

### 1) 組換え中空粒子の構造

中空粒子は構造蛋白のN末端側111個のアミノ酸を欠失させることによって初めて粒子構造を形成できるようになったものである。これまでの血清学的な性状解析からはこの組換え粒子はネイティブなHEV粒子と区別できない抗原性と免疫原性を持った粒子であることが明らかになっているが、この粒子が担う抗原構造をさらに詳細に明らかにするため、クリオ電子顕微鏡による撮影と画像解析による構造解析を行った。解像度は22オングストロームである。その結果、HEV VLPsは正二十面体の2回対称軸上に突出したダイマーをもつT=1粒子の三次構造であることが推定された。中空粒子の中心から50オングストロームの蛋白殻底から135オングストロームの最大突出部を占める蛋白殻はダイマーが30ユニット集合して形成されていた。いまだネイティブなHEV粒子の微細構造や構成蛋白の性状が明らかになっていないので、組換え粒子がネイティブなHEV粒子と同じ構造であるかどうかは現時点では結論できないが、単クローン抗体と結合させた後三次構造を解析し、単クローン抗体の認識部位から構造を解析する実験が進行中である。

### 2) 組換えE型肝炎ウイルス中空粒子を経口投与したカクイザルの免疫応答

マウスにおける至適量を基礎にマウスとカクイザルの体重比から一頭当たり10mgのVLPsをミカン果実(2-3房)に注入し、予め絶食しておいたサル2頭に与えた。この方法でサルは確実に摂食することは確認済みである。初回免疫日を0日とし、これを確実にこなうために1日めに同量のVLPsを再度経口投与した。その後14、28、42日に追加免疫を行なった。毎週採血と採便を行い、血中IgM、IgGおよび便中のIgA抗体をVLPsを抗原に用いたELISAで検出した。血中IgM抗体はマウスでみられたような顕著な上昇は観察されなかった。血中IgG抗体は2回目の投与後に上昇し、3回目の投与後にピークに達した。誘導された抗体のレベルはサル間で差が見られたが、抗体上昇のパターンが非常に類似していた。そこでIgG抗体陰性のサル、IgG抗体陽性のサル(E型肝炎患者の便乳剤を静脈注射して感染後、肝炎から回復したもの)をコントロールに、感染防御実験をおこなった。こ

れらのサルに、感染サルの便乳剤をチャレンジウイルスとして静脈注射した後、経時的に採血、採便し、血清ならびに便中のウイルス抗原、ウイルス核酸、生化学マーカー(ALT、AST)、および抗体を測定した。その結果、VLPを経口投与することによって血中IgGが誘導されていたサルでは、HEVに対して明瞭な感染防御が認められたことから、VLPはワクチンとして有望であることが確認された。

### D. 考察

経口投与によってHEV感染に対する感染阻止、あるいは発症阻止が観察されたことから、組換え中空粒子はedible vaccineとして有望である結果が得られた。また、アジュバントを用いなくとも感染防御あるいは発症阻止に十分な抗体を誘導できることが明らかになった。組換えバキュロウイルス発現系で産生される抗原量は他の発現系に比べて圧倒的に多いが、ヒトへ投与するには無理がある。この問題を解決するには、より高い発現量が期待できるトランスジェニック植物の開発が必須である。

### E. 結論

HEV組換え中空粒子は経口投与によって感染阻止あるいは発症阻止に十分な抗体を誘導することができた。

### F. 健康危険情報

これまでE型肝炎は輸入感染症と考えられてきたが、わが国にも少なからず存在することが明らかになってきた。非A非B非C型急性肝炎と診断された場合、原因のひとつとしてE型肝炎を疑うべきである。海外渡航歴の全くない人がE型肝炎と診断される例がわが国でも確認されるようになってきた。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Utagawa ET, Nakazawa E, Matsuo K, Oishi I, Takeda N, Miyamura T: Application of an automated specimen search system installed in a transmission electron microscope for the detection of caliciviruses in clinical specimens. J.

- Virology 2002;100: 49-56.
2. Someya Y, Takeda N, Miyamura T: Identification of Active-Site Amino Acid Residues in the Chiba Virus 3C-Like Protease. *J. Virol.* 2002;76: 5949-5958.
  3. Sheikh S, Sugitani M, Kinukawa N, Moriyama M, Arikawa Y, Komiyama K, Li T-C, Takeda N, Ishaque SM, Hasan M, Suzuki K: Hepatitis E virus infection in fulminant hepatitis patients and apparently healthy population in Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66: 721-724.
  4. Niikura M, Takamura S, Kim G, Kawai S, Saijo M, Morikawa S, Kurane I, Li T-C, Takeda N, Yasutomi Y: Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles as an oral vaccine vehicle presenting foreign epitopes. *Virology* 2002;293: 273-280.
  5. Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinihara M, Uchida K, Natori K, Takeda N, Katayama K: Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods* 2002;100: 107-114.
  6. Kitamoto N, Tanaka T, Natori K, Takeda N, Nakata S, Jiang X, Estes MK: Cross-reactivity among several recombinant calicivirus virus-like particles (VLPs) with monoclonal antibodies obtained from mice immunized orally with one type of VLP. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40: 2459-2465.
  7. Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino FB, Fukushi S, Shinohara M, Uchida K, Suzuki Y, Gojobori T, Takeda N: Phylogenetic Analysis of the Complete Genome of 18 Norwalk-like Viruses. *Virology* 2002;299: 225-239.
  8. Ishiko H, Shimada Y, Yanoha M, Hashimoto O, Hayashi A, Sakae K, Takeda N: Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification using the VP4 sequence. *J. Infect. Dis.* 2002;185: 744-754.
  9. Ishiko H, Miura R, Shimada Y, Hayashi A, Yamazaki S, Takeda N: Human rhinovirus 87 identified as human enterovirus 68 by VP4-based molecular diagnosis. *Intervirology* 2002;45: 136-141.
2. 学会発表
- 国際学会
1. Yatsushashi H, Yano K, Koga M, Ishibashi H, M. Y. Takeda N, Li T-C, Miyamura T, Ahmad N, Kahn M: Hepatitis E in Japan
  2. -Incidence and Comparison of HEV Markers between Japan and Bangladesh-. Asian Pacific Association for the Study of the Liver Meeting 2002, Taipei, Taiwan, 2002 Sept 26-29.
  3. Kamata K, Kato D, Sato T, Gondaira F, Takasugi K, Sato S, Natori K, Kitamoto N, Miyamura T, Tanaka T, Takeda N: Development of an ELISA-Based Assay for the Detection and Genogrouping of Norwalk-Like
  4. Virus in Stools using Genogroup I and II-Specific Monoclonal Antibodies. ASM 102nd General Meeting, Salt Lake City, 2002 May 20-23.
  5. Li T-C, Takeda N, Xing L, Haag L, Nilsson JC, R H., Miyamura T: Characterization of Self-Assembled Virus-Like Particles of Human Polyomavirus BK Generated by Recombinant Baculoviruses. XIIth International Congress of Virology, Paris, France, 2002 July 27-Aug 1.
  6. Kobayashi S, Sakae K, Kamata K, Sato T, Natori K, Takeda T: Development of immunomagnetic capture RT-PCR for detection of "Norwalk-like viruses" in foods. XIIth International Congress of Virology, Paris, France, 2002 July 27-Aug 1.
  7. Katayama K, Horikoshi-Shirato H, Oka T, Natori N, Takeda N, Miyamura T: Genotyping of "Norwalk-like viruses" based on phylogenetic analyses of 18 full genome sequences. XIIth International Congress

of Virology, Paris, France, 2002 July 27-Aug 1.

