



Hepatitis C Virus (HCV) Subtype Prevalence in Chiang Mai, Thailand and Identification of Novel Subtypes of HCV Major Type 6

土井, 久也

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1996-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1482

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001482>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	と い ひさ や 土 井 久 也	（兵庫県）
博士の専攻 分野の名称	博 士（医 学）	
学 位 記 番 号	博い第1008号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成8年3月31日	
学位論文題目	Hepatitis C Virus (HCV) Subtype Prevalence in Chiang Mai, Thailand and Identification of Novel Subtypes of HCV Major Type 6 （タイ国チェンマイにおけるC型肝炎ウイルスのサブタイプ分布状況およびHCVタイプ6の新サブタイプの同定）	
審 査 委 員	主査 教授 堀 田 博 教授 島 田 桂 吉	教授 前 田 盛

論 文 内 容 の 要 旨

<緒言>

C型肝炎ウイルス（HCV）は、世界各国において、輸血後肝炎や散発性非A非B型肝炎の主要な原因ウイルスとして知られている。ウイルス遺伝子はプラス鎖の一本鎖RNAで全長約9,500塩基からなる。HCVは、遺伝子塩基配列の多様性に基づいて少なくとも6種類のタイプに分類され、各々はさらに幾つかのサブタイプに分類されることが知られている。それらのサブタイプの違いによってインターフェロン治療に対する感受性が異なり、肝疾患の重篤度も異なることが報告されている。また、それぞれのサブタイプの浸淫度は世界的に異なることも知られており、これまでに調査されていない地域には、新しいタイプ／サブタイプのHCVの存在する可能性も指摘されている。我々は以前に、タイ国チェンマイ市の健康供血者および薬物中毒患者の抗HCV抗体保有状況及びHCVサブタイプ分布状況について調べ、変異株の存在について報告した。しかしそれら変異株の正確な分子系統樹的位置づけは不明のままであった。今回我々は、同地域における慢性肝疾患患者（慢性肝炎、肝硬変、原発性肝癌）のHCVについて解析し、そのサブタイプ分布状況について明らかにした。さらに、詳細な分子系統樹解析の結果、この地域の変異株が、我が国や欧米諸国にはみられないHCVタイプ6に属する新しいサブタイプであることが明らかになった。

<材料と方法>

1. 血清及び抗HCV抗体の測定

血清は、チェンマイ大学医学部附属病院の慢性肝疾患患者より集めた。抗HCV抗体は市販の第2世代ELISAキットを用いて測定した。

2. 逆転写（RT）-PCR法によるHCV遺伝子の増幅

グアニジンチオシアネート・フェノール・クロロホルム溶液を用いて抗HCV抗体陽性血清からRNAを抽出後、RT-PCR法を用いてHCV遺伝子の増幅を試みた。サブタイプ分類を目的として、まずNS5B領域を増幅対象とし、可及的多くのサンプルからの増幅を可能にするために、我々の開発した

多種類のプライマーセットを用いた。NS5B増幅陰性のサンプルは、5'非翻訳領域（UTR）を増幅してHCVの存在を確かめた。新しいサブタイプと考えられるHCV株については、Core領域とE1領域の増幅も試みた。得られた増幅産物は2%アガロースゲルにて電気泳動を行い、その存在を確認した。

3. 塩基配列分析及びサブタイプ分類

Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing KitとABI 373 Autosequencerを用いてダイレクト・シーケンス法にて増幅遺伝子産物の塩基配列を決定した。得られた塩基配列を既報のサブタイプの塩基配列と比較してホモロジーを算出し、それに基づいてサブタイプ分類を行った。

4. 分子系統樹解析

前述の方法で既知のサブタイプに分類されなかったHCV株は、詳細な分子系統樹解析を行い、サブタイプ分類上の位置を明確にした。この解析においては、塩基置換数の推定は6パラメーター法により行い、分子系統樹は近隣結合法（NJ法）により作成した。

