

- 1 Pei Z, Shi G, Kondo S, Ito M, Maekawa A, Suzuki M, Saito I, Suzuki T and Kanegae Y. Adenovirus vectors lacking virus-associated RNA expression enhance shRNA activity to suppress hepatitis C virus replication. *Scientific Rep.*, 2013, 3, 3575.
 - 2 Maekawa A, Pei Z, Suzuki M, Fukuda F, Kondo S, Saito I and Kanegae Y. Efficient production of adenovirus vector lacking genes of virus-associated RNAs that disturb cellular RNAi machinery. *Scientific Rep.*, 2013, 3, 1136.
2. 学会発表
- 1 近藤小貴、宿主 RNAi 経路に影響を与える virus-associated RNA を欠失したアデノウイルスベクターの高効率作製法、第 19 回日本遺伝子治療学会学術集会、岡山、7 月 4-6 日、2013
 - 2 近藤小貴、アデノウイルスベクターから発現しているウイルス由来 miRNAs は細胞増殖関連遺伝子を制御する、第 72 回日本癌学会学術総会、横浜、10 月 3-5 日、2013
 - 3 Zheng Pei, Aya Maekawa, Mariko Suzuki, Yumi Kanegae, Saki Kondo, Izumu Saito, Therapeutic strategy of HBV using VA-deleted adenovirus vectors dually expressing shRNA and interferon. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses, Fudan University, Shanghai, October 20-23, 2013.
 - 4 Yumi Kanegae, Aya Maekawa, Zheng Pei, Mariko Suzuki, Saki Kondo, Izumu Saito, Dual-safe adenovirus vector lacking virus-associated RNA genes enhanced shRNA activity. The 21th European Society of Gene and Cell Therapy collaborative Congress 2013, Palacio Municipal de Congresos de Madrid, Madrid, October 25-28, 2013.
 - 5 Saki Kondo, Aya Maekawa, Mariko Suzuki, Yumi Kanegae, Izumu Saito, First-generation adenovirus vector expresses viral-associated (VA) RNAs that disturb cellular gene expressions. The 21th European Society of Gene and Cell Therapy collaborative Congress 2013, Palacio Municipal de Congresos de Madrid, Madrid, October 25-28, 2013.
 - 6 Aya Maekawa, Zheng Pei, Mariko Suzuki, Saki Kondo, Izumu Saito, Yumi Kanegae, Very efficient production of adenovirus vector lacking genes of virus-associated RNAs that disturb cellular RNAi machinery: safer alternative to current vector. The European Society of Gene and Cell Therapy 2013 Annual Meeting, Palacio Municipal de Congresos, Spain/Madrid, October 25-28, 2013.
 - 7 近藤小貴、アデノウイルスベクターから常に発現している virus-associated (VA) RNA は標的細胞内の遺伝子発現に影響を与える、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、11 月 10-12 日、2013
 - 8 鈴木まりこ、アデノウイルスベクターの目的遺伝子挿入領域と向きはベクター作製や発現効率に影響を与えるか：Dual 発現 vector 作製に向けた検討、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、11 月 10-12 日、2013
 - 9 近藤小貴、アデノウイルスベクターの問題点：ベクターがコードする Virus-associated (VA) RNA は宿主遺伝子発現に影響を与える、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 3-6 日、2013
 - 10 裴崢、1 つの細胞に多数の DNA コピーを導入できるマルチコピーを保持したコスミドのトランスフェクションにおける有用性：B 型肝炎ウイルスゲノム複製研究への応用、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 3-6 日、2013
 - 11 前川 文、細胞特異的長期発現持続型 mini-adenovirus vector (mini-AdV) の開発、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 3-6 日、2013

12 鈴木まりこ、E3 領域への目的遺伝子の挿入はアデノウイルスベクターの作製効率に影響を与えるか：ベクター／目的遺伝子キメラ mRNA の生成、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 3-6 日、2013

H. 知的所有権の出願・登録状況特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
柘植雅貴 茶山一彰	HBV の感染実験系	田中榮司 竹原徹郎 持田智	Hepatology Practice 第1巻 B型肝炎の診療	文光堂	東京	2013	185-192
柘植雅貴 茶山一彰	B型肝炎、D型肝炎	浅香正博 菅野健太郎 千葉勉	カラー版 消化器病学	西村書店	東京	2013	1150-1155
渡邊綱正 田中靖人	B型肝炎ウイルス (HBV)研究の進歩	林紀夫 日々紀文 上西紀夫 下瀬川徹	Annual Review 消化器 2014	中外医学 社	東京	2014	99-103

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻	ページ	出版年
Kato N, (加藤)	Genetic characterization of hepatitis C virus in long-term RNA replication using Li23 cell culture systems.	PLoS One	9	e91156	2014
Mori K, (加藤)	Adenosine kinase is a key determinant for the anti-HCV activity of ribavirin.	Hepatology	58	1236-1244	2013
Dansako H, (加藤)	Class A scavenger receptor 1 (MSR1) restricts hepatitis C virus replication by mediating toll-like receptor 3 recognition of viral RNAs produced in neighboring cells.	PLoS Pathogens	9	e1003345	2013
Tsugawa Y., Kato H., Fujita T., Shimotohno K., <u>Hijikata M</u>	Critical role of interferon- α constitutively produced in human hepatocytes in response to RNA virus infection	PLoS ONE		DOI: 10.1371/journal.pone.0089869	2014

Katoh H, Okamoto T, Fukuhara T, Kambara H, Morita E, Mori Y, Kamitani W, <u>Matsuura Y.</u>	Japanese Encephalitis Virus Core Protein Inhibits Stress Granule Formation through an Interaction with Caprin-1 and Facilitates Viral Propagation.	J.Virol.	87	489-502	2013
Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, <u>Matsuura Y,</u> Wakita T, Suzuki T.	Signal peptidase complex subunit 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with E2 and NS2	PLoS Pathog		doi:10.1371/journal.pat.1003589	2013
Lee H, Komano J, Saitoh Y, Yamaoka S, Kozaki T, Misawa T, Takahama M, Satoh T, Takeuchi O, Yamamoto N, <u>Matsuura Y,</u> Saitoh T, Akira S.	Zinc-finger antiviral protein mediates retinoic acid inducible gene I-like receptor-independent antiviral response to murine leukemia virus	Proc Natl Acad Sci U S A	110	12379-12384	2013
Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, <u>Matsuura Y,</u> Hayashi N, Mizokami M, Takehara T.	Human BDCA3 (+) dendritic cells are a potent producer of IFN- λ in response to hepatitis C virus	Hepatology	57	1705-1715	2013
Kimura T, Katoh H, Kayama H, Saiga H, Okuyama M, Okamoto T, Umemoto E, <u>Matsuura Y,</u> Yamamoto M, Takeda K.	Ifit1 inhibits Japanese encephalitis virus replication through binding to 5' capped 2'-O unmethylated RNA	J Virol	87	9997-10003	2013
Tripathi LP, Kambara H, Chen YA, Nishimura Y, Moriishi K, Okamoto T, Morita E, Abe T, Mori Y, <u>Matsuura Y,</u> Mizuguchi K.	Understanding the biological context of NS5A-host interactions in HCV infection: a network-based approach	J Proteome Res	12	2537-2551	2013
Kosaka K., Hiraga N., Imamura M., Yoshimi S., Murakami E., Nakahara T., Honda Y., Ono A., Kawaoka T., <u>Tsuge M.</u> , Abe H., Hayes C.N., Miki D., Aikata H., Ochi H., Ishida Y., Tateno C., Yoshizato K., Sasaki T. and Chayama K.	A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections.	Biochem Biophys Res Commun	441(1)	230-5	2013
Ohishi W., Cologne J.B., Fujiwara S., Suzuki G., Hayashi T., Niwa Y., Akahoshi M., Ueda K., <u>Tsuge M.</u> and Chayama K.	Serum interleukin-6 associated with hepatocellular carcinoma risk: A nested case-control study.	Int J Cancer	134(1)	154-63	2013

Naeshiro N., Kakizawa H., Aikata H., Kan H., Fujino H., Fukuhara T., Kobayashi T., Honda Y., Miyaki D., Kawaoka T., <u>Tsuge M.</u> , Hiramatsu A., Imamura M., Kawakami Y., Hyogo H., Ishikawa M., Awai K. and Chayama K.	Percutaneous transvenous embolization for portosystemic shunts associated with encephalopathy: Long-term outcomes in 14 patients.	Hepatol Res.		doi: 10.1111/he pr.12181	2013
<u>Tsuge M.</u> and Chayama K.	Availability of monitoring serum HBV DNA plus RNA during nucleot(s)ide analogue therapy.	J Gastroenterol	48(6)	779-80	2013
Masaki K., Takaki S., Hyogo H., Kobayashi T., Fukuhara T., Naeshiro N., Honda Y., Nakahara T., Ohno A., Miyaki D., Murakami E., Nagaoki Y., Kawaoka T., <u>Tsuge M.</u> , Hiraga N., Hiramatsu A., Imamura M., Kawakami Y., Aikata H., Ochi H., Takahashi S., Arihiro K. and Chayama K.	Utility of controlled attenuation parameter measurement for assessing liver steatosis in Japanese patients with chronic liver diseases.	Hepatol Res.	43	1182–1189	2013
Arataki K., Hayes C.N., Akamatsu S., Akiyama R., Abe H., <u>Tsuge M.</u> , Miki D., Ochi H., Hiraga N., Imamura M., Takahashi S., Aikata H., Kawaoka T., Kawakami H., Ohishi W. and Chayama K.	Circulating microRNA-22 correlates with microRNA-122 and represents viral replication and liver injury in patients with chronic hepatitis	J Med Virol	85(5)	789-98	2013
<u>Tsuge M.</u> , Murakami E., Imamura M., Abe H., Miki D., Hiraga N., Takahashi S., Ochi H., Nelson Hayes C., Ginba H., Matsuyama K., Kawakami H. and Chayama K.	Serum HBV RNA and HBeAg are useful markers for the safe discontinuation of nucleotide analogue treatments in chronic hepatitis B patients.	J Gastroenterol	48(10)	1188-204	2013
Posuwan N, Payungporn S, Tangkijvanich P, Ogawa S, Murakami S, Iijima S, Matsuura K, Shinkai N, <u>Watanabe T.</u> Poovorawan Y, Tanaka Y	Genetic association of human leukocyte antigens with chronicity or resolution of hepatitis B infection in Thai population.	PLoS One.	9(1)	e86007.	2014
<u>Watanabe T.</u> , Wong DK, Tanaka Y, Seto WK, Lee CK, Fung J, Lin CK, Huang FY, Lai CL, Yuen MF	Role of HLA-DP polymorphisms on chronicity and disease activity of hepatitis B infection in Southern Chinese.	PLoS One	8	e66920	2013
Arata S, Nozaki A, Takizawa K, Kondo M, Morimoto M, Numata K, Hayashi S, <u>Watanabe T.</u> , Tanaka Y, Tanaka K	Hepatic failure in pregnancy successfully treated by online hemodiafiltration: Chronic hepatitis B virus infection without viral genome mutation.	Hepatol Res.	43(12)	1356-60	2013

