

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

研究要旨 ウエストナイルウイルス(WNV)ワクチン開発研究を緊急に開始した。(1)前期報告の不活化新 JE ワクチン製造法に準じて緊急に試作された不活化 WNV ワクチン候補品は、WNV NY99 株に対し十分な中和抗体誘導能を示し、日本侵入に対する対処の路が拓かれた。(2)WN サブユニットワクチン開発では：①WNV を中和する単クローン抗体の樹立に成功し、②ワクチン開発の基盤となる WNV 抗原及び抗体 ELISA 系を整備し、③構築した WNV 構造蛋白の cDNA 発現ベクターで大量の WNV 抗原の産生に成功した等、大きな進展をみた。(3)次世代 JE サブユニットワクチン開発では、ヒト投与が規制される BVDV 陽性細胞由来製品の問題に対処するため、BVDV 高感度検出法を確立した。(4)新テクノロジーでは、T 細胞株で CMV プロモーターより高活性を示す HHV-6B と HHV-7 の 2 種のプロモーターを見出した。

分担研究者

- (1) 国立感染症研究所感染病理部 小島 朝人
- (2) 国立感染症研究所ウイルス 1 部 高崎 智彦
- (3) (財)阪大微生物病研究会 東 雍
- (4) 大阪大学大学院医学系研究科 山西 弘一

A. 研究目的

WHOは熱帯・亜熱帯地域を視野に「ワクチンの改善・改良・新開発」の提言を行っている。フラビウイルス流行圏外の我国も、地球温暖化によりその脅威に曝される危険が現実化しつつある。既に米国では、ウエストナイルウイルス(WNV)が1999年突如侵入し、短期間で全土に定着し、今年も多数の患者・死者が発生している。フラビウイルスにはワクチン以外対処法がないため、ワクチンによる流行制圧を図ると共に、新たな侵入への対応を確立する必要がある。

研究組織・阪大微研会の、「マウス脳」を用いない細胞培養不活化日本脳炎(JE)新ワクチンの取り組みは、認可申請段階に到達して開発研究段階をクリアしたため、成功裏に本研究課題から解除した。他方、前期共同研究では、日本脳炎ウイルス(JEV)E蛋白をワクチン効果の高いウイルス様粒子抗原に生成するパイオプロダクションの技術開発に成功した(官民共同出願済)。そこでこの成果を進め、製造上ウイルス不使用/安全/安価な、理想の次世代サブ

ユニットJEワクチンに開発する事を、第1の目的とする。

一方、WNV は今や米国からカナダ・メキシコへと侵入し、日本侵襲の可能性がさらに高まっている。しかし、ワクチンは無い。WNVはJEVと同じ血清型の近縁フラビウイルスであるため、我々のJEワクチン開発で培われた技術と方策の有効活用が期待できる。そこで、緊急にWN 脳炎ワクチン開発を行なう事を第2の目的とする。

他方、未来ワクチンの代表たる DNA や新組換えワクチン開発の障壁が、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターの特許権による拘束にある。これに代わり且つ超えるプロモーターの開発は波及効果の高い目標である。本研究では、ヒトヘルペスウイルス 6B (HHV-6B) および 7 (HHV-7) のコードする前初期 (IE) プロモーターが血球の免疫担当細胞系で極めて高い活性を持つことに着目し、独自の新規プロモーター開発を行う。

B. 研究方法

(1) 次世代 JE サブユニットワクチン開発: FBS 混入 BVDV 感染リスクの検討: J12#26 細胞、ウサギ腎細胞 (RK-13; J12#26 細胞の親株とは継代歴が異なる)、牛精巣細胞 (FBT) とそれらの培養上清、及び培養に使用した FBS から全 RNA を抽出し、BVDV ゲノム RNA の 5' 末端非翻訳領域を RT-PCR で増幅

した (1st PCR;約 380bp、nested PCR;約 160bp)。J12#26 細胞、RK-13 細胞及び培養上清を FBT 細胞に接種し、市販の抗 BVDV 抗体 (VMRD, Inc.) を用いた間接蛍光抗体法で BVDV 抗原の検出を行った。これらの試験の陽性対照には BVDV Nose 株を使用した。

(2) WNV 不活化ワクチンの開発：組織培養 WNV 不活化ワクチン候補品の中和抗体誘導能：組織培養不活化 WNV NY99 株候補品を 4~32 倍の 4 段階に希釈し、その 0.5 ml を 4 週齢 DDY マウス腹腔に 1 週間隔で 2 度免疫した。免疫 2 回目の 1 週間後に各マウスから等量心臓採血し、等量混合後血清を分離した。JE ワクチン国家検定力価試験に準じて、分離血清の WNV NY99 株、JEV 北京 1 株、オーストラリアで 2001 年に分離されたクンジンウイルス K47382 株に対する中和試験をプラーク減少法で実施した。

