〔シンポジウム：プロット法と診断〕

C 型肝炎ウイルスの基礎研究とその診断への応用

江角真理子・前野 貢・林 仲信・志方俊夫

はじめに

C型肝炎は輸血後非A非B型肝炎の90%以上を占め、慢性化しやすく、感染して20年から30年後に肝硬変、肝臓に進展する重篤な疾患である。日本人の肝臓の75%はこのC型肝炎による慢性肝炎を母地に発生している。その原因ウイルスであるC型肝炎ウイルス(HCV)は、ヒトとチンパンジーにしか感染しないこと、感染材料中にウイルスやウイルス抗原がきわめて少ないこと、*in vitro* 培養系で感染増殖できないことなどが原因で、その本体の解明が遅れていた。ようやく1989年、米国カイロン社が初めて、ウイルス遺伝子のクローニングにより、一本鎖RNAを遺伝子としてもつHCVを発見した¹⁾。我々も日本人供血者血清よりイムノスクリーニング法でウイルス遺伝子断片を単離し²⁾、さらに単一患者血清を材料にして、日本株HCVの全遺伝子のクローニングを行った(投稿中)。この遺伝子クローニングにより、ようやくC型肝炎の診断法の確立が進められるようになった。本稿では、(1)日本株HCVの遺伝子クローニングとその遺伝子解析、(2)HCV遺伝子を用いたウイルスアッセイ系の確立、について、述べてみたい。

日本株 HCV の遺伝子クローニングと
その遺伝子解析

1. 遺伝子クローニング

肝機能異常を示す日本人供血者血清8リットルを材料にして、RNAを抽出し、発現ベクター λ gt 11を用いてcDNAライブラリーを作製した。抗ウイルス抗体が存在すると予想されるC型肝炎チンパンジー血清で、

120万個のファージをイムノスクリーニングした。その結果、1つの陽性クローンC8-2を単離することができた。このC8-2クローンは次のようなことから、非A非B型肝炎ウイルス遺伝子のクローンであることを確認した。

(1) C8-2クローン発現蛋白を電気泳動し、非A非B型肝炎患者血中抗体を用いてウェスタンブロットを行うと特異的に反応した。

(2) C8-2のcDNA塩基配列を決めこの配列検出用のpolymerase chain reaction (PCR)を行うと、非A非B型肝炎患者の血清中に特異的にC8-2配列のRNAを証明できた。

(3) C8-2塩基配列をプローブとしてヒト細胞遺伝子のサザンブロットを行ったが、C8-2配列は見つからなかった。

(4) C8-2塩基配列はデータバンクに登録された既知の塩基配列とはホモロジーを示さなかった。

さらに日本人単一患者血清を材料として血中RNAのcDNAを合成し、PCRを用いてランダムに増幅した後、遺伝子クローンの伸長を行っていった。

2. HCV の遺伝子構造

HCVは、9.4 kbの一本鎖のプラス鎖RNAを遺伝子としてもつRNAウイルスである。遺伝子は、3010-3014個のアミノ酸からなるpolyproteinをコードする領域のほか、5'端に約300 b、3'端に約50 bの非翻訳領域をもつ。polyproteinの構造を検討すると(図1)、次のような特徴から日本脳炎ウイルスなどが属するフラビウイルス、あるいは仔牛下痢症ウイルスなどが属するペスティウイルスに近いウイルスと考えられた。

(1) 疎水性親水性解析を行うとよく似たパターンを

Molecular biology of hepatitis C virus and its application to diagnosis of hepatitis C.

Mariko Esumi, Mitsugu Maeno, Nakanobu Hayashi, Toshio Shikata; 日本大学医学部第一病理、総合医学研究所

Correspondence address: Mariko Esumi, Department of Pathology and Medical Research Institute, Nihon University School of Medicine, 30-1, Oyaguchi Kamimachi, Itabashi-ku, Tokyo 173, Japan.

図 1. HCV ポリプロテインの疎水性親水性解析と特徴的のアミノ酸配列
比較のために JEV ポリプロテインの疎水性親水性解析⁴⁾ を上に示す。
C: コア蛋白, M: 膜蛋白, E: エンベロープ蛋白, NS 1~NS 5: 非構造蛋白。
⊕: 予想される細胞由来の signalase 切断部位で, 上流には疎水性領域と V/A-X-A/G 配列 (下線) が存在する。
↓: 予想されるウイルス由来セリンプロテアーゼ切断部位で, R/K-R 配列 (下線) の後で切断される。
▨: 三つの酵素 (セリンプロテアーゼ, ヘリカーゼ, RNA ポリメラーゼ) に保存されたアミノ酸配列の存在部位を示す。
LL: N-glycosylation 部位を示す。

