

Title	Quantitative analysis of hepatitis C virus RNA in serum during interferon alfa therapy
Author(s)	萩原, 秀紀
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38681">https://hdl.handle.net/11094/38681</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏 名	萩原 秀紀
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 0 0 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 5 年 12 月 15 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	Quantitative analysis of hepatitis C virus RNA in serum during interferon alfa therapy (C型慢性肝炎におけるインターフェロン治療中の 血中 HCV RNA の定量的検討)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 鎌 田 武 信  (副査) 教 授 松 沢 佑 次 教 授 山 西 弘 一

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目 的】

C型肝炎ウイルス(HCV)の遺伝子がクローニングされて以来、HCV RNAがRT(reverse transcription)-PCR法により検出できるようになり、C型慢性肝炎に対するインターフェロン(IFN)治療における肝機能の改善と血中HCV RNAの陰性化には相関のあることが明らかとなってきた。しかし通常のRT-PCR法では、血中HCV RNAの定量的検討は困難であり、血中HCV RNAレベルと治療効果の関係は不明であった。そこで、今回 mutant HCV RNAを internal standard とした competitive RT-PCR法を用いて血中HCV RNAを定量し、IFN療法時のウイルス量の変動と治療効果との関連性を検討するとともに、多変量解析を用いてIFN療法の治療効果予測因子を検討した。

#### 【方法ならびに成績】

慢性肝炎53例に対し、天然型IFN $\alpha$ を2週連日の後、24週間週3回投与した。1日投与量は26例が300万単位、27例が600万単位である。

Competitive RT-PCR法に用いる internal standard として、HCVキャリアからクローニングした wild-type HCV cDNAをもとに、site-directed mutagenesisと *in vitro* transcriptionにより、HCVの塩基配列において極めて保存されている5'端非翻訳領域に、新たな制限酵素(*EcoRI*)認識部位をもつ以外は塩基配列が相同である mutant HCV RNAを作成した。-80°Cに保存した血清5~50 $\mu$ lを蛋白変性剤で処理し、血清中のHCV RNAと既知量の mutant HCV RNAを同一チューブ内で競合的に抽出、精製し逆転写酵素によりcDNAとした後、30~40サイクルのPCR法により増幅した。PCR産物をエタノール沈澱し回収後、*EcoRI*処理しアガロースゲル中で電気泳動することにより、2つの断片に切断された mutant RNA由来のDNAと、切断されなかった血中HCV RNA由来のDNAを分離し、そのシグナルの強さを比較することにより血中HCV RNA量を決定した。

血中HCV RNA量は血中1 ml 当り $10^5 \sim 10^{9.5}$  copiesであり、HCV RNAの titer はその分布様式から血清1 ml 当りのHCV RNAの copy 数を常用対数変換したものとし、血中HCV RNAの検出されなかったサンプルの

titer は 0 と定義した。IFN 療法時における HCVRNA titer 平均の検討では、IFN 投与前は300万単位投与群と600万単位投与群に有意差は認められず、投与終了後では両群とも投与前に比べ有意に低値であった ( $P < 0.001$ )。

IFN 療法の治療効果を血清 GPT 値の変動パターンから①IFN 投与終了後 6 カ月以上正常値を維持した long-term complete response (CR-L), ②投与中は正常化するが、投与終了後 6 カ月以内に再燃した short-term complete response (CR-S), ③GPT 正常化を認めない no response (NR) の 3 群に分類し、HCV RNA titer との関係を検討すると、IFN 投与前は CR-L 群  $7.1 \pm 1.2$ , CR-S 群  $8.3 \pm 0.5$ , NR 群  $8.1 \pm 0.4$  であり、CR-L 群が有意に低値であった ( $P < 0.001$ )。また IFN 投与終了時においては CR-L 群  $0.8 \pm 1.6$ , CR-S 群  $2.3 \pm 2.7$ , NR 群  $6.8 \pm 1.7$  で、CR-L 群と CR-S 群は NR 群に比べ有意に低値であり ( $P < 0.001$ )、NR 群を含めいずれの群においても投与終了時の titer は投与前より有意に低値であった ( $P < 0.005$ )。

IFN 治療による GPT 改善パターンと各独立因子 (IFN 投与量, 輸血歴の有無, 治療開始時の年齢, 性別, 肝組織像, GOT, GPT, 2'5'-AS 活性, HCV RNA titer) の関係を stepwise regression にて解析した。IFN 治療後も肝機能が正常値を維持する群 (CR-L) を規定する因子は HCV RNA titer のみが有意であった。

#### 【総括】

IFN 治療の長期有効群規定因子として、治療前血中 HCV RNA 量が重要であると考えられた。またウイルス増殖レベルの高い症例は IFN 療法に抵抗性であり、今後 HCV RNA 量に応じた至適投与法を検討する必要があると思われた。

### 論文審査の結果の要旨

C 型慢性肝炎に対するインターフェロン治療の有効性は、血清 ALT 値に代表される肝機能と肝組織像の改善の面から評価されてきたが、C 型肝炎ウイルスの増殖レベルを反映する血中 HCV RNA 量と治療効果の関係は不明であった。Competitive RT-PCR 法を用いた今回の検討で、インターフェロン投与により血中 HCV RNA 量は低下し、投与量の多い症例において低下度は大きく、高用量投与の方が抗ウイルス効果の強いことが明らかにされた。さらに治療効果との関連において、長期有効群のインターフェロン治療前の血中 HCV RNA titer は、短期有効群および無効群より有意に低値であり、多変量解析では長期有効群の規定因子として血中 HCV RNA titer のみが有意な因子であることが明らかされた。これらの結果はインターフェロン治療がウイルス増殖抑制作用により有効であることを示すとともに、HCV 増殖レベルの低い症例にインターフェロン治療はより有効であることを示唆している。

本研究は C 型肝炎のインターフェロン治療の有効性とウイルス増殖レベルの関連を解明し、治療効果予測因子を明らかにした点で独創的であり、学位に値すると判断する。