



Title	B型肝炎ワクチンについて
Author(s)	吉田, 巖
Citation	makoto. 1989, 68, p. 2-7
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/85973
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

B型肝炎ワクチンについて

財団法人 阪大微生物病研究会

研究開発部長 吉 田 巖

1. はじめに

B型肝炎(HB)ワクチンは遺伝子工学によるワクチン第一号と言うばかりでなく人類最初のガン(肝癌)予防のワクチンです。

B型肝炎はウイルス性肝炎を引き起こすA型(HAV)、B型(HBV)、C型(血液伝播性非A非B型の新しい名前)、D型、E型(経口感染性非A非B型の新しい名前)に分類される肝炎ウイルスの仲間ですが、エイズやATLウイルスと同様にSTD(Sexually transmitted diseases: 性行為感染症)の病原体の仲間にも分類されています(表1)。

A型は劇症化しない限り大部分の症例は抗体を作り治癒します。D型とE型は日本にはほとんど見られません。C型は血液や体液を介して感染しますが、現在のところウイルス学的解明はようやく緒に就いたところ です。

さてB型肝炎は血液や体液を介して感染することから輸血用血液のスクリーニングがきびしく実施されるため、いわゆる輸血後肝炎は減少しております。しかしながらHBVの持続感染者が我が国でも300万人、全世界では2億人と推定されています。これら持続感染者すなわちキャリアのうち10%は慢性肝疾患を発病し、その後あるものは肝硬変、更に肝癌へと移行してゆきます。これらキャリアは輸血、院内感染、家族内感染などの新たな感染源になりますが、特に母親がキャリアの場合、新生児は高率にキャリアとなります。

表1 肝炎ウイルスの種類

肝炎の種類	ウイルス名	サイズ	分類	核酸	感染経路
A型肝炎	Hepatitis A Virus(HAV)	27nm	ピコルナウイルス	RNA	経口
B型肝炎	Hepatitis B Virus(HBV)	42nm	ヘパドナウイルス	DNA	血液、体液
C型肝炎	Hepatitis C Virus(HCV)	30~60nm?	フラビウイルス?	RNA	血液、体液
D型肝炎	Hepatitis D Virus(HDV)	36nm	未分類	RNA	血液、体液
E型肝炎	Hepatitis E Virus(HEV)	27nm?	カリシウイルス?	RNA	経口

B型肝炎の主な感染防止策としては、先に述べた様な血清のスクリーニングを含めた、感染経路の遮断の他に、ウイルス汚染時の予防措置の徹底、及び、ワクチン接種の3つが重要であると言われています。器具の汚染除去措置としては加熱滅菌として①オートクレーブ滅菌②乾熱滅菌③煮沸消毒(15分以上)が用いられ、薬物消毒としては塩素系消毒剤(塩素濃度0.1%で1時間)や2%グルタールアルデヒド液、エチレン・オキシドガス、ホルマリンガスが用いられます。また、汚染された人には、HBIGの投与が行われますが、医療機関等の感染の危険性の高い人には、ワクチンを予め接種する様に指導されています。HBワクチンは現在実用化されている唯一のウイルス性肝炎予防ワクチンです。

ここでは、血漿由来の第1世代ワクチンからその役割を引き継ぎつつある第2世代の酵母由来のHBワクチンについて、私たちの開発したBR-HBを例に挙げて述べさせていただきます。

2. 血漿ワクチンから組み換えワクチンへ

B型肝炎ワクチンはHBVがヒト、チンパンジーの肝臓でしか増殖せず、人工的に培養することが不可能なことから、前述のHBVキャリアの人の血漿からウイルス表面抗原粒子だけを分離精製し、加熱とホルマリン処理によって混入するウイルス粒子を不活化した後、アルミニウムゲルをアジュバント(免疫増強剤)として加えたものが血漿由来HBワクチンとして開発されました。1986年(昭和61年)1月から母子感染予防を目的として市販されています(図1)。

