【第44回 小島三郎記念文化賞】

肝炎ウイルスの分子医学的研究とその応用

Molecular medical research on hepatitis viruses and its clinical application

おかもとひろあき
岡本宏明
Hiroaki OKAMOTO

はじめに

大学卒業後の4年間の臨床経験を踏まえ、昭和58年(1983年)に自治医科大学予防生態学教授・真弓忠先生のもとでB型肝炎ウイルスについての基礎研究を始めて以来、臨床例の解析を通じて問題点を列記し、ウイルス側から分子レベルで追求し、実学としての医学研究を心掛けるとともに、その成果を社会に還元し医療の向上に役立つことを目指し、一貫して肝炎ウイルスの研究に取り組んできました。この度の受賞はこれまで25年間に亘って行ってきた肝炎ウイルスの基礎的・臨床的研究とその臨床応用に関する業績全体をご評価いただいたものと理解し、その概略を紹介させていただきます。

I. 肝炎ウイルス

肝炎ウイルスは肝臓を主たる増殖の場とし、肝炎を惹起しうるウイルスの総称であり、現在までにA型からE型までの5種類の肝炎ウイルスが同定されている。感染様式の違いによって2種類に大別される。流行性(伝染性)肝炎ウイルスは飲食物を介して経口感染するウイルスで、A型とE型の2種類が同定されている。血清肝炎ウイルスは血液や体液を介して感染伝播するウイルスであり、B型、C型、およびD型が知られている。

II. B型肝炎ウイルスに関する研究

B型肝炎ウイルス(HBV)は、急性肝炎や劇症肝

炎、慢性肝疾患としての慢性肝炎や肝硬変、そして肝癌の原因ウイルスである。全世界では3億5千万～4億人、わが国では150万～200万人のHBVキャリアが存在すると推定されているが、そのうちの約1割が慢性肝疾患に移行する。国内での慢性肝疾患の10～15%がHBV感染に起因する。HBVはヘパドナウイルス科に属するエンベロープで覆われた直径42nmの球状粒子であり、約3,200塩基対の不完全2本鎖環状DNAを内包している。1965年にBlumbergら¹⁾によってオーストラリア抗原(Au抗原:現在のHBs抗原)が発見されたことが発端となって、1970年にHBV粒子そのものであるDane粒子が見出され、1979年に全遺伝子構造が決定された。

現在、HBVが逆転写過程を介して増殖し、遺伝子変異に富むことは良く知られているが、私がHBVについて研究を始めた当時は、持続感染中のHBVは不変であり、流血中のHBVは均一であるという考え方が支配的であった。しかし1987年に、感染成立後54年経過したキャリア例でのHBVの解析を通じ、DNAウイルスであるにも拘わらず、HBVがRNAウイルスのように変異しやすいウイルスであることに気付き(変異率: $1.4-3.2 \times 10^{-5}$ /塩基・年)²⁾、患者流血中に欠失変異株などのdefectiveな変異ウイルスも存在することを見出すことができた³⁾。HBVは表面抗原であるHBs抗原の表現型の違いによって4種類のサブタイプ(adw, adr, ayw, ayr)に分類されているが、稀なサブタイプayrのHBVについてそれまで全塩基配列が決定されていなかったのは幸運であった。ayrのほか、adwr, adyr

などの表現型を持つ HBV について全塩基配列を決定したことがヒントになって、HBs 抗原の 2 組のサブタイプ特異抗原基 d と y、w と r の違いが S 遺伝子（それぞれコドン 122、コドン 160 の 2 番目の塩基）での点突然変異（A から G、あるいは G から A への変異）によって招来されることを明らかにし^{4, 5)}、adyr や adwr、さらには adywr などの複合型サブタイプの謎も、点突然変異によって生じたウイルスと元のウイルスにより産生された HBs 抗原の phenotypic mixing に起因するということで解決に導くことができた⁶⁾。サブタイプ自体、S 遺伝子での点突然変異によって容易に変わりうるようになったことから、表現型による分類よりもむしろ遺伝子配列の相同性の違いによる分類の方が HBV 感染と肝病態との関連性を明らかにする上で適していると考え、1988 年に全塩基配列の 8% 以上の違いを基準にして 4 つの遺伝子型 (genotype)、すなわち A 型、B 型、C 型、D 型の 4 種類に分類することを提唱した⁷⁾。A 型は欧米やアジア・アフリカに、B 型と C 型はアジアを中心に、そして D 型は世界各地に分布するメジャーな遺伝子型であるが、その後、1994 年に西アフリカに限局して分布する E 型とアメリカ原住民から分離された F 型が追加され、2000 年に北米やヨーロッパで分離されたマイナータイプとしての G 型、そして 2002 年に中南米に分布する H 型が加わり、現在では合計 8 種類となっている。HBV preS2 蛋白に対するモノクローナル抗体を用いた ELISA 法による遺伝子型判定法は⁸⁾、簡便法として臨床例での HBV 遺伝子型の違いによる肝病態の差異の解析に役立っている。

