

分担報告書

細胞培養弱毒生痘そうワクチンの安全性評価における病理学的研究

所属 国立感染症研究所・感染病理部・室長
研究分担者 永田 典代

研究要旨:サル痘ウイルスがマウスに不顕性感染することを利用し、好中球枯渇マウスにおける重症化機序を明らかにする。サル痘ウイルスの皮下接種はマウスに明らかに病変を起こさないが、好中球の枯渇処理はウイルス増殖と病変形成を亢進した。今年度は、本モデルにおける免疫反応を経時的に明らかにした。一時的な好中球の枯渇処理は、感染後の好中球増多、炎症性サイトカイン・ケモカインの高発現を引き起こした。今後、ウイルス感染動態と病像の変化について詳細に解析を進める。

研究協力者

岩田奈織子・国立感染症研究所感染病理部・主任研究官

佐藤由子・国立感染症研究所感染病理部・主任研究官

長谷川秀樹・国立感染症研究所感染病理部・部長

福士秀悦・国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官

吉河智城国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官

西條政幸・国立感染症研究所ウイルス第一部・部長

A. 研究目的

痘瘡ワクチンの副反応の発現機構を病理学的に理解するため、オルソポックスウイルス感染症の重症化とウイルス伝播力の変化に関わる宿主側因子を明らかにする。具体的には、サル痘ウイルスがマウスに不顕性感染することを利用し、その重症化機序について好中球枯渇マウスを利用し免疫学的、病理学的、ウイルス学的に明らかにする。

B. 研究方法

動物は、日本エスエルシーより購入した BALB/c マウス(接種時、14 週齢メス)を準備し、国立感染症研究所のバイオリスク管理委員会規定に従い、ABSL3 施設にて感染実験を行った。

ウイルスは、サル痘ウイルスの Zr-599 株を用いた。好中球枯渇のため、抗マウス Ly6G 抗体(1A8, BioXcell 社)を、また、アイソタイプコントロールとして rat IgG2a(BioXcell 社)を用いた。

これらの抗体をマウスの腹腔内に投与し(一匹あたり 500 µg/500 µL)、半日後にウイルス液(一匹あたり 2×10^5 PFU ウイルス量/100 µl)を頸背部に皮下接種した。対照群には細胞培養液を接種した(各群 10 匹、合計4群)。その後、接種 2, 4, 7, 10, 13 日目に抗体投与を行った。16 日間、臨床症状と体重変化を観察した(n = 6)。

ウイルス接種 3, 7, 10, 16 日目に一部の動物を安楽殺し、心臓採血後に解剖し材料を採取した(n = 4-6)。採血は、事前にヘパリンを含んだ注射筒で実施し、ヘパリン処理血液を得た。これを用いて、動物用血球計数装置(ベトスキャン HM II, 株式会社セントラル科学貿易)にて血球計測を行った。また、血漿を分離し、サイトカイン・ケモカインを測定した(Cytokine 20-Plex Mouse Panel, Thermo Fisher Scientific)。

【倫理面への配慮】

動物を扱う研究においては、国立感染症研究所実験動物委員会の審査と承認を得て、動物愛護の精神に則り遂行した。

C. 研究結果

いずれの接種群においても、サル痘ウイルスの皮下接種後に明らかな肉眼病変を示さなかった。しかし、好中球枯渇処理群はウイルス接種後に体重の有意な増加傾向がみられた。

白血球数について、好中球枯渇処理群ではウイルス接種の有無に関わらずほぼ同様の動態を示したが、アイソタイプコントロール処理群では、ウイルス接種3日後に白血球数の増多がみられ、

それは、リンパ球と単球の増多によるものであった。好中球枯渇群において単球の軽度の増多が3日目に見られた。

アイソタイプコントロール処理後のウイルス接種群では、IL-12 と IFN- γ の軽度の上昇を認めた。一方、好中球枯渇処理群ではウイルス接種 10 日目にIL-12の高値がみられ、16日目にはMIP-1 α , GM-CSF, IL-2 と IFN- γ の有意な上昇が見られた。

D. 考察

いくつかの急性ウイルス感染症において、好中球の減少は宿主側の重症化因子の一つと考えられている。ワクチニアウイルスを用いたマウスモデルにおいても、同様な知見が得られている (Fischer MA et al, 2011)。我々はすでに、BALB/c マウスのサル痘ウイルス不顕性感染のモデルにおいて、抗Ly6G抗体投与による好中球枯渇によりウイルス増殖と病変形成が亢進することを示した(平成26-28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)報告書)。よって、サル痘ウイルス感染防御において好中球は一定の役割を担っていると考えている。

今回は、この感染モデルを用いて、経時的な免疫反応を血液動態、サイトカイン・ケモカインの変化から検討した。好中球枯渇後のウイルス感染において、血球動態にあまり大きな変化は見られなかったが、サイトカイン・ケモカイン産生についてはIL-12を始めとした、IFN- γ , IL-2, MIP-1 α , GM-CSFを含む明らかなTh1応答であった。今後、血中及び臓器中のウイルス感染動態をウイルス学的、病理学的に検索する予定である。なお、好中球枯渇後のウイルス感染群での体重増加は、これまでの実験結果と再現性のある結果であった。食欲亢進等が示唆されたが、その原因は不明である。

今後は、当該モデル系における知見を考慮しながら、アトピー性皮膚炎等のアレルギーモデルとして知られている、NC/Ng a マウスにおけるポックスウイルス感染の影響について基礎検討も開始する。

E. 結論

好中球枯渇後のサル痘ウイルス感染における宿主応答を血液像、サイトカイン・ケモカイン解析から明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakata M, Tani H, Anraku M, Kataoka M, Nagata N, Seki F, Tahara M, Otsuki N, Okamoto K, Takeda M, Mori Y. Analysis of VSV pseudotype virus infection mediated by rubella virus envelope proteins. Sci Rep. 2017. 7(1):11607.
- 2) Taniguchi S, Maeda K, Horimoto T, Masangkay JS, Puentespin R Jr, Alvarez J, Eres E, Cosico E, Nagata N, Egawa K, Singh H, Fukuma A, Yoshikawa T, Tani H, Fukushima S, Tsuchiaka S, Omatsu T, Mizutani T, Une Y, Yoshikawa Y, Shimojima M, Saijo M, Kyuwa S. First isolation and characterization of pteropine orthoreoviruses in fruit bats in the Philippines. Arch Virol. 2017. 162(6):1529-1539.
- 3) Iizuka I, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Fukushima S, Ogata M, Morikawa S, Hasegawa H, Mizuguchi M, Kurane I, Saijo M. A Single Vaccination of Nonhuman Primates with Highly Attenuated Smallpox Vaccine, LC16m8, Provides Long-term Protection against Monkeypox. Jpn J Infect Dis. 2017.70(4):408-415.

