

バイオテロ対策のための備蓄されている細胞培養痘そうワクチンの備蓄等, バイオテロ病原体への検査対応, 公衆衛生との関連のあり方に関する研究

### 分担報告書

#### バイオテロ発生時に対応可能な診断法の開発

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。今まで、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、MSP の定量的 PCR 法により得られた。MSP の検出法を更に簡便化し、特異的、迅速的に改良するために、ウイルスレベルで検出できる方法を模索した。LC16m8 及び MSP の B5R 遺伝子の共通抗原と MSP の B5R 特異的抗原を 4 種類発現し、免疫原性を確認した。現在、ウサギに免疫することにより、ウサギ由来抗血清の作製中である。また、これら 4 種類の抗原を用いることで痘そうワクチン接種者とバイオテロによる天然痘ウイルスやサル痘ウイルス感染者を血清学的に鑑別診断できる可能性が示唆された。更に、LC16m8 の有効性を生かすために、高病原性人獣共通感染症の一つである狂犬病ウイルスのワクチンベクターとして組換え LC16m8 の作成中であ

#### 研究協力者

朴ウンシル(国立感染症研究所・獣医科学部)  
Milagros Virhuez Mendoza(国立感染症研究所・  
獣医科学部)  
原田倫子(国立感染症研究所・獣医科学部)

#### 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°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く、Vero E6 細胞ではプラークを形成しないことが判明している。LC16m8 株を培養細胞で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)解析により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確認した。また、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行い、継代培養に伴う MSP 変異パターンを比較した結果、今まで主な割合を占めていなかった MSP の出現頻度が最も高くなることが分かった。総合的に、MSP には主に 4 種類が存在し、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 を実施することにより可能であることが示された。

本研究では、MSP をウイルスレベルでより簡便、迅速、かつ特異的に検出できる検査法の開発のために、LC16m8 及び MSP の共通抗体及び MSP 特異抗体の作製を目的とした。また、天然痘ウイルスがバイオテロに用いられる可能性があることから、痘そうワクチン接種者と感染者が鑑別できる診断系の確立も必要である。本研究ではその抗原を作製し、ワクチン接種者と感染者の血清から鑑別できる診断系の開発も目的とする。

更に、LC16m8 は安全性の高い弱毒株であるため、更なる有効活用のために、組換えウイルスのベクターとしての応用を試みた。人獣共通感染症である狂犬病ウイルスを対象にするが、LC16m8 を敢えてワクチンベクターとして用いる理由として、狂犬病の発生に備えた野生動物への免疫のために餌ワクチンとして使用することを視野に入れたワクチンの熱安定性にある。

## B. 研究方法

### 1. LC16m8 及び MSP の鑑別検出のための抗体作製

#### 1) LC16m8 及び MSP の共通抗原の作製

Vaccinia virus の B5R は 317 個のアミノ酸からなり、signal peptide (1-19aa), short consensus repeats (SCR) I (20-71aa), SCR II (75-124aa), SCR III (129-181aa), SCR IV (185-236aa), transmembrane domain (276-303aa) の domain から構成されている(図 1)。痘そうワクチン株である LC16m8 の B5R は途中で 1 塩基欠損により中止コドンは生じるために、92 個のアミノ酸からなる。MSP はその欠損部位に 1 塩基挿入、4 塩基挿入、2 塩基欠損により reading frame が復帰し、全長の B5R を有する。そのため、Vaccinia virus, LC16mO, MSP は全長の B5R 遺伝子を有し、相同性が高い。そこで、LC16m8 及び MSP の B5R の共通抗原として、1-92 アミノ酸の中で 3 種類の抗原 (Ag1:20-75aa, Ag2-1:46-86aa, Ag2-2:51-86aa) の発現を計画した(図 1)。それぞれのアミノ酸の N 末端に GST タグを付与する大腸菌用発現プラスミド pGEX-6p-1 に各種 PCR 産物を挿入した。そのプラスミドを大腸菌 BL21 へ形質変換し、1mM の IPTG 下で 4 時間培養し、組換え蛋白質を発現誘導した。その後、1% NP-40/PBS 処理により、組換え蛋白質が可溶性成分であることを確認した。発現組換え蛋白質を GST カラムを用いて精製し、SDS-PAGE とクマシー染色により精製蛋白を確認した(図 2, Lane 2-4)。

#### 2) ポックスウイルス感染特異的 B5R 抗原の作製

B5R の細胞外ドメインは short consensus repeats 構造が繰り返されているため、その部位を除いた 237-275aa の部位を MSP 特異的抗原としてデザインした。1)と同様の方法により組換え蛋白質を発現・精製し、SDS-PAGE により確認した(図 2 Lane 5)。

#### 3) 抗原の特異性確認

以前の研究で作製された LC16mO-B5R に対するウサギ由来抗血清、LC16m8-B5R に対するウサギ由来抗血清を用いて、作製した抗原の特異性を確認した。LC16mO-B5R に対するウサギ由来抗血清は B5R 全長に対する抗体であるため、LC16m8 及び MSP 共通抗原を検出できる。その抗体を用いて Ag1, 2-1, 2-2 及び 3 に対する immunoblot 解析を行った。また、LC16m8-B5R に対するウサギ由来抗血清は 92 アミノ酸からなる切断された B5R を抗原とするため、共通抗原である Ag1, 2-1 及び 2-2 は検出できるが、MSP 特異的抗原である Ag3 は検出できないことが予想された。その抗体を用いて同様に immunoblot 解析を行った(図 3)。

