

B 型肝炎ワクチンならびに C 型肝炎ワクチン

独立行政法人労働者健康安全機構燕労災病院

小方 則夫

I. B型肝炎 (HB) ワクチン

1. 劇症肝炎関連 HBV 変異株 (Strain HT)

1) 臨床事件 (水平感染) : HB ワクチン非接種であり B 型劇症肝炎で死亡した医師

1980 年代後半、日本において、HBe 抗原陰性 HBV キャリアである悪性腫瘍小児の診療を担当していた、いずも HB ワクチン非接種者である 2 人の小児科医および 1 人の看護師がほぼ同時に B 型劇症肝炎に罹患し、前 2 者が死亡するという事件が起きた¹⁾。状況より HBV 感染源は上記小児と考えられた。

本小児に感染していた HBV 株は、HBe 抗原 encoding gene の promoter である precore 領域に stop codon をもち、したがって HBe 抗原を産生しない。本変異株は、“precore-stop mutant” と呼称され、「HBe 抗原陰性者の血液・体液の暴露により劇症肝炎が発症しやすい」という新しい概念が形成されつつあった¹⁾。

しかし、B 型劇症肝炎 outbreak の発端者 (感染源) や散発性 B 型劇症肝炎例は血清 HBe 抗原陽性者が多いとされていたため違和感を持った。

2) Strain HT の微生物学的特性

上記患児血清が、NIH/NIAID/LID/HVS (肝炎ウイルス部) へ付託され、私が実験・研究に供した²⁾。

血清中 HBV 変異株 (Strain HT と命名) の感染性・病原性 (肝炎発症性) を調べる目的で、チンパンジー 3 頭へそれぞれ異なる濃度に希釈した血清を経静脈接種した。

感染性について、原血清を希釈し最終的に 10^7 倍まで希釈して 1 mL 接種することにより感染が成立した (表 1)。 10^7 倍以上の希釈血清は作成せず接種実験は施行しなかったため、感染性はもっと高かった可能性がある。いずれにせよ、本血清は HBV 持続感染者のなかでもウイルス量の多い血清であり、Strain HT の旺盛な複製力を反映するものであった。さて、原血清を 10^7 倍希釈しても感染するということを考察すると、 10^{-7} mL = 10^{-4} μ L、すなわち 1μ L の 1/1,000 量が循環血中に侵入すれば感染が成立するということである。この血液量は目に見えない容量であり、完璧な HBV 感染対策が困難であることを物語る。

病原性 (肝炎発症性) について、感染成立 3 頭における peak ALT は、それぞれ 1,201 IU/L・669 IU/L・1,468 IU/L であり GMT は 1,057 IU/L であった。この値は、HBV 野生株接種実験におけるチンパンジー 12 頭における peak ALT GMT 290 IU/L に比べ極めて高値であった (図 1)。すなわち、Strain HT はチンパンジーにおいて個体差に関わらず野生株に比べ最重篤の肝炎を引き起こした。

3) Strain HT の遺伝子学的特性

B 型肝炎の重症度に関連する要因に関する研究は多く行われており、従来から、宿主の (遺伝的) 免疫反応が規定する、という風潮が強かった。そのとおりであろう。しかし、Strain HT の臨床事件と接種実験とは HBV そのものに劇症・重症肝炎を引き起こす要因もあることを強く示唆する。

表 1. 劇症肝炎関連 HBV 変異株 (Strain HT) のチンパンジー感染性^{2,5,6)}

Table 1 Hepatitis B in chimpanzees inoculated with serum containing a precore mutant of HBV, strain HT

Chimpanzee	Dilution of Donor Serum	Hepatitis
1410	10^{-1}	Yes
1442	10^{-3}	Yes
1420	10^{-7}	Yes

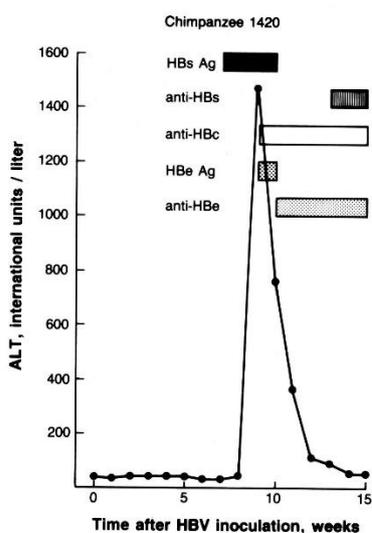


Fig. 1. Course of experimental infection of chimpanzee 1420 inoculated with a 10^{-7} dilution of serum from an index case infected with an HBV pre-C mutant (strain HT). HBV antigens or antibodies in serum were regarded as positive when the sample/negative control ratio was ≥ 2.1 by radioimmunoassay. From [16], with permission

図 1. 劇症肝炎関連 HBV 変異株 (Strain HT) のチンパンジー病原性^{2,5)}

この視点で文献をたどると、すでに 1970 年代に、Lancet 誌や New Engl J Med 誌などに似た事例が報告されている。例を挙げると、HBV キャリア母親の複数の出産児が、順々に出生直後に劇症肝炎に罹患した事例、HBV キャリア男性の複数の配偶者が、次々と結婚直後に劇症肝炎に罹患した事例、透析施設において HBV キャリア患者が発端と考えられる劇症肝炎が集団発生した事例、等である。これら報告は、何らかの劇症肝炎をおこしやすい HBV 株が存在するはずである、ということを提唱していた。

原血清由来 Strain HT と感染チンパンジー血清由来 Strain HT の全塩基配列を決定し、当時 Gene Bank に登録されていた HBV genomes と塩基・アミノ酸配列とを比較した。結果、原血清由来 Strain HT とチンパンジー血清由来 Strain HT の HBV 塩基配列はすべて同一で、subtype は *adr*、genotype は C であった。

そして subtype・genotype を超えて、多くの変異が存在した (図 2、図 3)。

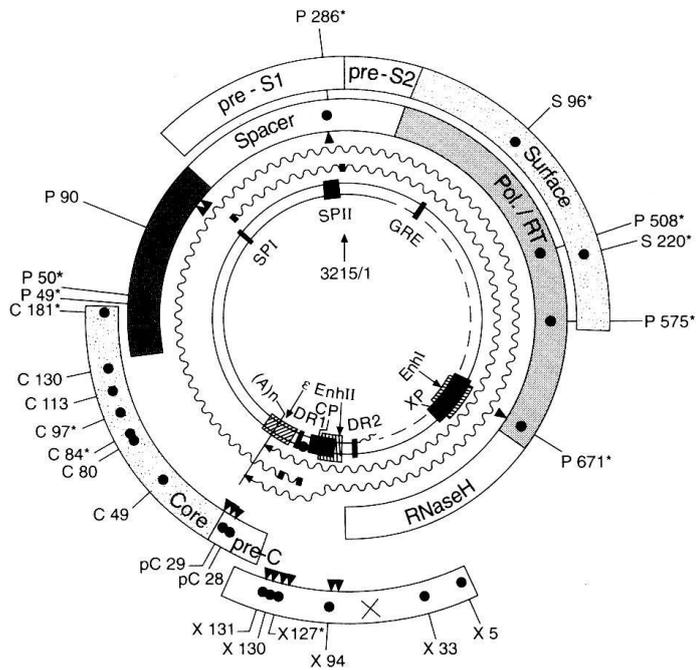


FIG. 2. Map of the genome of HBV strain HT. The genome is in the circular, partially double-stranded configuration. The RNA transcripts are shown outside of the genome as wavy lines with initiation sites as closed squares and poly-A addition signal as (A)_n. The open reading frames are shown outside of the RNA transcripts as boxes. *Cis*-acting regulatory elements are shown on the map as solid bars and hatched or closed boxes. Map unit 1 is the first A residue in the Eco R1 recognition site. Abbreviations and locations of the regulatory elements are as follows: ENH I (enhancer I) and XP (X promoter) are within nucleotides (nt) 963–1354 (Shaul *et al.*, 1985; Treinin and Laub, 1987; Patel *et al.*, 1989); ENH II (enhancer II) and CP (core promoter) are within nt 1591–1850 (Yee, 1989; López-Cabrera *et al.*, 1990); SPI (surface promoter I; large surface promoter) and its regulatory sequence are within nt 2711–2822 (Chang *et al.*, 1989); SPII (surface promoter II; major surface promoter) and its regulatory sequence are within nt 3003–3202 (Raney *et al.*, 1989); ϵ (pregenome RNA encapsidation signal ϵ) is within nt 1853–1982 (Junker-Niepmann *et al.*, 1990); DR2 and DR1 (direct repeat 2 and 1) at nt 1592–1602 and nt 1826–1636, respectively; GRE (glucocorticoid responsive element) is within nt 340–369 (Tur-Kaspa *et al.*, 1988). The virus genes and their map positions are as follows; pre-core (pre-C), 1816–1902; core, 1903–2454; pre-surface 1 (pre-S1), 2850–3206; pre-surface 2, (pre-S2) 3207–156; surface, 157–837; X, 1376–1840; polymerase, 2309–1625. The four domains of the polymerase gene are as follows: terminal protein (TP), 2309–2839; spacer (SP), 2840–131; DNA polymerase and reverse transcriptase (Pol-RT), 132–1163; ribonuclease H (RNaseH), 1164–1625 (Radziwill *et al.*, 1990). Rare or unique nucleotide substitutions within the regulatory elements are shown as closed triangles. The predicted amino acids that are rare or unique substitutions are shown as closed circles within the open reading frames. The residues unique to strain HT are indicated by asterisks on the codon positions.

