

## A. 研究目的

ヒトに感染するノロウイルス (HuNoV) は、感受性株化培養細胞が無く、インビトロで増殖させることができない。しかし、HuNoV の構造タンパク質をコードする領域をバキキュロウイルスベクターにクローニングし、ウイルス様中空粒子 (VLP) を作り出すことが可能である。VLP は、感染性 HuNoV 粒子と同様の抗原性を有しているとされており、ワクチンの抗原として利用できる。

HuNoV は、GI~GVI の 6 種類の遺伝子グループが存在する。そのうち、HuNoV は GI, GII, GIV である。GI, GII には、それぞれ 17 種類以上の遺伝子型 GI.1~GI.17, GII.1~II.22 が存在しており、遺伝学的にも、抗原性の面でも非常に多様である。HuNoV 粒子表面に存在する突起部分 (P domain) には、アミノ酸の超可変領域が有り、毎年のように抗原性を微妙に変化させる。同じヒトが、1 年に複数回 HuNoV 感染を受けること、毎年冬季に流行を繰り返すことは、このような抗原の多様性、変化の速さに一因がある。一方、米国で実施されたボランティアへの HuNoV (患者便から精製したウイルス) の接種試験や、我が国における家族内感染に関する疫学データから、一度感染したウイルスと同じ遺伝子型のウイルスには、再感染しにくいことが報告されている。つまり、これらの報告は、HuNoV 感染者が獲得した免疫が、再感染もしくは、発症を予防することを示しており、HuNoV ワクチンの可能性を示唆している。

本研究では、HuNoV の VLP を基盤とした第一世代ワクチン、第二世代ワクチンとしてリバースジェネティックスの手法を応用した HuNoV の弱毒化生ワクチン、第三世代として HuNoV の中和エピトープを抗原としたペプチドワクチンなどの HuNoV ワクチンの開発研究を行う。

(本研究の分担研究で施行した研究では、研究資金の不足から目的のわずかな部分しか実現できなかった。さらに、研究内容を分断して記載する報告書では内容の把握が難しいと考えられる。以上の理由により、本委託事業成果報告書には、新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業“不活化ポリオワクチンの有効性・安全性の検証及び国内外で進められている新規腸管ウイルスワクチン開発に関する研究”の分担研究内容、新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業“下痢症ウイルスの分子疫学と感染制御に関する研究”片山班による研究内容も含む。)

## B. 研究方法

### 1. 第一世代 VLP ベースワクチンシーズの開発

#### <HuNoV-VP1 領域のクローニング>

HuNoV GI については、GI.1 から GI.9 に至るまでデータベース上の塩基配列に基づき、遺伝子配列を合成し、シャトルベクターにクローニングした。HuNoV GII に関しては、GII.11, 18, 19 は、ブタのウイルスであるため除外し、それ以外の遺伝子型を GI

と同様にクローニングした。HuNoV 遺伝子は、シャトルベクターから、Bac to Bac システムを用いてバキュロウイルスゲノムのポリヘドリンプロモーター下流にサブクローニングした。

<HuNoV-VP1 発現バキュロウイルスの作製並びにシードウイルスの作製>

作製したバキュロウイルスゲノムは、Sf9 細胞にトランスフェクションし、組換えバキュロウイルスを産生させた。次に、培養上清に放出された組換えバキュロウイルスを、プラークアッセイにてプラーク純化した。純化したプラークを Sf9 で増殖させることでマスターシードウイルス候補を作製した。さらに、マスターシードウイルス候補は、Hi5 細胞を用いて VLP を発現させ、電子顕微鏡観察にて VLP 製造能力があることを確認した。作製したマスターシードウイルス候補は、濃縮後に次世代シーケンサーにより全長塩基配列を決定し、HuNoV インサート配列と、バキュロウイルス遺伝子配列を確認し、変異を持たないことを確認した後、マスターシードウイルスとした。次世代シーケンサーの解析パターンは、フィンガープリントのように、シードロットシステムの品質管理試験に利用できる。マスターシードウイルスは、プラークアッセイにて pfu を測定後、 $10^7 \sim 10^8$  pfu/mL のウイルス液として  $-80^\circ\text{C}$  にストックした。

<VLP の作製>

それぞれの HuNoV の遺伝子型の VLP は、Hi5 細胞を用いて作製した。概略を以下に記した。

シードウイルスを Sf9 細胞にて増殖させ、ワーキングシードを作製してストックした。ワーキングシードを Hi5 細胞に感染させ、プロテアーゼ阻害剤を感染 3 日後に投入し、感染 7 日目まで培養した。感染 7 日目にハーベストし、上清中のバキュロウイルスを 20000g, 20 分間の遠心にて沈降させて除去した。上清に含まれる VLP は、30% のスクロースクッションを用いて SW32Ti ローターにて 30000rpm で超遠心操作を行い、ペレットとして沈降させ、回収した。その後、VLP を PBS(+) に再懸濁し、CsCl の浮上密度勾配遠心 (SW55Ti ローター、35000rpm, 24 時間) にて分離精製した。その後、CsCl を除去し、再度 PBS(+) に懸濁し、VLP 液として、 $-80^\circ\text{C}$  に小分け分注して保管した。一部分を抗血清作製のためのウサギ、モルモットの免疫に用いた。また、モノクローナル抗体の作製、スクリーニングにも用いた。<ウサギ抗血清；ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の作製>

定法にて VLP をウサギ、モルモット、マウスにそれぞれ免疫し、抗 VLP ウサギ血清、抗 VLP モルモット血清をポリクローナル抗体として得た。ポリクローナル抗体の交差反応性を VLP-ELISA にて調べ、交差反応性のある VLP に関しては、それぞれの遺伝子型 VLP に特異的なモノクローナル抗体の作成を行った (表 1)。モノクローナル抗体の特異性は ELISA によって確認した。

<NGS による塩基配列解析>

便検体から抽出した RNA より、NEB 社の NEBnext Ultra キットを用いて、cDNA ラ

イブラリーを調整し、MiSeq に用いた。得られた塩基配列は、CLC 社 Genomics work bench によって De Novo assemble および standard sequence に対する Mapping を行い HuNoV ゲノム上の核酸変異、アミノ酸変異を検出した。

#### <抗体検出 ELISA>

VLP を 96 ウェルプレートにコーティングし、定法にて ELISA を行った。IgG, IgA2 等の抗体の検出には、それぞれの抗体特異的 POD ラベル二次抗体を用いた。

#### 2. 小児 HuNoV 感染患者の時系列解析

##### <患者ならびに検体>

研究協力者のご息子がノロウイルスに感染したため、保護者の同意を得て便検体のサンプリング、解析を行った。対照児は、1 歳 5 ヶ月の男児で、急な発熱、嘔吐、下痢の症状が認められた。クイックナビ・ノロ（デンカ生研）にてノロウイルス陽性を確認した後、4 月 18 日より、5 月 13 日まで 27 日間経過観察を行いながら 13 サンプルの（便検体）を採取した。

##### <QRT-PCR>

QRT-PCR、どちらの方法についても、我々が 2002 年、2004 年に開発し、報告した方法が世界のゴールドスタンダードとなっている。従って、これらの方法を用いて患者便中の HuNoV -RNA の定量を行った。

##### <抗体検出 ELISA>

前出に同じ。

##### <分子系統解析>

得られた NoV ゲノムシーケンスは、Clustal W version 1.8 でアライメントし、サンプリ

ング日時を入力の上、解析を施行した。具体的には、アライメント後、トレーサーにて時系列系統の解析パラメーターを設定した。その後、ベイジアンモンテカルロ法にて、進化速度、時系列を加味した分子系統解析を施行した。

##### <臨床症状のスコアリング>

Vesikari clinical scoring system に準拠して、体温、嘔吐症状、下痢症状、腹痛などの臨床症状の記録より、臨床症状のスコアリングを行った。

#### C. D. 研究結果・考察

##### 1. 第一世代 HuNoV-VLP ベースワクチンシーズの開発

###### (1) HuNoV-VP1領域のクローニング

大腸菌-バキュロウイルスシャトルベクターにクローニングしたHuNoV GIのGI.1からGI.9、HuNoV GIIのGII.1からGII.22までの（GII.11, 18, 19は、ブタのウイルスであるため除外した）ORF2, 3領域は、それぞれ2~3クローンの全塩基配列を決定し、デザイン通りのクローンである事を確認した。以上により現在、2014年の時点で、論文上に報告されている全ての遺伝子型のVLP作製準備が整った。

