

## 2) 化学合成 HB ワクチンの可能性

新潟大学医学部第三内科 青柳 豊・市田 文弘

本邦においても、B型肝炎ウイルス (HBV) に対するワクチンとして、HBs 抗原陽性患者より精製した血漿由来ワクチンが開発され、母子間感染を含めた HBV 感染予防に供されている。しかしながら血漿より HBs 抗原を精製する場合、HBV それ自体、非A非B型肝炎ウイルスならびに slow virus を含めた未知のウイルスの不活性化に対する細心の注意が払われなければならない、これらの理由により第二世代のワクチンとして yeast recombinant ワクチンが第二相の臨床試験に入っている。さらに安全性を高める目的で1980年代より HBs 抗原の抗原決定基付近の合成ペプチドによる第三世代のワクチンの試みがなされている。

本稿では、これら合成ワクチンの可能性について、文献的考察を述べてみることにする。

## HBs 抗原の一次構造

HBs 抗原は、3200 base pair よりなる HBV DNA の Gene S よりコードされる 226個のアミノ酸の single polypeptide chain であり、その塩基配列より一次構造が決定されている<sup>1)</sup>。またアミノ末端より146番目の位置に糖鎖結合部位としてのアスパラギンがあり、ペプチドとして、糖鎖をもたない分子量約25,000のものと、その glycosylated form の29,000のものが存在する。さらにアミノ末端より55個のアミノ酸が延長した Pre-S region をもつものも存在する。特にこの Pre-S region には変性アルブミンに対する受容体が存在するとされており、さらにもうひとつの糖鎖結合部位 (アミノ末端より4番目のアスパラギン) も認められる。

Peterson<sup>2)</sup> は血漿より 25,000 (GP-25), 30,000 (GP-30, 前記した 29,000 のものと同じ) の各ペプチドを精製し、そのアミノ酸組成ならびにアミノ末端一次構造を決定し、DNA 塩基配列より推定されたものとよく一致することを報告している。

## 化学合成ペプチドワクチンの試み

化学合成ペプチドワクチンの報告は、1980年代より多数の施設で行われている<sup>3-11)</sup>。ここでは代表的な、Lerner ら<sup>3)</sup> および Dreesman ら<sup>5)</sup> の行った実験につ

いて解説する。

Lerner らは、ayw のサブタイプの塩基配列より推定された HBs 抗原の一次構造にしたがい、ほぼ分子全域をカバーする最短6個から最長34個のアミノ酸よりなる13種のペプチドを合成し実験に供した。これら13種のうち11種のペプチドを、3種は carrier protein なしで、7種は keyhole limpet hemocyanin を carrier protein としてウサギに免疫し抗体作成を試みている。アジュバントとしては Freund complete adjuvant ならびに Alum を用い、4回免疫して、4-15週で抗体反応を見ている。結果は、11種のうち4種のペプチドに対し、native HBsAg と反応する抗体が得られ、またその他の1種はペプチド自身とは反応するが、native HBsAg とは反応しない抗体産生を認めた。彼らは、これらの実験より 1) 可溶性であること 2) 6個以上のアミノ酸よりなること 3) プロリンを含む (一次構造上  $\beta$ -turn をとりやすい) ペプチドがワクチンに適しているとしている。

つぎに、Dreesman らの報告について述べることにする。彼らは、ayw のサブタイプより推定される一次構造のアミノ末端より117-137番目、および122-137番目の二個のペプチドを、124と137のシステインによる S-S 結合で環状構造を作らせて実験に用いている。アジュバントとしては Freund complete adjuvant や Alum を用い、またはリポソームのかたちで carrier protein を用いることなく、マウスに一回のみ免疫し14日で充分な抗体産生を確認している。彼らは合成ペプチドを環状にすることによって、より native に近い立体構造をとるのではないかと推測しており、アジュバントの種類には抗体反応は関係がなかったとしている。

## 抗原決定基の予測

現在ではアミノ酸一次構造より立体構造と抗原決定基を予測することがある程度可能になってきているわけであるが<sup>4)</sup> 図1は、226個の HBsAg の一次構造について行った結果を示す。これは各アミノ酸に対してその疎水性および親水性の程度に応じて点数を与え、6個毎の平均の値をグラフ上に表わしたもので、0より上に出てい

