

C. 研究結果

中和抗体投与群サル 6 頭、コントロールサル 2 頭計 8 頭を用いて NAb の HIV/AIDS モデルの修飾作用を検討した。

1. ウイルス感染後 1 時間、1 日、2 日、4 日、7 日、8 日、14 日、18 日、3 週間、4 週間のスケジュールで 3 群に分け、前述のように投与した。血中ウイルス量をコピー数で検討すると中和抗体投与群はコントロール IgG 投与群に比してウイルス量が有意に低下しており、感染後における中和抗体の有効性が明らかになった。しかし、この 3 つの時期の差は本実験では見られなかった。特に 1 時間後に投与しても HIV の感染は既に成立しており、プライマリーなウイルス血症のコピー数を有意に下げることが不可能である。したがって、ウイルス感染がおきると中和抗体が前投与によって完全にコントロールできる量を投与してもウイルスの増殖を完全に抑えることは同じ量の後投与ではできない。
2. CD4 陽性 T 細胞の減少はコントロール抗体群に比べて有意に抑えることができる。しかし、抗体投与を止めた後 4 週間を過ぎると CD4 の減少の抑制は殆ど認められなくなる。
3. しかし、おもしろいことにこの抗体を投与すると血中の PBMC における Fas 抗原の発現をどの後投与群でも有意に

抑えることができた。特に 1 時間後の投与群では殆ど変化がなかった。

4. 全身のリンパ性組織を解剖して解析するとコントロール抗体群はリンパ性臓器が萎縮しており、脾臓及びリンパ節の重量が著しく減少していた。しかし、中和抗体 NAb 投与群は萎縮が全く認められず、脾臓はやや肥大ぎみであった。
5. CD4 の細胞のリンパ性臓器における残存を検索すると抗体投与群では CD4 陽性細胞がいずれの群も殆ど残存しており、この中和抗体の生体におけるウイルス中和のみでなく細胞を残存させることができる能力を有していることが示唆された。

D. 考察

本年度の研究ではウイルス感染後の中和抗体の passive transfer におけるコントロール作用を経時的に 1 時間、1 日、7 日に抗体を投与し週 1 回で連続投与し、病態進行のマーカールの変化を観察した。この実験の基礎として昨年度ウイルス感染時に既に血中の抗体濃度を 500 μ g/ml の濃度に上昇させるとこの病原性ウイルスの感染は完全に中和することを見いだし、その量で後投与の実験を計画した。上記のようにウイルスの感染を完全に制御することがこの濃度ではできなかった。しかし、今回の実験で得られたことは

- 1) ウイルスは一旦感染すると投与 1 時間後に入れても感染完全にブロックでき

ない。

- 2) 後投与において 1 週間まではいつ入れても病態の修飾の程度は変わりなくウイルス血症の有意な低下と CD4 減少の有意な阻止が認められる。
- 3) 最も効果的な点はこの抗体を投与すると passive transfer の時期にかかわらず、上記の 3 つのいずれの時期においても変化なく CD4 の減少を in vivo で殆ど阻止することができる。

これらの結果から生体内での HIV 感染の特徴的所見である CD4 陽性細胞の枯渇をこの抗体濃度でほとんど完全にブロックすることができる。このメカニズムについての詳細は検討中であるが末梢血リンパ球におけるウイルスチャレンジ後の Fas 抗原の発現が正常状態に近いようにコントロールされていることからこの抗体の存在によって CD4 細胞の減少が抑えられていると推測される。さらにここではデータを提示しなかったが、免疫不全マウスを用いた passive transfer の実験でも完全にウイルス感染を阻止することからサルとマウスの体重の差が 3kg と 150g の約 200 倍であることからウイルス感染後に抗体を投与するのに 100 倍から数 100 倍の抗体量が要求されることを示唆された。これらのデータはこれまでの種々のウイルス感染の passive transfer による制御の研究成果を考慮に入れると新規感染のコントロールよりも既に感染した病原体のコントロールには大量の少なくとも 100 倍のオーダーの中和抗体の存在は必要となることを示唆している。

E. 結論

HIV/AIDS 動物モデルの液性免疫によるコントロールは妥当な中和抗体を産生することができれば可能であり、具体的には現時点で NAb のような野生株中和抗体の存在が HIV/AIDS の感染病態を修飾することが明らかになった。さらに、本研究で中和抗体の in vivo における意義はウイルスに対する直接の中和能のみでなく組織における CD4 陽性細胞の保持に極めて効果的な作用を果たすことを明らかにした。そのメカニズムの詳細については現在の研究課題として残されている。さらに新規感染と既感染の中和抗体によるコントロール濃度の差は約 100 の濃度であることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表
無し
2. 口頭発表
無し

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

- 1) 特許取得 無し
- 2) 実用新案登録 無し
- 3) その他 無し

厚生労働科学研究費補助金(創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

ワクチンの安全性評価法

分担研究者 小室 勝利 国立感染症研究所 安全性研究部
協力研究員 青木 陽一郎 国立感染症研究所 安全性研究部

研究要旨

本研究はワクチン候補として有望である HIV 制御遺伝子 (Tat) に着目し、将来その有効性と同様に十分な検討が必要と考えられる安全性における基礎的研究の第一歩として行われた。ワクチンに使用する HIV の遺伝子の生体への影響は詳細に解析すべき項目の一つであり、特に投与を受ける集団には注意が必要で、近年の報告では、HIV 感染を受けている母親から生まれた HIV 感染を受けていない胎児には、血清学的、免疫学的異常が出生後も長期間継続することが示されたが、その詳細のメカニズムは不明である。そこで我々は、Tat の遺伝子、またその蛋白質がどのようなメカニズムで実際の胎児へ影響を与えるかを、短期間で広範囲に解析可能なアフリカツメガエル (*Xenopus Laevis*) の embryo (胚) をモデルに解析を行った。Tat は胚の原腸陥入の遅延、さらに三胚葉形成の発育遅延といった形態学的に有意な影響を与えた。特に中胚葉形成時に必須な転写因子である、*Xenopus Laevis* の Brachyury の発現を抑制した。また、Tat の変異体では全く影響がなかった。以上のことより、Tat は生体の組織特異的に、かつ特異的な発生段階において遺伝子発現レベルで抑制的に作用していることを示唆するものであった。このように、このシステムを用いることで目的とする遺伝子の胎児発生に与える影響を短期間に、広範に検討することが可能で、同じ脊椎動物である哺乳動物との共通点が多いと考えられる初期発生での動物モデルとしては、非常に有効な手段と考えられる。また、このような特徴を考慮したうえで、我々の最終目標である HIV 制御遺伝子 (Tat) ワクチン使用に伴う胎児毒性を検討するための哺乳動物で確認しておかなければならない安全性確認法の確立の第一歩としても期待されることである。

A. 研究目的

ワクチンをヒトに使用するに当たっては、種々の基準、ガイドラインその他 GLP 等、多くの規制をクリアしなければならない。規制の方法は、ワクチンを使用する国、使用されるワクチンの性状、投与を受けるヒト集団 (年齢、性、環境等) 臨床的重要性等により異なるが、基本的にはワクチンの有効性と投与を受けるヒト集団への安全性が如何に保障されるのかのバランスを考慮したものとなっている。エイズワクチンについては、日本国内の種々のガイドライン、世界的に共通する安全性に関する考え方、

使用する予定国の法律、接種対象等を特に注意しておく必要があるものと考えられる。本研究班の開発しているワクチンについては、BCG、ワクシニアウイルスをコンポーネントワクチン作製に使用していることから、これらに対する通常的安全性試験が要求されるであろうし、また、使用する HIV 構造遺伝子、HIV 抑制遺伝子の生体への影響への検討が特に、要求されると思われる。有効性が充分確認されていれば、通常的安全性試験にはそれ程時間を要することはなく、それを実施するにあたっては、GLP 認可を持つ組織で行えば大きな困難は伴わない。

