

一としての応用. 同上.

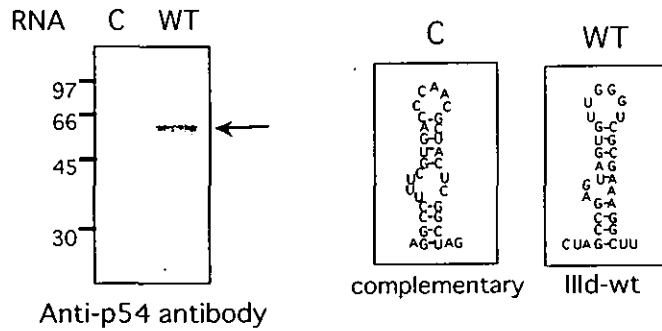
13. 村上恭子、石井孝司、吉崎佐矢香、井上 寧、小俣和彦、Su Su Hmwe、相崎英樹、鈴木哲朗、宮村達男. 三次元培養肝細胞を用いた感染 HCV クロームの経時的変化の解析. 同上.

#### H. 知的所有権の出願・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。

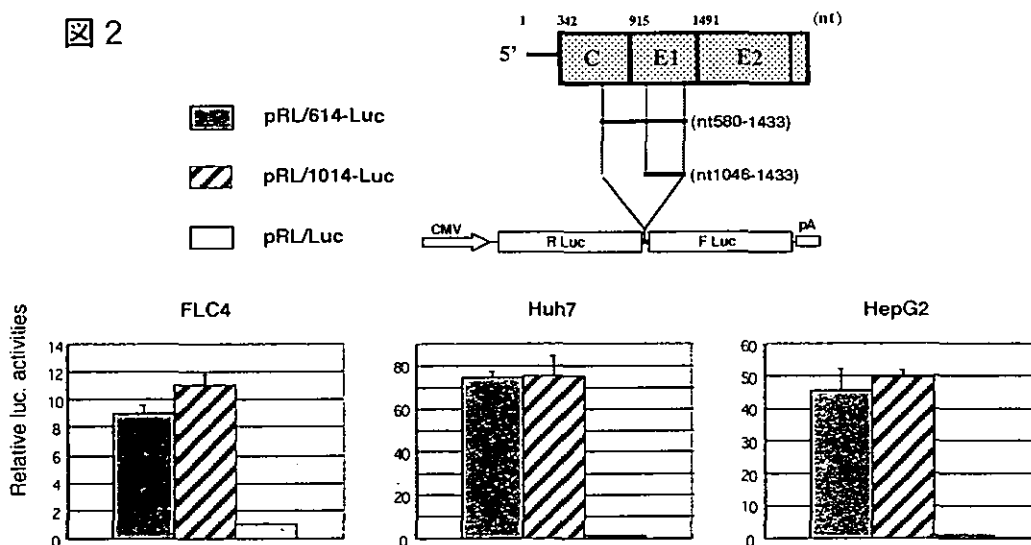
図 1

PSF : PTB-associated splicing factor. mRNAのスプライシングに関与。RNA結合能。PTBと結合。  
 hnRNP-H : RNA結合能。PTBと結合。  
 p54-nrb : RNAプロセッシングに関与。RNA結合能。PSFとinteraction.



HCV 5'UTR stem-loop IIIId RNAに結合する宿主蛋白の同定。Huh7細胞のcrudeS10分画を二種類の合成RNA (WT, C ; 図下右)とそれぞれ混合し、WT RNAとのみ結合する蛋白(PSF, hnRNP-H, p54-nrb)を同定した。図下左は抗p54抗体によるウエスタンブロッティング。

図 2



HCV E1領域のIRES活性。Dicistronic reporterの1st cistron (R Luc)と2nd cistron (F Luc)の間にE1遺伝子を挿入し、各ヒト肝癌細胞株に導入した。F Luc活性をR Luc活性で標準化してRelative luc activitiesとした。

厚生労働科学研究費補助金（がん予防健康科学総合研究事業）  
分担研究報告書

C型肝炎ウイルスの複製と肝発がん

分担研究者 加藤 宣之 岡山大学 教授

研究要旨：肝炎治療および肝発がんの予防への道をひらくために C 型肝炎ウイルス (HCV) に対する感染防御物質であるラクトフェリン (LF) の作用機序の解析と HCV 蛋白質によるインターフェロン (IFN) 応答刺激配列 (ISRE) の活性化機構について解析した。昨年度までに、ヒト LF の 600-632 番目の 33 アミノ酸が HCV のエンベロープ E2 蛋白質へ結合してヒト肝細胞への HCV の感染を防御することを見い出していたが、今年度は、この 33 アミノ酸を 2 量化、3 量化することにより感染防御活性が強まることと E2 蛋白質のどの領域に 33 アミノ酸が結合するかを明らかにした。昨年度まで、HCV のコア蛋白質の ISRE 活性化機構について解析していたが、今年度、HCV の RNA ポリメラーゼである NS5B 蛋白質がこの活性化に相乗的効果を与えることを見い出した。さらに、NS5B 蛋白質単独でも、ISRE の活性化が起こり、IFN- $\beta$  が産生されることを見い出した。また、コアおよび NS5B 蛋白質の様々な変異体を作成して解析した結果、ISRE の活性化における相乗効果には両蛋白質の間接的相互作用が関与していることが示唆された。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染機構や増殖機構を解明することは、HCV の生活環の理解とともに、HCV の増殖制御法の開発につながるものと考えられる。これまでに、抗ウイルス剤の評価系として用いることのできるヒト培養肝細胞を用いた HCV 感染複製系を開発し、感染防御物質として見い出したラクトフェリン (LF) の作用機序に関する解析を行ってきた。LF が HCV に結合して HCV 受容体 (未同定) への結合を阻害することにより感染防御活性を示すと考えられたことから、LF のどの部分が HCV エンベロープ蛋白質と直接的相互作用を示して、感染防御活性を示すかを明らかにすることを目的と

