

201208031A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

ワクチン基礎生産技術の 向上に関する研究

(H24-創薬総合-一般-005)

平成24年度 総括・分担研究報告書

平成25 (2013) 年 3月

研究代表者 森 康子

(神戸大学大学院医学研究科)

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

ワクチン基礎生産技術の 向上に関する研究

(H24-創薬総合-一般-005)

平成24年度 総括・分担研究報告書

平成25（2013）年 3月

研究代表者 森 康子

(神戸大学大学院医学研究科)

平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

ワクチン基礎生産技術の向上に関する研究

平成 24 年度 研究組織

研究代表者

森 康子 神戸大学大学院医学研究科微生物感染症学講座
臨床ウイルス学分野・教授

研究分担者

岡本 成史 医薬基盤研究所創薬基盤研究部
感染制御プロジェクト・プロジェクトリーダー

研究協力者

村上 宏起 医薬基盤研究所創薬基盤研究部
感染制御プロジェクト・協力研究員

研究協力者

定岡 知彦 神戸大学大学院医学研究科微生物感染症学講座
臨床ウイルス学分野・助教

目 次

I. 総括研究報告

ワクチン基礎生産技術の向上に関する研究	1
研究代表者 森 康子	

II. 分担研究報告

1. RSウイルス遺伝子を保有する水痘ワクチンウイルスの作製	7
森 康子	

2. RSウイルス遺伝子を保有する水痘ワクチンウイルスのモルモット への免疫による免疫能誘導の検討	11
森 康子・岡本 成史	

3. モルモットにおける水痘帯状疱疹ウイルスに対する細胞性免疫能測定 の試み	15
森 康子	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	17
---------------------	----

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)

総括研究報告書

ワクチン基礎生産技術の向上に関する研究(H24-創薬総合-一般-005)

研究代表者・森 康子

神戸大学大学院医学研究科・教授

研究要旨： 複数の病原体による感染症を一度に予防できる組換え生ワクチンを作製し、接種回数が少なく利便性の高い、かつ低コスト生産可能なワクチンを開発することを目的とする。現行の水痘生ワクチンは高い有効性と安全性が認められた世界で唯一の株である Oka 株を用いている。本研究では、この Oka ワクチン株を用いて水痘ウイルスのみならず他の感染症も同時に阻止できる多価生ワクチンの開発を目指す。そこで本研究では、高い有効性と安全性が既に認められ、世界的に水痘予防用ワクチンとして認可されている Oka ワクチン株ゲノムにRSウイルス(RSV)の表面抗原遺伝子(FあるはG)を組み込み、それらの遺伝子を発現する組換え水痘ワクチンウイルスを作製し、RSV および水痘ウイルスの感染を同時に予防できる生ワクチンの作製を試みる。本年度は、これら RSV ウイルスの抗原を保有する組換え水痘ワクチンウイルスの作製に成功し、本ウイルス感染細胞において RSV,F あるいは G タンパク質が明らかに発現していることを確認した。さらに本ウイルスをモルモットに接種し、モルモット体内においてこれらのタンパクに対する中和抗体が産生されていることを明らかにした。

A. 研究目的

複数の病原体による感染症を一度に予防できる組換え生ワクチンを作製し、接種回数が少なく利便性の高い、かつ低コスト生産可能なワクチンを開発する。既に認可されている水痘ワクチンを用いて、他の病原体の抗原遺伝子をもつ次世代組換え水痘ワクチンを作製し、安全性および有効性を明らかにすることによって臨床研究へと繋げる。

現行のワクチン接種は数種類のワクチンの複

数回接種となっている。生ワクチンの場合、ウイルスの大量生産が必要であり、製造は高コストで時間を要する。そのため、1種類のワクチン接種で複数の感染症に対処できる多価生ワクチンの開発が必要である。

現行の水痘生ワクチンは、WHOにおいて認可された世界で唯一の水痘ワクチン(Okaワクチン株)である。Okaワクチン株は、現在世界中で使用されており、安全性と有効性が認められている。最近、我々は、Okaワクチン株のゲノムを大

