

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業））

分担研究報告書

細胞培養弱毒生痘そうワクチンの疫学的有効性及び安全性評価に関する研究

研究分担者 金谷泰宏
国立保健医療科学院 健康危機管理研究部

研究要旨

我々は、これまでの研究の中で、LC16m8 が既存の種痘免疫に対してブーストをかけるとともに既接種者の B5R 抗体の産生を促すことについて検証を行った。一方で、初種痘における B5R に対する抗体誘導は既接種群と比して弱いことが指摘されている。本研究においては、プロテインアレイを用いて LC16m8 により誘導される抗体プロファイルを解析し、昨年度までに LC16m8 の有効性を支持する結果が得られた。今年度、引き続き解析したところ、さらに詳細な解析の必要性が認められた。国内外の研究により B5R 抗体の産生は痘そうワクチンによる防御に必須ではないという結果も示されているが、有効性・安全性の点から重要な抗原であることから、プロテインアレイ解析結果も踏まえ、その抗原性について解析を行い、LC16m8 の B5R タンパク質の抗体誘導能を確認した。抗体の機能については引き続き検討が必要である。

A. 目的

LC16m8 株は EEV の主要抗原 B5 に変異があり切断型として発現しているため、ワクチンとしての有効性の評価には、この変異が抗原性にどのような影響を与えているかを明らかにすることが必要である。一方、抗体産生にはウイルス株の種類、個人の遺伝的要素、生理状態、ワクチン接種歴などの過去における曝露が影響を与えることから、有効なワクチン接種プログラムの開発には、LC16m8 株接種に関わるこれらの要因の関係を明らかにすることが必要である。

1970 年代以前、わが国では、天然痘のワクチン接種は 3 回の種痘を受けるプログラムであり、1976 年まで実施された。そのため、現在では、76 年以降が生年の世代は免疫がなく、それ以前の世代は出生年によって種痘歴（ワクチン株の種類と接種回数）が異なる世代が混在しており、いずれもワ

クチンの有効性評価と接種プログラムを構築するにあたり考慮する必要がある。わが国では 1970～1975 年の間に出生した者は 1 回、1964～1969 年の間に出生した者は 2 回、1963 年以前に出生した者は 3 回の接種を受けている。1970 年以前においては池田株、大連 1 株が、1970 年代は Lister 株が使用された。日本人集団においては、これらの免疫的背景を考慮したワクチン接種プログラムを開発することにより、安全性、有効性の高い接種が可能となる。

本研究では、プロテインアレイを用いた LC16m8 抗原性の解析を続けるとともに、有効性・安全性の評価に重要な LC16m8 株の B5 タンパク質の抗原性について検討を行った。

B. 研究方法

1. プロテインアレイを用いた LC16m8 の抗原性の解析

(1)血清

齊藤らが報告した LC16m8 株接種の臨床試験のうち、第2ラウンドの被験者(200名)の血清を対象とした。善感反応を示さなかった4検体を除く196検体をプロテインアレイに供し測定を行った。血清は接種前、接種後1ヶ月目に採取し、ペア血清として解析を行った。

(2)抗原プロファイル解析

ウイルス抗原としてワクシニアウイルス ウェスタンリザーブ株のゲノム上の ORF の遺伝子産物を搭載したアレイを用いた (Antigen Discovery Inc. Irvine, CA, USA)。ネガティブコントロールとして、ウイルス由来の遺伝子産物を発現させないスポットを設定した (no DNA control)。血清は、E.coli 溶解液 (最終濃度 4~5mg/mL) を含んだブロッキングバッファーで 50 倍に希釈し、18 度で 1 時間処理し、アレイにプローブして 4 度で 18 時間処理した。洗浄後、ブロッキングバッファーで 200 倍に希釈したビオチン化ヤギ抗ヒト IgA/G/M、Ig 鎖、Ig 鎖、IgM μ 鎖 2 次抗体に 18 度で 2 時間処理した。数回洗浄後、スライドをストレプトアビジン結合 PBXL-3 存在下で 1 時間処理。遠心により風乾した後、Parkin Elmer confocal glass slide scanner を用いて蛍光強度を取得した。蛍光強度は、ScanArrayExpress software (Parkin Elmer) により定量化を行った。測定は 4 回に分けて行った。接種回によりアレイの構成が一部異なることから、全測定に共通して含まれる 195 個の遺伝子産物に対する測定値を統計解析に用いた。それぞれの血清についてトリPLICATEで測定を行った。ポジティブコントロールとして、ワクシニアウイ

