

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(遺伝子機能解析)、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 前田 健

研究要旨:Lister 株から低温馴化により LC16 株, LC16mO 株を經由して樹立された, 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 からは各 Lot において主な MSP が検出でき, MSP の種類が異なることが分かった. 更に, 次世代シーケンス解析と定量的 PCR の結果を比較した結果, MSP 出現頻度率がほぼ一致した総合的に, MSP には主に, 4 種類の MSP が存在し, その検出にはそれぞれ特異的プライマーを用いた定量的 PCR を実施する必要があると考えられた. 一方, より簡便に MSP の頻度が測定できるように, 復帰した MSP の B5R 部位を抗原としてウサギ由来の抗ペプチド抗体を作製した今後, その抗血清を用いて, 検出法を開発する予定である.

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 株を經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. しかし, 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 増幅率を定量的 PCR による結果と次世代

シーケンス解析結果を比較した結果、今まで主な割合を占めなかった MSP の出現頻度が最も高くなることが分かった。本研究では、その MSP の定量的 PCR 系を開発し、MSP 特異的定量 PCR と次世代シーケンス解析により、継代培養に伴う MSP 変異パターンを比較し、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. 268T 挿入型の MSP の作出

次世代シーケンス解析により、268T 挿入型の頻度が最も高かった Lot10 を RK13 細胞に moi0.1 で感染した感染 7 日目に、プラーク精製を行い、凍結融解を 3 回行った。その上清を LC16m8 及び MSP 共通のプライマーを用いて PCR を行い、direct シーケンスにより 268T 挿入型を選別した 268T 挿入型の MSP を再度 RK13 細胞に感染し、同様にプラーク精製を行ったこの過程をトータル 3 回行い、268T 挿入型 MSP を作出した。

2. 268T 挿入型の定量的 PCR 開発

268T 特異的プライマーを変異部位である T 塩基が最後に来るように、forward は 17mer から 20mer まで、reverse は 11mer から 22mer まで設計した。また、positive control は各 MSP を RK13 細胞に moi0.1 で感染させ、Hirt extraction により、MSP の DNA を抽出し、用いた。まずは、これらを用いて conventional PCR により 268 挿入型を特異的に検出できるプライマーを選別した選別されたプライマーを用いて、定量的 PCR を実施した最終的に選別されたプライマーを用いて検出限界を確認した。

3. MSP 特異的定量的 PCR と次世代シーケンス解析による MSP 変異パターン及び出現頻度比較

6 種類の Lot とそれぞれ Vero E6 細胞で 3 代継代培養した上清を 2) で開発した MSP 特異的定量的 PCR を合わせて、4 種類 (267A 挿入型、272T 挿入型、274ATAC 挿入型及び 268T 挿入型) のプライマーを用いた MSP 検出の定量的 PCR を行った。その結果と次世代シーケンス解析による結果を比較した。

4. MSP の B5R を抗原としたウサギ由来の抗ペプチド抗体作製

MSP は B5R 遺伝子中 1 塩基、または、4 塩基挿入及び 2 塩基欠損により復帰した株であり、LC16m8 とは異なり、LC16mO 株と同様に全長の B5R を有する (図 1)。B5R の中、LC16m8 と異なる SCR (short consensus repeats)

domain 以降、transmembrane domain 以前の 237aa から 275aa までの部位でデザインしたペプチドを抗原とし、ウサギ由来の抗ペプチド抗体を作製した Lot6, 7, 8, 9, 10 及び 12 それぞれの 3 代継代培養した上清を moi 0.1 で RK13 細胞に感染させ、感染 7 日目に、ウサギ由来の抗ペプチド抗体を用いて、FA (1:200~1,000) や IC (1:200~1,000) により MSP を特異的に検出できるかを確認した。

【倫理面への配慮】

該当しない。

C. 研究結果

1. 268T 挿入型の MSP の作出

前年度は今まで開発してきた 267A 挿入型、272 挿入型及び 274ATAC 挿入型検出のための定量的 PCR (図 2) の結果と次世代シーケンス解析による結果を比較すると、MSP 出現頻度が不一致することが分かった。その原因は次世代シーケンス解析によると、Vero E6 細胞で 3 代継代培養すると、268T 挿入型がメジャーに増加することによるものであった。今までの結果では、268T 挿入型は主な MSP ではなかったため、定量的 PCR 系は開発していなかった。そこで、268 挿入型の定量的 PCR を開発するために、まずは、その MSP を作出した次世代シーケンス解析により、268T 挿入型の頻度が最も高かった Lot を RK13 細胞に感染させ、プラーク精製を行った 268T 挿入型であることを PCR 後 direct シーケンスにより確認した。最初にランダムに選んだ 16 個のプラークの中、4 個が 268T 挿入型 MSP を含んでいた。更に、2 回プラーク精製をし、純粋な 268T 挿入型 MSP を作出できた。

