

合成ペプチド(N14E plus ^#19-^#40)を用いた非A非B 型肝炎抗体の有用性についての検討

杉安, 孝徳
鹿児島大学医学部内科学教室第二講座

<https://doi.org/10.15017/7331656>

出版情報：福岡醫學雑誌. 84 (4), pp.148-158, 1993-04-25. Fukuoka Medical Association
バージョン：
権利関係：



合成ペプチド (N14E plus #19-#40) を用いた非 A 非 B 型肝炎抗体の有用性についての検討

鹿児島大学医学部内科学教室第二講座 (主任: 有馬暉勝教授)

杉 安 孝 徳

Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Antibodies against Core Protein of Hepatitis C Virus with a Synthetic Oligopeptide

Takanori SUGIYASU

The Second Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Kagoshima University, Kagoshima 890

An ELISA using N14E plus #19-#40, a synthetic peptide of the HCV core for the purpose of improving diagnosis of the HCV infection was studied to evaluate its usefulness in comparison with the tests of C100-3 antibody, N14 antibody and HCV EIA II. N14E plus #19-#40 is made up of 34 amino acids, containing the first two hydrophilic regions of HCV core forming epitopes. By using N14E plus #19-#40 antibody, HCV-antibody was detected in 94.4% of chronic hepatitis, 80.6% of liver cirrhosis and 87.5% of hepatocellular carcinoma of non-A non-B chronic liver diseases. This assay seems to be more sensitive than the assays of C100-3 antibody and N14 as far as tested for our patients in this district. In chronic liver diseases, 5.6%(5/90) of patients negative for HCV EIA II were positive to anti-N14E plus #19-#40; one of these 5 patients was HCV RNA positive. Anti-N14E plus #19-#40 was detected in 57.5% out of 40 paid blood donors with elevated ALT higher than 50IU and negative for HBsAg, C100-3 and N14, but positive for HCV RNA.

The results suggest that anti-N14E plus #19-#40 as well as HCV EIA II seems to be useful for the detection of patients with the HCV infection and that an improvement for the diagnosis of type C hepatitis and a decrease in the incidence of type C post-transfusion hepatitis can be achieved by using anti-N14E plus #19-#40.

はじめに

C型肝炎ウイルス (HCV) は、1989年有馬ら²⁾³⁾⁴⁾とChooら⁶⁾¹⁹⁾によってそれぞれ独立して分子生物学的手法によりその遺伝子の断片が見いだされた。その後の研究により HCV は全長約 9.5 kb (kilobases) の+鎖 RNA ウィルスで構造的にベチウイルスもしくはフラビウイルスに類似していることが明らかとなっている²³⁾。また HCV は、他の RNA ウィルスと同様に、非常に変異の多いウィルスであり、その塩基配列により少なくとも四つの亜型に分類できるとされている²⁷⁾。現在では、HCV は非 A 非 B 型肝炎のほとんど大部分を占める原因ウィルスであることが示されている。

C型肝炎の診断は、最初はレコンピナント抗原を用

いた有馬 N14 抗体や第一世代の C100-3 抗体の検出によって行われていたが、いくつかの問題点があった。とくに C100-3 抗原に対する抗体は HCV の非構造蛋白に対する抗体であり、C型急性肝炎での早期診断には十分ではないことが示されている。また非 A 非 B 型慢性肝疾患での両抗体による C型肝炎の診断能も検出感度・特異性などの点で完全ではないこと¹⁾¹⁵⁾²⁹⁾³⁹⁾、自己免疫疾患において、融合蛋白である SOD (Superoxide dismutase) に対する抗体の出現によって非特異反応が出現する¹³⁾²¹⁾などの点が次第に明らかとなった。

第二世代の HCV EIA II (Abbott)¹⁴⁾ は、検出率が高いものの、その抗体検出系はコア領域と非構造領域を組み合わせたものであるので多種のエピトープに対

する抗体系であり、厳密に言えば現在の HCV 感染を意味するのか既感染を意味するのかは不明な点も存在する。第二世代の HCV 抗体の EIA 法は、測定手技がやや煩雑であり、また PHA 法では客観性に乏しい。また現在行われる確定診断の PCR (Polymerase Chain Reaction) による HCV-RNA の検出は、その手技の煩雑さ、費用などの面からスクリーニングテストとしては適切ではない。

コア領域は、3つの親水性領域を含み変異の多い HCV 遺伝子の中でも非常に良く保存されている領域であり、HCV の複製にとっては重要な部位であると推測されている^{9,11)}。この部位は HCV に幾つもの亜型が存在するものの保存性が高い部分であるので、その部位由来のエピトープを抗原抗体系に用いることは C 型肝炎の診断には最適と考える。

したがって筆者は HCV 遺伝子がコードするポリペプチドのうちコア領域の第一から第二の親水性領域にほぼ一致する 34 個の合成ペプチド (N 14 E plus *19-*40) を作成し、この合成ペプチドを用いた ELISA 系を確立しその有用性について検討した。

実験方法

対象は、平成 2 年から平成 4 年までに鹿児島大学第 2 内科およびその関連施設を受診した 1359 名である。その内訳は、非 A 非 B 型急性肝炎 16 例(散発性 12 例 男性 6 例、女性 6 例、輸血後 4 例男性 2 例、女性 2 例) 非 A 非 B 型慢性肝炎 107 例 (男性 55 例、女性 52 例)

Table 1 Detection of Anti-N14E plus *19-*40 in patients with chronic liver disease.

	No. of patients	positive (%)
Chronic hepatitis		
NANB	107	101 (94.4%)
B	31	5 (16.1%)
Liver Cirrhosis		
NANB	31	25 (80.6%)
B	21	2 (9.6%)
Hepatocellular Carcinoma		
NANB	40	35 (87.5%)
B	6	0 (0%)

Anti-N14E plus *19-*40 shows a high positive rate in non-A non-B chronic liver diseases. The positive rate is low in type B chronic liver diseases, the control. This shows that Anti-N14E plus *19-*40 is highly specific.

