

E. まとめ

1988年以降輸血後の長期経過観察を行い、輸血後肝炎の発生状況をモニターした結果、B型輸血後肝炎の発症は1879例中1例もなかった。また、PHA法によるHCV抗体スクリーニングが開始された1992年以降の経過観察例1543例にはC型肝炎の発症は認めず、非B非C型肝炎の発症が12例0.78%みられた。12例の非B非C型肝炎は、肝機能異常が軽度で一過性であり、重症例や慢性化はみられず、63.6% (7/11例) にTTVの関与が考えられた。2002年4月以降2年9ヶ月間、追跡例428例には肝炎の発症はみられず、輸血後肝炎は減少傾向にある。

1988年からの3年間の381例と、2001年からの3年間の294例および1988年のdonor血540本についてHEV抗体を測定した。3群のHEV抗体陽性率はそれぞれ5.8%、5.8%、6.5%であり、13年前と現在および患者群と健常者群の感染既往には差はなかった。また、年齢分布においても13年前と現在とは差を認めず、60歳にピークがあり、HEV感染は継続して身近かでおこっていることが推測された。輸血前HEV抗体陰性の675例を対象に輸血後8週または6週目のHEV抗体を測定した結果、抗体の陽性化はみられず、輸血を介するHEVの感染はなかった。

60歳以上の年齢層のHAV抗体陽性率は80%以上であるが、50歳代以下の年齢では22.4% (11/49例) であり、HAV感染の可能性はある。しかし、輸血前HAV抗体陰性の124例には、輸血後の新たな抗体陽性化はみられず、輸血を介するHAVの

感染はなかった。

CMVについては、30歳以上では90%以上が感染既往で防御抗体を持つ可能性があり、30歳未満の免疫不全の病態時や乳幼児における輸血を介する感染の可能性に留意すべきである。非感染の14例には輸血後CMV抗体の陽性化は見られなかった。

HBV非感染例292例を対象にHBs抗原とHBc抗体を測定した結果、輸血後の陽性化は見られなかった。輸血前HCV抗体陰性の280例には輸血後のHCV抗体陽性化は見られなかった。448例を対象に、輸血後3ヶ月目にHIV抗体を測定した結果、すべて陰性であり、輸血を介するHIVの感染はなかった。

2000年の経過観察例133例を対象に、輸血前と、輸血後経過中のTTV DNAを測定した結果、輸血前にTTV DNA陽性であった感染既往は46例34.6%であった。輸血前TTV DNA陰性であった50例は、34例に輸血後TTV DNAの陽性化がみられ、感染率は68.0%と高率であった。しかし、肝炎発症は2例で、発症率は5.9%に過ぎなかった。genotype 1型の肝炎発症率は15例中の1例6.7%であり、genotype 1型の病因性が特に高いとは言えない結果であった。

文献

- 1) 小西奎子, 高岡幸子, 前越 大: 輸血に伴うTTV感染について. 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型肝炎の予防と疫学に関する研究 平成11年度報告書 p81-83, 1999

分担研究報告書

肝細胞癌患者におけるE型肝炎ウイルスの感染状況に関する研究

分担研究者： 佐藤 裕二 北海道大学医学部助教授

研究協力者： 西平 順 ジェネテックラボ

研究要旨：

E型肝炎は人畜共通感染症であり、一般的には糞口感染により伝播し、また生肉がE型肝炎ウイルス（HEV）の主たる感染経路として存在している。最近、輸血後にE型肝炎を発症した症例が報告されており、輸血の際にはHEV感染にも注意を払う必要があると考えられる。本研究では、ヒト血液からE型肝炎ウイルス（III型、IV型）をNested-PCR法により検出した。同様の方法により、ブタ肝臓および血液からそれぞれIII型およびIV型のE型肝炎ウイルスを検出した。これらHEV遺伝子のORF2領域の解析から、相同性は高いものこれまで北海道で報告されているウイルスとは異なる新種のウイルスであった。また、LAMP法、ダイレクトシーケンス法を用いた迅速なHEV検出法を開発した。ついで、HCC患者の切除標本（肝組織）が得られた90例を対象とし、HEV陽性率を検討し、HBV、HCVと重複感染による影響を検索した。HEV-IgGは陽性者5名、偽陽性9名で、その中でHBV陽性は5名、HCV陽性は7名であった。これらの非癌部組織像は、比較的リンパ球浸潤が多く見られた。HEVの感染は一過性とされるが、今回の症例の感染時期については不明であるが、HCCにおける肝切除の病態に影響を与える可能性があることが示唆された。

A. 研究目的

E型肝炎はE型肝炎ウイルス（HEV）の感染によって引き起こされる急性肝炎で、発展途上国において飲料水などを介し大規模な流行を引き起こすいわゆる輸入感染症と考えられていた。しかし、近年海外渡航歴のない急性E型肝炎が発見されており、日本にも土着しているHEVが存在するものと考えられるようになった。

E型肝炎は人畜共通感染症であり、生で肉類摂取を好む地域では、生肉がHEV感染の主たる感染経路として存在すると思われる。即ち、北海道でも本州でも飼育豚は非常に高い頻度でHEVに感染しているが、北海道ではブタ肝臓など生で食べることも多いことからHEVの感染率が他の地域と比較して高いと考えられている。具体的な例として、平成16年8月、北海道北見市内の焼肉店で、豚レバーなどを食べた60歳代の男性が、E型肝炎で死亡したことが挙げられる。一方、土着のHEVの存在も示唆されていることから、地域における検証が必要となっている。最近、輸血後にE型肝炎を発症し、死亡した症例があることから、輸血によるE型肝炎発症について科学的に立証することが急務である。このことから、本研究ではヒト血液、ブタ肝臓と血液を対象にしたHEVの検出法を開発し、E型肝炎ウイルスによる輸血後肝炎を未然に防ぐことを目的とする。

一方、原発性肝細胞癌（HCC）は原因とされるHBV、

HCV感染があるが、その他のウイルス感染症とHCCとの因果関係は明らかではなく、また、HBV、HCVと他のウイルス感染症との相互作用も明らかではない。今回、HCC切除90例のHEV、HBV、HCV感染と病理組織像を検討した。

B. 研究方法

1. Nested-PCR法によるE型肝炎ウイルスの検出とゲノム構造解析

検体は、豚血液（北海道畜産試験場）と肝臓（札幌市内スーパー）を用いた。RNAの抽出は、ホモジナイゼーション後、Trizolで抽出し逆転写した。

HEVは約7.2Kbのプラス一本鎖RNAをゲノムとし、5末端からORF1、ORF3、ORF2の順に三つのオープンリーディングフレーム（ORF）の配列からなる。ORF1は非構造蛋白をコードし、N末端側からメチルトランスフェラーゼ、システインプロテアーゼ、RNAヘリカーゼ、RNA依存性RNAポリメラーゼのモチーフが並び、またORF2は660アミノ酸の構造蛋白をコードする。比較的変異の少ないORF2をターゲットにPCR Primerを設計し、Nested-PCR法を用いアガロース電気泳動により検出を行った。検出されたウイルスのバンド（ORF2領域）について塩基配列をダイレクトシーケンス法（ABI3100）で遺伝子構造を解析した。

2. LAMP法によるHEVの新たな解析法の開発

LAMP法 (Loop-mediated Isothermal Amplification) は、等温で遺伝子の増幅ができること、反応時間が短いことや、その特異性が高い検出方法として知られている。標的遺伝子に対して、3' 末端側からF3c、F2c、F1c という3つの領域を、5' 末端側でB1、B2、B3という領域を規定し、この6領域に対し、次の通り4種類のプライマー-FIP、F3 Primer、BIP、B3 Primerを設計し、約40分、60度で反応後、蛍光ラベル法によりHEVを検出した。

3. HCC患者と血液、切除組織：手術されたHCC患者のうちHBV、HCVを測定し、かつ切除標本（肝組織）が得られた90例を対象とした。血液採取は当科入院時に行い、直ちに血清分離し-80℃で保存した。肝臓組織は切除後に同様に保存した。

4. HEV感染検査：入院時の血液よりHEV抗体検査を行った。HEV-IgG、IgMはVIRAGENT HEV-Ab(ヒトIgG、IgM)キット(ティーアイティー社)を使用し、ELISA法で測定した。IgGでは13以上、IgMでは30以上を陽性とし、測定限界を5未満とした。

(倫理面への配慮)

輸血は、書面で同意をえた後に施行された。また、患者個人情報やプライバシーに配慮し、匿名化した。

C. 研究結果

ブタ肝臓(14検体)中、4検体にHEVが感染していることを確認した(図1)。それぞれについて塩基配列を解析を行ったところ、すべてIII型ウイルスであった。遺伝子配列の相同性の検索から、これまで札幌近郊で報告されているウイルス株(JKN-Sap)と極めて相同性の高いE型肝炎ウイルスであった。次に、ブタ血液を用いてHEVの検出を行ったところ、6検体中、1例にIV型のHEVの感染が確認された(図2)。遺伝子解析の結果から、IV型のウイルスであることが明らかとなった。遺伝子配列の解析から、これまで札幌近郊から発見されているウイルス株(JKK-sap)と高い相同性があった。また、ヒト血液からもIII型、IV型のウイルスを同様の方法で検出した(未発表)。

LAMP法については、100%マッチのLAMPプライマーを10セット設計し、ORF2の全長(III型ウイルス)のPCR産物に対し、等温での増幅反応を行った。10セットのプライマーの中、2セットのプライマーが有用であることも明らかにした。一方、ORF2の比較的よく保存されて部位にプライマーを作成し、ほぼ全長(2kb)を増幅する簡便かつ迅速に検出する方法も確立した(図

3)。

3) HCC患者のHBV、HCV、HEV感染症：HBV陽性者は36/87名、HCV陽性者は33/87名であった。また、HEV感染率はHEV-IgG陽性5、擬陽性9、陰性76名であった。