(3) WNV サブユニットワクチンの開発：①抗-WNV 単クローン抗体の樹立：WNV NY99 株を Vero 細胞で増殖させ、ホルマリン不活化後、2 回の蔗糖密度勾配超遠心で精製した。このウイルス画分を BALB/C マウスに 4 又は 5 回免疫した。免疫マウスの脾臓を採取し、常法により細胞融合して抗体産生クローンを選択した。抗体価は間接蛍光抗体法で測定した。得られた 11 クローンそれぞれのイソタイプ (Immuno Pure Monoclonal Antibody Isotyping Kit;PIERCE 社) と WNV に対する中和能を調査した。②WNV の抗原・抗体 ELISA：保井らの樹立したフラビウイルス交叉性単クローン抗体 402 を用いたサンドイッチ抗原 ELISA 法で WNV 抗原を検討した。抗体 ELISA は、不活化 WNV をプレーティング抗原に用い、ALP 標識 2 次抗体と組合せた通常の ELISA 法で検討した。③WNV cDNA の合成・クローニング：WNV NY99 株を Vero 細胞に接種して、培養上清から WNV ビリオンを調整した。このビリオンよりウイルスゲノム RNA を抽出・精製した。RT-PCR で WNV 構造蛋白領域の cDNA を合成・増幅し、クローニングした。変異導入法で制限酵素サイトを導入し、分泌シグナル配列-prM-E 遺伝子領域の cDNA を発現する pW6&7' ベクターを構築した。④WNV 抗原の発現解析：構築した pW6&7' 発現ベクターを数種の細胞株にトランスフェクトし、培養上清及びその超遠心沈降画分を調整した。上清・沈降画分中の WNV 抗原を上記の抗原 ELISA で測定し、WNV 抗原の産生・分泌を検討した。

(4) 新テクノロジーの開発：DNA ワクチン用新規プロモーターの開発：HHV-6B および HHV-7 の主要前初期 (MIE) 遺伝子と U95 遺伝子の制御領域をルシフェラーゼ (luc) 遺伝子上流に挿入した。これら

のレポーターベクターと導入効率補正用の hRluc 発現ベクター (phRL-SV40) を、T 細胞株の Jurkat、Molt-3、SupT-1 と骨髄系細胞株の SAS-413、および末梢血単核球 (PBMC) にトランスフェクションし、luc 発光量を測定した。発光量を hRluc 値で補正し、CMV プロモーターとの活性を比較した。

(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) 次世代 JE サブユニットワクチン開発：FBS 混入 BVDV 感染リスクの検討

J12#26 細胞、RK-13 細胞、FBT 細胞の培養上清及び細胞抽出物中に BVDV ゲノム RNA の 5' 末端非翻訳領域約 160bp の増幅産物が検出された。また、RT-PCR で増幅された PCR 産物には、報告されている制限酵素 XhoI 認識部位が存在することも確認された。さらには、使用した市販の FBS (2 社) 中にも大量の BVDV ゲノムの存在が確認された。他方、J12#26 細胞、RK-13 細胞には間接蛍光抗体法で BVDV 抗原が検出されなかった。また、J12#26 細胞を FBT 細胞に接種した場合は抗原が検出されなかったが、RK-13 細胞を FBT 細胞に接種した場合には抗原が検出された。

(2) WNV 不活化ワクチンの開発：組織培養 WNV 不活化ワクチン候補品の中和抗体誘導能

WNV NY99 株を用いて作製された組織培養不活化ワクチン候補品は、WNV NY99 株に対して感染防御に十分な中和抗体価をマウスに誘導した。その中和力価は 8 倍希釈を除き免疫希釈濃度に対して濃度依存性を示した。しかも、この中和力価は、現行 JE ワクチン国家検定に使用されている JE 不活化ワクチン参照品 (製造株;北京 1 株) が JEV 北京 1 株に対して誘導する中和力価と比較してもほぼ同等の値であった。この免疫マウス血清は JEV 北京 1 株に対しても中和力価 10 倍 (1.0 log10) 以上と、感染防御可能な力価を示した。しかし、WNV に対する力価とは異なり、濃度依存性は示さなかった。一方、JEV よりも WNV に近縁であるクンジンウイルスの K47382 株に対しては有意な中和力価を示さなかった。

(3) WNV サブユニットワクチンの開発

①抗-WNV 単クローン抗体の樹立：2 回の細胞融合により、合計 11 クローンのハイブリドーマが樹立された。蛍光抗体法、ELISA 法により、いずれ

のクローンも WNV 抗原に対する抗体を産生していることが示された。この内の 1 クローン (WNV-11) については、WNV に対する高い中和活性を有していることが確認され、イソタイプは IgG2a κ であった。

