

---

# HBウイルス感染細胞における細胞障害の機序の検討

---

基盤研究（C）課題番号07670622

平成7年度－平成8年度科学研究費補助金（基盤研究C）研究成果報告書



平成10年3月

研究代表者 加藤多津子  
(東京女子医科大学医学部)

## 研究組織

研究代表者 加藤 多津子 (東京女子医科大学医学部)

## 研究経費

平成6年度	700千円
平成7年度	500千円
計	1,200千円

## 研究発表

- 1) 第23回日本免疫学会
- 2) 第30回日本肝臓学会総会

## 科研費研究成果報告書概要

B型肝炎ウイルス（HBV）の持続感染者は漸次減少しつつあるとはいえ、わが国においても全人口の約1%を占めており、C型肝炎ウイルス（HCV）と共に、慢性肝疾患の主要な原因のひとつである。HBV持続感染の際立った特徴の一つは、肝細胞障害を全く起こさない無症候性キャリアーが存在するという点であり、この点からもHBV自身が直接細胞障害活性を起こすのではなく、HBVに対する何らかの生体反応が、肝細胞障害の発現に重要な役割を担っていることが考えられる。HBV感染後の臨床像は、無症候性キャリアーをHBV関連抗原に対する免疫学的寛容状態、慢性肝炎発症をその寛容状態のその破綻と考えると、HBV関連抗原に対する免疫学的寛容状態の維持をその破綻の機構を解明することは、B型慢性肝炎の発病やその進展を阻止する上で極めて重要な意味を持っている。この観点から、本研究では、HBV関連抗原（s抗原やpreS抗原）に対する生体の免疫反応の特徴を解析した。

### HBs抗原に対する免疫学的非応答性の解析：

HBVに対する免疫学的寛容状態の機構を解析する目的で、HBワクチン接種者の末梢血リンパ球のHBs抗原に対する反応性をIn vitroにおけるT細胞増殖能を用いて検討した。その結果、In vivoにおけるHBワクチンの応答性に比例して、in vitroにおける反応性が認められた。すなわち、ワクチンに対する高応答者（HR）のリンパ球は、in vitroにおいてもHBs抗原に対する反応性が見られたのに対し、ワクチン非応答者（NR）のリンパ球はIn vitroにおいてもHBs抗原に対して反応しないことが明らかになった。次いで、NRリンパ球のIn vitroでのHBs抗原に対する無反応性の機序を解析する目的で、NRリンパ球からCD8陽性T細胞を除いてHBs抗原に対する反応性を検討したところ、検討した3人のNRにおいて、CD8を含む細胞群のHBs抗原に対する非応答性は、CD8細胞を除去することによりHBs抗原に対する反応性が見られることが明らかとなった。即ち、NRにおけるHBs抗原に対する非応答性は、HBs抗原に反応するCD4陽性細胞の欠損によるのではなく、CD4細胞の反応を抑制する機能を持つCD8細胞の存在によることが明らかとなった。この事実をさらに確かめるために、HBs抗原に特異的に反応するCD4陽性T細胞クローンをNRリンパ球を用いて試みた。その結果、応答者、非応答者各2例から、8種類のクローン細胞の確立に成功した。これらのクローン細胞は、いずれも、HBs抗原にのみ反応し、HBc抗原等他の抗原に対する反応性は全く認められない。これらのクローン細胞の特徴を解析する目的で、まずT細胞レセプター中Vb遺伝子の解析を行った。その結果、単一ワクチン接種者由来であり、HBs抗原に特異的に反応する機能を持つクローン細胞でも、いくつかの異なったVb遺伝子を持っておりいくつかのクローンが存在する

ことが確認できた。次いで、Cytokine産生による解析からgIFNを産生するTh1型CD4が多く認められたが、IL-4を産生するCD4クローンも存在し、特定のCD4亜集団への偏りはHR、NR両方のクローンにおいて認められなかった。現在、CD4クローンの機能を制御する機能を持つCD8クローンの作製にも成功しており、これらのCD4クローン細胞の肝炎発生における役割について検討すると同時に、その機能を制御する機序についても検討を加えている。

HBV関連抗原に対する免疫学的寛容状態の破綻と慢性肝炎の発病。

HBVに対する免疫学的寛容状態の破綻と慢性肝炎の発病を解析する目的で、慢性肝炎患者におけるHBV遺伝子の解析を行ったところ、PreS2領域に極めて変異に富む場所が存在することが明らかになり、それぞれのアミノ酸配列の特徴から、I型pre-S2、II型pre-S2、III型pre-S2HBVの3種類に分類した。次いでこれらの、異なったPreS2遺伝子型を持つ患者の特徴を解析したところ、HLA-A24陽性患者にI型pre-S2を持つHBVが多く見られることが明らかとなった。

