

分担研究報告書

蚊媒介性ウイルスの鑑別検査法の開発

全 lineage をカバーするウエストナイルウイルス遺伝子検出法の開発

所属 国立感染症研究所ウイルス第一部
研究分担者 田島茂

研究要旨

ウエストナイルウイルス感染症は北米を中心として患者が発生している蚊媒介性ウイルス感染症である。ウエストナイルウイルスの日本への侵入はまだ確認されていないが、諸要因による侵入・拡大に備え万全な検査体制を整備しておく必要がある。ウエストナイルウイルスは6種類の lineage に分類されるが、現在我々がウイルス同定に使用している検出系やその他国外の研究機関から発表された検出系が全てのウエストナイルウイルスに対応できているかは不明である。そこで本研究では、これら我々が有する現行、および最近発表された方法 (TaqMan qRT-PCR 法) が全 lineage に対応可能かを調べた。さらに新たな TaqMan qRT-PCR セットを開発し、その特異性および検出感度について考察した。その結果 1) 本研究により、現行のウエストナイルウイルス用プライマー・プローブセットでは、lineage によっては検出不能であることが明らかとなった。2) 最近報告されたウエストナイルウイルスゲノム検出法 (TaqMan 法) の有用性について検討したが、現行セットと同様検出不能な lineage があることがわかった。3) すべての lineage に対応可能な新規 TaqMan プライマー・プローブセットを開発した。本セットはすべての lineage のゲノムを高い感度で検出することができた。

A. 研究目的

ウエストナイルウイルス感染症 (ウエストナイル熱・ウエストナイル脳炎) は北米、ヨーロッパ、北・中央アフリカ、インドなどで患者が発生している蚊媒介性ウイルス感染症である。米国では 1999 年にウイルスが侵入後何度かの大流行が発生し、15 年以上経った 2015 年でも 1000 人を超える患者が発生している。ヒトのウエストナイルウイルス感染症に対するワクチンや薬剤はない。幸い日本国内への侵入は確認されていないが、諸要因により侵入した場合に備え、万全の検査体制を整えておく必要がある。ウエストナイルウイルスには lineage が 6 種類 (L1a, L1b, L1c/5, L2, L3, L4) 存在する。北米で蔓延しているのは L1a である。これまでヒトへの病原性が比較的強いものは 2 種類 (L1a, L1c/5) に限られると考えられてきた。しかし近年、L2 でも重篤な中枢神経症状を引き起こす株が同定され、さらに L1c/5 の分離株が以前よりも強毒性を示すとの報告がなされている。一方 L3 と L4 はヒトからは同定されていないが、今後どのように変異するかわからない。このような状況から、ウエストナイルウイルスの侵入に備え、すべての lineage に対応できるようにしなければならない。そこで本年度は、まずは現在我々が使用している、L1a 用に設計されたウエストナイルウイルスゲノム検出系 (リアルタイム RT-PCR) が他の

lineage に対応可能かを調べた。また、比較的最近報告されたウエストナイルウイルスゲノム検出系がどの程度広範の lineage に対応できるか検証した。さらに全 lineage をカバーできる新たなリアルタイム RT-PCR 系の開発を試みた。

B. 研究方法

RT-PCR によるウエストナイルウイルスゲノム検出のための鋳型には、NY99 株 (L1a), EGY101 株 (L1a), g2266 株 (L1c/5), FCG 株 (L2) を使用した。これらを実験室由来株化腎細胞 Vero 細胞に感染させたのち、培養上清から RNA を精製し使用した。

新規 TaqMan プライマー・プローブセットの特異性および感度を調べるために、ウイルスゲノムの NS2A 領域 (500 ヌクレオチド) の DNA を受託合成し、それを鋳型に mMESSAGING mMACHINE kit (Ambion) を使用して *in vitro* で RNA を合成した。合成 RNA は精製後 260nm での吸光度より濃度を算出し、希釈し使用した。

本研究で使用したプライマー・プローブは表 1 に示す。リアルタイム RT-PCR 反応は、RNA-direct Realyime PCR Master Mix (Toyobo) を使用して行った。ゲノムの増幅・検出・解析は StepOnePlus (Thermo) を使用した。また、SYBR Green I で検出する場合は、反応キットとして SuperScript III Platinum SYBR Green

One-Step qRT-PCR kit (Thermo)を使用し、増幅・検出・解析は LightCycler 2.0 (Roche)を使用した。

C. 研究結果

1) 現行のウエストナイルウイルスゲノム検出用プライマー・プローブセットの評価: 4 種類のウエストナイルウイルス株ゲノム RNA を使用して現行の 3 セット (5NCR, Env, 3NCR) ですべての株の検出が可能か調べた (図 1)。すべてのセットで L1a 株ゲノムを検出できた。しかしいずれのセットでも L1c/5 株ゲノムを検出できなかった。L2 株については、5NCR でのみ検出できたが感度は非常に低かった。上記のセットの他に、日本脳炎ウイルスゲノム検出用のプライマー・プローブセット (NS5) を使用したところ、4 種類のウエストナイルウイルスすべてのゲノムを検出できた (図 2)。

2) ウエストナイルウイルスゲノム検出法の評価: 2013 年に発表された 2 論文 (J. Virol. Methods 189: 321-327, J. Virol. Methods 193: 554-557) に示されているプライマー・プローブセット (WN-LCV, NS2A) を使用し、4 種類のウエストナイル株のゲノム検出を試みた (図 3, 4)。L1a 株の検出感度は WN-LCV が優っていたが、L2 株については NS2A の方が高感度であった。しかし共に L1c/5 株を検出できなかった。

3) 新規ウエストナイルウイルスゲノム検出用プライマー・プローブセットの開発: 全ての lineage のゲノムを増幅可能なプライマー・プローブセットを設計した。塩基配列を比較したところ、非構造蛋白質 NS2A 領域が lineage 間で相同性が高かったため、この領域を選択した。前述の 4 種類のウエストナイルウイルスゲノムを用い、様々なプライマーを試み、最終的に 1 セット (3538p-3490r) に絞り込んだ (表 2, 図 5)。この新規のセットは、すでに発表されている NS2A セットと標的部位が近接しているが、新規セットは L1c/5 株の増幅も可能であった。わずかに日本脳炎ウイルスゲノムにも反応した。次に、全ての lineage から 1 株選択し、各々の NS2A 領域の合成 RNA を作製した。それらを鋳型に使用し、新規セットの検出能を調べた (図 6)。高コピー数で鋳型に用いた場合、全ての lineage の RNA を検出することができた。しかしわずかながら日本脳炎ウイルスと Usutu ウイルスにも反応した。一方 NS2A セットは L1a, L1b 以外の lineage に対しては反応性が非常に低く、L1c/5 と L4 の RNA を検出することが出来なかった。各合成 RNA を階段希釈し、検出感度を調べた (図 7)。全ての lineage において、少なくとも 5 コピー/反応までは検出できることが確認された。日本脳炎ウイルスと Usutu ウイルスについてはそれぞれ 5×10^5 コピー/反応、 5×10^4 コピー/反応以下では検出されないことが確認された (表 3)。新規セットと合成 RNA を使用して検量線を作成して、3 種類のウエ

ストナイルウイルス株コピー数を算出した (図 8)。

D. 考察

本研究において我々はウエストナイルウイルスの全 lineage のゲノムを網羅的に検出可能な TaqMan プライマー・プローブセットの開発を試みた。その前に現行およびすでに公表されている検出系が全 lineage に対応できるのかを調べた。すると、ほとんどがアメリカ大陸で流行している L1a やそれに近縁の L1b には反応するものの、他の lineage には反応しないか、反応しても非常に感度が悪いことが明らかとなった。しかし、L1a 以外の株によるウエストナイル感染症の流行がヨーロッパやインドで起こっていることから、これらの lineage への対応も疎かにすることはできない。今回我々が開発したセットは、これまでのものと比べ高感度かつ広範のウイルスに対応できることが示され、非常に有用であると考えられる。ただ一つの欠点は、上記の優れた点があるがゆえに、ウエストナイルウイルスに近縁なウイルスも時に増幅してしまう点である。しかし、検出感度の差異は 10^4 - 10^5 もあり、注意すればあまり問題にならないと思われる。今後この新規セットが国内で広く用いられることを期待する。

現在はトガウイルス科アルファウイルス属のベネズエラ馬脳炎ウイルス、東部馬脳炎ウイルス、西部馬脳炎ウイルスに変え、これらのウイルスゲノムの検出系について解析を進めている。

E. 結論

1) 本研究により、現行のウエストナイルウイルス用プライマー・プローブセットでは、lineage によっては検出不能であることが明らかとなった。2) 最近報告されたウエストナイルウイルスゲノム検出法 (TaqMan 法) の有用性について検討したが、現行セットと同様検出不能な lineage があることがわかった。3) すべての lineage に対応可能な新規 TaqMan プライマー・プローブセットを開発した。本セットはすべての lineage のゲノムを高い感度で検出することができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