一方、HIV の遺伝子のもつ生体への影響については、十分な基礎実験を行った上で、必要な安全性試験を実施することが求められることになる。

本年度より計画されている HIV 制御遺伝子 (Tat) ワクチンについては、免疫系への影響を主に、投与を受ける集団への影響を特に注意をはらっておく必要があるものと考えられる。その中で、どうしても確認しておかなければならない試験項目として、『妊婦にワクチン投与を行った場合、胎児への影響はないか』との問題がある。近年の報告によれば、HIV 感染を受けている母親から生まれた HIV 感染を受けていない胎児には、血液学的、免疫学的異常が長期間継続するという。HIV ワクチンの使用が妊婦又は妊娠していても、それに気付いていないヒトに対して実施されるとすれば、この胎児毒性の問題は是非とも確認しておく必要がある。本研究は、HIV 抑制遺伝子の胎児への影響を確認するためには、胎児に与える影響を短期間で広範な現象を解析し得る方法として、アフリカツメガエルの卵へ目的の遺伝子を接種し、各発生段階の胚 (embryo) を用いて解析し、将来、哺乳動物で確認しておかなければならない安全性確認法の確立を目指す目的で行われた。

B. 研究方法

発現ベクターへのクローニング：SHIV-C2/1 (Similian/Human Immunodeficiency Viruses) -Tat (pGEM-C2/1Tat-Rev)、又は SHIV-C2/1-muTat-1 の各 cDNA (阪井らがクローニング) が挿入されている、pGEM-C2/1 tat-rev、又は pGEM-muTat-1 から各々 Tat 及びその組換え体 muTat (Tat の transactivator 活性に必要なアミノ酸 30 番目の Cys を Ala へ、41 番目の Lys を Ala へ置換した)、さらに pcDNA3.1(+)-gagE (松尾らがクローニング) を本多先生より分与していただいた。それらの遺伝子を効率良くアフリカツメガエル (*Xenopus Laevis*) の卵、及び胚 (embryos) で発現させるために、プラ

スミド発現ベクター、pCS2+ (PBR 系のプラスミドベクター) へサブクローニングを行った。

In vitro RNA 合成、及びタンパク質合成：pCS2+ ベクター内の SP6、または T7 promoter を用いて、in vitro にて SP6、T7 RNA polymerase によりドライブし上記 muTat, Tat, gag のセンス、及びアンチセンス RNA を合成し、whole-mount in situ hybridization のプローブとして利用した。また、同様にして、5'側を cap analogue で修飾した各 RNA を合成し、下記のような条件で胚へのマイクロインジェクションを行った。

マイクロインジェクション (接種)：アフリカツメガエル (図 1) の受精卵を得るために、実験前日にヒトの性腺刺激ホルモン (HCG) 1000 unit で排卵誘発を行った雌から得られた卵と雄から摘出した精巣 (十分にホモジナイズしておく) とを 10 cm シャーレ内で体外受精を行う。室温で受精後、1細胞期の胚 (embryos) もしくは 2細胞期の片方の 1細胞へ muTat, Tat, gag 各 RNA の接種を行った (図 2)。

また、同時に接種における内部標準 (各卵への手技的な要因による接種効率のばらつきを補正するため) として beta-Gal 遺伝子 (RNA) も共に接種を行った。

Whole-mount In situ Hybridization：既にマウスをはじめとしてよく知られている、中胚葉形成 (原腸陥入、その際に伴う細胞移動、及び胚の前後軸形成、notochord 形成) に必修の転写因子と考えられている Brachyury(Xbra), Goosecoid(gsc)を遺伝子マーカーとして、上記 muTat, Tat, gag 各遺伝子または蛋白質がこれらの遺伝子発現パターンへ与える影響を whole-mount in situ hybridization 法によって解析を行った。

C. 研究成果

昨年度は、転写因子である Sox9 (ヒトではその

遺伝子の突然変異が、Neural Crest 由来の軟骨の形成不全と性逆転現象を引き起こすことが知られていたが、多分化能細胞集合体である Neural Crest の初期発生において必修の遺伝子) の役割を *Xenopus Sox9* をクローニング及びその遺伝子、蛋白質解析をおこなった。また、これらの得られた結果より、*Xenopus Laevis* システムを用いることで目的遺伝子の発現とその局在における広範な現象を一度に、かつ視覚的に解析することが可能であることを示した。以上のことを基本に、本年度はワクチン候補として有望である Tat による遺伝子活性化機構の解析を行った。HIV のトランス活性化因子である Tat は、ウイルスの mRNA の 5'リーダ配列に存在する TAR RNA に結合し、その作用を発揮することは分かっているが、その作用機構は依然不明な点が多く残されている。

そこで、Tat のトランス活性化因子としての作用が正常個体の細胞へ与える影響を *Xenopus* の系を用いて、HIV の抑制遺伝子 Tat が初期発生の胎児にどのような影響を与えるかを解析することを目的に、Tat 及びその組換え体 mu-Tat、gag 各遺伝子を *Xenopus* で効率良く発現するプラスミド発現ベクター、pCS2+へのクローニングを行い、解析を行った。Tat、muTat、及び gag の各 RNA を受精後、2細胞期のうちの1細胞のみへマイクロインジェクションを行い、stage10.5、stage12 (中胚葉形成時期)、stage13-19 (神経形成期)、stage20- (organogenesis) の発生段階で形態学的な解析を行った (図3-1)。中胚葉形成の初期 (stage10.5) では Tat、muTat、及び gag を接種した胚でいずれも形態学的な変化は認められなかった (図3-1)。ところがその後期 (stage12) では、muTat、及び gag を接種した胚では同様に、形態学的な変化は認められなかったが、Tat を接種した胚では明らかな原腸陥入の遅延が認められた。ところが、それらは死滅することはなくそのまま発生は継続され、神経形成期中期 (stage17) では Tat

を接種された側由来の組織群 (beta-Gal にて青色に染色された部位図) は blastpore の閉鎖が行われなまま (原腸陥入の不完全) であったが、その他は正常な形態を維持していた。また、muTat、及び gag を接種した同時期の胚では正常な形態を維持したままであった。さらに organogenesis の中期 (stage30) まで上記の胚発生は継続され、同様に Tat を接種された胚では、接種された側由来の組織群 (beta-Gal にて青色に染色された部位図) は blastpore の閉鎖が行われなまま内胚葉が体外へ露出した状態であった (図3-2)。この時期もまた、muTat、及び gag を接種した同時期の胚では正常な形態を維持したままであった (図3-2)。また、上記全てにおいて胚は healthy であったが、Tat を接種した胚では、organogenesis の後期 (stage45-) では死亡率が50%以上となり、stage50 まで生き残った胚は0%であった。

次に Tat の接種による形態学的な変化が認められた原因を詳細に検索するために、whole-mount in situ hybridization を行った。その際に遺伝子マーカーの Brachyury (Xbra) をプローブに用いた。Xbra は既にヒト、マウス、*Xenopus* をはじめとした主要な種で characterize された中胚葉形成時に必修の転写因子で、その遺伝子発現、局在、蛋白解析を中心に進められ、その解析が行われてきた。特にその遺伝子発現は presumptive な中胚葉が存在する部位で認められ stage10-12 にかけて blastpore (原腸陥入が行われる部位) の周囲にリング状に強く発現している (図4 control)。また、全脊椎動物においては、この時期におこなわれる三胚葉形成 (外胚葉、中胚葉、内胚葉) に必須な原腸陥入にともなう細胞移動 (movement)、後部中胚葉形成、notochord (将来脳、脊髄形成に必修な細胞、組織) 形成で Brachyury 遺伝子が重要な役割を演じていることが知られている。したがって、原腸陥入が cell adhesion, cell movement, cell polarity と重要な関係があることが考えられる

