

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

C型肝炎ウイルス検出を目的とした体外診断薬の再評価に関する研究
-HCV 検体パネルを用いた検討-

研究分担者 加藤 孝宣 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長

研究要旨：日本赤十字社由来の HCV 陽性献血検体を用い、HCV 検体パネルを作製した。この検体パネルを用い、現在国内で使用されている HCV RNA 定量法および HCV コア抗原定量法の評価を行った。これらの測定キットを用いて得られた測定値は、概ね良い相関が得られたが、いくつかのコア抗原定量法では乖離する例が認められた。この乖離の原因解明のために、これらの検体の HCV コア領域のシーケンスを確認したところ、コア領域の aa 47 - 49 のアミノ酸変異が HCV RNA 量とコア抗原量の乖離に関与している事が明らかになった。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は世界中に広がっており、日本でも100万人以上の感染者が存在すると考えられている。HCV感染は成人感染でも高率に慢性化する事が知られており、慢性肝炎から肝硬変、肝臓に至る慢性肝疾患の原因となる。C型慢性肝炎患者に対して、現在ではペグインターフェロンとリバビリンを中心とした治療が行われているが、その治療効果は十分ではなく、いくつか治療効果に影響を与える因子が報告されている。特にウイルス量の高い症例では治療反応性が悪い事が報告されており、患者の血中ウイルス量は治療効果を予測する上で、重要な因子として知られている。現在、HCVのウイルス量測定法としてHCV-RNA定量とHCVコア抗原定量が用いられているが、

これらのキットによる測定値の相関については詳細な検討がなされていない。

我々は国内で献血された検体でHCV陽性であったものの供与を受け、HCVウイルス量測定法評価のための検体パネルを作製した。本研究では、現在臨床で用いられているHCV RNA定量法、HCVコア抗原定量法によりこのHCV検体パネルのウイルス量を測定し、測定値の分布と相関について検討を行った。

B. 研究方法

日本赤十字社よりHCV RNA陽性HCV抗体陽性の献血血漿80検体の供与を受け、HCV検体パネルを作製した。この検体パネルに含まれるHCV株の遺伝子型は、1a株が1検体、1b株が35検体、2a株が26検体、2b株が18検

体であり、国内で検出される主要な遺伝子型が全て含まれている。

これらの検体を HCV RNA 定量法 3 種類 (コバス TaqMan HCV オート ver.1、コバス TaqMan HCV オート ver.2、アキュジーン m-HCV)、HCV コア抗原定量法 5 種類 (アーキテクト・HCVAg、ルミパルス オート HCV 抗原、ルミスポット栄研 HCV 抗原、BLEIA 栄研 HCV 抗原、オート HCV 抗原 IRMA テスト) で測定を行い、得られた測定値の相関について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用する検体パネルは、日本赤十字社により献血者から同意を得て採取された検体であり、倫理面での問題はない。

C. 研究結果

1. HCV RNA 定量系の検討

HCV 検体パネルを HCV-RNA 定量系であるコバス TaqMan HCV オート ver.1、コバス TaqMan HCV オート ver.2、アキュジーン m-HCV で定量した。その結果、検体パネルの HCV-RNA 量は 3.68 ~ 7.08 log IU/mL に分布しており、これらキットの測定値は非常に良く相関していた。コバス TaqMan HCV オート ver.1 では、高ウイルス量検体で測定値が高値側にシフトする事や、遺伝子型 2 型の測定値が 15%ほど低値となるなどの問題点が指摘されているが、今回用いた検体パネルでは問題となる乖離は観察されなかった。

2. HCV コア抗原定量法の検討

さらに HCV コア抗原定量法 5 種類のキットを用いて、HCV 検体パネルの測定を行った。得

られた測定値を HCV RNA 定量の結果と比較した結果、概ね良好な相関を認めたが、いくつかの測定法では乖離する例が認められた。そこで、これらの検体に含まれる HCV 株のコア領域を PCR 法にて増幅し、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した。その結果、コア領域の aa 47 - 49 のアミノ酸変異が HCV RNA 量とコア抗原量の乖離に関与している事が明らかになった。特にこの領域に 2 つのアミノ酸変異を認めた検体では、HCV RNA 量との相関から推定されるコア抗原量の期待値の 1/10 程度の値を示した。この領域の変異は測定した 80 検体中 12 検体 (15%) に認め、変異を持つ HCV 株は国内に少なからず存在すると考えられた。遺伝子型別に、この領域に変異を持つ株の検出頻度を用いて検討したところ、この変異は遺伝子型 2a 株で最も多く約 30%に認める事が明らかになった。

D. 考察

コア抗原定量は HCV RNA 定量法に比べ安価であり広く用いられているが、抗原抗体反応を用いた測定法のためアミノ酸変異による影響を受ける。今回の検討により、コア抗原量測定値がコア領域の一部の変異により影響を受け、HCV RNA 定量測定値に比べ低く乖離する例があることが明らかになった。これらの変異株ではコア抗原量が HCV RNA 値に比べ低値となる可能性があり、また経過観察中にこれらの変異が出現した場合にはウイルス量の低下と判断される可能性もあるため注意が必要である。

