

B型肝炎ウイルスコア関連抗原 (HBcrAg) 測定法の基礎的・臨床的検討

Fundamental and Clinical Evaluation of Hepatitis B virus core-related antigen assay

た なか やす ひと みぞ かみ まさ し
田 中 靖 人 : 溝 上 雅 史
Yasuhito TANAKA Masashi MIZOKAMI

はじめに

B型肝炎ウイルス (HBV) キャリアの予後予測や治療効果の判定には、ウイルスの活動性の指標としてHBe抗原 (HBeAg) およびHBe抗体 (HBeAb) 検査が汎用されているが、HBeAgはプレコア変異により陰性化することやHBeAb陽性でも肝炎の活動性を示す例が存在するなど、複雑なB型慢性肝炎の病態を把握するには十分な検査とはいえない。また、HBV-DNA検査はB型慢性肝炎の治療効果予測およびモニターリングマーカーとして使用されているが、高コストで操作が煩雑である。有用なB型肝炎治療のモニターリングマーカーが望まれている中、新規HBV血清マーカーとして、HBコア関連抗原 (HBcrAg) が最近保険収載された。さらに、化学発光酵素免疫自動測定装置であるルミパルス^fを用いたHBcrAg測定法が開発されており、ここではHBcrAg測定の基礎的性能および臨床的意義について紹介する。

I. B型肝炎ウイルスの特徴

HBVは、ヘパドナウイルス族に属するウイルスで、直径約42nmの球状のDNAウイルスであり、ウイルスそのものは、外被 (envelope) と不完全二重鎖のDNAとDNAポリメラーゼ、逆転写酵素などを含む、直径27nmの芯 (core) からなるDNAウイルスであり、発見者の名前をとってDane粒子と呼ばれている。二重構造を形成し、外側はHBs抗原、内側はHBc抗原と遺伝子DNAからなっている。

HBs抗原は、Dane粒子以外に、中空粒子、小型球形粒子、桿状粒子として存在する。DNAには、図1に示すようにpre-S/S遺伝子領域、P遺伝子領域、X遺伝子領域、pre-C/C遺伝子領域の4種類の転写解読枠 (open reading frame : ORF) がある。X遺伝子領域のcore promoter、C遺伝子領域のprecore領域は、HBe抗原構成蛋白の産生に関与し、この領域のpoint mutationによりHBe抗原構成蛋白が産生されなくなり、HBe抗原陰性となる。

HBVは図2に示すように、肝細胞に侵入すると、ウイルス遺伝子が肝細胞の核内に移動し、不完全環状二本鎖DNAは完全閉鎖二本鎖DNA、covalently closed circular DNA (cccDNA) に転換される。HBVの慢性感染状態では、複製中間体であるcccDNAは肝細胞1個あたり5~50個、ミニ染色体として存在する。肝細胞核内のcccDNAからは4種のmRNAが転写され、それらより構造蛋白であるHBs抗原、HBc抗原、HBe抗原および逆転写酵素を含むポリ

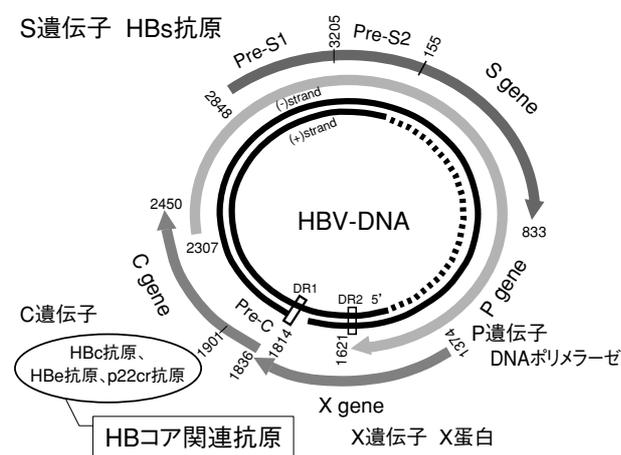


図1 HBV-DNAの構造と蛋白コード領域

名古屋市立大学大学院医学研究科 臨床分子情報医学分野
〒467-8601 名古屋市瑞穂区瑞穂町宇川澄1

Department of Clinical Molecular Informative Medicine,
Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences
(1, Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya)

