

令和元年6月6日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21354

研究課題名(和文) RSV/麻疹キメラウイルスの免疫原性の検討

研究課題名(英文) Immunogenic investigation of RSV/Measles chimeric virus

研究代表者

澤田 成史 (SAWADA, AKIHITO)

北里大学・感染制御科学府・助教

研究者番号：40726535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：RSVに対する有効なワクチンは未だ存在していない。麻疹ワクチンAIK-C株をウイルスベクターとして用い、AIK-C株の外殻タンパクをRSVの外殻タンパクに置換したキメラウイルスを作製した。感受性動物であるコットンラットを用いてキメラウイルスの免疫原性について検討した。結果、筋注でキメラウイルスを免疫したラットではRSVに対する中和抗体を産生した。さらにRSV感染実験において、免疫ラットは肺内のRSV感染を抑制し、肺組織における炎症反応もRSV感染ラットと比較して軽微であった。このことよりキメラウイルスは新規RSVワクチンに対して有効な可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RSVは乳幼児時期に感染すると重篤な呼吸器感染症を引き起こすウイルスで、有効なワクチン開発が望まれている。しかし未だ有効なワクチンは存在しない。本研究では麻疹ワクチンAIK-C株をウイルスベクターとして使用し新規RSVワクチン(キメラウイルス)の開発を試みた。コットンラットを用いてキメラウイルスの免疫原性の評価を行ったところ、RSV感染を防御できたことを確認した。さらに麻疹ワクチン株の性状も保持していたことから、安全性という側面からも有用であると考えられた。以上のことから新規RSVワクチン候補の1つとしての可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The effective vaccine against the RSV is not yet present. We used measles vaccine AIK-C strain as a viral vector and produced the chimeric virus which substituted the coat protein of the AIK-C strain for coat protein of the RSV. We examined the immunogenicity of the chimeric virus using the cotton rat. The results, the chimeric virus induced a neutralizing antibody for the RSV by administering it intramuscularly. Furthermore, in the RSV infection experiment, the immune rat inhibited intrapulmonary RSV infection. And the inflammatory response in the lung tissue was more minimal than an RSV infected rat. In this study, As for the chimeric virus, the potential as the candidate of the new RSV vaccine was suggested.

研究分野：ワクチン学

キーワード：RSV ワクチン キメラウイルス コットンラット 中和抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

RSV 感染症は 2 歳までにほぼ全員が経験し、乳幼児期においては細気管支炎などの重篤な下気道感染を引き起こすことが知られている。現在、RSV の外殻タンパクである F タンパクを用いたモノクローナル抗体製剤が予防的に投与されている。しかし高価なうえ、流行期に毎月接種しなければならず、さらに使用は心疾患児、低出生体重児、ダウン症児等に対してと使用の制限がある。そのため有効かつ安全なワクチン開発が望まれているが未だ現れていない現状である。これまでに不活化ワクチン、弱毒変異株作製、サブユニットワクチンなど様々な方法でワクチン開発が試みられてきた。近年開発されたりバースジェネティクス法を用いて作製されたウイルスベクターの使用によるワクチン開発の試みがある。

ウイルスベクターの利用の 1 つとして現在使用されている弱毒生麻疹ワクチン AIK-C 株がある。AIK-C 株は有効性と安全性が確立されているワクチンであり、ウイルスベクターとして用いて RSV の F タンパクを放出する組換え麻疹ウイルスの作製はこれまでに成功している (Sawada A, et al. Vaccine 2011)。さらに麻疹ウイルス、RSV などの呼吸器感染症ウイルスに感受性のあるコットンラットを用いて免疫原性、感染防御能を検討したところ、組換え麻疹ウイルスは元のワクチンの安全性に關与している温度感受性の性状を保持したまま、RSV に対する中和抗体を獲得し、RSV 感染を抑制することが確認できている。

さらなる RSV 感染に対する感染防御能の向上を検討するために AIK-C 株の細胞外ドメイン (F, HN タンパク) を RSV の細胞外ドメイン (F, G タンパク) に置換したキメラウイルスの作製を施行した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、作製した RSV/麻疹キメラウイルスの性状解析、親株の RSV との病原性の比較、ならびに免疫原性を RSV、麻疹ウイルスに感受性のあるコットンラットを用いて検討することである。ウイルスベクターを用いたワクチン開発ではアデノウイルス、パラインフルエンザウイルス 3 型などが使用されているが、現在も使用されており有効性、安全性の確立されているワクチン株を用いた研究は報告が限られている。これまでに報告してきた組換え麻疹ウイルスでは麻疹ウイルスの侵入経路を取り感染し、麻疹ウイルスの増殖とともに免疫原性に關与する RSV のタンパクを放出する形態をとっている。一方キメラウイルスの感染様式は RSV の感染形態を維持したまま細胞へ侵入するため、通常の RSV 感染様式を取ると想定される。そのためより自然な感染の反応を検討できると想定される。

