

201407014B

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-平成26年度 総合研究報告書

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 24 年度-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

研究組織

研究代表者（平成 24 年度-平成 26 年度）

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（平成 24 年度）

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（平成 24 年度）

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

研究協力者（平成 25 年度-平成 26 年度）

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（平成 24 年度-平成 26 年度）

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（平成 24 年度）
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（平成 25 年度-平成 26 年度）

目 次

I. 総括総合研究報告

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. 分担総合研究報告

1. RSウイルス抗原を発現する水痘ワクチンウイルスの作製 -----	5
森 康子・村上 宏起	

2. 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への免疫に よる有効性の検討 -----	9
森 康子・村上 宏起・岡本 成史	

3. モルモットにおける細胞性免疫測定法構築の試み -----	15
森 康子・湯 華民・定岡 知彦	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	20
---------------------------	----

I. 総括総合研究報告

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:

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水痘生ワクチン株ゲノムに RS ウイルス (RSV) の表面抗原遺伝子を組み込み、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 (VZV) の感染を同時に予防できる二価生ワクチンの作製を試みた。本研究では、RSV 遺伝子を保有する組換え水痘ワクチンウイルスを作製することができた。さらに F 遺伝子を発現する組換え水痘ウイルスを経気道的に複数回モルモットに接種した場合、RSV の同型のみならず亜型に対する中和抗体をも誘導することができた。本研究結果は、作製された組換え水痘ワクチンウイルスが、RS ウイルス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。一方、ワクチンとしての有効性の評価には液性免疫のみならず細胞性免疫の評価も必要であると考えられる。そこで、本研究ではモルモットにおける細胞性免疫の評価系を作製することを試みた。

A. 研究目的

現行の水痘 (VZV) ワクチン株である岡株 vOka は、水痘患者より分離したウイルス Oka 原株 pOka 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。日本でも、小児を対象とした定期接種に加えられている。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、ムンプスウイルスの表面抗原遺伝子を挿入し、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。

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 ゲノムは、NS1、NS2、N、P、M、SH、G、F、M2 および L をコードしている。膜タンパク質には、G、SH、F タンパク質があるが、その中で G タンパク質と F タンパク質は、中和抗体の標的であることが知られている。RSV は、G タンパク質により A 型と B 型に分類されている。本研究では、その水痘ワクチン株ゲノムに RSV 抗原の遺伝子として、RSV-A 型の F タンパク質 (RSV-A-F) あるいは G タンパク質 (RSV-A-G)、そして RSV-B 型の F タンパク質 (RSV-B-F) を挿入することを試みた。さらにこれらのワクチンウイルスをモルモットに免疫し、その血清中に RSV-G あるいは RSV-F に対する抗体が誘導されるか否かを検討した。さらには、それらの抗体が RSV-A 型および B 型両方に対する中和能を有するか否かを検討を行い、VZV および

RSV-A 型と RSV-B 型両方に対して効果があるワクチンの作製を目指した。

一方、免疫能を測定するためには液性免疫のほかに細胞性免疫能を測定することが必要となる。しかし、現状ではモルモットにおける細胞性免疫の評価系がない。そこで本研究では、モルモットにおける細胞性免疫応答の評価系を作製することを目的とした。

B. C. 研究方法および結果

(1) RSV抗原組換え水痘ワクチンウイルス作製

RSV遺伝子を発現するvOka-BACゲノムを作製した。得られた外来遺伝子挿入vOka-RSV-BACゲノムを、VZV感染許容細胞（MRC-5細胞）に導入し、組換え水痘ワクチンウイルスrvOka-RSV-A-F、rvOka-RSV-B-F、rvOka-RSV-A-Gを得た。

(2) モルモット免疫試験-感染細胞皮下接種

rvOka-RSV-A-F あるいは rvOka-RSV-A-G を 4 回接種したモルモットの血清中において RSV-A-F あるいは RSV-A-G に対する抗体価の上昇が確認された。VZV に対する中和抗体の誘導は認められた。そして RSV-Long 株（RSV-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（RSV-B 型）に対する中和抗体の誘導は確認できなかった。

