

綜 説

B型肝炎ウイルスの分子生物学と臨床への応用

清 沢 研 道

信州大学医学部第2内科学教室

Molecular Biology of Hepatitis B Virus and Its Application
for Clinical Medicine

Kendo KIYOSAWA

Department of Internal Medicine, Shinshu University School of Medicine

Key words: Hepatitis B virus (HBV), HBV-DNA, molecular biology, HBV vaccine
B型肝炎ウイルス, B型肝炎ウイルス DNA, 分子生物学, B型肝炎ウイルスワクチン

はじめに

1964年 Blumberg ら¹⁾により血清中に見出された Australia 抗原が Prince²⁾, Okochi と Murakami³⁾により血清肝炎と密接な関係にあることが判明した時期は近代肝炎学の黎明期であった。爾来20年, B型肝炎ウイルス (Hepatitis B Virus: HBV) の研究の進歩は目覚ましい。1970年 Dane ら⁴⁾により電子顕微鏡下に発見された直径42nm の二重構造を有する大型粒子が HBV そのものであることが判り別名 Dane 粒子と呼ばれるに至った。Blumberg らにより発見された Australia 抗原は Dane 粒子の表面構造である Hepatitis B surface antigen (HBs 抗原) であることが判明, 中心部は Hepatitis B Core antigen (HBc 抗原) であることが明らかとなった⁵⁾。1972年 Magnus と Espmark⁶⁾により発見された第3の抗原である Hepatitis B e 抗原 (HBe 抗原) は感染性, 病原性と密接な関係があることが明らかにされた。さらに HBc 抗原中には, DNA ポリメラーゼ活性⁷⁾, HBV-DNA⁸⁾⁹⁾が含まれていることも明らかとなった。そして B型肝炎研究はウイルス感染症最良の予防法であるワクチンの開発にまで進展した。わずか20年の間に基礎的研究の成果が予防法の確立にまで至ったことは近世医学の中でも特筆に値することの1つであろう。

一方, 分子生物学的研究の進歩に相俟って, B型肝炎

ウイルス DNA (HBV-DNA) の構造解析が行われるようになり, ほぼその全容が明らかとなった⁹⁾。それとともに今まで免疫血清学的, 超微形態学的方法により, どちらかと言えばウイルスの外側からアプローチされていた研究が, 分子生物学的方法によりウイルスの内側からなされるようになった。すなわち HBV-DNA 遺伝子構造の解析から, 新たな事実も発見されつつあり, また遺伝子工学的手法による HBV 関連抗原ペプタイドの発現, ひいては HBV ワクチン製造へと進展している。以下 HBV の分子生物学的研究の現況とその臨床応用について解説をしてみたい。

I HBV-DNA の構造

HBV-DNAは分子量 1.6×10^6 でHBs抗原のsub-typeにより若干異なるものの, おおよそ3,200塩基対よりなる2本鎖DNAである¹⁰⁾¹¹⁾(図1)。一方の鎖は全長の15-50%が欠落し短くくなっている¹²⁾。2本の鎖のうち長い方は長鎖(L鎖), 短い方は短鎖(S鎖)と呼ばれる。HBV-DNAを種々の制限酵素で切断することにより, その構造が明らかとなっている¹³⁾¹⁵⁾。Eco R1で切断すると, 1か所でのみ切断され, 制限酵素地図上この点を基準点0としている。

長鎖は messenger RNA (mRNA) への転写の際使われる一鎖で, 1,800番目付近に切れ目があり, その5'末端には5'末端結合蛋白質が存在する¹⁶⁾。短鎖

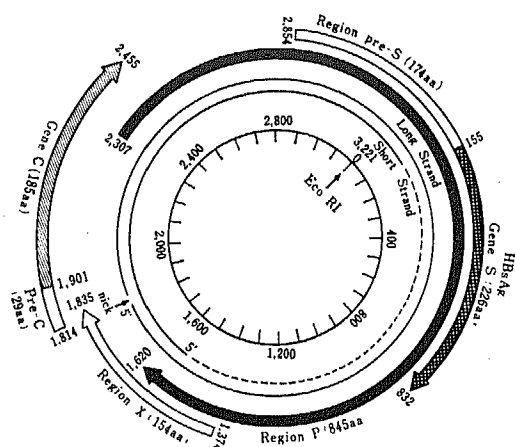


図1 HBV-DNA の遺伝子地図

点線は一本鎖部分を示す。大きな矢印は4種 (Gene S, Gene C, Region P, Region X) の open reading frame を示す。Gene S の上方には Region Pre-S, Gene C の上方には Pre-C がある。制限酵素 *Eco* R1 で切断されるのは1カ所で、遺伝子地図上この点を基準点0とする。(文献¹⁰⁾)

は5'末端が長鎖の1,560番目付近に固定されている。約3,200塩基配列は完全に決定されている(図2)¹⁷⁾¹⁸⁾。一般にDNAの遺伝子には蛋白質合成の開始や停止を示すコドンがある。これらの間は open reading frame と呼ばれている。HBV-DNAの長鎖には図1に示したように Gene S, Gene C, Region P および Region X という4種の open reading frame がある。すなわちこれらの open reading frame の蛋白質合成開始コドンから停止コドンの塩基配列によってHBV関連蛋白質が作られているわけである。今まで免疫血清学的、電子顕微鏡的に捕えられていたHBV関連抗原が、HBV-DNAの遺伝子配列から解析可能となった。それと同時に今まで分かっていたHBs抗原、HBc抗原、HBe抗原だけでは説明できない遺伝子領域の存在が明らかとなった。すなわち Gene S の上方にある Region Pre-S と Region X である。以下各遺伝子領域とそれにコードされる蛋白質について述べる。

1 Gene S および Region Pre-S

Dane 粒子 (HBV) の表面や、管状構造、小型球状粒子といった形態を示すHBs抗原は Gene S より作られる蛋白である。一方遺伝子解析の結果、Gene S

の上方に Region Pre-S が存在することが明らかとなり、この領域の遺伝子産物について興味を持たれた¹⁹⁾。Machidaら²⁰⁾はHBe抗原陽性の血清からDane粒子を精製しSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により各ポリペプチドに分離し、HBs抗体との反応をみたところ6本のバンドを見出した。それらのペプチドの分子量はP22 (分子量22,000), P27 (分子量27,000), P31 (分子量31,000), P35 (分子量35,000), P39 (分子量39,000) およびP43 (分子量43,000) である。これらのペプチドと Gene S および Region Pre-S との関係をみたところ、226アミノ酸残基よりなる Gene S にコードされるペプチドとしてはP22とP27の2つであることが判った (図3)。この2つはHBs抗原ポリペプチドのうち最も含有量が多く主要ポリペプチドと呼ばれる¹²⁾。P27はP22のN末端から146番目のアスパラギンに糖鎖が結合したものであることが明らかとなっている²⁰⁾²¹⁾。これらのペプチドより大きい分子量を有するP31, P35, P39, P43と遺伝子との関係をみたところ、Region Pre-S にコードされるペプチドが加わっていることが明らかとなった。すなわちP31はP22のN末端側に Region Pre-S よりコードされる55のアミノ酸残基よりなるペプチドが結合していることが判明した²²⁾²³⁾。この部分をコードする領域を Region Pre-S (III) という。P35のC末端部分は糖鎖の結合したP27に、同様に55アミノ酸残基よりなるペプチドが結合したものであり、糖鎖部分だけ分子量が多くなっているが、基本的にはP31と同じ遺伝子領域にコードされている。P39は、前述した55アミノ酸残基になるペプチドに加え、さらに119のアミノ酸残基よりなるペプチドの結合がみられている。この部分をコードする領域を Region Pre-S (I), (II) という。P43はP39に糖質が結合したものであり、P39と同じ遺伝子領域にコードされている。しかしこれらP39, P43はすべてのHBs抗原に存在するのではなく、HBs抗原の subtype により異なることが明らかとなっている。すなわち adw と ayw には存在するが、adr と ayr にはまだみつからない。

これら Region Pre-S よりつくられる蛋白質の役割は何であろうか。前述したごとく Gene S より作られたHBs抗原の主要蛋白であるP22, P27に、さらに若干のペプチドが結合しているところに意味がありそうである。時代は少し遡るが、1975年 Matsushashi

