

APC の存在のみで誘導された。T 細胞 (95%以上の purity) のみを培養してもサイトカインの産生はほとんど認められなかったことから、この現象が T 細胞分画中に抗原を保持している APC の残存のためとは考えにくい。むしろ、ブースター免疫されて 7 日目の個体内には非特異的に活性化された T 細胞が多く存在していて、APC との細胞相互作用あるいはサイトカインを介して *in vitro* で再活性化を受けているためではないかと考えている。この点に関しては更に検討していく予定である。

現状では、マウスにおける SARS-CoV は一過性の感染にとどまり、ヒトの病態モデルにならないことがワクチンを開発する上で大きな問題である。マウスで一過性の感染後にウイルスが排除されるメカニズムも未だあきらかでなく、B 細胞、T 細胞、NK 細胞のいずれかがないマウスでもその感染様式は変わらないことが知られている。一方、SARS-CoV に対しては受動免疫が有効であることが明らかとなっており、少なくとも UV と formalin 処理で不活化したワクチンで中和活性の高い抗体を誘導すれば、SARS-CoV に対する防御効果を十分期待できるであろう。

E. 結論

マウスモデルにおいて UV と formalin 処理で不活化した SARS-CoV ワクチンは中和抗体や T 細胞応答を長期に誘導可能な安全性の高いワクチンとして有望であることが示唆された。興味深いことに、formalin 処理によって IL-4 の産生が高まり、Th2 型に偏る傾向があることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ohnishi, K., Sakaguchi, M., Kaji, T., Akagawa, K., Taniyama, T., Kasai, M., Tsunetsugu-Yokota, Y.

Ohshima, M., Yamamoto, K., Takasuka, N., Hashimoto, S., Ato, M., Fujii, H., Takahashi, Y., Morikawa, S., Ishii, K., Sata, T., Takagi, H., Itamura, S., Odagiri, T., Miyamura, T., Kurane, I., Tashiro, M., Kurata, T., Yoshikura, H. and Takemori, T.

Immunological detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by monoclonal antibodies. *Jap. J. Infect. Dis.*, 58:88-94, 2005.

2) Hasegawa, H., Sawa, H., Lewis, M.J., Orba, Y., Sheehy, N., Yamamoto, Y., Ichinohe, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Katano, H., Takahashi, H., Matsuda, J., Sata, T., Kurata, T., Nagashima, K., and Hall, W.W. Development of thymus-Derived T-cell leukemia/lymphoma in mice transgenic for the tax gene of human T-lymphotropic virus type-I (HTLV-I). *Nature Medicine* 2006, in press.

3) Tsunetsugu-Yokota, Y., Ohnishi, K., and Takemori, T. Severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus: application of monoclonal antibodies and development of an effective vaccine. *Rev. Med. Virol.*, 2006, in press.

2. 学会発表

1) Yamamoto, T., Isogai, M., Inoue, J.-I., Tsunetsugu-Yokota, Y. Inhibition of HIV-1 replication in primary macrophage by a Nef-specific short hairpin RNA expressing lentivirus vector. Seventh International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, Kobe, July 1-5, 2005.

2) 山本拓也、井上純一郎、横田 (恒次) 恭子 : HIV-1 nef 発現を抑制する shRNA 発現システムの構築とマクロファージにおける Nef の機能解析。第 53 回ウイルス学会、横浜、平成 17 年 11 月。

3) 横田 (恒次) 恭子、高木弘隆、山本拓也、大島正道、水谷哲也、森川茂: VeroE6 における SARS-CoV の増殖とアポトーシスに関する解析。第 53 回ウイルス学会、横浜、平成 17 年 11 月。

4) 石井孝司、横田恭子、長谷川秀樹、永田典代、水谷哲也、森川茂、田口文広、田代真人、鈴木哲朗、宮村達雄: 高度弱毒化ワクチニアウイルス D I s の組換え SARS ワクチンとしての検討。第 53 回ウイルス学会、横浜、平成 17 年 11 月。

5) Yamamoto, T., Tachikawa-Kawana, A., Iwamoto, A., Autran, B., Tsunetsugu-Yokota, Y. Characterization of virus-specific T cell activation in human by a potent antigen-presenting activity of dendritic cells: an evaluation *in vitro* for the vaccine development, 第 35 回日本免疫学会、横浜、平成 17 年 12 月。

H. 知的所有権の取得状況

なし

The level of serum anti-SARS IgG

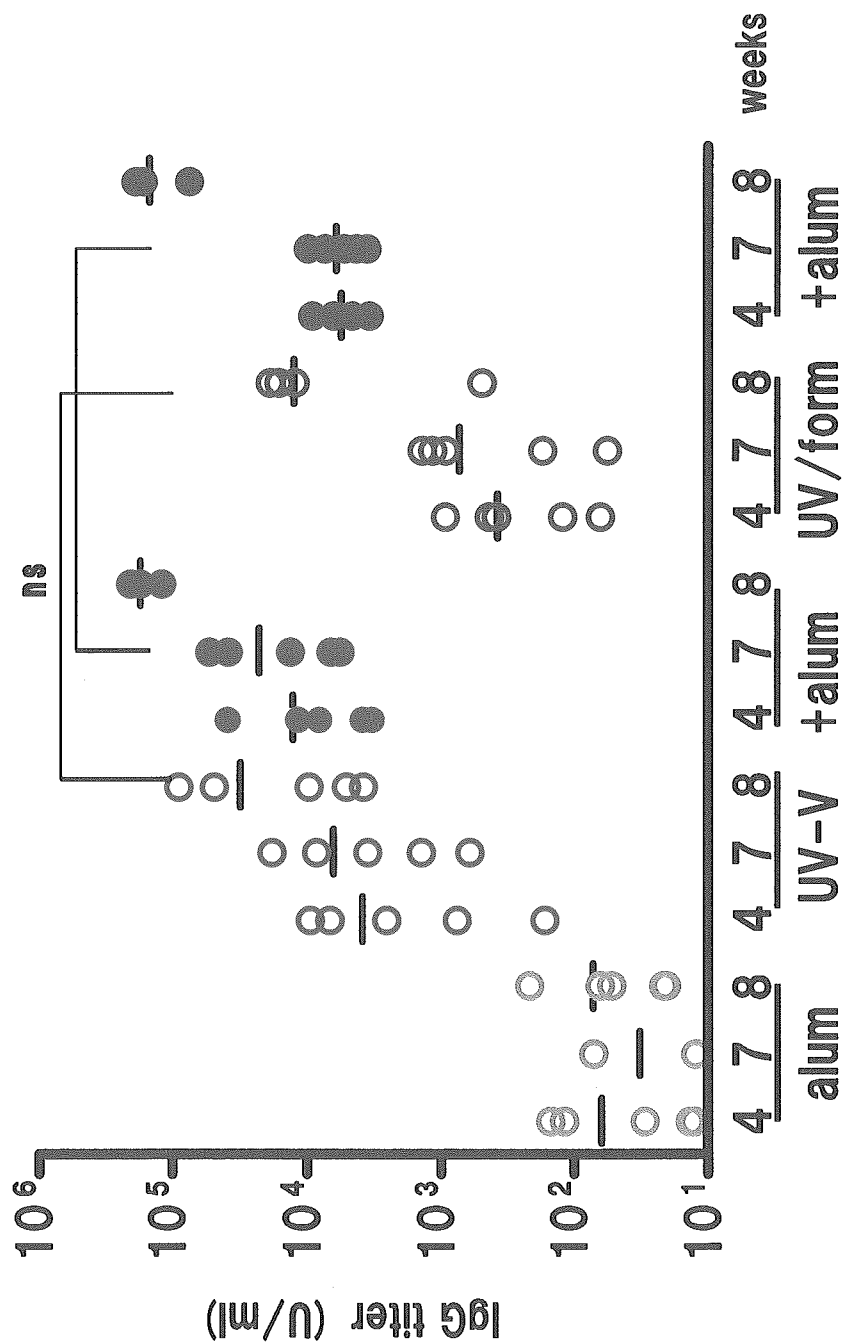


図1. UVおよびUV/form不活化ウイルスをアラム有り無しで皮下に免疫したマウスにおいて誘導される血中IgG抗体。一群5匹のマウスを初回の免疫後4週目と7週目に部分採血し、ブースター免疫後1週間(8週目)に全採血してその血中抗体価をエライザで測定した。UVとUV/form不活化ワクチンで誘導される抗体のレベルに統計学的有意差はなかった。