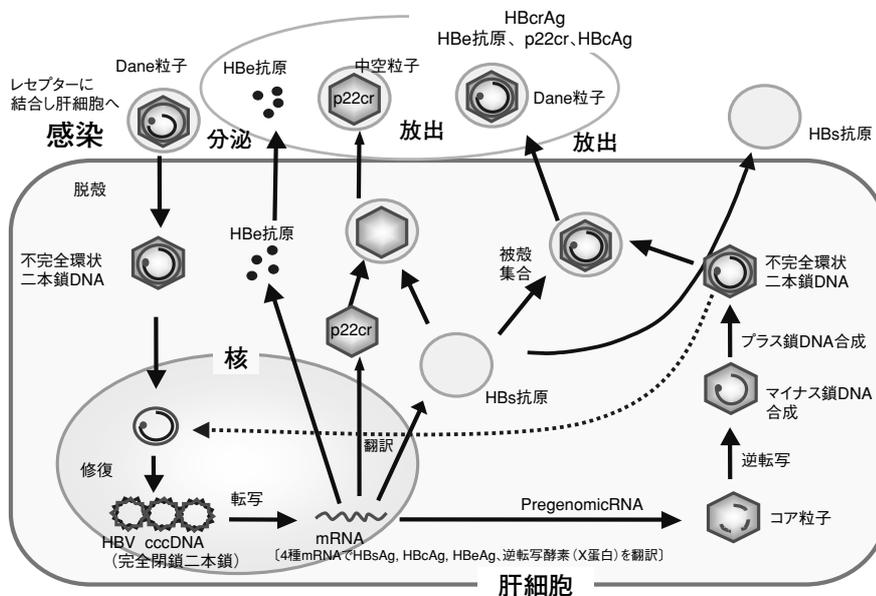


図2 B型肝炎ウイルスの感染・増殖

cccDNAは、肝細胞内1個あたり5～50個、ミニ染色体として存在している。逆転写されて合成された不完全環状二本鎖DNAの一部は再び核内に移動し、cccDNAとなってリサイクルされ、cccDNAの備蓄量が維持される。

メラゼ、X蛋白が翻訳される。mRNAの1つは pregenomic RNAとしてコア粒子に取り込まれ、逆転写酵素の働きによりマイナス鎖DNAが合成され、次にプラス鎖DNAが合成され不完全環状二本鎖DNAとなる。さらに、HBs抗原より形成されるエンベロープに包まれてウイルス粒子(Dane粒子)となり血中に放出される。Dane粒子の血中放出以外の増殖ルートとして、mRNAにより翻訳されたHBs抗原、HBc抗原とp22cr抗原を含む中空粒子(DNAの核が無い粒子)や肝細胞膜を通過するHBe抗原などは、図2に示すようにDane粒子血中放出とは別ルートとして多量に血中に放出、分泌される。この作用は、HBV感染における宿主免疫機構の攻撃から逃れている作用と考えられる。

II. 測定原理と測定方法

1. HBコア関連抗原

(HBcrAg ; HBV core related antigen) とは?

HBcrAgは、図1, 2に示すように、pregenomic mRNAから翻訳されるHBc抗原、precore mRNAから翻訳されるHBe抗原、p22cr抗原の3種類の抗原構成蛋白の総称である。

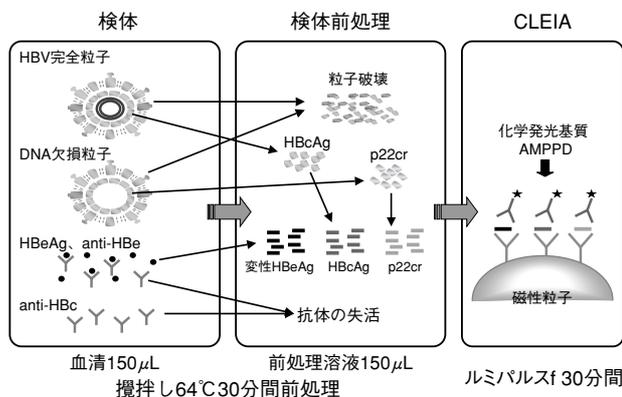


図3 HBcrAg測定原理

測定原理は、界面活性剤を主成分とする検体処理液で前処理し、HBcrAgを露出させ、同時に共存するHBcrAgに対する抗体を失活させる。この処理済み検体をフェライト粒子に結合した抗HBcrAg抗体で補足し、定量する2ステップサンドイッチ法である。

