

RSV に対する細胞性免疫を誘導する組換え麻疹ウイルス開発

感染制御科学専攻 ワクチン学

DI-12004 山路 祥晃

目的

Respiratory Syncytial Virus (RSV)は乳幼児が2歳を迎えるまでに100%感染するウイルスであり、毎年冬に世界各地で流行を起こしている。感染した子供は重篤な間質性肺炎を発症するためワクチンによる予防が求められている。

RSV ワクチン開発は1960年代アメリカで始まり、ホルマリン不活化ワクチン (FI-RSV) が開発された。Field trialにおいて、FI-RSV ワクチン接種を受けた乳幼児が RSV の自然感染後に重篤な肺炎を発症、2名の死亡例が報告された。

原因究明がおこなわれ、FI-RSV の課題として2つの重要な点が指摘された。一点はワクチン接種後に有効な中和抗体誘導されなかったため感染が抑えられなかったこと。もう一点はコントロール群と比較した際、FI-RSV ワクチン接種者の方がより重症化したことである。これらの原因はホルマリン不活化処理による抗原の変性、TLR へのシグナル減弱により抗体の成熟が行われなかった。Th2 型免疫応答によって自然感染後に過剰な炎症性サイトカイン産生と好酸球誘導が引き起こされたと報告されている。

本研究では細胞性免疫を誘導するために、RSV-M2-1, NP 遺伝子を麻疹ワクチン AIK-C 株ベクターへ組込み、組換え麻疹ウイルスプラスミドを作製し、リバーズジェネティクスの技法を用いて感染性 cDNA からキメラ麻疹ウイルスを作製した。この組換えウイルスは感染細胞内で M2-1 または NP を発現することから RSV に対して細胞性免疫を誘導することが期待される。RSV と麻疹ウイルスに感受性のあるコottonラットを用いて組換えウイルスで免疫した時の細胞性免疫活性化と感染防御能を検討した。

方法

1) 動物実験

コottonラットへ AIK-C 株、作製した組換え麻疹ウイルス株、ポジティブコントロールとして RSV の Fusion protein を発現する MVAIK/RSV/F を 1×10^6 TCID₅₀/匹の条件で筋肉内接種した。経時的に採血を行い血清の中和抗体価の測定を行った。初回接種から8週後に challenge 試験をおこない4日後に肺、脾臓、胸腺細胞を回収した。初回免疫から8週後に再免疫をおこない4週間後 challenge 試験を行い、同様に肺、脾臓、胸腺細胞を回収した。

2) 中和抗体価測定

RSV に対する中和抗体価を50%プラーク阻害効果で測定した。血清を PBS で10倍希釈し、その後に血清4倍希釈系列を作製した。50 μ l 血清を100 PFU/50 μ l のウイルス培養液と混合し室温で60分間静置を行った。100 μ l の混合液を HEp-2 細胞へ添加し37℃で6日間培養を行った。培養後、プラーク数をカウントし抗体によるウイルス感染の阻害活性を測定した。

3) CD8⁺/IFN- γ 細胞数の測定

脾臓細胞 $3\sim 4\times 10^6$ にペプチド $1\ \mu\text{M}$ を添加し 37°C 、5 時間刺激を行った。刺激後細胞を Cytofix/cytoperm kit (BD pharmingen) を用いて固定および膜透過処理を施し anti-CD8 抗体と anti-IFN- γ 抗体を結合させた。Cytomics FC500 を用いて CD8⁺/IFN- γ 細胞数を測定した。

4) 病理所見

Challenge 試験から 4 日後に肺を回収しホルマリン固定を行った。固定後、パラフィン包埋を行い、厚さ $4\ \mu\text{m}$ にスライスし、HE 染色と免疫染色を行った。

結果

1) 麻疹に対する抗体価は、すべてのラットで初回接種から 3 週目に検出された。一方、RSV に対する中和抗体は MVAIK/RSV/M2-1 免疫した場合では検出されなかった。MVAIK/RSV/NP で免疫下ラットからは 3 週目に中和抗体が検出された。ポジティブコントロール群と比較して中和抗体価は低かった。

