献血者の HCV 抗体スクリーニング法における第 1 世代と 第 2 世代検査法の比較評価：検出率に及ぼす献血者 の年齢，GPT 値，及び輸血歴の影響

栗木原修治¹⁾ 宮原 正行¹⁾ 近行 正昭¹⁾
内山 英一¹⁾ 佐藤 博正¹⁾ 宮本 寛治²⁾

¹⁾岡山県赤十字血液センター，²⁾岡山大学医療技術短大部

(平成 4 年 10 月 16 日受付)

COMPARATIVE EVALUATION OF FIRST- AND SECOND-GENERATION ANTI-HCV ASSAYS FOR SCREENING TESTS OF DONATED BLOOD:

The Relationship between Their Sensitivities and Donor's Age, GPT
Levels and Transfusion Histories

Shuji Awakihara¹⁾, Masayuki Miyahara¹⁾, Masaaki Chikayuki¹⁾, Eiichi Uchiyama¹⁾,
Hiromasa Sato¹⁾ and Kanji Miyamoto²⁾

¹⁾Okayama Red Cross Blood Center

²⁾School of Health Sciences, Okayama University

Comparative evaluation of 2nd-generation anti-hepatitis C virus (HCV) Dainabbot PHA assay for combined detection of antibodies to core and non-structural regions, Tokushumenekiken GOR assay containing only core-related antigen, and 1st-generation Ortho c100-3 ELISA was performed on 1,090 random donors and 102 donors with transfusion histories, as detected by HCV-RNA polymerase chain reaction (PCR). Among 1,090 donors, HCV-RNA were detected in 8 of 11 samples positive to c100-3, 13 of 17 samples positive to GOR and 16 of 18 samples positive to PHA, indicating that PHA and GOR containing core or core-related antigens are more sensitive to anti-HCV than c100-3. Among 102 donors with transfusion histories, while only one of five PCR-positive samples was detected by c100-3, all five samples were detected by PHA. These marked differences in sensitivity between the 2nd- and 1st-generation assays were also observed in the donors older than 50 years and GPT less than 25 KU. We conclude that core antigen contained in the 2nd-generation assay play an important role in detecting anti-HCV in donated blood and that PHA having higher specificity is especially useful for screening tests of donated blood.

緒 言

日赤血液センターは世界に先駆けて C 型肝炎ウイルス (HCV) 抗体検出系 オース c100-3 ELISA¹⁾を輸血用血液の HCV 抗体スクリーニング法として導入し，輸血後非 A 非 B 型肝炎の減少に大きな効果を上げてきた²⁾。しかし，この検査キットは，HCV の非構造 (NS) 領域の抗原だけを用いた，いわゆる第 1 世代の方法であり，その検出率や特異性に問題があることが次第に明らか

となってきた^{3)~5)}。

これらの問題点を改善する為，最近，NS 領域の抗原に加えて core 抗原を添加した第 2 世代の検査法が開発された。飯野らは，一般献血者及び NANB 肝炎患者を対象にし合成ペプチド試験や中和試験を用いて検討した結果，第 2 世代のダイナボット PHA や EIA が従来の c100-3 より検出率及び特異性とも大きく向上していることを報告している⁶⁾⁷⁾。しかし，この現象がすべての献血

者に平均的にあてはまるものか、あるいは特定のグループの検出率が高くなったものかは必ずしも明らかでない。

そこで、著者らは、この点について検討するため、一般献血者及び輸血歴を持つ献血者を対象にし、nested-polymerase chain reaction (PCR) を用いて第2世代の PHA と第1世代の c100-3 を比較検討し、両者の検出率の差は特に献血者の年齢、GPT 値、輸血歴等と関係することを見出した。また、第1世代と第2世代の中間に位置し、core 関連抗原を含むと言われている GOR キット(特殊免疫研)⁸⁾⁹⁾も一部の試験に用い、献血者の HCV スクリーニングにおける core 抗原の重要性について検討した。

