

Figure 1. Inhibition of NS3 helicase and ATPase activity by mannoalide. (A) The inhibitory effect of mannoalide on NS3 helicase activity was determined as described in the Experimental Section. Lane 1 shows the heat-denatured ssRNA (26-mer), and lane 2 shows the partial duplex RNA substrate. Lanes 3–7 show the reactions containing NS3 (300 nM) with increasing concentrations of mannoalide (lane 3, 0 μM; lane 4, 10 μM; lane 5, 20 μM; lane 6, 50 μM; lane 7, 100 μM). (B) The reaction mixtures were incubated with $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP as described in the Experimental Section. Lane 1 contains a control reaction mixture in the absence of NS3 and poly(U) RNA. Lane 2 shows the reaction mixture containing only NS3 (300 nM) and 5% DMSO. Lanes 3–6 show the NS3 reaction with increasing concentrations of mannoalide (lane 3, 0.1 mM; lane 4, 0.2 mM; lane 5, 0.3 mM; lane 6, 0.4 mM). The origin, migration of input ATP, and NS3-hydrolyzed inorganic phosphate (Pi) are indicated on the right side of the figure. (C) The experiment shown in panel B is represented graphically. Hydrolytic activity in the absence of inhibitor was taken as 100%. Experiments were conducted independently three times, and their means \pm standard deviations were included at each point. An IC_{50} of mannoalide of 70 μM was calculated from this figure.

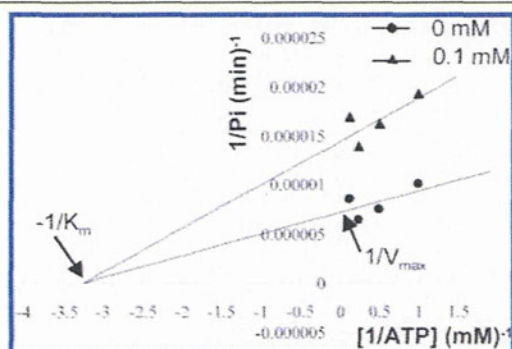


Figure 2. Kinetic profile of mannoalide on the inhibition of NS3 ATPase activity. Reactions were performed in 25 mM MOPS–NaOH (pH 7), 1 mM DTT, 5 mM MgCl_2 , 5 mM CaCl_2 , 300 nM NS3, and 0.1 μg/μL poly(U) RNA at various $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP concentrations (1, 2, 4, and 8 mM) in the presence of the indicated concentrations of mannoalide (0 mM mannoalide, filled circles; 0.1 mM mannoalide, filled triangles).

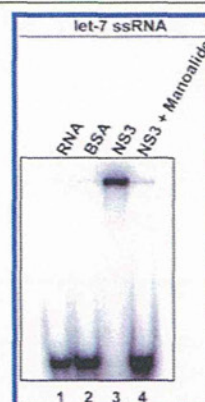


Figure 4. Gel mobility shift assay for the inhibition of NS3 RNA binding. GMSA was performed as described in the Experimental Section. Lanes 1–4 show the GMSA with 1 nM labeled let-7 ssRNA. Heat-denatured RNA alone (lane 1), 300 nM BSA (lane 2), 300 nM NS3 (lane 3), 300 nM NS3 + 0.1 mM mannoalide (lane 4).

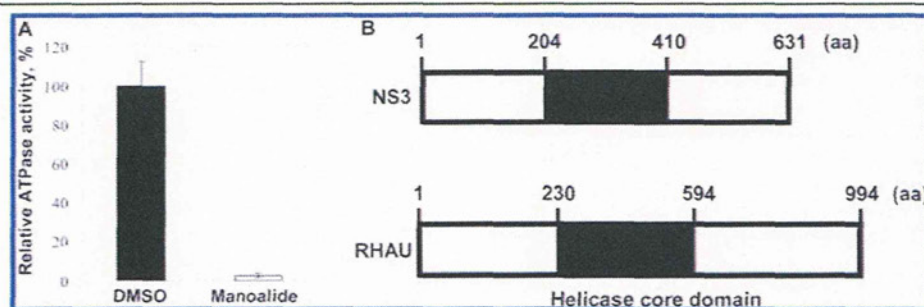


Figure 3. Inhibition of DHX36/RHAU ATPase activity. (A) Reactions were incubated in a buffer solution (50 mM MOPS [pH 7], 2 mM DTT, 3 mM MgCl_2) containing 0.5 μL of RHAU, 0.1 μg/μL poly(U) RNA, 0.1 mM mannoalide, and 0.1 mM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP at 37 °C for 30 min. Black and white bars indicate reactions performed in the absence (5% DMSO) or presence of mannoalide, respectively. The data are means \pm standard deviations of triplicate assays. (B) Schematic overview of NS3 and RHAU structures. Sequence alignment was carried out on CLUSTALW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>). Black box indicates the helicase core domain conserved in SF2 helicases. The numbers indicate amino acid residues.

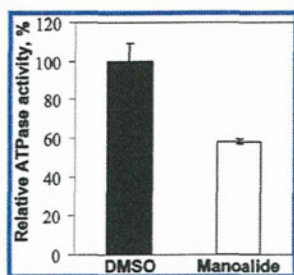


Figure 5. Effects of manoalide on NS3 ATPase activity in the absence of poly(U) RNA. Reaction mixtures contained 25 mM MOPS–NaOH (pH 7), 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 600 nM NS3, and 0.1 mM manoalide. These were incubated with 1 mM [γ -³²P] ATP in the absence of poly(U) RNA at 37 °C for 60 min. Black and white bars indicate that the reactions were performed in the absence (5% DMSO) or presence of manoalide, respectively. The data are means \pm standard deviations of triplicate assays.

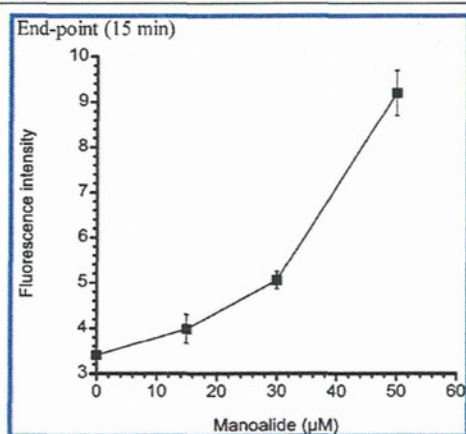


Figure 6. Isothermal denaturation assay (ITD). The ITD assay was performed in 25 mM MOPS–NaOH (pH 6.5), 10 \times concentrated SYPRO orange, and 240 nM NS3 helicase in 20 μ L of reaction mixture with the indicated increasing concentrations of manoalide. The data are means \pm standard deviations of triplicate assays.

Information). To test this idea, we have carried out an isothermal denaturation (ITD) assay, which can assess the stability of proteins at temperatures below the melting temperature and detect the binding of ligands.²⁸ The ITD assay was employed by detecting the increase of fluorescence intensity with the structural change of NS3 as described previously.²⁹ Figure 6 shows that the fluorescence intensity increased in a dose-dependent manner, strongly suggesting that the NS3 structure was changed by the addition of **1**. This result supports the idea that **1** inhibits NS3 activities through the structural changes by direct binding.

Manoalide (**1**) was originally isolated as an inhibitor of beta-bungarotoxin and phospholipase A₂³⁰ but was later found to inhibit calcium channels¹⁸ and 5-lipoxygenase.¹⁹ The hemiacetal in the dihydropyran ring of **1** has been shown to be required for the inhibition of phospholipase A₂.³¹ So far, we do not know if the hemiacetal is also essential for the inhibition of NS3. We speculate that acetal formation between a hemiacetal residue of **1** and a serine and/or threonine residue of the helicase core domain, which contains many evolutionally conserved serine and threonine residues, may occur. Future structural and functional analyses will reveal the essential

structure of **1** required to inhibit NS3, allowing the development of specific inhibitors to NS3 but not phospholipase A₂.

EXPERIMENTAL SECTION

Preparation of Extracts from Marine Organisms. Specimens of marine sponges were collected in Okinawa, Japan (Table S1, Supporting Information). The specimens were extracted three times with either EtOH or acetone, and the EtOAc-soluble portions were obtained after concentration and partition.

Chemicals. Manoalide was purchased from Santa Cruz Biotechnology. γ -³²P-ATP and γ -³³P-ATP were purchased from Muromachi Yakuhin and PerkinElmer, respectively. Let-7 ssRNA was synthesized by Gene Design Inc. Poly (U) RNA was obtained from Sigma-Aldrich.

High-Throughput Screening of NS3 Helicase Inhibitors. The fluorescence helicase activity assay based on photoinduced electron transfer was performed as described in our previous study²¹ with modifications of the substrate and the composition of the reaction mixture.

The substrate was prepared as dsRNA by annealing, at a 1:2 molar ratio, a 5' BODIPY FL-labeled 37-mer (5'-CUAAUACCUCACC-CUCAUAACCUUUUUUUUUUUU-3') to a 23-mer (GGUUAU-GAGGGUGGAGGUAUAG). When unwound by HCV NS3 helicase, the unlabeled ssRNA is captured by a DNA capture strand (5'-CTATTACCTCCACCCTCATAACC-3'). A fluorescent-dye-labeled oligonucleotide was purchased from J-Bio 21 Corporation. BODIPY FL was attached to the 5'-end via an aminoethylphosphate linker with a six-carbon spacer. Unlabeled oligonucleotides were purchased from Japan Bio Services Co., Ltd.