図 2. Strain HT の全ゲノム構造とアミノ酸変異²⁾

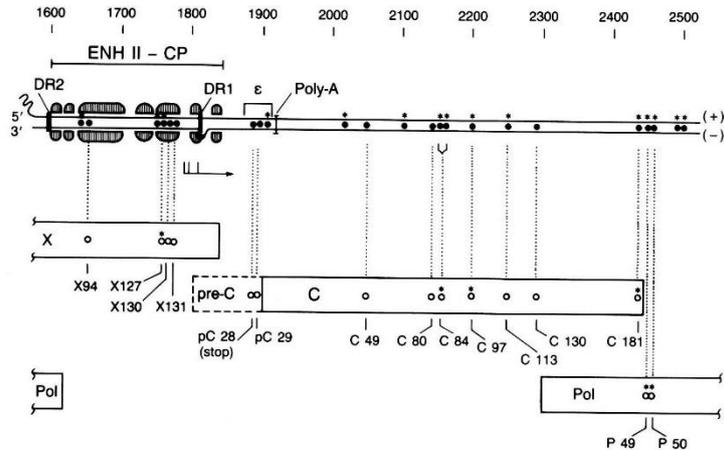


Fig. 2. Localization of nucleotides and amino acids that were unique to HBV strain HT or rarely found in 33 complete HBV genome sequences. Linear representation of the HBV genome from nucleotide positions (nt) 1575 to 2525 with *cis*-acting regulatory elements shown on the upper line [11]. *Closed circles highlighted with an asterisk* represent nucleotides unique to strain HT (i.e., nts 1639, 1753, 1754, 1917, 2026, 2103, 2152, 2153, 2191, 2241, 2443, 2454, 2456, 2488, and 2497) and those without an asterisk indicate nucleotides rarely found in other HBV sequences (i.e., nts 1655, 1764, 1766, 1898, 1901, 2047, 2140, and 2290). The X gene; *pre-C*, *pre-core* gene; C, core gene; and *Pol*, polymerase gene, are indicated by boxes. *Open circles highlighted with an asterisk* represent amino acids unique

to strain HT (i.e., X127, C84, C97, C181, P49, and P50) and those without an asterisk indicate amino acids rarely found in other HBV isolates (i.e., X94, X130, X131, pC28: Trp→stop codon, pC29, C49, C80, C113, and C130). Nucleotide and predicted amino acid sequences were identical between the index case and in chimpanzee 1410. *ENHII-CP*, enhancer II–core promoter; *DR2*, direct repeat 2; *DR1*, direct repeat 1; *ε*, pregenome encapsidation signal; *Poly-A*, polyadenylation signal; (+), positive strand DNA; (–), negative strand DNA. The *hatched region* within *ENHII-CP* represents nuclear protein binding sites. An *arrow* indicates transcription start sites for the *pre-C* and *C*/pregenome RNAs

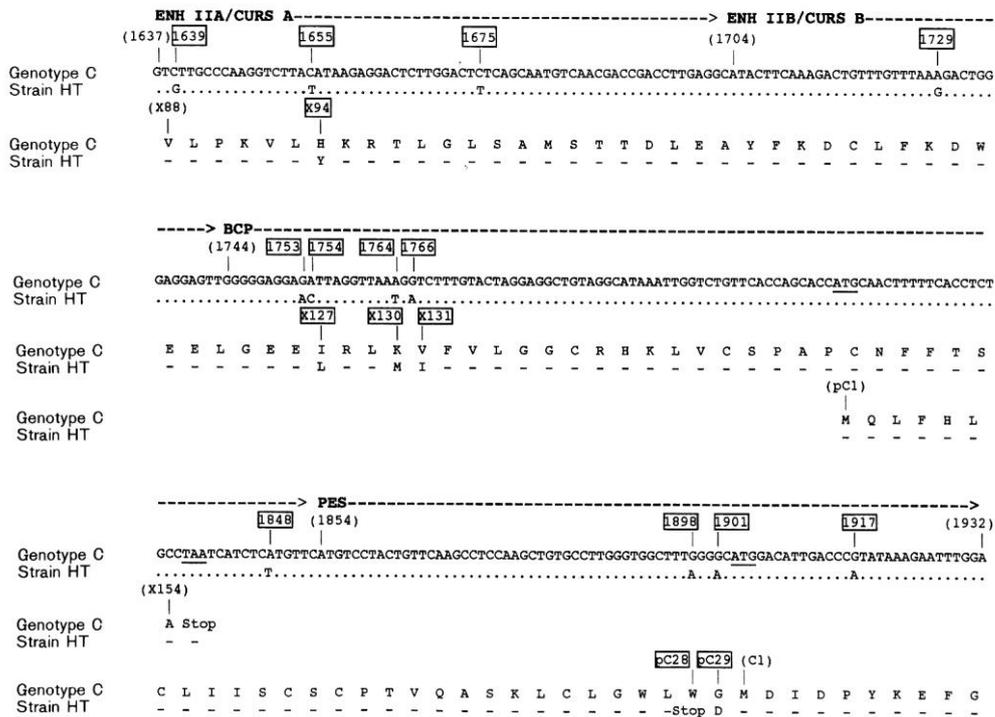


Fig. 1 Nucleotide and predicted amino acid sequences of an HBV strain HT which caused nosocomial outbreak of fulminant hepatitis. Consensus sequence of HBV genotype C is from ref. 11. Gene regions of ENH II (enhancer II), CURS (core upstream regulatory sequence) and BCP (basic core promoter) are from ref. 28. A gene region of PES (pregenome encapsidation signal) is from ref. 29.

図 3. Strain HT の X 遺伝子・C 遺伝子・P 遺伝子アミノ酸・塩基変異^{2, 5, 6}

変異の見られた HBV 各領域の機能等をすべて文献検索し、接種実験の結果とあわせ、候補として、C 遺伝子の多くの塩基・アミノ酸変異や precore stop codon の他に enhancer II-basic core promoter の塩基変異や、これに伴う X 遺伝子第 127 番アミノ酸が Ile から Lys へ変異していること等がウイルスの複製・増殖力の増強を促し、劇症肝炎をひきおこす要因であろうと推測、提唱した (図 3) ^{2,5,6}。

4) その後

日本を含め世界の多くの施設で多数例の B 型劇症肝炎例の保存血清中の HBV 遺伝子変異が追試検索された。私達が強調した enhancer II-basic core promoter 領域の変異を含め多種類の変異例が報告された。一方で変異を認めない例も報告された。Strain HT が原因となったような集団発症例と、散発発症例とでは、肝炎重症度を規定する HBV 固有の要素は相違するのかもしれない。

現在は、私達が候補に挙げた変異のうち、precore 変異解析と core promoter 変異解析とが保険適応となっている。肝癌発症と関係があるとも言われている。しかしわずかこれらの変異解析のみでは劇症肝炎発症の本質に迫ることはできないであろうと考えている。

こののち、本邦における HBV 感染高危険群、特に医療従事者への HB ワクチン接種が強力に勧奨されることとなった。しかし、どういふわけか公費負担はないままである。

2016 年 2 月ころ、神戸市の病院で 3 名の入院患者がほぼ同時期に B 型劇症肝炎で死亡するという事件が報告された。その後の経過は不詳であるが、Strain HT と同様な HBV 変異株が原因であろうと考えている。詳細な調査・研究報告が待たれる。このように、重大な感染症死亡事件は忘れた頃に起こる。後述するように、全国民が HBV 中和抗体を保有することは実現可能なのであろうか。

2. 中和抗体回避 HBV 変異株 (Strain AS)

1) 臨床事件 (垂直感染) : HB ワクチンと HBIG による感染予防措置にもかかわらずキャリア化した小児

1990 年代初頭、イタリアにおいて HBV キャリアの出生児で HB ワクチンと HBIG による母子間感染予防を実施したにもかかわらずキャリア化した小児例が報告された ³⁾。本小児の予防接種スケジュールは、出生時に HBIG 投与・1 ヶ月後から HB ワクチン 3 回接種と、当時の日本と同様のものであった。

本小児に感染していた HBV 株は、major S 蛋白の "a" epitope という HBV 中和抗体産生責任領域内の第 145 番アミノ酸が、Gly から Arg へと変異していた。本変異株は、"HB vaccine-escape mutant" と呼称され、「HB ワクチン接種の普及により、HBV 中和抗体に抵抗性であるこれらの変異株が蔓延し、現在の HB ワクチンの効果がなくなるおそれがある」と主張された ³⁾。

しかし、たった 1 個のアミノ酸置換でポリクローナル抗体であるはずの HBV 中和抗体を回避するという主張には違和感を持った。

表 2. 中和活性回避 HBV 変異株 (Strain AS) のチンパンジー感染性^{4, 5, 6)}

Table 3. Hepatitis B in chimpanzees inoculated with serum containing a surface mutant of HBV, strain AS

Chimpanzee	Dilution of Donor Serum	Hepatitis
1434	10 ⁻¹	Yes
1384	10 ⁻³	Yes
1406	10 ⁻⁶	Yes
1500	10 ⁻⁶	Yes
1516	10 ⁻⁷	Yes
1396	10 ⁻⁷	No

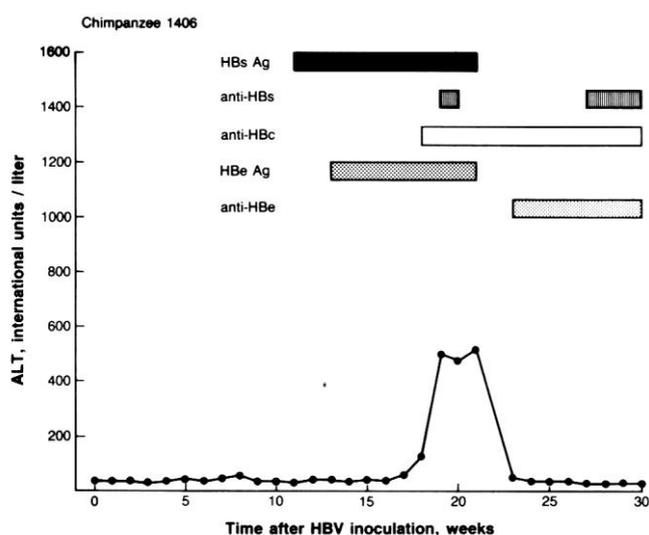


Fig. 3. Course of experimental infection of chimpanzee 1406 inoculated with a 10⁻⁶ dilution of serum from an index case with an HBV variant with a mutation in the S gene (strain AS). HBV antigens and antibodies in serum were regarded as positive when the sample/negative control ratio was ≥ 2.1 by radioimmunoassay. From [16], with permission

