

に少量しか取れません。それが、感染研の研究グループによって大量に取れるシステムが出来上がった。つまり、簡単に言いますと、レプリケートするときに引っかかる所を切ってしまうと、大量にガバガバ出てくるというシステムです。それをさらに我々がいただいたときに、もっと短くできないかということで、ギリギリまで切って VLP の産生効率を上げるシステムを作製しました李先生たちの研究がなければ、今回のワクチンベクターとして利用することも我々自身ではできなかつたと、この出会いが本研究に非常に重要であったと考えております。

この ORF2、バイアルカプシドの部分、先ほど言いましたサイトプラズムに引っかかる所を切って、バキロウイルス・トランスファーベクターを用いてバキロウイルスを作製し、昆虫細胞に感染させると、上清中に VLP が出来上がる。外観上は全くウイルスと同じですが、中は全くの空で遺伝情報を持たないために、ただの立体構造を持った蛋白として考えていただいて結構だと思います。また、ウイルスとしての性質を保持しておりますので、経口的に投与してもそのまま消化もされず、ちゃんと感染部位に到達するであろうと、そのようなことが考えられております。

まず最初に私も行ったのは、これをワクチンのカプセルとして使おうと、つまり、この中に物を入れれば、経口感染するウイルスですから、コロコロと転がって行って、目的の小腸粘膜にたどり着いて、そこに張り付くことができるであろうと考えました。この張り付くというのは非常に大切なイベントで、過去にやったことがあるのですが、腸溶剤のカプセルを使って飲ませます。そこに抗原を出しても、ほとんど免疫反応は起こらないのです。この場合は、張り付くというところがワクチンベクターとして非常にいいのではないかと考えています。

実際どのようにやるかと言いますと、これが VLP なのですが、もともとこのような状態のものを、これは結合型カルシウムイオンをディペンデントに粒子を構成しています。そのために、カルシウムを1回ここでキレートしてやりますと、見かけ上全く見えなくなります。分子間が広がって、伸びきったような状態になります。これを DNA ワクチン溶液内で行います。そうすると、分子間が広がります。そこで、もう1度ここにカルシウムを添加しますと、元どおりにギュッと元に戻る。そうすると、このように DNA ワクチンが中に封入されるであろうと考えました。

実際どうなるかと言いますと、これはセシウムクロライドで超遠心で精製した時のフラクションを示しております。DNA ワクチン溶液内で開いたり閉じたりしないでおいた VLP は、このように1つのピークであり、外にも DNA も何もくっついていなくて、何の DNA も見つからないのですが、いまのように広げて閉じるという動作をすると二方性になります。こちら側が DNA が入っている領域で、この VLP をつぶすと、中から DNA が出てくるのが確認できます。どのくらい入るかと言いますと、こちらのグラム等量でいくと大体 17、8 ぐらい、50 μ g の VLP に対して入るといことです。これをモル濃度にしみますと、大きなものは少しか入らなくて、小さなものはたくさん入るといことがわかりました。

これは、実際ジントランスファーが、DNA が本当に細胞の中に入るかどうかをいろいろな細胞でやってみました。そうすると、これは中には GFP の DNA を入れてあるのですが、GFP DNA を入れて VLP を細胞とミクスチャーして、その後 GFP の発現を見ると、ほとんどの細胞でこのように陽性反応が見られます。つまり、ほとんどの細胞に対しては、ちゃんとそこでトランスファーすることができるということが、ここで確認されました。

もう1つ、目的としては、これは *in vivo* でこのイベントが起こらなければ駄目なので、経口的に投与して本当に小腸に行くことがあるのかを試すのに、このようなトランスジェニックマウスを使いました。Cre/loxP システムを多く用いて、Cre リコンビナーゼの DNA を VLP の中に封入します。それをマウスに経口投与しますと、その DNA が発現した場所において、この Lac Z の青い色が見えてくるというマウスを用いました。このトランスジェニックマウスに経口投与します。口腔内から直腸まで全部組織を調べていきますと、このように小腸粘膜の上皮においてのみ、このように青い点がきれいに映ってまいります。これは小腸だけでしか認められませんでした。このことから、この VLP は通常感染するのと同じような立体構造を持っており、また消化等に対してもそれに耐え得るような性質もそのまま付与していることがわかっております。

これが本当にワクチンとしていくかどうかを試すために、この VLP の中に HIVenv の DNA ワクチンを封入します。そして、マウスにこのように0、1、2、3と4回投与します。その後、エンブ特異的な IgG、IgA を血清中もしくは糞便中から検出していこうと試みたものです。こうしてみると、VLP と DNA で、これは PO ですが、経口的に示したものがこの赤ですが、このように血清中の IgG は VLP DNA を皮下投与したものと同程度の高さで IgG を見るすることができます。糞便中からは、この IgG は認められません。

今度は IgA で見ますと、血清中でも明らかに経口投与したものにおいてのみ高い反応が認められ、糞便中では明らかに経口投与した場合においてのみ特異的な IgA が産生されています。このように、全身的かつ粘膜面に、液性免疫抗体の誘導が行われているだろうということがわかりました。

さらに行ったものは、これは細胞障害性 T リンパ球、CTL をここで見たものです。これは CD8 陽性の脾臓細胞、リンパ節、パイエル板、腸管膜リンパ節とパイエル板を見たところ、これはパイエル板では低いのですが、各部位においてウイルス特異的な細胞障害性 T リンパ球、CTL が誘導される。それは別に変った細胞ではなく、CD8 陽性のクラス 1 拘束性であるという典型的な CTL が、このように誘導できるということです。つまり、この DNA ワクチンを経口投与すると、粘膜面、全身に液性免疫並びに細胞性免疫の両者がこのように誘導できることがわかりました。