###### (2) HuNoV-VP1発現バキュロウイルスの作製並びにシードウイルスの作製

大腸菌-バキュロウイルスシャトルベクターよりバキュロウイルスのゲノムにHuNoVの配列をBac-to-Bacシステムにより移し、組み換えバキュロウイルスゲノムを作製した。このゲノムをSf9細胞にトランスフェクションし、イルミナ社のDNAシーケンス用キットのプロトコールに従って、次世代シーケンスを実施

した。以上により、フィンガープリンティングによる均一性を満たしたシードウイルスの作製が終了した。

### (3) VLPの作製

シードウイルスより作製したワーキングシードと、Hi5細胞を用いてVLPの大量発現（ミリグラムオーダー）作業を行った。ハイライトされたVLP（ウサギ血清、モノクロが作製中となっている）以外のVLPについては、抗体作製に足るVLPの作製が終了した。作製中のVLPについては、来年度も引き続き作業を行う。

### (4) ウサギ抗血清（ポリクローナル抗体）、モノクローナル抗体の作製

それぞれの抗原（VLP）に特異的な抗体（VLP特異的抗体）は、原薬の品質管理だけでは無く、数種類のVLPを混合して免役するHuNoVの多価ワクチンを想定した場合、VLP混合後の混合比確認のため必須である。そのためには、ウサギ抗血清の特異性を明らかにする必要がある。免疫源として使用したVLP以外のVLP、つまり、異なる遺伝子型のVLPに交差反応するか否かを、VLP-ELISAを用いて調べた。表2の結果より、GI.3,6, GII.1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 13は特異性が高いこと予想された。これらの遺伝子型については、モノクローナル抗体準備の必要性が無いことが明らかになり、モノクローナル抗体作製対象から除外した。GII.3, 4に関しては特異性が高いことが予想されたが、両遺伝子型共にバリエーション（亜株）の微妙な抗原性の違いによって流行が引き起こされることが報告されているため、バリエーション特異的VLPとそれを識別可能な抗体

が必要になる可能性がある。そこで、これらについては、バリエーション特異的モノクローナル抗体を作製することとした。

モノクローナル抗体作製が必要と判断された遺伝子型に関して、定法に従ってモノクローナル抗体作製を実施した。各種遺伝子型、バリエーション特異的抗体のクローニングは終了したが、各クローンのスクリーニングは未だ進行中である。

現段階では、GI.5, 7, 9, GII.9, 15, 20, 21, 22の抗体は作製途中である。今後、全てのVLPが揃ったところで、再スクリーニングを実施し、ウサギ血清、もしくはモノクローナル抗体の特異性を再確認する必要がある。

### (4) 仮想VLPワクチンの力価試験法の開発研究

ワクチンの品質管理試験において、原薬、最終小分け製品までの工程管理試験で想定されるVLPに対する品質管理に使用する抗原、抗体についての開発研究は順調に進行している。しかし、ワクチンの力価試験、つまりワクチンの能力を測る試験に関しては、来年度以降に開発研究を進める必要がある。現時点で想定している力価試験法は、ワクチン接種した動物体内で誘導される抗体が、VLPの細胞への吸着を阻害可能か否かを測定する方法である。具体的には、「ワクチン候補を動物に摂取し、接種後4週間ほどで採血を行う。その後、HuNoVに見立てたVLPと血清の希釈系列を反応させ、VLPが標的細胞もしくは、標的糖鎖に結合する現象をどの程度阻害できるかをELISAで測定する」という方法である。

ワクチンの接種方法、ワクチンによる感染防御のメカニズムがあまりよく分からないまま、力価試験法を開発することは、困難である。上記方法についても、腸管粘膜、細胞で引き起こされる感染とその防御に関する現象を、血清中に誘導される抗体の性質を調べることで予測可能か否かなど、明らかにすべき問題は山積している。そこで、本年度は、実際にノロウイルス感染患者の腸管で起きる抗体誘導とその抗体が症状の改善、ウイルスの排除に対し、どのように影響を与えているのかを調べることを目的とした臨床症例の解析を試みた。

## 2. 小児 HuNoV 感染患者の時系列解析

### (1) 症例

1歳五ヶ月の男児、2014年4月17日に嘔吐下痢症を発症、初期症状は激しい嘔吐、その後、発熱と激しい下痢に見舞われた。4月18日にクイックナビノロICキットにてノロウイルス陽性となった。4月18日より、5月13日まで27日間経過観察を行いながら13サンプル(便検体)を採取した。ベシカリの重症度スコアに準じてスコアを算出したところ、感染後2日では、スコア9を示した。その後添付の表3のようにスコアは変化し、13日目には重症度スコアはゼロを示し、症状は消失した。

### (2) ノロウイルスの遺伝子型

感染したノロウイルスについて、次世代シーケンスにより全塩基配列を決定し、NoroNetによる遺伝子型解析を実施したところ、GII.4 Sydney 2012 variantであった。

### (3) 便中HuNoV-RNAタイターの経時的変動

便中ノロウイルスRNAタイターは、発症感染2日目では、 $10^{10}$  copies/g・stoolであった。その後ベシカリの重症度スコアがゼロとなった13日目に $2.4 \times 10^7$  copies/g・stoolに低下した。以後、それ以下を維持したが、27日目でも $10^6$  copies/g・stoolの排泄量が保たれていた(図1)。

### (4) ICキットでの検出結果

ICキットは $10^7$  copies/g・stoolを下回ると検出不能となり、陰性を示した。この結果から、ICキットの検出限界は $10^7$  copies/g・stoolであることが明らかになった(図1)。また、本症例の場合、 $10^7$  copies/g・stool以下になるとベシカリの重症度スコアがゼロを呈していたことから、ICキットによって症状を評価できる可能性が示唆された。

### (5) 便中IgAの定量と経時的変化

便検体に含まれる抗体のキャプチャーには、本症例の感染後2日目の便検体に含まれるGII.4株(GII.4 leon2015-2と名付けた)より作出したVLPを用いた。VLPコートプレートに便中の抗GII.4 VLP抗体をキャプチャーした後、腸管上皮より腸管内部に分泌される分泌型IgA抗体の40~50%を占めると考えられているIgA2分子を、抗IgA2特異的HRPコンジュゲート抗体によって検出した。IgA2の量は、感染後2日目より7日目にかけて急激に減少したが、その後急上昇し、13日目にピークを迎えた。その後27日目まで緩やかに下降した(17日目を除く)。17日目にはほとんどIgA2並びにデータには示さないが総IgA量もゼロを示したが、その原因は不明であった(図2)。

#### (6) 次世代シーケンサーによるゲノム全長配列解析

感染後2, 6, 7, 8, 9, 13, 15, 17, 19, 22, 25, 26, 27日の便に排泄されたHuNoVの塩基配列を次世代シーケンサーで決定し、経時的quasispeciesの変化、ゲノム塩基配列アミノ酸配列の変化を比較検討した(図3)。全てのポイントにおいて1%を上回るquasispeciesは存在せず、Homogenousはウイルス配列が検出された。13日目までは、核酸変異、アミノ酸変異共に観察されなかった。15日目以降に核酸変異、アミノ酸変異が検出された。核酸変異は、HyPhyによる解析の結果、中立的な変異が多く検出された。ウイルス生存に有利な変異(ポジティブセレクション)は、NTPaseコード領域、キャプシド蛋白質のP領域に多発していた。これは、13日目以降のIgA2のピーク以降、ウイルスのキャプシド領域に非常に強い免疫学的選択圧がかかっていたことを示唆していた。しかし、ウイルスRNAタイターは減少傾向を示しており、 $10^7$  copies/g・stool以下を維持していたことから、ウイルスがこれらの変異により細々と増殖していたことが伺えた。

次に、BEASTにより各ポイント間の進化速度を算出したところ、15日目以降進化速度が上昇し、27日目にはピークを迎えていたことが明らかになった(図4)。この速度増加はIgA2のピーク以降に観察されることから、宿主からの免疫学的選択圧がウイルスゲノム進化を加速させていたと考えられた。

