

非A非B型慢性肝疾患におけるY19抗体測定 of 臨床的意義

坂下, 博樹
鹿児島大学医学部第二内科学講座

<https://doi.org/10.15017/7331657>

出版情報 : 福岡醫學雑誌. 84 (4), pp.159-172, 1993-04-25. Fukuoka Medical Association
バージョン :
権利関係 :



非 A 非 B 型慢性肝疾患における Y 19 抗体測定 of 臨床的意義

鹿児島大学医学部第二内科学講座 (主任: 有馬暉勝教授)

坂 下 博 樹

Clinical Significance of Antibody to Y19 Protein in nonA and nonB Chronic Liver Disease

Hiroki SAKASHITA

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

Antibody against the recombinant protein Y19 deriving from non-structural region 3 (NS3) of the hepatitis C virus (HCV) genome was measured in the serum from 300 patients with nonA-nonB chronic liver disease including serial serum samples from these patients by using an enzyme linked immuno-sorbent assay. Simultaneously, antibodies to a synthetic core peptide (AR142) and the recombinant peptide of NS 3-4 region (C-100) were tested. Anti-Y19 antibody was detected in 83.3%, 65.2% and 76.6% of patients with nonA-nonB chronic hepatitis (n=144), liver cirrhosis (n=46) and hepatocellular carcinoma (n=43), respectively. In sera of other chronic liver disease, the detection rate of anti-Y19 antibody was significantly low comparing to nonA-nonB chronic liver disease. Positive rates of the patients for AR142 antibody and C-100 antibody were similar to the one for Y19 antibody. Patients positive for Y19 antibody have a tendency to be positive for C-100 antibody.

Serum Y19 antibody level during and after treatment with natural interferon alpha (IFN- α ; 5MU, 24 weeks) was studied in 33 patients with chronic hepatitis C. The effectiveness of IFN therapy did not correlate with the Y19 antibody level before the treatment. In most cases Y19 antibody level decreased relating to the improvement of the serum ALT level during the treatment. Y19 antibody level declined not only during IFN treatment but after the treatment in Responder group (as assessed by normal ALT for 6 months after the treatment; n=14). Whereas, in Non-responder group (the rest of Responder group; n=16) Y19 antibody level was maintained to the level at the end of the treatment or elevated again to the level before the treatment. In Responder group, 6 of 7 cases in whose serum HCV-RNA disappeared at 6 months after the treatment, had decrease of Y19 antibody to less than 20% of the pretreatment level and Y19 antibody became undetectable in 4 cases at 6 months after the treatment. One case in whom Y19 antibody did not decrease by the treatment had an increase of serum ALT level and a relapse of the disease at 12 months after the treatment. 5 of 6 cases in "Responder" group that HCV-RNA remained positive had more than 20% of Y19 antibody level of the pretreatment level at 6 months after the treatment. Therefore the decrease of Y19 antibody level was closely related to the efficacy in terms of serum ALT level and HCV-RNA level.

In conclusion, anti-Y19 antibody is specific for the detection of the chronic liver diseases caused by HCV and the measurement of anti-Y19 antibody level during and after the treatment with IFN is useful to evaluate the efficacy of IFN therapy for patients with chronic liver diseases caused by HCV.

緒 言

肝炎ウイルスの中でも A 型, B 型については, 多く

の研究によりウイルスおよびその抗原抗体系の解明が進んできた。しかし, 急性肝炎後高率に慢性化する非 A 非 B 型肝炎に関しては, その原因がウイルスである

ことは示唆されていたものの、従来の手法ではウイルス粒子そのものはいかに及ばず、その手がかりさえも捕まえられない状況であった。そのような中で、1989年、米国のカイロン社の Choo ら⁷⁾は非 A 非 B 型肝炎ウイルスに感染したチンパンジーの血清から非 A 非 B 型肝炎ウイルス遺伝子由来の cDNA をとりだすことに成功し、またほとんど同時期に本邦の Arima ら²⁾も非 A 非 B 型肝炎の患者血清より同じ方法で遺伝子断片を取り出すことに成功した。この非 A 非 B 型肝炎ウイルスは C 型肝炎ウイルス (hepatitis C virus; HCV) と命名され、本邦のみならず全世界で問題となっている非 A 非 B 型肝炎の大部分の原因となっていることがわかってきた¹⁾⁹⁾³¹⁾。この発見を機に HCV 遺伝子の解明は急速に進み³⁵⁾、我が国において HCV 遺伝子の全塩基配列がいくつかの施設から報告²³⁾⁴⁰⁾されるにつれ、C型肝炎ウイルスにはいくつかのサブタイプが存在することも明らかになった¹²⁾³⁷⁾。C型肝炎ウイルスの感染をより正確に診断するためにこれらの塩基配列をもとに作製された合成ペプチド³⁴⁾⁴⁵⁾や各種のリコンビナントペプチド²²⁾⁴²⁾⁴⁴⁾を用いて次々と新しい抗体系が確立され、臨床的に用いられるようになった。オーソ社による非構造領域 (NS 3-4) の C-100 抗体²⁷⁾や有馬らによって確立された core 領域の抗体である N-14 抗体²¹⁾²⁸⁾、さらにはアボット社の HCV-II 抗体¹⁸⁾が開発され、現在では一般施設においても測定できるようになり、C型肝炎の診断および献血血液のスクリーニングに用いられている。そのほかにもさまざまな施設より HCV のいろいろな部位のエピトープに対する抗体測定系の確立が試みられている。その抗原抗体系のもつ意味は別にしても、とくに HCV のスクリーニングに関しては HCV 遺伝子由来の複数のエピトープを組み合わせた測定系の有用性が認められており、HCV-II 抗体のほかにもいくつかの抗体測定系が一般的に用いられるようになってきている²⁰⁾。

最初にオーソ社によって開発された C-100 抗体により、C型肝炎の診断および献血血液のスクリーニングによる輸血後肝炎の減少など多大な成果が得られた³¹⁾が、研究が進むにつれ C-100 抗体だけでは診断能が不十分であること¹³⁾³²⁾、偽陽性の割合が高いこと⁴⁶⁾、さらに C 型急性肝炎においては発症後抗体出現までに期間がかりすぎることなどの問題点¹⁾¹⁵⁾⁴²⁾が指摘されていた。その問題点を解決するために開発されたアボット社の HCV-II 抗体 (第 2 世代) は、HCV 遺伝子の中でも変異が少ないとされている core 部位と NS-3 部位に対する抗体をとらえられるようになって

おり、それによって急性肝炎も含めて診断能は非常に高くなり⁴¹⁾⁴⁸⁾、また偽陽性の比率もかなり抑えられた³²⁾。

core 抗体としての N-14 抗体は、その研究の中でエピトープの違いにより C-100 抗体とは異なる有用性を持っていることがわかり⁶⁾²⁸⁾、またその解析が進むにつれ core 抗体の重要性が認識されるに至った。

一方、HCV の非構造領域の中でも NS 3 領域は flavivirus または pestivirus との遺伝子構造の類似性より helicase, protease などの酵素活性を担い、これらの酵素を介してウイルスの複製や蛋白発現に深く関与していると考えられており⁸⁾⁹⁾、さらにウイルス遺伝子の変異も少ない³³⁾⁴¹⁾ことから、この領域に存在するエピトープを用いた抗体測定系は診断能が高いことが期待される。現在実用化されつつある HCV 抗体系もこの core 領域か NS 3 領域のエピトープを含んでいるものが多い²⁰⁾。このように NS 3 領域は core 領域と並んで抗体診断上重要な位置を占めていると思われる⁴³⁾が、NS 3 領域に対する抗体の臨床的意義についてはまだ解明が十分ではないと思われる。今回、著者は非 A 非 B 型慢性肝炎患者血清よりイムノスクリーニング法を用いてクローニングされた NS 3 領域のクローン Y 19 (アミノ酸; 1384~1511, Fig. 1) に対する抗体を非 A 非 B 型慢性肝疾患を中心にした対象において測定し、NS 3 領域のエピトープに対する抗体の特異性および特殊性について検討した。また、core 領域の合成ペプチドである AR 142 (N-14 と同じエピトープをもつペプチド, Fig. 1) 抗体と C-100 抗体、HCV-RNA などについても測定し、比較検討した。

