

平成18年度

政策創薬総合研究  
重点研究報告書（Ⅱ）

平成18年度

政策創薬総合研究

重点研究報告書（Ⅱ）

## 目 次

|         |  |       |     |
|---------|--|-------|-----|
| KH51039 | 臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法 (DLI) の実用化                                | 藤原成悦  | 589 |
| KH51041 | C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発                           | 脇田隆字  | 636 |
| KH51042 | 個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究                               | 石見佳子  | 656 |
| KH51043 | 食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用                         | 山本茂貴  | 671 |
| KH51044 | 食品添加物等の新機能性に関する研究  | 広瀬雅雄  | 680 |
| KH51045 | 新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発   | 池田康行  | 691 |
| KH51046 | 気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究 | 松本健治  | 707 |
| KH51048 | 新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究                                  | 長谷川秀樹 | 720 |
| KH51049 | 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  | 728 |
| KH51050 | 可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究                                | 田口文広  | 740 |
| KH51051 | ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発                                       | 小島朝人  | 761 |
| KH51052 | 脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究                                   | 最上知子  | 772 |
| KH51054 | 核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究                           | 武田直和  | 783 |
| KH51055 | siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用          | 森川 茂  | 795 |
| KH51057 | 血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究                                 | 新見伸吾  | 814 |
| KH51058 | 天然抗酸化剤を利用した創薬化学  | 福原 潔  | 826 |
| KH51102 | 内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立                              | 長谷川浩二 | 836 |
| KH61059 | 幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化                                   | 土屋利江  | 839 |
| KH61060 | 新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発                                      | 岸田晶夫  | 919 |
| KH61061 | 霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発             | 湯尾 明  | 939 |
| KH71063 | 臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法の確立に関する研究             | 乾 賢一  | 951 |
| KH71064 | ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立                     | 梅澤明弘  | 966 |

|         |  |               |
|---------|--|---------------|
| KH71066 | 創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築                   | 絵野沢 伸 …… 979  |
| KH71068 | ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション                                      | 本間 正充 …… 1000 |
| KH71069 | 高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発 | 永森 静志 …… 1021 |
| KH71070 | ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発  | 西尾 和人 …… 1042 |
| KH71071 | 外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究     | 大野 泰雄 …… 1054 |
| KH72077 | ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価                               | 澤田 康文 …… 1070 |
| KHB1201 | タンパクリン酸化酵素SIKの糖・脂質代謝における役割と創薬標的評価系の開発                        | 竹森 洋 …… 1080  |
| KHB1202 | 家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の新規治療及び予防薬の開発                         | 寺尾 恵治 …… 1086 |
| KHC1203 | 弱毒性ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究                                 | 大隈 邦夫 …… 1090 |
| KHC1204 | チオレドキシシンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発                 | 井上 達 …… 1096  |
| KHC2206 | 腹膜癒着予防剤の開発と応用  | 土肥多恵子 …… 1106 |
| KHD1205 | ヒト乾燥羊膜の機能再生医療材料への実用化に関する研究                                   | 阿久津英憲 …… 1111 |
| KHD2207 | ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究                   | 後藤 雄一 …… 1115 |



## 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

研究期間 平成16年4月～平成19年3月

研究要旨 (1) 我国侵入の危険性故、緊急開始した WN ワクチン研究で、1) 試作 WN 不活化ワクチンが中和抗体を誘導し WNV に有効であることを示した。又、製造用種 WNV 株の全塩基配列解析から有効性の分子遺伝学的根拠を示した。2) WN VLP サブユニットワクチン研究では、WN VLP の大量産生・分泌ベクター構築に成功し、VLP が中和抗体誘導能を持つ有効なワクチン抗原であることを示した。以上、不活化及び VLP 両 WN ワクチン開発が別途実施可能な基盤の整備は完了した。

(2)-1) 我国土着の JEV と WNV の鑑別に JEV 特異的遺伝子検出法も確立した。又、WNV 中和 MAb を樹立し WNV 特異的 ELISA を確立した。2) バイオ医薬品製造で問題の FBS 迷入 BVDV 検出法を確立した。以上、JE VLP サブユニットワクチン開発へ再展開する研究基盤が整備された。

