

C型肝炎抗体陽性者からのRNA検出について

豊田安基江 野田 雅博 福田 伸治 高尾 信一 徳本 静代

Hepatitis C Virus RNA Detection from HCV Antibody Positives

AKIE TOYOTA, MASAHIRO NODA, SHINJI FUKUDA, SHIN-ICHI TAKAO

and SHIZUYO TOKUMOTO

(Received Sep. 30, 1996)

はじめに

C型肝炎ウイルス (HCV) は、肝硬変、肝癌等の慢性肝疾患の起因ウイルスの一つとして最も重要視されている [1, 2].

最近、一般的な健康診断においても、慢性肝疾患予防のためにHCV抗体検査が実施されているが、HCV抗体陽性者には一過性感染 (急性感染) 者と持続感染者 (HCVキャリア) の場合があり、HCVキャリアの判別を行うことが重要となっている。

今回、我々はHCVキャリアをよりの確に検出するために40歳以上の成人を対象に、HCV抗体価の測定と、遺伝子増幅 (PCR) 法によるHCV遺伝子 (HCV RNA) 検出を実施し、両者の関連について検討を行ったので報告する。

材料および方法

1. 材料

1992年から1996年にかけて一般住民検診時に県内で採取された40歳未満、40歳代、50歳代、60歳代及び70歳以上の血清それぞれ189, 384, 681, 1,363及び1,174例、合計3,791例を用いた。

また、HCV RNA検出には、HCV抗体陽性例のうち190例を用いた。

2. 方法

(1) HCV抗体測定

第二世代のHCV抗体測定系 (HCV PHA法: ダイナボット) により実施した。なお、 2^5 PHA価以上を示したものを抗体陽性例とした。

(2) HCV RNAの抽出

アンプリコアHCV抽出キット (日本ロシユ), セバジーンRV (三光純薬), EX-R&D (住友金属) の3キットを用いた。また、Acidguanidium Phenol Chloroform (AGPC) 法については報告[3]に準じて行った。

(3) HCV RNAの検出

アンプリコアHCV検出キット (日本ロシユ) 及びNested Reverse Transcription PCR (NRT PCR) により行った。前者は吸光度値0.4以上を示したものを陽性と判定した。後者は岡本らの方法[4]に準じて行い、電気泳動により1st PCRで357bp, 2nd PCRで121bpにバンドが認められたものを陽性と判定した。なお、プライマーの設定は市村らの報告[5]に準じた。

結 果

1. HCV抗体検査結果

年齢階級別のHCV抗体保有状況を表1に示した。HCV抗体陽性率は40歳未満、40歳代、50歳代、60歳代及び70歳以上でそれぞれ2.6, 6.7, 14.4, 16.8及び22.1%であった。

抗体陽性例の年齢階級別HCV PHA価の分布を表2に示した。 2^5 , 2^6 , 2^7 , 2^8 , 2^9 , 2^{10} 及び 2^{11} HCV PHA価を示す例はそれぞれ4.1, 6.2, 4.4, 4.9, 3.6, 3.9及び3.6%であり、 2^{12} HCV PHA価以上を示す例は69.4%であった。年齢階級ごとの 2^{12} HCV PHA価以上を示す例は40歳未満、40歳代、50歳代、60歳代及び70歳以上でそれぞれ40.0, 69.6, 67.3, 66.4及び73.5%で、全体では69.4%を占めた。

表1 HCV抗体保有状況

| 年齢階級 (歳) | 全 体 | | 男 性 | | 女 性 | |
|-------------|-------|------------|-------|------------|-------|------------|
| | 対象者 | 陽性者 (%) | 対象者 | 陽性者 (%) | 対象者 | 陽性者 (%) |
| ～39 | 189 | 5 (2.6) | 54 | 2 (3.7) | 135 | 3 (2.2) |
| 40～49 | 384 | 23 (6.7) | 109 | 6 (5.5) | 275 | 17 (6.2) |
| 50～59 | 681 | 98 (14.4) | 181 | 25 (13.8) | 500 | 73 (14.6) |
| 60～69 | 1,363 | 229 (16.8) | 464 | 72 (15.5) | 899 | 157 (17.5) |
| 70～ | 1,174 | 260 (22.1) | 474 | 91 (19.2) | 700 | 169 (24.1) |
| 合 計 | 3,791 | 615 (16.2) | 1,282 | 196 (15.3) | 2,509 | 419 (16.7) |

