

HCV受容体（候補はあるが未同定）を探る意味においても重要な知見になるものと思われる。

(2) 今回、コア蛋白質によるIFN誘導遺伝子の活性化はISREを介していることを明らかにしたが、ISREのconsensus配列よりも2'-5'-OAS遺伝子に存在しているようなvariant配列に強く作用することは、予想外であった。これまでに、コア蛋白質による2'-5'-OAS遺伝子の活性化はHCVの増殖レベルの自己調節機構に関与しているのではないかと推定していたが、今回、コア蛋白質によるADAR1遺伝子プロモーターの活性化を見出したことは、コア蛋白質は2'-5'-OAS遺伝子のみならず、RNA editing 酵素として知られているADAR1遺伝子をも動員している可能性を示唆するものとして興味深い。今後は、これらの点を実験的に証明していくことが必要であると思われる。しかし、ヒト不死化肝細胞で見出したこのような現象は、残念なことに、最近我々がHCVゲノムの自己複製細胞として樹立したHCVレプリコン細胞では認められないことから、ヒト不死化肝細胞を基にしたHCVレプリコン細胞の樹立が必要と考えられる。Huh7肝癌細胞から由来しているHCVレプリコン細胞はIFNに対する応答性を低いことから、IFNによる活性化機構も正常に作用していない可能性がある。

コア蛋白質のN末端部20アミノ酸が2'-5'-OAS遺伝子プロモーターの活性化に重要であることが今回明らかになったが、この領域はHCV遺伝子型間でも高度に保存されていることから、これまでの結果を支持するものである。これまでの結果から、この20アミノ酸の部分を通じて、ISREの活性化に関与する何らかの蛋白質と会合するのではないかと予想される。最も、可能性の高い分子としては、STAT1であるが、現在までのところ、コア蛋白質により、STAT1遺伝子の発現が高進するとか、STAT1のリン酸化状態が高進するというような現象は認められていない。今後は、インターフェロン受容体遺伝子に及ぼす影響や、STAT1,STAT2への直接的相互作用について検討する予定である。

E. 結論

(1) マルトース結合蛋白質との融合蛋白質として大腸菌で発現させたヒトLFの600-632番目の33アミノ酸がHCV E2蛋白質に結合して、ヒト肝細胞におけるHCV感染に対する防御活性を有することを明らかにした。

(2) HCVコア蛋白質がISREを介してIFNにより発現誘導される遺伝子を活性化すること

とコア蛋白質のアミノ末端部20アミノ酸がこの活性化に必須であることを明らかにした。コア蛋白質はISREのconsensus配列よりも2'-5'-OAS遺伝子に存在するようなvariant配列に対して強く作用することを見出した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Nozaki, A., Ikeda, M., Naganuma, A., Nakamura, T., Inudoh, M., Tanaka, K., and Kato, N. Identification of a lactoferrin-derived peptide possessing binding activity to hepatitis C virus E2 envelope protein. *J. Biol. Chem.* (2003) in press.
2. Kishine, H., Sugiyama, K., Hijikata, M., Kato, N., Takahashi, H., Noshi, T., Nio, Y., Hosaka, M., Miyanari, Y. and Shimotohno, K. The replication of subgenomic RNA derived from MT-2C cells infected with hepatitis C virus in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (2002) 293, 993-999.
3. Hara, K., Ikeda, M., Saito, S., Matsumoto, S., Numata, K., Kato, N., Tanaka, K. and Sekihara, H. Lactoferrin inhibits hepatitis B virus infection in cultured human hepatocytes. *Hepatology Res.* (2002) 24, 228-235.
4. Nozaki, A. and Kato, N. Quantitative method of intracellular hepatitis C virus RNA using LightCycler PCR. *Acta Med. Okayama*, (2002) 56, 107-110.
5. Alam, S.S., Nakamura, T., Naganuma, A., Nozaki, A., Nouse, K., Shimomura, H. and Kato, N. Hepatitis C virus quasispecies in cancerous and noncancerous hepatic lesions: The core protein-encoding region. *Acta Med. Okayama*, (2002) 56, 141-147.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分担研究報告書

肝疾患におよぼす HCV タンパク質の機能解析

分担研究者 下遠野 邦忠 京都大学ウイルス研究所

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）感染による肝疾患を予防及び治療する目的でウイルスタンパク質のウイルス複製および細胞増殖に及ぼす機能の解析を行った。本年は特にウイルス構造タンパク質の一つであるコアが核内受容体を介した転写活性化に重要な働きをしていることを見いだした。また、ウイルスの複製を模擬するウイルスの部分的なゲノム複製細胞を構築してその細胞におけるHCVの複製解析をした。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）は肝炎発症、および肝がん発症の危険因子のひとつである。HCV感染がどのようにしてこれらの疾患を誘発するかについての知見を得るために、ウイルスタンパク質が細胞の増殖に及ぼす影響を明らかにすることを目的にする。また、ウイルス感染予防の目的で複製機構を理解して感染防御法を確立するために、ウイルスゲノムの複製系を構築しその細胞における増殖の特徴を解明する。

B. 研究方法

(1) HCV 蛋白質のうちコアを発現する細胞を構築する。その際に、コアタンパク質の発現量の異なる細胞を数種類得る。このことにより、コアタンパク質の発現量そのものによる効果を容易に判定できるようにする。このコア発現細胞を種々の薬剤で処理することにより細胞の増殖変化を解析する。

