

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

H I V感染予防における経粘膜ワクチンの開発

平成18年度 総括・分担研究報告

主任研究者 廣井 隆親

平成19年 (2007年) 4月

## 目 次

I. 総括研究報告	
HIV 感染予防における経粘膜ワクチン の開発 廣井隆親 (資料) 遺伝子組み換え生物等の第二種使用に関する拡散防止措置の確 認申請書と確認書	1
II. 分担研究報告	
1. HIV 経粘膜ワクチン開発にむけ ての組み換えヘルペスベクター の開発に関する研究 川口 寧	23
2. D-体のアミノ酸を含むペプチド を用いた新たな正常を持つ CTL 誘導の試みに関する研究 高橋秀実	27
3. ヒト細胞導入マウスにおける HIV 感染と抗 HIV 免疫応答の解析に関 する研究 横田恭子	33
4. 抗原の取り込みに関する研究 清野 宏	37
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	43
IV. 研究成果の刊行物・別刷	51

## I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金 エイズ対策研究事業  
総括研究報告書

**HIV 感染予防における経粘膜ワクチンの開発**

主任研究者 廣井隆親 ((財)東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所  
花粉症プロジェクト 副参事研究員)

**研究要旨**

現代において、HIV感染は主に性交渉による生殖器粘膜面を介した感染症である。経粘膜感染の防御機構は感染初期の粘膜面でウイルスの粘膜上皮への進入を阻止するか、粘膜上皮に感染したウイルスを直接殺傷することが重要である。これまでのHIV感染防御に関する多くの研究で、中和抗体を利用した体液性免疫の誘導とウイルス特異的な細胞傷害活性を誘導する各々のシステムの有効性が全身免疫を用いた研究で明らかになっている。しかしながら膣粘膜を含む生殖器粘膜には近接したリンパ器官が存在せず、一般に生殖器粘膜に細胞性と体液性免疫反応を誘導することは困難であると考えられてきた。以前我々は、粘膜面に細胞性免疫と体液性免疫の両者を誘導する可能性がある液性因子としてIL-15を見出した。本研究の目的は、生体が有するIL-15とHIV抗原を用いて膣粘膜にHIV特異的な体液性免疫である分泌型IgAと細胞傷害活性を有するCD8<sup>+</sup>T細胞の誘導法を開発する。この場合、膣粘膜にHIV抗原の種類と粘膜免疫アジュバントであるIL-15を発現するベクターを導入したウイルスを用いて免疫誘導を試みる。使用するウイルスと抗原はModified Vaccinia Ankara (MVA) とヘルペスウイルスHerpes Simplex Virus (HSV) をベクターとして用い、HIV-1のGag, Env, Polをワクチン抗原とし、また当研究室で粘膜アジュバントとしての可能性を見出したヒトIL-15を共発現させるウイルスベースHIVワクチンを開発する。免疫誘導に上記ウイルスを用いる利点としては、MVAはヒト上皮細胞に感染はするが増殖しない点でありヒトへの影響が倫理的に配慮されていることである。またHSVに関しては、ヒトの膣に感染しやすいウイルスであり発ガン効果が認められているが、組み換え技術により既に弱毒化したワクチン株が共同研究で作製されている。

一方、これらの経粘膜 HIV ワクチンの開発に伴い、よりヒトに近い感染モデルの開発が望まれている。これまで HIV や SHIV の感染実験に関してはサルやチンパンジーを用いた研究が主であったが、大型動物を用いることによって多くのコストと時間が浪費され効率的ではなかった。そこで我々は、マウスにヒトの免疫系を再構築した Hu-SCID マウスを用いることにより、ワクチンをヒトの免疫細胞を使って簡便に評価するシステムの構築に着手する。

## 分担研究者

川口寧（東京大学医科学研究所）

高橋秀実（日本医科大学）

横田恭子（国立感染症研究所）

清野宏（東京大学医科学研究所）

### A. 研究目的

HIV は世界で感染者数が劇的に増え続けている感染症であるが、未だ有効なワクチンが存在しない。HIV 感染を最初の感染経路である粘膜面で阻止するために、膣粘膜上に細胞性ならびに液性免疫の両方を誘導する新規粘膜ワクチンを開発する。現在マウスに感染する HIV 種が存在しないため、ヒトの免疫系をマウス内で再構築した Hu-SCID マウスを作成しそのマウスを用いて、開発したワクチンの生体内における感染防御の効果を検討するシステムを確立する

### B. 研究方法

HIV は性感染症で主に粘膜から感染する。したがって粘膜面に免疫を誘導する為に粘膜アジュバントとしての可能性が示唆される Interleukin-15(IL-15)または IL-2 を HIV の抗原タンパクである *env*, *gag*, *pol* とともにウイルスベクターに搭載する 3 種類 (HIV 抗原のみ、HIV 抗原+IL-2、HIV 抗原+IL-15) のウイルスを作成する。外来遺伝子発現にはワクシニアウイルス由来 *early promoter* を用いる。本実験では野生型に近いワクシニアウイルス Western Reserve (WR) 株と BHK21 など特定の細胞株でしか増殖せず非常に安全性の高い Modified Vaccinia Ankara (MVA) 株を用いる。これらの組換えワクシニアウイルスワクチンを BHK-21 細胞株や Vero 細胞株で培養増殖させ、目的外来遺伝子の発現を *in-vitro* で確認後、マウスの経膣、経鼻、経直腸などの粘膜面に接種する。その後経時的に採血並びに膣洗浄液を回収して ELISA により HIV 特異的抗体価を測定する。また、免疫したマウスの脾臓や他の二次リンパ組織から CD8 T 細胞を採取して、HIV 抗原を発現した細胞株と共培養することにより CTL

活性を測定する。

なお、これらのワクチンによりマウスで十分な HIV 特異的免疫反応が誘導可能であれば、ヒト造血幹細胞を NOD/SCID/IL-2R $\gamma$  chain 欠損マウスに移入してヒトの免疫系を再構築したマウスを作製する。そのマウスに組換えウイルスワクチンを投与してから HIV の感染実験を行い、ワクチン効果を検討する。

