

日本財団補助金による
1997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-

1997年3月3日

財團法人 日中医学協会
理事長 中島 章 殿

李柔

I. 研究者氏名

研究機関 名古屋市立大学医学部小児科 研究指導者 和田義郎 職名 教援
所在 地下 名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄 電話 052-853-8246 線

II. 過去の研究歴

C型肝炎ウイルス(HCV)に感染した母子例を対象として、HCVのエンベロープ領域にある起可変領域の基質及びアミノ酸配列を解析して、その多様性及び母子間の共有性を明らかにし、感染経路の解明を試みる。

III. 過去の研究実績

上記の研究についていくつかの成果をあげた。自検例の研究によって小児のC型肝炎のほとんどがその母親から移されると明るかる結果を得ました。それで第一作者で日本小児学会総会講演に論文を三つ載せた。また共同研究者とともに数回の論文を発表した。

IV. 本年度の研究業績

(1) 学会、研究会等においての口頭発表 (学会名・内容)

（記入欄）

(2) 学会誌等に発表した論文 無 有 (雑誌名・論文名)

"Homology of E2 gene in 8 child-mother pairs infected with hepatitis C virus." The Tohoku Journal of Experimental Medicine 1997, 183(3).

"Sequential change of hepatitis C virus E2 gene in two mother-child pairs." (この論文は書いてあると見て、まだ最後に完成していない)

V. 今後の研究計画及び希望

今後もHCVについて研究を続けてか。また、G型肝炎及びまだ末梢のウイルス性肝炎の病因や感染経路についての研究を始めたいです。

研究助成金をえていたので、友人へ助かりまして、まだあります。

今後も研究助成金を頂くチャンスをえてほしくて。

VII. 研究報告（日本語、又は英語で書いて下さい。4,000字以上で記載して下さい。別紙可）

研究報告は別紙12。



VII. 指導教官の意見

李柔代が貴財団の研究助成を得て行つた研究結果は、今日のわが国における小児のC型肝炎の感染経路を明らかにするもので、成人の領域では国民病とされるC型肝炎の予防および治療対策を小児の立場から明らかにする上で重要な知見が提供されたものと考える。李柔代の研究に対する姿勢は真摯で、助成の効果を十分生かしたものと思う。しかし、更に研究を発展させるためには貴財団の研究助成が、継続できよ体制が望まれる。

目的

(1) 小児におけるC型肝炎ウイルス（HCV）の感染機序を解明するため、HCVに感染した母子を対象にHCV E2領域の塩基配列を解析し、母子感染の確認に役立つか否かを検討する。

(2) HCVの変異状況と持続感染の関係を解明するため、HCVに感染した母子を対象にHCV E2領域の塩基配列を経時的に解析する。

対象

感染経路の解明については、名古屋市立大学病院小児科外来に通う小児8例とその母親8例とした。8例の性別は男児3例、女児5例で、年齢は2ヶ月から12歳であった。4例の児はHCV感染の母親から生まれ、フォローアップ中にHCVに感染した。他の4例の児はHCV抗体スクリーニングによって、HCV感染が判明し、母子共にHCV感染と診断された。児は全例輸血歴はなく、HCV水平感染のリスク因子もなかった。家族1の母子以外全例血液サンプルを同時に採取した。血液サンプルは採取後直ちに血清に分離し、-30℃に保存した。

母子感染例におけるHCVE2領域の経時的解析は2組の母子を行った。即ち、

家族1：母親は妊娠初期に流産に対する免疫治療として夫の白血球の皮下注射を受けた。治療前の母親のHCV抗体は陰性であった。治療後夫がHCVキャリアであることが判明した。母親は分娩前にHCV抗体陽性となっていた。

児は生後3ヶ月時HCV RNA陽性で、その後ウイルス血症が持続している。

血清サンプルは児においては、生後3、6、9、12、15、21、27、および30ヶ月の8時点で、母親においては、分娩後3、9及び12ヶ月の3時点で採取した。

家族2：母親は無症候性HCVキャリアであった。生後4ヶ月に行った児のHCV RNA検査が陽性で、その後HCV RNA陽性が続いている。血清サンプルは児においては、生後4、6、9、12、18、24及び30ヶ月の7時点で、母親においては、分娩後4、6、9、12及び30ヶ月の5時点で採取した。