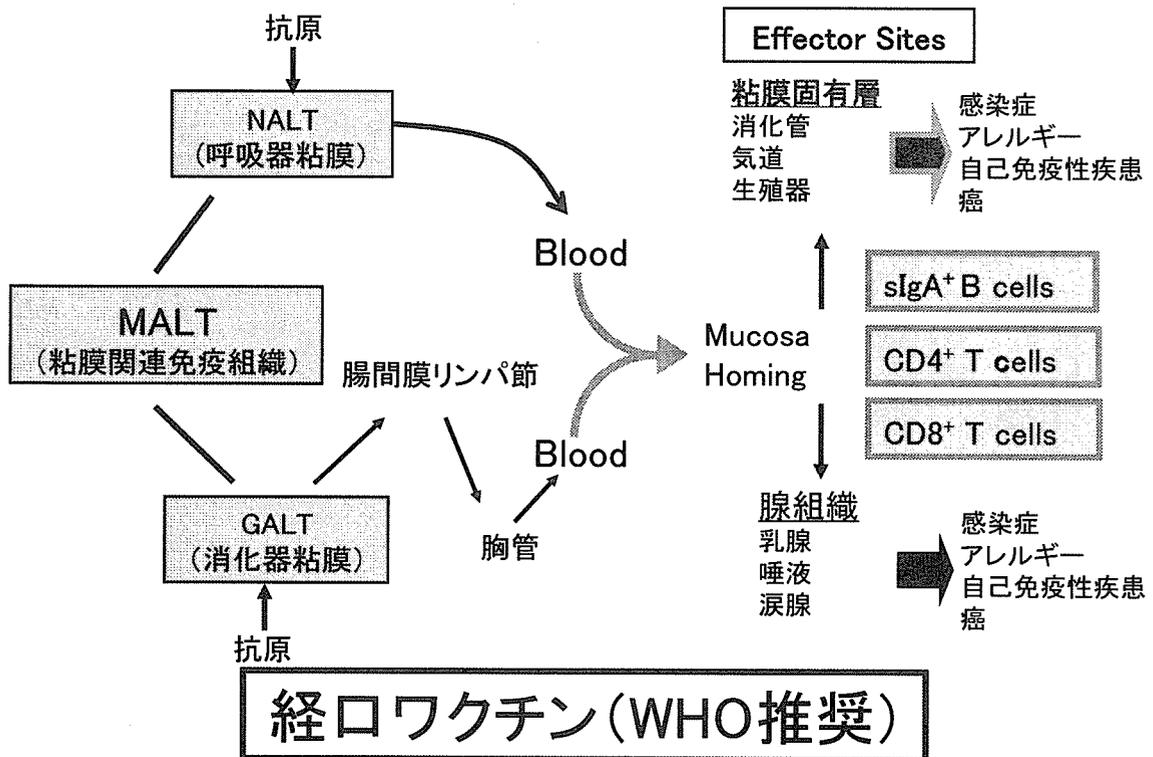
以上です。

E型肝炎ウイルス(HEV)のウイルス様中空粒子(VLP)を用いた経口ワクチンの開発

保富康宏

三重大学大学院医学系研究科生体防御医学

粘膜の免疫システム



経口ワクチンの有用性

- 安全性が高い
- 投与(免疫)が簡単、安価
- ワクチンを受ける側にストレスがない
- 大規模なフィールドトライアルが可能

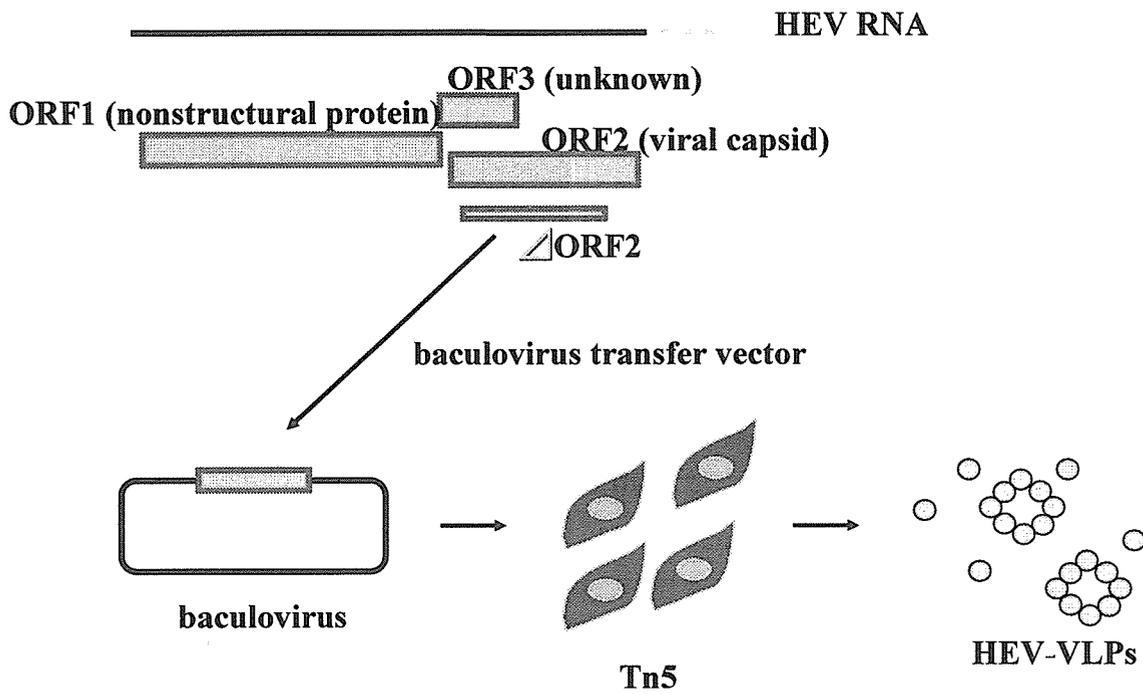
極端に低いpH、消化酵素 etc

免疫反応の誘導が非常に困難

E型肝炎ウイルス(HEV)

- calicivirus様のRNAウイルスで、小児や妊婦に急性肝炎を起こす。
- 世界中で広く存在することが知られている。
- 感染は飲用水や食物からヒトを含む哺乳類に経口感染する。
- ウイルスは小腸粘膜上皮に感染し、門脈を通過して肝臓に到達する。

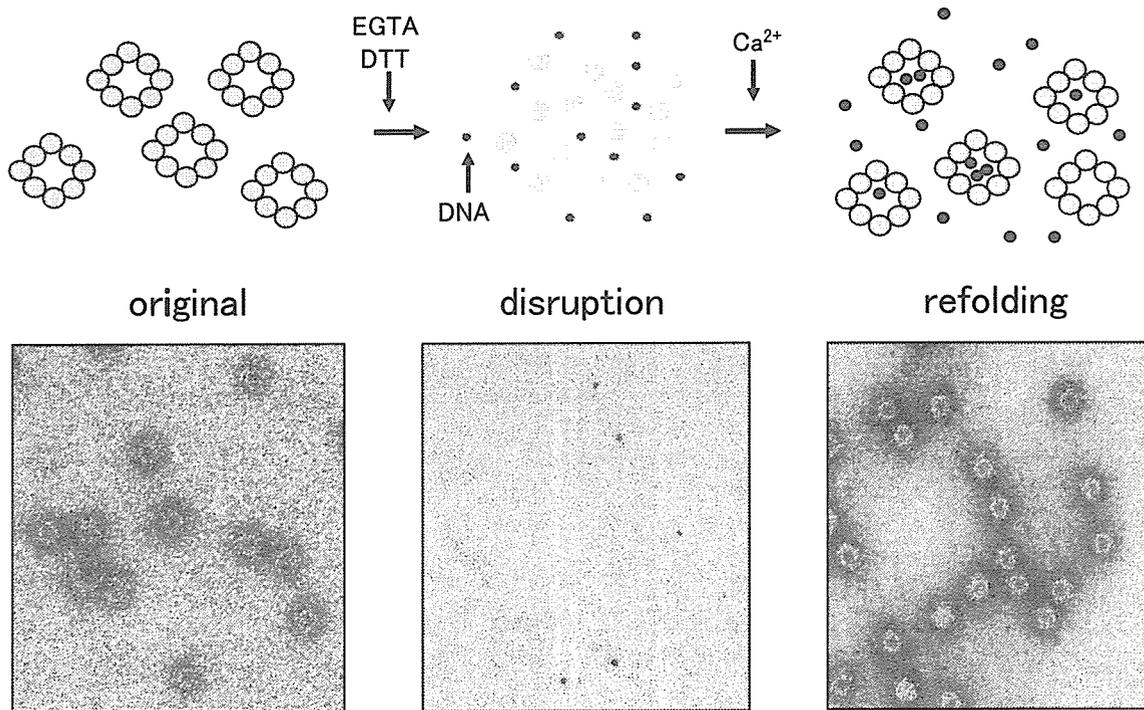
Expression of HEV capsid protein in insect cells