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

表 1. 本研究で使したプライマー・プローブセット

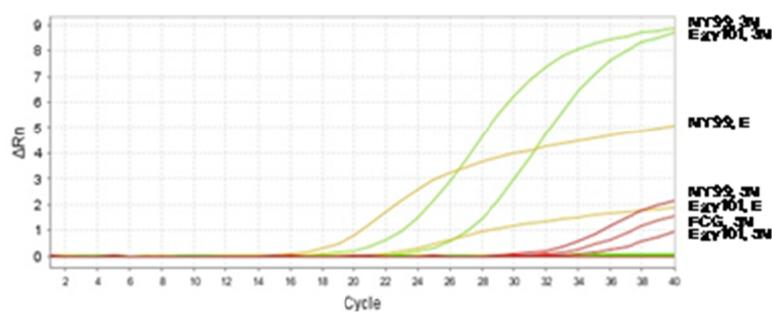
Primer	Sequence	Probe
WN5' NCR-f	CAGGAGGGCCCGGYAARA	WNV5' NCR-p: FAM-CCGGGCTGTCAATATGCTAAAACGCG-TAMRA
WN5' NCR-r	ATCAAGGACAAVMCGCGG	
WNENV-f	TCAGCGATCTCTCCAAAG	WNENV-p: FAM-TGCCCCGACC ATGGGAGAAGCT-TAMRA
WNENV-r	GGGTCAGCACGTTTGTTCATTG	
WN3' NC-f	CAGACCACGCTACGGCG	WN3' NC-p: FAM-TCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGAT-TAMRA
WN3' NC-r	CTAGGGCCGCGTGGG	
*WN-LCV-F1	GTGATCCATGTAAGCCCTCAGAA	S1: FAM-AGGACC CCACATGTT-MGB S2: VIC-AGGACCC CACGTGCT-MGB
*WN-LCV-R1	GTCTGACATTGGGCTTTGAAGTTA	
**NS2A-F	CCTTTTCAGYTGGGCCTTCTG	WNVpNS2A-3612: FAM-AGCCAAGATCA GCATGCCAGC-TAMRA
**NS2A-3R	CAGTGTAAGTVATRCCCCCAA	
WNVcommon.3451f	GGH TGT TGG TAT GGH ATG GA	WNVcom 3538p: FAM-ATGATTGAYCCTTTTCAGYTGGGCCTTCTG -TAMRA
WNVcommon.3590r	TC CTG GGT GGC CAA GAA CAC	

表 2. 新規 TaqMan プライマー・プローブの検討(ct 値)

Strain	pNS2A-3612	3538p			
		3491r	3490r	3493r	3496r
NY99 (L1a)	21.2	16.9	14.8	16.5	17.1
Egy101 (L1a)	23.9	21.0	19.2	20.7	21.2
g2266 (L1c/5)	ND	25.5	23.7	24.6	25.6
FCG (L2)	25.9	21.1	19.9	23.6	17.8
JEV Mie/41 (GI)	ND	31.7	ND	34.7	26.8
JEV JaTAn1/90 (GIII)	ND	30.0	ND	32.9	25.0
JEV Muar (GV)	ND	ND	35.1	33.8	24.6

表3. 3538p-3490r セットの検出感度の検討結果(ct 値)

Strain	5×10^7 *	5×10^6	5×10^5	5×10^4	5×10^3	5×10^2	5×10^1	5×10^0
NY99 (1a)	16.6	19.7	23.4	26.9	30.3	33.6	37.9	39.0
Kunjijin (1b)	17.6	18.1	21.6	25.1	28.3	31.6	34.7	38.7
India (1c/5)	13.0	16.6	20.1	23.1	27.0	30.5	34.0	36.0
Italy2011 (2)	14.2	17.9	21.0	24.5	28.5	31.7	34.7	36.6
Rabensburg (3)	12.9	16.1	19.3	21.5	26.5	29.3	33.6	34.8
LEIV (4)	15.9	19.1	22.5	26.0	29.3	32.6	35.5	38.8
Usutu V.	35.5	37.4	39.2	ND	ND	ND	NT	NT
JEV	36.5	39.2	ND	ND	ND	ND	NT	NT

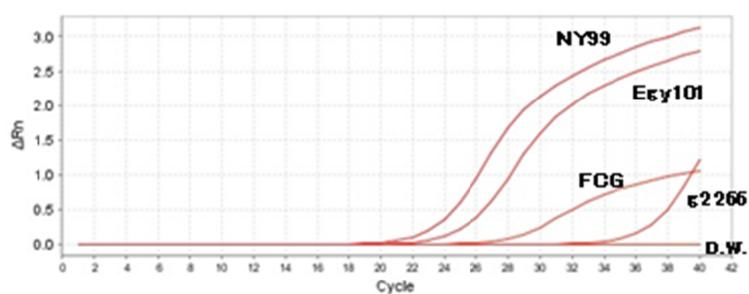


Ct value

Strain	5'NCR	Env	3'NCR
NY99 (L1a)	32.2	18.2	17.0
Egy101 (L1a)	36.0	24.0	21.8
g2266 (L1c/5)	ND	ND	ND
FCG (L2)	33.7	ND	ND

(genome: x100 cdl)

図1. 既存のプライマー・プローブセットを用いたウエストナイルウイルスゲノムの増幅



Strain	Ct value
NY99 (L1a)	23.3
Egy101 (L1a)	25.2
g2266 (L1c/5)	36.8
FCG (L2)	29.9

(genome: x100 dL)

図2. JEV 検出用プライマー・プローブセットを用いたウエストナイルウイルスゲノムの増幅

WN-LCV probe	Sequence
S1(for L1)	FAM-AGG ACC CCA CAT GTT-MGB
S2 (for L2)	VIC-AGG ACC CCA CGT GCT-MGB
S3	FAM-AGG ACC CCA CRT GY-MGB
S5	FAM-TCG GAA RGA GGA CCC-MGB

Strain	Ct value	
	S3	S5
NY99 (L1a)	20.5	19.14
Egy101 (L1a)	23.4	21.08
g2266 (L1c/5)	ND	ND
FCG (L2)	37.0	37.11
D1-4, CHIK	ND	ND
JE (GI)	ND	ND
ZKV	ND	ND

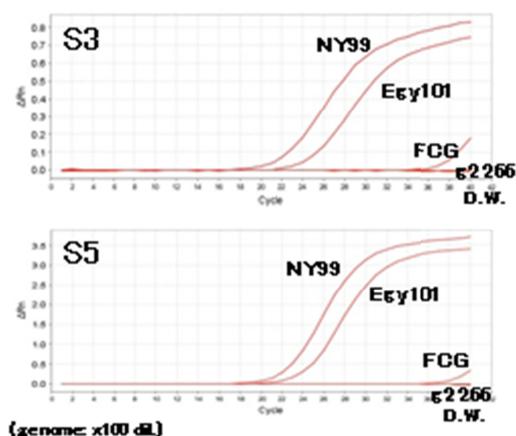


図3. 最近発表されたウエストナイルウイルス検出用プライマー・プローブセットの検討(1)

Probe	Sequence
WNV pNS2A-3612	FAM-AGCCAA GAT CAG CAT GCC AGC-TAMRA

Strain	Ct value
NY99 (L1a)	25.5
Egy101 (L1a)	27.0
g2266 (L1c/5)	ND
FCG (L2)	31.9
D1-4, CHIK	ND
JE (GI)	ND
ZKV	ND

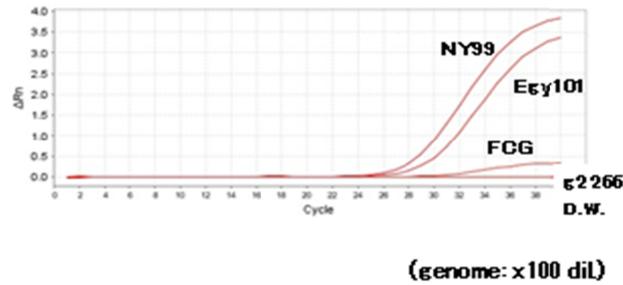


図4. 最近発表されたウエストナイルウイルス検出用プライマー・プローブセットの検討(2)