る部分は親水性の性質を、0より下の部分は疎水性の

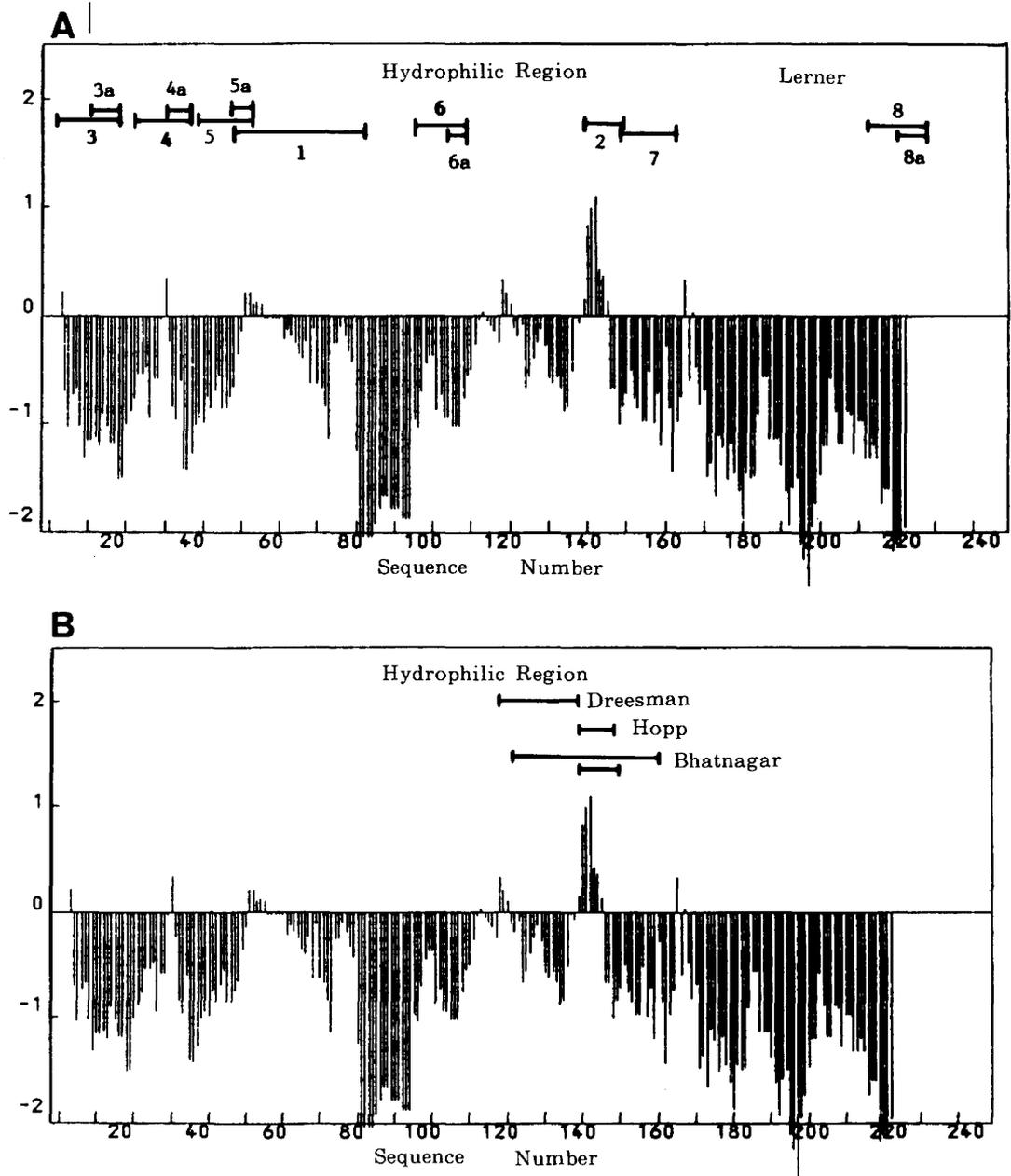


図 1 HBs Ag 一次構造より親水性領域を検索したもので、プログラムは PC-9800 用、江口至洋、麻生陽一著“Basic による生化学”。共立出版株式会社、東京、1985。による。  
Lerner, 文献 3): Dreesman, 5): Hopp, 4): Bahtnagar, 7).

