



Title	C型肝炎ウイルスのpolymerase chain reaction産物の定量法の開発と臨床応用
Author(s)	伊藤, 正雄
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38745">https://hdl.handle.net/11094/38745</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。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名 伊 藤 正 雄

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 1 1 0 5 0 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 6 年 2 月 1 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 C 型 肝 炎 ウ イ ル ス の polymerase chain reaction 産 物 の  
定 量 法 の 開 発 と 臨 床 応 用論 文 審 査 委 員 (主 査)  
教 授 栗 村 敬(副 査)  
教 授 鎌 田 武 信 教 授 網 野 信 行

## 論 文 内 容 の 要 旨

## 【 目 的 】

C 型肝炎ウイルス (HCV) は高頻度に慢性肝炎や肝硬変を起こすことが知られており、今日では種々の HCV 抗原を用いた抗体測定系が確立され日常検査として広く行われている。

最近で逆転写-polymerase chain reaction (RT-PCR) を用いた血液中の HCV・RNA の検出が血液中の HCV の動態の研究や interferon (IFN) 治療効果判定のマーカーに用いられている。しかし、RT-PCR の反応産物を ethidium bromide 染色法や Southern blot hybridization で検出しているため、定量法に乏しく信頼性に欠けると共に大量の検体を迅速に処理する場合にも不向きな面がある。

この点を解決するために poly-L-lysine-coated bead を用いた試験管内 hybridization assay (以下本法) を開発し、RT-PCR 産物の定量化を試み、C 型慢性肝炎の経過例や IFN 投与後の経過例での HCV・RNA の測定を行い本法の臨床応用を検討した。

## 【 方法ならびに成績 】

RT-PCR は 5' non-coding region の 'nested' primer pairs を用いて行った。標識 probe は  $TlCl_3$  を用いて  $^{125}I$  で標識した。poly-L-lysine-coated bead (PLL ビーズ) は poly-L-lysine を polystyrene bead に吸着させ、乾燥し用いた。本法の測定はまず第二 PCR の反応液  $10 \mu l$  に 0.2N NaOH  $100 \mu l$  を加え、 $25^\circ C$ 、10 分間変性後、0.2 N HCl で中和した。次に、0.2M tris-HCl pH 7.4 を  $100 \mu l$  加え PLL ビーズ 1 個を反応液に入れ  $25^\circ C$ 、1 時間反応後、蒸留水で洗浄し、0.01% glutaraldehyde  $200 \mu l$  を加え、 $25^\circ C$ 、1 分間放置後再度洗浄した。次いで、 $^{125}I$  標識 probe 溶液を  $200 \mu l$  分注し、 $25^\circ C$ 、1 時間反応後、洗浄を 2 回行いビーズに結合した放射活性を  $\gamma$ -scintillation counter で測定した。検体は健康人血清 20 例 (C100-3 抗体及びコア抗体陰性) を正常陰性血清として用い、患者検体は HCV・EIA II 「アボット」を用いて HCV 抗体を測定し陽性であった患者 (慢性肝炎: 7 症例, 肝硬変: 6 症例) の経過例, 13 症例 94 検体と IFN 投与例, 4 症例 35 検体を用いた。

RT-PCR 産物の本法による測定は反応時間が 130 分、測定範囲が  $0.4 ng$  から  $1 \mu g$  ( $0.25 \times 10^{10} \sim 630 \times 10^{10}$  コ

ピー), 測定内及び測定間再現性すなわち変動係数はそれぞれ2.6から7.3%, 4.3から10.1%と良好であった。RT-PCR産物の希釈試験も, 精製した第二PCR産物の用量反応曲線とほぼ平行し測定系としての性能は満足できる結果であり, RT-PCR産物の定量が可能であった。他法との比較では本法は ethidium bromide 染色法より10倍以上, Southern blot hybridization とはほぼ同等の感度であった。

臨床応用として本法による慢性C型肝炎患者および肝硬変患者のRT-PCR産物の定量値とALT値の相関を検討したところ, 本法で陰性であった検体のALT値は65IU/l以下であった。このことはIFN投与中のRT-PCR産物の定量値とALT値の相関でも示された。一方, ALT値が正常域の検体のRT-PCR産物の定量値の分布とALT値が異常域の検体のRT-PCR産物の定量値の分布を $630 \times 10^{10}$ コピー以上と以下の比で比較するとほぼ同じであり, ALT値とRT-PCR産物の量すなわちHCV・RNA量とは相関しなかった。IFN投与経過例をRT-PCR産物の定量値とALT値の関係で見ると全例ALT値が一低下しRT-PCR産物も陰性化した。すなわち, 肝障害の改善に伴いHCV・RNAも陰性化した。しかし, IFN投与によってALTが正常域へ低下した検体でもHCV・RNAが検出されることから肝障害の改善が先行していることや肝機能が改善されなければ血中からHCVが無くならないことが示された。IFN投与終了後の経過観察中に再燃する例ではIFN投与によって ethidium bromide 染色法では陰性化しても, 本法では既に治療中に陽性となったことが認められた。

IFN治療の効果判定に治療中のHCV・RNAの測定が有用であり, その測定には高感度の測定系が必要であることが示唆された。

#### 【総括】

HCV・RNAをRT-PCRで増幅した反応産物を, 定量できる試験管内 hybridization assay を開発し, Southern blot hybridization と同程度の感度が得られた。本法による臨床検体の測定結果はC型肝炎患者の血清 alanine aminotransferase (ALT) 値と血清中のHCV・RNA量の相関は必ずしもなく, 本法で陰性の検体のALT値は65IU/l以下であり, interferon 投与例では肝障害の改善が血清中HCV・RNAの陰性化よりも先行していることが示された。

本法は簡便で精度よく, 多数検体の同時測定が可能で, HCV感染症の経過の解明に有用であった。

### 論文審査の結果の要旨

本論文はウイルス分離, ウイルス抗原検出の困難なC型肝炎ウイルスに関してそのゲノムRNAを逆転写, PCRさらにハイブリダイゼーション法を組み合わせ、ビーズ法により定量的に検出する手法の開発を行ったものであり, C型肝炎ウイルス感染症の治療効果, 予後の推定に有用な方法であると評価される。学位の授与に値するものと判断される。