(2) コアタンパク質に結合する細胞側因子の探索。

コアタンパク質をベイトにして酵母 two-hybrid を行う。その結果結合が足される候補タンパク質について機能解析を行う。

(3) HCVゲノムの自己複製可能な細胞を構築し、それを用いて複製機構の素反応を解析する。得られた情報を抗ウイルス剤開発に役立て

る。

C. 研究成果

(1) コアたんぱく質を発現する産生する細胞株の構築。

コアタンパク質を発現するプラスミドを導入した人由来の細胞株 MCF-7 を解析し、コアタンパク質の発現量の異なるクローンを数種類樹立した。これらの細胞ではウエスタンブロット法でコアタンパク質発現が確認されると同時にクローン毎に発現の量も異なることが確認された。

(2) コアタンパク質と会合する新規タンパク質の解析

コアタンパク質による細胞増殖制御機構を明らかにするために酵母の系を用いた Two-Hybrid system を持いて会合する新たな細胞性因子を同定した。会合する新規候補タンパク質として9種類得たが、そのうちの1種類について解析を進めた。本タンパク質は Sp110b としてデータベースには報告されているが機能が不明である。しかし、類似のタンパク質の機能が報告されていたのでそれを参考にしながら解析を進めた。その結果以下のことが明らかになった。

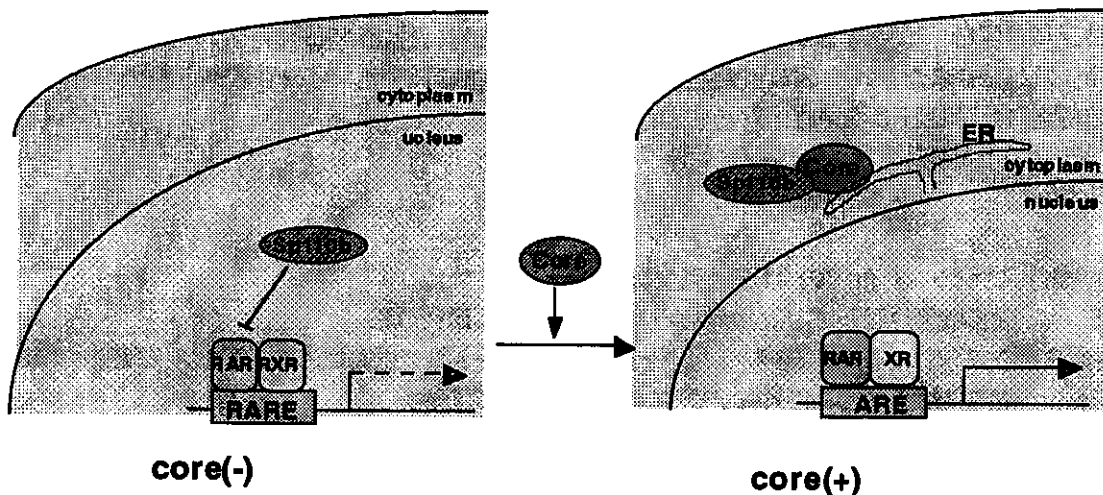
(a) 核内受容体の一つ RAR α に結合して転写活性を阻害する。このことは類似の因子で核内受容体を活性化する Sp110 と対比的である。

- (b) Sp110b はコアタンパク質と会合する。
- (c) Sp110b は核内に局在するが、コアを発現させると細胞質に移りコアと共局在ようになる。Sp100b のコアと結合できない変異体ではこの様なコアによる細胞内での局在の変化は見られない。
- (d) Sp110 はコアとは会合が試験管内の実験では弱い。In vivo の会合は見られない。
- (e) Sp110b は RARa 依存的な転写活性を抑制す

るが、コアタンパク質を共存させるとその抑制が解除される。

(f) コアと会合できない Sp110b では RARa の転写活性抑制が解除できない。

これらのことから、コアは RARa 依存的な転写抑制因子 Sp110b と会合することにより抑制を解除して RARa の転写を活性化すると考えられる。この機構のモデルを図に示した。



(3) コアによる RARa の転写活性化で細胞がアポトーシスを起こす。RARa 依存的なコアによるアポトーシスは RARa の下流遺伝子の活性化によると考えられる。事実、RARa の下流遺伝子である tissue glutaminase (tTGase) の発現がコアにより亢進していることを明らかにした。また、その際に tTGase の阻害剤である MDC を添加するとコアによるアポトーシスは有意に抑制された。

(4) HCV ゲノム複製の解析

HCV のゲノムが自己複製する培養細胞を用いて HCV ゲノム複製の環境を解析した。まず、レプリコン複製細胞をジギトニン処理すると細胞膜に穴が開き細胞質の可溶性画分は除かれる。この状態にした細胞 (semi intact 細胞) は HCV タンパク質の全てを保持している。また、ウイルスゲノムの大部分もこの状態にした細胞に保持されることから、ウイルス蛋白質およびゲノムは細胞内で可溶化状態であるにせよトラップされた状態になっていると推定さ

れた。小胞体蛋白質の一つである SC30 とウイルス蛋白質が共局在することから、HCV は小胞体膜状に存在してそこがウイルス複製の場になっている可能性が示唆される。

