

氏家誠、福士秀悦、森川茂、田口文広：
SARS-CoV スパイク (S) 蛋白質の
Cys-rich 領域は細胞間融合及びウイ
ルス細胞侵入活性に重要な働きを持
つ 第 54 回日本ウイルス学会総会、
名古屋 2006.11.19-21

座本綾、福士秀悦、田口文広、森川茂、
山田靖子：フェレット ACE2 と
SARS-CoV S 蛋白質の親和性の解析
第 54 回日本ウイルス学会総会、名古
屋 2006.11.19-21

不活化ウイルス粒子ワクチンの免疫効果の解析

分担研究者 横田恭子（国立感染症研究所）

協力研究者 大西和夫・光木裕也・大島正道・

高橋宜聖・阿戸学 他免疫部

研究要旨 マウスモデルにおいて UV とホルマリンで不活化した SARS-CoV ワクチンは、alum アジュバントと接種すると高値の中和抗体を誘導し、安全性の高いワクチンとして有望である。UV にホルマリン処理を加えると IL-4 産生が高まり Th2 型の免疫応答に偏る傾向はあるものの、マウスの SARS 病態モデルでの感染防御効果には全く影響が無かった。また、肺で特定のサイトカインが大量に産生されることが肺病変の形成に重要であることが示唆された。

A. 研究目的

マウス (BALB/c) をモデルとして UV 照射不活化 SARS-CoV 粒子 (UV-V) と更にフォルマリン処理して不活化した SARS-CoV 粒子 (UV/form) ワクチンの免疫効果、安全性について検討し、ヒトへの迅速な応用を図る。

B. 材料と方法

1. 不活化ウイルスの作成

plaque purify したマイコプラズマフリーの SARS-CoV (香港株) を MOI=1 で VeroE6 (ATCC) に感染させ、翌日培養上清を回収して UV で 20 分照射し、PEG 沈殿後蔗糖密度勾配で超遠心してウイルス粒子を精製した。この濃縮 UV 不活化ウイルス粒子 (UV-V) を 2 つに分け、一方に最終濃度 0.02% になるように formalin を (UV-FV) 添加し、室温で一晩放置した後、ウイルス粒子を PBS で 10 倍に希釈した後再度濃縮して免疫抗原とした。

2. 免疫と抗原作製

各群 5 匹のマウスに UV-V あるいは UV-FV を 10 µg/head で皮下にアラムアジュバント有り無しで投与した。対照としてアラムのみを皮

下に免疫した。7 週後同じ免疫を繰り返した。

その後 7 日目にマウスの脾臓、骨髄細胞および所属リンパ節を採取して TB 細胞機能を解析した。また、これらのマウスの血清を経時的に採取して血中抗体価を測定した。

ブースターに用いた S1-IgFc 融合蛋白は発現プラスミド (阪大・荒瀬教授より供与) を Cos7 にトランスフェクトして 2 日後の培養上清を濃縮し、プロテイン A カラムで精製した。

3. 血中抗体価の測定

SARS-CoV 感染および非感染 VeroE6 細胞を 1% NP40/PBS に溶解して 2000 倍に希釈し、エライザプレートにコーティングした。プレートをブロッキング後、マウスの抗血清を加えて反応させ、次いで HRP 標識抗マウス IgG 抗体あるいはサブクラス特異的 HRP 標識抗体で反応させ、OPD を基質として発色させた。IgG 抗体量は標準として設定したマウス抗血清の吸光値をもとにユニット数で表した。

4. 骨髄中の抗体産生細胞数の計測

SARS-CoV の組換え nucleocapsid 蛋白をコートした membrane plate 上で骨髄細胞 (106 cells per well) を 37°C で 5 時間培養し、洗浄後、ア

ルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG1 抗体を反応させた。Fast BB blue を基質として発色させ、スポット数を計測した。

5. サイトカインの測定

所属リンパ節の T 細胞を分画し(95%以上)、Th1 陰性の脾臓細胞の存在下に UV-V を 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で加えて培養した。4 日後の培養上清を採取し、上清中のサイトカイン(IL2, IL4, IL5, IFN- γ , TNF- α)量を Th1/Th2 CBA kit (BD)で測定した。肺洗浄液中のサイトカインは inflammation CBA kit で測定した。

6. ワクチンによる防御効果

UV-V あるいは UV-FV(10 $\mu\text{g}/\text{head}$)をアラムアジュバントとともに、あるいは対照としてアラムのみをマウスの皮下に免疫した。4 週間ブースター免疫し、9 日目に Pasteurella 菌(6x10⁶ cfu)を感染させ、翌日マウスに馴化した SARS-CoV(F-mus 株: 8x10⁵ pfu)を経鼻接種した。SARS-CoV 感染後の体重測定は毎日行い、3 日、5 日、7 日後にそれぞれ 3 匹ずつ解剖して血清、鼻洗浄液、肺洗浄液を回収した後、鼻と肺組織をホルマリン処理して保存した。

7. ウイルス価の測定

鼻及び肺洗浄液中を 10 段階希釈して 96 穴プレートにまいた Vero E6 細胞に感染させ、TCID₅₀ 値を測定した。

C. 研究結果

(1) UV のみ(UV-V)とホルマリン処理を追加した(UV-FV)不活化ワクチンの免疫効果

UV-V あるいは UV-FV ワクチンを一群 5 匹としてアラム有り無しの条件で皮下に 2 回接種すると、アラム無しの UV-FV ワクチンの効果は若干弱いものの、ブースター後には UV-V と UV-FV ワクチンはほぼ同等の効果であった。アラムを添加すると、両ワクチンの効果に有意差はなく、どちらの群でもほぼ同程度の中和抗体が誘導されていた。SARS-CoV に対する全 IgG 抗体と IgG1, IgG2b, IgG3, IgA 抗体量は両ワクチン

ともほぼ同じであったが、興味あることに、formalin 処理したワクチン接種群では IgG2a 抗体がかなり低値であった。

UV-V あるいは UV-FV ワクチンをアラムアジュバントとともに接種したマウスにおいて、骨髄中に存在して B 細胞の免疫記憶に関与すると考えられている抗体産生細胞数や特異的抗体価の持続に関しても、両群で有意な差は認められなかった。

皮下接種により所属リンパ節に誘導される T 細胞が in vitro で SARS-CoV に反応して産生するサイトカインを測定すると、IFN- γ 、IL-4、IL-5 の産生は抗原特異的に増加した。特に、UV-FV ワクチン接種マウスの T 細胞の IL-4 産生は常に高い傾向があり、formalin 処理により Th2 型の免疫応答が優位になることが示唆された。

