

劇症肝炎患者におけるTh1/Th2-associated cytokine imbalance (臨床的検討)

山口大学医学部・第一内科 沖田 極
協同研究者：萱野幸三, 坂口栄樹
瀬川 誠, 鈴木千衣子
弘中孝治, 内田耕一
増原昌明, 坂井田功
山口大学医学部・生体防御機能学
萱野幸三

はじめに

劇症肝炎は肝臓を標的臓器とする局所免疫反応が著明に亢進した状態であると同時に、全身性の免疫反応も過剰な病態であると捉えることが可能である。このような病態下では持続する高濃度の炎症性サイトカインの発現が肝細胞障害を継続させ、さらに全身性の炎症反応の亢進、すなわちSIRS (systemic inflammatory response syndrome) と呼ばれる病態を惹起し、多臓器不全 (MOF: multiple organ failure) へと至らしめると考えられる。

われわれは、全身性の過剰な免疫反応が劇症肝炎の進展・増悪に関与するという立場から、主として炎症性サイトカイン (pro-inflammatory cytokine) の産生に関連するhelper T cell, type 1 (Th1) と、主として抗炎症性サイトカイン (anti-inflammatory cytokine) の産生に関連するhelper T cell, type 2 (Th2) との免疫学的バランスが重要であると考えて研究を行っている。今回、劇症肝炎の病態におけるTh1/Th2-associated cytokine imbalanceの関与について、細胞内サイトカイン測定法という新しい手法を用いて、単一リンパ球レベルにおいて解析した。

対象および方法

対象は劇症肝炎急性型2例、亜急性型2例の合計4例で、原因はいずれもHBV感染によるものであり、転帰はいずれも死亡であった。コントロールとして意識障害を伴わない急性肝障害5例および健常人6例について同様の解析を行った。急性肝障害の内訳は急性肝炎2例、伝染性単核球症1例、アルコール性肝障害1例および薬剤性肝障害1例であった。

原則として当科入院時に採血を行い、より生体に近い条件下でのサイトカイン産生能を解析するために抗凝固剤添加全血を用いた。Th1-associated cytokineであるIFN- γ およびIL-2産生能を見るためにphorbol-myristate-acetate 25ng/mlおよびIonomycin 1 μ g/mlでリンパ球を刺激し、Th2-associated cytokineであるIL-10産生能を見るためにはConcanavalin A 5 μ g/mlでリンパ球を刺激した。

次いで産生されたサイトカインの分泌を阻害するために Brefeldin を 10 μ g/ml 添加後、IFN- γ 、IL-2 産生能に関しては 4 時間、IL-10 に関しては 24 時間、37 $^{\circ}$ C にて incubation した。

incubation 終了後、PerCP 標識抗 CD3 抗体により T リンパ球を染色した後、赤血球を溶血させ、さらにリンパ球細胞膜を浸透圧溶液にて処理した。引き続き抗人 IFN- γ 、抗人 IL-2 および抗人 IL-10 の各蛍光標識抗体を加え、細胞内に存在する目的サイトカインと結合させた。最後にフローサイトメトリーを用いて T リンパ球 7000-10000 個につき IFN- γ 、IL-2 および IL-10 の各陽性率を算出し各群間で比較した。

結 果

1. Th1-associated cytokine の比較

IFN- γ 陽性率は劇症肝炎 (37.3 \pm 2.3%) および急性肝障害 (48.0 \pm 9.0%) では健常人 (19.6 \pm 2.9%) に比して有意 ($P < 0.05$) に亢進していた。また IL-2 陽性率も劇症肝炎 (33.4 \pm 4.9%) および急性肝障害 (32.0 \pm 5.8%) で健常人 (18.3 \pm 1.4%) に比して有意 ($P < 0.05$) に亢進していた。IFN- γ 産生細胞あるいは IL-2 産生細胞の phenotype 別には、陽性率に特に差は認めなかった。

2. Th2-associated cytokine の比較

IL-10 陽性率は 24 時間および 48 時間の incubation 後においても、いずれの群においても著明な変化は観察されなかった。しかしながら急性肝障害 (2.6 \pm 1.3%) は劇症肝炎 (1.0 \pm 0.4%) に比べて高い傾向を認めた。

3. IL-10 の経時的変化

急性肝炎重症型の 1 症例においては、発症後 6 日目の IL-10、6.88% さらにその 6 日後にも IL-10、4.21% と、発症早期から IL-10 の産生が認められ、それが持続していた。このような特徴を示す症例が 3 例 (3/5:60%) において認められた。一方劇症肝炎急性型の 1 症例においては、発症後 7 日目において IL-10、2.1% さらに翌日には IL-10、0.9% と、さらに低下していた。このように劇症肝炎においては IL-10 産生は持続低値を示す症例がほとんどであった。

考案および結論

劇症肝炎は極めて予後不良な疾患であるが、その理由の一つとして肝臓を標的臓器とした局所免疫が亢進した状態、すなわち急性肝炎と呼ばれる病態だけに終わらず全身性にも免疫亢進を惹起し、SIRS (systemic inflammatory response syndrome) を引き起こしさらに多臓器不全 (MOF: multiple organ failure) へと至らしめるためであると考えられる。したがって劇症肝炎の進展・

増悪には全身性の免疫亢進が非常に深く関与しているものと思われる。

近年炎症性サイトカイン (pro-inflammatory cytokine) であるTh1-associated cytokineと、抗炎症性サイトカイン (anti-inflammatory cytokine) であるTh2-associated cytokineとの不均衡、すなわちTh1/Th2-associated cytokine imbalanceという観点から各種疾患^{1) 2) 3) 4) 5)}が解析されるようになり、特に肝疾患に関してはC型慢性肝炎の病態進展にTh1/Th2-associated cytokine imbalanceの関与が報告されている⁶⁾。そこで今回劇症肝炎の病態におけるTh1/Th2-associated cytokine imbalanceの関与について、細胞内サイトカイン測定法^{7) 8)}という新しい手法を用いて単一リンパ球レベルで解析した。

Th1-associated cytokineであるIFN- γ およびIL-2はともに劇症肝炎さらに急性肝障害患者においては、健康人に比して有意にその産生が亢進していることが単一リンパ球レベルにおいても証明され、これらの炎症性サイトカインの病態への強い関与が示された。また本細胞内サイトカイン測定法の重要な特徴の一つは、各サイトカイン産生細胞のphenotypeが明らかにできることであるが^{7) 8)}、IFN- γ あるいはIL-2産生Tリンパ球のphenotypeには特に差を認めなかった。

Th2-associated cytokineとしてIL-10を測定したが、IL-10の産生自体には劇症肝炎、急性肝障害および健康人のいずれの群においても著明な変化は観察されなかった。しかしIL-10は低値ではあるが急性肝障害患者においては劇症肝炎患者よりも高い傾向を認めたこと、および急性肝炎患者の数症例において発症早期からIL-10の産生が認められ、それが数日間持続していたが劇症肝炎患者においてはそのような症例は見られず、ほとんどの症例で持続低値であったことなどはIL-10の重要な役割を示唆しているものと考えられる。

劇症肝炎患者はその疾患の特性上から前医で加療を受けながら経過を観察され意識障害が出現した、あるいは出現しそうな状態になって初めて当科転院となる症例がほとんどであるために発症後早期でのIL-10産生動態が不明な場合が多いのも事実であり、今後は急性肝炎から劇症肝炎に移行するような症例における発症早期からのIL-10の産生動態の経時的変化の解析が必要不可欠であると思われる。またわれわれはTh1/Th2という観点からTリンパ球のIL-10産生能に着目したが、今後はmonocyte/macrophageのIL-10産生能にも注目して劇症肝炎や急性肝障害におけるこれらの細胞からのIL-10産生能を同手法を用いて検討し、IL-10の重要性およびその産生における責任細胞を明らかにしていく予定である。

Th2-associated cytokineであるIL-10はin vitroあるいはin vivoにおいてTh1-associated cytokineに対して抑制的

に作用することが数多く報告されており^{9) 10) 11) 12) 13)}、さらに種々の肝障害モデルにおいてもIL-10の肝障害抑制作用が示されている^{14) 15)}。われわれの結果と合わせ劇症肝炎においてはIL-10産生の持続低値が全身性の免疫亢進状態を惹起し、それが病態のさらなる進展・増悪を招くとするならば、免疫学的バランスを是正するという意味においても劇症肝炎におけるIL-10の投与が有効となる可能性があると思われる。

細胞内サイトカイン測定法という手法を用いて劇症肝炎におけるTh1/Th2-associated cytokine imbalanceを明らかにした。劇症肝炎におけるIL-10の投与は免疫学的バランスを是正するという観点からも有効であると考えられた。

参考文献

- 1) Clerici M, Shearer GM: The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. *Immunology Today* 1994; 15:575-581.
- 2) Clerici M, Shearer GM: A Th1-Th2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunology Today* 1993; 14:107-111.
- 3) Yamamura M, Uemura K, Deans RJ, et al: Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in Leprosy lesions. *Science* 1992; 254:277-279.
- 4) Sher A, Coffman RL: Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annu Rev Immunol* 1992; 10:385-409.
- 5) Pirmez C, Cooper C, Paes-Oliveira, et al: Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. *J Immunol* 1990; 145:3100-3104.
- 6) John N, Bishop GA, Peter HM, et al: Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology* 1996; 24:759-765.
- 7) Louis JP, Manoj KS, Zoran Z, et al: Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry. *Blood* 1995; 86:1408-1419.
- 8) Shar LW, Christine JP, Dolores MP, et al: Determination of antigen-specific Memory/Effector CD4+ T cell frequencies by flow cytometry. Evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency. *J Clin Invest* 1997; 99:1739-1750.
- 9) Taga K, Tosata G: IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol* 1992; 148:1143-1148.

- 10) Donckier V, Flament V, Gerard C, et al: Modulation of the release of cytokines and reduction of the shock syndrome induced by anti-CD3 monoclonal antibody in mice by interleukin-10. *Transplantation* 1994; 57: 1436-1439.
- 11) Florquin S, Amraoui Z, Abramowicz D, et al: Systemic release and protective role of IL-10 in staphylococcal enterotoxin B-induced shock in mice. *J Immunol* 1994; 153:2618-2623.
- 12) Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosman TR, et al: IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991; 148:3578-3582.
- 13) Cassatella MA, Meda L, Borona S, et al: Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1993; 178:2207-2211.
- 14) Luca S, Stefano F, Mihnea C, et al: Interleukin 10 reduces lethality and hepatic injury induced by lipopolysaccharide in galactosamine-sensitized mice. *Gastroenterology* 1996; 111:736-744.
- 15) Hubert L, Olivier LM, Marie-Odile P, et al: Production and role of Interleukin-10 in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 1997; 25:1382-1389.

