

## HBワクチン及び慢性B型肝炎患者血清中のHBs抗体に 対する抗イディオタイプ抗体

著者	小林 光樹
号	2213
発行年	1990
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/20439">http://hdl.handle.net/10097/20439</a>

氏名(本籍) 小 林 光 樹

学位の種類 医 学 博 士

学位記番号 医 第 2213 号

学位授与年月日 平 成 2 年 2 月 28 日

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

最終学歴 昭 和 56 年 3 月  
東北大学医学部医学科卒業

学位論文題目 HBワクチン及び慢性B型肝炎患者血清中のHBs抗体  
に対する抗イディオタイプ抗体

(主 査)  
論文審査委員 教授 豊 田 隆 謙 教授 今 野 多 助  
教授 菅 村 和 夫

## 論 文 内 容 要 旨

ヒト血清中より分離・精製されたHBs抗原 (24  $\mu$ g) をAdjuvantと共にBalb/cに免疫し4週後に良好なHBs抗体反応 (PHAで2の11管) を得た。追加免疫3日後に脾細胞を分離しMyeloma細胞 (P3-U1) との間でポリエチレングリコール (PEG) 4000を用いて細胞融合を行った。HAT培地での選択後限界希釈を繰り返してHBs抗体を産生するHybridoma13株を樹立した。このうち3種類 (8/6G9,  $\gamma_1\kappa$ , 9/4C6,  $\gamma_1\kappa$ , 9/3D4,  $\mu$ ,  $\kappa$ ) を無血清培地で培養後その上清より硫酸アンモニウムを用いて部分的に精製した。HBs抗原に対する特異性についてはELISA法による希釈曲線及び結合阻害試験, Ouchterlony法, 免疫組織化学的な肝組織HBs抗原染色により検討した。Western blot法及び2種類のHBs抗原サブタイプ (Adr及びAdw) による結合阻害試験を行った。これらの実験結果より8/6G9, 9/4C6, 9/3D4は各々HBs抗原の主要抗原決定部位を認識していると考えられた。次に8/6G9をHorse raddish peroxidase (HRPO) で標識しヒト血清中のHBs抗体に対する抗イディオタイプ抗体を測定した。抗イディオタイプ抗体の測定にはELISA法を用いた。すなわちイムロンIIプレートにヤギ抗ヒトIgG (10  $\mu$ g/ml), IgM (5  $\mu$ g/ml) を結合させ, 1%牛血清アルブミンで余剰結合部位を飽和した後に, 免疫複合体を除去するためにPEG6000で予め処理した血清を各ウェルに分注し, HRPO標識8/6G9で抗イディオタイプ抗体を検出した。このELISA法では血清中に存在するリウマチ因子, HBs抗原とHBs抗体の免疫複合体などが陽性の結果を与える可能性があるため, リウマチ因子についてはRPDA法によりチェックしリウマチ因子が陽性の検体は除外した。また前述のように, PEG6000を用いた方法により免疫複合体を除去して測定を行った。さらに抗イディオタイプ抗体のHBs抗体に対する特異性は陽性コントロールの希釈試験とヤギHBs抗体による結合阻害試験を行って確認した。IgG型は10~160倍, IgM型は10~80倍の希釈倍率の間でOD492nmが直線的に変化し, さらにこの反応がヤギHBs抗体により阻害されることから, この結合はHBs抗体に対する抗イディオタイプ抗体に特異的であると考えられた。そこでHBs抗原及びHBs抗体ともに陰性の健常者10例の血清を測定し, 磷酸緩衝液のOD492nmとの間に統計学的有意差がないことを確認し, この健常者血清を陰性コントロールとして抗イディオタイプ抗体の判定を行った。疾患対照としてHBs抗原及びHBs抗体共に陰性の肝疾患患者19例 (非A非B肝炎13例, 自己免疫型肝炎3例, 原発性胆汁性肝硬変2例, アルコール性肝疾患1例) より得られた血清について検討を行ったが, 全例IgG型, IgM型共に健常者血清との間には差は見られず抗イディオタイプ抗体は陰性であり, 陰性コントロールの設定は適切と考えられた。そこでHBs抗原キャリアー及びB型慢性肝疾患患者血清について検討を行った。対象は72例で男性50例, 女性22例で, 無症候性HBs

