

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

## ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発

所 属 国立感染症研究所 感染病理部  
研究者 小島 朝人

### 分担研究者

- |                         |       |
|-------------------------|-------|
| (1) 国立感染症研究所感染病理部       | 小島 朝人 |
| (2) (財)阪大微生物病研究会 観音寺研究所 | 東 雍   |
| (3) 大阪大学医学部             | 山西 弘一 |

### 要 旨

①脳材料を用いない培養Vero細胞由来の新不活化JEワクチン開発において、試作製造したワクチン原液は保存剤無しで抗原含量及び力価とも非常に安定であった。しかし、希釈液状ワクチンではチメロサルに代わる保存剤開発が求められた。副次的成果として、mAbを用いたELISAがワクチン濃度測定法として有用であることが示された。②WHOが求める理想の次世代ワクチン開発では、昨年度樹立したJEV抗原持続産生J12#26細胞株培養上清から精製したJ12#26抗原が、現行ワクチンと同等のワクチン効果を示した。この成果により、理想の新規JEワクチンとなる可能性が一層高まったため、研究の焦点をシフトする必要性が示唆された。③DNAワクチン開発を目的にクローニングされたHHV-6 MIEプロモーターが、リンパ系細胞でHCMV-IEプロモーターの数倍の発現活性を示した。しかし、発現遺伝子をJEVの外皮糖蛋白遺伝子に変換するとその活性が検出されなかったため、原因の解明を進めている。

### 1. 研究目的

アジアでは日本脳炎の大流行が依然として続き、毎年35,000名を越える患者発生がWHOに報告されている。わが国では日本脳炎患者発生が毎年50名を越えることはないが、約10年前沖縄県で大規模な演習を行った米軍関係者に6名(当時の米軍および軍属約2万名)の患者が発生した。このことは、日本脳炎ワクチン接種歴がなく基礎免疫を持たない人は発症の危険性が極めて高いことを示している。また、我が国だけの問題でなく、流行地域を含めた総合的な予防対策の必要性を示している。しかし、現在世界中で日本脳炎ウイルス(JEV)感染マウス脳を材料とする精製不活化ワクチンしか存在しない。確かに有効性・安全性とも優れたワクチンであるが、脳材料を用いることに由来する懸念は否定できない。それ故、脳を用いない新ワクチン開発が急務であり、WHOは世界各国に対して緊急の課題として要請していた。

本課題では、脳材料不使用ワクチンとして既に開発が進行していた、ATCC由来Vero細胞のマイクロキャリア大量培養法で増殖させたJEV北京-1株を原材料とする新しい不活化日本脳炎ワクチンを、コントロールされた材料と方法で計画的に製造できる方法の確立を目指してきた。本年度は、製造スケールで試験用ワクチンを試作した。しかし、今後開発される新規ワクチンには安定・保存剤としてチメロサールの使用が認められなくなった。従って、新たな安定・保存剤の開発、安定な液状製剤の開発は、冷蔵庫・冷凍庫の設備が不十分な地域でのワクチン接種を効率化し、財政負担を招く高コストを避けるためには重要な問題となる。そこで、製造された試作ワクチンについて、各種の安定剤・保存剤を添加した液状ワクチンを各種試作し、これらの安定性を検討した。

このように、細胞培養由来のJEVを不活化した脳材料不使用の新ワクチンが研究グループの阪大微研会により開発されつつある。そこで次なる目標は当然ながら、ウイルスを用いない・製造工程の安全なワクチン創製の新技術の開発と、これによる新世代ワクチンの開発である。しかし、JEVの表面糖蛋白は細胞にtoxicなため、日欧米で進められているゲノムテクノロジーを用いた大量発現細胞株樹立の試みも、ワクチン製造に十分な抗原産生量が得られず、未だ不首尾である。この点では、我々はJEVの3' C-prM-E cDNA(J12)を用いて、中和抗原粒子を高発現する持続産生J12#26細胞株の樹立に昨年度成功した。本年度は、この細胞株培養上清から精製したJ12#26抗原の抗原性解析と、マウスを用いた中和抗体誘導試験・感染防御試験を実施し、WHOが理想とする、製造にウイルスを用いない・安価な新規ワクチンの開発を目指した。