劇症および急性B型肝炎におけるCTLエピトープの同定の試み

熊本大学エイズ学研究センター・ウイルス制御分野
 滝口 雅文
 協同研究者：曾場尾勇司

はじめに

HBV肝炎における細胞傷害性T細胞(CTL)はウイルス排除に重要な役割を果たしていると考えられる^{1), 2)}。しかし、劇症B型肝炎の病因については、ウイルスゲノムの変異の報告はあるが、ウイルス側の要因のみで劇症化を説明できない。宿主側の要因であるCTLに関しては、劇症肝炎に特異的なCTLエピトープは報告されていない。これを解析することは病因の究明に重要と考えられる。そこでまず、日本における肝炎患者のCTLを調べるために、日本人に最も多く見られるHLA-A24が提示するCTLエピトープの同定を試みる。

方 法

HLA-A24結合ペプチドモチーフに一致した8-merから10-merのシークエンスをC, X, S, P領域より抜き出し、ペプチドを合成する。合成したペプチドがHLA-A24分子に結合するかRMA-S transfectantを用いたstabilization assayによって調べる³⁾。急性肝炎患者の末梢血リンパ球(PBL)をHLA-A24結合HBVペプチドで刺激し、特異的CTLを誘導する⁴⁾。

結 果

HLA-A24のペプチド結合モチーフを持つ、60個のHBV由来ペプチドが見い出され、ペプチド結合アッセイで検討したところ37ペプチドがHLA-A24分子によく結合することがわかった。次にこれらのHLA-A24結合ペプチドで、HLA-A24陽性急性B型肝炎患者由来末梢血リンパ球を刺激した。この結果、3例全例でP756-764において特異的CTLが誘導された。また3例中2例でC117-125において、特異的CTLが誘導された他、C102-110, P566-574においても、1例ずつ特異的CTLが誘導された。

考 察

急性B型肝炎におけるCTLエピトープについては、HLA-A2拘束性のものについて既に詳しい解析がなされている^{5), 6)}。報告によれば、C, S, P領域で合計16個ものCTLエピトープが同定されているが、我々のこれまでの検討では特異的CTLを誘導できたのは計4ペプチドだけであった。症例数をさらに増やして検討する必要があるが、真に強力でimmunodominantなCTLエピトープは限られている可能性がある。

参 考 文 献

- 1) Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, et al: Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1996; 4:25-36.
- 2) Rehermann B, Ferrari C, Pasquinelli C, et al: The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nature Med* 1996; 2:1104-1108.
- 3) Takamiya Y, Schöblich C, Nokihara K, et al: HLA-B*3501-peptide interactions: role of anchor residues of peptides in their binding to HLA-B*3501 molecules. *Int Immunol* 1994; 6:255-261.
- 4) Ibe M, Sakaguchi T, Tanaka T, et al: Identification and characterization of a cytotoxic T cell epitope of hepatitis C virus presented by HLA-B*3501 in acute hepatitis. *J Gen Virol* 1998; 79:1735-1744.

- 5) Penna A, Chisari FV, Bertolotti A, et al: Cytotoxic T lymphocytes recognize an HLA-A2 restricted epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J Exp Med* 1991; 174:1565-1570.
- 6) Nayersina R, Fowler P, Guilhot S, et al: HLA-A2 restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple hepatitis B surface antigen epitopes during hepatitis B virus infection. *J Immunology* 1993; 150:4659-4671.
- 7) Rehmann B, Fowler P, Sidney J, et al: The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis. *J Exp Med* 1995; 181:1047-1058.

非A非B非C型急性肝不全におけるHBVの関与

宮崎医科大学・第二内科 坪内 博仁
 協同研究者：江藤敏治, 林 克裕
 井戸章雄, 弘野修一

はじめに

平成9年度本研究班の研究報告によると劇症肝炎の成因では非A非B非C型, すなわち原因が明らかでない劇症肝炎の頻度は約40%と高い。我々は原因不明の重症肝炎を含む急性肝不全患者におけるHBVの関与を明らかにするため, 血清中HBV-DNAをPCR/Southern法あるいはnested PCR法により測定し, 陽性例では塩基配列の一部を解析した。また, 経時的に血清HBV関連マーカーの検討を行った。

対象と方法

1994年から1997年までに当科に入院し, 入院時血清肝炎ウイルスマーカー (IgM anti-HA, HBs-Ag, IgM anti-HBc, anti-HCV) が, すべて陰性の重症肝炎および急性肝不全症例 (男性1名, 女性6名, 計7名, 平均年齢53.5±17.3才, 劇症肝炎急性型 (AFH) 1名 (死亡0名), 劇症肝炎亜急性型 (SFH) 1 (1), 遅発型急性肝不全 (LOHF) 2 (2), 急性肝炎重症型 (SAH) 3 (0)) を対象とした。HBV-DNAは, 患者血清200 μ lからフェノールクロロホルム法を用い抽出後40 μ lのTE液に溶解し4 μ lをPCR反応に用いた。PCRは, precore/core領域認識プライマー (nt.1860nt.2437, Sense primer : 5'-GAGAAATCAAGCCTCAAGCTGTGCCCTTG-3', Anti Sense primer:5'-GAAAGCTTCTGCGACGCGGCGATTGAGA-3'), core領域認識プライマー (nt.2038-nt.2305,

Sense primer : 5' GCATTGCTCACCTCACCACAC-3', Anti Sense primer : 5'-GTTGATAAGATAGGGGCATTT-3'), S領域認識プライマー (nt.198-nt.347, Sense primer : 5'-TACAGGCGGGGTTTTCTTG-3', Anti Sense primer : 5'-AAGAGGTTGGTGAGTGATTG-3') 並びにx領域認識プライマー (nt.1398-nt.1625, Sense primer : 5'-CTGGATCCTGCGCGGGACGTC-3', Anti Sense primer : 5'-GTTACACGGTGGTCTCCAT-3') を用いた。PCR産物25 μ lのうち5 μ lを1.5%アガロースゲルに電気泳動後ナイロン膜に転写し, HBV-DNA cDNAをプローブとしてサザンブロット解析を行った。x線フィルムの曝露時間は30分室温にて行った。HBV遺伝子解析は, precore/core領域 (nt.1737-nt.2298) についてNested PCR後, それぞれ10クローンずつクローニングシーケンス法を用いて解析した。

結 果

血液製剤を投与されていない初診時の血清中にPCR/Southern法により7例中6例にHBV-DNAが検出された。このうち3例は血清学的ウイルスマーカーが全て陰性であった。PCR/Southern法でHBV DNAが検出された6例をさらにcore領域のnested PCR法で検討した結果2例でHBV DNAが検出された。(図-1) また, HBV DNAを検出した6例中5例で経過中に抗体価 (anti-HBs 1例, anti-HBc 5例, anti-HBe 3例) の変動を認めた。precoreおよびcore領域の塩基配列を解析した5例中1例 (LOHF) に1896塩基の点変異 (G→A) を認めたが他の4例は野生株であった (図-2)。またPCR/Southern法で陽性, nested PCR法で陰性の重症肝炎の1例の子供にHBVキャリアーが存在したため家系内調査を行った。その結果夫anti-HBe陽性, anti-HBc陽性, 長男HBsAg陽性, HBeAg陽性, 次男すべて陰性, 長女anti-HBs陽性, anti-HBe陽性, anti-HBc陽性であった。(表-1)

考案・結論

最近, 清学的にはB型肝炎が治癒した症例の中にも, HBVが持続的に存続する例があると報告されてきた¹⁻²⁾。また, HBsAg陰性, anti-HBc陽性ドナーからの肝臓移植後, レシピエントに急性B型肝炎が発症した例³⁾, HBsAgとIgM anti-HBcがともに陰性であるにも関わらず, PCR法でHBV-DNAが検出される劇症肝炎症例が存在することが報告される⁴⁾等, 従来のB型肝炎の血清学的診断基準では説明し得ない肝炎が報告されつつある。我々の成績ではPCR/Southern法で血清学的に非A非B非C型重症肝炎または急性肝不全7例中6例 (precore/core領域認識プライマーにて7例中5例, S領域認識プライマーにて7例中4例) で血清中にHBVDNAを検出した。そのうち2例ではnested PCR法でも陽性であるので少なく

ともこの2例についてはHBV-DNAが存在したと考えられる。また、HBV-DNAを検出した6例中5例で経過中にHBV関連抗体価 (anti-HBs 1例、anti-HBc 5例、anti-HBe 3例) の変動を認めた。precoreおよびcore領域の塩基配列を解析した5例中1例 (LOHF) (pt4) に1896塩基の点変異 (G→A) を含め多彩な変異を認めたが、劇症肝炎を含む他の4例はすべて野生株であった。5症例とも解析した10クローンの塩基配列は類似しており、感染したHBVが近縁のstrainであり、HBV-DNAのclonalityが非常に高い集団であることを示していた。また、PCR/Southern法で陽性、nested PCR法で陰性の重症肝炎の1例では子供にHBVのキャリアが存在したので家系内調査を行った。その結果、長女と夫はHBVに暴露していた。以上の結果より、血清学的に非A非B非C型重症肝炎または急性肝不全の一部には、HBVが検出されるということを示している。このHBVに病因としての意義があるかどうか今後検討する必要がある。

参考文献

- 1) Barbara R. et al: The hepatitis B virus persists for decades after patient's recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nature Medicine* 2:1104-1108, 1996.
- 2) Persistent viremia after recovery from self-limited acute hepatitis B. Yotuyanagi et al: *Hepatology* 27:1377-1382, 1998.
- 3) Rolland D. et al: Transmission of hepatitis B by transplantation of livers from donors positive for antibody to hepatitis B core antigen. *Gastroenterology* 113:1668-1674, 1997.
- 4) Andrew Mason et al: Prevalence of Herpesviridae and hepatitis B virus DNA in the liver of patients with non-A, non-B fulminant hepatic failure. *Hepatology* 24: 1361-1365, 1996.

