

Figure 7. Susceptibility of different cells to Fas stimulation. *A*, Immunoblotting analysis was carried out by using anti-caspase 8, anti-caspase 3, and anti-actin antibodies, and the membrane was then subjected to reaction with peroxidase-conjugated secondary antibody. Immunoreactivity was visualized by use of enhanced chemiluminescence detection. Loading proteins were obtained from the following cell groups: mock-infected Molt-4 cells; Molt-4 cells infected with UV-irradiated hepatitis C virus, strain B (UV-SB-HCV); SB-HCV-infected Molt-4 cells from the carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)-high group; and SB-HCV-infected Molt-4 cells from the CFSE-low group, with or without Fas-ligand (FasL) stimulation. Pretreatment with CD44 splicing variant 6-blocking antibody (CD44v6 Ab) was carried out for some samples, as indicated. *B*, Surface expression of Fas and FasL as measured by flow cytometry. *C*, Fluorescence-activated cell sorter analysis of annexin V and propidium iodide (PI) staining. Mock-infected cells, Molt-4 cells infected with UV-SB-HCV, and Molt-4 cells infected with SB-HCV were stimulated with FasL for 24 h and analyzed to detect annexin V-positive, PI-negative early apoptotic cells. The percentages of early apoptotic cells in each group are indicated in the dot plots. Iso-type cont., isotype control antibodies.

DISCUSSION

The SB cell line, which was derived from an HCV-positive B-cell lymphoma, produces lymphotropic HCV particles that can infect and replicate in B cell lines, such as Raji and Daudi cells, as well as PBMCs [28, 29]. Most recently, we also demonstrated

that SB-HCV could infect T cell lines, such as Molt-4 cells, and that this system could be used for signaling analysis of T cells [5]. Although there has been accumulating evidence indicating that HCV could replicate in both established T cell lines and primary T lymphocytes, so far little is known about the extent and biological significance of T cell infection [39–41]. The site of infec-

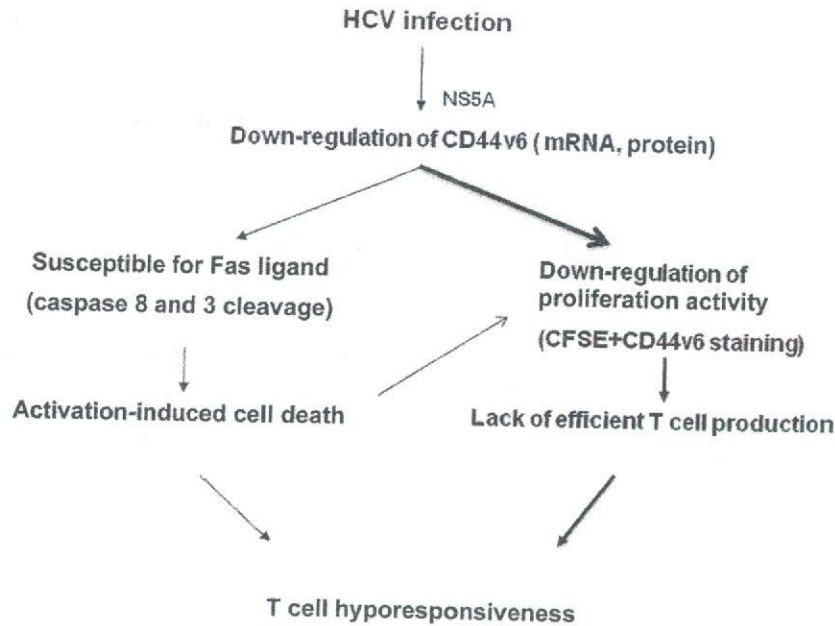


Figure 8. A proposed mechanism for T cell hyporesponsiveness induced by hepatitis C virus, strain SB (SB-HCV). T cell proliferation activity is strongly suppressed in SB-HCV infected T cells (*thick arrows*). A second effect is the induction of apoptosis through Fas. Both pathways lead to T cell hyporesponsiveness. The relative effects of these 2 pathways is not clear. CFSE, carboxyfluorescein succinimidyl ester.

tion, as well as proliferative activity and the subset of CD4⁺ cells involved may be important factors for HCV replication in vivo [42]. Some authors have suggested that coinfection with human T cell lymphotropic virus type 1 or HIV might induce HCV replication in T lymphocytes [43–45]. Previously, our data indicated that with CD3 and IL-2 stimulation, naive CD4⁺ T cells could be one of the target cells for HCV [5]. As a result of HCV infection, changes in the development and activation of apoptosis-related molecules in T cells may contribute partially to T cell hyporesponsiveness in some patients with hepatitis C.

The temporal expression of CD44v6 is important for proliferation, activation, and apoptosis in T cells [13, 16]. The suppression of CD44v6 expression or Ras-MEK-ERK signaling by HCV replication disrupted the positive loop of proliferation in T cells [27]. We could not conclude that CD44v6 suppression was either the result or the cause of Ras-MEK-ERK suppression, since Ras-MEK-ERK have been reported as upstream regulatory molecules for CD44v6 expression and CD44v6 could enhance Ras-MEK-ERK suppression [27]. However, unexpectedly, the other CD44 splicing variants, for example CD44v3, could not be suppressed by Ras-MEK-ERK signaling in this Molt-4 cell infection system [13, 14]. Our studies further showed that the protein NS5A is responsible for CD44v6 suppression. One of the possible mechanisms for this suppression is the stimulation of phosphatase 2A activity that can suppress MAPK signaling [24]. However, many individual HCV proteins have been reported to affect MAPK signaling and apoptotic signaling in diverse ways [25]; our Molt-4 cell HCV replication system showed that HCV replication, and NS5A protein alone, could suppress CD44v6

expression and MAPK signaling in T cells. Moreover, the results of Fas signaling experiments showed that suppression of CD44v6 might contribute to the apoptosis of T cells. However, some authors have reported that NS5A can inhibit apoptosis in hepatoma cell lines [46, 47]. One of the explanations for these contradictory results probably lies in the developmental stages and characteristics of the naive T cells. During T cell activation, apoptosis is easily induced, in order to maintain an appropriate immune response. During this stage, suppression of CD44v6 might strongly affect apoptosis signaling in T cells.

We have found that our results apply not only to T cell lines, but also to primary naive T cells. We could also detect significant suppression of proliferation after SB-HCV infection (data not shown). Furthermore, in our ongoing clinical study some clinical samples (PBMCs) from patients with chronic hepatitis C showed a significant, albeit small, degree of CD44v6 down-regulation with CD3 stimulation (data not shown).

We conclude that HCV replication in T cells may play a role in the regulation of proliferation and apoptosis during T cell activation. The results suggest that NS5A expression induces the suppression of MAPK signaling and CD44v6 expression in T cells. Suppression of CD44v6 could enhance susceptibility to Fas signaling by reducing the binding of Fas and CD44v6. These biological effects may contribute to the disturbance of T cell proliferation and activation in individuals with persistent lymphotropic HCV infection (figure 8). A key issue for future research will be determining what percentage of T cells are infected with HCV during natural T cell infection.