非 A 非 B 型肝硬変症 31 例 (男性 12 例、女性 19 例)、非 A 非 B 型肝癌 40 例 (男性 28 例 女性 12 例) である。その輸血の有無であるが、非 A 非 B 型慢性肝炎のうち輸血を受けたものは、26 例 (男性 10 例 18.2 %、女性 16 例 30.8%) で、非 A 非 B 型肝硬変症では 3 例 (男性 1 例 8.3%、女性 2 例 10.5%) 非 A 非 B 型肝癌 10 例 (男性 7 例 25%、女性 3 例 25%) である (Table 1)。

非 A 非 B 型肝炎以外の対象は、B 型慢性肝炎 31 例 (男性 17 例 女性 14 例)、B 型肝硬変症 21 例 (男性 14 例 女性 7 例)、B 型肝癌 6 例 (男性 3 例 女性 3 例) B 型急性肝炎 8 例 (男性 5 例 女性 3 例) 急性 A 型肝炎 6 例 (男性 4 例 女性 2 例) 原発性胆汁性肝硬変症 14 例(全例女性)薬剤性肝障害 5 例(男性 2 例 女性 3 例)、脂肪肝 10 例 (男性 7 例 女性 3 例) の計 101 例である (Table 2)。

また、N 14 E plus *19-*40 抗体と N 14 抗体、C 100-3 抗体、HCV-RNA との関連性を検討するためにミドリ十字社の御厚意により提供された GPT 高値、HBsAg 陰性検体の 155 例を用いた。これを、N 14 抗体、C 100-3 抗体によって以下のように 5 群に分類した。

- N 14 抗体(+) C 100-3 抗体(+) 24 検体、
- N 14 抗体(+) C 100-3 抗体(-) 29 検体、
- N 14 抗体(-) C 100-3 抗体(+) 30 検体、
- N 14 抗体(-) C 100-3 抗体(-) HCV RNA (+)

Table 2 Detection of Anti-N 14 E plus *19-*40 in patients with chronic liver diseases and healthy donors.

	No. of patients	positive (%)
PBC*	14	3 (21.4%)
Fatty liver	10	0 (0%)
Drug induced hepatitis	5	0 (0%)
Acute hepatitis (type A)	6	0 (0%)
Healthy donors	706	23 (3.26%)

*primary biliary cirrhosis

The positive rate was 21.4% in patients with primary biliary cirrhosis. Specificity due to inhibition test was confirmed in all cases. Positivity was not found in fatty liver, drug induced hepatitis and type A acute hepatitis. In summary, the high specificity of anti-N14E plus *19-*40 was confirmed.

40 検体

N 14 抗体(-) C 100-3 抗体(-) HCV RNA(-)

32 検体

その他に healthy blood donor 706 例と人間ドックを受診した HBsAg 陰性の肝機能異常者 113 例, カットオフ値の設定のために輸血歴・黄疸歴がなく HBsAg 陰性の肝機能正常者 90 例についても測定を行った。

慢性肝炎と肝硬変症の診断は, 腹腔鏡所見や肝生検による組織診とともに, 超音波検査, 臨床所見において行った。B 型慢性肝疾患および A 型急性肝炎患者は血液生化学的, ウイルス学的に確定診断されたものを対象とし, 原発性胆汁性肝硬変症は, 厚生省難治性の肝炎調査研究班の診断基準に基づいて診断したものを対象とした。

I. HCV 抗体の測定

1. N 14 抗体の測定: N 14 抗原固相化プレートを用いた ELISA 法 (Kuraray より供与) で行った。また HBsAg 陰性, ALT 50 以上の献血者については, Immunoblot 法にて行った。ELISA 法におけるカットオフ値は, 各プレート毎に $0.400 + NCx$ (陰性コントロールの平均) とし Cut-off index 1.0 以上のものを陽性とした。

2. C 100-3 抗体の測定: Ortho 社製キットを用いて行った。カットオフ値は, 0.450 とし Cut-off index 1.0 以上のものを陽性とした。

3. HCV EIA II の測定: Abbott 社製キットを用いてビーズ法を用いる EIA 法で行った。カットオフ値は, 各プレート毎に $NCx + 0.25 \times PCx$ (NCx: 陰性コントロールの平均 PCx: 陽性コントロールの平均) とし Cut-off index 1.0 以上のものを陽性とした。

II. 血中 HCV RNA の検出³⁸⁾

HCV 感染者の血中 HCV-RNA の検出は以下の方法で行った。被検者血漿 1 ml から RNA を検出し, reverse transcriptase を用いて cDNA に逆転写した。HCV の NS 5 region から作製した sense, anti-sense 1 組のプライマーを用いて first-stage で 50 Cycles の PCR (polymerase chain reaction) を行い測定した。用いた sense primer の塩基配列は, TGGGGATCCCGTATGATACCCGCTGCTTTGA で, anti-sense primer の塩基配列は, GGCGGAATT-CCTGGTCATAGCTCCGTGAA である。

III. ペプチド (N 14 E plus *19-*40) の合成

N 14 E plus *19-*40 のペプチド合成は(株)ペプチド研究所にて, 固相法 (Applied biosystems) ²²⁾ で行っ

た。その生成物はアミノ酸分析および HPLC (Hign Performance Liquid Chromatography) により純粋な物質であることが確認されている。

IV. N 14 E plus *19-*40 固相化プレートの作成

N 14 E plus *19-*40 固相化プレート作成は, 以下のように行った。N 14 E plus *19-*40 を脱気した固相化バッファー (20 mM Tris-HCl, pH 7.2, 150 mM NaCl, 12.5% sucrose) にて $4 \mu\text{g/ml}$ となるように調整した。固相化用プレート (Nunc Maxisorp 96 F, Intermed corp) に 1 ウェルあたり $250 \mu\text{l}$ 加え 4°C で overnight で固相化した。次に, 脱気後のブロッキング液 (12.5 mM PB, pH 7.2, 150 mM NaCl, 12.5% sucrose, goat serum) を 1 ウェルあたり $300 \mu\text{l}$ 加え 25°C , overnight でインキューベートした。その後, ブロッキング液を捨てプレートから完全に除去し 25°C で一晚乾燥させた。

