

HCVゲノム自律複製細胞においては、ウイルスゲノムの複製はインターフェロンで強く阻害される。事実HCVゲノム自律複製細胞に約100 IU/ml濃度のインターフェロン処理するとウイルス複製は一週間ではほぼ完全に消滅する。一方、生体内ではインターフェロン投与によってもウイルスが排除される場合とされない場合が存在する。また、Huh7細胞においてはインターフェロン産生経路の一部に欠失があると言われている。この欠失と、HCVゲノムがHuh7細胞でよく複製する事実とに何らかの関係がある可能性を考えて以下に解析をおこなった。HCVゲノム自律複製細胞をインターフェロンで処理すると確かにウイルスゲノムの複製は阻害されるが、インターフェロン発現誘導の初期反応、つまり priming の際に、二本鎖RNA（この場合ポリIC）で処理してもウイルスゲノム複製は阻害されない。そこでポリIC処理で活性化されるIRF3の転写活性を調べたところ、この細胞においては活性化が見られなかった。一方、このシグナル伝達の異常を調べ以下のことを明らかにした。単離したHCVゲノム自律複製細胞2株のうちのひとつはTLR3の発現が極端に低下している。一方、もう一つの株ではTLR3の発現があるもののシグナルが伝わらないことが分かった。これらの細胞に外来的にTLR3を発現させると両細胞株でポリIC依存的なシグナル伝達が観察されるようになる。

一方、TLR3の機能的な抑制がHCVゲノム複製に及ぼす影響をHuh7細胞にTLR3を外来的に発現させたときのHCVゲノム複製能で調べた。その結果、HCVゲノム複製能は強く抑制された。以上から、HCVゲノムの複製は二本鎖RNAにより誘導される自然免疫により強く制御されることが分かった。

#### D. 考察

HCVゲノム自律複製細胞を用いて、ウイルスの複製増殖に関して本格的な研究が可能になってきた。本研究ではそのうち

特にウイルスゲノム複製を制御しているウイルスタンパク質からの解析と自然免疫によるウイルス複製制御について解析をおこなった。まずHCV複製において中心的な役割を担うのがウイルスポリメラーゼである。本ポリメラーゼはウイルスRNAを鋳型として、プラス鎖からはマイナス鎖を、マイナス鎖からはプラス鎖を産生する。本研究ではマイナス鎖から産生されるプラス鎖の末端構造を解析した。その結果、5'末端に特別な修飾構造は存在せず、単にリン酸が付加した状態になっていると考えられる結果を得た。これまでにフラビウイルス科の中でも、フラビウイルス属に入るウイルスの5'末端はキャップ構造を持つのに対して、ペスチウイルス属に入るものの末端構造は明らかでない。HCVはこの科の中の第三番目の属に分類されるウイルスであるが、これらの属のウイルスゲノムの末端にはキャップが付加されていないことを示唆する。

さらにゲノム末端構造の解析から末端の塩基配列が冗長であることを示す結果が得られた。これはウイルスポリメラーゼの特徴なのかあるいは、別の要因により変化が生じるのか大変興味を持たれる。

また、このような結果はポリメラーゼを標的とした抗HCV剤の開発にも重要な情報を与えると期待される。

C型慢性肝炎患者の治療に広く用いられているインターフェロン（あるいはインターフェロンとリバビリンの併用療法）において、完治率は満足出来るものではない。その原因としてはHCV複製阻害にインターフェロンがどのような機構で効いているかについての詳細な研究がなされていないためである。本研究ではHCVゲノム複製が自然免疫機構で強く抑制されることを明らかにした。すなわち、二本鎖RNAによりプライムされるインターフェロンシグナルの初期過程が正常に働く場合にはインターフェロン効果が強く現れるが、そうでない場合には内在性のインターフェロン産生は強く抑制されその結果HCVゲノム複製を許すと考えられる。このよ

うなことが感染患者の生体内でも生じているとするなら、インターフェロン投与に加えて自然免疫を外因的に活性化すれば一層効率よくHCVゲノム複製を抑制出来ると考えられるので、今後の治療に明るい情報になる。

#### E. 結論

HCVゲノム自律複製細胞を用いて、ウイルスゲノムの構造を明らかにした。その過程で、ウイルスポリメラーゼによる転写開始におけるヌクレオチド選択の冗長性を明らかにした。また、これらの情報をもとにして転写開始機構については試験管内と生体内とはかなり異なる可能性が示唆され、ポリメラーゼによるRNA合成開始を標的にする抗HCV剤の開発には慎重を要することが示唆される。

自然免疫がHCVゲノム複製を強く制御することを示した。この成果は、HCV感染初期における樹状細胞の活性化の機構を考える上に重要な知見を与えると期待されるし、インターフェロン治療により効果が出にくい患者に対する治療法についても新たな知見を与えるものである。

#### F. 研究発表

Zhang, J., Yamada, O., Sakamoto, T., Yoshida, H., Iwai, T., Matsushita, Y., Shimamura, H., Araki, H., and Shimotohno, K. Down-regulation of viral replication by adenoviral-mediated expression of siRNA against cellular cofactors for hepatitis C virus. *Virology*, 320; 135-43.2004

Shimakami T., Hijikata M., Luo H., Ma Y. Y., Kaneko S., Shimotohno K. and Murakami S. Effect of Interaction between Hepatitis C Virus NS5A and NS5B on Hepatitis C Virus RNA Replication with the Hepatitis C Virus Replicon. *J. Virology*, 78; 2738-48. 2004

Kubm J-Y. Ohshima T. and Kunitada Shimotohno. Association of Ubc9, an E2 ligase for SUMO conjugation, with p53 is regulated by phosphorylation of p53. *FEBS Letters*. 573; 15-8. 2004.

Namba K, Naka K, Dansako H, Nozaki A, Ikeda M, Shiratori Y, Shimotohno K, Kato N. Establishment of hepatitis C virus replicon cell lines possessing interferon resistant phenotype. *Biochem Biophys Res Commun*. 323:299-309, 2004.

Abe K, Ikeda M, Dansako H., Naka K, Shimotohno K, Kato N. cDNA microarray analysis to compare HCV subgenomic replicon cells with their cured cells. *Virus Res*.107:73-81, 2004

厚生労働科学研究費補助金(第3次対がん総合戦略研究事業)  
分担研究報告書

HCV によるインターフェロンシステムの攪乱機構の解析

分担研究者 加藤 宣之 岡山大学 教授

研究要旨: C 型肝炎ウイルス(HCV)の持続感染を維持するために HCV がどのような分子機構によりインターフェロン(IFN)システムを攪乱しているかを明らかにすることを目的とした。HCV の NS5B がヒト不死化肝細胞の S 期進行阻害を引き起こすことを見出した。この現象は NS5B の RNA ポリメラーゼ活性に依存して Toll-like receptor 3 の活性化が起こり、それに引き続いて IFN- $\beta$ の発現誘導が起こることによるものであることを明らかにした。この現象は NS3/4A により強く抑制されたが、コアを共発現させると、NS3/4A の抑制効果が弱まることを明らかにした。昨年度樹立に成功した IFN 抵抗性 HCV レプリコン細胞における IFN 抵抗性がウイルス側因子と宿主側因子のどちらが主要な要因になっているかを解析した。今後実験系として有用な全長 HCV RNA 複製細胞や HCV RNA の複製レベルをルシフェラーゼアッセイで簡便にモニターできる評価系の開発に成功した。ヒト不死化肝細胞をベースにした HCV レプリコン細胞や全長 HCV RNA 複製細胞の樹立を試みた。

