

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、日本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。m8は高度に弱毒化されている。一方で免疫原性が維持されているという特徴から、外来遺伝子を導入した組換えワクチンとしての利用が期待されている。前年度までに私たちは m8 の全ゲノムを組み込んだ人工細菌染色体(bacterial artificial chromosome; BAC), pLC16m8.8S-BACを作製し、ここから感染性を持つm8をリカバリーさせるシステム(m8-BAC システム)を確立している。本研究は、1. m8-BAC システムで用いられている既存の組換え法を改良し、任意の領域に外来遺伝子を迅速かつ簡便に導入するシステムを確立する。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、m8を皮下、筋肉内、皮内、静脈内接種してルート毎の抗体誘導の速度と抗体価の違いを比較した。結果として 1. 迅速かつ簡便に外来遺伝子を導入するシステムを確立した。2. 抗体誘導が確認できるまでの時間と交代かは接種ルートごとに異なることが明らかとなった。

A. 研究目的

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)は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。既に私たちはm8を細菌人工染色体(Bacterial Artificial Chromosome; BAC)にクローニングしており、このBACプラスミドから感染性を持つm8を容易にリカバリーするm8-BACシステムを確立している。m8-BACシステムはBACプラスミド、pLC16m8.8S-BACにRed/ET相同組換え法(組換え酵素Red/ET遺伝子及び制限酵素I-SceI遺伝子を保持する大腸菌GS1783株を用いる)を用いて外来遺伝子の導入が可能である。本研究は既存の組換え法を改良し、任意の領域に外来遺伝子を迅速かつ簡便に導入するシステムの確立を目指すことを目的とした。

天然痘の根絶が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。日本では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。既にマウスにエクトロメリアウイルスを感染させた直後にm8を皮下、筋肉内、皮内、静脈内接種した場合、ルートによってマウスの生存率の改善は大きく異なる事が明らかとなっている。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は免疫の誘導速度や強さに違いがあるのではないかと考え、マウスに様々なルートでm8投与し血中の中和抗体価の誘導速度と強さを比較した。

B. 研究方法

1. 前年度までに作製した組換え用の遺伝子断片を作製するためのプラスミド 3 種類 (pUC-Kan-S-EGFP, pUC-Zeo-mKO2, pCR-Amp-mApple) にそれぞれラッサウイルスのマトリックス(Z) 遺伝子, エンベロープ糖蛋白質(GPC) 遺伝子, 核タンパク質(NP) 遺伝子を導入し, ここから PCR により遺伝子断片を作製, Red/ET 法により, BAC プラスミド pLC16m8.8S-BAC に各遺伝子断片を導入した. 次に, 作製した BAC プラスミドから蛍光遺伝子と薬剤耐性遺伝子を取り除き, 組込まれた遺伝子はラッサウイルスの遺伝子のみとなるようにした. そして, これらの BAC プラスミドから感染性を持つ組換え m8 のリカバリーを試みた.
2. C57BL/6 マウスに 1×10^7 PFU の m8 を皮下 (s.c.), 筋肉内 (i.m.), 皮内 (i.d.), 静脈内 (i.v.) 接種した. その後 2 日目から経時的に血液を採取し, 血中に含まれる m8 に特異的な中和抗体を m8 のプラーク減少法により決定した.

【倫理面への配慮】

該当しない.

