

図2 個体番号 5185 (病理番号 140623) に認められた精巣炎像。曲精細管の周囲の小葉結合織に炎症性細胞浸潤がみられ (A-C, *)、その周辺部の曲精細管内に細胞配列の乱れが認められた (B, C)。また、この部位に限局して、数個のウイルス抗原陽性細胞が存在した (D)。A-C、ヘマトキシリン・エオジン染色。D、免疫組織化学。

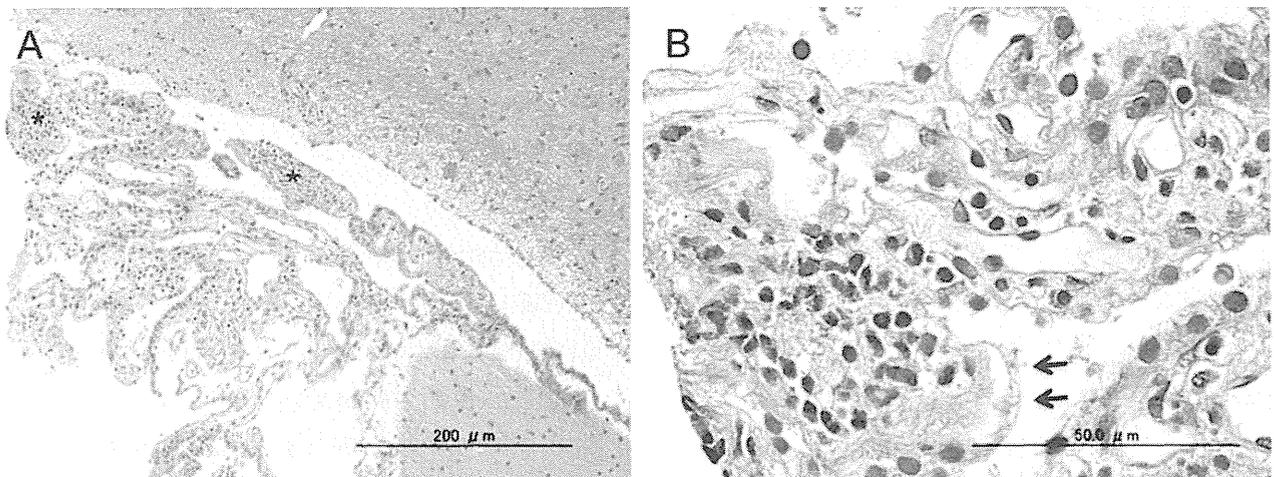


図3 個体番号 5189 (病理番号 140625) に認められた脈絡叢炎像。単核系細胞を中心とした炎症性細胞浸潤 (A *) と上皮細胞の脱落 (B 矢印) を認める。B は A の病変部位の拡大。一部に好酸球と形質細胞浸潤も認められる。ウイルス抗原は陰性であった。A, B、ヘマトキシリン・エオジン染色。

コモンマーモセットを用いたムンプスウイルス病原性評価モデルの開発

研究分担者：網 康至 国立感染症研究所 動物管理室
研究協力者：須崎百合子 国立感染症研究所 動物管理室
木所 稔 国立感染症研究所 ウイルス第3部
加藤大志 国立感染症研究所 ウイルス第3部

研究要旨

ムンプスウイルス野外株である大館株を3頭のコモンマーモセットに 10^4 PFU 経鼻接種し、血中のLDH およびアミラーゼを経時的に測定したところ、1頭にアミラーゼの上昇を認めた。また、ワクチン株であるJeryl Lynn株と星野株を 10^2 PFU皮下接種し、血漿中のLDH変動率について解析を行った。Jeryl Lynn株接種個体では、接種後11~14日に有意な変動を50%の個体が示したのに対して、星野株接種した個体では、接種後7日に有意な変動を67%の個体が示した。これらの結果は、マーモセットにおけるウイルス株間の病原性の差異を血液生化学的にも検出が可能であること示唆する。

A. 研究目的

有効で安全な生ワクチンの開発には、ヒトにおける感染を外挿できるモデル動物が必要であり、そのためには、感受性を限りなくヒトと同じくする実験動物が必要である。ムンプスウイルスでは、コモンマーモセットが有用な実験動物として知られているが、現状では、モデル動物としての実用性を評価するに足る情報は不足している。

昨年度、ムンプスウイルスワクチン株であるJeryl Lynn株を接種量を変えてコモンマーモセットに皮下接種により感染させ、その感染動態について臨床血液学的に解析を行ったところ、数頭に血漿中のLDH（乳酸脱水素酵素）に有意な上昇が認められた。

本年度は、野外株である大館株経鼻接種時、および、髄膜炎発症率の低いと考えられる

Jeryl Lynn株と国産株である星野株との間で皮下接種時の血中のLDH およびアミラーゼの変動を測定し、それら株間の病原性の差が臨床血液学的に検出可能かを検討することを目的とする。

B. 研究方法

約1歳齢、♂のコモンマーモセット（*Callithrix jacchus*）（日本クレア）（EDM:C.Marmoset(Jic)）3頭（動物番号5185、5186、5189）および昨年度Jeryl Lynn株で免疫した2頭（動物番号5181、5183）に、ムンプスウイルス野外株である大館株 10^4 PFUを経鼻接種した。

また6頭（動物番号5187、5196、5197、5188、5198、5199）に、ムンプスウイルスワクチン株であるJeryl Lynn株を、100PFU、3頭（動物番号5184、5194、5195）に星野

株を 100 PFU に皮下接種した。

接種後 5 週間、臨床観察を行うとともに、麻酔下で経時的に大腿静脈より採血を行った。また、EDTA 処理血液は、自動血球計算器（日本光電）を用いて赤血球数、白血球数、血小板数、ヘモグロビンを測定した。また、血液塗沫標本を作製し、通常の方法に従って、Wright-Giemsa 染色を行い、白血球の分画についてその百分率を求めた。

得られた血漿中の、LDH（乳酸脱水素酵素）、アミラーゼを生化学自動分析装置（富士ドライケム）を用いて測定した。LDH の変化の解析には、変動率（変化率/日）を求め、25% 以上のものを有意な変動とした。

