

|         |  |        |        |  |
|---------|--|--------|--------|--|
| 氏名(本籍)  | もろた ほし 師田(星) かおり (千葉県)   |        |        |  |
| 学位の種類   | 博士(生物工学)   |        |        |  |
| 学位記番号   | 博甲第 5751 号   |        |        |  |
| 学位授与年月日 | 平成 23 年 3 月 25 日   |        |        |  |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当   |        |        |  |
| 審査研究科   | 生命環境科学研究科  |        |        |  |
| 学位論文題目  | <b>Development and Performance Evaluation of Hepatitis C Virus Core Antigen and Liver Disease Marker Immunoassays</b><br>(C 型肝炎ウイルスコア抗原および肝疾患マーカーのイムノアッセイの開発および性能評価) |        |        |  |
| 主査      | 筑波大学教授   | 農学博士   | 深水 昭吉  |  |
| 副査      | 筑波大学教授   | 農学博士   | 小林 達彦  |  |
| 副査      | 筑波大学准教授  | 博士(薬学) | 木村 圭志  |  |
| 副査      | 筑波大学講師   | 博士(学術) | 加香 孝一郎 |  |

### 論文の内容の要旨

肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) は、アジア太平洋諸国およびアフリカで多く報告されているが、近年欧米でも症例数が増加している。HCC は予後不良な進行した段階で判明することが多く、C 型肝炎ウイルス (HCV) 持続感染、B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染、アルコール性肝炎等の慢性肝疾患および肝硬変が背景因子となる。国内および欧米では、慢性 C 型肝炎患者での発症が多い。HCV 感染後、約 70% でウイルス感染が持続し、慢性肝炎に進行し、その後 20-40 年後に、肝繊維化、肝硬変を経て HCC 発症にいたる。HCV 感染が診断されると、インターフェロンやリバビリンなどの抗ウイルス剤によるウイルス駆除のための治療が実施される。肝疾患が進行し、HCC を発症する症例については、画像診断や血清マーカーによる診断後、手術、放射線治療および化学療法が行われるが、HCC の早期診断により治療早期開始することにより、治癒率の向上が期待されている。著者は、HCV 感染の検出および治療効果のモニタリングに用いられる高感度 HCV コア抗原の自動化定量測定系を開発し、性能評価を行った。また、HCC の新規血清マーカー候補である Golgi Protein-73 およびフコシル化ヘモベキシンの測定系を開発し、既存の HCC マーカーと臨床性能の比較評価を行った。

HCV 感染の診断は、一般的にヒト血清中の抗 HCV 抗体検出によるスクリーニングと HCV RNA 測定による確定により行われている。HCV 抗体検査は、現在のウイルス感染と過去に感染して現在は感染していない症例を確実に区別することが困難で、単独では治療の必要性を判断することができない。また、ウイルス感染後、抗体検出まで 45 ~ 68 日を要する。一方、HCV RNA 検査は、現在の感染状態を良く反映するが、技術的スキルの必要性、長い測定時間や高価であることが、ルーチン測定に対する問題となっている。近年、HCV RNA と良好な相関を示す HCV コア抗原の測定系が開発され、HCV RNA 測定の代替となる可能性が示された。ただし、既存の HCV コア抗原測定系は感度が十分ではなく、HCV 粒子よりコア抗原を抽出するサンプルの前処理ステップに 56 ~ 60 °C で 30 分のマニュアル操作による熱処理が必要で、検査の操作性に関する改良が期待されてきた。治著者は、5 種類のマウスモノクローナル抗体を使用し、独創的な試薬デザイ

ンにより、高感度かつサンプル前処理を含むすべての操作手順を 37℃で行うことで全自動化し、結果が 37 分以内で得られる HCV コア抗原測定系を開発し、HCV 感染の診断および治療のモニタリングとして用いられるイムノアッセイを実用化した。

現在、HCC の診断は  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) や Protein Induced by the absence of vitamin K deficiency or antagonist type II (PIVKA-II) などの血清マーカーのアッセイと超音波、CT および MRI の画像診断によって行われている。近年の研究により、Golgi-Protein 73 (GP73) および フコシル化ヘモベキシン (Fuc-HPX) が新規 HCC および肝疾患の血清マーカーの可能性があると報告されてきた。これまでに、既存 HCC 血清マーカーである AFP および PIVKA-II と同時比較し、HCC、肝硬変、慢性肝炎および健常人検体を用いた臨床的有用性の評価を行った報告がなかった。著者は、GP73 ELISA および Fuc-HPX CLEIA 測定系を構築し、HCC 単独および HCC と肝硬変の両方の症例に対する性能について、4 つの血清マーカーの比較評価を行った。HCC 症例に対する Receiver Operating Characteristics 解析においては、PIVKA-II が最も診断感度および特異性が良く、ついで AFP が良好であった。HCC および肝硬変の両症例に対しては、検討したマーカーの中で GP73 がもっとも高い感度および特異性を示し、肝硬変に対する診断の有用性が確認された。また、B 型肝炎と C 型肝炎の症例を比較すると、B 型では慢性肝炎と肝硬変で GP73 濃度に有意差がないのに対し、C 型では慢性肝炎と比較し肝硬変で有意に GP73 濃度の上昇が見られた。この結果より、C 型慢性肝炎の症例における血中 GP73 濃度は HCC 発症リスクのバイオマーカーとなる可能性があることを見出した。

肝炎ウイルス感染、慢性肝炎、肝繊維化、肝硬変、HCC と肝疾患の進行を早期かつ的確に診断することで、より早期に適切な治療を行うことが可能となり、治癒率の向上に寄与できる。著者が研究開発した HCV コア抗原アッセイは、既存の測定系の性能および操作性の問題点を解決し、高感度、全自動、迅速かつ高い測定結果の信頼性を有する体外診断用試薬であることを確認できた。2009 年 3 月に国内外で市販され始め、既に HCV 感染の診断および治療のモニタリングに使用され始めている。また、血中 GP73 値は C 型慢性肝炎患者の肝硬変に対するリスク因子のマーカーとなりうる可能性が示され、今後肝の繊維化グレードおよび肝疾患の進行度との関連に関する大規模検討での臨床的有用性の確認が期待される。

## 審査の結果の要旨

著者が研究開発した HCV コア抗原アッセイは、既存の測定系の性能および操作性の問題点を解決し、高感度、全自動、迅速かつ高い信頼性を有し、HCV 感染の診断および治療のモニタリングに有用であると思われる。的確な診断結果を迅速かつ低コストで医療従事者および患者へ提供することにより、今後保健医療に貢献することが期待される。また、バイオマーカー候補として検討された血中 GP73 濃度は、C 型慢性肝炎の症例において肝硬変に対するリスク因子のマーカーとなりうる可能性が示され、臨床的有用性の確認検討が期待される。

以上のように、著者は既存の HCV コア抗原アッセイの問題点を克服し、独創的な観点からイムノアッセイ試薬を研究開発に成功した。低コストで的確な診断により、今後患者の保健医療の向上に寄与できると判断される。また、C 型慢性肝炎における肝硬変のバイオマーカーについては HCC 発症の早期発見および早期治療に貢献できる可能性を見出し、今後の研究の更なる発展が期待される。

よって、著者は博士（生物工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。