得られた結果は RSV に対する新規ワクチン開発におけるカニクイザルなどの高次動物を用いた研究のための足がかりとなると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 温度感受性試験

キメラウイルスおよび親株として用いた麻疹ウイルス AIK-C、RSV Long 株を Vero 細胞に MOI = 0.1 で感染させ、33, 35, 37, 39 で 1 週間培養した。培養後、上清を回収し、ウイルス力価 (TCID₅₀/mL) を測定した。

(2) 病原性の比較

キメラウイルス、RSV Long 株をそれぞれコットンラット (n = 3) に 10⁶ PFU の経鼻感染させた。感染 5 日後に肺組織を回収し、肺内ウイルス量 (PFU/50mg Lung tissue) の測定および、HE 染色による病理観察を行った。

(3) 免疫原性の検討

コットンラット (n = 3) にキメラウイルス、AIK-C をそれぞれ 10⁶ TCID₅₀ 筋注により免疫した。経時的 (接種前、1, 3, 5, 8 週) に血清を回収し、RSV に対する中和抗体価を 50% ブラーク減少法により測定した。さらに初回免疫 8 週後に同量のウイルス量で再免疫を行い、9, 12 週に血清を回収し測定を行った。

(4) 感染防御能の検討

キメラウイルス、AIK-C でそれぞれ 10⁶ TCID₅₀ 筋注で免疫したコットンラット (n = 3) を 8 週後に 5 x 10⁵ PFU の RSV Long 株を経鼻感染させた。比較対象として同量の RSV を感染させたラットも準備し、感染 4 日後に肺組織を回収し、肺内ウイルス量の測定および HE 染色による病理観察を行った。

肺組織の一部をホモジネートし、RNA を抽出し、real-time PCR 法によりコットンラットのサイトカイン、ケモカイン (IL-1β, 2, 4, 10, IFN-γ, RANTES, TNF-α, GM-CSF) の発現量を正常ラットの肺組織の発現量と比較した。

(5) 投与経路、接種回数 の検討。

10⁶ TCID₅₀ のキメラウイルスを経鼻接種、筋注接種と異なる接種方法によりコットンラット (n = 3) に免疫した。経時的 (接種前、1, 3, 5, 8 週、および再免疫後 1, 3 週) に回収した血清を用いた中和抗体測定による免疫原性の比較、再免疫による変化の確認、RSV 感染実験による防御能の検討を行った。

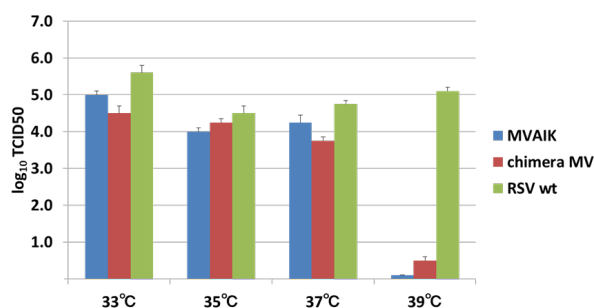
4. 研究成果

(1) キメラウイルスの性状解析

親株である AIK-C は 33 で最も増殖し、39 では増殖しない温度感受性の特徴がある。この温度感受性を検討するために各温度 (33, 35, 37, 39) における AIK-C 株、キメラウイルス、RSV の感染価を測定した。RSV は温度による増殖能の変化は見られなかったが、キメラウイ

ルスは AIK-C と同様の傾向を示し、温度感受性を保持していた (図 1)。

図 1 : 温度感受性試験

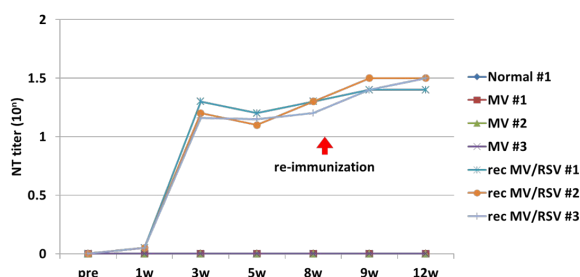


RSV 感染したコottonラットの肺組織は間質性肺炎、気管支周囲の細胞浸潤、肺胞壁の肥厚などの炎症症状が確認された。キメラウイルスは肺胞壁の肥厚や炎症は見られたが、いずれも RSV 感染と比較すると軽微であった。

