第2世代 HCV 抗体陽性献血者における各抗体の 保有状況と HCV-RNA の検出

鈴木 典子¹⁾ 伊藤 直文¹⁾ 跡部 里香²⁾ 石川 晃一²⁾

¹⁾山梨県赤十字血液センター, ²⁾山梨県衛生公害研究所

(平成4年11月11日受付)

ANTIBODY RESPONSE TO RECOMBINANT HCV ANTIGENS AND DETECTION OF HCV RNA IN SERUM SAMPLES OF BLOOD DONORS POSITIVE FOR ANTI-HCV BY 2ND GENERATION HCV ANTIBODY SCREENING TEST

Noriko Suzuki¹⁾, Naofumi Ito¹⁾, Rika Atobe²⁾ and Koh-ichi Ishikawa²⁾
Yamanashi Red Cross Blood Center¹⁾, Yamanashi Institute for Public Health²⁾

We studied antibody response against three different recombinant antigens (5-1-1/c100-3, c33c, c22-3) by RIBAII and detection of HCV RNA by RT-PCR in serum samples of blood donors positive for anti-HCV by 2nd generation HCV antibody screening test (PHA).

In 52 serum samples showing PHA titer $\geq 2^{12}$, 37 samples (71%) were reactive to three different antigens (5-1-1/c100-3, c33c, c22-3), and other 15 samples (29%) were reactive to two different antigens (c33c, c22-3). Moreover, HCV RNA was detected in 51 samples (98%) by RT-PCR.

On the other hand, in 52 serum samples showing PHA titer 2^{5-11} , only one samples (2%) was reactive to three different antigens (5-1-1/c100-3, c33c, c22-3) and other 7 samples (13%) were reactive to two antigens (c33c, c22-3). Twenty-five samples (48%) were reactive only to core antigen (c22-3). HCV RNA was detected in 5 samples (10%) out of these 52 samples.

These results suggest that blood donors showing PHA titer $\geq 2^{12}$ are HCV carriers and the majority of blood donors showing PHA titer 2^{5-11} may have past infection of HCV.

はじめに

近年カイロン社が開発した、C型肝炎ウイルス(HCV)遺伝子の非構造領域蛋白の一部のリコンビナント抗原(c100-3)を用いた抗体の測定によって、C型肝炎の実態が明らかになった¹⁾²⁾。さらにHCV遺伝子の全構造が解明されるとともに³⁾⁴⁾、従来のc100-3抗原に加え、core領域と非構造領域のNS3のエピトープを用いた第2世代のHCV抗体測定系が開発された⁵⁾⁶⁾。

赤十字血液センターでは1989年11月からc100-3抗体測定キットを用いて⁷⁾、1992年2月からは第2世代の測定キットを用いて、献血者のHCV抗体のスクリーニングを行っている。

われわれは第2世代の測定キットで陽性を示した献血者について、HCVの個々の蛋白に対する

特異抗体の検索とHCV-RNAの検出を行い、献血者で検出されるHCV抗体の特徴について興味ある結果を得たので報告する。

対象及び方法

第2世代のHCV抗体測定キットはダイナボット社製「HCV・PHAダイナボット」(以下PHA)を用い、山梨県赤十字血液センターの1992年1月から7月までのPHA陽性献血者血清を段階希釈して抗体価を測定し、抗体価 2^{12} 以上をA群、 $2^5 \sim 2^{11}$ をB群とした。さらに両群から献血者の地域が偏らないように配慮して選んだA群52例と、抗体価の分布割合を損わないよう配慮して選んだB群52例を対象として以下の検査を行った。

