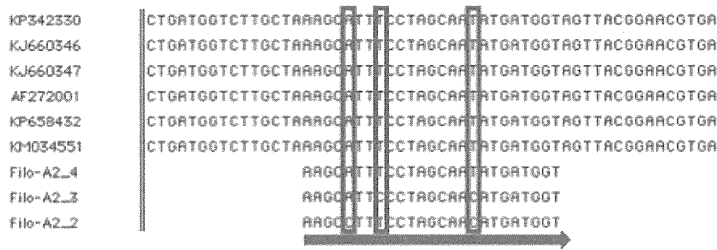


Filo-A2_4, Filo-A2_3, Filo-A2-2



Filo-B, FiloB-BI

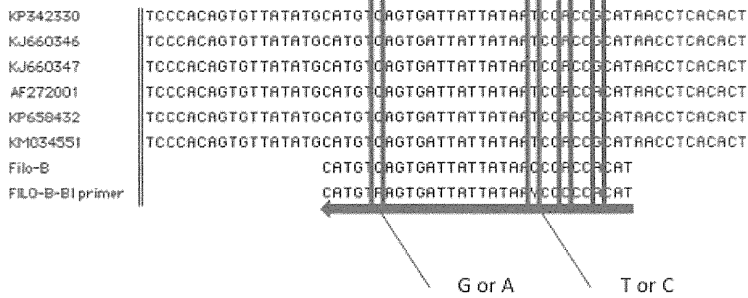
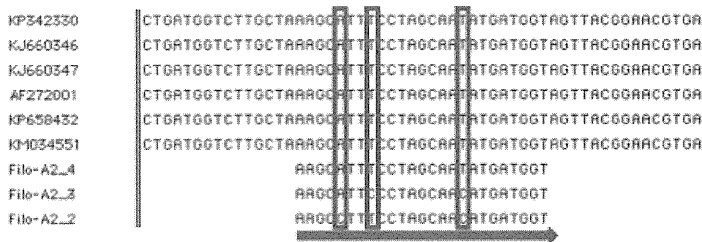


図5. L 遺伝子を標的にしたリアルタイム PCR 用プライマーにおける Forward プライマー Filo-A2-4 と Reverse プライマー Fili-B の西アフリカ型エボラウイルスの遺伝子標的部位との相同性. Forward プライマー Filo-A2-4 は「西アフリカ型」に完全に一致し, Reverse プライマー Fili-B は 5' 側に 2 塩基のミスマッチが認められる.

Filo-A2_4, Filo-A2_3, Filo-A2-2



Filo-B, FiloB-BI

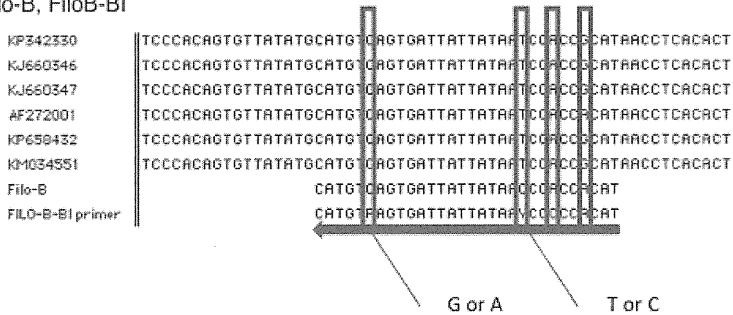
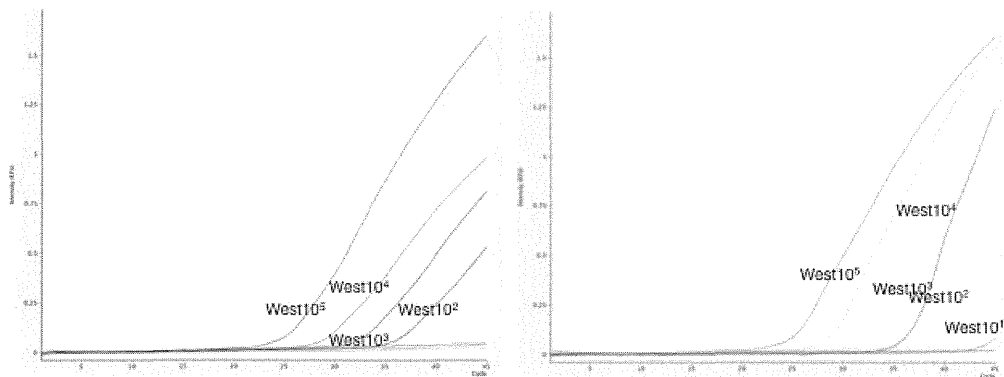


図6. L 遺伝子を標的にしたリアルタイム PCR 用プライマーにおけるプローブ FAM-EBOSud の標的遺伝配列との相同性. 「西アフリカ型」を検出可能であると考えられる.



鑄型DNA: 西アフリカ型エボラウイルス L遺伝子		
	従来のプローブ	西アフリカ型プローブ
10 ⁵	25.61722027	24.94538461
10 ⁴	30.39735545	28.35831422
10 ³	33.88288273	31.47739283
10 ²	37.8660777	35.65336026
10 ¹	ND	ND
10 ⁰	ND	ND

図7. 定量的リアルタイム RT-PCR において、西アフリカ型プローブを用いた場合と従来のプローブを用いたリアルタイム PCR における検出限界の比較。従来のプローブを用いても感度の低下することなく「西アフリカ型」を検出できると考えられた。

分担研究報告書

「ウイルス性出血熱の検査に関する研究」

細胞培養弱毒生痘そうワクチンを土台とした組換えワクシニアウイルス作製システムの改良

研究分担者 西條政幸 国立感染症研究所ウイルス第一部長

研究協力者 富士秀悦, 谷口怜, 谷英樹, 吉河智城, 下島昌幸 国立感染症研究所第一部

研究協力者 森川茂 国立感染症研究所獣医学部

研究要旨：細胞培養痘そうワクチンの製造承認株である LC16m8 株は、Lister 株から低温馴化により LC16 株、LC16m0 株を経由して樹立された安全性の非常に高いワクチン株である。近年ではこの長所を生かして、他の感染症へのワクチンとしての応用もされはじめている。既に我々は相同組換えを利用する、LC16 系統のワクシニアウイルスを土台とした組換えワクシニアウイルス作製システムを構築している。当システムは、簡便かつ高効率に recVac を作製可能であり、且つ最終的に完成したウイルスゲノム内からはその後の研究に不必要な recVac 選択カセット（薬剤耐性遺伝子と蛍光タンパク質を含む遺伝子カセット）を取り除くことが可能である。一方で、現時点までの方法ではこの recVac 選択カセットはこれを保持するウイルスを選択薬剤存在下で選択する際の、正の選択のみに使用している。このカセットをウイルスゲノムから取り除く際には選択薬剤非存在下で、相同組換えにより偶然脱落するのを期待するしか無く、そこが律速にもなり得た。そこで本研究は選択薬剤として 2-チオキサンチンを用いて、recVac 選択カセットが脱落することを人為的に促進する「負の選択システム」を組み込んだ改良版 recVac 作製システムを確立した。

