

## 就任講演

# リコンビナント水痘生ワクチンによるB型肝炎の予防

白木 公康

富山医科薬科大学ウイルス学教室

### はじめに

水痘带状疱疹ウイルス感染は、初感染で水痘を発症し宿主は回復するが、ウイルスは神経節に潜伏し、加齢・免疫の低下に伴い带状疱疹を引き起こす。水痘ウイルスの潜伏期はほぼ14日で、感染した場合その95%が発症するとされている。水痘感染は、免疫不全状態においては、致命的となることが知られており、特に小児白血病では、7—28%の死亡率が報告されている。また健康小児・成人においても肺炎・脳炎などの重篤な合併症を起こす。小児科領域では、その感染伝播力の強さのため病棟内で患者がでた場合、病棟閉鎖をすることになり、2次・3次感染者ができればその期間は、相当長期にわたることになる。また、带状疱疹はそれ自身疼痛を伴うが、罹患患者の約10%は带状疱疹後神経痛を経験する。

水痘生ワクチンは、水痘带状疱疹ウイルス感染が重症となる免疫不全状態にある白血病児に対しても、副反応なく安全に使用できるような高度弱毒生ワクチンとして開発された。そしてワクチン接種による水痘感染の予防効果および免疫の持続に関しても、従来の他の生ワクチンと同様に生涯継続するものと思われる。また、白血病児での接種成績では带状疱疹の発生頻度も低く、水痘及び带状疱疹予防のための理想的なワクチンと考えられる。したがって、この水痘生ワクチンは、現在日本をはじめ欧米でも広く使用されている。

B型肝炎ウイルスは、急性肝炎・慢性肝炎・肝硬変・肝癌をおこし、日本人の2—3%がウイルスの保因者である。現在その感染予防のためハイリスクグループに対してB型肝炎表面(HBs)抗原サブユニットワクチンの3回接種が行われている。

そこで、安全・有効に使用されている水痘生ワク

チンウイルス遺伝子にHBs抗原遺伝子を組み込んで、1回の接種にて水痘とB型肝炎を同時に予防できるワクチンの候補株を開発したのでそのことについて報告したい<sup>1)</sup>。ここで述べるリコンビナント水痘生ワクチンの研究は、ほぼこの1年間に行われたものである。

### 1. リコンビナント水痘ウイルスの作製

水痘ウイルスのチミジンキナーゼの研究及びその変異株の解析を通して、水痘ウイルスにとってチミジンキナーゼは必須ではないこと<sup>2,3)</sup>、また、チミジンキナーゼ遺伝子の塩基配列を明らかにした<sup>4)</sup>。したがって、HBs遺伝子を水痘ウイルスのチミジンキナーゼに組み込んでも水痘ウイルスは、増殖できることが予想された。チミジンキナーゼとHBs抗原遺伝子の塩基配列からチミジンキナーゼ遺伝子の翻訳部分(open reading frame)のinitiation codon(ATG)に続く2番目のcodonからHBs遺伝子の翻訳が始まるように、チミジンキナーゼ遺伝子にHBs遺伝子を組み込むことにした。このようにした場合HBs抗原はチミジンキナーゼ遺伝子独自のenhancerあるいはpromotorを利用してHBs抗原を発現でき、また、その発現は水痘带状疱疹ウイルスの本来の調節遺伝子によって制御されることになる。

B型肝炎ウイルスのHBs抗原のPreS遺伝子には、肝細胞へのレセプター領域が存在している。このリコンビナントウイルスが発現されたレセプターを介して肝細胞を特異的に攻撃することを避けるため、このレセプター領域を除いたB型肝炎のPreS抗原の一部とS抗原をふくむHBs抗原遺伝子を、クローニングした水痘ウイルスチミジンキナーゼ遺伝子に組み込んでキメラプラスミドを作製した。水

痘生ワクチンウイルス DNA とキメラプラスミド DNA をトランスフェクションして、水痘ウイルス特有の細胞変性を指標としてウイルスをクローニングして HBs 抗原に対する蛍光抗体法によりリコンビナント水痘生ワクチンウイルスを選択した。

