

Establishment of detecting system for surface antigen containing hypervariable regions of hepatitis C virus

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7461

C型肝炎ウイルスにおける表面抗原検出系の確立

—高変異領域の関与について—

中本 安成*

要 旨：C型肝炎ウイルス(以下HCV)ゲノムE2/NS1部位に存在する高変異領域の臨床的意義を検討するため、高変異領域を含む発現タンパク及びこれらに対するポリクローナル抗体を5種類作成し、それぞれの交差反応性について検討するとともに、ウエスタンブロッティング法によるE2/NS1タンパク検出系を確立した。これら5種の発現タンパク及び抗体の交差反応の結果から、それぞれの抗体の反応性の違いが見出され、さらに、この相違は高変異領域におけるアミノ酸配列の多様性に依存することが示唆された。また、E2/NS1タンパクについての検討では、C型肝炎疾患症例の生検肝組織中、約44kDaの特異反応性タンパクを認め、このタンパクに対する反応性についても5種類の抗体間で相違が認められた。以上の結果から、HCVの高変異領域の多様性は、ウイルスの免疫原性に影響し、C型肝炎の慢性化過程にも関与する可能性が示唆された。

索引用語： C型肝炎ウイルス 高変異領域 C型肝炎ウイルス表面抗原 慢性肝炎

結 言

1989年に、C型肝炎ウイルス(HCV)のcDNAが得られ、これを用いた免疫スクリーニング法によって、血液感染由来の非A非B型肝炎の主たる原因がHCVであることが明らかにされた^{1,2)}。HCVは約9,400塩基の(+)鎖RNAウイルスであり、そのゲノムは3010-3011アミノ酸からなる1本のウイルス前駆体タンパクをコードしていると考えられている。フラビウイルス、ベスティウイルスなどとの比較から、このウイルス前駆体タンパクのN末端側には、ウイルス構造領域タンパクが存在し、そのうちE1、E2/NS1部位は、ウイルスの表面抗原をコードする領域と考えられている²⁾。

さらに、E2/NS1部位に存在する2つの高変異領域(HVR1、HVR2)は、その抗原性及び変異率の高さからC型肝炎の慢性化と深く関わっている可能性が示唆されているが、詳細については未だ不明である³⁻⁵⁾。そこで今回、この表面抗原部位に存在する高変異領域の免疫系における役割及び臨床的意義を検討するため、5種類のE2/NS1部位N末端を含む領域のタンパクを分子生物学的に発現させ、それぞれに対するポリ

クローナル抗体を作成した。これらを用いて、それぞれの交差反応性を検討し、さらに、肝組織中E2/NS1タンパクの検出系を確立した。

対象および方法

対象：HCVゲノムの作成には、Table 1に示すごとくC-100抗体陽性肝癌合併肝硬変患者3例より得られた肝組織、及び慢性非活動性肝炎(CPH)患者の血清を対象とした。また、C-100抗体陽性慢性活動性肝炎症例、及びC-100抗体陰性B型肝炎ウイルス表面抗原陽性の慢性活動性肝炎症例の肝組織を用いて、ウエスタンブロッティングを行った。

発現タンパクの作成：これまで報告してきたHCV-JK1株⁴⁾の2つの高変異領域(HVR1、HVR2)を含む1474-1824塩基、又は1456-1791塩基にプライマーを設定した。プライマーは末端にEcoRI、BamHIまたはBglIIの制限酵素認識配列を付加し、390DNAシンセサイザー(ABI-Applied Biosystems, U.S.A.)にて合成した(Fig. 1A)。

これらのプライマーを用いてJK1、2、4株のクローン、あるいは、患者血清に対してpolymerase chain reaction(PCR)法⁶⁾を行いE2/NS1部位のcDNAを作成した。作成したcDNAをEcoRI、BamHIまたはBglIIにて切断後、pGEX-1N(AMRAD, Australia)系プラスミドベクター-pGENT2のポリクローニング

* 金沢大学第1内科

Table 1 Clinical features of patients, from whose samples RNA was extracted for production of cDNA of hepatitis C virus (HCV).

