

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

B型及びC型肝炎の疫学及び検診を含む肝炎対策に関する研究

平成16年度 班長研究協力者 研究報告書

「HCV感染初期における免疫担当細胞活性化の特性：表面マーカーから見た解析」

班長研究協力者 菅野雅元（広島大学大学院医歯薬学総合研究科・教授）

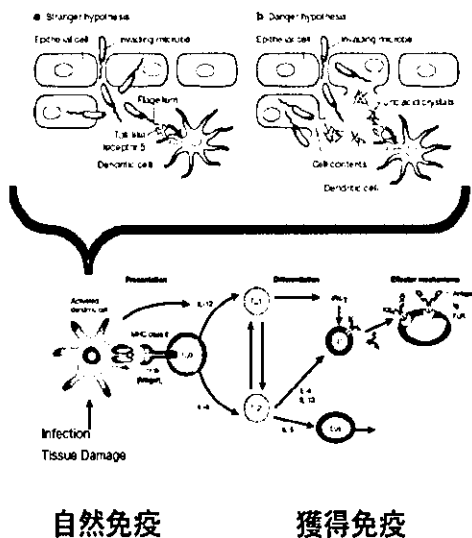
研究要旨： ウイルス性肝炎の予防・診断・治療・疫学などに関する臨床医学的研究、および基礎医学的研究や対策を考える上で、基礎免疫学の立場からのアプローチを加えることにより、研究班全体の広がりや基礎から臨床、そして疫学、予防医学までと幅を広げることを目指している。患者や一般市民生活、社会生活環境の向上へと結びつけるための、基礎的エビデンスを提供することを、本研究の主眼としている。肝炎ウイルス（B型、C型）は免疫系を介した急性・慢性の炎症性（NecroInflammatory）肝疾患を引き起こす。ウイルス性肝炎の宿主側の反応（免疫系を介した生体防御反応）を考える場合に、次のような基本的思想の変遷を考慮に入れる事が重要である。つまり「我々の免疫機構は何を監視するために出来ているか」という設問に対する答えが、20世紀までは「免疫は生体防御反応である」という思想であり、20世紀後半からは「免疫系は自己・非自己識別機構である」という考えであった。しかし、21世紀になり、自然免疫系の重要性が認識されるに従い「Danger 仮説」・「Stranger and Danger 仮説」という考え方が登場してきた。そのような新しい考え方に基づきウイルス性肝炎を見直したときに、「まず感染初期に宿主はどのような免疫反応を起こしているのか？」という問いかけが最も重要であると考えられる。次いで、肝障害や抗体出現後（慢性肝炎状態）の免疫系の解析、という2つの全く異なるフェーズの解析が必要となることは明らかである。しかし、それらすべての基礎となるものは、感染初期の宿主反応であり、その反応様式を正確に記載・解析する必要が急務である。その理解なしでは、その後の後期/慢性期の解析も不可能であると考えられる。そこで、チンパンジーを用い、まず感染初期の免疫担当細胞の動態を検討することから開始した。その結果、抗体産生・肝障害の出現よりも早く、ウイルス感染後約1週間で樹状細胞の活性化を検出することが出来た。今年度は、特にこの樹状細胞の活性化とウイルス増殖動態との関連性について検討した。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス感染を考えるうえで、今まではその疾患機序を従来の免疫学理論をもとに、リンパ球中心の「自己・非自己」、「抗体産生機序」、「Th1/Th2 バランス」等を中心に理解しようとしていた。しかし「ウイルス性肝炎の症状、および病態」を考えるうえで、従来の考え方だけでは無理があることが分かってきた。さらに最近の免疫学理論における「自然免疫系の重要性」、「樹状細胞群の重要性」、「Danger 仮説」などが提唱されるに至り、ウイルス性肝炎などで「生体の免疫応答系になぜスイッチが入ってしまうのか？」という疑問への解答は、従来とは異なる全

く新しい考え方を要求されている。

つまり、生体の免疫系が監視しているのは「自己・非自己」ではなく「Danger と Stranger」という考え方である（図1）。この場合、「Stranger」は感染・病原体であり、「Danger」は組織破壊、ストレス（物理的・精神的）などにより感知される自己成分である、と考えられる。両方のシグナルを受け取る細胞群は、樹状細胞等に代表される自然免疫系の細胞群であるため、獲得免疫系の様な「抗原特異性」は存在しない。つまり、この新しい考え方に基づくと、「抗原」とは我々の免疫系の入り口の反応性を規定しているもので



(図1) Stranger+ Danger 仮説

「生体の免疫系が監視しているのは外来の感染と内部の組織破壊である。」という考えかた。抗原提示細胞は組織破壊を受けた自己細胞由来の内在性の「Alarm シグナル」によって活性化されその後の免疫反応を調節する。

a: Stranger 仮説では、微生物（バクテリア/ウイルスなど）の侵入に対して樹状細胞状のセンサー（Toll-like receptor など）がそれぞれの微生物特異的構成成分を認識して活性化される。

b: Danger 仮説では、免疫系の入り口である樹状細胞は、「自己組織の障害」「ストレス」などのシグナルによって活性化される。破壊された組織から遊離した自己分子が、樹状細胞状のセンサーに作用する。ダメージを受けた組織から遊離した自己成分（尿酸結晶、熱ショック蛋白質 Hsp60/70、ヒアルロン酸分解物、酸化型 LDL など）が「アラーム・シグナル」と考えられている。

はない、ということになる。

逆の言い方をすると、入り口で、免疫系活性化の有無を制御しているのは「感染」や非特異的なアジュバント作用を持つ「自己成分」、ということになる。HCV 感染に関してそのような考え方に立つと、宿主側の免疫反応は少なくとも3種類の異なった素反応から成り立つことが考えられる。

1. 「HCV ウイルス感染」そのものによって起きる反応
2. 「ウイルス感染による自己組織破壊」によって誘導される反応
3. 「ウイルス抗原」を取り込み、リンパ球に抗原提示後に起きる獲得免疫系（T・Bリンパ球を介した）の抗原特異的反応