本研究により、腸管に分泌されるIgA2分子とウイルスのせめぎ合いが起きること、患者

体内でのウイルスに対する総合的な抗ウイルス状態の誘導が、便中ウイルスRNAタイターを下降させ、症状の軽減を導くこと等が示唆された。このような状況をあらかじめワクチンで誘導することで、ノロウイルス感染による症状を抑えることができるかもしれない。本症例においては抗体上昇後もウイルスの排泄は続いており、ウイルスは遺伝子を変化させることで、細々とではあるが体内での増殖を維持していた。従って、ワクチン接種により、ノロウイルスの感染を完全に防御することは困難である可能性が高い。我々はウイルスの進化を加速させてしまう可能性もあり、ワクチンの開発には、基礎的なデータの積み重ねと、慎重な対応が必要であると考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 論文発表のみ記載

- 1) Fang-TzyWu, MS<sup>1,2</sup>, Hsieh-Cheng Chen, MS<sup>1</sup>, Catherine Yen, MD MPH<sup>3</sup>, Ching-Yi Wu, MS<sup>1</sup>, Kazuhiko Katayama, Ph D<sup>4</sup>, Jason C. Huang, PhD<sup>2,#</sup>, Ho-Sheng WuPhD<sup>1,#</sup>. Epidemiology and Molecular Characteristics of Norovirus GII.4 Sydney 2012 Gastroenteritis Outbreaks in Taiwan, January 2012–December 2013. Arch Virol. In press.
- 2) Sato G, Ido H, Kiuchi M, Kataoka M, Katayama K and Tohya Y. Characterization of St-Valerien-Like

- Virus Genome Detected in Japan. Doi: 10.1292/jvms.13-0468; J. Vet. Med. Sci. 76(7):1045-1050, 2014.
- 3) Katayama K, Murakami K, Sharp TM, Guix S, Oka T, Takai-Todaka R, Nakanishi A, Crawford SE, Atmar RL, Estes MK. Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA. Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 23 ; 111 (38) ; E4043-52, Epub Sep 5, 2014.
- 邦文
- 1) 片山和彦 ノーウォークウイルス（ノロウイルス）の遺伝子型2014年版 IASR ノロウイルス特集号 vol.35 No.7 July 2014.
- 2) 片山和彦 ノロウイルス感染症とそ  
の対策 救命救急 vol.17 No.1 12-15,  
2014.
- 3) 片山和彦 質疑応答臨床一般 夏場  
にノロウイルスによる胃腸炎や食中  
毒が発生する可能性 日本医事新報  
No.4723, 59-60, 2014.
- 4) 片山和彦 特集 ノロウイルス感染症  
症 ノロウイルスとは 調剤と情報  
vol.20 No.12, 10-12, 2014
- 5) 片山和彦 特集 ノロウイルス感染症  
症 ノロウイルスの感染拡大を防ぐ  
には 調剤と情報 vol.20 No.12, 14-19,  
2014
- 6) 片山和彦 備えて立ち向かう感染性  
胃腸炎 ノロウイルス・ロタウイルス  
ノロウイルス感染症とは-ウイルスの  
特徴・流行変遷・臨床病態 感染症対  
策ICTジャーナル vol.9 No.4 2014.
- 7) 片山和彦 少年写真新聞社 中学保  
健ニュース ノロウイルスの感染予  
防 Dec.18, 2014.
- 8) 片山和彦 少年写真新聞社 高校保  
健ニュース ノロウイルスの感染予  
防 Dec.18, 2014.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし
1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし

表 1

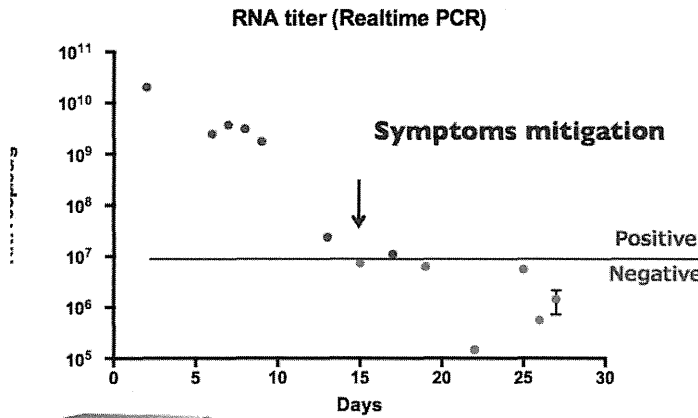
| Standard strain (NSC) |  |                                       | VLP name      | 抗体有無   |       |
|-----------------------|--|---------------------------------------|---------------|--------|-------|
| 遺伝子群                  | 新遺伝子型                                  | Strain                                | VLP name      | ウサギ・血清 | モノクロー |
| Genogroup I           | GI.1                                   | Hu/NV/GI/Aichi124-8/89/JP             | A124          | ○      | ○     |
|                       | GI.2                                   | Hu/NV/GI/Funabashi258/96/JP           | F258          | ○      | ○     |
|                       | GI.3                                   | Hu/NV/GI/Kashiwa645/99/JP             | K645          | ○      | ○     |
|                       |  | Hu/NV/GI.P3_G.3/Shi m a /KK2866/07/JP | KK2866        | ○      |       |
|                       | GI.4                                   | Hu/NV/GI/Chiba407/87/JP               | Chiba         | ○      | ○     |
|                       | GI.5                                   | Hu/NV/GI/SaitamaSzUG1/99/JP*          | SzUG1         | 作製中    | 作製中   |
|                       | GI.6                                   | Hu/NV/GI/WUG1/00/JP                   | W18           | ○      |       |
|                       | GI.7                                   | Hu/NV/GI/Winchester/94/UK             | Winchester    | 作製中    | 作製中   |
|                       | GI.8                                   | Hu/NV/GI.P8_G.8/N agoya/KY531/07/JP   | KY531         | ○      | ○     |
| GI.9                  | Hu/NV/GI/SaitamaT35aG1899/JP           | T35aG1                                | 作製中           | 作製中    |       |
| Genogroup II          | GII.1                                  | Hu/NV/GII/Noda485/00/JP               | N485          | ○      |       |
|                       |  | Hu/NV/GII/NG1/02/JP                   | NG1           | ○      |       |
|                       | GII.2                                  | Norovirus Hu/MK04/2004/JP             | MK04          | ○      |       |
|                       |  | Hu/NV/GII/Sanbu809/98/JP              | S809          | ○      |       |
|                       | GII.3                                  | Hu/NV/GII/SaitamaU201/98/JP           | U201          | ○      | ○     |
|                       |  | Hu/NV/GII/Matsudo18/00/JP             | M18-8         | ○      |       |
|                       |  | Hu/NV/GII/Kashiwa336/00/JP            | K336          | ○      |       |
|                       |  | Hu/NV/GII/SH5/97/JP                   | SH5           | ○      |       |
|                       |  | Hu/NV/GII/1152/91/JP                  | 1152          | ○      |       |
|                       | GII.4                                  | Hu/NV/GII/Narita104/97/JP             | N104          | ○      | ○     |
|                       |  | Hu/NV/GII-4Saga1/2006/JP              | Saga ( S4-8)  | ○      | ○     |
|                       |  | Hu/NV/GII-4Aomori2/2006/JP            | Aomori( A4-8) |        |       |
|                       |  |                                       | Fu2           | ○      | ○     |
|                       |  | Nii242                                | ○             |        |       |
|                       |  | HK01                                  | ○             |        |       |
|                       | GII.5                                  | Hu/NV/GII/Ichikawa754/98/JP           | K754          | ○      | ○     |
|                       | GII.6                                  | Hu/NV/GII/Ueno7k/94/JP                | U7K           | ○      |       |
|                       |  | Hu/NV/GII/Sanbu445/00/JP              | S445          |        |       |
|                       |  | Hu/NV/GII/V63/02/JP                   | V63           |        |       |
|                       | GII.7                                  | Hu/NV/GII/Osaka10-2/99/JP             | O10-25        |        | ○     |
|                       | GII.8                                  | Hu/NV/GII/SaitamaU25/99/JP            | U25           | ○      |       |
|                       |  | Hu/NV/GII/Mc24/99/TH                  | Mc24          | ○      |       |
|                       | GII.9                                  | VA97207/97                            | VA97207       | 作製中    | 作製中   |
|                       | GII.10                                 | Hu/NV/GII/26/00/JP                    | 026           | ○      |       |
|                       |  | Hu/NV/GII/NG15/03/JP                  | NG15          |        |       |
|                       | GII.11                                 | SwineNorovirus                        | -             |        |       |
|                       | GII.12                                 | Hu/NV/GII/Chitta/Aichi76-96/96/JP     | 1876          | ○      |       |
| Hu/NV/GII/Hiro/99/JP  |  | Hiro                                  | ○             |        |       |
| GII.13                | Hu/NV/GII/Kashiwa47/97/JP              | K47                                   | ○             |        |       |
| GII.14                | Hu/NV/GII/PT_GI.14/Fukuoka/KK282/07/JP | FK282                                 |               | ○      |       |
| GII.15                | Hu/NV/GII/Hokkaido299/07/JP            | HK299                                 | 作製中           | 作製中    |       |
| GII.16                | Hu/NV/GII/Kam o8/03/JP                 | Kom a7                                | ○             | ○      |       |
| GII.17                | Saitama/T87                            | ST87                                  | ○             | ○      |       |
| GII.18                | SwineNorovirus                         | -                                     |               |        |       |
| GII.19                | SwineNorovirus                         | -                                     |               |        |       |
| GII.20                | Hu/NV/GII/Luokenwaida591/07/JP         | Lu591                                 | 作製中           | 作製中    |       |
| GII.21                | Hu/NV/GII/SaitamaT53/99/JP             | T53                                   | 作製中           | 作製中    |       |
| GII.22                | Hu/NV/GII/Akita-Yuri/02/JP             | Yuri02                                | 作製中           | 作製中    |       |