ところを示している。これらの結果に関し、マッコウクジラのみオグロビンについて知られていることは、親水性の部分と抗原決定基がよく一致することである<sup>4)</sup>。

図1AにLernerらの合成したペプチドの分子内の位置を横線で示し、図1Bには、Lernerらの報告以降の合成ペプチドの分子内の位置を示すが、上記の結果に従い140残基付近の親水性の部分をおろして作られていることが理解できる。またHBsAgは、全体として比較的疎水性の性格を持っていることを示している。

### HBs 抗原のサブタイプの問題

HBs 抗原の抗原決定基には、すべてに共通する a 決定基、対立する d と y ならびに r と w の決定基が存在し、それらに対応するアミノ酸一次構造が示されている<sup>1)</sup>。これらの結果によれば、各サブタイプを規定するアミノ酸は HBsAg 分子内に比較的広く分布しているものと思われ、立体構造を広く認識していることが示唆される。

### 化学合成ペプチドワクチンの問題点

合成ペプチドによるB型肝炎ワクチンの問題点についてまとめてみると、1) 合成ペプチド自身に抗原活性があるか、または、高分子量の担体蛋白を用いなければならないか 2) 合成ペプチドに対して作成された抗体が、native HBsAg と反応するかどうか 3) 合成ペプチドに対して作成された抗体が中和活性を持つか 4) 量的に充分な抗体産生が得られるかどうか 5) サブタイプの問題として、すべての HBsAg に対して共通抗原性を持つ a 決定基を用いるか、その他の決定基を用いるか 6) HBsAg だけでなく、変性アルブミンに対するレセプターを持つとされる pre-S 領域のペプチドのワクチンの可能性<sup>12)</sup>、などがあげられる。

### おわりに

いままで化学合成ペプチドワクチンの可能性ならびに問題点などについて述べてきたわけであるが、次世代ワクチンとして抗イディオタイプ抗体による HB ワクチンの試み<sup>13)</sup>が動物実験によりなされている。

### 参考文献

1) Tiollais, P., et al.: Structure of Hepatitis B virus DNA, In "Viral hepatitis and liver disease" eds. Vyas, G. N., Dienstag, J. L. and Hoofnagle, J. H. pp. 49~65 (1984). Grune

and Stratton Inc. Orland, Florida.

- 2) Peterson, D. L.: Isolation and characterization of the major protein and glycoprotein of hepatitis B surface antigen. *J. Biol. Chem.*, 256:6975~6983, 1981.
- 3) Lerner, R. A., et al.: Chemically synthesized peptides predicted from the nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome elicit antibodies reactive with the native envelope protein of Dane particles. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78:3403~3407, 1981.
- 4) Hopp, T. P. and Woods, K. R.: Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78:3824~3828, 1981.
- 5) Dreesman, G. R., et al.: Antibodies to hepatitis B surface antigen after a single inoculation of uncoupled synthetic HBsAg peptides. *Nature*, 295:158~160, 1982.
- 6) Prince, A. M., et al.: Hepatitis B virus vaccine: Identification of HBsAg/a and HBsAg/d but not HBsAg/y subtype antigenic determinants on a synthetic immunogenic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79:579~582, 1982.
- 7) Bahtnagar, P. K., et al.: Immune response to synthetic peptide analogues of hepatitis B surface antigen specific for the a determinant. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79:4400~4404, 1982.
- 8) Neurath, A. R., et al.: Specificity of antibodies elicited by a synthetic peptide having a sequence in common with a fragment of a virus protein, the hepatitis B surface antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79:7871~7875, 1982.
- 9) Gerin, J. L., et al.: Chemically synthesized peptides of hepatitis B surface antigen duplicate the d/y specificities and induce subtype-specific antibodies in chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80:2365~2369, 1983.
- 10) Ionescu-Matiu, I., et al.: Epitopes associated with a synthetic hepatitis B surface antigen peptide. *J. Immunol.*, 130:1947~1952, 1983.
- 11) Brown, S. E., et al.: Affinity of antibody response in man to hepatitis B vaccine de-

terminated with synthetic peptides. Lancet, 11: 184~187, 1984.

