

ので、ベクターである BCG 抗原陽性部位での発現について免疫組織化学染色を用いて検討した。BCG 抗原陽性となったリンパ節組織において、HIVP24 抗原はいずれも認められなかった。また、rBCG/E-gag 50 mg 皮内投与群のサルにおいて、12 週および 24 週の剖検全組織を用いて nested PCR 法で検討したが、1 例のリンパ節のみ陽性でほかはすべて陰性であった。

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 皮内投与、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、1 回の接種量を 1 カ所の皮内に投与した結果、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。所属リンパ節も腫大した。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。rBCG-GagE の皮内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には著変を認めなかった。つまり、皮内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。皮内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。そのため、今回の 31 頭では、経口投与法は同じであるが、皮内投与法については右大腿部の皮内に摂取量を 10 回にわけて投与するように変更した。その結果、今回は接種局所の潰瘍性病変は認められなかった。

rDIs/LacZ ないし rDIs/E-gag 投与群では関連する組織変化は認められず、また rBCG/E-gag 投与に rDIs/E-gag を追加投与した群でも、rDIs/E-gag 投与に関連した組織変化はないと考えられた。さらに接種部位でのワクチニアウイルス抗原は陰性であり、剖検時にはベクタ

ーである DIs 株は残存していないと考えられた。BCG/Tokyo 株投与群では 5 mg の少量投与群では類上皮細胞肉芽腫がみられることはあっても乾酪壊死病変は認められない。しかしリンパ節の辺縁洞や胚中心に BCG 抗原が検出できる。50 mg 投与群では接種近傍のそけいリンパ節に乾酪壊死病変があり、ほかリンパ節内に BCG 抗原がみられる。しかし、rBCG/E-gag 投与群では 50 mg 投与群でもリンパ節内には BCG 抗原陽性組織球が観察されたが、乾酪壊死病変や類上皮細胞肉芽腫はみられず、肉芽組織変化のみであった。経口投与群においても同様で、一部のサルでは経口投与によりリンパ節へ病変を作るが、大部分では特異的所見はみられなかった。したがって、rBCG/E-gag 投与では安全性が高まっていると考えられた。また、組換えワクチニアや BCG に挿入された HIV-E-gag 抗原は接種部位や BCG 抗原陽性部位でも発現は免疫染色では検出できず、gag 遺伝子は BCG 抗原陽性となったリンパ節においても 1 例以外はすべて陰性であった。皮内に 10 回に分けて投与する方法では、少なくとも 1 2 週時点で挿入された gag 遺伝子は検出感度以下ないし残存していない可能性が考えられた。ベクターとして使われている BCG 遺伝子については検討中である。

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接種部位や全身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

Izumi Y, Ami Y, Matsuo K, Someya K, Sata T, Yamamoto N, Honda M.: Intravenous inoculation of replication-deficient recombinant vaccinia virus DIs expressing simian immunodeficiency virus gag controls highly pathogenic simian-human

immunodeficiency virus in monkeys. J Virol 2003,
77: 13248-13256.

2. 学会発表 なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし。

2. 実用新案登録 なし。

3. その他 なし。

HIV/AIDS ワクチンのためのベクターの開発
松尾和浩 国立感染症研究所 エイズ研究センター

研究要旨

有効かつ、安全、安価なエイズワクチンを開発するため、既に人に対するワクチンとして使用されている、BCG とワクシニアウイルス DIs のワクチンベクターとしての開発を行った。HIV-1 及び SIV 由来 Gag 抗原を高発現できる組み換え BCG (rBCG) と組み換え DIs (rDIs) の構築に成功し、いずれも動物モデルで顕著な免疫誘導能を有することを明らかにした。Tat については、発現株を構築できなかったが、env については rBCG で発現株が得られ、逆転写酵素 RT (pol) についても、rBCG, rDIs の両方で発現株が得られた。Gag 単独の現行の候補ワクチンでも、prime & boost regimen により感染防御に有効なレベルまで免疫誘導能を増強できるが、より有効性の高い第 2 世代のワクチンを開発するため、rBCG でのコドン最適化という戦略も含めて、gag+env, あるいは gag+env+pol を発現する rBCG 及び rDIs の確立と評価が、今後の重要な課題である。

A. 研究目的

今日の発展途上国における HIV 感染の拡大を鑑みると、エイズ感染予防ワクチンの要件として、有効な感染防御免疫を誘導できることは勿論であるが、それに加えて安全性が高いこと、安価にかつ安定に供給できることが重要である。我々は安全、安価で実用化の可能性が高いという観点から、BCG 及びワクシニアウイルス DIs 株のワクチンベクターとしての開発を行った。本研究では、種々の HIV-1 及び SIV 由来抗原遺伝子上記、2 種のベクターに組み込み、高発現株を得ること、組み換えワク

チンの実験室レベルでの調製と動物モデルでの免疫原性の評価を目的とした。

B. 研究方法

CRF01_AE 臨床株由来 gag 及び逆転写酵素 (RT) 遺伝子は、タイ人 HIV 感染者の provirus DNA より PCR 法により増幅して用いた。HIV-1 subtype B 及び SIV 由来 gag 遺伝子は、それぞれ感染性分子クローン pNL4-3, SHIV C2/1 を鋳型として PCR で増幅した。CRF01_AE env 遺伝子は、92TH022 分子クローンを鋳型として PCR で増幅した。SHIV C2/1 由来 tat 遺伝子

