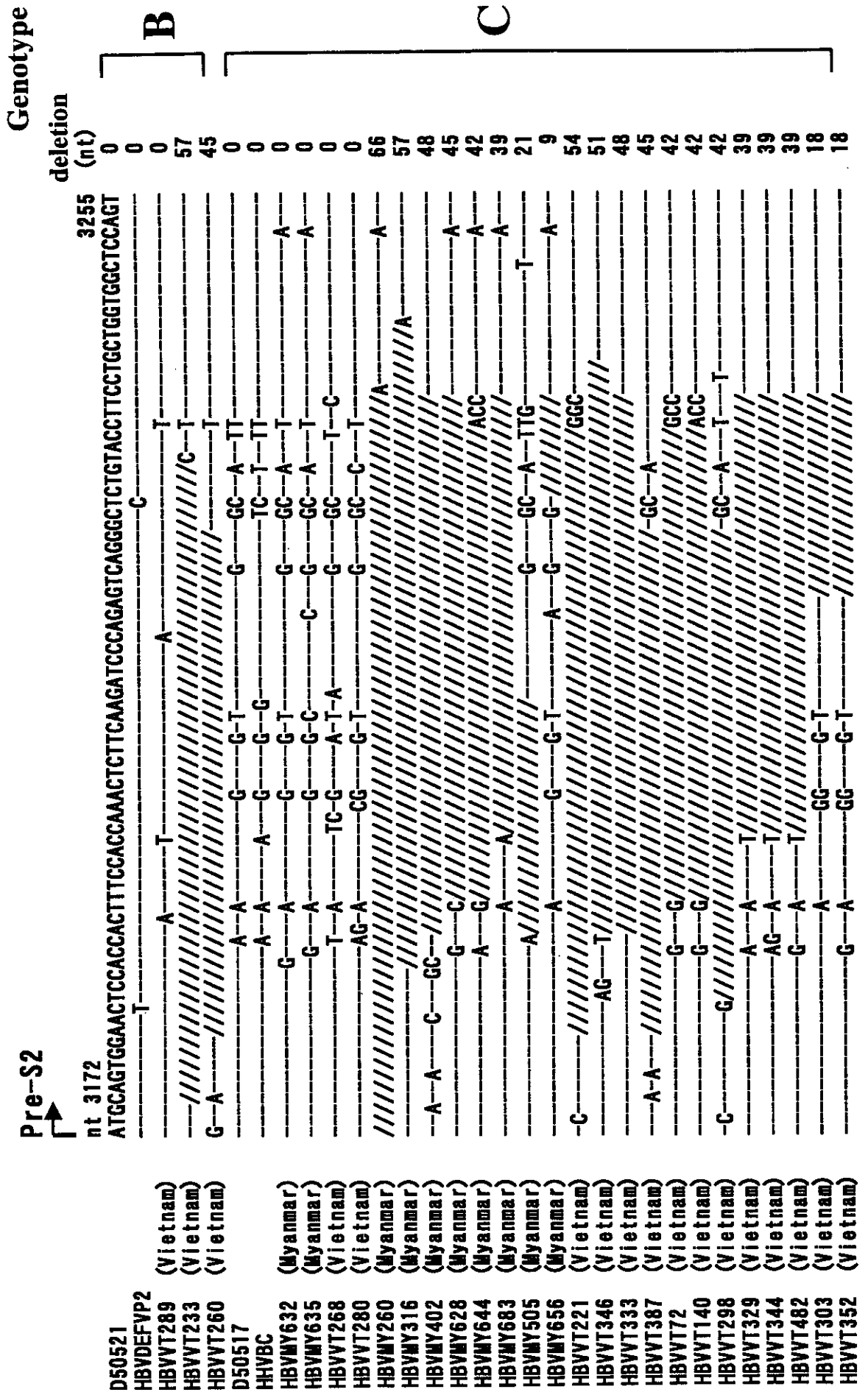
2. 学会発表

- 1) Huy TT Tran, Hiroshi Ushijima, Hideo Naito, Xin Ding, Yoko Iwaki, Eriko Hayakawa, Shigeki Hayashi, Tetsutaro Sata and Kenji Abe: Geographic characterization of HBV pre-S mutant-Comparison in 11 different countries. 53rd Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, November 2002, Boston, U.S.A.
- 2) Xin Ding, Young Nyun Park, Teresa Casanovas Taltavull, Swan N. Thung, Xiaoming Jin, Nguyen Sao Trung, Yoshihiro Edamoto, Tetsutaro Sata and Kenji Abe: Genotypic distribution of HBV and HCV and p53 mutation in hepatocellular carcinoma analyzed by *in situ* detection of viral genomes from carcinoma tissues: Comparison in six countries. 53rd Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, November 2002, Boston, U.S.A.
- 3) Yoko Iwaki, Naoto Aiba, Xin Ding, Huy TT Tran, Eriko Hayakawa, Shigeki Hayashi, Yasuyuki Arakawa, Tetsutaro Sata and Kenji Abe: Simian TT virus (s-TTV) infection in patients with liver disease. 53rd Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, November 2002, Boston, U.S.A.
- 4) Eriko Hayakawa, Andrei V. Sminov, Vasily F. Uchaikin, Huy T.T. Tran, Xin Ding, Tetsutaro Sata and Kenji Abe: Molecular epidemiology of hepatitis viruses and GBV-C among children in Moscow, Russia. 53rd Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, November 2002, Boston, U.S.A.
- 5) 丁 欣、朴 永年、Teresa C. Taltavull、金 毅、金 曉明、Nguyen S. Trung、Swan N. Thung、枝元良広、佐多徹太郎、阿部賢治：地理病理学的観点からみた肝発癌と HBV、HCV の感染および p53 ゲノム変異の関連。第 76 回日本感染症学会総会、2002 年 4 月、東京
- 6) 岩城陽子、相羽直人、丁 欣、Huy TT Tran、佐多徹太郎、荒川泰行、林 茂樹、阿部賢治：ヒトにおける simian-TTV (s-TTV) の感染。第 76 回日本感染症学会総会、2002 年 4 月、東京
- 7) 早川依里子、枝元良広、岩城陽子、丁 欣、Huy TT Tran、佐多徹太郎、阿部賢治：ヒト胆汁中からの TTV DNA の検出とウイルス様粒子の観察。第 76 回日本感染症学会総会、2002 年 4 月、東京
- 8) 早川依里子、Andrei V. Smirnov, Vasily F. Uchaikin, Huy T.T. Tran、岩城陽子、丁 欣、佐多徹太郎、阿部賢治：モスクワの小児における HBV、HCV および GBV-C 感染の実態 - 分子疫学的解析。第 76 回日本感染症学会総会、2002 年 4 月、東京
- 9) Huy TT Tran, Khin Maung Win, Vo Xuan Quang, Kazuhiko Nakai, Hiroshi Ushijima, Shigeki Hayashi, Ding Xin, Tetsutaro Sata and Kenji Abe: Molecular epidemiological characterization of hepatitis B, C, D, E viruses and GBV-C infections in Vietnam and Myanmar. 第 76 回日本感染症学会総会、2002 年 4 月、東京
- 10) Huy TT Tran、内藤秀夫、丁 欣、佐多徹太郎、牛島廣治、阿部賢治：HBV 変異株出現様式の国際間比較—第一報：HBV pre-S 変異株の流行。第 38 回日本肝臓学会総会、2002 年 6 月、大阪