Serum IgG subclass of immunized mice

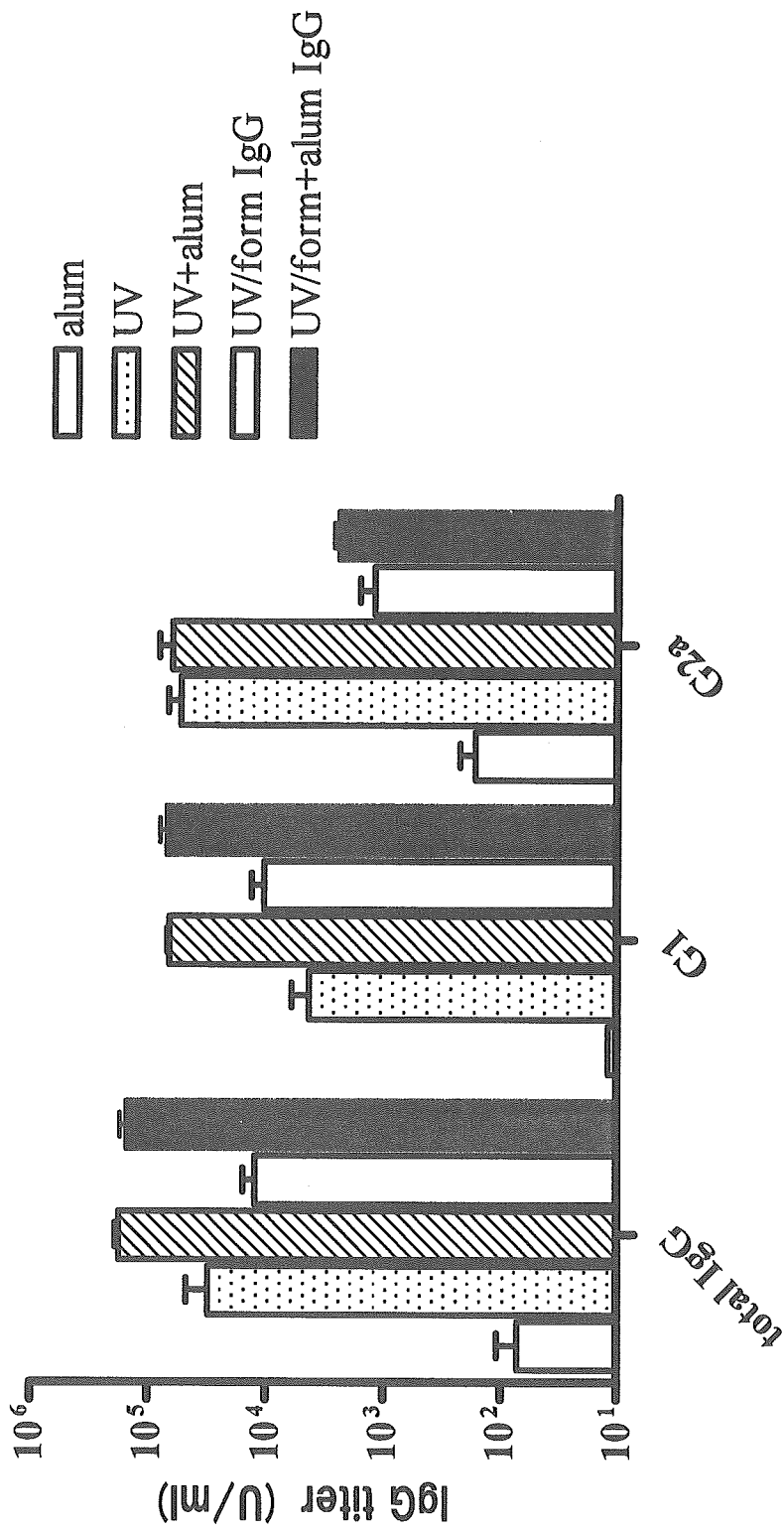


図2. UV/form不活化ウイルスワクチンの皮下免疫ではIgG2aが誘導されにくい。
 図1と同様にマウスの血中抗体のサブクラスをエライザで測定した。

Nucleocapsid-specific AFCs in BM

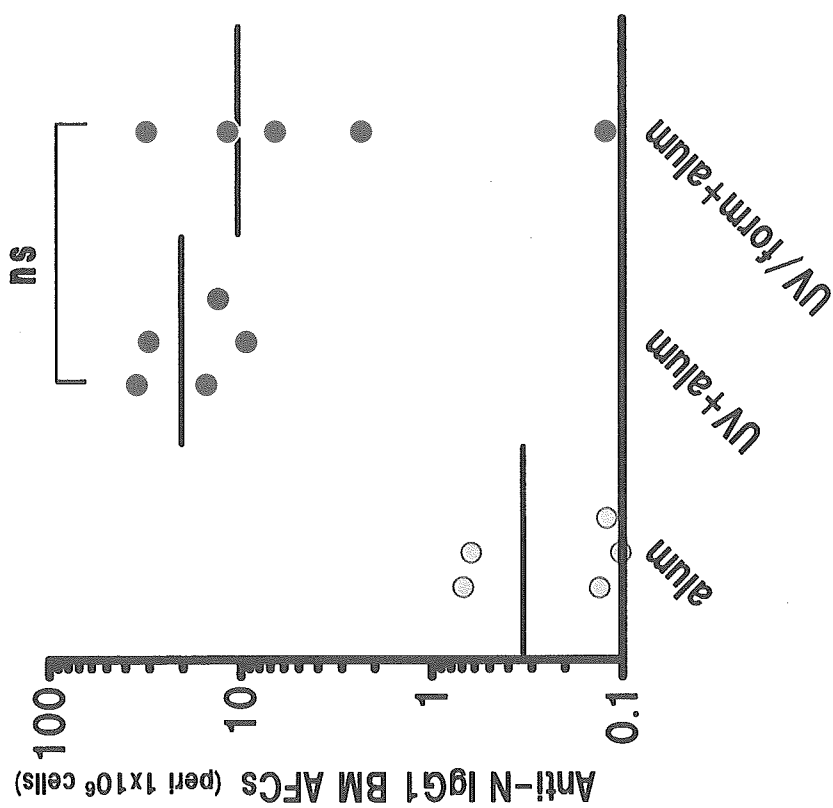


図3. UVあるいはUV/form不活化ウイルスワクチンに誘導される骨髄中のN特異的抗体産生細胞の頻度。図1のマウスで2回の免疫後最終的に(8週目)骨髄中に存在するN特異的抗体産生細胞数に違いは認められなかった。