(2) S1-IgFc のブースター免疫効果

粘膜面に IgA 抗体を誘導する目的で精製した S1-IgFc 蛋白をリポゾームとともに経鼻免疫したが、免疫効果は弱かった。そこで S1-IgFc の粘膜面へのブースター効果を評価するため、不活化ワクチンでの priming を行ったマウスの鼻に S1-IgFc(10 μg)をセンダイウイルスリポゾーム(HVJ-E)に封入、あるいは DOTAP と混合して 2 回ブースター免疫したが、血中抗体価の増強効果は認められず、IgA 抗体も検出できなかった。高まった。興味深いことに、鼻リンパ組織の S1 あるいは virion に反応する T 細胞は、HVJ-E に封入した抗原投与マウスでは IFN- γ を有意に産生するのに対し、DOTAP と混合した抗原投与マウスでは IL-4 を有意に産生した。従って、Th1/Th2 のバランスは抗原の投与形態によっても左右されることが明らかとなった。

(3) 不活化ウイルス粒子ワクチンの感染防御効果

UV-V と UV-FV ワクチンは同等の中和抗体誘導能があったことから、これらのワクチンが

SARS-CoV 感染のみならず SARS 病態モデルにおける肺病変形成に対しても防御効果があるのかどうかをテストするため、UV-V あるいは UV-FV とアラム、対照としてアラムのみを 2 回接種したマウスにパストツレラ菌を呼吸器感染させ、1 日後マウスに馴化した SARS-CoV を感染させた (day 0)。パストツレラ菌感染後から全てのマウスで体重減少が認められた。対照群のマウスはその後徐々に悪化して day 7 での致死率が 90% 以上であったのに対し、ワクチン接種群では day 2 をすぎると顕著に回復していき、day 7 ではほとんどのマウスが生存していた。SARS-CoV 感染後、マウスの肺洗浄液中のウイルス量はパストツレラ菌感染に関係なく通常 3 日をピークに減少していく。ワクチン接種群のマウスではウイルスがほとんど増えずに経過しており、SARS-CoV 感染の前にワクチンで誘導されていた中和抗体が十分な防御効果を発揮したことが明らかとなった。

これらマウスの感染早期 (day 3) の肺洗浄液中に産生される炎症性サイトカインを測定すると、IFN- γ 、IL-10、IL-12p70、TNF- α はほとんど検出されなかったが、ワクチン接種なしで防御されなかったマウスでは IL-6 と MCP-1 が大量に産生されていた。

D. 考察

UV 照射に formalin による不活化を加え、UV 照射のみより安全性の高いワクチンとして使用する場合、その免疫効果が劣るかどうかを検討した。中和活性のある血中 IgG 抗体誘導能は UV-V と UV-FV とで大差はなく、ワクチンとして十分利用可能であると思われた。興味深いことに、formalin 処理群では IL-4 産生が高くなり、それに関連して IgG2a 産生が低下して、いわゆる Th2 型に偏っていた。最近、他のウイルスワクチンモデルでも formalin 処理を加えることにより Th2 型の免疫応答に偏りやすいことが指摘されている (Nat. Med., 12:905, 2006)。しか

しながら、SARS-CoV 感染の防御には中和抗体が重要で、細胞性免疫はほとんど関与しないと考えられており、この Th2 型への多少の偏りはワクチン効果発揮においては問題ないと思われる。実際、田口室長 (感染研・ウイルス III 部) らの開発した SARS 病態モデルでの感染防御効果に両ワクチンの差は全く認められなかった。

マウスには通常 SARS による病変は誘導されず、感染は一過性に経過するのみである。今回用いたパストツレラ菌混合感染による SARS 病態形成モデルでは、ワクチン投与していないマウスはほとんど死亡した。従ってこれまでに指摘されているように、肺病変の形成には、単に SARS-CoV が増殖するだけでなく何らかの宿主由来の像悪因子が関与していると思われる。今回、肺洗浄液中の IL-6 と MCP-1 が非ワクチン接種群でのみ明らかに上昇していたことから、これらサイトカインの病態形成への重要性が示唆された。

E. 結論

マウスモデルにおいて UV に加えて formalin で不活化した SARS-CoV ワクチンは、alum をアジュバントとして接種することにより、高値の中和抗体や T 細胞サイトカイン応答の誘導が可能であった。したがって UV+formalin 処理不活化ワクチンは、より安全性の高いワクチンとして有望であると思われる。また、UV のみのウイルス不活化と比較して、formalin 処理を加えることによって IL-4 の産生が高まり、Th2 型に偏る傾向があったが、マウスの SARS 病態モデルを用い、このことは不活化ワクチン感染防御効果には全く影響を与えないことを明らかにした。このモデルでは特定のサイトカインが肺に大量に産生され、このことが肺病変形成に関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Tsunetsugu-Yokota, Y., Ato, M., Takahashi, Y., Hashimoto, S-I., Kaji, T., Kuraoka, M., Yamamoto, K-I., Mitsuki, Y-Y., Yamamoto, T., Ohshima, M., Ohnishi, K., Takemori, T. Formalin-treated UV-inactivated SARS coronavirus vaccine retains its immunogenicity and promotes Th2-type immune responses. *Jap. J. Infect. Dis.*, in press, 2007.
- (2) Tsunetsugu-Yokota, Y., Ishige, M., Murakami, M.: Attenuated *Salmonella Typhimurimu* expressing codon-optimized HIV-1 Gag potentiated Gag-specific CD8+ T cell-response in intestinal mucosa. *Aids Res. Hum. Retro.* (in press, vol 23, February 2007).
- (3) Yamamoto, T., Miyoshi, H., Yamamoto, N., Yamamoto, N., Inoue, J-I, Tsunetsugu-Yokota, Y. Lentivirus vectors expressing short hairpin RNAs against the U3-overlapping region of HIV nef inhibit HIV replication and infectivity in primary macrophages. *Blood.* 2006;108:3305-3312.
- (4) Yamamoto, T., Isogai, M., Ohtake, K., Tsunetsugu-Yokota, Y. High and inducible expression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Nef by adenovirus vector does not disturb potent antigen-presentation by monocyte-derived dendritic cells. *Micro. Infect.* 2006;8:2522-2530.
- (5) Ishii, K., Hasegawa, H., Nagata, N., Mizutani, T., Morikawa, S., Tashiro, M., Suzuki, T., Taguchi, F., Takemori, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Miyamura, T. Induction of Protective Immunity against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) infection using highly attenuated recombinant vaccinia Virus DIs. *Virology.* 2006;351:368-380.
- (6) 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;16:117-131.
- (7) 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). *Nat. Med.* 2006;12:466-471.
- (8) 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.* 2005;58:88-94.

