

C型肝炎ウイルス感染診断の検査と原理：愛知県保健所無料検査を中心に

1 はじめに—愛知県におけるC型肝炎感染者対策

C型肝炎ウイルス (hepatitis C virus: HCV) は、1989年非A非B型ウイルス性肝炎の原因ウイルスの一つとして発見された。1992年以降輸血血液にスクリーニング検査が導入され、輸血を原因とするHCV感染はほぼ完全に予防可能になった。わが国にはしかしながら、過去の輸血等を介して感染したウイルスキャリア（持続感染者）が全国で150万人以上存在すると推計されている^{1) 2)}。一般にHCV感染は自覚症状に乏しいため、今後慢性肝炎等の発症の増加が危惧されている。

これまで愛知県が実施してきたC型肝炎対策には、非加熱血液凝固因子製剤を投与された非血友病患者へのB型・C型肝炎検査受診の呼びかけ（2001年3月）、エイズの病原体ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus: HIV) と併せてC型肝炎の無料匿名検査の実施（同年6月1日から10月末）、フィブリノゲン製剤の納入先医療機関の公表や相談窓口の設置（2004年12月）などがある。平成19(2007)年1月厚生労働省によって「都道府県における肝炎検査後肝疾患診療体制に関するガイドライン」¹⁾がまとめられたのを契機に、平成19年度からはB型肝炎ウイルス (HBV) とともにHCVの無料検査を実施している。さらに平成20年度には、厚生労働省が「肝炎治療7ヵ年計画」として検査から治療体制に至る総合的な肝炎対策を打ち出した。愛知県においても国に倣い愛知県肝炎対策ガイドライン³⁾を策定し、無料肝炎ウイルス検査の実施を含む総合的な肝炎対策事業を進めている。

本稿では、HCVとHCV感染症の概要及び愛知県

において実施されているC型肝炎ウイルス検査法について述べる。

2 C型肝炎ウイルス (HCV) について

・構造と分類

HCVは、フラビウイルス科ヘパシウイルス属に属し、エンベロープを有する直径約60nmの1本鎖RNAウイルスである。ゲノムはプラス鎖RNA約9,500塩基からなり、約3,000アミノ酸の前駆体蛋白質をコードする。前駆体蛋白質がプロテアーゼによるプロセッシングを受けると、ウイルス粒子を構成する構造蛋白質であるコア (C)、エンベロープ1 (E1)、エンベロープ2 (E2)、ゲノム複製に必要な非構造蛋白質 (NS2～NS5) が産生される⁴⁾。(図1)

HCVは6つの遺伝子型に分類され、さらに100種類以上のサブタイプに分けられる。日本人患者における調査では1b型感染者が最も多く(70-80%)、次いで2a型(10-20%)、2b型(5-10%)と報告されている²⁾。HCVの遺伝子型には地域偏在性が認められる他、インターフェロン感受性、肝癌発症率などが遺伝子型により異なるという報告がある⁵⁾。

・HCV感染症の臨床症状と疫学

HCV感染経路は主に血液を介しており、輸血、鍼治療等医療行為の他に経静脈的薬物乱用、入れ墨等が主な感染経路として考えられる。感染後2～16週間の潜伏期ののち発症する場合がある。一般に劇症化することは少ないが、全身倦怠感に引き続き食欲不振、悪心・嘔吐、黄疸等の症状が現れることがある。感染者の一部は治癒しHCVを体内から排除するが、約70%^{1), 2)}はHCVキャリアになり、慢性肝炎に移行する。初感染から10～20年の歳月を経て10