腸菌内で保持できるプラスミドに組み込むことによりゲノムからの感染性ウイルスの再構築に成功し、容易に外来遺伝子を水痘ゲノムに挿入できる系を確立した。そこで本研究では、現行の水痘生ワクチンをベースとし、他の病原体の遺伝子を挿入した組換え水痘ワクチンを作製し、複数の感染症に対処できるワクチンを作製する。外来遺伝子としての標的は、乳幼児の重症呼吸器感染症の原因であるRSウイルス(respiratory syncytial virus)のF および G 遺伝子である。RSウイルス(RSV)は、パラミクソウイルス科に属するマイナス一本鎖RNAウイルスである。RSVは、ウイルス性肺炎や、細気管支炎等の重篤な下気道疾患の原因である。主要なRSV感染症は、生後6週間から2歳までの乳幼児に起こることが最も多く、小児肺炎の40%はRSVが原因とされる。小児だけでなく、高齢者や免疫不全者においても、重篤な疾患を発症することがある。RSVに対する予防には、ヒト化モノクローナル抗体製剤等はあるが、安全で有効なワクチンは今までのところ開発されていない。RSVゲノムは、NS1およびNS2、N、P、M、SH、G、F、M2、およびLをコードしている。その中で、膜タンパク質のG(glycoprotein)とF(Fusion protein)は、中和抗体の標的抗原であることが知られている。

そこで本年度はRSVのFあるいはGを挿入した組換え水痘ワクチンウイルスの作製とその効果判定法の検討を行うこととした。

B. C. 研究方法および結果

I. RSV-G 又は RSV-F を発現させた組換え水痘ウイルスの作製

1. VZV-BAC ゲノムへの RSV-G 又は RSV-F の挿入

Oka ワクチン株(vOka)-BAC ゲノムを保持する大腸菌に導入し、組換えによる挿入を行った。これにより、外来遺伝子発現カセットを保持したvOka-RSV-G-BAC 又はvOka-RSV-F-BAC ゲノムを得た。外来遺伝子の挿入部位は、RSV-G は ORF2 と ORF3 の間に挿入し、RSV-F は ORF13 への置換とした。組み込んだ RSV-G と RSV-F の遺伝子配列は臨床分離株 200/2004 株(A 型、大阪府立公衆衛生研究所・高橋和郎先生より分与)を基にしている。発現プロモーターはCMV(サイトメガロウイルス)のプロモーターを用いた。

2. 組換え水痘ウイルスの作製

得られた外来遺伝子挿入 vOka-BAC ゲノムを、VZV 感染許容細胞(MRC-5)に導入し、vOka-RSV-G-BAC 又はvOka-RSV-F-BACウイルスの再構築を行い、組換えウイルスを得た。

3. RSV-G 又は RSV-F の発現確認

vOka-RSV-G 又は vOka-RSV-F ウイルスをMRC-5細胞に感染させ、RSV-G 又は RSV-F に対するマウスモノクローナル抗体を用いてRSウイルス抗原の発現を確認した。IFA およびwestern blotにてそのタンパクの発現を確認できた。

II. モルモットを用いた免疫試験

1. vOka-RSV-G 又は vOka-RSV-F ワクチンウイルスのモルモットへの免疫

モルモットへの免疫試験により評価した。水痘ワクチン株は、モルモットに感染するが、ウイルス増殖はそれほど高くなく、また病気もまったく引き起こさない。しかし、水痘ウイルスの宿主はヒトのみであり、適当な動物モデルが存在しないため、水痘ワクチンウイルスが唯一感染するとされているモルモットを用いた。試験では、vOka-RSV-G 又は vOka-RSV-F ウイルス感染細胞を、モルモットの皮内に接種する方法で免疫した。接種は2週間ごとに計4回行い、その後、採血をして血清中の抗体価測定を行った。

2. 抗体価測定

IFA(間接免疫蛍光抗体法)により RSV-G と RSV-F に対する抗体価を測定した。RSV-G 又は RSV-F を発現させたプレートにおいて、モルモット血清を一次抗体として、IFA を行った。IFA で蛍光が観察できた血清の最大希釈倍数を抗体価とした。

次に、RSV と水痘に対する中和抗体価をプラークリダクションアッセイで測定した。判定ウイルスとして RSV-Long 株・RSV-9320 株(共に ATCC より購入)、VZV-vOka 株を用いた。