A. 研究目的

細胞培養痘そうワクチンの製造承認株である LC16m8 株は、Lister 株から低温馴化により LC16 株、LC16m0 株を経由して樹立された株である。サルを用いて行われた神経病原性試験により非常に神経毒性が低いことがわかっている。また、1970 年代には約 10 万人の子供に接種され、その際に重篤な副反応は確認されなかったことより安全性の非常に高いワクチン株といえる。さらに、自衛隊での成人への種痘にも用いられ安全性がさらに確認されている。この安全性と種痘における強く長期に亘る免疫誘導から、組換えワクシニアウイルスとして他の感染症ワクチンとしての応用も期待されている。既に我々は相同組換えを利用した組換えワクシニアウイルス（recVac）作製システムを構築している（図 1）。当システムは、簡便かつ高効率に recVac を作製可能であり、且つ最終的に完成したウイルスのゲノム内からはその後の研究に不必要な recVac 選択カセット（薬剤耐性遺伝子と蛍光タンパク質 mCherry 遺伝子を含む遺伝子カセット）を取り除くことが可能である。しかし現時点までの方法では、この recVac 選択カセットは

それを保持するウイルスを選択薬剤存在下で選択する際の、いわゆる正の選択にのみ使用している。一方で、このカセットを取り除く際には選択薬剤非存在下で相同組換えによって偶然 recVac 選択カセットが脱落するのを期待するしか無かった。カセットが脱落する確立はあまり高いものではなく、これがスクリーニングの手間を増やすため、recVac 作製の律速となってしまうていた。そこで本研究では、薬剤を用いて選択圧をかけることで、recVac 選択カセットが脱落することを人為的に促進する負の選択システムを組み込んだ改良版 recVac 作製システムの開発を行った。

B. 研究方法

recVac 選択カセット内の薬剤選択遺伝子には、これまで同様キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (*gpt*, または XGPRT と省略される) を用いている。本薬剤選択用遺伝子は、ミコフェノール酸 (MPA) を用いた recVac の正の選択時に用いている。MPA 存在下で阻害される細胞のプリン合成系（図 2）を中間型 recVac 感染細胞内で発現した XGPRT と、同時に添加するキサンチンによりレスキューする方法である。

今回は、キサンチンのアナログである 2-チオキサンチン (2-TX) を用いた負の選択法の適応を検討した。2-TX は XGPRT によってプリン合成系に取り込まれると、生体にとって機能的なプリンになりえないため毒性を発揮する。従って、XGPRT を持つ recVac の増殖が抑制され、更なる相同組換えによって生じた recVac 選択カセット部分が除かれた完成型の recVac が増殖する負の選択が可能になると考えたためである。そこで、2-TX の至適濃度などを検討し、負の選択法の実用性を検討した。

【倫理面への配慮】

ヒト検体、動物は使用していないため該当しない。遺伝子組換えに当っては、文部科学省の承認を得た上で行った。

C. 研究結果, 及び D. 考察

まず 2-TX の至適濃度を検討した。8mg/ml から 2 倍の段階希釈系列を作製し、そこで本組換え法で EGFP を導入した recVac (recVac-EGFP) を感染させた。recVac-EGFP は以前に作製した薬剤選択カセットが除去された完成型と、カセットを含む中間型を用いた。結果より、4mg/ml の 2-TX を培地中に添加することで、中間型ウイルスの増殖は阻害するが、完成型ウイルスの増殖は阻害しないことが明らかとなった (図 3)。この時、4mg/ml の 2-TX を培地中に添加したウェル内に出現したプラークを詳細に観察すると、中間型ウイルス感染細胞が発現する mCherry 遺伝子の赤色の蛍光を示すプラークの端から、完成型ウイルスが完成した細胞であることを示す赤色蛍光の発現していない EGFP の発現のみが確認されるプラークが出現していた (図 4)。これは、2-TX の選択圧によって、完成型ウイルスが選択されてきていることを示唆していると考えた。

そこで、薬剤選択カセットを含む中間型ウイルスを 2-TX 存在下で細胞に感染させた時に、完成型ウイルスが選択されてくるかを実際に検討した。前の検討実験より得られた結果をもとに、4mg/ml の 2-TX を培地中に添加し、そこに中間型ウイルスを感染させて 5 日間培養を行った。対照として MPA を添加したウェル、または薬剤を添加していないウェルも用意した (図 5)。感染細胞で発現している蛍光遺伝子を LED トランスイルミネーター上で確認すると、MPA 添加、または薬剤未添加のウェルでは、中間型ウイルスが発現している mCherry の赤色蛍光と EGFP の緑色蛍光が混ざったオレンジ色のプラークが多数を占めていたのに対して、2-TX を添加したウェルでは EGFP の蛍光が多数を占めていた (図 5A)。より定量的に観察するために、ウェルに含まれる、それぞれのウイルス量をプラーク

アッセイにより測定し、その割合を確認した。すると、やはり 2-TX 添加ウェル内では EGFP のみを発現している完成型ウイルスの割合が約 80% を占めていた (図 5B)。以上により、これまでに確立した、recVac 作製システムに負の選択システムを導入した改良型のシステムの確立が出来た。recVac 作製時間の律速の 1 つであった recVac 選択カセットが脱落を、2-TX によって人為的に促進することが可能となった。これにより recVac 作製のスピードアップにつながると考えている。

E. 結論

本研究により、薬剤を用いて選択圧をかけることで、recVac 選択カセットが脱落することを人為的に促進する「負の選択システム」を組み込んだ改良版 recVac 作製システムを確立した。

本法を用いて実際に組換えウイルスを作製している。現時点で、タンパク質発現の確認できた組換えウイルスワクチニアウイルスは・B5R (B5R 領域完全欠損ウイルス)、EGFP そしてワクチン開発のために行っている、LCMV (リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス) の NP, Z, GPC, 更に SFTSV (重症熱性血小板減少症候群) の NP, GPC 発現ウイルスである。引き続き組換えワクチニアウイルスの作製を行い、研究を進展させたい。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表

1) 吉河智城, 福士秀悦, 谷英樹, 福間藍子, 谷口怜, 須田遊人, Harpal Singh, 江川和孝, 下島昌幸, 森川茂, 西條政幸. ワクチニアウイルス LC16m8 株を土台とした組換えワクチニアウイルス作出システムの確立. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜 (2014.11)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

