

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することを目的とした。

B. 材料と方法：

1) 使用ウイルスとリバータントウイルスの含有率：

国立感染症研究所参照細胞培養痘そうワクチン（参照品）：0.003%

チバ血清 lot-3 (Chiba3)：0.8%

4%リバータントウイルス液（4%Rev）：4%

40% リバータントウイルス液（40%Rev）：40%

2) ウサギ：

SPF ウサギ 皮膚試験用 16 匹

3) 接種：

それぞれのウイルスの $10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3$ /mL 液を 0.1mL 毎（各希釈 2 箇所/ウサギ）皮内接種した。なお、接種したウイルスの力価は、RK13 細胞での plaque titration により許容誤差範囲内であることを確認している。なお、動物実験については、国立感染症研究所動物実験委員会の承諾を得ている。

4) 病理組織学的解析：

接種後 1 週間目に、安楽死させ皮膚病変部位を採取した。皮膚組織をホルマリン固定後、病理組織学的解析を行った。また、免疫組織

染色を行った。

C. 結果：

Group1: 参照品接種群における接種部位の病理組織所見は $10^4, 10^3$ pfu 接種群では極少量のリンパ球浸潤が見られるのみであり抗原はほとんど検出できない。 10^7 pfu 接種群においては真皮内に軽度のリンパ球浸潤が認められた。抗原は真皮内に軽度検出された (Fig. 1a)。

Group2: 0.8%のリバータントウイルスを含むウイルス接種群においては Group1 とほぼ同様の所見であり最高のウイルス価である 10^7 pfu 接種群においても組織学的に真皮内に軽度のリンパ球を中心とした炎症細胞浸潤がみられる程度 (Fig. 1b) であり抗原も表皮近傍の真皮内で軽度検出されるのみであった。組織学的に Group1 との鑑別は困難であった。

Group3: 4% リバータントウイルスを含むウイルス接種群においては 10^6 pfu 接種部位が Group1 及び2における 10^7 pfu 接種部位と同等の炎症像と抗原が認められた。 10^7 pfu 接種部位においては真皮内全層に及ぶ中程度のリンパ球を中心とする炎症像がみられところによっては肉芽組織を形成し表皮に潰瘍を形成し scab の形成も見られた (Fig. 1c)。

本群においてはウサギの個体差が見られ Group1 と同程度の反応の個体も有った。

Group4: 40% リバータントウイルスを含

むウイルス接種群においては最もウイルス価の低い 10^3 pfu 接種部位においても真皮全層に及ぶ中等度以上の炎症細胞浸潤がみられ真皮内結合織において組織の壊死が認められる (Fig. 1f)。それに伴いウイルス抗原も同定された。 10^5 pfu 以上の感染部位においては真皮全層に及ぶ著しい炎症細胞浸潤と組織の壊死が広範に認められそれに伴いウイルス抗原も同定された (Fig. 2)。表皮は剥離状となり好中球中心の炎症細胞を含む scab が形成されていた。

D. 考察 :

参照品と 40%リバータントウイルスを含むウイルス接種群では明らかにウイルスの増殖能に差があり、局所病原性の差があった。

0.8% リバータントウイルスを含む群では参照品接種群との差は認められなかったがリバータントウイルスの割合が 4%になると病原性にはウイルス価に換算して 10 倍の差が認められ、参照品接種群との鑑別が可能なウサギ個体があったが、参照品接種群との差がほとんど認められない個体も存在した為、反応の個体差を考慮すると鑑別は困難である。40%リバータントウイルスを含むウイルス接種群では、病変に明らかな差が認められウサギ皮膚増殖試験での鑑別が可能であった。今般アトピーを基礎疾患としてもつ population が増加していることを考慮すると、リバータントウイルス含有率が高いほど、副反応が生じる可能性が高いと考えられる。このため、リバータントウイルス含有率の低いワクチン

製造法の開発が急務と考えられる。

E. 結論 :

種々の割合で LC16m0 型のリバータントウイルスを含む 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Dewan MZ, Terashima K, Taruishi M, Hasegawa H, Ito M, Tanaka Y, Mori N, Sata T, Koyanagi Y, Maeda M, Kubuki Y, Okayama A, Fujii M, Yamamoto N.
Rapid tumor formation of human T-cell leukemia virus type 1-infected cell lines in novel NOD-SCID/gammac(null) mice: suppression by an inhibitor against NF-kappaB.
J Virol. 2003 May;77(9):5286-94.
- 2) Ito R, Ozaki YA, Yoshikawa T, Hasegawa H, Sato Y, Suzuki Y, Inoue R, Morishima T, Kondo N, Sata T, Kurata T, Tamura S.
Roles of anti-hemagglutinin IgA and IgG antibodies in different sites of