(3) モルモット免疫試験-経気道接種

rvOka-RSV-A-F あるいは rvOka-RSV-B-F をモルモットに経気道的に3回接種した。結果、rvOka-RSV-A-F あるいは rvOka-RSV-B-F を免疫した両群において、IFIによりRSV-A-FおよびRSV-B-Fの両方に対する抗体価の上昇が確認された。水痘ウイルスに対する中和抗体の誘導は、コントロールの水痘生ワクチン株接種群も含めて確認することができた。加えて

rvOka-RSV-A-F あるいは rvOka-RSV-B-F 接種群において、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。

(4)モルモット IFN- γ に対するモノクローナル抗体の作製

モルモット IFN- γ を作製、精製し、マウスに免疫した。免疫したマウスからリンパ節を採取し、モノクローナル抗体を作製した。

複数のモルモット IFN- γ ハイブリドーマの樹立に成功した。それらのハイブリドーマから産生された抗体のエピトープを調べるために、部分欠損したモルモット IFN- γ 遺伝子を発現した細胞を用いて、間接蛍光抗体法を行った。結果うち 1 つの抗体のエピトープがモルモット IFN- γ の N 末端側に、残りの 3 つは C 末端側にあることが明らかとなった。このことから、少なくとも、2 種類以上のエピトープを認識する抗体を作製することができた。

(5) モルモット IFN- γ を発現させたヒト由来細胞を用いた Elispot 実験

上記で作製した抗体が IFN- γ Elispot 法に使用できるか否かを調べるため、モルモット IFN- γ を発現させた細胞を用いて、IFN- γ Elispot 実験を行った。その結果、モルモット IFN- γ 発現細胞を用いたサンプルでは、モルモット IFN- γ を発現しない細胞に比べ、明らかにスポット数が上昇していた。

(6) 水痘抗原刺激による Elispot スポット数の変化

UV 不活化した水痘帯状疱疹ウイルスを免疫したモルモットから分離した単核球を、水痘抗原を用いて刺激し、Elispot 実験を行った。その結果、コントロールと比べ、有意なスポット数の上昇は認められなかった。

(倫理面への配慮)

本研究は医薬基盤研究所（2013年3月まで）および神戸大学で行った。本研究に関与する動物実験は、当該研究機関における動物実験委員会の承認を得たうえで行った。

遺伝子組換え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たうえで行った。

D. 考察、E. 結論

本研究でのモルモット免疫試験rvOka-RSV-A-Fや、rvOka-RSV-B-Fの3回の経気道接種によってモルモットの血清中に、RSV-A型とRSV-B型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。本研究成果は、これらのワクチンウイルスの接種によりRSVの両型のウイルス感染を防御できる二価ワクチンと成り得る可能性を示している。

複数のモルモットIFN- γ モノクローナル抗体を作製した。今後は、モルモットにおける細胞性免疫能の評価系を構築する必要がある。

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]. 第16回日本ワクチン学会学術集会

2012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」

[2]. 第28回ヘルペスウイルス研究会

2013年5月31(金)

村上 宏起、松浦 正明、Somboonthum Pranee、五味 康行、山西 弘一、森 康子

「RSウイルスの抗原遺伝子を発現する組換え水痘多価ワクチンの作製とその有効性の検討」

[3]. International Herpes virus Workshop 2013

Saturday, July 20, 2013

Kouki Murakami, Masaaki Matsuura, Pranee

Somboonthum, Yasuyuki Gomi, Koichi Yamanishi,

Yasuko Mori

Satellite workshop

「Development of a recombinant varicella zoster vaccine expressing respiratory syncytial virus fusion protein or glycoprotein」

[4]. International Herpes virus Workshop 2013

Monday, July 22, 2013

Kouki Murakami, Masaaki Matsuura, Pranee

Somboonthum, Yasuyuki Gomi, Koichi Yamanishi,

Yasuko Mori

Poster

「Development of a recombinant varicella zoster vaccine expressing respiratory syncytial virus fusion protein or glycoprotein」

[5]. 第17回日本ワクチン学会学術集会

2013年11月30日(土)

森 康子

「水痘ワクチンウイルスベクター」

[6]. 第17回日本ワクチン学会

2013年11月30日(土)

村上 宏起、松浦 正明、五味 康行、山西 弘一、森 康子

「RS ウイルスのF 抗原を発現する組換え水痘ワクチンの作製とその有効性の検討」

[7]. 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」

[8]. 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」

[9]. 第18回 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」

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

G. 知的財産権の出願・登録状況

II. 分担総合研究報告

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 ウイルス抗原を発現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

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:

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水痘生ワクチン株ゲノムにRSウイルス(RSV)の表面抗原遺伝子を組み込み、それらの遺伝子が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(VZV)の感染を同時に予防できる生ワクチンの作製を試みた。今回、これらRSV 遺伝子を保有する組換え水痘ワクチンウイルスの再構築に成功した。さらに作製したウイルスの感染細胞においてRSV-FあるいはRSV-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ウイルス(VZV)ワクチン岡株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。日本でも、小児を対象とした定期接種に加えられている。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、ムンプスウイルスの表面抗原遺伝子を挿入し、ムンプスウイルスの外来遺伝子が発現す

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。

RSVは、パラミクソウイルス科に属するマイナスイオン鎖RNAウイルスである。RSVゲノムは、NS1、NS2、N、P、M、SH、G、F、M2およびLをコードしている。膜タンパク質には、G、SH、Fタンパク質があるが、その中でG タンパク質とFタンパク質は、中和抗体の標的であることが知られている(図1)。また、G タンパク質によりA型とB型に分類されている。

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。

本研究では、その水痘ワクチン株ゲノムにRSV抗原の遺伝子として、RSV-A型のFタンパク質 (RSV-A-F)あるいはGタンパク質 (RSV-A-G)、そしてRSV-B型のFタンパク質 (RSV-B-F)を挿入することを試みた。

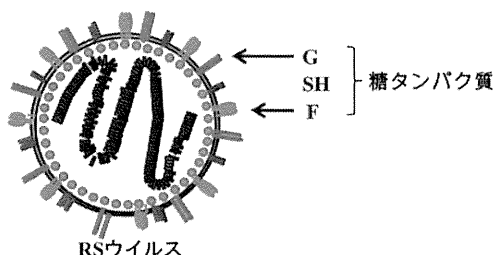


図1 RSVウイルス粒子

(Fields VIROLOGY Fifth Edition 改変)

B. 研究方法

(1) RSV抗原組換え水痘ワクチンウイルス作製

vOka-BACゲノムを保持する大腸菌に、RSV抗原遺伝子発現カセットを挿入し、組換えvOka-RSV-BACゲノムを得た。外来遺伝子はVZV ORF13との置換により挿入した。

組み込んだRSV-A-FとRSV-A-G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。RSV-B-Fの遺伝子配列は9320株 (ATCCより購入) 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 (図2)。

得られた外来遺伝子挿入vOka-RSV-BACゲノムを、VZV感染許容細胞 (MRC-5細胞) に導入し、組換え水痘ワクチンウイルスrvOka-RSV-A-F、rvOka-RSV-B-F、rvOka-RSV-A-Gを得た。

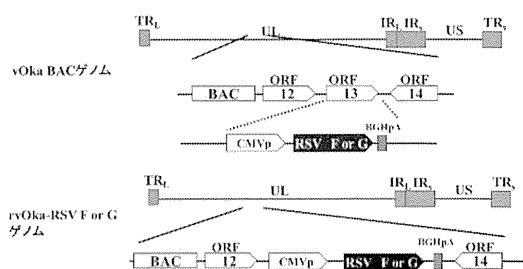


図2 RSV抗原発現組換え水痘ウイルスの作製

vOka-BACゲノムのORF13と、RSV抗原遺伝子発現カセットを置き換えることで作製した。

(2) 組換え水痘ワクチンウイルス感染細胞でのRSV-A-F、RSV-B-F、RSV-A-Gの発現の確認

作製した組換え水痘ワクチンウイルスrvOka-RSV-A-F、rvOka-RSV-B-F、rvOka-RSV-A-GをMRC-5細胞に感染させ、RSV-GあるいはRSV-Fに対するマウスモノクローナル抗体を用いたIFA (間接蛍光抗体法) とウェスタンブロットにより、RSウイルス抗原の発現を確認した。

(倫理面への配慮)

本研究は医薬基盤研究所 (2013年3月まで) および神戸大学で行った。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。

組換えウイルス実験および遺伝子組換え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) rvOka-RSV-A-F、rvOka-RSV-B-F、rvOka-RSV-A-Gの作製に成功