方法

RNA抽出とRT-PCRについて

血清100μlよりAGPC(acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform)法でRNAを抽出し、random hexamerをprimerとして、MMLV(malone murine leukemia virus)逆転写酵素を用いてcDNAを合成した。

HCVゲノタイプの同定は岡本らの測定方法を一部改変して行った。即ち岡本らはHCVのC領域に位置するuniversal primer(sense)と4種類のtype-specific primers(antisense)の混合液を用いてPCR反応を行い、4つのgenotypeにHCVを分類しているが、4種類のtype-specific primersを別々に用いてPCR反応を行った。HCVのE2領域ゲノムの增幅は岡田らの方法に従って行った。1st及びnested PCRはそれぞれ1種類のsense primerと2種類のantisense primerを用いた。PCR反応はthermal cyclerを用い、1st PCRでは35サイクル、nested PCRでは30サイクル行った。denaturation温度は94℃、annealing温度は55℃、extension温度は72℃とし、反応時間はそれぞれ1分とした。

cDNAサブクリーニング法について

増幅したcDNAはアガロース泳動した後目的のバンドを切り出し、ガラスパウダーで抽出した。制限酵素EcoRIとBclIIで処理した後cDNAのフラグメントをplasmid vectors(pUC119)のEcoRI/BamHIのサイトに組み込むことでクローナ化した。1つの検体についてそれぞれ5つのcDNAクローナーを解析した。

シーケンス解析について

塩基配列の解析はABI(Applied Biosystems)のTaq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kitと373A蛍光DNA sequencerを用いて、プラス鎖とマイナス鎖について行った。

塩基及びアミノ酸の番号はgenotype IIでは、HCV-BK株、genotype IIIでは、J6株を基準とした。本研究では解析した全領域をF領域と定義し、更にそれを3つの部分、即ち超可変領域(HVR)-1、HVR-2、及びHVR-1と2の間の領域に分けて検討した。超可変領域-1と2の間の領域はI領域と定義した。

系統発生学的解析について

I 領域に対して系統発生学的解析を行った。この解析はソフトウェア GENETYX-MAC を用い、neighbor-joining法で行った。

結果と考察

HCVゲノタイプをtype-specific primersを用いたPCR法で検索した結果、家族 1、4、6、7 及び 8 の母子はtype II と判定され、家族 2、3 と 5 の母子は type III と判定された。一方cDNAクローンの塩基配列に最も類似した塩基配列をGenBankに登録されている塩基配列の中から検索すると、家族 1、4、6、7 及び 8 の母子のcDNA塩基配列は type II の HCV-BK 株が選択された。同様に家族 2、3、と 5 の母子では type III の HCV-J6 株が選択された。即ち二つの異なった方法によってgenotype分類を検討したところ同じ結果であった。

Table 1 は各症例それぞれ 5 クローン間の塩基及びアミノ酸配列の同一性を検討した結果を示す。各項の左側の値は各領域の塩基及びアミノ酸配列の最も高い変異率を示し、右側は最も高い保存率を意味する。百パーセントは解析した 5 クローンの cDNA の中に完全に一致したクローンが少なくとも 2 クローンあったことを意味する。

超可変領域-1において クローンの種類を検討すると 図 1 に示した通りである。

図 1 のaは家族 1 – 5までの超可変領域のアミノ酸配列を示す。家族 3 の児では単一のアミノ酸配列が見られたが、他の症例では多種類の配列が見られた。図 1 のbは家族 6 – 8までの超可変領域のアミノ酸配列を示す。家族 6 の母子とも単一のアミノ酸配列を示す。家族 7 の児と家族 8 の母親は以前に interferon の治療を受けていたが HCV ウィルス血症が続いている。これらの症例では多種類の アミノ酸配列が観察された。なお、家族 7 の児の 10 クローン中 7 クローンには 3 塩基、1 アミノ酸の挿入を認め、またその母親の 11 クローン中の 9 クローンには 1 塩基の欠失を認め、frame shift により生じたstop codon が多数認められた。