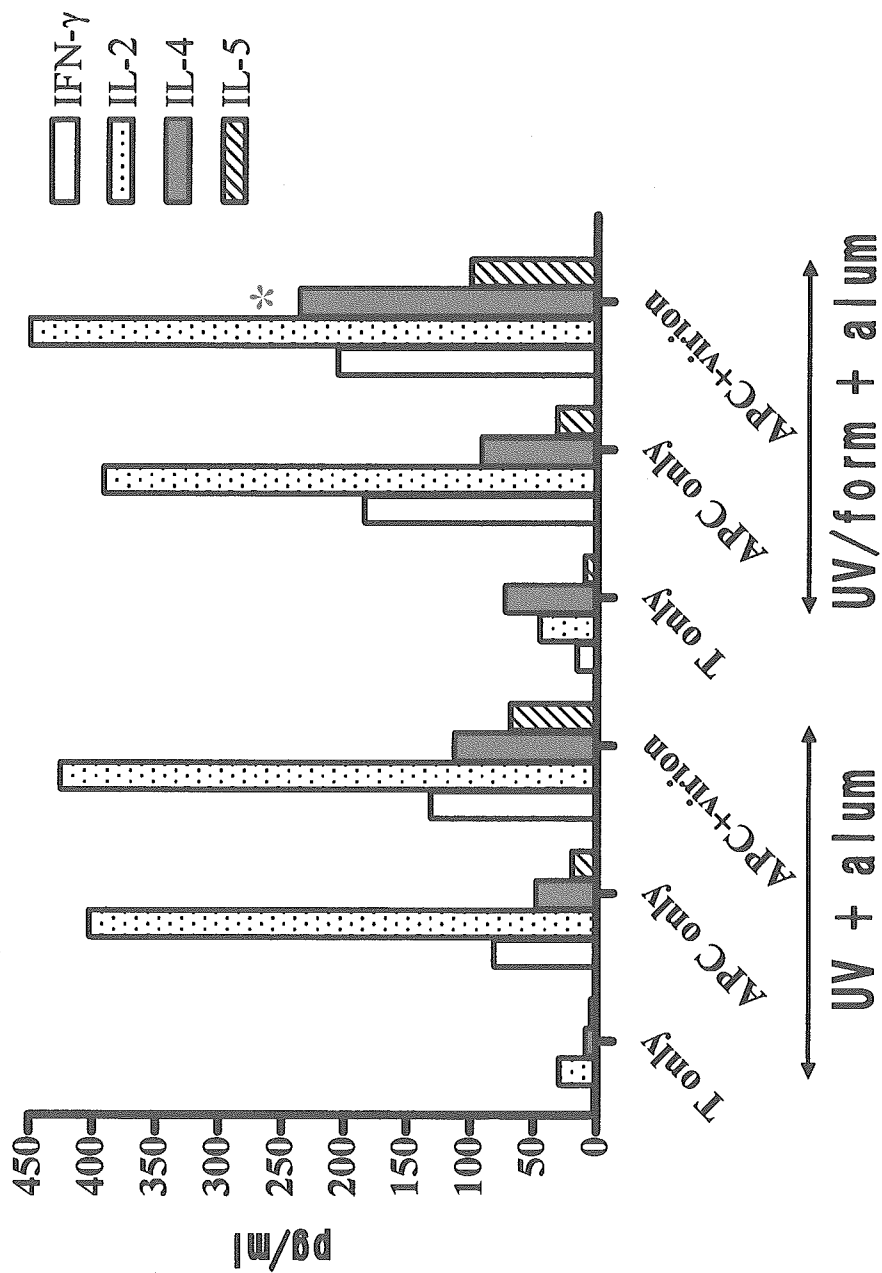


図4. UVあるいはUV/form不活化ウイルスワクチンの皮下免疫で所属リンパ節 (Axillar LN)由来T細胞のサイトカイン産生。アラムアジュバントとUVあるいはUV/form不活化ウイルスワクチンを皮下接種したマウスのALNのT細胞を分画し、UV不活化ウイルス粒子抗原有り無しの場合でthy1陰性脾臓細胞とともに4日間培養した。これらの培養上清中のサイトカインをCBA kitを用いて測定した。

SARSコロナウイルスに対するDNAワクチンの開発に関する研究

分担研究者 岡田 全司 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター

研究要旨

(1) 中和抗体依存性SARSワクチンの開発

SARSウイルスHKU39849, TW1, FFM-1のS, M, N, Eの各ウイルス構造タンパク cDNAをpcDNA3.1 (+)ベクターに構築した。Vero細胞を用い、中和抗体活性を測定した。その結果、マウスの系でSARS (S) DNAワクチンがSARSウイルスに対する中和抗体産生を誘導した

(2) 細胞性免疫（キラーT細胞）による新しいSARS DNAワクチンの開発

マウスII型肺胞上皮cell line (C57BL/6由来)を用い、SARS (N) DNAワクチンとSARS (M) DNAワクチンが強力なT細胞活性化SARSワクチンであることが示された。

(3) ヒト免疫応答解析モデル（SCID-PBL/hu）を用いたSARSワクチンの開発

- ① 健康人PBLをSCIDマウスに投与して作製したSCID-PBL/huを免疫し、SARS (S) DNAワクチンのみでなくSARS (M) DNAワクチンでもSARSウイルスに対するヒト中和抗体産生を誘導した。
- ② SCID-PBL/huを用い、SARS (N)、SARS (M) DNAワクチンは、ヒト・キラーT細胞分化及び増殖機能を示し、ヒトT細胞活性化SARSワクチンであることを示した。

A. 研究目的

本研究は世界的に多くの人命を奪い、さらには国民の経済基盤をも失う最悪の事態となる、SARS ウイルス感染症（中国・北米のみでなく全世界に対する国際貢献や我が国の国民の健康を守るためにも）に対して、我々が高い評価を受けている DNA ワクチン作成方法と中和抗体、キラーT細胞分化誘導機構解析を用い、迅速に SARS ウイルスに対する新しいワクチンを開発するものである。まずは DNA ワクチンの開発を行う。ウイルス構造タンパクである Spike(S)、Envelope(E)、Membrane(M)、Nucleocapsid(N)の存在が明らかとなり、これらが宿主細胞への感染に重要な役割を演じていると推察できる。また SARS の治療に、回復者の血清を使い、抗体依存性の感染防御が可能であることを示唆する発表もある。この点を踏まえて SARS ウイルスに対する中和抗体を多量に産生誘導する新規 SARS ワクチンの開発を目指す。一方、ウイルス感染症における宿主側の抵抗性において、細胞性免疫、特にキラーT細胞は極めて重要な役割を果たしている。したがって、SARS ウイルス感染肺胞上皮細胞に対して特異的なキラーT細胞の分化誘導を（種々のベクターを用いて）S、E、M 又は N 構造蛋白 DNA を組み込んだ DNA ワクチンを作製することを目的とする。

すなわち、中和抗体依存性 SARS ワクチンとキラー

T 依存性 SARS ワクチン開発の基礎的研究を行う。動物モデル、特に我々はヒトの生体内免疫解析モデル (SCID-PBL/hu) を世界に先駆けて開発した (Cancer Res 1997) ことより SCID-PBL/hu を用いた、SARS DNA ワクチンによる SARS ウイルスに対するヒト中和抗体産生誘導及びヒトキラーT細胞誘導を解明する。(表1)

[Subject]

- I. Vaccine against SARS corona Virus
- II. CTL dependent SARS DNA vaccine
- III. Antibody dependent SARS DNA vaccine
- IV. SCID-PBL/hu model

表 1

B. 研究方法

1. SARS corona virus 又はその DNA は三種類入手した。SARS ウイルス HKU39849 は香港大学 Peiris 教授より供与された。SARS ウイルス TW1 cDNA

は国立台湾大学 Pei-Jer Chen 教授より供与された。SARS corona virus (FFM-1 株) は東京医科歯科大学 山本直樹教授より入手した。

2. 中和抗体依存性 SARS ワクチンの開発

- (1) SARS ウイルス HKU39849 の S、M、N、E の各ウイルス構造タンパク cDNA の pcDNA3.1(+)ベクターへの構築。国立感染症研究所 田代眞人部長、森川室長より供与された pGEM-E、M、N 及び pUC-19-S より S、M、N、E cDNA を pcDNA3.1(+)ベクターに導入した DNA ワクチンを構築した。
- (2) 感染中和抗体測定法。BALB/c マウスと C57BL/6 マウスに 4 種の S、M、N、E DNA ワクチンを筋肉注射し (m.tibia anterior)、血清中の抗体価を SARS DNA を導入した Cos 細胞に対する抗体結合反応と Vero 細胞を用いた感染中和抗体活性で測定した。Vero-E6 細胞を平底 96 well plate にまき、SARS corona virus 100TCID₅₀ (median tissue-culture infectious dose units) を感染させた。37°C 30 分 CO₂ incubator で培養した後、マウスあるいは SCID-PBL/hu マウスより採取した血清を 56°C 30 分非動化した後に 5 倍希釈から倍々希釈して加えた。2 日 (48 時間) 後に well を 20% formaldehyde で固定し、Amidoblack 10B で染色し、cytopathic effect (CPE) を測定した。この方法を用いて、血清中の SARS ウイルス中和抗体活性を測定した (共同研究 大阪府立公衆衛生研究所感染症部 奥野良信、加瀬哲男)。

3. 細胞性免疫 (キラーT 細胞) 活性の測定法 :

- (1) マウス II 型肺胞上皮 cell line (T7) をキラーT 細胞の標的細胞として用いた。
- (2) T7 細胞に S、M、N DNA を導入し、これを抗原として用い、IFN- γ 産生によるキラーT 活性を測定した。
- (3) T 細胞の増殖反応を BrdU で測定した。

4. ヒト免疫応答解析モデル (SCID-PBL/hu) の作製。

- (1) IL-2 レセプター γ 鎖ノックアウト NOD-SCID マウス (実験動物中央研究所 野村達次所長との共同研究) に健常人 PBL を i.p 投与し、SCID-PBL/hu を作製した。これに DNA ワクチン 50 μ g を M. Anterior tibia に注射し、3~5 回免疫。最終免疫より、7 日後に採血。血清中のヒト中和抗体

