

<研究要旨>

これまでに我々は、遺伝子欠損 SHIV が HIV-1 に対するワクチンとして効果的であることをサルの系で示してきた。この SHIV ワクチンの安全性と免疫誘導能を改良するために、糖鎖欠損 SHIV の作製とサル感染実験を行った。その結果、V3 領域の糖鎖が増殖や抗体からの認識阻害に重要であることが示され、また、V1、V2 領域の糖鎖は V3 領域の糖鎖と相乗的に働くことが示された。V3 糖鎖欠損 SHIV、及び V2/V3 糖鎖欠損 SHIV をサルに接種したところ、*in vitro* と同様な糖鎖欠損による増殖能への影響がみられたが、糖鎖欠損による抗体誘導への影響はみられなかった。この結果は、糖鎖欠損によってエピトープを露出させても、個体における抗体誘導には結びつかないことを示唆している。

A. 研究目的

抗体からの認識を阻害していると考えられる Env の糖鎖を欠損することにより、宿主内での効果的な抗体誘導を促進し、誘導された抗体によって速やかに宿主内から除去される SHIV 弱毒生ワクチンの作成を目指す。

B. 研究方法

SHIV、NM-3rN 株の *env* 遺伝子に変異を導入し、V1 領域内の 2 つの糖鎖結合部が消失した SHIV-V1*、V2 領域の 1 つの糖鎖結合部が消失した SHIV-V2*、V3 領域の 1 つの糖鎖結合部が消失した SHIV-V3* を作製した。また、これらの変異を組み合わせた SHIV-V1*2*、SHIV-V1*3*、SHIV-V2*3*、SHIV-V1*2*V3* を作製した。これらの 7 種類の変異株について、*in vitro* での増殖能をヒトの cell line である M8166 とサルの PBMC を用い、RT 活性で解析した。また、被中和能を解析するため、NM-3rN 接種サル（MM43、MM46）の血漿、及び HIV-1NL432 の V3 部位を認識するモノクローナル抗体である 0.5B を用いたウ

イルス中和試験を行った。中和試験は M8166 細胞におけるウイルス増殖を RT 活性で測定し RT 活性を 50% 以下に阻害する血漿希釈倍率を決定した。*In vivo* での解析のため、SHIV-V3* と SHIV-V2*3*、及び親株である NM-3rN を、それぞれ 2 頭のサルに 10⁵TCID₅₀ 静脈接種し、SHIV-V3* と NM-3rN については、さらに 2 頭づつを 100 TCID₅₀ で静脈接種し、低い接種ウイルス量での比較を行った。各個体から血液を経時的に採取し、血漿中のウイルス RNA 量を RT-PCR で定量することで体内ウイルス量を決定した。また各個体におけるウイルス特異的な免疫応答を調べるために、血漿中の抗 HIV-1 抗体価を PA 法で測定し、さらに検出された抗体の NM-3rN と SHIV-V3* に対する中和抗体価を調べた。

本研究で行なわれたアカゲザルへの感染実験は、京都大学ウイルス研究所のウイルス感染動物実験施設使用指針、およびサル類を用いる実験のための基本指針に基づき、遂行された。

C. 研究結果

V1, V2, V3 領域の糖鎖を単独で欠損した SHIV の増殖を M8166 細胞で比較したところ、SHIV-V3* の増殖能が親株に比べ著しく低下していた (Fig 1)。糖鎖欠損を組み合わせたウイルスの増殖を比較すると、SHIV-V1*2*V3* の増殖が著しく低下していた (Fig 1)。アカゲザルの PBMC でも同様の解析を行い、同様の増殖低下がみられた。

これらの SHIV の被中和能を調べたところ、2 頭の NM-3rN 感染サル血漿による中和価が、SHIV-V1* でやや減少し、SHIV-V2* はほとんど同じ、SHIV-V3* で著しい上昇を示した (Table 1)。また、V3 糖鎖欠損と他の領域の糖鎖欠損を組み合わせたウイルスでは、さらなる中和価の上昇が見られた (Table 1)。V3 領域を認識するモノクローナル抗体である 0.5B による中和価も、SHIV-V1* での減少や SHIV-V3* での上昇はみられたが、V3 領域と他の領域の糖鎖欠損の組み合わせによる飛躍的な中和感受性の上昇はみられなかった (Table 1)。これらの結果は、V3 領域の糖鎖欠損は V3 領域を露出させて被中和能を上昇させていることを示唆している。また、V1, V2 領域の糖鎖は、単独では被中和能に影響をほとんど与えなかったにも関わらず、V3 領域の糖鎖欠損との組み合わせによって V3 以外のエピトープを露出させていると考えられる。

SHIV-V3* をアカゲザルに接種したところ、接種ウイルス量が低い場合は、血漿ウイルス量のピークの時期が 4 週及び 8 週と、親株が 2 週であるのに対して非常に遅れており、また、ピークも約 1/10 になっていた (Fig. 2A)。接種ウイルス量を増やすと、ピークの遅れはみられなかったが、ピーク時のウイルス量は、やはり減少していた (Fig. 2B)。SHIV-V2*V3* を 2 頭のサルに接種した結果、親株の NM-3rN と比較して、1 頭で約 1/10、1 頭で 1/1000 のピーク・ウイルス量であり、SHIV-V3* よりも低い増殖を示した (Fig. 2B)。

血漿中の抗 SHIV 抗体量を PA 法で調べた結果、

SHIV-V3* 及び SHIV-V2*V3* 接種サルで誘導された SHIV 特異的抗体量は、ウイルス増殖と関連しており、接種したウイルスによる差異は認められなかった (Table 2)。同様に、NM-3rN 及び SHIV-V3* に対する中和活性も、Table 2 で NM-3rN/PA 及び SHIV-V3*/PA で示した、抗体量と中和活性の比が一定であることから、PA の結果と関連しており、接種したウイルスによる差異は認められなかった。この結果は、*in vivo* でも *in vitro* と同様に糖鎖欠損による増殖能の低下がみられたが、糖鎖欠損による抗体誘導の量的及び質的な変化は認められなかったことを示している。

D. 考察

in vitro では、V3 領域の糖鎖がウイルス増殖能、被中和能のどちらにも重要であり、V1, V2 領域は V3 領域の糖鎖と相乗的に働くことが示された。しかし、*in vivo* では、*in vitro* と同様、増殖能への影響はみられたが、糖鎖欠損による抗体誘導への影響はみられなかった。この結果は、糖鎖欠損によるエピトープの露出が、効果的な抗体誘導には結びつかなかったことを示唆している。

E. 結論

SHIV を用いることで、これまで解析されていなかった個体レベルでの HIV-1 Env の糖鎖機能の解析を行うことができたが、糖鎖欠損によるワクチンとしての効果的な免疫誘導や安全性の確保は期待できない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kozyrev, I. L., Miura, T., Haga, T., Kuwata, T.,

Hayami, M.: Construction of SIV/HIV-1 chimeric viruses having the IL-5 gene and determination of their ability to replicate and produce IL-5. *Arch Virol*, 146: 1051-1062, 2001

Kozyrev, I. L., Ibuki, K., Shimada, T., Kuwata, T., Takemura, T., Hayami, M., Miura, T.: Characterization of less pathogenic infectious molecular clones derived from acute-pathogenic SHIV-89.6P stock virus. *Virology*, 282: 6-13, 2001

Kwofie, T., Haga, T., Iida, T., Hayami, M., Miura, T.: Cytokine kinetics in the plasma of monkeys infected with pathogenic and nonpathogenic simian and human immunodeficiency chimeric viruses at an early stage of infection. *Microbiol Immunol*, 45: 399-402, 2001

Iida T., Kita M., Kuwata T., Miura T., Ibuki K., Ui M., Hayami M., Imanishi J.: Apoptosis induced by in vitro infection with simian-human immunodeficiency chimeric virus in macaque and human peripheral blood mononuclear cells. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 17(15):1387-1393, 2001

2. 学会発表

Kozyrev, I. L., Miura, T., Kuwata, T., Haga, T., Ui, M., Takemura, T., Hayami, M.: Co-expression of IL-5 influences replication of SHIV in vitro and in vivo. 第13回日米合同会議、熊本、3月21-23日、2001

human immunodeficiency virus. 第13回日米合同会議、熊本、3月21-23日、2001

Akahata, W., Ido, E., Akiyama, H., Enose, Y., Takahashi, H., Hayami, M.: DNA vaccination of macaques by a full genome plasmid which produces noninfectious virus particles. 第2回熊本エイズセミナー、熊本、9月20-21日、2001

