薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
108 (4) 339-344 (1988)

組換え B 型肝炎ワクチンの開発研究. ELISA 法による混在酵母成分
及び体液性抗酵母成分抗体測定系の開発

大谷 渡,* 大水章正, 鷺見昭典, 大村孝男,
上村八尋, 横山和正

(株)ミドリ十字 中央研究所

Study on Recombinant Hepatitis B Vaccine: Development of ELISA Methods
for Detection of Contaminating Yeast Components in the Vaccine
and Humoral Anti-yeast Component Antibody
Developed in Humans and Guinea-pigs

WATARU OHTANI,* AKIMASA OHMIZU, AKINORI SUMI, TAKAO OHMURA,
YAHIRO UEMURA and KAZUMASA YOKOYAMA

Central Research Laboratories, The Green Cross Corporation,
Shodai-Ohtani, Hirakata, Osaka, 573, Japan

(Received November 12, 1987)

We have developed an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for the detection of contaminating yeast components in the hepatitis B surface antigen (HBsAg) which was produced using yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by gene technology. This method could detect 1 ng/ml of the yeast component mixture. By using this method, we found that average remaining amounts of the yeast component mixture in specimens of recombinant HBsAg manufactured in an industrial real were not more than 0.52%, which was verified by the sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoretic method.

Next, we have developed an ELISA method for the assay of anti-yeast component antibody and analyzed changes of the antibody level in guinea-pig and human sera after vaccination with recombinant hepatitis B vaccine. Maximum doses given to guinea-pigs and humans were 100 and 20 μ g per individual, respectively. As a result, anti-HBs antibody level in guinea-pig and human sera increased after vaccination, but no change was observed in anti-yeast component antibody level.

Keywords—recombinant hepatitis B vaccine; hepatitis B surface antigen; enzyme-linked immunosorbent assay; yeast component detection; anti-yeast component antibody

緒 言

近年、遺伝子組換え技術の進歩により、原料確保の難しい蛋白質製剤が、医薬品として製造できるようになった。現在市販されている B 型肝炎ワクチンは、HBs 抗原陽性血漿を原料としているために、原料確保に難点があると同時に、チンパンジーを用いた安全性試験が要求される。そのため、B 型肝炎ワクチンの原料である HBs 抗原を遺伝子組換え技術を用いて開発する動きが日本を含めた世界中で活発化した。現在では酵母を宿主として HBs 抗原を発現させる系^{1,2)}が最も多用されている。遺伝子組換え技術によって医薬品を開発する場合、安全性の指標の 1 つとして純度が考えられるが、その試験を行うためには宿主由来の不純物を高感度に検出する方法の開発が待望されていた。

そこで、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いた高感度な酵母成分の測定系の開発を検討し、酵母由来の精製 HBs 抗原液中に混在する微量の酵母成分を検出できる方法を確立した。また、一般に正常人血清中には一定レベルの抗酵母成分抗体の存在が知られており、³⁻⁵⁾ 酵母由来の B 型肝炎ワクチン接種によって被接種者血清中の抗酵母成分抗体価が上昇する可能性も考えられた。そこで、ELISA 法による抗酵母成分抗体価の高感度な測定系を開発し、酵母由来の B 型肝炎ワクチン接種後の抗酵母成分抗体価の追跡調査に応用した。

実 験 の 部

精製 HBs 抗原液及び組換え B 型肝炎ワクチンの調製 酵母由来の精製 HBs 抗原液は、HBs 遺伝子が組み込まれた酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* GRF18)²⁾ を、Ohmura らの方法⁶⁾ によって抽出・精製した溶液を用いた。更に、蛋白質濃度 20 $\mu\text{g/ml}$ 当たり水酸化アルミニウムゲル 500 $\mu\text{g/ml}$ と 0.01% のチメロサルを加え分注したものを、組換え B 型肝炎ワクチンとした。

