

平成 29 年 5 月 31 日

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 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  
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

研究開発課題名：(日本語) エボラ出血熱の制圧を目指した次世代ワクチン等の開発研究  
(英語) Development of Ebola virus vaccines to control Ebola virus disease

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人東京大学 医科学研究所 教授 河岡 義裕

• 所属 役職 氏名：(英語) Institute of Medical Science, The University of Tokyo  
Yoshihiro Kawaoka, Professor

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) エボラ出血熱の制圧を目指した次世代ワクチン等の開発研究  
開発課題名：(英語) Development of Ebola virus vaccines to control Ebola virus disease

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京大学 医科学研究所 特任准教授 渡辺 登喜子

所属 役職 氏名：(英語) Institute of Medical Science, The University of Tokyo  
Tokiko Watanabe, Project Associate Professor

分担研究 (日本語) エボラ出血熱の制圧を目指した次世代ワクチン等の開発研究  
開発課題名：(英語) Development of Ebola virus vaccines to control Ebola virus disease

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京大学 医科学研究所 特任准教授 福山 聡

所属 役職 氏名：(英語) Institute of Medical Science, The University of Tokyo  
Satoshi Fukuyama, Project Associate Professor

## II. 成果の概要（総括研究報告）

（和文）

- 米国ウイスコンシン大学と NIH の Rocky Mountain Laboratories との共同研究により、過酸化水素水によって不活化したエボラ ΔVP30 ウイルスのワクチン効果の検証を行った。不活化ウイルスをサルに 2 回接種したのち、致死量のエボラウイルスを感染させたところ、コントロール群のサルは全て死亡したのに対して、ワクチン群のサルは全て生き残った(Marzi et al., 2015, Science)。不活化エボラ ΔVP30 ウイルスの 1 回接種では十分なワクチン効果が得られなかったため、続いて、ワクチン効果を高めるアジュバントを探索すべく、サルにおいて、ワクチン実験を行い、2 種類の既存のアジュバントの効果を検証した。不活化エボラ ΔVP30 ウイルスのみを 1 回免疫したサルグループに、2014-15 年に西アフリカで流行したエボラウイルス(マコナ株)を致死量感染させたところ、感染 3-4 日目にエボラ様症状を示し始め、感染 6-7 日目までに全てのサルが死亡した。それに対して、不活化エボラ ΔVP30 ウイルスおよびアジュバント 1 あるいは 2 を 1 回免疫したグループにおけるサルの生残率は 50%あるいは 100%であった。以上の結果は、本研究で開発した不活化エボラ ΔVP30 ウイルスワクチンのサルモデルにおける高い有効性を示している。
- 本研究では、不活化エボラ ΔVP30 ウイルスの免疫原性を高めるアジュバント候補物質のスクリーニングを行っている。日本国内では、エボラ ΔVP30 ウイルスを使用できないため、ワクチン抗原として、エボラウイルス様粒子 (virus-like particle; エボラ VLP) を用いる必要がある。まず我々は、エボラウイルス(マコナ株)の VLP 作出系を確立した。すなわち、バキュロウイルス—昆虫細胞発現系を用いて、マコナ株の GP および VP40 蛋白質を有する VLP の産生系を確立し、エボラ VLP の大量培養および濃縮を行った。エボラ VLP をアジュバント候補化合物とともにマウスに接種し、抗体価を指標に、候補化合物のアジュバント効果の評価を行った。その結果、3 つの候補化合物について、アジュバント効果が認められた。
- 本研究では、ワクチンの実用化を見据えて、製造品質管理基準(GMP)に従った施設において、臨床試験や臨床研究に供するエボラ ΔVP30 ウイルスワクチンを製造する。当該作業は BSL3 施設あるいはそれに準ずる特別な実験施設で実施する必要があるが、対応可能な外注先を国内で選定することが困難であったため、海外での外注先を選定し、米国 NIH より ΔVP30 ウイルス取扱の承認を受けた BSL 2 施設を有する米国ウイスコンシン大学に、当該作業を外注した。GMP 下におけるワクチン製造に精通している専門家を相談役としながら、エボラ ΔVP30 ウイルス増殖用の VP30 発現細胞株のマスターセルバンクの作製およびマスターウイルスバンクの作製作業を進めた。
- 本研究では、2014-2015 年のエボラ出血熱の流行地であるシエラレオネにおいて、シエラレオネ大学と連携して、様々なステージ（感染初期・中期、死亡前、あるいは回復後）のエボラ患者群からサンプルを採取した。患者から採取した血液サンプルから、血漿と末梢血単核細胞（PBMC）を分離し、血漿サンプルの一部を用いて、メタボロミクス、リポドミクス、プロテオミクスなどのオミックス解析を行った。生存者と死亡者における宿主応答の比較解析を行ったところ、重症患者（死亡者）において、特異的な発現パターンを示すバイオマーカーを同定した。
- 本研究では、エボラウイルス感染から回復した患者の末梢血単核細胞(PBMC)とヒトフュージョンパートナー細胞(SPYMEG)と融合させることによって、ヒト抗体産生ハイブリドーマを作成し、エボラウイルスに対して中和活性を持つヒトモノクローナル抗体の大量培養系を確立する。これまでに、シエラレオネにおいて、エボラウイルス感染から回復した患者から血液を採取し、PBMC を分離した。また、ヒトモノクローナル抗体の作製方法および大量培養系を確立した。