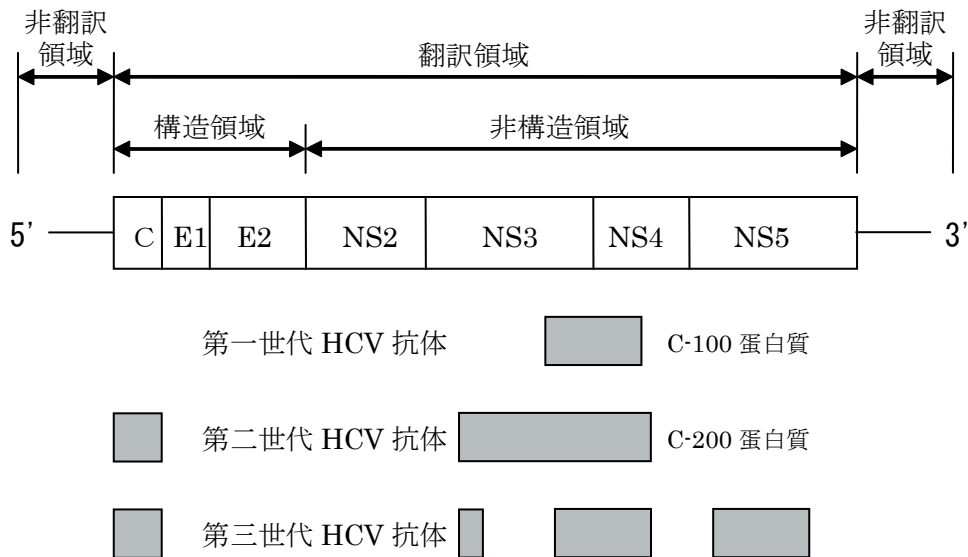


図1. HCV の遺伝子構造と抗体検査に使用される領域 7)より改変

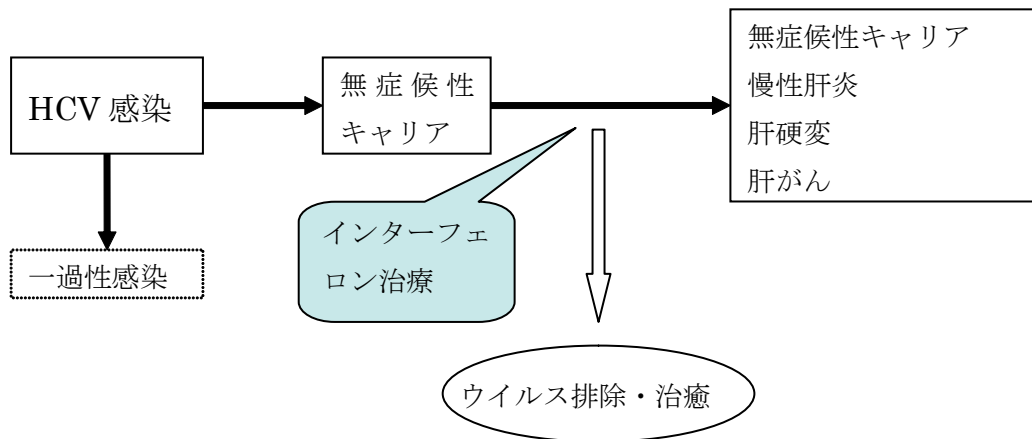


図2. C型肝炎感染後の経過

～15%は肝硬変に移行し、肝癌を発症する^{5),6)}(図2)。

わが国のHCV感染は輸血によるものが3-5割を占める。献血時スクリーニング検査の導入により1992年以降新規HCV感染の発生はほとんど認められていないが、ウイルスキャリアは未だ多く存在している。年齢別のHCV陽性率は年齢とともに上昇し、2000年時点においてキャリアの約半数は60歳以上である¹⁾。

・抗ウイルス治療

インターフェロン(IFN)療法が行われる。抗ウイルス療法が奏効する場合、HCV排除即ち根治が可能であり、肝硬変や肝がんの予防にもつながるため、早期発見・早期治療が重要である。日本人に多い1b型ではIFN単独治療の治癒率は30%と低く、IFNと抗ウイルス薬リバビリン(ribavirin)との併用でも治癒率50%程度とされている²⁾。

3 C型肝炎検査方法

HCV感染を疑う場合、まず血清中HCV抗体の有無を検査する。HCV抗体陽性者には、現在HCVに持続感染している人(HCVキャリア)と過去に感染していたが現在はHCVが排除され、治癒した人(感染既往者)がいるため、二次検査としてHCVキャリアと感染既往者とを鑑別する目的で、力価(HCV抗体価)定量の測定、HCV蛋白質(HCV抗原)あるいはHCV遺伝子検査を組み合わせで行われる⁷⁾。

・HCV抗体検査

HCV抗体検出には酵素抗体法(Enzyme Linked Immunosorbent assay: ELISA)やゼラチン粒子凝集反応法(PA法)が用いられる。抗体検出系に用いられているHCV抗原は構造領域のコア(C)