TCGAGGACTG GGGACCTG ACCGAACATG S GAGAACACAA CATCAGGATT CCTAGGACCC CTGCTCGTGT TACAGGCGGG GTTTTCTTG TTGACAAGAA 100
 TCCTCACAAT ACCACAGAGT CTAGACTCCT GGTGGACTTC TCTCAATTT CTAGGGGGAG CACCCACGTG TCCTGGCCAA AATTGCGAGT CCCCACCTC 200
 CAATCACTCA CCAAGGTCTT GTCCTCCAAT TTGTCTGGC TATCGCTGGA TGTGTCTGCG GCGTTTTATC ATATCTCTCT TCATCTGCT GCTATGCTC 300
 ATCTTCTGT TGGTCTTCT GGAACACAA GGTATGTTGC CCGTTTGCC TCTACTTCCA GGAACATCAA CTACCAGCAC GGGACCATGC AAGACCTGCA 400
 CGATTCTGCG TCAAGGAACC TCTATGTTTC CCTCTTGTTG CTGTACAAAA CCTTCGGACG GAAACTGCAC TTGTATTCCC ATCCCATCAT CCTGGGCTTT 500
 CGCAAGATTG CTATGGGAGG GGGCCTCAGT CCGTTTCTCC TGGCTCAGTT TACTAGTGCC ATTTGTTGAG TGGTTCGTAG GGCTTTCCCC CACTGTTTGG 600
 CTTTCAGTTA TATGGATGAT GTGGTATTGG GGGCCAAGTC TGTACAACAT CTTGAGTCCC TTTTACCTC TATTACCAAT TTTCTTTTGT CTTTGGGTAT 700
 ACATTTAAAC S CCTAATAAAA CCAAACGTTG GGGTACTCC CTTAACTTCA TGGGATATGT AATTGGATGT TGGGTACTT TACCGCAAGA ACATATTGTA 800
 CTAATAATCA AGCAATGTTT TCGAAAACCT CCGTAAATA GACCTATTGA TTGAAAAGTA TGTACAGAGC TTGTGGTCT TTTGGGCTTT GCTGCCCTT 900
 TTACACAATG TGGCTATCCT GCCTTAATGC CTTTATATGC ATGTATACAA TCTAAGCAGG CTTTCACTTT CTCGCCAACT TACAAGGCTT TTCTGTGTAA 1,000
 ACAATATCTG AACCTTTACC CCGTTGCCCG GCAACGGTCA GGTCTCTGCC AAGTGTGTC TGACGCAACC CCCACTGGAT GGGGCTTGGC TATCGGCCAT 1,100
 AGCCGATGC GCGGACCTTT GTGGCTCCTC TGCCGATCCA TACTGCGGAA CTCTAGCAG CTGTTTTGCG TCGCAGGCGG TCTGGAGCGA AACTTATCGG 1,200
 CACCGACAAC TCTGTTGTCC TCTCTCGGAA ATACACCTCC TTTCCATGGC P TGCTAGGGTG TGCTGCCAAC TGGATCTGCG GCGGGACGTC CTTTGTCTAC 1,300
 GTCCCGTCGG CGCTGAATCC GCGGACGAC CCGTCTCGGG GCGGTTTGGG X ACTCTACCGT CCCCTTCTTC ATCTGCCGTT CCGGCCGACC ACGGGGGCGA 1,400
 CCTCTCTTTA CGCGGTCTTT TTGTCTGTGC CTTCTCATCT GCCGGTCCGT GTGCACCTCG CTTACCTCTC GCACGTGCGA TGGAGACCAC CGTGAACGCC 1,500
 CACCAAGTCT TGCCCAAGGT CTTACATAAG AGGACTCTTG GACTCTCAGC GATGTCAACG ACCGACCTTG AGGCATACTT CAAAGACTGT TTGTTTAAAG 1,600
 ACTGGGAGGA GTTGGGGGAG GAGATTAGGT TAAAGGTCTT TGTACTAGGA GGCTGTAGGC ATAAATTGGT CTGTTACCA CACACCATGCA ACTTTTTCAC 1,700
 CTCTGCCTAA X TCATCTCATG TTAGTGTCTT ACTGTTCAAG CCTCCAAGT GTGCCTTGGG TGGCTTTGGG GCATGGACAT TGACCCGTAT AAAGAATTG 1,800
 GAGCTTCTGT GAGATTACTC TCTTTTTTGC CTTCTGACTT CTTTCTTCT ATTCGAGATC TCCTCGACAC CGCCTCAGCT CTATATCGGG AGGCCCTAGA 1,900
 GTCTCGGAA CATTGTCTCT CTCATCATAC AGCACTCAGG CAAGCTATTC TGTGTTGGGG TGAGTTGATG AATCTGGCCA CCTGGGTGGG AAGTAATTG 2,000
 GAAGACCCAG CATCCAGGGA ATTAGTAGTC AGCTATGTCA ATGTTAATAT GGGCCTAAAA ATCAGACAAC TACTGTGGTT TCACATTTC TGTCTTACT 2,100
 TTGGAAGAGA AACTGTTCTT GAGTATTGGG TGCTTTTGG AGTGTGGATT CGCACTCTC CTGCTTACAG ACCACCAAA P GCCCTATCT TATCAACACT 2,200
 TCCGAAACT ACTGTTGTTA GACGACGAGG CAGGTCCCTC AGAAGAAGAA CTCCCTCGCC TCGCAGACGA AGGTCTCAAT CGCCGCGTGC CAGAAGATCT 2,300
 CAATCTCGGG AATCTCAATG TTAGTATCCC TTGACTCAT AAGGTGGGAA ACTTTACTGG GCTTTATTCT TCTACTGTAC CTGCTTTTAA TCCTGAGTGG 2,400
 CAAACTCCCT CCTTTCTCTA CATTCAATTA CAGGAGGACA TTATTAATAG ATGTCAACAA TATGTGGGCC CTCTTACAGT TAATGAAAA AGGAGATTAA 2,500
 AATTAATTAT GCCTGCTAGG TTCTATCCTA ACCTTACCAA ATATTGCCA TTGGACAAAG GCATTAAACC ATATTATCTT GAACATGCAG TTAATCATT 2,600
 CTTCAAACT AGGCATTATT TACATACTCT GTGGAAGGCA GGCATTCTAT ATAAGAGAGA AACTACACGC AGTGCCTCAT TCTGTGGGTC ACCATATTCT 2,700
 TGGGAACAAG AGCTACAGCA TGGGAGGTTG GTCTTCCAAA CCTCGACAAG GCATGGGGAC GAATCTTTCT GTTCCCAATC CTCTGGGAAT CTTTCCCGAT 2,800
 CACCAAGTGG ACCCTGCGTT CGGAGCCAAC TCACACAATC CCGATTGGGA CTTCAACCCC AACAAAGATC ATTGGCCAGA GGCAAATCAG GTAGGAGCGG 2,900
 GAGCATTGCG GCCAGGGTTC ACCCCACCAC ACGGCGGTCT TTTGGGGTGG AGCCCGCAGG CTCAGGGCGT ATTGACAACC GTGCCAGTAG CACCTCTCTC 3,000
 TGCTCCACC AATCGGCAGT CAGGAAGACA GCCTACTCCC ATCTCTCCAC CTCTAAGAGA CAGTCATCCT CAGGCCATGC AGTGGAACTC CACAACATTC 3,100
 CACCAAGCTC TGCTAGACCC CAGAGTGAGG GGCCTATACT TTCCTGCTGG TGCTCCAGT TCCGAACAG TAAACCTGT TCCGACTACT GCCTCACCCA 3,200
 TATCGTCAAT CTCC Pre-S2

図2 HBV-DNA の全塩基配列 (文献¹³⁾-¹⁵)

と Hosokawa²⁴⁾ はある種の HBs 抗原陽性血は重合ヒトアルブミン (polymerized human serum albumin: Poly-HSA) と凝集することを発見した。その後 Machida ら²²⁾ は HBe 抗原陽性血から精製した Dane 粒子, 小型粒子, 管状粒子は poly-HSA と凝集

するが, HBe 抗体陽性血から精製した HBs 抗原粒子は poly-HSA と凝集しないことを報告した。すなわち HBe 抗原陽性期の HBs 抗原粒子表面には poly-HSA と結合する部分——すなわち poly-HSA レセプター——が存在することになる。さらに興味あること

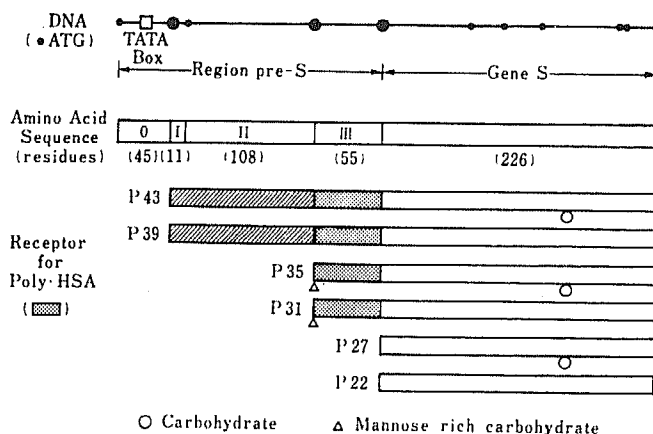


図3 Gene S および Region Pre-S にコードされるHBs 抗原, poly-HSA レセプターの模式図 (文献19)-21(47))

にこの poly-HSA レセプターはヒトおよびチンパンジーの重合アルブミンとのみ反応し、他の動物の重合アルブミンとは反応しないことである。HBV はヒトおよびチンパンジーにのみ感染が成立することを考えると、この poly-HSA レセプターは宿主特異性を決定していることになり、HBV の感染機序を考えるのにきわめて興味ある²⁵⁾⁻²⁷⁾。他方、肝細胞膜上には poly-HSA レセプターが存在することが明らかとなっている²⁵⁾²⁸⁾。これらの事実を組み合わせると、ヒトおよびチンパンジーでは poly-HSA を介して HBV が肝細胞に吸着するという説が成立する。すなわち Region Pre-S にコードされるペプチドは poly-HSA レセプターである可能性がでてきた。事実、HBV-DNA のGene S にのみコードされているP22とp27は poly-HSA とは反応せず、Gene S とその上流の Region Pre-S にコードされる P31, P35は poly-HSA と反応することが明らかとなった。また P39 と P43 は Region Pre-S にコードされているため、同様に poly-HSA レセプターを持つことが考えられる。すなわち HBs 抗原構成ポリペプチド中 P31, P35, P39, P43 の4種類が poly-HSA レセプターを有する。この poly-HSA レセプターは HBe 抗原陽性期の HBs 抗原上に存在するが、HBe 抗体陽性期のそれにはほとんどないことが明らかとなっている¹⁹⁾²⁶⁾²⁷⁾。従来、HBe 抗原陽性血はきわめて感染性が高く、HBe 抗体陽性血は感染性が低いとされてきた事実が²⁹⁾、HBV-DNA 遺伝子構造の解析から説明可能と