References

1. Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med* 1999; 341:556–62.
2. Chang KM, Rehermann B, Chisari FV. Immunopathology of hepatitis C. *Springer Semin Immunopathol* 1997; 19:57–68.
3. Manigold T, Racanelli V. T-cell regulation by CD4 regulatory T cells during hepatitis B and C virus infections: facts and controversies. *Lancet Infect Dis* 2007; 7:804–13.
4. Blackburn SD, Wherry EJ. IL-10, T cell exhaustion and viral persistence. *Trends Microbiol* 2007; 15:143–6.
5. Kondo Y, Sung VM, Machida K, Liu M, Lai MM. Hepatitis C virus infects T cells and affects interferon-gamma signaling in T cell lines. *Virology* 2007; 361:161–73.
6. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000; 407:789–95.
7. Holmstrom TH, Schmitz I, Soderstrom TS, et al. MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95/Fas-mediated apoptosis downstream of DISC assembly. *Embo J* 2000; 19:5418–28.
8. Lynch KW. Consequences of regulated pre-mRNA splicing in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:931–40.
9. Flanagan BF, Dalchau R, Allen AK, Daar AS, Fabre JW. Chemical composition and tissue distribution of the human CDw44 glycoprotein. *Immunology* 1989; 67:167–75.
10. Lesley J, Hyman R, Kincade PW. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol* 1993; 54:271–335.
11. Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4:33–45.
12. Yasuda M, Nakano K, Yasumoto K, Tanaka Y. CD44: functional relevance to inflammation and malignancy. *Histol Histopathol* 2002; 17:945–50.
13. Forster-Horvath C, Boci S, Raso E, et al. Constitutive intracellular expression and activation-induced cell surface up-regulation of CD44v3 in human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 2001; 31:600–8.
14. Seiter S, Schmidt DS, Zoller M. The CD44 variant isoforms CD44v6 and CD44v7 are expressed by distinct leukocyte subpopulations and exert non-overlapping functional activities. *Int Immunol* 2000; 12:37–49.
15. Marhaba R, Bourouba M, Zoller M. CD44v6 promotes proliferation by persisting activation of MAP kinases. *Cell Signal* 2005; 17:961–73.
16. Mielgo A, van Driel M, Bloem A, Landmann L, Gunthert U. A novel antiapoptotic mechanism based on interference of Fas signaling by CD44 variant isoforms. *Cell Death Differ* 2006; 13:465–77.
17. Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999; 285:110–3.
18. Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000; 290:1972–4.
19. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005; 309:623–6.
20. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005; 11:791–6.
21. Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, et al. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:9294–9.
22. Macdonald A, Harris M. Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. *J Gen Virol* 2004; 85:2485–502.
23. Szabo G. Hepatitis C virus NS5A protein—a master regulator? *Gastroenterology* 2006; 130:995–9.
24. Macdonald A, Crowder K, Street A, McCormick C, Saksela K, Harris M. The hepatitis C virus non-structural NS5A protein inhibits activating protein-1 function by perturbing ras-ERK pathway signaling. *J Biol Chem* 2003; 278:17775–84.
25. Tsutsumi T, Suzuki T, Moriya K, et al. Hepatitis C virus core protein activates ERK and p38 MAPK in cooperation with ethanol in transgenic mice. *Hepatology* 2003; 38:820–8.
26. Zhu J, Shendure J, Mitra RD, Church GM. Single molecule profiling of alternative pre-mRNA splicing. *Science* 2003; 301:836–8.
27. Cheng C, Yaffe MB, Sharp PA. A positive feedback loop couples Ras activation and CD44 alternative splicing. *Genes Dev* 2006; 20:1715–20.
28. Machida K, Cheng KT, Sung VM, et al. Hepatitis C virus induces a mutator phenotype: enhanced mutations of immunoglobulin and protooncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:4262–7.
29. Sung VM, Shimodaira S, Doughty AL, et al. Establishment of B-cell lymphoma cell lines persistently infected with hepatitis C virus in vivo and in vitro: the apoptotic effects of virus infection. *J Virol* 2003; 77:2134–46.
30. Kato T, Date T, Murayama A, Morikawa K, Akazawa D, Wakita T. Cell culture and infection system for hepatitis C virus. *Nat Protoc* 2006; 1:2334–9.
31. Hu Y, Shahidi A, Park S, Guilfoyle D, Hirshfield I. Detection of extrahepatic hepatitis C virus replication by a novel, highly sensitive, single-tube nested polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol* 2003; 119:95–100.
32. Negro F, Krawczynski K, Quadri R, et al. Detection of genomic- and minus-strand of hepatitis C virus RNA in the liver of chronic hepatitis C patients by strand-specific semiquantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *Hepatology* 1999; 29:536–42.
33. Yamada Y, Itano N, Narimatsu H, et al. Receptor for hyaluronan-mediated motility and CD44 expressions in colon cancer assessed by quantitative analysis using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90:987–92.
34. Ni HM, Leong AF, Cheong D, Hooi SC. Expression of CD44 variants in colorectal carcinoma quantified by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Lab Clin Med* 2002; 139:59–65.
35. Machida K, Cheng KT, Sung VM, Lee KJ, Levine AM, Lai MM. Hepatitis C virus infection activates the immunologic (type II) isoform of nitric oxide synthase and thereby enhances DNA damage and mutations of cellular genes. *J Virol* 2004; 78:8835–43.
36. Machida K, Kondo Y, Huang J, et al. HCV-induced immunoglobulin hypermutation reduces the affinity and neutralizing activities of antibodies against HCV envelope protein. *J Virol* 2008; 82:6711–20.
37. Machida K, Cheng KT, Sung VM, Levine AM, Fong S, Lai MM. Hepatitis C virus induces Toll-like receptor 4 expression, leading to enhanced production of beta interferon and interleukin-6. *J Virol* 2006; 80:866–74.
38. Franklin RA, Tordai A, Patel H, Gardner AM, Johnson GL, Gelfand EW. Ligation of the T cell receptor complex results in activation of the Ras/Raf-1/MEK/MAPK cascade in human T lymphocytes. *J Clin Invest* 1994; 93:2134–40.
39. Pham TN, King D, Macparland SA, et al. Hepatitis C virus replicates in the same immune cell subsets in chronic hepatitis C and occult infection. *Gastroenterology* 2008; 134:812–22.
40. MacParland SA, Pham TN, Gujar SA, Michalak TI. De novo infection and propagation of wild-type Hepatitis C virus in human T lymphocytes in vitro. *J Gen Virol* 2006; 87:3577–86.
41. Li Y, Wang X, Douglas SD, et al. CD8⁺ T cell depletion amplifies hepatitis C virus replication in peripheral blood mononuclear cells. *J Infect Dis* 2005; 192:1093–101.
42. Bare P, Massud I, Parodi C, et al. Continuous release of hepatitis C virus (HCV) by peripheral blood mononuclear cells and B-lymphoblastoid cell-line cultures derived from HCV-infected patients. *J Gen Virol* 2005; 86:1717–27.
43. Zhang J, Yamada O, Kawagishi K, et al. Up-regulation of hepatitis C virus replication by human T cell leukemia virus type I-encoded Tax protein. *Virology* 2007; 369:198–205.
44. Toro C, Bassani S, Rios P, Jimenez V, Camino N, Soriano V. Influence of HTLV-2 infection on hepatitis C virus replication in HIV-positive patients. *J Clin Virol* 2005; 32:338–9.
45. Mizutani T, Kato N, Saito S, Ikeda M, Sugiyama K, Shimotohno K. Characterization of hepatitis C virus replication in cloned cells obtained from a human T-cell leukemia virus type I-infected cell line, MT-2. *J Virol* 1996; 70:7219–23.
46. Nanda SK, Herion D, Liang TJ. The SH3 binding motif of HCV [corrected] NS5A protein interacts with Bin1 and is important for apoptosis and infectivity. *Gastroenterology* 2006; 130:794–809.
47. Miyasaka Y, Enomoto N, Kurosaki M, et al. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A inhibits tumor necrosis factor- α -mediated apoptosis in Huh7 cells. *J Infect Dis* 2003; 188:1537–44.

C型慢性肝炎治療中のナチュラルキラー細胞動態についての検討

椎名正明¹, 小林光樹², 昆 吏規², 小林智夫³,
近藤泰輝⁴, 上野義之⁴, 下瀬川 徹¹

¹東北大学大学院医学系研究科 消化器病態学

²東北大学大学院医学系研究科 がん看護学

³東北労災病院 消化器科

⁴東北大学病院 消化器内科

Analysis of the Dynamics of Natural Killer Cells in Chronic Hepatitis C Patients Receiving Anti-viral Treatment

Masaaki SHIINA¹, Koju KOBAYASHI², Satonori KON², Tomoo KOBAYASHI³,
Yasuteru KONDO⁴, Yoshiyuki UENO⁴ and Tooru SHIMOSEGAWA¹

¹*Division of Gastroenterology, Tohoku University Graduate School of Medicine*

²*Department of Oncology Nursing, Tohoku University Graduate School of Health Sciences*

³*Department of Gastroenterology, Tohoku Rosai Hospital*

⁴*Department of Gastroenterology, Tohoku University Hospital*

Key words: C型肝炎ウイルス, ナチュラルキラー細胞, インターフェロン, 免疫

[Background] Hepatitis C virus (HCV) is a major factor for liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma, while limited patients with persistent infection can clear HCV by the standardized interferon with ribavirin protocol. Both drugs are supposed to effect on host-immune responses during the treatment towards viral eradication. However, little is known about these responses including natural killer (NK) cells.

[Aim] Examine NK-related population and markers in patients' blood receiving anti-viral treatment and discuss the role of NK and its dynamics in the disease status.

[Method] Thirteen patients were enrolled and divided into two groups according to the subgroup of infected HCV, Group 1 and Group 2 respectively. Heparinized blood was taken from all patients in the chronic state, and Group 2 was further followed up during and after the 24-week treatment. NK cells and NKT cells were identified in peripheral blood mononuclear cells by the surface staining of CD56 and CD3. NKG2D was also stained and analyzed on flow cytometry.

[Results] Frequency of CD56^{bright} NK sub-population was higher in Group 1 than in Group 2 and the control group, while that of total NK cells did not differ. Dynamics of NK populations showed the up-regulation of CD56^{bright} NK around the end of treatment and subsequent decrease at the follow-up point. The expression of NKG2D showed no significant difference between the groups.

[Conclusion] The continuous admission of interferon and/or ribavirin changes the balance of NK sub-population that may relate to the immune activity in HCV infection.

背景と目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は、血液や体液を介して伝播するRNAウイルスであり、ヒトの肝臓に感染すると、70-80%と高率に持続感染へと移行する。HCVの持続感染と、それによって引き起こされる、肝実質の炎症がC型慢性肝炎であり、近年、肝硬変・肝細胞癌の最大の原因となっている¹⁾。C型慢性肝炎に対する治療としては、わが国では、1992年から、インターフェロンをもちいた、抗ウイルス療法が開始されており、以後、リバビリンの併用やインターフェロンのペグ化といった改良を経て、ペグインターフェロンとリバビリンの併用治療が、標準的治療として確立された。これにより、難治例といわれた症例においても、約半数の患者に、持続的ウイルス排除へ導くことができるようになった²⁾。一方で、治療の副作用や、治療無効例への対応は、不十分である。

インターフェロンやリバビリンは、HCVに対する特異的な治療薬ではなく、ウイルス排除過程には、様々な作用が関与していると推測される。インターフェロンには、 α 、 β 、 γ などがあるが、肝炎治療に使用されているのは、I型インターフェロンに分類される、前2者である。ウイルスに感染した肝細胞など上皮細胞は、内因性I型インターフェロンを産生し、autocrine, paracrine的に作用して、抗ウイルスシグナルを誘導する。さらに、インターフェロンには、免疫賦活・調節作用があることも知られている³⁾。治療併用薬として使用されるリバビリンは、核酸アナログでありながら、単独でのHCV抑制効果は、認められていない⁴⁾。しかし、近年では、その免疫調節作用が注目されている。

ナチュラルキラー(NK)細胞は、リンパ球系の細胞集団である。感染に際しては、好中球やマクロファージに次いで誘導されるため、自然免疫や早期誘導免疫に分類される。NK細胞の役割は、正常な自己のMHCを有さない、感染細胞や腫瘍細胞を、認知して細胞傷害をもたらすことである。近年、マウス同様にヒトのNK細胞に亜分類が存在することが示された^{5,6)}。また、NK細胞、T細胞

双方の表面マーカーをあわせもつ、NKT細胞の概念も注目を浴びている。これら、NK、NKT細胞は、末梢血に比して、有意に肝臓内に多く認められているが、その詳細な意義は解明されていない⁷⁾。

