

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 森川 茂(H29-30 年度)

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(R01 年度)

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(国立感染症研究所, 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

細胞培養痘瘡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℃以上でも初代ウサギ腎細胞でのブラック形成能があるのに対し, LC16mO 株と LC16m8 株は 41℃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)解析と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,

簡便にかつ特異的に MSP を検出する方法の開発を目的とし、研究を進めてきた。その結果、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。そこで、品質管理に資する知見として、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. 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、35°C で 1 週間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

1) で継代培養したウイルス液を  $10^{-1} \sim 10^{-6}/100 \mu\text{l}$  まで階段希釈し、RK13 細胞、Vero E6 細胞に感染させ、35°C で 1 週間培養した。その後、メチレンブルーにより、プラークを数え、MSP の比率を算出した(バイオアッセイ; Vero E6 における力価/RK13 における力価 $\times 100$ )、それにより、各 Lot に MSP がどの程度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、これまでに開発した 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。

### 4. 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、同様にプラーククローニングを行った。この過程をトータル 3 回行い、268T 挿入型 MSP を作出した。

### 5. 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。

### 6. 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(5)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。

### 7. 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 moi0.1 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】

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. 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瘡ワクチン中で、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)。

### 2. 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 ( $<10^6$ ) 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(図3)。

### 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。

### 4. 268T 挿入型の MSP の作出

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 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。

### 5. 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グ温度 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)。

### 6. 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ところ, 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)。

### 7. 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。その結果, 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。

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。また、その内訳には、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。参照細胞培養ワクチンの 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、主に 268T 挿入型ではあるが、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

#### 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

- 1) Tani H, Iha K, Shimojima M, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Kawaoka Y, Nakasone N, Ninomiya H, Saijo M, Morikawa S. Analysis of Lujovirus Cell Entry using Pseudotype Vesicular Stomatitis Virus. J Virol. 88(13):7317-7330, 2014

##### 2. 研究発表

- 1) 吉河智城, 福士秀悦, 谷英樹, 福間藍子, 谷口怜, 須田遊人, Harpal Singh, 江川和孝, 下島昌幸, 森川茂, 西條政幸. ワクシニアウイルス LC16m8 株を土台とした組換えワクシニアウイルス作出システムの確立. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜 (2014.11)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特記事項なし

