

学 位 論 文 題 名

Changes in hepatitis C virus quasispecies
and density populations in patients before
and after interferon therapy

(インターフェロン治療前後のC型肝炎ウイルスの擬種性および浮遊密度の変化)

学位論文内容の要旨

I 緒言

C型慢性肝炎に対するインターフェロン(以下IFN)治療の有効率は約30%と十分ではない。効果判定上、肝機能が正常を持続する症例はほとんどの例でウイルスも消失し著効を意味するが、一部の例で、肝機能が正常を持続しながらもウイルスが存在する解離例(以下IR)が存在する。したがって、IFN治療に限界があり、他に有効な効ウイルス薬が未だない現状では、ウイルスと個体がいわば共存しているIRは、治療目標の一つとなりえる可能性が考えられる。この病態に関して最近、考藤らは血中ウイルスの浮遊密度が、IFN治療後も肝機能障害が持続する無効例(以下NR)に比べIRでは高いことを指摘している。血中ウイルスは、フリーのビリオン、免疫複合体などで存在していると考えられる。一方、C型肝炎ウイルスは変異が多く、特にエンベロップ領域のE2の5'末端に集中している。この部位は超可変領域(以下HVR)と言われ、中和抗体のエピトープが存在し、この部位の変異により、ウイルスは中和抗体より逃避し、持続感染につながると考えられている。また同一個体内にも、さまざまな変異をもったウイルスが存在し、この状態をquasispecies(擬種性)と呼ぶ。したがって、血中ウイルスの免疫複合体形成には特にウイルスのHVRのquasispeciesが深く関わっていると考えられる。そこで今回、IRのウイルス動態を明らかにするために、IFN治療前後のウイルスの浮遊密度およびHVRのquasispeciesの変化をNRと比較検討した。

II 対象と方法

IFN治療を行い12ヶ月以上経過観察できたC型慢性肝炎患者12例を対象とした。6例はIFN終了後ウイルス血症が持続しながらalanine aminotransferase (ALT)が6ヶ月以上正常を持続するIR群で、残りの6例は治療終了後も異常値を示した無効(NR)群である。治療前、および治療後最低3ポイントの血清を

用いて以下の測定を行った。ウイルスの浮遊密度は血清 50 μ l を比重 1.063g/dl の NaCl 溶液 8ml にまぜ超遠心を行い、上層部(top)1ml、底部(bottom)1ml を採取し、それぞれの分画から RNA を抽出、reverse transcriptase により DNA に変換後、10 倍ごと段階希釈し、C 型肝炎ウイルスの 5' 非翻訳領域のプライマーを用いて、polymerase chain reaction (PCR) を行い、end point dilution 法にて、各分画の比を決定し、T/B と表現した。Quasispecies は non-isotopic single strand conformation polymorphism 法で HVR をターゲットとして行った。他にウイルス量は branched DNA assay で測定した。統計学的検討はフィッシャーの直接確率計算法を用い、危険率 5% 以下を有意差ありとした。

III 結果

1. IFN 治療前後の検討： T/B は治療前は IR 群は 6 例中 4 例は 1 であるのに対して NR は全例 0.1 と bottom 優位であった。治療後は IR、NR 群とも 0.1 以下を示していた。Quasispecies は IR 群では 6 例中 5 例が、NR 群では 6 例中 4 例が IFN 前後で population に変化を認めた。

2. IFN 投与後の検討： 投与後の観察期間は IR 群 12-44 ヶ月（中央値 24 ヶ月）、NR 群 18-32 ヶ月（中央値 23 ヶ月）で両群に差を認めなかった。T/B は両群とも 1 未満で推移することが多いが、NR 群で 2 例、IR 群でも 1 例に ALT が上昇する前に一過性の上昇を認めた。Quasispecies は IR 群では ALT が正常を継続する期間では 6 例中 4 例は population に変化を認めないのに対して、NR 群では観察期間中に全例 population に変化を認めた。経過観察中、ALT が上昇する直前に T/B が上昇し、quasispecies の変動を認めた例を 2 例経験した。

IV 考案

最近、C 型肝炎では ALT 値が高く推移するほど肝細胞癌発症の危険が増えることが指摘されており、肝炎のコントロールの重要性が再認識されつつある。このことから IR の病態を理解することは臨床上重要であると考え、今回 IR 症例のウイルスの浮遊密度に加えて HVR の quasispecies も検討した。IR 例では治療前の浮遊密度は比較的軽いウイルスが多く、治療後は重いウイルスに変化する傾向を認めた。浮遊密度は個体の免疫とかかわっており、IFN 投与により生じた免疫反応の変化が、IR の原因である可能性が考えられる。IFN 投与後の IR は浮遊密度も quasispecies も変化が少なかった。これはウイルスが変異に関して安定した状態で存在していると解釈される。さらに肝障害出現前に浮遊密度が軽いウイルスの増加と、HVR の新しいクローンが出現した例を 2 例経験した。このことより肝障害の発現に HVR が重要な領域である可能性が示唆された。

