

平成 29 年度～令和元年度厚生労働行政推進調査事業費補助金  
(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)

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:痘瘡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。本研究は、1. m8 を組換えワクチンベクターとして応用するために、細菌人工染色体(Bacterial Artificial Chromosome; BAC)にクローニングし、そこから感染性 m8 をリカバリーできる m8-BAC システムの確立、そして 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するシステムの確立を試みた。2. 国産の弱毒痘そうワクチン株である m8 を用いた痘瘡ウイルス暴露後重症化阻止の可能性を検討するため、痘瘡ウイルスの代わりに、エクトロメリアウイルス(ECTV)を用いてマウスを攻撃し、その直後に m8 を皮下、筋肉内、皮内、静脈内接種してルート毎の効果及び免疫誘導能の違いを検討した。

研究協力者

山田壮一・国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官  
柴村美帆・国立感染症研究所ウイルス第一部・協力研究員  
津田美穂子・国立感染症研究所ウイルス第一部・非常勤職員  
藤井ひかる・国立感染症研究所ウイルス第一部・協力研究員  
福井良子・国立感染症研究所ウイルス第一部・非常勤職員

A. 研究目的

現在、痘瘡ワクチンとして第 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が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。MVA は既に細菌人工染色体(Bacterial Artificial Chromosome; BAC)にクローニングされており、この BAC プラスミドから感染性を持つ MVA を容易にリカバリーする MVA-BAC システムが確立さ

れている。このシステムでは所謂大腸菌の遺伝学を利用して BAC プラスミドへの外来遺伝子導入、組換え MVA のリカバリーを容易に行うことが出来る。そこで本研究では m8 を BAC にクローニングし、BAC プラスミドから感染性 m8 をリカバリーする m8-BAC システムの確立を行った。また、m8-BAC システムの場合は 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。そこで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試みた。また、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試みた。

天然痘の撲滅が 1980 年に宣言されてから 40 年近くが経過した。近年は痘瘡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、痘瘡ウイルスに対して有効な免疫を保持していない。そこで、万が一痘瘡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、痘瘡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

モデルにて行われている。ECTV は痘瘡ウイルス、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 VACV Lister 株及び Modified Vaccinia Ankara (MVA)株を用いた場合、ECTV 暴露後 3 日目の投与であっても重症化を阻止できることが報告されている (J Infect Dis. 2009 Jan 1;199(1):39-48.)。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を検討するため、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、静脈内接種した時の生存率を検討した。また、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 を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. m8-BAC システムの確立は以下の様に行った (図 1)。まず古典的な相同組換え法を用いて大腸菌内で BAC を保持するために必須である mini-F カセットを EGFP カセットと共に導入した組換え m8(m8-EGFP-BAC)を作製した。次にこの組換え m8 のゲノムを感染細胞から抽出し、大腸菌に導入して形質転換を行った。mini-F カセット内にはクロラムフェニコール耐性遺伝子が含まれているので、薬剤選択が可能である。形質転換された大腸菌が保持する BAC プラスミドの配列を確認した。またこの pLC16m8-BAC を 293FT 細胞にトランスフェクションし、同時に鶏痘ウイルスをヘルパーウイルスとして感染させ、感染性ウイルスがレスキューされるかを検討した。pLC16m8-BAC から更に大腸菌の遺伝学 (Red/ET システム)を用いて、EGFP 及び BAC カセットが、リカバリーされたウイルスから相同配列を介して自己切断され、また m8 または mO タイプの B5R を保持する pLC16m8.8S-BAC と pLC16m8.OS-BAC を作製した (図 2)。更に自己切断しない BAC プラスミドで m8 または mO タイプの B5R を保持する pLC16m8.8-BAC, pCL16m8.O-BAC も作製し、リカバリーされたウイルスの性状を解析した。次に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、エンベロップ糖蛋白質 (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. 5LD<sub>50</sub> 相当の ECTV Hampstead 株を経鼻 (i.n.) 経路でマウスに感染させた。その直後に m8、またはその親株である Lister 株を皮下 (s.c.)、筋肉内 (i.m.)、皮内 (i.d.)、静脈内 (i.v.) 接種により 10<sup>7</sup>PFU 接種し、その発症・重症化阻止効果を生存率、体重変化により検討した。次に 1x10<sup>7</sup>PFU の m8 を皮下、筋肉内、皮内、静脈内接種した。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】

本研究にて行われた動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会の審議を受け適切であると承認されている。

## C. 研究結果

1. m8-EGFP-BAC 感染細胞から抽出したゲノムによって形質転換された大腸菌から精製した BAC プラスミド、2 クローンについて組換え m8 の全ゲノムを保持していることが次世代シーケンシングにより確認され、これを pLC16m8-BAC とした。この BAC プラスミドは親株である m8-EGFP-BAC と同一の配列を持ち、293FT 細胞にトランスフェクションしてヘルパーウイルスを感染させると、感染性を持つ組換え m8 (vLC16m8-BAC) をリカバリー出来ることが確認された。この vLC16m8-BAC の RK13 細胞に於ける増殖能は元ウイルスである m8-EGFP-BAC、また m8 と比較して違いは見られなかった (図 3)。pLC16m8.OS-BAC, pLC16m8.8S-BAC からリカバリーしたウイルス (vLC16m8.OS-BAC, vLC16m8.8S-BAC) はそれぞれ mO, m8 タイプの B5R を発現するため、プラークサイズが異なり、また、その内、5-10% のプラークは EGFP を発現していないことが確認された (図 4)。EGFP を発現していないプラークをクローニングしたウイルスは EGFP 及び mini-F カセットも欠失していることが PCR により確認された (図 5)。このウイルスはゲノム配列が m8 と比較しても区別が付かないことが次世代シーケンシングにより確認された。pLC16m8.8/O-BAC からリカバリーされたウイルスについては EGFP を発現していな