C. 研究結果

1. 図 1 に組換えの概略を示す. Z, GPC, NP の発現カセットが導入された組換え pLC16m8.8S-BAC の作製を行ったところ, GPC と NP の導入が成功した Z についてはカセットの導入が成功しなかった. 次に作製した BAC プラスミド, pLC16m8.8S-Lassa_GPC と pLC16m8.8S-Lassa_NP を用いて感染性を持つ組換え m8 のレスキューを試み, これに成功したこれらの組換え m8, vLc16m8.8S-Lassa_GPC と-Lassa_NP の遺伝子の発現を NP, または GP に対する特異抗体を用いて蛍光抗体法で確認した. どちらについても遺伝子産物の発現が確認された(図 2).
2. マウスに異なるルートで m8 を接種し, その二日後から経時的に採血し, 血中に含まれる m8 に特異的な中和抗体価を測定した. 図 3 に接種ルート毎の中和抗体価の違いを示す. m8 を皮下に接種した場合, 血中の中和抗体が確認されるのは接種から 4 日後で, その後抗体価が上昇することはなかった. 一方で静脈内接種の場合は, 接種 2 日後から抗体の誘導が確認されただけでなく, 4 日後には 2 の 10 乗以上の強い抗体価の誘導が確認された. 皮内, 筋肉内接種について

は皮下接種, 静脈内接種の中間程度の抗体価の誘導が確認された.

D. 考察

迅速かつ簡便な BAC プラスミドの組換え法に必要なのは, BAC プラスミドへの遺伝子導入が成功したこと, その後, 薬剤耐性遺伝子を除去して目的の外来遺伝子のみが BAC プラスミドに保持されたことが容易に確認できる方法である. 本研究では, 薬剤耐性遺伝子と共に蛍光タンパク質遺伝子を利用したこれにより組換えが成功した. 大腸菌コロニーは LED トランスイルミネーター上で蛍光を発する更に薬剤耐性遺伝子除去の際には同時に蛍光タンパク質遺伝子も除去されるように設計してあるため, 今度は LED トランスイルミネーター上で蛍光を発しないコロニーを選択すれば目的の遺伝子のみが導入された組換え BAC プラスミドを取得できる. 本研究ではラッサウイルス GPC と NP 遺伝子を保持する組換え m8 を迅速かつ簡便に樹立することが出来た. 一方で Z 遺伝子を保持する組換え m8 については現時点で樹立することが出来ていない. これは Z 遺伝子を導入するために選んだ m8 ゲノムの位置が何らかの理由で適していない可能性がある. 今後は導入する位置を変えて行う予定である.

前年度までにマウスに致死感染をおこすエクトロメリアウイルスの暴露直後に, m8 を皮下, 筋肉内, 皮内, 静脈内接種すると, 静脈内接種で, マウスの生存率の改善が最も著しく, 続いて皮内と筋肉内が同程度, 最も改善効果が低いのは皮下であることが判明していた. これはエクトロメリアウイルス感染を排除するための免疫を獲得する速さと, 強さが m8 の接種ルート毎に異なるのではないかと考察していた. 今回の中和抗体の誘導速度と, 強さが接種ルート毎に異なるという結果はこの考察をサポートする結果となった.

E. 結論

本研究により m8-BAC システムを利用して任意の領域に外来遺伝子を迅速かつ簡便に導入し, 組換え m8 を作製するシステムを確立した. m8 の投与ルートの違いは誘導される中和抗体の速度と強さに大きく影響を与えることが明らかとなった.

