

## 分担研究報告書

## ラジカルイムノアッセイ法によるHBs抗原測定法のさらなる高感度化

分担研究者 青山 正明 山形県産業技術振興機構 研究開発部

## 1. はじめに

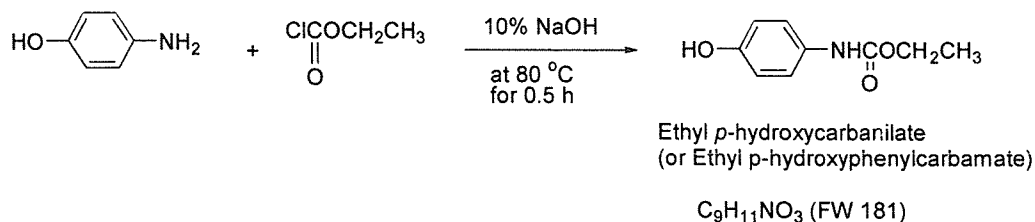
ラジカルイムノアッセイ法は最終生成物を安定ラジカルとするペルオキシダーゼと過酸化水素の高感度検出系である<sup>1)</sup>。検出器としてESR装置を使用するため処理能力は限定されるが、応用は極めて広範囲に及ぶ。本測定系は原理的にS/N特性に優れるため低濃度の測定を得意としている。この特性を生かし、我々はこれまでにラジカルイムノアッセイ法を、従来法では検出困難な低レベルのHBs抗原の検出<sup>2)3)</sup>、天然水中の過酸化水素の検出ならびにスギ花粉飛散開始前における微量な大気中Cry j 1の検出<sup>4)</sup>に応用してきた。ここでは、ラジカルイムノアッセイ法をさらに高感度化するため*p*-アセタミドフェノール (*p*-AP)の各種誘導体を合成しさらなる感度向上を試みた。またHBsモノクローナル抗体を感作したラテックスビーズを用いたHBs抗原の濃縮方法につき検討した。

*p*-AP誘導体の利用、ならびに酵素反応液等に若干の改良を加え、虎ノ門病院より提供されたHBs抗原陰性化サンプルの測定を山形大学医学部富樫教授と共同で行った。

## 2. 各種試薬の合成ならびに調整方法

2-1. *p*-AP誘導体の合成

各種*p*-AP誘導体の内最も感度向上が計れた、Ethyl *p*-hydroxyphenylcarbamateは、4-aminophenolとEthyl chloroformateを10% NaOH共存下にて80°C、30分間反応させて合成した(図1)。反応収率はおよそ80%であった。

図1 Ethyl *p*-hydroxyphenylcarbamateの合成方法

## 2-2. HBs モノクローナル抗体感作ラテックスビーズの作成ならびに測定方法

感作用ラテックス担体は、JSR 株式会社より購入した IMMUTEX H1007R (1.34  $\mu$  m) を用いた。抗 HBs 抗原モノクローナル抗体 (抗原決定基 a) は特殊免疫研究所より入手した。リン酸緩衝液 (0.1M, pH 7.0) 0.1ml に超純水 1ml、ラテックスビーズ 0.2ml を加え攪拌後、抗 HBs 抗原モノクローナル抗体 (40  $\mu$  g) を添加し、4°C にて 5 時間物理的吸着反応を行った。リン酸緩衝液にて二回遠沈洗浄後、2%BSA 含有リン酸緩衝液 (0.05M) 2 ml を添加し 4°C にて一晩ブロッキング処理を行った。リン酸緩衝液 (0.05M) にて遠沈、洗浄後 2%BSA 含有リン酸緩衝液 (0.1M, pH7.0) 2 ml を添加し抽出用ビーズを作成した。

血清からの HBs 抗原の抽出は、栄研化学社のコンジュゲート希釈液 0.1 ml に、血清 2 ml を加え、モノクローナル抗体感作ラテックスビーズを 0.1 ml 添加した後、室温で 1 時間静置反応させた。遠沈後上清を吸引除去し、超純水 1 ml を添加し再度、遠沈、上清の吸引除去を行う。ラテックス担体を吸引せぬよう注意深く吸引処理を行う事がポイントである。ラテックス担体からの HBs 抗原の溶出は、グリシン緩衝液 (0.1M, pH2.0) 100  $\mu$  l にて行い、攪拌、遠沈後の上清を抽出液とした。

HBs 抗原の測定は、ルミスポット栄研 HBs 抗原キットを使用した。反応条件等は若干の変更を加えた。リン酸緩衝液 (0.1M, pH 7.0, 0.2%BSA 含有) 160  $\mu$  l に、抽出液 90  $\mu$  l を添加後室温にて 1 時間反応させた。2<sup>nd</sup> ステップはコンジュゲート希釈液 170  $\mu$  l にコンジュゲート 50  $\mu$  l を添加し、室温で 1 時間反応させた。酵素反応は、酵素反応液 (表 2) 220  $\mu$  l を添加し、37°C にて 1 時間反応後、アジ化ナトリウム (100mM) 50  $\mu$  l を添加して反応を停止させた。シグナル強度は日本電子製 FR30 を用いてマニュアルにて測定した。

表 2. 酵素反応液の組成

|   |             |
|---|-------------|
| MOPS 緩衝液 (0.05M, pH 6.5, 0.015% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 含有) | 100 $\mu$ l |
| 超純水   | 70          |
| Ethyl <i>p</i> -hydroxyphenylcarbamate (20mM)                     | 30          |
| DTPA (5mM)  | 10          |
| HTIO (5mM)  | 10          |
| 全量  | 220 $\mu$ l |

## 2-3. 従来法にて HBs 抗原陰性化が確認されたサンプルの測定

一次反応は、サンプル量 200  $\mu$  l にコンジュゲート希釈液 50  $\mu$  l を添加後室温下にて 1 時間反応させた。生理食塩水にて洗浄後、コンジュゲート希釈液 180  $\mu$  l、コンジュゲート 40  $\mu$  l を加え室温下にて 1 時間反応させた。一次反応、二次反応共に独自に開発した攪拌装置を使用し、反応効率を大幅に向上させている。二次反応終了後、エルジア F 洗

浄液にて五回洗浄を行った。酵素反応は前述の方法に準じて行った。

### 3. 結果ならびに討論

各種 *p*-AP 誘導体の性能を HRP 濃度 50 amol/test にて比較した結果を表 1 に示した。

表 1 各種 *p*-AP 誘導体の性能比較

| <i>p</i> -AP 誘導体  | 相対シグナル強度(%) |
|---|-------------|
| <i>p</i> -acetamidophenol   | 100.0       |
| (HO)C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NHCOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                 | 98.1        |
| (HO)C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NHCOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                 | 100.0       |
| (HO)C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NHCOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 69.8        |
| (HO)C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NHCOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH                            | 9.4         |
| (HO)C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NHCOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH            | 51.4        |
| (HO)C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NHCOOCH <sub>3</sub>  | 53.1        |
| (HO)C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NHCOOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                | 170.0       |
| <i>p</i> -acetamido-2-methylphenol  | 70.8        |
| <i>p</i> -acetamido-5-methylphenol  | 13.3        |
| <i>p</i> -acetamido-2,5-dimethylphenol  | 2.2         |