HCVの個々の蛋白に対する特異抗体の検出にはオーソ社の「カイロンHCV RIBAテストII」

表 1 A群の抗体検出状況及びPCRの結果

NO.	年齢	性	S-GPT	PHA 2 ⁿ	c100-3抗体 (OD)	RIBAI				PCR
						5-1-1	c100-3	c33c	c22-3	
1	31	M	30	≥12	>3.00	4+	4+	4+	4+	+
2	31	M	36	≥12	2.96	4+	4+	4+	4+	+
3	50	M	45	≥12	>3.00	4+	4+	4+	4+	+
4	62	M	12	≥12	>3.00	4+	4+	4+	4+	+
5	44	M	22	≥12	>3.00	4+	4+	4+	4+	+
6	24	M	29	≥12	>3.00	4+	4+	4+	4+	+
7	25	M	46	≥12	>3.00	4+	4+	4+	4+	+
8	27	M	21	≥12	>3.00	3+	3+	4+	4+	+
9	30	M	34	≥12	>3.00	3+	4+	4+	4+	+
10	32	M	48	≥12	>3.00	3+	3+	4+	4+	+
11	43	M	32	≥12	>3.00	3+	3+	4+	4+	+
12	45	F	28	≥12	>3.00	3+	2+	4+	4+	+
13	37	M	17	≥12	>3.00	2+	2+	4+	4+	+
14	40	M	60	≥12	>3.00	3+	1+	4+	4+	+
15	31	M	19	≥12	2.77	3+	3+	4+	4+	+
16	19	M	37	≥12	>3.00	3+	2+	4+	4+	+
17	42	F	75	≥12	2.91	3+	2+	4+	4+	+
18	22	M	31	≥12	1.48	2+	2+	4+	4+	+
19	50	M	17	≥12	2.89	3+	1+	4+	4+	+
20	37	M	9	≥12	>3.00	2+	2+	3+	4+	+
21	25	M	29	≥12	>3.00	3+	4+	4+	3+	+
22	59	F	20	≥12	>3.00	2+	2+	2+	4+	+
23	43	M	15	≥12	>3.00	4+	4+	3+	4+	+
24	52	F	14	≥12	>3.00	3+	3+	3+	4+	+
25	19	F	17	≥12	1.73	2+	3+	3+	4+	+
26	27	M	17	≥12	>3.00	3+	3+	2+	4+	+
27	29	M	17	≥12	2.05	+/-	3+	4+	4+	+
28	34	M	94	≥12	>3.00	+/-	4+	4+	4+	+
29	53	F	26	≥12	0.53	+/-	1+	4+	4+	+
30	36	M	23	≥12	>3.00	+/-	3+	4+	4+	+
31	24	F	14	≥12	1.10	+/-	3+	3+	4+	+
32	28	M	102	≥12	>3.00	+/-	2+	4+	4+	+
33	58	F	24	≥12	0.42	2+	+/-	4+	4+	+
34	29	M	48	≥12	>3.00	0	3+	4+	4+	-
35	60	F	14	≥12	2.28	0	1+	3+	4+	+
36	48	M	133	≥12	>3.00	0	4+	4+	4+	+
37	32	F	18	≥12	0.88	0	2+	4+	4+	+
38	19	M	23	≥12	0.81	+/-	+/-	4+	4+	+
39	51	M	17	≥12	-	+/-	+/-	4+	4+	+
40	25	M	21	≥12	-	+/-	+/-	3+	4+	+
41	42	M	18	≥12	-	0	+/-	4+	4+	+
42	20	F	15	≥12	-	0	+/-	4+	4+	+
43	52	F	44	≥12	-	0	0	4+	4+	+
44	32	M	26	≥12	-	0	0	4+	4+	+
45	45	M	78	≥12	-	0	0	4+	4+	+
46	38	M	23	≥12	-	0	0	3+	4+	+
47	44	F	15	≥12	-	0	0	4+	4+	+
48	63	M	25	≥12	-	0	0	4+	4+	+
49	47	M	26	≥12	-	0	0	4+	4+	+
50	43	M	187	≥12	-	0	0	4+	4+	+
51	35	M	22	≥12	-	0	0	4+	4+	+
52	43	M	18	≥12	-	0	0	4+	4+	+

