異なる4種類のHCV抗原に対する抗体反応について

金崎 巧¹⁾ 木下 清二¹⁾ 辻野 儀一¹⁾ 吉岡慶一郎¹⁾
池上 信子²⁾ 真鍋 貞夫³⁾ 高見沢昭久³⁾

¹⁾国立大阪病院小児科, ²⁾同 臨床研究部, ³⁾阪大微研観音寺研究所

(平成4年5月16日受付)

CHARACTERIZATION OF ANTIBODY RESPONSE TO FOUR DIFFERENT HEPATITIS C VIRUS ANTIGENS

Takumi Kanesaki¹⁾, Seiji Kinoshita¹⁾, Giichi Tsujino¹⁾, Keiichiro Yoshioka¹⁾, Nobuko Ikegami²⁾,
Sadao Manabe³⁾ and Akihisa Takamizawa³⁾

Department of Pediatrics¹⁾ and Clinical Research Institute²⁾, Osaka National Hospital

³⁾Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University

We studied antibody responses to four different hepatitis C virus (HCV) antigens using sera collected from hemophilia patients. Three HCV antigens were expressed in *E. coli* which contained a fragment of the putative core, nonstructural (NS)3 and NS5 region of the genome, respectively. Antibody to each of these three antigens (core, NS3, NS5) was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The remaining one antigen used was C100 developed by Chiron Corporation and antibody to it was also detected by ELISA.

In 182 sera collected from 71 patients, seropositive rates for C100, core, NS3 and NS5 antigens were 79%, 95%, 95% and 91%, respectively. Sequential serum samples were obtained twice or three times at intervals of 1 to 4 years from 69 patients and were tested for antibody to four antigens. Forty seven patients were repeatedly seropositive and 4 were repeatedly seronegative for all of four antigens. One was seronegative for all of four antigens on first testing and became seropositive for core and NS3 after 1 year. At that point, antibody to C100 and NS5 was still negative. Eight were seropositive for three antigens except C100 on first testing and remained seropositive for core and NS3. The remaining 9 patients were seropositive for all of four antigens on first testing but lost antibody to C100 and/or NS5 on repeat testing.

These results show that the antibody response to core and NS3 appears earlier and persists for a longer period than that to C100 and NS5, and suggest that detection of the antibody to core and NS3 is more useful method for serological diagnosis of HCV infection.

序 言

1988年米国 Chiron 社の研究陣によって非 A 非 B 型肝炎ウイルスの遺伝子がクローン化され C 型肝炎ウイルス (HCV) と命名された。さらにその遺伝子から発現された蛋白を抗原とする抗体測定系が開発され、輸血後肝炎患者の中に高頻度に抗体の存在することが明らかにされた¹⁾²⁾。本抗原は C-100 とよばれ、その後米国を始め世界各国で用いられた結果、輸血後肝炎患者の 80~90% に抗体が存在し、HCV が輸血後肝炎を引き起こす主

要なウイルスであることが判明した。しかしながら研究が進むにつれて、輸血後長期間経過して始めて抗体の出現する例や抗体陰性の血液を輸血しても C 型肝炎の発症する例が報告され、この抗体測定系についての問題点も幾つか出現してきた³⁾⁴⁾。また近年開発された Polymerase Chain Reaction 法によって抗体陰性の血液中にもウイルス遺伝子の存在が確認され、C-100 抗原の使用のみでは HCV 感染症の診断は不十分であることが明らかとなった⁵⁾。そこで各国の研究者達によっ

て C-100 抗原以外の HCV 関連抗原の作製が行われるようになり、最近になり主として HCV ゲノム上 Core 領域によってコードされた蛋白 (Core 抗原) を用いた抗体測定法が試みられるようになってきた⁶⁾⁷⁾。

今回我々は、血友病患者から得られた血清を用いて、C-100 抗原、Core 抗原を含む異なる 4 種類の HCV 関連抗原に対する抗体反応について検討したので報告する。

対象と方法

国立大阪病院小児科外来に通院していた血友病患者 71 名を対象とした。血友病 A 58 名 B13 名で、平均年齢は 19.6 歳であった。全ての患者が凝固因子製剤補充療法を受けていた。21 名 (30%) の患者は HIV 抗体陽性であった。血清は、これらの患者より 1985 年から 1990 年の間に合計 182 検体得られた。71 名中 69 名からは 1 年から 4 年間隔にて 2 回以上採取された。