ルスのタンパク質に対して高い抗体価を有するヒトの抗ワクシニアウイルスイムノグロブリンを同様にプロテインアレイにプローブして抗原抗体反応を蛍光強度として測定した。

(3) LC16m8 接種血清のデータの処理

プロテインアレイ間のばらつき、複数回にわたる測定の影響を調整するため、アレイの測定結果の正規化を行った。正規化には R の vsn パッケージを用いた。正規化後、トリPLICATEのアレイデータのメディアン値をとり各抗原に対する抗体の測定値とした。正規化データは再変換を行い蛍光強度のスケールに戻した。

日本人の集団は、生年により種痘の接種履歴が異なるため、A 群 (1976 年以降出生、種痘歴なし)、B 群 (1970~1975 年の間に出生、種痘 1 回)、C 群 (1964~1969 年の間に出生、種痘 2 回)、D 群 (1963 年以前の出生、種痘 3 回) の 4 群にわけて解析を行った。第 2 ラウンドの全被験者は 200 名であり、A-D 群の人数は、45 名、47 名、45 名、63 名であった。このうち、善感反応が認められなかった A 群の 4 検体以外はアレイ測定を行った。さらに、ペア血清が揃わない 2 検体 (C 群、および D 群)、善感反応が認められなかった 1 検体 (A 群) は統計解析から除外した。ここに示した統計解では、A-D の各群の人数は、41 名、47 名、44 名、62 名である。

L1, A17 については技術的な問題によりシグナルが全検体からは取得できなかったため、A17 に対する A 群および B 群の結果以外は統計解析に含めなかった。

(4) アメリカ人の血清のデータの概要

LC16m8 接種血清の抗体プロファイルとの比

較のため、NCBI の GEO データベースに収録されている Dryvax 接種血清のアレイ測定の結果(GSE34931, Tan et al., 2012)の再解析を行った。検体は、本来は、3回の独立した dose-sparing studies (NIH study ID/clinicaltrial.gov. ID:01-632/NCT00026611,02-009/NCT00038987,02-054/NCT00050518) (Frey 2002)のものである。既存免疫について検討する目的では、過去に接種歴のある検体の接種前の抗体プロファイル(臨床試験での接種したワクチン株の種類と容量は問わず、接種前の血清のみを抽出)を再解析した。

(5)データ解析

抗体産生についての解析は、抗原ごとに接種前後の血清について各群の平均, SD, SE を算出した。t 検定により有意差を検定した。統計解析は R (2.14.0, 3.1.0)または JMP9.0 (SAS Japan)を用いて行った。

2. マウス LC16m8 接種血清のエピトープの解析

(1)B5 タンパク質の調整

B5 タンパク質および部分配列に相当するフラグメントタンパク質は、DNA を化学合成後、インビトロトランスレーションを行い調整した。合成タンパク質には、N 端に His タグ、His-TEV タグ、C 端に HA タグを必要に応じて付加した。合成後、タンパク質は、抗 His タグカラムを用いて精製した。

合成配列は、Lister 株などの野生型の B5 タンパク質 (1-317aa) LC16m8 株の B5 タンパク質 (truncated B5 protein, 1-92aa) LC16m8 株の B5 タンパク質が含まない C 端側のフラグメント (92-275aa) 膜外ドメイ

ン (20-275aa) とした。

(2)抗体の調整

B5 タンパク質の検出のため、部分配列に対する抗ペプチド抗体を調整した。抗原の配列は 22-39 残基の配列とした。常法に従いウサギポリクローナル抗体を調整した。抗体価は ELISA 法により確認した。

(3) マウス LC16m8 接種血清

化血研よりご提供いただいた。

3. B5(aa1-92)単体に対する抗体産生についての検討

(1)B5 タンパク質の調整

LC16m8 株の B5 タンパク質 (1-92aa) を上記の方法で大量合成を行った。

(2)マウスにおける抗原性の検証

精製した合成タンパク質をマウスに免疫した。抗体価は ELISA 法により確認した。

(3)統計解析

統計解析は R (3.1.0)または JMP9.0 (SAS Japan)を用いて行った。

【倫理面への配慮】

本調査研究の実施に当たっては、臨床研究の指針を踏まえるとともに、自衛隊中央病院倫理委員会の承認を得た (No.16-004. 平成 16 年 8 月 30 日)。