##### 2. 実用新案登録

特記事項なし

##### 3. その他

特記事項なし

図 1 これまでに得られた MSP の遺伝子型と頻度

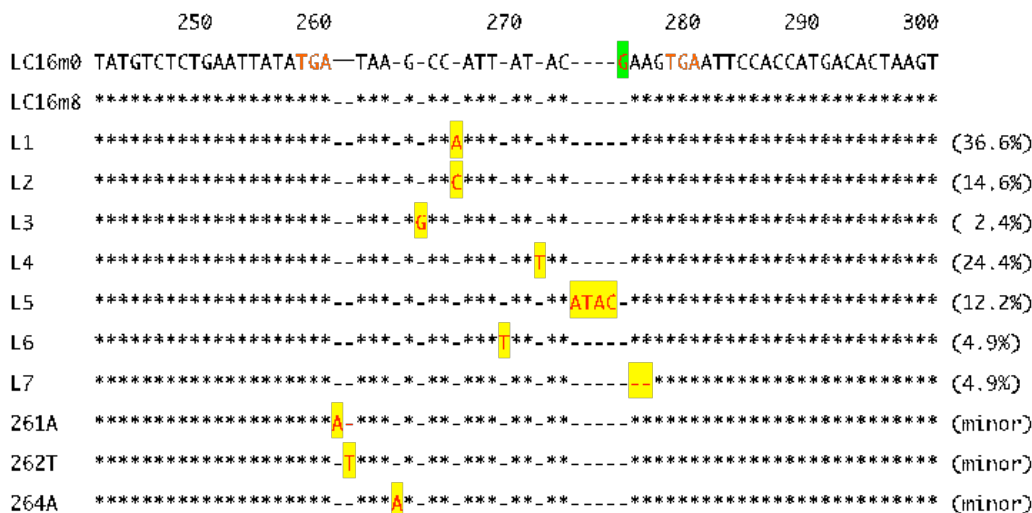


図 2 MSP 特異的定量 PCR の検出感度

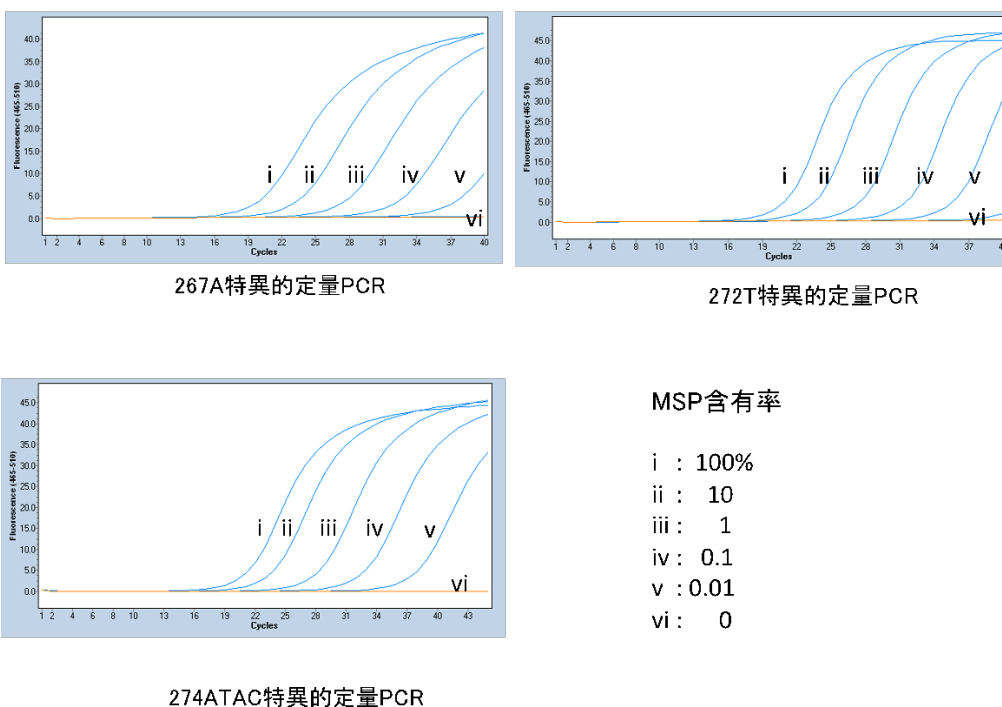


図 3 バイオアッセイによる MSP 比率

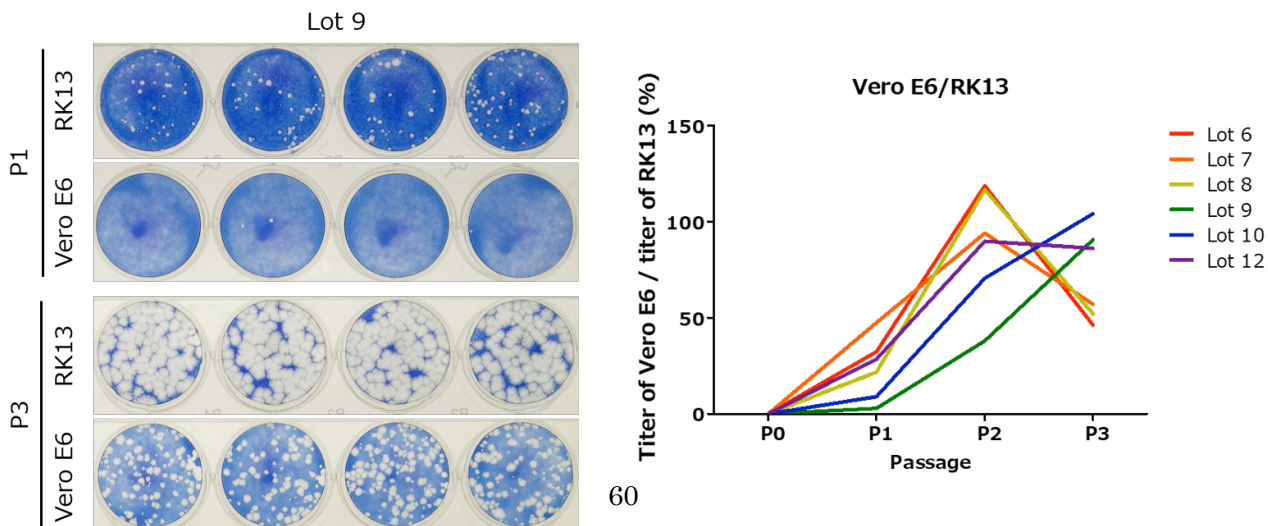
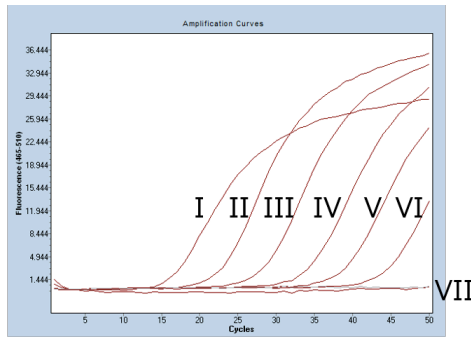