次に、この様な状態にした細胞が HCV ゲノムの複製をするか否かについて調べた。Semi intact 細胞を核酸の前駆体で処理したところ、ウイルス核酸への放射能の取り込みが観察された。合成された HCV RNA はゲノムサイズの大きさを示した。このことから細胞質可溶画分を除いた状態の細胞でもウイルスの核酸合成が可能であることが明らかになった。一方、この状態の細胞を NP-40 等の非イオン性界面活性剤で処理すると、合成された RNA は速やかに消えた。これらの結果から、HCV ゲノム複製は細胞室内の隔離された場所で引き起こされることが明らかになった。

D. 考察

HCV 感染がどのようにして肝臓疾患を惹起

するかについては、不明な点が多い。本研究では HCV のたんぱく質が細胞の増殖に及ぼす効果について解析するために、コアタンパク質に注目してそれらのタンパク質の細胞増殖に及ぼす機能を、コアについては NF- κ B 活性化アポトーシス誘導を指標にして解析している。これまでの実験からコアタンパク質は、小胞体膜に会合して NF- κ B を活性化することが明らかになっているがその機構は不明である。一方、コアが all trans retinoid 処理によりアポトーシス誘導することを見出した。また、コアと会合する細胞タンパク質を同定しそれが RAR α 依存的な転写を抑制することを見いだした。この転写抑制にはコアと相互作用する細胞質因子、Sp110b が関与している。本因子は RAR α 依存的な転写を抑制する働きがあるがコアが存在するとコアとの会合を通して Sp110b の細胞内局在に変化を生じる、その結果 Sp110b の転写抑制効果が失われ RAR α からの転写が活性化されることを明らかにした。HCV のこの様な働きは HCV ゲノムが自己複製する培養細胞でも観察された。HCV 蛋白質が核内受容体の転写活性を制御することは、HCV による肝疾患を考えるとときに興味深い。コア蛋白質を発現するトランスジェニックマウスでは肝がんを発症することが知られている。その際、脂肪代謝の異常が観察されている。RAR α を介した転写にはその下流に脂肪代謝に関与する遺伝子が含まれているので、コアによる RAR α の活性化は細胞のアポトーシス以外に脂肪代謝の異常を介した細胞のがん化にも関与している可能性が考えられる。

また、HCV RNA レプリコンを作製し、それが細胞内で自己複製することを示してきたが、HCV の複製は細胞内できちんと隔離された環境で行われている可能性が示された。この HCV ゲノム複製環境をさらに解析することにより、この部分を標的にした抗ウイルス剤の開発の可能性が考えられる。

E. 結論

HCV たんぱく質が核内受容体を介した細胞の増殖を直接制御することを示した。この現象

が疾患とどのように関連するかは今後の課題であるが、免疫により誘導される炎症に加えてウイルスたんぱく質が質的に炎症を変化させている可能性を強く示唆する。

HCV の効率良い複製系を作製する目的で HCV RNA レプリコンの作成を行った。この系を用いて抗ウイルス剤開発の標的が広まった。

F. 研究発表

1. Noguchi T, Satoh S, Noshi T, Hatada E, Fukuda R, Kawai A, Ikeda S, Hijikata M, Shimotohno K. Effects of mutation in hepatitis C virus nonstructural protein 5A on interferon resistance mediated by inhibition of PKR kinase activity in mammalian cells. *Microbiol Immunol.* 45:829-840, 2001
2. Takagi S, Ueda Y, Hijikata M, Shimotohno K. Overproduced p73 α activates a minimal promoter through a mechanism independent of its transcriptional activity. *FEBS Lett.* 509:47-52, 2001
3. Ueda Y., Hijikata M., Takagi S., Takada R., Takada S., Chiba T., and Shimotohno K., Wnt/b-catenin signaling suppresses apoptosis in low serum medium and induces morphological change in rodent fibroblasts, *Int. J. Cancer*, 99 : 681-688, 2002,
4. Masui O, Ueda Y, Tsumura A, Koyanagi M, Hijikata M, Shimotohno K. RelA suppresses the Wnt/beta-catenin pathway without exerting trans-acting transcriptional ability. *Int. J. Mol. Med.* 9:489-493, 2002
5. Kishine H, Sugiyama K, Hijikata M, Kato N, Takahashi H, Noshi T, Nio Y, Hosaka M, Miyanari Y, Shimotohno K. Subgenomic replicon derived from a cell line infected with the hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun.* ;293 :993-999, 2002.
6. Shimotohno K, Watashi K, Tsuchihara K, Fukuda K, Marusawa H, Hijikata M. Hepatitis C virus and its roles in cell proliferation., *J Gastroenterol.* 37 Suppl 13: 50-54, 2002.
7. Ueda Y, Hijikata M, Takagi S, Takada R, Takada S, Chiba T, Shimotohno K. Wnt/beta-catenin signaling suppresses

apoptosis in low serum medium and induces morphologic change in rodent fibroblasts. *Int J Cancer*. 99 : 681-688, 2002.