(cDNA) は、国立感染症研究所 阪井先生より分与頂いた。rBCG 作製においては、それぞれの遺伝子をまず hsp60 promoter の下流に繋いだ後、大腸菌 - 抗酸菌シャトルベクター pSO246 (長崎大学 山田先生より分与) に導入して、BCG 東京ワクチン株にエレクトロポレーション法により形質転換した。カナマイシン含有 7H10 寒天培地上で形質転換体を選択後、7H9 液体培地中で震盪培養することにより、rBCG 株を得た。rDIs 作製においては、まずそれぞれの遺伝子をワクシニア p7.5 promoter の下流に繋いだ後、DIs ゲノムの主要欠失部位への外来遺伝子 transfer vector pUC-DIs に導入する。そのプラスミドベクターを rDIs-lacZ を感染させた鶏卵胚繊維芽細胞 (CEF) に transfection して、X-gal 含有 MEM 寒天培地上で無色になったプラークを選択し、同様の操作を繰り返すことにより、クローン化 rDIs ウイルスを得た。rBCG 及び rDIs 感染 CEF における抗原発現は、それぞれの抗原特異抗体を用いたウエスタンブロット法により解析した。抗原発現を確認できた rBCG 株は、30 µg/ml のカナマイシンを含む 7H9 培地で2週間震盪培養し、集菌後、生理食塩水で洗浄して動物実験に用いた。rDIs 株については、5% FCS 含有 MEM 培地中、CEF monolayer で5日間培養後、細胞と上清を混合し、sonication 後、シェークコース密度勾配遠心法にて粗精製して用いた。動物での細胞性免疫誘導能の解析は、リンパ球増殖反応 (LP)、インターフェロン gamma-ELISPOT 及び Cr リリース法による CTL assay 等により行った。

(倫理面への配慮)

当該研究はマウスを用いた動物実験を中心に行っており、ヒトに対する倫理面に関しては特に問題ない。またマウスを用いた動物実験における動物愛護上には十分に配慮し国立大学実験動物施設協議会指針に基づいた研究を遂行している。さらに BCG 東京株の生菌を使用しておりヒトへの感染に対するバイオハザードには十分に注意をしている。

C. 研究成果

1 BCG ベクター

BCG はヒトに用いられている細菌ワクチンの中で、重篤な副作用を起こす頻度が極めて低く、安全性が高いことで定評がある。生産コストも低く、発展途上国への安価な供給も可能である。この系を用い、HIV-1 subtype E (CRF01_AE)を主な標的として、種々の HIV 抗原発現を検討した。**Gag p55.** Gag 前駆体 p55 については、HIV subtype B, CRF01_AE 及び SIV 由来のいずれも BCG 菌体内で安定に発現させることができた。それぞれの組み換え BCG (rBCG-Gag)の免疫誘導能を小動物とカニクイザルで検討し、Gag 特異的な細胞性免疫を priming できることが判った。

逆転写酵素 (RT) . より多くの CTL epitope に対する免疫誘導を得るため、gag に加え、pol 遺伝子をも組み込んだ rBCG の構築を検討した。CRF01_AE 由来の RT が BCG で高発現でき (rBCG-RT)、マウスで RT 特異的な細胞性免疫を誘導できることを確認した。また、上記 rBCG-Gag に RT 遺伝子を導入して、Gag と RT の両方を発現できる rBCG 株も構築できた。

Env gp120 & gp41. Prototype の

rBCG-Gag ワクチンでは、ウイルス中和抗体の誘導が期待できない。そこで env 遺伝子 (gp120 及び gp41) を、現行の gag 遺伝子を組み込んだコンストラクトに加えることは極めて魅力的である。まず、CRF01_AE 由来 full length の env (gp160) 遺伝子を導入した所、発現が認められなかったため、gp120 と gp41 の部分に分けて発現を試みた所、シグナルペプチド (SP) 部分を欠失した gp120 と gp41 で発現が認められた。SP を欠失させた gp160 は検討中で、今後最適のものを用いて Gag+Env の構築を目指すこととした。

制御遺伝子 Tat. SHIV C2/1 由来 tat cDNA を用いて、Full length の Tat 蛋白質の発現を試みたが、発現は認められなかった。種々の tat 遺伝子断片を抗酸菌の alpha 抗原遺伝子に fuse させて発現させる系も試みたが、N 末端から 20 アミノ酸をコードする断片しか発現できなかった。

Codon usage の最適化. 組み込む遺伝子の codon usage を最適化、発現レベルを増強することにより、rBCG 自身の免疫誘導能を向上させられるかどうか検討した。Subtype B の Gag p24 について codon optimization を行い、native gene との比較を行った所、p24 発現レベルは飛躍的に上昇し、マウスにおける細胞性免疫誘導能も増強された。この方法を、full length の gag 遺伝子 (CRF01_AE と SIVmac 由来) に応用し、高発現株を得た。その評価を、現在継続して行っている。