最も良い感度を示した Ethyl *p*-hydroxyphenylcarbamate を用いて HRP の最低検出感度を算出したところ 1.5 amol/test (S/N=1.5) であった。また、0.01ng/ml の濃度の HBs 抗原標準液を測定したところ、*p*-AP を用いた場合に比し、1.6 倍のシグナル強度の増加が確認された。

モノクローナル抗体感作ラテックス担体を用い、HBs 抗原濃度が 1pg/ml の試料を処理した場合、S/N 比で 2.0 の値が得られた。期待値に比し低めの値であったが、溶出条件の最適化がなされていないためと推測された。固定化抗体にポリクローナル抗体、あるいは溶出液に希塩酸を用いた場合、回収率は 10%程度に留まった。ここではグリシン緩衝液を使用しているが、それでも最終回収率は 45%程度であった。溶出条件の最適化は今後の課題であり、検討を続行する予定である。

従来法にて HBs 抗原消失と判定された検体五例をラジカルイムノアッセイ法にて測定した。消失直後の HBs 抗原濃度は低レベル (0.016~1.69 ng/ml) であるが全例 HBs 抗原陽性と判定された (図 2)。

この結果より 2つの問題点が浮き彫りになる。一つは、HBs 抗原の生物学的半減期であり、もう一つは、HBs 抗原消失の定義である。前者は実験的に確認可能であるが、後

者は長期に渡る追跡調査が必要となる。外因性ウイルス抗原は理想的にはゼロでなければならぬ。抗原値がゼロ値に近づくまで治療を継続すべきと思われるが、ゼロ値は測定系の感度に大きく左右されるため、今後ゼロ値の定義が問われる事と推測される。

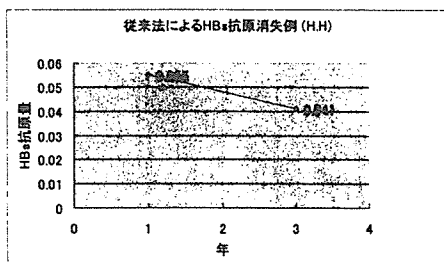
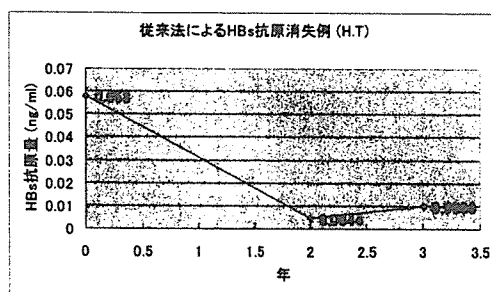
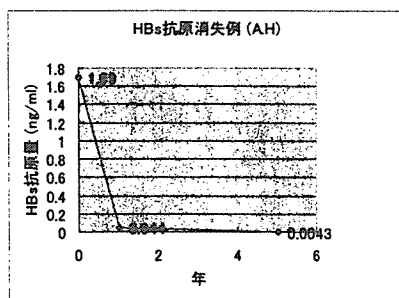
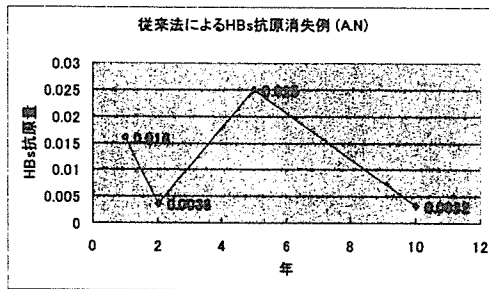
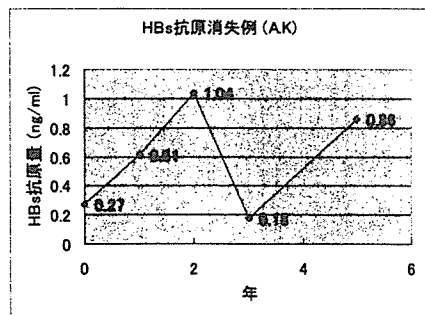


図2 従来法による HBs 抗原消失例

ラジカルイムノアッセイ法は低レベルの抗原測定に適した測定系であり、HBs 抗原測定的应用にあたり、*p*-AP 誘導体の開発、酵素反応液の最適化、抗原濃縮方法の開発により更に感度が向上することが示された。

#### 4. 参考文献

- 1) M. Aoyama, M. Shiga, H. Ohya, and H. Kamada. A novel ESR method for horseradish peroxidase activity using a combination of *p*-acetamidophenol and hydroxylamine, and its application to enzyme immunoassays. *Anal.Sci.* 14, 1107-1113 (1998).
- 2) T. Matsuo, H. Shinzawa, H. Togashi, M. Aoki, K. Sugahara, K. Saito, T. Saito, T. Takahashi, I. Yamaguchi, M. Aoyama, and H. Kamada. Highly sensitive hepatitis B surface antigen detection by measuring stable nitroxide radical formation with ESR spectroscopy. *Free Radic Biol Med.* 25, 929-935 (1998).
- 3) M. Aoki, T. Saito, H. Watanabe, T. Matsuo, K. Saito, H. Togashi, S. Kawata, K. Ishikawa, M. Aoyama, H. Kamada and H. Shinzawa. Clinical significance of a highly sensitive enzyme immunoassay of hepatitis B surface antigen using a novel electron spin resonance technique. *Free Radic Biol Med.* 25, 929-935 (1998).
- 4) 青山正明、高橋裕一：ESR ラジカルイムノアッセイ法による Cry j 1 の超高感度測定法の開発、アレルギー、53(10), 1088-1090 (2004).

## C型肝炎多発地区での肝検診により発見されたHCV抗体陽性者における肝癌罹患率の検討

山形県立日本海病院内科 新澤陽英、置賜総合病院内科 鵜飼克明、山形大学  
医学部第二内科 斉藤孝治、斎藤貴史、富樫整、河田純男  
山形大学医学部公衆衛生学 邵力

### はじめに

C型肝炎は慢性肝炎となり、また肝硬変へ進展し、さらに肝癌を合併してくる問題となる疾患である。医療機関においてはC型肝炎ウイルス(HCV: Hepatitis C Virus)感染者からの肝癌罹患率についてはかなり検討されてきている(1)。その多くは肝機能異常を呈する慢性肝炎からの肝癌の罹患率をみたものである。ところでHCVに感染していても自覚症状が無く、あるいは肝機能が正常で(2)医療機関を受診していない人は少なくない。したがって、医療機関受診者における肝癌罹患率が必ずしもHCV感染者における肝癌の罹患率を表したものとはいえない(1)。

