Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Quantitation of hepatitis C viral RNA in liver and serum samples using competitive polymerase chain reaction

菅野, 雅彦

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1998-05-13
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
乙2243
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002243

※ 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。

[164]

氏名・（本籍）	菅野雅彦（すがの まさひこ）　（兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	博ろ第1638号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与の日付	平成10年5月13日
学位論文題目	Quantitation of hepatitis C viral RNA in liver and serum samples using competitive polymerase chain reaction （PCR競合定量法による肝組織内および血清中C型肝炎ウイルスRNAの測定）
審査委員	主査　教授　春日雅人 教授　伊東　宏　教授　横野浩一

論文内容の要旨

【緒　言】

インターフェロン（IFN）αは多数のC型慢性肝炎治療に使用され，約80％の患者でALTが正常化するが，半数は治療終了後に再燃し，治癒率は30〜35％である。各種C型肝炎ウイルス（HCV）抗体の測定にても治癒の予測は不可能で，近年開発されたPolymerase Chain Reaction（PCR）法を用いたHCV-RNA測定は血清中HCVの存在を高感度に検出するが，治療終了時の陰性化が必ずしも肝炎の治癒を意味しない事が既に報告されている。そこで我々は肝組織中及び血清中HCV-RNA量を，より高感度に検出するcompetitive reverse transcriptional polymerase chain reaction（competitive RT-PCR）法を確立し，IFNのC型慢性肝炎に対する治療効果および治癒の予測と再燃の機序について検討した。

【対象と方法】

対　象

当科にてIFN治療終了後6か月間経過観察し得たC型慢性活動性肝炎72例を対象とした。治療前は全例血清中HCV-RNAが陽性であり，肝組織所見は2例を除いてchronic aggressive hepatitisであった。投与方法はnatural IFN αまたはrecombinant IFN αを600-1000万単位連日2〜6週間その後週3回にて計6か月間とした。

72例中56例（77.8％）は治療終了時にALTの正常化と血清中HCV-RNAの消失を認めた。このうち23例は治療終了後もHCV-RNAが再出現せず，治癒群（L－CR群）とし，33例は後6か月以内に血清中HCV-RNAの再出現を認め再燃群（S－CR群）とした。残り16例（22.2％）ALTの異常が持続，血清中HCV-RNAの残存を認めた。22例（L－CR群11例，S－SR群11例）は治療前後で肝生検を施行した。

方　法

治療前後に血清及び肝組織を採取した。肝生検は，17Gシュアーカット臓器生検針を用い20〜30mm長の組織を得，そのうち2〜5mmを-80℃凍結保存の上HCV-RNA測定に用いた。組織所見はヨーロッパ分類に従ってCPH，CAH2A，CAH2B，LCに分類し，さらにKnodellらのhistological activity index（HAI）に従って点数化した.

全72症例の血清についてnested PCR法によるHCV-RNAを測定した。治療前後で肝生検を施行した22例についてはmutant HCV-RNAを用いてcompetitive RT-PCR法にて定量した。

*mutant　HCV−RNA*の合成

木下らの作製したプライマーを用いてPCRミュータジェネシス法により，HCV-RNAゲノムの5′非翻訳領域に制限酵素KpnⅠ認識部位を導入した一点塩基置換フラグメントを作成，クローニングベクターに挿入，培養精製し発現ベクターのマルチクローニングサイトに挿入，組換えプラスミドを得た。HindIIIで消化し直鎖DNAとした後T7 RNA polymeraseに対する鋳型として，mutant HCV-RNAの合成を行いフェノール・クロロホルム精製してmutant HCV-RNAのスタンダード系列（10^1〜10^8copy／μL）を調整した。

*HCV-RNA*の抽出と競合定量法

肝組織を融解計量しguanidine solutionに混合溶解の後4〜5本のtubeに分注（500μL）した。mutant HCV-RNAスタンダードを加えた後AGPC法にてRNAを抽出，エタノール沈殿乾燥の後アンチセンスプライマーと逆転写酵素溶液を加え37℃120分反応させ，cDNAを合成した。血清は50〜100μLずつ5本のtubeに分注し同様にしてcDNAを合成した。

