

## ヒト培養肝癌細胞の産生する HBs 抗原の 精製方法とその物理化学的特性について

岡山大学医学部癌源病理学教室 (指導: 佐藤二郎教授)

小 田 宗 宏

(平成元年 4 月 4 日受稿)

**Key words:** Hepatoma, Cell culture, HBs antigen, Purification,  
Characterization

### 緒 言

世界では人口のおよそ 5% に相当する人が HBV のキャリアであると言われている。疫学的調査により、HBs 抗原陽性者における肝がん発生率は一般の人におけるそれと比較し数十倍~数百倍高いことが示され<sup>1-3)</sup>、キャリアは慢性肝炎、肝硬変、肝がんの High risk group に属すると言える。一方、医療技術の向上とともに盛んになった輸血などの医療行為に起因する感染や母子間の感染等による HBV の水平、垂直感染を予防するために、各国では HB ワクチンの開発を積極的に推進している。HB ワクチンの開発は HBV の宿主域がヒトおよびチンパンジーに限られるという理由から非常に困難であったが、実用化の第一歩はキャリア血漿中に含まれる小型粒子 (HBs 抗原) のみを分離・精製し、それに不活化処理を加えることによりワクチンとして使用可能としたことである。しかし、既知のあるいは未知の感染性因子を含む可能性のある血液を出発材料とするには血液および製品の安全性評価のために種々の試験がなされなければならない。

現在では、主として遺伝子工学的手法を用いた HB ワクチンの開発が試みられており、第一世代である血漿由来の HB ワクチンに対し、第二世代の HB ワクチンとして大量で安価なワクチンの製造が可能となっている。HBV DNA 断片を導入した酵母<sup>4-6)</sup>や動物細胞<sup>7-9)</sup>を培養することを基本とするワクチン開発の試みが我国にお

いても多くなされ、HB ワクチンとしてすでに実用段階にあるものもあり、また臨床試験中のものもある。

本報告では、HBs 抗原高生産株であるヒト肝がん培養細胞株を長期間 (4~5 ヶ月) 無血清環境化で培養、維持することを可能とする HBs 抗原の生産方法を確立したので、その培養上清液より HB ワクチンの原料として使用し得る極めて高純度の HBs 抗原の調製を可能とする精製方法と得られた HBs 抗原の物理化学的特性について検討した結果を報告する。

### 材 料 と 方 法

#### 1. 細 胞 株

HBs 抗原の生産には huGK-14 細胞株を用いた。本細胞株は許ら<sup>10)</sup>により肝がん組織より分離・樹立された huH-1 細胞株を親株とし、次いで小池ら<sup>11)</sup>により 2 回のクローニング (限界希釈法および軟寒天培養法) が行われ、HBs 抗原高生産株として得られたものである。本細胞株には HBV 遺伝子の一部を欠落したウイルス DNA が組み込まれており、感染性 HBV 成熟粒子の生産能力はなく、HBs 抗原の生産・回収には安全であると考えられた (未発表)。

#### 2. 培 養

huGK-14 細胞株を 150mm  $\phi$  dish (Falcon Plastics, USA) に  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種した後、10% FCS (Gibco Laboratories, USA) 添加 DM-160 培地 (極東製薬工業, 東京) を用い 2~3 日に一度の割合で培地交換を行いつつ

培養すると10日前後でほぼ飽和密度に達する。この増殖した細胞をトリプシン (Difco Laboratories, USA) 処理して細胞懸濁液を調製し、多段式培養基 (Nunc Intermed, Denmark) に  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種する。同様な培養方法で約3週間増殖させた後、HBs 抗原生産用培地として Fetuin (0.25mg/ml) (Sigma Chemical, USA) および Dexamethasone ( $10^{-6}$ M) (Sigma) を含む Williams' medium E (Flow Laboratories, USA) に置換し培養を継続する。HBs 抗原生産用培地に置換した後は6~7日間に一度の割合で培地交換を行い、得られた培養液はすべて HBs 抗原の精製に用いた。

### 3. 精 製

HBs 抗原の精製は以下に示す Step に従い実施した。

Step 1 : Cell あるいは Cell debris の除去を目的として培養液の連続遠心 (10500×g, 10分間滞留) (日立工機, 茨城) を行い、その上清液について膜濃縮 (MW 100000, cut-off) (Millipore Corporation, USA) して培養濃縮液を得る。濃縮後再び遠心分離 (10500×g, 30分間) を行い得られた上清液を Step 2 の試料とする。

Step 2 : Step 1 で示した試料中に存在する DNA を分解するため、ウシ臍臓 Deoxyribonuclease I (DNase I, 5 units/ml) (Cooper Biomedical, USA) および MgCl<sub>2</sub> (5mM) を試料に添加し、37°C で4時間保持する。この時、試料の一部を採取し、ヒト胎盤 DNA (2μg/ml) (Cooper Biomedical) をさらに添加して本条件下で DNA が分解されることを確認する。DNA 分解後遠心分離を行い、得られた上清液を Step 3 の試料とする。

Step 3 : Step 2 で示した試料について、あらかじめ 0.15M NaCl/10mM リン酸緩衝液 (pH7.2) で充分緩衝化した抗 HBs 抗体 (後述) 結合 Sepharose 4B カラム (5 cm φ × 7 cm) を用いてアフィニティーカラムクロマトグラフィーを行う。抗 HBs 抗体結合量は 1 mg/ml bed volume とし、試料の負荷条件は 4 ml/cm<sup>2</sup>/hr とした。HBs 抗原としての負荷量は結合した抗 HBs 抗体量と同程度とした。試料の負荷が終了した時、0.15M NaCl/10mM リン酸緩衝液でカラム

