

1. B型肝炎ワクチン

加藤 孝宣¹⁾, 明里 宏文²⁾

1) 国立感染症研究所 ウイルス第二部

2) 京都大学 ヒト行動進化研究センター

B型肝炎ウイルス (HBV) は感染力が極めて強く、一旦感染すると排除が難しい。HBV感染者の減少のためにはB型肝炎 (HB) ワクチン接種によるHBV感染の予防が必要である。現在、国内では酵母由来のSmall-HBs抗原を含むHBワクチンが用いられており、HBVの感染阻止が可能な抗体が誘導できる安全なワクチンとして知られている。しかし一部の接種者では十分に抗体が誘導されない例があり、またワクチンエスケープ変異と呼ばれる特定のアミノ酸変異を持つ株に対しては、誘導された抗体の感染中和活性の低下が報告されている。我々は、酵母由来のLarge-HBs抗原を用いた新規HBワクチンを開発し検討を行った。この新規HBワクチンにより誘導された抗体は、従来のHBワクチンで誘導された抗体では感染阻止が難しいワクチンエスケープ変異株の感染阻止が可能であり、感染中和活性が低下するHBVの遺伝子型は従来のHBワクチンとは異なっていた。この新規HBワクチンを従来のHBワクチンと併用することで、多くのHBV株の感染が阻止できる抗体誘導が可能と考えられ、HBV感染の根絶のために新規HBワクチンの一日も早い実用化が望まれる。

はじめに

B型肝炎ウイルス (HBV) は感染力が極めて強いウイルスであり、極少量の血液や体液でも感染が成立する。そのためHBV感染は世界中に広がっており、世界のHBVの感染者数は2億5700万人と推定されている¹⁾。HBVは感染者である母親から児への感染 (垂直感染) や、家族内・医療行為・性行為などによる感染 (水平感染) を介して広がってきた。日本でのB型慢性肝炎は垂直感染後に慢性化したものが主であり、成人での水平感染は一過性で慢性化は稀であると考えられていた。しかし、最近では国内のB型急性肝炎症例においてもHBVの遺伝子型により急性感染後の慢性化の頻度が高いものがあることが問題となっ

ている²⁾。また一過性感染でHBs抗原が陰性となった症例でもHBVゲノムは肝細胞中に保持され、何らかの理由で宿主の免疫が抑制された場合にはHBV増殖が活性化され重症肝炎を発症することも知られている^{3,4)}。B型慢性肝炎の治療薬の開発が進み肝炎のコントロールは可能となったが、一旦感染したウイルスの排除は難しいため、HBV感染者を減少させるためにはB型肝炎 (HB) ワクチン接種によるHBVの感染予防が最も有用と考えられている。そこで本稿では、現在国内で用いられているHBワクチンの特徴と問題点について概説し、その問題点を解決すべく開発された新規HBワクチンについて紹介したい⁵⁾。

B型肝炎ウイルスとは

HBVは不完全二本鎖のDNAをゲノムとして持つウイルスであり、そのゲノムはヌクレオカプシドに収納され外側をエンベロープに囲まれている⁶⁾。HBVのエンベロープはLarge (L), Middle (M), Small (S) の3種類のHBs抗原により構成されており、近年HBVの感染レセプターとして同定された胆汁酸トランスポーター (sodium taurocholate cotransporting polypeptide; NTCP) への結合領域は、L-HBs抗原にのみ含まれるpreS1領域にあることが報告されている (図1)⁷⁻⁹⁾。HBVが肝細胞に侵入すると、ヌクレオカプシドが細胞質から核に移行し、不完全二本鎖の

連絡先

〒162-8640

東京都新宿区戸山1-23-1

国立感染症研究所

ウイルス第二部

TEL: 03-5285-1111 (代)

FAX: 03-5285-1161

E-mail: takato@niid.go.jp

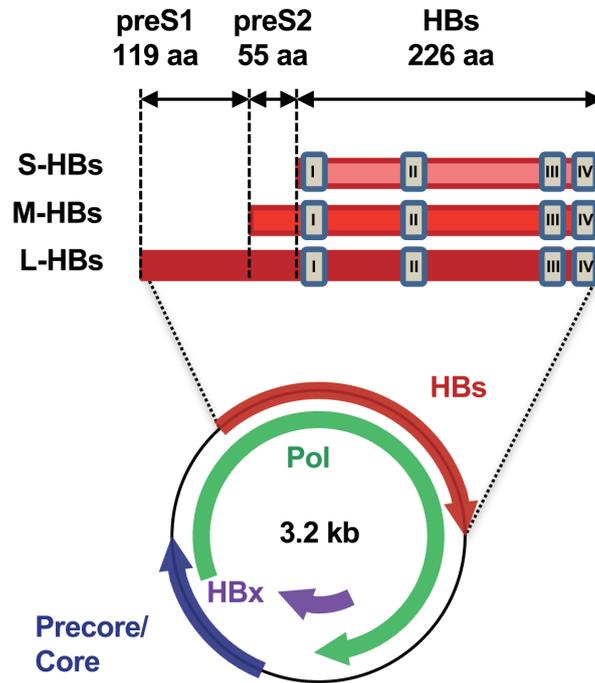


図1 HBV ゲノムと HBs 抗原の構造

HBV ゲノムは 3.2kb の不完全二本鎖 DNA であり、その中に Polymerase (Pol), HBs, Precore/Core, HBx の 4 つの ORF がコードされている。HBs は HBV のエンベロップを構成し、HBs 領域のみを持つ S-HBs, HBs 領域と preS2 領域を持つ M-HBs, HBs 領域と preS1 領域, preS2 領域を持つ L-HBs の 3 種類の蛋白質が産生される。ローマ数字 (I - IV) は膜貫通領域を示す。