Table 2 には児とその母親の間、児と他の児及び他の母親との間、また児と GenBankに登録されている塩基配列との間の一一致率を各領域について検討した結果を示す。I 領域について相同性をみると 8 組中 6 組 (75%) (家族 1、2、3、5、6 と 8) では児とその母親の間の塩基配列の相同性は、5 クローン全部が児とほかの児、他の母親及び GenBank に登録されている最も類似性の高い塩基配列の間の相同性より高った。1 組 (13%) (家族 7) は一部のクローンのみ高い相同性を示した。即ち、児の 10 クローン中 6 クローンと母親の 11 クローン中の 5 クローンの間の相同性は児と他の児、他の母親及び GenBank からの塩基配列の間の相同性より高い値を示した。他の 1 組 (13%) (家族 4) は母子間の塩基配列の相同性が児の 5 クローン中の 4 クローンと家族 7 の母親の 11 クローン中の 5 クローンの間の相同性より低い値を示した。F 領域について同様のことをみた結果をTable 2 に示した。即ち母子間の相同性を比較する場合、F 領域より I 領域の方がいくぶん高いという成績が得られた。

I 領域の塩基配列を用いて系統発生学的関係を検討した結果を示す。8 家族で 64 個、GenBank から得た 22 個のユニークな 塩基配列を用いて分析した。家族 1、2、3、4、6 及び 8 の児のDNA塩基配列は母親のそれと同じ枝に分類されたが、GenBank から得られた 1 つの塩基配列と家族 5 の塩基配列が同じ枝に分類され、また家族 7 では、GenBank から得られた多数の塩基配列とその家族の半数のクローンは比較的類似性の高い塩基配列として分類された。

今回の検討で我々は 1 症例について、5 クローンを解析し、HVR-1 と 2 の間のI領域について母子間の相同性をみると、8 家族中 7 家族で母親とその児の間で一致率が高いことを実証できた。これはまた系統発生学的分析法によっても証明された。即ちこの研究の結果によって、I 領域についての塩基配列を解析することで、HCV の母子感染の確認が可能と考えられた。

