

日本財団補助金による
1996年度日中医学協力事業助成報告書

- 在留中国人研究者研究助成 -

49年3月13日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島 章 殿

I. 研究者氏名 曹 堃 (イウゴン) Kwu Cao
研究機関 名古屋市第二内科消化器グループ 研究指導者 溝上 雅夫 職名 講師
所在地 〒467 名古屋市瑞穂区川澄1 電話 853-8216 内線 _____

II. 過去の研究歴
別紙

III. 過去の研究実績
別紙

IV. 本年度の研究業績
(1) 学会、研究会等における口頭発表 (学会名・内容)
別紙

(2) 学会誌等に発表した論文 無 ・ 有 (雑誌名・論文名)
別紙

V. 今後の研究計画及び希望
HBV、HGVなど取り込めて研究していきたい。お返しお礼いたします。

VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。 2,000字程度で記載して下さい。)

別紙

VII. 指導教官の意見

別紙

研究報告

インターフェロン治療に対するC型肝炎ウイルス遺伝子変異の研究

---E2/NS1 超可変領域塩基配列置換パターンの分析

はじめに

C型肝炎ウイルスは1989年に発見同定され、その遺伝子の全体像が明らかになって以来、HCVの遺伝子解析も盛んに行われてきた。HCVは約9.5kbのプラス鎖としてもち、ペステイウイルス近縁のRNAウイルスである。一般にRNAウイルスが複製する際には、RNAポリメラーゼが修復機構を持たないため高頻度に塩基置換 (nucleotide substitution) をきたす。この結果として、多様な遺伝子変異を有する多数の変異株 (quasispecies) が混在した状態が形成される。このようにして形成された宿主内の変異株は、免疫監視機構からの逃避や抗ウイルス療法への抵抗性など、さまざまな生物学的特性に関与していると考えられる。

HCV遺伝子のエンベロープ領域には塩基配列の多様な領域が存在し、超可変領域 (hypervariable region; HVR)と呼ばれている。HVRには中和抗体のエピトープが存在すると思われる、宿主の免疫監視機構から逃避するためにHCVが変異を繰り返す結果として、HVRの多様性が生じる可能性が考えられている。

臨床的にC型慢性肝炎を治療するのにインターフェロン(IFN)を使うのは的確な効果が認められているが、著効例 (持続的肝機能の正常化とHCV-RNAの陰性化) の頻度は30%前後に過ぎない。治療効果を左右する因子としてVIRUS量、HCVゲノタイプ、肝組

織進展度などの関与が指摘されているが、HCVゲノムの中にHypervariable region (HVR)の塩基多様性及び治療前後塩基配列の変化(塩基置換)はIFN治療効果との関係が特に深いと思われる。

今回我々はIFN(sumiferon)での初回治療に無効を示したC型慢性肝炎6例の保存血清を使ってHCVRNAを抽出し、HVR塩基配列の変化を分析し、その変異のパターンを観察したので報告する。

材料と方法：

C型慢性肝炎と診断したIFN (sumiferon) 治療施行し、無効を示した6例、IFN投与する直前(before)、投与完了(after)、投与完了から6ヵ月(6M) 三つのポイントで採取した血清より、HCVRNAを抽出、RT-PCR法にてHVRを含めたE2/NS1領域 (Fig.1)のcDNAを作製、増幅した。ついで、そのPCR産物をサブクローニング後、各々8クローンをpick upし、ABI社の373A DNAシーケンシングシステムにより塩基配列を決定し、各ポイントのクローン間に6-parameter法にてND (nucleotide diversity)を算出し、クローンごとに同方法にて塩基置換数を推定した、Neighbor-joining法で分子系統樹を書き、IFN治療前後にHCVHVR遺伝子の塩基置換パターンを分析した。

結果：

今回研究したIFN (sumiferon) 療法で無効例のC型慢性肝炎6例の臨床データはTable 1に示した。Genotypeの分類は1例(MN)を除けば皆1bであった。組織進展度から見ると、SEだけはCAH2Bで、他の症例がCAH2Aであった。各症例を三つのポイント[IFN (sumiferon) 投与前(before)、投与完了(after)、投与完了6ヵ月(6M)]の保存血清を使って分析

