

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録

- なし。
3. その他  
なし。

図1. コア蛋白におけるE6AP結合領域のalignment

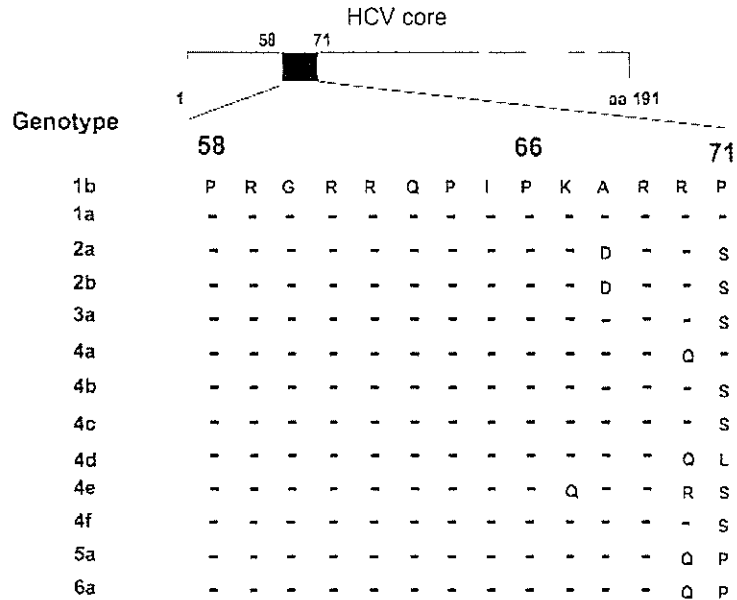
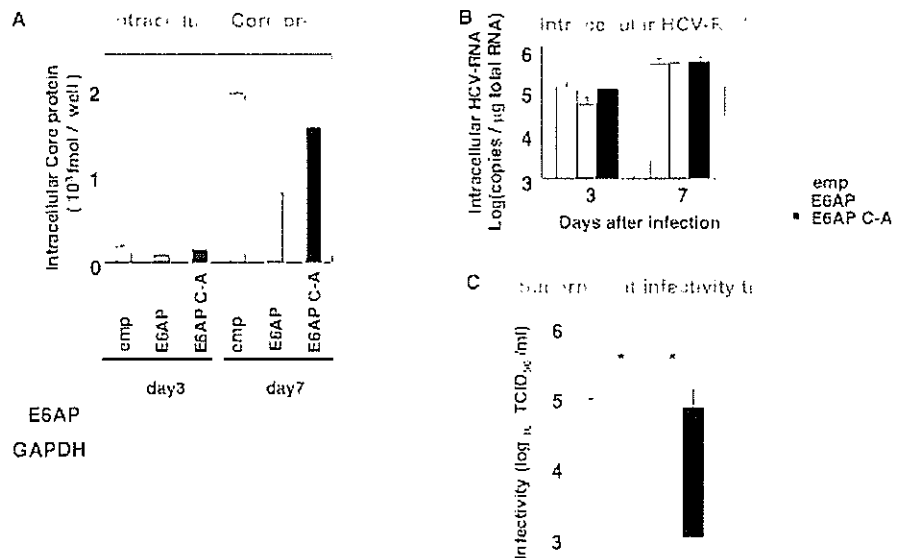


図2. E6APの強制発現によりHCV産生は低下する



Naive Huh-7 cells were seeded 24 hr before infection at a density of  $1 \times 10^6$  in 10-cm plate. Cells were infected with 2 units of the inoculum including infectious HCV JFH1 ( $3.5 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub> / ml) and transfected with 8  $\mu$ g of empty vector (pCAG-1), E6AP, or pCAG-1A-E6AP C-A. The culture supernatant and the cells were collected at day 3 and 7 postinfection. (A) Intracellular HCV core protein levels. (B) Levels of intracellular HCV RNA in HCV-infected Huh-7 cells. (C) Supernatant infectivity levels. At day 7 postinfection, culture supernatants were collected and assayed for TCID<sub>50</sub> determination. The difference between empty vector and E6AP or between E6AP and E6AP C-A was significant ( $* P < 0.05$ ).

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  
（主任又は分担）研究者 林 紀夫 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学教授

### 研究の要旨

樹状細胞（DC）にはウイルス感知系である Toll 様受容体（TLR）、RIG-I、MDA-5 が発現しており、I 型 IFN や炎症性サイトカインなどの発現を介して先天免疫、獲得免疫の効率的な活性化に参与する。今年度は C 型肝炎患者における DC サブセットの TLR/RIG-I/MDA-5 の発現と機能及び病態における意義を解析した。C 型肝炎患者のミエロイド DC（MDC）では、非感染者と比較して TLR2、TLR4、RIG-I の発現は増加しているが、TLR3、MDA-5 の発現には差を認めなかった。C 型肝炎患者 MDC では、各 TLR や RIG-I に対するアゴニストによる IFN- $\beta$  や TNF- $\alpha$  などの産生は、非感染者に比べ低下していた。C 型肝炎患者 MDC における TLR/RIG-I の機能の低下は、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

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）とプラズマサイトイド 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 Toll 様受容体（TLR）や RIG-I、MDA-5 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 感染においてもこれらのウイルス感知系が免疫病態に参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 サブセットにおける TLR/RIG-I/MDA-5 の発現と機能を解析し、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

C 型肝炎患者および非感染者の末梢血より MDC と PDC を分離し、TLR/RIG-I/MDA-5 の発現を Real-time PCR 法を用いて検討した。また MDC に各種サイトカイン、HCV 蛋白などを添加して TLR の発現変化を検討した。各 TLR に特異的なアゴニストを用いて MDC を刺激し、DC のサイトカイン産生を検討した。

（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

MDC における TLR2、TLR4、RIG-I の発現は C 型肝炎患者で亢進していたが、TLR3、MDA-5 の発現は非感染者と同程度であった。PDC においては TLR7、TLR8、TLR9 の発現は C 型肝炎患者と非

