

VLP を含有する pH 応答性炭酸アパタイトナノ粒子形成の検討

研究分担者 石井 孝司 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長
研究協力者 加藤 孝宣 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長
多田 誠一 理化学研究所 基幹研究所

研究要旨：JFH-1 株により C 型肝炎ウイルス（HCV）のウイルス培養系で作製した精製ウイルス粒子により中和活性の誘導が可能であることが明らかとなったが、強い免疫を誘導するためには効果的なアジュバントの開発が必要である。本研究では、近年開発された炭酸アパタイトによる蛋白質や核酸の細胞内へのデリバリー法を応用し、E 型肝炎ウイルス（HEV）とノロウイルスの VLP を炭酸アパタイト内に包埋させることが可能かどうかの検討を行った。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス（HCV）感染は持続感染化し肝臓癌に至る重大な感染症であり、現在のウイルス保有者数は世界中で 1.7 億人（HIV 感染者の 4 倍）にのぼると言われているが、インターフェロン及びリバビリンの治療効果は不十分である。輸血用血液のスクリーニングにより新規感染者数は減少したが、医療従事者などハイリスクグループに予防的ワクチンが必要である。さらに薬物常用者の HCV 感染や HIV 感染者の HCV 重感染の予防が必要である。また、治療用ワクチンの効果も期待され、HCV のワクチン開発が望まれている。

JFH-1 株により C 型肝炎ウイルス（HCV）のウイルス培養系で作製した精製ウイルス粒子により中和活性の誘導が可能であることが明らかとなったが、強い免疫を誘導するためには効果的なアジュバントの開発が必要である。近年、理化学研究所で開発された炭酸アパタイトは、炭酸イオンを含有している水酸アパタイトであり、炭酸イオンが不純物となって結晶性が低下している。歯や骨を構成する成分である水酸アパタイトと比

較した場合、結晶性の低下により析出する結晶粒子のサイズが減少する一方、酸性溶液中における溶解性が向上していることが知られている。この炭酸アパタイトと蛋白質や核酸の複合体を形成させることができるが、形成された複合体は細胞内へ効率よく導入することが可能である。また、樹状細胞へ抗原を導入することにより、複合体を形成している目的蛋白質に対する免疫を強く誘導できることも示されている。

本研究では、HEV とノロウイルスの VLP を用いて、炭酸アパタイトと VLP の複合体を形成させることが可能かどうかについて検討した。

B. 研究方法

HEV およびノロウイルスの VLP を DMEM に加え、さらに CaCl₂ を加えて室温で静置し、炭酸アパタイト-VLP 複合体を形成させた。複合体を遠心により沈殿させ、pH を酸性にすることにより複合体を再度溶解させ、含有されていた VLP 量を ELISA により測定した。

C. 研究結果

炭酸アパタイトと HEV、ノロウイルスとの複合体を形成させることができた。HEV の場合、CaCl₂ 濃度 7.8mM で添加量の約 30%弱が取り込まれた。ノロウイルスの場合、CaCl₂ 濃度 7.8mM では取り込みはほとんど見られなかったが、25.8mM まで上げると添加量の約 10%程度を取り込ませることができた。VLP により複合体形成の条件は異なり、カルシウム濃度等の条件検討が必要なことが判明した。

D. 考察

本研究により、炭酸アパタイトに VLP を結合させることが可能なことが示された。今回検討した VLP は、いずれもエンベロープ蛋白を持たないキャプシドのみで構成されるウイルスであり、エンベロープ蛋白を持つウイルスの VLP を炭酸アパタイトに結合させることができるかどうかはさらに検討が必要である。HCV の VLP を多量に取得する技術の確立が必要であり、まずバキュロウイルス発現系をさらに検討していく。また、HEV やノロウイルスの VLP を結合させた炭酸アパタイトについては、他のアジュバントを用いた場合との免疫誘導能の比較を行う。

E. 結論

HEV およびノロウイルスの VLP を結合させた炭酸アパタイトを形成させることができた。今後は、さらに複合体形成に適した条件の検討を行い、VLP を多く含有するアパタイトを作成する。また、形成されたアパタイトについてマウスなどの小動物での免疫誘導能の検討を行う。さらに、目的である HCV 粒子を含有したアパタイトを形成

させられるかどうかについても調べる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Li T.C., Yang, T., Shiota T., Yoshizaki S., Yoshida H., Saito M., Imagawa T., Malbas F., Lupisan S., Oshitani H., Wakita T. and Ishii K. Molecular detection of hepatitis E virus in rivers in the Philippines. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, in press.
2. Akazawa D., Moriyama M., Yokokawa H., Omi N., Watanabe N., Date T., Morikawa K., Aizaki H., Ishii K., Kato T., Mochizuki H., Nakamura N. and Wakita T. Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis C virus was effective both *in vitro* and *in vivo*. Gastroenterology, 145: 447-455 (2013)
3. Shiota T., Li T.C., Yoshizaki S., Kato T., Wakita T. and Ishii K. Hepatitis E virus capsid C-terminal region is essential for the viral life-cycle: Implication in viral genome encapsidation and particle stabilization. Journal of Virology, 87: 6031-6036 (2013)
4. 石井孝司 A 型肝炎、E 型肝炎 臨床と微生物 41: 72-78 (2014)
5. 石井孝司、清原知子 A 型肝炎ワクチン