A. 研究目的

我が国における肝がんによる犠牲者は毎年3万人を超えており、その9割以上には肝炎ウイルスの感染が認められる。特に、C 型肝炎ウイルス(HCV)の感染は肝がん患者の8割を占めている。HCV の持続感染状態であるC型慢性肝炎は肝細胞のがん化の重要な因子であるが、HCV による持続感染機構およびそれに起因する肝発がん機構については未だよく理解されていない。

肝発がんを予防するためには、HCV を体内から排除して持続感染状態を脱することが必須であることが明らかになっている。しかしながら、C 型慢性肝炎に対する有効な治療薬はインターフェロン(IFN)しかなく、我が国における治癒率も 30%と低い。最近ようやく、IFN との併用により効果を示すリバビリンや IFN の安定性を高めたペグ IFN が登場してきているが、それでも治癒率は最大 50%程度であり、依然として 50%程度は難治性である。また、リバビリンには貧血などの副作用が高齢者を中心に目立つという難点もある。従って、なぜ HCV が IFN に抵抗性を示すのか、すなわち、ウイルスに対する防御機構として宿主

が有している IFN システムを HCV がどのように攪乱しているかを明らかにすることができれば、IFN の治療効果の向上につながるものと考えられる。本研究では、HCV がどのような分子機構により IFN システムを攪乱しているかを明らかにすることを目的としてヒト不死化細胞と IFN 抵抗性 HCV レプリコン細胞を実験モデル系として以下に示す実験を行った。また、今年度は今後の実験に有用と考えられる新たな実験モデルの開発をも試みた。

B. 研究方法

(1)ヒト不死化肝 PH5CH8 細胞における HCV 蛋白質の発現による影響について

PH5CH8 細胞にレトロウイルス遺伝子導入システムを用いてコントロールベクター、並びに HCV 構造蛋白質 core, 非構造蛋白質 NS3, NS4A, NS4B, NS5A, 及び NS5B を導入し、HCV 蛋白質を恒常的に発現する PH5CH8 細胞の樹立を行った。比較のため、別のヒト不死化肝細胞である NKNT-3 細胞、ヒト子宮頸癌細胞 HeLa、並びにヒト肝細胞癌細胞 HuH-7 についても NS5B を発現させた細胞を樹立した。それぞれの HCV 蛋白質の発現を Western

blot により確認した細胞株をチミジン・アフリジコリン二重ブロック法により細胞周期の G1-S 期境界に同調させた後、通常培養液に戻して S 期にリリースすることで、細胞周期の進行を解析した。細胞周期は FACSCalibur フローサイトメーター、及び CellQuest ソフトウェアを用いて解析した。

ブロモデオキシウリジン(BrdU)による新規合成 DNA のパルスラベルを行い、S 期進行に関する定量的解析を行った。コントロール PH5CH8 細胞と NS5B 発現 PH5CH8 細胞を G1-S 境界に同調後 S 期にリリースし、回収 1 時間前に BrdU を添加してパルスラベルを行い、DNA 合成の進行をモニタリングした。また 12 時間での回収サンプルには、リリース後 5 時間後に、チューブリンの重合を阻害し G2-M 期の進行を停止する Nocodazole を添加して、リリース後 12 時間で G2-M 期に達した細胞を蓄積させ、その総数を比較した。

RT-PCR は通常行われている標準的な方法により行った。培養細胞から抽出した総 RNA を用いて、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、各種遺伝子特異的プライマーにより PCR を行い、mRNA の発現レベルを解析した。

RNA 干渉法による Toll-like Receptor (TLR) family の発現抑制は TLR3 と TLR4 特異的 siRNA により行った。コントロールとしてはルシフェラーゼ遺伝子の GL2 に対する siRNA を用いた。

HCV NS5B 蛋白質など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 IRF3 の標的配列 (AGTTTCACTTTCCC) の 5 回繰り返し配列を有するベクター (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、レポーターアッセイを行った。

(2) IFN 抵抗性 HCV レプリコン細胞の IFN 抵抗性獲得機構の解析

IFN に部分的抵抗性を示す HCV レプリ

コン細胞 ( $\alpha$  シリーズ) と IFN に高度に抵抗性を示す HCV レプリコン細胞 ( $\beta$  シリーズ) に HCV ゲノムの複製阻害剤であるサイクロスポリン A を添加して HCV レプリコンを細胞から排除した cured 細胞をそれぞれ作成した。HCV レプリコン細胞と cured 細胞に IFN 用の pISRE-Luc レポータープラスミドを導入し、IFN- $\alpha$  および IFN- $\beta$  を添加した後、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。

IFN 抵抗性レプリコン細胞内で複製している HCV レプリコンの遺伝子解析により見出された Q1737H や M2174V のアミノ酸置換を有する HCV レプリコン RNA 変異体を合成し、cured 細胞にエレクトロポレーションにより導入して再度 HCV レプリコン細胞を樹立した。得られたレプリコン細胞に IFN- $\beta$  (200 IU/ml) を数日おきに添加して 3 週間後に得られるコロニー数を測定した。

(3) 全長 HCV RNA 複製細胞およびルシフェラーゼ遺伝子をコードしている全長 HCV RNA 複製細胞の樹立について

昨年度樹立に成功した HCV-O 株由来の HCV subgenomic レプリコン、sO (旧名、IB-2R1) の上流に HCV-O 株由来の core から NS2 領域までの部分 (新たに RT-PCR により増幅して単離) を結合させ、HCV IRES で drive される G418 抵抗性遺伝子 (Neo<sup>R</sup>) と内部の EMCV IRES で drive される全長 HCV 遺伝子を有する dicistronic な全長 HCV RNA を作成した。この RNA を sO 細胞から IFN 処理により sO subgenomic レプリコンを排除した sOcured 細胞にエレクトロポレーションにより導入し、G418 耐性細胞の選択を行った。

細胞内で複製可能な全長 HCV-O RNA の Neo<sup>R</sup> 遺伝子上流に Renilla ルシフェラーゼ遺伝子を組み込み、HCV-O 細胞を IFN 処理により HCV-O RNA を排除した Ocured 細胞にエレクトロポレーションにより導入し、G418 耐性細胞の選択を行った。

(4)ヒト不死化肝細胞を用いた HCV レプリコン細胞や全長 HCV RNA 複製細胞樹立の試み

長期継代培養した HCV subgenomic レプリコン細胞 (50-1 或は sO) および HCV-O 細胞から Total RNA を抽出し、ヒト不死化肝 PH5CH 細胞にエレクトロポレーションにより導入することにより G418 耐性の細胞コロニーが得られるかどうかを検討した。

#### (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。そのために倫理面への配慮は特段の必要性はない。

#### C. 研究成果

(1)ヒト不死化肝 PH5CH8 細胞における HCV 蛋白質の発現による影響について

HCV 蛋白質が肝細胞内で発現するとどのような影響があるかについては、これまで多くの場合、がん細胞株が用いられている。そこで、我々は、非がん不死化肝細胞である PH5CH8 細胞に各種 HCV 蛋白質を安定的に発現させ、まず、細胞周期に対する影響を解析した。