PCRは岡本らのプライマーを用い，nested PCR法（各々92℃60秒，55℃45秒，72℃120秒を35サイクル）で行なった。

PCR産物にKpnIを加え一夜消化し3％アガロースゲル電気泳動した。HCV-RNA由来のPCR産物は144bpの所に，mutant HCV-RNA由来のPCR産物は82bpと62bpの二本に分割されて表現された。HCV-RNA量は三本のバンドの発光強度を比較することにより決定した。測定感度は10^2copy／mLであった。

【結　果】

血清中と肝組織中の*HCV-RNA*の定量

治療前血清中と肝組織中のHCV-RNA量はL-CR群及びS-CR群において相関したが（r＝0.585），治療後はS-CR群の肝組織中にのみHCV-RNAが残存した。治療前のHCV-RNA量は，血清中と肝組織中ともにL-CR群がS-CR群より少量であったが（血清：L-CR群$10^{5.0\pm0.9}$copy／mL：S-CR群$10^{6.3\pm1.1}$；肝組織：L-CR群$10^{6.8\pm1.0}$copy／mg　tissue：S-CR群$10^{7.4\pm1.3}$），有意差はなかった。しかし血清中HCV-RNA量が10^6copy／mL以下の症例の71.4％（10／14）がL-CR群となったのに対し，$10^{6.5}$copy／mL以上では12.5％（1／8）のみがL-CR群で，血清中HCV−RNA量が10^6copy／mL以下の症例にIFNはより有効であった（$p<0.05$；Fisher's test）。同様に肝組織中HCV-RNA量が10^7copy／mg tissue以下の70％（7／10）がL-CR群，$10^{7.2}$copy／mg tissue 以上の33.3％（4／12）がL-CR群となったが，有意差はなかった。

治療後HCV-RNAは両群とも血清中から消失した。一方肝組織中はL-CR群では全例が消失したが，

S-CR群では全例に少量の残存($10^{4.8\pm1.9}$copy／mg tissue）を認めた。

*HAI*スコアの変化

組織学的変化は各組織のHAIスコア（点数）にて検討した。治療前ではL-CR群（11.0±3.2）とS-CR群（10.8±3.5）に有意差はなく，両群のHAIスコアと肝組織中のHCV-RNA量の間にも相関関係は認めなかった。治療終了時のスコアはL-CR群：7.3±3.7，S-CR群：9.6±4.6で治療前後の変化はL-CR群でより大きく，IFN治療がより効果的であったと考えられたが，有意差は認めなかった。

【考　察】

IFN αがC型慢性肝炎の治療に応用され，血清中のHCV完全排除が可能となったが，多数例にて再燃がみられ，その大部分は肝機能異常が持続する。

本研究では治療後72例中56例（77.8%）に血清中HCV-RNAの消失を認めたが，このうち23例は治癒し，33例再燃した。後者ではHCVが主たるリザーバーとされる肝組織中に残存していたと推察されたため，我々は治療前後の肝組織と血清中のHCV-RNAをcompetitive RT-PCR法を用いて定量し予後との関連を検討した。

治療前の血清中HCV-RNA量は両群とも肝組織中HCV－RNA量と相関した。治療終了時HCV-RNAはL-CR群にて肝組織中，血清中いずれからも消失したが，S-CR群では肝組織中に少量残存した。即ち肝炎の治癒は，肝組織からの完全なHCV排除によってのみ可能なこと，そして肝臓がHCVの最大のリザーバーである事が示唆された。

Balartらは現行PCR法にて肝組織中HCV-RNAが陰性化した11例中４例に再燃が起こり，肝組織中の検索だけでは治癒予測は難しいと報告，以下の理由をあげている。１）サンプリングエラー又は生検肝組織が小さすぎた，２）PCR法の感度が低い，３）他の組織がHCV-RNAのリザーバーとなっていた。３）についてはGilらはIFN治療後にHCV-RNAが肝組織中と血清中いずれも陰性のまま再燃した患者の末梢血単核球中にpositive strand HCV-RNAを認めたと報告している。

我々の結果では，治療終了時に肝組織中にHCV-RNAが残存した患者はすべてS-CR群，陰性の患者は全例L-CR群となった。即ち肝組織中にも血清中にもHCV-RNAが存在せぬまま再燃する症例は極めて稀と考えられ，Gilらの結果と異なった理由の一つは我々の定量法が肝生検組織中HCV-RNAの検出に関して彼らの方法より高感度であったことが推察される。