V. 検体の測定

検体の測定は Fig 1 に示すように行った。前希釈として, 96 穴プレートの各ウェルに検体希釈液 (50 mM phosphate buffer, PH 7.1, 450 mM NaCl, goat serum, Thimerosal, Tween 20) を $200 \mu\text{l}$ 加え, 各ウェルに $20 \mu\text{l}$ の検体をピペットにて 4 回攪拌しながら加えた。この 11 倍希釈血清 $200 \mu\text{l}$ を 12 チャンネルのマルチピペッターで N 14 E plus *19-*40 固相化プレートの各ウェルに加えプレートシーラー (三光純薬) でカバーし 37°C で 1 時間インキューベートし, 1 次反応を行った。洗浄剤 (20 mM phosphate sodium buffer,

Add dilutions of patient sera at 1/11.
↓
Incubate for an hour at 37°C .
↓
Wash five times.
↓
Add HRP* conjugated anti-IgG at 1/20000 dilution and incubate for an hour at 37°C .
↓
Wash five times.
↓
Add $200 \mu\text{l/well}$ of OPD** substrate and incubate at room temperature for 30 minutes.
↓
Stop enzyme reaction by adding $50 \mu\text{l}$ 4N H_2SO_4 /well.
↓
Measure absorbance at 492 nm.

Fig. 1 ELISA for N14E plus *19-*40

* horseradish peroxidase

**phenylenediamine dihydrochloride

N 14 E plus [#]19-[#]40抗体体系の特異性を検討するために非 A 非 B 型慢性肝炎患以外の疾患においても検討を行った。その結果、急性 B 型肝炎で 0% (0/8), B 型慢性肝疾患では、慢性肝炎で 16.1% (5/31), 肝硬変症で 9.6% (2/21), 肝癌で 0% (0/6) の陽性率であった。A 型急性肝炎では 0% (0/6), 原発性胆汁性肝硬変

C	E1	E2/NS1	NS2	NS3	NS4	NS5
---	----	--------	-----	-----	-----	-----

☐ N14E plus *19-⁴⁰

☐ N14

☐ C100-3

☐

☐ ☐ HCV EIA II

Fig. 4 HCV genome and localization of epitopes in N14E plus *19-⁴⁰, N14, C100-3, and HCV EIA II

N14E plus *19-⁴⁰ is almost consistent with the HCV core region. N14 corresponds to the HCV core region, C100-3 to NS3-NS4 and HCV EIA II to the core region and nonstructural region respectively.

症で21.4% (3/14), 脂肪肝では0% (0/10), 薬剤性肝障害では0% (0/5) の陽性率であり特異性は高かった。

IV. HBsAg (-), ALT 50 以上の献血者における HCV 抗体測定 (Table 3)

HBsAg (-), ALT 50 以上の献血者血漿を N 14 抗体と C 100-3 抗体の陽性と陰性の組合せにより 5 群に分け, それぞれ N 14 E plus *19-⁴⁰ 抗体の陽性率の検討をした。その結果, N 14 抗体 (+) C 100-3 抗体 (+) で 100% (24/24), N 14 抗体 (+) C 100-3 抗体 (-) で 100% (29/29), N 14 抗体 (-) C 100-3 抗体 (+) で 60% (24/30) であり, とくにその群における HCV RNA (+) の症例では 84.6% (11/13) で, HCV 感染との関連が明確に示唆された。また, N 14 抗体 (-) C 100-3 抗体 (-) HCV RNA (+) 57.5% (23/

Table 3 Prevalence of anti-N 14 E plus *19-⁴⁰ in paid donors

	n	%positive
N 14+C 100-3 ⁺	24	100
N 14+C 100-3 ⁻	29	100
N 14-C 100-3 ⁺	30	60
N 14-C 100-3-HCVRNA ⁺	40	57.5
N 14-C 100-3-HCVRNA ⁻	32	6.3

Anti-N 14 E plus *19-⁴⁰ was detected at a highly percentage in donors negative to anti-N 14 or antiC 100-3.

40), N 14 抗体 (-) C 100-3 抗体 (-) HCV RNA (-) 6.3% (2/32) の陽性率であった。

V. 第 1 世代の HCV 抗体 (N 14 抗体, C 100-3 抗体) との比較

1. N 14 E plus *19-⁴⁰ 抗体と N 14 抗体の相関 (Table 4)

非 A 非 B 型慢性肝疾患について相関をみると慢性肝炎で N 14 E plus *19-⁴⁰ 抗体と N 14 抗体両者とも陽性が 75.8% (69/91) と最も多く, N 14 E plus *19-⁴⁰ 抗体単独陽性が 17.5% (16/91) 両抗体陰性が 6.7% (6/91), N 14 抗体単独陽性が 0% (0/91) であった。非 A 非 B 型肝硬変症 25 例においても N 14 E plus *19-⁴⁰ 抗体と N 14 抗体両者とも陽性が 56.0% (14/25) と最も多く, N 14 E plus *19-⁴⁰ 抗体単独陽性が 20.0% (5/25) 両抗体陰性が 24.0% (6/25) であった。同様に非 A 非 B 型肝癌 26 例においても N 14 E plus *19-⁴⁰ 抗体と N 14 抗体両方とも陽性が 77.0% (20/26) と最も多く, N 14 E plus *19-⁴⁰ 抗体単独陽性が 11.5% (3/26) 両抗体陰性が 11.5% (3/26) であった。両抗体陽性が各群で最も多く, N 14 抗体陰性群

Table 4 Detection of anti-N 14 E plus *19-⁴⁰ and anti-N 14 in patients with chronic NANB liver disease

	No. of patients	Anti-N 14 E plus *19- ⁴⁰ /Anti-N 14			
		+ / +	+ / -	- / +	- / -
Chronic hepatitis	91	69 (75.8%)	16 (17.5%)	0 (0%)	6 (6.7%)
Liver cirrhosis	25	14 (56.0%)	5 (20.0%)	0 (0%)	6 (24.0%)
Hepatocellular carcinoma	26	20 (77.0%)	3 (11.5%)	0 (0%)	3 (11.5%)
Total	142	103	24	0	15

The sensitivity rose by 17.5% for chronic hepatitis, 20.0% for liver cirrhosis, 11.5% for hepatocellular carcinoma in non-A non-B chronic liver diseases negative to anti-N 14.