The continuous fluorescence assay was performed in 25 mM MOPS–NaOH (pH 6.5), 3 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 4 U RNasin (Promega), 50 nM dsRNA substrate, 100 nM DNA capture strand, and 5 mM ATP in 20 μ L of reaction mixture. The diluted extracts in DMSO were added (2 μ L) to the reaction mixtures to a final concentration of 15–35 μ g/mL. The reaction was started by adding 240 nM HCV NS3 helicase, which was expressed and purified as described previously,²¹ and performed at 37 °C for 30 min using a LightCycler 1.5 (Roche). The fluorescence intensity was recorded every 5 s from 0 to 5 min and then every 30 s from 5 to 30 min. The activity of NS3 helicase was calculated as the initial reaction velocity. Inhibition was calculated relative to the control value examined without inhibitors but with DMSO.

ATPase Assay. NS3 ATPase activity was directly determined by monitoring [γ -³²P] ATP hydrolysis by thin-layer chromatography. The assays were performed as previously described³² with slight modifications. Unless otherwise specified, the standard assay mixture contained 25 mM MOPS–NaOH (pH 7.0), 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 1 mM [γ -³²P] ATP (PerkinElmer), 300 nM NS3, and 0.1 μ g/ μ L poly(U) with the indicated increasing concentrations of manoalide in a reaction volume of 10 μ L. Reactions were conducted at 37 °C for 10 min and stopped by the addition of stop solution (10 mM EDTA). A 2 μ L amount of each reaction mixture was spotted onto polyethyleneimine cellulose sheets (Merck) and developed in 0.75 M LiCl/1 M formic acid solution for 20 min. The cellulose sheets were dried, and released [³²P] phosphoric acid was visualized with an FLA-9000 image reader and quantified by Multi Gauge V3.11 software (Fujifilm).

RNA Binding Assay. RNA binding was determined by a gel mobility shift assay.³³ First, let-7 ssRNA (5'-UGAGGUAGUAGGUU-GUAUAGU-3') was labeled at the 5'-end with [γ -³²P] ATP (Muromachi) using T4 polynucleotide kinase (Toyobo) at 37 °C for 60 min and purified by the phenol-chloroform extraction method. Each 20 μ L of reaction mixture contained 30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 20 units of RNasin Plus (Promega) that was incubated with 300 nM NS3, 1 nM let-7 labeled ssRNA, and 0.1 mM manoalide at room temperature for 15 min. An equal volume of dye solution [0.025% bromophenol blue, 10% glycerol in 0.5 \times Tris/borate/EDTA (TBE)] was added to each reaction mixture and loaded onto a 6% native-PAGE gel

(acrylamide:bis = 19:1). The labeled RNA bands were visualized with an FLA-9000 image reader (FujiFilm).

RNA Helicase Assay. The NS3 RNA helicase assay was performed as described previously³² with some modifications. Briefly, the substrate for annealing two complementary RNA oligonucleotides, 5'-AGAGAGAGAGGUUGAGAGAGAGAGUUUGAGAGAGAGAGAG-3' (40-mer, template strand) and 5'-CAAACUCUCUCUCUCUCAACAAAAA-3' (26-mer, release strand), was purchased from Shanghai GenePharma Co., Ltd. The release strand was labeled at the 5'-end with [γ -³²P] ATP (Muromachi) using the T4 polynucleotide kinase (Toyobo) at 37 °C for 60 min and purified by phenol-chloroform extraction. The template and the labeled release strands were annealed at a molar ratio of 3:1 (template/release), denatured at 80 °C for 5 min, and slowly renatured at 23 °C for 30 min in an annealing buffer [20 mM Tris-HCl (pH 8), 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA]. The partial duplex RNA substrate was purified on a G-50 microcolumn (GE Healthcare) and stored at -20 °C in H₂O containing 0.25 U of RNasin Plus (Promega) per μ L.

The inhibition assay of NS3 RNA helicase activity by manolide was conducted in 20 μ L of helicase reaction mixture [25 mM MOPS-NaOH (pH 7), 2.5 mM DTT, 2.5 U of RNasin Plus (Promega), 100 μ g of BSA per mL, 3 mM MgCl₂] containing 300 nM NS3 protein and 0.4 nM ³²P-labeled partial duplex RNA substrate with increasing concentrations of manolide (as indicated) and preincubated at 23 °C for 15 min. After adding 5 mM ATP, the reaction was carried out at 37 °C for 30 min and stopped by adding 5 μ L of helicase termination buffer (0.1 M Tris [pH 7.5], 20 mM EDTA, 0.5% SDS, 0.1% Nonidet P-40, 0.1% bromophenol blue, 0.1% xylene cyanol, 25% glycerol). The inhibition of NS3 helicase activity was analyzed on a 10% native TBE polyacrylamide gel, and the labeled RNAs were visualized with an FLA-9000 image reader (FujiFilm).

Isothermal Denaturation Assay. The effect of manolide on the structure change of NS3 helicase was measured using the isothermal denaturation assay.²⁹ Briefly, the ITD assay was performed in 25 mM MOPS-NaOH (pH 6.5), 10 \times concentrated SYPRO orange (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), and 240 nM NS3 helicase in 20 μ L of reaction mixture with the indicated increasing concentrations of manolide (Santa Cruz Biotechnology). While SYPRO orange has a low quantum yield in an aqueous environment, the fluorescence intensity increases when the dye binds to the hydrophobic regions exposed upon unfolding of the enzyme. The reaction was carried out in three replicates for each concentration of manolide at 37 °C for 15 min using a LightCycler 1.5 (Roche) with the fluorescence intensity measured.

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

Summary of NS3 helicase inhibitory activity in extracts of marine sponges and Figure S1. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +81-3-5841-3057. Fax: +81-3-5841-3049. E-mail: akimitsu@ric.u-tokyo.ac.jp.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors express gratitude and special thanks to S. Nishikawa (AIST) for his kind gift of the expression plasmid pT7/His-NS3 containing an N-terminal His-tagged full-length HCV NS3.

■ REFERENCES

- Gravitz, L. *Nature* **2011**, *474*, S2–S4.
- Butt, A. A. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2005**, *3*, 241–249.
- Soriano, V.; Peters, M. G.; Zeuzem, S. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *48*, 313–320.
- Koziel, M. J.; Peters, M. G. *New Engl. J. Med.* **2007**, *356*, 1445–1454.
- Kai, L. *Virology* **2010**, *25*, 246–266.
- McHutchison, J. G.; Gordon, S. C.; Schiff, E. R.; Shiffman, M. L.; Lee, W. M.; Rustgi, V. K.; Goodman, Z. D.; Ling, M. H.; Cort, S.; Albrecht, J. K. *New Engl. J. Med.* **1998**, *339*, 1485–1492.
- Cummings, K. J.; Lee, S. M.; West, E. S.; Cid-Ruzafa, J.; Fein, S. G.; Aoki, Y.; Sulkowski, M. S.; Goodman, S. N. *J. Am. Med. Assoc.* **2001**, *285*, 193–199.
- Tam, R. C.; Lau, J. Y.; Hong, Z. *Antiviral Chem. Chemother.* **2001**, *12*, 261–272.
- Choo, Q. L.; Kuo, G.; Weiner, A. J.; Overby, L. R.; Bradley, D. W.; Houghton, M. *Science* **1989**, *244*, 359–362.
- Takamizawa, A.; Mori, C.; Fuke, I.; Manabe, S.; Murakami, S.; Fujita, J.; Onishi, E.; Anodoh, T.; Yoshida, I.; Oakayama, H. *J. Virol.* **1991**, *65*, 1105–1113.
- Moradpour, D.; Penin, F.; Rice, C. M. *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5*, 453–463.
- De Francesco, R.; Steinkühler, C. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2000**, *242*, 149–169.
- Raney, K. D.; Sharma, S. D.; Moustafa, I. M.; Cameron, C. E. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 22725–22731.
- Burney, T.; Dusheiko, G. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2011**, *9*, 151–160.
- Bacon, B. R.; Gordon, S. C.; Lawitz, E.; Marcellin, P.; Vierling, J. M.; Zeuzem, S.; Poordad, F.; Goodman, Z. D.; Sings, H. L.; Boparai, N.; Burroughs, M.; Brass, C. A.; Albrecht, J. K.; Esteban, R. *New Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 1207–1217.
- De Silva, E. D.; Scheuer, P. J. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 1611–1614.
- Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1216–1238.
- Wheeler, L. A.; Sachs, G.; De Vries, G.; Goodrum, D.; Woldemussie, E.; Muallem, S. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 6531–6538.
- De Vries, G. W.; Amdahl, L.; Mobasser, A.; Wenzel, M.; Wheeler, L. A. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 2899–2905.
- Bennett, C. F.; Mong, S.; Wu, H. L.; Clark, M. A.; Wheeler, L.; Crooke, S. T. *Mol. Pharmacol.* **1987**, *32*, 587–593.
- Tani, H.; Akimitsu, N.; Fujita, O.; Matsuda, Y.; Miyata, R.; Tsuneda, S.; Igarashi, M.; Sekiguchi, Y.; Noda, N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *379*, 1054–1059.
- Uddin, M. H.; Otsuka, M.; Muroi, T.; Ono, A.; Hanif, N.; Matsuda, S.; Higa, T.; Tanaka, J. *Chem. Pharm. Bull.* **2009**, *57*, 885–887.
- Tran, H.; Schilling, M.; Wirbelauer, C.; Hess, D.; Nagamine, Y. *Mol. Cell* **2004**, *13*, 101–111.
- Fairman-Williams, M. E.; Guenther, U. P.; Jankowsky, E. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 313–324.
- Suzich, J. A.; Tamura, J. K.; Palmer-Hill, F.; Warren, P.; Grakoui, A.; Rice, C. M.; Feinstone, S. M.; Collett, M. S. *J. Virol.* **1993**, *67*, 6152–6158.
- Borowski, P.; Deinert, J.; Schalinski, S.; Bretner, M.; Ginalski, K.; Kulikowski, T.; Shugar, D. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1645–1653.
- Gu, M.; Rice, C. M. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 521–528.
- Senisterra, G. A.; Hong, B. S.; Park, H. W.; Vedadi, M. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 337–342.
- Sarver, R. W.; Rogers, J. M.; Stockman, B. J.; Epps, D. E.; DeZwaan, J.; Harris, M. S.; Baldwin, E. T. *Anal. Biochem.* **2002**, *309*, 186–195.
- De Freitas, J. C.; Blankemeier, L. A.; Jacobs, R. S. *Experientia* **1984**, *40*, 864–865.
- Glaser, K. B.; de Carvalho, M. S.; Jacobs, R. S.; Kernan, M. R.; Faulkner, D. J. *Mol. Pharmacol.* **1989**, *36*, 782–788.
- Gallinari, P.; Brennan, D.; Nardi, C.; Brunetti, M.; Tomei, L.; Steinkühler, C.; De Francesco, R. *J. Virol.* **1998**, *72*, 6758–6769.
- Huang, Y.; Liu, Z. R. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 12810–12815.

