

図 2. 各個体(上段:鼻腔内接種非免疫サル群;下段:皮下接種非免疫サル群)における血中サイトカイン[IFN-gamma(右)および IL-6(左)]濃度の推移. 皮下接種非免疫サル群のサル(#4567)は, 感染 10 日目に死亡している.

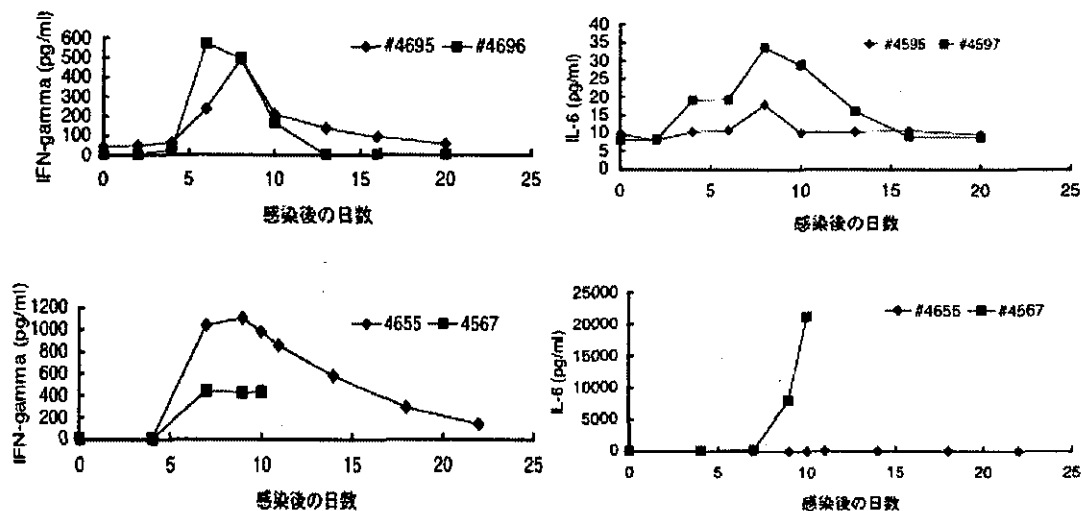
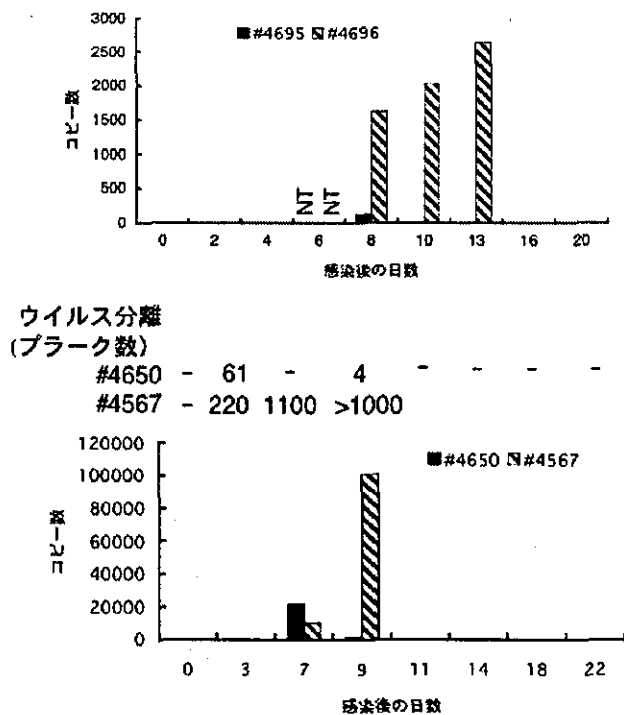


図 3. 各個体(上段:鼻腔内接種非免疫サル群;下段:皮下接種非免疫サル群)におけるウイルス血症およびウイルスゲノム血症の推移. 皮下接種非免疫サル群のサル(#4567)は, 感染 10 日目に死亡している.



単純ヘルペスウイルス感染症に対するワクチンの検討

分担研究者 錫谷 達夫(福島県立医科大学微生物学講座 教授)

研究要旨

単純ヘルペスウイルスに対するワクチンとして、どのようなワクチンが理想的であるかを明らかにすることを目的に、マウスの動物実験系を用いて研究を行った。生ワクチンとして病原性を持つ野生株 VR-3 株と免疫からの回避機能が欠損した弱毒株 VRΔ41 株、チミジンキナーゼ活性を欠損した弱毒株 VRTK⁻株、不活化ワクチンとして UV を照射して感染性を無くした VR-3 株を用いた。4週齢の Balb/c マウスに種々の量のワクチンを腹腔内投与し、4週後、50%致死量(50% lethal dose; LD₅₀)の20倍量の VR-3 株を脳内接種あるいは200倍量の VR-3 株を腹腔内接種して、その生存率を観察した。その結果、VRΔ41 株が最も強い免疫を誘導し、ワクチンとして優れていること、また、脳炎の予防にはウイルスが脳内に侵入し、増殖しなければならないことが解った。以上の結果は、ヘルペス脳炎の予防を目指すワクチンは現実的ではないこと、また、免疫からの回避機能を無くしたウイルス株は良い弱毒生ワクチン株の候補であることを示唆するものである。

A. 研究目的

単純ヘルペスウイルス1型と2型(Herpes Simplex Virus Type 1 and 2; HSV-1, HSV-2)は、およそ100万年前に分岐したウイルスとされ、74 個の遺伝子のほとんどは 90% 前後の相同性を持つ。HSV-1 は歯肉口内炎、角膜炎、脳炎など主に上半身に、HSV-2 は陰部ヘルペスや産道

感染による新生児ヘルペスなど下半身に感染すると言われてきたが、陰部ヘルペスの40%程度はHSV-1によるもので、必ずしも2種のウイルスの棲み分けが厳密に行われているものではない。

米国では、成人の4分の1ほどが HSV-2 に感染しており、多数の陰部ヘルペス感染症例が存在する。陰部ヘルペスはしば

しば致命的な感染となる新生児ヘルペスの原因であることもあって、HSVワクチンの開発は急務と考えられている。一方、日本では HSV-2 の感染者は数%しかおらず、米国のような陰部ヘルペスの蔓延はない。しかし、かつては幼少期に感染していた HSV-1 に感染していない成人が増加し、妊婦検診の結果では、世界で最も HSV-1 感染率の低い民族となった。HSV-1 と HSV-2 は抗原の交叉があり、幼少期の HSV-1 感染が思春期以降に性行為で感染する HSV-2 のワクチンとなっていた可能性が考えられるが、今後、HSV-1 未感染者が HSV-2 に感染する例が増加した場合、陰部ヘルペスの重症例が増加する可能性も考えられる。そのため、日本においても HSV ワクチンの開発は進められるべきである。