いウイルスは確認できなかった。ラッサウイルス遺伝子 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(図 6)。GPC と、NP について導入が成功した。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ところ、どちらについても遺伝子産物の発現が確認された(図 7)。

2. ECTV 暴露直後に m8 株を接種した場合の発症・重症化阻止効果を検討した。1 群 10 匹のマウスに 5LD50 の ECTV Hampstead 株で攻撃を行った。その直後に  $10^7$  PFU/100ul の Lister, m8 を s.c., i.m., i.d., i.v. で接種し、観察、体重測定を行った(図 8)。s.c., i.m. 接種に於いて Lister, または m8 の効果に有意な差は観察されなかった。一方対照である培地接種群と比較した場合、ワクチン接種群は接種ルートによってその効果に違いが現れた。s.c の場合では対照群とワクチン接種群間で有意な差が無かった。一方、i.m., i.d., i.v. の場合はワクチン接種により培地接種群と比較して有意な生存率の改善が確認された。また、ワクチン接種群の体重変化は i.m., i.d. では ECTV 攻撃 13 日後から増加傾向に転じるのに対して、i.v. では攻撃 7 日後から増加傾向に転じた(図 9)。

次に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 10 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 日後でその後強く誘導されることはなかった。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

1. m8 は、ACAM2000 と共に、天然痘を用いたバイオテロに備えた備蓄用ワクチンとして WHO から推奨される痘瘡ワクチンの一つであり、その

免疫誘導能と安全性は広く認知されている。m8 が組換えワクチンベクターの土台として広く利用されるためには、簡便に組換え m8 が作製できる事が重要であると考えている。本研究で確立した m8-BAC システムは、大腸菌の遺伝学を用いて容易に外来遺伝子を導入することが出来ることから、m8 を組換えワクチンベクターとして応用研究するための一助になると考える。本システムは野生型の m8 がコンタミする事がないため古典的な方法と比較してクローニングが非常に容易である。特に pLC16m8.8S-BAC を用いれば、リカバリーしたウイルスから自己切断によってゲノム内の EGFP 及び BAC カセットがゲノム内に存在しないウイルスが作製できる。このウイルスは、外来遺伝子以外は m8 と同一のゲノムを持ち、EGFP や mini-F カセットに起因する思わぬ副反応などの可能性を考慮する必要はない。また、迅速かつ簡便な BAC プラスミドの組換え法に必要なのは組換えが成功したこと、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保持された BAC プラスミドが作製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することで、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ることにより、目的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。本法によりラッサウイルス 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。

2. 本研究は弱毒痘瘡ワクチン m8 株の痘瘡ウイルス暴露後ワクチンとしての発症・重症化阻止効果を検討し、可能であれば改良を行うことを目的としている。投与ルートにより毎の、m8 の暴露後ワクチン効果の違いは、ECTV 感染を排除するための免疫を獲得する早さが異なる為ではないか仮説と立てて検証したところ、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となり仮説をサポートする結果となった。

## E. 結論

m8 をクローニングした BAC プラスミドから感染性 m8 をリカバリーできる m8-BAC システムを確立し、また 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。特に pLC16m8.8S-BAC を用いるシステムは本来の m8 と区別の出来ないゲノムを保持するウイルスをリカバリーすることが可能である。

ECTV 攻撃に対する m8 の感染防御効果はその接種ルート毎に異なること、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. 論文発表

### 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. 2018. Construction and characterization of bacterial artificial chromosomes harboring the full-length genome of a highly attenuated vaccinia virus LC16m8. PLoS

One 13:e0192725.

- 2) Omura N, Yoshikawa T, Fujii H, Shibamura M, Inagaki T, Kato H, Egawa K, Harada S, Yamada S, Takeyama H, Saijo M. 2018. A Novel System for Constructing a Recombinant Highly-Attenuated Vaccinia Virus Strain (LC16m8) Expressing Foreign Genes and Its Application for the Generation of LC16m8-Based Vaccines against Herpes Simplex Virus 2. Jpn J Infect Dis 71:229-233.2.
- 3) 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

