

論 文 内 容 要 旨

Construction of an anti-hepatitis B virus preS1 antibody and usefulness of preS1 measurement for chronic hepatitis B patients

(抗B型肝炎ウイルス preS1 抗体の構築と B型肝炎患者における preS1 測定の有用性)

Journal of Infection, 2021, in press.

主指導教員：田中 信治 教授

(広島大学病院 内視鏡医学)

副指導教員：伊藤 公訓 教授

(広島大学病院 総合診療医学)

副指導教員：相方 浩 准教授

(医系科学研究科 消化器・代謝内科学)

鳩岡 晴奈

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【序論】 B型肝炎ウイルス (HBV) の持続感染は、慢性肝炎、肝硬変、および肝癌を引き起こす。HBV エンベロープは、large、middle、および small HB surface proteins (それぞれ LHBs, MHBs, SHBs) の3つの表面タンパク質から成り、preS1 領域は LHBs のみに含まれている。PreS1 は HBV の受容体への結合に重要でありウイルス感染に不可欠である。また、LHBs は環状 DNA (cccDNA) の複製にも関与しており LHBs は HBV の感染と複製に重要な働きをしていると考えられている。HBV 感染患者の多くは HBe セロコンバージョン後ウイルスの増殖力が低く肝炎を生じない不活性キャリア (IC) となるが、一部では、ウイルス増殖が持続し、B 型慢性肝炎 (CHB) の状態となる。IC 状態の患者の中から CHB への進展を予測することが重要であるが、その予測因子は確立されていない。本研究では、preS1 に特異的に結合するモノクローナル抗体を構築し、血清 preS1 抗原レベルを測定するための ELISA システムを開発した。この ELISA システムを使用して HBV 感染者の preS1 を測定し、preS1 と HBV の臨床経過との関係を分析した。

【方法】 PreS1 配列の一部をマウスに免疫し、マウス腸骨リンパ節法により抗体産生ハイブリドーマを作成した。得られた抗体 8 種類について、preS1 ペプチドへの結合能、HBV への結合能、血清への非特異的結合の有無により、preS1 測定に最適な抗体を選定した。この抗体に対しエピトープマッピングにより結合部位を調べた。選定したモノクローナル抗体を用いて ELISA による preS1 抗原検出系を構築し、未治療の HBV 患者 200 例、HBV 既感染者 25 例、HBV 未感染者 55 例の血清の preS1 抗原量を測定し臨床的特徴を分析した。

【結果】 PreS1 の領域 1 (21-36 aa) に対して 1 種類、領域 2 (31-40 aa) に対し 1 種類、領域 3 (37-48 aa) に対し 6 種類、計 8 種類の抗体が得られた。各抗体の相補性決定領域を求めたところ、領域 3 の抗体は互いに相同性が高かった。PreS1 ペプチドに対する反応性は、領域 3 に反応する抗体が最も高く、6 種類の抗体の反応性は同程度であった。血清存在下における抗体の特異性を確認したところいずれの抗体も血清成分との非特異的な反応は殆ど起きなかった。また、HBV 感染者血清中の preS1 検出能も領域 3 に対応する抗体で高かった。エピトープマッピングにより、SNNPDWDFNP (aa 38-47) が抗体のエピトープとみられた。領域 3 の 6 つの抗体はエピトープも同様であり最も収量の多かった抗体を後の実験に用いた。次に、市販の HBs 抗体を固相化抗体とし HRP 標識した preS1 抗体を検出抗体としたサンドイッチ ELISA 法による preS1 検出系を構築した。この ELISA により血清 preS1 を測定したところ、B 型肝炎患者、既感染者、健常者での中央値はそれぞれ 2.82、1.13、1.10 log pg/mL であった。PreS1 は既存の HBV マーカーである HBsAg, HBeAg, HBV DNA, HBcrAg と相関した(いずれも $p < 0.0001$)。次に HBeAg 陰性者について、HBV DNA 3.3 log IU/mL および ALT 30 U/L を cut off 値として 4 群に分類し、ウイルスマーカーと抗ウイルス療法適応となる予後の関係を調べた。HBV DNA または ALT が低値の患者において、3 年後に同状態を維持した群と、病態が進行し ALT および HBV DNA が高値に増悪した群を比較すると、HBsAg, HBcrAg は同等であったが preS1 は後者で有意に高値であった ($p = 0.0068$)

【考察】 PreS1 は HBsAg, HBeAg, HBV DNA と相関することが報告されているが、本研究で

はさらに HBcrAg の相関も認めた。HBcrAg は肝内 cccDNA プールの量を推定する血清マーカーであり、preS1 と HBcrAg の相関は LHB が cccDNA の増加に重要な役割を果たすことを示唆した既報と合致していた。IC と CHB の判別において、Pfefferkorn らは HBsAg>1000 IU/mL の CHB 患者において、LHBs および MHBs は HBsAg より有用なマーカーであったと報告した。本研究では HBeAg 陰性 HBV 感染者において、3 年後に病態が進行し抗ウイルス治療介入を予測する因子として preS1 が有用であった。

【結論】 HBV 抗 preS1 抗体を作成し、ELISA による血清 preS1 測定系を構築した。PreS1 は HBeAg 陰性慢性 HBV 感染者において抗ウイルス治療介入を予測する理想的な因子となりうる。