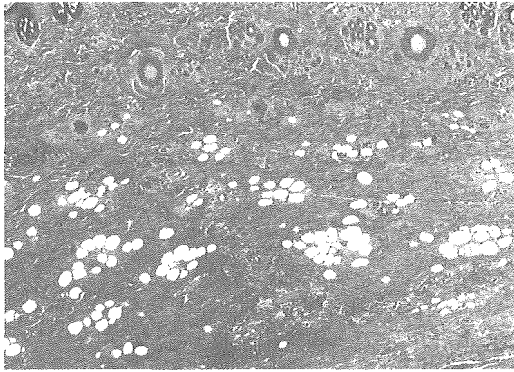
- the respiratory tract of vaccinated mice in preventing lethal influenza pneumonia.
- Vaccine.** 2003 Jun 2;21(19-20):2362-71
- 3) Shoya Y, Tokunaga K, Sawa H, Maeda M, Ueno T, Yoshikawa T, Hasegawa H, Sata T, Kurata T, Hall WW, Cullen BR, Takahashi H. Human topoisomerase I promotes HIV-1 proviral DNA synthesis: implications for the species specificity and cellular tropism of HIV-1 infection.
- Proc Natl Acad Sci U S A.** 2003 Jul 8;100(14):8442-7. Epub 2003 Jun 26.
- 4) Inoue S, Sato Y, Hasegawa H, Noguchi A, Yamada A, Kurata T, Iwasaki T. Cross-reactive antigenicity of nucleoproteins of lyssaviruses recognized by a monospecific antirabies virus nucleoprotein antiserum on paraffin sections of formalin-fixed tissues.
- Pathol Int.** 2003 Aug;53(8):525-33.
- 5) Watanabe I, Ross TM, Tamura S, Ichinohe T, Ito S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H* Protection against influenza virus infection by intranasal administration of C3d-fused hemagglutinin. **Vaccine** 2003 Nov 7;21(31):4532-8.
- 6) Takahashi H, Sawa H, Hasegawa H, Nagashima K, Sata T, Kurata T. Topoisomerase I dissociates human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase from genomic RNAs.
- Biochem Biophys Res Commun.** 2004 Jan 23;313(4):1073-8.
- 7) Ueno T, Tokunaga K, Sawa H, Maeda M, Chiba J, Kojima A, Hasegawa H, Shoya Y, Sata T, Kurata T, Takahashi H. Nucleolin and the Packaging Signal, Y, Promote the Budding of Human Immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1).
- Microbiol Immunol.** 2004;48(2):111-8.
2. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
特許取得：なし
3. 学会発表
- 1) 長谷川秀樹、丹野正隆、早川欽哉、佐藤由子、片野晴隆、倉田毅、佐多徹太郎
Human Herpesvirus 8-associated Solid Lymphoma arising from Liver and Spleen 第92回日本病理学会 2003年4月23-25日 福岡
- 2) 一戸猛志、渡邊泉、伊藤智史、田村慎一、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹
C3d 融合 sHA 経鼻ワクチンによるインフルエンザウイルス感染防御 第7回日本ワクチン学会 2002年10月18-19日 名古屋
- 3) 一戸猛志、渡邊泉、伊藤智史、千葉丈、森山雅美、田村慎一、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 新しい粘膜ワクチンアジュバン

トを用いた経鼻インフルエンザワクチンの開発
第 51 回 日本ウイルス学会 2003 年 10
月 27-29 日京都

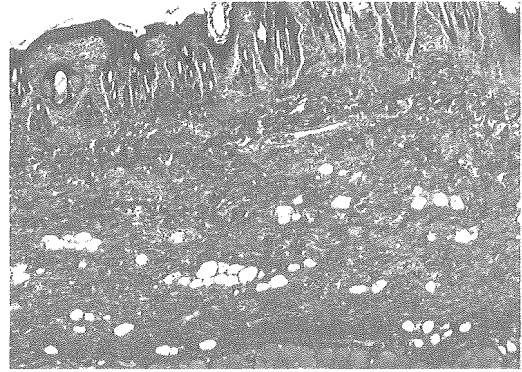
4) 長谷川秀樹、渡邊泉、森山雅美、一戸猛志、伊藤智史、田村慎一、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎 イソロイシン経鼻接種によるインフルエンザウイルスの感染予防の検討 第 51 回 日本ウイルス学会 2003 年 10 月 27-29 日京都

5) 伊藤智史、一戸猛志、渡邊泉、田村慎一、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 自然免疫刺激によるインフルエンザウイルスの感染防御 第 51 回 日本ウイルス学会 2003 年 10 月 27-29 日京都

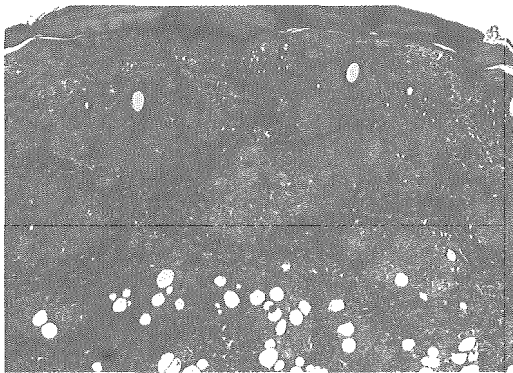
Fig. 1. ウサギ皮膚増殖試験における皮膚病変の病理 (HE 染色像)