しかしこのHBワクチンにはいくつかの問題点があります。まず、原材料となるキャリアの人の血漿を大量に集めることが困難であり、またキャリアの人の血漿中には感染性のHBVのみならず、エイズウイルスのような未知の危険なウイルスが混入している可能性があること、このため過酷な不活化条件を要求されることか

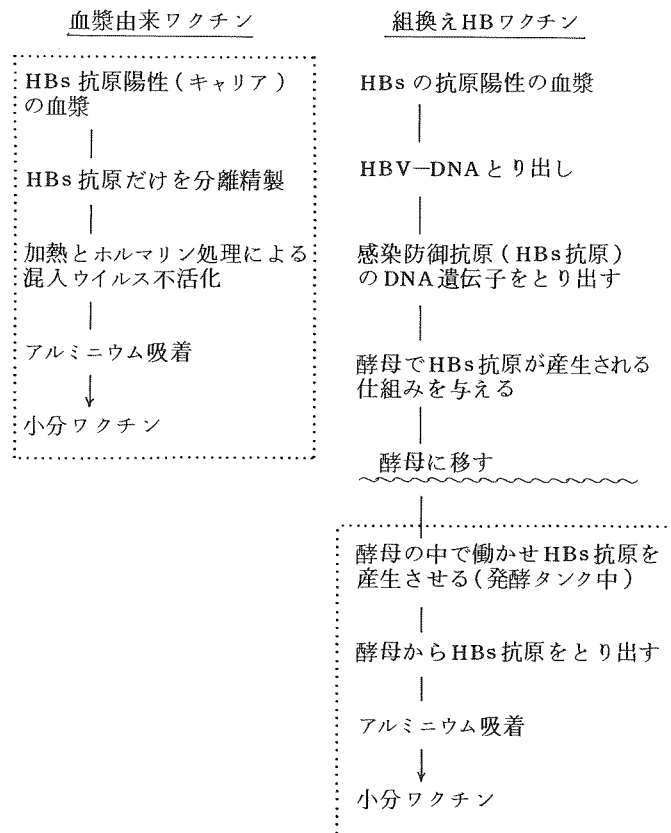


図1 HB ワクチンの製造方法の比較

らワクチンの免疫原性にまで影響する可能性があります。ワクチンの安全性を確認するため原液毎に非常に高価なチンパンジーを用いた試験を実施しなければなりません。更にこのような危険な原材料を取り扱うワクチン製造に従事する者の安全対策が十分でなければなりません。そこで遺伝子工学によるワクチン開発の要望が高まり組み換えDNA 技術を用いた酵母や動物細胞で産生されるHBs 抗原による第2世代のワクチン開発が進みました。なかでも1982年 Valenzuela が酵母でHBs 抗原を産生させることに成功して以来、いくつか同様の報告が国内外で発表されました。このことは人血漿由来HB ワクチンが抱えていた原材料、安全性の問題を解決するとともに、将来ワクチンの価格の低廉化が夢でなくなって来ました。

このようなことから、組み換えHB ワクチンの早期実用化が要望されるようになり、わが国では1988年3月酵母由来HB ワクチンの製造が承認されました。

3. 海外の状況

海外においては米国で最初の遺伝子組み換えワクチンとして酵母由来HB ワクチンが開発され1986年8月よりシンガポール、西独で販売され1987年1月には米国でも販売されました。また、ヨーロッパで開発されたものを含めると現在、日本も含め、数十ヶ国で使用されています。

これ迄、実用化された酵母由来HB ワクチンは肝細胞へのウイルス吸着の際、関与するPreS の抗原を含まないHBs 抗原のみのワクチンでしたが、現在日本、フランス、カナダ、米国等各国で酵母および動物細胞を用いてPreS 領域を含むワクチン開発が進んでいます(表2)。