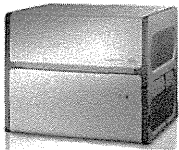
表 2

| Genogroup |         | GI     |      |      |       |      |      |      |      |      |       | GII  |      |      |      |      |      |        |       |      |      |      |      |      |      |     |
|-----------|---------|--------|------|------|-------|------|------|------|------|------|-------|------|------|------|------|------|------|--------|-------|------|------|------|------|------|------|-----|
| Genotype  | VLPs    | 1      | 2    | 3    | 4     | 8    | 1    | 2    | 3    | 3    | 3     | 3    | 3    | 4    | 5    | 6    | 6    | 7      | 8     | 8    | 10   | 12   | 12   | 14   |      |     |
| Antiserum | Strains | A124   | F258 | K645 | Chiba | W18  | N485 | NG1  | S809 | Sh5  | M18-3 | K336 | I152 | N104 | K754 | U7K  | S445 | O10-25 | Mc24  | U25  | 26   | 1876 | Hiro | K47  |      |     |
| GI        | 1       | A124   | 8192 | 1042 | 1024  | 1024 | 1024 | 128  | 256  | 256  | 256   | 256  | 256  | 128  | 128  | 256  | 256  | 256    | 128   | 128  | 256  | 256  | 256  | 256  | 256  |     |
|           | 2       | F258   | 512  | 8192 | 512   | 1024 | 512  | 16   | 64   | 32   | 128   | 64   | 32   | 16   | 128  | 128  | 64   | 64     | 32    | 32   | 64   | 128  | 32   | 64   | 32   |     |
|           | 3       | K645   | 256  | 256  | 8192  | 256  | 512  | 8    | 32   | 64   | 128   | 128  | 64   | 64   | 64   | 64   | 32   | 64     | 128   | 128  | 128  | 128  | 16   | 32   | 16   |     |
|           | 4       | Chiba  | 128  | 512  | 256   | 8192 | 512  | 4    | 32   | 64   | 128   | 64   | 32   | 64   | 32   | 32   | 32   | 32     | 64    | 64   | 64   | 64   | 16   | 64   | 32   |     |
|           | 6       | W18    | 256  | 512  | 256   | 256  | 8192 | 32   | 16   | 32   | 64    | 64   | 64   | 16   | 32   | 32   | 32   | 32     | 64    | 8    | 32   | 32   | 32   | 16   | 32   |     |
|           | 1       | N485   | 128  | 128  | 16    | 128  | 128  | 4096 | 128  | 256  | 256   | 256  | 256  | 64   | 128  | 256  | 128  | 128    | 128   | 64   | 256  | 256  | 512  | 256  | 256  |     |
| GII       | 2       | NG1    | <4   | 32   | 16    | 16   | 64   | 256  | 4096 | 128  | 128   | 256  | 128  | 64   | 512  | 512  | 256  | 128    | 128   | 256  | 128  | 512  | 256  | 512  | 128  |     |
|           | 3       | S809   | <2   | 4    | 4     | 8    | 32   | 128  | 128  | 8192 | 8192  | 4096 | 4096 | 1024 | 64   | 256  | 64   | 128    | 256   | 128  | 256  | 128  | 256  | 512  | 64   |     |
|           | 3       | Sh5    | 8    | 16   | 16    | 16   | 16   | 64   | 64   | 2048 | 2048  | 1024 | 1024 | 256  | 128  | 128  | 64   | 64     | 128   | 64   | 128  | 128  | 128  | 128  | 64   |     |
|           | 3       | M18-3  | 16   | 16   | 16    | 16   | 32   | 64   | 64   | 256  | 512   | 1024 | 512  | 128  | 64   | 64   | 64   | 64     | 128   | 64   | 128  | 128  | 128  | 128  | 64   |     |
|           | 3       | K336   | 32   | 16   | 32    | 32   | 32   | 128  | 128  | 1024 | 1024  | 1024 | 2048 | 512  | 128  | 128  | 128  | 128    | 256   | 128  | 256  | 128  | 256  | 256  | 128  |     |
|           | 3       | I152   | <4   | <4   | <4    | <4   | 8    | 16   | 32   | 512  | 1024  | 1024 | 1024 | 1024 | 32   | 64   | 32   | 32     | 32    | 32   | 32   | 32   | 16   | 32   | 8    |     |
|           | 4       | N104   | 32   | 64   | 128   | 64   | 256  | 512  | 512  | 512  | 512   | 1024 | 1024 | 128  | 8192 | 1024 | 256  | 512    | 512   | 256  | 512  | 512  | 512  | 512  | 512  |     |
|           | 5       | K754   | 128  | 128  | 64    | 128  | 256  | 1024 | 1024 | 512  | 1024  | 1024 | 1024 | 256  | 512  | 8192 | 512  | 1024   | 512   | 256  | 512  | 1024 | 1024 | 1024 | 512  |     |
|           | 6       | U7K    | 64   | 128  | 64    | 128  | 128  | 128  | 128  | 256  | 256   | 128  | 32   | 256  | 256  | 4096 | 2048 | 128    | 64    | 256  | 256  | 256  | 256  | 256  | 128  |     |
|           | 6       | S445   | 16   | 16   | 8     | 16   | 32   | 32   | 64   | 128  | 128   | 128  | 128  | 64   | 64   | 64   | 2048 | 4096   | 64    | 64   | 64   | 128  | 64   | 64   | 64   |     |
|           | 7       | O10-25 | 32   | 64   | 128   | 128  | 64   | 512  | 256  | 1024 | 512   | 1024 | 512  | 128  | 512  | 512  | 512  | 512    | 16384 | 512  | 1024 | 512  | 512  | 512  | 512  |     |
|           | 8       | Mc24   | 8    | 16   | 4     | 8    | 16   | 32   | NT   | 16   | NT    | 32   | 32   | 8    | 32   | 32   | 16   | 16     | 128   | 2048 | 2048 | 32   | 32   | 32   | 16   |     |
|           | 8       | U25    | 16   | 32   | 32    | 32   | 32   | 256  | 128  | 128  | 256   | 256  | 256  | 64   | 256  | 256  | 128  | 128    | 512   | 4096 | 4096 | 256  | 256  | 256  | 128  |     |
|           | 10      | 26     | 32   | 32   | 32    | 64   | 128  | 512  | 256  | 128  | 128   | 256  | 256  | 128  | 256  | 512  | 256  | 256    | 512   | 256  | 256  | 2048 | 512  | 512  | 256  |     |
| 12        | 1876    | 32     | 64   | 64   | 64    | 128  | 1024 | 512  | 256  | 256  | 512   | 64   | 512  | 256  | 512  | 256  | 256  | 256    | 256   | 256  | 128  | 512  | 1024 | 4096 | 2048 | 512 |
| 12        | Hiro    | <2     | 16   | 4    | 2     | 8    | 128  | 64   | 64   | 64   | 64    | 64   | 16   | 64   | 128  | 32   | 64   | 64     | 32    | 64   | 128  | 1024 | 1024 | 64   |      |     |
| 14        | K47     | 128    | 128  | 64   | 256   | 256  | 256  | 512  | 512  | 512  | 512   | 512  | 128  | 512  | 512  | 256  | 256  | 256    | 128   | 512  | 512  | 512  | 512  | 4096 |      |     |

