

平成 11 年度厚生科学研究費補助金
がん克服戦略研究事業

総括・分担研究報告書
ウイルスを標的とした発がん予防に関する研究

主任研究者 吉倉 廣

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）

総括研究報告書

分野4：発がんの予防に関する研究

ウイルスを標的とした発がん予防に関する研究

主任研究者 吉倉 廣 国立国際医療センター研究所長

研究要旨

HTLV-I感染者の長期追跡調査により、HTLV-I感染者の生涯発病率は男4.7%、女2.8%となった。HTLV-Iの母児感染防止のための短期授乳（6ヶ月間未満）で完全断乳に匹敵する感染予防効果が得られた。輸血におけるHIV、HBV、HCVのウインドウ・ピリオドによる感染が確認された。

C型肝炎ウイルス（HCV）コア蛋白とHCV RNAの相互作用をin vivoおよびin vitroで解析し、コア蛋白がHCV RNAの5'非翻訳領域および構造蛋白をコードする領域に特異的に作用し、ウイルスRNAの翻訳を特異的に抑制することを明らかにした。

HCVの感染性RNAをヒト血液由来細胞にトランスフェクトし、ウイルス産生細胞を得る場合、ウイルス増殖を持続させるには、細胞継代よりもウイルス継代の方が良いことが分かった。HCV特異的細胞障害性T細胞（CTL）の検討によりHCV特異的CTLは末梢血単核球の0.01~0.1%を占め、同一患者においても異なった抗原エピトープを認識する複数のHCV特異的CTLが存在することが判明した。

HPVの感染を予防するワクチンの開発をめざし、HPV6、16型を中心にキャプシド蛋白質（L1、L2）の抗原性を検討した。HPV6型L1遺伝子発現プラスミドの皮内接種によるDNAワクチンは、マウスに型特異的な中和抗体を誘導した。他方、HPV16型L2蛋白質のアミノ酸108-120の領域に結合する抗体は、複数のHPV型に有効である可能性が示された。

分担研究者

吉倉 廣	国立国際医療センター 研究所長
宮村達男	国立感染症研究所ウイルス第二部 部長
井廻道夫	自治医科大学附属大宮医療センター 教授
神田忠仁	国立感染症研究所遺伝子解析室 室長
田島和雄	愛知県がんセンター研究所疫学部 部長
十字猛夫	日本赤十字社中央血液センター 所長

A. 研究目的

ウイルスが原因となるヒトのがんは少なくない。特に子宮がんや肝臓がんは先進国、途上国何れに於いても大きな問題である。ウイルスによるがんの予防は感染防御と感染治療により、確実にできる事が大きな特徴である。従って、本研究班はヒトがんウイルスの感染予防・治療の研究を行う事を目的とした。

子宮がんの原因であるヒトパピローマウイルス、現在肝臓がんの主要原因であるC型肝炎ウイルスについて特に重点的に研究を行った。同時に、日赤の

輸血感染データを基にHTLV-1、B型及びC型肝炎ウイルス、がん誘発の素地となるHIV等の血液感染の動向のモニターを行った。又、HTLV-1の母子感染予防の為に介入試験をおこなった。

B. 研究方法

子宮がんの原因であるヒトパピローマウイルスについては、神田班員が担当した。感染性偽ウイルス粒子を作成し、これを抗原としたワクチン開発、或いは感染阻止抗体の検出法の開発を行った。肝臓がんの原因であるC型肝炎ウイルス（HCV）について

は、HCVの複製に関する研究を宮村、吉倉が担当し、本年度は宮村はウイルス粒子形成に関わるウイルス蛋白とゲノムRNAの相互作用の研究、吉倉は培養系の開発を担当した。HCVのCTL誘導を目指すワクチン開発は井廻が担当した。輸血のモニタリングによるヒトがんウイルスの疫学は日本赤十字社の十字班員が担当した。

(倫理面への配慮)

各研究班員が適切な処置をとっている(各研究班員報告書参照)。

C. 研究結果

人口45,000人のATLが好発する対馬のHTLV-I感染者の追跡調査から新たに感染する住民は少なく、全体に感染率は著しい低下傾向を示すことが明らかになった。HTLV-I感染者からATLの年間発病危険度は40歳以上の男で0.14%、女で0.08%となり、80歳までの生涯発病率は男4.7%、女2.8%となった。第二にATLの将来的予防を図るHTLV-Iの母児感染防止のため、人工乳と短期授乳による予防試験を実施した。その結果、短期授乳(6ヶ月間未満)で人工乳に匹敵する感染率低下が見られた。これは完全断乳が困難な開発途上国には朗報である。一方、妊婦のHTLV-I保有率が十年間で著しく低下(10%→3%)してきており、これは将来的に母子感染の予防的介入が不要となることを提示している。

1997年1月1日~1999年12月31日までの3年間に中央血液センターに報告された輸血との関連性のある症例のうち、医療機関からの副作用報告で、HBV158例、HCVが111例の計269例中、献血者の保管検体を用いたPCR検査で陽性となったのは、HBV20例、HCV3例の計23例であった。また、血漿分画原料プール前の500プールNATでは、HBV23例、HCV8例、HIV1例の計32例が確認された。新規献血者を対象とした調査から、若年層で、HBVとHCVの感染が顕著に減少していることが分かった。

医 HepG2細胞に組換えバキュロウイルスを用いてコア蛋白を発現させておき、その細胞にin vitroで合成したHCV遺伝子の種々の領域のセンスあるいはアンチセンスに対応するRNAをトランスフェクトした。細胞を溶解後、抗コア抗体を用いてコア蛋白とRNAの複合体を免疫沈降により回収し、その複合体からRNAを抽出して共沈したRNAを検出した。また、コア蛋白の発現がゲノムRNAの翻訳に及ぼす影響を調べるため、HCVのコア蛋白

を組換えバキュロウイルスを用いてHepG2細胞に発現させ、この細胞にHCVの5' UTRあるいはEMCVの5' UTRを持ったリポーターRNAをトランスフェクトし、細胞内で発現させたコア蛋白のリポーターRNAの翻訳に及ぼす影響を調べた。以上のようなin vivoのアッセイ系とは別に、精製したコア蛋白と合成オリゴヌクレオチドとの結合をBiosensorを用いてin vitroで解析した。このような解析の結果、コア蛋白がHCV RNAの5'非翻訳領域および構造蛋白をコードする領域に特異的に作用し、ウイルスRNAの翻訳を特異的に抑制することが明らかとなった。

血液細胞系を用いたHCV産生系の開発を行った。結果(1)RNAトランスフェクションにより効率のよいHCV増殖系は得られない、(2)細胞継代よりもウイルス(培養液)継代の方がウイルスの持続が良好である、(3)RNAサンプルをDNase処理しないと、HCVをコードするプラスミドDNAが染色体に組み込まれた細胞が得られ結論を誤る場合がある、等が分かった。ウイルス感染細胞の一部には蛋白の発現が著しく良いものがあり、電子顕微鏡の観察でも細胞が壊れる位ウイルス産生のよいもののある事が分かっている。細胞継代よりもウイルス継代の方がウイルス増殖には良い事も考えると、HCV感染細胞では何らかのネガティブフィードバックがかかっている可能性が示唆された。

