

## C型肝炎ウイルス (HCV) の抗体と 遺伝子検出に関する研究

### Ⅲ C型肝炎病態別のHCV遺伝子陽性率と HCV遺伝子型比率

町田 篤彦 小澤 茂 渡辺由香里 赤羽賢浩\*<sup>1</sup>

Studies on the Detection of Antibodies and Genome  
RNA of Hepatitis C Virus Ⅲ. Comparative Analysis  
of Hepatitis C Virus Genome Prevalence and  
Genotype Distribution in Patients with Clinical  
Course of Hepatitis C

Atsuhiko MACHIDA, Shigeru OZAWA, Yukari WATANABE  
and Yoshihiro AKAHANE

肝炎は肝臓に炎症が起こる病気だが、その約90%以上はウイルスによって起こる。現在までに肝炎に関与するウイルスとして報告順序はまちまちだが、A型、B型、C型、D型、E型、F型、G型の7種類が報告されている。このうち輸血など血液を介して感染するのは、B型、C型、D型およびG型であることが分かっている。日本に多いのはB型とC型であるがG型の存在については昨年米国で報告されたばかりなので日本での詳細はまだ分かっていない。輸血後のB型肝炎がほぼ駆逐された後にもかなりの頻度で発生する肝炎の原因ウイルスの実体を明らかにする試みが長年にわたってなされていたが、従来のウイルス同定法ではすべて徒労に終わっていた。しかし7年前、米国のカイロン社が従来の方法を一新するような分子生物学的手法により初めてこのウイルス遺伝子の一部をクローン化することに成功し、その情報が論文という形ではなく商業特許として公開となった<sup>1) 2)</sup>。このウイルスこそが現在C型肝炎ウイルスと呼ばれるものである。C型肝炎の大きな問題点はC型肝炎ウイルスに感染すると高率に慢性化し、続いて肝硬変から肝細胞癌へと進行し現在この癌による死亡率が逐年増加している事である。ではこのようなC型肝炎の病態の進行に何に関わっているのか? 日本ではC型肝炎ウイルスの遺伝子であるRNAにはI型、II型、III型、IV型の4種類の型があることが

知られている<sup>4) 5)</sup>。そこで慢性肝炎→肝硬変→肝細胞癌へと病態が進行し易い遺伝子型があるのかどうか調べた。また病態の進行にC型肝炎ウイルスの遺伝子量(ウイルス量)が関係あるのかどうか調べた。ここではこれらの結果を報告する。

#### 材料と方法

##### 1. 被検血清および血漿

山梨医科大学において臨床的に診断されたC型肝炎患者のうち慢性肝炎患者102名、肝硬変患者47名および肝細胞癌患者43名の血清あるいは血漿を使用した。検体は-80℃に保存した。

##### 2. HCV-RNA遺伝子の検出<sup>3)</sup> および遺伝子型の決定<sup>4) 5)</sup>

被検血清あるいは血漿からRNAを抽出し逆転写酵素によりHCV-cDNAを合成した。5'-非翻訳領域の2種類のプライマーを用いてHCV-cDNAを1次PCRによって増幅し、さらに1次PCRで用いたプライマーの塩基配列より内側に相当する塩基配列をもつ2種類のプライマーを用いて2次PCRにより更に増幅した(RT-nested RCR)。増幅反応物はアガロースゲル電気泳動により分画しエチジウムブロマイドで染色した後に

\*1 山梨医科大学

発する蛍光により検出した。220塩基対に相当する位置に蛍光を発するバンドが見られる検体をHCV-RNA陽性とした。またHCV-cDNAを1次PCRのみで増幅してHCV-RNA量を半定量的に調べた。HCV-RNAの型を決定するためにHCV-cDNAをコア領域の2種類のプライマーを用いて1次PCRにより増幅し、更に1次PCRで用いたプライマーの塩基配列より内側に相当する5種類の型特異的プライマーを用いて2次PCRにより更に増幅した。増幅反応物は上記のごとく検出し、49塩基対に相当する位置にバンドが見られる検体中のHCV-RNAをI型、144塩基対に相当するバンドをII型、174塩基対に相当するバンドをIII型、123塩基対に相当するバンドをIV型とした。

