

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591582

研究課題名(和文) RSV感染症克服を目指した「RSV妊婦ワクチン」の基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research of "RSV pregnant woman vaccine" aiming at RSV infection conquest

## 研究代表者

橋本 浩一 (HASHIMOTO, KOICHI)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50322342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Respiratory Syncytial virus (RSV)は乳幼児の急性呼吸不全の病因の1つである。治療に抗ウイルス薬は期待できず、抗RSV ヒト化単クローン抗体(パリビズマブ)による受動免疫の適応は限定的であり、ワクチンの開発が望まれている。本研究では治療法、予防法のない本感染症に対する「妊婦ワクチン」について、本邦で当施設のみが確立しているRSVマウス感染モデルを用い、ワクチン効果をウイルス学的、免疫学的、呼吸生理学的、病理組織学的に検討した。

研究成果の概要(英文)：Respiratory syncytial virus, RSV, is one of the leading cause of respiratory failure in infants and young children, particularly high risk children with a history of premature birth or congenital heart disease. However, there is no effective vaccine for RSV and pharmacologic treatment is far from optimal. Palivizumab is an RSV-neutralizing humanized monoclonal antibody that reacts with a highly conserved region on the RSV fusion protein to inhibit viral replication. Monthly administration of palivizumab to preterm infants has been shown to reduce the incidence of hospitalization due to RSV lower respiratory tract infection. However, the adaptation of the passive immunity with the monoclonal antibody is restrictive. Development of RSV vaccine is desired earnestly. In this study, we investigate effect of vaccine for RSV using with RSV murine model which was established in our only facilities in Japan, virologically, immunologically, physiologically, and histopathologically.

研究分野：感染症

キーワード：RSV ワクチン マウスモデル

## 1. 研究開始当初の背景

RSV は冬季に流行する乳幼児の下気道炎の病因の1つである。WHO の 2003 年の死亡率推計では、全世界での RSV 感染による死亡は、感染症においてヒト免疫不全ウイルス、B 型肝炎ウイルス / C 型肝炎ウイルス、麻疹ウイルスに次ぐ 4 番目である。3 歳までに殆どの幼児が感染し、乳幼児全体の約 2 ~ 10% が重症 RSV 感染症にて入院し、入院児の約 20% が人工呼吸器の装着などの集中治療が必要となる (Am. J. Respir. Crit. Care. Med.; 161: 1501-1507, 2000)。さらに、小児の喘息発症に重症 RSV 感染症の関与が示唆されている (Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 171:137-141 2005)。RSV 感染症はウイルス増殖のピークに遅れて症状が出現、増悪する、炎症を主体とした広義の免疫病である。従って抗ウイルス薬の治療効果は期待できず、本感染症の克服にはワクチンの開発が不可欠である。

1960 年代、米国にてホルマリン不活化 RSV (FI-RSV) ワクチンの治験が施行され、結果は RSV 初感染時の入院率が接種群で 80% (2 児死亡)、非接種群で 2% と散々たるものであった (Am. J. Epidemiol. 89:405-421. 1969)。その後の研究で、RSV のエンベロープ蛋白の G 蛋白による Th2 への免疫誘導 (Immunopharmacology. 48:237-47. 2000)、

ホルマリン処理により生成されるカルボニル化蛋白の Th<sub>2</sub> への免疫誘導 (Nature Medicine 12, 905 - 907 2006)、さらに、FI-RSV ワクチンによる抗体のアビディティの低くさが (Nature Medicine 15, 34 - 41, 2009) が FI-RSV ワクチン接種後の病態に深く関与していると報告された。その他 RSV ワクチンの開発の問題として、接種対象が新生児、あるいは乳幼児であり、免疫学的な特徴として Th2 優位であり、免疫反応が年長児に比べ弱く、母親からの移行抗体が児の体内に存在していることが挙げられる。これ

まで RSV ワクチンの候補としてサブユニットワクチン、ペプチドワクチン、弱毒生ワクチンが検討されてきたが、いずれも接種時期、アジュバント、移行抗体、免疫原性、安全性の問題点が克服されなければならない。

RSV 感染は乳幼児期以降も学童、成人で再感染を繰り返し、妊娠可能な時期には 100% の女性が RSV 既感染である。高い中和抗体価を持つ母から生まれた児は RSV 感染症の重症化から免れ (J. Med. Virol 7: 263-271, 1981)、乳幼児において移行抗体として高い抗体価の RSV に対する中和抗体を持つ児は RSV 感染症が重症化しないことが知られている (J. Pediatr. 98:708, 1981)。接種時期と接種対象を考慮した場合、妊娠母親からの移行抗体により児を感染症から守る、「RSV 妊婦ワクチン」への期待が高い。

