

## 分担研究報告書

### HCV ゲノム複製を支配するウイルス及び細胞側因子の解析

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）感染により発症する肝がんの予防・治療には感染持続するウイルスの排除が重要である。本研究においてはHCVゲノム複製を制御する細胞側要因を明らかにする目的で、HCVゲノム自律複製細胞を用いて解析を行った。また、人為的にHCVゲノム複製を抑制する方法の一つとして、siRNAを用いた抗HCV治療法の可能性を探った。

#### 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は不明な点が多い。一方、HCV感染によるこれらの疾患を予防するにはウイルス複製を効率よく阻害する薬剤の開発が急務である。そのために、これまでに樹立したHCVサブゲノムが効率よく自律複製する細胞を用いて、複製を制御する細胞側の因子の解析を行う。また、HCV複製をsiRNAを用いて簡便に抑制する方法についても解析を進める。

#### B. 研究方法

(1) HCVゲノム自律複製細胞を用いた抗HCV作用を示す低分子化合物の探索

HCVを効率よく感染・複製させる系がないためにHCVゲノムが自律的に効率よく複製する細胞を用いて、その複製を制御する種々の因子を明らかにする。そのために、まず、HCVの全長、部分ゲノムが効率よく自律複製する細胞を樹立する。さらにウイルスゲノム複製を簡便に測定するためにルシフェラーゼ活性を指標にして解析できる系を作成する。これらの細胞を96穴のプレートに撒き、その後各種薬剤を添加して、その3日、7日後にルシフェラーゼ活性を測定する。

(2) HCVゲノムを標的にしたsiRNAによる抗HCV効果に関する研究。

HCVゲノムは複製時に変異が入りやすいために、同一細胞から単離した別個のゲノムにおいて塩基配列を比較すると、同一のものは存在しない。長期間培養を続けた場合、ゲノム間の塩基配列の変異の蓄積は3%近くになる。しかし、ゲノム内のある特定の領域に限定すれば、変異が生じにくい箇所も存在する。そのような領域を見つけて、その領域を標的にするsiRNAがデザインされれば、変異を超越した抗HCV作用を示すと期待される。そこで、ゲノムの中で変異の少ない領域を探して、その領域に対するsiRNAによる抗HCV効果をHCVゲノム自律複製細胞を用いて解析する。

#### C. 研究成果

(1) HCVゲノム自律複製細胞の樹立と選択

Huh7細胞に由来するHCVゲノム自律複製細胞については、サブゲノム、および全ゲノムが複製する細胞を樹立した。なお、サブゲノム自律複製細胞についてはルシフェラーゼ遺伝子をゲノムに挿入したのを構築し、本酵素活性を用いて複製効率を測定するようにした。

(2) HCVゲノム複製を制御する低分子化合物のスクリーニング

(1) に記載した細胞を用いて市販の薬、実験試薬などをスクリーニングした。その結果、インターフェロン、TGF ベータ、IL1 ベータ、シクロスポリン A が強い抗 HCV 作用を示した。一方、MAP キナーゼ阻害剤の一つ、PD98059 が促進作用を示した。これらのうち、IL1 ベータ、インターフェロンについてはすでに報告があるので、TGF ベータおよび PD98059、サイクロスポリンについての解析を進めた。

### (3) HCV ゲノム複製を阻害するシクロスポリンの機構

これまでにサイクロスポリン A が抗 HCV 効果を示すことを報告してきた。本年はサイクロスポリンによる抗 HCV 効果が免疫機構とは異なる機構により発揮されることを見いだした。

シクロスポリンの持つ細胞への薬理作用には、(1) カルシニューリンを阻害することによる免疫関連遺伝子の転写活性化に関わる転写因子の不活化、(2) P 糖タンパク質の阻害による薬剤のくみ出し機構の阻害、(3) シクロフィリンの機能阻害、が知られている。これらの機能の中で、どれが抗 HCV 作用と関連するかを明らかにするためにサイクロスポリンの各種誘導体を用いた HCV ゲノム複製阻害効果を調べた。その結果、上の (1) および (2) の機構は関係しないことが明らかになった。

すなわち、サイクロスポリンは細胞のシクロフィリンを抑制することにより抗 HCV 作用を示した。

### (4) シクロフィリン B による HCV ゲノム複製の亢進

シクロフィリンは哺乳動物細胞に約 15 種類存在する。これらのシクロフィリンの中でどれが HCV 複製と関連しているかを明らかにするために、ほぼ 10 種類のシクロフィリンについて siRNA の技術を用いて発現抑制している HCV ゲノム複製細胞を樹立した。それらを用いて HCV RNA 量を測定した。その結果、シクロフィリン B が抑制されている細胞において明らかに HCV ゲノムの量が低下していた。このことからサイ

クロスポリンはシクロフィリン B を抑制する結果 HCV の複製を抑制していると考えられる。

### (5) シクロフィリン B による HCV ゲノム複製の亢進の分子機構

シクロフィリン B がどのような機構で抗 HCV 効果を発揮するかを調べるために、シクロフィリン B と結合する HCV タンパク質について解析した。その結果、NS5B が結合性を示すことが示された。それ以外のウイルスタンパク質でウイルスゲノムの自律的な複製に必須のタンパク質、NS3, NS4A, NS5A のうち NS4A 以外のタンパク質は結合性を示さなかった。NS4A は結合実験を行う系において発現が悪く解析できなかった。

この知見をもとにして NS5B の機能がシクロフィリン B によりどのように変化するかを調べた。その結果シクロフィリン B により NS5B は RNA との結合性を更新していることがわかった。

### (6) シクロフィリン誘導体による抗 HCV 効果

シクロスポリン誘導体各種類について、抗 HCV 効果を調べ、その中の一つ、NIM811, に免疫抑制作用を持たないが強く HCV 複製を抑制するものが存在することを見いだした。

### (7) PD98059 による HCV 複製の増強作用

PD98059 は ERK シグナルの阻害剤として知られている。HCV ゲノム自律複製細胞を用いた評価において、この試薬が HCV ゲノム複製をあげることがわかった。ウイルスゲノム複製のどの段階に PD98059 が働いているかを調べ、HCV IRES の翻訳反応がこの試薬の存在により更新することを見いだした。PD98059 はキャップ依存的な翻訳反応には影響を与えない。また、他の IRES 配列を持つ RNA からの翻訳にも影響を与えなかった。

