

山梨県で献血された輸血用血液中の GBV-C/HGV (G型肝炎ウイルス) 遺伝子の検出

町田篤彦 荻野絹代 鈴木典子*¹ 伊藤直文*¹ 赤羽賢浩*²

Detection of GBV-C/HGV Genome RNA in Blood for Transfusion in Yamanashi Prefecture

Atsuhiko MACHIDA, Kinuyo OGINO, Noriko SUZUKI,
Naohumi ITOH and Yoshihiro AKAHANE

輸血は現代でもこれに代わるものがない必須治療法である。輸血によって感染する肝炎の原因がウイルスであることが分かったのは1960年代後半から1970年にかけてであった。このウイルスをB型肝炎ウイルスと名付け、このウイルスを含む血液を介して感染する肝炎をB型肝炎と呼んだ。しかしB型肝炎ウイルスを含む血液を排除しても、輸血により起こる肝炎の頻度は期待どおりには下がらなかった。そこで他のウイルスの存在が考えられ長年世界中の研究者達をそのウイルス発見の競争に駆り立てたが、遂に1989年カイロン社の研究者達が免疫分子生物学の手法を駆使してC型肝炎ウイルスを発見した¹⁾。このウイルスによる肝炎はC型肝炎と呼ばれている。B型、C型肝炎ウイルスを含む血液を輸血用血液から除外することによって輸血後肝炎は激減したが皆無にはならなかった。経口感染するA型、E型肝炎ウイルスおよび非経口感染するB型、C型、D型肝炎ウイルスのいずれとも無関係で、しかも非ウイルス性の病因为が考え難い急性、慢性肝炎の存在が次第に明らかになってきており、これらは総括的に非A-E肝炎と呼ばれている。

1995年にアボット社の研究者達がタマリンで継代したGBウイルス(GBは外科医GBの急性肝炎黄疸期の血清がタマリンに肝障害をもたらしたことに因んでいる)接種源からA、Bと名付けた2種のGBウイルスを単離しその核酸の全塩基配列を決定した^{2,3)}。さらにこれらと近縁でヒトに感染するウイルスをアフリカ献血者の血清中に高頻度に発見してC(GBV-C)と命名した^{4,5)}。時を同じくしてGenelabsのグループは、非A-E肝炎患者の血清からウイルスを単離しその核酸の全塩基配列を決定した⁶⁾。このウイルスはG型肝炎ウイルス(HGV)と名付けられたが、のちにGBV-Cと同一物であることが明らかとなりGBV-C/HGVと表記されるに至った。

このウイルスは輸血と、違法な薬剤静注によって効率的に伝播されることが明らかにされているが本当に肝炎ウイルスか否かは未だはっきりはされていない。しかし非A-E肝炎にしばしば絡んでいるのは確かである。

そこで今回は、山梨県赤十字血液センターに献血された血液のうち輸血用血液として選択されたものの中にどのくらいの頻度でGBV-C/HGVが存在するのかをこのウイルスの遺伝子RNAを検出することによって調べたのでその結果を報告する。

材料と方法

1. 被検血清およびプラズマ

1996年5月から1996年12月の間に山梨県赤十字血液センターに献血された血液のうち、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全(エイズ)ウイルスを含む可能性のあるもの、およびALT値が正常値より高いものを除いたいわゆる輸血用血液のパイロット血清あるいはプラズマの一部を検体として用いた。年齢別、性別に分けた時、各々の検体数がほぼ同じになるように無作為に選択した。検体は-80℃に保存した。

2. RT-PCR(逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応)によるGBV-C/HGV RNA 遺伝子の検出⁷⁾

100 μ lの被検血清あるいはプラズマ中からグアニジンイソチオシアネートを含む抽出試薬(Isogen-LS, 日本ジーン)を用いて全RNAを抽出し、ジエチルピロカーボネートで処理した蒸留水5.3 μ lで溶かした。それを70℃で1分加熱し氷上で急冷後、リコンビナント逆転写酵素(Superscript II, GIBCO BRL)および5'-CCTATTGGTCAAGAGACAT-3'の配列のantisense primer(G75)を用いてcDNAを合成した。逆転写されたcDNAを95℃で15分加熱し、sense primer G58(5'-CAGGGTTGGTAGGTCGTAAATCC-3')とprimer G75とで