を充分洗浄し、次いで 0.5M NaCl/10mM リン酸緩衝液 (pH7.2) を用いて非特異的に吸着した不純物の除去を行う。カラムからの HBs 抗原の溶出には 3 M KSCN を含む 0.15M NaCl/10mM リン酸緩衝液 (pH7.2) を用い、bed volume のおよそ4倍量を用いて溶出した。この溶出液を Step 4 の試料とする。

Step 4 : Step 3 で得られた試料について濃縮・透析を行う。初めに、透析チューブに試料を入れ、ポリエチレングリコール #2000 (ナカライテスク, 京都) を用いて濃縮し、次いで 0.15 M NaCl/10mM リン酸緩衝液に対して透析する。透析は 4°C において行い、内液に対して20倍量程度の外液を用いて6回交換し終了とした。透析後、内液を遠心分離 (10500×g, 15分間) し、その上清液を Step 5 の試料とする。

Step 5 : Step 4 で得られた試料を、0.15M NaCl/10mM リン酸緩衝液であらかじめ充分緩衝化した抗ヒトアルブミン抗体 (後述) 結合 Sepharose 4B カラム (1.8cm φ × 15cm) に負荷し、アフィニティーカラムクロマトグラフィーを行う。抗ヒトアルブミン抗体結合量は 1 mg/ml bed volume とし、負荷条件は 4 ml/cm<sup>2</sup>/hr とした。このクロマトグラフィーでは不純物 (ヒトアルブミン) の除去を目的とするものであり、カラム通過液を Step 6 の試料とする。

Step 6 : Step 5 で得られた試料に CsCl を比重が 1.22 g/cm<sup>3</sup> となるように添加し、これを Beckman 45 Ti ローターを用いて 20°C で 40000rpm, 48時間の平衡密度勾配遠心を行う。遠心終了後、1フラクション 5 ml の分画を行い、各フラクションにつき HBs 抗原量, UV<sub>280</sub> および比重の測定を行うとともに還元下で SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動および蛋白質染色も実施し、HBs 抗原プール画分を決定する。これを Step 7 の試料とする。

Step 7 : Step 6 で示した試料について、Step 4 で示したと同様な方法で濃縮・透析を行い、Step 8 の試料とする。

Step 8 : Step 7 で示した試料について、ショ糖溶液による密度勾配遠心を行う。20%ショ糖溶液 (42.5ml) および 5%ショ糖溶液 (42.5ml) で密度勾配を作製し、試料 (15ml程度) を重ね

る。Beckman 45 Ti ローターを用い、4℃で28000 rpm、5時間の遠心を行う。遠心後、1フラクション5 mlの分画を行い、各フラクションにつきHBs抗原量、 $UV_{280}$ および屈折率の測定を行う。また、各フラクションについてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動および蛋白質染色も実施し、HBs抗原画分のプールを行う。プールしたHBs抗原液をStep 9の試料とする。

Step 9 : Step 8 で得られた試料をStep 4 で示したと同様な方法で濃縮・透析を行い、Step10の試料とする。

Step10 : Step 9 で示した試料について無菌ろ過 (Millex GV Filter, 0.22 $\mu$ m) (Millipore) をし、得られたろ液をHBs抗原液とした。

#### 4. HBs抗原の測定

HBs抗原の測定には Enzyme Immunoassay (EIA) 法 (オースザイムII) (Abbott Laboratories, USA) を用いた。

#### 5. アフィニティークラムの作成

抗HBs抗体および抗ヒトアルブミン抗体を activated CNBr-Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden) に固定化<sup>12)</sup>し、アフィニティークラムを作成した。抗HBs抗体はマウスモノクローナル抗体であり、ハイブリドーマをマウス腹腔内で増殖させた後、腹水より精製(硫酸分画およびDEAE-celluloseイオン交換クロマトグラフィー)したものを株式会社シノテスト(神奈川)より入手した。抗ヒトアルブミン抗体はポリクローナル抗体であり、ウサギにヒトアルブミンを投与した抗血清より同様な方法で自家調製した。

#### 6. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE および蛋白質染色は成書<sup>13)</sup>に準じた。試料を10%  $\beta$ -メルカプトエタノール存在下で100℃、5分間加熱処理した後にゲルに負荷し、泳動はブロムフェノールブルーが先端にほぼ到達するまでとした(20mA/ゲル)。泳動終了後、銀染色あるいはアミドブラック染色を行い蛋白質のバンドを確認した。

#### 7. 分子量の測定

HBs抗原および分子量測定用マーカー蛋白質( $\beta$ -ラクトグロブリン; MW 18400, トリプシ

ノーゲン; MW 24000, 卵白アルブミン; MW 45000, ウシ血清アルブミン; MW 66000)

(Sigma)について還元下でSDS-10% PAGEを行い、泳動後ゲルを銀染色する。各マーカー蛋白質の移動度(Rf値)と分子量との関係を示す回帰式より、HBs抗原由来のポリペプチドの分子量を算出した。

#### 8. 純度の測定

還元下でHBs抗原のSDS-10% PAGEを行った後、銀染色する。このゲルの600nmにおける吸収をスキャナー(DU-8, SLAB GEL SCANNING SYSTEM) (Beckman Instruments, USA) を用いて測定し純度を決定した。