効果的な治療計画を組むためには各患者のIFN治療に対する反応の簡便かつ早期の効果予測の指標を確立することが必要である。治療前では血清中及び肝組織中のHCV-RNA量はともにL-CR群においてS-CR群に比してより少量であり，また血清中HCV-RNA量が10^6copy／mL以下の症例の大部分がL-CR群となった。即ちIFN治療はHCV-RNA量が少ない患者でより有効であることが示唆される。肝組織所見では治療前に効果予測する事は不可能であり，また治療後はL-CR群がS-CR群より改善度は大きかったが，やはり治癒予測は不可能であった。

【結　論】

我々の確立したcompetitive RT-PCR法は肝組織中の微量なHCV-RNAを高感度に定量する事が可能であった。この方法を用いることにより，IFN α治療ではC型慢性肝炎患者の血清中のみならず肝組織中からもHCVが排除された場合にのみ完全治癒に到ることが示された。また治療前の血清中HCV-RNA量は多くの患者でIFN治療の効果と相関関係を呈していた。以上より治療終了時の肝組織

中HCV-RNAの消失が最も確実な治癒の指標であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

インターフェロン（IFN）αによるC型慢性肝炎治療は治癒率30%とされ，従来法のPolymerase Chain Reaction（PCR）法を用いたC型肝炎ウイルス（HCV）-RNA測定は肝炎の治癒を予測し得ない事が既に報告されている。

本研究ではHCV-RNA量を，より高感度に検出するcompetitive reverse transcriptional polymerase chain reaction（competitive RT-PCR）法を確立，IFNのC型慢性肝炎に対する治癒予測と再燃の機序について検討した。

対象は，IFN治療終了後6か月間経過観察し得たC型慢性活動性肝炎72例。IFNαの総投与量は480-960MU。56例は治療終了時ALTの正常化と血清中HCV-RNAの消失を認め，うち23例は6か月間HCV-RNAが再出現せず治癒（L-CR）群とし，33例は血清中HCV-RNAの再出現を認め再燃（S-CR）群とした。両群各11例では治療前後で肝生検を施行，一部をHCV-RNA定量に用いた。組織所見はKnodellらのhistological activity index（HAI）に従って点数化した。

治療前，血清中と肝組織中のHCV-RNA量は相関した（r=0.585）。治療前のHCV-RNA量は，血清中L-CR群$10^{5.0\pm0.9}$：S-CR群$10^{6.3\pm1.1}$ copy／mL；肝組織中L-CR群$10^{6.8\pm1.0}$：S-CR群$10^{7.4\pm1.3}$ copy／mg tissue と有意差はなかったが，L-CR群がより少量であった。また血清中HCV-RNA量が10^{6} copy／mL以下の14症例中10例がL-CR群に対し，$10^{6.5}$ copy／mL以上では8症例中1例のみL-CR群で，IFNは低ウイルス量症例により有効であった（$p<0.05$；Fisher's test）.同様に肝組織中HCV-RNA量が10^{7}copy／mg tissue以下の10症例中7例がL-CR群，$10^{7.2}$copy／mg tissue以上では12症例中4例のみL-CR群となるも有意差はなかった。

治療終了時HCV-RNAはL-CR群にて肝組織中，血清中いずれからも消失したが，S-CR群では肝組織中に$10^{4.8\pm1.9}$copy／mg tissue残存した。即ち肝炎の治癒は，肝組織からの完全なHCV排除によってのみ可能なこと，そしてIFN治療はHCV-RNA量が少ない患者でより有効であることが示唆された。

組織学的検討では，治療前はHAIスコアと肝組織中のHCV-RNA量の間に相関関係は無く，L-CR群：11.0±3.2とS-CR群：10.8±3.5にも有意差はなかった。治療終了時はL-CR群：7.3±3.7，S-CR群：9.6±4.6で治療前後の変化はL-CR群でより大きいが有意差は認めなかった。

本研究はIFN治療後の治癒と再燃について，その機序を研究したものであるが，従来ほとんど行われていなかったcompetitive RT-PCR法を肝組織中の微量なHCV-RNA定量に用いることにより，IFNα治療における完全治癒過程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。