表2 年齢階級別HCV PHA価分布率 (%)

| 年齢階級 (歳) | 抗 体 陽性数 | PHA価 (2 ⁿ) | | | | | | | |
|-------------|------------|------------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| | | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | ≥12 |
| ～39 | 5 | 20.0 | 40.0 | | | | | | 40.0 |
| 40～49 | 23 | | | 8.7 | 4.3 | 8.7 | | 8.7 | 69.6 |
| 50～59 | 98 | 6.1 | 7.1 | 9.2 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 4.1 | 67.3 |
| 60～69 | 229 | 4.8 | 6.1 | 3.9 | 7.4 | 3.9 | 4.4 | 3.1 | 66.4 |
| 70～ | 260 | 2.7 | 5.8 | 2.7 | 3.8 | 3.5 | 5.2 | 3.5 | 73.5 |
| 合 計 | 615 | 4.1 | 6.2 | 4.4 | 4.9 | 3.6 | 3.9 | 3.6 | 69.4 |

表3 抽出法別HCV RNA検出例数

| PHA価 (2 ⁿ) | 例数 | アンプリコア HCV | セパジーン RV | EX-R&D | AGPC |
|---------------------------|----|---------------|-------------|--------|------|
| 5 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 7 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 8 | 4 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 9 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ≥12 | 10 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| 合計 | 40 | 11 | 11 | 11 | 9 |

2. HCV RNA 抽出法の検討

HCV抗体陽性例40例について、異なる抽出方法によるHCV RNA検出例数を表3に示した。アンプリコアHCV抽出キット、セパジーンRV、EX-R&Dの3キットともにHCV PHA価2⁷、2⁸及び2¹²以上でそれぞれ1、1及び9例でHCV RNAが検出された。AGPC法では3キットで検出された例のうちの2⁷、2⁸HCV PHA価の2例が検出されなかった。

3キット間でRNA検出の差は認められなかったが、操作面では、一検体あたりのRNA抽出の所要時間はそれぞれ、およそ0.5、1.5、2時間であった。また、抽出に用いるチューブが一検体につきそれぞれ1、2、2本であり、抽出操作の迅速性、簡便性から、HCV RNA検出にはアンプリコアHCV抽出キットにより抽出したRNAを用いた。

3. HCV RNAの検出

HCV抗体陽性例190例について、アンプリコアHCV検出キット、NRT PCRによるHCV RNA検出例数を表4に示した。アンプリコアHCV検出キットでは72例でRNAが検出された。PHA価別では2⁷、2⁸、2¹⁰、2¹¹及び2¹²以上でそれぞれ22例中1例(4.5%)、17例中2例(11.8%)、19例中1例(5.3%)、10例中1例(10.0%)及び71例中67例(94.4%)が検出された。2⁵、2⁶及び2⁹では検出されなかった。一方、NRT PCRでは78例でRNAが検出され、PHA価別では2⁷、2⁸、2¹⁰、2¹¹及び2¹²以上でそれぞれ1例(4.5%)、2例(11.8%)、1例(5.3%)、4例(40.0%)及び70例(98.6%)が検出された。2⁵、2⁶及び2⁹では検出されなかった。また、アンプリコアHCV検出キットで検出されたものは全て、NRT PCRで検出された。

HCV抗体陽性例190例のHCV PHA価とHCV RNA検出の関係を図1に示した。アンプリコアHCV検出キット、NRT PCRでHCV RNA検出を行った190例におけるRNA陽性(HCVキャリア)率はHCV PHA価が2¹²以上、2⁷～¹¹及び2⁶の群でそれぞれ、前者で94.4、5.6及び0%、後者で98.6、8.9及び0%であった。

