講演

平成 22 年日本大学医学会秋季学術大会 <教授就任講演>

C 型肝炎感染実験

杉 谷 雅 彦

日本大学医学部病態病理学系病理学分野

講演要旨

平成 22 年 10 月日本大学医学会秋季学術大会における教授就任講演の機会をいただき、日本大学医学会会長の片山容一教授、理事および会員の諸先生、今回世話人の内山真教授に御礼申し上げます。また座長の労をお執りいただいた森山光彦教授に深謝いたします。

私は長崎大学医学部卒業後、日本大学大学院に入学し、第一病理学講座志方俊夫教授のご指導の下、ウイルス肝炎の研究を始めました。本講演では、C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染実験に関して、この分野における研究の歴史を簡単にご紹介しながら話を進めさせていただきます。

Blumberg 博士が発見した Australia (Au) 抗原と輸血後肝炎との密接な関連が 1968 年から 1969 年にかけて報告され、Au 抗原が B 型肝炎ウイルス蛋白抗原であることが判明しました。そして 1970 年代のはじめに A 型肝炎ウイルスが同定され、当初、肝炎の原因はこれで全て解明されたと考えられていました。しかし、1974 年に New York Blood Center (NYBC) の Alfred M. Prince 博士が B 型ではない輸血後肝炎の存在を Lancet に報告¹⁾し、その後同様の報告が相次ぎました。当初、Dr. Prince は未知のウイルスによるこの肝炎を C 型肝炎と呼ぶことを提唱しましたが、原因ウイルスが 1 種類であるかどうか判明していなかったことより、非 A 非 B 型肝炎と呼ぶことが提唱されました。非 A 非 B 型肝炎ウイルス感染例は慢性肝炎・肝硬変・肝癌へと進展し、先進国ではこれら肝疾患の原因として大きな部分を占めていたために、世界中で新たな未解決の肝炎起因ウイルス探しが活発に施行されました。しかし、輸血後非 A 非 B 型肝炎の起因ウイルス蛋白候補が発表されては否定され、消えてゆく、という試行錯誤の状況が長いこと続きました。

その様な状況の中で、1989 年に Chiron 社の Houghton 等により輸血後非 A 非 B 型肝炎原因ウイルスが同定されました²⁾。彼等が用いた検索方法で重要な役割を果たしたのは、当時発展めざましかった遺伝子工学的手法と、原因ウイルスの存在が確実なソースとして、感染実験が施行されたチンパンジー血清でした。彼らは高感染力価のチンパンジー血漿から核酸を抽出し、 λ gt11 とい

うベクターに組み込み、慢性肝炎患者血清と反応するコロニーより起因ウイルスの遺伝子を発見しました。そのウイルスが指定席として残されていた HCV と呼ばれるようになりました。それまでの研究手法とは異なり、当時めざましい進歩を遂げていた分子生物学的手法で、いきなりウイルスの構成核酸が報告されるという、ウイルス発見の経緯では世界で初めての事でした。私は、HCV が発見された同年に日本大学から長期海外出張で、NYBC の The Lindsley F. Kimball Research Institute ウイルス研究室に留学しました。Dr. Prince の指導の下、遺伝子工学の方法を学び、当時研究室を挙げて取り組んでいた HCV Hutchinson (HCV-H) 株のクローニングプロジェクトに参画し、ライブラリーから最初の HCV-H クローンの pick up に成功しました³⁾。研究室内の他の誰よりも早く目的産物を得る事ができ、私自身とても驚きましたが、Dr. Prince や研究室の皆がとても喜んでくれ、米国の研究室の雰囲気感激したことをよく覚えています。

HCV 発見までの研究の歴史の中で、ヒト HCV 感受性が証明された唯一の動物として、世界中でチンパンジーが用いられていました。HCV 感染の科学的なマーカーとしては、長いこと確実なものが発見されていませんでしたが、HCV 接種後のチンパンジー肝細胞質に、電顕上、特徴的な超微形態構造⁴⁾が出現することが報告され、HCV 発見までの期間はそれが HCV 感染の唯一の科学的な指標として用いられていました。さらに、特徴的な超微形態構造物が出現する時期のチンパンジー血清を他のチンパンジーに接種すると、そのチンパンジーには C 型肝炎が引き起こされることが確かめられました。すなわち、特徴的な超微形態構造物が出現する時期のチンパンジー血清には HCV が含まれている事が証明されたのです。これらのことより、チンパンジーはヒト C 型肝炎モデル動物として有用で貴重な動物と認識されてきました。

我々のグループのチンパンジーを用いた HCV 感染実験⁵⁾では、急性肝炎、慢性肝炎、キャリアの状態が発生し、急性肝炎から慢性肝炎あるいはキャリアへの移行はヒトに於ける HCV 感染後の慢性化への移行率と同様高率でした。しかし、我々を含む世界中のチンパンジー感

Fig. 1 HCV を含むチンパンジー継代血清を接種後の2頭のチンパンジーの臨床経過.