2 増殖能欠損型ワクシニアウイルス DIs ベクター

ワクシニアウイルス DIs は、大連株の継代培養により得られた弱毒株で、

ゲノムの部分的欠失により、ほとんどの動物細胞での増殖能を欠損している。1971 年に smallpox ワクチンとしての臨床試験が幼児を対象に行われたが、免疫原性が弱く、開発に失敗している。ただ全く副作用がなく、安全性には極めて優れている。人に対するワクチンとして実際に応用された MVA 株と比較して、より弱毒化されたウイルスであると考えられる。このウイルスに外来遺伝子を導入した rDIs が実際に免疫誘導能を有するかどうかを検討するため、種々の組み換えウイルスを作製し、評価を行った。

Gag p55. HIV subtype B, CRF01_AE 及び SIVmac 由来 Gag p55 遺伝子をそれぞれ DIs 株に組み込み、発現株を得た。いずれもマウスまたはサルにおいて、高い CTL 誘導能を示し、免疫原性を持つことが判った。rDIs-SIVgag については、iv 投与、iv チャレンジの系で SHIV C2/1 の感染を partial ではあるが、防御できることが判った。また、rBCG-SIVgag との組み合わせによる prime-boost regimen により、細胞性免疫を飛躍的に増強できることが判った (本多ら)。

逆転写酵素. HIV-1 CRF01_AE 由来 RT を発現する rDIs-RT を得た。rBCG-RT との prime & boost regimen を含め、マウスでの免疫誘導能を解析中である。

Env gp120 & gp160. HIV-1 CRF01_AE, subtype B について、現在、構築を行っている。

Tat. 変異型 tat 遺伝子 (tat cDNA に 2 points の変異を人工的に導入し、trans-activation 活性を欠失させたもの) を DIs に組み込み、発現株を得たが、凍結保存しておいた rDIs-Tat

ウイルスは、chick embryo fibroblast でのプラーク形成能を失っていた。評価が困難なため、pending とした。

D. 考察及び結論

rBCG, rDIs いずれにおいても、gag 遺伝子と RT 遺伝子は安定に保持され、それぞれの抗原を高発現することが判った。これは、いずれも元来細胞内に局在化している蛋白質であり、細胞内の安定性が抗原の発現に重要であると考えられる。今後、異なるサブタイプの HIV をターゲットにした場合でも、gag 及び RT については高発現株を得ることは容易であろう。Env についても、SP 部分を欠失させることにより、rBCG で高発現させられることが判ったので、gag と env を同時に組み込んだワクチンの構築も可能と考えられる。一方、tat については rBCG では高発現株が得られず、rDIs においても組み換えウイルス自身が不安定で、目的とした候補ワクチンは得られなかった。より安定な抗原との融合蛋白質として発現させるなどの工夫が必要である。

rBCG-Gag 及び rDIs-Gag について、免疫誘導能を評価し、それぞれ単独でも有意な細胞性免疫誘導能を有するが、rBCG-Gag で priming し、rDIs-Gag で boosting することにより、感染防御に有効なレベルまで増強できることが、本多らのサルを用いた評価で明らかになったので、今後は、gag と共に env 遺伝子あるいは pol 遺伝子を高発現できる rBCG と rDIs を構築し、防御能がさらに向上するかどうかを評価することが重要である。

Gag 遺伝子の使用コドン、BCG で高頻度に用いられているものに最適化することにより、抗原発現と細

胞性免疫誘導能を増強できることが判ったので、この方法により、rBCG の dose を、人に接種できる量以下に下げることが可能となり、より有効かつ安全なワクチンの開発にむけて、サルでの評価が待たれる。

E. 健康危険情報 特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishii, K., Y. Ueda, K. Matsuo, Y. Matsuura, T. Kitamura, K. Kato, Y. Izumi, K. Someya, T. Ohsu, M. Honda, and T. Miyamura. 2002. Structural analysis and application of vaccinia virus DIs strain as a completely replication-deficient viral vector for HIV vaccine. *Virology* 302:433-444.
2. Izumi, Y., Y. Ami, K. Matsuo, K. Someya, T. Sata, N. Yamamoto, and M. Honda. 2003. Intravenous inoculation of replication-deficient recombinant vaccinia virus DIs expressing simian immunodeficiency virus gag controls highly pathogenic simian-human immunodeficiency virus in monkeys. *J. Virol.* 77:13248-56.
3. 松尾和浩 2003. エイズワクチン研究の新展開 化学と生物, 41: 731-737
4. Hamano, T, P. Sawanpanyalert, H. Yanai, S. Piyaworawong, T. Hara, S. Sapsutthipas, J. Phromjai, S. Yamazaki, N. Yamamoto, P. Warachit, M. Honda and K. Matsuo. 2004. Determination of HIV-1 CRF01_AE gag p17 and env-V3 consensus sequences for HIV/AIDS vaccine design. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, in press.