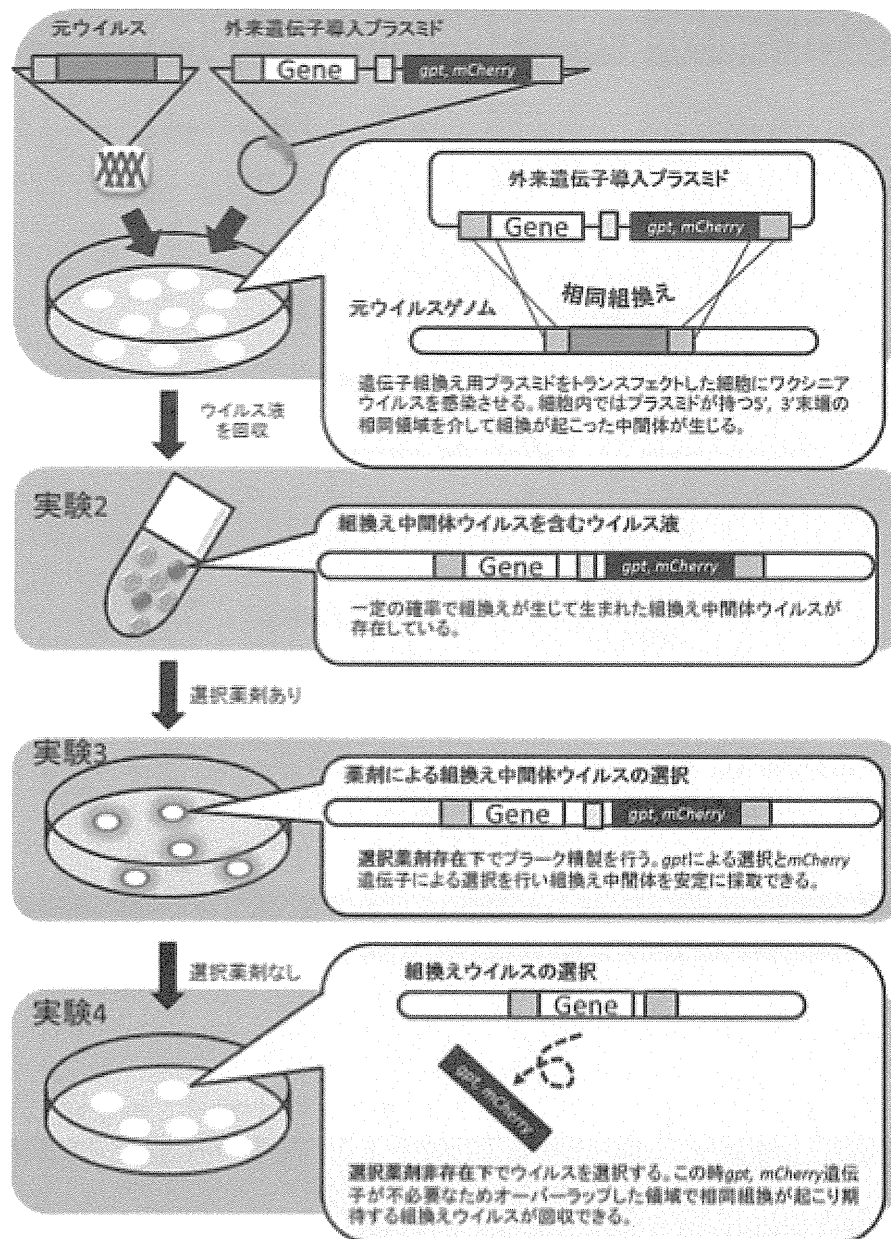


図 1. 組換えワクチニアウイルス作製の概略。

or Negative Selection by XGPRT

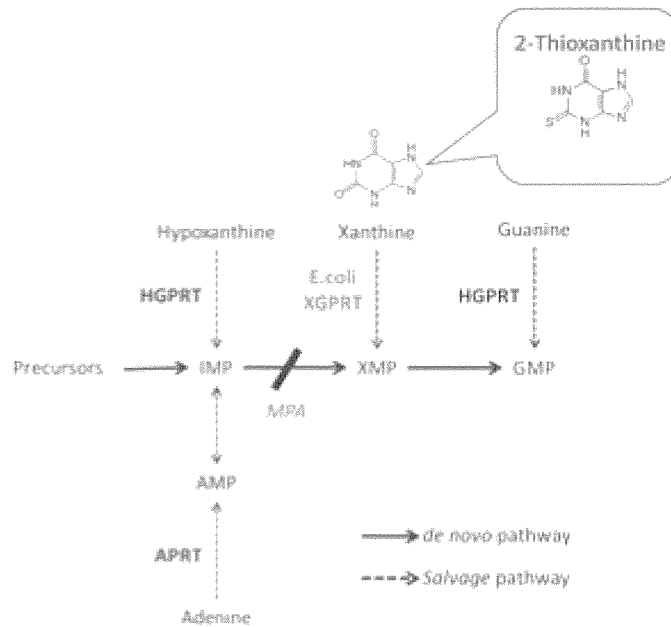


図 2. ミコフェノール酸 (MPA), キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (XGPRT) 及び 2-チオキサンチンの生体内プリン合成系への関与.

Determination The Dosage of 2-Thioxanthine

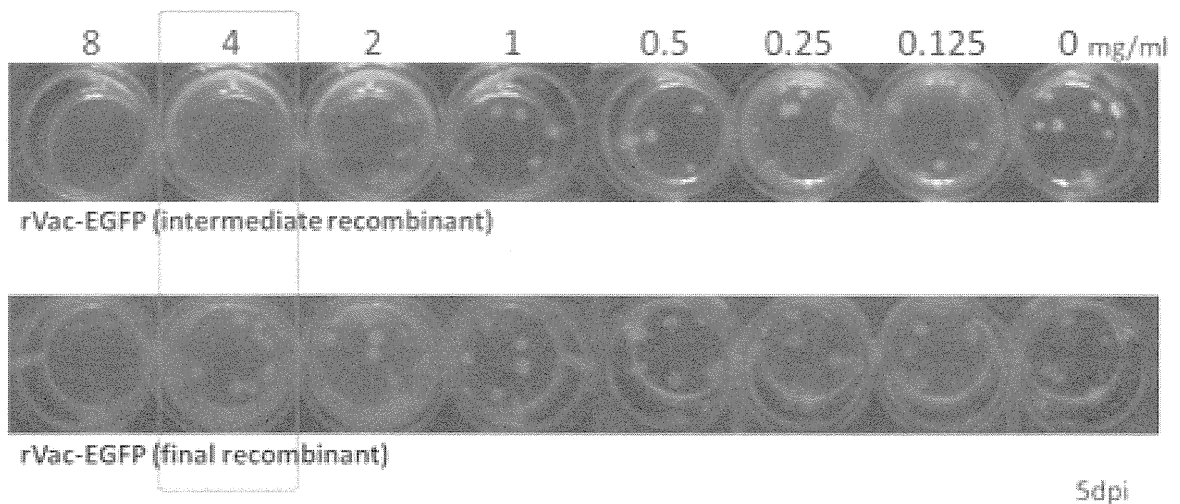


図 3. 2-チオキサンチンの至適濃度の検討.