なった。Gene S と Region Pre-S よりコードされる蛋白との関係を図3に示した。

2 Gene C

Gene C にコードされる蛋白は185コのアミノ酸残基よりなり、21,042の分子量を有するものと推定された³⁰⁾。さらに塩基配列より推定されるアミノ酸配列から、このポリペプチドは、そのC末端側にアルギニンに富んだプロタミン様の一次構造を有していることが明らかになった。一方、Dane 粒子を表面活性剤で処理して表面蛋白質を除くと、HBc 抗原粒子が得られる。この HBc 抗原粒子の構成ポリペプチドを SDS-PAGE で分析すると P19 と P45 が存在することが明らかとなった。さらにこの P45 は P19 の重合体であることが判り、HBc 抗原蛋白は P19より構成されていることになる。すなわち Gene C にコードされるポリペプチドの分子量とほぼ一致する。事実両者のアミノ酸配列がほぼ一致することより Gene C に対応する蛋白は HBc 抗原を構成する P19 であることが同定された³¹⁾。さらに酵母を用いた Gene C の発現実験でも HBc 抗原粒子にほぼ類似の粒子の産生が確認されている。Gene C の上方にも Pre-C の存在が認められているが詳細な役割については不明である。

Gene C は HBe 抗原をもコードしていることが明らかとなっている。図4に Gene C および HBc 抗原と HBe 抗原の関係を示した。HBc 抗原蛋白である P

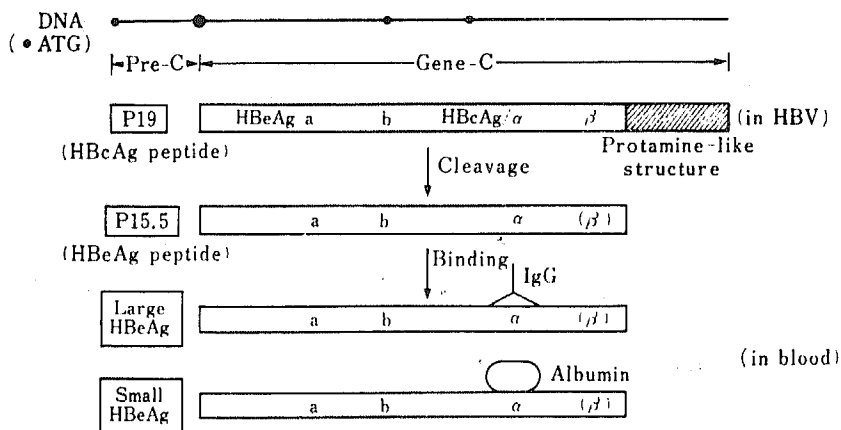


図4 Gene C よりコードされる HBc 抗原と HBe 抗原

HBe 抗原は HBc の抗原の P19 の C 末端側のアルギニンに富んだプロタミン様構造の部分がなくなったもの。血中 HBe 抗原は IgG の結合した large HBe 抗原と albumin の結合した small HBe 抗原がある。(文献³¹⁾⁻³⁴⁾)

19には2種の HBc 抗原決定基 (HBcAg/α, HBcAg/β)³¹⁾と2種類の HBe 抗原決定基 (HBeAg/a, HBeAg/b)³²⁾がおおの1つつつ存在することが明らかとなった。この P19 の C 末端側にあるアルギニンに富んだプロタミン様構造の部分 (34アミノ酸残基) がなくなった分子量約 15,500 (P15.5) のポリペプチドが HBe 抗原であることが判った³²⁾⁻³⁴⁾。この HBe 抗原が血液中に存在する形態として2種類あり、1つは分子量約30万の large HBe 抗原であり、他の1つは分子量約10万の small HBe 抗原である。Large HBe 抗原は IgG が抗原決定基 HBeAg/a に結合したものであり、small HBe 抗原は同部に血清アルブミンが結合したものであることが判った³³⁾³⁴⁾。Large HBe 抗原を決定する IgG の本態については不明であるが HBc 抗体の可能性が考えられている。Large HBe 抗原と small HBe 抗原の臨床的意義に関しては、教室の和田ら³⁵⁾によれば HBe 抗原から HBe 抗体へ seroconversion が生じるにつれて、small 型から large 型へ移行することが確認されている。

HBc 抗原粒子は P19 が約 300 個集まって、そのプロタミン様構造を有する C 末端部が粒子深部に存在し、HBeAg/a, HBeAg/b は抗原粒子表面下にかくれ、HBcAg/α, HBcAg/β が表面に露出する形で正20面体を形成する。一方血中に存在する HBe 抗原は肝細

胞内で過剰に生産された P19 のプロタミン様構造部分が切断され、血中に放出されたものである。したがって HBe 抗原が血中に存在することは、とりもなおさず HBV が多くつくられていることを示す。

3 Region P

HBV-DNA 中約75%の領域を占める Region P の正確な機能はまだ解明されていない。しかしながら、いくつかの状況証拠から Region P にコードされる蛋白は DNAポリメラーゼである可能性が高い。HBV に似たアヒルB型肝炎ウイルス (duck hepatitis B virus: DHBV) の DNA 解析から、Summers と Mason³⁶⁾は DNA→RNA→DNA に読みかえられるというレトロウイルスと共通の過程があることを示した。Region P よりつくられるアミノ酸配列と、レトロウイルスおよびカリフラワーマザイクウイルスの逆転写酵素 (reverse transcriptase) との間に共通部分があることが示されている³⁷⁾。すなわち Region P 由来蛋白が逆転写酵素活性を有する可能性も示されている。しかしながら実際の役割についてはまだ不明であり、今後の研究成果に期待が寄せられる。

4 Region X

Region X から果たして蛋白が作られているか否か

は分かっておらず、したがってその役割について不明である。最近 Moriarty らは³⁸⁾ Region X 遺伝子後半の2カ所に相当するペプチドを合成し、これで免疫して得られたウサギ抗ペプチド抗体が、①SV40のDNA上にRegion Xを組み込ませ、形質転換細胞内で発現させた細胞抽出液、②HBV-DNAが組み込まれている培養ヒト肝癌細胞 PLC/PRF/5 の細胞抽出液、③ヒト肝癌組織抽出液に含まれる分子量約28,000のペプチド、等と特異的に反応することを示し、Region Xが特定の蛋白をコードしている可能性を示唆した。また合成ペプチドでコートしたELISA系による血清のスクリーニングより、Region X産物に対する抗体が肝癌患者血清中に少なからず検出されることを報告した。これとは別にHBVに似た他の動物におけるB型肝炎ウイルス中 woodchuck hepatitis virus (WHV), ground squirrel hepatitis virus (GSHV) のDNA中に、HBV-DNAのRegion Xに相当する遺伝子領域があり、かつアミノ酸配列も類似していることが認められている³⁹⁾⁻⁴¹⁾。このことからRegion Xが蛋白を発現し何らかの機能を有していることが強く示唆される。そしてこの機能に関しては、肝癌細胞DNAの解析より、この中にHBV-DNAが組み込まれる場合、Region Xが関与している事実が明らかになったことから、発癌機序にかかわっている可能性が強く示唆されている⁴²⁾⁻⁴⁶⁾。

II HBV の構造

以上述べたごとく、HBV-DNA の構造解析から従来の HBV の構造は、より詳細なものとなった(図 5) (47)。すなわち基本的には HBs 抗原と HBc 抗原とからなる直径 42nm の二重構造を示す。HBs 抗原は主として P22, P27, のポリペプチドから構成され、所々に P31, P35, P39, P43 のポリペプチドがあり、この個所に poly-HSA レセプターが存在する。一方 HBc 抗原は約 300 の HBc 抗原粒子から形成され、その表面には HBc 抗原活性部位が存在し、内部には HBe 抗原活性部位が存在する。そして中心部には DNA ポリメラーゼと HBV-DNA が存在する。

血中の HBs 抗原は Dane 粒子の表面のほか、直径 22nm の小さな小球状粒子や、直径 22nm 長さ 40-700nm の管状粒子として存在する。また HBe 抗原は Dane 粒子の Hbc 抗原内部以外に、可溶性蛋白として血中にも存在する。この場合アルブミンと結合した small HBe 抗原と、IgG と結合した large HBe 抗

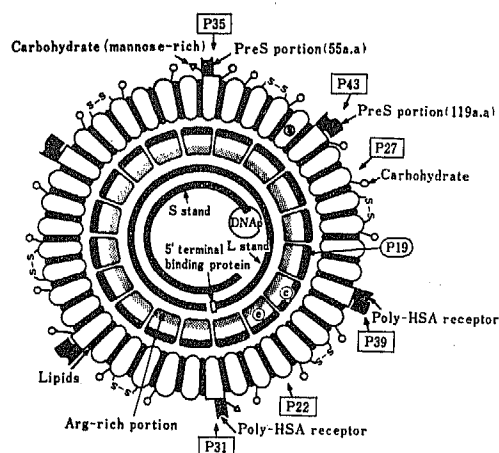


図5 HBV の構造

P22, P27, P31, P35, P39, P43 はHBs 抗原の構成ポリペプチド, P22 と P27 は主要ポリペプチド。P31, P35, P39, P43 には poly-HSA レセプターがある。P19 は HBc 抗原の基本ペプチド。

● HBs 抗原活性部位 © HBc 抗原活性部位 ⓔ HBe 抗原活性部位 (文献⁴⁷⁾)