一方、1986 年に Hoofnagle ら¹⁷⁾や Arima ら²⁾によって非 A 非 B 型慢性肝炎にインターフェロン (IFN) が有効であることが報告されてからインターフェロン療法が一躍脚光を浴び¹⁰⁾²⁹⁾、現在では一般的な治療法として広く浸透しているにもかかわらず、まだ解決されなければならない問題点が多く残されていることも事実である。とくにインターフェロン療法の有効性の判定は今後検討されるべき主たる問題点である。現在の状況では、Transaminase の変動が IFN 治療効果判定の唯一の指標となっているが²⁵⁾、HCV 関連抗体を追跡検討した結果 C-100 抗体価²⁶⁾、あるいは N-14 抗体価³⁹⁾の変動が効果判定に有用であったという報告もある。今回、インターフェロン療法において、NS 3 領域の抗体である Y 19 抗体価を IFN 投与前、投与中、投与後に測定することにより、インターフェロン療法の効果判定のより有用な指標となりうるか否かも

Y 19

1384

1511

```

C: IPLEVTKGGRIHIFCHSKKKDELAALKSSSLGUNAURYRGLDUSIIPITSGDUUUATDALMTGYTGDFDSUI DONTOUTQTUOFSLDPTFTIETITLPQDAUSRTQRRGRTGRGKPGIYRFUAPGER
.....
Y: IPIEAIKGGRIHIFCHSKKKDELAALKSSSLGUNAURYRGLDUSIIPITSGDUUUATDALMTGYTGDFDSUI DONTOUTQTUOFSLDPTFTIETTTUPQDAUSRSQRRGRTGRGKGGIYRYUTPGER

```

C:Chiron sequence Y:Y19 peptide sequence Homology in amino-acid level : 92.2%

AR142

```

      1          10          20
HC-J1 CORE : - - - - - Q R K T K R N T N R R - - - - -
               . . . . .
AR142      :   K D R T Q R K T K R S T N R R R S K N E K K K K

```

Fig. 1 Amino acid sequence of Y19 peptide and AR142 peptide and comparison with Chiron sequence or HC-J1 sequence

検討した。

対 象

慢性肝疾患患者 300 例（非 A 非 B 型慢性肝炎 144 例，非 A 非 B 型肝硬変 46 例，非 A 非 B 型肝細胞癌 43 例，B 型慢性肝疾患 41 例，その他 26 例），コントロールとして正常者 206 例について NS3 領域由来のリコンビナント抗原である Y 19 に対する抗体を中心に HCV 関連抗体を測定した。また，C 型慢性肝炎患者 40 例に天然型 IFN- α を 24 週間投与（2 週間連続投与後間欠投与）し，IFN 投与前，投与中，投与後の Transaminase，HCV 関連抗体の推移と治療効果との関連について検討した。

方 法

1. Y 19 抗体

非 A 非 B 型慢性肝炎患者血清よりイムノスクリーニング法を用いて得られた NS3 領域由来のリコンビナントペプチド Y 19（カイロン社シークエンスに対する相同性：アミノ酸レベル 92.2%，Fig. 1）に対する抗体の ELISA 測定系を確立した。まず Y 19 ペプチドを固相化バッファー（20 mM Tris-HCl，100 mM NaCl（pH 7.5））で 2 μ g/ml に希釈して 100 μ l/well ずつ分注し 37°C 2 hr 静置後，ブロッキング液（20% ヤギ血清（Nippon Bio-Test Laboratories Inc.，Tokyo，Japan），20 mM リン酸ナトリウムバッファー（pH

7.2），150 mM NaCl，10% シュークロース）200 μ l を加え，さらに 37°C 2 hr 静置後減圧乾燥させて固相化プレートを作製した（クラレ社製）。検体血清 20 μ l を希釈液（1% ウシ血清アルブミン（Seikagaku Kogyo Co.，Ltd.，Tokyo，Japan），20 mM リン酸ナトリウムバッファー（pH 7.2），0.45 M NaCl，0.05% Tween 20（Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate））により 11 倍に希釈し，その 200 μ l を固相化抗原と 37°C，1 hr 反応させ，反応した HCV 関連抗体を西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG（Gamma Chain Specific，TAGO，Inc.，Burlingame，CA，U. S. A. + 10% ヤギ血清，20 mM Tris-HCl（pH 8.0），0.3 M NaCl，0.2% Tween 20）と 37°C，1 hr 反応させる酵素標識二抗体法を用いた。ペルオキシダーゼにより OPD（濃度 0.83 mg/ml；0.1 M クエン酸/リン酸バッファー（pH 5.1），0.01% H_2O_2 により溶解）を発色させ（25°C，30 min），4 N H_2SO_4 により反応停止後，プレートリーダー（ORGANON TEKNICA 社製，Reader 510）を用い 490 $\pm$ 2 nm にて吸光度を測定し O. D 値とした。cut off value（C. O. V.）は，正常検体 mean $\pm$ 2 SD の O. D. 値より C. O. V. = Negative control + 0.15 $\times$ Positive control を算出した。O. D. 値が C. O. V. 以上のものを陽性と判定した。また IFN 投与例では抗体価の高いものはそれぞれの検体を適宜希釈し，O. D. 値を測定後補正し cut off index（C. O. I.）で表した。IFN 投与時の抗体価の経

過追跡は Y 19 抗体価を IFN 投与前の抗体価に対する比率として表した。

2. AR 142 抗体

N-14 のエピトープ部位の両側に、数個のアミノ酸を加えた合成ペプチド AR 142 (Fig. 1) に対する抗体測定用の ELISA kit を用いた。測定方法は、Y 19 と同様で cut off value は正常検体の O.D 値より C.O.V.= Negative Control+0.22×Positive Control とし、O.D. 値が C.O.V. 以上を陽性とした。

3. C-100 抗体

オーソ HCV-Ab ELISA kit を用いて、通常の測定方法に従い抗体測定を行った。C.O.V. は C.O.V.= Negative Control+0.4 とした。IFN 投与例では定量による経過追跡を試みたために RIA 法により測定し、C.O.I.(INDEX 0.15=C.O.I.1)にて表した。IFN 投与例において抗体価の変動を比較する際は Y 19 抗体と同様に投与前の抗体価に対する比率として表した。

4. アボット第 2 世代抗体

アボット第 2 世代抗体検出系は所定の測定方法に従い PHA 法にて測定した。

5. PCR(polymerase chain reaction)

HCV-RNA の検出のため PCR 法を用いた。今回の PCR 法は、NS 5 領域または 5'-non coding region をプライマーとして RT-PCR 法¹²⁾、および RT-nested PCR 法³⁶⁾を用いた (Fig. 2)。IFN 投与例では RT-nested PCR 法を用いた。

効果判定については、厚生省判定基準²⁵⁾における著効例を Responder その他を Non-responder とした。

IFN 投与例における肝組織の組織学的分類はヨーロッパ分類を用いた。

有意差の検定は Fischer の直接確率、 χ^2 検定、Student t 検定を用いた。

RT-PCR

sense primer ; 5'-TGGGATCCCGATGATACCCCTGCTTTGA-3'

anti-sense primer ; 5'-GGCGGAATTCCTGTCATAGCCTCCGTA-3'

RT-nested PCR

5'non-coding region

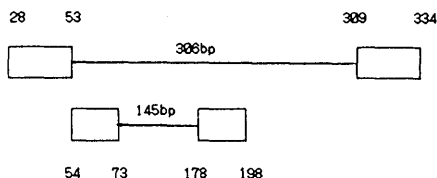


Fig. 2 Sequences of PCR primers used for detection of HCV-RNA. The primers of RT-PCR were chosen from portions of NS5 gene.