今回われわれは、C型慢性肝炎の標準治療に際して、得られた臨床検体をもちいて、NK細胞関連因子と、肝炎の病態、治療との関連について検討した。

方 法

対象は、C型慢性肝炎13例(男7例、女6例)であり、さらにHCV群別に、sero-group 1 (Gr1)とsero-group 2 (Gr2)に分類した。コントロールには、B型慢性肝炎(CHB)4例をもちいた。HCVの亜分類は、インターフェロン治療効果と密接な関わりがあり、genotype 1 (Gr1に相当)は日本人に多くみられるが、難治性である。一方、genotype 2 (Gr2に相当)は、治療感受性が高い。症例プロフィールは表1の通りである。すべての症例で、明らかな感染症や腫瘍性病変の存在は除外されている。また、本研究は開始前に、東北大学医学部倫理委員会の承認を得て、文書をもちいたインフォームド・コンセントを実施済みである。HCV感染の診断は、HCV RNA アンプリコア法(ロッシュ社)、群別判定は、血清EIA法にておこなった。

肝炎治療は、2007年現在における、わが国のコンセンサス・ガイドラインに沿い、体重換算によるペグインターフェロン α 2b (60-100 μ g/週)と、リバビリン(600-800 mg/日)の併用治療を、Gr1には48週間、Gr2に対しては24週間にわたって施行した。静脈血採血は全例、治療開始直前に施行した。また、Gr2症例は、治療開始後、4週、8週、12週、24週終了時と、終了後24週の時点を含めた、経時的な採血も施行した。採血後、Ficoll比重遠心法により、末梢血単核球(PBMC)を分離した。一部症例では、解析まで -80°C にて凍結保存した。

遠心洗浄したPBMCを、 1×10^6 cells/mlの濃度で染色バッファー(0.1% ウシ血清アルブミン

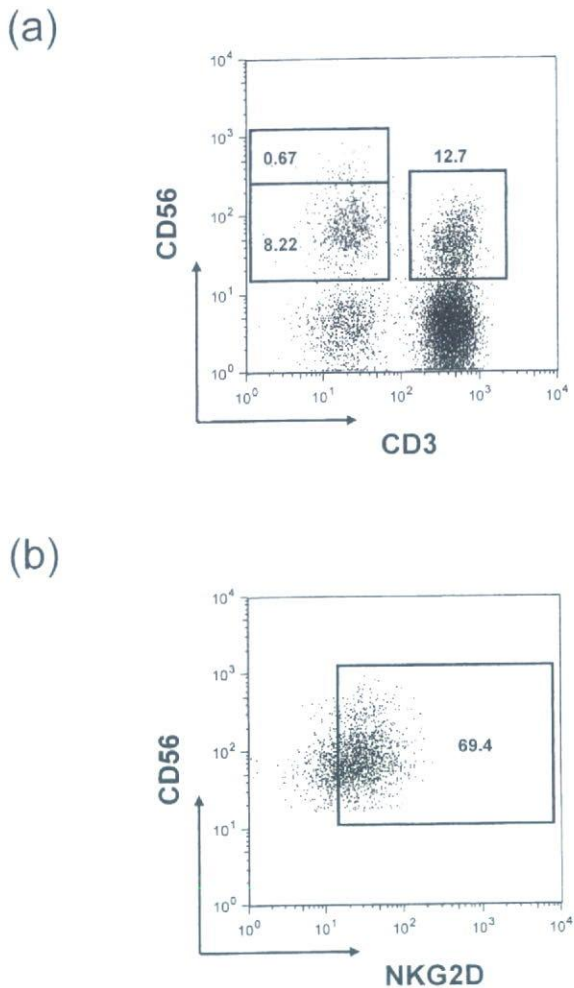


図1. フローサイトメトリーによる末梢血NK細胞分画の解析
リンパ球集団をCD3/CD56で展開した。枠内は左上, 左下, 右が, それぞれ, CD56^{bright} NK, CD56^{dim} NK, NKT細胞である (a)。総NK細胞 (CD56^{bright}とCD56^{dim}の和) について, NKG2D発現レベルで展開し解析した (b)。図中の数値は, 各母集団に対する枠内細胞の比率を示す。

添加リン酸緩衝液)に懸濁させ, FITC標識-抗CD3抗体 (BD Biosciences, San Jose, CA), APC標識-抗CD56抗体 (Miltenyi Biotec, Germany), PE標識-抗NKG2D抗体 (BD Biosciences)を添加し, 氷上遮光で30分間インキュベートした。染色バッファーにて洗浄した後, 1%パラホルムアルデヒドで固定, フローサイトメトリー (FACS Calibur, BD Biosciences) による解析をおこなった。解析プロットにおける, CD3-CD56⁺細胞をNK細胞とし, CD56発現強度の違いにより, CD56^{bright}NKとCD56^{dim}NKに分類した。また, CD3⁺CD56⁺細胞をNKT細胞と定義した (図1)。

統計解析は, 多群間比較 one-way ANOVA, post-hoc test には Tukey's multiple comparison test をもちい, $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結 果

対象症例の臨床検査データ比較 (表1):

治療前採血時点での, 年齢, 血清ALT値, HCV RNA量は, 表に示すとおりであり, いずれも, Gr1とGr2の群間では, 有意差を認めなかった。また, 治療終了後24週での, ウィルス排除率 (SVR) は, それぞれ, 43%, 83%であり, 群別の一般的な治療効果であった。

NK細胞関連分画の比較 (図2):

C型慢性肝炎のPBMCにおいて, フローサイトメトリーによる解析結果から, リンパ球におけるNK細胞頻度を求めると, Gr1 $21.4 \pm 2.5\%$, Gr2 $20.2 \pm 7.0\%$, コントロール $33.1 \pm 6.0\%$ (mean \pm SEM) であり, 群間の有意差を認めなかった (a)。また, NKT細胞の頻度も, Gr1 $4.5 \pm 1.6\%$,

表1. 対象症例のプロフィール

	N	Age mean (range)	Sex (M/F)	ALT (IU/L)	HCV RNA (kcopies/ml)	SVR rate
Sero-group 1	7	55 (25-67)	3/4	22-212	9-3,700	43% (3/7)
Sero-group 2	6	57 (43-70)	4/2	16-112	670-4,700	83% (5/6)
Control (CHB)	4	47 (36-62)	4/0	42-282	N/A	N/A

SVR, sustained viral response; CHB, chronic hepatitis B; N/A, not available

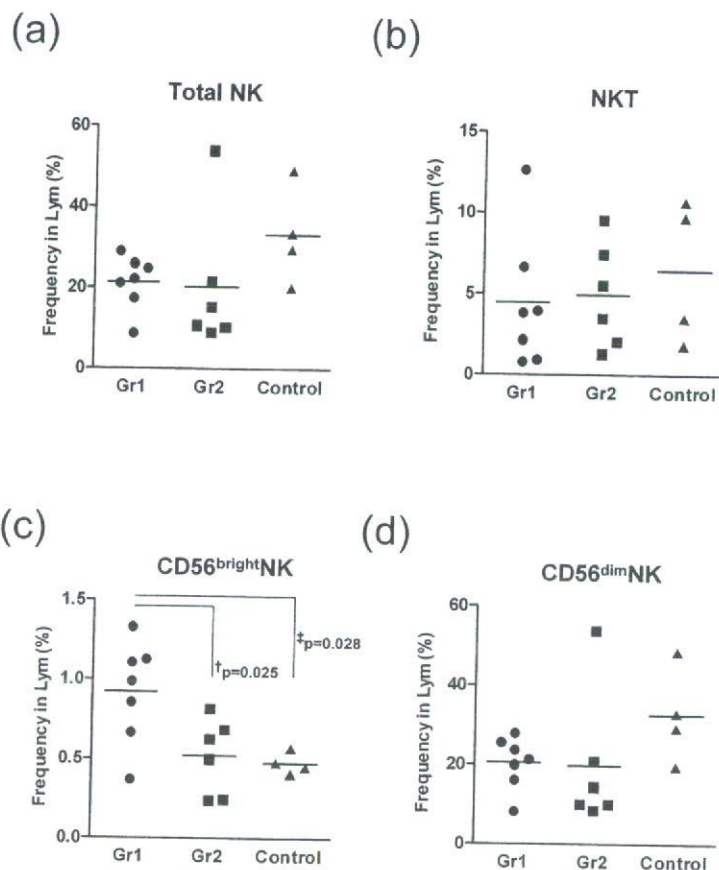


図2. グループ間におけるNK細胞関連集団比率の比較
症例グループ毎のNK細胞関連集団を、リンパ球に対する比率で示した。(a) NK細胞, (b) NKT細胞, (c) CD56^{bright}NK細胞, (d) CD56^{dim}NK細胞。

Gr2 4.9±1.3%, コントロール 6.4±2.2% であり、群間の有意差を認めなかった (b)。NK細胞については、CD56^{bright}NKとCD56^{dim}NKの亜集団に分けて検討した結果、前者は、Gr1が0.92±0.12%であり、Gr2 0.52±0.09% ($p=0.025$), コントロール 0.47±0.03% ($p=0.028$) と他群に比して有意に高頻度であった (c)。

抗ウイルス治療経過におけるNK細胞関連分画の動態 (図3) :

Gr2症例に対しては24週間のインターフェロン治療が施行された。全6例について、治療開始直前、4週、8週、12週、24週終了時、24週後効果判定時のNK細胞関連分画の動態を検討した。その結果、NK細胞とNKT細胞に関しては、治療開始時点と比較して、一定の変動を示さなかった (data not shown)。CD56^{bright}NK分画は、治療後

半に増加し、終了後は減少するパターンを示し、治療前、4週後と終了時(24週)の間では、有意差を認めた ($p<0.05$) (a)。一方、CD56^{dim}NK分画では、一定の傾向を示さなかった (b)。

NK細胞におけるNKG2D発現頻度 (図4) :

未治療時点でのNKG2D発現は、それぞれGr1 77.6±3.2%, Gr2 86.7±4.0%, コントロール 87.3±3.5%と、いずれの群でも高頻度であった。Gr1で若干低頻度の傾向があったが、有意差は認めなかった ($p=0.12$) (a)。また、Gr2症例での抗ウイルス治療中の経時的変動には、一定の傾向を認めなかった (b)。