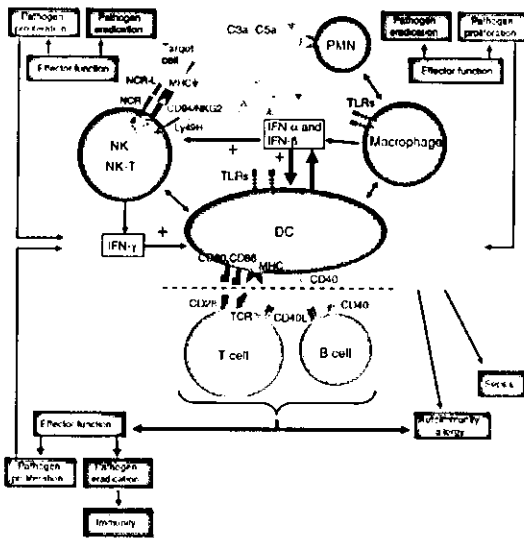
上記3種類の反応のうち、最も初期に起きる反応は「反応-1」であり、その反応形式がその後の反応-2、反応-3に影響を及ぼすことを考えると、HCV によるこの感染初期の宿主側の反応を免疫学的に正確に記載・検討する事が、最も重要と考えられる。さらに、その後の「慢性期」の宿主側の反応は、上記の3種類の反応が混在していることが容易に想像出来、その一断面や継時変化を免疫学的に検討しても、相互に関連するこの3種類の反応が絡まった状態での関係を検討するのは非常に困難であろう事も容易に想像できる。

最近の免疫学の考え方の変遷を下記に示す(表1)

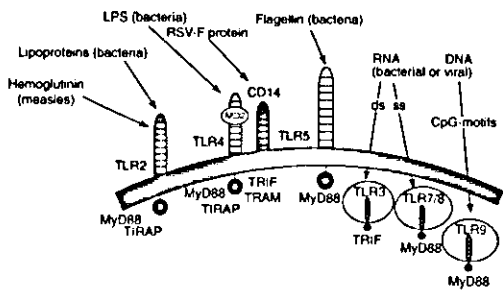
・(表1) 最近の免疫学的考え方の変遷

1. Stranger Hypothesis
(Janeway 1989):Innate Immunity
2. Danger Hypothesis
(Matzinger 1994,1996, 2002)
3. Integrity Model
(Dembic 1996, Bandeira 1997)
ほぼ同時期に
Ignorance Hypothesis
Suppressive Network
Morphostasis 等も登場してきている
4. Immunity/Tolerance decision
(Usharauli 2003,2005)
5. TLR と内在性リガンド
(Seong, など 2004)
6. Uric acid crystal と Danger シグナル
(Shi 2003)

特に、免疫系の入り口として重要な抗原提示細胞群（代表として樹状細胞群）は自然免疫系と獲得免疫系という2つの反応システムの境界面・接点にあたる細胞群であり（図2）、さらに多くのセンサー（Toll-Like Receptor：図3）を発現していることから、その反応性に注目する必要がある。



（図2）自然免疫系（上半分）と獲得免疫系（下半分）の境界面の樹状細胞、とこれらの免疫反応系の結果としての感染防御反応の成功（緑色）と失敗・感染の拡大/慢性化（オレンジ色）



（図3）Toll-like Receptor は細胞表面に主に発現しているもの（TLR2, 4, 5）と、エンドソームに発現しているもの（TLR3, 7-9）がある。これらは、自然免疫系担当細胞に発現しており、細菌やウイルス由来のリガンド特異的なセンサーとして働いている。Germ-line でレポーターが規定されている受容体であり、その点が獲得免疫系の抗原受容体（BCR, TCR）と異なる。

この様な、感染初期の宿主側の反応を解析することは、ヒト・臨床サンプルでは不可能であり、HCV・HBVが感染可能な唯一の動物であるチンパンジーを用いた解析系で行う事が必須である。

チンパンジーを用いた動物感染実験の利点として、以下のような点が上げられる。

1. 自然にHCV, HBVが感染する唯一の動物モデルであること
2. 計算されたウイルス摂取量を用いた感染初期の解析が可能
3. バイアスをかけずに、無作為に選んだ個体を用いて感染実験が行える点。ヒトの臨床研究では、臨床症状を呈したヒトのみが対象であり、asymptomaticなヒトは除外されてしまう。

上記のような利点を踏まえ、チンパンジーを用いた動物実験系を解析することで、ウイルス性肝炎の免疫学的な側面の解析を行うことを目標としている。未知の領域ではあるが、今までの免疫学理論とは別の観点から、不明な点を多く残しているウイルス性肝炎の病態の基礎を解析していきたい。

B. 研究方法

ヒト以外でRNAウイルスであるHCV感染に感受性を持つ事が知られている唯一の実験動物（チンパンジー）を用いた感染実験によって得られる感染価（Chimpanzee infectious dose/ml:CID/ml）と、核酸増幅検査（NAT）により *in vitro* で定量値として表示されるC型肝炎ウイルス量（HCV RNA量、copy/ml）、との関係を明らかにする実験系を用いた（吉澤）。そこでHCVの絶対量100コピーおよび1000コピーのHCVを接種する実験系を確立し、定期的に（週2回）末梢血を採血する。血清を用いて抗体価、肝障害マーカーとしてのALT/AST値、HCVコピー数、等を測定、さらに同様の感染実験をDNA型ウイルスであるB型肝炎ウイルスについても行う予定である。

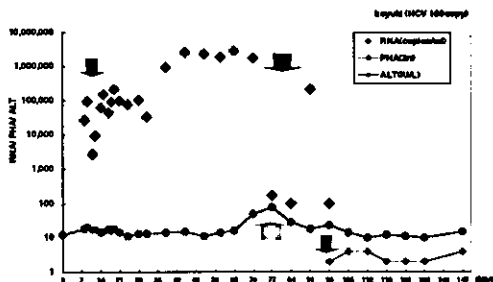
このような実験系を用い、樹状細胞、T細胞、NK細胞、B細胞の細胞数、活性化した細胞の割合などの変動をFlow Cytometryを用いてその経過を測定する。樹状細胞の活性化(CD11c+, CD86+またはHLA-DR+)、T細胞活性化(CD3+CD69+)、NK細胞活性化(CD56+CD69+)、B細胞活性化(CD19+CD69+)は、それぞれのLineageマーカー+活性化マーカーで測定する。初期実験では、樹状細胞、T細胞、NK細胞の活性化が正確に検出された。それぞれの細胞集団のサブセット解析、自然免疫系・獲得免疫系の制御細胞群の解析を行う(倫理面への配慮)

チンパンジーを用いた実験は、広島大学倫理委員会で審査され、許可されたものであり、倫理面の審査も問題がないとされた。

C. 研究結果

実験1:

HCVを100copy接種したチンパンジーを用いた感染実験によって、得られたHCVコピー数の推移と、血清中の抗体価、肝障害マーカーとしてのALT/値、の測定結果は下記の様であった(図4)。



