

厚生科学研究費補助金（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班
分担研究報告書

実験的にHBV(ジェノタイプC)を感染させたチンパンジーの
末梢血中におけるHBV DNAの初期動態

分担研究者 田中 純子¹⁾、柚木 久雄²⁾、吉澤 浩司¹⁾
研究協力者 片山 恵子¹⁾、小宮 裕¹⁾、水井 正明³⁾
友栗 徹士⁴⁾、早坂 郁夫⁴⁾

- 1) 広島大学大学院 疫学・疾病制御学
- 2) 日赤中央血液研究所 核酸増幅検査部
- 3) 広島県赤十字血液センター
- 4) (株)三和化学研究所 熊本霊長類パーク

研究要旨

ごく微量の（感染成立に必要な最少量の）HBV(ジェノタイプC)に感染した場合の末梢血中におけるHBV DNAの初期動態を知ることが目的として、チンパンジーを用いた感染実験を行なった。

その結果、実験に供した2頭のチンパンジーにおいて、1) 末梢血中のHBV DNA量が核酸増幅検査(NAT)の検出限界である 10^2 コピー/mlに達するまでの期間(NATのウィンドウ期間)はそれぞれ5週、6.5週であることが明らかとなった。2) 末梢血中のHBs抗原がEIA法により検出できる濃度に達するまでの期間(EIA法によるHBs抗原のウィンドウ期間)はそれぞれ7週、9週であった。3) 感染早期の末梢血中におけるHBV DNAの増加速度、すなわち2倍に増えるために要する時間:doubling timeはそれぞれ1.8日、2.5日であり、10倍に増えるために要する時間:log timeはそれぞれ6.0日、8.3日であることが明らかとなった。

A. 研究目的

ごく微量の（感染成立に必要な最少量の）HBVに感染した際の、いわゆるNATのウィンドウ期間、HBs抗原のウィンドウ期間、および「感染早期」の末梢血中における

HBV DNAのdoubling time、log timeに関する知見を得ておくことは、様々な分野におけるHBVの感染予防対策や、血液製剤、血漿分画製剤の安全性確保のための手順を見直し、感染論的視点から再構築するため

に必要なことであると考えられる。

本研究では、HBVの感染に感受性を有するチンパンジーをモデル動物として用い、日本に多く存在するジェノタイプCのHBVを実験的に感染させて、感染早期の末梢血中におけるHBVの動態を明らかにすることを目的とした。

B. 対象と方法

(1) 感染材料

HBV感染早期のチンパンジー由来の血清¹⁾ (HBVのジェノタイプC、HBV DNA量 3.0×10^6 コピー/ml、HBc抗体陰性) を感染材料として用いた。

(2) 実験に供したチンパンジー

C-269 (11Y、♂、63.3kg) と C-285 (7Y、♂、38.0kg) の2頭を用いた。また、上記感染材料を得る目的で献血者由来のFFP (HBV DNA量 5.3×10^5 コピー/ml) を5ml接種したC-272 (9Y、♂、62.5kg) のデータも解析の対象とした。

(3) 感染実験

接種材料の準備から、経過観察の詳細については文献¹⁾に記した。

(4) HBV マーカーの検出、測定

HBV DNAの定量はTaq Man PCR法により、また、HBs抗原の検出はAxSYM[®]により行なった。

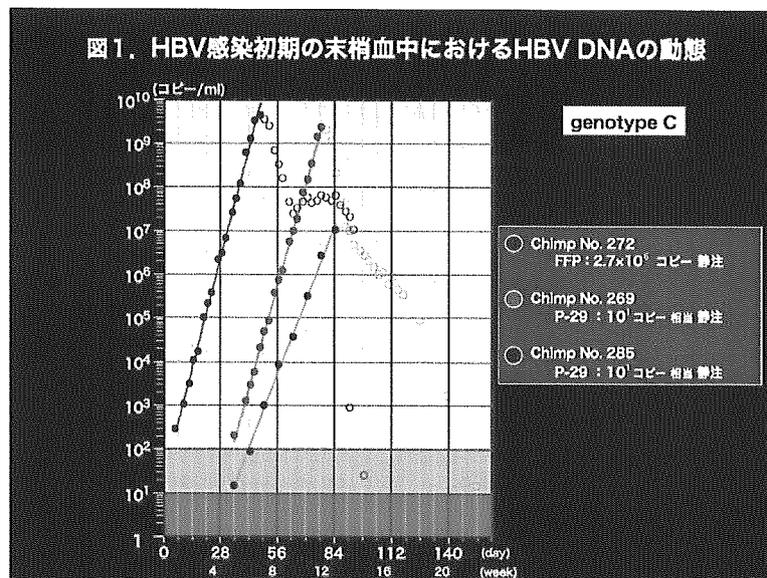
C. 結果

(1) NATのウィンドウ期間

感染成立に必要な最少量の (HBV DNA量に換算して10コピー相当の) HBVを接種したチンパンジーにおけるNATのウィンドウ期間は、それぞれ5週 (C-269)、6.5週 (C-285)であった。一方、感染材料を採取する目的で献血者由来の「HBV感染早期」のFFP (HBV DNA 5.3×10^5 コピー/ml \times 5ml) を接種したチンパンジー (C-272) では接種後10日目には、既にHBV DNA量が 1.1×10^3 コピー/mlに達し、その後も順調に増加を続けていることが確認された。

