

20140701/A

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26年度 総括・分担研究報告書

平成27（2015）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 26 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 26 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

研究協力者

湯 華民 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

研究協力者

村上 宏起 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

## 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 ウイルス抗原発現水痘ワクチンウイルスのモルモットにおける有効性の 検討 -----	4
森 康子・村上 宏起	
2. モルモットIFN- $\gamma$ Elispot法確立のための抗体作製 -----	7
森 康子・湯 華民	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	11
---------------------------	----

# I. 総括研究報告

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：

RSV 遺伝子を発現する水痘ワクチンウイルスを作製し、モルモットに免疫することによってその効果を判定した。複数回投与により RSV の両型に対する中和抗体産生を誘導できることが明らかとなった。さらに細胞性免疫を測定するためのモルモット IFN- $\gamma$  に対する抗体を作製した。本研究によって作製された組換え水痘ワクチンウイルスは、RSV および水痘に対する多価ワクチン候補となり得る可能性が示唆された。

A. 研究目的

水痘生ワクチンは世界中で広く使用されている水痘に対する有効なワクチンである。日本で確立されたOkaワクチン株(vOka)は現在世界中で使用されている。我々は他の病原体の遺伝子をvOkaゲノムに組み込んだ組換え水痘ウイルスを作製し、水痘ウイルスおよび他の病原体の感染も同時に防御できる多価ワクチンの開発を目指している。本研究ではそのvOka ゲノムにRSVの遺伝子を組み込んだ組換え水痘ウイルスを作製し、有効性を検討することを目的とした。本年度は作製した組換え水痘ウイルスをモルモットに複数回接種することでRSVに対する有効性を検討した。

さらに細胞性免疫能を測定するための系の確立を目指した。

B. 研究方法

1. rvOka-RSV-A-F、rvOka-RSV-B-F セルフリーウイルスを、モルモットへ経気道接種で免疫した。接種は複数回(3回)行った。その後、採血をして血清中の抗体価測定を行った。間接蛍光

抗体法(IFA)によりRSV-Fに対する抗体価を測定した。同時に、RSVと水痘ウイルス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。標的ウイルスとしてRSV-Long株、RSV-9320株(共にATCCより購入)、VZV-vOka株を用いた。

2. モルモットIFN- $\gamma$  遺伝子をヒト抗体のFc部分とfusionさせ、そのC末端にヒスチジンタグを付加した。次に、そのモルモットIFN- $\gamma$  遺伝子カセットを哺乳類細胞発現ベクターにクローニングした。作製したベクターを293T細胞に導入し、その培養上清を回収した。最後に、回収した培養上清から、Ni-NTAを用いて、モルモットIFN- $\gamma$  の精製を行った。上記で精製したモルモットIFN- $\gamma$  抗原を複数回マウスに免疫後リンパ節を採取し、それらから分離した細胞をマウスの骨髄がん細胞であるSP2細胞と融合させ、数種のハイブリドーマを樹立した。モノクローナル抗体のスクリーニングは、モルモットIFN- $\gamma$  を発現させた293T細胞を用いた間接蛍光抗体法により行った。モルモットIFN- $\gamma$  遺伝子を発現させた293T細胞を溶解し、その溶解液と作製したモルモットIFN- $\gamma$  モノクロー

ーナル抗体を用いた免疫沈降法にて、作製した抗体とモルモット IFN- $\gamma$ との結合を調べた。

(倫理面への配慮)

本研究に関する動物実験は、当該研究機関における動物実験委員会の承認を得ている。

組換えウイルス実験に関しては大臣確認および当該研究機関における遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得ている。

## C. 研究結果

### 1. モルモットへの免疫による検討

免疫回数を増やすことでrvOka-RSV-A-F又はrvOka-RSV-B-Fで免疫した両群で、IFAによりRSV-A-FとRSV-B-Fの両方に対する抗体価の上昇が確認された。加えて、免疫回数を増やすことで、rvOka-RSV-A-F又はrvOka-RSV-B-Fを接種した群で、RSV-A型とRSV-B型の両方に対する中和抗体が誘導されていた。

### 2.モルモット IFN- $\gamma$ の作製と抗体作製

我々は感度の高いモルモット IFN- $\gamma$  抗体を作製するため、ナチュラルフォームのモルモット IFN- $\gamma$  抗原の作製を試みた。我々はモルモット IFN- $\gamma$  遺伝子を哺乳類細胞発現ベクターに挿入し、作製したベクターを哺乳類細胞である293T細胞に導入した後、その培養上清中からのモルモット IFN- $\gamma$  タンパク質の精製に成功した。上記で精製した抗原をマウスに免疫し、そのリンパ節から、2 クローンのモルモット IFN- $\gamma$  抗体を分泌するハイブリドーマを樹立することができた。