（倫理面への配慮）

本実験は、国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

大館株接種 3 頭の内、1 頭(5185)で、接種後 4 週に血中アミラーゼの上昇が観察された。これ以外の個体で、血中 LDH、アミラーゼの有意な上昇は認められなかった。大館株接種 3 頭では、発熱が観察された（詳細は本報告書木所）。また、アミラーゼの上昇が認められた個体では、接種後 5 週での解剖による病理組織学的検査により、膵臓に病変が認められたが、唾液腺には認められなかった（詳細は本報告書長谷川）。Jeryl Lynn 株免疫個体への大館株接種個体では、血漿中アミラーゼの有意な変化は認められなかった。

どちらの群の接種個体においても、血漿中の LDH（乳酸脱水素酵素）は、その絶対値に変化が認められた。値の比較においては、個体間の差、上昇、下降の変動が激しいため、変動率を求め、+25% 以上のものを有意な変動とした。大館株接種個体では、有意な変動を認めなかったが、Jeryl Lynn 株免疫大館株

接種個体では、接種後 10 日～14 日に有意な変動を認めた（図 1）

ワクチン株皮下接種では接種後、全ての個体で食欲、体温、活動性などに有意な変化は認められなかった。また、ワクチン接種後の白血球数、リンパ球数、血漿中のアミラーゼの推移を経時的に測定したところ、全ての接種群において、有意な変動は認められなかった。

血漿中の LDH については、変動率でその変化を調べた。Jeryl Lynn 株接種の個体では、6 頭中 3 頭に、接種後 11 日あるいは 14 日に有意な変動が認められた（図 2）。他の 3 頭は、有意な変動率を認めなかった。星野株接種の個体では、3 頭中 2 頭に、接種後 7 日に有意な変動が認められ、内 1 頭については、接種後 14 日も有意な変動が認められた（図 2）。他の 1 頭は、有意な変動を認めなかった。

D. 考察

これまでコモンマーモセットがムンプスウイルスに対して高い感受性を示すことは知られており、脳内接種あるいは脊髄内接種後の中枢神経における病理組織学的な変化を主体として解析し、ワクチン株-ワクチン株間あるいは野外分離株-ワクチン株間の神経病原性の差を検出する試みがなされてきている。

今回、マーモセットを用いて、野外株のヒトにおける自然感染経路に類似する経鼻接種とヒトにおけるワクチン接種と同様の皮下接種による感染での血漿中の LDH の変動率、アミラーゼの変動の解析を行い、ウイルス株間の病原性の差が評価できる可能性について検討した。

野外株感染では、ヒトにおける病態の一つである膵炎発症個体が観察され、一致して血中アミラーゼの上昇が認められた。これまでムンプスウイルス感染における膵炎発症の病態モデルはなく、マーモセット感染モデルの

さらなる有用性を示すものと考えられる。

異なるワクチン株皮下接種間の比較において、血漿中の LDH（乳酸脱水素酵素）変動率では、Jeryl Lynn 株接種個体に比較して、星野株接種群で早期の接種後 7 日に 2/3 の個体が有意な変動を示した。血中の LDH 上昇が局所リンパ節におけるウイルス増殖を意味するものと考え、国産株はマーモセットにおいては、体内でより早期にウイルスが増殖すると考えられ、増殖性が Jeryl Lynn 株に比較して高いことが予想される。

国産株は Jeryl Lynn 株に比較して、ワクチン副反応としての髄膜炎発症率が低いことが知られており、マーモセットにおける増殖性の違いで、その発症率の差を検出することが可能かもしれない。

このように、マーモセットへの皮下接種における血中 LDH 変動率の解析は、統計学的な処理が必要となるが、ウイルス株の性状のひとつと考えられ、新規生ワクチン開発において、弱毒性評価の一つとして有用と考えられる。

LDH の有意な変動が認められない個体が両ワクチン株接種群に存在し、今後これら個体の抗体価、ウイルス血症の推移を調べ、それとともに評価することで、LDH の有意な変動に対する意味付けを行っていく計画である。野外株経鼻接種では、その有意な変動を認めないことから、接種経路により感染動態

が異なるかもしれない。Jeryl Lynn 株免疫群への野外株経鼻接種では有意な変動が認められることから、それらは特異的な免疫反応による可能性も考えられる。

E. 結論

コモンマーモセットに種々のムンプスウイルス株を経鼻接種あるいは皮下接種し、血中の LDH 変動率およびアミラーゼについて解析を行った。野外株経鼻接種では、アミラーゼ上昇を認めたが、ワクチン株接種では認められなかった。ワクチン株間、Jeryl Lynn 株接種個体と星野株接種した個体では、LDH 変動率の動態が異なり、星野株では接種後早期に有意な変動を示した。これら結果から、マーモセットにおける株間のウイルス増殖性の差を、血中 LDH、アミラーゼの動態により評価できると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

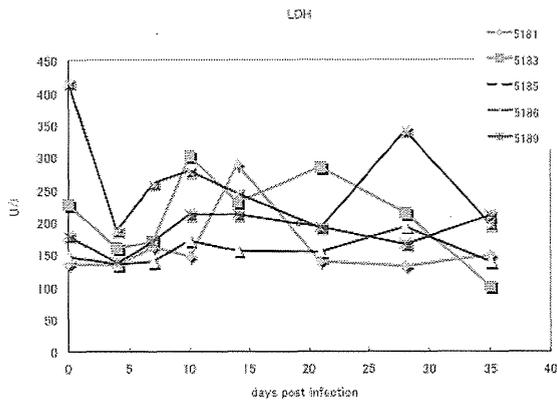
なし。

2. 学会発表

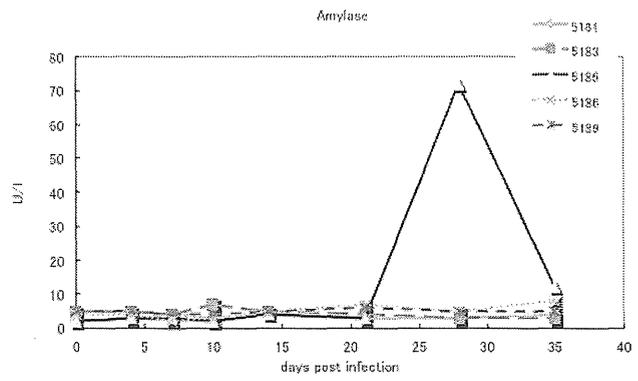
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

