

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検出法の比較

分担研究者 倉根 一郎（国立感染症研究所ウイルス第1部長）

協力研究者 緒方もも子、西條政幸、森川 茂（同ウイルス第1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。本研究では、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。その結果、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 LC16m0 型のリバータントウイルス検出法が最も高感度であった。

A. 目的と意義：

乾燥細胞培養痘そうワクチンに使用されているワクチニアウイルス LC16m8 株は、LC16m0 株を初代ウサギ腎細胞（PRK 細胞）で 30℃、3 代継代後にスモールプラーク形成ウイルス株としてプラーククロニングにより得られた株である。LC16m0 株は、ウサギ皮膚増殖性が LC16m8 株より高く、Vero 細胞での増殖能も高い。実際、LC16m0 株は約 3,000 人に接種されたが、皮膚反応が LC16m8 株よりも高かった。このため、LC16m8 株が最終的にはワクチン候補株として治験に用いられ、厚生省から細胞培養痘そうワクチンとして 1975 年に認可された。LC16m0 株と LC16m8 株の、

これらの生物学的性状の差異は、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 蛋白が産生されることによることが同定されている。

一方、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。このため、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を検出することは、ワクチンの安全性を考える上で重要である。本研究では、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により、LC16m0型のリバータントウイルス検出法を比較し、それぞれの検出感度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（細胞参照品）

チバ血清 lot-2, 3

4%リバータントウイルス液（リバータントウイルスを4%含む様に調整したLC16m8株（4% Rev）

2) リバータントウイルス検出法：

PRK細胞、RK13細胞、VeroE6細胞でのプラークアッセイ：それぞれの細胞を6穴プレートに平板培養になるよう調整し、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℃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の検出：

PRK細胞、RK13細胞では、35℃でLC16m8株も明瞭な1mm径程度のプラークを形成する。LC16m0株は、LC16m8株よりも大きなサイズ（2mm径程度）のプラークを形成する。リバータントウイルスは、LC16m0株と同等のサイズのプラークを形成する。両細胞とも、6穴プレートを用いたプラークアッセイでは、リバータントウイルス検出率は0.5%程度であった。これは、6穴プレートを用いた場合プラーク数200個程度が計測可能な上限数であり、これ以上になると細胞全体が細胞障害効果により死滅してプラークを形成できないためである。チバ血清lot-2, 3に含まれるリバータントウイルスを検出するためにRK13細胞で2,000プラーク測定した結果、lot-2では1個（0.1%）、lot-3では4個（0.2%）リバータントウイルスが検出された。細胞参照品からはリバータントウイルスは検出されなかった。また、鶏卵漿尿膜でのポックサイズ試験では、チバ血清lot-2, 3および細胞参照品からは明瞭に大きなポックは認められなかった。

一方、VeroE6細胞を用いた35℃でのプラークアッセイでは、LC16m8株は針穴状の極

少のプラークしか形成しないが、LC16m0 株やリバータントウイルスでは明瞭な 1mm 径程度のプラークを形成する。このため、VeroE6 細胞では 50,000PFU/well 程度感染させてもプラークが形成される。このため、より高感度でリバータントウイルスが検出されると考えられる。「リバータントウイルス含率 = VeroE6 細胞で明瞭な 1mm 径程度のプラークを形成するウイルス力価/RK13 細胞でのプラーク力価」の計算式でチバ血清 lot-2, 3 および細胞参照品のリバータントウイルス含率を求めると、それぞれ 0.2%、0.8%、0.03% であった。

4%Rev (RK13 細胞でのラージプラーク含率=4.4±0.4%) を用いて VeroE6 細胞でのプラーク力価/RK13 細胞でのプラーク力価、鶏卵漿尿膜でのラージポック含率 (径 2.0mm 以上のポック含率) を求めると、それぞれ 7.1 ±0.2%、5.0±0.0% であった。

D. 考察 :

旧来の痘そうワクチンは、ウシの皮膚病変部位からの粗精製品であり、またクローニングされたワクチニアウイルスを用いていなかった。このため、無菌性が保証されないワクチンであり、さらに、種痘後脳炎や全身性ワクチニア症等の重篤な副作用が 100 万人あたり 10~30 人の頻度で出現するものであった。これらの問題を解決するために、橋爪らは Lister(Elstree)株を親株として初代ウサギ腎細胞 (PRK 細胞) で低温順化 (30°C、36 代継代) した後クローニングし LC16 株を作製し

た。LC16 株は、温度感受性変異 (ts) 株であり、さらにサル脳内接種試験で低神経病原性であることが確認されている。LC16m0 株は LC16 株からさらに 6 代 PRK 細胞で継代後に中等度のポックサイズの株として得られ、LC16m8 株は、LC16m0 株からさらに 3 代継代後に少サイズのポック形成ウイルスとして得られたものである。LC16m0 株と LC16m8 株は、LC16 株同様に ts 株であり、神経病原性は低く、さらに向神経性も低い。このため、旧ワクチンと比べていずれも安全性は高いと考えられる。しかし、LC16m0 株は、皮膚増殖性が LC16m8 株と比較して強いことから、特にアレルギー、アトピーを基礎疾患としてもつ人では種痘性湿疹の発生率が高くなることが懸念される。