実際の測定方法は、検体処理液と検体を1:1の比率で混和・攪拌、60℃で30分間前処理する。この処理済検体をルミパルスfで自動測定し、トータル約1時間で終了する。

2. 測定原理

図3に示すように、血清(血漿)中では、HBc抗原とp22cr抗原は、HBV完全粒子(Dane粒子)およびHBV不完全粒子(中空粒子)に内包されているため、検体処理液によって破壊する。また、血清(血漿)中にHBe抗体、HBc抗体が存在する場合には、HBe抗原抗体複合体、HBc抗原抗体複合

体を形成し、測定試薬に用いているモノクローナル抗体で3種類の抗原蛋白を正確に測定できないため、共存している HBe 抗体、HBc 抗体を不活性化すると共に HBe 抗原抗体複合体の HBe 抗原も遊離状態にして、血清（血漿）中の HBe 抗原全量を測定できる方法としている。検体処理液で抽出された HBc 抗原、p22cr 抗原及び HBe 抗原は、立体構造を解除するためニアエピトープ化（直線状）にして、共通のモノクローナル抗体で測定できる系となっている。

3. 測定方法

検体の前処理は、血清（血漿）150 μ L と検体処理液 150 μ L を混和・攪拌（5 秒）し、60 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートする。この処理済検体を通常検体と同様にルミパルス f で自動測定する。試薬カートリッジはフェライト粒子に結合した抗 HBcrAg 抗体とアルカリホスファターゼ標識抗体で構成されている。この固相抗体と標識抗体により HBcrAg をサンドイッチした免疫複合物を形成させ、標識された酵素と化学発光基質の反応による発光強度を測定する。前処理 30 分、固相抗体への反応に 10 分、標識抗体との反応に 10 分、酵素反応に 5 分とトータル約 1 時間で終了する。測定機器はルミパルス f（富士レビオ社）、HBcrAg 測定は「CL-HBcrAg」（以下：HBcrAg）（富士レビオ社）を用いた。

検量線はキット内の標準溶液 5 濃度（0、5、250、2500、10000 kU/mL）を検体と同様な方法で、前処理・測定し、その発光量を用いて作成する。この検量線をもとに検体中の HBcrAg 量を算出する。測定単位は kU/mL、判定は 1.0 kU/mL 以上を陽性とする。

4. 測定範囲

測定範囲は 1 ~ 10000 kU/mL（1 kU は 10 pg/mL 相当）である。また、測定範囲を超えた検体については専用希釈液にて 200 倍希釈し測定した。

Ⅲ. 基礎的性能

1. 再現性：同時再現性（CV 値 2.8 ~ 5.2%）、日差再現性（CV 値 3.9 ~ 9.1%）と良好であった。また、冷蔵保存や凍結融解による影響は少なく、再現性は良好であった¹⁾。

2. 特異性：特異性評価として健常人検体 100 例および慢性 C 型肝炎患者検体 50 例について検討した。結果、健常人検体 1 例（0.2 kU/mL）を除き全ての検体が 0.0 kU/mL となり、全例が測定感度以下を示し特異性は良好であった¹⁾。

3. HBV-DNA との比較検討：HBs 抗原陽性患者検体 125 例について、HBcrAg と HBV-DNA との相関を確認したところ、正の相関が見られた（ $n=125$, $r=0.860$, $p<0.0001$ ）¹⁾。HBeAg 陽性群は陰性群に比べて HBcrAg は有意に高値であったが、HBeAg 陽性群（ $n=61$ 例）と HBeAg 陰性群（ $n=64$ 例）に分けて検討しても、それぞれ $r=0.884$ （ $p=0.0001$ ）、 $r=0.648$ （ $p=0.0001$ ）と有意に正の相関が得られた（図 4）。また、HBV-DNA で感度（3.7 LGE/mL）以下の検体についても、HBcrAg が検出される例が存在し、HBV-DNA と同程度以上の感度が得られていた。