Kwofie T. B., Miura, T., Ibuki, K., Enose, Y., Suzuki, H., Ui, M., Kuwata, T., Hayami, M.: Characterization of SHIV re-isolated from vaccinated macaque monkeys after challenge infection. 第2回熊本エイズセミナー、熊本、9月20-21日、2001

Hayami, M., Kuwata, T., Miura, T.: Potential use of nef-deleted SHIV derived from a nonpathogenic SHIV as a live-attenuated vaccine, that protected macaques against challenge infection of a heterologous pathogenic SHIV. 第2回熊本エイズセミナー、熊本、9月20-21日、2001

Kwofie, T. B., 三浦智行、伊吹謙太郎、榎瀬良美、鈴木元、宇井雅博、桑田岳夫、速水正憲 : CHARACTERIZATION OF SHIV RE-ISOLATED FROM VACCINATED MACAQUE MONKEYS AFTER CHALLENGE INFECTION, 第49回日本ウイルス学会、大阪、11月18-20日、2001

榎瀬良美、三宅在子、宇井雅博、鈴木元、上坂浩美、国澤純、清野宏、高橋秀実、速水正憲 : nef 欠損 SIVmac/HIV-1 キメラウイルス (SHIV-dn) の免疫誘導能と粘膜感染防御効果、第49回日本ウイルス学会、大阪、11月18-20日、2001

Miyazaki, Y., Kuwata, T., Ibuki, K., Miura, T.,

Hayami, M.: Effects of N-linked glycosylation sites on gp120 of HIV-1 in vivo and in vivo. 19th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, San Juan, Puerto Rico, November 7-10, 2001

Hayami, M., Kuwata, T., Miura, T: Potential use of nef-deleted SHIV derived from a nonpathogenic SHIV as a live-attenuated vaccine. Symposium on the Global Search for

an AIDS Vaccine, Tokyo, November 15, 2001

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Table 1.

Sensitivities of SHIVs to neutralization

Virus	Mutation sites	serum*		0.5 β #
		MM43	MM46	
NM-3rN	–	160	160	800
SHIV-V1*	V1	40	80	<400
SHIV-V2*	V2	160	320	1600
SHIV-V3*	V3	1280	1280	3200
SHIV-V1*V2*	V1 and V2	160	160	800
SHIV-V1*V3*	V1 and V3	2560	>5120	3200
SHIV-V2*V3*	V2 and V3	>5120	>5120	1600
SHIV-V1*V2*V3*	V1, V2 and V3	>5120	>5120	1600

*Sera were obtained from NM-3rN-infected macaques at 25 wpi.

#0.5 β is a monoclonal antibody which recognizes the V3 region of NL432.

Table 2.

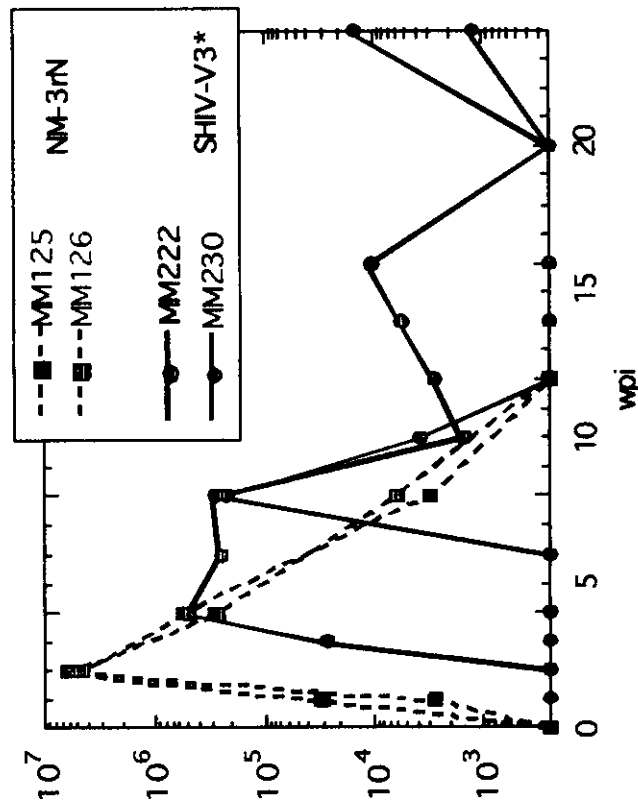
Neutralizing activities of sera from SHIV-infected macaques

Virus	Macaque	Neutralizing activity# against		PA	NM-3rN	SHIV-V3*
		NM-3rN	SHIV-V3*		PA	PA
NM-3rN	MM203	40	80	16384	0.01	0.02
	MM205	640	1280	65536	0.01	0.02
SHIV-V3*	MM232	40	80	4096	0.01	0.02
	MM233	-	20	1024	-	0.02
SHIV-V2*V3*	MM235	-	-	128	-	-
	MM238	20	40	2048	0.01	0.02

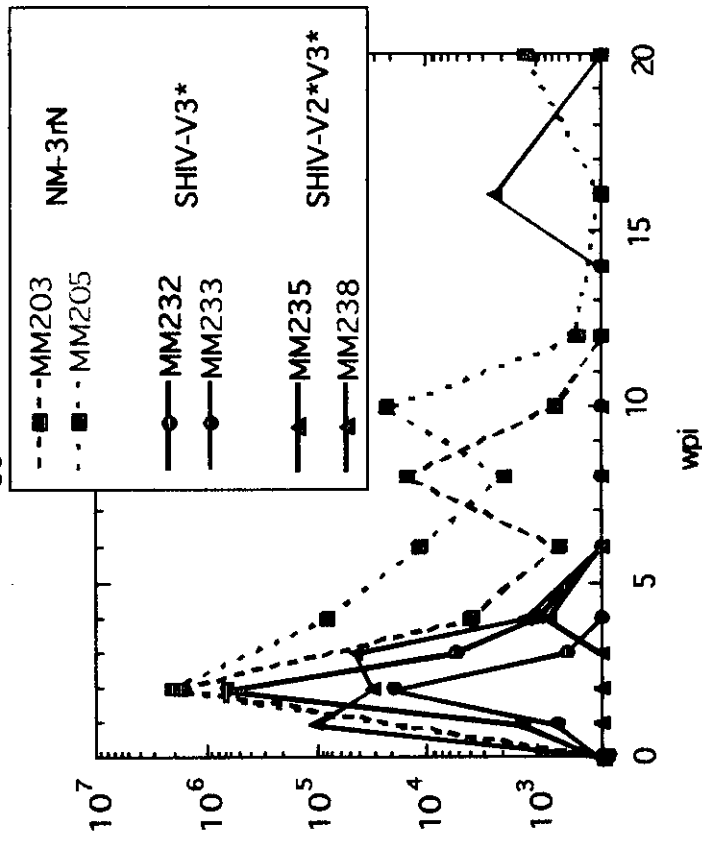
#Neutralizing activities were determined in M8166 cells using sera at 20 wpi and were given as the serum dilution at 50% of RT reduction.