Table 5 Detection of anti-N 14 E plus *19-*40 and anti-C 100-3 in patients with chronic NANB liver disease

	No. of patients	Anti-N 14 E plus *19-*40/Anti-C 100-3			
		+ / +	+ / -	- / +	- / -
Chronic hepatitis	85	61 (71.8%)	18 (21.1%)	4 (4.7%)	2 (2.4%)
Liver cirrhosis	25	18 (72.0%)	2 (8.0%)	2 (8.0%)	3 (12.0%)
Hepatocellular carcinoma	24	18 (75.0%)	4 (16.6%)	1 (4.2%)	1 (4.2%)
Total	134	97	24	7	6

The sensitivity rose by 21.1% for chronic hepatitis, 8.0% for liver cirrhosis, 16.6% for hepatocellular carcinoma in non-A non-B chronic liver diseases negative to anti-C 100-3.

においても N 14 E plus *19-*40 抗体の陽性例が高率に検出された。

2. N 14 E plus *19-*40 抗体と C 100-3 抗体の相関 (Table 5)

非 A 非 B 型慢性肝疾患 85 例について両抗体の相関をみると慢性肝炎で N 14 E plus *19-*40 抗体と C 100-3 抗体両者ともに陽性が 71.8% (61/85), N 14 E plus *19-*40 抗体単独陽性が 21.1% (18/85), C 100-3 抗体単独陽性が 4.7% (4/85), 両抗体陰性が 2.4% (2/85) であった。肝硬変症でも N 14 E plus *19-*40 抗体と C 100-3 抗体両者ともに陽性が 72.0% (18/25), N 14 E plus *19-*40 抗体単独陽性が 8.0% (2/25), C 100-3 抗体単独陽性が 8.0% (2/25) 両抗体陰性が 12.0% (3/25) であった。同様に肝癌では N 14 E plus *19-*40 抗体と C 100-3 抗体両者ともに陽性が 75.0% (18/24), N 14 E plus *19-*40 抗体単独陽性が 16.6% (4/24) C 100-3 抗体単独陽性が 4.2% (1/24) 両抗体陰性が 4.2% (1/24) であった。両抗体陽性が各群で最も多く, C 100-3 抗体陰性群においても N 14 E plus *19-*40 陽性が高率に検出された。

VI. 第 2 世代 HCV EIA II (Abbott) との比較 (Table 6, 7)

N 14 E plus *19-*40 抗体と HCV EIA II (Abbott) の一致率は, 95.6% (108/113) であり, 解離例は, 113 例中 5 例 (4.4%) に認められた。この解離例について HCVRNA の検出を行ったところ 5 例中 1 例 (20%) に HCVRNA が検出された。つまり N 14 E plus *19-*40 抗体の方が HCV 感染群での検出率において優っていた。HCV EIA II の Cut off index と N 14 E plus *19-*40 抗体の OD value はパラレルな関連性を有していた。

Table 6 Anti - N 14 E plus *19 - *40 and HCV EIAII in chronic liver disease

	N 14 E plus *19-*40	
	(+)	(-)
HCV EIAII (+)	23	0
(-)	5	85

The positive rate of Anti-N 14 E plus *19-*40 being consistent with HCV EIAII was 94.4% in non-B chronic liver disease. HCV RNA was detected in 20.0% of the cases positive to Anti-N 14 E plus *19-*40 alone.

考 察

従来, 除外診断に頼らざるを得なかった C 型肝炎の診断は, 1989 年の遺伝子工学的手法による HCV cDNA 分離の成功²⁾³⁾⁴⁾⁶⁾ 以来飛躍的に進歩を遂げ血清学的に診断が可能となった。HCV に関する基礎的研究も進み, HCV は約 9400 個の塩基を有する一本の+鎖 RNA ウイルスでありベスチウイルス属 (bovine viral diarrhea virus, hog cholera virus など), フラビウイルス属と近縁性がある²³⁾ と考えられている。HCV は, その遺伝子中に約 3010 のアミノ酸をコードする ORF (Open reading frame) を含んでおり, ORF は, 構造蛋白 (C, E1, NS1/E2) と非構造蛋白 (NS2, NS3, NS4, NS5) をコードする部分に分けられている²³⁾。さらにその他に 5'non-coding region と 3'non-coding region も存在することが示されている。コア蛋白領域は 191 個のアミノ酸から成り, 5'端から数えて #1-#120 のアミノ酸の中には Hydro-

Table 7 Anti-N 14 E plus *19-*40 and HCV EIA II (Abbott)

No. of patients	Age/Sex	Anti-N 14 E plus *19-*40 (OB value)	HCV EIA II (Abbott) (Cut off index)	ALT
1	48/M	1.238 +	5< +	77
2	56/M	0.728 +	3.7 +	71
3	53/F	0.506 +	2.1 +	12
4	56/M	1.252 +	4.9 +	12
5	42/M	2.164 +	5< +	64
6	60/M	2.401 +	5< +	56
7	50/M	2.239 +	5< +	69
8	54/F	2.164 +	5< +	27
9	66/F	1.911 +	5< +	61
10	36/M	1.966 +	5< +	46
11	58/M	2.488 +	5< +	51
12	50/M	2.015 +	5< +	155
13	47/F	1.862 +	5< +	22
14	57/M	2.129 +	5< +	154
15	65/M	1.939 +	5< +	41
16	40/F	2.152 +	5< +	30
17	47/F	2.476 +	5< +	38
18	58/F	2.316 +	5< +	39
19	55/M	2.389 +	5< +	62
20	56/F	2.389 +	5< +	33
21	56/F	2.351 +	5< +	12
22	42/M	2.108 +	5< +	40
23	43/F	2.200 +	5< +	22

