

B型肝炎ウイルスコア抗原測定系・コア関連抗原測定系の 開発およびDNA欠損粒子中プレコアタンパクの同定

学位論文内容の要旨

Hepatitis B virus (HBV) 感染の診断には、HBV DNAの定量的測定がHBVの複製・病態の進行・および抗ウイルス剤治療効果の判定に最も重要なマーカーとして用いられてきている。HBV DNAの測定には、transcription-mediated amplification (TMA) 法や、polymerase chain reaction (PCR) 法を用いたものなどがあるが、これらの測定法は操作が比較的煩雑で高コストである。

そこで本研究では、HBV ウイルス量の簡便な定量法の開発を目的として、HBV コアタンパク (hepatitis B core antigen, HBcAg) 測定系を開発し、その臨床的有用性を検討した。

HBcAg 測定系は高感度、高再現性、良好な希釈直線性、広いダイナミックレンジを持つ優れた特性を示した。HBV DNAがおおよそ 1×10^5 copies/ml 以上の検体においてHBcAgを検出することができた。B型肝炎患者血清中HBcAg濃度はHBV DNA量と極めて高い相関性を示し、ウイルス量を示すマーカーとして有用であった。しかしながら、臨床現場ではより高い感度が要求される。

血中HBV ウイルス量の簡便かつ高感度な定量法の開発を目的として、HBV コア関連抗原 (hepatitis B core-related antigens, HBcrAg) 測定系を開発し、その臨床的有用性を検討した。

HBcrAg 測定系はHBeAg, HBcAgを含むプレコア/コアタンパクを同時に測定するenzyme immunoassay (EIA) である。この測定系は高感度、高再現性、良好な希釈直線性、広いダイナミックレンジを持つ優れた特性を示した。HBV DNAがおおよそ 1×10^3 copies/ml 以上の検体においてHBcrAgを検出ことができ、臨床的にHBcAg測定系の約100倍高感度であった。B型肝炎患者血清中HBcrAg濃度は、HBV DNA量と高い相関性を示し、ウイルス量を示すマーカーとして有用であった。

開発したHBcAg測定系、HBcrAg測定系を用い、HBV粒子中のプレコア/コアタンパクの解析を行った。

HBV陽性血漿をシヨ糖密度勾配遠心法にて分画し、HBcAg, HBcrAg濃度を測定したところ、完全ウイルス粒子よりわずかに低密度の分画に大量のHBcrAgが存在していた。この分画のHBcrAgはエンベロープタンパクであるhepatitis B surface antigen (HBsAg) に対する抗体 (Anti-HBs) で免疫沈降されることから、エンベロープに覆われた粒子であることが示唆された。電子顕微鏡で観察したところ、HBcrAgを多く含む分画からはHBV DNAを多く含む分画の約3倍のウイルス様粒子が存在した。ウエスタンブロットおよび質量分析の結果、このHBcrAgはN末端シグナルペプチドを含みC末端核酸結合ドメインを持たない22 kDaのHBVプレコアタンパク (p22cr) であることが明らかとなった。

これらの結果は、コアタンパクではなくプレコアタンパク p22cr がHBV DNAを含まないキャプシド様粒子を形成し、エンベロープに覆われ、empty particlesとして放出されていることを強く示唆している。

HBV empty particlesの存在は以前より知られていたが、そのコア粒子はコアタンパクで

できていると信じられてきたし、HBV DNA を含まない機構も明らかではなかった。本研究は、empty particles が核酸結合ドメイン有する HBcAg ではなく、それを持たないプレコアタンパク p22cr を含むことを示し、HBV DNA を含まない機構を説明し得るモデルを提供する。

学位論文審査の要旨

主査	教授	菊池	九二三
副査	教授	矢澤	道生
副査	教授	坂口	和靖
副査	教授	及川	英秋
副査	教授	畠山	昌則

学位論文題名

B型肝炎ウイルスコア抗原測定系・コア関連抗原測定系の 開発およびDNA欠損粒子中プレコアタンパクの同定

博士学位論文審査等の結果について（報告）

本研究は、B型肝炎ウイルスコア抗原測定系・コア関連抗原測定系を開発し、これを用いてDNA欠損粒子 (empty particles) 中プレコアタンパクの同定を行ったものである。以下の3点に要約される。

1. HBV コアタンパク (hepatitis B core antigen, HBcAg) 測定系は高感度、高再現性、良好な希釈直線性、広いダイナミックレンジを持つ優れた特性を示した。HBV DNA がおよそ 1×10^5 copies/ml 以上の検体においてHBcAgを検出することができた。B型肝炎患者血清中HBcAg濃度はHBV DNA量と極めて高い相関性を示し、ウイルス量を示すマーカーとして有用であった。しかしながら、臨床現場ではより高い感度が要求される。
2. そこで次に、血中HBVウイルス量の簡便かつ高感度な定量法の開発を目的として、HBV コア関連抗原 (hepatitis B core-related antigens, HBcrAg) 測定系を開発し、その臨床的有用性を検討した。HBcrAg 測定系はHBeAg, HBcAgを含むプレコア/コアタンパクを同時に測定する enzyme immunoassay (EIA) である。この測定系は高感度、高再現性、良好な希釈直線性、広いダイナミックレンジを持つ優れた特性を示した。HBV DNA がおよそ 1×10^3 copies/ml 以上の検体においてHBcrAgを検出することができ、臨床的にHBcAg測定系の約100倍高感度であった。B型

肝炎患者血清中 HBcAg 濃度は、HBV DNA 量と高い相関性を示し、ウイルス量を示すマーカーとして有用であった。

3. 開発した HBcAg 測定系と HBcrAg 測定系を用い、HBV 粒子中のプレコア/コアタンパクの解析を行った。HBV 陽性血漿をショ糖密度勾配遠心法にて分画し、HBcAg, HBcrAg 濃度を測定したところ、完全ウイルス粒子よりわずかに低密度の分画に大量の HBcrAg が存在していた。この分画の HBcrAg はエンベロープタンパクである hepatitis B surface antigen (HBsAg) に対する抗体 (Anti-HBs) で免疫沈降されることから、エンベロープに覆われた粒子であることが示唆された。電子顕微鏡で観察したところ、HBcrAg を多く含む分画からは HBV DNA を多く含む分画の約 3 倍のウイルス様粒子が存在した。ウエスタンブロットおよび質量分析の結果、この HBcrAg は N 末端シグナルペプチドを保持し C 末端核酸結合ドメインを持たない 22 kDa の HBV プレコアタンパク (p22cr) であることが明らかとなった。これらの結果は、コアタンパクではなくプレコアタンパク p22cr が HBV DNA を含まないキャプシド様粒子を形成し、エンベロープに覆われ、empty particles として放出されていることを強く示唆している。

これを要するに、著者は、B 型肝炎ウイルスコア抗原測定系・コア関連抗原測定系を開発し、これを用いて DNA 欠損粒子中プレコアタンパクの同定を行ない、empty particles が核酸結合ドメイン有する HBcAg ではなく、それを持たないプレコアタンパク p22cr を含むことを示し、HBV DNA を含まない機構を説明し得る新しい知見を加えた。

よって、著者は、北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格あるものと認める。