した。

各症例のIFN投与前後のND変化はTable 1 に示した様にOK, KK二症例以外の四症例が投与期間中に各クローン間の相違度が一旦収められたが投与中止後にRebound 傾向も観察された。OK, KK二症例にOKは投与完了6ヵ月時点でReboundが見られなかったけれども、IFN耐性株は確かに存在していると考えられる；KKはIFN投与後にクローン間の相違(heterogeneity)が一旦大きくなった様に見えるが、投与完了6ヵ月時点で再び投与前のレベルに戻っていた、これもIFN耐性株が選択されたと言える。

さらに全症例のIFN投与前後の塩基置換パターンをまとめて比べました：A→Gへの置換以外は一定の増減傾向は見られなかったが、A→Gへの置換は全症例のIFN投与前後で減少していた ($P < 0.05$)。T→C、C→Tへの置換が多いことが観察されたが、統計的有意差は出なかった (Table2, Fig. 2)。

考案：

- 1.ほとんどの症例はIFN投与中にHVRの塩基多様度(ND)の減少が見られたが、投与中止後のReboundも観察された、これは臨床的結果と一致した。
- 2.C型肝炎ウイルスではC→T、T→Cへの置換が多いことが観察された。C型肝炎ウイルスは+strandから-strandとなり、-strandを増殖系として多量のウイルスvirionを複製するためmiss readingは-strandからウイルスvirionを複製するとき起こりやすいと考えられる (Fig. 3)。C→Tへの置換が多いとは正常ではCからG、GからCになる、ところがmutationではCからG、GからCの代わりにTが取り込まれたと考えられた。一方、TからCへの置換が多いとはTからA、AからTになるところが、T、Cが間違っ取り込まれた結果だと思われる、従って、T、CのanalogueがC型慢性肝炎に有効と思われる。文献的にはTsutsumiらがC

型肝炎ウイルスに対するTのanalogueであるAZTの有効性について報告しており、我々の観察結果と一致している。

3. IFN 投与中にA→Gへの置換の減少が観察された。A→Gへの置換が減少し、A→T、A→Cへの置換には増減がなかったため、Aはそのまま置換をおこさずAになる確率を高めたと考えられる。IFN 投与中にはAが取り込まれ易くなり、Aのanalogueが有効と思われる。

Ribavirinはnucleoside analogueとしての作用機序を持ち、体内でATP,GTPのanalogueに変化する。KakumuらはC型肝炎ウイルスに対するリバビリンとIFNの併用療法の有効性について報告しており、我々の観察結果と一致している。

結語：

IFN 投与前後にHCVゲノムの中にHypervariable region (HVR)の塩基配列の変化（塩基置換）はIFN治療効果との関係が深いと思われる。C→T、T→Cへの置換が多いことやA→Gへの置換の減少することが塩基置換パターン分析によって明らかになり、臨床的にも意義があると思われる。

主な文献：

1. M. Mizokami, T. Gojobori, and J. Y. N. Lau: Molecular evolutionary virology: its application to hepatitis C virus. *Gastroenterology* 1994; 107:1181-2.
2. E. N. Moriyama, Y. Ina, K. Ieko, N. Shimizu, and T. Gojobori: Mutation pattern of human immunodeficiency virus genes. *J Mol Evol.*(1991) 32:360-3.
3. T. Imanichi and T. Gojobori: Patterns of nucleotide substitutions inferred from the phylogenies of the class I major histocompatibility complex genes. *J Mol Evol.*(1992) 35:196-204.