- 11) 丁 欣、朴 永年、Teresa C. Taltavull、金 曉明、Nguyen S. Trung、Swan N. Thung、佐多徹太郎、阿部賢治：肝発癌と HBV、HCV の感染および P53 ゲノム変異の関連—各国由来肝臓組織を用いた民族疫学、地理病理学的解析—。第 38 回日本肝臓学会総会、2002 年 6 月、大阪
- 12) 岩城陽子、相羽直人、林 茂樹、荒川泰行、佐多徹太郎、阿部賢治：Simian-TTV (s-TTV) の人体感染と臨床的意義。第 38 回日本肝臓学会総会、2002 年 6 月、大阪

13) 早川依里子、Andrei V. Smirnov, Vasily F. Uchaikin、丁 欣、Huy T.T. Tran、佐多徹太郎、阿部賢治：モスクワの小児における肝炎ウイ

ルスおよび GBV-C 感染の分子疫学. 第 38 回
日本肝臓学会総会、2002 年 6 月、大阪

Alignment of nucleotide sequences of HBV pre-S2 deletion mutant isolated from Vietnamese and Myanmar



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
Minako Hijikata, <u>Kenji Abe</u> , Khin Maung Win, Yohko Shimizu, Naoto Keicho and Hiroshi Yoshikura	Identification of new parvovirus DNA sequence in swine sera from Myanmar.	Japanese Journal of Infectious Diseases	54	244-245	2002
William Ampofo, Nicholas Nii-Trebi, Justina Ansah, <u>Kenji Abe</u> , Hideo Naito, Simeon Aidoo, Victor Nuvor, James Brandful, Naoki Yamamoto, David Ofori-Adjei and Koichi Ishikawa	Prevalence of blood-borne infectious diseases in blood donors in Ghana.	Journal of Clinical Microbiology	40	3523-3525	2002
Kenji Ito, Takumi Kajiura and <u>Kenji Abe</u>	Effect of ethanol on antigenicity of hepatitis B virus envelope proteins.	Japanese Journal of Infectious Diseases	55	117-121	2002
Yi Jin, <u>Kenji Abe</u> , Yuko Sato, Kiyoshi Aita, Hiroshi Irie, Junji Shiga	Hepatitis B and C virus infection and p53 mutations in human hepatocellular carcinoma in Harbin, Heilongjian Province, China.	Hepatology Research	24	379-384	2002
Morio Mikuni, Mitsuhiro Moriyama, Naohide Tanaka, <u>Kenji Abe</u> , Yasuyuki Arakawa	SEN virus infection does not affect the progression of non-A to -E liver disease.	Journal of Medical Virology	67	624-629	2002
Yoko Iwaki, Naoto Aiba, Huy Thien Tuan Tran, Xin Ding, Shigeki Hayashi, Yasuyuki Arakawa, Tetsutaro Sata and <u>Kenji Abe</u>	Simian TT virus (s-TTV) infection in patients with liver diseases.	Hepatology Research		印刷中	
Xin Ding, Young Nyun Park, Teresa Casanovas Taltavull, Swan N. Thung, Xiaoming Jin, Yi Jin, Nguyen Sao Trung, Yoshihiro Edamoto and <u>Kenji Abe</u>	Geographic characterization of hepatitis virus infections, genotyping of hepatitis B virus and p53 mutation in hepatocellular carcinoma analyzed by <i>in situ</i> detection of viral genomes from carcinoma tissues: Comparison in six different countries.	Japanese Journal of Infectious Diseases		印刷中	