してこれまで解析を進めてきた。その結果、ヒト LF の 600-632 番目の 33 アミノ酸が HCV のエンベロープ 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これまでに明らかにしている。今年度は、この感染防御活性を強める試みと、この 33 アミノ酸が E2 蛋白質のどの部分に結合するかを明らかにすることを目的として以下に示す実験を行った。また、これまで、HCV の感染防御活性は、ヒト培養肝細胞への HCV 陽性血清の添加による HCV 感染系のみを用いていたが、今年度は新たに、HCV の E1 および E2 蛋白質を有するシェードタイプの vesicular stomatitis virus

(VSV)によるヒト肝細胞への感染系も導入することにより活性評価の信頼度を高めた。

HCV の増殖調節機構に関わると考えられる現象として見出した HCV コア蛋白質の ISRE 活性化機構についてこれまで解析した結果、これまでに、各種遺伝子型でよく保存されているコア蛋白質のアミノ末端部 20 アミノ酸が ISRE の活性化に重要であることや ISRE の variant 型を強く活性化することを明らかにしてきたが、Jak-STAT 系におけるコア蛋白質の標的蛋白質は未だ明らかではない。そこで、この点を明らかにすることを目的として、さらに追究した結果、コア蛋白質以外の HCV 蛋白質との相互作用について解析する過程において、予想外に HCV の RNA ポリメラーゼである NS5B 蛋白質がこの活性化に相乗的効果を与えることを見出した。そこで、今年度は、この現象とその分子機序を明らかにすることを目的として以下に示す実験を行った。

## B. 研究方法

(1) ヒト LF の 600-632 番目の 33 アミノ酸やこの 33 アミノ酸の 2 量体および 3 量体を MBP との融合蛋白質として大腸菌で発現させ、アミロース樹脂アフィニティーカラムを用いて精製した。得られた MBP 融合ヒト LF (600-632)、ヒト LF (600-632)<sub>2</sub> およびヒト LF (600-632)<sub>3</sub> を用いて CHO 細胞で発現分泌させた HCV E2 蛋白質をプローブとして Far-Western プロットを行った。

陰性コントロールとしては、大腸菌で発現させ同様に精製した LF 断片を含まない MBP<sub>2</sub> を用いた。メンブレン上の MBP 融合ヒト LF 断片に結合した E2 蛋白質の検出は抗 E2 モノクローナル抗体 (MO-12) により検出した。

MBP 融合ヒト LF 断片のヒト肝 PH5CH8 細胞における HCV 感染防御活性はライトサイクラーを用いて開発した real-time PCR 定量法を用いて解析した。HCV 感染後の細胞内 HCV RNA 量を定量することにより、LF の感染防御効果を測定した。また、別の方法として、HCV の代わりに HCV の E1 および E2 蛋白質を有するシュードタイプの vesicular stomatitis virus (VSV) (群馬大学医学部星野洪郎教授との共同研究) を用いて、LF の感染防御効果を測定した。このウイルスは感染して細胞内に侵入すると GFP を発現するように設計されているので、ウイルス感染 1 日後に、蛍光顕微鏡により、GFP を発現している細胞数を測定した。

HCV E2 蛋白質を 3 分割した E2A (384-500 番目のアミノ酸)、E2B (501-599 番目のアミノ酸) および E2C (600-661 番目のアミノ酸) をチオレドキシシン (TRX) との融合蛋白質として大腸菌の系で発現させ、His tag を利用してアフィニティー精製を行った。得られたそれぞれのチオレドキシシン融合 E2 蛋白質の MBP 融合ヒト LF (600-632) への結合活性を Far-Western プロット法により検討した。メンブレン上の E2 蛋白質断片に結合した MBP 融合ヒト LF (600-632) の検出は抗 MBP モ

ノクローナル抗体により検出した。E2A領域については、さらに様々な欠失体を作成して、MBP 融合ヒト LF (600-632) をプローブとして同様に Far-Western プロットを行った。

(2) HCV コア、NS3、NS4A、NS5A および NS5B 蛋白質を発現するレトロウイルスベクター-pCXbsr とホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に 2'-5' OAS 遺伝子プロモーター (-159 までを含む) を有するベクター 或いは ISRE の consensus 配列 (AGTTTCACITTTCCC) の 5 回繰り返し配列をホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に有するベクター (pISRE-Luci, Stratagene) をヒト肝 PH5CH8 細胞に導入した。ウミシイタケ遺伝子を有する内部標準用ベクター (phRL-CMV) も同時にヒト肝細胞に導入して 2 日後にそれぞれのルシフェラーゼの活性を測定した。

コア蛋白質のアミノ末端部の様々な欠失変異体や NS5B 蛋白質のカルボキシル末端部の欠失体や内部欠失体を発現するレトロウイルスベクターを作成してレポーターアッセイに使用した。

コア、NS5A、NS5B 蛋白質を恒常的に発現しているヒト肝細胞から、総 RNA を抽出して、オリゴ dT をプライマーとして逆転写酵素により cDNA を作成し、インターフェロン関連遺伝子特異的プライマーにより PCR を行い、mRNA の量的変動を解析した。

#### (倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されてい

るものであり、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのため倫理面への配慮は特に必要がない。

#### C. 研究成果

(1) これまでに、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が、その感染防御活性はヒト LF よりも数倍弱かった。LF の E2 蛋白質に対する結合性と感染防御活性には相関があると考えられたことから、LF の 600-632 番目の 2 量体や 3 量体を作成して、それらの E2 蛋白質結合活性や感染防御活性を測定した。その結果、E2 蛋白質結合活性は、2 量体や 3 量体が 1 量体よりも高いことが分った。HCV を用いた感染防御活性についても、2 量体や 3 量体が 1 量体よりも強く、ヒト LF と同等以上の活性を示した。シュードタイプの VSV を用いた感染防御活性についての解析でも同様の結果が得られた。このアッセイ系における IC<sub>50</sub> はヒト LF で 50 µg/ml、LF(600-632)の 1 量体で 650 µg/ml と相当の差があったが、LF(600-632)の 2 量体、3 量体ではそれぞれ 200、140 µg/ml となり、ヒト LF と近い値が得られた。

これまでに、E2 蛋白質に結合するヒト LF の領域を明らかにしたが、E2 蛋白質のどの領域が結合に関与しているかについては不明であった。今年度はこの点を明らかにするために、遺伝子型 1b 由来の E2 蛋白質を 3 分割して TRX との融合蛋白質として大腸菌の系で発現さ