(9) Iijima, S., Nitahara-Kasahara, Y., Kimata, K., Zhuang, W. Z., Kamata, M., Isogai, M., Miwa, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., Aida, Y. Nuclear localization of Vpr is crucial for the efficient replication of HIV-1 in primary CD4⁺ T cells. *Virology.* 2004;327:249-261.

(10) Takasuka, N., Fujii, H., Takahashi, Y., Kasai, M., Morikawa, S., Itamura, S., Ishii, K., Sakaguchi, M., Ohnishi, K., Ohshima, M., Hashimoto, S-I., Odagiri, T., Tashiro, M., Yoshikura, H., Takemori, T., and Tsunetsugu-Yokota, Y. A Subcutaneously Injected UV-inactivated SARS Coronavirus Vaccine elicits Systemic Humoral Immunity in Mice. *Int. Immunol.* 2004;16:1423-1430.

2. 学会発表

- 1) 光木裕也、大島正道、山本拓也、高木弘隆、森川茂、山岡昇司、永井美之、大西和夫、横田(恒次) 恭子: SARS-CoV Spike に対する中和抗体のエスケープ変異ウイルスの単離と感染防御に重要な抗体エピトープの同定。第 54 回ウイルス学会、名古屋、平成 18 年 11 月。
- 2) 水越文徳、山本拓也、光木裕也、立川(川名) 愛、横田(恒次) 恭子: 抗原の糖鎖による樹状細胞の cross-presentation の影響。第 35 回免疫学会、大阪、平成 18 年 12 月。第 35 回免疫学会、大阪、平成 18 年 12 月。
- 3) 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.
- 4) 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。
- 5) 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。
- 6) 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。
- 7) 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。

8) 横田(恒次) 恭子、立川(川名) 愛、山本拓也、磯貝まや、岩本愛吉、森川裕子。樹状細胞を介したウイルス抗原特異的T細胞の活性化に関する *in vitro* 評価解析。第52回日本ウイルス学会、横浜、平成16年11月。

9) 磯貝まや、横田(恒次) 恭子。HIV-1 Nef が樹状細胞の抗原提示機能に及ぼす影響について。第52回日本ウイルス学会、横浜、平成16年11月。

10) 石井幸司、横田恭子、長谷川秀樹、水谷哲也、森川茂、田口文広、田代真人、吉崎佐矢香、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 SARS 生ワクチンとしての応用。第52回ウイルス学会、横浜、平成16年11月。

11) 笠原(仁田原) 優子、飯島沙幸、横田恭子、間陽子。Importin aにより促進される Vpr 核移行機序の HIV-1 標的細胞を用いた解析。第52回ウイルス学会、横浜、平成16年11月。

12) 木全清典、倉光球、我妻昭彦、横田恭子、間陽子。vpr によって変化する HIV-1 mRNA 量比の定量解析。第52回ウイルス学会、横浜、平成16年11月。

13) 高村史記、新倉昌浩、横田恭子、李天成、武田直和、宮村達男、保富康宏。DNA ワクチン封入キメラ VLP 経口投与による粘膜誘導ワクチンの試み。第52回ウイルス学会、横浜、平成16年11月。

14) 山本拓也、磯貝まや、横田(恒次) 恭子。HIV-1 nef を標的として siRNA 発現システムによる HIV-1 複製抑制効果に関する解析。第34回日本免疫学会、札幌、平成16年12月。

15) 横田(恒次) 恭子、石毛真行、村上正裕、竹森利忠。弱毒サルモネラ菌ワクチンの経口投与による抗 HIV 粘膜免疫効果の解析。第34回日本免疫学会、札幌、平成16年12月。

16) 高須賀直美、藤猪英樹、高橋宜聖、大島正道、坂口雅弘、大西和夫、橋本修一、竹森利忠、横田(恒次) 恭子。UV 不活化 SARS ウイルス全粒子ワクチンの経皮免疫は、強く持続的な液性免疫を誘導する。第34回日本免疫学会、札幌、平成16年12月。

17) 大西和夫、坂口雅弘、加地友弘、横田恭子、大島正道、葛西正孝、谷山忠義、赤川清子、高須賀直美、橋本修一、山本紀一、阿戸学、藤猪英樹、高橋宜聖、竹森利忠。SARS コロナウイルスに対するモノクローナル抗体の確立とウイルス抗原検出法への応用。第34回日本免疫学会、札幌、平成16年12月。

18) 笠原(仁田原) 優子、飯島沙幸、横田恭子、間陽子。Importin aを介した Vpr 新規核移行機序の HIV-1 標的細胞を用いた解析。

H. 知的所有権の取得状況

なし

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が示された。また、田口らによって確立された *Pasteurella* と SARS-CoV の共感染により惹起されるマウス重症肺炎（SARS）モデルを使用し、S 蛋白を発現する組換え DI_s をマウスにあらかじめ接種した場合のワクチン効果を検討したところ、顕著な肺炎発症抑制効果が認められた。従ってこの組換え 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、小動物に接種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。3 年間の各年度での研究目的は以下の通りであった。

1 年目：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、目的蛋白が感染細胞で発現することを確認する。

2 年目：これらの組換えウイルスをマウスに経鼻あるいは皮下接種し、液性、細胞性および粘膜免疫誘導能を調べる。また、免疫誘導後に SARS-CoV を感染させ、感染を防御できるかどうかを調べる。

3 年目：主任研究者の田口らによって確立された *Pasteurella* と SARS-CoV の共感染により惹起されるマウス重症肺炎（SARS）モデルを用いて、上記組換えウイルスの接種により肺炎発症を阻止できるかどうかを検討する。

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 CEF に感染させ、目的蛋白の発現をウェスタンブロット法および免疫蛍光抗体染色法で確認した。これらの組換えウイルス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、病態モデルに対するワクチン効果を検討するため、マウスに S を発現する組換え DI_s を皮下接種して免疫誘導し、*Pasteurella* と SARS-CoV（マウスに馴化したフランクフルト-1 株）を経鼻接種により共感染させて 1 週間経過を観察した。また、血液中の抗体価、中和抗体価、肺及び鼻腔洗浄液中の SARS-CoV 量の測定、各種サイトカイン濃度の測定を行った。

C. 研究結果

合計6種 (Fig.1) の組換え DIs 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各種組換え DIs 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。(Table 1) 一方、組換え DIs 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 DIs 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。(Fig.2) 一方、N を発現する組換え DIs 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 DIs 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。

