



Title	B型肝炎ウイルス感染症の検査診断法に関する研究
Author(s)	出口, 松夫
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45242
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	出 口 まつ お
博士の専攻分野の名称	博 士 (保健学)
学 位 記 番 号	第 18570 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 16 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科保健学専攻
学 位 論 文 名	B 型肝炎ウイルス感染症の検査診断法に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岩谷 良則 (副査) 教 授 川野 淳 教 授 稲垣 忍

論 文 内 容 の 要 旨

【目 的】

B 型肝炎ウイルス (HBV) に感染すると種々の HBV 関連マーカーが血中に出現する。この中でも、HBs 抗原は HBV 感染症のスクリーニング検査として、HBV-DNA は臨床経過を反映するマーカーとして最も信頼されている。しかし、厚生労働省の認可を受けた HBs 抗原診断試薬の一部に、感度が悪い等の問題が存在することが最近明らかになってきた。そして、これらの試薬は、肝炎の誤診や血液製剤の安全性低下の原因になることから、社会的にも重大な問題となっている。一方、HBV-DNA 測定には主に PCR 法が用いられているが、操作が煩雑で特殊な設備が必要であることから普及が遅れている。さらに抗ウイルス薬投与時の経過観察等に問題があるため、測定法のさらなる高感度化が望まれている。そこで、本研究では、HBs 抗原診断用試薬の HBV サブタイプおよび s 抗原変異株に対する反応性を評価し、また、PCR 法に代わる HBV 感染症の病態診断法である HBs 抗原定量法の臨床的意義について調べた。さらには、HBV-DNA 測定法の高感度化を目的に、新たな HBV-DNA 抽出法の開発を試みた。

【方法ならびに成績】

1. HBs 抗原診断用試薬のサブタイプおよび変異株に対する反応性に関する研究

我国で使用されている主要な 7 種類の HBs 抗原診断用試薬の HBV サブタイプに対する反応性を評価するため、既知濃度の HBs 抗原陽性血清 ad および ay を用いて測定したところ、同一診断用試薬では、ad と ay に対する反応性は大きく異ならなかつたが、試薬間では、反応性に大きな差（10 倍以上）を認めた。また、HBs 抗原変異株に対する反応性を評価するため、Wild Type 抗原と 9 種類の変異抗原（リコンビナント抗原）を用いて比較検討したところ、7 試薬全てにおいて、変異抗原測定時の反応性は Wild Type 測定時に比し低値傾向を示し、3 試薬のみ全ての変異抗原を検出できた。さらに、変異株に対する反応性が低い 4 試薬の試薬組成を調べると、いずれも固相抗体および標識抗体にそれぞれ 1 種類のモノクローナル抗体を使用していることが判明した。以上のことから種々の変異株を検出し、偽陰性を減少させるためには、固相抗体および標識抗体に複数のモノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体を使用する必要があることが明らかとなった。

2. HBs 抗原定量の臨床的意義に関する研究

HBs 抗原定量の臨床的有用性を評価するために、ラミブジン、インターフェロンなどの薬物治療を受けた B 型肝炎患者における HBs 抗原を経時的に定量し、HBV-DNA、HBe 抗原および ALT 値の推移と比較したところ、HBs 抗原の推移は HBV-DNA の推移に比して緩やかではあったものの、HBV-DNA と同様に肝炎の憎悪時においては上昇し、沈静化と共に低下した。一方、HBe 抗原との比較においても、HBs 抗原の推移は HBe 抗原の推移に比し緩やかではあったが、近似した推移を示した。また、HBs 抗原の推移が HBe 抗原の推移に比し、より臨床経過を反映する症例も認められた。以上のことから、HBs 抗原の定量測定は迅速簡便に臨床経過を反映する方法として有用性の高いことを明らかにした。

3. HBV-DNA 高感度測定に関する研究

HBV-DNA の高感度測定を実現するために、新たな HBV-DNA 抽出法を考案した。抽出手順は、(1)血清 1 ml を 60000 rpm、2 時間遠心後、その沈査にポリエチレングリコールを添加し、15000 rpm、5 分間再遠心。(2)上清を完全に取り除いた後、NaOH により HBV を分解し、さらに Tris-HCl を加えて溶液を中和。この方法で抽出した溶液を用いて PCR 反応を行ったところ、最低検出感度は、従来法の 400 copies/mL から 25 copies/mL へと飛躍的に向上した。そして、B 型肝炎患者ラミブジン投与例で HBV-DNA を経時的に測定したところ、従来法で一過性の検出感度未満を示した症例で、高感度法は全て HBV-DNA を検出した。しかし、従来法で長期間検出感度未満を示した症例では、高感度法も検出感度未満であった。また、ラミブジン長期投与中の HBV-DNA の再上昇例において、高感度法は従来法よりも早期に HBV-DNA の再上昇を確認できた。以上より、高感度法は、臨床的にも有用性の高い方法であることが確認できた。

【総括】

(1)現在、HBV 感染症のスクリーニング検査として認可されている 7 種類の HBs 抗原診断用試薬のうち 4 種類が HBs 抗原変異株を正確に検出できること、(2)その原因が、固相抗体と標識抗体に 1 種類のモノクローナル抗体を用いているためであること、そして(3)HBV 感染症の臨床経過をみるためのマーカーとして、HBs 抗原定量法は、HDV-DNA 測定法よりもはるかに迅速簡便であり、推移は緩慢ではあるが、臨床経過を反映して有用であることを明らかにした。そして、(4)新たな HBV-DNA 抽出法を考案して HBV-DNA 高感度測定法を開発した。

論文審査の結果の要旨

本研究は、わが国における HBs 抗原検査試薬の性能を把握するために、HBs 抗原検査試薬の検出感度、HBs 抗原変異株との反応性などについて詳細に研究し、測定試薬間の検出感度差が 300 倍以上であり、半数以上の検査試薬は HBs 抗原変異株を検出できていないことを明らかにした。また、HBs 抗原を定量的に測定することの意義についても詳細に研究し、HBs 抗原を経目的に測定することにより、病態の把握がほぼ可能であることを明らかにした。さらに、高速遠心とポリエチレングリコール遠心を組み合わせた新しい HBV-DNA 抽出を開発することにより、HBV-DNA 検査法 (PCR 法) の高感度化に成功した。そして、この高感度法の臨床的有用性を明らかにした。

以上のことより本論文は、博士（保健学）の学位授与に十分値すると考えられる。