(3) CMV プロモーター特許権に拘束されない独自の新規プロモーター(特願 2005-261366) 研究では、HHV-6 及び HHV-7 IE プロモーターが血球系細胞で高活性、MDDC でも CMV に比肩することを示した。以上、第3世代ワクチン用プロモーターとしての有用性を示した。

### 分担研究者

- (1) 国立感染症研究所・感染病理部 小島 朝人  
高橋 秀宗  
田中 道子  
同 ・ウイルス1部 高崎 智彦
- (2) (財) 阪大微生物病研究会 東 雍
- (3) 独立行政法人医薬基盤研究所 山西 弘一

### A. 研究目的

WHO は熱帯・亜熱帯を視野に「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、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、短時間で全土に定着し、北米大陸・カリブ海全域に拡大し、昨年も多数の患者・死者が発生し、流行が終息する気配も無い。

我国でも2005年に米国渡航者の初症例が報告され、ウラジオストックの野鳥でのWNV分離報告を考慮すると、極めて強い警戒が必要になっている。しかし、フラビウイルスにはワクチン以外対処法がない。現在、馬用の不活化及びDNAワクチンが米国で認可されているだけで、人用ワクチンは無い。従って、WNワクチン開発は急務である。

WNV は日本脳炎ウイルス(JEV)血清型に属する

極近縁ウイルスであるため、我々のJEワクチン開発の方策と技術を生かす時である。そこで第1の柱として、WNワクチン研究を緊急に開始し、本課題外でもWNワクチン開発が別途実施可能な基盤を整備することを目的とした。即ち、1) 認可申請段階に到達し成功裏に今期研究課題から解除した微研会の細胞培養不活化JE新ワクチンに準じて、不活化WNワクチン研究を行うこと、2) 前期共同研究のJEV E蛋白粒子抗原生成技術(官民共同出願済)を用いてWNサブユニットワクチン研究を行うこと、を目的とした。

一方、上記新技術による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ワクチンをバイオ医薬品製造国際基準に合致する開発へと発展できるよう、GMP対応の製造を可能とする基盤研究を行うことを第2の柱とした。

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新規ワクチンの効率化に直結する極めて波及効果の高い目標である。従って、将来を見据えた独自の研究として、新規プロモーターの研究開発を第3の柱とした。

### B. 研究方法



(1)-1) WN 不活化ワクチンの研究開発: WN ワクチン製造用種ウイルス: WNV NY99-35262 株(長崎大学熱帯医学研究所森田公一博士より分与)を Vero 細胞で 3 回ブラック純化後増殖させマスターシード WNV(WMSV001)を調製し、これを Vero 細胞で 1 代増殖させワーキングシードとした。Cytodex 1 マイクロキャリアに付着・増殖させた数 L 又は 50L 培養規模の Vero 細胞に moi=0.01 でウイルスを接種し、牛血清不含培養系でのウイルス増殖をブラック法及び抗-WNV 単クローン抗体(MAb)WNY-11 を用いた ELISA 法で調査した。ウイルス不活化と精製: 調製した WNV 液に 4℃で 1/1000~1/8000 量のホルマリンを添加し、不活化をブラック法で調査した。不活化 WNV 液から 2 回の蔗糖濃度勾配超遠心でウイルスを精製し、試作ワクチンを作製した。これをネガティブ染色し電子顕微鏡で観察した。マスターシード WNV 塩基配列の決定: WMSV001 からウイルス RNA を抽出し、ゲノム両末端を除く 2 領域を RT-PCR 法で増幅後、ダイレクトシーケンシング法で塩基配列を解読した。+/-両鎖の塩基配列決定後コンセンサス配列を求めた。ウイルス RNA 3' 末端は poly(A) テイリング法で cDNA を合成後オリゴdT 及び特異的プライマーで PCR クロウンを得た。RNA 5' 末端は、SMART RACE cDNA 増幅法で得た RT-PCR クロウンを調製した。各 5 クロウン以上を解読し両末端の塩基配列を決定した。マウス免疫実験: 試作 WN 或いは JE ワクチンを ddY 又は DDY マウス腹腔内に 1 週間隔で 2 回免疫した。免疫 1 週後の血清中の中和抗体価は Vero 細胞を用いた 50%ブラック減少法で、赤血球凝集抑制抗体(HI 抗体)価は至適 pH=6.4 の常法で、間接蛍光抗体(IFA 抗体)価は WNV 感染 Vero 細胞を用いて測定した。ウイルス交叉中和試験: JE 血清型群に属する WNV NY99-6922 株, Eg101 株, FCG 株, g2266 株; クンジンウイルス OR393 株; JEV 北京-1 株, 中山株, 広島/25 株, 千葉/88 株; セントルイス脳炎ウイルス Parton 株; マレーバレー脳炎ウイルス 1/51 株; 黄熱ウイルス 17D 株、のウイルス力価を Vero 細胞ブラック法で算出し、2,000PFU/ml のウイルスを中和試験に用いた。

