

論文の内容の要旨

論文題目

組換えワクシニアウイルスを用いた SARS ワクチンの開発

指導教官 松島 綱治教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

社会医学専攻

氏名 北島 正大

研究の背景および目的

重症急性呼吸器症候群 (Severe Acute Respiratory Syndrome; SARS) は 21 世紀最初に出現した新興感染症である。その被害は 2002 年中国広東省広州で最初の感染者が報告された後、世界 29 カ国へと広がり、感染者 8098 名、死者 774 名にも及んだ。日本では 52 件の SARS 疑い例と 16 件の SARS 可能性例が報告されたものの、最終的には感染者は認められず、SARS の大流行から逃れることができた。しかし、2003 年 7 月 5 日に世界保健機構より SARS の終息が宣言された後も、中国で数件の SARS の発症例が報告されており、依然として SARS の再流行が懸念されている。

SARS の原因ウイルスは既知のコロナウイルスとは異なる新型のコロナウイルスであることが報告され、SARS コロナウイルス (SARS-CoV) と命名された。SARS-CoV は他のコロナウイルス科のウイルスと同様に約 30000 塩基の一本鎖 (+) RNA をゲノムとし、spike、nucleocapsid、envelope、membrane の 4 種類の構造タンパク質により構成される。

現在までに SARS ワクチンの候補としては不活化ワクチン、SARS-CoV の構

造タンパク質を発現する DNA ワクチンや非増殖性の組換えウイルスによるワクチンが報告されている。しかし、これらのワクチンの多くは複数回接種を前提としたワクチンであり、pandemic が起きた際に、短期間にワクチン効果を誘導するには十分とは言えない。

本研究は人での増殖性を示す弱毒性ワクシニアウイルス LC16m8 を用いた組換えワクシニアウイルスによる SARS ワクチンの開発を目的として行った。LC16m8 株は橋爪らによって Lister 株より弱毒化された株であり、皮膚増殖性、中枢神経毒性が極めて低く、これまでに 10 万人以上の小児に接種され、重篤な副作用を示さなかったこと、免疫原性がワクチン株である Lister 株と同等であったことから 1975 年に厚生省により天然痘ワクチンとしての認可を受けている。私は LC16m8 株を組換えウイルスの母体とし、志田らによって開発された強力なプロモーターである ATI/p7.5 ハイブリットプロモーターにより SARS-CoV spike タンパク質を発現する組換えワクシニアウイルス RVV-S を作製し、SARS ワクチンとしての効果を検討した。

方法と結果

1) SARS-CoV spike タンパク質を発現する組換えワクシニアウイルス RVV-S の作製

SARS-CoV (Vietnam/NB-04/2003 株) を VERO E6 細胞中で 2 回継代したウイルスより RNA を抽出単離し、逆転写反応により cDNA 合成した。合成した cDNA から全長の spike タンパク質遺伝子を翻訳開始点の 10 塩基上流からクローニングし、ワクシニアウイルスの相同組換え用プラスミドベクター pSFJ1-10 に挿入した。得られたクローンの中で *urbani* 株と最も配列が近いクローンを基に 4 ヶ所に変異を導入し、*urbani* 株の spike タンパク質とアミノ酸配列が同一であり、ワクシニアウイルス前期プロモーターの転写終結配列 (TTTTTNT) を含まない spike タンパク質遺伝子を持つプラスミド pSFJ1-10-SARS-S を作製した。LC16m8 を感染させたウサギ初代腎臓細胞に pSFJ1-10-SARS-S を導入することにより、ワクシニアウイルスのヘマグルチニン (HA) 遺伝子領域で相同組換えを引き起こさせ、組換えワクシニアウイルス RVV-S を作製した。RVV-S は HA の発現が欠損するため、RVV-S が形成するプラークは赤血球凝集反応を示さない。よって、赤血球凝集反応陰性のプラークをスクリーニングし、PCR 法およびプラークハイブリダイゼーション法によ

り spike タンパク質遺伝子の挿入を確認した。RVV-S 感染による spike タンパク質の発現はウエスタンブロット法により解析した。結果、RVV-S 感染細胞においてのみ、作製した 2 種類の抗 spike ポリクローナル抗体により spike タンパク質の分子量と一致する約 180kDa の位置にバンドが検出された。また、RVV-S 感染による spike タンパク質発現は蛍光免疫染色法によっても認められた。これらの結果より、RVV-S 感染による spike タンパク質の発現が示された。