5. セロタイプ分析

HCVタイプ1およびタイプ2に特異的なNS4由来組換えペプチド（東京都臨床医学総合研究所・小原道法博士より分与）を用いてセロタイプ分析を行った。

<結果と考察>

1. チェンマイの慢性肝疾患患者におけるHCVサブタイプの分布状況

抗HCV抗体陽性の慢性肝疾患患者50症例（慢性肝炎29例，肝硬変16例，原発性肝癌5例）について解析を行った。

慢性肝炎29例（平均年齢40.1才）のうち4例はNS5B及び5'UTRとも増幅陰性であった。HCV RNA陽性症例のうち，NS5B領域の解析ではHCV-1aおよびHCV-3aがそれぞれ20%（5/25），HCV-1bが16%（4/25），既知のサブタイプとは異なる変異株が4%（1/25）であった。NS5B領域は増幅陰性であるが5'-UTR領域では増幅陽性の症例が10例みられ，特有の塩基配列パターンに基づいて分類を行ったところ，タイプ1が16%（4/25），タイプ2が8%（2/25）および分類不能例が16%（4/25）であった。

肝硬変16例（平均年齢51.7才）は全例HCV RNA陽性であった。NS5B領域の塩基配列より，HCV-3aが44%（7/16），HCV-1aとHCV-1bがいずれも19%（3/16），HCV-3bが6%（1/16）にみられた。NS5B領域の増幅は陰性であるが5'-UTR領域の増幅では陽性の症例が2例みられ，特有の塩基配列パターンに基づいて分類を行ったところ，タイプ1が6%（1/16），分類不能例が6%（1/16）に見られた。

原発性肝癌5例（平均年齢62.5才）も全例がHCV RNA陽性であった。NS5B領域の塩基配列より，HCV-1aが40%（2/5），HCV-3aが20%（1/5）にみられた。5'-UTRのみ増幅陽性の症例が2例みられ，いずれもタイプ分類不能であった。

2. HCV株の分子系統樹解析

Core領域全体の塩基配列（573塩基）の分子系統樹解析の結果，今回我々が見出したタイの変異株は，HCVタイプ6の標準株（HK-2）やベトナムで見出された変異株と同じグループに位置することがわかった。さらにE1領域やNS5B領域の解析においても，タイ変異株及びベトナム変異株はHK-2株と同じグループに位置した。従って，我々が見出したタイの変異株はHCVタイプ6に属する新しいサブタイプであると考えられた。なお，上記のベトナム株は，他の研究グループによって，HCVタイプ7，8および9と報告されていたものであるが，6パラメーター・NJ法を用いた詳細な解析

により、タイプ6と分類された。タイのHCV株も含めて、アジア大陸東南端にはHCVタイプ6に属する特有のHCV株が存在していることが示唆された。HCVタイプ6の遺伝子塩基配列の多様性は他のタイプに比べて大きく、それらの遺伝子型分類には6パラメーター・NJ法のような詳細な解析を行う必要があると思われた。

3. HCV株のセロタイプ解析

HCVタイプ6（新サブタイプを含む）に感染した患者血清は、HCVタイプ1あるいはタイプ2特異的組換えペプチド（NS4由来）のいずれに対しても明らかな抗体反応を示さなかった。一方、それらHCVタイプ6感染患者血清は、各タイプに共通する抗原を用いた第2世代ELISAキットでは強い抗体反応を示した。これらのことから、HCVタイプ6のNS4蛋白は、HCVタイプ1やタイプ2とは異なる抗原決定基を有することが示唆された。

<まとめ>

タイ国チェンマイにおけるHCVサブタイプの分布状況について解析し、以下の成績を得た。

1. 慢性肝疾患患者においては、HCV-3aとHCV-1aが優位を占めていた。
2. 既報のサブタイプとは異なる変異株が見出され、詳細な分子系統樹解析により、それらはHCVタイプ6に属する新しいサブタイプであることが明らかになった。
3. それら新サブタイプのNS4蛋白の抗原性はHCVタイプ1やHCVタイプ2とは異なっていた。