表2 B群の抗体検出状況及びPCRの結果

NO.	年齢	性	S-GPT	PHA 2 ⁿ	c100-3抗体 (OD)	RIBAI				PCR
						5-1-1	c100-3	c33c	c22-3	
1	43	F	15	11	—	0	0	4+	4+	+
2	49	M	13	11	—	0	0	3+	4+	+
3	21	M	18	11	—	0	0	+/-	4+	+
4	51	F	15	11	—	0	0	+/-	4+	—
5	63	M	9	10	—	+/-	0	1+	4+	—
6	44	F	11	10	—	0	0	2+	4+	—
7	16	M	11	10	—	0	0	3+	2+	+
8	43	M	21	10	—	0	0	+/-	3+	—
9	50	F	13	10	—	0	0	+/-	2+	—
10	52	M	18	10	—	0	0	+/-	1+	—
11	57	M	8	9	—	0	0	1+	4+	—
12	41	M	11	9	—	0	0	0	2+	—
13	44	M	9	8	1.79	2+	1+	1+	3+	—
14	44	M	11	8	—	0	0	0	3+	—
15	20	M	8	8	—	0	0	1+	+/-	—
16	23	M	9	7	—	0	+/-	1+	3+	+
17	53	F	9	7	—	0	0	+/-	3+	—
18	59	F	12	7	—	0	0	+/-	3+	—
19	58	M	21	7	—	0	0	+/-	2+	—
20	56	M	10	7	—	0	0	0	3+	—
21	48	F	13	7	—	0	0	+/-	1+	—
22	48	F	11	7	—	0	0	+/-	+/-	—
23	53	M	10	7	—	0	0	0	+/-	—
24	49	M	14	6	—	0	0	0	4+	—
25	60	F	30	6	—	0	0	+/-	3+	—
26	30	M	9	6	—	0	+/-	0	3+	—
27	35	F	13	6	—	0	0	0	3+	—
28	48	F	12	6	—	0	0	0	3+	—
29	38	M	9	6	—	0	0	0	3+	—
30	55	M	23	6	—	0	0	0	2+	—
31	35	M	18	6	—	0	0	+/-	+/-	—
32	23	F	10	6	—	0	0	+/-	0	—
33	55	M	16	6	—	0	0	+/-	0	—
34	22	F	9	6	—	0	0	0	0	—
35	19	M	19	6	—	0	0	0	0	—
36	27	M	84	5	—	0	0	0	3+	—
37	56	M	8	5	—	0	0	0	3+	—
38	29	F	8	5	—	0	0	+/-	2+	—
39	30	M	30	5	—	0	0	0	1+	—
40	55	M	16	5	—	0	0	0	1+	—
41	30	M	31	5	—	0	0	0	1+	—
42	49	F	11	5	—	0	0	+/-	0	—
43	58	M	13	5	—	0	0	+/-	0	—
44	54	F	12	5	—	0	0	0	0	—
45	46	F	12	5	—	0	0	0	0	—
46	18	F	9	5	—	0	0	0	0	—
47	44	F	8	5	—	0	0	0	0	—
48	44	F	15	5	—	0	0	0	0	—
49	38	F	8	5	—	0	0	0	0	—
50	17	F	9	5	—	0	0	0	0	—
51	25	F	8	5	—	0	0	0	0	—
52	30	M	23	5	—	0	0	0	0	—

(以下 RIBAI)を用いた。RIBAI は HCV の非構造領域の NS4に由来する5-1-1及び c100-3, NS3に由来する c33c, 並びに構造領域の core 由来の c22-3の4種類の HCV リコンビナント抗原を2種の目視判定用コントロールとともに、ニトロセルロースストリップ上に配置したイムノブロット法による抗体検出法である。各抗原バンドの反応強度は0～4+とし、1+以上あるものを抗体陽性とした。c100-3抗体についてはオーソ社の「オーソ HCV ab ELISA キット」でも測定した。