4. N. Ogata, et al: Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. Proc Natl Acad Sci USA(1991) 88:3392-96.

5. 溝上雅史、大羽健一：C型肝炎ウイルスの分子進化学—分子系統樹と分岐時間—
日本臨床第693号（分子肝炎ウイルス病学）（1995）P57—63。

Table 1. Clinical characteristics of patients studied

patient	age/sex	history	genotype	serum sample	before and after IFN (sumiferon) treatment	duration	IFN (sumiferon) response	no. of clones sequenced	ALT level (IU/ml)	ND (nucleotide diversity)
MN	51/M	CAH2A	2a	MIN 1	before	6M	NR	8	92	0.05905
				MIN 2	after			8	61	0.00725
				MIN 3	6 M			8	112	0.07927
OK	49/F	CAH2A	1b	OK 1	before	6M	NR	8	47	0.14829
				OK 2	after			8	80	0.02471
				OK 3	6 M			8	35	0.00315
KK	30/M	CAH2A	1b	KK 1	before	6M	NR	8	136	0.01516
				KK 2	after			8	46	0.13521
				KK 3	6 M			8	142	0.01397
SA	63/M	CAH2A	1b	SA 1	before	6M	NR	8	232	0.10177
				SA 2	after			8	153	0.00991
				SA 3	6 M			8	197	0.01574
NJ	59/M	CAH2A	1b	NJ 1	before	6M	NR	8	166	0.01268
				NJ 2	after			8	490	0.00182
				NJ 3	6 M			8	136	0.01083
SE	64/M	CAH2B	1b	SE 1	before	6M	NR	8	187	0.01091
				SE 2	after			8	54	0.00466
				SE 3	6 M			8	46	0.0237

Table 2. Change of relative substitution frequency by IFN therapy

Case 1	From To	A	T	C	G
	A	-	15.83 ; 36.29 ; 11.49	0.00 ; 0.00 ; 0.00	26.39 ; 0.00 ; 15.32
	T	0.00 ; 0.00 ; 3.58	-	18.13 ; 32.90 ; 14.30	0.00 ; 0.00 ; 0.00
	C	0.00 ; 0.00 ; 2.83	11.25 ; 0.00 ; 33.92	-	11.25 ; 0.00 ; 8.48
	G	4.29 ; 0.00 ; 6.73	8.57 ; 30.81 ; 3.36	4.29 ; 0.00 ; 0.00	-

Case 2	From To	A	T	C	G
	A	-	3.35 ; 14.63 ; -	10.04 ; 0.00 ; -	16.73 ; 0.00 ; -
	T	2.72 ; 0.00 ; -	-	24.46 ; 42.06 ; -	2.72 ; 0.00 ; -
	C	2.08 ; 10.43 ; -	12.48 ; 20.87 ; -	-	10.40 ; 0.00 ; -
	G	6.45 ; 12.02 ; -	2.15 ; 0.00 ; -	6.45 ; 0.00 ; -	-

Case 3	From To	A	T	C	G
	A	-	11.70 ; 6.28 ; 0.00	0.00 ; 9.42 ; 0.00	11.70 ; 6.28 ; 0.00
	T	0.00 ; 7.12 ; 0.00	-	19.97 ; 7.12 ; 0.00	9.99 ; 0.00 ; 0.00
	C	7.50 ; 9.54 ; 0.00	22.49 ; 21.46 ; 0.00	-	7.50 ; 2.38 ; 0.00
	G	0.00 ; 24.89 ; 100.00	9.16 ; 2.77 ; 0.00	0.00 ; 2.77 ; 0.00	-

Case 4	From To	A	T	C	G
	A	-	12.93 ; 0.00 ; 6.88	4.31 ; 0.00 ; 0.00	17.24 ; 13.52 ; 41.29
	T	0.00 ; 0.00 ; 0.00	-	15.65 ; 34.84 ; 14.50	3.91 ; 0.00 ; 0.00
	C	0.00 ; 10.07 ; 6.12	23.56 ; 20.14 ; 18.37	-	3.37 ; 10.07 ; 6.12
	G	15.22 ; 11.36 ; 6.71	0.00 ; 0.00 ; 0.00	3.80 ; 0.00 ; 0.00	-

Case 5	From To	A	T	C	G
	A	-	0.00 ; 0.00 ; 0.00	0.00 ; 0.00 ; 0.00	16.67 ; 0.00 ; 0.00
	T	0.00 ; 0.00 ; 0.00	-	29.22 ; 0.00 ; 45.56	0.00 ; 0.00 ; 0.00
	C	7.73 ; 0.00 ; 0.00	38.85 ; 100.00 ; 36.64	-	7.73 ; 0.00 ; 0.00
	G	0.00 ; 0.00 ; 17.80	0.00 ; 0.00 ; 0.00	0.00 ; 0.00 ; 0.00	-