一方、HCV感染者について肝癌の罹患を調べた研究はあるが、その対象に偏りがあつたり、観察年数が短かつたりと問題点が少なくない。私どもはC型肝炎の多発地区において1991年より1995年の5年間で行ったC型肝炎の検診で1078人にHCV抗体を検出した。その後、1996年よりこれらのHCV抗体陽性者を対象として、毎年肝機能検査ならびにHCV-RNA検査そして超音波検査を行うと共に、肝癌罹患の調査を行ってきた。本研究ではC型肝炎多発地区においてHCV感染者における15年間の肝癌罹患率を検討すると共に、肝癌発生のリスクファクターについて検討したので報告する。

### 対象と方法

本コホート研究は、R町において1991年から1995年の5年間をかけ、全町のHCV感染について調査を行った結果抽出されたHCV抗体陽性者を対象として行ったものである。HCV感染についての調査は1991年にA地区、1992年にB地区、1993年にC地区、1994年にD、E、F地区、1995年にG地区を調査した。1991年から1992年には6歳以上の住民4655名、1993年から1995年までは30歳以上の住民15364人(男7375人、女7989人)を対象とした。受検率は全体で58.3%であった。この検診では1078人(男422人、女656人)にHCV抗体が検出された。初回検診時HCV抗体の検出はHCV EIAII Abbott (Dainabot Tokyo)で行われた。HCV抗体陽性者に対してはNested reverse transcription-polymerase chain reaction (nested RT-PCR)法(3)にてHCV-RNAの検出を行った。HCV-RNA陽性者についてはHCV genotypeを検出した(4)。また、面接の上、輸血歴、手術歴、既往歴、飲

酒歴、喫煙歴を聴取した。さらに、検診時には体重、身長を測定し、Body Mass Index (BMI) を算出した。肝癌の罹患状況の追跡調査については毎年アンケート調査ならびに聞き取り調査をし、さらに本人あるいは家族の同意の上医療機関により肝癌罹患の有無を確認した。HCV-RNA陽性に対しては1996年から2006年まで年1回の血液検査と腹部超音波検査を行った。血液検査はGOT, GPT,  $\gamma$ -グロブリン, ZTT検査とHCV-RNA検査を行った。

肝癌罹患率については人年法にて計算した。また、肝癌のリスクファクターについてはHCV-RNA genotypeが検出可能であった539例について(表1.)年齢、性、GPT、HCV-RNA genotype、BMI、HBc抗体の有無、家族歴、手術歴、輸血歴、飲酒歴、喫煙歴についてCoxの比例ハザード解析にて検討した。GPTについて、16年間に5回以上の検査で全て正常の群、正常上限(30IU/l)の2倍以内の数値で変動する群、2倍以上を超えて変動する群の3群に分けた。さらに、対象者を性別あるいはHCV genotypeより2群に分けて、Kaplan-Meier法でそれぞれの肝癌累積罹患率をプロットし、2群間の比較のためにlogrank test を行った。また、GPT値については3群間で同様にKaplan-Meier法でそれぞれの肝癌累積罹患率をプロットし、3群間の比較のためにlogrank test を行った。P値は0.05以下が有意と考えた。

統計分析についてはすべてSPSS Version J15.0 for Windows (SPSS Japan Inc.)を用いて行った。

## 結果

初回検診時にHCV抗体陽性とされた1078人の年齢は $61.7 \pm 10.4$  (mean  $\pm$  SD) 歳、性別では男422人;  $60.9 \pm 11.1$  歳、女656人;  $62.2 \pm 9.9$  歳)であった。また、follow-up期間中193人が肝癌以外の疾患で死亡、あるいは転出により脱落した。

15年間に追跡されたHCV抗体陽性者885人の中から男35人、女23人の計58人の肝癌の罹患が見られた。そのうち、HCV genotype 1bは40人、2bは15人、その他1人、HCV-RNA陰性者からも2人であった。この2人のうち1人は初回検診時よりHCV RNA陰性者で、もう1人はインターフェロン治療後にHCV RNA陰性となり、6年後に肝癌に罹患したものである。

肝癌罹患率は全体で5.1/1000人年で、男性では8.5/1000人年、女性は3.2/1000人年と男女では有意に男性の肝癌の罹患率が高かった ( $p < 0.01$ )。

Coxの比例ハザード解析ではリスクファクターとして男性、GPT異常、genotype 1bがあげられた。なかでもGPTが60を超えて高い群ではHRが19.0、30を超えて、60未満ではHRが6.3とGPT異常がハイリスクとしてあげられた(表2)。

肝癌の15年間の累積罹患率を性別・HCV genotypeより比較すると、性別では男が15年の観察期間で5.8%、女が3.2%であった(図1)。Genotypeでは1b型が6%、その他が2.5%であった(図2)。GPT値では60を超えて高値の場合は17.5%、30を超え、60以下で推移する場合は6%、30以下では1%であった(図3)。

その他、輸血歴、手術歴、既往歴、飲酒歴、喫煙歴 BMIでは差は認められなかった。年齢でも差は認められなかった。

## 考案

HCV感染後の肝癌の罹患率については人種差や地域差があることが指摘されている(1)。肝癌の罹患率の検討は多人数の一般地域住民を対象として、しかも長期間にわたるコホート研究が望ましい。本邦における肝癌罹患についての医療機関通院者ではないコホート研究は、小宮ら(5)の献血を契機に見出されたHCVキャリアー362人について5年以上の観察、稲田ら(6)の住民検診でHCV抗体陽性とされた140人について平均8年の経過観察、阿部ら(7)の検診で見つかった385人について平均で5.8年の経過観察での報告、そしてSurukiら(8)の667人での10年間での経過観察での報告がある。私どもの検討は885人16年間の経過観察と従来報告より対象人数も多く、さらに観察期間も長いものである。

HCV感染者における肝癌罹患のリスクファクターとして男性、加齢、HBVの重感染、過度の飲酒などがあげられている。HCVのgenotypeについては一定の見解は得られていない(1)。私どもの検討ではリスクファクターとして男性では一致したが、その他では一致しなかった。これはコホートの違いによるものとも思われるが、さらに長期にわたる観察が必要と考えられる。他方、私どもの検討ではHCV genotype 1b型がリスクファクターとしてあげられた。また、GPTが高値であることが最大のリスクファクターであった。これはSurukiら(8)の報告と一致するもので、C型肝炎の治療に際してはGPT値を下げることで肝癌罹患率を下げることに繋がることを示唆するものと思われた。私どもは以前にHCV genotype 1bでは2bに比べGPT値が高いことを報告した(9)。HCV genotype 1bが肝癌のリスクファクターたり得るのは1b型で肝機能障害が多く、また肝障害が進展しやすいものとも思われる。

ところで、HCV RNAが消失すると肝癌に罹患する率はかなり低下することは一致するところである(1)が、必ずしもゼロではない。今回の検討でもHCV RNA陰性者から2例の肝癌の発生がみられた。1例は自然陰性化例で、1例はインターフェロン著効例であった。HCV RNAの消失は肝癌発生の低下を意味することは間違いがないものの、少数ながらも肝癌が発生することがあり、超音波検査



