

C型肝炎ウイルス (HCV) の抗体と 遺伝子検出に関する研究

IV 山梨県における献血血液中の抗 HCV コア抗体力価と HCV-RNA 遺伝子陽性率との関係

町田篤彦 小澤 茂 鈴木典子*¹ 伊藤直文*¹ 赤羽賢浩*²

Studies on the Detection of Antibodies and Genome RNA of Hepatitis C Virus

IV. Relationship between Anti-HCV Core Antibody Titre and Prevalence of HCV Genome RNA of Blood Donor in Yamanashi Prefecture

Atsuhiko MACHIDA, Shigeru OZAWA, Noriko Suzuki,
Naohumi ITOH and Yoshihiro AKAHANE

輸血によってうつる肝炎のうち病因がまず解明されたのはB型肝炎で、B型肝炎ウイルスと名付けられたウイルスによって起こることが発見された^{1,2,3)}。それ以後検査法も開発され、このウイルスを含む血液を輸血に用いないようにして輸血による肝炎の発生を防ごうとしたが、期待どおりには減少しなかった。そこで経口感染するA型肝炎でも非経口感染するB型肝炎でもないいわゆる非A非B型肝炎の原因となるウイルスの存在が推定され、このウイルスの発見競争が十数年間も続けられた。その結果1989年に、これまで見られなかった全く新しい手法、すなわち免疫分子生物学的手法によって非A非B型肝炎の原因ウイルスの遺伝子の一部の塩基配列が解明され、C型肝炎ウイルス (Hepatitis C Virus ; HCV) と名付けられた⁴⁾。これを契機にC型肝炎を惹起するHCVに関する研究は急速に発展し各種検査法とその意義付けがなされてきた。開発された簡便な検査法によりHCVを含む血液が除外され輸血に用いられなくなり原因不明の肝炎は格段に少なくなった。しかし現在用いられている検査法ではHCV陰性の血液も陽性として捉えてしまう場合が少なくなく実用的見地から再考の余地が残されている。

ウイルスの表面を構成する蛋白質の内側に存在するコア粒子を形成するコア蛋白質に対する抗体の力価はウイルス増殖に比例するので、血中の抗HCVコア抗体価は簡便なウイルス血症の指標になることが期待される。そこで今回は日本人由来のHCV分離株の遺伝子の塩基配

列に基づいてコア領域の2種のペプチド (CP9とCP14)^{5,6,7)}を化学的に合成して、これらを抗原としたELISA法により山梨県赤十字血液センターに献血された血液中の抗HCVコア抗体価を測定した。同時にRT-nested PCR法によりHCV-RNA遺伝子を検出することにより、抗HCVコア抗体力価とHCV遺伝子陽性率 (HCV保有率) との関係調べたので報告する。

材 料 と 方 法

1. 被検血清およびプラズマ

1993年9月から1996年3月の間に山梨県赤十字血液センターに献血された120,264例のうちHCV-PA法により抗HCV抗体価が2⁴以上であった血清あるいはプラズマ435例を検体として用いた。検体は-80℃に保存した。

2. 検体の抗HCV抗体価の測定

遺伝子工学的に発現させたウイルス成分を感作したゼラチン粒子を用いるオーソ社の「HCV・PA II」によるPA法 (ゼラチン粒子凝集法) により血中の抗HCV抗体価を測定した。

3. 検体の抗HCVコア抗体価の測定

検体の抗HCVコア抗体価は住友金属KKのスマイテス「HCVコア抗体」ELISAを用いて、2ステップ・サンドイッチ法を利用したELISA法により検出した。即ちCP9、CP14合成ペプチド抗原固相プレートのウェルに緩衝液を加えコントロールまたは検体を反応させ検

* 1 : 山梨県赤十字血液センター

* 2 : 山梨医科大学

体中の抗 HCV コア抗体をプレートのウェルに結合させた。洗浄後、酵素標識抗ヒト IgG 抗体を加えて抗原固相プレートのウェル上で抗原-抗 HCV コア抗体-酵素標識抗体の複合体を形成させた。洗浄後、基質液を加えて反応させ抗原固相プレートのウェルに結合した酵素により発色させた。波長 450nm での吸光度をモデル 3550 マイクロプレートリーダー (BIO-RAD 社, OD = 3 まで測定可能) により測定した。