F. 健康危険情報

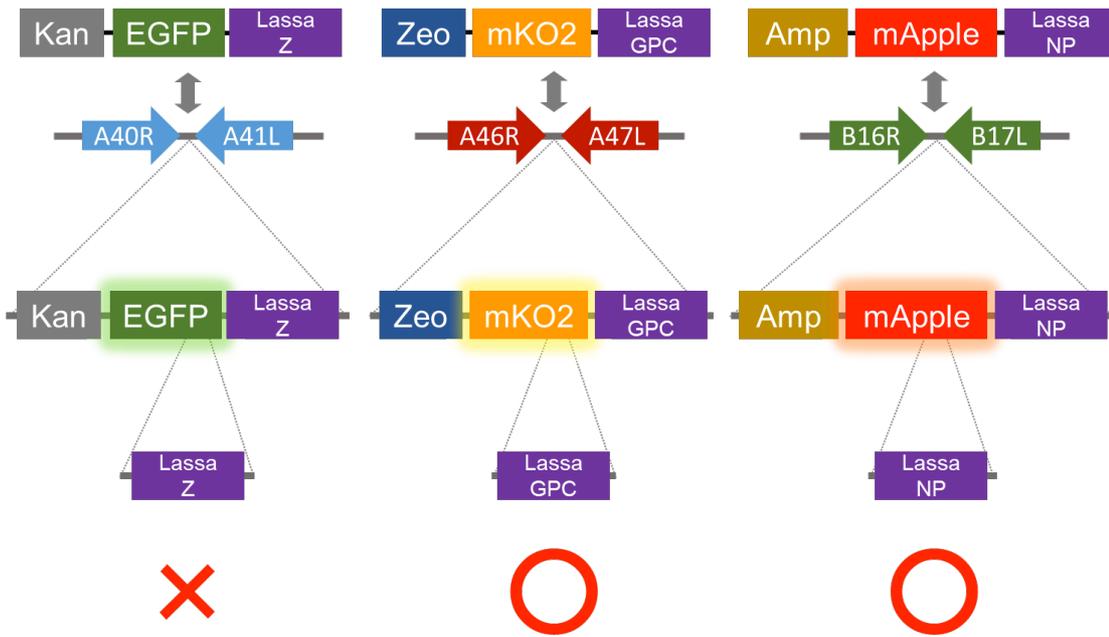
特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 吉河智城. サル痘ウイルス感染症およびその他のオルソポックスウイルス感染症. グローバル時代のウイルス感染症, 日本医事新報社, 東京, p177-181, 2019
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

