

平成15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

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

# 目 次

## 課題番号

20030933A KH51041	臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究	梨井 康 …… 1
934A KH51042	組換えDNA食品遺伝子産物の慢性経口毒性評価モデルの確立	廣瀬 雅雄 …… 5
935A KH51043	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦 善治 …… 10
936A KH51044	細胞内脂質輸送系に着目した血清脂質改善薬の開発のための基礎的研究	最上 知子 …… 16
KH51045	粘膜インフルエンザワクチンの実用化に関する研究	佐多 徹太郎 …… 21
937A KH51046	日本人糖尿病感受性遺伝子に基づく脂肪細胞を分子標的とした糖尿病・肥満の予防及び治療薬の開発	門脇 孝 …… 24
938A KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチン開発のための基礎研究	竹森 利忠 …… 27
939A KH51048	ノーウォークウイルスの超高感度核酸定量システム、及びベッドサイド抗原検出システムの開発	武田 直和 …… 31
940A KH51049	ワクチン創製の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島 朝人 …… 38
941A KH51050	食品および環境中の食中毒原因菌の病原因子に対する免疫学的高感度検出法に関する研究	五十君 静信 …… 43
942A KH51051	安全なアジュバントを用いた粘膜ワクチンの開発に関する研究	後藤 紀久 …… 48
943A KH51052	リポソーム表面結合型抗原のアレルギー予防・治療への応用に関する研究	内田 哲也 …… 55
944A KH51053	肺炎球菌感染症の標準的抗体価測定方法の確立に関する研究	岡部 信彦 …… 61
945A KH51054	PPAR $\alpha$ をターゲットとした生活習慣病予防薬の開発	片山 茂裕 …… 64
946A KH51055	感染症領域における先端的遺伝子診断技術の開発に関する研究	薄井 貢 …… 68
947A KH51056	乳幼児下痢症の原因ウイルス検出法に関する研究	西尾 治 …… 71
948A KH51057	可溶性ウイルス受容体等によるウイルス吸着阻止を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口 文広 …… 77
949A KH51058	EPA・DHA含有エステル交換構造脂質の体脂肪蓄積抑制効果に関する研究	斎藤 衛郎 …… 86
950A KH51059	エネルギー消費調節機構に立脚した生活習慣病予防薬に関する基礎研究	大坂 寿雅 …… 89
951A KH51060	遺伝子解析によるヒトエンテロウイルス同定の標準化	清水 博之 …… 93
952A		

## ワクチン創製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

研究要旨 新規・次世代日本脳炎ワクチン及びDNA ワクチン用プロモーター開発に官民共同・委託研究で取組んだ。その結果、①Vero 細胞由来不活化新ワクチンはマウス脳由来現行ワクチンと本質的に同等である、②感染 Vero 細胞から産生される SHA の免疫原性はビリオンに比して低下している、③次世代ワクチンのバイオプロダクター J12#26 細胞株を優れた特性を維持したまま無血清産生系に転換することに成功した、④Vero 細胞での HHV-6B MIE プロモーター活性は HCMV IE プロモーターに比べ弱いが十分な活性を示した。

### 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) 大阪大学大学院医学系研究科 山西 弘一

### A. 研究目的

アジアでは毎年 35,000 名を越える日本脳炎患者発生が WHO に報告されている。基礎免疫のある日本では年間 50 名を越えないが、ワクチン接種歴のない沖縄米軍関係者 2 万名中 6 名の患者が発生し、免疫の無い人の危険性とワクチン接種の重要性が示された。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ワクチンしか存在しない。有効性・安全性とも優れたワクチンであるが、現況では脳を用いない新ワクチン開発が急務であり、世界各国に対する緊急の要請であった。

本課題では、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 株を原材料とし、脳不使用の新規不活化ワクチンを、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第 1 の目的としてきた。そこで、製造スケールで試験用ワクチンを試作し、試作ワクチンの各種抗体との反応性を現行ワクチンと比較すること、他方、感染 Vero 細胞でウイルス粒子と共に産生されてくる SHA (slow sedimenting hemagglutinin) の収量及びマウス免疫原性を検討することを本年度の課題とした。