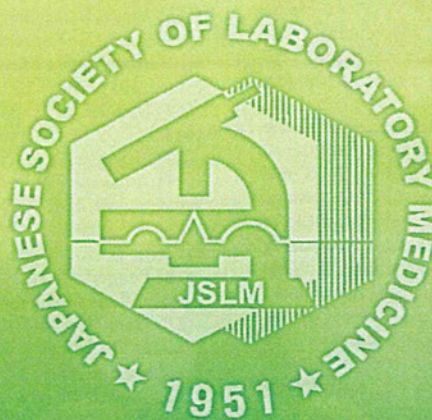
臨床検査のガイドライン

JSLM 2012

検査値アプローチ／症候／疾患

編集

日本臨床検査医学会ガイドライン作成委員会



日本臨床検査医学会

16. 潰瘍性大腸炎	小形 典之	262	
17. 大腸癌	渡邊 直樹	267	検査値 アブロー
18. 肝疾患	朝比奈靖浩	272	
19. 慢性肝炎・肝硬変	渡邊 綱正	279	症候 肝
20. 肝臓癌	河野 豊／宮西浩嗣／加藤淳二	284	
21. 膵疾患	大原 弘隆	289	症候 臓器
22. 膵臓癌	佐藤 典宏	294	

腎臓・尿路

23. 尿路感染症	荒川 創一	296	症候 呼吸器
24. ネフローゼ症候群	安部 尚子	300	
25. 慢性腎臓病 (CKD)	堀尾 勝	304	症候 消化器
26. 急性腎障害 (AKI)	古市 賢吾	308	
27. 前立腺疾患	石戸谷滋人	311	症候 血液

内分泌

28. 甲状腺機能亢進症・低下症	日高 洋	316	症候 呼吸・消化
29. 甲状腺の悪性腫瘍	岩崎 博幸	321	

代謝・栄養

30. 脂質異常症	吉田 博	326	症候 疼痛
31. 糖尿病	目黒 周／武井 泉	331	
32. 痛風・高尿酸血症	大野 岩男	338	疾患 神経
33. 骨粗鬆症	福本 誠二	343	

乳腺・女性生殖器

34. 乳 癌	福富 隆志	347	疾患 呼吸器
35. 卵巣またはその他の子宮付属器の悪性新生物	森定 徹／青木大輔	350	疾患 臓器
36. 子宮癌	八杉 利治	355	

血液・造血器

37. 白血病	長井一浩／上平 憲	358	疾患 消化器
38. 悪性リンパ腫	鈴宮 淳司	369	疾患
39. 多発性骨髄腫及び悪性形質細胞性新生物と悪性免疫増殖性疾患	村上 博和	375	呼吸・消化

免疫・結合織

40. 関節リウマチ	小柴 賢洋	383	疾患 内分泌
41. 膠原病と類縁疾患	森信 暁雄	387	疾患 免疫・生

付 録

基準範囲、パニック値／緊急報告値		391	疾患 血液・消化器
索引		397	疾患 免疫・結合織

肝 疾 患

【要 旨】 肝疾患の病因，病期を的確に診断し，病態に応じた治療を加えることにより病状の進展を阻止する。フォローアップの目的は，非代償性肝硬変，肝細胞癌，食道静脈瘤破裂など生命に関わる状態への病状進行を早期に発見し阻止することにある。慢性肝疾患の進展に従って肝細胞癌の発生率が増加するため，慢性肝疾患の病状に応じた定期フォローアップが重要となる。

【キーワード】 肝機能検査，肝細胞癌，慢性肝炎，肝硬変

疑うべき臨床症状

図 1 に肝疾患を疑う臨床症状や所見および病歴を示す。

急性肝炎：全身倦怠感や微熱などの感冒様症状や吐き気，食欲不振などの消化器症状から発症する。肝障害の程度が強い場合は黄疸やそれに伴う尿の濃染を認める。

慢性肝炎：特に症状を認めないことが多い。肝炎の増悪時には食欲不振や全身倦怠感を伴う。

肝硬変：代償性期では臨床症状に乏しい。微熱，全身倦怠感を認めることがある。手掌紅斑，くも状血管拡張，女性化乳房を認めることがある。非代償期には，腹水，黄疸，下腿浮腫，肝性脳症，下腿浮腫，ばち状指などを認める。

肝細胞癌：初期の肝細胞癌は，無症状であるが，基礎疾患として慢性肝炎，肝硬変など慢性肝疾患を有していることが多いため，基礎疾患に伴う症状を有する。進行肝

細胞癌では，腹痛，腹部膨満感を認める。

確定診断に要する検査

肝疾患を疑う自覚症状を認めた場合や健康診断などで肝疾患を疑う検査結果を得た場合には，図 1 に示したように自覚症状，臨床所見の確認を行うとともに医療面接で詳しく肝疾患に関連する事項について確認する。

A. 肝機能異常のスクリーニング検査

肝細胞障害，胆汁うっ滞，肝予備力，画像診断の 4 項目をカバーするように検査を行う。黄疸を認める場合の診断フローチャートを図 2 に，また AST，ALT の異常を認めた場合の鑑別診断上のポイントを表 1 に示す。