ので、中胚葉形成における Brachyury の molecular mechanism の解析が行われている。

muTat、及び gag を接種した胚では、コントロールと同様に Xbra の発現が認められたが（図 4 muTat200p, Gag200p）、Tat を接種された側由来の組織群ではその発現は抑制されていた（図 4 Tat200p）。また、rabbit reticulocytes を用いた in vitro 翻訳系にて、muTat、Tat、gag 各蛋白質の産生されることは確認済みである。今後は、in vivo (embryos 内) での各タンパク質の発現を特異的な抗体を用いて確認するとともに、他の遺伝子マーカー、Goosecoid（前部中胚葉形成）、Slug、Sox9、Sox10（神経冠：neural crest）等を用いた whole-mount in situ hybridization を行い、Tat 発現により抑制される特異的な細胞、組織などを解析していく予定である。また、RT-PCR、Northern blot 等の手法を用いて、mRNA レベルでの解析を行いたい。

D. 考察

近年、HIV コンポーネントワクチンは env のみならず、gag、Tat を標的抗原とする開発が進んでいる。一方で、早急に求められている成果は特異的な抗ウイルス作用、低い副作用、低コスト、これらの条件を満たすエイズ予防法の確立である。その際に問題となる第一歩が動物システムであろう。上記条件を満たすには哺乳動物、特にサル、チンパンジー等が候補にあげられるが、その動物システム限界のため、短期間に多数、かつ広範囲に解析することは困難とされていた。そこで我々は、同脊椎動物である *Xenopus* システムにより効率良く体外受精と接種を行うことで、Tat が原腸陥入に特異的に影響を与え、その際に重要な役割を果たす、Brachyury 遺伝子の発現を抑制することを示すことができた。同時にこのように胎児の初期発生において特異的に目的の遺伝子の発現とその機能を短期間に多数（100-200 embryos）広範囲に解析することが可能であるこ

とを示すことが可能となった。今後は時間、空間的に発現し、胎児発生を調節する他の転写因子など、遺伝子の解析を行うことで、トランスに転写を活性化する Tat が感染細胞内『いつ』、『どこで』、『どのようなメカニズム』により遺伝子活性化機構の解析を行っていく予定である。また、一個体へ与える影響を解析していくことが基本だが、このシステムを用いることで、目的の遺伝子を1細胞のみに接種し、もう一方の細胞を正常コントロールにすることで、その後の各発生段階で同一個体の embryo でありながらコントロールと陽性反応を同時に解析できるといった利点もある。

このような特徴を考慮したうえで、我々の最終目標である HIV 制御遺伝子 (Tat) ワクチン使用に伴う胎児毒性を検討するための哺乳動物で確認しておかなければならない安全性確認法の確立への第一歩として、この *Xenopus* 受精卵への接種法が有効であるものと考ええる。同じ脊椎動物であるが、哺乳動物と両生類 *Xenopus* 間には動物モデルとしての違いはあるものの、このシステムは、2-3日で organogenesis が終了するといった、非常に短期間で広範な現象の解析を行うことが可能だけでなく、哺乳動物との共通点が多いと考えられる初期発生における動物モデルとしては、非常に有効な手段と考えられる。

また、Serenella Venanzi ら (Analysis of HIV-1 Tat Effects in *Xenopus laevis* Embryos. J. Biomedical Science, 1998; 5: 211-220) によれば、HIV-1 の制御遺伝子 Tat を卵へ接種し、その後の各発生段階を解析すると原腸陥入の遅延、前後体軸の変性（前後軸の区別がつかない）、前方（頭部）の体部形成不全などを生じるが、Tat の組換え体 mu-Tat（37番目の Cys を Ser へ置換したもの）を接種した卵、及びその後発生した embryo に対しては全く影響を与えることがなかった。我々の実験では上記 Tat の組換え体 mu-Tat の置換部位は異なるが（我々はヒト、

サル等の株間でも高率に保存されている、Tat の transactivator 活性に必要なアミノ酸 30 番目の Cys を Ala へ、41 番目の Lys を Ala へ置換した) 結果は彼等と同様に Tat の接種による胚のみ影響があり、muTat、さらに gag を接種した胚では全く影響がなかった。さらに今回我々は、上記の Tat の接種による胚の原腸陥入の遅延を遺伝子、蛋白質レベルで解析を行い、Brachyury の遺伝子発現が抑制されることを新たに発見した。前後体軸の変性、前方(頭部)の体部形成不全に関しても現在他の遺伝子マーカー、Slug, Sox9, Sox10 等を用いて解析中である。

E. 結論

以上のことから、今回の実験結果から Tat 遺伝子は、胎児のごく初期の発生段階でそれを調節している転写因子等へ影響を与えることが示唆された。また、Tat の標的遺伝子等の解析を行うことで、その作用機構へとつながり、新規抗ウイルス剤の検討においても重要な情報となることが予測される。

当然のことながら、哺乳動物で確認しておかなければならない検査項目は早急に検討すべきだが、そのためにはまず安全性確認法を確立することが第一条件と考えられる。そのような確認法の一つとして、今回我々が用いたアフリカツメガエルの受精卵への接種法が有効な解析法として考えられる。

今後は、形態学、組織学的な解析だけではなく、各発生段階に必須な遺伝子マーカー、もしくは抗 Tat 抗体などを用いた分子生物学、生化学的な解析も加えてより詳細に検討していくことが必要なものと考えられる。

また、HIV 制御遺伝子 (Tat) ワクチンの安全性、特に妊婦投与等に際して、胎児にどのような影響を与えるのかを知る目的で、アフリカツメガエルの卵へ HIV 遺伝子を接種し、胎児毒性を検索する方法が、使用し得るかさらに哺乳動物で確認すべき安全性確認法の一助となり得るのかの検討を行った。

本法は、目的とする遺伝子の胎児発生に与える影響を短期間に、広範に検討することが可能で、同じ脊椎動物である哺乳動物との共通点が多いと考えられる初期発生における動物モデルとしては、非常に有効な手段と考えられる結果を得た。

本研究班で、ワクチンとして使用する HIV 制御遺伝子の胎児への影響、特に免疫系への発生、血液細胞分化への影響、等を中心に検討を加えている。これらの結果を基に、哺乳動物で確認すべき検査項目の選択を行う予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. Aoki Y, Spokony RF, Saint-Germain N, Magner-Fink E, Saint-Jeannet. The transcription factor Sox9 is required for cranial neural crest development in *Xenopus*. *Development*, 129(2): 421-32, 2002
2. Suzaki Y, Ami Y, Nagata N, Naito S, Kato H, Taneichi M, Takahashi M, Komiya T, Satoh S, Gondaira F, Sugiyama J, Nakano Y, Mori M, Komuro K, Uchida T. Protection of monkeys against Shiga toxin induced by Shiga toxin-liposome conjugates. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002 Apr;127(4):294-8.
3. Taneichi M, Naito S, Kato H, Tanaka Y, Mori M, Nakano Y, Yamamura H, Ishida H, Komuro K, Uchida T. T cell-independent regulation of IgE antibody production induced by surface-linked liposomal antigen. *J. Immunol* 2002 Oct 15;169(8):4246-52.
4. Naito S, Taneichi M, Kato H, Tanaka Y, Ami Y, Suzaki Y, Mori M, Nakano Y, Yamaura H, Morokuma K, Okhkuma K, Miyake H, Kinwa M, Komuro K, Uchida T. Selective inhibition of systemic anti-OVA IgE production in response to oral pre-treatment with OVA-liposome conjugates. *Int. Arch allergy*

Immunol. 2002 Dec; 129(4): 314-9.