乾燥細胞培養痘そうワクチンは、LC16m8 株を用いた細胞培養痘そうワクチンとして 1975 年に厚生省の認可を受けた後、昭和 55 年度に 1 ロット作製された。平成 11 年度には、試験製造品として 1 ロット作製されている。これらは、マスターシードから 1 代培養して作製された。一方、平成 13 年度に千葉血清により 2 ロット作製されたワクチンは、マスターシードから 2 代培養されている。木所らは、平成 13 年度に 2 ロット作製されたワクチンに、低率ながらラージプラーク形成ウイルスが混在していることを明らかにし、ラージプラーク形成ウイルスは、B5R 遺伝子のリバータントであることも明らかにした。(LC16m8 株由来リバータントウイルスの生物学的性状の検討, 第 6 回日本ワクチン学会, 2002 年 11 月)。本研究では、細胞参照品 (マ

スターシードより 1 代培養) とチバ血清 lot-2, 3 を用いて、リバータントウイルス検出法を検討した。その結果、「リバータントウイルス含率 = VeroE6 細胞で明瞭な 1mm 径程度のプラークを形成するウイルス力価 / RK13 細胞でのプラーク力価」を用いる検出法が他の方法に比べ 100 倍以上高感度であり、1/105 程度まで検出できることが明らかになった。4%Rev を用いて、各検出法を比較した結果、いずれの方法で求めた結果も近似した値を示した。この方法は、ワクチン製造過程での、あるいはワクチン製剤中のリバータントウイルス検出及び含率を求めるのに現時点では最も優れた方法であると考えられる。

E. 結論

LC16m8 株に含まれる LC16m0 型リバータントウイルスの検出法としては、「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」が最も高感度であった。

F. 研究発表

1. Shoji Y, Inoue S, Nakamichi K, Kurane I, Sakai T, Morimoto K. (2004): Generation and characterization of P gene-deficient rabies virus. *Virology*, 318: 295-305.

2. Sa-ngasang A, Wibulwattanakij S, Chanama S, O-rapinpatipat A, Anuegoonpipat A, Anantapreecha S, Sawanpanyalert P, Kurane I. (2003): Evaluation of RT-PCR as a tool for

diagnosis of secondary dengue virus infection. *Jpn J Infect Dis.*, 56: 205-9.

3. Pandey B, Yamamoto A, Morita K, Kurosawa Y, Rai S, Adhikari S, Kandel P, Kurane I. (2003): Serodiagnosis of Japanese encephalitis among Nepalese patients by the particle agglutination assay. *Epidemiol Infect.*, 131(2):881-5.

4. Takasaki T, Yabe S, Nerome R, Ito M, Yamada K, Kurane I. (2003): Partial protective effect of inactivated Japanese encephalitis vaccine on lethal West Nile virus infection in mice. *Vaccine*, 21(31):4514-8.

5. Mizutani T, Kobayashi M, Eshita Y, Shirato K, Kimura T, Ako Y, Miyoshi H, Takasaki T, Kurane I, Kariwa H, Umemura T, Takashima I. (2003): Involvement of the JNK-like protein of the *Aedes albopictus* mosquito cell line, C6/36, in phagocytosis, endocytosis and infection of West Nile virus. *Insect Mol Biol.*, 12(5):491-9.

6. Konishi E, Ajiro N, Nukuzuma C, Mason PW, Kurane I. (2003): Comparison of protective efficacies of plasmid DNAs encoding Japanese encephalitis virus proteins that induce neutralizing antibody or cytotoxic T lymphocytes in mice. *Vaccine*, 21(25-26):3675-83.

7. Yamada K, Takasaki T, Nawa M, Yabe S, Kurane I. (2003): Antibody responses determined for Japanese dengue fever patients by neutralization and

- hemagglutination inhibition assays demonstrate cross-reactivity between dengue and Japanese encephalitis viruses. *Clin Diagn Lab Immunol.*, 10(4):725-8.
8. Ikegami T, Niikura M, Saijo M, Miranda ME, Calaor AB, Hernandez M, Acosta LP, Manalo DL, Kurane I, Yoshikawa Y, Morikawa S. (2003): Antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of Reston Ebola virus nucleoprotein. *Clin Diagn Lab Immunol.*, 10(4):552-7.
9. Ikegami T, Saijo M, Niikura M, Miranda ME, Calaor AB, Hernandez M, Manalo DL, Kurane I, Yoshikawa Y, Morikawa S. (2003): Immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay using truncated nucleoproteins of Reston Ebola virus. *Epidemiol Infect.*, 130(3):533-9.
10. Nawa M, Takasaki T, Yamada K, Kurane I, Akatsuka T. (2003): Interference in Japanese encephalitis virus infection of Vero cells by a cationic amphiphilic drug, chlorpromazine. *J Gen Virol.*, 84(Pt 7):1737-41.
11. Tanabayashi K, Mukai R, Yamada A, Takasaki T, Kurane I, Yamaoka M, Terazawa A, Konishi E. (2003): Immunogenicity of a Japanese encephalitis DNA vaccine candidate in cynomolgus monkeys. *Vaccine*, 21(19-20):2338-45.
12. Tang Q, Saijo M, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Han L, Shimayi B, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. (2003): A patient with Crimean-Congo hemorrhagic fever serologically diagnosed by recombinant nucleoprotein-based antibody detection systems. *Clin Diagn Lab Immunol.*, 10(3):489-91.
13. Kurane I, West K, Tuazon CU, Zeng W, Ennis FA. (2003): Definition of two new epitopes on human immunodeficiency virus type 1 gag protein recognized by human CD8+ cytotoxic T lymphocyte clones. *J Clin Virol.*, 27(1):38-43.
14. Ito M, Itou T, Shoji Y, Sakai T, Ito FH, Arai YT, Takasaki T, Kurane I. (2003): Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Virol.*, 26(3):317-30.
15. Takahashi M, Miwa T, Yamada K, Sato Y, Ikawa K, Matsumoto Y, Sano T, Takasaki T, Nerome R, Ito M, Kurane I. (2003): Detection of dengue virus-infected patients among passengers at the quarantine station of the New Tokyo International Airport. *Jpn J Infect Dis.*, 55(6):215-6.
16. Maeda A, Lee BH, Yoshimatsu K, Saijo M, Kurane I, Arikawa J, Morikawa S. (2003): The intracellular association of the nucleocapsid protein (NP) of hantaan virus (HTNV) with small ubiquitin-like

