

20030119A

厚生労働科学研究費補助金

厚生労働科学特別研究事業

細胞培養痘そうワクチンの品質管理に関する研究
(H15-特別-43)

平成 15 年度 研究報告書

平成 16 (2003) 年 4 月

主任研究者 森川 茂
(国立感染症研究所)

目 次

I. 総括研究報告書

細胞培養痘そうワクチンの品質管理に関する研究 森川 茂	-----	1
--------------------------------	-------	---

II. 分担研究報告書

1. LC16m0 型リバータントウイルスの遺伝子解析と生物学的性状 森川 茂	-----	9
2. LC16m0 型リバータントウイルスの検出法の比較 倉根 一郎	-----	21
3. LC16m8 株の継代培養によるリバータントウイルスの出現の解析 木所 稔	-----	27
4. LC16m0 型リバータントウイルスの含まれる LC16m8 株のウサギ皮膚増殖試験 西條 政幸	-----	33
5. LC16m0 型リバータントウイルスの含まれる LC16m8 株の ウサギ皮膚増殖試験における皮膚病変の病理学的解析 長谷川 秀樹	-----	41
6. LC16m0 型のリバータントウイルスの性状解析と SCID マウスに対する病原性の研究 木所 稔	-----	49

総括研究報告書

細胞培養痘そうワクチンの品質管理に関する研究

主任研究者 森川 茂 国立感染症研究所室長

研究要旨 (1)LC16m0 型リバータントウイルスの遺伝子解析と生物学的性状：41 クローンの LC16m0 型のリバータントウイルスの B5R 遺伝子は、全て新たな変異により frameshift mutation を回避していたが、LC16m0 に復帰する変異は見られなかった。また、いずれのリバータントウイルスも、RK13 細胞、VeroE6 細胞でラージプラークを形成し、鶏卵漿尿膜でラージポックを形成した。(2)LC16m0 型リバータントウイルスの検出法の比較：LC16m0 型のリバータントウイルスの検出を PRK 細胞、RK13 細胞、VeroE6 細胞を用いたプラークアッセイ、鶏卵漿尿膜でのポックサイズでそれぞれ行った結果、リバータントウイルス含率 = 「VeroE6 細胞でのラージプラーク力価 / RK13 細胞でのプラーク力価」で求める検出法が高感度で 10^{-5} でも検出可能であった。(3)LC16m8 株の継代培養によるリバータントウイルスの出現の解析：プラーク純化した LC16m8 株を、初代ウサギ腎細胞に 10 継代培養し、リバータントウイルス含率を解析した結果、検出可能な含量でリバータントウイルスが出現し、継代を重ねるごとに含量が増加していくことが明らかになった。(4)LC16m0 型リバータントウイルスの含まれる LC16m8 株のウサギ皮膚増殖試験：種々の割合で LC16m0 型のリバータントウイルスが含まれる LC16m8 株を用いてウサギ皮膚増殖性試験を行った結果、リバータントウイルス含有率 4% 程度まではウサギ皮膚増殖試験において有意差がでないものの、それ以上になると有意差がでると想定された。(5)ウサギ皮膚増殖試験における皮膚病変の病理学的解析：種々の割合で LC16m0 型のリバータントウイルスが含まれる LC16m8 株をウサギに皮内接種して、皮膚病変部位の病理組織学的所見を解析した結果、リバータントウイルス含有率 0.8% では、組織学的に有意な差が認められなかったが、4% になると局所病原性の差が認められる個体と認められない個体があった。40% になると顕著な差が認められた。(6)LC16m0 型のリバータントウイルスの性状解析と SCID マウスに対する病原性の研究：リバータントウイルスの生物学的性状は LC16m8 株の親株である LC16m0 に酷似し、SCID マウスに対する病原性も LC16m8 株と比較して昂進していることが明らかになった。以上の実験結果から、リバータントウ

ウイルスは B5R 遺伝子が、LC16m0 株から欠失した 274 位の G が復帰するものではなく、その近傍での塩基挿入あるいは欠失により reading frame が復帰したものであることが明らかになった。しかし、いずれのリバータントウイルスも生物学的性状は、LC16m0 株と酷似していた。LC16m8 株の性質上、培養規模が大きいほどリバータントウイルスが出現することは避けられないと考えられる。リバータントウイルスの高感度検出法を開発し 10^{-5} 程度でも検出可能になったことは、ワクチン製造過程でのリバータントウイルス含率を把握するのに有用であると考えられる。リバータントウイルスの含率が 5% 程度以上になると、ウサギ皮膚増殖性に有意差がみられることが推測されることから、ワクチンへのリバータントウイルス含率の許容上限を規定する必要があると考えられる。SCID マウスでの LD50 試験では、より鋭敏にリバータントウイルス含率による病原性の差が検出できることから、リバータントウイルスの混入によるワクチンへの影響を評価する上で有用な試験法であることが示唆された。

分担研究者：

倉根 一郎 国立感染症研究所部長
 西條 政幸 国立感染症研究所主任
 研究官
 長谷川 秀樹 国立感染症研究所室長
 木所 稔 国立感染症研究所主任
 研究官

協力研究者：

緒方 もも子 国立感染症研究所技官
 灰谷あずさ 国立感染症研究所
 永田 典代 国立感染症研究所研究
 員
 須崎 百合子 国立感染症研究所主任
 研究官
 網 康至 国立感染症研究所主任
 研究官