HCVコア、E1、E2/NS1、NS2、NS3、NS4、NS5蛋白をそれぞれ感染細胞に発現する遺伝子組換えワクシニアウイルスを作製した。9例のC型肝炎患者の末梢血単核球をEBウイルスでトランスフォームし、CTLの標的細胞とするための各患者自己のB細胞株(BCL)を作製した。末梢血単核球を200細胞/ウェルで96穴プレートにまき、抗CD3抗体で刺激し、インターロイキン2存在下で2~3週間培養後、各ウェルの細胞のHCV蛋白を発現する遺伝子組換えワクシニアウイルス感染自己BCLに対する細胞障害活性を⁵¹Crリリース試験で検討した。各ウェルの細胞数に限りがあるため、標的細胞はコア蛋白を発現するBCL、E1とE2/NS1蛋白を発現するBCL、NS2とNS3蛋白を発現するBCL、NS4とNS5蛋白を発現するBCLの4群に分けて細胞障害試験を行った。その結果HCV特異的CTLの認識する抗原エピトープはHCV蛋白全体に分布していること、末梢血単核球の0.01~0.1%がHCV特異的CTLであることが明らかになった。HCV感染に対するDNAワクチンの開発のため平成9年度はHCV特異的CTLの活性化を促進するヘルパーT細胞

胞の抗原エピトープを明らかにした。

HPV は培養細胞で増殖しないため抗原の調製が難しく、また抗体による感染防御をモニターできないことがワクチン開発を困難にしてきた。今回、感染性偽ウイルスを試験管内で作る方法を開発し、抗体による HPV 感染の阻害を測定する実験系を作った。この系を使用し、マウスを HPV キャプシド抗原で免疫し得られた抗血清の感染中和活性を調べた。精製 L1 キャプシドを免疫した場合も、L1 遺伝子発現プラスミドを直接皮内接種 (DNA ワクチン) した場合も HPV の型特異的に感染中和抗体が誘導されることが示された。また、HPV16 型 L2 蛋白質のアミノ酸 108-120 領域に結合する抗体は HPV11 型の感染をも阻害出来ることが分かり、複数の型の HPV の感染性を中和し得る可能性のある事が分かった。

D. 考察

HTLV-I の母子感染が、短期授乳 (6ヶ月間未満) で完全断乳に匹敵する感染予防効果が得られた。これは断乳の困難な開発途上国で活用すべき知見である。

輸血後副作用調査及びブルックバックから HIV, HBV, HCV のウインドウ・ピリオドによる感染が確認され、その防止対策に minipool NAT が実施され、輸血用血液の安全性が強化された。

C 型肝炎患者において末梢血単核球の 0.01~0.1% を HCV 特異的 CTL が占め、同一患者においても異なった抗原エピトープを認識する複数の HCV 特異的 CTL が存在することが判明したことにより、HCV 特異的 CTL が認識する抗原エピトープおよびその HLA 拘束性を多数決定できる可能性が示された。この成果は HCV の排除を目的とした CTL を誘導するワクチン開発の基礎となるものと考えられる。

WHO の推定では、世界の女性のがんの 11% (45 万人) に HPV 感染が関わっているとされ、感染予防ワクチンの開発が求められている。抗 L1 抗体が HPV の型に特異的に感染中和活性を持つこと、抗 L2 抗体には複数の型を中和できるものがある事が判明し、感染性偽 HPV ウイルスの作成方法を含め、今後の HPV 感染予防ワクチンの開発に直接繋がることとなった。

E. 結論

HTLV-I 感染者の長期追跡調査により、HTLV-I 感染者の生涯発病率は男 4.7%、女 2.8% となった。

HTLV-I の母児感染防止のための短期授乳 (6ヶ月間未満) で完全断乳に匹敵する感染予防効果が得られる事がわかった。

C 型肝炎ウイルス (HCV) コア蛋白と HCV RNA の相互作用を *in vivo* および *in vitro* で解析し、コア蛋白が HCV RNA の 5' 非翻訳領域および構造蛋白をコードする領域に特異的に作用し、ウイルス RNA の翻訳を特異的に抑制することを明らかにした。

HCV の感染性 RNA をヒト血液由来細胞にトランスフェクトし、ウイルス産生細胞を得る場合、ウイルス増殖を持続させるには、細胞継代よりもウイルス継代の方が良いことが分かった。HCV 特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) の検討により HCV 特異的 CTL は末梢血単核球の 0.01~0.1% を占め、同一患者においても異なった抗原エピトープを認識する複数の HCV 特異的 CTL が存在することが判明した。

HPV の感染を予防するワクチンの開発をめざし、HPV6、16 型を中心に L1、L2 キャプシド蛋白質の抗原性を検討した。HPV6 型 L1 遺伝子発現プラスミドの皮内接種による DNA ワクチンは、マウスに型特異的な中和抗体を誘導した。他方、HPV16 型 L2 蛋白質のアミノ酸 108-120 の領域に結合する抗体は他の HPV 型の感染も阻止した。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka Y., Shimoike T., Ishii K., Suzuki T., Ushijima H., Mastuura Y., and Miyamura T. Interaction of HCV core protein with synthetic oligonucleotides. *Virology* (in press).
2. Shimoike T., Mimori S., Tani H., Matsuura Y., and Miyamura T. Specific interaction of core protein of hepatitis C virus with genomic RNA. *J. Virol.* 73, 9718-9725 (1999).
3. Fujie H., Yotsuyanagi H., Moriya K., Shintani Y., Tsutsumi T., Takayama T., Makuuchi M., Matsuura Y., Miyamura T., Kimura S., Koike K. Steatosis and intrahepatic hepatitis C virus in chronic hepatitis. *J. Med. Virol.* 59, 141-145 (1999).
4. Suzuki R., Suzuki T., Ishii K., Matsuura Y., and Miyamura T. Processing and function of hepatitis C virus proteins. *Intervirology*, 42, 145-152 (1999).
5. Sabile A., Perlemuter G., Bono F., Kohara K., Demaugre F., Kohara M., Matsuura Y., Miyamura