このケースは自然治癒したケースである。

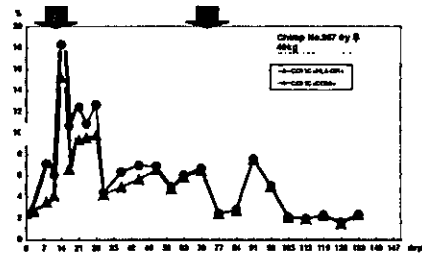
(図4) HCV RNA コピー数、抗体価、肝障害マーカーの推移。HCV コピー数が11日目と84日目に減少する。抗体価は98日目から検出される。

実験2: 活性化樹状細胞の割合の推移

チンパンジーから採血し、そのパフィーコートから細胞を回収し、樹状細胞の活性化した細胞の割合などの変動をFlow Cytometryを用いてその経過を測定した。樹状細胞の活性化マーカーとして

CD86、またはHLA-DRを用いた(CD11c+, CD86+またはHLA-DR+)。活性化樹状細胞の割合の推移に関しては、7日-21日目までに非常に大きなピークを認めた(図5)。

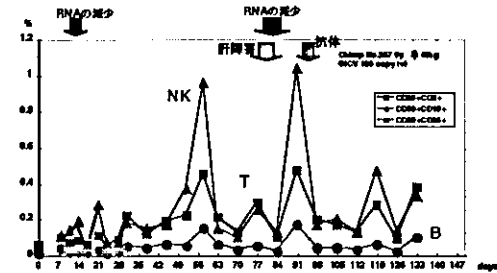
(図5) 樹状細胞の活性化の割合の推移



2種類の活性化マーカーを用い測定した結果

実験3: T/B細胞、NK細胞の活性化の推移

次に、同様にT細胞、B細胞、NK細胞について、同様に活性化マーカーとしてCD69を用いて活性化の推移を検討した。その結果、興味深い事に、肝障害の後や、抗体産生の開始前にNK細胞やT細胞の活性化が確認できた。特にNK細胞の活性化が顕著に確認できた(図6)。

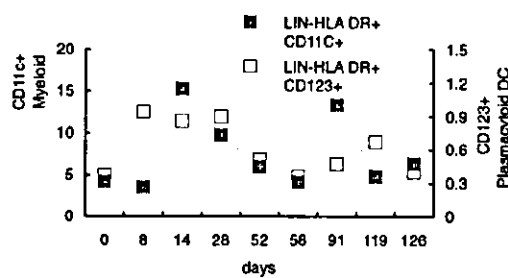


(図6) NK細胞、T細胞、B細胞の活性化の推移

実験4: DC (樹状細胞) のタイプ別の活性化

上記実験1-3までの結果よりHCVが体内に侵入後、最初に起きる宿主側の免疫反応は、樹状細胞の活性化である事が分かったので、この細胞群に関する解析に焦点を絞ることにした。実験2で調べていた樹状細胞は、一般的に昔から良く知られている、CD11c+でLineage marker(CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56)陰性の樹状細胞群を対象にして、活性化マーカーのCD86またはHLA-DRを指標として用いた。しかし、樹状細胞群には、

少なくとも6種類のサブタイプが存在しているが、多く分けると、4種類程度に分類可能であるが、特に、今回のように、末梢血中のDCの解析で対象となるのはMyeloid DCとPlasmacytoid DCである。一般的にMyeloid DCはTLR1からTLR8を発現して、Plasmacytoid DCはTLR7とTLR9を発現していると言われている。これら2つの樹状細胞サブセットのHCV感染後の活性化プロファイルを比較検討した(図7)。



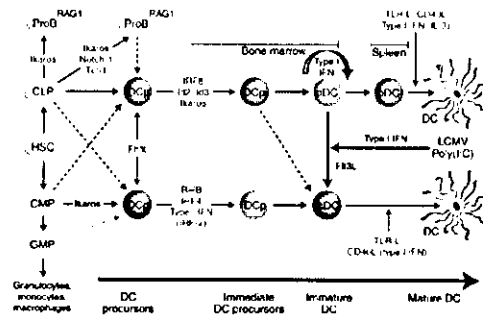
(図7) Myeloid DC と Plasmacytoid DC の HCV 感染後の活性化の比較。Myeloid DC (■)、Plasmacytoid DC を (□) で表してある。

図7からも分かるように、まず、HCV感染後1週間目(day8)にPlasmacytoid DCが活性化し4週目(day28)までその状態が持続する、その間の2週目(day14)にMyeloid DCの活性化が観測された。この時期のTLR1-4の発現を、抗体を用いて解析を行ったところ、day14でTLR3の発現上昇が見られ、day91でTLR4の発現上昇が観察された。これらの生物学的意味の解析は次年度以降に行う予定である。

実験5: 樹状細胞によるHCVの取り込み。

ではHCV感染に伴い活性化しているこれらの樹状細胞群は、HCVを取り込み(食べて)活性化することで、自然免疫系の活性化(サイトカイン産生等を介して)、獲得免疫系の活性化(抗原提示細胞として)を起こしているのでしょうか? HCV感染に関してこの2つの樹状細胞群はどのような関係にあるのだろうか? このような疑問

問に対する考え方のヒントとして、最近、ElZunigaらは、ウイルス感染によりPlasmacytoid DCがMyeloid DCへと分化するという報告をしている(Zuniga et al Nature Immunology, 5: 1227-1234, 2004) (図8)



(図8) LCMV や Poly(I:C)によりpDCがmDCへと分化する。

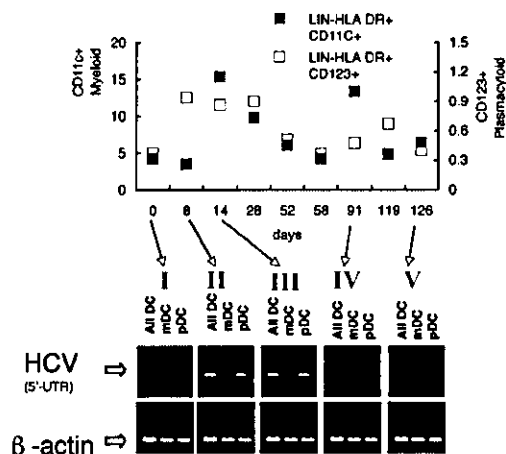
この報告を考えると、我々のデータ(図7)は、pDCがHCVを取り込み、その細胞群の一部がmDCへと分化した、とも考えられる。これを含め、我々は3つの可能性を考えた。