バイオテロ対策の中で、最優先対策のひとつに痘そう（天然痘）がある。痘そうによるバイオテロ対策の一環として、昭和 55 年度以降製造されていなかった乾燥細胞培養痘そうワクチンの製造を開始し、平成 13 年度には 250 万ドーズが作製されて備蓄されている。この製造再開されたワクチンと平成 11 年度に試験製造品として委託製造されたものとを比較すると、プラーサイズの大きいウイルスの含率が異なっている事が明らかとなった。このプラーサイズの大きいウイルスの数クロームの解析からは、これらが B5R 遺伝子のリバータントウイルスであることが明らかとなっている。痘そうワクチンは、天然痘の根絶に伴いワクチン製造が行われていなかったため、生物学的製剤基準は変更されていなかった。

A. 研究目的

当時は、このようなリバータントウイルスを検出することを想定していなかったため、その検出法が生物製剤基準にはなく、また現在の科学水準から勘案するとより簡便で有効な試験法が可能であると考えられる。

乾燥培養痘そうワクチンに用いられる LC16m8 株は、LC16m0 株と比較すると細胞外エンベロープウイルス (EEV) 表面蛋白のうち B5R 遺伝子の 274 番目の G 残基が欠失しているために、欠失型の B5R 蛋白が産生される。この遺伝子欠損が原因となり、LC16m8 株は宿主細胞域が狭く、他のワクチニアウイルスや直接の親株である LC16m0 株や祖先株の Lister 株と比べて皮膚増殖性が低く、RK13 細胞や初代ウサギ腎細胞でサイズの小さいプラークを形成する。

本研究では、乾燥細胞培養痘そうワクチンに低頻度であるが含まれているプラークサイズの大きいウイルスが LC16m0 株と同一のものか、異なるものかを B5R の遺伝子配列を決定して確認する。また、ウサギ皮膚増殖性や SCID マウスでの病原性を解析して、その安全性を確認する。また、通常の方法ではプラークサイズの大きいウイルスの検出は、数百プラーク当たり 1 個程度が検出限界である。このため、より高感度にラージプラーク形成ウイルスを検出できる試験法を開発する。また、LC16m8 株からプラーククローニングしたウイルス

から継代培養によりラージプラーク形成ウイルスがどの程度出現するかを解析する。これらにより、緊急時に用いられる可能性のある乾燥細胞培養痘そうワクチンの製造過程における品質管理を向上させ、より安全なワクチンの製造が可能にすることを目的とする。

B. 研究方法

(1) LC16m0 型リバータントウイルスの遺伝子解析と生物学的性状 (森川分担) :

LC16m0 型のリバータントウイルスを RK13 細胞、VeroE6 細胞を用いたプラークアッセイからクローニングして、その B5R 遺伝子の配列を比較した。また、それぞれの生物学的性状を、RK13 細胞と VeroE6 細胞でのプラークサイズ、鶏卵漿尿膜でのポックサイズに関して解析した。

(2) LC16m0 型リバータントウイルスの検出法の比較 (倉根分担) :

LC16m0 型のリバータントウイルスの検出を PRK 細胞、RK13 細胞、VeroE6 細胞を用いたプラークアッセイ、鶏卵漿尿膜でのポックサイズでそれぞれ行い、各試験法のリバータントウイルス検出法を比較した。

(3) LC16m8 株の継代培養によるリバータントウイルスの出現の解析 (木所分担) :

LC16m0 型のリバータントウイルス出現の再現実験のため、再度プラーク純化した LC16m8 株を、製造用細胞である初代ウサギ腎細胞に 10 継代培養し、リバータントウイルス含率を解析した。

(4) LC16m0 型リバータントウイルスの含まれる LC16m8 株のウサギ皮膚増殖試験（西條分担）：

種々の割合で LC16m0 型のリバータントウイルスが含まれる LC16m8 株を用いてウサギ皮膚増殖性試験を行い、リバータントウイルス含率と皮膚増殖性との関係を解析した。

(5) LC16m0 型リバータントウイルスの含まれる LC16m8 株のウサギ皮膚増殖試験における皮膚病変の病理学的解析（長谷川分担）：

種々の割合で LC16m0 型のリバータントウイルスが含まれる LC16m8 株を用いてウサギ皮膚増殖性試験を行い、リバータントウイルス含率と皮膚病変部位の病理組織学的所見との関係を解析した。

(6) LC16m0 型のリバータントウイルスの性状解析と SCID マウスに対する病原性の研究（木所分担）：

LC16m0 型のリバータントウイルスの生物学的性状および病原性を、温度感受性試験、プラークサイズ試験、および SCID マウスへの感染実験を行い解析した。

C. 研究結果

(1) LC16m0 型リバータントウイルスの遺伝子解析と生物学的性状：

LC16m0 型のリバータントウイルスを RK13 細胞、VeroE6 細胞を用いたプラークアッセイからクローニングして、その B5R 遺伝子の配列を比較した。また、それぞれの生物学的性状を、RK13 細胞と VeroE6 細胞でのプラークサイズ、鶏卵漿尿膜でのポックサイズに関して解析した。その結果、リバータントウイルスの B5R 遺伝子の配列は、いずれも LC16m0 株の配列とは異なり、orf の nuc 274 G の欠失が復帰したものはなかった。しかし、いずれも orf の nuc 274G の欠失部位の上流で 1 塩基挿入、4 塩基の duplication、あるいは 274G の欠失部位直後の 2 塩基の欠失により frameshift が復帰していた。その結果、LC16m0 株とリバータントウイルスの B5R 蛋白のアミノ酸配列は、1 アミノ酸から 4 アミノ酸異なった。41 クローンのリバータントウイルスは、B5R 遺伝子配列から 7 グループに分類された。また、いずれのリバータントウイルスも、RK13 細胞、VeroE6 細胞でラージプラークを形成し、鶏卵漿尿膜でラージポックを形成した。リバータントウイルスの多くのクローンは、5～14%の割合で 3.0 mm 径を越えるポックを形成した。