2. 学会発表

特になし

H. 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

図表

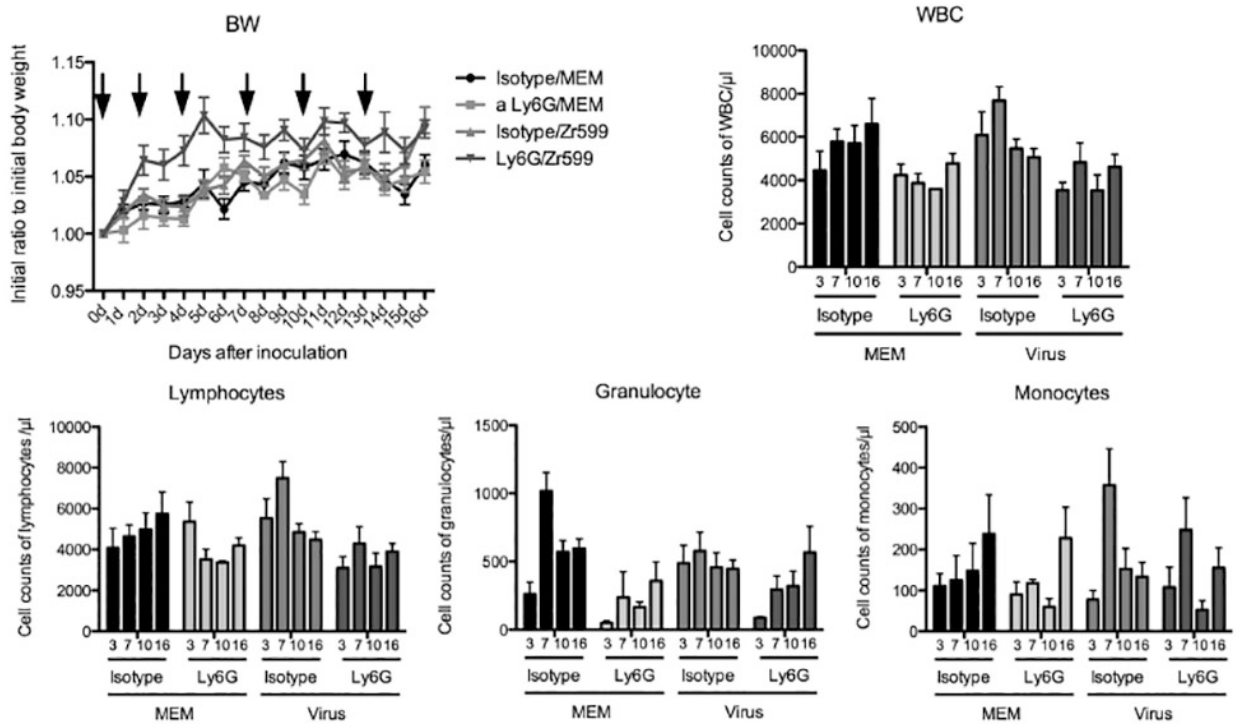


図1 左上はサル痘ウイルス皮下接種後のマウスの体重変化. Isotype/MEM, アイソタイプコントロール処理後細胞培養液接種; aLy6G/MEM, 好中球枯渇後細胞培養液接種; Isotype/Zr599, アイソタイプコントロール処理後ウイルス接種; Ly6G/Zr599, 接種好中球枯渇処理後ウイルス. 各群 n=6. 矢印は, 抗体投与日を示した. 右上, 下段は順にWBC, 白血球数; リンパ球数, 顆粒球数, 単球数を示した. ウイルス接種 3, 7, 10, 16 日の血液像.

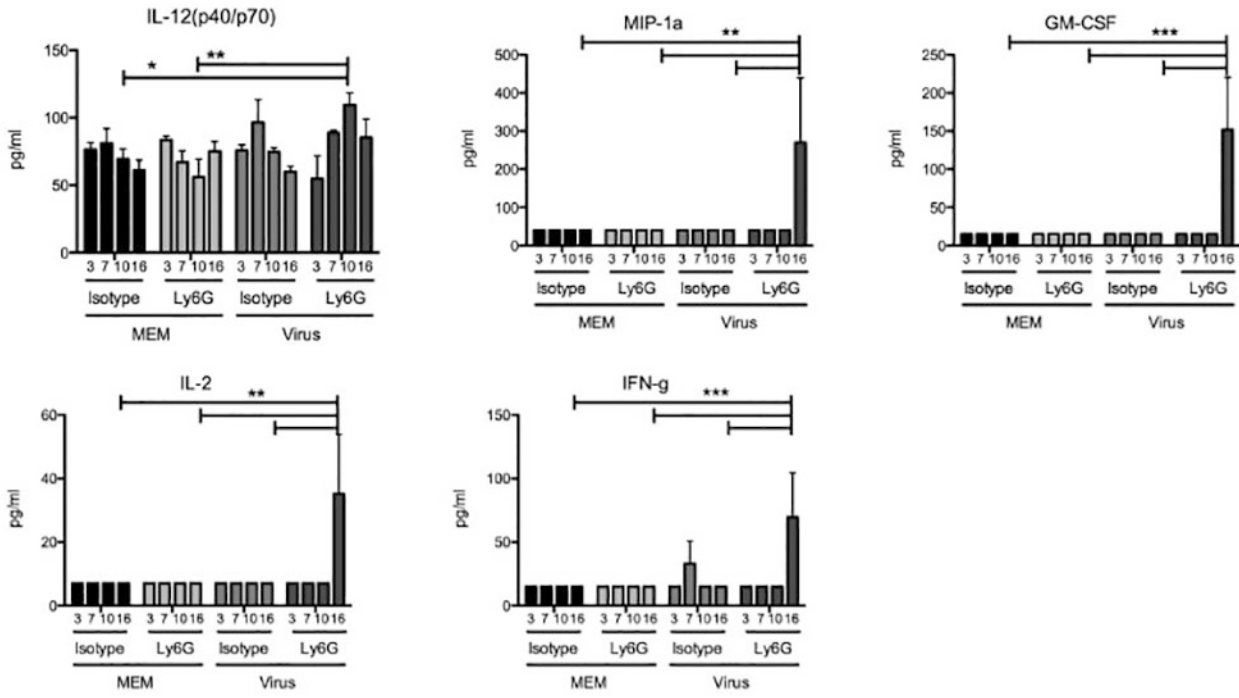


図2. ウイルス感染後3, 7, 10, 16 日目の血漿中のサイトカイン, ケモカイン発現量.

平成 29 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)
我が国で開発され、備蓄されている細胞培養痘そうワクチンの有効性、安全性、生産性向上
および国内外のバイオテロ対策のあり方に関する研究

分担報告書

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・部長
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 株を経由して樹立された, 安全性の高い痘そうワクチン製造用株である 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) の性状を保つウイルスが出現する. MSP は b5r 遺伝子の 1 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 1 塩基挿入や 4 塩基挿入等, 複数あることが分かっている. バイオアッセイで得られる MSP の出現頻度・パターンの解析結果と同様な結果が次世代シーケンス(NGS)解析により得られる. MSP のうち, 主要な MSP を検出する定量的 PCR 法を開発し, LC16m8 株と特定の MSP を識別可能とした. 継代培養によって MSP が出現する場合に, プラーク馴化した別個の LC16m8 株から RK13 細胞での増幅/Vero E6 細胞での増殖を 3 サイクル行い, 開発した定量的 PCR を実施したがいずれのクローン由来も MSP が検出限界未満であったことから, 3回の MSP 増幅サイクルでは検出限界の 0.01%未満しか MSP が増幅されないことがわかった. このため, さらに 3~5 代継代培養して MSP 含有率と MSP 遺伝子型の比率を明らかにする必要がある.