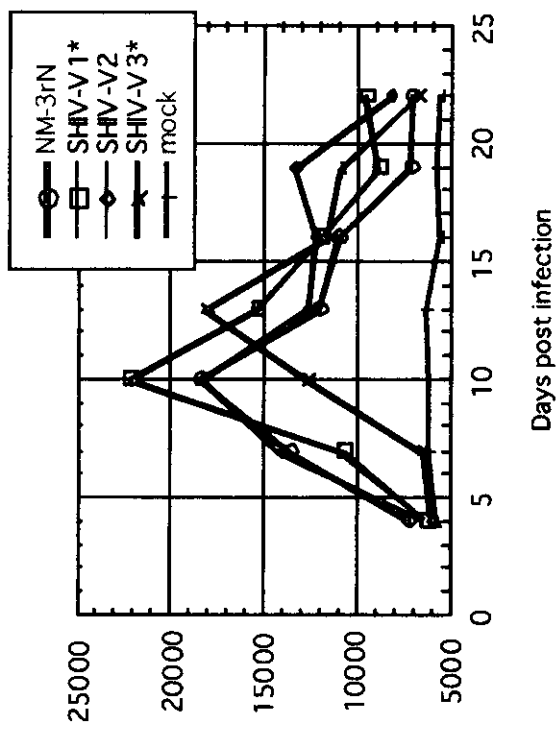
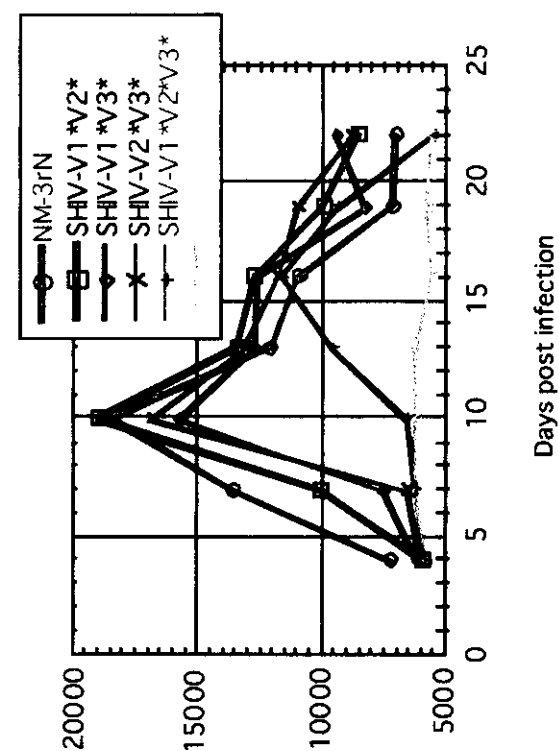
-; 50% neutralizing activity was not achieved at a dilution 1:20.

(A) Inoculated at 100 TCID₅₀



(B) Inoculated at 10⁵ TCID₅₀





新規ワクチンの手法に関する研究

分担研究者 狩野 宗英 国立感染症研究所エイズ研究センター研究員

研究要旨

われわれはこれまで、細胞性免疫誘導型エイズワクチンとして、新たな DNA ワクチン、および組換えセンダイウイルスベクター(SeV)ワクチンを各々開発し、マカクサルエイズモデルにて解析を進めてきた。さらに、両者を組み合わせたプライム・ブースト法についても検討をおこない、プライムに Env・Nef 以外の全てのウイルス抗原を発現する DNA、ブーストに Gag 抗原を発現する SeV (SeV-Gag) を用いて、優れた感染防御効果を示してきた。ワクチンにおける抗原の選択は重要課題の一つであるが、このブーストに用いる抗原について何が最適であるかはわかっていない。そこで本研究では、われわれのシステムにおけるブーストに用いる抗原の適性を調べる目的で、まず Tat について検討することとし、HIV-1 Tat を発現する組換え SeV(SeV-Tat)を用い、その防御免疫誘導能を解析した。細胞性免疫の解析では、SeV-Tat プースト後、ウイルス特異的 CD4 陽性 T リンパ球レベルの上昇は認められたが、ウイルス特異的 CD8 陽性 T リンパ球レベルの上昇は認められなかった。DNA + SeV-Tat 接種サル群では、病原性免疫不全ウイルス SHIV に対する感染防御効果が認められたが、その防御レベルは、DNA 単独接種群と比較して明らかな差を示さず、DNA + SeV-Gag 接種群より劣っていた。したがって、われわれのプライム・ブースト法において、SeV-Tat 単独によるブーストは、感染防御の点で有効ではないことが示された。

A. 研究目的

われわれは、細胞性免疫誘導型エイズワクチンの開発を目的として、サル免疫不全ウイルス(SIV)あるいは SIV-HIV-1 キメラウイルス(SHIV)を用いたマカクサルエイズモデルにて解析を進めてきた。これまで、env・nef 欠損 proviral SHIV DNA を用いた新たな DNA ワクチン、および組換えセンダイウイルスベクター(SeV)ワクチンを各々開発し、さらに、両者を組み合わせたプライム・ブースト法についても検討を重ね、優れた感染防御効果を示してきた。

このワクチンにおける抗原の選択は重要課題の一つである。一般に、エイズワクチンに用いる抗原としては、構造蛋白を中心に解析が進められてきたが、近年、構造蛋白以外の抗原もワクチン抗原として注目されてきており、どの抗原が最も有効であるかについての結論はでていない。われわれのシステムにおいても、ブーストに Gag 抗原を発現する SeV (SeV-Gag) を用いて優れた感染防御効果を示してきたが、その他の抗原については検討しておらず、ブーストに用いる抗原について何が最適であるかはわかっていない。

アクセサリ蛋白の一つである Tat は、ウイルス複製の早期から発現し、エイズの病原性に深く関与していることもあり、ワクチン抗原として強い関心がよせられている。しかし、Tat がワクチン抗原として有効か否かについては研究者間で意見が分か

れている。そこで本年度の研究では、われわれのプライム・ブースト法におけるブーストに用いる抗原の適性を調べる目的で、まず Tat について検討することとし、HIV-1 Tat を発現する組換え SeV(SeV-Tat)を用い、その防御免疫誘導能を解析した。

B. 研究方法

1 ワクチン接種後の Tat 特異的免疫反応の解析： アカゲサル 3 頭に DNA + SeV-Tat プライム・ブースト接種をおこなった。DNA ワクチン接種は、筋肉内注射および遺伝子銃を併用し、計 4 回(第 0、0.5、1、6 週)おこなった。さらに、初回免疫後第 12 週に、ブースターとして SeV-Tat を経鼻接種した。この DNA + SeV-Tat 接種群について、血漿中抗 Tat 抗体価、SHIV 特異的 T リンパ球レベルの解析をおこない、Naive 群(4 頭)、DNA ワクチン単独接種群(3 頭)、DNA + SeV-Gag 接種群(4 頭)と比較検討した。

2 SHIV チャレンジ後のエイズ発症防御の解析： 初回免疫後第 26 週に、病原性 SHIV 89.6PD を 10TCID₅₀ 静注にてチャレンジした。末梢血 T リンパ球サブセット解析、および血漿中ウイルス RNA 定量をおこない、各群のワクチンによる感染防御効果について比較検討した。

なお、全ての動物実験は、倫理面も含めて、国立感染症研究所動物実験委員会の審査をうけ、その承諾を得てから開始した。

C. 研究成果

1 免疫開始後の血漿中抗 Tat 抗体価については、DNA + SeV-Tat 接種群と DNA + SeV-Gag 接種群との間に有意な差はなく、ブースト後の上昇は認められなかった (図 1)。抗原特異的細胞性免疫反応の解析では、SeV-Tat ブースト後、末梢血に比較的高レベルの SHIV 特異的 CD4 陽性 T リンパ球が認められたが、SHIV 特異的 CD8 陽性 T リンパ球レベルの上昇は認められなかった (図 2)。

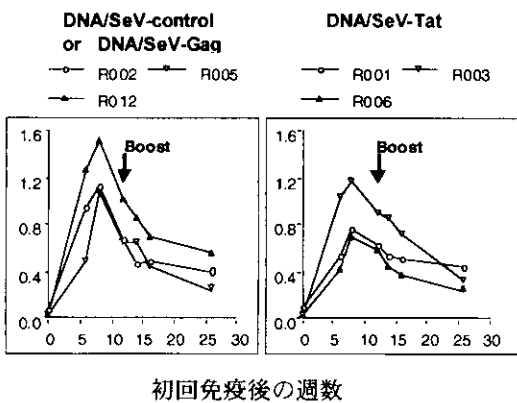


図 1 ワクチン接種後の血漿中抗 Tat 抗体価 (OD 405nm)