C型肝炎におけるCTL応答とCTLエピトープの同定

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型肝炎の各種病態における全C型肝炎ウイルス（HCV）抗原に対する細胞障害性T細胞（CTL）応答を検討した。更に、C型急性肝炎患者末梢血単核球をHLA-A24結合モチーフを有するHCVペプチドで刺激し、ELISpot法により11種類のHCV特異的CTLエピトープを同定した。しかし、HLA-A24拘束性CTLエピトープは1種類のみで、かつこのエピトープの抗原性は高くないことが示唆された。

A. 研究目的

C型肝炎の異なった病態におけるCTLの動態を明らかにするため、患者末梢血単核球の全HCV抗原に対するCTL応答を解析する。また、日本人の約60%はHLA-A24を有するので、HCVの排除に重要なCTLを誘導する日本人に適したワクチン開発するため、HLA-A24拘束性HCV特異的CTLが認識する抗原エピトープの同定を行う。

B. 研究方法

C型肝炎の各病態における全HCV抗原に対するCTL応答の検討は、HCV陰性健常者5例を対照に、C型慢性肝炎患者12例、無症候性HCVキャリア2例、インターフェロン治療によりHCVが排除された症例4例で行った。全HCV抗原に対するCTL応答測定は昨年度開発し、報告した方法により行った。即ち、患者の末梢血単核球からCD8陽性、CD45RA陰性T細胞を分画し、96ウェルプレート2枚の各ウェルに100細胞ずつ、フィーダー細胞の放射線照射したCD8陰性細胞と共に蒔き、anti-CD3抗体による刺激を行い、IL-2存在下に3週間培養した。増殖した細胞のHCV特異的CTL活性を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感染自己B細胞株を標的として各96ウェルの細胞を用いて測定した。各ウェルのCTL活性を合計し、CTL activity index (CAI) とした。

HLA-A24拘束性HCV特異的CTLが認識する抗原エピトープの同定は、C型急性肝炎発症後2年以内のHLA-A24陽性の症例1例とC型急性肝炎5例（内3例がHLA-A24陽性）の末梢血CD8陽性T細胞をHLA-A24結合モチーフを有する8～11アミノ酸の87種のHCVペプチドで刺激し、IFN- γ 産生細胞をELISpot法で算定することにより行った。

（倫理面への配慮）

この研究は自治医科大学大学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

C型慢性肝炎患者のHCV抗原に対する総CAIは、HCV陰性健常者と比べ有意に上昇していた。一方、無症候性HCVキャリア2例と治療によりウイルスが排除された4例中2例では総CAIは健常者と同じレベルであった。

C型急性肝炎発症後定期的にフォローしていた患者の総CAIは、発症後2年間は比較的高く保たれ、血清HCV RNAもほとんど検出できないレベルにコントロールされていたが、3年目に総CAIの著明な低下とともに血清HCV RNAの上昇が認められ、インターフェロン治療により血清HCV RNAが陰性化すると共に総CAIは以前のレベルに復した。

ELISpot法により11種類のHCV特異的CTLエピトープが同定された。内1つは、以前報告したHLA-A*0206拘束性CTLエピトープと同じものであったが、他の10種類は新しいエピトープであった。患者により1～5種類のエピトープが同定された。HLA-A24拘束性CTLエピトープは1種類のみで、かつHLA-A24を有する4例中1例で同定されたに過ぎず、そのエピトープを認識するCTL数は少なかった。

D. 考察

昨年度開発し、報告した全HCV抗原に対するCTL応答測定法はC型肝炎の各種病態の解析に有用であり、通常の方法ではHCV特異的CTL活性を証明できないC型慢性肝炎でも、この方法を用いてHCV陰性健常者より有意に高いHCV特異的CTL応答を証明することができた。更に、無症候性HCVキャ

リアではHCV特異的CTL応答は健常者のレベルに抑制されていること, インターフェロン治療でHCVが陰性化し経過すると, HCV特異的CTLメモリー細胞は本測定法でも検出できないレベルに減少することが明らかになった。また, C型急性肝炎発症後経過を追うことのできた症例の検討から, HCV特異的CTL応答はHCVの増殖抑制に非常に重要であることを示唆する結果が得られた。

C型急性肝炎患者末梢血を用いてELISpot法により比較的容易にCTLエピトープが同定できること明らかになった。しかしHLA-A24結合モチーフを有するHCVペプチドで刺激したにも関わらず, 同定されたHLA-A24拘束性CTLエピトープは同定された11種のエピトープの中で1つのみであり, かつ免疫原性が高くなかったことから, 日本人のHCV感染に対する治療的ワクチンの開発には, できるだけ多様なHLA拘束性CTLエピトープの同定が必要であると考えられる。

E. 結論

私達が開発した全HCV抗原に対するCTL応答測定法はC型肝炎の各種病態の解析に有用である。この方法を用いてHCV増殖のコントロールにCTL応答が重要であることが示された。

C型急性肝炎患者末梢血単核球をHCVペプチドで刺激し, ELISpot法により比較的容易にHCV特異的CTLエピトープが同定できることが明らかになり, 11種類のHCV特異的CTLエピトープが同定された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hiroishi, K., Eguchi, J., Ishii, S., Okamoto, H., Mitamura, K., Imawari, M. Differential effect of cytotoxic T lymphocyte variant epitopes on generation and cytotoxicity in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatol. Res.* 24:91-94 [2002].

井廻道夫. HCVに対する抗ウイルス免疫応答. *ウイルス* 52:151-159 [2002].