価を測定した。

- (2) SCID-PBL/hu の系を用いたタンパク抗原に対するヒト・キラーT 細胞の誘導 SARS 蛋白-パルス自己 B プラスト cell を標的細胞として用いた。IFN- γ 産生によるキラーT 活性を測定。

(倫理面への配慮)

1. SARS ウイルスに対する DNA ワクチン研究においては施設内の組換え DNA 安全委員のみでなく、大臣確認申請許可をすでに得た。大臣確認申請をし、お墨付きとなった P3 レベル B3 レベル実験施設 (P3 レベル培養実験室 P3 レベル動物実験室) で厳密に研究を行っている。
2. 実験動物に対しても動物愛護上の配慮が十分なされている。
3. 当院は厚生労働省より呼吸器疾患の準ナショナルセンター (高度専門医療施設) に選ばれたことにより、倫理・安全対策等への配慮を十分おこない臨床応用を目指している。

C. 研究結果

1. 中和抗体依存性 SARS ワクチンの開発

- (1) SARS ウイルス HKU39849 の S、M、N、E の各ウイルス構造タンパク cDNA (共同研究者 田代眞人部長、Peiris 教授) を pcDNA3.1(+)ベクターに構築した (図 1)。

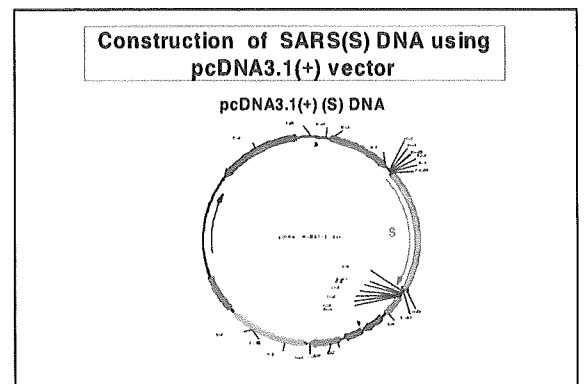


図1 pcDNA3.1(+)ベクターを用いたSARS(S)DNAの構築

PcDNA3.1(+)ベクターのマルチクローニングサイトに各々の cDNA を挿入した (図 1)。

- (2) BALB/c マウスと C57BL/6 マウスに 4 種の S、M、N、E DNA ワクチンを筋肉注射し、血清中の抗体価を SARS DNA を導入した Cos 細胞に対する抗体結合反応と Vero 細胞を用いた感染中和抗体活性を測定した。その結果、BALB/c マウスで SARS (S) DNA ワクチンが SARS Corona ウイルスに対する中和抗体産生を誘導した。(表 2)

	Immunization with	Adjuvant	Neutralizing antibody Against SARS Corona Virus
pcDNA 3.1(+)	SARS HKU-1 S DNA Vaccine 50 µg	MPL TDM ALUM	+
pcDNA 3.1(+)	SARS HKU-1 S DNA Vaccine 50 µg	-	-
	SARS TW1 S DNA Vaccine	MPL TDM ALUM	+
	SARS TW1 S DNA Vaccine	-	-

表2

2. 細胞性免疫（キラーT細胞）による新しい SARS DNA ワクチンの開発:

マウスII型肺胞上皮 cell line(T7)を用いて、T7細胞に S、M、N DNA を導入し、これを抗原として用い SARS(S) DNA キラーT 活性を測定した。その結果、ウイルスに対する T 細胞免疫（増殖反応と IFN-γ 産生）を増強する pcDNA3.1 SARS(N) DNA ワクチン及び SARS(M) DNA ワクチンを開発した。(図2)

SARS(N) DNA ワクチン（キラーT依存性）

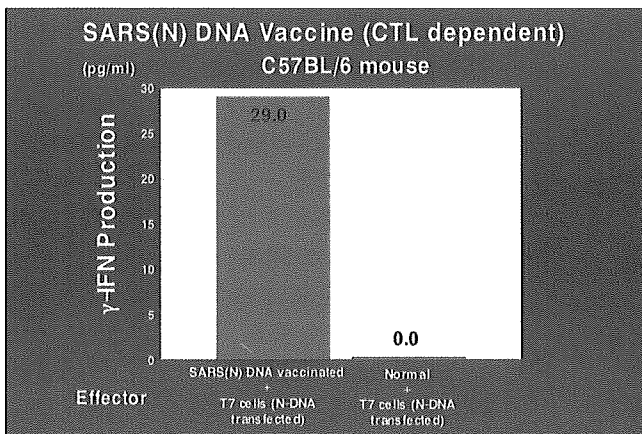


図2(A)

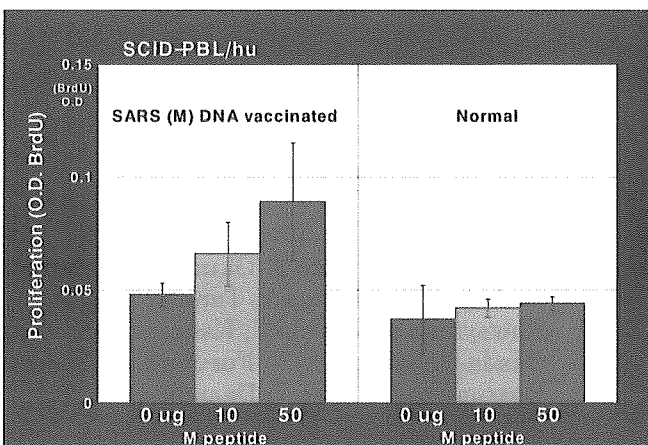


図2(B) キラーT依存性SARS(M) DNAワクチンの作製

3. ヒト免疫応答解析モデル（SCID-PBL/hu）を用いた SARS ワクチンの開発

(1) 健康人 PBL（末梢血リンパ球）を SCID マウスに i.p 投与して作製した SCID-PBL/hu に DNA ワクチンを免疫し、血清中の SARS S、M、N、E に対するヒト中和抗体価を測定した。(図3)

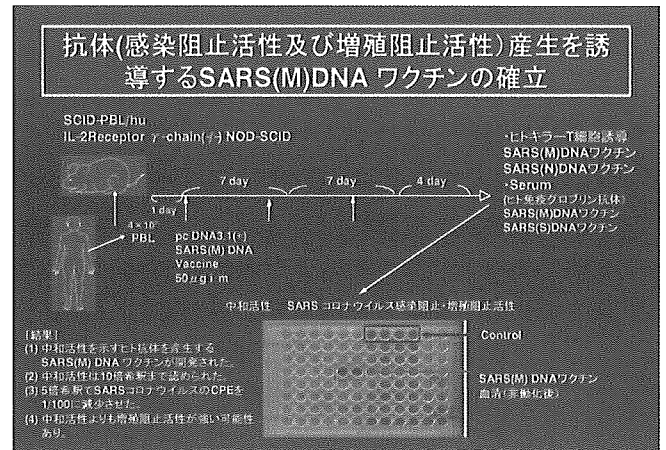


図3

(2) その結果、

- ① 中和活性を示すヒト抗体を産生する SARS(M) DNA ワクチンが開発された。
- ② 中和活性よりも増殖阻止活性が強い可能性あり。

SARS(M) DNA ワクチン (SCID-PBL/hu) の血清 (ヒト抗体) は SARS ウイルス感染 Vero 細胞に対し、ヒト中和活性及び SARS ウイルス増殖阻止活性を示した。すなわち抗体依存性 SARS(M) DNA ワクチンを確立した。

(3) SCID-PBL/hu の系を用いてタンパク抗原に対するヒト・キラーT細胞の誘導系を確立した。SARS(N) DNA ワクチン及び SARS(M) DNA ワクチンが SARS に対するヒト T細胞免疫（増殖反応と IFN-γ 産生）を増強した。SARS 蛋白-パルス自己 B プラスト cell を標的細胞として用い、SARS(N) DNA ワクチンは、ヒト・キラーT 依存性ワクチンであることを明らかにした。

D. 考察

1. 本研究において4種の SARS ウイルス S、M、N、E DNA ワクチンをマウス及びヒト免疫応答を解析しうる SCID-PBL/hu に免疫し、SARS ウイルスに対する中和抗体産生を誘導する SARS(S) DNA ワク