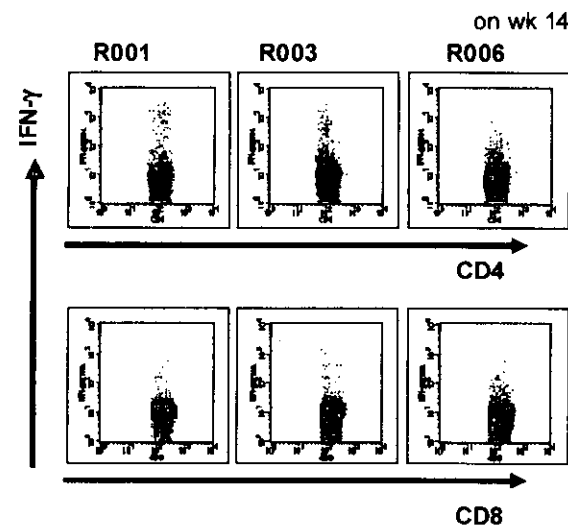


図 2 SeV-Tat ブースト後の SHIV 特異的 T リンパ球レベル (初回免疫後第 14 週、ブースト後 2 週)

2 SHIV チャレンジ後、DNA + SeV-Tat 接種群では、Naive 対照群と比較して、末梢血 CD4 陽性 T リンパ球減少が抑えられ (図 3)、体内ウイルス量も低値を示し (図 4)、良好な経過を示した。しかし、DNA 単独接種群と比較してみると、その感染防御レベルについては有意な差が認められなかった。さらに、DNA + SeV-Gag 接種群との比較では、DNA + SeV-Tat 接種群は、一過性の CD4 陽性 T リンパ球減少を示し、体内ウイルス量のコントロールの点でも劣っていた。

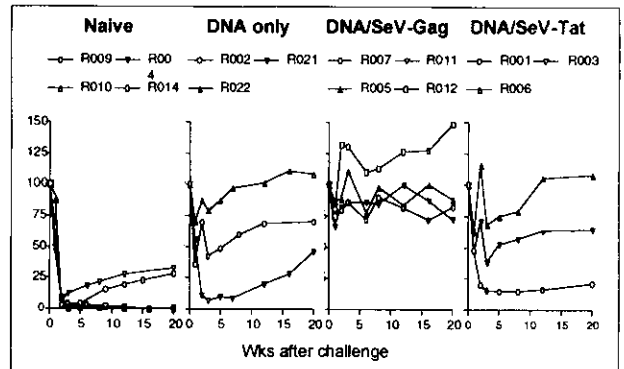


図 3 SHIV チャレンジ後の末梢血 CD4 陽性 T リンパ球数 (チャレンジ時を 100 とした相対値)

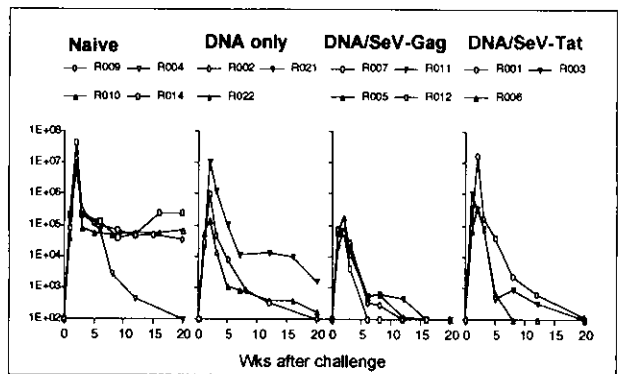


図 4 SHIV チャレンジ後の血漿中 SHIV RNA コピー数

D. 考察

われわれのプライム・ブースト法において、SeV-Tat ブーストでは有意な感染防御効果が認められず、DNA + SeV-Tat ワクチンは、DNA + SeV-Gag ワクチンと比較して、SHIV 感染防御免疫誘導能が劣ることが示された。細胞性免疫の解析から、SeV-Tat ブーストは、特異的 CD8 陽性 T リンパ球の誘導に有利でないことが示唆され、このことが感染防御効果の低下につながっている可能性

が考えられた。

E. 結論

われわれのプライム・ブースト法において、Tat はブースター抗原には適しておらず、SeV-Tat 単独によるブーストは、SeV-Gag 単独によるブーストよりも感染防御効果の点で劣っていることが示された。

F. 研究発表

1 論文発表

(1) Matano T, Kano M, Nakamura H, Takeda H, Nagai Y: Rapid appearance of secondary immune responses and protection from acute CD4 depletion after a highly pathogenic immunodeficiency virus challenge in macaques vaccinated with a DNA-prime/Sendai viral vector-boost regimen. *Journal of Virology*, 75, 11891-6, 2001.

2 学会発表

(1) Kano M, Matano T, Kato A, Nakamura H, Takeda A, Suzuki Y, Ami Y, Nagai Y: Primary antigen-expression and cellular immune responses in macaques immunized intranasally with a recombinant Sendai viral vector 第2回熊本エイズセミナー、2001年9月20-21日

G. 知的所有権

特許申請中。

HIV に対する新世代 DNA ワクチンに関する研究

分担研究者 奥田 研爾 横浜市立大学医学部教授

研究要旨 HIV-1 に対するワクチンを作製している。今回は HIV-1 の env、gag、pol の DNA 配列をヒト型化コドンに置き換えた HIV 抗原発現プラスミドを開発した。同プラスミドの抗原特異的免疫惹起能力は、従来の HIV DNA ワクチンよりも優れていることが分かった。また、このプラスミド、いわゆるヒト型化コドン多価ワクチンは免疫原性が強く、また組み換え HIV ワクチニアウイルスによるチャレンジ実験でも強い抵抗性を示した。

A 研究目的

HIV の cladeA, B, C, E の感染予防抗原として担っているエピトープ 18 コをコードする DNA をヒト型化コドン化して合成した(図 1)。これらコドンを発現するプラスミドが従来の DNA ワクチンより抗原特異的免疫惹起能力が優れているか否かを検討した。更に in vivo における効果を測定する為に、組み換え HIV ワクチニアウイルス(B. Moss, 米国 NIH より)によるチャレンジ実験も行ない、実用的 HIV DNA ワクチンの可能性を検討した。

B 研究方法

図 1 に示す 18 コの HIV 関連ヒト型化コドン DNA を含む HIV 抗原発現プラスミド(新世代 DNA ワクチン)を構築した。週に一度、3週に渡って BALB/c マウスに同ワクチンを 20~50 μ g 筋注し、免疫応答を測定した。一方、チャレンジ実験は組み換えワクチニアウイルス感染 2 週後の卵巣中のウイルス titer を測定した。

(倫理面への配慮)

今回の研究ではヒトに関与する研究を行な

わない為、考慮は必要無いと思われる。

C 研究結果

ワクチンの構成成分が 18 コのエピトープより成り立つヒト型化コドン DNA ワクチンを作製した(図 1)。またそれら各々の HIV 抗原に対する免疫反応を測定する為に A1~A5 のペプチドを合成した。

まず、3 回免疫した 1 週後の抗体価は、humanized DNA vaccine (hDNA vac.) +IL2/Ig

(N. Letvin より分与されたヒト Fc に IL-2 遺伝子を結合させたもの)を免疫した場合が最も高く、8 週まで徐々にではあるが増加してきた(図 2)。新世代 DNA ワクチンのみで免疫した場合は、従来までのウイルス由来の DNA で作製した DNA ワクチン pCMVIII B より高い抗体産性能があることが分かった。以上より、新世代 DNA ワクチンの免疫原性が高く、更に IL-2/Ig を混合して免疫した場合、より高い免疫原性を有することがわかった。次に、DNA ワクチンで 2 度免疫した後、rgp120 タンパク、Gag あるいは V3 エピトープ合成ペプチドを右足蹠に 5 μ g 注入し、48 時間後の左足の腫脹反応を測定したところ、新世代

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
(総括・分担) 研究報告書

DNA ワクチン+ IL-2/Ig を免疫したグループが最も高い免疫反応が出現し、Gag epitope や他のエピトープも各々免疫反応が出現していることが判明した(図 3)。

A2、A3、A5 も有為な差で免疫反応が出現していることが判明した。(データ記載せず)

次に、最終 DNA ワクチンの免疫 2 週後に、 2.5×10^7 PFU の組み換え HIV ワクチニアウイルスでチャレンジし、1 週間後の卵巣内のウイルスを測定したところ、ヒト型化コドンを使用した hDNA vaccine + IL-2/Ig で免疫したマウスに、同組み換えワクチニアウイルスに対する最も高い感染防御効果が観察された (図 4)。

D.E. 考察と結論

HIV 関連抗原 18 コのエピトープをヒト型コドン化して、合成された新世代 DNA ワクチンは、組み換え HIV-gp160 ワクチニアウイルスに対する感染防御免疫応答惹起能力を示し、実用的な HIV ワクチンとしての可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