#### 9. 電子顕微鏡像の作成

コロジオン膜(日新EM, 東京)上にHBs抗原を置き、4%酢酸ウラニルで染色した後乾燥し、電子顕微鏡観察用試料とした(JEM-1200 EX) (日本電子, 東京)。

#### 10. 比重の測定

0.15M NaCl/10mM リン酸緩衝液(1ml)に懸濁したHBs抗原にイオン交換水を加えてほぼ100mlとした後、精製の項Step 6で示したと同様な方法でCsClによる平衡密度勾配遠心を行う。遠心後、2.5mlの分画を行い各分画について比重、 $UV_{280}$ およびEIA法によるHBs抗原量を測定する。HBs抗原の比重はHBs抗原濃度のもっとも高い分画の比重とした。

#### 11. 沈降係数の測定

HBs抗原(0.05~0.4mg/ml)の沈降図形を $UV_{280}$ を測定することにより求めた。遠心(L8-55M, Prep UV SCANNER, An-A rotor) (Beckman)は20000 $\times$ g, 19.8~19.9℃の条件で行い、10分間隔で9~11回走査した。沈降係数( $s_{20, w}$ )は初濃度と $s_{20, w}$ の逆数との回帰直線より、初濃度0に外挿して求めた。

#### 12. 糖鎖存在の確認

ツニカマイシン(3 $\mu$ g/ml) (Sigma)存在下で培養して得られた培養液より粗精製(抗HBs抗体によるアフィニティークラムクロマトグラフィー)したHBs抗原を用い、SDS-10% PAGE(還元下)および銀染色を行った後、染色バンドの消長で糖鎖が存在するか否かを判断した。

## 13. アミノ酸組成の分析

HBs 抗原について塩酸加水分解を行い、日立 835型特殊アミノ酸分析計を用いてアミノ酸組成を求めた。塩酸加水分解は HBs 抗原液150 $\mu$ l (HBs 抗原蛋白として146 $\mu$ g) を減圧乾固後、6 N 塩酸(チオグリコール酸 2% 添加) 200 $\mu$ l を加え減圧下でシールし、110 $^{\circ}$ C で22時間行った。分解後、塩酸を減圧乾固し、残さに蒸留水400 $\mu$ l を加え溶解してオートサンプラー (50 $\mu$ l) にセットした。なお、加水分解中に徐々に破壊される Thr, Ser, Trp については22時間、48時間および72時間の各加水分解条件下で得られた値から求めた 0 時間補外値を用いた。

## 14. N 末端アミノ酸配列および C 末端アミノ酸の分析

HBs 抗原のアミノ酸配列を470A 型アミノ酸シーケンサー (Applied Biosystems, USA) を用いて決定した。HBs 抗原12 $\mu$ g を用いて Edman 分解を35サイクル行い、得られた PTH-アミノ酸は SP8100 HPLC (Spectra-Physics, USA) を用いて同定した。HPLC 用カラム充填剤には Senshu Pak SEQ-4 (センシュウ科学, 東京) を用い、展開溶媒には 5% イソプロピルアルコール/1.67% ブチルクロライドアセトニトリル液、80mM 酢酸ナトリウム/2% トリフルオロアセテート (TFA) および 2% TFA を用い、gradient で展開した。

C 末端アミノ酸は HBs 抗原をアルキル化した後、carboxy peptidase を作用させ、反応生成物を A-5500 アミノ酸分析計 (医理化, 京都) を用いて求めた。4% SDS 存在下で加熱処理した HBs 抗原 8  $\mu$ g に iodoacetic acid を加え、30分間暗所でアルキル化した後、0.1M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  を用いて 0.3% SDS 濃度まで希釈する。この HBs 抗原液に 1/40 モル相当の carboxy peptidase A (Sigma) を添加し、37 $^{\circ}$ C で15時間反応させる。塩酸を加えて反応を停止した後、遠心分離 (15000 $\times$  g, 2分間) を行い上清液を得る。この上清液を AG50W-X8 (Bio-Rad Laboratories, USA) に負荷し、反応生成物を吸着・溶出して試料とした。この試料についてアミノ酸分析を行い、得られた結果から C 末端アミノ酸を推定した。

## 15. PreS 遺伝子産物の確認

HBs 抗原に PreS (PreS 1 および PreS 2) 遺伝子産物<sup>14)</sup>が存在するか否かを調べるため、PreS 1 領域の部分合成ペプチド (p12-32) と PreS 2 領域の部分合成ペプチド (p120-145) に対するウサギの抗血清を New York Blood Center より入手した。HBs 抗原について SDS-7~15% PAGE (還元下) を行った後、ニトロセルロース (Schleicher & Schüll, West Germany) にブロッティングする。合成ペプチドに対するウサギの抗血清を一次抗体として反応させ、次いで二次抗体としてパーオキシダーゼ結合抗ウサギ IgG ヒツジ抗血清 (Bio-Rad) を用いて反応させた。

## 結 果

## 1. 精 製

方法の項で示した各 Step に従い培養液より HBs 抗原の精製を行った。抗 HBs 抗体によるアフィニティーカラムクロマトグラフィー (Step 3) を行うと 90% 前後の純度を示す HBs 抗原液が得られ、CsCl による平衡密度勾配遠心 (Step

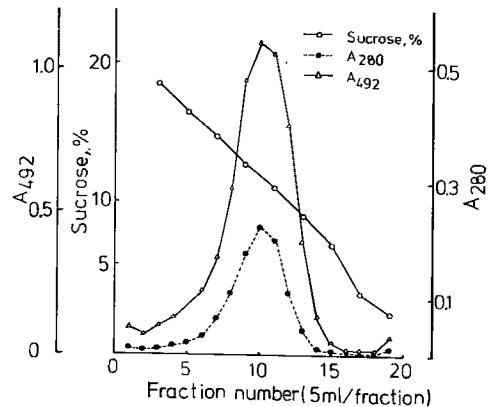


Fig. 1 Sucrose density gradient centrifugation of HBs antigen.