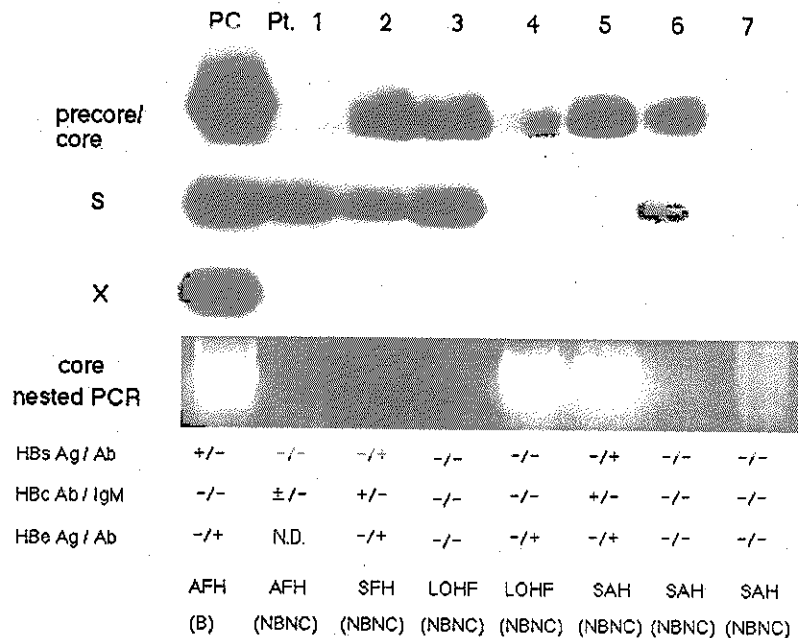


図-1 急性肝不全患者血清中におけるHBV-DNAの検出

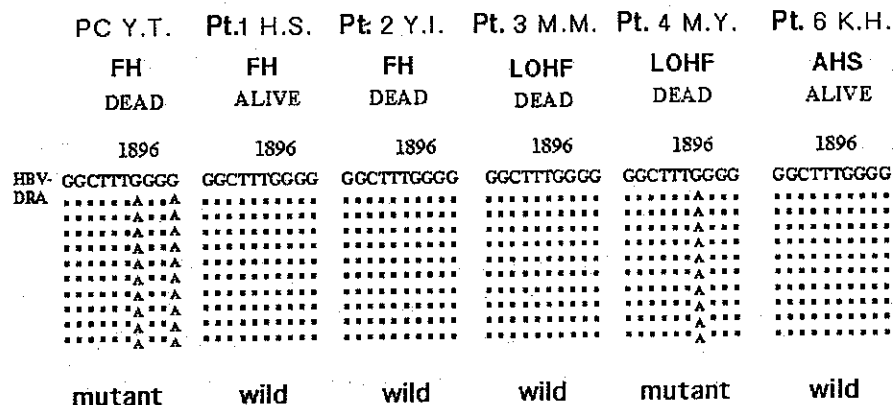


図-2 HBV pre core領域の塩基配列

| | 患者 | 夫 | 長男 | 次男 | 長女 |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| HBs-Ag | - 0.4 | - 0.3 | + 58 | - 0.4 | - 0.5 |
| anti HBs | - | - 0.9 | - 0.1 | - 0.3 | + 60 |
| HBe-Ag | - | - 0.3 | + 150 | - 0.2 | - 0.3 |
| anti HBe | - 3 | + 71 | - 0 | - 3 | + 100 |
| anti HBc | - 5 | + 95 | - 100 | - 3 | + 97 |

表-1 Pt.6の家族における血清HBV関連マーカー

HGFによるTPO mRNAの発現誘導

宮崎医科大学・第二内科 坪内 博仁

協同研究者：山下 清，弘野修一

堀 剛，林 克裕

はじめに

c-Mplのリガンドであるトロンボポイエチン (TPO) をコードする遺伝子のクローニングが1994年にいくつかのグループにより報告された¹⁻⁴⁾。血漿中のTPO濃度は血小板数に反比例して変動することが報告されている⁵⁻⁷⁾。さらにc-Mplのノックアウトマウスでは正常マウスに比べて末梢血中の血小板数と骨髄巨核球数が約85%減少している⁸⁾。このようにTPOは巨核球の有力な増殖及び成長因子であり、血小板の産生の制御に重要な役割を果たしていると考えられる。

肝硬変では血小板減少はよくみられるが、これは脾機能亢進症によるものと考えられている。しかしながら、TPO mRNAは種々の臓器中で肝に最も強く発現しており^{1, 3)}、しかも肝実質細胞で発現していることがin situ hybridizationで確認されている⁹⁾。したがって肝硬変における血小板減少はTPOの産生低下による可能性が考えられる。最近肝硬変患者における血清TPOレベルは正常者と同等か低く¹⁰⁻¹²⁾、また硬変肝ではTPO mRNAレベルが低下していると報告された¹²⁾。しかしながらTPOの発現を調節する因子は未だ不明である。そこで我々は、初代培養ラット肝細胞を用いてHGFをはじめとする種々の増殖因子およびサイトカインのTPO mRNA発現及ぼす影響

を検討し、さらに四塩化炭素肝硬変ラットを用いてHGFのin vivo投与によるTPO mRNA、血小板数および骨髄巨核球数に及ぼす影響を検討した。

対象と方法

初代培養ラット肝細胞：Wistar系雄性ラット(6週齢)を用いてSeglenらの方法により肝細胞を単離し、 5×10^4 個/0.2ml/cm²の密度で播き、WE(5%FCS)培地で培養した。培養開始後4時間で無血清のWE(基礎培地)に交換し、24時間後の培地交換時に種々の増殖因子あるいはサイトカイン(HGF, EGF, TGF-beta, G-CSF, IL-3, IL-6)を添加してさらに12時間培養した。

CCI₄肝硬変ラット：Wistar系雄性ラットに50%CCI₄オリブオイル混液0.5ml/kg body経鼻胃管投与し、それを3/週x20週繰り返して肝硬変ラットを作成した。CCI₄最終投与2週後にHGF(750μg/kg body)を腹腔内投与した。HGFは12時間毎x3日間、あるいは24時間毎x7日間行なった。ラットを最終のHGF投与後経時的に屠殺してTPO mRNAレベル、血小板数や大腿骨の骨髄巨核球数を測定した。

骨髄巨核球の同定：10%ホルムアルデヒドで固定した大腿骨の骨髄を抗factorⅧ抗体で免疫染色し、骨髄巨核球を同定した。

TPO mRNAレベルの検討：ラット肝細胞および肝硬変ラット肝よりtotal RNAを抽出し、RT-PCRによりTPO mRNAの発現を検討した。ラットβ-actin mRNAの発現をinternal controlとした。

結 果

初代培養ラット肝細胞のTPO mRNA発現におよぼすHGFの影響：各種因子を添加しないラット肝細胞では、わずかにTPO mRNAの発現がみられた。種々の因子のうちHGFのみがTPO mRNAの発現を促進した。HGFによるTPO mRNAの発現促進は5ng/mlで認められ、10ng/mlではさらに増加した(図-1)。

ラット硬変肝におけるTPO mRNA発現におよぼすHGFの影響：硬変肝におけるTPO mRNAの発現は正常肝と比較して著しく低下していた。HGF投与群では最終HGF投与後3時間で正常肝と同等のTPO mRNA発現がみられ、24時間後まで発現を促進させた(図-2)。

肝硬変ラットの血小板数および骨髓巨核球数におよぼすHGFの影響：最終のHGF投与後3日後の血小板数は対照に比し有為に増加した。5日および7日後では増加傾向にあるものの有為差はなかった(図-3)。一方、骨髓巨核球数は最終のHGF投与後3日および5日後で対象に比し有為に増加した(図-4)。

考案・結論

肝硬変患者の血漿中TPO値は健常者に比べて低いことが報告されている¹¹⁻¹²。また肝硬変患者の肝組織中TPO mRNAレベルは低下している¹²。今回の我々の肝硬変ラットのモデルにおいても肝組織中のTPO mRNAレベルの低下が示された。肝硬変に伴う血小板減少症は、肝におけるTPO mRNA発現低下により、TPO産生が低下するために起因する可能性が考えられる。しかしながら、放射線照射や抗癌剤を投与されたラットの血漿中TPOは増加しているが、肝におけるTPO mRNAレベルは変化しないので、肝におけるTPO mRNAの発現は一定であると考えられている^{6,7}。現在までTPO mRNA発現を促進する因子は報告されていない。我々はHGFが初代培養ラット肝細胞におけるTPO mRNAの発現を促進することを見いだした。HGFははじめ劇症肝炎患者血漿中に発見され¹³、ついでラット血小板¹⁴や、培養線維芽細胞の培養液中^{15,17}に見いだされた。HGFは多機能因子と知られており、増殖促進因子、運動性促進因子、器官形成因子や腫瘍抑制因子などの様々な機能を有している。HGFの受容体c-Metはチロシンキナーゼ型受容体であるが、同じようにチロシンキナーゼ型受容体のリガンドであるEGFやTGF-betaは初代培養ラット肝細胞におけるTPO mRNAの発現には影響しなかった。一方ヒトTPO遺伝子はその翻訳開始点より1.4kbp上流まで解析が行なわれたが、有力なプロモーターのモチーフは認められておらず⁴、TPO mRNAの発現調節機構は未だ不明である。HGFはin vivoで肝硬変ラットの肝TPO mRNAの発現を促進するだけでなく、骨髓巨核球数を増加させ、血小板数を増加させた。

これらの結果はHGFがTPO mRNA発現の調節因子であることを示唆する。

参 考 文 献

- 1) de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, Darbonne WC, Henzel WJ, Wong SC, Kuang WJ: Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 1994; 369:533.
- 2) Lok S, Kaushansky K, Holly RD, Kuijper JL, Lofton Day-CE, Oort PJ, Grant FJ, Heipel MD, Burkhead SK, Kramer JM: Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature* 1994; 369:565.
- 3) Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, Li YS, Lu HS, Martin F, Chang MS, Samal B, Nichol JL, Swift S: Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* 1994; 77:1117.
- 4) Sohma Y, Akahori H, Seki N, Hori T, Ogami K, Kato T, Shimada Y, Kawamura K, Miyazaki H: Molecular cloning and chromosomal localization of the human thrombopoietin gene. *FEBS Lett* 1994; 353:57.
- 5) Nichol JL, Hokom MM, Hornkohl A, Sheridan WP, Ohashi H, Kato T, LiYS, Bartly TD, Choi E, Bogenberger J: Megakaryocyte growth and development factor Analyses in vitro effects on human megakaryopoiesis and endogenous serum levels during chemotherapy-induced thrombocytopenia. *J Clin Invest* 1995; 95: 2973.
- 6) Stoffel R, Wiestner A, Skoda RC: Thrombopoietin in thrombocytopenic mice evidence against regulation at the mRNA level and for a direct regulatory role of platelets. *Blood* 1996; 87:567.
- 7) Ulich TR, del Castillo J, Yin S, Swift S, Padilla D, Senaldi G, Bennett L, Shutter J, Bogenberger J, Sun D: Megakaryocyte growth and development factor ameliorates carboplatin-induced thrombocytopenia in mice. *Blood* 1995; 86:971.
- 8) Gurney AL, Carver-Moore K, de sauvage FJ, Moore MW: Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice. *Science* 1994; 265:1445.
- 9) Nomura S, Ogami K, Kawamura K, Tsukamoto I, Kudo Y, Kanakura Y, Kitamura Y, Miyazaki H, Kato T: Cellular localization of thrombopoietin mRNA in the liver by in situ hybridization. *Exp Hematol* 1997; 25:565.
- 10) Shimodaira S, Ishida F, Ichikawa N, Tahara T, Kato T,