H. 知的所有権の取得状況

なし。

Figure 1 Life cycle in *Xenopus Laevis*

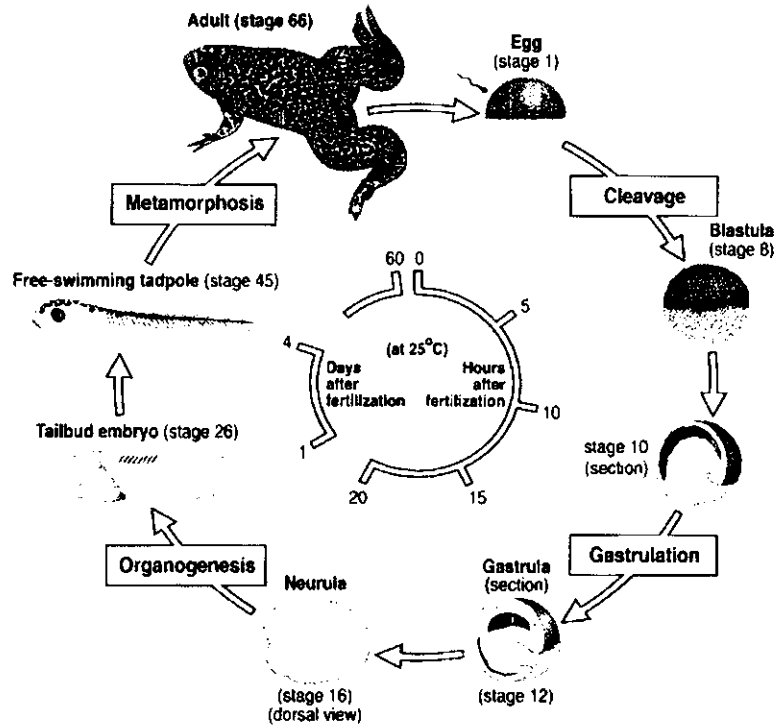


Figure 2 Experimental procedure in *Xenopus* embryo

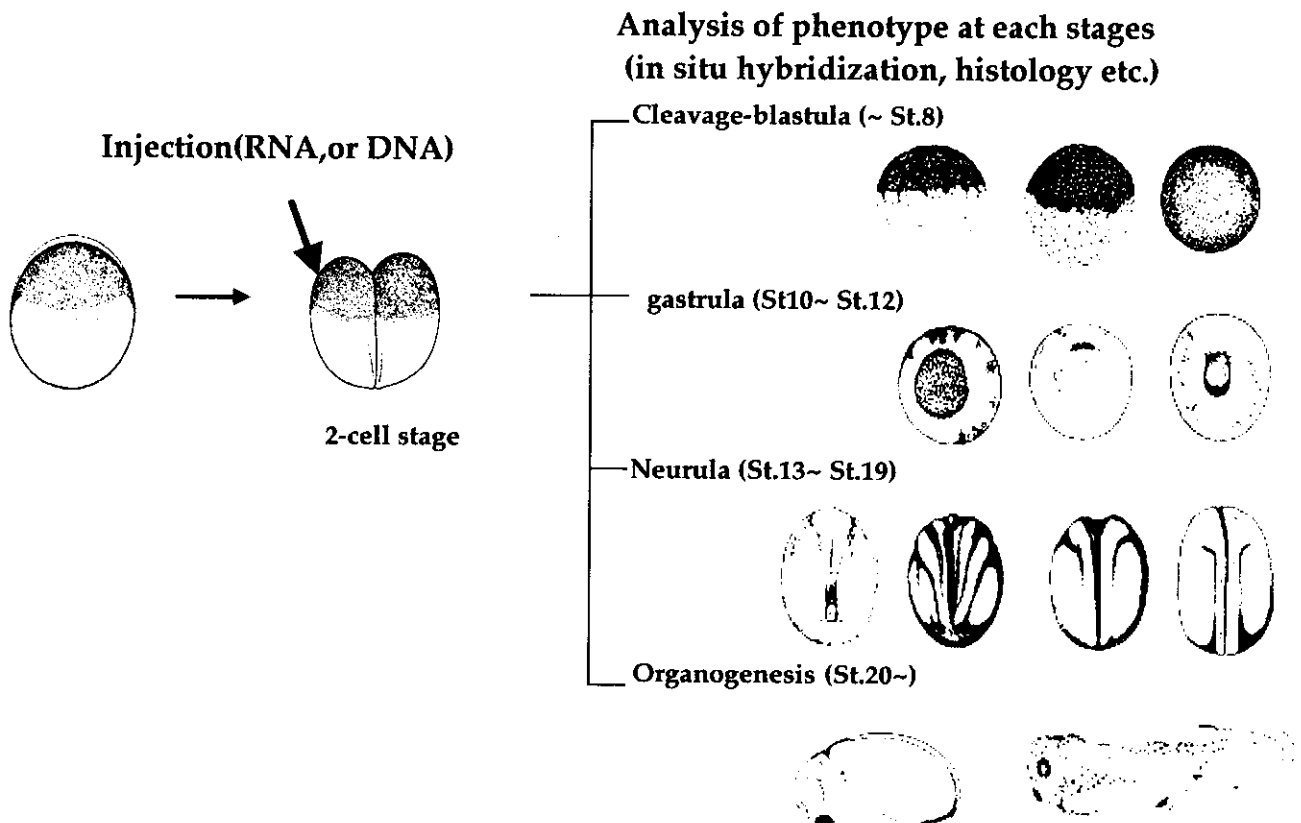
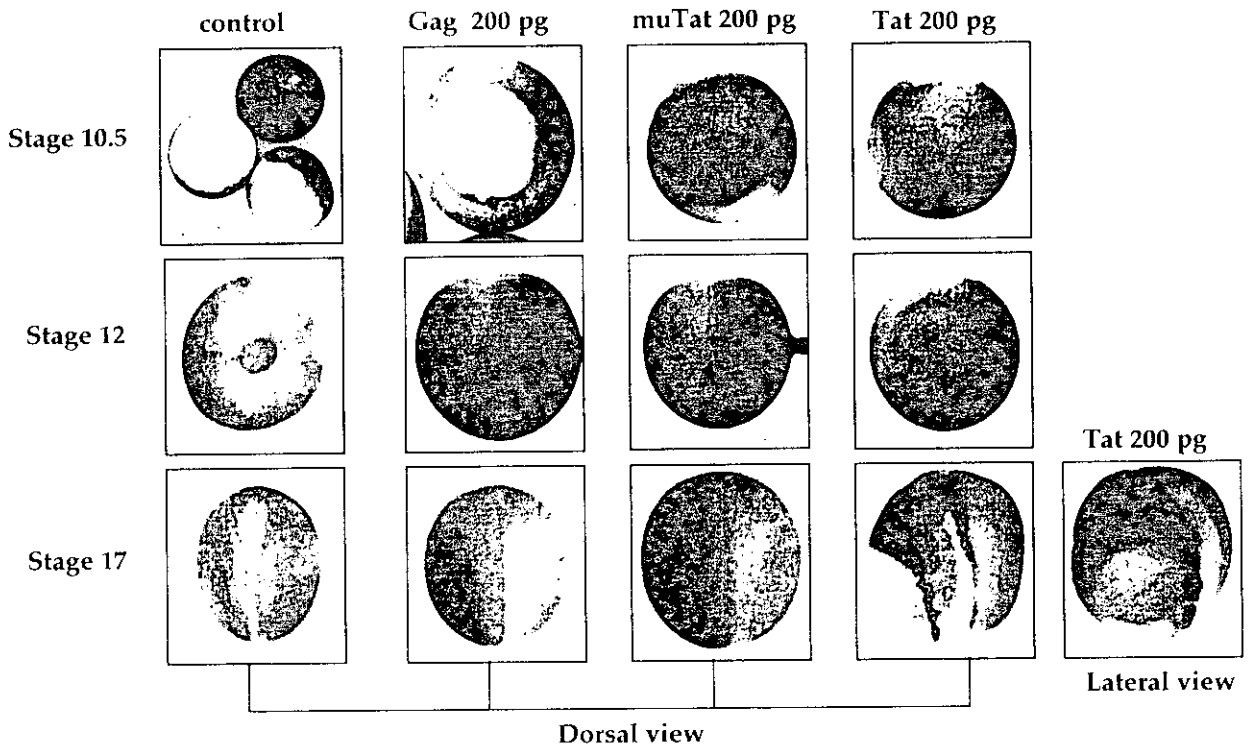