各々の遺伝子を発現する水痘ワクチンウイルスを免疫したモルモットの血清中に RSV-G あるいは RSV-F に対する抗体価の上昇が確認された。

RSV, F あるいは G(A 型)を発現する水痘ワクチ

ンウイルスを免疫したモルモットの血清中には、RSV-Long 株(A 型)に対しては中和抗体の誘導が確認できた。しかし、RSV-9320 株(B 型)に対する中和抗体の誘導は確認できなかった。

一方、水痘ウイルスに対する中和抗体価の誘導は、すべてのモルモットにおいて認められた。

III. モルモットにおける抗原特異的細胞性免疫測定法の検討

モルモット脾臓より、単核球を調製し、抗モルモット IFN- γ 抗体をコートした 96 穴メンブレンプレートに単核球を加え、リンパ球マイトジェンである phytohemagglutinin (PHA) を添加した。37°C、5%CO₂ 条件下で 38 時間培養した後、プレートを洗浄し、IFN- γ 分泌細胞をスポットとしてその数を測定した。スポット数の測定は、KS-ELISPOT 測定装置 (Carl Zeiss) により行った。同時に、PHA 刺激による細胞内 IFN- γ の発現上昇を、モット IFN- γ 抗体を用いた間接蛍光抗体法により確認した。

Ex vivo で PHA 刺激したモルモット脾臓単核球において、非刺激に比べ IFN- γ の細胞内発現量の上昇を、間接蛍光抗体法により確認した。また、IFN- γ ELISPOT 法によっても PHA 刺激による IFN- γ 産生の上昇を認めた。

(倫理面への配慮)

組換えウイルス作製および使用実験はすべて医薬基盤研究所で行った。組換えウイルス実験に関しては文部科学大臣による拡散防止措

置の確認および当該研究機関における組換え DNA 実験安全委員会の承認を受けている。動物実験については当該研究機関における動物実験委員会での承認の上、実験を行った。

D. 考察

今回、RSV-G あるいは F 遺伝子を保有する Oka ワクチン株 vOka ゲノムを作製した。さらに、そのウイルスゲノムからのウイルスの再構築に成功した。すなわち組換えウイルスを作製することができた。

その組換えウイルスを感染させた細胞において RSV-G 又は RSV-F タンパク質の発現を IFA とウェスタンブロットの両方で確認することができた。

結果本組換えワクチンウイルスの感染により RSV-G あるいは F タンパク質の発現が期待できる。

次にこれらの組換えウイルス vOka-RSV-G 又は vOka-RSV-F をモルモットに免疫したところ、RSV(A 型)および水痘ウイルスに対する抗体誘導が認められた。本結果より本ウイルスは、RSV および水痘ウイルスの双方に効果が期待できる生ワクチン候補となり得る可能性があると考えられた。

モルモットに接種し、その効果を判定するには抗体誘導の確認に加えて、細胞性免疫が誘導されているかを確認する必要があると思われた。そこで、本研究ではモルモットにおける細胞性免疫能を測定する系を立ち上げることも目的とした。今回、モルモット脾臓由来単核球を強力なリン

パ球マイトジェンである PHA で刺激する事により、明らかな IFN- γ の発現上昇を確認できた。しかしながら、現在汎用される有用な抗モルモット IFN- γ 抗体は非常に限られており、その感度も、ヒト IFN- γ 抗体に比べると明らかに低い。細胞性免疫能測定のためのモルモットにおける IFN- γ ELISPOT 法を確立させるためには、まず、より高感度で特異的な抗 IFN- γ 抗体が必要であると考えられる。よって本測定法の確立のため、現在、新たな抗モルモット IFN- γ 抗体を作製中である。

E. 結論

vOka に RSV-G と RSV-F の遺伝子配列を組み込むことで、RSV 抗原の G と F を発現する vOka-RSV-G 又は vOka-RSV-F ウイルスを作製することができた。モルモットへの免疫試験によって、これらの抗体に対する抗体誘導も確認できた。