この事実を確かめる目的で、それぞれのPreS2型に特異的なprimerを作成し、このprimerを用いてPreS2型の同定できるか否かについても検討を加えた。その結果、我々の用いたprimerを用いることにより直接核酸配列を決定するよりもより簡単にPreS2型が確定でき、しかも、直接核酸配列を決定する方法の結果と完全に一致することが証明できた。次いで、多くの症例において、先にのべたHLA-A24陽性とI型PreS2HBVとの相関を検討した。その結果表に示すように、I型PreS2HBV陽性で、かつ血中ALT高値の患者においては84%の患者が、HLA-A24陽性であることが明らかとなった。次に、I型PreS2HBV陽性で、かつ血中ALT低値の患者においてはHLA-A24陽性者は一人も見られず、HLA-A24陽性患者においては、I型PreS2HBVの存在が、肝細胞障害と密接な関連があることが明らかとなった

表1：各Pre-S2陽性患者における HLA-A2とHLA-A24の頻度

Pre-S2type	ATL値	Prevalence of			
		HLA-A24		HLA-A2	
type I	High	84% (27/32)	] < 0.0002	41% (13/32)	] < 0.05
	Low	0% (0/6)		100% (6/6)	
type II	High	25% (1/4)	] n.s.	100% (4/4)	] n.s.
	Low	67% (8/12)		67% (8/12)	
type III	High	33% (1/3)	] n.s.	100% (3/3)	] n.s.
	Low	0% (0/3)		0% (0/3)	

さらに、HLA-A24陽性慢性肝炎患者において、ALT高値の時期とALT低値の時期にそれぞれのPreS2型を解析してみた。その結果、全例においてALT高値の時期にはI型PreS2型が陽性であったのに対し、すべての症例において、血中 ALTの低下に伴い型PreS2HBVの消失が見られた。表一2に示すように、10例中7例ではII型PreS2HBVへの転換が見られ、他の3例では、HBVがPCR法でも確認できなかった。

表2：HLA-A24+B-CH患者におけるALT値の推移とI型Pre-S2HBVの消失

Patient	PreS2type	
	High ALT	Low ALT
1.26M	Type I	Type II
2.46M	Type I	Type II
3.24M	Type I	Type II
4.38M	Type I	Type II
5.38M	Type I	Type II
6.50M	Type I	Type II
7.45M	Type I	Type II
8.60M	Type I	-
9.24M	Type I	-
10.40M	Type I	-

以上の結果は、3-4年の臨床経過を追うことができた3人の患者においても確認できた。3人の臨床経過において、血中ALTの推移に伴いI型preS2HBVが変化し、ALT高値の時に優位に出現することが明らかとなった。これらの事実から考えられることは、幼少期に感染したHBVに対しては免疫学的に寛容状態にある（無症候性キャリアー）ウイルスが、ある時期突然変異を起こし、その変異型ウイルスが産生する抗原（PreS2抗原の一部）が、感染者のHLAクラスI抗原と結合するアミノ酸配列を持つ場合にのみ、誘導されたキラーT細胞（CTL）により認識され肝細胞の障害が起こるという可能性である。

#### 慢性肝炎の発症とCTL

先に述べた仮説に基づき、われわれは、HLA-A24を持つB型慢性肝炎患者の末梢血リンパ球を用いて、pre-S2ペプチドを認識するCTLの存在するかどうかについて、CTLクローンを作成し検討を加えた。その結果、HLA-A24陽性患者リンパ球を用いてpre-S2ペプチドを認識するCTLクローンを確立でき、その性状を検討し

たところ、いずれもgIFNを産生するクローンである事を証明できた。

表—3：CD8陽性T細胞のCTL活性と $\gamma$ -IFN産生能

Clone	%Cytotoxicity	E/T ratio	$\gamma$ -IFN濃度(pg/ml)
C-4	30.2	10:1	719.3
C-4	36.2	8:1	2595.7
1-27	3.0	3:1	427.2
1-33	5.0	5:1	452.4
2-27	2.0	2:1	119.4
2-18	2.0	1.6:1	36.6
3-44	20.0	1.6:1	129.5
2-22	0.0	1:1	38.3
3-47	0.0	1:1	58.9

以上の結果から、わが国で、最も多く認められるHLA-A24を持つB型慢性肝炎患者においては、HBVのpre-S2領域の変異と、その変異したウイルス由来の抗原を認識するCTLが重要な役割を担っている事を明らかにできた。