- Kodaira T, Tanaka E, Sodeyama T, Kiyokawa K, Kitano K: Serum thrombopoietin (c-Mpl ligand) levels in patients with liver cirrhosis. *Thromb Haemost* 1996; 76:545.
- 11) Peck-Radosavljevic M, Zacherl J, Meng YG, Pidlich J, Lipinski E, Langle F, Steininger R, Muhlbacher F, Gangl A: Is inadequate thrombopoietin production a major cause of thrombocytopenia in cirrhosis of the liver? *J Hepatology* 1997; 27:127.
- 12) Martin TG-3rd, Somberg KA, Meng YG, Cohen RL, Heid CA, de Sauvage FJ, Shuman MA: Thrombopoietin levels in patients with cirrhosis before and after orthotopic liver transplantation. *Ann Intern Med* 1997; 127: 285.
- 13) Gohda E, Tsubouchi H, Nakayama H, et al: Purification and partial characterization of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with fulminant hepatic failure. *J Clin Invest* 1988; 81:414.
- 14) Nakamura T, Nawa K, Ichihara A, Kaise N, Nishino T: Purification and Subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets. *FEBS Lett* 1987; 224:311.
- 15) Higashio K, Shima N, Goto M, Itagaki Y, Nagao M, Yasuda H, Morinaga T: Identity of a tumor cytotoxic factor from human fibroblast and hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 170:397.
- 16) Rubin JS, Chan AM, Bottaro DP, Burgess WH, Taylor WG, Cech AC, Hirschfield DW, Wong J, Miki T, Finch PW: A broadspectrum human lung fibroblast-derived mitogen is a variant of hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:415.
- 17) Gherardi E, Gray J, Stoker M, Perryman M, Furlong R: Purification of scatter factor, a fibroblast-derived basic protein that modulates epithelial interactions and movement. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:5844.

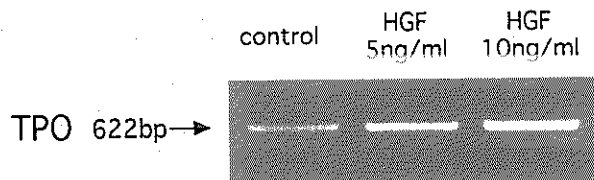


図-1. ラット初代培養肝細胞のTPO mRNA発現に及ぼすHGFの影響

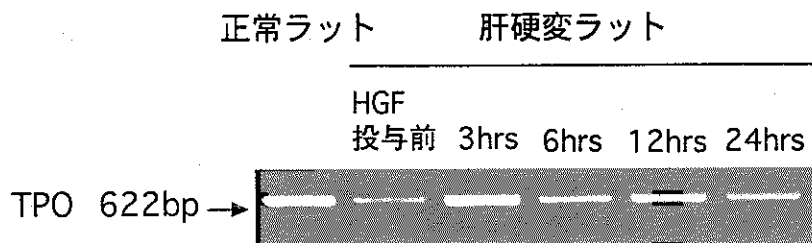


図-2. 投与による肝硬変ラットの肝組織TPO mRNA発現におよぼすHGFの影響

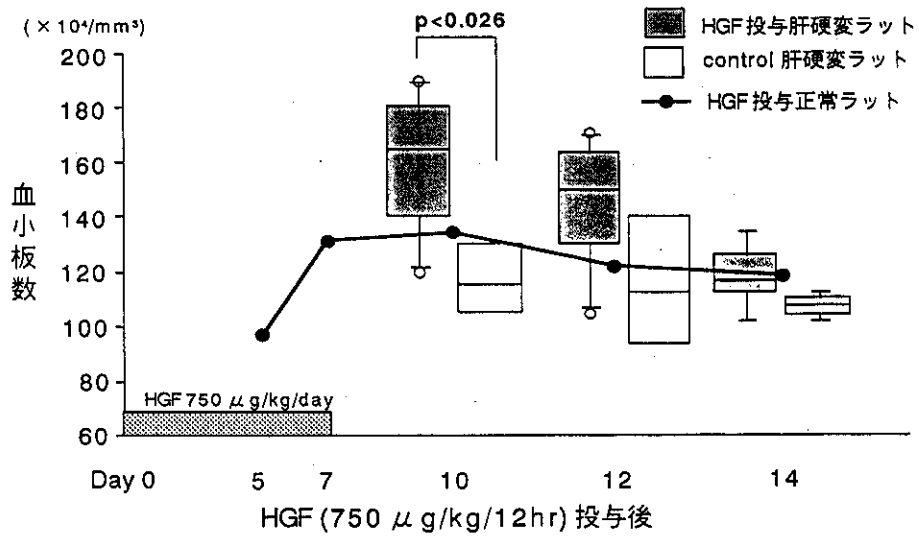


図-3. 肝硬変ラットの血小板におよぼすHGFの効果

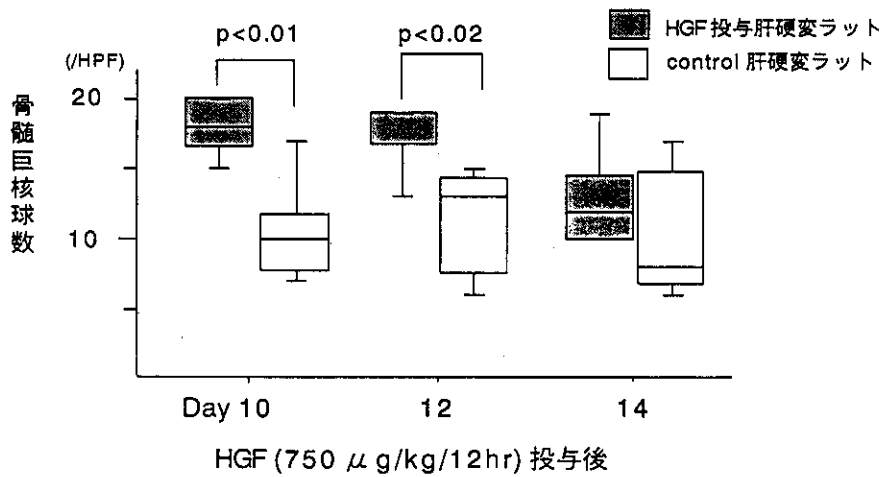


図-4. 肝硬変ラットの骨髓巨核球におよぼすHGFの効果

HBV既感染患者におけるHBVの存在様式

京都府立医科大学医学部・第三内科 岡上 武
協同研究者：村上善基，南 祐仁

はじめに

近年分子生物学的手法の発達に伴い，HBs抗原消失後も年余にわたり血清中にHBV DNAが検出されることが判明した。このような患者の肝を移植すると，recipientには高頻度にde novoのB型肝炎が発症する^{1, 2)}。今回我々はHBVの既感染におけるHBVの存在様式を明らかにするために，HBVの一過性感染例とB型慢性肝炎例を対象に，肝と肝外におけるHBVの存在様式を検討した。

対象と方法

HBs抗原陰性，HBc抗体低力価陽性のC型慢性肝炎10例，B型慢性肝炎7例を対象とした。また肝疾患の既往のない3例をnegative controlとした。血清，肝組織，末梢血単核球よりDNAとRNAを抽出し，HBV core，S，X領域に設定したプライマーでPCRを行いHBV DNAを検討した。HBVの組み込みはAlu配列を用いたPCRで検討し³⁾，組み込みの確定はdirect sequenceで行った。ウイルスの複製の証明にKockら⁴⁾の報告したDRを挟むプライマーでPCRを行い，cccDNAの検出とともにX領域のmRNAの検出をRT-PCRで行った。

結 果

(1) Alu配列を用いたPCRで，HBs抗原陽性例では肝組織では全例に，また末梢血単核球にも7例中4例にHBV

DNAの組み込みがみられた。また中間複製体のcccDNAも高率に検出された(表1)。(2) HBs抗原陰性，HBc抗体陽性のC型慢性肝炎でも10例中2例で肝組織に，また10例中2例で末梢血単核球に組み込みHBVが検出された。(3) HBs抗原陰性例でも10例中6例で血清中にHBV DNAが検出された。しかし大半の症例ではHBVのいずれかの領域でしかDNAが検出できなかった(表2)。

(4) HBV感染の既往のない症例ではHBV DNA，中間複製体は検出されなかった(表3)。

考 案

(1) HBs抗原陰性，HBc抗体低力価陽性例で肝組織，末梢血単核球にHBVが高率に存在し，HBVは組み込まれた状態と，潜伏感染の状態が存在していた。(2) HBs抗原陰性HBc抗体低力価陽性症例で血清中に検出されるHBV DNAは，PCRによる検出パターンから，肝細胞などで複製したウイルス粒子以外に，肝細胞や単核球が崩壊の結果血中に放出されたヒトゲノム中の組み込みHBV DNAを検出している可能性が考えられた。(3) 末梢血単核球にもHBV DNAは組み込まれていた。Alu配列を利用したPCRによる組み込みの検出には100個以上の同一クローンが必要であり，今回の成績から過去の感染時にHBVが組み込まれた細胞がクローナルに増殖して一部が血中に放出されているものと考えた。

参 考 文 献

- 1) Chazouilleres et al.: Lancet 1994; 343:142-146.
- 2) Wachs et al.: Transplantation 1995; 49:230-234.
- 3) Minami et al.: Genomics 1995; 29:403-411.
- 4) Kock J, et al.: Hepatology 1996; 23:405-13.