4. 肝細胞内 cccDNA 量との相関

無治療の慢性 B 型肝炎患者 54 人（HBeAg 陽性 17 人、陰性 37 人）を対象とした。全例で肝生検を行い、肝内の total HBV-DNA と cccDNA は Invader アッセイにて測定した。HBcrAg は e 抗原陽性例 17 人中すべて、e 抗原陰性例 37 人中 32 人に検出された。HBcrAg は血清中 HBV-DNA、肝内の total HBV-DNA、肝内の cccDNA と正の相関が得られた（それぞれ $r=0.820$ 、 $r=0.700$ 、 $r=0.664$ すべて $p<0.001$ ）（図 5）。また、HBcrAg は肝組織における炎症や線維化とも正の相関を認めた。免疫染色を行った結果、HB コア抗原は HBcrAg が高度な例ほど細胞質や核により強く染色された²⁾。HBcrAg を測定することで簡便に肝内の HBV の活動性をモニターリングできる。

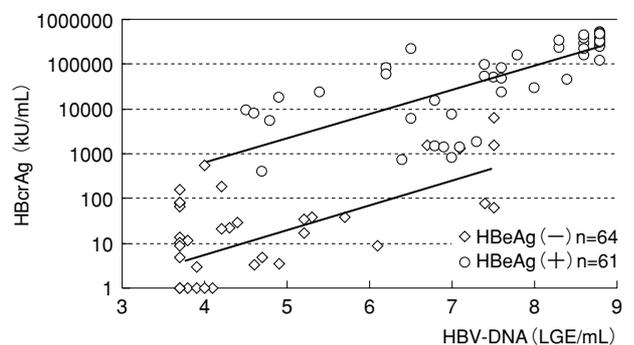


図 4 HBV-DNA と HBcrAg の相関（ $n=125$ ）

IV. HBcrAg の臨床応用

1. B型慢性肝炎の自然経過例

B型慢性肝炎の自然経過でHBe抗原がセロコンバージョンした症例においてHBcrAgを経時的に測

定したところ、HBV-DNAと同様な推移を示した。すなわち、HBcrAgはセロコンバージョン後にHBV-DNAと共に急激に低下しているのがわかる(図6a)。

2. 核酸アナログ投与例

B型慢性肝炎に対してラミブジン投与された症例に関してHBcrAgを経時的に測定してみると、ラミ