B. 重症度の判定と入院治療か外来治療かの判断

肝障害が検査で確認された場合には，肝予備力などを参考に入院治療の必要性を判断する（表 2 参照）急性肝障害の場合は，肝性脳症，顕性黄疸，出血時間の延長

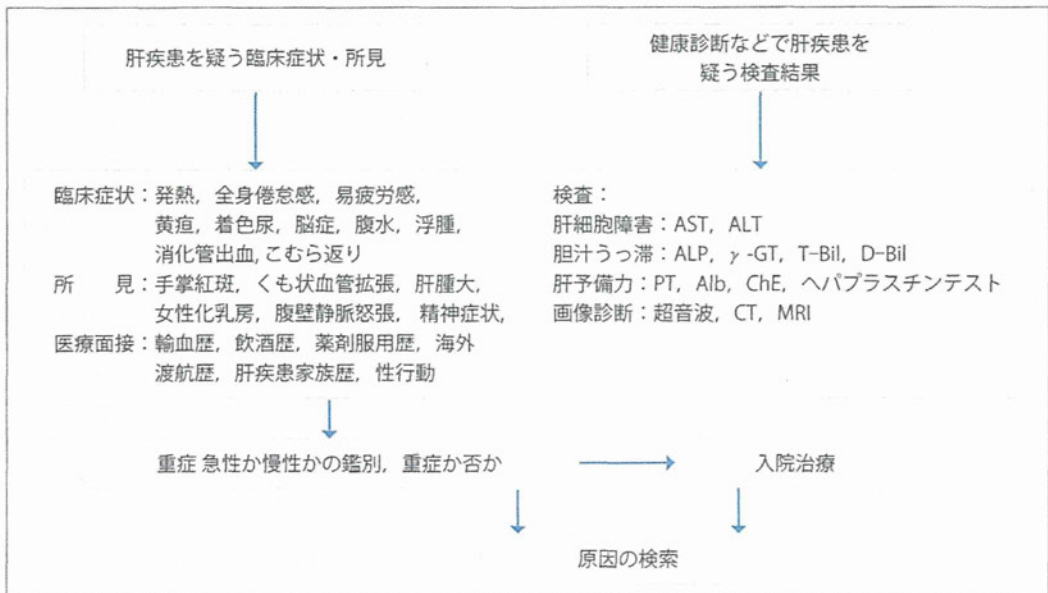


図 1 肝疾患が疑われる場合の基本的なフローチャート

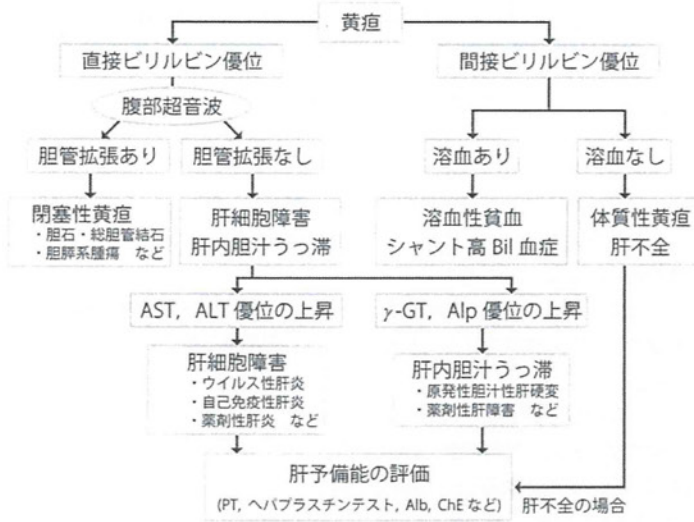


図2 黄疸を認めた場合の診断フローチャート

表1 AST, ALT 異常時の鑑別診断上のポイント

<ul style="list-style-type: none"> > 500 U/L 以上 ・急性肝炎 (ALT>AST, 初期は AST 優位) ・劇症肝炎 ・ショック肝 (LDH も著明に上昇)
<ul style="list-style-type: none"> > 100~500 U/L ・慢性活動性肝炎 (ALT>AST) ・薬剤性肝障害 (ALT<AST, 胆道系酵素の上昇) ・アルコール性肝炎 (ALT<AST, γ-GT の上昇) ・胆汁うっ滞 (胆道系酵素優位の上昇) ・溶血・心筋梗塞 (ALT<AST)
<ul style="list-style-type: none"> > 100 U/L 以下 ・慢性肝炎 (ALT>AST) ・脂肪肝 (脂質異常, 糖代謝異常を伴うことが多い) ・肝硬変 (ALT<AST, Alb の低下, 血小板数の低下) ・うっ血肝 (ALT<AST)

表2 肝障害の際の入院適応

<ul style="list-style-type: none"> ・急性肝炎でまだ回復期に至っていない症例 ・慢性肝炎の急性増悪時：外来での治療 (経口剤, 強ミノ静注など) にもかかわらず AST や ALT が 300~500 U/L 以上となった時 ・肝予備能が低下している症例 (PT 70%以下) ・初めての顕性黄疸 (T-Bil>2 mg/dL) の出現時または黄疸の急激な進行 ・肝硬変患者で初めての肝性脳症, 腹水の出現時 ・外来での塩分制限や投薬などにてコントロールのつかない肝性脳症や腹水 ・腫瘍性病変の疑われた時 ・食道静脈瘤の出血時およびその治療のため ・インターフェロンなど積極的な治療開始のため ・肝生検・腹腔鏡など検査入院 ・その他 (慢性肝炎や肝硬変の自覚症状が特に強い時など)

など予備能の大幅な低下がある場合は, 入院で加療する。生命に関わる食道静脈瘤からの出血や肝細胞癌の有無により判定する。

C. 病因の鑑別

表3に鑑別すべき疾患と診断上ポイントとなる検査項目を示す。

1) ウイルス性肝炎

急性肝炎を惹起するウイルスには, A型, B型, C型, E型の肝炎ウイルスが存在する。それぞれのウイルスマーカーにより鑑別する。A型肝炎は生牡蠣など貝, カニの経口摂取により感染する。IgM-HA抗体が診断に有用である。B型肝炎は, 血液を介してもしくは性的接触により感染する。B型肝炎関連ウイルスマーカーの測定を行う。C型肝炎は, 血液を介する感染が主体である。E型肝炎は, 国内では猪肉や鹿肉などの摂取による感染事例があり人畜共通感染症である。南アジア, 東南アジ

アなど海外からの輸入感染症であることも多い。

2) アルコール性肝障害

飲酒状況の詳細な把握が最も重要である。日本酒換算で一日3合以上を5年以上継続している常習飲酒家に起こることが多い。トランスアミナーゼはAST>ALTで上昇し, γ-GTの上昇を伴う。MCVの上昇も参考になる。禁酒により肝機能が改善することが確定診断につながる。

3) 自己免疫性肝障害

自己免疫性肝炎 (AIH), 原発性胆汁性肝硬変 (PBC), 原発性硬化性胆管炎 (PSC) がある。自己免疫性肝炎は中年女性に多く, トランスアミナーゼ (AST, ALT) の上昇が主体で, γグロブリンや血清IgGが2000 mg/dLを超えることが多い。抗核抗体, 抗平滑筋抗体, 肝腎ミクロソーム抗体などの自己抗体が陽性になることが多い。PBCも中年女性に多く, ALP, γ-GTなど胆道系酵

表 3 肝障害の原因と鑑別診断に有用な検査

<ul style="list-style-type: none"> ・ A 型肝炎：IgM-HA 抗体, IgM, 異型リンパ球 ・ B 型肝炎：HBs 抗原, HBc 抗体, IgM HBc 抗体, HBV-DNA ・ C 型肝炎：HCV 抗体, HCV-RNA ・ E 型肝炎：HEV-RNA, IgA (IgM)-HEV ・ EB ウイルス感染 (伝染性単核球症)：EB-VCA IgM 抗体, 異型リンパ球 ・ サイトメガロウイルス感染：CMV IgM 抗体, CMV antigenemia ・ アルコール性肝障害：飲酒歴, γ-GT, IgA, MCV ・ 自己免疫性肝炎：IgG, γ-グロブリン, 抗核抗体, 抗平滑筋抗体, 抗 LKM 抗体, HLA-DR (保険適応外) ・ 原発性胆汁性肝硬変：IgM, γ-グロブリン, 抗ミトコンドリア抗体, 抗ミトコンドリア M2 抗体 ・ 脂肪肝：BMI, 腹部 US ・ NASH：FOMA-R, AST>ALT, PLT 減少, 腹部 US ・ 薬物性肝障害：薬物歴, WBC, 好酸球数, IgE, DLST ・ 胆管閉塞 (腫瘍, 胆石による)：腹部 US, 腹部 CT, MRC ・ 甲状腺機能異常：fT4, fT3, TSH ・ 心不全 (shock liver)：病歴, LDH ・ うっ血肝：病歴, 腹部 US, 心機能 ・ ウイルソン病：セルロプラスミン, 尿中銅, 血中銅 ・ 高シトルリン血症：アンモニア, アミノグラム ・ ヘモクロマトーシス：血清鉄, 血清フェリチン, トランスフェリン飽和率

肝
疾
患

素の上昇が主体である。抗ミトコンドリア抗体 (AMA) が陽性になること, IgM の上昇が特徴的である。PSC では, ALP を主体とした胆道系酵素の上昇が特徴であるが, AMA は陰性である。診断は ERCP, MRC での特徴的胆管像の確認や肝生検で行う。

4) 脂肪性肝疾患

肝細胞に中性脂肪が過剰に蓄積した状態の肝臓を脂肪性肝疾患と総称し, 単純性脂肪肝と NASH に分けられる。いずれも, ウイルス性肝疾患, 自己免疫性肝疾患の否定とアルコール摂取の否定をした上で, 腹部超音波検査, 腹部 CT 検査で肝臓の脂肪沈着を確認する。NASH は, 進行すると肝細胞への脂肪沈着が少なくなるので注意が必要である。NASH か単純性脂肪肝かの鑑別は肝生検によりなされ, 血液検査のみで判断するのは困難ことが多い。NASH は, 肝細胞の壊死, 炎症を引き起こし, 線維化をきたすため ALT 値, ヒアルロン酸, IV 型コラーゲンが単純性脂肪肝と比較して高値であることが多い。インスリン抵抗性を示す HOMA-R (FBS×血中インスリン/405) や鉄の沈着を示す血清フェリチンも高値を示すことも多い。NASH は, 肝硬変から肝細胞癌へと進展することもあるので, それを念頭においたフォローアップが必要である。