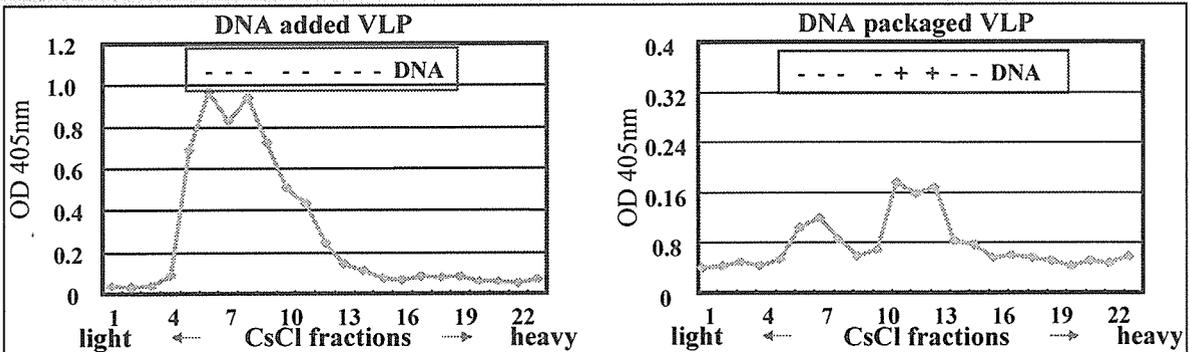
Li TC et al., *J. Virol.* 71, 1997.

1. DNA vaccine encapsulated VLP

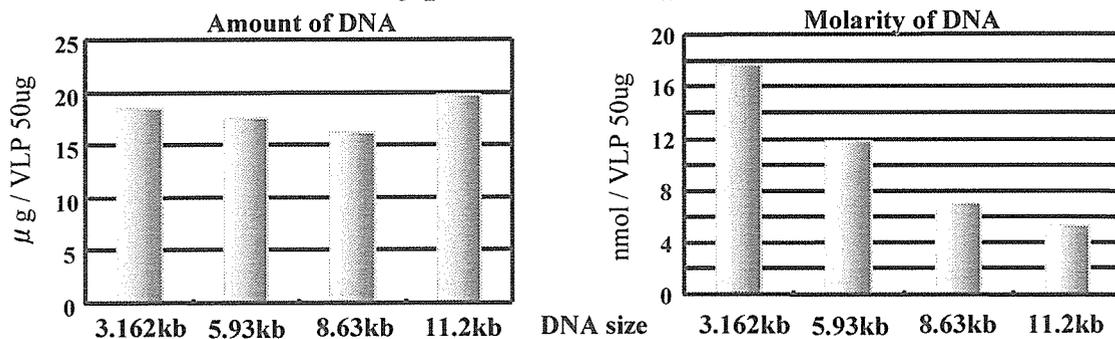
Procedure of DNA encapsulation into HEV-VLPs



Density shift of VLPs after DNA encapsulation

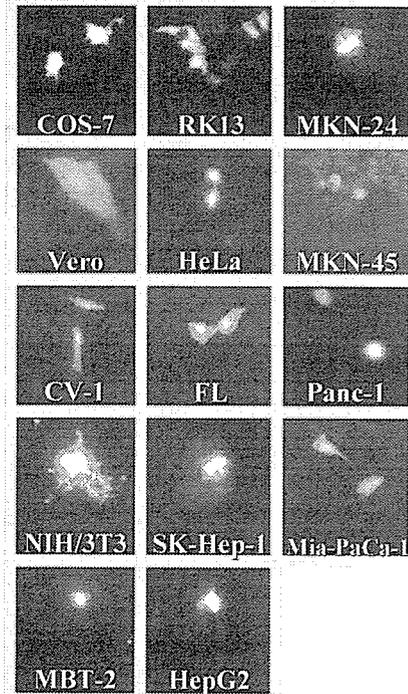


The amount of plasmid DNA packaged into VLPs

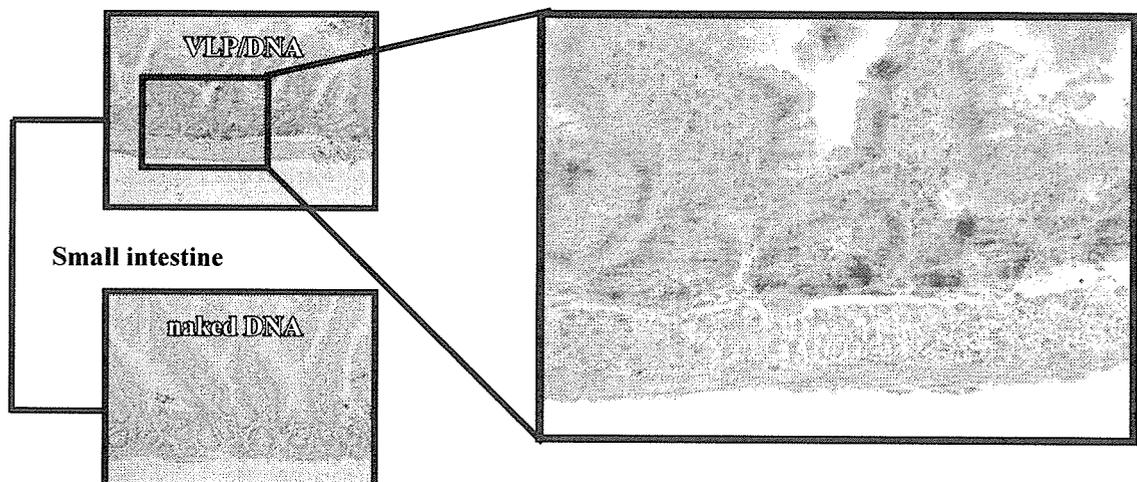
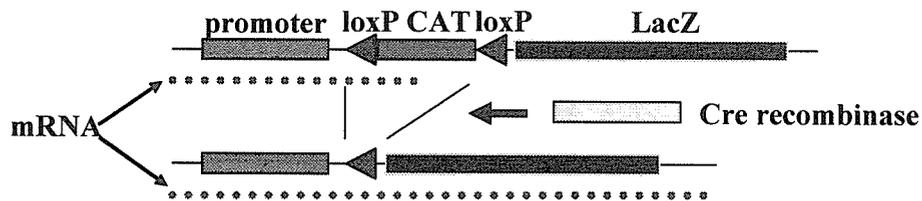