チン及び SARS(M) DNA ワクチンを開発した。また、細胞性免疫（キラーT 細胞）を介してワクチン効果を発揮する SARS(N) DNA ワクチン及び SARS(M) DNA ワクチンを開発した。

さらに SCID-PBL/hu を用い、SARS ウイルス増殖阻止活性を示すヒト抗体を誘導する SARS(M) DNA ワクチンを作製した。

- (1) SARS(M) DNA ワクチンは M 蛋白に対する抗体の産生を誘導し、この抗体はすでに SARS に感染した細胞にも作用し、SARS ウイルスの増殖を抑制する効果が示された。すなわち、SARS ウイルスが感染しても広がらない作用を発揮する可能性が示唆された。
- (2) マウスやサルにおいて SARS ウイルスに対する中和抗体産生を誘導する SARS(S) DNA ワクチンが報告されている。しかしながら最も重要なヒトの生体内ヒト抗体産生やヒト・キラーT 誘導において SARS ワクチンが SARS ウイルスに対する免疫応答による制御を発揮するか全く不明である。このような状況（表 3）において、我々が世界に先駆けて確立した SCID-PBL/hu の系（Cancer Res, 1997）を SARS DNA ワクチンの開発に応用し、キラーT 依存性 SARS ワクチンのみならず抗体依存性 SARS ワクチンを作製しえた。このことより SCID-PBL/hu の系は、SARS ワクチンにより活性化されるヒトキラーT、ヒト B 細胞生体内ヒト免疫応答を解明する上で、強力な武器を提供することが示された。

SCID-PBL/hu model	
(1)	We established first SCID-PBL/hu mice, which is a highly relevant translational model for demonstrating human immune response as we published in Cancer Research 1997.
(2)	Gao et al developed adenovirus based a SARS DNA vaccine encoding S1 polypeptide was capable of inducing neutralizing antibody, while another SARS DNA vaccine encoding N protein generated IFN- γ producing T cells in rhesus monkeys.
(3)	SARS S DNA vaccine which elicits effective neutralizing antibody responses that generate protective immunity in a mouse model.
(4)	However its immunogenicity in humans has yet to be established. Therefore, it is very important to evaluate the efficacy of SARS DNA vaccine in a SCID-PBL/hu mice, which we have established.

表 3

又、我々が世界に先駆けて確立した II 型肺胞上皮細胞 cell line T7 は、SARS ウイルスの target が肺胞 II 型上皮であることが報告されていることより、SARS ワクチン効果の詳細な解明に極めて重要な役割を果たすことが考えられる。(図 4)

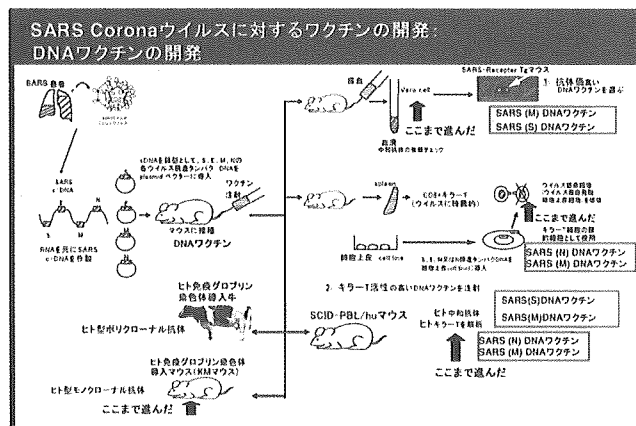


図 4

E. 結論

- (1) 中和抗体依存性SARSワクチンの開発
SARSウイルスHKU39849, TWI, FFM-1のS、M、N、Eの各ウイルス構造タンパク cDNAをpcDNA3.1 (+) ベクターに構築した。Vero細胞を用い、中和抗体活性を測定した。その結果、マウスの系でSARS (S) DNAワクチンがSARSウイルスに対する中和抗体産生を誘導した
- (2) 細胞性免疫（キラーT細胞）による新しいSARS DNA ワクチンの開発
マウス II 型肺胞上皮 cell line (C57BL/6由来) を用い、SARS (N) DNAワクチンとSARS (M) DNAワクチンが強力なT細胞活性化SARSワクチンであることが示された。
- (3) ヒト免疫応答解析モデル（SCID-PBL/hu）を用いたSARSワクチンの開発
① 健康人PBLをSCIDマウスに投与して作製したSCID-PBL/huを免疫し、SARS (S) DNAワクチンのみでなくSARS (M) DNAワクチンでもSARSウイルスに対するヒト中和抗体産生を誘導した。
② SCID-PBL/huを用い、SARS (N)、SARS (M) DNAワクチンは、ヒト・キラーT細胞分化及び増殖機能を示し、ヒトT細胞活性化SARSワクチンであることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Yoshida S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Matsumoto M, Kase T, Demello D.E., Peiris JSM, Chen P.J., Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: The Development of vaccines against SARS Corona Virus in Mice and SCID-PBL/hu Mice. Vaccine 2005; 23:2269-72.

(2) Masaji Okada, Yuji Takemoto, Yoshinobu Okuno, Satomi Hashimoto, Yukari Fukunaga, Takao Tanaka, Yoko Kita, Noriko Kanamaru, Hiroko Takai, Yayoi Sakaguchi, Izumi Furukawa, Miwa Izumiya, Shigeto Yoshida, Makoto Matsumoto, Tetsuo Kase, JSM Peiris, Daphne E. deMello, Pei-Jer Chen, Naoki Yamamoto, Yoshiyuki Yoshinaka, Tatsuji Nomura, Isao Ishida, Shigeru Morikawa, Masato Tashiro, and Mitsunori Sakatani*: Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS Corona Virus using mouse and SCID-PBL/HU mouse models. In "Xth International Nidovirus Symposium: Toward Control of SARS and Other Nidovirus Diseases" (Edit.) K. Holmes and S. Perlman, Springer Press (in press)

(3) 岡田全司, 橋元里実: SARSワクチン. 医学のあゆみ vol.214 No.12, 2005

2. 学会発表

- (1) Okada M. : DNA and Recombinant Vaccines: Novel vaccination (HVJ-liposome / HSP65 DNA+ IL-12 DNA and recombinant 72f BCG) against tuberculosis and DNA vaccines against SARS corona virus. 13th Annual Congress of the ESGT, 29th Oct – 1st Nov, 2005 Prague, Czech Republic (Symposist)
- (2) Okada M., Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Izumiya M, Yoshida S, Matsumoto M, Kase T, , Peiris M, Ishida I Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M ; Development of vaccines against the severe acute respiratory syndrome(SARS) corona virus. Groval Vaccinology International Forum(7th), Disease immunization and Immunotherapy. 5thMar-7th Mar, 2005, Dubai,UAE (Symposist)
- (3) Okada M., Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Izumiya M, Yoshida S, Matsumoto M, Kase T, Peiris M, deMello D, Chen P.J, Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M ; THE DEVELOPMENT OF VACCINES AGAINST SARS CORONA VIRUS IN MICE AND SCID-PBL/HU MICE. 10th International Nidovirus Symposium: Toward Control of SARS and other Nidovirus Diseases, 25th Jun – 30th Jun, 2005 Colorado Springs, USA (Symposist)
- (4) Okada M., Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kanamaru N, Takai H, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K,

Izumiya M, Yoshida S, Matsumoto M, Kasa T, Peiris M, deMello D, Chen P.J, Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M ; Development of vaccines against SARS corona virus infection using mouse and SCID-PBL/hu mouse models. The 5th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 5th Sep-8th Sep, 2005, Awaji Island, Hyogo

