

## 各種肝疾患における組み換えN-14融合蛋白を用いた ELISA系によるHCV抗体の有用性の研究

今村, 純博  
鹿児島大学医学部内科学教室第二講座

<https://doi.org/10.15017/7331655>

---

出版情報：福岡醫學雑誌. 84 (4), pp.138-147, 1993-04-25. Fukuoka Medical Association  
バージョン：  
権利関係：



## 各種肝疾患における組み換え N-14 融合蛋白を用いた ELISA 系による HCV 抗体の有用性の研究

鹿児島大学医学部内科学教室第二講座 (指導: 有馬暉勝教授)

今 村 純 博

### Virological Studies on the Usefulness of Anti-HCV ELISA Assay Using Recombinant N-14 Fusion Protein in Various Liver Diseases

Sumihiro IMAMURA

*The Second Department of Internal Medicine (Director: Prof. T. Arima),  
Faculty of Medicine, Kagoshima University, Kagoshima 890*

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of HCV antibodies was established, using recombinant N-14 fusion protein, and compared with the results of Ortho's HCV antibody (C-100 Ab) test, in serum samples of 1848 normal blood donors and 248 patients with liver diseases.

The following results were obtained.

1) N-14 antibodies and C-100 antibodies were detected in 25 (1.4%) and 17 (0.9%) out of 1848 normal blood donors, respectively.

The detection rate was enhanced by 1% by using the N-14 test in addition to the C-100 kit.

2) The prevalence rate of anti-HCV in NANB liver diseases was 119 of 169 patients (70.4%) by the N-14 test and 114 of 169 patients (67.5%) by the C-100 test. 145 (85.8%) patients were positive by either one of the assays.

The antibody in patients with chronic hepatitis tends to be detected in higher rate by the N-14 test than the C-100 test ( $p < 0.01$ ).

Reversely the latter could detect in higher rate than the former in patients with liver cirrhosis ( $p < 0.01$ ). The detection rate of the antibody in patients with HCC was the same level by these two tests. By using both tests the detection rate was increased by 15~18%, up to totally 85.8% when compared with the rate obtained by testing either one of these tests.

3) Among 79 patients with liver diseases unrelated to HCV infections such as chronic hepatitis B and auto-immune hepatitis, 3 cases (3.8%) were detected by the N-14 test and 7 (8.9%) by the C-100 test, suggesting more strict specificity of the N-14 test. History of blood transfusion of the patients gave no difference in the results.

In conclusion, the N-14 test for the detection of HCV infection seems to be specific and sensitive for the blood-screening, and the diagnosis of hepatitis C infection.

### 結 言

肝障害の成因として、ウイルス、自己免疫機序、薬物、毒物、アルコールなどがあげられるが、中でも肝炎ウイルスについての起因ウイルスの発見までには長い年月を要した。1965年 Blumberg<sup>3)</sup> の Australia 抗原の発見に端を発し、1968年 Prince<sup>20)</sup>, Okochi<sup>19)</sup> らによる Australia 抗原と輸血後肝炎との関連性、1970年 Dane<sup>7)</sup> による Dane 粒子 (B型肝炎ウイルス粒子) の

発見、1973年 Feinstone<sup>8)</sup> らによる A型肝炎ウイルス (HAV) の発見と研究が進展したが、1974年 Prince<sup>21)</sup> らによる輸血後肝炎の追跡から B型肝炎ウイルス感染とはまったく関係の認められない輸血後肝炎の存在が報告され、初めて非 A 非 B型肝炎の存在が提唱された。その後、十数年の間、多くの研究者の努力にもかかわらず、このウイルスを同定することが難しく、長い間除外診断に基づかざるを得ない状態であった。しかし、1989年、米国のカイロン社グループ<sup>5)14)</sup> および有馬

ら<sup>12)</sup>が従来のウイルス学的手法でなく、分子生物学的手法を用い、C型肝炎ウイルス (HCV) の遺伝子の断片をクローニングして以来、HCV の研究は急速に進歩した。またこれに前後して、D型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルスの存在が明らかになり、これにより長い間、除外診断に頼らざるを得なかった非A非B型肝炎が、C型肝炎、D型肝炎、E型肝炎とそれぞれ呼ばれるようになった。ここでは、有馬らにより、クローニングされた HCV 関連 cDNA クローンの一つである N-14 クローン<sup>11)12)</sup>を用いた HCV 抗体検出法を開発し、その有用性を検討した。この N-14 クローンは、非A非B型肝炎患者血漿より抽出した RNA より cDNA を合成し、これをバクテリオファージ ( $\lambda$  gt 11) DNA に組み込み、大腸菌 (Y 1090) に感染、増殖させ溶菌現象によりプラーク上に発現された蛋白のう

ち非A非B型肝炎患者血清と反応したクローンのうちのひとつであり、HCV 感染に最も特異的なものである。この N-14 クローンは、大腸菌での大量発現に成功している白サケ成長ホルモン (salmon growth hormone; sGH) との融合蛋白として合成した。本稿ではこの融合蛋白を抗原とした ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 系すなわち N-14 抗体と呼ばれる測定系を用いて、健康人 (献血者) および肝疾患患者について検討し、併せてカイロン社の HCV 抗体 (C-100 抗体) との比較検討も同時に行った。