(2) HBs抗原のウィンドウ期間

C-269、C-285、C-272の順に、それぞれ7週目、9週目、および22日目にHBs抗原が検出された。



(3) 「HBV 感染早期」の末梢血中における HBV DNA の増加速度

末梢血中の HBV DNA 量が2倍に増えるために要する時間 (doubling time) は、C-269、C-285、および C-272 の順に、それぞれ1.8日、2.5日、1.7日であった。同様に10倍に増えるために要する時間 (log time) は、それぞれ6.0日、8.3日、5.6日であった。

「HBV 感染早期」の末梢血中における HBV DNA の動態を図-1 に、まとめて示した。

(4) 感染した HBV のジェノタイプの違いによる末梢血中における HBV DNA の初期動態の差異

ジェノタイプ A の HBV を接種した場合 (平成 16 年度の報告書にて既報告)³⁾ ⁴⁾ とジェノタイプ C の HBV を接種した場合の HBV の初期動態の差異を表-1 と表-2 にまとめて示した。

表-1 から、NAT のウィンドウ期間、HBs 抗原のウィンドウ期間はジェノタイプ A の HBV に感染した場合³⁾ ⁴⁾ に比べて、ジェノタイプ C の HBV に感染した場合の方が短い (ジェノタイプ C の HBV の方が増殖速度が速い) ことがわかる。なお、接種したウイルス量が多ければ多いだけ、ウィンドウ期間が短くなることは、以前から知られていた通りである。

また、表-2 から、接種したウイルス量にかかわらず、ジェノタイプ C の HBV を接種したチンパンジーでは、ジェノタイプ A の HBV を接種したチンパンジーに比べて、doubling time、log time 共に短く、特に log time でみると、ジェノタイプ C の HBV に感染したチンパンジーでは最大限9日短いことが明らかとなった。

D. 結論と考察

今回のチンパンジーを用いた一連の感染実験により、「HBV 感染初期」の末梢血中における HBV DNA の増殖速度は感染した HBV のジェノタイプによって異なり、わが国に多くみられるジェノタイプ C の HBV は、欧米に多くみられるジェノタイプ A の HBV に比べて (NAT、HBs 抗原の) ウィンドウ期間が短く、また末梢血中における HBV DNA の doubling time、log time も短いことが初めて実証された。

今後、HBV の感染予防対策を講じる際や、血液製剤、血漿分画製剤の安全対策を講じる際には、このことを念頭に置いて対処することが必要であると考えられる。

表 1. HBV 感染初期の末梢血中における HBV DNA の動態
— NAT のウィンドウ期と HBs 抗原のウィンドウ期間 —

	接種 HBV DNA 量	NAT の ウィンドウ期間*1	HBs 抗原の ウィンドウ期間*2
genotype A			
Chimp No. 246 (13y ♂ 60.7kg)	6.9×10 ⁴ コピー 静注	17 日	35 日
Chimp No. 279 (8y ♂ 51.4kg)	10 コピー 相当 静注	8 日	10 日
Chimp No. 280 (8y ♂ 39.4kg)	10 コピー 相当 静注	11 日	14 日
genotype C			
Chimp No. 272 (9y ♂ 58.7kg)	2.7×10 ⁶ コピー 静注	10 日	22 日
Chimp No. 269 (11y ♂ 63.3kg)	10 コピー 相当 静注	5 日	7 日
Chimp No. 285 (7y ♂ 38.0kg)	10 コピー 相当 静注	7 日	9 日

*1) HBV DNA 量が 10² コピー/ml 以上に達するまでの期間

*2) AxSYM[®] により HBs 抗原が検出できるまでの期間

表2. HBV感染初期の末梢血中におけるHBV DNAの動態
— Doubling time と Log time —

	接種HBV DNA量	Doubling time	Log time
genotype A			
Chimp No. 246 (13y ♂ 60.7kg)	6.9×10 ⁴ コピー 静注	65 h = 2.7 日	9.0 日
Chimp No. 279 (8y ♂ 51.4kg)	10 コピー オーダー 静注	73 h = 3.1 日	10.1 日
Chimp No. 280 (8y ♂ 39.4kg)	10 コピー オーダー 静注	108 h = 4.4 日	14.7 日
genotype C			
Chimp No. 272 (9y ♂ 58.7kg)	2.7×10 ⁸ コピー 静注	40 h = 1.7 日	5.6 日
Chimp No. 269 (11y ♂ 63.3kg)	10 コピー オーダー 静注	43 h = 1.8 日	6.0 日
Chimp No. 285 (7y ♂ 38.0kg)	10 コピー オーダー 静注	60 h = 2.5 日	8.3 日

E. 健康危険情報

特記すべきことなし

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

G. 文献

1. 吉澤浩司 他,
チンパンジーを用いたHBV (ジェノタイプC)
の感染実験 — 感染成立に必要な際には最少
HBV 量の決定 —,
「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17年度報告書
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.
Intervirology.47 : 57-64, 2004
3. Tanaka J, Katayama. K, Kumagai. J, Komiya.
Y, Yugi. H, Kishimoto. S, Mizui. M,
Tomoguri. T, Miyakawa. Y, Yoshizawa. H:
Early Dynamics of Hepatitis C Virus in the
Circulation of Chimpanzees with
Experimental Infection .
Intervirology.48 : 120-123, 2005
4. 吉澤浩司 他,
感染成立に必要な最少 HBV 量 (コピー/ml)

の決定,

「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年度報告書,
pp93-96.