感染者と同等であった。I 型 IFN、PolyI:C により TLR2、TLR3、TLR4 の発現が誘導されたが、TNF- $\alpha$ 、IL-6、HCV 蛋白などでは発現は変化しなかった。TLR の各アゴニスト刺激により MDC の IFN- $\beta$ 、TNF- $\alpha$  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。また RIG-I のアゴニスト活性を持つ PolyI:C 刺激によっても、MDC の IFN- $\beta$ 、TNF- $\alpha$  の発現は、C 型肝炎患者において非感染者より低値であった。

### D. 考察

C 型肝炎患者 MDC における TLR 発現亢進には、内因性 IFN や HCV 複製中間体が関与している可能性が示唆された。また HCV 感染の感知システムとして RIG-I の可能性が示唆された。C 型肝炎患者 MDC では TLR/RIG-I 下流のシグナル伝達が強く抑制されていることが示された。MDC における TLR/RIG-I の機能低下は、DC が HCV 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。

### E. 結論

C 型肝炎患者 MDC では TLR2、TLR4、RIG-I の発現が亢進しているにも関わらず、これらの刺激によるサイトカイン誘導は低下しており、HCV による TLR/RIG-I 下流でのシグナル伝達阻害因子の存在が示唆された。

### F. 健康危険情報 なし

### G. 研究発表

Inoue, M., et al. Enhanced ability of peripheral invariant natural killer T cells to produce IL-13 in chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2006. 45: 190-196.

Jinushi, M., et al. Natural killer cell and hepatic cell interaction via NKG2A leads to dendritic cell-mediated induction of CD4 CD25 T cells with PD-1-dependent regulatory activities. *Immunology* 2007. 120: 73-82.

### H. 知的財産権の出願・登録状況

特に予定なし

## C型肝炎ウイルスの感染および複製機構の解析

分担研究者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨:C型肝炎ウイルス(HCV)のNS5A蛋白質と相互作用する宿主因子を検索し、免疫抑制剤であるFK506に結合するイムノフィリンに分類されるFK506結合蛋白質8(FKBP8)がNS5Aと特異的に結合することを見いだした。内在性のFKBP8をノックダウンすると、レプリコン細胞のゲノム複製は顕著に抑制され、その抑制はsiRNAに耐性なサイレント変異を導入したFKBP8の発現で回復した。エピトープタグ法を用いてFKBP8と相互作用する細胞内因子を探索し、分子シャペロンであるheat shock protein 90(Hsp90)を同定した。NS5AはFKBP8を介してHsp90をHCVの複製複合体に取り込む役割を演じており、Hsp90の阻害剤であるゲルダナマイシンはHCVの複製を阻害した。

### A. 研究目的

HCVに感染すると肝硬変を経て高率に肝細胞癌を発症する。我が国には2百万人ものHCV感染者が存在すると推定され、既感染者に対する有効な肝癌進展阻止法の開発が急務である。しかしながら、HCVを効率よく複製できる細胞培養系を欠くため、HCVの感染様式や発癌機構は依然として謎に包まれたままである。本研究ではHCVの宿主細胞への侵入および自然免疫の誘導を担うリセプター分子の同定を試みるとともに、ウイルス粒子の成熟過程の解析を解析し、各ステップをターゲットとした新しいC型肝炎治療法の開発の可能性を探ることを目的とする。

### B. 研究方法

ヒト脳及びヒト肝臓のcDNAライブラリーを用いてHCVのCon1株(genotype1b)のNS5Aと相互作用する宿主因子をYeast two hybrid法でスクリーニングし、FKBP8を同定した。HCVレプリコン細胞やJFH1株を用いたHCV細胞培養系でのノックダウン法と定量的RT-PCRによって、FKBP8のHCV複製への影響を解析した。また、FKBP8の変異体を作製し、NS5AおよびHsp90との相互作用を検討した。

TMHMMアルゴリズムを用いて、E1蛋白質の膜貫通様式の構造予測を行った。また、酵母2ハイブリット法および免疫沈降法によって、コア蛋白質とE1細胞質内領域との相互作用は解析した。コア蛋白質疎水性領域の下流のE1蛋白質の細胞外領域のアミノ末端にFlagタグ、E1蛋白質のカルボキシル末端にHAを付加したものをin vitro転写翻訳法によって発現/ラベルし、膜存在下/非存在下でトリプシンによるプロテアーゼプロテクションアッセイを行った。ショ糖密度勾配によ

る沈降速度法によってコア蛋白質オリゴマー形成を解析した。

### (倫理面への配慮)

本研究にあたっては、医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントを必要とする材料は含まれない。

### C. 研究結果

HCVレプリコン細胞やHCV感染細胞からFKBP8をノックダウンすると、顕著に細胞内のウイルスRNAの発現抑制が観察された。エピトープタグ法により、FKBP8はHsp90と複合体を形成することが示された。NS5A蛋白質はHsp90とは直接結合しないが、FKBP8を介して3つの蛋白質が複合体を形成した。さらに、FKBP8の蛋白質との相互作用を担うTetratricopeptide repeat(TPR)領域の異なる部位で、NS5A蛋白質とHsp90がそれぞれ結合することが示された。特に、Hsp90のC末端のMEEVD配列がFKBP8のTPR領域との結合に重要であった。また、Hsp90のATPase阻害剤であるゲルダナマイシンは濃度依存的にHCVの複製を阻害した。

TMHMMアルゴリズムによって、E1蛋白質はコア蛋白質C末端膜貫通領域をシグナル蛋白質として利用して、細胞外へ貫通し、265-287残基の疎水領域を用いてまた細胞内貫通し、361-377残基のC末端の疎水性領域でまた膜を貫通するポリトピックな構造が予測された。したがって、288-360残基が細胞質内領域と推測され、今まで報告されてきたType I型のトポロジーをとるものとの共存が示唆された。糖鎖付加部位を人工的にE1蛋白質に付加して、細胞外領域を予測したとき、ポリトピックな構造と今まで報告されてきたType I型の構造が示唆された。ま