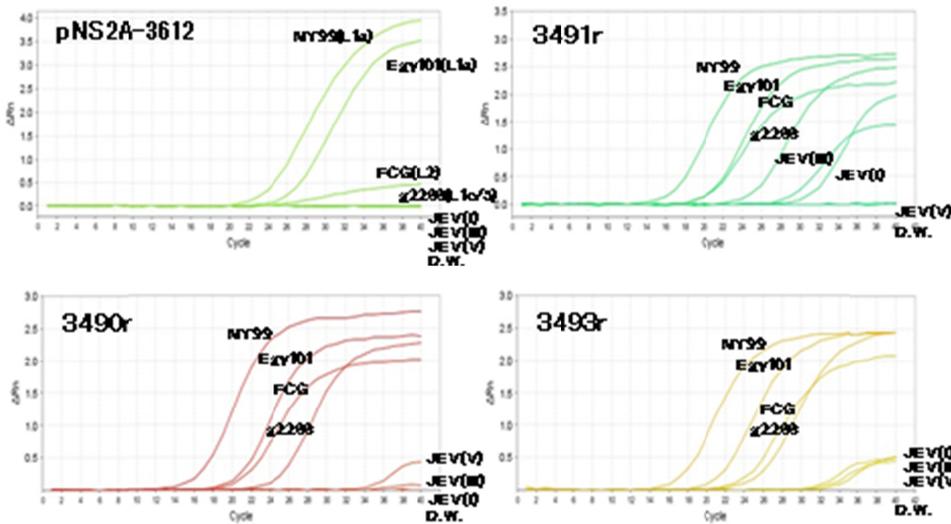


図5. 新規ウエストナイルウイルスゲノム検出用プライマー・プローブセットの検討

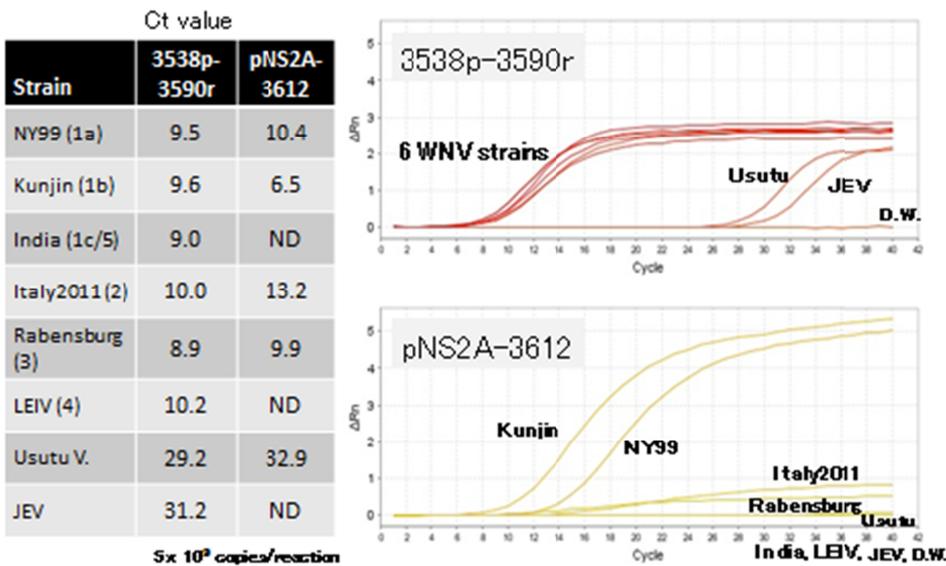


図6. 合成ウイルス RNA を用いたプライマー・プローブセット間の増幅性能の比較

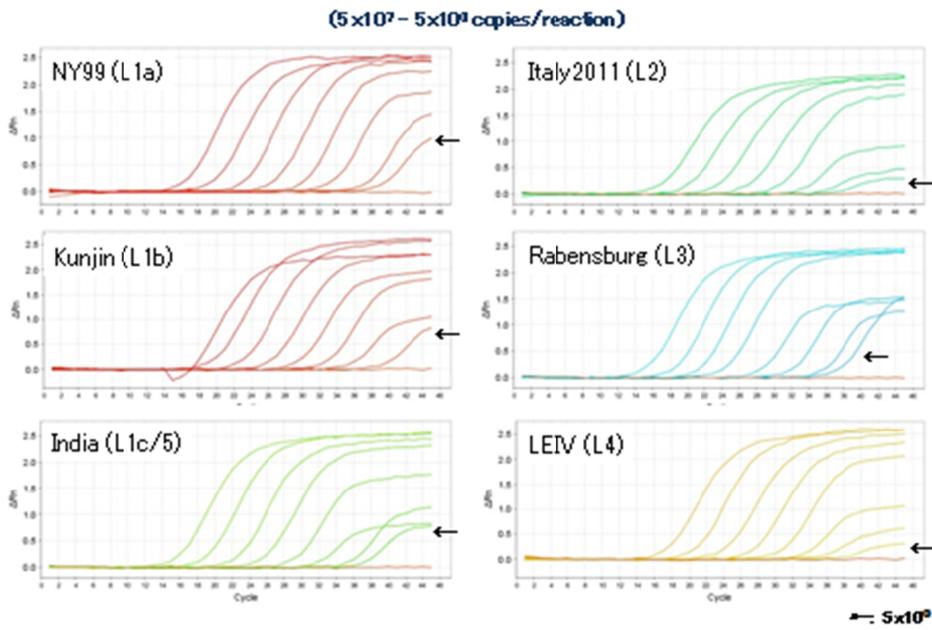


図7. 合成ウイルス RNA を用いた新規プライマー・プローブセットの検出感度試験

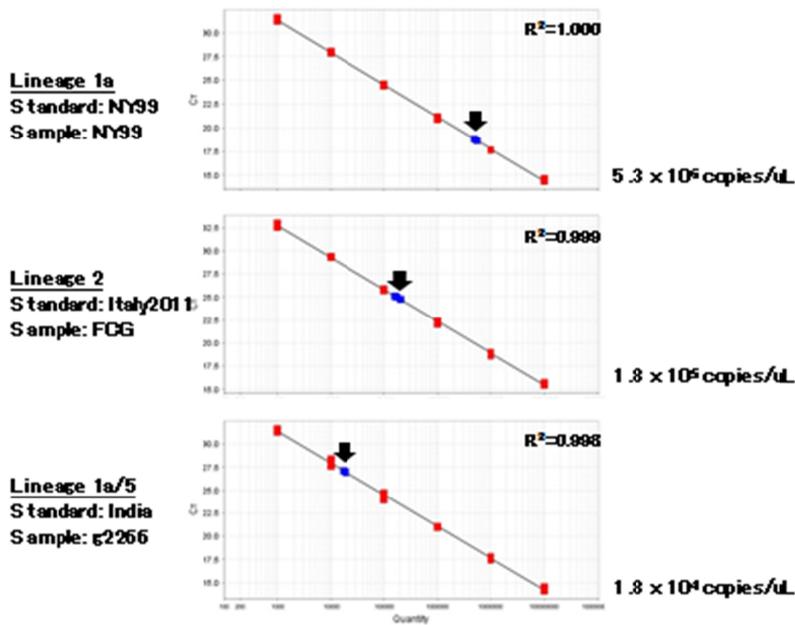


図8. 新規プライマー・プローブセットを用いたウエストナイルウイルス培養上清サンプル中のゲノムコピー数の算出

分担研究報告書

ウイルス性出血熱の検査法に関する研究

所属 国立感染症研究所ウイルス第一部
研究分担者 下島 昌幸

研究要旨

エボラ出血熱は急性熱性の感染症で、致死率は90%に達する。承認された治療法や予防法は無く、原因ウイルスであるエボラウイルスがバイオテロに利用される可能性は高い。国立感染症研究所ウイルス第一部では、エボラウイルスの診断法を整備しており、エボラ出血熱疑い事例発生時に備えている。一方、近年はエボラ出血熱の発生事例が相次ぎ、2013年末に始まった大規模流行はZaire型ではあるもののこれまでにない変異を持つエボラウイルスによるものであった。本研究では、準備しているエボラウイルスの検出方法で最近のエボラウイルスも検出するか試し、バイオテロ発生時に対応可能か検討した。

A. 研究目的

エボラ出血熱(近年ではエボラ熱ともいう)はフィロウイルス科エボラウイルス属に分類されるエボラウイルスによる急性感染症で、感染した人はインフルエンザ様症状を示したのちショック等を示し死亡する。エボラウイルスには Zaire ebolavirus, Sudan ebolavirus, Bundibugyo ebolavirus, Tai Forest ebolavirus の4つの病原性があるウイルス種と、人に病原性がない Reston ebolavirus が存在する。自然宿主はコウモリが有力視され、コウモリと、あるいは感染した他の動物(人も含む)との接触により人は感染すると考えられる。感染は血液や体液などウイルスを多量に含んだものとの直接の接触により感染は成立し、空気感染は起こらないとされる。Zaire ebolavirus による致死率は特に高く、感染者の90%が死亡することもある。中和抗体や小分子化合物などウイルスの増殖を抑制する抗ウイルス薬の開発や、組換えワクチンの開発が取り組まれているが、未だ承認された治療薬・予防法はない。患者の発生地域によっては医療や経済の破綻、社会のパニックも生じうる。これらのことからエボラウイルスがバイオテロに利用される可能性は高いと言える。