図 4. 中和抗体回避 HBV 変異株 (Strain AS) のチンパンジー病原性^{4, 5, 6)}

2) Strain AS の微生物学的特性

上記患児血清が、NIH/NIAID/LID/HVS (肝炎ウイルス部) へ付託され、私が実験・研究に供した^{4, 7)}。

血清中 HBV 変異株 (Strain AS と命名) の感染性・病原性 (肝炎発症性) を調べる目的で、チンパンジー6頭へそれぞれ異なる濃度に希釈した血清を経静脈接種した。

感染性について、原血清を希釈し最終的に 10⁷ 倍まで希釈して 1 mL 接種することにより2頭のうち1頭で感染が成立した (表 2)。この最終希釈検体に存在する HBV はほぼすべてが変異株であることを確認した。さらに Strain AS 全ゲノムを分子クローニングし HuhH7 細胞へトランスフェクションすることにより、複製・増殖能を確認した⁴⁾。

病原性（肝炎発症性）について、感染成立5頭における peak ALT の GMT は、HBV 野生株接種実験におけるチンパンジー12頭における peak ALT GMT 290 IU と有意差はなかった（図4）。すなわち、Strain AS はチンパンジーにおいて野生株と比べ同程度の肝炎を引き起こした。

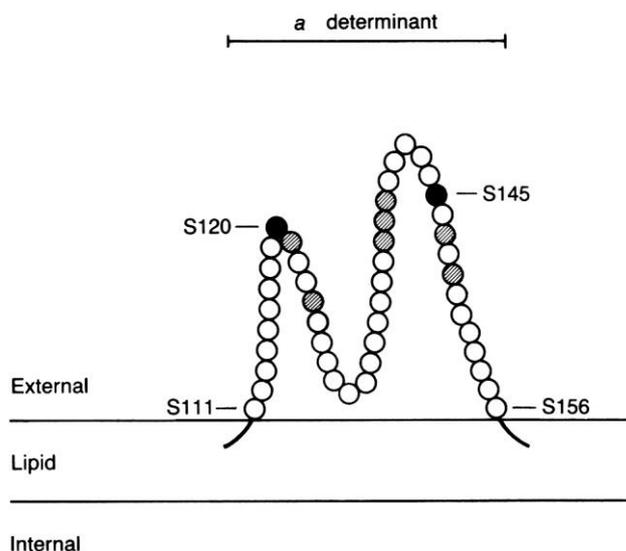


Fig. 4. Localization of amino acid substitutions in the *a* determinant of the S gene of HBV strain AS. The *a* determinant is shown in the secondary structure predicted by Howard et al. [12]. Amino acid residues that are different from the consensus sequence are indicated by *black circles*. The substitution at codon 145 of the S gene (S145:Gly→Arg) was observed in the index case and all infected chimpanzees, and that at codon 120 (S120:Pro→Gln) was found only in chimpanzee 1406 that had been inoculated with serum from the index case containing only a pure population of mutant virus. *Hatched circles* indicate Cys residues

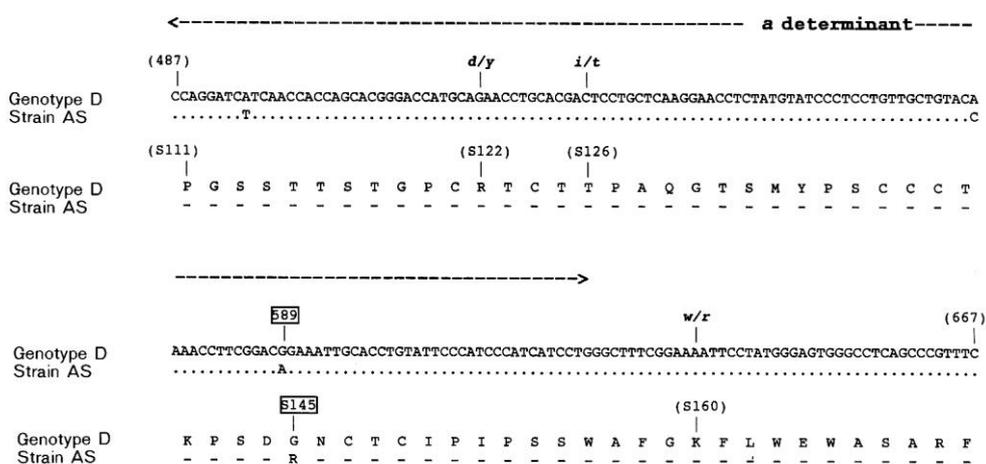


Fig. 2 Nucleotide and predicted amino acid sequences of an HBV strain AS which emerged in an immunized infant. Consensus sequence of HBV genotype D is from ref. 11. A gene region of group specific *a* determinant is from ref. 30.

図 5. Strain AS の S 遺伝子アミノ酸・塩基変異 (4, 5, 6)

3) Strain AS の遺伝子学的特性

原血清由来の Strain AS の S 遺伝子塩基配列の検索により、subtype は *ayw*、genotype は D であり、変異は上記、第 145 番アミノ酸 Gly から Arg への変異のみであった。チンパンジー 5 頭に由来する Strain AS では、1 頭の血清由来の Strain AS に major S 蛋白第 120 番アミノ酸 Pro が Gln に変異していた (図 4、図 5)。原血清 PCR 産物 direct sequencing では検出されない minor population として存在していたものと考えた。

4) 米国 FDA 認可 HB ワクチンは Strain AS 感染を防御する

チンパンジーに米国 FDA 認可 HB ワクチンである Recombivax, (Merck & Co./Merck) ならびに Engerix (SmithKline Biologicals/GlaxoSmithKline) をそれぞれ接種し、HBs 抗体産生を確認後、前実験で感染性を確認済みの Strain AS 含有血清を接種し、感染が成立するかどうか、実験した。

結果、HB ワクチン非接種チンパンジーは肝炎を発症したが、HB ワクチン接種チンパンジーは 3 年以上の経過をみても肝炎を発症せず、経時的に検査したすべての HBV マーカーや nested PCR による HBV DNA も検出されず、FDA 認可 HB ワクチンは 2 種ともに Strain AS 感染を完全に防御することを実証した (表 3) ⁷⁾。

以上の事実より、本変異株の発生は、すでに感染が成立してしまった (子宮内感染の可能性もあり) 野生株 HBV に対して、投与された HBIG が含有する中和抗体による圧力が原因となって major S 蛋白が変異したものであり、vaccine failure ではなく vaccination failure、すなわち感染予防策の失敗が原因であろうと推測、提唱した ⁷⁾。

5) その後

日本・台湾等の多くの施設から同様の小児例が低頻度ながら報告され、考察では、現行 HB ワクチンとは異なる、たとえば pre-S 領域を含むワクチンが必要との論調が強くなった。しかしこれらの主張には科学的根拠はなかった。さらに私達の論文に対して、英国グループが反発し Lancet 誌での debate ともなった。

表 3. 米国 FDA 認可 HB ワクチン接種後の Strain AS 接種実験 ⁷⁾

Chimp #	Injection*	Prechallenge						Postchallenge							
		Anti-HBs		Anti-subtype			HBsAg	Anti-HBc (wks. of duration)†	HBeAg	Anti-Be	HBV DNA (at wks 7 and 11)‡	ALT	ICD (wk of elevation)‡	GGT	
		SRU†	(mIU/mL)†	a	d	y									
88A04	M&Co. vac	166	8,889	+	+–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1486	M&Co. vac	33	73	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1475	SKB vac	139	6,721	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1479	SKB vac	54	120	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1480	Saline	–	–	–	–	–	7-11	11->32	10-11	17->32	+	11-13	11-14	12	
1491	Saline	–	–	–	–	–	7-13	10->32	10-12	14->32	+	9-17	9-17	11-18	

Abbreviations: ICD, isocitrate dehydrogenase; GGT, γ -glutamyl transpeptidase.

*Recommended dose of 0.5 mL of Merck vaccine (5 μ g) or SmithKline Beecham vaccine (10 μ g) or 0.5 mL of saline.

†Tested by radioimmunoassay at time of challenge (wk 7 after 1st vaccination).

‡Weeks after virus challenge.

私達が検定した Strain AS は 1~2 個のみのアミノ酸変異であり、他の複数のアミノ酸変異株に対する HB ワクチン防御能の検定は未だなされていない。将来の課題である。

現在は、台湾を中心に母子間感染予防を含め HB ワクチン接種を受けた小児が成長するに
および、“a” epitope 内にアミノ酸変異を有する変異株が増加しているという。これは HB ワ
クチン接種後 HBs 抗体低下・消失に伴い野生株感染を防御しきれなくなり、しかし体内に
残存する HBs 抗体による pressure により感染した野生株が変異株へ変化したものなのか、
あるいは HBs 抗体十分にもかかわらず変異株が感染したものなのか、の判断はである。ま
た、これら変異株の一部は HBs 抗原陰性を示すことも注意すべきである。

こののち、本邦においても母子感染予防接種スケジュールは、HBIG とともに HB ワクチ
ンも生後すぐに（12 時間以内）に接種するように改正された。

2016 年 10 月より、0 歳児への HB ワクチン接種が公費負担となることが決定された。き
ちんと接種を行い Strain AS と同様な変異株が蔓延しないことを期待したい。一方で、成人
はもとより幼児・学童・青少年への接種がまだ検討されていることが心配である。前述し
たように、全国民が HBV 中和抗体を保有することは実現可能なのであろうか。

3. HBs 抗体検査法の特異性の発見と是正

1) HBs 抗体測定法の変遷

1990 年代から抗原・抗体系の検査法が radioimmunoassay (RIA) 法から non-radioisotope
法へ変換されるようになった。HBs 抗体測定法もいくつかの国際単位表示法が普及するよ
うになり、本邦で伝統的に使用されてきた凝集法との several standards となった。しかしな
がらこれら測定法の相関性・互換性を検討した研究はなかった。