抗原キャリアー6例、慢性肝炎59例、肝硬変症7例であり、検査した72例のうち10例（13.9%）に抗イデオタイプ抗体が検出された。この抗イデオタイプ抗体の陽性群と陰性群の間では肝組織学的診断や血清トランスアミナーゼ値には有意差は見られず、抗イデオタイプ抗体の出現は肝臓の炎症の程度とは相関がないと考えられた。その陽性率はHBe抗原/HBe抗体系とは有意の相関はなかったが、HBV特異的DNAポリメラーゼ活性との相関ではポリメラーゼ活性高値群で有意に陽性率が高かった。また抗イデオタイプ抗体陽性群では血清中のHBs抗原価が2の12.8管と、陰性群の2の8.5管と比較して有意に高い結果であった。これらの結果から抗イデオタイプ抗体陽性の例ではB型肝炎ウイルスの増殖が陰性例よりも活発であることが示唆された。次にHBワクチン接種者44例（男性33例、女性11例、平均22.6才）について検討した。最終接種1ヶ月後のHBs抗体獲得率は85.7%で良好な抗体反応が見られ、従来の報告とほぼ同様であった。ワクチン接種前の血清で抗イデオタイプ抗体の陽性例が見られた（24.2%）。接種前に抗イデオタイプ抗体が陽性の例は陰性例に比較してワクチン接種後のHBs抗体の獲得率及び獲得したHBs抗体の抗体価が有意に低い結果であった。従って末梢血中に見られた抗イデオタイプ抗体はHBs抗体の産生に抑制的に働いている可能性が示唆された。

## 審査結果の要旨

本論文はB型肝炎ウイルス（HBウイルス）の表面抗原（HBs抗原）に対するマウスモノクローナル抗体を作製し、この抗体を用いてHBs抗体に対する抗イディオタイプ抗体を検出する測定系を作り、実際にB型肝炎患者血清あるいはHBワクチン接種者血清で抗イディオタイプ抗体を測定した結果をまとめたものである。

従来マウスのフォスフォリルコリンに対する抗体産生において、イディオタイプ・抗イディオタイプ・ネットワークが抗体産生の増強あるいは抑制に関与することが報告されているが、このイディオタイプ・抗イディオタイプ・ネットワークとHBウイルスに対する免疫応答との関連を解明することが本論文の目的である。その意味で免疫不応状態にあるHBs抗原キャリアーとHBワクチン接種者の血清を用いた事は妥当であり、この結果は生体内でのネットワークの役割を理解する上で重要である。

HBs抗体に対する抗イディオタイプ抗体の測定にはHBs抗原に対して特異的な抗体と、非特異的反応の少ない測定系が必要である。著者が証明しているように、ここで用いられたマウス・モノクローナル抗体はHBs抗原に特異的に反応していると考えて良く、またペルオキシダーゼ標識を行なった方法も妥当なものと思われる。次に、著者の採用したキャプチャー・アッセイは他の抗イディオタイプ抗体の検出にも用いられている確立された方法であるが、HBs抗体に対する抗イディオタイプ抗体の他にHBs抗原と抗体の免疫複合体、リウマチ因子などが陽性反応を与える可能性がある。これらの点については十分に検討が加えられており、この測定系については抗イディオタイプ抗体に特異的な反応が扱えられていると考えられる。一方、HBs抗体と抗イディオタイプ抗体などの免疫複合体が生体内で形成されている場合は本アッセイ法でfalse negativeとなる可能性がある。今後さらに感度の良い系を開発することにより、より詳細なネットワークの解明が期待される。

結果については、HBs抗原キャリアーHBワクチン接種者においてHBウイルスあるいはHBs抗原に対する免疫応答の中でイディオタイプ・抗イディオタイプ・ネットワークの関与が示唆される成績は、非常に興味深い。ただし著者の主張するようなHBs抗原キャリアーでのウイルスに対する免疫監視機構の証明には今後さらに知見を加える必要があるものと思われる。しかしHBs抗原に対する免疫応答の中でイディオタイプ・抗イディオタイプ・ネットワークが実際に働き、免疫を制御する可能性を示したことは臨床的に意義深く、この論文は臨床研究として学位に値する内容を持つと思われる。