Case 6	From To	A	T	C	G
	A	-	0.00 ; 0.00 ; 0.00	0.00 ; 0.00 ; 0.00	30.89 ; 29.77 ; 16.76
	T	0.00 ; 0.00 ; 0.00	-	27.25 ; 19.33 ; 22.60	0.00 ; 9.66 ; 0.00
	C	0.00 ; 0.00 ; 25.02	25.66 ; 21.31 ; 12.51	-	0.00 ; 0.00 ; 0.00
	G	16.20 ; 19.93 ; 23.11	0.00 ; 0.00 ; 0.00	0.00 ; 0.00 ; 0.00	-

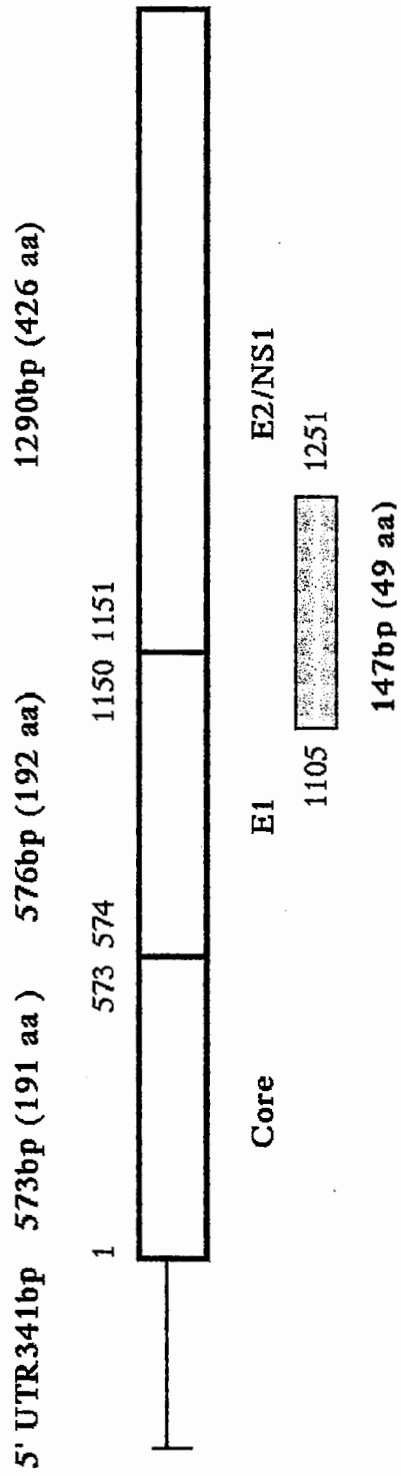


Figure 1. HCV sequence position in E2/NS1 HVR region in the study

		IFN (sumiferon)		
		Before	After	6M
A	T	6.9	6.7	7.2
	C	3.5	5.0	0.0
	G	18.1	8.3 *	19.9
T	A	0.9	3.5	1.9
	C	23.8	19.4	19.2
	G	2.8	1.8	0.0
C	A	2.1	7.9	5.7
	T	19.1	21.0	25.7
	G	7.5	2.6	5.7
G	A	8.5	19.3	12.9
	T	3.1	3.0	1.6
	C	3.9	1.5	0.0