4) HEV-IgG陽性と組織像：HEV-IgG陽性、擬陽性14例の非癌部組織像を検討した結果、HEV陽性、擬陽性例でリンパ球浸潤が多い傾向にあった(表1)。

D. 考察

E型肝炎は主に糞口経路によって伝播する。日本をはじめとする先進国では、発展途上国に滞在し感染を受け、帰国後発症した症例が大部分である。しかし、まったく海外渡航歴もないE型肝炎症例がわが国でも報告されている。このことは日本固有株が存在することを強く示唆している。

事実、本研究結果で示したようにブタ肝臓、血液から検出されたIII型、IV型ウイルスは新たな構造を有するウイルスであったが、これまで札幌近郊で同定されている菌株と相同性が極めて高かった。このことから、これは近郊に土着性に存在するHEV株であることが強く疑われた。

北海道における急性肝炎のなかでも、E型肝炎ウイルスによる感染が筆頭原因で、また輸血後E型肝炎が北海道から報告されている。E型肝炎ウイルスは、潜伏期間が長く遷延することもあることから、輸血の際にはHEV感染にも注意を払う必要があると考えられる。

一方、HBV、HCVは慢性肝炎へと移行し、HCCの原因とされるが、HEV感染は単に急性肝炎を発生するのみであるとする報告も多い。HCC患者でHEV感染との因果関係、特にHBV、HCVとの合併による肝予備能との関係は不明である。また、HCC患者は肝硬変、食道静脈瘤、消化管出血、凝固因子欠乏などにより輸血を受ける頻度が高い。従って、感染急性期では、肝切除術後に及ぼす影響も高い事が予想される。

E. 結論

1. 今回、ブタ肝臓、血液から検出されたIII型、IV型ウイルスは土着性に存在するHEV株であることが強く疑われた。E型肝炎ウイルスは、潜伏期間が長く遷延することもあり、輸血の際にはHEV感染にも注意が必要である。

2. HCC患者は輸血を受ける頻度が高く、HBV、HCVとHEV感染合併による肝切除と予備能との関係は不明である。今後、HCC患者におけるHEVの病状への影響を明らかにしたい。

図1. ブタ肝臓のE型ウイルス

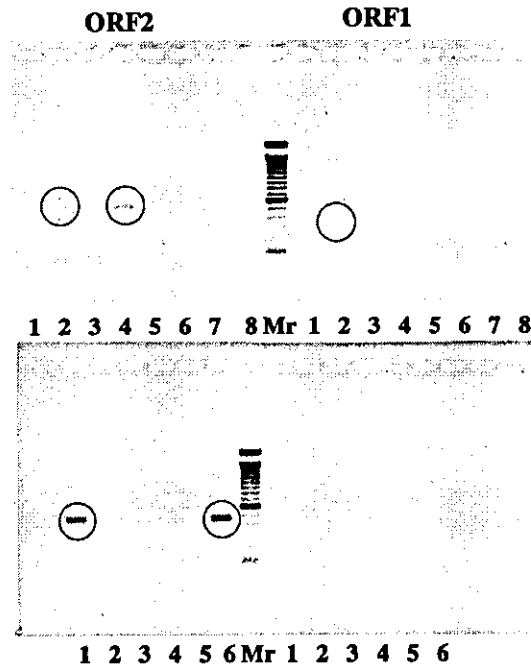


図2. ブタ血液のE型ウイルス

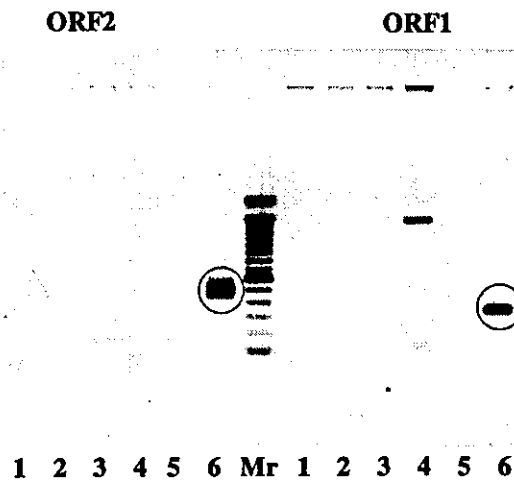


図3. ORF2領域全長の増幅

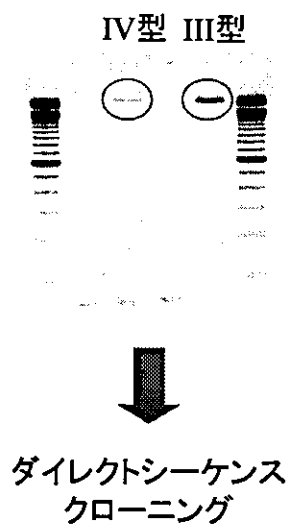


表1. HEV陽性者(N=14)の非癌部リンパ球浸潤

	N	Lym.infiltration		
		1(+)	2(+)	3(+)
HEV-IgG(+)	14	4	5 *	5 *, **
HBV(+)	5	3	2	0
HBV(±)	3	1	1	1
HBV(-)	6	0	2	4
HCV(+)	7	0	3	4
HCV(-)	7	4	2	1

HEV(+±)14名中HBs,HCV両者ともに陽性2名*、ともに陰性1名**であった。

分担研究報告書

輸血後肝炎における E 型肝炎ウイルス及び TT ウイルスの役割
原因不明輸血後肝炎の原因因子の探索

分担研究者：鈴木 哲朗¹⁾

研究協力者：菊地 秀²⁾、瀧本 眞³⁾、藤井 寿一⁴⁾、枝元 良広⁵⁾、李 天成¹⁾、
鈴木 亮介¹⁾、武田 直和¹⁾

¹⁾ 国立感染症研究所ウイルス第二部、²⁾ 仙台医療センター、

³⁾ 兵庫県立総合リハビリテーションセンターリハビリテーション中央病院、

⁴⁾ 東京女子医科大学、⁵⁾ 国立国際医療センター

研究要旨：

本研究では、1) 輸血後急性肝炎における E 型肝炎ウイルス (HEV)、TT ウイルス (TTV) の役割を明らかにすること及び 2) 原因不明輸血後肝炎における原因因子の探索を目的としている。東京女子医大病院、国立国際医療センター、及び兵庫県立総合リハビリテーションセンターリハビリテーション中央病院より供与された輸血後肝炎の疑われる症例検体について抗 HEV 抗体保有率の解析を行った。測定した 91 症例全例で抗 IgM 抗体は陰性であった。抗 IgG 抗体は 17 例 (18.7%) が陽性であった。仙台医療センターより供与された供血者血清 500 検体について同様に抗 HEV 抗体の解析を行ったところ、抗 IgG 抗体は 16 例 (3.2%)、抗 IgM 抗体は 0 例 (0%) が陽性であった。輸血歴を有する患者群では、輸血を介した抗 HEV 抗体の伝搬などのために抗 IgG 抗体保有率が高い傾向にあるのかもしれない。

一方、既知の肝炎ウイルス、TTV が関与しない輸血後肝炎症例（兵庫県立総合リハビリテーションセンターリハビリテーション中央病院）からサブトラクション法により病因因子の探索を行った。輸血後検体から特異的に増幅される遺伝子断片に候補クローンを得ており、現在、cDNA クローニングのためライブラリースクリーニングを行っている。

A. 研究目的

E 型肝炎ウイルス (HEV) は、A 型肝炎ウイルスと同様、経口感染する肝炎ウイルスであり、もっぱら発展途上国において蔓延し問題となっていたが、近年、我が国においても国内での生肉摂取や輸血による HEV 感染例が報告され、HEV が国内にも土着していると考えられるようになった。一方、TT ウイルス (TTV) は輸血後肝炎症例から発見されたウイルスであるが、急性肝炎における役割などその病原性について未だ不明な点が多い。

本研究では、輸血後急性肝炎における HEV、TTV の役割を明らかにすること、及び原因不明輸血後肝炎からの原因ウイルスの探索、同定を目的としている。本年度は、特に 1) 輸血を介した HEV の感染実態、及び 2) 既知の肝炎ウイルス、TTV が関与しない輸血後肝炎症例からの病因因子の探索、を行った。

B. 研究方法

1. 組換え HEV 様粒子の調製

HEV ORF2 遺伝子の 5'末端側 333 塩基を欠損させた断片をトランスファーベクター pVL1393 に組み込み、組換えバキュロウイルスを作製した。この組換えウイルスは HEV 構造蛋白の C 末端側 539 アミノ酸を発現する。昆虫細胞 Tn5 に感染させた後、培養上清に放出された浮上密度 1.285g/ml³ のウイルス様粒子を塩化セシウム平衡密度勾配遠心で精製した。

2. ELISA

HEV 様粒子を 96-well plate に分注し、4°C で一晚静置した。nonfat milk で 1 時間ブロッキングを行い洗浄後、段階希釈した血清と反応させた (37°C、1 時間)。洗浄後、二次抗体としてパーオキシダーゼ標識抗 IgG 抗体または同標識抗 IgM 抗体を加え、37°C、1 時間反応させた。発色は o-phenylenediamine

を基質として行い 492 nm の吸光度を測定した。

3. TTV PCR

QIAampDNA Blood Mini Kit (QIAGEN)を用いて各血漿(または血清)0.2 ml から全 DNA を抽出した。TTV の全遺伝子型を検出するためにプライマー NG133 と NG147 (参考文献 *Virology* 259, 428-436 (1999)) を、遺伝子グループ (genogroup) 1 を検出するためにプライマー NG061 と NG063 (参考文献同上) をそれぞれ用いて PCR を行った。増幅反応は、95°C、30 秒; 60°C、30 秒; 72°C、45 秒のインキュベーションを 55 サイクル繰り返した。