图 3-1 Over-expression of Tat in *Xenopus* embryos during early development



beta-Gal (Blue or red dye) indicate injected side of embryos with each RNA

图 3-2 Over-expression of Tat in *Xenopus* embryos during tailbud development

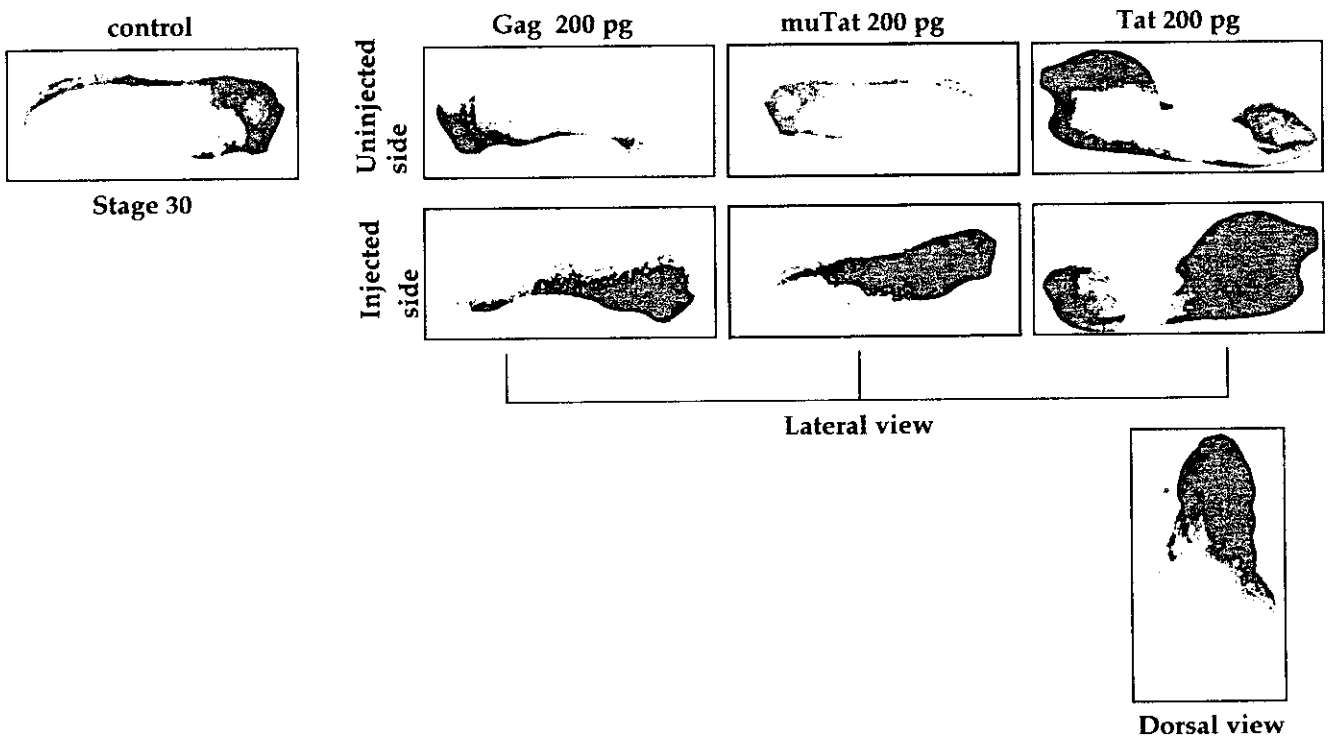
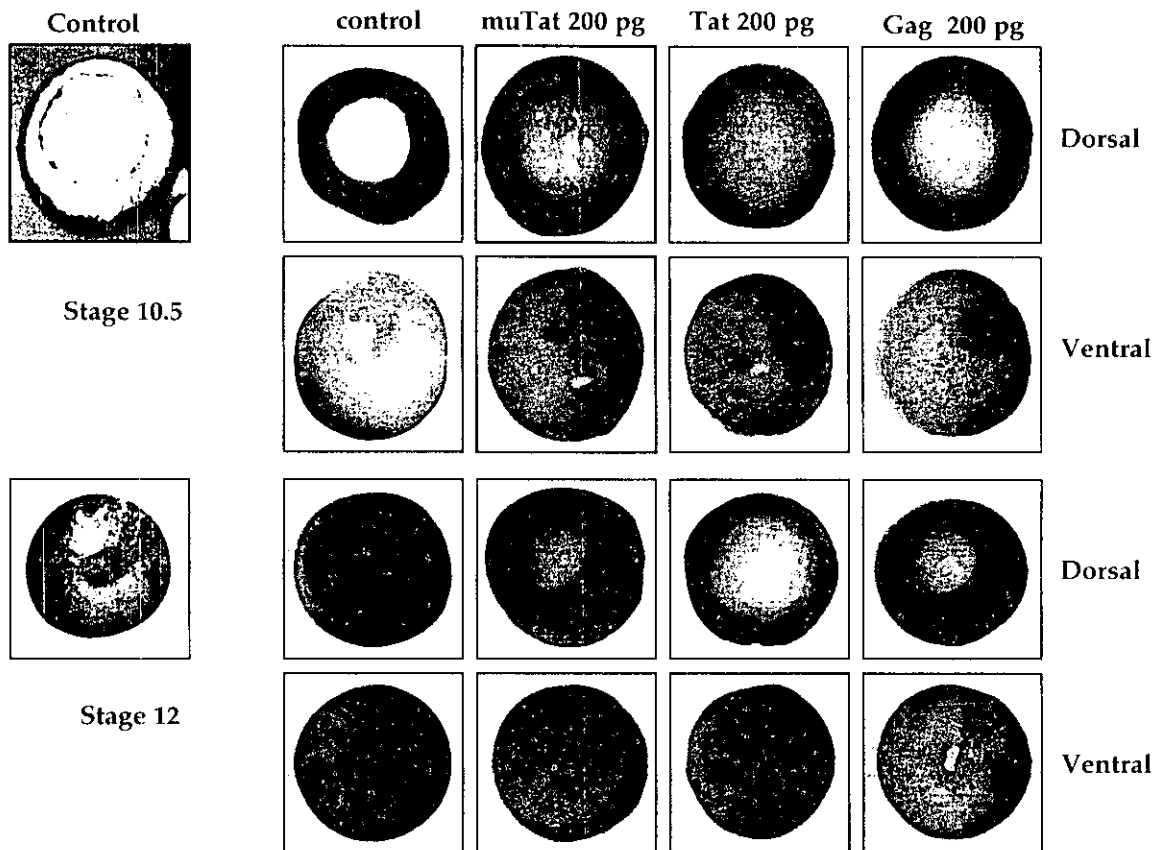


Figure 4 Inhibition of Xbra expression by HIV-1 Tat



beta-Gal (red spots) indicates injected side of embryos with each RNA.

Blue staining at dorsal view indicates expression of Brachyury (Xbra).