Sakamoto T, Tanaka Y, Watanabe T, Iijima S, Kani S, Sugiyama M, Murakami S, Matsuura K, Kusakabe A, Shinkai N, Sugauchi F, Mizokami M	Mechanism of the dependence of hepatitis B virus genotype G on co-infection with other genotypes for viral replication.	J Viral Hepat.	20(4)	e27-36	2013
Kobayashi E, Mizukoshi E, Kishi H, Ozawa T, Hamana H, Nagai T, Nakagawa H, Jin A, Kaneko S, Muraguchi A.	A new cloning and expression system yields and validates TCR molecules from blood lymphocytes of cancer patients within 10 days.	Nature Medicine.	19	1542-6	2013
Mizukoshi E, Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Ueda T, Arihara F, Kagaya T, Yamashita T, Fushimi K, Kaneko S.	Enhancement of tumor-associated antigen-specific T cell responses by radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma.	Hepatology.	57	1448-57	2013
Arihara F, Mizukoshi E, Kitahara M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Kaneko S	Increase in CD14(+)/HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients and its impact on prognosis.	Cancer Immunol Immunother.	62	1421-30	2013
Kawaguchi T, Kodama T, Hikita H, Tanaka S, Shigekawa M, Nawa T, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takehara T	Carbamazepine promotes liver regeneration and survival in mice.	J Hepatol	59	1239-1245	2013
Nishida T, Hiramatsu N, Mizuki M, Nagatomo I, Kida H, Tazumi K, Shinzaki S, Miyazaki M, Yakushijin T, Tatsumi T, Iijima H, Kiso S, Kanto T, Tsujii M, Takehara T.	Managing hepatitis B virus carriers with systemic chemotherapy or biologic therapy in the outpatient clinic.	Hepatol Res	43	339-346	2013
Pei Z, Shi G, Kondo S, Ito M, Maekawa A, Suzuki M, Saito I, Suzuki T and Kanegae Y.	Adenovirus vectors lacking virus-associated RNA expression enhance shRNA activity to suppress hepatitis C virus replication.	Scientific Rep.	3	3575	2013
Maekawa A, Pei Z, Suzuki M, Fukuda F, Kondo S, Saito I and Kanegae Y.	Efficient production of adenovirus vector lacking genes of virus-associated RNAs that disturb cellular RNAi machinery.	Scientific Rep.	3	1136	2013

IV B型肝炎を理解するための基礎研究

4 HBV の感染実験系

要点

- B型肝炎ウイルス (HBV) は、チンパンジーやツパイといった限られた動物にのみ感染し、マウスやラットといった小動物には感染しない。
- 2000年以降、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が開発された。
- B型慢性肝炎患者血清やHBV発現培養細胞の培養上清から採取したHBV粒子は、ヒト肝細胞キメラマウスに持続感染するが、肝炎は生じない。
- HBV感染ヒト肝細胞キメラマウスに、インターフェロンや核酸アナログ製剤を投与し、マウス血清HBV DNA量の変化を測定することにより、薬効評価が可能である。
- HBV感染ヒト肝細胞キメラマウスからマウス肝臓内のヒト肝細胞を採取し、ヒト肝細胞内の遺伝子発現変化を解析することにより、HBVのヒト肝細胞への直接的な影響を観察することが可能である。

はじめに

B型肝炎ウイルス (HBV) は、チンパンジーやツパイといった限られた動物への感染は成立するものの一過性感染であり、マウスやラットといった小動物には感染しない特徴をもつ。このため、HBVが高率に感染し、良好に複製するような小動物モデルが存在せず、*in vivo*におけるHBVの

感染、複製機構の解析は困難であった。2000年以降、マウス肝臓がヒト肝細胞に置換されたヒト肝細胞キメラマウス (以下、キメラマウス) が開発され、キメラマウスへのB型・C型肝炎ウイルス感染が報告された^{1,2)}。その後、本学においても、より高度にマウス肝臓がヒト肝細胞に置換されたキメラマウスの作製に成功し³⁾、同キメラマウスを用いて *in vivo* でのHBV持続感染・複製系を確立した^{4,5)}。さらに、さまざまな薬物耐性変異を有するHBVクローンから作製されたHBV粒子をヒト肝細胞キメラマウスに感染させることによる各種HBVクローンの薬物感受性評価や^{6,7)}、ヒト肝細胞内の遺伝子発現変化を解析することによるHBV感染が及ぼすヒト肝細胞への影響の評価に応用している⁸⁾。本稿では、これまでに確立してきたHBV感染・複製系と薬物感受性評価系・HBV感染によるヒト肝細胞への影響について解説する。

I ヒト肝細胞キメラマウスの構築

ヒト肝細胞キメラマウス (以下、キメラマウス) とは、マウスの肝臓にヒト肝細胞を移植することにより、マウス肝臓が高度にヒト肝細胞へと置換されたマウスである。キメラマウス作製の概略を図1に示す。アルブミン (Alb) プロモーター下に urokinase-type plasminogen activator (uPA) 遺伝子を組み込んだ Alb-uPA トランスジェニックマウスと重症免疫不全を呈する severe combined

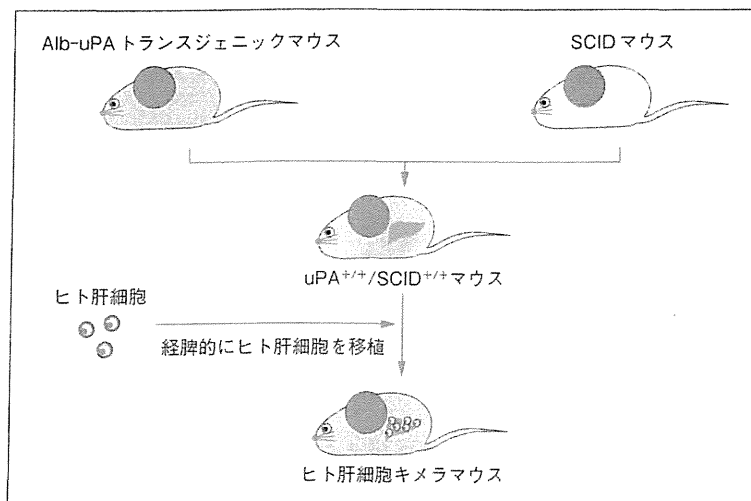


図1 ヒト肝細胞キメラマウスの構築
Alb-uPAトランスジェニックマウスとSCIDマウスを交配させ、uPA^{+/+}/SCID^{+/+}マウスを作製。同マウスに対し、経脾的にヒト肝細胞を移植。ヒト肝細胞は、マウス肝臓内で生着し、ヒト肝細胞キメラマウスが作製される。(文献3より引用)

immune deficient (SCID) マウスとを交配し、uPA-SCID マウスを作製する。uPA-SCID マウスは、Alb-uPA トランスジェニックマウスの表現型を有することから、マウス肝細胞特異的にuPA が高発現し、マウス肝細胞のアポトーシスが生じ、肝不全に至る。そこで、このuPA-SCID マウスに手術検体などで得られた正常なヒト肝細胞を、経脾的に移植することで、ヒト肝細胞がマウス肝臓に生着、増殖することにより、高度にヒト肝細胞に置換された(90%以上置換された)キメラマウスを作製することが可能となる³⁾。本キメラマウスは、SCID マウス由来であることから、高度に免疫が障害されており、肝炎ウイルスを感染させてもマウス生体内の免疫反応に伴うウイルス排除が起こらないことが特徴となっている。

II HBV 持続感染マウスモデルの構築

キメラマウスの肝臓はヒト肝細胞に置換されていることから、肝炎ウイルスを接種すると、感染が成立し、高率にウイルスが増殖する持続感染マウスモデルが作製できる。HBV キャリアから得た血清 50 μ L をマウス尾静脈より接種し、2週間ごとにマウス血清中のHBV DNA の変化を観察すると、接種後2週目よりマウス血清中の

HBV DNA は陽性となり、その後も徐々にウイルス量は増加し、8~10週間目には8~10 Log copies/mL 程度でプラトーとなり、ウイルス血症は24週以上持続する(図2)。また、図3に示すように、HBV が感染したキメラマウス肝を免疫染色にて観察すると、マウス肝細胞ではHBc 発現が認められず、ヒト肝細胞で発現していることから、HBV の感染がヒト肝細胞でのみ成立していることが確認できる。さらに、キメラマウスはSCID マウス由来であることから、T細胞、B細胞の機能が欠失しており、HBV が感染してもマウス肝臓内で肝炎は生じないことがわかる(図3)。