(2) LC16m0 型リバータントウイルスの検出法の比較：

LC16m0 型のリバータントウイルスの検出を PRK 細胞、RK13 細胞、VeroE6 細胞を用いたプラークアッセイ、鶏卵漿尿膜でのポックサイズでそれぞれ行った結果、リバータントウイルス含率 = 「VeroE6 細胞でのラージプラーク力価/RK13 細胞でのプラーク力価」によるリバータントウイルス検出法が最も高感度で 10^{-5} でも検出可能であった。

(3) LC16m8 株の継代培養によるリバータントウイルスの出現の解析：

プラーク純化した LC16m8 株を、製造用細胞である初代ウサギ腎細胞に 10 継代培養し、リバータントウイルス含率を解析した。その結果、検出可能な含量でリバータントウイルスが出現し、継代を重ねるごとに含量が増加していくことが明らかになった。また、VeroE6 細胞で $\text{moi}=0.01$ で感染させると、リバータントウイルス含率 0.01% の LC16m8 株を 3 代継代するとリバータントウイルス含率 80% まで増幅できた。

(4) LC16m0 型リバータントウイルスの含まれる LC16m8 株のウサギ皮膚増殖試験：

種々の割合で LC16m0 型のリバータントウイルスが含まれる LC16m8 株を用いてウサギ皮膚増殖性試験を行った結果、リバータントウイルス含有

率 4% 程度まではウサギ皮膚増殖試験において有意差がでないものの、それ以上になると有意差がでると想定された。

(5) LC16m0 型リバータントウイルスの含まれる LC16m8 株のウサギ皮膚増殖試験における皮膚病変の病理学的解析：

種々の割合で LC16m0 型のリバータントウイルスが含まれる LC16m8 株をウサギに皮内接種して、皮膚病変部位の病理組織学的所見を解析した結果、リバータントウイルス含有率 0.8% では、組織学的に有意な差が認められなかったが、4% になると局所病原性の差が認められる個体と認められない個体があった。40% になると顕著な差が認められた。

(6) LC16m0 型のリバータントウイルスの性状解析と SCID マウスに対する病原性の研究：

リバータントウイルスの生物学的性状（プラークサイズ、増殖温度感受性）は LC16m8 株の親株である LC16m0 に酷似し、SCID マウスに対する病原性も LC16m8 株と比較して昂進していることが明らかになった。SCID マウスに感染後 4 週目で発痘を 50% 生じる力価及び 50% 致死に要する力価は、LC16m0 株とリバータントウイルスでは、プラーククローニングされた LC16m8 株や B5R 遺伝子を完全欠失させた組換え LC16m0 株 ($\text{m0}\Delta$)、同様

の組換え LC16m8 株 (m8Δ) と比べて 1,000 倍程度低かった。

D. 考察

以上の実験結果から、細胞培養痘そうワクチンに含まれるリバータントウイルスは、LC16m0 株から欠失した B5R 遺伝子の 274 位の G が復帰するのではなく、その近傍での塩基挿入あるいは欠失により B5R 遺伝子の reading frame が復帰したものであることが明らかになった。しかし、いずれのリバータントウイルスも生物学的性状は、LC16m0 株と酷似していた。さらに、生物学的製剤基準の乾燥細胞培養痘そうワクチンの 3.3.2 マーカー試験の 3.3.2.2 ふ化鶏卵漿尿膜接種試験では、多くのリバータントウイルスでポックサイズ 3.0 mm 以上のポックを形成する場合があることから、リバータントウイルスの含率が高くなると、生物学的製剤基準 (3.0mm を超えるポックを形成してはならない) を満たさなくなる可能性がある。また、LC16m8 株の性質上 (すなわち、B5R 遺伝子の 1 塩基欠失は 1 塩基または 4 塩基の duplication あるいは、欠失 G 直後の 2 塩基欠失のいずれか一回の変異で相補される)、また、培養規模が大きいほどリバータントウイルスが出現することは避けられないと考えられる。この

ため、製造過程でリバータントウイルス含率を正確にモニタリングすることでワクチンのリバータント含率を極力低くすることが必要となる。このため、リバータントウイルスの高感度検出法を開発し 10^{-5} 程度でも検出可能になったことは、ワクチン製造過程でのリバータントウイルス含率を把握するのに有用であると考えられる。リバータントウイルスの含率が 5% 程度以上になると、ウサギ皮膚増殖性に有意差がみられることが推測されることから、ワクチンへのリバータントウイルス含率の許容上限を規定する必要があると考えられる。SCID マウスでの LD50 試験では、より鋭敏にリバータントウイルス含率による病原性の差が検出できることから、リバータントウイルスの混入によるワクチンへの影響を評価する上で有用な試験法であることが示唆された。

E. 結論

細胞培養痘そうワクチンに含まれる LC16m0 型のリバータントウイルスは、B5R 遺伝子が、LC16m0 株から欠失した 274 位の G が復帰するものではなく、その近傍での塩基挿入あるいは欠失により reading frame が復帰したもので、B5R 蛋白が 1 から 4 アミノ酸 LC16m0 株とは異なる。しかし、