成 績

慢性肝障害を認めた 300 例のうち HCV 関連抗体陽性あるいは PCR 陽性の非 A 非 B 型慢性肝疾患 235 例を中心に Y 19 抗体を測定した。Y 19 抗体の陽性率は、非 A 非 B 型慢性肝炎 (NANB-CH; n=144), 非 A 非 B 型肝硬変 (NANB-LC; n=46), 非 A 非 B 型肝細胞癌 (NANB-HCC; n=43) にてそれぞれ 83.3%, 65.2%, 76.6% であり、非 A 非 B 型慢性肝疾患において高い陽性率を示した (Table 1)。それに対して、B 型慢性肝疾患 (n=41), アルコール性肝障害 (n=4), 脂肪肝 (n=5), 高 Y-グロブリン血症 (n=8) の患者血清では、陽性率は Table 1 に示すように低率であった。Y 19 抗体陽性 B 型慢性肝炎の 2 例は、他の HCV 関連抗体も陽性となっており B 型と C 型の重複感染と考えられた。また Y 19 抗体が陽性であったアルコール性肝炎の 1 例と原発性胆汁性肝硬変 (PBC; n=9) の 1 例はともに他の HCV 関連抗体も陽性であり、C 型

Table 1 Detection of Anti-Y19 antibody in chronic liver disease NANB; nonA-nonB type B; B type CH; chronic hepatitis, LC; liver cirrhosis HCC; hepatocellular carcinoma, FL; fatty liver PBC; primary biliary cirrhosis

NANB-CH	NANB-LC	NANB-HCC	B-CH	B-LC	B-HCC
83.3%	65.2%	76.6%	3.9%	0%	33.3%
(120/144)	(30/46)	(33/43)	(1/26)	(0/12)	(1/3)
alcoholic	FL	gammopathy	PBC	Normal	
25.0%	0%	0%	11.1%	1.5%	
(1/4)	(0/5)	(0/8)	(1/9)	(3/206)	

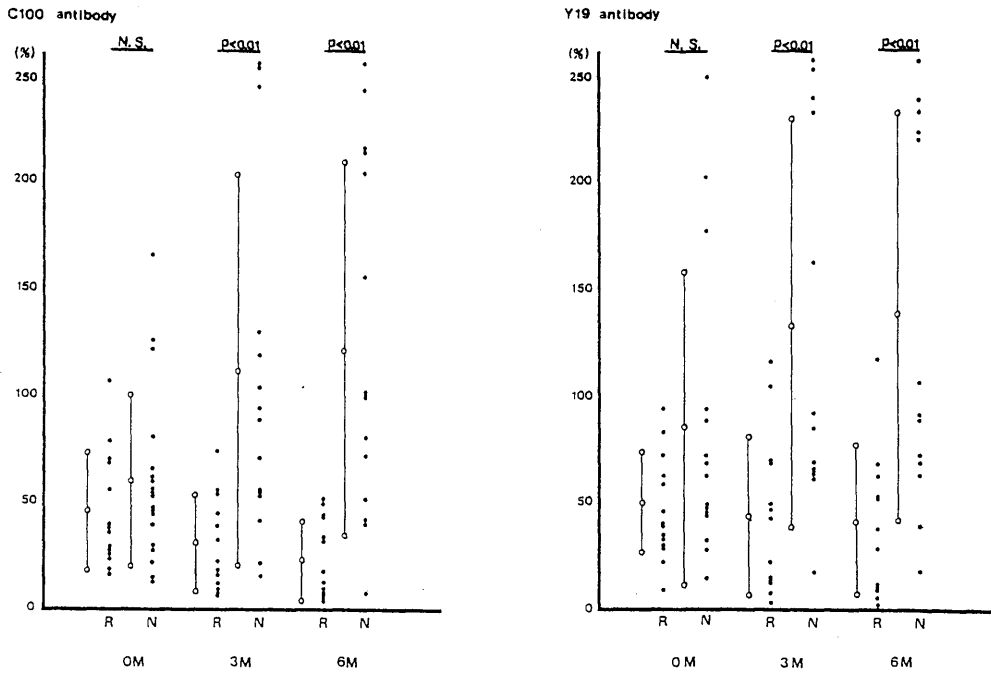


Fig. 3 Change of Y19 antibody after IFN therapy compared to the pretreatment level (R : Responder group, N : Non-responder group) There was statistical significance at 3 months and 6 months after the treatment between two groups.

慢性肝炎の合併例と考えられた。肝機能異常を認めず正常と思われた検体 206 例中、3 例 (1.5%) に陽性例が認められたが、HCV-II 抗体も含め他の HCV 関連抗体は陰性であった。

AR 142 抗体は NANB-CH, NANB-LC, NANB-HCC においてそれぞれ 68.8%, 66.1%, 64.7%, C-100 抗体は 82.4%, 74.4%, 76.0% の陽性率であり, AR 142 抗体の陽性率が若干低いものの Y 19 抗体とほぼ同程度の検出率であった (Table 2)。また, NANB-LC, NANB-HCC における各抗体陽性率は Y 19 抗体, AR 142 抗体, C-100 抗体ともに NANB-CH と比べると低率であった。Y 19 抗体を AR 142 抗体, C-100 抗体の一致率と比較すると, その成績は C-100 抗体と 82.3%, AR 142 抗体と 60.5% の例で一致し, core 領域の AR 142 抗体よりも同じ NS 領域の抗体である C-100 抗体とより一致する傾向があった。しかし, C-100 抗体と異なる例も 21 例 17.7% に認められた (Table 3)。3 つの抗体ともに陰性で PCR 陽性の慢性肝炎が 2 例存在した。また, Y 19 抗体陽性で PCR 陰性の例は正常検体を除き認められなかった。輸血歴の有無と Y 19 抗体陽性率においてはとくに有意差を認めなかった (Table 4)。慢性肝炎において Y 19 抗体陽性

Table 2 Comparison in positivity of Y19 antibody for AR142 antibody and C100 antibody in nonA-nonB chronic liver disease

	Y 19-Ab	AR 142-Ab	C 100-Ab
CH	83.3% (120/144)	68.8% (99/144)	82.4% (98/119)
LC	65.2% (30/46)	66.1% (37/56)	74.4% (40/56)
HCC	76.7% (33/43)	64.7% (22/34)	76.0% (19/25)

群と陰性群の間で GOT, GPT, ZTT を比較したところ, Table 5 に示すように Y 19 抗体陽性群は陰性群に比べて有意に高値を示した (GOT; $p < 0.01$, GPT, ZTT; $p < 0.05$)。

成 績 II

インターフェロン投与例 40 例の background を Table 6 に示した。効果判定からみると Responder 群

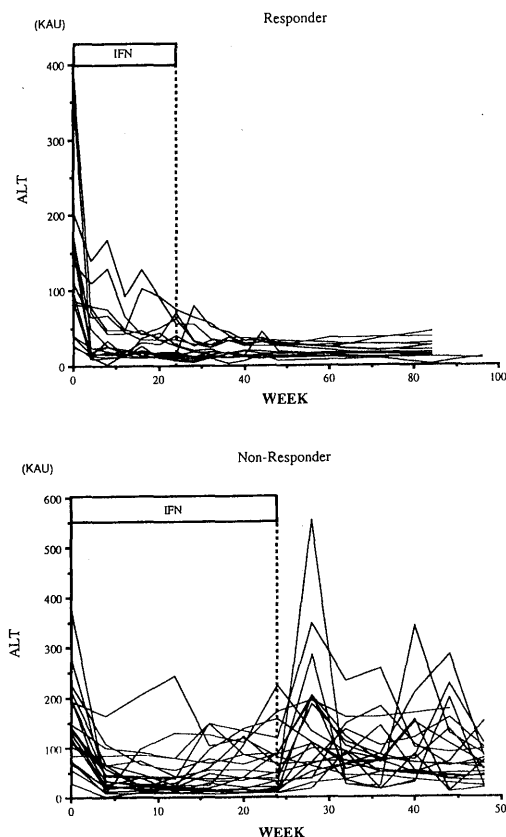


Fig. 4 Change of serum ALT level during and after the treatment with IFN

- 1) Responder group; normal ALT level continued for more than 6 months
- 2) Non-responder group; the rest of Responder group

Table 3 Relationship of Y19 antibody to GOT, GPT and ZTT in nonA-nonB chronic hepatitis
* ; $p < 0.01$ * * ; $p < 0.05$
Values are mean $\pm$ S. D.