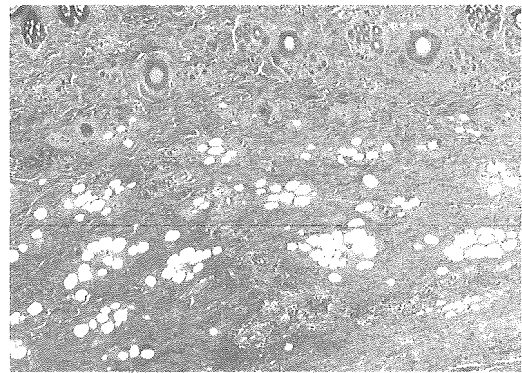
a) 参照品 10^7 pfu



b) 0.8% revertant 10^7 pfu



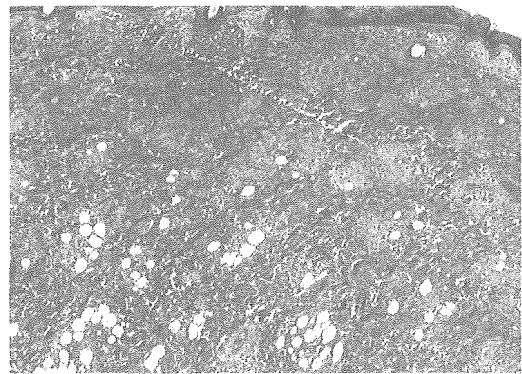
c) 4% revertant 10^7 pfu



d) 4% revertant 10^6 pfu

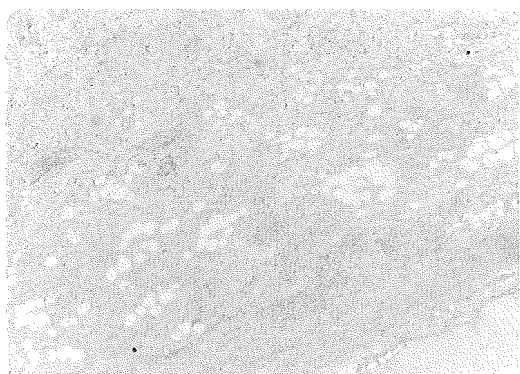


e) 40% revertant 10^7 pfu

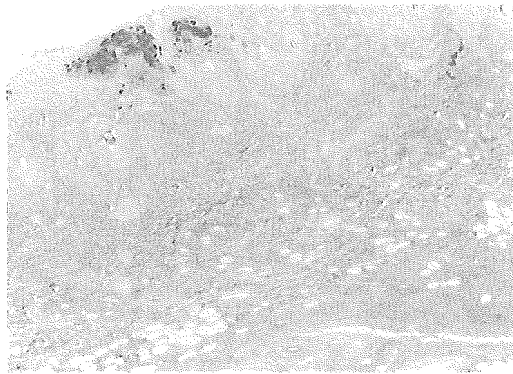


f) 40% revertant 10^3 pfu

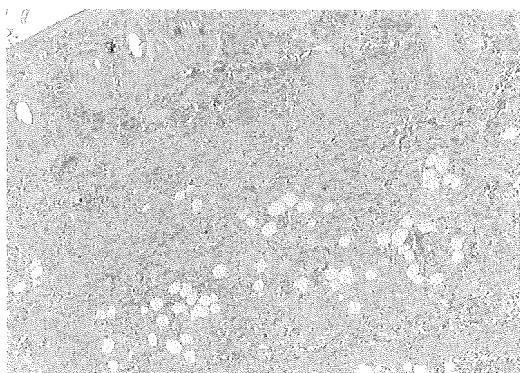
Fig. 2. ウサギ皮膚増殖試験における皮膚病変の免疫組織染色像



Group 1



Group 2



Group 3



Group 4

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

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

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）

協力研究者： 永田 典代（国立感染症研究所感染病理部）

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（以下 m8）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。RV の混入は、ワクチンの安全性に懸念を生じかねないと考えられたため、RV 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によって調べた。その結果、RV の生物学的性状は m8 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。今回の結果から、SCID マウスの系は RV の病原性に鋭敏であることから、RV の混入によるワクチンへの影響を評価する上で有用なツールとなりうることが示唆された。

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た。そこで我々は RV

の生物学的性状を調べ、RV の病原性を評価すると共に、RV 混入がもたらすワクチンの安全性への影響を調べるための評価系の確立を目指した。我々は RV 出現に関わる遺伝子が、ワクシニアウイルス（以下 VV）のプラークサイズや宿主域に関わる遺伝子 B5R であることを明らかにした。つまり、m8 株では B5R 遺伝子が orf 内での 1 塩基欠失によるフレームシフトで orf の大部分が失われることにより失活しているが、RV では新たに別の箇所塩基の挿入が起こることによって orf が復元されている。そこ

で、本研究においては、m8 株および m0 株から B5R 遺伝子の全域をノックアウトした組換えウイルス（それぞれ、m8 Δ 、m0 Δ ）、あるいは m8 株に m0 株由来 B5R 遺伝子を導入した組換えウイルス、m8B5R を対照用ウイルスとして用いた。

B. 研究方法

1) ウイルス:RV を約 0.1% 含有する m8 株（以下 m8 株）、LC16m0 株（m0 株）、再クローニングした m8 株（m8rc 株）、m8B5R（m0 株の B5R 遺伝子をもつ組換えウイルス）と m8 Δ 株および m0 Δ 株（それぞれ m8B5R と m0 株に B5R 遺伝子を欠失した組換えウイルス；研究方法 3）参照）を用いた。実験に供された全てのワクシニアウイルスは RK13 細胞で培養し、35(w/v)% ショ糖のクッション上で濃縮精製した後、RK13 細胞でウイルス力価を測定して、実験に用いた。