せ、MBP 融合ヒト LF (600-632) をプローブとして Far-Western プロット解析を行った。その結果、ヒト LF (600-632) は E2 蛋白質の 384-500 番目の断片 (E2A) と強く結合することが分った。興味深いことに、E2 蛋白質の 501-599 番目の断片 (E2B) にはまったく結合しなかったが、600-661 番目の断片 (E2C) には弱く結合することも分った。この現象は遺伝子型 1a 由来の E2 蛋白質を同様に 3 分割して Far-Western blot を行った場合にも認められ、再現性も確認された。これらの結果から、ヒト LF (600-632) は E2 蛋白質の 2 箇所結合しうるものと考えられた。E2A と E2C 内には部分的に類似したアミノ酸配列が認められることから、これらの領域を中心にして E2A の欠失体を幾つか作成して、ヒト LF (600-632) に対する最小結合領域の同定を試みた。その結果、当初の予想とは異なり、E2C とはほとんどアミノ酸配列の類似性が認められない、E2 蛋白質の 411-441 番目がヒト LF (600-632) と結合することを明らかにした。

(2) コア蛋白質による ISRE 活性化機構の解析により、これまでに、コア蛋白質が 2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素や 2 本鎖 RNA 特異的アデノシンデアミナーゼ遺伝子プロモーター内に存在する variant 型 ISRE を活性化することを見出ししている。コア蛋白質のアミノ末端部 20 アミノ酸が必須であることが明らかになったことから、この部分が関与している標的蛋白質として、Jak-STAT 系を担う既知蛋白質が考えられたが、同定には至らなかった。今年度はこの活性化

機構をさらに追究する一環として、HCV の他の蛋白質の存在下におけるコア蛋白質の ISRE に対する効果を調べた。ヒト不死化肝 PH5CH8 細胞を用いてレポーターアッセイにより調べた結果、予想外に HCV の RNA ポリメラーゼである NS5B 蛋白質がコア蛋白質による ISRE 活性化に相乗的效果を示すことを見出した。他の NS3、NS4A、NS4B および NS5A 蛋白質にはこのような効果は認められなかった。

NS5B 蛋白質にこのような相乗的效果が見い出されたことから、NS5B 蛋白質自身の ISRE 活性化能をレポーターアッセイにより調べたところ、コア蛋白質と同程度の活性化能があることを明らかにした。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がこれまでの解析で分っていたことから、この部分のアミノ酸配列と NS5B 蛋白質のアミノ酸配列を比較したところ、コア蛋白質の 6-13 番目のアミノ酸配列 (KPQRKTKR) が NS5B 蛋白質の 151-158 番目のアミノ酸配列 (KGGRKPAR) と類似していることが分った。そこで、コア蛋白質については、この部分を中心とした幾つかの欠失変異体を作成し、NS5B 蛋白質については、KGGRKPAR 配列を KGGTS に変えた変異体や RNA ポリメラーゼ活性との相関性を明らかにするための幾つかの変異体を作成して、ISRE の活性化能をレポーターアッセイにより調べた。その結果、コア蛋白質については、KPQRKTKR 配列を失うと顕著に活性化能が低下し、それ以降のアミノ酸

(14-21 番目) が欠けると活性化能が完全に消失することが分った。これに反して、NS5B 蛋白質では、KGGRKPAR 配列を欠いただけでも、活性化能が失われることが分った。また、NS5B 蛋白質の ISRE 活性化能は RNA ポリメラーゼ活性にリンクしたものであることも明らかにした。

これらの各種変異体を用いてを、次に、コア蛋白質と NS5B 蛋白質との相乗効果に関する解析を行った。その結果、興味深いことに、単独では完全に ISRE 活性化能を失っているコア蛋白質や NS5B 蛋白質にも相乗効果能があることが分った。この現象からコア蛋白質と NS5B 蛋白質との相互作用が示唆されたが、免疫沈降実験においてもコア蛋白質と NS5B 蛋白質との直接的相互作用は検出されなかった。

最近、米国の Gale 博士らのグループにより NS3-4A 蛋白質が自然免疫系の TLR3 を介したシグナル伝達系を阻害することを見出し報告していることから、コア蛋白質や NS5B 蛋白質による ISRE 活性化能に対する NS3-4A 蛋白質の効果調べた。その結果、NS3-4A 蛋白質は NS5B 蛋白質の ISRE 活性化能を顕著に阻害することが分った。このことから、NS5B 蛋白質の ISRE 活性化能は TLR3 のシグナル伝達系の活性化により引き起こされている可能性が示唆された。これに反して、コア蛋白質の ISRE 活性化能は NS3-4A 蛋白質により若干低下するものの失われなことから、NS5B 蛋白質とは異なる作用機序が示唆された。

NS5B 蛋白質が TLR3 のシグナル伝達系を活性化する可能性が示唆されたことから、この伝達系の活性化により IFN- $\beta$  の産生が上昇しているかどうかについて検討した。コア、NS5A および NS5B 蛋白質を恒常的に発現しているヒト肝 PH5CH8 細胞を作成して、IFN- $\beta$  mRNA の量を RT-PCR で調べた結果、NS5B 蛋白質が発現している細胞においてのみ、IFN- $\beta$  mRNA の量が顕著に上昇していることを示した。コア蛋白質や NS5A 蛋白質を発現している細胞ではこのような現象は認められなかった。また、IFN- $\beta$  の産生に伴い発現誘導される IRF7 mRNA の発現上昇も NS5B 蛋白質発現細胞で認められた。このような NS5B 蛋白質による IFN- $\beta$  の発現誘導現象は別のヒト不死化肝 NKNT-3 細胞においても観察された。

#### D. 考察

(1) ヒト LF の 600-632 番目のアミノ酸の HCV 感染防御活性はヒト LF よりも数倍弱かったが、この 33 アミノ酸を 2 量化、3 量化することにより、E2 蛋白質との結合性が高まり、HCV 感染防御活性もヒト LF に匹敵するようになることが分った。今後、この 33 アミノ酸を MBP のアミノ末端側とカルボキシル末端側につけることによりさらに感染防御活性を上げることができないかと考えている。

