

この表は、各項目の割合を示す。各項目の割合は、各項目の合計数で割り算される。

C型肝炎ウイルス（HCV）の抗体と 遺伝子検出に関する研究

III C型肝炎病態別のHCV遺伝子陽性率と HCV遺伝子型比率

町田篤彦 小澤茂 渡辺由香里 赤羽賢浩*

Studies on the Detection of Antibodies and Genome
RNA of Hepatitis C Virus III. Comparative Analysis
of Hepatitis C Virus Genome Prevalence and
Genotype Distribution in Patients with Clinical
Course of Hepatitis C

Atsuhiro MACHIDA, Shigeru OZAWA, Yukari WATANABE
and Yoshihiro AKAHANE

肝炎は肝臓に炎症が起こる病気だが、その約90%以上はウイルスによって起こる。今までに肝炎に関与するウイルスとして報告順序はまちまちだが、A型、B型、C型、D型、E型、F型、G型の7種類が報告されている。このうち輸血など血液を介して感染するのは、B型、C型、D型およびG型であることが分かっている。日本に多いのはB型とC型であるがG型の存在については昨年米国で報告されたばかりなので日本での詳細はまだ分かっていない。輸血後のB型肝炎がほぼ駆逐された後にもかなりの頻度で発生する肝炎の原因ウイルスの実体を明らかにする試みが長年にわたってなされていたが、従来のウイルス同定法ではすべて徒労に終わっていた。しかし7年前、米国のカイロン社が従来の方法を一新するような分子生物学的手法により初めてこのウイルス遺伝子の一部をクローニングすることに成功し、その情報が論文という形ではなく商業特許として公開となった¹⁾²⁾。このウイルスこそが現在C型肝炎ウイルスと呼ばれるものである。C型肝炎の大きな問題点はC型肝炎ウイルスに感染すると高率に慢性化し、統いて肝硬変から肝細胞癌へと進行し現在この癌による死亡率が逐年増加している事である。ではこのようなC型肝炎の病態の進行に何が関わっているのか？日本ではC型肝炎ウイルスの遺伝子であるRNAにはI型、II型、III型、IV型の4種類の型があることが

既知である。これらは、主に肝硬変や肝細胞癌などの疾患と関連がある。

そこで本研究では、C型肝炎ウイルスの抗体と遺伝子検出の関係について検討した。

また、C型肝炎の病態別にHCVの遺伝子陽性率と遺伝子型比率を比較した。

さらに、C型肝炎の病態別にHCVの遺伝子陽性率と遺伝子型比率を比較した。

また、C型肝炎の病態別にHCVの遺伝子陽性率と遺伝子型比率を比較した。

また、C型肝炎の病態別にHCVの遺伝子陽性率と遺伝子型比率を比較した。

また、C型肝炎の病態別にHCVの遺伝子陽性率と遺伝子型比率を比較した。

また、C型肝炎の病態別にHCVの遺伝子陽性率と遺伝子型比率を比較した。

知られている⁴⁾⁵⁾。そこで慢性肝炎→肝硬変→肝細胞癌へと病態が進行しやすい遺伝子型があるのかどうか調べた。また病態の進行にC型肝炎ウイルスの遺伝子量(ウイルス量)が関係あるのかどうか調べた。ここではこれらの結果を報告する。

材 料 と 方 法

1. 被検血清および血漿

山梨医科大学において臨床的に診断されたC型肝炎患者のうち慢性肝炎患者102名、肝硬変患者47名および肝細胞癌患者43名の血清あるいは血漿を使用した。検体は-80°Cに保存した。

2. HCV-RNA遺伝子の検出³⁾および遺伝子型の決定⁴⁾⁵⁾

被検血清あるいは血漿からRNAを抽出し逆転写酵素によりHCV-cDNAを合成した。5'-非翻訳領域の2種類のプライマーを用いてHCV-cDNAを1次PCRにより增幅し、さらに1次PCRで用いたプライマーの塩基配列より内側に相当する塩基配列をもつ2種類のプライマーを用いて2次PCRにより更に增幅した(RT-nested RCR)。增幅反応物はアガロースゲル電気泳動により分画しエチジウムプロマイドで染色した後に

*1 山梨医科大学

発する蛍光により検出した。220 塩基対に相当する位置に蛍光を発するバンドが見られる検体を HCV-RNA 阳性とした。また HCV-cDNA を 1 次 PCR のみで増幅して HCV-RNA 量を半定量的に調べた。HCV-RNA の型を決定するために HCV-cDNA をコア領域の 2 種類のプライマーを用いて 1 次 PCR により増幅し、更に 1 次 PCR で用いたプライマーの塩基配列より内側に相当する 5 種類の型特異的プライマーを用いて 2 次 PCR により更に増幅した。増幅反応物は上記のごとく検出し、49 塩基対に相当する位置にバンドが見られる検体中の HCV-RNA を I 型、144 塩基対に相当するバンドを II 型、174 塩基対に相当するバンドを III 型、123 塩基対に相当するバンドを IV 型とした。