また肝炎既往歴のない健康な成人及び小児合計 60 名から得られた血清 60 検体がコントロールとして用いられた。4 種類の抗原としては、Chiron 社の C-100 抗原及び HCV ゲノム上 Core, NS3, NS5 領域によってコードされている蛋白を、各々 Core, NS3, NS5 抗原として用いた (図 1)。

各領域遺伝子のクローニング法については既に詳細に報告されている⁸⁾。各抗原蛋白は、クローニングされた遺伝子を各々発現ベクター pT7-7 に組み込み大腸菌 JM109 に入れ、37°C で培養後、菌体

破碎抽質液よりイオン交換、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー等により精製した。Core, NS3, NS5 抗原に対する抗体 (Core, NS3, NS5 抗体) は ELISA 法によって測定した。方法の概略は、各抗原 100 ng を 96 穴マイクロプレートに固相し、11 倍希釈した血清 100 μ l を加え 37°C で 1 時間反応させた。そしてリン酸緩衝液にて洗浄後ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG を加えさらに 1 時間反応させた。再び洗浄後 O-phenylenediamine にて発色させ、490 nm にて吸光度を測定した。同一プレート上で測定された陰性対象血清 10 検体 (肝炎既往歴がなく C-100 抗体陰性の健康人血清) の平均吸光度 + 3SD 以上の吸光度を示した血清を抗体陽性とした。

C-100 抗原に対する抗体 (C-100 抗体) は、オーソ社の HCV Ab ELISA テストによって測定した。HIV に対する抗体測定は、アボット社の ELISA キットによった。そして HIV 抗体陽性血清は全てウェスタンブロット法によって確認された。

結 果

1. 4 種類の HCV 抗原に対する抗体陽性率

71 名の血友病患者から得られた血清 182 検体と 60 名の健康成人及び小児から得られた血清 60 検体の 4 種類の HCV 抗原に対する抗体陽性率を、表 1 に示した。健康人からの血清 60 検体は、4 種類の HCV 抗原いずれに対しても陽性反応を示さなかった。一方血友病患者から得られた血清 182 検体

図 1 HCV genome and mapping of four different HCV antigens

表1 Antibody response to four different HCV antigens in hemophilia patients and healthy persons

Subjects	No. of sera tested	No. with positive antibody to :			
		C-100(%)	Core(%)	NS3(%)	NS5(%)
Hemophilia patients (n=71)	182	143(79)	173(95)	173(95)	166(91)
Healthy persons (n=60)	60	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)

表2 HIV serological status and antibody response to four different HCV antigens in hemophilia patients

HIV serology	No. of sera tested	No. with positive antibody to :			
		C-100(%)	Core(%)	NS3(%)	NS5(%)
Anti-HIV positive (n=21)	49	37(75)	49(100)	49(100)	47(96)
Anti-HIV negative (n=50)	133	106(80)	124(93)	124(93)	119(89)

を測定した結果、Core抗体とNS3抗体が95%と最も高い陽性率を示した。そしてこれら両抗体陽性の検体は完全に一致していた。また、C-100抗体陽性の検体あるいはNS5抗体陽性の検体は、全てCore抗体、NS3抗体陽性であった。次にHIV抗体の有無により患者を2群に分け、それぞれの群における4種類の抗原に対する抗体反応につき検討した(表2)。HIV抗体陽性群においては、C-100抗体陽性率は75%とHIV抗体陰性群に比べて低かったが、Core抗体とNS3抗体陽性率は100%となり、HIV抗体陰性群に比べて高い結果となった。

2. 4種類のHCV抗原に対する抗体の陽転時期と持続

血友病患者71名中69名からは1年から4年間隔にて2回以上血清採取が可能であったので、各HCV抗原に対する抗体の陽転時期と持続について検討した。69名中47名は初回検査時既に4種類のHCV抗原全てに対して抗体が陽性で、再検査にても陽性を持続した。69名中4名は初回検査時4種類のHCV抗原全てに対して抗体が陰性で、再検査にても陰性を持続した。残り18名は、観察期間中4種類のHCV抗原に対して種々の抗体反応を示した(図2)。

Case 1は、初回検査時4種類のHCV抗原全て

図2 Antibody profiles in 18 hemophilia patients who showed various antibody responses to four different HCV antigens during follow-up period