いずれのリバータントウイルスも生物学的性状は、LC16m0 株と酷似していた。多くのリバータントウイルスでポックサイズ 3.0 mm 以上のポックを形成する場合があった。リバータントウイルスの含率が 5 % 程度以上になると、ウサギ皮膚増殖性に有意差が出るのが推測された。SCID マウスでの LD50 試験では、より鋭敏にリバータントウイルス含率による病原性の差が検出できることが明らか

になった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

厚生労働科学研究補助金（厚生労働科学特別研究事業）

分担研究報告書

LC16m0 型リバータントウイルスの遺伝子解析と生物学的性状

分担研究者 森川 茂（国立感染症研究所ウイルス第1部第1室長）

協力研究者 緒方もも子、灰谷あずさ、西條政幸（同ウイルス第1部）
木所 稔（同ウイルス第3部）

研究要旨：乾燥細胞培養痘そうワクチンに含まれる LC16m0 型のリバータントウイルスの含有率は、ウイルスの継代数に相関して上昇する。しかし、どのようなリバータントウイルスが生じているかは明らかでない。本研究では、LC16m0 型のリバータントウイルスを RK13 細胞、VeroE6 細胞を用いたプラークアッセイからクローニングして、その B5R 遺伝子の配列を比較した。また、それぞれの生物学的性状を、RK13 細胞と VeroE6 細胞でのプラークサイズ、鶏卵漿尿膜でのポックサイズに関して解析した。その結果、RK13 細胞でスモールプラークを形成するウイルスは、LC16m8 株と同様に B5R 遺伝子に frameshift mutation があり、リバータントウイルスは、すべて B5R 遺伝子の変異により frameshift mutation を回避していたが、LC16m0 に復帰する変異は見られなかった。また、いずれのリバータントウイルスも、RK13 細胞、VeroE6 細胞でラージプラークを形成し、鶏卵漿尿膜でラージポックを形成した。

A. 目的と意義：

乾燥細胞培養痘そうワクチンに使用されるワクチニアウイルス LC16m8 株は、LC16m0 株からスモールプラーク形成変異株として得られたものである。また、Vero 細胞での増殖能が LC16m0 株と比較して低下している。これらの生物学的性状の差異は、LC16m8 株の B5R 遺伝子の変異によることが同定されている。すなわち LC16m8 株の B5R 遺伝子の Open

reading frame (orf) の nuc 274G が欠損しているため、本来の B5R 蛋白（317 アミノ酸からなる膜蛋白）が発現されず、92 アミノ酸からなる欠損型の B5R 蛋白が産生される（Takahashi-Nishimaki F, Funahashi S, Miki K, Hashizume S, Sugimoto M. (1991) *Virology*, 181:158-64. 及び Takahashi-Nishimaki F, Suzuki K, Morita M, Maruyama T, Miki K, Hashizume S, Sugimoto M. (1987): *J Gen Virol.*, 68:2705-10.)。

乾燥細胞培養痘そうワクチンに含まれる LC16m0 型のリバータントウイルスは、ウイルスの培養継代数を重ねるとその含有率が上昇することが明らかになってきた。リバータントウイルスの混入あるいは出現は、乾燥培養痘そうワクチン承認時には想定されていなかった。リバータントウイルスの性状と B5R 遺伝子の変異に関しては、平成 14 年第 6 回日本ワクチン学会、平成 15 年第 51 回日本ウイルス学会で木所らが報告している。すなわち、リバータントウイルスは、B5R 遺伝子の変異導入により、B5R 遺伝子の orf が修復されたもので生物学的に LC16m0 に極めて近似したものである。本研究では、種々のリバータントウイルスの B5R 遺伝子の配列を決定し、どのような変異が生じているのかを明らかにし、RK13 細胞と VeroE6 細胞でのプラークサイズ、鶏卵漿尿膜でのポックサイズを明らかにすることを目的とした。

B. 材料と方法：

1) 使用ウイルス：

国立感染症研究所の参照細胞培養痘そうワクチン（参照品）

チバ血清 lot-2, 3

2) リバータントウイルス：

上記ウイルス材料から、VeroE6 細胞でラージプラーク形成するウイルス、RK13 細胞でラージプラーク形成するウイルスを得た。また、RK13 細胞で通常サイズのプラークを形成するウイルスを対象にクローニングした。

3) B5R 遺伝子の配列：

ウイルス感染細胞から Hirt 法で DNA を回収し、それを鋳型に PCR を行った。プライマーには 5'-CAC ACT ACA TCA TTG TTT CCT-3' B5R-f (B5R-orf 上流 67-47bp に相当する forward primer) と 5'-TGA TAG TCA TAT ATT CCC CA-3' B5R-r2 (B5R-orf の 446-465bp に相当する reverse primer) を用いた。PCR は、[94°C, 40sec / 52°C, 40sec / 72°C, 2min] x 20 cycle 行い、PCR 産物を精製後 B5R-r2 をプライマーに用いて dideoxy 法で塩基配列を決定した。

4) 生物学的性状の解析：

RK13 細胞と VeroE6 細胞でのプラークサイズ：それぞれの細胞を 6 穴プレートに調整し、希釈ウイルスを接種後、0.5%メチルセルロース、2%FCS 添加 MEM を 2mL 加え、35°C の CO₂ 孵卵器で 3 日間培養し、ホルマリン固定後 0.05% クリスタルバイオレットで染色し、プラークサイズを比較した。

鶏卵漿尿膜でのポックサイズ：生物学的製剤基準の乾燥細胞培養痘そうワクチンの 3.3.2 マーカー試験の 3.3.2.2 ふ化鶏卵漿尿膜接種試験に準拠して行い、ポックサイズを算定した。