## 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機構の解析が可能になっ

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細胞側要因を明らかにする目的で、すでに薬理機能が明らかでない薬による抗 HCV 効果を調べた。その結果幾つかの薬に加え、細胞のシグナルに関係する因子がウイルス複製を制御することが明らかになった。

その中で、シクロスポリン A およびその誘導体による抗 HCV 効果を中心に解析した。まず、シクロスポリンの持つ多彩な薬理作用のうち、抗 HCV 作用を示すのは、免疫抑制作用とは異なる機構であることを明らかにした。さらに細胞側の因子であるシクロフィリン B の機能阻害によることを明らかにした。シクロフィリン B は HCV ゲノム複製において、ウイルスポリメラーゼ活性を亢進する働きがある可能性を示した。また、この働きがシクロスポリンにより阻害されることも明らかにした。これらのことから、シクロスポリンは HCV 感染細胞内においてシクロフィリン B の機能を抑制することにより抗 HCV 効果を発揮すると考えられた。また、シクロスポリン誘導体のひとつ、NIM811 は免疫抑制作用が全くないにもかかわらず、HCV ゲノム複製を強く抑制した。このことからシクロスポリン A よりも NIM811 による抗 HCV 作用への期待が残された。

その他 ERK 阻害剤のひとつである、PD98059 がウイルス複製活性を高める働きがあることを見いだした。この薬剤は HCV IRES からの翻訳反応を高めることを見いだした。HCV IRES による翻訳の分子機構はまだ不明な点が多いので、個々で見いだした知見は、その機構の解明に役立つと期待される。

#### E. 結論

HCV ゲノム自律複製細胞を用いて、各種ウイルスゲノム複製を阻害する因子を見いだした。これまで HCV 阻害剤、あるいは C 型慢性肝炎を抑える薬剤として治療に用いられているものの中には、阻害作用の分子機構がまだ明らかでないものがある。本研究で得られた知見は阻害の分子機構を基本にして、今後抗 HCV 剤を開発する上で

重要な知見になると期待される。

#### F. 研究発表

Zhang J, Yamada O, Sakamoto T, Yoshida H, Araki H, Shimotohno K. Exploiting cis-Acting Replication Elements To Direct Hepatitis C Virus-Dependent Transgene Expression. *J Virol.* 79:5923-5932, 2005.

Takahashi H, Yamaji M, Hosaka M, Kishine H, Hijikata M, Shimotohno K. Analysis of the 5' end structure of HCV subgenomic RNA replicated in a Huh7 cell line. *Intervirology.* 48:104-111, 2005.

Obata Y, Yamamoto K, Miyazaki M, Shimotohno K, Kohno S, Matsuyama T. Role of cyclophilin B in activation of interferon regulatory factor-3. *J Biol Chem.* 280:18355-18360, 2005

Kato N, Nakamura T, Dansako H, Namba K, Abe K, Nozaki A, Naka K, Ikeda M, Shimotohno K. Genetic variation and dynamics of hepatitis C virus replicons in long-term cell culture. *J Gen Virol.* 86:645-656, 2005.

Koyanagi M, Hijikata M, Watashi K, Masui O, Shimotohno K. Centrosomal P4.1-associated protein is a new member of transcriptional coactivators for nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem.* 280:12430-12437, 2005.

Murata T, Ohshima T, Yamaji M, Hosaka

M, Miyanari Y, Hijikata M, Shimotohno K. Suppression of hepatitis C virus replicon by TGF-beta. *Virology*. 331:407-417,2005.

Naka K, Takemoto K, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Shimotohno K, Kato N. Interferon resistance of hepatitis C virus replicon-harboring cells is caused by functional disruption of type I interferon receptors. *J Gen Virol*. 86: 2787-2792, 2005.

Murata T, Hijikata M, Shimotohno K. Enhancement of internal ribosome entry site-mediated translation and replication of hepatitis C virus by PD98059. *Virology*. 340 :105-115, 2005.

Watashi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyanari Y, Shimotohno K. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell*. 19 :111-122, 2005.

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)によるインターフェロン(IFN)システムの攪乱機構の解明を目的として昨年度樹立に成功した IFN 抵抗性 HCV レプリコン細胞(軽度に抵抗性と高度に抵抗性)を用いて、IFN 抵抗性となる原因を追究した。その結果、2種類の I 型 IFN 受容体のうちのどちらかに構造異常が生じることにより高度に IFN 抵抗性になることと IFN 誘導遺伝子の発現調節部位にメチル化が起こることにより軽度に IFN 抵抗性となることを明らかにした。ヒト不死化肝細胞を用いた解析では HCV の NS3/4A が IFN- $\beta$  産生を強く抑制する場合とまったく抑制しない場合があることを明らかにした。また、最近開発した全長 HCV RNA の複製レベルを簡便にかつ正確に定量できる培養細胞系を用いて、有望な抗 HCV 剤として期待できるミノリビンとスタチン剤を見出した。

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 50%程度であり、依然として半数

は難治性という状態が続いている。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問題もある。従って、なぜ HCV が IFN に抵抗性を示すのか、すなわち、ウイルスに対する宿主の防御機構としての 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樹立した IFN 抵抗性 HCV レプリコン細胞やヒト不死化肝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、全長 HCV RNA の細胞内での複製レベルを簡便にかつ正確に定量できる評価系(OR6アッセイシステム)を用いて、HCV 増殖抑制剤の探索も行った。

B. 研究方法

(1) 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 に軽度な抵抗性を示す HCV レプリコン細胞 ( $\alpha$ R シリーズ) と IFN に高度な抵抗性を示す HCV レプリコン細胞 ( $\beta$ R シリーズ) から Total RNA を抽出し、RT-PCR 法により IFN シグナル伝達系に係る遺伝子 (Tyk2, Jak1, IFNAR1, IFNAR2c, Stat1 および Stat2) の cDNA (ORF 全体を含む) を増幅した。得られた増幅産物を sequencing 用のプラスミドベクターにクローニングし、それぞれの塩基配列を決定した。