modifier-1 (SUMO-1) conjugating enzyme 9 (Ubc9). *Virology*, 305(2):288-97.

17. Qing T, Saijo M, Lei H, Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Xinjung W, Kurane I, 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. *J Virol Methods.*, 108(1):111-6.

18. 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.

19. Inoue K, Shoji Y, Kurane I, Iijima T, Sakai T, Morimoto K. (2003): An improved method for recovering rabies virus from cloned cDNA. *J Virol Methods.*, 107(2):229-36.

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) 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.

5) 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.

6) 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.

分担研究報告書

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

分担研究者： 木所 稔（国立感染症研究所ウイルス第三部主任研究官）

研究要旨：千葉県血清研究所で開発された弱毒痘そうワクチン株 LC16m8 株に関する応用研究と実製造の経験から、我々は培養過程でラージプラークを形成する先祖返りしたウイルス（リバータント、以下 RV）が出現することを明らかにした。この RV 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 継代培養した。その結果、検出可能な含量で RV 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。従って、RV の出現は LC16m8 株の有する避けがたい性状であり、RV のコントロールが痘そうワクチン製造上、きわめて重要であることが改めて証明された。

A. 研究目的

千葉県血清研究所で開発された LC16m8（以下 m8）株は 10 万人の小児に接種され、高い安全性が証明された痘そうワクチン株である。しかし、我々は m8 株に関する応用研究と実製造の経験から、培養過程でラージプラークを形成するリバータントウイルス（RV）が出現することを見出した。RV はプラーク純化された m8 株から出現することから、リバータントウイルスと考えられ、ワクチンの安全性に懸念を生じかねないと考えられる。そこで、製造工程管理の参考とするために、m8 株からの RV の出現頻度を調べるため、再クローニングした m8 株を VeroE6 細胞（m8 株の増殖効率が低く、RV や m0 株では高い）と、製造用細胞である初代ウサギ腎臓細胞

（PRK）に継代培養することによって RV が出現するかどうかを確認する再現実験を行った。

B. 研究方法

- 1) ウイルス： RV を約 0.01%含有する m8 株（以下 RefVac）、再クローニングした m8 株（m8rc 株）、m8Δ株および m0Δ株（それぞれ m8B5R（m0 株の B5R 遺伝子をもつ組換えウイルス）と m0 株に B5R 遺伝子の欠失を導入した組換えウイルス）を用いた。
- 2) 細胞：RK13 細胞は 5 %FCS を含む MEM、VeroE6 細胞は 5 %FCS を含む DMEM、初代ウサギ腎細胞は 8 %FCS を含む MEM で培養した。

3) VeroE6 細胞継代培養：RefVac、m8rc 株、m8Δ 株および m0Δ 株を 12.5 cm² カルチャーボトルに培養した VeroE6 細胞に moi=0.01 で接種し、34℃で 7 日間培養した。ボトルごと凍結融解した後ウイルス液をソニケーションしてウイルス力価を測定した。同様に 10 代まで継代培養した。RV 含量は以下の 2 つの方法で求めた。1. RK13 細胞でウイルス力価を測定し、その内、ラージプラークの比率を求める。2. m8 株は VeroE6 細胞でプラークを形成しない（または、極めて小さいプラークしか形成しない）のに対し RV は m0 株同様にプラークを形成することから、RK13 細胞と VeroE6 細胞とで、ウイルス力価を測定し、VeroE6 での力価/RK13 での力価の比を求めた。

5) PRK 継代培養：m8rc 株、m8Δ 株および m0Δ 株を 75 cm² カルチャーボトルに培養した PRK 細胞に moi=1.0 で接種し、製造条件と同じ 30℃、およびより高い 34℃で 2 日から 3 日間培養した。ボトルごと凍結融解した後ソニケーションしてウイルス力価を測定した。同様に 10 代まで継代培養した。PRK 継代 5、6、7 および 10 代目のウイルス液について RV 含量を測定した。RV 含量の測定は 100mm カルチャーディッシュに培養した VeroE6 細胞で RV のウイルス量を測定し、RK13 細胞で測定した総ウイルス力価との比（VeroE6 での力価/RK13 での力価）を求めた。