## 対象および方法

### 1. 対象

健康人 (献血者) については鹿児島県日本赤十字血液センターにおいて凍結保存された 1848 例を対象とした (Table 1)。

肝疾患患者については鹿児島大学第二内科およびその関連施設で診断した 248 例を対象とした。症例の内訳は、非A非B型肝炎患者では輸血後急性肝炎 2 例、散发性急性肝炎 5 例、慢性肝炎 114 例、肝硬変 37 例、肝癌 11 例の計 169 例とその他肝疾患ではA型急性肝炎 1 例、B型急性肝炎 2 例、B型慢性肝炎 34 例、B型肝炎硬変 8 例、自己免疫性肝炎 11 例、原発性胆汁性肝硬変 2 例、アルコール性肝障害 5 例、脂肪肝 11 例、薬剤性肝障害 3 例の計 79 例を対象とした (Table 2, Table 3)。なお非A非B型急性肝炎は、HBs 抗原および IgM 型 HBc 抗体による B型肝炎および IgM 型 HA 抗体による A型肝炎からの除外診断に臨床的事項を加味し、非A非B型急性肝疾患については HBs 抗原・抗体が共に陰性で自己免疫性肝疾患、アルコール性肝障害、

**Table 1** Prevalence of HCV antibodies in blood donors

|                      | C-100<br>+ | antibodies<br>- | Total |
|----------------------|------------|-----------------|-------|
| N-14<br>antibodies + | 7          | 18              | 25    |
| antibodies -         | 10         | 1813            | 1823  |
| Total                | 17         | 1831            | 1848  |

Frozen serum samples drawn from blood donors at Kagoshima Blood Center (Red Cross, Japan) were tested for N-14 antibodies by ELISA. C-100 antibodies were determined by a commercial ELISA kit (Ortho), using recombinant HCV C-100 antigen.

**Table 2** Prevalence of HCV antibodies (N-14 Ab and C-100 Ab) in patients with non-A, non-B liver diseases

| Diagnosis   | Number of cases | anti N-14 | anti C-100 | N-14/C-100 |          |          |          |
|-------------|-----------------|-----------|------------|------------|----------|----------|----------|
|             |                 |           |            | + / +      | + / -    | - / +    | - / -    |
| PTH         | 2               | 2(100.0)  | 2(100.0)   | 2(100.0)   | 0        | 0        | 0        |
| Sporadic AH | 5               | 0         | 1(20.0)    | 0          | 0        | 1(20.0)  | 4(80.0)  |
| CH          | 114             | 84(73.7)  | 73(64.0)   | 57(50.0)   | 27(23.7) | 16(14.0) | 14(12.3) |
| LC          | 37              | 26(70.3)  | 30(81.1)   | 23(62.2)   | 3(8.1)   | 7(18.9)  | 4(10.8)  |
| HCC         | 11              | 7(63.6)   | 8(72.7)    | 6(54.5)    | 1(9.1)   | 2(18.2)  | 2(18.2)  |
| Total       | 169             | 119(70.4) | 114(67.5)  | 88(52.1)   | 31(18.3) | 26(15.4) | 24(14.2) |

( ) percentage

PTH: Post-transfusion hepatitis. AH: Acute hepatitis. CH: Chronic hepatitis. LC: Liver cirrhosis. HCC: Hepatocellular carcinoma.

**Table 3** Prevalence of HCV antibodies (N-14 Ab and C-100 Ab) in patients with liver diseases unrelated to the HCV infection

| Diagnosis    | Number of cases | anti N-14 | anti C-100 | N-14/C-100 |         |         |           |
|--------------|-----------------|-----------|------------|------------|---------|---------|-----------|
|              |                 |           |            | + / +      | + / -   | - / +   | - / -     |
| AH (Type A)  | 1               | 0         | 0          | 0          | 0       | 0       | 1(100.0)  |
| AH (Type B)  | 2               | 0         | 0          | 0          | 0       | 0       | 2(100.0)  |
| CH (Type B)  | 34              | 0         | 1( 2.9)    | 0          | 0       | 1( 2.9) | 33( 97.1) |
| LC (Type B)  | 8               | 0         | 2(25.0)    | 0          | 0       | 2(25.0) | 6( 75.0)  |
| HCC (Type B) | 2               | 0         | 0          | 0          | 0       | 0       | 2(100.0)  |
| AIH          | 11              | 1( 9.1)   | 1( 9.1)    | 1( 9.1)    | 0       | 0       | 10( 90.9) |
| PBC          | 2               | 0         | 1(50.0)    | 0          | 0       | 1(50.0) | 1( 50.0)  |
| ALD          | 5               | 0         | 0          | 0          | 0       | 0       | 5(100.0)  |
| FL           | 11              | 1( 9.1)   | 1( 9.1)    | 1(9.1)     | 0       | 0       | 10( 90.9) |
| Drug         | 3               | 1(33.3)   | 1(33.3)    | 0          | 1(33.3) | 1(33.3) | 1( 33.3)  |
| Total        | 79              | 3( 3.8)   | 7( 8.9)    | 2( 2.5)    | 1( 1.3) | 5( 6.3) | 71( 89.9) |

( ) percentage

AH: Acute hepatitis. CH: Chronic hepatitis. LC: Liver cirrhosis. HCC: Hepatocellular carcinoma. AIH: Autoimmune hepatitis. PBC: Primary biliary cirrhosis. ALD: Alcoholic liver diseases. FL: Fatty liver.