方 法

対象は無作為に抽出した献血者1,090例及び HCV 感染の high risk group のひとつと言われている輸血歴のある献血者102例とし、以下の検査法を使用した。第1世代の検査法として、オーソ社 HCV-Ab ELISA Kit (以下、c100-3)を、第2世代の検査キットとしてダイナボット社 HCV PHA Kit (以下、PHA)を用いた。また、特殊免疫研 NANB Anti-GOR EIA Kit (以下、GOR)⁸⁾⁹⁾を一部に使用した。それぞれのキットの使用法は各キットの説明書に従った。

一般献血者1,090例の内、HCV 抗体陽性例及び 36Karmen unit (KU) 以上の GPT 異常値を示すもの、及び輸血歴102例の全例について nested-PCR 法を用いて HCV 遺伝子の検出を行った。また、輸血歴をもつ献血者で HCV 抗体陽性を示したものについては、確認試験法として PCR 法その他に、オーソ社 recombinant immunoblot assay II (RIBA II) を使用した。

Nested-PCR 法は常法に従い、acid-guanidium phenol chloroform 法を用いて RNA を抽出した後¹⁰⁾、逆転写酵素を用いて cDNA を合成し、この合成した cDNA を鋳型として nested-PCR を行った⁵⁾。この時、プライマーは HCV 遺伝子配列の中で最も良く保存されていると言われている 5'-noncoding 領域のものを使用した¹¹⁾。なお、nested-PCR 法を用いた HCV 遺伝子の検出は同

一サンプルについて最低2回行い、2回以上 HCV 遺伝子が検出されたものを陽性と判定した。

また、glutamic-pyruvic transaminase (GPT) 値は UV 法を用いて測定した。

結 果

無作為に選んだ一般献血者1,090例を対象にし、c100-3、GOR、及び PHA を用いて HCV 抗体スクリーニングを行った。その結果、それぞれの抗体陽性例数は Fig. 1 に示すように、c100-3が11例、GOR が17例、PHA が18例であった。抗体陽性率を比較すると、NS 領域の抗原だけを含む c100-3 が約1.0%であるのに対し、core 関連抗原を含む GOR は約1.6%、core 抗原と NS 領域の抗原を含む PHA は約1.7%となり、core あるいは core 関連抗原を含むキットの方が若干高くなる傾向を示した (Fig. 1)。

3種のキットの乖離例を調べると、c100-3単独陽性が2例、GOR 単独陽性が4例、及び PHA 単独陽性が4例みられた。また、PHA、GOR 共に陽性が5例、PHA、c100-3共に陽性が1例、PHA、GOR 及び c-100-3の全キットに陽性を示したものが8例あった (Fig. 1)。これらの検体について HCV 遺伝子がどの程度検出されるかを nested-

Fig. 1 The number (the denominator) of samples positive to c100-3, GOR, and PHA anti-HCV assays and the number (the numerator) of samples positive to HCV-RNA among 1,090 random donors.

PCR 法を用いて検討したところ、3 キット共に陽性、及び PHA と GOR 共に陽性を示した全例に HCV 遺伝子が検出されたが、c100-3 及び GOR 単独陽性例はすべて PCR 陰性であった (Fig. 1). また、c100-3 は 8 例、GOR は 3 例の HCV 遺伝子検出例を見逃していることが示された (Fig. 1). 対照的に、PHA では HCV 遺伝子検出例全例が陽性と判定された (Fig. 1). また、PHA 陽性例 18 例のうち HCV 遺伝子が検出されなかった 2 例について阻止試験を行ったところ、2 例とも陽性と判定され、非特異反応でないことがわかった。

次に、一般献血者 1,090 例の年齢、性別、GPT 値と各キットの陽性率及び HCV 遺伝子検出例の関係について調べた。その結果、c100-3、GOR、及び PHA の検出率の差は、献血者の年齢の上昇と

共に大きくなり、特に 50 歳以上に c100-3 陰性で PHA 陽性となる例が顕著に増加してくる傾向が見られた (Table 1). すなわち、29 歳以下では、c100-3 と PHA の検出率は、ほぼ同等であったが、50 歳以上では PCR 陽性の 9 例すべてが PHA で検出されたのに対し、c100-3 では 5 例の見逃しがあった。

また、GPT 値が高くなるにつれていずれのキットの陽性率も上昇し、各キットとも GPT 値 25KU 以上では PCR 法の結果と良く一致し、キット間の差もあまりみられなかった (Table 2). しかし、25KU 未満になると PCR との一致率はキット間で差が生じ、特に c100-3 では見逃し例が多く認められた。この結果を男女別に見ると、女性は GPT 値が 25KU 以上になると、HCV 抗体陽性率が男性より大幅に高くなることが示された (Table 2).