原の 2 種類が存在する。Region X より産生される蛋白については想像されているものの、その証明が十分なされていないため、HBV のどの部位に、また血中に存在するか否かは今後の課題である。

Ⅲ HBV-DNA の肝細胞 DNA への組み込みと癌化

HBV は oncovirus (発癌ウイルス) という考えがある。これは、肝癌患者血清中に HBV 関連マーカーが高率に存在すること⁴⁸⁾、疫学上 HBs 抗原浸透率が高い地方に肝癌がきわめて多いという事実より推測されていた^{49)~51)}。最近になり HBV-DNA が肝癌細胞 DNA 中に高率に組み込まれていることが明らかとなり、さらに oncovirus の疑いが強くなっている^{42)~46)}。しかしながら、HBV-DNA 中には oncogene (癌遺伝子) の存在は確認されていない。したがって、肝癌細胞 DNA 中に HBV-DNA が組み込まれたとしても、それがどのような機序で癌をひきおこすかについてはまったく判っていない。しかしながら最近になり興味ある報告がみられるようになった。

ここで、Region X についてさらに詳しく解説して

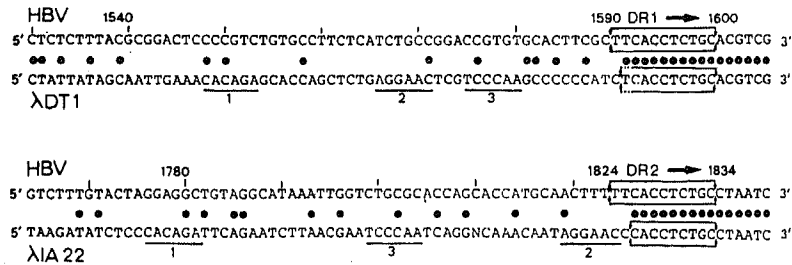


図6 肝臓組織 DNA へのHBV-DNA の組み込み。2名の肝臓組織 DNA より得られた2つの DNA クローン(λDT1 と λIA22) 中の HBV-DNA の細胞 DNA への接続部の塩基配列。おのおのにつき上段は HBV-DNA の塩基配列で、下段はクローン DNA の塩基配列。黒丸は HBV-DNA とそれぞれのクローンの共通な塩基を示す。(文献⁴⁵⁾)

みたい。HBV-DNA の長鎖および短鎖の5'末端部は Region X 内にあり、この部を付着末端部 (cohesive end) という。この中には TTCACCTCGC (T : チミン, C : シトシン, A : アデニン, G : グアニン) という11個の塩基のくり返し配列部分が存在する⁴⁵⁾。これを direct repeat (DR) という。2つあるので DR₁, DR₂ と呼ぶ。これに似たものにレトロウイルス遺伝子中に存在する long terminal repeat (LTR) があるが、細胞 DNA に組み込まれた場合、細胞癌遺伝子 (C-oncogene) の活性化作用を有するといわれている。

Dejean ら⁴⁵⁾ は肝臓組織から得た HBV-DNA の組み込まれた2つの DNA のクローン化に成功し、細胞 DNA にHBV-DNA が組み込まれた部分に規則性があるかの検討を行った。まず第1のクローン(λDT1)では11.5kb DNA があり、その中の1.5kb 部分が HBV-DNA と相補性を示し、第2のクローン (λIA22) では10.5kb の DNA 中1分子 (3.2kb) と0.8kb が HBV-DNA と相補性を示した。そしてそれぞれのクローンについての右側の HBV-DNA の接続部位の塩基配列をみたところ (図6), 両方とも Region X 内の11個のくり返し配列 (TTCACCTCGC) の中に存在することを明らかにした。一方左側の接合部には規則性はなかった。また host 側 DNA についてみると共通した規則性はみられなかった。以上のことより、HBV-DNA の組み込みは、host 側では任意であるが、ウイルス側では一方のみが Region X あるいは付着末端部領域に限定されていることから、一部特有の組み込みが働いたことが推察された。また Mizusawa ら⁴⁶⁾ はB型培養肝癌細胞より同様に DNA クローン

を樹立し、その解析から HBV-DNA の組み込み部分は Region X 内の付着末端部にあることを明らかにしている。このことは Region X が肝臓発生にきわめて重要な鍵を握っているように見える。最近 HBV-DNA の組み込まれた肝臓細胞核内に Hepatitis B Nuclear Antigen (HBNA)が発見された⁵²⁾。HBNA は癌発生に何らかの役割を担っていると想定され、Region X によりコードされた核蛋白と考えられた。しかし Moriarty らの作成した抗 Region X ペプタイド抗体を用いて検索した限りその同一性は否定された³⁸⁾53)。

IV. HBV-DNA 測定 of 臨床への応用

1 血中 HBV-DNA 測定の意義

HBs 抗原キャリアー血清中の HBV-DNA を測定することは、従来 HBV 感染の指標として HBs 抗原, HBe 抗原, HBc 抗体 (IgM型, Ig型) を免疫血清学的に測定し、HBV の肝内での replication を間接的に判定していたのに比し、直接的に HBV の増殖を判定できる。しかも HBV の増殖と肝疾患の病態との関連がより明らかにされ得る。血中 HBV-DNA 測定の原理は HBV-DNA を用いた molecular hybridization により、DNA の塩基配列の相補性に基づいている。Gene cloning により得た HBV-DNA (3.2kb pair) を nick translation 法により ³²PαdCTP でラベルし、これを probe として使用、ナイロン膜に付着した被検検体の一本鎖 DNA と hybridization を施行し、しかる後に autoradiography を行ういわゆる spot hybridization 法である。図7にその結果を示したが、陽性の場合黒色の spot として認められる。陽性コン

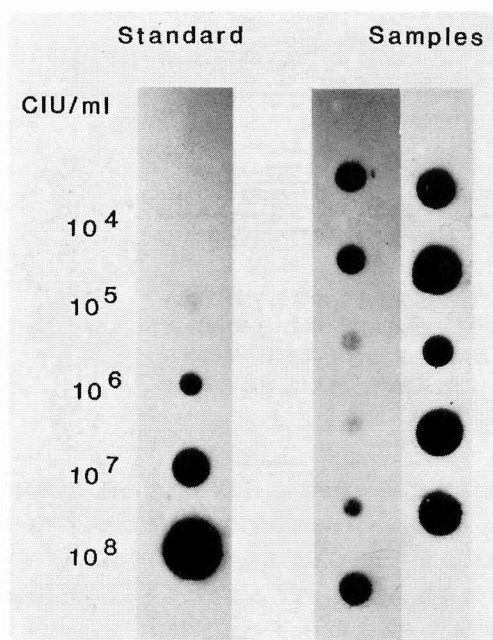


図7 血中 HBV-DNA の検出
Gene cloning により得られた HBV-DNA をnick translation 法により ^{32}P dCTP でラベルしたものを probe として使用。ナイロン膜に付着した被検検体の一本鎖 DNA と spot hybridization を施行し、その後 autoradiography を行う。黒色の spot が陽性である。(袖山ら⁶¹⁾の成績より)

コントロールと比較することにより力価を決める。表1に教室の袖山の成績を含め、今までの報告にみられる血中 HBV-DNA の検出率を血中 HBe 抗原・HBe 抗体別に示した。興味あることは、HBe 抗原陽性例ではきわめて高率に HBV-DNA が検出されるのは当然としても、HBe 抗原陰性あるいは HBe 抗体が陽性例においても検出されることである。この事実は今まで HBe 抗体陽性血は感染性がきわめて少ない、あるいは病原性が少ないといわれてきたが、実際には HBe 抗体陽性でも HBV の増殖が強いことを示す。図8は HBe 抗体が持続陽性でありながら、トランスアミナーゼが変動する慢性肝炎の経過であるが、血中 HBV-DNA がトランスアミナーゼの変動にやや先行して出現している。また教室の中村らは⁶⁵⁾ 血中 HBV-DNA、HBe 抗原・HBe 抗体系と肝組織内 HBc 抗原の関係を検討し、表2に示したように血中 HBe 抗原陽性例では、血中 HBV-DNA が陽性で肝内 HBc 抗原が陽性例は当然としても、血中 HBe 抗体陽性でありながら、血中 HBV-DNA、肝内 HBc 抗原が陽性の症例を証明した。このように血中 HBV-DNA は肝内 HBV の増殖を密接に反映していることが判る。一方 Nalpas ら⁶⁴⁾ は、HBV マーカーがすべて陰性でも血中 HBV-DNA 陽性例が、とくにアルコール肝障害時にはみられると報告している。したがって臨床的に血中 HBV-DNA の測定の意義は大きい。

表1 HBV マーカー別にみた血中 HBV-DNA の検出

報告者 (発表年)	HBsAg (+)			HBsAg (-)
	HBeAg (+)	—	anti-HBe (+)	
Brechot et al. (1981) ⁵⁴⁾	15/15	—	0/4	0/4
Bonino et al. (1981) ⁵⁵⁾	12/12	—	9/17	—
Weller et al. (1982) ⁵⁶⁾	36/36	—	1/23	0/4
Scott et al. (1983) ⁵⁷⁾	72/80	9/19	7/13	6/112
Liebermann et al. (1983) ⁵⁸⁾	28/28	1/1	16/32	0/3
Hadziyannis et al. (1983) ⁵⁹⁾	8/8	1/1	13/24	—
Karayiannis et al. (1984) ⁶⁰⁾	109/120	0/19	26/121	1/150
袖山 他 (1985) ⁶¹⁾	55/69	0/7	1/13	—
Chu et al. (1985) ⁶²⁾	52/54	2/3	14/22	—
Feiman et al. (1985) ⁶³⁾	9/11	—	0/5	—
Brechot et al. (1985) ⁶⁴⁾	3/4	—	—	7/101