HBV 感染防御最小 HBs 抗体値は、凝集法では 8~16 倍凝集価、国際単位表示法では 10
mIU/mL、とそれぞれ規定されている。これらは各測定法における“十分な特異度・鋭敏度
をもって陽性”の HBs 抗体濃度と考えてよい。したがって HBV 暴露事故に際して、状況に
よっては感染防止に十分とはいえないことを周知しなければならない。

ちなみに 1980 年代から 1990 年代にかけて施行された本邦における HB ワクチン（エッ
チビーワイ・ビームゲン・ヘプタバックス II・メイニュー）各臨床試験結果の“HBs 抗体陽
転”はすべて RIA 法“陽性”での評価である。RIA 法から国際単位表示法への変換は複雑
な数式をもって標準化され、RIA 法陽性=10mIU/mL 以上、と理解してよい。ただし、これ
は WHO 基準品を基礎に検定された測定法に限定される。

2) HB ワクチン種と HBs 抗体測定法の組み合わせによる HBs 抗体評価の乖離事象

1990 年代後半から全国的に医療系学生に対する HB ワクチン接種プロジェクトが開始さ
れるようになった。富山医科薬科大学（現富山大学）は早期に開始した大学で、私は担当責
任者となり HB ワクチン接種の現場で多くの経験・知見を得ることができた。

使用していたエッチビーワイが供給停止となり、普及していたビームゲンに切り替え、さ
らに安価で性能がよいとされる PreS2 蛋白含有メイニューへと切り替えた。

評価は日本伝統の PHA 法で、この方法は安価であるがゆえに健診等の分野を中心に圧倒的に普及しており、本邦における HB ワクチン反応指標としての HBs 抗体評価に関する evidences は PHA 法のみしかなかった。

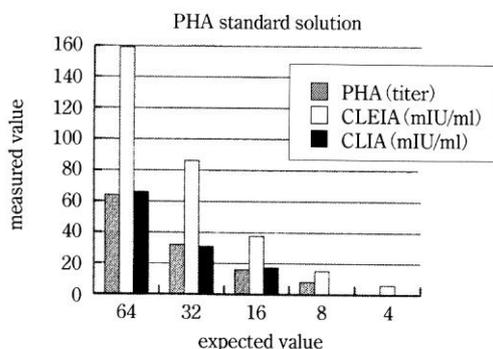


Figure 1 Comparison of anti-HBs measurements in standard anti-HBs solutions of the PHA kit among PHA, CLEIA, and CLIA.

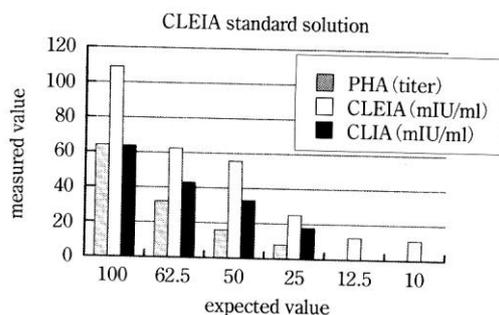


Figure 2 Comparison of anti-HBs measurements in standard anti-HBs solutions of the CLEIA kit among PHA, CLEIA, and CLIA.

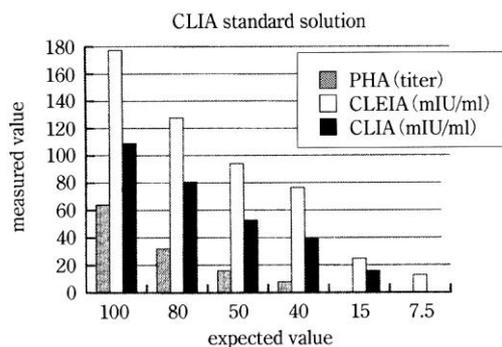


Figure 3 Comparison of anti-HBs measurements in standard anti-HBs solutions of the CLIA kit among PHA, CLEIA, and CLIA.

図 6. HBs 抗体測定キット標準試薬における交差試験¹⁰⁾

このように HB ワクチン種の変更を余儀なく行いながら年度を重ねていくうちに、母集団は学生であるため年齢・性別などに差異はなかったが、総合して PHA 法での HBs 抗体価の結果が、接種ワクチン毎に差があるように考えるようになった。

初回 HB ワクチン接種スケジュールにおいて反応者であるか無反応者であるかの判定は個人にとっては生涯の問題であるがゆえに、ないがしろにはできない。

そこで、国際単位表示法の世界標準ある米国アボット社のキットで再測定してみた。比較したところ、驚くべきことに接種ワクチン種と HBs 抗体測定法の組み合わせにより評価が大きく異なる結果となった^{8,9)}。

この結果をうけて、本格的に取り組むために WHO より HBs 抗体基準品をとりよせ、また特殊免疫研究所 PHA 法、国際単位表示法である国産フジレビオ社 CLEIA 法と米国アボット社 CLIA 法、各キットの HBs 抗体標準品を入手し、互いに他方法で測定したところ、歴然とした差異を見出した (図 6)¹⁰⁾。すなわち、PHA 法・CLEIA 法・CLIA 法いずれの測定キット標準液においても CLEIA 法は CLIA 法に比べ著名な高値を示したのである。このとき、フジレビオ社 CLEIA 法キットは標準品に WHO 基準品を使用していないことを初めて知り、啞然とした。

3) 国立感染症研究所による HBs 抗体測定法の検定

上記結果を、日本臨床検査医学会を通して国立感染症研究所において肝炎ウイルスを含むウイルス抗原・抗体系の各測定試薬の国家検定を責務のひとつとする研究室が注目してくれた。

国内で市販されている国際単位表示法 7 種類すべての HBs 抗体測定法キット間格差の調査が行われ、その結果、上記を含む国産数種類の測定法が是正勧告を受けた。

今にして思えば、私が公表したデータは、“官”にとっては都合が悪いため無視・黙殺されても不思議ではなかったはずである。責任感からか正義感からかはわからないが、きちんと対処していただけたことは幸いであった。

4. HB ワクチン性能の系統的比較解析

1) 4 種 HB ワクチンの性能比較

燕労災病院へ異動し、全職員の肝炎予防対策を行うこととなった。

この環境で、国内で普及していなかった輸入ヘプタバックス II を使用する機会をもった。理由のひとつは、以前から気になっていたワクチン保存剤であるチメロサル (水銀化合物) による健康被害を心配していたことがあり、本ワクチンはチメロサルを含有しないことであった。理由のもうひとつは、前記の中和抗体回避 HBV 変異株感染を防御した米国 FDA 認可 Recombivax と同一ではないかもしれないが同等の製品であろう、ということであった。“もしも”の場合に備えた対策である。

ちなみに本ワクチンが普及してこなかった理由は、凝集法 (PHA 法) での評価の限り、性能 (HBs 抗体誘導能) が極めて劣悪であったためである。

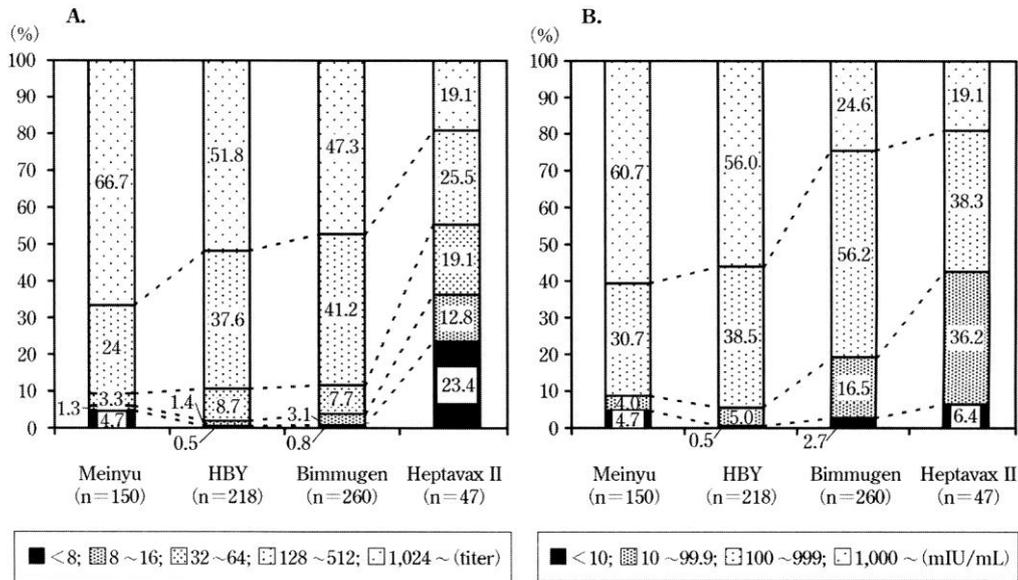


Figure 2 Ratios of number of HB vaccinees stratified by serum anti-HBs levels determined one month after completing the vaccination. Panel A, Mycell titers; Panel B, Architect measurements.