などによる経過観察は必要と思われる。

文献

- (1) El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma and hepatitis C in the United States. *Hepatology* 2002;36:S74-S83
- (2) Kuboki M, Shinzawa H, Shao L, Ishibashi M, Yoshii E, Suzuki K, Saito K, SDaito T, Togashi H, Tkahashi T et al. A cohort study of hepatitis C virus (HCV) infection in an HCV epidemic area of Japan: age and sex-related seroprevalence of anti-HCV antibody, frequency of viremia, biochemical abnormality and histological changes. *Liver*, 1999;19:88-96
- (3) Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Tanaka T, Sugai Y, Akahane Y, Machida A, Mishiro S, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. Detection of hepatitis C virus RNA by a two-stage polymerase chain reaction with two pair of primers deduced from the 5'-noncoding region. *Jap J Exp Med*, 1990;60:215-222
- (4) Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, Kurai K, Akahane Y, Sugai Y, Tanaka T, Sato K, Tsuda F, Miyakawa Y, et al. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol*, 199;73:673-679
- (5) 小宮裕、吉澤浩司 他. 献血を契機に見いだされた HCV キャリアの病態の推移. *肝臓*. 2003 ; 44 : Suppl.1 A132
- (6) 稲田エリカ 他. 富浦町における 11 年間の長期検診調査に基づく C 型肝炎の疫学的研究. *肝臓* 44 : Suppl.2 A433
- (7) 阿部弘一他. 集団検診(節目検診)が肝疾患診療にもたらしたものは? C 型肝炎ウイルス検診により発見された HCV キャリアーの治療の実態と病態の推移. *肝臓*. 2005..46 : Suppl.2 A326
- (8) Suruki R et al. Alanine aminotransferase level as a predictor of hepatitis C virus associated hepatocellular carcinoma incidence in a community-based population in Japan. *Int J Cancer*. 2006. 119:192-5
- (9) 武田由美子他. HCV 感染多発地区住民検診における ALT 値に及ぼす要因及び ALT 値と肝癌発生の関連性についての検討. *肝臓* 2000.41:Suppl.1 A249

表1.HCV genotype検出可能であった対象者の概要

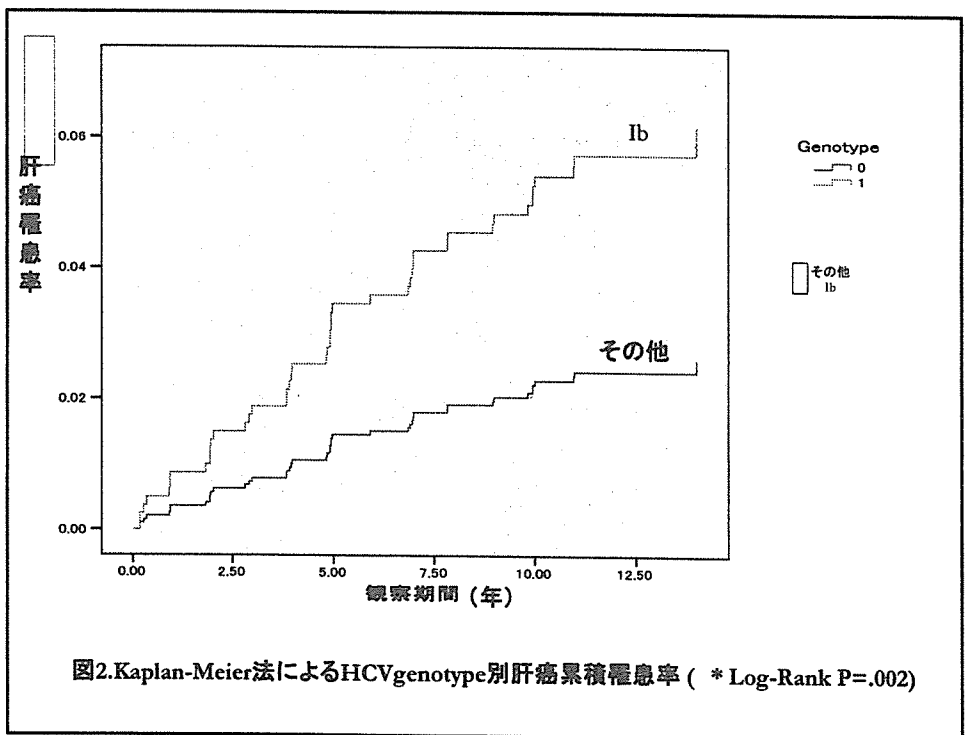
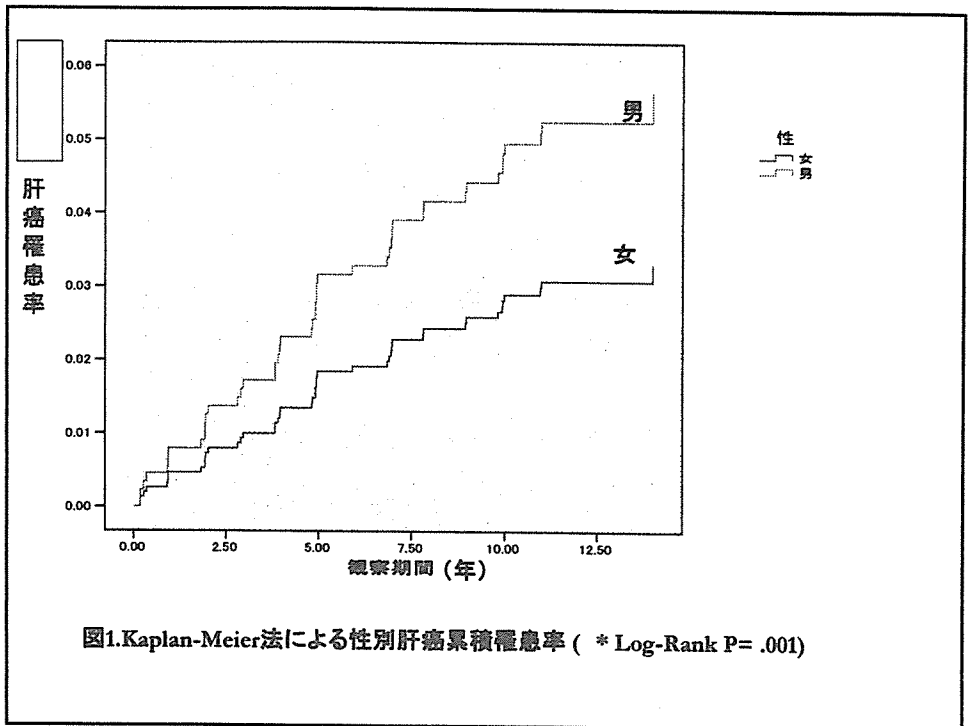
| Characteristics   | Genotype (n=539) |                |
|-------------------|------------------|----------------|
|                   | 1b (n=282)       | non-1b (n=257) |
| Age, mean (SD), y | 62.3 (9.0)       | 60.6 (9.7)     |
| Sex               |                  |                |
| Male              | 108              | 107            |
| Female            | 174              | 150            |
| GPT               |                  |                |
| <=30              | 89               | 125            |
| 30<=<60           | 113              | 71             |
| >60               | 80               | 61             |
| BMI               |                  |                |
| <25               | 209              | 182            |
| >=25              | 73               | 75             |
| HBcAb             |                  |                |
| +                 | 114              | 114            |
| -                 | 168              | 143            |
| 家族歴               |                  |                |
| +                 | 67               | 66             |
| -                 | 215              | 191            |
| 手術歴               |                  |                |
| +                 | 141              | 122            |
| -                 | 141              | 135            |
| 輸血歴               |                  |                |
| +                 | 55               | 45             |
| -                 | 227              | 212            |
| 飲酒歴               |                  |                |
| +                 | 71               | 71             |
| -                 | 211              | 186            |
| 喫煙歴               |                  |                |
| 吸わない              | 222              | 177            |
| 吸った               | 15               | 12             |
| 吸っている             | 45               | 68             |