近年、多くのウイルスが宿主の免疫から逃避する機能を持つことが明らかにされてきた。HSV でも、ICP47 が宿主の TAP (transporter associated with antigen processing) を抑制することによって感染細胞の抗原提示を抑制すること、Us11 が 2 本差 RNA に結合することにより、インターフェロンが誘導する抗ウイルス因子の活性化を防ぐこと、糖タンパク E (glycoprotein E;

gE) には Fc receptor 活性があり、ウイルス粒子や感染細胞に結合した抗体の Fc をマスクすることによって補体の活性化や Fc receptor を持つキラー細胞、食食細胞から回避すること、gC は C3b receptor で補体の活性化を防ぐことが明らかにされた。また、UL41 遺伝子産物である RNase は、感染細胞のインターロイキンや腫瘍組織適合抗原の産生を抑制することによって、炎症やキラー細胞による感染細胞の破壊を抑制する機能があることを我々は報告してきた (Suzutani et al. J. Gen. Virol. 81: 1763-1771, 2000)。このようなウイルスの免疫回避機能によって、感染しても有効な免疫が樹立されない可能性も予想される。そこで、本研究では、UL41 を欠損したウイルスを弱毒生ワクチンとして用い、免疫回避機能を欠損ウイルスが強い免疫を誘導するワクチン株となりうるか否か、それとワクチンが誘導する免疫が単純ヘルペスウイルスによって引き起こされるどの疾患に有効であるのかを検討した。

B. 研究方法

1. ウイルス株:

HSV-1 野生株である VR-3 株、チミジンキナーゼ (Thymidine kinase; TK) 欠損株 VRTK⁻株、UL41 遺伝子欠損株 VRΔ

41 株、UL41 復帰変異株 VR Δ 41R 株を用いた。不活化ワクチンを調製するためのウイルス不活化は、254 nm の UV を 2 Jcm⁻² 照射して行った。

2. マウスを用いたワクチン評価:

4週齢のメスの Balb/c マウスを用いた。マウスに種々のワクチンを腹腔内投与した4週間後に、野生株 VR-3 株を 200 LD₅₀ (50% lethal dose) 腹腔投与、または 20 LD₅₀ 脳内接種し、マウスの生死を観察し、ワクチンの効果を判定した。

3. HSV-1 株のマウス体内での増殖:

野生株と UL41 欠損株のマウス体内での増殖を調べた。1000 pfu 腹腔内にウイルスを接種後 0.5、1、2、3、4、5、6、7日に腹腔の洗浄液、胃、脳を採取した。腹腔洗浄液は 15,000 rpm 5分遠心して上清とペレットに分画し、上清は腹腔内に存在する free のウイルスとして、ペレットは培地で3回洗浄後、感染マクロファージのサンプルとしてウイルスのタイトレーションに用いた。胃と脳は培地中でホモジナイズし、ウイルスのタイトレーションに用いた。

サンプル中のウイルス数は Vero 細胞を用いて通常の方法で計測した。感染マクロファージ数の計測は Vero 細胞に段階希

釈したマクロファージを加え、一晚培養後に、培地をメチルセルロース添加培地に交換する、いわゆる infectious center assay を用いた。

C. 研究結果

1. 実験に用いたウイルス株の病原性:

はじめに、今回の実験に用いたウイルス株の Balb/c マウスでの病原性を調べた (Table 1)。脳内、腹腔内接種の系共に、宿主の週齢に伴う弱毒化が UL41 欠損株と TK 欠損株で認められ、弱毒化の度合いは後者の方が強かった。また、この結果をもとに、以下のワクチン実験で、8週齢のマウスに接種する VR-3 株のタイターを脳内接種では 120 pfu (20LD₅₀)、腹腔内接種では 9.0×10^5 pfu (200LD₅₀) と決定した。

2. HSV ワクチンの効果:

種々の HSV-1 株を4週齢 Balb/c マウスにワクチンとして接種後4週目に野生株をチャレンジし、生存率を調べた結果を図にまとめた (Fig. 1)。ワクチンを腹腔投与した場合、野生株の腹腔感染に対し、VR Δ 41、VR-3、VRTK⁻、VR-3 不活化ワクチンの順でワクチンの効果が高く、全てのワクチンで効果が認められた (Fig. 1A)。なお、

VR-3 をワクチンとして打った場合は、強い感染によって多くのマウスが死亡し、生き残ったマウスを次のウイルスチャレンジに用いた。つまり、VR Δ 41 は野生株に感染し、治癒したマウスよりも強い免疫を誘導する。

脳炎に対しては、VRTK⁻の効果が低く、不活化ワクチンでは全く効果が認められなかった (Fig. 1B)。そこで、ワクチンを脳内に接種し、脳炎の予防にどのように作用するかを調べた。その結果不活化ワクチンでも弱いながら効果が認められた (Fig. 1C)。以上の結果から1) VR Δ 41 株が優れた弱毒生ワクチン株の候補となりうること、2) 不活化ワクチンの結果から脳炎の予防には抗原が脳内に入って脳の免疫を誘導しなければならぬことが明らかとなった。

3. ウイルスのマウス体内での増殖:

VR Δ 41 株が脳炎に対しても有効なワクチンであったことから、この株が実際に脳内に入って増殖するか否かを検討した (Fig. 2)。

野生株 VR-3 株では、腹腔内、腸管壁で増えたウイルスが感染4日目には中枢神経系に到達して増殖する (Fig. 2A)。

一方 VR Δ 41 株では腹腔内や消化管でのウイルスタイターは野生株の10⁻¹⁰~10⁻¹⁰⁰

0分の1で、感染3日目には検出できなくなった。それでも少数のウイルスは中枢神経系に到達して、わずかながら増殖していた (Fig. 2B)。

D. 考察

これまで、少なくとも HSV の5つの因子が宿主の免疫から回避する機能を持っていることが明らかとなっていて、この機能が無い変異ウイルスは弱毒化する。今回我々は、その1つ、UL41 を欠損したウイルスをワクチンとして動物実験を行い、強い免疫を誘導する優れた弱毒生ワクチン株候補であることを明らかにした。この弱毒化ならびに生ワクチン化の戦略は単純ヘルペスウイルスに限らず、免疫からの回避機構を持つ全てのウイルスに応用可能なものと予想される。