	Anti-Y 19(+)	Anti-Y 19(-)
GOT	62.0 $\pm$ 35.9 * *	41.0 $\pm$ 28.1
GPT	82.0 $\pm$ 55.1 * *	54.6 $\pm$ 49.7
ZTT	17.4 $\pm$ 5.67	14.0 $\pm$ 4.82

Table 4 Relationship between Y19 antibody and blood transfusion (BT) There is no significance.

	BT(+)	BT(-)
Y 19-Ab (+)	37/41 (90.2%)	35/41 (85.4%)
Y 19-Ab (-)	4/41 (9.8%)	6/41 (14.6%)

Table 5 Relationship of detection rate between Y19 antibody and AR142, C100 antibody in NANB chronic hepatitis.

	C 100 antibody		AR 142 antibody	
	(+)	(-)	(+)	(-)
Y 19-Ab (+)	89/119 (74.8%)	12/119 (10.1%)	81/144 (56.3%)	39/144 (27.1%)
Y 19-Ab (-)	9/119 (7.6%)	9/119 (7.6%)	18/144 (12.5%)	6/144 (4.2%)

(著効)が18例45.0%, Non-responder群22例55.0% (有効6例15.0%, 悪化1例2.5%, 不変15例37.5%)であった。IFN投与中にY19抗体価の変動を経過観察できた33例のうちIFN投与前にY19抗体が陽性であったものは28例(84.8%), 陰性例が5例(15.2%)であった。Y19抗体陽性例の中ではResponder群14例(50.0%), Non-responder群14例(50.0%)であり, 陰性例ではResponder群3例(60.0%), Non-responder群2例(40.0%)であった。Y19抗体の陽性率はResponder群, Non-responder群間で差を認めなかった。またY19抗体陽性例において治療前のY19抗体価(C.O.I)をResponder群とNon-responder群で比較したところResponder群においてより抵抗性価である傾向は認められたものの有意な差は認められなかった。一方, C-100抗体はIFN投与前の陽性例が37例中32例(86.5%)であり, その中でResponder群13例(40.6%), Non-responder群19例(59.4%)であった。またC-100抗体陰性例ではResponder群4例(80.0%), Non-responder群1例(20.0%)であった。C-100抗体陽性例においてIFN投与前のC-100抗体価を比較するとResponder群がNon-responder群にくらべて有意に低値であった($p < 0.05$)。HCV-II抗体は全例陽性であった。その他

Table 6 Background of the patients with chronic hepatitis C treated by interferon. Values are mean $\pm$ S. D. (N. S.; not significant, C. O. I.; cut off index, B. T.; blood transfusion) Responder and Non-responder are defined in text.

	Responder		Non-responder
No of Case	18/40 (45.0%)		22/40 (55.0%)
Age	51.4 $\pm$ 9.65	N. S.	49.6 $\pm$ 10.80
Sex	Male : Female = 13 : 5	N. S.	Male : Female = 13 : 9
Duration	44.5 $\pm$ 77.5 (M)	N. S.	91.6 $\pm$ 81.4 (M)
B. T.	(+) : (-) = 7 : 11	N. S.	(+) : (-) : unknown = 4 : 16 : 2
GPT	134.1 $\pm$ 106.4		147.0 $\pm$ 81.5
C 100-Ab	43.2 $\pm$ 41.6	p<0.05	187.4 $\pm$ 192.7
(C. O. I.)	(n=13)		(n=19)
Y 19-Ab	42.8 $\pm$ 45.5	p<0.1	81.5 $\pm$ 61.2
(C. O. I.)	(n=14)		(n=13)
Pathology	CPH; 3 CAH 2 A; 8 CAH 2 B; 7		CPH; 3 CAH 2 A; 8 CAH 2 B; 11

性差, 年齢, 輸血歴の有無においては有意差を認めず, 罹病期間 (肝障害を指摘されてからの期間) では短期例で著効例が多かったものの有意差を認めるまでは至らなかった。また Table 6 に示すように Responder 群では治療前の肝組織において炎症の軽いものが多い傾向がみられた。IFN 投与中は多くの例で Y 19 抗体価の低下がみられたが, 中には投与途中より上昇に転じたものも 4 例に認められた。このうち 3 例は GPT も上昇を認めたが 1 例は GPT は低下したままであった。またこれらはすべて Non-responder 群であった。IFN 投与終了時における Y 19 抗体価は Responder 群, Non-responder 群間で有意差を認めなかった。HCV-RNA が検索できた 37 例中 13 例 (35.1%) で IFN 投与終了時に HCV-RNA の陰性化を認めたが, そのうち Responder 群は 9 例 (69.2%) のみで 4 例が Non-responder 群であった。

IFN 投与終了後, Y 19 抗体価は Fig. 5 に示したように Responder 群において一時的に上昇するものもあったものの, 基本的には低下傾向にあり, IFN 投与終了 6 カ月後において Y 19 抗体が陰性化した例も 4 例に認められた。それに対し, Non-responder 群では, Y 19 抗体価は投与終了後再上昇し, 以前のレベルあるいはそれ以上まで上昇する例や Responder 群と比べて抗体価の低下が少ない例が多かった。そのため

Fig. 5 に示したように抗体価のばらつきは大きかった。IFN 投与終了後 3 カ月における Y 19 抗体価は Responder 群で 43.0 $\pm$ 37.9%, Non-responder 群 132.8 $\pm$ 95.7% であり, また 6 カ月後では Responder 群 32.7 $\pm$ 33.0%, Non-responder 群 135.7 $\pm$ 94.7% であった。Responder 群と Non-responder 群において Y 19 抗体価を比較すると Fig. 3 に示したように Responder 群では Non-responder 群に比べて IFN 投与終了 3 カ月後, 6 カ月後ともに Y 19 抗体価が有意に低下した ($p<0.01$)。

C-100 抗体価も同様に低下し, 2 例で陰性化が認められた (Fig. 6)。3 カ月, 6 カ月後の抗体価は Responder 群 30.5 $\pm$ 22.0%, 22.3 $\pm$ 18.5%, Non-responder 群 111.1 $\pm$ 91.7%, 121.4 $\pm$ 85.7% となり, Y 19 抗体と同様に Responder 群, Non-responder 群間で有意差を認めた ($p<0.01$, Fig. 3)。

PCR による HCV-RNA の検出では IFN 投与終了時の陰性化例 13 例のうち終了後に再度陽転化したものが 5 例 (38.5%), 陰性のまま経過したものが 6 例 (46.2%) であった。他の 2 例においては HCV-RNA の経過追跡が困難であった。さらに IFN 投与終了時 HCV-RNA 陽性で 6 カ月後の段階で陰性化したものが 3 例あったため, IFN 終了 6 カ月後の時点で HCV-RNA が陰性になったものは HCV-RNA の経過が追