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

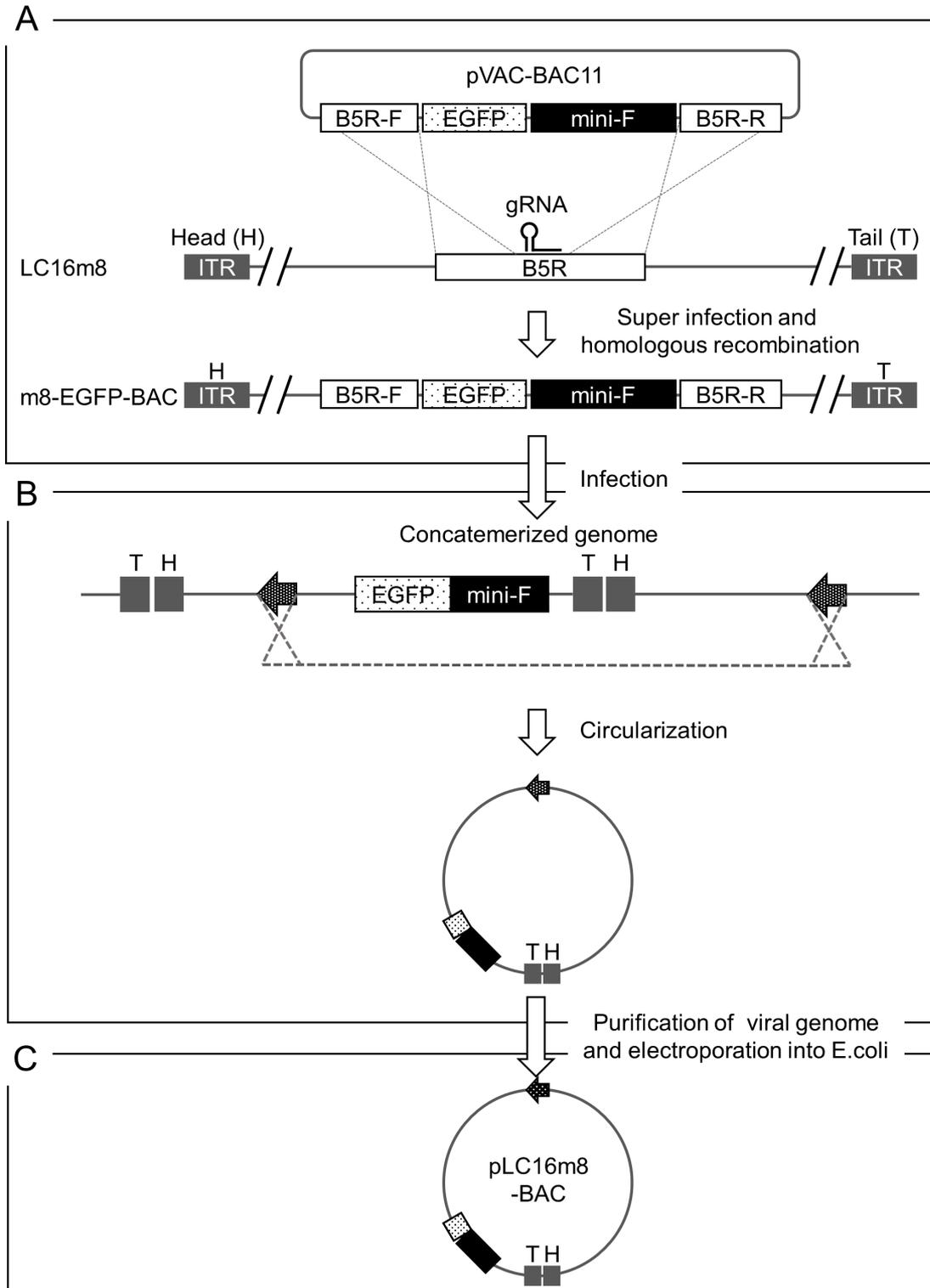


図1 m8-BACシステムに必要なm8の全ゲノムを保持するBACプラスミド、pLC16m8-BACの作製スキーム。(A)古典的な相同組換え法にCRISPR-Cas9システムを導入した方法によりEGFPとmini-Fカセットを保持する組換えm8, m8-EGFP-BACを作製した。(B)m8-EGFP-BACをRK13細胞に感染させてウイルスゲノムを回収した。ワクシニアウイルスはゲノムの複製時にコンカテマーを形成するが、相同配列間で組換えが起こり、環状化したゲノムが存在すると推測される。(C)回収したウイルスゲノムを用いて大腸菌を形質転換する。mini-Fカセット内にクロラムフェニコール耐性遺伝子が存在するため、形質転換した大腸菌を薬剤選択し、pLC16m8-BACを得た。