ワクチンによって HSV 感染のどのステップ、どの病気を防ぐのかを検討することは重要な課題である。ヘルペスウイルスは重感染することが知られており、我々の作る免疫で感染そのものを防ぐことが出来ないことは明らかである。したがって、ワクチンに期待する作用は、1) 重症となる初感染を軽症化する、2) 回帰感染の回数を減少させる、3) ウイルスは感染の頻度を低下さ

せ、感染源となる危険性を軽減させるという点であろう。また、対象となる疾患は回帰発症を繰り返す陰部ヘルペスと陰部ヘルペスが原因となる新生児ヘルペスということになる。

脳炎については、本研究で明らかに出来た様にウイルスが脳に侵入しなくてはならず、このようなウイルス株を弱毒生ワクチンとして接種することが可能であるかという難しい問題を含んでいる。今後、本研究課題で計画されているウイルスベクターを用いたワクチンによって、さらに問題を明らかにし、解決していきたい。

E. 結語

- 1) 免疫回避脳を欠損した HSV-1 VR Δ 41 株は弱毒生ワクチンとして優れた効果を発揮した。
- 2) ヘルペス脳炎を予防するためには、ウイルス抗原が脳内に侵入し、脳で免疫反応を起こさなければならないことが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kaneko, H., S. Mori, O. Suzuki, T. Iida, S. Shigeta, M. Abe, S. Ohno, K. Aoki and T. Suzutani. The cotton rat model for adenovirus ocular infection: antiviral activity of cidofovir. *Antiviral Res.* 61:63-66 (2004)

2. Yokota, S., N. Yokosawa, T. Okabayashi, T. Suzutani, S. Miura, K. Jimbow and N. Fujii. Induction of suppressor of cytokine signaling-3 by herpes simplex virus type 1 contributes suppression of interferon signaling pathway and replication of virus. *J. Virol.* 78: 6282-6286 (2004)
3. Koyano, S., T. Suzutani, Y. Hirano, A. Araki, K. Yagyu, K. Muro, N. Inoue and K. Fujieda. Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection by using dried umbilical cords. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 23: 481-482 (2004)
4. Kimura, K., K. Ishioka, K. Hashimoto, S. Mori, T. Suzutani, T.L. Bowlin and S. Shigeta. Isolation and characterization of NMSO3-resistant mutants of respiratory syncytial virus. *Antiviral Res.* 61: 165-171 (2004)
5. Murata, M., H. Gouda, K. Yano, S. Kuroki, T. Suzutani and Y. Katayama. An electrochemical device for the assay of the interaction between a dioxin receptor and its various ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14: 137-141 (2004)
6. Hashimoto, K., B.S. Graham, S.B. Ho, K.B. Adler, R.D. Collins, S.J. Olson, W. Zhou, T. Suzutani, P.W. Jones, K. Goleniewska, J.F. O'Neal and R.S. Jr. Peebles. Respiratory syncytial virus in allergic lung inflammation increases Muc5ac and gob-5. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 170: 306-312 (2004)
7. Hashimoto K, B.S. Graham, M.W. Geraci, G.A. FitzGerald, K. Egan, W. Zhou, K. Goleniewska, J.F. O'Neal, J.D. Morrow, R.K. Durbin, P.F. Wright, R.D. Collins, T. Suzutani, R.S. Peebles Jr. Signaling through the prostaglandin I₂ receptor IP protects against respiratory syncytial virus-induced illness. *J. Virol.* 78: 10303-10309 (2004)
8. Saijo, M., T. Suzutani, S. Morikawa and I. Kurane. Genotypic characterization of the DNA polymerase and sensitivity to antiviral compounds of foscarnet resistant HSV-1 derived from a foscarnet-sensitive herpes simplex virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 606-611 (2005)

2. 学会発表

橋本浩一、細谷光亮、石橋 啓、金子久俊、錫谷達夫. STAT-1 欠損マウスを用いた重症

Respiratory Syncytial Virus 感染症発症病理
の検討 第52回日本ウイルス学会学術集会
横浜(2004)

金子久俊、橋本浩一、石橋 啓、青木功喜、大
野重昭、錫谷達夫. LAMP 法による単純ヘ
ルペスウイルスの迅速同定 第52回日本ウイ
ルス学会学術集会 横浜(2004)

石橋 啓、橋本浩一、金子久俊、錫谷達夫. ヒ
トサイトメガロウイルス(HCMV)タイプ別抗体の
測定とその臨床応用. 第52回日本ウイル
ス学会学術集会 横浜 (2004)

横田伸一、横沢紀子、岡林環樹、錫谷達夫、
藤井暢弘. HSV-1 感染による宿主
JAK/STAT ネガティブレギュレーター SOCS3
の誘導とその意義. 第52回日本ウイルス
学会学術集会 横浜 (2004)

茂田士郎、森修一、山瀬利博、杉井俊二、
田島朋子、錫谷達夫. コロナウイルス感染
症に対する抗ウイルス剤の開発—ポリオク
ソメタレート抗コロナウイルス効果—.
第14回抗ウイルス化学療法研究会 名古
屋 (2004)

錫谷達夫、金子久俊、森修一、橋本浩一. 黒
色果汁の抗ウイルス効果の検討. 第14回
抗ウイルス化学療法研究会 名古屋 (2004)

金子久俊、川名尚、錫谷達夫. 単純ヘルペ
スウイルス 1 型、2型混合感染症の解析.
第58回日本細菌学会東北支部総会 仙台
(2004)

3. 特別講演

錫谷達夫. ヘルペスウイルスのインターフ
ェロン抵抗性. 第14回抗ウイルス化学療
法研究会、名古屋、2004.