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。

2) RV のクローニング：m8 株のウイルス浮遊液に混入していたラージプラークを形成するクローンを 3 株プラーク純化し、それぞれ RV#1、RV#2、RV#3 と命名した。それぞれの B5R 遺伝子をシーケンスすることによってこれらのウイルスが RV であることを確認した。3 株の B5R 遺伝子上の変異箇所は相互に異なっていた（図 1）。

3) 組換えウイルスの作製：まず、m0 株の B5R 遺伝子をクローニングし、塩基配列を確認した（wtB5R、図 2）。B5R(wt) を m8 株に相同組換えによって導入し、完全な B5R 遺伝子を持つ組換えウイルス（RVV）を作製した（m8B5R）。この RVV のスクリーニングはラージプラークを選択し、さらに B5R 遺伝子の配列を確認した。次に、プロモーター領域を含む B5R 遺伝子全体を完全に欠失させたコンストラクトを作製し（ Δ B5R、図-2）、相同組換えによって、m8B5R と m0 株に B5R 遺伝子の欠失を導入した RVV（それぞれ m8 Δ 、m0 Δ ）を作出した。RVV のスクリーニングは小さなプラークを選択し、さらにゲノム上の欠失領域の塩基配列を確認した。

4) プラークサイズ試験：6 穴マルチプレート上に培養した RK13 細胞に、適当な希釈倍率で調製されたウイルス液（RV 3 株；RV#1、RV#2、RV#3 と m8 株、および m0 株）を接種し、吸着させた後、0.8%メチルセルロースを含む MEM 培地を重層し、34℃、2 日間培養した。細胞を固定後、クリスタルバイオレットで染色し、プラークサイズを計測し、平均値を求めた。

5) 温度感受性（ts）試験：生物学的製剤基準の乾燥細胞培養痘そうワクチン、増殖温度感受性試験の方法に従って試験した。対照として Lister(L0) 株と m8 株を用いた。

6) SCID マウス感染実験：1 群 4 匹の 6 週令 BALB/c SCID マウス（雌）に、プラーク純化した RV、2 株（RV#1 および RV#2）と m0 株および m8B5R を 10^4 から 10^6 PFU/dose、

m8 株、m8 Δ 株、m0 Δ 株、および m8 株から再クローニングした m8rc 株をそれぞれ 10^7 から 10^9 PFU/dose で腹腔内接種した。接種後 4 週まで体重減少と発痘の有無および生残数を観察した。病原性の指標として、LD50 以外に半数の個体に発痘を起こしうるウイルス量として、Rash Expression Dose 50 (RED50) という値を設定し、その経時変化を記録した。対照群として、PBS を接種して同様の観察を行った。また、m8 Δ 、m0 Δ 、m8rc の 10^9 PFU 接種群で発症した個体の内臓と中枢神経系について病理学的観察を行った。なお、動物実験については、国立感染症研究所動物実験委員会の承諾を得ている。

C. 研究結果

1. プラークサイズ試験 (図-3)

プラーク純化した RV 3 株 (RV#1、RV#2、RV#3) について RK13 細胞を用いたプラーク試験でのプラークサイズを測定した。対照として m8 株と m0 株を用いた。m8 株では 1mm を越えない (0.8mm) 微小なプラークを形成したのに対し、3 つの RV はいずれも、m0 株と同じような 2mm を越える巨大なプラークを形成した。

2. ts 試験 (表-1)

RV の 3 株について 35°C と 40.8°C における増殖能を PRK 細胞で測定し、35°C と 40.8°C との比を求めた。その結果、いずれの RV クローンも 40.8°C での増殖は認めず、m8 株と同様 35°C/40.8°C の力価の \log_{10} 値

の比は 6 を越えており、温度感受性を保持していることが確認された。

3. SCID マウス感染実験 (図-4, 5, 6, 7)

m8 株では 10^7 PFU を SCID マウスに腹腔内接種しても全く発症しないのに対し、m0 株では 10^4 PFU 接種するだけで発症して全頭が死亡する。そこで RV の病原性がどの程度復帰しているかを調べるため、SCID マウスに対する病原性を調べた。

3.1. RED50 (図-4)

SCID マウスに発痘を起こす時期は 2 つの RV とも m0 株や m8B5R 株と同様に接種後 10 日前後で、B5R 遺伝子の機能を欠くウイルス (m8、m8rc、m8 Δ 、m0 Δ 株) 接種群よりも約 1 週早かった。接種後 4 週での RED50 値は、RV#1、RV#2、m8B5R、m0 株でそれぞれ、4.5、5.0、4.5、3.5 \log_{10} PFU で B5R 欠失ウイルスの場合 (m8; 7.5 \log_{10} PFU、m8rc; 7.5 \log_{10} PFU、m8 Δ ; 7.75 \log_{10} PFU、m0 Δ ; 8.25 \log_{10} PFU) に比べて約 3 \log_{10} PFU 低かった。

3.2 LD50 (図-5)

LD50 値も RED50 の結果と良く相関し、B5R 遺伝子活性を持つウイルス接種群では 5.5 から 6.25 \log_{10} PFU (RV#1; 6.25 \log_{10} PFU、RV#2; 5.5 \log_{10} PFU、m8B5R; 6.0 \log_{10} PFU、m0; 5.75 \log_{10} PFU) であったのに対し、B5R 欠失ウイルス接種群では、RV を 0.1% 含有する m8 株接種群 (LD50 = 9.2 \log_{10} PFU) 以外では全くマウスを殺さなかった (LD50 > 9.5 \log_{10} PFU)。