Patients	Age	Sex	Histology	B.T.	Anti-C-100	HBsAg	Samples
JK 1	70	M	LC with HCC	+	+	-	Autopsy
JK 2	45	M	LC with HCC	-	+	-	Autopsy
JK 4	38	F	LC with HCC	-	+	-	Operation
CPH 20	32	M	CPH	-	+	-	Serum

B.T., history of blood transfusion; Anti-C-100, C-100 antibody; M, male; F, female; LC, liver cirrhosis; HCC, hepatocellular carcinoma; CPH, chronic persistent hepatitis

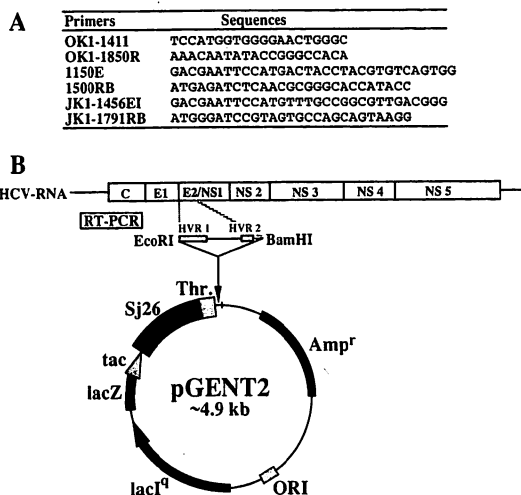


Fig. 1 Nucleotide sequences of primers (A) and schematic representation of the plasmid used (B). Five kinds of nucleotide sequences from putative E2/NS1 region were amplified by reverse transcriptase-nested polymerase chain reaction (RT-PCR) technique with the following sets of primers: OK1-1411 & OK1-1850R (the 1st PCR); 1150E & 1500RB (the 2nd PCR for HVR-70); JK1-1456EI & JK1-1791RB (the 2nd PCR for the other four). HCV sequences were inserted into the polylinker of pGENT2 downstream of Sjl26, the gene encoding glutathione S-transferase (GST). The construction of pGENT2 was engineered from pGEX-1N (AMRAD) by Dr. Murakami S. Thr., nucleotide sequences encoding cleavage recognition site of thrombin

部位 EcoRI, BamHI に挿入し, 大腸菌 JM109 をトランスフォーメーションした。cDNA からの合成タンパクは x2YT 150ml 培地中で, 0.2mM IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside) にて 37°C, 4~12 時

間誘導して, glutathione-S-transferase (以下 GST) との融合タンパクとして発現させた (Fig. 1B)。得られた大腸菌発現タンパク total lysate は 12.5% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins) にて分析した。

患者 JK1 より得られた HCV-JK1 株における E2/NS1 部位 1474-1824 塩基を発現させた融合タンパクを HVR-70 とした。また HCV-JK1 株 1456-1791 塩基にプライマーを設定し, 患者 JK1, JK2, JK4, CPH20 より得られた cDNA を発現させた融合タンパクをそれぞれ HVR-JK1, JK2, JK4, 20 とした。

発現タンパクの精製: 発現融合タンパクは PBS (-) にて 2 回洗浄後, 1.6% Triton X-100 を添加し, 超音波処理後, 3,000rpm にて 2 分間遠心し, 上清に 1.6M guanidine HCl を加え可溶化し, さらに 3,000rpm 6 分間遠心した。その上清を 100 倍量の PBS (-) にて透析 (4°C, over night) し, 生じた沈澱を 10,000rpm 5 分間遠心後, 回収した。得られた沈澱を, SDS-sample buffer (10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 2.3% SDS, 0.0625M tris-HCl pH 6.8) とともに boiling (95°C, 5 分間) し, 12.5% SDS-PAGE にて分離した。

これを氷温中 (0°C, 5 分間) にて 0.25M KCl によりバンドを確認し, 切り出した。切り出されたバンドは, 5ml の PBS (-) とともにホモジナイズし, 発現タンパクを遊出した。

ポリクローナル抗体の作成: 遊離精製した発現タンパクは等量の Freund Complete Adjuvant (DIFCO, U.S.A.) と混合して家兎に免疫した。家兎への免疫は第 1, 3, 4, 5 週にそれぞれ 1ml を皮下に注射し, 第 6 週に採血した。血清を 3,000rpm 20 分間遠心にて分離し, さらに protein A-Sepharose CL-4B (SIGMA, U.S.A.) カラムを用いて Rabbit-IgG 画分を精製した。

つづいて親水性 GST カラム [ProtOn™Kit2 (Multiple Peptide Systems, U.S.A.)] を用いて Anti-GST 抗体を取り除き、定量後、ウエスタンブロッティングの一次抗体とした。HVR-70, JK1, JK2, JK4, 20タンパクを家兎に免疫して得られた Rabbit-IgG 画分を、それぞれ Anti-HVR-70, JK1, JK2, JK4, 20とした。