考 察

免疫学的側面から、C型慢性肝炎の病態を検討した場合、HCV関連蛋白は、インターフェロンの

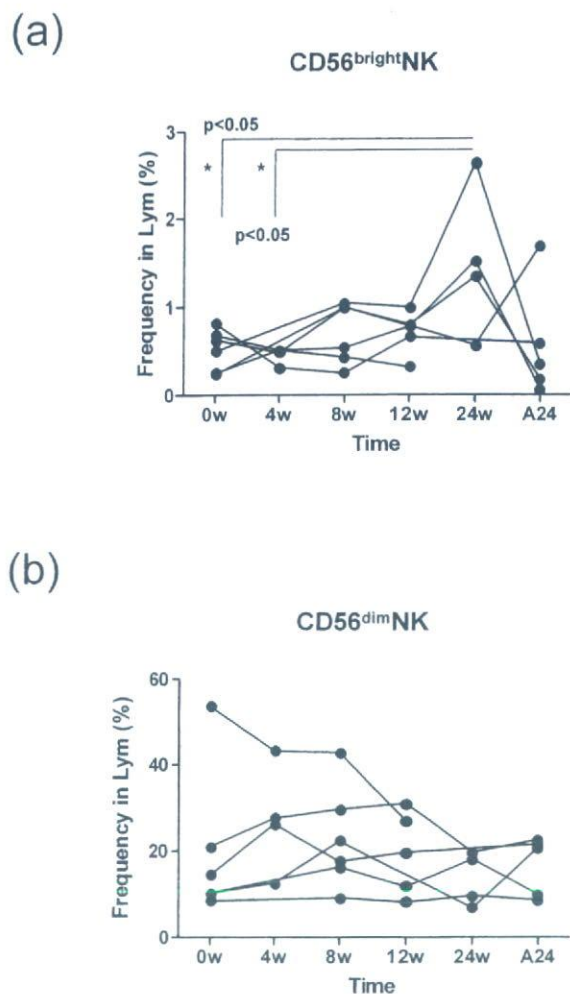


図3. Sero-group 2 HCV 感染症例における抗ウイルス治療期間でのNK細胞動態
治療前後での、NK細胞頻度の変動。CD56^{bright} NK細胞 (a)、およびCD56^{dim} NK細胞 (b)。

シグナルに抑制的に作用する⁸⁾。また、患者においては、末梢血・肝浸潤T細胞の特異的反応が減弱している。一方で、自然治癒した患者群では、年余にわたる反応が観察されていることから、HCVの排除には、宿主免疫の動態が深く関与していると考えられる⁹⁾。NK細胞は、元来、非特異的な作用をもつ、自然免疫応答に分類されており、慢性感染が成立した環境では、あまり重要視されてこなかった。しかし、近年では、C型慢性肝炎でのNK機能低下や、樹状細胞とNK細胞の相互作用が、取り上げられるようになった^{10,11)}。今回われわれは、未治療状態、および24週治療群の経時的サ

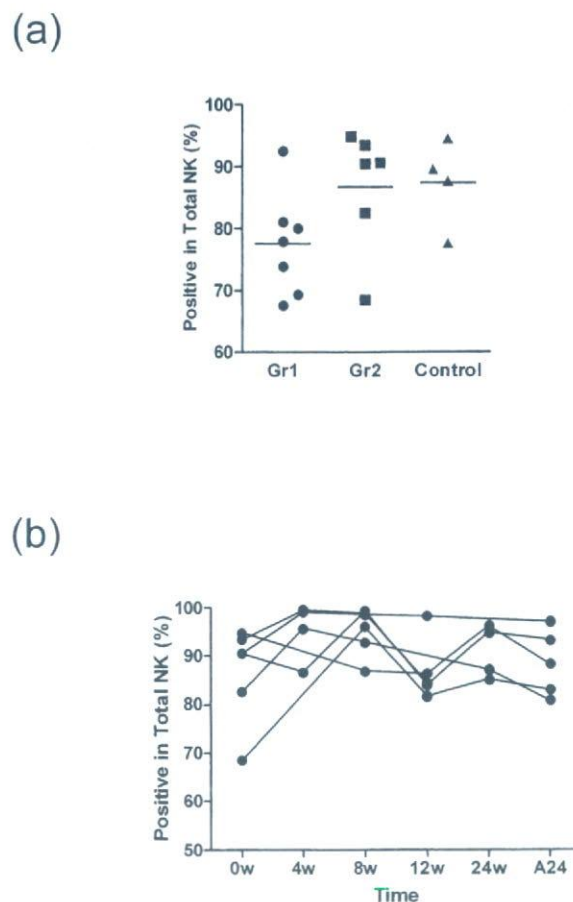


図4. NK細胞におけるNKG2D発現頻度の比較と推移
治療前の症例グループ間比較 (a)、sero-group 2の抗ウイルス治療前後での経時的変動 (b)。

ンプルをもちいて、NK細胞関連分画とマーカーについて検討をおこなった。

未治療での総NK細胞は、群間にて、有意差を認めなかったが、Gr2の1例を除けば、Gr1, Gr2ともに、C型慢性肝炎では、コントロールに比して、ややNK細胞が減少しており、既報にも合致する。NK細胞の数的な減少についての報告は、散見されるが^{12,13)}、その原因や、個々の細胞の細胞傷害能については、未だ議論の最中である。今回われわれは、コントロールに健常者ではなく、持続的な肝障害があると考えられる、B型慢性肝炎をもちいたが、仮に症例数の増加などにより、有意な差が得られれば、このNK細胞の減少は、肝炎によるものではなく、HCV感染特異的な事象と

捉えることができよう。

また、興味深いことにNK細胞の亜分画でみた場合、CD56^{bright}NKは、Gr1において、他群より、有意に高頻度であった。マウスのみならずヒトにおいても、CD56発現強度によって、亜分画が分類されることが明らかとなり、その分化過程や、意義などについての研究が盛んにおこなわれているところであるが、NK細胞のほとんどは、細胞表面のCD56が中程度発現し(CD56^{dim})、さらにCD16(FcγRIII)陽性である。CD16陽性細胞は細胞傷害能という、古典的なNK細胞活性を強く示す一方、総NK細胞の10%未満を占める、CD56^{bright}NKは、むしろサイトカイン産生が盛んであり、immuno-regulatory NKと呼ばれることもある⁶⁾。Gr1症例は、HCV genotype 1の感染に相当し、既存治療に対して、ウイルス排除率(SVR)が低い(表1)。GenotypeとNK分画の検討は、これまでに報告がないが、治療抵抗性の一因として、CD56^{bright}NKの増加と、その産生サイトカインにより、免疫的に制御されている可能性がある。

Gr2症例については、標準の治療期間が24週間のため、全6例にて治療中と判定時点でのフォローアップし得た。このなかでCD56^{bright}NK細胞は、治療開始前と4週後から徐々に増加し、24週後をピークにして、その後は減少した。HIV/HCV共感染の治療における検討でも同様の報告があり、HIV量がコントロールされているなかでの、インターフェロン治療によって、HCV複製が効率的に治まった結果としているものの、治療終了後に再び前値に戻る傾向がみられることから¹²⁾、長期間の外因性インターフェロンによる、骨髓あるいは未熟NK細胞への直接作用かもしれない。

NK細胞活性を調節するシグナルには、killer immunoglobulin-like receptorなどの抑制性レセプターが多く知られているが、NKG2D(CD314)は活性化レセプターであり、標的細胞のMHC class I-related molecules (MIC) A/Bに反応するとされている^{14,15)}。われわれは、今回の症例において、細胞レベルでのNK活性化レセプター発現が関連しているかどうかを検討した。残

念ながら有意差はみられなかったが、Gr1では発現頻度がやや低いように思われた。これについては、今後、症例数の増加を含めた検討が必要である。

結 論

CD56^{bright}NK細胞は、HCV genotype 1感染例で高頻度にみられるほか、抗ウイルス治療中に増加することから、C型慢性肝炎の病態に密接にかかわっている可能性がある。

文 献

- 1) Liang, T.J., Rehermann, B., Seeff, L.B., Hoofnagle, J.H.: Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C, *Ann. Intern. Med.*, **132**, 296-305, 2000
- 2) Manns, M.P., Foster, G.R., Rockstroh, J.K., Zeuzem, S., Zoulim, F., Houghton, M.: The way forward in HCV treatment—finding the right path, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **6**, 991-1000, 2007
- 3) Biron, C.A.: Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections, *Semin. Immunol.*, **10**, 383-390, 1998
- 4) Kakumu, S., Yoshioka, K., Wakita, T., Ishikawa, T., Takayanagi, M., Higashi, Y.: A pilot study of ribavirin and interferon beta for the treatment of chronic hepatitis C, *Gastroenterology*, **105**, 507-512, 1993
- 5) Biron, C.A.: Activation and function of natural killer cell responses during viral infections, *Curr. Opin. Immunol.*, **9**, 24-34, 1997
- 6) Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Turner, S.C., Chen, K.S., Ghaheri, B.A., Ghayur, T., et al.: Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56 (bright) subset, *Blood*, **97**, 3146-3151, 2001
- 7) Yonekura, K., Ichida, T., Sato, K., Yamagiwa, S., Uchida, M., Sugahara, S., et al.: Liver-infiltrating CD56 positive T lymphocytes in hepatitis C virus infection, *Liver*, **20**, 357-365, 2000
- 8) Gale, M., Jr., Foy, E.M.: Evasion of intracel-