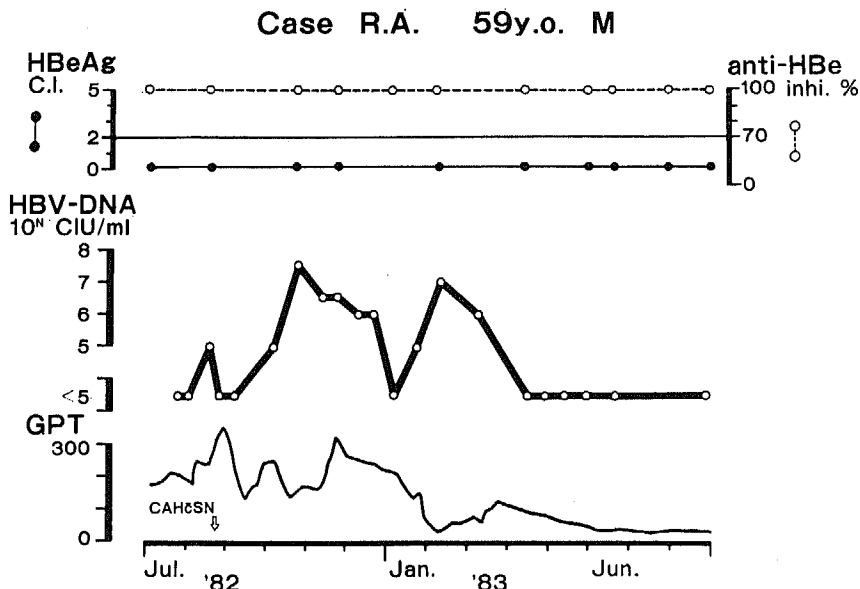


図8 HBe抗体が持続陽性でありながら、血清トランスアミナーゼ値が変動する慢性B型肝炎例の血中HBV-DNAの推移(袖山ら⁶¹⁾の成績より)

表2 血中HBV-DNA, HBe抗原と肝内HBc抗原の相関

HBeAg/anti-HBe	No	肝内HBcAg (+)		肝内HBcAg (-)	
		HBV-DNA (+)	HBV-DNA (-)	HBV-DNA (+)	HBV-DNA (-)
+/-	26	11	5	4	6
-/-	3	1	0	1	1
-/+	9	1	1	2	5

(中村ら⁶⁵⁾の成績より)

2 肝組織中HBV-DNAの検出の意義

肝組織中HBV-DNAの存在は、その増殖過程に出現するfree HBV-DNAと細胞DNAに組み込まれたHBV-DNA (integrated HBV-DNA)の2つが存在する。細胞DNAへのHBV-DNAの組み込みは前述したごとく肝癌発生機序解明のため盛んに研究が行われている。図9は³²P HBV-DNAをprobeとして用い、サザンブロット法により培養肝癌細胞内のHBV-DNAの組み込みをみたものである。Lane bのB型肝炎患者由来のPLC/PRF/5には明らかに組み込みが見られる。表3は今までに報告された肝癌組織中へのHBV-DNAの組み込み率を示したものであるが、血中HBs抗原陽性の肝癌にはきわめて高率にHBV-DNAの組み込みがみられる。報告者によって

は、血中にHBVマーカーがない肝癌患者でも、癌細胞内にHBV-DNAが組み込まれていることを報告している⁶⁶⁾。最近になり前癌病変である肝硬変や慢性肝炎例でも、肝組織内にHBV-DNAが組み込まれていることが報告されている⁵⁴⁾⁶⁷⁾⁷⁴⁾。この場合組み込みの仕方がランダムであり、クローナルではない。しかしながら癌化とともにクローナルな部分が多くなるわけで、今後肝硬変や慢性肝炎の肝臓中HBV-DNAの解析は肝癌発生の早期発見へとつながる可能性がある。

肝細胞以外の細胞である白血球細胞⁷⁵⁾や精子⁷⁶⁾のDNA中にもHBV-DNAの組み込みがあるとの報告がある。HBVの増殖が肝細胞以外にもあるのか、HBVの関与した発癌が肝細胞以外にもあるか、遺伝

表3 肝癌組織 DNA への HBV-DNA の組み込み率

報告者 (発表年)	血 中	
	HBsAg (+)	HBsAg (-)
Brechot et al. (1981) ⁶⁶⁾	4/4	3/3
Shafrit et al. (1981) ⁶⁷⁾	12/12	3/8
Koshy et al. (1982) ⁶⁸⁾	3/4	0/2
Chen et al. (1982) ⁶⁹⁾	8/8	—
Hadziyannis et al. (1983) ⁵⁹⁾	2/3	—
Hino et al. (1984) ⁷⁰⁾	8/9	0/13
三田村 ら (1984) ⁷¹⁾	12/13	—
Miller et al. (1985) ⁷²⁾	5/9	0/4
Hino et al. (1985) ⁷³⁾	19/23	1/59

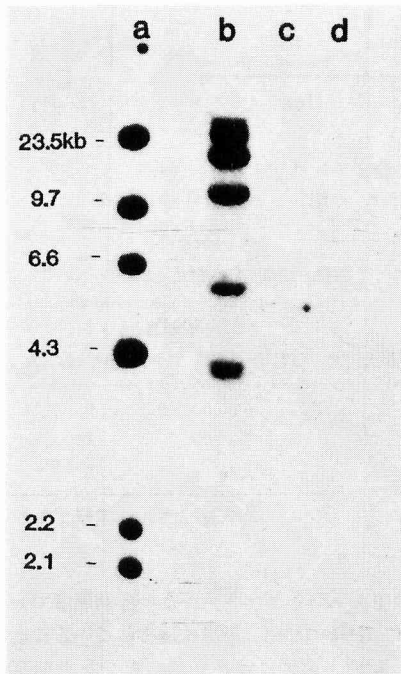


図9 培養B型肝炎細胞 DNA 中に組み込まれた HBV-DNA のサザンブロット法による検出
 lane a: コントロールサイズマーカー
 lane b: 培養B型肝炎細胞 (PLC/PRF/5),
 lane c: 非B型肝炎培養細胞 (Mahlavu),
 lane d: 非B型肝炎培養細胞 (KIM)
 (清沢ら¹⁰⁵⁾の成績より)

子を通しての感染が成立するのといったきわめて重要な問題を提起している。

光顕レベルでの肝組織中 HBV-DNA の局在をみる方法も開発されている⁷⁷⁾。この場合主として free の

HBV-DNA をみている可能性があり、今後組み込み型 HBV-DNA の局在をみる方法の開発が切望される。

V 分子生物学を応用した HBV ワクチンの開発

HBV がウイルスである以上その最良の予防法がワクチン接種による能動的免疫の獲得であることはいうまでもない。HBV ワクチン開発の意義はきわめて大きい。第1に全世界で約2億人の HBs 抗原キャリアーがいるが、その中の何割かは感染源になっている。第2に HBs 抗原キャリアーの中から慢性肝炎・肝硬変さらには肝癌にまで進展する例が少なからず存在する。すなわち HBV ワクチンは感染を未然に防ぐのみならず、HBV に起因した肝癌の予防にもつながることを意味している。現在すでに実用化し使用されている HBV ワクチンは、血液由来のものであり、すでにその安全性と効能に関しては十分認められている⁷⁸⁾⁻⁸³⁾。しかしながら、血液由来ワクチン(第一世代ワクチン)の欠点は血液材料をヒトに頼らざるを得ないこと、したがって供給量に限度があること、製造過程が複雑であること、費用が高いことなどがある。そこでこれらの欠点をカバーする意味で第二世代あるいは第三世代のワクチンの開発が進行中である⁸⁴⁾。ここで分子生物学的手法が用いられるわけである。

第二世代ワクチンとしては、クローニングにより得られた HBV-DNA より Gene S を取り出し、これを発現用ベクターに挿入後、大腸菌や酵母に形質転換することにより、HBs 抗原を遺伝子工学的に量産する方法である。現在大腸菌よりは酵母が広く使用されているが、それは酵母の方が HBs 抗原を容易に発現するためである⁸⁵⁾⁻⁸⁷⁾。この方法によると、大量培養が可能であること、感染性の心配がないこと、費用が安いといった利点がある。アメリカでは実用化されつつあり、その効果は血液由来のものと同等あるいはそれ以上であることが明らかとなっている⁸⁷⁾。前述した利点とも考え合わせるとききわめて有望なワクチンである。

最近 Smith らは⁸⁸⁾ ワクシニアウイルスを用いた生ワクチンの開発を行っている。すなわちワクシニアウイルス DNA 中に Gene S を組み込ませ、これを個体に注射することにより、個体内でワクシニアウイルスを増殖させ、同時に Gene S を発現せしめ HBs 抗原を産生させる。しかる後に HBs 抗体を獲得させしめるという方法である。すでにチンパンジーにて実験を行い良好な結果を収めつつあるが⁸⁹⁾、この方法での欠点はワクシニアウイルスによる脳炎、湿疹、壊死等の