ウエスタンブロッティング：患者肝生検組織は0.25 M Tris-HCl(pH 7.8)100 μ l とともにホモジナイズし、ソニケーション後、15,000rpm 30秒間遠心し、上清(30 μ g タンパク含)を8.5%SDS-PAGE にて泳動した。これを TRANS-BLOT™ CELL (BIO-RAD, U.S.A.) を用いてニトロセルロースフィルター(0.45 μ m pore, Schleicher & Schull, Germany) にトランスファー(0.3A, 4hrs.) した後、ウエスタンブロッティングを行った。

ウエスタンブロッティングの際、一次抗体(1mg/ml) は1,500倍希釈にて用い、Immunoblotting Systems for Rabbit Primary Antibodies using Streptavidin-Alkaline Phosphatase (GIBCO BRL, U.S.A.) により検討した。さらに患者肝生検組織に対しては、Protein A, ¹²⁵I-labelled with Bolton and Hunter reagent (Amersham, England) を使用し、放射活性を BIO-IMAGE ANALYSER BA 100 (FUJIX) にて検出した。

構造解析：cDNA クローニング部位を、制限酵素 EcoRI, BamHI を用いて pGENT2 より切り出し、プラスミドベクター pGEM-3Zf(+) (Promega, U.S.A.) のポリクローニング部位に挿入した。これより、Taq Dye Primer Cycle Sequencing Core Kit (Applied Biosystems, U.S.A.) を使用し、370A DNA Sequencer (Applied Biosystems, U.S.A.) にて塩基配列を決定した。タンパク疎水性マップには Kyte and Doolittle⁷⁾ プログラムを用いた。

成 績

1) 融合タンパクの作成 (Fig. 2)

HCV-JK1株の E2/NS1部位を組み込んだプラスミドにてトランスフォーメーションし、IPTG にて誘導した大腸菌 lysate の解析では、レーン 1 に示すごとくクマジーブルー染色にて HVR-70 と GST の融合タンパクとして予想されるサイズの 38kDa タンパクが得られた。IPTG による誘導を行わなかったレーン 2、及びプラスミドを加えなかった大腸菌 (レーン 4) ではこのバンドは認めなかった。レーン 3 に示したイン

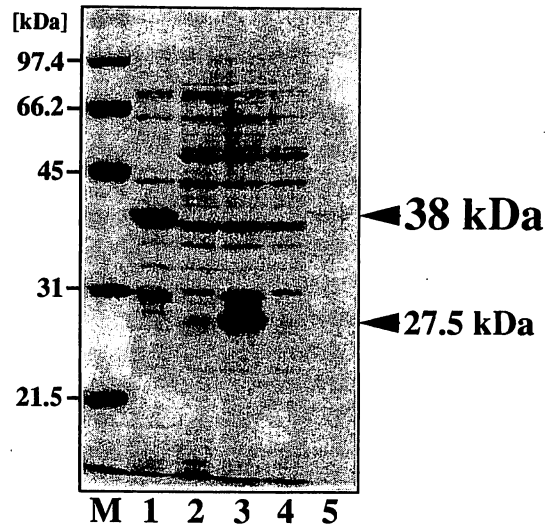


Fig. 2 Expression in *E. coli* JM109 and purification of fused-form protein HVR-70. Proteins from *E. coli* cell extracts were separated by 12.5% SDS-PAGE and stained with Coomassie brilliant blue. Lanes: M, molecular mass markers; 1, total lysate of HVR-70 (induced with IPTG); 2, HVR-70 (not induced); 3, GST; 4, not transformed JM109; 5, HVR-70 purified completely

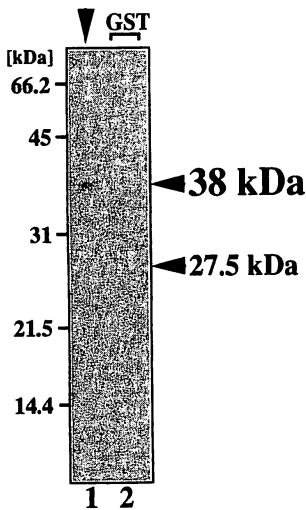
サート cDNA を有さない pGENT2 のみによるトランスフォーメーションでは、予想される GST サイズの 27.5kDa のバンドのみが認められた。レーン 5 には、今回の精製後の発現タンパクを示した。レーン 1 でみられた 38kDa (発現タンパク) のバンドが認められ、他のバンドはみられなかった。これらより、HVR-70 は IPTG にて十分に誘導、発現され、そのサイズは 38kDa であることが示された。

