

〈特集：B型及びC型肝炎ウイルス検査の最近の進歩〉

## B型及びC型肝炎ウイルスに関連する検査の変遷

藤野 達也<sup>1)</sup>、遠城寺 宗近<sup>2)</sup>、八橋 弘<sup>1)</sup>

### Development of assays for measuring HBV- and HCV-related markers

Tatsuya Fujino<sup>1)</sup>, Munechika Enjoji<sup>2)</sup> and Hiroshi Yatsuhashi<sup>1)</sup>

**Summary** Several decades have passed since HBV and HCV were identified, and many assays for measuring HBV/HCV-related markers have annually developed. These assays have contributed to the development of kinetic analysis, diagnosis, treatment, and prevention of hepatitis B and C, and previously unknown matters have been gradually revealed. According to rapidly-advancing methodology, simpler, more sensitive, and more economical assays are available nowadays. However, clinical significance of measured values, as well as characteristics and limitation of each assay, should be fully recognized in order to obtain exact information for clinical use. In this article, we reviewed the method, principle, and clinical meaning of each HBV- or HCV-related assay.

**Key words:** HBV, HCV, HBV DNA, HCV RNA, Genotype

#### I. はじめに

肝炎ウイルスにはA型、B型、C型、D型、E型が同定されている。主に経口感染するのはA型肝炎ウイルス (HAV) とE型肝炎ウイルス (HEV) で、主に血液を介して感染するのはB型肝炎ウイルス (HBV)、C型肝炎ウイルス (HCV)、およびD型肝炎ウイルス (HDV) である。ウイルス学的には、HBVはDNAウイルスであり、他はすべてRNAウイルスである。経口感染するHAVおよびHEV感染は、劇症化する稀なケース

を除けば、多くの場合一過性感染で慢性化することはない。一方、血液を介して感染するHBV、HCV、HDVは持続感染する可能性があり、慢性肝炎、肝硬変を経て肝細胞癌を発生しうることから世界中で大きな問題となっており、ウイルス駆除を目的とした治療が積極的に行われている。ただし、わが国ではHDV感染症はほとんどみられず、臨床上問題となっていない。本稿では、B型肝炎およびC型肝炎に関連するウイルスマーカー検査の測定法と原理、その臨床的意義について概説する。

<sup>1)</sup>国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター  
〒856-8562 長崎県大村市久原2-1001-1

<sup>2)</sup>福岡大学健康管理センター

<sup>1)</sup>Clinical Research Center, National Hospital Organization  
Nagasaki Medical Center

2-1001-1 Kubara Omura, Nagasaki 856-8562, Japan

<sup>2)</sup>Health Care Center, Fukuoka University

## II. B型肝炎ウイルス

### 1. 疫学

HBV持続感染者は、世界で約4億人存在すると推定されており、本邦におけるHBVの感染率は約1%である。出産時ないし乳幼児期においてHBVに感染すると、9割以上の症例は持続感染に移行する。そのうち約9割は、若年期にHBe抗原陽性からHBe抗体陽性へとセロコンバージョンを起こして非活動性キャリアとなり、ほとんどの症例で病態は鎮静化する。しかし、残りの約1割ではウイルスの活動性が持続して慢性肝炎の状態が継続し、年率約2%で肝硬変へと移行し、肝細胞癌や肝不全に進展する<sup>2,4)</sup>。HBVに関わる臨床研究の歴史は、1964年のBlumbergらによるオーストラリア抗原（後のHBs抗原）の同定に始まる。その後Prince、大河内らにより、オーストラリア抗原が肝炎の発症に関係することが報告され、さらに、HBVに感染しても肝炎を発症しないいわゆる無症候性キャリアが存在すること、HBVが慢性肝疾患の原因となることなど、新たな事実が次々に判明した。HBVの本態であるDane粒子が同定されたのは1970年、HBe抗原が発見されたのは1972年である。1979年にはウイルス粒子からHBVゲノムがクローニングされ、ウイルス遺伝子（HBV DNA）の測定が可能となった。

本邦では、1972年に日本血液センターにおけるHBs抗原のスクリーニング検査が開始された。その後、1986年に開始された母子感染防止事業に基づいて、出生児に対するワクチンおよび免疫グロブリン投与が施行され、垂直感染による新たなHBVキャリア成立が阻止され、若年者におけるHBs抗原陽性率は著しく低下した。しかし、一方で、性交渉に伴う水平感染によるB型急性肝炎の発症数は減少せず、近年では、肝炎が遷延し慢性化しやすいgenotype AのHBV感染が増加傾向にある<sup>5)</sup>。