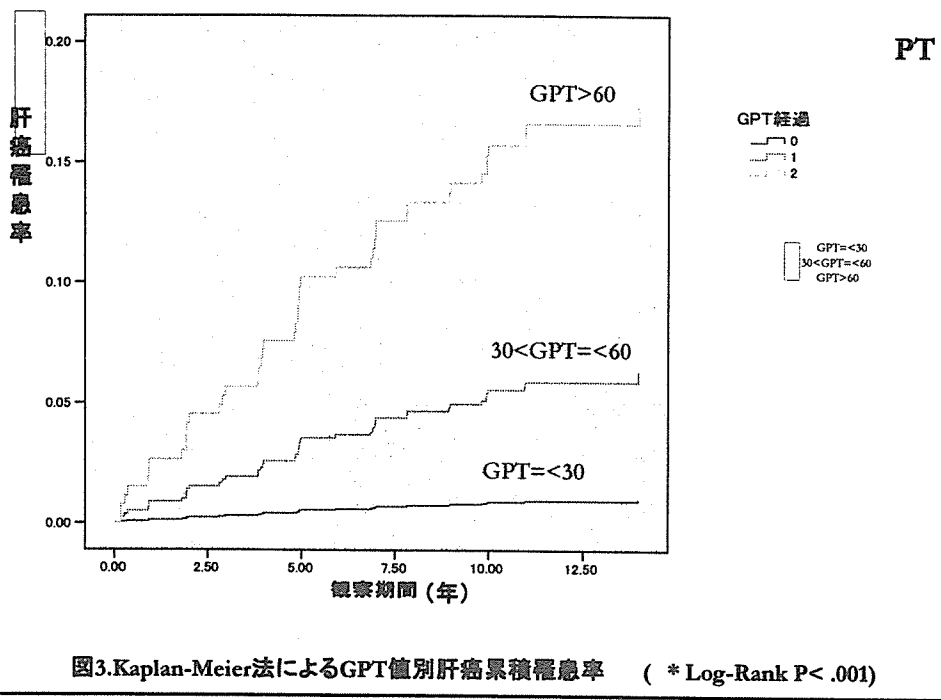
表2.肝臓癌罹患のリスクファクター

Coxの比例ハザード解析による

| Variables            | HR (95% CI)*    | P Value |
|----------------------|-----------------|---------|
| Male Sex (va Female) | 1.7 (0.9-3.2)   | 0.077   |
| GPT>60               | 19.0 (4.5-80.1) | <0.001  |
| 30<GPT=<60           | 6.3 (1.4-28.2)  | 0.016   |
| Genotype 1b          | 1.7 (0.9-3.2)   | 0.012   |

\* 年齢、手術歴、輸血歴などで調整





超高感度 HBs 抗原測定にて見える病態 —HBs 抗原自然消失例とエジプト・アラブ共和国の肝疾患患者を対象に

分担研究者 富樫 整 国立大学法人山形大学保健管理センター 教授

#### 研究要旨

HBs 抗原を超高感度に検出可能な radical immunoassay 法を用い、低濃度 HBs 抗原の意義を調べた。

HBs 抗原自然消失例 14 例（山形大学医学部附属病院 5 例、虎の門病院 9 例）を対象に、HBs 抗原自然消失後 1 年、2 年、3 年、5 年にわたり、低濃度 HBs 抗原を経時的に測定した。ELISA 法にて HBs 抗原陰性と判定されたエジプト人 C 型肝炎患者 41 例（C 型肝炎 17 例、C 型肝炎 24 例）と腎透析患者 9 例を対象に低濃度 HBs 抗原を測定し、肝病態との関連性を調べた。

ELISA 法にて HBs 抗原自然消失直後、14 例とも低濃度 HBs 抗原は、陽性であった。HBs 抗原自然消失後 5 年目においても、低濃度 HBs 抗原は、8 例陽性であった。エジプト人血清では、低濃度 HBs 抗原は、C 型肝炎患者群において C 型肝炎患者群に比べ、有意に高値であった ( $p=0.001$ )。また、B 型・C 型肝炎ウイルス陰性の腎透析患者においても HBs 抗原が高率に (55.6%) 陽性であった。Real-time PCR 法にて HBV DNA を測定では、C 型肝炎患者 24 例中 5 例 (20.8%)、C 型肝炎患者 17 例中 0 例 (0%)、腎透析患者 9 例中 1 例 (11.1%) 陽性であった。

今年度の研究により、HBs 抗原自然消失後、長期間にわたり低濃度 HBs 抗原陽性が持続することが明らかになった。また、エジプト人 C 型肝炎患者において、進展した C 型肝炎患者群の低濃度 HBs 抗原陽性率は高く、一部 HBV DNA が検出される症例もあり、肝炎の進展に B 型肝炎ウイルスが関与している可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

私どもは、B 型肝炎ウイルスや C 型肝炎ウイルス感染を高感度に検出するため、電子スピン共鳴装置 (ESR) を用いた超高感度免疫測定法を開発し、radical immunoassay 法と名づけた。Radical immunoassay 法は、迅速、安価という特徴をあわせ持つ。私どもは、radical immunoassay 法を用い、低濃度 HBs 抗原

陽性例が稀ならず存在する事を明らかにした。Radical immunoassay 法では、0.01 ng/ml までの HBs 抗原を検出することが可能で、低濃度 HBs 抗原陽性症例は、HBV DNA 陽性例と HBV DNA 陰性例に区別することが可能であった。前者は、潜在性 B 型肝炎ウイルスである。後者の意義は不明であるが、対象群に比べ非 B 型肝炎患者での低濃度 HBs 抗原陽性率は、有意に