脳材料不使用の不活化新ワクチンが研究組織の

阪大微研会により開発されつつある現在、次のステップは、ウイルス不使用で製造上安全なワクチン創製新技術による次世代ワクチン開発である。しかし、JEV の表面糖蛋白は細胞に toxic なため、日欧米のゲノムテクノロジーによるバイオプロダクター細胞株樹立の試みも未だ不首尾である。我々は、JEV の 3' prM-E cDNA (J12) を用いて中和抗原粒子高発現の持続産生 J12#26 細胞株の樹立に成功し、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有効性を持つことをマウス接種実験で示した。次は、牛血清混入可能性を排除するため、産生量を維持したまま、J12#26 細胞株の無血清培養系を開発することである。そこで、昨年度より取組んできたこの課題を本年度中に完了することを第 2 の目的とした。

一方、新テクノロジーとして着目の DNA ワクチン開発には、強力なプロモーターが必要不可欠である。現在はヒトサイトメガロウイルス (HCMV) の前初期 (IE) プロモーターが汎用されている。種々の細胞で一般的に強い活性を示すとの希望的考察がその理由である。しかし、リンパ系細胞での発現効率は低く、メチル化等による不活化現象も報告されている。加えて、HCMV IE プロモーターの DNA ワクチン利用を特許等の制約が抑制している。我々は、HCMV と同じヒトヘルペスウイルス属  $\beta$  ウイルス亜科に属する HHV-6 の主要前初期遺伝子 (MIE) プロモーターがヒトリンパ系細胞で強い活性を示すことを明らかにしてきた。そこで、この MIE 遺伝子プロモーターの DNA ワクチンへの応用

可能性を検討する事を第3の目的とした。

## B. 研究方法

### (1) Vero 細胞由来の不活化新ワクチンの開発

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、製造スケールで新たに連続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、ホルマリンにより不活化した後、硫酸プロタミン処理を行った。蔗糖密度勾配超遠心でウイルス粒子と SHA 粒子を分離・分画し、各画分をさらに蔗糖密度勾配超遠心で精製した。ウイルス及び SHA 粒子画分を透析後濾過し、各々ワクチン原液及び SHA 原液とした。

Vero 細胞由来ワクチン、SHA 原液及びマウス脳由来の現行市販ワクチンを 1% 酢酸アンモニウムで透析後、常法によりネガティブ染色し、電子顕微鏡(日立 H-7600 透過型)で観察した。又、Vero 細胞由来ワクチンとマウス脳由来の現行ワクチンについて、抗-JEV マウス抗体(ポリクローナル抗体)、及び6種の抗-JEV モノクローナル抗体(3種の抗-Envelope、3種の抗-PrM; 東京都神経科学総合研究所・保井孝太郎博士より分与)に対する反応性を ELISA 法で比較した。さらに、Vero 細胞由来ワクチン/SHA/マウス脳由来市販ワクチンを、現行日本脳炎ワクチンの力価試験法に準じたマウス免疫原性試験で比較した。

### (2) J12#26 細胞株を用いた次世代ワクチンの開発

JEV prM-E 領域の J12 cDNA を高い効率で発現する J12#26 持続細胞は既に報告した。無血清培地への馴化には血清濃度を2ヶ月間で順次低下させた。馴化 J12#26SF 細胞は VP-SFM 無血清培地で継代し、抗原産生量・ゲノム中の J12 cDNA について 10% 血清添加培地で継代した J12#26 細胞と比較検討した。J12#26 抗原の精製は、昨年度確立した蔗糖密度勾配遠心、Sephacryl S-300、Sephadex G-25 ゲル濾過を組合わせた方法で培養上清中から精製した。抗原の凝集(HA)活性は定法に従って測定した。抗原は、現行ワクチンを標準抗原として、ELISA で抗原価を定量し、ウサギ抗-JEV 抗体/抗-JEV モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロットで性状を解析した。精製抗原の形状はネガティブ染色後電子顕微鏡で観察した。

中和抗体誘導試験は、現行ワクチン試験法に準じて、6週齢 ddY 雌マウス腹腔に1週間隔で2回

抗原を投与した。血清中の中和抗体価は、Vero 細胞を用いた北京-1 株のプラーク減少法で測定した。感染防御試験は、4週齢 ddY 雌マウスを中和抗体誘導試験と同様に2回免疫後、6週齢時に北京-1 株を腹腔接種して臨床症状を観察した。