Effect of 2-Thioxanthine

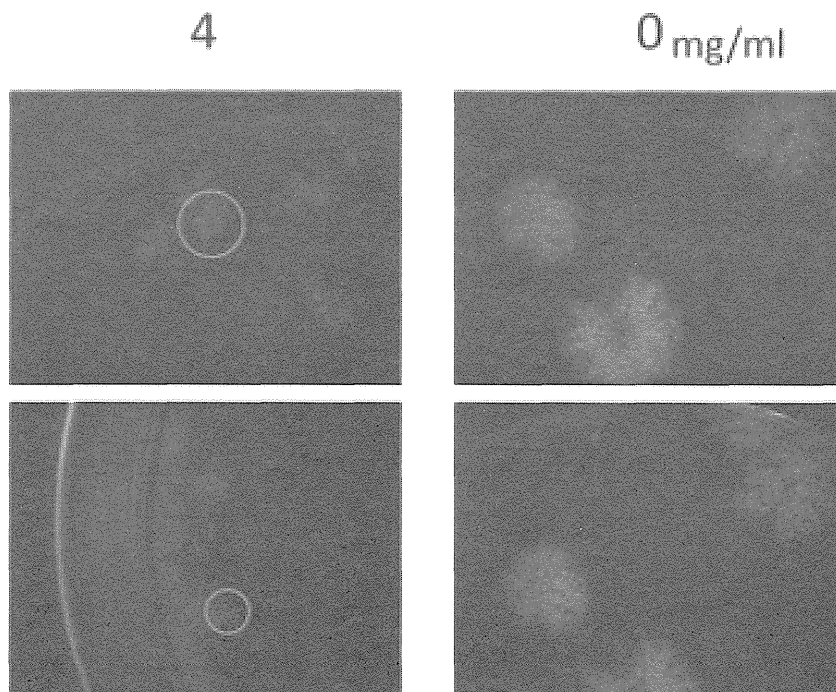


図 4. 完成型ウイルスが完成した細胞であることを示す，EGFP の発現のみが確認されるプラークの出現。

Performance of The Negative Selection

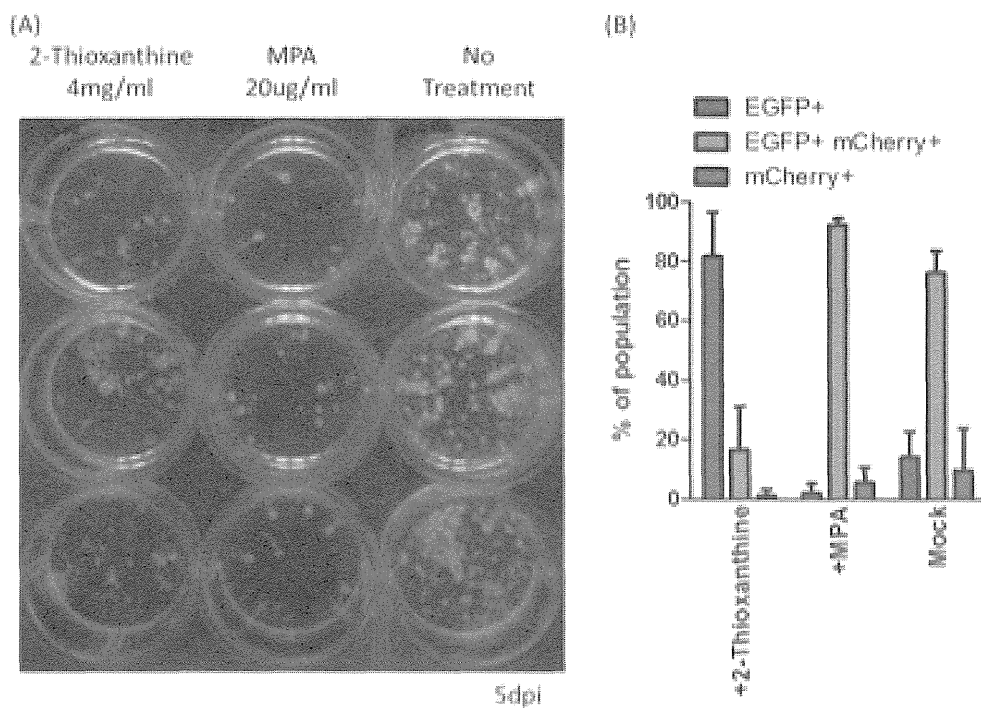


図 5. 薬剤選択カセットを含む中間型ウイルスを 2-TX 存在下で細胞に感染させた，「負の選択」時の，完成型ウイルスが選択されてくるか否かの検討。

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業））

分担研究報告書

細胞培養弱毒生痘そうワクチンの疫学的有効性及び安全性評価に関する研究

研究分担者 金谷泰宏
国立保健医療科学院 健康危機管理研究部

研究要旨

我々は、これまでの研究の中で、LC16m8 が既存の種痘免疫に対してブーストをかけるとともに既接種者の B5R 抗体の産生を促すことについて検証を行った。一方で、初種痘における B5R に対する抗体誘導は既接種群と比して弱いことが指摘されている。本研究においては、プロテインアレイを用いて LC16m8 により誘導される抗体プロファイルを解析し、昨年度までに LC16m8 の有効性を支持する結果が得られた。今年度、引き続き解析したところ、さらに詳細な解析の必要性が認められた。国内外の研究により B5R 抗体の産生は痘そうワクチンによる防御に必須ではないという結果も示されているが、有効性・安全性の点から重要な抗原であることから、プロテインアレイ解析結果も踏まえ、その抗原性について解析を行い、LC16m8 の B5R タンパク質の抗体誘導能を確認した。抗体の機能については引き続き検討が必要である。

A. 目的

LC16m8 株は EEV の主要抗原 B5 に変異があり切断型として発現しているため、ワクチンとしての有効性の評価には、この変異が抗原性にどのような影響を与えているかを明らかにすることが必要である。一方、抗体産生にはウイルス株の種類、個人の遺伝的要素、生理状態、ワクチン接種歴などの過去における暴露が影響を与えることから、有効なワクチン接種プログラムの開発には、LC16m8 株接種に関わるこれらの要因の関係を明らかにすることが必要である。

1970 年代以前、わが国では、天然痘のワクチン接種は 3 回の種痘を受けるプログラムであり、1976 年まで実施された。そのため、現在では、76 年以降が生年の世代は免疫がなく、それ以前の世代は出生年によって種痘歴（ワクチン株の種類と接種回数）が異なる世代が混在しており、いずれもワ

クチンの有効性評価と接種プログラムを構築するにあたり考慮する必要がある。わが国では 1970～1975 年の間に出生した者は 1 回、1964～1969 年の間に出生した者は 2 回、1963 年以前に出生した者は 3 回の接種を受けている。1970 年以前においては池田株、大連 1 株が、1970 年代は Lister 株が使用された。日本人集団においては、これらの免疫的背景を考慮したワクチン接種プログラムを開発することにより、安全性、有効性の高い接種が可能となる。

本研究では、プロテインアレイを用いた LC16m8 抗原性の解析を続けるとともに、有効性・安全性の評価に重要な LC16m8 株の B5 タンパク質の抗原性について検討を行った。

B. 研究方法

1. プロテインアレイを用いた LC16m8 の抗原性の解析

(1) 血清

齊藤らが報告した LC16m8 株接種の臨床試験のうち、第 2 ラウンドの被験者 (200 名) の血清を対象とした。善感反応を示さなかった 4 検体を除く 196 検体をプロテインアレイに供し測定を行った。血清は接種前、接種後 1 ヶ月目に採取し、ペア血清として解析を行った。

(2) 抗原プロファイル解析

ウイルス抗原としてワクシニアウイルス ウェスタンリザーブ株のゲノム上の ORF の遺伝子産物を搭載したアレイを用いた (Antigen Discovery Inc. Irvine, CA, USA)。ネガティブコントロールとして、ウイルス由来の遺伝子産物を発現させないスポットを設定した (no DNA control)。血清は、E. coli 溶解液 (最終濃度 4~5mg/mL) を含んだブロッキングバッファーで 50 倍に希釈し、18 度で 1 時間処理し、アレイにプローブして 4 度で 18 時間処理した。洗浄後、ブロッキングバッファーで 200 倍に希釈したビオチン化ヤギ抗ヒト IgA/G/M、Ig γ 鎖、Ig α 鎖、IgM μ 鎖 2 次抗体に 18 度で 2 時間処理した。数回洗浄後、スライドをストレプトアビジン結合 PBXL-3 存在下で 1 時間処理。遠心により風乾した後、Parkin Elmer confocal glass slide scanner を用いて蛍光強度を取得した。蛍光強度は、ScanArrayExpress software (Parkin Elmer) により定量化を行った。測定は 4 回に分けて行った。接種回によりアレイの構成が一部異なることから、全測定に共通して含まれる 195 個の遺伝子産物に対する測定値を統計解析に用いた。それぞれの血清についてトリPLICATEで測定を行った。ポジティブコントロールとして、ワクシニアウイ

ルスのタンパク質に対して高い抗体価を有するヒトの抗ワクシニアウイルスイムノグロブリンを同様にプロテインアレイにプローブして抗原抗体反応を蛍光強度として測定した。

(3) LC16m8 接種血清のデータの処理

プロテインアレイ間のばらつき、複数回にわたる測定の影響を調整するため、アレイの測定結果の正規化を行った。正規化には R の vsn パッケージを用いた。正規化後には、トリPLICATEのアレイデータのメディアン値をとり各抗原に対する抗体の測定値とした。正規化データは再変換を行い蛍光強度のスケールに戻した。