コントロールベクター導入 PH5CH8 細胞では、G1 期同調後のリリース 4 時間では S 期、8 時間では G2-M 期に至り、12 時間では再び G1 期に戻ることが観察され、正常に進行していることが分った。同様の細胞周期の進行はコア、NS3、NS4B、NS5A を発現させた PH5CH8 細胞でも確認され、これらの細胞では細胞周期の進行促進や遅延は起こらないことが分った。これとは対照的に、NS5B 発現 PH5CH8 細胞では、リリース後 8 時間で多くの細胞が S 期に残っており、12 時間でも G1 期に至っていないも

のが多く、細胞周期の S 期の進行が遅延していることが示唆された。同様の現象はインフルエンザヘマグルチニン(HA)蛋白質や myc タグ蛋白質を融合した NS5B 蛋白質を発現させた細胞でも確認された。

次に、BrdU による新規合成 DNA のパルスラベルを行い、NS5B 発現 PH5CH8 細胞における S 期進行遅延の定量的解析を行った。その結果、コントロールベクター導入細胞ではリリース後 12 時間で 77% の細胞が G2-M 期に達し、S 期残存細胞は僅か 5% であった。これに対して、NS5B 発現 PH5CH8 細胞では 12 時間で G2-M 期に達した細胞は 37% と約半数に低下し、未だ S 期に残存する細胞も 49% にのぼることが明らかになった。以上に結果から、NS5B 蛋白質はヒト PH5CH8 細胞において細胞周期の S 期の進行を遅延する効果を有することが明らかになった。

このような NS5B による細胞周期の進行遅延効果は別のヒト不死化肝細胞である NKNT-3 細胞では認められたが、ヒト子宮頸癌細胞株である HeLa やヒト肝細胞癌細胞株 HuH-7 のがん細胞株では認められなかった。

これまでの報告では、一部の細胞で IFN- $\beta$  が細胞周期の S 期進行を遅延する現象を引き起こすことが明らかにされていることから、次にこの点について検討した。NS5B を発現させた PH5CH8、NKNT-3、HuH-7、並びに HeLa 細胞における IFN- $\beta$  の mRNA の発現レベルをコントロールベクターを導入した細胞の場合と RT-PCR 法により比較解析した。その結果、NS5B を発現する PH5CH8 細胞と NKNT-3 細胞では IFN- $\beta$  の mRNA の発現誘導が認められたが、HuH-7 や HeLa 細胞では IFN- $\beta$  の mRNA の明らかな発現誘導は検出されなかった。このように、NS5B による細胞周期の進行阻害と相関して、IFN- $\beta$  の mRNA の発現がみられたことから、NS5B による細胞周期の進行阻害の原因として IFN- $\beta$  の誘導が関与する可能性が示唆された。

そこで、細胞周期進行阻害における

IFN- $\beta$ の関与を明らかにするため、抗-IFN- $\beta$ 中和抗体処理によって NS5B による細胞周期の進行阻害が回復するかどうかを検討した。コントロールベクター、並びに NS5B を発現する PH5CH8 細胞を G1 期に同調させ、リリース 12 時間前に抗-IFN- $\beta$  中和抗体添加した後、通常培養液に戻して S 期にリリースした。その結果、抗-IFN- $\beta$  中和抗体処理した NS5B 発現 PH5CH8 細胞では未処理の NS5B 発現 PH5CH8 細胞で見られる細胞周期の進行阻害が回復することが明らかとなった。以上の結果から、NS5B による PH5CH8 細胞の細胞周期進行阻害は IFN- $\beta$  の発現誘導が関与しているものと考えられた。

PH5CH8 や NKNT-3 細胞ではウイルスゲノムの複製が起こっていないにも関わらず、IFN- $\beta$  mRNA の発現誘導が認められたことから、NS5B が TLR family を活性化した結果である可能性が考えられた。そこで、RNA 干渉法により TLR3 と TLR4 の発現を抑制させ、この可能性を検討した。その結果、TLR4 を抑制した細胞の IFN- $\beta$  の発現レベルはコントロール細胞と同等レベルであったのに対して、TLR3 を抑制した NS5B 発現細胞では IFN- $\beta$  の著しい発現低下が確認された。従って、NS5B による IFN- $\beta$  の誘導には TLR3 シグナル経路が関与していることが示唆された。この可能性は、BrdU による新規合成 DNA のパルスラベルによる定量的解析法によっても支持された。

NS5B は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼであり細胞内の ER 膜へ局在することから、これらの性質が IFN- $\beta$  の誘導に必要であるかどうかを検討した。昨年度既に作成して報告した NS5B の各種変異体を用いてそれらの IFN- $\beta$  の誘導能を RT-PCR 法により解析した。その結果、NS5B による IFN- $\beta$  の誘導には RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性が必須であり、かつ ER 膜への局在も必要であることが判った。また、IFN- $\beta$  の誘導後に IFN システムの活性化が起こっていることについても、STAT1 のリン酸化や IRF7 の発現高進などを Western ブロット

法により確認した。

IFN- $\beta$  遺伝子のプロモーター領域には TLR3 からのシグナルにより活性化される IRF3 の標的配列が存在することから、この標的配列が 5 回繰り返された配列を有するプラスミドを PH5CH8 細胞に導入して NS5B がこの配列を活性化するかどうかをルシフェラーゼレポーターアッセイにより検討した。その結果、NS5B がルシフェラーゼ活性を数倍上昇させることが判った。しかしながら、この活性化は NS3/4A を発現させるとほぼ完全に抑制されることも明らかとなった。この抑制は、NS3 や NS4A 単独では起こらず、NS3 プロテアーゼ活性を欠く NS3 変異体/4A でも起こらないことから、プロテアーゼ活性に強く関連した効果であることが示唆された。しかし、NS5B とコアを共発現させると、IFN- $\beta$  の発現誘導がさらに高進したが、NS3/4A による抑制効果は弱まること分った。

## (2) IFN 抵抗性 HCV レプリコン細胞の IFN 抵抗性獲得機構の解析

IFN に高感受性を示す HCV レプリコン細胞に低濃度の IFN を繰り返し添加することにより昨年度樹立に成功した IFN 抵抗性 HCV レプリコン細胞を用いて、IFN 抵抗性がウイルス側因子に起因するのか或は宿主側因子に起因するのかの検討を行った。IFN 部分抵抗性株として 1 $\alpha$ R と 3 $\alpha$ R、IFN 高度抵抗性株として 1 $\beta$ R と 3 $\beta$ R に対してサイクロスポリン A 処理を行い、HCV レプリコンを細胞内から完全に排除した cured 細胞をそれぞれ作成した。得られた細胞を用いて、IFN のシグナルの伝わり方に差が認められるかどうかをルシフェラーゼレポーターアッセイにより検討した。その結果、既に樹立した HCV レプリコン細胞から HCV レプリコンを排除しても IFN の伝わり方に差は認められないことが判った。

次に IFN 高度抵抗性 HCV レプリコン細胞株に共通のアミノ酸置換を伴う変異として同定されていた Q1737H (NS4B 領域) や 1 $\beta$ R に特異的に検出された M2174V (NS5A 領域) と IFN 抵抗性との関係について

