抗 HBs モノクローナル抗体の性状解析と HBs 抗原 サブタイピングへの応用の試み

吉田芳哉 古屋由美子 井上正保 松島章喜 小田和正

神奈川県衛生研究所ウイルス部

(受付: 昭和59年4月14日)

Characterization of Anti-HBs Antigen Monoclonal Antibodies and Application to the Subtyping

Yoshiya YOSHIDA, Yumiko FURUYA, Masayasu INOUE, Akiyoshi MATSUSHIMA
and Kazumasa ODA

Kanagawa Prefectural Public Health Laboratory

Several monoclonal antibodies were produced against purified HBs antigens, subtype adr adw and ayw. The subtype specificity of these nine antibodies was characterized by the passive hemagglutination inhibition method. The specificity of these anti-HBs monoclonal antibodies was analyzed with use of 31 HBs antigen panels. Five of the nine monoclonal antibodies had a specificity against the group a-determinant of HBs antigen. Two antibodies were demonstrated to have anti-r specificity and another two were anti-w.

One of these anti-a monoclonal antibodies, in its reaction pattern, resembled anti-a polyclonal antibody derived from human serum. This anti-a monoclonal antibody was used as the standard to determine HBs antigen subtyping. The results nearly agree perfectly with results obtained when anti-a polyclonal antibodies were used as the standard.

Using these monoclonal antibodies, we analysed HBs antigen subtypes of asymptomatic carriers. Although the antigen titer changed at various time in each person, the ratio of each subtype determinant was unchanged. However, three anti-a monoclonal antibodies showed a different reaction pattern against "a" determinant of individual carriers, and therefore "a" determinant of HBs antigen might be subdivided, and should be analyzed in more detail by monoclonal antibodies.

総 括

HBs 抗原 (サブタイプは adr, adw, ayw) に対するモノクローナル抗体が、いくつか得られた。そのうちの9種類について、抗原のサブタイプに対する特異性を赤血球凝集抑制法 (PHI) を使い解析した。これらのモノクローナル抗体の性状解析には、31種類の HBs 抗原パネルを用いて行った。その結果、9種類のうちの5株は共通抗原の "a" に対する抗体であることがわかった。また2株は "r" に対する抗体であり残りの2株は "w" に対するものであると判定できた。

これらの抗体の1つは、従来法のヒト由来抗 a 抗体の反応性と類似していた。この抗 a モノクローナル抗体を

標準として、実際の HBs 抗原のサブタイピングを行ったところ、従来法のそれと大きな相違は見られなかった。

HBs 抗原持続陽性者の経時的なサブタイプの変動を見たところ、抗原の力価の変動は見られたが、各モノクローナル抗体に対応する抗原の比率に変化は見られなかった。しかし、3種類の抗 a 抗体は、各個体で相違が見られたことから、モノクローナル抗体を使うことによって、共通抗原 "a" に関し、さらに詳細な抗原分類が可能であると考えられる。

序 文

B型肝炎 (以下 HB) ウイルスには、サブタイプのあ

ることが知られている。これはウイルスの表面 (HBs) 抗原の血清型によるもので、主として adr, adw, ayr および ayw の4つに型別されている。これらのサブタイプは、HB ウイルスの感染源、感染経路の追求や疫学調査、さらに民族学の研究などを進める上で重要な武器となっている。サブタイプの同定には、ゲル内沈降反応^{9,11)}が広く利用されているが、結果の判定に客観性を欠く上に、検出感度も低いなどの問題があることから、赤血球凝集抑制法 (PHI), ラジオイムノアッセイ¹²⁾やエンザイムイムノアッセイ等が、一部で使用されている。しかしながら、これらの方法にはゲル内沈降反応に比べ、より純度の高い型特異血清を必要とするため、広く一般に普及するまでに至っていない。

我々は、HBs 抗原に対するモノクローナル抗体を作製し、その特異性を PHI で解析すると共に、サブタイプ同定への応用を試みた。

材料と方法

HBs 抗原の精製; 赤十字血液センターより供与された HBs 抗原陽性血しょうを、各ロット別にサブタイプの同定をし、型別にプールした。これらの血しょうをアフィニティクロマトグラフィーで部分精製したのち Dreesman (1972) らの原法⁶⁾に準じ超遠心法にて精製 HBs 抗原を得た。