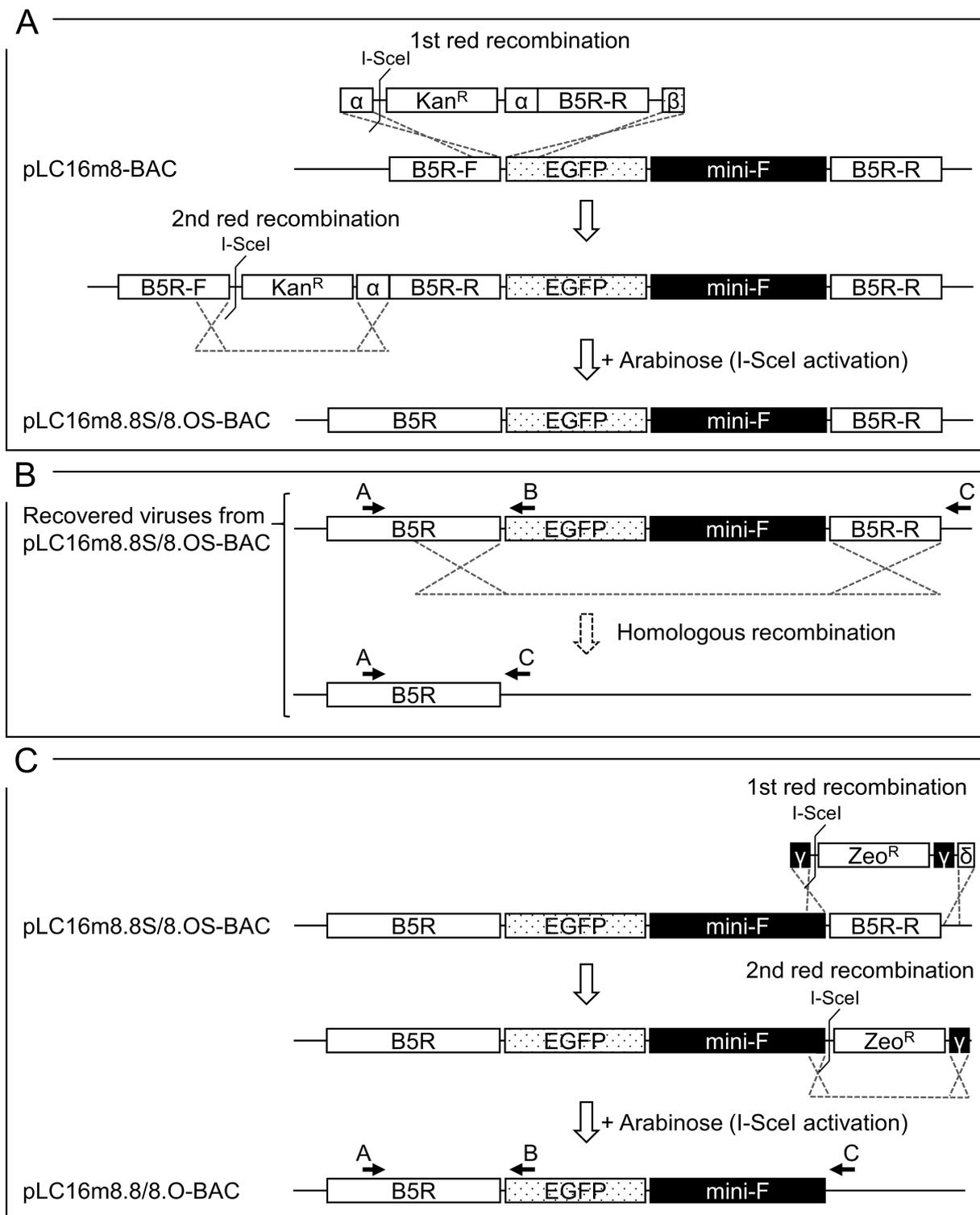


図 2 EFGE 及び mini-F カセットフリーの m8 をリカバリーする m8-BAC システム構築のスキーム, (A)カナマイシン耐性遺伝子と B5R 遺伝子の後部を保持する PCR 産物を Red/ET システムを用いた相同組換えにより pLC16m8-BAC に導入する. 更に 2 回目の組換えによりカナマイシン耐性遺伝子を除き, 完全な B5R の全長を持つ BAC プラスミド (m8 タイプまたは mO タイプの B5R を持つそれぞれ pLC16m8.8S-BAC, pLC16m8.OS-BAC) を作製した. (B)pLC16m8.8S-BAC, pLC16m8.OS-BAC からウイルスをリカバリーすると, 相同組換えにより EGFP と mini-F カセットが脱落したウイルスが出現する. (C)EGFP カセットと mini-F カセットが脱落しない BAC プラスミド pLC16m8.8-BAC, pLC16m8.O-BAC の作製. pLC16m8.8S-BAC, pLC16m8.OS-BAC をもとに mini-F カセットの下流に存在する B5R 遺伝子の後部を除去した. リカバリーしたウイルスゲノム内の EGFP と mini-F カセットを確認する為の PCR プライマー (A, B, C) を図示してある. 結果は図 5 に示している.

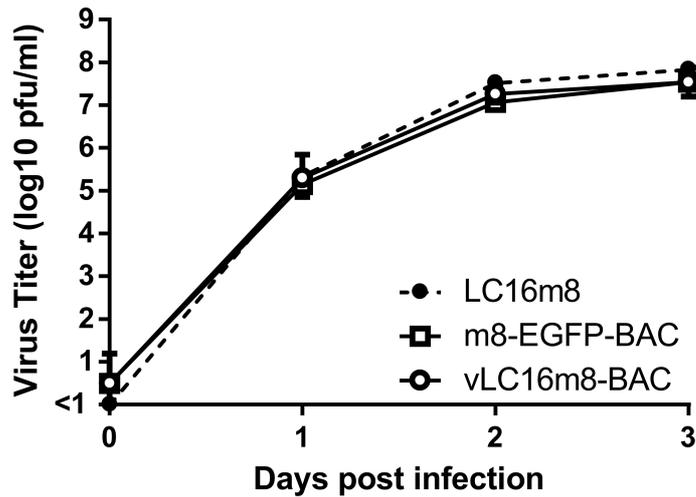


図3 pLC16m8-BAC からリカバリーしたウイルス vLC16m8-BAC の増殖曲線. RK13 細胞に m8, m8-EGFP-BAC, vLC16m8-BAC を MOI=0.1 で感染させて, 経時的なウイルス量の変化を測定した.