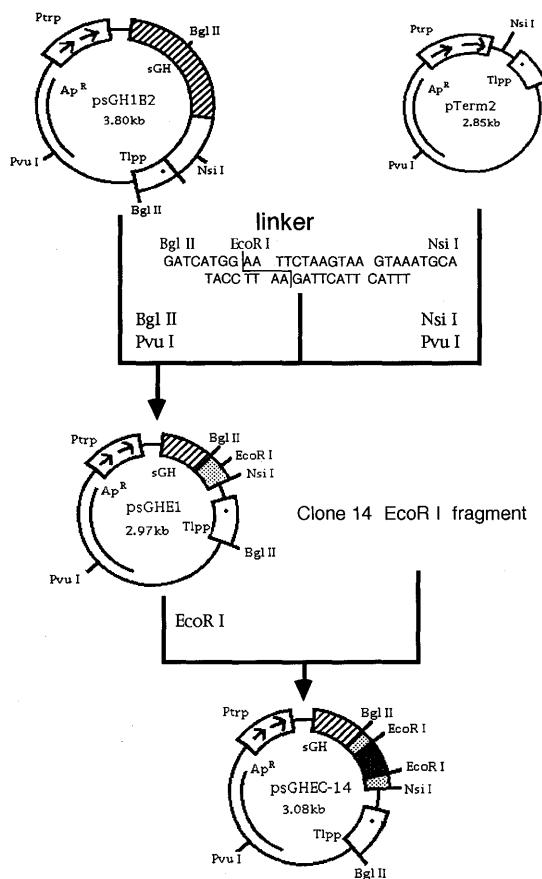
代謝性肝疾患, などを除外できるものとした。

## 2. 方法

N-14 クローンと白サケ成長ホルモン (sGH) との融合蛋白質 sGH-N14 融合抗原を遺伝子工学的手法により調整し, それを抗原とした ELISA 法による HCV 抗体測定キット (協和発酵工業株式会社, 東京) を用いた。

i) sGH-N14 融合蛋白の発現と精製発現プラスミド psGHEC-14 の構築法を Fig. 1 に示した。まずサケ成長ホルモン発現プラスミド psGHIB2 と, 発現ベクター pTerm2 を用いて, EcoRI サイトを含んだ psGHE1 を合成し, 次にクローン 14 の EcoRI 断片をこれに挿入し, 発現プラスミド psGHEC-14 を作成した。

作成した psGHEC-14 を用いて大腸菌 W3100 strA (FERM BP-732) を形質転換し, 得られた Ap<sup>r</sup> のコロニーを LG 培地に接種し 30°C 16 時間培養した。この培養液 200  $\mu$ l を 10 ml の MCG 培地に 50  $\mu$ g/ml のアンピシリンを添加した培地に接種し, 30°C, 24 時間培養した。この培養液を 8000 rpm, 40 分間遠心して集菌し, 30 mMNaCl, 30 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で洗浄した。sGHEC-14 は大腸菌内に顆粒として発現した。洗浄菌体から sGHEC-14 顆粒をパーコールを用いて, 純度 90% にまで精製し, この顆粒 800 mg を 70% ige に可溶化し, 40 ml とし, 12000 rpm, 20 分間遠

**Fig. 1** Construction of psGHEC-14

心後、逆相 HPLC を用い、sGHEC-14 を精製した。

ii) ELISA による sGH-N14 融合抗原を用いた N-14 抗体の検出

Fig. 2 に N-14 抗体 (ELISA 系) の測定法を示す。

1) 一次反応: sGH-N14 融合抗原を物理的吸着法により固相化したマイクロタイタープレート (Immuno plate II: Nunc 社) に検体希釈液 (0.1 M トリス緩衝化牛血清 pH 7.2) を 100  $\mu$ l/ウェル分注し、ついで検体 10  $\mu$ l を添加した。そして 37°C 1 時間インキュベーションし、反応終了後、反応液をすべて吸引除去し、洗浄液 (0.05% TWEEN-PBS pH 7.2) 250  $\mu$ l/ウェルにて 5 回洗浄した。

2) 二次反応: POD 標識抗ヒトイムノグロブリン抗体液を 100  $\mu$ l/ウェル添加し、37°C 1 時間インキュベーションを行い、反応終了後一次反応後と同様に洗浄液にて計 5 回洗浄を行った。

3) 発色反応: 洗浄液を取り除いた後、酵素基質液 (0.2 mg/ml MCDP: 10-N-メチルカルバモイル-3,

7-ジメチルアミノ-10 H-フェノチアジン: 協和メディクス社製) を 50  $\mu$ l/ウェル添加し、37°C 30 分間室温暗所にてインキュベーションを行った。

4) 反応停止: 停止液 (0.4 mg/ml ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム) 50  $\mu$ l/ウェルを添加し、反応を停止した。

5) 測定: プレートリーダーを用い 660 nm の吸光度を各ウェルにつき測定した。

iii) カットオフ値についてはプールした HCV 抗体陽性の検体を二段階希釈し、それぞれの O.D. 値を測定した値と健常人ヒストグラム (Fig. 3) の値を比較し、最も偽陽性、偽陰性の出現の少ないと思われる値 (1/16 希釈血清) の O.D. 値を暫定的にカットオフ値 0.281 と定め、それ以上を陽性とした。

iv) 血清中 C-100 抗体は『オーソ HCV Ab ELISA テスト』(Ortho Diagnostic Systems) により測定した。測定方法、測定結果の判定はキット添付の説明書によった。

N-14 Antigen-coated Immuno plate II (Nunc)

↓

Sample Diluent to all wells except a blank well : 100 $\mu$ l/well

↓

Control or serum samples : 10 $\mu$ l/well

↓

Incubation 37 °C for 60 minutes

↓

Wash 5 times (0.05 % Tween-PBS pH 7.2) : 250 $\mu$ l/well

↓

Conjugate solution : 100 $\mu$ l/well  
(Anti-human immuno globulin antibody labeled with peroxidase)