研究協力者

朴ウンシル・国立感染症研究所獣医科学部・主任研究官

奥谷晶子・国立感染症研究所獣医科学部・主任研究官

宇田晶彦・国立感染症研究所獣医科学部・主任研究官

吉河智城・国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官

西條政幸・国立感染症研究所ウイルス第一部・部長

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 株を経由して樹立された株である. 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から, 安全性の非常に高いワクチン株である. また, 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°C 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°C 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 塩基欠損があり,

正常な B5 蛋白質が作られないために初代ウサギ腎細胞や RK13 細胞におけるプラークサイズが小さい. また Vero E6 細胞ではプラークを作らない. 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. これまでの研究で MSP 含有率が 5%以上になるとウサギ皮膚増殖性が有意に高くなることから, ワクチン製造においては MSP 含有率があるレベル以下であることを保証する試験が行われる. これまでの解析から, MSP は LC16mO 型への復帰株ではなく, b5r 遺伝子の 1 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異なる部位への 1 塩基挿入や 4 塩基挿入等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)解析と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 を検出する定量的 PCR 法を開発し, 同等の結果が得られることを明らかにした. 本研究では, プラーク馴化した LC16m8 株を複数調整し, Vero E6 細胞での MSP 増幅と RK13 細胞でのウイルス増殖を 3 サイクル行い, 得られる MSP

の変異パターンとMSP増幅率を明らかにし、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) LC16m8株のプラーク馴化

LC16m8株のストックウイルス液には一定頻度のMSPが含まれている。参照細胞培養ワクチンにも低頻度ではあるがMSPが含まれている。そこで、ウサギ腎細胞由来細胞であるRK13細胞で参照細胞培養ワクチンのウイルスからプラーククローニングを3回行い、プラーク馴化したLC16m8株を3クローン調整した。

2) プラーク馴化したLC16m8株のバイオアッセイ

プラーク馴化したLC16m8株の3クローンをRK13細胞、Vero E6細胞でプラークアッセイを行ない、バイオアッセイで各クローンにMSPが含まれるかを検討した。本試験では、極微量のMSPが検出される。

3) プラーク馴化したLC16m8株からのMSPの増幅

プラーク馴化したLC16m8株の3クローンをVero E6細胞に低moiで感染させ、培養後に凍結融解し遠心した上清をRK13細胞で増殖し(1継代培養)、これを繰り返して3継代培養した。

4) プラーク馴化したLC16m8株から3継代培養後のMSP検出

3代継代培養したウイルス液からDNAを抽出し、これまでに開発したMSP特異的定量PCRを実施した。Mutation specific primerによる定量的PCRでは、強い3'→5' exonuclease活性をもつDNA polymeraseを用いると、非特異反応により野生型配列(LC16m8型)のb5r遺伝子も増幅されるため、3'→5' exonuclease活性の弱いTaq DNA polymerase由来酵素によるSYBR Green Realtime PCR Master mix (TOYOBO)を用いた定量的PCRで、267A挿入型、271T挿入型、274ATAC挿入型MSPを検出した。

【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。

C. 研究結果

1) プラーク馴化したLC16m8株

LC16m8株のストックウイルス液には一定頻度のMSPが含まれている。そこで、ウサギ腎細胞由来細胞であるRK13細胞でプラーククローニングを3回行ってプラーク馴化したLC16m8株を3クローン調整した。各クローンをLC16m8株とMSPのいずれもがプラークを形成できる

RK13細胞とMSPだけがプラークを形成できるVero E6細胞でそれぞれプラークアッセイを行った結果、RK13細胞で 10^7 pfu/mL、Vero E6細胞では $<10^2$ pfu/mLとMSPは検出限界未満($<10^{-5}$)であった。

2) MSP特異的定量PCR

これまでの研究でMSPには、主に7種類のb5r遺伝子の1塩基欠損を相補する1塩基挿入あるいは4塩基挿入するものが知られている(図1)。これらのワクチン試験製造品等や参照細胞培養痘そうワクチン中で、267A挿入型、271T挿入型、274ATAC挿入型等が主要なMSPの遺伝子型である。これらを検出するMSP特異的real time PCRを用いることにより267A挿入型、271T挿入型、274ATAC挿入型のMSP含有率がそれぞれ0.01%の感度で検出できた(図2)。

3) プラーク馴化したLC16m8株をVero E6細胞で3代継代培養したウイルス中のMSP頻度

プラーク馴化したLC16m8株の3クローンをVero E6細胞に低moiで感染させ、培養後に凍結融解し遠心した上清をRK13細胞で増殖し(1継代培養)、これを繰り返して3継代培養した。このウイルス液からDNAを抽出し、MSP特異的定量PCRを実施した結果、主な種類のMSP(267A挿入型、271T挿入型、274ATAC挿入型)はいずれも検出限界以下であった。また、3代継代培養したウイルス感染RK13細胞から抽出したDNAを用いてMSP特異的real time PCRを実施したがいずれも検出できなかった。

D. 考察

LC16m8株のストックウイルス液には一定頻度のMSPが含まれている。そこで、ウサギ腎細胞由来細胞であるRK13細胞でプラーククローニングを3回行ってプラーク馴化したLC16m8株を3クローン調整した。それぞれのLC16m8クローンをRK13細胞、Vero E6細胞でプラークアッセイを行なうと、RK13細胞ではサイズの大きいプラークは認められず、Vero E6細胞ではプラークを形成しなかったことから、3クローンにはMSPが含まれないか、極めて低レベルしか含まれないことが分かった。これらのクローンをそれぞれ3代継代培養したウイルスには、主な種類のMSP(267A挿入型、271T挿入型、274ATAC挿入型)はMSP特異的定量PCRで検出限界の0.01%未満であった。この結果、プラーククローニングしたLC16m8株は、Vero E6細胞で3代継代しても検出可能なレベルのMSPが含まれないことがわかった。一方、これまでの研究でMSPが0.01%含まれる参照細

胞培養痘そうワクチンを Vero E6 細胞で継代培養すると、3継代で MSP 含有率が 80%ほどまで増加することを確認している。このため、本実験で得られた3代継代からさらに継代数を増やし、MSP 含有率を高くして MSP 特異的 real time PCR によりどの遺伝子型の MSP がどの位の率で含まれるかを、各クローンごとに検証する必要がある。

E. 結論

主要な MSP を検出する MSP 特異的定量 PCR は 0.01%の検出限界がある。これを用いてピラークローニングした LC16m8 クローンを Vero E6 細胞で3継代したが、MSP は検出できなかった。さらに継代数を増やして MSP 含有率をあげて、MSP タイプとそれぞれの率を検証したい。

F. 健康危険情報

ナイジェリアでヒトのサル痘ウイルス感染症が流行している。2017 年 9 月から 12 月に Bayelsa 州でサル痘疑い患者 172 症例のうち 61 例がサル痘であることが実験室診断で確認された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshikawa T, Fujii H, Okutani A, Shibamura M, Omura N, Egawa K, Kato H, Inagaki T, Harada S, Yamada S, Morikawa S, Saijo M. Construction and characterization of bacterial artificial chromosomes harboring the full-length genome of a highly attenuated vaccinia virus LC16m8. PLoS One. 2018, 13(2):e0192725.