- 12) Neurath, A.R., et al.: Location and chemical synthesis of a pre-s gene coded immunodominant epitope of hepatitis B virus. Science, 224: 392~395, 1984.
- 13) Gryznych, J.M., et al.: An anti-idiotypic vaccine against experimental schistosomiasis. Nature, 316: 74~76, 1985.

司会 どうも有難うございました。合成ワクチンの可

能性ということで、多方面にわたってのお話だったと思うのですが、どなたかご質問ございますでしょうか。人間に使用するまでには、まだまだ遠いのですが、そんなに遠い夢ではなくなって来ていることも事実だと思います。どなたかございますでしょうか。どうも有難うございました。次に実際的な問題としての母児間感染予防の臨床的研究、最近では厚生省ではこの母児という言葉は使わずに「母子感染」という言葉を使おうということをご提案しております。日本の慣用語として母子衛生というのはあるそうです。

### 3) 母児間感染予防の臨床的研究

新潟大学医学部産婦人科学教室

吉谷 徳夫・大桃 幸夫・安達 茂実  
吉沢 浩志・竹内 正七

e 抗原陽性の HBs キャリア妊婦からの出生児の 80~90%がキャリア化するとされており<sup>1)</sup>、HBV キャリアの再生産の場として周産期が重要な位置を占めているのは周知の事実である。

HBIG, HB ワクチンを用いた母児間感染予防の研究は治験段階が終了し、優れた免疫獲得効果が確認され、昭和61年より母子保健関連の国家的事業として実施に移されることが決定した。

本稿では、我々がこれまで行ってきた母児間感染予防に関する臨床成績について述べ、今後の問題点について言及したい。

## I. 研究方法

### 1) 対象

HBs キャリア妊婦で、妊娠後期に HBe 抗原陽性と判明した場合に、出生児が臍帯血又は生後の血清で HBs 抗原が陰性であることを確認し、その出生児に以下に述べる方法で HBIG 及び HB ワクチンの投与を行った。

### 2) 検査方法

HBs 抗原は Reverse passive hemagglutination (RPHA) 法、HBs 抗体は Passive hemagglutination (PHA) 法で、HBe 抗原・抗体は Micro-Ouchterlony (MO) 法、昭和58年11月より Enzyme immunoassay (EIA) 法で測定した。

### 3) HBIG 及び HB ワクチン

投与した HBIG は PHA 法で 16,000~32,000 倍の力価をもち、1回 1 ml を臀部に筋注した。HB ワクチンはミドリ十字社製、アジュバント添加のもので、1 回蛋白量としては 8~10 $\mu$ g を臀部に皮下注した。

### 4) 投与方法 (図1)

- a) A 群 (昭和53年2月より昭和55年7月まで)  
生後48時間以内に1回目の HBIG 投与を行ない、児の血中 HBs 抗体価が 2<sup>2</sup>~2<sup>3</sup> 倍以下の時点で HBIG の追加投与を生後6~8ヶ月まで続けた。
- b) B 群 (昭和55年7月より昭和56年6月まで)  
児の血中 HBs 抗体価に関係なく生後48時間以内、1

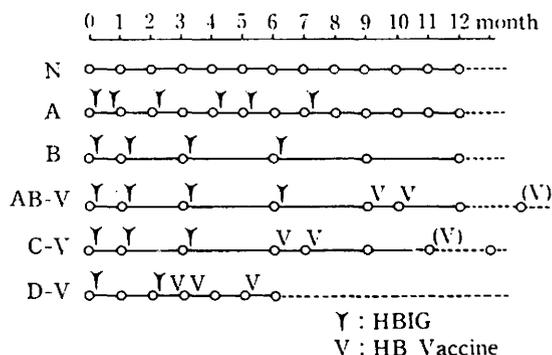


図1 HBIG および HB ワクチン投与スケジュール