C. 研究結果

1) 再クローニングした m8(m8rc) 株の細胞

継代培養によるリバージョン再現実験 (図-1, 2)。

1-1) VeroE6 細胞による継代培養 (図-1)

RV を 0.01% 含む m8 株(RefVac)は VeroE6 細胞で 3 代継代するだけで RV の含量が 80% にまで上昇し、VeroE6 細胞では、RV が選択的に効率よく増幅されることが示された。一方 m8rc 株では 10 代まで継代しても RV は検出限界 (1/10⁶) 以下であった。m8Δ、m0Δ 株についても同じ実験を行ったが、10 代まで継代しても RV は検出限界以下であった。

2) PRK 細胞による継代培養 (図-2)

m8rc 株では 5 代継代から検出可能な量の RV が出現し始め、継代を重ねるごとにその含量が増加し、10 代目には 30℃培養系で 0.1%、34℃培養系では 0.01% であった。30℃継代と 34℃継代では前者が常に 1 桁、RV 含量が高い結果となった。また、PRK 細胞で 34℃、1 代増殖した m8rc を、さらに VeroE6 細胞 (75cm² フラスコ、moi=1.0) で 3 代継代したところ、継代したウイルス液から RV が 33% 検出された。m8rc 株を PRK 細胞で 30℃、1 代増殖したものからは同様の方法で RV は検出できなかった。m8Δ、m0Δ 株についても同じ実験を行ったが、10 代まで PRK 細胞で継代し、その後さらに VeroE6 細胞に 3 代継代したが、RV は検出されなかった。

D. 考察

VeroE6 細胞での継代培養では RV のみが選択的に効率よく増幅されることが明らかになった。これは、VeroE6 細胞では、RV の増殖が m8 株に比べて極めて効率が良いためと考えられる。従って、RK13 細胞を用いたプラークアッセイでは検出限界 ($1/10^3$) 以下の微量の RV が混入したウイルス液からでも、RV を確実に検出可能であることが示された。

m8rc を VeroE6 細胞に 10 代継代しても RV は検出限界以下であったのは PRK 継代の結果と相容れない。その原因は 2 つ考えられる。すなわち、1) 継代の際に次の継代に持ち込むウイルス量の違いによる可能性。VeroE6 細胞継代では、カルチャーボトルが小さく (12.5cm^2) かつ低 moi (0.01) で感染させたため、接種ウイルス量は 10^4 PFU 以下であった。リバージョンが起こる確立が 10^{-4} 以下であれば、何代継代しても RV は出現しない可能性がある。PRK 継代では、その点を考慮して、 75cm^2 カルチャーボトルを用い、製造条件と同じ moi=1 (接種量 $10^{6.9}$ PFU) で継代した。その結果 m8rc 株の PRK 継代 5 代から検出可能な量の RV が出現したと考えられる。あるいは、2) VeroE6 細胞では m8 株の変異の頻度が極めて低い可能性がある。この点を明らかにするために、今後異なる moi で VeroE6 細胞にウイルスを感染継代した場合の RV 出現の有無を調べる必要がある。

PRK 細胞では、RV の含量はいずれの温度においても、継代ごとに上昇することが示された。しかし、実際の製造レベルではクローニ

ングから 7 代目 (マスターシードがクローニングから 5 代目で、千葉血清製造のロット 2, 3 がマスターシードから 2 代目である) で 0.1% 程度の RV が検出されており、今回の再現実験の結果は、それと比べると RV 出現頻度が $10^{1.6}$ 低い。これは、再現実験の規模が実製造のレベルの $1/1,000$ から $1/10,000$ 程度であるためと考えられる。また、PRK 細胞で 30°C および 34°C で 1 代増殖した m8rc を、VeroE6 細胞 (75cm^2 フラスコ、moi=1.0) で 3 代継代したところ、RV が前者では検出されなかったが後者では 33% 検出された。この実験では、VeroE6 細胞での増幅を高い moi で行ったため、VeroE6 細胞での継代中に RV が出現したか農政を否定できないが、PRK 細胞で 1 代培養時点ですでに RV が出現している可能性は否定できない。以上の成績から、培養の規模が大きくなるほど RV 出現と RV 含量の増加の可能性が増すことを示唆している。今後、製造スケールでの継代培養で、プラーク純化した m8 からどの程度 RV が出現するかを詳細に検討する必要がある。

再現実験によって出現した RV の B5R 遺伝子を調べたところ、調べた全てのクローンで復帰変異が確認され、変異のパターンは単一ではなかった。この結果もリバージョンが multiple に起こっていることを示している。

E. 結論

1. VeroE6 細胞での継代培養実験から、VeroE6 細胞で継代培養することで RV を選択的に増幅ことが可能になり、微量の

RV も検出できることが示された。

2. VeroE6 細胞と PRK 細胞の継代培養の結果から、m8 株がリバージョンを起こす頻度は決して低くは無く、培養の規模が大きくなるほど RV 出現と RV 含量の増加の可能性が増すことを示唆している。

3.

