

学 位 論 文 題 名

B 型および C 型慢性肝炎に対する IFN 療法の作用機序

学位論文内容の要旨

**目的** インターフェロン（IFN）の抗ウイルス作用機序として、2' - 5' オリゴアデニル酸合成酵素（2 - 5 AS）によるウイルス蛋白の合成阻害が考えられている。一方、B 型肝炎においては、感染肝細胞膜表面の HBV 関連抗原と HLA - class I（class I）抗原とを標的抗原とした細胞障害性 T 細胞によって B 型肝炎ウイルス感染肝細胞が障害され、それがウイルス排除機構の一つとして考えられている。

そこで筆者はウイルス性慢性肝炎の自然経過および IFN 療法時に、肝細胞において 2 - 5 AS 活性および class I 抗原の発現がどの様に作働しているのかを検討するため、肝細胞の代用として B 型および C 型慢性肝炎の末梢血単核球（PBMC）2 - 5 AS 活性および末梢血リンパ球（PBL）表面 HLA 抗原の発現を検索し、B 型および C 型肝炎に対する IFN の作用機序を検討した。

**対象および研究方法** 1) 対象：HBe 抗原陽性 B 型慢性肝炎 50 例、HCV 抗体陽性 C 型慢性肝炎 20 例、および IFN 療法を施行した HBV - DNA ポリメラーゼ（DNA - p）陽性 B 型慢性肝炎 24 例と HCV - RNA 陽性 C 型慢性肝炎 37 例とを対象とした。

2) PBMC および血清 2 - 5 AS 活性の測定：PBMC を分離後、細胞を融解し遠心後の上清を酵素液とし、栄研 2 - 5 A キットにて測定した。血清 2 - 5 AS 活性は血清 50  $\mu$  l を用いて栄研 2 - 5 A キットにて測定した。

3) PBL class I 抗原の測定：PBMC を分離後、 $1 \times 10^6$  個に調整し RPMI1640 培地に孵置、ついで class I 抗原のモノクローナル抗体を加えてインキュベートし、さらに蛍光標識二次抗体を加えてインキュベートし、洗浄後、フローサイトメトリー（FCM）にてリンパ球表面の蛍光強度を測定した。class I 抗原の発現は PBL 1 個あたりの平均蛍光強度（任意単位、AU）で表示した。

4) 肝細胞 class I 抗原の測定：肝組織を直ちに periodate - lysine - paraformaldehyde（PLP）液にて固定後、 $-80^{\circ}\text{C}$  にて保存して凍結切片を作成し、酵素抗体法にて染色した。

肝細胞膜 class I 抗原の染色は、I：染まらない、II：一部の細胞で始まる、III：大多数の細

・胞で染まる、Ⅳ：び漫性に染まる、の4段階で測定した。同時に PBL class I 抗原を測定して比較検討した。

5) HCV-RNA と HCV genotype の測定：HCV-RNA は血清より acid-guanidium-thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC) 法にて RNA を抽出し、逆転写を行い cDNA を作成し、5' 非翻訳領域の2組の primer を用いて two stage polymerase chain reaction (PCR) を行って測定した。HCV genotype はコア領域に各々 genotype に特異的な4種類の primer を設定し、PCR 産物のサイズからⅠ～Ⅳ型に分類した。

6) B型慢性肝炎例の IFN 療法時の血清 2-5 AS 活性、PBL class I 抗原の測定： $\alpha$  または  $\beta$ -IFN を投与し、経時的に血清 2-5 AS 活性、PBL class I 抗原を測定した。DNA-p の陰性化と血清 2-5 AS 活性および PBL-HLA 抗原の関係について比較検討した。

7) C型慢性肝炎例の IFN 療法時の血清 2-5 AS 活性の測定： $\alpha$  または  $\beta$ -IFN を4週間連続投与し、HCV-RNA 陰性化と血清 2-5 AS 活性の関係について比較検討した。

**結果** 1) B型およびC型慢性肝炎の PBMC 2-5 AS 活性：B型慢性肝炎、C型慢性肝炎では健常成人に比較して高値を示した。IFN 治療例では、投与直後よりその活性は上昇を示し、投与期間を通じて高値を維持した。

2) 肝組織 class I 抗原と PBL class I 抗原発現の比較

PBLclass I 抗原は肝細胞での class I 抗原の染色性別に、(Ⅰ) 平均520.3AU, (Ⅱ) 平均552.7AU, (Ⅲ) 平均928.3AU, (Ⅳ) 平均1095.5AU と肝細胞での class I 抗原の染色の増強に平行して強く発現した。