8. Wakuda M, Sasaki J, Urasawa T, Urasawa S, Takeda N, Taniguchi K: Completenucleotide sequemce of Otofuke-like virus, a member of Norwalk-like viruses in Caliciviridae, detected in Japan. XIIth International Congress of Virology, Paris, France, 2002 July-27-Aug 1.

#### 国内学会

1. 松原尚子、片山和彦、白土東子、岡 智一郎、小川智子、武田直和、浜野国勝、福士秀悦、小嶋慈之、影山 努、高井礼子、星野文則、宮村達男 バキュロウイルス発現系を用いた Norwalk-like viruses タンパク質の発現 第 25 回日本分子生物学会年会、横浜、2002 年 12 月 11-14
2. Masaru Tamura, Katsuro Natori, Masahiko Kobayashi, Tatsuo Miyamura, Naokazu Takeda Soluble histone molecules inhibit attachment of Norwalk-like viruses to mammalian cells 第 25 回日本分子生物学会年会、横浜、2002 年 12 月 11-14
3. 李 天成、武田直和、宮村達男 HEV そのウイルス学 宮川庚子記念研究財団ワークショップ「日本の E 型肝炎」、横浜、2002 年 10 月 26 日
4. 高村史記、新倉昌浩、武田直和、宮村達男、保富康宏 HIV CTL エピトープ表出 E 型肝炎ウイルス様中空粒子の経口投与による粘膜面におけるエピトープ特異的細胞性免疫の誘導 第 50 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002 年 10 月 16-18 日。
5. 石古博昭、三浦里香、島田康司、山崎修道、武田直和 VP4 塩基配列に基づく系統解析によって、ヒトライノウイルス 87 型はヒトエンテロウイルス 68 型に同定された 第 50 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002 年 10 月 16-18 日。
6. 内野清子、岩上泰雄、三好龍也、吉田永祥、前田章子、田中智之、鎌田公仁夫、北本憲利、名取克郎、武田直和 NLV 抗原検出 ELISA 法を用いた食中毒事例への対応と評価・問題点 第 50 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002 年 10 月 16-18 日。
7. 影山 努、小嶋慈之、高井玲子、星野文則、福士秀悦、白土東子、岡 智一郎、片山和彦、武田直和 Norwalk-like viruses を genogroup 特異的に認識するモノクローナル抗体の作製 第 50 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002 年 10 月 16-18 日。
8. 勢戸祥介、入谷展弘、名取克郎、武田直和、久保英幸、綾田 稔、小倉 壽、青木孝祐大阪市内で検出した Alphatron type NV の遺伝子解析および抗原性の解析 第 50 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002 年 10 月 16-18 日。
9. 植木 洋、有田富和、後藤郁男、山本紀彦、佐藤千鶴子、渡邊 節、沖村容子、秋山和夫、山本俊夫、白石廣行、武田直和 感染性胃腸炎患者・河川水・養殖カキから検出した NV の遺伝子解析 第 50 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002 年 10 月 16-18 日。
10. 入谷展弘、勢戸祥介、久保英幸、青木孝祐、名取克郎、武田直和、瀬戸俊之、服部英司、綾田 稔、小倉 壽 乳幼児における Norwalk virus 感染に対する免疫応答 第 50 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002 年 10 月 16-18 日。
11. 白土（堀越）東子、片山和彦、田村 克、名取克郎、岡 智一郎、武田直和、宮村達男 一ウオーク様ウイルスの組織特異性を決定する因子の検討— 第 50 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002 年 10 月 16-18 日。
12. 片山和彦、白土（堀越）東子、岡 智一郎、小嶋慈之、影山 努、福士秀悦、武田直和 Norwalk-like viruses の Full-length cDNA クローンを用いた複製機構の解析 第 50 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002 年 10 月 16-18 日。
13. 李 天成、武田直和、宮村達男 BK ウイルス様中空粒子の三次構造のい解析及び診断への応用 第 50 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002 年 10 月 16-18 日。
14. 保富康宏、高村史記、新倉昌浩、武田直和、宮村達男 E 型肝炎ウイルス (HEV) ウイルス様中空粒子 (VLP) をベクターとして用いた経口ワクチンの開発 第 50 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002 年 10 月 16-18 日。

- ス学会学術集会、札幌、2002年10月16-18日.
15. 武田直和 Histo-blood group antigens とノーウォークウイルスに対する感受性 14回ウイルス性下痢症研究会、札幌、2002年10月15日
  16. 小林慎一、榮 賢司、宮崎 豊、田中智之、名取克郎、武田直和 Immunomagnetic capture RT-PCR 法による食品中のノーウォークウイルスの検出 第23回衛生微生物技術協議会、奈良、2002年7月11-12日.
  17. 田中智之、内野清子、岩上泰雄、吉田永祥、鎌田公仁夫、名取克郎、武田直和 NLV 抗原検出 ELISA 法の普及とその意義 第23回衛生微生物技術協議会、奈良、2002年7月11-12日.
  18. 岩上泰雄、内野清子、鎌田公仁夫)、北元憲利、阪本瑠子、家永信彦、武田直和、田中智之。小児下痢症の腸管内ウイルス重感染の可能性 第43回日本臨床ウイルス学会、秋田、2002年6月.
- H. 知的財産権の出願・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

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野））  
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  
分担研究報告書

in-vitroで定量されるC型肝炎ウイルス量（HCV RNA量copy/ml）と  
チンパンジー感染価（CID/ml）との関係確定のための実験的研究

分担研究者	吉澤浩司	広島大学大学院	疫学・疾病制御学
研究協力者	柚木 久雄	日赤中央血液センター	核酸増幅検査部
	岸本 眞哉	埼玉県赤十字血液センター	研究部
	水井 正明	広島県赤十字血液センター	技術部
	山中 烈次	日本赤十字社	血液事業部
	玉造 滋	(株)ロシュ・ダイアグノスティクス	PCRテクニカルセンター
	友栗 徹士	(株)三和化学研究所	熊本霊長類パーク 実験研究部
	田上 哲也	(株)三和化学研究所	熊本霊長類パーク 実験研究部
	早坂 郁夫	(株)三和化学研究所	熊本霊長類パーク 所長
	田中 純子	広島大学大学院	疫学・疾病制御学
	片山 恵子	広島大学大学院	疫学・疾病制御学
	熊谷 純子	広島大学大学院	疫学・疾病制御学
	小宮 裕	広島大学大学院	疫学・疾病制御学