### (3) DNA ワクチンの開発

HHV-6 MIE プロモータ領域をルシフェラーゼベクター pGL3-Basic (プロメガ) のホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したプラスミド p9u を基本形にして、MIE プロモータ領域の上流から Mung Bean Exonuclease で塩基を分解削除することにより、末端から順次欠失した短縮ミュータントを複製した。これらの短縮ミュータントとトランスフェクション効率補正用のウミシイタケルシフェラーゼ発現プラスミド(phRL-SV40)を、Vero 細胞にリポフェクション法でトランスフェクションした。トランスフェクション後24時間で細胞を回収し、細胞溶解液を加えた。次いでこの細胞ライセート中の、ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼの発光量を測定した。測定値のトランスフェクション効率による影響を補正するため、ホタルルシフェラーゼによる発光量をウミシイタケルシフェラーゼによる発光量で除して活性効率を求めた。

### (倫理面への配慮)

マウスを用いた動物実験は動物倫理規程に則り、申請・承認を受けた方法で実施した。即ち、必要最小限のマウス数を使用し、採血時にはマウスに対して麻酔処置を施して負担を最大限軽減し、実験終了後は安楽死の処置を行った。

## C. 研究結果

### (1) Vero 細胞由来の不活化新ワクチンの開発

Vero 細胞で増殖させた日本脳炎ウイルス浮遊液中のウイルス抗原に占める SHA 画分の比率を ELISA 法で測定した結果、約 15% であった。ワクチン抗原を電子顕微鏡観察した結果、Vero 細胞由来ワクチン及びマウス脳由来ワクチンではウイルス粒子以外の不純物は観察されず、いずれも直径約 50nm の粒子が観察された。ウイルス粒子を比較した結果、マウス脳由来ウイルスに比べ Vero 細胞由来ウイルスの粒子表面はわずかにラフな形態であることが確認された。これに対して、SHA 原液では直径 15-30nm の粒子が観察された。

Vero 細胞由来ワクチンとマウス脳由来ワクチンそれぞれ3ロットについて、各種抗体に対する反応性を比較した結果、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の Clone 503、302 (いずれも

Envelope に対する抗体で、中和活性を有する) に対する反応性には差が認められなかった。しかし、モノクローナル抗体の Clone 401 (Envelope に対する抗体で、株特異的) 及び PrM に対する 3 種の Clone 抗体に対する反応性は Vero 細胞由来ワクチンと比較して、マウス脳由来ワクチンは 3 ロットとも 1/3~1/10 低い値を示した。

マウスにおける免疫原性は、Vero 細胞由来ワクチン及びマウス脳由来ワクチンともに力価試験用参照ワクチン (#197-1999) よりも高い中和抗体を誘導することが確認された。しかし、SHA をマウスに免疫した場合、中和抗体の産生は認められるものの、相対力価は 1/2.5~1/10 低い値を示した。

#### (2) J12#26 細胞株を用いた次世代ワクチンの開発

J12#26 細胞株培養液の血清濃度を 10% から順次低下させて無血清培地に馴化させ、J12#26SF 細胞を樹立した。この細胞株は形態・継代安定性とも馴化前と同等であったが、VP-SFM 或いは Opti-SFM 無血清培地での細胞増殖性がやや遅くなる傾向が見られた。しかし、モノレイヤー形成時の細胞数は同等であった。従って、一定の細胞数当りの抗原産生量も同等であった。一方、J12#26 細胞に導入された JEV の J12 cDNA 安定性を、種々の継代数の細胞からゲノム DNA を抽出し、J12 プローブを用いたサザンハイブリダイゼーションで検討した。J12 発現ベクターを 1 箇所のみ切断する Eco RI では、大きな断片サイズの広範囲な領域に不明瞭なシグナルが検出された。これに対して、J12 cDNA を切出す Eco RI+Xba I 切断では、J12 cDNA の位置に明瞭で強いシグナルが、馴化前後或いは継代数に拘わらず同等に検出された。

J12#26 細胞由来抗原を、JEV 感染 Vero 細胞の抗原と蔗糖密度勾配遠心法で比較した。その結果 J12#26 抗原は、感染 Vero 細胞より放出される JEV ビリオンより比重の軽い SHA (Slow Sedimenting Hemagglutinin) 画分に一致して分画された。そこで、J12#26 細胞の無血清培養液より昨年度報告した方法に準じて抗原精製を実施したところ、10 回の繰返し実験において、ほぼ一定の (40~50%) 収率で抗原が回収された。J12#26 抗原のウエスタンブロットでは、JEV E 蛋白に加えて M 蛋白の存在も確認された。また、電子顕微鏡により、JEV 感染 Vero 細胞由来の SHA 粒子と同サイズではあるがより均一な直径約 25 nm の粒子が観察された。精製 J12#26 抗原にホルマリン不活化等化学処理を加えずに、現行ワクチン検定法に準じて抗原性・免疫原性を検討した。その結果、昨年度報告の予試験と同様に、誘導された中和抗体価は現行ワクチン