4. 酵母でのHB ワクチンの製造

私達が1983年から開発した酵母由来HB ワクチンはPreS 部9個のアミノ酸が組み込まれたHBs 抗原を用いたものとして最初のものとなります。

現在製造承認申請中ですが酵母でのHB ワクチン製造の概略は次のようです。

キャリアー(HBe 抗原陽性、サブタイプ adr)の血漿からウイルス粒子を分離します。その粒子より

表2 HB ワクチンの開発状況

商品名	国名	製造会社名	由来	用量	製造承認
HEPTAVAX-B	米国	メルク	血漿	20ug	1981.11.16
hevac B PASTERU	フランス	パスツール	血漿(ad+ay)	5ug	
Engeric-B	ベルギー	スミスクライン RIT	酵母(adw)	20ug	1986. 6.
H-B-VAX II	米国	メルク	酵母(adw)	10ug	1986. 7.
沈降B型肝炎ワクチン「北研」	北里研		血漿	20ug	1984.10.30
HB ワクチン「ミドリ」	ミドリ十字		血漿	20ug	1984.10.30
HB ワクチン「化血研」	化血研		血漿	20ug	1985. 4.16
ビームゲン	化血研		酵母(adr)	10ug	1988. 3.29
γ-HB ワクチン「シオノギ」(輸入)	塩野義		酵母(adw)	10ug	1989. 3.29
ヘプタバックス-II	(輸入) 萬有	メルク	酵母(adw)	10ug	1989. 3.29
ビケンHB	阪大微研会		酵母(adr)	10ug	製造申請中

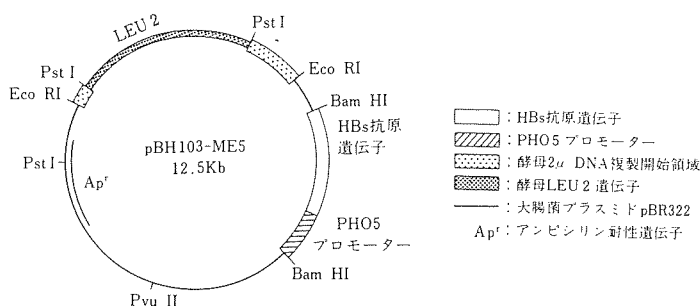


図2 発現プラスミド pBH 103-ME5 の構造

ウイルスの遺伝子を取り出し、さらにその中から表面抗原（PreS 2 領域の一部+HBs 抗原領域）の遺伝子だけを取り出します。この遺伝子を酵母（*Saccharomyces Cerevisiae* SHY4）で表面抗原が産生される仕組み（発現プラスミド）に組み込み、酵母の中にいれます。この発現プラスミドは酵母が培養されるとき培地中のリン酸の量の変化が信号となって、ワクチンの原料となる表面抗原を産生し始める様に設計されています（図2）。十分な産生を行わせた後、酵母を高圧ホモジナイザーで破碎し、HBs 抗原を取り出し精製します。私達は出来るだけHBs 抗原に変化を与えないよう、超遠心等の物理的な方法を用いています。精製HBs 抗原にはホルマリンを加えて、不活化し、アジュバントとして水酸化アルミニウム・ゲルに吸着後、小分けしてワクチンとなります（図1）。

この様にDNA組み換え技術によって得た酵母（形質転換酵母）を保存していれば、ほぼ無限に近く、また、一時に大量のワクチンをつくる事が可能です。しかもウイルスの一部（HBs 領域）しか使用しないので、感染性を持つ危険なウイルスが産生される可能性は全くありません。ただこの様な組み換えDNAという新しい技術を用いて製造するため組み換え酵母の取り扱いには十分な配慮がなされるよう実験段階から国の「組み換えDNA指針」によりP2施設の使用等の遵守が義務づけられています。さらに大量培養の段階でも組み換え酵母の拡散を防ぐ工夫がなされています。

