

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
井上俊宏	主査 教授 勝 健 一 副査 教授 佐 野 浩 一 副査 教授 北 浦 泰 副査 教授 芝 山 雄 老 副査 教授 花 房 俊 昭
主論文題名  C 型肝炎ウイルス感染者胆汁中 C 型肝炎ウイルスの検出と胆道内におけるウイルスの動態 (Detection of hepatitis C virus in the bile of infected patients and kinetics of hepatitis C virus in the biliary system)	
学位論文内容の要旨	
<p>《目的》 我が国で増加傾向にある肝細胞癌の原因の大部分が C 型肝炎ウイルス(HCV)感染であり、その感染対策が重要な課題となっている。主な感染経路は血液を介してであるが、他の体液による感染も否定できない。唾液、尿、汗、涙、母乳や胃液中に HCV が存在すると報告されているが、胆汁中 HCV の存在に関する報告は少なく、胆汁中 HCV の測定方法や <i>in vitro</i> での生物活性の有無についても十分な検討がなされていない。申請者は純粋胆汁を用いて、胆汁中 HCV の測定方法と HCV の胆道内における動態を明らかにするため検討を行った。</p> <p>《材料および対象》 (1)HCV 非感染者胆汁 血清 HCV 抗体および血清 HCV-RNA 定性が陰性で、肝炎の既往歴・家族歴のない胆道疾患患者 5 人を対象とした。胆汁は内視鏡的に胆道に留置したドレナージチューブから採取し、直ちに -80℃で凍結保存した。 (2)HCV 感染者血清 血清 HCV-RNA 定性陽性の HCV 感染者 5 人を対象とした。採血後直ちに遠心分離し、血清を -80℃で凍結保存した。 (3)HCV 感染者胆汁 胆道疾患を合併した血清 HCV 抗体陽性患者 36 人を対象とした。胆汁は内視鏡的あるいは経皮的に胆道に留置したドレナージチューブおよび ERCP 時に深部胆管から採取し、直ちに -80℃で凍結保存した。同時期に血清も採取して同様に凍結保存した。</p> <p>《方法》 (1)HCV 非感染者胆汁・HCV 感染者血清混和検体中の HCV-RNA の定性的検出 HCV 非感染者胆汁 5 検体と HCV 感染者血清 5 検体を無作為に対処させて、胆汁 450μl に血清 50μl の割で混和した模擬 HCV 陽性胆汁検体を作製した。この模擬 HCV 陽性胆汁検体を非感染者胆汁で 10 倍、100 倍、1000 倍、10000 倍に希釈し 24 時間室温で静置した。添加直後、15 分、30 分、60 分、90 分、2 時間、3 時間、6 時間、12 時間、24 時間後に HCV-RNA の定性的検出を行った。 (2)HCV 非感染者胆汁・HCV 感染者血清混和検体中の HCV-RNA ウイルス量の経時的変化 同様に模擬 HCV 感染胆汁を作製し、原液のまま静置し、添加直後、15 分、30 分、60 分、90 分、2 時間、3 時間、6 時間、12 時間、24 時間後に HCV-RNA の定性的検出とウイルス量の変化を測定した。 (3)HCV 感染者胆汁における HCV-RNA の定性的検出とウイルス量の測定</p>	

血清 HCV 抗体陽性患者 36 人について胆汁原液中 HCV-RNA の定性的検出とウイルス量の測定を行った。

(4)HCV 感染者胆汁中ウイルス量の経時的变化

HCV 感染者胆汁中ウイルス量の経時的な変化について採取直後、15 分、30 分、60 分、90 分、2 時間、3 時間、6 時間、12 時間、24 時間後に検討した。

(5)HCV 感染者血清および胆汁中 HCV genotype の測定

血清・胆汁中の HCV genotype を測定した。

(6)胆汁採取法別胆汁中 HCV-RNA 定性的検出率

drainage 群と ERCP 群の間で胆汁中 HCV-RNA の検出率を検討した。

《結果》

(1)HCV 非感染者胆汁・HCV 感染者血清混和検体中の HCV-RNA の定性的検出

模擬 HCV 感染胆汁検体では、いずれの希釈倍率でも静置時間の経過とともに胆汁中の HCV-RNA の検出率は低下し、特に高希釈検体ほど早期より検出されなくなった。

(2)HCV 非感染者胆汁・HCV 感染者血清混和検体中のウイルス量の経時的变化

模擬 HCV 感染胆汁検体中のウイルス量は、時間経過とともに減少し、検出感度未満になる検体数が増加した。

(3)HCV 感染者胆汁における HCV-RNA の定性的検出とウイルス量の測定

血清 HCV 抗体陽性 36 人中 32 人は血清 HCV-RNA 定性が陽性であり、そのうち 29 人(90.6%)は血清ウイルス量が測定可能であった。この 29 人中 27 人(93.1%)の胆汁中に HCV-RNA が定性的に検出され、そのうち 22 人(81.5%)で胆汁中ウイルス量の測定が可能であった。血清ウイルス量が検出感度未満であった低ウイルス量の 3 人では胆汁中 HCV-RNA は全く検出されなかった。血清ウイルス量と胆汁中ウイルス量の間には、統計学的に正の相関が認められた。