## D. 考察

モルモットにおいて RSV および水痘ウイルスに対する中和抗体を誘導できる組換え水痘ウイルスを作製した。モルモット IFN- $\gamma$  に対する抗体を作製した。

## E. 結論

今後は実用化を目指した臨床研究へ進めていく必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

[1]. 村上 宏起, 森 康子

総説「グローバル感染症 3. 多価生ワクチン - 現行の水痘生ワクチンをベースとして -」

最新医学

第69巻、第4号、810-818ページ、2014年4月

[2]. Murakami K, Mori Y. Use of a current varicella vaccine as a live polyvalent vaccine vector. *Vaccine*. 2014 Nov 11 [Epub ahead of print].

### 2. 学会発表

[1]. International Herpesvirus Workshop 2014

Saturday, July 19, 2014

Kouki Murakami, Masaaki Matsuura, Pranee

Somboonthum, Koichi Yamanishi, Yasuko Mori

Satellite workshop

「Construction of a recombinant varicella zoster vaccine expressing respiratory syncytial virus fusion protein」

[2]. International Herpesvirus Workshop 2014

Sunday, July 20, 2014

Kouki Murakami, Masaaki Matsuura, Pranee

Somboonthum, Koichi Yamanishi, Yasuko Mori

Poster

「Construction of a recombinant varicella zoster vaccine expressing respiratory syncytial virus fusion protein」

[3]. 第 18 回 日本ワクチン学会学術集会

2014年12月6日（土）

村上 宏起、松浦 正明、五味 康行、山西 弘  
一、森 康子

「モルモットにおけるRSウイルス抗原発現組換え  
水痘ワクチンウイルスのワクチン効果について」

G. 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

H. 健康危険情報

特記すべきことなし

## II. 分担研究報告



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)

1. RS ウイルス抗原発現水痘ワクチンウイルスのモルモットにおける有効性の検討

研究代表者・森 康子

神戸大学大学院医学研究科・教授

研究協力者・村上 宏起

神戸大学大学院医学研究科

研究要旨:

RS ウイルス (RSV) A 型の F タンパク質又は、B 型の F タンパク質を発現する組換え水痘ワクチンウイルスをそれぞれ作製した。これらのウイルスをモルモットに接種し、その後、追加接種を行い、ブーストをかけた。その結果、モルモットの血清中に RSV-A 型と B 型に対する抗体の誘導を確認することができた。本成果はワクチンの接種により RSV の両型のウイルス感染を防御できるワクチンと成り得る可能性を示している。

A. 研究目的

我々はこれまでに水痘生ワクチン Oka 株 (VZV-vOka 株) に、RSV の A 型の F タンパク質 (RSV-A-F) 又は G タンパク質 (RSV-A-G) の遺伝子を組み込み、RSV-A-F 又は RSV-A-G を発現する組換え水痘ワクチンウイルス (rvOka-RSV-A-F, rvOka-RSV-A-G) を作製した。さらにこれらをモルモットに2回免疫することで、RSV に対する中和抗体を誘導できることを明らかにしてきた。しかし、RSV-A 型の株である RSV-Long 株に対しての中和抗体は誘導されていたが、RSV-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。

RSV に対するワクチン開発には RSV A 型と B 型の両方に対して有効であるワクチン開発が望まれる。そのため、今年度は接種回数を増やしてその効果を確認した。

B. 研究方法

(1) モルモット免疫試験

①. 接種

rvOka-RSV-A-F, rvOka-RSV-B-F セルフリーウイルスを、モルモットへ経気道接種で免疫した。接種は2週間ごとに2回行い、後日、追加接種を1回行い、ブーストをかけた。その後、採血をして血清中の抗体価測定を行った (図1)。