ウイルス感染細胞を  $^{35}\text{S}$  メチオニンで標識して、ウイルスによって産生された HBs 抗原を免疫沈降法により確認したところ、感染細胞内に 26K と 30K の蛋白と細胞外に 30K と 35K の蛋白が検出された。感染細胞内と培養上清中の HBs 抗原量を RHPA 法により測定すると感染細胞  $10^6$  あたり  $10\mu\text{g}$  程度合成されており培養上清中には、 $23\text{ng/ml}$  の濃度で分泌されていた。培養上清中に分泌された HBs 抗原をポリエチレングリコールにより沈澱後、密度勾配超遠心法を組み合わせて精製後、電子顕微鏡により観察した。HBs 抗原は、大きさ  $20\text{--}25\text{nm}$  の粒子として浮遊密度 (CsCl)  $1.20\text{g/cc}$  の分画に精製された。このことから HBs 抗原は、細胞内で合成され細胞外へ HBs 粒子として分泌されていることが明らかとなった。また、この粒子は感染細胞の電子顕微鏡観察で確認された粒子構造と一致していた。以上の様に、HBs 抗原を発現するリコンビナント水痘生ワクチン株を樹立した。

## 2. リコンビナント水痘ウイルスの免疫原性

HBs 抗原を発現するリコンビナント水痘ウイルスが、B 型肝炎のワクチンとして使用されるためには少なくとも、この株を接種することにより HBs 抗原に対して免疫応答を惹起する必要がある。そこで、水痘帯状疱疹ウイルスの感染実験モデルとして、これまで使用されてきたモルモットを用いてリコンビナント水痘ウイルスの HBs ワクチンとしての免疫原性の検討をおこなった。

モルモットにリコンビナント水痘生ワクチンと現行の HBs サブユニットワクチンを接種して、HBs 抗原及び水痘ウイルスに対する免疫応答を検討した。

リコンビナント水痘生ワクチンは、水痘ウイルスに対してだけでなく、HBs 抗原に対しても、免疫応答を誘導した。リコンビナント水痘生ワクチンの接種モルモットでは、水痘に対して、原株である水痘生ワクチンと同等に、また、HBs 抗原に対しては、HBs サブユニットワクチンと同等の抗体価が検出

され、リコンビナント水痘生ワクチンが、水痘ワクチン及び HBs ワクチンとしての免疫原性を有していることが確認された。

リコンビナント水痘生ワクチンは、それを接種したモルモットの観察より原株水痘生ワクチンに比べて特に病原性を獲得したとは思われないことからワクチンとしての使用の可能性を示した。

このようにして、現在、安全・有効に使用されている水痘生ワクチンを基礎として、水痘・B 型肝炎予防のためのワクチン候補株を樹立した。そして、このワクチンは、原株水痘生ワクチンと同様に安全・有効にしかも水痘・B 型肝炎に対して 1 回の接種により生涯持続する免疫が得られるものと思われる。

## 3. リコンビナント水痘生ワクチンによって発現された HBs 抗原の解析

リコンビナント水痘生ワクチンによって発現された HBs 抗原は、細胞内で 26K と 30K の蛋白として合成され、30K と 35K の蛋白となり HBs 粒子として細胞外へ分泌されていることを述べた。この分子量の変化、即ち、HBs 蛋白のプロセッシング(修飾)の過程を glycosylation (糖付加)を中心に検討した。glycosylation には、蛋白上のアスパラギンのアミド基と N-アセチルグルコサミンとの N-グリコシド結合と、セリンやスレオニンの水酸基と糖との O-グリコシド結合の二種類が知られている。現在までの HBs 抗原の研究により、HBs 抗原には N-グリコシド結合のみの存在が知られておりその結合部位も明らかにされている。

ウイルス感染細胞内での HBs 抗原の合成・細胞外への分泌過程を検討するため、感染細胞を  $^{35}\text{S}$ -メチオニンで 10 分間標識し、アイソトープを洗い去り過剰の非放射性のメチオニンを入れた培地で培養し経時的にメチオニンで標識された HBs 抗原の分子量の変化と細胞外への分泌過程を免疫沈降後 SDS-PAGE によって解析した(pulse-chase 実験)。この結果、HBs 抗原は、26K と 30K の蛋白として合成され、1 時間後培養上清に 30K と 35K の蛋白として分泌されていた。しかし、細胞分画に、30K と 35K 蛋白は検出されなかった。また、4 時間後まで細胞外に分泌されないで 26K と 30K の蛋白として細胞内にとどまる HBs 抗原が存在していた。