さらに、輸血歴をもつ献血者 102 例について c100-3 と PHA の陽性例数を比較したところ、c100-3 陽性が 1 例、PHA 陽性が 5 例認められ、PHA 単独陽性が 4 例存在した (Fig. 2). Nested-PCR を行った結果、HCV 抗体陽性例全 5 例に HCV 遺伝子が検出され、HCV 抗体陰性 97 例には検出されなかった (Fig. 2). また、この 5 例について RIBA II で測定したところ、3 例が 2 バンド以上に 1 + 以上のバンドが検出され陽性と判定され、

Table 1 Positive rates of c100-3, GOR, and PHA anti-HCV assays among 1,090 random donors according to age

Age	n	Anti-HCV assays			PCR
		c100-3	GOR	PHA	
~29	359	4(1.11%)	4(1.11%)	4(1.11%)	3(0.83%)
30~49	550	3(0.55%)	6(1.09%)	4(0.73%)	4(0.73%)
50~	181	4(2.2%)	7(3.86%)	10(5.52%)	9(4.97%)
total	1090	11(1.01%)	17(1.56%)	18(1.65%)	16(1.47%)

(): positive rate

Table 2 Positive rates of c100-3, GOR, and PHA anti-HCV assays among 1,090 random donors according to GPT level

GPT (KU)	Sex	n	Anti-HCV assays			PCR
			c100-3	GOR	PHA	
~14	male	354	1(0.28%)	5(1.41%)	5(1.41%)	4(1.12%)
	female	398	2(0.50%)	1(0.25%)	1(0.25%)	1(0.25%)
	subtotal	752	3(0.39%)	6(0.79%)	6(0.79%)	5(0.66%)
15~24	male	227	2(0.88%)	3(1.32%)	3(1.32%)	2(0.88%)
	female	40	2(5%)	3(7.5%)	4(10%)	4(10%)
	subtotal	267	4(1.49%)	6(2.25%)	7(2.62%)	6(2.25%)
25~35	male	49	1(2.04%)	1(2.04%)	1(2.04%)	1(2.04%)
	female	6	2(33.3%)	2(33.3%)	2(33.3%)	2(33.3%)
	subtotal	55	3(5.45%)	3(5.45%)	3(5.45%)	3(5.45%)
36~	male	14	0	1(6.25%)	1(6.25%)	1(6.25%)
	female	2	1(50%)	1(50%)	1(50%)	1(50%)
	subtotal	16	1(6.25%)	2(12.5%)	2(12.5%)	2(12.5%)
	total	1090	11(1.01%)	17(1.56%)	18(1.65%)	16(1.47%)

(): positive rate

Fig. 2 The number (the denominator) of samples positive to c100-3 and PHA anti-HCV assays and the number (the numerator) of HCV-RNA among 102 blood donors with transfusion histories.

の HCV 遺伝子検出例を見逃していることが認められたが、core 抗原を含む PHA は RNA 検出例の全てが陽性と判定された。また、第 1 世代と第 2 世代の中間に位置し、NS 領域の抗原は含まず core 関連抗原を有すると言われている GOR は、RNA 検出例の見逃しが PHA より若干多いが、c100-3 よりはるかに高い一致率を示した。従って、献血者の HCV 抗体の検出率の改善には、core 抗原が特に重要な役割を果していると推定される。