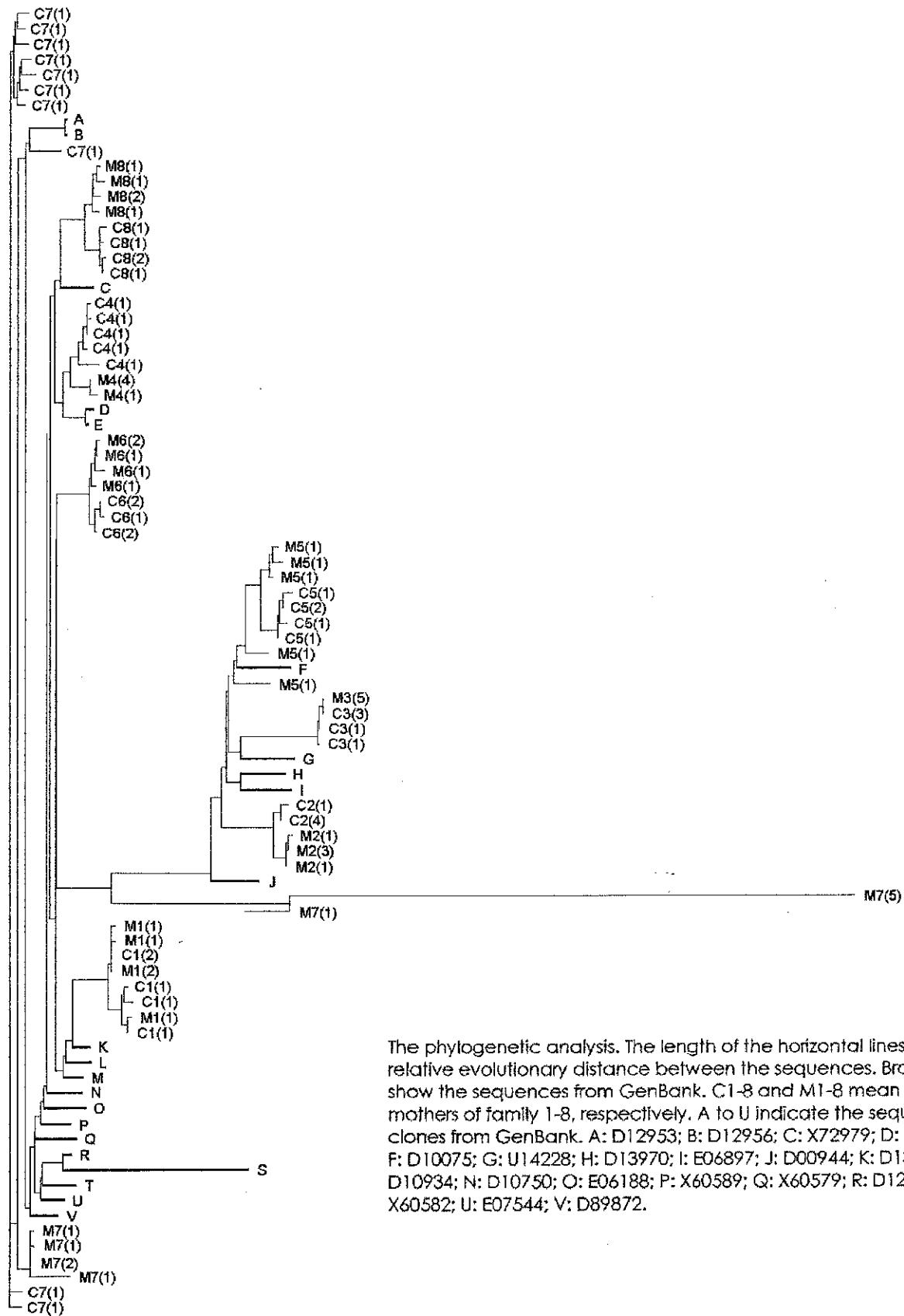
			HVR-1		HVR-2	
family 1	m1	AGVDG	ETHVTGASEGRAAHGLTRLFNFGAS	QKIQL	WGPIT	Y AEPGNL
	m2TQ.....S..GF.TS.P.	DQRPY
	m3	S.....TO.....T..GF.SP.P.	C
	m4TQ.....T.....T.
	m5A.....S.....
	c1-2
	c3-4	HIR....AQ..T.KTF.SF..P.P.
	c5	S.....TO.....T..GF.SP.P.
family 2	m1-4	AGVDA	STHTVGGTAARTVDGLTLSFSPGAK	QNIQL	WGTLO	YEDNVTNSE
	m5V.	DMRPY
	c1-3R.....GM..P...
	4TG..P...
	5TG..P...H.
family 3	m1	AGVDA	KTQISGSVAGHTSRGLSSFFAPGAR	QEIQL	WGNLQ	YEENVTNPE
	m2-5K	DMRPY
	c1-5K
family 4	m1	AGVDG	HTVVSGGTQAFTTRSFVSLNPGAQ	QKIQL	WGPIT	Y AERGSS
	m2-3	Y.....
	m4	Y.....L.....
	m5	R.....A..H..FTLT...RF.P.
	c1S...GV..F.TA.PK	N...
	c2	R.....A..S....L....TR.P.	S...G...
	c3A.....K.....GV.GF.TA.PK	N...
	c4A.....K.....GV.GF.TA.P.	N...	..R..D..
	c5	R.A.....S.....N..TS.P.	N...D..
family 5	m1	AGVDA	QTHTTGGTAARNAYGLVSLFRAGAK	QNIQL	WGTLO	YEDNVTNPE
	m2	S...V..Q..H..RT.T...AP...H.....S.	DMRPY
	m3	S...V..SM.QSTSRIAG..TP..Q
	m4-5	S...V..Q..H..RT.T...AP...
	c1-3	N...V..K..HSVSTFTG..TS.P.
	c4-5	D...V..Q...SVSTFTG..TS.P.

Fig. 1 a. Amino acid sequences for HCV HVR-1 and HVR-2. The consensus sequences for the predicated amino acid of the mother is shown by a single letters on the top line. A dotted line indicates identical residue to consensus. * indicates stop codon. m indicates mother. c indicates child. The regions enclosed in boxes indicate HVR-1 and HVR-2.