国立感染症研究所ウイルス第一部では、エボラウイルスを含め出血熱ウイルスの実験室診断法を整備している(病原体検出マニュアル)。この診断法は5つの全てのエボラウイルス種を検出するのみでなく、同じフィロウイルス科に属し高い致死率を持つマールブルグ病を引き起こす Marburg virus も検出可能である。国内のエボラ出血熱疑いの発生時にはこの診断法が用いられている。

2013年の末より西アフリカのギニアで始まったエボラ出血熱は隣国のリベリアやシエラレオネにも広まった。このエボラ出血熱は Zaire ebolavirus によるものであるが、ゲノム情報を見る限り病原体検出マニュアルで遺伝子検出の標的としている部位にこれまでにない変異を持つことが判明し、病原体検出マニュアルでは検出できないことが懸念された。

西アフリカで流行した Zaire ebolavirus Makona 株も含めた様々なエボラウイルス種のサンプルを用い、病原体マニュアルに記載の診断法でいずれのエボラウイルスも検出できるか検討した。

B. 研究方法

エボラウイルスの診断は病原体検出マニュアルに記載された conventional RT-PCR (nested), real time RT-PCR, 抗原検出 ELISA により行なった。Conventional RT-PCR (nested)で予想されるサイズの遺伝子が増幅された場合には塩基配列の決定も行なった。

サンプルは世界健康安全保障イニシアティブ(GHSI)内の世界健康安全保障グループラボラトリーネットワーク(GHSAG-LN)より得られた Ebola Proficiency Panel-II を用いた。これは Robert Koch Institute が Bernard Nocht Institute, Philipps University とともに作製したもので、陰性のもも含む11のサンプル(不活化済み)よりなるパネルである。

【倫理面への配慮】

該当なし。

C. 研究結果(図1)

サンプルより RNA を抽出し行なった conventional RT-PCR (nested) では, 11 のサンプルのうち No.1-No.10 が陽性であった。塩基配列を決定したところ, No.1 は 1976 年の初のエボラ出血熱の流行時に分離された Mayinga 株であった。No. 3-No.6, No.9 は 2003 年にガボンで流行した株であった。No.2, No.7, No.8 は西アフリカで流行した Makona 株であった。No.10 は Marburg marburgvirus の Marburg virus であった。

Real time RT-PCR では, No. 2, No.3, No.6, No.7, No.8 がそれぞれ 10 の 3.9, 4.6, 4, 4.3, 4.7 乗コピー/ml であった。他のサンプルは陰性であった。

抗原検出 ELISA では No.3, No.6, No.7, No.8 がそれぞれ 80, 10, 10, 80 の力価を示した。

No.11 のサンプルは conventional RT-PCR (nested), real time RT-PCR, 抗原検出 ELISA のいずれの方法でも陰性であった。

D. 考察

Ebola Proficiency Panel-II は複数の Zaire ebolavirus の株(西アフリカの Makona 株を含む)と Marburg marburgvirus, 1 つの陰性サンプルよりなっていた。5 つのサンプルは real time RT-PCR でウイルスゲノムコピー数を決定でき, そのうち高い値を示した 4 サンプルは抗原も検出された。

結果が正しいかは現在提供元に確認中であるが,

少なくとも現行の病原体検出マニュアルが最新の Makona 株も検出できることが判明した。また conventional RT-PCR (nested), real time RT-PCR, 抗原検出 ELISA の 3 つの診断法では感度はこの順に優れ, コピー数と抗原量は相関しリーズナブルな結果が得られることが判明した。

E. 結論

現行のマニュアルが知られているすべてのエボラウイルスを検出可能であることが確認でき, バイオテロ発生時に対応可能であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表
該当なし。
2. 学会発表
該当なし。

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。
3. その他
該当なし。

図 1. Proficiency panel – II for Ebola virus PCR diagnostics

Sample No	Results of Ebola virus PCR diagnostics	Copy numbers (Log10 copies/ml)	Comments	Sequence	Ag-ELISA
1	EBOV		Conv. PCR NP(+)	Mayinga	
2	EBOV	3.9	Conv. PCR FiloA/B (+), NP(+), Real-time PCR (+)	GIN/2014/Makona-C15	
3	EBOV	4.6	Conv. PCR FiloA/B (+), NP(+), Real-time PCR (+)	Gabon 2003	80
4	EBOV		Conv. PCR NP(+)	Gabon 2003	
5	EBOV		Conv. PCR FiloA/B (+)	Gabon 2003	
6	EBOV	4	Conv. PCR FiloA/B (+), NP(+), Real-time PCR (+)	Gabon 2003	10
7	EBOV	4.3	Conv. PCR FiloA/B (+), NP(+), Real-time PCR (+)	GIN/2014/Makona-C15	10
8	EBOV	4.7	Conv. PCR FiloA/B (+), NP(+), Real-time PCR (+)	GIN/2014/Makona-C15	80
9	EBOV		Conv. PCR FiloA/B (+)	Gabon 2003	
10	EBOV		Conv. PCR FiloA/B (+)	MARV Lake Victoria	
11	Negative				

分担研究報告書

弱毒痘そうワクチン LC16m8 株をポックスウイルス暴露後に接種した場合の
発症・重症化阻止効果について、エクトロメリアウイルスを用いたマウスモデルによる検討

所属 国立感染症研究所ウイルス第一部
研究分担者 吉河 智城

研究要旨

天然痘ウイルスは撲滅されたものの、バイオテロへの利用が懸念されている。天然痘には痘そうワクチンが有効であり、我が国では万が一の為に保管されている一方、未接種者の割合は 40 代以下の人口のほぼ 100%に達する。諸外国においても状況は似ている。故に天然痘ウイルス暴露された場合、事後に痘瘡ワクチンを接種することで発症、重症化を阻止できないかが検討されてきた。本研究では国産の弱毒痘そうワクチン株である LC16m8 を用いて暴露後重症化阻止が可能か検討を行う。まず、天然痘ウイルスの代わりに同じオルソポックスウイルスに属するエクトロメリアウイルス(ECTV)を用いたマウスモデル系を確立した。次に ECTV でマウスを攻撃する前後 3 日の間に LC16m8 株、またはその親株の Lister 株を接種して効果を検討した。その結果、ECTV 暴露 3 日前に Lister 株を投与した群でのみ発症・重症化阻止効果は確認できた。一方、ECTV 暴露後の LC16m8, Lister 株の投与による効果は確認されなかった。これは既報の研究結果と一致していないため、今後はより詳細な検討を行う予定である。

A. 研究目的

天然痘の撲滅が 1980 年に宣言されてから 40 年近くが経過した。だが、天然痘ウイルスのバイオテロへの利用が危惧されており、その脅威が無くなったわけではない。我が国においても 40 歳未満の殆どが未種痘で有効な免疫を保持していない。そこで、万が一天然痘ウイルスに暴露された場合に暴露後に痘瘡ワクチンを接種することで発症、重症化を阻止できないかが検討されてきた。無論、天然痘ウイルスは研究に使用できない。そこで既報の研究の多くはその代替となるエクトロメリアウイルス(ECTV)を用いたマウスモデルにて行われている。ECTV は天然痘ウイルス、ワクシニアウイルス(VACV)と同じオルソポックスウイルスに属し、血清学的にも交差性がある。既に VACV Lister 株及び Modified Vaccinia Ankara (MVA)株を用いた場合、ECTV 暴露後 3 日目の投与であっても重症化を阻止できることが報告されている (J Infect Dis. 2009 Jan 1;199(1):39-48.)。そこで本研究では、弱毒化細胞培養痘そうワクチン株である LC16m8 の暴露後ワクチンとしての効果を検討する。

B. 研究方法

まず、ECTV を用いたマウスモデルを確立した。ECTV は Hampstead 株を用いて i.n.経路における

C57BL/6 マウスでの LD50 を決定した。

次に 4LD50 相当の ECTV を i.n.経路で感染させた前後に VACV LC16m8, またはその親株である Lister 株を i.m.経路で 10^7 PFU 接種し、その発症・重症化阻止の効果を検討した。

【倫理面への配慮】

本研究にて行われた動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会の審議を受け適切であると承認されている。

C. 研究結果

1. C57BL/6 マウスにおける ECTV Hampstead 株を i.n. で接種した際の LD50 の決定

1 群 5 匹のマウスに 10^4 から 10^8 PFU/20ul の Hampstead 株を i.n.で接種し、観察、体重測定を行った。その生存曲線を図 1 に示す。この結果を元にプロビット法により計算した結果、LD₅₀ は 1200PFU であった。以降 ECTV の攻撃実験には 4LD₅₀ 相当、4800PFU の Hampstead 株を用いた。