HBV ゲノムが核内で covalently closed circular DNA (cccDNA) に変換され、子孫ウイルスのゲノムやウイルス蛋白質を産生するための鋳型となる¹⁰⁾。一旦、cccDNA が作られると感染細胞の核内で保持されるため、感染した HBV を感染細胞から排除することは難しい。また HBV ゲノムはヒトゲノムにインテグレーションされることが知られており、インテグレーションされた HBV ゲノムのフラグメントが肝発癌に関与していると考えられている^{11, 12)}。HBV は DNA ウイルスであるが、複製過程で RNA に転写されるため他の DNA ウイルスと比較して変異が多く、そのゲノムの多様性から遺伝子型分類が用いられる¹³⁻¹⁸⁾。遺伝子型の分布には地域特異性があり、臨床像や治療反応性が異なることが報告されている。現在、A から H までの少なくとも 8 つの遺伝子型が知られており、国内の HBV キャリアは遺伝子型 C 株と B 株の感染が大半を占めているが、近年の B 型急性肝炎では遺伝子型 A 株の感染が増加しており、この遺伝子型 A 株の B 型急性肝炎は肝炎発症後に遷延化や慢性化が起りやすいことが報告されている¹⁹⁻²³⁾。

現行の HB ワクチン

現在、HB ワクチンとして酵母由来の S-HBs 抗原が世界

中で用いられている。日本でも酵母由来の S-HBs 抗原にアジュバントとして水酸化アルミニウム (Alum) を加えた HB ワクチンが販売されており、遺伝子型 A 株の S-HBs 抗原を用いたヘプタバックス®-II と遺伝子型 C 株の S-HBs 抗原を用いたビーメゲン® の 2 種類のワクチンが利用可能である²⁴⁾。これらの HB ワクチンは強い抗 HBs 抗体誘導能を持ち、副反応が少ない優れたワクチンであるが、成人ではワクチンを接種しても抗体が誘導されない、いわゆる不応者が接種例の 10% 程度存在することが知られている²⁵⁾。また下記に示す様に S-HBs 抗原領域のエピトープ内に特定の変異を持つ HBV 株は、これらのワクチンにより誘導された抗体で感染を阻止することが難しく、ワクチンエスケープ変異株と呼ばれている²⁶⁾。米国の献血者における HBV 感染者の検討においてワクチン接種後に HBV DNA 陽性が確認された例では、ワクチン株とは異なる遺伝子型株か、ワクチンエスケープ変異を持つ株が感染していることが確認された²⁷⁾。これらの報告は、現行の HB ワクチンだけでは HBV 感染の根絶が難しいことを示唆するものであり、ワクチンエスケープ変異株やワクチン抗原とは異なる遺伝子型株に対しても有効な HB ワクチンが必要とされている。

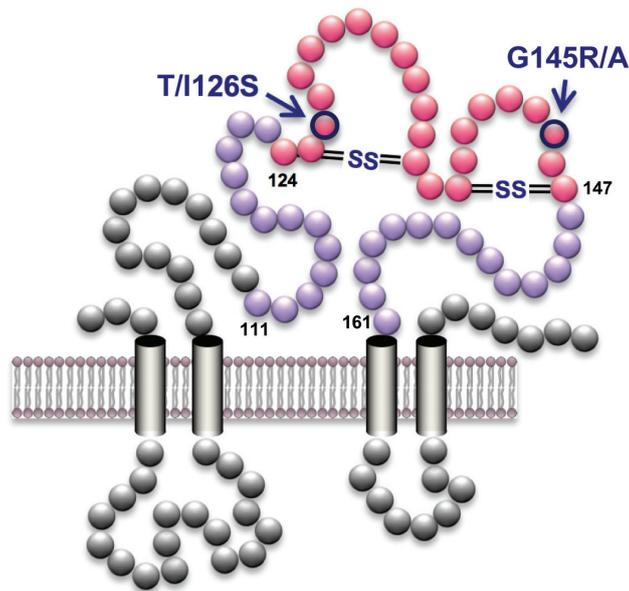


図2 S-HBs 抗原内の a-determinant の構造とワクチンエスケープ変異の位置

HBs 抗原のウイルス表面に突出する領域は SS 結合により 2 つのループを形成し、親水性領域である Major Hydrophilic Region (MHR; aa111 - aa161: 紫 + 赤) を持つ。この中で抗原性を持つ領域は a-determinant (aa124 - aa147: 赤) と呼ばれ、その中の aa126 と aa145 の座位の変異は代表的なワクチンエスケープ変異として知られている。

ワクチンエスケープ変異株の特徴

S-HBs 抗原を用いた HB ワクチンの抗原領域は 2 つの SS 結合で形成される 2 つのループ様構造部と考えられている (図 2)。1990 年にイタリアで HBV キャリアの母親から生まれ、抗 HBs ヒト免疫グロブリン (HBIG) 投与と HB ワクチンの接種を受けたにもかかわらず HBV 陽性となった児から分離された HBV 株は、S-HBs 領域のこのループ内に存在する 145 番目のアミノ酸のグリシンからアルギニンへの変異 (G145R 変異) を持つことが報告された²⁸⁾。その後の検討により、このループの中で S-HBs 領域の 145 番目のアミノ酸のグリシンからアラニンへの変異 (G145A 変異)、126 番目のアミノ酸のスレオニン / イソロイシンからセリンへの変異 (T/I126S 変異) など S-HBs ワクチンで誘導された抗体の感染中和を逃避すると考えられている^{26, 29-34)}。我々の検討でも、現行の S-HBs ワクチン接種者において産生された抗体では、G145R 変異を持つ株 (HBV-G145R) に対する感染中和活性が変異を持たない HBV 株 (HBV-WT) に対する感染中和活性と比較して 2.8 倍から 4.9 倍程度低下していた (図 3)⁵⁾。これらのワクチンエスケープ変異株については、その存在比率がユニバーサルワクチンの導入後に増加したことが報告されており、台湾では 1985 年のユニバーサルワクチンの導入後、小児の HBV 感染者の 20~30% にワクチンエスケープ変異株が検出されている³⁴⁾。中国やイタリアでもユニバーサルワクチン導入後に小児 HBV キャリアにおける G145 座位や