HBs 抗原パネル; WHO の標準抗原および当研究所で型別された各サブタイプの HBs の抗原合計31種類を使った。

HBs 抗原被覆 SRBC (以下PHA セル)の調製; 精製 HBs 抗原を、50 μ g/ml の濃度に PBS で希釈した。この抗原をグルタルアルデヒド固定タンニン酸処理 SRBC に混合し感作した。得られた PHA セルは、1 μ g/ml の HBs 抗原に対応する抗体によって凝集した。

赤血球凝集抑制法 (PHI); 凝集価2単位の抗体と階段希釈パネル抗原とを反応させた後、PHA セルを加え、各パネル抗原の凝集抑制価を測定した。

モノクローナル抗体の作製; 渡辺ら¹⁷⁾の方法に準じて次の方法で行った。BALB/c マウスに adr, adw, ayw の HBs 抗原をそれぞれ 200 μ g フロイント完全アジュバントと混合し腹腔内接種した。さらに4週間後、追加免疫として同量の抗原を静脈内に接種し、P3X63Ag8 U1 細胞と融合させた。抗体の検出には PHA 反応を用い、単一細胞クローニングには特製毛細管¹⁹⁾を使った。

成 績

1. モノクローナル抗体の性状

表 1 抗 HBs モノクローナル抗体の性状

Immunogen	Cell lines	Globulin Class	Subtype
adw	2H 1	IgG 1	anti-a
	7E 2	IgG 1	anti-w
adr	8E 5	IgG 1	anti-a
	8E11	IgG 1	anti-a
	5C 1	IgG 1	anti-r
	4G 5	IgG 1	anti-r
ayw	1A 2	IgM	anti-a
	5B 5	IgM	anti-a
	7A 1	IgG 1	anti-w

表1は、細胞融合により得られたモノクローナル抗体のうち PHI でサブタイプの決まった代表的な9種のモノクローナル抗体の特性を示したものである。9種のうち 5B5, 1A2, 8E5, 8E11 および 2H1 の各抗体は、PHI 全てのパネル抗原と反応したことから共通抗原の“a”決定基に対する抗体であると判定した。しかし、これら5種の抗体は、パネルとの反応性に微妙な差異を示すことから、各抗体を使ってパネル抗原の赤血球凝集抑制価を比較したところ、この抗 a 抗体は、さらに幾つかのグループに区別できることが明らかになった。すなわち 2H1 と 1A2 (図1) および 8E5 と 8E11 の各抗体を使った場合の赤血球凝集抑制価 (図2) をそれぞれ比較したのが図1と図2である。前者では、全く相関が見られなかったのに比し、後者では直線上に分布すること

図1 異った抗原決定基を認識していると思われるモノクローナル抗体による HBs 抗原サブタイプの比較

図2 同じ抗原決定基を認識していると思われるモノクローナル抗体による HBs 抗原サブタイプの比較

図3 モノクローナル抗体と抗 HBs ヒト抗体による HBs 抗原サブタイプの比較

図4 抗 r, 抗 w モノクローナル抗体による HBs 抗原のサブタイプの比較

がわかった。このようにして 5B5 と 1A2 も同じ抗体であることが確認された。

2. モノクローナル抗体のサブタイプ特異性

従来法によるサブタイプには、主にヒト由来の抗体を使用していたが、この抗体とモノクローナル抗体との関係を比較検討した結果、ヒト由来抗 a 抗体は、モノクローナル 2H1 抗体と高い類似性を示した(図3)。そこで 2H1 抗体を抗 a 抗体標準血清と定め、その他のモノクローナル抗体の反応性は、全て 2H1 の 2 凝集単位抗体と反応する 31 種の抗原パネルを PHI 価 32 倍になるように調整し、他の 4 種類の抗体の解析を行った。その結果、7E2 と 7A1 は、パネルの adr と ayw に反応したが、adr と ayr 抗原に反応性のないことがわかった。一方、4G5 と 5C1 抗体は、前のグループと対照的に adr, ayr 抗原と良く反応し、adw, ayw 抗原とは反応しなかった(図4)。また 7E2 と 7A1 および 4G5 と 5C1 は、それぞれ同じ抗原決定基を認識していることが示唆された。