BIO Clinica 28: 25-29 (2013)

2. 学会発表

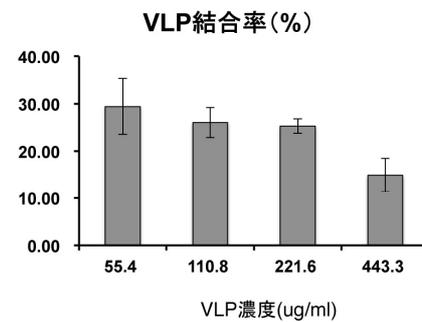
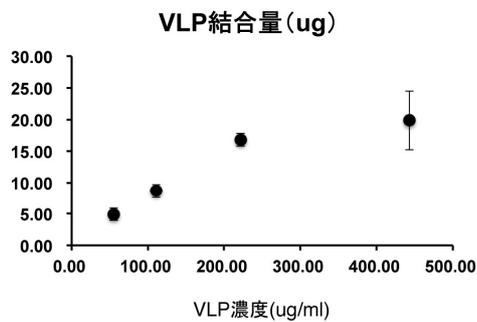
1. Yokokawa H., Moriyama M., Nakamura N., Higashino A., Akari H., Kato T., Ishii K. and Wakita T. Induction of neutralizing antibodies by vaccination with cell culture derived hepatitis C virus particles in primate model. 20th International Meeting on HCV and Related Viruses, Melbourne, Australia, October 10-14, 2013.
2. Ishii K. Epidemiological and genetic analysis of hepatitis A virus infection in Japan. 15th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim. Singapore. March 10-14, 2013
3. 宗片圭祐、安井文彦、伊藤靖、石井孝司、七戸新太郎、喜田宏、小笠原一誠、小原道法：ワクシニアウイルス DIs 株を母体としたインフルエンザ HA 組換えワクチンの混合接種によるカニクイザルでの発症予防効果、第 17 回日本ワクチン学会、平成 25 年 11 月、津
4. 清原知子、石井孝司、多田有希、脇田隆字：A 型肝炎のリスクアセスメント、第 17 回日本ワクチン学会、平成 25 年 11 月、津
5. 塩田智之、李天成、吉崎佐矢香、西村順裕、清水博之、下島昌幸、西條政幸、脇田隆字、石井孝司：E 型肝炎ウイルス感染性規定宿主因子の探索に関する研究、第 61 回日本ウイルス学会、平成 25 年 11 月、神戸
6. 石井孝司、李天成、吉崎佐矢香、塩田智之、脇田隆字：E 型肝炎ウイルスレプリコンの構築とレプリコン包埋 VLP 作成の検討、第 61 回日本ウイルス学会、平成 25 年 11 月、神戸
7. 白土東子、石田豊和、熊谷安希子、伊藤浩美、古川早苗、染谷雄一、石井孝司、脇田隆字、成松久、久保田智己：結晶構造解析と QM/MM 計算の組み合わせによるノロウイルスとルイス抗原の結合解析、第 61 回日本ウイルス学会、平成 25 年 11 月、神戸
8. 清原知子、石井孝司、杉山真也、溝上雅史、脇田隆字：小児における HBs 抗原保有率調査、第 61 回日本ウイルス学会、平成 25 年 11 月、神戸
9. 横川寛、森山正樹、中村紀子、東濃篤徳、明里宏文、加藤孝宣、石井孝司、脇田隆字：霊長類モデルを用いた培養細胞由来 HCV 粒子ワクチンの有効性の検討、第 61 回日本ウイルス学会、平成 25 年 11 月、神戸

G. 知的所有権の取得状況

なし

HEV VLPの炭酸アパタイトへの結合量

| VLP添加量 (ug) | VLP濃度 (ug/mL) | CaCl ₂ 濃度 (mM) | VLP結合率 (%) | | | 平均値 | SD |
|-------------|---------------|---------------------------|------------|-------|-------|-------|------|
| | | | a | b | c | | |
| 55.41 | 55.4 | 7.8 | 34.18 | 22.84 | 31.27 | 29.43 | 5.89 |
| 110.82 | 110.8 | 7.8 | 29.41 | 25.55 | 23.12 | 26.03 | 3.18 |
| 221.64 | 221.6 | 7.8 | 26.99 | 24.92 | 24.02 | 25.31 | 1.52 |
| 443.27 | 443.3 | 7.8 | 11.44 | 18.45 | 14.93 | 14.94 | 3.51 |



ノロウイルスVLPの炭酸アパタイトへの結合量

| VLP添加量 (ug) | CaCl ₂ 濃度 (mM) | VLP結合率 (%) | | | 平均値 | SD |
|-------------|---------------------------|------------|-------|-------|-------|------|
| | | a | b | c | | |
| 15 | 7.8 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 15 | 13.8 | 8.39 | 4.33 | 4.93 | 5.88 | 2.19 |
| 15 | 19.8 | 5.58 | 6.76 | 4.98 | 5.77 | 0.91 |
| 15 | 25.8 | 11.92 | 10.97 | 10.89 | 11.26 | 0.57 |
| 15 | 31.8 | 9.49 | 12.58 | 12.50 | 11.52 | 1.76 |

