

平成 26 年度～平成 28 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金
(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)

バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法の確立，
及び細胞培養痘そうワクチンの有効性，安全性に関する研究

分担報告書

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。故にバイオテロなどで天然痘ウイルスに暴露された場合、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。本研究は国産の弱毒痘そうワクチン株である LC16m8 を用いた天然痘ウイルス暴露後重症化阻止の可能性の検討することを目的とする。平成 27 年度は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。平成 28 年度は ECTV でマウスを攻撃直後に 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、エクトロメリアウイルス暴露直後に LC16m8、または Lister を接種すれば死亡率が減少する傾向が確認された。更に LC16m8 接種と同時に自然免疫応答を誘導する poly I:C を投与すると防御効果が増強されることが確認された。

研究協力者

山田壮一・国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官

柴村美帆・国立感染症研究所ウイルス第一部・協力研究員

津田美穂子・国立感染症研究所ウイルス第一部・非常勤職員

藤井ひかる・国立感染症研究所ウイルス第一部・協力研究員

福井良子・国立感染症研究所ウイルス第一部・非常勤職員

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、その脅威は未だ無くなっていない。我が国では 40 歳未満の殆どが未種痘であるため、天然痘ウイルスに対して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は、その直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ため、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証し、更に可能であれば、その防御効果の増強を試みる。

B. 研究方法

ECTV を用いたマウスモデルを確立した。ECTV は Hampstead 株、Moscow 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 4 または 5LD50 相当の ECTV を i.n. 経路でマウスに感染させる前後に 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・重症化阻止効果を検討した。更に poly I:C を i.n. で 100ug 単独, または LC16m8 を i.m. 経路で 10^7 PFU 接種すると同時に投与した際の感染防御効果を検討した。

【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

平成 27 年度 : C57BL/6 マウスに ECTV Hampstead 株を i.n. で接種した際の LD50 を決定した。1 群 5 匹のマウスに 10^4 から 10^1 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。この結果を元にした LD50 は 1200PFU であった。そこで, それ以降の ECTV の攻撃実験には 4LD50 相当, 4800PFU の Hampstead 株を用いた。次に ECTV 暴露後に LC16m8 株を接種した場合の発症・重症化阻止効果を検討した。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。既報で示されていた ECTV 暴露後のワクチン効果が確認できなかったことから, 今度は既報で用いられていた Lister 株による実験を行った。1 群 5 匹のマウスに 4LD50 の ECTV で攻撃を行った。その後 -3, 0, 1, 2, 3 日後に 10^7 PFU/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。

平成 28 年度 : 前年度で得られた結果は既報の研究結果と異なっていた。そこで, 既報の研究と本研究における実験条件の違いを考察した(表 1)。殆どの部分で実験条件は近似しているが, VACV は既報では MVA と Lister, 本研究では LC16m8 と Lister の 2 株を使用している。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 の株が異なることと, 攻撃に用いたウイルス量だと考えられる。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, 病原性に差があるのかもしれない。そこで, 私たちは Moscow 株を入手し, 再度 Hampstead 株, Moscow 株の両方について LD50 を決定した。前回の実験と同様に 1 群 5 匹のマウスに 10^4 から 10^1 PFU/20ul の ECTV を i.n. で接種し, 観察, 体重測定を行った。結果を図 6 に示す。LD50 は Hampstead 株で 208PFU, Moscow 株で 316PFU であった。両株の LD50 に違いは見られない一方で, Hampstead 株の LD50 は前年度の結果(1200PFU)と比べて低い値になった。このような違いが出た理由是不明であるものの, 本年度の結果の方が過去の報告と照らし合わせても妥当だと考え, 以降, LD50 は本年度の結果を基にして実験を行った。次に ECTV 暴露前後に LC16m8 株を接種した場合の発症・重症化阻止効果を検討した。1 群 5 匹のマウスに 5LD50 の ECTV Hampstead 株, または Moscow 株で攻撃を行った。その後 3 日前(-3), 0, 1 日後に 10^7 PFU/100ul の Lister 株, LC16m8 株, HSV-1, または 100ug/100ul の poly I:C を i.m. で接種し, 観察, 体重測定を行った。図 7 に結果を示す。攻撃に使用した Hampstead 株と Moscow 株で結果に大きな違いは見られなかった。ECTV 攻撃 3 日前に Lister 株, または LC16m8 を接種しておくともマウスは 100%

生存した。一方で, poly I:C, HSV-1, または対照として Medium を接種した群では有意な発症や重症化の阻止効果は確認できなかった。ECTV 攻撃直後に Lister 株, LC16m8 株, また poly I:C を接種すると, 死亡率が減少する傾向が見られた。ECTV 感染 1 日後に VACV 等を投与した場合は, 全ての群で有意な発症や重症化の阻止効果は確認できなかった。