また、本研究では、モルモット脾臓由来単核球を用いた IFN- γ ELISPOT 法の確立を試みた。しかし、今回用いたモルモット抗 IFN- γ 抗体の反応性が悪く、測定法の確立には至らなかった。モルモットにおける IFN- γ ELISPOT 法の確立には、まず、より感度が高くかつ特異的な抗体を作製する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2.学会発表

1) 第16回日本ワクチン学会

平成24年11月18日(日)

森 康子「水痘ワクチンの組換えワクチンベクターとしての応用」

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)

分担研究報告書

ワクチン基礎生産技術の向上に関する研究(H24-創薬総合-一般-005)

RS ウイルス遺伝子を保有する水痘ワクチンウイルスの作製

研究代表者・森 康子

神戸大学大学院医学研究科・教授

医薬基盤研究所感染制御プロジェクト・チーフプロジェクトリーダー

研究協力者・村上宏起

医薬基盤研究所感染制御プロジェクト・協力研究員

研究要旨:本研究では、高い有効性と安全性が既に確認され、世界的に水痘予防用ワクチンとして認可されている岡ワクチン株ゲノムにRS ウイルス(RSV)の表面抗原遺伝子(FあるはG)を組み込み、それらの遺伝子を発現する組換え水痘ワクチンウイルスを作製し、RSV および水痘ウイルスの感染を同時に予防できる生ワクチンの作製を試みる。今回、これらRSV ウイルスの抗原を保有する組換え水痘ワクチンウイルスを再構築に成功した。さらに本ウイルスの感染細胞においてRSV,FあるいはGタンパク質が発現していることが確認された。

A. 研究目的

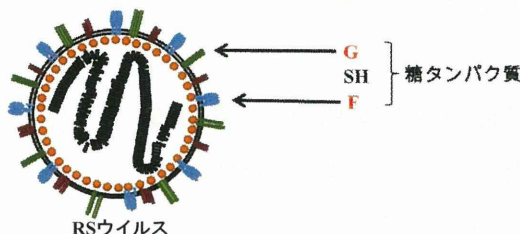
現在使用されている水痘ワクチン岡ワクチン株 vOKa 株は、水痘患者より分離したウイルス Oka 原株 pOka 株を継代を繰り返すことにより弱毒化した生ウイルスワクチンである。この水痘ワクチンは世界中で広く使用されており、高い有効性と安全性が実証されている。また、比較的大きなサイズの DNA を有しており、さらにいくつかの非必須遺伝子を持っていることから、外来性遺伝子の挿入に有利であると考えられ、組換え多価ワクチンのウイルスベクターとして期待されている。我々はこれまでにこの水痘ワクチン株をベクターとし、他の外来遺伝子を挿入した組換えウイルスを作製し、多価生ワクチンの候補となることを報告してきた。以前我々が挿入した外来遺伝子はムンプスウイルスの表面抗原であり、その組換えウイルス、すなわちムンプスウイルスの外来遺伝子を発現する組換え水痘ワクチンウイルスを用いてその効果を明らかにしてきた。

そこで本研究では、その水痘ワクチン株ゲノムにRSウイルスの外来遺伝子を挿入することを試みた。

RS ウイルス(RSV)は、パラミクソウイルス科に属するマイナス一本鎖 RNA ウイルスである。RSV は、ウイルス性肺炎や、細気管支炎等の重篤な下気道疾患の原因である。主要な RSV 感染症は、生後6週間から2歳までの乳幼児に起こることが最も多く、小児肺炎の40%はRSVが原因とされる。小児だけでなく、高齢者や免疫不全者においても、重篤な疾患を発症することがある。RSV に対する予防には、ヒト化モノクローナル抗体製剤等はあるが、安全で有効なワクチンは今までのところ開発されていない。

RSV ゲノムは、NS1 および NS2、N、P、M、SH、G、F、M2、およびLをコードしている。その中で、膜タンパク質の G (glycoprotein) と F (Fusion protein) は、中和抗体の標的抗原であることが知られている。