考 察

広島県では1991年度から慢性肝炎患者対策のモデル化事業の一環として、実施希望の申し出のあった市町

表4 HCV RNA検出法の比較

| PHA価 (2 ⁿ) | 例数 | アンプリコア HCV | NRT PCR |
|---------------------------|-----|---------------|---------|
| 5 | 16 | 0 | 0 |
| 6 | 13 | 0 | 0 |
| 7 | 22 | 1 | 1 |
| 8 | 17 | 2 | 2 |
| 9 | 22 | 0 | 0 |
| 10 | 19 | 1 | 1 |
| 11 | 10 | 1 | 4 |
| ≥12 | 71 | 67 | 70 |
| 合計 | 190 | 72 | 78 |

村で実施される住民検診にC型肝炎ウイルス (HCV) 抗体検査を採り入れ, HCVキャリアの発見から必要に応じた治療に至る一貫した対策のあり方を検討してきた [6]. HCV抗体高力価群 (2¹²HCV PHA価以上) の大多数がHCVキャリアであること, 中力価群 (2⁷~¹¹HCV PHA価) には少数のHCVキャリアと大多数の感染既往例が混在していること, 低力価群 (2⁶HCV PHA価以下) にはHCVキャリアはほとんど認められ

ないことからHCV PHA価をこれら3群に分け, HCVキャリアの判別及び健康管理への指導がなされている.

今回, HCV抗体陽性者について確実にHCVキャリアであるか否かを判定するために, HCV PHA価とHCV RNA検出との関係についての検討を行った. 図1に示したように2¹²HCV PHA価以上の群についてはほぼHCVキャリアであるとの推測は可能であった. しかしながら, 2⁷~¹¹HCV PHA価の群については, 今回の結果からはPHA価によるHCVキャリアの推測はできなかった.

アンプリコアHCV検出キット, NRT PCRでのHCV RNA検出率の差は, 増幅領域が前者は5' 非翻訳領域の一部, 後者はコア領域の一部と異なること, また増幅条件として前者が一段階, 後者が二段階であること等が理由と考えられた. また, HCV 5' 非翻訳領域の塩基配列は高度に保存されており, HCV RNA検出に適しているとの報告 [7] から, 今後更に, 増幅領域, 検出条件等の検討を加えていきたい.