主任研究者の田口らによって確立された *Pasteurella* と SARS-CoV の共感染により惹起されるマウス重症肺炎 (SARS) モデルを用いて、組換え DIs の接種によるワクチン効果を検討した。組換えウイルスを皮下接種された群では抗 SARS-CoV 液性免疫誘導が確認され、SARS-CoV に対する強い中和活性も認められたため、*pasteurella* と SARS-CoV を共感染させた。組換え DIs 接種群は全例が生存したのに対し、コントロール接種群では5日で約80%が死亡した。また、体重減少でも組換え DIs 接種群には明らかなワクチン効果が認められた。(Fig.3) また、組換え DIs 接種群では鼻腔及び肺洗浄液から SARS-CoV は全く検出されなかった。(Fig.4) 肺洗浄液中の各種サイトカイン量を測定したところ、コントロール接種群では IL-6、

MCP-1 量に顕著な増加が見られ、TNF- α 量も増加していた。(Fig.5)

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。特にSを発現する組換え DIs には SARS 発症を抑制する効果があることが示され、この組換えウイルスはワクチンとして有効であることが証明された。SARS の発症原因として、ウイルス感染による細胞傷害よりも、感染に伴って分泌される炎症性サイトカインによる傷害が主たる原因であるという説があるが、今回の実験でもワクチン接種群とコントロール群で IL-6、MCP-1 量に大きな差がある点は、SARS 発症におけるこれらのサイトカインの重要性を示唆しているのではないかと思われる。今後、ホルマリン固定した肺標本の病理検索を行う予定である。また、組換えウイルス作成に使用したのは香港株 (HKU39849) で、チャレンジに使用したのはマウスに馴化したフランクフルト-1 株であり、従って本ワクチンは SARS-CoV の株に依存せず広い範囲で使える可能性も高いと考えられる。

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た。SARS-CoV の S 蛋白を発現する組換え DIs は、マウスに接種した場合 SARS 発症を完全に抑制する効果があることが示され、この組換えウイルスはワクチンとして極めて有効で

あることが証明された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishii K., Iijima S., Kimura N., Lee Y.-J., Ageyama N., Yagi S., Yamaguchi K., Maki N., Yoshizaki S., Machida S., Suzuki T., Iwata N., Sata T., Miyamura T. and Akari H. GBV-B as a pleiotropic virus: Distribution of GBV-B in extrahepatic tissues *in vivo*. *Microbes and Infection*, in press.
 2. Mizutani T., Fukushi S., Kenri T., Sasaki Y., Ishii K., Endoh D., Zamoto A., Saijo M., Kanaji H., Shiota K., Kurane I. And Morikawa S. Mechanisms of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells. *Archives of Virology*, in press.
 3. Mizutani T., Endoh D., Shirato K., Shimizu H., Fukushi S., Saijo M., Sakai K., Kwang L., Ito M., Nerome R., Takasaki T., Ishii K., Suzuki T., Kurane I., Morikawa S. and Nishimura H. System for rapid determination of viral RNA sequence by ligation-mediated amplification and direct sequencing technology for emerging viral infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases*, in press.
 4. Nakai K., Kimura-Someya T., Okamoto T., Ishii K., Lim C.K., Tani H., Matsuo E., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Miyamura T., Nunberg J.H., Moriishi K. and Matsuura Y. Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for interaction with cytoplasmic domain of E1 envelope protein. *Journal of Virology* 80: 11265-11273 (2006)
 5. 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.* 581: 253-258 (2006)
 6. 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.* 581: 593-596 (2006)
 7. Ishii K. Vaccines for severe acute respiratory syndrome. SARS, Mizutani T. ed.: 107-117, Transworld Research Network, Kerala, India (2006).
 8. Mizutani T., Fukushi S., Ishii K., Sasaki Y., Kenri T., Saijo M., Kanaji Y., Shiota K., Kurane I. And Morikawa S. Mechanisms of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 347: 261-265 (2006).
 9. 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* 351: 381-392 (2006).
 10. 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* 351: 368-380 (2006).
 11. 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. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 58: 88-94 (2005)
 12. Takasuka N., Fujii H., Takahashi Y., Kasai M., Morikawa S., Itamura S., Ishii K., Sakaguchi M., Ohnishi K., Ohshima M., Hashimoto SI., Odagiri T., Tashiro M., Yoshikura H., Takemori T., and Tsunetsugu-Yokota Y. A subcutaneously injected UV-inactivated SARS coronavirus vaccine elicits systemic humoral immunity in mice. *International Immunology*. 16:1423-30 (2004).
 13. 李天成、石井孝司、武田直和 E 型肝炎ウイルス：感染様式と食中毒 遺伝 印刷中
 14. 石井孝司、水谷哲也 SARS コロナウイルス研究の最前線 医学のあゆみ 218：839-844 (2006)
 15. 石井孝司、李天成 肝炎ウイルス VLP の作成と応用 感染・炎症・免疫 36：44-47 (2006)
 16. 石井孝司、宮村達男 SARS-コロナウイルス 現代医療 36：39-45 (2004)
2. 学会発表
1. Ishii K., Zhang B., Li J., Shirakura M., Morikawa K., Suzuki R., Miyamura T., Wakita T. and Suzuki T. Assembly and release of HCV-like particles in which the viral subgenomic replicon RNAs are encapsidated. 13th International Meeting on HCV and Related Viruses, Cairns, Australia, August 27-31, 2006.
 2. 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.
3. Murakami K., Ishihara Y., Ishii K., Yoshizaki S., Aizaki H., Tanaka K., Kohara M., Shoji I., Sata T., Bartenshalager 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.
 4. 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.
 5. Okamoto T., Someya-Kimura T., Moriishi K., Watanabe R., Ishii K., Nunberg J.H., Suzuki T., Miyamura T., and Matsuura Y. Polytopic topology of HCV E1 glycoprotein on the endoplasmic reticulum. 11th International Meeting on HCV and Related Viruses, Heiderberg Germany, October 3-7, 2004.
 6. Murakami K., Ishii K., Yoshizaki S., Aizaki H., Tanaka K., Shoji I., Sata T., Suzuki T., Bartenschlager R., and Miyamura T. Assembly of HCV-like particles in three-dimensional cultures. 11th International Meeting on HCV and Related Viruses, Heiderberg Germany, October 3-7, 2004.
 7. 吉崎佐矢香、松田麻未、村上恭子、相崎英樹、石井孝司、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗：温度感応性高分子 TGP を用いて三次元培養したヒト肝癌細胞の機能的解析とプロテオーム解析、日本分子生物学会、平成18年12月、名古屋。
 8. 水谷哲也、福士秀悦、石井孝司、西條政幸、緒方もも子、酒井宏治、遠藤大二、座本 綾：SARS-coronavirus と Mycoplasma fermentans の共感染が細胞に及ぼす影響、第54回日本ウイルス学会、平成18年11月、名古屋。
 9. 明里宏文、石井孝司、飯島沙幸、榎 昇、森健一、吉崎佐矢香、木村展之、片貝祐子、揚山直英、岩崎優紀、鈴木哲朗、宮村達男：C型肝炎のサロゲート霊長類モデル：GBV-B 長期持続感染マーマセットの解析、第54回日本ウイルス学会、平成18年11月、名古屋。
 10. 石井孝司、張 斌、李 津、白倉雅之、森川賢一、鈴木亮介、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗：HCV の subgenomic replicon を持つウイルス様粒子の形成と放出、第54回日本ウイルス学会、平成18年11月、名古屋。
 11. 水谷哲也、遠藤大二、白戸憲也、岡本道子、渡辺理恵、福士秀悦、西條政幸、倉根一郎、石井孝司、鈴木哲朗、清水博之、高崎智彦、森川茂、西村秀一：新興・再興感染症に備えた迅速な網羅的ウイルスゲノム検出方法 (LAV法)、第142回日本獣医学会、平成18年9月、山口。
 12. 横田隆徳、石井孝司、榎 昇、矢野純一、榎本信幸、明里宏文：siRNA の静脈注射によるC型肝炎の遺伝子治療：サルを用いたC型肝炎サロゲートモデルによる有効性の検討、第42回日本肝臓学会総会、平成18年5月、京都。
 13. 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。
 14. 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。
 15. 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。
 16. 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
 17. 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。
 18. 飯島沙幸、石井孝司、李 永仲、岩田奈織子、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、鈴木哲朗、佐多徹太郎、宮村達男、明里宏文：C型肝炎のサル病態モデル開発、第52回日本ウイルス学会、平成16年11月、横浜。
 19. 村上恭子、石井孝司、吉崎佐矢香、相崎英樹、田中恵子、勝二郁夫、佐多徹太郎、鈴木哲朗、宮村達男：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、第52回日本ウイルス学会、平成16年11月、横浜。
 20. 町田早苗、松井政則、石井孝司、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男、赤塚俊隆：HCV envelope E1 (signal peptide)-E2 をコードする DNA を用