3.3 SCID マウスにおける感染病理像 (図-6, 7)

3.3.1 腹腔内の炎症所見 (図-6)

m0Δ接種個体では脾 (図-6A)、肝 (図-6C, D) の漿膜の肥厚が認められたが、実質臓器の壊死は伴っていなかった。

m8Δ接種個体では腹腔内臓器に重度の癒着が認められた。組織学的には、肝実質の巣状壊死 (図-6E, F) と各臓器の漿膜同士の癒着がみられた。

3.3.2 発痘部位の病理所見 (図-7)。

m8rcを接種した個体は腹腔内臓器に著変は見られなかったのに対し、今回観察した個体の中では最も発痘が顕著であった。図-7A, Bは鼻腔先端分の皮膚に認められた発痘部位で、毛根を巻き込んだ上皮の増生と壊死および好中球を伴った炎症反応が認められた。

C, D, E, Fは後肢先端の皮膚に認められた発痘で、表皮から突出した発痘は好中球を伴った壊死物質で、細菌叢も認められた (E)。

発痘組織は扁平上皮層と連続しており、中心部には真皮層まで巻き込んだ壊死がみられた (D)。残存する扁平上皮細胞は変性、膨化が認められたが、明らかなウイルス性封入体はみられなかった (F)。また、いずれの個体においても中枢神経系において著変は認められなかった。炎症性反応は好中球が主体であった。

D. 考察

細胞レベルの実験と SCID マウス感染実験の結果から RV は m8 株の親株である m0

株にきわめて近い表現型 (病原性) を持つことが明らかになった。この結果は、別に行ったウサギの皮膚増殖性試験 (西條、長谷川分担研究の項参照) でも裏付けられており、病原性復帰に B5R 遺伝子が直接関与することも、1) RV の B5R 遺伝子の orf が必ず復元されている、2) m8B5R が RV と同じ性質を示し、m8B5R から再び B5R 遺伝子をノックアウトした m8Δでは、病原性が m8rc 株と同程度まで減弱する、という結果から直接証明された。SCID マウスの感染発症モデルでは RV と m8rc 株との間に 10^3 の感受性の差があり、B5R 遺伝子活性陽性の株間、あるいは陰性の株間での差が小さいことから、痘そうワクチンの安全性を評価する系として有望である可能性がある。今回実験に供した RV を 0.1%含有する m8 株では、m8rc、m8Δ、および m0Δ株との間で、LD50 の結果で若干の差が認められたものの、RED50 では差が認められなかった。これは試験法の感受性の差 (10^3) を考慮すれば、検出限界に近い RV 含有率であるためと考えられる。今後は、RV 含量を連続的に増減させて、ウサギの皮膚反応との対応付けをして、結果を評価する必要がある。

E. 結論

3. RV の生物学的性状は m0 株に類似しており、SCID マウスに対する病原性は m0 株と同程度に昂進している。

4. SCID マウスの感染実験系は RV と m8 株の病原性の違いを 10^3 のレベルで測定可能であり、ばらつきも小さいこと

からワクチンの品質管理に有効である。

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. クローニングしたリバータントウイルスの B5R 遺伝子の配列

		欠失部位 ↓	
m0	840	AAGAAAATGTCACAGTTTCTGATTATGCTCTCTGAAATATGATAAGCC-A-TT-ATACG	897
RV#1	840C.....	897
RV#2	840A.....	897
RV#3	840T.....	897
m8	840	896
m0	898	AAGTGAATTCACCATGACACTAAGTTGCAACGGCGAAACAAAAATATTTTCGTTGCGAAGA	957
RV#1	898	957
RV#2	898	957
RV#3	898	957
m8	897	956