研究要旨

核酸増幅検査（Nucleic acid Amplification Test：NAT）により血清検体中のC型肝炎ウイルス（HCV）量（HCV RNA量）を定量する方法は、HCV感染のウイルス・血清疫学的研究、C型肝炎の病態解析、治療効果の判定等に広く役立てられている。しかし、NATによりin-vitroで定量されるHCV RNA量とHCVの感染価との関係については必ずしも明らかにはされないまま今日に至っている。

今年度は、HCV感染のウィンドウ期（HCV抗体が産生される以前の感染ごく初期）の血清中に存在するHCV量（NATにより定量されるHCV RNA量：copy/mlで表示される）とヒト以外でHCV感染に感受性を持つことが知られている唯一の実験動物であるチンパンジーを用いた感染実験により得られる感染価（Chimpanzee infectious dosis/ml：CID/ml）との関係を確定することなどを目的とした実験研究を行い、下記の結果を得た。

- 1) HCV感染既往者由来の新鮮凍結血漿（fresh frozen plasma：FFP）をヒトと同一の条件で輸注してもHCVの感染はおこらないこと。
- 2) HCV感染のウィンドウ期のFFPに、融解—再凍結の操作を各1回追加するだけで感染価は少なくとも $10^2$  CID/ml以上のオーダーで減弱すること。
- 3) HCV感染価の減弱を最小限に抑えたHCV感染のウィンドウ期の血清を接種材料とした場合、NATにより定量値として示されるHCV RNAの絶対量として10コピーオーダーのHCVを接種することにより感染は成立すること。

以上の結果は、ウインドウ期の血清について、NATによる定量値として表示されるHCV量（HCV RNA量、copy/ml）と感染価（CID/ml）との関係を初めて明らかにしたものであり、今後様々な医療の分野においてNATにより定量値として示されるHCV RNA量を参考にしてHCVの感染予防対策を立てて行く上での基礎となるものと考えられる。

## A. 研究目的

核酸増幅検査（Nucleic acid Amplification Test：NAT）により、in-vitroで定量値として表示されるC型肝炎ウイルス量（HCV RNA量、copy/ml）と、ヒト以外でHCV感染に感受性を持つことが知られている唯一の実験動物（チンパンジー）を用いた感染実験によって得られる感染価（Chimpanzee infectious dosis/ml：CID/ml）との関係を明らかにすることを目的とする。

本年度は、付随する予備的実験を含めて、

- 1) HCVの感染既往者由来の新鮮凍結血漿（fresh frozen plasma：FFP）をヒトと同一の条件で輸注した場合にHCVの感染は成立するか否かを明らかにすること、
- 2) 凍結、融解操作が感染価の減弱に及ぼす影響を明らかにすること、
- 3) 感染価の減弱を最小限に抑えた接種材料（HCV感染のウインドウ期の血清）中のHCV量（HCV RNA量、copy/ml）と感染価（CID/ml）との関係を明らかにすること、

を目的とする実験を行なった。

## B. 研究方法

核酸増幅検査（NAT）により、HCV RNAの有無、HCV RNA量（copy/ml）を確定した血漿又は血清を接種材料として、ヒト以外の実験動物で唯一HCVの感染に感受性を有することが知られているチンパンジーを用いて感染実験を行った。

実験は、以下の1)～4)より成る。

- 1) HCV感染既往者由来の新鮮凍結血漿

（FFP）を接種材料とした実験

- 2) 融解、再凍結の操作を各1回ずつ加えたHCV感染のウインドウ期の新鮮凍結血漿（接種材料-1）を用いた感染実験
- 3) 感染価の減弱を最小限に抑えたHCV感染のウインドウ期の血清（感染材料-2）確保を目的とした感染実験
- 4) 感染材料-2を用いたHCV感染に必要な最小HCV量決定のための感染実験

HCV抗体の測定にはHCV PHA法（アボットジャパン社製）、およびEIA法（同）を用いた。

HCV RNAの検出にはAmplinat MPX（ロシュ社製）およびn-RT PCRを、HCV RNAの定量にはTaqman PCR、Amplicore monitor（ロシュ社製）を用いた。

## C. チンパンジーを用いた感染実験

- 1)～4)の感染実験について実験方法、結果と考察を順に記す

- 1) HCVの感染既往者由来の新鮮凍結血漿（FFP）を接種材料とした実験

### a) 接種材料

核酸増幅検査（NAT）によりHCV RNAは陰性であったが、HCV抗体陽性（ $2^6 \sim 2^8$  HCV PHA価）であったことからヒトへの使用が不適となった新鮮凍結血漿（FFP）計15 bagを接種材料とした。

### b) チンパンジーへの接種と経過観察

血液型のクロスマッチテストを施行、安

全性を確かめた上で3頭のチンパンジーに下記の手順で輸注した。

実験に用いたチンパンジーの属性と、輸注したFFPの内訳、および量は下記の通りである。

チンパンジーNo.265、7Y ♀、37.9 kg  
に対して

FFP 1 bag (282 g)

チンパンジーNo.267、7Y ♀、42.5 kg  
に対して

FFP 1 bag (273 g)