- いた HCV E2 特異的 CTL の誘導 第 5 2 回
日本ウイルス学会、平成 1 6 年 1 1 月、横浜。
21. 石井孝司、横田恭子、竹森利忠、長谷川秀樹、水谷哲也、森川 茂、田口文広、田代真人、吉崎佐矢香、鈴木哲朗、宮村達男：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 第 5 2 回日本ウイルス学会、平成 1 6 年 1 1 月、横浜。
 22. 松山州徳、石井孝司、森川 茂、田代真人、田口文広：SARS-CoV S 蛋白のプロテアーゼによる開裂と膜融合活性 第 5 2 回日本ウイルス学会、平成 1 6 年 1 1 月、横浜。
 23. 石井孝司、町田早苗、鈴木亮介、吉崎佐矢香、森川 茂、水谷哲也、田口文広、田代真人、横田恭子、高須賀直美、大西和夫、鈴木哲朗、宮村達男：高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DI_s の組換え生ワクチンとしての応用 第 8 回日本ワクチン学会、平成 1 6 年 1 0 月、札幌。

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 DI_s 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 DI_s 株、およびその利用・2004 年 8 月 2 日出願

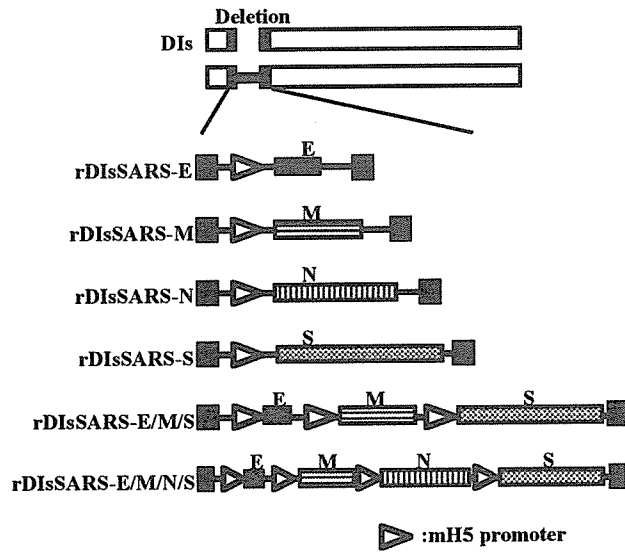


Fig. 1 構築した組換えDIssの構造。E、M、N、SはSARS-CoVの4種の構造蛋白を示す。

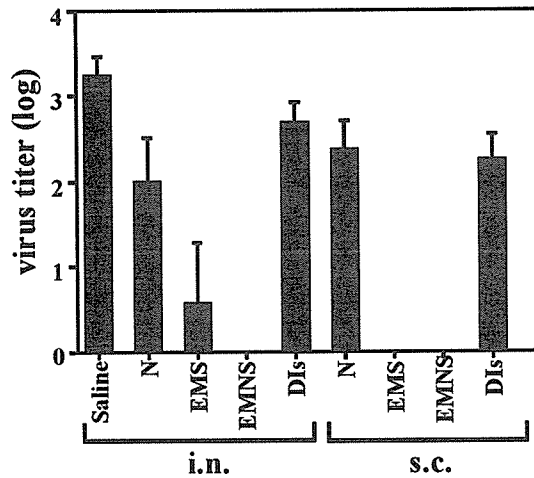


Fig. 2 SARS-CoVチャレンジ実験。Balb/cマウスに組換えDIssを皮下または経鼻接種し、最終免疫の1週間後にSARS-CoVを経鼻感染させた。3日後に肺洗浄液中のSARS-CoV titerを測定した。組換えDIss接種群では、明らかなウイルス増殖抑制効果が見られた。

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

	i.n.		S.C.	
	^a SARS-specific IgG titer (ELISA units/ml)	^b Neutralization antibody titer	^a SARS-specific IgG titer (ELISA units/ml)	^b Neutralization antibody titer
rDI _s SARS-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 _s SARS-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 _s SARS-S	5984	x300	4768	x300
	7852	x1500	13390	x1500
	1679	x60	807	x300
	33113	x1500	3467	x1500
rDI _s SARS-E/M/S	6465	x60	13385	x60
	5779	x60	9225	x60
	2489	x60	25099	x60
	3165	n.d.	36708	x1500
rDI _s SARS-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.