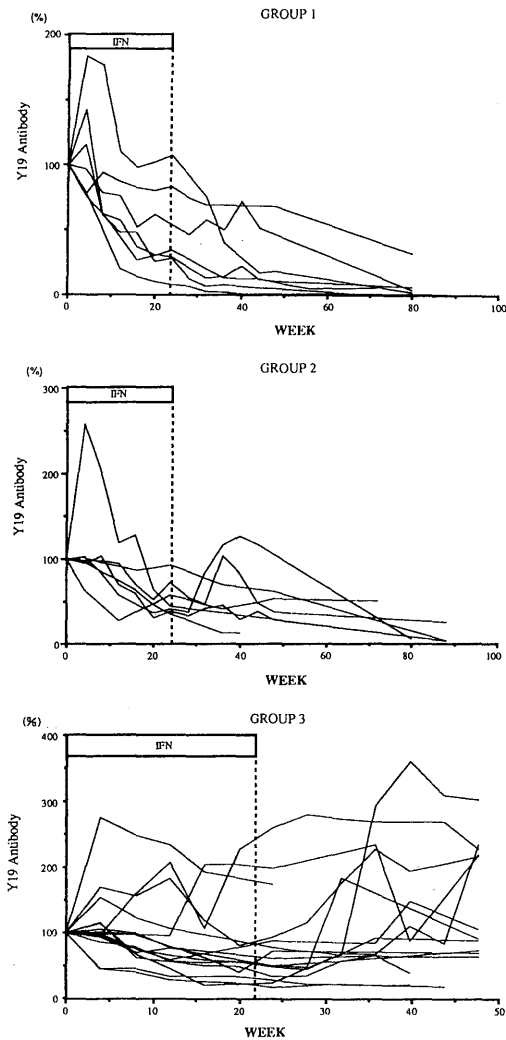


Fig. 5 Change of Y19 antibody in the patients with chronic hepatitis C treated with IFN
 1) GROUP 1; HCV-RNA disappeared at 6 months after the treatment in Responder group
 2) GROUP 2; HCV-RNA remained positive or reappeared after the treatment in Responder group
 3) GROUP 3; Non-responder group

跡できた 31 例中 9 例 (29.0%) であり、これらはすべて Responder 群であった。また逆に Redponder 群の中には、HCV-RNA が持続陽性であったものが 17 例中 5 例 (29.4%)、陰性化後再度陽転化したものが 2 例 (11.8%) 認められた。したがって IFN 終了後 6 カ月の時点であわせて 7 例 (41.2%) が HCV-RNA 陽性で

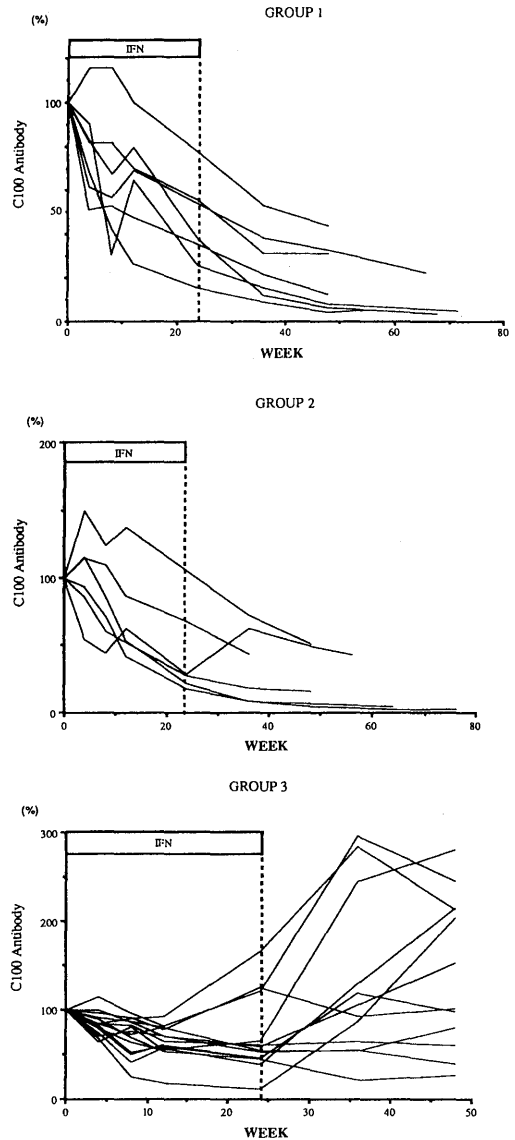


Fig. 6 Change of C100 antibody in the patients with chronic hepatitis C treated with IFN
 “GROUP” are defined in Figure 5.

ありウイルスの存在が確認された。そこで Responder 群を IFN 終了後 6 カ月の時点における HCV-RNA 陰性群と陽性群とにわけて Y 19 抗体価の推移を Fig. 5 に示した。Responder 群の中で 6 カ月後の Y 19 抗体価が IFN 投与前の 20% 以下に低下した症例では 7 例中 6 例 (85.7%) が HCV-RNA 陰性化群であった。HCV-RNA が陰性化した症例の中に同じ 6 カ月後の時点で抗体価が 20% 以下に低下しなかった例が 1 例

Table 7 Change of HCV-RNA and Y19 antibody level in Responder group Y19 antibody level is represented by ratio (percentage) for the pretreatment level. Before; before treatment, OM; just after treatment 6M (12-18M): 6 (12-18) months after treatment ND: not determined

	Before	0 M	6 M	12-18 M	Y 19 (6 M)	Y 19 (12-18 M)
CASE 1	+	-	-	-	1.3	1.0
2	++	+	-	-	5.0	0.2
3	++	-	-	-	10.0	5.8
4	++	-	-	-	6.8	4.2
5	++	+	-	-	11.1	6.5
6	++	-	-	-	10.1	2.1
7	++	-	-	-	68.6	32.5
8	++	+	-	-	-	-
9	++	-	-	-	-	-
CASE 10	++	++	++	++	62.1	3.9
11	++	++	++	++	53.3	51.2
12	++	++	++	++	28.8	6.2
13	++	+	+	++	117.8	6.0
14	++	-	+	ND	12.8	ND
15	++	+	+	-	37.8	26.1
16	++	+	+	-	ND	3.2
17	++	-	+	-	-	-

認められたが、この1例はIFN終了後12カ月の時点でGPTの再上昇を認めた。またTable 7に示したようにHCV-RNA陰性化群ではIFN終了後12-18カ月にはGPT再上昇例を除きY 19抗体価は全例10%以下に低下していた。HCV-RNAが持続陽性の症例や再度陽転化した症例でもY 19抗体価は低下したものの、低下の程度はHCV-RNA陰性化例に比し小さかった。一方、Non-responder群16例においては投与終了時に陰性化した症例が4例みられたもののその後すべて陽転化し、投与終了6カ月後にHCV-RNAが陰性化した症例はなかった。

考 察

1989年、イムノスクリーニング法を用いてChiron社の研究グループ⁷⁾はチンパンジー血清から、またArimaら²⁾は非A非B型肝炎患者血清からC型肝炎ウイルスの遺伝子断片を取り出すことに成功したことはウイルス肝炎の研究において画期的なことであった。以来、HCV、とくにウイルス遺伝子に関する研究は急速に進み、全遺伝子配列も明らかになった⁸⁾²³⁾⁴⁰⁾。また、HCV遺伝子の塩基配列の解析が進むにつれ³³⁾⁴¹⁾各領域の変異の程度が明らかとなり、これを基にOkamotoら³⁷⁾はHCVを4つのサブタイプに分けており、現在ではPCR法を用いてサブタイプの分類も