2.学会発表

1. 松尾和浩, 泉 泰之, 大洲竹晃, 浜野隆一, 網 康至, 阪井弘治, 仲宗根 正, 本多三男 2001. SIV-Gag 抗原発現型組換え BCG 及び組換え vaccinia virus DIs 株によるカニクイザルでの免疫誘導能と感染防御能の評価

第 15 回 日本エイズ学会学術集会総会、京都

2. Matsuo, K., T. Nakasone, Y. Izumi, Y. Ami, T. Ohsu, T. Hamano, N. Yamamoto, S. Yamazaki, and M. Honda 2002. SIV Gag-expressing recombinant BCG-prime and recombinant vaccinia virus DIs strain-boost regimen evokes protective immune response in monkey. XIV International AIDS Conference, Barcelona, TuOrA1222.

3. 松尾和浩 2003. タイにおけるエイズワクチンの臨床開発に向けた取り組み

第 17 回 日本エイズ学会学術集会総会 シンポジウム、神戸

G.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ーを使用した攪拌培養法（マイクロキャリアー法）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。また、バイオテロ対策の関連で天然痘ワクチンの開発や製造に関連し進展があり、その点の調査についても触れた。

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うことができる。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ー法を紹介し、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°C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°C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（200 ml 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。

マイクロキャリアー法：一方、牛痘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ー法が使用された。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ー（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。マイクロキャリアー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）マイクロキャリアー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。マイクロキャリアー法の利点は、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、マイクロキャリアよび投資を必要とする点である。ローラボトル法は比較的単純であり、設備投資などはそれほど要しない。なお、培養液あたりのウイルスの収率は、上述したように、ローラボトル法の方が少し上回っている（ローラボトル法、 $10^{10.2}$ PFU/200 ml；マイクロキャリア法： 0.4×10^{10} pfu/200 ml）。ただし、製造しているワクチンが異なるために厳密な比較はできない。上述した方法ではいずれもウサギ腎臓細胞を用いて LC16m8 ないし LC16mO の組み換えウイルスの製造を行っているが、鶏胚細胞を用いた rDIs/SIVgag の生産もほぼ同様に行えると思われる。なお、製造したあとの、ワクチンの品質検査については、以下の項目を含む、多くの検査が必要であるが、ここでは簡単な記載にとどめたい。

- ・ウイルス価の測定
- ・マイコプラズマを含む汚染微生物の試験
- ・汚染ウイルスの試験
- ・培養細胞の癌原性試験
- ・組み換えウイルスの遺伝的安定性：継代接種
- ・感染防御能
- ・副作用試験

最近のベクターおよび組み換えウイルス開発の動向

ワクチニアウイルスワクチンとそのベクター開発に関する研究開発は、2001 年の同時多発テロを契機とした、バイオテロの危険性の増大に伴い、非常に盛んになってきた。この点について触れておきたい。

1) Acambis 社の開発ワクチンについては前述したとおりである。

一法を採用している。欠点は、システムを確立するためにはかなり高度の技術と時間お

2) Bavarian Nordic 社（ドイツ）はバイオテロおよび組み換えウイルスベクターのために、MVA-BN 株の製造を今年より始める。この株は Modified Vaccinia Ankara (MVA)由来であり、エイズのような免疫不全の患者にも接種可能であるとしている。また、HIV nef 遺伝子を用いた組み換えウイルスワクチンのフェーズ I/II の臨床試験が進行中とのことである。参考資料：Update of Bavarian Nordic's development of MVA-BN as a safe 3rd generation smallpox vaccine. Bavarian Nordic GmbH.

3) バイトテロとの関連 米国は 2003 年にはこの分野の予算として約 6000 億円を計上した。バイオテロの予防に計上された予算の 85%はワクチン開発に関するものである。これまでに述べてきた企業以外で、ワクチン開発を行っているのは、Case Western Reserve University、Gene Therapy Systems, Inc.、Therion Biologics Corp.、University of Pennsylvania（いずれも米国）である。詳細は不明であるが、培養細胞を利用したワクチン生産が想定される。資料：Biodefense: An analysis of strategic opportunities. (2003) Front Line Strategic Consulting, Inc. USA.

E. 結論

上述したような調査研究の結果、次のような結論に達した。まず、開発の初期の段階では、技術的にも容易で大きな投資を必要としないローラボトル法が推奨される。次に、プロジェクトが発展し、たとえば、アフリカを含め世界的に大量のワクチン生

産を行うためにはマイクロキャリア法が好ましい。なお、本調査研究は細胞培養に焦点を絞ったが、鶏胚を用いた生産を否定するものではない。なお、バイオテロとの関連で天然痘ワクチンに関する開発は米国を中心に非常に活発になっており、製造面でも今後大きな進展の可能性はある。

F. 健康危険情報

関係しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

杉本 正信 (2002) バイオテロで蘇る国

産天然痘ワクチン 長崎大学熱帯医学
研究所同門会誌 31号 36-40.