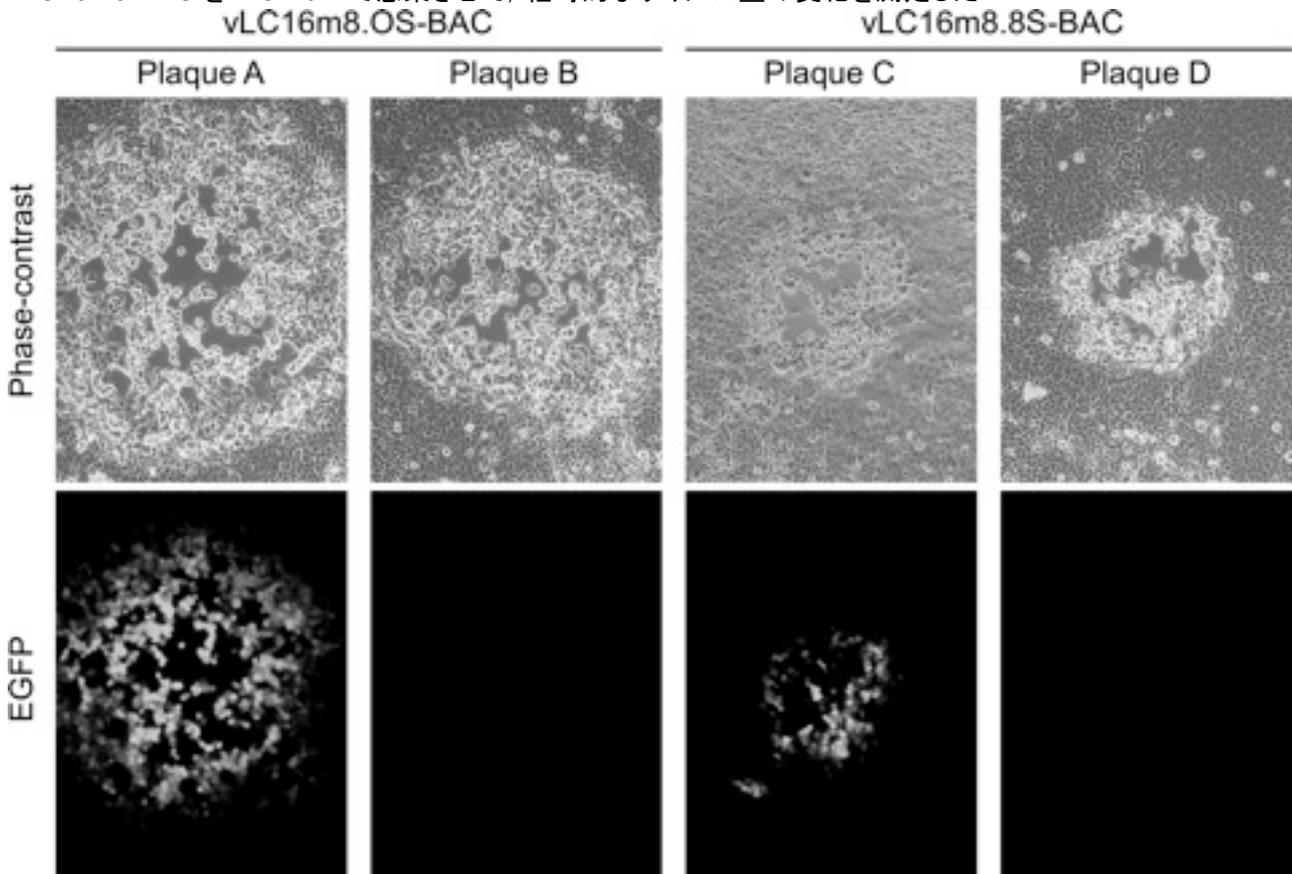


図4 pLC16m8.8S-BAC, pLC16m8.OS-BAC からリカバリーしたウイルスの性状. プラークの大きさとEGFPの発現を顕微鏡下で観察した. RK13 細胞に pLC16m8.OS-BAC, pLC16m8.8S-BAC からリカバリーしたウイルス (vLC16m8.OS-BAC, vLC16m8.8S-BAC)を感染させた. vLC16m8.OS-BAC (plaque A と B) と vLC16m8.8S-BAC (plaque C と D)のプラークについてEGFPの発現とプラークサイズを検討した.