ヒト化コドンを断片的に組み立てた DNA ワクチンを使用している為、HIV ウイルス等のような危険なリコンビナントウイルスの出現する危険性は少ないと思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okuda K, Xin K, Haruki A, Kawamoto S, Kojima Y, Hirahara F, Okada H, Klinman D, Hamajima K. Transplacental genetic immunization after intravenous delivery of plasmid DNA to pregnant mice. *J Immunol* 2001;167(9), 5478-5484.
- 2) Ara Y, Saito T, Takagi T, Hagiwara E, Miyagi Y, Sugiyama M, Kawamoto S, Ishii N, Yoshida T, Hanashi D, Koshino T, Okada H, Okuda K. Zymosan enhances the immune response to DNA vaccine for human immunodeficiency virus type-1 through the activation of complement system. *Immunology* 2001;103(1), 98-105.
- 3) Xin KQ, Urabe M, Yang J, Nomiyama K, Mizukami H, Hamajima K, Nomiyama H, Saito T, Imai M, Monahan J, Okuda K, Ozawa K, Okuda K. A novel recombinant adeno-associated virus vaccine induces a long-term humoral immune response to human immunodeficiency virus. *Hum Gene Ther* 2001;12(9), 1047-1061.
- 4) Hamajima, K., Hoshino, Y., Xin, KQ., Hayashi F., Tadokoro, K., Okuda, K. Systemic and mucosal immune response in mice after rectal and vaginal immunization with HIV-DNA vaccine, *Clin Immunol.* 2002 102(1),12-18.
- 5) Tadokoro K, Koizumi Y, Miyagi Y, Kojima Y, Kawamoto S, Hamajima K, Okuda K, Tanaka S, Onari K, Wahren B, Aoki I, Okuda K. Rapid and Wide-reaching delivery of HIV-1 env DNA vaccine by intranasal administration. *Viral Immunology* 2001;14(2), 159-167.
- 6) Liu L, Watabe S, Yang J, Hamajima K, Ishii N, Hagiwara E, Onari K, Xin K,

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
（総括・分担）研究報告書

- Okuda K. Topical application of HIV DNA vaccine with cytokine-expression plasmids induces strong antigen-specific immune responses. *Vaccine* 2002;20(1-2), 42-48.
- 7) Okuda K, Ihata A, Watabe S, Okada E, Yamakawa T, Hamajima K, Yang J, Ishii N, Nakazawa M, Okuda K, Ohnari K, Nakajima K, Xin K-Q. Protective immunity against influenza A virus induced by immunization with DNA plasmid containing influenza M gene. *Vaccine* 2001;19(27), 3681-3691.
- 8) Okuda K, Ishihara K, Nakagawa T, Hirayama A, Inayama Y, Okuda K. Detection of *Treponema denticola* in atherosclerotic lesions. *J Clin Microbiol* 2001;39(3), 1114-1117.
- 9) Tsuji-Yamada J., Nakazawa M, Takahashi K, Iijima K, Hattori S, Okuda K, Minami M, Ikezawa Z, Sasaki T. Effect of IL-12 encoding plasmid administration on tight-skin mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280(3), 707-712.
- 10) Sasaki S, Takeshita F, Okuda K, Ishii N. *Mycobacterium leprae* and leprosy: a conpedium. *Microbiol Immunol* 2001;45(11), 729-736.
- 11) Watabe S, Xin K, Ihata A, Liu L, Honsho A, Aoki I, Hamajima K, Wahren B, Okuda K. Protection against influenza virus challenge by topical application of influenza DNA vaccine. *Vaccine* 2001;19(31), 4434-4444.
- 12) Yoshida T, Okuda K, Xin K-Q, Fukushima J, Toda S, Hagiwara E, Hamajima K, Koshino T, Saito T. Activation of HIV-1-specific immune responses to an HIV-1 vaccine constructed from a replication-defective adenovirus vector using various combinations of immunization protocols. *Clin Exp Immunol* 2001;124(3), 445-452.

2.学会発表

1) 国内

- ① 篠田香織、忻克勤、浜島健治、奥田研爾／A novel rAAV-based vaccine induced strong immune response against HIV／口頭／第74回日本細菌学会総会、岡山シンフォニーホール、コンベックス岡山、2001年4月1～4日
- ② 渡部節子、忻克勤、井畑淳、劉麗娟、浜島健治、奥田研爾／DNA ワクチンの経皮的塗布によるインフルエンザウイルス感染に対する防御効果／第74回日本細菌学会総会、岡山シンフォニーホール、コンベックス岡山、2001年4月1～4日
- ③ 奥田研爾、忻克勤、渡部節子、戸田すま子、川本進、浜島健治／DNA ワクチンは胎盤を通過し新生児にも免疫を付与しうる／ポスター／第74回日本細菌学会総会、岡山シンフォニーホール、コンベックス岡山、2001年4月1～4日
- ④ 浜島健治、忻克勤、奥田研爾／活性型Tリンパ球の移入はDNA ワクチンの特異的免疫応答を増強する／ポスター／第74回日本細菌学会総会、岡山シンフォニーホール、コンベックス岡山、2001年4月1～4日

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
（総括・分担）研究報告書

- ⑤ 奥田研爾／Effects of fetal DNA vaccination on immune response of offspring／口頭／第13回日米医学協力研究会エイズ専門部会、熊本市国際交流会館、2001年3月21～23日
- ⑥ 小島良績、大木敬章、星野由香、篠田香織、忻克勤、浜島健治、奥田研爾／HIV-1 DNA ワクチンに対する多価 CpG モチーフのアジュバント効果の検討／第84回日本細菌学会関東支部総会、横浜 神奈川県民ホール、2001年11月26、27日
- ⑦ 大木敬章、忻克勤、小島良績、篠田香織、浜島健治、奥田研爾／アデノ随伴ウイルス（AAV）の Invert Terminal Repeat (ITRs) を含む HIV-DNA ワクチンの免疫誘導効果の検討／第84回日本細菌学会関東支部総会、横浜 神奈川県民ホール、2001年11月26、27日
- ⑧ 篠田香織、小島良績、大木敬章、忻克勤、浜島健治、奥田研爾／ワクシニアウイルスを用いた HIV ワクチンの開発／第84回日本細菌学会関東支部総会、横浜 神奈川県民ホール、2001年11月26、27日
- ⑨ 奥田 研爾／Developmental approach for a novel HIV-1 vaccine using a new type of DNA vaccine and vaccinia virus vector vaccine／学術講演／よこはま21世紀フォーラム、横浜 はまぎんホールヴィアマール、2001年11月28、29日
- ⑩ 篠田香織、忻克勤、浜島健治、奥田研爾／組み換えワクシニアウイルスを用いたエイズワクチンの開発／第15回日本エイズ学会学術集会総会、東京 北区王子北とぴあ 2001年11月29～12月1日
- ⑪ 忻克勤、浜島健治、篠田香織、奥田研爾／組み換えアデノ随伴ウイルスの経口投与による HIV 特異的免疫応答の検討／第15回日本エイズ学会学術集会総会、東京 北区王子北とぴあ、2001年11月29～12月1日
- ⑫ 浜島健治、忻克勤、篠田香織、奥田研爾／多価 CpG モチーフ包含プラスミドの HIV-DNA ワクチンに対するアジュバント効果の検討／第15回日本エイズ学会学術集会総会／東京 北区王子北とぴあ、2001年11月29～12月1日
- 2) 外国
- ① K. Okuda, S Watabe, K Hamajima, S Toda, K-Q Xin / Fetal immunization with a DNA vaccine induces protective immunity / 11th International Congress for Immunology / Stockholm (Sweden) 2001年7月22～27日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
- 1) ワクチニアLC16m8を用いたエイズワクチン
- 2) HIV-1に対する新世代DNAワクチン(ヒト型化コドン使用)
- 以上2件出願中

酵母 VLP 出芽系の応用と麻疹ウイルスベクターを用いたワクチンへの試み

分担研究者 森川裕子 (北里大学北里生命科学研究所)
共同研究者 横田恭子 (国立感染症研究所免疫部)
 中山哲夫 (北里大学北里生命科学研究所)

