

## マーモセットを用いたHCV粒子ワクチンの有効性の検討

研究分担者 成見 英樹 東レ株式会社医薬研究所 主席研究員

研究要旨：我々は不活化した培養細胞由来HCV粒子を免疫抗原とするHCVワクチンの開発を目指している。本研究では霊長類モデルとしてマーモセットを選択し、不活化HCV粒子の免疫原性と安全性を評価した。不活化HCV粒子免疫マーモセットの血中抗体価測定の結果、投与したHCV粒子のエンベロープタンパク質だけでなく、遺伝子型の異なるHCV粒子のコアタンパク質を認識する抗体が検出された。しかしながら投与個体により抗体誘導能が異なることがわかった。体重比抗原量に有意な差は無いことから、この抗体誘導能の差はアジュバントの抗原増強能やマーモセットの個体差に起因するものと考えられる。また、免疫したマーモセットの病理学的組織解析および生化学的血液検査において、安全面で懸念される事象は認められなかった。

### A. 研究目的

HCVのワクチン開発が進まなかった最大の理由として、ウイルスが培養細胞系で増殖しなかったこと、宿主域が狭くヒト及びチンパンジー以外の動物に感染・発症しないことが挙げられる。脇田らが劇症肝炎患者から分離したJFH-1株は、これまでのHCV株と比較して培養細胞における複製能力が非常に高く、JFH-1株の合成全長RNAを培養細胞に導入することにより感染性ウイルス粒子が分泌され、さらにJFH-1の非構造遺伝子と他のHCV株の構造遺伝子からなるキメラウイルスも作製できることが分かった。我々は、これまでに本ウイルス産生系で、感染性ウイルスを調製して、ウイルス感染中和活性のアクセシ系の樹立に成功した。また部分精製したウイルス粒子を小動物に免疫し、感染中和活性が誘導されることを実証してきた。さらにワクチンの実用化を目的として、霊長類モデルとしてのアカゲザルにおけるHCVワクチンの免疫原性と安全性を評価するとともに、ヒトに投与できる可能性のあるアジュバントの免疫誘導能を検討してきた。3頭のアカゲザルについて、HCV粒子とAlumアジュバント、Alum+CpGアジュバントまたはMPL+TDMアジュバントを組み合わせ、HCVワクチンとして免疫した結果、HCVエンベロープタンパク質であるE1およびE2タンパク質に対する抗体の誘導を確認した。

また、アジュバントと抗原の組み合わせによって、抗体誘導結果が異なることが示唆されたが、個体ごとの体重差が大きく、体重比抗原量による抗体誘導能の差が現れたとも考えられた。これに対し本研究では、比較的小型で体重コントロールが容易なマーモセットを用い、HCV粒子ワクチンの免疫原性および安全性の検討を行ったので報告する。

### B. 研究方法

#### 1. 免疫抗原の調製

##### (1) 感染性 HCV の大量培養

$5 \times 10^5$  個の Huh7 細胞を 10 cm ディッシュに播種し、翌日に感染性 HCV (J6/JFH1 : J6CF 株と JFH-1 株のキメラウイルス、遺伝子型 2a) 濃縮液を multiplicity of infection (MOI) が 0.2 となるように 500  $\mu$ L の溶液量で接種した。15 分毎に軽く振とうし、37°C でインキュベーションした。2 時間後、ウイルス液を除去し、PBS で洗浄して 10% FBS 含有 DMEM (DMEM-10) を 8 mL 添加後、培養した。サブコンフルエントに達した時に、225 cm<sup>2</sup> フラスコ (Corning 社) に継代培養し、さらにセルスタック (5 段、Corning 社) に継代培養した。セルスタック培養は 650 mL の培養液で行い、DMEM-10 で播種した翌日に 2% FBS 含有 DMEM (DMEM-2) に培養液交換した。その 3 日後に培