表1：B型慢性肝炎におけるHBV DNAの存在様式

| | 性別 | 年齢 | HBV DNA | | | | | | | | | | | | | |
|---|----|----|---------|---|---|------|------|---|---|--------|------|------|---|---|--------|----------|
| | | | 血清 | | | 肝 | | | | 末梢血単核球 | | | | | | |
| | | | core | X | S | 組み込み | core | X | S | cccDNA | 組み込み | core | X | S | cccDNA | X領域のmRNA |
| 1 | 男性 | 36 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 2 | 男性 | 29 | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | + | - | ND |
| 3 | 男性 | 31 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | ND |
| 4 | 女性 | 33 | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | - | + |
| 5 | 男性 | 51 | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + | ND |
| 6 | 女性 | 44 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | + |
| 7 | 女性 | 15 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ND |

ND: not done

表2：HBs抗原陰性、HBc抗体陽性C型慢性肝炎におけるHBVDNAの存在様式

| | 性別 | 年齢 | HBVDNA | | | | | | | | | | | | | |
|----|----|----|--------|---|---|------|------|---|---|--------|------|------|---|---|--------|----------|
| | | | 血清 | | | 肝 | | | | 末梢血単核球 | | | | | | |
| | | | core | X | S | 組み込み | core | X | S | cccDNA | 組み込み | core | X | S | cccDNA | X領域のmRNA |
| 1 | 女性 | 56 | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| 2 | 男性 | 38 | + | + | + | - | + | + | + | - | - | + | + | + | - | + |
| 3 | 男性 | 63 | - | - | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 4 | 女性 | 52 | - | - | + | - | - | - | + | - | + | + | - | - | - | + |
| 5 | 女性 | 57 | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 6 | 女性 | 62 | - | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - | - | - | + |
| 7 | 女性 | 37 | + | + | + | - | + | + | + | - | - | + | + | - | - | + |
| 8 | 男性 | 40 | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| 9 | 女性 | 67 | - | + | + | - | + | + | + | - | - | + | + | + | - | - |
| 10 | 女性 | 62 | - | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |

ND: not done

表3：HBV感染の既往のない症例におけるHBVDNAの存在様式

| | 性別 | 年齢 | HBVDNA | | | | | | | | | | | | | |
|---|----|----|--------|---|---|------|------|----|----|--------|------|------|---|---|--------|----------|
| | | | 血清 | | | 肝 | | | | 末梢血単核球 | | | | | | |
| | | | core | X | S | 組み込み | core | X | S | cccDNA | 組み込み | core | X | S | cccDNA | X領域のmRNA |
| 1 | 女性 | 25 | - | - | - | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - | - | - | ND | ND |
| 2 | 女性 | 24 | - | - | - | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - | - | - | ND | ND |
| 3 | 女性 | 21 | - | - | - | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - | - | - | ND | ND |

ND: not done

PCR in situ hybridization法を用いたB型肝炎ウイルスの組織内局在の解析

東京都臨床医学総合研究所・放射線医学研究部門
小原 道法

はじめに

ウイルス疾患において、ウイルスの組織内局在を明らかにすることは、病原性の発現機序を解析するうえで重要なことである。しかし、複製の少ない細胞や組織では検出することが困難であった。そこで高感度検出系としてPCR in situ hybridization法 (PCR-ISH), RT-PCR-ISH法を用いて、B型肝炎ウイルス遺伝子の組織内局在及び遺伝子発現状況の解析を実施した。また、HBsAg, HBcAgの組織染色を行い、HBV遺伝子の局在との相関性

について検討した。

対象と方法

B型肝炎ウイルス陽性者9例の肝組織をHBsおよびHBxの領域に3種類のプライマー、プローブを設定して、PCR-ISH法を実施した。陰性コントロールとしてC型肝炎患者3例と非B非C型肝炎2例について検討した。また、PCR産物が組織細胞内から溶出して他の細胞内に移行する可能性を検討するために、陰性検体にHBV DNAを添加してPCR-ISHを行い、シグナルの有無について検討した。また、HBVの複製制御が転写、翻訳のどの段階で行われているかを明らかにするためにRT-PCR-ISH法、HBsAg, HBcAgの組織染色を行い、HBV遺伝子DNAの局在との相関性について検討した。さらに、ステロイド中断により劇症化した例についてPCR-ISH, HBsAg, HBcAgの組織染色を行い、HBV局在との相関性について

検討した。

結 果

PCR-ISH法では門脈周囲の肝実質細胞に強陽性染色像が多く認められたが、ほとんどの検体でほぼすべての肝実質細胞が染色された。細胞質が強く染色されるものが多かったが核周囲が強く染色されるものもあった。また、HBs抗原陰性、HBs抗体陰性、血中HBウイルス（RTD-PCR法）が陰性でHBe抗体は陽性の検体でも陽性染色像が認められた。また連続切片では同一細胞に陽性染色像が認められたが、HBV陰性検体では陽性染色像は認められなかった。これらの陽性染色像はDNase I処理により消失した。また、HBV陰性検体およびコントロールHBV-DNAを用いたPCR産物の細胞間移行性の検討では移行染色像は認められず、よい特異性を示した。さらにPCR-ISH法で陽性染色像が検出された患者について、HCVなど他のコントロールプライマーを用いて同様にPCR-ISHを実施したが、陽性染色像は認められなかった。

陽性検体をDNase Iで処理後にRT-PCR-ISHを行い、mRNAへの転写がどの程度行われているかについて検討したところ、ほぼ遺伝子DNAの存在と一致する傾向が認められた。DNA、mRNAの存在とHBsAg、HBcAgの存在には乖離が認められ、post translationalな制御の可能性が示唆された。

劇症化例ではステロイド中断療法を行う30日前でもすべての肝実質細胞にHBV-DNAの存在が認められた。また、HBsAg、HBcAgの強い染色が認められた。

考案・結論

HBsAg、HBcAgの組織染色では細胞質に遺伝子が存在しているにもかかわらず染色されない組織領域が認められ、転写および翻訳段階以降での発現制御機構の存在が示された。現在、これらウイルス遺伝子の存在とタンパク質発現制御機構が劇症化の原因の一つである可能性を考えて解析を進めている。

参 考 文 献

- 1) Yohko K. Shimizu, Stephen M. Feinstone, Michinori Kohara, Robert H. Purcell, and Hiroshi Yoshikura. Hepatitis C Virus: Detection of Interacellular Virus Particles by Electron Microscopy. *Hepatology* (1996) 23:205-209.
- 2) Tomiko Kashiwakuma, Akira Hasegawa, Tadahiro Kajita, Atumi Tanaka, Hiyoyuki Mori, Yohsuke Ohta, Eiji Tanaka, Kendo Kiyosawa, Takeshi Tanaka, Satoshi Tanaka, Nobu Hattori and Michinori Kohara. Detection of hepatitis C virus specific core protein in serum of patients by a sensitive fluorescence enzyme immunoassay (FEIA). *J. Immunological Methods* (1996) 190:79-89.
- 3) E. Orito, M. Mizokami, T. Tanaka, J. Y-N. Lau, K. Suzuki, M. Yamauchi, Y. Ohta, A. Hasegawa, S. Taanaka and M. Kohara. Quantification of serum hepatitis C virus core protein level in patients chronically infected with different hepatitis C virus genotypes. *GUT*. (1996) 39:876-880.
- 4) G. Barba, F. Harper, T. Harada, M. Kohara, S. Goulinet, Y. Matsuura, G. Eder, Zs. Schaff, M.J. Chapman, T. Miyamura, and C. Brechot. Hepatitis C Virus Core Protein shows a Cytoplasmic Localization and Associates to Cellular Lipid Storage Droplets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. (1997) 94:1200-1205.
- 5) Nobuhiko Kamoshita, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Michinori Kohara, and Akio Nomoto. Genetic analysis of internal ribosomal entry site on hepatitis C virus RNA: implication for involvement of the highly-ordered structure and cell type specific trans-acting factors. *Virology* (1997) 233:9-18.
- 6) Takeshi Tanaka, Tomoko Takeuchi, Kazuaki Inoue, Satoshi Tanaka, and Michinori Kohara. Acute hepatitis caused by sexual or household transmission of GBV-C. *J. Hepatology* (1997) 27:1110-1112.
- 7) Hideki Akiyama, Haruhiko Yoshinaga, Takeshi Tanaka, Kiyoshi Hiruma, Shu Tanikawa, Hisashi Sakamaki, Yasusuke Onozawa, Takaji Wakita, Michinori Kohara, and Bone Marrow Transplantation Team. Effects of cyclosporin A on hepatitis C virus infection in bone marrow transplantation patients. *Bone Marrow Transplant* (1997) 20:993-995.
- 8) M. Yamauchi, E. Orito, T. Kumada, O. Yanagihara, M. Kohara, M. Mizokami. Serum hepatitis C virus core protein level during Interferon- α therapy in patients with chronic hepatitis C: relationship between biochemical and virologic responses. *Hepatology Res.* (1997) 8:189-197.
- 9) Takaji Wakita, Choji Taya, Asao Katsume, Junko Kato, Hiromichi Yonekawa, Yumi Kanegae, Izumu Saito, Yukiko Hayasi, Morio Koike, Michinori Kohara. Efficient conditional transgene expression in hepatitis C virus cDNA transgenic mice mediated by the Cre/loxP system. *J. Biol. Chem.* (1998) 273:9001-9006.
- 10) Young L. OH, Bumsuk HAHM, Yoon K. KIM, Hae K. LEE, Joo W. LEE, Ok-K. SONG, Kyoko TSUKIYAMA-KOHARA, Michinori KOHARA, Akio NOMOTO and

Sung K. JANG. Determination of functional domains in polypyrimidin-tract-binding protein. *Biochem. J.* (1998) 331: 169-175.

- 11) Shozo Watanabe, Masahiko Kaito, and Michinori Kohara. Immunoelectron Microscopic Characterization of HCV. *Methods in Molecular Medicine*, (1998) vol. 19:279-285, *Hepatitis C Protocols*, Edited by J.Y.N. Lau.
- 12) Kohichiroh Yasui, Takaji Wakita, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Shin-ichi Funahashi, Masumi Ichikawa, Tadahiro Kajita, Darius Moradpour, Jack R. Wands, and Michinori Kohara. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J. Virology* (1998) 72:6048-6055.
- 13) Takeshi Tanaka, George Hess, Volker Schlueter, Dietmar Zdunek, Satoshi Tanaka, and Michinori Kohara. Interferon Treatment of Patients Co-infected with HGV and HCV: Correlation of Treatment Response with Serum Anti-HGV Envelope (E2) Protein Antibody and Genomic RNA. *J. Med. Virol.* (1999) in press.
- 14) Kazuaki Inoue, Makoto Yoshiba, Kazuhiko Sekiyama, Michinori Kohara. Etiological relationship between GB virus C and fulminant hepatitis. *J. Hepatology* (1999) in press.
- 15) Tomoko Takeuchi, Asao Katsume, Takeshi Tanaka, Aki Abe, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Ryuji Kawaguchi, Satoshi Tanaka, and Michinori Kohara. Real-Time Detection System for Quantification of Hepatitis C Virus Genome. *Gastroenterology* (1999) in press.