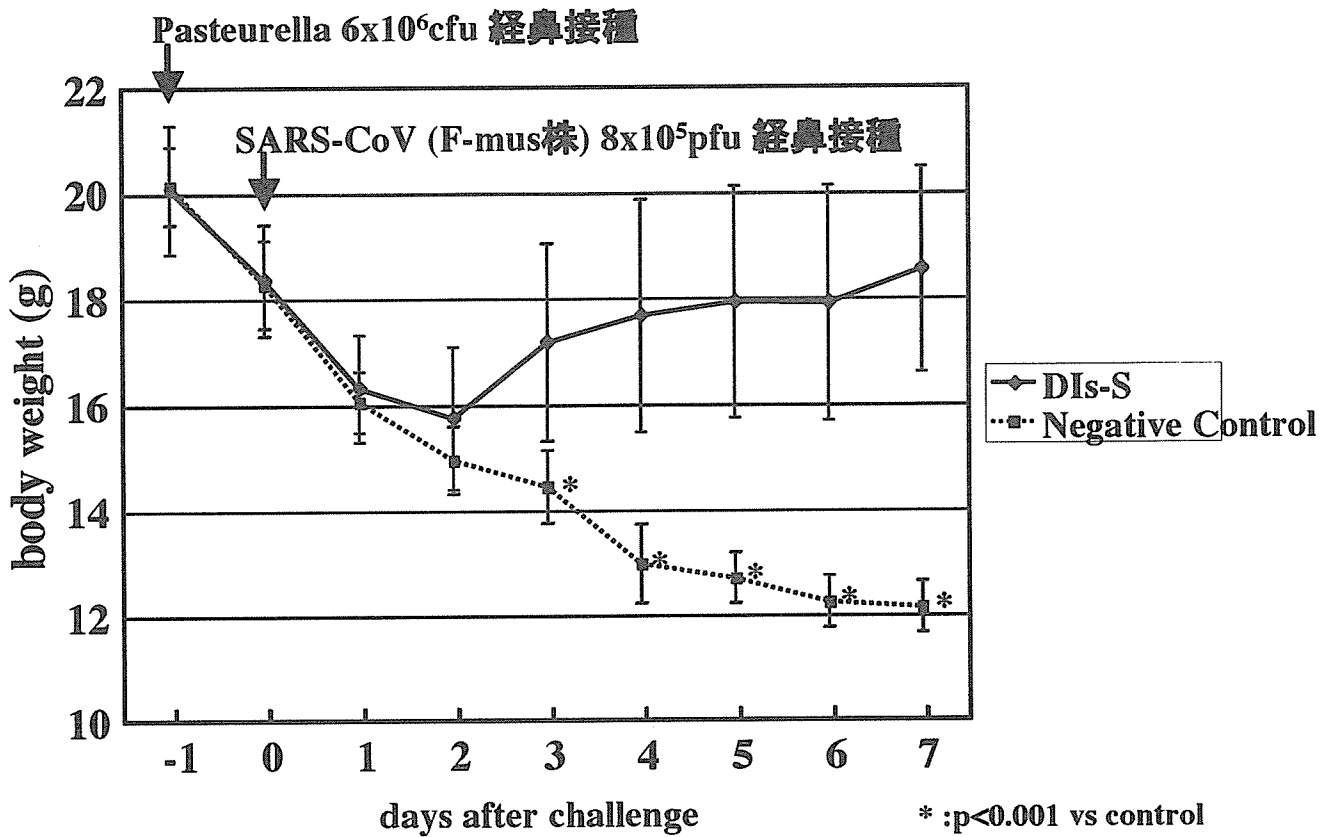
n.d. not detected

^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.

Table 1. 各種組換えDI_sを皮下または経鼻接種されたマウス血清中の抗SARS-CoV抗体価および中和抗体価。いずれも高い抗体価が誘導されているが、中和抗体価が検出されるのはSを発現する組換えウイルスを接種された群のみである。

A 体重変化



B 生存率

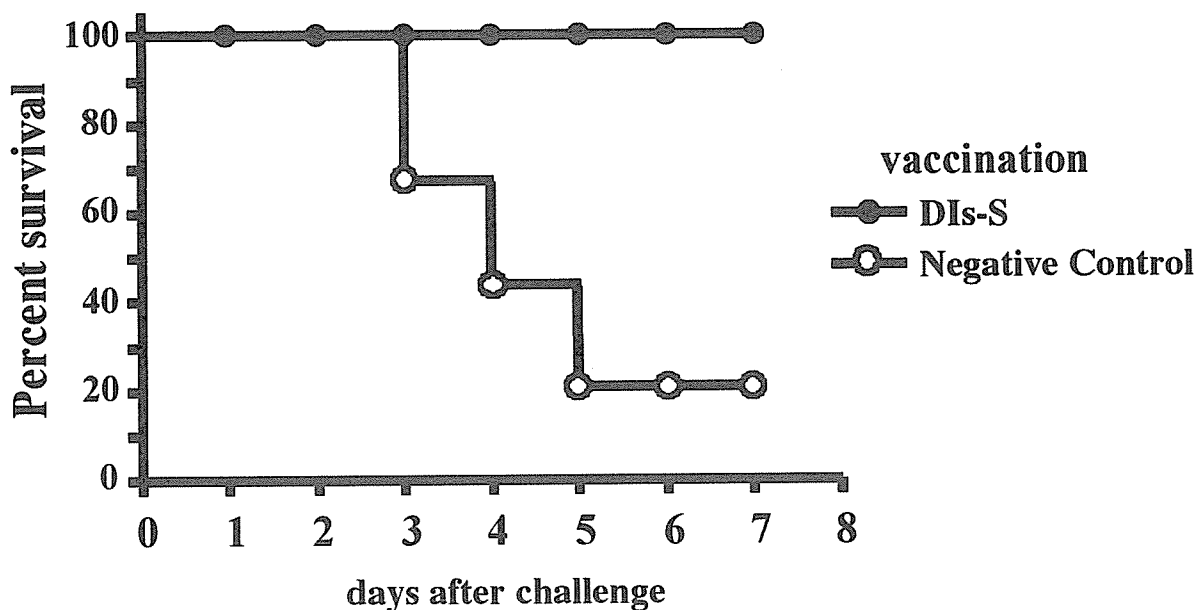


Fig. 3 田口らにより確立されたSARS病態モデルを用いたSARS予防効果の検討。Balb/cマウスに組換えDIIsを皮下経鼻接種し、最終免疫の1週間後にPasteurella、さらにその1日後にSARS-CoVを経鼻感染させ、体重変化と生存率を計測した。DIIs-Sには明らかなSARS発症予防効果が認められた。