て検討した。Q1737HやM2174Vの変異を有するHCVレプリコンをcured細胞に導入して得られた新規HCVレプリコン細胞をIFN- $\beta$ で処理し、最終的に得られるIFN抵抗性コロニーの出現頻度と遺伝的変異との関係を調べた。その結果、もとの1 $\beta$ R細胞ではIFN- $\beta$ 処理によってもほとんどの細胞がG418耐性を維持していたが、それ以外の新規に作製したHCVレプリコン細胞はIFN- $\beta$ に高感受性を示した。この高感受性は遺伝的変異の有無には無関係であった。従って、IFN抵抗性レプリコン細胞で見出されたレプリコンの遺伝的変異を導入しただけではIFN抵抗性になるわけではないことが判った。

### (3) 全長HCV RNA複製細胞およびルシフェラーゼ遺伝子をコードしている全長HCV RNA複製細胞の樹立について

HCV-O株由来の全長HCV RNAが細胞内で複製しているG418耐性細胞(O細胞)の樹立に成功した。Northern blot解析により約11 kbの全長HCV RNAが検出され、Western blot解析によっても各種HCV蛋白質が検出され、細胞内でHCV RNAゲノムが効率良く複製していることを確認した。複製している全長HCV RNAの遺伝子解析により、NS3のヘリカーゼ領域に位置する1609番目にアミノ酸がリジンからグルタミン酸に変化していることが判り、このアミノ酸変化によりHCV RNAの複製効率が著しく上昇することを実験的に明らかにした。

得られたHCV-O RNAのNeo<sup>R</sup>遺伝子上流にRenillaルシフェラーゼ遺伝子を追加的に組み込んだHCV-O RNAが複製しているG418耐性細胞を樹立することができ、HCV-O RNAの複製レベルをルシフェラーゼアッセイにより簡便にモニターできるシステムの開発に成功した。このアッセイシステムを用いて、HCV-O RNAの複製のIFN感受性を定量化した結果、これまでHCV subgenomicレプリコンで得られていたIFN感受性とほぼ同様の結果が得られた。

### (4) ヒト不死化肝細胞を用いたHCVレプリコン細胞や全長HCV RNA複製細胞樹立の試み

HCV subgenomicレプリコン細胞(50-1またはsO)を長期間(数ヶ月以上)継代培養すると、レプリコンRNAの配列が変化しquasispeciesの状態になることを明らかにしていることから、これらのレプリコン細胞からTotal RNAを抽出してヒト不死化肝PH5CH細胞に導入して、G418耐性の細胞コロニーの単離を試みたが、そのようなコロニーは得られなかった。全長HCV RNA複製細胞であるHCV-O細胞由来のTotal RNAについても試みたが、G418耐性コロニーは得られなかった。この原因としてPH5CH細胞においては、HCV RNAの複製によりIFN- $\beta$ が誘導産生されてしまう可能性が考えられ、そこで、IFN- $\beta$ 産生を阻害するRIG-I dominant negative formやHCV NS3/4Aを恒常的に発現させたPH5CH8細胞を作成して、これらの細胞に先程と同様にレプリコン細胞やHCV-O細胞由来のTotal RNAを導入した。しかしながら、G418耐性の細胞コロニーを得ることは出来なかった。

## D. 考察

### (1) ヒト不死化肝PH5CH8細胞におけるHCV蛋白質の発現による影響について

今回見出したNS5BによるTLR3を介したIFN- $\beta$ の発現誘導の分子機構には2つの可能性が考えられる。1つ目は、NS5BとTLR3のシグナル系の活性化に関わる蛋白質(TRIFやRIG-Iなど)との相互作用が挙げられる。2つ目は、NS5BのRNAポリメラーゼ活性がTLR3の活性化を引き起こすことが挙げられる。今回の実験結果では、IFN- $\beta$ の発現誘導にはER膜に局在したRNAポリメラーゼ活性が必須であることが示されたことから少なくとも後者の分子機

序により引き起こされた現象であることが示唆された。TLR3のリガンドは2本鎖RNAであることが知られていることから、HCV RNAの複製が起こらない状態においてもNS5Bが宿主由来のRNAを基質にして2本鎖RNAを合成している可能性が示唆された。

今回、見出したNS5BによるTLR3の活性化現象はHCVの宿主に対する弱点を示したものと思われるが、この現象はNS3/4Aの発現により抑制されることから、HCVの弱点と補う方法としてHCV自身がNS3/4Aを有しているものと考えられる。NS3/4Aの活性が勝ればHCVの持続感染の成立に有利に働くが、NS3/4Aの活性が弱まれば、HCVは排除されるようになると思われる。今回は、HCV1株のNS3/4Aしか検討していないことから、異なる病態由来のNS3/4A株についてその活性を調べる必要性がある。

近年、HCV RNAゲノムが細胞内で自立的に効率よく複製するHCVレプリコン細胞が頻用されているが、これらは、TLR3のシグナル系が欠損しているヒト肝がん細胞株HuH-7由来であることから、残念ながら、今回に実験系には使用できない。PH5CH8細胞のようなTLR3のシグナル系が正常な細胞由来のHCVレプリコン細胞に樹立が必要である。

## (2) IFN 抵抗性 HCV レプリコン細胞の IFN 抵抗性獲得機構の解析

今年度の実験結果からは、HCVレプリコン細胞のIFN抵抗性は、ウイルス側の遺伝的因子により規定されているわけではなく、宿主側のIFNシグナル伝達系の異常によ

り起こっていることが示唆された。しかしながら、HCVレプリコンの細胞内複製が長期間繰り返されたことによりこれらのシグナル伝達の異常が生じるという可能性も残ることから、さらなる解析が必要である。また、現在、IFNシグナル伝達系のどの部分に異常が生じているかを明らかにするために、関連宿主因子の遺伝的異常の有無を解析中である。

## (3) 全長 HCV RNA 複製細胞およびルシフェラーゼ遺伝子をコードしている全長 HCV RNA 複製細胞の樹立について

今年度、国産の全長HCV RNA複製細胞HCV-Oおよびその複製レベルをルシフェラーゼアッセイにより定量化できるシステム系を確立できたことから、今後このシステムをフルに活用することによりHCV RNAの複製阻害剤の探索や迅速な評価が可能になるものと思われる。また、今回得られたHCV RNA複製細胞を用いることにより、全HCV蛋白質の細胞内機能を解析するための有用な実験ツールになるものと思われる。その有用性は非常に高いものと考えられる。

## (4) ヒト不死化肝細胞を用いた HCV レプリコン細胞や全長 HCV RNA 複製細胞樹立の試み

TLR3を介したIFN- $\beta$ 誘導産生系をほぼ完全に抑えた細胞系においても、HCVレプリコン細胞を樹立出来なかったことから、PH5CH細胞においてHCV RNAの複製に必要な宿主因子が欠けている可能性がある。もう一つの可能性として、PH5CH細胞の培養にはEGFを含め各種添加剤を加え



ていることから、これらの添加剤が HCV RNA の複製を阻害している可能性がある。今後これらの点を検討する必要がある。

#### E. 結論

(1) NS5B がそれ自身の RNA ポリメラーゼ活性に依存して TLR3 を活性化し、引き続いて IFN- $\beta$  の発現誘導を起こすことを明らかにした。

(2) IFN 抵抗性 HCV レプリコン細胞では宿主側因子の異常が IFN 抵抗性に寄与していることを明らかにした。

(3) 全長 HCV RNA 複製細胞 HCV-O および HCV RNA の複製レベルをルシフェラーゼアッセイで簡便にモニターできる評価系を開発した。

(4) ヒト不死化肝細胞を用いた実験から、HCV レプリコンの樹立には IFN- $\beta$  産生系の抑制以外の因子が必要であることが判った。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) M. Ikeda, K. Abe, H. Dansako, T. Nakamura, K. Naka and N. Kato. Efficient replication of a full-length hepatitis C virus genome, strain O, in cell culture, and development of a luciferase reporter system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2005) in press.
- 2) N. Kato, T. Nakamura, H.