LF の 600-632 番目のアミノ酸の E2 蛋白質に対する結合領域として、今回同定した 411-441 番目のアミノ酸配列の中には、遺伝的多様性の激しい E2 蛋白質の

中でもアミノ酸配列がウイルス株間でよく保存されている領域があることから、この領域に結合することにより、E2 蛋白質が HCV 受容体（未知）に結合することを阻害している可能性がある。今後、411-441 番目のアミノ酸配列の中で結合に必須なアミノ酸の同定を行うことにより、HCV 受容体に対するオトリペプチドの作成につながるのではないかと考えられる。また、HCV 受容体の追究にも役立つのではないと思われる。

(2) 今回見出した NS5B 蛋白質による ISRE の活性化は予想外ではあったが、これまでのコア蛋白質による ISRE の活性化と合わせた検討で新たな展開が得られた。NS5B 蛋白質の RNA ポリメラーゼ活性に相関して TLR3 のシグナル伝達系が活性化されること、つまり、IRF3 が活性化され、IFN- $\beta$  の産生が起こることを初めて明らかにした。従って、NS5B 蛋白質の発現により、IFN- $\beta$  から始まる IFN シグナル伝達系の活性化が引き起こされることが、分った。しかし、このようなウイルスの増殖に不利と考えられる NS5B 蛋白質の活性を NS3-4A 蛋白質が阻害していることも同時に分った。ウイルス株により、NS3-4A 蛋白質の活性は相当異なることが知られていることから、NS3-4A 蛋白質の活性の弱いウイルス株には、IFN- $\beta$  の産生により、持続感染が成立しない場合もあると考えられる。

これに対して、コア蛋白質による ISRE 活性化は NS3-4A 蛋白質では、それほど阻害を受けないことから、NS5B

蛋白質とは異なる機構によるものと考えられるが、コア蛋白質と NS5B 蛋白質は何らかの相互作用を示して、ISRE に対して相乗効果を示すことから、コア蛋白質も TLR3 のシグナル系に何らかの影響を与えているものと思われる。

TLR3 のシグナル系が異常で、NS3-4A 蛋白質が高度に発現している HCV レプリコン細胞においては、コアや NS5B 蛋白質の ISRE に対する活性化現象が認められないことから、今回見出した現象の解析には、TLR3 のシグナル系が正常であるヒト不死化肝細胞などを使用する必要があると思われる。また、IFN- $\beta$  の恒常的発現は、細胞周期や細胞増殖にも影響を与えるものと考えられることから、がん化との関係の上でも、この方面の研究が必要だと考えられる。

## E. 結論

(1) ヒト LF の 600-632 番目の 33 アミノ酸を 2 量化、3 量化することにより 1 量体より E2 蛋白質結合活性や感染防御活性が強まることを明らかにした。

この LF 由来の 33 アミノ酸が E2 蛋白質の 411-441 番目のアミノ酸と結合するかを明らかにした。

(2) HCV の NS5B 蛋白質がコア蛋白質による ISRE 活性化に相乗効果を与えることを見出した。

NS5B 蛋白質単独でも、ISRE の活性化を引き起こすことを見出した。

NS5B 蛋白質は TLR3 のシグナル系を活性化して、IFN- $\beta$  の産生を誘導することを明らかにした。

コアおよび NS5B 蛋白質による ISRE



の活性化における相乗効果は両蛋白質の間接的相互作用が関与していることを示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Naganuma, A., Dansako, H., Nakamura, T., Nozaki, A., and Kato, N. Promotion of microsarellite instability by hepatitis C virus core protein in human non-neoplastic hepatocyte cells. *Cancer Res.*, (2004) in press.
2. Kato, N., Sugiyama, K., Namba, H., Dansako, H., Nakamura, T., Takami, M., Naka, K., Nozaki, A., and Shimotohno, K. Establishment of a hepatitis C virus subgenomic replicon derived from human hepatocytes infected in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (2003) 306, 756-766.
3. Suzuki, K., Aoki, K., Ohnami, S., Yoshida, T., Kazui, T., Kato, N., Inoue, K., Kohara, M., and Yoshida, T. Adenovirus-mediated gene transfer of interferon alpha improves dimethinitro-samine-induced liver cirrhosis in rat model. *Gene Ther.*, (2003) 10, 765-773.
4. Dansako, H., Naganuma, A., Nakamura, T., Ikeda, F., Nozaki, A., and Kato, N. Differential activation of interferon-inducible genes by hepatitis C virus core protein mediated with the interferon stimulated response element. *Virus Res.*, (2003) 97, 17-30.
5. Suzuki, K., Aoki, K., Ohnami, S., Yoshida, K., Kazui, T., Kato, N., Inoue, K., Kohara, M., and Yoshida, T.

Adenovirus-mediated gene transfer of interferon a inhibits hepatitis C virus replication in hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (2003) 307, 814-819 (2003)

6. 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) 278, 10162-10173.

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）感染が肝疾患とくに肝がんを発症する際の分子機構の解明及び感染者からウイルスを排除することを目的として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。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昨年見出したが、さらにその研究を進め、コアタンパク質の中でその機能に必要な領域を明らかにした。また、ウイルスの複製を模倣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の複製解析を行い、ウイルス増殖を抑制する作用のある薬剤候補をスクリーニングした。

#### 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、およびウイルス感染予防の観点からウイルス複製系を構築しそれを用いて、ウイルスを排除する働きのある薬剤の探索を行うことを目的にする。そのような薬剤の探索をもとにウイルスの複製機構の解析を行う。

#### B. 研究方法

(1) 昨年、HCV コアタンパク質の発現量が異なる各種細胞を構築し、それを用いて細胞のアポトーシス感受性を解析することにより、コアタンパク質は核内ホルモン受容体を活性化して、その下流にある転写因子の中でアポトーシスにかかわる遺伝子を活性化する可能性を示した。本年は引き続きこの可能性を探ること、およびコアタンパク質による核内ホルモン受容体の活性化の機構を解析する。