(1)-2) WN サブユニットワクチンの開発: WNV prM-E 発現ベクターの構築: WNV NY99 株ビリオンを感染 Vero 細胞培養上清から調整し、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・クローニング後、変異導入法で制限酵素サイトを導入し、種々のサイズの分泌シグナル配列を prM-E 遺伝子上流に連結した WNV prM-E 発現ベクターを構築した。発現 WNV 抗原の解析: 発現ベクターを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 ELISA で測定して WNV 抗原の産生・分泌を検討した。抗原蛋白はフラビ交叉反応性ウサギ抗-JEV 抗体及び抗-WNV/M 抗体を用いた免疫プロットで解析した。抗原の細胞内分布・局在は prM-E と EGFP を連結した融合蛋白の蛍光で解析した。培養上清中の抗原は 20-60%平衡蔗糖密度勾配遠心法で解析した。抗原ピーク画分を濃縮しネガティブ染色後電子顕微鏡で観察した。この粗精製抗原を BALB/c マウスに免疫し、血清中の中和抗体価を 50%ブラック減少法で測定した。

(2) 次世代 JE サブユニットワクチンの基盤研究: 1) 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 の親株と異なる継代歴)、牛精巢細胞(FBT)、培養上清、使用した FBS から全 RNA を抽出し、BVDV(牛ウイルス性下痢症ウイルス)ゲノム RNA の 5' 末端非翻訳領域を RT-PCR で増幅した。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 抗体を用いた間接蛍光抗体法で BVDV 抗原の検出を行った。陽性対照には BVDV Nose 株を使用した。2) JEV 用 TaqMan RT-PCR 法の構築: WNV 脳炎と JEV 脳炎の鑑別診断系を確立するため、米国 CDC の WNV 遺伝子検出 TaqMan RT-PCR 法を参照して、JEV 遺伝子検出用の種々のプライマー・プローブセットを調製した。JEV 遺伝子特異的検出が可能なこれらの至適 TaqMan RT-PCR 条件を検討した。3) 抗-WNV MAb と抗原 ELISA の樹立: 精製不活化 WNV NY99 株を BALB/C マウスに 4~5 回免疫し、脾臓細胞を常法により細胞融合した。抗体産生クローンを選択し、WNV 特異抗体の産生を間接蛍光抗体法、フラビ特異的 MAb402(保井孝太郎博士より分与)-ELISA で判定した。陽性クローンを市販の Iso-tying Kit で検索し、WNV 中和能をブラック法で調査した。中和活性陽性 MAb を捕捉及び検出抗体に用い、不活化 WNV 抗原を標準抗原とするサンドイッチ抗原 ELISA の確立を試みた。