(可能性-1): Plasmacytoid DCがHCVを取り込み、先に活性化する。その細胞群の一部が、HCVを細胞内に取り込んだままMyeloid DCへと分化し、活性化する。

(可能性-2): Plasmacytoid DCがHCVを取り込み、先に活性化する。活性化したpDCの影響で、Myeloid DCもHCVを取り込むことが出来るようになる。または、取り込んだHCVをPlasmacytoid DCからMyeloid DCへ移動させることによりMyeloid DCも活性化する。

(可能性-3): 活性化したPlasmacytoid DCが産生するサイトカインによりMyeloid DCも活性化しているが、HCVは取り込んでいないため抗原提示は出来ない。

これらの可能性を検討するために、それぞれの樹状細胞サブセットからHCVゲノムが検出できるかどうかをHCVの5'-UTRのPCR-Primerを用いたRT-PCRを行い検討した(図9)



(図9) Plasmacytoid DCだけがHCVを取り込んでいる。

この図9の実験結果から明らかとなった事は、

- ・ HCV 感染初期において、樹状細胞が HCV を取り込んで (食べて) 活性化している。
- ・ HCV を取り込んでいる樹状細胞サブセットは Plasmacytoid DC であり、一般的な樹状細胞である Myeloid DC は HCV を取り込んでいない。

という2点である。

Plasmacytoid DC は、別名 Interferon Producing Cell (iPC) とも呼ばれる細胞であり、主に I 型 IFN を産生する。このことを合わせて考えると、day14 前後に Myeloid DC が活性化しているのは、Plasmacytoid DC が産生する I 型 IFN 等による 2 次的作用である可能性が高い。同様に day91 で Myeloid DC が活性化しているのも、炎症によるサイトカイン産生や肝障害等の自己組織破壊による「Danger シグナル」によるもの、と考えられ、HCV 感染初期の Plasmacytoid DC による、HCV の取り込み (+それに続く抗原提示?) とは全く別の機構による、感染の 2 次的免疫反応と考えることができる。このような感染後の 2 次・3 次的反応が樹状細胞にフィードバックされる事により、免疫反応・炎症の継続および反応の増幅が継続して起

きていると考えられる。

今回の解析は、100 コピー接種し、自然治癒したチンパンジーのケースであったが (急性反応)、今後、このような解析を持続感染型になったチンパンジーで同様な実験を行うことにより、このような感染初期の免疫反応の、何が「急性・自然治癒」と「慢性感染」タイプの違いになっているのか? という設問に対する解析を予定している。

D. 考察

最近、Science (2004) に掲載された論文で、RNA ウィルスなどの single-stranded RNA を Plasmacytoid DC (Dendritic cell) に発現している TLR-7/8 が認識するという事からも分かるように、免疫系の反応性の有無を決めている最初のスイッチはリンパ球ではなく、抗原提示能力を持った細胞群 (樹状細胞など) である。この細胞群が活性化する事で宿主側の反応が始まると考える事が出来る。そこで HCV 感染に関しても、宿主側の免疫系がどのように活性化され、どのような反応が起きているのか、という疑問に対する解析には、まず「感染初期にどのような細胞が、いつどのような形で活性化しているのか?」という素朴な疑問に答える必要が有る。その後、肝障害が起きた後には「組織障害を伴う形で、今度はどのような活性化ネットワークが出来ているのか?」という第 2 の質問が浮上してくる。しかし、まず第 1 の質問に対する解析を行ってからでないと、複数の反応系が混在した状態での宿主反応の解析となり、渾沌とした状態での解析になる可能性が高い。チンパンジーを用いた HCV 感染実験の位置付けは、「Stranger and Danger」のうち、まず「Stranger」として侵入してきた HCV に対する初期免疫応答を理解するため、そしてその後の 2 次免疫応答を理解するための、最も基礎になる研究であると理解している。まだ研究は始まったばかりであるが、HCV 感染における宿主側の複雑な免疫反応系を、いくつかの素反応に分解すること、および最も初期反応の解析、が出来ると考えている。特に、興

味深い点の一つは、感染後7日目にウイルスのコピー数が低下する時期にDCが活性化している点である。これは全身の樹状細胞のうちPlasmacytoid DCがHCVを取り込んだ(endocytosis, phagocytosis)結果であることが判明した。さらに、その波及効果として、別の樹状細胞サブセット(もっと一般的なMyeloid DC)が活性化することが明らかとなった。今後、顕著に活性化が見られるNK細胞群の検討、活性化しているT細胞のサブセットは何か、自然治癒例と持続感染型の初期反応の違いは何か、などの疑問に順次焦点を当てていきたい。

E. 結論

HCV感染初期の宿主免疫応答の理解のために行ったチンパンジーを用いた感染実験から、多くの結論・示唆が生まれそうである。特に、「Strangeness and Danger」に基づいた考え方、自然免疫系(樹状細胞系)の重要性の認識、などは本研究の基本として最も重要な発想法である。今回判明した重要な知見として、HCV感染初期に樹状細胞群のPlasmacytoid DCサブセットがHCVを取り込んで(食べて)活性化している事(おそらく、抗原提示、IFN産生を行っている)。しかし、最も代表的な樹状細胞群(Myeloid DC)はHCVを取り込んで活性化しているわけではなく、2次的な反応であることが分かった。宿主の免疫反応系の入り口の段階で、既に直接HCVを取り込み活性化する樹状細胞群と、2次的に活性化する樹状細胞群に別れていることが分かった。それぞれの入り口から、2つの全く別の免疫反応系が個体レベルで共存して感染後期の反応に向かうことが分かった。このような観点からウイルス肝炎を解析し直す事で、基礎研究のみでなく、臨床的に応用できる診断・検査法等への応用を研究して行きたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Miyazaki M, Kawamoto H, Kato Y, Itoi M, Miyazaki K, Masuda K, Tashiro S, Ishihara H, Igarashi K, Amagai T, Kanno R, and Kanno M. Polycomb group gene mel-18 regulates early T progenitor expansion by maintaining the expression of Hes-1, a target of Notch pathway. *J. Immunol.* **174**: 2507-2516, 2005

Kajiume T, Ninomiya Y, Ishihara H, Kanno R, and Kanno M. The Polycomb group gene mel-18 modulates the self-renewal activity and cell-cycle status of hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* **32**: 571-578, 2004

2. 学会発表 など

・井上洋子、片山恵子、田中純子、菅野理恵子、吉澤浩司、菅野雅元 ヒトC型肝炎ウイルス(HCV)の感染初期過程の免疫学的解析2 第34回日本免疫学会 札幌 ロイトン札幌 2004年12月1日-3日