目的遺伝子の読み取り枠 (ORF) 全体を pCXbsr レトロウイルス発現ベクターに組み込み、レトロウイルス感染法により標的細胞に導入して目的遺伝子を発現させた。

IFN 感受性を評価するためのコロニーアッセイはレプリコン細胞に IFN- $\beta$  (200 或は 400 IU/ml) を 4-5 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する方法を用いた。

レプリコン RNA の定量試験はレプリコン細胞から RNeasy RNA preparation kit により調製した Total RNA を LightCycler を用いた real-time RT-PCR 法にて行った。

$\alpha$ R シリーズのレプリコン細胞の 5-azacytidine 処理は培地に最終濃度が 10  $\mu$ M になるように加えて 2 週間培養するという方法を用いた。なお、対照として親株の 50-1 レプリコン細胞を同様に処理した。

cDNA マイクロアレイ解析用として以下に示す 4 種類の細胞を用意し、RNeasy RNA preparation kit にてそれぞれの細胞から Total RNA を調製した。

1. 未処理の 1 $\alpha$ R 細胞; 2. IFN- $\alpha$  (500

IU/ml で 8 時間) で処理した 1 $\alpha$ R 細胞; 3. 5-azacytidine (10  $\mu$ M で 2 週間) で処理した 1 $\alpha$ R 細胞; 4. 5-azacytidine (10  $\mu$ M で 2 週間) で処理した後に IFN- $\alpha$  (500 IU/ml で 8 時間) で処理した 1 $\alpha$ R 細胞。cDNA マイクロアレイは Amersham Biosciences 社の CodeLink™ (54,840 スポットを含む Uniset human I) を用いて解析した。

(2) ヒト不死化肝 PH5CH8 細胞での NS3-4A の発現による IFN- $\beta$  産生抑制効果

二本鎖 RNA (dsRNA) の添加および細胞内導入による IFN- $\beta$  遺伝子プロモーターのレポーターアッセイは以下に示す方法により行った。

レポーターベクター等のトランスフェクションの前日に、PH5CH8 細胞を 1 ウェルあたり  $1.5 \times 10^5$  ずつ 6 ウェルプレートに蒔き込んだ。これらの細胞に、pCXbsr レトロウイルス発現ベクター (NS3-4A など) 2  $\mu$ g、レポータープラスミド (pIFN- $\beta$ (-125)-Luc) 0.5  $\mu$ g および pRL-CMV internal control ベクター 1 ng を FuGENE6 を用いてトランスフェクションした。培養 42 時間後に dsRNA (poly I:C) 刺激を行った。

細胞外から刺激する場合は、培地交換後、poly I:C を 50  $\mu$ g/mL となるように、培地に添加し、6 時間後に Dual-Luciferase Assay を行った。一方、細胞内で刺激する場合は、培地交換後、poly I:C 5  $\mu$ g を Lipofectamine 2000 を用いて、トランスフェクションし、6 時間後に Dual-Luciferase Assay を行った。

(3) OR6 アッセイシステムを用いた HCV

## 増殖抑制剤の探索

薬剤を添加する前日に、OR6細胞を1ウェルあたり $2 \times 10^4$ ずつ24ウェルプレートに蒔き込んだ。これらの細胞に、各種薬剤を添加して72時間後に細胞のリンフェラーゼ活性を測定した。

### (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) 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 に抵抗性を示す HCV レプリコン細胞(軽度に IFN 抵抗性を示す $\alpha$ R シリーズの細胞と高度に IFN 抵抗性を示す $\beta$ R シリーズの細胞)から IFN- $\gamma$ やシンクロスポリン処理で HCV レプリコンを完全に排除しても IFN に対する感受性が回復しなかったことや、IFN 抵抗性 HCV レプリコン細胞株に共通して認められた HCV レプリコン内のアミノ酸置換も IFN 抵抗性に関して直接的な関与が認められなかったことから、IFN シグナル系で機能している宿主因子の異常が予想された。

そこで、IFN 高感受性の親株細胞(50-1)、 $\alpha$ R シリーズの細胞(1 $\alpha$ R、3 $\alpha$ R、4 $\alpha$ R および 5 $\alpha$ R) および $\beta$ R シリーズの細胞(1 $\beta$ R、3 $\beta$ R、4 $\beta$ R および 5 $\beta$ R)由来の RNA から IFN シグナル伝達系の上流域に位置する Tyk2、Jak1、IFN- $\alpha/\beta$  受容体(IFNAR1とIFNAR2c)、Stat1、Stat2などを

コードする cDNA を RT-PCR 法により増幅して、それらの構造に異常がないかどうかを順番に調べることにした。まず、Tyk2 と Jak1 について検討したところ、それぞれの細胞での発現量は同程度であり、cDNA の塩基配列を決定して比較した結果、特に異常は認められなかった。次に、IFNAR1 と IFNAR2c について検討した。その結果、これらの遺伝子の発現量には各細胞間で大きな差はなかったが、高度に IFN 抵抗性である 1 $\beta$ R や 4 $\beta$ R 細胞由来の cDNA には構造異常があることが判った。1 $\beta$ R 細胞の IFNAR2c では調べた 13 クローン中すべてにおいて

159 番目のグルタミン酸のコードン GAG がストップコードン TAG に変異していることが判明した。また、4 $\beta$ R 細胞の IFNAR1 では調べた 12 クローン中すべてにおいて 107 番目のグルタミン酸のコードン GAA がストップコードン TAA に変異していることが判明した。そこで、これら以外の IFN 抵抗性レプリコン細胞由来の IFNAR1 および IFNAR2c の cDNA についてそれぞれ最低 3 クローンの塩基配列を決定して異常がないかどうかを調べた。その結果、3 $\beta$ R 細胞の IFNAR1 について 11 クローン中 3 クローンで 458 番目のリジンコードンのストップコードンへの変異が見つかり、2 クローンでは 135 アミノ酸しかない Truncate 型の IFNAR1 が生じるような欠損が見つかった。また、5 $\beta$ R 細胞でも 78 或は 67 アミノ酸しかない IFNAR1 が生じるような欠損が見つかった。これに反して、軽度に IFN 抵抗性を示す $\alpha$ R シリーズのレプリコン細胞からはこれらの構造異常はほとんど検出されなかった。

