

B型肝炎ウイルス関連抗原および δ 抗原の 肝細胞内局在と病態について

——免疫電顕による検討——

富山医科薬科大学内科学第3教室

小島 隆

Blumberg によるオーストラリア抗原の発見(Blumberg, B. S. et al. 1965)を契機に、B型肝炎ウイルス(HBV)についての知見は、臨床面および本態解明という面より飛躍的な発展をとげてきた。現在ではHBVに関して免疫学的に3つの異った抗原の存在が知られており、Blumberg が最初に血清中に見出したオーストラリア抗原は、リポ蛋白よりなる直径22nmの小型球状粒子、管状粒子および直径42nmの大型のDane粒子の表面(surface)にみられる抗原であり、HBs抗原とよばれている。一方、Dane粒子はその内に二重鎖環状DNA、DNA dependent DNA polymeraseが確認されており、HBVそのものと考えられている。この二重構造をもつDane粒子の内部の核様構造(core)には、HBs抗原とは別の抗原性が認められており、HBc抗原とよばれている。第三の抗原は1972年MagniusとEspmarkにより発見されたHBe抗原(Magnius, L. O. and Espmark, J. A. 1972)で、臨床面からの解析によりHBVの感染性と密接な関連のあることが判明し、さらに近年このHBe抗原はHBc抗原と同一の polypeptide上に存在し、core粒子形成に際しHBc抗原を外側にHBe抗原を内側に包み込むようにして存在することが明らかにされた(Takahashi, K. et al, 1981)。本稿では、これらHBV関連抗原の肝細胞内での局在を酵素抗体法を用い光顕および電顕レベルで検討し、HBVの肝細胞内での増殖動態について考察し、さらにこれら抗原を標的抗原とする免疫機序を介しての肝細胞障害機構について述べる。

Rizzettoらにより発見された hepatitis delta (δ) virus(HDV)(Rizzetto, M. et al. 1977)は、その感染増殖にHBVの helper functionを必要とする特殊な defective virusであることが明らかにされている。このHDVによる δ 肝炎は日本では稀れであるが、

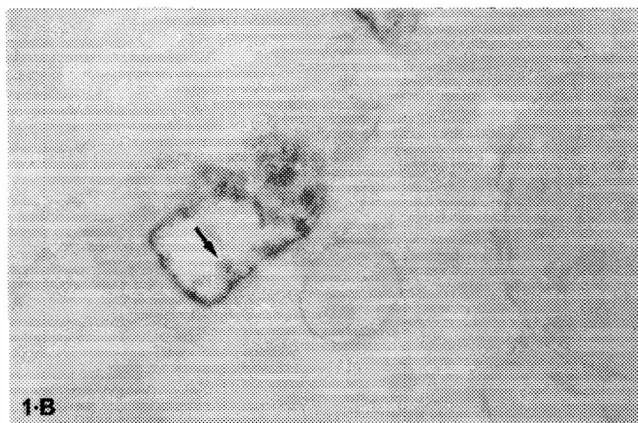
近年HDVと非A非B型(NANB)肝炎ウイルスとの類似性が問題にされてきている。本稿の後半では、この δ 肝炎の研究がNANB肝炎解明への糸口となり得るか検討する。

1. B型肝炎とB型肝炎ウイルス

B型肝炎生検肝組織を通常電顕にて観察すると、直径約27nmのcore粒子が肝細胞核内および細胞質内のcytoplasmic matrixに観察される。一方、小胞体腔内には直径約42nmの二重構造をもつDane粒子が観察され(Fig. 1-A)、その一部は小胞体膜と直接連続していることより、Dane粒子はcore粒子が小胞体の膜を被って小胞体腔内へ buddingすることにより形成されるものと推定されている。なお、小胞体腔内には多数の管状構造物も観察されるが、これは過剰に産生されたHBs抗原と考えられている。



このようなHBV関連粒子に加えて、粒子形態をとらないHBV関連抗原の検討を主たる目的に酵素抗体法による光顕および電顕レベルでの検索を試みた。HBs抗原は肝細胞膜を含む細胞質内に観察され、免疫電顕による検討ではHBs抗原は小胞体膜、小胞体腔内の管状構造物、Dane粒子の外被また時