2. 学会発表

船附清美, 広石和正, 井廻道夫, 石古博昭. C型慢性肝炎患者が持つC型肝炎ウイルス特異的細胞障害性T細胞の解析. 第88回日本消化器病学会総会, 旭川, 2002年4月24日

多治見守泰, 中村郁夫, 井廻道夫. C型慢性肝炎患者におけるHCV抗原特異的肝浸潤リンパ球応答. 第38回日本

G. 知的所有権の取得状況
なし

宿主細胞の細胞周期におよぼす HCV core 蛋白の作用

分担研究者 林 紀夫 大阪大学大学院医学系研究科分子制御治療学教授

研究要旨 HCV core 蛋白の発現が宿主細胞の細胞周期関連分子群に及ぼす作用について、マウス正常肝細胞株の系を用いて検討した。細胞周期の検討では core 発現に伴い S 期移行の遅延を認めた。E2F 依存性転写活性、pRb リン酸化、CDK2/4-キナーゼ活性も core 発現により低下した。そこで各種 CDK/cyclin(cyc)複合体を活性化する CDK 活性化キナーゼ(CAK、CDK7/cycH/MAT1 の 3 者複合体)に注目した。CDK7、cycH、MAT1 の発現レベルは core 発現による変化を認めなかったが、CAK 複合体形成、CAK 活性は core 発現により低下した。さらに core 蛋白と各種 CAK component との結合の検討では、core 蛋白と CDK7、cycH との結合が示唆された。以上のことより、core 蛋白は CAK と結合することにより CAK 活性を阻害し、宿主細胞の細胞周期進行を遅延させることが示された。

A.研究目的

HCV core 蛋白の発現が宿主細胞の細胞周期進行に及ぼす影響に関しては、いまだ完全には明らかにされていない。細胞周期進行には各種サイクリン依存性キナーゼ(CDK)/サイクリン(cyc)複合体の役割が不可欠である。特にG1からS期への移行にはCDK/cyc複合体によるpRbのリン酸化が重要であり、不活化状態のpRbはE2Fと結合しているがCDK4(6)/cycDやCDK2/cycE複合体によりpRbがリン酸化を受けるとpRbはE2Fを解離し、解離されたE2FはS期移行に必要な各種遺伝子の転写を活性化する。一方CDK inhibitorはCDK/cyc複合体を負の方向に制御する。また、CDK活性化キナーゼ(CAK)は CDK7/cycH/MAT1からなる 3 者複合体であり、各種CDK/cyc複合体をリン酸化し、活性化することが知られている。本研究では、core 蛋白発現が細胞周期関連分子群に対してどのような影響を及ぼすかについて詳細な検討を行った。

B.研究方法

マウス正常肝細胞株BNL CL2(CL2)にcore遺伝子を導入した細胞(core)と空ベクターを導入した細胞(mock)を用いて以下の検討を行った。細胞周期の検討はflow cytometry、E2F依存性転写活性は luciferase assay、各種細胞周期関連分子の発現ならびにpRb、CDK2リン酸化レベルはWestern blot (WB)、CDK2/4-キナーゼ活性、CAK活性はkinase assay、蛋白相互の結合や複合体形成は免疫沈降(IP)/WB法にて検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は培養細胞系を用いたものであるため、特に倫理的問題には抵触しないと考える。

C.研究結果

細胞周期の検討ではcore細胞ではmockに比しS期移行の遅延を認めた。E2F依存性転写活性、pRb リン酸化、CDK2/4-キナーゼ活性もcore細胞で低下

していた。CDK2/4/6、cycD1や各種CDK inhibitor (p21/p27/p16/p15/p19)の発現に関してmock、core細胞間で有意差はなかった。cycE発現レベルはcore細胞で低下していたが、これはE2F依存性転写活性低下による二次的な結果と考えられた。CAKを構成するCDK7、cycH、MAT1の発現レベルはmock、core細胞間で差を認めなかったが、CAK複合体形成、CAK活性ならびにCDK2の活性化リン酸化レベルはcore細胞で低下していた。core蛋白と各種CAK componentとの結合をcore細胞を用いたIP/WB法で検討したところ、CDK7、cycHとの結合が示唆された。さらにCL2細胞ライセートに*in vitro*で作成したcore蛋白を添加する系でCAK活性、CAK複合体形成を検討したところ、双方ともcore蛋白による濃度依存性の抑制が認められた。

D.考察

core蛋白はCAKと結合することによりCAK複合体形成ひいてはCAK活性を阻害し、その結果、宿主細胞の細胞周期進行を遅延させることが明らかとなった。C型慢性肝炎の経過においては肝細胞の壊死・再生の繰り返しの経て、肝硬変ひいては肝癌発症へと繋がる。core蛋白が細胞機能の根幹である細胞周期進行に直接的な影響を与えることは、このようなHCV関連肝疾患の病期の進展に関して重要な関連を持つものと推察される。

E.結論

HCV core蛋白はCAKと結合することによりCAK活性を直接阻害し、宿主細胞の細胞周期進行を阻害することが示唆された。

F.健康危険情報 なし

G.研究発表

1. Jinushi M, et al. Critical role of MICA/B expression on interferon- α -stimulated dendritic cells in NK cell activation: Impairment in chronic hepatitis C infection. *J Immunol* (in press).
2. Jinushi M, et al. Expression and role of MICA and MICB in human hepatocellular carcinomas and their regulation by retinoic acid. *Int J Cancer* (in press).
3. Hosui A, et al. Hepatitis C virus core protein differently regulates the JAK-STAT signaling pathway under interleukin-6 and interferon- γ stimuli. (in submission).