* P < 0.05

Figure 2. Pattern of nucleotide substitutions observed in the study

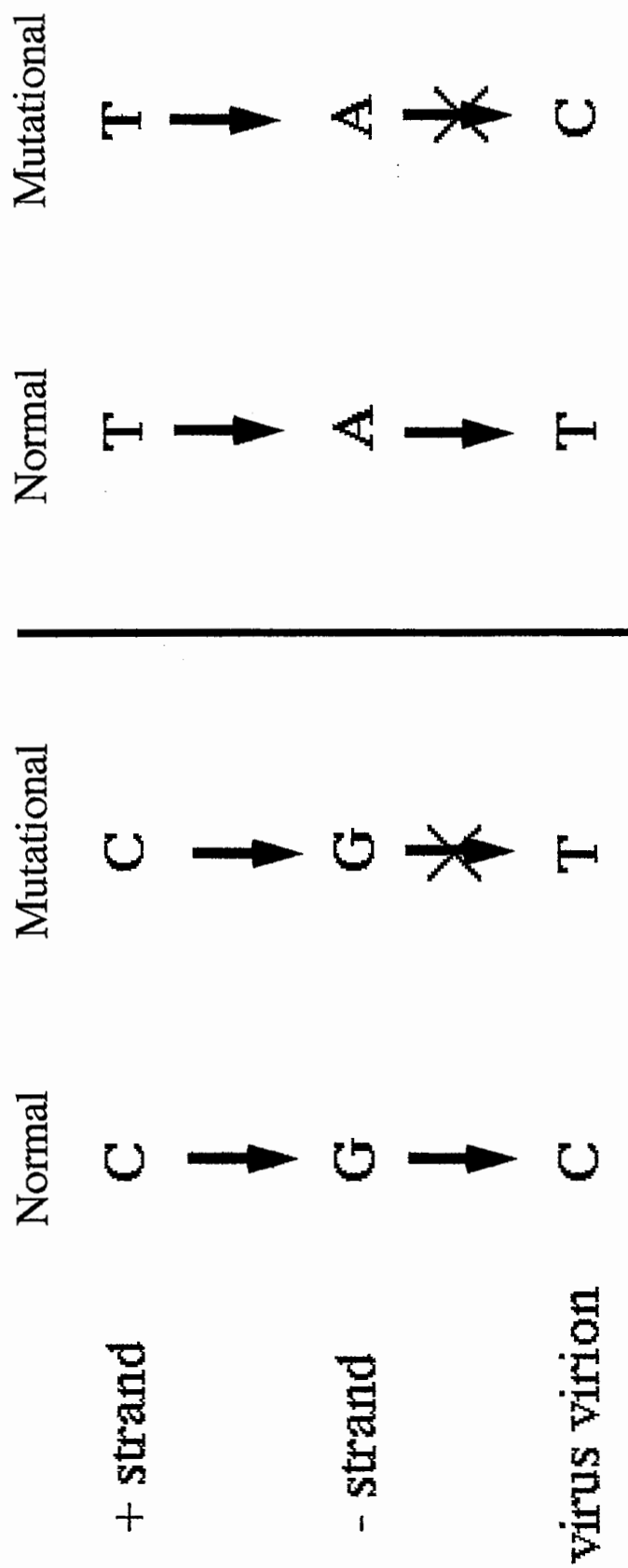


Figure 3. model of mutational changes of HCV virion

業績録：

1. 学会発表：

【平成6年】

溝口直人、溝上雅史、折戸悦朗、鈴木馨、大羽健一、大野智義、寺島久博、中野達徳、
Ron-Ron Wu, 曹 苙, Kui-Xian Wang
ポーランドのC型慢性肝疾患患者におけるC型肝炎ウイルスserotypeの測定と本邦との比較検討
第30回日本肝臓学会総会、平成6年7月8、9日、旭川
肝臓 35(suppl):322, 1994.

鈴木馨、溝上雅史、折戸悦朗、大羽健一、大野智義、溝口直人、寺島久博、中野達徳、
曹 苙、金井正三
インターフェロンによるC型肝炎ウイルスの遺伝子変異
第30回日本肝臓学会総会、平成6年7月8、9日、旭川
肝臓 35(suppl):108, 1994.

大野智義、溝上雅史、鈴木馨、溝口直人、折戸悦朗、Ron-Ron Wu, 曹 苙,
Kui-Xian Wang、大羽健一、寺島久博、中野達徳、小原道法
世界各国のC型慢性肝疾患におけるC型肝炎ウイルスserotypeとgenotypeの測定及びその意義
第30回日本肝臓学会総会、平成6年7月8、9日、旭川
肝臓 35(suppl):103, 1994.

Ron-Ron Wu, 溝上雅史、大野智義、溝口直人、折戸悦朗、鈴木馨、大羽健一、
寺島久博、中野達徳、曹 苙, Kui-Xian Wang、小原道法
日本人C型慢性肝疾患患者におけるserotypeおよびgenotypeの比較と日本人第六型genotypeの存在
第30回日本肝臓学会総会、平成6年7月8、9日、旭川
肝臓 35(suppl):91, 1994.

【平成7年】

呉蓉蓉、溝上雅史、大野智義、折戸悦朗、鈴木馨、大羽健一、溝口直人、寺島久博、
中野達徳、曹 苙、徳留信寛、向出雅一
C型肝炎ウイルスの新しいGenotyping法とその有用性の検討
第31回日本肝臓学会総会、福岡、平成7年7月21日
肝臓 36巻(suppl) (1): 156, 1995.