チンパンジーNo.235、12Y ♀、44.8 kg  
に対して

FFP 23 g × 13 bag pool

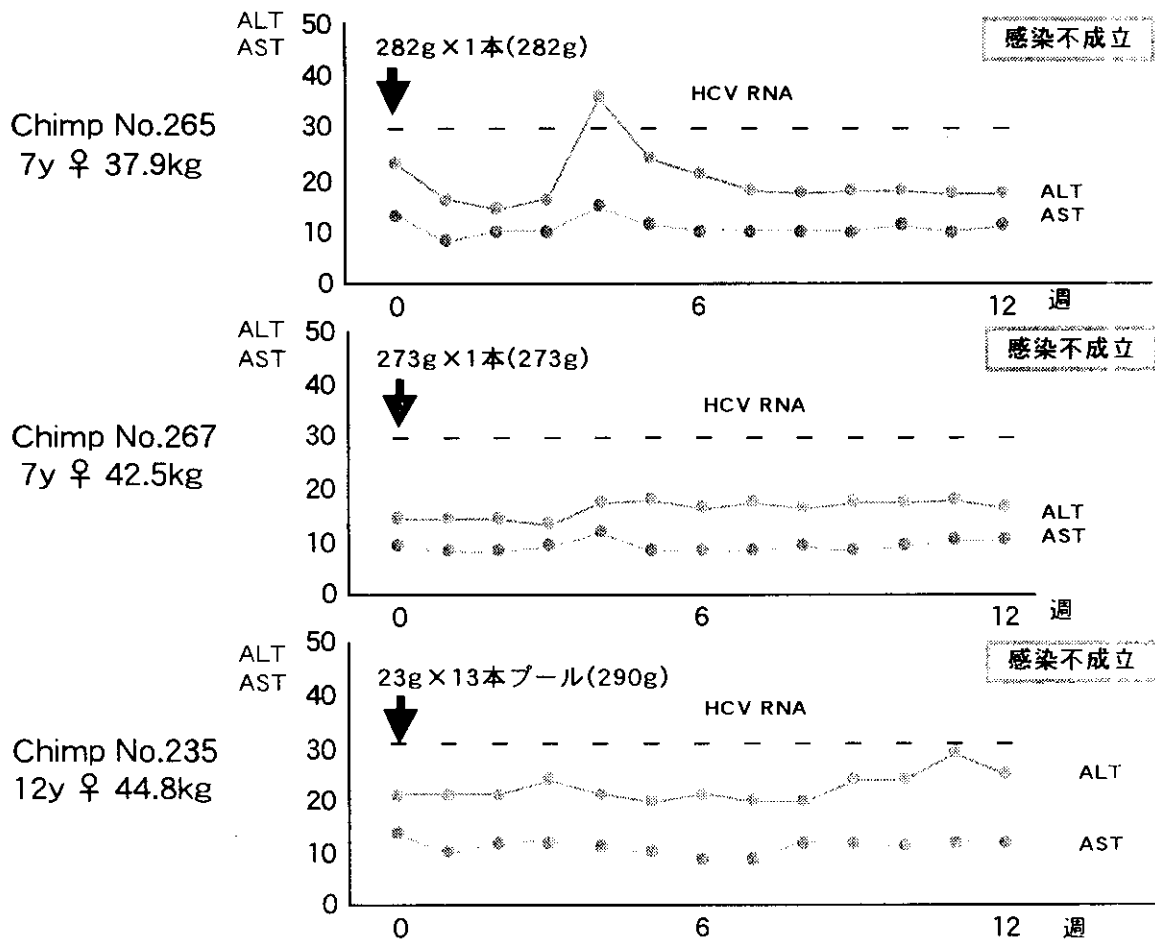
総重量 299 g

ケタラル麻酔下のチンパンジーに、それぞれヒトへの輸注と同一の条件で点滴静注した後、週1回の頻度で採血を行ないつつ、12週まで経過観察を行なった。

c) 結果と考察

単独の献血者由来のFFPを各1 bag 接種したチンパンジーNo.265、267 および13人の献血者由来のFFPをプールした後に接種したチンパンジーNo.235のいずれにも、接種後12週の経過観察期間内にHCV感染の成立は認められなかった(図-1)。

図1. FFP (HCV 抗体陽性、HCV RNA 陰性) 輸注後の経過



接種材料として用いたFFPのHCV抗体価は、 $2^6 \sim 2^8$  HCV PHA価（HCV抗体中力価）であり、いずれもNATによりHCV RNAは検出されていない。このことは、HCV抗体が陽性であっても、HCV RNAが検出されない血漿はHCVの感染源とはならないことを示している。一方、HCV抗体が検出されないか、またはごく低力価のHCV抗体が検出されるにすぎないHCV感染のウィンドウ期の血液のほとんどは日赤血液センターが導入している核酸増幅検査（NAT）によりHCV RNAが検出され、輸血用血液から除外されていることから、現行のHCV抗体の測定と、HCV RNA検出のためのNATの組み合わせによる献血者血液のスクリーニング検査体制により血液の安全性は保持されており、いたずらにHCV抗体の検出感度を上げる必要はないことを示していると考えられた。

## 2) 融解、再凍結の操作を各1回ずつ加えたHCV感染のウィンドウ期の血漿（接種材料-1）を用いた感染実験

### a) 接種材料-1

HCV感染のウィンドウ期にあたることからヒトへの使用が不適となったFFP（HCV抗体陰性、HCV RNA陽性： $7.0 \times 10^6$  copy/ml、HCVのgenotype 1b）1 bagを37℃の温浴にて融解、保存用試験管に分注後、-80℃にて再凍結保存したものを接種材料（接種材料-1）とした。

### b) チンパンジーへの接種と経過観察

接種材料-1を37℃の温浴にて再融解後、あらかじめ採取し、-80℃にて凍結保存しておいた被接種チンパンジーの自己血清にて稀釈後、経静脈的に接種し、以後週1回の頻度で採血を行ないつつ、12週まで経過観察を行なった。実験に用いたチンパンジーの属性と接種材料-1の稀釈倍数および