- Dansako, K. Namba, K. Abe, A. Nozaki, K. Naka, M. Ikeda and K. Shimotohno. Genetic variation and dynamics of hepatitis C virus replicons in long-term cell culture. *J. Gen. Virol.* (2005) in press.
  - 3) K. Tamura, A. Oue, A. Tanaka, N. Shimizu, H. Takagi, N. Kato, A. Morikawa and H. Hoshino. Efficient formation of vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing the native forms of hepatitis C virus envelope proteins detected after sonication. *Microbes Infect.* (2005) in press.
  - 4) K. Abe, M. Ikeda, H. Dansako, K. Naka, K. Shimotohno and N. Kato. cDNA microarray analysis to compare HCV subgenomic replicon cells with their cured cells. *Virus Res.* 107, 73-81 (2005)
  - 5) K. Namba, K. Naka, H. Dansako, A. Nozaki, M. Ikeda, Y. Shiratori, K. Shimotohno, and N. Kato. Establishment of hepatitis C virus replicon cell lines possessing interferon-resistant phenotype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323, 299-309 (2004).
  - 6) A. Naganuma, H. Dansako, T. Nakamura, A. Nozaki and N. Kato. Promotion of microsarellite instability by hepatitis C virus core protein in human non-neoplastic hepatocyte cells. *Cancer Res.* 64, 1307-1314 (2004).
- ##### 2. 学会発表
- 1) K. Naka, H. Dansako, N. Kobayashi, M. Ikeda and N. Kato. Hepatitis C virus NS5B activates

- TLR3 signaling pathway in non-cancerous hepatocytes. p59, 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Heidelberg, Germany, 2004.
- 2) M. Ikeda, K. Abe, H. Dansako, T. Nakamura, K. Naka and N. Kato. Characterization of cured cells derived from clonal Huh-7 cell line carrying replicating a newly established genome-length HCV RNA (HCV-O). p114, 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Heidelberg, Germany, 2004.
- 3) H. Dansako, K. Naka, N. Kobayashi, M. Ikeda and N. Kato. Distraction of interferon signaling pathway in non-cancerous hepatocytes by HCV Proteins, p190, 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Heidelberg, Germany, 2004
- 4) K. Abe, M. Ikeda, H. Dansako, K. Naka, K. Shimotohno and N. Kato. cDNA microarray analysis to compare HCV subgenomic and genome-length RNA replicating cells with their cured cells. p110, 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Heidelberg, Germany, 2004
- 5) 仲 一仁、團迫浩方、小林直哉、池田正徳、加藤宣之。C型肝炎ウイルスNS5B蛋白質によるTLR3シグナル経路の活性化。第52回日本ウイルス学会学術集会。2004年 横浜
- 6) 池田正徳、阿部健一、團迫浩方、中村孝志、仲 一仁、加藤宣之。HCV-0(1B-2)株由来の全長HCV RNA複製系の開発。第52回日本ウイルス学会学術集会。2004年 横浜
- 7) 田村一志、大上厚志、清水宣明、加藤宣之、星野洪郎。Native formのHCV envelopeを持つVSV pseudotype virusの作製、およびその感染性についての検討。第52回日本ウイルス学会学術集会。2004年 横浜
- 8) 阿部健一、池田正徳、團迫浩方、仲 一仁、下遠野邦忠、加藤宣之。C型肝炎ウイルス(HCV)レプリコン細胞および全長HCV RNA複製細胞を用いたcDNAマイクロアレイ解析。第52回日本ウイルス学会学術集会 2004年 横浜
- 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

厚生労働科学研究費補助金(第3次対がん総合戦略研究事業)  
分担研究報告書

樹状細胞からみたC型肝炎ウイルス(HCV)持続感染機構の解析  
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

C型慢性肝炎患者では、IFN $\alpha$  反応性に認められる樹状細胞 (DC) の Th1 細胞誘導が低下しており、この IFN $\alpha$  反応性の低下が治療抵抗性に関与していると考えられる。その機序として、患者 DC では IFN $\alpha$  による CD86 発現誘導や IL-10 産生の抑制が十分でないことが示された。IFN $\alpha$  とリバビリンの添加により DC 機能が回復する例、実際の併用療法により治療開始早期に DC の Th1 誘導能が亢進し、Th1/Th2 比が上昇した例では HCV が高率に排除された。以上より C 型慢性肝炎に対する IFN $\alpha$ /リバビリン併用療法において、DC 機能の回復は HCV 排除に重要であり、治療前および治療経過中の DC 機能の解析は効果予測のために有用である可能性が示された

A.研究目的

C 型慢性肝炎における HCV 持続感染の機序、肝細胞障害の発症と進展、IFN $\alpha$ 、リバビリンによる HCV 排除などには宿主の免疫応答が深く関与していることが明らかになっている。樹状細胞 (DC) は強力な抗原提示細胞であり、ウイルス、癌に対する免疫応答の中心的役割を果たしている。我々の検討により C 型慢性肝炎患者ではミエロイド DC (MDC) とプラスマサイトイド DC (PDC) の頻度が減少しており、MDC の Th1 誘導能や PDC の IFN 産生能が低下していることが明らかになった。また C 型慢性肝炎患者 DC は IFN $\alpha$  に対する反応性が低下しており、これにより DC を介した NK 細胞の活性化が低下し、癌のサーベイランスが不十分となっていることが明らかになった。これを踏まえて本研究では、C 型慢性肝炎において、1) IFN $\alpha$  不応答性の機序の解明、2) IFN $\alpha$ /リバビリン治療における DC 機能の解析を行い、DC の機能制御を介した初期免疫と獲得免疫の統合的調節による HCV 排除、肝発癌予防の治療法を確立することを目的とする。

B.研究方法

C 型慢性肝炎患者または非感染者の末梢血単球より DC を誘導し、ナイーブ CD4 T 細胞と共培養した後に、T 細胞のサイトカイン産生を解析することで DC の Th1 誘導能を評価した。DC 誘導過程において IFN $\alpha$  単独または IFN $\alpha$ 、リバビリン両剤の添加による DC の機能変化を検討した。また IFN $\alpha$ /リバビリン併用療法の過程での DC の Th1 誘導能を治療前及び開始後経時的に解析し、治療効果との関連を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は大阪大学医学部倫理委員会の承認を受けており、事前に被験者の同意を得ており倫理的問題はないと考える。