## 2. 研究の目的

RSV ワクチンの開発において重要なことは、過去の報告からわかるように、如何に自然感染に近い免疫誘導を得るかである。マウスに紫外線不活化 RSV ワクチンを接種する際、アジュバントとして Toll like receptor (TLR) アゴニストを加えることにより、特異抗体のアビディティが改善し、ワクチン後の RSV 感染にても Th2 優位な免疫誘導がされず、さらに高い中和活性誘導が観察されている (Nature Medicine 15, 34 - 41, 2009)。本研究では RSV マウス感染モデルを用い、Toll like receptor アゴニストをアジュバントとして不活化 RSV を接種し、ウイルス学的、免疫学的、呼吸生理学的、病理組織学的に検討し、「RSV 妊婦ワクチン」の可能性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

日本国内で当施設でのみ確立している RSV 感染マウスモデルを用い、ウイルス学的、免疫学的、組織病理学的手法、さらに呼吸数、気道抵抗の測定など呼吸生理学的な手法で

検討した。

#### (1)平成 24 年度

RSV のワクチン方法の検討のため、ウイルス液の経鼻投与（経鼻ワクチン）による効果を検討した。

#### (2)平成 25 年度

抗 RSV F 蛋白ヒト化単クローン抗体（Palivizumab）の受動免疫効果を RSV 感染マウスモデルを用いて評価した。

#### (3)平成 26 年度

アジュバントとして用いた Toll like receptor（TLR）刺激薬のマウスモデルを用いた RS ウイルス経鼻ワクチンへの効果について検討した。

### 4．研究成果

#### (1)24 年度

RSVのワクチン方法の検討のため、ウイルス液の経鼻投与（経鼻ワクチン）による効果を検討した。RSV非感染マウスへ経鼻にてRSVウイルス液（alive-RSV）、紫外線不活化RSVウイルス液（UV-RSV）を接種し、1か月後に再度alive-RSV、UV-RSVを経鼻にてマウスに接種した。2回目接種後、重症度の指標として連日、体重、気道抵抗を測定し、接種後4日目、6日目に肺を摘出し、ウイルス量、各種サイトカイン量を測定した。さらに再接種後4週間後に血中中和抗体価を測定した。alive-RSVによる初感染群に比較し、初回alive-RSV接種後のalive-RSV再接種群はより軽症化した。また、UV-RSV接種後、alive-RSV再接種群（UV-alive群）は初回接種alive-RSV群（alive-alive群）に比べより重症化した。肺でのウイルス量はalive-alive群はUV-alive群の約10000分の1であった。中和抗体価はUV-UV群は4倍以下、UV-alive群、alive-UV群、alive-alive群の順に抗体価の上昇が認められた。肺中サイトカ

インの測定からはUV-alive群がalive-alive群に比較し、GCSF、IFN-gamma、IL-10、IL-4、IL-5、IL-6、MCP-1、MIP-1alphaの高値が認められた。以上より、alive-RSVによる経鼻ワクチンの有用性が示唆され、RSVワクチンを開発する際に基となる重要な知見が得られた。

#### (2)25 年度

抗 RSV F 蛋白ヒト化単クローン抗体（Palivizumab）の受動免疫効果を RSV 感染マウスモデルを用いて評価した。Palivizumab をヒトへの投与量と同様の15mg/kg を筋注にてマウスに筋注した。対象を生理的食塩水接種とした。接種1週間後にRSV-A2株を $10^7$  pfuを経鼻より感染させた。重症度の指標として連日、体重、気道抵抗を測定し、接種後4日目、6日目に肺を摘出し、ウイルス量、各種サイトカイン量を測定した。Palivizumab を投与したマウスでは、感染2日後の体重減少は同等であったが、感染7日後の体重減少は約10%と対照群の25%減に比べ明らかに軽症であった。気道抵抗の上昇も同様に、palivizumab群では軽度であった。また、palivizumab群はRSV感染後4日目、6日目の肺においてウイルスは検出されなかった。また、肺中のサイトカインの測定において、測定したIL-1、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-7、IL-9、IL-10、IL-13、IL-15、IL-17、TNF-、IFN-、G-CSF、GM-CSF、RANTES、KC、MCP-1、MIP-1は全てPalivizumab群で低値であった。Palivizumabの有効性が本RSV感染モデルでも再現され、本モデルが受動免疫、移行抗体の効果を評価する系としての有効性が示された。