2. ECTV 暴露後に LC16m8 株を接種した場合の発症・重症化阻止効果の検討

1 群 5 匹のマウスに 4LD50 の ECTV で攻撃を行った。その後 0, 1, 2, 3 日後に 10^7 PFU/100ul の LC16m8 株を i.m.で接種し、観察、体重測定を行っ

た。図2, 図3にスケジュール及びその結果を示す。LC16m8 を接種した, いずれの群においても対照群である ECTV の攻撃のみを行った群と比較して有意な発症や重症化の阻止効果は確認できなかった。

3. ECTV 暴露前後に Lister 株を接種した場合の発症・重症化阻止効果の検討

実験 1 で期待する効果が確認できなかったことから, 今度は既報である Lister 株を用いた実験を行った。1 群 5 匹のマウスに 4LD₅₀ の ECTV で攻撃を行った。その前後 -3, 0, 1, 2, 3 日後に 10⁷PFU/100ul の Lister 株を i.m. で接種し, 観察, 体重測定を行った。図4, 図5にスケジュール及びその結果を示す。ECTV 攻撃 3 日前に Lister 株を接種した群は ECTV 感染に伴う臨床症状を示すことなく全頭生存した。一方で, それ以外の群, つまり ECTV 攻撃後に Lister 株を接種した場合, いずれの群においても対照群である ECTV の攻撃のみを行った群と比較して有意な発症や重症化の阻止効果は確認できなかった。

D. 考察

本研究では, ECTV 暴露後に VACV を接種した場合の発症・重症化阻止を検討したものの, 有意な効果を確認することはできなかった。これは既報の研究と結果が異なる。そこで, 既報の研究と本研究における実験条件の違いを図6に示す。殆どの部分で実験条件は近似している。VACV は既報では MVA と Lister, 本研究では LC16m8 と Lister の 2 株を使用した。従って少なくとも Lister 株は共に使用しており, この部分で結果が一致しないとすれば, 最大の違いは

使用した ECTV の株が異なることだと考えられる(図6の赤字強調部分)。ECTV にはいくつかの株が存在することが知られており, 本研究では既報で使用している Moscow 株ではなく Hampstead 株を用いている。LD₅₀ はそれぞれ 80PFU, 1200PFU と 10 倍以上異なることから, 病原性にも差があることが示唆される。そこで, 我々は Moscow 株を入手した。今後は Moscow 株を用いて既報の実験条件を近似した状況で再度実験を行い, その再現性を検討する予定である。また, それを足がかりに ECTV 暴露後の VACV 接種の効果の有無を含めて, より詳細に検討を行う予定である。

E. 結論

ポックスウイルス暴露後に VACV 接種した場合の発症・重症化阻止効果を検討するため, エクトロメリアウイルスを用いたマウスモデル系を確立した。確立した系を用いて検討した結果, 現時点ではポックスウイルス暴露後に VACV 接種した場合の発症・重症化阻止効果は確認できなかった。これは既報の研究結果と一致していないため, 今後より詳細な検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 既報の研究と本研究の実験条件の違い

	既報	本研究
Mouse	C57BL/6	C57BL/6
ECTV strain	Moscow	Hampstead
Dose	3LD ₅₀ (240PFU)	4LD ₅₀ (5000PFU)
Root of infection	i.n.	i.n.
VACV strain	MVA, Lister	LC16m8, Lister
Dose	10 ⁶ or 10 ⁸	10 ⁷
Root of infection	i.m.	i.m.

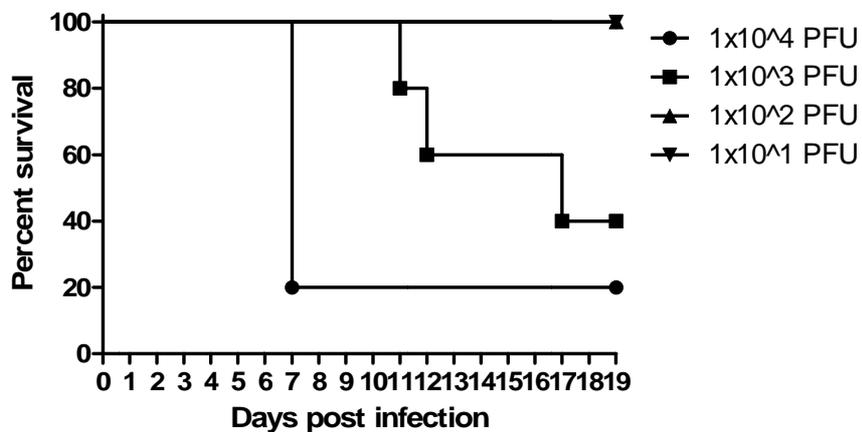


図 1. ECTV Hampstead 株を i.n. で接種された C57BL/6 マウスの生存曲線

ECTV strain Hampstead
 4LD50 (5000PFU) /20ul/i.n
 C57BL/6 (Female, 8 wks)

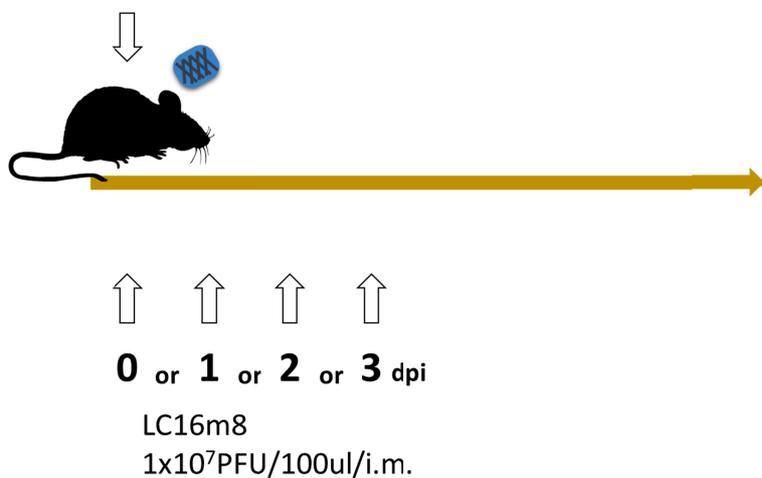


図 2. EVTV 暴露後に LC16m8 株を接種した場合の発症阻止効果の検討

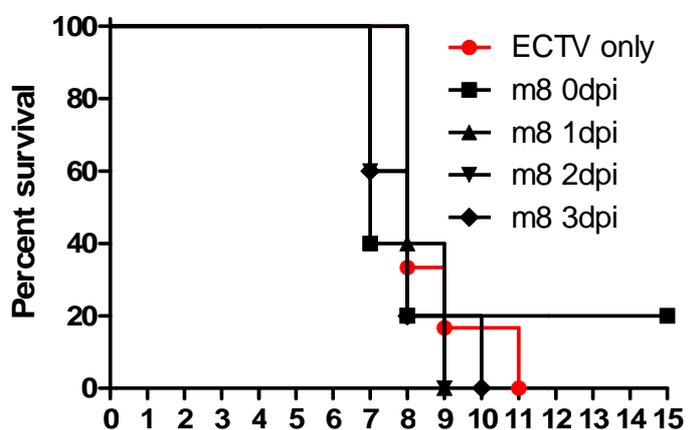


図 3. EVTV 暴露後に LC16m8 株を接種した場合の発症阻止効果の検討結果

ECTV strain Hampstead
 4LD50 (5000PFU) /20ul/i.n
 C57BL/6 (Female, 8 wks)