表 1. HCV の塩基配列ホモロジーとアミノ酸配列ホモロジー*

	5'-NC	C	E	NS 1	NS 2	NS 3	NS 4	NS 5	3'-NC	Total
HCV-BK ⁴⁾	100	96 (95)	91 (93)	88 (88)	90 (92)	92 (96)	92 (97)	93 (94)	86	92 (94)
HCV-J ⁵⁾	99	95 (96)	89 (91)	86 (85)	88 (93)	90 (95)	91 (97)	91 (93)	91	91 (93)
HCV-1 ³⁾	100	90 (95)	74 (77)	73 (79)	72 (76)	79 (91)	79 (87)	78 (82)	71	78 (84)

* われわれの単離した HCV-N に対し, 各 HCV 株を比較した。() 内はアミノ酸配列ホモロジーを示す。

示し, N端側からコア蛋白, エンベロープ蛋白, 非構造蛋白 (NS) 1, NS 2, NS 3, NS 4, NS 5 にプロセシングされることが予想された。

(2) 予想されるプロセシング部位に, 同様の signalase やセリンプロテアーゼの認識部位を見つけることができる。

(3) コア蛋白領域は塩基性アミノ酸に富み, RNA と結合してヌクレオカプシドを形成しやすいようになっている。

(4) エンベロープ蛋白領域, NS 1 領域には N-glycosylation 部位が多数存在し, ウイルス外殻蛋白と

なる糖蛋白と予想される。

(5) NS 3 領域には, N端側にセリンプロテアーゼ, C端側にヘリカーゼに特徴的なアミノ酸配列が見いだされる。

(6) NS 5 領域には, RNA ウイルスのもつ RNA 依存性 RNA ポリメラーゼに保存されているアミノ酸配列が見いだされる。

3. ウイルスの多様性

日本株 HCV をクローニングして得た成果の1つは, ウイルスの多様性である。表 1 に示すように, 日本株は, カイロン社が報告した米国株 HCV-1³⁾ とだいぶ異

なる。全体のアミノ酸ホモロジーで約 80% しか示さない。一方、日本株同士では約 90% のホモロジーを示し、よく似ている。それでも領域別でみると、5' 端非翻訳領域とコア蛋白領域は日米両株間でよく保存されている。このことは遺伝子アッセイ系をつくる上で重要なポイントとなってくる。逆に、エンベロープ蛋白領域、NS1, NS2 領域ではホモロジーが特に低くなっており、ワクチンの開発の上で考慮しなければならない問題となってくる。このように、日本株 HCV と米国株 HCV とでは異なるタイプのウイルスと考えられた。

ウイルスアッセイ系の確立

1. 抗体アッセイ系

一般にウイルス感染症の診断にはウイルス抗原アッセイ、ウイルス抗体アッセイ、そして最近ではウイルス遺伝子アッセイも用いられている。HCV の場合、検体中にウイルス量、ウイルス抗原量がきわめて少ないことから、もっぱらウイルス抗体アッセイに頼るところが大きい。その HCV 抗体アッセイも用いる抗原は、単離した遺伝子クローンを大腸菌や酵母、時には真核細胞で発現させて用いる手法をとらざるを得ない。

米国カイロン社は、はじめに単離した非構造蛋白領域 (NS3, 4) の遺伝子クローンを酵母で発現させて、抗体アッセイ系 C100-3 を作製した⁶⁾。我々もはじめに単離できた遺伝子クローン C8-2 (NS5 領域) を大腸菌で発

現させて、抗体アッセイ系 C8-2 を作製した⁷⁾。さらに日本株 HCV のアミノ酸配列をもとに C100-3 と C8-2 の両方に由来する合成ペプチドを混合して、アッセイ系 KCL (NS4/5) を作製した。さらにコア蛋白領域を大腸菌で発現させてアッセイ系 JCC を作った⁸⁾。表 2 に示すように、これらのアッセイ系で非 A 非 B 型肝炎と診断された患者の血清をアッセイすると、コア蛋白抗体陽性率が最も高く、NS4/5 抗体アッセイ系を併用することにより、さらに検出率を上げることができた。輸血後非 A 非 B 型急性肝炎と非 A 非 B 型慢性肝疾患の 90% 以上が C 型肝炎と診断された。また、そのほかの肝疾患においても、HCV 感染の関与が示唆された。さらに供血者スクリーニングも、現行のカイロン社の C100-3 抗体アッセイに加えてコア抗体アッセイ系 JCC を用いることにより、さらに未知の HCV キャリヤーを排除することができることがわかった (表 2)。実際、コア抗体のみ陽性者の 60% に HCV RNA を検出できた。本来、感染既往歴を示すにすぎない抗体アッセイであるが、HCV の場合、慢性化率が高いこともあって、抗体陽性であることはウイルスそのものの存在を意味する場合が往々にしてある。とくにウイルス抗原アッセイ、遺伝子アッセイがルーチン化困難な状況では、簡便な抗体アッセイは供血者スクリーニングには必須である。