抗原、非構造領域の NS3 および NS4 抗原であるが、最初に開発された第一世代 HCV 抗体測定系は非構造領域の C100 蛋白質 (NS3 ~ 4 領域) のみを抗原としていた。第二世代では C100 蛋白質に替わってより大きな C200 蛋白質 (NS3 ~ 4 領域) と新たにコア (C 領域) 蛋白質を抗原として用い、より高感度となった。最近第二世代測定系に NS5 領域の蛋白質を加えた第三世代抗体測定系が開発されているが、感度、精度ともに第二世代と明らかな差はない⁷⁾。(図 1)

・HCV 抗原検査

HCV 抗原検査は HCV のコア蛋白質を免疫学的に検出する。最近、ELISA のほか、免疫放射定量法 (Immuno Radio Metric Assay : IRMA)、化学発光酵素免疫測定法 (Chemiluminescent Enzyme Immunoassay : CLEIA) など、微量の抗原を鋭敏に検出する手法が主流となっている。HCV RNA 量とコア抗原量の間には有意の正の相関があり次項の HCV-RNA 測定検査と臨床的意義はほぼ同等である^{7),8)}。

・HCV-RNA 測定検査

HCV-RNA 測定検査にはウイルス遺伝子の存否を判定する定性法とゲノムコピー数を測定する定量法がある。慢性 C 型肝炎の経過観察には HCV-RNA 定量法が有用であるが、低ウイルス量の慢性 C 型肝炎や HCV キャリアの診断には高感度の定性検査が必要である⁸⁾。HCV-RNA 定性検査法として

は、RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) を利用した核酸増幅検査が従来用いられてきたが、近年、“TaqMan プローブ”を用いた高感度のリアルタイム RT-PCR 法が開発され、今後 HCV-RNA 測定の主流になると考えられている⁹⁾。

現在愛知県では、一次検査 (HCV 抗体検査) で PA 法、二次検査で RT-PCR 法を用いて検査が行われている (図 3)。次にこれらの検査法について述べる。

4 ゼラチン粒子凝集反応法

(Particle Agglutination Test : PA 法)

PA 法は、HCV リコンビナント抗原を感作させた人工担体であるゼラチン粒子を被検血清と反応させ、粒子の凝集の有無で抗 HCV 抗体の存在及び抗体力価を検査する方法である。現在愛知県で採用されている PA 法は、抗原として C200 蛋白質 (NS3 ~ 4 領域) とコア蛋白質 (C 領域) を用いる第二世代抗体測定系にあたる。手技が簡便で、多数検体のスクリーニングに適している。検査に要する時間は短く、2 時間反応後に判定できる^{7)・10)}。

PA 法定性法において HCV 抗体陽性を示した人は、さらに HCV 持続感染者 (HCV キャリア) か、既に治癒している感染既往者か判定する必要がある。定量法により 212HCV PA 価以上の高い抗体価を示すものを高力価、25 ~ 211HCV PA 価を中力価、