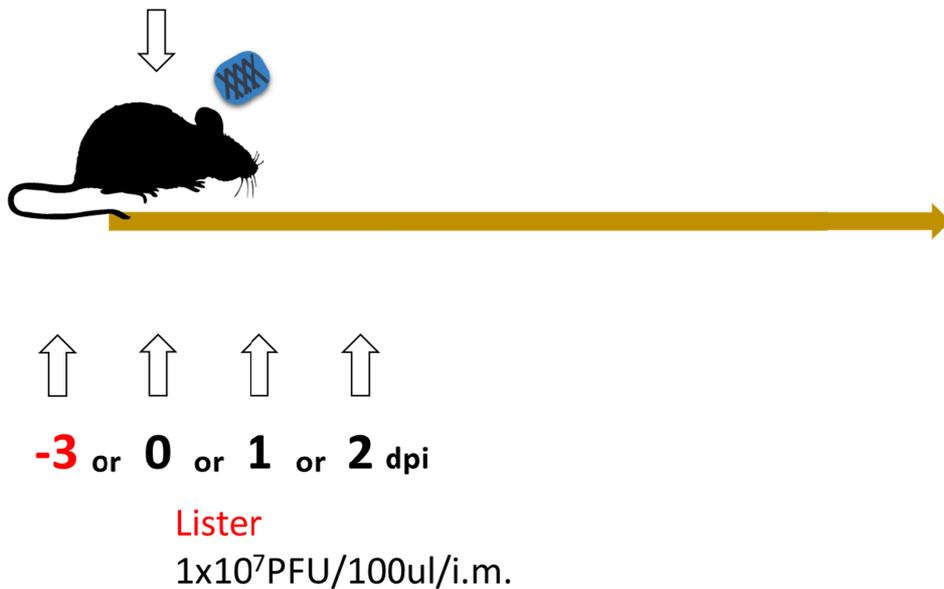


図 4. ECTV 暴露後に Lister 株を接種した場合の発症阻止効果の検討

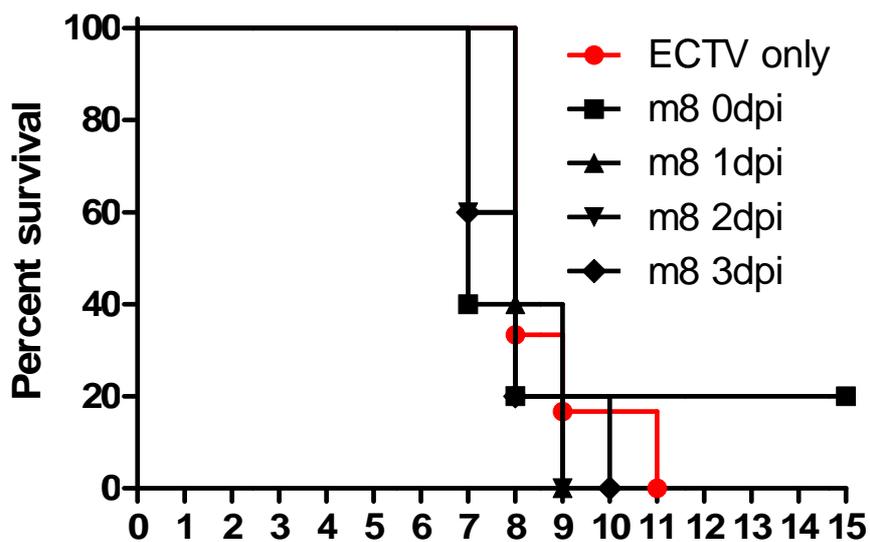


図 5. ECTV 暴露後に Lister 株を接種した場合の発症阻止効果の検討結果

分担研究報告書

細胞培養弱毒生痘そうワクチンの特性解析(遺伝子機能解析), 品質試験法に関する研究

所属 国立感染症研究所獣医科学部
研究分担者 森川茂

研究要旨

Lister 株から低温馴化により LC16 株, LC16mO 株を經由して樹立された安全性の高いワクチン株である LC16m8 株は, 継代培養するとプラークサイズのやや大きい LC16mO 型 (medium size plaque; MSP) のウイルスが出現する。これまでの解析から, MSP は B5R の一塩基欠失を相補する変異ウイルスであり, その変異のパターンが複数あることが分かっている。これまでに, バイオアッセイで得られる MSP の出現頻度やパターンの解析が次世代シーケンス (NGS) 解析により得られることを示した。NGS 解析は取得データの処理に比較的時間を要することから, これまでの MSP の変異パターン解析で得られた主要な MSP を定量的に検出可能な PCR 法を開発することを試みた。その結果, MSP の遺伝子変異特異的配列を 3' 末端とする primer を用いた PCR で, LC16m8 株と特定の MSP を識別できた。そこで, 主要タイプの MSP を特異的に検出する PCR を用いて, LC16m8 株と MSP を混合したスパイク試験を実施した結果, MSP 含有率 0.01~1% まで検出できた。さらに RNase H2-dependent PCR により, より特異度の高い MSP 検出 PCR が開発された。今後, 主要な MSP を定量的に検出可能な real-time PCR を行う予定である。

研究協力者

朴ウンシル, 宇田晶彦 (国立感染症研究所獣医科学部)
吉河智城, 西條政幸 (同ウイルス第一部)
倉根一郎 (同所長)
横手公幸, 金原知美, 丸野真一, 新村靖彦 (化血研)

A. 研究目的

細胞培養痘そうワクチンの製造株であるワクシニアウイルス LC16m8 株は, Lister 株から低温馴化により LC16 株, LC16mO 株を經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。Lister 株は 41 以上でも初代ウサギ腎細胞でのプラーク形成能があるのに対し, LC16mO 株と LC16m8 株は 41 ではプラークを形成しない (増殖温度感受性)。LC16m8 株は, *b5r* 遺伝子に 1 塩基欠損があるため, 正常な B5 蛋白質が作られないために初代ウサギ腎細胞におけるプラークサイズが小さい。LC16m8 株を継代するとプラークサイズのやや大きい

LC16mO 型のウイルス (medium size plaque; MSP) が出現する。これまでの解析から, これらは LC16mO 型への復帰株ではなく, *b5r* の一塩基欠失を相補する変異ウイルスであり, その変異のパターンは複数あることが分かっている。これまでに, 次世代シーケンス (NGS) 解析によりバイオアッセイで得られた MSP の情報と同等の成績が得られることを明らかにした。NGS 解析は取得データの処理に比較的時間を要することから, これまでの MSP の変異パターン解析で得られた主要な MSP を, 定量的に検出可能な PCR 法を開発し, 品質管理に資する情報を提供することを目的とした。

B. 研究方法

1. MSP を検出する PCR 法の検討:

LC16m8 株のウイルス標本中に含まれる MSP の含有率を測定するには, 主要なタイプの MSP の含有率を測定すれば良いと考えられる (図 1, 表 1)。そこで, mutation specific primer PCR 法, RNase H2-dependent PCR 法を検討した。

1) Mutation specific primer PCR による MSP の検出法: この PCR では片側のプライマーに MSP の型特異的プライマーを設定した (図 2)。各 MSP を特異的に検出できる条件検討 (PCR enzyme, プライマーの長さ,

Tm, cycles等)し, 指摘条件を求めた. MSPとLC16m8株と段階混合してスパイク試験を行い, 有用性を検討した.

2) RNase H2-dependent PCRによるMSPの検出法:

この方法は, 各MSP特異的DNA/RNA hybrid primers (rhPCR用primers), RNase H2および専用のbufferをPCR enzymeに添加してPCRを行う(図4). この方法では, 図4に示すように本来のprimer領域に1塩基のSNP特異的RNAを挟んで4塩基のmatching DNA塩基, 1塩基のmismatch DNA塩基からなる(rhPCR用primers)を用いてPCRを行う. RNAと相補的なDNA塩基があるとRNase H2によりprimerのDNA-RNA間が切断されて機能的primerとなりDNA合成反応がおきる. PCRに用いる酵素の3' 5' exonuclease活性による影響がないため, 1)のmutation specific primer PCRによるPCRと比較してより特異的にSNPが同定できる特徴を持つ. 本法により, 非特異反応がより出難いMSP検出用PCR法の確立を試みた.

【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.

C. 研究結果, 及びD. 考察

これまでの研究により, MSPはLC16m8株のb5r遺伝子の1塩基欠失を相補するような1ないし4塩基挿入によることが分かっている. また, MSPに認められるb5r遺伝子の変異には10種類ほどあるが, 主要なMSPは4ないし5種類であり, これらがMSPの85%程度をしめる(図1, 表1). このため, 幾つかの主要なMSPタイプの含有率を定量的に検出できるPCRを開発すれば, ワクチンの品質管理に応用可能と考えられる. 昨年度に, 種々のPCR法を検討した結果, mutation specific primer PCR法が各MSPを最も効率よく検出できる可能性が見出された. そこで, 主要なMSPを構成するL1(267位にA挿入), L2(267位にC挿入), L4(272位にT挿入)及びL5(274位にATACの重複で4塩基挿入)(図1, 表1)の検出を試みた.

1) Mutation specific primer PCRによるMSPの検出法:

昨年度は, primeSTAR GXL DNA polymerase (Takara)を用いたPCRを行い, L2の検出が可能であることを示した. しかし, 検出感度を上げるためにPCRのcycle数を増やすと, 非特異反応により非MSP由来産物も増幅されてくる. その原因は, primeSTAR GXL DNA polymeraseの強い3' 5' exonuclease活性によりプライマーの末端が削られる

からと考えられた. そこで, 3' 5' exonuclease活性の弱いTaq DNA polymerase由来酵素によるillustra puRe Taq ready-to-go PCR beads (GE healthcare)を用いて, 同様のPCRを行った結果, 特異性および感度が向上した. そこで, illustra puRe Taq ready-to-go PCR beadsによるPCRで主要なMSPを検出するためのprimersを検討した. 変異部位特異的primerの長さを17merから22merまで替えて検討した結果, L1(267A), L2(267C)およびL4(272T)のMSP検出には長さが18merのprimerを, L5(274ATAC)のMSP検出には19merのprimerを用いた場合に, 最も効率よくMSPが検出できた(図2). これらの各MSP特異的PCRは, LC16m8, LC16mO, 他のMSPに対しては20から25cyclesのPCRでは非特異的増殖が認められず, 特異性が高いことが検証された(図3). しかし, 30cycles以上のPCRでは非特異的反応が生じた.