厚生科学研究費補助金（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班
分担研究報告書

ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いた肝炎ウイルス（HBV、HCV）の感染実験
— チンパンジーの代替実験動物としての有用性の検証 —

分担研究者 吉澤 浩司¹⁾、田中 純子¹⁾、柚木 久雄²⁾
研究協力者 片山 恵子¹⁾、小宮 裕¹⁾、
松倉 晴道³⁾、水井 正明⁴⁾、島田 卓⁵⁾

- 1) 広島大学大学院 疫学・疾病制御学
- 2) 日赤中央血液研究所 核酸増幅検査部
- 3) 大阪府赤十字血液センター
- 4) 広島県赤十字血液センター
- 5) (株) フェニックス・バイオ

研究要旨

ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いて、ジェノタイプAのHBVを接種材料とした感染実験を行ない、以下の事項を明らかにした。1) 感染成立に必要な最少HBV量は、HBV DNA量に換算して10コピー相当（絶対量）であり、この小動物のHBV感染に対する感受性はチンパンジーのそれと等価であること。2) この小動物にHBVを感染させた場合には、少なくとも接種後6週目には感染成立の有無を確実に判定することができること。以上の基礎的実験結果から、この小動物はチンパンジーの代替実験動物として、HBVの感染実験に供することができることが明らかとなった。また、この小動物はHCV RNA量に換算して10コピー相当（絶対量）のHCVを接種することにより感染が成立することも予備的実験により明らかとなっている。

A. 研究目的

肝炎ウイルスの感染論的な視点に立った実験研究のために、これまでは専らチンパンジーが用いられてきた。しかし、わが国では、様々な制約から、チンパンジーを用いた感染実験を今後もこれまで通りに継続することの保証は得られなくなりつつある。しかし、一方では、血液製剤、血漿分画製剤の安全性確保のために、また、肝炎

ウイルスの除去、不活化の条件設定及びその効果の検証を行なうために、肝炎ウイルスの感染実験系を確保しておくことの重要度は益々高まってきていると言える。

本研究は、チンパンジーの代替実験動物としてヒト肝細胞置換キメラマウスが、肝炎ウイルスの感染実験のために有用であるか否かを検証することを目的として実施した。

B. 対象と方法

(1) 感染材料

「HBV 感染早期」の血清 (HBV のジェノタイプ A、HBV DNA 量 2.6×10^6 コピー/ml、HBc 抗体陰性、HBV 感染早期のヒト FFP 接種後 8 週目のチンパンジーの血清) ^{1) 2)} を用いた。

血清採取後の取り扱い、保存方法は文献 3) に記載した通りである。

(2) 実験に供したヒト肝細胞置換キメラマウス

体重 13.0g~16.7g、ヒト肝細胞高置換率 (69%~86%) のマウス 6 匹を選別して用いた (表 2 として後出)。

(3) 接種材料の準備

上記の感染材料をヒト肝細胞未置換の同種マウスのプール血清にて 10^N 倍に段階稀釈、各稀釈列を各 3 本に分注後、液

体窒素により瞬間凍結し、そのまま -80°C のディープフリーザー中に保存した。使用時の 37°C 温浴による融解は 1 回限りとし、残余の血清は以後の感染実験に用いないこととした。3 本中の 1 本は接種用に、1 本は HBV DNA 定量用に用い、1 本は予備として保存した。

(4) 段階稀釈サンプル中の HBV DNA の定量

HBV DNA の定量は Taq Man PCR に抛った。

各段階稀釈サンプル中の HBV DNA 量の定量結果は、表-1 に示した通りであり、 10^4 倍稀釈まで正しく稀釈されていることをもとに、 10^5 倍稀釈サンプル中の HBV DNA 量は 10^1 コピー/ml であるものとして感染実験を行なった。

表 1. 同種マウス血清による 10^N 倍段階稀釈と各サンプル中の HBV DNA 量

接種材料：チンパンジー血清 (1st passage)、HBV 感染早期；HBc 抗体陰性、HBV genotype A

稀釈倍率 コピー/ml	接種材料	$\times 10^1$ 倍	$\times 10^2$ 倍	$\times 10^3$ 倍	$\times 10^4$ 倍	$\times 10^5$ 倍
	(原血清) コピー/ml	コピー/ml	コピー/ml	コピー/ml	コピー/ml	(10^1 コピー/ml 相当)
		HBV DNA (実測値)				
接種材料	2.6×10^6	1.2×10^5	1.3×10^4	1.2×10^3	1.2×10^2	<100

稀釈：ヒト肝細胞未移植同種マウスの pool 血清による。
HBV DNA の定量：Taq Man PCR による。

(5) 感染成立に必要な最少 HBV 量を決定するための実験

3 匹のマウスには 10^5 倍稀釈サンプルをそれぞれ 100ul (絶対量として 1 コピー相当)、他の 3 匹には 10^4 倍稀釈サンプルをそれぞれ 100ul (絶対量として 10 コ