このように、第 2 世代キットは第 1 世代キットに比べて HCV 抗体の検出率が大幅に向上していることがわかったが、この差はすべての献血者に平均的にみられると言うより、むしろ以下に示す 3 つのグループに顕著に認められた。第 1 に、PHA の検出率は、献血者の年齢が上昇するにつれて特に高くなる傾向がみられた。すなわち、29 歳以下の若年齢層では両者の検出率の差はほとんどなかったが、50 歳以上の高年齢層において PHA は c100-3 に比べて RNA 陽性例の見逃しはるかに少なくなった。第 2 に、いずれのキットも GPT 値が高くなるにつれ陽性率は上昇したが、PHA で検出でき c100-3 で検出できないという乖離例の多くは、GPT 値が比較的低値を示すグループ(約 25KU 以下)において認められた。第 3 に、PHA と c100-3 の検出率の差は、一般献血者より輸血歴のある献血者群において大きくなる傾向が認められた。以前から輸血歴のある献血者は HCV 抗体陽性率が高くなると言われていたが¹²⁾、著者らのデータはこれを支持するだけでなく、c100-3 では一般献血者よりむしろ輸血歴のある献血者において見逃し率が多かったことを示

残り 2 例のうち 1 例は c22-3 に 4 + のバンドが、もう 1 例は c22-3 に 1 + のバンドが認められた。しかし、この 2 例はその他に 1 + 以上のバンドは検出されず判定保留となった (Table 3)。

考 察

第 1 世代の HCV 抗体検査法である c100-3 の問題を改善するため、最近、種々の第 2 世代検査法が開発されてきた。これは、いずれも core 抗原と NS 領域の抗原を含むのが特徴であり、特に core 抗原の重要性が示唆されている⁶⁾⁷⁾。今回、著者らは第 2 世代のダイナボット PHA キットについて nested-PCR 法を用いて第 1 世代のオーソ c100-3 キットと比較検討した結果、PHA の検出率と特異性に大幅な向上を確認した。すなわち、1,090 例の一般献血者及び 102 例の輸血歴のある献血者において、c100-3 ではそれぞれ 8 例及び 4 例

Table 3 Confirmatory RIBAII test of c100-3 and PHA positive samples among 102 donors with transfusion histories

No.	Age	Sex	GPT (KU)	c100-3	PHA	Ortho RIBAII						PCR
						5-1-1	c100-3	c33c	c22-3	SOD	Result	
1	36	female	87	+	+	-	4+	4+	4+	-	+	+
2	35	male	9	-	+	-	-	4+	4+	-	+	+
3	20	male	35	-	+	-	-	2+	4+	-	+	+
4	41	female	13	-	+	-	-	+/-	4+	-	Ind	+
5	63	female	15	-	+	-	-	+/-	1+	-	Ind	+

Ind: Indeterminate

しており、第2世代キットによって初めての確に捕捉できることがわかった。

このように、第2世代キットのHCV抗体検出率が高くなった主因は、高齢層（約50歳以上）、低GPT値群（25KU以下）、及び輸血歴のある献血者群の見逃しが少なくなったことにあると思われる。これらのグループがなぜc100-3抗体で検出されにくく第2世代検査法で捕捉できるのかについて断定はできないが、恐らくcore抗体がc100-3抗体より感染後血液中に長期間にわたって存在すると言われていること¹³⁾と関係していると推定される。一方、c100-3抗体はインターフェロンの抗ウイルス作用を反映しC型肝炎の病変の指標となると言われており¹⁴⁾、HCVの活動期に特に強く現れる抗体である可能性が示唆される。そこで、高齢層と輸血歴のある献血者の多くは感染後かなり経過しているとみられること、低GPT値群は少なくともHCVの強い活動期ではないとみなせることなどから、このようなグループの献血者はその他の献血者に比べてcore抗体だけが残りc100-3抗体は既に消失した状態になる可能性が高いと推測される。従って、core抗体を検出できる第2世代キットは、献血者や一見健康者とみられるHCVキャリアのスクリーニング法として特に有効であると考えられる。