F. 研究発表

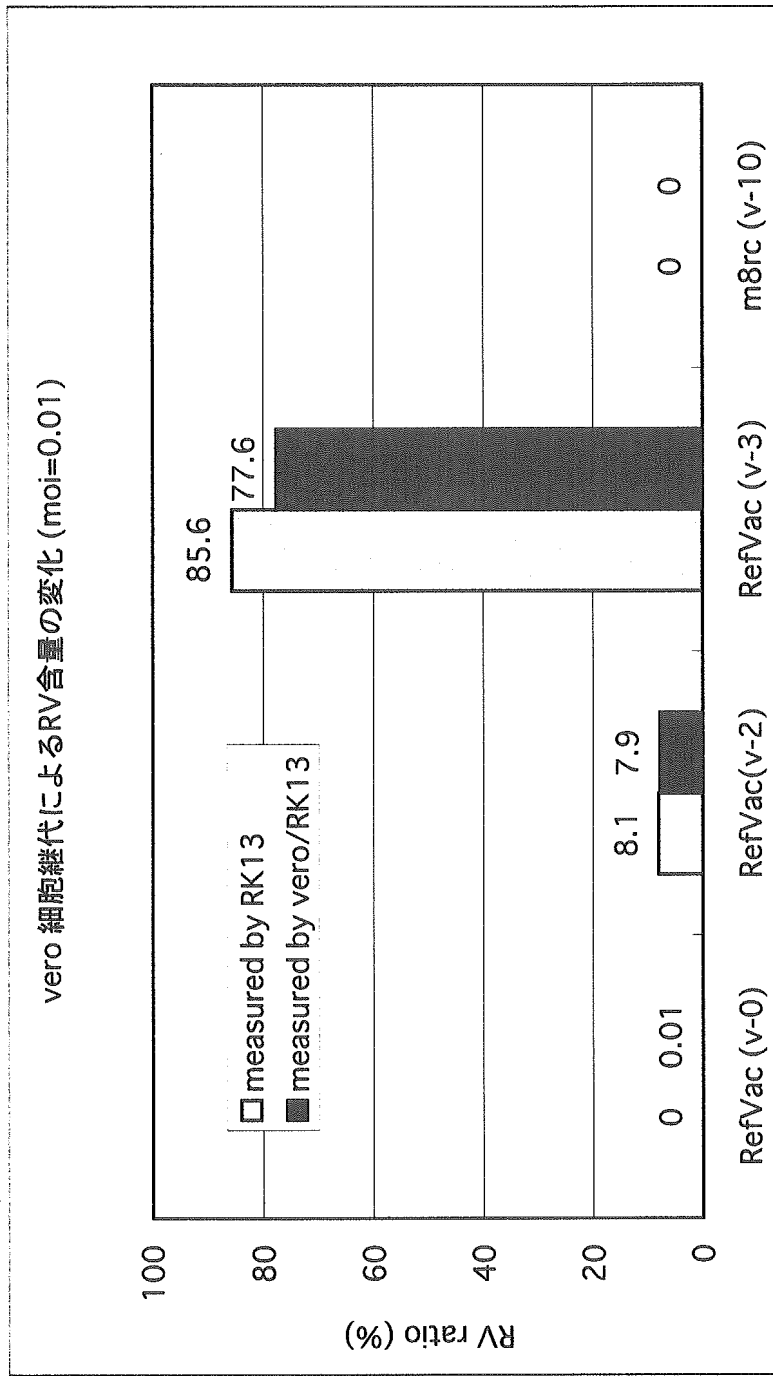
1. 学会発表

木所 稔, 田代 真人, 堀内 清, 志田 壽利; 痘そうワクチン株 LC16m8 由来リバータントウイルスの生物学的性状の解析、第 51 回日本ウイルス学会総会、2003 年 10 月