そこで, 各MSPに特異的なmutation specific primer PCRによるMSP検出感度を検証するために, LC16m8株DNAに各MSPのDNAを種々の割合で混合したサンプルを用いたスパイク試験を実施した. その結果, 20から25cyclesのPCRでは, L1, L2およびL4型MSPでは, 0.01%の頻度まで検出可能で, L5型MSPでは1%の頻度まで検出可能であった(表2).

2) RNase H2-dependent PCR (rhPCR)によるMSPの検出法:

Mutation specific primer PCRでは, 実用上十分の感度と特異度でMSPを検出できたが, より精度の高いPCRの開発を試みた. 図4に示すようなL1, L4およびL5MSP特異的DNA/RNA hybrid primers (rhPCR用primer)でrhPCRを行った. その結果, L1, L4およびL5特異的rhPCRとも, LC16m8, LC16mO, 他のMSPに対しては40cyclesでも非特異的増殖が認められず, 特異性が非常に高いことが検証された(図5). 本法では, mutation specific primer PCRと比較して, より特異度・検出感度の高いMSP検出が可能と考えられる. 今後, LC16m8と各MSPのDNAのスパイク試験を行い, 検出感度の検定を行い, 乾燥細胞培養痘そうワクチンV03, V07およびV09由来DNAを用いて実証試験を実施する予定である. また定量的なSybrGを用いたreal-time PCRへの応用も行う予定である.

上記の結果から, mutation specific primerによるPCRおよびrhPCR法によりMSPの特異的検出が可能となると予想される. 最終的にはMSP検出のバイオアッセイと比較して有用性を明らかにしたい.

E. 結論

乾燥細胞培養痘そうワクチンは, quasispeciesから

なる Lister 株による第1世代の calf lymph ワクチンの製造用ワクチニアウイルスから、低温培養により温度感受性株で小ポックサイズを形成する株として選択された LC16m8 株をウサギ初代腎細胞で増殖して製造される。少ポックサイズは *b5r* 遺伝子の 274 位の G の欠損によることが分かっているが、この欠損を相補するような変異挿入変異が導入されたものが LC16mO 株用のプラーク形成能を持ち MSP と呼ばれる。MSP の含有率を定量することはワクチンの品質管理のうえでも有用であると考えられる。MSP の含有率および遺伝子型は、バイオアッセイと次世代シーケンサーによる解析でよく一致した。そこで主要な MSP 遺伝子型を検出する PCR による MSP の定量法により、より簡便、迅速に MSP 含有率が求められ品質管理条有用であると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tani H, Fukuma A, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Iwata-Yoshikawa N, Sato Y, Suzuki T, Nagata N, Hasegawa H, Kawai Y, Uda A, Morikawa S, Shimojima M, Watanabe H, Saijo M. Efficacy of T-705 (Favipiravir) in the treatment of infections with lethal severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *mSphere*, 1 (1): e00061-15.
- 2) Hotta A, Tanabayashi K, Fujita O, Shindo J, Park CH, Kudo N, Hatai H, Oyamada T, Yamamoto Y, Takano A, Kawabata H, Sharma N, Uda A, Yamada A, Morikawa S. Survey of *Francisella tularensis* in Wild Animals in the Endemic Areas in Japan. *Jpn J Infect Dis.* in press
- 3) Ogawa K, Komagata O, Hayashi T, Itokawa K, Morikawa S, Sawabe K, Tomita T. Field and laboratory evaluations of the efficacy of DEET repellent against *Ixodes* ticks. *Jpn J Infect Dis.* in press
- 4) Okutani A, Osaki M, Takamatsu D, Kaku Y, Inoue S, Morikawa S. Draft genome sequences of *Bacillus anthracis* strains stored for several decades in Japan. *Genome Announc.* 2015, 3(3). pii: e00633-15.
- 5) Sakai K, Hagiwara K, Omatsu T, Hamasaki C, Kuwata R, Shimoda H, Suzuki K, Endoh D, Nagata N, Nagai M, Katayama Y, Oba M, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Mizutani T, Maeda K. Isolation and Characterization of a Novel Rhabdovirus from a Wild Boar (*Sus scrofa*) in Japan. *Vet Microbiol*, 2015, 179(3-4):197-203.
- 6) Hamamoto N, Uda A, Tobiume M, Park CH, Noguchi A, Kaku Y, Okutani A, Morikawa S, Inoue S. Association between RABV G Proteins Transported from the Perinuclear Space to Cell Surface Membrane and N-glycosylation of the Sequon at Asn204. *Jpn J Infect Dis.* 2015, 68(5): 387-93.
- 7) Yoshikawa T, Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Singh H, Suda Y, Shirabe K, Toda S, Shimazu Y, Nomachi T, Gokuden M, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Uramoto M, Osako H, Kida K, Takimoto H, Kitamoto H, Terasoma F, Honda A, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M. Phylogenetic and Geographic Relationships of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in China, South Korea, and Japan. *J Infect Dis.* 2015, 212(6): 889-98.
- 8) Okamoto M, Miyazawa T, Morikawa S, Ono F, Nakamura S, Sato E, Yoshida T, Yoshikawa R, Sakai K, Mizutani T, Nagata N, Takano J, Okabayashi S, Hamano M, Fujimoto K, Nakaya T, Iida T, Horii T, Miyabe-Nishiwaki T, Watanabe A, Kaneko A, Saito A, Matsui A, Hayakawa T, Suzuki J, Akari H, Matsuzawa T, Hirai H. Emergence of infectious malignant thrombocytopenia in Japanese macaques (*Macaca fuscata*) by SRV-4 after transmission to a novel host. *Sci Rep.* 2015, 5:8850.
- 9) Ching PK, de los Reyes VC, Sucaldito MN, Tayag E, Columba-Vingno AB, Malbas FF Jr, Bolo GC Jr, Sejvar JJ, Eagles D, Playford G, Dueger E, Kaku Y, Morikawa S, Kuroda M, Marsh GA, McCullough S, Foxwell AR. Outbreak of Henipavirus Infection, Philippines. *Emerg Infect Dis.* 2015, 21(2): 328-31.
- 10) Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Suda Y, Maeda K, Takahashi T, Morikawa S, Saijo M. Effects of ribavirin on severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. *Jpn J Infect Dis.* 2014, 67(6): 423-7.
- 11) Orba Y, Sasaki M, Yamaguchi H, Ishii A, Thomas Y, Hang'ombe BM, Mweene AS, Morikawa S, Saijo M, Sawa H. Orthopoxvirus infection among wildlife in Zambia. *J Gen Virol.* 2015, 96 (Pt 2): 390-4.

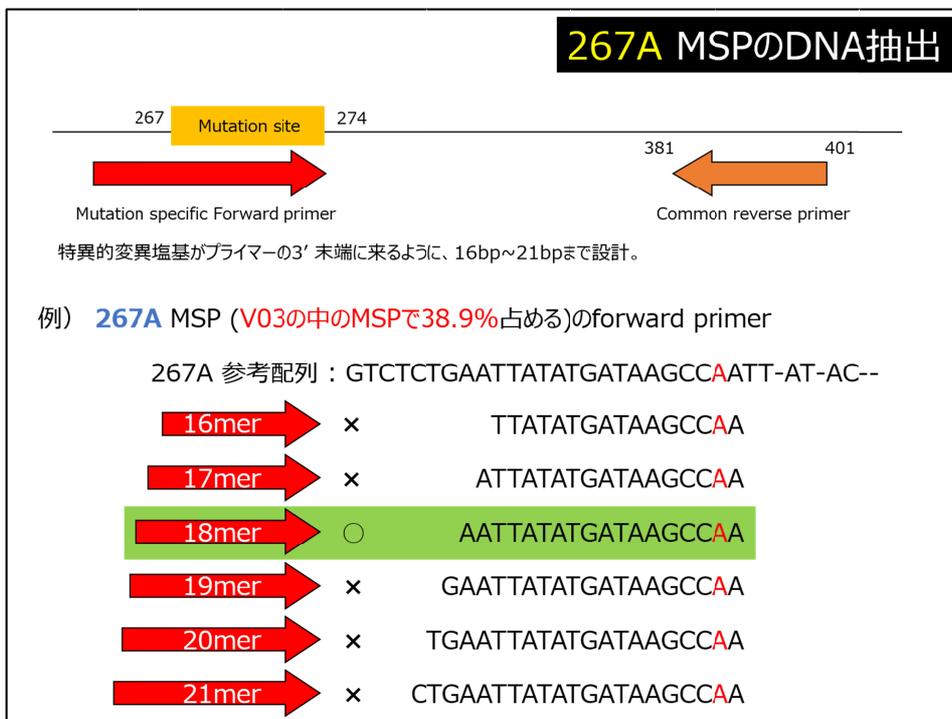


図2. Mutation-specific primer PCR による L1 型 MSP の検出. 種々の長さの変異部位特異的 primers を検討した結果, L1, L2, L4 型 MSP には 18mer primer が, L5 型 MSP には 19mer primer が最適であった.

