

学 位 論 文 題 名

Detection of TT virus sequences in children
with liver disease of unknown etiology
小児の原因不明の肝機能障害と
TT ウイルス DNA の検出

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

1997年にNishizawaらは非A-G型輸血後肝炎患者の血清からDNA断片N22を発見し、これが新しいウイルスTTウイルス(TTV)であり、さらにこのウイルスが原因不明の輸血後肝炎の病因となり得るとを報告した。しかしその後の研究で、あらゆる年齢の健常者からもTTV DNAが高率に検出されることが明らかになってきた。またTTVは糞便からも検出されており血液感染のほかに経口(糞便)感染の可能性も考えられている。

最近の研究でTTVの初感染はかなり低年齢でおきることがわかってきた。しかし初感染の症状やその後の感染の持続に関しては未だ不明な点が多い。我々は小児期のTTVの感染の検討をすることがTTVの初感染の研究につながると考えた。そこで研究対象を小児とし、原因不明の肝機能障害を示す患者血清中のTTV DNAを検索することで、小児におけるTTVと肝機能障害との関連性について検討した。

<方法>

対象は原因不明の急性肝障害16例(1カ月-15歳、平均4歳)、劇症肝炎2例(1.3歳、4歳)、慢性肝障害2例(3カ月、13歳)の計20例の血清とした。対照として肝機能障害を示さない保存血清35例(1カ月-16歳、平均3.6歳)を検討した。患者群はA、B、C型肝炎ウイルス、及びサイトメガロウイルス、EBウイルスによる肝障害は否定されている。急性肝障害はトランスアミナーゼ値の異常が6カ月以内に軽快したもの、慢性肝障害は異常トランスアミナーゼが6カ月以上持続したが肝硬変は否定されたもの、劇症肝炎は進行性の黄疸、プロトロンビン時間の延長、発症8週以内にIII度以上の肝性脳症が存在するものと定義した。劇症肝炎2例はそれぞれ血漿交換、肝移植で軽快しているが、検体はいずれも治療前の血清を使用した。

DNAの調整は血清サンプルからSMITEST(住友金属工業)を用いてDNAを抽出した。TTV-PCRはOkamotoらが報告したhemi-nested polymerase chain reaction(PCR)法を用いて行った。first PCRはNG059とNG063をプライマーとして使用して35サイクル、second PCRはNG061とNG063を使用して25サイクル増幅した。増幅産物は2.0%のアガロースゲルで電気泳動し、これをエチジンプロマイドで染色した後、予想されるサイズのバンドの有無を確認した。

DNAの塩基配列はTTV-2nd PCRの増幅産物をABI PRISM™ Dye terminator cycle sequencing ready reaction Kit(Perkin-Elmer社)を使用して解析した。さらにこの結果から2パラメーター法による近隣結合法(N-J法)で分枝系統樹を作成しgenotypeを分類した。統計学的検討はフィッシャーの直接確率計算法にて行った。

<結果>

TTV DNAは、患者群で20例中6例(30.0%)、対照群で35例中5例(14.2%)から検出された。両群の陽性率に有意差は認められなかった(P=0.147)。しかし疾患別の陽性率で

は慢性肝障害と劇症肝炎ではそれぞれ2例中2例とも陽性であった。

TTV DNAの塩基配列は genotype 1aであるプロトタイプのTTV (TA278株)を基準にそれぞれ比較した結果、0.4-40.5%の変異を認めた。

さらにこの結果を元に系統樹を作成した。分類はOkamotoらの報告に従った。患者群の陽性6検体のうち genotype 1aが4検体、 genotype 3が2検体であった。対照群は陽性5検体のうち genotype 1aが1検体、 genotype 1bが2検体、 genotype 2が1検体、 genotype 3が1検体であった。 genotype 1aの検出率は患者群では20例中4例(20.0%)で、対照群の35例中1例(2.8%)と比較したp値は0.053で明らかな差は認めなかった。しかし劇症肝炎患者では2例中2例、慢性肝障害患者では2例中1例が genotype 1aであった。

<考案>

TTVは外殻を持たない、環状、一本鎖DNAウイルスであり、血清の他にも糞便、胆汁、母乳、肝組織、末梢血単核球からも検出されている。感染経路としては血液感染のほかに糞便などの経口感染を含む非血液感染により伝播する可能性も考えられている。またTTVは健常者からも高頻度に検出されることがわかってきた。このことはTTVが初感染のあとも感染が持続し、無症候性キャリアが多く存在することを示唆している。

最近の研究で初感染が生後1年の間で高頻度におきていることが報告された。またこれまでの報告ではその初感染は生後3カ月以降におきることが多いとされている。今回の研究では対照群の中で1ヶ月時の陽性例があり、今後は周産期感染の可能性も含めた検討が必要と考えられる。健常人の中でどのような機序で無症候性キャリアが多数存在するのかは不明であるが、乳児期早期に初感染がおきることと何らかの関連があるのかもしれない。

成人での肝機能障害との関連性は不明であるが、TTVの初感染の臨床症状を把握するのは重要である。特に初感染の肝機能障害との関連性の検討は必要であると考えられた。今回の研究ではTTV DNAの検出率は患者群と対照群では有意差を認めなかった。急性肝障害患者のうちTTV DNA陽性者と陰性者ではトランスアミナーゼ値にも差はなかった。また急性肝障害、慢性肝障害ともに発症から3カ月後の血清ではTTV DNAは検出されなかった。よってこれらの結果からは小児においてもTTVと肝機能障害との関連性は証明できなかった。しかし慢性肝障害患者と劇症肝炎患者ではそれぞれ2例中2例ともTTV DNAが陽性であった。今回は検体数が少なかったもののTTVが慢性肝障害と劇症肝炎を引き起こす可能性があることが推測された。