H.知的財産権の出願・登録状況

特に予定なし

献血者血液の核酸増幅検査実施状況と輸血副作用発生状況

分担研究者:内田茂治(東京都赤十字血液センター)

共同研究者:高橋雅彦(東京都赤十字血液センター)

村岡正人(日本赤十字社中央血液センター)

研究要旨

1999年より日本赤十字社は全国の献血者血液に対して、HBV、HCVおよびHIVを対象としてミニプール核酸増幅検査(NAT)を導入し、これらウイルスの輸血による伝播は大幅に減少することが期待された。実際、2000年および2001年には「輸血による感染の可能性が高い」と考えられる症例数は、NAT実施以前と比較して激減した。このミニプールNATの実施状況と、2002年に全国の医療機関から報告のあった自発報告例ならびに献血者の献血後情報による症例の解析を行った。

A. 研究目的

1999年に輸血用血液にHBV、HCV、HIVを対象としたミニプール核酸増幅検査(NAT)が開始され、輸血によるウイルス感染は大幅に減少すると考えられた。しかしながら、全国医療機関からの自発報告例は依然として症例数が多く、感染と輸血との因果関係を明らかにする必要がある。

B. 対象と方法

ミニプールNATは1999年7月1日から2002年8月までの、血清学的感染症検査およびALT検査に合格した16,318,088名の献血者血液を対象として、2000年1月までは500本プール、2000年2月からは50本プールでHBV、HCV、HIVを標的としたNATを行った。

また、輸血によるウイルス感染の調査は2002年1月から2002年9月までの9ヶ月間に、全国の医療機関から日本赤十字社中央血液センター医薬情報部に輸血後感染症として自発報告のあった78

例を対象とした。内訳はHBV感染の疑いが54例、HCV感染の疑いが24例であった。これらの症例における感染と輸血との関連性を調査するため、輸血に使用された血液の保管検体の精査(血清学的検査ならびにPCR)を行った。

C. 結果

ミニプールNAT実施状況

対象となった16,318,088名の献血者から、HBV-DNAが289例(約1/6万)、HCV-RNAが50例(約1/33万)およびHIV-RNAが6例(約1/272万)検出された。

検出されたHBV-DNAのうち、初感染と考えられる244例のHBV遺伝子型はCが190例(77.9%)、Bが29例(11.9%)、Aが22例(9.0%)およびDが3例(1.2%)であった。同様に、検出されたHCV-RNAの遺伝子型は1bが14例(35.0%)、2aが15例(約37.5%)および2bが11例(27.5%)であった。

副作用報告症例の解析結果

2002年1月から9月までの9ヶ月間に、全国の医療機関から日本赤十字社中央血液センター医薬情報部に輸血後感染症として自発報告のあった症例は、HBV感染の疑い54例およびHCV感染の疑い24例であった。このうち献血時の保管検体からウイルス核酸が検出され、輸血による感染の可能性が高いと考えられた症例はHBVの6例のみであった。他のウイルス感染疑い例は保管検体からそれぞれのウイルス核酸が検出されず、輸血による感染の可能性は低いと考えられた。

D. 考察

プールNATを行った検体は全て血清学的検査およびALT検査に合格した血液であるため、HBV-DNAが検出された献血者はHBs抗原産生前の感染初期の状態またはHBs抗原・HBc抗体低力価陽性の持続感染状態であると考えられる。また、HCV-RNAが検出された献血者は全てHCV抗体産生前の感染初期の状態であると考えられた。

検出されたHBV-DNAの遺伝子型はアジア型のB、Cが大部分であったが、日本では2%以下といわれている欧米・フィリピン型のAが22例(9.0%)と高い割合で検出された。その他の遺伝子型ではヨーロッパ型のDが3例検出され、アフリカ型のE、南米型のFは検出されなかった。また、A型のほとんどは遺伝子解析により欧米型でみるこ

と、全員が男性であることなどから男性同性愛者との関連が示唆された。

HCV-RNAの遺伝子型は、日本人のキャリアではII(1b)が約70%であると報告されている。それに対してNATで検出されたものはIII(2a)およびIV(2b)が高い割合で検出されている。また、HCV-RNAが検出された献血者の男女比はII(1b)が50:50であるのに対して、III(2a)およびIV(2b)は男性が優位であった。

日本赤十字社中央血液センター医薬情報部では、1994年から輸血によるウイルス感染疑い例の調査を行っているが、図1および図2に1994年から2002年までのHBV、HCVの感染報告例とその解析結果を示した。HBV感染は1998年に22例(自発報告6例、献血後情報16)、1999年には20例(自発報告5例、献血後情報15例)が保管検体精査結果陽性で、輸血による感染の可能性が高い症例と考えられたが、2000年には5例(自発報告4例、献血後情報1例)、2001年には4例(自発報告4例)にまで減少し、2002年は6例であった。HCV感染では1998年の7例、1999年の5例(いずれも献血後情報)の保管検体精査結果陽性の症例が認められたが、2000年以降は1例も確認されていない。このようにミニプールNAT導入後、HCVおよびHIVの輸血による感染の可能性の高い症例は確認されておらず、HBVにおいても大幅な減少が認められた。