4. Representational Difference Analysis (RDA) 法

GeneFisher PCR Subtraction System (TaKaRa) を利用した RDA 法により、輸血前後の患者血清から調製した遺伝子 (total DNA 及び cDNA) 間のサブトラクション解析を行った。

C. 研究結果及び考察

1. 輸血を介した HEV の感染実態

輸血後肝炎が疑われる患者 91 症例(すべて HBV、HCV 陰性)について血清中の抗 HEV 抗体の測定を行った。血清検体は東京女子医大病院、国立国際医療センター、及び兵庫県立総合リハビリテーションセンターリハビリテーション中央病院より分与された。急性 E 型肝炎の場合に顕著な上昇の認められる抗 IgM 抗体は全例で陰性であったのに対し、抗 IgG 抗体は 17 例 (18.7%) が陽性であった。同様の解析法による抗 HEV 抗体サーベイランスによれば、一般日本人の抗 IgG 抗体保有率は約 4.5% となっている (李、武田らの報告)。今回の検査対象となった肝炎患者には、明らかな輸血後 E 型肝炎は認められなかったが、輸血歴を有する患者群では、輸血を介した抗 HEV 抗体の伝搬などのために抗 IgG 抗体保有率が高い傾向にあるのかもしれない。

一方、仙台医療センターより供与された供血者血清 500 検体について同様に抗 HEV 抗体の解析を行ったところ、抗 IgG 抗体は 16 例 (3.2%)、抗 IgM 抗体は 0 例 (0%) が陽性であった。

2. 原因不明輸血後肝炎症例からの病因因子の探索

兵庫県立総合リハビリテーションセンターリハ

ビリテーション中央病院より、図 1 に示すような輸血後肝炎症例が報告された。この症例では、ALT 値が輸血後 41 日目に 1852 IU/L まで上昇し、その後一旦 25 IU/L まで低下したものの、63 日目に再上昇 (2052 IU/L) が観察された。この症例は HBV 及び HCV マーカーは全て陰性であることが知られていたため、感染研にて HEV、HAV に対する抗体及び TTV 遺伝子の解析を行った。その結果、抗 HEV、HAV 抗体は IgG、IgM 抗体とも陰性であり、TTV についても輸血との関連が考えられる genogroup 1 遺伝子は陰性であった (TTV universal プライマーを用いた PCR では輸血前後とも陽性)。そこで次に、輸血前及び輸血後の血清から DNA 及び RNA を抽出して、輸血後検体に特異的に存在する遺伝子を RDA 法によって探索した。解析の流れは図 2 に示したが、輸血前 (Driver) 及び輸血後 40 日目 (Tester) の血清から抽出した DNA を制限酵素消化によって断片化した後、アダプターを付加した。アダプターの配列を持つプライマーを使って PCR を行い、Tester、Driver DNA を増幅した。アダプターを付加した amplicon と過剰量の Driver amplicon との間でハイブリダイゼーションを行った後、PCR により Tester 特異的な DNA 断片のみを増幅した。この結果、約 450 及び 350 bp の DNA 断片を得ることが出来たが、遺伝子配列の決定、データベース解析によりいずれもヒトゲノム由来遺伝子であることがわかった。次に、Tester、Driver 検体から抽出した total RNA を鋳型としてランダムプライマーで cDNA を合成し同様の RDA 解析を行った。Tester 特異的な遺伝子増幅により 300-500 bp の遺伝子断片を検出することができた (図 3)。遺伝子解析の結果、得られた 29 種類の遺伝子断片のうち 3 種類 (#4、10、15) はヒトゲノムに由来せず、既知の微生物由来遺伝子とも相同性が低いことが明らかとなった。現在、Tester 検体より cDNA ライブラリーを作成し、#4、10、15 の周辺領域遺伝子のクローニングを行っている。

D. 結論

1) 輸血を介した HEV の感染実態を調べるため、輸血後肝炎が疑われる症例について抗 HEV 抗体を検査したところ、抗 IgG、IgM 抗体保有率はそれぞれ 18.7%、0% であった。供血者血清では、3.2%、0% がそれぞれ陽性であった。

2) 原因不明輸血後肝炎症例からの病因因子の探

素を RDA 法で行った。輸血後検体から特異的に増幅される遺伝子断片に候補クローンを得ており、現在、cDNA クローニングのためライブラリースクリーニングを行っている。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishikawa T., Fukushima Y., Shiobara Y., Kishimoto T., Tanno S., Shoji I., Suzuki T., Matsui T., Shimada Y., Ohyama T., Nagai R., and Miyamura T. An outbreak of hepatitis C virus infection in an outpatient clinic. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, (2005) (in press).
- 2) Suzuki, T., and Suzuki, R. Maturation and assembly of hepatitis C virus core protein. *In: FLAVIVIRIDAE: Pathogenesis, Molecular Biology and genetics.* (2005) (in press).
- 3) Suzuki R., Sakamoto S., Tsutsumi T., Rikimaru A., Shimoike T., Mizumoto K., Matsuura Y., Miyamura T., and Suzuki T. Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.*, 79: 1271-1281 (2005).
- 4) Suzuki T., Suzuki R., Li J., Hijikata M., Matsuda M., Li T-C., Matsuura Y., Mishiro S., and Miyamura T. Identification of basal promoter and enhancer elements in an untranslated region of the TT virus genome. *J. Virol.*, 78: 10820-10824 (2004).
- 5) 鈴木哲朗 C型肝炎ウイルスと肝発癌 臨床とウイルス 32: 156-162 (2004).
- 6) 村上恭子、鈴木哲朗. HCV の新たな感染系及び HCV-RNA 複製系の開発動向. ウイルス性肝炎 (上) 日本臨床 増刊号, 62: 111-115 (2004).
- 7) 相崎英樹、鈴木哲朗. HCV-RNA 複製および HCV 増殖の分子メカニズム. ウイルス性肝炎 (上) 日本臨床 増刊号, 62: 81-84 (2004).
- 8) 鈴木哲朗、松浦善治. HCV 感染レセプター. 肝疾患 Review 2004. 117-120 (2004).

2. 学会発表

- 1) Suzuki, T. Assembly of HCV-like particles in the three-dimensional cultures. 40th Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program, 2004

年 12 月.

- 2) 勝二郁夫、白倉雅之、市村 徹、鈴木亮介、鈴木哲朗、梶山裕一、下地 徹、村上恭子、佐藤慈子、深澤征義、山河芳夫、西島正弘、宮村達男. MEF タグ精製-プロテオーム解析による C 型肝炎ウイルス Core 蛋白新規結合因子の同定. 第 27 回日本分子生物学会年会, 2004 年 12 月.
- 3) 鈴木亮介、坂本真一郎、堤 武也、松田麻未、森石恆司、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. 第 27 回日本分子生物学会年会, 2004 年 12 月.
- 4) 亀岡洋祐、伊東玲子、笠間 毅、鈴木哲朗、猪原登志子、武曾恵理、橋本雄之、鈴木和男. ミエロペルオキシダーゼのリーダーペプチド内の多型と炎症性疾患との関連. 第 27 回日本分子生物学会年会, 2004 年 12 月.
- 5) 飯島沙幸、石井孝司、李 永伸、岩田奈織子、八木慎太郎、山口健次郎、榎 昇、吉崎佐矢香、町田早苗、木村展之、鈴木哲朗、佐多徹太郎、宮村達男、明里宏文. C 型肝炎ウイルスのサル病態モデル開発. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月.
- 6) 白倉雅之、勝二郁夫、市村 徹、鈴木亮介、鈴木哲朗、梶山裕一、下地 徹、村上恭子、佐藤慈子、深澤征義、山河芳夫、西島正弘、宮村達男. MEF tag 精製-プロテオーム解析による C 型肝炎ウイルス Core 蛋白新規結合因子の同定. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月.
- 7) 森石恆司、中村理加、宮本大伸、鈴木哲朗、森屋恭爾、小池和彦、宮村達男、松浦善治. HCV コア蛋白質の局在および病原性発現における PA28 γ の役割. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月.
- 8) 鈴木亮介、坂本真一郎、下池貴志、森石恆司、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小胞体、ミトコンドリア、核への局在を規定するシグナルの解析. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月.
- 9) 村上恭子、石井孝司、吉崎佐矢香、相崎英樹、田中恵子、勝二郁夫、佐多徹太郎、鈴木哲朗、宮村達男. 三次元肝細胞培養システムによる C 型肝炎ウイルス (HCV) 粒子形成. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月.
- 10) 町田早苗、松井政則、石井孝司、鈴木亮介、鈴木哲朗.