## 結 果

### 1. C型肝炎の病態とHCV遺伝子陽性率および遺伝子量との関連性

C型肝炎患者のうち慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌と診断された患者の血液を検体としてC型肝炎の病態の進行に伴うHCV遺伝子陽性率と遺伝子量を調べその結果を図1に示した。病態が慢性肝炎→肝硬変→肝細胞癌へと進むにつれHCV-RNA遺伝子陽性率は各々95% (97/102), 98% (46/47), 100% (43/43) と僅かに上昇した。一方ウイルス遺伝子量を1次PCR陽性のものは多い、陰性のものは少ないとする基準で調べた結果、慢性肝炎では35% (34/97)、肝硬変では33% (15/46) が陽性であったのに対して肝細胞癌では5% (2/43) のみが陽性であった。このことから肝細胞癌へと病態が進むと前段階(慢性肝炎、肝硬変)よりウイルス量が減少することが分かった。

### 2. C型肝炎の病態とHCV遺伝子型の比率

HCV遺伝子型によりC型肝炎の病態が慢性肝炎→肝硬変→肝細胞癌へと進行する速度に違いが見られるのかどうかを調べるために各々の病態に相当する患者のHCV遺伝子型(I~IV)の比率を調べその結果を表1に示した。病態が慢性肝炎、肝硬変から肝細胞癌へと進むとII型の比率が上昇しIV型の比率が下降する傾向が見られた。

表1 C型肝炎の病態とHCV遺伝子型の比率

病 態	遺 伝 子 型				
	I	II	III	IV	
慢性肝炎	例数	0	71	14	12
	(%)	(0)	(73)	(14)	(12)
肝硬変	例数	0	34	7	5
	(%)	(0)	(74)	(15)	(11)
肝細胞癌	例数	0	34	6	3
	(%)	(0)	(79)	(14)	(7)

## 考 察

日本でのHCV遺伝子型にはI~IV型の4種類が存在し遺伝子型により慢性肝炎のインターフェロンによる治療効果が異なることが知られている<sup>6)</sup>。これは遺伝子型によりウイルス量が異なるためであるとも考えられる。II型の慢性肝炎はウイルス量が多いためかインターフェロンによる治療効果が低いことが知られている<sup>7)</sup>。このようにC型肝炎の慢性肝炎から肝硬変そして肝細胞癌への肝病変の進行に影響を与える因子としてHCV量およびHCV遺伝子型が考えられた。そこでC型慢性肝炎、

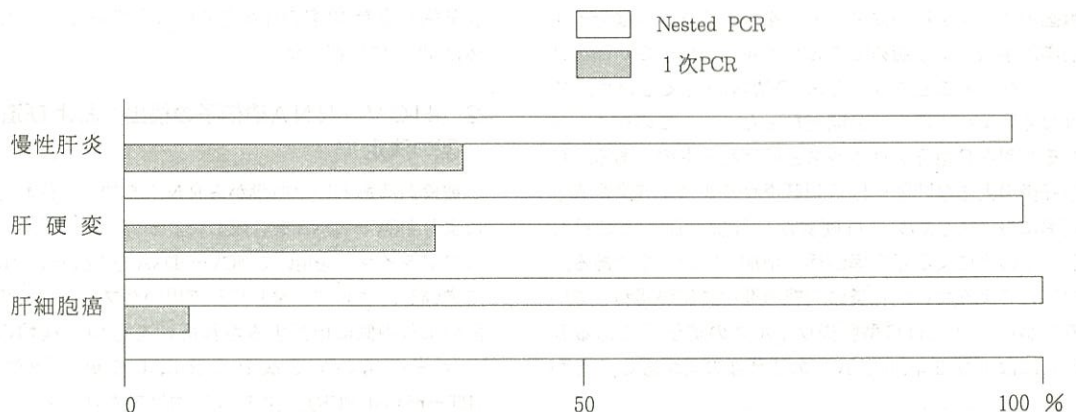


図1 C型肝炎の病態とHCV-RNA遺伝子陽性率