錫谷達夫. 感染症予防対策. 福島県国保地
域医療学会. 7月10日 福島市

錫谷達夫. 移植後サイトメガロウイルス感
染症の発症病理. 第10回福島移植フォー
ラム. 7月17日 福島市

錫谷達夫. 先天性サイトメガロウイルス感
染による聴覚障害. 平成16年度病診連携
懇談会. 11月17日 福島市

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1. HSV-1 株のマウスに対する病原性

Virus	Intracerebral (i.c.) inoculation ^a			Intraperitoneal (i.p.) inoculation		
	3-day-old	4-week-old	8-week-old	3-day-old	4-week-old	8-week-old
VR-3	0.21	2.0	6.0	0.37	27	4.5×10^3
VRΔ41	1.0	3.6×10^3	N.T. ^b	10	$> 10^6$	$> 10^6$
VRΔ41R	0.23	1.1	N.T.	0.63	1.0×10^2	N.T.
VRTK ⁻	79	$> 10^5$	$> 10^5$	25	$> 10^6$	$> 10^6$

^a 50%致死量 (LD50) を pfu/マウスで示した。

^b Not tested.

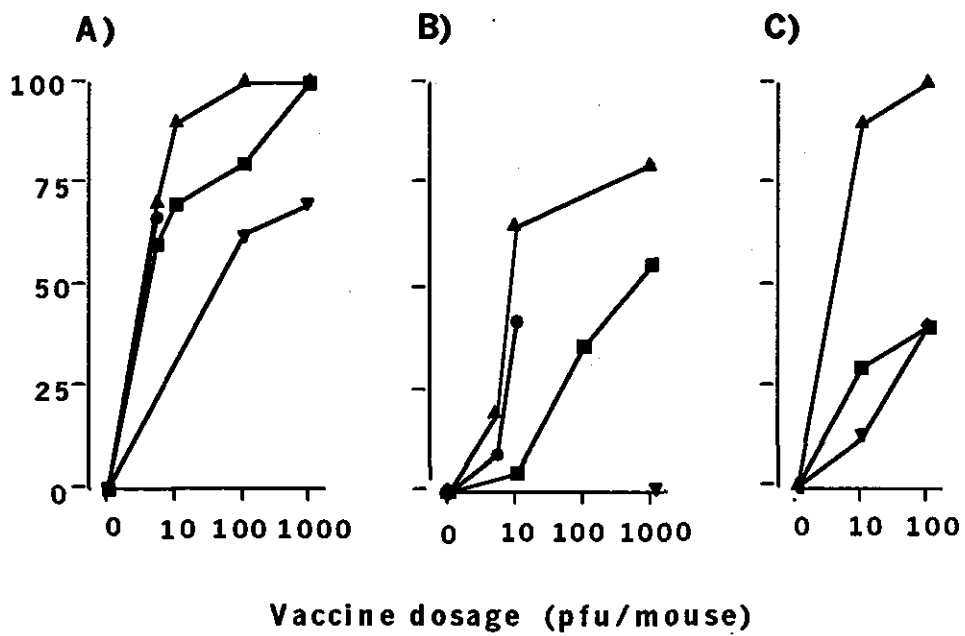


Fig. 1 HSV-1 株のワクチン効果。種々の量の HSV-1 を腹腔内 (A、B) または脳内 (C) にワクチンとして接種。4 週後 200LD50 の VR-3 株を腹腔に (A)、または 20LD50 の VR-3 株を脳内 (B、C) に接種し、生存率を調べた。

記号： ●VR-3、▲VRΔ41、■VRTK⁻、▼UV 照射 VR-3

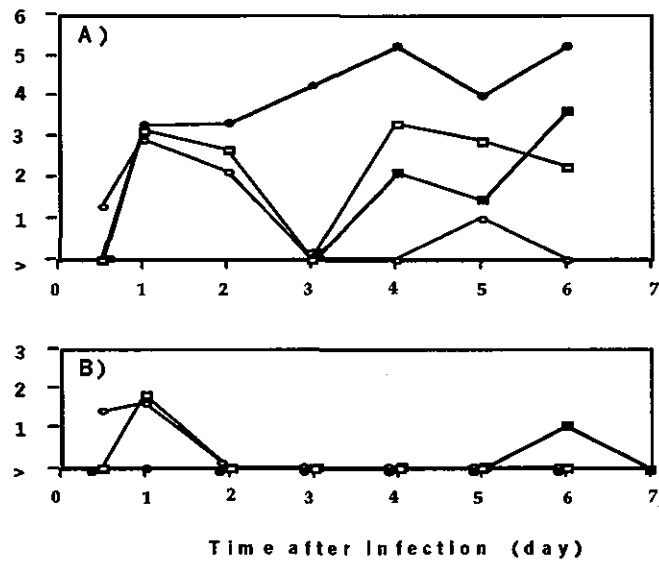


Fig. 2. HSV-1 株のマウス体内での増殖。10³ pfu の VR-3 株(A)、VRΔ41 株(B)をマウスの腹腔内に接種し、各臓器内のウイルス量を測定した。
 記号: ●胃、■脳、□腹腔内 free virus、○腹腔内感染マクロファージ

厚生労働科学研究費新興再興感染症研究事業
分担研究報告書

ヘルペスウイルスワクチンの評価法の開発に関する研究

分担研究者	井上 直樹	(国立感染症研究所)
協力研究者	Vladimir Loparev	(米国疾病対策センター)
	古谷野 伸	(旭川医大小児科)
	原田 志津子	(国立感染症研究所)
	野沢 直樹	(国立感染症研究所)

研究要旨 エンベロープをもつウイルスにおいては、ウイルス糖蛋白が免疫原として中和抗体やCTL活性の誘導を行うなどワクチン開発において重要な役割を果たす。G蛋白を欠き感染性のない組換え体水泡性口内炎ウイルス (VSV) のエンベロープに他のウイルスの糖蛋白を取り込ませて感染性を回復させたシュードタイプウイルスは、糖蛋白の機能や中和抗体等の解析に有用である。本研究では、レトロウイルスとヘルペスウイルスの糖蛋白をモデルとしてシュードタイプウイルスの作製とその応用について検討を加え、1) マウス白血病ウイルス (MLV) env 糖蛋白の場合、MLV粒子内と同様なプロテアーゼ分解産物により高い感染効率が得られること、2) 単純ヘルペスウイルス (HSV) の場合、糖蛋白B(gB), gD, gH, gLの組合せが感染のために必須十分であること、3) MLV envとヘルペスウイルスの個別の糖蛋白を組合せることにより抗体価を測定できることなどを見出した。