* 1 : 山梨県赤十字血液センター

* 2 : 山梨医科大学

以下の条件で1次PCRを行なった。94°Cで30秒、55°Cで30秒、72°Cで60秒を1サイクルとして35サイクル行い最後に72°Cで8分行った。1次PCRで増幅した産物(242bp)の1/10量を、5'-GGGTCAICYTGGTAGCCACTATAGG-3'(Y=C or T)の配列のprimer G134(sense)と5'-AAGAGAGACATTGWAGGCGACGT-3'(W=A or T)の配列のprimer G131(antisense)を用いたnested-2次PCRを1次PCRと同じ条件で25サイクル行い208bpのフラグメントを増幅した。用いた全てのprimerはGBV-C/HCV遺伝子の5'-非翻訳領域の保存領域の塩基配列に基いて合成した。PCR増幅産物をアガロースゲル電気泳動で分画した後エチジウムブロマイドで染色して、紫外線ランプにより208bpのバンドの存否を調べた。

結果と考察

1. 年齢別、性別からみた輸血用血液中のGBV-C/HGV(G型肝炎ウイルス)陽性頻度

表1に献血可能年齢および性別についてGBV-C/HGV遺伝子RNAを調べた検体数と遺伝子が検出された陽性検体数を示した。この結果から陽性検体がある特定の年齢層に多いとかC型肝炎の様に年齢が高くなるに連れて多くなるといった傾向は見られなかった。

山梨県における輸血用血液のGBV-C/HGV(G型肝炎ウイルス)陽性率は0.5%(5/1,000)であった。献血者全体でのGBV-C/HGV陽性率は我が国では0.8~1.0%であることが報告されているが^{8,9)}B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全(エイズ)ウイルスに汚染されている可能性のある血液は排除されている輸血用血液での報告は見られない。GBV-C/HGVはHCV(C型肝炎ウイルス)との混合感染がC型肝炎の慢性肝疾患にも10%程度みられることから、今回山梨県について得られた成績は報告されている陽性率とほぼ同じと考えられる。

2. 献血輸血用血液中のGBV-C/HGV(G型肝炎ウイルス)遺伝子陽性例

輸血用血液1,000検体についてGBV-C/HGV遺伝子RNAを調べた結果、陽性となった検体についての年齢、性、ALT値を表2に示した。上記したように、陽性例と年齢、性、ALT値との関連性は認められなかった。またALT値(正常値7~45IU/l)が高い献血血液は未知の肝炎ウイルスに汚染されている可能性が高いので輸血用血液から除外されているため今回陽性であった検体のALT値は全て正常値であった。この成績はGBV-C/HGV感染が必ずしもALT値の上昇を伴わないことを示しており、G型肝炎の病原性を考える上で示唆に富む

表1 輸血用血液中のG型肝炎ウイルス遺伝子の検出

年齢	性別	検体数	遺伝子陽性検体数
16-19	男	101	0
	女	104	1
20-29	男	101	0
	女	95	1
30-39	男	99	1
	女	103	0
40-49	男	103	1
	女	97	0
50-59	男	88	0
	女	85	0
60-65	男	11	1
	女	13	0
計		1,000	5

表2 輸血用血液のG型肝炎ウイルス遺伝子陽性例

年齢	性別	ALT
61	男	33
52	男	10
16	女	8
21	女	10
41	男	15

ものであろう。

輸血用血液のGBV-C/HGVのスクリーニングも急務であるが未だ有効な血清学的診断法が得られていない。抗E2抗体(ウイルスの表面蛋白質の1種に対する抗体)だけは測定可能であるが、これは感染終結を意味しているだけでウイルス血症の指標にはならない。コア蛋白質に対する抗体が測れるようになればその力価がウイルス増殖に比例するので簡便なウイルス血症の指標となるであろう。

G型肝炎ウイルスがどこで増殖しているのか依然として不明である。このウイルスがはたして肝炎ウイルスか否か、また臨床的に意味があるのかどうかについては今後の研究の進展が待たれる。

謝 辞

稿をおわるにあたり、PCRに用いたprimerを恵与くださり、またご指導頂きました自治医科大学の眞弓忠博士ならびに岡本宏明博士に深謝致します。

