

氏名(国籍)	か 何	せん 川(中国)
学位の種類	博士(医学)	
学位記番号	博甲第2936号	
学位授与年月日	平成14年3月25日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
審査研究科	医学研究科	
学位論文題目	Molecular Epidemiological Studies of Human Hepatitis Virus in China — Prevalence of TT Virus and Hepatitis B Virus Vaccine Escape Mutants in China — (中国におけるウイルス性肝炎に関する分子疫学的研究 — TTVの臨床的意義およびHBVのワクチンエスケープ変異について—)	
主査	筑波大学教授	医学博士 田中直見
副査	筑波大学助教授	医学博士 有波忠雄
副査	筑波大学助教授	医学博士 轟健
副査	筑波大学講師	博士(理学) 清水健

### 論文の内容の要旨

中国はB型肝炎ウイルス陽性者が約10%と効率であることで知られている。そこで、新たな肝炎ウイルスとして注目されているTTウイルス(TTV)の分子疫学的検討とB型肝炎ウイルス感染予防に使用されているHBワクチン接種後のエスケープ変異について検討した。

#### 1. TTVの分子疫学的研究

##### (目的)

1997年、非A～G型輸血後肝炎症例から同定されたTTVは新たな肝炎ウイルスとして注目されている。健康人における陽性率が高いことに加え、各種肝疾患においてもTTVの臨床的意義は明確にされていない。そこで、これまで検討されていない中国におけるTTV感染症の実態を地域差も含めて明らかにすることを目的とした。

##### (対象及び方法)

中国の男女計295名で、内訳は献血者127名、非A～G型慢性肝炎25例、非A～G型劇症肝炎31例、HBsAgキャリア29例、Anti-HCV陽性者14例である。凍結保存血清よりDNAを抽出し、2種類の方法でTTV-DNAを検出した。12例においてDNA配列決定を行って、UPG(Unweighted pair-group method)にて分子系統樹を作成し、ゲノタイプ分類を行った。8例においてクローニングを行い、重複感染を分析した。さらにゲノタイプ分類も行った。

##### (結果)

Okamotoらが報告したいわゆる第2世代のプライマー(以下2nd primer)を用いた場合は献血者におけるTTV-DNA陽性率は28%(北部31%、南部22%)であり、HBキャリアでは28%、HCV陽性者では21%だった。劇症肝炎症例におけるTTV-DNA陽性率は45%とやや高値だが、献血例との間に有意差は認められなかった。一方、高橋らが報告した第3世代のプライマーを用いると、TTV-DNA陽性率は献血者、肝疾患症例いずれにおいても80%ないし90%ときわめて高率だった。PCR強陽性検体の分子系統樹の結果は12例中4例(33.3%)がG1に属し、8

例 (66.7%) が G 2 に属していた。2 nd primer で得られた計 88 例の陽性検体全例を対象に PCR-RFLP 法により TTV のゲノタイプ分類を行った結果は、献血者におけるゲノタイプをみると G 1 と G 2 がほぼ同数であったが、劇症肝炎例では献血例に比べて G 1 の比率が有意に高かった。(10/14 vs 22/55,  $P < 0.05$ )。重複感染を疑われた血清検体においては遺伝子型の異なる TTV 変異体が二種類以上検出された。

#### (考察)

本研究から中国における TT ウイルスの感染率は日本や、米国、英国、フランスにおける報告よりもきわめて高いことがわかった。中国における感染率の地域差は北部 (天津市) では 31% (40/127) 南部 (昆明市) では 22% (15/69) であり、両者に有意差はなかった。B 型肝炎でみられた北部より南部の比率が高い結果とは異なっていた。両 PCR 法による検出率の違いは用いたプライマーの遺伝子型別の特異性の違いに起因するものと考えられた。分子系統樹の結果を見ると、ゲノタイプ 2 の割合がゲノタイプ 1 より多く、日本での報告とは逆の傾向だった。(66.7% vs 2.6%,  $P < 0.001$ )。肝機能正常献血者と非 A ~ G 型肝炎患者の間で TTV 陽性率に差はなかったが、非 A ~ G 型劇症肝炎では献血群と有意に異なる TTV のゲノタイプ分布を示した。Okamoto らによると、複数の遺伝子型の TTV 変異株が存在することが分かってきて、ある特定の遺伝子型の TTV やその変異体が病原性を発現する可能性が示されている。

## 2. B 型肝炎ウイルスにおけるワクチンエスケープ変異

#### (目的)

HBV のエスケープ変異は最初 HBs 抗体を獲得したにもかかわらずキャリア化したイタリアの母児間感染例から得られた。その HBV 株では、S ペプチドの 145 番目のアミノ酸変異が起こったために “a” 抗原決定基に変化が起きたものとして報告された。以後、種々の escape mutant が報告されている。そこで我々は中国における市中感染を焦点に成人を対象として、ワクチンの接種効果、HBV のエスケープ変異の実態を明らかにするために本研究を行った。

#### (対象及び方法)

479 名のレストラン従業員 (中国天津市) から HBsAg, HBeAg, Anti-HBs, Anti-HBe, Anti-HBc, 及び HBV-DNA が陰性、ALT 正常の一般健康人 176 人をスクリーニングし、ワクチン接種を行い、(recombinant vaccine, MERCK, US), 接種効果 (HBsAg, Anti-HBs, ALT) を調べた。Yamanaka らが報告したプライマーを用い、nested PCR 法で HBV-DNA を検出し、陽性サンプルについて DNA 配列決定を行い、S ペプチドの変異性を検討した。

#### (結果)

HBs 抗体陽性率 ( $> \text{or} = 20 \text{mIU/ml}$ ) は 94.9% (167/176) であった。HBV-DNA 陽性者は 6 例 (3.4%, 6/176) であった。このうち、HBs 抗体産生のみられたものは 4 例 2.3% (4/176) であり、HBs 抗原陽性となったのは 2 例 (1.1%, 2/176) であった。HBs 抗体を産生した 4 例において S ペプチドの変異を見つけた。内訳は Gly-145-Ala 変異株が 1 例で、Ile/Thr-126-Ser/Asn 変異株が 3 例であった。全 6 例が健康キャリアであった。

#### (考察)

中国は B 型肝炎感染率の極めて高い国であるといわれている。水平感染は主要なルートであり、性感染はその一つである。今回の研究対象は平均年齢が 24.6 才であり、結婚しているかまたはパートナーがいると考えられ性感染は主要な感染ルートと思われる。変異株の直接感染または野生株が感染してから体内で変異の起きた可能性がある。変異株が肝病変又は肝臓癌を引き起こすことが報告されているので、現在健康キャリアであっても注意

するべきである。Pre-S2ペプチドを含んだHBワクチンがエスケープ変異株に有効と報告されているので、このワクチンを使うべきと考えられる。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

### (批評)

本研究は新しいウイルス TTV 及び HBV のワクチンエスケープ変異について中国における実態を調べた初めての報告であり、貴重な研究である。中国における TTV 感染率はきわめて高く、肝機能正常献血者と非 A-G 型肝炎患者が同じレベルの陽性率であったが、非 A-G 型肝炎では献血群と有意に異なるゲノタイプ分布を示すことが明らかとなった。TTV の臨床的意義については問題があるところであるが HBV 感染の多い中国において TTV を調べた所に価値がある。HBV については中国成人における HB ワクチン接種後の HBV エスケープ変異発生率は極めて高く、HBs 抗体陽性でも感染が成立したことが明らかとなった。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。