養上清を回収し、650 mL の DMEM-2 培養液を添加してさらに培養した。その 2 日後に培養液回収、DMEM-2 添加を行い、さらに 2 日後、培養液を回収する操作を行い、計 650 mL×3 の培養液を回収した。得られた培養液は 0.45 μm フィルター濾過を行い、使用するまで-80℃で保存した。

### (2) 限外濾過膜による濃縮・精製

上記に示したように調製した感染性 HCV を含む 21 L の培養上清をホローファイバー-UFP-500-C-8A (GE Healthcare 社) で濃縮した。1 L/min の定流速条件下、膜間差圧を 4 で 80 倍濃縮した。その後、等量の PBS を添加してダイアフィルトレーションを 5 回行った。次に、250 mL の PBS を 0.5 L/min の流速で 5 分間循環させることで限外濾過膜を洗浄して回収し、濃縮液と混合して最終濃縮液とした。

### (3) ショ糖密度勾配遠心

10-60 % (w/v) ショ糖含有 20 mM Tris-HCl (pH7.4) -150 mM NaCl-0.05 mM EDTA (TNE バッファー) を調製し、Ultra-Clear™ Centrifuge Tubes (BECKMAN 社) に 60 %、50 %、40 %、30 %、20 % および 10 % ショ糖/TNE の順に 2 mL ずつ重層した後、上記のように調製した溶出プール画分を 23 mL をさらに重層した。重量を測定しバランスを合わせた後、Optima L-70K (BECKMAN 社) で SW28 ローターにて 28,000 rpm、4 分、4 時間遠心分離した。遠心後のチューブは 25G 注射針 (テルモ社) を用いて下部を穿刺し、1.5 mL チューブに約 1 mL ずつ 14 分画を抽出した。予め重量を測定しておいた 1.5 mL チューブに 100 μL の各分画を分注し、分注後のチューブ重量を測定して比重を算出した。

各分画に含まれる HCV 粒子の定量は Lumipulse (富士レビオ社) を用いて HCV コアタンパク質を検出して求めた。また各分画に含まれる総タンパク質量は protein assay reagent (Bio-rad 社) を用いて Bradford 法で実施し、最終的な精製効率を求めた。調製された HCV 粒子は 60 pmol/tube となるようにスクリーキャップチューブに分注し、使用まで-80℃で保存した。

2. マーモセットを用いた HCV 粒子の免疫原性および安全性の評価

### (1) 精製 HCV 粒子のマーモセットへの免疫

HCV 抗原は、J6/JFH1 培養上清から限外ろ過膜およびショ糖密度勾配遠心により精製した HCV 粒子を使用した。1 回の投与量は、1 匹あたり 60 pmol の HCV コアタンパク質に相当する HCV 粒子とした。アジュバントには、Alum(Imject Alum; Thermo SCIENTIFIC 社) を用いた。

マーモセット 3 匹への投与は京都大学霊長類研究所にて行った。投与する精製 HCV 粒子は 5 分間の UV 照射によって不活化させた。投与 2 週間前に採血をした後、1 匹あたり 60 pmol の HCV コアタンパク質に相当する HCV 粒子と Alum 250 μg を混合し、0、4 および 12 週に左右大腿筋 4 カ所に筋肉内接種した。それぞれの投与日、投与 2 日後および 8、16 週に採血した。採血後、Ficoll 2mL 上に血液 1 mL を充填し、400×g、20 分、30 分間で遠心分離を行い、血漿成分を回収した。血漿は使用時まで-80℃で保存した。免疫終了したマーモセットは投与開始 16 週後に全採血および臓器摘出を行い、摘出臓器は安全性評価のためにホルマリンにて固定した。

### (2) マーモセットの生化学的血液検査および病理学的組織解析

生化学的血液検査は、BUN、TP、ALB、GOT、GPT、LDH、ALP、WBC、RBC、Hb、Ht、MCV、MCH、MCHC、PLT および CRP の 16 項目について検査した。