図2. LC16m8 株の B5R 遺伝子を完全欠失した組み換えワクチニアウイルスの作製

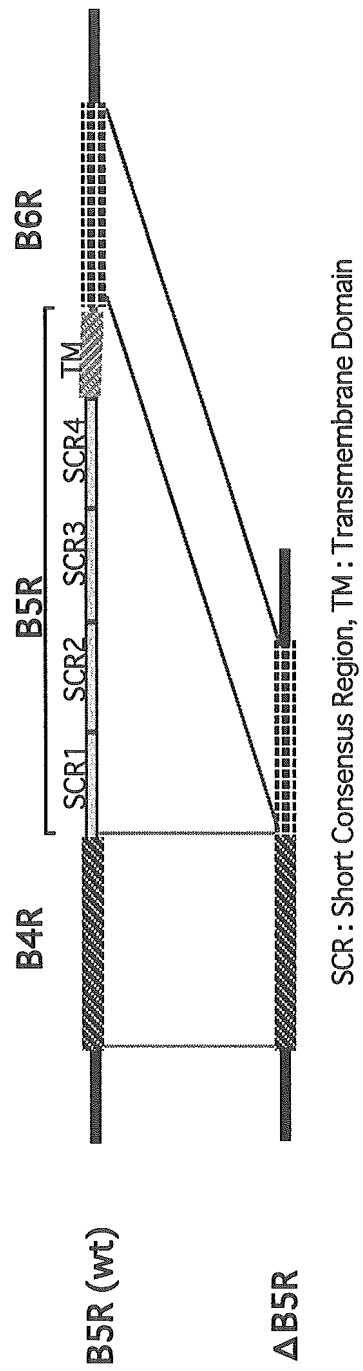


図3. LC16m8, LC16m0, リバータントウイルスの RK13 細胞でのプラークサイズ

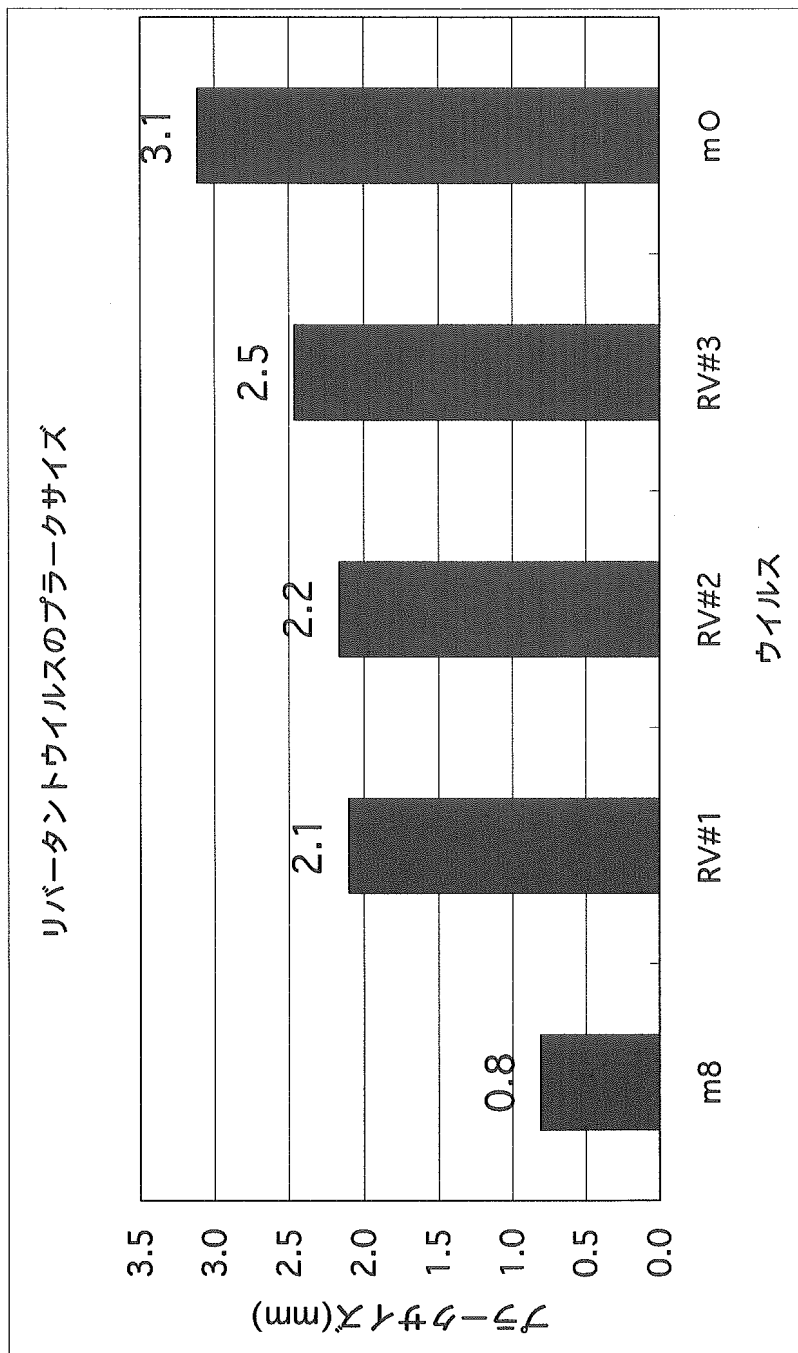


表1. LC16m8, LC16m0, リバートアントウイルスの増殖温度感受性試験成績

Virus	温度			増殖比率
	40.8 °C	35.0°C	35°C/40.8°C	
m8	< 3.00	9.09	> 6.09	
RV#1	< 2.00	8.94	> 6.94	
RV #2	< 2.00	8.43	> 6.43	
RV #3	< 2.00	8.61	> 6.61	
L0	6.81	8.15	1.34	