- T., Brechot C., and Barba G. Hepatitis C virus core protein binds to apolipoprotein AII and its secretion is modulated by fibrates. *Hepatology*, 30, 1064-1076 (1999).
6. Shoji I., Sato M., Suzuki T., Aizaki H., Chiba T., Matsuura Y., and Miyamura T. Internal Processing of Hepatitis C Virus NS3 Protein. *Virology*, 254, 315-323 (1999).
7. Nishimura Y., Kamei A., Uno S., Tamaki S., Kim G., Adachi Y., Kuribayashi K., Matsuura Y., Miyamura T., and Yasutomi Y. A single immunization with a plasmid encoding hepatitis C virus (HCV) structural proteins under the elongation factor 1- α promoter elicits HCV-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL). *Vaccine* 18, 675-680 (1999).
8. Matsushita, T., Ando, K., Kimura, K., Ohnishi, H., Imawari, M., Muto, Y. and Moriwaki, H. IL-12 induces specific cytotoxicity against regenerating hepatocytes in vivo. *Int. Immunol.*, 11:657-665 (1999).
9. Honda, A., Arai, Y., Hirota, N., Sato, K., Ikegami, J., Koizumi, T., Hatano, M., Kohara, M., Moriyama, T., Imawari, M., Shimotohno, K. and Tokuhisa T. Hepatitis C virus structural proteins induce liver cell injury in transgenic mice. *J. Med. Virol.* 59:281-289 (1999).
10. Kozuka, T., Aoki, Y., Nakagawa, K., Ohtomo, K., Yoshikawa, H., Matsumoto, K., Yoshiike, K., and Kanda, T.: Enhancer-promoter activity of human papillomavirus type 16 long control region isolated from cell lines SiHa and CaSki and cervical cancer biopsies. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91, 2000. in press.
11. Matsumoto, K., Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K., and Kanda, T.: DNA vaccination to mice with plasmid expressing human papillomavirus 6 major capsid protein L1 elicits type-specific antibodies neutralizing pseudovirions constructed in vitro. *J. Medical Virology*, 60, 200-204, 2000.
12. Kukimoto, I., Igaki, H., and Kanda, T.: Human CDC45 Protein Binds to Minichromosome Maintenance 7 Protein and the p68 Subunit of DNA Polymerase. *European J. of Biochemistry*, 265, 1-9, 1999.
13. Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K., and Kanda, T.: Common neutralization epitope in minor capsid protein L2 of human papillomaviruses 16 and 6. *J. Virol.* 73, 6188-6190, 1999.
14. Matsumoto, K., Yoshikawa, H., Yasugi, T., Nakagawa, S., Kawana, K., Nozawa, S., Hoshiai, H., Shiromizu, K., Kanda, T., and Taketani, Y.: Balance of IgG subclasses toward human papillomavirus type 16 (HPV 16) L1-capsids is a possible predictor for the regression of HPV-16 positive cervical intraepithelial neoplasia. *BBRC* 258, 128-131, 1999.
15. Takezaki, T., Tajima, K., Ito, M., Ito, S., Kinoshita, K., Tachibana, K., Yamashita, Y. and The Tsushima ATL Study Group: Short-term breast-feeding may reduce the risk of vertical transmission of HTLV-I. *Leukemia* 11 (Supple 3), 60-2, 1997.
16. Takezaki, T., Hirose, K., Hamajima, N., Kuroishi, T. and Tajima, K.: Estimation of adult T-cell leukemia incidence in Kyushu district from vital statistics Japan between 1983 and 1992: Comparison with a nationwide survey. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 27: 140-145, 1997.
17. Tajima, K. Worldwide distribution of HTLV. *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 1374-1375, 1998.
18. Tajima, K., Takezaki, T.: Human T-cell Leukemia Virus Type I. *Cancer Survey Vol. 33: Infections and Human Cancer.* eds, Weiss, R.B., Beral, V., Newton, R., pp191-211, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1999.
19. N. Nakajima, T. Sata, K. Hanaki, T. Kurata, and H. Yoshikura. 1999. Application of the hybridization AT-tailing method for detection of human immunodeficiency virus RNA in cells and simian immunodeficiency virus RNA in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *J. Virol. Methods* 81, 169-177
20. Y. Shimizu, M. Hijikata, T. Kiyohara, Y. Kitamura, and H. Yoshikura. 1999. Replication of GB virus C (Hepatitis G Virus) in interferon-resistant Daudi cells. *J. Virol.* 73, 8411-8414.
2. 学会発表
1. Tsutsumi T, Suzuki T, Shimoike T, Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Matsuura Y, Koike K, Miyamura T. : Identification of differentially expressed genes in hepatitis C

- virus core gene transgenic mice. 6th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. June, 1999, Bethesda, USA.
2. Moriya K., Fujie H., Shintani Y., Tsutsumi T., Yitsuyanagi T., Ishibashi K., Todoroki T., Watanabe K., Aoyama T., Suzuki T., Matsuura Y., Kimura S., Miyamura T., and Koike K. Expression pattern of lipid metabolic and mitochondrial enzymes in HCV core transgenic mouse liver. *ibid.*
 3. Shimoike T., Tani H., Aizaki H., Suzuki T., Matsuura Y., and Miyamura T. Expression of HCV core protein specifically suppresses its viral RNA translation. *ibid.*
 4. Tanaka Y., Ishii K., Shimoike T., Suzuki R., Suzuki T., Ushijima H., Matsuura Y., and Miyamura T. Interaction of HCV core protein with synthetic oligonucleotides. *ibid.*
 5. Arai M., Yasuda M., Yuasa S., Matsuura Y., and Miyamura T. A competitive inhibitor suppresses HCV NS3 protease activity in cells. *ibid.*
 6. 堤武也、鈴木哲朗、森屋恭爾、四柳宏、新谷良澄、藤江肇、松浦善治、小池和彦、宮村達男: C型肝炎ウイルスコア遺伝子トランスジェニックマウスにおける遺伝子発現の変化の解析 第57回日本癌学会総会, 平成11年10月, 広島
 7. 井廻道夫, 森山貴志, 金子隆志. ウイルス肝炎の発症病理. 第25回日本医学会総会 (シンポジウム ウイルス肝炎の病態と治療), 東京, 1999年4月3日.
 8. 中村郁夫, 井廻道夫, Cote PJ. Woodchuck (WC) - woodchuck hepatitis virus (WHV) neonatal infection model における WHV 感染の慢性化成立機序の研究. 第3回日本肝臓学会大会 (シンポジウム 肝免疫の新しい展開), 広島, 1999年10月29日.
 9. 川名 敬, 神田忠仁: HPV16型キャプシド蛋白質 L2には16型、6型に共通の感染防御抗体が結合するエピトープがある。第58回日本癌学会総会。
 10. 小塚拓洋, 神田忠仁: HPV16 転写調節領域 (LCR) の YY1 結合配列の変異による E6/E7 癌遺伝子の転写亢進。第58回日本癌学会総会。
 11. 柗元 巖, 神田忠仁: Human CDC45 Protein Binds to Minichromosome Maintenance 7 Protein and the p68 Subunit of DNA Polymerase. Cold Spring Harbor 会議
 12. Tajima, K.: Infection and Malignancy: HTLV-I, The 3rd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. US-Japan Cooperative Medical Science Program, Bali, Indonesia, March, 1998
 13. Tajima, K.: Ethnoepidemiologic approach to the risk factors of human cancers. US-Japan Workshop on Molecular Carcinogenesis and Molecular Epidemiology of Cancer. Hawaii, February, 1998
 14. 田島和雄、園田俊郎: ATLの民族疫学、日本リンパ網内系学会シンポジウム: ATL 20年、熊本、1998年5月
 15. Tajima, K., Takezaki, T.: Ethnoepidemiology of HTLV-I and its related diseases. 15th Asia Pacific Cancer Congress. Chennai, India, December
- F. 知的所有権の取得状況
なし。

研究要旨

HCV の感染性 RNA をヒト血液由来細胞にトランスフェクトし、ウイルス産生細胞を得る場合、ウイルス増殖を持続させるには、細胞継代よりもウイルス継代の方が良いことが分かった。

A. 研究目的

わが国人口の1%位がC型肝炎ウイルス(HCV)に感染していると云われ、途上国に目を転ずると人口の半分位が感染している場所も稀ではない。HCV感染の一部は肝硬変から肝がんに至り、その予防治療はがん制圧の上で非常に重要な問題である。HCV治療開発を遅らせている大きな原因として培養でこのウイルスが良く増殖せず、アッセイも容易でない事が挙げられる。我々は血液系の細胞がHCVの増殖をよくサポートする事を見出し、この系で中和抗体測定、抗ウイルス剤のアッセイなどが可能である事を示してきた。しかし、ウイルスの増殖度は十分でなかったため、今回は感染性RNAを用いより効率のよい系の確立を目指した。尚、本研究は国立感染症研究所/米国NIH清水洋子との共同研究によるものである。

B. 研究方法

米国NIHでクローンされ、チンパンジーで感染性の証明されているpCVH77に我々の以前の研究で血液細胞で増殖するHCVに特有である事が分かっている変異(清水ら、1998)を導入したpCVH77C-G107AをHCVクローンとして使用した。感染用の細胞としてはDaudi細胞及びMolt4細胞を使用した。

(倫理面への配慮)

チンパンジー実験は米国NIHで行われ、倫理審査を終えている。

C. 研究結果

pCVH77C-G107AをXbaI部位で開裂し、これよりT7RNAポリメラーゼにてRNAを転写し、リポフェクションによりRNAを導入した。Molt4にトランスフェクトした実験では、DNase Iで処理しない場合、T7プロモーターの上流を含む細胞由来