C.研究結果

C 型慢性肝炎患者由来の DC (HCV-DC) は非感染者 DC (N-DC) に比べて、IFN $\alpha$  への反応性に見られる Th1 誘導能の亢進が認められなかった。この機序を明らかにするために、まず誘導後の DC の表面マーカーを検討すると、HCV-DC では N-DC に比べ、IFN $\alpha$  による CD86 CD80 の発現増強が軽度であった。また両群で DC からの IL-12p70 産生能は差を認めなかった。IFN $\alpha$  により N-DC では IL-10 の産生が著明に低下したが、HCV-DC ではその低下は軽度であった。N-DC では CD86 発現亢進、IL-10 産生低下と Th1 細胞誘導亢進は有意に相関したが、HCV-DC では相関を認めなかった。IFN $\alpha$  のみでは DC の Th1 誘導が亢進しなくてもリバビリンを加えることで Th1 誘導能が亢進する症例が、IFN $\alpha$ /リバビリン併用療法を受けた 20 例の患者のうち 6 例存在した。これらの症例は、全例投与開始後 DC の Th1 反応誘導能が亢進し、最終的に HCV が排除された。

D.考察

C 型慢性肝炎患者 DC は非感染者 DC に比べて IFN $\alpha$  による Th1 誘導能が低下していた。

これは IFN $\alpha$  による DC の CD86 発現亢進、IL-10 産生低下が関与していると考えられた。IFN $\alpha$ /リバビリン治療を受ける C 型慢性肝炎患者において、開始前の DC への IFN $\alpha$  とリバビリン添加により Th1 誘導能が亢進した症例では、治療開始後 Th1 反応が亢進し、HCV が排除されたことから、DC 機能が C 型慢性肝炎における抗ウイルス治療の効果予測因子になる可能性が示唆された。

#### E. 結論

C 型慢性肝炎患者では DC の IFN $\alpha$  反応性 Th1 誘導能が低下しており、リバビリンは DC に作用して Th1 誘導能を回復させることで、治療効果に関与すると考えられた。

F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

1. Kanto, T., et al. Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2004. 190: 1919-1926. 2. Kaimori, A., et al. Pseudotype hepatitis C virus enters immature myeloid dendritic cells through the interaction with lectin. *Virology* 2004. 324: 74-83.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特に予定なし

分担研究報告書

C型肝炎ウイルス特異的細胞障害性T細胞が認識する抗原エピトープの同定

分担研究者 井廻 道夫 昭和大学医学部教授

研究要旨 全C型肝炎ウイルス（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 アッセイにより、3例のC型急性肝炎の患者でそれぞれ1種類、計3種類の新しい細胞障害性T細胞（CTL）エピトープを同定した。また、2例のC型急性肝炎患者でCTLの動態を検討した。

A. 研究目的

C型肝炎に対するペプチドワクチンの開発をめざし、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

HCV特異的CTLエピトープは、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401種類の15あるいは20アミノ酸のペプチドを20種類ずつ（1組のみ21種類）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。また、同定したエピトープペプチドを用いて急性肝炎におけるHCV特異的CTLの経過を観察した。

（倫理面への配慮）

この研究は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

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、3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\*2602, 3101, B\*5101, 5102, Cw\*1402, 1502の患者ではHCV NS3 1367-1386, HLA-A\*2402, B\*0702, 5201, Cw\*0702, 1202の患者ではHCV E2 604-618, HLA-A\*1101, 3101, B\*6701, 5101, Cw\*0702, 1401の患者ではHCV NS5A 2284-2303にCTLエピトープが存在することが明らかになった。HCV特異的CTLの経過を観察できたC型急性肝炎2例の検討では、肝炎早期には末梢血中にはHCV特異的CTLが少なく、肝炎の改善、HCV量の減少と共に増加することが認められる症例と肝炎早期には末梢血中に多数のHCV特異的CTLが認められるものの、肝炎の改善、HCV量の減少と共に減少する症例が存在することが明らかになった。

D. 考察

私達はこれまで、C型肝炎患者末梢血からのCTL株の樹立により3種類、HLA-A\*2402結合モチーフを有するHCVペプチドを用いたELISpotアッセイにより11種類、全HCVオーバーラッピングペプチドを用いたELISpotアッセイにより5種類のCTLエピトープを同定すると共に、CTLエピトープの同定は急性肝炎患者あるいは感染早期の慢性肝炎患者で容易であることを明らかにした。今回、3例のC型急性肝炎患者でそれぞれ1種類、計3種類の新しいHCV特異的CTLエピトープ

を同定した。最小有効エピトープの解析は1アミノ酸ずつオーバーラップするペプチドを合成し、進行中であり、HLAの拘束性の決定のため、同定したエピトープペプチド特異的 CTL 株の樹立を行っている。

C型急性肝炎患者2例の自然経過における同定した HCV ペプチド特異的 CTL の末梢血中での動態の観察では、C型肝炎のインターフェロン治療で HCV 量が減少し、抗原刺激の低下とともに HCV 特異的 CTL が減少するという現象と同様な CTL の動態がみられる症例と、反対に、肝炎早期にはむしろ末梢血中の HCV 特異的 CTL は少なく、肝炎の改善、HCV 量の減少と共に増加する症例が存在した。後者の理由としては肝炎早期には CTL が末梢血よりも肝に強く集積している可能性、肝炎初期の高ウイルス量の時期には CTL が機能不全状態になっている可能性が考えられる。

#### E. 結論

今回、新たに3種類の HCV 特異的 CTL エピトープが同定され、日本人における HCV 特異的 CTL エピトープの library に加えられた。更に、このエピトープの最小有効エピトープと HLA 拘束性の解析が進行中である。

C型急性肝炎早期の CTL の動態とウイル

ス排除の関係は今後更に検討する必要がある。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Hyodo, N., Nakamura, I., Imawari, M. Hepatitis B core antigen stimulates interleukin-10 secretion by both T cells and monocytes from peripheral blood of patients with chronic hepatitis B virus infection. Clin. Exp. Immunol. 135:462-466 [2004].

Hakamada, T., Funatsuki, K., Morita, H., Ugajin, T., Nakamura, I., Ishiko, H., Matsuzaki, Y., Tanaka, N., Imawari, M. Identification of novel hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocyte epitopes by ELISpot assay using peptides with human leukocyte antigen-A\*2402-binding motifs. J Gen Virol 85:1521-1531, 2004

##### 2. 学会発表

なし

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

分担研究報告書

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（東京都西赤十字血液センター）

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。

共同研究者

中村榮一（東京都赤十字血液センター）

中山修一、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、稲葉頌一（神奈川県赤十字血液センター）

友成洋子、柏木征三郎（福岡県赤十字血液センター）

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16年の陽性率は平成14年に比べてほぼ全年代で著しい陽性率の低下が認められた。特に過去の陽性率が1%を越えていた40歳代以降での低下が顕著で、陽性率の一番高い50歳代後半でも陽性率が1%を下回った。平成16年5月より輸血用血液の安全性向上を目的として、献血時の本人確認を一部の血液センターで試験的に実施

し、マスコミ報道等でも大きく取り上げられた。このことが初回献血者のHBs抗原陽性率の低下に影響しているのかもしれない。16歳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、平成15年は陽性率がついにゼロとなったが、平成16年は逆に増加してしまった。(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年に陽性基準の変更があったため、平成10年の陽性率は高齢者を中心に平成8年より高くなった。しかしながら、その後は年毎に陽性率が少しずつ低下していたが、平成16年は全年代で明らかな低下傾向が認められ、特に陽性率の高い30歳代以降でその低下は顕著であった(図3)。