に対して抗体が陰性であったが、約1年後の検査にてCore抗体とNS3抗体のみが陽性化し、その後の検査にて4種類の抗体とも陽性化した。Case

2～9は、初回検査時 C-100抗体陰性であったが、Core, NS3, NS5抗体陽性であった症例で、C-100抗体はその後種々の動きを示した。Case10～17は、初回検査時4種類のHCV抗体全てが陽性であったが、その後C-100抗体あるいはNS5抗体が陰性化した症例であった。Case18は、初回検査時4種類のHCV抗体全てが陽性であったが、その後の検査にて4種類の抗体とも陰性化した。これらの結果より、Core抗体とNS3抗体はC-100抗体やNS5抗体よりも感染後早期に陽転化し、長期に持続することが明らかとなった。

3. 4種類のHCV抗原に対する抗体反応と肝機能との関係

血友病患者71名において1990年に採取された血清の4種類のHCV抗原に対する抗体反応と肝機能との関係について検討した(表3)。各患者において観察期間中に施行された肝機能検査にて、少なくとも1回のALT値上昇(60U/L以上)を認めた者を肝機能異常群とした。

全体では、71名中45名(63%)の患者に肝機能異常が認められた。4種類のHCV抗原に対する抗体反応との関係においては、4種類の抗体全て陰性であった5名の患者(全員10歳未満の小児)では肝機能異常を示した者はいなかった。Core抗体とNS3抗体陽性を示した患者では、66名中45名(68%)に肝機能異常が認められた。このうちC-100抗体陽性の患者では52名中36名(69%)に肝機能異常があり、C-100抗体陰性では14名中9名(64%)に肝機能異常が認められた。したがってC-100抗体の有無と肝機能異常との間には関連性は

認められなかった。またNS5抗体については、陽性群では62名中44名(71%)に肝機能異常があり、陰性群では4名中1名(25%)に肝機能異常が認められた。

考 察

血友病患者におけるHCV感染症については、現在までにC-100抗原を使って数多くの検討がなされており、その頻度はおよそ60～75%と報告されている^{9)～12)}。今回我々の症例においても、表3に示された結果よりC-100抗体陽性率は73%となり、これまでの報告とほぼ一致していた。しかしながら、Core抗体とNS3抗体の陽性率でみると93%となり、非常に高い値となった。今回我々が用いたCore, NS3, NS5抗体測定系の特異性については、表1に示された様に、健康人から採取された血清60検体では抗体陽性を示した検体のなかったこと、また血友病患者の血清で抗体陰性を示した血清9検体は全て肝機能正常の小児より採取されたものであることを考えると、特異性は十分高いものと思われた。また感度に関しても、表1に示された様にCore抗体とNS3抗体の陽性率は、C-100抗体よりも16%上昇する結果となった。現在までにCore抗体陽性率はC-100抗体陽性率よりも14～15%上昇することが報告されているので⁶⁾⁷⁾、感度にも特に問題はないように思われた。以上の結果より我々の症例においては、ほとんどの患者においてHCV感染症が起こっていると考えられた。

次に各抗体の陽転時期と持続について検討した結果、図2に示された様に、Core抗体とNS3抗体はC-100抗体、NS5抗体より感染後早期に陽転化し、長期に渡って持続することが明らかとなった。C-100抗体については、感染後長期間経って始めて陽性化する例や長期間経過すると陰性化する例があることは既に報告されてきたが、他のHCV関連抗体の陽転時期や持続についての検討はまだあまり行われていない。本結果は、上述の各抗体間の陽性率の差を部分的に説明するとともに、HCV感染症の血清学的診断にはCore抗体とNS3抗体の測定がC-100抗体の測定より有用であることを示していると思われた。さらに表2の結果より、

表3 Association with antibody response to four different HCV antigens and alanine aminotransferase(ALT) level in 71 hemophilia patients

Antibody response to			No. of cases	No. with elevated ALT level	(%)
C-100	Core, NS3	NS5			
○	○	○	5	0	(0)
○	●	○	2	1	(50)
○	●	●	12	8	(67)
●	●	○	2	0	(0)
●	●	●	50	36	(72)
Total			71	45	(63)

○ negative ● positive

Core抗体とNS3抗体はHIV抗体陽性の患者から採取された血清においても100%の陽性率を示しており、これら両抗体は免疫抑制による影響もあまり受けないように思われた。