曹 苙、鈴木馨、折戸悦朗、大羽健一、溝口直人、小出常雄、寺島久博、中野達徳、
溝上雅史
C型肝炎ウイルスE2/NS1領域の塩基多様度とインターフェロン治療効果との関係
第31回日本肝臓学会総会、福岡、平成7年7月22日
肝臓 36巻(suppl) (1): 261, 1995.

葛憲民、王樹声、吳蓉蓉、曹 玟、黄果勇、王櫻、潘海東、大羽健一、鈴木馨、折戸悦朗、溝上雅史
中国広西チワン族自治区の麻薬常用者におけるB型およびC型肝炎ウイルスの感染状況
第31回日本肝臓学会総会、福岡、平成7年7月21日
肝臓 36巻(suppl) (1): 154, 1995.

Mizokami M, Ge XM, Hotta H, Wang SS, Wnag Y, Pan HD, Huang GY, Wu RR, K Cao, Ohba KI, Orito E, Lau JYN.
Hepatitis C virus genotypes 7, 8, and 9 should be classified as genotype 6 subtypes.
46th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases
Chicago, USA. Nov 3-7, 1995.

Mizokami M, Ge XM, Wang SS, Wang Y, Pan HD, Huang GY, Wu RR, K Cao, Orito E, Lau JYN.
Molecular epidemiology of hepatitis C infection among intravenous drug users in Guangxi province, southern China.
46th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases
Chicago, USA. Nov 3-7, 1995.

【平成8年】

鈴木馨、溝上雅史、曹 玟、折戸悦朗、大羽健一、小出常雄、寺島久博、中野達徳、吳蓉蓉
RFLP法によるHCV genotypingの試み
第32回 日本肝臓学会総会、神戸、平成8年4月20日
肝臓、37巻(Supplement 1): 141, 1996.

T Kato, M Mizokami, RR Wu, K Cao, T Nakano, XM Ge, Y Kondo, K Ohba, M Mukaide, E Orito, S Iino.
High prevalence of HGV/GBV-C infection in Southern China.
10th Asian-Pacific Congress of Gastroenterology, Yokohama, September 21, 1996.
Proceeding of 10th APCGA, 291, 1996.

K Ohba, M Mizokami, E Orito, T Nakano, RR Wu, K Cao, T Kato, Y Kondo, R Ueda, T Ohno, JYN Lau, T Gojobori.
Evolutionary relationship between hepatitis C virus, pestiviruses, flaviviruses, GB agents and hepatitis G virus.
47th Annual Meeting of the American Association of the Study of Liver Diseases. Chicago, Nov. 8-12, 1996. Hepatology 24(4): 227A, 1996.