病理学的組織解析は、心臓、腎臓 (左右)、肝臓、脾臓のホルマリン固定検体について HE 染色を行い、病理学的組織解析を行った。

### (3) 血漿中の抗 HCV 抗体価の測定

抗原となる J6CF E1/FLAG 融合組換え型タンパク質、J6CF E2/FLAG 融合組換え型タンパク質および遺伝子型 1 のコアタンパク質である HCV-213 (Prospec 社) を PBS で 1 μg/ml に希釈し、イムノプレート (Nunc™ 社、#439454) に 50 μL/well ずつ分注し、室温で 2 時間あるいは 4 分で一晩静置

した。その後、抗原溶液を捨て、Milli Q水で5倍希釈したブロッキング・ワン(ナカライテスク社、#03953-95)を200  $\mu$ L/well ずつ添加し、室温で1時間静置した。ブロッキング終了後、ブロッキング溶液を捨て、PBS /0.05 % Tween20 を150  $\mu$ L/well で添加し2回洗浄した。PBS /0.05 % Tween20 で100~10000倍に希釈した血漿を50  $\mu$ L/well ずつ添加し、室温で1.5時間静置した。血漿溶液を捨ててPBS /0.05 % Tween20 150  $\mu$ L/well で3回洗浄し、続いてPBS /0.05 % Tween20 で5000倍に希釈したHRP-anti monkey IgG (BETHYL 社、#A140-102P)を50  $\mu$ L/well ずつ添加して室温で1時間静置した。抗体溶液を捨ててPBS /0.05 % Tween20 150  $\mu$ L/well で4回洗浄し、ペルオキシダーゼ用発色キット(住友ベークライト社、#ML-1120T)の発色溶液に1/100量の基質液を添加したものを50  $\mu$ L/well ずつ添加した。5~15分間静置し、青色の発色が適度になったら停止液を50  $\mu$ L/well ずつ添加して反応を停止させ、プレートリーダー(BIORAD 社、Benchmark Plus または PerkinElmer 社、ARVO X4)にて450 nmの吸光度を測定した。

#### (倫理面の配慮)

本研究計画の実験計画は所属施設に提出されその承認を得ている。取り扱うすべてのDNAおよび病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験施設で取り扱われる。取り扱うすべてのDNAに関して組み換えDNA実験計画を提出し承認を得ている。また、本研究は、京都大学霊長類研究所との共同研究であり、マーモセットを用いた実験は、京都大学の動物実験委員会で承認された実験計画に基づき、倫理的配慮を行いながら実験を実施した(承認番号2013-061、研究課題名「HCV不活化ワクチン接種実験」)。ヒトの遺伝子解析を行う予定はない。

### C. 研究結果

#### 1. マーモセットの生化学的血液検査および病理学的組織解析

生化学的血液検査について検討した結果、3匹のマーモセットについて、肝臓の毒性マーカーおよび炎症マーカーに著変は見られなかった。

病理学的組織解析の結果、心臓については単核球浸潤および微小出血、肝臓については小肉芽腫、腎臓については間質における単核細胞浸潤、尿細管における尿円柱、尿細管上皮における色素沈着が認められた。一方、脾臓には著変は認められなかった。

#### 2. 血漿中の抗HCV抗体価の測定

Alumをアジュバントとして不活化HCV粒子を投与したマーモセット3匹(識別番号:cj239, cj265, cj203)から採取した血漿中に含まれる抗HCV抗体価をEIAにて評価した。

J6E2/FLAGを抗原として用いたEIAにおいて、マーモセットcj239は抗原投与開始後8週から抗E2抗体価の上昇が認められ、ワクチン投与3回目後の血漿でも同様の抗体価上昇が認められた。これに対しcj265ではワクチン投与開始16週後まで抗体価の上昇が認められなかった。cj203ではワクチン投与開始4週後の早い段階から効果が上昇しており、その誘導はcj239と同等であった。

J6E1/FLAGを抗原としたEIAでは、抗E1抗体価はJ6E2/FLAGのEIAと同様の結果であったが、cj203の抗体価はcj239の3倍以上高い値であった。