↓

Incubation 37 °C for 60 minutes

↓

Wash 5 times (0.05 % Tween-PBS pH 7.2) : 250 $\mu$ l/well

↓

Substrate solution : 50 $\mu$ l/well  
(0.2 mg/ml MCDP: 10-N-Methylcarbamoyl-3, 7-Dimethylamino-10H-Phenotiazin)

↓

Incubation in dark room at 37 °C for 30 minutes

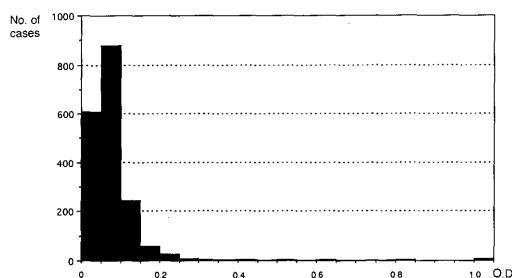
↓

Stopper (sodium diethyl-dithio-carbamate) : 50 $\mu$ l/well

↓

Determination of Absorbance by ELISA Reader (O. D. 660nm)

**Fig. 2** Procedure for measurement of N-14 antibodies in serum



**Fig. 3** Distribution of O. D. value among healthy donors:

$n = 1848$ , mean = 0.079, SD = 0.090

After elimination of cases with O. D. value more then the mean plus

3 SD:  $n = 1786$ , mean = 0.068, SD = 0.034, cut off value = 0.281

v) 統計学的検査は  $\chi^2$ -test (McNemar test) を用いた。

## 結 果

### 1. 健康人(献血者)におけるN-14抗体およびC-100抗体の測定

健康人(献血者) 1848 例中における N-14 抗体と C-100 抗体の測定結果を Table 1 に示した。N-14 抗体陽性者は 25 例(陽性率 1.4%)で、同じ検体の C-100 抗体陽性者は 17 例(0.9%)であった。そのうちで N-14 抗体と C-100 抗体の両方とも陽性となったのは 7 例(0.4%)であった。一方 N-14 抗体と C-100 抗体のいずれかが陽性と判定されたのは 42 例(2.3%)であった。

### 2. 肝疾患患者における N-14 抗体および C-100 抗体の測定

#### 1) 非 A 非 B 型肝炎患者

非 A 非 B 型肝炎患者 169 例における N-14 抗体と C-100 抗体の陽性率を Table 2 に示した。急性肝炎では輸血後急性肝炎は症例 2 例と少ないが、N-14 抗体と C-100 抗体の両方ともに検出され 100%の陽性率であったが、散発性急性肝炎 5 例中では N-14 抗体は検出されず、C-100 抗体は 1 例(20%)に検出された。慢性肝炎患者 114 例中 N-14 抗体陽性は 84 例(73.7%)で、C-100 抗体陽性は 73 例(64.0%)で両者間に有意差( $P < 0.01$ )が認められた。両者ともに陽性は 57 例(50.0%)でいずれか一方でも陽性は 100 例(87.7%)であった。次に肝硬変患者 37 例中については、N-14 抗体陽性は 26 例(70.3%)で、C-100 抗体陽性は 30 例

(81.1%)で両者間に有意差( $P < 0.01$ )が認められた。そして両者ともに陽性は 23 例(62.2%)で、いずれか一方でも陽性は 33 例(89.2%)であった。次に肝癌患者 11 例中については N-14 抗体陽性 7 例(63.6%)で、C-100 抗体陽性は 8 例(72.7%)で両者間には有意差は認められなかった。そして両方ともに陽性は 6 例(54.5%)でいずれか一方でも陽性は 9 例(81.8%)であった。いずれにしても非 A 非 B 型肝炎患者 169 例中からみても N-14 抗体単独陽性は 119 例(70.4%)また C-100 抗体単独陽性は 114 例(67.5%)でいずれか一方でも陽性は 145 例(85.8%)と N-14 抗体単独陽性あるいは C-100 抗体単独陽性よりも両者の抗体を組み合わせることによって 15~18%の陽性率の上昇が得られた。

#### 2) その他の肝疾患

非 A 非 B 型肝炎患者以外の肝疾患における N-14 抗体と C-100 抗体の陽性率を Table 3 に示した。急性肝炎 3 例では A 型急性肝炎(1 例)、B 型急性肝炎(2 例)ともに陰性であった。B 型慢性肝炎患者 44 例中で、N-14 抗体は慢性肝炎・肝硬変・肝癌すべて陰性であったが、C-100 抗体では慢性肝炎 34 例中 1 例(2.9%)、肝硬変 8 例中 2 例(25.0%)で陽性例がみられた。そしてウイルス肝炎以外の肝疾患では N-14 抗体陽性は自己免疫肝炎 11 例中 1 例(9.1%)、脂肪肝 11 例中 1 例(9.1%)、薬剤性肝障害 3 例中 1 例(33.3%)であり全疾患 79 例中では N-14 抗体陽性は 3 例(3.8%)であった。同様に C-100 抗体陽性は自己免疫肝炎 11 例中 1 例(9.1%)、原発性胆汁性肝硬変 2 例中 1 例(50.0%)、脂肪肝 11 例中 1 例(9.1%)、薬剤性肝障害 3 例中 1 例(33.3%)で全疾患 79 例中では C-100 抗体陽性は 7 例(8.9%)であった。C-100 抗体が N-14 抗体に比べて若干陽性率が高かったが明らかな統計学上の有意差は認められなかった。