- E Orito, M Mizokami, T Nakano, RR Wu, K Cao, T Kato, Y Kondo, K Ohba, R Ueda, M Mukaide, K Hikiji, JYN Lau.
Quantitative changes of serum GB virus C/hepatitis G virus (HGV) RNA in Japanese patients with HCV/HGV coinfection treated with interferon-alfa.
47th Annual Meeting of the American Association of the Study of Liver Diseases. Chicago, Nov. 8-12, 1996. Hepatology 24(4): 228A, 1996.
- E Orito, M Mizokami, T Nakano, RR Wu, K Cao, Y Kondo, T Kato, K Ohba, R Ueda, M Mukaide, K Hikiji.
GB virus C/hepatitis G virus infection among Japanese patients with chronic liver diseases and blood donors.
47th Annual Meeting of the American Association of the Study of Liver Diseases. Chicago, Nov. 8-12, 1996. Hepatology 24(4): 287A, 1996.
- M Mizokami, RR Wu, K Cao, T Nakano, X Din, E Orito, XM Ge, SS Wang, M Mukaide, K Hikiji, JYN Lau, S Iino.
GB virus C/hepatitis G virus infection in Southern China.
47th Annual Meeting of the American Association of the Study of Liver Diseases. Chicago, Nov. 8-12, 1996. Hepatology 24(4): 292A, 1996.
- 大羽健一、溝上雅史、向出雅一、Naoky C Tsai、折戸悦朗、中野達徳、RR Wu、曹 堃、加藤孝宣、近藤豊、上田龍三
ハワイのC型慢性肝炎患者のHCV genotype分布とHGV RNAの検出
第31回日本肝臓学会西部会、四日市市、平成8年11月29、30日
肝臓 37(suppl 3):70, 1996.
- RR Wu、溝上雅史、XM Ge、曹 堃、近藤豊、加藤孝宣、折戸悦朗、大羽健一、中野達徳、上田龍三
中国広西チワン族自治区のGBV-C/HGV感染
第31回日本肝臓学会西部会、四日市市、平成8年11月29、30日
肝臓 37(suppl 3):160, 1996.
- 加藤孝宣、溝上雅史、折戸悦朗、大羽健一、中野達徳、RR Wu、曹 堃、近藤豊、上田龍三、向出雅一
ウズベキスタンにおけるGBV-C/HGV感染の疫学的検討
第31回日本肝臓学会西部会、四日市市、平成8年11月29、30日
肝臓 37(suppl 3):161, 1996.
- 近藤豊、溝上雅史、折戸悦朗、大羽健一、中野達徳、RR Wu、曹 堃、加藤孝宣、上田龍三、向出雅一、矢野右人
モンゴルにおけるGBV-C/HGV感染の分子生物学的および疫学的検討
第31回日本肝臓学会西部会、四日市市、平成8年11月29、30日
肝臓 37(suppl 3):161, 1996.
- 向出雅一、大羽健一、中野達徳、RR Wu、曹 堃、折戸悦朗、山内寿靖、引地一昌、溝上雅史
GBV-C/HGVのgenotyping法の開発と地域特異性の検討
第31回日本肝臓学会西部会、四日市市、平成8年11月29、30日
肝臓 37(suppl 3):162, 1996.

折戸悦朗、溝上雅史、中野達徳、RR Wu、曹 竑、大羽健一、近藤豊、加藤孝宣、
向出雅一、引地一昌、上田龍三
Competitive RT-PCR法を用いたC型慢性肝炎に合併したG型肝炎ウイルスのインター
フェロン治療に対する反応性についての検討
第31回日本肝臓学会西部会、四日市市、平成8年11月29、30日
肝臓 37(suppl 3):167, 1996.

中野達徳、溝上雅史、折戸悦朗、大羽健一、近藤豊、加藤孝宣、RR Wu、曹 竑、
上田龍三、向出雅一
各種血液疾患患者中のGBV-C/HGV感染
第31回日本肝臓学会西部会、四日市市、平成8年11月29、30日
肝臓 37(suppl 3):168, 1996.

【平成9年】

Y Kondo, M Mizokami, K Cao, T Nakano, T Kato, R Ueda, M Mukaide, K Hikiji, T Oyunsuren,
D Dorjsuren, JYN Lau.
Prevalence and molecular epidemiology of GBV-C/hepatitis G virus infection in Mongolia.
4th international meeting on hepatitis C virus and related viruses. March 7, 1997 Kyoto
Japan.

2. 論文発表：

Etsuro Orito, Masashi Mizokami, Tatsunori Nakano, Rong-Rong Wu, Kun Cao, Ken-Ichi Ohba,
Ryuzo Ueda, Motokazu Mukaide, Kazumasa Hikiji, Yoshifuji Matsumoto, Shiro Iino.
GB virus C/hepatitis G virus infection among Japanese patients with chronic liver diseases
and blood donors.
Virus Research 46: 89-93, 1996.

Rong-Rong Wu, Masashi Mizokami, Kun Cao, Tatsunori Nakano, Xian-Min Ge, Su-Seng
Wang, Etsuro Orito, Ken-Ichi Ohba, Motokazu Mukaide, Kazumasa Hikiji, Johnson YN
Lau, Shiro Iino.
GB virus C/hepatitis G virus infection in Southern China.
Journal of Infectious Disease 175: 168-171, 1997.

Kun Cao, Masashi Mizokami, Etsuro Orito, Ken-Ichi Ohba, Tatsunori Nakano, Yutaka Kondo,
Takanobu Kato, Ding Shin, Ryuzo Ueda, Shinkan Tokudome,
Shun-Zhang Yu.
GB virus C/hepatitis G virus infection in patients with primary hepatocellular carcinoma in H-
city, China- a case controlled study
(submitted to International Hepatology Communications)