肝臓内科レター 60

発行：飯塚病院肝臓内科　発行日：2020 年 1 月 10 日
TEL0948-22-3800　〒820-8505 福岡県飯塚市芳雄町 3-83　https://aih-net.com

「肝臓内科レター第 60 号」発行にあたって　　飯塚病院肝臓内科　部長　本村 健太

明けましておめでとうございます。先生方の益々のご健勝をお祈りしますともに、今年も何卒よろしくお願い申し上げます。今月は「C 型肝炎ウイルス HCV の発見・同定」です。

＜「輸血後肝炎」＞

日本では GOT/GPT（AST/ALT）が、1962～1963 年頃から普通に測定されるようになり、それまでは黄疸が出なければ診断されなかった輸血後肝炎が、実は非常に多いことがわかって社会問題になりました。厚生省に血清肝炎研究班（片山透班長）が出来て、まず輸血後肝炎の診断基準を提唱し、この基準に基づいてたんねんな調査が行われました。同時に行なわれた患者血清の収集・保存が、後に大きな役割を果たすことになりました（蛋白質 核酸 酵素 35;2007-2127:1990）。調査の結果、輸血後肝炎の頻度は、なんと約 50%もあったのですが、売血制度が問題であることは調査以前から指摘されており、1964 年から移行期間を経て売血から献血になった後に約 20%まで低下しました（日本輸血学会雑誌 43;335-342:1997）。

輸血後非A非B肝炎の診断基準
（日本消化器病学会1985年）

①輸血前に肝障害がなく、輸血後2週以後にS-GPT値が正常上限を超えて持続し上限値の倍を超えるものを輸血後非A非B肝炎と診断する。

②上記の条件を満たさない場合でも、輸血後S-GPT値が続けて2回以上続くものは疑診例とする。

③術後の肝機能異常、薬剤起因性肝障害、原疾患に起因するS-GPT値の上昇例、肝炎症状を呈する既知のウイルス疾患などを除外する。

蛋白質 核酸 酵素35: 2007-2127, 1990
において引用された表をもとに改変

さらに B 型肝炎ウイルスの発見後、日本では、1972 年には世界でもいち早く、輸血用血液のスクリーニングとしての HBs 抗原検査が開始されました。これによって輸血後肝炎は解決すると考えられていましたが、予想に反して輸血後肝炎は半分にしか減らず、HBV 持続感染者と同数くらいの別の肝炎ウイルスが存在することが明らかになりました。

同様に、米国でも B 型肝炎発見後の輸血後肝炎が問題となっていました。大河内一雄と同時期にオーストラリア抗原と肝炎の関連を報告した Alfred Prince（ニューヨーク血液センター）は、1974 年には A 型、B 型いずれも陰性の輸血後肝炎を報告し「C 型肝炎」という用語を初めて使用しています（Lancet 2;241-6:1974）。Blumberg とともにオーストラリア抗原を発見した Harvey Alter 博士は、一旦臨床を経てから NIH（アメリカ国立衛生研究所）に戻って輸血後肝炎の研究を続けていました。彼は 1975 年に、輸血後肝炎患者 12 人のうち B 型肝炎だったのは 4 人で、他は A 型肝炎（ごく稀に輸血後肝炎の原因になる）、EBV、CMV のいずれでもなく、未知の肝炎ウイルスが原因と考えられるとして、共同研究者の Robert Purcell 博士らと「非 A 非 B 肝炎」を提唱しました（NEJM 292;767-70:1975）。そのうえで、「非 A 非 B 肝炎」患者の血清と、肝炎の原因となった 1 人の供血者の血清をそれぞれチンパンジーに接種するといずれも肝炎が起きた事を報告しました（Lancet 1;459-63:1978）。これで「非 A 非 B 肝炎」の存在が証明され、ここからこのウイルスを特定する研究が始まりました。

＜C 型肝炎ウイルス HCV の発見＞

非 A 非 B 肝炎ウイルスの同定の試みは世界中で無数に行われましたが、血中のウイルス粒子の数が微量であったため、既に知られたウイルスの分離・培養・同定の方法－例えば感染する細胞で培養・増殖して分離（麻疹など）、抗原抗体反応を利用する免疫電顕（B 型、A 型、D 型肝炎ウイルス）－などがいずれも通用しませんでした。