4. 検体中の HCV-RNA 遺伝子の検出^{8,9)}

検体から全 RNA を抽出し, リコンビナント逆転写酵素 (Superscript II, GIBCO BRL) により HCV-cDNA を合成した。次いで HCV-cDNA を 2 種類のプライマーを用いて 1 次 PCR により増幅し, 更に 1 次 PCR で用いたプライマーの塩基配列より内側に相当する塩基配列をもつ 2 種類のプライマーを用いて 2 次 PCR により増幅した (RT-nested PCR)。増幅産物はアガロースゲル電気泳動により分画しエチジウムブロマイドで染色後, 紫外線ランプによりバンドを検出した。220 塩基対に相当する位置に蛍光を発するバンドが見られる検体を HCV-RNA 陽性とした。用いた 4 種の 20mer のプライマーは HCV-RNA 遺伝子の 5'-非翻訳領域の保存領域の塩基配列に基づいて合成した。

結果と考察

1. 抗 HCV 抗体価 (PA 法) と

抗 HCV コア抗体価 (ELISA 法) との比較

献血された 120,264 例のうち抗 HCV 抗体価が 2^4 以上の 435 例について, 混合した 2 種類の化学合成 HCV コアペプチド (CP9, CP14) を抗原とした ELISA 法により抗 HCV コア抗体価を測定し, 抗 HCV 抗体価 (PA 法) と抗 HCV コア抗体価との関連性について調べその結果を図 1 と図 2 に示した。PA 法による抗 HCV 抗体価が 2^{212} と高い 161 例の全てが, 抗 HCV コア抗体価も高力価 (ELISA 法で $OD \geq 3$) であった。抗 HCV 価が 2^6 と低い 208 例についてみると抗 HCV コア抗体価も低い例 ($OD < 3$, 175 例) が多かった。しかし例数は少ないが, コア抗体価が高い例 ($OD \geq 3$, 34 例) も存在した。抗 HCV コア抗体価と HCV-RNA 陽性率との関係を見ると, 図 1 に示したように抗 HCV コア抗体高力価群 ($OD \geq 3$, 235 例) では, その 78.3% (184 例) が HCV-RNA 陽性 (斜線棒で示した) であった。一方, 図 2 に示したように抗 HCV コア抗体低力価群 ($OD < 3$, 200 例) では, ほとんど (99.0%) が HCV-RNA 陰性 (白棒で示した) であった。

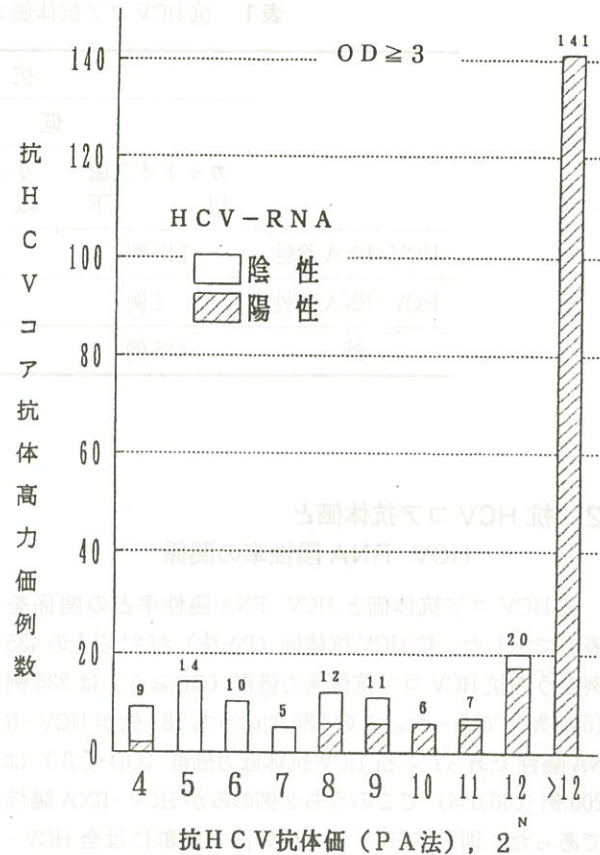


図 1 抗体価と遺伝子検出率 (抗 HCV コア抗体高力価群)