のプロモータから転写されたと思われる転写産物が検出され、DNA及びその転写産物は7ヶ月以上細胞から検出された。RNAは培養液からも検出されたが、次の細胞への感染性は証明されなかった。以上の事から、DNAが混在する条件でトランスフェクションを行うと、DNAが導入され転写されたRNAが培養液から検出されるような細胞が得られることが分かった。RNAが培養液から検出されるのは細胞が壊れそこにあるRNAが培養液に存在した為と思われるが、トランスフェクション実験ではDNAの除去が重要である事が示された。

他方、Daudi細胞を使用し、T7RNAポリメラーゼ転写産物をDNase I処理、未処理に分け、トランスフェクションし、後細胞を継代培養した。DNase処理しないものの方がHCVゲノムがDNAとして検出される期間が長かった(56日対28日)。トランスフェクション後、単に細胞を継代する場合と、濾過培養液を新しい細胞に感染させなが継代する場合とを比較した。図1のように細胞継代では20-70日位消失するのに対し培養液継代では100日以上持続し、恐らく無限に継代出来ると考えられた。また、典型的なHCVコア抗原の検出が可能であった。

D. 考察

培養細胞でのHCV感染/増殖が患者血清を使用したのでは効率が良くない為、RNAトランスフェクションでこの問題が解決出来るのではないかと考え、本実験を行った。結論として、(1)RNAトランスフェクションにより効率のよいHCV増殖系は得られない、(2)細胞継代よりもウイルス(培養液)継代の方がウイルスの持続が良好である、(3)RNAサンプルをDNase処理しないと、HCVをコードするプラスミドDNAが染色体に組み込まれた細胞が得られ結論を誤る場合がある、等が分かった。ウイルス感染細胞の一部には蛋白の発現が著しく良いものがある

り、電子顕微鏡の観察でも細胞が壊れる位ウイルス産生のよいものがある事が分かっている。細胞継代よりもウイルス継代の方がウイルス増殖には良い事も考えると、HCV 感染細胞では何らかのネガティブフィードバックがかかっている可能性が示唆された。

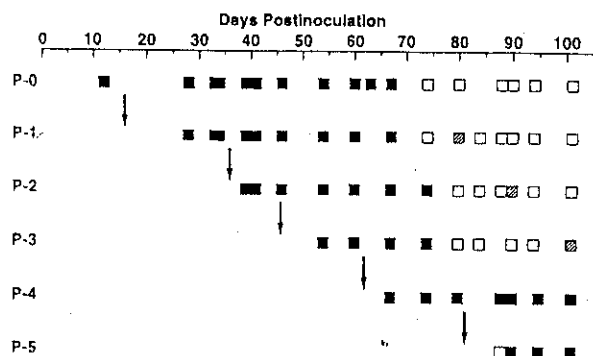
E. 結論

HCV の感染性 RNA をヒト血液由来 Daudi 及び Molt4 細胞にトランスフェクトし、ウイルス産生細胞を得る事が出来た。培養でウイルス増殖を持続させるには、細胞継代よりもウイルス継代の方が良いことが分かった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. N. Nakajima, T. Sata, K. Hanaki, T. Kurata, and H. Yoshikura. 1999. Application of the hybridization AT-tailing method for detection of human immunodeficiency virus RNA in cells and simian immunodeficiency virus RNA in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *J. Virol. Methods* 81, 169-177
2. Y. Shimizu, M. Hijikata, T. Kiyohara, Y. Kitamura, and H. Yoshikura. 1999. Replication of GB virus C (Hepatitis G Virus) in interferon-resistant Daudi cells. *J. Virol.* 73, 8411-8414.



厚生科学研究補助金（がん克服研究事業）
分担研究報告書

C型肝炎ウイルスコア蛋白の性状に関する研究

分担研究者 宮村達男 国立感染症研究所ウイルス第二部部長

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）のコア蛋白は、構造蛋白としての機能ばかりでなく、宿主細胞や他のウイルスの遺伝子発現の調節蛋白としての役割が注目されている。これまでに我々は、コア蛋白を発現しているトランスジェニックマウスが脂肪肝を発生し、さらに観察を続けると肝細胞癌を発症することを明らかにしてきた。今回は、コア蛋白とウイルス RNA の相互作用を *in vivo* および *in vitro* で詳細に解析した。その結果、コア蛋白が HCV RNA の 5' 非翻訳領域および構造蛋白をコードする領域に特異的に作用し、ウイルス RNA の翻訳を特異的に阻害することを明らかにした。

A. 研究目的

HCV コア蛋白は、塩基性アミノ酸に富むことや近縁ウイルスとの比較から、ウイルス粒子内でゲノム RNA と結合してヌクレオキャプシドを形成していると考えられている。我々はこれまでに、コア蛋白の細胞内での発現が細胞の形態や増殖様式や Fas 刺激によるアポトーシスの感受性に影響を与えること、またコア蛋白を発現するトランスジェニックマウスで脂肪肝が観察され、さらに長期に観察を続けると肝細胞癌を発症することを報告してきた。今回は、コア蛋白と HCV RNA の相互作用を *in vivo* および *in vitro* で解析した。

B. 研究方法

ヒト肝臓由来の HepG2 細胞に組換えバキュロウイルスを用いてコア蛋白を発現させておき、その細胞に *in vitro* で合成した HCV 遺伝子の種々の領域に対応するセンスあるいはアンチセンス RNA をトランスフェクトした。細胞を溶解後、抗コア抗体を用いてコア蛋白と RNA の複合体を免疫沈降により回収し、その複合体から RNA を検出した。また、コア蛋白のゲノム RNA の翻訳に及ぼす影響を調べるため、HCV のコア蛋白、エン

ペロープ蛋白、あるいは β -galactosidase (β -Gal) を組換えバキュロウイルスを用いて HepG2 細胞に発現させ、この細胞に HCV の 5' 非翻訳領域 (5'UTR) あるいは EMCV の 5' UTR を持ったリポーター RNA をトランスフェクトし、細胞内で発現させた蛋白質のリポーター RNA の翻訳に及ぼす影響を調べた。以上の様な *in vivo* のアッセイ系とは別に、組換えバキュロウイルスを用いて発現精製したコア蛋白と合成オリゴヌクレオチドとの結合を Biosensor を用いて *in vitro* で解析した。

(倫理面への配慮)

インフォームドコンセントを必要とするような人体材料は用いていない。

C. 研究結果と考察

全長の HCV RNA をトランスフェクトした場合にコア蛋白と RNA の共沈が観察されたが、全長のマイナス鎖 RNA を用いた場合にはコア蛋白との共沈は認められなかった。次に、HCV RNA の様々な領域を合成し、コア蛋白との共沈に必要な RNA 領域を検索した。その結果、5' 末端から E2 蛋白をコードする領域がコア蛋白との相互作用に重要であることが明らか

となった。また、Biosensor を用いた *in vitro* の結合試験では、5'UTR に存在するループ IIIId に精製コア蛋白が強く結合することが示された。

コア蛋白を発現させた細胞に HCV のレポーター RNA をトランスフェクトした場合、エンベロープ蛋白 や β -Gal を発現させた場合に比べルシフェラーゼ活性が約半分に抑制された。また、コア蛋白の発現量の増加に伴いルシフェラーゼ活性は減少した。一方、EMCV のレポーター RNA ではこの様な抑制効果は認められず、発現させた蛋白の違いに関係なく一定のルシフェラーゼ活性を示した。以上の結果から、HCV のコア蛋白は HCV の 5'UTR と構造蛋白をコードする配列に特異的に作用し、自身の RNA の翻訳を抑制していることが示唆された。