2. 学会発表

なし

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

	250	260	270	280	290	300	
LC16m0	TATGTCTCTGAATTATATGA	TAA-G-CC-ATT-AT-AC	---	GAAGTGAATTCCACCATGACACTAAGT			
LC16m8	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
L1	*****	*****	A	*****	*****	*****	(36.6%)
L2	*****	*****	C	*****	*****	*****	(14.6%)
L3	*****	*****	G	*****	*****	*****	(2.4%)
L4	*****	*****	T	*****	*****	*****	(24.4%)
L5	*****	*****	ATAC	*****	*****	*****	(12.2%)
L6	*****	*****	T	*****	*****	*****	(4.9%)
L7	*****	*****	---	*****	*****	*****	(4.9%)
261A	*****	A	*****	*****	*****	*****	(minor)
262T	*****	T	*****	*****	*****	*****	(minor)
264A	*****	A	*****	*****	*****	*****	(minor)

図1. これまでに得られた MSP の遺伝子型と頻度

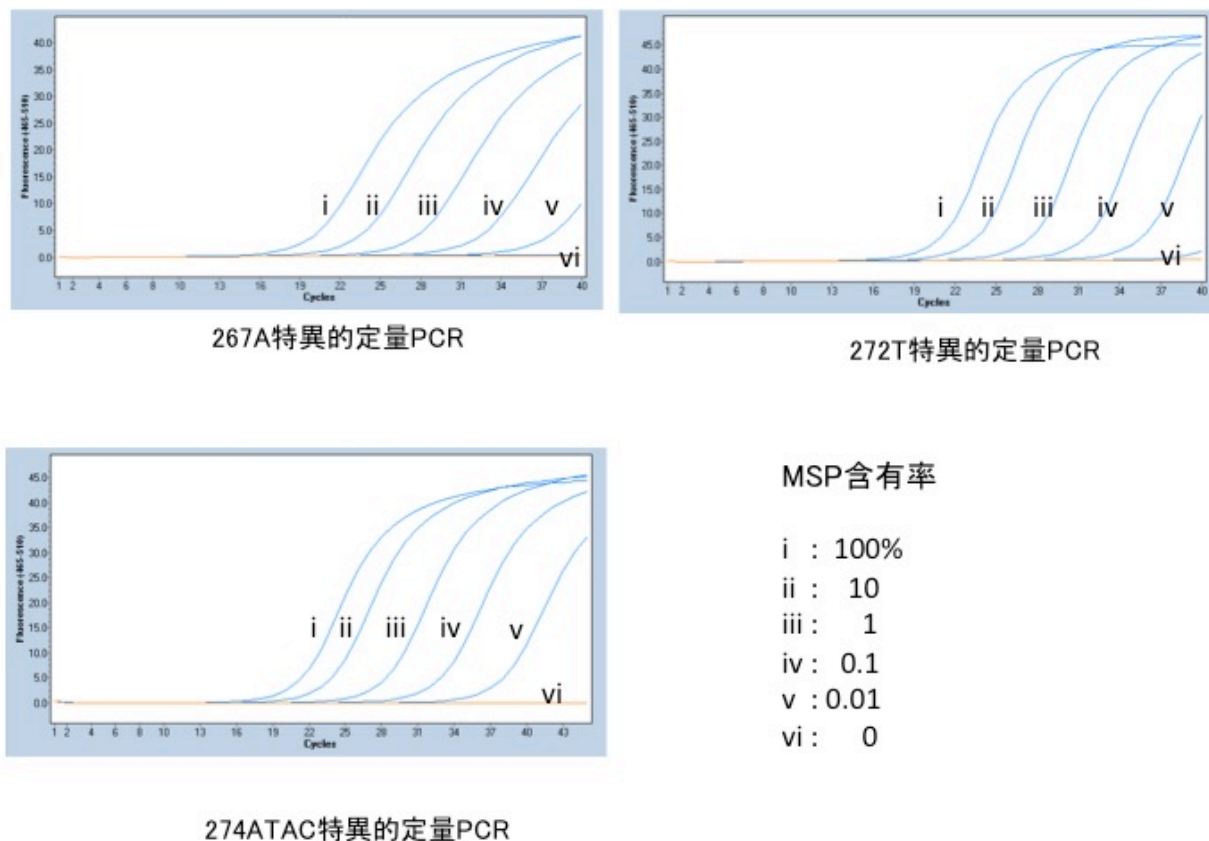


図2. MSP 特異的定量 PCR の MSP 検出感度

平成 29 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)
我が国で開発され、備蓄されている細胞培養痘そうワクチンの有効性、安全性、生産性向上
および国内外のバイオテロ対策のあり方に関する研究

分担報告書

細胞培養弱毒生痘そうワクチンの有効性及び安全性評価に関する研究

所 属 国立感染症研究所
ウイルス第一部・主任研究官
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細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8(m8)が保管されている。本研究は、1. m8 を組換えワクチンベクターとして応用するために、細菌人工染色体(Bacterial Artificial Chromosome; BAC)にクローニングし、そこから感染性 m8 をリカバリーできる m8-BAC システムの確立を目指した。また、2. 国産の弱毒痘そうワクチン株である m8 を用いた天然痘ウイルス暴露後重症化阻止の可能性を検討するため、天然痘ウイルスの代わりに、エクトロメリアウイルス(ECTV)を用いてマウスを攻撃し、その直後に m8 を皮下、筋肉内、皮内、静脈内接種してルート毎の効果を比較した。結果として 1. m8 をクローニングした BAC プラスミドから感染性 m8 をリカバリーできるシステムを確立できた。2. エクトロメリアウイルス攻撃に対する m8 の感染防御効果の程度はその接種ルート毎に異なることが確認された。

研究協力者

氏名・所属研究機関名・職名

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

1. 現在、痘そうワクチンとして第 3 世代にあたる高度弱毒化株の MVA(Modified Vaccinia Ankara)が、組換えワクチンベクターとしての可能性について世界的に活発に検討されている。他方で同じく高度弱毒化株である LC16m8(m8)は、安全性、免疫原性の高さが科学的に証明されているにもかかわらず、組換えワクチンベクターとしての応用検討は MVA に水をあけられている。その理由の一つは、外来遺伝子を保持する組換えワクシニアウイルスを容易に作成するシステムの

有無にあると考えられる。MVA は既に細菌人工染色体(Bacterial Artificial Chromosome; BAC)にクローニングされており、この BAC プラスミドから感染性を持つ MVA を容易にリカバリーする MVA-BAC システムが確立されている。このシステムでは所謂大腸菌の遺伝学を利用して BAC プラスミドへの外来遺伝子導入、組換え MVA のリカバリーを容易に行うことが出来る。そこで本研究では m8 を BAC にクローニングし、BAC プラスミドから感染性 m8 をリカバリーする m8-BAC システムの確立を行った。

2. 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。近年は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、m8 の暴露後ワクチンとして接種ルート毎の効果を検討するため、様々なルートで投与した。

B. 研究方法

1. m8-BAC システムの確立は以下の様に行った (図 1)。まず古典的な相同組換え法を用いて大腸菌内で BAC を保持するために必須である mini-F カセットを EGFP カセットと共に導入した組換え m8 (m8-EGFP-BAC) を作製した。次にこの組換え m8 のゲノムを感染細胞から抽出し、大腸菌に導入して形質転換を行った。mini-F カセット内にはクロラムフェニコール耐性遺伝子が含まれているので、薬剤選択が可能である。形質転換された大腸菌が保持する BAC プラスミドの配列を確認した。またこの pLC16m8-BAC を 293FT 細胞にトランスフェクションし、同時に鶏痘ウイルスをヘルパーウイルスとして感染させ、感染性ウイルスがレスキューされるかを検討した。pLC16m8-BAC から更に大腸菌の遺伝学 (Red/ET システム) を用いて、EGFP 及び BAC カセットが、リカバリーされたウイルスから相同配列を介して自己切断され、また m8 または mO タイプの B5R を保持する pLC16m8.8S-BAC と pLC16m8.OS-BAC を作製した (図 2)。更に自己切断しない BAC プラスミドで m8 または mO タイプの B5R を保持する、pLC16m8.8-BAC、pCL16m8.O-BAC も作製し、リカバリーされたウイルスの性状を解析した。
2. 5LD50 相当の ECTV Hampstead 株を経鼻 (i.n.) 経路でマウスに感染させた。その直後に m8、またはその親株である Lister 株を皮下 (s.c.)、筋肉内 (i.m.)、皮内 (i.d.)、静脈内 (i.v.) 接種により 10^7 PFU 接種し、その発症・重症化阻止効果を生存率、体重変化により検討した。