接種量は下記の通りである。

チンパンジーNo.205、16Y♂、58.8 kg  
に対して

$10^5$  倍稀釈×1 ml

（HCV量、 $10^1$  コピーオーダー）

チンパンジーNo.210、14Y♂、63.1 kg  
に対して

$10^4$  倍稀釈×1 ml

（HCV量、 $10^2$  コピーオーダー）

チンパンジーNo.268、7Y♂、43.3 kg  
に対して

$10^3$  倍稀釈×1 ml

（HCV量、 $10^3$  コピーオーダー）

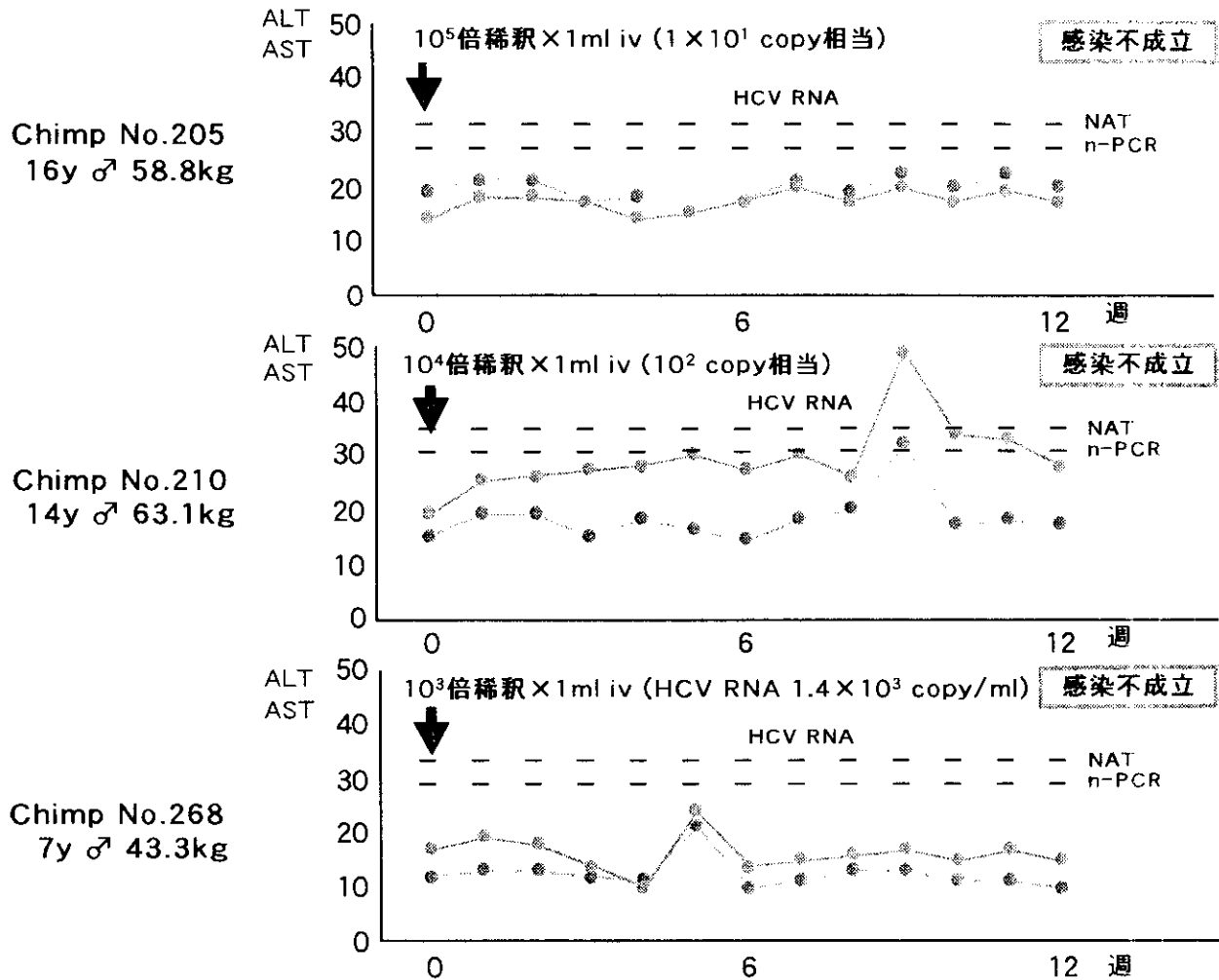
### c) 結果と考察

実験に用いた3頭のチンパンジーのうち接種ウイルス量が最も多いNo.268を含めていずれも接種後12週の観察期間内に感染の成立は認められなかった（図-2）。

チンパンジーNo.268への接種ウイルス量は $10^3$  copyオーダーであることから、献血者からの採血直後のFFP製剤の調製（-30℃以下での凍結、保存）、FFP製剤の融解（37℃、温浴）後の分注、再凍結（-80℃）、接種材料の稀釈調整直前の融解（37℃、温浴）操作の過程で、ある程度の感染性の減弱がおこったことが推測された。



図2. “Window” 期の FFP (段階希釈) 接種後の経過



3) 感染価の減弱を最小限に抑えた HCV 感染のウィンドウ期の血清 (感染材料-2) 確保を目的とした感染実験

a) 接種材料

接種材料-1 を用いた

b) チンパンジーへの接種と経過観察

実験に用いたチンパンジーの属性と接種材料および接種量は下記の通りである。

チンパンジーNo.205、16Y ♂、61.3 kg  
接種材料-1 原血漿  
( $7.0 \times 10^6$  copy/ml) × 1 ml

チンパンジーNo.210、14Y ♂、62.8 kg  
接種材料-1 原血漿  
( $7.0 \times 10^6$  copy/ml) × 1 ml

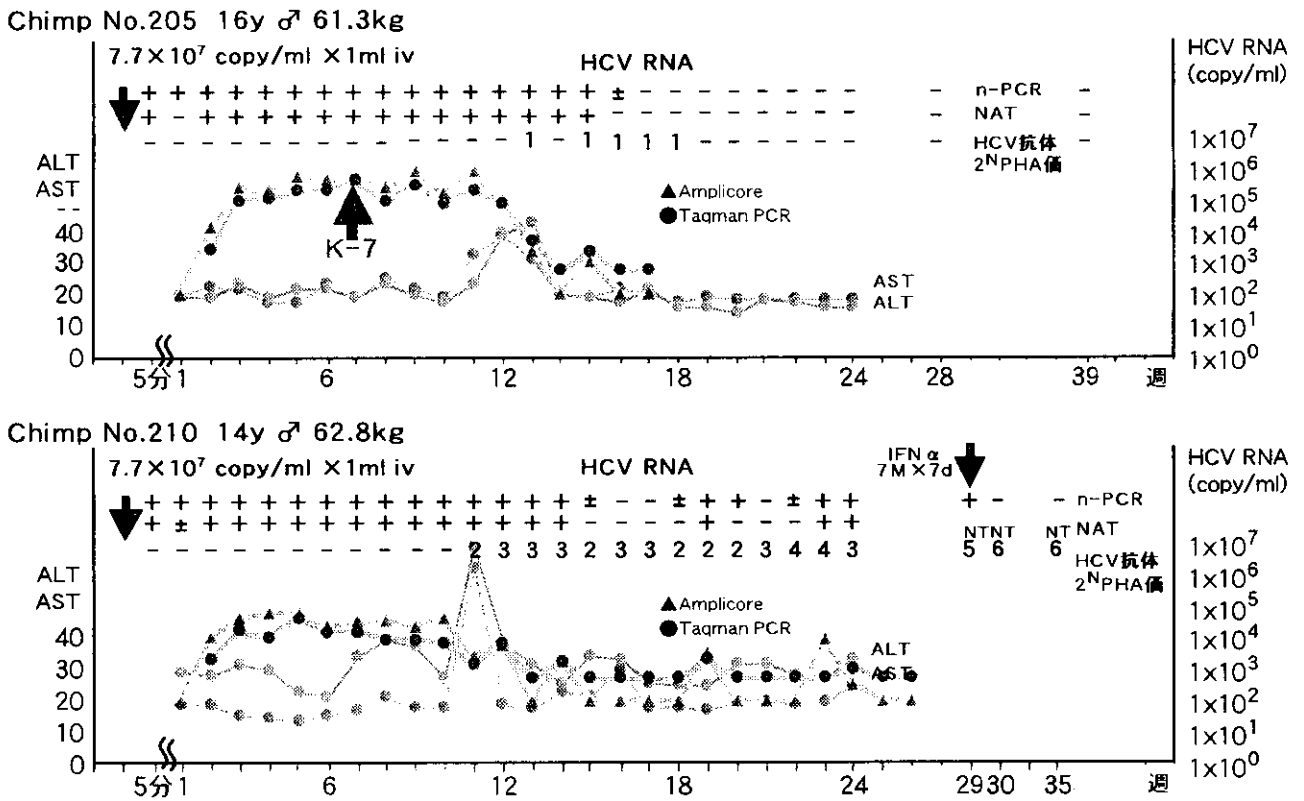
接種材料を経静脈的に接種後、週1回の頻度で採血し、24週目まで経過を観察し

た。なお、採血した血液から直ちに血清を分離し、その都度、1.1 ml×8本に分注後、液体窒素にて瞬間凍結後、-80℃に保存した。血清中のHCV RNA量はその都度測定しつつ経過を観察し、経過観察終了後に上記の条件下で保存したシリーズの血清を用いて再度HCV RNA量、およびHCV抗体価の同時測定を行なった。

### c) 結果と考察

接種材料-1の原血漿各1mlを経静脈的に接種したチンパンジーNo.205、No.210は、ともに接種後1週目から血清中にHCV RNAが出現し、3週目でその量はほぼプラトーに達した(図-3)。

図3. “Window”期のFFPを接種したChimpanzeeの経過  
-接種材料の確保を目的とした1st passage実験-



経過中のシリーズ血清を用いて再度同時測定して得た最終結果をもとに、経過中HCV RNA量が最大値を示し、Taqman PCRとAmplicore monitorの両者による測定値がほぼ一致したチンパンジーNo.205の接種後7週目の血清(HCV量