増加していた。(論文投稿中・発表論文3)成人でのHBs抗原の自然消失例が報告されているが、HBs抗原自然消失例の予後は、必ずしも良好ではない事が報告されている。低濃度HBs抗原測定にて、潜在性B型肝炎ウイルスキャリアやHBs抗原自然消失例を識別している可能性が考えられる。低濃度HBs抗原測定の意義を明らかにする目的にて、(1)HBs抗原自然消失例ではどの程度の期間低濃度HBs抗原が持続するのか、(2)低濃度HBs抗原の存在が、C型肝炎患者の病態に与える影響について調べた。特に後者について海外(エジプト)の症例を対象とした。

## B. 研究方法

radical immunoassay法によるHBs抗原の測定は既報のごとくである。ルミスポット栄研HBs抗原測定キットを用いた。抗HBs抗体(マウス・モノクローナル)に標識されたペルオキシダーゼ活性を安定なラジカル(HHTIO $\cdot$ )に置き換え、これを電子スピン共鳴装置(ESR)により定量する原理に基づいている。ESR法は電子スピンを有する常磁性種のみを計測するため、バックグラウンドノイズを最小限にし、大幅な感度向上をもたらす。

ELISA法にてHBs抗原陰性例となったHBVキャリア14症例を対象にした。その内訳は、山形大学医学部附属病院症例5例、虎の門病院症例9例である。HBs抗原消失直後、1年後、2年後、3年後、5年後までradical immunoassay法にて経過観察した。

エジプト人においては、C型肝炎硬変24例、C型慢性肝炎17例、腎透析患者9例を対象にし、低濃度HBs抗原を測

定した。低濃度HBs抗原陽性例について、リアルタイムPCR法にてHBV DNAを測定した。(表1)

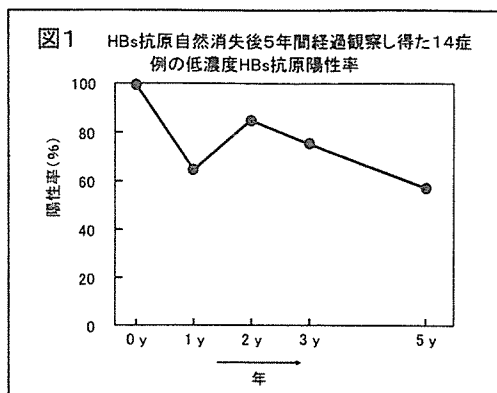
|                  | 例数  | M : F  | 平均年齢   |
|------------------|-----|--------|--------|
| 進行したC型肝炎         | 24例 | 16 : 8 | 53 ± 7 |
| C型肝炎硬変(代償性、非代償性) |     |        |        |
| C型肝炎硬変 + 肝がん     |     |        |        |
| C型肝炎硬変 + 住血吸虫症   |     |        |        |
| 慢性C型肝炎           | 17例 | 10 : 7 | 49 ± 8 |
| 腎透析患者            | 9例  | 7 : 2  | 47 ± 5 |

(倫理面での配慮)

十分な説明と理解に基づく自発的同意を本人より文書で得た。検体の使用目的、参加者の人権の保護などについても、説明した。また、山形大学医学部とセオドル・ビルハルツ研究所の間にて、データの所有権、論文発表時の覚書を取り交わした。

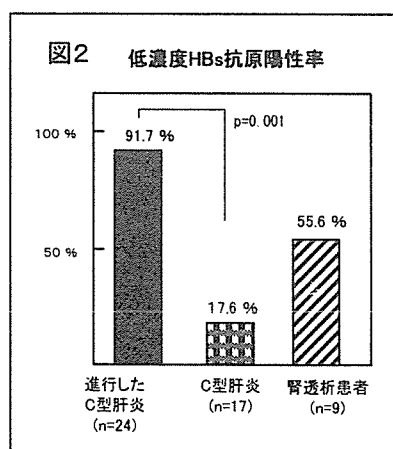
## C. 研究結果

HBs抗原自然消失後、5年間経過観察しえた14症例の低濃度HBs抗原陽性率を図1に示す。HBs抗原消失直後、radical immunoassay法では全例陽性と判定された。同一患者を経時的に経過観察したところ、半数以上の症例がHBs抗原消失後5年経ても、低濃度HBs抗原は陽性であった。(図1)



エジプト人症例の中で進行したC型肝炎（肝硬変）では、低濃度HBs抗原陽性率は、91.7%であり、C型肝炎群（17.6%）に比べ、有意に高値であった（ $p=0.001$ ）。腎透析患者において、低濃度HBs抗原は、55.6%と高率であった。（図2）全例を対象に、Real-time PCRにて、HBV DNAを検討した。C型肝炎硬変患者は、低濃度HBs抗原陽性例24例中5例（20.8%）陽性であった。一方、C型慢性肝炎患者では、HBV DNAは、17例何れも陰性であった。腎透析患者9例中1例（11.1%）HBV DNAは陽性であった。

C型肝炎硬変24例における各項目の陽性率は、HBs抗体陽性率29.2%、HBc抗体陽性8.3%、HGV/CBV-C RNA陽性12.5%、TTV DNA陽性33.3%であり、何れも低濃度HBs抗原陽性例との関連性はなかった。



#### D. 考察

私どもは、感染症関連蛋白を高感度に検出可能な radical immunoassay 法を開発した。私どもが radical immunoassay 法で測定した結果では、ルーチンのHBs抗原測定結果が陰性であるにもかかわらず、正常人ボランティアや肝疾患患者において低濃度HBs抗原陽性と判定される方が多いことが判明した。低濃度HBs抗原測定の意義を明らかにする目的にて、HBs抗原自然消失例ではどの程度の期間低濃度HBs抗原が持続するのか、低濃度HBs抗原の存在が、C型肝炎患者の病態に与える影響について海外を対象として調べた。HBs抗原自然陰性化した症例において、長期間にわたり低濃度HBs抗原は、陽性を示すことが明らかになった。さらに、エジプト人血清において、C型肝炎硬変患者は、91.7%と高率に低濃度HBs抗原が陽性であり、C型肝炎とB型肝炎の重感染が、肝病態を悪化させることが示唆された。

低濃度のHBs抗原の意義をさらに明らかにするため、HBs抗原自然消失例に注目し、経時的に低濃度HBs抗原を計測した。HBs抗原自然消失例においても、低濃度HBs抗原は数年間にわたり陽性となった。以前の検討で、非B型慢性肝疾患において低濃度HBs抗原陽性例が有意に高い事実を考慮すると、非B型慢性肝疾患の中にHBs抗原自然陰性化例が含まれている可能性があるかと推測する。

エジプト・アラブ共和国において、ナイル河流域に住血吸虫症が蔓延し、エジプトの国策として経静脈的な駆虫剤の投与がなされた。不潔な注射針、注射器の使用により、C型肝炎が蔓延し新た