【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. m8-EGFP-BAC 感染細胞から抽出したゲノムに

よって形質転換された大腸菌から精製した BAC プラスミド、2 クローンについて組換え m8 の全ゲノムを保持していることが次世代シーケンシングにより確認され、これを pLC16m8-BAC とした。この BAC プラスミドは親株である m8-EGFP-BAC と同一の配列を持ち、293FT 細胞にトランスフェクションしてヘルパーウイルスを感染させると、感染性を持つ組換え m8 (vLC16m8-BAC) をリカバリー出来ることが確認された。この vLC16m8-BAC の RK13 細胞に於ける増殖能は元ウイルスである m8-EGFP-BAC、また m8 と比較して違いは見られなかった (図 3)。pLC16m8.OS-BAC、pLC16m8.8S-BAC からリカバリーしたウイルス (vLC16m8.OS-BAC、vLC16m8.8S-BAC) はそれぞれ mO、m8 タイプの B5R を発現するため、プラークサイズが異なり、また、その内、5-10% のプラークは EGFP を発現していないことが確認された (図 4)。EGFP を発現していないプラークをクロニングしたウイルスは EGFP 及び mini-F カセットも欠失していることが PCR により確認された (図 5)。このウイルスはゲノム配列が m8 と比較しても区別がつかないことが次世代シーケンシングにより確認された。pLC16m8.8/O-BAC からリカバリーされたウイルスについては EGFP を発現していないウイルスは確認できなかった。

2. ECTV 暴露直後に m8 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 10 匹のマウスに 5LD50 の ECTV Hampstead 株で攻撃を行った。その直後に 10^7 PFU/100ul の Lister, m8 を s.c., i.m., i.d., i.v. で接種し、観察、体重測定を行った (図 6)。s.c., i.m. 接種に於いて Lister, または m8 の効果に有意な差は観察されなかった。一方対照である培地接種群と比較した場合、ワクチン接種群は接種ルートによってその効果に違いが現れた。s.c. の場合では対照群とワクチン接種群間で有意な差が無かった。一方、i.m., i.d., i.v. の場合はワクチン接種により培地接種群と比較して有意な生存率の改善が確認された。また、ワクチン接種群の体重変化は i.m., i.d. では ECTV 攻撃 13 日後から増加傾向に転じるのに対して、i.v. では攻撃 7 日後から増加傾向に転じた (図 7)。

D. 考察

1. m8 は、ACAM2000 と共に、天然痘を用いたバイオテロに備えた備蓄用ワクチンとして WHO から推奨される痘そうワクチンの一つであり、その免疫誘導能と安全性は広く認知されている。m8

が組換えワクチンベクターの土台として広く利用されるためには、簡便に組換え m8 が作製できる事が重要であると考えている。本研究で確立した m8-BAC システムは、大腸菌の遺伝学を用いて容易に外来遺伝子を導入することが出来ることから、m8 を組換えワクチンベクターとして応用研究するための一助になると考える。本システムは野生型の m8 がコンタミする事がないため古典的な方法と比較してクローニングが非常に容易である。特に pLC16m8.8S-BAC を用いれば、リカバリーしたウイルスから自己切断によってゲノム内の EGFP 及び BAC カセットがゲノム内に存在しないウイルスが作製できる。このウイルスは、外来遺伝子以外は m8 と同一のゲノムを持ち、EGFP や mini-F カセットに起因する思わぬ副反応などの可能性を考慮する必要はない。

2. 本研究は弱毒痘そうワクチン m8 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。投与ルートにより毎の、m8 の暴露後ワクチン効果の違いは、ECTV 感染を排除するための免疫を獲得する早さが異なる為ではないかと現時点では考察している。次年度では、m8 を異なる投与ルートにより接種したマウスから経時的に脾臓を採取、リンパ球を分離し、これを EVTV 攻撃直後のマウスに移植することで、獲得免疫が準備されるまでの期間の違いを検討したいと考えている。

E. 結論

1. m8 をクローニングした BAC プラスミドから感染性 m8 をリカバリーできる m8-BAC システムを確立した。特に pLC16m8.8S-BAC を用いるシステムは本来の m8 と区別の出来ないゲノムを保持するウイルスをリカバリーすることが可能である。
2. ECTV 攻撃に対する m8 の感染防御効果はその接種ルート毎に異なることが確認された。i.v., i.d., i.d. ルートを用いた接種はマウスの生存率

を有意に増加させる一方で、s.c.では効果が確認されなかった。特に、i.v.は i.d., i.m.よりも、マウスの体重変化が ECTV 感染による減少傾向から、回復に向かう増加傾向に転ずるタイミングが 1 週間近く早いことが判った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshikawa T, Fujii H, Okutani A, Shibamura M, Omura N, Egawa K, Kato H, Inagaki T, Harada S, Yamada S, Morikawa S, Saijo M. Construction and characterization of bacterial artificial chromosomes harboring the full-length genome of a highly attenuated vaccinia virus LC16m8. PLoS One. 13(2):e0192725, 2018.
- 2) Omura N, Yoshikawa T, Fujii H, Shibamura M, Inagaki T, Kato H, Egawa K, Harada S, Yamada S, Takeyama H, Saijo M. A novel system for constructing a recombinant highly-attenuated vaccinia virus strain (LC16m8) expressing foreign genes and its application for the generation of LC16m8-based vaccines against herpes simplex virus 2. Jpn J Infect Dis. In press