た、膜存在下で E1 蛋白質を発現したとき、細胞外領域と同じ大きさの Flag タグをもつフラグメントがトリプシンによる消化から保護されたことから、E1 蛋白質の細胞質内ループ構造の存在が間接的に裏付けられた。コア蛋白質を 293T 細胞に発現させ、その溶解物をショ糖密度勾配遠心によって解析したとき、0.1mg/ml tRNA と 1mM MgCl<sub>2</sub> が存在したときにオリゴマー形成が認められた。コア蛋白質と E1 蛋白質との結合にはコア蛋白質 72-91 残基の領域が必要で、その領域はオリゴマー形成にも必要であったが、その部位のみを発現させても E1 蛋白質との相互作用が認められなかった。また、E1 蛋白質とコア蛋白質との相互作用には tRNA と MgCl<sub>2</sub> の添加が必要であることから、E1 とコア蛋白質との相互作用にはコア蛋白質のオリゴマー形成が必要であることが示唆された。また、E1 蛋白質の細胞質領域の 312-315 残基の欠損によって、コア蛋白質との相互作用が消失することから、その領域がコア蛋白質との結合に必要であることが示唆された。

#### D. 考察

多くのウイルスの複製に分子シャペロンが関与していることが知られているが、今回我々が見いだした FKBP8 は、Hsp90 を HCV の複製複合体にリクルートするコシャペロンとして機能しているものと思われる。NS5A と FKBP8、あるいは FKBP8 と Hsp90 との結合阻害は、慢性 C 型肝炎の新たな創薬ターゲットと思われる。特に、免疫抑制活性を欠損し、FKBP8 に結合可能な FK506 誘導体は、HCV の複製阻害剤としての可能性を秘めている。

また、オリゴマーを形成したコア蛋白質が E1 蛋白質の細胞質内領域に結合することが示唆された。オリゴマー形成には Stem loop 構造をもつような高次構造をもつ RNA の存在が必要で、ウイルスゲノム RNA がそれに相当すると思われる。E1 蛋白質は二つのトポロジーが共存し、細胞質ループをもつものはコア蛋白質と結合することによって、ウイルス粒子形成をより強固なものにしていると考えられ、type I 構造の E1 蛋白質は E2 蛋白質とのダイマー形成に重要なかもしれない。

#### E. 結論

1. HCV の複製機構の解析:HCV ゲノムはウイルス自身がコードしている酵素群と宿主因子から構成される複合体で複製されると考えられている。HCV の NS5A 蛋白質がコシャペロンとして知られている FKBP8 と特異的に結合し、さらに FKBP8 がシャペロン分子である Hsp90 を複製複合体にリクルートすることが、HCV のゲノム複製に重要であることを明らかにした。
2. HCV の E1 蛋白質のトポロジー解析:HCV のエンベロープ蛋白質 E1 がこれまでに考えられていた 1 回膜貫通の分子だけでなく、小胞体

膜を 2 回貫通して細胞質領域を保持した分子も存在することを明らかにした。さらに、その細胞質領域にコア蛋白質が結合することが、粒子形成に重要である可能性を提示した。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Moriishi K., Mochizuki R., Moriya K., Miyamoto H., Mori Y., Abe T., Murata S., Tanaka K., Miyamura T., Suzuki T., Koike K., and Matsuura Y. Critical role of PA28  $\gamma$  in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *PNAS*, 104, 1661-1666 (2007).
2. Miyamoto H., Moriishi K., Moriya K., Murata S., Tanaka K., Suzuki T., Miyamura T., Koike K., and Matsuura Y. Involvement of PA28  $\gamma$ -dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. *J. Virol.*, 81, 1727-1735 (2007).
3. Shirakura M., Murakami K., Ichimura T., Suzuki R., Shimoji T., Fukuda K., Abe K., Sato S., Fukasawa M., Yamakawa Y., Nishijima M., Moriishi K., Matsuura Y., Wakita T., Suzuki T., Howley P.M., Miyamura T., and Shoji I. The E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.*, 81, 1174-1185 (2007).
4. Nakai K., Okamoto T., Kimura-Someya T., Ishii K., Lim C-K., Tani H., Matsuo E., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Miyamura T., Nunberg J.H., Moriishi K., and Matsuura Y. Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for interaction with cytoplasmic domain of E1 envelope protein. *J. Virol.*, 80, 11265-11273 (2006).
5. Okamoto T., Nishimura Y., Ichimura T., Suzuki K., Miyamura T., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBO J.*, 25, 5015-5025 (2006).
6. Kato H., Takeuchi O., Sato S., Yoneyama M., Yamamoto M., Matsui K., Uematsu S., Jung A., Kawai T., Ishii K. J., Yamaguchi O., Otsu K., Tsujimura T., Koh C.-S., Sousa C. R., Matsuura Y., Fujita T., and Akira S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, 441, 101-105 (2006).