T/I126 座位の変異株が出現もしくは増加していることが報告されている^{32,33)}。

L-HBs 抗原を用いたワクチンの試み

L-HBs 抗原は S-HBs 領域に加え preS1 領域と preS2 領域を含み、感染性ウイルス粒子に必須のエンベロップ蛋白質である (図 1)。HBV のレセプターである NTCP に結合する領域は preS1 領域に存在するが、現行の S-HBs 抗原を用いたワクチンにはこの領域は含まれていない⁷⁻⁹⁾。この L-HBs 抗原をワクチンとして用いることで preS1 領域の NTCP 結合領域に対する中和抗体が誘導されれば、S-HBs 領域を主なターゲットとするワクチンエスケープ変異株の感染を阻止できる可能性があると考えた⁵⁾。またワクチンには効果的なアジュバントが不可欠であるため、組み合わせるアジュバントとして、季節性インフルエンザワクチン等で用いられるエマルジョン型のアジュバントである MF59 を選択した (実験に用いたものは類似製品の Addavax)。この L-HBs 抗原と Addavax を組み合わせた L-HBs ワクチンをアカゲザルに免疫し、抗 HBV 抗体誘導能を S-HBs ワクチンと比較した。ワクチンの接種スケジュールは現行の HB ワクチンに倣い、初回から 1 ヶ月後と 5 ヶ月後の 3 回接種とした。3 回目接種終了から 6 週後の抗 HBV 抗体の抗体価を測定したところ、S-HBs 抗原に対する抗体は L-HBs ワクチン接種よりも S-HBs ワクチン接種により強く誘導されていたが、L-HBs 抗原に対する抗体価は L-HBs ワクチン接種で高値であった。また、S-HBs

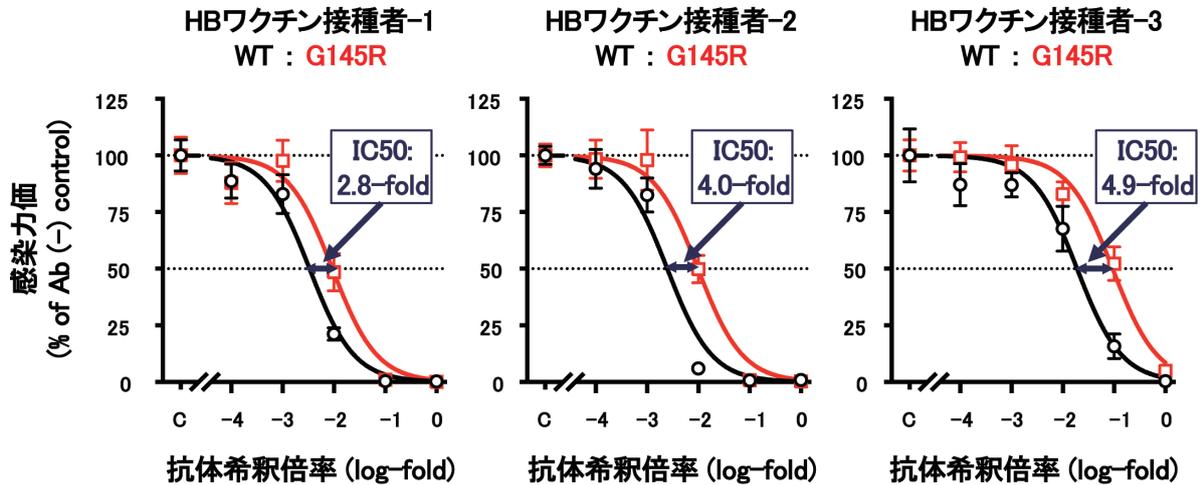


図3 現行のHBワクチン(S-HBsワクチン)接種者に誘導された抗体のHBV感染中和活性
 HBワクチン接種者の血清から抗体を分離し、培養細胞で作製したHBVレポーターウイルスと混合して感染中和活性を評価した。変異を持たないHBV株(WT)とG145R変異を持つワクチンエスケープ変異株(G145R)に対する感染中和活性を比較している。

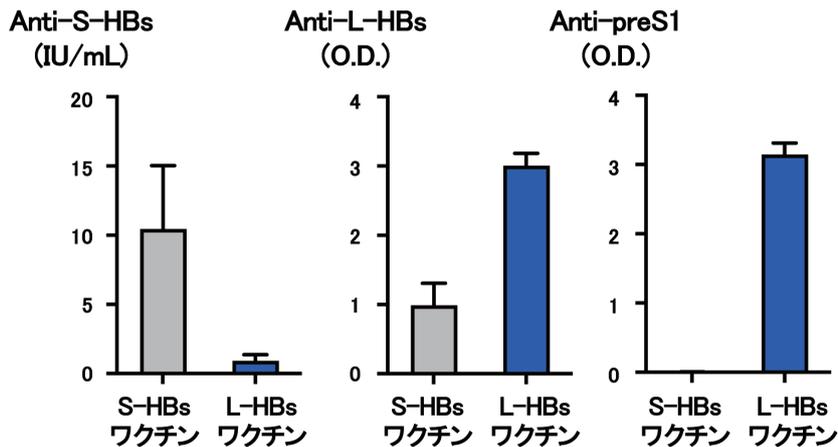


図4 S-HBsワクチン, L-HBsワクチンによる抗HBV抗体の誘導
 アカゲザルにS-HBsワクチンもしくはL-HBsワクチンをそれぞれ3回接種し、接種終了から6週後の抗HBV抗体の抗体価を評価した。S-HBs抗原に対する抗体価(Anti-S-HBs), L-HBs抗原に対する抗体価(Anti-L-HBs), preS1領域のペプチドに対する抗体価(Anti-preS1)を示す。

ワクチンに含まれないpreS1領域のペプチドに対する抗体はS-HBsワクチン接種では誘導されず、L-HBsワクチン接種のみで誘導されていた(図4)。

HBワクチン誘導抗体のHBV感染中和活性

次に、ワクチン接種により誘導された抗体のHBV感染中和活性について、遺伝子型C株のHBVレポーターウイルス(HBV-WT)感染系を用いて解析した。このレポーターウイルスは、NanoLuc Luciferase遺伝子を持ちウイルス粒子にパッケージングされるウイルスゲノムを作るためのプラスミドと、ウイルス粒子産生に必要なウイルス蛋白質