また、この発現精製系においては、1,000ml の培地より約 3mg の発現タンパクが精製された。

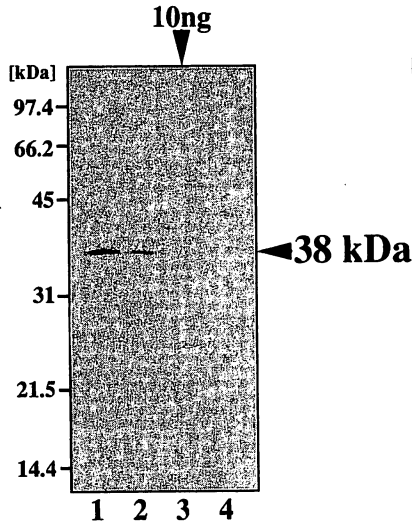
2) ポリクローナル抗体の作成 (Fig. 3)

Anti-HVR-70 抗体における HVR-70 タンパク及び GST との反応性を検討した (Fig. 3A)。HVR-70 タンパク 50ng を泳動したレーン 1 では 38kDa にバンドを認めたものの、GST 50ng を泳動したレーン 2 には、バンドを認めず、Anti-HVR-70 抗体は GST と交差反応性を示さなかった。次に、HVR-70 タンパク 100ng, 50ng, 10ng, 5ng を泳動し、ウエスタンブロッティングにて検出限界を検討した (Fig. 3B)。100ng, 50ng, 10ng のタンパクを用いた場合にみられた 38kDa のバンド (レーン 1, 2, 3) は、5ng では認められず (レ

A. Cross-reactivity



B. Sensitivity



C. Specificity

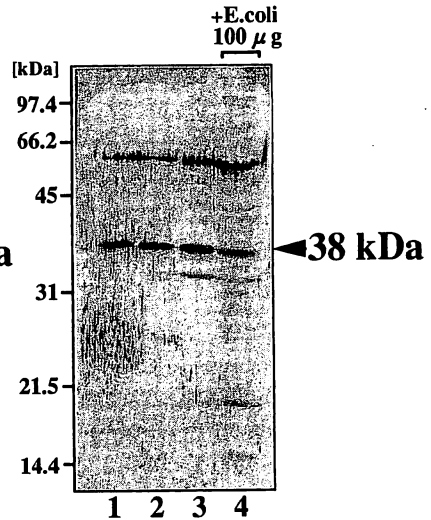


Fig. 3 Properties of rabbit polyclonal antibody (Anti-HVR-70). Western blotting analysis of cross-reactivity (A), sensitivity to HVR-70 (B), and Specificity for that (C), using 1,500-fold diluted Anti-HVR-70 (1mg/ml). Lanes : A, 1, HVR-70 (50ng) ; 2, GST (50ng) ; B, 1, 100ng of HVR-70 ; 2, 50ng ; 3, 10ng ; 4, 5ng ; C, 1, HVR-70 (15ng) ; HVR-70 (15ng) mixed with 2, 1μg of total lysate of *E. coli* JM109 ; 3, 10μg ; 4, 100μg

ン4), この反応条件における検出限界はおよそ10ngであることが示された。同様の反応条件にて非特異的タンパク (大腸菌 JM109 lysate 1μg, 10μg, 100μg) 中における精製発現タンパク (HVR-70タンパク 15ng) の検出を検討した (Fig. 3C)。38kDaのバンド (レーン1) は, 大腸菌 lysate 100μgを混合し泳動しても明瞭に認められ, 抗体の特異性が示された (レーン2, 3, 4)。他の4種の発現融合タンパクにおいても GSTの交差反応性, 検出限界, 及び非特異的タンパク中における検出能は同様であった。

3) 5種の発現融合タンパク及びポリクローナル抗体間の交差反応性

5種類の発現融合タンパク total lysate 200ngを電気泳動し, 5種の抗体 (1mg/ml)を8,000倍に希釈して, それぞれの抗体に対するタンパクの交差反応性を検討した。Fig. 4にその1例として Anti-HVR-70抗体と各発現融合タンパクとの反応結果を示した。レーン1, 2, 3, 4では38kDaのバンドを認め, Anti-HVR-70抗体は, 免疫に用いたタンパクおよび他の3種のタンパクを認識した。しかし, レーン5にバンドは認めず, Anti-HVR-70抗体は HVR-20タンパクと交差反応性を示さなかった。同様にしてこれらの発現タンパク