### 2. HBV遺伝子の構造とHBV関連抗原・抗体

HBV遺伝子は二本鎖の環状DNAから構成されるが、その全周の35~50%は一本鎖で、正確には不完全二本鎖環状DNAである<sup>6)</sup>。(一)鎖は全周性で約3.2 kbから成る。この(一)鎖に蛋白質への読み取りがなされるopen reading frame

(ORF)が4つ存在し、主に4種類のウイルス蛋白が合成される。pre-S遺伝子領域からはHBs抗原蛋白、pre-C遺伝子領域からはHBe抗原蛋白とHBe抗原蛋白、ポリメラーゼ遺伝子領域からはHBV関連DNAポリメラーゼ、X遺伝子領域からはX蛋白が合成される。HBV関連マーカーには、HBs抗原とHBs抗体、HBe抗原とHBe抗体、IgM-HBc抗体、HBc抗体、HBV DNAの検査がある。最近では、B型慢性肝炎治療の目標は、HBs抗原量をいかに減少、消失させるかという方向に向かっている。

### 3. 各種HBV関連検査とその臨床的意義

#### 1) HBs抗原・抗体

HBs抗原測定は、定性的にHBV感染状態の確認に用いられており、通常HBs抗原陽性をもってB型肝炎と診断する。近年、高感度のHBs抗原定量系が開発され、HBs抗原量によりHBVキャリアの自然経過を論じる報告が2010年頃から発表されている<sup>7,9)</sup>。HBs抗原定量測定の臨床的意義は、HBs抗原量が肝細胞中の二重鎖DNA(cccDNA)量を反映しており、自然経過および抗ウイルス治療中いずれにおいても、HBV感染の活動性を評価できることにある。HBs抗原の測定法には種々の方法が開発されており、主にスクリーニングとして用いられる人工担体凝集法 (particle agglutination: PA) の他に、イムノクロマトグラフィー法 (immunochromatography assay: ICA)、ラジオイムノアッセイ法 (radioimmunoassay: RIA)、酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay: EIA)、化学発光免疫測定法 (chemiluminescent immunoassay: CLIA)、化学発光酵素免疫測定法 (chemiluminescent enzyme immunoassay: CLEIA)、電気化学発光免疫測定法 (electro-chemiluminescent immunoassay: ECLIA) がある。

HBs抗体はHBs抗原に対する中和抗体であり、HBs抗体陽性の場合には、既往感染（現在治癒）とHBワクチンによる免疫獲得状態の2つの可能性が考えられる。HBワクチン接種によって出現する抗体はHBs抗体であるが、この場合HBV自体は感染していないので、後述するHBc抗体は陰性となり、鑑別される。HBs抗体測定法には、PA法、ICA法、RIA法、EIA法、CLIA法、CLEIA法、ECLIA法がある。

## 2) HBc抗体

HBc抗体はHBc抗原に対する抗体であり、高力価の抗体価（通常HBs抗原陽性）は現在のHBV感染を、低力価の抗体価（通常HBs抗体陰性）は過去のHBV感染を表す。HBc抗体のうちIgM成分は、HBV初感染後の早期から出現するため、通常IgM-HBc抗体陽性をもってB型急性肝炎の診断を行う。ただし、B型慢性肝炎の急性増悪期にも、低力価ながらIgM-HBc抗体陽性となり得ることから、B型急性肝炎とHBVキャリアでの急性増悪との鑑別には、経過とともにHBs抗原が消失するか否かを確認することが必要である。HBc抗体測定法には、ラテックス凝集法（latex agglutination: LA）、ICA法、EIA法、CLIA法、CLEIA法、ECLIAがある。

## 3) HBe抗原・抗体

HBe抗原陽性は、一般的に血液中にHBV量が多いことを表し、感染力が強いことを示す。例えばHBe抗原陽性の妊婦が児に対して予防処置を行わず出産した場合は、約90%の確率で垂直感染が成立する。またHBe抗原陽性キャリアの配偶者は、結婚3年以内に90%以上がHBs抗体陽性となり、ウイルス学的に一過性感染が成立している。また、HBe抗原陽性血液による注射針を介した汚染事故が生じた場合は、感染成立の可能性を考えねばならない。このようにHBe抗原陽性者は、HBV感染のhigh risk group（高危険群）として扱われる。また、HBe抗原陽性の場合、肝炎としての炎症・活動性が強い。

HBe抗体はHBe抗原に対する抗体で、一般的にHBe抗原消失後に出現し、血液中のHBV量が少ないことを示す。例えば、HBe抗体陽性妊婦では、予防処置を施さなくとも児に感染成立がみられる可能性は少ないとされる。輸血などの特殊な場合を除き、HBe抗体陽性キャリアからはあまり感染しないと考えられている。しかし、HBV増殖が活発な例でも、pre-C領域の変異によりHBe抗原が産生されなくなる場合があり、HBe抗体陽性でも感染性が強い可能性があることに注意が必要である。HBe抗原・抗体の測定には、LA法、EIA法、CLIA法、CLEIA法がある。