を発現するためのプラスミドを同時に細胞に導入することで得られる。このレポーターウイルスは、培養細胞に感染後に感染細胞内のNanoLuc Luciferaseの発現を測定することで感染力価の定量が可能である³⁵⁻³⁷。この系を用いて、S-HBsワクチンとL-HBsワクチン接種で誘導された抗体のHBV感染中和活性の比較を行った。ワクチン接種後の血清から抗体を精製し、レポーターウイルスと混合した後に、HBVの感染レセプターであるNTCPを発現させたHepG2細胞(HepG2/NTCP細胞)に感染させ、その感染力価を評価した³⁸。その結果、S-HBsワクチンまたはL-HBsワクチンを接種したアカゲザルから得られた抗

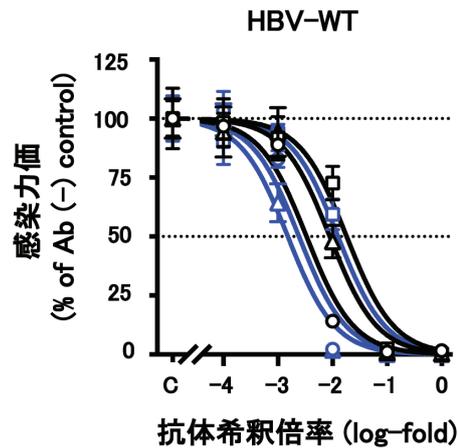


図5 S-HBs ワクチンと L-HBs ワクチンにより誘導された抗体の HBV-WT に対する感染中和活性
アカゲザルに S-HBs ワクチン (黒) もしくは L-HBs ワクチン (青) をそれぞれ接種し、誘導された抗体の感染中和活性を HBV レポーターウイルス (HBV-WT: 遺伝型 C) を用いて評価した。

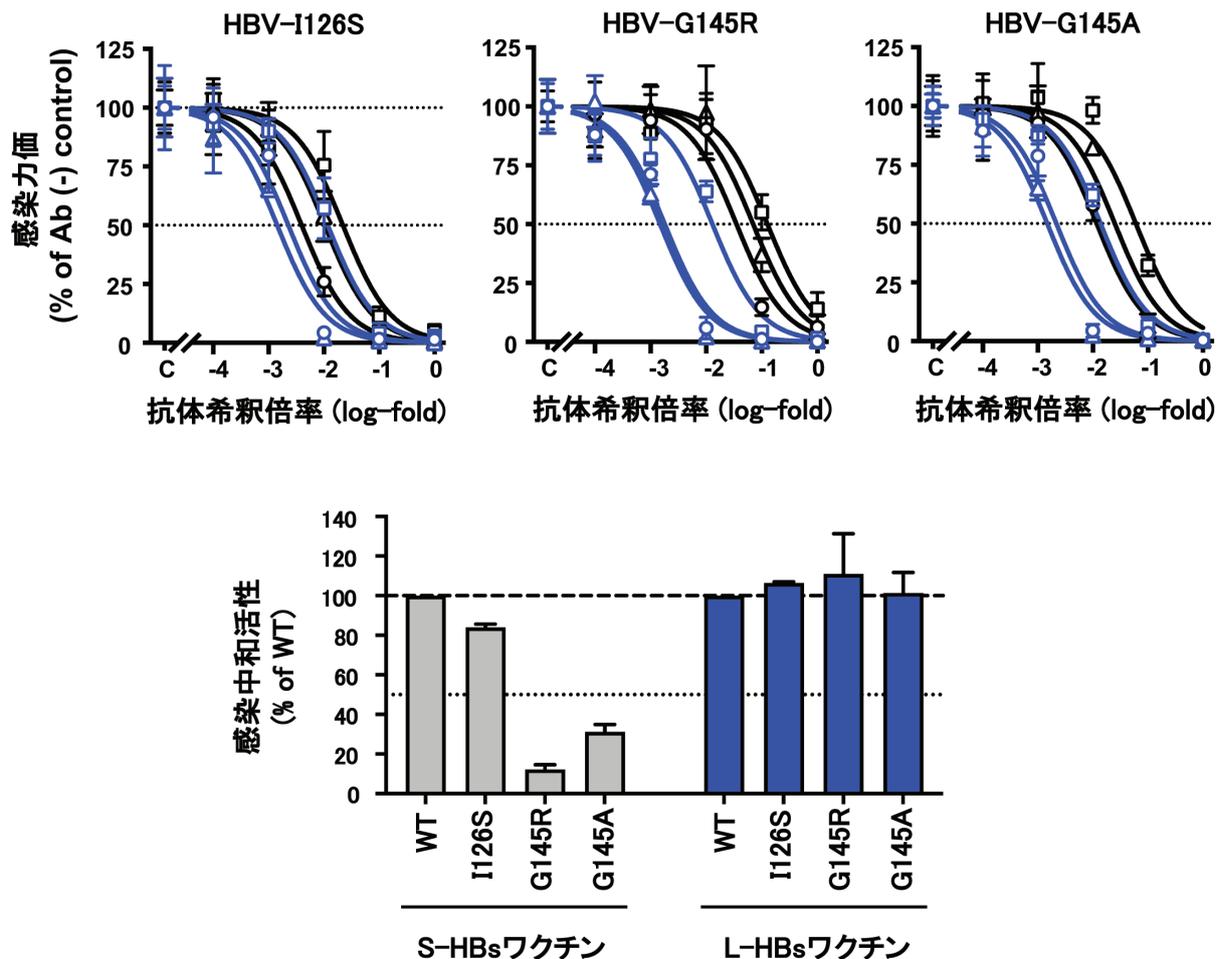


図6 S-HBs ワクチン, L-HBs ワクチンにより誘導された抗体のワクチンエスケープ変異株に対する感染中和活性
アカゲザルに S-HBs ワクチン (黒) もしくは L-HBs ワクチン (青) をそれぞれ接種し、誘導された抗体のワクチンエスケープ変異株に対する感染中和活性を評価した。代表的なワクチンエスケープ変異である I126S 変異, G145R 変異, G145A 変異の 3 種類について検討を行っている。感染中和活性レベルは、それぞれのワクチンエスケープ変異株に対する希釈倍率の IC50 値を、変異を持たない HBV 株の希釈倍率の IC50 値に対するパーセントで示した。