日本人の集団は、生年により種痘の接種履歴が異なるため、A 群 (1976 年以降出生、種痘歴なし)、B 群 (1970~1975 年の間に出生、種痘 1 回)、C 群 (1964~1969 年の間に出生、種痘 2 回)、D 群 (1963 年以前の出生、種痘 3 回) の 4 群において解析を行った。第 2 ラウンドの全被験者は 200 名であり、A-D 群の人数は、45 名、47 名、45 名、63 名であった。このうち、善感反応が認められなかった A 群の 4 検体以外はアレイ測定を行った。さらに、ペア血清が揃わない 2 検体 (C 群、および D 群)、善感反応が認められなかった 1 検体 (A 群) は統計解析から除外した。ここに示した統計解では、A-D の各群の人数は、41 名、47 名、44 名、62 名である。

L1, A17 については技術的な問題によりシグナルが全検体からは取得できなかったため、A17 に対する A 群および B 群の結果以外は統計解析に含めなかった。

(4) アメリカ人の血清のデータの概要

LC16m8 接種血清の抗体プロファイルとの比

較のため、NCBI の GEO データベースに収録されている Dryvax 接種血清のアレイ測定の結果(GSE34931, Tan et al., 2012)の再解析を行った。検体は、本来は、3回の独立した dose-sparing studies (NIH study ID/clinicaltrial.gov.ID:01-632/NCT00026611, 02-009/NCT00038987, 02-054/NCT00050518) (Frey 2002)のものである。既存免疫について検討する目的では、過去に接種歴のある検体の接種前の抗体プロファイル(臨床試験での接種したワクチン株の種類と容量は問わず、接種前の血清のみを抽出)を再解析した。

(5)データ解析

抗体産生についての解析は、抗原ごとに接種前後の血清について各群の平均, SD, SE を算出した。t 検定により有意差を検定した。統計解析は R (2.14.0, 3.1.0)または JMP9.0 (SAS Japan)を用いて行った。

2. マウス LC16m8 接種血清のエピトープの解析

(1)B5 タンパク質の調整

B5 タンパク質および部分配列に相当するフラグメントタンパク質は、DNA を化学合成後、インビトロトランスレーションを行い調整した。合成タンパク質には、N 端に His タグ、His-TEV タグ、C 端に HA タグを必要に応じて付加した。合成後、タンパク質は、抗 His タグカラムを用いて精製した。

合成配列は、Lister 株などの野生型の B5 タンパク質 (1-317aa)、LC16m8 株の B5 タンパク質 (truncated B5 protein, 1-92aa)、LC16m8 株の B5 タンパク質が含まない C 端側のフラグメント (92-275aa)、膜外ドメイン

(20-275aa) とした。

(2)抗体の調整

B5 タンパク質の検出のため、部分配列に対する抗ペプチド抗体を調整した。抗原の配列は 22-39 残基の配列とした。常法に従いウサギポリクローナル抗体を調整した。抗体価は ELISA 法により確認した。

(3) マウス LC16m8 接種血清

化血研よりご提供いただいた。

3. B5(aa1-92)単体に対する抗体産生についての検討

(1)B5 タンパク質の調整

LC16m8 株の B5 タンパク質 (1-92aa) を上記の方法で大量合成を行った。

(2)マウスにおける抗原性の検証

精製した合成タンパク質をマウスに免疫した。抗体価は ELISA 法により確認した。

(3)統計解析

統計解析は R (3.1.0)または JMP9.0 (SAS Japan)を用いて行った。

【倫理面への配慮】

本調査研究の実施に当たっては、臨床研究の指針を踏まえるとともに、自衛隊中央病院倫理委員会の承認を得た (No. 16-004, 平成 16 年 8 月 30 日)。

動物実験については、厚生労働省の動物実験等の実施に関する基本指針を踏まえて行った。

C. 研究結果

1. プロテインアレイを用いた LC16m8 の抗原性の解析

昨年度までに引き続き、プロテインアレイを用いた天然痘ワクチン接種による抗体産

生について解析を進めた。今年度は特に長期免疫に焦点を当てた。天然痘ワクチンによる防御に寄与する抗原として、複数の IMV 表層の抗原が中和抗原として報告されているが、日本人、アメリカ人の集団のデータとも、長期免疫の抗体プロファイルにおいては、コアなどに局在する抗原に対する抗体が多く検出される (A9, A4, I1, A10 など)。これらの長期免疫による既存抗体量とワクチン接種による抗体産生量の関連等についてさらに解析を行った。一方、EEV の抗体は、抗 B5 抗体も含め、長期免疫においては多くは検出されなかった。

2. マウス LC16m8 接種血清のエピトープの解析

LC16m8 株の接種による抗体産生において、B5 タンパク質 (truncated B5 protein, 1-92aa) の抗原性を評価するに当たり、B5 protein(aa1-92) そのものが抗体を誘導しているのか、あるいは LC16m8 株のリバートが生じ野生型の B5 タンパク質 (aa1-317) が発現されたために抗体が誘導されたのかを識別することが重要である。ワクチン接種血清が認識する B5 のエピトープを明らかにするため、B5 の部分配列に相当するフラグメントに対する認識の有無を検討することとした。はじめに、B5 タンパク質および抗体の調整を行った。合成したタンパク質は以下の通りである。全長のタンパク質 (B5aa1-317, 317 アミノ酸)、LC16m8 株の配列に相当するフラグメント (B5aa1-92, 92 アミノ酸)、LC16m8 株では失われた 92 残基以降 C 末端側の配列のフラグメント (B5aa92-317, 226 アミノ酸) を合成タンパク質として調整した。

B5(aa1-92) は予想される分子量に合成産物が得られた。B5aa1-317 は予想される分子量の他、熱処理等による重合が起こると思われる挙動を示し、一定の収量を得るのが困難であった。そこでさらに、合成、精製を困難にする膜貫通領域及びシグナルペプチドを除いた配列 (B5aa20-275, 276 アミノ酸) も合わせて合成した。B5(aa20-275) は膜外領域全体に相当するため、B 細胞エピトープを含むと考えられている。

これらの抗原を認識する抗体として、22-39 残基のアミノ酸配列を合成し、抗ペプチド抗体を作成した。2 検体の抗体価を ELISA 法により測定した結果、OD450 の吸光度が 12,500 倍希釈溶液において、0.486, 0.534、2,500 倍希釈溶液において 1.151, 1.167 と高抗体価が得られた。

これらの合成タンパク質 (抗原)、および抗体 (ポジティブコントロール) を用い、マウス LC16m8 接種血清のエピトープの解析を進めているところである。

3. B5(aa1-92) 単体に対する抗体産生についての検討

LC16m8 株の接種により B5 に対する抗体が産生されることはマウスにおいて報告されている (Meseda 2009, 本研究班の未発表データ)。しかし、LC16m8 株の B5 (aa1-92) の配列に対し、どのような構造をエピトープとする抗体が産生されるのか、その詳細は不明である。エピトープの解析は B5 (aa1-92) の抗原性を明らかにするために重要である。そこで、合成した B5 (B5aa1-92) に対する抗体産生を検証した。Tag 配列を付加した B5 (aa1-92) を大量合成し、マウス 4 匹に免疫し、血清の抗体

価を ELISA 法により測定したところ、B5 (aa1-92) の配列に対する抗体価の上昇が認められた (2 回免疫後、12500 倍希釈において吸光度 0.9965) . 一方、タグ配列に対する抗体は検出されなかった. そのため、B5 (aa1-92) のタンパク質が抗体を誘導したと考えられた.

D. 考察

1. プロテインアレイを用いた LC16m8 の抗原性の解析について

プロテインアレイを用いた抗体プロファイルの解析は、網羅的に抗体産生を把握することが可能であり、従来、主要抗原として研究が進んでいた IMV, EEV の表層抗原以外の抗体も血清中に多く存在することが明らかとなった. これらの抗体の機能についてはあまり報告がない. 他の測定系での検証、機能解析などが今後必要と考えられる.