(3) 新テクノロジーの開発: ワクチン用新規プロモーターの開発: ヒトヘルペスウイルス(HHV)-6B の主要前初期(MIE)遺伝子上流約 1.2 kbp と U95 遺伝子上流約 700bp、及び HHV-7 の MIE と U95 遺伝子上流の約 400bp を、pGL3 Basic 又は pGL4.10 ベクターのホタルルシフェラーゼ(F-luc)遺伝子上流に挿入してプロモーター活性測定用ベクターを構築した。また、ウミシイタケルシフェラーゼ(R-luc)発現プラスミド(phRL-SV40 又は pGL4.70-SV40)をトランスフェクション効率補正に、比較対象に CMV IE プロモーターを用いた。プロモーター活性の比較: T 細胞株は Jurkat, Molt-3, SupT-1



を、骨髄系細胞株は SAS-413 を用いた。初代培養細胞には末梢血単核球 (PBMC) 及び単球由来樹状細胞 (MDDC) を用いた。MDDC は PBMC より CD14 マイクロビーズで単球を分離し、800U/ml GM-CSF 及び 400 U/ml IL-4 存在下で 1 週間培養した。細胞株のトランスフェクションには Lipofectamine 2000 を、PBMC 及び MDDC には Nucleofector kit を用いた。トランスフェクション 24 時間後の各 Luc による発光量を Dual Luciferase Assay Kit で測定した。

(倫理面への配慮)

PBMC 等ヒト検体の取り扱いに際しては、疫学研究および臨床研究に関する倫理指針を遵守し、当該研究所における倫理委員会の承認を得た上で研究を遂行した。マウスを用いた動物実験は動物愛護倫理規程に則り、当該研究機関において申請・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)-1) WN 不活化ワクチンの開発：製造用種ウイルス：マイクロキャリア培養 Vero 細胞での WNV 増殖は、接種 2 日目に  $10^{9.0}$  PFU/ml 以上の最高感染価を示し以後低下した。HA 抗原価は接種 3 日目で 256 倍、ELISA 価も自家参照品 WN03001A=100 の相対値で 244 単位と最高値を示した。種 WNV が至適 pH=6.4 でガチョウ赤血球を凝集させることも確認された。次に、ワーキングシードウイルスを調製し培養規模 50L の Vero 細胞に接種してウイルス増殖試験を行った。3 回の試験とも感染価は接種 2 日目で  $10^{9.0}$  PFU/mL 以上に達し、3 日目は同等/やや低下した。ELISA 抗原含量は 3 日目で最高値 83~113 単位に達した。塩基配列：マスターシードウイルス (WMSV001) の全塩基配列 (11, 029bp) を決定し、NY99-flamingo 382-99 株と比較した。塩基番号 247 番 (C 遺伝子)、5612 番/5725 番 (NS3 遺伝子)、7015 番/7287 番 (NS4B 遺伝子)、8811 番 (NS5 遺伝子)、10851 番 (3' 非翻訳領域) の 7 塩基置換が検出され、NS3 領域の 2 ヲ所のでアミノ酸置換を伴っていた。塩基置換 5612/5725 番のアミノ酸は NY99-flamingo 382-99 株が Ser/Ile で、種ウイルス WMSV001 が Phe/Val であった。不活化：ホルマリンを WNV 液の 1/1000 量添加した場合 4°C/28 日間で感染価は消滅したが、1/2000 量以下では 36 日後も不活化は不完全であった。不活化 WNV ワクチンの電子顕微鏡観察では、直径約 50nm の球形ウイルス粒子構造が良く保存されていた。マウス免疫実験：不活化 WN 試作ワクチン及び JE ワクチン