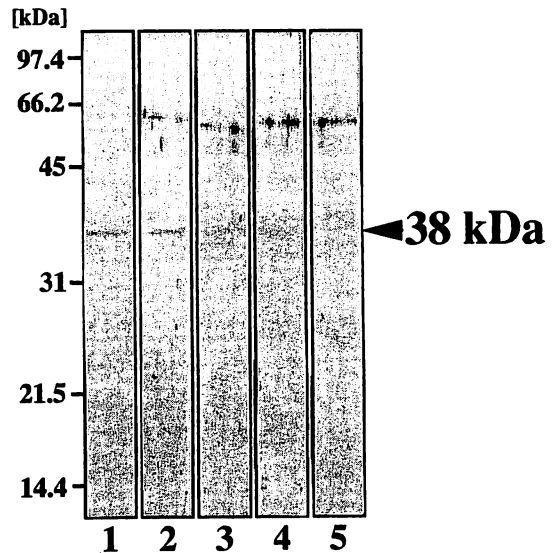


Fig. 4 Western blotting analysis of cross-reactivity of the polyclonal antibody (Anti-HVR-70) against 5 kinds of proteins expressed in *E. coli*. Anti-HVR-70 (1mg/ml) was diluted 8,000-fold. 200ng of total lysate of the expressed protein was applied in a lane. Lanes : 1, HVR-70 ; 2, HVR-JK1 ; 3, HVR-JK2 ; 4, HVR-JK4 ; 5, HVR-20

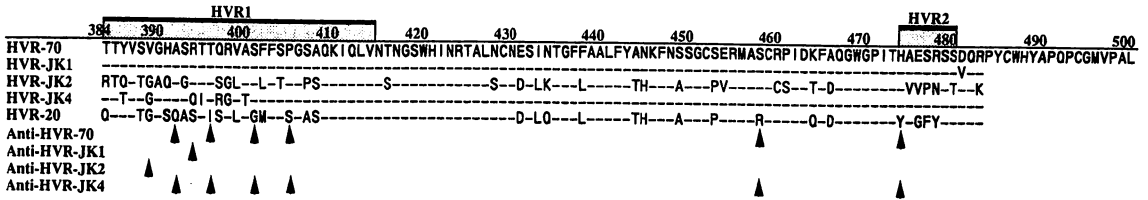


Fig. 5 Alignment of predicted amino acid sequences of a part of putative E2/NS1 region expressed in *E. coli*. The sequences were compared to the HCV-JK1 sequence shown on the top line. Identical amino acids are shown as dots. ▲: difference in amino acids deduced from cross-reactions

Table 2 Summary of cross-reaction studies of the polyclonal antibodies against the proteins expressed in *E. coli*. +: positive in Western blotting analysis

		Expressed Fused Proteins				
		HVR-70	HVR-JK1	HVR-JK2	HVR-JK4	HVR-20
Polyclonal Antibodies	Anti-HVR-70	+	+	+	+	
	Anti-HVR-JK1		+	+		
	Anti-HVR-JK2			+	+	+
	Anti-HVR-JK4	+	+	+	+	
	Anti-HVR-20	+	+	+	+	+

と他の4種の抗体間における交差反応性を検討し、その結果をTable 2にまとめた。それぞれの抗体は、作成の際に抗原として用いたタンパクを認識したが、他の複数のタンパクに対する反応には、多様性が認められた。

これらの結果にもとづいて、各cDNA塩基配列より予想されるアミノ酸配列(Fig. 5, 上段)のうち、それぞれの抗体で認識されなかったタンパクに固有のアミノ酸部位をFig. 5, 下段に矢頭で示した。これらの矢頭は14個中10個が高変異領域HVR1に集中していた。

このように、HVR1領域においては5種の発現タンパク間のアミノ酸配列に高い多様性を認めた。しかしながら、E2/NS1領域における疎水性パターンの検討では、一定の傾向を保っており、比較的親水性に富む領域であることが示された(Fig. 6)。

4) C型慢性活動性肝炎症例の肝組織における発現(Fig. 7)