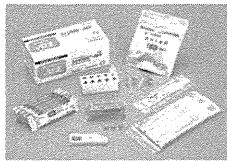
# Clinical symptom and viral shedding



| Days | Realtime PCR (copies/g) | Immuno Chromatography kit | Vesikari Severity Score |
|------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|
| 2    | 2.0E+10                 | +                         | 9                       |
| 6    | 2.5E+09                 | +                         | 6                       |
| 7    | 3.7E+09                 | +                         | 9                       |
| 8    | 3.1E+09                 | +                         | 9                       |
| 9    | 1.8E+09                 | +                         | 5                       |
| 13   | 2.4E+07                 | +                         | 0                       |
| 15   | 7.3E+06                 | -                         | 0                       |
| 17   | 1.1E+07                 | +                         | 0                       |
| 19   | 6.3E+06                 | -                         | 0                       |
| 22   | 1.5E+05                 | -                         | 0                       |
| 25   | 5.5E+06                 | -                         | 0                       |
| 26   | 5.6E+05                 | -                         | 0                       |
| 27   | 1.4E+06                 | -                         | 1                       |



Realtime PCR  
[Roche Life Science  
Lightcycler 480 II]  
↓  
Genomic copies/g feces

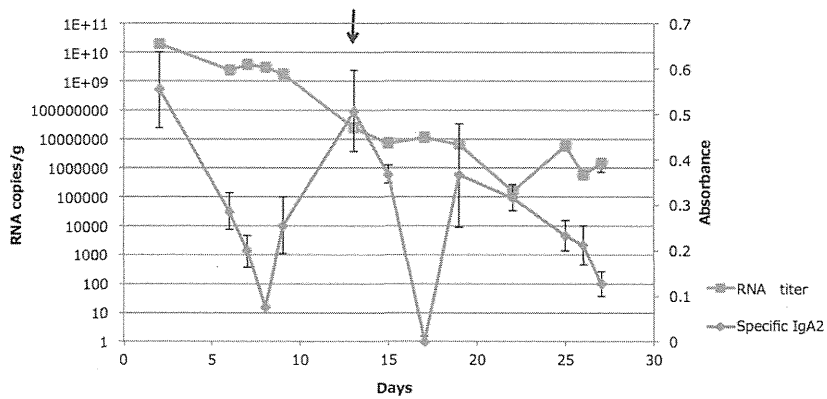
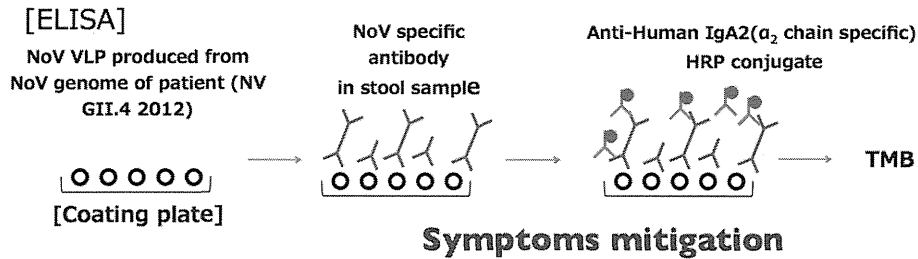


Immuno Chromatography  
[Denka Seiken Co.  
QuickNavi™ Norovirus2]  
↓  
The presence of antigen

- Virus shedding was detected by Realtime RT-PCR from 2 days to 27 days after onset.
- Virus shedding was detected by Immuno Chromatography from 2 days to 13 days after onset.
- The presence of antigen has correlated with the convergence of symptoms mitigation

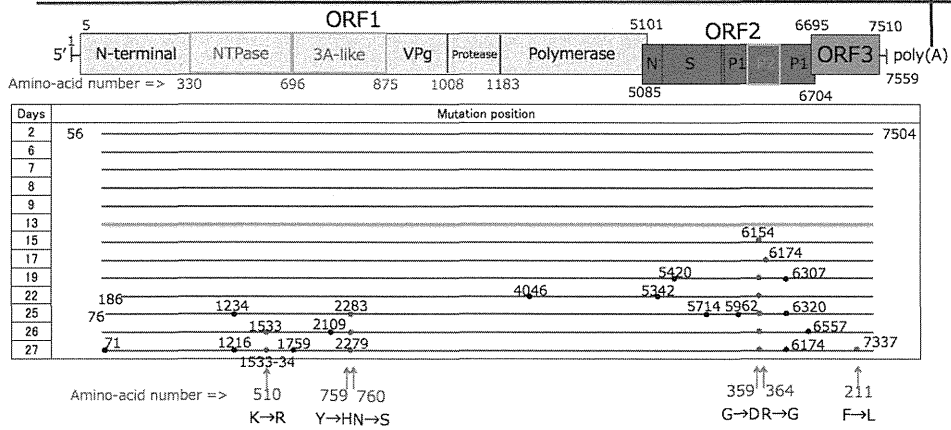
☒ 2

## Viral shedding and immune response



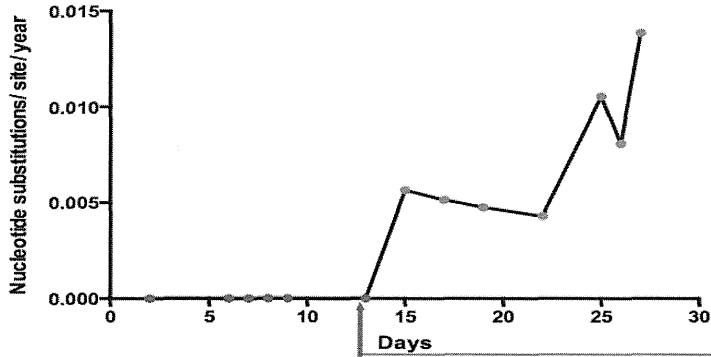
☒ 3

## Confirmation of site mutation(nucleotide & amino-acid)

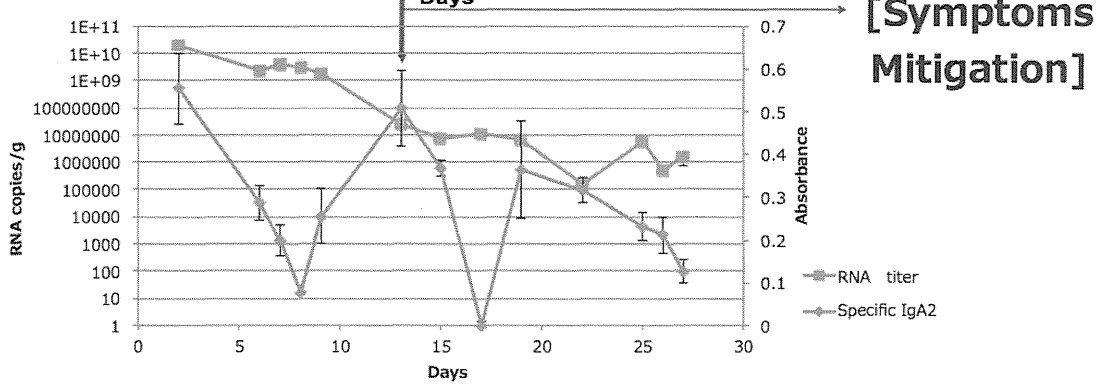


# Evolution speed analysis

Evolution speed between Day 2 and other days



[Bayesian evolution analysis sampling trees]  
 Rate heterogeneity model: *Lognormal relaxed clock*  
 Population growth model: *Bayesian skyline*



## デングウイルス感染症に対する次世代ワクチンの開発と インフルエンザに対する次世代ワクチンの開発

|       |        |                      |       |       |
|-------|--------|----------------------|-------|-------|
| 担当責任者 | 鈴木 忠樹  | 国立感染症研究所             | 感染病理部 | 室長    |
| 研究協力者 | 長谷川 秀樹 | 国立感染症研究所             | 感染病理部 | 部長    |
|       | 小島 朝人  | 国立感染症研究所             | 感染病理部 | 客員研究員 |
|       | 新倉 健一  | 北海道大学電子科学研究所         |       | 准教授   |
|       | 澤 洋文   | 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター |       | 教授    |
|       | 山口 喜之  | 国立感染症研究所             | 感染病理部 | 研究生   |
|       | 大原 有樹  | 国立感染症研究所             | 感染病理部 | 研究生   |
|       | 齊藤 慎二  | 国立感染症研究所             | 感染病理部 | 研究生   |

