



Title	Influence of Viral Quasispecies on Effectiveness of Interferon Therapy in Chronic Hepatitis C Patients
Author(s)	金澤, 禎行
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39839">https://hdl.handle.net/11094/39839</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">大阪大学の博士論文について</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	かな ざわ よし ゆき 金 澤 禎 行
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 3 9 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 8 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科内科系専攻
学 位 論 文 名	Influence of Viral Quasispecies on Effectiveness of Interferon Therapy in Chronic Hepatitis C Patients (C型慢性肝炎患者のインターフェロン治療効果における、ウイルス遺伝子多様性の影響についての検討)
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) は、単一の宿主内において多数の変異体が混在した状態で存在している事が知られている。このような性質は、quasispecies natureと呼ばれており、他のウイルスにおいて幾つかの生物学的に重要な性質をもたらす事が報告されている。

HCVゲノム上で、このような多様性が最も顕著に認められる領域は、エンベロープ 2 (E2) 領域内に同定されており、hypervariable region (HVR) と名付けられている。この研究の目的は、HCVゲノムの多様性をこの E2 HVR 1 にて評価し、その程度とインターフェロン (IFN) 治療効果との関連性の有無を明らかにする事である。

#### [方法ならびに成績]

1) IFN治療を受けたC型慢性肝炎患者8例の血清からHCV-RNAを抽出し、RT-PCR法によりE2HVR1を含む領域を増幅、サブクローニングした。個々の患者に対し、各々、任意に10-13クローンを選択し、dideoxy法を用いて塩基配列を決定した。塩基配列のalignmentからIFN投与前の著効群のHVR1は、再燃群・無効群に比してよりhomogeneousである事が示された。

2) 決定した塩基配列を基に、多様性をcomplexityとdiversityの2つの要素に分け、客観的指標を用いて分析した。すなわち、complexityに関しては、各症例における異なるクローン種数を比較した。また、diversityに関しては、各症例に対して、任意に選び出した2つのクローン間の塩基配列の違い (Hamming distance) をすべての組み合わせに対して計算し、その頻度と共にplotした。また、Hamming distanceをさらに平均化した塩基多様度 (nucleotide diversity) を算出した。

IFN投与前のHVR1のcomplexityは、著効群に比べて、再燃群・無効群において有意に高値であった ( $P < 0.05$ )。Hamming distanceの分布様式も、IFN投与前において、著効群ではバーが極端に左ヘシフトしており、HVR1の塩基配列がクローン間で非常に均一であることを示した。それに対して再燃群・無効群においては、バーが右方ヘシフトし、HVR1の不均一性を示した。塩基多様度 ( $X10^{-2}$  per site) も、著効群では0.21から5.61と低値であるのに対し再燃群・無効群では5.79から20.14と有意に高値であった ( $P < 0.05$ )。

3) Single strand conformation polymorphism法 (SSCP法) を用いて、多様性評価のための簡便法を確立し、多検体での検討を行った。

まず、基礎的検討としてHVR1のPCR産物をサブクローニングした plasmid クローンを用いてSSCP解析を行った結果、それぞれのクローンの塩基配列に応じて特異的なバンドパターンが観察され、混合したクローン数の増加に伴いバンド数も増加した。また、16例の患者血清を用いてSSCP解析と sequence analysis を行った結果、SSCP法によるバンド数と塩基多様度の間に有意な相関が認められ ( $P<0.05$ )、SSCP法による多様性の評価が sequence analysis による評価の代替となり得ることを確認した。

そこでIFN治療を受けたC型慢性肝炎患者49例の、治療前の血清に対するSSCP解析を行った結果、著効例は、2本以下のバンド数を示す low heterogeneity の症例が有意に多く ( $P<0.01$ )、3本以上のバンド数が観察される high heterogeneity の症例での著効は期待し難い事が示された。

[総括]

Conventional な sequence analysis によりHCV HVR1の genetic heterogeneity と、IFN治療効果との間に関連が認められた。さらに、SSCP法を用いることにより、heterogeneity の評価を簡便に行うことが可能であり、多検体の検討の結果、治療前のHVR1の多様性が高い症例では、IFN治療の有効性は期待し難く、その多様性が低値であることが、著効例の必要条件である事が示された。

### 論文審査の結果の要旨

C型慢性肝炎のインターフェロン治療効果に影響を与えるウイルス側の因子としては、既にウイルス量・サブタイプが報告されている。後者のサブタイプはこのウイルスの遺伝的多様性を示すものであるが、更に、一種類のサブタイプが感染した単一の宿主内のレベルにおいても、quasispecies nature と呼ばれるゲノム多様性の存在が報告されている。

本研究は、この quasispecies nature とインターフェロン治療効果との関連を検討したものであり、この性質に基づく治療前のゲノム多様性の程度が、インターフェロン治療の inefficacy の指標となることを明らかにした。更に、SSCP法を用いたゲノム多様性評価のための簡便法を確立し、多様性解析の多検体処理を可能にした。これらの事は、ウイルス量・サブタイプのみでは、インターフェロン治療効果の予測が困難な症例での効果予測を可能にし、例えばインターフェロン再投与を行うべき症例の選択に寄与するなど、実際の臨床の場において有益な情報をもたらすものであり、且つ簡便法を確立したことで、臨床応用が容易であると考えられる。従って、本研究で得られた知見は、C型慢性肝炎のインターフェロン治療において重要な意義を有しており、学位に値するものと認められる。