ピー相当) を経尾静脈的に接種して経過を観察した (表-2)。

C. 結果

10^1 コピー相当の HBV を接種したマウスでは 3 匹中 1 匹に感染が成立した。

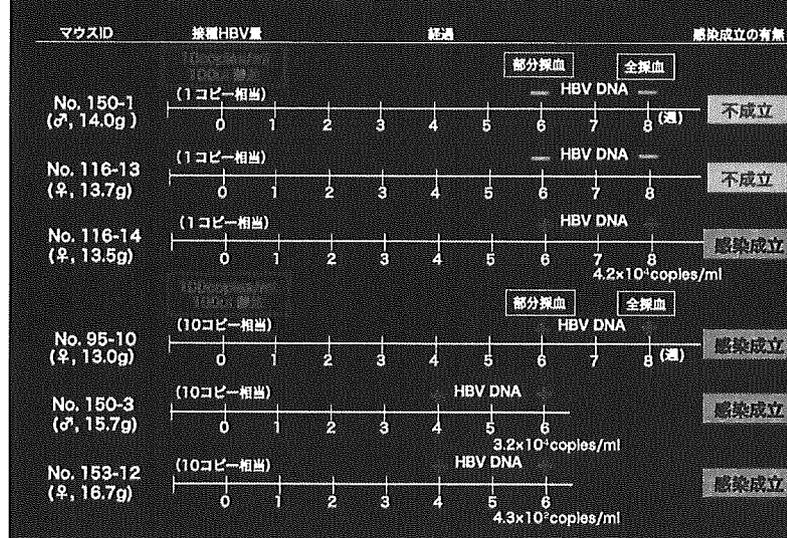
一方、10コピー相当のHBVを接種したマウスでは3匹中3匹に感染が成立した

(表-3)。

表2. 実験に用いたキメラマウスとそれぞれに接種したHBV量

マウスIDNo.	体重	性	ヒト肝細胞置換率	接種量	〔HBV DNA量：絶対量に換算〕
No. 150-1	14.0g	♂	(80%)	10コピー/ml×100ul 静注	(1コピー相当)
No. 116-13	13.7g	♀	(78%)	10コピー/ml×100ul 静注	(1コピー相当)
No. 116-14	13.5g	♀	(86%)	10コピー/ml×100ul 静注	(1コピー相当)
No. 95-10	13.0g	♀	(69%)	100コピー/ml×100ul 静注	(10コピー相当)
No. 150-3	15.7g	♂	(72%)	100コピー/ml×100ul 静注	(10コピー相当)
No. 153-12	16.7g	♀	(73%)	100コピー/ml×100ul 静注	(10コピー相当)

表3. HBVを接種したキメラマウスの経過



D. 結論と考察

ヒト肝細胞置換キメラマウスのHBV感染に対する感受性はチンパンジーと等価(10コピー相当)であり、チンパンジーの代替実験動物として利用することが可能であることが明らかとなった。

なお、予備的実験により、この小動物はHCV感染に対する感受性もチンパンジーと

等価であるとの成績が得られつつあることを付記しておく。

この小動物をチンパンジーの代替感染実験動物として利用することにより、感染論に基づいた肝炎ウイルスの研究を飛躍的に進展させることが期待できる。

E. 健康危険情報

特記すべきことなし

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

G. 文献

1. 吉澤浩司 他,
感染成立に必要な最少HBV量 (コピー/ml)
の決定,
「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年度報告書,
pp93-96.
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.
Intervirology.47 : 57-64, 2004
3. 吉澤浩司 他,
チンパンジーを用いたHBV (ジェノタイプ
C) の感染実験 —感染成立に必要な際には
最少HBV量の決定—,
「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17年度報告書

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた肝炎ウイルスの感染実験

分担研究者 茶山一彰 広島大学医歯薬学総合研究科

研究要旨：肝炎ウイルスに感染する小動物モデルの作製は、生体内における肝炎ウイルス増殖メカニズムの解明・新薬の開発に必須である。本研究において、マウス肝臓が高度にヒト肝細胞に置換された、ヒト肝細胞キメラマウスに野生型や変異株型のB型およびC型肝炎ウイルスを投与し、持続感染させることに成功した。このモデルマウスは抗ウイルス剤の効果判定に有用であり、さらにはウイルス蛋白の機能解析にも有用であった。本モデルマウスは、新規抗ウイルス剤の効果判定のスクリーニングや肝炎ウイルスの分子生物学的検討などの *in vivo* 研究に広く応用が可能であると思われる。

A. 研究目的

肝炎ウイルスに感染する小動物モデルは確立されておらず、生体内における感染・複製のメカニズムの解明は困難である。本研究は、マウス肝臓が高度にヒト肝細胞に置換されたヒト肝細胞キメラマウスを用いて肝炎ウイルス感染マウスを作製し、肝炎ウイルスの基礎的研究に有効利用することを目的とする。

B. 研究方法

Alb プロモーター下に uPA を高発現し、生後、肝細胞がアポトーシスを起こす Alb-uPA Tg マウスと重症免疫不全である SCID マウスを交配させた uPA-SCID マウスにヒト肝細胞を経脾的に投与し、マウス肝臓が高度にヒト肝細胞に置換された、ヒト肝細胞キメラマウス（キメラマウス）を用いる。キメラマウスへ B 型（HBV）および C 型肝炎ウイルス（HCV）陽性患者血清や HBV を産出する細胞培養上清を経静脈的に投与する。投与後、定期的にマウス血液を採取し、血中 HBV-DNA および HCV-RNA を測定し、感染確認後、抗ウイルス剤と投与する。

なお、血清を用いる患者には、あらかじめ本研究目的を説明し、同意を得た。また、マウスの処置の際は、ジエチルエーテルを用いた麻酔下に行い、マウスの苦痛はごく軽度にとどまるものと思われる。

C. 結果

- HBV 陽性血清の投与の投与により、 10^7 ~ 10^9 コピー/mL のウイルス血症が長期にわたり持続した。肝免疫組織学的検討において、ヒトアルブミン陽性のヒト肝細胞は、HBc-Ag 陽性であり、置換されたヒト肝細胞に特異的に HBV が感染していることが確認された。この HBV 感染マウスに 30 mg/kg/日のラミブジンを経口投与すると、血中 HBV-DNA は著明に低下した。
- 1.4 倍長の HBV ゲノムを組み込んだ plasmid を作製し、HepG2 細胞に stable transfection し、上清中に約 10^6 コピー/mL の HBV を恒常的に産出