・菅野雅元、劉 蘭々、茂久田翔、梶川正人、高路修、山本昇壯、菅野理恵子 アトピー性皮膚炎の悪化因子とDanger仮説・組織障害の解析 第54回日本アレルギー学会 パシフィコ横浜 2004年11月4日-6日

・菅野雅元 組織障害とアレルギー: Danger仮説と自然/獲得免疫系 シンポジウム3「気道感染とアレルギー・最近の知見」第41回日本小児アレルギー学会 都市センターホテル 2004年11月27日-28日

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

研究協力者

井上洋子 (広島大学 医学部・教務員)

菅野理恵子 (広島大学 医学部 研究員)

加藤裕子 (広島大学)

厚生科学研究費補助金 肝炎当克服緊急対策研究事業
B型及びC型肝炎の疫学及び検診を含む肝炎対策に関する研究

分担研究報告書 (平成 16 年度)

キメラマウスを用いた肝炎ウイルス感染実験

分担研究者 茶山一彰 広島大学医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨: 肝炎ウイルスはヒトとチンパンジーにしか感染しないことが研究や創薬の大きな妨げになっていた。今回我々はヒト肝細胞を移植したキメラマウスを使用して、B型肝炎ウイルスの感染実験を行った。B型肝炎ウイルス持続感染者から得られた血清をキメラマウスに投与すると、2-4週間でウイルス血症が認められ、 10^7 - 10^8 copy/ml の抗ウイルス血症が得られた。チンパンジーを用いて測定された血清の感染価がこのマウスモデルを使用して同等に評価できるかどうかの検討を開始した。

共同研究者

吉澤浩司	広島大学医歯薬学総合研究科	教授
吉里勝利	広島大学理学研究科	教授
立野知世	広島県組織再生プロジェクト	主任研究員
高石英樹	ウイルス肝炎財団	リサーチレジデント
平賀伸彦	広島大学医歯薬学総合研究科	

生着する。このマウスを使用して、患者血清、チンパンジーの感染実験から得られた、infectious dose の明らかにされた血清を使用して感染実験を行った。

(倫理面への配慮) 広島大学医学部倫理委員会において承認された説明文章、同意書により試験の目的、趣旨、方法、治療効果、副作用、個人情報、患者の権利保障などについて十分に説明を行い、患者が熟考するのに十分な時間の後に書面による同意の得られた症例の血液を使用して実験を行った。動物実験に関しては、動物実験施設倫理委員会の承認をえて実験を行った。マウスの採血、接種、義死はすべてエーテル麻酔下に行った。

A. 研究目的

チンパンジーにかわる肝炎ウイルス感染が可能な小動物モデルを作製する。広島大学理学研究科で開発された、ヒト肝細胞を高置換で長期間維持するマウスモデルを使用して感染が成立するかどうかについて検討を行う。

B. 研究方法

広島大学理学研究科と広島県組織再生プロジェクトにおいて作製されたマウスモデルを使用して実験を行うこととした。このマウスは、スキッドマウスに uPA 遺伝子を transgene したものであり、プロモーターはアルブミンのものを用いている。マウスが出生した後にアルブミンプロモーター下の uPA 遺伝子が肝細胞内でのみ活性化され、マウス肝細胞はアポトーシスに陥る。理論的にはすべての肝細胞がアポトーシスにおちいることになるが、実際には transgene の deletion が起こり、uPA 遺伝子の脱落が起きた細胞は apoptosis を免れる。ヘテロ接合体のマウスでは deletion が高頻度で起こり、マウス肝細胞は相当の割合で残存するが、ホモのマウスではほとんど残存しない。このマウスに対してヒト肝細胞を移植する。ヒト肝細胞は、外科手術により得られた肝臓の小片に対してコラゲナーゼ灌流液により灌流し、メスによって皮膜を細切した後に肝細胞を濾過精製し、さらに底側円心により肝実質細胞を分離した。上記のホモの uPA scid マウスに対して脾臓からヒト肝細胞を注入すると、マウスの肝細胞が残存しなかった場合にはヒト肝細胞が

C. 研究結果

B型慢性肝炎患者のうち、動物実験への使用を文章を用いて同意した症例の血清を用いた。ウイルス量が 10^{10} copy/ml と多い症例の血清を使用し、 $50 \mu\text{l}$ をキメラマウス尾静脈より投与した。投与2週目から nested polymerase chain reaction による HBV DNA の検出が陽性となり、その後 real time PCR により定量したところ、高いマウスで 10^9 copy/ml ~ 10^{10} copy/ml と、高度のウイルス血症が認められた。チンパンジーに対する感染実験の、感染初期に得られた血清は、HBV に対する抗体反応がまだ起きていない時期であり、ウイルス量が少量であっても感染が成立する可能性が高いと考えられるが、このような血清で、チンパンジーに対する感染価が測定されている血清を使用して実験を行った。理論上 1 HBV copy を含有すると考えられる試料を2頭のマウスに接種した。接種後1-2週間ごとに採血し nested PCR による HBV の検出を行った。現在7週間目まで経過を観察しているが、HBV のウイルス血症は認められていない。

D. 考察

B型肝炎ウイルスは宿主域の狭いウイルスであり、ヒトとチンパンジーにしか感染しない。チンパンジーは高価である上、ワシントン条約で保護されているため、実験終了後も生涯飼育し続ける必要がある。このことがウイルスの研究、あるいは創薬を行ってゆく上で大きな障害となっている。

た。今回我々が開発した肝炎ウイルス感染モデルは、このような問題を解決する上でこの上なく貴重な動物モデルを提供するものである。今後ウイルス学的な研究や創薬、特に耐性ウイルスに対する新たな薬剤の効果の検定などに大きな力を発揮するものと考えられる。

E. 結論

ヒト肝細胞を移植したキメラマウスを使用して、B型肝炎ウイルスの感染実験を行った。B型肝炎ウイルス持続感染者から得られた血清をキメラマウスに投与すると、2-4週間でウイルス血症が認められ、 10^7 - 10^8 copy/mlの抗ウイルス血症が得られた。今後さらに感染価の明らかな血清を使用して、最小感染価等について明らかにすることが可能となった。

F. 健康危険情報今回の研究では特になし。

G. 研究発表

論文発表

1. Tsuge M, Takaishi T, Hiraga N, Noguchi C, Oga H, Imamura M, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Ochi H, Chayama K, Tateno C, Yoshizato K. Infection of genetically engineered hepatitis B virus using human hepatocyte chimeric mouse.(投稿準備中)