1989 年から 1991 年にかけて B 型慢性肝疾患患者および無症候性 HBV キャリアの血清検体から、preC 領域においてコドン 28 が TGG から TAG に変異 (G1896A [1896 番目の塩基で G から A に変異]) した HBV (preC 変異株) を同定し、持続感染中の HBe 抗原から HBe 抗体への seroconversion に伴って、ウイルス自体も HBe 抗原を産生できる野生株から HBe 抗原を産生できない preC 変異株に置き換わっていることを発見した⁹⁾。加えて、preC 変異株の初感染が B 型劇症肝炎発症と密接な関連があることを明らかにすることができた^{10~14)}。輸血後 B 型劇症肝炎患者およびその感染源である HBs 抗原陰性供血者からも同様に preC 変異株を同定し¹³⁾、

HBc 抗体測定が preC 変異株の検出に有用であることを明らかにすることができた結果¹⁵⁾、1989 年 11 月から日本赤十字社で輸血用血液のスクリーニング検査として HBc 抗体検査が追加導入され、それを契機に、わが国では輸血後 B 型劇症肝炎は事実上根絶された¹⁶⁾。

1994 年には、コアプロモーター領域での特徴的な二重変異 (A1762T & G1764A) を見出し、preC mRNA の産生が低下し、結果として HBe 抗原の産生が低下すること^{17, 18)}、またこのコアプロモーター変異株感染と B 型劇症肝炎発症とが密接な関係にあることを明らかにすることができた¹⁹⁾。HBV ゲノムの点変異や欠失変異、挿入変異など様々な変異は、C 遺伝子や P 遺伝子、preS1/preS2 領域などでも起きており、多彩な病態と密接な関連があることが次第に明らかになった^{20~23)}。

Ⅲ. C 型肝炎ウイルスに関する研究

C 型肝炎ウイルス (HCV) は、急性肝炎や慢性肝炎、肝硬変、そして肝癌の原因ウイルスである。HCV に感染しても一般に症状に乏しく劇症肝炎は稀であり、ほとんど自覚症状がないまま約 7 割の感染者が慢性肝疾患に移行する。全世界では 1 億 7 千万人、わが国では 150 万~200 万人と推定される HCV キャリアが存在しており、国内での慢性肝疾患の約 8 割は HCV 感染に起因する。HCV はエンベロープに覆われた直径約 60nm の球状粒子で、フラビウイルス科に分類されている。ウイルス遺伝子は、約 9,600 塩基長の線状 1 本鎖 (プラス鎖) RNA である。

1988 年 5 月 10 日、米国カイロン社は血液伝播性非 A 非 B 型肝炎の原因ウイルスとしての HCV の遺伝子をクローン化することに成功し、HCV 抗体 (第一世代、C100-3 抗体) の検出系を開発したことを記者会見で発表した。しかし、HCV 遺伝子の塩基配列はその後 1 年間ベールに包まれたまま、1989 年 5 月 31 日にヨーロッパ特許出願 (#88310922.5) の公開という形で全塩基配列の 7 割に相当する 7,310 塩基のデータが初めて明らかにされた。しかしながら、その塩基配列は非構造遺伝子領域に相当するものであり、ゲノムの 5' 末端側に位置すると推測される構造遺伝子領域や 5' 末端非翻訳領域の塩基配列は

公表されなかった。そこで、上述のHBV preC 変異株についての研究とほぼ並行して、1989年後半からHCVの遺伝子構造を決定する研究も行った。具体的には、HC-J1株（米国型：現在でいう1a型）とHC-J4株（日本型：1b型）の2株について、5'側に1672塩基分延びたcDNAクローンを分離し、その塩基配列を決定した。新しく決定された遺伝子配列は少なくとも324塩基長よりなる5'非翻訳領域、C遺伝子とE1遺伝子の全長およびE2遺伝子の一部からなっていた²⁴⁾。その塩基配列を、1990年6月15日に開催された第26回日本肝臓学会総会（国立教育会館、東京）において、カイログループよりも先に公表し、そのデータを論文出版前に日本国内のみならず、アジア、欧米の研究者にリクエストに応じて配布し感謝されたことは今でも思い出の一つとして残っている。