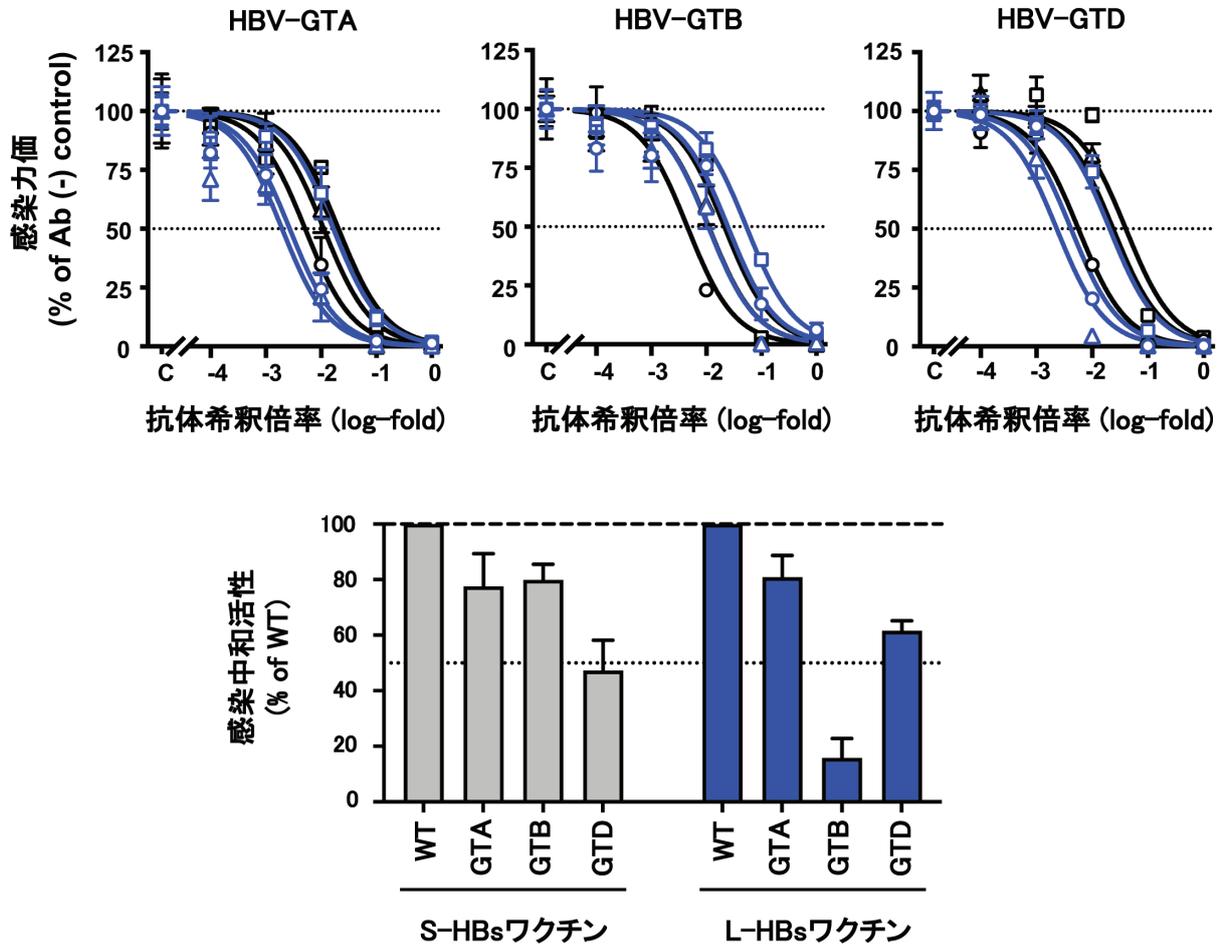


図7 S-HBs ワクチン, L-HBs ワクチンにより誘導された抗体のHBV 各種遺伝子型株に対する中和活性
 アカゲザルに S-HBs ワクチン (黒) もしくは L-HBs ワクチン (青) をそれぞれ接種し, 誘導された抗体の HBV 各種遺伝子型株に対する感染中和活性を評価した. 主要な遺伝子型株である遺伝子型 A 株, B 株, D 株について検討を行っている. 感染中和活性レベルは, それぞれの遺伝子型株に対する希釈倍率の IC50 値を, 遺伝子型 C 株 (WT) の希釈倍率の IC50 値に対するパーセントで示した.

体は, どちらもほぼ同程度に HBV の感染を中和できることが明らかとなった (図 5).

**ワクチンエスケープ変異株に対する
 HB ワクチン誘導抗体の感染中和活性**

そこでワクチンエスケープ変異として知られている I126S 変異, G145R 変異, G145A 変異を HBV レポーターウイルスの S-HBs 抗原領域に導入し, これらのワクチンエスケープ変異株に対する感染中和活性を評価した. S-HBs ワクチンにより誘導された抗体の I126S 変異株に対する感染中和活性は HBV-WT に対する感染中和活性よりわずかに低下する程度であったのに対し, G145R または G145A を持つ変異株に対する感染中和活性は顕著に減弱していた (図 5, 図 6). 一方, L-HBs ワクチンの接種により得られた抗体によるワクチンエスケープ変異株への感染中和活性は, HBV-WT に対する感染中和活性とほぼ同程

度の高いレベルを維持していた. 感染中和活性を示す希釈倍率の IC50 値をこれらのワクチン間で比較したところ, S-HBs ワクチンにより誘導された抗体では, I126S 変異株では HBV-WT と比較して約 80% まで, G145R 変異株では約 12%, G145A 変異株では約 31% まで低下していたが, L-HBs ワクチンの接種により得られた抗体ではいずれの変異株に対しても HBV-WT に対する感染中和活性レベルと同等であった (図 6). 以上の結果から, L-HBs ワクチンは HBV-WT だけではなくワクチンエスケープ変異株に対しても感染の中和が可能な抗体を誘導できることが示された.

