<原 著>

C型慢性肝疾患における HCV-serological group と HCV-genotype の一致, 不一致例の検討

小林万利子* 熊田 博光** 池田 健次** 茶山 一彰**
荒瀬 康司** 斉藤 聡** 坪田 昭人** 鯉田 勲**
岩崎 里美* 高木 公子* 中野 明美* 橋本みちえ*

要 旨: 今回我々は, HCV-genotype (以下 genotype) を測定した HCV-RNA 陽性 C 型慢性肝疾患338例について HCV-serological group (以下 serological group) を測定した。serological group の検出率は95.0%と高率であり, genotype からみた serological group との一致率は, genotype 1b で serological group 1 を呈した症例は94.4%, genotype 2a で, serological group 2 を呈した症例は97.1%, genotype 2b で, serological group 2 を呈した症例は88.2%と単独の type においては高い一致率であった。しかし mixed type では両者一致した症例は16.7%と低率であり, serological group と genotype で不一致例が多くみられるので注意を要すると考えられた。mixed type を除いた serological group と genotype の不一致は4例(1.2%)であったが, このうち genotype 3b が2例ありその塩基配列からみて真の意味の完全不一致の症例は2例(0.6%)のみと考えられた。以上から serological group によるタイピング法は日常の臨床に実用적であると思われた。

索引用語: HCV-serological group HCV-genotype HCV 抗体

緒 言

最近開発された C 型肝炎ウイルスの亜型を ELISA 法^{1,2)}にて判定される HCV-serological group (以下 serological group) と NS5 region の primer を用いた PCR 法にて判定される HCV-genotype^{3,4)} (以下 genotype) との関係は, genotype 1a, 1b は serotype group 1 に, genotype 2a, 2b は, serotype group 2 に相当するとされている。今日 C 型肝炎ウイルスの genotype は, 慢性肝炎におけるインターフェロン療法の治療効果に大きく影響することが報告⁶⁻⁸⁾されている。しかし, genotype の測定法は煩雑な技術など困難な問題を有している。今回我々は, 日常の検査において簡便な方法である serological group が日常の臨床に実用적であるかの検討を行った。

対象と方法

対象は, 1987年から1993年までの間に腹腔鏡肝生検を施行した慢性肝炎と血管造影等の画像診断および腫瘍生検にて肝臓と診断された慢性肝疾患のうち, genotype と serological group の両方を測定した HCV-RNA 陽性 C 型慢性肝疾患338例とした。慢性肝疾患の組織学的分類は, ヨーロッパ分類をもちい, 以下のごとく略した。portal fibrosis (PF), chronic persistent hepatitis (CPH), chronic aggressive hepatitis 2A (CAH2A), chronic aggressive hepatitis 2B (CAH2B), liver cirrhosis (LC), hepatocellular carcinoma (HCC) 肝疾患別の内訳は, CPH 15例(4.4%), CAH2A 113例(33.4%), CAH2B 84例(24.9%), LC 65例(19.2%), HCC 61例(18.0%)であった。

genotype の測定は, 茶山ら⁴⁾ (NS5 region) の方法

Mariko KOBAYASHI*, Hiromitsu KUMADA**, Kenji IKEDA**, Kazuaki CHAYAMA**, Yasuji ARASE**, Satoshi SAITHO**, Akihito TSUBOTA**, Isao KOIDA**, Satomi IWASAKI*, Kimiko TAKAGI*, Akemi NAKANO* and Michie HASHIMOTO*

*虎の門病院肝臓研究室, **同 消化器科

<受付日1994年5月24日>

とした。また解離例において岡本⁵⁾らの core region における typing も行った。genotype の分類は Simmonds ら⁸⁾の分類を用いた。

serological group の測定は、小原ら^{1,2)}が開発した C14-1抗体および C14-2抗体を用いた NS4 region の recombinant antigen 固相 ELISA 法にて行い、判定は Cut Off Index (検体の吸光度/Cut Off 値)を用い、1未満を陰性、1.0以上を陽性とした。検出不能は、C14-1抗体および C14-2抗体ともに陰性、mixed 型は、C14-1および C14-2抗体価が等しい場合とした。

塩基配列の決定は、PCR による cloning sequence 法にて決定した。HCV 抗体第 I 世代 (以下 HCV-I) の測定は Ortho 社 (USA) RIA 法にて、HCV 抗体第 II 世代 (以下 HCV-II) の測定は Ortho 社 (USA) ELISA 法にて測定した。