研究目的

新規ワクチンの評価において中和抗体価の測定は必須である。しかしながら、バイオセーフティ上の理由から容易に培養できないウイルス、細胞培養系で増殖しないもしくは力価測定に時間と労力を必要とするウイルスも存在する。こうした場合に、感染に必要なG蛋白の代わりに緑色蛍光蛋白(GFP)ないしはアルカリフォスファターゼ(AP)を発現する組換え体水泡性口内炎ウイルス (VSV) を用いて、当該ウイルスの糖蛋白をエンベロープに持つVSVシュードタイプを作製し、そのウイルスの中和抗体価の測定等を行うことが可能である。VSVシュードタイプは、中和エピトープの解析をはじめ、吸着や侵入といった感染初期におけるウイルス糖蛋白の機能解析にも用いられてきた。しかしながら、方法論的には、1ないし2種類の外来糖蛋白を有するシュ-

ードタイプウイルスのみしか報告されておらず、外来糖蛋白としてどこまでの数や組合せを導入したシュードタイプが検出可能なウイルスとして作製できるかは不明である。また、報告されているシュードタイプは、導入した外来糖蛋白に依存して感染が成立するもののみであり、中和の標的になるなど感染に関与していても感染力のあるシュードタイプウイルスを単独では作製できないような糖蛋白に対する解析方法は報告されていない。さらに、本来の糖蛋白よりもVSV-G由来の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインとキメラにした蛋白の方がシュードタイプへの取り込み効率が良くなった事例が報告されているが、すべてのウイルス糖蛋白に普遍化できるかについては不明である。本研究ではこれらの点についてレトロウイルスとヘルペスウイルスをモデルに検討を行った。具体的には、1) レトロウ

ウイルスであるマウス白血病ウイルス(MLV)の env 蛋白、ヘルペスウイルス科の単純ヘルペスウイルス(HSV)、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)、サイトメガロウイルス(CMV)の主要な糖蛋白(表1)の遺伝子発現系を確立するとともに、2) MLVenvとVSV-Gとのキメラ蛋白の解析によりVSV-G由来ドメインの必要性を検討した。さらに、3) ヘルペスウイルス糖蛋白を数種類組合せることにより感染性VSVシュードタイプウイルス作製が可能かを検討し、4) 単独で感染性のVSVシュードタイプとならない個別の糖蛋白とMLV env蛋白とを組合せることにより感染性となるシュードタイプを作製することで特異的な抗体価測定に用いる方法を検討した。

研究方法

- 1) ヘルペスウイルスゲノム DNA の調製: VZV P-Oka 株 (山西弘一博士より分与)、CMV AD169 株及び Towne 株 (ATCC より購入) 感染細胞より、Straus らの方法に従いゲノム DNA を nucleocapsid DNA として精製した。即ち、感染細胞を集め、界面活性剤を含む緩衝液で溶解後、細胞由来の核酸を酵素分解し、ここからウイルスキャプシドを含む分画を超遠心により回収後、プロテアーゼ処理、フェノール抽出によりキャプシドにパッケージングされていたウイルスゲノムの DNA を精製した。
- 2) 糖蛋白発現系の構築: HSV の糖蛋白発現系についてはすでに報告した (Koyano et al., 2003)。VZV 及び CMV の糖蛋白遺伝子は PfuI ポリメラーゼを用いてゲノム DNA を鋳型として PCR により増幅し、pcDNA3 (Invitrogen) 及び pCAGGS (斉藤泉博士より分与) にクローニングした。Ecotropic MLV の env 蛋白遺伝子は MLV ゲノムの一部を含むプラスミド (DW Russell 博士より分与) よりクローニングした。すべてのプラスミドクローンについてその ORF の塩基配列を確認した。VZV 糖蛋白 B (gB), gH, gE, gI に対するモノクローナル抗体 (V Loparev)、CMV gB, gH に対するモノクローナル抗体 (Chemicon)

及び CMV gM ペプチドを KLH 蛋白に結合し免疫して得たウサギ抗体 (Koyano, Inoue 未発表) を用いて蛍光抗体法にて各蛋白の発現を確認した。

- 3) VSVシュードタイプの作製: 293T細胞に各糖蛋白発現プラスミドを燐酸カルシウム法にて導入し、24時間後VSV-ΔG* (M Whitt博士より分与) をMOI=3で感染し、その20-24時間後に感染上清を集め0.45μmフィルターによりろ過し、シュードタイプウイルスを得た。シュードタイプの評価にはヒト由来細胞株であるHeLa、293T、U373MG、hTERT-BJ1、MeWo、BSC40、マウス由来細胞株NIH3T3、ラット由来細胞株XC1、ハムスター由来細胞株CHOなどを用いた。
- 4) シュードタイプウイルスの精製: MLVenv 及びCMV gBのシュードタイプウイルスは、5、20及び50%ショ糖の3層を使用したステップグラジエント遠心により精製した。

研究結果

- 1) HSV糖蛋白によるシュードタイプ: HSV では、各糖蛋白遺伝子をノックアウトした組換え体HSVの解析からgB, gD, gH, gLが感染に必須であることが知られている。また、これら4つの糖蛋白の組合せにより細胞融合が引き起こされることも報告されている。そこで、本研究では、この4つのHSV糖蛋白を組合せたシュードタイプがフリーなウイルスとしての感染力をもつかを検討した。その結果、4つの糖蛋白全てが発現された場合にのみ感染性のあるシュードタイプが産生されることを見出した(図1)。このシュードタイプは中和能をもつ抗gBモノクローナル抗体により感染が阻害されたが、中和能のないモノクローナル抗体では感染阻害が起らなかった。また、シュードタイプウイルス感染の際10mM塩化アンモニウム処理を行うと、バックグラウンドの感染が低下しエンドサイトーシスに依存しないHSVに特異的な感染のみが測定できた。従って、4つのHSV糖蛋白によるシュードタイプウイル

スは本来のHSVの感染様式を反映していると考えられる。

- 2) VZV、CMV糖蛋白によるシュードタイプ：
VZV gB, gH, gL, gE, gI, gC, gM, gN
CMV gB, gH, gL, gO, gM, gN, gp42などの糖蛋白遺伝子のクローニングを行い、塩基配列を確認した。293T及びCHO細胞株に一過性のトランスフェクションを行い、各蛋白に対する特異抗体を用いた蛍光抗体法にて蛋白発現を確認した。

これらのCMVもしくはVZV糖蛋白を様々に組合せて発現させ感染性のあるシュードタイプウイルスの作製を試みたが現在までのところHSVと同等レベルの感染性を有するものを作製するには至っていない。また、いずれの糖蛋白自体もHSVシュードタイプウイルス形成は阻害しなかった。