日赤血液センターでは、平成4年2月から第2世代の検査法のひとつであるPHA法に切り替えられた。この方法は、これまで述べたように検出率及び特異性とも高く、また、検出方法が凝集法であるため献血者のスクリーニングのように大量の検体を測定する方法として適切な選択であったと考えられる。ただし、すでに指摘したようにcore抗体はc100-3抗体より血中に長くとどまる抗体であるとする、c100-3抗体に比べて低力価の抗体が広く分布することが予測される。かつて、c100-3のcut-off値近辺の検体の判定が問題視されたが、第2世代検査キットはc100-3以上に判定基準の設定如何によって検出率が大きく影響される可能性がある、この点に注意を払う必要があらう。

また、第2世代キットの若干の問題点は、非常

にまれではあるが、PHA陰性検体の中にc100-3で弱陽性を示し、PCRで陽性例がみられることである¹⁵⁾。また、c100-3検査において所定の37℃では陰性であるが、4℃付近の低温で反応性を示す抗体がまれに存在することも示唆されている¹⁶⁾。このような抗体は第2世代のPHAキットにおいても検出されにくいと言われており、今後の検討課題であらう。

今回、HCV感染の確認には主としてnested-PCR法によるRNA検出試験を用いたが、本法は操作が複雑であり、もっと簡便な方法が求められている。また、nested-PCR法は、その検出限界以下のウイルス量しか血中に存在しない感染者やHCVが消失し抗体だけを有するHCV既往歴者のような場合には有効ではない。そこで、今後の確認方法として、4種のHCV抗原がニトロセルロース膜にバンド状に固定されたRIBA IIを試用したところ、PCR法との一致率が高く、確認試験として有用であることが示唆された。Follettらも、RIBA IIで陽性と判定されたものは、その約95%にHCV遺伝子が検出されたと報告している¹⁷⁾。

HCV抗体検査法の導入以前は、GPT値がNANB肝炎防止のsurrogate markerとして重要な役割を果たしてきた¹⁸⁾¹⁹⁾。また、その目的から基準値をさらに25KU程度まで下げるべきであると言う議論も行われてきた¹⁸⁾¹⁹⁾。しかし、今回の著者らが得たデータから判断すると、第2世代のHCV抗体検査法を行えばGPT検査の価値は以前より小さくなると考えられる。たとえば、今回の実験では、GPT値が基準値以上（ ≥ 36 KU）を示す献血者でもPHA陰性であればHCV遺伝子は検出されなかった。さらに、GPT値のHCVのsurrogate markerとしての役割は男女間で差がみられ、女性はGPT値が基準値以内でも25KU以上になるとHCV抗体を有する確率が男性よりはるかに高いことが認められる（Table 2）。一方、男性は、GPT値が基準値（36KU）以上でも必ずしもウイルス性肝炎を反映するものではなく、むしろ高体重者に多い脂肪肝など他の要因によることが指摘されている²⁰⁾²¹⁾。したがって、GPT値を

従来どおり HCV の surrogate marker として併用するとしても、血液の有効利用のことも考慮すれば、男女別あるいは体重別に基準値を設定するなど、今後見直す必要があろう。

以上のように、第2世代の HCV 検査キットである PHA は、従来の c100-3キットで特に見逃される傾向にあった高年齢層の献血者群、低 GPT 値の献血者群、及び輸血歴のある献血者群の検出率が高く、また、偽陽性の少ない特異性の高い方法であり、献血者の HCV 抗体スクリーニング法として優れた方法であると考えられる。

ま と め

献血者を対象にし、第1世代 HCV 抗体検査法であるオーソ c100-3キット、第2世代のダイナボット HCV PHA キット及び第1世代と第2世代の中間的な特殊免疫研 GOR キットを比較検討し、以下の知見を得た。

1. Core 及び NS 領域の抗原を有する PHA 及び core 関連抗原を有する GOR は、NS 領域の抗原だけを有する c100-3に比べて HCV-RNA 検出例の見逃しが少なく、特に PHA は特異性も高いことが示された。

2. PHA と c100-3の検出率の差は、全ての献血者に平均的にみられるというより、むしろ、c100-3で主として見逃される傾向のあった高年齢層群(約50歳以上)、低 GPT 値群(約25KU 以下)、及び輸血歴のある献血者群における PHA の検出率が向上したことに基因することが認められた。