RSウイルス(RSV)抗原発現vOkaの作製



今回我々は水痘 vOka 株に、RSV の G 抗原又は F 抗原の遺伝子を組み込み、RSV-G 又は RSV-F を発現する組換え水痘ウイルスを作製した。

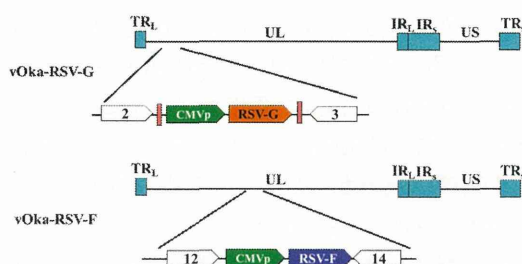
B. 研究方法

■1.RSV-G 又は RSV-F を発現させた組換え水痘ウイルスの作製■

①. VZV-BAC ゲノムへの RSV-G 又は RSV-F の挿入

vOka-BAC ゲノムを保持する大腸菌に導入し、組換えによる挿入を行った。これにより、外来遺伝子発現カセットを保持した vOka- RSV-G-BAC 又は vOka-RSV-F -BAC ゲノムを得た。外来遺伝子の挿入部位は、RSV-G は ORF2 と ORF3 の間に挿入し、RSV-F は ORF13 への置換とした。組み込んだ RSV-G と RSV-F の遺伝子配列は臨床分離株 200/2004 株 (A 型、大阪府立公衆衛生研究所・高橋和郎先生より分与) を基にしている。発現プロモーターは CMV (サイトメガロウイルス) のプロモーターを用いた。

RSウイルス抗原発現水痘ワクチンの作製



②.組換え水痘ウイルスの作製

得られた外来遺伝子挿入 vOka-BAC ゲノムを、VZV 感染許容細胞 (MRC-5) に導入し、vOka-RSV-G-BAC 又は vOka-RSV-F-BAC ウイルス

を得た。

③. Cre recombinase による BAC カセットの除去 外来遺伝子挿入

vOka-BAC ウイルスを、Cre recombinase 発現細胞に感染させることで、BAC カセットを除去し、vOka-RSV-G 又は vOka-RSV-F ウイルスを得た。

■2.RSV-G 又は RSV-F の発現確認■

①. IFA (間接蛍光抗体法) とウェスタンブロットによる RSV-G 又は RSV-F の発現確認

vOka-RSV-G 又は vOka-RSV-F ウイルスを MRC-5 細胞に感染させ、RSV-G 又は RSV-F に対するマウスモノクローナル抗体を用いて RS ウイルス抗原の発現を確認した。

(倫理面への配慮)

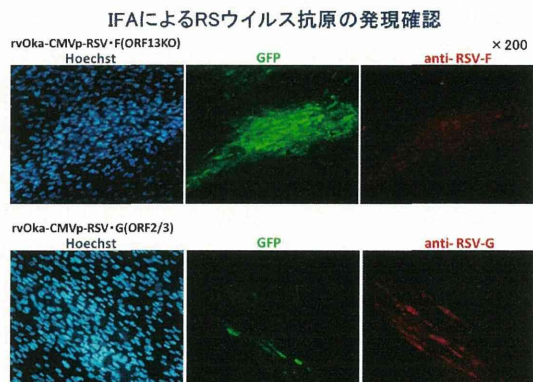
本実験は医薬基盤研究所で行った。組換えウイルス実験に関しては文部科学大臣による拡散防止措置の確認および当該研究機関における組換え DNA 実験安全委員会の承認を受けている。

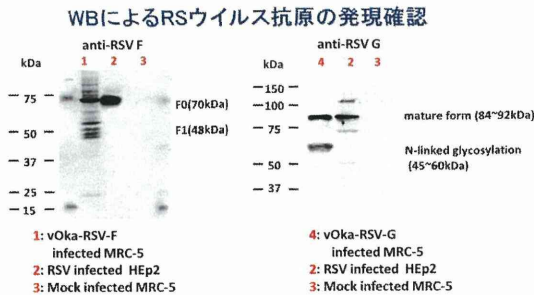
C. 研究結果

■2.RSV-G 又は RSV-F の発現確認■

①. IFA とウェスタンブロットによる RSV-G 又は RSV-F の発現確認

作製した vOka-RSV-G 又は vOka-RSV-F ウイルス感染細胞において、RSV-G 又は RSV-F ウイルスの発現が、IFA とウェスタンブロットの両方で確認できた。