を腹腔内接種した ddY マウス 10 匹/群プール血清中の抗-WNV、抗-JEV 抗体価を検討した。WN ワクチン群の WNV 中和抗体価、HI 抗体価及び IFA 抗体価は接種抗原量に相関し、最高抗原量 62.5ng 接種群の中和抗体価は  $10^{2.81}$  倍を示し、JEV 中和抗体価は  $10^{1.59}$  倍を示した。一方、JE ワクチン 62.5ng 接種マウスの JEV 中和抗体価は  $10^{3.75}$  倍にも達したが、WNV 中和抗体価は  $10^{1.13}$  倍、HI 抗体価は 20 倍であった。しかし、IFA 抗体価は 640 倍と高い交叉反応性を示した。WN ワクチン・JE ワクチン混合接種群では、両抗体価とも単独ワクチン群と同等の高値を示した。ウイルス交叉中和試験：不活化 WN ワクチン接種 DDY マウスの JE 血清型群フラビウイルス交叉中和抗体価誘導調査では、WNV NY99-6922 株、Eg101 株、FCG 株、g2266 株；クンジンウイルス OR393 株；JEV 北京-1 株、中山-NIH 株；マレーバレー脳炎ウイルス 1/51 株、に対する中和抗体誘導を認めた。JE ワクチン群では、JEV 北京-1 株、広島/25 株；クンジンウイルス OR393 株の中和抗体が誘導されたが、他の WNV 株中和抗体は陰性であった。相対力価：WN ワクチン接種群中和抗体の WNV NY99-6922 株に対する WNV Eg101 株、g2266 株、FCG 株；JEV 北京-1 株の相対力価を、平行線定量法によりコンピューター解析した結果、WNV NY99-6922 株との相対力価は各々 51.7%、17.7%、17.0%；0.06% であった。

(1)-2) WN サブユニットワクチンの研究開発：WNV prM-E 抗原の発現解析：WNV NY99 株 C 蛋白 C' 末端シグナルペプチドから prM-E 構造蛋白領域をクローニングし発現ベクター pWN#12 を構築した。これを 293T 細胞にトランスフェクトし、培養上清を平衡蔗糖密度勾配遠心法で分画した結果、比重 1.11 と 1.16 の画分に E 蛋白抗原が分画された。各ピーク画分を濃縮し電子顕微鏡観察を行った結果、比重 1.11 画分には直径約 25 nm の球形粒子が、1.16 画分には直径約 20 nm に変形した球状粒子凝集像を認めた。これらのウイルス様粒子 (VLP) 抗原は E、prM、及びプロセッシングを受けた M 蛋白から成ることが免疫プロットで示された。EGFP と prM-E の融合蛋白は分泌器官のゴルジと考えられる部位に集積し、ネットワーク状に分布していた。発現 WN prM-E VLP の抗原性：WNV NY-99 株に対し 200,000 倍以上の強い中和活性を持つ MAAb WNY-11 で WN VLP 抗原の中和エピトープを検索した結果、比重 1.11/1.16 の両 VLP 抗原画分とも WNY-11 エピトープ陽性で、402 フラビ抗原画分と一致した。培養上清からの粗精製 VLP 抗原で免疫した BALB/c マウスの血清中に 100~200 倍の WNV NY-99 株中和抗体価の誘導を認めた。