一方、新テクノロジーとして着目されているものの未だ実現例の無いDNAワクチン開発においては、強力な発現プロモーターが必要不可欠である。現在までの事例では、ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)の前初期(IE)プロモーターがDNAワクチンに汎用されている。その根拠は、HCMV IEプロモーターが一般的に種々の細胞において強い活性を示すと考えられていることによる。しかし、リンパ球系細胞での発現効率が低いことや、メチル化による不活化等の現象が見られることも他方では報告されている。また、HCMV IEプロモーターのDNAワクチンへの利用については、特許等の制約が実現性を抑制している問題点もある。我々はこれまでの研究で、HCMVと同じヒトヘルペスウイルス属βウイルス亜科に属するHHV-6の主要前初期遺伝子(MIE)のプロモーターが強い活性を示すことを明らかにしている。そこで、このMIE遺伝子プロモーターのDNAワクチンへの利用可能性について検討を行った。

## 2. 研究方法

### (1) Vero細胞を用いた不活化日本脳炎ワクチンの開発

ATCCから購入したVero細胞を用いて確立したセルバンクシステム、北京-1株を用いて確立したシードロットを使用して、製造スケールで連続3ロットのワクチン原液を製造した。ワクチンの製造方法は、マイクロキャリアに付着させて増殖させたVero細胞に種ウイルスを接種し、牛血清を含まない培養液で培養した後、培養上清を採取した。ウイルス浮遊液を濃縮し、ホルマリンによりウイルスを不活化した後、硫酸プロタミン処理を行った。さらに、蔗糖密度勾配超遠心法を2回繰り返して精製した後、ウイルス画分を透析、濾過したものをワクチン原液とした。ワクチン原液を予想される臨床使用時の濃度に希釈調製し、チメロサルに代わる保存剤として2-Phenoxyethanol等の添加剤を加えた後小分けしたものを試作ワクチンとした。小分け品を4℃、25℃または37℃に保存し、定期的に日本脳炎ウイルス抗原含量と力価を測定した。日本脳炎ウイルス抗原含量は、抗日本脳炎ウイルスモノクローナル抗体(東京都神経科学総合研究所;保井孝太郎博士より分与を受けたGroup-8 Clone503)を用いたサンドイッチELISA法により測定した。力価は生物学的製剤基準日本脳炎ワクチンの力価試験法に準じて測定した。

### (2) 中和抗原粒子持続産生J12#26細胞株を用いた新世代日本脳炎ワクチンの開発

JEV prM-E領域のcDNA, J12を高い効率で発現するJ12#26持続細胞株は昨年度報告したものをを用いた。細胞は10%FBS添加MEM培地で維持・継代した。J12#26細胞内に発現されたJ12#26蛋白の抗原性は、アセトン固定した細胞の、JEV中和エピトープ503、No4モノクローナル抗体あるいは中和活性を持つウサギ抗-JEVポリクローナル抗体を用いた蛍光抗体法で検討した。また、2.5%グルタルアルデヒドで前固定した細胞の薄切標本を透過型電子顕微鏡で観察した。培養上清中のJ12#26蛋白は、昨年度報告した方法に従って精製した。精製した抗原は、マウス脳由来精製不活化ウイルスを標準抗原として、JEV中和503モノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA、あるいはウサギ抗-JEV抗体を用いたウエスタンブロットで解析した。J12#26蛋白の中和抗体誘導試験は、6週齢雌BALB/cマウスの腹腔に現行試験法に準じて、ELISA抗原価で現行ワクチンと当量のJ12#26精製抗原を1週間隔で2回投与した。投与後1週と2週目の血清を採取し、Vero細胞を用いたプラーク法でJEV北京株に対する中和抗体価を測定した。抗体価は、プラークを50%減少させる最大血清希釈倍率で求めた。感染防御試験には4週齢雌BALB/cマウスを用いた。上記中和試験と同様に2回免疫したマウスの6週齢時に、50LD<sub>50</sub>のJEVを腹腔接種し、マウスの生死を3週間観察して生存率を求めた。