V 結語

1. IR の病態には浮遊密度の変化がかかわっている可能性が示唆された。
2. HVR は中和抗体のエピトープ領域と考えられているが、肝細胞障害の発現にも重要な領域であると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 皆 川 知 紀
副 査 教 授 小 池 隆 夫

学 位 論 文 題 名

Changes in hepatitis C virus quasispecies and density populations in patients before and after interferon therapy

(インターフェロン治療前後のC型肝炎ウイルスの擬種性および浮遊密度の変化)

C型慢性肝炎に対するインターフェロン(以下IFN)治療の有効率は約30%と十分ではない。効果判定上、肝機能が正常を継続する症例はほとんどの例でウイルスも消失し著効を意味するが、一部の例で、肝機能が正常を継続しながらもウイルスが存在する解離例(以下IR)が存在する。この病態に関して最近、血中ウイルスの浮遊密度が、IFN治療後も肝機能障害が持続する無効例(以下NR)に比べIRでは高いことを指摘している。血中ウイルスは、フリーのビリオン、免疫複合体などで存在していると考えられる。一方、C型肝炎ウイルスは変異が多く、特にエンベロープ領域のE2の5'末端に集中している。この部位は超可変領域(以下HVR)と言われ、中和抗体のエピトープが存在し、この部位の変異により、ウイルスは中和抗体より逃避し、持続感染につながると考えられている。また同一個体内にも、さまざまな変異をもったウイルスが存在し、この状態をquasispecies(擬種性)と呼ぶ。したがって、血中ウイルスの免疫複合体形成には特にウイルスのHVRのquasispeciesが深く関わっていると考えられる。このような状況を背景に、学位申請者は、IRのウイルス動態を明らかにするために、IFN治療前後のウイルスの浮遊密度およびHVRのquasispeciesの変化をNRと比較検討し、その成果をまとめたのが本研究である。

IFN治療を行い12ヶ月以上経過観察できたC型慢性肝炎患者12例を対象としている(IR6例、NR6例)。治療前、および治療後最低3ポイントの血清を用いて以下の測定を行った。ウイルスの浮遊密度は血清50 μ lを比重1.063g/dlのNaCl溶液8mlにまぜ超遠心を行い、上層部(top)1ml、底部(bottom)1mlを採取し、それぞれの分画からRNAを抽出、reverse transcriptaseによりDNAに変換後、10倍ごと段階希釈し、C型肝炎ウイルスの5'非翻訳領域のプライマーを用いて、polymerase chain reaction(PCR)を行い、end point dilution法にて、各分画の比を決定し、T/Bと表現した。Quasispeciesはnon-isotopic single strand conformation polymorphism法でHVRをターゲットとして行った。他にウイルス量はbranched DNA assayで測定した。統計学的検討はStudent t-testおよびMann-Whitney testを用い、危険率5%以下を有意差ありとした。

IFN治療前後の検討ではT/Bは治療前はIR群は6例中4例は1であるのに対してNRは全例0.1と

bottom 優位であった。治療後は IR、NR 群とも 0.1 以下を示していた。Quasispecies は IR 群では 6 例中 5 例が、NR 群では 6 例中 4 例が IFN 前後で population に変化を認めた。IFN 投与後の検討では、T/B は両群とも 1 未満で推移することが多いが、NR 群で 2 例、IR 群でも 1 例に ALT が上昇する前に一過性の上昇を認めた。Quasispecies は IR 群では ALT が正常を持続する期間では 6 例中 4 例は population に変化を認めないのに対して、NR 群では観察期間中に全例 population に変化を認めた。経過観察中、ALT が上昇する直前に T/B が上昇し、quasispecies の変動を認めた例を 2 例経験した。これら結果より学位申請者は、IR 例はウイルスが変異に関して安定した状態で存在していると解釈し、肝細胞障害の少ない状況では、中和抗体のエピトープ領域である HVR も変異率が減少することを示した。さらに肝障害出現前に浮遊密度が軽いウイルスの増加と、HVR の新しいクローンが出現した例から一部の症例で肝障害の発現に HVR が重要な領域である可能性を示唆した。

学位論文発表にあたって、免研の細菌感染部門の岸助教授から PCR 法の特異性とその確認、副査の皆川教授から、IFN により complete に効く症例のウイルスの存在様式、T/B の変化の意味、Top、bottom のウイルスの存在様式と IFN 治療効果、IR の予後を含めた臨床的考え方、患者への説明について、IFN 治療抵抗性の理由などについての質問があり、また副査の小池教授から top、bottom 各分画のウイルスの mutation、HCV の潜伏感染の存在、mannose-binding protien とウイルスの関係、ウイルスと結合する抗体の種類について、主査の長嶋教授から、SSCP 法の泳動条件、IR 例の選出条件、top、bottom 各分画のウイルスの sequence の必要性についての質問があったが、学位申請者は豊富な臨床経験と十分な医学基礎知識から概ね妥当な回答をおこなった。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。