な国民病となった。Uchidaらは、C型肝炎ウイルスと同時に潜在性B型肝炎ウイルスもまたエジプト国民にて高率に見られることを報告した。私どもは、セオドル・ビルハルツ研究所との共同研究にてエジプト人C型肝炎にB型肝炎ウイルスが重感染し、肝病態に影響を与えていないか研究した。日本人を対象とした研究成果と同様に、エジプトにおいても、非B型慢性肝疾患において低濃度HBs抗原陽性例が有意に高かった。

日本の非B型慢性肝疾患では、9.34%陽性であるのに対し、エジプトの低濃度HBs抗原陽性率は91.7%と驚異的である。エジプトにおいて、B型肝炎ウイルスの遺伝子型はDである。今後、ウイルス側の要因、宿主側の要因を含め、検討する必要がある。

疫学的に見てB型肝炎ウイルスの感染率の高い地域（中国を始めとするアジア、アフリカ）においては、母子感染、性行為などに伴う水平感染が社会的な問題になっている。この様な地域においては、潜在性B型肝炎が多いと予想されるが、簡便さ、価格、検体処理速度の理由からPCR法の導入は困難である。また、PCR法は、プライマーの設定や測定者の技量の影響を受けやすく、世界標準の測定法になり難い。Radical immunoassay法は、感度と簡便さの面で、PCR法の短所を補うことができる。疫学的にエジプトは、C型肝炎ウイルスの多発地区である。今回のデータで示したように、エジプトにおいても潜在性B型肝炎ウイルスを効率よく拾い上げることができた。潜在性B型肝炎ウイルスは、感染力を有する。Radical immunoassay法による高

感度抗原測定法の導入により、母子感染と水平感染と同時に免疫機構の低下に基づくB型肝炎ウイルス再燃を制御し、B型肝炎ウイルスに関連する死を減少させると予測される。

## E. 結論

私どもは、低濃度HBs抗原測定の意味付けを行った。HBs抗原自然消失後、長期間にわたり低濃度HBs抗原陽性が持続することが明らかになった。また、エジプト人C型肝炎患者において、進展したC型肝炎群の低濃度HBs抗原陽性率は高く、一部HBV DNAが検出される症例もあり、肝炎の進展にB型肝炎ウイルスが関与している可能性が示唆された。低濃度HBs抗原測定により、HBs抗原自然消失例、潜在性B型肝炎キャリアを効率よく拾い上げることが出来た。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Togashi H, et al. Separate analysis of asialoglycoprotein receptors in the right and left hepatic lobes using (99m)Tc-GSA SPECT in patients with acute hepatic damage. *Hepatol Res.* 2006 36:130-8.
2. Suzuki A, Togashi H, et al. (corresponding author) Characteristics of three cases of hepatocellular carcinoma showing enhanced 99mTc-GSA accumulation by SPECT analysis. *Hepatol Res.* 2007 (in press)
3. What Can Be Revealed by Extending the Sensitivity of HBsAg Detection to Below the Present Limit? (投稿中)

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産の出願・登録状況

なし



「B 型および C 型肝炎ウイルスの新たな感染予防法の確立のための感染病態解明に関する研究」  
分担研究報告書

HCV の感染経過に関与する宿主要因の検討

分担研究者 斎藤貴史 山形大学医学部・消化器病態制御内科学・助教授

研究要旨：平成 16 年度および 17 年度に引き続き、HCV の感染感受性に係わる宿主要因を明らかにする目的で、コレステロール生合成に関与する酵素をコードする TM7SF2 遺伝子の SNP 解析を行った。また、先の SNP 解析にて感染感受性候補遺伝子として Prolactin (PRL) 遺伝子が検出された。PRL は免疫担当ホルモンとして、各種感染症で最近注目されているが、HCV 感染における PRL の関与は不明であり、HCV 感染における PRL 発現動態の解析を行った。遺伝子 SNP 解析は、HCV 抗体陽性者のうち、HCV RNA 陽性持続感染者と陰性既往感染者の二群間における SNP 頻度を比較解析した。両群間の比較で、TM7SF2 遺伝子のエクソン領域でアミノ酸置換を伴う coding SNP として有意差のある遺伝子多型が検出された。これは、個人間における HCV 増殖能の差異として、宿主の HCV 感染感受性(防御)に影響を及ぼす可能性があるものと思われた。また、血清 PRL は HCV 感染者では非感染者に比し高値であること、C 型慢性肝炎患者の PBMC では健常者のそれに比し PRL mRNA の発現が亢進していること、健常者 PBMC を *in vitro* 産生 HCV 粒子で刺激すると、PBMC において PRL mRNA の発現が亢進すること、などから、HCV 感染における PRL の関与が示唆された。

A. 研究目的

感染症において、宿主側の感染防御に係わる遺伝的要因の解明は、その感染症の病態解明に寄与するとともに、新たな予後予測因子や治療薬の開発にとって重要である。HCV 感染後の経過は個人間で多様である。私たちは、HCV 感染者の多い山形県某町において、HCV 感染後の経過に影響する宿主側の遺伝的要因を明らかにするためのコホート研究を継続して行っている。HCV 抗体陽性の住民において HCV 持続感染者と既往感染者の二群間で遺伝子一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism: SNP) の網羅的な解析を行った結果、初年度(平成 16 年度)に HCV 感染感受

性候補遺伝子および SNP として 10 遺伝子 12SNP を報告した。平成 17 年度はこの結果を踏まえ、感染成立に深く関与すると考えられる細胞表面上の heparan sulfate proteoglycan (HSPG) の糖鎖硫酸化に係わる酵素 NDST に着目し NDST3 の遺伝子多型が宿主の HCV 感染感受性に係わる可能性を報告した。また、感染初期の自然免疫に関与すると考えられる TGF- $\beta$ 1 について、その promotor 遺伝子の rSNP の多型が HCV 排除に関わっていることを報告した。

最近、HCV 増殖に際し、細胞内で脂質ラフトが重要な役割を担っていることが明らかにされている。そこで、脂質代謝に関わる遺伝子群

の SNP 解析を追加して行った。また、初年度に HCV 感染感受性に係わる遺伝子多型の一つとして、Prolactin (PRL) の intron SNP が検出されていたが、PRL は HIV 感染症などにおいて、免疫担当ホルモンとして病態への関与が指摘されている。PRL の HCV 感染への関与については報告がなく、HCV 感染症における PRL の動態を検討した。

## B. 研究方法

### I. HCV の感染感受性と TM7SF2 の一塩基多型性

HCV 高率感染地区の 20 歳以上の一般住民 1040 名を対象として、採血による HCV 感染調査を行った。遺伝子解析の同意が文書で得られた被験者のうち、IFN 治療歴がなく、かつ輸血歴のない HCV 抗体陽性 215 名 (HCV 持続感染者 156 名、HCV 自然排除者 59 名) のサンプルを用いて、遺伝子 SNP 解析を行った。本研究は、国が定めた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則り山形大学医学部倫理委員会の承認を得て行われた。