染実験でこれまで肝硬変、肝癌が発生したという報告は見あたりません。ところが、30年ほど前に我々のグループのHCV感染実験に用いたチンパンジーが最近死亡し、剖検が行われ、当時の共同研究者より、死亡したチンパンジーに肝硬変が発生しているという知らせが届きました。実際に剖検を施行した施設の研究グループが学会報告をするとのことで、詳細はその報告を待たねばなりません。私は当該症例の肝硬変組織を未確認のために断定はできませんが、HCV接種後30年目にして初めて肝硬変の可能性が疑われる事態が発生したものと考えられ、肝疾患研究における新たな展開が期待できるかもしれません。

1989年にHCVが発見され驚くべき速度で研究が進んでいる現在においては、実験動物を用いなくとも多くの研究が可能となりましたが、チンパンジーを用いなければならない実験系は存在します。ウイルス保菌者血清の感染価の検定^{6,7)}、再感染実験^{8,9)}、ウイルス不活化検討実験、ワクチンの有効性と安全性の検定等です。その中で最近論文にしたHCV再感染実験⁹⁾を紹介します。

遺伝子型が同じHCVを同一チンパンジーに三度接種した実験で、2頭のチンパンジーを用いて施行された臨床経過をFig. 1に示します。チンパンジーへHCVを接種し、初回のHCV感染が成立、その後血中のHCVが陰性化し、一年以上持続的に陰性であることを確認した後に、同じチンパンジーに二度目の同一遺伝子型HCVを接種し、二度目の接種でHCV感染が再び成立、更にしばらく後、血中HCVが陰性化、そして更に一年以上持続的に陰性であることを確認した後に、三度目の同一

遺伝子型のHCV接種を施行したところ、第二回目接種と同様HCV感染が成立しました。この実験に関し、同じHCVクローンの再感染・再々感染かどうかを検討する目的で、HCV遺伝子の中で最も変異が多いhypervariable region-1 (HVR1)領域を増幅するようにprimerを設計し、接種材料中のHCVとtransmissionされたHCVの遺伝子解析実験を施行しました。最初の接種材料中には複数のHCVクローンが存在しましたが、2度目、3度目の感染したチンパンジー血清中のクローンは初回接種材料中のmajorクローンがほとんどを占め、接種血清中のminor typeクローンは認められませんでした。詳しい実験結果は文献9)をご参照下さい。

結論として、本実験におけるHCV遺伝子の解析により、同一HCV株で再感染が二度成立した事が確認されました。また、transmissionされたHCVクローンの解析より、接種材料中のmajor typeクローンが他の型のクローンより強い感染性・増殖性を有していた可能性、全てのクローンが感染性を有していてもmajor quasispeciesを維持あるいは受け入れるように個体側の機構が働いた可能性、等が示唆されるものと考えられました。

さらにHCVの各領域のpolypeptideを用いてHCV遺伝子の各領域に対する抗体アッセイ系を作製し検討しました。その結果、コアや非構造領域の蛋白に対する抗体反応は十分認められても、再感染あるいは再々感染において感染防御に関与すると考えられているHVR1蛋白に対する抗体反応は十分ではない事が示されました。HCV免疫機構の複雑さが示唆され、C型のワクチン開発の困難さを示唆しているものと考えられます。T-cell response

が感染におけるウイルスのコントロールに大きな役割を果たしていることが知られていますが、本実験においてもこの観点より機構解明の研究を進展させることができればと考えています。

以上、チンパンジーを用いた HCV 感染実験を簡単に紹介しました。今後も研究を継続し、C 型肝炎・肝癌における病因解明に貢献したいと考えています。また、これまで実験病理をご指導頂いた志方俊夫名誉教授と Alfred M. Prince 博士、人体病理をご指導頂いた桜井勇名誉教授に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Prince AM, Brotman B, Grady GF, et al. Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *Lancet* 1974 Aug 3; **2** (7875): 241–246.
- 2) Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989 Apr 21; **244** (4902): 359–362.
- 3) Inchauspe G, Zebedee S, Sugitani M, et al. Genomic structure of the human prototype strain H of hepatitis C: comparison with American and Japanese isolates. *P Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 10292–10296.
- 4) Pfeifer U, Thomssen R, Legler K, et al. Experimental non-A, non-B hepatitis: four types of cytoplasmic alteration in hepatocytes of infected chimpanzees. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1980; **33** (3): 233–243.
- 5) 杉谷雅彦, 阿部賢治, 志方俊夫. 肝疾患の実験動物モデル-ヒトとの相異似性について: チンパンジーを用いた HCV 感染実験. *肝臓*, 1995; **36**: 330–333.
- 6) 厚生省非 A 非 B 型肝炎研究班 (Corresponding author: 杉谷雅彦). 日本人 C 型肝炎患者血清感染性のタイトレーション実験. *肝臓*, 1994; **35**: 887–891.
- 7) Sugitani M, Shikata T. Comparison of amino acid sequences in hypervariable region-1 of hepatitis C virus clones between human inocula and the infected chimpanzee sera. *Virus Research* 1998; **56**: 177–182.
- 8) 水野喬介. チンパンジーを用いた実験的 C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染実験. *日大医学雑誌*, 1993; **52** (12): 775–782.
- 9) Sugitani M, Nishimura S, Mizuno K, et al. Analyses of amino acid sequences in hypervariable region-1 of hepatitis C virus (HCV) in sera from chimpanzees infected three times with the same HCV strain. *J Med Primatol* 2010 Feb; **39** (1): 1–8. Epub 2009; Oct. 7.

氏名：杉谷 雅彦（すぎたに まさひこ）

所属：日本大学医学部病態病理学系病理学分野

主な研究領域：ウイルス肝炎，肝疾患の病理

抱負：平成 21 年 11 月 1 日付けをもって日本大学医学部病態病理学系病理学分野主任教授を拝命いたしました。病理学は疾患の原因や機序解明に関わる学問研究を行う重要な分野です。実際の医療においても病理診断科として重要な臨床診断部門として機能しています。これまで、ご指導いただいた志方俊夫名誉教授と Prince AM 博士、桜井勇名誉教授の教えを受け継ぎ、微力ながら、医学・医療及び社会のために役立てれば幸いと考えています。今後も日本大学の皆様方のご指導ご鞭撻をよろしくお願い申し上げます。