- 3) MLVenv蛋白によるシュードタイプ：
Ecotropic (マウス・ラットに感染するがヒト細胞に感染しない) MLVのenvとVSV-Gとのキメラ蛋白を発現させ、VSVシュードタイプとしての感染性をNIH3T3細胞で検討したところ、MLVのプロテアーゼにて切断されるカルボキシル末端19アミノ酸部位を欠失させたものがVSV-Gとのキメラに比べても感染性が高かった(図2)。このシュードタイプウイルスはヒト由来の細胞株に感染性はなかった。

- 4) MLVenvとCMVgBによるシュードタイプ：
MLV envをHSV gB, gD, gH, gLと組合せてもシュードタイプの感染性は変化しなかった。そこで、MLV envとCMV gBの組合せでVSVシュードタイプを作製し精製後、CMV gBに対する抗体を用いてウェスタンブロッティング法によりgBが精製粒子中に含まれているかを確認した(図3)。CMV gBは本来のCMV粒子中に含まれるのと同様に、プロテアーゼで切断された2蛋白として検出された。

次に、補体存在下で特異性がすでに解析済みのヒト血清パネルをMLV envとCMV gBのシュードタイプと反応させ、その感染阻害について検討した。その際、ゲノムタ

イプの異なるAD169株及びTowne株由来のgBにより作製したシュードタイプも比較した。その結果、血清希釈10倍においてCMV陰性血清によるシュードタイプに対する感染阻害は5%以下であった。一方、CMV陽性血清ではシュードタイプ感染が20-95%の範囲で阻害された(図4)。この感染阻害はCMV Towne株を用いて測定した中和抗体価に相関した。また、ゲノムタイプの異なるgBを用いたシュードタイプ間で差異を示す血清もあり現在詳細な検討を行っている。

考察

ヘルペスウイルス科に分類される各ウイルスの場合、ウイルスごとにその初感染及び再活性化の病態も潜伏感染の標的となる細胞の種類も異なる。公衆衛生の観点からワクチンの開発が重要な疾病としては新生児ヘルペスと先天性CMV感染症がある。妊婦のHSV初感染ないしは再活性化に伴う産道感染により新生児ヘルペスはおこる。抗ウイルス剤の発達により致死的ではなくなったものの依然として重篤な後遺症を残す。一方、先天性CMV感染症は、妊婦の初感染に伴う経胎盤感染により新生児に発達障害がもたらされるものである。すでに市販ワクチンが存在するVZVと併せ、HSV及びCMVに対するワクチン開発状況とワクチンに関連する糖蛋白について表1にまとめた。HSVの場合、弱毒生ワクチンはワクチン効果が十分に発揮されなかった。感染細胞内で増殖するが感染力のない粒子が産生されるため感染が広がらないタイプのDISC (disabled infectious single cycle) ワクチンの一部については第2相の治験での良好な成績が報告されている。また、gB及びgDのサブユニットワクチンが検討されてきたが、アジュバントにより結果に大きな違いがあるうえ効果が限定的であった。しかし、女性を対照とした場合に有用である可能性が残されているため第3相の治験が現在米国で進行中である。CMVについては、Institute of Medicine (IOM) レポートにおいてワクチン開発の優先度が最も高く位置づけられているものの、先天

性感染の動物モデルやワクチン評価系の制約のため開発がすすんでいない。ワクチン評価の制約要因のひとつには、HSV以外のヘルペスウイルスでは、高力価の細胞フリーのウイルスが取りづらい (10^4 - 10^6 pfu/ml以下) ことに加え、ウイルス増殖が遅くプラーク形成にも1週間単位で時間がかかるため、力価測定を必要とする中和抗体価測定などが治験にとって大きな負担となっていることが挙げられる。また、CMVにはいくつかのゲノムタイプが存在し、gBやgHなどの中和エピトープ中のアミノ酸配列に差が認められる。異なるゲノムタイプをもつウイルスにより再感染し疾病がおこる例も報告されていることから、ゲノムタイプ別の測定系開発も求められている。

本研究では、HSVgB, gD, gH, gLの組合せにより作製したVSVシュードタイプが感染性をもち、どのひとつのHSV糖蛋白を欠いても感染力を失うことを示した。この結果は、4つの糖蛋白の組合せがHSV感染に必須十分であるとする細胞融合系の実験に基づく推測を細胞フリーのウイルス感染によりはじめて実証したことになる。HSV糖蛋白を用いたシュードタイプウイルスは、HSVの増殖が早いことから、実用的な利便は発生させない。しかしながら、今後、gBやgDに変異を導入したシュードタイプを迅速に作製できることから、HSV感染に必須な蛋白ドメインや中和エピトープの迅速な解析に利用できると考えられる。さらに、MLVenv蛋白と組合せることにより単独で感染性VSVシュードタイプを作製できないようなCMVgBに対する抗体価を感染粒子に近い立体的条件で検討できること、また、ゲノムタイプの異なるgBを並行して検討できることを示した。

現在、HSV gB及びgD、CMV gB及びgHを発現するセンダイウイルスベクターや狂犬病ベクターを作製し、これらのベクターを用いてマウスを免疫する研究の準備を進めており、今回検討したシュードタイプによる中和抗体測定法を用いることにより迅速なワクチン評価ができるようになることが期待できる。また、アラバマ大のグループが行っているCMV Towne株gB由来のサブユニットワクチンの治

験において異なるゲノムタイプに対する抗体価をモニターすることによりTowne型ではないCMVによる自然感染に対するワクチンの防御効果が測定できるようになると考えられ、方法の確立を待つて共同研究を行いたいとの申し入れがある (B. Pass博士私信)。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) N. Inoue, T. Spira, L. Lam, J.L. Corchero, W. Luo. (2004) Comparison of serologic responses between Kaposi's sarcoma- positive and -negative men who were seropositive for both human herpesvirus 8 and human immunodeficiency virus. *J. Med. Virol.* 74:202-206.
- 2) L.T. Krug, V.P. Pozharskaya, Y. Yu, N. Inoue, M.K. Offermann. (2004) Inhibition of infection and replication of human herpesvirus 8 in microvascular endothelial cells by alpha interferon and phosphonoformic acid. *J Virol.* 78:8359-71.
- 3) V. Pozharskaya, L.L. Weakland, J.C. Zimring, L.T. Krug, E.R. Unger, A. Neisch, H. Joshi, T. Kroll T, N. Inoue, Offermann MK. (2004) The impact of viral interferon regulatory factor-1 expression on responsiveness to interferon alpha and the production of infectious human herpesvirus 8 by BCBL-1 cells. *J.Virol.* 78:6621-6635.
- 4) S. Koyano, A. Araki, Y. Hirano, K. Fujieda, T. Suzutani, K. Yagyu, K. Murono, N. Inoue. (2004) Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection using dried umbilical cords. *Ped. Infect. Dis. J.* 23:481-482.