これまでに HCV のコア蛋白はアポトーシスに対する感受性の増強、脂肪代謝異常および他のウイルスプロモーターや宿主遺伝子の転写調節等の多岐にわたる活性を示すことが報告されている。今回得られたコア蛋白による自分自身の遺伝子 RNA の翻訳抑制は HCV の持続感染機構を考える上で興味深い。

D. 結論

コア蛋白とウイルス RNA の相互作用を *in vivo* で解析した結果、コア蛋白が HCV RNA の 5' UTR と構造蛋白をコードする領域に特異的に作用し、その翻訳を特異的に阻害することが示された。また、精製コア蛋白が 5' UTR のループ IIIId に結合することが *in vitro* のアッセイ系で示された。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Tanaka Y., Shimoike T., Ishii K., Suzuki T., Ushijima H., Matsuura Y., and Miyamura T. Interaction of HCV core protein with synthetic oligonucleotides. *Virology* (in press).
- 2 Shimoike T., Mimori S., Tani H.,

Matsuura Y., and Miyamura T. Specific interaction of core protein of hepatitis C virus with genomic RNA. *J. Virol.* 73, 9718-9725 (1999).

- 3 Fujie H., Yotsuyanagi H., Moriya K., Shintani Y., Tsutsumi T., Takayama T., Makuuchi M., Matsuura Y., Miyamura T., Kimura S., Koike K. Steatosis and intrahepatic hepatitis C virus in chronic hepatitis. *J. Med. Virol.* 59, 141-145 (1999).
- 4 Suzuki R., Suzuki T., Ishii K., Matsuura Y., and Miyamura T. Processing and function of hepatitis C virus proteins. *Intervirology*, 42, 145-152 (1999).
- 5 Sabile A., Perlemuter G., Bono F., Kohara K., Demaugre F., Kohara M., Matsuura Y., Miyamura T., Brechot C., and Barba G. Hepatitis C virus core protein binds to apolipoprotein AII and its secretion is modulated by fibrates. *Hepatology*, 30, 1064-1076 (1999).
- 6 Shoji I., Sato M., Suzuki T., Aizaki H., Chiba T., Matsuura Y., and Miyamura T. Internal Processing of Hepatitis C Virus NS3 Protein. *Virology*, 254, 315-323 (1999).
- 7 Nishimura Y., Kamei A., Uno S., Tamaki S., Kim G., Adachi Y., Kuribayashi K., Matsuura Y., Miyamura T., and Yasutomi Y. A single immunization with a plasmid encoding hepatitis C virus (HCV) structural proteins under the elongation factor 1-a promoter elicits HCV-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL). *Vaccine* 18, 675-680 (1999).

2. 学会発表

- 1 Tsutsumi T., Suzuki T., Shimoike T., Moriya K., Yotsuyanagi H., Shintani Y., Fujie H., Matsuura Y., Koike K., Miyamura T. : Identification of differentially expressed genes in hepatitis C virus core gene transgenic mice. 6th

- International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. June, 1999, Bethesda, USA.
- 2 Moriya K., Fujie H., Shintani Y., Tsutsumi T., Yitsuyanagi T., Ishibashi K., Todoroki T., Watanabe K., Aoyama T., Suzuki T., Matsuura Y., Kimura S., Miyamura T., and Koike K. Expression pattern of lipid metabolic and mitochondrial enzymes in HCV core transgenic mouse liver. *ibid.*
 - 3 Shimoike T., Tani H., Aizaki H., Suzuki T., Matsuura Y., and Miyamura T. Expression of HCV core protein specifically suppresses its viral RNA translation. *ibid.*
 - 4 Tanaka Y., Ishii K., Shimoike T., Suzuki R., Suzuki T., Ushijima H., Matsuura Y., and Miyamura T. Interaction of HCV core protein with synthetic oligonucleotides. *ibid.*
 - 5 Arai M., Yasuda M., Yuasa S., Matsuura Y., and Miyamura T. A competitive inhibitor suppresses HCV NS3 protease activity in cells. *ibid.*
 - 6 堤武也、鈴木哲朗、森屋恭爾、四柳宏、新谷良澄、藤江肇、松浦善治、小池和彦、宮村達男: C型肝炎ウイルスコア遺伝子トランスジェニックマウスにおける遺伝子発現の変化の解析 第57回日本癌学会総会, 平成11年10月, 広島

F. 知的所有権の取得状況
なし。

HCV 感染に対する DNA ワクチンの開発

分担研究者 井廻 道夫 自治医科大学医学部教授

研究要旨 C型肝炎患者末梢血単核球からC型肝炎ウイルス（HCV）特異的細胞障害性T細胞（CTL）のクローン化を試みた。限界希釈法により得られたT細胞株の検討によりHCV特異的CTLは末梢血単核球の0.01～0.1%を占め、同一患者においても異なった抗原エピトープを認識する複数のHCV特異的CTLが存在することが判明した。

A. 研究目的

HCV特異的CTLの認識する抗原エピトープとそのHLA拘束性を可能なかぎり多数決定し、それをもとにHCVの排除に重要なCTLを誘導するためのワクチンを開発し、C型慢性肝炎患者の治療に応用する。

B. 研究方法

HCVコア、E1、E2/NS1、NS2、NS3、NS4、NS5蛋白をそれぞれ感染細胞に発現する遺伝子組換えワクシニアウイルスを作製した。

9例のC型肝炎患者の末梢血単核球をEBウイルスでトランスフォームし、CTLの標的細胞とするための各患者自己のB細胞株（BCL）を作製した。

末梢血単核球を200細胞/ウェルで96穴プレートにまき、抗CD3抗体で刺激し、インターロキニン2存在下で2～3週間培養後、各ウェルの細胞のHCV蛋白を発現する遺伝子組換えワクシニアウイルス感染自己BCLに対する細胞障害活性を⁵¹Crリリース試験で検討した。

（倫理面への配慮）

この研究は自治医科大学大学附属大宮医療センターの研究倫理委員会の承認を得、患者からはインフォームドコンセントを得て行った。

C. 研究成果

各ウェルの細胞数に限りがあるため、標的細胞はコア蛋白を発現するBCL、E1とE2/NS1蛋白を発現するBCL、NS2とNS3蛋白を発現するBCL、NS4とNS5蛋白を発現するBCLの4群に分けて細胞障害試験を行った。その結果HCV特異的CTLの認識する抗原エピトープはHCV蛋白全体に分布していること、末梢血単核球の0.01～0.1%がHCV特異的CTLであることが明らかになった。

D. 考察

HCV特異的CTLはHCV増殖を抑制することが明らかにされている。従って、HCV特異的CTLを誘導するようなワクチンをC型慢性肝炎患者に対して治療的に使用できると考えられる。今回の検討で、C型肝炎患者末梢血中にはHCV蛋白の異なった部位を認識するCTLが存在し、それらをクローン化できる可能性が明らかになった。しかしながら、解析可能な安定したCTLクローンを樹立するには症例の選択とクローニング法の改良が必要と考えられる。

E. 結論

C型肝炎患者末梢血中にはHCV蛋白の異なった抗原部位を認識する複数のCTLが存在する。そのようなCTLをクローン化し、解析することは、HCV増殖を抑制する治療的ワクチン開発に寄与するものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Matsushita, T., Ando, K., Kimura, K., Ohnishi, H., Imawari, M., Muto, Y. and Moriwaki, H. IL-12 induces specific cytotoxicity against regenerating hepatocytes in vivo. *Int. Immunol.*, 11:657-665 (1999).