2. 論文発表

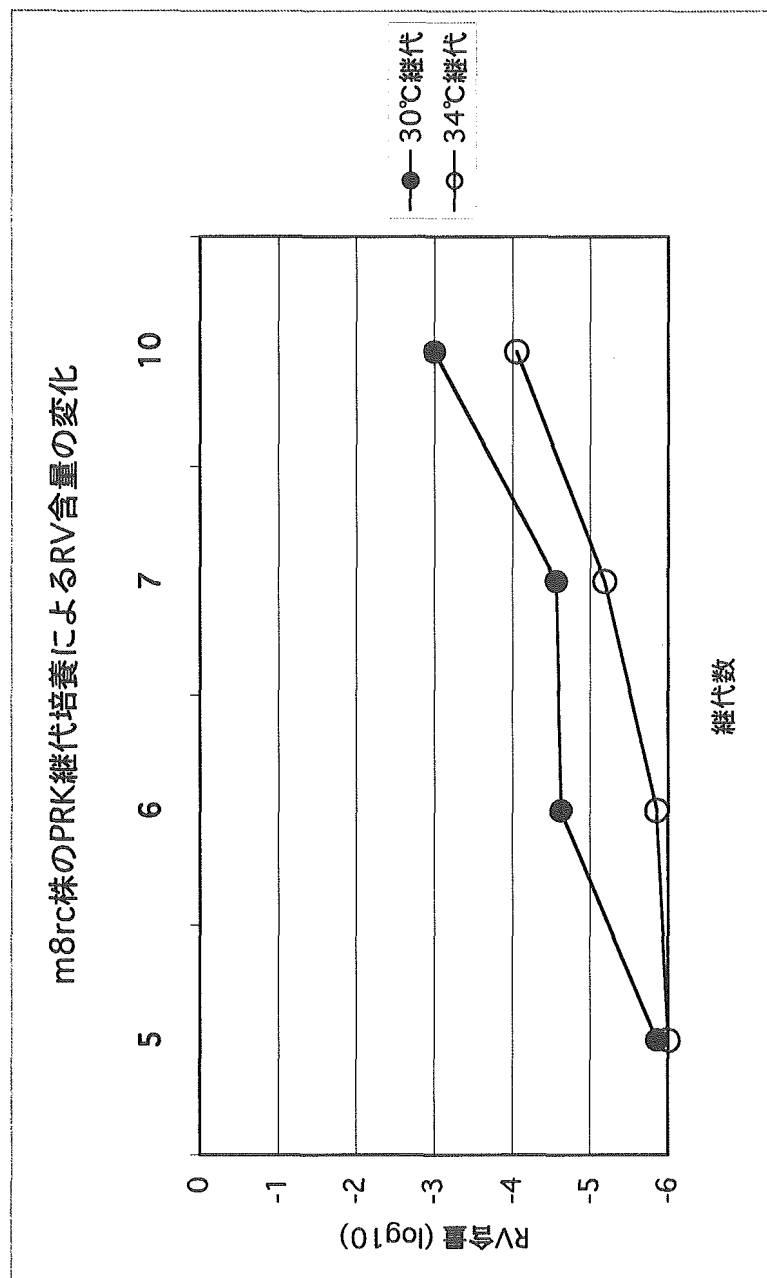
杉本正信、大石和恵、木所稔、橋爪壮：国産天然痘ワクチンの新たな役割ーバイオテロ対策およびベクターとしての利用、蛋白質 核酸 酵素、vol 48 (No12), 2003

図1 VeroE6 細胞での継代培養によるリバータウイルス含率の上昇



RefVac (RV 含率 0.01%) を VeroE6 細胞 (12.5cm² フラスコ) に moi=0.01 で感染後、34°C で 7 日間培養した。3 代継代すると 80% 程度まで上昇する。この条件で、再クローニングした m8rc 株や m8Δ、m0Δ 株では、10 代まで継代しても RV は検出限界 (1/10⁶) 以下であった。

図2 PRK細胞での継代培養によるリバータウイルス含率の上昇



PRK細胞 (75 cm² フラスコ) に再クローニングした m8rc 株を moi=1.0 で接種し、製造条件と同じ 30°C とより高い 34°C で 2 日から 3 日間培養した。この条件で 5 代継代が RV が検出可能になり、10 代目には 30°C 培養系で 0.1%、34°C 培養系では 0.01% であった。

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含まれる LC16m8 株の
ウサギ皮膚増殖試験

分担研究者 西條 政幸（国立感染症研究所ウイルス第1部）

協力研究者 森川 茂（同ウイルス第1部）、木所 稔（同ウイルス第3部）、
永田 典代、長谷川 秀樹（同感染病理部第2室）
須崎 百合子、網 康至（同実験動物管理室）

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、リバータントウイルスの混入・出現は、乾燥細胞培養痘そうワクチン承認時には想定されていなかったため、どの程度リバータントウイルスが混入するとワクチンの性状、安全性に影響するかは不明である。本研究では、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有率と皮膚増殖性との関係を明らかにした。その結果、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。

A. 目的と意義：

我が国の乾燥細胞培養痘そうワクチンに使用されているワクチニアウイルス LC16m8 株は、Lister 株から得られた LC16m0 株からさらに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。つまり LC16m8 株は培養細胞においてスモールプラークを形成するが、LC16m0 株は Lister 株と同様に LC16m8 株のそれに比較して大きいプラークを形成する。しかし、LC16m8 株痘そうワクチンの培養継代数を重ねると LC16m0 型のリバータントウイルス含有率が上昇することが明らかになっ

た。リバータントウイルスの混入あるいは出現は、乾燥細胞培養痘そうワクチン承認時には想定されていなかったため、どの程度リバータントウイルスが混入するとワクチンの性状、安全性に影響を与えるのかは不明である。LC16m8 株と LC16m0 株の生物学的性状の大きな差異の一つに、ウサギ皮膚でのウイルス増殖性が異なることが明らかになっている。また、ウサギ皮膚増殖性は、ヒトの種痘部位でのウイルス増殖性と相関することが知られている。そこで本研究では、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 株ワクチン液のウサギ皮膚増殖性試験を行い、

