

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た。今年度は、本モデルのリンパ系組織および血中におけるウイルスゲノム動態を経時的に明らかにした。さらに、これまでに得られた宿主応答と組織変化を総合的に検討したところ、好中球は本モデルにおける体内のウイルス伝播と病態の更新に一定の役割を担うと考えられた。本モデルは、今後のオルソポックスウイルスワクチン研究に利用できると思われる。

研究協力者

岩田奈織子・佐藤由子・鈴木忠樹  
国立感染症研究所 感染病理部  
吉河智城・福土秀悦・西條政幸  
国立感染症研究所 ウイルス第一部

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、アインタイ 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、心臓採血し血液とリンパ組織を得た(n = 4-6)。材料は解析まで、DNA/RNA Shield(ZYMO Research)中で -80°C にて保管し、Quick-DNA Kits(ZYMO Research)を用いて DNA を抽出し Monkeypox ウイルスのゲノムを real time PCR 法により検出した。使用したプライマー、プローブは次の通り(Maksyutov RA et al., 2016):

MPXV F3L upper,  
5'-CATCTATTATAGCATCAGCATCAGA-3'  
MPXV F3L lower,  
5'-GATACTCCTCCTCGTTGGTCTAC-3'  
MPXV F3L probe,  
HEX-5'-TGTAGGCCGTGTATCAGCATCCAT  
T-3'-BHQ1

QuantiTect Probe PCR Kits(QIAGEN)を用いてサンプルを調製し、Real time PCR 反応プロトコルは、テンプレート変性・酵素活性化ステップ 95°C10 分、変性 95°C15 秒およびアニーリング・伸長反応

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、主に単球系の活性化を引き起こすことが示された。今年度は、ウイルスゲノムの体内動態を評価した。

B. 研究方法

1. 組織材料

初年度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

63°C60 秒 45 サイクル, 37°C30 秒とした。

【倫理面への配慮】

該当しない。

C. 研究結果

アイソタイプコントロールおよび Ly6G 抗体投与後のウイルスの皮下接種により, 3 日目の頸部リンパ節あるいは脾臓においてそれぞれ 5 匹中 4 匹あるいは 5 匹からウイルスゲノムが検出された(図)。また, Ly6G 抗体投与群においては, 4 匹中 2 匹で 10 日目の血中からウイルスゲノムが検出された。16 日目にはいずれの個体からもウイルスゲノムは検出されなかった。好中球の枯渇によってウイルス血症が遷延することが示唆された。

D. 考察

オルソポックスウイルスの小動物モデル開発のために種々の経路や系統でマウスの実験的感染が試されてきた。新生仔マウスや免疫不全マウスでは全身感染や致死感染を示すが, 成マウスではほぼ不顕性感染を示すのみであった。本研究では, 成 BALB/c マウスに好中球枯渇処理を施すことによって, サル痘ウイルスの易感染状態を作り出すことが出来ることを示した。また, 好中球枯渇状態ではウイルス血症が遷延し, ウイルス増殖と病変形成が亢進されることも示唆された。本研究で用いたウイルス量は一匹あたり  $2 \times 10^5$  PFU ウイルス量/100  $\mu$ l であったが, 今後はウイルス量をさらに高くすることで安定した動物モデル系となると考えている。以上から, 新たなオルソポックスウイルス感染マウスモデルを提示した。

E. 結論

サル痘感染マウスモデルの検討結果から, オルソポックスウイルス感染症の重症化の宿主因子として好中球を中心とした免疫応答の関与が示唆された本モデルは, 今後のオルソポックスウイルスのワクチン開発研究に利用できると考える。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsuyama S, Nao N, Shirato K, Kawase M, Saito S, Takayama I, Nagata N, Sekizuka T, Katoh H, Kato F, Sakata M, Tahara M, Kutsuna S, Ohmagari N,

Kuroda M, Suzuki T, Kageyama T, Takeda M. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 117(13):7001-7003, 2020.

- 2) Sekimukai H, Iwata-Yoshikawa N, Fukushi S, Tani H, Kataoka M, Suzuki T, Hasegawa H, Niikura K, Arai K, Nagata N. Gold nanoparticle-adjuvanted S protein induces a strong antigen-specific IgG response against severe acute respiratory syndrome-related coronavirus infection, but fails to induce protective antibodies and limit eosinophilic infiltration in lungs. Microbiol Immunol. 64(1):33-51, 2020.

2. 学会発表

特記事項なし

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

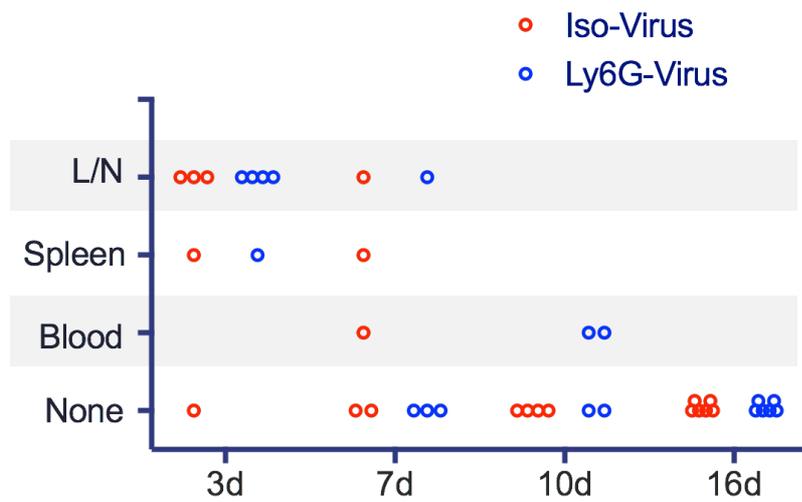


図 頸部リンパ節, 脾 および血液における経時的なウイルスゲノムの検出 (n=4)各ドットは個体を示す. Noneはいずれの材料においてもウイルスゲノムが検出されなかった事を示す.