なぜ酵母がHBs 抗原を産生する宿主に選ばれたかは、技術的な難易度や産生量もさることながら、この新しい組み換えDNA技術によって産生される

HBs 抗原の安全性に大きなポイントが置かれているのは当然のことです。幸い酵母は有史以前からワインやパンに、また、私達日本人の生活の中にも清酒、味噌、醤油等々に有用な微生物として利用されており、他の微生物に比べて安全であることが確かめられております。

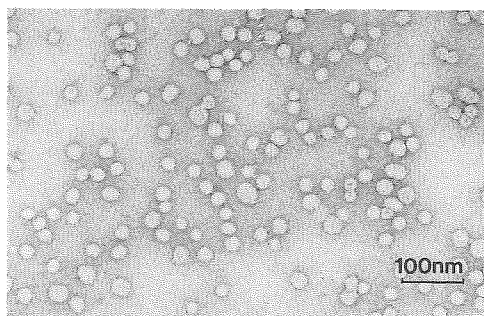
それでは組み換えDNA技術によって酵母で産生されたHBs 抗原は人血漿由来のHBs 抗原とどのような違い

があるかお話ししたいと思います。

5. 組み換え酵母由来のHBs 抗原

組み換え酵母により産生されたHBs 抗原（yHBs）を電子顕微鏡で観察すると人血漿由来HBs 抗原（hHBs）とはその粒子の形状が少し異なっています。hHBsは粒子表面が平滑で粒子サイズが均一（22nm）なのに比してyHBsは昔懐かしい金平糖

yHBs 抗原



hHBs 抗原

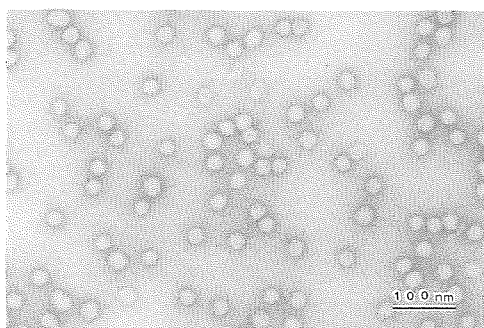
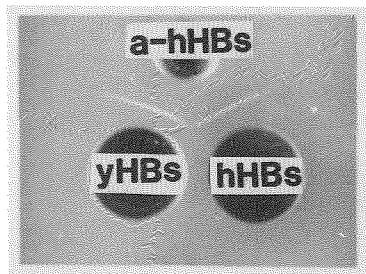


図3 HBs 抗原の電顕写真



a-hHBs : Anti-hHBs goat antibody (Dako Co.)
hHBs : Human HBs antigen
yHBs : Yeast HBs antigen

図4 yHBs 抗原と hHBs 抗原(血漿由来)の寒天ゲル内沈降反応

のような突起がみられその粒子サイズは、やや不均一です(図3)。しかしながら寒天ゲル内沈降反応によってその抗原性を hHBs と比較したところ全く同一の抗原性を持つことが確認されました(図4)。

この yHBs 抗原の粒子は HBs 抗原にプレS と呼ばれる領域の一部(アミノ酸9個)が付加された抗原粒子を酵母が産生する様に工夫されております(図5)。このプレS の領域はウイルスの表面に露出しており、ウイルスの肝細胞への吸着に関与するものと考えられています。このためこの領域を保有する表面抗原により、より強力な感染防御の免疫が得られることになると考えられます。

しかしながら、このような人工的に合成された抗原をワクチンに使用する場合、抗原の純度をできるだけ高めることが要求され実用化の大きな課題となっています。

宿主となった人血漿及び、酵母からの夾雑物を精製で除いた純度は、人血漿由来 HB ワクチンが95%

表3 純度試験の成績

方法	方法概要	純度
ポリアクリルアミドゲル電気泳動法	還元状態で検出されるバンドから hHBs 抗体と反応する抗原ペプチド量を限界希釈法により測定	>99.6%
ELISA 法	抗酵母成分と反応する酵母成分含量を測定する	>99%
P C A	宿主Yeast 抗原と反応するYeast 抗体を産生させる最少抗原量として測定	>99%
高速液体クロマトグラフィー法	分画パターンでの UV ₂₈₀ 吸収の面積比からの HBs 抗原粒子の純度測定	>99%