- 木哲朗、宮村達男、赤塚俊隆。 HCV envelope E1 (signal peptide)-E2 をコードする DNA を用いた HCV E2 特異的 CTL の誘導。 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月。
- 11) 石井孝司、横田恭子、竹森利忠、長谷川秀樹、水谷哲也、森川 茂、田口文広、田代真人、吉崎佐矢香、鈴木哲朗、宮村達男。 高度弱毒化ワクチニアウイルス DIs の SARS 生ワクチンとしての応用。 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月。
- 12) Shirakura, M., Shoji, I., Ichimura, T., Suzuki, R., Suzuki, T., Sugiyama, Y., Shimoji, T., Murakami, K., Sato, S., Fukasawa, M., Yamakawa, Y., Nishijima, M., and Miyamura, T. Proteomic analysis of hepatitis C virus core-interacting proteins using a novel tandem affinity purification tag and mass spectrometry. 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2004 年 10 月。
- 13) Okamoto, T., Kimura-Someya, T., Moriishi, K., Watanabe, R., Ishii, K., Numberg, J.H., Suzuki, T., Miyamura, T., and Matsuura, Y. Polytopic topology of HCV E1 glycoprotein on the endoplasmic reticulum. 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2004 年 10 月。
- 14) Fukasawa, M., Sato, S., Yamakawa, Y., Natsume, T., Suzuki, T., Shoji, I., Aizaki, H., Miyamura, T., and Nishijima, M. Proteomic profiling of lipid droplet proteins in HCV core-expressing hepatoma cell lines. 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2004 年 10 月。
- 15) Sakamoto, S., Shiroki, K., Suzuki, R., Matsuura, Y., Suzuki, T., and Miyamura, T. HCV capsid assembly: role of basic residue clusters in the core protein. 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2004 年 10 月。
- 16) Moriishi, K., Mochizuki, R., Abe, T., Mori, Y., Moriya, K., Koike, K., Suzuki, T., Miyamura, T., and Matsuura, Y. PA28gamma-dependent degradation of HCV core protein in the nucleus in vivo. 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2004 年 10 月。
- 17) Murakami, K., Ishii, K., Yoshizaki, S., Aizaki, H., Tanaka, K., Shoji, I., Sata, T., Suzuki, T., Bartenshlarger, R., and Miyamura, T. Assembly of HCV-like particles in three-dimensional cultures. 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2004 年 10 月。
- 18) 松浦善治、森屋恭爾、小池和彦、田中啓二、鈴木哲朗、宮村達男、森石恆司。 HCV コア蛋白質の成熟および分解の分子機構。 第 63 回日本癌学会学術総会, 2004 年 9 月。
- 19) Suzuki, T. Assembly of HCV-like particles in the three-dimensional cultures of human hepatoma cells. Fuji Forum 2004. 2004 年 8 月。
- 20) 森屋恭爾、田島 藍、堤 武也、伊藤晃成、三好秀征、藤江 肇、新谷良澄、下池貴志、鈴木哲朗、宮村達男、堀江利治、小池和彦。 HCV core 蛋白質はミトコンドリア電子伝達系 complex I 機能を障害する。 第 40 回日本肝臓学会総会, 2004 年 6 月。

F. 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。

图1

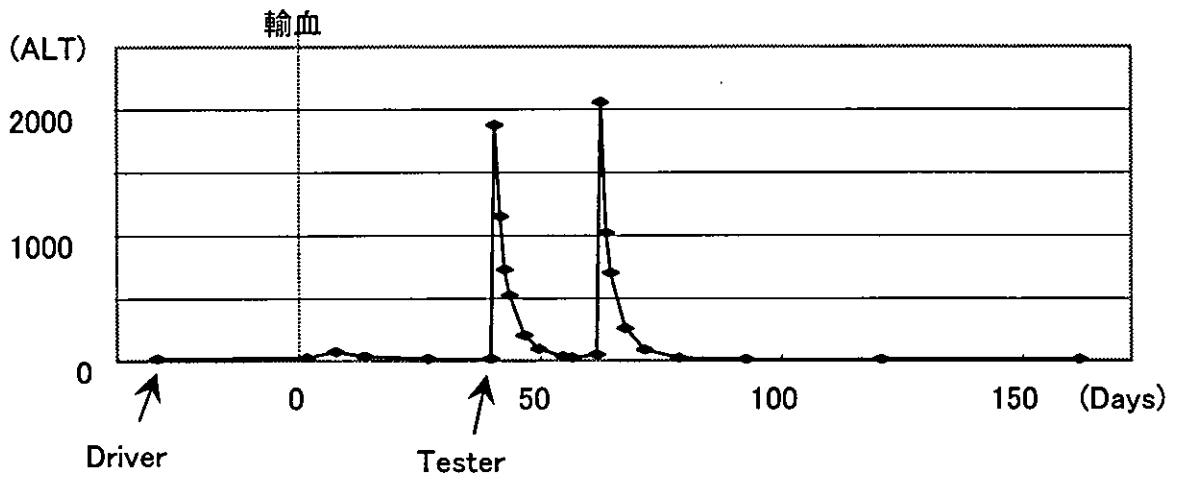


图2

Representational Difference Analysis (RDA)

(I) Representation



(II) Kinetic Enrichment

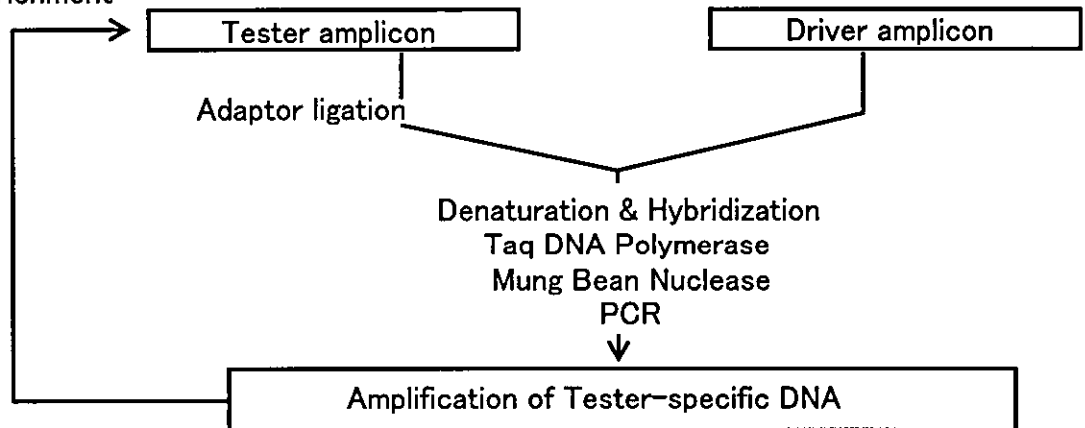
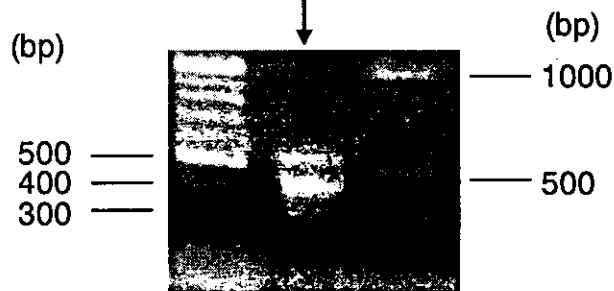


图3



分担研究報告書

2004 年輸血後肝炎の発症状況及び
1979 年以降における肝機能異常時の ALT 値とリンパ球数の検索結果について

分担研究者：瀧本 真¹⁾

研究協力者：山下万利子²⁾ 鈴木 哲朗³⁾ 園崎 君子¹⁾

1) 兵庫県立総合リハビリテーションセンターリハビリテーション中央病院

2) 兵庫県赤十字血液センター

3) 国立感染症研究所

研究要旨：

1. 1979 年以来、当院において輸血後肝炎発症の定点観測を継続し、輸血後肝機能異常例について原因ウイルスの追跡調査を行った。2004 年の輸血症例は 122 例で、追跡出来た症例は 63 例；男性 16 例；女性 47 例、平均年齢 69.0 歳が対象となった。異常例が 6 例あり 2 例が輸血後肝炎を疑われ原因ウイルス検索結果は、2 例ともウイルスマーカーは非 A 非 B 非 C で TTV の Universal primer を用いた PCR では輸血前後とも陽性であった。Genotype1 の PCR では 1 例が輸血後一過性に陽性となった。

2. 1979 年より当施設で ALT 異常により輸血後肝炎発症や ALT 異常があり報告を行って来た症例を中心に ALT 値とリンパ球数を検索・集計した結果 71 症例が対象となった。男性 15 例、女性 56 例。平均年齢 57.9 歳であった。71 例中非 A 非 B 型肝炎は 15 例であり TTV 陽性の症例は 11 例であった。結果；全 71 症例の輸血前 ALT 値とリンパ球数は平均値で 18.5IU/L；2066/ μ l であった。71 例中、輸血後 ALT 値が最高値を示した時のリンパ球数と輸血後リンパ球数が最低値を示した時のリンパ球数について a) 男性 15 例と女性 56 例を比較 c) 非 A 非 B 型肝炎 15 症例と ALT 異常 56 症例を比較 d) 非 A 非 B 型肝炎 15 症例と TTV の 11 例をそれぞれ比較した所、平均値で統計学的に検討した結果前者で有意傾向、後者で有意差があった。b) 60 歳以上 40 例と 59 歳以下 31 例には有意差は認められなかった。他に HCV:1 症例と TTV : 2 症例の報告を加え検討したところ、日和見感染症として TTV が輸血後の肝機能異常に強く関与している事が推測された。

<目的>

1) 2004 年の当院における輸血後肝炎発症の定点観測を継続する。輸血後肝機能異常症例について原因ウイルスを究明し追跡調査結果を報告する。

2) ウイルス感染症である輸血後肝炎発症；肝機能異常時の患者状態について、ALT 異常時のリンパ球数を臨床免疫学的指標の一つとして検索・集計する。

<対象>

1) 当院で 2004 年の輸血症例(肝機能障害、肝胆膵系疾患を除く)は 122 例で、追跡出来た症例は 63 例；男性 16 例；女性 47 例、平均年齢 69.0

歳が対象となった。

2) 1979 年より 2004 年まで、当施設で ALT 異常により輸血後肝炎発症の検索を行った 1526 例のうち、非 A 非 B 型肝炎発症が多かった 1990 年までの 70 例と、その後 ALT 異常があり報告を行って来た症例を中心に検索・集計した結果 71 症例が対象となった。男性 15 例、女性 56 例。平均年齢 57.9 歳であった。71 例中非 A 非 B 型肝炎は 15 例であり TTV 陽性の症例は 11 例であった。診断は 1996 年改訂：輸血後肝炎の診断基準に従った。

<研究方法>

1) 当院では 1979 年より行っている輸血後肝

炎の定点観測を2004年でも実施した(表1参照)。また、輸血バック数別の症例数は表2に示す通りである。肝機能異常症例に対してHBV.HCV以外にもTTV.HEV等のウイルスマーカーにより原因ウイルスの究明を行った。