### C. 結果

前年度は HIV を用いた組み換えワクシニアウイルス作成を行うために厚生労働省の大臣確認の申請を行った。また組み替えワクシニアウイルス作成用プラスミドベクター 6 種類を、大腸菌を用いた遺伝子組み換えにて作成し、その塩基配列を確認した。その 6 種類とも目的の遺伝子が挿入された発現ベクターであることを確認できた。現在組み替えヘルペスウイルス作成用のプラスミドベクターの開発に取り掛かっている。また IL-15 の膣内における機能を解析するために、腸管から IL-15 を過剰発現するマウス (T3<sup>b</sup>-IL-15 トランスジェニック (Tg) マウス) の膣内の粘膜固有層に存在するリンパ球サブセットを解析した。このマウスは過剰発現した IL-15 が血流によって全身を循環しており、全身での IL-15 の機能解析にも適したマウスである。その結果 IL-15Tg マウスの膣粘膜固有層において主に CD8 陽性細胞が顕著に増加していた。また膣内環境は性周期に多大な影響を受け変化する為、ウイルスベクター投与時の投与条件の検討は必須である。今回我々は性ホルモンである progesterone の誘導体を皮下注射することにより性周期のコントロールを試みた。

### D. 考察

HIV 粘膜ワクチンの開発において、機能的な粘膜アジュバントは必須であるが、マウスを対象とした実験で使用されている代表的な粘膜アジュバントであるコレラ毒素は、ヒトにおいて神経毒性が報告されているために臨床応用は非常に困

難である。その為我々は臨床応用に向けた新規粘膜アジュバントとしてIL-15の機能解析を行っている。IL-15は様々なデータから効率の良い粘膜アジュバントとしての可能性が示唆されている為、このIL-15を用いてHIVに対する免疫応答を腔粘膜で増強することを試みることにした。その予備的実験としてまずIL-15が腔粘膜面に与える影響をIL-15Tgマウスを用いて解析した。今回確認された腔粘膜固有層で増加していたCD8陽性細胞は、野生型マウスの粘膜固有層にはほとんど確認できないことから、二つの可能性が示唆される。一つは血流中のIL-15が腔粘膜固有層に極少数存在するCD8陽性細胞を増加させた可能性。また二つ目はIL-15が作用したCD8陽性細胞が他の臓器から腔粘膜固有層に移動してきた可能性である。いずれにせよIL-15の影響により腔粘膜固有層にCD8陽性細胞が増殖していることはエイズ感染防御に働く細胞障害活性を持つT細胞(CTL)の誘導の可能性を強く示唆し、エイズ粘膜ワクチンの作成を強くサポートするものである。今後は今年度大臣申請を行い作成したウイルス発現用のプラスミドを用いて組み替えワクシニアウイルス、ならびに組み替えヘルペスウイルスを用いて、マウスへの感染実験を行い、HIV特異的な免疫応答を誘導する。またprogesterone誘導体を皮下注射して、五日後にマウスの腔洗浄液を回収して、光学顕微鏡で観察すると、発情期を示す剥離した角化細胞はほとんど見当たらず、発情間期を示すリンパ球が確認された。以上のことからprogesterone誘導体投与によって性周期をコントロールし、ウイルスベクター感染に適した発情間期を誘導することができた。

#### E. 結論

今年度はワクシニアウイルス作成の為のプラスミド構築を行い、計6種類の組み替えワクシニアウイルス作成用プラスミドの構築を完了した。またIL-15の腔粘膜における生理作用を検討したところ、IL-15トランスジェニックマウスでは腔粘膜固有層にCD8陽性細胞の増加を確認した。このことはIL-15の粘膜アジュバントとしての可能

性を示唆する結果である。さらに効率的なワクチンベクター感染の為の発情間期の誘導もprogesterone誘導体の皮下注射により確認した。以上の結果より次年度における組み替えワクシニアウイルスを用いたHIV粘膜ワクチンの効果を検討する準備が完了したと言える。

#### F. 健康危険情報

該当無し

#### G. 論文発表

1. Hiroi, T. and Takaiwa, F. Peptide immunotherapy for allergic diseases using a rice-based edible vaccine, *Curr. Opin. Allergy. Clin. Immunol.*, 6: 455-460, 2006.
2. Terahara, K., Takahashi, K.G., Nakamura, A., Osada, M., Yoda, M., Hiroi, T., Hirasawa, M., and Mori, K. Differences in integrin-dependent phagocytosis among three hemocyte subpopulations of the Pacific oyster "Crassostrea gigas" *Dev. Comp. Immunol.*, 30: 667-683, 2006.
3. Jang, MH., Sougawa, N., Tanaka, T., Hirata, T., Hiroi, T., Tohya, K., Guo, Z., Umemoto, E., Yang, B., Seoh JY., Kiyono, H. and Miyasaka, M. CCR7 is critically important for migration of immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *J. Immunol.*, 176: 803-810, 2006.
4. Tamagawa, H., Hiroi, T., Mizushima, T., Ito, T., and Kiyono, H. Therapeutic efficacy of roxithromycin on colitis of interleukin-10 deficient mice. *IBD* 2006. (in press)