実験結果を受けて, 私たちは poly I:C の投与ルートに着目した。ECTV は接種経路が i.n. 経路であることからウイルスが増殖する主な器官は肺であると考えられる。そこで, poly I:C の投与方法を i.m. から i.n. に変更して実験を行った。1 群 5 匹のマウスに 5LD50 の ECTV Hampstead 株で攻撃を行った。その直後 100ug/100ul の poly I:C を i.n. で接種し, 観察, 体重測定を行った。図 8 に実験スケジュール, 図 9 に結果を示す。統計学的に有意では無かったが, ECTV 暴露直後に i.n. で poly I:C を投与するとマウスの死亡率が減少する傾向が見られた。そこで, 防御効果の増強を期待して poly I:C と LC16m8 の同時投与を検討した。1 群 5 匹のマウスに 5LD50 の ECTV Hampstead 株で攻撃を行った。その直後に 10⁷PFU/100ul の LC16m8 株を i.m. で接種すると同時に 100ug/10ul の poly I:C を i.n. で接種し, 観察, 体重測定を行った。図 10 に実験スケジュール, 図 11 に結果を示す。この実験に於いて LC16m8 のみ接種した群が ECTV の攻撃に対して 100%の生存率を示したため, 生存率の違いは比較できなかったものの, poly I:C と LC16m8 を両方投与した群も 100%の生存率を示した。更に LC16m8 のみ接種した群と比較して体重の減少率に大きな差が見られたことから, ECTV 暴露後に poly I:C と LC16m8 を同時投与することで, LC16m8 単独接種より効果的な防御効果が得られる可能性が示唆された。

D. 考察

本研究は弱毒痘そうワクチン LC16m8 株の天然痘ウイルス暴露後ワクチンとしての発症・重症化阻止効果を検討し, 可能であれば改良を行うことを目的と

している。実験に使用不可能である天然痘ウイルスを用いる代わりに, ECTV を用いたマウスモデルを構築できたことが本研究を円滑に行うことができた要因の一つだと考えている。既報の研究では ECTV 暴露 3 日後までであれば Lister 株, MVA 株の接種により有意な死亡率の減少効果が確認されている。一方本研究では, ワクチン接種を ECTV 暴露直後にしないと死亡率の減少効果が見られなかった。どちらの研究についても Lister 株を使用しているため, その違いが生じている原因は不明であるが, 攻撃に使用した ECTV のウイルス量の差(既報では 3LD50, 本研究では 5LD50)などが理由として考察できる。従って, LC16m8 株についても MVA 株や Lister 株と同様に暴露後ワクチンとして使用できる可能性があると考えている。今回の実験は使用したマウスが 5 匹/実験群であることから, 統計学的な検討を行うのが難しい場合があった。そこで今後はマウスの匹数を増やして再度実験を行い, 本研究の再現性を確認すると共に統計学的な検討を厳密に行う必要がある。

LC16m8 の接種と同時に poly I:C を投与することで ECTV 感染による体重減少が軽減されることが示唆された。興味深いことに, LC16m8 投与群と, poly I:C 投与群は体重減少が確認されるタイミングが, それぞれ 5 日目と, 6 から 7 日目と異なっていた。このことから, LC16m8 の接種と poly I:C の投与による感染防御効果の機序は異なっていることが示唆される。今後はこのメカニズムを詳細に解析し, 得られた結果をフィードバックすることで暴露後ワクチンとしての LC16m8 の使用法を更に改善したと考えている。

E. 結論

天然痘ウイルス暴露後に VACV を接種した場合の発症・重症化阻止効果を検討するため, ECTV 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, ECTV 暴露直後に VACV を接種することで発症・重症化阻止効果が得られる可能性が示唆された。更に VACV と poly I:C を同時に投与することで, その発

症・重症化阻止効果が増強される可能性が示唆された。

bacterial artificial chromosome, which retains the full-length viral genome of a strain, LC16m8 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌 (2016. 10)

F. 健康危険情報
特記事項なし

G. 研究発表
1. 論文発表
なし
2. 学会発表
1) Tomoki Yoshikawa, Hikaru Fujii, Miho Shibamura, Natsumi Omura, Shizuko Harada, Souichi Yamada, Masayuki Saijo. Recovery of infectious vaccinia virus from a