検体は-80°Cにて保存された血清を用いた。

成 績

I. C型慢性肝疾患338例の genotype および serological group の頻度 (Table 1)

338例にみられた genotype の頻度は、1b 232例 (68.6%)、2a 68例 (20.1%)、2b 17例 (5.0%)、3b 5例 (1.5%)、mixed 6例 (1.8%)、検出不能13例 (3.0%)であった。

次に serological group の頻度は、group 1 231例 (68.3%)、group 2 84例 (24.9%)、mixed 6例 (1.8%)、検出不能17例 (5.0%)であった。serological group の検出率は95.0%と高率であり、genotype の97%に匹敵した。

II. genotype からみた serological group との一致率の検討 (Table 2)

genotype と serological group がどのくらい一致するかを検討した。

genotype 1b は232例のうち serological group 1は219例 (94.4%)であったが、serological group 2は1例 (0.4%)、検出不能例は12例 (5.2%)であった。

genotype 2a は68例のうち serological group 2は66例 (97.1%)であったが、serological group 1は1例 (1.5%)、検出不能例は1例 (1.5%)であった。

genotype 2b は17例のうち serological group 2は15例 (88.2%)、serological group 1は1例 (5.9%)、検出不能例は1例 (5.9%)であった。

genotype と serological group において単独のタイプは高率に一致した。

genotype 3b は5例のうち serological group 1は1

Table 1 Incidence of HCV-serological group and HCV-genotype in 338 patients.

genotype		serological group	
1b (II)	232 (68.6%)	group 1	232 (68.3%)
2a (III)	68 (20.1%)	group 2	85 (24.9%)
2b (IV)	17 (5.0%)		
3b (VI)	5 (1.5%)		
mixed	6 (1.8%)	mixed	6 (1.8%)
N.D	10 (3.0%)	N.D	17 (5.0%)

N.D=Nondetectable

Table 2 Prevalence rate of agreement in HCV-genotype and HCV-serological group.

genotype 1b (II) (n=232)	
serological group 1	219 (94.9%)
serological group 2	1 (0.4%)
N.D	12 (5.2%)
genotype 2a (III) (n=68)	
serological group 1	1 (1.5%)
serological group 2	66 (97.1%)
N.D	1 (1.5%)
genotype 2b (IV) (n=17)	
serological group 1	1 (5.9%)
serological group 2	15 (88.2%)
N.D	1 (5.9%)
genotype 3b (V) (n=5)	
serological group 1	1 (20.0%)
serological group 2	1 (20.0%)
N.D	3 (60.0%)
genotype of mixed (n=6)	
serological group 1+2	1 (16.7%)
serological group 1	3 (50.0%)
serological group 2	2 (33.3%)
N.D (n=10)	
serological group 1	8 (80.0%)
serological group 2	2 (20.0%)

N.D=Nondetectable

例 (20.0%)、serological group 2は1例 (20.0%)、検出不能例は3例 (60.0%)であった。

genotype の mixed type は6例のうち serological group も mixed と判定された症例は1例 (16.7%)のみであり、他の5例は serological group 1は3例 (50.0%)、serological group 2は2例 (33.3%)であった。mixed type において、その一致は低率であった。

genotype における検出不能は10例のうち serological group 1は8例 (80.0%)、serological group 2は2例 (20.0%)であった。genotype が検出できない症例においても serological group にてタイピングが

Table 3 Prevalance of mixed type in HCV.

1. mixed type in HCV-genotype

case	輸血	Bp	genotype	serological group		
				group	C14-1	C14-2
1.	—	CAH2A	1b+2a	2	0.1	10.8
2.	—	CAH2B	1b+2b	1	14.2	4.3
3.	—	LC	1b+2b	1	12.7	4.4
4.	—	HCC	1b+2a	1	12.7	1.6
5.	+	HCC	1b+2a	2	1.2	9.9

2. mixed type in HCV-serological group

case	輸血	Bp	genotype	serological group		
					C14-1	C14-2
1.	—	CAH2A	2a(III)	1+2	2.70	2.73
2.	—	LC	2a(III)	1+2	2.62	2.70
3.	+	LC	2a(III)	1+2	5.52	5.50
4.	—	LC	2a(III)	1+2	3.10	3.05
5.	+	HCC	2a(III)	1+2	2,734	2,690

3. Both mixed type in HCV-serological group and HCV-genotype

case	輸血	Bp	genotype	serological group		
				group	C14-1	C14-2
1.	+	HCC	1b+2a	1+2	5.86	5.90