## H. 学会発表

1. Hiroi, T. Oral tolerance: Peptide immunotherapy for allergic diseases using a rice-based edible vaccine 第36回日本免疫学会総会 (シンポジウム)、大阪、2006.
2. 廣井隆親、高木英典、高岩文雄、経口免疫寛容: T細胞エピトープ発現スギ花粉症緩和米によるアレルギー症状の緩和、衛生薬学2006フォーラム、東京、2006.
3. Tsukakoshi, Y., Watanabe, N., Yokoyama, S., Takada, K., Hirasawa, M., Hiroi, T. and Kiyono, H. IL-15 activates distinct cell types of gdTcells in small and large intestinal intraepithelial lymphocytes 第36回日本免疫学会総会、大阪、2006.
4. Terahara, K., Igarashi, O., Gotoh, Y., Nochi, T., Yuki, Y., Hiroi, T. and Kiyono, H. Induction of villous M cells by intestinal environmental factors. Annual Meeting of the American Association of Immunologist. Boston, USA, J. Immunol. 176: S227-S227, 2006
5. Terahara, K., Igarashi, O., Gotoh, Y., Nochi, T., Yuki, Y., Hiroi, T. and Kiyono, H. Intestinal environmental alteration contributes to the induction of villous M cells. The 6th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Hyogo, Japan, 2006.
6. Gotoh, Y., Igarashi, O., Terahara, K., Nochi, T., Obata, T., Hiroi, T., Akira, S. and Kiyono, H. Commensal bacteria induce UEA-1 positive cells in small intestinal villous epithelia via a TLR2 and TLR4 independent pathway. The 6th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Hyogo, Japan, 2006.
7. 神沼修、北村ふじ子、北村紀子、巽英樹、根本莊一、廣井隆親、森晶夫、宮武昌一郎. アレルギー患者における Th1/Th2 シフトに対する特異的転写因子の役割. 第56回日本アレルギー学会総会、東京、2006.
8. 山岡和子、三島一彦、西川亮、松谷雅生、秋田朗子、山本行男、廣井隆親 ヒトグリオーマの悪性化に関与するチロシンリン酸化たんぱく質の検索. ヒトプロテオーム機構第4回大会、東京、2006.
9. 渡邊伸昌、清野宏、廣井隆親、花粉症対策-米国および日本における現状と将来, 治療学, 41(1), ライフサイエンス出版, 2007. 1月10日発行、41: 32-36.
10. 鈴木一矢、廣井隆親、高岩文雄、清野宏、花粉症緩和米; Medical Science Digest, (印刷中)
11. 横山清司、鈴木一矢、高岩文雄、廣井隆親、スギ花粉症緩和米による予防効果、アレルギーの臨床、北隆館、2007. 1月号、27: 17-23.
12. 廣井隆親、塚越百合子、清野宏、粘膜系好酸球様樹状細胞による免疫寛容制御 Annual Review 免疫 2007. 中外医学社、221-230, 2006.

## I. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し



18 諸文科振第801号

平成19年2月27日

財団法人東京都医学研究機構  
理事長 今村 皓一 殿

文部科学大臣

伊吹 文明



遺伝子組換え生物等の第二種使用等をする間に執る拡散防止措置の確認について（回答）

「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（平成15年法律第97号）第13条第1項の規定により、平成18年10月19日付けで申請のありました第二種使用等「遺伝子組換えワクシニアウイルスを用いたHIV粘膜ワクチンの開発」をする間に執る拡散防止措置を確認しました。





※整理番号		
-------	--	--

第二種使用等拡散防止措置確認申請書

年 月 日

文部科学大臣 殿

氏名 財団法人東京都医学研究機構 理事長 今村皓一 印

申請者

住所 東京都新宿区西新宿二丁目8番1号

遺伝子組換え生物等の第二種使用等をする間に執る拡散防止措置の確認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第13条第1項の規定により、次のとおり申請します。

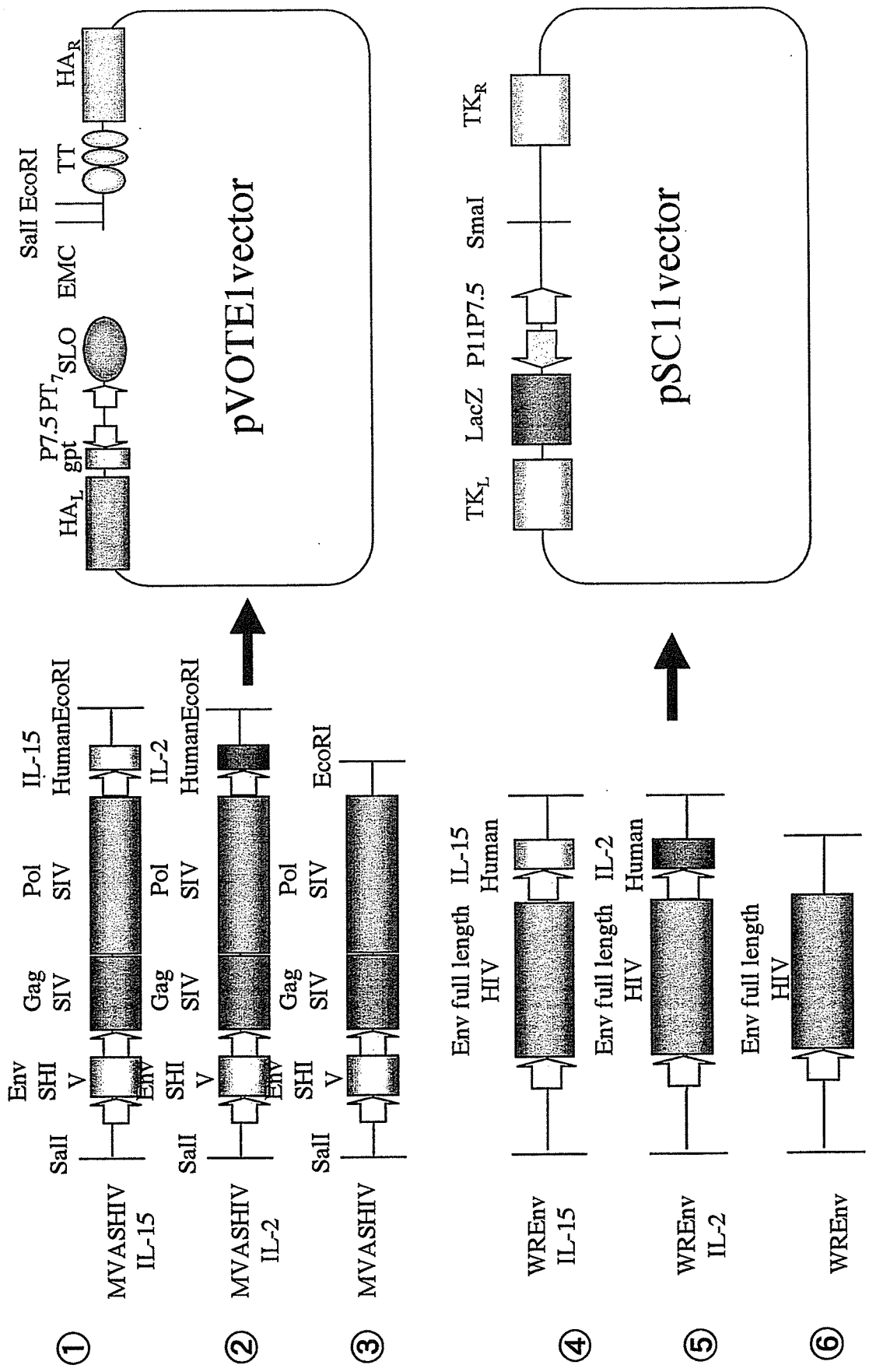
第二種使用等の名称		遺伝子組換えワクシニアウイルスを用いたHIV粘膜ワクチンの開発	
第二種使用等をする場所	名称	財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所 ① 3階P2組換えDNA実験室 (312号室) ② 6階P2A動物感染実験室 (607号室)	
	所在地	郵便番号 (113-8613) 東京都文京区本駒込三丁目18番22号	
		電話番号 (03) 3823-2105 内線 5330	
事務連絡先	実験の管理者	所属機関の名称及び職名	財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・ 花粉症プロジェクト・プロジェクトリーダー
		氏名	廣井 隆親
	住所	郵便番号 (113-8613) 東京都文京区本駒込三丁目18番22号	
		電話番号 (03) 3823-2105 内線5330	
		ファクシミリ番号 (03) 3823-6723	
		電子メールアドレス thiroi@rinshoken.or.jp	
	その他の連絡先	所属機関の名称及び職名	財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所 調査係
氏名		清水 文子	
住所		郵便番号 (113-8613) 東京都文京区本駒込三丁目18番22号	
		電話番号 (03) 3823-2105 内線 5130	
	ファクシミリ番号 (03) 3823-2965		
		電子メールアドレス fs@rinshoken.or.jp	