また、血漿由来の精製 HBs 抗原は、Funakoshi らの方法⁷⁾ によって精製したものをを用いた。

抗酵母成分ウサギ血清の作製 HBs 遺伝子を含まないプラスミドを持つ酵母を培養後破碎し、HBs 遺伝子を含むプラスミドを持つ酵母の場合と同様に、遠心上清液を粗精製し酵母成分とした。調製した酵母成分溶液 ($A_{280}=12.4$) 1 ml と等量のフロインドの完全アジュバントとを混合乳化し、ウサギの背部皮下に 2 ml 免疫した。追加免疫は、初回免疫量の半量を 2 週間ごとに 3 回行った。全採血は、最終免疫から 2 週間後に行い、血清分離後、抗酵母成分ウサギ血清を得た。

酵母成分の測定方法 コースター社製 96 穴 EIA プレートに、50 mm 炭酸緩衝液 (pH 9.6) で 100 倍希釈した酵母成分 ($A_{280}=0.12$) を 100 $\mu\text{l/well}$ 加え、室温 2 時間インキュベートした。次に、1% ウシ血清アルブミン (BSA) 含有 phosphate buffered saline (PBS) (75 mm リン酸, 75 mm 塩化ナトリウム, 0.01% チメロサル, pH 7.2) を 200 $\mu\text{l/well}$ 加え、室温で 2 時間と 4°C で一昼夜インキュベートし各ウェルをブロッキング後、蒸留水で 5 回洗浄し酵母成分結合プレートを調製した。

一方、検体 55 μl と抗酵母成分ウサギ血清 10 万倍希釈液 55 μl とを混合し室温一昼夜インキュベート後、この混合溶液を先に調製した酵母成分結合プレートに 100 $\mu\text{l/well}$ ずつ加え、37°C 2 時間インキュベートした。蒸留水で各ウェルを 5 回洗浄後、ヤギ抗ウサギ IgG 抗体のパーオキシダーゼ標識体 (KPL 社, 800 倍希釈液) を 100 $\mu\text{l/well}$ 加え、37°C 2 時間インキュベートした。蒸留水で各ウェルを 5 回洗浄後、基質 (1 mg/ml *o*-フェニレンジアミン, 0.006% 過酸化水素) を 100 $\mu\text{l/well}$ 加え、室温で 30 分間酵素反応を行った。反応は、5 N 硫酸を 50 $\mu\text{l/well}$ 加えて停止させ、各ウェルの吸光度 (492 nm) をタイターテック® マルチスキャン (フロウラボラトリーズ社) で測定した。

抗酵母成分抗体の測定方法 96 穴 EIA プレートに、50 mm 炭酸緩衝液 (pH 9.6) で 100 倍希釈した酵母成分 ($A_{280}=0.12$) を 100 $\mu\text{l/well}$ 加えた。室温 2 時間のインキュベート後、各ウェルを蒸留水で 5 回洗浄し 1% BSA 含有 PBS を 200 $\mu\text{l/well}$ 加えた。4°C 一昼夜インキュベート後、蒸留水で 5 回洗浄した。

次に、検体である血清を 1% BSA と 0.5% Tween 20 含有 PBS で希釈し、先に調製したプレートに 50 $\mu\text{l/well}$ 加え 37°C 2 時間インキュベートした。各ウェルを洗浄液 (0.05% Tween 20 含有生理食塩水) で 9 回洗浄後、ヤギ抗ヒト又は抗モルモット IgG 抗体のパーオキシダーゼ標識体 (KPL 社, 800 倍希釈液) を 50 $\mu\text{l/well}$ 加え、37°C 2 時間インキュベートした。洗浄液で各ウェルを 9 回洗浄後、基質を 50 $\mu\text{l/well}$ 加え、室温 30 分間酵素反応を行った。反応は、5 N 硫酸を 50 $\mu\text{l/well}$ 加えて停止し、吸光度 492 nm を測定した。