本研究の結果は、抗 B5 抗体の長期免疫における役割など、いくつかの疑問を新たに生じさせた. 先行研究等との比較を詳細に行い、相違点については、技術的要因、ウイルス側の要因、ホスト側の要因のいずれに起因するのかを検証し、抗体産生におけるウイルス株の種類、個人の遺伝的要素、過去における暴露の影響などについて明らかにしていくことが重要である.

2. LC16m8 株の B5 の抗原性について

LC16m8 株は EEV の主要抗原 B5R に変異があり、短縮型のタンパク質として発現していることから、その有効性に議論があった. 最近の国内外の報告をみると、抗 B5 抗体が防御のために決定的に重要であるという報告 (Putz 2005) がある一方、B5R 以外の EEV

抗原も補体を加えたより生理条件に近い測定系において中和活性を担う抗体を惹起すること、さらに単独の抗原に対する抗体が防御能 (中和能) の全てを担うわけではなく、複数の抗体が関与していることが報告されている (Benhnia 2013) . LC16m8 株が動物モデルにおいて防御を示す (Kidokoro 2005, Morikawa 2005, Saijo 2006) ことから抗 B5 抗体の有無のみで防御の有無が決定されるのではないと考えられる. 同時に、B5 タンパク質は、主要抗原としてワクチンの有効性のみならず安全性にも影響を与えていることから重要であり、LC16m8 株の B5 の抗原性についても明らかにしていく必要がある.

LC16m8 株接種により、マウスにおいては B5 タンパク質に対する抗体の産生が報告されているが、ヒトにおいては、現在までのプロテインアレイ解析の結果から新規の疑問点も生じ、引き続き解析が必要な状況である. マウスにおいても、B5 (aa1-92) の抗原性について、B 細胞エピトープ、T 細胞エピトープの詳細はわかっていない.

野生型の B5R タンパク質の B 細胞エピトープは主に aa56-84, aa256-275 の 2 カ所に集中して存在することがマウスにおけるモノクローナル抗体作成の研究から示されている (Aldaz-Carroll 2005). B5 (aa1-92) は、そのうち N 端側の領域 (aa56-84) を含むものの、分子内のシステインの架橋による高次構造を失っていることから、野生型と同様のエピトープを供するか否かは検証が必要である. さらに、LC16m8 株感染細胞における B5 タンパク質の発現をみると、ごく少量ではあるが野生型の分子量に相当する分子も検出されることから、LC16m8 株接種マ

ウス血清における抗体誘導が B5(aa1-92)のみでも起こりうるものかどうか疑問が残っていた (Meseda 2009).

本研究において、B5(aa1-92)の抗原性について、ワクチン接種血清のエピトープ解析、および、ウイルスではなく合成タンパク質単体による抗体誘導能の検証という観点から研究を進めている。今年度、B5(aa1-92)単体による抗体誘導が認められたことは上記の先行研究の疑問点を説明するものである。LC16m8 株の B5 に対する抗体について、Paran and Lustig は、抗 B5 抗体の *in vitro* での中和反応と *in vivo* での防御の多くが補体(C3, C1q)への結合能に依存しているとした Benhnia らの報告 (Benhnia 2009) を取り上げた総説の中で、「LC16m8 株の truncated B5 protein に対する抗体が同様のメカニズムで EV を中和できるか、マウスを防御できるかどうかは興味深い」と言及している。B5(aa1-92)抗体の機能解析は、ワクシニアに対する免疫において B5 タンパク質が果たす役割を明らかにする上で重要と考えられる。

LC16m8 株の B5 タンパク質の抗原性について引き続き解析を続ける予定である。

E. 結論

本研究では、LC16m8 株接種による抗体産生をについて、プロテインアレイを用いて

網羅的に解析を続けるとともに、その結果も踏まえて、主要抗原 B5 の抗原性について解析を進めている。今年度、B5(aa1-92)単体の抗体誘導能を確認した。B5 に対する免疫応答は、ワクチンの有効性のみでなく安全性にもかかわることから、LC16m8 株の接種プログラムの確立のためには詳細な解析が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

江藤亜紀子、齋藤智也、西山靖将、横手公幸、金谷泰宏. 種痘による長期免疫に寄与する抗原の同定および LC16m8 株接種に対する影響についての解析。第 18 回ワクチン学会学術集会；2014 年 12 月；福岡市

G. 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

分担研究報告書

痘そうワクチン LC16m8 接種者における中和抗体持続に関する調査研究

所 属 一般財団法人 化学及血清療法研究所
ワクチン事業部門 開発部
研究分担者 横手 公幸

研究要旨：

LC16m8 を 1 回接種された健康成人の約 4 年後の抗体陽性率は初種痘群において低下傾向が認められた。Proteome Microarray Chip を用いたプロテオミク解析を行った結果、種痘 4 年後まで抗体陽性であった被験者群において、種痘前と比較して種痘 1～7 か月後の蛍光強度が有意に高かった抗原は 6 種類あり、そのうち A27L, A10L は種痘 4 年後まで有意に高かった。また、種痘 4 年後で陰性であった被験者群において、種痘前と比較して種痘 1～7 か月後の蛍光強度が有意に高かった抗原は 7 種類あり、そのうち A11R, A34R, D8L は種痘 4 年後では有意に低下した。

研究協力者

- (1) 千葉大学 名誉教授
橋爪 壮
- (2) 一般財団法人化学及血清療法研究所
新村 靖彦、上村 千草、内田 梓、金原 知美、
丸野 真一、宮本 誠二

ンについては、2～3 回の種痘後 10～30 年程度経過した時点においても天然痘の発症または重症化を阻止可能なレベルの抗体が保持されていることが報告されている。

以上の背景より、近年 LC16m8 を 1 回接種された成人対象者に対する免疫持続の調査が必要と考え、本研究を開始した。

A. 研究目的

乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 は、有効性を保持しながら弱毒化に成功した生ウイルスワクチンで 1975 年に製造承認が許可された。当時の痘そうワクチンの定期接種は、小児に対して予防目的で池田株、大連 I 株や LC16m8 の親株である Lister 株が 3 期、3 回の接種が実施されていたが、WHO（世界保健機関）の天然痘根絶計画が進み、日本では 1976 年に痘そうワクチンの定期接種が中止となった。

近年天然痘ウイルスによる生物テロの危険性が指摘されたことを受けて、わが国ではこの痘そうワクチン LC16m8 がテロ対抗医薬品として 2001 年以降再製造、国家備蓄されている。また、天然痘テロに対する危機管理対策としてファーストレスポンスの成人対象者（初種痘者及び再種痘者）に対して LC16m8 が 1 回接種されている。

一方、天然痘流行期に WHO は、天然痘曝露に対する最大限の防御レベルが要求される人（ファーストレスポンスの対象者）に対しては、毎年追加接種を推奨していた。また流行期の疫学調査や種痘経験者に対する最近の血清学的調査（抗体測定）等の文献によると、従来の痘そうワクチ

B. 研究方法

1) 血清検体

バイオテロ対処の観点から細胞培養弱毒痘そうワクチン LC16m8 が接種され、種痘前、種痘後 1 か月後、4 か月後及び 7 か月後に採取された血清サンプルが保管されている自衛隊員のうち、本研究に同意の得られた 39 名（初種痘：24 名、再種痘 15 名）より採取した血清サンプルを用いた。これらの大部分が採血された時点で種痘後 4 年経過していた。