杉本 正信、大石 和恵、木所 稔、橋
爪 壮 (2003) 国産天然痘ワクチンの
新たな役割 バイオテロ対策およびベ
クターとしての利用 蛋白質核酸酵素
48巻、1693-1701 (2003)

2. 学会報告

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

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）

分担研究報告書

先天性免疫におけるコレクチンの役割研究

分担研究者 若宮 伸隆 旭川医科大学医学部教授

研究要旨

細胞性免疫を強力に誘導する HIV コンビネーションワクチンを、先天性免疫の面から解析するために、コレクチンのサブファミリーであるマンナン結合レクチン (MBL) に焦点を当て、in vitro・in vivo での役割を明らかにすることが研究目的であり、2 年間の研究期間で以下の事を行った。① MBL がクレイドを越える中和抗体のように、抗 HIV 活性をもつことを明らかにした。② 正常人における血中濃度 MBL の日内動態とストレス時の変動について明らかにした。

A. 研究目的

過去 20 年は獲得免疫が、爆発的に解明された。獲得免疫は、主に抗体と細胞障害性 T 細胞と T 細胞受容体からなり、特異性とクローンの増殖が大きな特徴である。一方先天性（自然）免疫は、当初マクロファージや補体、NK 細胞が中心に解析されたが、近年 toll 様受容体の発見により新しい展開がみられている。一方 HIV の感染に際しては、これまで病原体の感染と関連の無かった生体反応の白血球の動員を司る遊走因子（ケモカイン）のレセプターを介して細胞内に侵入することから先天性免疫との関わりが重要な課題となっている。分担研究者は、コレクチン分子がインフルエンザウイルスの内因性インヒビターであることを世界で初めて明らかにし、さらに近年膜型コレクチン CL-P1 を発見し、これらが新たな先天性免疫担当分子であることを報告している。今回の研究の目的は、コレクチン分子であるマンナン結合レクチン

(mannan-binding lectin=MBL) の HIV における関わり、つまり MBL による抗 HIV 効果が in vitro 及び in vivo で認められるかどうかを解析することを目的とする。実際には中和反応の有無とその作用機序を明らかにするとともに、ヒト生体での測定系の作成と日内変動やストレス時における変動を中心に、MBL の生理的役割についての基礎的知見を得て、細胞性免疫誘導型ワクチンである HIV コンビネーションワクチンの生理的な意義を側面から明らかにする事が目的である。

B. 研究方法

現在の重要な課題である HIV-1 R5 ウイルス (CCR5 トロピックウイルス) のコントロールが、HIV/AIDS の感染及び防御をコントロールするのに極めて重要である。そしてその多様性に対応した種々のクレイドの R5 ウイルスを対照にした MBL のウイルス不活化効果を明らかに

することは、HIV 感染の病態の解析のみならず、感染者の病気の進行をコントロールする可能性の有無を検討することにつながる。本プロジェクトではリコンビナントタンパクを含めた精製 MBL タンパクを用いて野生型 R5 ウイルスの感染阻害効果の有無を以下の方法で検討した。

1) in vitro における HIV 中和アッセイ系における抗ウイルス効果の検討

MBL の抗 HIV 活性を *in vitro* の系で検討するために、実験株の HIV-1 NDK 株 (サブタイプ D) 及び臨床分離株のサブタイプ E 型 HIV (仮称 LP65) , サブタイプ B 型 HIV 92TH014, 92US712, JRCSF を PHA で blast 化したヒト PBMC 及び T cell 系の株化細胞 M8166 に感染させ、洗浄後、1~30 μ g/ml の濃度で native 及び recombinant MBL (rMBL) を添加し、ヒト血清添加培地で培養した。培養後のウイルス量の変化の指標として培養上清中の HIV p24 抗原量を ELISA 法で測定し、MBL 非添加群と比較検討した。

2) 正常人における、MBL の日内変動とストレス時の変動についての検討

若宮らが作成した ELISA 法による、MBL 測定システムを用いて測定した。血液サンプルは、健康人ボランティア 12 人において、十分にインフォームドコンセントを得て、丸 24 時間での日内変動を測定した。血清は、その場で分離して、同じ条件で凍結保存した。一度に全検体を融解し、測定に用いた。次に、ストレス時における MBL の変動をあきらかにす

るために、自衛隊レインジャー部隊の特殊訓練前後の血液を、自衛隊中央病院内科部長箱崎幸也博士との共同研究により、供与を受けた。血液は上記と同じように採血・保存し、検査に用いた。

C. 研究結果

1) in vitro ウイルス中和アッセイ法による MBL のウイルス不活化効果

中和抗体による不活化が困難であるといわれている HIV 実験室株 HIV-1 NDK を用いてウイルス産生の変動を解析について、MBL 添加群では 50%抑制率が約 10 μ g/ml であった。サブタイプ E 臨床分離株 LP65 では、rMBL の不活化効果は約 20 μ g/ml であり、ウイルスのクレイドを超えた中和が初めて明らかにされた。さらに、クレイド B, B' の 92US712, JRCSF, 92TH014 においても中和活性を認めることができ、50%抑制率は、ほぼ血中の MBL 値に近い 0.19-7.0 μ g/ml の値を示した (Table1)。

2) 正常人における、先天性免疫の MBL においてその変動について

1 μ g/ml 以下の集団はほとんど変動がなかった。しかしながら 2 μ g/ml 以上の集団は 20 %以上の増減が見られた。1~2 μ g/ml 前後の集団は 10 %前後変動が見られた。その理由については、変動が多い集団はもともと高産生型の promoter を持っていることが考えられ、このタイプの promoter を有する集団の変動の幅が大きい事が示