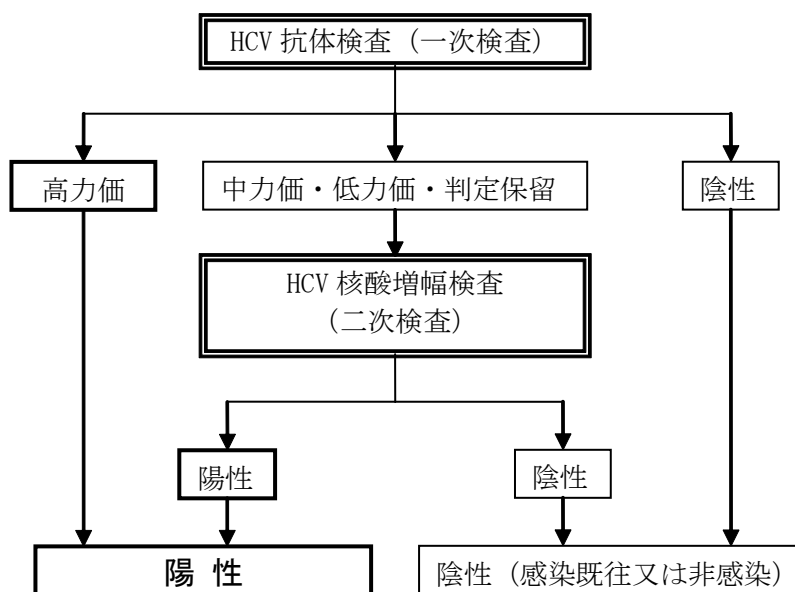


図3. 愛知県における HCV 検査の流れ

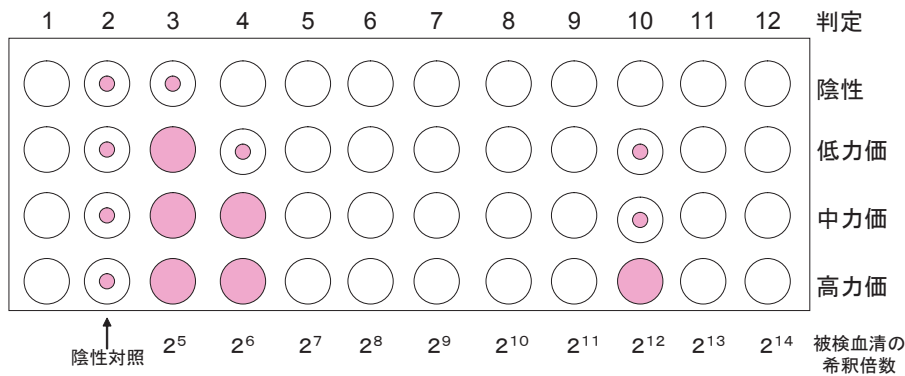


図4. PA法の判定

反応例を模式的に表した。2⁴倍希釈より2倍階段希釈した血清に、2列目(2⁴倍希釈血清)に対照粒子を、3列目(2⁵倍)、4列目(2⁶倍)、10列目(2¹²倍)の希釈血清に感作粒子を加え、凝集の有無で被検血清中の抗体の有無、抗体力価を判定する。

25HCV PA価を低力価に分ける(図4参照)。一般に、HCVキャリアの体内には変異に富んだ多様なHCV粒子が混在しており、複数のレセプターや血清因子を臨機応変に利用して巧妙に持続感染を維持している。よって高力価を示す場合は、キャリアの可能性が高い。一方、HCVの感染既往者の抗体価は年単位の経過で中力価～低力価へと低下していく。中力価や低力価を示す場合は、HCV抗体価変動の個人差を考慮するとキャリアの可能性も考えられるため二次検査が必要となる。なお、感染初期にはウイルスの抗体が検出されないHCV抗体のウィンドウ期があるが、これは新規HCV感染の発生が少ない現在の日本ではごく稀と考えられている¹⁾。

5 HCV 核酸増幅検査 (HCV アンプリコア定性)

HCV 遺伝子 RNA を RT-PCR 法を応用して増幅・検出する検査であり、現在市販の HCV-RNA 検出法の中で最も感度が高いリアルタイム RT-PCR 法について感度の高い方法である。HCV 抗体陽性者におけるウイルス持続感染の確認だけでなく、インターフェロン投与患者の投与後の効果予測及び経過観察にも使用される^{8)、11)}。

HCV アンプリコア法の測定原理を図5に示したが、以下にその説明を加える。

1. 5' 末端をビオチン化した HCV 遺伝子特異的合成オリゴヌクレオチドプライマーを検体中の標的 RNA に結合させる。

2. マンガンイオン存在下で逆転写酵素とポリ

メラーゼの活性を有する Tth DNA ポリメラーゼを用いて cDNA を合成 (RT) 後、PCR により増幅した HCV 遺伝子断片 (amplicon) を作成する。

3. 増幅された amplicon を変性し 1 本鎖にする。

4. 1 本鎖 DNA (ビオチン標識) に変性した amplicon を、HCV に相補的な DNA プローブを固相化したマイクロウェルに加え、ハイブリダイゼーションを行う。

5. アビジン標識ペルオキシダーゼを加え、ビオチン・アビジンの結合を介して、ビオチン標識された DNA ハイブリッドと結合させる。

6. 酵素の基質 (TMB: テトラメチルベンジジン) を加え、ビオチン・アビジン結合酵素活性を基質の発色反応で測定する。発色の吸光度値から標的 DNA 断片、即ち HCV-RNA 存在の有無を判定する。⁸⁾