5) 薬物性肝障害

薬物性肝障害は, 薬物の肝細胞への直接的な毒性による中毒性肝障害と薬物アレルギー性肝障害に 2 分される。

いずれも薬物摂取歴と除外診断で診断する。頻度的には薬物の投与開始後に 2-3 か月以内に発症することが多

いが, 長期間服用している薬物が原因のこともあり, 注意が必要である。

その他, 腫瘍や胆石による胆管閉塞, 急性心筋梗塞などの心疾患も肝機能障害を引き起こすので注意を要する。

D. 肝生検の適応と禁忌 (表 4)

血液検査, 腹部 US など比較的低侵襲の検査で診断がつかない場合の診断確定や, 肝疾患の進行度評価や治療効果や予後の予測を目的に肝生検を行うことが考慮される。肝腫瘍性病変が疑われる場合で, 総合画像診断で診

表 4 肝生検の適応と禁忌

適 応	
<ul style="list-style-type: none"> ・ 肝機能異常の原因検索 ・ ウイルス性慢性肝疾患の進行度診断 ・ 自己免疫性肝炎, 原発性胆汁性肝硬変, 原発性硬化性胆管炎の診断 ・ アルコール性肝障害の進行度診断 ・ NASH の診断 ・ 薬物性肝障害の診断 ・ 代謝性疾患の診断 (ウイルソン病, 高シトルリン血症, アミロイドーシス, ヘモクロマトーシス, 肝ポルフィリン症等) ・ 不明熱 (AIDS, 悪性リンパ腫等) の病因検索 ・ 全身性炎症性疾患, 肉芽腫性疾患 (サルコイドーシス等) ・ 肝移植後の拒絶反応の診断 ・ 遺伝性疾患の家族のスクリーニング 	
禁 忌	
<ul style="list-style-type: none"> ・ 著明な出血傾向 ・ 横隔膜ヘルニア ・ 全身衰弱状態 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 心肺機能不全 ・ 腹腔内細菌感染

断が確定されない場合も、USガイド下の腫瘍生検を検討する。適応は出血などのリスクも考慮して決定する。

病態把握と治療方針の決定

A. B型肝炎の病態把握と専門医コンサルテーションのポイント

B型肝炎感染の診断フローチャートを図3に示す。HBs抗原陽性の肝障害を診た場合、HBV感染による急性肝炎かHBVキャリアからの急性増悪かの鑑別が臨床上極めて重要であり、HBc抗体の力価が診断上のポイ

ントとなる。HBVの持続感染者（HBVキャリア）に対して肝臓専門医へコンサルテーションする際のポイントを図4に示す。HBV-DNA高値かつALT異常値例あるいは非若年者は肝発癌リスクが高いため肝臓専門医へのコンサルテーションが望ましい。このうち、ALT異常値を呈する症例は基本的に抗ウイルス療法の適応となる。抗ウイルス療法の目的は、B型肝炎ウイルスの活動性の低下によるALTの正常化で、肝硬変・肝細胞癌への進展を抑制することである。最近ではHBs抗原の陰性化を最終的な治療目標と考えることが多い。抗ウイルス療法は、インターフェロン投与と核酸アナログ製剤内服に

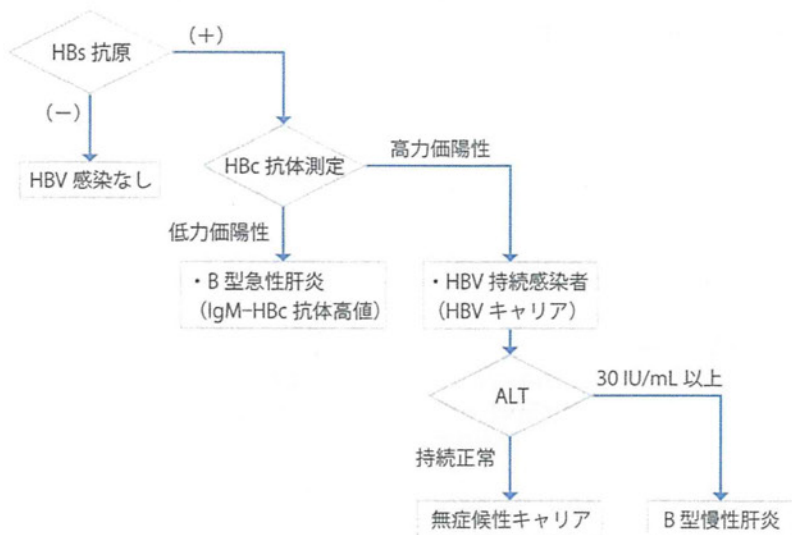


図3 HBV感染の診断の流れ

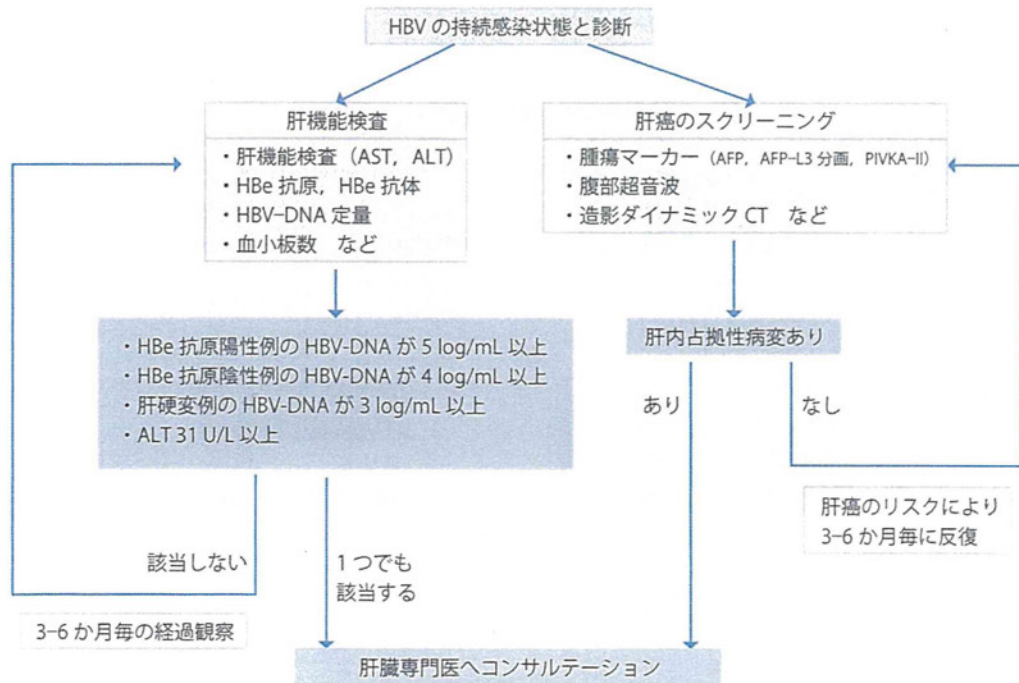


図4 HBVキャリアを肝臓専門医へコンサルテーションする際のポイント (抗ウイルス療法の適応と発癌リスクを考慮したフローチャート)

よる治療がある。一方、コンサルテーションしない症例でも、定期フォローアップにより肝炎活動性のモニターや肝細胞癌の早期発見につとめることも重要である。

B. C型慢性肝炎の病態把握と専門医コンサルテーションのポイント

C型肝炎感染の診断フローチャートを図5に示す。HCV感染者と診断場合の専門医にコンサルテーションするポイントを図6に示す。ALT31 U/L以上または血小板数15万/μL未満は発癌リスクが高く、抗ウイルス療法の適応であり、肝臓専門医へのコンサルテーションが望ましい。また、慢性肝炎の状態では肝癌が存在しなくてもAFP値の異常を認めることがあるが、AFP6 ng/mL以上は将来の肝発癌のリスクが高いため、肝臓専門医へ

のコンサルテーションまたは厳重な経過観察が必要である。C型慢性肝炎の治療の目標は、C型肝炎ウイルスの排除とALTの正常化による、肝硬変と肝癌への進展の抑止である。

C型肝炎に対する抗ウイルス療法は、ウイルス排除を目的とした治療と基本であり、ウイルスのジェノタイプ（あるいはセロタイプ）やウイルス量およびHCV NS5A領域に存在するISDRの遺伝子変異数やHCVコア70番・91番のアミノ酸変異、さらには宿主IL28B遺伝子近傍のSNP等によりその適応を決定する。C型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法は、インターフェロンが基本であり、症例に応じてリバビリンやプロテアーゼ阻害剤を併用して行う。