論文審査の結果の要旨

C型肝炎ウイルス（HCV）は、世界各国において、輸血後肝炎や散発性非A非B型肝炎の主要な原因ウイルスとして知られている。HCVは、その遺伝子塩基配列の多様性に基づいて少なくとも6種類のタイプに分類され、各々はさらに幾つかのサブタイプに分類されている。それらのサブタイプの違いによってインターフェロン治療に対する感受性が異なり、肝疾患の重篤度も異なることが報告されている。また、それぞれのサブタイプの浸淫度は世界的に異なることも知られており、これまでに調査されていない地域には、新しいタイプ／サブタイプのHCVの存在する可能性も指摘されている。本研究は、タイ国チェンマイ市の慢性肝疾患患者のHCVサブタイプ分布状況およびHCV変異株の存在の有無について調べたものである。

血清は、チェンマイ大学医学部附属病院の慢性肝疾患患者より集め、抗HCV抗体の有無について第2世代ELISAキットを用いて測定した。抗HCV抗体陽性血清よりRNAを抽出し、RT-PCR法を用いてHCV遺伝子の増幅を試みた。サブタイプ分類を目的として、まずNS5B領域を増幅対象とし、可及的多くのサンプルからの増幅を可能にするために、申請者らの開発した多種類のプライマーセットを用いた。得られた増幅DNA産物について、ダイレクト・シーケンス法にてその塩基配列を決定し、既報のサブタイプの塩基配列と比較してホモロジーを算出し、それに基づいてサブタイプ分類を行った。既知のサブタイプに分類されなかったHCV株は、6パラメーター・NJ法を用いた詳細な分子系統樹解析を行い、サブタイプ分類上の位置を明確にした。新しいサブタイプと考えられるHCV株については、コア領域とE1領域の遺伝子解析も行い、サブタイプ分類上の位置付けをより明確にした。また、HCVタイプ1およびタイプ2に特異的なNS4由来組換えペプチドを用いて、新しいサブタイプを含むタイのHCV株についてセロタイプ分析を行った。

以上の解析の結果、次のことが明らかになった。(1)抗HCV抗体陽性の慢性肝炎（平均年齢40.1才）

ではHCV-1aおよびHCV-3aがそれぞれ20% (5/25), HCV-1bが16% (4/25), 既知のサブタイプとは異なる変異株が4% (1/25)であった。肝硬変(平均年齢51.7才)では, HCV-3aが44% (7/16), HCV-1aとHCV-1bがいずれも19% (3/16), HCV-3bが6% (1/16)にみられた。原発性肝癌(平均年齢62.5才)では, HCV-1aが40% (2/5), HCV-3aが20% (1/5)にみられた。(2)新しいサブタイプと考えられるHCV株について, まず, コア領域全体の塩基配列の分子系統樹解析の結果, HCVタイプ6の標準株(HK-2)や他の研究グループによってHCVタイプ7, 8および9と報告されていたベトナム変異株と同じグループに位置することがわかった。さらにE1領域やNS5B領域の解析においても, タイ変異株及びベトナム変異株はHK-2株と同じグループに位置した。従って, これらの変異株はHCVタイプ6に属する新しいサブタイプであると考えられた。以上より, タイ, ベトナム等, アジア大陸東南端にはHCVタイプ6に属する特有のHCVが存在していることが明らかになった。また, この地域のHCV株のサブタイプ分類には, 6パラメーター・NJ法のような詳細な解析を行う必要があると考えられた。さらに, セロタイプ解析の結果, HCVタイプ6(新サブタイプを含む)は, HCVタイプ1やタイプ2とは異なる抗原決定基を有することが示唆された。

以上, 本研究は, タイにおけるHCVの遺伝子および抗原性について解析したものであるが, 従来ほとんど行われていなかった同地域における慢性肝疾患患者のHCVサブタイプの分布状況について明らかにするとともに, 既報のサブタイプとは異なる新しい変異株を見出し, HCVタイプ6に属する新しいサブタイプであることを同定したものであり, HCVについて重要な知見を得たものとして, 価値ある集積であると認める。よって, 本研究者は, 博士(医学)の学位を得る資格があると認める。