##### 2. 学会発表

1. Toru Okamoto, Yorihiro Nishimura, Tohru Ichimura, Kensuke Suzuki, Tatsuo Miyamura, Tetsuro Suzuki, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, June 18–23, 2006.
  2. Tetsuo Yamashita, Yoshio Mori, Hideaki Unno, Kohji Moriishi, Tomitake Tsukihara and Yoshiharu Matsuura: Crystal Structure of Catalytic Domain of Japanese Encephalitis Virus NS3 Helicase/Nucleoside Trisphosphatase at a Resolution 1.8 Å.同上。
  3. Toru Okamoto, Yorihiro Nishimura, Tohru Ichimura, Kensuke Suzuki, Tatsuo Miyamura, Tetsuro Suzuki, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. 13th International Meeting on HCV and Related Viruses, Cairns, August 27–31, 2006.
  4. Kohji Moriishi, Kyoji Moriya, Hironobu Miyamoto, Tetsuro Suzuki, Tatsuo Miyamura, Kazuhiko Koike, and Yoshiharu Matsuura: Critical role of PA28  $\gamma$  in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. 同上。
  5. Yoshio Mori, Yoshimi Tsuda, Tetsuya Yamashita, Yoshinori Tanaka, Kohji Moriishi and Yoshiharu Matsuura: Biological significance of nuclear localization of Japanese encephalitis virus core protein.同上。
  6. Takayuki Abe, Shyu-hei Tagawa, Yuhki Kaname, Kohji Moriishi, Osamu Takeuchi, Kawai Taro, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, Shizuo Akira, and Yoshiharu Matsuura: Modulation of Toll-like receptor signaling in immune cells by expression of hepatitis C virus non-structural proteins. 同上。
  7. 岡本 徹、西村順裕、市村 徹、鈴木哲朗、宮村達男、森石恒司、松浦善治: C型肝炎ウイルスの複製におけるFKBP8 の役割、第 54 回日本ウイルス学会総会、名古屋、平成 18 年 11 月 19–21 日。
  8. 阿部隆之、田鍬修平、要 祐喜、森石恒司、考藤達哉、林 紀夫、審良静男、松浦善治: C 型肝炎ウイルス蛋白質による免疫細胞における自然免疫シグナルの阻害機構の解析、同上。
  9. 田鍬修平、岡本 徹、阿部隆之、森 嘉生、森石恒司、松浦善治: C型肝炎ウイルスの複製に關与する新規宿主因子の解析、同上。
  10. 森 嘉生、山下哲生、田中佳典、森石恒司、松浦善治: カテプシンLによってコア蛋白質がプロセスされない日本脳炎ウイルスの性状、同上。
  11. 津田祥美、森 嘉生、阿部隆之、山下哲生、岡本 徹、市村 徹、森石恒司、松浦善治: 核小体蛋白質B23は日本脳炎ウイルスのコア蛋白質と結合しウイルス複製に關与する、同上。
  12. 谷 英樹、菰田泰正、山下哲生、松尾栄子、岡本 徹、森石恒司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治: HCVエンベロープ遺伝子を組み込んだ組換えVSV、同上。
  13. 山下哲生、海野英明、森 嘉生、森石恒司、月原富武、吾郷昌信、松浦善治: 日本脳炎ウイルスのRNAヘリケースドメインのX線結晶構造解析、同上。
  14. 森石恒司、森屋恭爾、宮本大伸、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、松浦善治: HCVコア蛋白質による脂肪酸合成促進と肝細胞癌発症におけるPA28  $\gamma$  の役割、同上。
  15. 松永朋子、谷 英樹、佐藤 薫、森石恒司、藤原晴彦、松浦善治: カイコ幼虫へ遺伝子導入可能な水疱性口内炎ウイルスベクターの開発、同上。
  16. 松浦善治、森屋恭爾、田中啓二、宮村達男、鈴木哲朗、小池和彦、森石恒司: C型肝炎ウイルスによる脂肪肝および肝癌発症におけるPA28 $\gamma$ の役割、第 65 回日本癌学会学術総会、横浜、平成 18 年 9 月 28–30 日。
- H. 知的所有権の出願・登録状況  
特になし。

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пит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 C型肝炎ウイルス（HCV）蛋白全体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、C型急性肝炎 1例と C型慢性肝炎 1例で新たにそれぞれ 1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。以前 C型急性肝炎患者で同定された 3種類の CTL エピトープで最小エピトープも決定した。また、1例の自然治癒した C型急性肝炎患者で末梢血 CTL の動態を検討し、以前の症例の動態と比較した。

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目指し、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、HCV 蛋白全体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、HCV 蛋白全体をカバーし、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型慢性肝炎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、陽性ウエ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と本年度 C型慢性肝炎患者で同定した CTL エピトープペプチドについて、アミノ酸を一つずつずらしたペプチドを作製し、最小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 エピトープの最小エピトープは HCV NS4 1760-1768（既知、HLA-A\*2402 拘束性）、NS5B 2556-2564、NS5B 2803-2811 であった。HCV 蛋白全体をカバー

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 HLA-A\*0201, 0301, B\*4402, 4601, Cw\*0102, 0501 の C 型急性肝炎患者では HCV NS4 1958-1977 に CTL エピトープが含まれることを証明した。また, HLA-A\*1101, 2601, B\*1501, 5201, Cw\*0401, 1202 の C 型慢性肝炎患者で HCV NS4 1858-1867 が最小 CTL エピトープであることを証明した。HCV NS4 1858-1867 は HLA-A3 拘束性の CTL エピトープであることが報告されているが, 私達の患者はこの HLA は有していなかった。C 型急性肝炎 1 例で新たに HCV 特異的 CTL の経過を観察することができた。激しい肝炎にも関わらず, 末梢血中の CTL 数は多くなかったが, 肝炎鎮静後増加が見られたことから, CTL は炎症の場である肝臓に集まっていた可能性が高い。

#### E. 結論

今回, 新たに 2 種類の HCV 特異的 CTL エピトープを同定し, 日本人における HCV 特異的 CTL エピトープの library に加えた。また, 4 種類の CTL エピトープで最小エピトープを決定することができた。C 型急性肝炎における末梢血中の HCV 特異的 CTL の動態から, CTL 応答の強さは肝障害の程度とは関連するが, ウイルス排除とは必ずしも関連せず, HCV 排除には自然免疫と獲得免疫の協調が重要であると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Tajimi M, Ugajin T, Ota M, Hiroishi K, Nakamura I, Imawari M. Immune responses of

liver-infiltrating lymphocytes and peripheral blood mononuclear cells to hepatitis C virus core and NS3 antigens. *Hepato Res* 35:250-255 [2006].