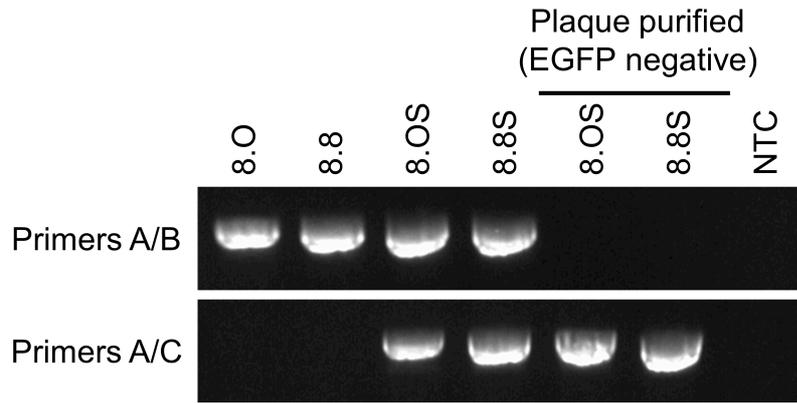
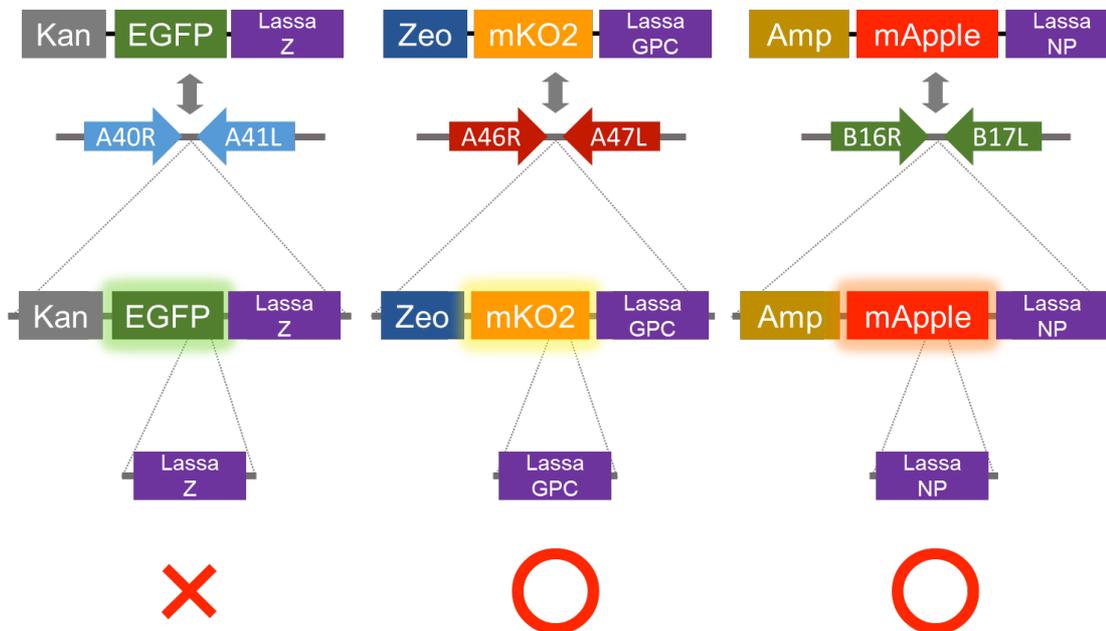


図 5 自己切断による EGFP と mini-F カセットの脱落の確認. RK13 細胞にプラーク精製をしていない vLC16m8.O-BAC (8.O), プラーク精製をしていない vLC16m8.8-BAC (8.8), プラーク精製されたクローン, またはプラーク精製をしていない vLC16m8.OS-BAC (8.OS), プラーク精製されたクローン, またはプラーク精製をしていない vLC16m8.8S-BAC (8.8S)を感染させた. 回収したウイルスゲノムを鋳型として, 図3で示したプライマーA/BまたはA/Cを用いたPCRを行い産物の有無を確認した. NTCは鋳型を含まない対照である.



