

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、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。そこで、肝組織におけるクッパー細胞の活性化に着眼し、ウイルス感染の影響の評価を試みた。その結果、好中球枯渇群において有意な肝クッパー細胞の活性化が示された。

研究協力者

岩田奈織子・佐藤由子・長谷川秀樹  
国立感染症研究所 感染病理部  
福士秀悦・吉河智城・西條政幸  
国立感染症研究所 ウイルス第一部

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。昨年度までに、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、感染後の好中球増多と、主に単球系の炎症性サイトカイン・ケモカインの高発現を引き起こすことが判明した。そこで、肝組織におけるクッパー細胞の活性化に着眼し、ウイルス感染後の影響について組織学的に評価した。

B. 研究方法

1. 組織材料

昨年度までに実施した感染実験の組織標本を用いて解析を進めた。感染実験は次の通りである。BALB/c マウス(日本エスエルシー、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  $2 \times 10^5$  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)。常法どおり 10%ホルマリン緩衝液で浸漬固定した組織をパラフィン包埋し、組織切片を得た。

2. 免疫組織化学法と画像解析法

活性化マクロファージのマーカーである Iba-1 抗原のパラフィン包埋組織上の検出を免疫組織化学法により行った。pH6.0 抗原賦活化液(ニチレイ)を用いて 121 度 10 分の抗原賦活化処理後、一次抗体には抗 Iba-1 ポリクローナル抗体(Wako)を用いた。ポリマー法によるペルオキシダーゼ標識を行い、ジアミノベンチジンによる可視化後、対比染色にはマイヤーのヘマトキシリンを用いた。

検索対象は中心静脈を撮影中心とした顕微鏡撮影デジタル画像で、撮影倍率 400 倍で画像を得た。計算上、対象面積はおよそ 150,000 µm<sup>2</sup>であった。各個体の肝組織切片から 3 カ所を撮影した。色域選択による抗原陽性部位の抽出には、画像解析ソフト Neurolucida (MBF Bioscience)を用い、抽出した画像から解析ソフト Neurolucida explorer (MBF

Bioscience)による面積の自動計算を行った。各個人の平均値を統計解析に用いた(n=6)。統計解析は統計解析ソフト Prism 7 (MDF)を用いた。

#### 【倫理面への配慮】

今年度内に動物実験の実施はなく、倫理面で配慮しなければならない事項はなかった。

### C. 研究結果

接種 16 日目の肝組織を HE 染色で評価したところ、ウイルス接種群において腫大したクッパー細胞が散見された(データは示さない)。抗 Iba-1 抗体を用いた免疫組織化学法により、肝の類洞内に Iba-1 抗原を検出した(図 A)。抗原陽性部位を色域選択(RGB スペクトル R,G,Bはそれぞれ 197, 176, 147 とした)によってトレースし、その輪郭内の面積を自動計算により算出し各群における面積値を比較した(図 B)。その結果、抗原陽性面積によるクッパー細胞の活性化の評価はそれぞれ次の様になった。

非感染群において、アイソタイプコントロール投与と Ly6G 抗体投与によるクッパー細胞の活性化への影響に有意な差はみられなかった(p=0.20)。また、アイソタイプコントロール群に対するウイルス接種の影響としては、感染によるクッパー細胞の活性化が有意にみられた(p=0.013)。Ly6G 抗体投与後のウイルスの皮下接種により、クッパー細胞の活性化はいずれの群に対しても有意であり(p<0.01)、好中球の枯渇によって、肝臓内のクッパー細胞に対する感染の影響が強く認められることが示された。

### D. 考察

昨年度報告したように、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- $\gamma$ 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 $\alpha$ 、GM-CSF、IL-2 と IFN- $\gamma$ の有意な上昇が見られた。いずれも血中の単球系ケモカイン・サイトカインの上昇であったことから、単球系細胞の活性化が示唆されていた。そこで今年度は、組織中の単球・マクロファージに着眼することとした。HE 染色による組織の評価結果から、肝組織の評価が容易と判断し、肝組織内のクッパー細胞の活性化について組織上での評価を試みた。

Iba1 (別名 : G1, Daintain/AIF-1)は、単球あるいはマクロファージの細胞質で発現し、炎症応答に関与するタンパク質であり、マクロファージの活性化に関与することが知られている。そのため、活性化マクロフ

ージやマイクログリアのマーカーとしてよく利用されている。一方、細胞の活性化についての形態的評価は困難で、主観的となるため、Iba-1 抗原陽性部位の面積値を評価対象とすることとした。

その結果、Iba-1 抗原の陽性面積値は、ケモカイン・サイトカイン反応の結果と一致した。本解析法は、ポックスウイルス感染後の宿主応答を組織学的に調べる上で新たな指標となりえる。今回の結果についてはウイルス動態とともにその意義を考察する必要がある。血中及び臓器中のウイルス感染動態を検索予定であるが、現在、検出系について評価中である。