### 研究要旨：

これまでにウイルスワクチンとして抗原タンパク質自己集合能型VLPやリポソームに抗原タンパク質を埋め込んだ微粒子などが実用化されているが、これらの微粒子は粒子の大きさや形状のコントロールが非常に難しい。我々は、これまでの研究により抗原粒子の大きさや形状により免疫応答の経路がダイナミックに変化する事を見出し、大きさや形状を自由に变化させる事ができ生体不活性な金属である金ナノ粒子を用いてフラビウイルスのワクチンを作成し、ワクチン効果を制御することに成功している。そこで、本研究では、他のフラビウイルス属ウイルスで技術開発に成功している Virus Like Particle (VLP) 抗原生産技術を DENV に応用し、DENV の VLP 産生系を確立するとともに性状解析を行い、野生型 DENV 及び既に確立されているウエストナイルウイルス (WNV) の VLP と比較した。さらに、金ナノ粒子を用いて新たなインフルエンザワクチンの開発も試みた。

### A. 研究目的

#### 1. デングウイルス感染症に対する次世代ワクチンの開発

デングウイルス (DENV) はフラビウイルス属に属するウイルスであり、熱帯・亜熱帯地域に分布し、毎年約 3 億人の感染者が推定される。また、昨年には約 70 年ぶりとなる我国での国内感染例が確認された。ウイルスは主にネッタイシマカまたはヒトスジシマカにより媒介され、ヒ

トスジシマカは我国における生息が確認されているため国内感染の伝播が拡大する可能性がある。このような重要度の高い国際的な感染症に対する予防策は流行地のみならず、非流行地の人々のためにも確立される必要がある。

現在認可されたワクチンは存在せず、種々のワクチン開発が世界中で進行している。最も進展しているのは黄熱弱毒生ワクチン株である 17D 株を元にしたキメ

ラ弱毒生ワクチンであり、2015年1月に全ての臨床試験論文が出版され、発症予防効果は概ね50%であると発表された。しかし、我国を含む先進国では遺伝子組み換え生物である当ワクチンが認可される蓋然性は乏しい。古典的手法による弱毒ワクチンや不活化ワクチンも臨床試験段階であるが、DENV自体が培養細胞での増殖能が低く、ワクチンとして用いるには効率が悪い。製造の観点からみた場合、感染性ウイルスを用いるため製造に特別な施設が必要であり、そのコストがワクチン製造に負担となりうる。感染性ウイルスをワクチンに用いる欠点を克服したものがVLPワクチンであり、安全であり効率が良い。さらに感染性を持たないため、特別な製造施設を必要としない。

本研究では、哺乳動物由来細胞であるExpi293F細胞を用いて一過性にウイルス抗原(VLP)を産生する技術の構築し、作製したVLPの性状解析を、ELISA、ショ糖密度勾配遠心解析、透過型電子顕微鏡観察を用いて行なった。

## 2. インフルエンザに対する次世代ワクチンの開発

現行のインフルエンザワクチンは皮下接種によるもので、IgG抗体のみ誘導できる。これは感染後の重篤化は防げるものの、感染自体を防ぐことはできない。近年、インフルエンザワクチンを鼻に投与する、経鼻ワクチンと呼ばれる手法によりワクチンを投与することにより、粘膜上のIgA抗体の分泌を誘導し、高い効果が期待されているが、免疫誘導能が低く、何らかのアジュバントが必要と考えられている。しかしながら、経鼻投与ワクチンとして実績のあるアジュバントは未だ存在していない。これまでの研究によりインフルエンザワクチンのアジュバントとして期待されているものとしてTLR3

のリガンドであるPoly(I:C)と呼ばれる、ポリイノシン酸とポリシチジル酸からなる二本鎖RNAが挙げられる。Poly(I:C)は自然免疫を活性化することにより免疫原性を高めるが、その効果は塩基長に依存し、塩基長が長いほど活性が高い。しかし、塩基長が長いほど毒性が増大するため、実用化に至っていない。よって、低毒性かつ免疫賦活能力のある新しいアジュバントが必要とされている。

金ナノ粒子はそれ自身に対する抗体産生が無い場合、ワクチンの抗原のキャリアとして報告がある。近年、抗原を担持したナノ粒子やナノ粒子単体によって引き起こされる、サイズ・形状依存的な免疫応答が報告されている。これらの報告から、ナノ粒子が単なるキャリアだけでなく、アジュバントとして有効であることが示唆されている。しかし、ナノ粒子を用いるだけでは実用化に十分な免疫応答が得られておらず、さらなる改良が必要である。そこで、我々は金ナノ粒子上に鎖長の短く安全性の高いPoly(I:C)をコーティングし、これをアジュバントとして用いることで、毒性の出ない鎖長で効果的に免疫応答を惹起することのできる新たな粘膜アジュバントの開発を試みた。

## B. 研究方法

### 1. デングウイルス感染症に対する次世代ワクチンの開発

#### 1) VLP発現ベクターの構築

DENV1型、WNVゲノムのうち、構造タンパク質コード領域であるprM、E領域を組み込んだcDNAプラスミドを発現ベクターとして作製した。

#### 2) DENVまたはVLPの検出ELISA

フラビウイルス特異的なEタンパク質領域を検出する抗体(4G2)を用いて4G2:HRP-4G2(フラビウイルスEタンパ

ク質多量体検出) サンドイッチ ELISA を行い、DENV または VLP を定量した。

### 3) VLP の一過性発現系

発現細胞には市販の浮遊細胞 Expi293F 細胞(Life Science)を 37°C、CO<sub>2</sub> 8%、125rpm の条件で培養したものを用いた。遺伝子導入には、市販の Expi293F 細胞用トランスフェクション試薬を用いて推奨されている方法で行い、トランスフェクトされた細胞から培養上清中に放出された VLP を、上述した ELISA で定量した。

### 4) 野生型 DENV の発現

Vero E6 細胞に野生型 DENV1 型ウイルスを moi = 0.03 で感染させ、4 日後の培養上清を回収し、上述した ELISA を用いて定量した。

### 5) 発現 VLP の性状解析

細胞外に放出された DENV または VLP を含む培養上清を、5-30%速度ゾーンシヨ糖密度勾配遠心法で分画し、ELISA で検出することで DENV、VLP を沈降速度の違いによって比較した。

さらに、5-45%平衡沈降シヨ糖密度勾配法で濃縮・精製した VLP を透過型電子顕微鏡で観察し、実際に粒子形を形成しているかを確認した。

## 2. インフルエンザに対する次世代ワクチンの開発

### 1) 金ナノ粒子の合成

金ナノ粒子は Murphy らの手法を参考に合成を行い、表面がヘキサデシルアンモニウムブロミド (CTAB)、もしくはヘキサデシルアンモニウムクロリド (CTAC) で保護された直径 38±4.3nm もしくは 20±1.4nm の球状金ナノ粒子、及び長軸 27±3.1nm、短軸 7.3±0.97nm の金ナノロッドを得た。これらを遠心分離によって 3

回洗浄した後、(16-mercaptohexadecyl) trimethylammonium bromide (MTAB) を加え、金ナノ粒子表面を MTAB で修飾した。金ナノ粒子溶液を遠心分離により 3 回洗浄した後、ナノ粒子の終濃度が 1nM (40nm 球状金ナノ粒子、金ナノロッド)、または 5nM (20nm 球状金ナノ粒子)、Poly(I:C)の終濃度が 1mg/ml となるようにそれぞれ体積比 1:1 で混合し、ナノ粒子表面をコーティングした。