このような中で、米国では前述の NIH 以外にも、CDC（アメリカ疾病予防管理センター）の Daniel Bradley 博士がチンパンジーの非常にていねいな感染実験を地道に行って、キャリアのチンパンジー血液の感染性が証明されている分画（血漿や血清）を保持しており、いろいろなサイズのフィルターを通した検体での感染実験などから、非 A 非 B ウイルスは小型のエンベロープを持つフラビウイルスやトガウイルスの近縁のものだろうと予測されていました（J Virol Methods 10;307-319:1985、埼玉医科大学雑誌 30;74-79:2003)。

そして、ウイルスを同定することになるカイロン社（バイオ医薬品会社ー後にノバルティスにより買収合併）の Michael Houghton 博士の研究チームは、この Bradley 博士からチンパンジーの血液や肝組織のサンプルを供給されていました。

彼らはウイルス本体を発見する事は狙わず、ウイルスの遺伝子を釣り上げる方がうまくいくと考え、開発されて間もない immunoscreening 法という手法を採用しました。

C型肝炎ウイルスの遺伝子断片を特定した方法

① 極めて感染力が強いことからウイルス量が多いと想定されたチンパンジーの血漿を超遠心して核酸（DNAとRNA）を分離する。

② この核酸（宿主のDNAと、RNAかDNAか不明のウイルスの核酸が混じっているはず）を逆転写酵素（DNA→DNAもRNA→DNAの転写もできる）を使用して全てDNAにする（このDNAをcDNAと言います）。

③ cDNAを決まった配列の部位で切断する酵素（Eco RI）で断片化する。

④ cDNA断片を、大腸菌に感染するλgt11ファージというウイルスの遺伝子に組み込んで（このためにEco RIで切断しておく必要がある）ベクター（cDNA断片の運び屋）を作る。

⑤ このλgt11ファージを感染させて大腸菌の遺伝子にcDNAを組み込ませる（大腸菌は組み込まれたcDNAの蛋白を作る）。

⑤ ニトロセルロースの膜の上に大腸菌を蒔いて培養し、これに非A非B肝炎患者の血清をかけて、抗体がついたプラークを選んでcDNAを調べる。

蛋白質 核酸 酵素35:45-55、 Science 244: 359-362, 1989を参考に作成

そして、左表の手順を繰り返すことで、ついに 155 塩基対の短い cDNA を釣り上げることに成功しました。抗原抗体反応を利用していますが、抗体の標的はウイルス粒子ではなく、分子生物学的手法で大腸菌に作らせた無数の遺伝子産物の中に含まれているはずの、抗体に反応する非 A 非 B ウイルスの蛋白であることがポイントです。

後日、NIH の Harvey Alter 博士は、ある総説の中で、「この 1 つの cDNA クローンを得るまでに、1981 年から 1986 年の間に、陰性の結果が 600 万あったという小話がある」と述べています(Trans Am Clin Climatol Assoc. 130;104-118:2019)。そのような確率の宝探しを良くも続けたものだと感心しますが、Houghton 博士たちは、やはり RNA ウイルスである D 型肝炎ウイルス HDV で同様の実験を行っており、このやり方でうまくいくことについての確信があったようです(J Hepatol 51;939-948:2009)。そして、釣り上げた虎の子の cDNA を足がかりに、前後の DNA 配列を調べていく遺伝子ウォーキングという方法で HCV-RNA の配列が突き止められました(Science 244;359-362:1989)。Bradley 博士の予測どおり、1 本鎖 RNA の遺伝子を持つフラビウイルス科のウイルスだったのです。