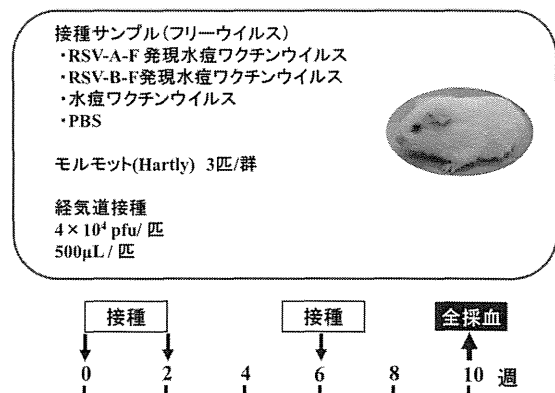


図1 モルモット免疫試験 接種スケジュール

## ②. 抗体価測定

間接蛍光抗体法（IFA）によりRSV-Fに対する抗体価を測定した。RSV-A-F 又は RSV-B-F を発現させた細胞を用い、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 と水痘ウイルス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。標的ウイルスとして 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）

本研究に関する動物実験は、当該研究機関における動物実験委員会の承認を得ている。

組換えウイルス実験に関しては大臣確認および当該研究機関における遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得ている。

## C. 研究結果

### (1) モルモット免疫試験-経気道接種

#### ②. 抗体価測定

IFA(間接蛍光抗体法)

免疫回数を増やすことでrvOka-RSV-A-F又はrvOka-RSV-B-Fで免疫した両群で、IFAによりRSV-A-FとRSV-B-Fの両方に対する抗体価の上昇が確認された（表1）。

プラークリダクションアッセイ

水痘ウイルスに対する中和抗体が、コントロールの水痘ワクチン接種群も含めて確認できた。加えて、免疫回数を増やすことで、rvOka-RSV-A-F 又は rvOka-RSV-B-F を接種した群で、RSV-A型とRSV-B型の両方に対する中和抗体が誘導されていた（図2）。

表1 間接蛍光抗体法による抗体価

接種サンプル	抗RSV-A-F 抗体価	抗RSV-B-F 抗体価
RSV-A-F 発現 水痘ワクチンウイルス	1600	1333
RSV- B-F発現 水痘ワクチンウイルス	1600	2133
水痘ワクチンウイルス	<100	<100
PBS	<100	<100

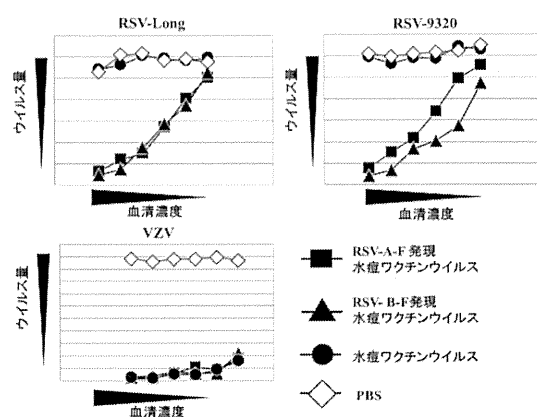


図2 RSVとVZVに対するウイルス中和活性

## D. 考察

RSV-A型のFタンパク質とB型のFタンパク質を発現する組換え水痘ワクチンウイルスをそれぞれ作製し、これらのウイルスをモルモットに接種した。その際に、接種回数を複数回にすることで、モルモットの血清中に、水痘ウイルスに加えて、A型とB型のRSVの両方に対する中和抗体の誘導を確認することができた。

## E. 結論

RSVのA型とB型の両方のサブグループに対する中和抗体が、モルモットにおいて誘導できていた。rvOka-RSV-Fは、水痘ウイルスとRSVに対して効果があると思われる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

[1]. 村上 宏起、森 康子

総説「グローバル感染症 3. 多価生ワクチン  
- 現行の水痘生ワクチンをベースとして -」  
最新医学  
第69巻、第4号、810-818ページ、2014年4月

[2]. Murakami K, Mori Y. Use of a current varicella vaccine as a live polyvalent vaccine vector. *Vaccine*. 2014 Nov 11 [Epub ahead of print].

### 2. 学会発表

[1]. International Herpesvirus Workshop 2014  
Saturday, July 19, 2014

Kouki Murakami, Masaaki Matsuura, Pranee Somboonthum, Koichi Yamanishi, Yasuko Mori  
Satellite workshop  
「Construction of a recombinant varicella zoster vaccine expressing respiratory syncytial virus fusion protein」

[2]. International Herpesvirus Workshop 2014  
Sunday, July 20, 2014

Kouki Murakami, Masaaki Matsuura, Pranee Somboonthum, Koichi Yamanishi, Yasuko Mori  
Poster  
「Construction of a recombinant varicella zoster vaccine expressing respiratory syncytial virus fusion protein」