III HBV 発現細胞株の樹立とキメラマウスへの感染

これまで、感染性を保持したHBV を恒常的に産生する細胞株としてHepG2.2.15株が使用されてきたが、同細胞株ではウイルスゲノムへのさまざまな変異導入や、薬物耐性変異の評価は不可能であった。当研究室では、*in vitro*にてHBV を産生する新たな細胞株を構築し、産生されたHBV が感染性を保持していることを、キメラマウスを用いて示した。

まず、HBV キャリア血清よりHBV ゲノムを抽出し、それを鋳型とした1.4倍長のHBV ゲノ

図2 HBV 持続感染キメラマウスを作製
ヒト肝細胞キメラマウスにHBV 感染患者
血清を接種。マウス血清中のHBV DNA は
徐々に上昇し、8~12 Log copies/mL に
達した。ウイルス血症は、24週以降も持
続し、7 Log copies/mL 以上の高いHBV
DNA titer が持続した。

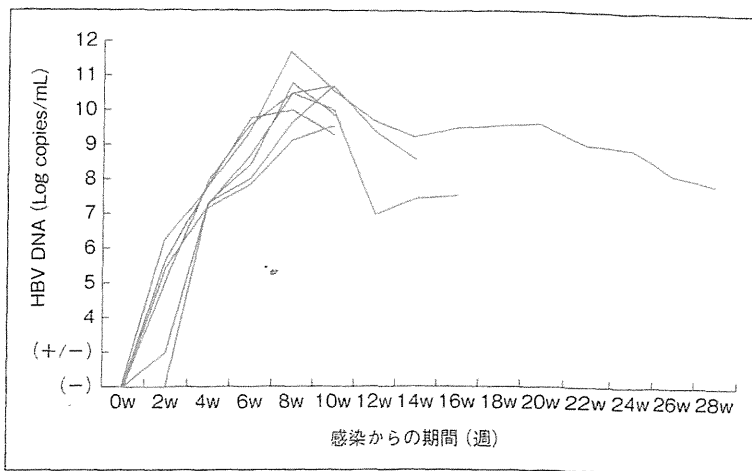
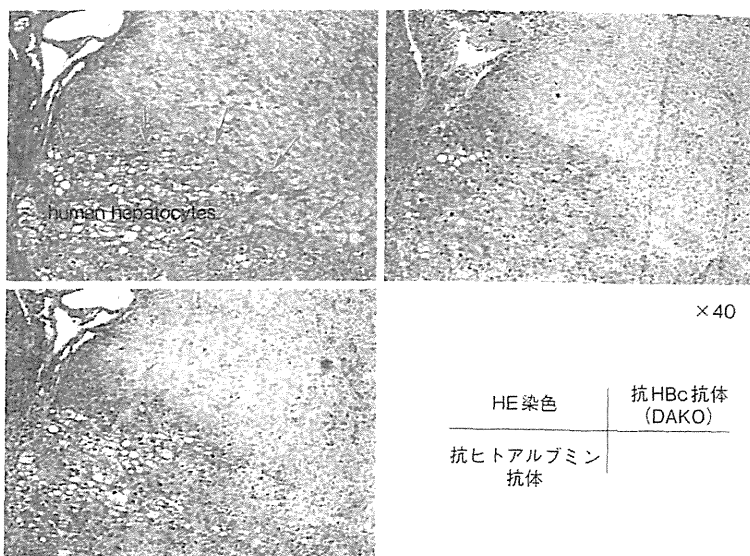


図3 HBV 感染キメラマウス肝の免疫組
織学的検討

HBV 感染が成立したマウスを sacrifice し、
マウス肝内での HBe 抗原の産生を免疫組
織染色にて検討。ヒトアルブミンを産生す
る細胞つまり生着したヒト肝細胞でのみ
HBe 抗体で染色され、HBV が生着したヒ
ト肝細胞に感染していることが示された。
(文献5より引用)



ムを組み込んだ HBV 発現プラスミド(野生株)を
作製した。このプラスミドを、肝癌細胞株である
HepG2 細胞にリン酸カルシウム法を用いてトラ
ンスフェクションしたところ、培養上清中に HBs
抗原、HBe 抗原の発現と高濃度の HBV DNA (8~
9 Log copies/mL) が確認され、一過性発現によ
り、培養細胞からウイルスが産生されたことが示
唆された(図4A)。また、培養上清中のウイルス
粒子からポリメラーゼを抽出し、内在性ポリメ
ラーゼ反応を行ったところ、HBV DNA の複製
が確認されたことから、自己複製能を保持した

HBV 粒子が産生されたものと考えられた(図4B)。

そこで、培養細胞より産生させた HBV 粒子が
感染能を保持しているか否かを検討するため、キ
メラマウス尾静脈より培養上清を接種した。その
結果、マウス血清中の HBV DNA は、接種後 2~
8 週目より定量可能となり、患者血清を接種した
場合と同等の 8~10 Log copies/mL までウイルス
量は増加し、感染は 12 週以上持続した(図5)。
以上の結果から、*in vitro* にて作製した HBV ク
ローンが感染性を有し、キメラマウス肝臓内のヒ
ト肝細胞に感染し、複製・増殖することが示され

IV B 型肝炎を理解するための基礎研究

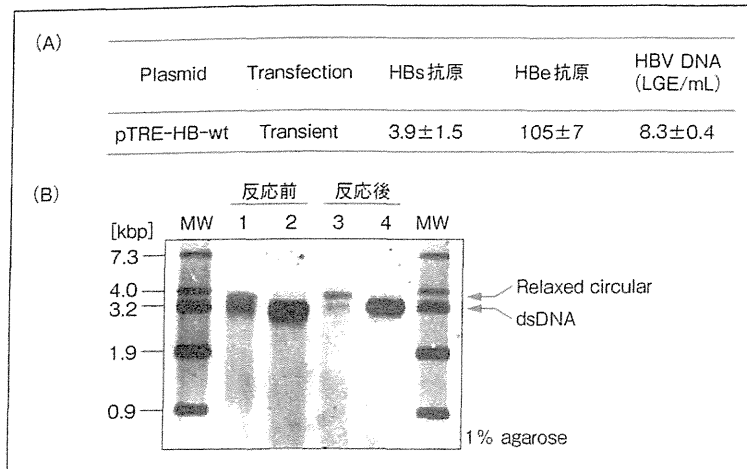


図4 HBV 発現プラスミドの構築と HBV 粒子の作製

A: HBV 発現プラスミドを、HepG2 細胞にリン酸カルシウム法を用いて transient transfection し、培養上清中に分泌される HBV マーカーを検討。その結果、高力価の HBV DNA が培養上清中へ放出されていることが確認された。

B: 内在性ポリメラーゼ反応を用いて、産生された HBV 粒子の自己複製能を検討。その結果、反応により、relaxed circular のバンドが増加したことから、産生された HBV 粒子が自己複製能を保持していることが確認された (レーン 3)。

(文献 5 より引用)

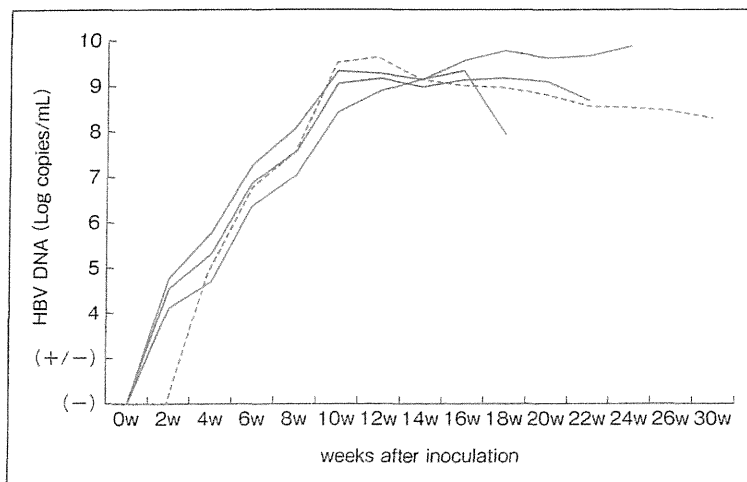


図5 培養細胞由来の HBV 粒子を用いたキメラマウスへの感染

キメラマウスに培養細胞由来の HBV 粒子を接種したところ、マウス血中 HBV DNA は 2~4 週目より定量可能となり、10 週目には 8~10 Log copies/mL まで上昇した。また、ウイルス血症は、24 週以降まで持続した。

た。

IV *In vitro* および *in vivo* における HBV の薬物感受性評価

次に、先程紹介した *in vitro* および *in vivo* での HBV 感染・複製系を応用し、HBV ゲノムの遺伝子変異がもたらす薬物感受性変化の評価系を構築した。先述した HBV 発現プラスミド (野生株) に対し、組み込んだ HBV ゲノム領域に点変異を導入し、ラミブジン耐性変異株である YVDD 株を発現するプラスミドを作製した。

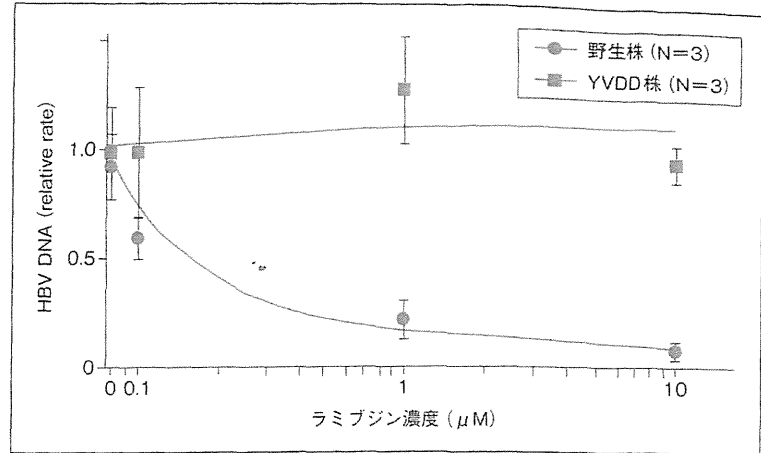
まず初めに、先述した野生株の HBV 発現プラ

スミドと YVDD 株を用いて、各 HBV クローンの薬物感受性の評価を *in vitro* にて行った。HBV 発現プラスミド (野生株および YVDD 株) をそれぞれ HepG2 細胞にトランスフェクションし、24 時間後より培養上清中にラミブジンを加え、ラミブジン添加 72 時間後の細胞内の HBV 複製中間体量の変化を Southern blot 法を用いて検討した (図 6)。その結果、両株ともラミブジンの濃度上昇に伴い、複製中間体量の減少が確認されたものの、野生株に比べ、YVDD 株では、明らかに細胞内の複製中間体量の変化は乏しく、約 200 倍程度の抵抗性を示した。