ベクターを基盤とした HIV ワクチンの問題点とその実用化に関する研究

分担研究者 山本直樹 国立感染症研究所・エイズ研究センター

研究要旨：HIV 感染の拡大の特徴や、病態解析の結果から第2世代のワクチンとしてリコンビナントベクターをベースにしたワクチン開発、あるいはリコンビナントベクターに DNA を組み合わせたワクチンが開発されている。しかし、HIV 感染は免疫不全に至る重篤な感染症であることから実用化につながる HIV ワクチンの解析が検討すべき課題となっている。本研究では実用化に結びつく候補ワクチンとしての HIV ワクチンの適合性について検討する。

協力研究者

本多三男、仲宗根正、松尾和浩、浜野隆一、染谷健二、川原守、海津雅彦、滝澤万里、泉泰之、原敬志、吉野直人、堀端重男、兼清優、浜武牧子、田中陽子（国立感染症研究所・エイズ研究センター）

A. 研究目的

現在、リコンビナントワクチンが HIV ワクチンの第2世代ワクチンとして開発されており、細菌性及びウイルス性ベクターを用いて極めて多くのワクチンが開発されつつある。しかし、HIV 感染症は長期にわたる極めて重篤な免疫不全を引き起こすことから HIV ワクチンとして実用化できるかどうかワクチン効果の判定に劣らず重要な課題となっている。従って日本における

HIV ワクチンの実用化を目指してリコンビナントワクチンとしての HIV 候補ワクチンの確立を目的にして日本独自のワクチン開発を検討する。

B. 研究方法

rBCG-HIV ワクチンの候補として以下の点について検討した。

1. 免疫不全動物における候補ワクチンの病原性の主な検討(例えばヌードマウス、種々の SCID マウス等の免疫機能不全動物を用いた候補ワクチンの接種による病原性の解析)
2. 通常の小動物モデルを用いた毒性の検討
3. サル（成人サル及び新生児サル）を用いた大量投与によるワクチン抗原の安

全性、安定性、毒性、環境汚染、免疫誘導の解析

ワクチン抗原の作製：本プロジェクトにおいて検討したワクチン抗原は

①ウイルス粒子用リコンビナント V3 蛋白抗原

②rBCG-Tokyo 172 をベクターに用いた以下の遺伝子を組み込んだ rBCG ワクチン

- ・ HIV-1 クレイド B, クレイド E の V3 遺伝子
- ・ HIV-1 クレイド B, クレイド E SIV の全 Gag 遺伝子
- ・ rBCG 全 Gag Pol 遺伝子
- ・ rBCG Tat 遺伝子
- ・ rBCG Env 遺伝子

③rDIs ベクターを用いて以下の遺伝子を組み込んだ rDIs ワクチン

- ・ rDIs SIV Gag 遺伝子
- ・ rDIs SIV Gag Pol 遺伝子

(倫理面への配慮)

所内に設置された動物実験委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

ベクターをベースにしたワクチンは以下の3つの方法によって作製されてきた。

- 1) 継代培養を続けることによって得られてきた変異株 (MVA, BCG ワクシニア DIs 等)
- 2) 遺伝子操作による不全型ベクターの開発 (サルモネラワクチンや NYVAC ワ

クシニア株)

- 3) ベクターワクチンを作製するために遺伝子導入を行うことによって得られる細菌性ワクチン (栄養要求型 BCG など)

これらのいくつかは既に動物用ワクチンとして汎用されていることから人間への実用化が可能と考えられている。しかし、本研究グループでは HIV/AIDS の特殊性を考慮に入れて免疫不全状態でもワクチンとして安全に機能するリコンビナントワクチンをベクターとして選別した。その結果 rBCG 及び rDIs ワクチンを作製することができた。さらに rBCG でプライミングし、rDIs でブースターをかけるプライムブーストの系を確立した。

また、これらのワクチンは既にベクターの持つ免疫誘導能を用いた相当疾患に対するワクチンとしても使用される可能性を有していることから、ワクチンベクターの先行免疫における HIV 候補ワクチンとしての免疫誘導能に対する既往症反応を解析し、BCG 免疫においては今回本プロジェクトで確立した rBCG プライミング rDIs ブースターのワクチンによる免疫誘導能が防御効果の誘導に関してはワクチンとして機能することが明らかになった。

D. 考察

生ベクターをベースにした HIV ワクチンの開発は第2世代ワクチンとして広範に開発研究が進められている。しかし、ワ

ワクチンの実用化に関しては安全性と免疫誘導能が極めて重要な課題としてとらえられている。安全性に関しては HIV 感染症が種々の免疫不全を伴うことからその対策が求められている。一方ワクチン効果については効果的な免疫誘導能を得るために重複免疫の必要性が推測されることや、先行するベクターのワクチンとしての免疫能の対する既往症反応の解析が、実用化における重要な解決すべき課題となっている。本研究では上記のプライムブーストレジメンによって克服できることが明らかになり、実用化の道を開くことができた。

E. 結論

現在の HIV 感染に対応すべく安全性とワクチン効果の誘導に優れた rBCG rDIs のプライムブーストワクチンを開発した。このワクチンは生ベクターをもとにした種々のワクチン開発において実用化のために既往症反応を克服できるレジメンとして開発されていることが明らかになった。他のベクターに比べてベクター自体の安全性、安定性、供給性が極めて優れており、さらにリコンビネーションにおいてもその機能を保持することを明らかにし、BCG およびワクシニア DIs をベクターに用いたリコンビナントワクチンの道を開いた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

無し

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1) 特許取得 無し

2) 実用新案登録 無し

3) その他 無し

厚生労働科学研究費補助金(創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業) 分担研究報告書

ワクチンの有効性、安全性に関する病理学的解析 -rBCG-GagE ワクチンの安全性評価に関する研究-

分担研究者：佐多徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）

研究協力者：Sanya Sukpanichnant（マヒドン大学病理）

研究要旨：エイズワクチンの開発ではその有効性評価とともに、安全性評価が重要である。今回31頭のサルを用いて、rBCG-GagE ワクチンの単独皮内投与ないし経口投与、さらにプライム・ブースト法による rDIs-GagE の追加投与を行い、その接種局所および所属リンパ節、ほかの臓器組織について病変の有無を肉眼的および病理組織学的に検討した。その結果、皮内投与では対照群の BCG 東京株を投与したときに所属リンパ節の乾酪壊死病巣がみられたが、rBCG-GagE ワクチン投与群では肉芽腫も乾酪壊死病変も認められなかった。皮内接種を用いれば重篤な副病変は起こらないと考えられる。ほかの臓器組織についてさらに検討することで、安全性について評価が可能と考えられた。

A. 研究目的

多くの努力にもかかわらず、HIV 感染者はいまだに増加しており、全世界で4000万人を越えた。HIV 感染者およびエイズ発症者に対し HAART が開始され、CD4 数の改善とともに日和見感染症の発症阻止および症状の劇的改善もたらされ、エイズ患者の予後は著明に改善した。しかしコンプライアンスや治療のコスト、そして治療の継続性に大きな問題が残されている。一方、開発途上国での薬物治療は上記の点で大きな期待はできず、エイズの蔓延防止には感染予防に優る方法はない。HIV ワクチンは早くから開発が試みられ、すでに臨床治験も行われているものもあるが、いまだにその有効性は十分確認されていない。ワクチン開発にはその有効性とともに、使用に当たって副作用がないことを確認する安全性評価は欠くことのできないものである。HIV ワクチン開発には、モデル動物としてマカク属サルとウイルスとして HIV の代わりに SIV や SHIV を用いて、その有効性や安全性の評価に動物実験が行われている。

今回、rBCG-GagE およびワクシニア DIs 株を用いたワクチン候補についてカニクイサルを用いて、安全性について検討することを目的とした。すべての解析が終了したわけでは

ないので、その途中経過について報告する。

B. 研究方法

1) 実験動物：3-5才のカニクイサル計31頭を用いた。

2) ワクチン候補：タイ型の Gag タンパクを発現するように組み換えた rBCG-GagE および対照として BCG 東京株、および rDIs-GagE と対照として rDIs-LacZ を使用した。その詳細は別の報告に譲る。

3) 実験スケジュール：二つの実験群に分けた。グループ1は、rBCG-GagE および対照の BCG 東京株の一回投与群で、12頭のサルからなっている。rBCG-GagE は5mg と50mg を各3頭、対照として BCG 東京株を5mg と50mg を各2頭のサルに右大腿に皮内接種した。ほか rBCG-GagE ワクチンを800mg を2頭のサルに経口投与した。グループ2は、プライム・ブーストによる投与方法で、対照として BCG 東京株と rDIs-LacZ の組み合わせを各2頭のサルに、それぞれ50mg 皮内接種と 10^8 pfu 皮内接種および800mg 経口投与と 10^8 pfu 皮内接種を行った。rBCG-GagE を5mg, 50mg の皮内接種、および800mg の経口投与