劇症及び急性A型肝炎患者血清由来のA型肝炎ウイルスの全塩基配列の解析

千葉大学医学部・第一内科 横須賀 収
協同研究者：藤原慶一

はじめに

わが国においては、衛生環境の改善によりA型肝炎の大流行はみられなくなったが、散発性急性肝炎におけるA型肝炎の割合は決して減少しておらず、その30-40%を占めている。また、当科では、近年、重症化例も目につくようになってきている。A型肝炎重症化の宿主側の因子として、これまで患者の高齢化等が言われてきたが、我々の検討では急性肝炎例と重症化例との間に有意差を認めず、重症化における年齢因子の関与は少ないと考え

られた。そこで、A型肝炎の重症化について、ウイルス側の因子を検討する必要性が生じ、血清中のA型肝炎ウイルス(HAV) RNAの検出を試み、その5'非翻訳領域(5'NTR)の変異を検索したところ、重症型、劇症肝炎例の原因となるウイルスは比較的近縁のstrainであるのに対して、急性肝炎例のウイルスは多様なstrainの集合である可能性が示唆されることを報告した¹⁾。また、5'NTR以外の領域においても、肝炎の重症化とHAV遺伝子との間に関連があるかどうかを検討するため、Long RT-PCR法を用いて劇症肝炎、急性肝炎患者血清よりHAV RNAの全蛋白コード領域の増幅を試み、構造蛋白領域の塩基配列を決定した²⁾。今回は非構造蛋白領域(4308塩基、1436アミノ酸)、3'非翻訳領域(3'NTR)(63塩基)の塩基配列を決定し、HAVの全塩基配列を解析した。

対象と方法

対象はA型劇症肝炎3例、急性肝炎3例で、それらの患者の保存血清、各25 μ lからRNAを抽出し、specific primerを用いてHAVのほぼ全長にわたるcDNAを合成した。そのcDNAの1/200を1st PCRに使い、7224塩基のproductをえ、その1/50を2nd PCRに使用した。2nd PCRは16 fragmentsに分けて行ない、genomeの5'、3'端は5'3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法により増幅した(図-1)。増幅産物について、Dye terminator法によりCycle sequence反応を行ない、Autosequencerで塩基配列を決定した。

結 果

A型劇症肝炎3例、急性肝炎患者3例の血清から、HAV RNA(全7478塩基)の全領域を増幅することができ、全塩基配列を決定した。Wild typeとされているHM175をprototypeとした³⁾。HAV蛋白のhyper variable regionである構造蛋白と非構造蛋白の接合部(VPI/2A)領域の塩基配列の相同性により、HAVには7つのgenotypeが存在するが⁴⁾、得られたウイルスのgenotypeは、劇症肝炎、急性肝炎ともに1Aであった。5'NTRの中央部において、FHではAHに比べてヌクレオチド変異が少ない傾向がみられた(図-2)。構造蛋白領域においては、劇症肝炎、急性肝炎由来のHAVに著明な差異はみられず、変異は少数であった。非構造蛋白領域の2BにおいてFHで変異が多い傾向が認められた。3B、3Cには全例で変異を認めなかった。3DにおいてはAHの1例で11アミノ酸のdeletionを認めた(図-3)。3'NTRにおいて全例で変異を全く認めなかった(図-4)(表-1)。また培養細胞において報告されている細胞障害性ウイルス株にみられる変異⁵⁾は認められなかった。

考案・結論

散発性急性肝炎中、A型肝炎の占める割合は30%前後あり、決して過去の疾患ではなく、近年になってA型肝炎の重症化例の増加傾向がみられる。われわれの検討では、宿主側の因子との関連は必ずしもみられず、ウイルス側の因子の解析の必要性が示唆された。臨床における、A型肝炎の重症化とウイルス側の因子(HAVの変異など)についての検討はこれまでなされていなかった。従来、A型肝炎では発症時にはすでにウイルス血症は認められないと考えられてきた。Yotsuyanagiらは、発症早期のトランスアミナーゼがピークに達する前であれば、RT-PCR法により血中にHAV RNAを検出しようことを示した⁶⁾。さらにわれわれは、より感度の高いRT-PCR法を用いることにより、ほとんどの症例の血清中に発症から平均18±14日間(3-114日間)HAV RNAが検出されることを示した⁷⁾。HAVは5'端より、5'NTR(734)、構造蛋白領域(2373塩基、791アミノ酸)、非構造蛋白領域(1436塩基、4308アミノ酸)、3'NTR(63塩基)、polyAから成る。われわれはこれまで、重症化とウイルスの5'NTRが関連すること、つまり重症型、劇症肝炎例の原因となるウイルスは比較的近縁のstrainであるのに対して、急性肝炎例のウイルスは多様なstrainの集合である可能性が示唆されることを報告した¹⁾。また、われわれはA型肝炎患者の保存血清から、Long RT-PCR法を用いることにより3-5kbのHAV RNAの増幅を行ない、従来より少量の臨床検体から、より多くの情報を得ることが可能になった。さらに、構造蛋白領域においては、劇症肝炎、急性肝炎由来のHAVに著明な差異はみられないことを報告してきた²⁾。

今回、非構造蛋白領域、3'NTRをあわせて、HAV全領域について解析結果をまとめてみると、(1) genotypeと重症化との関連はみられなかった。(2) 5'NTRの中央部において、FHではAHに比べてヌクレオチド変異が少ない傾向がみられた。この部位には、internal ribosomal entry site (IRES)が存在し、RNAのtranslation、HAVのreplicationに関与するとされており⁸⁾、そのヌクレオチド変異がHAVの増殖能などに影響を与えることにより、肝炎の重症化に関与する可能性も考えられる。(3) 構造蛋白領域においては、FH、AHの間に著明な差異はみられず、変異は少数であった。(4) 非構造蛋白領域の2Bにおいて、FHではAHに比べ変異が多い傾向が認められた。2B蛋白はhelicaseである。また、viral proteaseをコードする3BとRNA polymeraseをコードする3Cには変異は全く認めなかった。(5) さらに、3'NTRにおいても全例で変異はみられなかった。つまり、A型肝炎の重症化とHAVの5'NTR、非構造蛋白2B領域との関連の可能性が示唆された。細胞にて継代培養中に増殖速度が速く

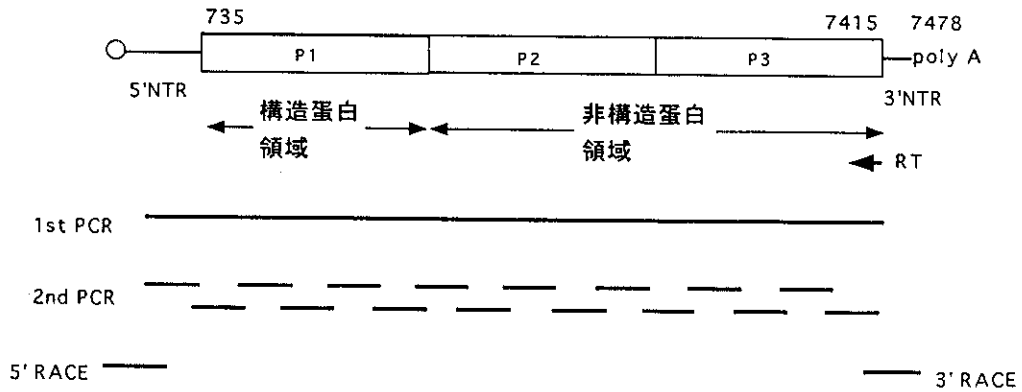
なり、細胞障害効果を示すウイルス株においては、非構造蛋白領域の2B、2Cの変異が必要であり、5'NTRの変異と相互作用しているとの報告がある⁵⁾。

A型肝炎ウイルスは細胞培養系で増殖する唯一の肝炎ウイルスである。今後は、患者血清から得た全塩基配列をもとに、細胞内でA型肝炎ウイルスを発現するcDNA cloneを構築し、細胞における劇症肝炎、急性肝炎由来のウイルスのvirulenceについて検討する予定である。

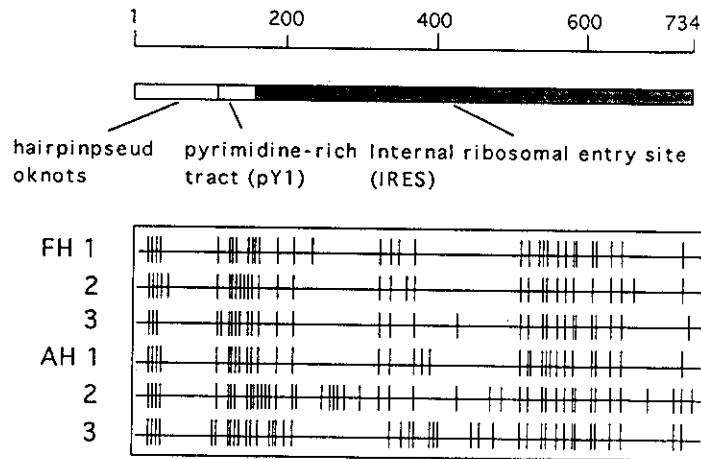
参考文献

- 1) 横須賀收, 藤原慶一: A型劇症肝炎および急性肝炎におけるHAV変異の検討 平成8年度研究報告書.
- 2) 横須賀收, 藤原慶一: 劇症及び急性A型肝炎由来のA型肝炎ウイルス全塩基配列決定の試み 平成9年度研究報告書.
- 3) Cohen JI, Ticehurst JR, Purcell RH, et al.: Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: comparison with different strains of hepatitis A virus and other picorna viruses. *J Virol* 1987; 61:50-59.
- 4) Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, et al.: Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol* 1992; 73:1365-1377.
- 5) Zhang H, Chao S-F, Ping L-H, et al.: An infectious cDNA clone of a cytopathic hepatitis A virus: genomic regions associated with rapid replication and cytopathic effect. *Virology* 1995; 212:686-697.
- 6) Yotsuyanagi H, Iino S, Koike K, et al.: Duration of viremia in human hepatitis A viral infection as determined by polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1993; 40:35-38.
- 7) Fujiwara K, Yokosuka O, Ehata T, et al.: Frequent detection of hepatitis A viral RNA in serum during the early convalescent phase of acute hepatitis A. *HEPATOLOGY* 1997; 26:1634-1639.
- 8) Brown EA, Day SP, Jansen RW, et al.: The 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: secondary structure and elements required for translation in vitro. *J Virol* 1991; 65:5828-5838.