### 2) マウスを用いた免疫/攻撃感染実験

6~8 週齢、雌の BALB/c マウスを一群 6 匹で利用した。動物への処置は国立感染症研究所の定める動物実験実施規定に則り、苦痛を与えないように配慮した。これらの個体に HA タンパク量で 10ng の HA split vaccine A/California/7/2009 (H1N1pdm09)にアジュバント候補物質を混合し片鼻 5μL 合計 10μL を 3 週間隔で 2 回接種した。最終接種から 2 週間後に 2009 年のパンデミックの際に国内で分離され、その後マウスに対して馴化を行った A/ Narita/1/09 (NRT 株、(H1N1)pdm09) を 4000 PFU/4μL で鼻腔内に感染させた。感染 3 日後に安楽殺を行い、血清および鼻腔洗浄液を回収した。鼻腔洗浄液は、1% BSA を含む PBS(-) 1 mL で上気道を繰り返し 3 回洗浄することで回収した。

### 3) ウイルスの定量

MDCK 細胞を用いたプラークアッセイ法により、鼻腔洗浄液中のウイルス価を算出した。MDCK 細胞に希釈した鼻腔洗浄液を 200 μL 添加し、37°C の培養器内で 1 時間の吸着操作を行った。その後、細胞を洗浄しアガロース添加培地を重層して 37°C で 40 時間培養した。アガロース培地を剥離したのちに、クリスタルバイオレット染色液で染色し、プラーク数を数え、ウイルス価の算出を行った。

## C. 研究結果

### 1. デングウイルス感染症に対する次世代ワクチンの開発

#### 1) DENV および VLP の、細胞外に放出される抗原量の比較

4G2:HRP-4G2 (フラビウイルス E タンパク質多量体検出) サンドイッチ ELISA を用いて DENV および VLP の培養上清中の ELISA 価を定量した結果、単位培養上清あたり DENV-VLP は DENV の約 10 倍、WNV-VLP は DENV-VLP のさらに約 10 倍の ELISA 価の抗原が培養上清中に存在することが確認された。

#### 2) DENV および VLP の速度ゾーンシヨ糖密度勾配遠心解析

DENV、VLP の培養上清を速度ゾーンシヨ糖密度勾配遠心法で解析したところ、DENV は比重  $d=1.111$ ,  $d=1.091$  の分画に、DENV-VLP は  $d=1.089$ ,  $d=1.059$  の分画に、WNV-VLP は  $d=1.118$ ,  $d=1.060$  の分画にそれぞれ二相性のピークを描いて分離された。分画された DENV の感染性を、Vero E6 細胞を用いたプラークアッセイ法で確認した所、沈降速度の早い分画( $d=1.111$ )には感染性が確認され、沈降速度の遅い分画( $d=1.091$ )には感染性が確認されなかった。DENV の感染性の無い沈降速度の遅い分画( $d=1.091$ )は、DENV-VLP の沈降速度の早い分画( $d=1.089$ )とほぼ同等の沈降速度である。

#### 3) VLP の透過型電子顕微鏡観察

DENV-VLP および WNV-VLP の培養上清をシヨ糖クッション法で濃縮した後、平衡沈降シヨ糖密度勾配遠心法で分画したところ、共に  $d=1.180$  から  $d=1.150$  の分画に単相性のピークを描いて分画された。その分画を、限外濾過法を用いてシヨ糖から PBS(-)に置換した後、透過型電子顕

微鏡で観察したところ、共に大きさの異なる粒子形の構造を確認した。

### 2. インフルエンザに対する次世代ワクチンの開発

40nm 球状金ナノ粒子、金ナノロッド、20nm 球状金ナノ粒子を Poly(I:C) と結合させた各アジュバントと HA 抗原を含むワクチンを経鼻接種したマウスにインフルエンザウイルス攻撃感染したところ、ロッド型金ナノ粒子-Poly(I:C) からなるアジュバント添加群でのみ鼻腔洗浄液中ウイルス量が有意に減少していた。これらの有意な変化はロッド型金ナノ粒子単体添加群および Poly(I:C) 単体添加群では認められなかったことから、Poly(I:C) のアジュバント活性がロッド型金ナノ粒子-Poly(I:C) 複合体化によって増幅されたことと考えられた。また、球型金ナノ粒子-Poly(I:C) を含む組成物添加群でもウイルス量の有意な減少が認められなかったことから、ロッド型の粒子形状が Poly(I:C) のアジュバント活性上昇に寄与していることと考えられた。

## D. 考察

### 1. デングウイルス感染症に対する次世代ワクチンの開発

哺乳動物由来の Expi293F 細胞を用いて発現させた DENV-VLP の単位培養上清あたりの ELISA 価は、Vero E6 細胞を用いて作製した DENV と比較して約 10 倍であり、より効率良くワクチン抗原を作製できることが確認された。従来のウイルスを用いる方法と比較して容易に抗原を大量製造することが可能である。

WNV-VLP の ELISA 価は DENV-VLP のさらに 10 倍であり、より効率良くワクチン抗原を作製するため、更に DENV-VLP の発現系を改良する必要がある。

速度ゾーンシヨ糖密度勾配遠心法を用



いて解析した DENV およびそれぞれの VLP は、全て二相性のピークを描いて分画され、DENV の沈降速度の遅い分画と DENV-VLP の沈降速度の早い分画はほぼ同等の比重に分画された。DENV の沈降速度の遅い分画には感染性が無く、sub viral particle と呼ばれる、内部にゲノムが取り込まれていない不完全なウイルス粒子であると推察される。sub viral particle にも感染性ウイルス粒子と同様の免疫原性があることが知られているので、DENV の沈降速度の遅い分画と DENV-VLP の沈降速度の早い分画が同じ性質を持つ粒子であるならば、DENV-VLP にも十分な免疫原性が期待できる。

平衡沈降シヨ糖密度勾配遠心法を用いて分画した VLP は、速度ゾーンシヨ糖密度勾配遠心の場合とは異なり単相性のピークを描いた。速度ゾーンシヨ糖密度勾配遠心法は、粒子を比重と浮力の比によって分画されるので、例えばウイルス粒子の構造タンパク質が糖鎖修飾された場合、修飾されていない粒子と分画位置が異なる場合が考えられる。対して平衡沈降シヨ糖密度勾配遠心法は、粒子を比重によってのみ分画するので、糖鎖修飾の有無に関わらず同じ位置に分画され得る。ピークの分画を PBS(-)に置換し、透過型電子顕微鏡で観察したところ粒子構造が確認された。粒子は主に直径約 20nm と約 40nm のものが存在した。野生型の DENV は直径が約 40nm であることから、大きい方の粒子が sub viral particle と同等の VLP である可能性が高いと考えられる。

## 2. インフルエンザに対する次世代ワクチンの開発

本研究では、新たなインフルエンザワクチン開発のために経鼻インフルエンザの粘膜アジュバントとなる物質の新規合成を行った。鎖長が短く毒性の低い

Poly(I:C)は、それ単独では、アジュバント活性は見られず、金ナノ粒子単体でもアジュバント活性は見られなかったら、両者を結合させることにより、アジュバント活性を誘導することに成功した。さらに、このアジュバント活性は金ナノ粒子の形状に依存しており、これまで知られていなかった現象を見出した可能性が考えられる。核酸のナノ粒子化によるアジュバント効果の制御という技術は、全く新しい観点でのアジュバント開発につながる可能性が考えられ、様々なワクチンに応用できることが期待される。

## E. 結論

### 1. デングウイルス感染症に対する次世代ワクチンの開発

Expi293F 細胞を用いて作製した DENV-VLP は Vero E6 細胞を用いた DENV よりも約 10 倍の抗原を発現し、DENV-VLP の一部はシヨ糖中の沈降速度が DENV の sub viral particle と同等であったため、この二つは同じものである可能性が高く、DENV-VLP はワクチン抗原の候補となりうると考えられる。