(2) 次世代 JE サブユニットワクチンの基盤研究 : 1) FBS 混入 BVDV 感染リスクの調査 : JE VLP 高産生 J12#26 クローンがバイオ医薬品製造上の BVDV 汚染規定に合致するワクチン製造用細胞か調査した。J12#26、RK-13 細胞の培養上清・細胞抽出液で BVDV ゲノム RNA5'末端非翻訳領域約 160bp が増幅された。この RT-PCR 増幅産物は培養に用いた市販 FBS (2 社) 中にも大量に検出された。しかし、間接蛍光抗体法では J12#26 細胞に BVDV 抗原は検出されず、J12#26 細胞を FBT 細胞に接種しても BVDV 抗原は検出されなかった。2) JEV 遺伝子特異的 TaqMan RT-PCR 法の構築 : 我国には JEV が存在し、WNV との鑑別が必須あるため、JEV 遺伝子高感度検出 TaqMan RT-PCR 法の確立を試みた。米国 CDC の WN TaqMan RT-PCR 法の設定が E と 3' NCR 遺伝子の 2 箇所であることから、JEV も 2 領域に TaqMan RT-PCR プライマー、プローブセットを構築した。p: プローブ、s/r: センス/アンチセンスプライマーとして、E 領域に、JEen585p599s622c: ACT RAACACTGAAGCGT と、JEen562s-585pset: CTGGAYTGT GARCCAAGGA、及び JEen623c-585pset: GAHCCACGGT CATGA を、NS5 領域に、JENS5p294AF092550:CTGCCT GCGTCTCA (MGB プローブ) と、JENS5s269AF092550: GCCACCGGATACT G(G/A)GTAGA、及び JENS5r330AF 092550: TGTTAACCC AGTCCTCTGG(A/G)A を選定した。何れも 0.5 PFU/tube の高感度であった。E 領域では cycle 37 以降非特異性の上昇傾向を認めたが、両セットを用いれば特異性を担保できることが示された。3) 抗-WNV Mab 樹立と抗原 ELISA の確立 : 抗-JEV Mab を用いた JEV 抗原 ELISA は確立済のため、抗-WNV Mab 樹立とこれを用いた WNV 抗原 ELISA の確立を試みた。2 回の細胞融合で IgG1;5 株、IgG2a;2 株、IgG2b;3 株、IgM;1 株の計 11 クローンが樹立され、蛍光抗体法、ELISA 法で全てに抗-WNV 抗体の産生を認めた。WNY-11 は WNV 中和活性を有し、腹水は 200,000 倍以上の中和抗体価を示したが、JEV 中山株には 30 倍、北京株で 10 倍以下の低値であった。抗原 ELISA : 精製不活化 WNV と JEV を標準抗原に用い、WNV 抗原検出の新規 WNY-11 ELISA とフラビウイルス抗原交叉反応性 402-ELISA を比較した。両 ELISA とも WNV 抗原を高感度で検出したが、WNY-11 ELISA は約 20 倍高感度で、JEV と交叉せず WNV 特異的 ELISA 系として確立された。

(3) 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-6 プロモーター : CMV プロモーターと比較し、MIE プロモーターは Jurkat、Molt-3、SupT-1 細胞で其々 5、10、30 倍以上の高活性を示したが、SAS-413 細胞では 70%

程度であった。U95 プロモーターは Jurkat、Molt-3、SupT-1 細胞で 4、8、10 倍以上、SAS-413 細胞で 1/5 程度であった。PBMC と MDDC での活性は MIE プロモーターが CMV と同等で、U95 プロモーターは同等かやや低い活性であった。HHV-7 プロモーター : MIE プロモーターは Molt-3、SupT-1 細胞で CMV の約 6-7 倍高く、Jurkat 細胞では同等、SAS-413 細胞では 1/10 以下の活性であった。PBMC では同等かやや高く、MDDC での活性は約 1/2 程度であった。U95 プロモーターは、Jurkat と Molt-3 細胞で数倍、SupT-1 細胞で 20 倍の高活性を示したが、SAS-413 細胞では数分の 1 程度であった。PBMC と MDDC では約 1/2 程度の活性であった。R2 領域のエンハンサー活性 : HHV-7 R2 領域のエンハンサー活性はプロモーターと細胞の組合せに依存し、HHV-7 MIE プロモーターには Molt-3、SupT-1、SAS-413 細胞で 2-5 倍程度の活性上昇をもたらし、Jurkat 細胞では作用を示さなかった。HHV-7 U95 プロモーターに対しては SAS-413 細胞では作用せず、Molt-3、Jurkat、SupT-1 細胞で活性を 2-7 倍程度上昇させた。樹状細胞における NF- $\kappa$ B 結合配列の機能 : MDDC に IkB 発現プラスミドを共導入したが、何れの IE プロモーターも活性変化を示さなかった。樹状細胞における HHV-7 IE2 の trans-activation 能 : MDDC に HHV-7 IE2 発現プラスミドを共導入しても、何れの IE プロモーターにも活性変化は認められなかった。