2) 各症例のALT値および白血球数とリンパ球%によりリンパ球数を経時的に検索した。また◆1:輸血前◆2:輸血後ALT値が最高値を示した時◆3:輸血後リンパ球数が最低値を示した時の各々についてALT値とリンパ球数を中心に検索・集計した。また、a)男性と女性;b)60歳以上と59歳以下;c)非A非B型肝炎15症例と他のALT異常症例のグループに分けd)さらに、非A非B型肝炎15症例と他のALT異常56例のグループの内非B非CでTTVが陽性であることが判明した11例に分けて、それぞれについて、上に示した◆1◆2◆3状態のALT値および白血球数の変動について比較検討を行った。

<結果>

1) 対象63例を検索診断の結果、症例1と症例2の2症例に輸血後ALT異常例を認めた[症例1][症例2]。この2症例について原因ウイルスを究明した所、TTV-DNA; universal primerを用いたPCRでは輸血前後とも陽性であった。症例2は、TTV-DNA;genotype1が輸血後8週目に一過性に陽性化した。また、症例2に対する供血者のウイルスマーカーの検査結果を表3に示した。供血者M-1のTTV-DNA;genotype1検査が1例陽性であった。

2) ◇全71症例の◆1輸血前ALT値とリンパ球数は平均値で18.5IU/L:2066/ μ lであり◆2輸血後ALT値が最高値を示した時のALT値とリンパ球数は平均値で285IU/L(1540%):1608/ μ l(77.83%)◆3輸血後リンパ球数が最低値を示した時ALT値とリンパ球数は平均値で190IU/L(1027%):1255/ μ l(60.74%)であった。

{図①参照} ◇男性と女性では◆2輸血後ALT値が最高値を示した時のリンパ球数は平均値で1994/ μ lと1504/ μ l◆3輸血後リンパ球数が最低値を示した時のリンパ球数は1464/ μ lと1199/ μ lで統計学的にも◆2で $p < 0.0049$ ◆3で $p < 0.0583$ と有意差と有意傾向が見られ{図②} ◇非A非B型肝炎15例と他のALT異常56例のグループでは◆2のリンパ球数は平均値で2030/ μ lと1446/ μ l◆3でのリンパ球数は平均値で1566/ μ lと1144/ μ lで統計学的にも◆

2で $p < 0.0020$ ◆3で $p < 0.0052$ と有意差があり{図③} ◇非A非B型肝炎15例と非B非CでTTV(+) 11 例について◆2のリンパ球数は平均値で2030/ μ lと1474/ μ lで◆3でのリンパ球数は平均値で1566/ μ lと981/ μ lで統計学的に◆2で $p < 0.0709$ と有意傾向があり◆3で $p < 0.0182$ と有意差が認められた{図④} 59歳以下と60歳以上のグループでは◆2のリンパ球数は平均値で1739/ μ lと1506/ μ l◆3のリンパ球数は平均値で1139/ μ lと1143/ μ lで◆2◆3状態とも有意差は認められなかった{図⑤}。

<症例>

症例3;45歳の男性で、1989年7月18日18バッグのHCVウイルスマーカーでスクリーニングされていない輸血を受けHCV肝炎を発症した症例のALT値とリンパ球数の変化を経時的にグラフに示したものである。ALT値の上昇は2峰性で、リンパ球数の軽度低下後1~2週間後に上昇が見られる[症例3]参照。

症例4;65歳男性;頸髄損傷で四肢麻痺、1999年5月25日にMAP3バッグ輸血され輸血前後ともTTVのみ陽性であった非A非B非Cの症例で、リンパ球数が正常の25%程度に低下し、ALT値の軽度の上昇がみられた[症例4]参照。

症例5;76歳男性;右膝関節置換術後再生不良性貧血を発症した輸血前後ともTTVのみ陽性であった非A非B非Cの症例で、6月8日のリンパ球数が99/ μ lでT細胞-CD2百分率で1%、T細胞絶対数で1/ μ lと激減し17日後にALT値が2263IU/lと上昇したあと脳内出血で死亡した[症例5]参照。

<考察>

1) 症例1は、ALT値745IU/Lと肝機能異常を示す6ヶ月前に3バッグと5ヶ月前に18バッグの輸血歴があり、リンパ球数は直前の3日前に263/ μ lと著明に低下しているが、TTV;Universal primer以外のCMVを含むウイルスマーカーは検出されなかった。ALT値が100を越えた期間が2週間とならず、輸血後肝炎症例と診断されなかった。症例2では、1年6ヶ月前に5バッグの輸血歴があり、今回MAP:5バッグ輸血後6週でALT値が1952IU/lと異常高値を示したが、1週間程度で正常値まで回復しており、再度ALT値が2052IU/lと異常高値を示したが、前回と同様に1週間以内に正常値まで回復していた。またリンパ球数もALT値に連動して低値を

示していない。このような肝機能異常では、薬剤性や胆石症による肝機能障害を否定することは出来ない。また、診断基準からも輸血後肝炎症例と診断する事は困難であった。

2) リンパ球数により肝炎ウイルス感染症に対する宿主である患者の免疫学的状態を正確に把握する事は困難であると考えられ、問題も多いと思われるが、臨床的には白血球とリンパ球%の測定は一般的な検査である。今回、当病院で輸血後肝炎の追跡調査を行って来た患者カルテから ALT 値の異常とリンパ球数を検索集計する事が可能であった。結果からあまり明確な結論を示す事は出来ないが、宿主である患者からみると、当院で ALT 値の異常を示した非 A 非 B 非 C 型肝炎ウイルスは、非 A 非 B 型 (C 型肝炎) ウイルスに比較して、リンパ球数がより低値でありいわば日和見感染ウイルスであると推察する事が出来る。さらに ALT 値の異常を示した非 A 非 B 非 C 型肝炎ウイルスの内、1997 年以降存在が明らかとなった TTV 感染^{1) 2)} が認められる 11 症例では、ALT 値の異常高値を示した状態で C 型肝炎ウイルスに比較して、リンパ球数がより有意に低値である事が示された。非 A-非 G 型肝炎の内 TTV 感染が臨床的にも報告された^{3) 4)}。TTV ウイルス分子学や遺伝子学的解析で TTV と肝炎病原性について genotype1 との関連性が検討され⁵⁾、TTV の変異が中和抗体や細胞障害性 T 細胞などの生体防御機構の攻撃からのエスケープや細胞指向性も変化させる可能性があることが指摘されている^{6) 7)}。症例報告について検討を行った。頸髄損傷術後の症例 4 では、TTV の持続感染下でリンパ球数が全体に低下していたが、更に $650/\mu\text{l}$ 程度に低下するに従って ALT 値の異常は $101\text{ IU}/\text{l}$ までと大きくは無いが上昇する傾向が認められた。術後合併症により再生不良性貧血となった症例 5 は、TTV の持続感染下でリンパ球数が 6 月 8 日に $99/\mu\text{l}$ と激減した。翌日のリンパ球の検索でも T 細胞-CD2 が 1% で、T 細胞絶対数は $1/\mu\text{l}$ と激減していたが、17 日後 ALT 値は $2263\text{ IU}/\text{l}$ と異常高値を示した 2 日後に脳内出血で死亡した。この症例では TTV による日和見感染症として輸血後肝炎の可能性を疑う事が出来る。輸血後 C 型肝炎を発症した症例 3 では、リンパ球の軽度低下で ALT 値の上昇が認

められており、HCV の感染毒性が TTV より強い事によるものではないかと思われる。

<結論>

輸血後肝炎発症の定点観測と輸血後肝機能異常例について原因ウイルスの追跡調査を継続する事の必要性が確認出来た。TTV の肝臓に対する病原性等について議論されているが、今回の輸血後肝炎発症と ALT 異常時のリンパ球数検索で TTV が非 A-非 G 型輸血後肝炎の日和見感染症として肝機能異常をもたらしていることが推測された。

<健康危険情報> なし

<研究発表> なし

<知的財産権出願・登録状況> なし

<参考文献>

- 1) Nishizawa T, et al: A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 241:92-97, 1997
- 2) Okamoto H, et al: Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatology Res.* 10: 1-16, 1998
- 3) 折井幸司 田中栄司: 慢性非 A~非 G 型肝炎の実態と疫学的統計. *日本臨床* 57:37-41, 1999
- 4) 小西奎子 上山武史: 非 A~非 G 型輸血後肝炎例における新しい感染因子 TTV の関与: *日本臨床* 57:47-52, 1999
- 5) 岡本宏明: TTV ウイルスの分子ウイルス学: *日本臨床* 57:7-17, 1999
- 6) 栗原千枝他: 臨床例における TTV の genetic variant の解析: *日本臨床* 57:24-29, 1999
- 7) Fauci A S: Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature* 384:529-534, 1996

表1 新診断基準による輸血後肝炎発症率及びウイルスマーカーによる検索

	検索数	疑肝炎	旧確診	新確診	HBV	非A非B	術後 HCV+	術後 HCV-	n.t.
1979	37	3	1	3	0	3	1	0	2
1980	41	8	4	8	0	8	2	1	5
1981	39	4	3	3	0	3	0	1	3
1982	46	6	5	6	0	6	3	0	3
1983	46	5	2	5	1	4	0	1	4
1984	77	7	2	7	1	6	1	1	5
1985	48	4	2	4	0	4	1	0	3
1986	40	3	2	3	0	3	0	0	3
1987	56	5	4	4	0	4	0	1	4
1988	33	4	2	2	0	2	1	1	2
1989	57	9	5	7	0	7	4	3	2
1990	44	4	3	3	0	3	2	2	0
1991	33	0	0	0	0	0	0	0	0
1992	39	0	0	0	0	0	0	0	0
1993	59	0	0	0	0	0	0	0	0
1994	77	0	0	0	0	0	0	0	0
1995	90	0	0	0	0	0	0	0	0
1996	81	(1)*	0	0	0	0	0	0	0
1997	95	0	0	0	0	0	0	0	0
1998	39	0	0	0	0	0	0	0	0
1999	61	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	87	1	1	1	0	0	0	1	0
2001	76	2	0	0	0	0	0	0	0
2002	79	1	0	0	0	0	0	0	0
2003	83	0	0	0	0	0	0	0	0
2004	63	2	1	0	0	0	0	2	0
総計	1526	68(1)	37	56	2	53	15	14	36