第二種使用等の目的及び概要	種類	<p>1. 微生物使用実験</p> <p>2. 大量培養実験</p> <p>3. 動物使用実験</p> <p>(1) 動物作成実験</p> <p>(2) 動物接種実験</p> <p>4. 植物等使用実験</p> <p>(1) 植物作成実験</p> <p>(2) 植物接種実験</p> <p>(3) きのこ作成実験</p> <p>5. 細胞融合実験</p>
	目的	HIV遺伝子とヒトIL-15を共発現するワクシニアウイルス (VV: vaccinia virus) を作製し、粘膜面より投与してHIVに対する粘膜免疫を惹起するワクチン開発を行う。またそれと同時にヒトIL-15の粘膜アジュバントとしての効果を検討する。
	概要	<p>実験の概略は別紙A-1, A-2, A-3に示した。また、遺伝子組換え生物等及び拡散防止措置の一覧表は別紙Bに示した。</p> <p>ワクチン抗原遺伝子及びアジュバント用遺伝子ヒトIL-2, ヒトIL-15をコードするDNA断片を化学的に合成し、組換えワクシニアウイルス作製用ベクターpVOTE1(<i>Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Jul 18;92(15):6773-7.</i>) にはSalI-EcoRI siteに挿入、pSC11(<i>Mol Cell Biol. 1985 Dec;5(12):3403-9.</i>) にはSmaIで作成した平滑末端に挿入する。別紙A-1参照 (P2レベル・機関承認実験、承認番号 395)</p> <p>↓</p> <p>ワクシニアウイルスWestern Reserve (WR)株あるいは、Modified Vaccinia Ankara(MVA)を感染させたCV-1細胞に別紙A-1で作製したpVOTE1由来プラスミドベクターあるいはpSC11由来プラスミドベクターを遺伝子導入して、pVOTE1のHA領域、pSC11はTK領域の相同組換えによりHIV抗原遺伝子ならびにアジュバント用遺伝子を発現する組換えワクシニアウイルスを得る。別紙A-2, A-3 参照 (P2レベル大臣確認実験)</p> <p>↓</p> <p>BHK21細胞にて得られた組換えウイルスを増幅し、動物培養細胞に感染させた後の目的タンパク質の発現を確認する。(P2レベル大臣確認実験)</p> <p>↓</p> <p>マウスに組換えワクシニアウイルスを接種し、目的の効果について検討する。(P2レベル・大臣確認実験)</p>
	確認を申請する使用等	HIV/SIVウイルスの一部の構成遺伝子を有する組換えワクシニアウイルスは、自立的な増殖力及び感染力を保持したウイルスである遺伝子組換え生物であって、マウスに接種することでその性状を解析する過程において従来の科学的知見に照らして増殖することが推定される。よってこの過程における組換えワクシニアウイルスの使用は二種省令別表第一第一号へに該当し、大臣確認を要する。また上記組換えワクシニアウイルスのマウスへの接種実験は別表第一第一号へに掲げる遺伝子組換え生物等の動物接種実験であることから、二種省令別表第一第三号イに該当するため大臣確認を要する。
遺伝子組換え生物等の特性	核酸供与体の特性	<p>ヒト：霊長目ヒト科：クラス1：該当無し</p> <p>マウス：げっ歯類ネズミ科：クラス1：該当無し</p> <p>大腸菌：エンテロバクテリア科エシユキュリア属：クラス1：病原性無し</p> <p>脳心筋炎ウイルス (EMCV)：ピコナウイルス科：クラス2：主にげっ歯類を宿主とする、人に感染するとまれに中枢神経系障害を含む熱性疾患を起こす。</p> <p>Human Immunodeficiency Virus (HIV) 1型：レトロウイルス科レンチウイルス属：クラス3：人に感染すると重篤な細胞性免疫不全を引き起こす。</p> <p>Simian Immunodeficiency Virus (SIV)：レトロウイルス科レンチウイルス属：クラス2：サルに感染すると重篤な細胞性免疫不全を引き起こす。</p> <p>Simian/Human Immunodeficiency Virus (SHIV)：レトロウイルス科レンチウイルス属：クラス3：膜タンパクenv遺伝子の改変によりサルとヒト両方への感染能を獲得したウイルス。感染すると重篤な細胞性免疫不全を引き起こす。</p>
	供与核酸の特性	<p>供与核酸の性状、機能等については別紙Cに示した。</p> <p>1 全ての供与核酸から産生される蛋白質は毒性及び病原性は示さない。</p> <p>2 単独または複数個の供与核酸を、別紙A-2, A-3に示したようにワクシニアウイルスゲノムcDNA内TK遺伝子またはHA遺伝子領域に挿入し、組換えウイルスを得る。得られた組換えウイルスが目的の細胞へ感染した場合のみ感染細胞内で供与核酸がコードする蛋白が産出される。</p> <p>3 供与核酸がコードする蛋白には、組換えワクシニアウイルス内、またはウイルス膜表面に局在させるための配列を付加していない。以上のことから、野生型ワクシニアウイルスと比較して組換えワクシニアウイルスの動物の宿主域や感染細胞の宿主域が広がるとは考えられない。</p>