さらに、*in vivo* においても各 HBV クローンが

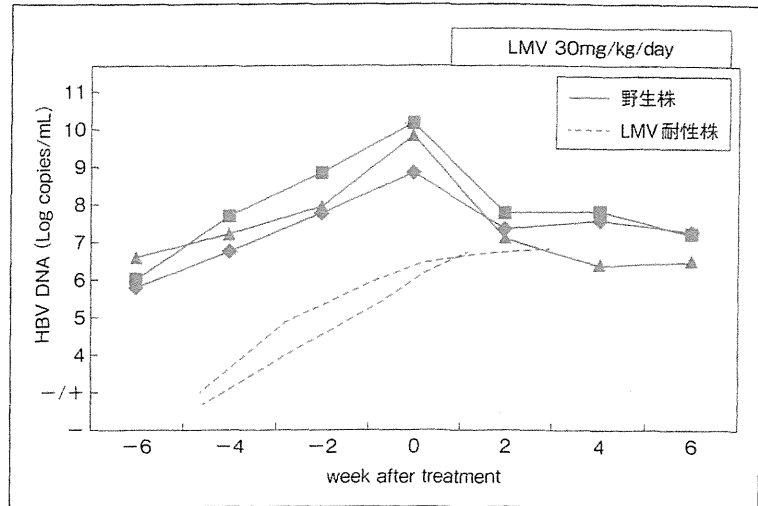
【図6】野生株、YVDD株に対するラミブジンの抗ウイルス効果 (*in vitro*)

HepG2細胞に野生株またはYVDD株を発現するHBV発現プラスミドをトランスフェクション。トランスフェクション24時間後よりラミブジンを添加し、72時間後の細胞内HBV複製中間体量の変化を観察。野生株では、ラミブジンの濃度依存的に複製中間体量が低下したのに対し、YVDD株ではラミブジンの濃度を上昇させても十分な抗ウイルス効果は認められない。



【図7】野生株、YVDD株に対するラミブジンの抗ウイルス効果 (*in vivo*)

野生株およびYVDD株の感染が成立したキメラマウスに対し、ラミブジンを経口投与。野生株が感染したキメラマウスでは、速やかなマウス血中HBV DNAの低下を認めたが、YVDD株感染キメラマウスでは、HBV DNAの低下は認められなかった。



持続感染したキメラマウスを作製し、ラミブジンの感受性を評価した。いずれのウイルスを接種したキメラマウスも感染は成立し、マウス血中のHBV DNAは8~10週間目にはプラトーとなった。これらのマウスにラミブジン 30mg/kg/dayを4~6週間経口投与したところ、野生株を感染させたマウスでは、6週間で-2~3 Log copies/mL程度のウイルス量低下が確認されたのに対し、YVDD株を感染させたマウスでは、ラミブジン投与にもかかわらず、HBV DNA量の減少は認められなかった(図7)。

以上の結果から、これらの *in vitro*, *in vivo* での結果は、臨床での経過を良好に反映するもの

であり、両実験系がHBVの遺伝子変異による薬物感受性変化の評価に有用であることが示された。

V キメラマウスを用いた薬物感受性評価系の有用性

これまで、述べてきた結果から考えると、*in vitro*, *in vivo*の実験系は、臨床の結果を良好に反映するものであり、キメラマウスが高価であることや飼育施設の確保や飼育の手間を考えると、*in vitro*の実験系で十分ではないかとの考え方も可能である。しかしながら、各症例でHBVゲノムの配列は少しずつ異なっており、各症例の

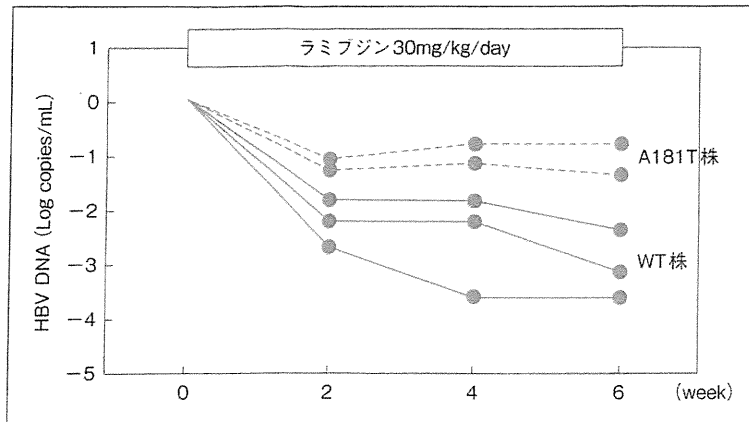


図8 キメラマウスを用いたラミブジン耐性の評価

WT株およびA181T株を感染させたキメラマウスにラミブジンを投与したところ、A181T株感染マウスにおいて、十分な抗ウイルス効果が得られなかった。

HBVをすべてクローニングしていくことは困難である。一方、キメラマウスでは、採取した患者血清を使用することにより、感染マウスを作製することが可能であり、臨床で使用を予定している薬物を投与することで、感染しているHBVが使用薬物に感受性をもつかを判断することが可能と考えられる。以下に、一例を示す。

症例は、44歳、男性。B型慢性肝炎に対してラミブジン治療を行っていたが、治療24ヵ月目にHBV DNAの急上昇を認めた。ラミブジン投与開始前とHBV DNAが急上昇した際の保存血清を用いて、治療に伴うHBVゲノムの遺伝子変異をdirect sequence法にて検討した結果、ラミブジン投与前後でYMDDモチーフに変異は確認されなかったが、RT領域のrtA181T変異を認めた。当初、このアミノ酸の変異がラミブジン耐性変異であることが報告されておらず、薬物感受性にどのように影響するかは不明であった。そのため、同患者血清よりHBV DNAをクローニングし、Pt's strain (rtA181T株)を作製した。さらに、rtA181Tの変異を野生型に戻したHBV発現プラスミドPt's strain (WT株)を作製した。rtA181Tの変異がHBVのラミブジン感受性に影響するか否かを検討するため、作製したPt's strain (rtA181T株)、Pt's strain (WT株)をそれぞれHepG2細胞にトランスフェクションし、HBV粒子を回収後、キメラマウスに接種し、*in vivo*における薬物感受性を検討した。感染成立

後、ラミブジン30mg/kg/dayを8週間投与したところ、WT株を接種した2頭のマウスでは3~4 Log copies/mLのHBV DNA低下を認めたにもかかわらず、rtA181T株を接種したマウスでは1 Log copies/mL程度の低下にとどまり、この変異がHBVのラミブジン耐性獲得に関与していることが確認された(図8)。

本症例では、HBV発現プラスミドを構築した後に、核酸アナログ製剤の有効性を評価したが、患者血清を感染させたキメラマウスでも同様の抗ウイルス効果が再現されており、明らかな薬物耐性変異が認められない症例では、患者血清をキメラマウスに接種することにより、より迅速な薬効評価や薬物耐性ウイルスに対する対応策の構築が可能であると考えられる。

VI HBV感染が及ぼすヒト肝細胞への影響

近年、HBV感染がヒト肝細胞に及ぼす影響については、いくつかのマイクロアレイ解析が報告されているが、培養細胞を用いた解析や生体内における免疫応答存在下での解析である^{9~11)}。これまで述べてきたようにキメラマウスはSCIDマウス由来であり、T細胞、B細胞系の免疫応答が欠如し、肝炎が生じないことから、このキメラマウスを用いて、HBV感染が、ヒト肝細胞に及ぼす直接的な影響について検討を行った。通常、ヒト

表1 HBV感染により、3倍以上発現が亢進した上位20遺伝子

gene symbol	genbank accession	fold change	functions
S100P	NM_005980	529.27	肝癌の早期発育に関与。
BI910665	BI910665	74.25	unknown
UNC5B	NM_170744	67.57	大腸癌、胃癌、乳癌、腎癌などさまざまな癌腫で発現が低下。apoptosisに関与。
FMOD	NM_002023	41.13	B-cell chronic lymphocytic leukemia (BCLL) や mantle cell lymphoma (MCL) にて発現亢進
KLHDC7B	NM_138433	40.82	unknown
GDF15	NM_004864	33.59	前立腺癌で、恒常的に発現。発現レベルと体重減少が関連
GDNF	ENST00000381827	24.13	Parkinson病と関連。神経細胞の survival や分化に関与
KCNMB3	NM_171828	15.01	機能不明。細胞内での発現は低い。
TACSTD2	NM_002353	14.21	膀胱癌、肺癌で発現亢進
COL16A1	NM_001856	13.51	細胞間接着に関与
CDKN2B	NM_078487	12.53	cyclin-dependent protein kinase 活性を制御し、細胞増殖に関与。さまざまな腫瘍で異常あり。
FUT1	NM_000148	12.26	血液型と関連
FAM134B	NM_019000	9.49	Golgi装置のマーカー。細胞増殖に関与
TNFRSF10C	NM_003841	8.90	正常細胞の apoptosis に関与
C6orf128	NM_145316	8.67	unknown
BC043411	BC043411	8.35	unknown
LRRC25	NM_145256	7.93	蛋白-蛋白の結合に関与
ASNS	NM_001673	7.84	アスパラギンの合成に関与
RASD1	NM_016084	7.72	RASの superfamily で、体内時計の制御
LAMP3	NM_014398	7.66	細胞増殖に関与。食道癌、胃癌、大腸癌などで発現亢進