			HVR-1		HVR-2		
family 6	m1-4	AGVDG	DTRVTGAVQGYTTRSITSLFTTGPH	QKIQL	WGPIT	Y ASPDNP	DQRPY
	m5	V.....
	c1-3	..A..	..HTI....SR.A..F....P..QS..
	c4-5	..A..	..HTI....SR.A..F....P..Q
family 7	m1	AGVDG	RTHVTGESAGRTTQSFTSFTPGPS	QKIQL	WGPIS	H VVPNTP	DQRPY
	m2	H.R.
	m3	H.R.
	m4-8	H.V.S.GTQAF..RG.VDL..V..Q
	m9	H.R...RARAVPPRALRPSLHQ.LH	R.SN.
	m10	N.RT..GARAVPPRALRPSLHQ.LH	R.SN.
	m11	.S..	H.R.
	c1	N.RTA.GAVAH..ST..GL..R.AA	Y ...DI.
	c2	N.RTA.GAVAH..ST..GL..R.AAT	..L..V.
	c3G	S.RTM.G.MAH...GL....Q...I.
	c4G	G.RTM.G.VAH..RGL.T..Q...DI.
	c5G	G.RA..G.MAH..RGL.T..NL...DI.
	c6G	VG.RTM.G.MAH..KG..T..Q...DI.
	c7R	RG.RT..G.MAH..RGL.T..NL...DV.
	c8G	G.RTM.G.VAH..RGL.T..*D...DI.
	c9G	G.RTM.G.VAHN.RGL.T..Q...DI.
	c10G	RG.RT..G.MAH..RGL.T..NL...DI.
family 8	m1	AGVDG	RTHVVGGTAGLTTTTRGLSSLFTTGPS	QKIQL	WGPIT	H GVSQMP	DQRPY
	m2	T.....A.S.....C.
	m3A.S.....F.
	m4	T.....A.S.....F.
	m5A.....F.
	c1	N.F....QT.QV.....P.A.	D...P.
	c2-3	T.VA...K.SQV.S.A..SP.A.G..P.
	c4	T.VA...K.SQV.S.PA..SP.A.	P ..G..P.
	c5	N...I..RS.QV.....V.A.	D...P.

Fig. 1 b. Amino acid sequences for HCV HVR-1 and HVR-2. The consensus sequences for the predicated amino acid of the mother is shown by a single letters on the top line. A dotted line indicates identical residue to consensus. * indicates stop codon. m indicates mother. c indicates child. The regions enclosed in boxes indicate HVR-1 and HVR-2.

Fig. 2



The phylogenetic analysis. The length of the horizontal lines indicates the relative evolutionary distance between the sequences. Broad lines in trees show the sequences from GenBank. C1-8 and M1-8 mean the children and mothers of family 1-8, respectively. A to U indicate the sequences of cDNA clones from GenBank. A: D12953; B: D12956; C: X72979; D: D50481; E: D50485; F: D10075; G: U14228; H: D13970; I: E06897; J: D00944; K: D13406; L: X60581; M: D10934; N: D10750; O: E06188; P: X60589; Q: X60579; R: D12958; S: D12965; T: X60582; U: E07544; V: D89872.

Table 1 Homology search for nucleotide and amino acid sequences among the clones from 8 children and their mothers