副作用が強いことであろう⁸⁴⁾。

最近の方法としては、Gene S のみならず Region Pre-S 領域を同時に組み込ませることが考えられている。

第三世代の HBV ワクチンとしてペプチドワクチンが開発されている。HBV-DNA の塩基配列にしたがい、Gene S にコードされるアミノ酸を組み立てることによりペプチドとして HBs 抗原を化学的に合成する方法である⁹⁰⁾⁻⁹⁶⁾。ペプチドには親水性部分と疎水性部分があるが、親水性部分に抗原性が強いと言われ、またペプチドの部分によって抗原性に強弱があるといわれている。したがってより効果的なワクチンの合成が可能となる。しかしながら、現時点でのこれらペプチドワクチンの動物実験での効果は弱いとされており⁹⁷⁾、今後の改良を待たねばならない。Neurath ら⁹⁸⁾は、Region Pre-S にコードされる親水性部分のペプチドを HBs 抗原のペプチドに付着させることにより、免疫原性が強まったことを報告している。Region Pre-S にコードされる poly-HSA レセプターが HBV の肝細胞吸着点とすれば、poly-HSA レセプター抗体を作ることにより確実な HBV 感染防禦となる。

VI HBV 撲滅への今後の展望

HBV 撲滅の基本的戦略は (1) HBV キャリヤーからの水平感染の防止 (2) HBV キャリヤーの母親からの垂直感染の防止の 2 つに尽きる。(1)については、医療事故により代表される水平感染で、HBs 抗体含有ヒト免疫グロブリン (HBIG) の使用によりほぼ 100% 感染防止が可能となった⁹⁹⁾¹⁰⁰⁾。さらに未然に予防する方法は HBV ワクチン接種により HBs 抗体を獲得することである。表 4 に HBV ワクチンの適応者を列記した。このうち第 1 群は戦略(2)に相当する。近年本邦における乳幼児の HBs 抗原キャリヤー率は 1% 以下となり¹⁰¹⁾¹⁰²⁾、欧米なみになっている。このことは水平感染による乳幼児期でのキャリヤー化の減少を意味している。したがって母子間感染ブロックは最も効

表 4 HBV ワクチンの適応

第 1 群

- HBe 抗原陽性キャリヤー妊婦からの新生児

第 2 群

- HBe 抗原陽性キャリヤーのいる家族 (特に乳幼児)
- 頻回の血液製剤投与が予測される患者 (血友病、再生不良性貧血、白血病、移植、透析患者等)
- HBe 抗原陽性キャリヤーの婚約者、および HBs 抗体のない配偶者
- HBe 抗原陽性血汚染事故の被汚染者

第 3 群

- 医療関係者
(病院のみならずその他職場においても、ヒトの血液、あるいは分泌物に直接接する仕事に従事し、B型肝炎ウイルスに感染する機会が多いと考えられる人)
- HBs 抗原キャリヤーのいる家族 (特に乳幼児)
- 海外長期滞在者等

率のよい戦略となる。母子感染ブロックに関しては、HBIG と HBV ワクチンの併用による確立した方法が行われずでその安全性と効果については十分認められている¹⁰³⁾¹⁰⁴⁾。これを踏まえて、1986年より国 (厚生省) と自治体の協力により、妊婦の HBs 抗原の検診および HBe 抗原陽性妊婦から出生する児に HBIG および HBV ワクチン併用による受・能動免疫が施行されることとなった。今後年々、HBV キャリヤーは減少し、いずれは HBV は地球上から消えてなくなるであろう。HBV が撲滅されれば、これに起因した肝炎・肝硬変・肝癌も撲滅されることになり、HBV ワクチンの意義はきわめて大きいものである。

おわりに

HBV の分子生物学的知見につき解説し、分子生物学の臨床への応用について述べた。HBV は HBIG および HBV ワクチンの併用により感染が防止できるようになった。将来 HBV が地球上に存在するとすれば、それは限られた研究施設内のみになるであろう。

文 献

- 1) Blumberg, B.S., Alter, H.J. and Visnich, S.: A "new" antigen in leukemia sera. JAMA, 191: 541-546, 1965
- 2) Prince, A.M.: An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. Proc Natl Acad Sci USA, 60: 814-821, 1968
- 3) Okochi, K. and Murakami, S.: Observations on Australia antigen in Japan. Vox Sang, 15: 374-385, 1968

- 4) Dane, D.S., Cameron, C.H. and Briggs, M. : Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen-associated hepatitis. *Lancet*, i : 695-698, 1970
- 5) Almeida, J.D., Rubenstein, D. and Stott, E. J. : New antigen-antibody system in Australia antigen-positive hepatitis. *Lancet*, ii : 1225-1227, 1971
- 6) Magnus, L.O. and Espmark, J.A. : New specificities in Australia antigen-positive sera distinct from Le Bouvier determinants. *J Immunol*, 109 : 1017-1021, 1972
- 7) Kaplan, P.M., Greenman, R.J., Gerin, J.L., Purcell, R.H. and Robinson, W.S. : DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J Virol*, 12 : 995-1004, 1973
- 8) Takahashi, T., Kaga, K., Akahane, Y., Yamashita, T., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. : Isolation of Dane particles containing DNA strand by metrizamide density gradient. *J Med Microbiol*, 13 : 163-166, 1980
- 9) Robinson, W.S., Clayton, D.A. and Greeman, R.L. : DNA of a human hepatitis B candidate. *J Virol*, 14 : 384-391, 1974
- 10) Tiollais, P., Charnay, P. and Vyas, G.N. : Biology of hepatitis B virus. *Science*, 213 : 406-411, 1981
- 11) Cummings, I.W., Browne, J.K., Salser, W., Tyler, G.V., Snyder, R.L., Smolec, J.M. and Summers, J. : Isolation, characterization and comparison of recombinant DNAs derived from genomes of human hepatitis B virus and woodchuck hepatitis virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77 : 1842-1846, 1980
- 12) Hruska, J.E., Clayton, D.A., Rubenstein, J.L.R. and Robinson, W.S. : Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after the Dane particle polymerase reaction. *J Virol*, 21 : 666-672, 1977
- 13) Summers, J., O'Connell, A. and Millman, I. : Genome of hepatitis B virus : Restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 72 : 4597-4601, 1975
- 14) Siddiqui, A., Sattler, F. and Robinson, W.S. : Restriction endonuclease cleavage map and location of unique features of the DNA of hepatitis B virus, subtype adw2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76 : 4664-4668, 1979
- 15) Sninsky, J.J., Siddiqui, A., Robinson, W.S. and Cohen, S. : Cloning and endonuclease mapping of the hepatitis B viral genome. *Nature*, 279 : 346-348, 1979
- 16) Pask, M., Goto, T., Gilbert, W., Zink, B., Schaller, H., Mackay, P., Leadbetter, P. and Murray, K. : Hepatitis B virus genes and their expression in *E. coli*. *Nature*, 282 : 575-579, 1979
- 17) Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P. and Charnay, P. : Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature*, 281 : 646-650, 1979
- 18) Ono, Y., Onda, H., Sasada, R., Igarashi, K., Sugino, Y. and Nishioka, K. : The complete nucleotide sequences of the cloned hepatitis B virus DNA ; subtype adr and adw. *Nucleic Acids Res*, 11 : 1747-1757, 1983
- 19) Heerman, K.H., Goldman, U., Schwartz, W., Seyffarth, T., Baumgarten, H. and Gerlich, W.H. : Large surface proteins of Hepatitis B virus containing the Pre-S sequence : *J Virol* 52 : 396-402, 1984
- 20) Machida, A., Kishimoto, S., Ohnuma, H., Miyamoto, H., Baba, K., Oda, K., Nakamura, T., Funatsu, G., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. : Glycopeptide containing 15 amino acid residues derived from hepatitis B surface antigen particles : Demonstration of immunogenicity to raise anti-HBs in mice. *Molecular Immunol*, 19 : 1087-1093, 1982
- 21) Peterson, D.L., Robert, I.M. and Vyas, G.N. : Partial amino acid sequence of two major component polypeptides of hepatitis B surface antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74 : 1530-1534, 1977