HCVワクチンの汎用性を確認するために、遺伝子型1のコアタンパク質であるHCV-213を抗原としたEIAを行った。その結果、cj239ではJ6E2/FLAGおよびJ6E1/FLAGと同様ワクチン投与開始後12週および16週にて遺伝子型1に対する抗コア抗体価の上昇が認められた。しかしながら他個体では抗体価の上昇は認められなかった。

#### D. 考察

我々は、細胞培養系で産生された感染性HCV粒子をUVで不活化した不活化HCV粒子をワクチンとして開発しようと試みている。本検討では、この不活化HCV粒子の免疫原性および安全性を評価することを目的として、また体重比抗原量の影響

を考慮して小型の霊長類であるマーモセットを用いて検討を行った。マーモセットは霊長類における実験モデル動物として広く利用され、またワクチン投与実績もある。本検討ではマウスで感染中和抗体誘導が認められる抗原量（2 pmol core protein / 20 g body weight）を指標として、マーモセットの体重（約 300 g）から投与量を算出した（60 pmol core protein / 300 g body weight）。アジュバントはアカゲザルにて感染中和抗体誘導が認められた Alum に固定し、不活化 HCV 粒子と混合してマーモセット大腿筋内 4 カ所に投与した。

安全面において、ワクチン投与部位にはアジュバントに起因する軽度の炎症以外の所見は認められず、その炎症も投与後速やかに消失した。生化学的血液検査の結果、ワクチンを投与した 3 匹のマーモセットについて、肝臓の毒性マーカーおよび炎症マーカーに著変は見られなかった。実験殺後、摘出した臓器を用いて病理学的組織解析を行ったところ、いくつかの所見（心臓：単核球浸潤および微小出血、肝臓：小肉芽腫、腎臓：間質における単核細胞浸潤、尿管における尿円柱、尿管上皮における色素沈着。）が認められたが、これら所見はいずれも軽度であり、主に実験殺時の操作（過麻酔および全採血）によって引き起こされる症状であることから、ワクチンとは直接関係が無いと考えられた。

血漿抗体価の検討では、免疫したマーモセット 3 匹中 2 匹に抗体の誘導が認められる結果となった。これらマーモセットは体重差がほとんど無く、体重比抗原量にも差が無い。また十分な抗原量を投与していると考えられることから、抗原量不足とは考えづらい。抗体誘導に関しても、抗体価上昇が認められたマーモセット cj239 と cj203 では差があり、cj239 では E1 および E2 に対してほぼ同等の抗体価上昇が認められたが、cj203 では E1 に対する抗体価が E2 に対する抗体価の 3 倍以上高かった。また、遺伝子型 1 のコアタンパク質に対する抗体は cj239 では認められたが、cj203 では検出されなかった。以上の結果から、不活化 HCV 粒子ワクチンの免疫原性は、霊長類では個体差が大きい

事が示唆された。今後、Alum 以外のアジュバントを用いてマーモセットに免疫し、不活化 HCV 粒子の免疫原性をより高めるアジュバントの検討および投与条件の検討を行う。

#### E. 結論

霊長類モデルとしてマーモセットを選択し、HCV 粒子の免疫原性の検討を行った。抗原量は 60 pmol/head に固定し、アジュバントは Alum を選択した。3 回免疫の結果、cj239 は E1 および E2 に対する抗体価上昇を認めた。Cj265 は抗体価の上昇が認められなかった。Cj203 は免疫開始 4 週後から顕著な抗体価上昇が認められた。本検討の結果、HCV 粒子ワクチンの免疫原性は霊長類では個体差が大きい事が示唆された。免疫時の臨床所見、解剖時の肉眼的観察の結果は正常であった。また病理学的組織解析においていくつかの所見が認められたが、大きな問題とならないことを確認した。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1.論文発表

なし

##### 2.学会発表

なし

#### H.知的所有権の出願・取得状況

##### 1.特許取得

なし

##### 2.実用新案登録

なし

##### 3.その他

なし