次に、新たに見出された IFNAR の構造

異常が IFN のシグナル伝達を阻害して IFN 抵抗性の原因になっていることを実験的に検証する実験を行った。IFNAR1 の 107 番目のグルタミン酸コドンがストップコドンになっていることが見つかった 4βR 細胞に正常型の IFNAR1 を発現させた場合に IFN に対する感受性に変化が認められるかどうかを調べた。対照として IFN 高感受性である 50-1 レプリコン細胞を用いた。正常型や変異型(107 番目のグルタミン酸コドンがストップコドンになっている) IFNAR1 を 50-1 および 4βR 細胞に発現させ、IFN に対する感受性の変化をコロニーアッセイ(定性試験)とレプリコン RNA の定量試験により調べた。その結果、4βR 細胞に正常型の IFNAR1 を発現させた場合にのみ、高度な IFN 抵抗性から IFN 高感受性に変化することを確認した。これにより 4βR 細胞において観察された高度な IFN 抵抗性の主要な原因は IFNAR1 の構造異常によるものであることが明らかとなった。

しかしながら、軽度な IFN 抵抗性を示す αR シリーズのレプリコン細胞では、IFNAR の構造異常がほとんど検出されなかったことから、別の原因であることが予想された。IFN シグナル伝達系に関与している遺伝子群の発現低下の可能性が考えられたが、RT-PCR による解析では上述した遺伝子群の発現レベルが低下しているという結果は得られなかった。次に考えられたのは、IFN により誘導される数百種類の遺伝子群(抗 HCV 作用を有する遺伝子が含まれるはず)の中で、抗 HCV 作用を有する遺伝子の発現量が低下している(或は IFN により誘導がかからない)可能性が考えられた。遺伝子の発現調節部位である

promoter 或は enhancer 領域のメチル化が起こっていると IFN 抵抗性の原因になるものと予想された。そこで、IFN で細胞を処理する前に、脱メチル化剤である 5-azacytidine でレプリコン細胞を処理し、その後 IFN-α処理を行ってみた。その結果、予想どおり、αR シリーズのレプリコン細胞では、前もって 5-azacytidine 処理を行うと、IFN 抵抗性から IFN 高感受性に変化することが判った。このような現象については、定性的なコロニーアッセイとレプリコン RNA を測定する定量試験により確認した。

そこで、どのような IFN 誘導性遺伝子の脱メチル化が抗 HCV 作用の出現に関与しているかを探索するために、1αR 細胞を用いて cDNA マイクロアレイ解析(約 55,000 遺伝子)を行った。細胞を 5-azacytidine で処理してもあまり誘導されず、IFN-α処理によっても期待されるほど誘導されないが、5-azacytidine + IFN-α処理により遺伝子の発現量が有意(2.5 倍以上)に上昇する遺伝子群を選択した。かなり多くの遺伝子群が選択されたが、その中で遺伝子に名前がついている7種類の遺伝子(IFI27, 9-27, LMP2, LMP7, Viperin, IFI44, IFIT2)をピックアップした。cDNA マイクロアレイ解析により得られた 5-azacytidine や IFN-αによるこれらの遺伝子の発現レベルの変動は LightCycler を用いた定量的 RT-PCR により確認した。

次に、これらの遺伝子の発現が抗 HCV 作用を有しているかどうかを調べるために、これらの遺伝子の cDNA を RT-PCR 法によりそれぞれ増幅単離し、それぞれ pCXbsr レトロウイルス発現ベクターに組み



込んだ。これらの発現ベクターから得られたレトロウイルスを 1 $\alpha$ R 細胞に感染させ、それぞれの遺伝子が安定的に発現している細胞を得た。これらの細胞内におけるレプリコン RNA の量を real-time RT-PCR で定量した結果、Viperin を発現している細胞ではレプリコン RNA 量が約 50%低下していることが判った。LMP2, IFIT2, LMP7 を発現している細胞でもそれぞれ、20-30%レプリコン RNA 量の低下が認められたが、IFI27, IFI44, 9-27 を発現している細胞でのレプリコン RNA 量の低下はほとんど認められなかった。

しかしながら、これらの細胞を IFN- $\alpha$  で処理した後にレプリコン RNA を real-time RT-PCR にて定量すると、さらに IFN 感受性になることが判った。特に、LMP7 や Viperin を発現している細胞は IFN 高感受性である親株の 50-1 細胞と同程度の IFN 感受性に変化することが観察された。それ以外の遺伝子を発現している細胞も元の 1 $\alpha$ R 細胞よりも有意に IFN 感受性に変化していることが判った。

以上の解析により、 $\alpha$ R シリーズに見られる軽度な IFN 抵抗性は少なくともマイクロアレイ解析により選択された遺伝子を含むある遺伝子群のメチル化により生じていることが明らかとなった。

## (2) ヒト不死化肝 PH5CH8 細胞での NS3-4A の発現による IFN- $\beta$ 産生抑制効果

ヒト不死化肝 PH5CH8 細胞は HuH-7 や HepG2 細胞などのヒト肝癌細胞株と異なり、IFN- $\beta$  産生システムの TLR3/TFIF および RIG-I/IPS-1 の両シグナル系が機能していることが最近明らかにされたことから、今

年度は IFN- $\beta$  の代表的発現誘導剤である poly I:C を用いて、IFN- $\beta$  産生に対する HCV NS3-4A の抑制能を調べた。PH5CH8 細胞に IFN- $\beta$  遺伝子プロモーターを有するレポータープラスミドと NS3-4A 発現ベクタープラスミドを導入した後に poly I:C で刺激を加えてレポーターアッセイを行った。poly I:C を直接細胞内に導入して刺激した場合の IFN- $\beta$  遺伝子プロモーターの活性化は NS3-4A のセリンプロテアーゼ活性に依存して顕著に抑制された。しかしながら予想外に、poly I:C を細胞の外部から添加して刺激した場合の IFN- $\beta$  遺伝子プロモーターの活性化は NS3-4A により抑制されないことが明らかとなった。