Honda, A., Arai, Y., Hirota, N., Sato, K., Ikegami, J., Koizumi, T., Hatano, M., Kohara, M., Moriyama, T., Imawari, M., Shimotohno, K. and Tokuhisa T. Hepatitis C virus structural proteins induce liver cell injury in transgenic mice. *J. Med. Virol.* 59: 281-289 (1999).

2. 学会発表

井廻道夫, 森山貴志, 金子隆志. ウイルス肝炎の発症病理. 第25回日本医学会総会（シンポジウム ウイルス肝炎の病態と治療）, 東京, 1999年4月3日. 中村郁夫, 井廻道夫, Cote PJ. Woodchuck

(WC) - woodchuck hepatitis virus (WHV)
neonatal infection model における WHV
感染の慢性化成立機序の研究. 第3回
日本肝臓学会大会 (シンポジウム 肝
免疫の新しい展開), 広島, 1999年10
月29日.

G. 知的所有権の取得状況
なし

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書

ヒトパピローマウイルスによる子宮頸がん発症機構の解明と感染予防に関する研究
分担研究者 神田忠仁 国立感染症研究所・遺伝子解析室・室長

高リスク型ヒトパピローマウイルス（HPV）の感染が子宮頸がん発症の原因となっている。そこで、HPVの感染を予防するワクチンの開発をめざし、キャプシド蛋白質（L1、L2）の抗原性を検討した。HPV6型L1遺伝子発現プラスミドの皮内接種によるDNAワクチンは、マウスに型特異的な中和抗体を誘導した。HPV16型L2蛋白質のアミノ酸108-120の領域に結合する抗体は、HPV6、16型偽ウイルスだけでなく、コンジローマ手術材料から分離したHPV11ウイルスの感染性も中和できた。L2蛋白質のこの領域は、ウイルスの細胞への結合、侵入に重要な機能を持つことが示唆され、この領域に結合する抗体を誘導するワクチンを開発すれば、複数の型のHPV感染予防に有効である可能性が示された。また、子宮頸がん細胞に見られるE6、E7蛋白質の継続的高発現を可能にする機構を検討し、HPVの転写調節領域（LCR）にあるYY1結合配列の変異がプロモーター活性の亢進を起こす例を見出した。これらの成績は、今後のHPV感染予防ワクチン開発と感染病変の治療・予後の推定に役立つ。

A. 研究目的

子宮頸がん発症の最大リスクファクターは、高リスク型ヒトパピローマウイルス（HPV）の感染である。そこで

1) 感染予防ワクチン開発を念頭に、HPV L1 キャプシドの免疫によって誘導される抗体を解析した。また、感染防御能を持つ抗L2抗体が結合する領域が担う機能について検討した。

2) 子宮頸がん細胞の増殖や悪性形質の維持に不可欠とされるHPV E6、E7遺伝子の継続的高発現をもたらす機構及び不明な点が多いゲノムの複製機構を調べ、感染細胞ががん化する初期過程を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) マウスをモデルに、精製L1キャプシドによる免疫及びL1発現プラスミドの皮内接種で血清中に誘導される抗体の特異性、感染中和活性を調べた。感染性偽ウイルスは、バキュロウイルスベクターで作成したL1/L2キャプシドに、レポーター遺伝子発現プラスミドを組み込む方法で作成し、抗体による感染阻害はレポーター遺伝子発現の有無で解析した。HPV11型ウイルス粒子は、巨大なコンジローマの手術材料から抽出、精製し、感染はウイルス初期遺伝子の発現をRT-PCRで検出する方法で検出した。

2) HPV E6、E7遺伝子の転写を制御する long control region (LCR) の変異が、がん細胞に特有な

E6、E7遺伝子高発現の原因の1つになりうると考え、子宮頸癌由来細胞株（SiHa、CaSki）及び51例の子宮頸癌生検材料に含まれるHPV16 LCRの塩基配列とエンハンサー・プロモーター活性を調べた。

HPVの複製は、HPV16 E1、E2蛋白質の発現プラスミドと複製開始点を細胞に導入し、細胞内で合成されるDNAをPCRで定量する方法で調べた。

（倫理面への配慮）

動物実験は全て国立感染症研究所において行われる動物実験に関する基本方針（昭和62年11月19日）に沿って、審査委員会に実験計画を申請し、許可を得て行っている。

C. 研究結果

1) HPV6型L1蛋白質を発現するプラスミドを使ったDNAワクチンでマウスに誘導される血清中の抗体は、L1-キャプシドを抗原とした場合と同様、立体構造を認識し、型特異的にL1-キャプシドに結合し、偽ウイルスの感染を阻害する活性を持っていた。

昨年までに、HPV16型L2蛋白質のアミノ酸108-120領域（ほぼ全ての粘膜型HPVのL2蛋白質のこの領域のアミノ酸配列は極めて良く似ている）に結合する2種のマウス単クローン抗体と、この領域と同じアミノ酸配列を持つ合成ペプチドをマウスに免疫して得た抗血清が、HPV6及び16型偽ウイルスの感染を阻害することを示したが、これらの抗

体はコンジローマ手術材料から分離した11型HPVの感染も阻害できることが判った。また、この108-120領域を付加したGFP（オワンクラゲから分離した蛋白質で蛍光を出す）はHeLa、SiHa、CaSki等の子宮頸癌由来細胞の表面に結合し、さらに細胞内部に侵入することがわかった。

2) LCRには多数の転写因子の結合配列と共に転写抑制因子であるYY1の結合配列が5カ所存在する。1コピーのHPV16ゲノムのみを組み込んでいるにもかかわらず、E6、E7蛋白質を高発現しているSiHaのLCRには38塩基対の欠失があり、エンハンサー・プロモータ活性が4-5倍亢進していた。この38塩基対の欠失によって5'側から2番目のYY1結合配列（YY1#5）が失われていた。子宮頸癌生検材料にもYY1#5に置換変異をもつLCRとYY1#5を含む3つのYY1結合配列を欠失したLCRが見つかり、これらのエンハンサー・プロモータ活性が亢進していることがわかった。

また、癌生検材料51例のLCRの塩基配列を調べたことから、我が国で多いHPV16のサブタイプがはじめて明らかになった。アジア型が35例（68.6%）、ヨーロッパ型が14例（27.5%）、アジア・アメリカ型が2例（3.9%）であり、東南アジアでは27.5%と報告されているアジア型が我が国では極めて多いことがわかった。LCRのエンハンサー・プロモータ活性はサブタイプ間で異なり、アジア型LCRはヨーロッパ型の約2~2.5倍の活性を示した。

HPVE1遺伝子とE2遺伝子をIRESを利用した1つのプラスミドで発現させ方法で、HPVの複製を定量的に調べることができるようになった。

D. 考察

1) HPVは遺伝子型で80以上の型に分けられている。各型のHPVに対して個別のワクチンを用意することが容易な点を考慮すると、L1遺伝子発現プラスミドを用いるDNAワクチンは実用的な感染予防ワクチンの候補である。

HPV6、16型の偽ウイルスの感染性を中和する抗L2抗体は、コンジローマ手術材料から分離したHPV11の感染性も阻害した。昨年までに開発した偽ウイルスを使った実験系の有用性とHPV16L2蛋白質のアミノ酸108-120領域にあるエピトープを認識する抗体が複数の型のHPVの感染性を中和できる可能性が一層確実なものとなった。