C. 結果：

1) リバータントウイルス：

LC16m8 株（参照細胞培養痘そうワクチン）と比較して明らかにサイズの大きいプラークを形成するウイルスを RK13 細胞を用いたプラークアッセイから 7 クローン (R クローン)、VeroE6 細胞を用いたプラークアッセイから

34 クローン (E クローン) を得た。また、RK13 細胞を用いたプラークアッセイから参照細胞培養痘そうワクチンと同一サイズのプラーク形成ウイルス 3 クローン (S クローン) を得た。

2) B5R 遺伝子の配列 :

参照細胞培養痘そうワクチンから PCR 増幅し決定した B5R の配列は、GenBank Acc. No. M55435 (LC16m8 の B5R 遺伝子配列) と完全に一致した。また、S クローンは 3 クローンとも同様に一致した。

リバータントウイルスの B5R 遺伝子の配列は、いずれも LC16m0 株の配列 (GenBank Acc. No. M55434) とは異なり、orf の nuc 274 G の欠失が復帰したものはなかった。しかし、いずれも orf の nuc 274G の欠失部位の上流で 1 塩基挿入、4 塩基の duplication、あるいは 274G の欠失部位直後の 2 塩基の欠失により frameshift が復帰していた。また、以下の 7 グループのいずれかに属した (図 1)。

L1: orf の 267 A の duplication : E クローンのうち 13 クローンと R クローンのうち 2 クローン (計 15 clones : 全クローンの内 36.6%)

L2: orf の 266 C の duplication : E クローンのうち 4 クローンと R クローンのうち 2 クローン (計 6 clones : 同 14.6%)

L3: orf の 264 G の duplication : E クローンのうち 1 クローン (同 2.4%)

L4: orf の 271 T の duplication : E クローンのうち 8 クローンと R クローンのうち 2 クローン (計 10 clones : 同 24.4%)

L5: orf の 270-273 ATAC の duplication : E クローンのうち 5 クローン (同 12.2%)

L6: orf の 269 T の duplication : E クローンのうち 1 クローンと R クローンのうち 1 クローン (計 2 clones : 同 4.9%)

L7: orf の 274-275 AA の欠失 : E クローンのうち 2 クローン (: 同 4.9%)

この結果、LC16m0 株とリバータントウイルスの B5R 蛋白のアミノ酸配列は、1 アミノ酸から 4 アミノ酸の相違が認められた (図 2)。

3) 生物学的性状 :

得られたリバータントウイルスは、いずれも PK13 細胞、VeroE6 細胞でラージプラークを形成した。また、鶏卵漿尿膜でのポックサイズを比較したところ、LC16m0 株とリバータントウイルスの形成するポックのサイズは有意差がなく、参照品と S クローンの形成するポックのサイズとは有意差があった。参照品と S クローンの形成するポックのサイズには有意差がなかった。また、リバータントウイルスの多くのクローンは、5~14%の割合で 3.0 mm 径を越えるポックを形成した (表 1、図 3)。

D. 考察 :

LC16m8 株は、LC16m0 株からスモールプラーク形成変異株として得られたもので、両者の生物学的性状の差異は、LC16m8 株の B5R 遺伝子の変異によることが同定されている。

すなわち LC16m8 株の B5R 遺伝子の orf の nuc 274G が欠損しているため、本来の B5R 蛋白 (317 アミノ酸からなる膜蛋白) が発現されず、92 アミノ酸からなる欠損型の B5R 蛋白が産生される。乾燥細胞培養痘そうワクチンに含まれる LC16m0 型のリバータントウイルスの性状と B5R 遺伝子の変異に関しては、平成 14 年第 6 回日本ワクチン学会、平成 15 年第 51 回日本ウイルス学会で木所らが報告している。また、ウイルスの培養継代数を重ねるとその含有率が上昇することが明らかになってきた。本研究では、リバータントウイルスを多数プラーククロニングして、その配列を解析した結果、ラージプラーク形成ウイルスは、全て B5R 欠失が復帰するリバータントであったが、nuc274G の復帰により LC16m0 株と同一配列に復帰したリバータントはなく、nuc274G 近辺の 1 塩基の duplication、4 塩基の duplication、2 塩基の欠失により orf の reading frame が復帰したものであり、LC16m0 株とは、アミノ酸配列で 1~4 アミノ酸異なる。これより上流での変異によるリバータントが認められなかったのは、これより上流で 1 塩基の duplication が生じると、in-frame stop codon が生じて、87 アミノ酸からなる欠失型 B5R が翻訳されると予想される。このため、もしこのような変異ウイルスが生じて、LC16m8 株と生物学的性状が区別できないためと考えられる。

リバータントウイルスの生物学的性状を比較した結果、RK13 細胞、VeroE6 細胞でラージプラークを形成し、鶏卵漿尿膜でラージポックを形成し、LC16m0 株と同等であった。

鶏卵漿尿膜でのポックサイズは、生物学的製剤基準の乾燥細胞培養痘そうワクチンの 3.3.2 マーカー試験の 3.3.2.2 ふ化鶏卵漿尿膜接種試験として国家検定項目に該当するが、多くのリバータントウイルスでポックサイズ 3.0 mm 以上のポックを形成するところから、リバータントウイルスの含率が高くなると、生物学的製剤基準 (3.0mm を超えるポックを形成してはならない) を満たさなくなる可能性がある。生ワクチンの性質上、リバータントの混入は避けたいが、今後、リバータントウイルスの含率ができるだけ低いワクチン製造技術の開発が急務であると考えられる。