(2) コアタンパク質と結合し、核内ホルモン受容体をお転写を活性化する細胞性因子 SP110b とコアとの相互作用の解析する。

(3) これまでにHCVゲノムが自己複製す

る細胞を構築した。この細胞を用いてウイルスの複製機構を解析する。また、この細胞を用いて抗ウイルス作用を示す薬剤のスクリーニングを行う。候補薬剤についてはその薬理作用の解析から複製の分子機構を解析する。

#### C. 研究成果

(1) コアタンパク質を異なるレベルで発現する細胞株の樹立とそれを用いたアポトーシスの解析。

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。これらの細胞を種々のアポトーシス誘導試薬で処理し細胞死を測定したところ、レチノイドのひとつである、all trans-retinoic acid (ATRA)処理により細胞のアポトーシスが亢進することを見出した。このアポトーシス促進の程度はコアタンパク質の発現量と比例していることから、コアは ATRA 依存的なアポトーシスを誘導することを明らかにした。この ATRA 依存的なアポトーシスの誘導はコアタンパク質を発現している他の細胞でも観察されたこ

とから、正常肝組織においても見られる現象であると考えられる。

(2) コアタンパク質と会合し ATRA 依存的に核内ホルモン受容体の転写活性化に参与する細胞性因子 SP110b の解析。

SP110b についてはこれまでの研究から以下のことが明らかになっている。

(a) 核内受容体の一つ RAR $\alpha$  に結合して転写活性を阻害する。細胞内には SP110b と類似の転写因子 SP110 が存在するが、この因子は核内ホルモン受容体の転写を活性化する。

(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するようになる。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 RAR $\alpha$  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 RAR $\alpha$  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 RAR $\alpha$  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 RAR $\alpha$  の転写を活性化すると考えられた。

これらの情報をもとに、コアタンパク質で SP110b と会合できない変異コアを作成した。N 端から 61、62 番目のアミノ酸に変異を導入したコアタンパク質は SP110b との会合ができない。この変異コアタンパク質を発現させた細胞においては ATRA 依存的なアポトーシスの活性化は見られなかった。以上より、SP110b がコアと RAR $\alpha$  の中間に位置しており、コアによる核内ホルモン受容体の転写活性化に重要な働きをしていることが強し示唆された。

(3) コアによる RAR $\alpha$  の転写活性化で細胞がアポトーシスを起こす。RAR $\alpha$  依存的なコアによるアポトーシスは RAR $\alpha$  の下流遺伝子の活性化によると考えられる。事実、RAR $\alpha$  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 MD C 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。しかし、このアポトーシス誘導は細胞の種類により異なることも判った。すなわちコアにより核内ホルモン受容体が活性化されるにもかかわらず、その下流遺伝子でアポトーシスの誘導に関与していると思われる tTGase 活性が誘導されない細胞も存在することを示唆する。したがって正常肝細胞にコアを発現させたときに、ATRA 依存的なアポトーシスに対して細胞がどのような応答を示すかについては今後の課題である。

#### (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 ゲノム複製機構の解析を行った。昨年度はウイルスゲノム複製環境の解析を、ジギトニン処理した細胞を用いて行い、HCV ゲノム複製は細胞質内の隔離された場所、特に膜成分により保護された状態の中で複製が起こることが明らかになった。

さらに、本年はこのウイルスゲノム複製細胞を用いて HCV ゲノム複製を阻害する薬剤のスクリーニングを行った。その結果免疫抑制作用を示すシクロスポリン A (CsA) が複製を強く抑制することを見出した。CsA が持つ多くの薬理作用のうち、どの機能が HCV ゲノム複製に阻害的に働くかを解析したところ、免疫抑制作用ではなくそのほかの機能が主に関わってい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の制御をしていると考え、特にコアタンパク質に注目して細胞増殖に及ぼす効果を調べてきた。コアについてはこれまでに NF- $\kappa$ B の活性化がアポトーシスを抑制することを示してきたが、昨年に ATRA 処理がコア産生細胞をアポトーシス感受性を示すことを見出しその解析を行っている。その結果、アポトーシスの誘導には核内ホルモ

ン転写因子のコアによる活性化が重要であること、そのために細胞側の因子 SP110b が重要な働きをすることを見出した。本因子は RAR $\alpha$  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と通して Sp110b の細胞内局在に変化を変える。その結果 Sp110b の転写抑制効果が失われ RAR $\alpha$  からの転写が活性化されると考えられる。HCV のこのような働きは 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 $\alpha$  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 $\alpha$  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。SP110b は RAR $\alpha$  以外の核内ホルモン受容体にも会合すると考えられる。もし、そうなら、コアタンパク質による核内ホルモン受容体の活性化の制御は複雑であり、その結果各種ホルモン作用による肝細胞の増殖制御がコアによりもたらされると考えられる。

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。さらに、この細胞を用いて HCV ゲノム複製を阻害する薬剤の探索を行い、CsA が強い抗ウイルス効果を示すことを見出した。

#### E. 結論

HCV コア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。また、コアタンパク質が核内ホルモン受容体を解した細胞の増殖に各種ホルモンの働きを増強させる可能性を示した。この現象と肝疾患との関連性の解析が重要である。

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。また、CsA が HCV ゲノム複製を強く抑制することを明らかにし、その機能は CsA がもつ免疫抑制効果とは異なることを示した。このことは最近慢性 C 型肝炎患者にインターフェロンと CsA を一緒に投与するとウイルスの排除に効果を示すという報告と合わせ考えると今後の治療の展望を示す。また、肝臓移植患者から慢性肝炎患者の発症を抑えるための免疫抑制剤の選択について重要な知見を与える。

#### F. 研究発表

1. Watashi K, Shimotohno K. The roles of hepatitis C virus proteins in modulation of cellular functions: A novel action mechanism of the HCV core protein on gene regulation by nuclear hormone receptors. *Cancer Sci.* 94 :937-943. 2003
2. Watashi K, Hijikata M, Hosaka M, Yamaji M, Shimotohno K. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology.* 38 :1282-1288. 2003
3. Watashi K, Hijikata M, Tagawa A, Doi T, Marusawa H, Shimotohno K. Modulation of retinoid signaling by a cytoplasmic viral protein via sequestration of Sp110b, a potent transcriptional corepressor of retinoic acid receptor, from the nucleus. *Mol Cell Biol.* 23 :7498-7509. 2003
4. Kakiuchi N, Fukuda K, Nishikawa F, Nishikawa S, Shimotohno K. Inhibition of hepatitis C virus serine protease in living cells by RNA aptamers detected using fluorescent protein substrates. *Comb Chem High Throughput Screen.* 6:155-160. 2003
5. Kato N, Sugiyama K, Namba K, Dansako H, Nakamura T, Takami M, Naka K, Nozaki A, Shimotohno K. Establishment of a hepatitis C virus subgenomic replicon derived from human hepatocytes infected in vitro.