### 3. 非 A 非 B 型慢性肝疾患における輸血の有無による N-14 抗体および C-100 抗体の比較

非 A 非 B 型慢性肝疾患 162 例(慢性肝炎 114 例、肝硬変 37 例、肝癌 11 例)の中で、輸血の有無が確認された 101 例(慢性肝炎 70 例、肝硬変 26 例、肝癌 5 例)について N-14 抗体と C-100 抗体の陽性率を Table 4 に示した。慢性肝炎では 70 例中輸血歴のあった 23 例中、N-14 抗体陽性は 18 例(78.3%)で、C-100 抗体陽性は 17 例(73.9%)であった。輸血歴の無いもの 47 例では、N-14 抗体陽性は 32 例(68.1%)で、C-100 抗体陽性は 23 例(48.9%)で輸血歴の有無による陽性率の有意差は認められなかった。肝硬変については 26 例

**Table 4** Relationship between blood transfusions and HCV antibodies (N-14 Ab and C-100 Ab) in patients with NANB chronic liver diseases

| Diagnosis | Number of cases | B. T. | Number of patients | anti N-14 | anti C-100 |
|-----------|-----------------|-------|--------------------|-----------|------------|
| CH        | 70              | +     | 23                 | 18( 78.3) | 17( 73.9)  |
|           |                 | -     | 47                 | 32( 68.1) | 23( 48.9)  |
| LC        | 26              | +     | 8                  | 4( 50.0)  | 7( 87.5)   |
|           |                 | -     | 18                 | 12( 66.7) | 15( 83.3)  |
| HCC       | 5               | +     | 4                  | 3( 75.0)  | 4(100.0)   |
|           |                 | -     | 1                  | 1(100.0)  | 1(100.0)   |

( )percentage

B. T.: Blood transfusion. CH: Chronic hepatitis. LC: Liver cirrhosis. HCC: Hepatocellular carcinoma.

中輸血歴のあったものは8例でこのうち N-14 抗体陽性は4例 (50.0%), C-100 抗体陽性は7例 (87.5%) であった。輸血歴の無いもの18例では N-14 抗体陽性は12例 (66.7%), C-100 抗体陽性は15例 (83.3%) で輸血歴の有無による陽性率の有意差は認められなかった。肝癌5例中輸血歴のあったものは4例で、このうち N-14 抗体陽性は3例 (75.0%) で、C-100 抗体陽性は4例 (100.0%) であり、輸血歴の無いもの1例では N-14 抗体陽性、C-100 抗体はいずれも1例陽性 (100.0%) で、同様に輸血歴の有無による陽性率の有意差は認められなかった。

## 考 察

1989年、米国のカイロン社グループ<sup>5)14)</sup>および日本の有馬ら<sup>1)2)</sup>による、輸血後非A非B型肝炎の起因ウイルス核酸の分離、クローニングの成功により、C型肝炎の診断が可能になった。両者によるC型肝炎ウイルス遺伝子のクローニングの成功は、分子生物学的手法という新しい方法の導入によりもたらされたものであるが、ウイルス核酸抽出の材料として、カイロン社は非A非B型肝炎患者血清を接種された感染力価の高いチンパンジーの血漿を用いたのに対し、有馬らはB型肝炎ウイルスに汚染されておらず (HBs 抗原およびHBV-DNA 陰性) なおかつ明らかな既知ウイルスの存在しない、ALT 高値の新鮮凍結血漿約100 l (1,000人分) のプール血漿を用いた点が異なっている。

本邦では1989年11月より全国の日赤血液センターにてカイロン社の開発した C-100 抗体を用いた HCV

抗体検査を供血者血液のスクリーニングに導入し輸血後肝炎の減少<sup>13)</sup>が確認されているが、その後いくつかの問題点も次第に明らかになってきた。すなわち C-100 抗体陰性血を輸血したにもかかわらず輸血後のC型肝炎の発症がみられたり「検出感度の問題」、C型肝炎発症後の C-100 抗体の出現に数週から数カ月を要し早期診断に不向きなこと「急性期診断の限界」そして偽陽性 (特異性) の問題などが指摘されている<sup>15)</sup>。その後カイロン社は HCV 遺伝子の全塩基配列を解明し、polymerase chain reaction (PCR) 法<sup>25)</sup>を応用してのC型肝炎の遺伝子診断も可能となった。HCV 遺伝子の全構造解明により以下のことが明らかになった。①全長約9.5 Kbp のプラス鎖の RNA 遺伝子であり、その中に9,030 bp よりなる一つの長い open reading frame (ORF) が存在し3,010 個のアミノ酸をコードしている。②5'末端側と3'末端側に短い non-coding region があり5'末端側より構造領域と非構造領域 (non structural region; NS) とに大きく分けられ構造領域はウイルス粒子自体を構築する蛋白をコードしコア領域とエンベロープ領域とに分けられ、非構造領域はウイルスが増殖、複製するために必要な蛋白をコードする領域で5つ (NS1~NS5) の領域に区分される。しかし NS1 領域はエンベロープ領域である可能性も指摘され、フラビウイルス属<sup>4)22)</sup>では非構造領域に相当し、ベスチウイルス属<sup>9)</sup>ではエンベロープ領域に相当するとされ、C型肝炎ウイルスはフラビウイルスやベスチウイルスに類似しているものの両者とは異なる属に分類されるべきものと考えられている