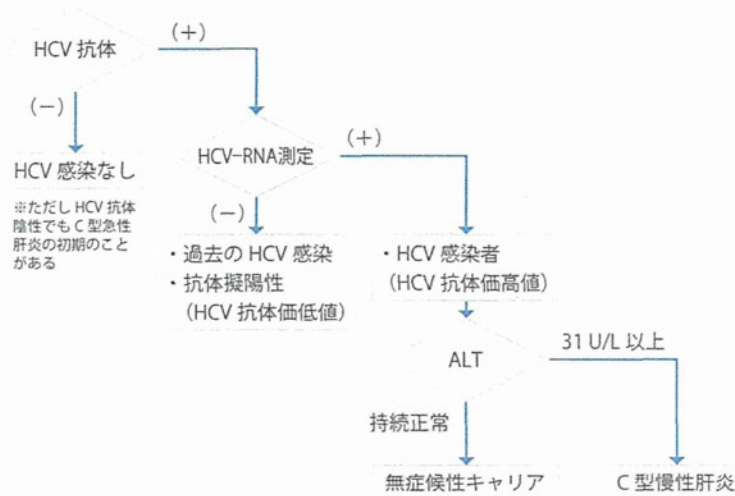


図5 HCV感染の診断の流れ

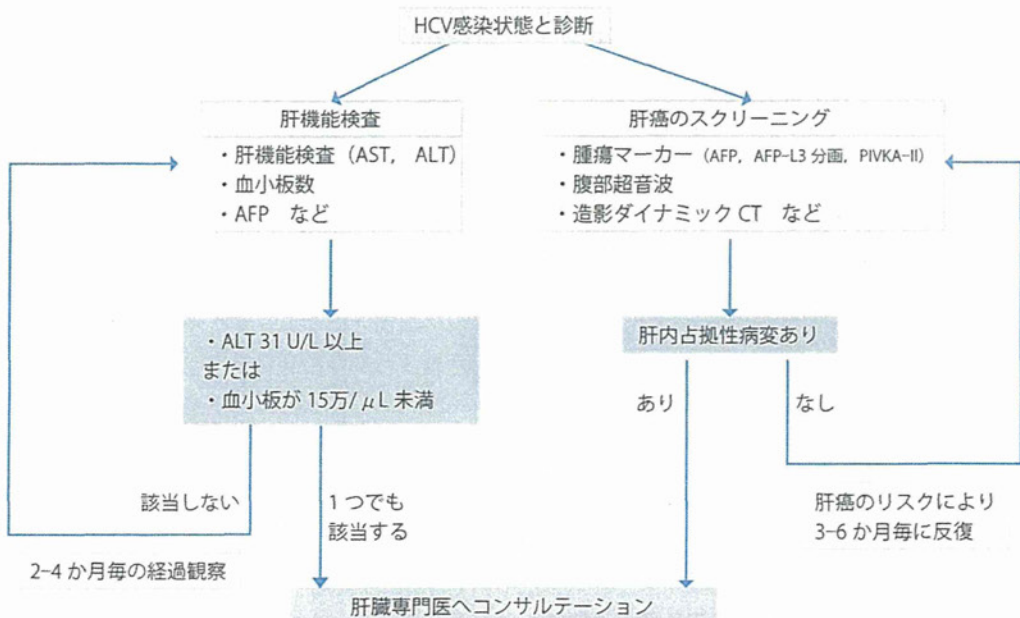


図6 HCVキャリアを肝臓専門医へコンサルテーションする際のポイント (抗ウイルス療法の適応と発癌リスクを考慮したフローチャート)

一方、ウイルス排除が困難な症例では、肝炎の鎮静化を目的とした治療が適応となる。

C. 肝底護療法

ウイルスの排除を目的とした抗ウイルス療法の適応でないALT変動を伴う慢性肝疾患に対しては、肝炎の鎮静化をめざした治療により肝線維化の進展抑制と肝発癌の抑止を図る。この目的のためにインターフェロン少量長期療法が行われる。また肝底護療法もALTの低下を目的に行われ、これにはグリチルリチン製剤、ウルソデオキシコール酸や小柴胡湯等が用いられることが多い。グリチルリチン製剤投与中は、低カリウム、浮腫に注意する。小柴胡湯は、肝硬変患者、インターフェロン投与患者には使用しない。

D. 肝硬変かどうかの判定

肝硬変は、さまざまな慢性肝疾患の終末像であり、高度の線維化、肝小葉構造の破壊とびまん性の再生結節の形成が特徴である。診断の確定には、肝生検や画像診断も含めて肝硬変か否かの目安として血小板数10万/μL以下(表5)、AST>ALTのトランスアミナーゼの変動が参考になる。C型肝炎においては、図7に示した実用的判別式を用いて約90%の精度で診断が可能である。

肝硬変の場合は、代償期か非代償期かの判別を行う。肝硬変の程度の判定には、臨床上の病態を総合判断するChild-Pugh分類が有用である(表6)。さらに予後を大きく変える食道静脈瘤や肝細胞癌の有無を検索する。特に肝細胞癌は、進展度に応じて発癌率が増加する(表5)ので、病気に応じたフォローアップが必要である(後述の慢性肝疾患のフォローアップ参照)。

表5 肝疾患の進展と血小板数, 推定発癌率

病期	新犬山分類	血小板数	推定発癌率
慢性肝炎	F1	18万/μL	0.5%
	F2	15万/μL	1-2%
	F3	13万/μL	3-5%
肝硬変	F4	10万/μL以下	7-8%

$$Z = 0.124 \times [\text{グロブリン} (\%)] + 0.001 \times [\text{ヒアルロン酸} (\mu\text{g/L})] - 0.075 \times [\text{血小板数} (\text{万}/\mu\text{L})] - 0.413 \times [\text{性別男}=1, \text{女}=2] - 2.005$$

Z < 0 ⇒ 慢性肝炎
Z > 0 ⇒ 肝硬変

図7 C型肝炎における慢性肝炎と肝硬変の実用的判別式

表6 Child-Pugh分類

Score	1	2	3
肝性脳症	0	軽度 (I-II度)	昏睡 (III度以上)
腹水	なし	軽度	中等度
T. Bil	<2 mg/dL	2-3 mg/dL	>3 mg/dL
Alb	>3.6 g/dL	2.8-3.5 g/dL	<2.7 g/dL
PT	>80%	50-80%	<50%

Child 重症度 A : 5-6点, B : 7-9点, C : 10-15点

E. 肝硬変に対する治療

1) B型肝硬変

拡散アナログ製剤投与でHBV-DNAを低値に保ちAST, ALT値の正常化を目指す。

2) C型肝硬変

ウイルス排除を目的とした抗ウイルス療法を行う場合、ペグインターフェロン・リバビリン併用療法が第一選択であるが、天然型インターフェロン単独療法や、ジェノタイプ1b、高ウイルス以外ではIFN-βも適応となる。これらインターフェロンを中心とした治療は代償性肝硬変に対して行い、非代償性肝硬変では行ってはならない。

3) 非ウイルス性肝硬変およびウイルス性肝硬変に対する抗ウイルス療法以外の治療

a. 肝底護療法

b. 分岐鎖アミノ酸製剤 : Alb 3.5 g/dL以下の非代償性肝硬変に対して投与する。肝予備能低下の予防と肝発癌抑止に効果がある。T-Bil 3.0 mg/dL以上の高度な肝硬変、肝性脳症III度以上、著しい蛋白合成障害の場合は使用できない。

c. 瀉血療法 (C型肝硬変のみ) : Hb 11 g/dL以下、血清フェリチン値 50-100 μmol/L以下を目標に行う。

F. 肝腫瘍性病変に対する検査

肝腫瘍性病変のスクリーニングには腹部USが簡便であり有用であるが、ウイルス性肝硬変などの肝発癌の超高危険群などでは年1-2回の造影CTまたは造影MRIによるスクリーニングも併用するのが望ましい。肝腫瘍性病変が疑われる場合は、造影CT, 造影MRIを用いたdynamic study および造影超音波検査を行う。これらと場合によっては腹部血管造影下CTを含めた総合画像診断で肝腫瘍の診断と生物学的悪性を評価する。

腫瘍マーカーAFP, PIVKA-IIの測定は肝細胞癌の診断に有用であるが、AFPは肝硬変など肝臓の再生を伴う病態においても数百ng/mL程度までは上昇することがある。継続的な上昇の有無や、AFPレクチン分画の測定が有用である(表7)。CEAやCA19-9は、胆管細胞癌や大腸癌の転移で上昇することがある。

総合画像診断などで診断がつかない場合は、腫瘍生検を検討する。肝腫瘍性病変を認めた場合の鑑別診断や、悪性腫瘍が疑われる場合の検査・治療は肝臓専門医にコ

検査値
アプローチ

症候
一般

症候
循環器

症候
呼吸器

症候
消化器

症候
血液

症候
腎臓・泌尿

症候
疼痛

疾患
神経

疾患
呼吸器

疾患
循環器

疾患
消化器

疾患
腎臓・泌尿

疾患
内分泌

疾患
代謝・栄養

疾患
乳腺・女性生殖

疾患
血液・造血器

疾患
免疫・結合部

付録

表 7 肝癌の腫瘍マーカー

<ul style="list-style-type: none"> AFP <ul style="list-style-type: none"> 最も一般的な肝細胞癌のマーカー。 肝炎、肝硬変でも非特異的に上昇(特異性が低い)。 経時的に右肩上がり上昇する場合には肝細胞癌の可能性が高い。 AFP-L3 分画 <ul style="list-style-type: none"> AFP の糖鎖構造をレクチン親和性で分類した検査法。 L3 分画が肝細胞癌に特異的に産生される。 PIVKA II <ul style="list-style-type: none"> Vitamin K 欠乏により出現する異常な prothrombin。 進行した肝細胞癌や、門脈内浸潤に伴い上昇する。 ワーファリン服用者では非特異的に上昇する。