Biochem Biophys Res Commun. 2003,  
306:756-66.

6. Miyanari Y, Hijikata M, Yamaji M, Hosaka M, Takahashi H, Shimotohno K. Hepatitis C virus Non-structural proteins in the probable membranous compartment function in viral RNA replication. J Biol Chem. 2003
7. Ohshima T, Shimotohno K. TGF- $\beta$  mediated signaling via the p38 MAP kinase pathway activates Smad-dependent transcription through SUMO-1 modification of Smad4. J Biol Chem. 2003

## 厚生科学研究費補助金

### 分担研究報告書

#### C型肝炎におけるIFN治療のCTL応答への影響と新たなCTLエピトープの同定

分担研究者 井廻 道夫 昭和大学医学部教授

**研究要旨** インターフェロン (IFN) 投与のC型肝炎患者における全C型肝炎ウイルス (HCV) 抗原および特定のHCV特異的CTLエピトープに対する細胞障害性T細胞 (CTL) 応答への影響の検討を行った。一部の症例では治療開始後4週で4週間の治療中断を行い、そのCTL応答への影響を検討した。更に、全HCV蛋白をカバーするオーバーラッピングペプチドを用い、ELISpotアッセイにより5種類のCTLエピトープを同定した。

#### A. 研究目的

C型肝炎のIFN治療におけるCTL応答の意義を明らかにするため、全HCV抗原に対するCTL応答は限界希釈法を応用したCTLアッセイで、特定のHCV特異的CTLエピトープに対するCTL応答はELISpotアッセイで経時的に検討する。更に、日本人におけるHCV特異的CTLエピトープのlibraryを作る目的で、全HCV蛋白をカバーするオーバーラッピングペプチドを用い、ELISpotアッセイにより新しいCTLエピトープを同定する。

#### B. 研究方法

C型慢性肝炎治療の全HCV抗原に対するCTL応答への影響の検討は、IFN、リバビリン併用療法を行った7例で行った。4例は24週間連続的に治療を行い、治療前、治療開始後2週、4週、12週、24週 (治療終了時)、治療終了後4週、12週、24週にCTLアッセイと血清HCV RNAの測定を行った。3例は治療開始後4週で4週間の治療中断を行い、その後治療を再開し、20週継続し、治療前、治療開始後2週、4週、治療中断後2週、治療再開時、治療再開後4週、12週、20週 (治療終了時)、治療終了後4週、12週、24週にCTLアッセイと血清HCV RNAの測定を行った。7例の患者の内の2例では治療開始前、開始後1日、2日、3日、7日、10日にCTLアッセイと血清HCV RNAの測定を行った。全HCV抗原に対するCTL応答測定は先に開発し、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、98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陰性細胞と共にまき、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患者自己B細胞

株を標的としてCrリリースアッセイを行い、各96ウェルのCTL活性を合計し、CTL activity index (CAI) とした。

IFN治療の特定のHCV特異的CTLエピトープに対するCTL応答への影響の検討は、IFN単独投与を行ったC型急性肝炎患者2例で行った。IFN投与開始前、治療開始後4週、8週、12週、24週 (治療終了時)、治療終了後4週、12週に特定のHCV特異的CTLエピトープを用いたELISpotアッセイと血清HCV RNA測定を行った。ELISpotアッセイは患者末梢血単核球のCD8陽性細胞を、マクロファージを抗原提示細胞としてCTLエピトープで刺激し、IFN- $\gamma$ 産生細胞を算定することにより行った。

新たなHCV特異的CTLエピトープの同定は全HCV蛋白をカバーし、10アミノ酸ずつオーバーラップする400種類の15あるいは20アミノ酸のペプチドを20種類ずつ混合し、C型急性肝炎患者末梢血単核球のCD8陽性細胞を、マクロファージを抗原提示細胞として混合ペプチドで刺激し、IFN- $\gamma$ 産生細胞を算定することによりスクリーニングした。反応が陽性の場合には個々のペプチドで再度刺激して、エピトープの同定を行った。

(倫理面への配慮)

この研究は自治医科大学、筑波大学臨床医学系、昭和大学医学部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型慢性肝炎をIFNとリバビリンで治療すると、CAIは治療開始2~3日後に上昇した後一旦低下し、血清HCV RNAの消失に伴い治療中に再度上昇し、その後低下した。治療終了後再び血清HCV RNAが陽性化した2例中1例では陽性化の直前にCAIの上昇が認められたが、血清HCV RNAの増加と共にCAIは再び低下した。治療開始後4週

で治療を4週間一時中断した3例中2例では治療開始後4週に一旦低下していたCAIがHCVの再出現に伴い上昇し、内一例ではIFN治療再開前に治療中止により上昇した血清HCV RNAの再低下がみられた。

IFN治療のCTL応答への影響を、特定のCTLエピトープ刺激に対するIFN- $\gamma$ 産生細胞応答で検討したC型急性肝炎患者2例では、1例で治療開始前強いCTL応答がみられたが、治療開始後12週にはCTL応答は著明に低下し、その低下は治療終了後も持続した。

全HCV蛋白をカバーするオーバーラッピングペプチドを用いたELISpotアッセイによるHCV特異的CTLエピトープの同定は2例のC型急性肝炎患者末梢血CD8陽性細胞を用いて行った。HLA-A\*0207, 2601, B\*3501, 4601, Cw\*0102, 0303の患者ではHCV NS3 1527-1546とHCV NS5B 2591-2605に、HLA-A\*2402, 3303, B\*4403, 5401, Cw\*0803, 1403の患者ではHCV E1 332-351, NS3 1638-1656, NS5B 2591-2605にCTLエピトープが存在することが明らかになった。