る。

HCV 抗体測定系として HCV 遺伝子のどの部分を抗原に用いるかであるが、コア領域、NS3～NS4 領域、NS5 領域が比較的アミノ酸の変異が少ないとされ、これらの領域を用いて、すでに各種の抗体系が開発されている。現在一般に普及しているカイロン社より開発された HCV(C-100)抗体は HCV 遺伝子の非構造領域である NS3～NS4 の 363 個のアミノ酸部分をヒト superoxide dismutase (SOD) との融合蛋白を酵母で発現させ、これを抗原に用いた測定系である。ほかには非構造領域に対する (NS 抗体) 測定系として日本大学 (志方ら)・化血研グループらによる NS4～NS5 領域を用いた KCL がある。一方、コア蛋白領域を用いた自治医大の真弓らの CP-9、CP-10、国立予研の宮村らの P-22、日本大学 (志方ら)・化血研グループの JCC などが開発されている。最近では検出感度を上げるためコア領域、NS 領域の両者をコードする第 2 世代 (2'nd gen) HCV 抗体<sup>23)</sup>の測定も開発され臨床応用されるようになった。今回われわれの用いているクローン 14<sup>16)</sup>は 114 塩基よりなり、38 個アミノ酸をコードするもので、カイロン社および岡本ら<sup>13)17)</sup>の HCV 遺伝子のコア領域と対比するとコア蛋白をコードするアミノ酸の 8 番目から 18 番目の 11 個のアミノ酸のうち 8 個および 10 個が一致 (Fig. 4) しており、最終的には HCV のコア蛋白のひとつのエピトープを認識するコア抗体であることが明らかになった。この

ことより前述したように非構造部位の発現蛋白を用いている C-100 抗体の成績とはいくぶん異なる結果が出たものと考えられた。またコア領域は HCV 遺伝子の中でも比較的変異が少ない部位であることより輸血用血液のスクリーニングや C 型肝炎の診断にかなり有用な部位であることが推測される。

今回健康人 (献血者) 1848 例について測定した結果をみると、N-14 抗体陽性 25 例 (1.4%)、C-100 抗体陽性 17 例 (0.9%) で、本邦で報告されている C-100 抗体陽性率 1.15%<sup>26)</sup>と比較してみても、若干 N-14 抗体陽性率が高い結果となった。しかし、N-14 抗体・C-100 抗体、両者とも陽性は 7 例 (0.4%) にすぎず、両抗体の不一致例が多くみられた。すなわち N-14 抗体と C-100 抗体のいずれか陽性は 42 例 (2.3%) であり、それぞれの単独での陽性率よりも約 1% 高くなった。このことは両者の抗体系を併用したスクリーニングにより、多くの輸血後肝炎の予防が可能となることが示唆された。

非 A 非 B 型肝炎疾患における N-14 抗体陽性率をみると急性肝炎では輸血後急性肝炎 100%、散発性急性肝炎 0% であった。C-100 抗体では 100%、20% で、全体的にみると N-14 抗体陽性率より若干高かった。慢性肝炎疾患では N-14 抗体陽性率は慢性肝炎 73.7%、肝硬変 70.3%、肝癌 63.6% であり、C-100 抗体はそれぞれ 64.0%、81.1%、72.7% であった。慢性肝炎では N-14 抗体の陽性率が、また肝硬変では C-100 抗体の陽性率

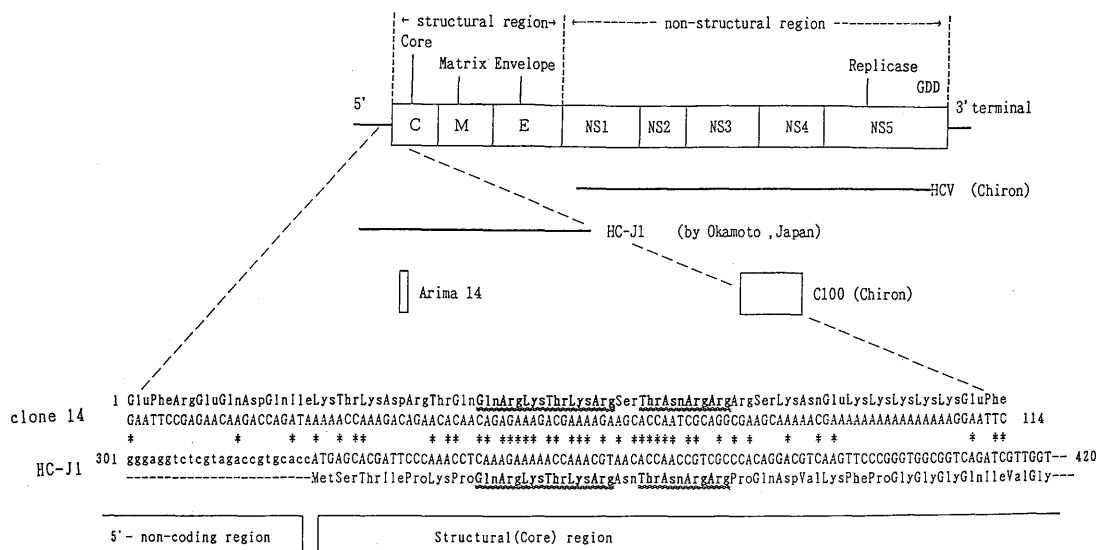


Fig. 4 Homology of the sequence of clone 14 to the 5'-terminal sequence of HC-J1 determined by the other laboratory in Japan.