研究要旨

HIV Gag 蛋白発現の plasmid を導入した酵母細胞から細胞壁を除去して培養すると、ベクターウイルス free の GagVLP が自発的に出芽・放出される。この酵母スフェロプラスト細胞より出芽した VLP の免疫誘導能をマウスを用いて調べたところ、Gag 抗体の産生は認められたものの、Gag 特異的 CTL の産生は認められなかった。次に、組換えエイズワクチン開発を目的として、現行の麻疹ワクチン AIK-C 株をベクターとして用いることが可能か、すなわち、健常成人はこの麻疹ワクチン株が再感染するかを検討した。麻疹罹患歴のある健常成人 6 人に接種したところ、HI 抗体価 32 倍以下 (4 例) 及び中和抗体価 64 倍以下 (3 例) の個体では抗体価の上昇が認められ、そのうち 2 例では AIK-C 株のウイルスゲノムが確認できた。従って、現行麻疹ウイルスワクチン AIK-C 株は、麻疹ウイルスに常時暴露されていない通常個体に対して再感染が成立する、すなわち、ウイルスベクターとして使用できると思われる。

A、研究目的

HIV Gag 蛋白発現の plasmid を導入した酵母細胞から細胞壁を除去して培養すると、ベクターウイルス free の GagVLP が自発的に出芽・放出される (昨年度、本班で報告済み)。今年度は、この酵母スフェロプラスト細胞から出芽した VLP の免疫誘導能をマウスを用いて検討した。さらに、「実用可能な組換えエイズワクチン作製に用いるウイルスベクターとして、人体投与の歴史からその安全性が保証されている現行麻疹ウイルスワクチン AIK-C 株が利用できるか」を検討する前段階として、麻疹罹患歴をもつ健常成人に現行麻疹ウイルスワクチン AIK-C 株が再感染するかを調べた。

B、研究方法

1、酵母スフェロプラスト細胞から出芽させた VLP の準備

HIV Gag 蛋白恒常発現の plasmid で形質転換させた酵母細胞から、常法に従って細胞壁を Zymolyase により消化し、1M sorbitol 添加の等張 YPD 培地で培養した。この酵母スフェロプラストの培養上清から常法に従い、20~70% 蔗糖密度勾配で VLP を精製した。精製 VLP は PBS (-) に懸濁した。

2、マウスを用いた酵母 VLP の免疫誘導能の評価

精製 VLP 懸濁液を BALB/c マウスの皮下あるいは腹腔に 3~4 週間ごとに 4 回接種した (10 ug/shot)。コントロール群には Complete Freund's adjuvant 混和 p24 蛋白を food pad に 1 回接種した。また、粘膜免疫の誘導能について検討する目的で、精製 VLP 懸濁液を BALB/c マウ

スに 3~4 週間ごとに 6 回経鼻投与した (10 ug/shot)。経鼻投与のコントロールとして、p24 蛋白のみ、コレラトキシン添加 p24 蛋白、酵母膜画分の 3 群をおいた。いずれの場合も、接種開始後 3~4 週間ごとに採血し、ELISA 法で p24 抗体価を測定した。最終回接種後、⁵¹Cr を用いて CTL の活性を調べた。

3、現行麻疹ウイルスワクチン AIK-C 株の準備

現行麻疹ウイルスワクチン AIK-C 株は市販のもの (北里研究所) を用いた。

4、麻疹罹患歴をもつ健常成人に対する現行麻疹ウイルスワクチン AIK-C 株の接種と追跡調査

小児期に麻疹罹患歴をもつ健常成人 6 人 (20 才代後半~50 才、うち麻疹ウイルス研究従事者 3 人) を被験者とし、まず、医師 (ワクチン外来専門医) から被験者に、実験目的、実験内容と計画、それに伴う被験者の利益と不利益、実験結果の利用方法、等を説明し同意を得た。ワクチン外来専門医によりこれら被験者に、現行麻疹ウイルスワクチン AIK-C 株のウイルス液を現行 dose (5 x 10³ TCID₅₀ / 0.5 ml) 皮下接種し、継時的に採血した。これを用いて、i) リンパ球からのウイルス分離、ii) RT-PCR 法による麻疹ウイルスゲノムの検出と RFLP 法による麻疹ウイルス株の同定、iii) 血清 HI 抗体価及び中和抗体価の測定を行った。

C、研究結果

1、酵母スフェロプラスト細胞から出芽させた VLP の免疫誘導能

精製 VLP 懸濁液をマウスの皮下あるいは腹腔に 3~4 週間ごとに 4 回接種した。接種開始後 3~

4週間ごとに p24 抗体価の上昇を調べた。陽性コントロール (Complete Freund's adjuvant 混和 p24 蛋白を food pad に接種) に比べると弱いものの、VLP 接種群でも p24 抗体の産生が認められた (図 1)。次に、経鼻投与による粘膜免疫について検討した。陽性コントロール (コレラトキシン添加 p24 蛋白接種群) に比べ非常に弱いものの、p24 蛋白のみ接種群あるいは酵母膜画分接種群より有意な p24 抗体の上昇が VLP 接種群で観察された (図 2)。しかしながら、VLP 投与のいずれの場合も有意な CTL 活性は認められなかった。従って、VLP すなわち細胞内で蛋白発現のおこらないワクチン接種では CTL 誘導の priming は難しいと思われた。

2. 麻疹罹患歴をもつ健常成人に対して現行麻疹ウイルスワクチン AIK-C 株が再感染するかの検討

CTL 誘導の priming には、少なくとも細胞内で蛋白発現がおこるワクチン (DNA vaccine など) かあるいは細胞内でその増殖がおこるワクチン (組換えウイルスワクチン など) が必要と思われた。そこで、人体投与の歴史から副反応がないと既に判明している現行麻疹ウイルスワクチン AIK-C 株を組換えウイルスベクターの候補として選択した。今年度はまず、この現行麻疹ワクチン株が、通常健常成人 (ほとんどの場合、麻疹罹患歴か麻疹ワクチン接種歴をもつ) に利用できるか、すなわち、再感染するかを検討した。麻疹罹患歴をもつ健常成人 6 人 (20 才代後半~50 才、うち麻疹ウイルス研究者 3 人) に現行麻疹ウイルスワクチン AIK-C 株を小児用 dose 皮下接種し、1 及び 3 週間後に採血した。まず、血清学的に調べた。ワクチン接種前から既に HI 抗体価が 64 倍以上を示す個体 (2 人でいずれも麻疹ウイルス研究者) では接種による HI 抗体価の上昇はなかったが、HI 抗体価がそれ以下の場合には接種後に HI 抗体価の上昇が観察された (図 3 左)。同様に、接種前に既に中和抗体価が 128 倍以上を示す個体 (3 人でいずれも麻疹ウイルス研究者) では接種による中和抗体価の上昇はなかったが、それ以下の場合にはワクチン接種により中和抗体価の上昇が認められた (図 3 右)。これらの結果は、現行麻疹ウイルスワクチン AIK-C 株が、麻疹ウイルスに常時暴露されているような抗体価の高い個体に対しては無効であるものの、通常個体に対しては有効すなわち再感染が成立した可能性を示唆している。これを明らかにする目的で、リンパ球からウイルス分離とウイルスゲノムの検出を行った。ウイルス分離は、すべての個体で接種前及び後いずれにおいても陰性であった。しかしながら、RT-PCR 法によるウイルスゲノムの検出を行ったところ、中和抗体価の上昇が認められた個体 3 例中 2 例にワクチン接種後 1 週間目でウイルスゲノムが検出できた。RFLP 法により、この検出された麻疹ゲノ

ムが被験者の麻疹罹患時流行株ではなく、今回接種した AIK-C 株であることが判明した (表 1)。従って、現行麻疹ウイルスワクチン AIK-C 株は、麻疹ウイルスに常時暴露されていない通常個体に対しては再感染が成立する、すなわちウイルスベクターとして使用できる可能性が示された。