- lular host defence by hepatitis C virus, *Nature*, **436**, 939-945, 2005
- 9) Rehermann, B., Nascimbeni, M.: Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection, *Nat. Rev. Immunol.*, **5**, 215-229, 2005
 - 10) Corado, J., Toro, F., Rivera, H., Bianco, N.E., Deibis, L., De Sanctis, J.B.: Impairment of natural killer (NK) cytotoxic activity in hepatitis C virus (HCV) infection, *Clin. Exp. Immunol.*, **109**, 451-457, 1997
 - 11) Jinushi, M., Takehara, T., Kanto, T., Tatsumi, T., Groh, V., Spies, T., et al.: Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection, *J. Immunol.*, **170**, 1249-1256, 2003
 - 12) Gonzalez, V.D., Falconer, K., Michaelsson, J., Moll, M., Reichard, O., Alaeus, A., et al.: Expansion of CD56⁻ NK cells in chronic HCV/HIV-1 co-infection: reversion by antiviral treatment with pegylated IFNalpha and ribavirin, *Clin. Immunol.*, **128**, 46-56, 2008
 - 13) Kawarabayashi, N., Seki, S., Hatsuse, K., Ohkawa, T., Koike, Y., Aihara, T., et al.: Decrease of CD56(+)T cells and natural killer cells in cirrhotic livers with hepatitis C may be involved in their susceptibility to hepatocellular carcinoma, *Hepatology*, **32**, 962-969, 2000
 - 14) Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., et al.: Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA, *Science*, **285**, 727-729, 1999
 - 15) Lanier, L.L.: NK cell recognition, *Annu. Rev. Immunol.*, **23**, 225-274, 2005

血液透析患者のナチュラルキラー細胞に対する C型肝炎ウイルス感染の影響について

昆 吏規¹, 椎名正明², 大高徹也^{3,4}, 大橋洋一⁴,
佐藤孝臣⁵, 佐藤寿伸⁶, 小林光樹¹

¹東北大学大学院医学系研究科 保健学専攻 がん看護学

²東北大学大学院医学系研究科 消化器病態学

³東北大学大学院医学系研究科 保健学専攻 検査技術科学コース

⁴公立刈田総合病院

⁵宏人会木町病院

⁶東北大学附属病院 血液浄化療法部

Evaluation of Natural Killer Cells in Hemodialysis Patients with Hepatitis C Virus Infection

Satonori KON¹, Masaaki SHIINA², Tetsuya OOTAKA^{3,4}, Yoichi OHASHI⁴,
Takaomi SATO⁵, Toshinobu SATO⁶ and Koju KOBAYASHI¹

¹Department of Oncology Nursing, Tohoku University Graduate School of Medicine

²Department of Gastroenterology, Tohoku University Graduate School of Medicine

³Course of Medical Technology, Tohoku University Graduate School of Medicine

⁴Katta General Hospital

⁵Kojinkai Kimachi Hospital

⁶Department of Hemodialysis, Tohoku University Hospital

Key words: hepatitis C virus, natural killer cell, hemodialysis, cytokine, flow cytometry

High incidence of tuberculosis and malignancies in hemodialysis patients suggests the disturbance of cellular immunity in these patients. The high prevalence of hepatitis C virus infection has also been reported in hemodialysis units. In this report, we evaluate natural killer cells in hemodialysis patients with hepatitis C virus infection. Nine hemodialysis patients were included in this study; 5 were hepatitis C virus RNA positive (mean age, 50.4 years) and 4 patients were negative for hepatitis C virus RNA (mean age, 65.0 years). Natural killer cells were detected by flow cytometry after staining with fluorescence-conjugated monoclonal antibodies (anti-CD3 and anti-CD56). Populations of total CD3⁺CD56⁺, CD3⁺CD56^{dim} in lymphocyte fraction were 17.5±11.0%, 15.5±10.8% in hepatitis C virus-positive patients, and they were significantly lower than those in uninfected patients (35.0±14.0% and 34.3±14.2%). However, there was no statistical difference in CD3⁺CD56^{bright} population between the groups. Up-regulation of CD69 expression after stimulation with anti-CD16 was observed and there was no statistical difference between the two groups.

Cytokine production after anti-CD16 stimulation was not statistically different between the two groups. In conclusion, although hepatitis C virus infection may affect natural killer cell population in hemodialysis patients, the functions of natural killer cells as evaluated by the activation and cytokine production were well maintained in patients with hepatitis C virus infection.

はじめに

C型肝炎ウイルス (HCV) は、主に血液を介して伝播する RNA ウィルスである。HCV は肝細胞と一部のリンパ球を標的細胞とし、宿主の免疫機構やインターフェロン (IFN) からエスケープして持続感染を引き起こす。また、ヒトの肝臓に感染すると、70-80% と高率に持続感染へと移行する。これにより引き起こされるのが、C型慢性肝炎である。また、C型慢性肝炎の 30-60% は肝硬変、肝癌に進行する。

血液透析患者は、健常人と比較してその細胞性免疫能が低下し、発癌率や結核罹患率が高いことが報告されている¹⁾。また、血液透析患者の 10-20% は、HCV 感染が血清学的に証明されるとされている^{2,3)}。

ナチュラルキラー (NK) 細胞は、大型顆粒リンパ球で、抗原やサイトカインなどの前感作なしに標的細胞を傷害する、自然免疫細胞である。NK 細胞の主な役割は、正常な自己の MHC を発現していない感染細胞や腫瘍細胞を認識して細胞障害をもたらすことである。最近、NK 細胞には 2 つの亜集団が存在し、CD56 発現強度の違いにより、CD56^{bright}NK 細胞、CD56^{dim}NK 細胞に分類されることが想定されるようになり、CD56^{bright}NK 細胞は主にサイトカインを産生し、CD56^{dim}NK 細胞は主に細胞障害性があるとされている⁴⁾。

今回、血液透析患者の NK 細胞に対する C 型慢性肝炎の影響について検討したので報告する。

対象と方法

本研究には、宮城県の 2 施設で血液透析を受けている慢性腎不全患者 9 例を対象とした。内訳は、男性：6 名、女性：3 名、年齢 34~72 歳 (平均年齢：56.9 歳) であった。慢性腎不全の原疾患は慢

性糸球体腎炎 6 名、糖尿病性腎症 1 名、逆流性腎症 1 名、IgA 腎症 1 名、ネフローゼ症候群 1 名であった。本研究は、東北大学医学部及び両施設の倫理委員会の承認を得た後に、研究に参加する各個人よりインフォームド・コンセントを得て実施した。

HCV 感染の判定は、HCV 抗体測定 (第 3 世代 HCV 抗体検査、ロッシュ・ダイアグノースティックス、東京) 及び HCV RNA アンプリコア定量ハイレンジ法 (ロッシュ・ダイアグノースティックス) で行い、両者ともに陽性の症例を HCV 感染者とした。

1) 細胞分離及び培養

採血した新鮮末梢血から Ficoll 比重遠心法により、末梢血単核球 (PBMC) を分離した。5% FBS 加 RPMI1640 培地 (GIBCO Invitrogen cell culture, 東京) を用いて、PBMC を 2×10^6 /ml に調節し、24 穴培養プレート (BD biosciences, San Jose, CA) にて、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で 16 時間培養した。刺激には、抗 CD16 抗体 (BD biosciences, U.S.A.) 1 μ g/ml を用いた。細胞内染色にあたっては、培養終了 6 時間前に 1 μ g/ml の GolgiPlug (BD Biosciences) を添加した。

2) 染色

表面染色

5×10^5 cells の PBMC を遠心洗浄 (300 \times g, 6 分間) し、染色バッファー (0.1% ウシ血清アルブミン添加リン酸緩衝液) に懸濁させ、FITC 標識-抗 CD3 抗体 (BD Biosciences)、APC 標識-抗 CD56 抗体 (Miltenyi Biotec, Germany)、PE 標識-抗 CD69 抗体 (BD Biosciences) を添加し、よく混和した後、氷上遮光で 30 分インキュベートした。染色バッファーにて遠心洗浄した後、1% パラホルムアルデヒドで固定した。

細胞内染色

培養した PBMC を遠心洗浄し, Per CP 標識-抗 CD3 抗体, APC 標識-抗 CD56 抗体を添加し, よく混和した後, 氷上遮光で 30 分インキュベートした。染色バッファーにて遠心洗浄した後,

Cytofix/CytoPerm 及び Perm/Wash (いずれも BD Biosciences) を用いて, 細胞膜透過処理を行った。その後, PBMC を遠心洗浄後, FITC 標識-抗 IFN γ 抗体 (BD Biosciences), PE 標識-抗 TNF α 抗体 (BD Biosciences) を添加し, よく混和した後, 氷上遮光で 30 分インキュベートした。Perm/Wash にて遠心洗浄した後, 1% パラホルムアルデヒドで固定した。

3) フローサイトメーターの解析

FACS Calibur (BD Biosciences) を測定, 解析に用いた。Forward scatter/Side scatter プロットにおけるリンパ球集団について, 解析プロットにおける CD3-CD56⁺ を NK 細胞と定義した (図 1, a+b)。CD56 の発現強度の違いにより, 発現強度の高い亜集団を CD56^{bright} NK 細胞 (図 1, a), 低い亜集団を CD56^{dim} NK 細胞 (図 1, b) と分類し, また, CD3⁺CD56⁺ をナチュラルキラー T (NKT) 細胞とした (図 1, c)。NK 細胞のうち, CD69 を発現しているものを活性化 NK 細胞とした (図 2-B, d)。細胞内染色では, CD3-CD56⁺ の NK 細胞における IFN γ , TNF α の発現を解析した (図 3-B)。アイソタイプ・コントロールとしてマウス IgG₁, PE, IgG_{2b} FITC (いずれも BD Biosciences) を使用した (図 2-A, 図 3-A)。

統計学的有意差の検討には, SPSS ver.17

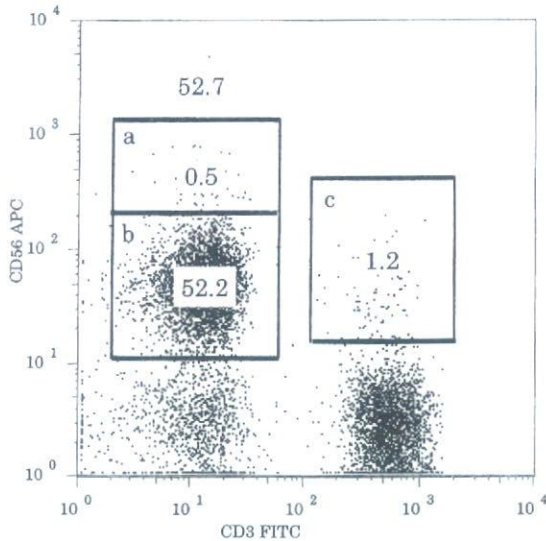


図 1. NK 細胞集団の解析
末梢血リンパ球における代表的な CD3/CD56 の染色例。a+b の範囲を NK 細胞 (CD3-CD56⁺), a の範囲を CD56^{bright} NK 細胞, b の範囲を CD56^{dim} NK 細胞として解析を行った。c の範囲を NKT 細胞 (CD3⁺CD56⁺) として解析を行った。