する細胞を作製した。野生型の YMDD 株と同時に、ラミブジン耐性である YVDD 株を産出する細胞も作製した。これらの細胞の培養上清をキメラマウスへ投与することにより、HBV 感染が確認された。これらの感染マウスに 30 mg/kg/day のラミブジンを経口投与したところ、YMDD 株感染マウスでは血中 HBV-DNA は低下したが、YVDD 株感染マウスでは低下しなかった。

- 培養上清の投与による HBV 感染マウスの血清を naïve なキメラマウスに投与したところ、血中に HBV-DNA が検出され、Passage も可能であることが確認された。また、高容量の培養上清や濃縮による高濃度の HBV を投与することにより、マウスへの感染性が向上した。
- 変異株を用いて HBV 蛋白の機能の解析を行った。e 抗原の機能解析のため、e 抗原を欠失させたコンストラクトを作製し、その培養上清をキメラマウスに投与したところ、HBV 感染が成立した。このことより、e 抗原は HBV の感染・複製には必須ではないことが示された。
- HCV 陽性患者血清の投与により、 10^6 ~ 10^7 copy/mL のウイルス血症が長期にわたり持続した。肝免疫組織学的検討ではヒトアルブミン陽性細胞はコア蛋白陽性であり、置換されたヒト肝細胞に特異的に HCV が感染していることが確認された。この HCV 感染マウスへ 7000 単位/kg/day の IFN- α を連日筋注したところ、血中 HCV-RNA 量は感度以下に低下した。また IFN- α の投与中止により、HCV-RNA は再陽性化した。

D. 考察

キメラマウスを用いて有効な肝炎ウイルス感染モデルマウスが作製された。作製したモデルは、既知の抗ウイルス剤の効果判定に有用あり、今後、新規候補となる抗ウイルス剤の生体内における効果判定としても有用であると思われる。

E. 結論

リバーシジェネティクス法により種々の変異ウイルスを血中に有するマウスの作製が可能であり、

生体内における肝炎ウイルスの分子生物学的な検討に、広く応用が可能であると思われる。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
 1. Noguchi C, Ishino H, Tsuge M, Fujimoto Y, Imamura M, Takahashi S, Chayama K. G to A hypermutation of hepatitis B virus. *Hepatology*. 2005 Mar;41(3):626-33.
 2. Tsuge M, Takaishi H, Hiraga N, Noguchi C, Oga H, Imamura M, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Ochi H, Chayama K, Tateno C, Yoshizato K. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus. *Hepatology* 2005;42:1046-54.
 3. Takahashi S, Chayama K. Integration of hepatitis B virus DNA and hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 2005 Aug;20(8):1141-2.
 4. Tanaka E, Matsumoto A, Suzuki F, Kobayashi M, Mizokami M, Tanaka Y, Okanoue T, Minami M, Chayama K, Imamura M, Yatsushashi H, Nagaoka S, Yotsuyanagi H, Kawata S, Kimura T, Maki N, Iino S, Kiyosawa K: HBV Core-Related Antigen Study Group. Measurement of hepatitis B virus core-related antigen is valuable for identifying patients who are at low risk of lamivudine resistance. *Liver Int*. 2006 Feb;26(1):90-6.
 5. Yamaguchi A, Tazuma S, Nishioka T, Ohishi W, Hyogo H, Nomura S, Chayama K. Hepatitis C virus core protein modulates fatty acid metabolism and thereby causes lipid accumulation in the liver. *Dig Dis Sci*. 2005 Jul;50(7):1361-71.
 6. Kanno K, Tazuma S, Nishioka T, Hyogo H, Chayama K. Angiotensin II participates in hepatic inflammation and fibrosis through MCP-1 expression. *Dig Dis Sci*. 2005 May;50(5):942-8.
 7. Imamura M, Ogawa T, Sasaguri Y, Chayama K, Ueno H. Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats. *Gastroenterology*. 2005;128(1):138-46.
2. 学会発表
 - ・平賀信彦, 他. ヒト肝細胞キメラマウスを用いたC型肝炎ウイルス感染マウスモデル作製に寄与する因子の検討. 第41回日本肝臓学会総会. 平成17年6月6日、大阪。
 - ・今村道雄, 他. ヒト肝細胞キメラマウスを用いたリバースジェネティクスによるHBV感染モデルマウスの作製. 第36回日本肝臓学会大会. 平成17年10月6日、神戸。

・Takahashi S, et al. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus. 第56回AASLD. 平成17年11月16日、サンフランシスコ。

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし

厚生科学研究費補助金（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班
班長研究協力報告書

HCV感染における宿主初期免疫応答、免疫担当細胞活性化の解析

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をもとに臨床、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。

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、次のような免疫学の基本的思想の変遷を考慮に入れる事が重要だと考えている。「我々の免疫機構は何を監視するために出来ているか」という問に対する答えが、20世紀は「免疫は生体防御反応である」、または「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連れ「Stranger and Danger 仮説」という考え方が登場してきた。つまり、ウイルス性肝炎の際の宿主応答を理解するのに、従来のリンパ球中心の宿主反応系に基づく理解から、21世紀型の新しい考え方にに基づき見直す必要がある。そのような感染論の大前提として個体レベルで、「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？」という観察が最も重要である。そのような感染初期の宿主免疫応答系の理解があつて初めて、慢性肝炎状態の免疫系の解析が成り立つ。