[3]. 第18回 日本ワクチン学会学術集会  
2014年12月6日(土)

村上 宏起、松浦 正明、五味 康行、山西 弘一、森 康子  
「モルモットにおけるRSウイルス抗原発現組換え水痘ワクチンウイルスのワクチン効果について」

## G. 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

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）

2. モルモット IFN- $\gamma$  Elispot 法確立のための抗体作製

研究代表者・森 康子

神戸大学大学院医学研究科・教授

研究協力者・湯 華民

神戸大学大学院医学研究科・助教

研究要旨：

水痘生ワクチン株をベースとして開発した多価ワクチンの評価にあたり、実験動物での細胞性免疫の誘導効果の評価が不可欠だと考えられる。そこで、水痘生ワクチン株が感染可能な唯一の動物モデルであるモルモットにおける細胞性免疫測定法の開発を試みた。

A. 研究目的

本研究の最終的な目的は水痘生ワクチン株に、RS ウイルス（RSV）の G タンパク質あるいは F タンパク質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である。

作製したウイルスのワクチン効果を判定するため、まず実験動物での効果判定が不可欠だと考えられる。水痘生ワクチン株は唯一モルモットへの感染が報告されている。そこで、我々は、細胞性免疫応答によって誘導される IFN- $\gamma$  を測定し（IFN- $\gamma$  Elispot 法）、モルモットにおける細胞性免疫応答の評価系を確立することを目指した。

昨年度、我々は数種類のモルモット IFN- $\gamma$  モノクローナル抗体の作製に成功し、モルモット IFN- $\gamma$  Elispot 法の開発に成功したが、実験の結果から、より感度の高い抗体が必要であることが明らかとなったため、本年度はその抗体の作製を目的とした。

B. 研究方法

(1) 抗体作製のためのナチュラル抗原の作製

モルモット IFN- $\gamma$  遺伝子をヒト抗体の Fc 部分と fusion させ、その C 末端にヒスチジンタグを付加した。次に、そのモルモット IFN- $\gamma$  遺伝子カセットを哺乳類細胞発現ベクター（pCAGGS）にクローニングした。作製したベクターを 293T 細胞に導入し、その培養上清を回収した。最後に、回

収した培養上清から、Ni-NTA を用いて、モルモット IFN- $\gamma$  の精製を行った。

#### (2) モルモット IFN- $\gamma$ に対するモノクローナル抗体の作製

上記で精製したモルモット IFN- $\gamma$  抗原を複数回マウスに免疫後リンパ節を採取し、それらから分離した細胞をマウスの骨髄がん細胞である SP2 細胞と融合させ、数種のハイブリドーマを樹立した。モノクローナル抗体のスクリーニングは、モルモット IFN- $\gamma$  を発現させた 293T 細胞を用いた間接蛍光抗体法により行った。

#### (3) モルモット IFN- $\gamma$ モノクローナル抗体と抗原との結合能の検討

モルモット IFN- $\gamma$  遺伝子を発現させた 293T 細胞を可溶化 buffer で溶解し、その溶解液と作製したモルモット IFN- $\gamma$  モノクローナル抗体を用いた免疫沈降法にて、作製した抗体とモルモット IFN- $\gamma$  との結合を調べた。

#### (4) 作製したモルモット IFN- $\gamma$ に対するモノクローナル抗体を用いたモルモット IFN- $\gamma$ の測定の試み (Elispot 法)

モルモット脾臓より単核球を分離し、上記で作製したモルモット IFN- $\gamma$  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、PHA を添加した。37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 40 時間培養した後、プレートを洗浄し、IFN- $\gamma$  分泌細胞数をスポットとして計測した。

(倫理面への配慮)

本研究に關与する動物実験は、当該研究機関における動物実験委員会の承認を得ている。

遺伝子組換え実験に關しては当該研究機関における遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得ている。

### C. 研究結果

#### (1) ナチュラルフォームのモルモット IFN- $\gamma$ の作製および精製

昨年度、我々は大腸菌でのタンパク質発現系を用いて、モルモット IFN- $\gamma$  抗原の作製および精製を行った。大腸菌で作製した抗原はナチュラルフォームであるか否かは不明であり、また、その糖鎖修飾も哺乳類細胞で発現したタンパク質と異なっている。そこで、我々は感度の高いモルモット IFN- $\gamma$  抗体を作製するため、ナチュラルフォームのモルモット IFN- $\gamma$  抗原の作製を試みた。