3. この原因は、上記3群の献血者が HCV 感染から長期間経過しているか、少なくとも HCV の活動期ではないとみなせることから、core 抗体だけが残り c100-3は既に消失した状態になる可能性がその他の献血者に比べて高いためであると推測される。

4. 従って、献血者等の一見健常者とみられる HCV キャリアの捕捉には、第2世代キットに含まれる core 抗原が重要な役割を果たすと推定され、特に PHA は特異性も高く、輸血用血液のスクリーニング法として有用であると考えられる。

文 献

1) Kou, G., Choo, Q.-L., Alter, H.J., et al.: An

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

- 2) The 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 posttransfusion hepatitis type non-A,non-B and type B. *Lancet*, 335: 1040—1041, 1991.
- 3) McFarlane, G.I., Smith, H.M. and Johnson, P. J.: Hepatitis C virus antibodies in chronic active hepatitis: Pathogenetic factor or false-positive result? *Lancet*, 335: 754—757, 1990.
- 4) Zanetti, A.R., et al.: Hepatitis C virus RNA in symptomless donor implicated in posttransfusion non-A,non-B hepatitis. *Lancet*, 336: 448, 1990.
- 5) Garson, J.A., et al.: Detection of hepatitis C virus sequences in blood donations by “nested” polymerase chain reaction and prediction of infectivity. *Lancet*, 335: 1419—1422, 1990.
- 6) 飯野四郎, 他: 受身赤血球凝集反応 (Passive Hemagglutination: PHA 法) による第2世代の HCV 関連抗体測定系. *Prog. Med.*, 175: 1911—1921, 1991.
- 7) 飯野四郎: 第2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(1): 87—95, 1991.
- 8) Mishiro, S., Hoshi, Y. and Takeda, K.: Non-A,non-B hepatitis specific antibodies directed at host-derived epitope: Implication for an autoimmune process. *Lancet*, 336: 1400—1403, 1990.
- 9) 三代俊次: 非 A 非 B 型肝炎特異エピトープ GOR とその抗体. *日本臨牀*, 49(2): 335—346, 1991.
- 10) Chomczynski, P. and Sacchi, N.: Single-step method RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162: 156—159, 1987.
- 11) Garson, J.A., Ring, C.J.A. and Tuke, P.W.: Improvement of HCV genome detection with “short” PCR products. *Lancet*, 338: 1466—1467, 1991.
- 12) 下村益広, 他: 輸血歴のある献血者における HCV 関連マーカーの検討. *血液事業 Blood Programme*, 14(4): 746—750, 1991.
- 13) 矢野右人: HCV 抗体測定の臨床的意義と問題点. *日本臨牀*, 49(2): 402—408, 1991.
- 14) 奥新浩見, 他: 非 A 非 B 型急性肝炎のインターフェロン療法における 2nd HCV 抗体および HCV 2nd RIBA 測定の有用性について. 兵庫県

- 医師会医学雑誌, 34(4): 168—173, 1992.
- 15) 近行正昭, 他: アボット EIA キットによる HCV 抗体検査法の検討—HCV ゲノム検出および GPT 値との関係. 血液事業 Blood Programme, 14(4): 734—736, 1991.
- 16) 鈴木雅治, 他: 献血者に見出された低温依存性 c100-3 抗体. 医学のあゆみ, 161(5): 303—307, 1992.
- 17) Follett, E.A.C., Dow, B.C., et al.: HCV confirmatory testing of blood donors. Lancet, 338: 1024, 1991.
- 18) 片山 透: 非 A 非 B 肝炎. 臨床検査, 32(3): 1585—1595, 1988.
- 19) 赤羽賢治, 鈴木 宏: 輸血による非 A 非 B 肝炎感染の防止. Immunohaematology, 10(3): 266—269, 1988.
- 20) Katkov, W.N., Friedman, L.S., Cody, H., et al.: Elevated serum alanine amino-transferase levels in blood donor: The contribution of hepatitis C virus. Ann. Intern. Med., 115(11): 882—884, 1991.
- 21) 木村 泰, 他: 献血者における S-GPT 異常値者の解析. 日輸血会誌, 38(2): 320, 1992.
-