## (3) OR6 アッセイシステムを用いた HCV 増殖抑制剤の探索

全長 HCV RNA の複製レベルを簡便にかつ正確に定量できる OR6 アッセイシステムを用いて、既存薬を中心に HCV RNA の複製を抑制する薬剤の探索を行った。その結果、リバビリンと類似した構造を有するミゾリビンがリバビリンとほぼ同程度の抗 HCV 活性を有することを見出した。薬剤添加後 3 日目で HCV RNA の複製レベルを 50% 阻害する濃度 ( $IC_{50}$ ) は 99  $\mu$ M と抗 HCV 作用としては弱いものであったが、10  $\mu$ M 程度の低濃度 (臨床上的での血中濃度) でも IFN- $\alpha$  との併用効果が認められた。

これまでに、高脂血症薬の一つである Lovastatin (国内では認可されていない) に抗 HCV 作用があることが報告されていたことから、国内で認可されている他のスタチン剤である Atrovastatin、Fluvastatin、Simvastatin および Pravastatin の抗 HCV 効果を OR6 アッセイシステムを用いて調べた。その結果、前 3 者は Lovastatin より強い抗

HCV効果を示した。薬剤添加3日後における測定でのIC<sub>50</sub>はLovastatinで 2.16 μMであったのに対してSimvastatin 1.57 μM、Atorvastatin 1.39 μM、Fluvastatin 0.90 μMであった。特にFluvastatinは他の薬剤よりも有意に強い抗HCV効果を示した。しかしながら、Pravastatinにはまったく抗HCV効果がなく、他のスタチン剤とは異なることが判った。抗HCV効果を示すスタチン剤はIFN-αとの併用によっても相乗効果を示すことが明らかになった。

肝発がんに対して予防効果があると最近報告されたコーヒーに抗HCV効果があるかどうかをOR6アッセイシステムにより調べた。常温可溶性のインスタントコーヒーを用いて検討した。培地への添加で顕著な細胞毒性がない濃度(0.05%まで)で検討した結果、コーヒーはHCV RNAの複製に影響を与えることはないことが判った。

#### D. 考察

##### (1) 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、HCV レプリコン細胞の IFN 受容体の構造異常(変異や欠損)により高度な IFN 抵抗性が獲得されることと、IFNにより誘導される抗HCV作用を有する遺伝子の発現調節部位におけるメチル化によりそれらの発現量が低下して軽度の IFN 抵抗性になることが明らかにされた。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 IFN シグナル伝達系の異常が生じたという可能性も残る。また、今回解析に用いたHCVレプリコン細胞はすべてG418存在下において単離樹立されたものであることから、偏つ

た細胞群について調べている可能性もある。これらの点を検討する実験系として、現在、G418非存在下での全長HCVRNAの複製細胞モデルを用いて解析を進めている。さらに、今回見出したIFNシグナル伝達系に關与する宿主因子の異常が実際にIFN治療を受けた肝炎患者にも起こっているかどうかについても検討する必要がある。

αR シリーズ細胞の IFN 抵抗性に関しては、今回の解析により選択された遺伝子群だけで決定されているわけではなく、DNAメチル化をあまり受けていないIFN誘導性遺伝子(未同定)が協同的に作用して抗HCV作用を発揮している可能性も考えられる。

##### (2) ヒト不死化肝 PH5CH8 細胞での NS3-4A の発現による IFN-β 産生抑制効果

他の研究室からのこれまでの報告も合わせて考えると、IFN-β遺伝子の活性化に対するNS3-4Aの抑制効果はHCVの持続感染を成立させるために有利になるものと思われるが、PH5CH8細胞を用いた解析ではdsRNAの細胞外刺激によるIFN-β遺伝子の活性化はNS3-4Aでは抑制できず、従来考えられているメカニズムでは説明できない現象である。現在までに判明しているメカニズムに従うとdsRNAの細胞外刺激ではTLR3/TRIF系が活性化され、IRF3の活性化を経てIFN-βが産生されることになっている。この場合、NS3-4AはTRIF分子を切断して、このシグナル伝達をブロックするということが報告されている。しかしながら、今回の解析結果からNS3-4Aにより

TRIF の切断が起こっていないか、或は TLR3/TRIF 以外のシグナル伝達系がある可能性が考えられる。今後、このメカニズムの解明が必要である。

### (3) OR6 アッセイシステムを用いた HCV 増殖抑制剤の探索

抗 HCV 効果を示す薬剤として今年度見出したミゾリピンにはリバビリンに認められるような貧血の副作用(高齢者に頻発)がないことから、高齢者に対する治療においてはリバビリンに代わってミゾリピンを使用できる可能性がある。ミゾリピンもリバビリンもイノシン酸デハイドロゲナーゼ阻害剤であるが、抗 HCV 作用と直接関与しているかどうかは証明されておらず、RNA 変異誘導活性による効果や細胞免疫を増強させる効果によるという説もあることから、それらの作用機序を明らかにする必要もある。

スタチン剤は安全な薬剤として長期間の服用が可能な薬剤であるので、IFN との併用で治療に使用できる可能性がある。スタチン剤はコレステロール生合成系における律速酵素である HMG-CoA レダクターゼの特異的阻害剤であるが、Pravastatin にまったく抗 HCV 効果がないことから、別の作用機序が考えられる。コレステロールを添加してもスタチン剤の抗 HCV 活性は変化しないが、メバロン酸を添加するとスタチン剤の抗 HCV 効果は低下することから、別の経路としてメバロン酸より下流のゲラニルニリン酸やファ-ネシルニリン酸の段階における蛋白質のプレニル化のところで作用している可能性がある。この段階での Pravastatin の効果を調べてスタチン剤にみられる抗 HCV 作用の分子機序を明らか