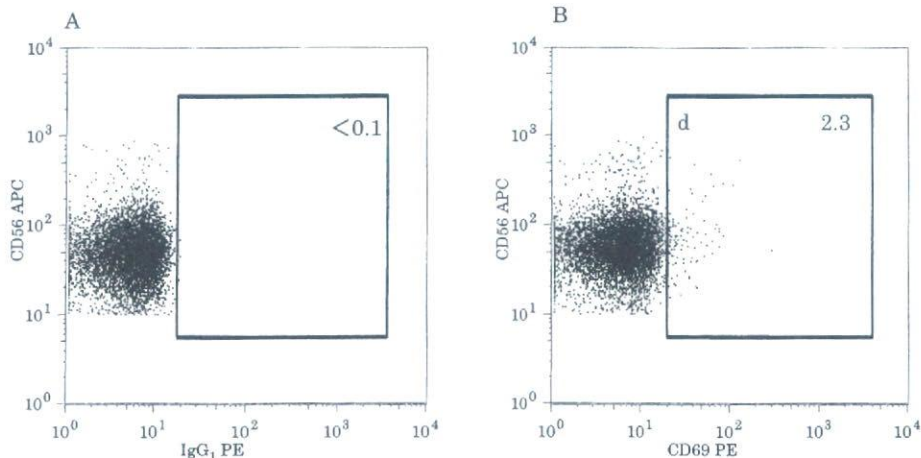


図 2. NK 細胞における CD69 発現の解析
NK 細胞 (CD3-CD56⁺) における CD69 の発現の解析結果を示す。アイソタイプ・コントロール (IgG₁ PE) のプロットを基に (図 2-A), 図 2-B の d のゲートを設定し, 活性化 NK 細胞 (CD3-CD56⁺CD69⁺) として解析を行った。

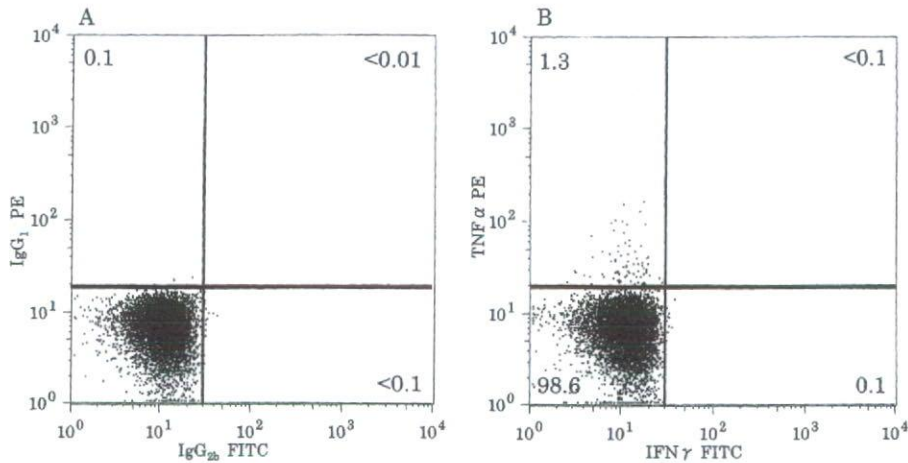


図3. 細胞内染色の解析
 抗 CD16 抗体にて刺激培養を行った検体における NK 細胞 (CD3-CD56⁺) の細胞内染色例。アイソタイプ・コントロール (IgG₁ PE および IgG_{2a} FITC, 図 3-A) の染色結果をもとに, 図 3-B の如くゲートを設定し IFN γ 産生と TNF α 産生を測定した。IFN γ 産生性 NK 細胞 0.1%, TNF α 産生性 NK 細胞 1.3%, IFN γ +TNF α 産生性 NK 細胞<0.1%であった。

表1. HCV 感染群と非感染群の臨床的特徴

項目	HCV(+)	HCV(-)	統計検定 (p)
症例数	5	4	N.S.
年齢 (歳)	50.4±12.6	65.0±6.7	N.S.
性別 男性:女性	3:2	3:1	N.S.
透析期間 (月)	195.6±154.8	126.3±74.1	N.S.

N.S.: not significant

(SPSS Statistics 社, 東京)を用い, $p < 0.05$ を統計学的有意差ありと判定した。

結 果

1) HCV 感染群と非感染群の臨床的特徴の比較

HCV 感染群と非感染群の臨床的特徴を表 1 に示す。両群間で, 有意差が認められるものはなかったが, HCV 非感染群と比較して HCV 感染群では, 年齢が低く, 透析期間が長い傾向にあった。また, 原疾患は HCV 感染群が慢性糸球体腎炎 2 名, 糖尿病性腎症 1 名, 逆流性腎症 1 名, ネフローゼ症候群 1 名, HCV 非感染群が慢性糸球体腎炎 3 名, 糖尿病性腎症 1 名, IgA 腎症 1 名で, 2 群間に有意差は認められなかった。

2) 新鮮リンパ球における NK 細胞集団の解析の比較

新鮮リンパ球の表面染色における NK 細胞集団の解析を表 2 に示す。全リンパ球中の NK 細胞比率, 全リンパ球中の CD56^{dim}NK 細胞比率は有意差をもって, HCV 感染群が低かった。また, 全リンパ球中の CD56^{bright}NK 細胞比率, NK 細胞中の CD56^{bright}NK 細胞比率, NK 細胞中の CD69 陽性比率に有意差は認められないが, HCV 感染群の方が高い傾向にあった。NK 細胞中の CD56^{dim}NK 細胞比率は, HCV 感染群の方が低い傾向にあった。

表には示していないが, 全リンパ球中の NKT 細胞比率に有意差は認められなかった。(HCV 感染群 1.7 ± 0.8 , HCV 非感染群 4.1 ± 5.0)

表 2. 新鮮リンパ球における NK 細胞集団の解析

測定項目	HCV (+) (%)	HCV (-) (%)	統計検定 (<i>p</i>)
全リンパ球中の NK 細胞比率	17.5±11.0	35.0±14.0	<i>p</i> <0.05
全リンパ球中の CD56 ^{bright} NK 細胞比率	2.0±2.8	0.7±0.4	N.S.
NK 細胞中の CD56 ^{bright} NK 細胞比率	14.6±15.5	2.6±2.2	N.S.
全リンパ球中の CD56 ^{dim} NK 細胞比率	15.5±10.8	34.3±14.2	<i>p</i> <0.05
NK 細胞中の CD56 ^{dim} NK 細胞比率	85.1±15.5	97.7±2.1	N.S.
NK 細胞中の CD69 陽性比率	4.2±4.2	2.1±0.6	N.S.

N.S.: not significant

表 3. 培養後リンパ球における NK 細胞集団の解析

測定項目	刺激	HCV (+) (%)	HCV (-) (%)	統計検定 (<i>p</i>)
全リンパ球中の NK 細胞比率	—	25.3±17.5	37.1±15.1	N.S.
	Anti-CD16	17.5±10.9	34.2±15.0	N.S.
全リンパ球中の CD56 ^{bright} NK 細胞比率	—	2.8±4.3	0.8±0.3	N.S.
	Anti-CD16	2.7±4.5	0.8±0.5	N.S.
全リンパ球中の CD56 ^{dim} NK 細胞比率	—	22.5±16.5	36.2±15.3	<i>p</i> <0.05
	Anti-CD16	14.8±8.1	34.2±15.0	N.S.
NK 細胞中の CD69 陽性比率	—	6.5±5.3	2.7±0.5	N.S.
	Anti-CD16	50.6±25.0	38.5±23.2	N.S.

*1,*2: *p*<0.05

N.S.: not significant

表 4. 細胞内染色を用いた NK 細胞のサイトカイン産生能の検討

測定項目	刺激	HCV (+) (%)	HCV (-) (%)	統計検定 (<i>p</i>)
IFN γ 産生性 NK 細胞	—	0.3±0.2	0.2±0.1	N.S.
	Anti-CD16	0.2±0.1	0.1±0.1	N.S.
TNF α 産生性 NK 細胞	—	1.0±0.7	0.5±0.2	N.S.
	Anti-CD16	0.7±0.3	1.1±0.6	N.S.