と rDis-GagE 10⁸pfu 皮内接種を組み合わせたもの、さらに rDis-GagE 10⁸pfu 皮内接種および rDis-LacZ 10⁸pfu 皮内接種のそれぞれ単独投与を各3頭に行った。グループ1は12週後に、グループ2は12週後と18週後にブースター投与を行い24週後に、それぞれのサルを剖検した。

4) 病理組織検索：麻酔薬の過剰投与と全採血後に、それぞれのサルのワクチン接種部位、近傍の鼠径部リンパ節の状態、連続する腹腔内リンパ節、さらに腸間膜リンパ節の観察と写真撮影を行い、全身諸臓器の肉眼観察を行った。それぞれの臓器重量を計測したのち、各臓器組織から凍結組織と凍結標本を採取し、残りをホルマリンで固定した。固定組織標本から適切な場所を切り出し、通常のごとくパラフィンに包埋した。4ミクロンの組織切片を作製し、HE染色、抗酸菌染色、BCG抗体や HIVp24抗体等を用いて LASB法で免疫染色を行った。組織標本は病理医二名で組織検索を行った。

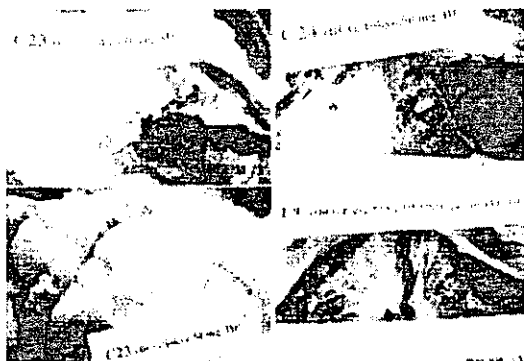
(倫理面への配慮)

国立感染症研究所動物実験委員会の承認のもとに行い、動物愛護の観点から動物実験を行った。ヒトの材料等は使用していないので、倫理上問題にはならない。

C. 研究結果

今回はおもにリンパ節について検討した。検討したリンパ節は、鼠径リンパ節、腋窩リンパ節、腸間膜リンパ節、顎下リンパ節およびそのほかのリンパ節である。

肉眼的には BCG 東京株を皮内接種した部位には特に著変は認められなかった。しかし、所属リンパ節である鼠径リンパ節では、50 mg 投与群でリンパ節の腫大があり、色はと黄色調に変化していた。リンパ節の断面では乾酪

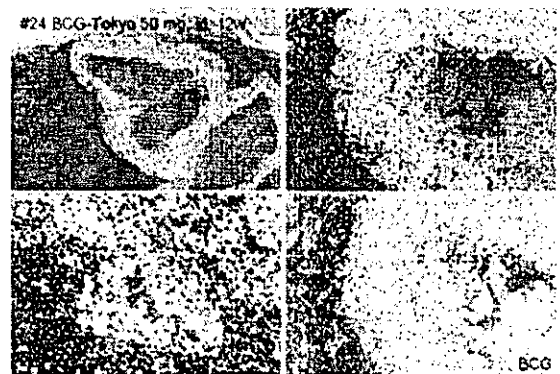


(図1)

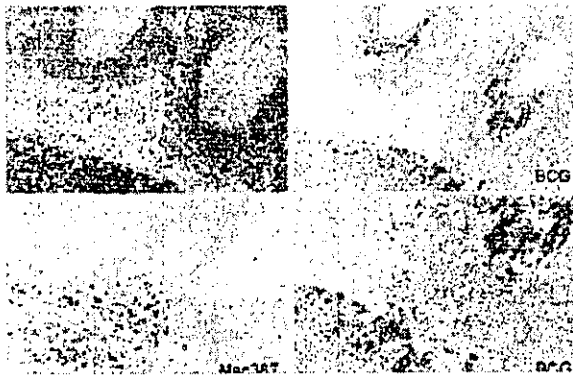
壊死巣が認められた(図1)。ほかの実験群のサルでは接種部位や所属リンパ節には著変を認めなかった。しかし、800 mg の経口投与群では軽度の腸間膜リンパ節の腫脹が認められたが、断面に乾酪壊死病変はみられなかった。

組織学的には、対照とした BCG 東京株 50 mg 皮内接種群では所属リンパ節に中心部が壊死となり、類上皮細胞の増生と多核巨細胞をまじえる大きな乾酪壊死病変が、肉眼所見に一致して認められた(図2)。抗酸菌染色や抗 BCG 抗体による免疫染色では陽性所見は認められなかった。また BCG 東京株を 5 mg 皮内接種したサルでは、リンパ節の辺縁洞と髄質内に胞体の大きなマクロファージの集簇巣がみられ、リンパ濾胞は二次濾胞が発達していた。BCG 抗体による免疫染色ではこれらのマクロファージの細胞質内に粗大顆粒状の陽性所見が認められた。またリンパ濾胞に二次濾胞の皮質寄りの部分に編み目状の陽性所見が認められた(図3)。抗酸菌染色では陰性であった。これと同様の組織変化および免疫組織化学所見が、rBCG-GagE を 5 mg ないし 50 mg 投与群のサルの表在リンパ節で認められた(図4、図5)。いずれも12週で目立ったが、24週後のリンパ節にも認められた。しかし乾酪壊死病変や肉芽腫性変化はみられなかった。

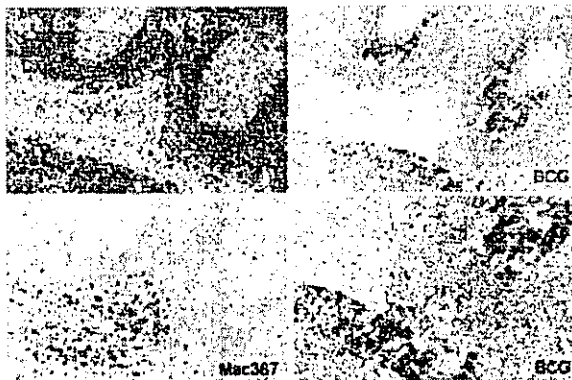
ほかの臓器組織では BCG ないし rBCG によると考えられる肉芽腫性病変はごく一部にのみしか認められていない。Dis によると考えられる病変は明らかではない。一部のサルに寄生虫とこれに関わる肉芽腫性変化がみられた。



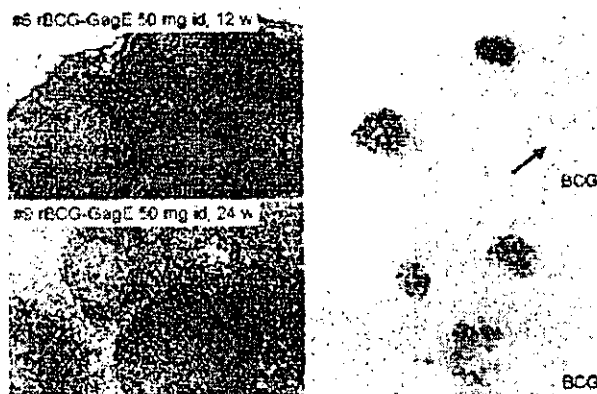
(図2)



(図 3)



(図 4)



(図 5)

D. 考察

この実験以前に 10 頭の若年 (6-18ヶ月) および成年 (5-6才) のサルを用い、BCG 東京株ないし rBCG-GagE 株を 50 mg 皮下投与、ないし 800 mg の経口投与を 2 回 6 週間隔で投与した実験がある。この場合、接種部位の膿瘍病変がみられ、経過観察中に潰瘍となり、3 週後には完全に治癒した。所属リ