動物実験については、厚生労働省の動物実験等の実施に関する基本指針を踏まえて行った。

C. 研究結果

1. プロテインアレイを用いた LC16m8 の抗原性の解析

昨年度までに引き続き、プロテインアレイを用いた天然痘ワクチン接種による抗体産

生について解析を進めた。今年度は特に長期免疫に焦点を当てた。天然痘ワクチンによる防御に寄与する抗原として、複数の IMV 表層の抗原が中和抗原として報告されているが、日本人、アメリカ人の集団のデータとも、長期免疫の抗体プロファイルにおいては、コアなどに局在する抗原に対する抗体が多く検出される(A9, A4, I1, A10 など)。これらの長期免疫による既存抗体量とワクチン接種による抗体産生量の関連等についてさらに解析を行った。一方、EEV の抗体は、抗 B5 抗体も含め、長期免疫においては多くは検出されなかった。

2. マウス LC16m8 接種血清のエピトープの解析

LC16m8 株の接種による抗体産生において、B5 タンパク質 (truncated B5 protein, 1-92aa) の抗原性を評価するに当たり、B5 protein(aa1-92)そのものが抗体を誘導しているのか、あるいは LC16m8 株のリバーストが生じ野生型の B5 タンパク質 (aa1-317) が発現されたために抗体が誘導されたのかを識別することが重要である。ワクチン接種血清が認識する B5 のエピトープを明らかにするため、B5 の部分配列に相当するフラグメントに対する認識の有無を検討することとした。はじめに、B5 タンパク質および抗体の調整を行った。合成したタンパク質は以下の通りである。全長のタンパク質 (B5aa1-317, 317 アミノ酸)、LC16m8 株の配列に相当するフラグメント (B5aa1-92, 92 アミノ酸)、LC16m8 株では失われた 92 残基以降 C 末端側の配列のフラグメント (B5aa92-317, 226 アミノ酸) を合成タンパク質として調整した。

B5(aa1-92)は予想される分子量に合成産物が得られた。B5aa1-317 は予想される分子量の他、熱処理等による重合が起こると思われる挙動を示し、一定の収量を得るのが困難であった。そこでさらに、合成、精製を困難にする膜貫通領域及びシグナルペプチドを除いた配列 (B5aa20-275, 276 アミノ酸) も合わせて合成した。B5(aa20-275)は膜外領域全体に相当するため、B 細胞エピトープを含むと考えられている。

これらの抗原を認識する抗体として、22-39 残基のアミノ酸配列を合成し、抗ペプチド抗体を作成した。2 検体の抗体価を ELISA 法により測定した結果、OD450 の吸光度が 12,500 倍希釈溶液において、0.486, 0.534、2,500 倍希釈溶液において 1.151, 1.167 と高抗体価が得られた。

これらの合成タンパク質 (抗原) および抗体 (ポジティブコントロール) を用い、マウス LC16m8 接種血清のエピトープの解析を進めているところである。

3. B5(aa1-92) 単体に対する抗体産生についての検討

LC16m8 株の接種により B5 に対する抗体が産生されることはマウスにおいて報告されている (Meseda 2009, 本研究班の未発表データ)。しかし、LC16m8 株の B5 (aa1-92) の配列に対し、どのような構造をエピトープとする抗体が産生されるのか、その詳細は不明である。エピトープの解析は B5 (aa1-92) の抗原性を明らかにするために重要である。そこで、合成した B5 (B5aa1-92) に対する抗体産生を検証した。Tag 配列を付加した B5 (aa1-92) を大量合成し、マウス 4 匹に免疫し、血清の抗体

価を ELISA 法により測定したところ、B5 (aa1-92)の配列に対する抗体価の上昇が認められた(2回免疫後、12500倍希釈において吸光度 0.9965)。一方、タグ配列に対する抗体は検出されなかった。そのため、B5 (aa1-92)のタンパク質が抗体を誘導したと考えられた。

D. 考察

1. プロテインアレイを用いた LC16m8 の抗原性の解析について

プロテインアレイを用いた抗体プロファイルの解析は、網羅的に抗体産生を把握することが可能であり、従来、主要抗原として研究が進んでいた IMV, EEV の表層抗原以外の抗体も血清中に多く存在することが明らかとなった。これらの抗体の機能についてはあまり報告がない。他の測定系での検証、機能解析などが今後必要と考えられる。