HBV 遺伝子型別の感染中和活性

HBV の各種遺伝子型株に対する感染中和活性の解析のため, 遺伝子型 C 株の HBV レポーターウイルスの preS1 から HBs にかけての領域を遺伝子型 A 株, B 株, D 株に

置換したHBV レポーターウイルスを作製した。これらのウイルスは、遺伝子型 A 株、B 株、D 株のエンベロープの配列を持ち、それぞれの遺伝子型株に対する感染中和活性が評価できる。S-HBs ワクチンにより誘導された抗体では、遺伝子型 A 株と B 株に対しては遺伝子型 C 株(HBV-WT) とほぼ同等の感染中和活性を示したが、遺伝子型 D 株に対する感染中和活性は低下していた (図 5, 図 7)。一方、L-HBs ワクチンの接種により得られた抗体では、遺伝子型 A 株と D 株に対しては遺伝子型 C 株に近い中和活性が見られたが、遺伝子型 B 株に対する中和活性は顕著に低下していた。遺伝子型別の感染中和活性レベルをこれらのワクチン間で比較してみると、S-HBs ワクチンにより誘導された抗体の遺伝子型 D 株に対する感染中和活性レベルは HBV-WT に対する感染中和活性の 47% であり、L-HBs ワクチンにより誘導された抗体の遺伝子型 B 株に対する感染中和活性レベルは 16% であった (図 7)。これらの結果は、S-HBs ワクチンと L-HBs ワクチンにより誘導された抗体は、それぞれ異なる遺伝子型株に対する感染中和活性が低下していることを意味している。従って、この新規 HB ワクチンを従来の HB ワクチンと併用することで、ワクチンエスケープ変異株のみならず複数の HBV 遺伝子型株の感染を中和できる抗体の誘導が可能であると考えられた。

おわりに

世界保健機構 (WHO) は HB ワクチンの乳児期での 3 回接種を推奨しており、2015 年には全世界の 84% の地域でこの 3 回接種が行われている。日本でも 2016 年から HB ワクチンのユニバーサルワクチネーションが開始されており、ユニバーサルワクチネーション開始後に出生したほとんどの児は抗 HBV 抗体を獲得すると考えられ、B 型肝炎の罹患数の減少が期待されている。しかし、一旦誘導された抗 HBV 抗体も時間経過とともに抗体価が低下することが知られており、HBV 感染者のパートナーをもつ者や医療従事者などの観血的処置を行う職業、不特定多数の血液に暴露される者など HBV 感染のハイリスク群では抗体価を維持するために HB ワクチンの再接種が必要となる³⁹⁻⁴¹⁾。また、ユニバーサルワクチネーション導入国ではワクチンエスケープ変異株の増加が報告されており、国内でも今後そのような変異株感染の増加が危惧されている³²⁻³⁴⁾。さらに、日本では遺伝子型が異なる S-HBs 抗原を用いた 2 種類の HB ワクチンが使用されているが、抗体が十分産生されない場合や経年変化により抗体価が低下した場合には、ワクチン株と異なる遺伝子型株への暴露により感染が成立してしまう危険性も指摘されている^{27, 42)}。これらの事象は、現行の HB ワクチンだけでは HBV 感染の蔓延を完全に阻止することが難しいことを示唆するものであり、従来のものとは異なる抗原や異なるアジュバントを用いた新たな HB ワクチンの必要性を示している。我々が開発した

L-HBs 抗原を用いた新規 HB ワクチンは、従来の HB ワクチンでは感染阻止が難しいワクチンエスケープ変異株の感染阻止が可能であり、この新規 HB ワクチンを従来の HB ワクチンと併用することで、ワクチンエスケープ変異株や複数の HBV 遺伝子型株の感染予防が可能となる。また従来の HB ワクチンとは異なるアジュバントを使用しているため、従来の HB ワクチンへの不応者にも良好な抗体反応誘導が期待される。HBV 感染の根絶のため、新規 HB ワクチンの一日も早い実用化が望まれる。

・本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

引用論文

- 1) World Health Organization: Global Hepatitis Report, 2017. 2017.
- 2) Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsushashi H, Karino Y, Takikawa Y, Saito T, Arase Y, Imazeki F, Kurosaki M, Umemura T, Ichida T, Toyoda H, Yoneda M, Mita E, Yamamoto K, Michitaka K, Maeshiro T, Tanuma J, Tanaka Y, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, Mizokami M, Japanese AHBSG.: Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. *Hepatology* 59(1):89-97, 2014.
- 3) Seto WK, Chan TS, Hwang YY, Wong DK, Fung J, Liu KS, Gill H, Lam YF, Lie AK, Lai CL, Kwong YL, Yuen MF.: Hepatitis B reactivation in patients with previous hepatitis B virus exposure undergoing rituximab-containing chemotherapy for lymphoma: a prospective study. *J Clin Oncol* 32(33):3736-43, 2014.
- 4) Kusumoto S, Tanaka Y, Suzuki R, Watanabe T, Nakata M, Takasaki H, Fukushima N, Fukushima T, Moriuchi Y, Itoh K, Nosaka K, Choi I, Sawa M, Okamoto M, Takahashi T, Sugiura I, Onishi Y, Kohri M, Yoshida S, Sakai R, Kojima M, Takahashi H, Tomita A, Maruyama D, Atsuta Y, Tanaka E, Suzuki T, Kinoshita T, Ogura M, Mizokami M, Ueda R.: Monitoring of Hepatitis B Virus (HBV) DNA and Risk of HBV Reactivation in B-Cell Lymphoma: A Prospective Observational Study. *Clin Infect Dis* 61(5):719-29, 2015.
- 5) Washizaki A, Murayama A, Murata M, Kiyohara T, Yato K, Yamada N, Aly HH, Tanaka T, Moriishi K, Nishitsuji H, Shimotohno K, Goh Y, Ishii KJ, Yotsuyanagi H, Muramatsu M, Ishii K, Takahashi Y, Suzuki R, Akari H, Kato T.: Neutralization of hepatitis B virus with vaccine-escape mutations by hepatitis B vaccine with large-HBs antigen. *Nat Commun* 13(1):5207, 2022.
- 6) Kobayashi M, Koike K.: Complete nucleotide sequence of hepatitis B virus DNA of subtype adr and its conserved gene organization. *Gene* 30(1-3):227-32, 1984.
- 7) Ueda K, Tsurimoto T, Matsubara K.: Three envelope