H. 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

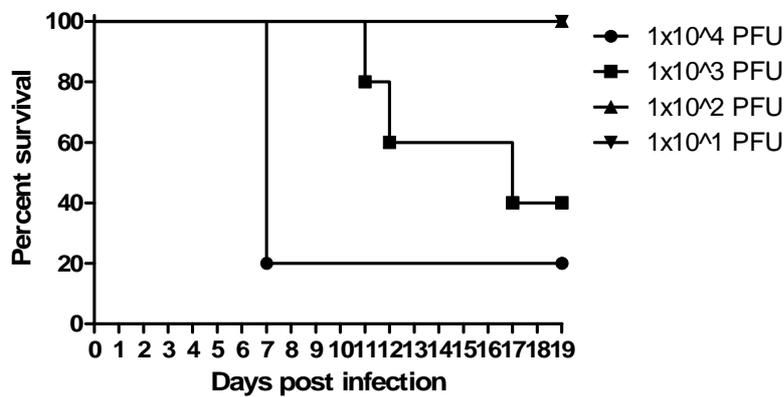


図 1. ECTV Hampstead 株を i.n. で接種された C57BL/6 マウスの生存曲線

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

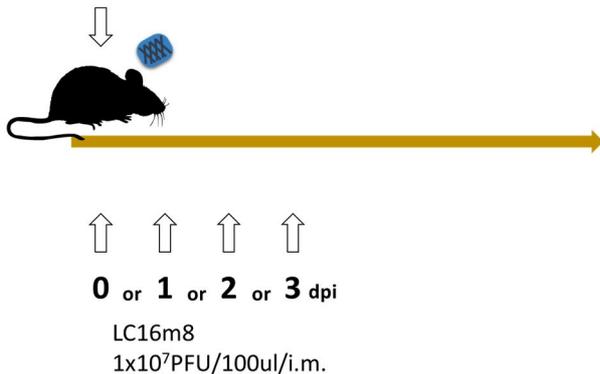


図 2. ECTV 暴露後に LC16m8 株を接種した場合の発症阻止効果の検討

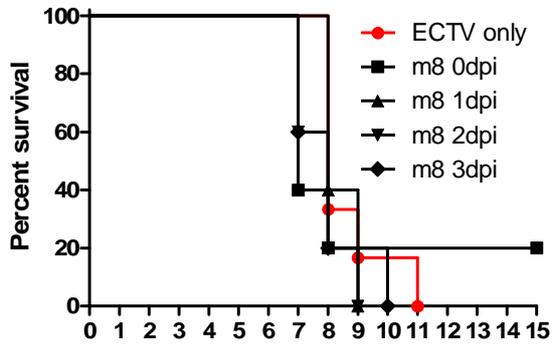


図 3. ECTV 暴露後に LC16m8 株を接種した場合の発症阻止効果の検討結果

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



↑ ↑ ↑ ↑
 -3 or 0 or 1 or 2 dpi
 Lister
 1x10⁷PFU/100ul/i.m.

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

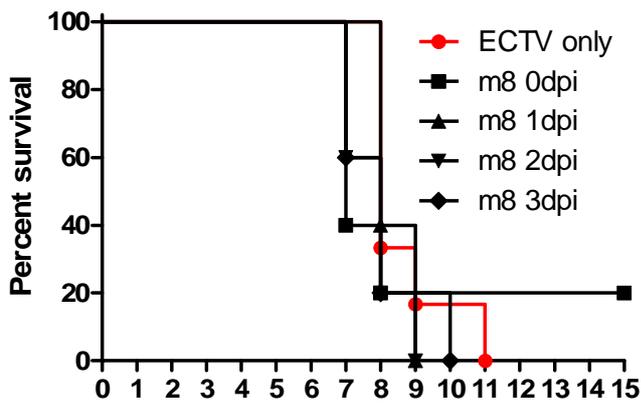


図 5. ECTV 暴露後に Lister 株を接種した場合の発症阻止効果の検討結果

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.