図表



The improved system works well so far except for Lassa Z

図 1 組換え m8 作製の概略

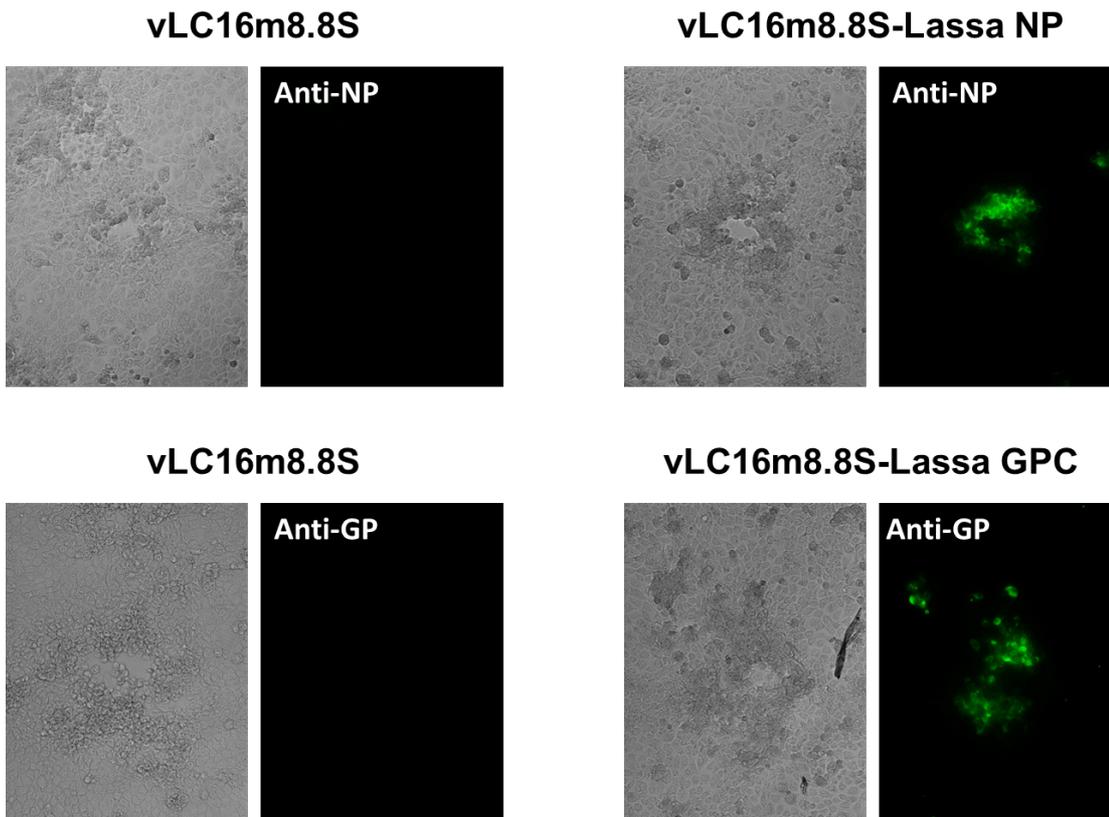


図 2 ラッサウイルス遺伝子を発現する組換え m8 の確認

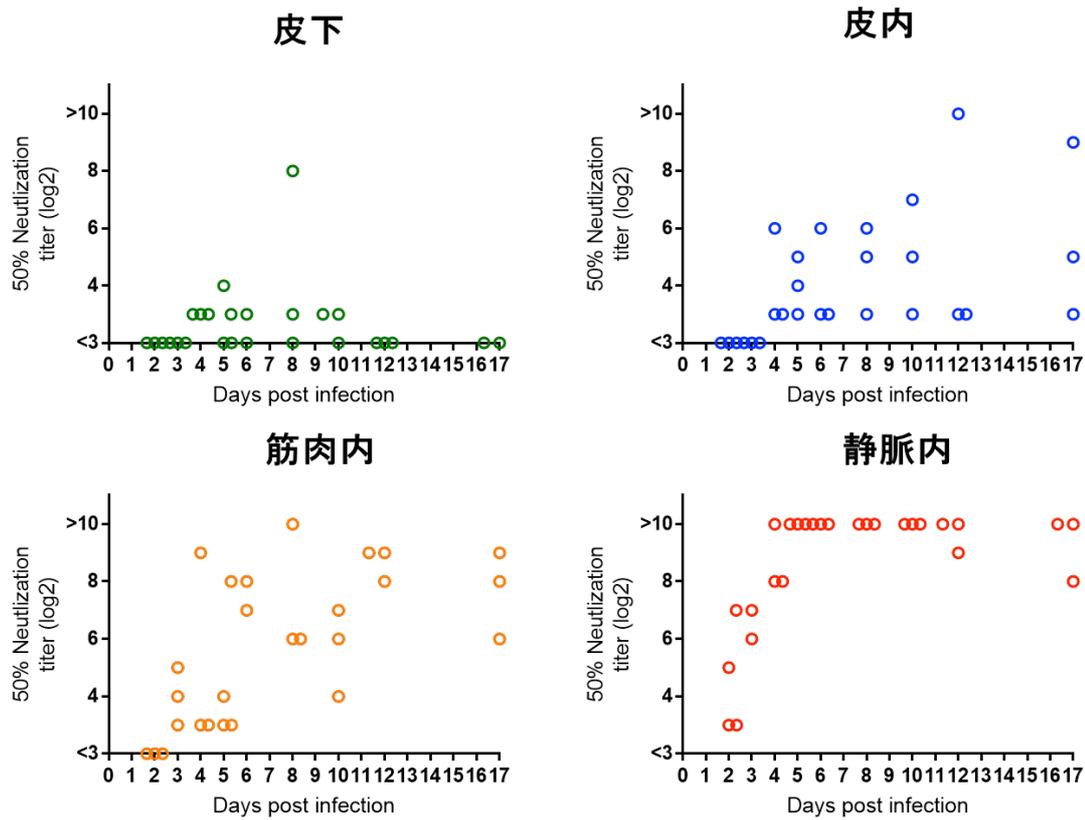


図 3 接種ルート毎の中和抗体価の違い