## 4) HBV DNA

血液中HBV DNAの検出は、血液中にHBVが存在することを直接示すものであり、その値は

血液中のHBV量を示す。HBV DNAの検出には、PCR法が最も鋭敏である。HBV DNAの測定は、慢性肝炎患者の病態把握、薬剤治療による抗ウイルス効果の評価、break throughの診断などに有用である。また、HBV DNAが高値な場合は発癌率が高いため、予後にも関連する因子でもある<sup>10)</sup>。HBV量の測定法として、以前はHBV関連DNAポリメラーゼが測定されていたが、現在は行われていない。その後、分岐鎖DNAプローブ法（branched DNA probe assay: bDNA法）、TMA-HPA法（transcription mediated amplification-hybridization protection assay）、Amplicor HBV Monitor法が用いられ、2008年以降、これらの3法と比較して短時間での測定が可能で、高感度かつ測定レンジが広いreal-time detection PCR test（リアルタイムPCR法）が汎用されている。

bDNA法は、被検者血清よりDNAを抽出後、HBV特異プローブでHBV DNAを補足し、増幅プローブ、化学発光を用いてシグナルを増幅する<sup>11)</sup>。各検体のシグナルの強度をあらかじめ作成した標準曲線から算出して、DNA量を求めるものである。測定範囲は0.7~3800 Meq/mL ( $7 \times 10^5 \sim 3.8 \times 10^9$  copies/mL) である。

TMA-HPA法は、2種類の酵素（T7 RNAポリメラーゼおよび逆転写酵素）と2種類のプライマーおよび基質を用いて、HBVDNAの特異的塩基配列をRNAとして増幅するものである<sup>12)</sup>。その増幅産物RNAを、ハイブリダイゼーション法に相補的なアクリジニウムエステルで標識したDNAプローブを用いて、RNAを測定する。測定範囲は3.7~8.7 LGE/mL ( $5.0 \times 10^3 \sim 5.0 \times 10^8$  copies/mL) である。

Amplicor HBV Monitor法は、被検者血清よりDNAを抽出後、増幅産物をDNP（2,4-dinitrophenyl）標識HBV用プローブとハイブリダイゼーションさせて定量するものである<sup>13)</sup>。測定範囲は2.6~7.6 Log copies/mL ( $4.0 \times 10^2 \sim 4.0 \times 10^7$  copies/mL) である。

リアルタイムPCR法では、プライマーとプローブ（5'末端に蛍光標識し、3'末端にクエンチャーを標識した短いオリゴヌクレオチド）はHBVゲノム上の保存性の高い領域を使用している<sup>14)</sup>。ある一定の蛍光強度に到達した時のPCRサイクル数からPCRプロダクト量を算出して、DNA量を求めるものである。この方法は感度が良く、

ダイナミックレンジも広いのが特徴である。現在、TaqMan HBV「オート」(ロシュダイアグノスティックス)とアキュジーンm-HBV(アボットジャパン)の2法が主流である。測定範囲はTaqMan HBV「オート」では1.8~8.8 Log copies/mL (69.8~6.4×10<sup>8</sup> copies/mL)、アキュジーンm-HBVでは1.53~9.5 Log copies/mL (34~3.4×10<sup>9</sup> copies/mL)である。

5) HBコア関連抗原 (HBV core-related antigen: HBcrAg)

HBcrAgは、pregenomic mRNAから翻訳されるHBc抗原、precore mRNAから翻訳されるHBe抗原およびp22cr抗原の3種類の抗原構成蛋白の総称である。わが国で開発された測定系「CL-HBcrAg」(富士レビオ)では、短時間で自動測定が可能である。HBcrAgは、抗ウイルス治療前にはHBV DNA量と正の相関が認められるが、治療後にはHBV DNA量は速やかに低下する一方、HBcrAg量は緩やかに低下するという乖離現象が認められる。HBcrAgもcccDNA量を反映することが明らかにされており、HBs抗原量とHBcrAg量とを組み合わせることにより、核酸アナログ治療中の再燃の予測や治療中止時期の決定に有用であり、臨床応用されている<sup>15)</sup>。

6) HBV遺伝子変異

HBV DNAのPre-Core (Pre-C) 領域: 1896番目、Core-promoter (Core-P) 領域: 1762、1764番目の塩基配列変異は、HBe抗原の産生・分泌に関係することが明らかになっている。現在までに、その両塩基の変異を比較的簡単に検出するPre-C変異検出キットenzyme linked mini sequence assay (ELMA) とCore-P変異検出キットenzyme linked specific probe assay (ELSPA) が開発され使用されている。