表 8 慢性肝疾患のフォローアップに最低限必要な検査

病 態	検査項目	頻 度
慢性肝炎	T-Bil, PT, AST, ALT, γ -GT, アルブミン, 総コレステロール, 血小板数, AFP, PIVKA-II	1回/1-3か月
	腹部超音波検査	2-4回/年
肝硬変	T-Bil, PT, AST, ALT, γ -GT, アルブミン, 総コレステロール, 血小板数, アンモニア, AFP, PIVKA-II	1回/1-2か月
	腹部超音波検査	3-4回/年
	腹部CTもしくはMRI (dynamic studyが望ましい)	1-2回/年
	上部消化管内視鏡	年1回以上

表 9 インターフェロン投与中の検査

検査項目	頻 度
AST, ALT, γ -GT 等肝機能検査	4週間に一度以上
CBC	投与開始後1週間は週2回投与開始後8週間は毎週その後は2-4週間に一度
AFP または PIVKA-II	月に一度
甲状腺機能 (FT3, FT4, TSH)	12週間に一度
FBS, HbA1C	2-3か月に一度 (糖尿病, 耐糖能異常の場合は月に一度, 血糖値は月1回以上状態に応じて確認)
腹部超音波検査	2回/年

ンサルトすることが望ましい。

慢性肝疾患のフォローアップ

慢性肝疾患は、肝硬変への進展、肝細胞癌の発生、食道静脈瘤の発生に注意してフォローアップを行う。特にウイルス性肝炎、肝硬変からは肝細胞癌の発生頻度が高い。表 8 にフォローアップに最低限必要な検査を示す。

治療中の副作用チェックと注意など

インターフェロン導入時：血液生化学検査、画像診断を行い肝硬変でないことを確認するとともに肝細胞癌の有無をチェックする。CBC、甲状腺機能、糖尿病の有無、高血圧の有無、胸部 X 線検査、眼底検査も行う。
インターフェロン投与中：投与中の副作用チェックは、表 9 に示す。咳が続く場合は、間質性肺炎に注意し胸部 X 線検査、KL-6 の測定を行う。インターフェロン投与中は 2-3 か月ごとに眼底のチェックを行うことが望ましい。

核酸アナログによる治療中：エンテカビルやリバビリ

ンなど核酸アナログ投与は、妊婦、妊娠の可能性のある女性、授乳中、パートナーが妊娠する可能性のある男性には、催奇形性の可能性あり投与できない。

参考文献

- 科学的根拠に基づく肝臓診療ガイドライン 2009 年版. 日本肝臓学会編. 金原出版.
- 平成 23 年厚生労働省科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業 (肝炎分野) 肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化に関する研究 研究報告書.
- Asahina, et al. Effect of aging on risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2010; 52: 518-27.
- Tateyama M, et al. Alpha-fetoprotein above normal levels as a risk factor for the development of hepatocellular carcinoma in patients infected with hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 2011; 46: 92-100.

(朝比奈靖浩)

平成 24 年 12 月 20 日 第 1 版印刷

平成 24 年 12 月 25 日 第 1 版発行

臨床検査のガイドライン
JSLM2012
検査値アプローチ/
症候／疾患

編 集

日本臨床検査医学会 ガイドライン作成委員会

制作・発売

株式会社 宇宙堂八木書店

<日本臨床検査医学会> 事務局

〒 101-0052 東京都千代田区神田小川町 2-2 UIビル 2 階
TEL 03-3295-0351 FAX 03-3295-0352
e-mail office@jslm.org

本誌に掲載された著作物の複写・複製・転載・翻訳・データベースへの取り込みおよび送信
に関しては、個人または施設内の教育研修の目的での使用を除き、日本臨床検査医学会の承
諾を得て下さい。無断で行いますと損害賠償、著作権法の罰則の対象となる場合があります。

感度と特異度からひもとく

感染症診療の Decision Making

[編集] 細川直登

亀田総合病院
総合診療・感染症科部長、
臨床検査科部長

文光堂

3. 抗原・抗体検査 C. ウイルス

C型肝炎ウイルスマーカー

① アウトライン

● C型肝炎の診断に用いられる検査

検査法	測定物質	検査目的
HCV抗体検査 (第3世代)	HCVに感染した宿主が作る抗体を測定	・HCV感染状態のスクリーニング
HCVコア抗原	HCV粒子を構成するコア粒子の蛋白を直接測定	・HCV抗体低～中力価陽性者の二次検査 ・抗ウイルス療法の効果予測 ・抗ウイルス療法中のHCVモニタリング ・急性肝炎の迅速診断
核酸増幅検査	血中に微量に存在するHCVゲノム(HCV-RNA)をリアルタイムPCR法により増幅し測定	・HCVの最終的存在診断 ・抗ウイルス療法の効果予測 ・抗ウイルス療法中のHCVモニタリング

1. HCV抗体検査(第3世代)

現在認可を受けて市販されている各種のHCV抗体検査(第3世代)の試薬を用いた場合、真の意味での偽陽性反応と偽陰性反応はほとんどない。

C型肝炎ウイルス(HCV)は、直径55～57nmの球形をしたRNA型のウイルスで、ウイルスゲノムとこれを包んでいるヌクレオカプシド(コア粒子)、およびこれを覆う外殻(エンベロープ)から成り立っている。HCVゲノムは、構造蛋白としてコア蛋白とエンベロープ蛋白(E1, E2/NS1)を、非構造蛋白としてNS2, NS3, NS4, NS5をコードしている。HCV抗体とは、HCVのコア粒子に対する抗体(HCVコア抗体)、エンベロープに対する抗体(E2/NS-1抗体)、非構造蛋白に対する抗体(NS抗体:C100-3抗体, C-33c抗体, NS5抗体など)のすべてを含む総称である。

HCV抗体検査は、HCV抗体測定系で用いられるHCV抗原の種類世代により第1世代から第3世代まである。現在用いられている、第3世代HCV抗体検査はHCV感染診断のスクリーニングに用いられる。なお、これらHCV抗体は中和抗体ではないため、HCVに対する宿主の防御免疫を示すものではない。

2. HCVコア抗原検査

HCVのコア粒子の表面を構成する蛋白がHCVコア抗原である。HCVコア抗原は、エンベロープに覆われておりHCV粒子の内部に存在することと、血清中にはHCVコア抗体が多量に存在することから、HCVコア抗原の検出にはHCV粒子とコア抗体をペプチドに分解する前処理が必要である。検体(血清)を前処理した後にHCVのコア抗原を酵素抗体法(EIA法)や免疫化学発光法などの手法を用いて検出する方法がHCVコア抗原の検査法である。本法は、簡便で安価である上、血清中のHCVの存在の有無を直接知ることができ、感度に優れ、コア抗原量はウイルス量と相関するため定量性がよい。単位はコア抗原量を分子数に換算したf(femto= 10^{-15})molを用いる。1fmol/Lは約HCVゲノム100copy/mLと考えるとわかりやすい。HCVコア抗原検査は、①肝炎ウイルス検診(HCV抗体低～中力価陽性者の二次検査に使用)、②インターフェロン療法の効果予測(高ウイルス量域まで測定可能)、③抗ウイルス療法中のHCVモニタリング(ダイナミックレンジが広い)、④急性肝炎の迅速診断(短時間で結果が得られる)において有用である。

3. 核酸増幅検査(HCV)

polymerase chain reaction (PCR)を用いてHCVの標的とするゲノムの一部を試験管内で約1億倍に増やして検出する方法で、検体(血清)の中に存在するごく微量のHCVゲノムすなわちHCV RNAをきわめて高感度に検出可能な方法である。現在はリアルタイムPCR法が用いられており、HCVの検出法としては最も感度が高いためHCVの最終的存在診断として用いられる。またHCVは1粒子あたり1分子(1コピー)のHCV-RNAをゲノムとして内包しているため、リアルタイムPCR法を用いてHCV-RNAのコピー数を測定することでウイルス量が定量できる。本法はその感度のみならず定量性にも優れるため抗ウイルス療法を行う際の抗ウイルス効果の予測や、治療中のHCVモニターおよび最終的治療効果の判断に用いられる。

② 診断と見極めのポイント

1. HCV感染の診断

HCV感染の診断やスクリーニングには、通常まずHCV抗体検査を実施する。「HCV抗体陽性」は、「現在のHCVの感染(HCVキャリア)」または「過去のHCV感染の治癒(感染の既往)」を意味する。したがって、HCV感染の診断には両者を適

切に区別する必要があり、HCV抗体検査に加えHCVコア抗原検査や核酸増幅検査を組み合わせて判断する。

HCVキャリアでは、抗原刺激に常にさらされているため、HCV抗体は「高力価」陽性となることが多い。一方、C型急性肝炎の自然治癒例や、HCVキャリアであった人がインターフェロン治療などにより、HCVが体内から完全に排除されて治癒した症例では、年単位の経過でHCV抗体は「中力価」～「低力価」陽性へと低下する。ただし、抗体産生能力には個人差があることから、HCVキャリアでもHCV抗体「中力価」陽性や「低力価」陽性となることがある。