図 7. 4 種 HBV ワクチンの PHA 法・CLIA 法による性能比較¹¹⁾

このような経過を経て、結局 4 種 HB ワクチンの性能を HBs 抗体測定法の特異性を踏まえて系統的に解析することとなった¹¹⁾。

結果は、HBs 抗体非陽転（無反応）率、すなわち、PHA 法 8 倍凝集価未満あるいはアボット CLIA 法 10 mIU/mL 未満は、とくにヘプタボックス II 接種者において測定法による差異が際立った。すなわち、PHA 法では 23.4% と高率に対して、CLIA 法では 6.4% と低率であった。この結果には驚いた。

HBs 抗体量誘導能は、供給停止となったメイニュー・エッチビーワイの方が、現在使用可能なビームゲン・ヘプタボックス II よりも優秀であることも判明した（図 7）^{11, 12)}。

2) 本邦で使用可能な 2 種ワクチンの接種者における HBs 抗体検査法による評価乖離

本邦において使用可能なビームゲン・ヘプタボックス II 各接種者群におけるフジレビオ社 CLEIA 法とアボット社 CLIA 法による HBs 抗体濃度の相違は顕著であった^{11, 12, 14)}。

同一 PHA 価における比較では、ビームゲン接種者においては、PHA 法にて 16~32 倍凝集価にもかかわらず CLIA 法では 10 mIU/mL 未満の例があり、逆にヘプタボックス II 接種者においては、PHA 法にて 8 倍凝集価未満にもかかわらず、CLIA 法・CLEIA 法ともに 10 mIU/mL 以上の例が多数あり、中には 100 mIU/mL 近い値を示す例も存在した（図 8）。

CLIA 法と CLEIA 法との比較では、ビームゲン接種者において、CLEIA 法値は CLIA 法値の 2 倍以上の定量値を示していた（図 9）。

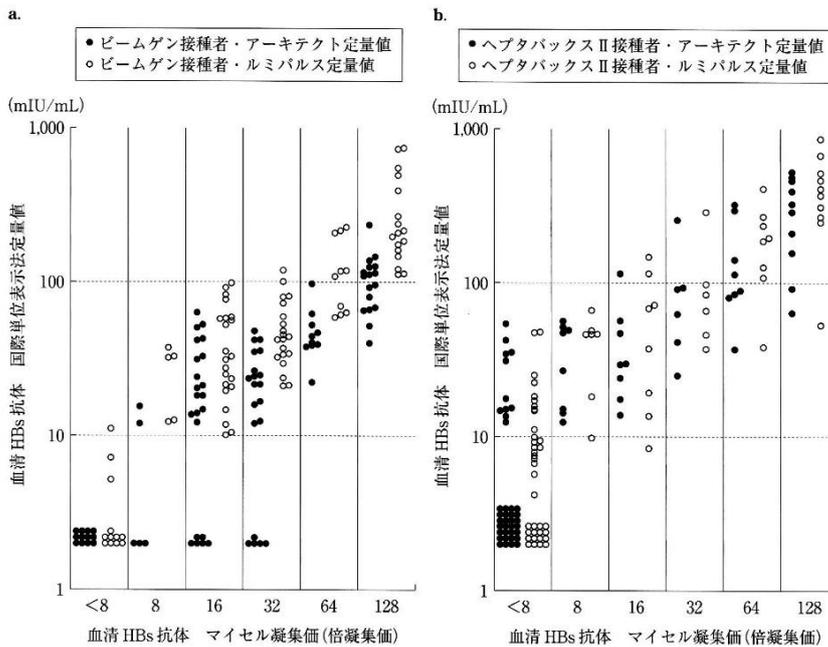


図 8. HB ワクチン接種者における血清 HBs 抗体濃度、同一マイセル (PHA 法) 凝集価におけるアーキテクト (CLIA 法) 定量値とルミパルス (CLEIA 法) 定量値との比較^{12, 14)}

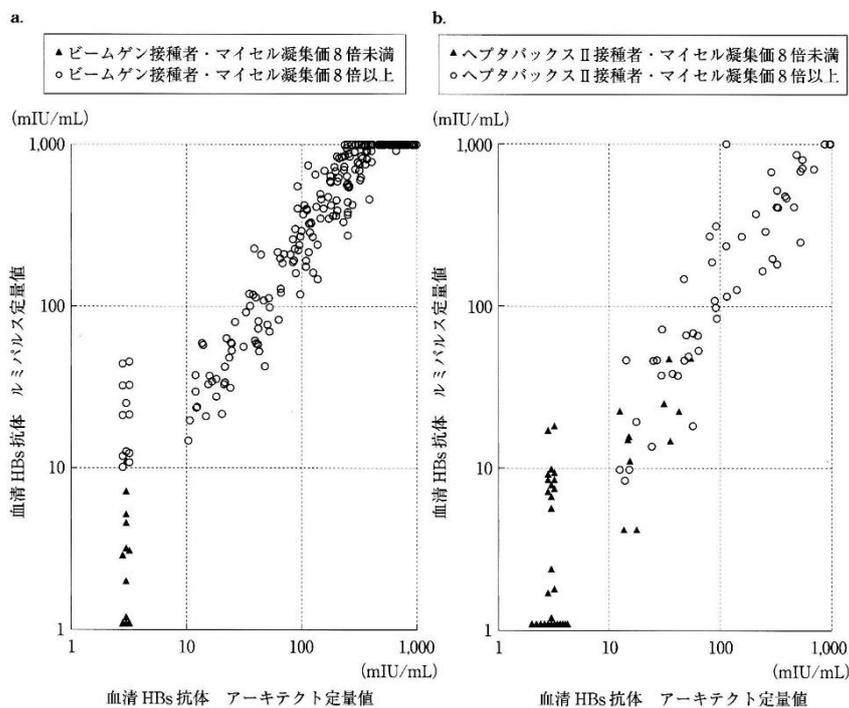


図 9. HB ワクチン接種者における血清 HBs 抗体濃度、マイセル (PHA 法) 凝集価 8 倍未満・以上判定とアーキテクト (CLIA 法) 定量値に対するルミパルス (CLEIA 法) 定量値との相関^{12, 14)}

3) HBs 抗体測定試薬の改良

私達の勧告を受けて、指摘された国内企業は HBs 抗体想定法の改築作業を開始した。

相当の期間や資金を必要としたと思う。フジレビオ社 CLEIA 法の改良試薬が市販されたのは 2012 年であった。私の検討の結果、改良後は改良前と比較してアボット社 CLIA 法との測定値が近似してきたが依然差異がある¹³⁾。抗原抗体測定系標準化の限界なのであろうか。ともかく、私の現場での疑問が、国内最大手のひとつである検査企業を動かしたことに、われながら社会的責務を果たした感がある。

なお、凝集法については何の方策も採られていないままである。使用はやめたほうが良いと考えている。

5. 日本における universal HB vaccination の提唱

上記一連の仕事は国立感染症研究所で注目され、本邦における HB ワクチン接種の再検討の良い契機と目され、2007 年度より厚生労働科学研究のひとつとして採択された¹⁴⁾。

日本は、1992 年の WHO の universal HB vaccination 実施勧奨に対して、英国や北欧諸国と同様、応じてこなかった。上記、厚生労働科学研究班会議途中の世界の情勢を示す(図 10)。本班会議は、日本における universal HB vaccination 実施を最初に提唱した¹⁵⁾。本班会議は、その後小児科領域へ引き継がれ、私達の提唱が承認されることとなった。

2016 年 4 月の WHO 公表によると、日本を含め英国や北欧諸国も universal HB vaccination 実施を決定したとのことであり、これで世界の 98% の国家・地域が参画することになる。

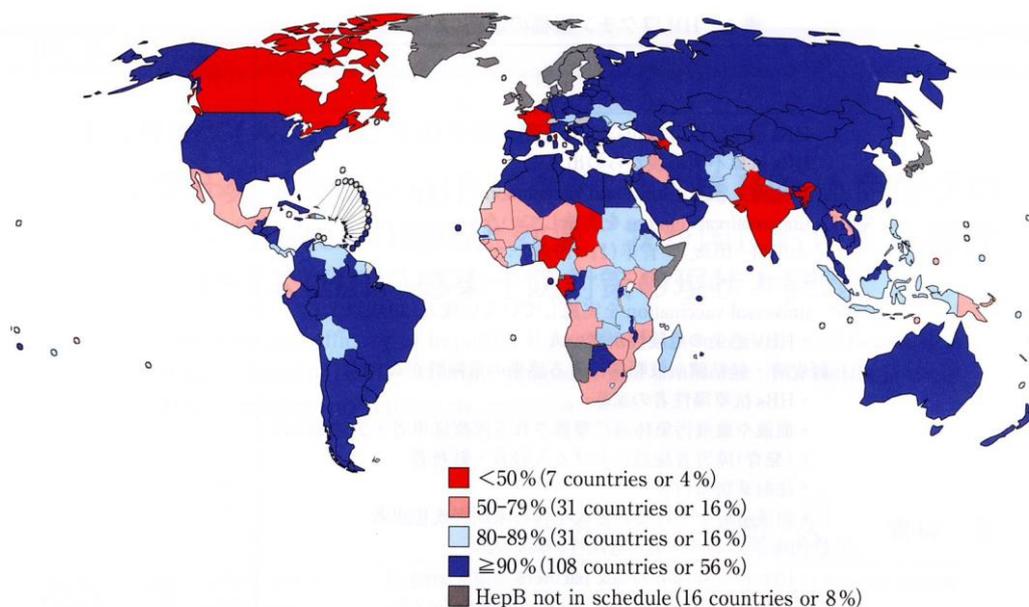


図 10. 2009 年に universal HB vaccination 実施をしていた国家としていなかった国家¹²⁾

6. HB ワクチンに関わる 2016 年現在の状況

1) HBV 感染予防の知識普及

母子間感染予防対策の効果であろうか、HBV キャリア母が存在する家庭は、家族ときには親族一同が HBV 検査を目的に受診され、必要なら自費で HB ワクチン接種を受けてくださる。一方で、HBV 感染に対して全く意識しない人が大多数であることも事実である。

2006 年～2007 年に B 型急性肝炎 (genotype A) を 2 例診療した。うち 1 例は首都圏在住の 20 歳代男性であった。2 例とも急性期のうちに Entecavir (バラクルード) 治療を開始し、血清 HBV DNA・HBs 抗原の陰性化に至り、結果として慢性化を免れた。HBs 抗体への seroconversion まで経過を見たかったのであるが受診は途絶えた。もとの生活・行動環境へ戻ったのであろう。

B 型肝炎疾患診療は苦勞の時代が続いたが^{29,30)}、現在では容易となった。しかし、医療経済的にも感染予防が基本であることはいまでもなく、その知識普及対策にさらなる工夫が必要と考える。

2) HBIG 供給の問題

本邦の血清 HBs 抗体が陽性者血液から作成・精製される HBIG は将来的に供給不足となることが容易に予想される。現在市販されている HBIG 製剤に含有される HBs 抗体量は表示より少量という懸念もある。私達は HBIG に代わりうる HBs モノクロナル抗体の HBV 感染防御能を検定し、良好な効果を認めた¹⁶⁾。残念ながらこのモノクロナル抗体は市販・実用には到らなかったが、このような試みは今後も必要であらう。