が統計学的有意差をもって高値であった ( $P < 0.01$ ) しかし健康人の場合と同じように両抗体間には不一致例がみられ、非 A 非 B 型肝炎疾患全例 169 例についても N-14 抗体・C-100 抗体いずれかが一方でも陽性例の陽性率は 85.8% に達し、それぞれの N-14 抗体単独陽性率 70.4% と C-100 抗体単独陽性率 67.5% よりも 15~18% の高い値が得られた。非 A 非 B 型肝炎疾患では N-14 抗体、C-100 抗体不一致例においては単独抗体陽性例でも PCR 法では高率に HCV 遺伝子陽性であり<sup>18)</sup>、いずれもウイルス血症の存在を意味している。このことより、N-14 抗体、C-100 抗体不一致の原因は、両抗体の認識する抗原が異なっており、個々により抗体反応の出現に差異がある為と推測される。これはすなわち両抗体の相補性を示すもので、C 型肝炎の検出に関しては両者の組み合わせにより陽性率の上昇が認められる。また従来非 A 非 B 型肝炎疾患とよばれたものの成因を両 HCV 抗体の測定結果から考察すると、従来の輸血後急性肝炎はほとんど HCV 感染に起因すると考えられた。また、散発性急性肝炎については C 型肝炎のみならず非 A 非 B 非 C 型肝炎の存在も考えられ未知の肝炎ウイルスの存在も示唆されたが、慢性疾患に関してはそのほとんどが C 型肝炎ウイルス由来と考えられた。

非 A 非 B 型肝炎疾患以外のその他の肝疾患においては全症例 79 例中 N-14 抗体陽性は 3 例 (3.8%) で非 A 非 B 型肝炎疾患と比べて明らかに低く、N-14 抗体の C 型肝炎に対する特異性は明らかであった。同症例における C-100 抗体陽性は 7 例 (8.9%) で、N-14 抗体より高くなっている。自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変をあわせると N-14 抗体、C-100 抗体はそれぞれ 1 例および 2 例に陽性であった。アルコール性肝障害は比較的 C-100 抗体の陽性率が高い<sup>24)</sup> という報告があるが、今回の測定結果では N-14 抗体・C-100 抗体の両者とも陰性であった。B 型慢性肝疾患では慢性肝炎、肝硬変、肝癌、すべてで N-14 抗体は陰性であったが、C-100 抗体では慢性肝炎 34 例中 1 例 (2.9%)、肝硬変 8 例中 2 例 (25.0%) に陽性であった。自己免疫性肝炎については C-100 抗体陽性の多くは疑陽性であるとする考え方が最近一般的で疑陽性の原因としてカイロン社の用いている抗原が C-100 蛋白とヒトの superoxide dismutase (SOD) との融合蛋白であることより、SOD に対する自己抗体を C-100 抗体陽性として検出している可能性が高いとされている<sup>21)10)</sup>。これらの結果より融合蛋白として sGH を用いた N-14 抗体測定系が、SOD を用いた C-100 抗体測定系より偽陽性が少

ない可能性が示唆された。ただ、B 型慢性肝疾患については HBV と HCV との重複感染であるかどうかの診断は実際難しく、PCR 法による HCV 遺伝子の有無も確認する必要があると思われた。

非 A 非 B 型慢性肝疾患における輸血の有無による N-14 抗体と C-100 抗体の陽性率について、慢性肝炎・肝硬変・肝癌それぞれについて検討したが、輸血歴の有無による統計学的な有意差は認められなかった。C 型肝炎の感染経路として輸血以外には血液透析、医療行為に関係した感染、刺青、性交渉による感染、母児間感染、家族内感染などがあげられるがまだ不明な点も多い。

以上今回の N-14 抗体測定系は白サケ成長ホルモン (sGH) との融合蛋白を抗原として用いた ELISA 法であるが、この測定系が輸血用血液のスクリーニングや C 型肝炎の診断に大きく寄与することが確認された。

## 結 語

組み換え N-14 融合蛋白を用いた HCV 抗体検出の ELISA 法が確立され、健康人 (献血者) 1848 例および肝疾患患者 248 例について検討し、併せて C-100 抗体と比較検討した。

1. 健康人 (献血者) 1848 例中における N-14 抗体と C-100 抗体の各々の陽性者は 25 例 (1.4%)、17 例 (0.9%) であった。両者併用した場合 1% の陽性率の上昇が認められた。

2. 非 A 非 B 型肝炎疾患 169 例における HCV 抗体の陽性者は、N-14 抗体は 119 例 (70.4%) で C-100 抗体は 114 例 (67.5%) であった。また両者の抗体を組み合わせることにより 145 例 (85.8%) に達しそれぞれの単独陽性率よりも 15~18% の上昇がみられた。N-14 抗体は慢性肝炎に C-100 抗体は肝硬変に有意差 ( $P < 0.01$ ) をもって陽性率が高くなったが、肝癌では両者間に有意差は認められなかった。

3. HCV 感染以外の肝疾患 79 例においては N-14 抗体は 3 例 (3.8%)、C-100 抗体は 7 例 (8.9%) で N-14 抗体の特異性が示唆された。輸血歴の有無による陽性率の有意差はなかった。

以上より HCV 感染検出のための N-14 抗体は輸血用血液のスクリーニングや C 型肝炎の診断に特異的また有用であることが確認された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、研究の機会をお与え下さり、終始、御懇篤な御指導、御校閲を賜りました恩師鹿児島大学第二