- proteins of hepatitis B virus: large S, middle S, and major S proteins needed for the formation of Dane particles. *J Virol* 65(7):3521-9, 1991.
- 8) Bruss V, Ganem D.: The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(3):1059-63, 1991.
 - 9) Gripon P, Le Seyec J, Rumin S, Guguen-Guillouze C.: Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity. *Virology* 213(2):292-9, 1995.
 - 10) Summers J, Mason WS.: Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 29(2):403-15, 1982.
 - 11) Brechot C, Pourcel C, Louise A, Rain B, Tiollais P.: Detection of hepatitis B virus DNA sequences in human hepatocellular carcinoma in an integrated form. *Prog Med Virol* 27:99-102, 1981.
 - 12) Takada S, Gotoh Y, Hayashi S, Kobayashi M, Koike K.: Integrated structures of HBV DNA in chronic hepatitis and hepatoma tissues. *Gastroenterol Jpn* 25 Suppl 2:31-7, 1990.
 - 13) Okamoto H, Imai M, Kametani M, Nakamura T, Mayumi M.: Genomic heterogeneity of hepatitis B virus in a 54-year-old woman who contracted the infection through materno-fetal transmission. *Jpn J Exp Med* 57(4):231-6, 1987.
 - 14) Girones R, Miller RH.: Mutation rate of the hepadnavirus genome. *Virology* 170(2):595-7, 1989.
 - 15) Lindh M, Hannoun C, Dhillon AP, Norkrans G, Horal P.: Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. *J Infect Dis* 179(4):775-82, 1999.
 - 16) Mizokami M, Nakano T, Orito E, Tanaka Y, Sakugawa H, Mukaide M, Robertson BH.: Hepatitis B virus genotype assignment using restriction fragment length polymorphism patterns. *FEBS Lett* 450(1-2):66-71, 1999.
 - 17) Chu CJ, Lok AS.: Clinical significance of hepatitis B virus genotypes. *Hepatology* 35(5):1274-6, 2002.
 - 18) Sumi H, Yokosuka O, Seki N, Arai M, Imazeki F, Kurihara T, Kanda T, Fukai K, Kato M, Saisho H.: Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. *Hepatology* 37(1):19-26, 2003.
 - 19) Matsuura K, Tanaka Y, Hige S, Yamada G, Murawaki Y, Komatsu M, Kuramitsu T, Kawata S, Tanaka E, Izumi N, Okuse C, Kakumu S, Okanoue T, Hino K, Hiasa Y, Sata M, Maeshiro T, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Miyakawa Y, Mizokami M.: Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection in Japan shifting toward an increase of genotype A. *J Clin Microbiol* 47(5):1476-83, 2009.
 - 20) Kramvis A.: Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus. *Intervirology* 57(3-4):141-50, 2014.
 - 21) Ito K, Yotsuyanagi H, Sugiyama M, Yatsushashi H, Karino Y, Takikawa Y, Saito T, Arase Y, Imazeki F, Kurosaki M, Umemura T, Ichida T, Toyoda H, Yoneda M, Tanaka Y, Mita E, Yamamoto K, Michitaka K, Maeshiro T, Tanuma J, Korenaga M, Murata K, Masaki N, Koike K, Mizokami M, Japanese AHBCB-BSG.: Geographic distribution and characteristics of genotype A hepatitis B virus infection in acute and chronic hepatitis B patients in Japan. *J Gastroenterol Hepatol* 31(1):180-9, 2016.
 - 22) Ito K, Yoneda M, Sakamoto K, Mizokami M.: Virological and Clinical Characteristics of Hepatitis B Virus Genotype A. *J Gastroenterol* 53(1):18-26, 2018.
 - 23) Araujo NM, Teles SA, Spitz N.: Comprehensive Analysis of Clinically Significant Hepatitis B Virus Mutations in Relation to Genotype, Subgenotype and Geographic Region. *Front Microbiol* 11:616023, 2020.
 - 24) Doi H, Kanto T.: Factors influencing the durability of hepatitis B vaccine responses. *Vaccine* 39(36):5224-30, 2021.
 - 25) Averbhoff F, Mahoney F, Coleman P, Schatz G, Hurwitz E, Margolis H.: Immunogenicity of hepatitis B Vaccines. Implications for persons at occupational risk of hepatitis B virus infection. *Am J Prev Med* 15(1):1-8, 1998.
 - 26) Inoue T, Tanaka Y.: Cross-Protection of Hepatitis B Vaccination among Different Genotypes. *Vaccines (Basel)* 8(3), 2020.
 - 27) Stramer SL, Wend U, Candotti D, Foster GA, Hollinger FB, Dodd RY, Allain JP, Gerlich W. Nucleic acid testing to detect HBV infection in blood donors. *N Engl J Med* 364(3):236-47, 2011.
 - 28) Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, Thomas HC. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 336(8711):325-9, 1990.
 - 29) Harrison TJ, Hopes EA, Oon CJ, Zanetti AR, Zuckerman AJ.: Independent emergence of a vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *J Hepatol* 13 Suppl 4:S105-7, 1991.
 - 30) Waters JA, Kennedy M, Voet P, Hauser P, Petre J, Carman W, Thomas HC.: Loss of the common "A" determinant of hepatitis B surface antigen by a vaccine-induced escape mutant. *J Clin Invest* 90(6):2543-7, 1992.
 - 31) Lai MW, Lin TY, Tsao KC, Huang CG, Hsiao MJ, Liang KH, Yeh CT.: Increased seroprevalence of HBV DNA with mutations in the s gene among individuals greater than 18 years old after complete vaccination. *Gastroenterology* 143(2):400-7, 2012.
 - 32) Bian T, Yan H, Shen L, Wang F, Zhang S, Cao Y, Zhang S, Zhang Y, Bi S.: Change in hepatitis B virus large surface antigen variant prevalence 13 years after implementation of a universal vaccination program in China. *J Virol* 87(22):12196-206, 2013.
 - 33) Tosti ME, Alfonsi V, Lacorte E, Mele A, Galli C, Zanetti AR, Romano L, Group SC.: Acute Hepatitis B After the Implementation of Universal Vaccination in Italy: Results From 22 Years of Surveillance (1993-2014). *Clin Infect Dis* 62(11):1412-8, 2016.
 - 34) Hsu HY, Chang MH, Liaw SH, Ni YH, Chen HL.: Changes of hepatitis B surface antigen variants in