D. 考察

今回、RSV-G あるいは F 遺伝子を保有する vOka ゲノムを作製した。さらに、そのウイルスゲノムからのウイルスの再構築に成功した。

その組換えウイルスを感染させた細胞において RSV-G 又は RSV-F タンパク質の発現が、IFA とウェスタンブロットの両方で確認できた。

本組換えワクチンウイルスの感染により RSV-G あるいは F タンパク質の発現が期待できる。

E. 結論

vOka に RSV-G と RSV-F の遺伝子配列を組み込むことで、RSV 抗原の G と F を発現する vOka-RSV-G 又は vOka-RSV-F ウイルスを作製することができた。このウイルスによるモルモットへの免疫試験によって、今後 RSV と VZV に対する抗体誘導を確認する。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 第 16 回ワクチン学会

平成24年 11 月 18 日(日)

森 康子「水痘ワクチンの組換えワクチンベクターとしての応用」

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)

分担研究報告書

ワクチン基礎生産技術の向上に関する研究(H24-創薬総合-一般-005)

RSウイルス遺伝子を保有する水痘ワクチンウイルスのモルモットへの免疫による免疫能誘導の
検討

研究代表者・森 康子

神戸大学大学院医学研究科・教授

医薬基盤研究所感染制御プロジェクト・チーフプロジェクトリーダー

研究分担者・岡本成史

医薬基盤研究所感染制御プロジェクト・プロジェクトリーダー

研究協力者・村上宏起

医薬基盤研究所感染制御プロジェクト・協力研究員

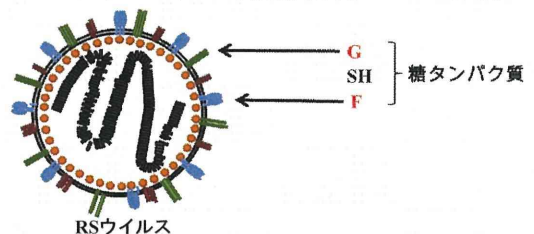
研究要旨: RSVウイルスのGあるいはFを発現する組換え水痘ワクチンをモルモットに接種した。その結果、モルモットの血清中にFおよびGに対する抗体価の誘導を確認することができた。本結果は、今回作製された組換え水痘ワクチンウイルスが、RSVおよび水痘ウイルスに対する弱毒生ワクチン候補となり得る可能性を示唆している。

A. 研究目的

水痘生ワクチンOka株(vOka株)に、RSウイルスのG抗原又はF抗原の遺伝子を組み込み、RSV-G又はRSV-Fを発現させた組換え水痘ウイルスを作製した。

そこで本研究では、本ワクチンウイルスをモルモットに免疫し、免疫したモルモットの血清中にRSV-G又はRSV-Fに対する中和抗体が誘導されるか否かを検討した。

RSウイルス(RSV)抗原発現vOkaの作製



B. 研究方法

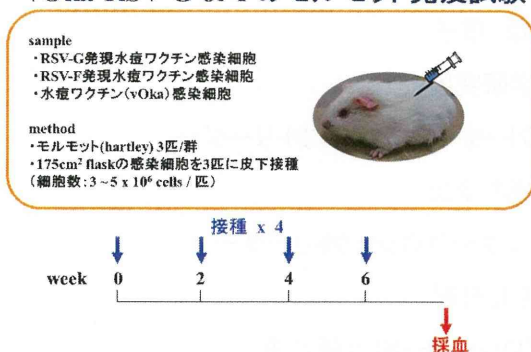
■ 1.モルモットを用いた免疫試験■

①. vOka-RSV-G 又は vOka-RSV-F ワクチン ウイルスのモルモットへの免疫

モルモットへの免疫試験により評価した。水痘ワクチン株は、モルモットに感染するが、ウイルス増殖はそれほど高くなく、また病気もまったく

引き起こさない。しかし、水痘ウイルスの宿主はヒトのみであり、適当な動物モデルが存在しないため、水痘ワクチンウイルスが唯一感染するとされているモルモットを用いた。試験では、vOka-RSV-G 又は vOka-RSV-F ウイルス感染細胞を、モルモットの皮内に接種する方法で免疫した。接種は2週間ごとに計4回行い、その後、採血をして血清中の抗体価測定を行った。

vOka-RSV-G or Fのモルモット免疫試験



②. 抗体価測定

IFA(間接免疫蛍光抗体法)により RSV-G と RSV-F に対する抗体価を測定した。RSV-G 又は RSV-F を発現させたプレートにおいて、モルモット血清を一次抗体として、IFA を行った。IFA で蛍光が観察できた血清の最大希釈倍数を抗体価とした。