An HBs antigen solution (15ml) was loaded onto a linear sucrose gradient (85ml, 5~20%) and centrifuged for 5 hr at 28000 rpm in a Beckman 45Ti rotor. The gradient was divided into 19 fractions (5 ml/fraction). ○, sucrose (%); ●, protein; △, HBs antigen

6) 後では残存した不純蛋白質がほとんど除去された。Fig. 1 にショ糖による密度勾配遠心 (Step 8) の結果を示したが、Bottom 側で UV<sub>280</sub> および EIA 法による OD<sub>492</sub> の吸収が若干認められるものの、SDS-PAGE、銀染色を行った結果では HBs 抗原由来のポリペプチドが主体であった。HBs 抗原回収画分においては銀染色される不純蛋白質はほとんど認められなかった。主要な精製工程での収率を Table 1 に示したが、38.4% という比較的高い収率で純度の高い HBs 抗原を得ることができた。

### 2. 分子量

分子量測定用マーカー蛋白質 ( $\beta$ -ラクトグロブリン、トリプシノーゲン、卵白アルブミン、ウシ血清アルブミン) の Rf 値はそれぞれ 0.925, 0.770, 0.443, 0.263 であり、分子量算出のための回帰式は  $\log(\text{分子量}) = 5.733 - 1.137 \times \text{Rf}$  であった。この回帰式より HBs 抗原由来の 4 本のポリペプチドはそれぞれ 22000 (22K), 26000 (26k), 44000 (44k), 47000 (47k) ダルトンと計算された。

### 3. 純度

純度の決定に使用した SDS-10% PAGE 後の銀染色像を Fig. 2 に示した。高分子側に 2 本のバンド (47k, 44k) が、低分子側に 2 本のバンド (26k, 22k) がそれぞれ対で見られる。これら 4 本のバンドはいずれも抗 HBs 抗体で染色されることから、純度は 4 本のバンドの吸収強度の和をもって決定した。その結果、純度は 99% 以上であった。

Table 1 Purification of HBs antigen

Step	Yield (%)
Spent medium	100
Concentration (MW. 100000. cut-off)	87.2
Affinity chromatography (Anti-HBs antibody)	61.5
Affinity chromatography (Anti-human albumin antibody)	59.9
Isopycnic banding (CsCl)	51.1
Rate zonal sedimentation (sucrose)	39.5
Filtration (0.22- $\mu\text{m}$ )	38.4

### 4. 電子顕微鏡像

HBs 抗原のネガティブ染色像を Fig. 3 に示した。いずれも均一な粒径を示し、Dane 粒子あるいは管状構造のものは認められなかった。HBs 抗原の粒径は平均  $23.2 \pm 2.9 \text{ nm}$  であった。

### 5. UV 吸収スペクトル

HBs 抗原の UV 吸収スペクトルを測定し結果を Fig. 4 に示した (Uvikon 810, Uvikon Recorder 21) (Kontron Instruments, Switzerland)。吸収スペクトラムより 280nm 付近に吸収極大が、290nm 付近に肩を有することが明らかであり、挿入図に示す血漿由来の HBs 抗原が示すそれ<sup>15)</sup>と類似しており、HBs 抗原蛋白質に特徴的なスペクトラムであった。なお、マイクロセルダール法で求めた HBs 抗原蛋白質量と UV<sub>280</sub> との関係では、吸光係数 ( $\epsilon_{280}^{\%}$ ) は 35.9 であった。

### 6. 比重

HBs 抗原について CsCl による平衡密度勾配

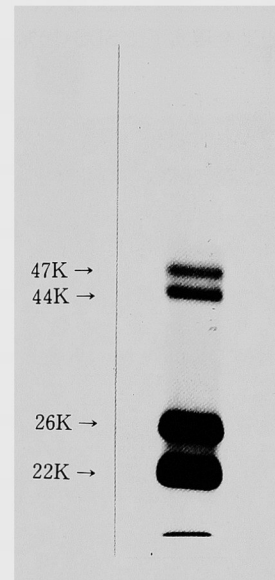


Fig. 2 Polyacrylamide gel electrophoresis of HBs antigen in the presence of sodium dodecyl sulfate.

One  $\mu\text{g}$  of HBs antigen was heated in a solution containing mercaptoethanol and sodium dodecyl sulfate at  $100^\circ\text{C}$  for 5 min and then electrophoresed in a 10% acrylamide gel at 20mA. After the electrophoresis, the gel was silver-stained.