血清 HBs 抗体を得るために、ボランティアに HB ワクチンを接種することにより産生される HBs 抗体を使用しようとする計画がある。この目的で、私達の HB ワクチンの系統的性能比較の仕事が着目され、厚生労働科学研究へ提示した¹⁷⁾。メイニュー (真核細胞由来すなわち糖鎖保存かつ PreS2 蛋白含有) が圧倒的に良好と報告し、期待されたが、残念ながらその後供給停止となってしまった。

3) HB ワクチン供給の問題

本邦で使用できる HB ワクチンは、かつては 7 種類ものワクチンが市販された時期もあったが、現在では、国産ワクチン (ビームゲン) が 1 種類、輸入ワクチン (ヘプタバックス II) が 1 種類である。2015 年末より前者が供給停止となる事態が起こり、診療現場、特に小児科では接種スケジュールにおいて異なるワクチンを接種してもよいかどうか、等の困惑する事態に陥りつたため、見解を求められた¹⁸⁾。

本邦では、歴史的に HB ワクチンが生産方法の不備とやらの理由で供給停止を繰り返している。向後、国産 HB ワクチンが存在しなくなることも危惧される。

4) 臨床試験中の HB ワクチン

Merck/Dynavax 社 : HBs 抗原と自然免疫系 TLR9 agonist とを含有する。第 3 相試験を終了して FDA に申請中である。1 ヶ月間隔での 2 回接種によりきわめて優秀な HBs 抗体誘導能を認める。

II. C型肝炎 (HC) ワクチン

1. HCV ゲノム塩基変異率の解析と超可変領域の発見

1) 塩基変異率

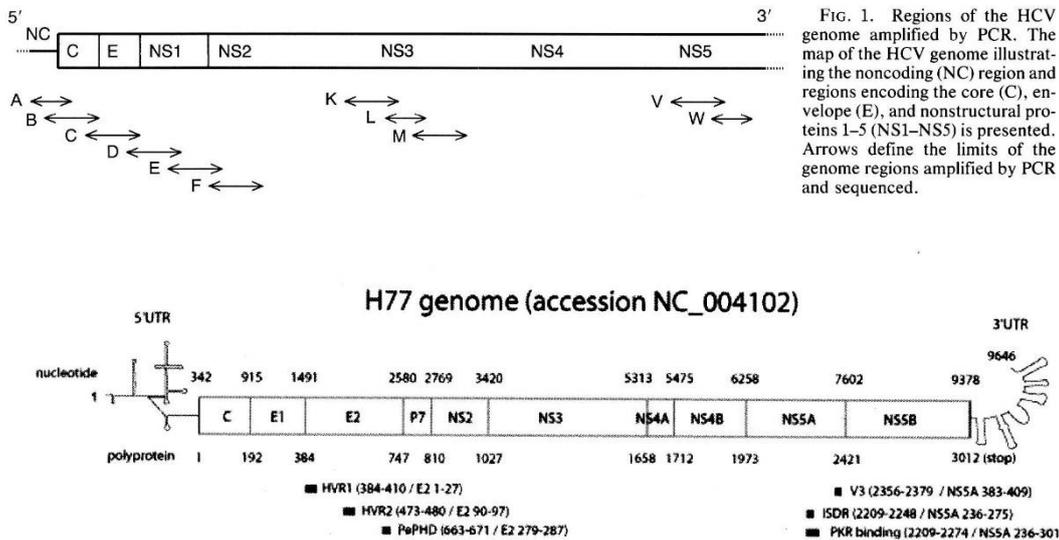
1989年に長年の懸案であった HCV ゲノムがクローニングされ、昔から非 A 非 B 型肝炎ウイルスのうち血液媒体型の典型とされていた H Strain も HCV と判明した。

本株が由来する HCV 持続感染者の 13 年間 (H77 Strain:1977 年採取と H90 Strain:1990 年採取) にわたる塩基配列を部分的に決定し比較した^{19, 21)}。目的はウイルス学根幹のひとつであるゲノムの塩基変異・分子進化の速度を解析するためであった。塩基配列を決定したゲノム領域(図 11)は、現在見ると稚拙ではあるが、当時は未だ蛋白 encoding regions の boundary が不明な時期であったためにフラビウイルス属の塩基順を参考に作成したものである。全塩基配列決定後の H77 Strain 全ゲノム構造をあわせて示す(図 11)。

塩基変異率は、年率約 2.0×10^{-3} 塩基変異と、RNA ウイルスとしては普通であった。

2) 超可変領域

意外なことに、非構造蛋白と目されていた領域に多くの塩基・アミノ酸変異が集中していた(図 12)。直ちに、この領域は表面蛋白に存在する構造蛋白でこのように変異しやすいことが HCV の中和抗体回避をもたらす要因であろうとする仮説を提唱した^{19, 21)}。



Start coordinates, based on [H77 \(accession NC_004102\)](#), from Fields' Virology. Structures of 3'UTR (based on [Kolykhalov 1996](#)) and 5'UTR ([Honda 1996](#)) adapted from a figure provided by Stuart Ray. Other features based on [Major & Feinstone, 1997](#) and [You et al., 2004](#).

図 11. HCV H Strain のゲノム構造と塩基配列決定領域^{19, 21)}

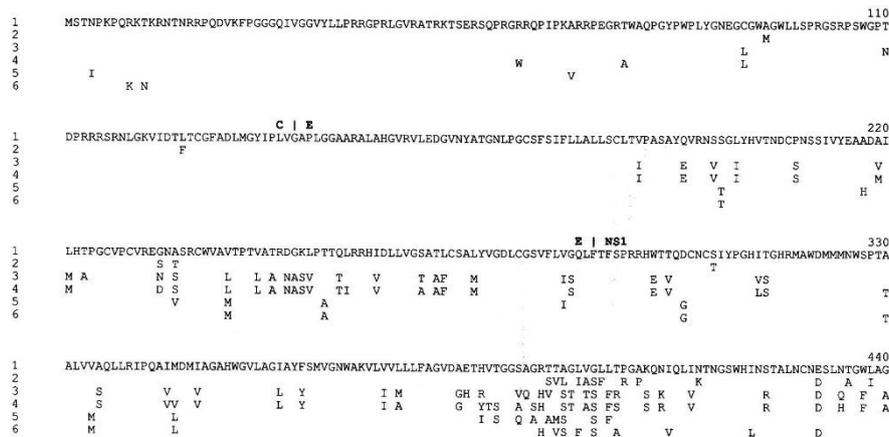


Fig. 3. Alignment of the amino acid sequences in single-letter code predicted from the core, envelope, and NS1 gene regions of five isolates of HCV. The predicted amino acids of the core (positions 1-140), envelope (141-290), and part of NS1 (291-440) are aligned for the following isolates: 1, H77; 2, H90; 3, isolate from ref. 14; 4, HC-J4 (11); 5, HC-J1 (11); and 6, isolate from ref. 17. It should be noted that gene regions are approximate as discussed in the text. The hypervariable 39-nucleotide region discussed in the text corresponds to amino acid positions 395-407. The approximate boundaries of the core (C), envelope (E), and NS1 proteins are shown.

図 12. H77 Strain と H90 Strain および他 HCV 株との塩基・アミノ酸配列の比較¹⁹⁾

3) HVR1 と HCV 中和抗体

私達が発見した上記、超過変領域は、その後現在に至るまで膨大な研究が展開・継続されることとなった。現在では E2 蛋白 N 末端 27 アミノ酸 (第 384~410 アミノ酸) に相当する hypervariable region (HVR)1 と呼称される。

HVR1 の機能に関しては現在でも研究が継続されている。脂質をはじめとする他分子との共役により細胞進入の側面での重要性、等も指摘されている。中和活性との関連では、HVR1 に対する抗体活性は、HVR1 の変異と相俟って、E1・E2 蛋白等に対する広範な HCV 中和抗体 epitopes への結合を阻害することにより免疫回避の要因となることが指摘されている。このため、HC ワクチンは HVR1 産生蛋白に対する抗体を回避する方法が重要と推測されている。

2. HCV の初感染・再感染と中和活性

1) チンパンジーにおける HCV 初感染と再感染

従来より、急性 C 型 (NANB 型) 肝炎を繰り返す患者が存在することが知られていた。このことが、一過性感染の反復事象なのか、あるいは持続性感染の活性事象なのかは、不明のままであった。

同一患者・別個患者、それぞれに由来する HCV 感染血清を sequential にチンパンジーへ接種する実験を行った²⁰⁾。結果、両者とも 2 度目の接種により急性 C 型肝炎を引き起こした (図 13)。このことは、HCV 感染では、中和抗体の効率的な産生がないか、中和抗体を遺伝子変異によりすり抜ける事象が起こるため (HVR1 が最有力候補) か、と推測し、HC ワクチン開発の困難さを示唆した。