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 0.1% SDS-12.5% ポリアクリルアミドゲルに、あらかじめ 2% SDS 含有 5% メルカプトエタノール溶液で 100°C 5 分間処理した酵母成分 1 μg を添加し、12 mA の定電流で 4 時間泳動した。染色は、銀染色試薬「第一」(第一化学薬品(株)) を使用し、方法はそのテクニカルマニュアルに従った。

イムノブロッティング法 あらかじめ 2% SDS 含有 5% メルカプトエタノールで 100°C 5 分間処理した酵母成分 10 μg を 0.1% SDS-12.5% ポリアクリルアミドゲルに添加し 12 mA の定電流で 4 時間泳動後、ニトロセルロース膜 (アドバンテック東洋(株)製) に 36 V の定電圧で 18 時間転写した。膜のブロッキング及び各試薬の希釈液には、1% BSA 含有 TBS (50 mm トリス, 150 mm 塩化ナトリウム, pH 8.0) を用いた。転写後、膜をブロッキング (4°C, 一昼夜) し、1 次抗体として 1% BSA 含有 TBS で抗酵母成分ウサギ血清を 1000 倍希釈又はヒト血清を 50 倍希釈した溶液に浸し、室温 2 時間振盪した。膜を蒸留水で 5 回洗浄後、ヤギ抗ウサギ IgG 抗体又はヤギ抗ヒト IgG 抗体のパーオキシダーゼ標識体 (KPL 社, 100 倍希釈液) に浸し、室温 2 時間振盪した。膜は洗浄後、基質液 (1 mg/ml ジアミノベンチジン四塩酸塩, 0.05% 過酸化水素) に浸し、発色させた後 TBS で洗浄した。

モルモットに対する組換え B 型肝炎ワクチンの接種 精製 HBs 抗原液 (ロット YHB-11) から調製された組換え B 型肝炎ワクチンを、1 群 5 匹のモルモット (ハートレー系, 雌) に、蛋白質量 (20 $\mu\text{g/ml}$) として 1 回に 20, 40 及び 100 $\mu\text{g/匹}$ を背部皮下に接種した。4 週後に追加接種し、採血は、各接種前及び追加接種の 4 週後に行った。抗 HBs 抗体価の測定は、ヘプスゲンセル® ((株) ミドリ十字製) を使用した。

ヒトに対する組換え B 型肝炎ワクチンの接種 組換え B 型肝炎ワクチンを正常人 48 名 (男 8 名, 女 40 名)

に皮下接種 (20 μ g) した。4 週後と 20 週後に追加接種した。

結 果

酵母成分の測定

本測定方法に用いる抗酵母成分ウサギ血清は、Fig. 1 に示すように各種酵母成分と幅広く反応していた。つぎに、この抗血清を用いて ELISA 法による酵母成分の定量を試みた。酵母成分濃度は、ケルダール法により求めた窒素含量に 6.25 を乗じた値で示した。その結果、酵母成分濃度のほぼ 1—12.5 ng/ml の範囲で直線性が認められた (Fig. 2)。

そこで、この範囲内で未知検体の測定を行い、平行線定量法により酵母成分の混入量を求めた。酵母由来の精製 HBs 抗原液の 4 ロットについて酵母成分の混入量を測定した結果、酵母由来 HBs 抗原液中の酵母成分は約 0.2—0.5% であった (Fig. 3, Table I)。なお、血漿由来の精製 HBs 抗原液 (150 μ g/ml) も同様に測定したが、この標品からは酵母成分は検出されなかった。

正常人血清中の抗酵母成分抗体価の測定

正常人血清 3 検体を 50 倍から 800 倍まで希釈し、抗酵母成分抗体価を測定したところ、Fig. 4 に示するような 3 本の曲線が得られた。また、この反応は、酵母成分による吸収操作により阻害された。

Fig. 1. Immunoblotting Patterns of Yeast Component Mixture with Anti-yeast Component Antibody

Yeast components were separated by 12.5% SDS-polyacrylamide gel (silver-stained, lane 1) and transferred to nitrocellulose membrane (lane 3). Lane 3 was then incubated with anti-yeast component antibody and horseradish peroxidase-linked anti-rabbit IgG. Lanes 2 and 4 were molecular weight standards.