### 2. インフルエンザに対する次世代ワクチンの開発

金ナノ粒子上に鎖長の短く安全性の高い Poly(I:C)をコーティングし、これをアジュバントとして用いることで、毒性の出ない鎖長で効果的に免疫応答を惹起することのできる新たな粘膜アジュバントの開発を試みた。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1.) van Riet E, Ainai A, Suzuki T, Kersten G, Hasegawa H. Combatting infectious diseases; nanotechnology as a platform for rational vaccine design. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014 Jul 30;74:28-34.
2. 学会発表
- 【国内会議】
- 1.) 山口喜之、小島朝人、長谷川秀樹、鈴木忠樹：デングウイルス(DENV)のエンベロープタンパク質を持つウイルス様粒子の作製と性状解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月、神奈川
  - 2.) 齊藤慎二、van Riet Elly、相内章、鈴木忠樹、池田千将、伊藤良、泉地恭輔、高橋宜聖、浅沼秀樹、小田切孝人、田代真人、田村慎一、竹山春子、長谷川秀樹：高病原性鳥インフルエンザ A (H5N1) ウイルスの経鼻不活化全粒子ワクチンにより誘導されたヒトモノクローナル抗体の特性解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月、神奈川
  - 3.) 大原有樹、鈴木忠樹、中野哲郎、齊藤慎二、相内章、秋本和憲、長谷川秀樹：低毒性型合成二重鎖 RNA uPIC を用いた経鼻インフルエンザワクチンの開発。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月、神奈川
  - 4.) 長谷川秀樹、相内章、鈴木忠樹、川口晶、田村慎一、小田切孝人、田代真人：経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンと現行皮下接種ワクチンの抗体応答の比較。第 18 回日本ワクチン学会学術集会、2014 年 12 月、福岡
  - 5.) 齊藤慎二、van Riet Elly、相内章、鈴木忠樹、大原有樹、池田千将、伊藤良、泉地恭輔、高橋宜聖、浅沼秀樹、小田切孝人、田代真人、田村慎一、竹山春子、長谷川秀樹：経鼻インフルエンザワクチンにより誘導されたヒトモノクローナル抗体の特性解析。第 18 回日本ワクチン学会学術集会、2014 年 12 月、福岡
- 6.) 相内章、鈴木忠樹、齊藤慎二、田村慎一、幸義和、小田切孝人、田代真人、清野宏、長谷川秀樹：経鼻インフルエンザワクチンの動態と抗体応答。第 18 回日本ワクチン学会学術集会、2014 年 12 月、福岡
  - 7.) 鈴木忠樹、大原有樹、中野哲郎、齊藤慎二、寺内芳彦、相内章、長谷川秀樹：合成二本鎖 RNA uPIC をアジュバントとする経鼻不活化インフルエンザワクチンの開発。第 18 回日本ワクチン学会学術集会、2014 年 12 月、福岡
- 【国際会議】
- なし
- Ⅱ. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得  
発明の名称：ロッド型ナノ粒子及び核酸からなる組成物  
出願番号：特願 2014-252111  
出願日：2014 年 12 月 12 日
  2. 実用新案登録  
該当なし
  3. その他  
該当なし

## 免疫原性を改善した H7N9 ワクチンの開発

担当責任者 高橋 宜聖 国立感染症研究所免疫部 室長  
研究協力者 安達 悠 国立感染症研究所免疫部 研究員  
阿戸 学 国立感染症研究所免疫部 部長  
山本 典夫 順天堂大学医学部 准教授

### 研究要旨

A/H7N9 ワクチン臨床試験の結果から、他のサブタイプの A 型ウイルスに比べ、この A/H7N9 ウイルスの免疫原性は低いと想定されている。H7N9 ワクチンの低免疫原性を改善するため、サポニンベースアジュバントの添加型ワクチンや VLP ワクチンが開発され、一定の改善効果が確認されている。しかし、これらワクチン導入のために克服すべき課題を考慮すると、可能な限り現行の剤形に沿ったシードワクチンを開発することが望ましい。本研究では、ヒト末梢血細胞を移植したヒト化マウスを用いることにより、インフルエンザワクチンの免疫原性評価システムを構築した。興味深いことに、本システムを用いることにより、H7N9 ワクチンの低免疫原性を再現することが可能であった。さらに、H7 ヘマグルチニンに人為的に変異を導入した変異型 H7 ヘマグルチニンを複製し、ヒト化マウスを用いて免疫原性を検証した結果、免疫原性改善効果を有する変異型 H7 ヘマグルチニンを同定することに成功した。以上、本研究から、免疫原性を改善した H7 ヘマグルチニン構造を明らかにするとともに、本研究アプローチは、他のワクチンの免疫原性改善にも応用可能と推察される。

### A. 研究目的

これまでの臨床試験の結果から、不活化 H7N9 ワクチンに含まれる H7 ヘマグルチニン（HA）はヒトでの免疫原性が低いと考えられている。この低免疫原性を克服するため、海外ではサポニンベースアジュバントの添加や接種量の増加が検討されているものの、導入に際して克服すべき課題を考慮すると、アジュバントや剤形に依存しないワクチン種株の開発が望ましい。本研究では、H7 HA の一次構造を修飾することにより、ヒトでの免疫原性を改善した H7N9 ワクチンの開発

を試みる。

### B. 研究方法

1. インフルエンザワクチンの調製  
リバーシジェネティクスによりヘマグルチニン（HA）とノイラミニダーゼ（NA）以外を A/Puerto Rico/8/34 (H1N1; PR8) 由来に置き換えた H7N9 型ワクチン株 NIBRG-268 (A/Anhui/1/2013 由来)と、対照として、同様に PR8 由来の内部タンパクを有する H3N2 型ワクチン株である IVR-165 と X31 を使用した。各ウイルスを発育鶏卵で増幅した後、ショ糖密度勾配遠心法で精製し、0.05%ホルマリンで不

活化した。また、HA ワクチンとして、バキュロウイルス発現系を用いて作製した組換え HA タンパクを使用した。

## 2. ヒト末梢血細胞を移植したヒト化マウスの作製

H7N9 に対する血清 HI 抗体価が 10 以下の健常人からヘパリン含有末梢血を採取し、フィコール遠心分離により末梢血単核球を分離した。これをヒト組織の生着性に優れた NOD/SCID/Jak3<sup>-/-</sup>マウスに移植したヒト化マウスを作製した。

## 3. ワクチンに対するドナー由来液性免疫応答の測定

ヒト化マウスの尾静脈にワクチンを接種し、その 10 日後に血清と脾臓細胞を回収した。バキュロウイルス発現系にて作製した組換え HA タンパクを ELISA プレートや ELISPOT プレートにコーティングし、1% BSA でブロッキング後、ヒト血清中に含まれるヒト抗 HA IgG 抗体濃度と、ヒト抗 HA IgG 抗体産生細胞数を ELISA と ELISPOT 法により測定した。

(倫理面への配慮)

全ての実験は国立感染症研究所戸山庁舎高度安全実験施設において、国立感染症研究所病原体等安全管理規程および動物実験委員会規程に従い実施した。動物実験は、動物実験委員会の承認を得てから行い、ヒト試料を用いた実験は、ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を得てから行った。

## C. 研究結果

### 1. ヒト化マウスを用いたインフルエンザワクチン免疫原性の評価

現行のインフルエンザワクチンは免疫記憶リンパ球を再活性化して、抗 HA 抗体を惹起することを主目的とする。ヒト末

梢血中には、免疫記憶を司る記憶 B リンパ球と記憶 T リンパ球の双方が存在し、ワクチン抗原に反応したこの両者のクロストークによって、抗 HA 抗体産生が行われる。ヒト化マウスでは、移植したドナー由来記憶 B リンパ球・T リンパ球のクロストークによって抗 HA 抗体産生が行われるため、ヒトにワクチン接種した際に誘導される免疫記憶応答の大部分を本マウス内において再現することが可能となる。

実際、我々のヒト化マウスのシステムで、インフルエンザワクチンに対するヒト抗体応答が認められるか否か検証するため、3 名のドナーから各 3 匹のヒト化マウスを作製し、3 種類の異なる量の H3N2 ワクチンを接種した (図 1 A)。すると、濃度依存的にヒト抗 H3 HA IgG 抗体がマウス血中に産生されることが確認された。本結果を踏まえ、以降の実験では 90 µg のワクチン量を用いて解析を行った。

### 2. 不活化全粒子ワクチンと HA ワクチンの免疫原性の評価

免疫記憶を有している健常人に、不活化全粒子ワクチンや HA スプリットワクチンを追加接種した場合、抗体産生惹起能に大きな差はないことが報告されている。ヒト化マウスでも同様な現象が認められるか否か検証するため、このマウスに H3N2 型不活化全粒子ワクチン (X31 由来)、もしくは X31 HA ワクチンを接種し、血清中の抗 HA IgG 抗体価 (図 1 B) と脾臓中の抗 HA IgG 抗体産生細胞数 (図 1 C) を測定した。その結果、少なくともワクチン接種 10 日後において、不活化全粒子ワクチンと HA ワクチンの間に有意な免疫原性の差は認められなかった。この結果から、H7 HA の免疫原性評価には、不活化全粒子ワクチンと HA ワクチンのいずれの剤形も利用可能であると考えら