In chronic liver diseases positive to HCV EIA II, all cases were positive to anti-N 14 E plus *19-*40. Optical density was almost completely correlated with the cut-off index of HCV EIA II.

phobicity profile からみて 3 つの親水性の大きい領域が存在する²⁰⁾。またフラビウイルス属やペステウィルス属と同様にアルギニンなどの塩基性アミノ酸を多く有し糖鎖付加シグナルを有さない²³⁾。HCV 亜型において、この部位のアミノ酸配列の相同性は 96.8~98.4% と高い⁹⁾¹¹⁾ことが示されている。N 14 E plus *19-*40 のアミノ酸は米国株の大部分を占める HCV-1⁷⁾⁸⁾と比較すると 4 個、日本株の大部分を占める HC-J 4²⁷⁾とは 2 個異なっている。現在 C 型肝炎ウイルスゲノムの全塩基配列が、HCV-J¹⁷⁾、HCV-BK³¹⁾、HCV-1⁷⁾⁸⁾、HC-J 6²⁵⁾、HCV-H¹⁶⁾、HC-J 8、HC-J 1²⁶⁾、HC-J 4²⁶⁾と 8 種類報告されており、さらにそれらはそれぞれの特徴ある部分の塩基配列により 4 亜型に分けられている²⁷⁾。HCV-1 と HC-J 4 のコア領域について比較してみるとアミノ酸で 96.8%、塩基で 90.2% の相同性を示している。そのコア領域でも #8~#40 のアミノ酸について比較すると #9 と #11 の 2 個のアミノ酸が異なっているのみである。このようにコア領域は核酸配列ばかりではなくそれにより表現

されるアミノ酸配列はさらに保存性が高い。つまり、アミノ酸配列がほとんど同じであるためその部位のエピトープを HCV 抗体系に用いることは、亜型を越えて有用であると考えられる。さらに、この高い親水性領域は、表現蛋白にエピトープとして表出される可能性が高いことが推測される¹⁰⁾。

最近まで用いられてきた C 100-3 抗体検出系は、NS 3~NS 4 領域の分子量約 54 kDa である 363 アミノ酸を fusion protein として酵母プラスミドで発現させた抗原に対する抗体検出系である¹⁹⁾。しかしながら、C 100-3 抗体検出系にはとくに自己免疫性肝炎において非特異反応が存在し、それは C 100-3 抗原を得る際に用いた融合蛋白である SOD (superoxidase dismutase) に対する反応によることが示唆されている²¹⁾³⁹⁾。この C 100-3 抗体検出系に対し、有馬らは、独自に非 A 非 B 型慢性肝炎の患者血漿から非 A 非 B 型慢性肝炎に特異的な cDNA をクローニングし、大腸菌で発現することで、有馬 N 14 抗体検出系を作成した²⁾³⁾⁴⁾。そのクローニングした有馬 N 14 のエピトープ

解析によれば, QRKTKRSTNRR の 11 個のアミノ酸がとくに重要であると考えられ, このアミノ酸は HCV コア領域蛋白とほぼ一致している。有馬 N 14 抗体の疾患別陽性率は, 非 A 非 B 型慢性肝炎で 74.6%, 非 A 非 B 型肝炎硬変症で 56.8%, 非 A 非 B 型肝炎で 58.3% の陽性率であり, C 100-3 抗体に比し, 非 A 非 B 型肝炎硬変症・非 A 非 B 型肝炎では陽性率は低いものの非 A 非 B 型肝炎では高い³⁰⁾。急性 C 型肝炎において, コア抗体である有馬 N 14 抗体は C 100-3 抗体に比べ早期に出現するが, このことは HCV コア領域蛋白が非構造蛋白よりも早期に生体の免疫機構に認識されやすいと推測される。

合成ペプチドを用いる系は, レコンビナント抗原を用いる系と比較すると数々の利点を有している。第一には非特異反応を減らせるということである。つまり, レコンビナント抗原に含まれる host cell の Major Histocompatibility 抗原や内因性の細菌蛋白に対する抗体が非特異反応をきたすことがあるが, 合成ペプチドを用いる系ではこれらの要素は完全に排除できる。事実, 対照疾患である A 型急性肝炎, 薬剤性肝障害, 脂肪肝に陽性例は認められていない。また B 型慢性肝炎, B 型肝炎硬変症にはそれぞれ 16.1% (5/31), 9.6% (2/21) で陽性であったが, その陽性例すべて Inhibition test で N 14 E plus *19-#40 の特異性が確認でき B 型肝炎ウイルスと C 型肝炎ウイルスの重感染であることが証明された。次に抗原が比較的安価で容易に, しかも大量に得られる点である。34 アミノ酸から成る N 14 E plus *19-#40 は固相法により容易に合成でき, 再現性でも優れている。さらには, シグナル/カットオフ値の分布で, 反応サンプル群と非反応サンプル群の間に広いという特徴を有しており, これも非特異反応を減らせるという点で有利である。合成ペプチドを用いた ELISA 系は, 至適な免疫反応領域を選択することが出来れば特異的にその抗体を検出可能なこととすでに HIV, HTLV-1, HTLV-2 の抗体系に合成ペプチドを用いたイムノアッセイが応用されて³⁸⁾ 示されている。