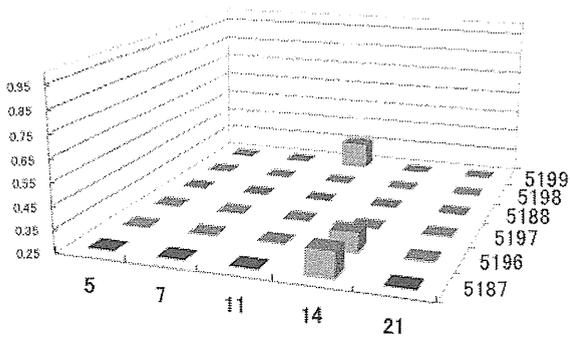


LDH

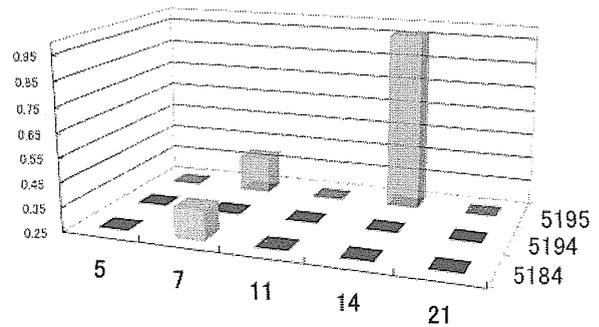


アミラーゼ

図1 大館株経鼻接種時の血中LDHおよびアミラーゼ値の経時的推移



(Jeryl Lynn 株)



(星野株)

図2 ワクチン株皮下接種時の血中LDH変動率の経時的変化

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・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業））
「ムンプスに関する重大なワクチンギャップを抜本的に解決するための研究」
分担研究報告書

新規ムンプスワクチン開発のための基盤的研究

研究分担者：加藤 大志（国立感染症研究所・ウイルス第三部 研究員）

研究協力者：木所 稔（国立感染症研究所・ウイルス第三部 室長）

永田 典代（国立感染症研究所・感染病理部 室長）

研究要旨 現行の国産おたふくかぜ(ムンプス)ワクチンは、副反応としてワクチン接種後の無菌性髄膜炎の問題を抱えている。これは高い神経親和性を有するムンプスウイルス(MuV)が脳上皮細胞で増殖することで、炎症が誘発されるためと考えられている。本研究課題では、上皮細胞特異的に MuV の増殖を抑制するために、上皮細胞に高発現する microRNA である miR449 の相補配列をゲノムに有する組換え MuV (rOdate/miR449) を遺伝子操作系によって作出し、その増殖能および神経病原性について解析を行った。Vero 細胞における rOdate/miR449 の増殖能は親株である rOdate とほぼ同等であった。一方、ラットの脳における rOdate/miR449 の増殖は rOdate と比べ、著しく低下していた。また rOdate 感染ラットの脳では観察された脳室脈絡叢炎が rOdate/miR449 接種群ではほとんど観察されず、上皮細胞における抗原もわずかに検出されるのみであった。rOdate/miR449 接種群では脳室拡張を指標とする神経病原性も減弱しており、miR449 相補配列をゲノムに組み込む手法はより安全なおたふくかぜワクチンの開発に有用であると考えられた。

A. 研究目的

平成 25 年の第 3 回厚生科学審議会予防接種・ワクチン分科会基本方針部会において、おたふくかぜ(ムンプス)ワクチンの定期接種化に向けた議論が行われた。現行の国産ワクチンにはワクチン接種後の副反応として無菌性髄膜炎の問題が挙げられている。一方、海外で使用されているワクチン株 Jeryl-lynn 株は国産ワクチンに比べて高い安全性を持つが、近年ワクチン接種群のアウトブレイクが報告されており、その免疫原性には疑問が生じて

いる(*Vaccine*, 2006, 26: 3601-3607; *Vaccine*, 2011, 29: 3883-3887)。このような背景からおたふくかぜワクチンの定期接種化には、安全性と有効性を兼ね備えた新規ワクチン株の開発が求められている。

おたふくかぜワクチン接種後に起こる無菌性髄膜炎は、ムンプスウイルス(Mumps virus: MuV)が脳の上皮細胞で増殖することに起因すると考えられている(*J. Virol.*, 2007, 81: 8293-8302)。すなわち、上皮細胞における MuV の増殖を抑制することが、無菌性髄膜炎の発生リスクの

軽減につながると考えられる。本研究では、上衣細胞特異的に MuV の増殖を制御するために、上衣細胞で高発現する microRNA である miR449 に着目した (*Brain Res.*, 2009, 1250: 20-26)。本年度は、昨年度確立した MuV 神経病原株の遺伝子操作系を用いて、miR449 と相補的な配列を有する組換え MuV を作製し、培養細胞およびラットの脳内における増殖について検討した。

B. 研究方法

1). miR449 相補配列を有した組換え MuV の作製

MuV Odate 株の L 遺伝子の 3'UTR 領域に miR449 の相補配列を 3 つつないだ配列を有する組み換え MuV を遺伝子操作系によって作製した (rOdate/miR449) (図 1)。作製した rOdate/miR449 の Vero 細胞における増殖能を親株である rOdate と比較した。

2). 組換え MuV のラット脳内における増殖と病原株の評価

rOdate/miR449 の上衣細胞における増殖能および神経病原性を確認するために、乳のみラットを用いた感染実験を行った。生後 24 時間以内のラットに rOdate または rOdate/miR449 を 10^2 PFU/head で脳内接種した。

そのうち 3 頭は、接種 3 日後にイソフルランを用いて安楽殺し、脳内におけるウイルス RNA 量および感染性ウイルス力価を測定した。

さらに 3 頭を接種 6 日後にイソフルランによる深麻酔下で灌流固定し、病理組

織学的検索に供した。病理学的検索は HE 染色および抗 MuV 抗体を用いた免疫組織染色を行った。

残る個体については、接種 28 日後に、MRI を用いて脳室拡張を観察し、神経病原性の評価を行った。神経病原性の評価は MRI によって得られた矢状断面像より、大脳に占める脳室拡張面積の割合を Neurovirulence test (NVT) スコアとして算出した。

(倫理面への配慮)

ラットを用いた感染実験は国立感染症研究所・動物実験委員会の承認を得て実施した。(実験課題名:miRNA 標的配列を導入したムンプスウイルスの神経病原性解析、承認番号: 114031)