L2蛋白質のこの領域がもつ細胞表面への結合、細胞内への侵入機能はHPVの感染成立に必要で、それを抗体の結合で阻害することが抗L2抗体によ

る感染阻止の機構であると推定し、この領域に結合するIgA及びIgG抗体をヒトに誘導し複数の型のHPV感染を予防できるワクチンの開発をめざしている。

2) HPV16LCR内のYY1#5の機能を失うことで生じるエンハンサー・プロモータ活性の増大がHPVによる子宮頸がん発症に寄与している可能性が示唆された。また、LCRのエンハンサー・プロモータ活性が高いアジア型が多いことが、我が国の子宮頸がん発症率に寄与している可能性がある。

昨年までの研究から、皮膚基底層に感染したHPVの複製はE6蛋白質とhMCM7蛋白質の会合を介して、細胞DNA複製の制御に同調し、小規模なゲノムの複製を繰り返していると推定される。この持続感染の時期にHPVゲノムが組み込まれた細胞の一部が将来がん化すると考えられるので、高リスクHPVの複製制御機構の詳細な解析が、子宮頸がん発症の初期過程を知るために重要である。

E. 結論

- 1) HPVのL1遺伝子発現プラスミドによるDNAワクチンは、型特異的な中和抗体を誘導する。
- 2) HPV6、11、16型に共通な感染中和抗体が結合するL2蛋白質のアミノ酸108-120の領域は、細胞に結合、侵入する機能を持つ。
- 3) 子宮頸がん細胞に見られるE6、E7蛋白質の高発現は、LCRの変異でもたらされる場合がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kozuka, T., Aoki, Y., Nakagawa, K., Ohtomo, K., Yoshikawa, H., Matsumoto, K., Yoshiike, K., and Kanda, T.: Enhancer-promoter activity of human papillomavirus type 16 long control region isolated from cell lines SiHa and CaSki and cervical cancer biopsies. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91, 2000. in press.
- 2) Matsumoto, K., Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K., and Kanda, T.: DNA vaccination to mice with plasmid expressing human papillomavirus 6 major capsid protein L1 elicits type-specific antibodies neutralizing pseudovirions constructed in vitro. *J. Medical Virology*, 60, 200-204, 2000.

- 3) Kukimoto, I., Igaki, H., and Kanda, T.:
Human CDC45 Protein Binds to
Minichromosome Maintenance 7 Protein and
the p68 Subunit of DNA Polymerase.
European J. of Biochemistry, 265, 1-9, 1999.
- 4) Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y.,
Yoshiike, K., and Kanda, T.: Common
neutralization epitope in minor capsid protein
L2 of human papillomaviruses 16 and 6. J.
Virol. 73, 6188-6190, 1999.
- 5) Matsumoto, K., Yoshikawa, H., Yasugi, T.,
Nakagawa, S., Kawana, K., Nozawa, S.,
Hoshiai, H., Shiromizu, K., Kanda, T., and
Taketani, Y.: Balance of IgG subclasses toward
human papillomavirus type 16 (HPV 16)
L1-capsids is a possible predictor for the
regression of HPV-16 positive cervical
intraepithelial neoplasia. BBRC 258, 128-131,
1999.

2. 学会発表

- 1) 川名 敬、神田忠仁：HPV16型キャプシド蛋白質 L2 には 16 型、6 型に共通の感染防御抗体が結合するエピトープがある。第 58 回日本癌学会総会。
- 2) 小塚拓洋、神田忠仁：HPV16 転写調節領域 (LCR) の YY1 結合配列の変異による E6/E7 癌遺伝子の転写亢進。第 58 回日本癌学会総会。
- 3) 柗元 巖、神田忠仁：Human CDC45 Protein Binds to Minichromosome Maintenance 7 Protein and the p68 Subunit of DNA Polymerase. Cold Spring Harbor 会議

G. 知的所有権の取得

なし。

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）

分担研究報告書

長崎県離島（対馬、上五島）におけるATLの予防：HTLV-Iの母児感染予防とキャリアーの追跡調査

分担研究者 田島 和雄 愛知県がんセンター研究所疫学部長

協力研究者 木下研一郎、立花一憲（対馬いづはら病院）、山下義文（上対馬病院）

要旨

対馬は人口45,000人のATLが好発する島の一つである。また、HTLV-Iの感染率は部落ごとに異なり（2～50%）、それは人の移動史に繋がる世界のHTLV-Iの地理分布の縮図と言える。本研究では第一に、HTLV-I感染者の追跡調査から新たに感染する住民は少なく、全体に感染率は著しい低下傾向を示すことが明らかになった。HTLV-I感染者からATLの年間発病危険度は40歳以上の男で0.14%、女で0.08%となり、80歳までの生涯発病率は男4.7%、女2.8%となった。第二にATLの将来的予防を図るHTLV-Iの母児感染防止のため、人工乳と短期授乳による予防試験を実施した。その結果、短期授乳（6ヶ月未満）で人工乳に匹敵する感染率低下が見られた。これは完全断乳が困難な開発途上国には朗報である。一方、妊婦のHTLV-I保有率が十年間で著しく低下（10%→3%）してきており、これは将来的に母子感染の予防的介入が不要となることを提示している。

A. 研究目的

1) HTLV-I感染者の経年変動と関連疾患の罹患リスクを評価する。それは世代間で著しい差を示す感染率とその背景要因を明らかにする研究として重要と考える。

2) HTLV-Iの母児感染予防の効率的方法を確立するため、授乳管理による予防試験を実施する。特に、完全断乳の困難性を考慮すると短期授乳の予防可能性を明らかにすることは国際的に意義深い。

B. 研究方法

1) 追跡調査：世代間における感染リスクの変動を明らかにするため、30歳以上の住民検診に参加した集団を対象に、性・年齢群別にみたHTLV-I感染率を過去十年間（1984-88年から1994-98年まで）で比較検討する。一方では、HTLV-I感染者のATL発病危険度を評価する。

2) 予防試験：妊婦の抗HTLV-I抗体を妊娠30週までに検索し、感染妊婦に対しては断乳、または短期授乳（6ヶ月未満）を促し、児のHTLV-I感染状況を2歳児まで追跡して感染危険度を評価する。

（倫理面への配慮）

1) ATL好発地域である対馬においては1984年からATL研究会を発足させ、研究実施に関する倫理的諸問題についても常に検討してきた。過去十年間は老人保健法に基づく住民検診における一連の検査内容として、抗HTLV-I抗体に関する検査を断続的に実施してきた。そして、検診結果の総合的評価を下す場において、個々の検査結果を必要に応じて住民に説明しながら還元してきた。

2) HTLV-Iの母児感染予防のための試験研究では、母親本人に研究の意義と重要性、ATLの疫学的知見などについて十分に説明し、本人が研究への参加を納得した上で授乳形態を選択してもらい、試験を開始した。授乳停止方法や採血などに関しても安全性を十分に配慮しながら実施してきた。また、研究への参加は実施中いつでも放棄できるように説明した。

C. 研究結果

1) 非感染者の中で新たに感染したものが少数見られ（表1）、その陽転化率は約0.1%（/1,000人/年）と推測された（表2）。1984-88年時に比べて1994-98年時には検診への受診者数が激減しているため両期間の性・年齢群別陽性率の分布を直

接比較することは出来ないが、両期間ともに受診したものについてのみ検討していくと、陽性率の分布はほぼ出生コホート群でのみ変動しており、新たな感染は希だった。

HTLV-I感染者におけるATLの年間推定発病危険度は男で1000人対1.38、女で0.76となり、平均余命を基準とした80歳までの生涯発病危険度は男で4.7%、女で2.8%となった(表3)。