### E. 結論

サル痘ウイルス感染マウスモデルにおいて、好中球の枯渇は、肝臓内のクッパー細胞の強い活性化を引き起こした。

### F. 健康危険情報

該当なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Iwata-Yoshikawa N, Okamura T, Shimizu Y, Hasegawa H, Takeda M, Nagata N. TMPRSS2 Contributes to Virus Spread and Immunopathology in the Airways of Murine Models after Coronavirus Infection. *J Virol.* 2019. 93(6) doi: 10.1128/JVI.01815-18.
- 2) Iwata-Yoshikawa N, Okamura T, Shimizu Y, Kotani O, Sato H, Sekimukai H, Fukushi S, Suzuki T, Sato Y, Takeda M, Tashiro M, Hasegawa H, Nagata N. Acute Respiratory Infection in Human Dipeptidyl Peptidase 4-Transgenic Mice Infected with Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Virol.* 2019. 93(6). doi: 10.1128/JVI.01818-18.

#### 2. 学会発表

該当なし

### 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

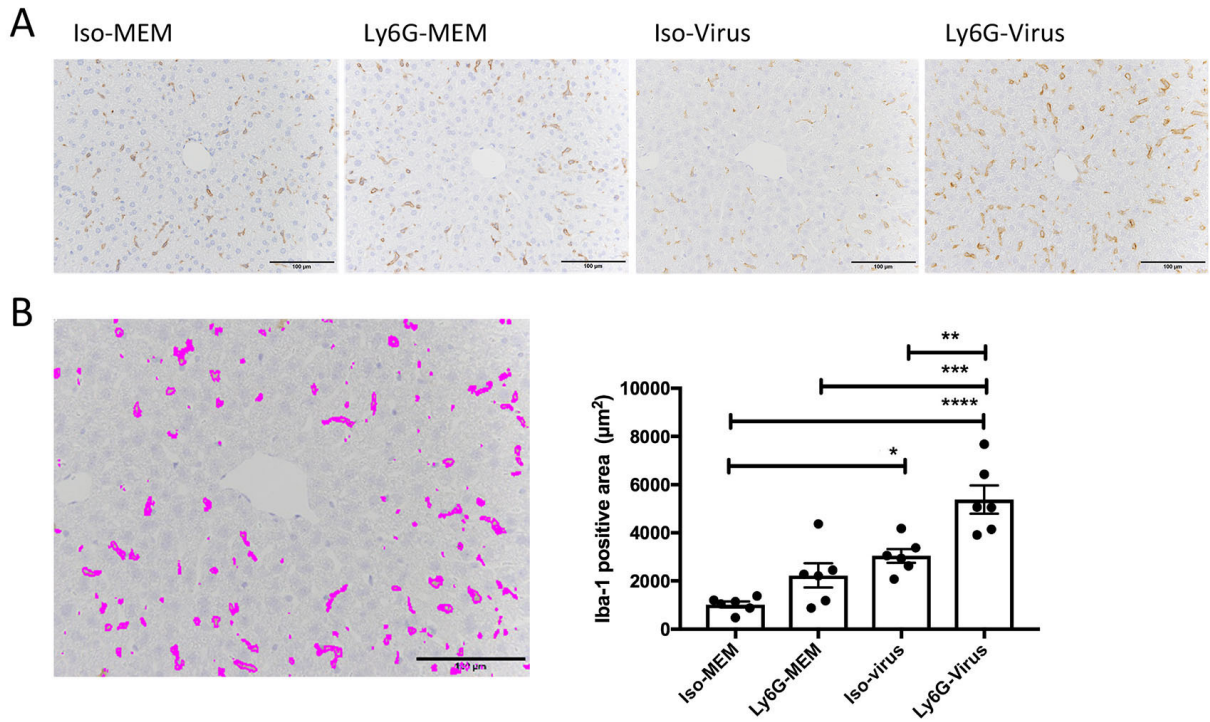


図 サル痘ウイルス皮下接種 16 日目の肝組織における Iba-1 陽性細胞の評価. A. 抗 Iba-1 抗体を用いた免疫組織化学法の組織像. 中心静脈を撮影中心として, 撮影倍率 400 倍の画像(面積 約 150,000  $\mu\text{m}^2$ )を得た. Iso-MEM, アイスotypeコントロール処理後細胞培養液接種; Ly6G-MEM, 好中球枯渇後細胞培養液接種; Iso-Virus, アイスotypeコントロール処理後ウイルス接種; Ly6G-Virus, 接種好中球枯渇処理後ウイルス. 各群 n=6. B. 左図 Iba-1 抗原陽性部位を色域により抽出しトレースした画像. 右図 トレース画像から面積を算出し, Iba-1 陽性面積とし One-way ANOVA 解析により比較解析した. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001; \*\*\*\*, p<0.0001.