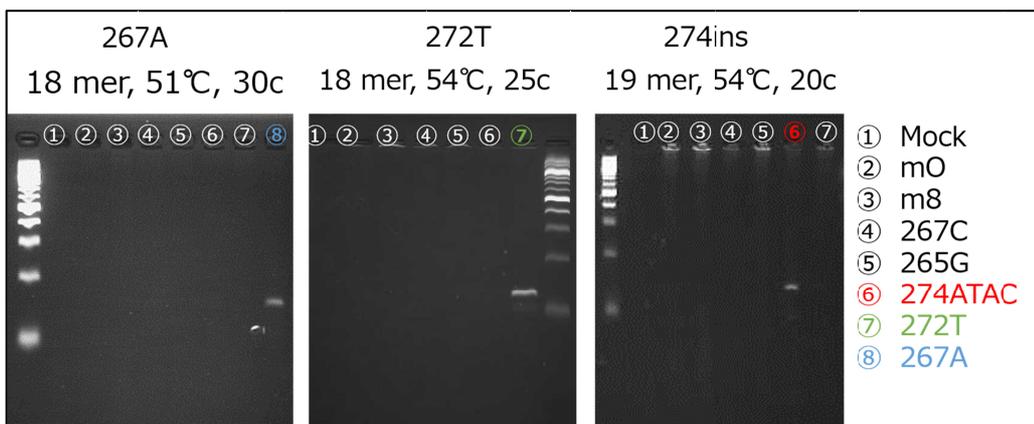


図3. Mutation specific primer PCR による L1, L4 および L5 型 MSP の特異的検出. 各 MSP 特異的 PCR は, LC16m8, LC16mO, 他の MSP に対しては 25cycles までは非特異的増殖が認められず, 特異性が高いことが確認された.

表2. Mutation specific primer PCR による各 MSP 検出のまとめ

MSP	DNA polymerase	Primer	Tm (°C)	Cycles	MSP含率 (%)	検出限度 MSP含率 (%)
267C	PCR RTG beads	18 mer	53	20~30	6.6	0.01
267A	PCR RTG beads	18 mer	51	20~30	38.9	0.01
272T	PCR RTG beads	18 mer	54	25	20.6	0.01
274ATAC	PCR RTG beads	19 mer	54	20	12.8	1

L1, L2, L4 では, 頻度 0.01%でも MSP を検出可能であった.

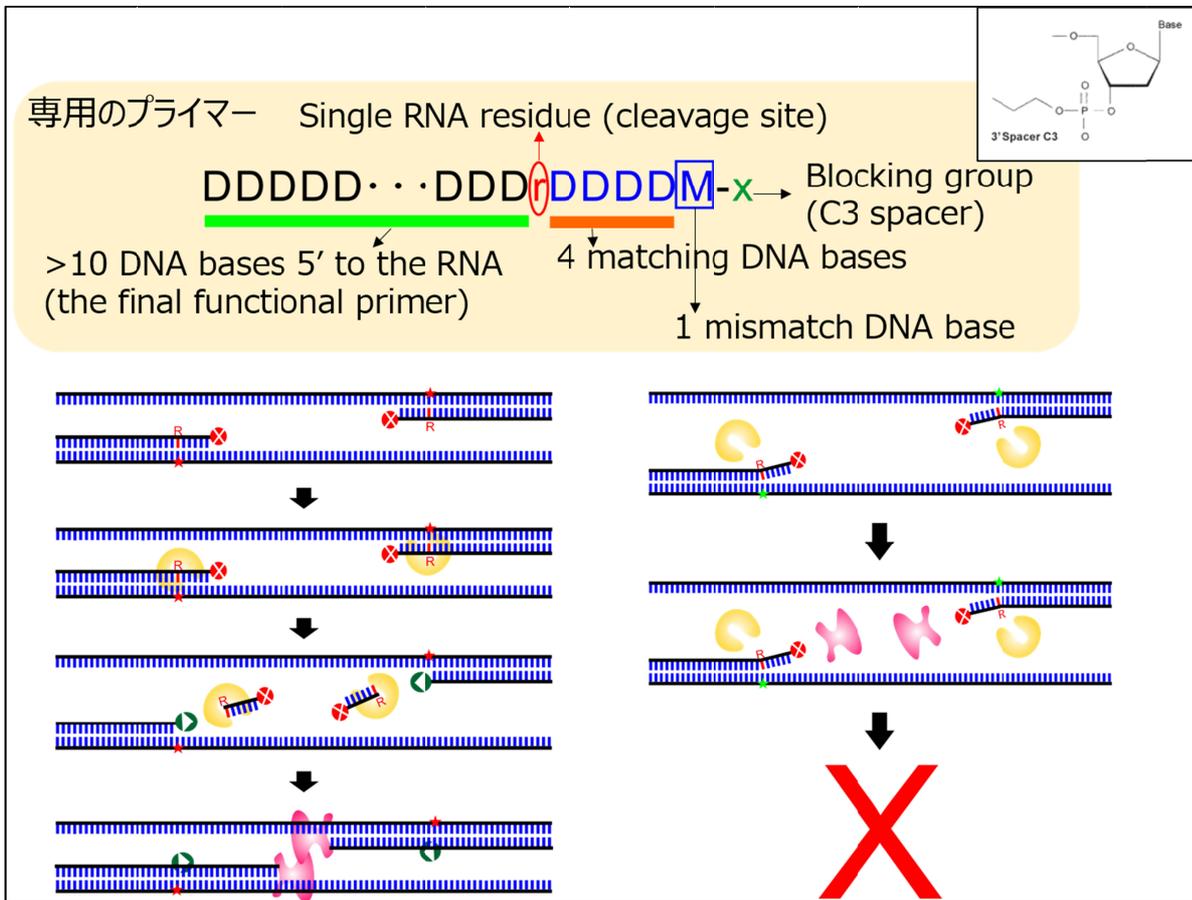


図4. RNase H2-dependent PCR による MSP の検出

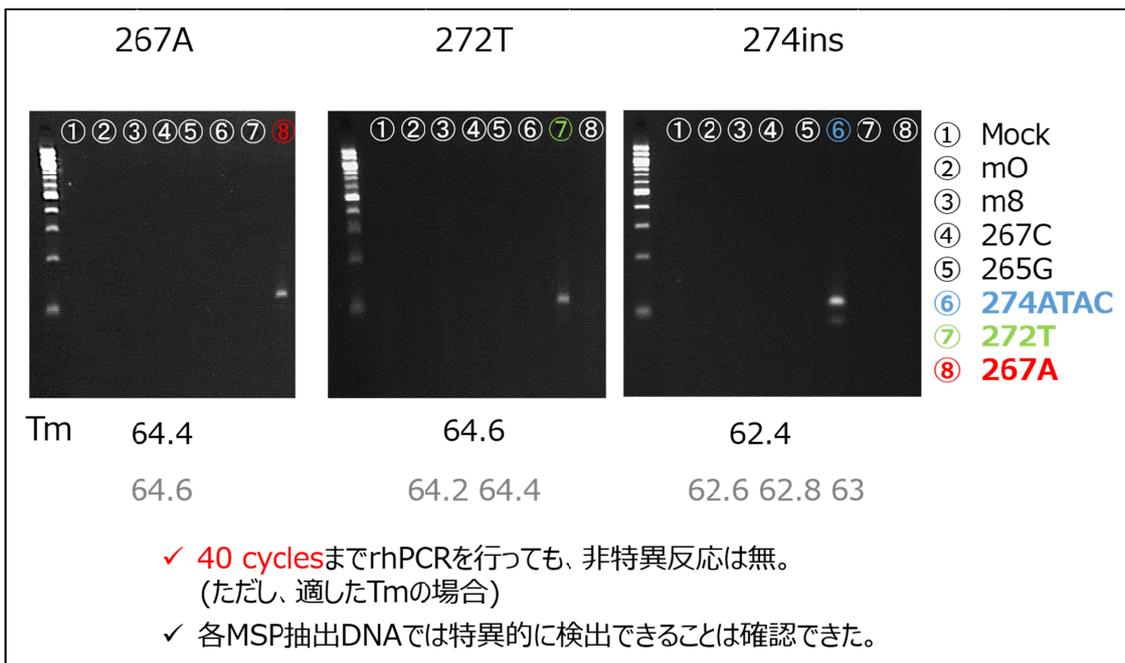


図5. RNase H2-dependent PCR による L1, L4 および L5 型 MSP の検出