遠心を行った結果を Fig. 5 に示した。EIA 法による HBs 抗原のピークと UV<sub>280</sub>によるピークとが一致し、その分画について比重を求めたところ 1.202 g/cm<sup>3</sup> であった。

### 7. 沈降係数

沈降係数の算出に必要な HBs 抗原の偏比容を 0.832cm<sup>3</sup>/g (比重 1.202 g/cm<sup>3</sup>より算出) とした。HBs 抗原量を 0.05, 0.1, 0.2 および 0.4mg/ml とし、遠心した後の初濃度と  $1/s_{20,w}$  との関係を図 6 に示した。この図より HBs 抗原粒子間の相互作用がないと仮定した場合の回帰式を求めると、 $1/s_{20,w} = 0.000908 \times (\text{初濃度}) + 0.0257$  となる。ここで初濃度を 0 とすると  $1/s_{20,w} = 0.0257$  となり、HBs 抗原の沈降係数 ( $s_{20,w}$ ) は 39S と計算された。

### 8. 糖 鎖

精製 HBs 抗原 (Lane 1 : 1 μg) とツニカマイシン存在下で培養して得られた培養液より粗精製した HBs 抗原 (Lane 2 : 0.25 μg, Lane 3 : 1 μg) とを還元下で SDS-10% PAGE を行

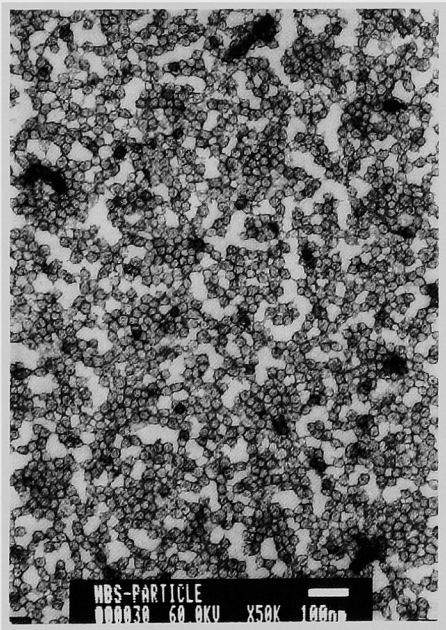


Fig. 3 Electron micrograph of HBs antigen. HBs antigen was negatively stained with 4% uranyl acetate (magnification,  $\times 50000$ ; bar, 100nm).

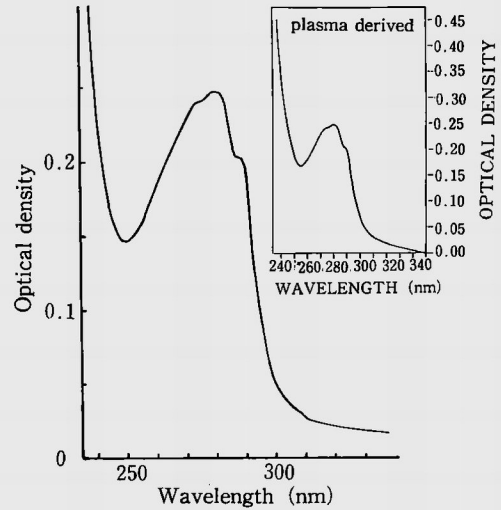


Fig. 4 Ultraviolet absorption spectrum of HBs antigen. Inset shows the UV absorption spectrum of HBs antigen derived from human plasma<sup>15)</sup>.

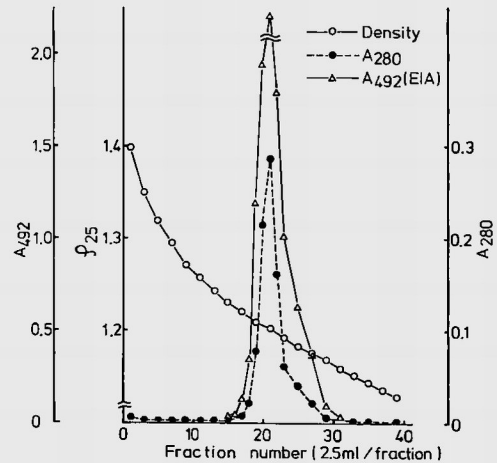


Fig. 5 Isopycnic centrifugation of HBs antigen in CsCl.

CsCl was added to an HBs antigen solution to a final density of 1.22g/cm<sup>3</sup> and centrifuged for 48hr at 40000rpm in a Beckman 45Ti rotor. The gradient was divided into 39 fractions (2.5ml/fraction).  $\circ$ , density;  $\bullet$ , protein;  $\Delta$ , HBs antigen

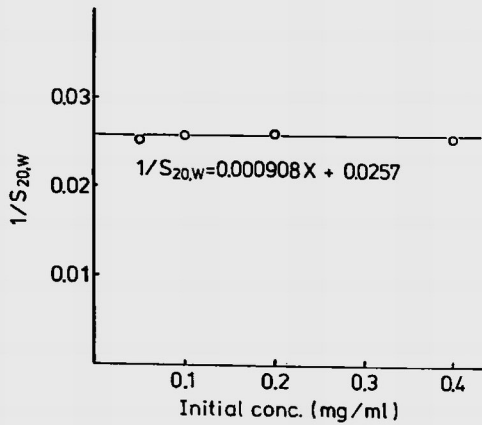


Fig. 6 Sedimentation coefficient of HBs antigen.

Sedimentation rate was determined at four different concentration of HBs antigen by centrifugation at 20000×g in a Beckman An-A rotor (L8-55M, Prep UV SCANNER). The sedimentation coefficient under standard conditions (water at 20°C) was calculated and then extrapolated to zero concentration.