- (5) 橋元里実, 福永有可里, 武本優次, 喜多洋子, 金丸典子, 田中高生, 高井寛子, 岡田知佳, 坂口弥生, 古川いづみ, 山田恭子, 和泉谷美和, 桑山さち子, 山本喜三子, 白石尚子, 橋本雄太, 坂谷光則, 岡田全司; SARSウイルスに対するDNAワクチンの開発研究. 第59回国立病院総合医学会 2005(10/14-10/15), 広島
- (6) 橋元里実, 福永有可里, 喜多洋子, 田中高生, 武本優次, 奥野良信, 加瀬哲男, 吉田栄人, 坂谷光則, 岡田全司; SARSウイルスに対するDNAワクチンとSARSウイルスレセプター遺伝子導入マウス作製によるT細胞・B細胞免疫応答機構の解明. 第35回日本免疫学会総会.2005(12/13-12/15).横浜
- (7) 橋元里実, 福永有可里, 武本優次, 喜多洋子, 桑山さち子, 金丸典子, 田中高生, 村木裕美子, 高井寛子, 岡田知佳, 坂口弥生, 古川いづみ, 山田恭子, 和泉谷美和, 奥野良信, 加瀬哲男, 吉田栄人, 坂谷光則, 岡田全司; SARSウイルスに対するキラーT細胞分化誘導機構. 第45回日本呼吸器学会. 2005 (4/14-4/16) .幕張
- (8) 橋元里実, 福永有可里, 武本優次, 喜多洋子, 桑山さち子, 金丸典子, 田中高生, 村木裕美子, 高井寛子, 岡田知佳, 坂口弥生, 古川いづみ, 山田恭子, 和泉谷美和, 奥野良信, 加瀬哲男, 吉田栄人, 坂谷光則, 岡田全司; SARSウイルスに対するDNAワクチンの開発研究. 第45回日本呼吸器学会. 2005 (4/14-4/16) .幕張

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

高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DI_s の SARS 生ワクチンとしての応用

分担研究者 石井孝司（国立感染症研究所）

研究要旨 DI_s 株は、ほとんどの哺乳類細胞に感染するが増殖しない高度弱毒化ワクチニアウイルスである。本研究ではこの株に SARS-コロナウイルス (SARS-CoV) の構造蛋白遺伝子を組み込んだ組換えウイルスを作成し、SARS ワクチンとしての可能性を検討した。作成した 6 種の組換え DI_s をマウスに接種した場合、目的のウイルス蛋白に対する強い液性及び細胞性免疫の誘導が見られた。E/M/S または E/M/M/S を発現する組換え DI_s を接種したマウスは、SARS-CoV のチャレンジに抵抗性を示し、これらの組換え DI_s に強いワクチン効果があることを示すことができた。従ってこれらの組換え DI_s は SARS に対する安全な組換え生ワクチンの有望な候補であると考えられる。

A. 研究目的

約 40 年前に国立予研において大連株より樹立された DI_s は、ニワトリ胎児繊維芽細胞 (CEF) でのみ増殖し、ほとんどの哺乳類細胞では感染するが増殖しない高度弱毒株である。本研究で我々は、本ウイルスに SARS-CoV の構造蛋白 (E、M、N、S) を組み込んだ組換えウイルスを作製し、1. 目的蛋白の哺乳類細胞での大量発現、2. 組換えウイルス感染細胞での virus-like particles 生成の検討、3. 組換えウイルスの免疫誘導能の検討を行う。今回は、組換えウイルスを小動物に投与して免疫誘導能の確認を行い、組換え生ワクチンとしての可能性を検討した。

B. 材料と方法

香港で分離された SARS-CoV 株 HKU39849 からクローニングされた各構造蛋白遺伝子を、DI_s へ外来遺伝子を挿入するためのトランスファーベクターに組み込み、DI_s を感染させたニワトリ胎児繊維芽細胞 (CEF) 中で相同組換えを起こさせることにより組換えウイルスを取得した。作成した組換えウイルスの構造は Fig.1 に示した。これらの組換え DI_s をマウスに皮下あるいは経鼻接種し、SARS-CoV 構造蛋白に対する液性、細胞性および粘膜免疫の誘導能を検討した。また、前もってこれ

らの組換え DI_s で免疫したマウスへの SARS-CoV 感染実験を行った。

C. 研究結果

合計 9 種の組換え DI_s を作製し、哺乳類細胞に感染させると目的蛋白が効率よく発現されることを確認した。SARS-CoV の構造蛋白を発現する組換え DI_s を経鼻あるいは皮下接種されたマウスは SARS-CoV を認識する抗体が誘導され、目的蛋白に対する細胞性および粘膜免疫も同様に誘導されていた。S を発現するウイルス接種群の血清は、*in vitro* で SARS-CoV の哺乳類細胞への感染を阻止する活性を有していた。一方、組換え DI_s を鼻腔から投与した場合、鼻腔洗浄液中に目的蛋白に対する IgA 抗体が誘導された。E/M/S あるいは E/M/N/S を発現する組換え DI_s を経鼻あるいは皮下接種された群は、SARS-CoV を経鼻感染させた場合感染から完全に防御された。一方、N を発現する組換え DI_s を接種された群は SARS-CoV に対する強い抗体価が誘導されたが、SARS-CoV を経鼻感染させた場合に感染を防御することはできなかった。(Fig. 2) E/M/S または E/M/N/S を発現する DI_s を経鼻または皮下接種されたマウスは、呼吸器にリンパ球の強い浸潤が見られた。免疫組織学的解析では、この部分から SARS-CoV 抗原は検出されなかった。浸潤した

リンパ球は、CD3 positive T-cells であった。

D. 考察

DIs は約 40 年前に副作用のない種痘の候補としてヒトへの接種実験も行われており、安全性の高さはすでに確認されている。SARS-CoV の構造蛋白の全部または一部を発現する組換え DIs は、SARS に対する安全な組換え生ワクチンとなり得ると考えられる。しかしながら、組換え DIs のうち S を発現するものを接種された群では、感染局所に T-cell の強い浸潤がみられ、炎症反応がおこっていることが示唆された。この結果から、ワクチン実験に使用する組換えウイルスの選択や、組換えウイルスの接種量にはさらなる検討が必要であるとされる。今後は、病態を反映した動物モデルにワクチン接種し、疾病の発症や進行を阻止できるかどうかの検討を行う予定である。

E. 結論

SARS-CoV の構造蛋白を発現する組換え DIs は、マウスに投与した場合ターゲットとなるウイルス蛋白に対する液性、細胞性免疫及び粘膜免疫を誘導し、S 蛋白を発現する DIs を投与されたマウスの抗血清にはウイルス中和活性も存在した。また、前もって E/M/S または E/M/M/S を発現する組換え DIs を接種したマウスは、SARS-CoV のチャレンジに抵抗性を示し、これらの組換え DIs に強いワクチン効果があることを示すことができた。従ってこれらの組換え DIs は SARS に対する安全な組換え生ワクチンの有望な候補であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishii K., Hasegawa H., Nagata N., Mizutani T., Morikawa S., Tashiro M., Suzuki T., Taguchi F., Takemori T., Tsunetsugu-Yokota Y. and Miyamura

T. Induction of Protective Immunity against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection using Highly Attenuated Recombinant Vaccinia Virus DIs. *Virology* in press.

- 2) Murakami K., Ishii K., Ishihara Y., Yoshizaki S., Tanaka K., Gotoh Y., Aizaki H., Kohara M., Yoshioka H., Mori Y., Manabe N., Shoji I., Sata T., Bartenshalager R., Matsuura Y., Miyamura T. and Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. *Virology* in press.
 - 3) Matsuyama S., Ujike M., Ishii K., Fukushi S., Morikawa S., Tashiro M. and Taguchi F. Enhancement of SARS-CoV infection by proteases. *Adv. Exp. Med. Biol.* in press. (2006)
 - 4) Ishii K., Hasegawa H., Nagata N., Mizutani T., Morikawa S., Tashiro M., Suzuki T., Taguchi F., Takemori T., Miyamura T. and Tsunetsugu-Yokota Y. Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. *Adv. Exp. Med. Biol.* in press. (2006)
 - 5) Ohnishi K., Sakaguchi M., Kaji T., Akagawa K., Taniyama T., Kasai M., Tsunetsugu-okota Y., Ohshima M., Yamamoto K., Takasuka N., Hashimoto S., Ato M., Fujii H., Takahashi Y., Morikawa S., Ishii K., Sata T., Takagi H., Itamura S., Odagiri T., Miyamura T., Kurane I., Tashiro M., Kurata T., Yoshikura H. and Takemori T. Immunological detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by monoclonal antibodies. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 58: 88-94 (2005)
- ##### 2. 学会発表
- 1) Ishii K., Iijima S., Kimura N., Iwata N., Yagi S., Yamaguchi K., Maki N., Yoshizaki S., Machida S., Suzuki T., Sata T., Miyamura T. and Akari H. GBV-B is a pleiotropic virus *in vivo*. 12th International Meeting on HCV and Related Viruses, Montreal Canada, October 2-6, 2005.
 - 2) Murakami K., Ishihara Y., Ishii K., Yoshizaki S.,