内科学教室有馬暉勝教授に深甚なる謝意を申し上げます。また、本研究を直接御指導、御教示いただきました鹿児島大学第二内科学教室前田栄樹助手に深く感謝申し上げます。また貴重な御助言をいただきました元鹿児島大学第二内科学教室坪内博仁講師（現宮崎医科大学第二内科学教室教授）に深謝申し上げます。さらに種々の御援助および御協力いただきました鹿児島大学第二内科学肝臓研究室桶谷真先生ほか諸先生方、鹿児島通信病院内科部長岩橋正人博士および松元實院長、鹿児島大学第二内科学研究助手中堂園美知子さん、鹿児島県民総合保健センター臨床検査技師尾辻誠氏に厚く御礼申し上げます。そして本研究にいろいろ御協力いただきました協和発酵工業株式会社（東京）の方々に心から御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Arima T, Nagashima H, Murakami S, Kaji C, Fujita J, Shimomura H and Tsuji T: Cloning of a cDNA associated with acute and chronic hepatitis C infection generated from patients serum RNA. *Gastroenterol Jpn* 24: 540-544, 1989.
- 2) Arima T, Takamizawa A, Mori C, Murakami S, Kaji C and Fujita J: A lambda gt10-cDNA clone specific for chronic hepatitis C generated from pooled serum presumably infected by hepatitis C virus. *Gastroenterol Jpn* 24: 545-548, 1989.
- 3) Blumberg BS, Alter HJ and Visnich S: A "New" antigen in leukemia sera. *JAMA* 191: 541-546, 1965.
- 4) Castle E, Leider U, Nowak T, Wengler G and Wengler G: Primary structure of the west nile flavivirus genome region coding for all nonstructural proteins. *Virology* 149: 10-26, 1986.
- 5) Choo Q-L, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW and Houghton M: Isolation of a cDNA clone derived from a blood-born non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244: 359-362, 1989.
- 6) Collect MS, Larson R, Gold C, Strick D, Anderson DK and Pruchio AF: Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology* 165: 191-199, 1988.
- 7) Dane DS, Cameron CH, Briggs M: Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* i: 695-698, 1970.
- 8) Feinstone SM, Kapikian AZ and Purcell RH: Hepatitis A: Detection by immune electron microscopy of a virus-like antigen associated with acute illness. *Science* 182: 1026-1028, 1973.
- 9) 飯野四郎, 日野邦彦: C型肝炎の診断. *臨床科学* 26: 1526-1533, 1990.
- 10) Ikeda Y, Toda G, Hashimoto N and Kurokawa K: Antibody to superoxide dismutase, autoimmune hepatitis, and antibody tests for hepatitis C virus. *Lancet* 335: 1345-1346, 1990.
- 11) 今村純博, 前田栄樹, 有馬暉勝: 各種抗体系の開発と臨床の有用性-有馬抗体. *Modern Physician* vol. 11 No. 3: 334-336, 1991.
- 12) 今村純博, 前田栄樹, 有馬暉勝: C型肝炎ウイルスと関連抗体. *消化器科* 14 巻第 4 号: 287-291, 1991.
- 13) Japanese Red Cross Non-A, Non-B Hepatitis Research Group: Effect of screening for hepatitis C virus antibody and hepatitis B virus core antibody on incidence of post-transfusion hepatitis. *Lancet* 338: 1040-1041, 1991.
- 14) Kuo G, Choo Q-L, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE, Tegtmeier GE, Bonino F, Colombo M, Lee WS, Kuo C, Berger K, Shuster JR, Overby LR, Bradley DW and Houghton M: An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 244: 362-364, 1989.
- 15) McFarlane IG, Smith HM, Jonson PJ, Bray GP, Vergani D and Willams R: Hepatitis C virus antibodies in chronic active hepatitis: pathogenetic factor or false-positive result? *Lancet* 335: 754-757, 1990.
- 16) 前田栄樹, 有馬暉勝: C-100 抗体と有馬 14 抗体の評価. *Mebio* vol. 7. No. 11: 20-25, 1990.
- 17) Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Yotsumoto S, Tanaka T, Yoshizawa H, Tsuda F, Miyakawa Y and Mayumi M: The 5'-terminal sequence of the hepatitis C virus genome. *Jpn J Exp Med* 60: 167-177, 1990.
- 18) Oketani M, Kawabata H, Imamura S, Maeda E, Tsubouchi H and Arima T: Development of a specific enzyme-linked immunosorbent assay for the hepatitis C virus antibody using clone 14. *Gastroenterol Jpn* 28: 56-63, 1993.
- 19) Okochi K and Murakami S: Observation on Australian antigen in Japanese. *Vox Sang.* 15: 374-385, 1968.
- 20) Prince AM: An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc. Natl. Sci. USA* 60: 814-821, 1968.
- 21) Prince AM, Brotman B, Grady GF, Kuhns WJ, Hazzi C, Levine RW and Millians S: Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *Lancet* 3: 241-246, 1974.
- 22) Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL and Strauss JH: Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* 229: 726-733, 1985.
- 23) 鈴木宏, 赤羽賢浩, 松嶋喬, 飯野四郎, 日野邦彦, 古田精市, 黒木哲夫, 矢野右人, 渡部準之助, 西岡久壽彌: 肝疾患における第 2 世代 HCV 抗体測定キ

ット (ELISA) および RIBA-II の臨床的意義. 医学と薬学 26(2): 303-312, 1991.

24) 高瀬修二郎, 高田昭: アルコール性肝障害と C 型肝炎ウイルス. 内科 67 巻 5 号: 892-897, 1991.

25) Weiner AJ, Kuo G, Bradley DW, Bonino F, Saracco G, Lee C, Rosenblatt J, Choo Q-L and Houghton M: Detection of hepatitis C viral sequences in non-A, non-B hepatitis. Lancet 335: 1

-3, 1990.

26) 吉澤浩司, 田中純子, 大堀兼男, 飯塚久雄, 丹後俊郎, 渡部準之助, 青山憲一, 水井正明: 供血者における HCV 関連抗体 (C100-3 抗体, GOR 抗体) からみた C 型肝炎ウイルスキャリア. 日本臨床 49 巻 2 号: 97-105, 1991.

(受付 1993-3-16)