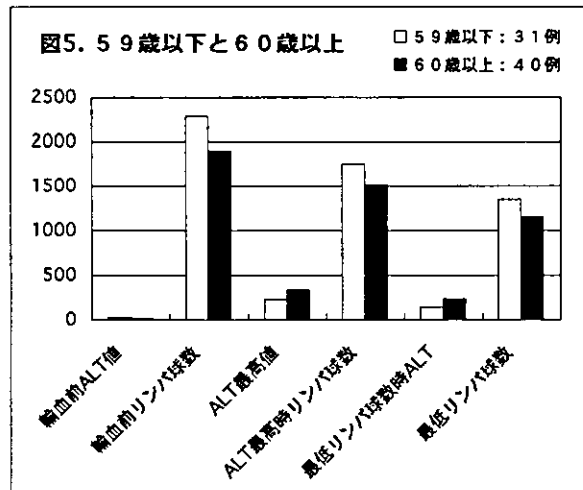
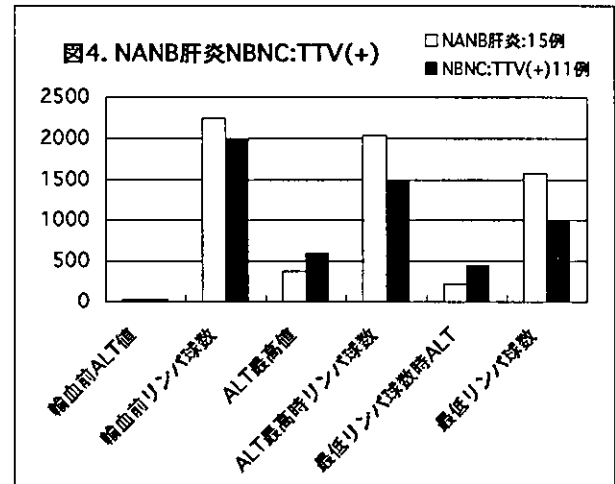
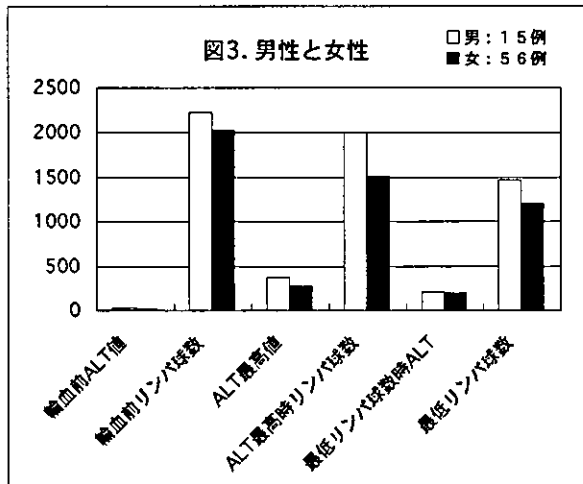
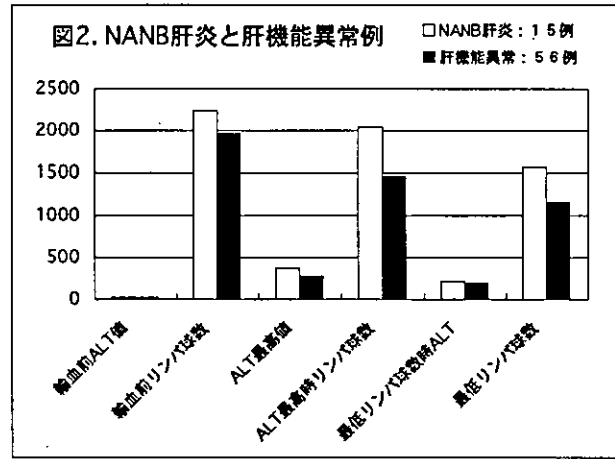
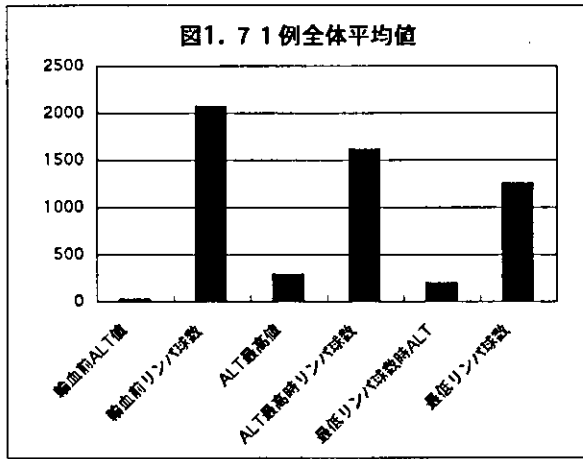
*HGV 陽性

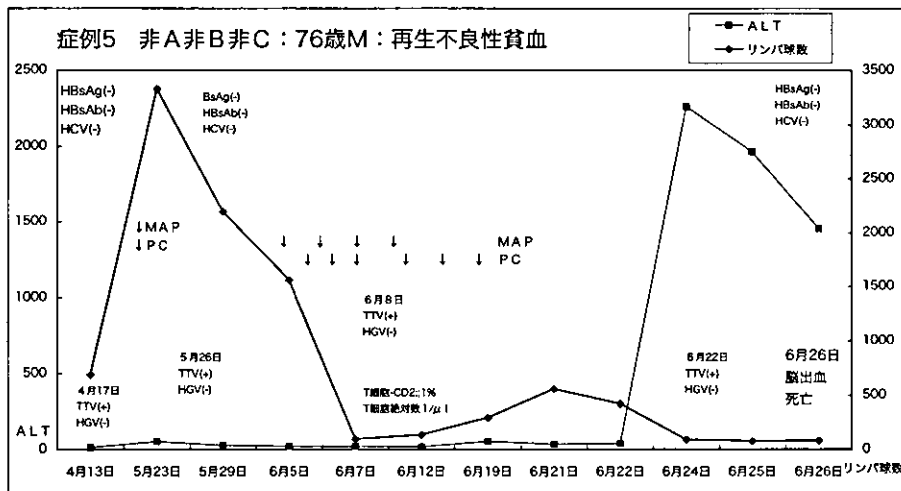
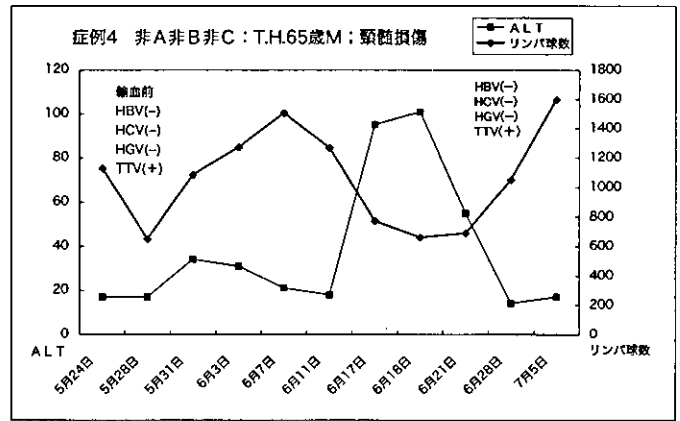
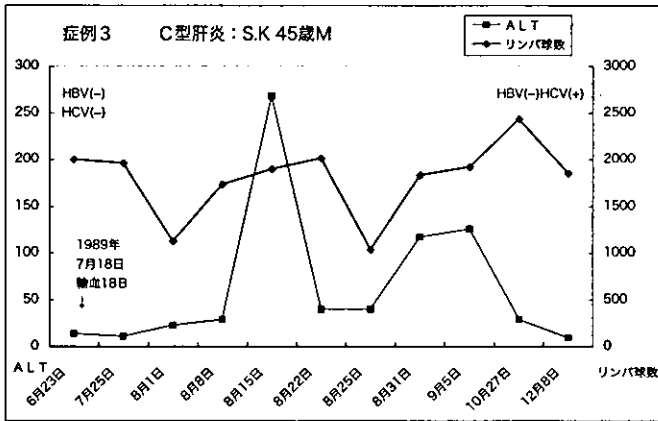
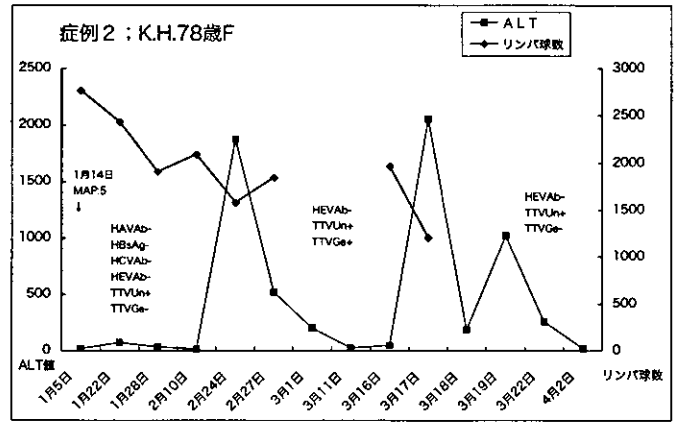
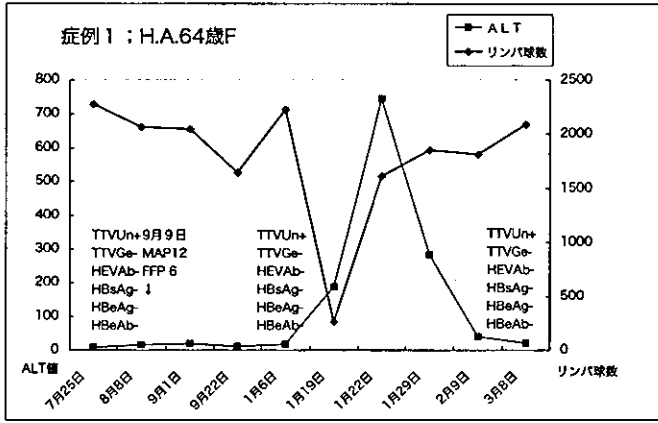
表2 輸血バッグ数の発生例数