初回献血者におけるウイルスマーカーの陽性頻度

分担研究者:内田茂治(東京都赤十字血液センター)

共同研究者:福田さと子 永井政勝(栃木県赤十字血液センター)

佐藤賢一 川口隆司(茨城県赤十字血液センター)

伊藤 明 諏訪 三(神奈川県赤十字血液センター)

宮崎 卓 前田義章(福岡県赤十字血液センター)

研究要旨

献血者のウイルスマーカー陽性率の傾向を調査することは、輸血用血液の安全性や献血者スクリーニングの有効性をモニタリングする上で重要である。また、初回献血者のウイルスマーカー陽性率は、通知による選択を受けないため、一般地域住民の陽性率を反映すると考えられる。

A. 研究目的

前年度に引き続き、中央(東京都)、茨城県、栃木県、神奈川県の関東地域の4血液センターと福岡県を加えた計5血液センターにおける初回献血者を対象として、HBV、HCVならびにHTLV-1関連マーカーの陽性率を調査し、各ウイルスマーカーの疫学調査を行う。

B. 対象と方法

中央(東京都)、茨城県、栃木県、神奈川県の関東地域の4血液センターと福岡県を加えた計5血液センターにおける初回献血者を対象として、HBs抗原、HBc抗体、HCV抗体ならびにHTLV-1抗体の陽性率を年齢別に調査した。HBs抗原検査は逆受身赤血球凝集反応(RPHA法)、HBc抗体検査は凝集阻止法(HI法)、HCV抗体検査は血球凝集反応(PHA法)または粒子凝集反応(PA法)およびHTLV-1抗体検査はPA法により行った。

C. 結果

各血液センターにおけるウイルスマーカー陽性率はHBs抗原、HBc抗体、HCV抗体およびHTLV-1抗体の陽性率は、関東地域の4血液センターではそれぞれ0.22-0.35%、0.50-1.02%、0.15-0.37%および0.05-0.26%と差が小さかったのに対して、福岡センターではそれぞれ0.57%、1.22%、0.49%および0.68%と関東地区の4血液センターに比べて高かった。

HBs抗原、HBc抗体、HCV抗体およびHTLV-1抗体の年齢別陽性率では、いずれのマーカーの陽性率も10歳代、20歳代で低率であるのに対して、30歳代後半以降は加齢と共に陽性率の上昇が認められた。

HBs抗原の年齢別陽性率を過去のデータと比較すると、10歳代、20歳代後半ならびに40歳代前半で陽性率の低下傾向が認められたが、他の年代層では明らかな低下傾向は認められず、40歳代後半ならびに50歳代前半では陽性率の増加傾向が

認められた。また、16歳献血者のHBs抗原陽性率を過去のデータと比較すると、調査を始めた平成7年から直線的な陽性率の低下傾向が認められた。

同様にHBc抗体の年齢別陽性率を過去のデータと比較すると、平成9年に陽性の基準が64倍から32倍に引き下げられたため、平成10年の陽性率は高齢者を中心に平成8年より高めである。しかしながら、平成12年および平成14年の陽性率は平成10年に比べて全年齢で低値を示し、特に30歳代以降の陽性率は高年齢側にシフトした形となった。この傾向は関東地区の4センターだけでなく、福岡センターでも認められた。

HCV抗体の陽性率は30歳代以降で低下傾向が認められたが、60歳代では増加していた。

HTLV-1抗体の年齢・地域別陽性率では、各年齢層とも福岡センターの陽性率は関東地域の4センターに比べて高かった。しかし、福岡センターでは20歳代後半から40歳にかけて陽性率が年ごとに低下傾向を示しているのに対して、関東地域の4血液センターでは全年代において低下傾向は認められなかった。

D. 考察

母子間の垂直感染を阻止してHBV感染源の撲滅を意図した、厚生省の「B型肝炎母子感染防止事業」が1985年から一部の医療機関で、1986年からは全国の医療機関で開始された。2001年にはこれ以降の出生児が献血年齢に達する。しかし、16歳の初回献血者のHBs抗原陽性率は平成7年からほぼ直線的に減少しており、平成14年の陽性率もこの直線上に位置していた。これはHBe抗原

からHBe抗体へのセロコンバージョンの若齢化と出産の高齢化により、HBe抗原陽性の妊産婦が減少したためと考えられる。2002年以降の16歳献血者のHBs抗原陽性率を調査し、かつ当該献血者が持続感染であるのか、初感染であるのかを明確にすることで、この事業の成果を評価することができるであろう。

HBc抗体の陽性率は平成10年に比して高年齢側へのシフトが認められた。このことは、少なくともこのような調査で判明する新たなHBV感染が無くなったことを意味する。

HCV抗体の陽性率では明らかな傾向が認められなかった。全国の血液センターではHCV抗体の測定をPHA法またはPA法の凝集法により行っているが、この方法での低力価陽性検体には非特異反応が多く含まれており、このことが陽性率の傾向を見え難くしている可能性も考えられた。