にする必要がある。また、OR6 アッセイシステムを用いて、さらに有効な抗 HCV 作用を示す物質の探索も今後行う予定である。

## E. 結論

(1) HCV レプリコン細胞が高度に IFN 抵抗性を示す原因は IFN 受容体の構造異常(変異や欠損)であることと軽度に IFN 抵抗性を示す原因は抗 HCV 作用を有する IFN 誘導性遺伝子の発現調節部位のメチル化によるものであることを明らかにした。

(2) ヒト不死化肝細胞において HCV の NS3/4A が IFN- $\beta$  産生を強く抑制する場合と抑制しない場合があることを明らかにした。

(3) 全長 HCV RNA の複製レベルを簡便にかつ正確に定量できる培養細胞を用いたアッセイ系を用いて、ミゾリピンとスタチン剤に抗 HCV 作用があることを見出した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) K. Naka, H. Dansako, N. Kobayashi, M. Ikeda and N. Kato. Hepatitis C virus NS5B delays cell cycle progression by inducing interferon- $\beta$  via Toll-like receptor 3 signaling pathway without replicating viral genomes. Virology in press

- 2) K. Naka, K. Abe, K. Takemoto, H. Dansako, M. Ikeda, K. Shimotohno and N. Kato. Epigenetic silencing of interferon-inducible genes is implicated in interferon resistance of hepatitis C virus replicon-harboring cells. *J. Hepatology* in press.
- 3) L. Deng, M. Nagano-Fujii, M. Tanaka, Y. Nomura-Takigawa, M. Ikeda, N. Kato, K. Sada and H. Hotta. The NS3 protein of hepatitis C virus associates with the tumour suppressor p53 and inhibits its function in an NS3 sequence-dependent manner. *J Gen Virol* in press
- 4) H. Dansako, K. Naka, M. Ikeda and N. Kato. Hepatitis C virus proteins exhibit conflicting effects on the interferon system in human hepatocyte cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2005) 336, 458-468 .
- 5) K. Li, Z. Chen, N. Kato, M. Gale, Jr and S. M. Lemon. Distinct poly-I:C and virus-activated signaling pathways leading to interferon- $\beta$  production in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* (2005) 280, 16739-16747.
- 6) K. Naka, K. Takemoto, K. Abe, H. Dansako, M. Ikeda, K. Shimotohno, and N. Kato. Interferon resistance of hepatitis C virus replicon-harboring cells is caused by functional disruption of type I interferon receptors. *J. Gen. Virol.* (2005) 86, 2787-2792.
- 7) K. Naka, M. Ikeda, K. Abe, H. Dansako and N. Kato. Mizoribine inhibits hepatitis C virus RNA replication: effect of combination with interferon- $\alpha$ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2005)330, 871-879.
- 8) 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) 329, 1350-1359.
- 9) 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) 86, 645-656.
- 10) 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) 7, 29-40.
- 11) 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.* (2005)107, 73-81.

## 2. 学会発表

- 1) 池田 正徳、阿部 健一、團迫 浩方、

- 仲 一仁、加藤 宣之.  
全長HCV RNAレポーター評価システム  
により見出したスタチンとインターフェ  
ロンの併用による相乗的抗ウイルス効果.  
第64回 日本癌学会総会、札幌、  
2005年9月
- 2) 阿部 健一、池田 正徳、團迫 浩方、  
仲 一仁、加藤 宣之.  
HCV-O株由来の全長HCV RNA複製細胞  
群の樹立. 第64回 日本癌学会総会、  
札幌、2005年9月
- 3) K. Naka, K. Takemoto, K. Abe,  
H. Dansako, M. Ikeda, K. Shimotohno  
and N. Kato.  
Interferon resistance of HCV replicons  
is caused by functional disruption of  
type I interferon receptors.  
12th International Meeting on  
Hepatitis C Virus and Related  
Viruses. Montreal, Canada,  
October, 2005.
- 4) M. Ikeda, K. Abe, M. Yamada, H.  
Dansako, K. Naka and N. Kato.  
HMG-CoA reductase inhibitors as a  
new class of anti-HCV reagents: their  
different effects on HCV replication  
and their applications for combination  
therapy with IFN.  
12th International Meeting on Hepatitis  
C Virus and Related Viruses. Montreal,  
Canada, October, 2005.
- 5) H. Dansako, K. Naka, M. Ikeda and  
N. Kato. HCV proteins exhibit  
contradictory effects on interferon  
system in human hepatocyte cells.  
12th International Meeting on  
Hepatitis C Virus and Related Viruses.  
Montreal, Canada, October, 2005.
- 6) K. Abe, M. Ikeda, H. Dansako, K. Naka  
and N. Kato. Identification of a cell  
culture-adaptive mutation in newly  
established genome-length HCV RNA  
replicating cell lines.  
12th International Meeting on  
Hepatitis C Virus and Related Viruses  
Montreal, Canada, October, 2005.
- 7) 加藤 宣之, 阿部 健一, 竹本 和憲,  
團迫 浩方, 池田 正徳, 下遠野 邦忠  
C型肝炎ウイルスレプリコン細胞のイン  
ターフェロン抵抗性獲得機構.  
第53回日本ウイルス学会学術集会、  
横浜、2005年11月
- 8) 池田 正徳、阿部 健一、山田 将士、  
團迫 浩方、加藤 宣之. 全長HCV  
RNA複製抑制効果を示すスタチン:スタ  
チンの種類による抗HCV効果の違いと  
インターフェロンとの併用による相乗的  
抗HCV効果. 第53回日本ウイルス学会  
学術集会、横浜、2005年11月
- 9) 團迫 浩方、池田 正徳、加藤 宣之. C型  
肝炎ウイルス蛋白質のインターフェロン-  
 $\beta$ 産生系に対する相反的效果.  
第53回日本ウイルス学会学術集会、  
横浜、2005年11月
- 10) 竹本 和憲、團迫 浩方、池田 正徳、  
加藤 宣之. 各種病態由来のC型肝炎ウ  
イルス NS3-4A: インターフェロン- $\beta$   
産生抑制効果の比較.  
第53回日本ウイルス学会学術集会、  
横浜、2005年11月
- 11) 阿部 健一、池田 正徳、團迫 浩方、  
加藤 宣之. HCV-O株由来の全長HCV  
RNA複製細胞群の樹立と適応変異に関  
する解析.  
第53回日本ウイルス学会学術集会、  
横浜、2005年11月
- 12) 田村 一志、大上 厚志、清水 宣明、