- Aizaki H., Tanaka K., Kohara M., Shoji I., Sata T., Bartschlager R., Miyamura T. and Suzuki T. Thermoreversible gelation polymer-based three-dimensional culture system to produce HCV particles from cells harboring the genome-length dicistronic RNA. 12th International Meeting on HCV and Related Viruses, Montreal Canada, October 2-6, 2005.
- 3) Ishii K., Yokota Y., Takemori T., Hasegawa H., Nagata N., Mizutani T., Morikawa S., Tashiro M., Suzuki T., Taguchi F. and Miyamura T. Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. Xth International Nidovirus Symposium, Colorado Springs, USA, June 25-30, 2005.
- 4) 石井孝司、横田恭子、竹森利忠、長谷川秀樹、永田典代、森川 茂、水谷哲也、田口文広、田代真人、鈴木哲朗、宮村達男：高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DIs の組換え SARS ワクチンとしての検討、第 53 回日本ウイルス学会、平成 17 年 11 月、横浜。
- 5) 石井孝司、飯島沙幸、山口健次郎、榎 昇、八木慎太郎、森 健一、吉崎佐矢香、李 永仲、木村展之、揚山直英、鈴木哲朗、宮村達男、明里宏文：タマリンを用いた C 型肝炎のサロゲートモデル：tissue tropism に関する解析、第 53 回日本ウイルス学会、平成 17 年 11 月、横浜。
- 6) 村上恭子、石井孝司、吉崎佐矢香、相崎英樹、田中恵子、小原道法、勝二郁夫、佐多徹太郎、宮村達男、鈴木哲朗：三次元肝細胞培養システムによる C 型肝炎ウイルス (HCV) 粒子形成とその応用、第 53 回日本ウイルス学会、平成 17 年 11 月、横浜。
- 7) 飯島沙幸、石井孝司、李 永仲、八木慎太郎、山口健次郎、榎 昇、吉崎佐矢香、町田早苗、木村展之、揚山直英、寺尾恵治、鈴木哲朗、宮村達男、明里宏文：サル類を用いた C 型肝炎の新規感染病態モデルの樹立、第 140 回日本獣医学会、平成 17 年 10 月、鹿児島
- 8) 石井孝司、横田恭子、大西和夫、竹森利忠、長谷川秀樹、永田典代、森川 茂、水谷哲也、田口文広、田代真人、鈴木哲朗、宮村達男：高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DIs の組換え SARS ワクチンとしての検討、第 9 回日本ワクチン学会、平成 17 年 10 月、大阪。
- H. 知的所有権の取得状況
- 1) 2004-242937・石井孝司他 12 名・財団法人ヒューマンサイエンス振興財団・SARS-コロナウイルスタンパク質の全部もしくは一部のタンパク質をコードする DNA をゲノム DNA 上に保有し、該タンパク質を発現し得る組換えワクチニアウイルス DIs 株。・2004 年 8 月 23 日出願
- 2) 2004-225043・石井孝司他 4 名・独立行政法人医薬品医療機器総合機構・HCV ウイルスタンパク質をコードする DNA を保有する組換えワクチニアウイルス DIs 株、およびその利用・2004 年 8 月 2 日出願

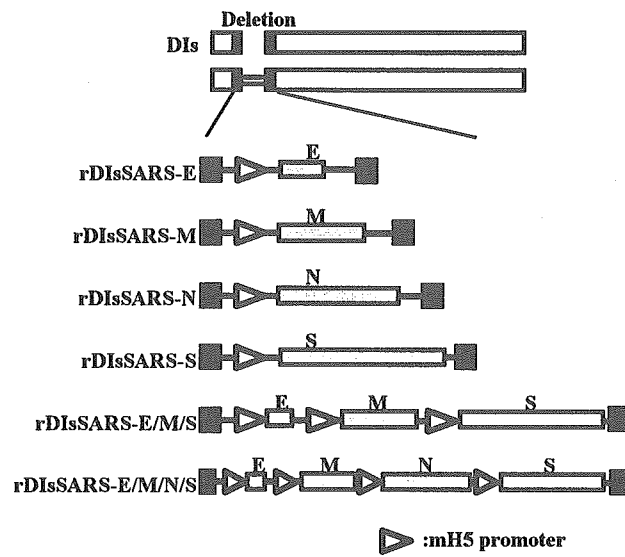


Fig.1 構築した組換えDIIsの構造。E、M、N、SはSARS-CoVの4種の構造蛋白を示す。

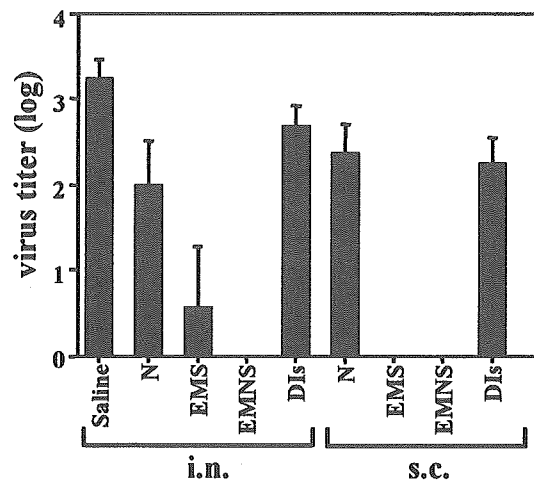


Fig.2 SARS-CoVチャレンジ実験。Balb/cマウスに組換えDIIsを皮下または経鼻接種し、最終免疫の1週間後にSARS-CoVを経鼻感染させた。3日後に肺洗浄液中のSARS-CoV titerを測定した。

Table 1. Titers of SARS-CoV specific and neutralizing antibodies

	i.m.		S.C.	
	^a SARS-specific IgG titer (U/ml)	^b Neutralization Ab	^a SARS-specific IgG titer (U/ml)	^b Neutralization Ab
rDI_sSARS-M	488	n.d.	22296	n.d.
	388	n.d.	5147	n.d.
	606	n.d.	12395	n.d.
	556	n.d.	8398	n.d.
rDI_sSARS-N	1560	n.d.	5931	n.d.
	2279	n.d.	4855	n.d.
	10630	n.d.	8890	n.d.
	2906	n.d.	1451	n.d.
rDI_sSARS-S	5984	x300	4768	x300
	7852	x1500	13390	x1500
	1679	x60	807	x300
	33113	x1500	3467	x1500
rDI_sSARS-E/M/S	6465	x60	13385	x60
	5779	x60	9225	x60
	2489	x60	25099	x60
	3165	n.d.	36708	x1500
rDI_sSARS-E/M/N/S	9964	x60	58522	x1500
	8266	x300	19683	x300
	20188	x1500	15410	x300
	5154	x60	26550	x1500
DI_s	212	n.d.	1824	n.d.
	922	n.d.	2583	n.d.
	214	n.d.	1066	n.d.
	394	n.d.	1441	n.d.

n.d. not detected

^aSARS-CoV-specific IgG titers were calculated as described in Fig.3.

^bNeutralization antibody titers were expressed as the minimal dilutions of serum capable of inhibiting the cytopathic effects of the virus.

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

中和エピトープの解析

分担研究者： 黒澤良和 藤田保健衛生大学総合医科学研究所
研究協力者： 伊庭善孝 藤田保健衛生大学総合医科学研究所

研究要旨

分担研究者らのグループでは、数 10 名のドナーから採取した B リンパ球を用いて約 1000 億個のクローンからなるヒト抗体ライブラリー(AIMS)を作製して様々な疾患に対する治療用抗体の単離調製を実施している。一方、対象とする疾病に罹患した経験を有し、治癒した結果ウイルスや病原菌毒素に対して中和抗体を有する人がボランティアとして献血に協力する状況下では、その人の成分血（リンパ球画分）を用いて巨大抗体ライブラリーを作製して、その中から対象とする抗原に結合する抗体を単離する研究体制も築いている。SARS の場合、我が国には患者がいないため、AIMS を抗体のソースとして用いている。SARS ウイルス粒子を構成する膜タンパク質である Spike(S)タンパク質が主要な中和エピトープを有することが判明しているため、多数の抗 S 抗体を単離し、ウイルス中和活性を示す抗体の詳細なエピトープマッピングを行うことが本研究の目的である。そのためには S タンパク質を膜上に大量に強制発現した形質転換株を作製するか、または S タンパク質の膜外部分を分泌分子として発現させるか、どちらかをライブラリースクリーニングの際の抗原として用いる必要がある。本年度、様々なアプローチで抗原調製を試みたが、充分量の抗原を得ることができなかった。S タンパクの発現が困難であることはかねてより指摘されており、唯一バキュロウイルス系でのみ充分量の発現に成功したという報告が存在することがわかり、現在バキュロウイルス発現系を導入し、昆虫細胞での発現を試みている。