図4. SCID マウスでの Rash Expression Dose 50 (RED50) の比較

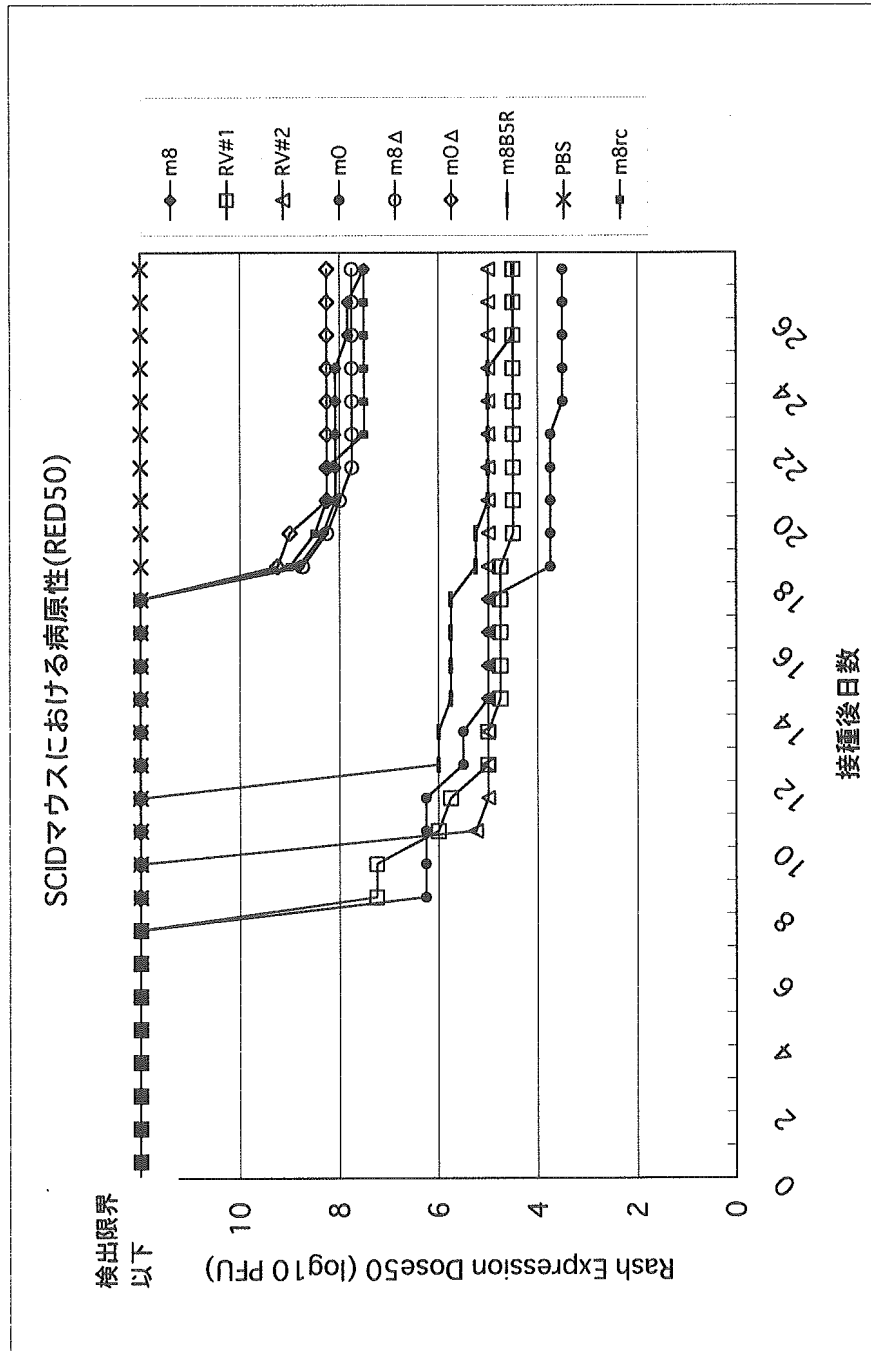


図5. SCID マウスでの LD50 の比較