H. 知的財産権の出願・登録情報

今回の研究内容については特になし。

200400669A (別冊)

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

**B型及びC型肝炎の疫学及び
検診を含む肝炎対策に関する研究**

(課題番号 H16-肝炎-3)
(3年計画の1年目)

平成16年度 研究成果

主任研究者 吉澤 浩司

平成17(2005)年 3月

B型及びC型肝炎の疫学及び検診を含む肝炎対策に関する研究
平成16年度 班構成

主任研究者

吉澤 浩司 広島大学大学院 疫学・疾病制御学 教授

分担研究者

柚木 久雄 日赤中央血液センター 核酸増幅検査部 部長
 阿部 弘一 岩手医科大学第一内科 講師
 池田 健次 虎ノ門病院 消化器科 医長
 西口 修平 大阪市立大学大学院医学研究科 肝胆膵病態内科 助教授
 金子 周一 金沢大学大学院医学系研究科 消化器内科 教授
 茶山 一彰 広島大学大学院 分子病態制御内科学 教授
 溝上 雅史 名古屋市立大学大学院 臨床分子情報医学分野 教授
 秋葉 隆 東京女子医科大学 腎臓病総合医療センター 教授
 田中 純子 広島大学大学院 疫学・疾病制御学 助教授
 三浦 宜彦 埼玉県立大学 保健医療福祉学部情報科学 教授

班長研究協力者

友栗 徹士 (株)三和科学研究所熊本霊長類パーク実験研究部 研究員
 菅野 雅元 広島大学大学院 免疫学 教授
 佐田 通夫 久留米大学 第二内科 教授
 佐藤 千史 東京医科歯科大学大学院 健康情報分析学分野 教授
 小山 富子 岩手県予防医学協会 県南センター 次長
 松崎 靖司 筑波大学医学部内科 (消化器科) 助教授
 山本 匡介 佐賀医科大学 内科 助教授
 頼岡 徳在 広島大学大学院 分子内科学 助教授
 宮川 侑三 (財)宮川庚子記念研究財団 専務理事
 高畠 譲二 日本肝臓病患者団体協議会 事務局長

目 次

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

- 【書籍】
- 【雑誌】

IV. 研究成果の刊行物

- 【書籍】
- 【雑誌】

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

【書籍】

著書名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版者名	出版地	出版年	ページ
1) 田中純子、 吉澤浩司	わが国の HCV 感染の現状	林 紀夫、 岡上武、 熊田博光	C型慢性肝炎治療の新たなストラテジー-インターフェロン治療の今後-	先端医学社	東京	2004	24-29
2) 小宮裕、 田中純子、 吉澤浩司	ウイルス肝炎の疫学	林紀夫	最新医学別冊 新しい診断と治療のABC27 消化器3 ウイルス性肝炎	最新医学社	東京	2005	16-21
3) 田中純子、 吉澤浩司	現在の肝がん検診の問題点とこれからの検診計画		住民検診・職域検診・人間ドックのためのがん検診計画ハンドブック	南江堂		2004	110-113
4) 池田健次	肝発癌予防	戸田剛太郎、 税所宏光、 寺野彰 幕内雅敏	Annual Review 消化器 2005	中外医学社	東京	2005	148-153
5) Ikeda K, Kumada H	Snmc in the orevention of cirrhosis and hepatocellular carcinoma-Japaneseexperience	Hayashi N, Manns MP	Prevention of progression in chronic liver disease	Kluwer Academic Publishers	Dordrecht	2004	98-101
6) NishiguchiS Habu D. Shiomi S.	Effect of oral supplementation with branched-chain amino acid on albumin cincrentraeion in the early stage of cirrhosis.	Okita K.	NASH and Nutritional Therapy Frontiera in Hepatology	Springer-Verlag	Tokyo	2005	100-107
7) NishiguchiS Habu D.	Effect of oral supplementation with branched-chain amino acid granules in the early stage of cirrhosis	Imawari M.	Hepatol. Res.	Elsevier Science	Tokyo	2004	S36-S41
8) 西口修平	HCVキャリアの指導、管理および院内感染事故対策	山口徹、 北原光夫	今日の治療指針 2004-私はこう治療している-	医学書院	東京	2004	408-409
9) 西口修平、 久保正二	インターフェロンによる肝細胞癌の再発予防	林 紀夫、 岡上武、 熊田博光	C型慢性肝炎治療の新たなストラテジー-インターフェロン治療の今後-	先端医学社	東京	2004	103-108