HC-J1株とHC-J4株の塩基配列を比較した結果、5'非翻訳領域は変異が少ないことが分かり、RT-PCR法によるHCV RNAの検出に適していることを実証した²⁵⁾。5'非翻訳領域を標的領域とするHCV RNA測定系は世界標準となり、現在でもすべてのHCV定性・定量測定系に5'非翻訳領域のプライマーやプローブが用いられている。また、C遺伝子領域はアミノ酸配列の保存性が高く、N末端側の120アミノ酸からなる領域は親水性に富むことから、CP9 (aa 39-74 : 36-mer) やCP10 (aa 5-23 : 19-mer) などの合成ペプチドを用いたコア抗体測定系を確立し、HCV感染の早期診断に有用であることを示した²⁶⁾。核酸検出および抗体検出による高感度のC型肝炎診断法の確立に引き続き、C型肝炎患者やHCV感染チンパンジーの血清を用いた分子生物学的解析を通じて、E2領域のN末端側にある超可変領域(HVR)での変異がウイルスのquasispeciesの形成およびHCVの持続感染状態の維持に重要な役割を果たしていることを明らかにした^{27, 28)}。

HCVゲノムは多様性に富み、全塩基配列が互いに30%以上異なる株が多数存在することを明らかにし、1a型や1b型のみならず、2a型や2b型など合計22種類の遺伝子型のHCV株について全塩基配列を決定し、HCVゲノムの特徴を明らかにした^{29~33)}。加えて、世界各地に広く分布する主要な5種類の遺伝子型(1a, 1b, 2a, 2b, 3a)をコア領域の型特異的プライマーを用いたmultiplex RT-PCR法により簡便

に分類できる方法を開発し、臨床検体での応用を可能にした^{34, 35)}。

HCV感染の分子疫学的研究として、透析患者や非加熱血液製剤での治療歴を有する血友病患者でのHCV感染率が高いこと(それぞれ26%, 90%)^{36, 37)}、母子感染や針刺し事故による感染の実態や危険因子を明らかにするとともに^{38, 39)}、世界16ヶ国の研究者との共同研究により、それぞれの国々でのHCVの感染状況や遺伝子型の分布、その特徴を明らかにした^{40~45)}。また、遺伝子型やウイルス量、HVRのquasispeciesの度合いなどのウイルス側因子がインターフェロン治療効果と密接な関連があることを明らかにし、C型肝炎例でのインターフェロン治療に対する感受性者の予測に寄与した^{46~48)}。

IV. E型肝炎ウイルスに関する研究

E型肝炎ウイルス(HEV)は、約7,200塩基長の線状1本鎖(プラス鎖)RNAをゲノムとする直径27~34nm(平均30nm)の小型球形粒子であり、へペウイルス科に分類されている。熱帯・亜熱帯に位置する発展途上国では、糞便中のHEVによって汚染された飲料水が感染源となり、河川の氾濫に伴う水系感染による流行性E型肝炎が現在でもしばしば起きている。ところが、このE型肝炎が浸淫地域への渡航による「輸入感染」としてではなく、「国内感染」として先進国にも存在することが最近になって明らかになった。HEVの血清型は1種類とされているが、遺伝子型としては1型から4型までの4種類が知られており、異なる遺伝子型に属するHEV株間の全塩基配列の違いは約25%にも達する⁴⁹⁾。

HEV研究にも没頭するきっかけとなったのは、感染実態の把握と感染源・感染ルートの解明が急務であると実感するに至った貴重な1例に遭遇したことによる。すなわち、2000年3月に発症した非A非B非C型散発性急性肝炎の、海外渡航歴のない患者(45歳の日本人男性)から思いがけなくIgMクラスおよびIgGクラスHEV抗体が高力価で検出されたことに起因する。その後の解析によって、本症例は3型と4型のHEVが同時に感染した、世界でも最初のケースであることが判明した⁵⁰⁾。この症例の解析を契機に、HAVやHBV、HCVの感染の証拠がなく、原因不明とされていた急性肝炎患者(87例)