Table 2 Amino acid composition of HBs antigen

Amino acid	Mol %	
	Amino acid analysis*	From DNA sequence**
Aspartic acid	4.90	3.98
Threonine	9.37	7.96
Serine	9.30	10.18
Glutamic acid	4.96	3.98
Glycine	7.51	6.64
Alanine	3.39	2.66
Valine	4.02	4.42
1/2-Cystine	6.50	6.19
Methionine	2.72	2.65
Isoleucine	4.01	6.19
Leucine	13.43	15.49
Tyrosine	2.27	2.21
Phenylalanine	6.17	7.52
Lysine	1.22	0.88
Histidine	0.45	0.44
Arginine	3.06	2.65
Proline	11.89	10.62
Tryptophan	4.86	5.31

\* Average values from three 22-hr hydrolysates. Threonine, serine and tryptophan values were obtained by extrapolating those of 22-hr, 48-hr and 72-hr hydrolysates to 0-hr of hydrolysis.

\*\* Calculated from the nucleotide sequence of HVB DNA subtype adr 4<sup>16</sup>.

いゲルを銀染色した (Fig. 7). Lane 1 と比較し Lane 2 において26k ダルトンのポリペプチドに染色強度の低下が, また Lane 3 において47k ダルトンのポリペプチドの消失が明瞭に認められた. 従って, 26k および47k ダルトンのポリペプチドはそれぞれ22k および44k ダルトンのポリペプチドに糖鎖が結合したものである可能性が示唆された.

9. アミノ酸組成

HBs 抗原のアミノ酸組成についての分析結果を Table 2 に示した. なお, 本細胞株には adr 型の S 遺伝子が組み込まれていることが明らかになっており (未発表), adr 型 S 遺伝子のシークエンスから予測されるアミノ酸組成<sup>16)</sup>について

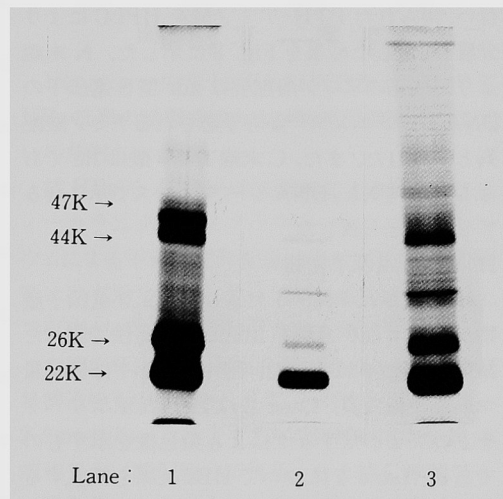


Fig. 7 Polyacrylamide gel electrophoresis of HBs antigen in the presence of sodium dodecyl sulfate.

HBs antigen was heated in a solution containing mercaptoethanol and sodium dodecyl sulfate at 100°C for 5 min and then electrophoresed in a 10% acrylamide gel at 20mA. After the electrophoresis, the gel was silver-stained.

Lane 1 : Purified HBs antigen (1 µg)

Lanes 2, 3 : Partially purified HBs antigen prepared from the culture fluid in which the cells were grown in the presence of Tunicamycin (Lanes 2, 0.25µg ; 3, 1 µg)

```

                                10
H2N-Met-Glu-Asn-Thr-Thr-Ser-Gly-Phe-Leu-Gly-
                                20
      Pro-Leu-Leu-Val-Leu-Gln-Ala-Gly-Phe-Phe-
                                30
Leu-Leu-Thr-Arg-Ile-Leu-Thr-Ile-Pro-Gln-
                                35
Ser-Leu-Asp-Ser-Trp

```

Fig. 8 Amino-terminal sequence of HBs antigen

も表中に合わせ記載した。

#### 10. N 末端側アミノ酸配列および C 末端アミノ酸

HBs 抗原について Edman 分解を 35 サイクル行い、得られた PTH-アミノ酸を HPLC により分離・同定した結果を Fig. 8 に示した。N 末端より 35 残基のアミノ酸配列は adr 型 S 遺伝子の DNA シークエンス<sup>16)</sup>から予想されるアミノ酸配列と一致した。また、C 末端アミノ酸は Ile であることが判明し、DNA シークエンスで示されるアミノ酸と一致した。

#### 11. PreS 遺伝子産物

HBs 抗原に PreS 1 および PreS 2 遺伝子産物が存在するか否かを Immunoblot 法で調べた結果を Fig. 9 に示した。図中 Lane 1 は分子量マーカー蛋白質、Lane 2 は HBs 抗原ポリペプチドのアミドブラックによる染色像を示すものである。Lane 2 において HBs 抗原を構成する主要な 4 本のバンドが認められる。Lane 3 には抗 PreS 1 抗血清で、Lane 4 には抗 PreS 2 抗血清でそれぞれ染色した像を示してあるが、Lane 2 に示される 4 本のバンドとはいずれの場合も互いに異った移動度を示す位置にバンドが認められた。従って、HBs 抗原は、S 遺伝子由来のポリペプチドに加えて PreS 1 遺伝子産物を含む (PreS 1 + PreS 2 + S) ポリペプチドと PreS 2 遺伝子産物を含む (PreS 2 + S) ポリペプチドをも含むと考えられた。しかし、Lane 2 で示されるように、(PreS 1 + PreS 2 + S) ポリペプチドと (PreS 2 + S) ポリペプチドとはともに蛋白質のバンドとしては認められず、HBs 抗原中には極めて僅かしか存在しないと推察される。

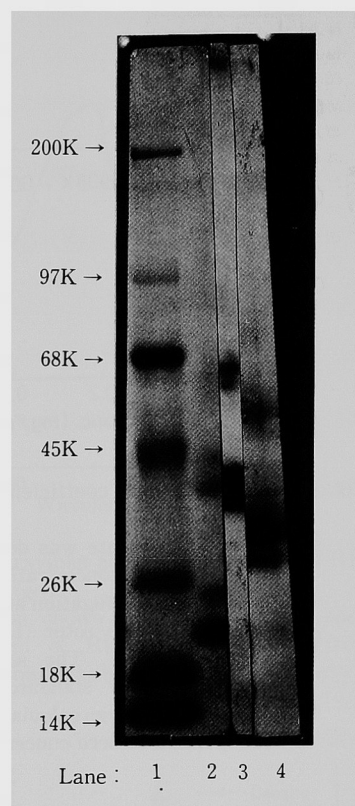


Fig. 9 Western blotting analysis of PreS1 and PreS2 gene products.