#### D. 考察

C型慢性肝炎のIFN, リバビリン治療開始2~3日後に全HCV抗原に対するCTL活性の上昇がみられたが、これはIFNによる免疫増強作用によると考えられる。一旦上昇したCTL応答は血清HCV RNAの減少に伴い低下するが、これはIFNによる細胞増殖抑制作用によることが考えられる。更に血清HCV RNAの減少、消失により再度CTL応答が上昇するが、これはトレランスの解除を反映し、その後のCTL活性の低下はHIVの治療の際と同様に抗原刺激の減少によるものと考えられる。短期間の治療と治療中断の繰り返しは、少数例の検討ではあるがCTL活性を維持する効果があると共に、CTL活性の維持がウイルス増加を抑制する可能性があることを示唆する結果が得られた。

特定のHCV特異的CTLエピトープに対するCTL応答のELISpotアッセイによる検討では、全HCV抗原に対するCTL活性測定法による検討とは一部異なった結果が得られた。即ち、ELISpotアッセイによる検討ではウイルス消失に伴う一時的なCTL応答の上昇は認められなかった。この違いの原因としては対象患者が異なったこと、*ex vivo*の測定と*in vitro*の測定の違いがあることなどが考えられる。

今回5種類のCTLエピトープが同定された。この内HCV NS3 1531-1539は既知のHLA-B35拘束性CTLのエピトープを含み、かつ患者もHLA-B\*3501を有することから同一のエピトープをみている可能性が高い。また、2人の患者の両方で同定されたHCV NS5B 2594-2602には既知のHLA-

A\*0201拘束性CTLのエピトープが含まれるが、両患者ともHLA-A\*0201は有さず、かつHLA class I分子は全く異なり、HCV NS5B 2594-2602には新たな2種類のエピトープが含まれる可能性が高い。

#### E. 結論

C型肝炎患者をIFNで治療するとHCVの消失に伴い、CTL応答が低下することが明らかになった。また、治療開始早期の一時治療中断の試験結果から、短期間のIFN治療と治療中断の繰り返しは、CTL活性の維持の面からは効果があると考えられ、今後治療効果の面から検討する価値があると考えられる。全HCV抗原に対するCTL活性測定と特定のHCV特異的CTLエピトープに対するELISpotアッセイでの検討結果には一部異なる結果がみられ、更に症例を増やし検討する必要がある。

HCV特異的CTLエピトープの同定においては、少なくとも4種類の新しいエピトープが同定された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ito, H., Ando, K., Nakayama, T., Taniguchi, M., Ezaki, T., Saito, K., Takemura, M., Sekikawa, K., Imawari, M., Seishima, M., Moriwaki, H. Role of V $\alpha$ 14 NKT cells in the development of impaired liver regeneration in vivo. *Hepatology* 38:1116-1124 [2003].

Hyodo, N., Tajimi, M., Ugajin, T., Nakamura, I., Imawari, M. Frequencies of interferon- $\gamma$  and interleukin-10 secreting cells in peripheral blood mononuclear cells and liver infiltrating lymphocytes in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 38:109-116 [2003].

##### 2. 学会発表

袴田 拓, 松崎靖司, 井廻道夫. ELISpot assayによる新しいHCV特異的CTLエピトープの同定. 第89回日本消化器病学会総会, 埼玉, 2003年4月24日

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

HCV core蛋白のCDK活性化キナーゼ(CAK)結合活性とその細胞生物学的意義  
(主任又は分担) 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CDK活性化キナーゼ(CAK)抑制作用の分子機構を検討した。細胞抽出液から得たCAK分画にcore蛋白を添加すると、MAT1のCAK複合体からの解離とCAK活性の低下がみられた。蛋白相互結合の検討では*in vivo*ではcore蛋白とCDK7-cycH複合体との結合が、*in vitro*ではcore蛋白とCDK7との結合が認められた。免疫染色ではcore蛋白とCDK7は主として核において共存していた。さらに、core蛋白発現により基本転写に重要であるCTDキナーゼ活性やnucleotide除去修復能の低下も認められた。以上のことより、core蛋白は主に核内でCDK7と結合し、その結果MAT1の複合体からの解離が起き、CAK活性が抑制されることが明らかとなった。また、core蛋白はTFIIH機能にも影響を与え、基本転写活性やDNA修復活性も抑制する可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

CDK活性化キナーゼ(CAK)はCDK7、cyclin(cyc)H、MAT1の3つの遺伝子産物のtriplet complexであり、細胞周期進行に必須である各種CDK(CDK1/2/4など)をリン酸化し、活性化作用を有する。前年度までに培養細胞系において、HCV core蛋白の恒常的発現が、宿主細胞の細胞周期進行をG1からS期移行の過程で阻害すること、さらにこれはcore蛋白が直接的にCAKを阻害することにより引き起こされることを報告した。そこで本年度は、このようなcore蛋白によるCAK抑制作用の分子機構の解明を試みた。また、CAKは基本転写因子TFIIHの構成因子でもあり、基本転写やDNA修復にも主要な役割を果たすことが明らかとなっている。core蛋白発現がこれらに及ぼす影響についても検討を加えた。

#### B. 研究方法

マウス正常肝細胞株BNL CL2(CL2)、ヒト肝細胞株HepG2、CL2に遺伝子導入にてcore蛋白を恒常的に発現させたCL2 coreならびに陰性controlであるCL2 mockの4種の細胞を用いた。蛋白発現レベルの検討はimmunoblot(IB)、*in vivo*での蛋白複合体形成は免疫沈降(IP)/IB法、*in vitro*での蛋白結合能はGST pull-down法、蛋白の細胞内局在については免疫蛍光染色にて検討した。またCAK活性、CTDキナーゼ活性はkinase assay、nucleotide除去修復(NER)能についてはNER assay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

CL2 core細胞とmock細胞の比較検討ではCDK7、cycH、MAT1の発現レベルに差はなかったが、CAK triplet complex形成とCAK活性は前者でより低かった。そこでCL2ならびにHepG2からIPにてCAK分画を抽出し、これに*in vitro*翻訳系にて作成したcore蛋白を添加する系にてCAK複合体形成とCAK活性を検討したところ、core蛋白の添加に伴って、MAT1のCAK複合体からの解離とCAK活性の