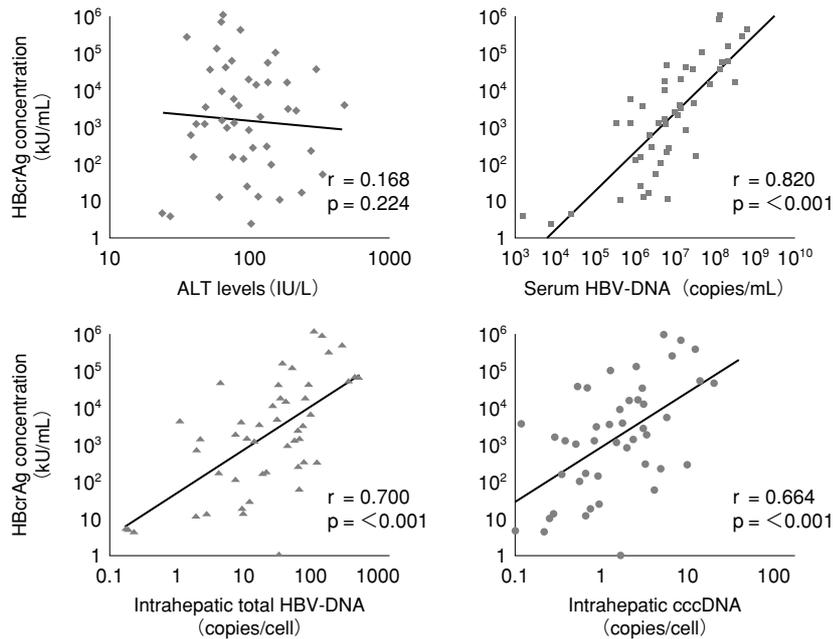


図5 HBcrAgと各種データとの相関

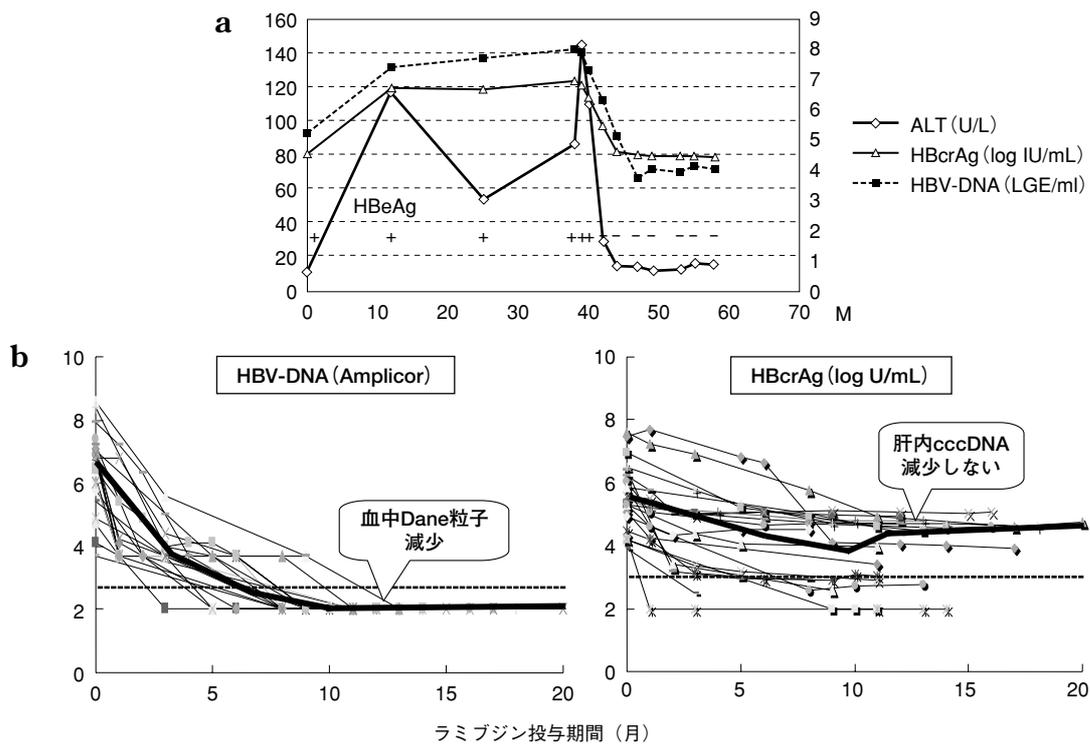


図6 a: B型慢性肝炎の自然経過例 b: 治療中HBcrAgはHBV-DNAと乖離する

ブジン投与中 HBV-DNA と HBcrAg には乖離が見られる (図 6b)。すなわち、ラミブジン投与により HBV-DNA は早期に陰性化していたが、HBcrAg の減少は緩徐でかつ陽性のまま推移している。この乖離は、図 7 に示したように、肝細胞内の core 粒子に内包されている HBV pregenomic mRNA がラミブジンによる逆転写酵素阻害により DNA へ転写されず、HBV-RNA 粒子のまま血中に放出されるため血中の Dane 粒子 (HBV-DNA) は著減し、検出感度以下となるが、HBcrAg はラミブジンによる逆転写

酵素阻害を直接受けけない pregenomic mRNA の別ルートにより肝細胞から血中に分泌、放出され続けるためだと考えられている (信州大学 松本ら、未発表データ)。したがって、HBV-DNA が検出感度未満となった場合でも、ラミブジンの中止により肝炎が再燃する症例が頻発する。この現象は、図 7 に示したように、ラミブジンは B 型慢性肝炎の血中の HBV-DNA 量を減少させるだけであり、HBV 複製中間体である肝細胞内の cccDNA 量に変化は無いため、B 型肝炎そのものの根治は難しく、ラミブジン