E. 結論

乾燥細胞培養痘そうワクチンに含まれるリバータントウイルスは、全て B5R 遺伝子の変異により Frameshift mutation を回避していたが、LC16m0 に復帰する変異は見られなかった。また、いずれのリバータントウイルスも、RK13 細胞、VeroE6 細胞でラージプラークを形成し、鶏卵漿尿膜でラージポックを形成した。リバータントウイルスの多くの多くのクローンは、5~14%の割合で 3.0 mm 径を越えるポックを形成した。今後、リバータントウイルスの含率ができるだけ低いワクチン製造技術の開発が急務であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表
- 1) Niikura M, Ikegami T, Saijo M, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. (2003): Analysis of linear B-cell epitopes of the nucleoprotein of ebola virus that distinguish ebola virus subtypes. *Clin Diagn Lab Immunol.* 10(1):83-7.
 - 2) Tang, Q., Saijo, M., Han, L., Niikura, M., Maeda, A., Ikegami, T., Xinjung, W., Kurane, I., and Morikawa, S. (2003) Detection of immunoglobulin G to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in sheep sera by recombinant nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent and immunofluorescence assays. *Journal of Virological Methods,* 108: 111-116.
 - 3) Ikegami, T., Saijo, M., Niikura, M., Miranda, M.E.G., Calaor, A.B., Hernandez, M., Manalo, D.L., Kurane, I., Yoshikawa, Y. and Morikawa, S. (2003): Immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay using truncated nucleoproteins of Reston Ebola virus. *Epidemiology and Infection,* 130(3):533-9.
 - 4) Tang Q, Saijo M, Zhang Y, Asiguma M, Dong T, Han L, Shimayi B, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. (2003) A patient with Crimean-Congo hemorrhagic fever diagnosed with recombinant nucleoprotein-based antibody detection systems. *Clinical and Diagnostic Laboratory immunology* 10(3):489-91.
 - 5) Maeda, A., Lee, B-H., Yoshimatsu, K., Saijo, M., Kurane, Arikawa, J. and Morikawa, S. (2003): The Intracellular Association of the Nucleocapsid Protein (NP) of HantaanVirus (HTNV) with Small Ubiquitin-Like Modifier-1 (SUMO-1) Conjugating Enzyme 9 (Ubc9). *Virology,* 305: 288-297.
 - 6) 森川 茂 (2003) : ラッサウイルス 日本臨床 61 巻増刊号 3 (通巻 821 号) 539-543
 - 7) 森川 茂 (2003) : フィロウイルス 日本臨床 61 巻増刊号 3 (通巻 821 号) 544-5
 - 8) 森川 茂 (2003): マールブルグ病、総合臨床 (増刊: 感染症診断・投薬ガイド) Vol 52, 601-604
 - 9) 森川 茂 (2003): ウイルス性出血熱のその検査、モダンメディア、第 49 巻第 4 号、103-109
 - 10) Ikegami, T., Niikura, M., Saijo, M., Miranda, M.E., Calaor, A.B., Hernandez, M., Acosata, L.P., Manalo, D.L., Kurane, I., Yoshikawa, Y. and Morikawa, S. (2003) Antigen-capture Enzyme-linked Immunosorbent Assay that specifically detects Reston Ebola Virus nucleoprotein. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.,* 10: 552-557
 - 11) Lee BH, Yoshimatsu K, Maeda A, Ochiai K, Morimatsu M, Araki K, Ogino M, Morikawa S, Arikawa J. (2003) : Association of the nucleocapsid protein

- of the Seoul and Hantaan hantaviruses with small ubiquitin-like modifier-1-related molecules. *Virus Res.*, 98(1):83-91.
- 12) T. Sakamoto, H. Ushijima, S. Okitsu, E Suzuki a, K. Sakai, S. Morikawa, and W. E.G. Muller (2003) : Establishment of an HIV cell-cell fusion assay by using two genetically modified HeLa cell lines and reporter gene. *J. Virol. Meth.* 114 159-166
- 13) 小田切孝人, 二宮愛, 板村繁之, 西藤岳彦, 宮島直子, 森川茂, 西條政幸, 田代真人(2004) : SARS 診断法の開発と SARS 検査の結果. *インフルエンザ (メディカルレビュー社)* 5:35-42.
- 14) 森川 茂(2004): ウイルス性出血熱、アニムス、第 9 巻第 1 号、15-20
- 15) Nikura, M., Maeda, A., Ikegami, T., Saijo, M., Kurane, I., and Morikawa, S. (2004): Modification of Endothelial Cell Functions by Hantavirus : Extension of TNF-alpha-induced hyperpermeability of hantavirus-infected endothelial cell monolayers. *Arch. Virol.* in press
2. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
特許取得：該当なし
3. 学会発表
- 1) 西條政幸, 唐青, 森川茂, 前田秋彦, 倉根一郎. クリミア・コンゴ出血熱に対するリバビリンによる治療経験. 第 13 回抗ウイルス化学療法研究会, 2003 年 1 月, 津田沼
- 2) 西條政幸, 錫谷達夫, 森川茂, 前田秋彦, 倉根一郎. 2 番目のメチオニンから翻訳されるチミジンリン酸化酵素を発現する単純ヘルペスウイルス 1 型の薬剤感受性. 第 13 回抗ウイルス化学療法研究会, 2003 年 1 月, 津田沼市
- 3) 西條政幸, 森川茂, 倉根一郎. 組換え核蛋白を用いたクリミア・コンゴ出血熱の血清学的診断. 第 77 回日本感染症学会総会, 2003 年 4 月, 福岡市
- 4) 板村繁之, 森川茂, 田代真人. 重症急性呼吸器症候群 (SARS) コロナウイルスの感染性とゲノムの不活化. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2003 年 10 月, 京都.
- 5) 森川茂, 板村繁之, 西藤岳彦, 西條政幸, 小田切孝人, 倉根一郎, 田代真人. 重症急性呼吸器症候群 (SARS) の血清診断法. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2003 年 10 月, 京都.
- 6) 板村繁之, 二宮愛, 西藤岳彦, 森川茂, 西條政幸, 小田切孝人, 倉根一郎, 田代真人. RT - PCR 法による重症急性呼吸器症候群 (SARS) コロナウイルスの検出感度の検定. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2003 年 10 月, 京都.
- 7) 西條政幸, 森川茂, 前田秋彦, 倉根一郎. 急性期クリミア・コンゴ出血熱患者におけるウイルス血症と液性免疫応答. 第