ELMAは、まずターゲットとなる領域を含むHBV DNAをPCR法で増幅した後、プレート上でPre-C: 1896番目の塩基1個のDNA合成を行い、変異株か野生株かを酵素抗体法で識別する方法である。ELSPAは、Core-P: 1732、1764番目の塩基変異を含むHBV DNA部分をPCR法で増幅した後、それぞれ変異株と野生株に特異的なプローブをプレート上で反応させ、両塩基の同時変異の有無を酵素抗体法で識別する方法である。両測定法とも、遺伝子変異の最終判定に酵素抗体法を用いており、客観的かつ簡便に検出できる

ように工夫されている。これらの測定方法では、1回の測定で約6時間以内に30サンプル以上の検体処理が可能であり、測定感度は100 copies/100 μLと検出感度も高い。

HBV DNA変異の検出は、B型急性肝炎の重症度と密接に関係することが明らかになっている<sup>16), 17)</sup>。我々の施設でも、この両方法を用いてB型急性肝炎の初診時血清60検体(劇症肝炎7検体、重症肝炎12検体、通常肝炎41検体)を測定し、劇症肝炎で7例中7例(100%)、重症肝炎で12例中6例(50%)、通常肝炎で41例中4例(10%)においてPre-CないしCore-P変異が検出されている。このようにB型急性肝炎の予後の推定にELMA、ELSPAが有用である。

7) HBVゲノタイプ

一般にDNAウイルスはRNAウイルスに比較して遺伝子変異が少ないが、HBVはDNAウイルスであるにも関わらず、ウイルス増殖の中に逆転写過程を持つため、高率に変異を起こすことが知られている<sup>18)</sup>。この遺伝子変異に由来する塩基配列の違いによる分類がHBVゲノタイプであり、現在A型からJ型まで9つのゲノタイプ(I型はC型の亜型)に分類されている。本邦においては、ゲノタイプA、B、C、Dの4種でほとんど全てである。HBVゲノタイプ検査法には、restriction fragment length polymorphism (RFLP)法、EIA法、塩基配列に基づく系統解析がある。これらのうち保険収載されているものはイムニスHBVゲノタイプEIA法(特殊免疫研究所)のみである。EIA法はUsudaらの開発した方法で、Pre-S2領域のゲノタイプ特異的なアミノ酸を認識するモノクローナル抗体を組み合わせた酵素免疫測定法である<sup>19)</sup>。HBVゲノタイプによる臨床像の差異が数多く報告されており、予後や治療効果予測に有用である<sup>20)</sup>。

Ⅲ. C型肝炎ウイルス

1. 疫学

HCVは、1989年に米国のChooらによって発見され<sup>21)</sup>、それまで非A非B型肝炎と診断されていた患者の9割以上、アルコール性肝障害と診断されていた症例の半数以上が、HCVによる肝障害であることが明らかとなった。現在、HCVキャリアは全世界で1億7000万人、本邦で150万~



200万人と推定されている。HCV感染が一旦成立すると、健康成人への感染であっても、急性の経過で治癒するものは約30%であり、感染例の約70%でHCV感染が持続し慢性肝炎へと移行する。慢性化した場合、ウイルスの自然排除は年率0.2%と低値であり、HCV感染による炎症の持続により肝線維化が惹起され、肝硬変や肝細胞癌へと進展する<sup>22)</sup>。インターフェロン (interferon: IFN) による抗ウイルス治療は、1986年にHoofnagleらが非A非B型肝炎に対してヒト組み換えIFN $\alpha$ を投与し、トランスアミナーゼの正常化を確認したことに始まり<sup>23)</sup>、欧米で1991年、本邦では1992年からC型肝炎に対するIFN治療の一般臨床での使用が開始された。その後、PCR法という画期的なウイルス検出法の開発により、IFN治療によってHCV RNAの排除に成功した症例では肝炎が鎮静化することが示され<sup>24)</sup>、さらに、こうした症例では、肝病変進展や肝発癌が抑制されることも明らかにされてきた<sup>25-28)</sup>。

## 2. HCV RNAの構造とHCV関連抗原

HCV遺伝子は1本鎖RNAで約9600塩基の長さを有し、N末端から構造蛋白遺伝子としてCore領域、E1、E2領域、続いて非構造遺伝子としてp7領域、NS2、NS3、NS4、NS5領域より構成されている。米国Chiron社が非構造領域 (c100-3) を用いた第1世代HCV抗体検査法を開発し、その後HCVの全塩基配列の解明が進み、Core領域とNS3領域を抗原にした第2世代HCV抗体検査法が開発された。さらに、これにNS5領域の抗原を加えた第3世代HCV抗体検査法が開発された。現在、輸血用血液は、これらの抗体測定系と核酸増幅検査を用いてスクリーニングされており、その結果、輸血後C型肝炎は激減した。しかし、C型肝炎患者の病態把握や治療を目的とした臨床の現場では、抗体検査に加えHCV RNA量やHCV蛋白、さらにはHCVの遺伝子型などを測定し、多方向からHCVウイルスを捉える必要がある。