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

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, 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 健常人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。

(4) ヒト免疫グロブリン染色体導入マウス（KMマウス）を用いてSARS S抗原タンパクに対するヒト・モノクローナル抗体を作製した。S ペプチドを免疫し、ヒト・モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ21種を作製した。現在それらの抗体のSARSウイルス感染に対する中和活性を検討中である。さらに、SARS (S)、(M) DNAワクチンをこのKMマウスに免疫し、中和活性を示すヒト・モノクローナル抗体を作製中である。

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。さらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子染色体導入マウス(KM マウス)を用いたヒト型モノクローナル抗体の開発。

KM マウスに DNA ワクチン、P3U1 ミエローマと細胞融合を行いヒト型モノクローナル抗体(ウイルス中和活性を有する)を作製する。(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
- V. Humanized monoclonal antibody against SARS CoV

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 田代真人部長、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。さらに、SCID-PBL/hu の系を用いて、SARS(M)DNA ワクチン又は SARS(N)DNA ワクチンを 1 週毎に 3 回筋肉注射 (100 μ g DNA) した。最終免疫より 1 週後に spleen cell を投与し、effector 細胞とした。SARS(M)DNA 又は SARS(N)DNA を自己のヒト PBL プラスト (PWM でプラスト化) に導入した細胞を標的細胞とし、⁵¹Cr release 法でアッセイした。

この系は SARS(N)DNA ワクチンで免疫した SCID-PBL/hu より SARS N 蛋白に対して特異的特異的なヒト・キラーT 細胞が誘導された。SARS M 蛋白に対するキラー活性は認められなかった。これらのヒト・キラーT 細胞はヒト CD3⁺・CD8 陽性 T 細胞であった。

(倫理面への配慮)

1. SAR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）。

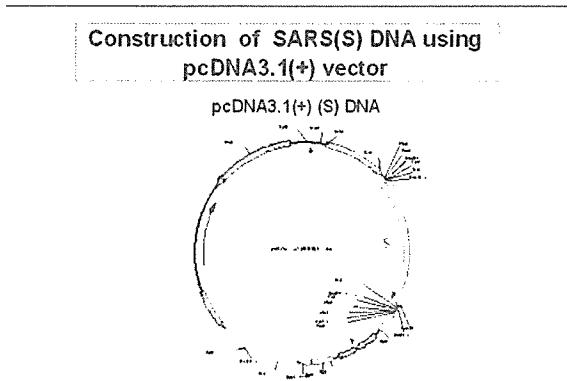


図1 pcDNA3.1(+)ベクターを用いたSARS(S)DNAの構築

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-S DNA Vaccine 50 µg	MPL TDM ALUM	+
pcDNA 3.1(+) SARS HKU-S DNA Vaccine 50 µg	-	-
SARS TWI-S DNA Vaccine	MPL TDM ALUM	+
SARS TWI-S DNA	-	-

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）

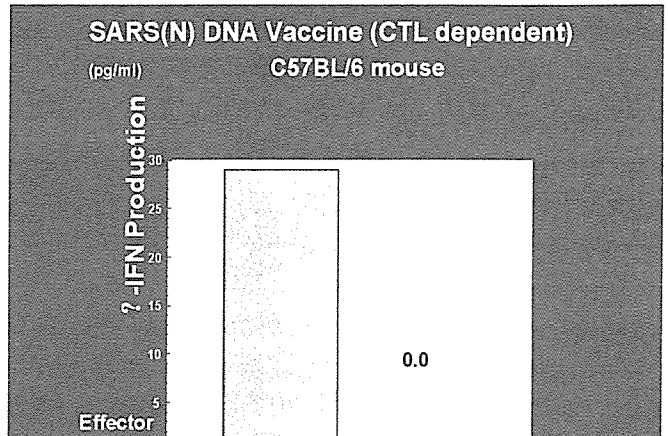


図2 (A)

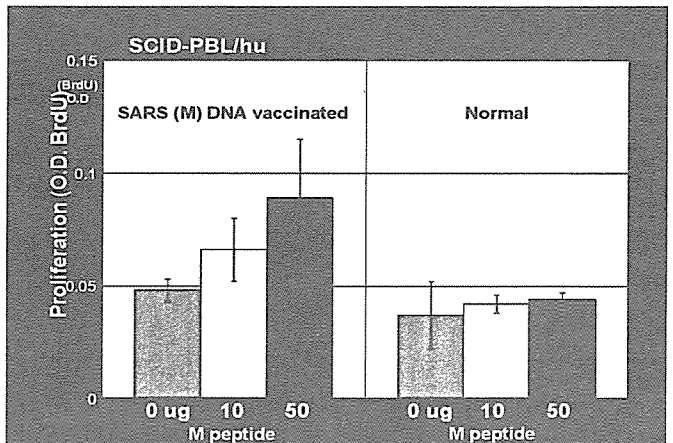


図2(B) キラーT依存性SARS(M) DNAワクチンの作製

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) 健常人 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)

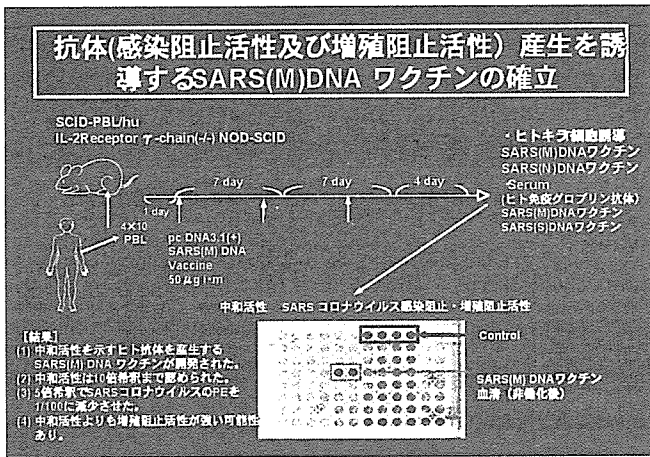


図 3

(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 を標的細胞として使い、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。

(4) SCID-PBL/hu の系を用いて、SARS(M)DNA ワクチン又は SARS(N)DNA ワクチンを 1 週毎に 3 回筋肉注射 (100 μ g DNA) した。最終免疫より 1 週後に spleen cell を投与し、effector 細胞とした。SARS(M)DNA 又は SARS(N)DNA を自己のヒト PBL プラスト (PWM でプラスト化) に導入した細胞を標的細胞とし、⁵¹Cr release 法でアッセイした。