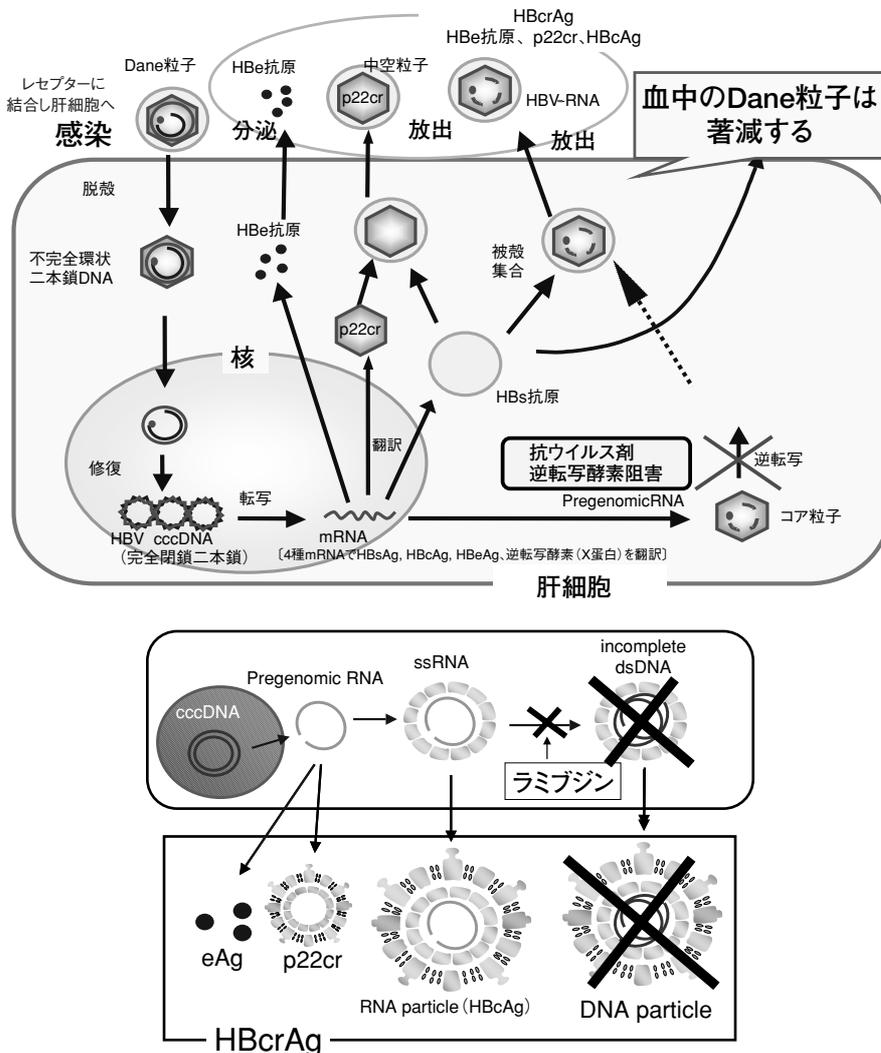


図 7 B 型肝炎ウイルスの感染・増殖 (抗ウイルス剤投与時)

ラミブジンを投与すると HBV-DNA は速やかに減少するが、コア関連抗原はゆっくり下がるという乖離現象が見られる。自然に起きるセロコンバージョン時にも HBV-DNA 量が減少するが、このときはコア関連抗原も同時に減少しており、この現象が、ラミブジン治療に特有の現象であることがわかる。この乖離現象は、コア関連抗原は cccDNA から転写される progenomic RNA の量を反映しているが、HBV-DNA は progenomic RNA がコア粒子に取り込まれたあと、逆転写酵素によって転写される DNA 量を測定しており、逆転写酵素阻害剤によって DNA に転写されない未完成の HBV 粒子が血中に放出されていることを示している。したがって、ラミブジン治療下では HBV の真の増殖能力を反映しているのはコア関連抗原測定法であると考えられる。

治療中止後に肝炎が再燃する例が報告されている。

3. ラミブジン治療中止指標としての

HBcrAg 測定の意義

我々は、ラミブジン治療により HBe 抗原セロコンバージョンが得られ、6 カ月以上 HBV-DNA 持続陰性化かつ ALT 持続正常化した 22 症例について前向きに治療中止を試みた (ラミブジン投与期間は平均 12 カ月)³⁾。中止後 12 カ月以上観察した結果 (平均 31 カ月)、22 例中 11 例では肝機能の再燃が見られたが、残りの 11 例は HBV-DNA の軽度上昇はみられたが、肝機能の悪化は見られなかった。その違いを明確にするために、保存検体を用いて経時的に HBcrAg を測定し、その推移を比較した。HBcrAg の減少量を比較してみると、ラミブジン投与中のいずれのポイントにおいても非再燃群で有意に HBcrAg 減少量が大きかった (図 8, 非再燃群/再燃群 = -1.36 log U/mL/-0.29 (1 カ月), -1.44/-1.00 (3 カ月), -1.82/-1.06 (6 カ月), -2.12/-1.62 (治療中止時))。また、治療中止時の平均 HBcrAg 量を比較してみると、非再燃群は再燃群より有意に低値で