唆された。

つぎに強いストレス時における MBL の1週間における推移では、全体の平均値では、若干の低下(約10%)が認められた。しかしながら、個々の例では、60%は減少、40%は軽度上昇もしくは変化無しの2群に分類できた。上昇は通常、平均値である1.5 µg/mlよりも低値の集団にみられやすく、減少は2 µg/ml以上の高値をしめす集団に認められた(Figure 1)。

D. 考察

本プロジェクトでは、in vitro のT細胞株及びPBMCを用いたウイルス中和アッセイ系でMBLのウイルス不活化作用の有無を検討した。これまでの研究でMBLはin vitroでHIV-1の細胞への感染を、生理的血中濃度に近い濃度で抑えることがわかった。この際用いたウイルスはこれまで中和することが極めて困難であるといわれてきた実験室株クレイドD HIV-1 NDK株であり、さらにV3部分のミューテーションを伴うLP65である、したがってこのMBLは生体内で産生されるウイルスのレパートリーを有意に不活化することが可能であると予測された。さらに、このMBLは正常人の血清中にも存在することより副作用の面で考慮する必要のないことが、今後のin vivo効果が大きく期待できる点である。しかも臨床分離株であるクレイドBにも効果があることより、抗体とは異なりクレイドやtropismを越えて作用することよりHIV感染者の治療薬としても追

求できる抗ウイルス物質として捉えることができると考えられた。一方、ヒトにおけるMBL測定系がプロトタイプであるが、ELISAのシステムができており、正常状態とストレス状態での動的変化を明らかにした。結論として以外だったのは、MBLは、その調節において個人差が存在することであった。次の研究のステップとしては、ストレスや急性炎症応答時の発現誘導や抑制が惹起される原因を、MBLの転写レベルで解析する必要があると考えている。

E. 結論

- ① MBLがクレイドを越える中和抗体のように働き、抗HIV活性をもつことを明らかにした。
- ② 正常人における血中濃度 MBL の日内動態とストレス時の変動について明らかにした。
 1. 日内動態としては MBL 高値群に高頻度に増減を認めた。
 2. ストレス時には、MBL 減少群が約60%認められ、MBL 濃度が高値の集団に顕著であった。

F. 健康危険情報

関係しない。

G. 研究発表

論文発表

- ① Hokozaiki, Y., Yoshida, M., Sekiyama, K., Seike, E., Iwamoto, J., Mitani, K., Masafumi, M., Morizone, T., Ohtani, K., Suzuki, Y., Wakamiya, N.: Mannose-

- binding lectin and the prognosis of fulminant hepatic failure caused by HBV infection. *Liver* 22(1): 29-34.2002.
- ② Zhao H., Wakamiya, N., Suzuki, Y., Hamonko, M.T., Stahl, G.L.: Identification of human mannose binding lectin (MBL) recognition sites for novel inhibitory antibodies. *Hybridoma and Hybridomics* 21(1): 25-36, 2002.
- ③ Fukuzawa, J., Nishimura, J., Hasebe, N., Haneda, T., Osaki, J., Saito, T., Nomura, T., Wakamiya, N., Kikuchi, K.: Contribution of macrophage migration inhibitory factor to extracellular signal-regulated kinase activation by oxidative stress in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 277(28): 24889-24895, 2002.
- ④ Kawai, T., Suzuki, Y., Eda, S., Kase, T., Ohtani, K., Sakai, Y., Keshi, H., Fukuoh, A., Sakamoto, T., Nozaki, M., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Wakamiya, N.: Molecular cloning of a mouse collectin liver I. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66(10): 2134-2145, 2002.
- ① 鈴木定彦、若宮伸隆：感染防御とコレクチンファミリー。 *Annual Review 免疫* 2002 217-225, 2002.
- ⑥ 若宮伸隆、鈴木定彦：MBL (mannan-binding lectin) その機能と生理学的意義 *中国四国支部会誌* 17:2-12, 2002.
- ⑦ Ohmori, H., Makita, Y., Funamizu, M., Chiba, S., Ohtani, K., Suzuki, Y., Wakamiya, N., Hata, A.: Haplotype analysis of human collectin placenta 1 (hCL-P1) gene. *J. Hum. Genet.* 48: 82-85, 2003. 2.
- ⑧ Suzutani T, Ishioka K, De Clercq E, Ishibashi K, Kaneko H, Kira T, Hashimoto KI, Ogasawara M, Ohtani K, Wakamiya N, Saijo M.: Differential Mutation Patterns in Thymidine Kinase and DNA Polymerase Genes of Herpes Simplex Virus Type 1 Clones Passaged in the Presence of Acyclovir or Penciclovir. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(5): 1707-1713. 2003.
- ⑨ Saito, T., Fukuzawa, J., Osaki, J., Sakuragi, H., Yao, N., Haneda, T., Fujino, T., Wakamiya, N., Kikuchi, K., Hasebe, N.: Roles of calcineurin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *J. Molecular and Cellular Cardiology.* 35(9): 1153-1160. 2003
- 学会報告
- ① 福澤純、小山聡、高下圭一、長谷部直幸、菊池健次郎、大谷克城、福應温、鈴木定彦、若宮伸隆：新しくクローニングされた内皮特異的スカベンジャー受容体 CL-P1 第50回日本心臓病学会学術集会（名古屋）2002.
- ② 福應温、大谷克城、福澤純、小笠原正洋、吉田逸朗、鈴木定彦、若宮伸隆：血管内皮細胞型受容体 CL-P1 の細胞内領域結合分子の解析。第25回日本分子生物学会（横浜）2002
- ③ Wakamiya, N., Ohtani, K., Keshi, H., Fukuoh, A., Sakamoto, T., Suzuki, Y.: The membrane type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular

endothelialcells.lenterLec (Copenhagen)
2002

- ④ Nobutaka Wakamiya: Roles of the membrane type collectin CL-P1 in vascular endothelial cells. Glycobiology (Boston) 2002.
- ⑤ 大谷克城、高下圭一、小山聡、チャン・ソンチェ、福澤純、若宮伸隆: CL-P1の分子生物学的解析。第76回日本生化学会(横浜) 2003
- ⑥ 古川健太、福田光子、内田司、鈴木映未由、松本哲、近藤裕地、大谷克城、若宮伸隆: ゼブラフィッシュ CL-P1 遺伝子クローニングと機能解析。第76回日本生化学会(横浜) 2003
- ⑦ 北元憲利、生田和良、加藤陽二、小林隆幸、若宮伸隆、田中智之、宮本博行、加藤四郎: 痘瘡発症事例の祭の迅速・簡便診断法の可能性。第51回日本ウイルス学会(京都) 2003
- ⑧ Wakamiya, N. Ohtnai, K. Sakamoto, T. Keshi, H. Suzuki. Y.: The membranetype collectin CL-P1 is a scavenger receptor conserving in vertebrates. The 16th Naito conference (kanagawa) 2003.
- ⑨ 大谷克城、福田光子、古川健太、内田司、鈴木映未由、松本哲、近藤裕地、張成宰、若宮伸隆: ゼブラフィッシュ CL-P1 遺伝子クローニングと構造および機能の解析。第26回日本分子生物学会(神戸) 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況
特にありません。

HIV-1 isolates	clade	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)
92TH014	B'	Native MBL 1.57 / recombinant MBL 7.0
92US712	B	Native MBL <1.0 / recombinant MBL <1.0
JRCSF	B	Native MBL 2.74 / recombinant MBL 0.19
NDK	D	Native MBL ND / recombinant MBL *10
LP65	E	Native MBL ND / recombinant MBL *20

Table1. HIV 分子株における MBL の抗 HIV 効果の比較

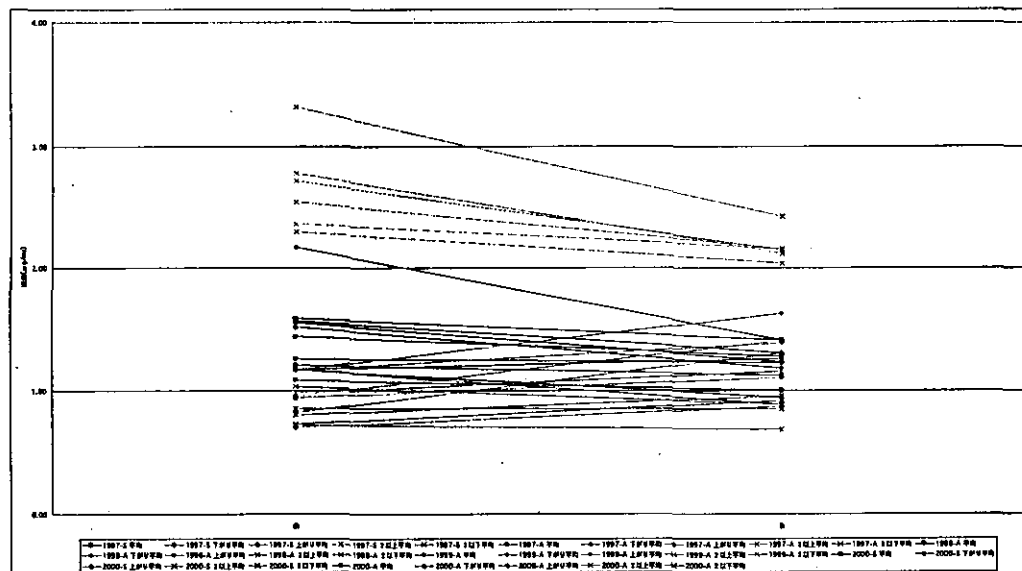


Figure 1. ストレス状態における血中 MBL の変化について

前臨床試験計画と結果の解析及びヒト臨床試験の可能性の検討

分担研究者 山崎修道 国立感染症研究所・名誉所員

研究要旨：タイ国と日本との共同研究でタイ国で伝搬している HIV-1 CRF01_AE に対するワクチン開発を行い前臨床レベルでの開発を行うことができた。臨床開発に向けてこれまで得られたワクチン効果、ワクチンの安全性及び安定性、環境汚染に関するデータを編集し、前臨床レベルで Clinical Investigator Brochure の編集を行った。その作成にあたり、タイ国ワクチン開発小委員会の議長である Prasert 教授に出席していただき概ね了解を頂いた。今後、GLP ワクチン製造の情報を追加し、seed lot approval を得るための Clinical Investigator Brochure を完成させる。