D. 考察

酵母スフェロプラスト細胞からの VLP 出芽・放出系は plasmid-based の発現系であるため、感染性がないものの免疫原性を有する VLP ワクチンが作製できると期待された。しかしながら、その VLP 投与では、液性免疫は誘導されたが、CTL は産生されなかった。この原因は本研究の VLP がベクターウイルス free すなわち細胞内で蛋白発現のおこらない画分であるためかと考察された。この VLP が、既に priming された CTL を stimulation できるか、すなわち、発症阻止ワクチンとして利用可能かは現在検討を進めているが、CTL 誘導の priming が求められる感染予防ワクチンとしては難しいと思われる。

これに対し、組換えウイルスベクターを用いたワクチンの場合、細胞内でその増殖がおこるため、CTL 誘導の priming が期待できる。組換えウイルスを人体投与のワクチンとして用いる場合、安全性が保証されねばならないが、人体用現行生ウイルスワクチン株のベクターへの利用はこの点で信頼性が高い。本研究で用いた麻疹ウイルスワクチン AIK-C 株は、現行生ウイルスワクチン (ポリオ・麻疹・おたふくかぜ・風疹などの弱毒ウイルス株) の中でもとりわけ安定な弱毒株であり、副反応症例がほとんど認められない WHO 推奨株である。

近年、初回感染で終生免疫を獲得すると信じられてきた麻疹免疫の実体が成人になっても繰り返しておこる不顕性感染によるものであると明らかにされた。この事実は、麻疹ウイルスベクターが麻疹罹患成人に対してもワクチンベクターとして機能する可能性を示唆する。本研究では、現行麻疹ウイルスワクチン株でもこれが成立するか、すなわち、麻疹ワクチン株が麻疹罹患成人に再感染するかをエイズ組換え麻疹ワクチン株ベクター作製の前段階実験として行った。結果に示したように、現行麻疹ウイルスワクチン株は麻疹ウイルスに常時暴露されている抗体価の高い個体には無効であったが、通常抗体価をもつ個体に対しては再感染が成立したと考えられた。社会一般の健常成人が何倍の麻疹ウイルス抗体価を保有しているかはサーベイランスがないためわからないが、その多くは本研究における通常個体群に分類されると思われる。従って、前検査 (接種前の麻疹中和抗体価が 64 倍以下であることの確認) が必要かもしれないが、多くの健常成人に対して、現行麻疹ウイルスワクチン AIK-C 株をベクターとする組換えワクチンが使用可能と期待される。

E、結論

酵母スフェロプラスト細胞から出芽した HIV GagVLP は液性免疫の誘導が可能なものの、細胞性免疫誘導の priming はできなかった。また、現行麻疹ウイルスワクチン AIK-C 株は、麻疹ウイルスに常時暴露されていない通常の個体に対しては再感染が成立する、すなわちウイルスベクターとして使用できる可能性が示された。

F、研究発表

1、論文発表

1) Yuko Morikawa, Ayako Kinoshita, Toshiyuki Goto, Hiroshi Tomoda, and Kouichi Sano
Membrane relocation but not tight binding of human immunodeficiency virus type 1 Gag particles myristoylated in *Escherichia coli*
Virology 283: 343-352 (2001)

2、学会発表

1) 古屋禎佑、小菅成治、森川裕子、大槻健蔵
CKII による HIV-1 protease の活性調節とその選択的阻害物質に関する解析
第74回日本生化学会大会、京都、2001/10/25-28

2) 岡野麻衣子、森川裕子、大槻健蔵
CKI 及び CH-3S による HMG1 の機能調節に関する in vitro での解析
第74回日本生化学会大会、京都、2001/10/25-28

3) 森川裕子、後藤俊幸、佐野浩一
酵母を用いた HIV 粒子出芽系の確立
第49回日本ウイルス学会、大阪、2001/11/18-20

4) 百瀬文隆、森川裕子、永田恭介
インフルエンザウイルス遺伝子の転写・複製に関与する宿主因子 RAF-2 p48 / BAT1 の機能解析
第49回日本ウイルス学会、大阪、2001/11/18-20

5) 森川裕子、後藤俊幸、佐野浩一
ヒト免疫不全ウイルスGag蛋白のアッセンブリー中間体
第24回日本分子生物学会年会、横浜、2001/12/9-12

6) 百瀬文隆、森川裕子、永田恭介
インフルエンザウイルス遺伝子の転写・複製を促進する宿主因子 RAF-2 p48 / BAT1 の機能解析
第24回日本分子生物学会年会、横浜、2001/12/9-12