の肝組織を利用したマイクロアレイ解析では、免疫応答に関与する遺伝子が発現変化の大きい遺伝子として抽出されるのに対し、キメラマウスを用いたマイクロアレイ解析では、HBV感染にて発現が亢進した上位20遺伝子の多くは、発癌や細胞増殖に関与する遺伝子であり(表1)、HBV感染にて発現が低下した上位20遺伝子の多くは、転写関連遺伝子であった⁸⁾。さらに、HBV感染が影響を与えている pathway について解析を行っても、細胞周期制御やDNA修復といった発癌に強く関与する pathway が影響を受けていることがわかる(表2)。つまり、本結果は、臨床検体を用いた解析結果とは異なる一方で、B型無症候性キャリアからの発癌に寄与する遺伝子が含まれている可能性も考えられ、HBV関連肝発癌の発癌機序の解明につながる可能性も考えられる。

まとめ

キメラマウスを用いた薬効評価系は、臨床現場での治療効果を良好に反映した実験系であり、さまざまな抗ウイルス薬やウイルスクローンに応用可能である。また、新たな治療薬の探索や発癌メカニズムを解析するうえで、HBV感染による肝細胞内への直接的な影響を把握することは重要であり、本実験系は有用な device の一つと言える。

(柘植雅貴、茶山一彰)

Memo Alb-uPA トランスジェニックマウス

Alb-uPA トランスジェニックマウスは、Albプロモーター下に uPA 遺伝子を組み込んだマウスである。出生後、マウス肝細胞内ではアルブミンが発現されてくるが、アルブミンの発現に応じてマウ

表2 HBV 感染により、発現が変化した遺伝子の GO analysis

GO Term of biological process	p value
cell cycle	0
mitotic cell cycle	1.44E-40
cell division	2.76E-26
DNA replication	3.64E-10
cell cycle checkpoint	4.24E-10
chromosome segregation	2.78E-09
spindle organization and biogenesis	2.85E-09
response to DNA damage stimulus	1.24E-08
organelle organization and biogenesis	5.72E-08
cytoskeleton organization and biogenesis	3.00E-07
microtubule-based process	5.24E-07
DNA repair	3.38E-06
regulation of cyclin-dependent protein kinase activity	5.76E-06
chromosome localization	3.60E-05
establishment of chromosome localization	3.60E-05

ス肝細胞は uPA が高発現状態となる。その結果、マウス肝細胞に特異的な機能障害を生じ、マウスは肝不全を呈する。ヒト肝細胞キメラマウスは、肝不全状態のマウスにヒト肝細胞を経脾的に移植し、生着させることにより、高度にヒト肝細胞に置換されたマウス肝が構築される。

文献

1) Brown JJ, Parashar B, Moshage H, et al. : A long-term hepatitis B viremia model generated by transplanting nontumorigenic immortalized human hepa-

toocytes in Rag-2-deficient mice. *Hepatology* 31 : 173-181, 2000

2) Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, et al. : Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 7 : 927-933, 2001

3) Tateno C, Yoshizane Y, Saito N, et al. : Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol* 165 : 901-912, 2004

4) Chayama K, Hayes CN, Hiraga N, et al. : Animal model for study of human hepatitis viruses. *J Gastroenterol Hepatol* 26 : 13-18, 2010

5) Tsuge M, Hiraga N, Takaishi H, et al. : Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus. *Hepatology* 42 : 1046-1054, 2005

6) Yatsuji H, Hiraga N, Mori N, et al. : Successful treatment of an entecavir-resistant hepatitis B virus variant. *J Med Virol* 79 : 1811-1817, 2007

7) Yatsuji H, Noguchi C, Hiraga N, et al. : Emergence of a novel lamivudine-resistant hepatitis B virus variant with a substitution outside the YMDD motif. *Antimicrob Agents Chemother* 50 : 3867-3874, 2006

8) Tsuge M, Takahashi S, Hiraga N, et al. : Effects of hepatitis B virus infection on the interferon response in immunodeficient human hepatocyte chimeric mice. *J Infect Dis* 204 : 224-228, 2011

9) Farci P, Diaz G, Chen Z, et al. : B cell gene signature with massive intrahepatic production of antibodies to hepatitis B core antigen in hepatitis B virus-associated acute liver failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 107 : 8766-8771, 2010

10) Honda M, Kaneko S, Kawai H, et al. : Differential gene expression between chronic hepatitis B and C hepatic lesion. *Gastroenterology* 120 : 955-966, 2001

11) Otsuka M, Aizaki H, Kato N, et al. : Differential cellular gene expression induced by hepatitis B and C viruses. *Biochem Biophys Res Commun* 300 : 443-447, 2003

- 13) Peron JM, Danjoux M et al : Liver histology in patients with sporadic acute hepatitis E: a study of 11 patients from South-West France. *Virchows Arch* 450:405-410, 2007
- 14) 佐田通夫 : A型肝炎の流行施設における不顕性感染についての検討. *肝臓* 22:933-942, 1981
- 15) Sata M, Nakano H et al : Analysis of serum hepatitis A virus antibody response in different courses of hepatitis A virus infection. *J Gastroenterol* 31:812-817, 1996
- 16) Takahashi M, Kusakai S et al : Simultaneous detection of immunoglobulin A(IgA) and IgM antibodies against hepatitis E virus (HEV) is highly specific for diagnosis of acute HEV infection. *J Clin Microbiol* 43:49-56, 2005
- 17) Kamar N, Selves J et al : Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 358:811-817, 2008
- 18) Kamar N, Rostaing L et al : Ribavirin therapy inhibits viral replication on patients with chronic hepatitis e virus infection. *Gastroenterology* 139:1612-1618, 2010
- 19) Ide T, Sata M et al : Clinical evaluation of four cases of acute viral hepatitis complicated by pure red cell aplasia. *Am J Gastroenterol* 89:257-262, 1994
- 20) Tokeshi S, Sata M et al : Secretory IgA anti-HAV in bile of hepatitis A patients. *Hepatol Res* 10:167-174, 1998
- 21) Tanaka E, Sata M et al : Antibody response to inactivated hepatitis A vaccine. *Hepatol Res* 9:103-112, 1997
- 22) Shrestha MP, Scott RM et al : Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N Engl J Med* 356:895-903, 2007
- 23) 持田智, 中山伸朗ほか : ①劇症肝炎の診断基準: プロトロンビン時間の扱いに関する検討, ②劇症肝炎, 急性肝不全の概念の改変, ③肝移植適応ガイドラインの改訂. 厚生労働省科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究班」平成19年度報告書, p110-113, 2008
- 24) 持田智, 中山伸朗ほか : ①劇症肝炎の診断基準: プロトロンビン時間の扱いに関する検討, ②劇症肝炎, 急性肝不全の概念の改変, ③肝移植適応ガイドラインの改訂. 厚生労働省科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究班」平成20年度報告書, p16-18, 2009

B型肝炎, D型肝炎

■ **概念** B型肝炎・D型肝炎は、それぞれB型肝炎ウイルス(hepatitis B virus: HBV)・D型肝炎ウイルス(hepatitis D virus: HDV)が急性感染した後に生じる肝障害(肝炎)を示しており、HBVの持続感染者(無症候性キャリアやB型慢性肝炎患者)から発症した急速な肝障害(急性増悪)は含めない。

B型肝炎の原因ウイルスであるHBVは、肝炎ウイルスのうち唯一のDNAウイルスであり、1963年のBlumbergらによるオーストラリア抗原の発見を契機に研究が進められ、1970年にDane粒子がウイルス本態であることが同定された¹⁾。その後、ウイルスゲノムのクローニング、治療薬開発など、世界各国でさまざまな研究が進められている。

一方、HDVはRNAウイルスであり、1977年にHBV感染患者の肝細胞内にHBコア抗原とは異なるウイルス抗原が存在することが同定され、デルタ抗原(HD抗原)と命名された。その後、HBVとは異なる感染性粒子としてHDVが同定された²⁾。HDVは、単独では

ウイルスの増殖ができず、HBVのヘルパー作用を利用してHBs抗原を外被としたウイルス粒子を形成する³⁾。しかしながら、そのウイルスの複製自体は、HBVには非依存的であることが知られている。

■ **成因** HBV感染の原因としては、性交渉や注射の回し打ち、刺青、ピアスなどによる感染のほか、医療現場での輸血や針刺し事故など、血液や体液を介した感染があげられる。1999年10月からは、輸血用の血液に対し、核酸増幅検査(nucleic acid amplification test: NAT)によるB型肝炎ウイルス遺伝子(HBV DNA)の検出が全面的に導入されており、血液製剤の安全性は向上しているものの、年間10数例の輸血後感染が存在することも事実である。これは、HBVが感染後、HBs抗原やHBV DNAが検出可能となるまでにはある一定の期間(ウィンドウ期)が存在するため、この期間に献血された血液ではHBV感染を認識することが不可能なためである。一方、性交渉による感染としては、異性間、夫婦間の感染が中心であるが、最近では都市部を中心に同性間の性交渉による感染も散見されており、性行為感染症(sexually transmitted disease: STD)の一つとして扱われていることもある。

HDV感染は、HBVと同様、血液や体液による感染であり、これまでの既報から輸血や注射の回し打ち、性交渉、出生時感染が明らかとなっている。ただし、HDVの感染条件として、HBV感染の存在が必須であることから、HBV非感染者ではHBVとHDVの同時感染(co-infection)で、HBV持続感染者ではHDVが上乗せで感染する重複感染(super-infection)により、HDV感染が成立する。

■ **疫学** 世界でのHBV感染者は、既往感染者も含めると人口の約30%、20億人にのぼると推測され、東南アジアやアフリカでは感染者率が10%を上回る国もあり、大きな地域差が認められる。しかし最近では、世界的なユニバーサル・ワクチネーションの拡大によって、若年者でのHBV感染頻度は低下してきているものと考えられる。