### II. C 型肝炎感染症における PRL の動態

①住民検診受診者における血清 PRL 値の検討: HCV 高率感染地区の HCV 抗体陽性者 232 名、年齢と性を適合させた ALT 値異常のない HCV 抗体陰性者 (健常者) 65 名を対象とした。

②C 型慢性肝炎患者 (男性) における血清 PRL 値の検討: 患者 31 名、健常者 34 名を対象とした。また IFN 治療前後において、ウイルスが排除された症例 (SVR) 10 例、無効症例 (NVR) 10 例、を対象として、IFN 治療前後における血清 PRL 値の検討をおこなった。

③末梢血単核球細胞 (PBMC) における PRL mRNA の発現: 患者 12 名、健常者 6 例、を対象

として、TaqMan real-time PCR により、PRL mRNA の定量を行った。

④*in vitro* 産生 HCV 刺激による PBMC における PRL mRNA の発現: pFL-J6/JFH-1 レプリコンより転写した HCV RNA を Huh7.5 細胞へトランスフェクションを行い、培養上清液中に HCV 粒子を産生させた。健常者 5 名の PBMC を用いて、培養上清中の HCV 粒子にて刺激し、PBMC における PRL mRNA の発現を real-time PCR で検討した。

## C. 研究結果および考察

### I. HCV の感染感受性に係わる宿主要因としての TM7SF2 の遺伝子多型性

HCV 持続感染者と既往感染者間で、TM7SF2 遺伝子の cSNP (C/T; rs1129195) に有意差が検出された。ウイルス排除に係わるアレルは C アレルであり ( $P < 0.01$ , odds ratio 3.32)、この SNP は exon 上の存在し、C(Thr)/T(Ile) のアミノ酸置換を伴っていた。

TM7SF2 遺伝子は 11 番染色体上にあり、8 エクソンを有する 4.4kb の DNA であり、遺伝子は  $\Delta 14$ -SR (ミクロゾーム性酵素) をコードし、哺乳類の体内でラノステロールからコレステロールを生合成する。したがって、TM7SF2 の細胞内における脂質代謝は細胞膜上で存在する HCV 複製複合体形成の基盤となる脂質ラフトとそれが形成する脂質微小環境に影響を及ぼすことが推察される。TM7SF2 mRNA は肝臓で多く発現しており、その翻訳産物である  $\Delta 14$ -SR の細胞内局在は小胞体であり、HCV の蛋白プロセッシングに直接的に影響を与えることが推察される。

### II. C 型肝炎感染症における PRL の動態

住民検診受診者における血清 PRL 値の検討

では、血清 PRL 値は HCV 抗体陽性者は陰性者に比し有意に高値であった ( $10.28 \pm 9.67$  ng/ml vs.  $8.36 \pm 8.86$  ng/ml,  $P < 0.01$ )。男女別の検討では、男性 109 名 (HCV 抗体陽性者 83 名、陰性者 26 名) において、血清 PRL 値は、HCV 抗体陽性者は陰性者に比し有意に高値であった ( $10.30 \pm 8.54$  ng/ml vs.  $5.62 \pm 2.76$  ng/ml,  $P < 0.001$ )。血清 PRL 値は、女性では両群間に有意差は認められなかった。C 型慢性肝炎患者における血清 PRL 値の検討では、血清 PRL 値は、患者は健常者に比し有意に高値であった ( $12.0 \pm 9.0$  ng/ml vs.  $6.3 \pm 3.6$  ng/ml,  $P < 0.01$ )。IFN 治療効果との関連では、血清 PRL 値は、治療前と治療後の比較において、SVR 例では有意に低下したが、NVR 例では不変であった。ヒト PBMC における PRL mRNA を測定したところ、PRL mRNA の発現は、C 型慢性肝炎患者では健常者に比し有意に高値であった (ratio:  $7.75 \pm 6.10$  vs.  $0.35 \pm 0.37$ ,  $P < 0.001$ )。pFL-J6/JFH-1 レプリコンより作成した HCV を健常人の PBMC に添加し培養したところ、全例で PRL mRNA 発現増強が確認された。PRL は主に乳汁分泌や妊娠に係わる下垂体ホルモンであるが、下垂体以外の臓器からも分泌される。とくに、リンパ球から分泌され、免疫担当ホルモンとしての機能が注目されている。HCV 感染症において、PRL のリンパ球内における PRL mRNA の発現が亢進しており、血清レベルでも HCV 感染者は陰性者に比べ高値であることが判明した。IFN によるウイルス排除成功後に血清 PRL 値は低下し、また HCV の *in vitro* での直接刺激によりヒト PBMC で PRL mRNA の発現が亢進することから、PRL は HCV 感染に際し、リンパ球で誘導さ

れ、HCV 感染に関与していることが推測された。

#### D. 結語

コレステロール生合成に係わる TM7SF2 の遺伝子多型が、宿主側の HCV 感染感受性(防御)に係っている可能性が示唆された。また HCV 感染に際し、PRL が誘導され、宿主免疫応答に関与している可能性のあることが示唆された。

#### E. 健康危険情報

特記事項なし。

#### F. 研究発表

##### 1. 学会発表

1. 斎藤貴史、西瀬雄子、河田純男：HCV-1b NS3 領域二次構造に基づく HCV サブグループ分類と肝発癌リスクの関連性に関する検討(シンポジウム：肝発癌発生と進展の分子機構)、第 42 回日本肝臓学会総会、京都、2006. 5. 26
2. 斎藤貴史、河田純男：HCV 感染感受性に係る宿主遺伝要因の検討(シンポジウム：肝病態形成に関わる宿主と攻撃因子の遺伝子多様性)、第 36 回日本肝臓学会東部会、東京、2006. 12. 9

##### 2. 論文発表

- 1) Kimura T, Saito T, Yoshimura M, Yixuan S, Baba M, Ji G, Muramatsu M, Kawata S. Association of transforming growth factor (TGF)- $\beta$  1 functional polymorphisms with natural clearance of hepatitis C virus. *J Infect Dis* 2006; 193: 1371-1374
- 2) Okumoto K, Saito T, Onodera M, Sakamoto A, Tanaka M, Hattori E, Haga

H, Ito JI, Sugahara K, Saito K, Togashi H, Kawata S. Serum levels of stem cell factor and thrombopoietin are markedly decreased in fulminant hepatic failure patients with a poor prognosis. J Gastroenterol Hepatol in press

- 3) Akatsuka T, Kobayashi N, Ishikawa T, Saito T, Shindo M, Yamauchi M, Kurokohchi K, Miyazawa H, Duan H, Matsunaga T, Komoda T, Morisseau C, Hammock BD. Autoantibody response to microsomal epoxide hydrolase in hepatitis C and A. J Autoimmunity 2007; 28: 7-18
- 4) 三沢慶子、斎藤貴史、菅原一彦、斎藤孝治、富樫 整、河田純男： C型慢性肝炎患者における脂肪酸 $\beta$ 酸化障害—絶食試験を用いた検討—。肝臓 2007; 48: 85-86

G. 知的財産権の出願・登録状況なし。