51 回日本ウイルス学会学術集会・総会，
2003 年 10 月，京都。

- 8) 鈴木映子、岩坂正和、上野照剛、林京子、
巽正志、森川 茂、沖津祥子、牛島廣治。
HIV-1 の cell to cell fusion における
gp41-mediated fusion. 第 51 回日本ウ
イルス学会学術集会・総会， 2003 年 10
月，京都。

図1. リバータントウイルスのB5R 遺伝子の塩基配列

```

                250      260      270      280      290      300
LC16m0  TATGTCCTGAATTATATGATAAG-CC-ATT-AT-AC-----GAAGTGAATTCACCACATGACACTAAGT
LC16m8  *****
S1      *****
L1      *****
L2      *****
L3      *****
L4      *****
L5      *****
L6      *****
L7      *****

```

S1: 3 small clones have identical consensus sequence of LC16m8

L1: 13E-clones, 2R-clones (total 15 clones:36.6%)

L2: 4E-clones, 2R-clones (total 6 clones: 14.6%)

L3: 1E-clone (1 clone: 2.4%)

L4: 8E-clones, 2R-clones (total 10 clones: 24.4%)

L5: 5E-clones (total 5 clones: 12.2%)

L6: 1E-clone, 1R-clone (total 2 clones: 4.9%)

L7: 2E-clones (total 2 clones: 4.9%)

図2. リバータントウイルスのB5R蛋白の部分アミノ酸配列

LC16m0	Y	V	S	E	L	Y	D	K	P	L	Y	-	E	V	N	S	T	M	T	L	S
LC16m8	Y	V	S	E	L	Y	D	K	P	L	Y	-	K	*	(C-terminus)						
L1	Y	V	S	E	L	Y	D	K	P	I	I	-	Q	V	N	S	T	M	T	L	S
L2	Y	V	S	E	L	Y	D	K	P	I	I	-	Q	V	N	S	T	M	T	L	S
L3	Y	V	S	E	L	Y	D	K	A	I	I	-	Q	V	N	S	T	M	T	L	S
L4	Y	V	S	E	L	Y	D	K	P	L	L	-	Q	V	N	S	T	M	T	L	S
L5	Y	V	S	E	L	Y	D	K	P	L	Y	I	Q	V	N	S	T	M	T	L	S
L6	Y	V	S	E	L	Y	D	K	P	F	I	-	Q	V	N	S	T	M	T	L	S
L7	Y	V	S	E	L	Y	D	K	P	L	Y	-	-	V	N	S	T	M	T	L	S

S1: 3 small clones have identical consensus sequence of LC16m8

L1: 13E-clones, 2R-clones (total 15 clones:36.6%)

L2: 4E-clones, 2R-clones (total 6 clones: 14.6%)

L3: 1E-clone (1 clone: 2.4%)

L4: 8E-clones, 2R-clones (total 10 clones: 24.4%)

L5: 5E-clones (total 5 clones: 12.2%)

L6: 1E-clone, 1R-clone (total 2 clones: 4.9%)