C. 研究結果

1). Vero 細胞における組換え MuV の増殖

rOdate または rOdate/miR449 を Vero 細胞に MOI=0.01 で感染させ、感染 24、48、72 および 96 時間後の培養上清中の感染性ウイルス力価を測定した。その結果、rOdate/miR449 は rOdate と同等な増殖能を有することが示された (図 2)。

2). ラット脳内における組換え MuV の増殖

感染 3 日後のラット脳内におけるウイルスゲノム RNA 量をリアルタイム PCR によって測定した。その結果、rOdate を接種した 3 頭すべての脳から平均 $5.02 \text{ Log}_{10} \text{ copy}/\mu\text{g}$ のゲノム RNA が検出されたのに対し、rOdate/miR449 を接種した群では 3 頭すべて検出限界以下であった (図 3A)。さらに rOdate を接種した個体からは

平均 6.82 Log₁₀ PFU/g 感染性ウイルスが回収されたのに対し、rOdate/miR449 接種群では 1 頭から 2.05 Log₁₀ PFU/g の感染性ウイルスが検出されたが、他の 2 頭では検出限界以下であった(図 3B)。

3). 組換え MuV 感染ラット脳の病理学的解析

感染 6 日後のラットの脳の病理学的検索を行ったところ、rOdate を接種したすべての個体において脳室内および脈絡叢への炎症性細胞の浸潤が認められた。また、一部の変性および壊死した上皮細胞の脳室内への脱落も観察された。さらに残存する上皮細胞、脱落細胞および脳室直下の細胞に MuV 抗原が検出された。一方、rOdate/miR449 を接種した 1 個体において第三脳室への炎症性細胞の浸潤および一部上皮細胞における MuV 抗原が観察されたが、他の 2 群に比べ、病変の程度は軽いものであった。rOdate/miR449 接種群の残る 2 個体については顕著な病変像は認められなかった(図 4)。

4). 組換え MuV のラットに対する神経病原性

感染 28 日後に感染ラットの脳室拡張を MRI を用いて評価したところ、rOdate を接種したラットにおいて重度の脳室拡張が観察された。NVT スコアはそれぞれ 25.0%であった。一方、rOdate/miR449 接種ラットにおいては脳室の拡張はほとんど観察されず、NVT スコアは 2.0%であった(図 5)。

D. 考察

rOdate/miR449 のラットの脳内におけ

る増殖および神経病原性は親株に比べ著しく減弱した。すなわち rOdate/miR449 は miR449 が高発現する上皮細胞において増殖が阻害され、その結果として神経病原性が低下したと考えられた。一方で、rOdate/miR449 の Vero 細胞における増殖が親株である rOdate と比べて有意な差を認めなかったことから、L 遺伝子の 3'UTR 領域への 70 塩基ほどの挿入が MuV 増殖へ及ぼす影響は低く、miR449 の発現が低い細胞での増殖は親株と同等であることが示唆された。以上の結果より、miR449 相補配列を有する組換え MuV は防御免疫を付与するのに十分な末梢での増殖を保持しつつ、無菌性髄膜炎の発生のリスクを軽減する新規ワクチン候補株になりうると考えられる。

ラットを用いた MuV の神経病原性解析は MuV の脳上皮細胞での増殖を評価するのに有用な実験系ではあるが、脳に直接ウイルスを接種するために、全身感染を評価できないこと、また生後 24 時間以内の幼若個体への接種のために、獲得免疫の評価ができないことが問題となる。今後は rOdate/miR449 の全身感染における増殖および病原性の評価および免疫原性についてさらなる解析が必要である。

E. 結論

遺伝子組換えによって、miR449 の相補配列をゲノムに組み込む手法は、免疫原性を付与するのに必要な増殖能を維持しつつ、現行の国産おたふくかぜワクチンの問題である無菌性髄膜炎の発生リスクを軽減する理想的なワクチン株の開発に

つながると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1). Katoh H, Kubota T, Kita S, Nakatsu Y, Aoki N, Mori Y, Maenaka K, Takeda M, Kidokoro M. Heat shock protein 70 regulates degradation of the mumps virus phosphoprotein via the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Virol. In press*

2. 学会発表

1). 加藤大志、喜多俊介、久保田耐、中津祐一郎、前中勝実、木所稔、竹田誠: ムンプスウイルス感染における: Heat Shock Protein 70 の役割、第 62 回日本ウイルス学会、2014 年 11 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1). ムンプスウイルスの弱毒化方法、ムンプスウイルス、及び、生ワクチン: 特願 2014-244999 号(出願中)

