

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. 参照細胞培養ワクチン Lot を 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. バイオアッセイからはいずれの Lot においても 3 回継代することによって MSP 頻度が 100%まで増加することが分かった. また, 定量的 PCR から各 Lot において主な MSP が検出できた. 今後, 次世代シーケンス解析による定量的 PCR の結果との比較が必要である.

研究協力者: 朴ウンシル, 奥谷晶子, 宇田晶彦(同, 獣医科学部), 吉河智城, 西條政幸(同, ウイルス第一部)

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)解析で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, 参照細胞培養ワクチン Lot を用いて, 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) 参照細胞培養ワクチンからの MSP 増幅:
参照細胞培養ワクチンには低頻度ではあるが MSP が含まれている. そこで, 次世代シーケンスにより多様な SNP が検出された Lot6, 7, 8, 9, 10 及び 12 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回収した(1継代培養). これを繰り返し 3 継代培養した.
- 2) 継代培養した Lot のバイオアッセイ:
継代培養した Lot を RK13 細胞, Vero E6 細胞でバイオアッセイを行ない, 各 Lot 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) 継代培養した Lot からの 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) 参照細胞培養ワクチンからの MSP 増幅:
次世代シーケンスにより多様な SNP を含んでいる Lot6, 7, 8, 9, 10 及び 12 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 細胞でそれぞれバイオアッセイを行った結果、RK13細胞で 10^8 pfu/mL、Vero E6 細胞では $<10^2$ pfu/mL と MSP は検出限界未満 ($<10^0$) であった。各 Lot を Vero E6 細胞において moi0.01 で 3 回継代培養し、同様にバイオアッセイを行った結果、2~3 回継代培養で MSP 出現頻度がほぼ 100%に達した。
- 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) Vero E6 細胞で 3 代継代培養した参照細胞培養ワクチン Lot 中の MSP 頻度
上記で調製した Vero E6 細胞で継代培養した Lot ウイルス液から DNA を抽出し、MSP 特異的定量 PCR を実施した。その結果、多数の Lot において継代培養するごとに 267A 挿入型 MSP の比率が増えたため、267A 挿入型 MSP がメジャーであると推測された。さらに、Lot12 においては 274ATAC 挿入型 MSP のみ

が検出され、継代培養ごとに比率が増えたため、MSP 検出には 3 種類(267A 挿入型、271T 挿入型および 274ATAC 挿入型)のプライマーを用いて行う必要があると考えられた。

D. 考察

次世代シーケンスにより多様な SNP を含んでいる 6 種類の Lot を Vero E6 細胞で 3 回継代培養するとバイオアッセイでは 2~3 回継代により MSP の出現頻度がほぼ 100%に達することが分かった。これら Lot のそれぞれ 3 代継代培養したウイルスから主な種類の MSP の中でも 267A 挿入型が高い頻度で検出され、その比率も継代ごとに増えていた。しかし、Lot によっては 274ATAC 挿入型のみが検出され、継代することによってその比率が増えていたため、MSP 検出には 3 種類のプライマーを用いて定量的 PCR を行う必要があることが分かった。今後はこれら Lot の Vero E6 細胞で継代培養したウイルス液を次世代シーケンス解析を行い、その結果を比較し、定量的 PCR の結果との相同性を確認する予定である。

E. 結論

参照細胞培養ワクチンの継代ウイルス液を用いた実験から 3 種類の MSP が検出され、その MSP 特異的定量 PCR にはやはり 3 種類のプライマーを用いて実施する必要があることが分かった。今後、次世代シーケンス解析により MSP 特異定量的 PCR の結果と相同性を確認する予定である。

F. 健康危険情報

痘そうワクチンに関しては特になし。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 |
| なし | 3. その他 |
| 2. 実用新案登録 | なし |

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

図 1. これまでに得られた MSP の遺伝子型と頻度

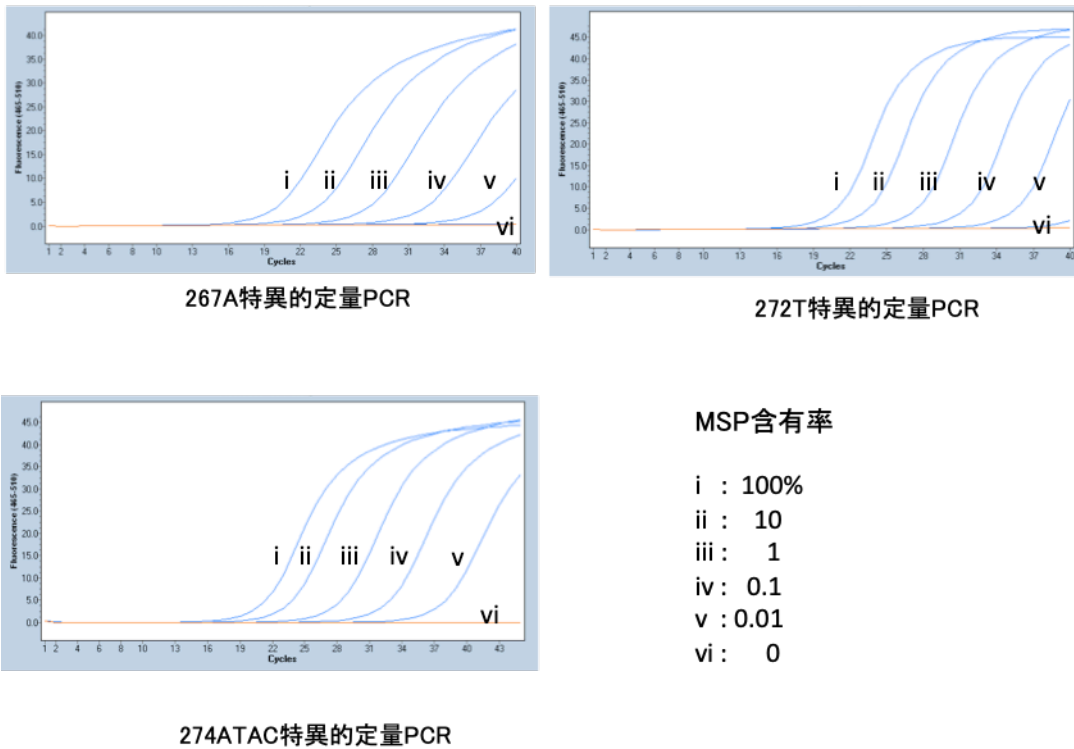


図 2. MSP 特異的定量 PCR の MSP 検出感度