可能となっている。HCV遺伝子のなかでもワクチンの開発に重要なEnvelope領域はアミノ酸レベルでも一致率が52.1-97.9%と最も変異が多い部位であることが報告²⁰⁾³³⁾されており、まだその実用化には至っていない。一方、ウイルスのスクリーニングのためには変異の少ない部位に対する抗体系が有効であると考えられる。Okamotoら³⁶⁾の報告によるとウイルス変異の最も少ない部位は5'-non coding regionで一致率は99%以上であり、次いで構造領域のcore領域、非構造領域の中ではNS3領域、NS5領域であるといわれている³³⁾⁴¹⁾。このなかでcore領域、NS3領域、NS3-4領域のエピトープ部位を組み合わせで開発されたアボット社のHCV-II抗体測定系は非A非B型慢性肝疾患において92-95%の高い陽性率が報告¹⁸⁾されている。またスクリーニングのために開発された新しい抗体測定系もcore領域、NS3領域、NS5領域のうちいずれかのエピトープの組み合わせで構成されており、HCV-II抗体と同程度の陽性率が得られている²⁰⁾。しかし、ウイルス感染の病態把握という意味では、それぞれが関与しあう組み合わせの抗体系よりも単一領域の抗体系の方が有用であると思われる。中でもNS3領域はウイルスのproteaseやhelicaseなどの酵素活性に関与し⁹⁾、それを介してウイルスの複製に重要な役割を担っていると考えられており、ウイルス増殖の

状態をよく反映している可能性が大きいと思われる。今回、イムノスクリーニング法により得られたNS3領域のリコンビナントペプチドY19に対する抗体測定系をELISA法にて確立し、各種肝疾患について測定するとともにAR142抗体（core領域）C-100抗体（NS3~4領域）についても比較検討した。

非A非B型慢性肝疾患においてはNANB-CH（ $n=144$ ）83.3%、NANB-LC（ $n=46$ ）65.2%、NANB-HCC（ $n=43$ ）76.6%において陽性となり、HCV-II抗体¹⁸⁾などの複合抗体測定系と比較すると低率であったもののかなり高い陽性率を認めた。さらにY19抗体にAR142抗体、C-100抗体を加えていずれかの抗体が陽性の例をみると非A非B型慢性肝炎では98.3%と非常に高い陽性率が得られ、core領域、NS3領域、C-100領域に対する抗体系の併用によってほとんどの例がチェックできることが明らかとなり、これはHCV-II抗体や他の複合抗体系の陽性率の高さと一致していた¹⁸⁾²⁰⁾。そのほかの慢性肝疾患ではアルコール性肝障害³⁸⁾、自己免疫性肝炎³⁹⁾などにおいてHCV抗体の陽性率が高いという報告があるが、C型肝炎の合併と思われた例を除外すればウイルス型肝炎以外の例においてはY19抗体の陽性例は認められず特異性は高いと考えられた。また、C-100抗体で偽陽性が多いと報告³⁰⁾されている高 γ グロブリン血症においてもY19抗体陽性例は認められなかった。B型慢性肝疾患においてC-100抗体、N-14抗体では5-20%に重複感染がみられたという報告²¹⁾があるが、今回の症例でもB型とC型の重複感染と思われる陽性例が2例（4.9%）に認められた。また正常例（ $n=206$ ）において3例（1.5%）の陽性例がみられたが、そのほかの抗体系はHCV-II抗体も含めてすべて陰性であったことより非特異的反応であった可能性も示唆された。

非A非B型慢性肝疾患におけるAR142抗体、C-100抗体の陽性率は他の報告²¹⁾²⁸⁾とほぼ同程度であり、今回Y19抗体もふくめてすべての抗体でNANB-CHに比べてNANB-LC、NANB-HCCでは陽性率は低く、抗体産生の低下を示すものと思われた。Y19抗体とAR142抗体、C-100抗体との比較ではAR142抗体との一致率が60.5%、C-100抗体との一致率が82.3%とよりC-100抗体との一致率が高かった。これはY19とC-100のエピトープ部位はHCV遺伝子上近接していることおよびY19とAR142のエピトープ部位が非構造領域と構造領域に存在するための差異と考えられた。しかしY19抗体の結果はC-100抗体と異なる例もあり、C-100抗体とは異なる意義がある

ものと思われた。輸血歴の有無については急性肝疾患では輸血後肝炎と散発性肝炎との間で抗体陽性率に差を認める報告¹⁸⁾が多いが、慢性肝疾患においては抗体陽性率に差を認めない報告²¹⁾が多くY19抗体についても有意差を認めなかった。GOT、GPT、ZTTについては、ウイルス量が多く抗体価の高いものが肝内の炎症も強くこれらの値も高くなる可能性があると思われるが、今回Y19抗体陽性例でGOT、GPT、ZTTが有意に高値であったことはこのことを示唆しているものと思われた。

インターフェロンは、C型肝炎治療の主役として定着したが、その投与方法、期間、効果判定、有効例と無効例の差などまだ研究途中であり、解決すべき問題点も多い。今回、天然型インターフェロン（IFN- α ）5MU24週間投与例40例において追跡したところ、厚生省判定基準²⁵⁾にて著効45.0%、有効15.0%、不変または悪化40.0%となり、他報告¹⁰⁾¹⁹⁾の有効率と大きな差はなかった。また肝炎発症から治療までの期間が短く、IFN投与前の肝組織障害の程度が軽いものに有効例が多いという報告¹⁹⁾が多いが今回もそれと合致するデータが得られた。

IFN治療開始後のGPTの動きをFig.4に、Y19抗体価の変動をFig.5に示した。IFN投与中は多くの例においてY19抗体価が低下していたが、Non-responder群においてはIFN投与終了後に再上昇や変動がみられたのに対しResponder群では低下傾向が持続した。Responder群とNon-responder群の間でY19抗体価を比較してみると、IFN終了時は差がなくとも3カ月後、6カ月後には有意差がみられたことにより投与終了後早期の抗体価の変動を解析することがIFN治療の効果判定に有用であると考えられた。

C-100抗体についてはとくにIFN治療前の抗体価（C.O.I.）の低い群において著効例が多くみられ（ $p<0.05$ ）、このような例では熊田らの報告²⁶⁾にみられるようにIFNの効果が期待できるものと思われた。またIFN治療開始後はC-100抗体もY19抗体と同様の動きを示し、投与終了後6カ月以内のC-100抗体価の変動もY19抗体と同様IFN治療効果判定の指標として有用であると思われた。しかし、C-100抗体価と比べるとY19抗体価のほうが変動が大きく、抗体価を経時的に比較測定していく上でY19抗体のほうがより有用であると思われた。

また最近ではとくにcore抗体の有用性が注目されており、N-14抗体がIFN治療の効果判定に有用であることも報告³⁹⁾されている。また近藤²⁴⁾はCP-9抗

体, CP-10 抗体における抗体価の推移が HCV-RNA の消長と密接な関係があったと報告している。しかし一般的に core 抗体は著効例でも抗体価の低下がゆるやかであるため長期の観察を必要とし, IFN 治療後早期の効果判定は困難である。一方, 今回の Y 19 抗体価の測定でもみられたように NS 領域の抗体は core 抗体に比べ変動がすみやかで IFN 終了後早期においては core 抗体よりも治療効果判定に有用であると思われた。しかし長期の効果判定においては core 抗体の推移は有効な指標であり, core 抗体と NS 領域抗体の抗体価を経時的に測定していくことによってより正確な効果判定ができると思われた。