### (3) HHV-6Bプロモーターの探索とDNAワクチンの開発

HHV-6BのMIE遺伝子のプロモーター領域(約1.2kbp)をクローニングし、さらにその下流に日本脳炎ウイルス北京-1株の外皮糖タンパク遺伝子cDNAを連結したプラスミド(p9u/JEVenv)を構築した。緑色蛍光タンパク発現プラスミドpEGFP-N1は市販のものを使用した(clontech)。また、ルシフェラーゼ発現プラスミドは既に構築したものをを用いた。これらプラスミドを293細胞(ヒト腎臓由来)、Vero細胞(サル腎臓由来)、SupT1細胞(ヒトTリンパ球由来)、U937細胞(ヒト単球由来)等にリポフェクション法で導入した。細胞内での外皮糖タンパクの発現は、抗-JEVポリクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法、細胞抽出液のウエスタンブロット法で検討した。

## 3. 研究成果

### (1) Vero細胞を用いた不活化日本脳炎ワクチンの開発

3ロットのワクチン原液は、リン酸緩衝食塩液を溶媒とし、安定剤にアミノ酸を添加して4℃に保

存したとき、日本脳炎ウイルス抗原含量は約2年間保存しても80%以上の値を示し、力価の低下もほとんど認められなかった。また、25℃、6ヶ月間保存しても力価の低下は認められなかった。添加剤として、Tween80を50μg/mLまたは2-Phenoxyethanolを0.3%添加した試作ワクチンを37℃で7日間保存したとき、無添加に比べTween80を添加したワクチンは日本脳炎ウイルス抗原含量及び力価ともやや低下が認められ、Tween80及び2-Phenoxyethanolを添加したワクチンでは抗原含量及び力価とも低下が顕著であった。さらに、Tween80を50μg/mL及び2-Phenoxyethanolを0.3%添加した試作ワクチンを25℃または37℃に4週間保存し、定期的に蛋白質含量、日本脳炎ウイルス抗原含量及び力価を測定した結果、蛋白質含量の変化は認められなかった。しかし、25℃に保存した場合は日本脳炎ウイルス抗原含量の低下はほとんど認められなかったが、力価は2週間の保存で1/7~1/11に低下し、4週間の保存では1/9~1/15に低下した。また、37℃、4週間の保存では日本脳炎ウイルス抗原含量が約1/2に低下し、力価は1/33~1/191に低下した。各温度に保存した試作ワクチンの日本脳炎ウイルス抗原含量と力価は相関する傾向が認められた。

#### (2) 中和抗原粒子持続産生J12#26細胞株を用いた新世代日本脳炎ワクチンの開発

J12cDNAを導入したJ12#26細胞株は増殖速度がやや低下するものの、形態も未導入親株と全く変化が無く、細胞接着阻害も正常に生じた。中和モノクローナル抗体503およびNo. 4によって細胞質が明瞭に染色され、抗-JEVポリクローナル抗体によっても同様の染色像を示した。電子顕微鏡観察では、ゴルジ体の小胞内に直径約20nmの電子密度の高い小型球形粒子構造が認められた。J12cDNAを含まないベクターDNAのみを導入した細胞では、そのような構造は観察されなかった。J12#26細胞の培養上清から昨年度報告した、PEG沈殿法・蔗糖密度勾配遠心法・Sephadexカラムゲルろ過法の組合せで精製したJ12#26抗原は、分子量53kDaのJEV E蛋白を主要構成成分とすることが、JEV特異的な抗体を用いたウェスタンブロット法で明らかになった。このように実験室的に調整したJ12#26抗原のLot-1とLot-2を、精製不活化JEV抗原を標準抗原に用いた503エピトープELISAで平行線検定を行ったところ、いずれのLotも現在ワクチンに用いられている標準抗原と全く同一の中和503抗原性を保持していることが示された。そこで、マウスを用いた免疫原性試験で、J12#26抗原の中和抗体誘導能を検討した。その結果、J12#26抗原を投与したマウスでは、現行日本脳炎ワクチンを投与した群と全く同等の高い中和抗体価(1:640)の誘導が、免疫後1週及び2週目共に観察された。次に、J12#26抗原で免疫したマウスに対する、JEV感染試験を行った。非免疫群(PBS投与群)では全匹がJEV接種後6日目までに死亡したのに対して、J12#26抗原免疫群およびJEワクチン免疫群では全匹とも何ら臨床症状も示さず生存した。