本研究課題では、チンパンジーを用い、感染初期の免疫担当細胞の動態を観察・解析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。また、感染コースの選択（自然治癒コースと持続感染コース）、樹状細胞群のHCVゲノムの取り込み・活性化、その後のNK細胞の活性化、の間に相関があることが判明した。このように宿主免疫の初期反応と感染コースの相関が意味するところは大きく、今後の詳細な解明が予防・治療に貢献出来ると考える。

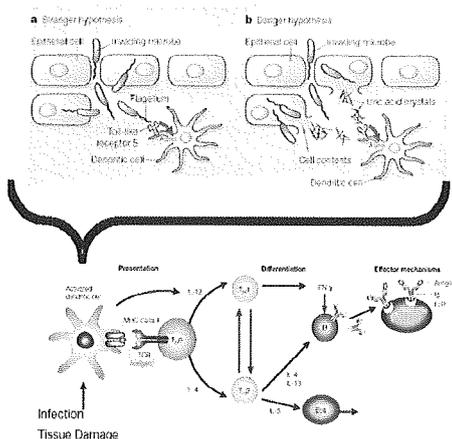
A. 研究目的

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」、「Stranger & 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、獲得免疫系のような「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はない、ということになる。



自然免疫 獲得免疫

(図1) Stranger+ Danger 仮説

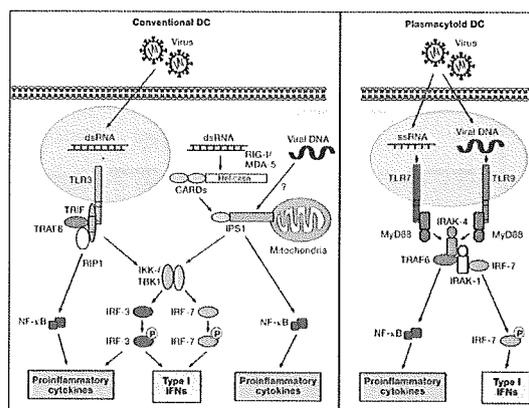
「生体の免疫系が監視しているのは外来の感染と内部の組織破壊である。」という考えかた。抗原提示細胞は組織破壊を受けた自己細胞由来の内在性の「Alarm シグナル」によって活性化されその後の免疫反応を調節する。

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。

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・接点に当たる細胞群であり、さらに、Toll-Like Receptor (TLR)、RIG-Iをはじめとする多くのセンサーを発現していることから、その反応性が注目されている。(図2)



(図2) 2種類の樹状細胞によるRNAウイルスの検出の方法。従来のmyeloid DC(個々ではconventional DC)と plasmacytoid DCにおける検出方法の違いを示している。特にmDCではRIG-Iが、pDCではTLRが重要である。

このような、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 (Gold Standard) である。小型原猿類のツバイを用いる実験系も存在するが、宿主側の免疫応答を解析するモデルとしては不明である。

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. バイアスをかみせずに、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 8.4×10^6 コピーのHCV を接種する実験系を用い、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、等を測定する(吉澤)。

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(CD11c+)の活性化マーカー(CD86+またはHLA-DR+)、T細胞(CD3+)、NK細胞(CD56+)、B細胞活性化(CD19+)は、それぞれのLineage マーカー+活性化マーカー(CD69+など)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

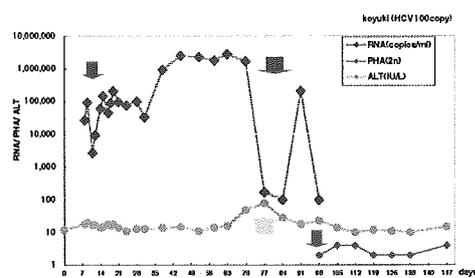
(倫理面への配慮)

チンパンジーを用いた実験は、広島大学倫理委員会にて審査され、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、自然治癒コースを辿ったチンパンジー、および 8.4×10^6 copy 接種し、持続感染コースを辿ったチンパンジー、の2種類の感染実験を得ることが出来た。一例として、自然治癒コースの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/AST値、の測定結果は下記の様であった(図3)。



(図3) 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: 樹状細胞の活性化およびその推移

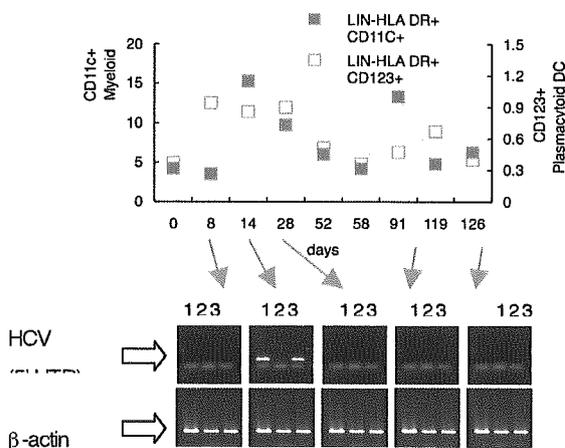
チンパンジーから採血し、そのパフイーコートから細胞を回収し、樹状細胞の活性化した細胞の割合などの変動をFlow Cytometryを用いてその経過を測定した。樹状細胞はmyeloid DC (mDC)とplasmacytoid DC (pDC)の大きく2種類のサブセットに分類される事が知られている。そこでそれぞれのサブセットのDCの活性化の割合を、自然治癒コース、持続感染コースのチンパンジーの末梢血サンプルを用いて検討したところ図4、図5の様になった。つまり、自然治癒コースでは、初期(1週間以内)にまずpDCの活性化が起き、mDCの活性化は、それから約1週間遅れることが分かった。一方、持続感染コースでは、pDCの活性化が28日目、mDCの活性化が38日目ごろに観測された。自然治癒コースのような感染初期のDC細胞群の活性化は観察されなかった。