(英文)

- Through a collaboration with the University of Wisconsin-Madison (USA) and the Rocky Mountain Laboratories of NIH (USA), we evaluated the vaccine efficacy of EbolaΔVP30 virus, which was inactivated by hydrogen peroxide. Non-human primates (NHPs) were immunized with the inactivated EbolaΔVP30 virus twice at four-week intervals. After challenging with a lethal dose of Ebola virus, all of the animals in the vaccine group survived whereas all of the animals in the control group succumbed to their Ebola infection (Marzi et al., 2015, Science). Next, to explore adjuvants to enhance the vaccine efficacy of the inactivated EbolaΔVP30 virus, we tested two commercially available adjuvants (adjuvants 1 and 2) in the NHP model. Animals were immunized once with the inactivated Ebola ΔVP30 virus and challenged with a lethal dose of Ebola virus (Makona strain; prevalent in West Africa in 2014–15). All non-vaccinated animals began to show Ebola-like symptoms on days 3–4 after infection and died by days 6–7 after infection. In contrast, the survival rate of the animals immunized with the inactivated Ebola ΔVP30 virus combined with adjuvant 1 or 2 was 50% or 100%, respectively, indicating the promising vaccine efficacy of the combination of the inactivated EbolaΔVP30 virus and adjuvant(s).
- We screened adjuvant candidates for enhancement of the vaccine efficacy of inactivated Ebola ΔVP30 virus. Since Ebola ΔVP30 virus cannot be used in Japan, we used Ebola virus-like particle (Ebola VLP) as a vaccine antigen. First, we established a production system for Ebola VLPs, which comprised the GP and VP40 proteins of the Makona strain of Ebola virus, by using a baculovirus system. Mice were immunized with the purified Ebola VLPs together with the adjuvant candidates and antibody titers were measured to evaluate the adjuvant effects. We found three candidates that showed an adjuvant effect.
- For human use, vaccines must be developed in accordance with the basic principles of good manufacturing practices (GMP). Therefore, the aim of this project is to manufacture EbolaΔVP30 virus under GMP for clinical trials. EbolaΔVP30 virus is usually handled under biosafety level 3 (BSL3) conditions, and, therefore, the production of GMP-grade EbolaΔVP30 virus vaccines would require GMP-BSL3 facilities and be very expensive. However, in early 2016, the NIH gave the University of Wisconsin-Madison special permission to handle EbolaΔVP30 virus under BL2 containment. We have established the GMP-BL2 system to produce the GMP-grade EbolaΔVP30 virus vaccine at the University of Wisconsin-Madison. A master cell bank of the VP30-expressing cell line for Ebola ΔVP30 virus propagation and a master virus bank have been generated.
- In this study, samples were collected from Ebola patients at various infection stages during the 2014–15 outbreak in Sierra Leone in collaboration with the University of Sierra Leone. Plasma and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from the blood samples collected from the patients, and used for OMICS analysis (e.g., metabolomics, lipidomics, and proteomics) to examine the host responses in survivors and fatalities. We identified individual putative biomarkers that distinguish between survivors and fatalities.
- In this study, we are generating human antibody-producing hybridomas by fusing PBMCs from Ebola survivors with human fusion partner cells (SPYMEG) to establish a system of producing neutralizing antibodies against Ebola virus. Blood was collected from patients recovered from Ebola virus infection in Sierra Leone and PBMCs were isolated. We have also established a mass culture system for preparing human monoclonal antibodies.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 件）

1. 渡辺登喜子、河岡義裕. エボラ出血熱の制圧にむけて：ワクチン開発とシエラレオネでの研究. ウイルス. 2016, 66 (1), 53-62.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Influenza or Ebola-which is the greater threat? 招待講演, Kawaoka Y. German Society of Virology, 2016/4/7, 国外.
2. インフルエンザならびにエボラワクチン, 口頭, 河岡義裕, 第 20 回日本ワクチン学会学術集会, 特別講演, 2016/10/22, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 東京大学医学部・医学部附属病院 健康と医学の博物館企画展「第 10 回見えざるウイルスの世界」における展示協力, 河岡義裕, 2016/04/21-10/30, 国内.  
(<http://mhm.m.u-tokyo.ac.jp/exhibition010.html>)
2. ラブラボ 2016, 河岡義裕, 2016/8/2-3, 国内.  
(<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/jp/events/others/lovelabo2016.pdf>)
3. 神戸高校生研究室見学の受入れ. 河岡義裕, 2016/8/23, 国内.
4. 東京大学医科学研究所 中高生見学ツアー（四日市市暁中学校、鳴門教育大学附属中学校）における講義. 渡辺登喜子, 2016/10/20, 国内.
5. 東京大学医科学研究所 中高生見学ツアー（石見智翠館高等学校）における講義. 渡辺登喜子, 2016/11/17, 国内.
6. 東京大学医科学研究所 中高生見学ツアー（庄内町立余目中学校）における講義. 渡辺登喜子, 2017/2/23, 国内.
7. ウイルス感染症の制圧：インフルエンザとエボラ, 河岡義裕, 感染症対策協議会, 2017/7/22, 国内.
8. シエラレオネでのエボラウイルスの流行, 河岡義裕, 市民公開講座, 2017/3/12, 国内.

(4) 特許出願