可能であった。

III. genotype および serological group において mixed type を呈した症例の検討 (Table 3)

① genotype にて mixed type を呈した症例

genotype にて mixed type を呈した症例は 5 例であり, genotype 1b+2a は 3 例で, serological group では group 1 が 1 例と group 2 が 2 例であった。また 1b+2b は 2 例で serological group は 2 例ともに group 1 であった。肝疾患別には, HCC 2 例, LC 1 例, CAH2B 1 例, CAH2A 1 例であった。

② serological group にて mixed 型を呈した症例

serological group にて mixed type を呈した症例は

5 例であり, 全例 genotype 2a であった。肝疾患別には, HCC 1 例, LC 3 例, CAH2A 1 例であった。

③ genotype と serological group 両者ともに mixed type を呈した症例

genotype と serological group 両者ともに mixed 型を呈した症例は 1 例のみで HCC の症例であった。

この症例の臨床経過は, 33 歳イレウスにて輸血を受けその後黄疸を認めた。他院にて 58 歳時慢性肝炎の診断をうけ, 66 歳食道静脈瘤にて当院初診し, 71 歳にて多発性肝細胞癌を発生した症例である。本例は genotype および serological group ともに mixed type を呈した。

genotype および serological group において mixed type を呈する症例では, 11 例中 8 例 (72.7%) が肝硬変に進行しており肝疾患の進行例に多い傾向がみられた。

IV. genotype と serological group とが不一致であった症例の検討 (Table 4)

mixed type を除いた serological group と genotype における不一致例の検討を行った。

症例 1 は, genotype 1b であったが, serological group は group 2 であった。症例 2 は, genotype 2a であったが, serological group は, group 1 であった。症例 3, 4 は, genotype 3b であり, group 1 および group 2 であった。症例 3, 4 は genotype 3b であることからその塩基配列の違いから, 完全に不一致と考えられるのは case 1, 2 のみの 2 例と考えられた。

1. 完全不一致例の呈示

① 症例 1 (Fig. 1)

既往歴: 29 歳左肺上葉切除術。輸血歴: 先記疾患時 2,000ml。家族歴: 特になし。現病歴: 1975 年検診にて肝障害を指摘される。1986 年他大学にて慢性肝炎と診断されグリチルリチン製剤投与を受けていた。1988 年 4 月当科初診。初診時 GOT 154K.U, GPT 182K.U, γ -GTP 136, ChE 0.8, T-bil 1.7, 血小板 3.7 万であ

Table 4 Cases of disagreement in HCV-serological group and HCV-genotype.

case	age. sex	BTF	Bp	genotype	serological group		
					group	C14-1	C14-2
1. T. S	57. M	+	LC-HCC	1b(II)	group 2	1.9	3.5
2. H. A	40. M	—	CAH2B	2a(III)	group 1	12,640	4,640
3. T. S	47. M	—	CPH	3b(VI)	group 1	2.7	0.9
4. K. F	54. M	—	CAH2A	3b(VI)	group 2	0.9	3.5

Fig. 1 Clinical course of case 1

Fig. 2 HCV-genotype in core region and sequencing of NS5 region.

Fig. 3 Clinical course of case 2

Fig. 4 Sequencing in NS4 region of case 2

り、腹部超音波検査にて肝硬変の診断であった。1989年7月血管造影にて多発性肝細胞癌と診断され、その後肝動脈塞栓術の治療および低アルブミン血症にて新鮮凍結血漿投与を繰り返していたが、1991年7月26日肝癌腹腔内破裂にて同年8月14日死亡した。この症例のserological groupは、初診時から1990年12月までは、group 1であったが、1991年になりgroup 2へと変化していた。genotypeは、NS5 regionのタイピングでは全経過 genotype 1bであった。しかし、1990年6月のポイントにおけるcore regionのタイピングで

は、genotype 1b+2bと2種のgenomeの存在が確認できた。core法における2bが非特異でないことを確認 (Fig. 2) したところ、3クローンともに2bの塩基配列であった。

② 症例2 (Fig. 3)

既往歴：特記すべきことなし。家族歴：妻C型慢性肝炎。輸血歴：なし。鍼治療歴：1984年1回あり。現病歴：1989年肝障害を指摘され他大学病院受診し腹腔鏡にて慢性肝炎と言われ、グルチルリチン製剤投与を受けていた。1993年4月当科初診、腹腔鏡肝生検にて

Table 5 Cases of nondetected in HCV-genotype.

case	age/sex	Bp	RNA	anti-HCV 1st/2nd	HCV-serological group
1	M/61	HCC	+	+/+	group 1
2	M/61	HCC	+	+/+	group 2
3	F/64	LC	+	-/+	group 1
4	M/55	3H2B	+	-/+	group 1
5	M/40	CH2B	+	+/+	group 2
6	M/52	CH2A	+	+/+	group 1
7	M/33	CH2A	+	+/+	group 1
8	F/56	CH2A	+	+/+	group 1
9	F/33	CH2A	+	-/+	group 1
10	M/39	CH2A	+	-/+	group 1