また現在用いられている効果判定とは別に IFN 治療の効果判定の一つの指標として血中 HCV-RNA の消失を考えるならば, PCR 法によって血清中の HCV-RNA の存在を調べていく必要がある。しかし, DiBisceglie らの報告¹¹⁾のように IFN 治療後の経過観察中においては HCV-RNA が再出現する例もあり, ある時点だけの測定ではウイルスが除去されたかどうかの判定は難しい。しかもすべての症例で PCR 法にて経過を追跡することは容易ではなく問題点も多い。その点抗体価による経過観察は簡便であり, すでに日野ら¹⁶⁾や熊田ら²⁰⁾によって C-100 抗体の経過観察が IFN 治療の効果判定に有用であることが報告されている。しかし, その後の研究により C-100 抗体における抗体価の低下が HCV-RNA の消長とは必ずしも一致しないことが次々と報告⁵⁾¹⁴⁾され, 問題点として浮上してきた。今回, C-100 抗体において問題となっている HCV-RNA の消長と Y 19 抗体価の変動との関連を Responder 群において調べたところ, IFN 投与終了 6 カ月時点での HCV-RNA 陰性化例においては Y 19 抗体価は 7 例中 6 例が 20% 以下まで低下し, 12-18 カ月後には 6 例とも 10% 以下まで低下したのに対し, 6 カ月後の時点で HCV-RNA 陽性例では Y 19 抗体価が 50% 以上維持される例が多かった。この結果より IFN 治療後早期の Y 19 抗体価を経時的に測定することによって, IFN 治療後のウイルスの存在についてもある程度の予測が可能であると思われた。また HCV-RNA 陰性化例の中で IFN 終了後 6 カ月にて抗体価が 20% 以下まで低下しなかった 1 例はその後 GPT が上昇してきており, Responder 群のなかで HCV-RNA が陰性化した例でも Y 19 抗体価が有意に低下しない時には, その後の経過中に再び Transaminase が上昇し HCV-RNA が再出現する可能性があるということを予測できた。つまり IFN 治療後に

Y 19 抗体価を経時的に測定することによって, Responder 群か Non-responder 群かの効果判定のみならずその後の Transaminase の変化や HCV-RNA の消長に関してもある程度予測でき, その後の経過観察の上で非常に重要であると思われた。ただ Y 19 抗体価の低下が続いているにもかかわらず HCV-RNA が陽性であった例もあり, より確実な効果判定のためには AR 142 抗体などの core 抗体との併用も有用であると思われる。

IFN 治療の効果として HCV-RNA の消長まで考えるならば現在の効果判定基準では不十分であるが, HCV-RNA 検出手技および大量検体を扱うことが困難であることを考えると現在のところでは IFN 治療効果判定の指標として Transaminase と HCV 関連抗体の変動を追跡することが最も簡便な方法であり, 実用的であると思われる。今回 Y 19 抗体について検討したところ抗体価の推移と HCV-RNA の消長が必ずしも一致しない例も存在し, 他の抗体と同様に HCV-RNA からみた効果判定の指標としては不十分な点もあるものの, Y 19 抗体価の変動は HCV-RNA の消長と高率に一致していた。さらに HCV 関連抗体のなかでもとくに今回測定した Y 19 抗体は Transaminase の変動とよく相関しており, IFN 治療効果判定の重要な指標になるだけでなく, Y 19 抗体価の低下の程度をみることによって HCV-RNA の消長や治療後の経過予測にも有用であると思われた。

総 括

慢性肝疾患 300 例において, HCV のなかでも NS-3 領域由来の蛋白 Y 19 に対する抗体を中心に HCV 関連抗体を ELISA 法にて測定した。また, IFN 治療における抗体価の変動についても検討した。

1. 非 A 非 B 型慢性肝炎, 非 A 非 B 型肝硬変, 非 A 非 B 型肝細胞癌において Y 19 抗体陽性率はそれぞれ 83.3%, 65.2%, 76.6% と高率であった。その他の慢性肝障害では陽性率は低く, 非 A 非 B 型慢性肝疾患に対する Y 19 抗体の特異性は高かった。

2. Y 19 抗体は AR 142 抗体, C 100 抗体と比較すると C 100 抗体との一致率が高かったが, 同じ非構造領域のなかでもエピトープ部位の差異により C-100 抗体とは結果の異なる例が 17.7% に認められた。

3. IFN 治療例において Responder 群 (著効例) では Y 19 抗体価は持続的に低下傾向を示したのに対し, Non-responder 群 (著効例以外) では投与中は低下するものの投与終了後は同レベルで推移するかあるいは

上昇する傾向を認め、IFN 治療の有効性の指標になり得た。

4. Responder 群の中で HCV-RNA が陰性化した例では持続陽性例に比べ Y 19 抗体価の著明な低下をみとめ、HCV-RNA の消長も高率に予測できた。

上記の結果より、Y 19 抗体は非 A 非 B 型慢性肝疾患に特異的でその診断に有用であると考えられた。また、IFN 治療においてその抗体価を測定し、経過を追跡していくことはその効果判定を行う上で有用であると思われた。

稿を終えるにあたり御指導、御校閲をいただきました恩師有馬暉勝教授に深謝いたします。また、本研究を直接御指導いただきました第二内科霜出義輝博士、ならびに第二内科助手前田栄樹博士をはじめ御協力いただきました第二内科の諸先生方に深く感謝申し上げます。また、Y 19 蛋白を提供して頂きました山之内製薬中央研究所、ELISA 測定キットの作製に協力して頂きましたクラレ中央研究所の方々に深謝いたします。さらに、本研究を補助して頂きました第二内科研究助手中堂園美智子さん、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。

なお、本論文の一部は第 13 回九州肝臓研究会(福岡)、第 79 回日本消化器病学会総会(京都)において発表した。

文 献

- 1) Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL and Kuo G: Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A non-B hepatitis. *N Engl J Med* 321: 1494-1500, 1989.
- 2) Arima T, Nagashima H, Murakami S, Kaji C, Fujita J, Shimoyama 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.
- 3) Arima T, Shimomura H, Nakagawa J: Treatment of nonA, nonB hepatitis with human fibroblast interferon. *Hepatology* 6; 1117 (Abstract) 1986.
- 4) Beach MJ, Meeks EL, Mimms LT, Vallari D, DuCharme L, Spelbring J, Taskar S, Schleicher JB, Krawczynski K and Bradley DW: Temporal Relationships of Hepatitis C Virus RNA and Antibody Responses Following Experimental Infection of Chimpanzees. *J. Med. Virol.* 36: 226-237, 1992.
- 5) Chayama K, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Matsumoto T, Sakai Y, Kobayashi M, Unakami M, Morinaga T and Kumada H: Effect of Interferon Administration on Serum Hepatitis C Virus RNA in Patients with Chronic Hepatitis C. *Hepatology* 13: 1040-1043, 1991.
- 6) Chiba J, Ohba H, Matsuura Y, Watanabe Y, Katayama T, Kikuchi S, Saito I and Miyamura T: Serodiagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection with an HCV core protein molecularly expressed by a recombinant baculovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 88; 4641-4645, 1991.
- 7) Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW and Houghton M: Isolation of a cDNA clone derived from a bloodborne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244: 359-362, 1989.
- 8) 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.
- 9) Choo QL, Weiner AJ, Overby LR, Kuo G, Houghton M and Bradley DW: Hepatitis C virus: The major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. *Br Med Bull* 46: 423-441, 1990.
- 10) Davis GL, Balart LA, Schiff ER, Lindsay K, Bodenheimer HC, Perrillo RP, Carey W, Jacobson IM, Payne J, Dienstag JL, Van Thiel DH, Tamburro C, Lefkowitz J, Albrecht J, Meschievitz C, Ortego TJ, Gibas A and The Hepatitis Interventional Therapy Group: Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alfa: a multicenter randomized, controlled trial. *N Engl J Med* 321; 1501-1506, 1989.
- 11) DiBisceglie AM, Martin P, Kassianides C, Lisker-Melman M, Murray L, Waggoner J, Goodman Z, Banks SM and Hoofnagle JH: Recombinant interferon alfa therapy for chronic hepatitis C: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med* 321; 1506-1510, 1989.
- 12) Enomoto N, Takada A, Nakao T and Date T: There are two major types of hepatitis C virus in Japan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170; 1021-1025, 1990.
- 13) Garson JA, Tedder RS, Briggs M, Tuke P, Glazebrook JA, Trute A, Parker D, Barbara JAJ, Contreras M and Aloysius S: Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by "nested" polymerase chain reaction and prediction of infectivity. *The Lancet* 335; 1419-1422, 1990.
- 14) 萩原秀紀, 林 紀夫, 三田英治, 上田啓次, 竹原徹郎, 結城暢一, 片山和宏, 笠原彰紀, 房本英之, 鎌田武信: Interferon 治療時の血中 C 型肝炎ウイルス RNA の検討. *日消誌* 88: 1420-1425, 1991.
- 15) 林 茂樹, 平田啓一, 藤原研司: C 型肝炎と慢性肝炎, 肝硬変, *M B Gastro* 1: 51-57, 1991.
- 16) 日野邦彦, 下田和美, 妻神重彦, 近藤寿郎, 加来浩器, 丹羽寛文: HCV 抗体の臨床的意義・慢性 C 型肝炎の病態と HCV 抗体価との関係, *Medical Prac-*

tice 8 : 407-411, 1991.