TTVはDNAウイルスであるにもかかわらず変異の多いウイルスであることもわかってきており、今後の可能性としてはある特定の genotype が肝機能障害をひき起こすということが挙げられる。我々の研究では genotype 1aが患者群では20例中4例から検出されたのに対し、対照群35例中陽性だったのは1例であった。両者の陽性率には有意差はなかったが、劇症肝炎例で2例中2例、慢性肝障害例で2例中1例が genotype 1aであったことは注目されるべきかもしれない。TTVが変異の多いウイルスであることから考えると、ある一つのプライマーを使用した感染率がどれだけ正確にTTVの感染率をとらえているかは疑問が残る。最近、Takahashiらが使用したプライマーでは健常者で92%の陽性率であったと報告されている。また異なる genotype のTTVが重複感染することもわかっており、TTVの病原性を把握するのを困難にしている。

今後、PCR以外の検査法を含めさらなる研究を要すると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査 教授 皆川 知紀
副査 教授 浅香 正博
副査 教授 小林 邦彦

学位論文題名

Detection of TT virus sequences in children with liver disease of unknown etiology 小児の原因不明の肝機能障害と TT ウイルス DNA の検出

1997年にNishizawaらは非A-G型輸血後肝炎患者の血清からDNA断片N22を発見し、これが新しいウイルスTTウイルス(TTV)であり、さらにこのウイルスが原因不明の輸血後肝炎の病因となり得ると報告した。しかしその後の研究で健常者からもTTV DNAが高率に検出されることが明らかとなってきた。最近TTVの初感染はかなり低年齢でおきる事がわかってきたが、初感染時の症状やその後の感染の持続に関しては未だ不明な点が多い。今回、TTVの初感染と肝機能障害の関連性の検討を目的として、原因不明の肝機能障害を示す小児患者血清中のTTV DNAを検索した。

対象は原因不明の肝機能障害を示す小児患者20例(急性肝障害16例、劇症肝炎2例、慢性肝障害2例)の血清とした。対照として肝機能障害を示さない保存血清35例を検討した。まずこれらの血清からDNAを抽出し、Okamotoらが報告したhemi-nested polymerase chain reaction (PCR)法を用いてTTV DNAの検出を行った。得られたTTV-2nd PCRの増幅産物のDNA塩基配列を解析し、この結果からgenotypeを分類した。

TTV DNAは、患者群で20例中6例、対照群で35例中5例から検出された。両群の陽性率に有意差は認められなかった。しかし疾患別の陽性率では慢性肝障害と劇症肝炎ではそれぞれ2例中2例とも陽性であった。TTV DNAの塩基配列はgenotype 1aであるプロトタイプのTTVを基準にそれぞれ比較した結果、0.4-40.5%の変異を認めた。genotypeを分類したところ、患者群でgenotype 1aが多い傾向にあったため、genotype 1aの検出率を検討した。患者群では20例中4例で、対照群の35例中1例と比較したp値は0.053であり明らかな差は認めなかった。しかし劇症肝炎患者では2例中2例、慢性肝障害患者では2例中1例がgenotype 1aであった。

TTVは成人健常者からも高頻度に検出されることから、その病原性に否定的な報告もみられている。今回は初感染時の検討として小児を対象に研究を行ったが、肝障害全体でのTTV DNAの検出率は患者群と対照群では有意差を認めず、小児においてもTTVと肝機能障害との関連性は証明できなかった。しかし慢性肝障害患者と劇症肝炎患者ではそれぞれ2例中2例ともTTV DNAが陽性であった。今回、検体数は少なかったがTTVが慢性肝障害と劇症肝炎を引き起こす可能性があることが推測された。

これまでに初感染は生後1年の間で高頻度におきていることがわかってきたが、生後3カ月以前の報告は少なかった。今回の研究では対照群の中で1ヶ月時の陽性例があり、今後は周産期感染の可能性も含めた検討が必要と考えられる。

TTVはDNAウイルスであるにもかかわらず変異の多いウイルスであり、今後の可能性とし

てはある特定の genotype が肝機能障害をひき起こすということが挙げられる。申請者らの研究での genotype 1a の検出率は患者群では 20%であったのに対し、対照群では 2.8%だった。両者の陽性率には有意差はなかったが、劇症肝炎例で 2 例中 2 例、慢性肝障害例で 2 例中 1 例が genotype 1a であったことは注目されるべきかもしれない。最近 Takahashi らが報告したプライマーでは成人健常者の 92%で TTV DNA が陽性であったという報告もある。

今後はさらに症例数を増やして、プライマーの選択を含めた PCR の方法、PCR 以外の検査法の検討などの研究を要すると考えられる。

公開発表に際し、副査の浅香教授から、Takahashi のプライマーでの検討、成人例では劇症肝炎での検出率は低いという報告が多いため、in situ hybridization などの検討の有無、検体の他の原因の可能性などについての質問があった。次いで主査の皆川教授から臨床経過などから慢性肝炎や劇症肝炎と TTV との関連性を証明できた症例の有無、キャリア化する例と発症する例の宿主側の要因、PCR 以外での検査法の検討、動物で類似するウイルスの有無についての質問があった。次いで副査の小林教授から TTV の胎盤の通過性、ウイルスの増殖の部位についての質問があった。申請者はいずれの質問に対しても実験結果や他の研究者からの報告を引用し妥当な回答を行った。

この論文は小児における原因不明の肝機能障害と TTV の関連性を検討し、本ウイルスが劇症肝炎や慢性肝障害の原因となりうることを示し、また TTV のなかでも genotype 1a が大きく関わっている可能性を示したことで今後の研究の方向性を示唆した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。