からの入院時保存血清を用いて、RT-PCR法によってHEV RNAを検出し、11例(13%)が実はE型肝炎であったことを明らかにした⁵¹⁾。これら11例にはいずれも海外渡航歴はなく、分離されたHEVも、日本固有株と想定される3型、ないし4型の新種ウイルスであった。また、入院時血清が保存されていた原因不明(非A非B非C型)の劇症肝炎例18例についても、同様の検査を行ったところ、3例(17%：いずれも死亡)がHEV感染によることが判明し、N Engl J Med誌に報告した⁵²⁾。

国内感染E型肝炎症例の特徴を整理すると次のようになる。症状や身体所見において特にA型肝炎との差異は認められない。いずれも孤発例であり、患者の年齢は25～86歳(平均55.4歳)で男性が82%を占める。患者の多くは安静を主とする保存的療法のみで軽快治癒したが、血液凝固能の低下(プロトロンビン時間40%未満)が見られた急性肝炎重症型が135例中15例(11%)、そのほか劇症化し、肝不全のために死亡した症例が5例認められた。HEV感染は広く国内各地で認められるが、過去の感染既往を示すIgGクラスHEV抗体の一般健常人での陽性率は中部以北で高い傾向にある。HEV感染のほとんどは不顕性で、発症する例は0.1%以下と推定されているが、E型肝炎患者は北日本、特に北海道に圧倒的に多く存在する^{53, 54)}。

インドやネパールなどのE型肝炎の流行地域(1型HEVの浸淫地域)では、妊婦がとくに妊娠第3期にHEVに感染した場合、15～25%が劇症肝炎により死亡することが知られているが、わが国のE型劇症肝炎による死亡例の大多数は中高年の男性で、これまでに妊婦のE型劇症肝炎例は1例も経験されていない。重症化には、高齢であることや、生活習慣病や肝疾患などの基礎疾患の存在などの宿主側の因子も重要であるが、HEV遺伝子型と肝炎重症度との相関は注目に値する。わが国では3型HEVの感染者の方が多くにも拘わらず、E型劇症肝炎患者では4型が優位であること、さらに3型HEV感染例に比べて4型HEV感染例の方が、初診時、あるいはピーク時の総ビリルビン値やトランスアミナーゼ値が有意に高く、経過中のプロトロンビン活性の最低値は4型HEV感染例の方が有意に低いことから、4型HEVに感染した患者では3型に感染した患者より重症であるといえる⁵⁵⁾。HEVゲノムの5'末端か

ら3148番目の塩基がU(ウラシル)に置換された4型HEVが急性肝炎よりも劇症肝炎患者から有意に多く分離され⁵⁶⁾、特定のゲノム変異と重症化との関連性が注目されている。

飼育ブタはHEV感染が蔓延しヒトへの感染のリザーバーとなりうること^{57, 58)}、北海道ではE型肝炎の患者数が国内で最も多いことは先に述べたが、その北海道のE型肝炎患者では、ブタのレバーやホルモンを生、あるいは加熱不十分な状態で喫食し、感染したと想定される患者が93%(27/29)を占めていたこと、そしてE型肝炎患者が居住する地域の食料品店で販売されていた生の食用ブタ肝臓の1.9%(7/363)からHEV RNAが検出されたこと⁵⁹⁾、などからHEV汚染食物摂取による感染が強く疑われている。これらの情報は、厚生労働省のホームページ(<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2003/08/h0819-2a.html>)に健康危険情報として公開されており、ここ数年の北海道でのE型肝炎の減少傾向に寄与しているものと推測される。感染ルートとして、輸血感染もあり、1970年代に輸血によるHEV感染事例を解析し報告した⁶⁰⁾。しかし、感染源や感染経路を特定できていない症例も少なくない。解明に向けてのさらなる研究が重要である。

HEVが発見されてから四半世紀が経過したが、最近まで培養系が確立されていなかった。国内感染E型肝炎患者から提供された糞便のなかに、飛びぬけて高い力価のHEV(JE03-1760F[3型])を含むサンプルがあり⁶¹⁾、その浮遊液(2.0×10^7 copies/ml)をヒトやサルなどの21種類の株化細胞に接種したところ、肝癌細胞株のPLC/PRF/5細胞と肺癌細胞株のA549細胞の2種類で効率よくHEVが増殖し、培養上清中のHEVが 10^8 copies/mlにまで達した⁶²⁾。また、培養上清中に放出されたHEVが感染性を有し、新たな培養細胞に接種し、継代培養を行うことも可能であることが分かった。継代を重ねることにより、より活発な増殖能を有する馴化株が得られている⁶³⁾。HEVの培養系の確立は、世界で初めてであり、この培養系を用いることにより、増殖機構や蛋白発現様式の解明のみならず、抗体の中和能の評価、ウイルス不活化条件の検討など、HEVに関する多方面の数々の疑問に一つ一つ答えを出すことが可能になったといえる。