N.S.: not significant

3) 培養後リンパ球における NK 細胞集団の解析の比較

抗 CD16 抗体刺激と無刺激下で、16 時間培養後のリンパ球の表面染色における NK 細胞集団の解析を表 3 に示す。無刺激での全リンパ球中の CD56^{dim}NK 細胞比率は、HCV 非感染群に比較して、HCV 感染群で有意に低かった。また、両群と

も、無刺激に比較して、抗 CD16 抗体刺激では NK 細胞中の CD69 陽性率は有意に高くなっていた。

4) NK 細胞のサイトカイン産生能の検討

刺激のもと、16 時間培養後のリンパ球の細胞内染色におけるサイトカイン産生能の検討を表 4 に示す。無刺激、抗 CD16 抗体ともに有意差は認められなかった。

考 察

新鮮リンパ球におけるNK細胞集団の解析においては、全リンパ球中のNK細胞比率がHCV感染群の方が有意に低かった。この結果は慢性腎不全を合併していないC型慢性肝炎症例を対象としたLinら⁵⁾の報告と同様の結果であった。また、今回の検討では、NK細胞中のCD56^{bright}NK細胞比率がHCV感染群で高く、NK細胞中のCD56^{dim}NK細胞比率がHCV感染群で低い傾向にあったのに対して、Linらの報告ではNK細胞中のCD56^{bright}NK細胞比率がHCV感染群で有意に高く、NK細胞中のCD56^{dim}NK細胞比率がHCV感染群で有意に低い結果であった。この点は今回検討した透析症例での特徴であるのか、今後の検討が必要と考えられる。また、今回の検討では、全リンパ球中のNK細胞比率は、HCV感染群、非感染群ともにLinらの研究に比較して高かったが、血液透析患者の全リンパ球中のNK細胞比率は、健常者と比較して有意に高いことが報告されており⁶⁾、このためと考えられる。また、HCV感染群、非感染群の2群間で活性化NK細胞比率に有意差は認められないが、HCV感染群の方が高い傾向にあった。しかし、従来の検討では、HCV感染群の方が活性化NK細胞は低いと報告されている⁵⁾。今回の結果は、活性化NK細胞は加齢により低下する⁷⁾ため、HCV非感染群の活性化NK細胞比率は年齢の影響を受けた可能性が考えられる。また、健常者のNK細胞中のCD56^{dim}NK細胞比率は95.5±3.1%で、透析症例のHCV非感染群の値とほぼ同様であった。このことより、NK細胞中のCD56^{dim}NK細胞比率が低下しているのは、透析導入によるものではなく、HCV感染によるものであると考えられる。透析患者は、輸血歴がある患者や長期透析患者がHCVに感染する比率が高いこと⁸⁾が報告されており、また、観血的な透析操作、頻回の医療行為などHCVに曝露される機会も多く、透析室内での水平感染の可能性が考えられる。

CD16は、免疫グロブリン(IgG)のFc部分と結合する、Fcレセプターであり、主に、NK細胞

活性化や抗体依存性細胞障害(ADCC)に関わっている⁹⁾。今回の検討で、抗CD16抗体刺激で16時間培養したNK細胞のCD69陽性率は、無刺激のものと比較して、HCV感染群、非感染群ともに有意に高くなっていた。しかし、抗CD16抗体刺激で16時間培養後のリンパ球におけるNK細胞集団の解析においては、すべての項目でHCV感染群、非感染群の2群間に有意差は認められなかった。また、無刺激で16時間培養後のリンパ球におけるNK細胞集団の解析においては、全リンパ球中のCD56^{dim}NK細胞比率がHCV非感染群と比較して、HCV感染群で有意に低くなっていた。

抗CD16抗体刺激で16時間培養後、細胞内染色を用いたNK細胞のサイトカイン産生能においても、IFN γ 産生性NK細胞及びTNF α 産生性NK細胞で2群間に有意差は認められなかった。CD56^{bright}NK細胞は、CD56^{dim}NK細胞と比較して、有意にIFN γ 、TNF α などのサイトカインを産生する⁴⁾ことが報告されている。今回の検討において、NK細胞に占めるCD56^{bright}NK細胞は、HCV非感染群と比較して、HCV感染群で高い傾向を示す結果であった。CD16は、CD56^{bright}NK細胞と比較して、CD56^{dim}NK細胞に有意に発現している¹⁰⁾ため、抗CD16抗体刺激によるサイトカイン産生能において、2群間に有意差が認められなかった可能性が考えられる。

結 語

9例の慢性血液透析患者に対して、NK細胞を測定し、以下の結果を得た。

1. 新鮮リンパ球の表面染色において、全リンパ球中のNK細胞比率、全リンパ球中のCD56^{dim}NK細胞比率は、HCV非感染群と比較して、HCV感染群で有意に低くなっていた。

2. NK細胞中のCD69陽性率は、新鮮リンパ球及び抗CD16抗体刺激での16時間培養後もHCV感染群、非感染群の2群間に有意差は認められなかった。抗CD16抗体刺激で16時間培養した後、細胞内染色を用いたサイトカイン産生能では、HCV感染群、非感染群の2群間に有意差は認められなかった。

文 献

- 1) 吉田栄一：長期血液透析患者と悪性新生物発生に関する研究，日本臨床免疫学会会誌，**9**，197-205，1986
- 2) 小林光樹，佐藤寿伸，上野義之，木村朋由：透析患者のC型肝炎感染リスクと予後に関する研究，厚生労働科学研究肝炎等克服緊急対策研究事業透析施設におけるC型肝炎院内感染の状況・予後・予防に関する研究 平成19年度総括・分担研究報告書，133-142，2008
- 3) 島田俊夫，公受伸之，村上 陽，石橋 豊：高感度心筋トロポニンTによる慢性血液透析患者の心筋障害スクリーニングとC型肝炎ウイルス感染と心・血管障害の関連について，厚生労働科学研究特定疾患対策研究事業特発性心筋症に関する調査研究班 平成14年度総括・分担研究報告書，95-98，2003
- 4) Jacobs, R., Hintzen, G., Kemper, A., Beul, K., Kempf, S., Behrens, G., Sykora, K.-W., Schmidt, R.E.: CD56^{bright} cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56^{dim} NK cells, *Eur. J. Immunol.*, **31**, 3121-3126, 2001
- 5) Lin, A.W., Gonzalez, S.A., Cunningham-Run-
dles, S., Dorante, G., Marshall, S., Tignor, A., Ha, C., Jacobson, I.M., Talal, A.H.: CD56^{dim} and CD56^{bright} cell activation and apoptosis in hepatitis C virus infection, *Clin. Exp. Immunol.*, **137**, 408-416, 2004
- 6) Daichou, Y., Kurashige, S., Hashimoto, S., Suzuki, S.: Characteristic Cytokine Products of Th1 and Th2 Cells in Hemodialysis Patients, *Nephron*, **83**, 237-245, 1999
- 7) 大森景文：ヒトの natural killer cell，感染・炎症・免疫，**9**，168-174，1979
- 8) 菊池 勤，秋葉 隆，新田孝作：慢性血液透析患者におけるC型肝炎ウイルス感染のサーベイランス，東京女子医科大学雑誌，**76**，92-97，2006
- 9) Golden-Mason, L., Rosen, H.R.: Natural Killer Cells: Primary Target for Hepatitis C Virus Immune Evasion Strategies, *Liver Transplant.*, **12**, 363-372, 2006
- 10) Golden-Mason, L., Madrigal-Estebas, L., McGrath, E., Conroy, M.J., Ryan, E.J., Hegarty, J.E., O'Farrelly, C., Doherty, D.G.: Altered natural killer cell subset distribution in resolved and persistent hepatitis C virus infection following single source exposure, *Gut*, **57**, 1121-1128, 2008

Analysis of the Entire Nucleotide Sequence of Hepatitis B Causing Consecutive Cases of Fatal Fulminant Hepatitis in Miyagi Prefecture Japan

Futoshi Nagasaki,¹ Yoshiyuki Ueno,^{1*} Hirofumi Niitsuma,¹ Jun Inoue,¹ Takayuki Kogure,¹ Koji Fukushima,¹ Koji Kobayashi,² and Tooru Shimosegawa¹

¹Division of Gastroenterology, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan

²Tohoku University School of Health Sciences, Comprehensive Research and Education Center for Planning of Drug Development and Clinical Evaluation, Sendai, Japan

We encountered five consecutive patients with fulminant hepatitis induced by acute hepatitis B virus (HBV) infection in 2000–2001 in Japan. They had not had previous contact each other, and were referred to us from different hospitals. Although a 69-year-old woman could be rescued by intensive internal treatment, the four patients died. We analyzed the partial (nt 278–646) and entire nucleotide sequences of the HBV obtained from them, and their divergences were 0–0.3% and 0–0.2%, respectively. The results suggested that they had been infected with the same HBV isolates. The isolates belonged to genotype B and subgenotype B2 on the phylogenetic tree analysis (AB302942–AB302946). As for the nucleotides sequences of them, previously reported mutations of G1896A, A1762T, and G1764A were present. Amino acid analysis revealed that previously reported Ile97-Leu and Pro130Non-Pro in the core region and Trp28Stop in the precore region were present. As for the entire nucleotide sequences among B2, AB302942 showed low divergences with AF121245 and AB073834 (1.7%), and X97850 from patients with fulminant hepatitis (3.2%). We compared the two consensus nucleotides derived from AB302942 and X97850 (fulminant hepatitis) versus AY121245 and AB073834 (non-fulminant hepatitis), which revealed a difference in nt 1,504 located in the P and X region. Nucleotide 1,504 was C for isolates from fulminant hepatitis and G for non-fulminant hepatitis, and it was recognized among most of the isolates belonging to B2 registered on GenBank. Further studies could disclose the mechanism of severe inflammation of liver that finally leads to fulminant hepatitis. *J. Med. Virol.* 80:967–973, 2008. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: hepatitis B virus; genotype B; subgenotype B2; fulminant hepatitis

INTRODUCTION

Hepatitis B virus (HBV) infection has a wide spectrum of clinical presentations, including self-limited acute hepatitis, fulminant hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma [Lee, 1997]. The clinical manifestations of HBV infection are related to interactions between the virus and host immune responses to HBV antigens [Chisari and Ferrari, 1995].

HBV is each characterized according to the genotype based on the comparison of entire genomes, with intergroup divergences of more than 8% [Okamoto et al., 1988]. The distribution of genotypes throughout the world includes eight different genotypes of HBV, named A to H, that have been determined to date [Okamoto et al., 1988; Norder et al., 1992]. Recently, HBV strains have been shown to be composed of subgenotypes [Norder et al., 2004]. For example, genotype B (HBV/B) is divided into five subgroups, B1–B5, according to the countries where they are found [Norder et al., 2004; Nagasaki et al., 2006]. Thus, HBV needs to be examined with regards not only to its genotype but also to its subgenotype.

Clinically, there have been some reports that the outcomes vary according to the HBV genotype or subgenotype. For example, as for HBV/B and genotype C (HBV/C), which are commonly found in Asia, HBV/B has been found to cause HBe-seroconversion more frequently than HBV/C, and chronic infected patients with HBV/B appear to have better prognoses [Kikuchi

Grant sponsor: Health and Labour Sciences Research (partial support from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan).