リバータントウイルス含有率と皮膚増殖性との関係を明らかにした。

B. 材料と方法：

- 1) 使用ワクチン液とそのリバータントウイルス含有率：国立感染症研究所参照細胞培養痘そうワクチン（参照品）は0.03%のリバータントウイルスを含むことが確認されている。また、チバ血清 lot-3（Chiba3）は0.8%のリバータントウイルスを含むことが確認されている。さらに4%のリバータントウイルスが含まれるワクチン（4%Rev）、40%のリバータントウイルスが含まれるワクチン液（40%Rev）を作製し、本研究に用いた。
- 2) ウサギ：SPF ウサギを皮膚試験用として16匹使用した。本研究にウサギを使用することについては、国立感染症研究所動物実験委員会の承諾を得ている。
- 3) 接種：それぞれのワクチン液をワクチンウイルスの感染価が $10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3$ p. f. u./mL になるように調整し、その階段希釈された各ウイルス液0.1mL（各希釈倍率のウイルス液につき2ヶ所/ウサギ）をウサギ皮膚に皮内接種した。なお、接種されたそれぞれのワクチン液のウイルス力価を、RK13細胞を用いた plaque titration 法により決定し、実験成立の許容誤差範囲内であることを確認した。
- 4) 判定：接種後1週間毎日ウイルス接種部位を観察し、ウイルス接種部位の発赤

径が1cm以上を示した場合を陽性として50%発赤量の \log_{10} 値（50% ErD₅₀）を算出した（図1）。なお、発赤径が最大を示した日数は、個体差があり接種4日目の場合と5日目場合があった。

C. 結果：

- 1) ErD₅₀：各ウイルス液を接種された4匹のErD₅₀を算出し、ErD₅₀の平均値（Mean）、標準偏差（SD）、標準誤差（SE）、最大値と最小値を求めた（表1）。階段希釈されたワクチン液を皮内接種された部位のウサギ皮膚病変を図1に示した。その結果、ErD₅₀の平均値は、参照品では5.0、Chiba3では4.4、4%Revでは4.1、40%Revでは1.9となった。Student's-t検定を行うと、参照品、Chiba3、4%RevのErD₅₀間には有意差は認められなかったが、40%RevのErD₅₀は他の3種ErD₅₀よりも有意に低かった（表2）。

D. 考察：

参照品は、マスターシードから1代培養されたものであり、Chiba3は、さらに1代多く培養されたもので、つまりマスターシードから2代培養されたものである。すなわち継代数が多くなるとリバータントウイルス含有率が上昇することを示している。計算上は、リバータントウイルス含有率が約5%までは、ウサギ皮膚増殖試験で有意差がないと予想されていたが、実際の試験でもこのことが確認

された。しかし、リバータントウイルス含有量がそれぞれ 0.02%、0.8%、4%である参照品、Chiba3、4%Rev の ErD_{50} は、それぞれ 5.0、4.4、4.1 で徐々に低下する傾向にある。また、参照品と 4%Rev の ErD_{50} 間の統計学的有意差を判定するための p 値が 0.058 とほぼ 0.05 に近似していることから、リバータントウイルス含有量の値として 4%が、ウサギ皮膚増殖試験において有意差が認められない上限付近であると考えられる。生物学的製剤基準では、LC16m0 型のリバータントウイルスが含まれることを前提とされてない。しかし、本研究成績から、もし 4%を越えるリバータントウイルスが含まれるとすると、皮膚増殖性に明らかな差異が生じると予想されることから、乾燥細胞培養痘そうワクチンの安全性を確保するためにリバータントウイルス含有率の上限を生物学的製剤基準で定めることが必要である。

E. 結論：

ヒトの種痘部位でのウイルス増殖性と相関するウサギの皮膚増殖試験を行った結果、細胞培養痘そうワクチン中の LC16m0 型のリバータントウイルス含有率 4%程度までは、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。

F. 研究発表

16) 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., 10:83-87.

17) Tang, Q., Saijo, M., Han, L., Niikura, M., Maeda, A., Ikegami, T., Xinjung, W., Kurane, I., 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. J. Virological Methods, 108:111-116.

18) 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. Epidemiol. Infect., 130:533-539.

19) 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. Clin. Diagnost. Lab. Immunol., 10:489-91.

20) Maeda, A., Lee, B-H., Yoshimatsu, K., Saijo, M., Kurane, Arikawa, J., Morikawa,

- S. (2003): The intracellular association of the nucleocapsid protein (NP) of hantaan Virus (HTNV) with small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) conjugating enzyme 9 (Ubc9). *Virology*, 305:288-297.
- 21) 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
- 22) Suzutani, T., Ishioka, K., De Clercq, E., Ishibashi, K., Kaneko, H., Kira, T., Hashimoto, K., Ogasawara, M., Ohtani, K., Wakamiya, N., Saijo, M. (2003): Differential mutation patterns in thymidine kinase and DNA polymerase genes of herpes simplex virus type 1 clones passaged in the presence of acyclovir or penciclovir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1707-1713.
- 23) 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)
- 24) 西條政幸 (2003) : ダニ媒介性ウイルス性出血熱ークリミア・コンゴ出血熱. *感染症* 33:83-93.
- 25) 西條政幸(2003):クリミア・コンゴ出血熱. *総合臨床* 52:1241-1244.
- 26) 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.
- 27) 西條政幸(2004): サル痘ウイルス感染症. *臨床と微生物* 31:21-24.
- 28) 西條政幸(2004) : ウイルス性出血熱. *化学療法の領域* 20:224-228.
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
- 9) 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, 津田沼市
- 10) 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
- 11) 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

- 12) 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, 京都市.
- 13) 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, 京都市.
- 14) 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, 京都市.