## 3. 各種HCV関連検査とその臨床的意義

### 1) HCV抗体

HCV抗体は、HCV感染検出のため最初に開発された関連マーカーであり、主にHCV感染のスクリーニング目的に用いられている。HCV抗体

測定法としては凝集法 (PHA、PA法)、EIA法、CLEIA法などが用いられている。いずれにしても最近使用されている市販キットでは感度、特異度ともに良好で、一般臨床に用いる場合、どのキットを用いてもその目的は達成できる。その理由は、HCV抗体の主たる領域はCore領域であり、第2世代以降のキットにはこの領域が含まれているからである。これらを使用することにより、95%以上のC型慢性肝炎を診断することが可能である。

HCV抗体測定はHCV感染者のスクリーニングに適し、急性肝炎および慢性肝炎の診断に用いられる。ただし、過去の感染でも陽性 (低力価抗体) となるので、最終的にはHCV RNA測定による確認が必要不可欠である。健康診断 (基礎健診) の場では、定量的なHCV抗体価の測定が行われている。HCV抗体高力価を示すほとんどがウイルス血症であるのに対し、HCV抗体低力価を示すほとんどが感染既往例であることより、HCV抗体価からウイルス血症の有無を予測することができる<sup>29), 30)</sup>。

### 2) HCV RNA

HCV抗体が広くHCVの既往感染者および現時点での感染者を検出するための感染マーカーであるのに対し、HCV RNAの検出は、C型肝炎患者および健康キャリア等からHCVそのものの存在を確認する診断方法である。微量のウイルス核酸を検出する方法としては、高感度のPCR法を用いる必要がある。HCV RNA定性検査として1994年からキット化されたAmplicor (アンプリコアHCV: ロシユダイアグノスティックス) が、以下に述べるリアルタイムPCR法が開発されるまでHCV RNAを検出できる高感度な測定法であった。検出感度は1.7 Log IU/mL (50 IU/mL) である。HCV RNA定性検査の臨床的意義は、HCV抗体陽性のウイルス血症の確認、IFN治療中のモニター、IFN治療中での治療効果予測、IFN治療によるHCV RNA消失の確認に有用なことである。また、急性肝炎初期においては、HCV抗体やHCVコア蛋白が陰性でもHCV RNAが陽性であれば急性C型肝炎と診断される<sup>31)</sup>。

HCV RNA定量法として、いくつかの測定方法が開発されてきた。当初は研究室レベルでcompetitive reverse transcription polymerase chain reaction (CRT-PCR) が行われていたが、操作が

煩雑で、施設ごとに独自のプロトコルを用いたため施設間で定量結果が大きく異なっていた。1992年に開発されたHCV定量法は、遺伝子増幅を行わず、マイクロプレートに固相化されたプローブに直接RNAを結合した後、標識プローブにてシグナルを増幅する方法で、蛍光強度よりRNA量を求めるbDNA法であった。その後、RT-PCRを用いた定量法として、1995年にAmplicor Monitorが開発されたが、HCV genotype 2における反応性に問題があったため<sup>30)</sup>、改良を加えたAmplicor Monitor version 2.0 (オリジナル法：ロシュダイアグノスティックス)が1999年に開発された。さらに2004年には、高ウイルス領域での定量性が改善されたハイレンジ法が開発された。2007年にはリアルタイムPCR法 (TaqMan-PCR) を用いたコバスタqMan HCV「オート」(ロシュダイアグノスティックス)が開発され、2008年にはアキュジーンm-HCV (アボットジャパン)も使用可能となり、両方法が一般検査室内での遺伝子診断法として定着している。

bDNA法はPCRを用いない核酸検出法で、マイクロプレートに固相化されたプローブにより直接RNAを結合した後、標識プローブにてシグナルを増幅する方法で、その後、蛍光強度よりRNA量を求めるものである<sup>33)</sup>。高ウイルス領域の定量性は優れているが、検出感度、測定範囲は5.7~8.1 LGE/mL (0.5 Mcq/mL)である。低ウイルス領域の感度が低いため、現在ではあまり使用されていない。

Amplicor Monitor法は、検体に既知の人工核酸であるinternal quantitative standard (IQS)を含んだ溶液を加え、サンプルターゲットとIQSを共に増幅し、増幅されたIQSの量との比較により検体中のHCV RNAを定量するものである<sup>34), 35)</sup>。検出感度、測定範囲は、オリジナル法で2.7~5.7 Log IU/mL (0.5~500 KIU/mL)、ハイレンジ法で3.7~6.7 Log IU/mL (5~5000 KIU/mL)である。