(2)キメラウイルスの免疫原性

キメラウイルスを筋注で 1 回免疫し、図 2 に示す週数で RSV に対する中和抗体価を測定した。さらに免疫後 8 週で再免疫を行い、継続して経時的に抗体価を測定した。免疫後 3 週から中和抗体が検出され、再免疫を行うことにより抗体価の微増も確認できた。しかしキメラウイルスを経鼻接種で免疫した場合、中和抗体が検出されなかった。再免疫を行っても抗体産生は見られなかった要因は AIK-C 株が持つ温度感受性により筋注接種部位である大腿部 (33 前後) と比較して鼻腔内 (39 前後) は温度が高いためウイルスが増殖できず免疫されなかったと考えられる。

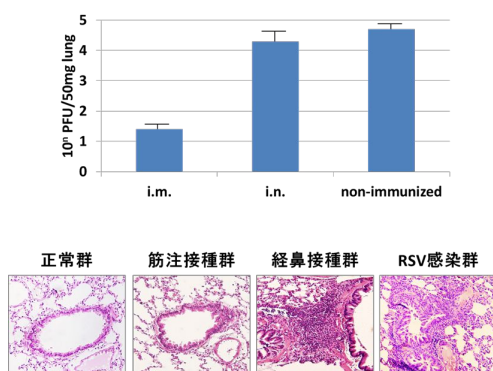
図 2 : 中和抗体価



(3)キメラウイルスの感染防御能

中和抗体価が確認され、上昇が見られた免疫後 8 週に RSV 感染実験を行った。筋注、経鼻接種で免疫したコottonラットそれぞれに 5×10^5 PFU の RSV を経鼻感染させ、4 日後に肺内ウイルス量を測定したところ、筋注免疫群は RSV 感染群と経鼻接種群のウイルス量と比べ 1/1000 程度に抑制していた (図 3 上段)。また、気管支周囲の病理所見をみると RSV 感染群およびキメラウイルス経鼻接種群では顕著な間質性肺炎、肺胞構造の破壊、炎症症状が観察されたが、筋注接種群は比較すると炎症所見は軽微なものであった (図 3 下段)。

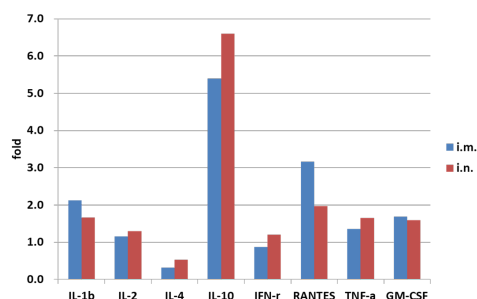
図 3 : RSV 感染実験



RSV 感染実験後の肺組織におけるサイトカイン、ケモカインの発現量の変化を確認したところ、筋注、経鼻接種群どちらも IL-1 β , 10, RANTES, TNF- α が上昇していた (図 4)。RANTES, TNF- α は炎症反応に関与するケモカインとして知られている。筋注接種群と経鼻接種群での肺組織の炎症像の差異は肺内ウイルスの検出量の違いによりこれら上昇したケモカインが関与している

ことが示唆された。同様にウイルスが検出された RSV 感染群も RANTES 等の炎症反応に関与するサイトカインなどの発現量が上昇していた。

図 4：サイトカイン、ケモカイン発現量測定



本研究から、以下の点が明らかとなった。

キメラウイルスは麻疹ワクチン AIK-C 株のワクチンとしての弱毒化に起因する温度感受性の性状を同様に保持していた。

温度感受性により高温では増殖できないため筋注接種時のみ免疫原性を示した。

筋注接種後 3 週から RSV に対する中和抗体が確認でき、RSV に対する感染防御効果が示唆された。

RSV に対する中和抗体を保持していてもキメラウイルスで再免疫することで抗体価を上昇させることが可能であった。

今後、さらなる細胞性免疫の検討とともに論文報告を行う予定である。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

澤田成史、中山哲夫

MV/RSV キメラウイルスの投与経路による免疫原性の検討

第 20 回日本ワクチン学会学術集会，東京，2016

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：組換え麻疹ウイルス

発明者：澤田成史、中山哲夫

権利者：北里大学 北里生命科学研究所

種類：特許

番号：特開 2016-202113

出願年：2016

国内外の別：国内

取得状況 (計 1 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。