樹状細胞(DC)は抗原提示細胞でもある

ので、ウイルスを取り込んで、リンパ球へ提示している事が予想される。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を起こしているのでしょうか？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4、図5）。これら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。

さらに驚いたことは、持続感染コースで同様の実験を行ったところ、どの時期においても、pDC、mDC、両方の樹状細胞とも HCV ゲノムが検出されなかった。（図5）

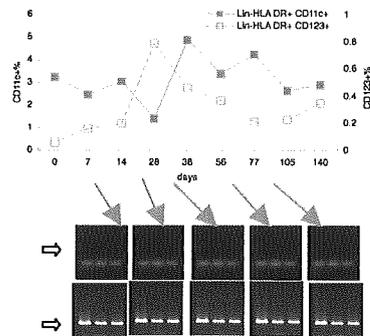


（図4） 100copy 接種し、自然治癒コースを取った場合。 Plasmacytoid DC だけが HCV を取り込んでいる。しかもそれは感染初期の pDC だけであり、その後のどの時期の pDC、mDC ではウイルスゲノムの取り込みを

介さずに樹状細胞の活性化が起きている。

- 1: All DC
- 2: mDC: Lin-, CD11c+
- 3: pDC: Lin-, CD123+

活性化マーカーとして HLA-DR+ を用いている



（図5） 8.4×10^6 copy 接種し、持続感染コースを取った場合、HCV ゲノムが樹状細胞に取り込まれていない

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。自然治癒コースと持続感染コースを比較した場合に、最も大きな差は、NK 細胞の活性化が、持続感染コースではほとんど観測されないことであった。

D. 考察

今年度までの、チンパンジーを用いた HCV 研究で、明らかとなった自然治癒コース（100copy 接種）と持続感染コース 8.4×10^6 copy 接種）での、宿主初期免疫応答の大きな違いは

- （1）自然治癒コースでのみ plasmacytoid DC

(pDC)がウイルスゲノムを取り込み、感染後1週間で活性化していた。Myeloid DC (mDC)の活性化は2週間目で観察できたが、HCVの取り込みは見られなかった。

(2) 持続感染コースでは、pDC, mDC共に、初期活性化は検出できず、4-5週間後の活性化が観察できた(しかし、HCVの取り込み無し)。

(3) NK細胞の顕著な活性化が自然治癒コースでのみ検出できた。NK細胞の活性化の有無と感染コースの選択(自然治癒、持続感染)の関係は十分予想できるが、正確な因果関係は不明。

(4) pDCのHCV取り込み、DCの初期活性化、NK細胞の活性化、この3つのパラメーターの因果関係は不明であるが、相関していることは明らかである。

(5) なぜ大量摂取(8.4×10^6 copy)した場合に、DCがHCVを取り込むことが出来ないのか? これらが、自然治癒コースを取ることが出来ない要因であると考えられる。

自然治癒コースで、感染初期にHCVゲノムを取り込んでいる事が判明した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。同様に感染後期(day91)で、もう一度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「Dangerシグナル」などによる2次的なものと考えられ、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。

HCV持続感染(慢性肝炎)から肝硬変(および肝臓ガン)への推移に関しては、NK細胞の活性化

が大きな役割をしている可能性が論じられている。今回の研究から、そのNK細胞活性と感染初期の樹状細胞の活性化(HCVの取り込み)の有無、との間に相関があることが示唆された。

最近、DCとNKの相互作用(Cross-Talk)が、抗ウイルス免疫に対する監視機構として非常に重要であるという報告が出されている(Nature Immunol 2005, J.Exp.Med. 2005 など)。そのような観点から今回の解析結果を考えると、やはりDC-NKの相互作用(リンク)が感染コースを規定している可能性が考えられる。

また、最近新しい樹状細胞のサブセットとしてIKDCが発見された(Nature Medicine 2006)。これはNK細胞のような細胞障害活性(キラー活性)を持つ樹状細胞で、なおかつ抗原提示能力をも兼ね備えているサブセットである。このような新展開を考えると、我々が自然治癒コースでのみ検出していたNK活性が典型的なNK細胞由来か、IKDCを含んで検出していたのかは、不明である。いずれにしても、DC-NKのクロストークが重要である可能性が高いことに間違いはなさそうである。

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、「Stranger and Danger」に基づいた考え方、自然免疫系(樹状細胞やNK細胞)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、最も代表的な従来型樹状細胞群(Myeloid DC)はHCVを取り込んで活性化しているわけではなく、2次的な反応である可能性が高い。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。さらに、大

量にウイルスを接種した場合の持続感染コースでは樹状細胞の活性化が大幅に遅れ、しかもウイルスを取り込んで活性化する初期反応タイプではないこと（つまり2次的な活性化）が判明した。このような感染初期における樹状細胞群のウイルスを取り込んでの活性化、それに続くNK細胞の活性化、感染コースの選択（自然治癒・持続感染コース）が、密接に関係していることが分かった。

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

Yasuda T, Kanno M, Kawamoto M, Yuge O, Ninomiya Y. Suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expression by 22(R)-hydroxycholesterol requires de novo protein synthesis in activated macrophages. **J Steroid Biochem Mol Biol.** 97:376-83.2005