研究成果の刊行に関する一覧表 【雑誌】

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
1) Tanaka. J, Kumagai. J, Katayama. K, Komiya. Y, Mizui. M, Yamanaka. R, Suzuki K, Miyakawa. Y, Yoshizawa. H	Sex-and age-specific carriers of hepatitis B and C viruses in Japan estimated by the prevalence in the 3,485,648 first-time blood donors during 1995-2000	Intervirolgy	47 (1)	32-40	2004
2) Katayama. K, Kumagai. J, Komiya. Y, Mizui. M, Yugi. H, Kishimoto. S, Yamanaka. R, Tamatsukuri. S, Tomoguri. T, Miyakawa. Y, Tanaka. J, Yoshizawa. H	Titration of hepatitis C virus in chimpanzees for determining the copy number required for transmission	Intervirolgy	47 (1)	57-64	2004
3) 吉澤浩司、田所憲治	特集 わが国の輸血感染症の現状と対策 -NATによる阻止にも限界、社会的認識の向上を	Medical Tribune		49-52	2004
4) 田中純子、吉澤浩司	がん疫学の最新情報 肝炎・肝がん対策	癌と化学療法	31(6)	864-870	2004
5) 茶山一彰、吉澤浩司	慢性肝炎治療における病診連携-広島のをを中心に-	治療	86(9)	81-85	2004
6) Yoshizawa.H ,Tanaka. J	A national project for the manegement of viral hepatitis toward prevention of hepatocellular carcinoma in Japan	International Kilmer Conference Proceedings	8	247-264	2004
7) 吉澤浩司	HBV キャリアの感染経路	日本医事新報	4205	119	2004
8) 吉澤浩司	肝がん対策	Medico	36(1)	15-18	2004
9) 熊谷純子、小宮裕、片山恵子、田中純子、頼岡徳佐、吉澤浩司	血液透析施設におけるC型肝炎ウイルス (HCV) 感染の実態-感染予防の基礎としてのウイルス、血清疫学的調査成績-	医工学治療	16(2)	69-72	2004
10) Agha. S, Tanaka. Y, Saudy. N, Kurbanov. F, Abo-Zeid. M, EL-Malky. M, Khalaf. M, Ohta. N, Yoshizawa.H, Mizokami. M	Reliability of Hepatitis C Virus Core Antigen Assay for Detection of Viremia in HCV Genotypes1, 2, 3, and 4 Infected Blood Donors: A Collaborative Study Between Japan, Egypt, and Uzbekistan	Journal of Medical Virology	73	216-222	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
11) Tanaka. Y, Hanada. K, Orito. E, Akahane.Y, <u>Chayama. K. Yoshizawa.</u> H. Sata.M , Ohta. N, Miyakawa. Y, Gojobori. T, <u>Mizokami. M</u>	Molecular evolutionary analyses implicate injection treatment for schistosomiasis in the initial hepatitis C epidemics in Japan	Journal of Hepatology	42	47-53	2005
12) <u>Tanaka. J.</u> Katayama. K, Kumagai. J, Komiya. Y, <u>Yugi. H.</u> Kishimoto. S, Mizui. M., Tomoguri. T, Miyakawa. Y, <u>Yoshizawa. H</u>	Early Dynamics of Hepatitis C Virus in the Circulation of Chimpanzees with Experimental Infection	Intervirolgy	48	120-123	2005
13) 鈴木一幸、妻神重彦、 遠藤龍人、 <u>阿部弘一</u> 、 熊谷一郎、滝川康裕	わが国における E 型肝炎の実態とその対策	Medical Science Review	21	50-53	2004
14) <u>阿部弘一</u> 、熊谷一郎、遠藤龍人、滝川康裕、鈴木一幸	B型肝炎重症化例の治療	内科	93	471-476	2004
15) S Sainokami, <u>Koichi Abe.</u> I Kumagai, A Miyasaka, R Endo , Y Takikawa, K Suzuki, H Mizuo, Y Sugai, Y Akahane,Y Koizumi, Y Yajima, and H Okamoto	Epidemiological and clinical study of sporadic acute hepatitis E caused by indigenous strains hepatitis E virus in Japan compared with acute hepatitis A	Journal of Gastroenterology	39	640-648	2004
16) 稲葉宏次、大内健、 <u>阿部弘一</u> 、滝川康裕、 鈴木一幸	発症時薬剤性肝障害との鑑別が困難であった C 型急性肝炎の 1 例	内科	93	993-996	2004
17) 池田健次	B型肝炎変症に対する治療法の最新動向	日本臨床	62(suppl 8)	358-362	2004
18) 池田健次、小林正宏、 熊田博光	症例からみた治療法の選択—どの治療を選ぶか?—	消化器の臨床	7 (4)	341-346	2004
19) 池田健次	B型肝炎の実態	医学と薬学	49(4)	531-536	2004
20) 池田健次	肝癌に対する局所治療—その長期予後と肝切除例との比較	医学と薬学	52 (5)	771-776	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
21) <u>Ikeda K</u> , Kumada H	Locoregional therapy for hepatocellular carcinoma	Tropical J Gastroenterol	52(59)	771-776	2004
22) <u>Ikeda K</u> , Kobayashi M, Saitoh S, et al	Significance of hepatitis B-virus DNA clearance and its early prediction in hepatocellular carcinogenesis in patients with cirrhosis undergoing interferon therapy-A long-term follow-up of a pilot study	J Gastroenterol Hepatol	20(1)	95-102	2005
23) Narimatsu T, Tamori A, Koh N, Kubo S, Hirohashi K, Yan Y, Arakawa T, Otani S, <u>Nishiguchi S</u>	P16promoter hypermethylation in human hepatocellular carcinoma with or without hepatitis virus infection	Intervirolgy	47	26-31	2004
24) Watanabe A, Matsuzaki S, Moriwaki H, Suzuki K, and <u>Nishiguchi S</u>	Problems in serum albumin measurement and clinical significance of albumin microheterogeneity in cirrhotics	Nutrition	20	351-357	2004
25) Kubo S, Tamori A, Tanaka H, Takemura S, Shuto T, Hirohashi K, Kinoshita H and <u>Nishiguchi S</u>	Polyamine metabolism and recurrence after resection for hepatocellular carcinoma	Hepatogastroenterology	51	208-210	2004
26) Yoshida H, Takeishi R, Arakawa Y, Sata M, Fujiyama S, <u>Nishiguchi S</u> , Ishibashi S, Yamada G, Yoshioka O, Shiratori Y, and Omata M	Benefit of interferon therapy in hepatocellular carcinoma prevention for individual patients with chronic hepatitis C	Gut	53	425-430	2004
27) Habu D, shiomi S, tamori A, Takeda T, Tanaka T, Kubo S, and <u>Nishiguchi S</u>	Role of Vitamin K2 in the development of hepatocellular carcinoma in women with viral cirrhosis of the liver	JAMA	292	358-361	2004
28) Enomoto M, <u>Nishiguchi S</u> , Kohmoto M, Tamori A, Habu D, Takeda T, Seki S, and Shiomi S	Effects of ribavirin combined with interferon- α 2b on viral kinetics during first 12 weeks of treatment in patients with hepatitis C virus genotype 1 and high baseline viral loads	J. Viral Hepatitis	11	448-454	2004
29) Nishikawa M, <u>Nishiguchi S</u> , Kioka K, Tamori A, and Inoue M	Interferon reduces somatic mutation of mitochondrial DNA in liver tissues from chronic viral hepatitis patients	J. Viral Hepatitis	11	1-5	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