2. 実用新案登録

なし

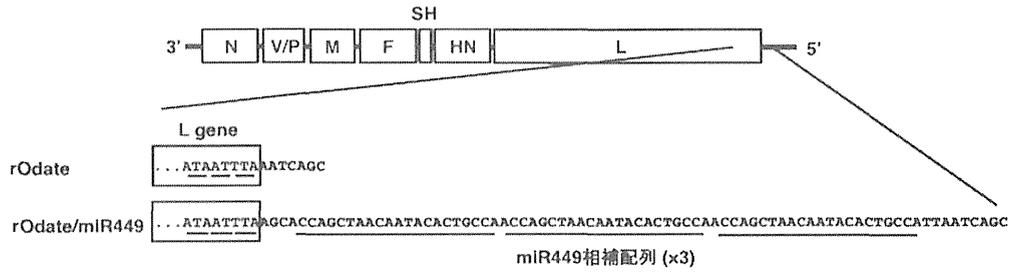


図1 rOdate/miR449の遺伝子構造

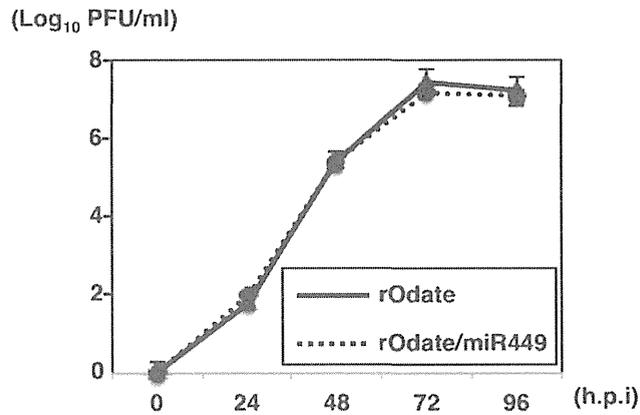


図2 rOdateおよびrOdate/miR449のVero細胞における増殖曲線

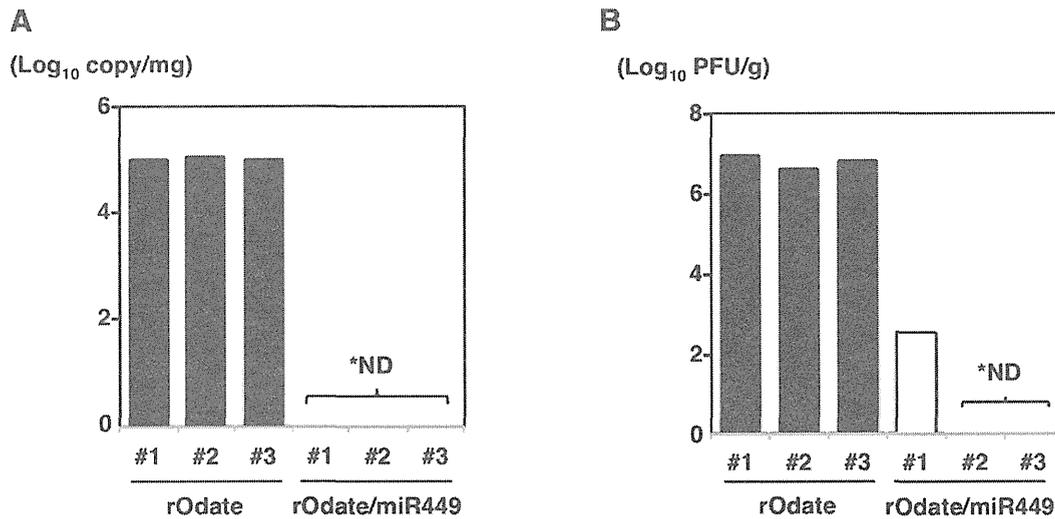


図3 rOdateおよびrOdate/miR449接種ラットの脳内のウイルスゲノムRNA量(A) および感染性ウイルスカ価(B)
*ND: 検出限界以下

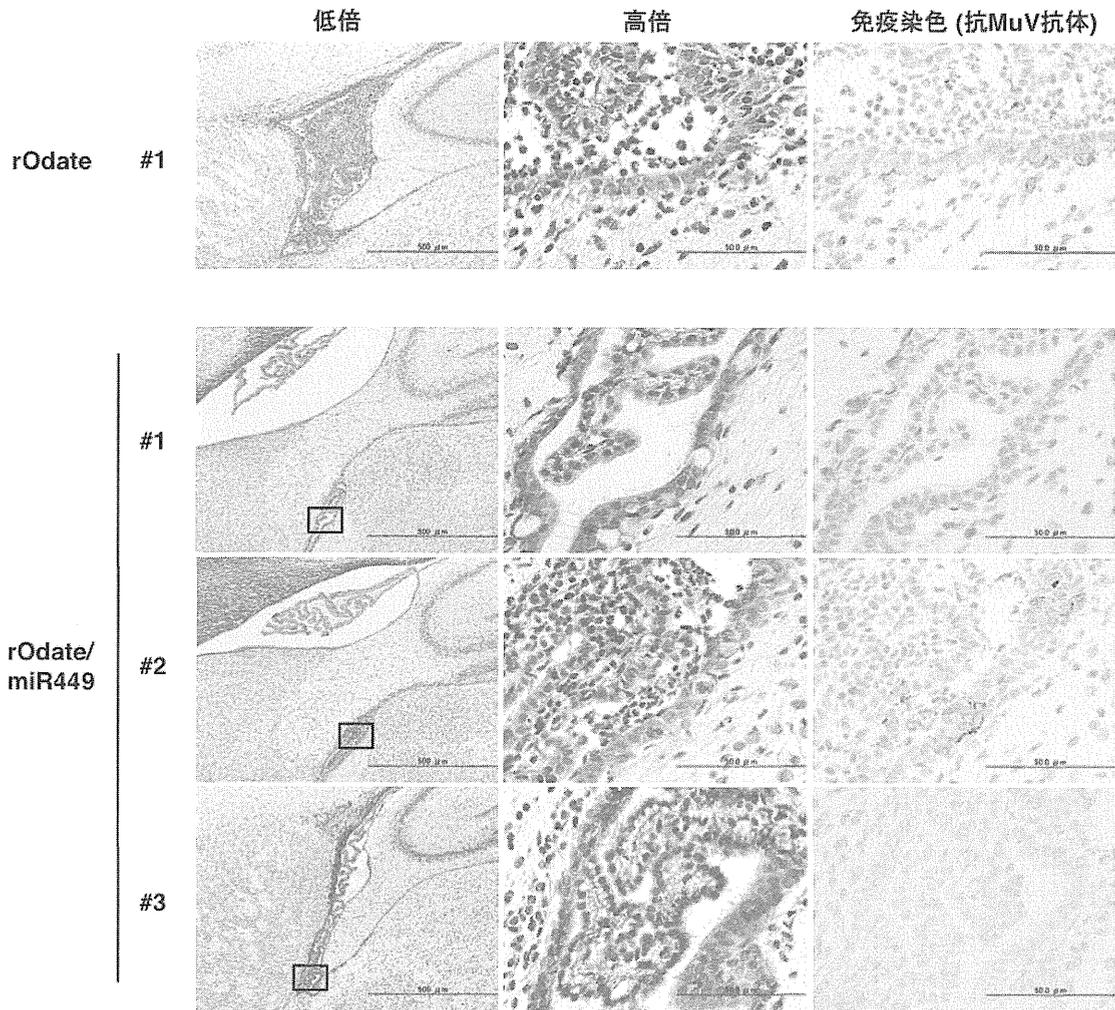


図4 rOdate および rOdate/miR449 接種ラットの脳の病理学的所見

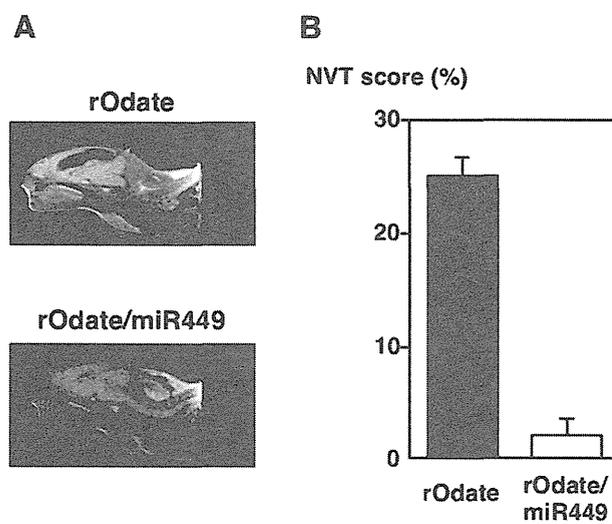


図5 rOdateおよびrOdate/miR449接種ラットのMRI画像(A) およびNeurovirulence test (NVT) score (B)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