4.2×10<sup>5</sup> copy/ml : Taqman PCR、3.6×10<sup>5</sup> copy/ml ; Amplicore monitor、HCV抗体陰性、HCV PHA, EIA)を条件に通ったHCV感染のウインドウ期の血清(接種材料-2)として選択した。

なお、チンパンジーNo.205では接種後13週目に、またチンパンジーNo.210では接種後11週目の血中にHCV抗体が出現し、いずれもこの時期に一致してS-ALT値の軽度上昇が認められた。

また、チンパンジーNo.210では、接種後29週目まで血中のHCV RNAが持続陽性を示したことから、キャリア化阻止を目的としたヒト型インターフェロンの投与（スミフェロン<sup>®</sup>、（株）住友製薬、600万単位、1週間連日投与）を行なった結果、血中のHCV RNAは消失し、以後6ヶ月以上にわたって陰性の状態を持続した。

本実験から、(1) 今回は週1回の採血、検査による追跡であったためチンパンジーの体内でのHCV増殖の正確なダブリングタイム（血中のHCV量が2倍に増えるために要とする時間）を算出することは困難ではあるものの、少なくとも接種したHCVはすみやかに、かつ、きわめて早いスピードで増殖することが明らかとなったことから、感染実験の目的を感染成立の有無を判定することに止める場合には、接種後3週ないし4週までの経過観察でその目的を十分に達することができること、(2) S-ALT値の上昇はHCV抗体の出現時期に

一致しておこること、(3) ヒト型インターフェロンはチンパンジーに感染したHCVを排除するためにも有効である可能性があること、も同時に明らかとなった。

#### 4) 感染材料-2を用いたHCV感染成立に必要な最小HCV量決定のための感染実験

##### a) 接種材料

接種材料-2を用いた

##### b) チンパンジーへの接種と経過観察

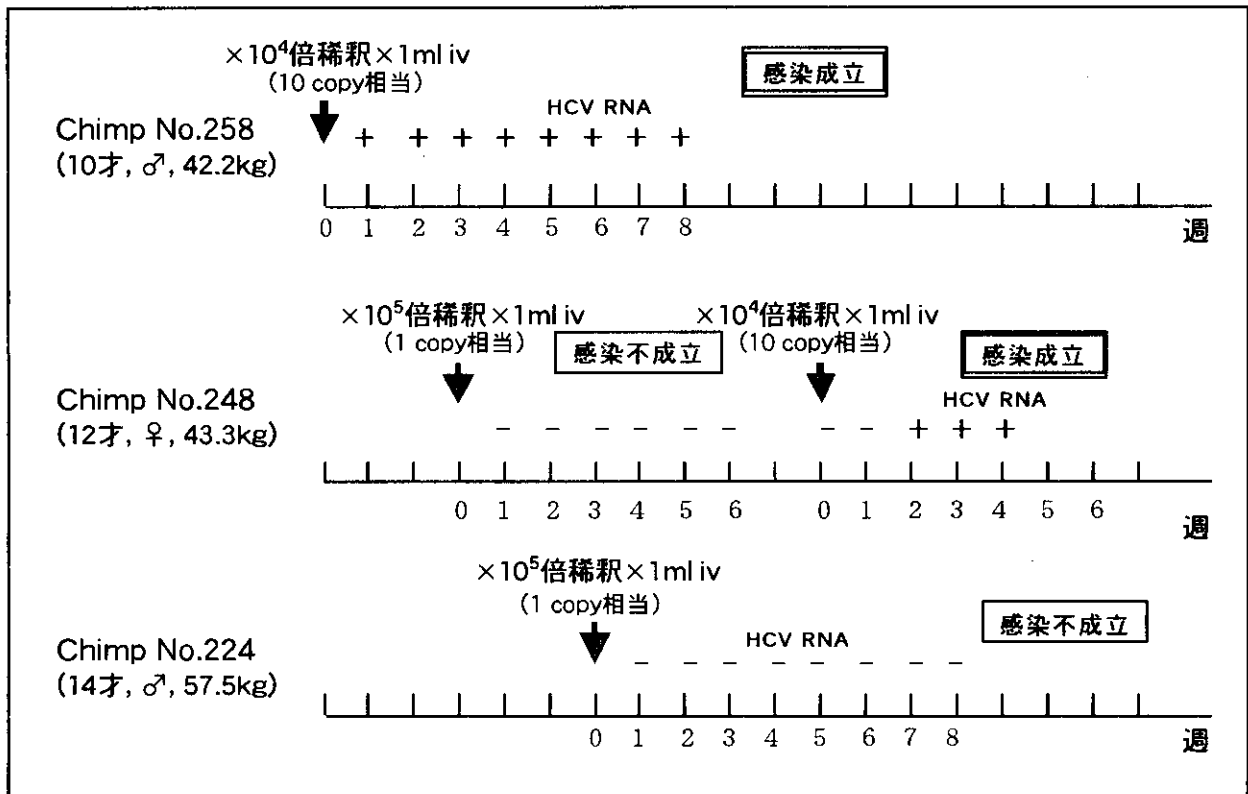
接種材料-2をあらかじめ準備した計3頭の被接種チンパンジーの自己血清を用いて、それぞれ $10^N$ 倍ずつ段階希釈し、 $10^5$ 倍希釈（接種材料中のHCV量、1コピーオーダー）、 $10^4$ 倍希釈（接種材料中のHCV量、10コピーオーダー）各1mlづつを延べ4頭のチンパンジーに経静脈的に接種し、6週～8週間経過を観察した。段階希釈した接種材料中のHCV量（copy/ml）の測定結果と、3頭のチンパンジーへの接種の手順は表-1に示した通りである。

表1. 感染成立に必要な最少HCV量(copy数)の決定  
-被接種Chimpの自己血清による段階希釈サンプル中のHCV RNA量-

被接種Chimp	稀釈倍率					
	原液	$\times 10^1$ 倍 copy/ml	$\times 10^2$ 倍 copy/ml	$\times 10^3$ 倍 copy/ml	$\times 10^4$ 倍 copy/ml	$\times 10^5$ 倍 copy/ml
No.258 (10才, ♂, 42.0kg)	$4.2 \times 10^5$	$2.0 \times 10^4$	$2.3 \times 10^3$	$2.4 \times 10^2$	<100 ( $10^1$ copy/ml相当)	<100 ( $10^0$ copy/ml相当)
No.248 (12才, ♀, 43.3kg)	$4.2 \times 10^5$	$1.8 \times 10^4$	$2.6 \times 10^3$	$2.3 \times 10^2$	<100 ( $10^1$ copy/ml相当)	<100 ( $10^0$ copy/ml相当)
No.224 (14才, ♂, 57.5kg)	$4.2 \times 10^5$	$2.0 \times 10^4$	$3.1 \times 10^3$	$2.3 \times 10^2$	<100 ( $10^1$ copy/ml相当)	<100 ( $10^0$ copy/ml相当)