2) RVV-S 接種による SARS-CoV に対する中和抗体の誘導

10⁸ PFU の RVV-S または LC16m8 をウサギ (New Zealand White 種) の皮内より 0 週および 6 週に接種し、経時的に採血を行って、抗血清の spike タンパク質に対する結合能を解析した。全長の His 標識 spike タンパク質を抗原として ELISA を行った結果、RVV-S を接種したウサギ血清は接種 2 週間後より spike タンパクに対する抗原抗体反応が認められ、追加接種によりほぼ 10 倍の抗体価の上昇が認められた。また、SARS 患者血清が反応することが報告されている 3 種類の spike タンパク質由来の peptide を抗原として ELISA を行った結果、RVV-S 接種群では 3 種類すべての抗原に対して抗原抗体反応が認められた。一方、LC16m8 を接種した群においてはほとんど反応が認められなかった。以上の結果より、RVV-S は複数のエピトープを認識する spike タンパク質に対する結合抗体を誘導することが明らかとなった。

次に抗血清の SARS-CoV に対する中和能を *in vitro* SARS-CoV 中和試験により解析した。RVV-S 接種群は接種 1 週間後から SARS-CoV に対する中和反応を示し、中和抗体価は接種 3 週間後には 1:100 以上まで上昇した。また、追加接種 2 週間後には中和抗体価はさらに約 10 倍上昇した。一方、LC16m8 接種群は SARS-CoV に対する中和反応を示さなかった。また、RVV-S 接種による SARS-CoV に対する中和抗体の誘導は 10⁶、10⁷ PFU 接種群においても認められ、10⁷ PFU 接種群の中和抗体価は 10⁸ PFU 接種群とほぼ同等であることが示された。一方、10⁶ PFU 接種群の中和抗体価は 10⁸ PFU 接種群より低かったものの、同用量の追加接種により中和抗体価は約 1:300 まで上昇が認められた。以上の結果より、10⁶ PFU 以上の RVV-S の接種により SARS-CoV に対する中和抗体が誘導されることが示された。

3) ワクシニアウイルスに対する免疫を持つ個体に対する RVV-S 接種による SARS-CoV に対する中和抗体の誘導

10⁸ PFU の LC16m8 を 0 週および 6 週に接種したウサギに対し、10⁸ PFU の RVV-S を追加免疫（12 週および 18 週に接種）することにより、SARS-CoV に対する中和抗体を誘導することが可能であるか検討した。LC16m8 を接種した 12 週間後にはワクシニアウイルスに対する中和抗体価は 1:4096 という非常に高い値を示した。これらのウサギに 10⁸ PFU の RVV-S を追加接種した結果、接種した 3 匹すべてにおいて接種 2 週間後から SARS-CoV に対する中和抗体が誘導された。また RVV-S の 2 回目の接種によるブースト効果も認められ、中和抗体価は LC16m8 を事前接種しなかった群と同等であった。以上の結果より、10⁸ PFU の RVV-S の接種はワクシニアウイルスに対する中和抗体の影響を受けずに、SARS-CoV に対する中和抗体を誘導できることが示された。

考察

本研究において、RVV-S は単回接種により接種 1 週間後という非常に早期から SARS-CoV に対する中和抗体を強力に誘導すること、ワクシニアウイルスに対して免疫を持つ個体に対しても SARS-CoV に対する中和抗体を誘導できることを明らかにした。SARS において致死率の高い高齢者の大部分は天然痘ワクチンとしてワクシニアウイルスを接種しており、ワクシニアウイルスに対する免疫を保持していると考えられるが、これらの人々に対しても RVV-S はワクチンとしての効果が期待できる。また、LC16m8 を使用した組換えワクシニアウイルスは LC16m8 の弱毒化した性質を保持することが報告されていることから、RVV-S も高い安全性を持つと予測される。よって、RVV-S は高い安全性と効果を持つ SARS ワクチンとして、今後の臨床応用が期待される。また、LC16m8 と ATI/p7.5 ハイブリットプロモーターを組み合わせた組換えワクシニアワクチンは SARS のみならず、インフルエンザなど種々の感染症に対しても有力なワクチンとなることが期待される。