#### (3)26 年度

アジュバントとして用いた Toll like receptor（TLR）刺激薬のマウスモデルを用いた RS ウイルス経鼻ワクチンへの効果について検討した。初回免疫としてマウスに経鼻にてRSウイルス-A2株（生ウイルス群）紫

外線 (UV) 不活化 RS ウイルス-A2 株 (UV ウイルス群) TLR 刺激薬添加紫外線不活化 RS ウイルス-A2 株 (TLR-UV ウイルス群) を投与した。生ウイルス群のみ感染に伴う体重減少 (重症化) がみられたが 2 週間以内に回復した。初回免疫 4 週間後に RSV 生ウイルスを感染させた。生ウイルス群では体重減少が軽減し初回免疫効果が認められたが、UV ウイルス群、TLR-UV ウイルス群ともに体重減少が遷延し免疫効果が認められなかった。また、体重減少において、UV ウイルス群と TLR-UV ウイルス群において差は見られなかった。

初回免疫 4 週の後、生ウイルス (A2 株) を感染させ、感染後 4 週間後に中和抗体を測定し初回免疫の感染後の中和抗体誘導について検討した。生ウイルス群では RS ウイルス-A2 株への中和抗体価は 32 倍、サブタイプの異なる RS ウイルス-B へは 4 倍を示した。UV ウイルス群、TLR-UV ウイルス群ともに RS ウイルス-A2 株への中和抗体価は 8 倍、サブタイプの異なる RS ウイルス-B へは 4 倍未満であった。以上の結果から、経鼻による紫外線不活化ウイルスの免疫はその後の感染への軽症化は導かず重症化させ、さらに中和抗体誘導も生ウイルスに比べて不良であった。さらに、経鼻ワクチンでの TLR 刺激薬添加の効果は見られなかった。

以上の結果より、経鼻接種によるワクチン効果は生ウイルスを用いるべきであることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Rhinovirus load and disease severity in children with lower respiratory tract infections. Takeyama A, Hashimoto K, Sato M, Sato T, Kanno S, Takano K, Ito M, Katayose M, Nishimura H, Kawasaki Y, Hosoya M. J

Med Virol. 査読有 2012 84(7):1135-42.

doi:10.1002/jmv.23306.

Clinical and epidemiologic factors related to subsequent wheezing after virus-induced lower respiratory tract infections in hospitalized pediatric patients younger than 3 years. Takeyama A, Hashimoto K, Sato M, Sato T, Tomita Y, Maeda R, Ito M, Katayose M, Kawasaki Y, Hosoya M. Eur J Pediatr. 査読有 2014 173(7):959-66. doi: 10.1007/s00431-014-2277-7.

治療開始のタイミングと使用薬剤 6 歳未満 RS ウイルス感染後の喘息長期管理すべきポイント、小児科診療、査読無(依頼論文) 75/ 10, 1649 -1655、2012.

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 橋本浩一、根本健二、川崎幸彦、佐藤晶論、大原信一郎、阿部優作、渡部真裕、西村秀一、細矢光亮、臨床分離株解析による RSV 病原性発現の新たな機序の解明 第 86 回日本感染症学会総会 2012 年 04 月 24 日 長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)
2. Koichi Hashimoto, Masatoki Sato, Aya Takeyama, Yusaku Abe, Kyohei Miyazaki, Yukihiko Kawasaki, and Mitsuaki Hosoya, Molecular epidemiology of RS virus in Fukushima, Japan, 2007-2012. 第 8 回 RSV 国際シンポジウム 2012 年 09 月 28 日 サンタフェ(アメリカ)
3. 橋本浩一、佐藤晶論、武山彩、阿部優作、宮崎恭平、川崎幸彦、細矢光亮 福島県における RS ウイルスの分子疫学、および分離 RS ウイルスのマウスへの感染 第 44 回日本小児感染症学会総会 2012 年 11 月 24 日 北九州国際会議場(福岡県・北九州市)
4. Koichi Hashimoto, Masatoki Sato, Aya Takeyama, Yusaku Abe, Kyohei Miyazaki, Yukihiko Kawasaki, and Mitsuaki Hosoya Molecular epidemiology of Respiratory Syncytial Virus (RSV) in Fukushima,