最後にこれら4種類の抗原に対する抗体反応と肝機能異常との関係について検討した。血友病患者においてC-100抗体の有無と肝機能異常とは関連しないことは既に報告されているが¹²⁾、我々の検討でも同様であった。またCore抗体とNS3抗体も肝機能異常との間に関連性は見い出せなかった。ただ症例数は少ないが、NS5抗体陰性で他の抗体陽性例では、肝機能異常者が4名中1名(25%)と少なかった。NS5抗体陰性が肝機能正常化と関連しているかもしれないと考えると、興味ある所見と思われた。今後さらに症例数を増やして検討していきたいと考えている。

結 語

血友病患者より得られた血清を用いて、異なる4種類のHCV関連抗原に対する抗体反応について検討した結果、陽性率はCore抗体とNS3抗体が95%、C-100抗体79%、NS5抗体91%となった。また各抗体の陽転時期と持続期間について検討した所、Core抗体とNS3抗体はC-100抗体やNS5抗体よりも感染後早期に陽性化し、また長期に渡って持続することが明らかとなった。以上の結果よりHCV感染症の血清学的診断には、Core抗体とNS3抗体の測定がC-100抗体やNS5抗体の測定より有用であると考えられた。

本論文の要旨は、第2回国際輸血学会西太平洋部会(香港)において発表された。

References

- 1) Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W. 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.
- 2) Kuo, G., Choo, Q.L., Alter, H.J., Gitnick, G.L., Redeker, A.G., Purcell, R.H., Miyamura, T., Dienstag, J.L., Alter, M.J., Stevens, C.E., Tegtmeier, G.E., Bonino, F., Colombo, M., Lee, W.S., Kuo, C., Berger, K., Shuster, J.R., Overby, L.R., Bradley, D.W., 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.
- 3) Esteban, J.I., Gonzalez, A., Hernandez, J.M., Viladomiu, L., Sanchez, C., Lopez-Talavera, J. C., Lucea, D., Martin-Vega, C., Vidal, X., Esteban, R. and Guardia, J.: Evaluation of antibodies to hepatitis C virus in a study of transfusion-associated hepatitis. *N. Engl. J. Med.*, 323(16): 1107—1112, 1990.
- 4) Alter, H.J., Purcell, R.H., Shih, J.W., Melpolder, J.C., Houghton, M., Choo, Q.L. 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(22): 1494—1500, 1989.
- 5) Farci, P., Alter, H.J., Wong, D., Miller, R.H., Shih, J.W., Jett, B. and Purcell, R.H.: A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A,non-B hepatitis. *N. Engl. J. Med.*, 325(2): 98—104, 1991.
- 6) Muraiso, K., Hijikata, M., Ohkoshi, S., Cho, M. J., Kikuchi, M., Kato, N. and Shimotohno, K.: A structural protein of hepatitis C virus expressed in *E. coli* facilitates accurate detection of hepatitis C virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 172(2): 511—516, 1990.
- 7) Aach, R.D., Stevens, C.E., Hollinger, F.B., Mosley, J.W., Peterson, D.A., Taylor, P.E., Johnson, R.G., Barbosa, L.H. and Nemo, G.J.: Hepatitis C virus infection in posttransfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. *N. Engl. J. Med.*, 325(19): 1325—1329, 1991.
- 8) Takamizawa, A., Mori, C., Fuke, I., Manabe, S., Murakami, S., Fujita, J., Onishi, E., Andoh, T., Yoshida, I. and Okayama, H.: Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J. Virol.*, 65(3): 1105—1113, 1991.
- 9) Esteban, J.I., Esteban, R., Viladomiu, L., Lopez-Talavera, J.C., Gonzalez, A., Hernandez, J.M., Roget, M., Vargas, V., Genesca, J., Buti, M., Guardia, J., Houghton, M., Choo, Q.L. and Kuo, G.: Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain. *Lancet*, 2: 294—297, 1989.
- 10) Noel, L., Guerois, C., Maisonneuve, P., Verroust, F. and Laurian, Y.: Antibodies to hepatitis C virus in haemophilia. *Lancet*, 2: 560, 1989.

- 11) Makris, M., Preston, F.E., Triger, D.R., Underwood, J.C.E., Choo, Q.L., Kuo, G. and Houghton, M.: Hepatitis C antibody and chronic liver disease in haemophilia. *Lancet*, 335 : 1117—1119, 1990.
 - 12) Brettler, D.B., Alter, H.J., Dienstag, J.L., Forsberg, A.D. and Levine, P.H.: Prevalence of hepatitis C virus antibody in a cohort of hemophilia patients. *Blood*, 76(1) : 254—256, 1990.
-