結 果

1. C型肝炎の病態と HCV 遺伝子陽性率および遺伝子量との関連性

C型肝炎患者のうち慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌と診断された患者の血液を検体として C型肝炎の病態の進行に伴う HCV 遺伝子陽性率と遺伝子量を調べその結果を図 1 に示した。病態が慢性肝炎→肝硬変→肝細胞癌へと進むにつれ HCV-RNA 遺伝子陽性率は各々 95% (97/102)、98% (46/47)、100% (43/43) と僅かに上昇した。一方ウイルス遺伝子量を 1 次 PCR 陽性のものは多い、陰性のものは少ないとする基準で調べた結果、慢性肝炎では 35% (34/97)、肝硬変では 33% (15/46) が陽性であったのに対して肝細胞癌では 5% (2/43) のみが陽性であった。このことから肝細胞癌へと病態が進むと前段階（慢性肝炎、肝硬変）よりウイルス量が減少することが分かった。

2. C型肝炎の病態と HCV 遺伝子型の比率

HCV 遺伝子型により C型肝炎の病態が慢性肝炎→肝硬変→肝細胞癌へと進行する速度に違いがあるのかどうかを調べるために各々の病態に相当する患者の HCV 遺伝子型 (I~IV) の比率を調べその結果を表 1 に示した。病態が慢性肝炎、肝硬変から肝細胞癌へと進むと II 型の比率が上昇し IV 型の比率が下降する傾向が見られた。

表 1 C型肝炎の病態と HCV 遺伝子型の比率

病 態	遺 伝 子 型				
	I	II	III	IV	
慢 性 肝 炎	例数 (%)	0 (0)	71 (73)	14 (14)	12 (12)
肝 硬 変	例数 (%)	0 (0)	34 (74)	7 (15)	5 (11)
肝 細 胞 癌	例数 (%)	0 (0)	34 (79)	6 (14)	3 (7)

考 察

日本での HCV 遺伝子型には I~IV 型の 4 種類が存在し遺伝子型により慢性肝炎のインターフェロンによる治療効果が異なることが知られている⁶。これは遺伝子型によりウイルス量が異なるためであるとも考えられる。II 型の慢性肝炎はウイルス量が多いためかインターフェロンによる治療効果が低いことが知られている⁷。このように C型肝炎の慢性肝炎から肝硬変そして肝細胞癌への肝病変の進行に影響を与える因子として HCV 量および HCV 遺伝子型が考えられた。そこで C型慢性肝炎、

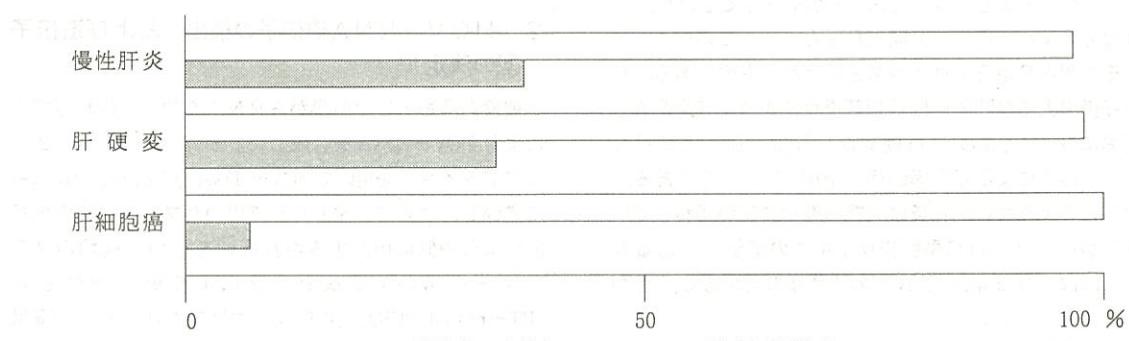


図 1 C型肝炎の病態と HCV-RNA 遺伝子陽性率

肝硬変、肝細胞癌と臨床診断された患者の血液中のウイルス量を1次PCRにより、またウイルス遺伝子型を型特異的プライマーを用いたnested PCRにより調べた。C型肝炎の病態が進むにつれて、ウイルス量が多いと考えられているⅡ型遺伝子が検出される割合は若干高くなつた（慢性肝炎73%→肝細胞癌79%）。反対にウイルス量が少ないと考えられているⅢ型、Ⅳ型遺伝子のうちⅣ型遺伝子が検出される割合は若干低くなつた（慢性肝炎12%→肝細胞癌7%）。このことはC型肝炎の病態の進行速度に遺伝子型が一部関与している可能性を示唆している。肝細胞癌では全例にウイルスが検出されたが、予想に反してウイルス量は前段階（慢性肝炎、肝硬変）より著しく少なく、この現象がHCVによる癌化との様な関係があるのか今後の問題である。