上記の方法でRSV-A-F、RSV-B-FおよびRSV-A-Gを、それぞれvOka-BACに挿入し、遺伝子組換えvOka-RSV-BACゲノムを得た。さらにそれらのBACゲノムから感染性のrvOka-RSV-A-F、

rvOka-RSV-B-FおよびrvOka-RSV-A-Gの作製に成功した。

(2) 組換え水痘ワクチンウイルス感染細胞でのRSV-A-F、RSV-B-F、RSV-A-Gの発現の確認

作製した組換え水痘ワクチンウイルスの感染細胞において、IFAとウェスタンブロットによって、RSV-A-F、RSV-B-F、またはRSV-A-Gが発現していることが確認できた(図3、4)。

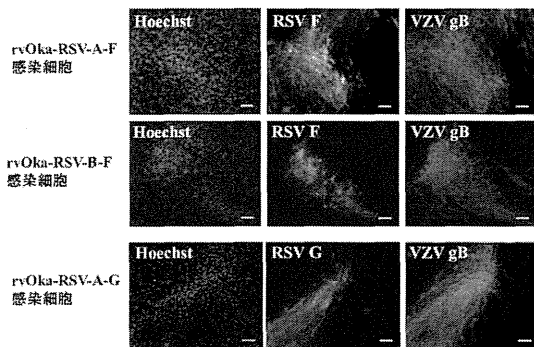


図3 IFAによるRSウイルス抗原発現の確認

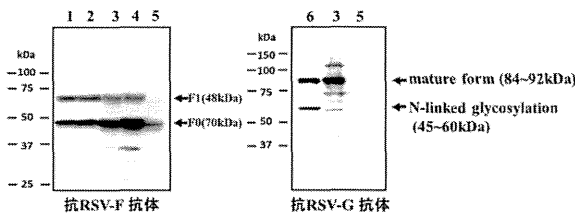


図4 ウェスタンブロットによるRSウイルス抗原発現の確認

レーン1: rvOka-RSV-A-F 感染細胞、レーン2: rvOka-RSV-B-F 感染細胞、レーン3: RSV Long (RSV-A型) 感染細胞、レーン4: RSV 9320 (RSV-B型) 感染細胞、レーン5: 非感染細胞、レーン6: rvOka-RSV-A-G 感染細胞

D. 考察

今回、RSV-A-F、RSV-B-F、RSV-A-Gの遺伝子を保有するvOkaゲノムを作製した。さらに、これらのウイルスゲノムからのウイルスの再構築に成功した。そして、これらの組換えウイルスを感

染させた細胞におけるRSV-A-F、RSV-B-F、RSV-A-G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RSV-Fタンパク質の発現が認められたため、これらのウイルスの動物への接種により、VZVのみならずRSVに対する抗体の誘導も期待できるものと考えられる。

E. 結論

RSV抗原を発現する組換え水痘ワクチンウイルス rvOka-RSV-A-F、rvOka-RSV-B-F および rvOka-RSV-A-Gの作製に成功した。

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]. 第16回日本ワクチン学会学術集会

2012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」

[2]. 第28回ヘルペスウイルス研究会

2013年5月31(金)

村上 宏起、松浦 正明、Somboonthum

Pranee、五味 康行、山西 弘一、森 康子
「RSウイルスの抗原遺伝子を発現する組換え
水痘多価ワクチンの作製とその有効性の検
討」

[3]. International Herpes virus Workshop 2013
Saturday, July 20, 2013

Kouki Murakami, Masaaki Matsuura, Pranee
Somboonthum, Yasuyuki Gomi, Koichi Yamanishi,
Yasuko Mori
Satellite workshop

「Development of a recombinant varicella
zoster vaccine expressing respiratory syncytial
virus fusion protein or glycoprotein」

[4]. International Herpes virus Workshop 2013
Monday, July 22, 2013

Kouki Murakami, Masaaki Matsuura, Pranee
Somboonthum, Yasuyuki Gomi, Koichi Yamanishi,
Yasuko Mori
Poster

「Development of a recombinant varicella zoster
vaccine expressing respiratory syncytial virus
fusion protein or glycoprotein」

[5]. 第17回日本ワクチン学会学術集会
2013年11月30日(土)

森 康子
「水痘ワクチンウイルスベクター」

[6]. 第17回日本ワクチン学会
2013年11月30日(土)

村上 宏起、松浦 正明、五味 康行、山西 弘
一、森 康子

「RS ウイルスのF 抗原を発現する組換え水
痘ワクチンの作製とその有効性の検討」

[7]. 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」

[8]. 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」

[9]. 第18回 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

2. 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への免疫による有効性の検討

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

神戸大学大学院医学研究科

研究要旨:

RS ウイルス(RSV)の F タンパク質(RSV-F)あるいは、G タンパク質(RSV-G)を発現する組換え水痘ワクチンウイルス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 RSV-F および RSV-G に対する抗体の誘導を確認することができた。しかし、RSV-B 型に対する中和抗体は誘導されなかった。そこで、RSV-A 型と RSV-B 型の両方に対する中和抗体の誘導を目的として、RSV-A 型の F タンパク質(RSV-A-F)、あるいは RSV-B 型の F タンパク質(RSV-B-F)を発現する組換え水痘ワクチンウイルスの混合接種や、単独接種での接種回数を増やすなど、免疫方法の変更を行った。その結果、RSV-A 型と RSV-B 型および水痘ウイルスに対する中和抗体の誘導が認められた。本研究結果は、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

水痘ウイルス(VZV)生ワクチンOka株(vOka株)に、RSV-A型のGタンパク質(RSV-A-G)、Fタンパク質(RSV-A-F)、あるいはRSV-B型のFタンパク質(RSV-B-F)の遺伝子を組み込み、これらのRSV抗原を発現する組換え水痘ワクチンウイルスrvOka-RSV-A-F、rvOka-RSV-B-F およびrvOka-RSV-A-Gの作製に成功した。

そこで本研究では、これらのワクチンウイルスをモルモットに免疫し、その血清中にRSV-G あるいはRSV-Fに対する抗体が誘導されるか否かを検討した。さらには、それらの抗体がRSV-A型お

よびB型両方に対する中和能を有するか否かを検討を行い、VZVおよびRSV-A型とRSV-B型両方に対して効果があるワクチンの作製を目指した。

B. 研究方法

(1) モルモット免疫試験①-感染細胞皮下接種

rvOka-RSV-A-FまたはrvOka-RSV-A-G感染MRC-5細胞を回収し、モルモットに皮下接種を行った。接種は2週間ごとに計4回を行い、その後、採血をして血清中の抗体価測定を行った(図1)。

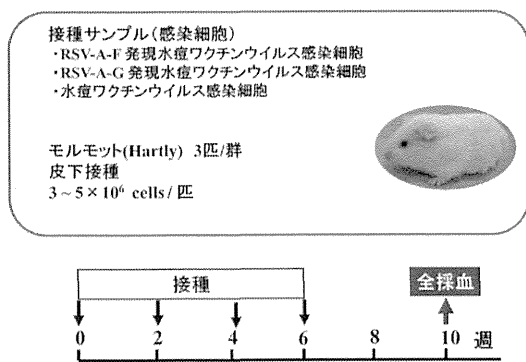


図1 モルモット免疫試験① 接種スケジュール

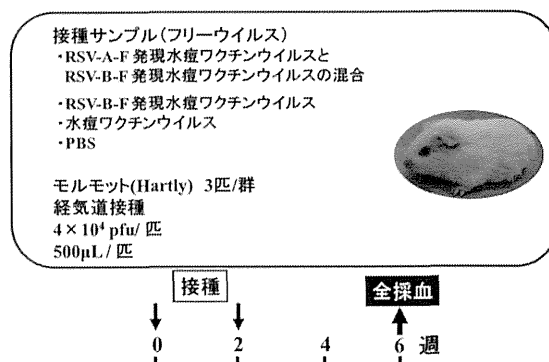


図3 モルモット免疫試験③ 接種スケジュール

(2) モルモット免疫試験②-経気道接種

rvOka-RSV-A-FまたはrvOka-RSV-A-Gセルフリーウイルスを、モルモットに経気道接種により免疫した。接種は2週間ごとに計2回行い、その後、採血をして血清中の抗体価測定を行った(図2)。

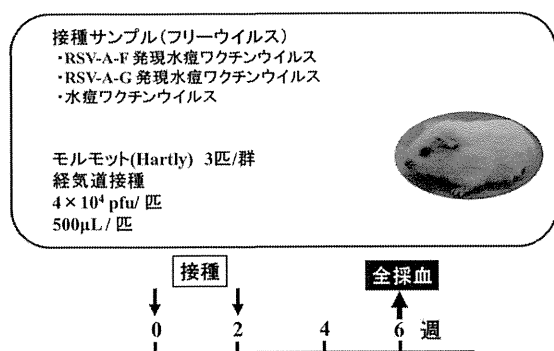


図2 モルモット免疫試験② 接種スケジュール

(3) モルモット免疫試験③-経気道接種

rvOka-RSV-B-Fセルフリーウイルスあるいは、rvOka-RSV-A-FとrvOka-RSV-B-Fセルフリーウイルスを混合し、モルモットに経気道接種により免疫した。接種は2週間ごとに計2回行い、その後、採血をして血清中の抗体価測定を行った(図3)。