2. 268T 挿入型の定量的 PCR 開発

268T 特異的プライマーを変異部位である T 塩基が最後に来るように、forward は 17mer から 20mer まで、reverse は 11mer から 22mer まで設計した。また、positive control は各 MSP を RK13 細胞に moi0.1 で感染させ、Hirt extraction により、MSP の DNA を抽出し、用いたこれらを用いた conventional PCR により forward 17mer 及び 18mer が 54°C、20 cycles で特異的に 268T 挿入型を特異的に検出できることが分かった。更に、その二つのプライマーを用いて定量的 PCR を検討した結果、forward 18mer プライマーがアニリン温度 54°C で 268T 挿入型を特異的に検出できることが分かったその検出限界は 0.3% 程度であった (図 3)。

3. MSP 特異的定量的 PCR と次世代シーケンス解析による MSP 変異パターン及び出現頻度比較

2)で開発した MSP 特異的定量的 PCR を合わせて、4 種類のプライマーを用いた MSP 検出の定量的 PCR の結果と次世代シーケンス解析による結果を比較した。各 Lot を Vero E6 細胞に 3 代継代培養すると、6 種類の Lot 中、5 種類の Lot において、268T 挿入型の出現頻度が顕著に増加することが分かった。また、継代ごとの MSP の変異パターンにおいて両方の結果がほぼ一致した(図4)。

4. MSP の B5R を抗原としたウサギ由来の抗ペプチド抗体作製

B5R の 237aa から 275aa までの配列からのウサギ由来の抗ペプチド抗体(図5)を用いて FA 及び IC を実施した結果、MSP は検出できなかった。それには、ペプチド抗原の限界が一つの原因である可能性が考えられた。今後、感染細胞を用いて immunoblot や flow cytometry によりウサギ由来の抗ペプチド抗体が MSP を検出できるかを検討する予定である。

D. 考察

次世代シーケンス解析により、主な比率を占めなかった 268T 挿入型が増加することが分かった。その MSP を特異的 forward 18mer プライマーより定量的に検出できた更に、4 種類(267A 挿入型、272T 挿入型、274ATAC 挿入型及び 268T 挿入型)のプライマーを用いた MSP 検出の定量的 PCR の結果と次世代シーケンス解析による MSP 出現頻度の結果はほぼ一致した。痘そうワクチン株の Lot を Vero E6 細胞に 3 代継代培養を重ねると、83%の確立で 268T 挿入型の出現頻度が高くなることが分かった。

また、より簡便に MSP を検出できるように、MSP の B5R 部位からペプチドをデザインし、ウサギ由

来の抗ペプチド抗体を作製したが、現在、MSP が検出できないことが分かったそのウサギ由来の抗ペプチド抗体により MSP が検出できる系を検索すると共に、ペプチドではなく、大腸菌から組換え蛋白質を作製し、ウサギ由来の抗血清を作製することを予定している。

E. 結論

MSP 特異的プライマーを用いた real time PCR と次世代シーケンスによる MSP 出現頻度検出率はほぼ一致し、MSP 頻度が 3%以上は検出できた。また、継代培養ごとに MSP の出現頻度が高くなること、また、メジャーな MSP が Lot により異なることから、MSP 検出のためには 4 種類(267A 挿入型、272T 挿入型、274ATAC 挿入型及び 268 挿入型)の特異的プライマーを用いて行う必要があると考えられた。