我々はモルモット IFN- $\gamma$  遺伝子を哺乳類細胞発現ベクターに挿入し、作製したベクターを哺乳類細胞である 293T 細胞に導入した後、その培養上清中からのモルモット IFN- $\gamma$  タンパク質の精製に成功した (図 1)。

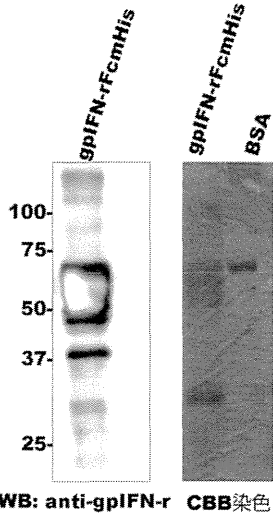


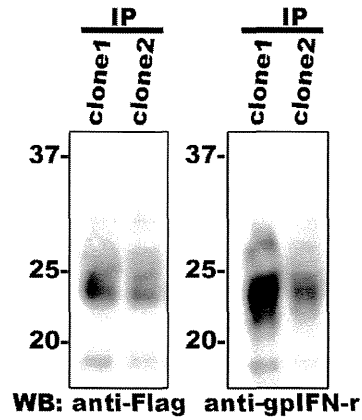
図 1 哺乳類細胞からモルモット IFN- $\gamma$  抗原の精製に成功

(2) モルモット IFN- $\gamma$  抗体の作製

上記で精製した抗原をマウスに免疫し、そのリンパ節を採取し、ハイブリドーマの作製を試みたところ、2 クローンのモルモット IFN- $\gamma$  抗体を分泌するハイブリドーマの樹立に成功した。

(3) 作製した抗体がナチュラルフォームのモルモット IFN- $\gamma$  を認識

我々は作製した抗体が、哺乳類の細胞で発現したモルモット IFN- $\gamma$  を認識するか否かを調べるため、免疫沈降実験を行った。その結果、今回作製した抗体はモルモット IFN- $\gamma$  を認識することが確認された(図 2)。



※免疫沈降の実験には Flag タグ付きのモルモット IFN- $\gamma$  を発現させた細胞を用いた。

図 2 モルモット IFN- $\gamma$  抗体は哺乳類細胞由来モルモット IFN- $\gamma$  を認識

(4) 作製したモルモット IFN- $\gamma$  抗体の Elispot 法への応用

作製した抗体を用いて、Elispot 法で PHA の刺激によって産生されたモルモット IFN- $\gamma$  の測定を試みたところ、spot の検出は確認されたが、コントロールと比べ、大幅な spot 数の上昇は認められなかった。

D. 考察

水痘生ワクチン株をベースとした多価ワクチンの細胞性免疫誘導能の評価には、感度のよいモルモット IFN- $\gamma$  Elispot 法の開発が不可欠だと考えられる。昨年度我々はモルモット IFN- $\gamma$  Elispot 法を開発したが、それに際してより感度の高い抗体の使用が必要であるという結果が得られたため、今回 Elispot 法の基本となる抗体の作製を試みた。

ナチュラルフォームのモルモット IFN- $\gamma$  を認識する抗体を作製するため、我々は哺乳類の細胞である 293T 細胞を用いて、モルモット IFN- $\gamma$  抗

原を作製した。その抗原を用いて作製した抗体は免疫沈降法において、293T 細胞で発現させたモルモット IFN- $\gamma$ との結合が確認された。それらの抗体を用いて PHA の刺激によって産生されたモルモット IFN- $\gamma$  の測定を試みたところ、spot が検出されたものの、コントロールと比べ、大幅な spot 数の上昇は認められなかったため、本実験に関しては再検討が必要であると考えられる。今後は、モルモット細胞からの IFN- $\gamma$  の分泌量などの詳細を解析し、更なる抗体の作製を含めた実験条件の検討が必要であると考えられる。

#### E. 結論

哺乳類細胞由来モルモット IFN- $\gamma$  を抗原とした抗体作製に成功した。Elispot 法の改良のため、更なる条件検討が必要である。

#### F. 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

#### G. 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



研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	特記事項なし						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
村上宏起 森 康子	総説 グローバル感染症 3. 多価生ワクチン -現行 の水痘生ワクチンをベ ースとして-	最新医学	第69巻 第4号	810-818	2014年4月
Murakami K, Mori Y.	Use of a current varicella vaccine as a live polyvalent vaccine vector	Vaccine			印刷中