Fig. 2. Standard Curve for Measurement of Yeast Component

TABLE I. Contents of Yeast Component Mixture in Yeast-derived HBsAg

Lot No.	Yeast components (%)
YHB- 5	0.22
YHB- 9	0.23
YHB-11	0.52
YHB-13	0.33
Plasma-derived HBsAg	<0.0007

Fig. 3. Quantitative Analysis of Yeast Component in Purified Yeast-derived HBsAg by Parallel Line Assay Method

○, standard yeast component mixture (0.1 μ g/ml);
 △, yeast-derived HBsAg (Lot No. YHB-5, 117 μ g/ml);
 □, yeast-derived HBsAg (Lot No. YHB-9, 149 μ g/ml);
 ●, yeast-derived HBsAg (Lot No. YHB-11, 165 μ g/ml);
 ▲, yeast-derived HBsAg (Lot No. YHB-13, 153 μ g/ml);
 ■, plasma-derived HBsAg (150 μ g/ml).

Fig. 4. Detection of Anti-yeast Component Antibody in Normal Human Sera

●, ■, ▲, anti-yeast component antibody level in 3 normal human sera; ○, □, △, anti-yeast component antibody level in 3 normal human sera after incubation with yeast component mixture (10 μ g).

Fig. 6. Changes of Anti-yeast Component Antibody Level and Anti-HBs Antibody Level in Guinea-pig Sera

○, □, △, anti-yeast component antibody level before and after vaccination with recombinant hepatitis B vaccine (100 μ g, 40 μ g and 20 μ g, respectively); ●, ■, ▲, anti-HBs antibody level before and after vaccination with recombinant hepatitis B vaccine (100 μ g, 40 μ g and 20 μ g, respectively). V₁, first vaccination at 0 week; V₂, second vaccination at 4 weeks.

モルモットに対する組換え B 型肝炎ワクチン接種後の抗酵母成分抗体価の変動

組換え B 型肝炎ワクチンをモルモットに接種し、4 週後に追加接種を行った。その結果、抗 HBs 抗体価は免疫後順調に増加したが、抗酵母成分抗体価に変動は全く見られなかった (Fig. 6)。

組換え B 型肝炎ワクチン被接種者血清中の抗酵母成分抗体価の変動

組換え B 型肝炎ワクチン被接種者血清中の抗酵母成分抗体価の変動を調べた (Fig. 7)。その結果、すべての被接種者血清中の抗酵母成分抗体価に有意な変動は見られなかった。但し、3 回接種後 4 週目の抗 HBs 抗体の陽転率は、100% であった。⁸⁾

Fig. 5. Immunoblotting Patterns of Normal Human Sera against Yeast Component Mixture

Normal human sera (lane 1, 2 and 3) before and (lane 4, 5 and 6) after incubation with yeast component mixture.

Fig. 7. Changes of Anti-yeast Component Antibody Level in Human Sera after Vaccination with Recombinant Hepatitis B Vaccine

V₁, first vaccination at 0 week; V₂, second vaccination at 4 weeks; V₃, third vaccination at 20 weeks. 48 individuals were vaccinated with recombinant hepatitis B vaccine (20 μ g dose, s.c.).