次に、糖鎖による修飾を検討するため N-グリコシド結合の阻害剤である tunicamycin と O-グリコシド結合を含めてゴルジ装置での修飾を阻害する monensin のそれぞれの薬剤の存在下で感染細胞を標識し免疫沈降後 SDS-PAGE により HBs 抗原の processing を検討した。tunicamycin の存在下で HBs 抗原は細胞内に 26K と細胞外に 30K の蛋白として検出され、細胞内の 30K と細胞外の 35K は検出されなかった。また、monensin 処理の場合には、細胞内と細胞外の両者に 26K と 30K の抗原が検出され細胞外への分泌の際に分子量の変化は、認められなかった。還元・非還元の状態での SDS-PAGE 上の HBs 抗原の分子量の変化から、これらの過程で HBs 抗原は、dimer (2 量体) として、存在していることが明らかとなった。26K の蛋白以外は、グルコサミンで標識されるので糖蛋白であることも判明した。これらのことより HBs 抗原は、細胞内で 26K の蛋白として合成され 2 量体となり一方の蛋白に N 型の糖鎖が付加され 30K の糖蛋白となる、これに続いて 26K—30K の 2 量体となった両者の蛋白にゴルジ装置を通過して O-グリコシド結合による修飾をうけ、それぞれ 30K—35K 蛋白となり細胞外へ分泌される。この過程は、速いものでは 1 時間以内に終了することが推測された。

リコンビナント水痘生ワクチンウイルスによって発現された HBs 抗原を解析することによって、HBs 抗原の成熟修飾過程が明らかにされた。興味深いことは、このウイルスによって発現された HBs 抗原が、従来の HBs 抗原のように 2 量体として存在して N-グリコシド結合を有することに加えて、O-グリコシド結合も保有していることが考えられることである。今後、さらに N-, O-グリコシド結合の存在を N-グリコナーゼ、O-グリコナーゼ処理により確認し、この過程が細胞由来の酵素によるものか水痘ウイルス由来の酵素によるものか、また、それらの生物学的・免疫学的意義を明らかにしたい。

#### おわりに

将来の水痘と B 型肝炎の予防のための有望なワクチンの候補となるリコンビナント水痘生ワクチンについて述べてきた。水痘帯状疱疹ウイルスは、体液

性免疫だけでなく強力な細胞性免疫を誘導する。この細胞性免疫、特に遅延型反応を利用して水痘ウイルス皮内抗原<sup>5, 6)</sup>を開発してきたが、今春診断薬として臨床応用されることとなった。ここで報告した方法を用いてエイズの原因ウイルスである HIV の表面抗原遺伝子を組み込んで、皮内抗原にみられるような水痘ウイルスの強い細胞性免疫と体液性免疫の誘導能を利用したエイズ・水痘の予防ワクチンなどを考えていきたい。今後、HBs 抗原を発現するリコンビナント水痘生ワクチンの実用化に向けてさらに検討していきたい。

本講演の機会を与えていただいた富山医科薬科大学医学会会長 片山 喬教授、司会をして下さった渡辺明治教授、お世話していただいた岡田敏夫教授に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) Shiraki K., Hayakawa Y., Mori H. et al. : Development of immunogenic recombinant Oka varicella vaccine expressing hepatitis B virus surface antigen. *J. Gen. Virol.* in press.
- 2) Shiraki K., Ogino T., Yamanishi K. et al. : Isolation of drug resistant mutants of varicella-zoster virus ; cross resistance of acyclovir resistant mutants with phosphonoacetic acid and bromodeoxyuridine. *Biken J.* **26** : 17—23, 1983.
- 3) Shiraki K., Ogino T., Yamanishi K. et al. : Immunochemical characterization of pyrimidine kinase induced by varicella-zoster virus. *J. Gen. Virol.* **66** : 221—229, 1985.
- 4) Mori H., Shiraki K., Kato T. et al. : Molecular analysis of the thymidine kinase (TK) gene of TK deficient mutants of varicella-zoster virus. *Intervirology* **29** : 301—310, 1988.
- 5) Shiraki K., Yamanishi K., Takahashi M. et al. : Biologic and immunologic characterization of the soluble skin-test antigen of varicella-zoster virus. *J. Infect. Dis.* **149** : 501—504, 1984.

- 6 ) Baba K., Shiraki K., Kanasaki T. et al. :  
Specificity of skin test with varicella-zoster  
virus antigen in varicella-zoster and herpes  
simplex virus infections. J. Clin. Microbiol.  
**25** : 2193—2196, 1987.