(4) モルモット免疫試験④-経気道接種

rvOka-RSV-A-FあるいはrvOka-RSV-B-Fフリーウイルスを、モルモットに経気道接種により免疫した。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4)。

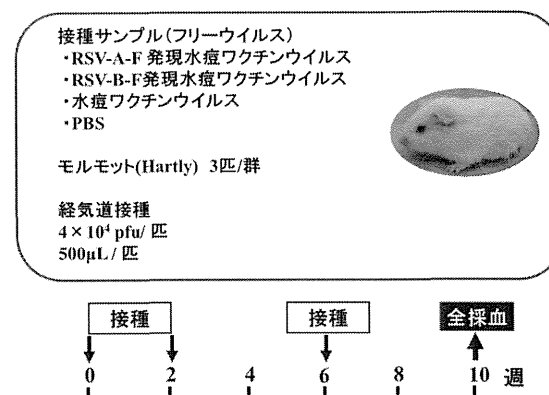


図4 モルモット免疫試験④ 接種スケジュール

(4) 抗体価測定

RSV-A-G、RSV-A-FまたはRSV-B-Fを発現させた細胞を用い、上記の実験により得られたモルモット血清を一次抗体として、間接蛍光抗体法(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VZV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。攻撃ウイルスとして RSV-Long株 (RSV-A型)、RSV-9320株 (RSV-B型、共にATCCより購入) および VZV

vOka株を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は医薬基盤研究所（2013年3月まで）および神戸大学で行った。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。

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。

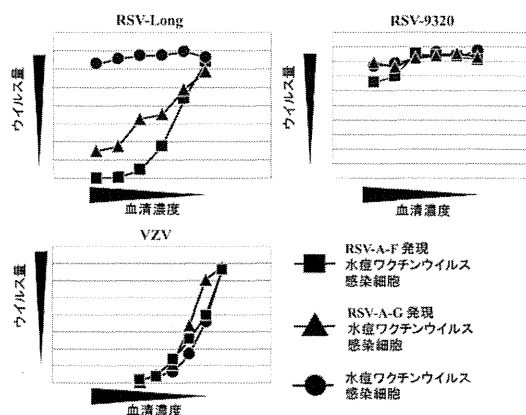


図5 RSVとVZVIに対するウイルス中和活性

(2) モルモット免疫試験②-経気道接種

抗体価測定

IFA (間接蛍光抗体法)

RSV-A-F および RSV-A-G に対する抗体価の上昇が確認された (表 2)。

プラークリダクションアッセイ

感染細胞を皮下接種した際と同じく、RSV-Long株 (RSV-A型) に対しては中和抗体の誘導が確認できたが、RSV-9320株 (RSV-B型) に対する中和抗体の誘導は確認できなかった。また、VZV に対する中和抗体の誘導は認められた (図6)。

表2 間接蛍光抗体法による抗体価

接種サンプル	抗RSV-A-G 抗体価	抗RSV-A-F 抗体価
RSV-A-F 発現 水痘ワクチンウイルス	-	800
RSV-A-G 発現 水痘ワクチンウイルス	666	-
水痘ワクチンウイルス	<100	<100

C. 研究結果

(1) モルモット免疫試験①-感染細胞皮下接種

抗体価測定

IFA (間接蛍光抗体法)

RSV-A-F および RSV-A-G 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

VZVI に対する中和抗体の誘導は認められ、また RSV-Long株 (RSV-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 (RSV-B型) に対する中和抗体の誘導は確認できなかった。(図5)。

表1 間接蛍光抗体法による抗体価

接種サンプル	抗RSV-A-G 抗体価	抗RSV-A-F 抗体価
RSV-A-F 発現 水痘ワクチンウイルス 感染細胞	-	3200
RSV-A-G 発現 水痘ワクチンウイルス 感染細胞	1600	-
水痘ワクチンウイルス 感染細胞	<100	<100