10	20	30	40	50	60
MSRTCDPAPN	MENTTSGFLG	PLLVLQAGFF	LLTRILTIPQ	SLDSWWTSLN	FLGGAPTCPG
70	80	90	100	110	120
QNSQSPTSNH	SPTSCPPICP	GYRWMLRRF	IIFLFIILLC	LIFLLVLLDY	QGMPLVCPLL
130	140	150	160	170	180
PGTSTTSTGP	CKTCTIPAQG	TSMFPSCCCT	KPSDGNCTCI	PIPSSWAFAR	FLWENASVRF
190	200	210	220	230	
SWLSLLVPFV	QWFGVLSPTV	WLSVIWMMWY	WGPSLYNLS	PFLPLLPIFF	CLWVYI

A Alanine	G Glycine	P Proline	HBs 由来
R Arginine	H Histidine	S Serine	Pre S 由来
N Asparagine	I Isoleucine	T Threonine	
D Aspartic acid	L leucine	W Tryptophan	
C Cysteine	K Lysine	Y Tyrosine	
E Glutamic Acid	M Methionine	V Valine	
Q Glutamine	F Phenylalanine		

図5 「ビケン- HB」中の HBs 抗原のアミノ酸配列

以上に対して酵母由来では97.5%以上の純度が要求されています。私どもは99%以上の純度を達成することが出来ました(表3)。なかでも酵母由来の DNA の除去については、残存する DNA が正常細胞を癌化するのではないかと懸念に対して小池の言う安全率 10^{-12} となる $10 \sim 100 \text{ pg}$ をはるかに下回る1投与量 ($10 \mu\text{g}$) 当り $9.6 \times 10^{-6} \text{ pg}$ (安全率 10^{-18}) 以下とすることが出来ました。このような物理化学的な面からの安全性ばかりでなく既存ワクチンで求められる動物試験による安全性試験の他に急性毒性、局所障害性、および変異原性試験の結果からも全く問題のないことが確認されています。

次にマウス、カニクイザルを用いて yHBs 抗原のワクチンとしての免疫原性について調べましたが、ワクチン ($10 \mu\text{g}$) としての力価は国立予防衛生研究所から交付された力価参照品に比べ、約2~4倍の高い力価を示し、半量の $5 \mu\text{g}$ でも2.1倍の力価を示しました(図6)。

HBs 抗体の上昇と追加接種によるブースター効果が認められました。

この yHBs 抗原のように有用成分のみをワクチンとするコンポーネントワクチンではアジュバントが重要な問題となって来ますがこの HB ワクチンの場合もマウス、カニクイザルの実験では水酸化アルミニウムの量が $0.1 \text{ mg} / 0.5 \text{ ml}$ (1ドーズ) より $0.25 \text{ mg} / 0.5 \text{ ml}$ の方が明らかに良好な抗体応答を示しました。