2. 学会発表

井上直樹、T Spira, L Lam, JL Corchero, W Luo. HHV-8とHIV重感染者におけるカポジ肉腫発症群と非発症群の間での免疫反応の比較 第19回ヘルペスウイルス研究会 2004年6月

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

図1 HSV糖蛋白によるVSVシュードタイプ

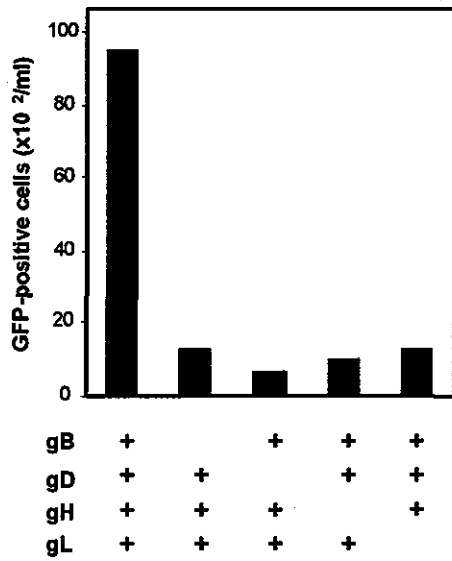


図2 MLVenv蛋白によるシュードタイプ

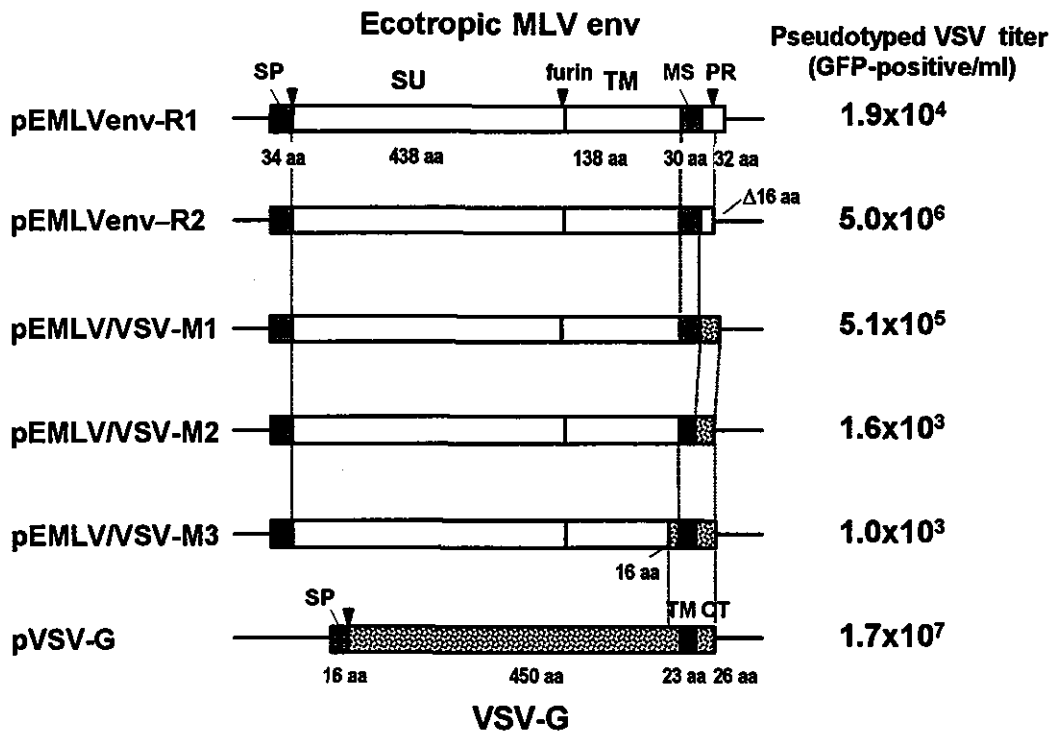


図3 シュードタイプ粒子に**CMVgB**取り込まれたことの確認
(抗**CMVgB**抗体を用いたウエスタンブロット)