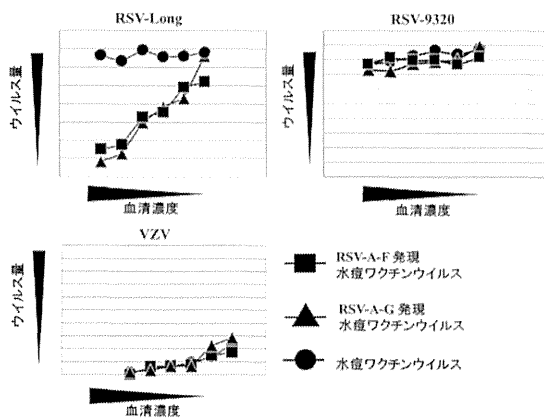


図6 RSVとVZVに対するウイルス中和活性

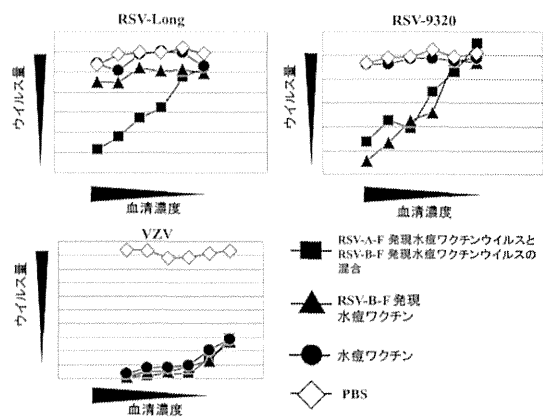


図7 RSVとVZVに対するウイルス中和活性

(3) モルモット免疫試験③-経気道接種

抗体価測定

IFA(間接蛍光抗体法)

混合したウイルスを接種した群において、RSV-A型およびRSV-B型両方の型のRSV-Fに対する抗体価の上昇が確認された(表3)。

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の誘導は、コントロールの水痘生ワクチン株接種群も含めて確認することができた。さらに、rvOka-RSV-A-FおよびrvOka-RSV-B-Fを混合して接種した群において、RSV-A型およびRSV-B型の両方に対する中和抗体が若干低めではあったが誘導されていた(図7)。

表3 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と RSV-B-F 発現水痘ワクチンウイルス の混合	200	166
RSV-B-F 発現 水痘ワクチンウイルス	<100	400
水痘ワクチンウイルス	<100	<100
PBS	<100	<100

(4) モルモット免疫試験④-経気道接種

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あるいはrvOka-RSV-B-Fを免疫した両群において、IFAによりRSV-A-FおよびRSV-B-Fの両方に対する抗体価の上昇が確認された(表4)。

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の誘導は、コントロールの水痘生ワクチン株接種群も含めて確認することができた。加えて免疫回数を増やした、rvOka-RSV-A-FあるいはrvOka-RSV-B-F接種群において、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8)。

表4 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	1066	800
RSV-B-F 発現 水痘ワクチンウイルス	800	1333
水痘ワクチンウイルス	<100	<100
PBS	<100	<100

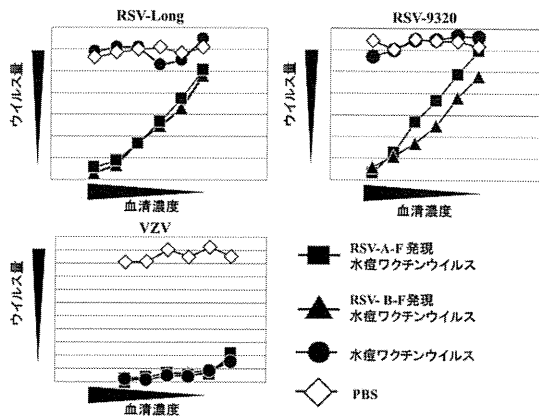


図8 RSVとVZVに対するウイルス中和活性

D. 考察

高力価のセルフリー水痘ワクチンウイルスの調製は難しく、また水痘ワクチンウイルスはモルモットには感染するものの、ほとんど増殖はしないため、これまでのモルモットへの接種は、本研究におけるモルモット免疫試験①のような水痘ワクチンウイルス感染細胞を用いてきた。しかし、感染細胞には多くの細胞成分が含まれることや、皮下接種においては4回もの接種を行う必要があるため、力価の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の改良が必須であると考えられた。そこで本研究では経気道接種を採用したところ、力価の低いセルフリーウイルスを用いた接種実験においても、抗体価の上昇が認められた。この接種方法の改良は今後の水痘ワクチンウイルスをベースとした多価ワクチン開発に寄与するものと考えられる。