Forty five  $\mu$ g of HBs antigen was heated in a solution containing dithiothreitol and sodium dodecyl sulfate at 100°C for 5 min and subjected to gel (7~15% acrylamide) electrophoresis at 20mA.

After the electrophoresis in a single lane, HBs antigen was transferred to nitrocellulose membrane and vertically cut into 3 pieces, and then the antigen was visualized by staining with antibodies against PreS synthetic peptides and horseradish peroxidase-conjugated second antibody.

- Lane 1 : Marker proteins (Amido Black staining)
- Lane 2 : HBs antigen (Amido Black staining)
- Lane 3 : Staining for PreS1 gene product
- Lane 4 : Staining for PreS2 gene product



## 考 察

本報告では Hepatoma 由来 huGK-14細胞株が産生する HBs 抗原を用いた HB ワクチンの開発を可能とする有効な精製方法を確立するとともに、HBs 抗原の物理化学的特性を明らかにした。本精製法においては抗体の溶出が問題となり得るが、抗 HBs 抗体によるアフィニティーカラムクロマトグラフィーが有効であった。CsCl による平衡密度勾配遠心法は未だ共存する異種蛋白質の除去には極めて有効であり、高比重側にはほとんどの異種蛋白質が濃縮され、除去が可能であった。次いでショ糖による密度勾配遠心を行うと、HBs 抗原画分には異種蛋白質の存在はほとんど認められなかった。この HBs 抗原の純度は99%以上であり、本精製法を用いることにより HBs 抗原は高度に精製されることが明らかになった。

HB ワクチンの接種は主として健康人を対象とすることから、有効性は勿論のこと安全であることも重要である。本 HBs 抗原をワクチンとして使用する場合、特に、培地成分、細胞成分(蛋白質、DNA)あるいは精製工程に由来する異種蛋白質の混入が問題となる。そこで、精製された HBs 抗原液中に混入が予想される異種蛋白質 (FCS, ヒト血清蛋白質, マウス IgG, ウサギ IgG, DNase I) 含量を酵素免疫測定法 (サンドイッチ型 EIA 法) を確立して測定したところ、最も混入率の高い蛋白質でも0.004%程度しか含まれず<sup>17)</sup>、これを実験動物に HB ワクチンとして接種してもその蛋白質に対する抗体産生は認められなかった(未発表)。さらに、細胞由来の DNA や HBV DNA の混入も極力避けなければならない。そのため、精製工程の初期に DNase I を用いて培養濃縮液中に存在する DNA を分解することにより安全性を高めた。一方では、出発材料中に存在する DNA 量を測定するとともに、モデル実験で主要な精製工程における DNA 除去率を求め、これらの結果をもとに1接種量中に存在する可能性のある DNA 量を推定した<sup>17)</sup>。その結果、ワクチン1接種量(20 $\mu$ g) 当り0.01pg 程度の DNA 量であり、WHO より示された1接種量当り100pg 以下という数値<sup>18)</sup>に充分対応できる

ものであった。

本細胞株由来の HBs 抗原の粒子径はほぼ均一であり、Dane 粒子や管状構造のものは認められず、また、種々の物理化学的特性はヒト血漿由来の HBs 抗原のそれと極めて類似し、HBs 抗原中の異種蛋白質含量および DNA 残存量が極めて少ないこと、また、細胞株にはフリーの状態の HBV DNA は存在せず、一方、細胞 DNA に組み込まれた HBV DNA は再編成が認められるとともに C 遺伝子の一部が欠落していることから感染性粒子が産生される可能性は考えられない(未発表) などから、本 HBs 抗原をワクチンの原料として使用する上での安全性は充分確保されると考えられた。

## 結 論

Hepatoma 由来 huGK-14細胞株が産生する HBs 抗原の精製方法および物理化学的特性について検討した。

抗 HBs モノクローナル抗体によるアフィニティーカラムクロマトグラフィーおよび塩化セシウムによる平衡密度勾配遠心法が HBs 抗原の精製には有効であり、最終的には純度が99%以上で収率が40%程度の精製方法を確立した。

本細胞株由来の HBs 抗原には Dane 粒子や管状構造のものは認められず、平均粒子径が $23.2 \pm 2.9$ nm の均一な粒子であった。HBs 抗原の N 末端側アミノ酸配列(35残基) および C 末端側アミノ酸を調べたところ adr 型 S 遺伝子の DNA シーケンスから推定される配列と一致した。また、種々の物理化学的特性はヒト血漿由来の HBs 抗原のそれと極めて類似したものであった。

本研究を行うに当たり多くの御助言、御協力をいただきました明治乳業ヘルスサイエンス研究所角尾肇博士、藤木幸夫博士、浜口好孝博士、宮原道則博士、鈴木靖徳学士、川口直子学士をはじめ多くの方々に深く感謝いたします。また、抗 PreS 1 および抗 PreS 2 抗体を分与下さいました New York Blood Center Dr. A. R. Neurath に心より感謝いたします。