ベクター等の特性	第二種告示別表第一第一号のB1レベルEK1に掲げる認定宿主ベクター系に属するpUC13,pBR322の大腸菌用クローニングプラスミドベクターを元にして作られたプラスミドを用いる。 <i>E. coli</i> K12株又はこの誘導体を宿主とし、ベクターや供与核酸が接合等により宿主以外の細菌に伝達されることはない。哺乳類細胞内では病原性・増殖性・伝達性はなく組換えも起こさない。(別紙D)
宿主等の特性	<p>1 大腸菌</p> <p>(1) 分類学上の位置及び実験分類 第二種告示別表第一第一号のB1レベル EK1に掲げる宿主大腸菌であり、遺伝学的、及び生理学的によく知られており、毒性がなく自然環境下での生存能力も低いとされている。例えば、JM109, DH5<math>\alpha</math>, STABLE-2, STABLE-4, TOP10, XL-1 Blueなど。実験分類はクラス1に該当する。</p> <p>(2) 自然環境における分布状況及び生息又は生育が可能な環境 自然環境における上記大腸菌の生育は不可能である。</p> <p>(3) 繁殖の様式 LB培地等の指摘培地でのみ増殖する。</p> <p>(4) 病原性、有害物質の産生性その他の特性 遺伝学的及び生理学的に良く知られた、毒性の無く、自然環境下での生存能力も低い大腸菌である。</p> <p>2 ワクシニアウイルス</p> <p>(1) 分類学上の位置及び実験分類 ワクシニアウイルス：ボックスウイルス科オルソボックスウイルス属(クラス2)</p> <p>(2) 自然環境における分布状況及び生息又は生育が可能な環境 これまでにワクシニアウイルスは生ワクチンとして投与されてきた。従って自然界から分離されたものはほとんどワクチン株である。</p> <p>(3) 繁殖又は増殖の様式 感染の宿主域が広いとため、ヒト・マウスなどの動物及び、通常実験で用いられるほぼ全ての動物実験培養細胞に感染し増殖する。</p> <p>(4) 病原性、有害物質の産生性その他の特性 実験室外でもヒト、サル、ウサギ、ヒツジ、ウシなどに感染増殖可能。天然痘ウイルスが変異し、ヒトへの病原性が弱まり、ウシ、ウサギの皮膚でよく増殖するように変異したもの。宿主ゲノムとの核酸の交換や持ちだしについての報告はない。</p>
遺伝子組換え生物等の特性(宿主等との相違を含む。)	<p>1 大腸菌 組換えワクシニアウイルス作製用ベクターを大腸菌へ導入することにより、アンピシリン耐性形質を獲得する。アンピシリン耐性遺伝子以外の供与核酸が大腸菌内で発現することは無いため大腸菌の病原性、伝達性を増強するとは考えにくい。</p> <p>2 組換えワクシニアウイルス 組換えワクシニアウイルス(RVV)は、ワクシニアウイルスのHA遺伝子領域に外来遺伝子が挿入されるか、あるいはTK遺伝子領域に外来遺伝子が挿入される。HA遺伝子領域内に外来遺伝子が挿入された場合、ウイルスのエンベロープ表面上にはHA蛋白質が発現せず、赤血球凝集能を失う。TK遺伝子が外来遺伝子に置換された場合、野生型のワクシニアウイルスと比較して病原性は低下することが報告されている。(Nature: 1985 Oct 31-Nov 6;317(6040):813-5) 供与核酸を挿入した組換えウイルスは感染細胞において、供与核酸のコードする蛋白の産生が考えられるが、供与核酸によってワクシニアウイルス本来の動物の宿主域や感染細胞の宿主域を広げるとは考えられない。</p>
遺伝子組換え生物等を保有している動物、植物又は細胞等の特性	<p>動物培養細胞：組換えワクシニアウイルスの<i>in-vitro</i>での増幅実験にはCV-1細胞または、BHK21細胞を使用する。組換えワクシニアウイルス感染細胞内において、組換えワクシニアウイルスの増殖がおこる。HIV/SIVウイルス構成遺伝子およびヒトIL-2とヒトIL-15保持した組換えワクシニアウイルスが感染した培養細胞で発現する供与核酸由来蛋白の毒性・病原性はない。</p> <p>マウス：それぞれの組換えワクシニアウイルスを投与した局所において、組換えワクシニアウイルスの増殖が起こる。組換えワクシニアウイルスによって導入されたHIV/SIVウイルス構成遺伝子から発現する蛋白ならびに、ヒトIL-2及びIL-15は毒性、病原性を示さない。組換えワクシニアウイルスを接種したマウスの繁殖実験は行わない。</p>