No	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
1	Katoh H, Kubota T, Kita S, Nakatsu Y, Aoki N, Mori Y, Maenaka K, Takeda M, Kidokoro M.	Heat shock protein 70 regulates degradation of the mumps virus phosphoprotein via the ubiquitin-proteasome pathway.	J Virol.	<i>In press</i>		2014
2	<u>Kidokoro M</u> , Shida H.	Vaccinia Virus LC16m8Δ as a Vaccine Vector for Clinical Applications.	Vaccines	2	755-771	2014
3	Ohashi T, Nakamura T, <u>Kidokoro M</u> , Zhang X, Shida H.	Combined cytolytic effects of a vaccinia virus encoding a single chain trimer of MHC-I with a Tax-epitope and Tax-specific CTLs on HTLV-I-infected cells in a rat model.	Biomed Res Int.	2014	1-13	2014
4	庵原俊昭	ムンプス	小児科診療	77	164-166	2014
5	庵原俊昭	幼稚園における感染症の実態とその予防.	小児科診療	67	1997-2004	2014
6	庵原俊昭、落合 仁	ムンプスワクチン; 定期接種化への流れ.	臨床とウイルス	42	174-182	2014
7	Kashiwagi Y, Miyata A, Kumagai T, Maehara K, Suzuki E, Nagai T, Ozaki T, Nishimura N, Okada K, Kawashima H, <u>Nakayama T</u>	Production of inflammatory cytokines in response to diphtheria-pertussis-tetanus (DPT), haemophilus influenzae type b (Hib), and 7-valent pneumococcal (PCV7) vaccines.	Human vaccine & Immunother	10	677-685	2014
8	Kashiwagi Y, Maeda M, Kawashima H, <u>Nakayama T</u>	Inflammatory responses following intramuscular and subcutaneous immunization with aluminum- adjuvanted or non- adjuvanted vaccines.	Vaccine	32	3393-3401	2014
9	Yamaji Y, <u>Nakayama T</u>	Recombinant measles viruses expressing respiratory syncytial virus proteins induced virus-specific CTL responses in cotton rats.	Vaccine	32	4529-4536	2014
10	Kumagai T, Yoshikawa T, Shiraki K, Yoshida M, <u>Nakayama T</u> , Ihira M, Asano Y	Virus specific cell-mediated immunity may play a role in controlling reactivated human herpes virus 6B in patients under measles induced immunosuppression.	J Med Virol	86	658-665	2014
11	Kumagai T, <u>Nakayama T</u> , Okuno Y, Kase T, Nishimura N, Ozaki T, Miyata A, Suzuki E, Okafuji T, Okafuji T, Ochiai H, Nagata N, Tsutsumi H, Okamatsu M, Sakoda Y, Kida H, Ihara T	Human immune response to influenza A(H1N1) pdm2009 in patients with natural infection and in vaccine recipients in the 2009 pandemic.	Viral Immunol	27	368-374.	2014
12	Jin L, Orvell C, Myers R, Rota PA, <u>Nakayama T</u> , Forcic D, Hiebert J, Brown KE.	Genetic diversity of mumps virus and global distribution of the 12 genotypes.	Rev Med Virol	19	DOI:10.1002/rmv.18	2014

No	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
13	Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, Iwasaki T, Sata T, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N.	Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections..	Neuropath ology		doi: 10.11 11/ne up.12 171.	2014
14	Kato H, Kubota T, Kita S, Nakatsu Y, Aoki N, Mori Y, Maenaka K, Takeda M, Kidokoro M.	Heat shock protein 70 regulates degradation of the mumps virus phosphoprotein via the ubiquitin-proteasome pathway.	J. Virol.		<i>In press</i>	2014

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Review

Vaccinia Virus LC16m8 Δ as a Vaccine Vector for Clinical Applications

Minoru Kidokoro ^{1,†} and Hisatoshi Shida ^{2,†,*}

¹ Department of Virology III, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama-shi, Tokyo 208-0011, Japan; E-Mail: kidokoro@nih.go.jp

² Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University, Kita-15, Nishi-7, Kita-ku, Sapporo 060-0815, Japan

[†] These authors contributed equally to this work.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: hshida@igm.hokudai.ac.jp; Tel./Fax: +81-11-706-7543.

Received: 3 June 2014; in revised form: 16 September 2014 / Accepted: 28 September 2014 /

Published: 17 October 2014

Abstract: The LC16m8 strain of vaccinia virus, the active ingredient in the Japanese smallpox vaccine, was derived from the Lister/Elstree strain. LC16m8 is replication-competent and has been administered to over 100,000 infants and 3,000 adults with no serious adverse reactions. Despite this outstanding safety profile, the occurrence of spontaneously-generated large plaque-forming virulent LC16m8 revertants following passage in cell culture is a major drawback. We identified the gene responsible for the reversion and deleted the gene (*B5R*) from LC16m8 to derive LC16m8 Δ . LC16m8 Δ is non-pathogenic in immunodeficient severe combined immunodeficiency (SCID) mice, genetically-stable and does not reverse to a large-plaque phenotype upon passage in cell culture, even under conditions in which most LC16m8 populations are replaced by revertants. Moreover, LC16m8 Δ is >500-fold more effective than the non-replicating vaccinia virus (VV), Modified Vaccinia Ankara (MVA), at inducing murine immune responses against pathogenic VV. LC16m8 Δ , which expresses the SIV *gag* gene, also induced anti-Gag CD8⁺ T-cells more efficiently than MVA and another non-replicating VV, Dairen I minute-pock variants (DIs). Moreover, LC16m8 Δ expressing HIV-1 Env in combination with a Sendai virus vector induced the production of anti-Env antibodies and CD8⁺ T-cells. Thus, the safety and efficacy of LC16m8 Δ mean that it represents an outstanding platform for the development of human vaccine vectors.