In vitro gene transfer using GFP plasmid packaged into HEV-VLPs

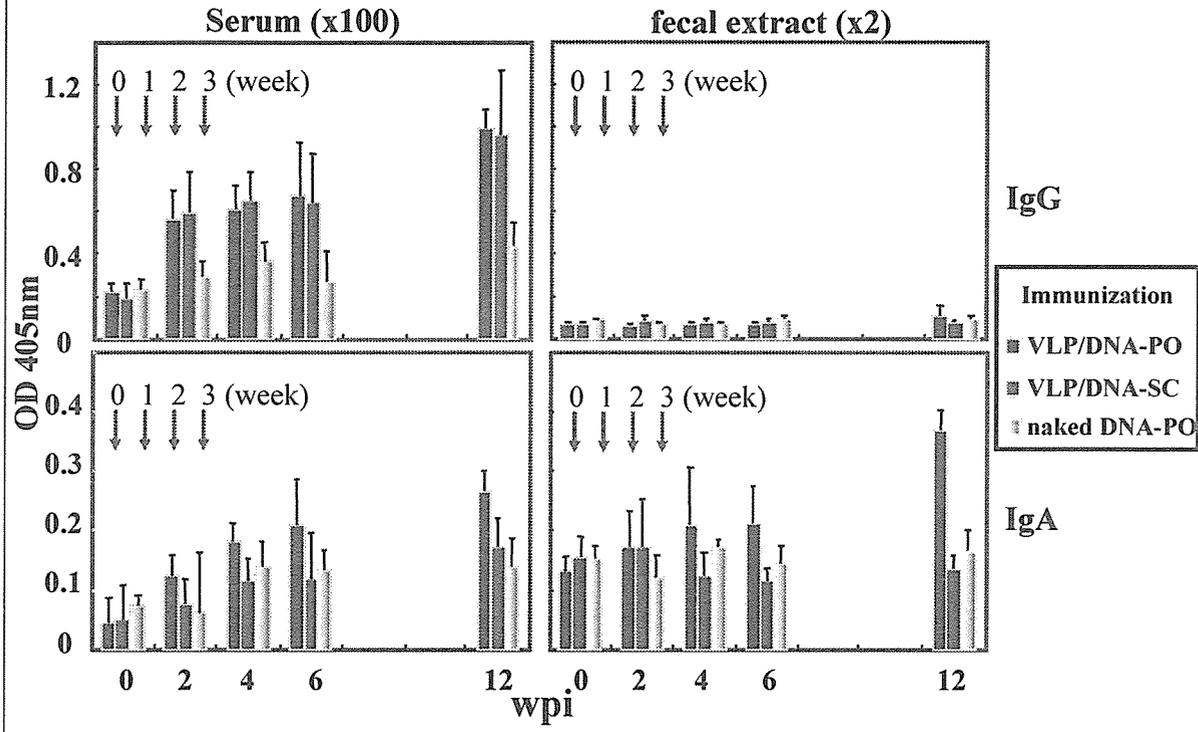
Cell line	Source	Transfection
COS-7	Kidney, African green monkey	+
Vero	Kidney, African green monkey	+
CV-1	Kidney, African green monkey	+
NIH/3T3	Embryo, NIH Swiss mouse	+
MBT-2	Bladder carcinoma, Mouse	+
RK13	Kidney, Rabbit	+
HeLa	Epitheloid carcinoma, Human	+
FL	Amnion, Human	+
SK-Hep-1	Hepatocellular carcinoma, Human	+
HepG2	Hepatocellular carcinoma, Human	+
MKN-24	Gastric carcinoma, Human	+
MKN-45	Gastric carcinoma, Human	+
Panc-1	Pancreatic carcinoma, Human	+
Mia-PaCa-1	Pancreatic carcinoma, Human	+
Capcn-1	Pancreatic carcinoma, Human	-
T24	Bladder carcinoma, Human	-



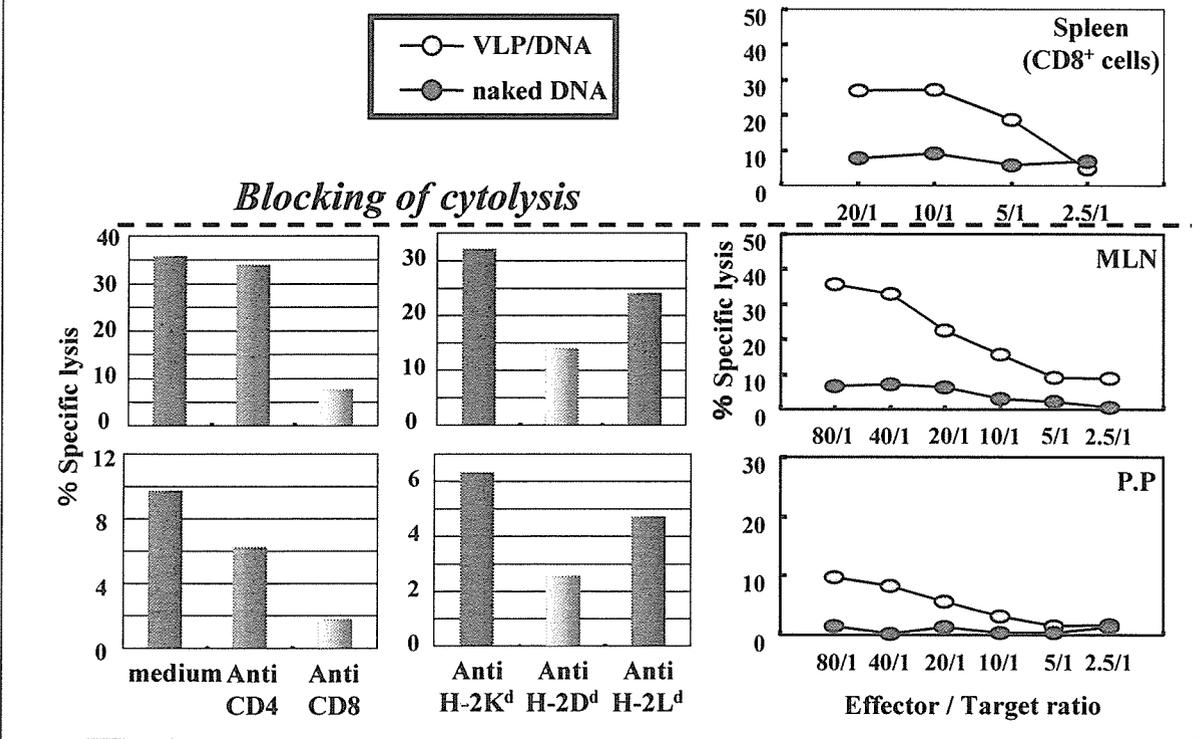
Cre-mediated activation of LacZ gene in loxP-CAT-loxP-LacZ transgenic mouse orally administered with Cre gene packaged into HEV-VLP



Induction of mucosal and systemic anti-HIV humoral immune response by oral administration of VLP/DNA



Induction of the mucosal and systemic anti-HIV CTL responses by oral immunization with VLP/DNA



CONCLUSIONS

- VLP composed of open reading frame 2 of orally transmissible hepatitis E virus is able to package plasmid DNA in vitro and then to deliver this foreign DNA to intestinal mucosa in vivo by oral route.
- Oral administration of DNA vaccine encapsulated HEV-VLP induced specific mucosal and systemic humoral as well as cellular immune responses without any kind of adjuvant.
- These findings provide evidences for the possibility of VLP derived from orally transmissible virus as a DNA vector to mucosal tissue by oral administration and its continued exploration as a vehicle for mucosal DNA vaccine.