以上の利点があるので, 合成ペプチドを用いた HCV ELISA 系を確立した。技術的に長い合成ペプチドを作製できないので, 抗原性の存在するとされる有馬 N 14 の 11 アミノ酸からなるエピトープ (QRKTKRSTNRR) に HCV-1 のコア蛋白の # 19 から # 40 を加えた 34 アミノ酸の合成ペプチド N 14 E plus *19-#40 を抗原として用いた。N 14 E plus *19-#40 に相当する HCV コア領域は, 前半 (アミノ酸 1~28) は強い第

一の親水性領域であり, 後半 (アミノ酸 29~40) は疎水性領域および第二の親水性領域の一部である。この合成ペプチドを抗原とし, ELISA を確立し, 各種肝炎疾患での評価を行った。その結果, 非 A 非 B 型慢性肝炎において慢性肝炎で 94.4% (101/107), 肝硬変症で 80.6% (25/31), 肝癌で 87.5% (35/40) の陽性率であり, きわめて良好な成績であった。C 100-3 抗体や N 14 抗体と比較しても明らかに感度は向上していた。C 100-3 抗体, N 14 抗体は慢性肝炎, 肝硬変症, 肝癌と病態が進むにつれその陽性率が低下するが, N 14 E plus *19-#40 抗体も同様な傾向を認めた。また HBsAg (一) で ALT 50 以上の献血者血漿を用いての結果において, N 14 E plus *19-#40 抗体の陽性率は C 100-3 抗体陰性, HCV-RNA (+) の群で 73% (46/73), N 14 抗体陰性, HCV-RNA (+) の群で 82.3% (42/51), 両抗体陰性, HCV-RNA (+) の群で 60.0% (24/60) であった。このことは, N 14 E plus *19-#40 抗体系は C 100-3 抗体系, N 14 抗体系に比べ, より高い感度を持ち特異性が高いことを示している。N 14 E plus *19-#40 には, 少なくとも 2 つ以上の免疫認識にとって重要なエピトープが含まれていると考えられ, C 型肝炎の診断にとって有用である。これは従来の C 100-3 抗体系や N 14 抗体系などの HCV 抗体系では診断できず見逃していた C 型肝炎を拾い上げ得ることができ, 今回の合成ペプチドにより感度の向上に成功したと考えられる。以上から C 型肝炎診断能が高いので, 献血者での HCV 感染のスクリーニングには, 最適と考えられる。

HCV のアミノ酸配列の公開¹²⁾以降, それらの一部を用いて多施設において様々な合成ペプチドを用いた HCV 抗体検出系の報告がなされた。岡本らは, HCV-1⁷⁸⁾ のコア領域アミノ酸のうち, その疎水性曲線から第二の親水性領域にほぼ一致する 36 個のアミノ酸から成る合成ペプチド CP 9 を作成し, その合成ペプチド CP 9 に対する抗体系を ELISA 系により検討した²⁵⁾。N 14 E plus *19-#40 と CP 9 を比較してみると, アミノ酸の数では N 14 E plus *19-#40 が 34 アミノ酸と 2 個少なく, またアミノ酸配列については, 2 個のアミノ酸が一致しているのみである。その CP 9 抗体系の結果において, その陽性率は, 非 A 非 B 型慢性肝炎で 77%, 非 A 非 B 型肝炎硬変症で 62%, 非 A 非 B 型肝炎で 76% であった。これは N 14 E plus *19-#40 抗体系の結果と比較すると陽性率は劣っている。同様にコア領域の第一の親水性領域からも CP 10 抗体系²⁸⁾ を作成したが, N 14 E plus *19-#40 とのアミノ酸の比較で

は、その15アミノ酸が一致している。CP 10はCP 9に比べると非A非B型慢性肝疾患において約20%の感度の上昇が認められており、CP 9抗体系とCP 10抗体系の比較から、第一の親水性領域の方が第二の親水性領域より抗原性が強力であることを示している。N 14 E plus *19-*40抗体系は、第一の親水性領域と第二の親水性領域を含んだ系であるので、複数のエピトープの存在が感度の上昇をもたらしていると考えられる。C型肝炎ウイルスはきわめて変異を起こし易いウイルスであることが知られている。結城らは²⁷⁾ HCV 遺伝子がコードするポリペプチド上の6カ所の合成ペプチドの抗体系に関してELISA系を作成した。その結果、HCVの抗原エピトープは抗原性の強弱はあるものHCV上に広く分布しているとしている。C 100-3抗体やN 14抗体のみの単独で診断することは困難であると考えられる。

そのために感度向上を目指しコア蛋白および非構造蛋白をつなぎ合わせたりコンビナント抗原の第2世代HCV抗体系について開発が進み、それによって診断能の向上がみられるようになった¹⁴⁾。第2世代HCV抗体のEIA法は定量性はあるが手技が煩雑であり、PHA法は簡便ではあるが定量性がなく客観性に乏しいという短所がある。第2世代の抗体系(HCV EIA II Abbott)は、コア蛋白(pHCV-34)とNS 3 (33c)、NS 4(BCD)を繋ぎ合わせたものである。HCV EIA IIの陽性は大部分の場合は持続感染状態を反映するが厳密に言えば一部においては感染既往を示す可能性も存在する。HBsAg(-)の慢性肝機能障害者113例についてN 14 E plus *19-*40抗体とHCV EIA II (Abbott)の陽性率の比較も行った。その結果、HCV EIA II陽性例23例については全例結果は一致し、そのCut off indexとN 14 E plus *19-*40抗体のOD valueがパラレルな動きを示した。一方HCV EIA II陰性例90例中5例(5.6%)にN 14 E plus *19-*40抗体陽性が認められた。この陽性例にPCR法によるHCV-RNAの検出を行ったところ5例中1例(20.0%)に陽性が認められた。このように解離例が存在した事実は、抗体検出系に用いたエピトープの違いによるものと考えられた。以上のHCV EIA IIとの比較から、N 14 E plus *19-*40抗体系は、鋭敏性、特異性、簡便性、経済性において、HCV EIA IIと同等もしくはそれ以上の有用性があると考えられた。