6 おわりに—愛知県における HCV 検査実施状況と検査の受検について

平成 19 年度の HCV 抗体検査 (一次検査) は愛知県内各保健所において実施された。検査件数 4,668 件中、高力価は 89 件 (1.9%) であった。低力価、中力価を示した 59 件 (1.3%) について、当所にて HCV 核酸増幅検査 (二次検査) を実施した結果、59 件中 8 件 (0.17%) が陽性であり、高力価件数と合わせて 97 件 (2.1%) が陽性 (HCV キャリア) であった。

平成 20 年 4 月以降は、一次検査、二次検査とも当所において実施している。平成 20 年 9 月まで半年間の検査件数は、一次検査 906 件であった。

一次検査の結果、高力価は9件(1.0%)、中力価または低力価で二次検査を行った検体は14件(1.5%)であった。二次検査の結果は14件すべて陰性であったため、20年9月現在で9件(1.0%)が陽性(HCVキャリア)と判明している。(表1)

多くの感染症と同様、C型肝炎対策においても早期発見・早期治療が重要である。平成20年度は医療機関においても無料検査が実施されており、感染が心配な人は早めに医療機関または保健所での受検をお勧めする。愛知県内各保健所におけるC型肝炎ウイルス検査の受付等詳細については、健康担当局健康対策課ホームページ(<http://www.pref.aichi.jp/kenkotaisaku/kanen/test.htm>)をご覧ください。

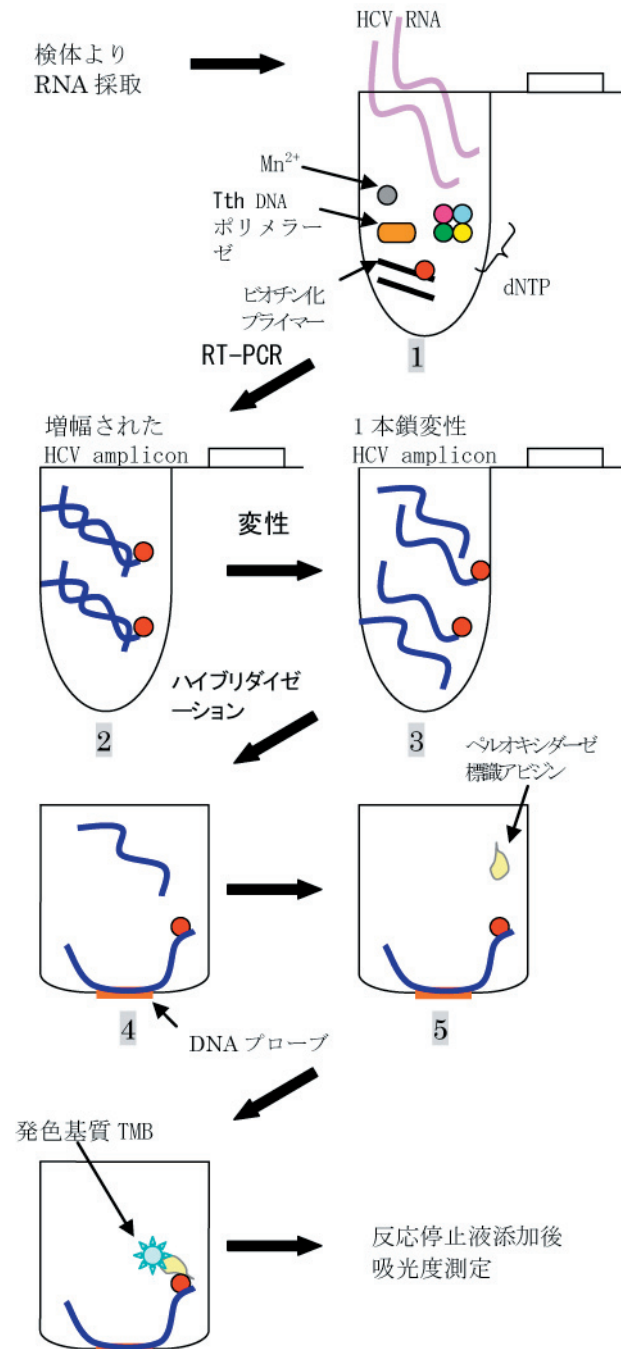


図5. アンプリコア定性法の測定原理

アンプリコア法の原理を模式的に表した。ステップ3まではPCRチューブ中の反応、その後はELISAプレートウェル内の反応を示す。各ステップの詳細は本文中に記述した。