Table 6 Cases of nondetected in HCV-serological group.

case	sex/age	Bp	anti-HCV 1st/2nd	HCV-genotype
1	57/M	HCC	+/+	1b
2	44/M	HCC	-/+	1b
3	68/F	HCC	-/+	1b
4	76/F	HCC	-/+	1b
5	65/M	HCC	-/+	1b
6	60/F	HCC	+/+	2a
7	82/M	HCC	-/+	2b
8	58/M	LC	-/+	1b
9	49/F	LC	-/+	1b
10	60/M	LC	-/+	3b
11	59/M	CH2B	+/+	1b
12	58/M	CH2B	-/+	1b
13	56/M	CH2B	+/+	3b
14	27/M	CH2A	+/+	1b
15	26/M	CPH	+/+	1b
16	39/M	CPH	-/+	1b
17	54/M	CPH	-/+	3b

CAH2B の診断1994年2月より天然型インターフェロン α 製剤 (6MU) を8週間連日投与後週2回を16週投与を施行した。

この症例の serological group は全経過において group 1 であったが, genotype においては NS5 region, core region において 2a であった。この症例の serological group の C14-1, C14-2 の抗体価は全経過中高力価であった。そこで genotype 1b, 2a, 2b を検出し得る NS4 region の primer を用いて塩基配列の確認 (Fig. 4) をしたところ 5 クローンともに 2a の塩基配列であった。

V. genotype および serological group における検出不能例の検討 (Table 5, 6)

genotype で検出不能であった症例は 338 例中 10 例 (3.0%) であり, group 1 8 例 (80.0%), group 2 2 例 (20.0%) であった。肝疾患別にみると CAH2A 5 例 (50.0%), CAH2B 2 例 (20.0%), LC 1 例 (10.0%), HCC 2 例 (20.0%) であった。

次に serological group で検出不能であった症例は 338 例中 17 例 (5.0%) で, genotype 別にみると 1b 12 例, 2a 1 例, 2b 1 例, 3b 3 例であった。

肝疾患別にみると CPH 3 例 (17.6%), CAH2A 1 例 (5.9%), CAH2B 3 例 (17.6%), LC 3 例 (17.6%), HCC 7 例 (41.2%) と肝癌の症例に多くみとめた。

さらに HCV-I および HCV-II の陽性率をみると HCV-I は, 17 例中 6 例 (35.3%) のみしか陽性ではなかったが, HCV-II は全例陽性であった。

serological group における検出不能例は, genotype に比し HCV-I 陰性および肝疾患の進行例にその検出率が低い傾向がみられた。

考 案

HCV の全塩基配列が解明され HCV における genome のタイピングが多種類開発³⁻⁵⁾された。しかし, この測定は設備や技術の点で煩雑であることが現状である。今回測定した serological group は, 小原ら^{1,2)}が開発した NS4 region における recombinant antigen をもちいた ELISA 法であり, 一般の検査室にても容易に測定できる方法である。このため HCV のタイピングも簡便にできうこととなった。今回我々は, この NS4 region におけるタイピングにより決定した serological group を測定し, 従来の genotype との一致, 不一致の検討を行った。まず genotype からみた serological group と genotype との一致率は, genotype 1b では, serological group 1 を呈した症例は 94.4%, genotype 2a では serological group 2 を呈した症例は 97.1%, genotype 2b では serological group 2 を呈した症例は 88.2% と単独の type では高率に一致した。しかし serological group および genotype における mixed では, 6 例中 1 例 (16.7%) とその一致率は低かった。また, serological group における mixed の genotype は全例 2a であり, この理由としては, ①過去の感染におけるメモリーの結果 serological group が mixed となった。② 1a または 1b の genome 量が少ないため genotype の検出が不能である, ことなどが考えられた。一方 genotype において

mixedであったが, serological groupが単独と判定された症例は, どちらか一方の genomeにたいする NS4 regionにおける蛋白合成能が低いため serological groupにおいて単独と判定されたなどが考えられた。

serological groupと genotypeが不一致であった4症例中2例に genotype 3bが存在したが, その塩基配列の違いから完全に不一致と考えられるのは, 2例(0.6%)のみと思われた。