それまでの方法では、測定目的に応じて定性法と定量法を、さらには定量法においてはオリジナル法とハイレンジ法とを使い分ける必要があったが、リアルタイムPCR法としてコバスタqMan HCV「オート」、アキュジーンm-HCVが開発されたことにより、高感度かつより広い

範囲の定量が一つの検査法で可能となり、HCV RNAの定性・定量検査に関しては本検査法に集約され一本化された<sup>36), 37)</sup>。さらに、RNA抽出から増幅、検出まで全自動で行えるようになり、コンタミネーションの可能性の軽減、測定効率に向上が得られている。測定範囲は、コバスタqMan HCV「オート」で1.2~7.8 Log IU/mL (15~6.9×10<sup>7</sup> IU/mL)、アキュジーンm-HCVで1.08~8.0 Log IU/mL (12~1.0×10<sup>8</sup> IU/mL)である。HCV RNAの測定は、HCV感染診断として既往感染者および現時点での感染者鑑別に用いられるほか、抗ウイルス治療患者の治療前効果予測や治療法の選択、治療中のモニタリング、治療終了後の効果判定などに用いられており、HCVキャリアの診断、治療に不可欠なマーカーとして汎用されている。

### 3) HCVコア蛋白

HCVコア蛋白を測定することにより、短時間で血液中のHCVを直接検出および定量化することが可能である。HCVコア蛋白測定は、1992年に2種類のモノクローナル抗体でコア抗原を補足するサンドイッチ酵素免疫測定法 (ELISA)が開発され、1996年にはポリエチレングリコールおよびアルカリで前処理した検体を試料として、2種類のモノクローナル抗体でコア抗原をサンドイッチし検出する蛍光酵素免疫測定法 (FEIA)が開発された。しかし、この前処理操作は煩雑であったため、2008年に前処理を含めた全行程を自動化した化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA)が開発された。2012年には、臨床検査分野では世界初となる生物発光 (ホタルルシフェラーゼ発光) 酵素免疫測定法が開発され<sup>38-40)</sup>、広い測定範囲とリアルタイムPCRとの高い相関性を示し、臨床的にも有用であると報告されている。

HCVコア蛋白測定の臨床的意義は、HCV RNA測定同様にIFN治療効果を高い確度で予測できることである。また、C型慢性肝炎患者に対するIFN治療中のウイルス動態の評価にも有用である。さらに、針刺し事故後の急性肝炎患者の鑑別やウィンドウ期にある供血者からの感染による輸血後C型肝炎について、安価で迅速に結果が得られるところにHCVコア蛋白測定の有用性がある<sup>41-45)</sup>。

### 4) HCVゲノタイプ

HCVは、ウイルスの遺伝子型として10種類以上に分類される。HCVのゲノタイプ分類は国際的にはSimmondsの分類（1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, etc）が広く用いられている。わが国でのゲノタイプの頻度は、1bが70%、2aが20%、2bが10%である。ゲノタイプ決定法は、HCVコア領域において、各ゲノタイプにそれぞれ特異的なプライマーを設定し、PCR法を用いることにより識別してきた。一方、1994年小原らは、PCR法でなくEIA法によりHCVを2つのグループに分類する方法（セログループ）を開発した<sup>46)</sup>。小原らの分類でのセログループ1はSimmondsの分類の1a/1bに、セログループ2は2a/2bに相当する。小原らの方法は簡便で、多数検体処理可能な抗原抗体反応を利用したものであり、得られた結果はウイルス遺伝子の違いを識別するものである。HCVゲノタイプやセログループを測定する臨床的意義は、感染経路の判定、IFN治療の効果予測等である<sup>47)</sup>。

#### IV. おわりに

B型肝炎、C型肝炎の診断ウイルスマーカーの測定法と原理、その臨床的意義について述べた。HBV、HCVが発見され数十年が経ち、各種HBV、HCV関連マーカー検査法が年々進歩してきたことにより、B型およびC型肝炎の疫学、診断、治療、予防も大きく進歩し、従来不明瞭であった事柄が、一つ一つ明らかとなってきている。技術が日進月歩で発展する中、簡便で感度良く、安価な検査法が続々と開発されてきている。今後も臨床検査において、検査の特徴と検査の限界、測定値の解釈、臨床的意義について十分理解した上で、臨床サイドに対して正確な情報を伝達していく必要があると考える。