三重大学生体防御

高村 史記
松原 明弘
唐松 克夫

東京大学医科学研究所

河岡 義裕

University of California

Holland R Cheng

国立感染症研究所

李 天成
武田 直和

武部 豊
草川 茂

新倉 昌浩

宮村 達男

「インフルエンザワクチン（ベクター）」

東京大学医科学研究所感染症国際研究センター長 河岡義裕

今日は、インフルエンザのワクチンとインフルエンザウイルスを使ったベクターの話をしてみたいと思います。

インフルエンザは、感染率が5～10%で、日本では一年に600～1,200万人の方が感染し、死亡率0.05～0.1%とすると、罹患者が1,000万人の場合、5,000～10,000人が亡くなっている計算になります。それほど重要な病気です。今朝、長谷川先生からもお話がありましたが、H5N1ウイルスは1996年に中国南部で分離され、それがアジアに広がり、ヨーロッパ、アフリカに広がりました。予防にはワクチンがいちばん効果的ということで、それに対するワクチンが作られているわけです。今日は、この新型ウイルスに対し、どのようにしてワクチンが作られているのかという話を最初にお話し、そこからインフルエンザワクチンについて考えてみたいと思います。

いまアジア等で流行しているH5N1ウイルスは、高病原性のインフルエンザウイルスで、ニワトリに感染すると100%死にます。インフルエンザのワクチンは卵を使って作っていますが、高病原性のウイルスは発育鶏卵を殺しますので、ウイルスの収量が良くありません。また、ヒトに感染しヒトを殺すこともありますので、ワクチンを作っている人が危険にさらされます。従って、野外で流行している高病原性のインフルエンザウイルスそのものはワクチン株としては使えません。どうすればいいかというと、これを弱毒のインフルエンザウイルスに変えてやればいいのです。

インフルエンザウイルスの特徴は、遺伝子が8つの分節に分かれているということです。ウイルスの表面には、HAとNAという2つの糖蛋白質のスパイクがあります。鳥インフルエンザウイルスの場合には、HAが病原性発現に非常に重要な役割を果たします。

HAは、1本のポリペプチドとして合成されたのちに、宿主の蛋白質分解酵素によって2つのサブユニットに分かれます。この切れる部分の上流のアミノ酸の配列が非常に重要で、強毒の鳥インフルエンザウイルスと弱毒の鳥インフルエンザウイルスのHAの配列を比較すると、開裂部位の上流のアミノ酸配列が強毒株と弱毒株では違っていることがわかりました。強毒株では、アルギニンやリジンといった塩基性のアミノ酸が連続しているのですが、弱毒株の場合は連続していません。この違いがウイルスの病原性を決定するわけです。従って強毒株のHAの開裂部位のアミノ酸の配列を弱毒型に変えてやると、抗原性は全く一緒だけれども、病原性が全くないウイルスを作ることができるのです。これは今から13年前の仕事です。

1999年に、リバーズジェネティックスというインフルエンザウイルスをプラスミドから人工的に作るという方法を開発しました。この方法を使えば、先ほどお話したHAの開裂部分だけを簡単に変えることができます。WHOの協ラボがH5N1ワクチンの候補株を作って、いろいろな国に配り日本を含めいろいろな国で臨床試験が行われていますが、こ

これらの候補株はこの方法を使って作られています。

そのうちの1つで、「NIBRG14」という最初に作られた候補株があります。イギリスの National Institute for Biological Standards (NIBSC) という所で作られたウイルスで、HA と NA が VN1194 という H5N1 ウイルス由来です。HA は開裂部位を弱毒型に変えてあります。卵でよく増えるように、HA と NA 以外の遺伝子は PR8 という卵でよく増えるウイルスに置き換えてあります。これがいろいろな国に配られたのですが、この株はあまり発育鶏卵で増えなくて、いろいろな所で、増えないから困るという話が出ています。そこで、発育鶏卵でよく増える H5N1 ワクチン候補ウイルスはできないかと考えました。

PR8 というウイルスですが、これは 1934 年にヒトから分離されたウイルスで、いろいろな実験室でいろいろな継代方法で受け継がれています。つまり世界中にいろいろな PR8 株があります。塩基配列を比較するとそれぞれ、かなり違いがあります。NIBRG14 はケンブリッジで継代されていた PR8 を使ったウイルスです。

ウイスコンシン大学で保存されていた PR8 は、普通の PR8 と比較し卵で 10 倍よく増えるということがわかっていました。そこでこの PR8 株を使ってワクチン候補株をつくることを考えました。そうするとウイスコンシンの PR8 を使った方が NIBRG14 よりも 7 倍よく増えました。

H5N1 ウイルスにはいろいろなウイルスがありますが VN1194 株と抗原性がよく似ている VN1203 という株があります。この株の HA と NA に変えてやると NIBRG14 よりも 14 倍増えるようになりました。インフルエンザウイルス不活化ワクチンでいちばん重要な感染防御抗原は HA です。そこで、NA をいろいろなウイルスの NA に変えたウイルスを作りました。その中で一番増殖性がよかったのが、PR8 の NA に変えたものです。つまり HA だけが 1194 株で、ほかの遺伝子はすべて PR8 というウイルスですが、このウイルスは NIBRG14 よりも 21 倍よく増えました。さらに HA を VN1203 に変えてやると、NIBRG14 よりも 27 倍よく増えました。すなわちいろいろなウイルスの遺伝子を組み合わせることにより発育鶏卵でよく増える H5N1 ワクチン候補ウイルスは作製可能であることがわかりました。

ここで重要なのは、この方法を使えば H5N1 ワクチン候補ウイルス同様、通常のインフルエンザワクチン用にも安定的に増殖性の高いワクチン候補株を作製することが可能であるということです。これがなぜ重要かというと、最近ヒトから分離されるインフルエンザウイルスは、なかなか卵では増えないのです。WHO が推奨したワクチン候補株がなかなか増えないということも最近よくあります。リバーシジェネティクスを使って、卵で増殖性の良いウイルスをバックグラウンドを使えば安定的に増殖性の高い不活化ワクチン候補株をつくることができるというわけです。

ただ、不活化ワクチンの効果には限界があります。アメリカでは生ワクチンが認可されており、このワクチンは、成人では不活化ワクチンと大きな差はないのですが、小児では不活化ワクチンよりもかなり効果的であることが証明されています。このように生ワクチ

ンには不活化ワクチンよりも高い効果が期待されるわけですが、アメリカで認可されているのは別の生ワクチンができないかということで、私たちの実験室では新規生ワクチンの開発も行っています。

次にインフルエンザウイルスを基にしたワクチンベクターのお話をしたいと思います。リバーシジェネティクスを開発したときに、普通のウイルスの8つの分節に加えて9本目の外来の遺伝子分節を持つウイルスを作りました。ところが、この9番目の分節は継代していくうちになくなってしまいました。その当時は理由がわかりませんでした。しかし、ウイルスの遺伝子がウイルス粒子に入っていくメカニズムを調べていくうちに、それぞれの遺伝子分節にはウイルス粒子に取り込まれるために必要なパッケージング・シグナルがあることがわかりました。最初に作られた9本鎖ウイルスの9本目の分節にはパッケージング・シグナルが一部しかはいつていなかったのです。