2. 学会発表

特になし

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

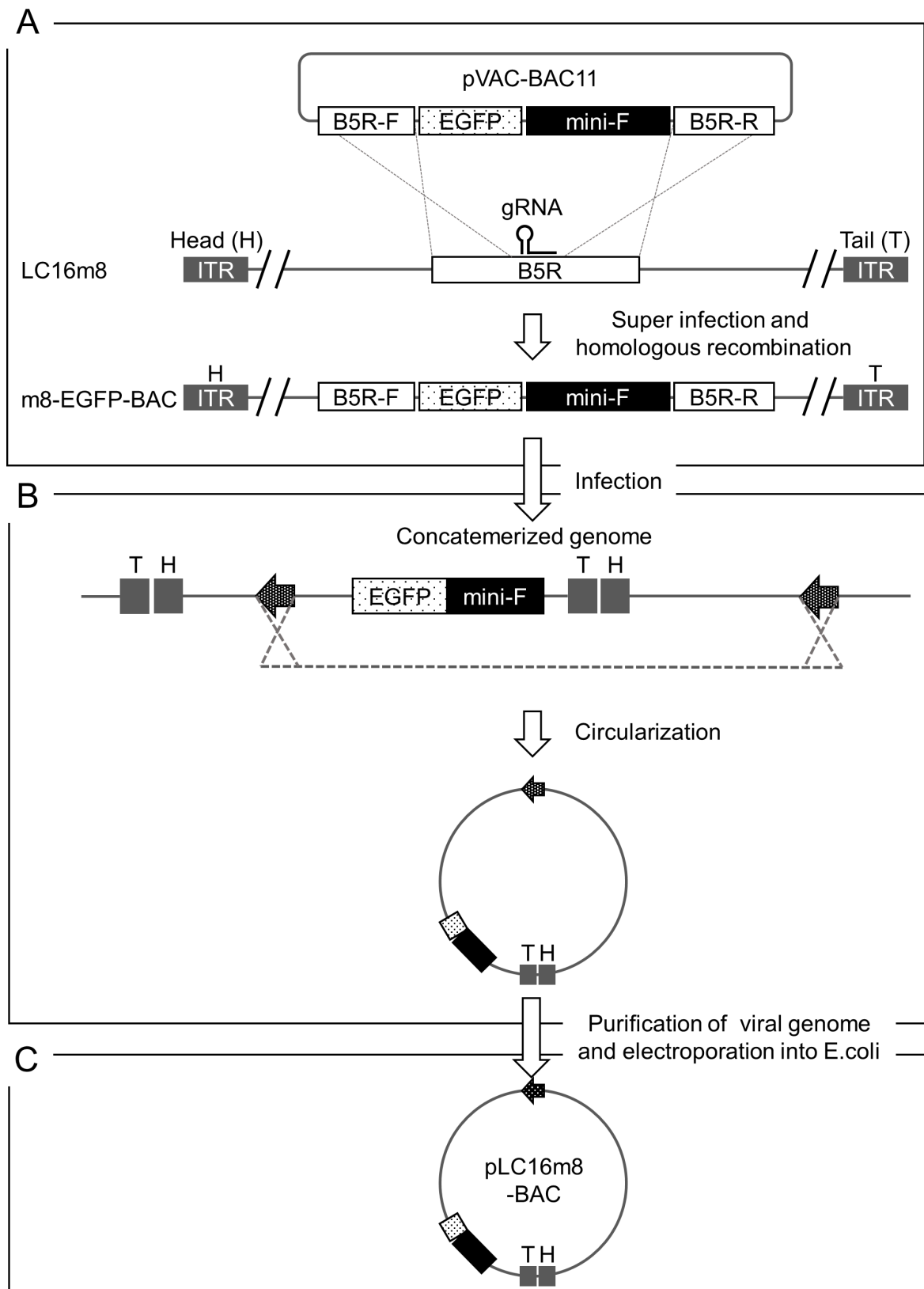


図 1. m8-BAC システムに必要な m8 の全ゲノムを保持する BAC プラスミド, pLC16m8-BAC の作製スキーム. (A) 古典的な相同組換え法に CRISPR-Cas9 システムを導入した方法により EGFP と mini-F カセットを保持する組換え m8, m8-EGFP-BAC を作製した. (B) m8-EGFP-BAC を RK13 細胞に感染させてウイルスゲノムを回収した. ワクシニアウイルスはゲノムの複製時にコンカテマーを形成するが, 相同配列間で組換えが起こり, 環状化したゲノムが存在すると推測される. (C) 回収したウイルスゲノムを用いて大腸菌を形質転換する. mini-F カセット内にクロラムフェニコール耐性遺伝子が存在するため, 形質転換した大腸菌を薬剤選択し, pLC16m8-BAC を得た.

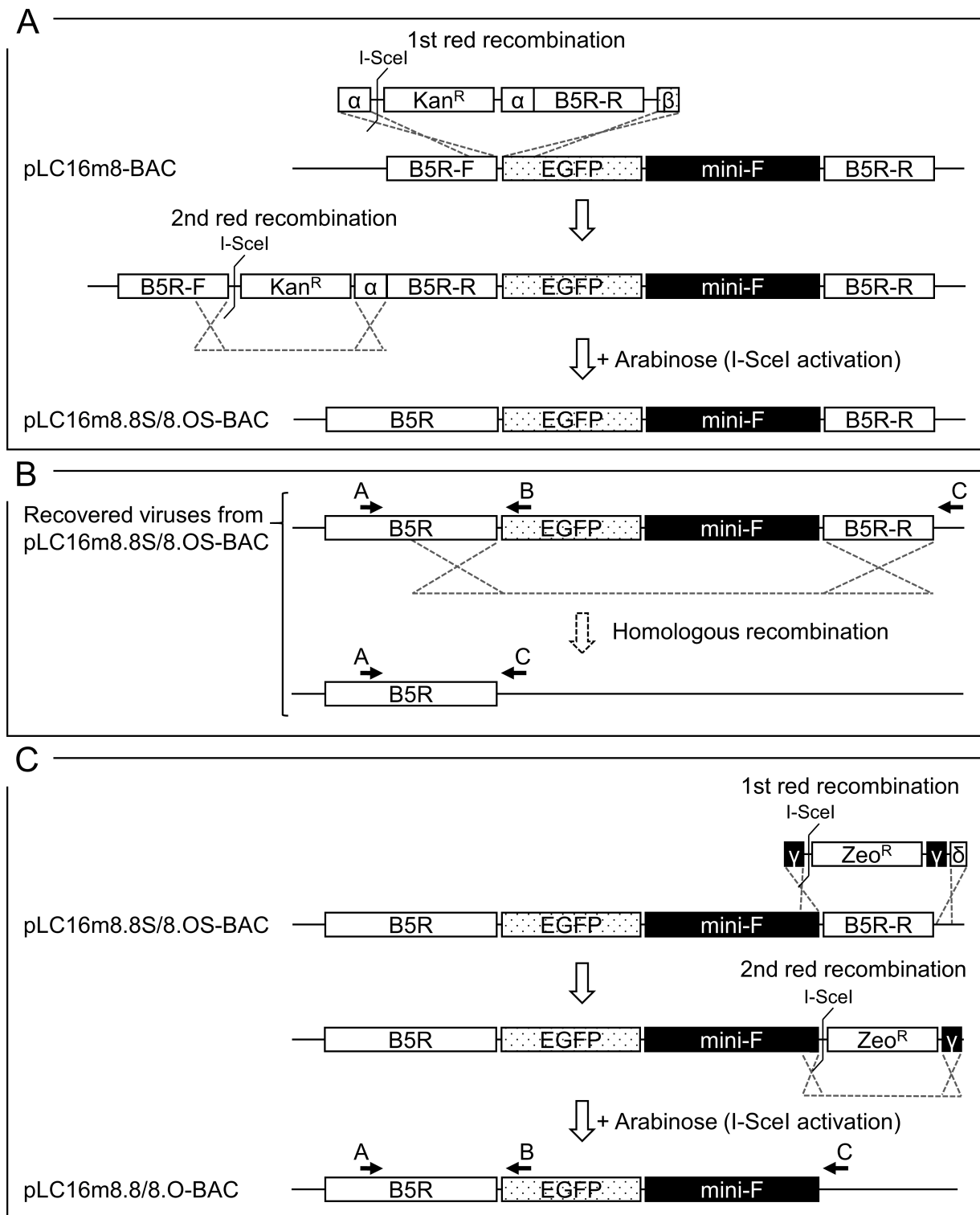


図 2. EGFP 及び mini-F カセットフリーの m8 をリカバリーする m8-BAC システム構築のスキーム. (A) カナマイシン耐性遺伝子と B5R 遺伝子の後部を保持する PCR 産物を Red/ET システムを用いた相同組換えにより pLC16m8-BAC に導入する. 更に 2 回目の組換えによりカナマイシン耐性遺伝子を除き, 完全な B5R の全長を持つ BAC プラスミド (m8 タイプまたは mO タイプの B5R を持つそれぞれ pLC16m8.8S-BAC, pLC16m8.OS-BAC) を作製した. (B) pLC16m8.8S-BAC, pLC16m8.OS-BAC からウイルスをリカバリーすると, 相同組換えにより EGFP と mini-F カセットが脱落したウイルスが出現する. (C) EGFP カセットと mini-F カセットが脱落しない BAC プラスミド pLC16m8.8-BAC, pLC16m8.O-BAC の作製. pLC16m8.8S-BAC, pLC16m8.OS-BAC をもとに mini-F カセットの下流に存在する B5R 遺伝子の後部を除去した. リカバリーしたウイルスゲノム内の EGFP と mini-F カセットを確認する為の PCR プライマー (A, B, C) を図示してある. 結果は図 5 に示している.