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、滝澤万里、泉泰之、原敬志、吉野直人、堀端重男、兼清優（国立感染症研究所・エイズ研究センター）

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。

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重篤な免疫不全を引き起こすことから安全な HIV ワクチンとして実用化できるかどうかはワクチン効果の判定に劣らず重要

B. 研究方法

既に臨床試行が始まった HIV ワクチンは欧米を中心にいくつもあるので、実用化をめざした本ワクチン開発プロジェクトは以下の点を考慮した。

1. これまで開発されたワクチンとは異った日本独自の HIV ワクチンを開発する。そのためにこれまで使用されている他の疾患に対するワクチンをベクターに

用いて HIV ワクチンを開発する。このことは基礎開発の研究期間をセーブできるのみでなく経済性や生産性あるいは供給性に優れており発展途上国を主体とした HIV ワクチンの開発に極めて有用であると考えられる。

2. 使用するワクチンのベクターの中での HIV 感染症が免疫不全になることから免疫不全状態でも使用可能なワクチンベクターを HIV ワクチンとして開発使用する。

以上の点を満たすことができる使用可能なワクチンとして BCG Tokyo 株を用いた細菌性ベクターと、約 45 年前国立予防衛生研究所の腸内ウイルス部で開発されたワクシニアウイルス DIs 株をウイルス性ベクターに用いて HIV ワクチンの開発を行った。

(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

組換え BCG をベースにした組換え BCG-HIV ワクチンのプライミングと rDIs ベクター HIV ワクチンによるブースター免疫を組み合わせたコンビネーションワクチンはサル HIV/AIDS モデルにおいて防御免疫の誘導を可能にすることが明らかにされ、前臨床レベルで一定の成果が得られたことを確認した。さらに、2002 年 2 月 28 日—3 月 1 日における国

際会議で UNAIDS、米国 NIH ワクチンプログラム、米国 CDC ワクチン部門、及びハワイ大学熱帯病微生物部門からワクチン評価 international advisor として出席していただき、前臨床レベルの成果を検討して頂き、臨床試行への移行が推奨された。そして国際的なレベルで

- (1)ワクチンのパイロットプロダクション
- (2)ワクチン製剤の恒常性(consistency)、免疫能、安定性、安全性などの証明

(3)臨床試行について

を計画し、具体的討論を行ってきた。

日本国内における HIV ワクチン開発のための検討グループ、タイにおける前臨床及び臨床試行を行う委員会を通して上記の 3 点をいかにすすめるかについて具体的な合同委員会を作成し、ワクチンの実用化のための推進グループを作成した。前臨床レベルで動物実験において安全性研究を含めた動物委員会を設置し、共同研究を行った。

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。

今後の方向性としてはタイでパイロットプロダクションを行い、タイにプロジェクトのサイトを作り、そこで日本のサポートのもとで行う。実際の臨床試験のための委員会を日本側でも準備する。そのために臨床試験がよくわかる人が望まれるので日本側からの臨床試験の責任者、医者、実際に働く人、さらにそれとは別にラボワークのグループを作成する。

E. 結論

- 1) Clinical Investigator Brochure (図 1) を完成させるためにデータの編集を行った。
- 2) 2003 年 12 月までに安全性に関するサルのデータの合意を得ることができた。
- 3) 今後最終的な打ち合わせを行いタイ国ワクチン小委員会に International Advisor の意見を頂いた後提出の予定 (図 2) である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Matsuo K, Promkhatkaew D, Balachandra K, Hamano T, Sutthent R, Ruxrungtham R, Sittisombut N, Puthavathana P, Butraporn R, Sriwanthana B, Boon-Long J, Nakasone T, Warachit P, Rugpoa S, Yamazaki S and Honda M. Japan-US Collaboration with Thailand in the Development of HIV/AIDS Vaccine. AIDS in ASIA, 2004. in press.
- 2) Hamano, T, P. Sawanpanyalert, H. Yanai, S. Piyaworawong, T. Hara, S. Sapsutthipas, J. Phromjai, S. Yamazaki, N. Yamamoto, P. Warachit, M. Honda and K. Matsuo. Determination of HIV-1 CRF01_AE gag p17 and env-V3 consensus sequences for HIV/AIDS vaccine design. AIDS Res. Hum. Retroviruses, 20 (3):337-340, 2004
- 3) Kanekiyo M, Matsuo K, Hamatake M, Hamano T, Ohsu T, Matsumoto S, Yamada T, Yamazaki S, Hasegawa A, Yamamoto N, Honda M¹ Codon Optimization of the HIV Gene in *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin Recombinant Elicits Effective Virus-Specific Immunity. 2004, submitted.

学会発表

- 1) Honda M, Nakasone T, Izumi Y, Matsuo K, Ami Y, Someya K, Kanekiyo M, Hamano T, Horibata S, Yoshino N, Hara T, Takizawa M, Kawahara M, Kaizu M, Hamatake M, Sakai K, Shinohara K, Yamazaki S, Yamamoto N: Vaccine efficacy and safety of recombinant