と同等或いはやや高い値を示し、JEV 北京株の腹腔内感染攻撃に対しても J12#26 抗原免疫マウスは完全な防御効果を示した。

#### (3) DNA ワクチンの開発

Vero 細胞において HHV-6B MIE プロモータは、HCMV IE プロモータに比べて弱かったものの、ある程度のプロモータ活性を発揮した。また、短縮ミュータントを用いた解析は現在進行中である。

#### D. 考察

これまでの研究で Vero 細胞由来新不活化ワクチンの優れた免疫原性が示されてきた。本年度の研究において、ワクチン抗原粒子の電子顕微鏡観察でマウス脳由来現行ワクチンと比較したとき、Vero 細胞由来新ワクチンのウイルス粒子表面の形態がわずかにラフな構造であることが観察された。また、幾つかのモノクローナル抗体に対する反応性についても、Vero 細胞由来新ワクチンの方が優ることが確認された。これはワクチン精製工程のわずかな差に起因している可能性が考えられ、今後、種々の不活化ワクチン開発に重要なヒントを与えよう。

一方、Vero 細胞で増殖させた日本脳炎ウイルス浮遊液中の SHA 粒子は、抗原量で算出すると約 15% も存在していた。しかし、SHA のマウスにおける免疫原性は、接種する抗原含量又はたん白質含量を同量にしても 1/2.5~1/10 程度劣ることが確認された。SHA はウイルス RNA ゲノムを含まず、サイズも小型の非感染性粒子であり、ウイルス粒子とは抗原構造が必ずしも同一ではないものと考えられる。従って、ウイルス粒子と同様のプロセスでは抗原性の低下が大きく、至適な処理条件が異なるものと考えられる。

現行日本脳炎ワクチンの問題点の 1 つがマウス「脳」を使用していることであった。とすれば、細胞培養由来次世代ワクチンの問題点の 1 つは、培養液に加える牛血清の使用である。既に不活化新ワクチンでは感染 Vero 細胞培養を無血清培地で実施している。次世代ワクチン開発においてもこの問題をクリアするには、無血清培養系に変換することである。しかし、無血清培養系への変換は一般的に、産生量・産生細胞頻度の低下や挿入遺伝子の欠失・発現効率の低下を招く事が多い。本研究では昨年度よりこの課題に取り組み、これらのマイナス要因をもたらすことなく無血清培養系への変換に成功した。導入 J12 cDNA は安定に維持され、産生量の低下も無く、産生細胞頻度も 100% を維持していた。安価で且つ製造上も安全な次世代ワクチンへの大きな進展と考えられる。ま

た、牛血清使用が不可欠な開発段階での場合も考慮して、バイオプロダクトのガイドラインに適合する牛血清選別法も検討中である。

細胞培養由来産物のヒトへの適用には、牛血清成分以外にも、培養細胞由来の想定外の危険因子混入可能性を排除するためホルマリン等の処理を求められる場合がある。本実験では J12#26 抗原にこのような処理を行わずに抗原性・免疫原性の比較を行い、良好な結果を得た。他方、上記の化学処理した Vero 細胞由来 SHA 粒子抗原の免疫実験では、不活化ウイルス粒子よりも抗原性は低下することが示されている。将来の実用化に向け抗原精製過程における処理条件の詳細な検討が必要であろう。不活化新ワクチンと比較して J12#26 ワクチンは精製工程での抗原性の低下が大きい可能性はあるものの、SHA 抗原でさえ感染防御には十分な抗原性を保持している事から、安価で製造上安全なワクチンとしての期待は大きい。

さらに先を見通した DNA ワクチン用プロモーター開発研究においては、著しい進展が得られた。作製された短縮ミュータントを用いた解析から、MIE プロモーターの詳細なキャラクタライズができるものと思われる。