Keywords: LC16m8 Δ ; LC16m8; vaccinia virus; reversion; *B5R*; MVA; DIs; SIV; HIV

1. Introduction

1.1. First-Generation Smallpox Vaccines

Smallpox was eradicated worldwide in the 1970s [1,2]. However, serious public health concerns due to the threat of bioterrorism [3] and natural outbreaks of monkeypox [4,5] at the start of the 21st century have highlighted the necessity for a vaccinia virus (VV)-based smallpox vaccine. Existing vaccine stockpiles have not been updated since the 1970s; because these early vaccines are lymph-derived vaccines produced by propagating vaccine viruses in the skin of animals (*i.e.*, first-generation vaccines (Table 1)), they do not meet good manufacturing practice (GMP) standards [6–8]. Therefore, they are at risk for adventitious microbial contamination. Moreover, these vaccines occasionally caused serious adverse effects (e.g., progressive vaccinia, eczema vaccinatum and post-vaccinial encephalitis) due to the pathogenicity of the vaccine viruses used [9,10].

Table 1. Smallpox vaccines and candidate vaccines classified according to generation.

Generation	Product	Platform	Parental Strain
First-generation	Lister/Elstree	Lymph-derived	Lister/Elstree
	Dryvax	Lymph-derived	NYCBH ^a
	Ikeda	Lymph-derived	Ikeda
	Dairen I	Lymph-derived	Dairen I
Second-generation	ACAM1000	Clonal virus grown in MRC-5 cells	<u>Dryvax</u>
	ACAM2000	Clonal virus grown in Vero cells	ACAM1000
	Elstree-BN	Lister/Elstree lymph-derived virus passaged in CEF ^b	Lister/Elstree
	CCSV	NYCBH lymph-derived virus passaged in MRC-5 cells	NYCBH
Third-generation	LC16m8 ^c	Minute-pock-forming, temperature-sensitive variant virus	Lister/Elstree
	IMVAMUNE (MVA ^d)	MVA571 additionally passaged in CEF	MVA571
	DIs ^e	Minute-pock-forming variant virus passaged in eggs	Dairen I
Fourth-generation	LC16m8Δ	Derived from LC16m8 by deleting the <i>B5R</i> gene	LC16m8
	NYVAC	Attenuated clonal Copenhagen strain generated by deleting 18 non-essential genes	Copenhagen

^a New York City Board of Health; ^b chicken embryo fibroblast; ^c Lister Clone 16m8; ^d Modified Vaccinia Ankara;

^e Dairen I minute-pock variants.

1.2. Second-Generation Vaccines

To address the issues outlined above, much effort has gone into developing safer smallpox vaccine candidates. Some studies aimed to generate vaccines using a sterile cell culture technique to reduce the risk of contamination by adventitious agents (second-generation vaccines) (see Table 1) [11]. For example, ACAM1000 [12,13] was propagated in MRC-5 cells (diploid human lung fibroblasts) using a single clone VV isolated from a Dryvax calf lymph vaccine (manufactured by Wyeth Laboratories using New York City Board of Health (NYCBH)). ACAM2000 was prepared in Vero cells under serum-free conditions using ACAM1000 as the seed virus [13,14]. The cell-cultured smallpox vaccine (CCSV), which was derived from a plaque-purified NYCBH strain, was also prepared in MRC-5 cells [15]. The Elstree-BN vaccine was manufactured in chicken embryo fibroblasts (CEF) using the Lister/Elstree

(Lister) strain, which was widely used as a lymph-derived vaccine in Europe, Africa and Asia during the global smallpox eradication campaign [16]. The manufacturing of vaccines in cell culture reduced the risk of vaccine contamination by extraneous agents. However, because second-generation vaccines were manufactured using first-generation vaccines or their isolates as seed viruses, their safety profiles were equivalent to those of the original lymph-derived vaccines, *i.e.*, they caused the same adverse events [13,15].

1.3. Third-Generation Vaccines

As the global smallpox eradication campaign progressed and the risk of contracting smallpox infections diminished, developed countries began to raise concerns about the side effects associated with lymph-derived smallpox vaccines. This triggered new research to develop alternative attenuated vaccines (third-generation vaccines), such as the Modified Vaccinia Ankara (MVA) [17,18], Dairen I minute-pock variants (DIs) [19] and Lister Clone 16m8 (LC16m8) [20–23]. The main method used to attenuate the VVs was serial passage in primary cell culture or eggs.

MVA was attenuated by serial passage of the chorioallantoic VV Ankara strain in CEF (>570 times). This resulted in the loss of approximately 15% of its genome, including host range-related genes, such as *KIL*, and some immunomodulatory genes, thereby generating a phenotype that is unable to replicate in most mammalian cells [24–26]. MVA, which shows an extremely attenuated phenotype in animals and humans [27], was administered to about 120,000 individuals in Western Germany and Turkey during the global eradication campaign with no apparent side effects [28]. Although its ability to protect against smallpox infection was not proven at that time, the need for a smallpox vaccine that was safe for use in immunocompromised individuals (including AIDS patients, patients treated with chemotherapy and transplant recipients) meant that MVA was examined in a number of clinical trials [29–33]. Data from these clinical trials and some animal experiments suggest that although MVA-derived vaccines have an extremely good safety profile; they are less immunogenic than replication-competent VVs, such as Dryvax, LC16m8 and LC16m8Δ [30,34–36]. For example, data from animal models show that multiple and 1–2 log higher doses of MVA are required to elicit antibody titers comparable with those elicited by replication-competent VVs [34–36].

The DIs strain originates from the Dairen I strain, a smallpox vaccine strain in Japan, and was isolated as a small-sized pock forming variant on chick chorioallantoic membrane (CAM) after 13 passages in one-day-old eggs [19]. As is the case with MVA, DIs harbors a large deletion within the left terminal region of the genome, which contains the host range genes, *KIL* and *C7L*, and the immunomodulatory gene, *K3L* [37]; consequently, DIs lacks the ability to replicate in a number of mammalian cell types. Although DIs showed a good safety profile when tested in field trials involving 200 Japanese children, it was not adopted as a smallpox vaccine, because it was less immunogenic than Lister Clone 16 (LC16).