Ito K, Shiraki K, Funatsuki K, Ishiko H, Sugimoto K, Murata K, Nakano T, Imawari M. Identification of novel hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocyte epitope in NS3 region. *Hepato Res* 36:294-300 [2006].

##### 2. 学会発表

伊藤圭一, 船附清美, 石古博昭, 杉本和史, 村田一素, 白木克哉, 井廻道夫. NS3 領域における HCV 特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) エピトープの同定. 第 10 回日本肝臓学会大会, 札幌, 10 月 11 日 [2006]

##### 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

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行った実験において、昨年度、ヒト不死化肝 PH5CH8 細胞内で 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見出した。今年度はこのような現象を引き起こす分子メカニズムの解明に取り組み、以下のような研究成果を得た。（1）IFN- $\beta$  産生系において NS3-4A は Cardif を介するシグナル伝達経路をほぼ完全に抑制したが、TRIF を介するシグナル抑制経路を抑制しないことを明らかにした。（2）NS3-4A は PH5CH8 細胞および HeLa 細胞において Cardif を切断したが、TRIF を切断しないことを明らかにした。（3）HCV-RNA 複製細胞である O 細胞や HCV-RNA を排除した治癒細胞である Oc 細胞においても、NS3-4A は Cardif を切断するが、TRIF を切断しないことを示した。以上の結果、従来報告されている結果とは異なり、HCV-RNA の複製に伴い活性化される IFN- $\beta$  の産生を HCV の NS3-4A だけでは完全に抑制することができないことを明らかにした。

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、HCVがどのような手段を使って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（自然免疫機構）としてのIFN産生システムをHCVがどのように攪乱抑制しているのかを解明することができれば、IFNの治療効果の向上に大きく貢献でき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産生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。

本年度は、昨年度見出した現象 (HCV の NS3-4A が肝細胞からの 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) を引き起こす分子メカニズムの解明に取り組み、以下のような研究成果を得た

## B. 研究方法

2本鎖RNA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 (Dual-Luciferase Assay) 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 (或はHeLa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)  $2 \mu\text{g}$ 、レポータープラスミド (pIFN- $\beta$ (-125)-Luc)  $0.5 \mu\text{g}$  および pRL-CMV internal controlベクター  $1 \text{ ng}$  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poly I:Cにより刺激を行った。

細胞外から刺激する場合は、培地交換後、poly I:Cを  $50 \mu\text{g/ml}$  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  $5 \mu\text{g}$  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。

IRF-3の2量体については、回収した祖蛋白質画分をNative-PAGEにて分離

してIRF3抗体により検出した。また、IRFのリン酸化の状態については、IRF-3の386番目と396番目のセリン残基のリン酸化を特異的に認識する抗体を用いて検出した。

アミノ末端部にMycタグを有するTRIFとCardifを発現するようにアレンジしたpCX4purレトロウイルス発現ベクターを構築し、これらのベクターをPH5CH8, HeLa, O (HCV RNA複製細胞) およびOc (O細胞からIFN- $\alpha$ によりHCV RNAを排除した治癒細胞)細胞に導入してMyc-TRIFやMyc-Cardifを発現させた。

細胞内で発現させたMyc-TRIFおよびMyc-Cardif分子のNS3-4Aによる切断状況については、抗Myc抗体を用いたウェスタンブロット法により解析した。

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用いて行った。コントロールとしてはルシフェラーゼ遺伝子のGL2用に化学合成したsiRNAを用いた。

## (倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものであり、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのため倫理面への特段の配慮はなかった。但し、実験に使用した細胞および核酸については蒸気滅菌を施した後廃棄した。

## C. 研究成果

ヒト不死化肝細胞株である PH5CH8 では、poly I:C を細胞培地に添加して刺激した場合起こる IFN- $\beta$  遺伝子プロモーターの活性化が NS3-4A により抑制されないという予想外の結果を昨年度得た。細胞内に直接 poly I:C を導入した場合に起こる IFN- $\beta$  遺伝子プロモーターの活性化は他の研究グループが報告しているように NS3-4A によりほぼ完全に抑制されたことから、今年度はこのような顕著な違いを引き起こすメカニズムを明らかにすることを目的として以下の実験を行った。

通常、poly I:C のような 2 本鎖 RNA の刺激による IFN- $\beta$  遺伝子の活性化は IRF-3 の活性化を介することが知られている。そこで、まず、PH5CH8 細胞の細胞外および細胞内 poly I:C 刺激により IRF-3 が活性化するかどうかを調べた。その結果、poly I:C の細胞内や細胞外の刺激に関わらず、IRF-3 の 2 量化が起こり、IRF-3 の 386 番目と 396 番目のリン酸化も生じていることがわかった。これらの結果から、IRF-3 より下流は同一のシグナル経路をたどるものと考えられた。poly I:C の細胞内刺激による IRF-3 の 2 量化やリン酸化は NS3-4A のプロテアーゼ活性依存的に抑制されたが、poly I:C の細胞外刺激により生じた IRF-3 の 2 量化やリン酸化はやはり NS3-4A ではまったく抑制されなかった。従って、細胞内刺激と細胞外刺激による結果の違いは IRF-3 より上流に起因しているものと推測された。

次に poly I:C の細胞外刺激による IRF-3 の活性化が TLR3 を介するものか TLR4 を介するものかを調べた。まず、TLR3 および TLR4 特異的 siRNA を PH5CH8

細胞に導入し、TLR3 および TLR4 mRNA 量が特異的に低下していることを確認した。その後、IFN- $\beta$  遺伝子プロモーターを用いたレポーターアッセイを行った。その結果、TLR3 特異的 siRNA を導入した PH5CH8 細胞の場合のみ、poly I:C の細胞外刺激によるルシフェラーゼ活性が顕著に低下し、IRF-3 の 2 量体形成やリン酸化も顕著に抑制されていることが分かった。