表1. 各ワクチン液のErD₅₀のMean、SD、SE、最小値、最大値

ワクチン液	n	ErD ₅₀				
		Mean	SD	SE	最小値	最大値
参照品	4	5.00	0.58	0.29	4.5	5.5
Chiba3	4	4.4	0.25	0.13	4.0	4.5
4%Rev	4	4.1	0.48	0.24	3.5	4.5
40%Rev	4	1.9	0.48	0.24	1.5	2.5

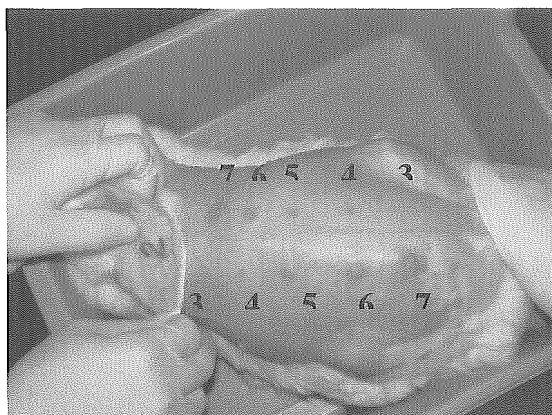
表2. Student's-t検定による各ワクチン液のErD50の比較

第1段: t値	参照品	Chiba3	4%Rev	40%Rev
第2段: 自由度, 確率P				
参照品	*****	1.987	2.333	8.333
		6: 0.09413	6: 0.05837	6: 0.00016
Chiba3		*****	0.926	9.258
			6: 0.39026	6: 0.00009
4%Rev			*****	6.647
				6: 0.00056

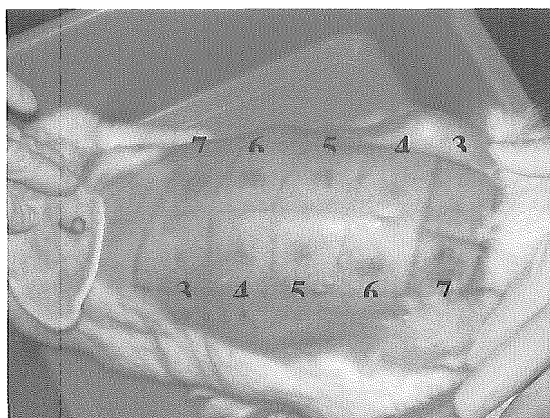
40%Revと参照品、Chiba3、4%Revとは P値が <0.001で有意差あり。

参照品、Chiba3、4%Revの間には、有意差なし。

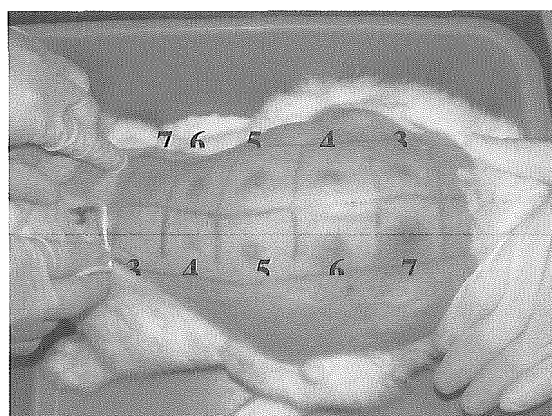
図1. ウサギ皮膚増殖試験



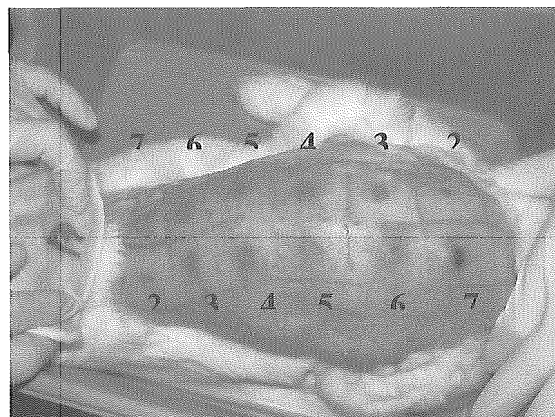
参照品接種



チバ lot3 接種



4% Rev 接種



40% Rev 接種

注：写真内の数字は、皮内接種部位の接種ウイルス力価を示す

分担研究報告書

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

分担研究者 長谷川 秀樹（国立感染症研究所感染病理部第2室長）

協力研究者 西條政幸、森川 茂（同ウイルス第1部）、木所 稔（同ウイルス第3部）、
永田 典代（同感染病理部）、須崎 百合子、網 康至（同実験動物管理室）

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。リバータントウイルスの混入、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ため、どの程度リバータントウイルスが混入するとワクチンの性状、安全性に影響するかは不明である。本研究では、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有率と皮膚病変部位の病理組織学的所見との関係を明らかにした。その結果、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。

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。しかし、培養継代数を重ねると LC16m0 型のリバータントウイルス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

ていなかったため、どの程度リバータントウイルスが混入するとワクチンの性状、安全性に影響するかは不明である。LC16m8 株と LC16m0 株の生物学的性状の大きな差異の一つに、ウサギ皮膚でのウイルス増殖性が異なることが明らかになっている。また、ウサギ皮膚増殖性は、ヒトの種痘部位でのウイルス増殖性と相関することが知られている。本研究では、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