血清中の HCV 遺伝子の検出は、5'-non-coding 領域の primer を用いて RT-PCR 法を行い検出した⁸⁾⁹⁾。

S-GPT36KU 以上を肝機能異常とした。

文中5-1-1及び c100-3抗体を NS4抗体、c33c 抗体を NS3抗体、c22-3抗体を core 抗体とした。

成 績

1. A 群の各抗体の検出成績及び GPT 値

PHA の抗体価^{2¹²}以上の検体52例について各抗体の検出結果、GPT 値、年齢および性別を表1に示した。52例中、NS3, NS4, core の3抗体陽性は37例(71%)で、NS3, core の2抗体だけ陽性が15例(29%)あり、1抗体のみ陽性や陽性抗体の無い例は1例も無かった。

ストリップ上の各抗体の反応強度は、core 抗体では4+が98% (51/52)、3+が2% (1/52)となり、大部分が4+の強い反応強度を示した。NS3抗体は4+が81% (42/52)、2+～3+が19% (10/52)となり、core 抗体に比し強さにバラツキが見られた。NS4抗体は1+から4+まで広

く分布していた。

肝機能異常は52例中14例(27%)に認められた。各抗体と肝機能異常との関係は、NS4抗体では、抗体陽性37例中11例(30%)に肝機能異常が認められたが、抗体陰性15例中にも3例(20%)あった。NS3抗体については、反応強度4+の42例中の肝機能異常は14例(33%)あったが、3+以下の10例には肝機能異常は1例も無く、NS3抗体の陽性強度と肝機能異常に相関が見られた。

2. B 群の各抗体の検出成績及び GPT 値

PHA の抗体価^{2⁵～2¹¹}の検体52例について各抗体の検出結果、GPT 値、年齢および性別を表2に示した。52例中 NS3, NS4, core の3抗体陽性は1例(2%)で、NS3, core の2抗体だけ陽性が7例(13%)、core 抗体のみ陽性が25例(47%)、NS3抗体のみ陽性が1例(2%)となり、core 抗体単独陽性が約半数を占めた。また、陽性強度が+/-または反応パターン無しが18例(36%)見られたが、この中で+/-に相当したものが7例で反応パターン無しは11例であった。

肝機能異常は1例(2%)だけで PHA の抗体価は^{2⁵}で core 抗体のみ陽性の検体であった。3抗体陽性の1例は core 抗体が3+, NS4抗体の5-1-1が2+, c100-3が1+に反応したが、NS3抗体は1+で core 抗体の陽性強度に比して弱く、A 群の3抗体陽性例とは明らかに相違が見られた。この献血者には輸血歴があった。

3. 各抗体と HCV-RNA の検出結果

A 群と B 群の全例に PCR 法を行い HCV-RNA の検出を行って結果を表1と表2に示し

表3 各抗体の反応パターンと HCV-RNA の検出結果

RIBAI 抗原バンド反応パターン				A 群		B 群	
5-1-1	c100-3	c33c	c22-3	PHA 陽性数	HCV-RNA 検出数(%)	PHA 陽性数	HCV-RNA 検出数(%)
+	+	+	+	26	26 (100%)	1	0
-	+	+	+	10	9 (90%)	0	0
+	-	+	+	1	1 (100%)	0	0
-	-	+	+	15	15 (100%)	7	4 (57%)
-	-	+	-	0	0	1	0
-	-	-	+	0	0	25	1 (4%)
-	-	-	-	0	0	18	0
				52	51 (98%)	52	5 (9.6%)

表4 PHA抗体価別のHCV-RNA検出率

PHA抗体価 2 ⁿ	PHA陽性数	PCR陽性数(%)
≥12	52	51 (98%)
11	4	3 (75%)
10	6	1 (17%)
9	2	0
8	3	0
7	8	1 (13%)
6	12	0
5	17	0