1989年にHCVの遺伝の1部分が発見されて以来、HCVに関する研究は急速に進歩し、数多くのHCV抗体系が報告されてきた。しかしながら、その大部分

のHCV抗体系は、特異性や鋭敏性の点で満足できるものでなかった。とくにコンビナント抗原を用いるHCV抗体系では、発現抗原の立体構造がwild typeと異なっていたり、抗原発現の際の融合蛋白によって非特異反応が出現する可能性が存在する。HCV抗原系の確立していない現在、確定診断として行われるPCRによるHCV-RNAの検出はone-stage, two stageであれ、感受性が高く特異的である反面、厳密な保存を必要とすることや測定手技の煩雑さであることなどいくつかの欠点がある。したがって、大量の検体を対象としての測定の方法としては決してふさわしくなく、抗体の血清学的診断の方がより有用である。

筆者は、HCVコア領域の合成ペプチドN 14 E plus *19-*40を用いる抗体のELISA系を確立し、その結果HCV感染の患者の血清中のHCVに対する抗体を非常によく検出することが出来た。この結果が示すようにC型肝炎の診断率の向上や献血者スクリーニングにおいて感度の向上を認めることができ有用であった。N 14 E plus *19-*40抗体は、第1世代のHCV抗体系に優るばかりでなく第2世代のHCV抗体に比肩できるものであり、先に述べたようにHCV抗原検出系が確立されていない現在はその経済性や簡便性からもC型肝炎の診断や献血者のスクリーニングに非常に適したものと結論できる。この応用によりC型肝炎の診断能の向上ばかりでなく輸血後肝炎の発生を大幅に減少できる可能性が大きい。

結 語

HCV感染症の診断の向上のためにHCVコア領域の合成ペプチドであるN 14 E plus *19-*40のELISAを用いC 100-3抗体、N 14抗体、HCV EIA IIと比較し、その有用性について評価した。N 14 E plus *19-*40は、エピトープを形成するHCVコア領域の初めの二つの親水性領域を含む34アミノ酸から成っている。N 14 E plus *19-*40抗体検出系を用いると、このHCV抗体は非A非B型慢性肝炎で94.4%非A非B型肝炎硬変症で80.6%非A非B型肝炎癌で87.5%に検出できた。この抗体検出系は、この地域の患者を検査した限りではC 100-3抗体やN 14抗体より感度が高いようである。HCV EIA II陰性慢性肝疾患の患者のうち5.6%(5/90)が陽性であり、これらの5人のうち1人はHCV RNA陽性であった。さらに、N 14 E plus *19-*40抗体はHBsAg陰性、C 100-3抗体、N 14抗体共に陰性、HCV RNAが陽性でALT 50以上の40例の献血者において、57.5%に検出できた。

これらの結果は、N 14 E plus *19-*40抗体が HCV EIA II と同様に HCV 感染患者の検出に有用であり、N 14 E plus *19-*40抗体系を用いることによって C 型肝炎の診断能は向上し C 型輸血後肝炎を減少させ得るということを示唆する。

稿を終えるにあたり御指導、御校閲賜りました鹿児島大学第二内科有馬暉勝教授に深く感謝致します。また本研究の場所を提供して頂いた県民総合保健センター所長尾辻義人先生に深く感謝致します。さらに終始御指導を賜りました霜出義輝博士、前田栄樹博士、宮崎医科大学第二内科坪内博仁教授、御協力頂きました教室の諸先生、研究補助員の中堂園美智子氏、県民総合保健センター生化学検査室楠元一秋氏、尾辻誠氏に深く感謝致します。また、本研究に協力いただいたクラレ中央研究所の諸氏に深謝致します。

なお本論文の要旨は、第 78 回日本消化器病学会総会 (92.4 東京) で発表した。また厚生省「基礎研究班」ガン研究助成金平成三年度報告会—C 型肝炎と肝臓に関する研究 (91.10 東京) および厚生省「非 A 非 B 型肝炎研究班」平成三年度報告会 (92.1 東京) で発表した。

文 献

- 1) Aceti A and Taliani G: Hepatitis C virus antibodies in parasitic infections. *Ann Intern Med.* 113: 560, 1990.
- 2) Arima T, Mori C, Takamizawa A, Shimomura H and Tsuji T: A cDNA clone encoding a peptide highly specific for hepatitis C infection. *Gastroenterol Jpn.* 25: 1111, 1990.
- 3) 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.
- 4) Arima T, Takamizawa A, Mori C, Murakami S, Kaji C and Fujita J: A lambda gt11-cDNA clone specific for chronic hepatitis C generated from pooled serum presumably infected by hepatitis C virus. *Gastroenterol Jpn.* 24: 545-548, 1989.
- 5) Barbara H, Chyang TF, Mark AP, John Y, Meilun Z and Chang YG: Improved serodiagnosis of hepatitis C virus infection with synthetic peptide antigen from capsid protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 3647-3651, 1991.
- 6) Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW and Houghton M: Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* 244: 359-362, 1989.
- 7) Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby A, Barr PJ, Weiner AJ, Bradley DW, Kuo G and Houghton M: Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88: 2451-2455, 1991.
- 8) Han JH, Shyamala V, Richman KH, Brauer MJ, Irvine B, Urdea MS, Takamp-Olson P, Kuo G, Choo QL and Houghton M: Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA. Identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88: 1711-1715, 1991.
- 9) 本多政夫: 5 症例より得られた C 型肝炎ウイルスの構造遺伝子解析と、その多様性について。肝臓。32: 1101-1109, 1991.
- 10) Hopp T and Woods KR: Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 3824-3828, 1981.
- 11) Houghton M, Weiner A, Han J, Kuo G and Choo QL: Molecular biology of the hepatitis C viruses: Implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology.* 14: 382-388, 1991.
- 12) Houghton M, Choo QL and Kuo G: NANBV Diagnostics and Vaccines. European Patent Application 88310992.5, European Patent Office
- 13) Housset C, Hirschauer C and Degos F: False-positive anti-HCV in primary biliary cirrhosis. *Ann Intern Med.* 114: 251, 1991.
- 14) 飯野四郎, 小池和彦, 安田清美, 日野邦彦: 第二世代の HCV 関連抗体測定キット HCV EIA II の検討。医学と薬学。26: 87-95, 1991.
- 15) Ikeda Y: Antibody to superoxide dismutase, autoimmune hepatitis, and antibody test for hepatitis C virus. *Lancet.* 1: 1345-1346, 1990.
- 16) Inchauspe G, Zebadee S, Dong-Hun Lee, Sugitani M, Nasoff M and Prince AM: Genomic structure of the human prototype strain H of hepatitis C virus: Comparison with American and Japanese isolate. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88: 10292-10296, 1991.
- 17) Kato N, Hijikata M, Ootsuyama, Nakagawa M, Ohkoshi S, Sugimura T and Shimotohno K: Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87: 9524-9528, 1990.
- 18) Kubo Y, Takeuti K, Boonmar S, Katayama T, Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Bradley DW, Houghton M, Sato I and Miyamura T: A cDNA fragment of hepatitis C virus isolated from an implicated donor of post-transfusion non-A, non-B hepatitis in Japan. *Nucleic Acids Res.* 17: 10367-10372, 1989.
- 19) Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Overby LR, Bradley DW and Houghton M: Assay for circu-