2) 評価

【中和抗体価測定】

LC16m8 ワクチン種痘前、種痘 1 か月後、4 か月後、7 か月後、及び約 4 年後の各時期に採取された血清検体について、中和抗体価を測定した。中和抗体価の測定は Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT)により行い、50%のプラーク減少時の抗体価 (PRNT₅₀) を判定した。チャレンジウイルスは、WHO の天然痘根絶計画で主軸を担った Lister 株を用いた。なお、PRNT₅₀ が 128 倍以上の場合を抗体陽性と判定した。

【プロテオミック解析】

24名の初種痘群から、種痘前、種痘1か月又は4か月又は7か月後、種痘約4年後に採血された血清が3ポイント全て揃っている11名の被験者の血清検体について、ワクチン接種により誘導された抗体による認識抗原たん白質群をVaccinia Western Reserve (WR) specific-Proteome Microarray Chipを用いて解析した。なお、この解析はAntigen Discovery, Inc. (Irvine, CA, USA)へ委託し実施した。

【倫理面への配慮】

本調査研究の実施に当たっては、臨床研究の指針を踏まえるとともに、自衛隊中央病院倫理委員会の承認を得た。(No.16-004.平成16年8月30日、No.18-022.平成18年12月21日、No.21-001.平成21年6月10日)

C. 研究結果

天然痘テロに対する危機管理対策として、細胞培養弱毒生痘そうワクチンLC16m8を1回接種された成人被接種者が獲得した中和抗体の持続を調査した。まず初種痘者24名、再種痘者15名の計39名について調査を実施した。LC16m8ワクチン種痘前、種痘1ヵ月後、4ヵ月後、7ヵ月後、及び約4年後のPRNT₅₀のGMT(幾何学平均値)及び抗体陽性率を表1に示した。

初種痘群及び再種痘群の中和抗体陽性率はそれぞれ、LC16m8ワクチン種痘前では17%(2/12)及び100%(13/13)、種痘1ヵ月後では56%(5/9)及び87%(13/15)、4ヵ月後では86%(6/7)及び92%(11/12)、7ヵ月後では80%(4/5、初種痘群のみ測定)、約4年後では58%(14/24)及び93%(14/15)であった。

次に、LC16m8接種により誘導された抗体による認識抗原たん白質群をVaccinia WR specific-Proteome Microarray Chipを用いて解析した。24名の初種痘群から、種痘前、種痘1か月又は4か月又は7か月後、種痘約4年後の血清がそろっている11名の被験者について、個人毎のPRNT₅₀の推移を図1に示した。

11名の被験者は抗体陽性率により、以下の3つのグループに分けて解析を行った。

Group A: LC16m8種痘1-7ヶ月後及び種痘約4年後で陽性であった被験者(5名)

Group B: LC16m8種痘1-7ヶ月後は陽性であったが、約4年後では陰性の被験者(4名)

Group C: LC16m8種痘後全ての時期で陰性の被験者(2名)

Group A, Group B, Group Cにおいて、LC16m8ワクチン接種による抗原認識パターンをヒートマッ

プとして図2に示した。

各グループ毎に、種痘前と比較して蛍光強度に有意差が見られた抗原を表2、表3及び表4に示した。Group Aでは、種痘前と比較して種痘1-7か月後の蛍光強度が有意に高かった抗原はA13L, A26L, A27L, A33R, D13L, A10Lであり、そのうちA27L, A10Lは種痘4年後まで有意に高かった。また、A13Lは種痘1-7か月後と比較して種痘4年後では蛍光強度が有意に低下した。Group Bでは、種痘前と比較して種痘1~7か月後の蛍光強度が有意に高かった抗原はA11R, D13L, D8L, A34R, H3L, A27L, A10Lであった。また、A11R, D6R, A34R, D8Lは種痘1-7か月後と比較して種痘4年後では蛍光強度が有意に低下した。

D. 考察

本研究では、天然痘テロに対する危機管理対策として、細胞培養弱毒生痘そうワクチンLC16m8を1回接種された成人被接種者が獲得した中和抗体(Anti-Lister PRNT)の持続を調査した。

中和抗体陽性率については再種痘群では経時的な変化は認められなかったが、初種痘群では低下傾向が認められ、約4年後には抗体陽性率が約60%となった。この低下傾向について原因調査するため、ワクチニアウイルスWR株の95%以上の構成たん白質を網羅するProteome Microarray Chipを用いて、ワクチン接種により誘導された抗体の認識ウイルス抗原を調査した。種痘4年後まで抗体陽性であった被験者群において、種痘前と比較して種痘1~7か月後の蛍光強度が有意に高かった抗原は6種類あり、そのうちA27L, A10Lは種痘4年後まで有意に高かった。また、種痘4年後で陰性であった被験者群において、種痘前と比較して種痘1~7か月後の蛍光強度が有意に高かった抗原は7種類あり、そのうちA11R, A34R, D8Lは種痘4年後では有意に低下した。これらの抗原群が4年後の中和抗体価及び抗体陽性率の低下に起因していると考察された。今後、さらに各接種時期におけるグループ間の蛍光強度の解析や個人毎の解析を実施する。

E. 結論

天然痘テロに対する危機管理対策として、細胞培養弱毒生痘そうワクチンLC16m8を1回接種された成人被接種者が獲得した中和抗体の持続を調査した結果、再種痘群では抗体陽性率に経時的な変化は認められなかったが、初種痘群では低下傾向が認められた。この低下傾向について原因調査するため、ワクチニアウイルスWR株の95%以上の構成たん白質を網羅するProteome Microarray

Chip を用いて、ワクチン接種により誘導された抗体の認識ウイルス抗原を調査した。その結果、種痘4年後まで抗体陽性であった被験者群において、種痘4年後まで反応強度が有意に高かった抗原はA27L, A10L であり、また、種痘1-7か月後では抗体陽性であったものの、種痘4年後で陰性であった被験者群において、種痘4年後の反応強度が有意に低下した抗原はA11R, A34R, D8L であった。これらの抗原群が4年後の中和抗体価及び抗体陽性率の低下に起因していると考えられた。

3. その他
該当なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hiroyuki Yokote, Yasuhiko Shinmura, Tomomi Kanehara, Shinichi Maruno, Masahiko Kuranaga, Hajime Matsui and So Hashizume. Safety of attenuated smallpox vaccine LC16m8 in immunodeficient mice. Clin. Vaccine Immunol. 2014, 21(9):1261-66

2. 学会発表

1) Paul N. Hudson, V. Olson, S. Smith, Z. Reed, A. Kondas, W. Davidson, H. Yokote, M. Saijo, S. Morikawa, I. Kurane, I. Damon. ASSESSING THE NEUTRALIZATION EFFICIENCY OF SERUM FROM LC16m8-VACCINATED INDIVIDUALS AGAINST TWO VARIOLA VIRUS STRAINS. 2014 International Poxvirus, Asfarvirus & Iridovirus Conference. Victoria, Canada (2014, 09)

2) 丸野真一, 金原知美, 新村靖彦, 横手公幸, 齋藤智也, 橋爪壮. 国産第三世代痘そうワクチン LC16m8 の WHO 推奨. 第18回日本ワクチン学会学術集会 福岡 (2014.12)

3) 江藤亜紀子, 齋藤智也, 西山靖将, 横手公幸, 金谷泰宏. 種痘による長期免疫に寄与する抗原の同定およびLC16m8株に対する影響についての解析. 第18回日本ワクチン学会学術集会 福岡 (2014.12)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