以上の結果から、poly I:C の細胞外刺激は TLR3 およびそのアダプタータンパク質である TRIF を介したシグナル伝達であると考えられた。

これまでに、幾つかのグループにより RIG-I (或は MDA5) のアダプター分子である Cardif が NS3-4A により切断を受けることにより無能化して、2 本鎖 RNA の細胞内刺激によるシグナル伝達が抑制されることが知られている。一方、NS3-4A は TRIF も切断することにより TLR3 からのシグナルも抑制されるという報告も米国のグループによりなされている。

そこで、本研究では、PH5CH8 細胞で Cardif や TRIF を活性化させた場合 (過剰発現させた場合) において NS3-4A が実際に Cardif や TRIF を切断してこれら分子の機能を無能化させるかどうかを調べることにした。

まず、最初にアミノ末端部に Myc タグを有する Cardif (Myc-Cardif) を一過性に PH5CH8 細胞で過剰発現させ、IFN- $\beta$  遺伝子プロモーターのレポーターアッセイを行った。Myc-Cardif の過剰発現によりプロモーター活性は約 200

倍程上昇したが、1B-1株および0株由来のNS3-4Aの発現によりほぼ完全に抑制されることが分った。同様の結果は、IRF-3の2量化解析によっても得られ、Myc-Cardifの発現により生じたIRF-3の2量化がNS3-4Aの発現により顕著に抑制された。次に、発現しているMyc-Cardif分子の大きさをWestern blot解析により調べた。その結果、NS3-4Aが発現している場合にのみ、Myc-Cardifは切断を受けていることが分った。プロテアーゼ活性を欠くNS3-4A変異体を発現させた場合は、このような現象は認められなかったことから、Myc-Cardifの切断はNS3-4Aのプロテアーゼ活性に依存した現象であると考えられた。Myc-Cardif分子の切断部位であると報告されている508番目のシステイン残基をアラニン残基に置換するとNS3-4Aによる切断が起こらないことも確認した。以上の結果は、poly I:Cの細胞内刺激によるシグナル伝達系をNS3-4Aが顕著に抑制するのは、NS3-4AがCardif分子を切断するためであることを示しており、これ迄に他のグループが報告した結果(Nature, 437:1167, 2005 & Proc. Natl. Acad. Sci, 102: 17717, 2005)と合致するものであった。

次に、アミノ末端部にMycタグを有するTRIF(Myc-TRIF)を一過性にPH5CH8細胞に発現させ、IFN- $\beta$ 遺伝子プロモーターのレポーターアッセイを行った。Myc-TRIFの過剰発現によりプロモーター活性は約1,200倍程上昇し、1B-1株および0株由来のNS3-4Aの発現によっ

てもまったく抑制されなかった。同様の結果は、IRF-3の2量化解析によっても得られ、Myc-TRIFの発現により生じたIRF-3の2量化がNS3-4Aの発現により抑制されることはなかった。次に発現しているMyc-TRIF分子の大きさをWestern blot解析により調べた。その結果、NS3-4Aの発現に関わらず、Myc-TRIFの大きさは変わらず切断を受けていないことが分った。以上の結果は、poly I:Cの細胞外刺激により活性化したTLR3を介したシグナル伝達系をNS3-4Aが抑制できないのは、NS3-4AがTRIF分子を切断することができないためであることを示しており、これ迄の他の報告(Proc. Natl. Acad. Sci, 102: 2992, 2005)とは明らかに異なる結果を得た。

これまで不死化肝細胞であるPH5CH8細胞を用いて調べていたために、細胞クローンの特殊性による可能性もある。例えばTRIF分子の切断部位のアミノ酸配列が変化しているためによるものかもしれない。そのような可能性を否定するために、poly I:Cの細胞内および細胞外刺激に応答性を示すことが知られているHeLa細胞を用いて同様の実験を行った。その結果、HeLa細胞においてもPH5CH8細胞を用いて得られた結果とほぼ同様の結果が得られた。HeLa細胞においても、poly I:Cの細胞内刺激によるIFN- $\beta$ 遺伝子プロモーターの活性化(10-15倍上昇)をNS3-4Aは抑制できたが、細胞外刺激によるIFN- $\beta$ 遺伝子プロモーターの活性化(約10倍上昇)については、NS3-4Aはまったく抑

制することはできなかつた。また、NS3-4A はMyc-Cardif を 508 番目のシステイン残基の部分で切断すると考えられる結果であったが、Myc-TRIF を切断することはなかつた。

さらなる証拠を得るために、全長 HCV RNA が効率良く複製している (NS3-4A が効率よく発現して機能している) O 細胞 (HuH-7 細胞由来のクローン化細胞) に Myc-Cardif と Myc-TRIF を発現させ、両分子の大きさを Western blot 解析により調べた。その結果、やはり Myc-Cardif は切断を受けているが、Myc-TRIF は切断を受けていないことが分つた。Myc-Cardif については 508 番目のシステインをアラニンに置換した分子を発現させた場合には切断されないことも確認したことから、O 細胞でも PH5CH8 細胞や HeLa 細胞と同じことが起こっていると考えられた。さらに、Oc 治癒細胞 (O 細胞を IFN- $\alpha$  で処理して HCV-RNA を排除した細胞) でも NS3-4A を発現させて同様の実験を行い、O 細胞で得た結果とほぼ同様の結果を得た。

#### D. 考察

これまでに報告されているメカニズムに従うと poly I:C のような 2 本鎖 RNA の細胞外刺激では TLR-3 およびそのアダプタータンパク質である TRIF が活性化され、IRF3 の活性化を経て IFN- $\beta$  が産生されることになっている。この場合においても、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

(Proc. Natl. Acad. Sci., 102: 2992, 2005)。しかしながら、本研究の解析結果から、NS3-4A の発現により TRIF の切断は起こっていないことが明白となった。2005 年に報告された上記論文との食い違いの原因は明らかではないが、本研究では、3 種類の細胞 (PH5CH8, HeLa および O 細胞) を用いて、いずれからも同様の結果を得ているので、実験手法の間違いとは考えにくい。その理由として、本研究では NS3-4A による Cardif 分子の切断は再現性よく確認できていることが挙げられる。