次に、RSV と水痘に対する中和抗体価をプラークリダクションアッセイで測定した。判定ウイルスとして RSV-Long 株・RSV-9320 株(共に ATCC より購入)、VZV-vOka 株を用いた。

(倫理面への配慮)

本実験は医薬基盤研究所で行った。当該研究機関における承認済みの動物実験計画書に基づいて動物実験を行った。組換えウイルス実験に関しては文部科学大臣による拡散防止措置の確認および当該研究機関における組換えDNA 実験安全委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

■1.モルモットを用いた免疫試験■

②. 抗体価測定

IFA(間接免疫蛍光抗体法)

各々の遺伝子を発現する水痘ワクチンウイルスを免疫したモルモットの血清中に RSV-G あるいは RSV-F に対する抗体価の上昇が確認された。

間接免疫蛍光抗体法による抗体価測定

接種サンプル		抗G抗体価	抗F抗体価
vOka	1	1 : <100	1 : <100
	2	1 : <100	1 : <100
	3	1 : <100	1 : <100
vOka-RSV-G	1	1:3200	-
	2	1:3200	-
	3	1:3200	-
vOka-RSV-F	1	-	1:1600
	2	-	1:1600
	3	-	1:1600

プラークリダクションアッセイ

RSV, F あるいは G(A 型)を発現する水痘ワクチンウイルスを免疫したモルモットの血清中には、RSV-Long 株(A 型)に対しては中和抗体の誘導が確認できた。しかし、RSV-9320 株(B 型)に対する中和抗体の誘導は確認できなかった。

一方、水痘ウイルスに対する中和抗体価の誘導は、すべてのモルモットにおいて認められた。

水痘とRSウイルスに対する中和抗体価

	Neutralizing antibody titer against RSV-Long			Neutralizing antibody titer against RSV-9320			Neutralizing antibody titer against VZV		
vOka-RSV-G	128	128	64	<4	<4	<4	160	160	80
	64	64	32	<4	<4	<4	160	80	80
vOka	<4	<4	<4	<4	<4	<4	160	80	160

D. 考察

vOka-RSV-G 又は vOka-RSV-F をモルモットに免疫したところ、RSV(A 型)および水痘ウイルスに対する抗体誘導が認められた。本結果より本ウイルスは、RSV および水痘ウイルスの双方に効果が期待できる生ワクチン候補となり得る可能性があると考えられた。

今回、免疫した抗原と同じ A 型の株である RSV-Long 株に対して中和抗体が誘導された。しかし、異なった型である B 型の RSV-9320 株に対する中和抗体誘導は確認できなかった。A 型と B 型の両方のウイルスに対して効果があるワクチンと成り得るためには、B 型由来の遺伝子を組み込んだ組換え水痘ウイルスを作製する必要があると考えられる。

また、免疫試験では、水痘ウイルスの適切な動物モデルがなく、さらに組換え水痘ウイルスのためタイターが vOka 株よりも低いなどの理由から、組換え水痘ウイルス感染細胞をモルモットに、4 回皮下接種を行う方法を取った。しかし、感染細胞を皮下に 4 回接種というのは接種回数として多すぎると思われる。そこで、タイターが低いセルフリーウイルスを接種しても抗体価が上昇するような接種方法を検討する必要があると思われる。

E. 結論

RSV-F 又は RSV-G 発現組換え水痘ウイルス (vOka-RSV-G 又は vOka-RSV-F) は、VZV と RSV の双方に対して有効性が認められた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 第 16 回日本ワクチン学会

平成24年 11 月 18 日(日)

森 康子「水痘ワクチンの組換えワクチンベクターとしての応用」

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)

