

氏名(本籍)	小島真樹(茨城県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第1,411号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Influence of Antibodies to the Hypervariable Region of E2/NS1 Glycoprotein on the Selective Replication of Hepatitis C Virus in Chimpanzees (C型肝炎ウイルス高変異領域のE2/NS1糖蛋白質に対する抗体が、チンパンジーでの特異ウイルスクローンの増殖に与える効果の研究)
主査	筑波大学教授 医学博士 滝田 齊
副査	筑波大学教授 医学博士 林 英生
副査	筑波大学教授 医学博士 三澤 章吾
副査	筑波医学実験用霊長類センター長 (筑波大学併任教授)農学博士 吉川 泰弘
副査	筑波大学助教授 獣医学博士 八神 健一

論 文 の 要 旨

〈目的〉

C型肝炎ウイルス(HCV)高変異領域(HVR)のE2/NS1糖蛋白質に対する抗体がHCVの持続感染に及ぼす影響を検証し、持続感染におけるクローンの選択の機序の一端を解明することを目的とした。

〈対象と方法〉

1) 感染実験の対象と方法

HCVに感染したヒト供血者に由来する血漿(接種材料No.1)を原材料として、3代にわたる継代感染実験を計8頭のチンパンジーで行った。すなわち、接種材料No.1を1頭のチンパンジーに接種して急性肝炎を発症させ、その血漿(接種材料No.2)を5頭のチンパンジーに接種して全例に急性肝炎を発症させた。5頭から採取した血漿(接種材料No.3)をさらに2頭のチンパンジーに接種(1頭にはそのまま、他の1頭にはセシウムクロライド浮上遠心分画を接種)して2頭とも急性肝炎を発症させた。急性肝炎はすべて病理組織学的に診断した。(この実験はHCV発見以前の1980年頃、非A非B型肝炎の原因検索のために行われたもので、検体は血漿として保存してあったものを使用した。)

2) HVRの塩基配列の解析

PCR法を用いて、各接種材料とチンパンジーの血漿から10クローンずつのHVR塩基配列を決定し、ウイルスのクローンの推移について検討した。

3) HVR に対する抗体の測定

HVR の E2/NS1糖蛋白に対する抗体は、10アミノ酸からなる合成ペプチド（1アミノ酸ずつずらして21個のペプチドを作製）を固相抗原とし、EIA 法により測定した。

4) 蔗糖密度勾配遠心法

各検体の HCV 粒子を蔗糖密度勾配遠心法により、まず比重ごとの分画に分け、さらに免疫グロブリンの結合した比重の重いものと、結合していない比重の軽いものとに分画した。比重ごとに HVR の塩基配列を決定した。

〈結果〉

1) HVR の塩基配列

a. 接種材料 No. 1

7クローンが得られ、それらをクローン A, B (クローン A と12アミノ酸異なる), C (クローン A と7アミノ酸異なる) etc. と名付けた。クローン A は1クローンのみ認められた。

b. 接種材料 No. 2

7クローンは、接種材料 No. 1で minor であったクローン A/A'であった。

c. 5頭のチンパンジーの血漿

それぞれ10クローンずつ分離し解析した結果、クローン A がいずれも5～9クローンで大勢を占めていた。

d. 接種材料 No. 3

4クローンが A, 5クローンが B/B' (クローン B とアミノ酸配列が1～2個異なるものを B' とした), 1クローンが C であった。

e. 接種材料 No. 3を接種された2頭のチンパンジーの血漿

得られた40クローンはすべてクローン A であった。

以上のように、接種材料 No. 1において1クローンのみ認められた minor なクローン A は、この3世代にわたる継代感染実験において、各世代を通じて次々に選択され、優位に増殖した。

2) HVR に対する抗体

HVR に対する抗体は、接種材料 No. 2を受けた5頭のチンパンジーのうちの2頭 (C26, C47) と、その2頭を含む5頭分の血漿をプールした接種材料 No. 3でのみ検出された。C46ではクローン A, B, C, C47ではクローン B と C, 接種材料 No. 3ではクローン B と C に対する抗体が検出された。

3) 蔗糖密度勾配遠心法

接種材料 No. 1と No. 2には免疫グロブリンの結合していない比重の軽い HCV 粒子の分画が、No. 3には免疫グロブリンの結合していない比重の軽い分画と結合している比重の重い分画の両者が存在していた。

4) 上記比重の軽い分画と比重の重い分画の HVR の塩基配列

接種材料 No. 3の比重の軽い分画はクローン A のみであった。一方、比重の重い分画には、クローン A, B を含む多様なクローンが認められた。

〈まとめ〉

以上の研究結果から、HVR に対する抗体が結合していないクローン A が感染を阻止されずに増殖し得たものと推測された。従って、HVR に対する抗体が HCV の感染に対して防御的に働き、増殖の際のクローンの選択に影響していることが示唆された。

審 査 の 要 旨

HCV の持続感染の機序を明らかにするため、HCV エンベロープの HVR に着目して、これに対する抗体が感染阻止に重要な役割を演じているとの仮説を立て、3代にわたるチンパンジーの継代感染実験でウイルスのクローンの解析、HVR に対する抗体の測定および免疫グロブリン結合／非結合ウイルスの分離を行って、その仮説の一部を実証した研究であり、独創性とウイルス学的意義は評価される。しかし、HCV の持続感染には多数の因子の関与が考えられること、宿主を変えた場合、免疫応答とは別にウイルスの選択が起きやすいこと、本研究では HVR-1 のみ解析されたが HVR-2 の関与も否定できないことなど課題も多数残されており、今後の発展が期待される。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。