#### D. 考察

WN 脳炎は一旦発症すると致死率が高く回復しても重度の後遺症を伴う場合が多い。ロシアの患者発生地域も東進し日本海沿岸に達した。WNV は野鳥と蚊の間で感染環が成立しており、感染野鳥が飛来した場合は、JEV による脳炎と異なり、都会での大流行が懸念されるが、我国には JE ワクチンによる基礎免疫保持者は多い。しかし、JE ワクチンの JE 血清型群 WNV に対する有効性の検討では、WNV 交叉中和抗体の誘導が観察されず、現行 JE ワクチンの高い WNV 予防効果は期待薄と思われる。従って、WN ワクチン研究は急務であり、本課題で緊急に研究を開始し、別途 WN ワクチン開発が実施可能な基盤を整備する必要がある。

そこで、前期成果の不活化新 JE ワクチン製造法に準じ、緊急に WNV NY99-35262 流行株からワクチン製造用マスターシード WNV (WNSV001)・ワーキングシードを作製し不活化 WN ワクチンを試作した。抗原形状が直径 50nm の球形ウイルス粒子構造を保存していたため精製・製造過程に問題は無く、少量 (62.5ng) の蛋白含量でも高い NY99 株中和抗



価を誘導した。詳細な交叉中和試験では世界流行中の多種 WNV 及び亜株に対する有効性が示された。ワクチン製造用種ウイルス WNV WNSV001 と NY99-flamingo 382-99 株の全塩基配列比較でも、構造蛋白以外の 2 箇所しかアミノ酸置換は無く、最重要な感染防御抗原 E 蛋白遺伝子は完全に一致した。両株とも 1999 年ニューヨーク州動物園のフラミンゴの分離ウイルスで、ワクチン製造株塩基配列の安定な保存は、有効性の分子遺伝学的根拠を示している。従って、本不活化ワクチンは WN 熱・脳炎予防に有効と考えられ、我国侵入前の速やかな開発へ進展が望まれる。

他方、不活化ワクチンの次に位置付けられる安価/安全な WN サブユニットワクチンでは、非感染性 WN VLP 抗原発現ベクターの抗原産生効率が価格を大きく左右する。WNV の粒子形成・分泌機構に関する解析で同定された高効率シグナルシーケンスを用いて発現ベクターの改変を行い、WNV E 蛋白の大量産生・分泌系を開発した。分泌抗原は比重 1.11 と 1.16 の 2 画分に分離されたが、電子顕微鏡の形態観察で比重 1.11 の VLP が凝集した VLP 塊が 1.16 の抗原と考えられた。また、WNV E 蛋白特異的中和 MAb WNY-11 ELISA では比重 1.11 と 1.16 の両 VLP 画分とも WNY-11 エピトープ陽性のため、形態は遊離か凝集塊か異なるが、共に中和抗体誘導基を有する WN VLP 抗原と考えられた。そこで、培養上清より VLP を調整しマウスに免疫した結果、感染防御に十分な中和抗体価が誘導された。有望な次世代 WN ワクチン抗原と思われる。

我国には JEV が土着しているため、JEV と WNV 感染の鑑別はワクチン開発上極めて重要である。既に確立済の WNV 遺伝子検出法に次ぎ、JEV 特異的遺伝子検出法が確立された。また、JEV 中和 MAb 503-ELISA は確立済のため WNV 抗原特異的 ELISA 樹立は必須であったが、強力な WNV 中和活性を持つ MAb WNY-11 とこれを用いた WNV 特異的 ELISA の樹立に成功した。今後のワクチン研究開発に有用であろう。しかし、次世代 JE サブユニットワクチン開発の問題点は FBS の使用である。BSE 問題を機に感染源 FBS のリスクが厳しく問われ、BVDV 陽性細胞由来医薬品は強く規制される。前期成果の J12#26 細胞株は RK-13 細胞由来で、ATCC 原株には BVDV が持続感染している。BVDV にヒト病原性は無くとも、国際基準対応には陰性 FBS 使用と簡便検出法確立が重要である。そこで、ゲノム RNA 及び感染性 BVDV 高感度検出法を確立し J12#26 株の BVDV 汚染を調査した。J12#26 株自体は陰性であったが、使用 FBS に BVDV RNA 断片が検出された。研究基盤は今期整備されたので、バイオ医薬品製