加藤 宣之、森川 昭広、星野 洪郎.  
VSV/HCV pseudotype virus感染系を  
用いたHCV母子感染症例の感染機構の  
検討.  
第53回日本ウイルス学会学術集会、  
横浜、2005年11月

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

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消化器内科学教授

研究の要旨

DC サブセットには特有の Toll 様受容体（TLR）が発現しており、HCV 感染による TLR 刺激が DC を介した先天免疫系、獲得免疫系の効率的な活性化に関与する。今年度は C 型肝炎患者における DC サブセットの TLR の発現と機能を解析した。C 型肝炎患者の単球由来 DC では、非感染者と比較して TLR2 発現が低下しており、TLR 刺激による TLR2 の発現誘導が不十分であり、T 細胞の増殖刺激活性が低下していた。HCV 蛋白と TLR2 との関連が報告されており、C 型肝炎患者 DC における TLR2 の発現・機能の低下は、DC が HCV 感染を十分に感知できず、効果的に免疫系を活性化できない可能性を示唆している。

A. 研究目的

C 型肝炎患者における HCV 持続感染の機序、肝細胞障害の発症と進展などには宿主の免疫応答が深く関与している。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）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 型肝炎患者 DC は NK 細胞の活性化能が低下しており、癌のサーベイランスが不十分となっている。DC にはサブセット特異的に Toll 様受容体（TLR）が発現しており、ウイルス感染を感知して免疫応答を効果的に発動させる。HCV 感染においても TLR が免疫病態に関与していると想定されるが、その発現と機能については明らかではない。本研究では C 型肝炎患者の DC における TLR の発現と機能を解析し、TLR 経路を介した DC の機能制御によって 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

末梢血単球より誘導した DC における TLR の発現を Real-time PCR 法を用いて検討した。また各 TLR に特異的なアゴニストを用いて DC を刺激し、TLR の発現変化、DC の成熟度、DC のサイトカイン産生を検討した。TLR アゴニスト刺激 DC の T 細胞増殖刺激能、Th1 誘導能を検討した。

（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

DC における TLR2 の発現は C 型肝炎患者で低下していたが、TLR3、TLR4 の発現は非感染者と同程度であった。また TLR2、TLR3、TLR4 の各アゴニスト刺激により DC の TLR2 の発現は亢進したが、その程度は C 型肝炎患者で低かった。一方 TLR3 の発

現は TLR3 アゴニスト刺激によってのみ亢進し、TLR4 発現はいずれのアゴニスト刺激によっても低下した。これらの TLR3、TLR4 の発現変化は患者と非感染者とで差を認めなかった。TLR 刺激によって DC の成熟マーカーである CD86、CD83 の発現は患者、非感染者とも同等に亢進した。TLR2、TLR4 アゴニスト刺激による TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10 の産生は患者と非感染者とで差を認めなかったが、TLR3 アゴニスト刺激による IL-12p70、IL-23、IL-27 の発現誘導は患者 DC で高い傾向を認めた。TLR アゴニスト刺激 DC の T 細胞増殖能、Th1 誘導能は、TLR2 刺激では患者 DC で低下していたが、TLR3、TLR4 刺激では両群で差を認めなかった。

D. 考察

C 型肝炎患者 DC は非感染者に比べて TLR2 の発現、TLR 刺激による TLR2 発現誘導は低下していたが、TLR2 刺激による DC の成熟、炎症性サイトカイン産生能は同等であった。また TLR2 刺激 DC の T 細胞刺激能は患者で低下していた。一方 TLR3 刺激に対しては患者 DC は非感染者よりも IL-12 関連サイトカイン産生能が高い傾向があり、T 細胞刺激能も同等であった。以上の結果は C 型肝炎患者 DC では TLR2 経路が選択的に障害されている可能性を示唆している。

E. 結論

C 型肝炎患者 DC では TLR2 経路は障害されているが TLR3 経路は保たれており、HCV 感染における DC 機能の活性化には TLR3 経路を介した刺激が有用であると考えられた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

Yakushijin, T., et al. Reduced expression and functional impairment of Toll-like receptor 2 on dendritic cells in chronic hepatitis C virus infection. *Hepato Res* 2006. in press.

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マトリックスセッティングの ELISpot アッセイにより、2例のC型急性肝炎の患者、1例のC型急性肝炎治癒後の患者、1例のC型急性肝炎が慢性化し1年経過した患者で新たに7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、マトリックスセッティングの 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297種類の20アミノ酸のペプチドをマトリックスセッティングで10種類ずつ（1組のみ7種類）混合し、C型急性肝炎患者あるいはC型急性肝炎治癒後の患者、C型急性肝炎慢性化後1年経過した患者の末梢血単核球の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。マトリックスセッティン

グによるペプチド混合物刺激であるため、陽性ウェルの組み合わせにより直ちにエピトープペプチドが推定された。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。更に、前年度同定した3種類のCTLエピトープペプチドを含め、アミノ酸を一つずつずらしたペプチドを作製し、最小有効エピトープの決定も行った。

（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

前年度同定した3種類のCTLエピトープの最小有効エピトープはHCV E2 611-618, NS3 1373-1380, NS5A 2290-2298であった。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マトリックスセッティングの ELISpot アッセイによる新たなHCV特異的



CTL エピトープの同定は、4 例の C 型肝炎患者末梢血 CD8 陽性細胞を用いて行った。HLA-A\*2402, 2601, B\*4002, Cw\*0304 の患者では HCV NS2 957-965, NS5A 2122-2130 が最小有効エピトープ、HLA-A24, 33 B7 の患者では HCV C 91-110 にエピトープが含まれ、HLA-A\*2402, B\*4801, 5201, Cw\*0803, 1202 の患者では HCV NS3 1643-1656 が CTL エピトープ、HLA-A\*2402, B\*5201, Cw\*1202 の患者では HCV NS4 1758-1777, NS5B 2551-2570, NS5B 2801-2820 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 型肝炎 2 例の内の 1 例は急性肝炎発症時に HCV RNA アンプリコア定性で陰性、HCV 抗体が陰性であるにもかかわらず HCV に対する CTL 応答が認められ、感度の更に高いホームメイドの HCV RNA アッセイにより血清中に HCV RNA が微量検出され C 型肝炎と確定した。この患者ではその後も HCV 抗体値の上昇は認められず、HCV 排除における CTL 応答の重要性が確認された。別の一例では、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した。