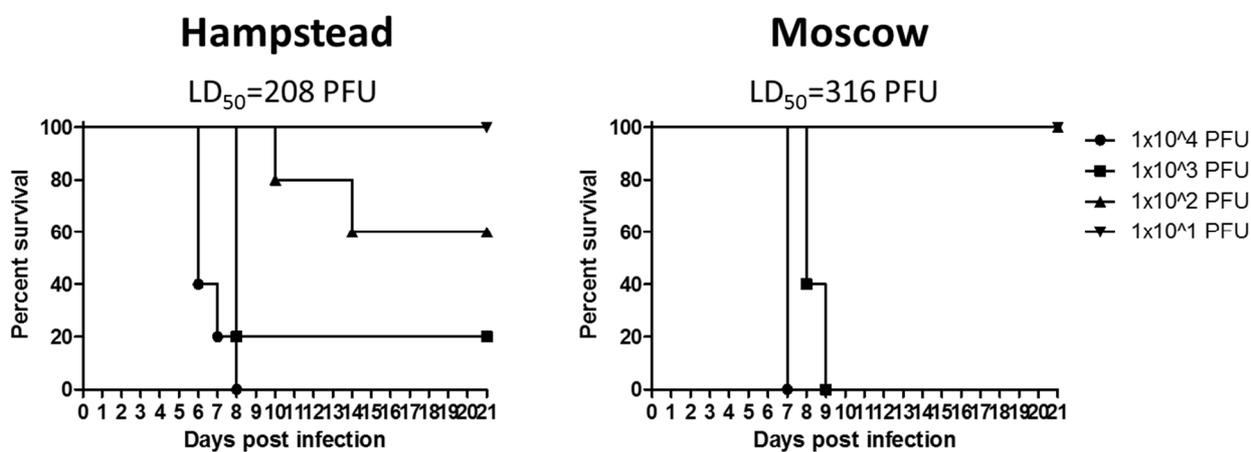


図 6. ECTV Hampstead 株, または Moscow 株を i.n. で接種された C57BL/6 マウスの生存曲線

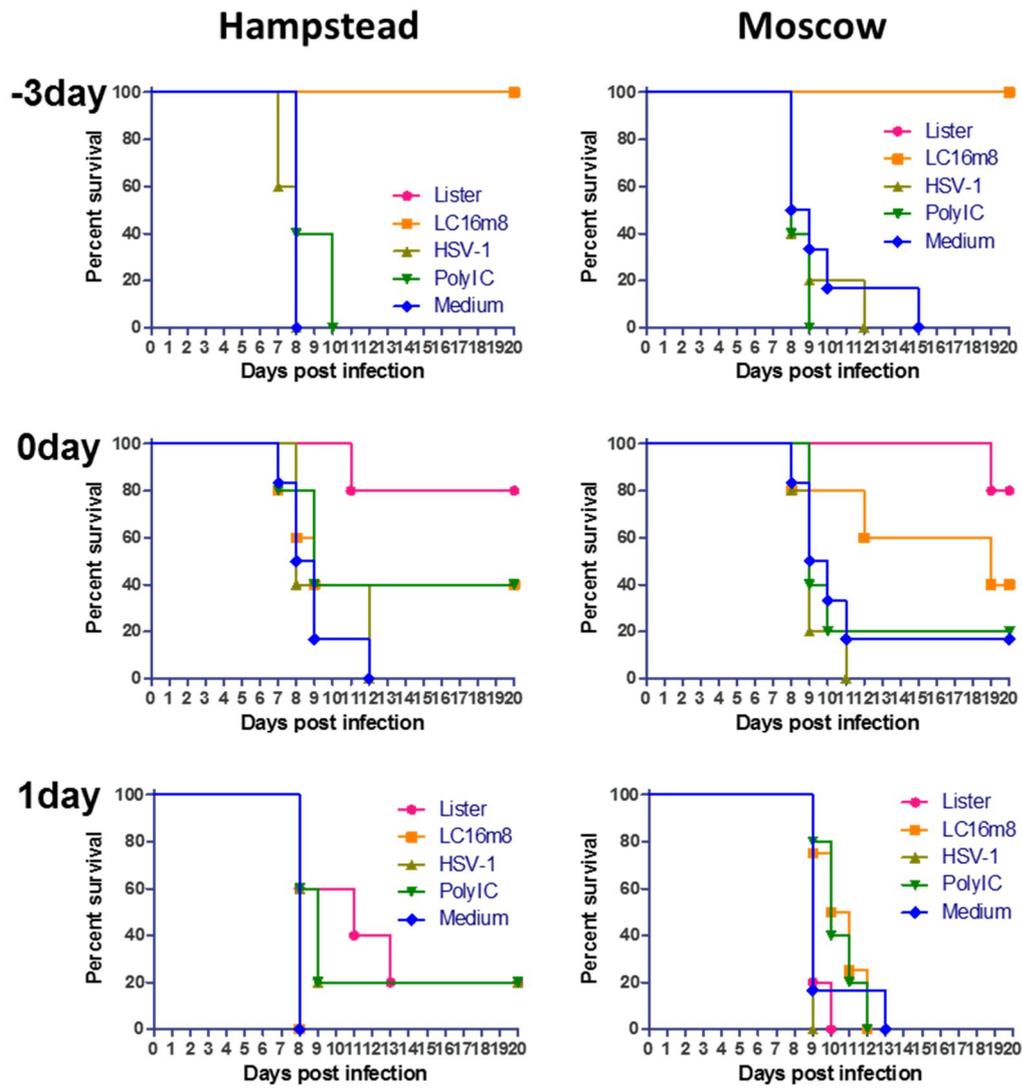


図7. ECTV 暴露前後にワクシニアウイルス等を接種した場合の発症阻止効果の検討結果

ECTV strain Hampstead
5LD50 (1000 PFU) /10ul/i.n
C57BL/6 (Female, 8 wks), 5 mice/group