本研究でのモルモット免疫試験②では、RSV-A-FやRSV-A-Gに対する抗体価の上昇が確認されたが、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-A型とB型の両方のウイルスに対して有効性が認められるワクチンと成り得るために、rvOka-RSV-B-FをrvOka-RSV-A-Fと混合したウイルスをモルモットに接種した。その結果、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(モルモット免疫試験③)。更にrvOka-RSV-A-Fや、

rvOka-RSV-B-Fの単独接種回数を増やして、追加接種を行うことでも、モルモットの血清中に、RSV-A型とRSV-B型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(モルモット免疫試験④)。本研究成果は、これらのワクチンウイルスの接種によりRSVの両型のウイルス感染を防御できる多価ワクチンと成り得る可能性を示している。

E. 結論

本研究で作製した水痘ワクチンウイルスの接種によって、RSV-A型およびB型の両方の型に対する中和抗体が誘導されていたことから、水痘ワクチンウイルスrvOka-RSV-Fは、VZVとRSVの双方に対して有効性が認められた。

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]. 第16回日本ワクチン学会学術集会

2012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」

[2]. 第28回ヘルペスウイルス研究会

2013年5月31(金)

村上 宏起、松浦 正明、Somboonthum Pranee、五味 康行、山西 弘一、森 康子
「RSウイルスの抗原遺伝子を発現する組換え水痘多価ワクチンの作製とその有効性の検討」

[3]. International Herpes virus Workshop 2013

Saturday, July 20, 2013

Kouki Murakami, Masaaki Matsuura, Pranee Somboonthum, Yasuyuki Gomi, Koichi Yamanishi, Yasuko Mori

Satellite workshop

「Development of a recombinant varicella zoster vaccine expressing respiratory syncytial virus fusion protein or glycoprotein」

[4]. International Herpes virus Workshop 2013

Monday, July 22, 2013

Kouki Murakami, Masaaki Matsuura, Pranee Somboonthum, Yasuyuki Gomi, Koichi Yamanishi, Yasuko Mori

Poster

「Development of a recombinant varicella zoster vaccine expressing respiratory syncytial virus fusion protein or glycoprotein」

[5]. 第17回日本ワクチン学会学術集会

2013年11月30日(土)

森 康子

「水痘ワクチンウイルスベクター」

[6]. 第17回日本ワクチン学会

2013年11月30日(土)

村上 宏起、松浦 正明、五味 康行、山西 弘一、森 康子

「RS ウイルスのF 抗原を発現する組換え水

痘ワクチンの作製とその有効性の検討」

[7]. 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」

[8]. 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」

[9]. 第18回 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

3. モルモットにおける細胞性免疫測定法構築の試み

研究代表者・森 康子

神戸大学大学院医学研究科・教授

研究協力者・湯 華民、定岡 知彦

神戸大学大学院医学研究科・助教

研究要旨:

モルモットは水痘生ワクチン株の感染可能な唯一の小動物モデルであり、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、モルモット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、我々は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

本研究事業は水痘生ワクチン株に、RS ウイルスの G タンパク質または F タンパク質の遺伝子を組み込み、RSV-G または 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、水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) および RSV の感染予防効果があるワクチンを目指していた。

作製した組換えウイルスのワクチン効果を調べるため、まず実験動物での免疫誘導能の判定が不可欠だと考えられる。モルモットは水痘生ワクチン株が唯一感染可能な小動物であるため、我々は、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的とした。

B. 研究方法

(1) 大腸菌由来抗原を用いてのモルモット IFN- γ に対するモノクローナル抗体の作製

Phytohemagglutinin (PHA) で刺激したモルモット単核球を用いて、モルモット細胞由来 cDNA を構築し、モルモット IFN- γ 遺伝子を PCR で増幅した。得られたモルモット IFN- γ 遺伝子を大腸菌発現ベクター (pGEX-4T-1) および哺乳類細胞発現ベクター (pCAGGS) にクローニングした。大腸菌で発現させたモルモット IFN- γ を精製し、マウスに免疫した。免疫したマウスからリンパ節を採取し、リンパ節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、ハイブリドーマを樹立した。モノクローナル抗体