V. TTウイルスに関する研究

A型からE型までの5種類の肝炎ウイルスについての高精度・高感度の検出法が確立され、臨床診断に応用されているにも拘わらず、劇症肝炎の過半数、急性肝炎の約10～20%、慢性肝炎の約10%は原因不明であり、未同定の肝炎ウイルスの存在が推測されている。

原因不明の輸血後肝炎症例から起因ウイルスの同定を試みる過程で、1997年にヒトで初めての環状1本鎖(マイナス鎖)DNAウイルスを分離することができた^{64,65)}。その新しいウイルスに対して当時は、発見の発端になった患者のイニシャル(T.T.)にちなんで暫定的にTTウイルス(TTV)と命名したが、現在では国際ウイルス命名委員会(ICTV)により、正式名称をTorque Teno virus (TTV)とし、Anellovirus(アネロウイルス)属という新規のウイルス属に分類されている。ウイルス科は未定であるが、新しいウイルス科を設定する方向で検討されている。直径30～32nmの球状粒子でゲノム長は3.6～3.9kbである。ゲノムの多様性が顕著で、全塩基配列が50%以上異なるTTVが多数存在し、5つの遺伝子グループと少なくとも39種類の遺伝子型に分類されている⁶⁶⁾。同一個体内で、異なる遺伝子型のTTVの重複感染が高頻度に認められ、さらにゲノム長が2.8～2.9kbのTorque teno mini virus (TTMV)や最近発見したゲノム長が3.2kbのTorque teno midi virus (TTMDV)が共感染していることも判明している^{67～69)}。これまでのウイルスには見られない数々の稀な特徴を有することが明らかにされているが、臨床医学的な見地からの研究は未だ不十分である。TTV/TTMDV/TTMV感染と疾病との関連性について、肝疾患以外の疾患も含め、数多く存在する遺伝子型や遺伝子グループを区別し、ウイルス量の違いに着目した臨床医学的な研究が今後も重要であると思われる。

TTV研究の詳細については、最近、Curr Top Immunol Microbiol誌に総説を書く機会がありましたので⁷⁰⁾、そちらをご覧頂けましたら幸いです。

おわりに

研究の原点としてのB型肝炎ウイルスの変異に

ついでの研究を振り返るとともに、C型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、そしてTTウイルスの研究について概述した。今後も、臨床例から学び、その成果を臨床に還元できることを目指し、肝炎ウイルス研究に邁進したいと考えております。

謝 辞

良き師、先輩、共同研究者、同輩、そして研究を支えてくれる良きスタッフを得ましたことが本日の受賞の源となったものと心から感謝申し上げる次第です。今回の受賞を励みにして、今後も肝炎ウイルス研究領域の学術発展に少しでも貢献していきたいと決意を新たにしております。末筆ながら、ご推薦くださいました自治医科大学学長・高久史磨先生、私どものこれまでの研究に大きな評価を与えて下さいました選考委員の方々および黒住医学研究振興財団の皆様方にも深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S : A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA* **191** : 541-546, 1965.
- 2) Okamoto H, Imai M, Kametani M, et al.: Genomic heterogeneity of hepatitis B virus in a 54-year-old woman who contracted the infection through materno-fetal transmission. *Jpn J Exp Med* **57** : 231-236, 1987.
- 3) Okamoto H, Tsuda F, Mayumi M : Defective mutants of hepatitis B virus in the circulation of symptom-free carrier. *Jpn J Exp Med* **57** : 217-221, 1987.
- 4) Okamoto H, Imai M, Shimozaki M, et al.: Nucleotide sequence of a cloned hepatitis B virus genome, subtype ayr : comparison with genomes of the other three subtypes. *J Gen Virol* **67** : 2305-2314, 1986.
- 5) Okamoto H, Imai M, Tsuda F, et al.: Point mutation in the S gene of hepatitis B virus for a d/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adyr or adwr. *J Virol* **61** : 3030-3034, 1987.
- 6) Yamanaka T, Akahane Y, Suzuki H, et al.: Hepatitis B surface antigen particles with all four subtypic determinants : point mutations of hepatitis B virus DNA inducing phenotypic changes or double infection with viruses of different subtypes. *Mol Immunol* **27** : 443-449, 1990.
- 7) Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, et al.: Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence : comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* **69** : 2575-2583, 1988.
- 8) Usuda S, Okamoto H, Iwanari H, et al.: Serological detection of hepatitis B virus genotypes by ELISA with monoclonal antibodies to type-specific epitopes in the preS2-