#### (3) HHV-6Bプロモーターの探索とDNAワクチンの開発

HCMVのIEプロモーターをコントロールにして、我々のクローニングしたHHV-6BのMIEプロモーターの活性をルシフェラーゼ発現系で比較検討した。その結果、293細胞やVero細胞など付着性の細胞では、HHV-6 MIEプロモーターはHCMV-IEプロモーターの1/100程度の活性しか示さなかった。しかし、SupT1やU937等のリンパ系細胞においては数倍高い発現効率が得られた。そこで、このプロモーター下流にJEV cDNAを連結したp9u/JEVenvによるJEVの外皮糖タンパクの発現を検索したところ、トランスフェクション48時間後の付着性細胞、浮遊リンパ系細胞何れにおいてもJEVタンパクの発現が検知されなかった。他方、陽性対照とした日本脳炎ウイルス感染Vero細胞では、外皮糖タンパクが容易に検出された。原因解明のため、GFPタンパク発現プラスミドを用いてトランスフェクション効率の確認を行った。その結果、SupT1細胞での導入効率は0.1%以下と低い値であったが、付着性の293細胞とVero細胞ではそれぞれ45%、20%と高い導入効率であった。

#### 4. 考察

現行日本脳炎ワクチンは、マウス脳内に日本脳炎ウイルス(JEV)を接種して、神経症状を呈したマウスから脳を採取し、これを原材料にしてウイルスを精製・不活化したワクチンで、これが世界中で存在する唯一のワクチンである。WHOは脳のプリオン蛋白を原因とする狂牛病の勃発を重視し、さらには、ワクチン製造に大量(日本のみでも数百万匹)のマウスを犠牲にする動物愛護面、および、バイオハザード上封じ込めを必要とする感染性ウイルスを用いる点を指摘して、脳を材料としない・動物を犠牲にしない・製造上安全な、新しい日本脳炎ワクチンの開発を緊急課題として各国に提言していた。これを受けて、JEV感染培養Vero細胞の培養上清からJEVを回収・精製・不活化した組織培養不活化ワクチンが研究組織の阪大微研会で現在開発されつつある。一方、現行日本脳炎ワクチンは液状であり、保存剤としてチメロサルが添加されているが、新規ワクチンにはチメロサルの使用が認められな

くなる。従って、新たな安定・保存剤の開発、安定な液状製剤としての開発は、冷蔵庫・冷凍庫の設備が不十分な地域でのワクチン接種率の上昇に貢献し、財政負担を招く高コストを避けるうえで重要な問題であろう。今年度、製造された試作ワクチンについてワクチン原液での安定性を調査した結果、保存剤等の添加物を含まない原液では日本脳炎ウイルス抗原含量及び力価とも非常に安定であることが確認された。しかし、ワクチン濃度に希釈調製し、保存剤として2-Phenoxyethanolを添加した試作ワクチンは、25℃以上の温度で保存すると顕著に日本脳炎ウイルス抗原含量及び力価とも低下することが確認された。このことは、Vero細胞を用いた不活化日本脳炎ワクチンの保存剤として2-Phenoxyethanolの使用は適さないことを示唆していよう。また、本年度の研究過程で抗-JEVモノクローナル抗体を用いたELISA法により測定した日本脳炎ウイルス抗原含量は、力価とよく相関することが確認されたことから、ワクチン濃度を測定する方法として有用な方策であると思われる。