分担研究報告書

ワクチン基礎生産技術の向上に関する研究(H24-創薬総合-一般-005)

モルモットにおける水痘帯状疱疹ウイルスに対する細胞性免疫能測定の試み

研究代表者・森 康子

神戸大学大学院医学研究科・教授

医薬基盤研究所感染制御プロジェクト・チーフプロジェクトリーダー

研究協力者・定岡知彦

神戸大学大学院医学研究科・助教

研究要旨:

モルモットにおける水痘帯状疱疹ウイルスに対する細胞性免疫能の測定系を確立することを目的とし、水痘帯状疱疹ウイルスワクチン株が唯一感染可能な動物モデルであるモルモットの単核球を用いて IFN- γ ELISPOT 法による 細胞性免疫能の測定を試みた。

A. 研究目的

本研究費での全体研究では、現行の水痘ワクチン株ゲノムにRSウイルスの外来遺伝子を挿入した組換え水痘ワクチンウイルスを作製し、そのワクチン効果を判定することを目的としている。

その効果判定には動物実験が必要となるが、水痘帯状疱疹ウイルスの自然宿主はヒトのみであり、適切な動物モデルが現在のところ存在せず、水痘ワクチン株において唯一モルモットへの感染(病原性は示さない)が報告されているだけである。そこで、我々はその組換え水痘ワクチンの効果判定にモルモットを使用することとした。その効果判定には、対象とする病原体に対する液性免疫に加えて、細胞性免疫の誘導能も評価する必要があると考えられる。そこで、本研究では、まずモルモットにおける水痘帯状疱疹ウイ

ルスに対する細胞性免疫誘導能を判定するための測定系を確立する事を目指した。

B. 研究方法

モルモット脾臓より、単核球を調製し、抗モルモット IFN- γ 抗体をコートした 96 穴メンブレプレートに単核球を加え、リンパ球マイトジェンである phytohemagglutinin (PHA) を添加した。37°C、5%CO₂ 条件下で 38 時間培養した後、プレートを洗浄し、IFN- γ 分泌細胞をスポットとしてその数を測定した。スポット数の測定は、KS-ELISPOT 測定装置 (Carl Zeiss) により行った。同時に、PHA 刺激による細胞内 IFN- γ の発現上昇を、モット IFN- γ 抗体を用いた間接蛍光抗体法により確認した。

(倫理面への配慮)

本研究におけるモルモットを用いた実験は、神戸大学動物実験実施規則に則り、神戸大学動物実験委員会に申請、承認された方法により実施した。

C. 研究結果

*Ex vivo*でPHA刺激したモルモット脾臓単核球において、非刺激に比べIFN- γ の細胞内発現量の上昇を、間接蛍光抗体法により確認した。また、IFN- γ ELISPOT法によってもPHA刺激によるIFN- γ 産生の上昇を認めた。

D. 考察

本研究では、モルモット脾臓由来単核球を強力なリンパ球マイトジェンであるPHAを用いて*ex vivo*で刺激する事により、明らかなIFN- γ の発現上昇を確認できた。しかしながら、現在汎用される有用な抗モルモットIFN- γ 抗体は非常に限られており、その感度も、ヒトIFN- γ 抗体に比べると明らかに低い。細胞性免疫能測定のためのモルモットにおけるIFN- γ ELISPOT法を確立させるためには、先ず、より高感度で特異的な抗IFN- γ 抗体が必要であると考えられる。よって本測定法の確立のため、現在、新たな抗モルモットIFN- γ 抗体を作製中である。

E. 結論

本研究では、モルモット脾臓由来単核球を用いた*ex vivo*でのIFN- γ ELISPOT法を試みた。

しかし、今回用いたモルモット抗IFN- γ 抗体の反応性が悪く、測定法の確立には至らなかった。モルモットにおけるIFN- γ ELISPOT法の確立には、先ず、より感度が高くかつ特異的な抗体を作製する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

特記すべきことなし。

2. 学会発表

特記すべきことなし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特記すべきことなし。

2. 実用新案登録

特記すべきことなし。

3. その他

特記すべきことなし。

III. 研究成果の刊行に関する一覧表