②WNV 抗原および抗体 ELISA：不活化 WNV 及び JEV を標準抗原に用いて、WNV 抗原検出の新規 402-ELISA と前期報告した JEV 抗原検出の 503-ELISA を比較検討した。その結果、WNV 抗原はいずれの ELISA でも検出可能であること、感度においては抗原希釈度で約 10 倍の違いを示すこと、が明らかになった。次に、フラビ交叉性単クローン抗体 3 種、抗-WNV 或いは抗-JEV 血清 4 種の 100 倍と 10000 倍希釈を用いて、不活化 WNV/JEV を抗原とした抗体 ELISA を検討した。その結果、全ての抗体の検出が可能であった。さらには、フラビ交叉性抗体は 10000 倍希釈においても、両抗原に対して高い交叉反応性を示した。これに対し、抗-WNV 抗体は WNV 抗原・抗-JEV 抗体は JEV 抗原と強く反応し、高希釈で反応性は顕著に低下することが示された。

③WNV cDNA の合成・発現と発現抗原の検討：現在米国で流行している WNV NY99 株の C 蛋白 C' 末端のシグナルペプチドから prM-E 構造蛋白領域の cDNA W6&7' を合成した。前期報告した、JEV の相当領域をコードする J12 cDNA 発現ベクターの J12 部分と W6&7' を置換して、WNV の発現ベクター pW6&7' を構築した。この発現プラスミド DNA 10 μ g を直径 10-cm プレートの RK-13、MRC-5、CHO 細胞にトランスフェクトし、72 時間後の培養上清中の WNV 抗原を抗原 ELISA で測定した。その結果、RK-13、CHO 細胞ではそれぞれ約 10 μ g、12 μ g の不活化 WNV ビリオン相当量の抗原が培養上清中に放出されていた。しかし、MRC-5 細胞では 1/10 以下の産生量であった。産生された抗原は、超遠心によりほぼ 70% が沈降画分に回収された。

(4)新テクノロジーの開発：DNA ワクチン用新規プロモーターの開発

Luc 発現ベクター系を用いて HHV-6B、HHV-7、及び CMV の IE プロモーター活性を比較した結果、Jurkat および Molt-3 では HHV-6 と HHV-7 の MIE、U95 いずれのプロモーターも CMV より 5~10 倍高い活性を示した。一方、SAS-413 では HHV-6B が CMV の約 1/2、HHV-7 が約 1/4 の活性であった。また、SupT-1 および PBMC では、導入効率の低さのため、何れのレポーター活性も検出限界以下であった。

D. 考察

本研究が目指す遺伝子導入細胞由来の次世代

JE ワクチン開発の問題点は、FBS の使用である。J12#26 は JEV cDNA を RK-13 細胞に導入して樹立したが、RK-13 細胞原株には BVDV 持続感染の報告がある。BSE 問題を機に FBS のリスクが厳しく問われるようになり、BVDV 陽性細胞由来製品のヒト投与は強く規制されている。BVDV のヒト病原性の報告は無いが、この問題をクリアするには陰性 FBS の使用と簡便な検出法の確立が重要である。そこで、RT-PCR によるゲノム RNA 及び感染性 BVDV の高感度検出法を確立して J12#26 細胞の BVDV RNA 及び抗原を調査した。培養上清及び細胞中に BVDV ゲノムが検出されたものの、使用した FBS 自体にも同一のゲノムが検出された。間接蛍光抗体法では BVDV 抗原陰性であることから、J12#26 の BVDV 持続感染可能性は極めて低いと思われる。さらなる調査を詳細に実施し、バイオプロダクトのガイドラインに適合する次世代 JE ワクチンの実現を目指したい。

前期報告の組織培養不活化新 JE ワクチン製造法に準じ、WNV NY99 株を用いて本年度緊急に組織培養不活化 WNV ワクチン候補品が試作された。この候補品が WNV NY99 株に対して十分な中和抗体誘導能を示したことから、我国に北米から WNV が侵入した場合、本候補品と同様の過程で製造される不活化 WNV ワクチンは十分に有効であることが示唆された。本年度最大の成果であろう。また、JEV に対しても感染防御しうる中和抗原力価を示したことから、JE の基礎免疫を持つ集団に対してはブースター効果の可能性も示唆された。他方、免疫血清が近年オーストラリアで分離されたクンジンウイルス K47382 株を中和しなかったことから、クンジンウイルスが抗原性を変化させている可能性が考えられる。

WNV サブユニットワクチン開発においては、出発点となる発現 WNV 抗原を検出できる ELISA 系と、将来動物免疫実験に進展した場合の抗体 ELISA 系の基盤を整えることが本年度達成された。一方、阪大微研会では WNV に対する単クローン抗体の樹立を試み、数種得られたクローン中の 1 クローンは高い WNV 中和活性を有することが確認された。今後の WNV ワクチン開発において、より特異性が高く、且つ高感度な WNV 抗原検出及び測定系開発にも極めて有用なツールとして期待できよう。