#### 参考文献

- 1) Lavanchy D: Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat*, 11: 97-107, 2004.
- 2) Fattovich G, Bortolotti F, Donato F: Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J Hepatol*, 48: 335-352, 2008.
- 3) Ganem D, Prince AM: Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med*, 350: 1118-1129, 2004.
- 4) McMahon BJ: Natural history of chronic hepatitis B. *Clin Liver Dis*, 14: 381-396, 2010.
- 5) Sugauchi F, Orito E, Ohno T, et al.: Spatial and chronological differences in hepatitis B virus genotypes from patients with acute hepatitis B in Japan. *Hepatol Res*, 36: 107-114, 2006.
- 6) Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, et al.: Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol*, 69: 2575-2583, 1988.
- 7) Nguyen T, Thompson AJ, Bowden S, et al.: Hepatitis B surface antigen levels gueing the natural history of chronic hepatitis B: a prespective of Asia. *J Hepatol*, 52: 508-513, 2010.
- 8) Chan HL, Wong VW, Wong GL, et al.: A longitudinal study on the natural history of serum hepatitis B surface antigen changes in chronic hepatitis B. *Hepatology*, 52: 1232-1241, 2010.
- 9) Jaroszewicz J, Calle Serrano B, Wursthom K, et al.: Hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels in the natural history of hepatitis B virus (HBV)-infection: a European perspective. *J Hepatol*, 52: 514-522, 2010.
- 10) Chen CJ, Yang HI, Su J, et al.: Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA*, 295: 65-73, 2006.
- 11) 渡部裕子, 日野邦彦, 安田清美 ほか: bDNAプローブ法によるHBV DNAの検出と臨床的有用性の検討. *医学と薬学*, 30: 1217-1226, 1993.
- 12) 倉光智之, 長沼敏雄, 銭谷 明 ほか: Transcription mediated amplification-hybridization protection (TMA-HPA) 法によるHBV DNAの検出と臨床的有用性の検討. *医学と薬学*, 44: 919-925, 2000.
- 13) 中尾瑠美子, 大黒 学, 八橋 弘: AMPLICOR HBV Monitor test (Monitor法) によるHBV-DNA定量法の基礎的・臨床的検討. *医学と薬学*, 48: 985-991, 2002.
- 14) 狩野吉康, 赤池 淳, 山崎克 ほか: HCV RNA測定試薬コバスタqMan HCV「オート」およびHBV DNA測定試薬コバスタqMan HBV「オート」における既存測定法との比較検討. *医学と薬学*, 58: 137-149, 2007.
- 15) Matsumoto A, Tanaka E, Minami M, et al.: Low serum level of hepatitis B core-related antigen indicates unlikely reactivation of hepatitis after cessation of lamivudine therapy. *Hepatol Res*, 37: 661-666, 2007.
- 16) 藤野達也, 八橋 弘, 有富朋礼: ELMAによる血中HBV-DNA Pre-Core Mutant検出法の基礎的検討と臨床的意義. *肝胆臓*, 37: 567-573, 1998.
- 17) Aritomi T, Yatsushashi H, Fujino T, et al.: Association of