<p>拡散防止措置</p>	<p>区分及び選択理由</p>	<p>1. 組換えワクシニアウイルス：P2レベル 組換えワクシニアウイルスの作製時に宿主として使用する大腸菌及びワクシニアウイルスは、それぞれ第二種告示別表第1第1号に掲げる実験分類クラス1及び、第二種告示別表第2第2号に掲げる実験分類クラス2に該当する。核酸供与体由来のHIV/SIVの構成遺伝子は第二種告示別表第2第3号に掲げる実験分類クラス2に該当する。以上のことからこれら組換えウイルスは野生型ウイルスより病原性・伝達性が高まるとは考えにくいいため、宿主の実験分類に基づきP2レベルの拡散防止措置を執る。</p> <p>2. 組換えワクシニアウイルスの感染実験：P2レベル 上記のように、病原性・伝達性が高まったとは考えにくい組換えウイルスを用いるため、CV-1, BHK21, 動物培養細胞への感染実験はP2レベルの拡散防止措置を執る。</p> <p>3. 組換えワクシニアウイルスの動物投与実験：P2Aレベル 上記のように、病原性・伝達性が高まったとは考えにくい組換えウイルスを用いるため、組換えワクシニアウイルスのマウスへの接種ならびに投与実験はP2Aレベルの拡散防止措置を執る。</p>
	<p>施設等の概要</p>	<p>(別紙図面1,2,3,4,5の通り)</p> <p>(1) 主要な施設、設備及び機器の位置及び名称： 財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所（全体図 図1）</p> <p>(2) 3階P2組換えDNA実験室。（312号室）は室内に手洗い設備を完備する（黒塗りのフロア（図2）・実験区画（図3）の詳細図を参照。</p> <p>(3) 6階P2A動物感染実験室。（607号室）は前室前にスルータイプのオートクレーブ、組換え動物逃亡防止設備、手洗い設備、及び「組換え動物飼育中（P2）」の表示板を完備する。フロア（図4）・実験区画（図5）の詳細図を参照</p>
	<p>遺伝子組換え生物等を不活化するための措置</p>	<p>1. ウイルスは0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液及び、オートクレーブ処理（121℃, 30分）にて不活化する。</p> <p>2. 動物に関してはオートクレーブ処理（121℃, 30分）を行い、ウイルス蛋白を不活化する。</p>
<p>その他</p>		<p>1. 第二種使用等の実施予定期間：大臣確認後～平成21年3月</p> <p>2. 遺伝子組換え生物等の安全取り扱いについて検討する委員会等の設置状況及び当該委員会等の委員長の職名及び氏名等； 組換えDNA実験安全委員会 委員長：財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所 副所長 米川 博通</p> <p>3. 動物を飼育する施設等の管理者による確認状況：  東京都臨床医学総合研究所・動物実験委員会により1年に1回逃亡防止措置を含めた施設管理状況及び動物の取り扱い状況について審査・許可を受ける。</p>

別紙A-1 (pVOTE vectorならびにpSC11 vectorへの目的遺伝子断片の挿入)

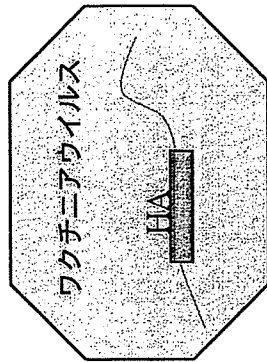


化学的に合成したDNA断片 (①~⑥) のうち、①から③をSallとEcoRIでdouble digestionしたpVOTE1ベクターに挿入する。また④~⑥は両端が平滑末端で、SmaIでdigestionしたpSC11ベクターに挿入する。(P2レベル・機関承認実験)

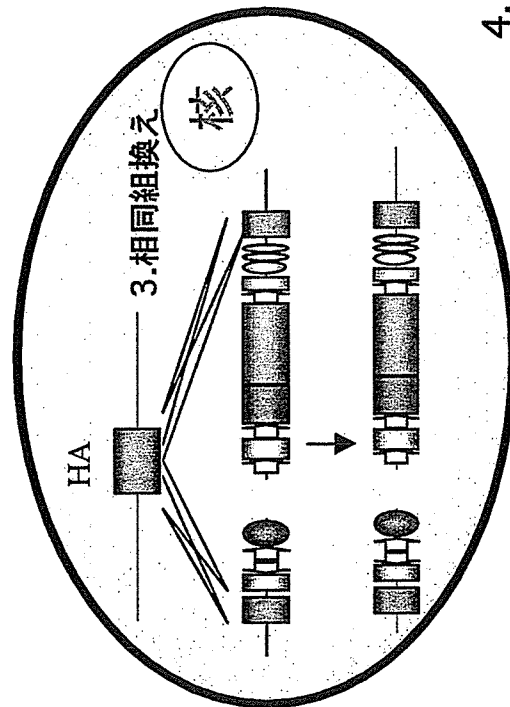
# 別紙A-2

概略2で作成した遺伝子組換えワクチニアウイルスvT7lacOIを再びCV-1細胞に感染させ、概略1で示した各種pVOTE vectorを遺伝子導入するCV-1細胞の細胞質内でワクチニアウイルスのHA遺伝子とpVOTEプラスミド内のHA遺伝子断片の間で相同組換えが起こり、組換えワクチニアウイルスvVOTEが作成される。(P2レベル・大臣確認実験)  
その後、作製した組換えワクチニアウイルスを各種細胞株 (HeLa, BHK21等) に感染させ、外来タンパク質の発現の確認、ならびにウイルスの培養、精製を行う。(P2レベル・大臣確認実験)