- region product. *J Virol Methods* **80** : 97-112, 1999.
- 9) Okamoto H, Yotsumoto S, Akahane Y, et al.: Hepatitis B viruses with precore region defects prevail in persistently infected hosts along with seroconversion to the antibody against e antigen. *J Virol* **64** : 1298-1303, 1990.
 - 10) Kosaka Y, Takase K, Kojima M, et al.: Fulminant hepatitis B : induction by hepatitis B virus mutants defective in the precore region and incapable of encoding e antigen. *Gastroenterology* **100** : 1087-1094, 1991.
 - 11) Terazawa S, Kojima M, Yamanaka T, et al.: Hepatitis B virus mutants with precore-region defects in two babies with fulminant hepatitis and their mothers positive for antibody to hepatitis B e antigen. *Pediatr Res* **29** : 5-9, 1991.
 - 12) Yotsumoto S, Kojima M, Shoji I, et al.: Fulminant hepatitis related to transmission of hepatitis B variants with precore mutations between spouses. *Hepatology* **16** : 31-35, 1992.
 - 13) Kojima M, Shimizu M, Tsuchimochi T, et al.: Posttransfusion fulminant hepatitis B associated with precore-defective HBV mutants. *Vox Sang* **60** : 34-39, 1991.
 - 14) Tanaka S, Yoshida M, Iino S, et al.: A common-source outbreak of fulminant hepatitis B in hemodialysis patients induced by precore mutant. *Kidney Int* **48** : 1972-1978, 1995.
 - 15) Iizuka H, Ohmura K, Ishijima A, et al.: Correlation between anti-HBc titers and HBV DNA in blood units without detectable HBsAg. *Vox Sang* **63** : 107-111, 1992.
 - 16) Japanese Red Cross Non-A, Non-B Hepatitis Research Group. Effect of screening for hepatitis C virus antibody and hepatitis B virus core antibody on incidence of post-transfusion hepatitis. *Lancet* **338** (8774) : 1040-1041, 1991.
 - 17) Okamoto H, Tsuda F, Akahane Y, et al.: Hepatitis B virus with mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen. *J Virol* **68** : 8102-8110, 1994.
 - 18) Moriyama K, Okamoto H, Tsuda F, et al.: Reduced precore transcription and enhanced core-pregenome transcription of hepatitis B virus DNA after replacement of the precore-core promoter with sequences associated with e antigen-seronegative persistent infections. *Virology* **226** : 269-280, 1996.
 - 19) Sato S, Suzuki K, Akahane Y, et al.: Hepatitis B virus strains with mutations in the core promoter in patients with fulminant hepatitis. *Ann Intern Med* **122** : 241-248, 1995.
 - 20) Okamoto H, Yano K, Nozaki Y, et al.: Mutations within the S gene of hepatitis B virus transmitted from mothers to babies immunized with hepatitis B immune globulin and vaccine. *Pediatr Res* **32** : 264-268, 1992.
 - 21) Yamamoto K, Horikita M, Tsuda F, et al.: Naturally occurring escape mutants of hepatitis B virus with various mutations in the S gene in carriers seropositive for antibody to hepatitis B surface antigen. *J Virol* **68** : 2671-2676, 1994.
 - 22) Horikita M, Itoh S, Yamamoto K, et al.: Differences in the entire nucleotide sequence between hepatitis B virus genomes from carriers positive for antibody to hepatitis B e antigen with and without active disease. *J Med Virol* **44** : 96-103, 1994.
 - 23) 岡本宏明 : B型肝炎ウイルスの変異と病態 (Editorial). *肝臓* **38** : 477-488, 1997.
 - 24) Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, et al.: The 5'-terminal sequence of the hepatitis C virus genome. *Jpn J Exp Med* **60** : 167-177, 1990.
 - 25) Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, et al.: Detection of hepatitis C virus RNA by a two-stage polymerase chain reaction with two pairs of primers deduced from the 5'-noncoding region. *Jpn J Exp Med* **60** : 215-22, 1990.
 - 26) Okamoto H, Tsuda F, Machida A, et al.: Antibodies against synthetic oligopeptides deduced from the putative core gene for the diagnosis of hepatitis C virus infection. *Hepatology* **15** : 180-186, 1992.
 - 27) Okamoto H, Kojima M, Okada S, et al.: Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee : variability and stability. *Virology* **190** : 894-899, 1992.
 - 28) Taniguchi S, Okamoto H, Sakamoto M, et al.: A structurally flexible and antigenically variable N-terminal domain of the hepatitis C virus E2/NS1 protein : implication for an escape from antibody. *Virology* **195** : 297-301, 1993.
 - 29) Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, et al.: Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier : comparison with reported isolates for conserved and divergent regions. *J Gen Virol* **72** : 2697-2704, 1991.
 - 30) Okamoto H, Kurai K, Okada S, et al.: Full-length sequence of a hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates : comparative study of four distinct genotype. *Virology* **188** : 331-341, 1992.
 - 31) Sakamoto M, Akahane Y, Tsuda F, et al.: Entire nucleotide sequence and characterization of a hepatitis C virus of genotype V/3a. *J Gen Virol* **75** : 1761-1768, 1994.
 - 32) Tokita H, Okamoto H, Iizuka H, et al.: The entire nucleotide sequences of three hepatitis C virus isolates in genetic groups 7-9 and comparison with those in the other eight genetic groups. *J Gen Virol* **79** : 1847-1857, 1998.
 - 33) Simmonds P, Bukh J, Combet C, et al.: Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* **42** : 962-973, 2005.
 - 34) Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, et al.: Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers : application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol* **73** : 673-679, 1992.
 - 35) Okamoto H, Kobata S, Tokita H, et al.: A second-generation method of genotyping hepatitis C virus by the polymerase chain reaction with sense and antisense primers deduced from the core gene. *J Virol Methods* **57** : 31-45,