表5 各抗体別のHCV-RNA検出成績

	NS3抗体	NS4抗体	core抗体
HCV-RNA (+) 56例	55 (98%)	36 (64%)	56 (100%)
HCV-RNA (-) 48例	6 (13%)	2 (4%)	29 (60%)

た。A群52例中51例(99%)に、B群52例中5例(9.6%)にHCV-RNAが検出された。

各抗体の陽性パターンとPCR法との関係を表3に示した。NS3、NS4、coreの3抗体陽性38例中36例(95%)に、NS3、coreの2抗体陽性22例中19例(86%)に、core抗体のみ陽性25例中1例(4%)にHCV-RNAが検出された。

PHAの抗体価とPCR法の関係を表4に示した。PHAの抗体価2¹²以上では98%(51/52)に、2¹¹では75%(3/4)に、2¹⁰では17%(1/6)に、2⁷では13%(1/8)にHCV-RNAが検出され、2¹⁰以下では血中にHCV-RNAが検出される例は著しく少なかった。

各抗体別のHCV-RNA検出率を表5に示した。HCV-RNA陽性56例について、NS3抗体は98%、NS4抗体は64%、core抗体は100%捕捉しているが、陰性48例については、NS3抗体は13%、NS4抗体は4%、core抗体は60%陽性となり、NS3抗体が血中のウイルスの有無を良く捕らえていると思われた。

考 察

献血者のHCV抗体検査は従来のc100-3抗原を用いたスクリーニングから、core領域及びNS3領域のエピトープも加えた第2世代の測定系に変

わった。第2世代の測定系は感度及び特異性に優れ、第1世代の測定系では見逃していたHCV-RNA陽性検体を広く捕捉できると言われている^{10)~12)}。この第2世代の測定キットに陽性を示した献血者について、各抗体の分布状況を調査し、献血者の抗体の特徴、各抗体と肝機能との関係及びPCR法を用いた血中ウイルスの有無と各抗体の関係について検討した。

PHAの抗体価2¹²以上の群では、NS3とcore抗体が全例強陽性に反応し、その内71%がNS4抗体も陽性であった。また98%にHCV-RNAが認められ肝機能異常も27%に認められた。山梨県赤十字血液センターの1992年2月から7月までの献血者26,335人中PHA陽性者は239人(0.9%)で、この内2¹²以上の抗体価を示す人は65%を占めており、今回の結果からこの65%の人たちはHCV持続感染者と考えられた。一方残りの35%を占める2¹¹以下の群では、HCV-RNA検出率も9.6%と低く、各抗体の重なる例が少なく反応強度も弱く、core抗体単独陽性例が全体の約半数を占め、NS3、NS4抗体の出現する例は著しく少なかった。また肝機能異常もわずかに1例認められたに過ぎない。このことから2¹¹以下の群はHCVに過去に感染しウイルスを排除できた既感染者が大部分を占めていると考えるが、一方HCVは従来のウイルスに比べ極めて微量しか血中に存在していないと推定されるため、血中にPCR法でも検出できない微量のウイルスが存在している可能性と、血中にウイルスが存在していない場合でも、肝細胞中にはウイルスが認められる可能性も否定出来ない。さらにはこの抗体がHCV特異抗体ではなく、他のウイルスとの交叉反応による抗体である可能性も否定出来ないと思われる。

この群の人たちが感染後どのような経過を経て現在の状態になっているのか、また今後どのような経過をたどるのか興味深い。これについては今後、過去の肝炎多発地域の検体を用いた疫学的検討を行っていくつもりである。

肝機能異常と各抗体の関係をみると、NS4抗体はA群の肝機能異常例の78.6%(11/14)を捕捉しているが、NS3抗体の反応強度を4+とそれ以下

とに分けると肝機能異常14例は全て4+に反応しており、NS3抗体の産生と肝機能異常にはなんらかの関係が有るものと思われた。またNS3抗体はHCV-RNAの有無とも相関が見られ、NS3抗体を測定することがHCV持続感染の判別や予後の予測にもつながることが示唆された。