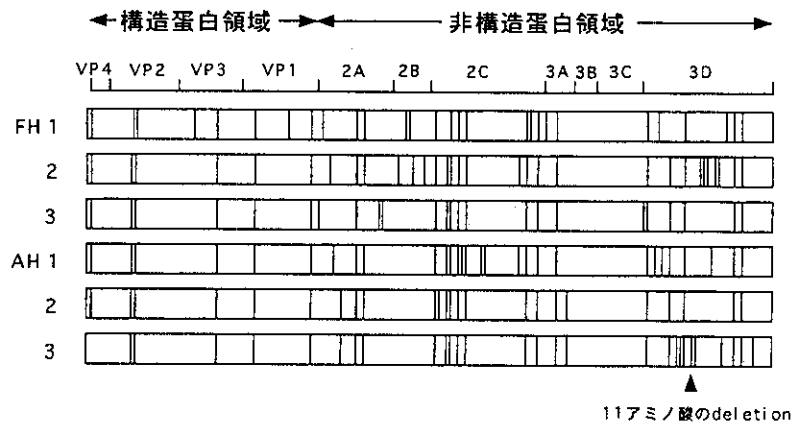
HAV genomeの増幅



5'NTRのヌクレオチド変異



蛋白翻訳領域のアミノ酸変異



3'NTRのヌクレオチド変異

```

7416                                     7478
HM 175 TGATTTGTTTAAACAATTTTCTTAAATTTCTGAGGTTTGTATTCTTTTATCAGTA AAT
FH 1 .....
  2 .....
  3 .....
AH 1 .....
  2 .....
  3 .....
    
```

各領域のヌクレオチド、アミノ酸変異数

| Region | FH | | | AH | | |
|-------------------------------|----|----|----|----|----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 5'NTR (734 nt) | 33 | 32 | 31 | 33 | 46 | 42 |
| Structural protein region | | | | | | |
| VP4 (23 aa) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| VP2 (222 aa) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| VP3 (246 aa) | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| VP1 (300 aa) | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Non-structural protein region | | | | | | |
| 2A (189 aa) | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 3 |
| 2B (107 aa) | 2 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2C (335 aa) | 7 | 8 | 7 | 11 | 8 | 7 |
| 3A (74 aa) | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 |
| 3B (23 aa) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3C (219 aa) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3D (489 aa) | 6 | 10 | 6 | 8 | 5 | 22* |
| 3'NTR (63 nt) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

非A非B非C型劇症肝炎患者の肝組織中の肝炎ウイルスとヘルペスウイルス族の検出とその臨床的意義

東京女子医科大学・消化器内科 林 直諒
 協同研究者：長谷川潔，石川賀代
 飯塚愛子，成富琢磨
 金井尚子，山内克巳

はじめに

劇症肝炎のなかには、未だにウイルス，自己免疫，薬剤などの原因となるagentが同定されない疾患群が存在する。これらのいわゆる非A非B非C型劇症肝炎は、直接その原因物質を標的とする効果的な治療ができず、このことが、劇症肝炎の内科的治療の限界の要因の一つとなっている。これまでに肝炎ウイルスのほか、cytomegalovirus (CMV)，herpes simplex virus (HSV)，Epstein-Barr virus (EBV)，human herpes virus-6 (HHV-6)などのヘルペスウイルス族も、劇症肝炎の起因ウ

ルスとなりうる可能性を示唆する報告がこれまでになされている¹⁻⁴⁾。また、PCR法を用いれば、いわゆる血清のウイルスマーカーが陰性の場合でも、肝組織内で、B型肝炎ウイルス (HBV) や、C型肝炎ウイルス (HCV) が検出されるとする報告もなされている⁵⁻⁶⁾。そこで我々は、非A非B非C型劇症肝炎の肝組織から核酸を抽出し、肝炎ウイルスや、ヘルペスウイルス族のウイルスの遺伝子の検出を試みた。また、特に陽性率の高かったHHV-6については、ウイルスの肝障害への関与をより明らかにするために、in situ hybridizationと免疫組織染色により、肝組織内でのHHV-6の局在を検討した。

対象と方法

血清のA型 (IgM型HA抗体)，B型 (HBs抗原，IgM型HBc抗体)，C型 (HCV抗体)の肝炎ウイルスマーカーがいずれも陰性で、薬剤性，自己免疫，代謝性疾患，アルコールなどの関与が否定された、非A非B非C型劇症肝炎11例と非A非B非C型急性肝炎10例を対象とした。DNAウイルスについては、凍結肝組織より、

proteinase K/chloroform法で、またRNAウイルスについては、グアニジン法でそれぞれ核酸を抽出し、PCR法に供した。HBVについては、coreとenvelopeの領域、HCV、HGVは、5'-NCRの領域内にprimerを設定し、また、ヘルペス族については、過去の報告⁷⁻¹⁰⁾に基づいてprimerを設定しPCRを行った。免疫組織染色は、HHV-6のgp110/50と、p101に対するモノクローナル抗体を用いて、ABCキット(DAKO)により、HHV-6のenvelope蛋白の局在を調べた。また、in situ hybridizationは、Kondoraの報告に基づき¹¹⁾、HHV-6のimmediate early gene locusにprimerを設定し、PCR法により、digoxigenine-labeled productを作成し、プローブとして用いた。

結 果

非A非B非C型劇症肝炎10例の肝組織について検討を行った(表1)。10例のうち、5例は小児、残りは成人例である。PCRの結果は、HBV、HCV、HGVについては、10例いずれも陰性で、CMVが2例に陽性、EBVが3例に陽性であった。HHV-6は、5例の小児いずれも陽性であり、成人の1例でも陽性と、計6例(60%)に認められた。HSVは1例のみに認められた。小児2例を含む非A非B非C型急性肝炎11例では、HCVが1例で陽性、HSVが3例で陽性、HHV-6が2例で陽性であった。CMV、EBVは1例も認められなかったが、HSVは3例で陽性であった(表2)。小児の急性肝炎2例では、いずれもHHV-6は陰性であった。どうじに、肝疾患以外で死亡した小児3例で、肝組織中のHHV-6を調べたが、いずれも陰性であった。また、control群として、IgMHBc抗体陽性のB型劇症肝炎4例について調べたところ、HSVが1例で認められたほかは、CMV、EBV、HHV-6はいずれも陰性であった(表3)。以上のように、非A非B非C型劇症肝炎で高率にHHV-6が陽性であることがわかった。そこで、HHV-6と肝障害との関連を調べることと、HHV-6の遺伝子の血清中のcontaminationによって陽性の結果が得られた可能性を除外するために、HHV-6が陽性であった、非A非B非C型劇症肝炎の肝組織を用いて、in situ hybridizationを行った。その結果、HHV-6 DNA、RNAともに、肝細胞の核に一致して陽性所見を得た(図1)。また、免疫組織染色では、HHV-6のgp110/50は、肝細胞の細胞質に局在していることがわかった(図2)。しかし、完全なウイルス粒子にのみ発現すると考えられているp101に対するモノクローナル抗体では、陽性所見は得られなかった(data not shown)。非A非B非C型劇症肝炎の中の1例(FH-1)は、劇症肝炎のために肝移植を受けて約40日後に、劇症肝炎が再発し死亡した症例である(図3)。この症例でも移植時の摘出肝を調べたところHHV-6が陽性であった。再発後の死亡時の剖検

肝を調べたところ、やはりPCRでHHV-6が陽性であった。そこで、摘出肝と剖検肝の両者についてHHV-6 RNAのin situ hybridizationを行ったところ、いずれの標本においても、肝細胞の核にHHV-6 RNAが存在した(図4)。
また、CMVに対するポリクローナル抗体で、FH-3の染色を行ったが、結果は陰性であった。

考 察

非A非B非C型劇症肝炎は、多くの場合、B型の劇症肝炎と比較して、症状の発現から意識障害の出現までの期間が長く、また救命率も低いことから、B型とは異なるウイルスによる可能性が以前から指摘されていた¹²⁾。また小児の非A非B非C型劇症肝炎も成人連と同様の経過をとることが報告されている¹³⁾。今回の我々の検討でも、非A非B非C型劇症肝炎10例のうちB、C、Gの肝炎ウイルスはいずれも検出されなかった。また全例で、HBs抗原、IgM-HBc抗体のほか、HBs抗体、HBc抗体も陰性であり、検討症例においては、HBVの関与の可能性は考えにくいと思われた。また、HCV、HGVの関与の可能性も低く、これらの結果は、非A非B非C型劇症肝炎において、HCVの関与がないとするMutimerらの報告に一致する¹⁴⁾。このように、非A非B非C型劇症肝炎では、既知の肝炎ウイルスの関与の可能性は低いものと考えられた。そこで我々は、これまでに劇症肝炎との関連が指摘されている、ヘルペスウイルス族について、非A非B非C型劇症肝炎との関連について検討を行った。その結果、非A非B非C型劇症肝炎10例のうち6例にHHV-6が陽性であり、また、CMV、EBVもそれぞれ2例、3例に陽性であった。HHV-6が陽性であった6例のうち5例は小児例であったが、周知のように、HHV-6は、ほとんどの小児に感染し、潜伏していることから、潜伏しているウイルスを検出しているだけで、肝障害には関与していない可能性も考えられた。ところが、肝障害を伴わない他疾患の死亡例3例や、小児の急性肝炎2例では、HHV-6が検出されないことから、HHV-6と劇症肝炎との関連が示唆された。そこでHHV-6の肝組織内の局在を調べる目的で、免疫染色と、in situ hybridizationを行ったところ、HHV-6 DNAは肝細胞の核に、RNAは、細胞質に局在していた。また、HHV-6のenvelope蛋白であるgp110/50も肝細胞の細胞質に存在していることから、HHV-6が、肝細胞内に存在し、ウイルス蛋白を発現していることが示された。HHV-6のp101は、nucleocapsid proteinであり、HHV-6の特異的なマーカーとして報告された¹⁵⁾。しかし、今回の検討では、p101に対する抗体を用いた免疫染色の結果、陰性であったことから、HHV-6は肝細胞内で、完全なウイルス粒子を産生している可能性は否定された。従って、HHV-6が肝障害を起こ

しているかどうかについては、今後、臨床経過を詳細に検討し、ウイルスに対する抗体価と肝障害の消長との関連を調べる必要がある。また、今回は、移植や、解剖症例であり、肝障害の終末像しか得られなかったために、病理学的に、壊死の部位や、多核巨細胞などHHV-6による病変を示唆する部位での検討が行えなかったが、今後は、上記の点をふまえて、病理学的な検討を詳細に行う必要がある。また、CMVは2例でPCR法でウイルスが検出されたが、抗体を用いた免疫組織染色では、陽性所見は得られなかった。従って、重篤な全身状態の患者に感染し、リンパ型の組織あるいは、末梢血中に存在するCMVをPCR法で検出した可能性が強く、CMVに起因する肝障害とはいえなかった。また、EBVが3例で陽性であったが、EBVの肝組織内の局在については、今後検討を加える予定である。