A. 研究目的

本研究班は、SARS コロナウイルスに対するワクチン開発を目標に設置されているが、SARS ウイルス粒子構成成分の中で、どの分子の、更にどの部位が中和エピトープとなるかに関する情報が重要な位置を占める。そこで、S タンパク質に

クローン抗体を多数単離して、その中からウイルス中和活性を示す抗体を選び出し、中和エピトープを解析する。

B. 研究方法

抗体ライブラリー(AIMS)をスクリーニングして中和抗体を得るには、標的抗原である

Sタンパク質が必要となる。Sタンパク質を膜上に大量発現した細胞、またはなるべくナチュラルに近い構造をした形でSタンパク質の膜外部分のみを動物細胞から分泌させる、等いずれかの方法により抗原を入手した後、ライブラリーをスクリーニングする。

(倫理への配慮)

用いる抗体ライブラリーの作製等、幾つかヒト臨床材料を使用した。それは全て過去に於いて倫理委員会の承認の下に行われた研究である。

C. 研究結果

本研究の目的はSARSのSpike (S) proteinに対するモノクローナル抗体を単離し、中和のエピトープ解析を行い、更には治療用の中和抗体を作製することにある。抗体単離のためには、十分量のS proteinを得ることが不可欠である。必要なS proteinは細胞上で十分量発現させたもの

でも、細胞外ドメインを十分量発現させてSDS-PAGEで単一バンドを得られる程度まで精製したもののどちらでもよい。そこで、S protein遺伝子を動物細胞発現ベクターに組み込んだものを293T細胞上または培養上清中に発現させることを試みた。まず、下記の全長あるいはフラグメント (AC, DF, DJ, IJ, IL) を、それぞれ下記の動物細胞発現ベクター (pKS336, pcDNA3.1, pSecTag2, pDisplay) に組み込んで発現実験を行った。その結果、抗体単離に必要な十分な発現量が得られなかった (結果は下の表)。次に、大腸菌発現系を用いた発現を試みた。すなわち、pETベクターにNXフラグメントを組み込んで発現させた。その結果、NXフラグメントは発現したが発現量が非常に少なく、SDS-PAGEで単一バンドを得られる程度まで精製することはできなかった。現在、昆虫細胞の発現系での発現を試みている。

Construct	Vector	SARS gene	Leader	Tag	Expression
pKS336-SARS-S	pKS336	Full length	SARS-S	None	No
pcDNA-SARS-S	pcDNA3.1	Full length	SARS-S	None	No
pcDNA-SSABMH	pcDNA3.1	Full length	SARS-S	myc, (His) ₆	No
pcDNA-SSACMH	pcDNA3.1	Full ECD	SARS-S	myc, (His) ₆	No
pSect-SSDEMH	pSecTag2	Full length	Igk	myc, (His) ₆	No
pSect-SSDFMH	pSecTag2	A part of ECD	Igk	myc, (His) ₆	No
pDisp-SSDJ	pDisplay	A part of ECD	Igk	HA, myc	No
pDisp-SSIJ	pDisplay	A part of ECD	Igk	HA, myc	No
pSect-SSILMH	pSecTag2	A part of ECD	Igk	myc, (His) ₆	No
pET-SSNX	pET	A part of ECD	None	myc, (His) ₆	Yes

D. 考察

現在までに抗原として用いるSタンパク質をスクリーニングに必要なだけ充分量得

ることができていない。理由ははっきりしないが、膜外部分だけでシステイン基が多数 (総数 30) 存在することもその一因かもしれない。Sタンパク発現に関して、幾

つか論文が発表されているが、いずれもタグ部分に対する抗体でわずかに同定できているだけである(BBRC 312, 1159-1164, 2003)。最近一報、バキュロウイルス系でSタンパクの発現に成功した論文が報告されたので、我々もその系を導入することにした (Virology 334, 160-165, 2005)。

E. 結論

現在までのところ、ライブラリースクリーニングに必要な抗原Sタンパク質を充分量得られていない。そこでバキュロウイルス発現系を導入している。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

I. 論文発表

1. M.Sato, R.Iwaya, K.Ogihara, R.Sawahata, H. Kitani, J. Chiba, Y. Kurosawa, K. Sekikawa, Intrabodies against EVH1 domain of wiskott-Aldrich syndrome protein inhibit T cell receptor signaling in transgenic mice T cells. FEBS J. (2005) 272, 6131-6144.
2. 血液代謝物としての治療用ヒト抗体の開発、黒澤良和、人工血液、13、13-21(2005)

II. 学会発表

1. 黒澤良和 「感染症および癌治療薬としてのヒト抗体の開発状況」 人工血液を作る(6)、 於：日本科学未来館、平成 18 年 2 月 11 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

抗 IGSF4 抗体及びその利用
特願 2005-54624、
平成 17 年 2 月 28 日出願

抗 SARS-CoV 剤の開発に関する研究

分担研究者 山本典生（東京医科歯科大学）

研究要旨 SARS-CoV のプロテアーゼを標的として *in silico* screening を行い、高い抗 SARS-CoV 活性を持つ薬剤の同定に成功した。さらに、同定された化合物の類縁体を作成して抗ウイルス活性を調べたところ、さらに強い抗ウイルス活性を持つ化合物を同定できた。マウス感染モデルを用いた *in vivo* アッセイでもこれらの薬剤はウイルスの増殖を抑えたことから、抗 SARS-CoV 薬候補物質として有望であると我々は考える。

A. 研究目的

本研究の目的は抗 SARS-CoV 活性を持つ薬剤を同定することである。現在 SARS 患者は存在しないが、依然としてその脅威はある。抗ウイルス剤開発は、医学的側面からばかりでなく経済的な見地からも、社会に与える影響は極めて大きいと思われる。

B. 材料と方法

In silico screening の結果に基づいて抗 SARS-CoV 剤の候補となる物質を集め、それらの抗ウイルス活性を *in vitro* の系を用いて評価した。SARS-CoV の株としては FFM-1 株を用い、評価方法としては MTT assay, リアルタイム RT-PCR 等を用いた。*In vivo* アッセイは BALB/c マウスに FFM-1 を感染させる系を使用した。感染後 3 日目で材料を採取し、リアルタイム RT-PCR 等によってウイルスの定量を行った。

C. 研究結果

我々は *in silico* screening により約 100 万種類の化合物の中から SARS-CoV の 3CL プロテアーゼ阻害剤の候補物質を約 100 種類に絞り込み、

実際の抗ウイルス活性を測定したところ、強い抗 SARS-CoV 活性を持つ化合物の同定に成功した(RIKEN00046)。リアルタイム PCR によってウイルス RNA の定量を行ったところ、同定された化合物により処理された Vero E6 cell ではウイルス量がコントロールと比較して 1%未満まで減少した。この物質は recombinant proteinase を用いた実験においても阻害活性を示した。

さらに、同定された化合物の類縁体を作成して抗ウイルス活性を調べたところ、さらに強い抗ウイルス活性を持つ化合物を同定できた。マウス感染モデルでこれらの薬剤の評価を行ったところ、ウイルスの増殖が抑制されていることが明らかとなった。

D. 考察

In silico screening から同定されたこの化合物 (RIKEN00046) は、recombinant SARS-CoV main proteinase による *in vitro* cleavage assay においても阻害活性を示した。この結果から少なくともこの化合物が SARS-CoV main proteinase の活性を直接抑制できることが示唆された。また、この類縁化合物のうち、RIKEN00157 は *in vitro* で

RIKEN00046 と同等の抗ウイルス活性を示し、*in vivo* では RIKEN00046 より明らかに強い抗ウイルス活性を示した。今後は *in vivo* における薬物動態等も検討していく予定である。

E. 結論

本研究により抗 SARS-CoV 活性を持つ化合物が同定された。RIKEN00046 及び RIKEN00157 は新規抗 SARS-CoV 薬開発のリード化合物として有望であると我々は考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

山本典生、山本直樹

In silico screening による SARS-CoV 増殖抑制薬剤の同定

第 53 回日本ウイルス学会学術集会抄録、138 ページ、2004

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

プロテアーゼインヒビター 特願 2005-64664