- (1) Poly I:C 100ug/20ul/i.n.
- (2) Mock treatment (PBS)

図 8. ECTV 暴露直後に i.n. で poly I:C を投与したときの発症阻止効果の検討

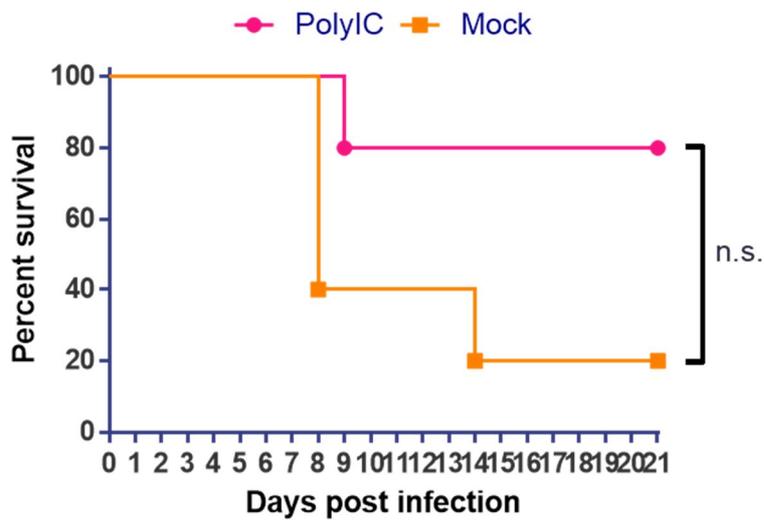


図 9. ECTV 暴露直後に i.n. で poly I:C を投与したときの発症阻止効果の検討結果

ECTV strain Hampstead
 5LD50 (1000 PFU) /10ul/i.n
 C57BL/6 (Female, 8 wks), 10 mice/group



	Treatment	
	i.n.	i.m.
1	Poly I:C 100ug/20ul/i.n.	LC16m8 1x10 ⁷ PFU/100ul/i.m.
2	Poly I:C 100ug/20ul/i.n	Mock treatment
3	Mock treatment	LC16m8 1x10 ⁷ PFU/100ul/i.m
4	Mock treatment	Mock treatment

図 10. ECTV 暴露直後に i.n. で poly I:C、i.m. で LC16m8 を投与したときの発症阻止効果の検討

	i.n.	i.m.
●	Poly I:C	m8
■	Poly I:C	Mock
▲	Mock	m8
▼	Mock	Mock

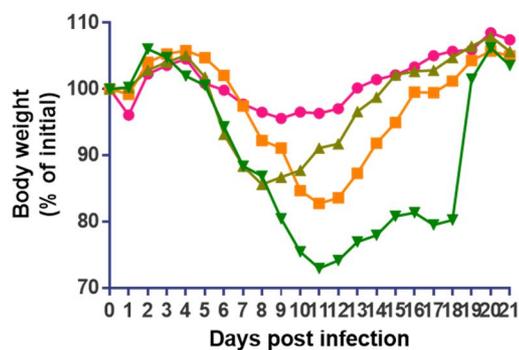
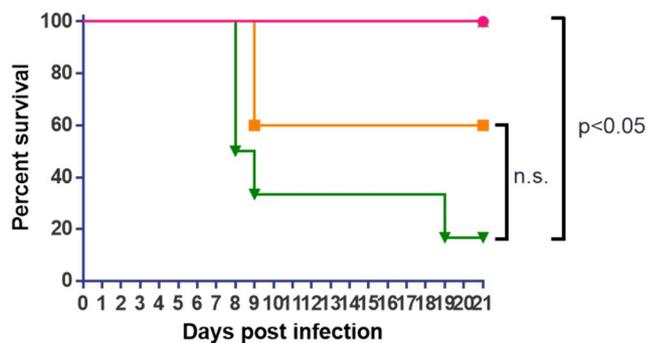


図 11. ECTV 暴露直後に i.n. で poly I:C、i.m. で LC16m8 を投与したときの発症阻止効果の検討結果