30) Ohba K, Kubo S, Tamori A, Hirohashi K, Tanaka H, Shuto T, <u>Nishiguchi S</u> , Kinoshita h	Previous or occult hepatitis B virus infection in hepatitis B surface antigen-negative and anti-hepatitis C negative patients with hepatocellular carcinoma	Surgery Today	34	842-848	2004
31) Chang B, Nishikawa M, <u>Nishiguchi S</u> , Inoue M	L-carnitine inhibits hepatocarcinogenesis via protection of mitochondria	Int. J. Cancer	113	719-729	2005
32) Boxall S, Stanton T, Hirai K, Yasui T, Tahara H, Tamori A, <u>Nishiguchi S</u> , Shiomi, Ishiko O, Inaba M, Nishizawa Y, Dawes R, Bodmer W, Beverley PC, and Tchilian EZ	Disease associations and altered immune function in CD45 138G variant carriers	Hum Mol Genet	13	2377-2384	2004
33) Tamori A, <u>Nishiguchi S</u> , Nishikawa M, Kubo S, Koh N, Hirohashi K, Shiomi S, and Inoue M	Correlation between clinical characteristics and mitochondrial D-loop DNA mutations in hepatocellular carcinoma	J Gastroenterol	39	1063-1068	2004
34) Torii K, Kawabe J, Hayashi T, Oe A, Kotani J, Kawamura E, Shiomi S, and <u>Nishiguchi S</u>	Gastoric ulcer detected incidentally by Renal scintigraphy	Indian J Gastroenterol	23	195-196	2004
35) 田中隆、広田良夫、 <u>西口修平</u>	ウイルス性肝炎（上）—基礎・臨床研究の進歩— C型肝炎ウイルス（HCV）:C型肝細胞癌—我が国におけるC型肝炎ウイルスと肝細胞癌の疫学	日本臨床	62増 8	611-614	2004
36) <u>西口修平</u> 、久保正二、 塩見進	ウイルス性肝炎（上）—基礎・臨床研究の進歩— C型肝炎硬変に対するIFN療法の肝発癌抑制効果	日本臨床	62増 8	600-604	2004
37) 田守昭博、 <u>西口修平</u>	ウイルス性肝炎（上）—基礎・臨床研究の進歩— HBV,HCV重複感染慢性肝疾患の疫学と臨床的特徴	日本臨床	62増 8	667-670	2004
38) <u>西口修平</u> 、田守昭博、 田中隆	ウイルス性肝炎（下）—基礎・臨床研究の進歩— B型肝炎細胞癌の疫学—我が国と諸外国との比較	日本臨床	62増 8	377-380	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
39) K Kawaguchi , M Honda , T Yamashita , Y Shirota and <u>S Kaneko</u> .	Differential gene alteration among hepatoma cell lines demonstrated by cDNA microarray-based comparative genomic hybridization	Biochem Biophys Res Commun.	329(1)	370-380,	2005
40) M Honda, T Shimazaki, and <u>S Kaneko</u>	La protein is a potent regulator of replication of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C through internal ribosomal entry site (IRES) directed translation	Gastroenterolog y	128(2)	449-462	2005.
41) K Kaji, S Yoshida, N Nagata, T Yamashita, E Mizukoshi, M Honda, Y Kojima and <u>S Kaneko</u>	An open-label study of administration of EH0202, a health-food additive, to patients with chronic hepatitis C	J Gastroenterol	39(9):	873-878	2004
42) T Yamashita, M Honda, H Takatori, R Nishino, N Hoshino, and <u>S Kaneko</u> .	Genome-wide transcriptome mapping analysis identifies organ-specific gene expression patterns along human chromosomes	Genomics	84(5)	867-875	2004.
43) Y Nakamoto, T Suda, T Momoi and <u>S Kaneko</u> .	Different procarcinogenic potentials of lymphocyte subsets in a transgenic mouse model of chronic hepatitis B	Cancer Res	64(9)	3326- 3333,	2004
44) T Shimakami, M Hijikata, H Luo, Y Y Ma, <u>S Kaneko</u> , K Shimotohno, and S Murakami.	Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon	J Virol	78(6)	2738- 2748	2004.
45) 石川県健康福祉部健康推進 課。(金子周一)	C型肝炎の精密検査を受けましょう。石川県肝炎 対策検討会作成。事務局				
46) 石川県健康福祉部健康推進 課。(金子周一)	B型肝炎の精密検査を受けましょう。石川県肝炎 対策検討会作成。事務局				
47) Kamada K, Kitamoto M, Aikata H, Kawakami Y, Kono H, Imamura M, Nakanishi T, <u>Chayama K</u>	Combination of transcatheter arterial chemoembolization using cisplatin-lipiodol suspension and percutaneous ethanol injection for treatment of advanced small hepatocellular carcinoma.	Am J Surg	184(3)	284-90	2004
48) Ohishi W, Shirakawa H, Kawakami Y, Kimura S, Kamiyasu M, Tazuma S, Nakanishi T, <u>Chayama K</u> .	Identification of rare polymerase variants of hepatitis B virus using a two-stage PCR with peptide nucleic acid clamping.	J Med Virol	72(4)	558-565	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
49) Yasyhito Tanaka (M Mizokami)	A Case-Control Study for Differences Among Hepatitis B Virus Infections of Genotypes A(Subtypes Aa and Ae)and D	HEPATOLOGY	40	747-755	2004
50) Hasegawa I (M Mizokami)	Novel hepatitis B virus genotype A subtyping assay that distinguishes subtypes Aa from Ae and its application in epidemiological studies	Journal of Virology	78	7575-7581	2004
51) Hideaki Kato (M Mizokami)	Hepatitis B virus genotype G is an extremely rare genotype in Japan	Hepatology Research	30	199-203	2004
52) Yasyhito Tanaka (M Mizokami)	Molecular evolutionary analyses implicate injection treatment for schistosomiasis in the initial hepatitis C epidemics in Japan	Journal of Hepatology	42	47-53	2005
53) 田中純子、熊谷純子、 小宮裕、吉澤浩司	ウイルス性肝炎（上）-基礎・臨床研究の進歩-我が国における地域別 HCV 罹患状況とその疫学的特徴	日本臨床・臨時増刊号	62 (suppl 7)	253-257	2004
54) 片山恵子、田中純子、熊谷純子、 小宮裕、吉澤浩司	ウイルス性肝炎（上）-基礎・臨床研究の進歩-老人保健法に基づく住民検診への HCV 検査導入の意義	日本臨床・臨時増刊号	62 (suppl 7)	248-252	2004
55) 熊谷純子、片山恵子、 小宮裕、田中純子、 柚木久雄、吉澤浩司	輸血後肝炎の現況と対策	臨床と研究	81	1147-1150	2004
56) 田中純子、吉澤浩司	本邦における地域別にみた肝炎ウイルス罹患状況と肝臓がん	総合臨床	54(3)	452-462	2005
57) Nagao Y, Sata M	Hepatitis C virus and lichen planus	J Gastroenterol Hepatol	19	1101-1113	2004
58) Nagao Y, Tanaka K, Kobayashi K, Kumashiro R, Sata M	A cohort study of chronic liver disease in an HCV hyperendemic area of Japan: a prospective analysis for 12 years	Int J Mol Med	13	257-265	2004
59) Nagao Y, Tanaka K, Kobayashi K, Kumashiro R, Sata M	Analysis of approach to therapy for chronic liver disease in an HCV hyperendemic area of Japan	Hepatol Res	28	30-35	2004