

学 位 論 文 題 名

血清および肝組織内C型肝炎ウイルス

遺伝子検出の臨床的意義

学位論文内容の要旨

【目的】

C型肝炎ウイルス(HCV)の遺伝子配列が、1988年に分子生物学的に発見されて以来、多くの知見が急速に報告されてきている。しかし、血中に存在するHCV RNA量は微量であるため、その検出や量的検討には困難をとまなう。さらに、HCVの増幅に関しては、不明の点も多い。今回の検討では、標識ヌクレオチドを用いたRT-PCR(Reverse transcription -polymerase chain reaction)法でHCV RNA量の定量化を検討し、C型肝炎における血清および肝組織中のHCV RNA測定の意義や病態との関連を検討した。

【対象および研究方法】

1) 対象：第二世代HCV抗体陽性の慢性非A非B型肝炎患者78例（男46例、女32例、平均年齢49.9歳）を対象とした。そのうち、肝組織内のHCV RNAの測定は、42例に行った。IFN治療は63例に施行した。

2) HCV RNAの検出：血清またはhomogenize後の肝組織から、AGPC法により核酸を抽出した後、random primerを用い、

M-MLV(Molony Murine Leukemia Virus) Reverse transcriptaseで逆転写反応を行った。合成されたcDNAを、2段階のPCR(polymerase chain reaction)法で増幅した。1st PCRは40cycle、2nd PCRは25cycle

施行した。PCR産物をAgarose gelで電気泳動した後に、Ethidium bromide染色し、紫外線下にポラロイド撮影して判定した。

3) (-)鎖RNAの検出：RNA抽出物に、20mM NaIO₄, 0.1N NaBH₄を加えて、3'末端を化学的に処理後、sense primerを用いて逆転写反応を行った。100℃で30分間加熱し、酵素を失活させた産物を、PCR法で増幅し、上述した方法と同様に判定した。

4) HCV RNAの定量化：反応液中に、標識ヌクレオチド(α -³²P-dCTP)を加えて施行したPCR産物をAgarose gelで電気泳動し、該当する部分を切り出してシンチレーションカウンターで放射活性を測定した。同時に、Standard用に核酸量既知のcDNAを段階希釈したsampleもPCRを行い、標準曲線を作製して検体のcDNA量を算定した。

5) HCV genotypeの判定：Okamotoらの方法に準じ、HCVのcore領域の一部を1st PCRで増幅し、各々のgenotypeに特徴的な部位に設定したantisense primerを用いて2nd PCRを施行した。得られた産物を電気泳動し、バンドのサイズからgenotypeを決定した。

6) 病理組織学的検討：慢性肝炎の病理組織は、ヨーロッパ分類にしたがって分類した。肝炎の活動性は、KnodellらのHistology activity index(HAI)でスコア化した。

【結果】

1) 標識ヌクレオチドを用いたRT-PCR法によるHCV RNA量測定の定量性

段階希釈したstandard用のsampleでは、20～35 cycleの範囲で、サイクル数および濃度とPCR産物量の間に関連が認められた。40 cycleでは、高濃度域でamplification plateauに達したが、実際のC型肝炎患者の検体では、plateauに達するものは、ほとんど認めなかった。

2) 肝組織と抽出核酸量

両者の間には相関が認められた($r=0.71, p<0.01$)。核酸の抽出効率はほぼ一定で、平均では、肝組織1mgから抽出される核酸量は $1.6\mu\text{g}$ であった。

3) 血清中HCV RNA量と宿主側因子の関係

病期別のHCV RNA量では、病期の進行とともに増加し、肝硬変で減少する傾向が認められた。罹病期間の長期化にともないRNA量の増加する傾向が認められた。加齢にともないRNA量のやや増加する傾向がみられたが、有意差は認められなかった。

4) 肝組織中のHCV RNAと血清中HCV RNAの関係

肝組織1gあたりと血清1mlあたりとのRNA量の比較では、両者に有意な相関が認められた。

5) 肝組織中の(+)鎖および(-)鎖HCV RNA

組織中のRNAを測定した42例中、(+)鎖は全例に、(-)鎖は39例(92.9%)に検出された。病期別の(+)鎖および(-)鎖RNA量には、有意差は認められなかった。(+)鎖に対する(-)鎖RNA量の割合は、数%程度の例が多かった。

6) IFNの治療効果とHCV RNA

著効例では、一過性有効例や無反応例より、治療前のHCV RNA量が低値の傾向であった。さらに、治療開始4週目のRNAの陰性化も、著効例で高率であった。治療終了時には、一過性有効例においても半数以上の症例でRNAは陰性化するが、終了6か月後では、RNA陰性例の大部分は著効例であった。再治療後の著効例では、初回投与時より再投与時のRNA量は低値の傾向であった。

7) Genotype別の治療効果とHCV RNA量

III型の症例では、II型の症例に比べ、著効率は高率であった。治療開始前のRNA量は、両型に差はなかったが、治療開始4週後のRNAの陰性化率は、II型で50.0%、III型で87.5%であった。

【考按】

HCVの検出は、血中に存在する量が微量であるため、困難をとまう。PCR法の応用により、定性的にはその検出は可能となったが、定量的な検討には、方法論的に問題が残されている。著者は、標識ヌクレオチドを用いたRT-PCR法によるHCV RNAの定量化を報告してきたが、一定の条件下で施行することにより、臨床応用が可能と考えられた。さらに、本法により定量化したHCV RNA量の検討より、ウイルス量の増加と肝病変の進行とに関連が認められた。一方、肝組織内のRNA量と血清中のRNA量には相関がみられ、血清中のRNA測定で、組織内RNA量の推定が可能と考えられた。肝組織中からは(-)鎖RNAが検出され、慢性肝疾患では、HCVが肝内で増幅されていることが示唆された。