- 22) Machida, A., Kishimoto, S., Ohnuma, H., Miyamoto, K., Baba, K., Oda, K., Nakamura, T., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. : A hepatitis B surface antigen polypeptide (P31) with the receptor for polymerized human as well as chimpanzee albumins. *Gastroenterology*, 85 : 268-274, 1983
- 23) Sttibe, W. and Gerlich, W. : Structural relationship between minor and major proteins of hepatitis B surface antigen. *J Virol*, 46 : 626-628, 1983
- 24) Matsushashi, T. and Hosokawa, Z. : Reactants to human serum albumin-coated red cells found in Au (1)-positive sera. *Jpn J Med*, 42 : 183-184, 1972
- 25) Lenkei, R., Onica, D. and Ghetie, V. : Receptors for polymerized albumin on liver cells. *Experientia*, 33 : 1046-1047, 1977
- 26) Ponttiso, P., Alberti, A., Bortolotti, F. and Realdi, G. : Virus associated receptors for polymerized human serum albumin in acute and in chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology*, 84 : 220-226, 1983
- 27) Imai, M., Yanase, Y., Nojiri, T., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. : A receptor for polymerized human and chimpanzee albumins on hepatitis B virus particles co-occurring with HBe-Ag. *Gastroenterology*, 76 : 242-247, 1979
- 28) Lenkei, R., Mota, G., Dan, M.E., Mustea, A. and Dorbe, I. : The polymerized albumin and anti-albumin autoantibodies in patients with hepatic diseases. *Rev Roum Biochem*, 11 : 271-276, 1974
- 29) Okada, K., Kamiyama, I., Inomata, M., Imai, M., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. : e antigen and anti-e in the serum of asymptomatic carrier mothers as indicators of positive and negative transmission of hepatitis B virus to their infants. *N Engl J Med*, 294 : 746-749, 1976
- 30) Gerlich, W.H. and Robinson, W.S. : Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell*, 21 : 801-809, 1980
- 31) Takahashi, K., Machida, A., Funatsu, G., Nomura, M., Usuda, S., Aoyagi, S., Tachibana, K., Miyamoto, H., Imai, M., Nakamura, T., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. : Immunohistochemical structure of hepatitis B e antigen in the serum. *J Immunol*, 130 : 2903-2907, 1983
- 32) Imai, M., Nomura, M., Gotanda, T., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. : Demonstration of two distinct antigenic determinants on hepatitis B e antigen by monoclonal antibodies. *J Immunol*, 12 : 69-71, 1982
- 33) Takahashi, K., Miyakawa, Y., Gotanda, T., Mishiro, S., Imai, M. and Mayumi, M. : Shift from free "small" Hepatitis B e antigen to IgG-bound "large" form in the circulation of human beings and a chimpanzee acutely infected with hepatitis B virus. *Gastroenterology*, 77 : 1193-1199, 1979
- 34) Takahashi, K., Imai, M., Miyakawa, Y., Iwakiri, S. and Mayumi, M. : Duality of hepatitis B e antigen in serum of persons infected with hepatitis B virus : Evidence for the non-identity of e antigen with immunoglobulins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75 : 1952-1956, 1978
- 35) 和田秀一, 袖山 健, 野村元稔, 上条賢介, 小池ゆり子, 清沢研道, 長田敦夫, 古田精市, 赤羽賢浩, 津田文男 : Monoclonal 抗体を用いた ELISA による HBe 抗原の定量的測定と, その臨床的意義について. *肝臓*, 25 : suppl. 114, 1984
- 36) Summers, J. and Mason, W.S. : Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an DNA intermediate. *Cell*, 29 : 403-415, 1982
- 37) Toh, H., Hayashida, H. and Miyata, T. : Sequence homology between retroviral reverse transcriptase and putative polymerases of hepatitis B virus and califlower mosaic virus. *Nature*, 305 : 827-829, 1984
- 38) Moriaty, A.M., Alexander, H. and Lerner, R.A. : Antibodies to peptides detect new hepatitis B antigen : Serological correlation with hepatocellular carcinoma. *Science*, 227 : 429-432, 1985

- 39) Summers, J., Smolec, J.M. and Snyder, R.L. : A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchacks. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75 : 4533-4537, 1978
- 40) Galibert, F., Chen, T.N. and Mandart, E. : Nucleotide sequence of a cloned woodchack hepatitis virus genome : Comparison with the hepatitis B virus. *J Virol*, 41 : 51-65, 1982
- 41) Robinson, R.S. : Genetic variation among hepatitis B and related viruses. *Ann NY Acad Sci*, 354 : 371-378, 1980
- 42) Ziemer, M., Garcia, P. and Shaul, Y. : Sequence of hepatitis B virus DNA and incorporated into the genome of human hepatoma cell line. *J Virol*, 53 : 885-892, 1985
- 43) Dejean, A., Bréchet, C., Tiollais, P. and Wain-Hobson, S. : Characterization of integrated hepatitis B viral DNA cloned from a human hepatoma and the hepatoma-derived cell line PLC/PRF/5. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80 : 2505-2509, 1983
- 44) Koshy, R., Koch, S., Freytag von Loringhoven, A., Kahmann, R., Murray, K. and Hofshneider, P.H. : Integration of hepatitis B virus DNA : evidence for integration in the single stranded gap. *Cell*, 34 : 215-223, 1983
- 45) Dejean, A., Sonigo, P., Wain-Hobson, S. and Tiollais, P. : Specific hepatitis B virus integration in hepatocellular carcinoma DNA through a viral 11-base-pair direct repeat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81 : 5350-5354, 1984
- 46) Mizusawa, H., Taira, M., Yaginuma, K., Kobayashi, M., Yoshida, E. and Koike, K. : Inversely repeating integrated hepatitis B virus DNA and cellular flanking sequences in the human hepatoma-derived cell line hu SP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82 : 208-212, 1985
- 47) 町田篤彦 : B型肝炎ウイルスのポリペプチド. *Medical Immunology*, 10 : 196-203, 1985
- 48) Furuta, S., Nagata, A., Kiyosawa, K., Koike, Y., Sahara, T., Oda, M., Mayumi, M. and Tsuda, F. : Anti-HBc titer in relation to the etiological role of hepatitis B virus in primary hepatocellular carcinoma. *Acta Hepato-gastroenterol*, 24 : 3-9, 1977
- 49) Beasley, R.P., Hwang, L.Y. and Lin, C.C. : Hepatocellular carcinoma and HBV : A prospective study of 22707 men in Taiwan. *Lancet*, ii : 1129-1133, 1981
- 50) Beasley, R.P. : Hepatitis B virus as the etiologic agent in hepatocellular carcinoma-epidemiologic considerations. *Hepatology*, 2 : 21S-26S, 1982
- 51) Szmuness, N. : Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus : evidence for a causal association. *Prog Med Virol*, 24 : 40-69, 1978
- 52) Wen Y.-M., Mitamura, K., Merchant, B., Tang, Z.Y. and Purcell, R.H. : Nuclear antigen detected in hepatoma cell lines containing integrated hepatitis B virus DNA. *Infect Immun*, 39 : 1361-1367, 1983
- 53) Kiyosawa, K., Daemer, R.J., He, L.F., Bonino, F., Prozesky, O.W. and Purcell, R.H. : The spectrum of complement-fixing antinuclear antibodies in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 5 : 548-555, 1985
- 54) Bréchet, C., Hadchouel, M., Scott, J. and Tiollais, P. : Detection of hepatitis B virus DNA in liver and serum : a direct appraisal of the chronic carrier state. *Lancet*, ii : 765-767, 1981
- 55) Bonino, F., Hoyer, B., Nelson, J., Engle, R., Verme, G. and Gerin, J.L. : Hepatitis B virus DNA in the sera of HBs antigen carriers : a marker of active hepatitis B virus replication in the liver. *Hepatology*, 1 : 386-391, 1981
- 56) Weller, I.V.P., Fowler, M.J.F. and Monjardino, J. : The detection of HBV-DNA in serum by molecular hybridization. *J Med Virol*, 9 : 273-280, 1982
- 57) Scott, J., Hadchouel, M., Hery, C., Yvart, J., Tiollais, P. and Brechet, C. : Detection of hepatitis B virus DNA in serum by a simple spot hybridization technique : comparison with results for other viral markers. *Hepatology*, 3 : 279-284, 1983
- 58) Lieberman, H.M., LaBrecque, D.R., Kew, M.C., Hadziyannis, S.J. and Shafritz, D.A. :

- Detection of hepatitis B virus DNA directly in human serum by a simplified molecular hybridization test : comparison to HBeAg/anti-HBe status in HBsAg carriers. *Hepatology*, 3 : 285-291, 1983
- 59) Hadziyannis, S. J., Lieberman, H. M., Karvountzis, G. G. and Shafritz, D. A. : Analysis of liver disease, nuclear HBcAg, Viral replication, and hepatitis B virus DNA in liver and serum of HBeAg Vs. anti-HBe positive carriers of hepatitis B virus. *Hepatology*, 3 : 656-662, 1983
- 60) Karayiannis, P., Fowler, M. J. F., Lok, A. S. F., Greenfield, C., Monjardino, J. and Thomas, H. C. : Detection of serum HBV-DNA by molecular hybridisation. Correlation with HBeAg/anti-HBe status, racial origin, liver histology and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 1 : 99-106, 1985
- 61) 袖山 健, 清沢研道, 和田秀一, 中村 信, 依田英俊, 長田敦夫, 古田精市, 赤羽賢浩, 田中榮司. HBs抗原 carrier における血中 HBV-DNA 測定の臨床的意義について. *肝臓*, 26 : 1307-1314, 1985
- 62) Chu, C. H., Karayiannis, P., Fowler, M. J. F., Monjardino, J., Liaw, Y. F. and Thomas, H. C. : Natural history of chronic hepatitis B virus infection in Taiwan : Studies of hepatitis B virus DNA in serum. *Hepatology*, 5 : 431-434, 1985
- 63) Freiman, J., Eckstein, R., McCaughan, G., Parsons, G., Davies, J. S., Diegutis, P., Burnett, L. and Gallagher, N. : Significance of serum and hepatic markers of hepatitis B viral infection in HBsAg-positive and HBsAg-negative chronic active hepatitis. *Hepatology*, 5 : 50-53, 1985
- 64) Nalpas, B., Berthelot P., Thiers, V., Duhamel, G., Courouze, A. M., Tiollais, P. and Brechot, C. : Hepatitis B virus multiplication in the absence of usual serological markers. A study of 146 chronic alcoholics. *J Hepatol*, 1 : 89-97, 1985
- 65) 中村 信, 田中榮司, 今井康晴, 袖山 健, 和田秀一, 宜保行雄, 清沢研道, 古田精市. HBV carrier における血中 HBeAg, HBV-DNA と肝内 HBcAg との関連について. *日消誌*, 82 : 2325, 1985
- 66) Brechot, C., Hadchouel, M., Scott, J., Fonck, M., Potet, F., Vyas, G. N and Tiollais, P. : State of hepatitis B virus in hepatocytes of patients with hepatitis B surface antigen-positive and-negative liver disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78 : 3906-3910, 1981
- 67) Shafritz, D., Shouval, D., Sherman, H. I., Hadziyannis, S. J. and Kew, M. C. : Integration of hepatitis B virus DNA into the genome of liver cells in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 305 : 1067-10173, 1981
- 68) Koshy, R., Maupas, P. H., Muller, R. and Hofshneider, P. H. : Detection of hepatitis B virus-specific DNA in the genomes of human hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis tissues. *J gen Virol*, 57 : 95-105, 1981
- 69) Chen, D. S., Hoyer, B. M., Nelson, J., Purcell, R. H. and Gerin, J. L. : Detection and properties of hepatitis B virus DNA in liver tissues from patients with hepatocellular carcinoma *Hepatology*, 2 : 42S-46S, 1982
- 70) Hino, O., Kitagawa, T., Koike, K., Kobayashi, M., Hara, M., Mori, W., Nakashima, T., Hattori, N. and Sugano, H. : Detection of hepatitis virus DNA in hepatocellular carcinoma in Japan. *Hepatology*, 4 : 90-95, 1984
- 71) 三田村圭二, 井廻道夫, 松崎靖司, 大管俊明, 大林 明, 相川達也 : 肝細胞および肝癌細胞におけるWHV-DNA および HBV-DNA の存在様式 : 犬山シンポジウム記録刊行会編. B型肝炎のトピックス—自然経過・HBV-DNA・治療. pp.144-149 中外医学社, 東京, 1984
- 72) Miller, R. H., Lee, S. C., Liaw, Y. F. and Robinson, W. S. : Hepatitis B viral DNA in infected human liver and hepatocellular carcinoma. *J Infet Dis*, 151 : 1081-1092, 1985
- 73) Hino, O., Kitagawa, T. and Sugano, H. : Relationship between serum and histological markers for hepatitis B virus and rate of viral infection in hepatocellular carcinoma in Japan. *Int J Cancer*, 35:5-10, 1985
- 74) Kam, W., Rall, L. B., Smuckler, E. A., Schmid, R. and Rutter, W. J. : Hepatitis B viral

