

|              |  |
|--------------|--|
| Title        | Generation of a Recombinant Oka Varicella Vaccine Expressing Mumps Virus Hemagglutinin-Neuraminidase Protein as a Polyvalent Live Vaccine  |
| Author(s)    | 吉井, 洋紀   |
| Citation     | 大阪大学, 2008, 博士論文   |
| Version Type |  |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/49926">https://hdl.handle.net/11094/49926</a>  |
| rights       |  |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。 |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

|            |  |
|------------|--|
| 氏名         | 吉井洋紀   |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(医学)   |
| 学位記番号      | 第22352号  |
| 学位授与年月日    | 平成20年4月21日   |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第2項該当   |
| 学位論文名      | Generation of a Recombinant Oka Varicella Vaccine Expressing Mumps Virus Hemagglutinin-Neuraminidase Protein as a Polyvalent Live Vaccine<br>(ムンプスウイルスのヘマグルチニン-ノイラミニダーゼを発現する多価生ワクチンの可能性としての組換え岡株水痘ワクチンの作成) |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 生田 和良<br>(副査)<br>教授 松浦 善治 教授 塩田 達雄  |

## 論文内容の要旨

## 〔 目 的 〕

水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) はアルファヘルペスウイルス亜科に属し、全長約 125kb の DNA ゲノムを有する。VZV は初感染時には水痘を発症する。この時ウイルスの一部は神経節に到達して潜伏感染し、高齢化や過度のストレス、免疫抑制療法等に伴う免疫低下状態において再活性化し、帯状疱疹を発症する。

水痘ワクチンの開発においては臨床分離株である岡株 (Oka 親株; pOka) をヒトおよびモルモットの細胞を用いて継代を繰り返すことにより弱毒化し、現在これをワクチン株 (Oka ワクチン株; vOka) として用いている。

一方、おたふくかぜの原因ウイルスであるムンプスウイルス (MuV) に対して、日本では以前ムンプス、麻疹、風疹の弱毒生ウイルスの混合ワクチン (MMR) が用いられていたが、副反応として無菌性髄膜炎が多発するという問題のため、現在では混合でないムンプスワクチンが用いられている。

本研究において我々は、300kb 以上の DNA をクローニングすることが可能である Bacterial Artificial Chromosome (BAC) システムを用いて、少なくとも 9 種類のクローンの mixed population である vOka より単クローンの vOka ゲノムをクローニングして感染性ウイルス粒子を再構築することを試みた。さらに vOka ゲノムに外来遺伝子として MuV のヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ (HN) 遺伝子を導入し、組換えウイルスにおいて HN タンパクを発現させることを試みた。

## 〔 方法ならびに成績 〕

ヒト胎児細胞である MRC-5 細胞に VZV ゲノムと相同な配列をアームを持つ BAC ベクターを導

入し、そこに vOka を感染させることによって、相同組換えにより BAC が挿入された VZV を作製した。

組換え VZV は BAC にコードされている Green fluorescent Protein (GFP) 及び Guanine phosphoribosyl transferase (GPT) を用いてクローニングし、感染細胞より環状 VZV ゲノム DNA を抽出して大腸菌 DH10B に導入することにより単クローンの VZV ゲノムを持つ大腸菌コロニーを得た。

得られたクローンより VZV ゲノムを精製し、制限酵素切断パターンを確認した結果、予想された切断パターンとの明確な差異は認められなかった。また、これらのクローンについて、pOka と vOka においてアミノ酸置換を伴う 20 の塩基配列変異箇所について塩基配列を確認した結果、クローンは 2 グループに分けられた。

上記の 2 グループの 1 クローンずつから感染性ウイルス粒子を再構築して cell free virus を作製し、MRC-5 細胞における増殖性を pOka 及び vOka と比較した結果、得られた 2 グループ間において増殖性の差は認められなかったが、pOka 及び vOka と比較して有意な増殖性の低下が認められた。

これら 2 グループのうち、塩基配列が pOka に近いクローンに大腸菌内において MuV の HN 遺伝子を導入した。HN 遺伝子は、培養細胞における VZV の増殖に必須ではない thymidylate synthetase を発現する ORF13 の全長と入れ替えた。

HN 遺伝子を導入した vOka ゲノムを MRC-5 細胞に導入した結果、感染性ウイルス粒子が再構築され、感染細胞において HN タンパクが発現していることが確認された。

感染細胞より cell free virus を調製し、MRC-5 細胞における増殖性を HN 遺伝子を導入する前の vOka と比較した結果、増殖性に有意な差は認められなかった。

この cell free virus をモルモットに経鼻投与した結果、2 回投与で VZV と MuV の双方に対する高い中和抗体価の誘導が見られた。

## 〔 総 括 〕

我々は本研究において BAC システムを用いて VZV vOka の全ゲノムをクローニングすることを試み、これに成功した。部分的な塩基配列の確認により、得られたクローンは 2 グループに分けられた。2 グループ間での変異箇所は ORF62/71 において 1 箇所だけに認められた。上記の 2 グループの 1 クローンずつより cell free virus を作製し、培養細胞における増殖性を比較した結果、両クローンとも pOka 及び vOka と比較して有意に増殖性が低下していた。これにより、得られたクローンが vOka の population の中でもより高度に弱毒化された性状を有する事が示唆された。

2 グループのうち一方のクローンに MuV の HN 遺伝子を導入した結果、組換え vOka ゲノムより感染性ウイルス粒子が再構築され、またこの組換えウイルスは、感染細胞において HN タンパクを発現していた。この組換えウイルスは元になった vOka クローンより再構築された組換えウイルスと増殖性に差が見られなかった。さらに HN を発現する cell free virus をモルモットに経鼻投与することで、モルモットにおいて VZV と MuV の双方に対する中和抗体価を誘導した。

今後、より多くの種類の vOka クローンを得てその分子生物学的性状を解析すると共に、様々な外来遺伝子を導入することにより、vOka ゲノムを外来遺伝子を発現するベクターとして用いることが可能となることが期待される。

## 論文審査の結果の要旨

申請者の論文において、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)ワクチン株(vOka)のゲノムをBacterial Artificial Chromosome(BAC) systemを用いてクローニングした。すでに全長がクローニングされていたワクチン株の原株(pOka)との制限酵素切断断片の比較により、得られたBACクローンはvOkaゲノムの全長を含むことが示唆された。

上記のBACクローンをを用いてVZVとMuVの双方の感染を防御する多価ワクチンを作製することを目的とし、BACクローンにムンプスウイルス(MuV)の粒子表面に存在する糖蛋白であり、中和抗体誘導に重要と考えられているヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ(HN)の遺伝子を導入し、HN蛋白を発現する組換えVZVの作製を試みた。

HN導入BACクローンを培養細胞に導入した結果得られた組換えウイルスは、培養細胞においてHN蛋白を発現することが確認された。また、このウイルスとHN遺伝子導入前の組換えウイルスとの*in vitro*での増殖性に有意差は認められなかった。さらに組換えウイルスをモルモットに接種した結果、VZVとMuVの双方に対する中和抗体を誘導した。

上記よりこの研究において得られた組換えウイルスはVZVとMuVの双方に対し感染防御する多価ワクチンとして使用できる可能性を示した。以上の点を鑑みると、今回申請された論文は学位論文に値するものと考えられる。