HBV、HDVの急性感染は、不顕性感染例も多く、実態が把握しがたいのが現状であり、日本では、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律(感染症法)で五類感染症に指定され、診断確定後7日以内の届出が必要とされているものの、届出の徹底も十分に行われていないなどの問題点があり、B型・D型急性肝炎の発症件数を厳密に把握することは困難である。2008年の田中らの報告では、1994~2004年に広島での献血者約22万人を対象とした調査において、新規HBV感染者は24例とされ、2.78/10万人年の発症頻度であった⁴⁾。実際に、広島県内における過去5年間の急性肝炎発症状況に関して、県内主要施設にアンケート調査を実施した結果、約30例/年のB型急性肝炎発症があり、不顕性感染の割合を考慮すると、田中らの報告とほぼ同等といえる。これらの結果から単純に計算すると、日本におけるB型急性肝炎は、現在

も年間 1,200~1,500 例程度発生しているものと推測される。

また、近年、HBV の遺伝子型に関する研究が進み、B 型急性肝炎例の HBV genotype の分布に変化が起こっていることが明らかとなっている。小林らの報告によると、1990 年までは、20%以下であった genotype A の感染者は、90 年以降増加しており、1996 年以降では約 40%を占めるまでに増加している⁵⁾。実際、広島大学病院における B 型急性肝炎例を検討してみても、図 3 に示すように、2000~2003 年には、12 例中 1 例(8.3%)であった genotype A 感染は、2004~2009 年には 12 例中 6 例(50%)と著明に増加しており、HBV の遺伝型も欧米化していることがうかがえる。

一方、HDV 感染についてであるが、1980 年代に行われた世界的な調査によると、HBs 抗原陽性者(HBV 持続感染者)の約 5%に HDV に対する抗体 anti-HD 陽性者が認められ、HBV とは異なり、地中海沿岸、中近東、中央アジア、東アフリカ、南米が高度浸淫地域であり、東アジアは低浸淫地域であることが判明している。日本では、anti-HD 陽性者は HBs 抗原陽性者の 1%未満と報告されており⁶⁾、非常に低頻度であるが、長崎県の上五島や沖縄県の宮古島では、anti-HD 陽性者の頻度が高いことが報告されている^{6),7)}。現在、ワクチン接種による世界的な HBV キャリアの減少や医療環境の整備などが行われており、若年者を中心に anti-HD 陽性者は減少しているものと推測される。

■ 病理 急性ウイルス性肝炎の典型的な病理組織学的所見は、小葉中心性の壊死炎症反応であり、肝細胞障害・壊死とリンパ球や貪食細胞の浸潤、Kupffer (クッパー)細胞の過形成と肥大が実質内にほぼびまん性に認められる。肝細胞壊死は、肝細胞が巣状に数個融解壊死に陥り、リンパ球で置換されるような巣状壊死(focal necrosis)が主体であり、肝障害が高度の場合、壊死巣が融合し、帯状壊死を呈することもある。一方、生き残った肝細胞は活発に分裂・再生をはじめため、門脈域周囲では再生した肝細胞が密に配列した像を呈する。門脈域は、炎症反応により、疎に拡大し、リンパ球が増生する。まれにリンパ濾胞を形成することもあるが、門脈域の炎症反応は肝炎の鎮静化とともに終息する。

■ 症状 B 型急性肝炎は、1~6 カ月の潜伏期間(ウィンドウ期)のち、ウイルス量(HBV DNA)、HBs 抗原の増加に伴って、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)が上昇する。多くの場合、不顕性感染であるが、20~30%で急性肝炎の症状が出現するとされている。初発症状としては、全身倦怠感、食欲低下、嘔気・嘔吐、発熱などの頻度が高く、感冒などのウイルス感染症と診断されてしまうことも多い。その後、肝炎の程度に応じて、黄疸や浮腫、腹水、肝性脳症などの症状が出現する。B 型急性肝炎の場合、約半数で総ビリルビン値が 2 mg/dL 以上を呈するような顕性黄疸となるが、肝炎の鎮静化に伴い、ゆるやかに低下する。

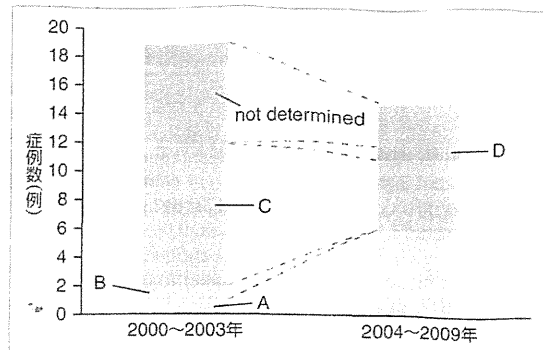


図 3 広島大学病院を受診した B 型急性肝炎 34 例における HBV genotype の頻度

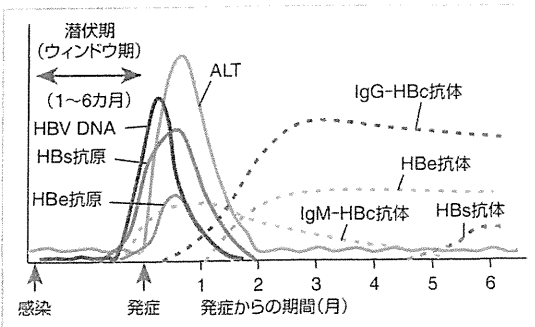
多くの場合、全身倦怠感や食欲低下などの臨床症状は、数日~数週間で消失し、肝機能検査値(アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、ALT など)も正常化する。黄疸の遷延、PT(プロトロンビン時間)活性の低下、肝性脳症が出現するような症例では、重症化や劇症化の可能性を考慮する必要がある。特に、PT 活性が 40%以下かつ II 度以上の肝性脳症が出現した場合、発症からの期間に応じて劇症肝炎や遅発性肝不全(LOHF)と診断され、救命率が著しく低下するため、肝炎の鎮静化までは十分な経過観察が必要である(なお、劇症肝炎および LOHF の詳細については 8 章 4-2「劇症肝炎、遅発性肝不全」参照)。

一方、D 型急性肝炎における臨床症状も B 型急性肝炎とはほぼ同様であるが、感染様式により、一部臨床像が異なる。欧米からの既報によると、同時感染例では、HBV 単独感染に比べ致死率が高く、約 2~20%と報告されている。重複感染例では、B 型慢性肝炎の急性増悪との鑑別が重要であり、HDV 感染は 70~80%で慢性化するとされる。これらのことから、HDV 感染時には、HBV 単独感染時以上に細やかな観察が必要といえる。

■ 診断 急性肝炎では、AST、ALT などの肝胆道系酵素異常や PT の延長(PT 活性の低下)が出現するが、それとともにウイルスマーカーの推移を観察することも重要なポイントである。表 7 に示すように、B 型急性肝炎の診断に用いられるマーカーとしては HBs 抗原をはじめとした 8 種類の HBV 関連マーカーが存在する。これらのマーカーを組み合わせることにより、B 型急性肝炎の診断および病期を推定することが可能である(図 4)。各ウイルスマーカーの特徴を下記に示す。**HBs 抗原・HBs 抗体**: HBs 抗原は、現在の HBV 感染の有無を反映しており、陽性であれば、100%HBV に感染していると診断可能である。ただし、HBV 感染のごく初期には、図 4 に示すようなウィンドウ期が存在することから、HBs 抗原が陰性である期間が存在するため、HBs 抗原が陰性であっても HBV 感染を強く疑う場合、1~6 カ月後に再検査してみることも診断に有用である場合もある。一方、HBs 抗体は中和抗体で

表7 B型・D型急性肝炎の診断に用いるウイルスマーカー

B型急性肝炎	
1) ウイルスが産生する蛋白の検出	HBs 抗原, HBe 抗原, HB コア関連抗原
2) 宿主がつくる抗体の検出	HBc 抗体(IgM 型・IgG 型), HBe 抗体, HBs 抗体
3) ウイルスの核酸を検出	HBV DNA
D型急性肝炎	
1) ウイルスが産生する蛋白の検出	HD 抗原
2) 宿主がつくる抗体の検出	HD 抗体(IgM 型・total)
3) ウイルスの核酸を検出	HDV RNA

図4 B型急性肝炎におけるウイルスマーカーの推移
ALT: アラニンアミノトランスフェラーゼ

あり、HBV が肝細胞から排除され、HBs 抗原が陰性化した後に陽性となることが多い。

HBe 抗原・HBe 抗体: 通常、HBe 抗原の有無は、ウイルスの活動性、感染力を示している。B型急性肝炎の場合、HBs 抗原の増加に伴い、HBe 抗原も陽性となり、肝炎の極期を過ぎると低下し、HBe 抗原は陰性化し、HBe 抗体陽性へと変化する。ただし、HBe 抗体の出現は、肝炎の治療を意味するのではなく、図3のように、HBe 抗体出現時も HBs 抗原や HBV DNA が陽性であることが多く、肝炎も持続している場合がある。

HBc 抗体: IgM(免疫グロブリン M)型、IgG 型、IgA 型が存在する。IgM 型は、感染初期から血清中に出現し、2カ月から数年かけて陰性化する。HBs 抗原よりも長期間血液中に存在することから、HBs 抗原が早期に消失したような症例の診断にも有用であり、B型急性肝炎の最もよい指標とされている。B型急性肝炎の回復期になると、IgM クラスから IgG クラスへのクラススイッチが起こり、IgG 型が出現する。IgG 型の HBc 抗体は治癒後徐々に減少していくものの、長期間陽性が持続し、生涯陽性であることも少なくない。また、HBV 持続感染例でも高抗体価を呈することが多く、IgG 型で急性肝炎を診断することはできない。IgA