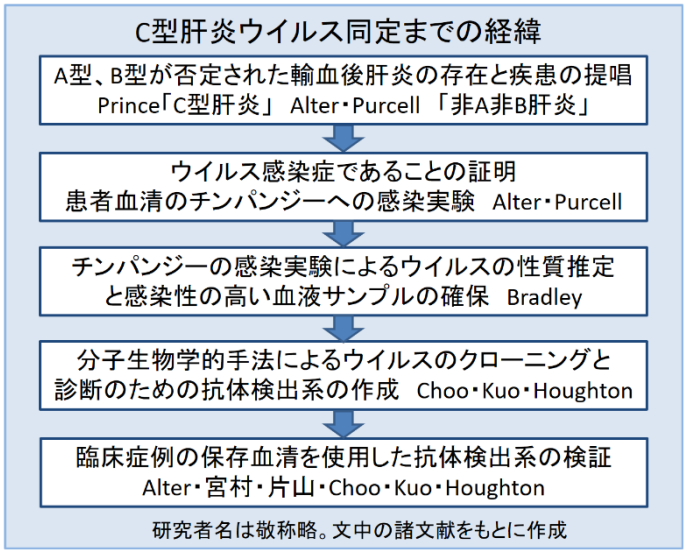
最初に釣れた配列を含む cDNA 断片から C100 抗原というタンパクを酵母で大量に作り、これを用いた第一世代抗 HCV 抗体のアッセイが作られました。この C100 抗原は日本の 36 人を含む非 A 非 B 肝炎患者の血清を用いて、その多くで抗体が検出されることが確認されました(Science 244;362-364:1989)。

その後すぐに、この抗体検出検査法は、Alter 博士保有の感染性が確認された患者血清「Alter パネル」と、日本の厚生省研究班（片山班）が収集した輸血後肝炎患者および供血者の血清を使用して検証されました（NEJM 321;1494-1400:1990、PNAS 87;983-987:1990、Transfusion 30;374-376:1990)。

＜C 型肝炎ウイルス HCV の発見とノーベル賞＞

米国には、ノーベル医学・生理学賞への登竜門と言われるラスカー賞があり、C 型肝炎の存在を示した Alter 博士と、ウイルスを同定した Houghton 博士は 2000 年に同賞を受賞しています。B 型肝炎の場合、オーストラリア抗原発見から Blumberg のノーベル賞受賞までの期間は 13 年でしたが、同様に間違いなくノーベル賞に値する成果である C 型肝炎に関しては随分と長い時間がかかっています。

理由について考えてみると、第一にC型肝炎ウイルスの同定は、カイロン社の営利目的の研究であったことが挙げられます。一例をあげると、今回大いに参考にさせていただいた総説の中では、「(前略) 全塩基配列の7割、約7kbがヨーロッパ特許の公開（特許出願後1年）という、必ずしも科学的ではない形で情報が流れ、一部では他の研究者がこの特許番号を引用文献として論文を発表するという、学術上理想的とはいえない展開となっている」と述べられています（蛋白質 核酸 酵素 35;2007-2127:1990)。



他の理由としては、チンパンジーの感染実験でHoughton博士らの研究の基を作っていたBradley博士が後にカイロン社を提訴したことや、ラスカー賞と同様にノーベル賞受賞の前触れと言われる賞のCanada Gairdner International Award（賞金10万ドル）のHoughton博士への授与が決まった際に、彼が共同研究者（Qui-Lim Choo博士とGeorge Kuo博士）が同時に選ばれていないことを理由に受賞を辞退した（Wikipedia「Michael Houghton」）ことも影響しているのかもしれません。

Alter博士の研究がなければBradley博士の研究がなく、Bradley博士の研究がなければHoughton博士と仲間の研究もなく、Houghton博士のチームだけがHCVの同定というゴールにたどり着いたということなのですが、ノーベル賞の共同受賞は3人までというルールも影響しているのかもしれません。

次回はC型肝炎の治療の主役だった「インターフェロン」について述べたいと思います。

	月	火	水	木	金
本村　健太		○/●	○/●	●	
矢田　雅佳		○/●		○/●	○/●
宮﨑　将之	○/●		●		●
田中　紘介		●	○/●	●	
森田　祐輔	●				○/●（10:30～)
増本　陽秀	●				●

❒外来スケジュール　　受付時間（○初診・●再診）　8:00～11:30