3) B型およびC型慢性肝疾患の PBL-class I 抗原発現

B型慢性肝炎、C型慢性肝炎の class I 抗原は、健常成人に比較して高値を示した。IFN 治療例では class I 抗原発現はさらに増強していた。

4) IFN 添加培養 PBMC の 2-5 AS 活性と class I 抗原発現

$\alpha$ -IFN の濃度依存性にその活性は上昇したが、 $\gamma$ -IFN では僅かであった。PBL class I 抗原発現は両 IFN で濃度依存性に増強した。

5) IFN 投与時の血清 2-5 AS 活性および PBLclass I 抗原発現－B型慢性肝炎－：血清 2-5 AS 活性および PBL class I 抗原の IFN 投与前値は有効群と無効群の比較で差を認めなかった。血清 2-5 AS 活性は IFN 投与にて上昇し、有効群で高値が認められた。PBL class I 抗原発現は IFN 投与にて増強したが、その程度は有効群と無効群とで差を認めなかった。

6) IFN 投与時の血清 2-5 AS 活性－C型慢性肝炎－：血清 2-5 AS 活性は RNA 陰性化群で高値を示したが、推計学的には有意でなかった。HCV-RNA の陰性化は genotype Ⅲお

よびⅣ型では90%と高率であったが、genotype Ⅱ型では35.1%であった。genotype Ⅲ型では2-5 AS 活性と RNA 陰性化に一定の傾向を認めなかったが、genotype Ⅱ型では2-5 AS 活性高値例に RNA 陰性化を多く認めた。

**考按** ウイルス性慢性肝炎患者の肝細胞 class I 抗原の染色性と PBL class I 抗原発現とは関連することが示唆された。BおよびC型慢性肝炎では PBMC 2-5 AS 活性および PBL class I 抗原発現は健常成人に比較して高値であり、B型慢性肝炎の急性増悪時には PBL class I 抗原および PBMC 2-5 AS 活性は高値を示し、GPT の改善に伴って漸減した。これらの事より、B型慢性肝炎では自然経過中に内因性に IFN が産生され、HBV 関連抗原と class I 抗原とを標的抗原とした細胞障害性T細胞による肝細胞障害と2-5 Aシステムを介した HBV の増殖抑制とが働いている事が示唆された。

B型慢性肝炎における IFN 療法時の血清2-5 AS 活性と PBL class I 抗原発現との検討では、血清2-5 AS 血清は有効例で高値を示したが、PBL class I 抗原発現には一定の傾向が認められず、IFN の抗ウイルス状態の指標としては2-5 AS 活性の有用性が示唆された。

一方、C型慢性肝炎では IFN 投与時の血清2-5 AS 活性と HCV-RNA 消失の検討から、genotype ⅢおよびⅣ型の症例では、2-5 AS の誘導の程度に関わらず大部分の症例で RNA は陰性化が認められた。Ⅱ型の症例では RNA 陰性化例は35.1%で、genotype 間で IFN 治療に対する反応性の異なることが認められた。Ⅱ型の症例では2-5 AS の誘導が良好な症例において RNA 陰性化率が高く、血清2-5 AS 活性と抗ウイルス効果とは密接な関連を示した。

**結論** B型およびC型慢性肝炎に対する IFN 療法の作用機序を検討し、以下の結論を得た。

- 1) PBMC の HLA 抗原の発現は、肝細胞の HLA 抗原発現の指標になることが示唆された。
- 2) B型慢性肝炎では、経過中に内因性に IFN が産生され、HBV 関連抗原と class I 抗原とを標的抗原とした CTL による肝細胞障害と2-5 Aシステムを介した HBV の増殖抑制が働いている事が示唆された。
- 3) B型慢性肝炎の IFN 療法では血清2-5 AS 活性が、抗ウイルス状態の有用な指標と考えられた。PBL class I 抗原の発現と IFN 療法の効果とには一定の傾向が認められなかった。
- 4) C型慢性肝炎の IFN 療法では、HCV genotype によって効果に差があり、Ⅲ型、Ⅳ型で良好であった。Ⅱ型では2-5 AS 活性の高値例で HCV-RNA の消失例が多く、2-5 AS 活性は抗ウイルス効果を反映していると考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 崎 保  
副 査 教 授 葛 巻 暹  
副 査 教 授 皆 川 知 紀