- 1996.
- 36) Masuko K, Okuda K, Meguro T, et al.: Hepatitis C virus antibodies, viral RNA and genotypes in sera from patients on maintenance haemodialysis. *J Viral Hepat* **1** : 65-71, 1994.
 - 37) Fujimura Y, Ishimoto S, Shimoyama T, et al.: Genotypes and multiple infections with hepatitis C virus in patients with haemophilia A in Japan. *J Viral Hepat* **3** : 79-84, 1996.
 - 38) Ohto H, Terazawa S, Sasaki N, et al.: Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. *N Engl J Med* **330** : 744-750, 1994.
 - 39) Mitsui T, Iwano K, Masuko K, et al.: Hepatitis C virus infection in medical personnel after needlestick accident. *Hepatology* **16** : 1109-1114, 1992.
 - 40) Tokita H, Okamoto H, Tsuda F, et al.: Hepatitis C virus variants from Vietnam are classifiable into the seventh, eighth, and ninth major genetic groups. *Proc Natl Acad Sci USA* **91** : 11022-11026, 1994.
 - 41) Tokita H, Okamoto H, Luengrojankul P, et al.: Hepatitis C virus variants from Thailand classifiable into five novel genotypes in the sixth (6b), seventh (7c, 7d) and ninth (9b, 9c) major genetic groups. *J Gen Virol* **76** : 2329-2335, 1995.
 - 42) Shrestha S M, Tsuda F, Okamoto H, et al.: Hepatitis B virus subtypes and hepatitis C virus genotypes in patients with chronic liver disease in Nepal. *Hepatology* **19** : 805-809, 1994.
 - 43) Wang Y, Okamoto H, Tsuda F, et al.: Prevalence, genotypes, and an isolate (HC-C2) of hepatitis C virus in Chinese patients with liver disease. *J Med Virol* **40** : 254-260, 1993.
 - 44) Tsatsralt-Od B, Takahashi M, Nishizawa T, et al.: High prevalence of dual or triple infection of hepatitis B, C, and delta viruses among patients with chronic liver disease in Mongolia. *J Med Virol* **77** : 491-499, 2005.
 - 45) Holland PV, Barrera JM, Ercilla MG, et al.: Genotyping hepatitis C virus isolates from Spain, Brazil, China, and Macau by a simplified PCR method. *J Clin Microbiol* **34** : 2372-2378, 1996.
 - 46) Kanai K, Kako M, Okamoto H.: HCV genotypes in chronic hepatitis C and response to interferon. *Lancet* **339** : 1543, 1992.
 - 47) Okada S, Akahane Y, Suzuki H, et al.: The degree of variability in the amino terminal region of the E2/NS1 protein of hepatitis C virus correlates with responsiveness to interferon therapy in viremic patients. *Hepatology* **16** : 619-624, 1992.
 - 48) Hino K, Sainokami S, Shimoda K, et al.: Genotypes and titers of hepatitis C virus for predicting response to interferon in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* **42** : 299-305, 1994.
 - 49) Okamoto H.: Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res* **127** : 216-228, 2007.
 - 50) Takahashi M, Nishizawa T, Yoshikawa A, et al.: Identification of two distinct genotypes of hepatitis E virus in a Japanese patient with acute hepatitis who had not traveled abroad. *J Gen Virol* **83** : 1931-1940, 2002.
 - 51) Mizuo H, Suzuki K, Takikawa Y, et al.: Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic cases of acute hepatitis in Japan. *J Clin Microbiol* **2002** ; **40** : 3209-3218.
 - 52) Suzuki K, Aikawa T, Okamoto H.: Fulminant hepatitis E in Japan. *N Engl J Med* **2002** ; **347** : 1456.
 - 53) Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T : Features of hepatitis E virus infection in Japan. *Intern Med* **42** : 1065-1071, 2003.
 - 54) 岡本宏明 : 我が国に於けるE型肝炎の現況. *肝臓* **47** : 379-383, 2006.
 - 55) Mizuo H, Yazaki Y, Sugawara K, et al.: Possible risk factors for the transmission of hepatitis E virus and for the severe form of hepatitis E acquired locally in Hokkaido, Japan. *J Med Virol* **76** : 341-349, 2005.
 - 56) Inoue J, Nishizawa T, Takahashi M, et al.: Analysis of the full-length genome of genotype 4 hepatitis E virus isolates from patients with fulminant or acute self-limited hepatitis E. *J Med Virol* **78** : 476-484, 2006.
 - 57) Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, et al.: Analysis of the complete genome of indigenous swine hepatitis E virus isolated in Japan. *Biochem Biophys Res Commun* **289** : 929-936, 2001.
 - 58) Takahashi M, Nishizawa T, Miyajima H, et al.: Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus. *J Gen Virol* **84** : 851-862, 2003.
 - 59) Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, et al.: Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J Gen Virol* **84** : 2351-2357, 2003.
 - 60) Mitsui T, Tsukamoto Y, Yamazaki C, et al.: Prevalence of hepatitis E virus infection among hemodialysis patients in Japan : evidence for infection with a genotype 3 HEV by blood transfusion. *J Med Virol* **74** : 563-572, 2004.
 - 61) Takahashi M, Tanaka T, Azuma M, et al.: Prolonged fecal shedding of hepatitis E virus (HEV) during sporadic acute hepatitis E : evaluation of infectivity of HEV in fecal specimens in a cell culture system. *J Clin Microbiol* **45** : 3671-3679, 2007.
 - 62) Tanaka T, Takahashi M, Kusano E, et al.: Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *J Gen Virol* **88** : 903-911, 2007.
 - 63) Lorenzo FR, Tanaka T, Takahashi H, et al.: Mutational events during the primary propagation and consecutive passages of hepatitis E virus strain JE03-1760F in cell culture. *Virus Res* **137** : 86-96, 2008.
 - 64) Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, 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.
 - 65) Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, et al.: Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV)

- associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepato Res* **10** : 1-16, 1998.
- 66) Okamoto H, Nishizawa T, Takahashi M : Torque Teno virus (TTV): molecular virology and clinical implications. In *Perspectives in Medical Virology, 10 (Viral Hepatitis : Molecular Biology, Diagnosis, Epidemiology and Control)*. Ed by Mushahwar IK, p241-254, 2004, Elsevier
- 67) Ninomiya M, Nishizawa T, Takahashi M, et al.: Identification and genomic characterization of a novel human torque teno virus of 3.2 kb. *J Gen Virol* **88** : 1939-1944, 2007.
- 68) Ninomiya M, Takahashi M, Shimosegawa T, et al.: Analysis of the entire genomes of fifteen torque teno virus variants classifiable into a third group of genus Anellovirus. *Arch Virol* **152** : 1961-1975, 2007.
- 69) Ninomiya M, Takahashi M, Nishizawa T, et al.: Development of PCR assays with nested primers specific for differential detection of three human anelloviruses and early acquisition of dual or triple infection during infancy. *J Clin Microbiol* **46** : 507-514, 2008.
- 70) Okamoto H.: History of discoveries and pathogenicity of TT viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **331** : 1-20, 2009 (TT viruses : The Still Elusive Human Pathogens, edited by E.-M. de Villiers and H. Zur Hausen, Springer)