近年のゲノムテクノロジーの進展はウイルス蛋白遺伝子のみを発現ベクターに組み込み、感染性ウイルスを用いることなく、ウイルス蛋白を産生する技術的基盤を与えてきた。しかし、一般にウイルス抗原蛋白は細胞にtoxicなため、速やかに分解されるか、不溶化されるか、発現細胞自体にアポトーシスを誘導して死滅させるかであった。発現可能な場合でも、感染防御の抗原エピトープが形成されない変性型であった。JEV抗原蛋白についても、E. coli. や酵母発現系は不可で、昆虫細胞/バキュロウイルス由来蛋白は防御抗原エピトープが消失していた。これまでの成功例は、我々と、米国のMasonらが、ワクシニアウイルスベクターを用いて発現させた2例しかなかった。昨年度の本研究では、JEV感染・複製に関する我々のこれまでの研究を基に、JEV抗原の発現で細胞融合・細胞死を生じないようJEV感染に感受性の低い細胞を親株とし、且つ、発現JEV抗原が細胞内に滞留せず速やかに分泌されるようJEVのシグナル配列を付加して、JEV抗原持続産生細胞株J12#26の樹立に成功した。本年度は、この細胞株培養上清から精製したJ12#26抗原の抗原性解析とマウスを用いた中和抗体誘導試験・感染防御試験を実施し、J12#26抗原が現行ワクチンと同等のワクチン効果を示すことを明らかにした。この成果は、WHOが求める理想の新規JEワクチン開発への大きな前進と思われる。次の課題は、牛血清蛋白混入の可能性を除去するため、産生量を低下させることなく、J12#26細胞株の無血清培養系を開発することであろう。現在、これに焦点を当てて研究を進めている。本研究の成果はJEVと同じフラビウイルスに属するデングウイルスワクチン開発の基盤を与えるものでもあるが、本年度の進展により理想の次世代JEワクチン実現の可能性が一層高まったため、研究の中心をこのワクチン開発にシフトした研究計画の再構築が必要となるかもしれない。

DNAワクチン開発ではプロモーターの開発がキーポイントになる。HCMV-IEプロモーターは、その活性が強いためDNAワクチンに汎用されているが、特許の問題がありこれを実用化することは難しい。これまでの事例では、プロモーター・発現遺伝子/産生抗原の性状・発現細胞等の組み合わせにより、DNAワクチンの結果が大きく左右されている。これら個々の経験例の中から何らかの法則性はまだ見出されていない。培養系での発現効率と動物個体での免疫効率が必ずしも一致するわけでもない。特に、抗原提示細胞として大きな役割を果たしているリンパ系細胞での抗原発現効率については、ほとんどの点が不明である。この点において、モノサイト・マクロファージに親和性の高いHHV-6のプロモーター開発は極めて重要であろう。本研究において、クローニングされたHHV-6 MIEプロモーターがリンパ系細胞でHCMV-IEプロモーターの数倍の発現活性を示したことは興味深い。しかし、発現遺伝子をレポーター遺伝子からJEVの外皮糖タンパク遺伝子に変換したときに、その活性が検出されなかった点は不可解な結果であった。活性が抑制されたのか、発現抗原がこれらの細胞では不安定なのか、現在原因の解明に努めている。

## 5. まとめ

- (1) 培養Vero細胞由来の新不活化JEワクチン原液は、保存剤無しで抗原含量及び力価とも非常に安定であった。しかし、希釈液状ワクチンではチメロサルに代わる保存剤開発が求められた。副次的成果として、mAbを用いたELISAがワクチン濃度測定法として有用であることが示された。
- (2) 昨年度樹立したJEV抗原持続産生J12#26細胞株培養上清から精製したJ12#26抗原が、現行ワクチンと同等のワクチン効果を示した。この成果により、理想の次世代JEワクチンとなる可能性が一層高まったため、研究の焦点をシフトする必要性が示唆された。
- (3) クローニングされたHHV-6 MIEプロモーターが、リンパ系細胞でHCMV-IEプロモーターの数倍の発現活性を示した。しかし、発現遺伝子をJEVの外皮糖蛋白遺伝子に変換するとその活性が検出されな

った。原因の解明を進めている。

#### 6. 研究発表

Hachiya, A., Aizawa-matsuoka, S., Tanaka, M., Takahashi, Y., Ida, S., Gatanaga, H., Hirabayashi, Y., Kojima, A., Tatsumi, M., and Oka, S.: Rapid and simple phenotypic assay for drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 by using CCR5-expressing HeLa/CD4 cell clone 1-10 (MAGIC-5). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45:495-501, 2001.

Ohba, H., Soga, T., Tomozawa, T., Nishikawa, Y., Yasuda, A., Kojima, A., Kurata, T. and Chiba, J.: An immunodominant neutralization epitope on the thumb subdomain of HIV-1 reverse transcriptase revealed by phage display antibodies. *J. Gen. Virol.* 82:813-820, 2001.

第 42 回日本臨床ウイルス学会

第 36 回日本脳炎ウイルス生態学研究会

---

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社