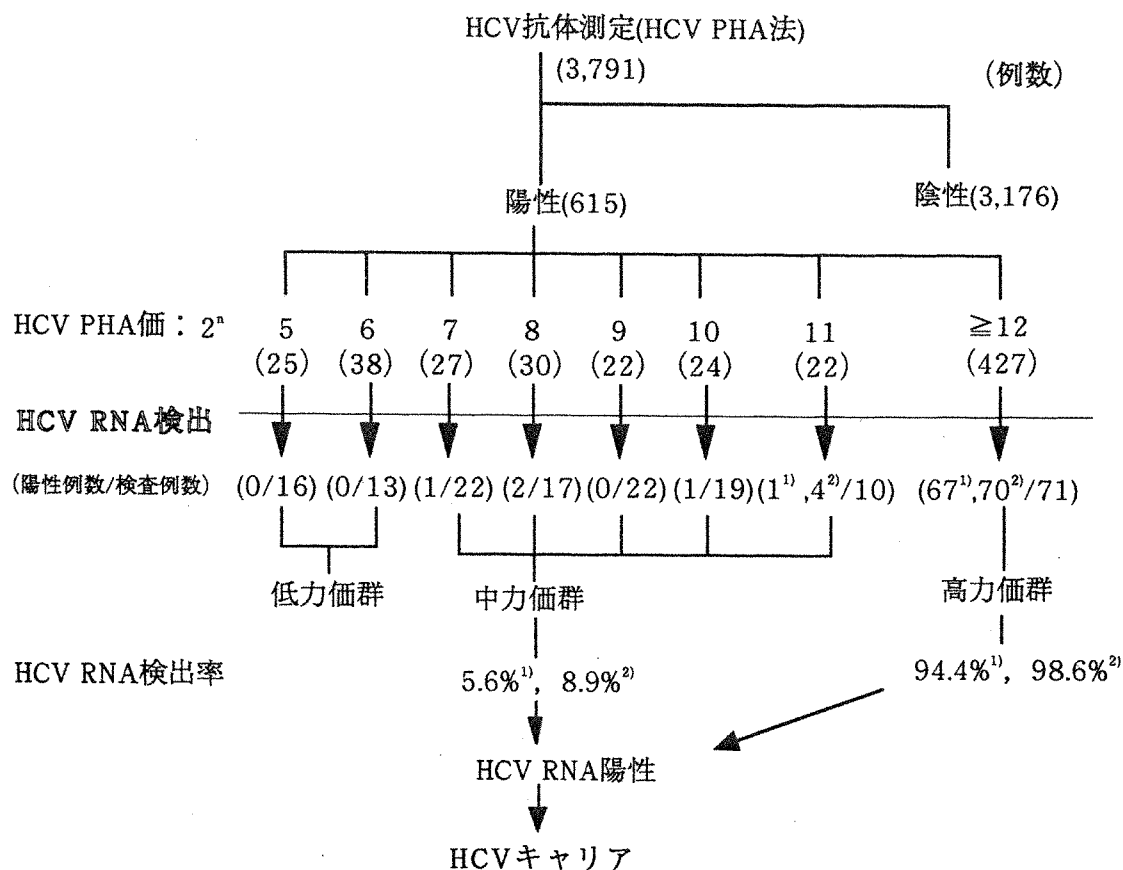


図1 HCV PHA価とRNA検出の関係

1): アンプリコアHCV, 2): NRT PCR

謝 辞

本研究を行うにあたり、ご指導をいただきました広島大学吉澤浩司教授、ならびにご協力いただきました、県健康対策課、県立保健所及び広島県環境保健協会の関係各位に深謝致します。

なお、本稿の要旨は、第42回中国地区公衆衛生学会（広島市）において発表した。

文 献

- [1] 飯野四郎 (1995) : C型肝炎. 臨床とウイルス, 23 (増刊号), 268 - 269.
- [2] 松浦善治, 相崎英樹, 石井孝司, 宮村達男 (1995) : C型肝炎ウイルス. 臨床とウイルス, 23 (増刊号), 270 - 276.
- [3] 林仲信 (1990) : ウイルスの生検ならびに病理標本を使用しての検出. 実験医学, 8 (9), 89 - 101.
- [4] Okamoto, H., Okada, S., Sugiyama, Y., Yotsumoto, S., Tanaka, T., Yosizawa, H., Tsuda, F., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (1990) : The 5' -Terminal Sequence of the Hepatitis C Virus Genome. Japan. J. Exp. Med., 60, 3, 167 - 177.
- [5] Ichimura, H., Tamura, I., Yamada, E. Takezaki, T. Koda, O. Kurimura and T. Kurimura (1992) : Hepatitis C Virus RNA and Hepatitis C Virus antibody in the serum of patients with abnormal liver function. Journal of Infection, 25, 47 - 53.
- [6] 吉澤浩司 (1995) : 住民検診におけるHCV抗体測定結果の判定と通知の方法について. 平成6年度広島県地域保健対策協議会調査研究報告書 26, 1 - 5.
- [7] Okamoto, H., Okada, S., Sugiyama, Y., Tanaka, T., Sugai, Y., Akahane, Y., Machida, A., Mishiro, S., Yosizawa, H., Miyakawa Y., and Mayumi, M. (1990) : Detection of Hepatitis C Virus RNA by a Two-Stage Polymerase Chain Reaction With Two Pairs of Primers Deduced from the 5' -Noncoding Region. Japan. J. Exp. Med., 60, 4, 215 - 222.