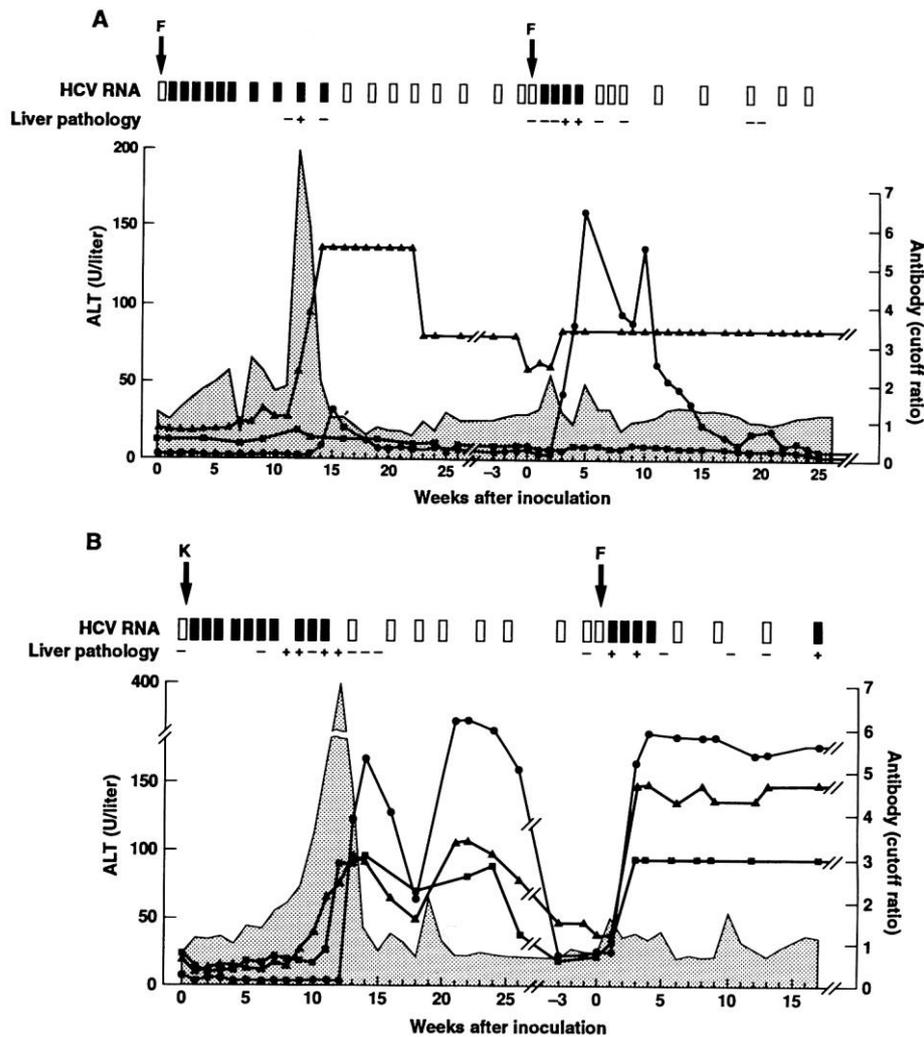


Fig. 2. Course of HCV infection in chimpanzee 963 rechallenge with the homologous HCV strain (A) and in chimpanzee 793 rechallenge with a heterologous HCV strain (B). The gray areas indicate the values of serum ALT. Normal ALT values in chimpanzees range between 6 and 38 U/liter. The arrows indicate the time of challenge and the strain used for inoculation. Open bars indicate negative assays for serum HCV RNA by PCR (18) and solid bars indicate positive assays. Liver pathology indicates necroinflammatory changes rated as negative or positive. First-generation anti-HCV is indicated by circles, second-generation anti-HCV is indicated by triangles, and squares indicate anti-NS5 (23). Cutoff ratio represents the ratio between the absorbance value for the test sample and that for the assay cutoff; values above 1 were considered positive.

図 13. チンパンジーにおける HCV 再感染実験の経過²⁰⁾

本実験における別の注目点は、血清 ALT 値を指標とした肝炎重症度である。

初感染時に比べて再感染時には血清 ALT が低値であった。すなわち、HCV は、再感染はするが、初感染時よりは肝炎は軽症である可能性を示唆した。このことは、HCV 初感染時に、完璧な中和活性にまでは至らないものの、何らかの免疫記憶が作動していた結果ではないかと推測した。

2) 患者における HCV 初感染と再感染

その後、広範な臨床調査の結果、HCV 初感染では 20%のみの患者が一過性感染で終わるが、HCV 再感染では 80%もの患者が一過性感染で終わることが明らかとなった。また HCV 感染早期には旺盛なウイルス中和活性が認められた。

これら事象は、HCV 感染時の中和抗体産生と宿主免疫記憶の存在を意味し、HC ワクチン開発を元気づけるものであった。

3. GB 肝炎因子

1) GB 肝炎因子とは

GB 肝炎因子は、ヒト肝炎ウイルスがひとつも発見されていなかった 1967 年にその候補として最初に報告された。GB とは原因不明の急性肝炎に罹患した外科医のイニシャルに由来する。

この患者の発黄 3 日目の血清を新世界ザル、タマリンに接種したところ肝炎を発症、しかも継代感染することから、この血液媒体で感染する未知の肝炎”病原体”は GB 因子と呼称された。チンパンジーには肝炎を発症しなかったようであるが、感染したか否かはマーカーがなく検索する手段がなかったため、半ば強引に感染性はあるが病原性（肝炎発症性）はない、という観点でとらえられていたようである。

2) 弱毒生ワクチンの可能性

なぜこの GB 肝炎因子が HC ワクチンと関連するかというと、上記の経過より HCV の弱毒株ではないか、という仮説に基づく。

ちなみに、弱毒生ワクチンの好例は、HCV と同じフラビウイルス属であり、野口英世でも有名な黄熱病に対するワクチンである。黄熱ワクチンは、黄熱ウイルスを培養細胞で継代中に出現した弱毒株（Strain 17D-204）を使用している。作成者の Max Theiler はノーベル賞を受賞、開発から半世紀以上経過した現在でも絶大な効果をあげている。

3) GB 肝炎因子ゲノム同定

私は GB 肝炎因子ゲノム断片を拾い上げる目的で、HCV が属するフラビウイルス属ゲノムに保存される 5'UTR 領域塩基配列を根拠に膨大な種類の primer sets を作成し多様な設定の thermal cycles を使用し RT-PCR に供した。かろうじて増幅でき、sequencing した塩基配列は HCV とは“似て非なる”ものであった。

これ以上はなかなか進展できず、結局、帰国後に日本に初めて紹介する形となった²²⁾。

4) GBV-A・GBV-B・GBV-C

その後、米国にて GBV-A・GBV-B・GBV-C の全ゲノムが分子クローニングされた^{23, 24)}。こうなると本邦でもこの新しいウイルスの研究が爆発的に流行した。

結局、最終的には、GBV-C のみがヒトに感染しており、しかし肝嗜好性ではなくリンパ球嗜好性であることが判明している。

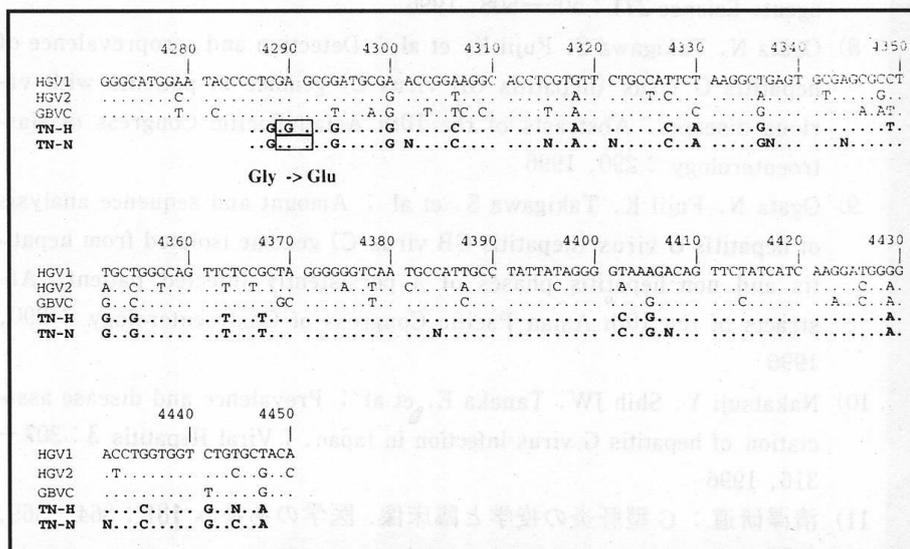
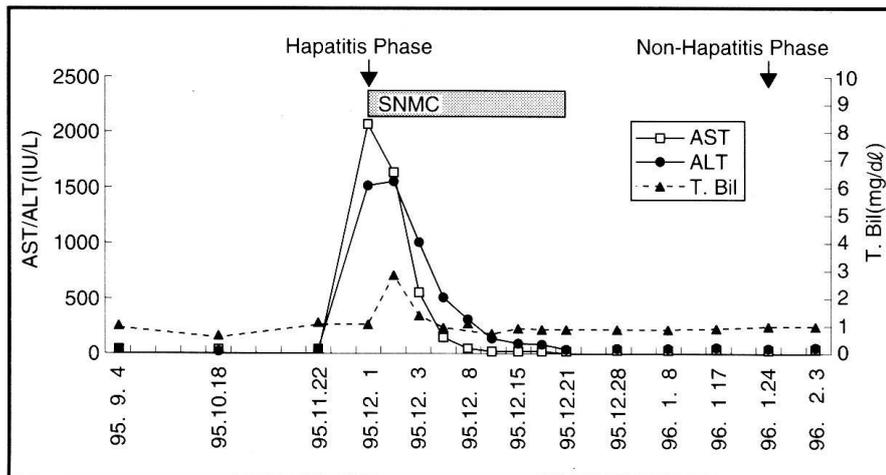


図 14. 非 ABCDE 型肝炎患者の臨床経過と血清中 GBV-C 塩基配列²⁷⁾

私達を含め、本邦においても劇症肝炎例や急性・慢性肝炎例から RT-PCR 法で GBV-C ゲノムの検出が報告された (図 14)^{25, 26, 27)}。しかしながら肝疾患における GBV-C 陽性率は 1%前後と低く、その後は注目されなくなった。単なる passenger/bystander だったのであろうか。

私達の HC ワクチン候補の目論見ははずれたが、最新の研究では、GBV-C は世界中に分布し HIV と共感染する頻度が高く HIV の複製を抑制し AIDS 病勢を軽減する、という予想外の観点で注目を集めている。

はて、GB なる外科医が発症した黄疸をとまなう肝炎は何だったのだろうか。原血清は残存していないようである。タマリンに馴化しすぎて、未知のヒト肝炎ウイルスを見逃したようにも思える²⁸⁾。

4. HC ワクチンに関わる 2016 年現在の状況

1) HCV 感染予防の知識普及

抗ウイルス薬企業広告の効果であろうか、HCV 持続感染を指摘されてきた患者で自ら治療を希望される方や家族内感染の心配を相談される方が増加した。一方で、HCV 感染に対して全く意識しない人が大多数であることも事実である。