MVA



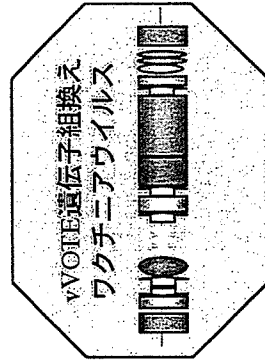
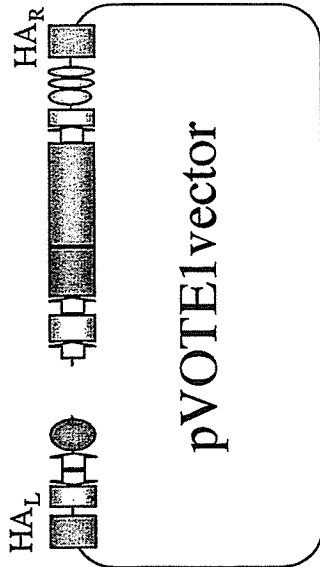
CV-1細胞



2. 遺伝子導入

3. 相同組換え

4. 組換えワクチニアウイルスの作成



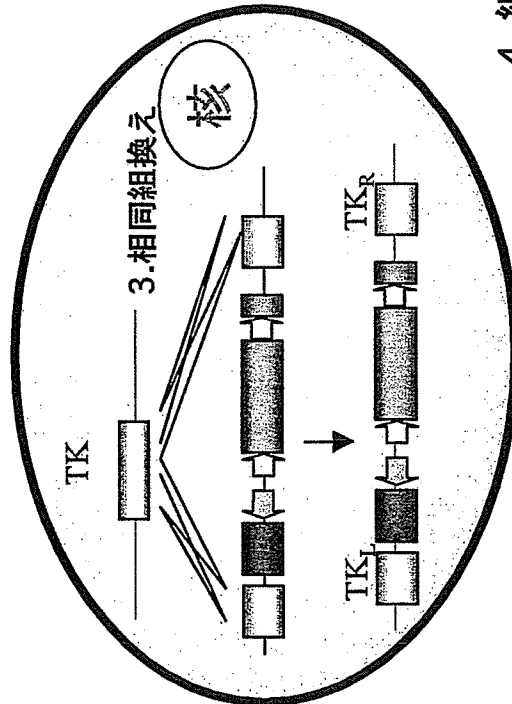
5. 組換えワクチニアウイルスの培養細胞への感染  
外来タンパク質の発現確認ならびに  
ウイルスの培養、精製

# 別紙A-3

別紙A-1で作成した目的遺伝子を挿入したpSC11ベクターをワクシニアウイルス (WR 株) を感染させたCV-1細胞に遺伝子導入する。CV-1細胞の細胞質内でワクシニアウイルスのTK遺伝子とpSC11プラスミド内のTK遺伝子断片の間で相同組換えが起こり、組換えワクシニアウイルスvSC11が作成される。(P2レベル・大臣確認実験) その後、作製した組換えワクシニアウイルスを各種細胞株 (Hela, BHK21等) に感染させ、外来タンパク質の発現の確認、ならびにウイルスの培養、精製を行う。(P2レベル・大臣確認実験)

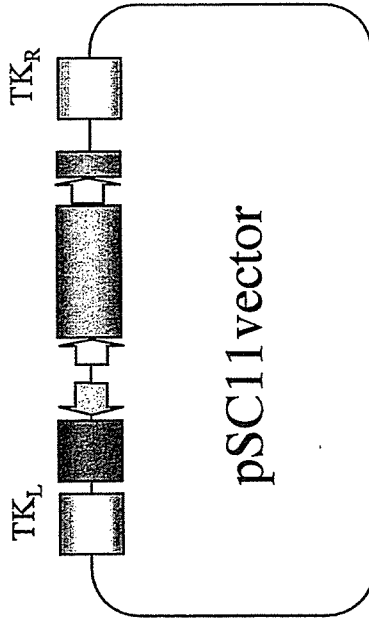
## 1. 感染

CV-1細胞

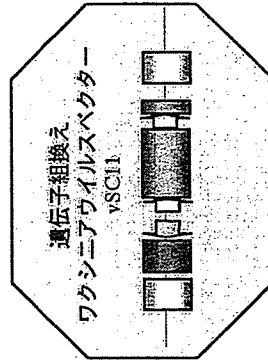


## 2. 遺伝子導入

pSC11 vector



## 4. 組換えワクシニアウイルスベクターの作成



vSC11

- ## 5. 組換えワクシニア 培養細胞への感染
- 外来タンパク質の発現確認ならびに  
ウイルスベクターの培養、精製

## 遺伝子組換え生物等及び拡散防止措置の一覧表

核酸供与体	供与核酸	ベクター	宿主等	保有助植物等	核酸防止措置の区分	備考
ワクチニアウイルス	P7.5(ゲノムDNA) P11(ゲノムDNA) TK遺伝子(ゲノムDNA) HA遺伝子(ゲノムDNA) T7プロモーター(ゲノムDNA) T7 RNAポリメラーゼ転写終止シグナル(ゲノムDNA)	pUC誘導体, pBR322	E.coli K12株		P2	機関承認実験: 承認番号322 大腸菌を用いた遺伝子組み換え実験 使用等する場所:3階 P2組換えDNA実験室 (312号室)
T7バクテリオファージ	Lac オペロン(ゲノムDNA) stem-loop Lac オペロン(ゲノムDNA) Lac I 遺伝子(cDNA) rrnBT1/BT2 転写終止シグナル(ゲノムDNA) アンピシリン耐性遺伝子(プラスミドDNA) gpt 遺伝子(cDNA)					
大腸菌	EMC 非翻訳領域(ゲノムDNA)					
Encephalomyocarditis (EMC)ウイルス						