- DNA in liver and serum of asymptomatic carriers. *Proc Natl Aca Sci USA*, 79 : 7522-7526, 1982
- 75) Gu, J.R., Chen, Y.C., Jiang, H.Q., Zhang, Y.L., Wu, S.M., Jiang, W.L. and Jian, J. : State of hepatitis B virus DNA in leucocytes of hepatitis B patients. *J Med Virol*, 17 : 73-81, 1985
 - 76) Hadchouel, M., Scott, J., Huret, J.L., Molinie, C., Villa, E., Degos, F. and Brechot, C. : Presence of HBV-DNA in spermatozoa : a possible vertical transmission of HBV via the germ line. *J Med Virol*, 16 : 61-66, 1985
 - 77) Blum, H.E., Haase, A.T. and Vyas, G.N., : Molecular pathogenesis of hepatitis B virus infection : simultaneous detection of viral DNA and antigens in paraffin embedded liver sections. *Lancet*, ii : 771-775, 1984
 - 78) Krugman, S. and Giles, J.P. : Viral hepatitis, type B (MS-2 strain). Further observations on natural history and prevention. *N Engl J Med*, 288 : 755-760, 1973
 - 79) Purcell R.H. and Gerin, J.L. : Hepatitis B vaccine : A status report. In : Vyas, G.N., Cohen, S.N. and Schmid, R. (ed.), *Viral hepatitis*. pp.491-505, The Franklin Institute Press, Philadelphia, 1978
 - 80) Purcell, R.H. and Gerin, J.L. : Hepatitis B submit vaccine : A preliminary report of safety and efficacy tests in chimpanzees. *Am J Med Sci*, 270 : 395-400, 1975
 - 81) Maupas, P.H., Goudeau, A., Coursaget, P. and Drucker, J. : Immunization against hepatitis B in man. *Lancet*, i : 1367-1370, 1976
 - 82) Maupas, P.H., Goudeau, P., Coursaget, P., Drucker, J., Barin, F. and Andre, M. : Immunization against hepatitis B in man : A pilot study of two years duration. In : Vyas, G.N., Cohen, S.N., Schmid, R. (ed.), *Viral hepatitis*, pp.539-556, The Franklin Institute Press, Philadelphia, 1980
 - 83) Szmunes, W., Stevens, C.E., Harley, E.J., Zang, E.A., Oleszko, W.R., William, D.C., Sadovsky, R., Morrison, J.M. and Kellner, A.K. : Hepatitis B vaccine ; Demonstration of efficacy in a controlled clinical trial in a high-risk population in the United States. *N Engl J Med*, 303 : 833-841, 1980
 - 84) Purcell, R.H. and Gerin, J.L. : Prospects for second and third generation hepatitis B vaccines. *Hepatology*, 5 : 159-163, 1985
 - 85) Valenzuela, P., Medina, A., Rutter, W.J., Ammerer, G. and Hall, B.D. : Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature*, 298 : 347-350, 1982
 - 86) Miyanohara, A., Toh-E, A., Nozaki, C., Hamada, F., Ohtomo, N. and Matsubara, K. : Expression of hepatitis B surface antigen gene in yeast. *Proc Nat Acad Sci USA*, 80 : 1-5, 1983
 - 87) Mac Aleer, W.J., Buynak, E.B., Maigetter, R.Z., Wampler, D.E., Miller, W.J. and Hillman, M.R. : Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature*, 307 : 178-180, 1984
 - 88) Smith, G.L., Mackett, M. and Moss, B. : Infectious vaccinia virus recombinants that express hepatitis B virus surface antigen. *Nature*, 302 : 490-495, 1983
 - 89) Moss, B., Smith, G.L., Gerin, J.L. and Purcell, R.H. : Live recombinant vaccinia virus protects chimpanzees against hepatitis B. *Nature*, 311 : 67-69, 1984
 - 90) Lerner, R.A., Green, N., Alexander H., Liu, F.T., Sutcliffe, G. and Shinnick, T.M. : 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 USA*, 78 : 3403-3407, 1981
 - 91) Hopp, T.P. and Woods, K.R. : Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78 : 3824-3828, 1981
 - 92) Dreesman, G.R., Sanchez, Y., Ionscu-Matiu, I., Sparrow, J.T., Six, H.R., Peterson, D.

- L. and Hollinger, F.B. : Antibody to hepatitis B surface antigen after a single inoculation of uncoupled synthetic HBsAg peptides. *Nature*, 295 : 158-160, 1982
- 93) Bhatnagar, P.K., Papas, E., Blum, H.E., Milich, D.R., Nitecki, D., Karels, M. and Vyas, G.N. : Immune response to synthetic peptide analogues of hepatitis B surface antigen specific for the a determinant. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79 : 4400-4404, 1982
- 94) Prince, A.M., Ikram, H., Hopp, T.P. : 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 USA*, 79 : 579-582, 1982
- 95) Neaurath, A.R., Kent, S.B.H. and Strick, N. : 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 USA*, 79 : 7871-7875, 1982
- 96) Brown, S.E., Howard, C.R., Zuckerman, A.J. and Steward, M.W. : Affinity of antibody responses in man to hepatitis B vaccine determined with synthetic peptides. *Lancet*, ii : 184-187, 1984
- 97) Gerin, J.L., Purcell, R.H. and Lerner, R.A. : Recombinant DNA and synthetic peptide approaches to HBV vaccine development : Immunogenicity and protective efficacy in chimpanzees. In : Chanock, R.M., Lerner, R.A., (ed.), *Modern approaches to vaccines : Molecular and chemical basis of virus virulence and immunogenicity*. pp. 121-125, Cold Spring Harbor Laboratory. New York, 1984
- 98) Neaurath, A.R., Kent, S.B.H. and Strick, N. : Location and chemical synthesis of a pre-S gene coded immunodominant epitope of hepatitis B virus. *Science*, 224 : 392-395, 1984
- 99) Grady, G.F., Lee, V.A., Prince, A.M., Gitnick, G.L., Fawaz, K.A., Vyas, G.N., Levitt, M.D., Senior, J.R., Galambos, J.T., Bynum, T.E., Singleton, J.W., Glowdus, B.F., Akdamar, K., Aach, R.D., Winkelman, E.I., Schiff, G.M. and Hersh, T. : Hepatitis B immune globulin for accidental exposures among medical personnel : Final report of a multicenter controlled trial. *J Infect Dis*, 138 : 625-638, 1978
- 100) A Combined Medical Research Council and Public Health Laboratory Service Report : The incidence of hepatitis B infection after accidental exposure anti-HBs immunoglobulin prophylaxis. *Lancet*, i : 6-8, 1980
- 101) Nishioka, K. : Hepatitis B virus vaccines : prevention of perinatal transmission. 6th US-Japan Hepatitis Research Conference. Oiso, March 11-12, 1985
- 102) 古田精市, 清沢研道 : B型肝炎の疫学. *産婦人科治療*, 51 : 689-693, 1985
- 103) Tada, H., Yanagida, M., Mishina, J., Fujii, T., Baba, K., Ishikawa, S., Aihara, S., Tsuda, F., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. : Combined passive and active immunization for preventing perinatal transmission of hepatitis B virus carrier state. *Pediatrics*, 70 : 613-619, 1982
- 104) Beasley, R.P., Hwang, L.Y., Lee, G.C.Y., Lan, C.C., Roan, C.H., Huang, F.Y. and Chen C.L. : Prevention of perinatally transmitted hepatitis B virus infections with hepatitis B immune globulin and hepatitis B vaccine. *Lancet*, ii : 1099-1102, 1983
- 105) 清沢研道, 今井明彦, 袖山健, 宜保行雄, 和田秀一, 吉沢要, 小池ゆり子, 長田敦夫, 古田精市, 赤羽賢浩, 何麗芳 : 肝癌細胞の核抗原に関する研究. *肝臓*, 10 : 1330-1336, 1985

(60. 11. 29 受稿)