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
特記事項なし
2. 学会発表
特記事項なし

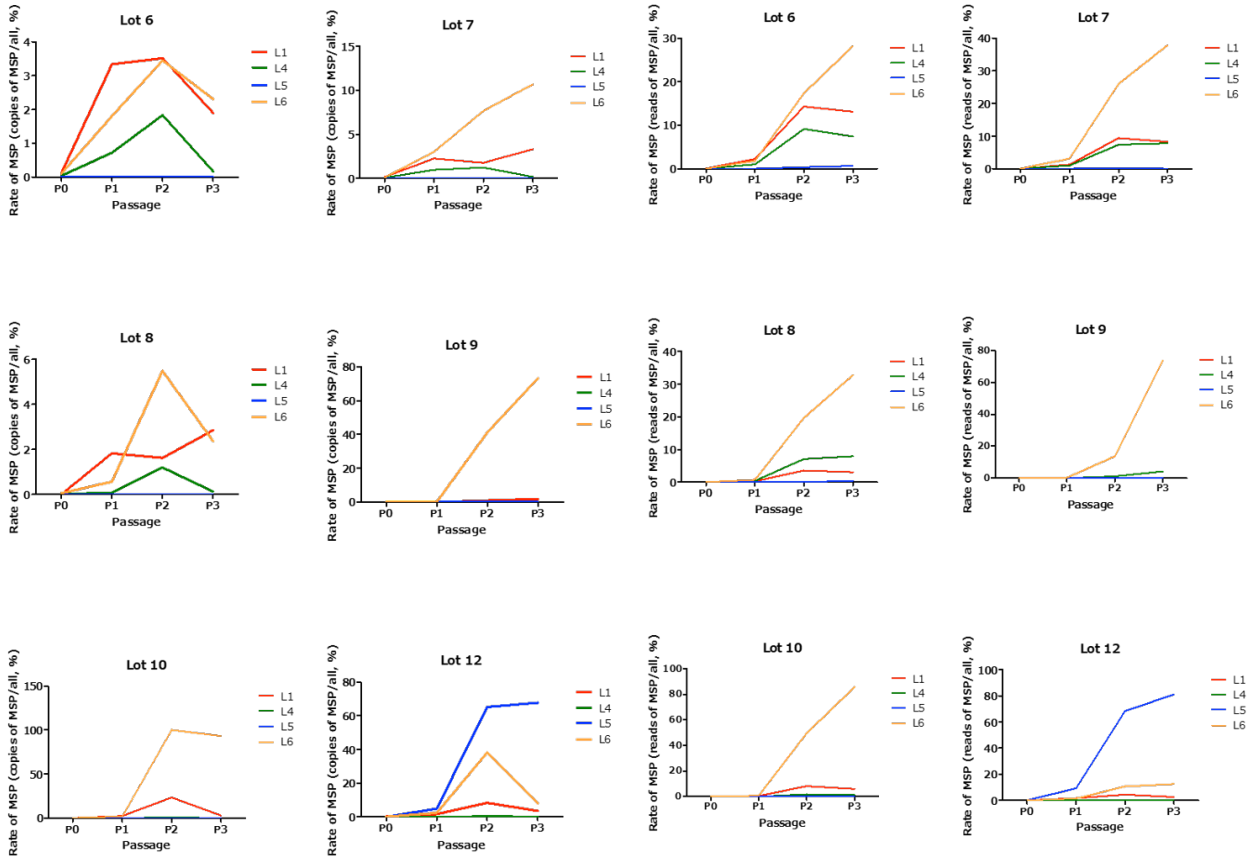
H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図4MSP 特異的定量 PCR 及び次世代シーケンス解析による結果比較

Real time PCRによるMSP含有率

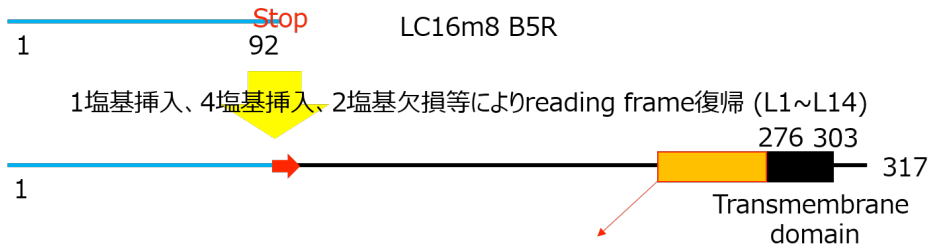
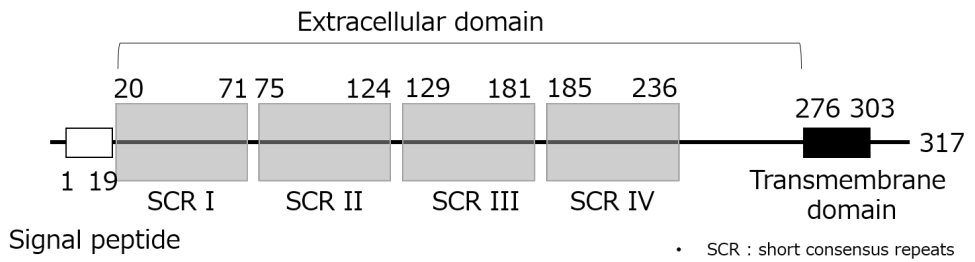
次世代シーケンス解析によるMSP含有率



L1 : 267A 挿入型, L4 : 272T 挿入型, L5 : 274ATAC 挿入型, L6 : 268T 挿入型

図 5MSP の B5R domain の抗ペプチド抗体を作製

Vaccinia virus B5R domain



Reading frame復帰したMSPの共通の抗原として、SCR domain以降の237aa~275aa。

ウサギ由来の抗ペプチド抗体を作製