一般に、HCV抗体検査では、cut off index 1.0以上が陽性と判断される。高力価陽性 (cut off index 50以上) の場合は、ほぼ100%ウイルス血症を認めるが、反対に4.0未満の低力価陽性の場合はウイルス血症を認めないことが多い。したがって、特に中・低抗体価 (cut off index 50未満) の場合は、HCVコア抗原検査または核酸増幅検査を実施し、これらで陽性と判定されればHCV感染状態と診断する。ただし、HCVコア抗原検査と核酸増幅検査では後者の方が高感度であるため、HCVコア抗原検査で感度以下と判定された場合では、さらに核酸増幅検査でHCV-RNAの有無を判定する必要がある。

2. C型肝炎ウイルス検診

わが国では、C型肝炎ウイルス検診が行われており、肝炎検診で用いられている肝炎スクリーニング検査のアルゴリズムを図1に示す。一般に、下記に示す者はHCV感染の可能性が通常より高いと考えられるため、HCV検査を受けることが推奨されているが、これらのリスクを有しない人でもHCVキャリアであることが多いため注意を要する。

- 1) 平成4(1992)年以前に輸血を受けたことがある(出産時を含む)人
- 2) 長期に血液透析を受けている人
- 3) 輸入非加熱血液凝固因子製剤を投与されたことがある人
- 4) 3)と同等のリスクを有する非加熱凝固因子製剤を投与されたことがある人
- 5) フィブリノゲン製剤(フィブリン糊を含む)を投与されたことがある人
- 6) 大きな手術を受けたことがある人
- 7) 臓器移植を受けたことがある人
- 8) 薬物濫用者、入れ墨(タトゥー)をしている人
- 9) ボディピアスを施している人
- 10) その他(過去に健康診断などで肝機能検査の異常を指摘されているにも関わらず、その後肝炎の検査を実施していない人など)

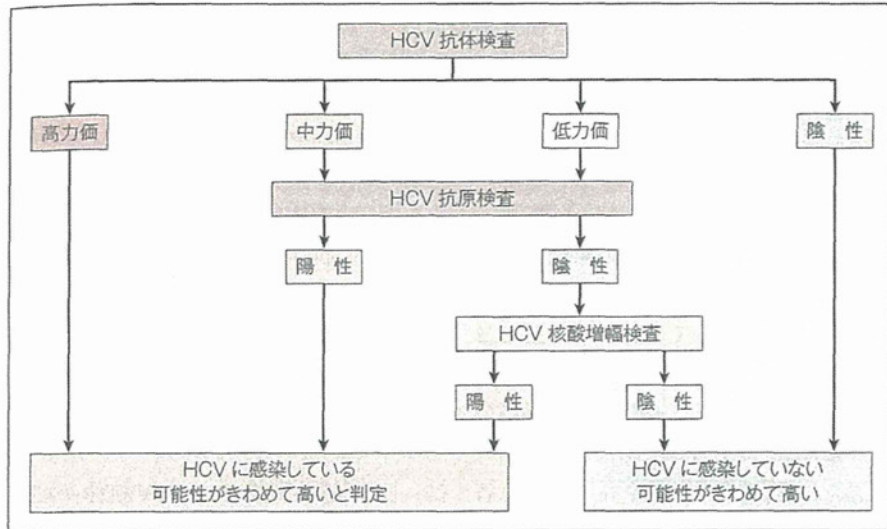


図1 肝炎ウイルス検診の診断アルゴリズム

3. C型慢性肝炎の抗ウイルス療法の治療効果予測

インターフェロンなどによる抗ウイルス療法による治療効果は、血中のHCV量が少ない方がより効果が高いとされる。このため抗ウイルス療法を考慮するにはHCVコア抗原検査または核酸増幅検査によるHCV定量検査を実施し、治療効果を予測し治療方針を決定する。

4. C型慢性肝炎抗ウイルス療法の治療効果判定

インターフェロンなどによる抗ウイルス療法中には血中HCV量は動的に変化することが知られている¹⁾。この治療中のHCV動態をモニターすることで治療効果が予測でき、それに基づいて治療法の最適化が行われている。HCV動態のモニターには、高感度で定量性の高いHCV検査法が必要でありHCVコア抗原検査法やリアルタイムPCRによるHCV核酸増幅検査が用いられる。治療早期の血中HCV量の減衰が早く、血中HCV-RNAが早く陰性化する症例ほど最終的治療効果が高い。

また、抗ウイルス療法によりHCVが排除されC型肝炎が治癒したか否かの判定には、リアルタイムPCR法によるHCV核酸増幅検査を用いる。すなわち、抗ウイルス療法終了後6ヵ月時点でのHCV-RNAの陰性で判定される。ちなみに、抗ウイルス療法による治癒後ではHCV抗体は「高力価」陽性のことが多く、年単

位の経過を経て抗体価は徐々に低下する。

③悩ましいときの次の一手

1. HCVの急性感染

HCV感染直後では、HCVの感染状態でもHCV抗体が陰性のことがある。一般にHCV感染からHCV抗体陽性となる期間(HCV抗体のウィンドウ期)は約3ヵ月である。したがって、C型急性肝炎のHCV抗体陽性率は発症時で50～70%、3ヵ月後は約90%である。わが国では、新規のHCV感染の発生が少なくなってきたが、HCV抗体陰性でもHCVの急性感染を疑った場合は、核酸増幅検査でHCV-RNAを測定し診断する必要がある。なお、HCV感染からHCV-RNA陽性となる期間は約23日である。

また、血液透析患者や免疫不全患者では、HCV感染状態でもHCV抗体が陰性のことがあるので注意を要する。

2. HCV感染状態と診断されたときのさらなるウイルス学的検査

HCV抗体検査やHCVコア抗原および核酸増幅検査でHCV感染状態と判定された場合には、治療適応や治療方針の決定のために、専門医によりさらなるウイルス学的検査が行われる。

1) HCVゲノタイプ検査

HCVは6つのゲノタイプと、さらにそれぞれサブゲノタイプに分かれる。HCVゲノタイプの違いにより抗ウイルス療法の治療成績が異なるため、治療方針を決定するためにゲノタイプの同定検査がきわめて重要である。わが国には、ゲノタイプ1b, 2a, 2bが存在し、頻度は1bが70%、2aが20%、2bが10%を占める。インターフェロンの感受性は、ゲノタイプ2a>2b>1bの順に高い。

2) セロタイプ

NS3およびNS4領域の抗原であるC14-1およびC14-2抗原を用いたELISA法により測定し保険適用がある。一般的にセログループ1はゲノタイプ1に、セログループ2はゲノタイプ2に相当する。したがって、インターフェロンの感受性はセログループ2の方がセログループ1に比し高い。

3) NS5A変異

HCVゲノタイプ1bにおいて、HCV遺伝子の非構造領域であるNS5Aの後半部に存在するアミノ酸コドン2,209～2,248の40アミノ酸の変異数がインターフェロン療法の治療効果と密接に関連しており、インターフェロン感受性決定領域

(interferon sensitivity determining region : ISDR)と名づけられている^{2,3)}。ゲノタイプ1bのプロトタイプであるHCV-Jと比べて、ISDRにアミノ酸変異を多く認めるほどインターフェロンの治療効果が高い。ISDRの変異数は直接塩基配列決定法によって測定される。

4) HCV コア変異

HCVゲノタイプ1bにおいて、HCV遺伝子の構造領域であるコア遺伝子のアミノ酸コドン70番と91番のアミノ酸変異がインターフェロン療法の治療効果と密接に関連していることが知られている⁴⁾。コア70番や91番にアミノ酸変異を認める変異型のHCVは、変異を認めない野生型のHCVに比し、インターフェロン抵抗性である。

5) 宿主のIL28B遺伝子近傍のI遺伝子多型(SNP)

宿主の19番染色体上に存在しインターフェロンλをコードしているIL28B遺伝子の近傍に存在するSNPが、インターフェロン・リバビリン併用療法の治療効果やHCV急性感染時における自然排除に、きわめて強く関連していることが最近発見された^{5~7)}。したがって、HCVキャリアと診断され抗ウイルス療法を考慮する際には、患者の同意を得た上で測定されることがある。

●参考文献●

- 1) Asahina Y, Izumi N, Uchihara M, et al : A potent antiviral effect on hepatitis C viral dynamics in serum and peripheral blood mononuclear cells during combination therapy with high-dose daily interferon alfa plus ribavirin and intravenous twice-daily treatment with interferon beta. *Hepatology* 2001 ; 34 : 377-384
- 2) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al : Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J Clin Invest* 1995 ; 96 : 224-230
- 3) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al : Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996 ; 334 : 77-81
- 4) Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, et al : Association of amino acid substitution pattern in core protein of hepatitis C virus genotype 1b high viral load and non-virological response to interferon-ribavirin combination therapy. *Intervirology* 2005 ; 48 : 372-380
- 5) Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, et al : Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 2009 ; 10 : 1105-1109
- 6) Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al : Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009 ; 461 : 399-401
- 7) Thomas DL, Thio CL, Martin MP, et al : Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009 ; 461 : 798-801

(朝比奈靖浩)