#### 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 8 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、4 例の C 型肝炎患者で新たに 7 種類の HCV 特異的 CTL エピトープを同定した。

C 型肝炎患者 2 例のうちの 1 例の結果から、C 型肝炎ウイルス感染後、HCV 抗体も出現せず、CTL 応答によりウイルスが排除される例も存在することが明らかになった。

#### E. 結論

今回、新たに 7 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、自然治癒した C 型肝炎の検討で、通常の HCV RNA 測定系ではウイルス感染を同定できず、HCV 抗体の出現も見られず、CTL 応答のみ観察される症例が存在することが明らかになった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

広石和正, 渡邊豪紀, 井廻道夫. C型肝炎の発症機序とHCV持続感染. 総合臨床 54:503-511 [2005].

広石和正, 井廻道夫. HCV持続感染の免疫学的背景. Annual Review消化器 2005, 29-35 頁, 中外医学社 [2005]

##### 2. 学会発表

広石和正, 袴田拓, 井廻道夫. C型肝炎におけるCTL応答. シンポジウム「Liver Immunology最前線」. 第41回日本肝臓学会総会, 大阪, 6月16日 [2005]

#### 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

中島一格（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）

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。

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

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17年の陽性率は平成15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、全ての年代で陽性率が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。また、同年10月からは全国の血液センターで本人確認を実施している。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年には陽性率の増加が認められた(図2)。しかし、この年の陽性者は全て水平感染であることが確認されており、平成15年から平成17年までの3年間では、16歳初回献血者でHBVキャリアは確認されていない。

#### 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17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17年では30歳代以降で明らかな陽性率の低下が認められ(図4、5)、全年代で陽性率が1%を下回った。HCV抗体陽性率の低下にもHBs抗原と同様に、献血時の本人確認の影響が関与していると考えられる。

#### 初回献血者におけるHTLV-I抗体陽性率

HTLV-I抗体の陽性率も他のマーカーと同様に陽性率の低下傾向が認められ、(図6)特に40歳以降の高齢者側で低下傾向が顕著であった。関東地方の1都3県と福岡県の陽性率を比較すると、関東地方の低下

傾向は福岡県に比べ明確ではなかった(図7、8)。

#### D. 考察

平成17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実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抗原陽性率は平成15年ゼロ、平成16年は約0.08%、平成17年は再びゼロとなった。平成16年の陽性者は全て水平感染であることが確認されており、平成15年以降では16歳初回献血者からHBVキャリアは認められていない。これは昭和61年から始められた「B型肝炎ウイルスの母子感染防止対策」の効果といえる。

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ことを昨年報告したが、関東の1都3県では陽性率の低下傾向が明らかではなく、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

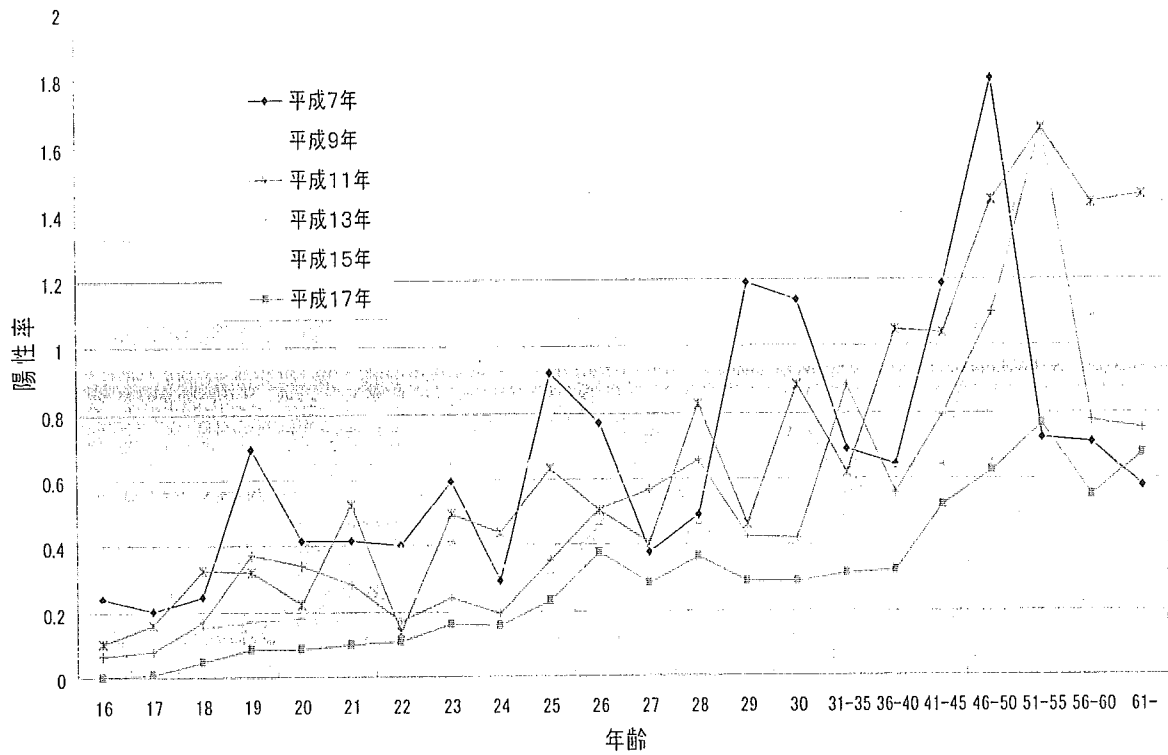


図2

16歳初回献血者におけるHBs抗原陽性率