## 文 献

- 1) Sakuma K, Takahara T, Okuda K, Tsuda F and Mayumi M : Prognosis of hepatitis B virus surface antigen carriers in relation to routine liver function tests : A prospective study. *Gastroenterology* (1982) **83**, 114—117.
- 2) Beasley RP, Lin C-C, Hwang L-Y and Chien C-S : Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus : A prospective study of 22707 men in Taiwan. *Lancet* (1981) **2**, 1129—1133.
- 3) Alward WLM, McMahon BJ, Hall DB, Heyward WL, Francis DP and Bender TR : The long-term serological course of asymptomatic hepatitis B virus carriers and the development of primary hepatocellular carcinoma. *J Infect Dis* (1985) **151**, 604—609.
- 4) Miyanohara A, Toh-e A, Nozaki C, Hamada F, Ohtomo N and Matsubara K : Expression of hepatitis B surface antigen gene in yeast. *Proc Natl Acad Sci* (1983) **80**, 1—5.
- 5) Hitzeman RA, Chen CY, Hagie FE, Patzer EJ, Liu C-C, Estell DA, Miller JV, Yaffe A, Kleid DG, Levinson AD and Oppermann H : Expression of hepatitis B virus surface antigen in yeast. *Nucleic Acids Res* (1983) **11**, 2745—2763.
- 6) Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ, Ammerer G and Hall BD : Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* (1982) **298**, 347—350.
- 7) Siddiqui A : Expression of hepatitis B virus antigen gene in cultured cells by using recombinant plasmid vectors. *Mol Cell Biol* (1983) **3**, 143—146.
- 8) Moriarty AM, Hoyer BH, Shih JW, Gerin JL and Hamer DH : Expression of the hepatitis B virus surface antigen gene in cell culture by using a simian virus 40 vector. *Proc Natl Acad Sci* (1981) **78**, 2606—2610.
- 9) Yoneyama T, Akatsuka T and Miyamura T : Stable expression of hepatitis B virus surface antigen containing Pre-S2 protein in mouse cells using a bovine papillomavirus vector. *J Gen Virol* (1988) **69**, 1931—1939.
- 10) Huh N and Utakoji T : Production of HBs-antigen by two new human hepatoma cell lines and its enhancement by dexamethasone. *Gann* (1981) **72**, 178—179.
- 11) Koike K, Yoshida E, Katagiri K, Katayanagi M, Oda M, Tsunoo H, Yaginuma K and Kobayashi M : Production of hepatitis B virus surface antigen particles by human hepatoma cell line huGK-14 in a serum-free medium. *Jpn J Cancer Res (Gann)* (1987) **78**, 1341—1346.
- 12) Pharmacia Fine Chemicals : *Affinity Chromatography, Principles and Methods*. 15—18.
- 13) 堀尾武一, 山下仁平編 : *蛋白質・酵素の基礎実験法*. 南江堂, 東京 (1982) 319—324, 439—442.
- 14) Milich DR, McLachlan A, Moriarty A and Thornton GB : A single 10-residue pre-S (1) peptide can prime T cell help for antibody production to multiple epitopes within the pre-S (1), pre-S (2), and S regions of HBsAg. *J Immunol* (1987) **138**, 4457—4465.
- 15) Hilleman MR, McAleer WJ, Buynak EB and McLean AA : Quality and safety of human hepatitis B vaccine. *Dev Biol Stand* (1983) **54**, 3—12.
- 16) Fujiyama A, Miyanohara A, Nozaki C, Yoneyama T, Ohtomo N and Matsubara K : Cloning and structural analyses of hepatitis B virus DNAs, subtype adr. *Nucleic Acids Res* (1983) **11**, 4601—4610.
- 17) 小田宗宏, 角尾 肇, 小池克郎 : ヒト培養細胞株により産生した HB ワクチン. *肝・胆・膵* (1986) **13**, 585—590.

- 18) World Health Organization : Requirements for hepatitis B vaccines made by recombinant DNA techniques in yeast. WHO Tech Rep Ser (1987) No. 760, 120.

**Purification and characterization of HBs antigen  
from hepatoma huGK-14 cell line**

**Munehiro ODA**

**Division of Pathology, Cancer Institute,**

**Okayama University Medical School,**

**Okayama 700, Japan**

**(Director : Prof. J. Satoh)**

HBs antigen was purified from the culture fluid of hepatoma huGK-14 cell line and its physico-chemical properties were studied.

The purification consists of following steps : concentration of culture fluid by membrane filtration, affinity column chromatography (anti-HBs monoclonal antibody column and anti-human serum albumin antibody column), and ultracentrifugation (isopycnic centrifugation in CsCl density gradient and rate zonal centrifugation on sucrose gradient). Highly purified (purity > 99%) HBs antigen was isolated with an overall yield of about 40%. The HBs antigen showed uniform spherical particles (diameter :  $23.2 \pm 2.9\text{nm}$ ) and had a specific gravity of  $1.20\text{g/cm}^3$ . The purified HBs antigen yielded, in SDS-PAGE (under reducing conditions), four protein bands with apparent molecular weights of 22,000 and 26,000 (the two major bands), and 44,000 and 47,000. The two proteins of molecular weights of 26,000 and 47,000 are likely to be glycosylated, as these were several fold reduced when the cells were cultured in the presence of Tunicamycin. Amino acid analysis, Edman degradation, carboxypeptidase digestion, and ultraviolet absorption spectrum indicated that the HBs antigen from hepatoma cells is very similar to that derived from human plasma.