The improved system works well so far except for Lassa Z

図 6 組換え m8 作製の概略

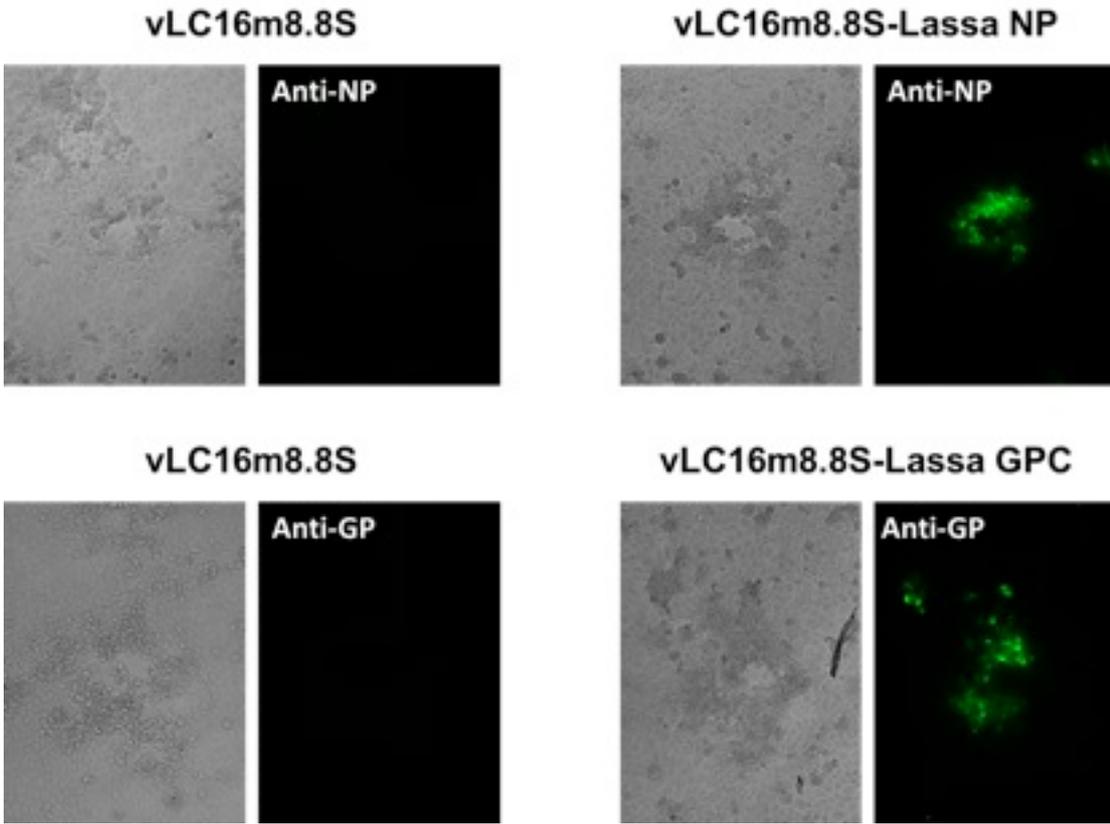


図7 ラッサウイルス遺伝子を発現する組換え m8 の確認

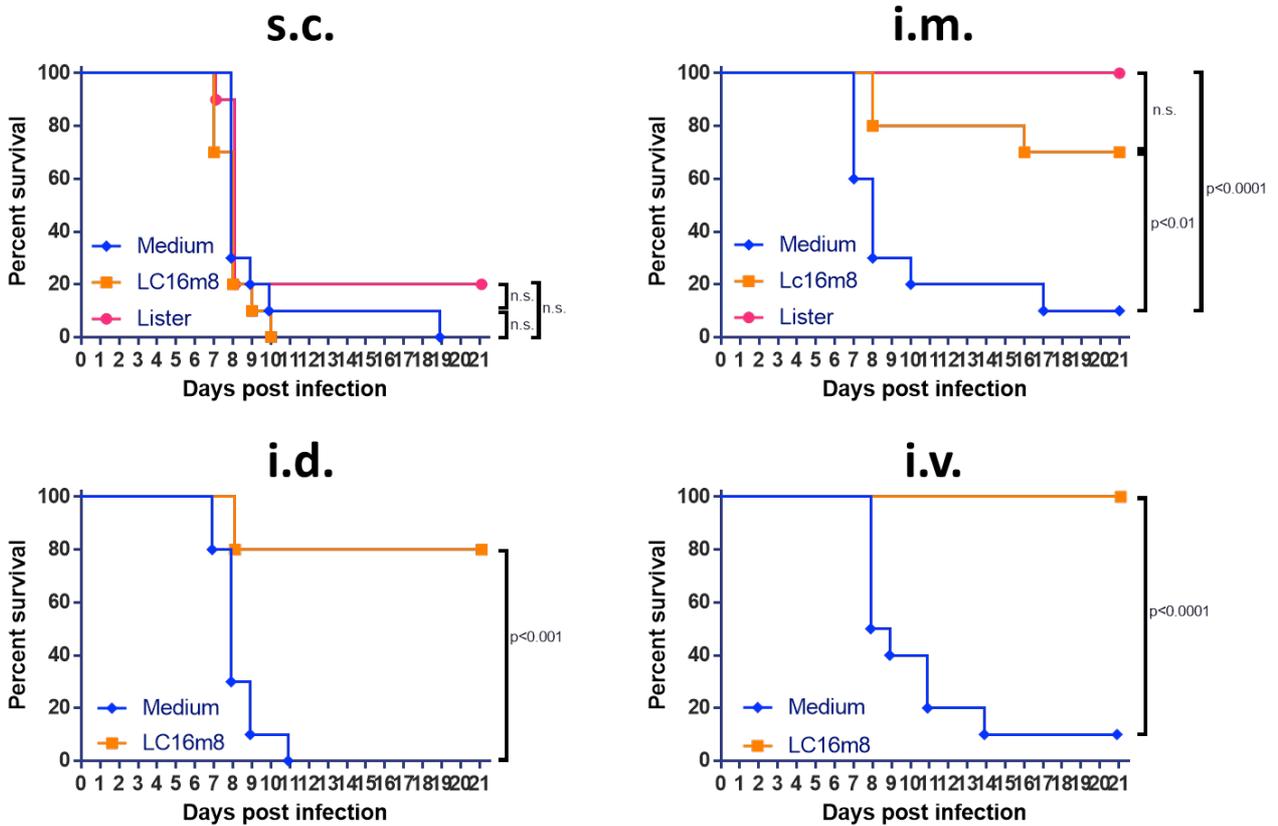


図8 ECTV を感染させたマウスに、直後に様々な投与ルートで m8 を接種した際の生存率の違い. 5LD50 相当の ECTV を i.n. で感染させた直後に Lister, m8 または対照として培地を接種した. その後マウスの生存を経時的に観察した.