型は、B型急性肝炎のほぼ全例で陽性となり、約3カ月で陰性化する。しかしながら、持続感染例でも高抗体価を呈するとされ、B型急性肝炎診断には必ずしも有用とはいえず、むしろ肝病変の活動性や肝障害度を反映している。

HB コア関連抗原: HBc 抗原、HBe 抗原、p22cr 抗原(中空粒子)の総称であり、HBe 抗原が陰性化すると HB コア関連抗原は低下する。直接的ではないが、血液中の HBV 量を反映している。

HBV DNA: 血液中に存在するウイルス量を定量化したものである。近年、TaqMan 法が開発され、血清中に 2.1Log copies/mL 以下のわずかな HBV が存在する場合でも検出が可能となっている。

HBV 遺伝子型: HBV の遺伝子を比較し、8%以上(約3,200塩基のうち250カ所以上)の違いがある場合、遺伝子型として区別している。現在までに、HBV には10の遺伝子型があることが示されており(genotype A~J)、遺伝子型によって IFN(インターフェロン)感受性や核酸アナログ耐性の出現頻度が異なることが報告されていることから⁸⁾、治療法を考慮するうえで検査しておくべきマーカーと考えられる。

一方、HDV 感染の診断に関しても、ウイルスマーカーの推移は重要なポイントである。HDV 感染に関しては、HBs 抗原が陽性であること(HBV 感染が存在する)が必須であるが、それに加えて、表7に示すような HDV 関連マーカー検査が必要となる。

HD 抗体: HD 抗体が陽性であれば、HDV に感染している、もしくは感染既往があることを示す。HD 抗体は、IgM 型 anti-HD と total anti-HD が測定可能であり、HDV の急性感染では、IgM 型は数カ月、total は数年で陰性化していく。

HDV RNA: 血液中に存在するウイルス量を定量化したものであり、HDV RNA が陽性であれば、現在 HDV が感染・増殖していることを示す。一過性感染の場合、ウイルス血症は、2~8週間持続する。

なお、HDV 感染は、B型慢性肝炎症例だけでなく、B型急性肝炎症例でも発生することから、いずれの場合も、HDV 感染の合併を考慮することが必要である。また近年では、図5に示すような HBV 急性感染に HIV(ヒト免疫不全ウイルス)感染を合併するような症例も散見されるようになっており、B型急性肝炎診断時には、HDV 感染とともに HIV 感染の有無も検査しておくことが重要と考えられる。

■ **鑑別** B型急性肝炎や D型急性肝炎の診断において、鑑別が必要と考えられる疾患として、B型慢性肝炎の急性増悪やその他のウイルス性肝炎、急性肝炎の経過をたどる可能性のある疾患(自己免疫性肝炎や Wilson(ウィルソン)病など)があげられる。なかでも、B型慢性肝炎の急性増悪と B型急性肝炎との鑑別は非常に困難である場合があり、注意が必要である。通常、IgM-HBc 抗体が陽性であることは B型急性肝炎を強く示唆する所見であるが、図6に示すように、

HBs抗原/HBs抗体	2.4/0.0	2000/0.1	2000/0.2	96.7/0.1	0.1/136.8	0.1/208.4
HBe抗原/HBe抗体		+/-	+/-	+/+	-/+	-/+
HBV DNA		8.8<	4.2	3.0	<1.8	(-)
HIV RNA		13,600	4,700	1,100	1,300	22,000

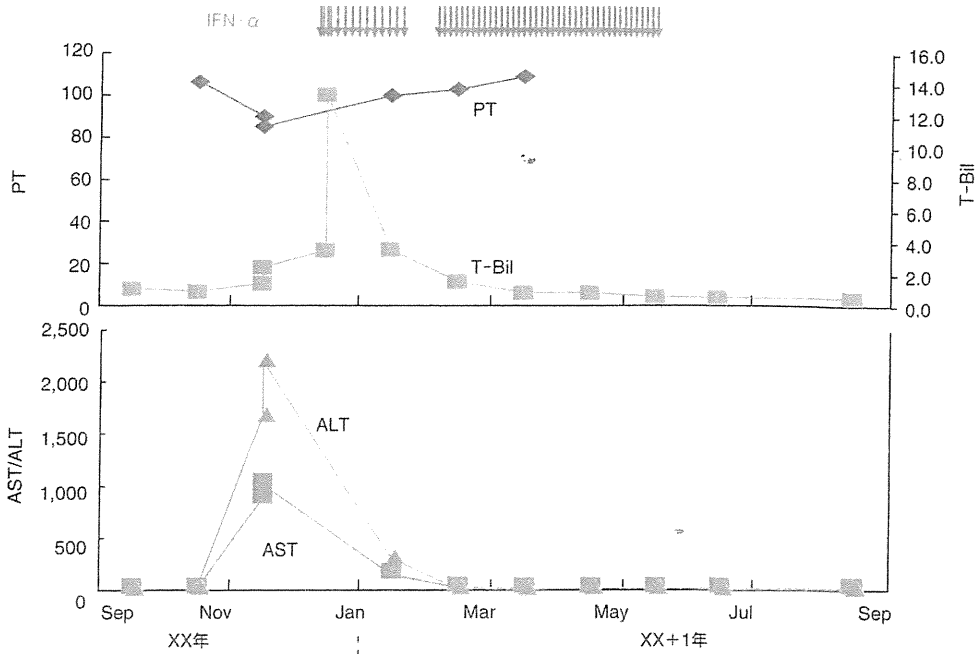


図5 HBV と HIV の同時感染後に B 型急性肝炎を発症した症例

XX年9月、HIV・HBVの同時感染を指摘。その後、HBV DNAの増加とともにALTが上昇し、B型急性肝炎を発症した。HIV感染合併のため、核酸アナログ投与が困難であったため、IFN-αを投与した。一時、肝炎の遷延傾向が認められたものの、発症から8カ月後にHBs抗体陽性となり、肝炎の終息が得られた

HIV：ヒト免疫不全ウイルス、IFN-α：インターフェロンα、PT：プロトロンビン時間、T-Bil：総ビリルビン、AST：アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、ALT：アラニンアミノトランスフェラーゼ

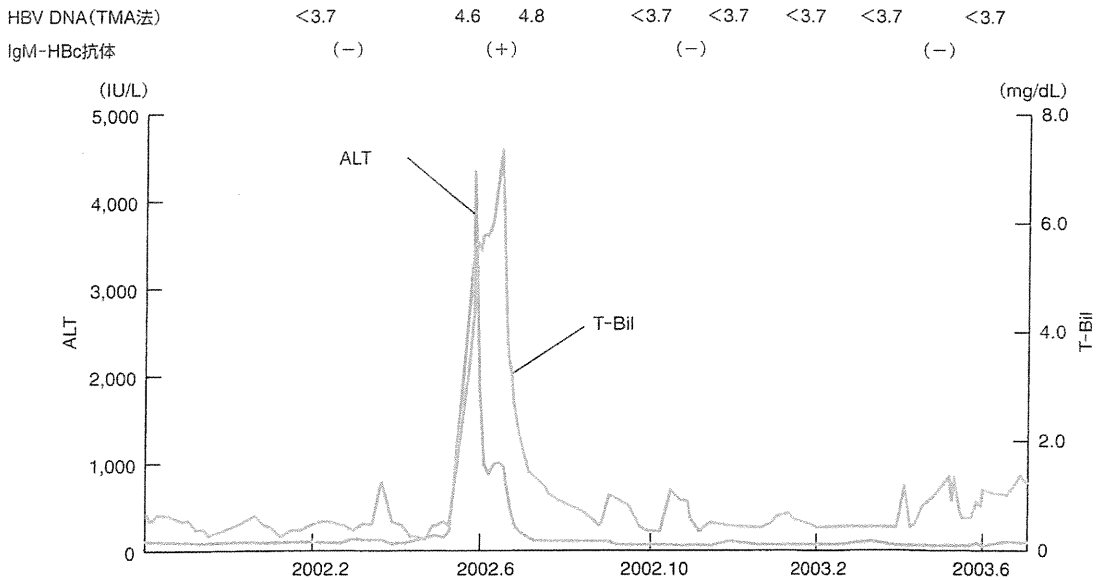


図6 B型慢性肝炎の急性増悪に伴うIgM-HBc抗体の陽転化

B型慢性肝炎の経過中、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)と総ビリルビン(T-Bil)が急激に上昇し、肝炎の急性増悪を認めた。その際、IgM-HBc抗体は陽転し、肝炎改善に伴い、IgM-HBc抗体も消失した

B型慢性肝炎が急性増悪した場合もIgM型のHBc抗体が陽性となることはしばしば認められ、急性肝炎との鑑別に苦慮することも少なくない。そのため、B型急性肝炎の診断の際には、以前に行った血液検査でHBs抗原が陰性であることを確認することも重要であり、たとえIgM型HBc抗体が陽性であっても以前の血液検査でHBs抗原が陽性であれば、B型慢性肝炎の急性増悪と診断される。

一方、B型慢性肝炎例でのD型急性肝炎は、B型慢性肝炎の急性増悪との鑑別が重要といえる。B型慢性肝炎例にHDVが感染した場合、高率に慢性化するうえ、肝硬変への移行が早く、肝発癌の危険率が3倍増加するとの報告もあることから⁹⁾、日本での発生頻度は少ないものの、HDV感染の合併も考慮に入れた診療が重要である。

■治療 現在、HDV感染症に対する治療法は確立されていない。しかしながらHDV感染は、HBV感染に依存していることから、HBVに対する治療が原則として施行される。そのため、ここではB型急性肝炎に対する治療について述べる。