G、知的所有権の取得状況

PCT 国際出願「ウイルス様微粒子及びその製造方法」出願中

国際出願番号 PCT / JP01 / 06791

国際出願日 平成13年 8 月 7 日

図1、酵母スフェロプラスト細胞から出芽させた GagVLP による液性免疫の誘導

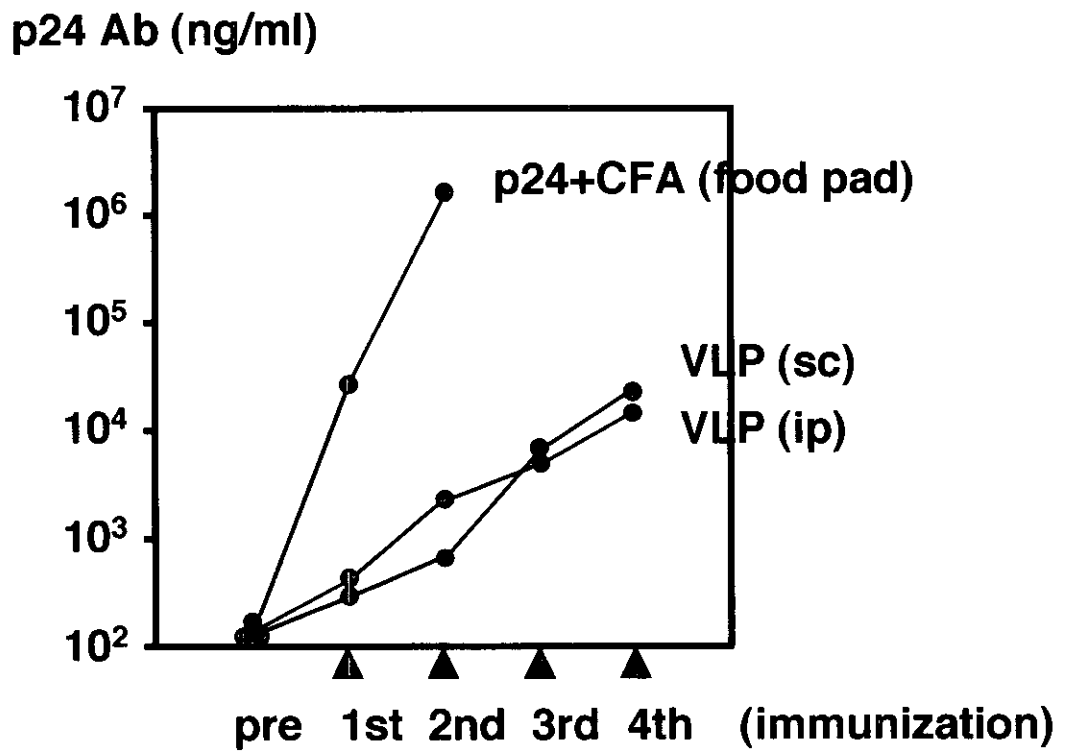


図2、酵母スフェロプラスト細胞から出芽させた GagVLP の経鼻接種による液性免疫の誘導

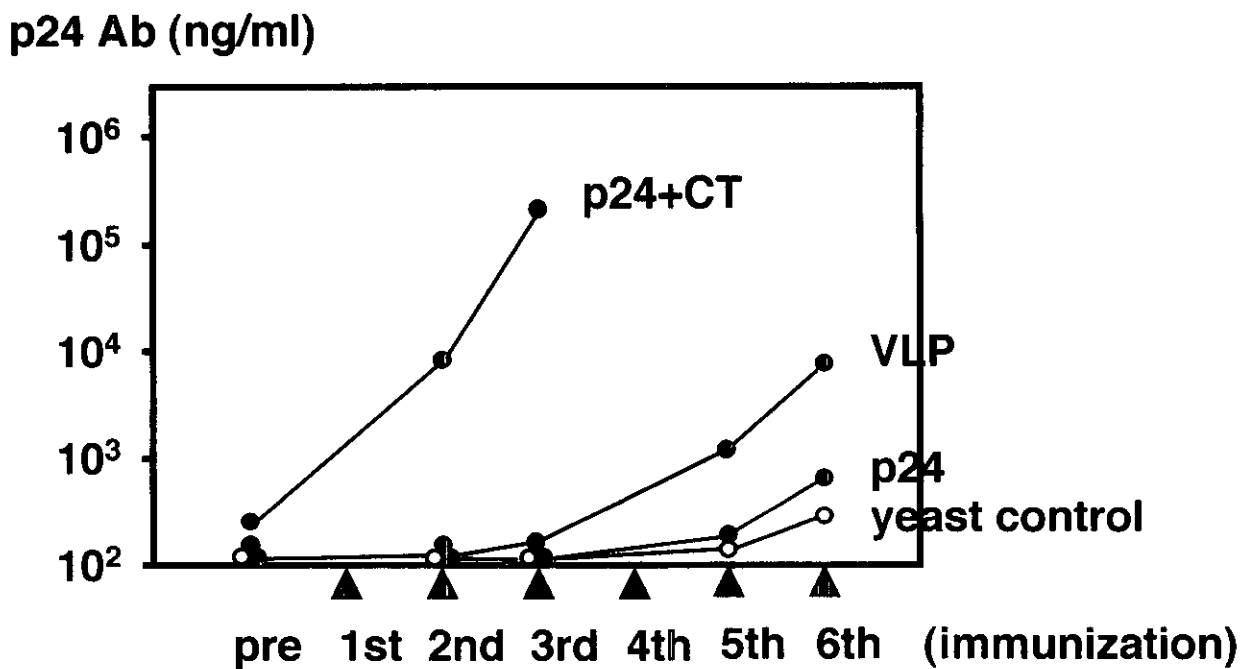


図3、麻疹罹患歴をもつ健常成人への麻疹ワクチン AIK-C 株接種で観察される HI 抗体価 (左) と中和抗体価 (右) の変化

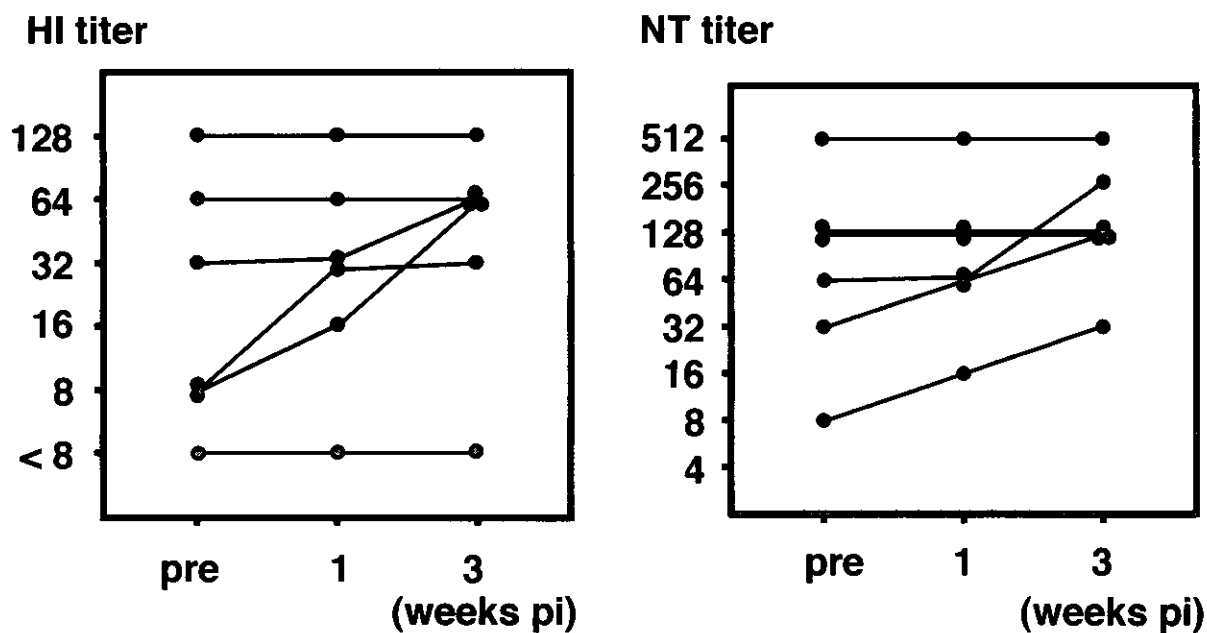


表1、Detection of MV in healthy adults vaccinated with MV (AIK-C)

Subject No.	MV Ab responses		MV isolation	MV genome (strain by RFLP)
	HI titer	NT titer		
1	→	→	-	-
2	→	→	-	-
3	↗	→	-	-
4	↗	↗	-	-
5	↗	↗	-	+ (AIK-C)
6	→ (negative)	↗	-	+ (AIK-C)

マウスを用いて経口的に投与でき、粘膜免疫誘導可能な DNA ワクチン開発の基礎的研究を行った。E 型肝炎ウイルス(HEV)より樹立されたウイルス様中空粒子(VLP)を HIVenv 発現プラスミド溶液中で EGTA にて Ca イオンをキレートし、ウイルス分子間の結合を広げ、その後 Ca を添加することにより再構築し、HIVenv DNA ワクチン封入 VLP(HIV-VLP)を作成した。この HIV-VLP をマウスに経口投与したところ消化管内溶液および血清中にエピトープ特異的抗体が誘導され、更にこの特異抗体は消化管内では IgA が主であり血清中よりも高濃度であった。HIVenv に対する細胞傷害性 T リンパ球(CTL)の誘導を検討したところ CD8+の CTL が脾臓、腸管膜リンパ節およびパイエル板より認められた。現在この VLP にアジュバント活性を持つ Th エピトープを含むを挿入したものを作製しており、その免疫反応増強効果を検討している

A.研究目的

HIV 感染の予防には液性免疫と細胞性免疫の両者が必要であると考えられている。更に、本ウイルスに対しては感染経路から考えて粘膜免疫は重要である。ウイルス様中空粒子(VLP)は遺伝情報を持たず、そのウイルスとしての立体構造が保存されている。一方 DNA ワクチンは多くの利点を備えたワクチンとして期待されているが経口的に投与した場合の効果は期待できない。本研究では経口感染を示す E 型肝炎ウイルス(HEV)の VLP に HIVenv DNA ワクチンを封入し、経口投与可能で粘膜免疫誘導型の DNA ワクチン開発の基礎的研究を行った。

B.研究方法

1.VLP への DNA ワクチン封入：VLP をプラスミド DNA 溶液(2mg/ml)内で EGTA にて Ca をキレートし、その後 Ca を加えることにより VLP を再構築した。VLP の変化は電子顕微鏡観察で確認した。

2.免疫：BALB/C マウスを用い経口ゾンデにて 2 週間隔で 3～4 回経口投与した。

3.抗体の測定：抗体はエピトープペプチドを用いた ELISA 法にて測定した。

4.CTL の誘導：脾細胞、腸管膜リンパ節細胞およびパイエル板細胞をエピトープペプチドに

て刺激培養し、Cr 遊離試験にて測定した。

C.研究結果

1.封入されたプラスミド濃度：封入されたプラスミドは mol 濃度依存的であり、形態的には封入前後で違いは認められなかった(Fig. 1, 2)。

2.抗原発現と特抗体の誘導：プラスミド DNA 封入 VLP を経口投与したところ発現は小腸粘膜上皮に認められた(Fig. 3)。DNA ワクチン封入 VLP 経口投与後血清中および糞便中の HIVenv 特異的抗体を測定したところ血清中では IgG と糞便中では IgG と IgA が認められた(Fig. 4)。

3.HIVenv 特異的 CTL の誘導：HIVenv 特異的 CTL の誘導を見たところ脾臓、腸管膜リンパ節およびパイエル板から誘導が見られた(Fig. 5)。

D.考察

HIV に対する粘膜免疫誘導型のワクチン開発は急務であると考えられており、幾つかの試みがなされている。DNA ワクチンは種々の利点より次世代のワクチンの可能性として注目されているが、経口的に投与し、粘膜免疫と全身免疫の両者を誘導することは困難である。本研究で行った VLP を封入体として利用する経口 DNA ワクチンは安全性が高く、簡便であると考えられる。我々は過去に VLP にエピトープを挿入す