本研究の結果、従来考えられていたほど、NS3-4A による IFN- $\beta$  産生システムの抑制は完全ではないことが示唆された。TLR3 分子がまったく細胞表面に表出していない細胞の場合は、NS3-4A により IFN- $\beta$  産生がほぼ完全に抑えられるものと考えられるが、今回用いた細胞株の場合には、その抑制は部分的なものとなることが予想される。しかし、HCV- JFH1 株 (2a 型) の感染性 HCV 粒子産生システムを用いた最近の報告によると、HCV は NS3-4A とは関与しないメカニズムにより 2 本鎖 RNA により誘導されるシグナル経路を抑制することができるとされていることから、HCV の NS3-4A 以外のタンパク質の関与も考えられる。このような点についても、今後検討していく必要がある。

今回の解析に用いた 2 種類の NS3-4A (1B-1 株と O 株) は肝炎を発症していない HCV キャリアー由来のものであったこと、および HCV にはかなりの遺伝的多様性が認められることから、C 型

慢性肝炎患者や肝癌患者由来の NS3-4A が同じように Cardif 分子を切断して TRIF 分子を切断しないという確証は現在のところ得られていない。この点についても、今後検討評価する必要がある。

自然免疫システムを攪乱して無能化しようとする NS3-4A に対抗する手段を得ることは、HCV の持続感染を断ち切ることができる可能性を示唆しており、今後の重要な研究課題であると考えられる。

#### E. 結論

今年度の実験結果 (NS3-4A は TRIF を切断することができない) から、HCV の NS3-4A だけでは、HCV-RNA の複製に伴い活性化される IFN- $\beta$  の産生を完全に抑制することができないことを明らかにし、これまでに報告された結果により構築されている概念を今後変更する必要があることを示した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) K. Abe, M. Ikeda, Y. Ariumi, H. Dansako, and N. Kato. Serum-free cell culture system supplemented with lipid-rich albumin for hepatitis C virus (strain 0 of genotype 1b) replication. *Virus Res.* in press (2007).
- 2) K. Abe, M. Ikeda, H. Dansako,

K. Naka, and N. Kato. Cell culture-adaptive NS3 mutations required for the robust replication of genome-length hepatitis C virus RNA. *Virus Res.* in press (2007).

- 3) K. Abe, A. Nozaki, K. Tamura, M. Ikeda, K. Naka, H. Dansako, H. Hoshino, K. Tanaka, and N. Kato. Tandem repeats of lactoferrin-derived anti-hepatitis C virus peptide enhance antiviral activity in cultured human hepatocytes. *Microbiol. Immunol.* 51, 117-125 (2007).
- 4) K. Yuasa, A. Naganuma, K. Sato, M. Ikeda, N. Kato, H. Takagi, and M. Mori. Zinc is a negative regulator of hepatitis c virus RNA replication *Liver Int.* 26, 1111-1118 (2006).
- 5) M. Ikeda, K. Abe, M. Yamada, H. Dansako, K. Naka, and N. Kato. Different Anti-HCV profiles of statins and their potential for combination therapy with interferon. *Hepatology* 44, 117-125 (2006).
- 6) N. Ishii, K. Watashi, T. Hishiki, K. Goto, D. Inoue, M. Hijikata, T. Wakita, N. Kato, and K. Shimotohno. Diverse effects of cyclosporine on hepatitis C virus strain replication. *J. Virol.* 80, 4510-4520 (2006).

- 7) 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.* 87, 1703-1710 (2006).
- 8) 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* 346, 348-362 (2006).
- 9) 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. Hepatol.* 44, 869-878 (2006).
2. 学会発表
- 1) 是永 匡紹、安藤 美恵、原 裕一、池田 正徳、加藤 宣之、日野 啓輔、坂井田 功. HCV genomic repliconを用いたミトコンドリア機能解析. 第42回日本肝臓学会総会、京都、2006年5月.
- 2) 湯浅 和久、長沼 篤、高木 均、鈴木 秀幸、柿崎 暁、佐藤 賢、市川 武、蘇原 直人、森 昌朋、池田 正徳、加藤 宣之. C型慢性肝炎に対する亜鉛補充療法. 第42回日本肝臓学会総会、京都、2006年5月.
- 3) 池田 正徳、阿部 健一、團迫 浩方、脇田 隆宇、加藤 宣之. HCV-O (1b)とJFH1 (2a)のシスエレメントキメラウイルスの作成とそれらを用いたHCV複製効率規定領域の解析第65回日本癌学会総会、横浜、2006年9月.
- 4) 團迫 浩方、池田 正徳、阿部 健一、加藤 宣之. HCV RNAの複製レベルを生細胞のまま定量できる新しい評価システムの開発. 第65回日本癌学会総会、横浜、2006年9月.
- 5) 阿部 健一、池田 正徳、團迫 浩方、仲 一仁、加藤 宣之. HCV RNAの複製を著しく亢進させる適応変異の組合せの同定. 第65回日本癌学会総会、横浜、2006年9月.
- 6) 渡士 幸一、後藤 覚、土方 誠、脇田 隆宇、加藤 宣之、下遠野 邦忠. シクロフィリン阻害剤によるC型肝炎ウイルス複製の抑制. 第65回日本癌学会総会、横浜、2006年9月.
- 7) K. Abe, M. Ikeda, H. Dansako, K. Naka, and N. Kato. Combination of cell-adaptive mutations causes the drastic enhancement of genome-length HCV RNA replication. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Cairns, Australia. August, 2006.
- 8) K. Abe, A. Nozaki, K. Tamura, M. Ikeda, K. Naka, H. Dansako, H. Hoshino, K. Tanaka, and N. Kato. Tandem repeats of lactoferrin-derived anti-HCV peptide enhance the antiviral activity. 13th International

- Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Cairns, Australia. August, 2006.
- 9) H. Dansako, M. Ikeda, K. Abe, and N. Kato. Development of a new cell-based assay for monitoring HCV RNA replication level with living cells. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Cairns, Australia. August, 2006.
- 10) K. Takemoto, H. Dansako, K. Naka, M. Ikeda, and N. Kato. Comparative analysis of inhibiting activities against IFN- $\beta$  production of NS3-4As derived from patients with different hepatic conditions. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Cairns, Australia. August, 2006.
- 11) M. Ikeda, K. Abe, H. Dansako, T. Wakita, and N. Kato. Production and characterization of infectious HCVs from JFH1 (2a) with cis-element of HCV-0. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Cairns, Australia. August, 2006.
- 12) K. Watashi, N. Ishii, K. Goto, M. Hijikata, T. Wakita, N. Kato, and K. Shimotohno. Cyclophilin B, a cellular cofactor for HCV replication, determines the diverse anti-HCV efficacy of cyclosporine A among strains. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Cairns, Australia. August, 2006.
- 13) 阿部 健一、池田 正徳、團迫 浩方、加藤 宣之. 全長HCV RNAの効率的な複製を引き起こすNS3領域の適応変異に関する解析. 第54回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、2006年11月.
- 14) 阿部 健一、池田 正徳、團迫 浩方、加藤 宣之. 全長HCV RNAの複製を長期間維持できる無血清培地を用いた細胞培養系の開発. 第54回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、2006年11月.
- 15) 池田 正徳、阿部 健一、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之. 1b型と2a型HCVのシスエレメント領域のキメラウイルスを用いたウイルスの複製および粒子産生に関する解析. 第54回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、2006年11月.
- 16) 團迫 浩方、池田 正徳、加藤 宣之. C型肝炎ウイルスNS3-4A蛋白質のインターフェロン $\beta$ 産生阻害メカニズム. 第54回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、2006年11月.
- 17) 團迫 浩方、池田 正徳、阿部 健一、加藤 宣之. HCV RNAの複製を生細胞のまま観察できる培養システムの開発. 第54回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、2006年11月.
- 18) 山田 将士、池田 正徳、阿部 健一、團迫 浩方、加藤 宣之. ヒト肝癌由来の培養細胞におけるC型肝炎ウイルスおよびエタノールのTGF- $\beta$ 産生に及ぼす影響に関する解析. 第54回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、2006年11月.
- 19) 田村 一志、大上 厚志、田中 淳、清水 宣明、加藤 宣之、森川 昭廣、星野 洪郎. VSV/HCV pseudotype virus 感染系を用いたHCV母子感染症例・小児HCV感染例の感染機構の検討. 第54回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、2006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

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、前村大成（東京都西赤十字血液センター）

共同研究者：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）

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。また、本年度は厚生労働省からの依頼により、初回献血者のHTLV-I抗体陽性率の全国調査を行なったので併せて報告する。

A. 研究目的

初回献血者のウイルスマーカー陽性率の調査によって、そのウイルスの疫学調査が可能となる。また年齢別の調査を行うことにより、過去の感染原因を推定することも可能となるはずである。1985年から一部の医療機関で、1986年からは全国の医療機関で行われている「B型肝炎ウイルスの母子感染防止事業」や、一部地方自治体で行われているHTLV-Iの母子感染予防対策の成果を確認することもできるはずである。

B. 対象と方法

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

行った。

C. 結果

初回献血者におけるHBs抗原陽性率

図1に初回献血者における年齢別HBs抗原陽性率を示す。平成18年の陽性率は平成16年に比べてほぼ全年代で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可能性がある。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、1

6歳初回献血者でHBVキャリアは確認されていなかった。しかし、平成18年では母子感染防止対策を施したにもかかわらず、垂直感染してしまったHBVキャリアが1例確認されている。

#### 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18年はさらに低下傾向が認められ、特に31歳から55歳で明らかな低下が確認された(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18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)、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た。

#### 初回献血者におけるHTLV-I抗体陽性率

HTLV-I抗体の陽性率も他のマーカーと同様に陽性率の低下傾向が認められ、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5、6)。

全国調査からは甲信越・北陸地方ならびに東北地方で陽性率が低く、次いで関東、北海道が低い。近畿地方では全国平均より少し高い程度であるが、九州地方では全国平均の3倍以上の陽性率を示した。さらに甲信越・北陸地方を除く全ての地方で女性の陽性率が男性を上回った(図7)。茨城、栃木、東京、神奈川、福岡の5都県の平成7年(神奈川は平成9年)、12年、17年のHTLV-I抗体

陽性率を各年代別に比較した。福岡では平成7年、12年、17年と全年代で陽性率の低下が認められた。一方、陽性率の低い関東の4都県では明らかな傾向が認められなかった(図8、9)。

#### D. 考察

平成15から平成17年までの3年間は16歳初回献血者にHBVキャリアは認められていなかったが、H18年にはキャリアが1例確認された。当該献血者は母子感染防止対策を施したにもかかわらずキャリア化した例であった。

HTLV-I抗体の平成7年、12年、17年の陽性率の比較から、福岡では明らかな陽性率の低下傾向が認められた。長崎、鹿児島などでは自治体がHTLV-I母子感染防止事業に積極的に取り組んでいることが全国的にも知られている。福岡でこのような事業が行われているかどうかは分からないが、少なくとも陽性率の低い地方よりは住民の関心も高いと考えられる。陽性率の低い関東地方では陽性率の低下傾向が明らかでなく、特に栃木、東京では若年層における陽性率の低下傾向が全く認められていない。人工乳で育児をする割合が増えているとはいえ、妊婦に母子感染の危険性を周知し、希望者には出産前に抗体検査を行うべきと考える。