(4)HCV 感染者胆汁中ウイルス量の経時的变化

HCV 感染者胆汁中 HCV-RNA は時間経過にかかわらず、すべての検体で定性的に検出されたが、ウイルス量は経時的に減少した。

(5)HCV 感染者血清および胆汁中 HCV genotype の測定

血清と胆汁中の HCV genotype の不一致例は認めなかった。

(6)胆汁採取法別胆汁中 HCV-RNA 定性的検出率

drainage 群と ERCP 群の間で胆汁中 HCV-RNA 検出率には統計学的有意差は認めなかった。

《考察及び結語》

胆汁中 HCV の存在に関する報告は少なく、そのほとんどは血液、唾液や胃液の混入の可能性がある胆汁を用いた研究であり、検出された HCV が実際に胆汁中に存在していたものか否かは明らかではない。申請者は、胆汁中の HCV の存在を明確にするために、血液、唾液、胃液、十二指腸液などの混入の可能性が極めて少ない純粋な胆汁を採取し HCV の検出を試みた。第 2 世代の血清 HCV 抗体が陽性でかつ血清 HCV-RNA 定性が陰性、すなわち過去の HCV 感染の既往と考えられる状態では、胆汁中 HCV-RNA 定性はいずれも陰性であり、胆汁中に HCV は存在しないことが示された。一方、HCV 持続感染患者の胆汁中 HCV-RNA 検出率は 84.4%であった。模擬 HCV 陽性胆汁および HCV 感染者胆汁中ウイルス量は測定までの時間経過にともない徐々に低下することから、検体の管理を含めて測定方法の違いにより検出率に影響を及ぼす可能性が考えられる。胆汁中 HCV の検出精度を上げるためには採取後早期に測定するシステムや測定検体に応じた HCV の効率的な検出方法を検討していく必要がある。血清ウイルス量と胆汁中ウイルス量には正の相関が認められ、血液中のウイルス量が多いほど胆汁中へのウイルスの移行も多くなると推察された。

本研究により C 型肝炎患者の肝臓から分泌される胆汁中に HCV が存在することが証明され、胆汁中に分泌された HCV の胆汁採取後の動態も一部明らかとなった。HCV 感染患者の胆汁の取り扱いに際しては、血液汚染物質と同様に慎重な態度で臨み、厳重な感染対策を行う必要がある。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第677号	氏名	井上俊宏
論文審査担当者		主査	教授 勝 健 一
		副査	教授 佐 野 浩 一
		副査	教授 北 浦 泰
		副査	教授 芝 山 雄 老
		副査	教授 花 房 俊 昭
主論文題名			
C型肝炎ウイルス感染者胆汁中C型肝炎ウイルスの検出と胆道内におけるウイルスの動態 (Detection of hepatitis C virus in the bile of infected patients and kinetics of hepatitis C virus in the biliary system)			
論文審査結果の要旨			
<p>肝細胞癌の増加に伴い、C型肝炎ウイルス(Hepatitis C virus: HCV)に対する感染対策が重要な問題となっている。HCVの主な感染経路は血液を介してであるが、他の体液等による感染も否定できない。申請者はHCV感染者胆汁を非観血的に採取し、HCV感染者胆汁でのHCVの検出と採取後におけるウイルスの動態について検討を行い、以下の知見を得ている。</p> <p>1) HCV非感染胆汁にHCV感染者血清を混和した模擬HCV陽性胆汁を作製し、時間経過別・希釈濃度別に胆汁中のHCVを測定した。静置時間の経過毎に胆汁中HCV-RNAの検出率は低下し、HCV-RNAは高希釈検体ほど静置後早期より検出されなくなった。胆汁中ウイルス量も時間経過とともに検出感度以下となる検体数の増加を認めた。</p> <p>2) 血清HCV抗体陽性患者のうち血清HCV-RNA定性が陽性例に胆汁中HCV-RNAが検出された。さらに血清HCV-RNA定性が陽性かつ血清ウイルス定量が可能であった例では胆汁中HCV-RNAが高率に検出され、胆汁中ウイルスの定量が可能であった。一方、血清HCV-RNA定性が陽性でも血清ウイルス量が検出感度未満であった例では胆汁中HCV-RNAは全く検出されず、血清と胆汁中ウイルス量の間には、統計学的に正の相関が認められた。</p> <p>3) HCV感染者胆汁中HCVの経時的变化を検討すると、胆汁中HCV-RNAは24時間後まで定性的に検出されたが、そのウイルス量は時間とともに減少した。</p> <p>以上の結果より、C型肝炎患者の肝臓から分泌される胆汁中に高率にHCVが存在することが証明され、胆道内におけるウイルスの動態が一部明らかとなった。HCVの感染対策にとって本研究の臨床的意義は高いと考えられる。</p> <p>以上より、本論文は本学大学院学則第9条の定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) 大阪医科大学雑誌 63(1): 42-49, 2004</p>			