## E. 結論

(1) 培養 Vero 細胞由来の不活化新ワクチンは、マウス脳由来の現行ワクチンと本質的に同等であることを確認した。

(2) 感染 Vero 細胞から JEV と共に産生される SHA の免疫原性は、ビリオンに比して劣ることが確認された。

(3) 次世代ワクチン用抗原のバイオプロダクター J12#26 細胞株を、その優れた特性を維持しつつ無血清産生系に転換することに成功した。

(4) Vero 細胞における HHV-6B MIE プロモーターの活性は HCMV IE プロモーターに比べ弱かったものの、ある程度のプロモーター活性を示した。

## F. 研究発表

### 論文発表

Mutoh, E., Ishikawa, T., Takamizawa, A., Kurata, T., Sata, T. and Kojima, A.: Japanese encephalitis subunit vaccine composed of virus-like envelope antigen particles purified from serum-free medium of a high-producer J12#26 cell clone. *Vaccine* (in press).

Kojima, A., Yasuda, A., Asanuma, H., Ishikawa, T., Takamizawa, A., Yasui, K. and Kurata, T.: Stable high-producer cell clone expressing

virus-like particles of the Japanese encephalitis virus E protein for a second-generation subunit vaccine. *J. Virol.* 77, 8745-8755, 2003.

Shiraki K, Yoshida Y, Asano Y, Yamanishi K, Takahashi M. Pathogenetic tropism of varicella-zoster virus to primary human hepatocytes and attenuating tropism of oka varicella vaccine strain to neonatal dermal fibroblasts. *J Infect Dis* 188:1875-7, 2003.

Nishimura K, Ueda K, Sakakibara S, Do E, Ohsaki E, Okuno T, Yamanishi K. A viral transcriptional activator of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) induces apoptosis, which is blocked in KSHV-infected cells. *Virology* 316:64-74, 2003.

Kondo K, Nozaki H, Shimada K, Yamanishi K. Detection of a gene cluster that is dispensable for human herpesvirus 6 replication and latency. *J Virol* 77:10719-24, 2003.

Takahashi M, Okada S, Miyagawa H, Amo K, Yoshikawa K, Asada H, Kamiya H, Torigoe S, Asano Y, Ozaki T, Terada K, Muraki R, Higa K, Iwasaki H, Akiyama M, Takamizawa A, Shiraki K, Yanagi K, Yamanishi K. Enhancement of immunity against VZV by giving live varicella vaccine to the elderly assessed by VZV skin test and IAHA, gpELISA antibody assay. *Vaccine* 21:3845-53, 2003.

Nakano K, Tadagaki K, Isegawa Y, Aye MM, Zou P, Yamanishi K. Human herpesvirus 7 open reading frame U12 encodes a functional beta-chemokine receptor. *J Virol* 77:8108-15, 2003.

Nakano K, Isegawa Y, Zou P, Tadagaki K, Inagi R, Yamanishi K. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)-encoded vMIP-I and vMIP-II induce signal transduction and chemotaxis in monocytic cells. *Arch Virol* 148:871-90, 2003.

Mori Y, Yang X, Akkapaiboon P, Okuno T, Yamanishi K. Human herpesvirus 6 variant A glycoprotein H-glycoprotein L-glycoprotein Q complex associates with human CD46. *J Virol* 77:4992-9, 2003.

Mori Y, Akkapaiboon P, Yang X, Yamanishi K. The human herpesvirus 6 U100 gene product is the third component of the gH-gL glycoprotein complex on the viral envelope. *J Virol* 77:2452-8, 2003.

Kondo K, Sashihara J, Shimada K, Takemoto M, Amo K, Miyagawa H, Yamanishi K. Recognition of a novel stage of betaherpesvirus latency in human herpesvirus 6. *J Virol* 77:2258-64, 2003.

Amo K, Tanaka-Taya K, Inagi R, Miyagawa H, Miyoshi H, Okusu I, Sashihara J, Hara J, Nakayama M, Yamanishi K, Okada S. Human

herpesvirus 6B infection of the large intestine of patients with diarrhea. Clin Infect Dis 36:120-3, 2003.

Ueda K, Ishikawa K, Nishimura K, Sakakibara S, Do E, Yamanishi K. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) replication and transcription factor activates the K9 (vIRF) gene through two distinct cis elements by a non-DNA-binding mechanism. J Virol 76:12044-54, 2003.

G. 知的所有権の取得状況  
(出願準備中)

---

平成15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

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

平成16年9月30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