## I. 研究目的

インターフェロン (IFN) の抗ウイルス作用の機序として、2' - 5' オリゴアデニル酸合成酵素 (2 - 5 AS) によるウイルス蛋白の合成阻害が考えられている。一方、B型肝炎においては、肝細胞膜表面のHBV 関連抗原とHLAclass I (class I) 抗原を標的抗原とした細胞障害性T細胞による感染肝細胞障害がウイルス排除機構の一つとして考えられている。今回の研究ではウイルス性慢性肝炎の自然経過およびIFN 療法時に、肝組織において2 - 5 AS 活性およびclass I 抗原の発現がどのような様に作働しているのかを検討するため、肝細胞の代用としてB型およびC型慢性肝炎の末梢血単核球 (PBMC) 2 - 5 AS 活性および末梢血リンパ球 (PBL) 表面 HLA 抗原の発現を検索し、B型およびC型肝炎に対するIFN 療法の作用機序を検討した。

## II. 対象および研究方法

- 1) 対象：B型慢性肝炎74例，C型慢性肝炎57例を対象とした。
- 2) PBMC および血清 2 - 5 AS 活性の測定：PBMC を融解し遠心後の上清を酵素液とし、血清は凍結保存血清を用いて栄研 2 - 5 A キットにて測定した。
- 3) PBL class I 抗原の測定：PBMC を分離後，RPMI1640培地に孵置後 class I 抗原のモノクローナル抗体を加えてインキュベートし，さらに蛍光標識二次抗体を加えてインキュベートし，洗浄後，フローサイトメトリーにてリンパ球表面の蛍光強度を測定した。
- 4) 肝組織 class I 抗原の測定：凍結切片を作成し，酵素抗体法にて染色した。肝細胞膜 class I 抗原の染色は，Ⅰ：染まらない，Ⅱ：一部の細胞で染まる，Ⅲ：大多数の細胞で染まる，Ⅳ：び漫性に染まる，の4段階で判定した。同時にPBL class I 抗原を測定して比較検討した。
- 5) HCV-RNA と HCV genotype の測定：HCV-RNA は血清より acid-guanidium-thiocyanate-phenol-chloroform 法にてRNA を抽出し，逆転写を行いcDNA を作成し，5' 非翻訳領域の2組の primer を用いて two stage polymerase chain reaction (PCR) を行って測定した。HCV genotype はコア領域に各々 genotype に特異的な4種

類の primer を設定し、PCR 産物のサイズから I ～IV型に分類した。

### Ⅲ. 結 果

#### 1) PBMC 2 - 5 AS 活性および PBL class I 抗原発現：

B型慢性肝炎，C型慢性肝炎では健常成人に比較して PBMC 2 - 5 AS 活性は高値を示し，PBL class I 抗原は強く発現した。IFN治療例では，さらに PBMC 2 - 5 AS 活性の上昇，PBL class I 抗原発現の増強を認めた。

#### 2) 肝組織 class I 抗原と PBLclass I 抗原発現の比較

PBL class I 抗原は肝細胞での class I 抗原の染色性別に平均で，(I) 520.3AU，(II) 552.7AU，(III) 928.3AU，(IV) 1095.5AU と肝細胞での class I 抗原の染色の増強に平行して強く発現した。

5) IFN 投与時の血清 2 - 5 AS 活性および PBL class I 抗原発現 - B型慢性肝炎 - ：血清 2 - 5 AS 活性は IFN 投与にて上昇し，有効群 (DNA-p 陰性化群) で高値であった。PBL class I 抗原発現は IFN 投与にて増強したが，その程度は有効群と無効群 (DNA-p 持続陽性群) とで差を認めなかった。

6) IFN 投与時の血清 2 - 5 AS 活性 - C型慢性肝炎 - ：血清 2 - 5 AS 活性は HCV-RNA 陰性化群で高値を示したが，推計学的には有意でなかった。HCV-RNA の陰性化は genotype III および IV 型で高率であった。genotype II 型では 2 - 5 AS 活性高値例に RNA 陰性化を多く認めた。

### Ⅳ. 結 語

1) PBL の HLA 抗原の発現は，肝細胞の HLA 抗原発現の指標になることが示唆された。

2) B型慢性肝炎では，経過中に内因性に IFN が産生され，HBV 関連抗原と class I 抗原とを標的抗原とした CTL による肝細胞障害と 2 - 5 A システムを介した HBV の増殖抑制の働いている事が示唆された。

3) B型慢性肝炎の IFN 療法では血清 2 - 5 AS 活性が，抗ウイルス状態の有用な指標と考えられた。PBL class I 抗原の発現と IFN 療法の効果とには一定の傾向が認められなかった。4) C型慢性肝炎の IFN 療法では，HCV genotype によって効果に差があり，III 型，IV 型で良好であった。II 型では 2 - 5 AS 活性の高値例で HCV-RNA の消失例が多く，2 - 5 AS 活性は IFN による抗ウイルス状態を反映していると考えられた。

・以上より，本研究は博士（医学）の学位論文として妥当なものと判断される。