には肝細胞膜に認められた (Fig. 1-B)。HBs 抗原は肝細胞核内および細胞質内に観察されたが、一般に肝小葉内の炎症性変化に乏しい症例では核内に限局して観察され、一方、炎症性変化の強い例では主として肝細胞質内に認められた。HBe 抗原の局在は、HBc 抗原のそれとほぼ類似のパターンを示し肝細胞内の核と細胞質内に観察された。HBc 抗原および HBe 抗原の免疫電顕による subcellular level の検討では、両抗原は cytoplasmic matrix および ribosomes 上に観察された。特記すべきことは、少数の肝細胞において HBc 抗原が細胞膜上に観察されたことであり、免疫性肝障害に際しての標的抗原として細胞膜上に表出した HBs 抗原だけでなく HBc 抗原もその可能性が考慮されるべきものと思われる (Kojima, T. and Desmet, V. J. 1984)。これらの所見より、HBc 抗原および HBe 抗原活性を示すポリペプチドは細胞質内の ribosomes 上で合成された後、核内に migrate し core 粒子に assemble された後、再び核膜孔を通して細胞質内に出、HBs 抗原活性を示す小胞体膜あるいは細胞膜を被って Dane 粒子を形成してくるものと考えられる。なお、ribosomes 上で合成された HBc 抗原と HBe 抗原活性を示すポリペプチドの一部は core 粒子に assemble されることなく、直接血中に放出されることが考えられている (Kojima, T. 1982)。

このような HBV 感染肝細胞に対しては、リンパ球を主体とする多数の炎症細胞の浸潤が観察されるが、単クローン性抗ヒト・リンパ球抗体による検討では、浸潤リンパ球の主体は cytotoxic T-cell であることが明らかにされた (Sasaki, H. et al. 1984)。

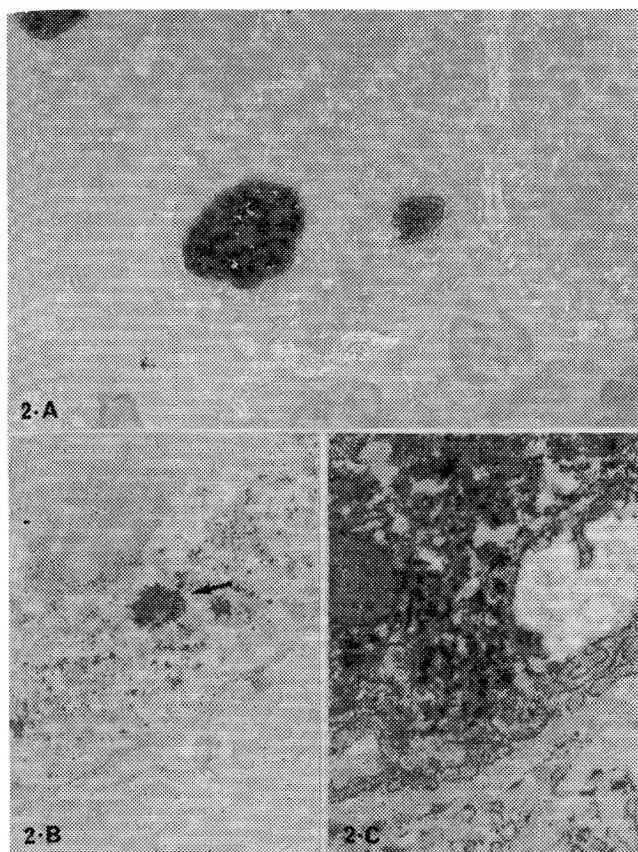
2. δ肝炎と δ肝炎ウイルス

Rizzetto らは、B 型肝炎の免疫組織学的研究の過程で HBV 関連抗原とは明らかに異なる δ 抗原、δ 肝炎を発見した (Rizzetto, M. et al. 1977)。この発見から比較的早い時期に δ 抗原・抗体系の radioimmunoassay (RIA) 法が開発され (Rizzetto, M. et al. 1979)、その結果 δ 抗体陽性者では HBV 関連抗原抗体も同時に陽性を示すことが判明した。さらに δ 肝炎発症早期には、血中に δ 抗原の出現が認められ、この δ 抗原陽性血清中から直径 35~37nm の δ 感染粒子が同定されるに至った (Rizzetto, M. et al. 1980)。この RIA 法を用いた検討により、δ 肝炎はイタリアを中心として地中海沿岸諸国に見られ、米国での成績は移民イタリア人を中心に高頻度に分布し、また最近の成績では、アフリカ、東南アジアにも広くその分布があり、さらに南米ベネズエラではインディアンの間での集団発生が報告されている。一方、チンパンジーを用いた δ 肝炎感染実験において、δ 肝炎チンパンジー肝細胞にも非特異的構造物ではあるが、チンパンジー NANB 肝炎の感染指標である管状構造物が見られることが明らかにされ、δ 肝炎と NANB 肝炎との類似性が注目された (Kamimura, T. et al. 1983)。

このような背景のもと、筆者らは免疫電顕法により肝細胞内 δ 抗原の局在を検討し、形態学的に確認できる δ 抗原に特異的な粒子の検討および肝細胞における δ 粒子形成に際しこの δ 抗原と δ 粒子内 RNA との関連につき検討した (Kojima, T. et al. 1986)。