また今回の結果から第2世代の測定系で陽性の献血者には、血中にウイルスが認められるHCV持続感染例と血中にウイルスが認められない例があり、それらはPHAの抗体価、陽性抗体の数及び陽性強度に比例していることが確かめられた。

B群のNo. 37の検体はGPTが高値であるものの、PHA価が2⁵と低くcore抗体のみ陽性で、PCR法も陰性であることから非C型肝炎の可能性も考えられた。PHA陽性でRIBAIの反応パターン無しの12例については、core領域のエピトープの合成ペプチドを用いた「CP9」「CP10」で、ELISA法によりcore抗体の追加試験を行ったところ、全例陰性であったことから、PHAの疑陽性の可能性も考えられ、今後他の方法で検討して行く予定である。

結 論

献血者における各HCV抗体の分布状況とHCV-RNAの検出率を調べた。

(1) PHA価2¹²以上の群では、NS3, NS4, core抗体陽性が71%, NS3, core抗体陽性が29%で、全例が2抗体または3抗体陽性であるとともに、各抗体の反応強度もNS3, core抗体は強陽性に反応し、NS4抗体も強陽性が多く見られた。

(2) PHA価2¹¹以下の群では、複数の抗体が認められる例は少なく、core抗体単独陽性例が47%あった。各抗体の反応強度は弱いものが多かった。

(3) 肝機能はNS4抗体の有無で異常率に差が見られたが、NS3抗体の反応強度にも肝機能異常との関係を認めた。

(4) HCV-RNAは2¹²以上の群に98%認められたが、2¹¹以下の群では9.6%と少なく、PHA陽性献血者には血中にウイルスが認められる持続感染例と認められない既感染例があり、PHAの抗体価が高くなるほど持続感染が多く見られた。またNS3抗体はHCV-RNAの検出成績と良く相関し

ていた。

謝辞 稿を終えるにあたり、ご指導頂いた山梨医科大学鈴木 宏学長、赤羽賢浩助教授に深謝いたします。また本研究の費用の一部は、厚生科学研究費および山梨県研究交流促進調整費を活用させて頂きました。

文 献

- 1) Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., et al.: Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B hepatitis genome. *Science*, 244: 359—362, 1989.
- 2) Kuo, G., Choo, Q.L., Alter, H.I., et al.: An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of non-A, non-B hepatitis. *Science*, 244: 362—364, 1989.
- 3) Okamoto, H., et al.: The 5'-terminal sequence of the hepatitis C virus genome. *Jpn. J. Exp. Med.*, 60: 167—177, 1990.
- 4) Kubo, Y., Takeuchi, K., Boonmer, S., et al.: A cDNA fragment of hepatitis C virus isolated from an implicated donor of post-transfusion non-A, non-B hepatitis in Japan. *Nucl. Acid. Res.*, 17: 10367—10372, 1989.
- 5) 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. *Progres in Medicine*, 11(7): 1911—1921, 1991.
- 6) 飯野四郎, 他: 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.
- 7) 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.
- 8) Shimotohno, K., et al.: 蛋白質核酸酵素, 35(17): 3011—3015, 1990.
- 9) Van der Poel, C.L., et al.: Confirmation of hepatitis C virus infection by new four-antigen recombinant immunoblot assay. *Lancet*, 337: 317—319, 1991.
- 10) Aach, R.D., et al.: Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. *N. Engl. J. Med.*, 325: 1325—1329, 1991.
- 11) Atobe, R., et al.: Detection of HCV antibody and gene using Elisa and RT-PCR among blood donors. *日輸血会誌*, 38: 58—63, 1992.
- 12) Ishikawa, K., et al.: Detection of anti-HCV antibodies and HCV-RNA in blood donors. *医学と薬学*, 28: 793—801, 1992.