

氏 名 (本籍) 齋 藤 幸 惠

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 医 博 第 1 2 4 5 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 7 年 3 月 24 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

研 究 科 專 攻 東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科
(博 士 課 程) 内 科 学 系 專 攻

学 位 論 文 題 目 C 型 肝 炎 ウ イ ル ス の 胆 汁 感 染 , イ ン タ ー フ ェ ロ ン
再 投 与 時 の 反 応 性 , 血 中 免 疫 複 合 体 形 成 に 関 する
研 究

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 豊 田 隆 謙 教 授 大 槻 昌 夫

教 授 菅 村 和 夫

論文内容要旨

【目 的】

慢性C型肝炎でみられる胆管炎の発生病理，インターフェロン（IFN）再治療の可能性，C型肝炎ウイルス（HCV）の免疫複合体の臨床的意味を明らかにするために，RT-PCR法を用いて以下につき検討した。

- (1) 慢性C型肝炎患者胆汁中のHCV-RNAの検出。
- (2) IFN再治療のウイルス学的検討。
- (3) IFN治療後の慢性C型肝炎患者血中のnaked HCVと免疫複合体の検出。

【対 象】

- (1) 慢性C型肝炎7例（うち2例はIFN投与中）と，HCV-RNA及びHCV抗体陰性で肝機能正常の対照患者4例の胆汁を用いた。Double-lumen tubeを十二指腸まで挿入し，胆汁を4℃で採取した。胆汁及び胆汁採取時血清のHCV-RNAを測定した。慢性C型肝炎患者肝生検は，胆汁採取20日以内に施行した。
- (2) 初回IFN投与で著効が得られず，IFNを再投与した慢性C型肝炎12例で検討した。IFN投与後，ALT値40 IU/L以下を示した例をresponder，それ以外をnonresponderとした。IFN投与量は初回治療で平均227.8MU，再治療で平均270.7MUであり，初回治療，再治療においてIFN投与直前，終了時の血清につき定量的RT-PCR法でHCV量を測定した。
- (3) IFN治療を受けた慢性C型肝炎8例（著効：3例，無効：5例）で，IFN投与直前，終了時，終了1ヶ月後，3ヶ月後，6ヶ月後の血清を用い，ALT値，免疫複合体の有無につき検討した。

【方 法】

定性的RT-PCR：検体（血清，胆汁又は免疫グロブリン処理した上清と沈殿）100 μ lよりRNAを抽出し，プラス鎖HCV-RNA検出用又はマイナス鎖HCV-RNA検出用プライマーでcDNAを合成した後RT-PCRを行った。

定量的RT-PCR： $10^1 \sim 10^{10}$ copies/ μ lのスタンダードDNAを作製した。検体のHCV定量は，100 μ lの血清よりRNAを抽出後cDNAを合成し，cDNAと $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTPを20 μ Ci/ml含む反応液でPCR反応を行った。PCR反応毎にスタンダードDNAを入れた。PCR反応産物に取り込まれた $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTPの量を，BAS-2000で測定した。

HCVの免疫複合体の検出：あらかじめ血清と抗体の混合比に関して検討を行い、患者血清を1000倍希釈とした。血清中の細胞成分を除く為、遠心した後上清に同量の4倍希釈ウサギ由来抗ヒト免疫グロブリンを加え、4℃で一晩静置した。遠心して上清と沈殿に分離し、各々につきRT-PCR法でHCV-RNAの有無を検討した。

【結果及び考察】

(1) HCV-RNA陽性の血清に、胆汁あるいは緩衝液のみを加え、RNAを抽出しPCRを行ったところ、添加した胆汁量に比例してPCR反応は抑制されたが、血清HCV-RNA陽性のIFN治療前の5症例全例の胆汁中に、プラス鎖HCV-RNAが検出された。マイナス鎖HCV-RNAは全例検出されなかった。一方、血清プラス鎖HCV-RNAが陰性の6例（2例IFN治療中）全例で胆汁中にHCV-RNAは検出されなかった。胆汁中への血液混入の可能性は否定され、HCVが胆汁中に分泌されていると考えられた。現在まで、胆汁中HCV-RNAの報告はない。

肝組織像では、7例中3例にリンパ球浸潤を伴った胆管炎を認め、胆管炎を認めた3例中2例は胆汁中HCV-RNA陽性、1例は陰性（IFN治療中）であった。胆汁中HCV-RNAと胆管炎の因果関係は未だ不明だが、胆管細胞のHCV感染は否定できない。

(2) 初回IFN投与前の血清中HCV量は $10^6 \sim 10^8$ copies/ μ lであったが、responderでは5例全例でHCV量が低下し、2例で 10^4 copies/ μ l以下となった。一方nonresponderでは同様にHCV量は低下したが、 10^4 copies/ μ l以下は1例もなかった。再治療直前のHCV量は、12例中6例で初回IFN投与前のHCV量と同量、2例で増量、3例で減量していた。IFN再投与終了時のHCV量は、 10^8 copies/ μ lより変化しなかった1例を除き全例低下した。以上より再治療時には、初回より強い抗ウイルス作用が必要と考えられた。再治療時HCV量が低下しなかった例を認めたが、この症例は、変異によりIFN抵抗性を獲得した可能性が考えられた。

(3) 無効例の5例中2例で、IFN投与前で沈殿にのみHCV-RNAが検出されたが、1例では投与終了1ヶ月後と3ヶ月後で、他の1例では投与終了6ヶ月後で、沈殿と共に上清にHCV-RNAが検出された。上清中のHCVは肝機能異常時に出現しており、escape mutantの可能性が示唆された。

審査結果の要旨

本研究は、プラス鎖 RNA ウイルスである C 型肝炎ウイルス (hepatitis C virus : HCV) について、Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法を用い、その存在様式、インターフェロン治療とウイルス量、ウイルス変異について検討している。

HCV は主に血液を介して伝播し、感染を起こせば高率に慢性化し慢性肝炎、肝硬変、さらには肝癌を起こすため、その感染経路、予防、治療は重要である。HCV は血液、肝組織、唾液、尿中には同定されてきたが、胆汁に関しては現在のところ報告はない。本研究では、慢性 C 型肝炎患者胆汁中の HCV-RNA の存在を確認し、さらには、原因は不明であるが、慢性 C 型肝炎で高率にみられる胆管炎の発生病理についても考察している。また、マイナス鎖 HCV-RNA の検出には十分な基礎検討を行っている。本研究は HCV の感染様式、胆管炎の発生病理の研究に寄与すると考えられる。

ウイルス量に関しては、既報の定量法より幾分感度は落ちるものの、より簡便で、かつ多検体処理可能な方法を確立している。さらにインターフェロン治療とウイルス量について検討し、インターフェロン無効症例の再治療の方針をたてる上で、ウイルス量が重要であることを明確にした。

ウイルス変異については、本研究により HCV の escape mutation が生体内でもおこり、インターフェロン治療で誘導される可能性も示された。近年、ウイルス変異は免疫学的反応、治療との関連が注目されており、今後さらに検討の必要な分野である。本論文では、その変異の意義を最新の知見で考察を加えている。

以上のように本論文は、HCV について基礎的、臨床的両面より明らかにしたものであり、学位論文に値するものと考えられる。