その結果、SARS(N)DNA ワクチンで免疫した SCID-PBL/hu より SARS N 蛋白に対して特異的なヒト・キラーT細胞が誘導された。SARS M 蛋白に対するキラー活性は認められなかった。一方、SARS (M) DNA ワクチンで免疫し

た SCID-PBL/hu から SARS M 蛋白に特異的なヒト・キラーT細胞が誘導された。これらのヒト・キラーT細胞はヒト CD3⁺・CD8 陽性 T 細胞であった。(図 4)

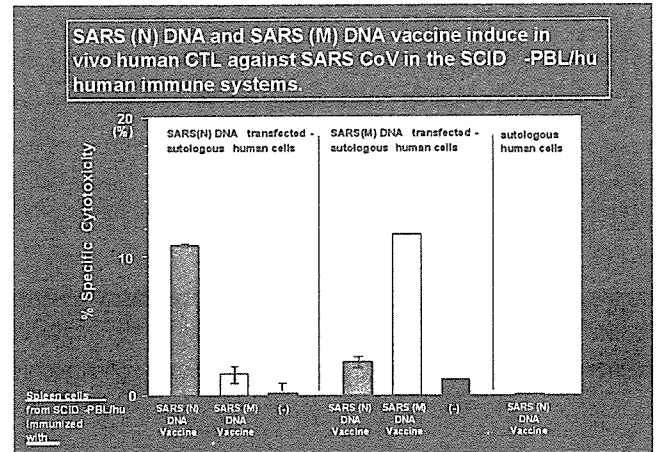


図 4

- (5) また、ヒト免疫グロブリン染色体導入マウス (KM マウス) を使い、これに SARS 蛋白抗原又は SARS DNA ワクチンを免疫した。3~5 回免疫後 spleen と P3U を細胞融合し、SARS ウイルスに対するヒト型モノクローナル抗体を作製した。(表 4) SARS ウイルス S 抗原に対するモノクローナル抗体産生の 21 個のハイブドーマを確認した。現在これを解析中。

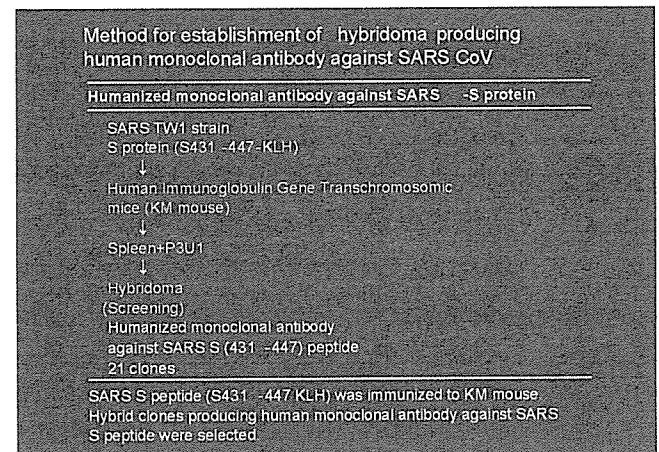


表 4

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 を使い、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。

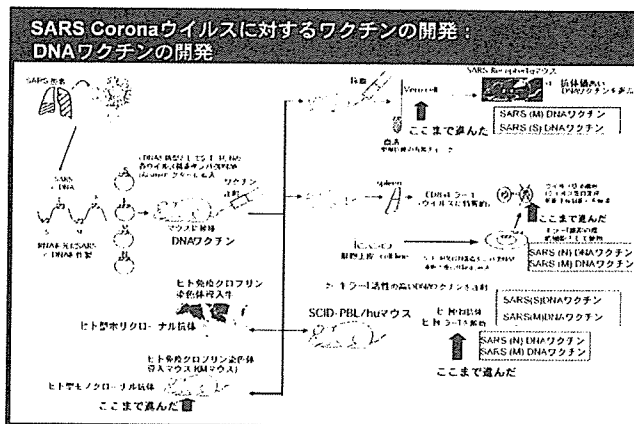
SCID-PBL/hu model

- (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 nentralizing 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 5)

図 5



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pcDNA A3.1(+)-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, Okuno Y, Hashimoto S, Kita Y, Kanamaru N, Nishida Y, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Fukamizu R, Namie Y, Yamada J, Takao K, Asai R, Asaki R, Kase T, Takemoto Y, Yoshida S, JSM Peiris, Pei-Jer Chen, Yamamoto N, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using SCID-PBL/hu mouse models. Vaccine (in press)
- (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, DeMello D, Chen P.J, Yamamoto Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M. : Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using mouse and SCID-PBL/hu mouse models. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2006; 581-566
- (3) 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.
- (4) 岡田全司, 橋元里実 : SARS ワクチン. *医学のあゆみ* vol.214 No.12, 1025-1026 2005
2. 学会発表
- (1) Okada M. (Symposist): Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using SCID-PBL/hu mouse models. Fifth World Congress on Vaccines, Immunization and Immunotherapy (WCVII), November 6-9, 2006. Montreal, Canada.
- (2) Okada M(Symposist) : Novel Vaccines Against Tuberculosis and SARS Corona Virus.; Non-antibiotic Strategy for Pulmonary Infection. 46th JRS-International Symposium (Japanese Respiratory Society). June 1-3, 2006. Tokyo, JAPAN.
- (3) Hashimoto S, Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Fukunaga Y, Kita Y, Kanamaru N, Teramoto S, Nishida Y, Namie Y, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Kase T, J.S.M. Perris, Pei jer Chan, Nomura T, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M: Development of Vaccines and Passive Immunotherapy Against SARS Corona Virus using Mouse and SCID—PBL/hu Mouse model. The 11th congress of the Asian pacific society of respirology(11th APSR) 19-22 November 2006, Kyoto
- (4) Hashimoto S, Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Kita Y, Kanamaru N, Fukamizu R, Nishida Y, Namie Y, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Yamada J, Takao K, Peiris, J.S.M.: Development of three distinct vaccines against SARS corona virus infection using SCID-PBL/hu mouse models. 6th Awaji International Forum on Infection and immunity. 4-7 September 2006 Awaji
- (5) 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. 13thAnnual Congress of the ESGT, 29th Oct – 1st Nov, 2005 Prague, Czech Republic (Symposist)
- (6) 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)
- (7) 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)
- (8) 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
- (9) 橋元里実、喜多洋子、深水玲子、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に対するヒト・キラーT細胞免疫反応の解析 第36回日本免疫学会総会 2006年12月11日-13日、2006
- (10) 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
- (11) 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
- (12) 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
- (13) 橋本里実、福永有可里、武本優次、喜多洋子、