そこで次に完全なパッケージング・シグナルを持った9本目の分節を持つウイルスを作りました。ところが3回継代では、なくならないのですが、5回継代するとすこし9本目の遺伝子が落ちているのがわかりました。この理由も、ウイルスの増殖過程を調べていくうちにわかってきました。どういうことかといいますと、インフルエンザウイルスが感染して細胞から出てくるときには、8種類の遺伝子が一塊になってウイルス粒子に入っていくとわかりました。つまり、インフルエンザウイルスをベクターとして使う場合には8本鎖のウイルスでないと駄目だということがわかったのです。

そこで、8本鎖のウイルスで何ができるかを考えました。どういうことをやったかといいますと、インフルエンザウイルスのHAとNAをコードしている遺伝子がありますが、このNAをコードしている部分を取り除いて、その部分にパラミクソウイルスの感染防御抗原であるHNをコードしている部分を入れることを考えました。動物実験で感染防御効果をみたいので、センダイウイルスのHNを使いました。

作った組換えウイルスは、インフルエンザウイルスのHAとセンダイウイルスのHNの両方を発現していることがわかりました。また、このウイルスは卵で、 10^8 PFU/mlとかなりよく増殖しました。このウイルスをマウスに感染させ免疫し、次にインフルエンザウイルスで攻撃すると、免疫していないマウスは全部死んでしまいましたが、免疫したマウスは全て生残しました。

次に、同じように免疫しておいて、今度はセンダイウイルスで攻撃しました。この場合も、免疫していないマウスは全部死にましたが、免疫したマウスは全部生残しました。このようインフルエンザウイルスを基にした多価ワクチンを作ることができたわけです。

今日お話したことをまとめますと、

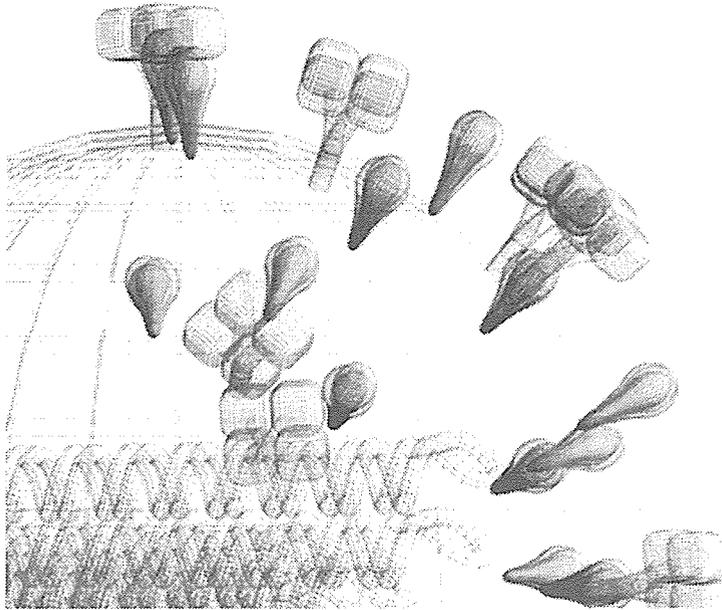
1. 現行よりも増殖効率のよいインフルエンザワクチン候補株の作製は可能です

2. 外来遺伝子を安定的に発現するインフルエンザウイルスベクターの開発に成功しました。

今日お話した不活化ワクチンの仕事は大学院生の村上君と堀本助教授の仕事です。多価ワクチンの仕事は現在ポストクの前田さんが大学院のときにした仕事です。

河岡義裕
東京大学 医科学研究所
感染・免疫部門 ウイルス感染分野
感染症国際研究センター

インフルエンザワクチン ワクチンベクター



インフルエンザ感染症の猛威

- 罹患率は約5~10%
➡ 約600~1200万人
- 死亡率は0.05~0.1%
➡ 罹患者1000万人とすると
5000~1万人が死亡

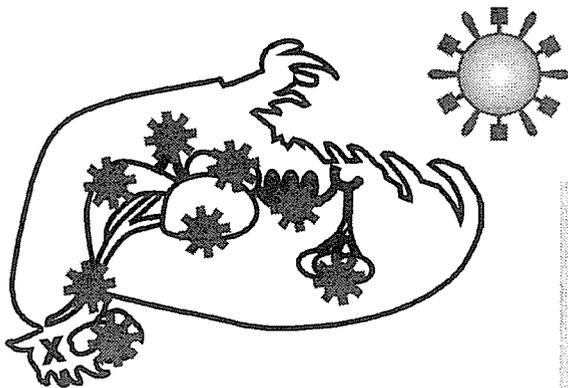
高病原性鳥インフルエンザウイルスがパンデミックを起こしたら？

ワクチン

・ 予防には最善の方法

新型ウイルスが現れたら、
どのようにしてワクチンを作るか？

高病原性鳥インフルエンザ用ワクチン作製の問題点



・ 発育鶏卵を殺す
・ 人に強い病原性



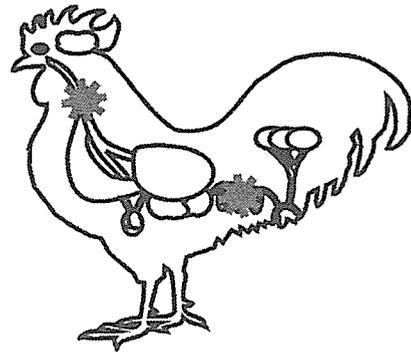
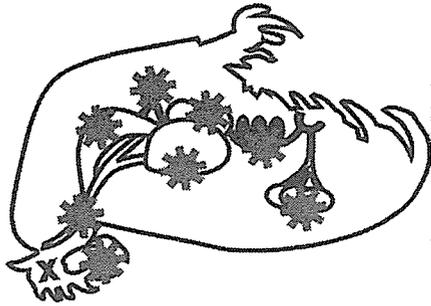
・ 品質の高いウイルス液が
採取できない
・ ワクチン製造者の安全が
確保できない



ワクチン株としては使えない

どうすればよいか？

HA開裂部位を強毒型から弱毒型にすればよい。

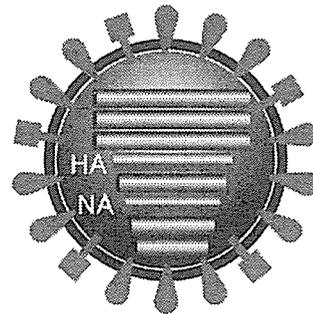
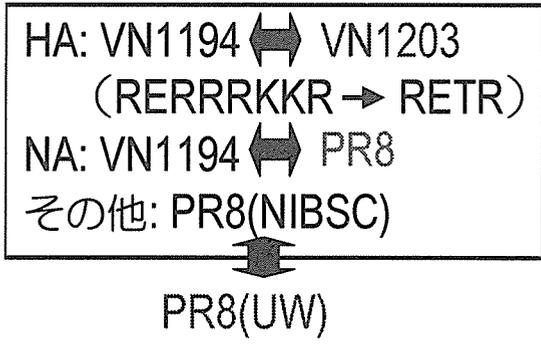
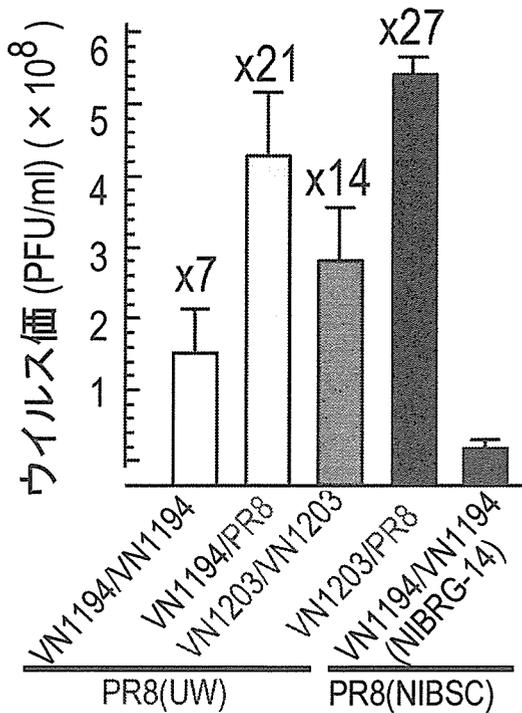