造国際基準に適合する次世代 JE VLP サブユニットワクチン研究開発が次期主要目的となろう。

新テクノロジー研究開発では、阪大から基盤研へと継続した独自の研究により、CMV プロモーターに対置できる新規 IE プロモーター(特願 2005-261366)を見出した。HHV-6 と HHV-7 が各々コードする MIE プロモーターと U95 プロモーターは、概ね血球系細胞で高い活性を示すものの、個別的に解析すると、プロモーター活性は細胞とプロモーターの組合せに依存することが判明した。従って、細胞毎に異なる転写因子レパートリーが発現しており、これらに対してプロモーター毎に内在転写因子結合部位が異なるため生じる現象と推測される。MDDC で NF- $\kappa$ B が機能せずとも HHV-6 及び HHV-7 IE プロモーターが強力な活性を示した結果は、T 細胞での NF- $\kappa$ B を介した HHV-6 U95 プロモーター活性化とは異なる活性強化機構の介在を示唆し、その好例といえよう。それ故今後は、ワクチン免疫成立過程に関与する各種細胞の高発現転写因子を同定し、必要に応じプロモーターを改変することで、CMV プロモーターの特許権に拘束されず、しかも、遥かに有効なプロモーターの合目的な開発に繋がるものとする。第 3 世代ワクチンへの活用が期待される。

## E. 結論

(1) 緊急に開始した WN ワクチン研究において、1) WN 不活化ワクチンを大スケールでも試作し、本ワクチンが中和抗体を誘導し、WNV に有効であることを示した。又、製造用種 WNV 株の全塩基配列解析からその有効性の分子遺伝学的根拠を示した。2) 安価/安全な WN VLP サブユニットワクチン研究では、遊離型・凝集型 WN VLP の大量産生・分泌ベクター構築に成功し、本 VLP が中和抗体誘導能を持つ有効なワクチン抗原であることを示した。

以上の結果、WN ワクチン開発が別途実施可能な基盤の整備は完了した。

(2)-1) 我国に土着する JEV と WNV の新たな鑑別法として、JEV 特異的遺伝子検出法も確立した。また、WNV 中和 MAb を樹立して WNV 特異的 ELISA を確立した。2) BSE 以来バイオ医薬品製造で問題の FBS 迷入 BVDV 高感度検出法を確立した。

以上、JE VLP サブユニットワクチン開発へ発展的に回帰する研究基盤が整備された。

(3) CMV プロモーターの特許権に拘束されない独自の新規プロモーター(特願 2005-261366)研究では、HHV-6 及び HHV-7 IE プロモーターが血球系細胞で高活性、MDDC でも CMV プロモーターに比肩する活性を発揮する事を示し、第 3 世代ワクチン

用プロモーターへの有用性を示唆した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

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.

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.

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.

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.

### 2. 学会発表

Lim C, Takasaki T, Kotaki A, Nerome R, Ito M, Tajima S, Morita K, Ishikawa T, Kurane I. Mouse antibody response to inactivated West Nile and inactivated Japanese encephalitis vaccines for immunization against West Nile virus and other flaviviruses. 2006 National Conference on West Nile Virus in the United States (San Francisco), 2006.

高橋秀宗、前田才恵、田中道子、佐多徹太郎、小島朝人：ウエストナイルウイルスサブユニットワクチンの開発。第54回日本ウイルス学会学術集会（名古屋），2006。

林 昌宏、高崎智彦、小滝 徹、根路銘令子、伊藤美佳子、田島 茂、森田公一、石川豊数、倉根一郎。ウエストナイル不活化ワクチンの日本脳炎血清型群ウイルスに対する交差反応の検討。第53回日本ウイルス学会総会（横浜），2005。

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許出願継続中

特願 2005-261366：リンパ球・血球系細胞へ遺伝子導入するためのプロモーターおよびその利用方法。

### 2. 実用新案登録

該当事項なし。

### 3. その他

該当事項なし。



---

平成18年度

政策創薬総合研究  
重点研究報告書(Ⅱ)

平成19年7月31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