これら5種の抗体を用いて、C型慢性肝炎症例の肝組織におけるタンパクの発現を検討した。Anti-HVR-70, JK1, JK4抗体に対して、約44kDaのバンドがみら

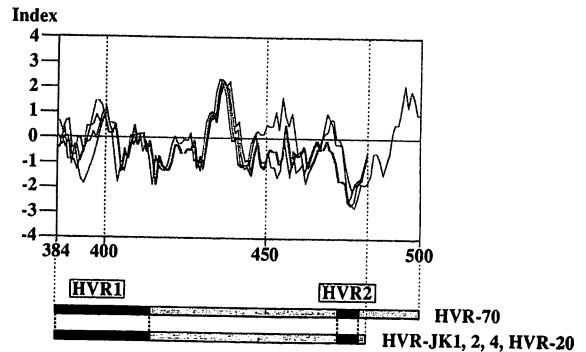


Fig. 6 Hydrophobicity plot deduced from predicted amino acid sequences of a part of putative E2/NS1 region expressed in *E. coli*. Relative hydrophobicity at each position is computed by using a moving window of 7 amino acids as described by Kyte and Doolittle⁷⁾. Peaks above the x axis indicate increased hydrophobicity, while those below indicate increasing hydrophilicity. Numbers show locations of predicted amino acids in putative structural region of HCV-JK1⁸⁾.

れた(レーン1, 2, 4)。しかしこのバンドは、Anti-HVR-JK2, 20抗体では認められなかった(レーン3, 5)。陽性例にみられたこのバンドは吸収試験にて消失し、その特異性が示された。さらに7例のC-100抗体陰性の対象症例ではこれらのバンドはどの抗体によっても認められなかった。

考 察

HCVゲノムは、近縁のウイルスであるフラビウイルス、ベステウイルスとの比較解析の結果から、3010-3011アミノ酸からなる1本のウイルス前駆体タンパクとして翻訳されることが推測されている^{2,8)}。このウイルス前駆体タンパクは、プロセッシング、マチュレーションの過程で、宿主細胞小胞体のシグナルペプ

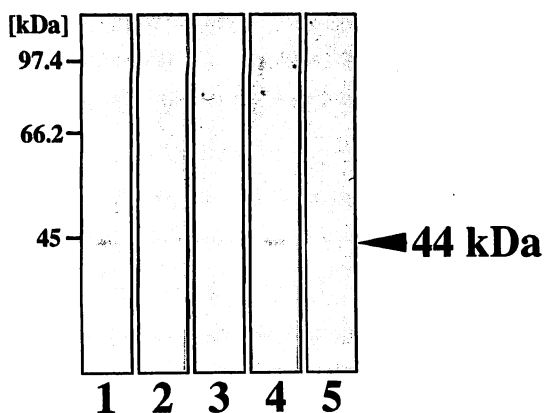


Fig. 7 Western blotting analysis of a liver specimen with 5 kinds of polyclonal antibodies. 30 μ g of homogenised liver specimen was applied in a lane. A kind of the antibodies (1mg/ml) was diluted 1,500-fold. Lanes: 1, Anti-HVR-70; 2, Anti-HVR-JK1; 3, Anti-HVR-JK2; 4, Anti-HVR-JK4; 5, Anti-HVR-20

チダーゼ⁹⁾や、その他のタンパク分解酵素¹⁰⁾により、C, E1, E2/NS1, NS2, NS3, NS4, NS5に切断され、それぞれが機能をもつことが予想されている¹¹⁾。

なかでも、表面抗原をコードすると考えられる E2/NS1部位は(+)鎖 RNA ウイルスの構造領域における位置、タンパク疎水性パターンなどよりフラビウイルスの NS1領域、ベスティウイルスの gp53/55 (bovine viral diarrhea virus の gp53, hog cholera virus の gp55)と類似するものと考えられている²⁾。このフラビウイルスの NS1糖タンパクは、実験動物にワクチンとして接種すると発症を防ぐことが知られている¹²⁾。また hog cholera virus の gp55についても、このタンパクに対する抗体は中和抗体であり、virus の感染を防御することが知られている¹³⁾。従って、HCV の E2/NS1部位は、ウイルス中和抗体の産生と深く関わっている可能性が示唆される。