2015 年に C 型急性肝炎 (genotype 1b) を 1 例診療した。怪我をして出血している人の手当てを素手でやったことが原因で罹患した 30 歳代女性であった。肝炎とは異なる主訴で初診されたが、問診から判断して肝機能検査を行ったことが発見の契機であった。慢性期に入ったことを確認後 Sofosbuvir/Ledipasvir (ハーボニー) 治療を実施し、HCV RNA 陰性化、著効を得た。しかし同様の episodes があっても病院を受診しない人のほうが多数であろう。さらに生活・行動習慣の中でも薬物注射、刺青、等における感染知識を持たない人が多いであろう。

C 型肝炎診療も苦勞の時代が続いたが^{29,30)}、現在では容易となった。しかし、医療経済的にも感染予防が基本であることはいまでもなく、その知識普及対策にさらなる工夫が必要と考える。

2) HCIG・HC ワクチンの必要性

HCV 既感染者、特に一過性感染直後の血中には十分な中和抗体が存在することから、これを濃縮・精製した HCIG ともいえる製剤や、様々な手法による HC ワクチン製造の試行錯誤の時代が継続している。

日本に住んでいると、これらは果たして必要なのか、と考えがちであるが、世界的には経静脈薬物常習者の増加、また開発途上国では医療現場の衛生面の問題から、新規 HCV 感染者が増加している。また、環境が不変であれば再感染者も多いという。

過去に輸血・手術等、明らかな感染機会がない HCV 感染者は、抗ウイルス治療により治癒しても、場合によっては再感染がありうることを伝えなければならない。

現在継続されている HC ワクチン開発は、HCV 初感染よりも再感染の予防目的の要素が強い。とりあえずは、対象者を明確に限定するためであろう。

3) 臨床試験中の HC ワクチン

Chiron/Novartis 社：中和抗体を産生する E1・E2 蛋白を発現させ、作成したものである。第 1 相臨床試験で安全性は確立されたが、その後の進捗状況は不明である。

Okairos/GlaxoSmithKline 社：CD4+/CD8+T 細胞を誘導する NS3 protease/helicase と NS5b polymerase 蛋白を発現させ、作成したものである。これは、T 細胞免疫活性化でウイルス感染予防効果を発揮する可能性があり従来にはない発想のワクチンである。第 2 相臨床試験まで進捗しているとのことである。

文献

1. Kosaka Y, et al. Fulminant hepatitis B: induction by hepatitis B virus mutants defective in the precore region and incapable of encoding e antigen. *Gastroenterology* 1991; 100: 1087-1094.
2. Ogata N, et al. The complete nucleotide sequence of a pre-core mutant of hepatitis B virus implicated in fulminant hepatitis and its biological characterization in chimpanzees. *Virology* 1993; 194: 263-276.
3. Carman WF, et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990; 336: 325-329.
4. Ogata N, et al. Infectivity and pathogenicity in chimpanzees of a surface gene mutant of hepatitis B virus that emerged in a vaccinated infant. *J Infect Dis* 1997; 175: 511-523.
5. Ogata N, et al. Genetic and biological characterization of two hepatitis B virus variants: A precore mutant implicated in fulminant hepatitis and a surface mutant resistant to immunoprophylaxis. In: Nishioka K, et al (eds.), *Viral Hepatitis and Liver Disease* 1994; pp 238-242, Springer-Verlag, Tokyo.
6. Ogata N. Genetic variation of hepatitis B virus: Biological characterization of a fulminant hepatitis-related mutant and an immunization-resistant mutant. *Progress in Liver Study* 1995; 21: 27-34.
7. Ogata N, et al. Licensed recombinant hepatitis B vaccines protect chimpanzees against infection with the prototype surface gene mutant of hepatitis B virus. *Hepatology* 1999; 30: 779-786.
8. Ogata N, et al. Antibody to hepatitis B surface antigen (anti-HBs) induced by a recombinant hepatitis B vaccine consisting of subtype *adr* antigen is underestimated on the World Health Organization (WHO)-standardized assay. *Intern Med* 2003; 42: 446-447.
9. Ogata N. Measurements in international units of antibody to hepatitis B surface antigen (anti-HBs) after immunization with a yeast-derived, subtype *adr* hepatitis B vaccine are considerably different between chemiluminescent immunoassay (CLIA) and chemiluminescent enzyme immunoassay (CLEIA). *Rinsho Byori: The Official Journal of the Japanese Society of Laboratory Medicine* 2006; 54: 340-343.
10. Ogata N. Requirement of standardizing anti-HBs assay methods in Japan for HBV infection-preventing strategy-Discrepancy of anti-HBs measurements among three different kits widely used in Japan. *Rinsho Byori: The Official Journal of the Japanese Society of Laboratory Medicine* 2006; 54: 960-965. (In Japanese, Abstract in English)
11. Ogata N. Comparison of antibody responses to hepatitis B surface antigen among four recipient groups of hepatitis B vaccines that have been approved in Japan: Evaluation using passive hemagglutination assay and chemiluminescent immunoassay. *Rinsho Byori: The Official Journal of the Japanese Society of Laboratory Medicine* 2009; 57: 954-960. (In Japanese, Abstract in English)

12. 小方則夫、他. 新時代のウイルス性肝炎学：B型肝炎ワクチン（HB ワクチン）と抗 HBs 人免疫グロブリン（HBIG）の適応と効果：我が国における B型肝炎ウイルス（HBV）感染予防対策の現状と課題. 日本臨床 2011; 69 (suppl. 4): 408-416.
13. 小方則夫、他. B型肝炎ウイルス（HBV）感染防御 HBs 抗体値：改良 CLEIA 法と CLIA 法とが示す 10 mIU/mL 基準の比較検討. 臨床病理 2014; 62 (Suppl.): 233.
14. 小方則夫. 日本における universal HB vaccination 実施へ向けての課題：日本で使用される HB ワクチン性能と HBs 抗体測定キット特性の検討、および HB ワクチン・エスケープとされる HBV 変異株の霊長類モデル感染実験の概要. 厚生労働科学研究補助金：肝炎等克服緊急対策研究事業「肝炎ウイルス感染防御を目指したワクチン接種の基盤構築」平成 19～21 年度総合分担研究報告書. 水落利明（編集）、2010, pp 35-47.
15. 水落利明、小方則夫、他. ユニバーサル HB ワクチン接種に関する提言. 厚生労働科学研究費補助金：肝炎等克服緊急対策研究事業「肝炎ウイルス感染防御を目指したワクチン接種の基盤構築」平成 19～21 年度総合分担研究報告書. 水落利明（編集）、2010, pp 194-224.
16. Ogata N, et al. Markedly prolonged incubation period of hepatitis B in a chimpanzee passively immunized with a human monoclonal antibody to the *a* determinant of hepatitis B surface antigen. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 3014-3018.
17. 小方則夫、他. 日本において使用可能な B型肝炎ワクチンの性能比較. 厚生労働科学研究補助金：医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業「特殊免疫グロブリンの国内製造に係わる基礎整備」平成 19 年度研究報告書. 白幡 聡（編集）、2008, pp 9-12.
18. 小方則夫. B型肝炎ワクチンの種類を途中で変更することで生じうる問題とは？日本医事新報 2016; 4796: 55-56.
19. Ogata N, et al. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 3392-3396.
20. Farci P, Ogata N, et al. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. Science 1992; 258: 135-140.
21. Ogata N. Genetic variation of hepatitis C virus: Discovery of the molecular evolution with a hypervariable region. Progress in Liver Study 1995; 21: 35-40.
22. Ogata N, et al. The GB hepatitis agent is not hepatitis C virus. Jpn J Gastroenterol 1995; 92 (suppl.): 423.
23. Simons JN, et al. Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 3401-3405.
24. 小方則夫. “古くて新しい”ヒト肝炎ウイルス候補、GB 肝炎ウイルスゲノムクローニングの成功. Medical Briefs in Virus Infection 1996; 9: 132-133.

25. Ogata N, et al. Amount and sequence analysis of hepatitis G virus (hepatitis GB virus-C) genome isolated from hepatitis and non-hepatitis phase of a persistently infected patient. Abstracts in the 10 th Asian-Pacific Congress of Gastroenterology, 1995; pp 290.
26. Ogata N et al. Detection and seroprevalence of hepatitis G virus (hepatitis GB virus-C) genome in patients with various diseases. Abstracts in the 10 th Asian-Pacific Congress of Gastroenterology, 1995; pp 290.
27. 小方則夫、他. 日本における肝疾患と GBV-C/HGV 感染病因的意義. 肝疾患研究の新しい展開 第Ⅱ巻、谷川久一（編集）、1997; pp 57-68.
28. 小方則夫. GB 肝炎について—GB ウイルスはヒト非 ABCDE 型肝炎ウイルスか. 内科診療 Questions & Answers 1996; 29: 1008-1011.
29. 小方則夫、他. B 型慢性肝炎に対する Lamivudine 長期投与療法ならびに C 型慢性肝炎に対する Interferon- β 初期投与療法の抗ウイルス効果と臨床評価. 大学病院における診断と治療シリーズ：肝炎. 真興交易医書出版部（編集）、1997, pp 139-150.
30. 小方則夫. B 型肝炎ウイルス (HBV)・C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染者の新規発見と合理的抗ウイルス療法の実践：肝癌発症の完全予防に向けて. 独立行政法人労働者健康福祉機構病院機能向上研究結果報告集 第 5 号、名川弘一（編集）、2011; 212-245.

後記

本稿は通常の総説ではないため、私が行ってきた仕事を記載し、引用文献も、私が **First Author** である論文にできるだけ限定させていただいた。

記載した研究内容は、いずれも、それぞれの領域・分野で最初の提唱を行ったものであるがゆえに、その後の多数の追試的な研究結果によっては修正すべき部分があるかもしれないが、下記の世界定番の **Textbooks** に引用されているため、信頼していただいてもよいと思う。

- Sheila Sherlock & James Dooly. **Diseases of the Liver and Biliary Systems.**
- Arie J. Zuckerman & Howard C. Thomas. **Viral Hepatitis.**
- Bernard N. Fields, David M. Knipe & Peter M. Howley. **Virology.**
- Stanley A. Plotkin, Walter A. Orenstein & Paul A. Offit. **Vaccines.**

本稿に関連する研究の現在の動向は、秀逸な **Review Articles** をご参照いただきたい。