3. HBs 抗原持続陽性者におけるサブタイプ

次に HBs 抗原持続陽性者のサブタイプについて検討を試みた。5 名の持続陽性者を対象に、各個人で 3—6 年の間に採血された検体についてサブタイプの同定を行った。供試したモノクローナル抗体は、2H1, 1A2, 8E5, 5C1 および 7E2 で、これらの抗体に対応する抗原決定基の量を算定した。その結果、持続陽性者の各個体ではそれぞれの抗原に対して経時変化のないことが確認された(図5)。また個体 O.M. では、対立関係にある 5C1 と 7E2 の両抗体に反応する抗原性のあることが観察された。

考 察

HBs 抗原に対するモノクローナル抗体の作製は、すでに幾つか報告⁵⁾⁷⁾¹⁰⁾¹⁵⁾¹⁶⁾されているが、その抗体を使い HBs 抗原サブタイプの解析を行った成績⁵⁾¹⁴⁾は少い。これは HBs 抗原のサブタイプが adr, adw, ayr, ayw の 4 種類だけではなく、さらに多くの亜型に分類できる可能性があることに関連するのかもしれない。その他従来のサブタイプはヒト由来の抗体³⁾¹¹⁾を中心に、家兎¹²⁾あるいはモルモット¹⁾⁸⁾産生の抗体を利用し、解析が進められてきたことも考慮する必要がある。

そこで我々は、得られた抗 a 抗体が従来法で広く利用されているヒト由来の抗体²⁾⁸⁾とどのような関係にあるかを重視し解析した。一般に共通抗原を“a”と規定しているが、その抗原性は複数であり、さらに ayw₁, ayw₂, ayw₃, ayw₄ などの型に分類¹⁸⁾されている。また最近、モノクローナル抗体を使い、複数の決定基の存在が示

図5 HBs 抗原持続陽性者におけるモノクローナル抗体の反応性の比較
各 HBs 抗原の力価は 2H1 抗体の反応性で32倍となるように調製した。

唆¹⁴⁾されており, このことは我々の得た抗 a モノクローナル抗体が3つに分類され, その反応性が免疫原として使ったサブタイプに影響を受けていることから推察できる。したがって現在のサブタイプがモノクローナル抗体を利用することで, さらに細分できるものと思われる。

HBs 抗原パネルと3種類の抗 a 抗体の反応性は図1のように, 1A2 と 2H1 ではほとんど共通性が見られなかった。この結果, Ionescu-matiu (1983) ら⁹⁾が合成ペプチドとモノクローナル抗体を使った実験で“a”抗原決定基を持ったペプチドがいくつかの抗 a モノクローナル抗体との反応性が異なるという報告と類似している。また彼らは, 抗 γ 抗体と考えられたモノクローナル抗体が adw 抗原とも反応することを観察しており, これは今回我々の得た抗 r 特異抗体 (5C1) と抗 w 特異抗体 (7E2) が相反する関係³⁾にありながら, 両者の抗体と反応できる抗原の存在 (図4) を認めたことと似ている。このような中間型の抗体また抗原について足立ら²⁾は, 新しいサブタイプを導入すべきであるとしているが, Courouce-pauty (1979) ら⁴⁾は, すでに従来法でこれらの型の存在を見いだしており, 重感染説を主張している。

次に, これらのモノクローナル抗体による HBs 抗原サブタイプの同定への応用が可能であるかを調べるため, 抗原持続陽性者のサブタイプの経時変化を解析した。抗原の力価をヒト由来抗体に近い 2H1 抗体で一定に調整し, 2H1 の反応性と相対的に表現してみた。そ

の結果, 各抗体に対応する抗原決定基は6年間にわたり量的に変化は認められていない。すなわち, 各モノクローナル抗体によって認識される抗原決定基は個人においては恒常性のあることが確かめられた。またモノクローナル抗体による adr と adw 抗原のサブタイプの同定は従来法とはほとんど一致し, モノクローナル抗体が同定に十分利用できることが明らかになった。そのなかで検体 O. M. は adr と adw の中間型の性質を示しており, 二重感染説を取ることも可能であるが, 我々は両方の抗体と反応できる抗原が存在し, 個体で増殖が行われていると考えている。Peterson (1982) ら¹³⁾は HBs 抗原のペプチドレベルの解析で adw と ayw のアミノ酸はわずか2個所で異なっていると述べており, もしも1個所の変化があるならば両者に反応する抗原の存在を支持するものである。

