OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	B型肝炎ワクチンの生理化学的研究
Author(s)	大村, 孝男
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36537
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【10】

氏名・(本籍)	大村孝男
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第8397号
学位授与の日付	昭和63年12月12日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	B型肝炎ワクチンの生理化学的研究
論文審査委員	(主査) 教授 三村 務 (副査) 教授 近藤 雅臣　教授 岩田平太郎　教授 三浦 喜温

論文内容の要旨

ウイルス性肝炎はA型肝炎，B型肝炎，非A非B型肝炎の3種類に分けられる。このうちB型肝炎は症状が重篤なこと，患者数が多いこと，感染をした者のかなりの数がウイルスのキャリアとなり，感染源となることなどの理由で，3種のなかでもっとも重要なものとみなされている。ウイルス性疾患には有効な治療法がないことが多く，ウイルス性疾患に対する対策としてワクチンによる予防が重要である。

著者はB型肝炎予防のためのワクチンの開発という観点から，まず最初にB型肝炎ウイルス（HBV）キャリアの血液を原材料に用いるワクチンの製造法を確立した。しかし，肝炎対策が進めば近い将来には原材料不足になることが予想される。また，不特定多数のヒト血液に含まれる未知の因子による汚染の危惧が考えられる。

そこで，これら血漿由来B型肝炎ワクチンに伴う問題点を一挙に解決する手段として，血漿由来B型肝炎ワクチンの開発に引き続き，遺伝子組換え技術により酵母で発現したHBs抗原を原材料とするワクチンを開発するための基礎的検討を行い，酵母由来B型肝炎ワクチンが第二世代のワクチンとして有用であることを明らかにした。

1981年にWHOからB型肝炎ワクチン基準が提示され，わが国においても原料血，HBs抗原の精製法と不活化法などの製法及び純度試験，チンパンジー接種試験，或いは力価試験などの試験法の基準化が進められた。著者はこのような情勢を考慮して，WHO基準及び日本の基準に適合するワクチンの製法について，HBVキャリア血液のうち，感染性のHBVの含まれる量の少ないHBe抗体陽性血漿を原材料とするワクチンの製法及び液状の沈降ワクチン製剤に加えて，乾燥ワクチン製剤とする方法を確立した。

精製HBs抗原粒子はホルマリン不活化処理前後とも小型球形粒子であり，ＨＢＶ粒子（直径42nm）は認められず，粒子の平均直径は不活化前20.9（17～30)nm，不活化後20.4（16～30)nmであった。

精製HBs抗原の純度はＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）及びウエスタンブロット法により分析したところ，不純物としてアルブミンが３％含まれており，純度は97％と判定した。Ｂ型肝炎ワクチンはモルモットに接種することによりHBs抗体の産生が認められた。また，生物学的製剤基準に準じた試験ならびにチンパンジー接種試験において，異常のないことが確認され，ヒトへの適用が可能と判断された。

つぎに，感染性のＨＢＶを多く含むHBe抗原陽性血漿を原材料としたときの安全性を，ワクチン精製工程中のＨＢＶ ＤＮＡの挙動を追跡することによって検討した結果，原材料中に存在するＨＢＶは最終精製品では5×10^{-9}に減少することが証明された。このことより，HBe抗原陽性血漿をワクチン原材料として安全性の高いＢ型肝炎ワクチンの製造が可能であると判断された。

血漿由来Ｂ型肝炎ワクチンは感染防御能のあるHBs抗体を産生し，効果的である。しかし，ワクチンの使用を世界的規模のものとするには原材料に制約を受けている。そこで，第二世代のワクチンとして，遺伝子組換え技術により酵母で発現したHBs抗原を原材料とするワクチンの開発を試みた。

*Saccharomyces cerevisiae*の培養により産生したHBs抗原は，ガラスビーズとともにホモジナイズすることにより破砕し抽出した。抽出されたHBs抗原はコロイド珪酸塩により澄明化したのち，疎水性クロマトグラフィー及び超遠心分離により精製した。

酵母由来HBs抗原の純度測定法として，ＳＤＳ－ＰＡＧＥ法ならびに抗酵母抗体を用いたＥＬＩＳＡ法による酵母成分の定量法について検討した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥで銀染色されたバンドとウエスタンブロット法で検出されたバンドは一致しており，ＳＤＳ－ＰＡＧＥで検出されたバンドはHBs抗原ポリペプチドであることが確認された。なお，高分子側のバンドはダイマーに相当するものと判断され，デンシトメトリーにより，純度は99％以上と判定された。酵母由来HBs抗原中の酵母成分の検出はＥＬＩＳＡの競合法で行った。この反応には，酵母成分に対して幅広く反応することを確認した抗酵母抗体を用いた。本法は１～10ngの範囲において直線性が良いことから，この範囲において酵母由来HBs抗原中の酵母成分を定量した結果，Lowry法で測定した総蛋白に対する酵母成分の割合は0.22％であった。

酵母由来HBs抗原は糖鎖のない１本のポリペプチドから成り，そのアミノ酸組成はHBs抗原遺伝子の塩基配列より求めた理論値とほぼ一致した。Ｎ末端及びＣ末端のアミノ酸配列についての分析結果は，組み込んだHBs抗原遺伝子に相当するアミノ酸配列に一致した。電子顕微鏡観察では均一な球形粒子として観察され，平均粒子径は21.8nmであり，直径・形状ともに血漿由来HBs抗原とほぼ同じであった。その他の物理化学的性質は血漿由来HBs抗原と殆ど同じであった。酵母由来Ｂ型肝炎ワクチンの抗体産生力価は血漿由来Ｂ型肝炎ワクチンより有意に高く，チンパンジーの感染防御試験において，異なるサブタイプ（adr又はayw）のＨＢＶに対して感染防御能を有することが証明された。また，酵母由来Ｂ型肝炎ワクチンの有効性をヒトにおいて検討した結果，HBs抗体陽転率及び幾何平均HBs抗体価のいずれにおいても血漿由来Ｂ型肝炎ワクチンより優れた成績を示した。

以上より第一世代の血漿由来B型肝炎ワクチンの開発につづいて，遺伝子組換え法により酵母で発現したHBs抗原を原材料とするワクチンを開発するとともに，酵母由来B型肝炎ワクチンの第二世代のワクチンとしての優秀性を明らかとした。

論文の審査結果の要旨

本論文はB型肝炎のワクチンとして実際に用いられるHBs抗原の調整法と純度，安全性などに検討を加えたもので，原料としてヒトのHBe抗体陽性血漿，HBe抗原陽性のいずれの血漿を用いたときも最終産物のHBs抗原には感染性のウイルス粒子は存在しないことをチンパンジー接種試験及びＤＮＡハイブリッドで確認した。また第二世代のワクチンとして遺伝子組換え法により酵母において99%以上の純度のHBs抗原の大量調整に成功し，そのウイルスに対する防御能が血漿由来のHBsに優るとも劣らぬことを明らかにしたもので薬学博士の学位を授与するに値するものである。