RERRRKKR

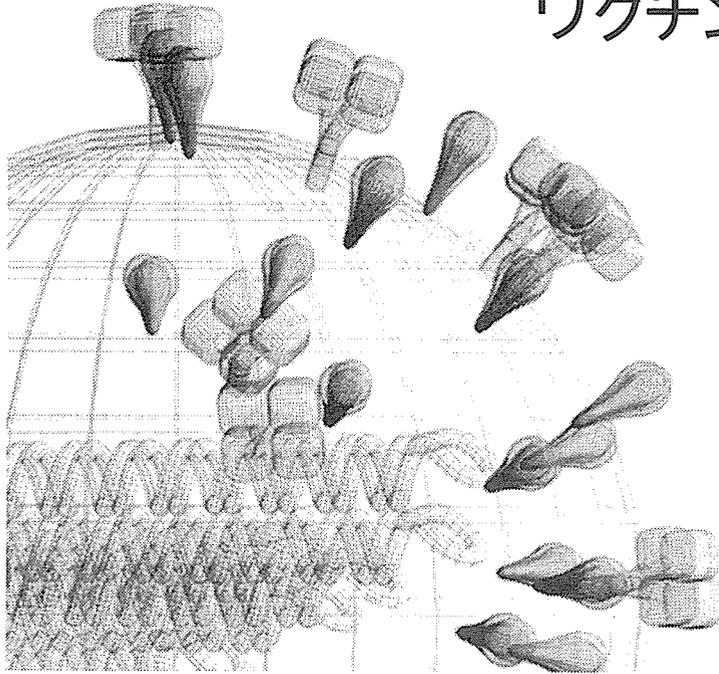
----RETR

(Horimoto and Kawaoka, J Virol. 1994)