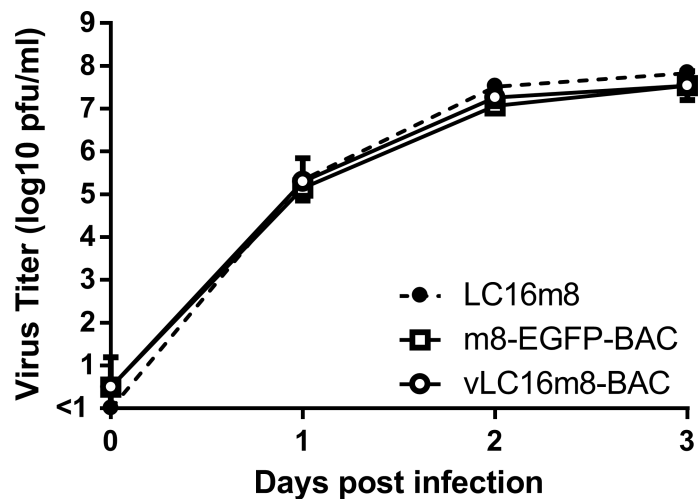


図 3. pLC16m8-BAC からリカバリーしたウイルス vLC16m8-BAC の増殖曲線. RK13 細胞に m8, m8-EGFP-BAC, vLC16m8-BAC を MOI=0.1 で感染させて, 経時的なウイルス量の変化を測定した.

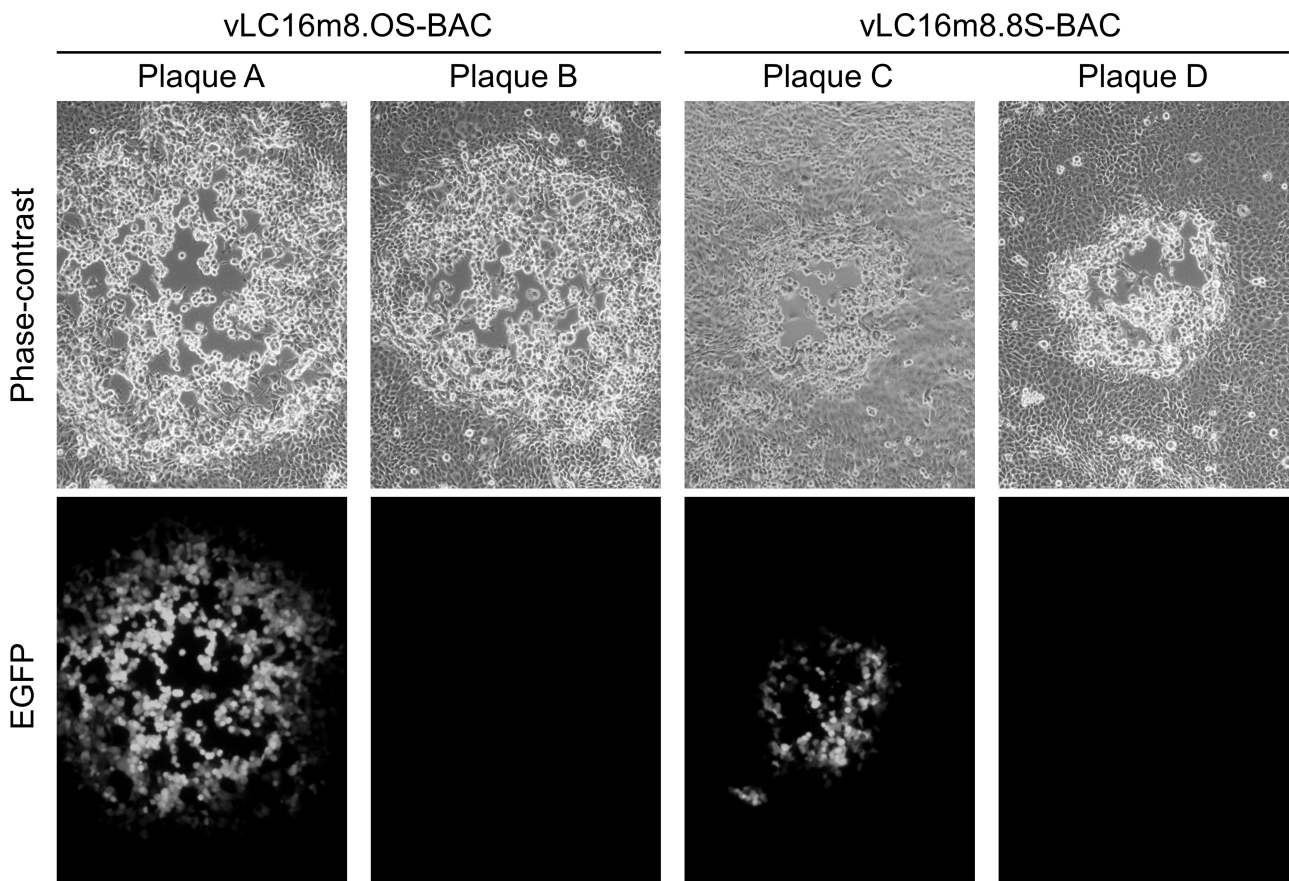


図 4. pLC16m8.8S-BAC, pLC16m8.OS-BAC からリカバリーしたウイルスの性状. プラークの大きさや EGFP の発現を顕微鏡下で観察した. RK13 細胞に pLC16m8.OS-BAC, pLC16m8.8S-BAC からリカバリーしたウイルス(vLC16m8.OS-BAC, vLC16m8.8S-BAC)を感染させた. vLC16m8.OS-BAC (plaque A と B) と vLC16m8.8S-BAC (plaque C と D)のプラークについて EGFP の発現とプラークサイズを検討した.

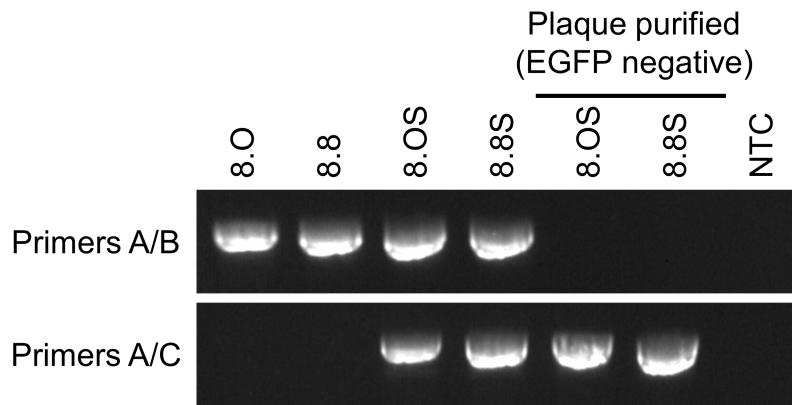


図 5. 自己切断による EGFP と mini-F カセットの脱落の確認. RK13 細胞にプラーク精製をしていない vLC16m8.O-BAC (8.O), プラーク精製をしていない vLC16m8.8-BAC (8.8), プラーク精製されたクローン, またはプラーク精製をしていない vLC16m8.OS-BAC (8.OS), プラーク精製されたクローン, またはプラーク精製をしていない vLC16m8.8S-BAC (8.8S)を感染させた. 回収したウイルスゲノムを鋳型として, 図 3 で示したプライマー A/B または A/C を用いた PCR を行い産物の有無を確認した. NTC は鋳型を含まない対照である.