輸血バッグ数	1~5	6~10	11~15	16~20	21以上
検索例数	97	6	1	1	1
疑診例	0	1	0	0	1

表3 症例2(338) H.K に対する供血者の検査結果

	輸血日	TTV-DNA		HAV-Ab	HEV-Ab	
		Universal	Genogroup I		IgG	IgM
F-4	20020522	NT	NT	-	-	-
F-5	20020522	NT	NT	-	-	-
M-6	20020522	NT	NT	(IgG)+	-	-
M-7	20020522	NT	NT	-	-	-
M-8	20020522	NT	NT	-	-	-
M-1	20040114	+	+	-	-	-
M-2	20040114	+	-	-	-	-
M-3	20040114	+	-	-	-	-
M-4	20040114	+	-	-	-	-
M-5	20040114	+	-	(IgG)+	-	-
F-1	20040114	+	-	-	-	-
F-3	20040114	+	-	-	-	-
F-1	20040114	+	-	-	-	-
F-3	20040114	+	-	-	-	-





分担研究報告書

献血で見出されたHBV陽性通知対象者における、

肝細胞癌罹患率 —コホート研究—

分担研究者： 田中 英夫¹

研究協力者： 津熊 秀明¹，松倉 晴道²，大島 明¹，柴田 弘俊²

¹ 大阪府立成人病センター調査部

² 大阪府赤十字血液センター

研究要旨：

HBV 陽性通知者がその後の受療行動を継続する必要性を本人達自身によく認識してもらうために、これに資する肝細胞癌（HCC）罹患情報を得る。

1991年～93年に大阪府赤十字血液センターで献血をした667,461人のスクリーニングデータから、40歳以上の大阪府在住者を抽出し、この中から、大阪府在住の40-64歳で、HCV抗体とHTLV-1抗体が共に陰性で、かつ、HBs抗原が陽性の、HBV陽性通知該当者2,519人を調査対象とした。対象者の性、氏名、生年月日、住所地情報を用いて大阪府がん登録資料と記録照合し、献血をした日から2000年末日までのHCC罹患情報を把握した。人年法により解析した。

1. 平均105ヶ月追跡し、45人のHCC罹患者を把握した。
2. 年率の罹患率は全体で0.204%であった。HBe抗原(+)HBe抗体(-) (0.513%)、HBe抗原(-)、HBe抗体(-) (0.382%) キャリアでは、HBe抗体(+) (0.166%) キャリアに比べて年率罹患率が高かった。
3. HBe抗体(+)キャリアの中でも、献血時点で血清トランスアミナーゼ値が正常上限を超えていた者(30KU以上)では、正常域内であった者(29KU以下)に比べて累積罹患率が高かった(9年累積罹患率5.1%対1.3%)。
4. 多変量解析では、性(女/男=0.38)、献血時ALT値(30-59KU/29KU以下=3.83、60KU以上/29KU以下=3.77)が、有意なHCC罹患リスク要因であった。
5. これらの結果をHBV陽性通知者への指導に活用し、ハイリスクドナーの減少につなげたい。

A. 研究目的

HBVの陽性通知を受けたHBVキャリアがその後確実に医療機関を受診し、その後の献血行動や感染ハイリスク行動が抑制されれば、輸血によるHBV感染が起きる可能性(検出限界付近増減例、検査過誤時、2次感染者による感染初期の献血行動)を引き下げることができると思われる。検査感度の向上が限界に達すると、小さな輸血による感染リスクをさらに引き下げするためには、献血行動を起こしたHBVキャリアに対する的確な働きかけが相対的に重要になる。HBV陽性通知者が受療行動を継続する必要性を本人達自身に認識してもらうために、これに資する肝細胞癌(HCC)罹患情報を得る。

B. 研究方法

1991-93年に大阪府赤十字血液センターで延べ1,235,926件の献血が行われた。これを性、生年月日、氏名、ABO血液型を用いて1人1件にし、667,461人の実人数を得た。この中から、大阪府在住の40-64歳で、HCV抗体とHTLV-1抗体が共に陰性で、かつ、HBs抗原が陽性の、HBV陽性通知該当者2,519人を調査対象とした。

対象者の性、氏名、生年月日、住所地情報を用いて大阪府がん登録資料と記録照合し、献血をした日から2000年末日までの肝細胞癌罹患情報を把握した。人年法により解析した。

献血時の性、年齢、血清ALT値、血清コレステロール値およびHBe抗原、HBe抗体の有無に関する情報を用いて肝発癌リスクとの関連を調べた。

(倫理面の配慮)

本研究の実施に当たっては、大阪府立成人病センター倫理審査委員会および大阪府赤十字血液センター倫理審査委員会の承認を得た。

C. 研究結果

2,519人(男1,532人、女987人)のHBV陽性通知献血者を平均105ヶ月追跡し、男38人、女7人のHCCを把握した(表1)。罹患率は10万人年あたり男282、女81であった。男では60歳代前半での罹患率が最も高かったが、加齢とともに罹患率が上がる傾向は、男女とも、明らかではなかった。

表1. 40歳以上のHBs抗原陽性献血者2519人における、性、年齢別肝細胞癌罹患率(大阪)

	男(n=1,532)		女(n=987)		計(n=2,519)	
献血時平均年齢(±SD)	47.2±5.4		47.9±5.6		47.5±5.5	
平均観察期間(月)(±SD)	104.9±12.9		104.9±12.3		104.9±12.7	
年齢	人年	HCC罹患率(10 ⁻³)	人年	HCC罹患率(10 ⁻³)	人年	HCC罹患率(10 ⁻³)
40-44	1396	0	743	1	2139	1
45-49	4194	9	2395	0	6589	9
50-54	4030	15	2817	5	6847	20
55-59	2345	5	1728	0	4073	5
60-64	1083	7	857	0	1941	7
65-69	734	2	312	1	685	3
70-74	55	0	41	0	96	0
Total	13478	38	8692	7	22169	45

HCC: hepatocellular carcinoma, SD: standard deviation

調査対象の3.6%(n=90)は、HBe抗原陽性であった。HBs抗原陽性の者では平均ALT値が28.9KUと、HBe抗原陰性の者に比べて高かった。また、HCCの年率罹患率は0.513%と、HBe抗原陰性に比べて高かった(表2)。

HBe抗原陽性かつHBe抗体陰性(n=90)、HBe抗原とHBe抗体が共に陰性(n=309)、HBe抗原陰性かつHBe抗体陽性(n=2,120)の3群のKaplan-Meier法によるHCCの9年累積罹患率を図1に示す。各々5.8%、3.3%、1.7%と、差がみられた。

表2. 40歳以上のHBs抗原陽性献血者2519人における、献血時属性と肝細胞癌罹患率(大阪)

	HBe抗原+ HBe抗体- n=90	HBe抗原- HBe抗体- n=309	HBe抗原- HBe抗体+ n=2120	Total n=2519
平均年齢(±SD)	46.7 (6.1)	48.1 (5.7)	47.4 (5.4)	47.5 (5.5)
男/女	63/27	205/109	1264/856	1532/987
平均ALT(KU) (±SD)	28.9 (22.6)	21.7 (23.9)	16.6 (12.8)	17.6 (15.3)
平均観察期間 (月)(±SD)	104.0 (12.0)	101.7 (14.4)	105.4 (12.4)	104.9 (12.7)
肝癌罹患数	4	10	31	45
肝癌罹患時年齢	58.0	51.5	53.7	53.6
年率罹患率(%)	0.513	0.382	0.166	0.204

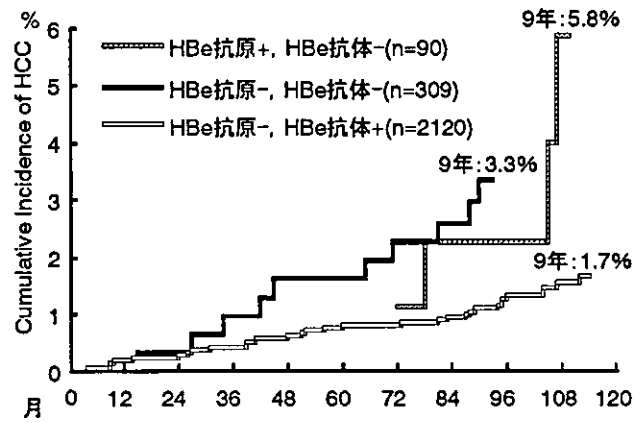


図1 40歳以上のHBs抗原陽性献血者2519人における、肝細胞癌累積罹患率. Kaplan Meier法

調査対象の84%を占めるHBe抗原陰性かつHBe抗体陽性の者での、男女別に見たHCCの9年累積罹患率は、男(2.2%)では女(0.61%)に比べ、高かった(図2)。また、献血時の血清ALT値別にみると、30KU以上であった者では29KU以下の者に比べて明らかに高い9年累積罹患率を示した(5.2%対1.3%)(図3)。

調査対象のHCC罹患のリスク要因とその大きさを調べるために、年齢、性、献血時ALT値およびHBe抗原とHBe抗体の態様で調整したハザード比を計算した(表3)。男性であること、献血時のALT値が30KU以上であることが、高いHCCのリスクに関連していた。献血時年齢は明らかな要因とはならなかった。