#### 初回献血者におけるHCV抗体陽性率

HCV抗体陽性率もHBc抗体陽性率と同様に、年毎に陽性率が少しずつ低下していたが、平成16年では20歳代後半以降で明らかな陽性率の低下が認められた(図4)。

#### 初回献血者におけるHTLV-I抗体陽性率

HTLV-I抗体の陽性率を関東地方の1都3県と福岡県とを比較すると、全年代で福岡県が高く、特に30歳代以降では顕著に高かった(図5)。陽性率の年毎の減少を確認するために40歳以下で陽性率曲線を描くと、

平成16年は16歳初回献血者の陽性率がゼロであったが、関東地方の1都3県では年毎の減少傾向が認められない(図6)。一方、福岡県では10代、20代後半で陽性率の低下が認められ(図7)、特に16歳・17歳の陽性率が平成15年、16年と2年連続でゼロであったことが目を引く(平成15年のデータは示さず)。

#### D. 考察

平成16年はHBs抗原、HBc抗体ならびにHCV抗体の陽性率が予想以上に低下傾向を示した。その原因として、明確な因果関係は証明できないものの献血時の本人確認の試験的实施とそのマスコミ報道が考えられる(スクリーニング核酸増幅検査での陽性件数も同時期から減少した)。16歳献血者のHBs抗原陽性率が平成15年のゼロから上昇してしまっただが、これらの陽性者は水平感染による感染者と考えられる。今後の傾向を確認したい。

福岡県のHTLV-I抗体陽性率は関東の1都3県より明らかに高いが、40歳以下で検討すると年毎の減少傾向が確認された。関東の1都3県では減少傾向が認められず、母子感染防止対策事業の違いによるものと考えられた。



図1 初回献血者におけるHBs抗原陽性率

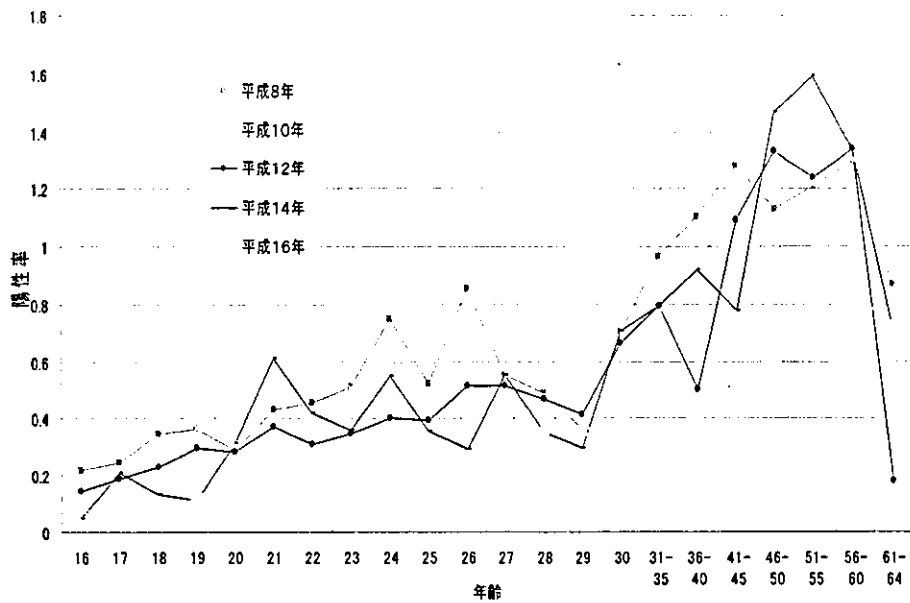


図2 16歳初回献血者におけるHBs抗原陽性率

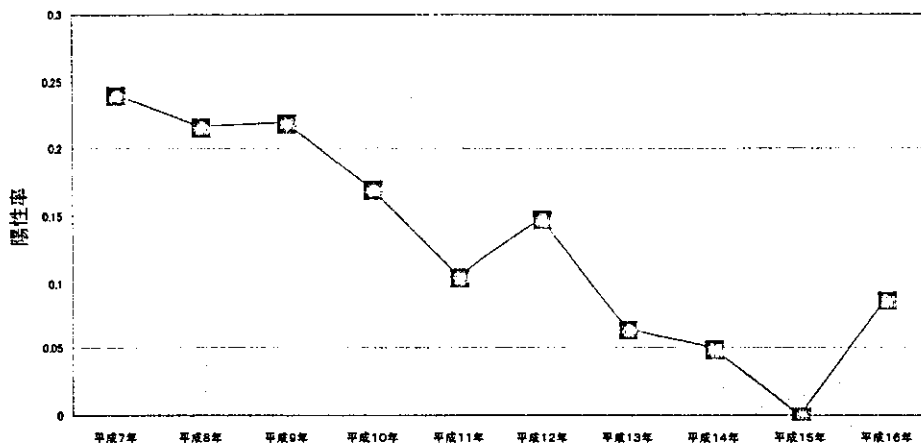


図3 初回献血者におけるHBc抗体陽性率

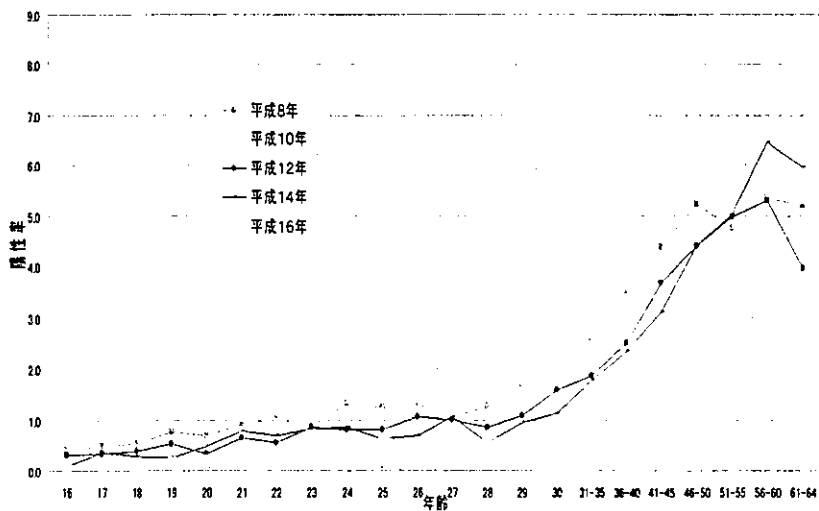


図4 初回献血者におけるHCV抗体陽性率

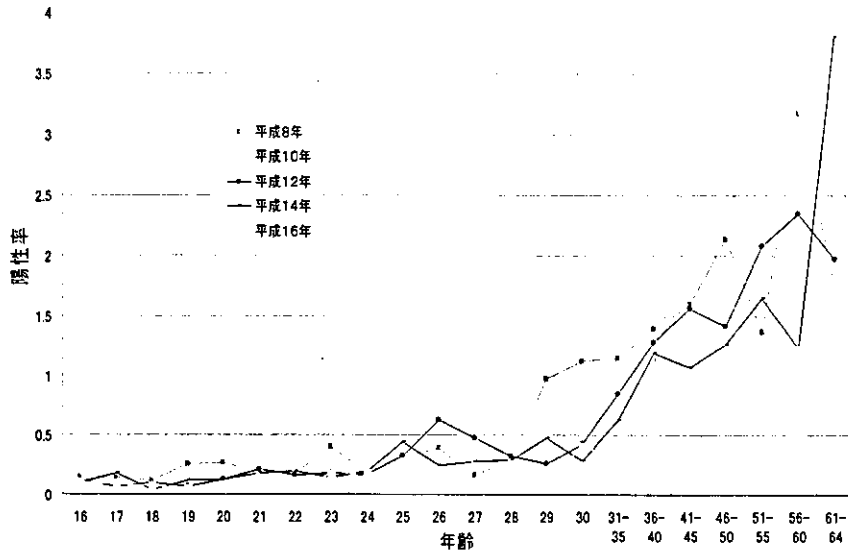


図5 初回献血者におけるHTLV-I抗体陽性率(関東と福岡)