2) HTLV-Iの母児感染予防試験では、妊婦の感染率が近年著しい低下傾向を示しており(表4)、2歳児まで観察した断乳(人工乳)群、授乳群の感染率はそれぞれ、2.1%、13.9%であった。授乳群でも長期授乳群(6ヶ月以上)は22.4%と高くなるが、短期授乳群では4%と、完全断乳群なみに低下していた(表5)。

D. 考察

1) ATL好発地域の集団内において、HTLV-I感染の経年変動やATLの罹患危険度などについて疫学的に把握できる対象は日本国内でも限られており、国際的にはほとんど存在しない。従って、上記のようなHTLV-I感染率やATL発病率などに関する疫学的知見を明らかにすることは重要と考える。日本ではHTLV-Iの年齢群別感染率が世代を経ることにより明らかに低下しており、それは背景にある感染危険要因の経時的変動を示していると考えられる。その最も大きな要因として上げられるのが、日本で昭和30年代から出現してきた人工乳による授乳期間の相対的な短縮である。

2) ATLの最も効果的な一次予防対策であるHTLV-Iの母児感染予防は完全断乳のみならず、短期授乳(6ヶ月未満)により可能であることを疫学的に示した。一方、高危険群と考えられる母親(完全断乳でも感染、あるいは複数児に感染)を同定しながら公衆衛生学的に効率的な母児感染予防を目指した介入方法を検討することも重要と考える。それは将来的にATLの発病予防にも繋がる重要な研究課題である。つまり、HTLV-I感染者の中で血中ウイルス量の多い高危険群を同定し、抗ウイルス作用を有する物質により血中ウイルス量を減少させることができれば、第三者への感染防止のみならず本人のATL発病予防も図ることが可能となるであろう。

E. 結論

1) 対馬におけるHTLV-Iの感染率は各部落ごとに異なり(2~50%)、それは人の移動史にも繋がっており、日本文化論からみても極めて興味深い

知見と言える。さらに、HTLV-I感染者の長期追跡調査により新たに感染する成人が少なく、全体に感染率は低下傾向を示すことが明らかになった。また、HTLV-I感染者の生涯発病率は男4.7%、女2.8%となった。

2) ATLの将来的予防を図るHTLV-Iの母児感染防止のための予防試験は意義深いと考える。結果的に短期授乳(6ヶ月未満)で完全断乳に匹敵する感染予防効果が得られた。これは断乳の困難な開発途上国にとって朗報と言える。

F. 研究発表

1. 論文発表(関連研究)

1) Takezaki, T., Tajima, K., Ito, M., Ito, S., Kinoshita, K., Tachibana, K., Yamashita, Y. and The Tsushima ATL Study Group: Short-term breast-feeding may reduce the risk of vertical transmission of HTLV-I. *Leukemia* 11 (Supple 3), 60-2, 1997.

2) Takezaki, T., Hirose, K., Hamajima, N., Kuroishi, T. and Tajima, K.: Estimation of adult T-cell leukemia incidence in Kyushu district from vital statistics Japan between 1983 and 1992: Comparison with a nationwide survey. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 27: 140-145, 1997.

3) Tajima, K. Worldwide distribution of HTLV. *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 1374-1375, 1998.

4) Tajima, K., Takezaki, T.: Human T-cell Leukemia Virus Type I. *Cancer Survey Vol. 33: Infections and Human Cancer.* eds, Weiss, R.B., Beral, V., Newton, R., pp191-211, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1999.

2. 学会発表

1) Tajima, K.: Infection and Malignancy: HTLV-I, The 3rd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. US-Japan Cooperative Medical Science Program, Bali, Indonesia, March, 1998

2) Tajima, K.: Ethnoepidemiologic approach to the risk factors of human cancers. US-Japan Workshop on Molecular Carcinogenesis and Molecular Epidemiology of Cancer. Hawaii, February, 1998

3) 田島和雄、園田俊郎: ATLの民族疫学、日本リンパ網内系学会シンポジウム

: ATL 20年、熊本、1998年5月

4) Tajima, K., Takezaki, T.: Ethnoepidemiology of HTLV-I and its related diseases. 15th Asia

表1) 長崎県下対馬の抗HTLV-I抗体陰性者の中で陽転の確認された者の分布

居住地 コード	登録番号	性 年齢 (1986年時)		検索年次		陽転年齢
				最終陰性確認	陽転確定	
25	382	男	54	1987	1994	62
13	125	男	56	1987	1994	57
10	116	女	50	1988	1994	58
14	612	女	55	1988	1994	63
14	748	女	43	1987	1998	54
17	257	女	49	1987	1994	57
17	338	女	57	1994	1998	68
24	12	女	38	1989	1998	49
29	77	女	46	1986	1994	54
29	158	女	54	1988	1994	62

表2) 対馬の同一集団における抗HTLV-I抗体の性・年齢群別陽転化率

年齢 (歳)	1985年		1995年		陽転化率		陽転化率*			
	対象数		陽性者		陽転者		(／年／100)			
	男	女	男	女	男	女	男	女		
30-39	23	64	4	5	0	1	0.00	0.17	0.00	0.16
40-49	62	146	7	18	1	3	0.18	0.23	0.16	0.21
50-59	94	237	18	48	1	4	0.13	0.21	0.11	0.17
60-69	74	96	6	18	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
合計	253	543	35	89	2	8	0.09	0.18	0.08	0.15

*陽性者も含む全集団における陽転化率

表3) 対馬における性・年齢群別に推定したATLの罹患数、およびHTLV-I感染者における年間、累積罹患率(1988-95年、対1,000人、人口は1990年)

年齢 (歳)	男				女			
	罹患数	感染数	罹患率	累積率#	罹患数	感染数	罹患率	累積率#
40-59	10	1,250	1.00	—	9	1,560	0.72	—
60-74	7	660	1.33	—	7	1,230	0.71	—
≥75	7	260	3.37	—	2	640	0.59	—
合計	24	2,170	1.38	4.7	19	3,130	0.76	2.8

#: 80歳まで累積したリスク (%)

表4) 長崎県対馬、上五島の妊婦の
HTLV-I感染率の経年変動(1986-99)

検査年 (西暦)	陽性数/総数(%)	
	対馬	上五島
1986	34/ 370 (9.2)	38/ 246 (15.4)
1987	30/ 452 (6.6)	24/ 302 (7.9)
1988	27/ 326 (8.3)	45/ 425 (10.6)
1989	23/ 328 (6.8)	34/ 399 (8.5)
1990	22/ 359 (6.1)	36/ 403 (8.9)
1991	26/ 378 (6.9)	36/ 407 (8.8)
1992	19/ 326 (5.8)	21/ 400 (5.3)
1993	13/ 345 (3.8)	25/ 350 (7.1)
1994	15/ 321 (4.7)	19/ 400 (4.8)
1995	12/ 341 (3.5)	11/ 327 (3.4)
1996	14/ 318 (4.4)	11/ 310 (3.5)
1997	26/ 399 (5.9)	13/ 286 (4.5)
1998	15/ 455 (3.6)	19/ 297 (6.4)
1999*	12/ 345 (3.4)	17/ 217 (7.8)

* 1999/11/16現在

表5) 下対馬、上五島におけるHTLV-I感染への予防研究と
授乳型別抗HTLV-I抗体陽性率(二歳児における検査)

授乳タイプ	陽性児/総数 (%)
人工乳群	4/195 (2.1)*
母乳継続群	15/108 (13.9)*
6ヶ月未満	2/50 (4.0)#
6ヶ月以上	13/58 (22.4)#
合計	19/303 (6.3)

* # : 二群間の差は統計学的有意(P<0.05)