表 1. 痘そうワクチン LC16m8 接種後の中和抗体価(Anti-Lister PRNT)及び中和抗体陽性率

種痘歴	評価タイミング									
	種痘前		種痘 1 ヶ月後		種痘 4 ヶ月後		種痘 7 ヶ月後		種痘約 4 年後	
	GMT	陽性率	GMT	陽性率	GMT	陽性率	GMT	陽性率	GMT	陽性率
初種痘	40	17% (2/12)	323	56% (5/9)	815	86% (6/7)	404	80% (4/5)	214	58% (14/24)
再種痘	457	100% (13/13)	772	87% (13/15)	1274	92% (11/12)	-	-	716	93% (14/15)

GMT: Geometric mean titer

陽性判定基準: PRNT₅₀ ≥ 128

表 2. 痘そうワクチン LC16m8 接種前と比較してプロテオミク解析における蛍光強度が有意に上昇した抗原

	種痘 1-7 か月後*	種痘 4 年後*
Group A	A13L, A26L, A27L, A33R, D13L, A10L	A27L, A10L
Group B	A11R, D13L, D8L, A34R, H3L, A27L, A10L	無
Group C	無	無

*有意差が大きい順に記載

表 3. 痘そうワクチン LC16m8 接種 1-7 か月後と比較してプロテオミク解析における蛍光強度が有意に低下した抗原

	種痘 4 年後*
Group A	A13L
Group B	A11R, D6R, A34R, D8L
Group C	無

*有意差が大きい順に記載

表 4. 蛍光強度に有意差が見られた抗原

Membrane		Core (1)	Other (4)
EEV (2)	IMV (4)		
A33R	A13L	A10L	A26L
A34R	A27L		A11R
	D8L		D13L
	H3L		D6R

A33R: EEV membrane phosphoglycoprotein, A34R: IEV and EEV membrane glycoprotein, A13L: IMV membrane protein, A27L: IMV surface protein, D8L: IMV membrane protein, H3L: IMV heparin binding surface protein, A10L: precursor p4a of core protein 4a, A26L: cowpox A-type inclusion protein, A11R: hypothetical protein, D13L: rifampicin target, D6R: 70kDa small subunit of early gene transcription factor VETF

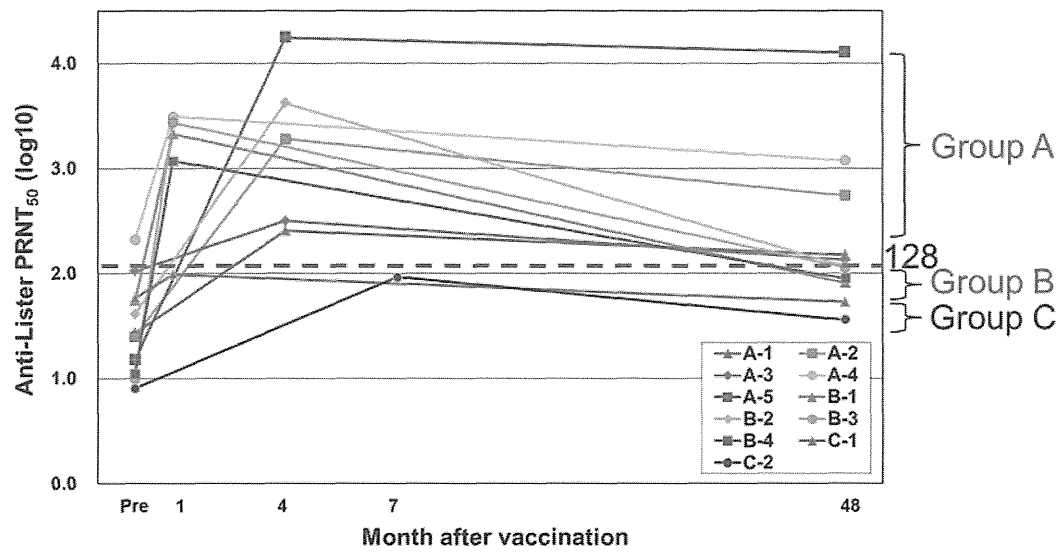


図 1. 痘そうワクチン LC16m8 接種後の中和抗体価推移 (個人別)

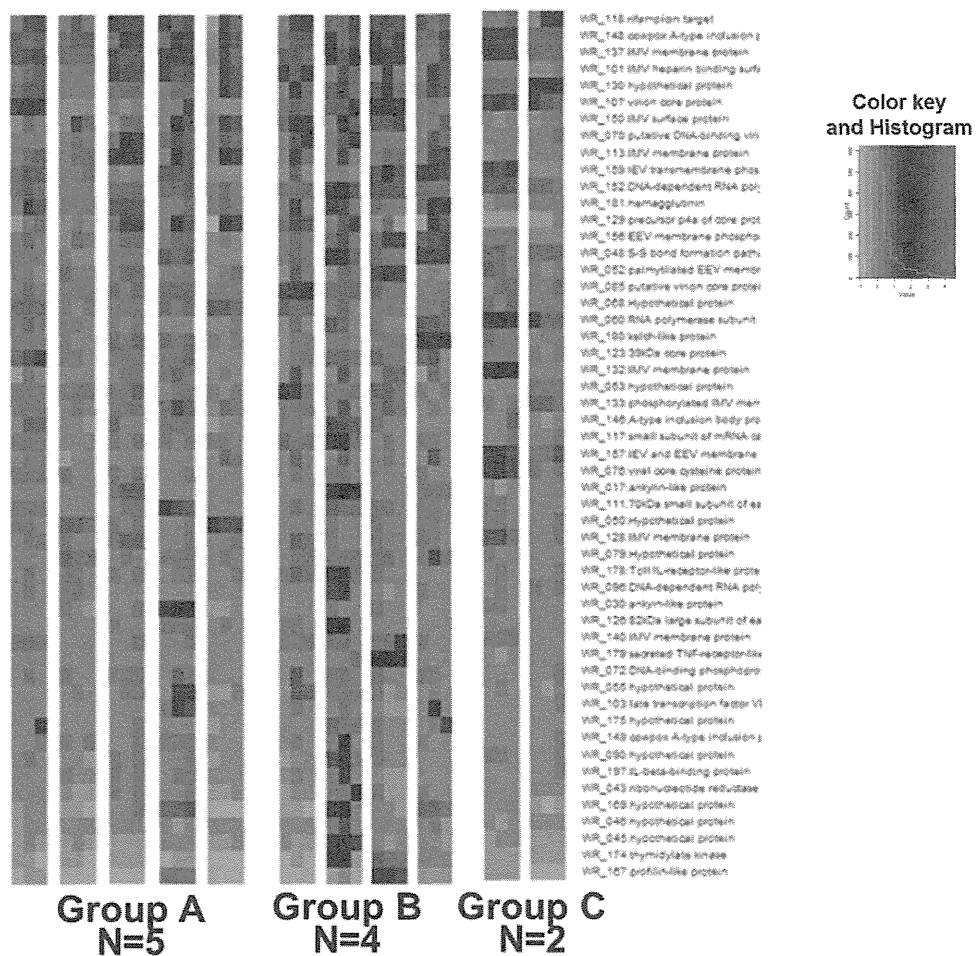


図 2. 痘そうワクチン接種後の認識抗原たん白質プロファイル(Heatmap)

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
中島典子	感染症法による規制	辻省次、水澤英洋	アクチュアル 脳・神経疾患の 臨床 神経感染 症を究める	中山書店	東京都	2014	320-324
小林和夫	病原微生物額-基礎 と臨床-	荒川宣親、神谷茂、 柳雄介	細菌および真菌 による呼吸器感 染症	東京化学同 人	東京都	2014	239-244
宮崎義継	V. 感染症検査・真 菌.	中原一彦	パーフェクトガ イド検査値事典 [第2版]	総合医学社	東京都	2014	477-481