- Japan, 2007-2012, and evaluation of clinical RSV strains using with mouse infection model. RSV VACCINES FOR THE WORLD, RSVW 2013 2013年10月14日～2013年10月16日 ポルト(ポルトガル)
5. 橋本浩一、佐藤晶論、宮崎恭平、川崎幸彦、細矢光亮 マウス RSV 感染モデルを用いた生ウイルス、紫外線不活化ウイルスのワクチン効果の検討 第116回日本小児科学会学術集会 2013年4月9日～2013年4月10日 広島国際会議場(広島県・広島市)
  6. 橋本浩一、佐藤晶論、宮崎恭平、細矢光亮 福島県におけるRSウイルスの分子疫学、および分離RSウイルスのマウスへの感染 第54回日本臨床ウイルス学会 2013年6月8日～2013年6月9日 倉敷市芸文館(岡山県・倉敷市)
  7. 橋本浩一、佐藤晶論、宮崎恭平、川崎幸彦、細矢光亮 マウス RSV 感染モデルを用いた生ウイルス、紫外線不活化ウイルスのワクチン効果の検討 第45回日本小児感染症学会学術集会 2013年10月26日～2013年10月27日 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
  8. 橋本浩一、佐藤晶論、宮崎恭平、細矢光亮 マウス RSV 感染モデルを用いた生ウイルス、紫外線不活化ウイルスのワクチン効果の検討 第61回日本ウイルス学会学術集会 2013年11月10日～2013年11月12日 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)
  9. 橋本浩一、佐藤晶論、宮崎恭平、川崎幸彦、細矢光亮 マウス RSV 感染モデルを用いた生ウイルス、紫外線不活化ウイルスのワクチン効果の検討 第117回日本小児科学会学術集会 2014年4月11日～2014年4月13日 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
  10. 橋本浩一 「RSウイルス感染症流行を理解するヒント」、第55回日本臨床ウイルス学会、2014年6月14日～15日 ロイトン札幌(北海道・札幌市)
  11. 橋本浩一、佐藤晶論、宮崎恭平、川崎幸彦、細矢光亮 RSV 臨床株におけるF蛋白結合部アミノ酸配列の解析 第46回日本小児感染症学会学術集会 2014年10月14日 京王プラザホテル(東京都・新宿区)
  12. Koichi Hashimoto, Masatoki Sato, Aya Takeyama, Yusaku Abe, Kyohei Miyazaki, Yukihiro Kawasaki, and Mitsuaki Hosoya Amino Acid Substitution-Associated Palivizumab Resistance in Clinical Respiratory Syncytial Virus Isolates in Japan, 2004-2013. 第9回国際RSウイルスシンポジウム 2014年11月9日～2014年11月13日 ケープタウン(南アフリカ共和国)
  13. Koichi Hashimoto, Kenji Nemoto, Aya Takeyama, Masatoki Sato, Kyohei Miyazaki, Yukihiro Kawasaki, and Mitsuaki Hosoya Amino Acid Substitutions -Associated Palivizumab Resistance of RSV in Japan. 第118回日本小児科学会学術集会 2015年4月17日～2015年4月19日 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)
- 〔図書〕(計 3件)
1. 「RSウイルスに関する最近の話題について教えてください」、橋本浩一、up-to date 子供の感染症、依頼執筆、メディカルビュー社、30,31、2013.
  2. RSウイルス感染症 パリビズマブ DATA BOOK 橋本浩一、依頼執筆、メディカルビュー社、9-12,14,15、2014.
  3. 感染症 橋本浩一 / 細矢光亮 / 川崎幸彦、最新ガイドライン準拠 小児科 診断・治療指針、依頼執筆、中山書店、427-492、2012.
- 〔産業財産権〕
- 出願状況(計 0件)
  - 取得状況(計 0件)
- 〔その他〕
- なし
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
橋本 浩一 (HASHIMOTO KOICHI)  
福島県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：50322342
  - (2) 研究分担者  
細矢 光亮 (HOSOSYA MITSUAKI)  
福島県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：80192318
  - (3) 研究分担者  
川崎 幸彦 (KAWASAKI YUKIHIKO)  
福島県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：00305369

(4) 研究分担者

橋本 優子 (HASHIMOTO YUKO)  
福島県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60305357

(4) 研究分担者

錫谷 達夫 (SUZUTANI TATSUO)  
福島県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：40196895