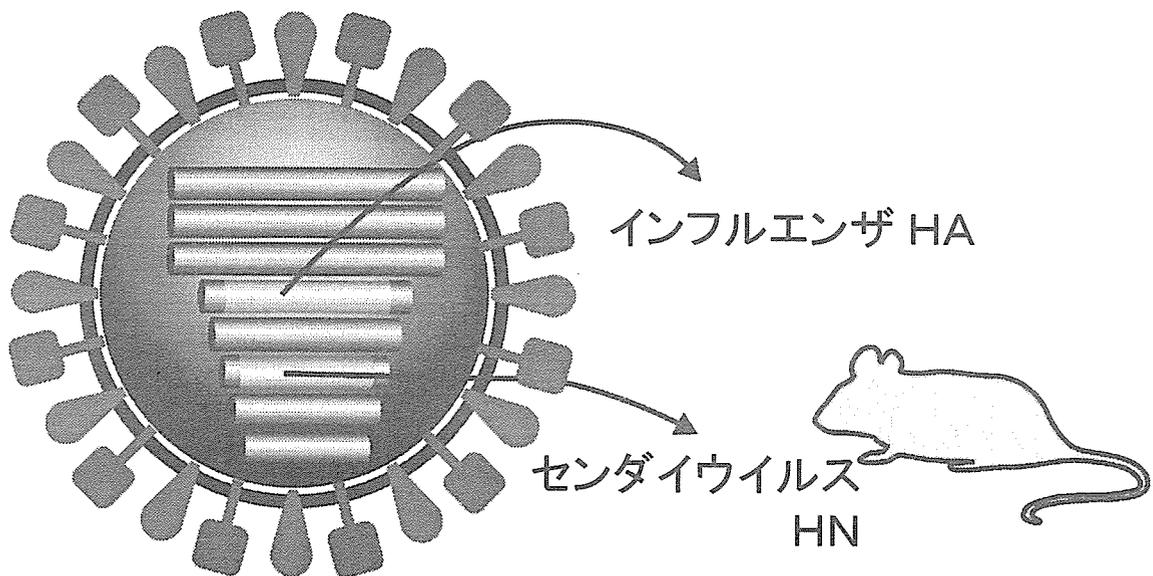
発育鶏卵でよく増える H5N1 ワクチン候補ウイルスは出来る

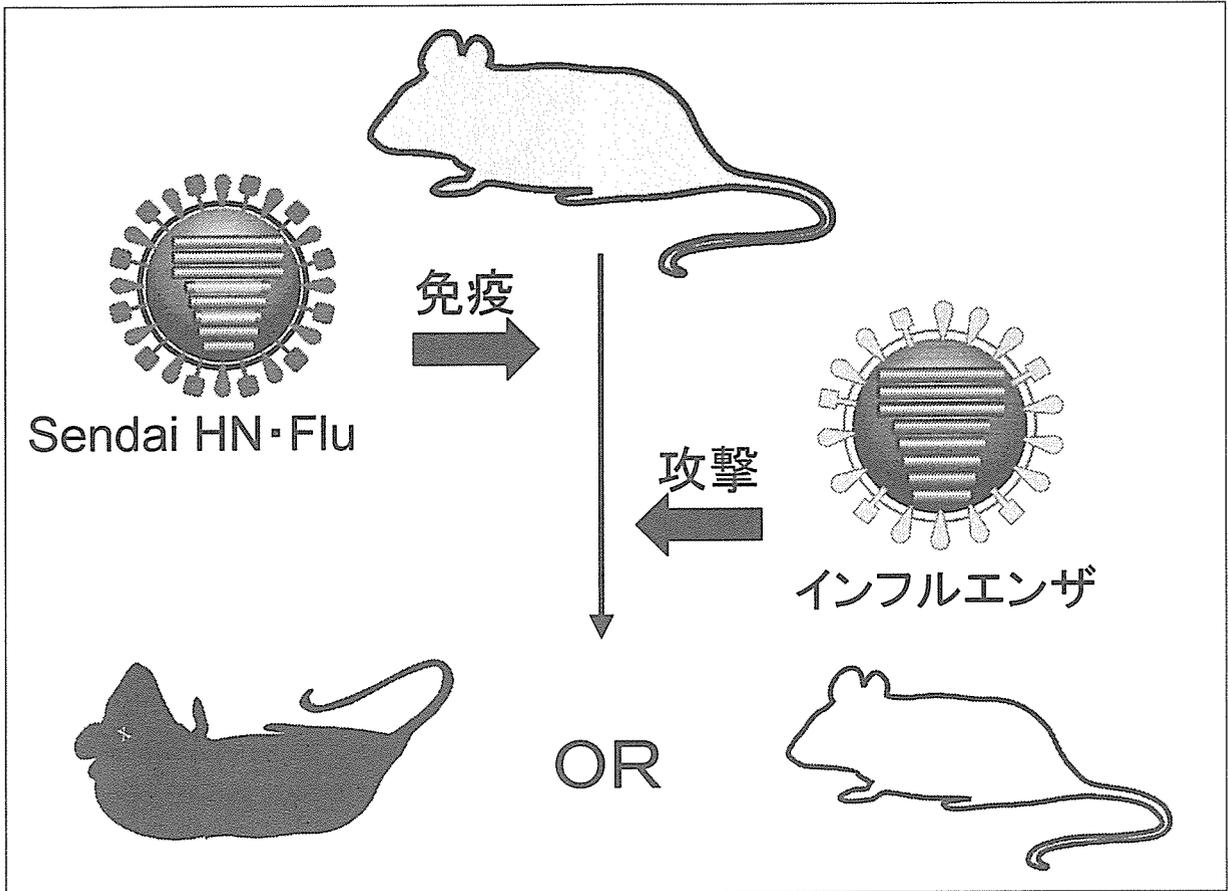


インフルエンザウイルスを基にした ワクチンベクターの開発

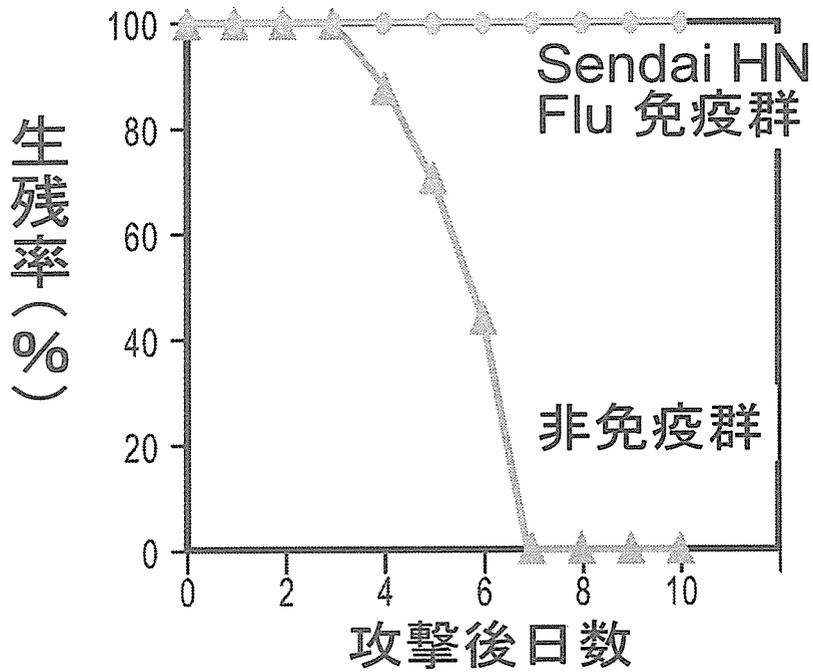


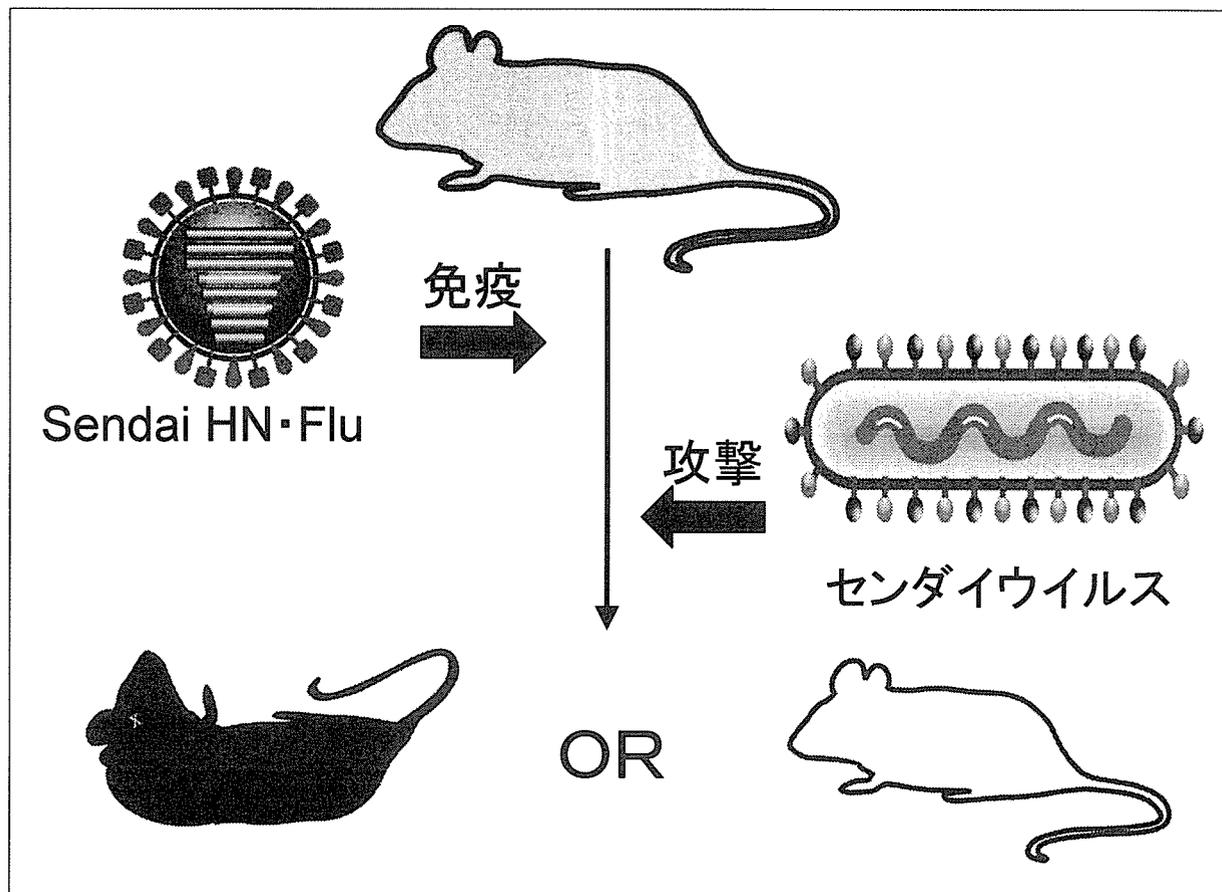
インフルエンザウイルスを基にした多価ワクチンの開発





インフルエンザ・センダイ多価ワクチンの効果
 —インフルエンザウイルスによる攻撃—





インフルエンザ・センダイ多価ワクチンの効果 —センダイウイルスによる攻撃—

インフルエンザウイルスを基にした
多価ワクチンができた。

まとめ

- 現行より増殖効率のよいインフルエンザワクチン候補株の作出は可能である
- 外来遺伝子を安定的に発現するインフルエンザ・ウイルスベクターを開発した。

謝辞

東京大学医科学研究所

堀本泰介

岩附(堀本)研子

村上晋

前田(八田)寧子