参考文献

- 1) Connor RW, Lorts G, Gilbert DN. Lethal herpes simplex virus type 1 hepatitis in a normal adult. *Gastroenterology* 1979; 76:590-594.
- 2) Markin RS, Linder J, Zuerlein K, Mroczek E, Grierson HL, Brichacek B, Purtilo D. Hepatitis in fatal infectious mononucleosis. *Gastroenterology* 1987; 93:1210-1217.
- 3) Mason A, Sallie R, Perrillo R, Rayner A, Dohner DE, Dehner M, Naoumov N, Gelb L, Saha B, O'Grady J, Williams R. Prevalence of herpesviridae and hepatitis B virus DNA in the liver of patients with non-A, non-B fulminant hepatic failure. *Hepatology* 1996; 24:1361-1365.
- 4) Tajiri H, Nose O, Baba K, Okada S. Fatal fulminant hepatitis in an infant with human herpesvirus-6 infection. *Lancet* 1990; 335:863.
- 5) Wright TL, Mamish D, Combs C, et al. hepatitis B virus and apparent fulminant non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1992; 339:952-5.
- 6) Hytioglou P, Dash S, Haruna Y, Fernandez M, Thiese ND, Schwartz M, Miller C. Detection of hepatitis B and hepatitis C viral sequences in fulminant hepatic failure of unknown etiology. *Am J Clin Pathol* 1995; 104:588-93.
- 7) Rogers BB, Josephson SL, Mak SK. Detection of herpes simplex virus using the polymerase chain reaction followed by endonuclease cleavage. *Am J Pathol* 1991; 139:1-6.
- 8) Shibata D, Martin WJ, Appleman MD, Causey DM, Leedom JM, Arnheim N. Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1988; 158:1185-1192.
- 9) Peiper SC, Myers JL, Broussard EE, Sixbey JW. Detection of Epstein-Barr virus genomes in archival tissues by polymerase chain reaction. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114:711-714.
- 10) Collandre H, Aubin JT, Agut H, Bechet JM, Montagnier L. Detection of HHV-6 by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1991; 31:171-179.
- 11) Kondo K, Hayakawa Y, Mori H, et al. Detection polymerase chain reaction amplification of human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood of patients with exanthem subitum. *J Clin Microbiol* 1990; 28:970-74.
- 12) Rochling FA, Jones WF, Chau K, Ducharme L, Mimms LT, Moore B, Scheffel J, Cuthbert JA, Thiele DL. Acute sporadic non-A, non-B, non-C, non-D, non-E hepatitis. *Hepatology* 1997; 25:478-483.
- 13) Lai ML, Chang MH, Hsu HY. Non-A, non-B, non-C hepatitis: Its significance in pediatric patients and the role of GB virus-C. *J Pediatr* 1997; 131:536-540.
- 14) Mutimer D, Shaw J, Neuberger J, Skidmore S, Martin B, Hubscher S, McMaster P. Failure to incriminate hepatitis B, hepatitis C and hepatitis E viruses in the aetiology of fulminant non-A non-B hepatitis. *Gut* 1995; 36:433-7.
- 15) Yamamoto M, Black J, Stewart J, Lopez C, Pellet P. Identification of a nucleocapsid protein as a specific serological marker of human herpesvirus 6 infection. *J Clin Microbiol* 1990; 28:1957-1962.

表1 非A非B非C型劇症肝炎患者の肝組織中のウイルスの検出

| | | HBV | HCV | HGV | CMV | EBV | HSV | HHV-6 |
|-------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
| FH-1 | 10M♂/M | - | - | - | + | - | - | + |
| FH-2 | 11/F | - | - | - | - | - | - | + |
| FH-3 | 13/M | - | - | - | - | + | - | + |
| FH-4 | 2/M | - | - | - | - | - | - | + |
| FH-5 | 44/M | - | - | - | + | - | - | + |
| FH-6 | 7/F | - | - | - | - | + | - | + |
| FH-7 | 51/F | - | - | - | - | + | - | - |
| FH-8 | 56/F | - | - | - | - | - | - | - |
| FH-9 | 26/F | - | - | - | - | - | - | - |
| FH-10 | 48/M | - | - | - | - | - | + | - |

表2 非A非B非C型急性肝炎患者肝組織中のウイルスの検出

| | | HBV | HCV | HGV | HSV | CMV | EBV | HHV-6 |
|-------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
| AH-1 | 36/M | - | - | - | - | - | - | + |
| AH-2 | 47/M | - | - | - | - | - | - | + |
| AH-3 | 21/F | - | - | - | - | - | - | - |
| AH-4 | 29/F | - | - | - | + | - | - | - |
| AH-5 | 26/M | - | - | - | + | - | - | - |
| AH-6 | 33/M | - | - | - | - | - | - | - |
| AH-7 | 52/M | - | - | - | - | - | - | - |
| AH-8 | 46/F | - | + | - | - | - | - | - |
| AH-9 | 13/M | - | - | - | + | - | - | - |
| AH-10 | 15/F | - | - | - | - | - | - | - |
| AH-11 | 27/M | - | - | - | - | - | - | - |

表3 B型劇症肝炎患者の肝組織中のウイルスの検出

| | | HBV | HCV | HGV | HSV | CMV | EBV | HHV-6 |
|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
| FH-1 | 70/M | + | - | - | + | - | - | - |
| FH-2 | 49/M | + | - | - | - | - | - | - |
| FH-3 | 65/M | + | - | - | - | - | - | - |
| FH-4 | 30/M | + | - | - | - | - | - | - |

図1 in situ hybridizationによるHHV-6の肝組織内の局在

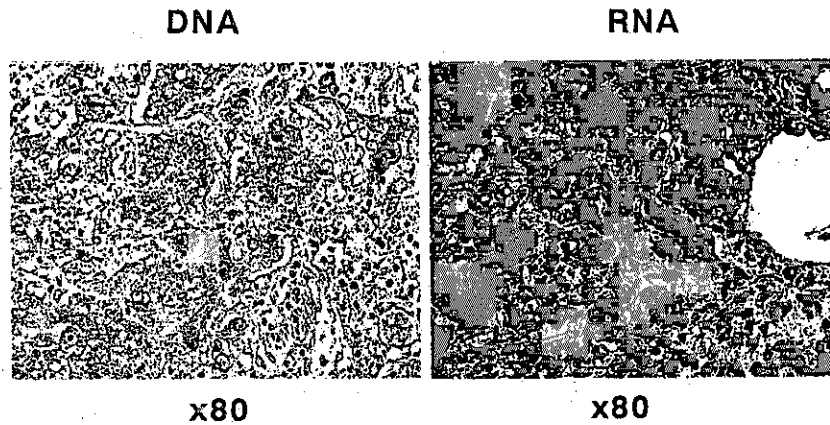


図2 HHV-6 envelope protein (gp110/50) の検出

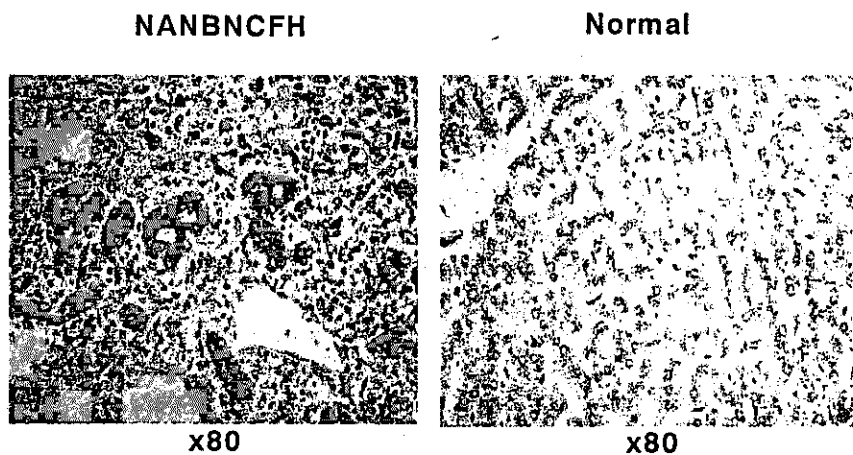


図3 Clinical Course of Case 1

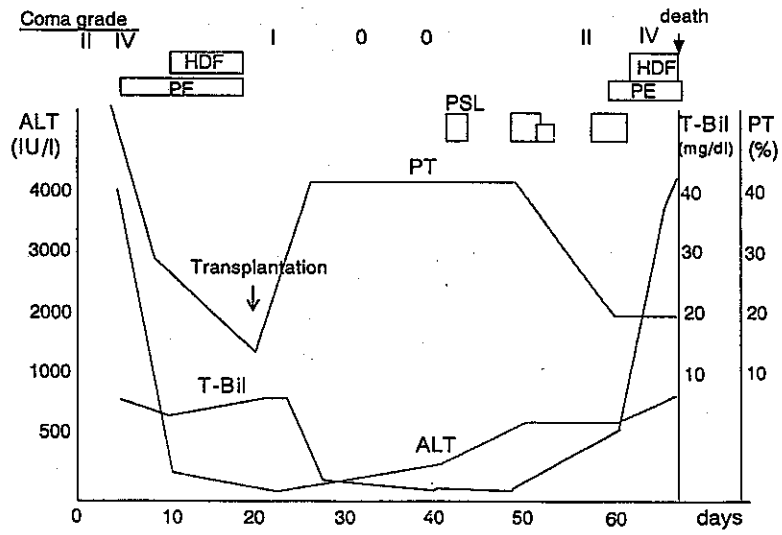
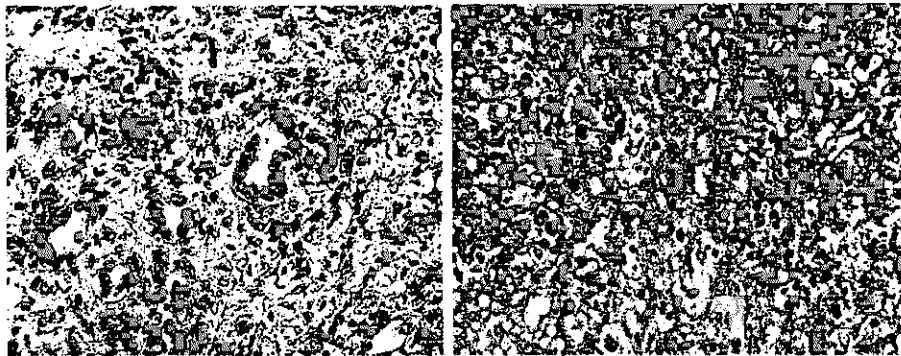


図4 肝移植後劇症肝炎を再発した症例における肝組織内HHV-6 RNAの検出

手術時摘出肝

再発後剖検肝



x100

x80