HCV RNA量 : Taqman PCR

図4. 感染成立に必要な最少 HCV 量 (copy 数) の決定  
 - HCV copy 数をあらかじめ決定した接種材料による感染実験 -



c) 結果と考察

接種 HCV 量を 1 コピーオーダーとした延べ 2 頭のチンパンジーでは HCV の感染は認められなかった。

一方、接種 HCV 量を 10 コピーオーダーとした延べ 2 頭のチンパンジーでは、いずれも HCV の感染が認められた (図-4)。

この結果は、感染に必要な最小 HCV 量は、NAT の検出限界 ( $10^2$  copy/ml) を下回ることを示すものである。

も HCV の感染はおこらないこと。

2. 凍結-融解の操作は、接種材料中の HCV 感染価を減弱させること。
3. 感染性の減弱を最小限に抑えたウインドウ期の血清を接種材料とした場合、感染を成立させるために必要な最小 HCV 量は 10 コピーオーダーであること。
4. ヒト型インターフェロンの投与は、HCV に感染したチンパンジーのキャリア化防止に有効である可能性があること。

D. 結論

チンパンジーを用いた感染実験を実施し、その結果を解析することにより、次の事項を明らかにした。

1. NAT により HCV RNA が検出されない (HCV 抗体陽性の) 新鮮凍結血漿 (FFP) をヒトと同一の条件で輸注して

なお、本実験研究を実施するにあたり、  
 1)、2) の実験に用いた新鮮凍結血漿 (FFP) はいずれも日本赤十字社においてヒトへの輸注用製剤として調整されたものの、HCV 抗体が陽性もしくは HCV RNA が陽性であったことからヒトへの使用ができなかった製剤であり、ヒトへの有効期限内のものを正規の手続を経た上で、日赤血液事業部より本研究班あてに譲渡されたも

のであること。

また、感染実験を行なうにあたっては、研究目的、実験の実施計画、実験終了後のチンパンジーのHCVキャリア化阻止のための処置を含めたチンパンジーの取り扱い等の詳細を倫理委員会に提出し、あらかじめ承認を得た上で実験に着手したことを付記する。

## E. 研究発表、文献

1. 吉澤浩司：  
C型肝炎の疫学-病因論に基づいた肝炎・肝がん対策-神戸市医師会. 95. 21-33. 2002
2. 田中純子、片山恵子、熊谷純子、小宮裕、吉澤浩司：  
効果的なC型肝炎ウイルス感染者検診体制. 化学療法の領域.18(6).19-29. 2002
3. 飯野四郎、吉澤浩司：  
特集 ~国家プロジェクトとしての肝炎・肝癌対策~HCVキャリアを守るために. Medical Tribune.53-55. 2002
4. 吉澤浩司：  
特集 C型肝炎ウイルス感染者を肝硬変・肝癌から守れ 膨大な潜在患者への対応 潜在キャリアの約7割は慢性肝炎 重要性増す開業医のフォローアップ. 日経メディカル 8.45.2002
5. 田中純子、吉澤浩司.  
特集 慢性肝炎と肝癌 肝細胞癌の発生と分子制御 日本の肝癌発生の将来予測と予防戦略. Molecular Medicine. 39(8). 888-894. 2002
6. 吉澤浩司：  
C型慢性肝炎-検査と治療の現状.新薬と治療 NEW REMEDIES & THERAPY 438. 52(5) . 14-18.2002
7. H. Yoshizawa:  
Trends of hepatitis virus carriers. Hepatology Research.24.28-39.2002
8. 吉澤浩司、飯野四郎  
第2版 ウイルス肝炎 診断/予防/治療第2版 医師、コメディカルスタッフ、肝炎対策関係者のためのウイルス肝炎 診断/予防/治療 -ウイルス肝炎対策の指針-. 2002
9. 吉澤浩司:

特別講演 病因論に基づいた肝炎・肝がん対策 -対策実施の基となった疫学的背景と対策の理念-. 日本公衆衛生雑誌 第61回日本公衆衛生学会総会抄録集 埼玉. 49(10). 58.2002

10. 片山恵子、中西敏夫、田中純子、熊谷純子、小宮裕、水井正明、吉澤浩司：  
献血を契機に見出されたHCVキャリアの病態の推移. 日本公衆衛生雑誌 第61回日本公衆衛生学会総会抄録集 埼玉.49(10). 869.2 002
11. 熊谷純子、田中純子、片山恵子、小宮裕、水井正明、吉澤浩司：  
HCVキャリアを見出すための効率的な検査手順の検証 -定量域の広い2つの測定系の応用-. 日本公衆衛生雑誌 第61回日本公衆衛生学会総会抄録集 埼玉. 49(10). 869. 2002
12. 田中純子、片山恵子、長神英聖、熊谷純子、小宮裕、水井正明、吉澤浩司：  
健常者集団に潜在するHBV、HCVキャリア数推計の試み. 日本公衆衛生雑誌 第61回日本公衆衛生学会総会抄録集 埼玉.49(10). 870. 2002

## F. 知的財産権の出願・登録状況

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版者名	出版地	出版年	ページ
1) 吉澤浩司, 飯野四郎	第2版 医師, コメディカルスタッフ, 肝炎対策関係者のためのウイルス肝炎 診断/予防/治療 -ウイルス肝炎対策の指針-		第2版 医師, コメディカルスタッフ, 肝炎対策関係者のためのウイルス肝炎 診断/予防/治療 -ウイルス肝炎対策の指針-	文光堂	東京	2002	
2) 鈴木一幸, 阿部弘一, 宮坂昭生, 岡野継彦, 熊谷一郎, 佐藤慎一郎, 遠藤龍人, 滝川康裕	B型慢性肝疾患の急性増悪による重症化例に対するラミブジンの効果		B型C型肝炎治療の新たな展開 第23回犬山シンポジウム	アークメディア	東京	2002	65-70
3) 長尾由美子, 佐田通夫	肝炎ウイルスによる肝外病変を見逃さないためのコツ	井廻道夫	肝疾患診療のコツと落とし穴	中山書店	東京	2002	44-45
4) 長尾由美子, 佐田通夫	肝炎ウイルスによる肝外病変	多賀須幸男 三田村圭二 幕内雅敏	今日の消化器疾患治療指針第2版	医学書院	東京	2002	67-70
5) 長尾由美子, 佐田通夫	A型急性肝炎	多賀須幸男 三田村圭二 幕内雅敏	今日の消化器疾患治療指針第2版	医学書院	東京	2002	619-622