上記の様な yHBs 抗原の性状確認から安全性が高く、高い効果が予想される yHBs 抗原を用いた

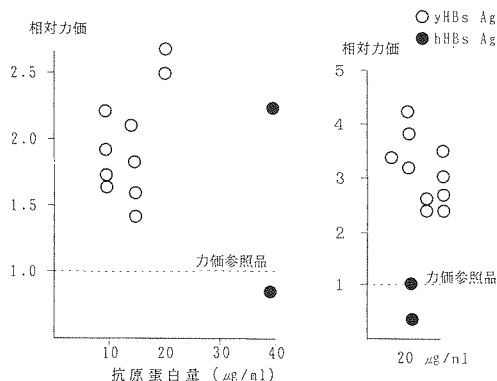


図6 yHB ワクチンの力価

H B ワクチン (B R - H B) の臨床試験についてお話ししたいと思います。

6. 組み換えHBワクチン (B R - H B) の臨床試験成績

これまでお話しした成績をもとに1986年 (昭和 6 1 年) 7 月、リコビナントHBワクチン臨床応用検討委員会 (織田敏次会長) で治験実施認可の評価を受けた後、岡山大学第一内科の長島秀夫教授 (現川鉄水島病院長) を会長とする治験研究会を中国四国の肝臓病の専門の先生により組織し、11月より順次、第1相、第2相、第3相の治験を実施しました。現在は母子感染予防の治験が厚生省のB型肝炎母子感染予防対策事業の方式に従って実施中です。

第1相試験 (57名) では1回接種量0.5ml 当り yHBs 抗原蛋白量 5 µg、10 µg 及び、20 µg を含む沈降ワクチンを3回接種して主として安全性について検討しました。血液及び尿の検査においてワクチン接種によると考えられる異常値は1例もありませんでした。副反応出現率は延べ159回の接種に対して17.6%で、主な副反応は局所の疼痛および発赤でした。いずれも軽度で問題はありませんでした。酵母由来成分に対する抗体反応についてワクチン接種前後の抗酵母抗体の変動を観察しましたが、最大量20 µg 接種群で3回注射後も有意な上昇は認められず安全性の点では問題ありませんでした (図7)。

第2相 (357名) では免疫原性と安全性を検討しました。特に接種経路 (皮下と筋肉)、抗原量 (10 µg と 20 µg) 及び、ワクチンロットの違いによる

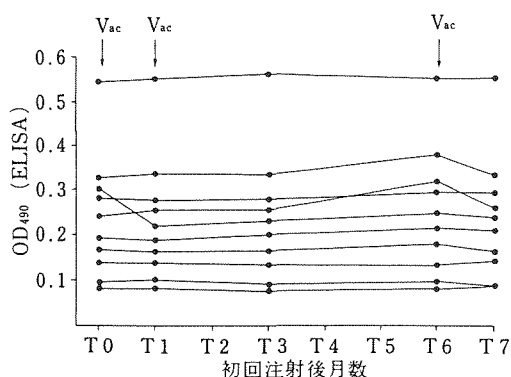


図7 yHB ワクチン注射後の抗酵母抗体の推移 (第1相臨床試験)

抗体反応を比較しました。酵母由来組み換えHBワクチンの接種後陽転率は、山本らの10 µg 皮下3回接種で88.9~95.0%、筋肉内接種で98.2~100%、矢野らの10 µg 皮下接種で96.3%、外国では Scolnick らの10 µg 3回接種で100%が報告されていますが、BR-HBは3ロットのワクチンで91.2~95.7% (10 µg / ドーズ)、93.8~97.0% (20 µg / ドーズ) と高い陽転率を示しました。また、抗体のレベルも高く、ロット間で統計学上有意の差はありませんでした。また、他報告で差のみられる接種経路別では筋肉内 (i.m.) 接種と皮下 (S.C.) 接種の間で抗体価はほとんど差がなく、陽転率においても差が見られませんでした (図8)。

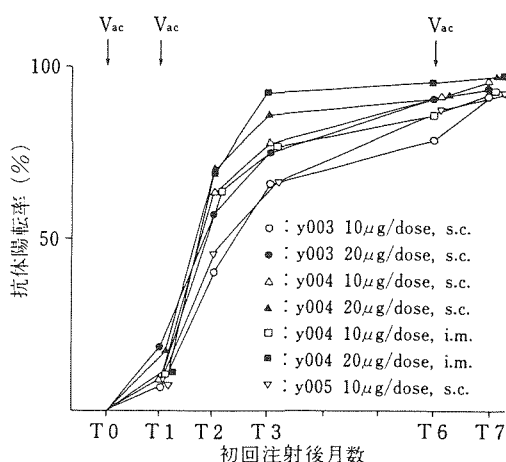


図8 yHB ワクチンの用量・注射経路別HBs 抗体陽転率の推移 (第2相臨床試験)