つぎに、同じ血清についてイムノブロッティング法を行った。結果は、Fig. 5 に示すように 3 検体ともほぼ同一パターンバンドが得られた。これらのバンドは、検体を酵母成分で吸収処理することにより、ほぼ消失した。

考 察

酵母成分の定量

ELISA 法や radio immunoassay 法を応用した細菌及びその成分の検出例が種々報告されている.⁹⁻¹⁴⁾ そこで、我々も酵母由来の精製 HBs 抗原液の純度解析、特に不純物である酵母成分の定量に競合反応系による ELISA 法を応用した。この測定系による酵母成分の検出限界は 1 ng/ml であり (Fig. 2), 100 µg/ml の精製 HBs 抗原液があれば不純物としての酵母成分は、0.001% まで検出可能であると考えられた。そこで、酵母由来の精製 HBs 抗原液の 4 ロットについて平行線定量法による酵母成分の定量を試みたところ、全てのロットについて 5% の危険率で平行性と直線性が認められた (Fig. 3)。そして、その混入量は約 0.2—0.5% (Table I), すなわち、純度は 99% 以上と算出され、図には示していないが同ロットの SDS-PAGE から求めた純度 (99% 以上) と一致していた。これらの結果から、検量線作製に用いた酵母成分と精製 HBs 抗原液中に混在している酵母成分に対する抗体の反応性は、ほぼ同等であると考えられた。また、血漿由来の HBs 抗原液と抗酵母成分ウサギ血清との間での非特異反応は全く認められなかった (Table I) ことから、この方法は酵母由来の精製 HBs 抗原液の純度検定の一手段として有用と考えられる。

正常人血清中の抗酵母成分抗体価の測定

ヒト血清中の真菌に対する抗体価測定に関しては、種々報告されている。^{3-5,15,16)} また、微生物に対する抗体価の測定に、ELISA 法を応用した報告は多い。¹⁷⁻²⁰⁾ 今回、ELISA 法を用いた抗酵母成分抗体価の測定系を開発し、正常人約 150 名の血清中の抗酵母成分抗体価を測定した。測定に用いた全検体に抗酵母成分抗体が確認され、その数値に大きな個人差は認められなかった。Fig. 4 には 3 検体を代表例として示し、これらの血清中の抗酵母成分抗体価は、検体の 800 倍希釈液まで検出可能であった。反応は、酵母成分により特異的に吸収阻害されることから、この測定系は、組換え B 型肝炎ワクチン接種後の抗酵母成分抗体価の追跡調査に十分応用可能と考えられた。また、この結果とイムノブロッティング法の結果 (Fig. 5) から、正常人血清中には一定レベルの抗酵母成分抗体が存在し、その抗体の性状も個人間ではほぼ同じである事が示唆された。

モルモットに対する組換え B 型肝炎ワクチン接種後の抗酵母成分抗体価の変動

酵母成分が最も多く検出されたロット YHB-11 (Table I) から調製された組換え B 型肝炎ワクチンをモルモットに接種し、抗酵母成分抗体価の変動を調べた (Fig. 6)。このロットの 100 µg 中に酵母成分が 0.52 µg 混在していると推定され、同様な方法で組換え B 型肝炎ワクチンを 0.52 µg 接種した場合、抗 HBs 抗体は十分産生される量である。しかし、新たな抗酵母成分抗体の産生は観察されなかった原因として、混入している酵母成分の抗原性が低い事が考えられた。臨床試験ではこの 1/5 量 (1 回の接種量 20 µg) 以下が接種されるため、抗酵母成分抗体が新たに産生される危険性は更に低いと考えられた。

組換え B 型肝炎ワクチン被接種者血清中の抗酵母成分抗体価の変動

今回開発した抗酵母成分抗体測定系を、組換え B 型肝炎ワクチン接種による被接種者血清中の抗酵母成分抗体価の変動追跡に応用した。Fig. 7 に示した 48 例以外に、組換え B 型肝炎ワクチン被接種者約 100 名についても同様な方法で抗酵母成分抗体価の変動を測定したが、組換え B 型肝炎ワクチンの接種による抗酵母成分抗体価の増加した例は 1 例も無かった。これらの結果 (Fig. 6, 7) から、組換え B 型肝炎ワクチンに微量混入している酵母成分によって、抗酵母成分抗体が産生される可能性は無いと考えられた。