Concerns regarding the side effects of first-generation smallpox vaccines, such as Ikeda, Dairen I and Lister were becoming a problem in Japan during the 1970s. In response to demands for a safer (but still effective) vaccine, the Chiba Serum Institute developed a highly attenuated strain, called LC16m8 [20,23]. LC16m8, which forms minute pocks on the CAM of embryonated eggs, was isolated from the Lister (Lister original, LO) strain via intermediate strains, such as LC16 and its derivative, LC16mO [23,38]. Tests in rabbit and monkey models showed that LC16m8 was markedly less neurovirulent than

first-generation vaccine strains, such as LO and Dryvax; indeed, its virulence was comparable with that of replication-defective DIs [21–23,39]. Moreover, LC16m8 induced a much weaker dermal reaction in rabbits and humans and showed a lower rate of febrile reactions than LC16mO (a direct parent of LC16m8) in clinical trials [23,40]. LC16m8 was administered to approximately 100,000 infants without any serious adverse reactions and proved to be as immunogenic as the parental LO strain [23,40]. Therefore, LC16m8 was adopted as the favored vaccine strain in Japan [40].

1.4. Fourth-Generation Vaccines

A number of novel attenuation approaches involving direct modification of the VV genome using genetic engineering techniques were used to develop highly attenuated VV strains (fourth-generation vaccines), such as NYVAC and LC16m8 Δ [6,34,41–46]. These methods replaced classical attenuation methods based on serial passage in primary cell cultures or eggs. NYVAC was derived from the Copenhagen VV vaccine strain by deleting 18 non-essential genes, which include *C7L* and *K1L*, the host range genes; the thymidine kinase gene, a gene related to viral DNA synthesis and the *I4L* gene encoding the large subunit of ribonucleotide reductase. Thus, NYVAC shows very restricted replication in mammalian cells and a highly attenuated phenotype in animals [41]. However, since the replication of NYVAC in non-permissive mammal cells is arrested at an early stage [47] (as is the case for avipoxviruses, such as canary poxvirus and fowl poxvirus), it elicits weaker immune responses than MVA or replication-competent VVs [48].

LC16m8 Δ should be categorized as a fourth-generation vaccine, because it was obtained from the parental smallpox vaccine strain (LC16m8) by deleting the *B5R* gene, which is responsible for the reversion of LC16m8. Consequently, it shows good genetic stability with very little (if any) reversion; however, it retains its ability to replicate in mammalian cells [34].

2. LC16m8 and *B5R*

Takahashi-Nishimaki *et al.* first identified the VV *B5R* gene, which is responsible for large-plaque formation and replication in Vero cells, during the course of investigating the mechanism of attenuation to generate LC16m8 [49]. LC16m8 harbors a frameshift mutation due to a single base deletion in the middle of its open reading frame (ORF); this mutation results in the loss of *B5R* function. *B5R* encodes a 42-kDa glycoprotein (B5 protein), which is involved in packaging the intracellular mature virion (IMV) within the trans-Golgi membrane or endosomal cisternae to form an intracellular enveloped virion (IEV) [50–52]. The IEV is transported along microtubules to the cell periphery [53,54], where it adheres to the cell membrane as a cell-associated enveloped virion (CEV). The B5 protein, in cooperation with the A36 and A33 proteins, also participates in the Src kinase-dependent formation of actin-containing microvilli and the subsequent release of the CEV from the cell surface to form an extracellular enveloped virion (EEV) [55,56]. Despite the relative paucity of whole progeny virions, EEVs play an important role in dissemination within the host [57]. Since anti-B5 antibodies neutralize EEV, *B5R*-expressing VV has been proposed as an effective smallpox vaccine [50,58–61].

When generating and performing basic research on LC16m8, we found that the vaccine spontaneously reverted to large-plaque-forming clones (LPCs) [34]. Thus, we were concerned that LPC contamination might ruin the safety profile of a future LC16m8 vaccine. Therefore, we investigated the

molecular mechanism(s) underlying the reversion, with a focus on the *B5R* gene associated with the formation of large plaques [49].

We isolated three LPC clones from a vaccine stock of LC16m8 and examined their phenotypes in terms of plaque size, dermal reactions in rabbits and pathogenicity in severe combined immunodeficiency (SCID) mice; these phenotypes were compared with those of LC16m8 and the parental virus LC16mO, which retains a fully-functional *B5R* gene. All three LPC viruses showed phenotypes similar to that of LC16mO, resulting in better growth in cell culture and greater virulence in SCID mice than LC16m8 [34]. As expected, sequencing the *B5R* in these LPCs revealed that the *B5R* ORF contained a single base insertion upstream of the nucleotide that was deleted from the LC16m8 *B5R*. It is noteworthy that the nucleotide insertion site in the LPC *B5R* ORF was different in each of the three clones, even though they originated from the same viral stock, which was prepared through only seven passages after the LC16m8 cloning. These results strongly suggest that the reversion of LC16m8 is a multi-clonal event and may occur frequently.

3. LC16m8Δ

3.1. Safety Profile

To prevent the generation of LC16m8 revertants, we decided to delete the entire *B5R* gene from the LC16m8 genome by homologous recombination to yield LC16m8Δ [34]. The phenotype of LC16m8Δ (plaque size and dermal reaction in rabbits) was similar to that of LC16m8. Intraperitoneal (i.p.) injection of 10^7 PFU of LC16m8Δ (a dose three logs higher than that needed to elicit protective immunity in BALB/c mice) did not cause any symptoms in SCID mice over an eight-week period (Figure 1). MVA and plaque-purified LC16m8 (which contains a very low level of revertants) were also nonpathogenic; however, LC16mO and m8*B5R* (a derivative constructed by reintroducing the intact *B5R* gene into LC16m8) caused severe rashes and death in SCID mice, even when administered at a dose two logs lower than LC16m8Δ (Figure 1).

Figure 1. Pathogenicity of *B5R*-defective viruses in severe combined immunodeficiency (SCID) mice. Figure modified from Kidokoro *et al.* [34].