HTLV-1抗体は以前より西日本で高値を示すことが知られている。このことから特に九州地区では母乳による母子感染防止対策が早くから進められていた。しかしながら、東日本では対策が遅れ、陽性率の低下は今のところ認められていない。

初回献血者の各ウイルスマーカー陽性率は30歳までの年代では低率であるのに対して、これ以降の年代では年齢の上昇とともに陽性率も上昇している。この傾向は使い捨て注射器・注射針が普及し始めた1972年の出生者を境としており、これらウイルスマーカーの陽性率に医療器具が関与していたことが推定される。

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Ishii, Y. et al.	Mutational analysis of human papillomavirus type 16 major capsid protein L1: the cysteines affecting the intermolecular bonding and structure of L1-capsids	Virology	308	128-136	2003
Matsumoto, K. et al.	IgG Antibodies to Human Papillomavirus 16, 52, 58, and 6 L1 Capsids: Case-Control Study of Cervical Intraepithelial Neoplasia in Japan	Journal of Medical Virology	69	441-446	2003
Kawana, K. et al.	Neutralizing antibodies against oncogenic human papillomavirus as a possible determinant of the fate of low-grade cervical intraepithelial neoplasia	Biochemical and Biophysical Research Communications	296	102-105	2002
Mori, S. et al.	Rescue of AAV by Antibody-induced Fas-mediated Apoptosis from Viral DNA Integrated in HeLa Chromosome	Virology	301	90-98	2002
Tsutsumi, T. et al.	Interaction of Hepatitis C Virus Core Protein With Retinoid X Receptor α Modulates Its Transcriptional Activity	Hepatology	35	937-946	2002
Burioni, R. et al.	Diverging Effects of Human Recombinant Anti-Hepatitis C Virus (HCV) Antibody Fragments Derived from a Single Patient on the Infectivity of a Vesicular Stomatitis Virus/HCV Pseudotype	Journal of Virology	76	11775-11779	2002
Ishii, K. et al.	Structural Analysis of Vaccinia Virus Dls Strain: Application as a New Replication-Deficient Viral Vector	Virology	302	433-444	2002
Aizaki, H. et al.	Expression Profiling of Liver Cell Lines Expressing Entire or Parts of Hepatitis C Virus Open Reading Frame	Hepatology	36	1431-1438	2002
Matsui, M. et al.	Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by immunization with dendritic cells transduced with replication-defective recombinant adenovirus	Vaccine	21	211-220	2002

Tsutsumi, T. et al.	Alteration of Intrahepatic Cytokine Expression and AP-1 Activation in Transgenic Mice Expressing Hepatitis C Virus Core Protein	Virology	304	415-424	2002
Otsuka, M. et al.	Differential cellular gene expression induced by hepatitis B and C viruses	Biochemical and Biophysical Research Communications	300	443-447	2003
Nozaki, A. et al.	Identification of a Lactoferrin-derived Peptide Possessing Binding Activity to Hepatitis C Virus E2 Envelope Protein	Journal of Biological Chemistry	278	10162-10173	2003
Hara, K. et al.	Lactoferrin inhibits hepatitis B virus infection in cultured human hepatocytes	Hepatology Research	24	228-235	2002
Nozaki, A. and Kato, N.	Quantitative Method of Intracellular Hepatitis C Virus RNA using LightCycler PCR	Acta Medica Okayama	56	107-110	2002
Alam, S. et al.	Hepatitis C Virus Quasispecies in Cancerous and Noncancerous Hepatic Lesions: The Core Protein-encoding Region	Acta Medica Okayama	56	141-147	2002
Ueda, Y. et al.	WNT/ β -CATENIN SIGNALING SUPPRESSES APOPTOSIS IN LOW SERUM MEDIUM AND INDUCES MORPHOLOGIC CHANGE IN RODENT FIBROBLASTS	International Journal of Cancer	99	681-688	2002
Masui, O. et al.	RelA suppresses the Wnt/ β -catenin pathway without exerting trans-acting transcriptional ability	International Journal of Molecular Medicine	9	489-493	2002
Kishine, H. et al.	Subgenomic replicon derived from a cell line infected with the hepatitis C virus	Biochemical and Biophysical Research Communications	293	993-999	2002
Shimotohno, K. et al.	Hepatitis C virus and its roles in cell proliferation	Journal of Gastroenterology	37	50-54	2002
Hiroishi, K. et al.	Differential effect of cytotoxic T lymphocyte variant epitopes on generation and cytotoxicity in chronic hepatitis C virus infection	Hepatology Research	24	91-94	2002
井廻 道夫	肝炎ウイルス(1) -HCVに対する抗ウイルス免疫応答-	ウイルス	52	151-156	2002
井廻 道夫	CTL 活性・ウイルス肝炎の治療における宿主側因子	アニムス	冬	19-23	2002

Jinushi, M. et al.	Critical Role of MHC Class I-Related Chain A and B Expression on IFN- α -Stimulated Dendritic Cells in NK Cell Activation: Impairment in Chronic Hepatitis C Virus Infection	Journal of Immunology	170	1249-1256	2003
Sugimoto, Y. et al.	A single nucleotide polymorphism of the low molecular mass polypeptide 7 gene influences the interferon response in patients with chronic hepatitis C	Journal of Viral Hepatitis	9	377-384	2002