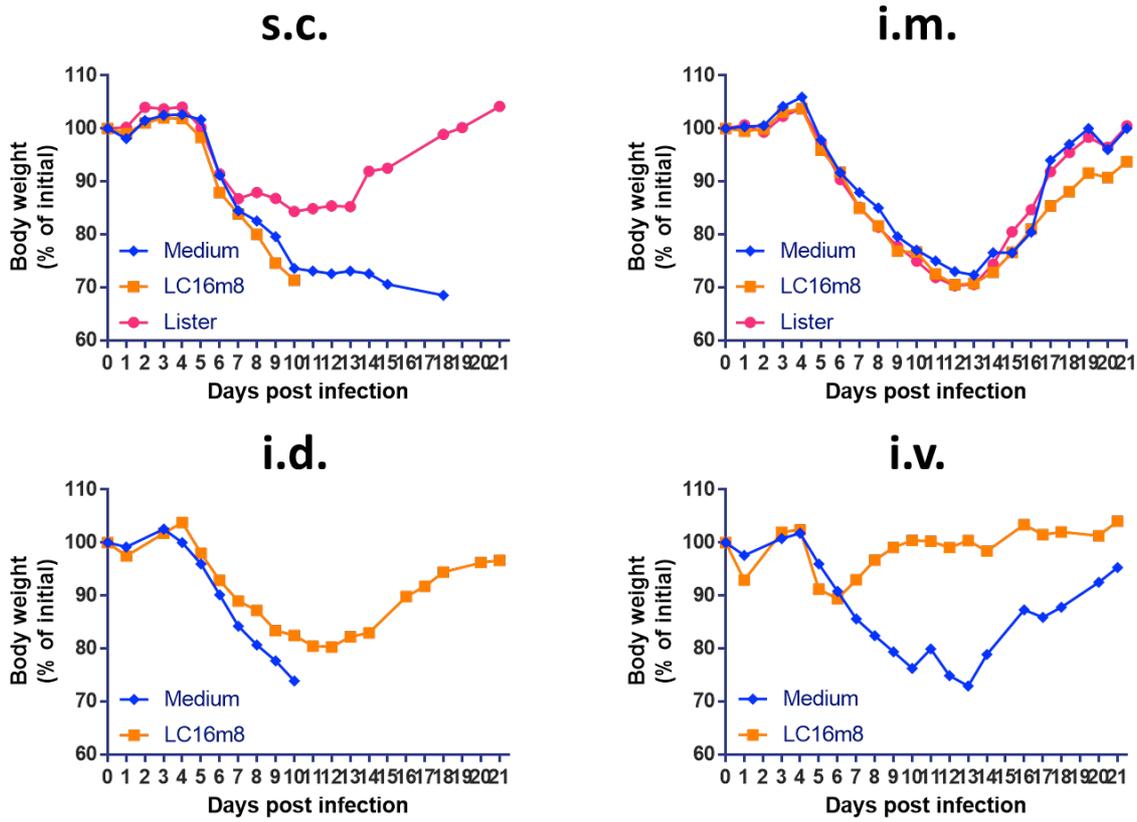


図9 ECTVを感染させたマウスに、直後に様々な投与ルートでm8を接種した際の体重変改の違い。図6の実験に於いて同時に体重変化も測定した。

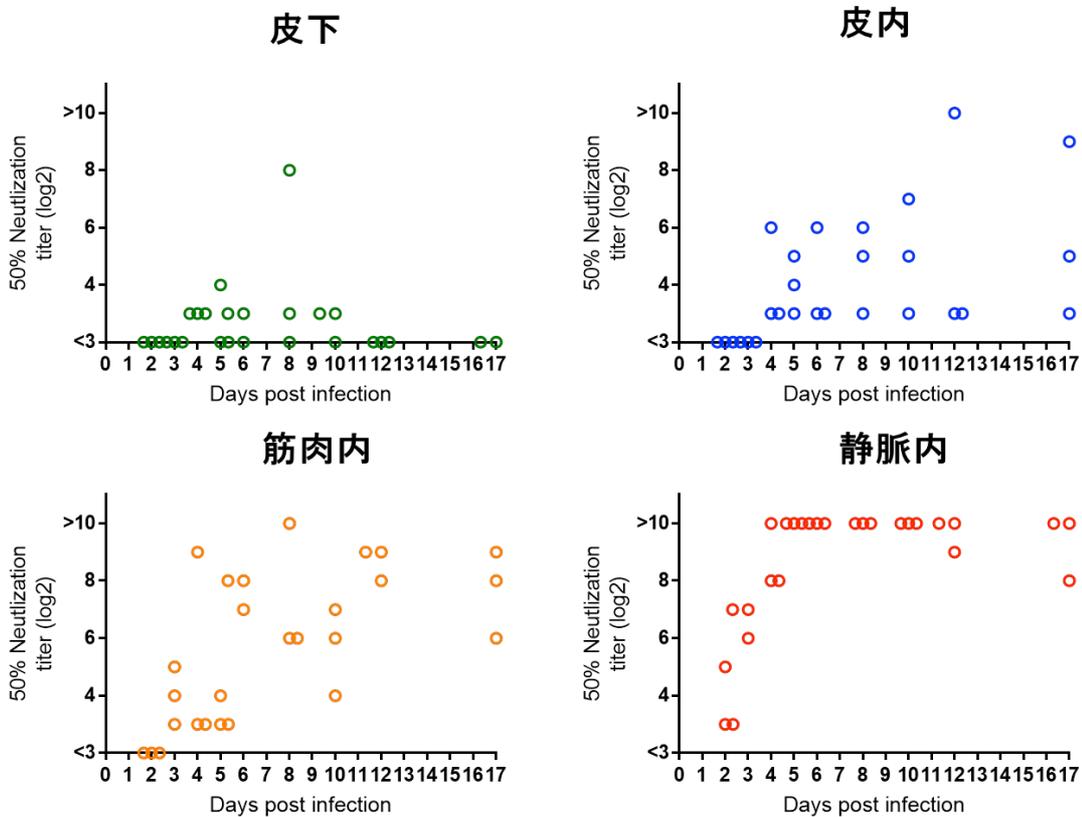


図10 接種ルート毎の中和抗体価の違い