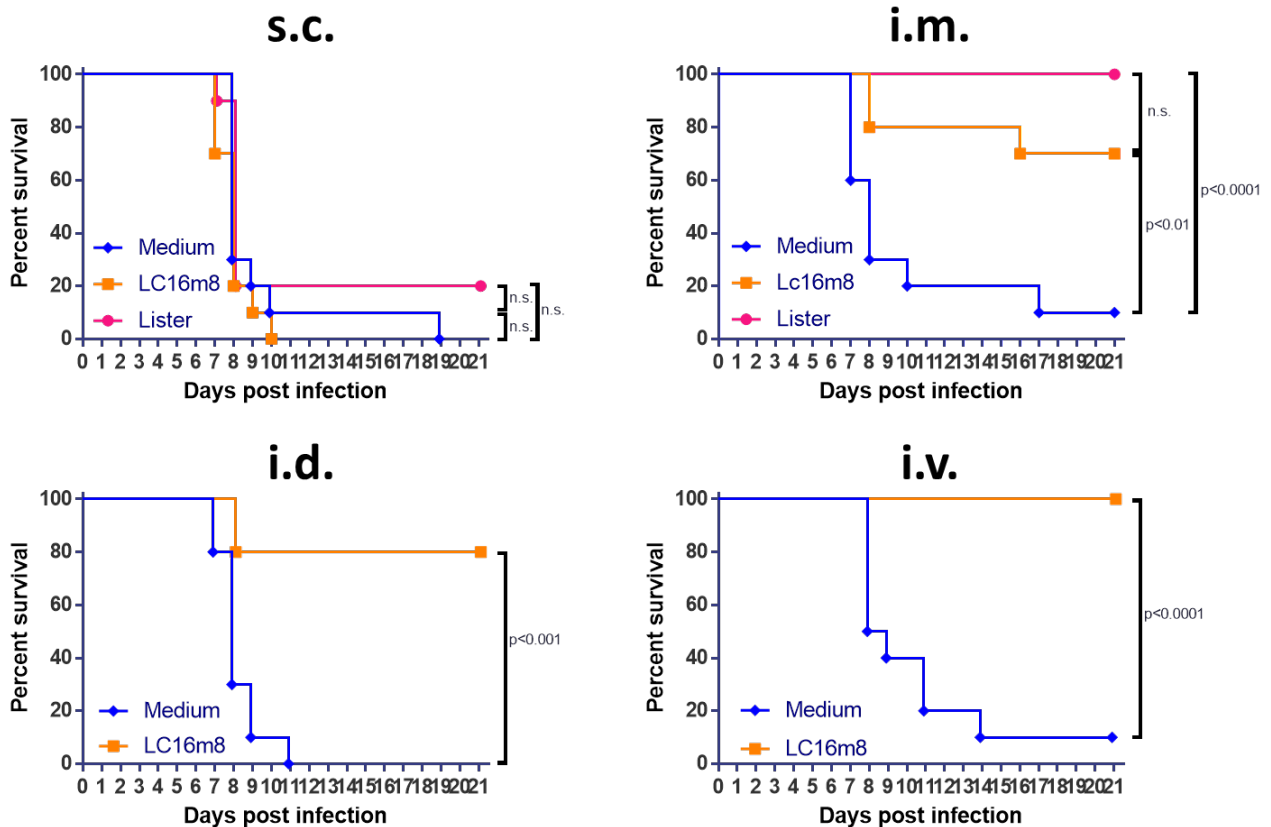


図 6. ECTV を感染させたマウスに, 直後に様々な投与ルートで m8 を接種した際の生存率の違い. 5LD50 相当の ECTV を i.n. で感染させた直後に Lister, m8 または対照として培地を接種した. その後マウスの生存を経時的に観察した.

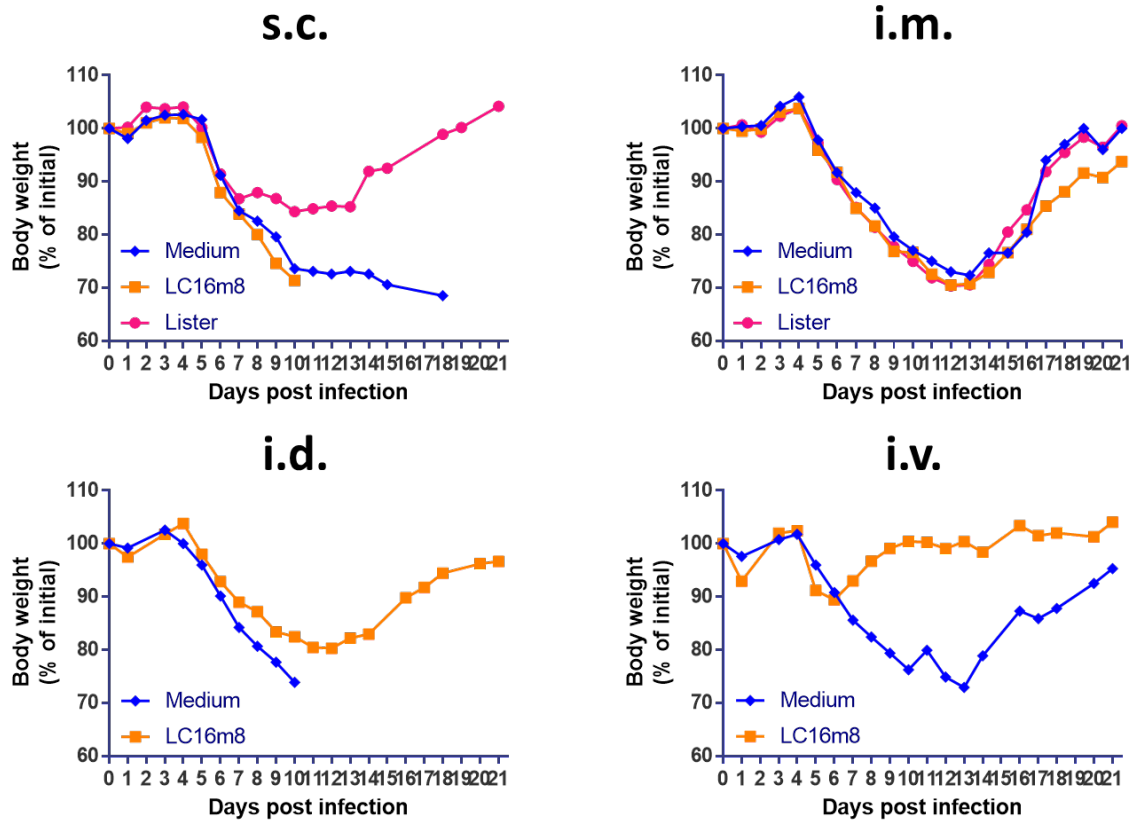


図 7. ECTV を感染させたマウスに、直後に様々な投与ルートで m8 を接種した際の体重変改の違い。図 6 の実験に於いて同時に体重変化も測定した。