

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：粘膜免疫誘導型新規結核ワクチンの開発

2. 研究開発代表者：保富 康宏

(国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 霊長類医科学研究センター)

3. 研究開発の成果

本研究ではヒトパラインフルエンザ2型ウイルス (HPIV2) を用いたワクチン開発と、粘膜投与における免疫反応の解析、ワクチンの毒性評価さらには臨床治験を見据えた疫学調査を行い、新規のベクターを用いた粘膜免疫誘導型結核ワクチンの開発を行った。ワクチン開発においてはベクターや抗原を新たに構築すること、ワクチンの効率的な産生系の開発、さらには粘膜投与におけるワクチン効果をカニクイザルで検討することを行った。免疫反応の解析では気道投与における局所免疫反応、自然免疫の誘導および気道粘膜局所における組織学的解析を行った。これらのことから以下の如く結果を得た。

1. 既に発表をしている結核菌抗原 Ag85B を組み込んだ HPIV2 (rHPIV2-Ag85B) と、潜伏感染時に発現している抗原および再発において病原性に関わる抗原を発現した新たな rHPIV2 ベクターワクチン (rHPIV2-CRL2) の混合接種をカニクイザルに経鼻投与をしたところ、血液生化学的変化 (CRP、赤血球沈降反応)、肺内菌数もにおいてワクチン効果が認められた。
2. 新規結核ワクチン開発に向けて、EGFP ならびに結核抗原遺伝子 (Ag85B、CRL2) を挿入した遺伝子欠損型 HPIV2 ベクター (Δ) の構築構築した。
3. HPIV2 の遺伝子欠損型ベクターを用いて作製した組み換えウイルスを生産するため、ワクチン製造実績がある Vero 細胞を用いてパッケージング細胞を樹立した。複製能を完全に欠損し安全性に優れている点で、開発の第一候補となる欠損ウイルスを高生産できる遺伝子発現 Vero 細胞株をスクリーニングし、 Δ -HPIV2-EGFP ウイルスを高生産できる株を作製した。これらの株を用いて、結核菌抗原遺伝子を組み込んだ Δ ウイルス 2 種の培養条件の最適化、タイトレーション法の確立、遠心分離による精製法の確立を行い、サルを用いたワクチン評価試験への候補ワクチンの供給体制が整った。
4. HPIV2 感染実験における *in vivo* 感染でのアジュバント活性は、TLR7 による自然免疫活性化機構に依存することを見出した。
5. HPIV2-Ag85B ワクチンの免疫誘導のメカニズム、安全性、投与経路についてマウスを用いた *in vivo* レベルでの解析したところ、誘導性気管支関連リンパ組織 (inducible bronchus-associated lymphoid tissue: iBALT) が発達し、この誘導には CD11b 陽性細胞が関与していることが示された。
6. HPIV2 投与による局所での急性反応および嗅球・嗅神経への影響について病理組織学的検討を行い、投与後はいわゆる風邪症候群に類似し、嗅神経に炎症は及ばないことを明らかにし、安全性を確認した。また、早期および慢性期の安全性や異常・過剰な免疫応答の解析のために、カニクイザルにおけるリンパ球サブタイプの免疫染色法を確立した。
7. 呼吸器感染症に罹患し入院加療を行った小児における、ヒトパラインフルエンザウイルス感染実態を明らかにし、小児および妊婦、新生児における、ヒトパラインフルエンザウイルス血清抗体保持状況を明らかにした。