E. 結論

HCV 検体パネルを用いて、HCV RNA 定量法および HCV コア抗原定量法の評価を行った。

これらの測定キットを用いて得られた測定値は概ね良い相関が得られたが、いくつかのコア抗原定量法では乖離する例を認め、コア領域の変異がこの測定値の乖離に関係している事が明らかになった。今後、コア抗原定量法についてはこの変異の影響を受けないようなキットの開発が望まれる。

G. 研究発表

1 . 論文発表

- 1) Yamada N, Shigefuku R, Sugiyama R, Kobayashi M, Ikeda H, Takahashi H, Okuse C, Suzuki M, Itoh F, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Koike K, Wakita T, and Kato T. Acute Hepatitis B of Genotype H Resulting in Persistent Infection. **World J Gastroentero.** in press.
- 2) Ishida H, Kato T, Takehana K, Tatsumi T, Hosui A, Nawa T, Kodama T, Shimizu S, Hikita H, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N, and Takehara T. Valine, the branched-chain amino acid, suppresses hepatitis C virus RNA replication but promotes infectious particle formation. **Biochem Biophys Res Commun.** 2013; 437(1), 127-33.
- 3) Akazawa D, Moriyama M, Yokokawa H, Omi N, Watanabe N, Date T, Morikawa K, Aizaki H, Ishii K, Kato T, Mochizuki H, Nakamura N, and Wakita T. Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis C virus protect against infection in mice. **Gastroenterology.** 2013; 145(2), 447-55.

- 4) Kondo Y, Kato T, Kimura O, Iwata T, Ninomiya M, Kakazu E, Miura M, Akahane T, Miyazaki Y, Kobayashi T, Ishii M, Kisara N, Sasaki K, Nakayama H, Igarashi T, Obara N, Ueno Y, Morosawa T, and Shimosegawa T. 1(OH) vitamin D3 supplementation improves the sensitivity of the immune-response during peg-IFN/RBV therapy in chronic hepatitis C patients-case controlled trial. **PLoS One.** 2013, 8(5), e63672.

- 5) Shiota T, Li TC, Yoshizaki S, Kato T, Wakita T, and Ishii K. The Hepatitis E virus capsid C-terminal region is essential for the viral life cycle: Implication for viral genome encapsidation and particle stabilization. **J Virol.** 2013, 87(10), 6031-6.

- 6) Saeed M, Gondeau C, Hmwe S, Yokokawa H, Date T, Suzuki T, Kato T, Maurel P, and Wakita T. Replication of hepatitis C virus genotype 3a in cultured cells. **Gastroenterology.** 2013, 144 (1), 56-58.

2 . 学会発表

- 1) Sugiyama N, Murayama A, Suzuki R, Shiina M, Wakita T, Kato T. Identification of cell-culture adapted hepatitis C virus JFH-1 variants by single virus isolation with end-point dilution method. 20th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, October 6-10, 2013. Melbourne, Australia.

- 2) Murayama A, Sugiyama N, Masaki T, Wakita T, Kato T. Assessment of antiviral activities of NS5A inhibitors on recombinant HCV replaced with NS5A from genotypes 1 and 2 strains. 20th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, October 6-10, 2013. Melbourne, Australia.
- 3) Sugiyama R, Sugiyama N, Murayama A, Tasaka-Fujita M, Masaki T, Wakita T, Kato T. Amino acid substitution in interferon sensitivity-determining region in NS5A involves infectious virus production of hepatitis C virus. 20th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, October 6-10, 2013. Melbourne, Australia.
- 4) Murayama A, Sugiyama N, Wakita T, Kato T. Evaluation of second-generation NS5A inhibitors against hepatitis C virus by using NS5A replaced JFH-1 viruses and full-length infectious clones other than JFH-1. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 2-5, 2013. Washington D.C., USA.
- 5) Kato T, Sugiyama N, Murayama A, Takuya Matsumura, Masaaki Shiina, Shinichi Asabe, Takaji Wakita, Michio Imawari. Antimicrobial peptide LL-37 deteriorate infectivity of hepatitis C virus. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 2-5, 2013. Washington D.C., USA.
- 6) Tasaka-Fujita M, Nao Sugiyama N, Wonseok Kang W, Murayama A, Asahina Y, Sakamoto N, Wakita T, Shin EC, Kato T. Substitution of amino acid 70/91 in the hepatitis C virus core region affects infectious virus production and cell surface expression of MHC class I. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 2-5, 2013. Washington D.C., USA.
- 7) 藤田めぐみ、加藤孝宣、村山麻子、山田典栄、脇田隆字、朝比奈靖浩、坂本直哉. HCV Core 領域アミノ酸 70/91 変異株を用いた反応機序の解析. 第 49 回日本肝臓学会総会、2013 年 6 月 6-7 日、東京.
- 8) 杉山隆一、杉山奈央、村山麻子、藤田めぐみ、山田典栄、脇田隆字、加藤孝宣. ISDR アミノ酸変異が C 型肝炎ウイルスの増殖に与える影響の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10-12 日、神戸.
- 9) 村山麻子、杉山奈央、脇田隆字、加藤孝宣. An adaptive mutation in NS4A region enhances Hepatitis C Virus replication and virus production in cell culture. 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3-6 日、神戸.

H.知的所有権の出願・登録状況

- | | |
|----------|----|
| 1.特許取得 | なし |
| 2.実用新案登録 | なし |
| 3.その他 | なし |