低下が認められた。CL2 core細胞を用いてIP/IB法にて*in vivo*でのcore蛋白とCAKとの結合を検討したところ、core蛋白とCDK7-cycH複合体との結合が示唆された。さらにGST pull-down法にてcore蛋白の直接標的を探索したところ、core蛋白とCDK7の結合が認められた。そこでcore蛋白とCDK7の二重染色を検討したところ、colocalizationは主として核で検出された。さらにCL2 coreならびにmock細胞でCTDキナーゼ活性、NER活性を比較したところ、両者とも前者でより低下していた。

#### D. 考察

core蛋白は主として核内において、CDK7と直接結合し、core-CDK7-cycH複合体を形成し、これによりMAT1の複合体からの解離が起きることによってCAK活性が抑制されることが明らかとなった。また、core蛋白はCAK複合体形成を阻害するのみならず、CAKが構成因子となっているTFIIHの機能にも影響を与え、基本転写活性やDNA修復活性も抑制する可能性が示唆された。

#### E. 結論

HCV core蛋白のCAK抑制作用の詳細が明らかとなった。この作用を通じてcore蛋白は宿主細胞の細胞周期進行のみならず、基本転写やDNA修復機構にも影響を与える可能性が示された。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

1. Ohkawa K, et al. Changes in gene expression profile by HCV core protein in cultured liver cells: Analysis by DNA array assay. *Hepatology* 2003; 25: 396-408.

2. Hosui A, et al. Hepatitis C virus core protein differently regulates the JAK-STAT signaling pathway under interleukin-6 and interferon- $\gamma$  stimuli. *J Biol Chem* 2003; 278: 28562-71.

3. Ohkawa K, et al. Hepatitis C virus core functions as a suppressor of cyclin-dependent kinase-activating kinase and impairs cell cycle progression. In submission.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特に予定なし



## 初回献血者におけるウイルスマーカー陽性率

分担研究者：内田茂治、中村榮一（東京都赤十字血液センター）

共同研究者：佐藤賢一、柏井昭良（茨城県赤十字血液センター）

福田さと子、齋藤信雄（栃木県赤十字血液センター）

伊藤 明、諏訪<sup>次</sup>三（神奈川県赤十字血液センター）

宮崎 卓、柏木征三郎（福岡県赤十字血液センター）

### はじめに

われわれは平成7年から東京都、茨城県、栃木県、神奈川県および福岡県の初回献血者を対象としてHBs抗原、HBc抗体、HCV抗体およびHTLV-I抗体の陽性率の調査を行っている。初回献血者は通知による選択を受けることがないため、その陽性率は地域住民の陽性率を反映していると考えられる。

### A. 研究目的

初回献血者のウイルスマーカー陽性率の調査によって、そのウイルスの疫学調査が可能となる。また年齢別の調査を行うことにより、過去の感染原因を推定することも可能となるはずである。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行われている「B型肝炎ウイルスの母子感染防止事業」や、一部地方自治体で行われているHTLV-Iの母子感染予防対策の成果を確認することもできるはずである。

### B. 対象と方法

東京都、茨城県、栃木県、神奈川県および福岡県の初回献血者を対象としてHBs抗原、HBc抗体、HCV抗体およびHTLV-I抗体の陽性率の調査を行った。HBs抗原検査は逆受身赤血球凝集反応（RPHA法）、HBc抗体検査は逆受身赤血球凝集阻止法（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）、HTLV-I抗体は粒子凝集反応（PA法）により行った。

### C. 結果

初回献血者におけるHBs抗原陽性率

図1に初回献血者における年齢別HBs抗原陽性率を示す。平成7年の陽性率と比べ平成15年の陽性率は50歳代を除くほとんどの年齢で陽性率の低下が認められる。特に10歳代の若年でその陽性率の低下が顕著である。16歳の初回献血者におけるHBs抗原陽性率は、平成7年から直線的に低下しているが、平成15年は陽性率がついにゼロとなった(図2)。

#### 初回献血者におけるHBc抗体陽性率

HBc抗体の陽性率は平成9年9月に陽性基準の変更(64倍→32倍)があったため、平成11年の陽性率は平成7年や9年と比べてもほとんど変化がなく、高齢者では陽性率が高くなっていた。しかし、平成13年、平成15年はその陽性曲線が高齢者側にシフトしたのとなっていた(図3)。

#### 初回献血者におけるHCV抗体陽性率

HCV抗体陽性率は全年代を含めると60歳代の陽性率が年々低下していることは明らかであるが、その他の年代ではあまり変化がないようにみられる(図4)。そこで16歳から50歳までの陽性率をみると(図5)、平成13年、平成15年で20歳代半ばから40歳にかけて陽性率の低下が認められた。

#### 初回献血者におけるHTLV-I抗体陽性率

HTLV-I抗体の陽性率(関東の4県、図6)は平成15年は高齢者を中心に陽性率の低下が認められるが、平成13年は高めであるため年毎に陽性率が低下しているとはいえない。福岡県の陽性率も顕著に低下しているとはいえないが(図7)、平成15年は16歳・17歳がともにゼロであったことが目を引く。平成15年の陽性率を福岡県と関東の4県とで比較すると(図8)、特定の年齢によっては同率であるが、福岡県が全体に高く、特に30歳代以降では顕著に高かった。

#### D. 考察

HBs抗原、HTLV-I抗体の陽性率は全年齢で低下傾向が認められるものの、陽性率曲線が高齢者側にシフトしているとはいえない。これはHBc抗体やHCV抗体のように主に医療行為により感染していたマーカーとは異なる感染原因を示している。

16歳初回献血者のHBs抗原陽性率が平成15年はついにゼロとなった。平成7年から陽性

率は直線的に低下しているが、これはHB e 抗原陽性からHB e 抗体陽性へのセロコンバージョン年齢の若年化と、出産年齢の高齢化が原因と考えられる。平成15年の16歳献血者はすべて母子感染防止事業開始以降の出生児であり、この事業の成果が改めて確認された。

# 初回献血者におけるHBs抗原陽性率