47. Nitta T, Nasreen M, Seike T, Goji A, Ohgashi I, Miyazaki T, Ohta T, Kanno M, and Takahama Y. IAN family critically regulates survival and development of T Lymphocytes **PLoS Biology** in press ,2006

2. 学会発表 など

M.Kanno Epigenetic Regulation on Immune System **POLYCOMB GROUP GENE CONTROLS NOTCH SIGNALING IN EARLY T PROGENITOR**

EXPANSION; CSHL meeting; SYSTEM BIOLOGY Global Regulation of Gene Expression Cold Spring Harbor, NY, 2005

M.Miyazaki and M.Kanno. Stability of Polycomb protein complexes influences intrathymic T cell development during DN to DP transition. 4th International Workshop of Kyoto T cell Conference Shiran-Kaikan Kyoto Japan 2005

・菅野雅元、宮崎正輝、河本 宏、加藤裕子、糸井まなみ、雨貝 孝、宮崎和子、菅野理恵子 第78回日本生化学会 ワークショップ 免疫とその疾患神戸国際会議場 2005年10月19日-22日

・菅野雅元 教育講演 「血球系細胞とエピジェネティクス」 第45回 日本血液学会 中四国地方会 広島 2006年3月4日

・Masaki Miyazaki,^{*} Hiroshi Kawamoto,[†] Yuko Kato,^{*} Manami Itoi,[§] Kazuko Miyazaki,[¶] Kyoko Masuda,^{||} Satoshi Tashiro,[†] Hiroto Ishihara,^{*} Kazuhiko Igarashi,[†] Takashi Amagai,[§] Rieko Kanno,^{*} and Masamoto Kanno^{*} Epigenetic Regulation in the Immune System: Polycomb group gene *mel-18* regulates early T progenitor expansion by maintaining the expression of *Hes-1*, a target of Notch pathway 転写研究会 JBS ホテルヴィラ 草津 2005年1月11-13日

・菅野雅元、梶梅輝之、田上英明、井倉 毅、菅野理恵子、中谷喜洋 複数のポリコム蛋白質複合体 PRC1s の精製および複合体による細胞増殖機構 第64回 日本癌学会 ロイトン札幌 札幌 2005年9月14日-16日

・宮崎正輝、加藤裕子、菅野理恵子、菅野雅元 Stability of Polycomb group protein influences intrathymic T cell development during DN to DP transition 第28回 日本分子生物学会 福岡

Yahoo Japan ドーム・福岡 2005年 12月7日
-10日

・黒木利知、宮崎正輝、加藤裕子、菅野理恵子、
菅野雅元 T細胞分化におけるポリコム複合
体(PRC1)遺伝子の発現料の検討第28回 日本
分子生物学会 福岡 Yahoo Japan ドーム・福岡
2005年 12月7日-10日

・二宮雄一、安田季道、菅野雅元 LPS活性化
マクロファージのプロスタグランジン E2 産生に
対するLXRリガンドの効果の検討 第28回
日本分子生物学会 福岡 Yahoo Japan ドーム・福
岡 2005年 12月7日-10日

・宮崎和子、宮崎正輝、菅野雅元、小田秀明、Ighor
R. Lemischka、本田浩章 Zinc finger domain protein
Hemp 遺伝子欠損マウスの解析 第28回 日本
分子生物学会 福岡 Yahoo Japan ドーム・福岡
2005年 12月7日-10日

・菅野雅元、宮崎正輝、河本 宏、加藤裕子、糸
井まなみ、雨貝 孝、宮崎和子、菅野理恵子 第
78回日本生化学会 神戸国際会議場 2005年
10月19日-22日

・菅野雅元、劉 蘭々、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 第55回日本アレルギー
学会 盛岡市民文化ホール 2005年10月20日
-22日

・菅野雅元、井上洋子、岡村さおり、山下敬介、
菅野理恵子 Autophagic cell death in thymus by
aryl-hydrocarbon receptor (AhR) and Dioxin (TCDD)
on beta-selection and DN/DP transition 第35回日本
免疫学会 パシフィコ横浜 2005年12月13
日-15日

・井上洋子、片山恵子、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3 第35回日本免疫学
会 パシフィコ横浜 2005年12月13日-15
日

・宮崎正輝、加藤裕子、黒木利知、菅野理恵子、
菅野雅元 Stability of Polycomb group protein
influences intrathymic T cell development during DN to

DP transition 第35回日本免疫学会 パシフ
ィコ横浜 2005年12月13日-15日

・加藤裕子、宮崎正輝、菅野理恵子、菅野雅元 胸
腺内T細胞分化におけるポリコム遺伝子群によ
るエピジェネティック制御機構 第35回日本免
疫学会 パシフィコ横浜 2005年12月13日-
15日

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)

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2年目)

平成17年度 研究成果

主任研究者 吉澤 浩司

平成18(2006)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17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	日赤中央血液研究所 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	虎の門病院 消化器科	部長
西口 修平	兵庫医科大学 消化器科	教授
金子 周一	金沢大学大学院 がん制御学	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	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	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 消化器内科	助教授
頼岡 徳在	広島大学大学院 腎臓病制御学	教授
山崎 一美	奈良尾病院	院長
高橋 和明	東芝病院臨床研究部	研究員
大野 尚文	おおの消化器内科	院長
高島 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】

以下は【別冊】平成17年度 総括研究報告書・分担研究報告書 に集録

I. 総括研究報告

II. 分担研究報告