さらに、E2/NS1部位の N 末端には高変異領域が存在し^{3,4)}、この変異率の高さは human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) の gp120に存在する高変異領域 V3 loop 以上であるといわれている^{5,14)}。またウイルスの表面タンパクにおける高変異配列は、エスケープミュータントに対する免疫選択の結果として生じている¹⁵⁾可能性も示されており、この領域にウイルスの中和エピトープが含まれていることも予想されている⁵⁾。このことは、ウイルス中和エピトープの有無の

みならず、免疫応答の結果とウイルス感染の慢性化の機構を考える上でも、この領域が極めて重要な部位であることを示唆している。

これまでには、ウイルスタンパクに対する抗体を遺伝子学的に産生する方法としてパキユロウイルス¹⁶⁾やワクシニアウイルスを用いる方法、大腸菌をプラスミドによりトランスフォーメーションする方法¹⁷⁾、合成ペプチドを作成する方法などが行われている。しかし、パキユロウイルス、ワクシニアウイルスを用いる方法は、発現量も多く、翻訳後の糖鎖の修飾も期待されるという利点があるものの、ブラックアッセイや発現に用いる細胞の継代維持に経験が必要とされる。また合成ペプチドに対する抗体では、その抗原性が問題とされている。これに対して、大腸菌での発現系は、安定な発現タンパクを比較的容易に得ることが可能である。今回用いたベクター-pGENT2は、大腸菌内で GST との融合タンパクとして発現されるにもかかわらず、挿入 DNA 由来の発現タンパク部分の抗原性に影響せず¹⁸⁾、精製も容易であり、家兎の免疫に直接用いることが可能であった。

今回の検討では、5種類の E2/NS1領域のタンパク及びポリクローナル抗体を作成した。それぞれの抗体において、希釈濃度等の反応条件、免疫に用いたタンパクの検出感度や特異性は同様であったものの、高変異領域を含む5種類の大腸菌発現タンパクとの交差反応性に違いが認められた。従って、これらの違いは抗原性の違いを反映しているものと推測され、Table 2 と Fig. 5 に示したごとく、HVR1領域の多様性が強く影響しているものと考えられた。つまり、E2/NS1部位 N 末端の変化によって抗原性が変化し、特定の抗体によっては認識不能になると考えられた。さらに同部位の変異率の高さ、及び同一個体内における変化¹⁹⁾をあわせて考慮すると、同部位の変異によって HCV が生体のサーベイランスから免れ、エスケープミュータント⁵⁾として潜在し、その感染の持続慢性化とも関連しうることも示唆される。今後さらに、宿主の免疫系の変化とウイルス自身の変化の両面から検討することによって、ウイルス感染の慢性化の機構あるいは中和抗体の産生に関わる E2/NS1部位の生物学的役割が明らかにされていくことと思われる。

一方、上述の如く、ウイルスの免疫原性と深い関わりをもつ E2/NS1部位の発現形に関しては、今のところ、HCV ゲノムの一部を用いた *in vitro* での翻訳系⁹⁾、mammalian cell での発現系²⁰⁾が報告され、約70

kDaの糖タンパク(gp70)であることが予想されている。しかし、未だ生体肝組織における発現は検討されておらず、今回確立したE2/NS1タンパク検出系を用いてC型肝炎症例の肝組織について検討した。その結果、70kDaのタンパクは認めず、約44kDaの反応性タンパクが認められた。このタンパクは、吸収試験によって検出されなくなること、C-100抗体陰性の対象症例では検出されないことから、E2/NS1部位由来の発現タンパクであると推定される。が、HCV感染肝細胞におけるウイルス前駆体タンパクのプロセッシング過程の詳細は不明であり、今後の検討として残されている。

さらに、この44kDaのタンパクは、5種類のポリクローナル抗体における反応性に違いがみられ、先に示した各々の大腸菌発現タンパクと抗体の交差反応性に違いを認めたことに一致する所見であった。このことから、肝組織内において発現しているE2/NS1タンパクは、高変異領域依存性の交差反応性を示す可能性が強く示唆された。

今回、HCVの表面抗原領域と考えられるE2/NS1部位の発現タンパク検出系を確立し、同部位の生体免疫における役割とその臨床的意義を検討した。この領域は、C型肝炎慢性化の機構を考える上で極めて重要であることが示された。

謝辞：稿を終えるに臨み、本研究の機会を与えて戴き、終始、御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師小林健一教授に深甚の謝意を表します。また直接の御指導を戴いた、金沢大学がん研究所生物物理部門、村上清史助教授、金沢大学第1内科、金子周一講師に心から感謝します。本研究にご援助下さった金沢大学がん研究所生物物理部門、原田文夫教授に深謝致します。また、御協力戴いた鶴浦雅志講師並びに金沢大学第1内科第2研究室各位、金沢大学がん研究所生物物理部門各位、金沢大学がん研究所薬理部門、松島綱治教授に深く感謝致します。