本研究の結果は、抗 B5 抗体の長期免疫における役割など、いくつかの疑問を新たに生じさせた。先行研究等との比較を詳細に行い、相違点については、技術的要因、ウイルス側の要因、宿主側の要因のいずれに起因するのかを検証し、抗体産生におけるウイルス株の種類、個人の遺伝的要素、過去における暴露の影響などについて明らかにしていくことが重要である。

2. LC16m8 株の B5 の抗原性について

LC16m8 株は EEV の主要抗原 B5R に変異があり、短縮型のタンパク質として発現していることから、その有効性に議論があった。最近の国内外の報告をみると、抗 B5 抗体が防御のために決定的に重要であるという報告 (Putz 2005)がある一方、B5R 以外の EEV

抗原も補体を加えたより生理条件に近い測定系において中和活性を担う抗体を惹起すること、さらに単独の抗原に対する抗体が防御能(中和能)の全てを担うわけではなく、複数の抗体が関与していることが報告されている (Benhnia 2013)。LC16m8 株が動物モデルにおいて防御を示す (Kidokoro 2005, Morikawa 2005, Saijo 2006)ことから抗 B5 抗体の有無のみで防御の有無が決定されるのではないと考えられる。同時に、B5 タンパク質は、主要抗原としてワクチンの有効性のみならず安全性にも影響を与えていることから重要であり、LC16m8 株の B5 の抗原性についても明らかにしていく必要がある。

LC16m8 株接種により、マウスにおいては B5 タンパク質に対する抗体の産生が報告されているが、ヒトにおいては、現在までのプロテインアレイ解析の結果から新規の疑問点も生じ、引き続き解析が必要な状況である。マウスにおいても、B5(aa1-92)の抗原性について、B 細胞エピトープ、T 細胞エピトープの詳細はわかっていない。

野生型の B5R タンパク質の B 細胞エピトープは主に aa56-84, aa256-275 の 2 カ所に集中して存在することがマウスにおけるモノクローナル抗体作成の研究から示されている (Aldaz-Carroll 2005)。B5(aa1-92)は、そのうち N 端側の領域 (aa56-84) を含むものの、分子内のシステインの架橋による高次構造を失っていることから、野生型と同様のエピトープを供するか否かは検証が必要である。さらに、LC16m8 株感染細胞における B5 タンパク質の発現をみると、ごく少量ではあるが野生型の分子量に相当する分子も検出されることから、LC16m8 株接種マ

ウス血清における抗体誘導が B5(aa1-92)のみでも起こりうるものかどうか疑問が残っていた(Meseda 2009)。

本研究において、B5(aa1-92)の抗原性について、ワクチン接種血清のエピトープ解析、および、ウイルスではなく合成タンパク質単体による抗体誘導能の検証という観点から研究を進めている。今年度、B5(aa1-92)単体による抗体誘導が認められたことは上記の先行研究の疑問点を説明するものである。LC16m8 株の B5 に対する抗体について、Paran and Lustig は、抗 B5 抗体の *in vitro* での中和反応と *in vivo* での防御の多くが補体(C3, C1q)への結合能に依存しているとした Benhnia らの報告(Benhnia 2009)を取り上げた総説の中で、「LC16m8 株の truncated B5 protein に対する抗体が同様のメカニズムで EV を中和できるか、マウスを防御できるかどうかは興味深い」と言及している。B5(aa1-92)抗体の機能解析は、ワクシニアに対する免疫において B5 タンパク質が果たす役割を明らかにする上で重要と考えられる。

LC16m8 株の B5 タンパク質の抗原性について引き続き解析を続ける予定である。

E. 結論

本研究では、LC16m8 株接種による抗体産生をについて、プロテインアレイを用いて

網羅的に解析を続けるとともに、その結果も踏まえて、主要抗原 B5 の抗原性について解析を進めている。今年度、B5(aa1-92)単体の抗体誘導能を確認した。B5 に対する免疫応答は、ワクチンの有効性のみでなく安全性にもかかわることから、LC16m8 株の接種プログラムの確立のためには詳細な解析が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

江藤亜紀子、齋藤智也、西山靖将、横手公幸、金谷泰宏. 種痘による長期免疫に寄与する抗原の同定および LC16m8 株接種に対する影響についての解析。第 18 回ワクチン学会学術集会；2014 年 12 月；福岡市

G. 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