C型慢性肝炎に対するインターフェロン(IFN)治療の効果に關与するウイルス側の因子は、HCV RNA量とgenotypeであった。治療前のRNA量が同レベルでも、IFN投与後のRNAの消失にはgenotype間に差が認められ、genotypeによりIFNに対する感受性は異なることが示唆された。

【結論】

C型慢性肝疾患患者の血清および肝組織内のHCV RNAを検出し、以下の結論を得た。

- 1) C型慢性肝疾患患者のHCV RNA量は、罹病期間の長期化、活動性の増加にともない、増加の傾向を認めた。
- 2) 血清中のHCV RNA量は、肝組織中のRNA量と相関が認められ、肝内ウイルス量を反映していると考えられた。
- 3) 肝組織内で(-)鎖RNAが検出され、肝内でHCVが増殖すると考えられた。
- 4) IFNの治療効果に關与するウイルス側の因子は、HCV RNA量とgenotypeであった。genotypeⅢ型では、Ⅱ型よりRNA陰性化率

が高く、IFNに対する感受性が異なることが示唆された。

以上より、RT-PCR法を用いた血清および肝組織内のHCV RNAの検出は、病態解析や治療効果判定に有用と考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 崎 保

副 査 教 授 内 野 純 一

副 査 教 授 西 信 三

学 位 論 文 題 名

血清および肝組織内C型肝炎ウイルス 遺伝子検出の臨床的意義

【 目 的 】

血中に存在するC型肝炎ウイルス(HCV) RNA量は微量であるため、その検出や量的検討には困難を伴う。今回の検討では、RT-PCR(Reverse transcription-polymerase chain reaction)法でHCV RNA量の定量化を検討し、C型肝炎における血清および肝組織中のHCV RNA測定の意味や病態との関連を検討した。

【 対象および研究方法 】

1) 対象：第二世代HCV抗体陽性の慢性非A非B型肝炎患者78例を対象とした。肝組織内のHCV RNAの測定は42例に、IFN治療は63例に施行した。

2) HCV RNAの検出：血清または肝組織から、AGPC法により核酸を抽出し、逆転写反応を行なって合成したcDNAをPCR法で増幅した。

3) (-)鎖RNAの検出：RNA抽出物に、NaIO₄とNaBH₄を加えて、3'末端を化学処理後、sense primerを用いて逆転写反応を行った。100℃で30分間加熱して酵素を失活させ、産物をPCR法で増幅した。

4) HCV RNAの定量化：標識ヌクレオチド(α -³²P-dCTP)を加えて施行したPCR産物をagarose gelで電気泳動し、該当する部分を切り出してシンチレーションカウンターで放射活性を測定した。核酸量既知のcDNAを段階希釈したstandard用sampleも同時にPCRを行い、標準曲線を作製して検体のcDNA量を算定した。

5) HCV genotypeの判定：Okamotoらの方法に準じ、HCVのcore領域の一部を、タイプ別に特異的なprimerを用いて増幅したPCR産物のサイズからgenotypeを決定した。

【 結 果 】

1) 標識ヌクレオチドを用いたRT-PCR法によるHCV RNA量測定の定量性

段階希釈した標準用sampleでは、20～35 cycleの範囲で、サイクル数および濃度とPCR産物量の間に関係が認められた。40 cycleでは、高濃度域でamplification plateauに達したが、実際のC型肝炎患者血清中HCV RNA濃度を考慮し、40 cycleが適当と考えられた。

2) 肝組織と抽出核酸量

両者の間には関係が認められ($r=0.71, p<0.01$)、核酸の抽出効率ほぼ一定であった。

3) 血清中HCV RNA量と宿主側因子の関係

病期別のHCV RNA量では、慢性肝炎では活動性の上昇とともに増加し、肝硬変でやや減少する傾向を認めた。罹病期間の長期化にともないRNA量の増加する傾向が認められた。

4) 肝組織中のHCV RNAと血清中HCV RNAの関係

肝組織1gあたりと血清1mlあたりのRNA量には、有意な関係が認められた。

5) 肝組織中の(+)鎖および(-)鎖HCV RNA

(+)鎖は42例全例に、(-)鎖は39例(92.9%)に検出された。(+)鎖に対する(-)鎖RNA量の割合は、数%程度の例が多かった。

6) IFNの治療効果とHCV RNA

著効例では、一過性有効例や無反応例より、治療前のHCV RNA量が低値の傾向で、さらに、治療開始4週目のRNAの陰性化も高率であった。治療終了6か月後のRNA陰性例の大部分も著効例であった。再治療後による著効例では、初回と比較し、再投与時のRNA量は低値の傾向であった。

7) Genotype別の治療効果とHCV RNA量

III型の症例では、II型の症例に比べ、著効率は高率であった。治療開始前のRNA量は、両型に差はなかったが、治療開始4週後のRNAの陰性化率は、II型で50.0%、III型で87.5%であった。

【 結 語 】

1) C型慢性肝疾患患者のHCV RNA量は、罹病期間の長期化、活動性の増加に伴い、増加の傾向を認めた。

2) 血清中のHCV RNA量は、肝組織中のRNA量と関係が認められ、肝内ウイルス量を反映していると考えられた。

3) 肝組織内で(-)鎖RNAが検出され、肝内でHCVが増殖すると考えられた。

4) IFNの治療効果に関与するウイルス側の因子は、HCV RNA量とgenotypeであった。

genotypeIII型では、II型よりRNA陰性化率が高く、IFNに対する感受性が異なることが示唆された。

以上より、RT-PCR法を用いた血清および肝組織内のHCV RNAの検出は、病態解析や治療効果判定に有用と考えられた。

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。