2. 遺伝子アッセイ系

HCV の遺伝子診断は、血中 RNA の抽出-逆転写酵

表 2. 肝疾患における各種 HCV 抗体陽性率の比較

疾 患 名	症例数	陽性例数 (%)			
		JCC (コア)	KCL (NS 4/5)	C 100-3 (NS 3/4)	いずれかの抗体
非 A 非 B 型急性肝炎					
輸血後	54	45 (83%)	42 (78%)	35 (65%)	50 (93%)
散発性	44	13 (30%)	14 (32%)	13 (30%)	15 (34%)
非 A 非 B 型慢性肝疾患					
慢性肝炎	701	629 (90%)	558 (80%)	547 (78%)	644 (92%)
肝硬変	211	188 (89%)	167 (79%)	168 (80%)	192 (91%)
肝細胞癌	105	98 (93%)	79 (75%)	86 (82%)	100 (95%)
B 型急性肝炎	35	0	0	0	0
B 型慢性肝疾患					
慢性肝炎	251	25 (10%)	16 (6%)	24 (10%)	36 (14%)
肝硬変	74	9 (12%)	4 (5%)	7 (9%)	15 (20%)
肝細胞癌	60	13 (22%)	10 (17%)	11 (18%)	16 (27%)
A 型急性肝炎	64	0	0	3 (5%)	3 (5%)
アルコール性肝炎	84	22 (26%)	17 (20%)	17 (20%)	26 (31%)
自己免疫性肝炎	35	5 (14%)	4 (11%)	9 (26%)	11 (31%)
原発性胆汁性肝硬変	45	5 (11%)	6 (13%)	8 (18%)	8 (18%)
正常供血者	2832	121 (4.3%)	—	65 (2.3%)	133 (4.7%)

図 2. RT-PCR による血中 HCV RNA の検出

日本人患者血清3例と米国株 HCV が感染しているチンパンジー血清1例を用いて RNA を抽出し、ランダムプライマー存在下に逆転写酵素 (RT) により cDNA を合成した。これら4検体の cDNA を用いて、NS2, NS3, NS4 の領域は米国株 HCV-1³⁾ の塩基配列によるプライマーで PCR を行い、NS5²⁾ および 5' 非翻訳領域は日本株の塩基配列によるプライマーで PCR を行った。塩基配列ホモロジーの高い 5' 非翻訳領域だけが、変異株を越えて HCV RNA の検出に用いることができる。

素による cDNA 合成-PCR と複雑な過程が必要であるが、ウイルスそのものを捉える点で重要である。5' 端非翻訳領域は最も塩基配列ホモロジーの高い領域として見

いだされ、この領域を用いた遺伝子診断が有効となっている。図2に示すように、領域別に PCR プライマーを合成し、日本株と米国株の遺伝子アッセイを行ってみると、5' 端非翻訳領域を用いれば日米両株の検出が可能であることがわかる。

おわりに

HCV の遺伝子クローニングで、ウイルスの全貌が明らかにされた。と同時に、ウイルスのアッセイ系が確立し、C型肝炎の診断が急速に進歩した。後は、抗原や遺伝子のアッセイが手軽に高感度でできる新しい方法の開発が必要である。ワクチンや抗ウイルス剤の開発も残された問題である。しかし、最も重要な問題は、日本人の肝臓の75%が、C型慢性肝炎、肝硬変から発生していることである。米国でのC型肝炎から肝臓への発生率と比較すると数十倍と言われている。HCV 感染がなぜ高率に慢性肝炎を引き起こすのか、肝臓にいたる機序は何か？ 複雑な宿主を介した研究が必要となってくるであろう。

本研究成果は、化学及血清療法研究所、国立長崎中央病院、防衛医科大学第二内科、熊本大学医学部第三内科との協同研究で得られたものである。

文 献

- 1) Choo, Q.-L. et al. : Science, **244** : 359, 1989.
- 2) Maeno, M. et al. : Nucleic Acids Res., **18** : 2685, 1990.
- 3) Choo, Q.-L. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88** : 2451, 1991.
- 4) Takamizawa, A. et al. : J. Virol., **65** : 1105, 1991.
- 5) Kato, N. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87** : 9524, 1990.
- 6) Kuo, G. et al. : Science, **244** : 362, 1989.
- 7) 杉本洋之, 他 : 肝臓, **32** : 436, 1991.
- 8) 江角真理子, 他 : 肝胆膵, **22** : 897, 1991.