以上の WN ワクチン開発基盤の整備を背景に、WNV の中和粒子抗原発現ベクターの構築を行った。一過性発現系ではあるが、遺伝子導入細胞から培養液中に大量の WNV 抗原が放出されており、この抗原は超遠心で沈降する構造物である事が示された。WNV 中和単クローン抗体との反応性や、CHO、

RK-13 細胞及び FBS の BVDV 混入調査を進め、J12#26 細胞のような高産生細胞株樹立に向けた取り組みを進めたい。

新テクノロジーの開発においては、阪大・医が継続してきた研究により、T 細胞において CMV プロモーターより高活性を示す新規 IE プロモーターが、HHV-6B と HHV-7 で各 2 種類ずつ見出された。今後、初期培養細胞やさらに多くの T 細胞株を用いた再現性の確認を行うとともに、プロモーター活性の長期持続性や、ワクチン抗原蛋白発現能の検討に進展させる予定である。CMV プロモーターの特許権に拘束されない第 3 世代ワクチン開発への路が拓かれたと言えよう。

E. 結論

- (1) WNV ワクチン開発研究を開始し、緊急試作の不活化 WNV ワクチン候補品が WNV NY99 株に対し十分な中和抗体誘導能を示して、日本侵入に対する対処の路を拓いた。
- (2) WN サブユニットワクチン開発では、①WNV を中和する単クローン抗体の樹立、②ワクチン開発の基盤となる抗原・抗体 ELISA 系整備、③構築した WNV cDNA 発現ベクターによる大量の WNV 抗原産生の成功等、大きな進展をみた。
- (3) 次世代 JE サブユニットワクチン開発では、ヒト投与規制を受ける BVDV の高感度検出法を確立した。
- (4) 新テクノロジーでは、CMV プロモーターを越える高活性プロモーターの発見等、顕著な成果を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

Mutoh E, Ishikawa T, Takamizawa A, Kurata T, Sata T, 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* 22: 2599-2608, 2004.

Akkapaiboon, P., Y. Mori, T. Sadaoka, S. Yonemoto, K. Yamanishi. Intracellular processing of human herpesvirus 6 glycoproteins Q1 and Q2 into tetrameric complexes expressed on the viral envelope. *J Virol* 78:7969-83, 2004.

Nishimura, K., K. Ueda, E. Guwanan, S. Sakakibara, E. Do, E. Osaki, K. Yada, T. Okuno, K. Yamanishi. A posttranscriptional regulator of Kaposi's sarcoma-associated

herpesvirus interacts with RNA-binding protein PCBP1 and controls gene expression through the IRES. *Virology* 325:364-78, 2004.

Mori, Y., P. Akkapaiboon, S. Yonemoto, M. Koike, M. Takemoto, T. Sadaoka, Y. Sasamoto, S. Konishi, Y. Uchiyama, K. Yamanishi. Discovery of a second form of tripartite complex containing gH-gL of human herpesvirus 6 and observations on CD46. *J Virol* 78:4609-16, 2004.

Shimada, K., K. Kondo, K. Yamanishi. Human herpesvirus 6 immediate-early 2 protein interacts with heterogeneous ribonucleoprotein k and casein kinase 2. *Microbiol Immunol* 48:205-10, 2004.

Takemoto, M., Y. Mori, K. Ueda, K. Kondo, K. Yamanishi. Productive human herpesvirus 6 infection causes aberrant accumulation of p53 and prevents apoptosis. *J Gen Virol* 85:869-79, 2004.

Tanaka-Taya, K., J. Sashihara, H. Kurahashi, K. Amo, H. Miyagawa, K. Kondo, S. Okada, K. Yamanishi. Human herpesvirus 6 (HHV-6) is transmitted from parent to child in an integrated form and characterization of cases with chromosomally integrated HHV-6 DNA. *J Med Virol* 73:465-73, 2004.

Usuku, S., Noguch, Y., Takasaki, T. Newly developed TaqMan assay to detect West Nile viruses in a wide range. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57: 129-130, 2004.

Kuwayama M, Ito M, Takao S, Shimazu, Y, Fukuda S, Miyazaki K, Kurane I, Takasaki T. Japanese encephalitis virus in meningitis patients, Japan. *Emerg. Infect. Diseases* 11: 471-473, 2005.

Tajima, S., Takasaki, T., Matsuno, S., Nakayama, M., Kurane, I. Genetic characterization of Yokose virus, a flavivirus isolated from the bat in Japan. *Virology* 332: 38-44, 2005.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：(出願準備中；新規プロモーター)
2. 実用新案登録：該当なし
3. その他：該当なし