*Correspondence to: Yoshiyuki Ueno, MD, PhD, Division of Gastroenterology, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan E-mail: yueno@mail.tains.tohoku.ac.jp

Accepted 31 January 2008

DOI 10.1002/jmv.21167

Published online in Wiley InterScience
(www.interscience.wiley.com)

et al., 2000]. Furthermore, as for HBV/B, B1 is known to show a good clinical prognosis compared with B2–B5.

Fulminant hepatitis is an often fatal complication of acute HBV infection or acute exacerbation of chronic HBV infection. The pathogenesis is not completely understood and it shows high mortality without liver transplantation. Virologically, the association between of the precore stop mutation (G1896A), the core promoter mutations (A1762T and G1764A) and fulminant hepatitis induced by HBV infection has been recognized [Carman et al., 1989; Aritomi et al., 1998; Friedt et al., 1999]. Similarly, an association between the amino acid Ile97Leu and Pro130Non-Pro in the core region and Trp28Stop in the precore region was previously reported [Kosaka et al., 1991; Aye et al., 1994].

We encountered five consecutive patients with fulminant hepatitis induced by acute HBV infection in 2000–2001. They were all residents of Miyagi prefecture in Japan. We investigated entire nucleotide sequences of the HBV detected in their serum samples and compared them with those of previous reports.

METHODS

Patients

The clinical characters of five patients are shown in Table I. The criteria for fulminant hepatitis induced by HBV infection were the development of hepatic encephalopathy, prolongation of the prothrombin time during the course of hepatitis, and immunoglobulin M antibody to hepatitis B core antigen [Perrillo and Aach, 1981]. They were all referred to our hospital from other clinics or hospitals. They were Japanese and had not had contact with known each other. They had never been abroad, had not met nor had with sexual contacts with foreigners, nor were they intravenous drug abusers. None of them had had prior hepatitis. The 66-year-old male patient (FH-3) had been administered medication for hyperlipidemia and hypertension, and the 71-year-old female patient (FH-4) had been administered medication for hypertension.

Thereafter, all but one patient (FH-4) died despite treatment in the intensive care unit due to multiple organ failure, including liver. We obtained serum samples from them and analyzed their HBV-DNA.

None of these five patients were positive for anti-hepatitis C virus antibody or for serum HCV-RNA (RT-PCR assay, Amplicor qualification assay, Roche Japan, Tokyo, Japan), the presence of which could worsen the outcome of hepatitis B virus infection [Feraf et al., 1993; Sagnelli et al., 2002; Liaw et al., 2004]. In addition, other serum markers related to acute infection of hepatitis A virus, EB virus, and Cytomegalovirus were all negative.

Assays of HBV Related Markers

HBeAg, anti-HBe, and anti-HBc were detected by immunoassays (Abbott Laboratories, N. Chicago, IL).

TABLE I. Clinical Characters and Data of Present Five Patients With Fulminant HBV Infection

Patients	Age	Sex	Onset	Symptom	Admission	Therapy	Outcome (hospital/day)	T-Bil (mg/dl)	ALT (IU/L)	PT (%)	HBsAg anti-HBs	HBsAg (COI)	anti-HBe (%)	anti-HBc (%)	IgM anti-HBc (COI)	HBV-DNA (LGE/ml)
FH-1	69	F	May 29, 2000	Fever, anorexia	June 2, 2000	—	Died (2)	10.2	3,945	8.0	—	— (0.57)	— (98.5)	— (98.5)	— (2.81)	5.6
FH-2	71	M	July 26, 2000	Fever	August 3, 2000	PE	Died (44)	16.8	2,715	38.0	—	— (0.43)	— (97.3)	— (99.0)	— (3.04)	7.5
FH-3	66	M	October 24, 2000	Fever	November 6, 2000	PE, CHDF, mPLS	Died (2)	13.9	6,950	15.0	—	— (0.62)	— (97.1)	— (98.9)	— (2.50)	6.2
FH-4	71	F	September 1, 2000	Epigastralgia	January 4, 2001	—	rescued (50)	9.4	3,380	27.0	—	— (0.53)	— (97.0)	— (82.7)	— (2.95)	4.9
FH-5	60	M	December 12, 2000	Fever, malaise	December 6, 2000	PE	Died (4)	4.4	7,884	24.0	+	— (0.71)	— (70.0)	n.t.	— (2.32)	6.2

HBeAg, anti-HBe, and anti-HBc were detected by immunoassays (positive range, HBeAg ≥ 1.0 ; anti-HBe and anti-HBc ≥ 70.0). IgM anti-HBc was detected by CORE-M-IMx (positive range, COI (cut off index) ≥ 1.0). Serum HBV-DNA levels were measured by transcription-mediated amplification-hybridization protection assay (TMA-HPA; Chugai Diagnostics, Ltd., Tokyo, Japan). Percent in each parenthesis meant for inhibition percent. For details, please see method section in the text.
 F, female; M, male; PE, plasma exchange; CHDF, continuous hemodiafiltration; mPLS, methyl-prednisolone pulse administration; T-Bil, total bilirubin; ALT, alanine aminotransferase; PT, prothrombin time; HBsAg, hepatitis B s antigen; anti-HBs, antibody to hepatitis B s antigen; anti-HBe, hepatitis B e antigen; anti-HBc, antibody to hepatitis B c antigen; IgM anti-HBc, immunoglobulin M antibody to hepatitis c antigen; n.t., not tested; COI, cut off index; LGE, logarithm of the genome equivalent.

IgM anti-HBc was detected by CORE-M-IMx (Abbott Laboratories). Serum HBV-DNA levels were measured by transcription-mediated amplification-hybridization protection assay (TMA-HPA; Chugai Diagnostics, Ltd., Tokyo, Japan) with frozen stocked sera as described previously [Sakugawa et al., 2001; Kobayashi et al., 2007]. The results of this TMA-HPA assay were indicated as logarithm of the genome equivalent (LGE)/ml and its measurable range was 3.7–8.7 LGE/ml (equivalent to HBV-DNA $10^{3.7}$ – $10^{8.7}$ copies/ml).

Amplification of HBV DNA by Polymerase Chain Reaction (PCR)

Nucleic acids were extracted from 200 µl of serum as described previously [Niitsuma et al., 1995]. For analysis of the entire nucleotide sequence, we divided the entire HBV genome into six overlapping segments and amplified each segment. Extracted DNA was subjected to the first round of PCR with each set of primers. PCR was performed with TaKaRa Ex Taq™ (TaKaRa Co. Ltd., Shiga, Japan) for 35 cycles (consisting of denaturation for 1 min at 93°C, annealing for 1 min at 55°C, and extension for 1 min at 74°C), followed by an extension cycle at 74°C for 8 min. The second round of PCR was carried out for 30 cycles consisting of the same protocol as in the first round.

The primers for the first and the second PCR rounds were as previously reported [Shan et al., 2002].

We used the standard numbering system method in this report, with the numbering of the bases commencing at the cleavage site for the restriction enzyme EcoRI in the preS2 region and counting of the full lengths of the 3,215 base pairs.

Nucleotide Sequences of HBV Isolates

We used each set of sequencing primers previously described [Shan et al., 2002]. Direct sequencing of the PCR products was carried out by a fluorescence autosequencer (model 377, PE Japan Applied Biosystems, Chiba, Japan) using a Big Dye Terminator Sequencing Kit (PE Japan Applied Biosystems) according to the manufacturer’s instructions.

Phylogenetic Analysis of the Isolated HBV Clones

Six overlapping segments were joined and phylogenetic determination of the sequences of the HBV clone was performed by the neighbor-joining method

with the aid of ClustalW (DNA Data Bank of Japan; DDBJ, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/clustalw-j.html>).

We compared the present isolated clones with the eight reported HBV clones and confirmed their genotype by phylogenetic analysis. The accession numbers of the clones and genotypes of these HBV sequences used in the analysis were as follows: AB014370 (genotype A); X97850 (genotype B); X75665 (genotype C); J02203 (genotype D); X75664 (genotype E); X75663 (genotype F); AF160501 (genotype G); and AY090457 (genotype H).

RESULTS

Serum Test Findings

All of the patients were IgM class anti-HBc positive, as shown in Table I, and showed severe liver dysfunction, and coagulopathy compatible with fulminant hepatitis.

Entire Genome Sequences Detected From the Present Patients

We determined the entire nucleotide sequences except in one isolate (FH-5). The divergences among the four isolates were 0–0.2% (Table II). As for the partial nucleotide analysis in the HBs region (nt 278–646), all but one isolate were completely matched. Only one isolate (FH-4) demonstrated single different nucleotide.

Phylogenetic Analysis With HBV Entire Genome

We constructed a phylogenetic tree using the present four entire nucleotide sequences and other HBV isolates retrieved from the DNA database (DDBJ/GenBank) as representative genotypes (A, B, C, D, E, F, G, and H) (Fig. 1).

The genotype was B. The HBV/B isolates detected worldwide are divided into five subgenotypes: B1, B2, B3, B4, and B5; the present subgenotype was B2.

Comparison of the Nucleotides and Amino Acids of AB302942 With the Isolates From Previous Reports

Some nucleotide and amino acid mutations related to HBV fulminant hepatitis were previously reported [Carman et al., 1989; Aritomi et al., 1998; Sterneck et al., 1998; Friedt et al., 1999; Yuasa et al., 2000]. As for the nucleotides sequences of AB302942, the mutations of

TABLE II. Percentage Divergences of Entire HBV Nucleotide Sequences Among the Five Isolates From the Present Patients and Other HBV Isolates Registered on GenBank

Patient	Accession number	Accession number (country)						
		AB302942 (Japan)	AB302942 (Japan)	AB302942 (Japan)	AB302942 (Japan)	AF121245 (Vietnam)	AB073834 (Vietnam)	X97850 (China)
FH-1	AB302942	—	0.1	0	0.2	1.7	1.7	3.2
FH-2	AB302943	—	—	0.1	0.2	1.7	1.7	3.1
FH-3	AB302944	—	—	—	0.2	1.7	1.7	3.2
FH-4	AB302945	—	—	—	—	1.7	1.7	3.2