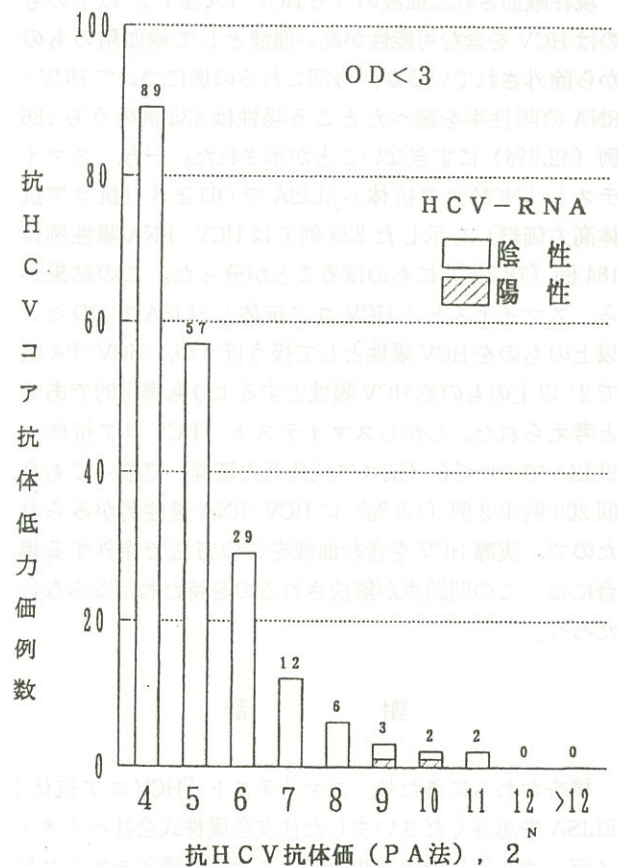


図 2 抗体価と遺伝子検出率 (抗 HCV コア抗体低力価群)

表1 抗HCVコア抗体価(ELISA法)とHCV-RNA陽性率

	抗HCVコア抗体価 (ELISA, OD ₄₅₀)				
	低力価群				高力価群
	カットオフ値以下	カットオフ値以上1未満	1以上2未満	2以上3未満	3以上
HCV-RNA陰性	143例	21例	18例	16例	51例
HCV-RNA陽性	2例	0例	0例	0例	184例
計	145例	21例	18例	16例	235例

2. 抗HCVコア抗体価とHCV-RNA陽性率の関係

抗HCVコア抗体価とHCV-RNA陽性率との関係を表1に示した。抗HCV抗体価(PA法)が2⁴以上の435例のうち抗HCVコア抗体高力価群(OD≥3)は235例(54.0%)であった。この235例のうち184例がHCV-RNA陽性であった。抗HCV抗体低力価群(OD<3)は200例(46.0%)でこのうち2例のみがHCV-RNA陽性であった。即ち抗HCVコア抗体高力価群には全HCV-RNA陽性例のほとんど全て(184/186=98.9%)が含まれることが分かった。

現在献血された血液のうちHCV-PA法で2⁴以上のものはHCVを含む可能性が高い血液として輸血用のものから除外されているが、今回これらの例についてHCV-RNAの陽性率を調べたところ陽性は435例のうち186例(42.8%)にすぎないことが示された。一方、スマイテスト「HCVコア抗体」ELISAでOD≥3(抗コア抗体高力価群)を示した235例ではHCV-RNA陽性例は184例(78.3%)にもものぼることが分かった。この結果から、スマイテスト「HCVコア抗体」ELISAでOD≥3以上のものをHCV陽性として扱うほうが、HCV-PA法で2⁴以上のものをHCV陽性とするよりも実用的であると考えられた。しかしスマイテスト「HCVコア抗体」ELISAでOD<3(抗コア抗体低力価群)であっても今回200例中2例(1.0%)にHCV-RNA陽性例がみられたので、実際HCVを含む血液をこの方法で除外する場合には、この問題点が解決されるのを待たねばならないだろう。

謝 辞

稿をおわるにあたり、スマイテスト「HCVコア抗体」ELISAを恵与くださいました住友金属株式会社バイオ・メディカル部の越坂卓也氏に、またご指導頂きました自治医科大学の眞弓忠博士に深謝致します。

文 献

- 1) Blumberg, B. S. et. al. : J. A. M. A., 191, 541~546 (1965)
- 2) Okochi, K. et. al. : Vox Sang., 15, 374~385 (1968)
- 3) Dane, D. S. et. al. : Lancet, i, 695~698 (1970)
- 4) Choo, Q. L. et. al. : Science, 244, 359~362 (1989)
- 5) Okamoto, H. et. al. : Jpn. J. Exp. Med., 60, 223~233 (1990)
- 6) Okamoto, H. et. al. : Hepatology, 15, 180~186 (1991)
- 7) Nakayama, R. et. al. : J. Med. Virol., 42, 311~317 (1994)
- 8) Okamoto, H. et. al. : Jpn. J. Exp. Med., 60, 167~177 (1990)
- 9) Okamoto, H. et. al. : Jpn. J. Exp. Med., 60, 215~222 (1990)