lating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*. 244: 362-364, 1989.

20) Kyte J and Doolittle RF: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*. 157: 105-132, 1982.

21) Macfarlane IG, Smith HM, Johnson PJ, Bray GP, Vergani D and Williams R: Hepatitis C virus antibodies in chronic active hepatitis: pathogenetic factor or false positive? *Lancet*. 1: 754-757, 1990.

22) Merrifield RB: Solid-phase peptide synthesis. *Adv. Enzymol.* 32: 221-296, 1969.

23) Miller RH and Purcell RH: Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87: 2057-2061, 1990.

24) Okamoto H, Mune-kata E, Tsuda F, Takahashi K, Yotsumoto S, Tanaka T, Tachibana K, Akahane Y, Sugai Y, Miyazawa Y and Mayumi M: Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies against the capsid protein of hepatitis C virus with a synthetic oligopeptide. *Jpn J Exp Med*. 60: 223-233, 1990.

25) Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Kurai K, Iizuka H, Machida A, Miyazawa Y and Mayumi M: Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: comparison with reported isolates for conserved and divergent regions. *J. gen virol.* 72: 2697-2704, 1991.

26) Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Yotsumoto S, Tsunaka 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, 1991.

27) Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, Kurai K, Akahane Y, Sugai Y, Tanaka T, Sato K, Tsuda F, Miyakawa Y and Mayumi M: Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J. Gen. Virol.* 73: 673-679, 1992.

28) Okamoto H, Tsuda F, Machida A, Mune-kata E, Akahane H and Mayumi M: Antibodies against synthetic oligopeptides deduced from the putative core gene for the diagnosis of hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 15(2): 180-186, 1992.

29) Sherman KE, Freeman S, Harrison S and Andron L: Prevalence of antibody to hepatitis C virus in patients with the human immunodeficiency virus. *J Infect Dis*. 163: 414-415, 1991.

30) 庄 幸彦, 前田栄樹, 有馬暉勝: ARIMA クロ

ーンの塩基配列と表現ペプチド, 合成ペプチドの抗原性. *日本臨床* 49(2): 65-69, 1991.

31) Takamizawa A, Mori C, Fuke I, Manabe S, Murakami S, Fujita J, Onishi E, Andoh T, Yoshida I and Okayama H: Structural and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol*. 65: 1105-1113, 1991.

32) Takeuti K, Boonmar S, Kubo Y, Katayama T, Harada H, Ohbayashi A, Choo QL, Kuo G, Houghton M, Saito I and Miyamura T: Hepatitis C viral cDNA clones isolated from a healthy carrier donor implicated in posttransfusion non-A, non-B hepatitis. *Gene*. 91: 287-291, 1990.

33) Takeuti K, Kubo Y and Boonmar S: Nucleotide sequence of core and envelope genes of the hepatitis C virus genome derived directly from human healthy carriers. *Nucleic Acids Res*. 18: 4626, 1990.

34) Takeuti K, Kubo Y, Boonmar S, Watanabe Y, Katayama T, Choo QL, Kuo G, Houghton M, Saito I and Miyamura T: The putative nucleocapsid and envelope protein genes of hepatitis C virus determined by comparison of the nucleotide sequence of two isolates derived from an experimentally infected chimpanzee and healthy human carriers. *J Gen Virol*. 71: 3027-3033, 1990.

35) Van der Poel CL, Reesink HW and Schaasberg W: Infectivity of blood seropositive for hepatitis C virus antibodies. *Lancet*. 335: 558-560, 1990.

36) Weiner AJ, Kuo G, Bradley DW, Bonino F, Saracco G, Lee C, Rosenblatt J, Choo QL and Houghton M: Detection of hepatitis C viral sequences in non-A non-B hepatitis. *Lancet*. 335: 1-3, 1990.

37) 結城暢一, 林 紀夫, 笠原彰紀, 萩原秀紀, 上田啓次, 片山和宏, 房本英之, 鎌田武信: 合成ペプチドを用いたC型肝炎ウイルス関連抗体の検討. *肝臓*. 32: 465-469, 1991.

38) Wang JJG, Steel S, Wisniewolski R and Wang CY: Detection of antibodies to human T-lymphotropic virus type III by using a synthetic peptide of 21 amino acid residues corresponding to a highly antigenic segment of gp41 envelope protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83: 6159-6163, 1986.

39) Wong DC, Diwan AR, Rosen L, Gerin JL, Johnson RG, Polito A and Purcell RH: Non-specificity of anti-HCV test for sero-epidemiological analysis. *Lancet*. 336: 750-751, 1990.

(受付 1993-3-17)