引 用 文 献

- 1) P. Valenzuela, A. Medina, W. J. Rutter, G. Ammerer, B. D. Hall, *Nature* (London), **298**, 347 (1982).
- 2) K. Murray, S. A. Bruce, A. Hinnen, P. Wingfield, P. M. C. A Van Erd, A. De Reus, H. Schellekens, *The EMBO Journal*, **3**, 645 (1984).
- 3) B. V. Kumar, G. Medoff, G. S. Kobayashi, W. L. Sieling, *Infect. Immun.*, **48**, 806 (1985).
- 4) E. M. Scolnick, A. A. McLean, D. J. West, W. J. McAleer, W. J. Miller, E. B. Buynak, *JAMA*, **251**, 2812 (1984).
- 5) 菅原敬信, 宮田和正, 足達 聡, 溝上 寛, 石原義光, 田中正比古, 水野喬介, 基礎と臨床, **20**, 8883 (1986).
- 6) T. Ohmura, A. Ohmizu, A. Sumi, W. Ohtani, Y. Uemura, H. Arimura, M. Nishida, Y. Kohama,

- M. Okabe, T. Mimura, C. M. Heldebrant, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **149**, 1172 (1987).
- 7) S. Funakoshi, T. Ohmura, T. Fujiwara, M. Tajima, K. Kinoshita, T. Matsumoto, T. Suyama, "Hepatitis B Vaccine INSERM Symposium No. 18," ed. by P. Maupas and P. Guesry, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1981, p. 57.
 - 8) F. Ichida, A. Yoshikawa, M. Mizokami, M. Yamamoto, N. Inaba, H. Takamizawa, T. Ohmura, A. Ohmizu, J. Ohata, Y. Uemura, M. Nishida, *J. Int. Med. Res.*, accepted.
 - 9) D. C. Dodd, B. I. Eisenstein, *Infect. Immun.*, **38**, 764 (1982).
 - 10) S. K. Sarafian, H. Young, *J. Med. Microbiol.*, **15**, 541 (1982).
 - 11) E. Segal, R. A. Berg, P. A. Pizzo, J. E. Bennett, *J. Clin. Microbiol.*, **10**, 116 (1979).
 - 12) N. E. Thompson, M. Razdan, G. Kuntsmann, J. M. Aschenbach, M. L. Evenson, M. S. Bergdoll, *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 885 (1986).
 - 13) V. Bal, R. S. Kamat, J. Kamat, P. Kandoth, *Indian J. Med. Res.*, **78**, 477 (1983).
 - 14) L. J. Wheat, R. B. Kohler, A. White, *J. Infect. Dis.*, **138**, 174 (1978).
 - 15) H. Schonheyder, J. A. Johansen, C. Moller-Hansen, A. Stenderup, *Sabouraudia*, **21**, 223 (1983).
 - 16) J. L. F. Wang, R. Patterson, M. Rosenberg, M. Roberts, B. J. Cooper, *Am. Rev. Respir. Dis.*, **117**, 917 (1978).
 - 17) J. I. Ito, A. C. Wunderlich, J. Lyons, C. E. Davis, D. G. Guiney, A. I. Braude, *J. Infect. Dis.*, **142**, 532 (1980).
 - 18) S. J. Cryz, E. Furer, R. Germanier, *J. Clin. Microbiol.*, **16**, 41 (1982).
 - 19) R. H. Yolken, R. G. Wyatt, B. A. Barbour, H. W. Kim, A. Z. Kapikian, R. M. Chanock, *J. Clin. Microbiol.*, **8**, 283 (1978).
 - 20) G. T. Stiernstedt, M. Granstrom, B. Hederstedt, B. Skoldenberg, *J. Clin. Microbiol.*, **21**, 819 (1985).