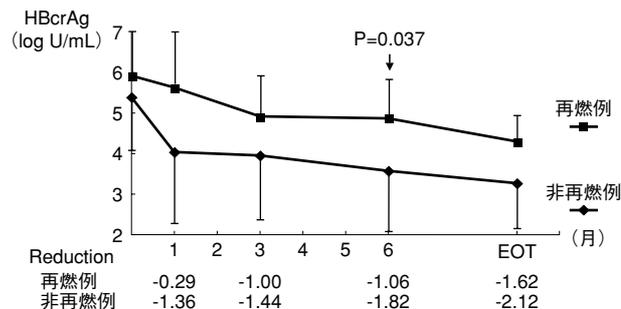


図 8 再燃例と非再燃例のラミブジン投与中の HBcrAg の動態

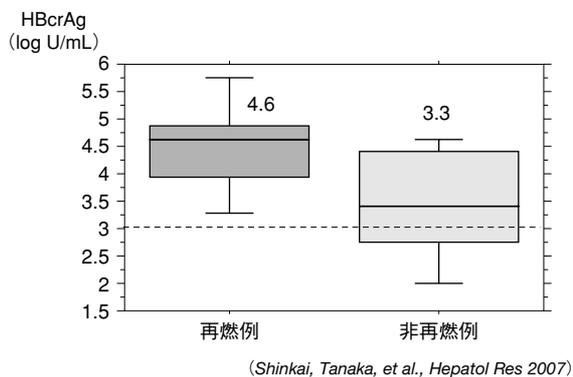


図 9 再燃例と非再燃例におけるラミブジン投与終了時の HBcrAg の比較

あったが (3.4 : 4.5 log U/mL) (図 9)、治療前の DNA 量、HBcrAg 量、ラミブジン投与期間、DNA 陰性期間などには差が見られなかった。多変量解析の結果でも、HBcrAg < 3.4 log U/mL のみが中止後の非再燃を規定する因子となった。実際に、HBcrAg < 3.4 log U/mL となった 7 人中 6 人は中止後の再燃はみられていない。このことの解釈は、HBV 複製中間体である肝細胞内の cccDNA 量が減少したことにより、血中に HBcrAg が分泌、放出されないことが考えられる。以上より、HBcrAg は核酸アナログ治療における薬剤投与中止の指標として有用な血清マーカーと考えられる。

V. おわりに

今回、簡便で短時間で自動測定が可能なルミパルス f を用いた HBcrAg 測定の基礎的性能およびその臨床的意義について報告した。今回の検討から、HBcrAg は肝組織中の cccDNA 量と関連しており、ラミブジン治療中の再燃の予測⁴⁾や治療中止時期の決定^{3,5)}の血清マーカーとして今後広く臨床応用されることが期待される。また、臨床的には血中 HBV-DNA 定量との使い分けが重要であり、HBcrAg 測定のタイミングに関しては今後の検討課題と思われる。

文 献

- 1) 田中靖人, 高木和美, 平松久美子, 他. ルミパルス f を用いた B 型肝炎ウイルスコア関連抗原 (HBcrAg) 測定法の基礎的・臨床的検討; 臨床病理; **54**; 692-698, 2006.
- 2) Wong DK, Tanaka Y, Lai CL, et al. Hepatitis B Virus Core-related Antigens as a Marker for Monitoring of Chronic Hepatitis B Infection. *J Clin Microbiol.* **45**(12): 3942-3947, 2007.
- 3) Shinkai N, Tanaka Y, Orito E, et al. Measurement of hepatitis B virus core-related antigen as predicting factor for relapse after cessation of lamivudine therapy for chronic hepatitis B virus infection. *Hepatol Res.* **36** (4): 272-276, 2006.
- 4) Tanaka E, Matsumoto A, Suzuki F, et al. Measurement of hepatitis B virus core-related antigen is valuable for identifying patients who are at low risk of lamivudine resistance. *Liver Int* **26** (1): 90-96, 2006.
- 5) Matsumoto A, Tanaka E, Minami M, et al. Low serum level of hepatitis B core-related antigen indicates unlikely reactivation of hepatitis after cessation of lamivudine therapy. *Hepatol Res.* **37** (8): 661-666, 2007.