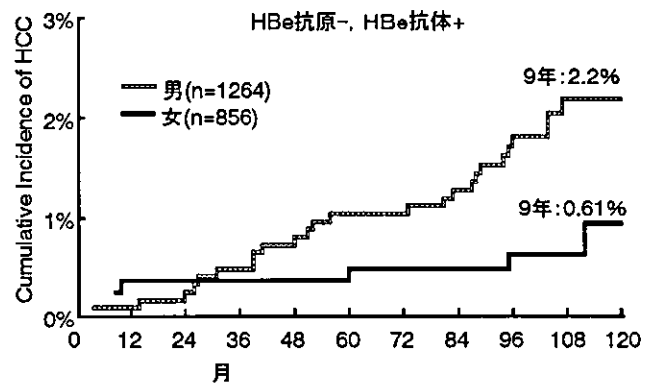


図2 40歳以上のHBs抗原陽性献血者2120人(HBe抗原-, HBe抗体+)における、肝癌累積罹患率. Kaplan Meier法

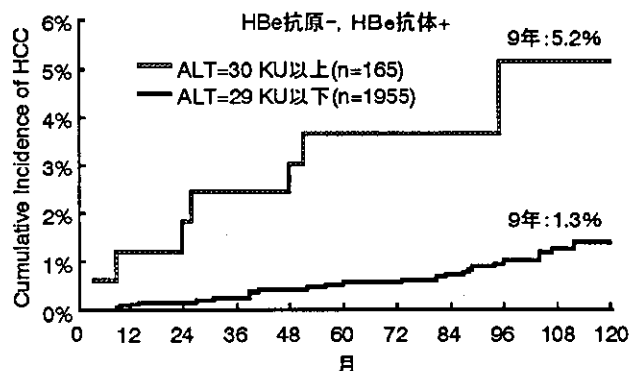


図3 40歳以上のHBs抗原陽性献血者2120人(HBe抗原-, HBe抗体+)における、肝癌累積罹患率. Kaplan Meier法

表3. 40歳以上のHBs抗原陽性献血者2519人における、肝細胞癌相対リスク

献血時属性	n	HCC	リスク比	95%信頼区間
40歳代	1714	27	1.00	—
50-54歳代	504	13	1.91	0.98-3.72
55-59歳代	218	3	1.05	0.32-3.49
60-64歳	83	2	1.72	0.40-7.36
男	1532	38	1.00	—
女	987	7	0.38	0.17-0.88
ALT				
29KU以下	2277	29	1.00	—
30-59KU	188	12	3.83	1.91-7.69
60KU以上	54	4	3.77	1.25-11.36
HBe抗原(-)Hbe抗体(+)	2120	31	1.00	—
HBe抗原(-)Hbe抗体(-)	309	10	1.70	0.82-3.50
HBe抗原(+)Hbe抗体(-)	90	4	2.08	0.70-6.16

Cox proportional hazard model.

HBe 抗原陽性者の HBe 抗原陰性かつ HBe 抗体陽性者に対する調整ハザード比は 2.08 と高かったが、有意ではなかった。

D. 考察と結論

献血により 1991~93 年に見出された 40 歳以上の HBV 感染者 2,519 人を平均 105 ヶ月観察したところ、45 人の肝細胞癌罹患者を把握した。罹患率は 203/10 万人年に上った。年率の罹患率は HBe 抗原陽性かつ HBe 抗体陰性の者で 0.513%、HBe 抗原、抗体共に陰性の者で 0.382%、HBe 抗原陰性かつ HBe 抗体陽性の者で 0.166%となった。

HBe 抗体陽性の者でも献血時 ALT 値が 30KU 以上の者では 9 年肝癌累積罹患率が 5.2%と、HBe 抗原陽性 HBV キャリアの 5.8%に近い値を示した。このことから seroconversion を起こした後も ALT 値が異常値を示す HBe 抗体陽性 HBV キャリアでは、肝庇護療法等による ALT 値の正常化を目指した治療が肝発癌リスクの軽減には必要であることが示された。また、多変量解析の結果、年齢は明らかなるリスク要因ではないこと、および高 ALT 値はリスク要因であるが、ALT 値とリスクとの間に正の量反応関係を認めなかったことが示されたが、これらの特徴は、HCV キャリアでの肝発癌リスクの特徴と異なっていた。また男女間での肝発癌リスクの違いは、HCV キャリアでのそれと同程度に大きいものであった。

これらの知見を HBV 陽性通知対象者に示すことにより、その後の受療行動（精検受診や治療継続）の促進に役立てることができると思われる。そのこと

によって、再献血行動の確実な防止や 2 次感染行動の防止に努め、population strategy としての輸血による HBV 感染防止につなげていきたい。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. Kasahara A, Tanaka H, et al. Interferon treatment improves survival in chronic hepatitis C patients showing biochemical as well as virological responses by preventing liver-related death. *J Viral Hepatitis*. 11. 148-156, 2004.
2. 今井康陽, 田中英夫, 他. 地域医療における C 型肝炎ウイルス検診の現況と課題—大阪北部地域での平成 14 年度の取り組み—. *肝臓*. 45. 232-238, 2004.
3. Tanaka H, et al. Liver cancer risk in Japanese male dentists: a long-term retrospective cohort study. *J. Occup. Health*. 46. 398-402, 2004.
4. 津熊秀明, 田中英夫. 我が国におけるウイルス性肝炎の疫学—特に B 型・C 型慢性肝疾患の現状—. *最新医学*. 59. 17-24, 2004.
5. Tanaka H, et al. Prospective study on the risk of hepatocellular carcinoma among hepatitis C virus-positive blood donors focusing on demographic factors, alanine aminotransferase level at donation and interaction with hepatitis B virus. *Int. J. Cancer*. 112. 1075-80, 2004.
6. 今井康陽, 笠原彰紀, 田中英夫, 他. 高齢 C 型肝炎患者におけるインターフェロン治療の生命予後改善効果. *治療学*. 38. 983-986, 2004.
7. Imai Y, Kasahara A, Tanaka H, et al. Interferon therapy for aged patients with chronic hepatitis C: improved survival in patients exhibiting a biochemical response. *J Gastroenterol*. 39. 1069-77, 2004.

分担研究報告書

輸血後肝炎 ー医療機関からの報告ー

分担研究者：中島 一格 東京都西赤十字血液センター

共同研究者：百瀬 俊也、平 力造、村岡 正人、松田 利夫 日本赤十字社血液事業本部

研究要旨：

2004 年、全国の医療機関から日本赤十字社へ報告された副作用・感染症報告(自発報告)の中から、輸血後肝炎が疑われる症例について調査した。また、遡及調査も行った。遡及調査は、1999 年 4 月 1 日以降の複数回献血者でウイルスマーカーが陽転したものを対象に、前回、前々回の献血時の保管検体について個別核酸増幅検査によりウイルスの有無を検査するとともに、医療機関へ情報提供を行った。その結果、自発報告の中で輸血により感染した可能性が高いと考えられる症例は、HBV8 症例、HEV 2 症例であった。さらに、それらに関連した献血血液の追跡調査から、HBV 5 症例の新たな感染が確認された。遡及調査からは 7 症例の HBV 感染が確認された。合計 HBV20 症例、HEV 2 症例であった。そして、本研究から現在の輸血による HBV 感染の残存リスクは年 12～15 例と推定した。

A. 研究目的

日本赤十字社では輸血用血液の安全確保対策として、献血時にまず医師による問診を行い、次に、献血された血液に対しては様々な感染症に対する血清学的スクリーニング検査および核酸増幅検査(NAT)を行っている。

輸血用血液に対する感染症関連の検査は、血液事業を開始した 1952 年には梅毒だけであったが、その後、肝機能検査、HBs 抗原(HBsAg)検査、HIV 抗体検査、HTLV-1 抗体検査を導入してきた。1989 年 12 月、HCV 抗体と HBe 抗体(HBeAb)検査を導入したことにより、輸血後肝炎は劇的に減少した。

更に 1999 年 10 月からは全献血血液について HIV, HBV, HCV に対する核酸増幅検査(NAT)を開始した。2000 年 2 月からは NAT の検体プールサイズを 500 検体から 50 検体に、2004 年 8 月には 20 検体に変更し、更なる安全性の向上に努めている。

また、原因調査に備え、1996 年 9 月から、全献血血液の検体(保管検体)を 10 年間の予定で保管している。

市販後の安全性に対しては、1993 年、全国の医療機関より副作用・感染症報告の収集を開始した。薬事法の改正により、1997 年から、輸血による HBV, HCV, HIV 感染の報告を受けた場合はすべての症例を厚生労働省(2004 年 4 月からは医薬品医療機器総合機構)に情報入手後 24 時間以内に FAX で報告す

るとともに、15 日以内に報告書を提出している。

2003 年 6 月以降、厚生労働省の指示を受け、遡及調査をはじめとする感染症に対する献血者の追跡を強化するとともに、遡及調査ガイドラインの作成や NAT の精度向上など 8 項目の安全対策に取り組み実施している。

この報告書では、医療機関から報告された副作用・感染症報告(自発報告)、および遡及調査の結果から、輸血後肝炎と思われる症例について調査し、輸血後肝炎の現状を明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

1. 医療機関からの副作用・感染症報告(自発報告)

全国の医療機関より、輸血後 HBV, HCV 感染等が疑われ、血液センターに報告された症例に対し、輸血前後の患者側のデータおよび輸血された血液の保管検体等献血者側のデータを調査した。その結果、保管検体にウイルス核酸が検出され、保管検体と患者血清中のウイルスの塩基配列が一致した場合、輸血により感染した可能性が高いと考えられる症例とした。

また、輸血により感染した可能性が高いと考えられる症例の献血者が複数回献血している場合は、それらの血液が輸血された患者の追跡調査を実施した。