尚、本論文の要旨は、第28回日本肝臓学会総会<要請演題I>(平成4年6月、東京)にて発表した。

文 献

- 1) Choo Q-L, Kou G, Weiner AJ, et al: Isolation of a cDNA clone derived from blood-borne non-A,non-B viral hepatitis genome. *Science* 244: 359-362, 1989
- 2) Choo Q-L, Richman KH, Han JH, et al: Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2451-2455, 1991
- 3) Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, et al: Hypervariable regions in the putative glycoprotein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 175: 200-228, 1991
- 4) Honda M, Kaneko S, Unoura M, et al: Sequence analysis of putative structural regions of hepatitis C virus isolated from 5 Japanese patients with hepatocellular carcinoma. *Arch Virol*, in press
- 5) Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C, et al: Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: Potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3468-3472, 1992
- 6) Kaneko S, Miller RH, Feinstone SM, et al: Detection of serum hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis using the polymerase chain reaction assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 312-316, 1989
- 7) Kyte J, Doolittle RF: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157: 105-132, 1982
- 8) Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, et al: Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A,non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9524-9528, 1990
- 9) Nowak T, Faerber PM, Wengler G, et al: Analyses of the terminal sequences of west nile virus structural proteins and of the *in vitro* translation of these proteins allow the proposal of a complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis. *Virology* 169: 365-376, 1989
- 10) Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, et al: Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by *in vitro* processing analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5547-5551, 1991
- 11) Kato N, Hijikata M, Nakagawa M, et al: Molecular structure of the Japanese hepatitis C viral genome. *FEBS Letters* 280: 325-328, 1991
- 12) Schlesinger JJ, Brandriss MW, Walsh EE: Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2

- virus non-structural glycoprotein NS1. *J Gen Virol* 68: 853—857, 1987
- 13) Ruimenapf T, Stark R, Meyers G, et al: Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: Further characterization and induction of protective immunity. *J Virol* 65: 589—597, 1991
- 14) LaRosa GJ, Davide JP, Weinhold K, et al: Conserved sequence and structural elements in the HIV-1 principal neutralizing determinant. *Science* 249: 932—935, 1990
- 15) Payne SL, Salinovich O, Nauman SM, et al: Course and extent of variation of equine infectious anemia virus during parallel persistent infections. *J Virol* 61: 1266—1270, 1987
- 16) Chiba J, Ohba H, Matsuura Y, et al: Serodiagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection with an HCV core protein molecularly expressed by a recombinant baculovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4641—4645, 1991
- 17) Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, et al: A structural protein encoded by the 5' region of the hepatitis C virus genome efficiently detects viral infection. *Jpn J Cancer Res* 81: 1092—1094, 1990
- 18) Nasoff MS, Zebedee SL, Inchauspe G, et al: Identification of an immunodominant epitope within the capsid protein of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5462—5466, 1991
- 19) Ogata N, Alter HJ, Miller RH, et al: Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 3392—3396, 1991
- 20) Spaete RR, Alexander D, Rugroden ME, et al: Characterization of the hepatitis C virus E2/NS1 gene product expressed in mammalian cells. *Virology* 188: 819—830, 1992

Establishment of detecting system for surface antigen containing hypervariable regions of hepatitis C virus

Yasunari NAKAMOTO*

E2/NS1 region, putative surface antigen of hepatitis C virus (HCV), contains two hypervariable regions (HVRs). To get insight of the clinical significance of HVRs, detecting system for E2/NS1 protein was established using 5 kinds of polyclonal antibodies against recombinant proteins of the regions expressed in *E. coli*.

As low as 10 ng of the recombinant proteins were specifically detected in this system. Cross-reaction studies of the 5 antibodies against the proteins suggested that heterogeneity of amino acid sequences in HVRs is closely correlative with affinity of the antibodies. A protein corresponding to size of 44 kDa was specifically observed in a liver sample from a patient with chronic active hepatitis C using this system. Also, reactivity of the 44 kDa protein against the antibodies was different among these 5 antibodies.

Thus, these results indicate that HVRs may have an important role on immune system against HCV.

* First Department of Internal Medicine, School of Medicine, Kanazawa University (Kanazawa)