OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Detection of Hepatitis B Virus X Gene Protein and Antibody in Type B Chronic Liver Disease
Author(s)	片山, 和宏
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36835
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【97】

氏名・(本籍)	片山和宏 (かたやまかずひろ)
学位の種類	医学博士
学位記番号	第8952号
学位授与の日付	平成2年2月2日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	Detection of Hepatitis B Virus X Gene Protein and Antibody in Type B Chronic Liver Disease (B型肝疾患におけるHBV X蛋白及び抗体の発現動態の検討)
論文審査委員	(主査) 教授 鎌田 武信 (副査) 教授 垂井清一郎 教授 吉川 寛

論文内容の要旨

(目　的)

B型肝炎ウィルス(HBV) genomeには4つのopen reading frame (S-gene, C-gene, P-gene, およびX-gene)が存在しており，各々HBsAg, HBcAg, DNA polymeraseおよびX-Ag (X protein)をコードしている。B型肝疾患におけるX-Ag発現動態およびその機能については未だ明らかではないが，HBVを含む各種hepadna virusにもX-geneが保存されており，HBVの複製もしくは生存に重要な機能を有すると考えられている。1988年にin vitroの系でX-geneがHBVのenhancer領域をtrans-actingに活性化することが報告され，X-geneとHBウィルス増殖との関連が示唆されている。そこで本研究は，B型肝疾患に於けるX-Agおよびanti-Xの発現動態を明らかにし，X-Agのin vivoでの機能を明らかにすることを目的とした。

(対象と方法)

(1) 対象は，HBsAg陽性症例129例(急性肝炎4，無症候性キャリアー12，慢性肝炎63，肝硬変24，肝癌26)とanti-HBs陽性症例14例，HBV marker陰性症例13例の計156例である。

(2) 使用したX-Agは，HBV genome X-gene open reading frameのBamHIからBglⅡまでの領域を含むplasmid (pOCT－X)を大腸菌にtransfectさせて発現させたもので，X-gene全体の約94%のアミノ酸を含む分子量約17-kDの蛋白である(TrpE-X)。さらに同蛋白を家兎に免疫し抗血清を得た。

(3) 肝組織中X-Agの検出：前述のrabbit anti-X (1：500 dilution)を一次抗体とした間接免疫組織化学法を用いた。二次抗体以降は，FITCを用いた蛍光抗体法とペルオキシダーゼとアビジン－ビオチンコンプレックスを組み合わせた酵素抗体法を使用した。検体は，腹腔鏡下肝生検もしくは手術

時の肝生検組織をザンボニ固定液で固定後，クライオスタットで10μmの切片を作成したものを用いた。

(4) 血中anti-X検出：前述のTrpE-Xを15%SDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動しニトロセルロース膜にelectroblotting後，検体血清を同ニトロセルロース膜と反応させ，抗ヒトIgGペルオキシダーゼ標識抗体を用いて血清中anti-TrpE-X（anti-X）の有無を検討した。

(5) 肝組織中HBcAgの検出：mouse anti-HBc monoclonal antibodyを使用し，X-Agの検出(3)と同様の方法を用いた。

（結　果）

1．肝組織中X-Ag発現と血中anti-X出現および他のウィルスマーカーとの関連を検討すると，肝組織中にX-Agが発現しているときは，血中のanti-Xは見られず，anti-X出現と共にX-Agの発現は抑えられる傾向が見られた。しかしながら，他のウィルスマーカーとの明らかな関連は指摘できなかった。

2．肝組織中X-Agの発現率を慢性肝炎，肝硬変別およびHBeAg／anti-HBe別に見てみると，慢性肝炎では，e抗原陽性期（17／23：74%）の方がe抗体陽性期（4／10：40%）に比べ高率であった。しかし，肝硬変ではむしろe抗原陽性期に比べ（0／4：0%）e抗体陽性期（5／6：83%）に高率に発現が見られた。

3．血中anti-X出現頻度を疾患別に見てみると，急性肝炎やhealthy carrier等の感染の比較的早期にはanti-Xは出現せず，慢性肝炎以降の比較的晩期の感染期に見られた。HBe抗原抗体系とは有意の相関は見られなかったが，慢性肝炎では，e抗原陽性期（10／32：31%）よりもe抗体陽性期（11／19：58%）の方がanti-X出現率が高くなる傾向が見られた。

4．肝組織中X-Ag発現とHBcAg発現との関連を検討してみると，慢性肝炎においては，X-Ag陽性例でのHBcAg出現率（14／16：88%）は，X-Ag陰性例のそれ（1／10：10%）に比し有意に高率であり（$p<0.01$），X-Ag発現とHBcAg発現とに有意の関連を認めた。

5．連続切片によるX-AgおよびHBcAgの分布の検討では，両者はほぼ同様の分布を示した。

6．肝癌合併慢性肝炎の2例では，両者とも癌部でのX-Ag発現は見られず癌周囲の非癌部に発現が見られた。

（総　括）

anti-XがX-Ag発現を抑制する事や，anti-X出現が感染の比較的後期に多いことより，HBV X-AgはB型肝疾患の比較的早期に出現していると考えられ，実際慢性肝炎でのX-Ag発現ではその傾向が認められた。さらにX-Agは，ウィルス増殖の指標と考えられるHBcAgと有意の相関関係が認められた事より，X-AgとHBV増殖との関連が示唆された。しかしanti-e陽性期の肝硬変にX-Ag発現が見られたことは，ヒト遺伝子に組み込まれたHBV　DNAからのX-Ag発現も考慮する必要があると考えられた。また2例の肝癌周囲部にX-Ag発現が見られ，癌部には見られなかったことより，X-Agは癌増殖よりむしろ発癌との関連が示唆された。

論文の審査結果の要旨

本研究は，B型肝疾患におけるHBウィルスX遺伝子の発現および血中X抗体出現動態を，間接酵素抗体法とウェスタンブロット法を用いて解析したものである。X蛋白は，ウィルス増殖の良い指標であるHBc抗原と密接な関連を持って発現しており，感染の後期には血中X抗体の出現とともにX蛋白の発現が抑制されることを明らかにした。本研究は，B型肝疾患におけるX蛋白発現動態とその抗体の出現やウィルス増殖との関連を初めて解析したものであり，B型慢性肝疾患におけるX遺伝子の役割を検討する上で，新たな知見をもたらすとともに，B型肝炎慢性化機序の解明に資するところがきわめて大きく，学位に値すると考える。