



Title	Density analysis of hepatitis C virus particle population in the circulation of infected hosts.
Author(s)	考藤, 達哉
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39542
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	かん 考 とう 達 ザ
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 1 3 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 1 1 月 7 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	Density analysis of hepatitis C virus particle population in the circulation of infected hosts. (C型肝炎ウイルス粒子 population の浮遊密度分析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 鎌田 武信 (副査) 教 授 松沢 佑次 教 授 栗村 敬

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

C型肝炎ウイルス (HCV) 遺伝子が同定される以前よりウイルス量の評価方法としてCID (Chimpanzee Infectious Dose) が用いられていた。これはチンパンジーに肝炎を発症させるウイルス量に相当するが、患者によっては血清中のHCV RNA 量が高値でもCID 低値のものがあることが知られている。この現象は血中のHCV 量と感染性とは必ずしも相関しないこと、HCV は均一な集団ではないことを示唆している。HCV 粒子の患者血液中での形態に関しては不明な点が多く、肝炎の病態、HCV の感染性と形態との関連も明らかではない。

【目 的】

HCV 粒子の患者血液中での存在形態を浮遊密度の観点より検討し、形態の異なるウイルス粒子集団 (population) の比率を定量的に評価する方法を確立する。HCV 粒子 population を多症例で検討し、粒子形態と肝炎の病態との関連を明らかにする。

【対象と方法】

- 1) 慢性持続性肝炎 (CPH)、慢性活動性肝炎 (CAH) 例の血清をショ糖密度勾配上で平衡遠心した後、分画を採取し各分画中のHCV RNA 量を competitive RT - PCR 法で定量した。また HCV 粒子のエンベロープを界面活性剤にて除去した後、同様に遠心し各分画のHCV RNA を定量した。
- 2) 血液中で抗HCV 抗体と結合している HCV 粒子 (Immune Complex, IC) の浮遊密度を決定するため、患者血清を用いて抗イムノグロブリン (Ig) 抗体で免疫沈降を行い、得られた上清を 1) と同様にショ糖密度勾配上で平衡遠心し、各分画のHCV RNA の有無を RT - nested PCR で検討した。一部の分画では更に HCV のコア領域に対する抗体を用いて免疫沈降を行い、沈降の有無を RT - nested PCR で確認した。
- 3) 血液中の HCV 粒子を抗体結合 (IC) 型、抗体非結合 (Virion, V) 型それぞれの population に分離するため患者血清を 35 % ショ糖液上で超遠心した。遠心後上層 (Top) と底層 (Bottom) の HCV RNA 量を competitive RT - PCR 法で測定した。

- 4) 肝組織正常のHCV キャリア (HC) 2例, CPH 5例, CAH 5例, 肝硬変 (LC) 5例, 肝癌 (HCC) 5例でIC型, V型 population の量比を3) の簡便法を用いて検討し, 肝病変の進展度との関連を検討した。また急性肝炎5例では経過に伴うpopulation比の変化を検討した。
- 5) IFN 治療を行ったCAH 21例を対象とし, IFN 投与前, 投与終了後6ヶ月での population 比を検討し治療効果, 再発の有無との関連を検討した。

【成 績】

- 1) CPH 患者血液中では密度 $1.08 - 1.11\text{g}/\text{ml}$ のHCV 粒子が主であり, CAH 患者では $1.09 - 1.11\text{g}/\text{ml}$ と $1.22 - 1.25\text{g}/\text{ml}$ の粒子が主として存在していた。界面活性剤処理後の血清中では $1.23 - 1.25\text{g}/\text{ml}$ の粒子が主となり, エンベロープの外れたHCV (nucleocapsid, N) の密度は $1.23 - 1.25\text{g}/\text{ml}$ と決定された。
- 2) 免疫沈降後の上清では密度 $1.03 - 1.16\text{g}/\text{ml}$ の分画でHCV RNA が検出され, $1.16 - 1.30\text{g}/\text{ml}$ では検出されなかった。これより $1.03 - 1.16\text{g}/\text{ml}$ の粒子はV型であり, $1.16 - 1.30\text{g}/\text{ml}$ の粒子はIC型と決定した。またCAH 患者では沈降後の上清で $1.22\text{g}/\text{ml}$ にもHCV RNA が検出され, この分画のHCV はコア抗体で免疫沈降したことより nucleocapsid と想定された。以上より, C型肝炎患者血液中にはV型, IC型, N型のHCV 粒子が混在していることが明かとなった。
- 3) 患者血清を35%ショ糖で遠心した後 Bottom と Top とのHCV RNA 量の比をB/T 比として表すと, B/T 比は患者血液中でのIC型HCV 粒子とV型粒子の量比を反映すると考えられた。慢性肝炎例でB/T 比を検討すると, HC, CPH 例では1:10とV型粒子優位, CAH, LC 例では1:1, HCC 例では10:1とIC型粒子優位となった。また急性肝炎例でALT の正常化が見られた例では, ALT の正常化と一致して1:1から10:1へとIC型優位に変化した。一方, ALT 高値の遷延した例ではB/T 比は1:1で経過した。
- 4) IFN 治療を行った21例のうち終了後よりALT 正常を持続しているものをSR群とし, HCV RNA の有無により SR+, SR-群とした。SR+群10例中, 終了後6ヶ月でのB/T 比が10:1とIC型優位となった4例では3年以上 ALT 正常が持続した。一方SR+群中B/T 比が1:1のままであった6例はその後6ヶ月以内にALT が再上昇した。

【総 括】

HCV 粒子は患者血液中では, V型, IC型, N型の形態で存在しており, V型, IC型 population の量比は肝炎の病態と関連し変化していた。急性肝炎例でALT 正常化に伴いIC 優位に変化したこと, IFN 投与後IC 優位であればウイルス血症が持続してもALT 正常が維持されたことより, HCV 粒子 population のIC型優位への変化は抗体の結合による中和現象を反映していると考えられた。HCV 粒子の血中 population を解析することにより, 各患者血液中のHCV 粒子集団の中和の程度, 感染性の評価が可能である。

論文審査の結果の要旨

C型肝炎の臨床像は明らかになりつつあるが, その原因ウイルスであるHCV 粒子の形態や, 肝炎の病態との関連は不明であった。密度勾配遠心, 免疫沈降法とCompetitive RT-PCR法によりHCV の浮遊密度を決定し, 患者血液中のHCV 粒子の存在分布を解析した今回の検討で, HCV 粒子はVirion, Immune Complex, Nucleocapsid の形態で存在しており, その量比は肝炎の病態により変化することが明かとなった。慢性肝炎例ではキャリア例から肝癌例へと肝障害が進展するにつれてVirion 優位からImmune Complex 優位へと変化し, 急性肝炎例, インターフェロン治療例では肝炎の鎮静化と一致してImmune Complex 優位へと変化した。HCV 粒子 population のImmune Complex 優位への変化は抗体の結合による中和現象を反映していると考えられる。

本研究はHCV 粒子の形態と病態との関連を浮遊密度の観点より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。