研究成果の刊行に関する一覧表

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
1) 吉澤浩司	C型肝炎の疫学-病因論に基づいた肝炎・肝がん対策	神戸市医師会報	495	21-33	2002
2) <u>Yoshizawa H</u>	Trends of hepatitis virus carriers	Hepatology Research	24	28-39	2002
3) Utagawa ET, Nakazawa E, Matsuo K, Oishi I, <u>Takeda N</u> , Miyamura T	Application of an automated specimen search system installed in a transmission electron microscope for the detection of caliciviruses in clinical specimens.	Journal of Virological Methods	100	49-56	2002
4) Someya Y, <u>Takeda N</u> , Miyamura T	Identification of Active-Site Amino Acid Residues in the Chiba Virus 3C-Like Protease.	Journal of Virology	76	5949-5958	2002
5) Sheikh A, Sugitani M, Kinukawa N, Moriyama M, Arakawa Y, Komiyama K, Li T-C, <u>Takeda N</u> , Ishaque S M., Hasan M, Suzuki K	Hepatitis E virus infection in fulminant hepatitis patients and apparently healthy population in Bangladesh	The American Society of Tropical Medicine and Hygiene	66(6)	721-724	2002
6) Niikura M, Takamura S, Kim G, Kawai S, Saijo M, Morikawa S, Kurane I, Li T-C, <u>Takeda N</u> , Yasutomi Y	Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles as an oral vaccine vehicle presenting foreign epitopes	Virology	293	273-280	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
7) Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, Natori K, <u>Takeda N</u> , Katayama K	Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses	Journal of Virological Methods	100	107-114	2002
8) Kitamoto N, Tanaka T, Natori K, <u>Takeda N</u> , Nakata S, Jiang X, Estes MK	Cross-reactivity among several recombinant calicivirus virus-like particles (VLPs) with monoclonal antibodies obtained from mice immunized orally with one type of VLP	Journal of Clinical Microbiology	40	2459-2465	2002
9) Katayama K, Shirato-H H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino FB, Fukushi S, Shinohara M, Uchida K, Suzuki Y, Gojobori T, <u>Takeda N</u>	Phylogenetic Analysis of the Complete Genome of 18 Norwalk-like Viruses	Virology	299	225-239	2002
10) Ishiko H, Shimada Y, Yonaha M, Hashimoto O, Hayashi A, Sakae K, <u>Takeda N</u>	Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification using the VP4 sequence	The Journal of Infectious Diseases	185	744-754	2002



発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
11) Ishiko H, Miura R, Shimada Y, Hayashi A, Nakajima H, Yamazaki S, <u>Takeda N</u>	Human rhinovirus 87 identified as human enterovirus 68 by VP4- based molecular diagnosis	Intervirolgy	45	136-141	2002
12) Takahashi K, Kang J-H, Ohnishi S, Hino K, <u>Mishiro S</u>	Genetic heterogeneity of hepatitis E virus recovered from Japanese patients with acute sporadic hepatitis	The Journal of Infectious Diseases	185	1342-1345	2002
13) <u>Mishiro S</u> , Takahashi K, Kang J-H, Ohnishi S, 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"	The Journal of Infectious Diseases	186	1536-1537	2002
14) Tanaka Y, Hanada K, <u>Mizokami M</u> , Yeo AET, Shih J.W-K, Gojobori T, Alter HJ.	A comparison of the molecular clock of hepatitis C virus in the United States and Japan predicts that hepatocellular carcinoma incidence in the Unites States will increase over the next two decades	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	99(24)	15584- 15589	2002
15) Sugauchi F, Orito E, Ichida T, Kato H, Sakugawa H, Kakumu S, Ishida T, Chutaputti A, Lai C-L, Ueda R, Miyakawa Y, <u>Mizokami M</u>	Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus core gene	Journal of Virology	76(12)	5985-5992	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
16) Kato H, Orito E, Gish RG, Bzowej N, Newsom M, Sugauchi F, Suzuki S, Ueda R, Miyakawa Y, <u>Mizokami M</u>	Hepatitis B e antigen in sera from individuals infected with hepatitis B virus of genotype G	Hepatology	35(4)	922-929	2002
17) Mizuo H, <u>Suzuki K</u> , Takikawa Y, Sugai Y, Tokita H, Akahane Y, Itoh K, Gotanda Y, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H	Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic cases of acute hepatitis in Japan	Journal of Clinical Microbiology	40(9)	3209-3218	2002
18) <u>Suzuki K</u> , Aikawa T, Okamoto H	Fulminant hepatitis E in Japan	The New England Journal of Medicine	347(18)	1456	2002
19) 石井元康, 佐藤俊一, 石川和克, 吉田俊巳, 吉田豊, 佐々木大輔, 須藤俊之, 正宗研, 小松真史, 小野剛, 豊田隆謙, 三浦雅人, 高橋恒男, 新澤陽英, 斉藤貴史, 粕川禮司, 高木徹, 黒田聖仁, <u>鈴木一幸</u>	C型慢性肝炎に対するインターフェロン治療の肝細胞癌発生抑制効果	新薬と臨床	51(8)	768-775	2002
20) <u>鈴木一幸</u> , 阿部弘一, 熊谷一郎	重症 B 型肝炎はラミブジンか?	成人病と生活習慣病	32(8)	1009-1011	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
21) 田中純子, 片山 恵子, 熊谷純子, 小宮 裕, 吉澤 浩司	効果的な C 型肝炎ウイルス感染 者検診体制	化学療法の領域	18(6)	19-29	2002
22) 田中純子, 吉澤浩司	特集 慢性肝炎と肝癌 肝細胞 癌の発生と分子制御 日本の肝癌 発生の将来予測と予防戦略	Molecular Medicine	39(8)	888-894	2002
23) 渡辺由美, 三浦 宜彦, 藤田利治, 菱輪眞澄	肝がん死亡の地理的分布と年次 推移	厚生指標	49(6)	1-7	2002
24) Nagao Y, Tanaka J, Nakanishi T, Moriya T, Katayama K, Kumagai J, Komiya Y, Itoh Y, Myoken Y, Fujihara M, Sata M, Yoshizawa H.	High incidence of extrahepatic manifestations in an HCV hyperendemic area	Hepatology Research	22	27~36	2002
25) Nagao Y, Tsubone K, Kimura R, Hanada S, Kumashiro R, Ueno T, Sata M	High prevalence of anticardiolipin antibodies in patients with HCV- associated oral lichen planus	International Journal of Molecular Medicine	9	293-297	2002
26) Nagao Y, Tomonari R, Kage M, Komai K, Tsubone K, Kamura T, Sata M	The possible intranspousal transmission of HCV in terms of lichen planus	I International Journal of Molecular Medicines	10	569-573	2002
27) 長尾由実子, 佐田通夫	扁平苔癬と C 型肝炎ウイルス	歯界展望	99(6)	1367-1375	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
28) 長尾由実子, 佐田通夫	C型慢性肝炎のリバビリン療法 の実際	Medical Practice	19(6)	1019-1023	2002
29) 長尾由実子, 佐田通夫	インターフェロンの臨床 イン ターフェロンの副作用 (小柴胡 湯との併用を含む)	日本医師会雑誌	128(7)	1068-1069	2002
30) 長尾由実子, 佐田通夫	C型肝炎; 肝外病変	肝胆膵	45(5)	831-837	2002
31) 橋本修, 緒方 啓, 長尾由実子, 神代龍吉, 上野 隆登, 佐田通夫	HCV 関連蛋白ペプチド-HLA 複 合体特異的 T 細胞レセプターの 新しい解析法とその応用	Minophagen Medical Revier	47(4)	191-195	2002