図4 シュードタイプを用いた**CMVgB**に対する抗体の検出

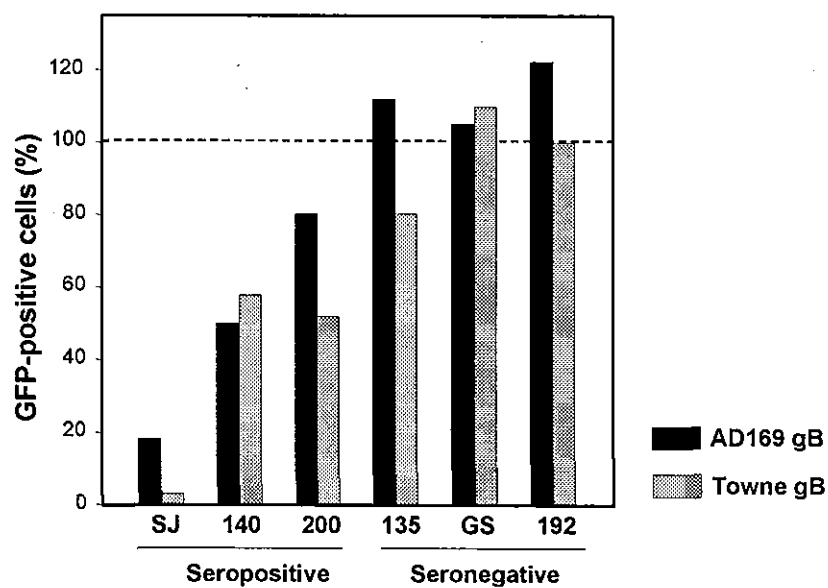


表1 ヘルペスウイルスワクチンと糖蛋白

サブファミリー		alphaherpes	betaherpes	
ウイルス		HSV	VZV	HCMV
疾病	初感染	新生児ヘルペス	水痘	(妊婦) 先天性感染
	再活性化	口唇ヘルペス 性器ヘルペス	帯状疱疹	(移殖) 日和見感染
ワクチン開発	生ワクチン	免疫原性が弱いため 開発打切り	岡ワクチン株 実用販売	Towne/Toledo組換え体 第1相治験
	DISC	gH欠損、ICP10欠損等 第2相治験	/	無
	サブユニット	gB, gD+アジュバント 第3相治験		gB+アジュバント 第2相治験
感染動物モデル		マウスなど各種	SCID-huマウス	HCMV感染性なし
糖蛋白	gB	必須、吸着侵入 中和の標的 ワクチン開発の対象	(必須) 中和の標的	必須 中和の標的 ワクチン開発の対象
	gH/gL	必須、侵入 中和の標的	(必須) 中和の標的	必須、中和の標的
	gO	無	無	gH/gLと複合体
	gD	必須、受容体認識 中和の標的 ワクチン開発の対象	無	無
	gE/gI	細胞-細胞伝達	細胞-細胞伝達 中和の標的	無
	gM/gN	細胞融合	機能不明	機能不明 中和の標的
	gC	非特異的結合	無	無

ヒト Fab ライブラリーの構築と狂犬病ウイルス中和 モノクローナル Fab 抗体の選別

分担研究者 西園晃 (大分大学医学部感染分子病態制御講座)

協力研究者 山城哲 (大分大学総合科学研究支援センター)

安藤忠助 (大分大学医学部感染分子病態制御講座)

研究要旨：狂犬病ウイルスの曝露後にはその咬傷の程度に応じて能動免疫（ワクチン）の投与と、より重篤な曝露の際には受動免疫（グロブリン）の同時投与が推奨されている。しかし抗狂犬病グロブリン製剤は全世界的にも全く品薄で、その供給には以前より限界が指摘されている。コンビナトリアル・ライブラリー法およびファージディスプレイ法を組み合わせることにより狂犬病ワクチン接種後のヒトボランティア末梢血リンパ球から、ヒト抗体 Fab ライブラリーを構築し、狂犬病ウイルスを特異的に中和する能力のある Fab クローンを選別した。総計 132 クローンの中から 2 個の特異的 Fab クローン(EP5G3, GD2D12)が選別できた。これらはいずれも狂犬病ウイルスの G 蛋白を認識し、高いウイルス中和能力を示していた。

A. 研究目的

狂犬病は全ての哺乳類に感染しうる人畜共通感染症であり、ヒトの場合いったん発症するとその致死率はほぼ 100%である。全世界における狂犬病による年間死者数はおよそ 40,000 から 70,000 と推測され(WHO)、その多くはアジア、アフリカといった発展途上国に集中している。WHO は高度 (カテゴリーIII) の狂犬病ウイルス(RV)曝露後には直ちにワクチン接種と抗狂犬病抗体製剤(RIG)投与を推奨しており、適切に行われれば有効な治療(予防)とされているが、現在 RIG として

使用されているウマ血清およびヒト抗免疫グロブリンは高価で安定的な供給に限界があり、副反応、未知のウイルス感染症など問題点が多く、世界的には十分な治療を受けられず死亡する人の数は相変わらず減少していない。

現在、コンビナトリアル・ライブラリー法およびファージディスプレイ法を組み合わせることによりヒト抗体ライブラリーから感染性疾患の治療に有効なヒト抗体を選別することが可能となり、既にいくつかの報告がなされている。今回高い狂犬病ウイルス中和抗体価を有するが

ランティアの末梢血リンパ球を用いてヒト Fab ライブラリーを構築し、その中から狂犬病ウイルス中和活性を有するヒト Fab を分離したので報告する。

B. 研究方法

1) ウイルス

狂犬病ウイルス西ヶ原株及び challenge virus standard (CVS)株は当教室にストックしているものを用いた。西ヶ原株はパニング、Glycoprotein (RV G 蛋白)の精製、ELISA 用抗原として用いた。CVS 株は中和活性の評価および免疫沈降反応の抗原として用いた。

2) RV G 蛋白精製

RV G 蛋白は RV 西ヶ原株から 2% octyl- β -(+)-glucopyranoside を用いて定法に則り精製した。

3) ボランティア 6 名の狂犬病不活化ワクチンを用いた追加免疫

大分大学医学部倫理委員会によって承認後、書面による十分な説明と同意のもとに、過去に狂犬病ワクチンの接種歴がある 6 名の健康成人に対して市販の狂犬病ウイルス不活化ワクチン(HEP Flury 株、化血研)を用いて追加免疫を行った。添付書類に記載されている量を 2 週間おきに 2 回皮下に接種し、接種前、接種後 2 週間経過後に 6 名のボランティアの RV(西ヶ原株)に対する中和抗体価を rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT)によ

って測定した。

4) ヒト V_H/ κ Fab ライブラリーの構築

それぞれのボランティアから 100ml の末梢血を採取後 Ficoll-paque gradient を用いた遠心法にてリンパ球を分離し、リンパ球より得られた mRNA から cDNA を合成した。 κ 鎖可変領域(V _{κ})および重鎖可変領域(V_H)の DNA 断片を、報告されている V _{κ} および V_Hを全てカバーする primer set を用いて PCR 法にて増幅した。また、 κ 鎖定常領域(C _{κ})および Fd region (C_{H1})の DNA 断片も同様に各種 primer set を用いてヒト Fab がクローニングされた vector pComb3XTT を鋳型として PCR 法にて増幅した。V _{κ} と C _{κ} 、および V_Hと C_{H1}の DNA 断片から overlap PCR 法にて κ 軽鎖および重鎖 DNA 産物を合成した。最終的に κ 軽鎖および重鎖 DNA 産物を overlap PCR 法にて full-length Fab PCR 産物とし、pComb3X phagemid vector 上にヒト Fab ライブラリーを構築した。full-length Fab PCR 産物を含む pComb3X にて *E.coli* XL1-Blue を電気穿孔法にてトランスフォーメーションした。

5) ファージライブラリーのパンニング (生物学的濃縮)

全長 Fab PCR 産物を含む pComb3X にてトランスフォーメーションされた *E.coli* XL1-Blue の培養液に helper phage VCS M13 を感染させることにより phage ライブラリーに変換した。ELISA plate に