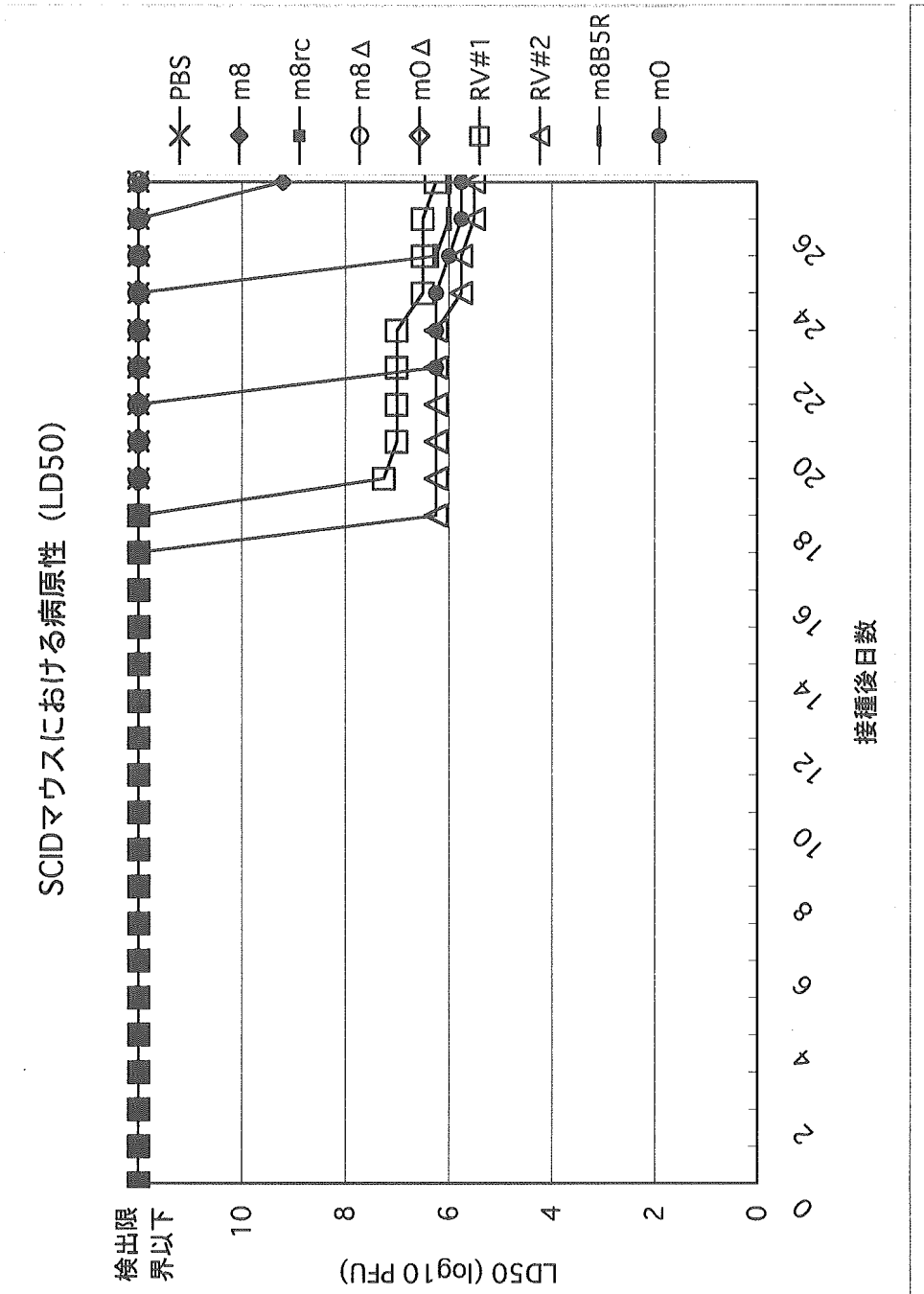


図6. SCID マウスにおける感染病理像 (腹腔内の炎症所見)

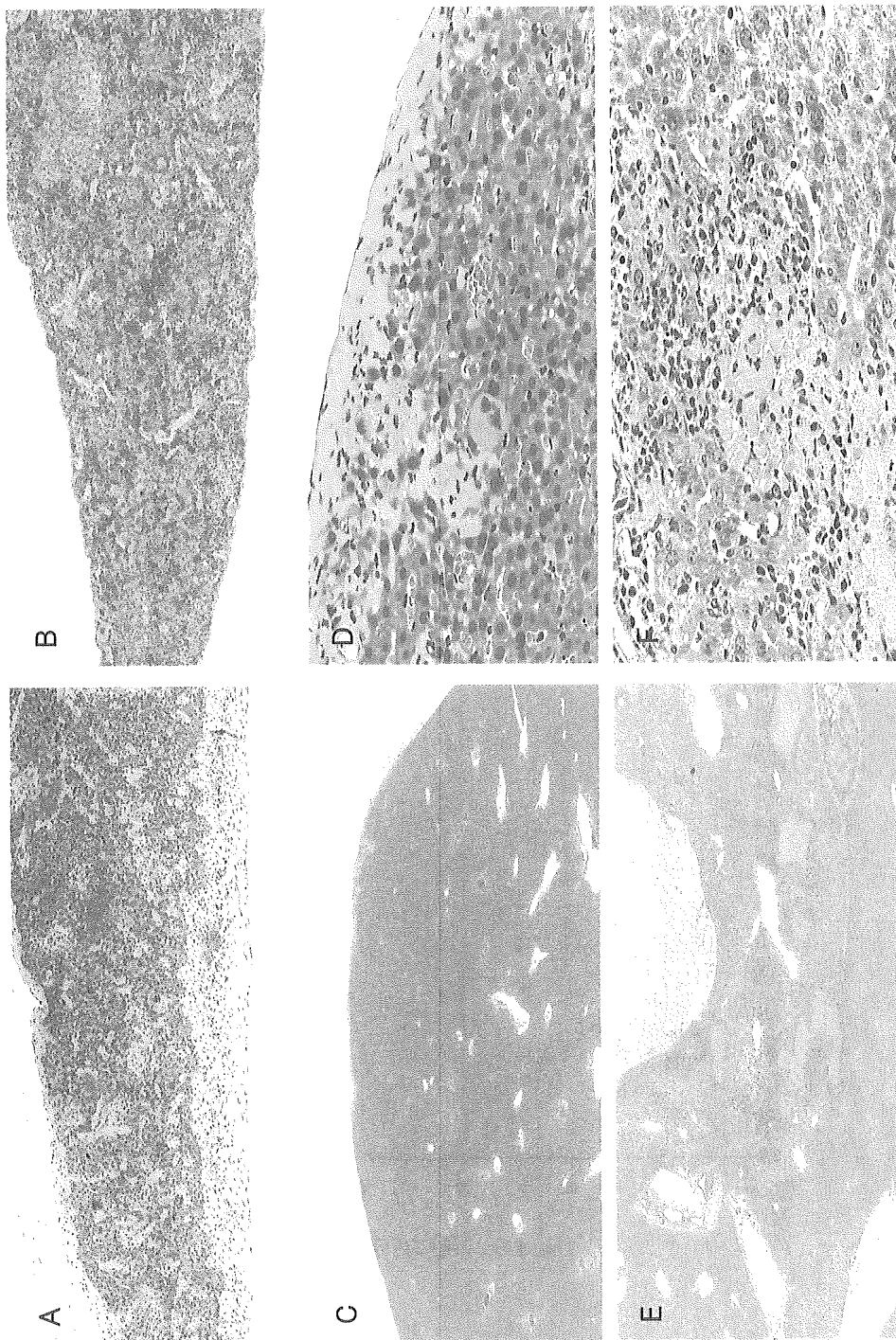


図7. SCID マウスにおける感染病理像 (皮膚の発痘部位)