ンパ節は腫大した。剖検時には軽度の腫大がみられるほか肉眼的には著変はみられなかった。組織学的には対照群で肺、肝臓、リンパ節にラ氏型多核巨細胞を伴う肉芽腫が観察された。しかし rBCG-GagE の皮下接種群では軽度の肉芽腫性変化がリンパ節や肝臓で認められた。800 mg の経口投与群では腸間膜リンパ節の軽度の腫大ほか、著変を認めなかった。つまり、皮下接種では接種部位と所属リンパ節に肉眼病変が認められ、臓器内にも組織病変を起こしていた。皮下接種後にリンパ性のみならず、一時的にも菌血症を起こしたと考えられた。

今回は皮下接種から皮内接種に投与方法を切り替えた。同量のワクチン株を投与しても接種局所の膿瘍や潰瘍病変を起こすことがなかった。しかし、対照群で所属リンパ節の乾酪壊死病変を認めた。rBCG-GagE 投与群では所属リンパ節やほかの臓器組織に乾酪壊死病変や肉芽腫性変化は一部のみ認められたが、皮内投与により安全性が高まったと考えられた。今回接種した量は実際の BCG 投与量 0.1 mg の 50 倍から 500 倍量を投与したので、実際の使用量では病変はかなりの程度低くなるか、あるいは全くみられないものと予想される。

BCG 抗体でリンパ濾胞に編み目状の陽性所見が対照群および実験群ともに、12 週や 24 週でも認められた。この免疫染色所見は濾胞樹状細胞の染色パターンと一致する。HIV や SIV 感染後のリンパ節腫脹の際にみられる所見と一致する。BCG 抗原が体内で産生され、これが一部のリンパ節樹状細胞の細胞表面でトラップされているものと考えられる。試しに HIVgagP24 抗原の有無を検索したが、現在まで陽性所見は観察されていない。興味ある所見であるが、今後の検索にゆだねたい。

E. 結論

rBCG-GagE ワクチンの皮内接種および経口投与では実験サルの臓器組織に重篤な病変は認められなかった。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）
「HIV 構造遺伝子と HIV 制御遺伝子のコンビネーションワクチンの開発に関する研究」班
分担研究報告書

リコンビナントワクチニア HIV ワクチンのプロダクションリサーチに関する研究
分担研究者 杉本 正信 株式会社ジーンケア研究所副所長

研究要旨

ワクチニアウイルス組み換えワクチンである rDIs/SIVgag の細胞培養を用いた製造方法について調査研究を行った。使用細胞は鶏胚より得られた初代培養細胞を用いる。培養方法はローラボトル法とマイクロキャリアを使用した攪拌培養法（マイクロキャリア法）があり、それぞれ一長一短がある。これら方法の具体的な技術と、その長所短所について報告する。

A. 研究目的

ワクチニアウイルス組み換えワクチンである rDIs/SIVgag の細胞培養を用いた製造方法の調査研究を行う。

B. 研究方法

研究分担者および研究協力者である大石和恵（国立感染症研究所、協力研究員）および木所稔（国立感染症研究所）はそれぞれワクチニアウイルスの製造やその組み換えウイルスワクチン開発に携わってきたので、その経験を踏まえ、調査を主体に研究を行った。

（本件はワクチンの製造に関するもので、人体接種や人体材料を直接扱わないので、倫理面の特別な配慮は必要としない）。

C. 研究結果

rDIs/SIVgag は鶏胚ないし鶏胚由来の初代培養細胞でしか増殖できないことが分かっているので、鶏胚由来初代培養細胞を用いて製造することを前提とした。

これまで天然痘ワクチンに用いられてきたワクチニアウイルスはウシに接種し、皮膚の膿瘍から得ていた。ワクチニアウイル

スの細胞培養を用いた製造は、国産の LC16m8 株が世界で最初である。最近バイオテロとの関連で種痘接種が世界的に再開され、その目的で英国の Acambis 社および米国の Baxter 社が共同で開発したワクチン株（ACAM2000）は Vero 細胞を用いた細胞培養法で製造された。したがって、ワクチニアウイルスの細胞培養の製造は最先端の技術に属するといえることができる。次に、日本で具体的に実施されたローラボトル法とマイクロキャリア法を紹介し、これに基づき、rDIs/SIVgag の具体的製造方法と提案したい。

ローラボトル法： 前述したように、LC16 株の開発が行われるまでは、天然痘ワクチンの製造は、VV を牛の全身の皮膚に接種し、その膿汁からウイルスを得るといった、極めて原始的な方法によっていた。そのために、製造工程中に菌の混入を避けることは事実上不可能であり、工程管理は至難の業であった。LC16m8 株は、ウサギ腎臓の初代培養細胞を用いて製造され、これも大きな技術的進歩であった。

千葉県血清研究所ではローラーボトル法によりワクチン製造を行い、昨年（2002年）の緊急製造もこの方法により行われた。基本的には現行の風疹生ワクチンの製造方法と同様である。幼齢ウサギの腎臓を無菌的に摘出し、トリプシン等のプロテアーゼ（現在は細菌由来のディスパーゼを使用）により細胞を1個1個に分散させる。それを増殖培地（4%FCSと4%CSを含むLH培地）に浮遊させローラーボトル当たり 5×10^8 の細胞を播き込む。37℃で4日間回転培養し、細胞が confluent になった状態で種ウイルスを $\text{moi}=1.0$ で接種する。ウイルスを吸着後細胞表面を培地で3回洗い、維持培地（0.2%gelatinを含む199培地）を加え、細胞全面にCPEが現れるまで30℃で2~3日回転培養する。ウイルスのハーベストは、ローラーボトルを振とうすることにより感染細胞を浮遊させ、これを低速遠心で回収することにより行う。風疹ウイルスとは異なりVVの場合、培養上清に放出されるウイルス量は全体の1/10程度しかないため、細胞画分のみをワクチンに使用する。この細胞沈さを少量の培地で再浮遊し、細胞内のウイルスを分散させるため超音波処理を施し、細胞片を除くため再び遠心処理を行い、その上清をワクチン原液として用いる。通常ウイルスのyieldはローラーボトル当たり $10^{10.2}$ PFU程度（200mlの培地）である。ワクチン原液を適当な希釈倍率で希釈し安定剤としてのソルビトールとペプトンをそれぞれ最終濃度5%加えて凍結乾燥する。前述したように、開発当時組織培養による凍結乾燥痘苗は最先端の技術によるものであった。

マイクロキャリア法： 一方、牛疫の組

み換えウイルスワクチンをウシでの感染防御実験に使用するために、桃木ら（1988）

（当時、東燃株式会社基礎研究所）によりマイクロキャリア法が使用された。この凍結乾燥ワクチンがウシでの感染防御実験に使用された。その概略は次の通りである。ウサギ腎臓の樹立細胞株RK-13をマイクロキャリア（サイトデックス1、ファルマシア社製）に付着させ、スピナーフラスコを用いて、攪拌培養した。培養期間は5~6日間程度である。マイクロキャリアの表面を細胞がほぼ覆ったのを確認し、ウイルス液を滴下して感染させた。培地交換を行うと2日ほどでウイルス量はほぼ最大に達した。気相は5%炭酸ガス-95%空気を用いたが、酸素を補給することでウイルスの産生量が増加することが分かった。2リットルのスケールでの培養では、 4×10^{10} pfu程度のウイルスを得ることができた。以上は、桃木 利明、飯島 信司、小林 猛（1988）マイクロキャリアによる動物細胞の培養とワクシニアウイルスの効率的生産 化学工学 52、41（化学工学協会第21回秋季大会学会抄録）による。

D. 考察

rDIs/SIVgagの製造方法の提案：本プロジェクトはタイとの共同研究であり、将来のワクチン製造はタイで行われる可能性があることも考慮して、製造方法を提案したい。マイクロキャリア法の利点は、システム工学を適用し、大量生産に向いていることである。事実、米国を対象に2億ドーズ以上を供給することになっているAcambis/Baxter社では、マイクロキャリア法を採用している。欠点は、システムを確立するためにかなり高度の技術と時間お