図 4 268T 挿入型特異的定量 PCR



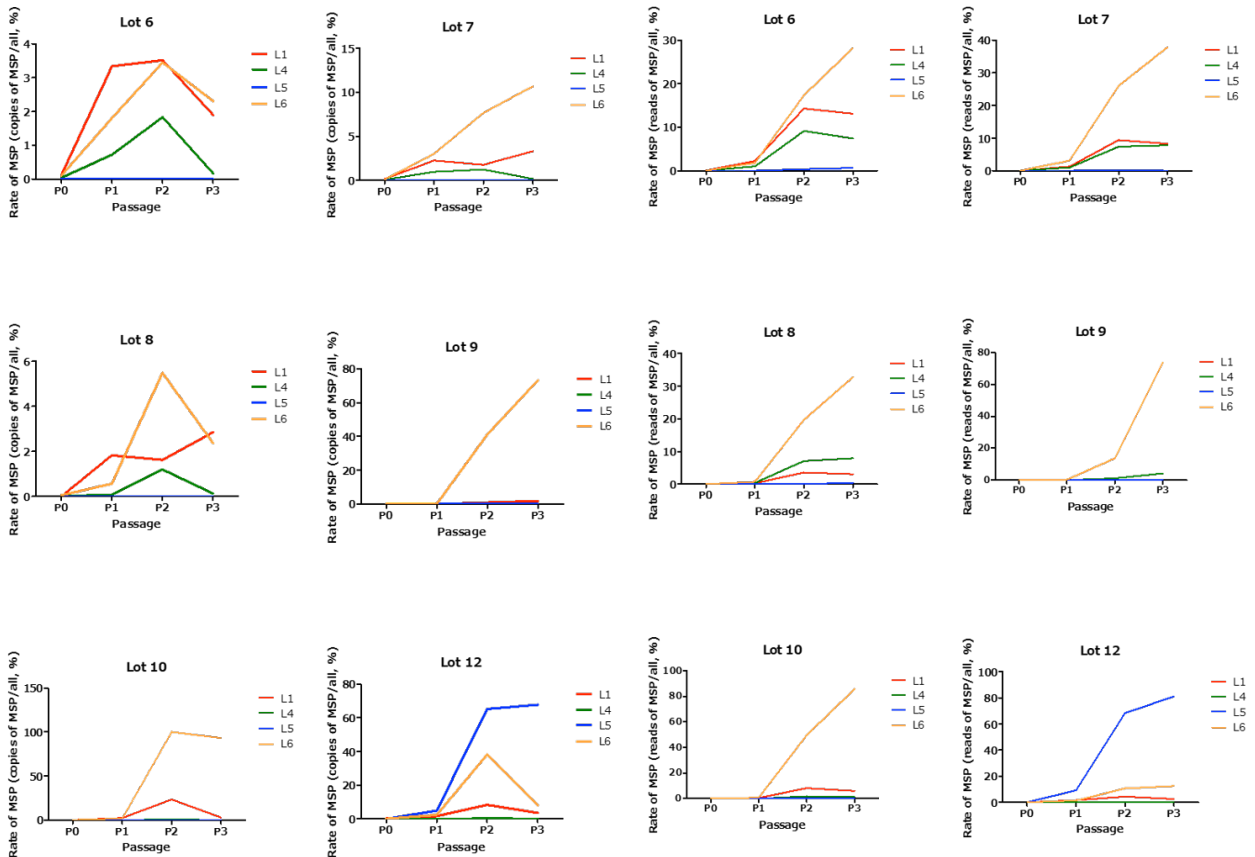
Standard  
 I : 10<sup>10</sup> copies/uL  
 II : 10<sup>9</sup> copies/uL  
 III : 10<sup>8</sup> copies/uL  
 IV : 10<sup>7</sup> copies/uL  
 V : 10<sup>6</sup> copies/uL  
 VI : 10<sup>5</sup> copies/uL  
 VII : negative control

MSP specific primer中, forward 18mer primerがL6を特異的に検出できた。  
 (Annealing Tm 54°C, 50 cycles)

図 5 MSP 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 6 MSP の B5R domain の抗ペプチド抗体を作製

Vaccinia virus B5R domain