Patient No.	Region F			HVR-1			Region I			HVR-2		
	Nucleotide (%)	Amino acid (%)	Nucleotide (%)	Nucleotide (%)	Amino acid (%)	Nucleotide (%)	Nucleotide (%)	Amino acid (%)	Nucleotide (%)	Amino acid (%)	Nucleotide (%)	Amino acid (%)
Family 1	Child	93.8-99.8	88.1-99.4	73.3-100	48.0-100	96.4-100	93.9-100	100	100	100	100	100
	mother	94.7-98.7	92.6-98.9	78.7-96.0	64.0-92.0	95.9-100	95.4-100	95.2-100	95.2-100	85.7-100	88.9-100	88.9-100
Family 2	Child	98.1-100	94.9-100	94.7-100	88.0-100	99.0-100	96.9-100	96.3-100	96.3-100	88.9-100	100	100
	mother	99.4-100	98.9-100	98.7-100	96.0-100	99.0-100	98.5-100	100	100	100	100	100
Family 3	Child	99.4-100	99.4-100	100	100	99.0-100	100	100	100	100	100	100
	mother	99.1-99.8	98.3-100	97.3-100	96.0-100	100	100	100	100	100	100	100
Family 4	Child	96.0-98.3	91.5-96.0	80.0-98.7	60.0-96.0	95.4-99.5	95.4-98.5	90.5-100	90.5-100	71.4-100	100	100
	mother	94.7-99.1	92.1-98.9	72.0-100	60.0-100	99.0-100	98.5-100	100	100	100	100	100
Family 5	Child	97.6-99.3	96.1-99.4	94.7-100	88.0-100	97.4-100	100	96.3-100	96.3-100	100	100	100
	mother	87.1-98.5	86.5-98.3	60.0-100	40.0-100	88.7-98.0	90.8-100	88.9-100	88.9-100	77.8-100	100	100
Family 6	Child	98.9-100	98.3-100	100	100	98.5-100	98.5-100	100	100	100	100	100
	mother	98.5-99.4	97.2-98.9	100	100	98.0-100	95.4-100	95.2-100	95.2-100	85.7-100	100	100
Family 7	Child	89.8-97.6	85.9-99.4	66.7-100	42.3-100	89.7-97.4	89.2-100	81.0-100	81.0-100	42.9-100	100	100
	mother	85.1-100	----- ^a	60.0-100	----- ^a	89.7-100	----- ^a	52.4-100	52.4-100	----- ^a	100	100
Family 8	Child	94.3-99.8	90.3-100	76.0-100	52.0-100	98.0-100	98.5-100	76.2-100	76.2-100	57.1-100	100	100
	mother	97.9-99.6	95.5-98.9	92.0-98.7	84.0-96.0	97.4-100	93.9-100	100	100	100	100	100

^a Data could not be obtained.

Table 2 Homologous frequencies of nucleotide and amino acid sequences between 8 child-mother pairs

Child No.	Region F				HVR-1				Region I				HVR-2			
	Nucleotide		Amino acid		Nucleotide		Amino acid		Nucleotide		Amino acid		Nucleotide		Amino acid	
	Child-other	Child-mother	Child-mother	Child-mother	Child-mother	Child-mother	Child-other	Child-mother	Child-mother	Child-mother	Child-mother	Child-mother	Child-mother	Child-mother	Child-mother	Child-mother
mothers ^a	data ^b				mothers ^a				mothers ^a				data ^b			
1	93.9-99.6	87.1	86.7	88.1-100	73.3-100	48.0-100	95.9-100	88.7	92.3	92.3-100	95.2-100	85.7-100	93.9-99.6	87.1-100	96.3-100	88.9-100
2	96.8-97.8	88.0	86.1	92.7-95.5	92.0-94.7	76.0-84.0	95.9-97.4	89.2	85.1	90.8-95.4	96.3-100	88.9-100	93.9-99.6	87.1-100	96.3-100	88.9-100
3	99.1-100	84.3	82.4	98.3-100	97.3-100	96.0-100	99.0-100	85.1	84.6	100	100	100	93.9-99.6	87.1-100	96.3-100	88.9-100
4	92.6-95.3	97.2	92.1	86.9-91.5	70.7-84.4	48.0-76.0	92.3-95.4	96.9	94.9	87.7-92.3	95.2-100	85.7-100	93.9-99.6	87.1-100	96.3-100	88.9-100
5	87.5-94.4	87.8	88.4	87.1-89.3	65.3-84.0	44.0-60.0	89.2-95.4	85.1	88.7	90.8-93.9	88.9-100	77.8-100	93.9-99.6	87.1-100	96.3-100	88.9-100
6	93.8-94.5	86.6	85.2	90.3-92.1	80.0	64.0	95.9-98.5	90.8	92.8	93.9-98.5	95.2-100	85.7-100	93.9-99.6	87.1-100	96.3-100	88.9-100
7	83.4-95.3	86.7	88.8	-----	54.4-85.3	-----	86.7-96.9	90.3	93.9	-----	42.9-90.5	-----	93.9-99.6	87.1-100	96.3-100	88.9-100
8	91.1-93.4	85.7	85.6	85.8-91.5	69.3-78.7	48.0-68.0	93.9-96.4	90.3	90.8	89.2-93.9	71.4-85.7	57.1-71.4	93.9-99.6	87.1-100	96.3-100	88.9-100

a Highest homologous frequency of nucleotide sequence between one child and the other children or mothers for Region F and I.

b Highest homologous frequency of nucleotide sequence between one child and accession cases in GenBank database for Region F and I.