- carrier children before and after universal vaccination in Taiwan. *Hepatology* 30(5):1312-7, 1999.
- 35) Nishitsuji H, Ujino S, Shimizu Y, Harada K, Zhang J, Sugiyama M, Mizokami M, Shimotohno K.: Novel reporter system to monitor early stages of the hepatitis B virus life cycle. *Cancer Sci* 106(11):1616-24, 2015.
 - 36) Nishitsuji H, Harada K, Ujino S, Zhang J, Kohara M, Sugiyama M, Mizokami M, Shimotohno K.: Investigating the hepatitis B virus life cycle using engineered reporter hepatitis B viruses. *Cancer Sci* 109(1):241-9, 2018.
 - 37) Murayama A, Yamada N, Osaki Y, Shiina M, Aly HH, Iwamoto M, Tsukuda S, Watashi K, Matsuda M, Suzuki R, Tanaka T, Moriishi K, Suzuki T, Nishitsuji H, Sugiyama M, Mizokami M, Shimotohno K, Wakita T, Muramatsu M, Liang TJ, Kato T.: N-Terminal PreS1 Sequence Regulates Efficient Infection of Cell-Culture-Generated Hepatitis B Virus. *Hepatology* 73(2):520-32, 2021.
 - 38) Otoguro T, Tanaka T, Kasai H, Kobayashi N, Yamashita A, Fukuhara T, Ryo A, Fukai M, Taketomi A, Matsuura Y, Moriishi K.: Establishment of a Cell Culture Model Permissive for Infection by Hepatitis B and C Viruses. *Hepatol Commun* 5(4):634-49, 2021.
 - 39) Ni YH, Huang LM, Chang MH, Yen CJ, Lu CY, You SL, Kao JH, Lin YC, Chen HL, Hsu HY, Chen DS.: Two decades of universal hepatitis B vaccination in taiwan: impact and implication for future strategies. *Gastroenterology* 132(4):1287-93, 2007.
 - 40) But DY, Lai CL, Lim WL, Fung J, Wong DK, Yuen MF.: Twenty-two years follow-up of a prospective randomized trial of hepatitis B vaccines without booster dose in children: final report. *Vaccine* 26(51):6587-91, 2008.
 - 41) McMahon BJ, Dentinger CM, Bruden D, Zanis C, Peters H, Hurlburt D, Bulkow L, Fiore AE, Bell BP, Hennessy TW.: Antibody levels and protection after hepatitis B vaccine: results of a 22-year follow-up study and response to a booster dose. *J Infect Dis* 200(9):1390-6, 2009.
 - 42) Kato M, Kato M, Hamada-Tsutsumi S, Okuse C, Sakai A, Matsumoto N, Sato M, Sato T, Arito M, Omoteyama K, Suematsu N, Okamoto K, Kato T, Itoh F, Sumazaki R, Tanaka Y, Yotsuyanagi H, Kato T, Kurokawa MS.: Effects of vaccine-acquired polyclonal anti-HBs antibodies on the prevention of HBV infection of non-vaccine genotypes. *J Gastroenterol* 52(9):1051-63, 2017.

Neutralization of hepatitis B virus with vaccine-escape mutations by novel hepatitis B vaccine with large-HBs antigen

Takanobu KATO¹⁾, Hirofumi AKARI²⁾

- 1) Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan.
- 2) Center for the Evolutionary Origins of Human Behavior, Kyoto University, Aichi, Japan.

Although the current hepatitis B (HB) vaccine comprising yeast-derived small hepatitis B surface antigen (HBsAg) is potent and safe and used worldwide, specific concerns should not be ignored, such as the attenuated prophylaxis against hepatitis B virus (HBV) infection with specific amino acid polymorphisms, called vaccine-escape mutations (VEMs). We investigated a novel HB vaccine consisting of large-HBsAg that covers the shortcomings of the current HB vaccine in a non-human primate model. The yeast-derived large-HBsAg was mixed with the adjuvant and used to immunize rhesus macaques, and the induction of antibodies to HBsAg was compared with that of the current HB vaccine. The current HB vaccine predominantly induced antibodies to small-HBsAg, whereas immunization with the large-HBsAg vaccine mainly induced antibodies to the preS1 region. Although the antibodies induced by the current HB vaccine could not prevent infection of HBV with VEMs, the large-HBsAg vaccine-induced antibodies neutralized infection of HBV with VEMs at levels similar to those of the wild type. The HBV genotypes that exhibited attenuated neutralization by induced antibodies differed between these vaccines. In conclusion, the novel HB vaccine consisting of large-HBsAg was revealed to be useful to compensate for shortcomings of the current HB vaccine. The combined use of these HB vaccines may be able to induce antibodies that can neutralize HBV strains with VEMs or multiple HBV genotypes.

- We have no potential conflicts of interest to declare.