2) 動物から回収した脾臓、胸腺細胞を RSV 抗原で刺激することによって CD8⁺ T 細胞による IFN- γ 産生が観察された。誘導された CD8⁺/IFN- γ 細胞数は NP>F>M2-1 の順で多かった。再免疫後に IFN- γ の生産能を比較したところ MVAIK/RSV/NP と MVAIK/RSV/F 接種ラットにおいて CD8⁺/IFN- γ 細胞数が大きく増加した。一方、MVAIK/RSV/M2-1 接種ラットは他の 2 種類の組換えウイルス接種群と比較したところ再免疫をおこなっても CD8⁺/IFN- γ 細胞数に大きな変化が見られなかった。

3) 肺内の感染性ウイルス量を測定した結果、F, M2-1, NP の組換えウイルスは全て感染性ウイルスを検出限界以下まで減少させた。

4) 病理所見から AIK-C 接種群は肺胞壁の肥厚を特徴とする間質性肺炎が確認された。組換えウイルス接種群は肺胞壁の肥大と炎症が初回接種後の Challenge 試験で確認された。追加接種を行うことで Challenge 試験後に肺胞の形態が鮮明に保たれ明らかな肺炎像は見受けられなかった。

初回接種後の Challenge 試験では全てのグループで気管支とその周辺細胞にウイルス抗原が検出された。MVAIK/RSV/M2-1, MVAIK/RSV/NP の追加接種することで Challenge 試験後の RSV 抗原が陰性となった。

考察

RSV の M2-1 または NP を発現する組換え麻疹ウイルスを回収することができ、両抗原は感染細胞内に局在することがわかった。M2-1 で免疫したラットからは RSV からの感染防御に有効な中和抗体は検出されなかった。これはウイルス粒子内に存在するタンパクであるため、仮に抗体が誘導されていたとしても感染能の中和に関与しないためであると考えられる。

免疫したラットから脾臓、胸腺を回収し抗原ペプチドで刺激することによって CD8⁺ 細胞による IFN- γ 産生が確認された。刺激を行うために使用したペプチドは RSV subgroup 間で保存性の高い領域である。今回導入した M2-1 および NP の RSV subgroup

間における相同性は M2-1 92%、NP 96%であり、subgroup A と B 両方に反応することが期待されている。再免疫をおこない challenge 試験後に脾臓細胞を回収し IFN- γ の生産能を調べたところ MVAIK/RSV/NP と MVAIK/RSV/F 接種ラットにおいて IFN- γ 産生が増加した。一方、MVAIK/RSV/M2-1 接種ラットは他の 2 種類の組換えウイルスと比較して再免疫をおこなっても IFN- γ の産生に大きな変化が見られなかった。M2-1 はマウスを用いた研究では有効性が証明されており、これは BALB/c マウスの MHC class I 分子と親和性が強い領域を持つため抗原提示されやすい特徴をもつためであるといわれている。コットンラットのもつ MHC 分子は調べられておらず親和性の特徴がマウスと異なるために抗原分子への反応に違いが生じていることが考えられる。

再免疫することでチャレンジ試験後肺内からは感染性ウイルスが検出限界値以下となった。MVAIK/RSV/M2-1 と MVAIK/RSV/NP は中和抗体の誘導を行わないことから、ウイルスの排除は細胞性免疫が主な役割を果たしていると考えられる。したがって、チャレンジ後ウイルスは肺内に感染するが感染細胞を細胞障害性細胞が特異的に認識し破壊することによってウイルスの感染拡大を防いでいると考えられる。

結論の骨子

MVAIK/RSV/M2-1 と MVAIK/RSV/NP は RSV 特異的な細胞性免疫を活性化し、感染性ウイルスの排除が促進された。これらの組換え麻疹ウイルス接種によって麻疹 PA 抗体は上昇したが RSV 特異的な中和抗体が誘導されることがなかった。組換えウイルスを接種することで免疫応答が誘導されるが、ウイルス排除を行うには追加接種が必要である。