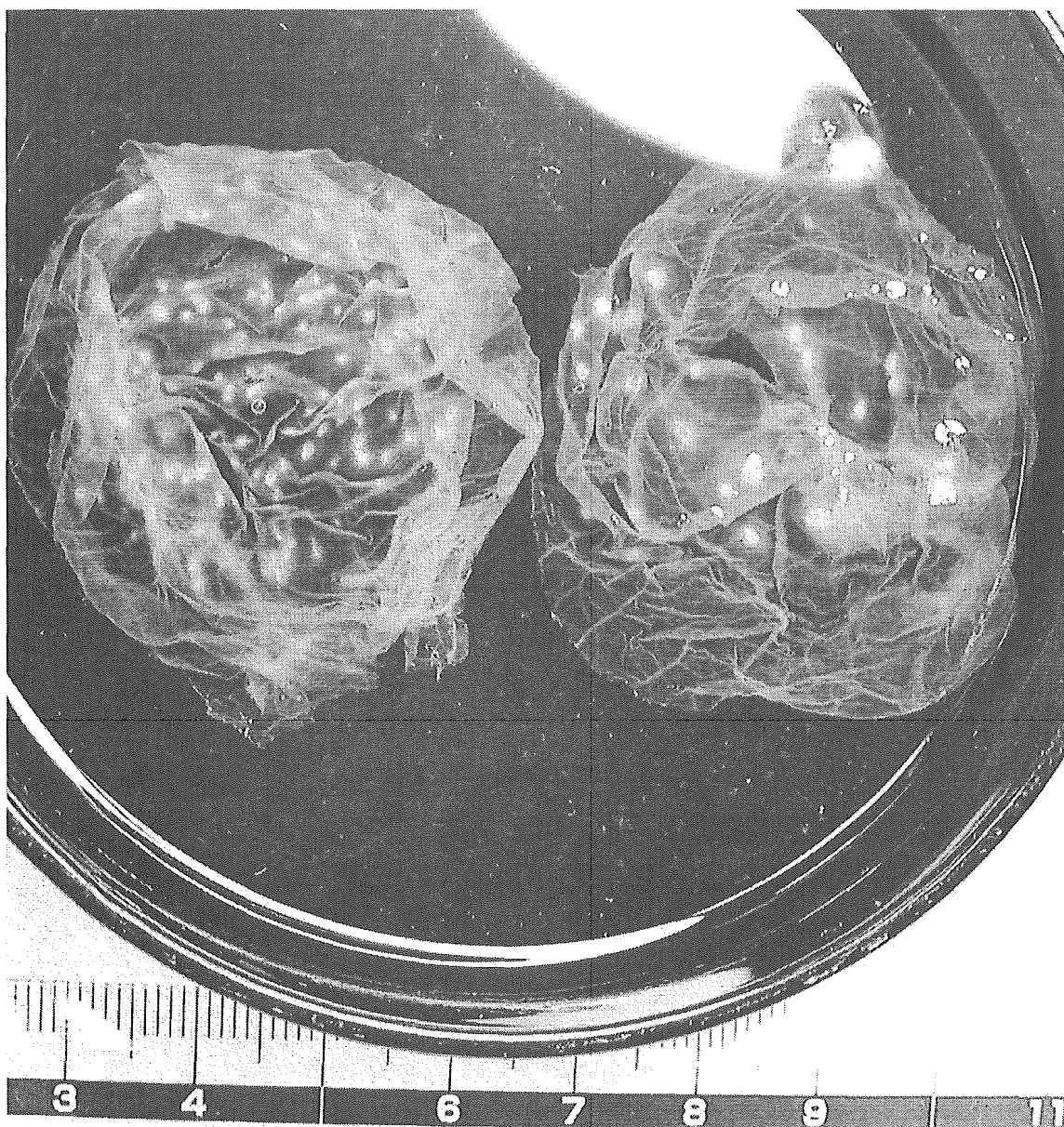
L7: 2E-clones (total 2 clones: 4.9%)

表1. 鶏卵漿尿膜上のポックサイズの比較

Inoculum	LC16m0	LC16m8 Ref. 1	S		L1		L2	L4		L5	
clone			S-1	S-2	E-1	E-5	E-13	E-3	E-4	E-2	E-12
1	1.9	0.9	1.0	1.2	2.4	2.3	1.8	2.7	1.8	2.2	2.2
	2.0	0.9	1.1	0.8	2.2	1.9	2.2	3.2	3.3	2.2	1.8
	1.8	0.9	1.2	0.9	1.8	1.4	2.3	2.2	2.3	1.6	2.0
5	1.8	1.5	0.8	1.0	2.2	1.3	2.4	2.4	2.2	1.7	1.7
	1.5	1.1	1.1	1.4	2.5	1.8	3.1	2.2	2.2	2.9	2.6
	1.9	1.1	1.1	0.8	1.8	1.9	2.0	2.1	1.9	2.1	1.6
10	2.3	0.8	1.0	1.1	1.4	1.8	1.4	2.1	1.9	2.3	2.0
	1.3	1.4	1.0	1.1	2.3	3.0		1.8	2.5	1.4	2.1
	2.1	1.1	1.4	1.1	2.1	1.5		2.8	1.7	1.5	2.0
15	1.7	1.3	0.9	1.0	1.6	2.2		3.2	1.9	2.9	2.1
	1.7	1.3	1.1	1.0	2.2	2.0		2.2	1.9	2.2	1.4
	2.4	1.1	1.1	1.1	1.8	1.2		2.4	1.7	1.8	2.0
20	1.9	0.9	1.4	1.1	1.6	1.8		1.5	1.9	1.6	2.0
	2.7	1.4	1.0	1.1	2.0	2.0		1.8	1.5	1.5	1.9
	2.3	1.3	0.9	1.0	1.8	1.3		1.8	1.7	1.7	
20	2.7	1.2	0.9	1.0	2.5			1.5	1.9	3.1	
	2.5	1.1	1.0	1.0	2.0			1.6	1.9	1.5	
	2.1	1.1	1.3	1.1	2.1			1.6	1.8	1.9	
20	2.7	1.0	1.2	1.0	2.4			1.4	1.5	2.0	
	2.1	1.2	0.8	1.0	1.9			2.4	2.2	1.9	
Average	2.1	1.1	1.1	1.0	2.0	1.8	2.2	2.1	2.0	2.0	2.0
SD	0.40	0.19	0.17	0.13	0.31	0.47	0.53	0.54	0.40	0.50	0.28

LC16m0株と参照品 (LC16m8 Ref. 1)、Sクローン (S-1, S-2) のポックサイズは有意差があるが、リバータントウイルス (L1グループのE-1, E-5; L2グループのE-13, L4グループのE-3, E-4; L5グループのE-2, E-12) のポックサイズは有意差がない。参照品とSクローン (S-1, S-2) のポックサイズとは有意差がないが、リバータントウイルスのポックサイズとは有意差がある。クローニングされたリバータントウイルスでは、3.0mm 径以上のサイズのポックが形成されることがある。

図3. 参照品とリバータントウイルスの鶏卵漿尿膜上のポック



参照品のポック（写真左）とリバータントウイルス（L1 グループの E-1 クローン）のポック（写真右）とは、明らかにサイズが異なる。