この完全に不一致の症例1は, 初診時から1960年12月までは, serological group 1であったが, 1991年には group 2へと変化していた。この症例の NS5 regionにおける genotypeは, 全経過1bであったが, core regionにおける genotypeは1990年6月で1b+2aと判定された。この core regionにおいて2bが検出しえたバンドが非特異的な増幅でないことを確認したところ, 塩基配列は3 cloneとも2bであった。以上より, ①この症例は初診時より2種類の genomeが存在していたが, 一方の genomeの量が低値であったため, NS5 regionにおいて検出不能であった。②肝癌発症後は, PPFの投与を行っているため2bの感染を受けたなどの理由が考えられた。

他の完全不一致の1例は, 初診時より serological group 1であり, C14-1およびC14-2の抗体価は高力価であり, genotypeはcore, NS5 regionともに2aを呈していた。この症例において1b, 2a, 2bを検出し得る NS4 regionにおける塩基配列を確認したところ, 5 cloneともに2aであった。このように著しく抗体価が高い症例においては, serological groupの測定に限界があると考えられた。

serological groupにおける検出不能例は, genotypeに比し HCV-I 陰性例が多く, さらに肝疾患の進行例に多い傾向がみられた。このことは我々の報告⁹⁾から肝疾患の進行例においては HCV-I の陰性化例が多いことから serological groupが検出しにくいと考えられた。

結 語

genotype および serological group において単独の type は高い一致率であり, serological group の検出率は95.0%と高率であった。しかし mixed type は不一致例が多く注意を要する必要があると考えられ, sero-

logical group と genotype の完全な不一致例は, 338例中2例(0.6%)のみであった。

文 献

- 1) Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Maki N, et al: Antigenicities of group 1 and 2 hepatitis C virus polypeptides-molecular basis of diagnosis. *Virology* 192: 430-437, 1993
- 2) Tanaka T, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, et al: Significance of specific antibody assay for genotyping of hepatitis C virus. *Hepatology* (in print)
- 3) Enomoto N, Takada A, Nakao T, et al: There are two major types of hepatitis C virus in Japan. *Biochem Biophys Res Comm* 170: 1021-1025, 1990
- 4) Chayama K, Tsubota A, Arase Y, et al: Genotypic subtyping of hepatitis C virus. *J Gastroenterol and hepatol* 8: 150-156, 1993
- 5) Okamoto H, Okuda S, Sugiyama Y, et al: Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: comparison with reported isolates for conserved and divergent regions. *F Gen Virol* 72: 2697-2704, 1991
- 6) Arase Y, Kumada H, Chayama K, et al: Alanine aminotransferase and HCV-RNA response following interferon therapy of HCV-RNA positive chronic hepatitis. *J Gastroenterol Japonica* 27: 646-651, 1992
- 7) Tsubota A, Chayama K, Arase Y, et al: Factors useful in predicting the response to interferon therapy in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 8: 535-539, 1990
- 8) Simmonds P, Holmes E, Cha T, et al: Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus: identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. *J Gen Virol* 74: 661-668, 1993
- 9) 小林万利子, 熊田博光, 荒瀬康司, 他: 各種肝疾患の C-100抗体陽性率と長期観察例における消長. *肝臓* 7: 9-13, 1991

Examination in case of agreement and disagreement of HCV-genotype and HCV-serological group in chronic hepatitis C

Mariko KOBAYASHI*, Hiromitsu KUMADA**, Kenji IKEDA, Kazuaki CHAYAMA,
Yasuji ARASE, Satoshi SAITHO, Akihito TSUBOTA,
Isao KOIDA, Satomi IWASAKI, Kimiko TAKAGI,
Akemi NAKANO and Michie HASHIMOTO

Using the HCV-serological group method (a simplified evaluation method) and the HCV-genotype method, 338 patients with HCV-RNA positive chronic hepatitis C were investigated. In those patients having only one genotype, the serological method detected a high 95% of them overall, and agreed quite well with those determined by the HCV-genotype method, i.e., 94% of serological group 1 was genotype 1b, and 91.7% of serological group 2 was genotype 2a or 2b. However, in the mixed type patient having 2 or more genotypes, agreement rate was very poor, showing only 16.7%. This point becomes critical when a physician tries to detect genotypes using the serological group method. On the other hand, when the mixed type patients were excluded from the analysis, only 4 patients (1.2%) were not in agreement. Of these 4 patients, 2 patients had genotype 3b, a basal sequence undetectable by the serological method. Therefore, only 2 (0.6%) patients were in actual disagreement. Thus, we concluded that the HCV-serological group method is highly useful for determining genotypes of HCV in the daily clinical practice environment.

* Department of Liver Research Laboratory, Toranomon Hospital (Tokyo)

**Department of Gastroenterology, Toranomon Hospital (Tokyo)