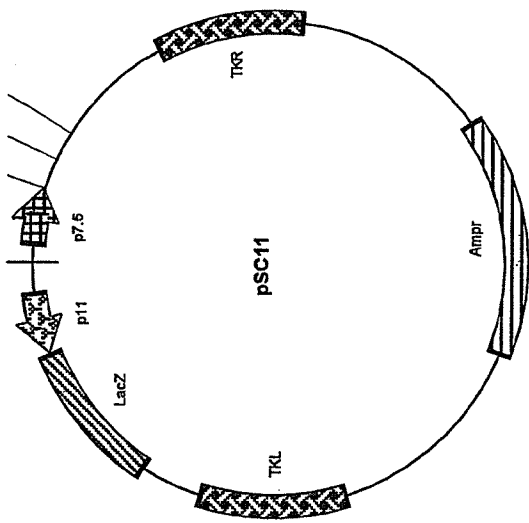


ヒト	Interleukin-2遺伝子 (cDNA)	ワクチニアウイルス (Western Reserve 株、Modified Vaccinia Ankara 株)	P2	大臣確認実験 組換えウイルスの作 出 使用等する場所:3階 P2組換えDNA実験室 (312号室)
	Interleukin-15遺伝子(cDNA)			
	env遺伝子(cDNA)			
	env遺伝子(cDNA)			
	gag遺伝子(cDNA)			
pol遺伝子(cDNA)				
ワクチニアウイルス	P7.5(ゲノムDNA)	ヒト培養細胞 (Hela細胞) ハムスター培養細胞 (BHK21細胞) アフリカミドリザル培養細胞 (CV-1細胞)		
	P11(ゲノムDNA)			
	TK遺伝子 (ゲノム DNA)			
	HA遺伝子 (ゲノム DNA)			
	T7プロモーター (ゲノムDNA)			
T7 RNAポリメラーゼ転写終止シグナル (ゲノムDNA)				
T7バクテリオファージ				
大腸菌	Lacオペロン (ゲノムDNA)			
	stem-loop Lacオペロン (ゲノムDNA)			
	Lac I遺伝子(cDNA)			

Encephalomyocarditis (EMC)ウイルス	rrnBT1/BT2 転写終止シグナル(ゲノムDNA)	上記遺伝子組換えワクチニアウイルス	P2	大臣確認実験 培養細胞への接種実験 使用等する場所:3階 P2組換えDNA実験室(312号室)
	gpt遺伝子(cDNA)			
ヒト	EMC 非翻訳領域(ゲノムDNA)	ヒト培養細胞 (Hela細胞) ハムスター培養細胞 (BHK21細胞) アフリカミドリザル培養細胞 (CV-1細胞) マウス	P2A	大臣確認実験 動物接種実験 使用等する場所:6階 P2A動物感染実験室(607号室)
	Interleukin-2 遺伝子(cDNA)			
	Interleukin-15 遺伝子(cDNA)			
	env 遺伝子(cDNA)			
	env 遺伝子(cDNA)			
gag 遺伝子(cDNA)	大臣確認実験 培養細胞への接種実験 使用等する場所:3階 P2組換えDNA実験室(312号室)			
pol 遺伝子(cDNA)				
サル並びにヒト免疫不全ウイルス (SHIV)	大臣確認実験 培養細胞への接種実験 使用等する場所:3階 P2組換えDNA実験室(312号室)			
ヒト免疫不全ウイルス (HIV)				
サル免疫不全ウイルス (SIV)				
サル免疫不全ウイルス (SIV)				

別紙C 供与核酸の特性

種類	一般名称	構成要素 (目的遺伝子、発現調節遺伝子等)			塩基配列情報又は日本DNAデータベースの等のアクセッションナンバー
		機能	大きさ	構成	
cDNA	大腸菌lacI遺伝子	ラクトースリプレッサーとして構造遺伝子の転写を調節する	0.9kb	別紙D参照	NC_000913
ゲノムDNA	大腸菌lacO調節領域	この配列へのラクトースリプレッサーの結合によりRNAポリメラーゼのラクトースプロモーターへの結合を阻害する。	11b		
ゲノムDNA	大腸菌SLO調節領域	lacO調節領域がパリンドロームの形で連結したもの	22b		NC_000913
ゲノムDNA	大腸菌rrnB遺伝子転写終止配列	rrnBリボソームRNAの転写終止配列	72bp		
cDNA	大腸菌gpt遺伝子	大腸菌由来のmycophenolic酸への耐性遺伝子	459bp		U00096
プラスミドDNA	大腸菌アンピシリン耐性遺伝子	大腸菌に薬剤耐性を付加する	0.8kb		J01749
ゲノムDNA	T7バクテリオファージ転写終止配列	T7バクテリオファージ由来転写終止配列	48bp		
ゲノムDNA	T7バクテリオファージプロモーター	T7RNAポリメラーゼ遺伝子のプロモーター	20bp		
cDNA	ヒトInterleukin-2	T細胞の増殖、B細胞の抗体産生誘導、NK細胞の細胞傷害活性の増強等	0.4kb		NM_000586
cDNA	ヒトInterleukin-15	T及びNK細胞の増殖因子、CD8陽性T細胞のメモリー機能の増強等	0.5kb		NM_172174
cDNA	HIVgp160遺伝子	HIV膜タンパク構成遺伝子	2.6kb		K02011
cDNA	SIVgag遺伝子	SIV内殻タンパク質群遺伝子	1.5kb		AY588946
cDNA	SIVpol遺伝子	SIV逆転写酵素遺伝子	3.2kb		AY611488
ゲノムDNA	脳心筋炎ウイルス(EMCV)UTR	mRNA内部のリボソーム結合サイトであり、uncapな転写産物でも翻訳することができる	0.6kb		NC_001479
cDNA	SHIVgp120遺伝子	ヒト及びサルCD4に結合する膜タンパク構成遺伝子	0.8kb		AF038398



発現用のcDNA(env, IL-2, IL-15等)をコードするDNA断片をSmaIで作成した平滑末端に挿入する。ワクシニアウイルス(WR株)を感染させたCV-1細胞に目的遺伝子を挿入したpSC11プラスミドを遺伝子導入してTK領域の相同組換えを起こした組換えワクシニアウイルスを得る。