- mutations in the core promoter and precore region of hepatitis virus with fulminant and severe acute hepatitis in Japan. *J Gastroenterol Hepatol*, 13: 1125-1132, 1998.
- 18) Orito E, Mizokami M, Ina Y, et al.: Host-independent evolution and a genetic classification of the hepadnavirus family based on nucleotide sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 7059-7062, 1989.
  - 19) Usuda S, Okamoto H, Iwanari H, et al.: Serological detection of hepatitis B virus genotypes by ELISA with monoclonal antibodies to type-specific epitopes in the preS2-region product. *J Virol Methods*, 80: 97-112, 1999.
  - 20) Miyakawa Y, Mizokami M: Classifying hepatitis B virus genotypes. *Intervirology*, 46: 329-338, 2003.
  - 21) Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al.: Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244: 359-362, 1989.
  - 22) Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, et al.: Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology*, 12: 671-675, 1990.
  - 23) Hoofnagle JH, Mullen KD, Jones DB, et al.: Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *N Engl J Med*, 315: 1575-1578, 1986.
  - 24) Hagiwara H, Hayashi N, Mita E, et al.: Detection of hepatitis C virus RNA in serum of patients with chronic hepatitis C treated with interferon-alpha. *Hepatology*, 15: 37-41, 1992.
  - 25) Cardoso AC, Mouchari R, Figueiredo-Mendes C, et al.: Impact of peginterferon and ribavirin therapy on hepatocellular carcinoma: incidence and survival in hepatitis C patients with advanced fibrosis. *J Hepatol*, 52: 652-657, 2010.
  - 26) Ikeda K, Saitoh S, Arase Y, et al.: Effect of interferon therapy on hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic hepatitis type C: a long-term observation study of 1,643 patients using statistical bias correction with proportional hazard analysis. *Hepatology*, 29: 1124-1130, 1999.
  - 27) Kasahara A, Hayashi N, Mochizuki K, et al.: Risk factors for hepatocellular carcinoma and its incidence after interferon treatment in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 27: 1394-1402, 1998.
  - 28) Yoshida H, Shiratori Y, Moriyama M, et al.: Interferon therapy reduces the risk for hepatocellular carcinoma: national surveillance program of cirrhotic and noncirrhotic patients with chronic hepatitis C in Japan. IHIT Study Group. Inhibition of Hepatocarcinogenesis by Interferon Therapy. *Ann Intern Med*, 131: 174-181, 1999.
  - 29) 後藤秀子, 八橋 弘, 藤野達也 ほか: 新しい組み換え抗原 (C50) を用いたHCV抗体検出試薬イムチェック・F-HCV C50 Abの検討. *医学と薬学*, 40: 747-752, 1998.
  - 30) 藤野達也, 矢野右人: 慢性肝疾患とウイルスマーカー検査. *検査と技術*, 27: 1195-1200, 1999.
  - 31) 藤野達也, 八橋 弘, 浜田るみこ ほか: アンプリコアHCVによるHCV-RNA測定の臨床的意義. *医学と薬学*, 35: 223-228, 1996.
  - 32) Simmonds P, McOmish F, Yap PL, et al.: Sequence variability in the 5' non-coding of hepatitis C virus: identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. *J Gen Virol*, 74: 661-668, 1993.
  - 33) 矢野右人, 八橋 弘, 猪口 薫 ほか: DNAプローブ法によるHCV-RNAの定量. *肝胆膵*, 25: 931-935, 1992.
  - 34) 中田敬一, 庄美 保, 木村智美: C型慢性肝炎におけるCOBAS AMPLICOR HCV MONITORキットによるHCV-RNA量測定の検討. *肝胆膵*, 39: 713-717, 1999.
  - 35) 坪田昭人, 荒瀬康司 ほか: 高HCV量C型慢性肝炎に対応した高濃度領域測定用アンプリコアHCVモニターv2.0 (ハイレンジ法) の検討. *肝臓*, 45: 223, 2004.
  - 36) 田原和子, 出口松夫, 中野 卓 ほか: C型肝炎ウイルス(HCV)-RNA量測定におけるコバスタqMan HCV「オート」の臨床的評価. *日本臨床検査自動化学会誌*, 32: 245-252, 2007.
  - 37) 中山 妙, 前田 豊, 鳩居敏彦: アキュジーンm-HCVによる高感度HCV-RNA定量法. *検査と技術*, 37: 456-459, 2009.
  - 38) 八橋 弘, 明時正志, 中村実可 ほか: 全自動生物化学発光免疫測定装置「BLEIA(R)-1200」専用試薬「BLEIA(R)栄研HCV抗原」の臨床性能評価. *医学と薬学*, 68: 157-167, 2012.
  - 39) 板倉 潤, 松田秀哉, 中田 徹 ほか: 新規HCVコア蛋白質測定法であるBLEIAのC型肝炎患者検体における検討. *肝臓*, 53: A683, 2012.
  - 40) 橋本 悟, 八橋 弘, 戸次鎮宗 ほか: 生物発光免疫測定法 (BLEIA法) による好感度HCVコア蛋白質測定試薬「BLEIA栄研HCV抗原」の性能評価. *肝臓*, 53: A683, 2012.
  - 41) Fujino T, Nakamura M, Aoyagi Y, et al.: Early dynamics of viremia in patients with genotype 1b chronic hepatitis C: Peg-IFN  $\alpha$  2a shows earlier viral decline than peg-IFN  $\alpha$  2b in combination therapy with ribavirin. *Med Sci Monit*, 17: CR687-691, 2011.
  - 42) 藤野達也, 朱鼎 宏, 八橋 弘 ほか: HCV-Core蛋白



- 定量キットの基礎的検討と臨床的有用性. 医学と薬学, 36: 1065-1070, 1996.
- 43) 藤野達也, 後藤和人, 有村英一郎 ほか: C型慢性肝炎に対するPEG-IFN  $\alpha$  2b + ribavirin併用療法における早期治療効果予測—血中HCV抗原によるモニタリング解析—. 肝臓, 47: 355-356, 2006.
- 44) Fujino T, Nakamuta M, Aoyagi Y, et al.: Early decline of the HCV core antigen can predict SVR in patients with HCV treated by Pegylated interferon plus ribavirin combination therapy. J Dig Dis, 10: 21-25, 2009.
- 45) 日本赤十字社血液事業本部医薬情報課: 「輸血療法の実施に関する指針」(改定版) および「血液製剤の使用指針」(改定版) 平成17年7月・11月一部改正対応版
- 46) 小原道法: NS4領域特異抗体によるHCVグループ分類 (genotype 1, 2) とIFN反応性. 日本臨牀, 52: 1728-1733, 1994.
- 47) 江畑美恵子 ほか: IFN療法の効果予測因子としてのHCV genotype. 日本臨牀, 53増刊号: 954-958, 1995.