17) Hoofnagle JH, Nullen KD, Jones B, Rustigi V, DiBisceglie A, Peters M, Waggoner JG, Yoon P and Jones EA : Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *N Engl J Med* 315 : 1575-1578, 1986.

18) 飯野四郎, 小池和彦, 安田清美, 日野邦彦, 妻神重彦, 鈴木 宏, 赤羽賢浩, 清沢研道, 田中英司, 吉澤浩司, 中西敏夫, 田村 徹, 佐多通夫, 渡慶次千, 西岡久壽彌, 渡部準之助 : 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.

19) 飯野四郎, 日野邦彦, 黒木哲夫, 鈴木 宏, 山本祐夫, 小川暢也 : 非 A 非 B 型 (C 型) 慢性肝炎に対するインターフェロンアルファ-2b (IFN α -2b) 療法, *基礎と臨床* 26 (3) : 1149-1177, 1992.

20) 河合 忠, 野本明男, 小原恭子, 服部 信, 田中 慧, 飯野四郎, 安田清美, 高橋武夫, 五十嵐すみ子, 古田精市, 清沢研道, 田中英司, 小林健一, 鶴浦雅志, 金子周一, 武藤泰敏, 大西弘生, 酒井 勉 : HCV 抗体測定用 ELISA キット (イムチェック-HCV Ab) の臨床評価, *機器・試薬* 14 : 725-733, 1991.

21) 金井弘一, 岩田一郎, 中尾国明, 有馬暉勝, 吉澤浩司, 河崎恒久, 高橋和明, 日野邦彦, 加藤良朗, 小俣政男, 伊藤よしみ, 稲葉憲之, 清水久美子, 野尻徳行, 柏崎一男, 針谷吉人 : N-14 抗体 ELISA キット (栄研化学) による非 A 非 B 型肝炎疾患の診断, *医学と薬学* 25 : 423-430, 1991.

22) Katayama T, Mazda T, Kikuchi S, Harada S, Matsuura Y, Chiba J, Ohba H, Saito I and Miyamura T : Improved Serodiagnosis of Non-A, Non-B Hepatitis by an Assay Detecting Antibody to Hepatitis C Virus Core Antigen. *Hepatology* 15 : 391-394, 1992.

23) Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Sugimura T and Shimotohno K : Molecular cloning of the human hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 9524-9528, 1990.

24) 近藤寿郎 : C 型慢性肝炎に対するインターフェロン療法のウイルス学的評価, *肝臓* 33 : 591-599, 1992.

25) 厚生省特定疾患難治性の肝炎調査研究班 : 平成 4 年度研究報告.

26) 熊田博光, 荒瀬康司, 茶山一彰, 斎藤 聡, 池田健次, 松本豊海, 酒井洋子, 小林万利子, 海上雅光 : インターフェロン療法における HCV 抗体の力価の有用性について, *肝臓* 31 : 902-906, 1990.

27) Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE, Tegtmeier GE, Bonino F, Colombo M, Lee WS, 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.

28) 前田栄樹, 有馬暉勝 : C-100 抗体と有馬 14 抗体の評価, *Mebio* 7 : 20-25, 1990.

29) Marcellin P, Boyer N, Giostra E, Degott C, Courouce AM, Degos F, Coppere H, Cales P, Coutigou P and Benhamou JP : Recombinant human α -interferon in patients with chronic non-A, non-B hepatitis : a multicenter randomized trial from France. *Hepatology* 13 : 393-397, 1991.

30) McFarlane IG, Smith HM, Johnson PJ, Bray GP, Vargani D and Williams R : Hepatitis C virus antibodies in chronic active hepatitis ; pathogenic factor or false positive result? *Lancet* 335 : 754-756, 1990.

31) 中西敏夫, 守屋 尚, 吉澤浩司 : C 型肝炎の疫学, *肝胆膵* 23 : 383-392, 1991.

32) Nakatsuji Y, Matsumoto A, Tanaka E, Ogata H and Kiyosawa K : Detection of Chronic Hepatitis C Virus Infection by Four Diagnostic Systems : First-generation and Second-generation Enzyme-linked Immunosorbent Assay, Second-generation Recombinant Immunoblot Assay and Nested Polymerase Chain Reaction Analysis. *Hepatology* 16 : 300-305, 1992.

33) 岡本宏明 : C 型肝炎ウイルスの遺伝子型, 診断と治療 80 : 295-302, 1992.

34) Okamoto H, Munekata E, Tuda F, Takahashi K, Yotsumoto S, Tanaka T, Tachibana K, Akahane Y, Sugai Y, Miyakawa Y and Mayumi M : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Antibodies against the Capsid Protein of Hepatitis C Virus with a Synthetic Oligopeptide. *Japan J. Exp. Med.* 60 : 223-233, 1990.

35) 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. *Jap J Exp Med* 60 : 167-177, 1990.

36) Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Tanaka T, Sugai Y, Akahane Y, Machida A, Mishihiro S, Yoshizawa H, Miyakawa Y and Mayumi M : Detection of Hepatitis C Virus RNA by a Two-Stage Polymerase Chain Reaction with Two Pairs of Primers Deduced from the 5'-Noncoding Region. *Japan J. Exp. Med.* 60 : 215-222, 1990.

37) Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, Kurai K, Akahane Y, Sugai Y, Tanaka T, Sato K, Tsuda F, Miyazaki Yuzo 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.

38) 清水 聡, 清沢研道, 袖山 健, 田中英司, 吉沢 要, 中野善之, 薄田誠一, 古田精市 : 肝障害を有するアルコール多飲者における HCV 抗体の検出, 肝

臓 31 : 589-590, 1990.

39) 庄 幸彦, 霜出義輝, 有馬暉勝 : C 型肝炎 - 診断と治療の展望. 消化器外科 14 : 1725-1731, 1991.

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

41) Takeuchi 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 sequences of two isolates derived from an experimentally infected chimpanzee and healthy human carriers. *J Gen Virol* 71 : 3027-3033, 1990.

42) Vallari DS, Jett BW, Alter HJ, Mimms LT, Holzman R and Shih JW : Serological Markers of Posttransfusion Hepatitis C Viral Infection. *J. Clin. Microbiol.* 30 : 552-556, 1992.

43) Van der Pouel CL, Cuypers HTM, Reesink

HW, Weiner AJ, Quan S, DiNello R, Van Boven JJP, Winkel I, Mulder-Folkerts D, Exel-Oehlers PJ, Schaasberg W, Leentvaar-Kuypers A, Polito A, Houghton M, Lelie PN : Confirmation of hepatitis C virus infection by new four-antigen recombinant immunoblot assay. *Lancet* 337 : 317-319, 1991.

44) Yatsuhashi H, Inoue O, Koga M, Nagataki S, Mizuno K, Kolberg J, Beall E, Tai-An Cha, Irvine B, Kuo G, Urdea MS and Yano M : Comparison of hepatitis C Virus markers in patients with NANB hepatitis. *J. Virol. Methods* 37 : 13-21, 1992.

45) 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 : 465-470, 1991.

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

(受付 1993-3-19)