モノクローナル抗体による HBs 抗原のサブタイプピングは, より安定した抗体の供給を可能にし, さらに一般化が進むものと期待している。

文 献

- 1) Aach, R. D., Hacker, E. J. and Parker, C. W. (1973) Recognition of hepatitis B antigen determinants by a double label radioimmunoassay. *J. Immunol.* **111**: 381-388.
- 2) 足立英斎, 近藤哲也, 山下寛, 福田俊昭 (1982) 肝炎ウイルスに対するモノクローナル抗体 II 渡

- 辺武監修 ハイブリドーマ法とモノクローナル抗体：R&Dプランニング
- 3) Bancroft, W. H., Mundon, F. K., Russell, P. K. (1972) Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. *J. Immunol.* **109**: 842-848.
 - 4) Courouce-pauty, A.M., Drouet, J., Kleinknecht, D., (1979) Simultane occurrence in same serume of hepatitis B surface antigen and antibody to hepatitis B surface antigen of different subtype. *J. Immunol.* **140**: 975-978.
 - 5) Devid, J. S., Presnt, W., Martinis, J., Wands, R., Bartholomew, R., Desmont, W., Serrvier, E. D. (1982) Monoclonal antibodies in the detection of hepatitis infection. *Med. Lab. Sci* **38**: 341-348.
 - 6) Dreesman, G. R., Hollinre, F. B., McCombo, R. M., Melnic, J. L. (1972) Production of potent anti-Austraria antigen sera of high specificity and sensitivity in goats. *Infect. Immun.* **5**: 213-221.
 - 7) Goodall, A. H. (1981) Monoclonal antibodies in a solidphase radiometric rssay for HBsAg. *Med. Lab. Sci.* **38**: 349-358.
 - 8) Imai, M., Yamashita, Y., Miyakawa, Y., Mayumi, M. (1974) Hemagglutination inhibition assay of the common determinunts and subtype specificities of Austraria antigen. *Immunology* **27**: 871-878.
 - 9) Ionescu-matiu, J. L., Dreesman, G. R. (1983). Epitopes associated with a synthetic hepatitis B surface antigen peptide. *J. Immunol.* **130**: 1947-1952.
 - 10) Kennedy, R. C., Ionescu-matiu, I., Adlerstorthz, K., Henbel, R. D. Sanchel, Y., Dreesman, G. R. (1982) Characterization of anti-hepatitis B surface antigen monoclonal antibodies. *Intervirology* **19**: 176-180.
 - 11) Le Bouvier, G. L. (1971) The hepatogeneity of Australia antigen. *J. Infect. Dis.* **123**: 671-675.
 - 12) Miyakawa, Y., Imai, M., Mayumi, M. (1975) Application of the paired label radio antibody technique to detection and subtyping of hepatitis B surface antigen. *J. Immunol.* **114**: 1135-1137.
 - 13) Peterson, D. L., Nath, N., Gavilanes, F. (1982) Structure of hepatitis B surface antigen. *J. Biol. Chem.* **256**: 10414-10420.
 - 14) Peterson, D. L., Paul, D. A., Lam, J., Tribby, I. T. E., Achord, D. T. (1984) Antigenic structure of hepatitis B surface antigen: identification of the "d" subtype determinant by chemical modification and use of monoclonal antibodies. *J. Immunol.* **132**: 920-927.
 - 15) Shih, J. W. K., Cote, P. J., Dapotite, G. M., Gerin, J. L. (1980) Production of monoclonal antibodies against hepatitis B surface antigen by somatic cell hybrids. *J. Virol. Meth.* **1**: 257-273.
 - 16) Wans, J. R., Zurawski, V. R. Jr. (1981) High affinity monoclonal antibodies to hepatitis B surface antigen (HBsAg) produced by somatic cell hybrids. *Gastroenterology.* **80**: 225-232.
 - 17) 渡辺武, 木本雅夫, 円山誓信 (1978) ポリエチレングリコールを用いた細胞融合法：免疫実験操作法Ⅶ 日本免疫学会編
 - 18) World health organization; (1977) *Teck. Rep. Ser. No. 602.*
 - 19) 井上正保, 古屋由美子, 吉原なみ子, 田中繁, 矢野間俊介, 高田満 (1982) B型肝炎ウイルス抗体：臨床免疫. **13**: 929-936.