謝　　辞

この研究が完成するにあたっては、鳥取大生物医学研究所の篠原浩一氏、山下智之氏、久保田義和氏、高木正之氏の各君が多大な貢献をいたしました。また、本研究の初期段階で、当院の脳神経外科部長である馬場忠一博士から、肝細胞癌の病理組織学的検査の実験室にてお世話になりました。馬場先生には、その専門性と親切なる態度、また、丁寧な説明を心より感謝いたします。

本文の著者紹介

著　　者

ABは卒後3年目の研究室勤務医として、HCVの分子生物学的な研究を通して、HCVに対する興味を持ち、現在はHCVの宿主細胞である肝細胞の病態を研究中である。

標題の読み解きと著者の紹介　HCVは、これまで幾つかの名前で呼ばれていました。A型とB型とC型とに分類され、C型は日本で見つけられました。C型は他の型と比べて、遺伝子構造の違いと、抗体に対する免疫逃げの仕組みと、分子構造の違いなど、多くの特徴があります。一方で、遺伝子構造の違いについては、他のC型HCV（主に東洋系のHCV）と比較してもほとんど見受けられません。しかし、抗体に対する免疫逃げの仕組みについては、他のC型HCVと異なっています。HCVは、その構造や遺伝子構造から、他のウイルスと大きく異なる点があります。HCVは、他のウイルスと比べて、構造的に複雑で、そのため、抗体に対する免疫逃げの仕組みが他のウイルスと異なります。

標題拆訳とアロハゲル

西田博士は新規の創生技術である質膜アロハゲルを作り、PDIH（アラニン・ドーリン）によるDNA複製抑制薬を発明。それをもとに、新規の抗痘瘧のアロハゲルを開拓した。

文　　献

- Houghton,M.,et al.: Eur Patent Appl. 88, 310, 922.5 and publ. 318. 216, (1988)
- Choo,Q.L.,et al.: Science, 244, 359~362 (1989)
- Okamoto,H.,et al.: Jap.J.Exp.Med., 60, 167~177 (1990)
- Okamoto,H.,et al.: J.Gen.Viro., 73, 673~679 (1992)
- Okamoto,H.,et al.: Virology, 188, 331~341 (1992)
- Kanai,K.,et al.: Lancet, 339, 1543 (1992)
- Hayashi,N.,et al.: Virus, 43, 327~333 (1993)

本研究が、HCVの宿主細胞である肝細胞の病態を理解するための重要な手がかりとなること、また、HCVに対する免疫逃げの仕組みを理解するための手がかりとなることを期待しています。また、HCVに対する免疫逃げの仕組みが、他のウイルスや、HCVの宿主細胞である肝細胞でも、同じく免疫逃げの仕組みを共有している可能性があります。そのため、本研究は、HCVに対する免疫逃げの仕組みを理解するための重要な手がかりとなることが期待されています。

馬場忠一博士がHCVに対する免疫逃げの仕組みを理解するための手がかりとなることを期待します。一方で、HCVに対する免疫逃げの仕組みを理解するための手がかりとなることを期待します。HCVに対する免疫逃げの仕組みを理解するための手がかりとなることを期待します。HCVに対する免疫逃げの仕組みを理解するための手がかりとなることを期待します。HCVに対する免疫逃げの仕組みを理解するための手がかりとなることを期待します。HCVに対する免疫逃げの仕組みを理解するための手がかりとなることを期待します。HCVに対する免疫逃げの仕組みを理解するための手がかりとなることを期待します。HCVに対する免疫逃げの仕組みを理解するための手がかりとなることを期待します。

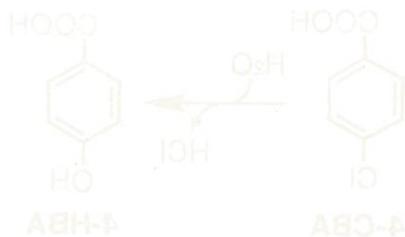


図-4 4-ヒドロキシブенゾ酸のABG-4への変換