第3相(1949名)では第2相で安全性と免疫原性が確認されたyHBs抗原蛋白質量 $10\mu\text{g}/\text{ドーズ}$ (0.5ml)を用いてさらにその安全性と免疫原性について検討しました。その結果3回接種後1ヶ月で97%の高い抗体陽転率を示し(図9)、その幾何平均抗体価は $100\text{mIU}/\text{ml}$ 以上の高い値が得られました(図10)。10才未満の小児では半量の $5\mu\text{g}/\text{ドーズ}$ で98.5%の陽転率及び、平均 $400\text{mIU}/\text{ml}$ 以上の高い抗体価を示し、女性や若年者での抗体陽転率、抗体価が高いことが確認されました。また、接種前HBs抗体陽性者の副反応も抗体陰性者と同様ならず、いずれも軽度で一過性に見られたのみで、副反応については全く問題のないことがわかりました。HBワクチンの効果判定については他の感染症の様に罹患率の比較を行う事が不可能であり、接種による抗体陽転率、および、その抗体価をチンパンジーによる感染防御試験成績との比較に頼らざるを得ないので現状です。ちなみに有効な抗体価のレベルは $10\sim 100\text{mIU}/\text{ml}$ とされており、今回の成績はこれをはるかに上回る成績でありました。

本HBワクチン是不活化ワクチンのため、生ワクチンによる終生免疫とは異なり、3回接種後何年か経過すると抗体価の低下が起るため上記の有効な抗体価レベルを維持するための適当な間隔での追加接種が必要です。

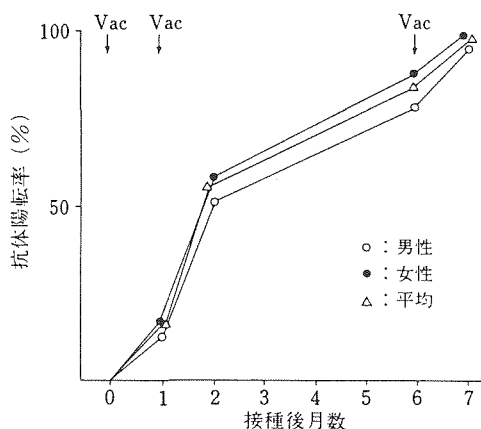


図9 yHBワクチン注射後の性別HBs抗体陽転率の推移

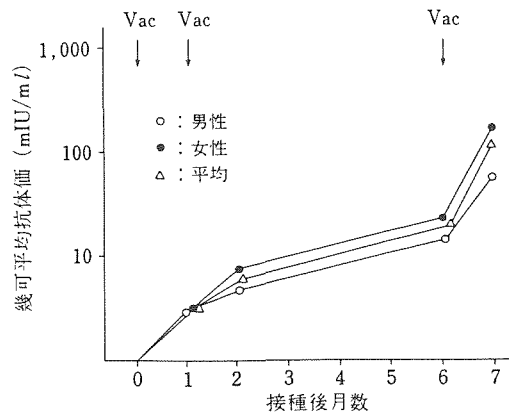


図10 yHBワクチン注射後のHBs幾何平均抗体価の推移

7. おわりに

酵母由来のHBワクチンを中心に述べさせて頂きましたが、遺伝子操作は、あたかも悪魔の落し子の様な扱いを受けた時期を乗り越え、正しい理解が進むと共に、その有用性が評価され始めました。その一つとして大量のワクチン製造が不可能といわれたHBワクチンに、ついに突破口を開き、第2世代のワクチンとしてその役割を引き継ぎつつあるということです。このことは世界保健機構(WHO)が推進している発展途上国の子供達にワクチンを接種して、感染症から守る計画(EPI計画)を可能にすることが、HBワクチンについても夢ではなくなったこととなります。