肝組織内 δ 抗原は、主に肝細胞核内 (Fig. 2-A) に観察されたほか、時に細胞質内にも認められた。肝細胞核内の δ 抗原は、核の chromatin 領域に直径約 20~30nm の不均一な顆粒状の構造物の集積として観察された (Fig. 2-B)。核小体は陰性であった。δ 抗原に特異的な構造物の検討では、NANB 肝炎チンパンジーで最初に報告された nuclear particles と区別不可能な nuclear aggregates に δ 抗原が観察されており (Fig. 2-B)、δ 肝炎および NANB 肝炎におけるこれら nuclear particles が両疾患、とりわけ難解の NANB 肝炎においても感染粒子である可能性が推測された (Kojima, T. et al. 1986)。

一方、δ 抗原の細胞質内局在を示した肝細胞の免疫電顕による検討では、δ 抗原は細胞質内の cytoplasmic matrix に観察されたほか、一部の肝細胞で



は free および membrane-bound ribosomes 上に認められた (Fig. 2-C)。既に述べた如く、血中 δ 粒子はその内部に δ 抗原 (168,000MW) と1750塩基のRNAを含み、外被としてHBs抗原に包まれている。この δ 粒子内RNAはsingle strand RNAであり、その末端には3'-poly-(A) tailはなく、negative strand virusと考えられている。したがって、ribosomes上に観察された δ 抗原は、このsingle strand RNAが直接または間接的に translate されたものと推測される。

本論文の要旨は、第36回米国肝臓学会 (AASLD), 1985, 11, Chicago, International Symposium: Hepatitis Delta Virus and Its Infection, 1986, 6, Aosta, Italy および International Conference on the Impact of Viral Diseases on the Development of Asian Countries, 1986, 12, Bangkok にて発表した。

文 献

- 1) Blumberg B. S., Alter H. J. and Visnich S. : A "new" antigen in leukemia sera. JAMA 191 : 541-546, 1965.
- 2) Kamimura T., Ponzetto A., Bonino F., Feinstone S. M., Gerin J. L. and Purcell R. H. : Cytoplasmic tubular structures in liver of HBsAg carrier chimpanzees infected with delta agent and comparison with cytoplasmic structures in non-A, non-B hepatitis. Hepatology 3 : 631-637, 1983.
- 3) Kojima T. : Immune electron microscopic study of hepatitis B virus associated antigens in hepatocytes. Gastroenterol Jpn. 17 : 558-575, 1982.
- 4) Kojima T. and Desmet V. J. : Hepatitis B core antigen (HBcAg) in liver cell plasma membrane : Immunoelectron microscopic study. Liver 7 : 191-200, 1987.
- 5) Kojima T., Callea F., Desmyter J. and Desmet V. J. : Immune electron microscopy of hepatitis δ -antigen in hepatocytes. Lab. Invest. 55 : 217-225, 1986.
- 6) Magnus L. O. and Espmark J. A. : New specificities in Australia antigen positive sera distinct from the Le BOUVIER determinants. J. Immunol. 109 : 1017-1021, 1972.
- 7) Rizzetto M., Canese M. G., Arico S., Crivelli O., Trepo C., Bonino F. and Verme G. : Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (δ /anti- δ) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. Gut. 18 : 997-1003, 1977.
- 8) Rizzetto M., Shih J. W-K, Gocke D., Purcell R. H., Verme G. and Gerin J. L. : Incidence and significance of antibodies to delta antigen in hepatitis B virus infection. Lancet ii : 986-990, 1979.
- 9) Rizzetto M., Hoyer B., Canese M. G., Shih J. W-K., Purcell R. H. and Gerin J. L. : δ agent : Association of δ antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of δ -infected chimpanzees. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 : 6124-6128, 1980.
- 10) Sasaki H., Kojima T., Matsui S., Aoyama K., Higuchi K., Inoue K. : Interaction of lymphocytes with hepatocytes bearing hepatitis B

antigen : Ultrastructural investigation of target antigen and T cell subsets dy means of peroxidase antibody technique. Hepatology 4 : 781, 1984.

写 真 説 明

Fig. 1 肝細胞小胞体内に観察される Dane 粒子(1-A)。uranyl acetate and lead citrate.($\times 100000$)。HBs 抗原陽性の小胞体膜と Dane 粒子(矢印) (1-B)。peroxidase staining.($\times 70000$)。

Fig. 2 肝細胞核内 δ 抗原(2-A, B)。 δ 抗原は核内の nuclear particles に認める(矢印) (2-B)。free および membrane bound ribosomes 上の δ 抗原 (2-C)。peroxidase staining.($\times 1500, 7500, 21000$)。