B型急性肝炎は、多くの場合、自然軽快・治癒することから、基本的には対症療法のみで十分といえる。しかしながら、一部には黄疸の遷延、PT活性の低下、肝性脳症出現などの症状が出現し、重症化や劇症化、肝炎の遷延や慢性化が危惧される症例がある。そのため、そのような症例に対しては、積極的に核酸アナログ製剤を用いた抗ウイルス療法が行われており、さらに高度の肝障害が認められるような場合には、副腎皮質ステロイド、シクロスポリンなどを用いた免疫抑制療法や血漿交換などの人工肝補助療法が追加される。さらに、肝不全状態の改善が見込めないような場合には、肝移植も行われる。

核酸アナログ薬は、B型慢性肝炎に対してラミブジン、アデホビル、エンテカビル³⁾の3剤が保険適用となっているが、B型急性肝炎に対する保険適用がないのが現状である。ただ近年、国内外の施設から、B型急性肝炎に対する有効性が報告されており、重症化例における予後改善にも寄与していると考えられ、専門医の厳密な管理のもとで使用していくことが推奨される。ただし、現在のところ、核酸アナログ薬を慢性化やキャリア化の予防目的で使用することについては、効果が認められておらず、今後、症例を重ねていく必要がある。また近年、HBV急性感染にHIV感染が合併している症例を散見するようになった。元来、核酸アナログ薬の多くは、抗HIV薬として開発されたものであり、HBV、HIVいずれにも抗ウイルス効果を示す。しかしながら、HIVはHBV以上に薬剤耐性を獲得しやすいウイルスであることから、核酸アナログ薬を安易に使用することで、薬剤耐性HIVが出現する可能性が高く、HIV治療が必要となった際に、治療効果が十分に得られない可能性も考えられる。そのため、B型急性肝炎患者に対して、同意を得たうえで、HIV

感染の有無を検査することも治療法選択の重要なポイントであり、HIVとの重複感染が認められた場合には、HIV専門医との綿密な連携を保ちながら、HAART(抗レトロウイルス療法)やIFN治療も考慮する必要がある。

■経過/予後 B型急性肝炎は、無症状であったり、無治療で自然寛解したりするケースが多く、成人感染の場合、95%以上の症例は完全寛解に至る。しかし、1%前後の症例では、劇症化に至る症例が存在する。重症化や劇症化が認められた場合、核酸アナログ薬の投与や免疫抑制療法・肝移植などが行われることになるが、核酸アナログ薬の登場・肝移植の成績向上により、救命率は向上しており、少数例の検討ではあるが、平松らの報告によると、B型急性肝炎により急性肝不全となった症例の救命率は78%であった¹⁰⁾。

HBVの遺伝子型に関する研究が進歩するにつれ、HBVのgenotypeにより、急性肝炎の特徴が異なることが知られるようになった。日本では、これまでHBV感染の大多数をgenotype Cが占めていたことから、成人のB型急性肝炎からの慢性化はほとんどないとされてきたが、近年、外来種であるgenotype Aの感染が増加していることから、B型急性肝炎に対するイメージを一部変更する必要がある。都市部を中心に急速に増加しているgenotype A感染では、genotype C感染に比べ、慢性化例が多く、慢性化率は10~30%と高い。また、これまでに学会などで報告されているgenotype A急性感染例をみると、HBV DNAは比較的高く、HBV DNA陰性化までの期間は3~8カ月と遅く、肝炎が遷延する傾向にある。外来種であるHBV genotype Eやgenotype Hの報告例もALT正常化まで3カ月を要するなど遷延化する傾向にあり、今後、遷延化や慢性化するB型急性肝炎症例が増加していくことが危惧される。

一方、HDV感染であるが、潜伏期間は6週間~6カ月であり、ALTが二峰性に推移する場合がある。HBVとの同時感染例の95%以上は一過性感染であり、ウイルスの排除が得られるが、HBVキャリアに重複感染した場合には、HBVが排除されないために75%以上で慢性化し、D型慢性感染に移行する。前述したように、外来種によるHBVの急性感染が増加するなかで、HBV genotype A感染ではHDV RNA陽性例が多いとの報告もあることから、今後、HDVとHBVの同時または重複感染の症例が増加する可能性が考えられ、十分な注意が必要と考えられる。

【柘植 雅貴・茶山 一彰】

参考文献

- 1) Blumberg BS, Alter HJ et al: A "new" antigen in leukemia sera. JAMA 191:541-546, 1965
- 2) Rizzetto M, Canese MG et al: Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. Gut 18:997-1003, 1977
- 3) Bergmann KF, Gerin JL: Antigens of hepatitis delta virus

- in the liver and serum of humans and animals. J Infect Dis 154:702-706, 1986
- 4) Tanaka J, Mizui M et al : Incidence rates of hepatitis B and C virus infections among blood donors in Hiroshima, Japan, during 10 years from 1994 to 2004. Intervirology 51:33-41, 2008
 - 5) Kobayashi M, Ikeda K et al : Change of hepatitis B virus genotypes in acute and chronic infections in Japan. J Med Virol 80:1880-1884, 2008
 - 6) Iwanami E, Yano M et al : Local spread of HDV infection transiently occurring in Japan. J Gastroenterol Hepatol 8:565-568, 1993
 - 7) Arakawa Y, Moriyama M et al : Molecular analysis of hepatitis D virus infection in Miyako Island, a small Japanese island. J Viral Hepat 7:375-381, 2000
 - 8) Keefe EB, Dieterich DT et al : A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States: an update. Clin Gastroenterol Hepatol 4:936-962, 2006
 - 9) Fattovich G, Giustina G et al : Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. The European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep). Gut 46:420-426, 2000
 - 10) Hiramatsu A, Takahashi S et al : Etiology and outcome of acute liver failure: retrospective analysis of 50 patients treated at a single center. J Gastroenterol Hepatol 23:1216-1222, 2008

C型肝炎

▶▶ はじめに

Chiron社の研究グループは、1989年HCV(C型肝炎ウイルス)遺伝子のクローニングに成功し、その発現蛋白を用いたHCV抗体測定系を確立した。これに

より、当時の非A非B型肝炎と診断されていた症例の大部分はHCV抗体陽性であることが確認された。その後、HCVの全遺伝子配列が決定され、HCVはフラビウイルスに属することが明らかとなった。HCVは少なくとも6つの遺伝子型(genotype)に分類され、日本ではgenotype 1b型が約70%、2a型が20%、2b型が10%程度を占めている。B型肝炎はHBV(B型肝炎ウイルス)ワクチンにより完全に防止できるが、現時点ではHCVワクチンは開発されていない。このため、医療事故による急性肝炎はC型肝炎が主体を占めており、慢性化が危惧される症例にはインターフェロン(IFN)の早期投与が推奨されている。ここでは、C型肝炎の診断と自然経過および治療について述べる。

■疫学 HCVは血液を介する感染であり、感染ルートとして輸血などの医療行為や不衛生な注射針の使用、覚せい剤使用、刺青、針治療などが存在した。特に、輸血後急性肝炎は売血時代には受血者の約半数に発症したが、1968年献血制度が開始されると輸血後肝炎の発症率は16.2%に減少した(図7)¹⁾。献血者に比べ売血者のHCV感染率が高かったことが原因とされている。その後、1972年に献血血液へのHBs抗原検査が導入されたが発症率は14.3%であり、わずかな減少にとどまった。このことから、輸血後肝炎の大部分は非A非B型肝炎ウイルスが原因と推定され、ウイルスハンティングが活発に行われるようになった。Chiron社の研究グループが、1989年HCV遺伝子のク

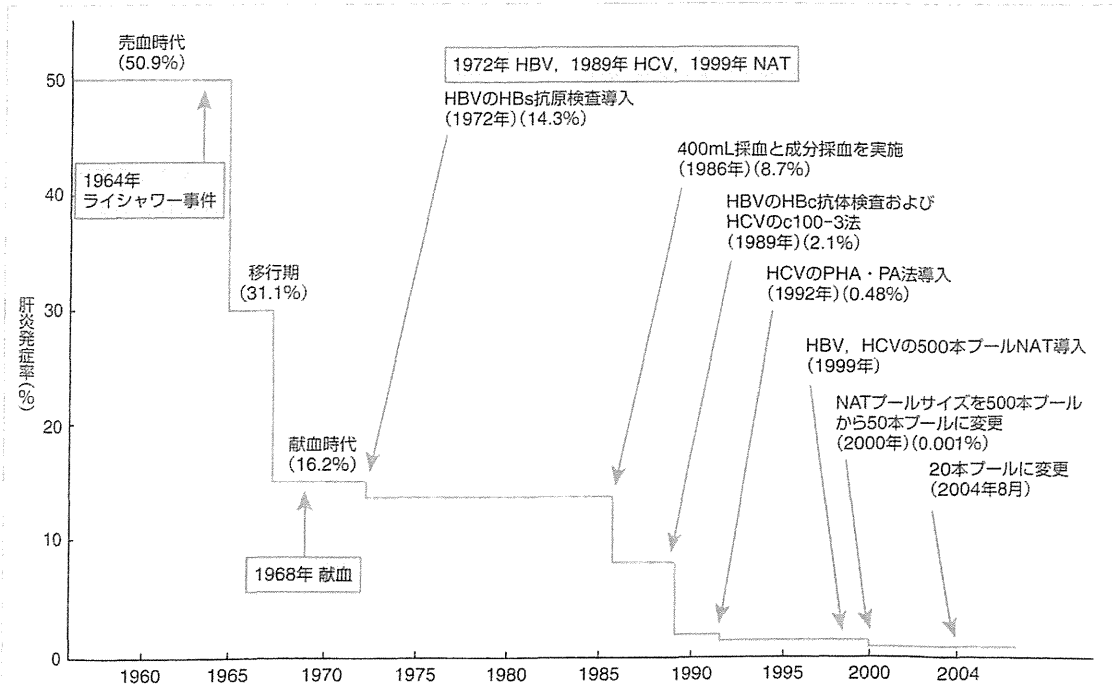


図7 輸血後急性肝炎の年次別発症頻度
 1968年HBV発見、1988年HCV発見
 HBV: B型肝炎ウイルス, HCV: C型肝炎ウイルス, NAT: 核酸増幅検査