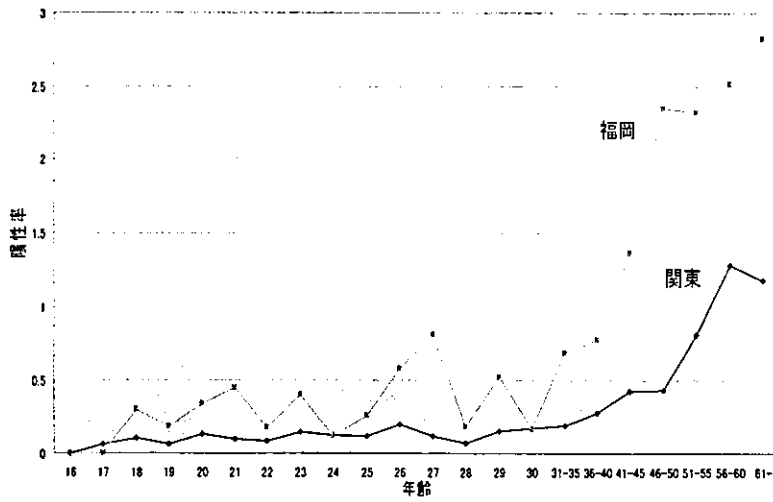


図6 初回献血者におけるHTLV-I抗体陽性率(関東40歳以下)

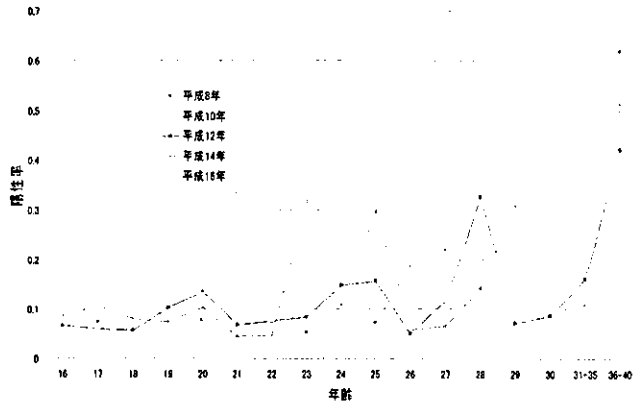
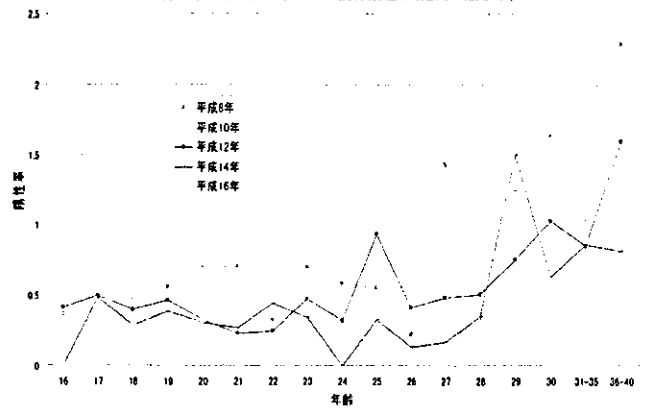


図7 初回献血者におけるHTLV-I抗体陽性率(福岡40歳以下)



厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

分担研究報告書

2004年の輸血感染症報告

分担研究者：内田茂治（東京都西赤十字血液センター）

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NAT導入以前と比較して大幅に減少した。しかしながら、全国の医療機関からの自発報告例は依然として症例数が多く、輸血と感染との因果関係を明らかにする必要がある。また、2003年6月からは過去の陽転化例も含めた遡及調査を開始した。

共同研究者

高橋雅彦（東京都赤十字血液センター）

A. 研究目的

輸血によるウイルス伝播の実態を調査することを目的として、2004年に全国の医療機関から報告のあった自発報告例、ならびに遡及調査を含めた献血者の献血後情報による症例の解析を行った。また、2004年8月よりNATの検出感度向上のため、プールサイズを従来の50から20に変更した。このプールサイズ縮小の評価を行う。

B. 対象と方法

2004年1月から2004年12月までに、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231例、2004年中に

遡及調査の終了した症例、および試験的に行っている輸血実施例の全数調査症例を対象とした。自発報告例の内訳はHBV感染の疑いが138例（取り下げ11例）、HCV感染の疑いが88例（取り下げ24例）、HIV感染の疑いが5例（取り下げ1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個別NAT）を行った。

C. 結果

HBV対象症例とその解析結果

取り下げ例を除く自発報告127例と、遡及調査ならびに全数調査症例の解析を行い、計20例のHBV-DNA陽性例が確認された（図1）。内訳は自発報告で8例、遡及調査で6例、全数調査で1例および追跡調査で5

例（低濃度キャリア症例の波及4例（表1）、自発報告陽性例の片割れ血液による1例）であった。これらの他、輸血による感染であるかどうかの評価が未確定である陽性疑い例が3例あった。

#### HCV対象症例とその解析結果

取り下げ例を除く64例の解析を行ったが、HCV-RNA陽性例は確認できなかった（図2）。

#### HIV報告例とその解析結果

取り下げ例を除く4例の解析を行ったがHIV-RNAは検出されなかった。

#### NATプールサイズ変更の評価

2004年8月より2005年2月までに確認された20プールNAT陽性例が、従来の50プールNATで検出されるかどうかの検討を行った（表2）。HCV3例およびHIV3例の陽性例は50倍希釈しても確実にNATで検出され、この2種のウイルスに対するプールサイズ縮小の効果は確認できなかった。しかしHBV陽性例42検体のうち50倍希釈で陰性になってしまうものが6例あり、2回検査のうち1回しか陽性とならないもの10例を含めるとプールサイズ縮小の効果は高いと考えられた。

#### D. 考察

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、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7例（自発報告5例、献血後情報2例）、2002年は8例（自発報告4例、献血後情報3例、追跡調査1例）、2003年は12例（自発報告4例、献血後情報8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NAT導入直後の2000年には大幅な減少が認められたが、遡及調査の徹底により2001年以降解析結果陽性の件数が増加している。しかし、この陽性件数の増加は、今まで見えなかったものを見ることが出来るようになったため、NATの精度や効果が落ちたためではないと思われる。

2004年は20例のHBV陽性例が確認されたが、この数には従来輸血との関連性は低いと考えられた個別NAT検出限界以下の