#### 4) ウサギ由来抗血清の作製

上記の精製抗原を用いてウサギに免疫し、抗体作製を試みた。それぞれの抗原 400µg をアジュバントと同量混合し、皮下に免疫した。現在、1 か月間隔で接種中である。

## 2. 狂犬病ウイルスの組換えワクチン開発

### 1) 狂犬病ウイルス G 蛋白発現組換えワクシニアウイルスのプラスミド作製

2020 年に国内で分離された街上毒である狂犬病ウイルス(Toyohashi 株)の G 蛋白質遺伝子、LC16m8 の B5R 遺伝子を含む周囲領域(200bp-600bp)、レポーター遺伝子(mCherry)、薬剤耐性遺伝子(guanine phosphoribosyl transferase; gpt) を pCR-Blunt II-TOPO にクローニングし、DH5α 大腸菌に形質変換し、精製した。

### 2) 中間体組換えワクシニアウイルスの作出

HEK293T 細胞にワクシニアウイルスを moi 0.05-0.1 で感染した後、24 間後に 1)で作製されたプラスミドをトランスフェクションし、3 日後上清を回収した。回収したウイルス液を RK13 細胞に感染させ、mycophenolic acid (MPA), xanthine and hypoxanthine が選択薬剤として含まれているアガロースゲルで培養した。感染 3-5 日後(プラークが観察できる時期)レポーター遺伝子である mCherry が光っているコロニーを 10 個回収し、それぞれ 100µL の培

地にサスペンドした。回収したウイルス液を RK13 細胞に感染させ、狂犬病ウイルスの G 蛋白質に対するウサギ由来抗体を用いて蛍光抗体法により、狂犬病ウイルス G 蛋白質が組み込まれている陽性コロニーを選別し、中間体組換えワクシニアウイルスとした。選別された中間体組換えワクシニアウイルスを同様に RK13 細胞に感染させ、3 回繰り返すことで、組換えワクシニアウイルスをプラーク純化法により精製した(図 4)。

その後、レポーター遺伝子を除去するために、中間体組換えワクシニアウイルスを感染させた RK13 細胞を選択薬剤を含んでいないアガロースゲルで培養し、レポーター遺伝子である mCherry の光の無いプラークを回収した。その後、上記と同様にプラーク純化法により狂犬病 G 蛋白質発現組換えワクシニアウイルスを精製した。

#### 【倫理面への配慮】

ヒト検体は使用していないため該当しない。動物実験にあたっては、国立感染症研究所動物実験委員会へ研究申請して承認を得たうえで、国立感染症研究所動物実験実施規定に基づいて実験を行っている。

#### C. 研究結果

##### 1) LC16m8 及び MSP の共通抗原, MSP 特異的 B5R 抗原の作製

精製したタンパク質を SDS-PAGE により確認した結果、それぞれ予想されるサイズにバンド(GST: 26kDa, Ag1: 31.35kDa, Ag2-1: 29.73kDa, Ag2-2: 28.61kDa, Ag3: 29.09kD)が認められた(図 2)。

##### 2) 抗原の特異性確認

精製した 4 種類の抗原全てにおいて SDS-PAGE により予想されたサイズでバンドが確認されたため、抗原の特異性をウサギ由来抗血清を用いて immunoblot 解析により確認した。

まず、LC16mO-B5R に対するウサギ由来抗血清による immunoblot 解析では 4 種類全ての抗原において陽性反応が確認された。また、LC16m8-B5R に対するウサギ由来抗血清を用いた immunoblot 解析では Ag1, 2-1 及び 2-2 においては予想されたサイズでバンドが確認されたが、Ag3 においてはバンドが認められず、予想通りの結果となった。以上の結果から、Ag1, 2-1, 2-2 及び 3 において抗原の特異性は確認された。

##### 3) ウサギ由来抗血清の作製

特異性が確認された 4 種類の抗原を 400 µg を同量

のアジュバントと混合し、ウサギに皮下免疫を行っている最中である。2 間隔で 4 回免疫した後に、抗体の上昇を確認後、血清を回収する予定である。

#### 2. 狂犬病ウイルス G 蛋白質発現組換え LC16m8 開発

LC16m8 を HEK293T 細胞に moi 0.1 で感染後、作製できた狂犬病ウイルス G 蛋白質組換えワクシニアウイルスのプラスミドをトランスフェクションし、3 日後上清を回収した。回収したウイルス液を RK13 細胞に感染させ、選択薬剤を含んでいるアガロースゲルで培養した。感染 5 日後、レポーター遺伝子である mCherry の発光が認められる 10 個のコロニーを回収した。回収したウイルスを RK13 細胞に感染させ、狂犬病ウイルスの G 蛋白質に対するマウス由来抗体を用いて蛍光抗体法により、狂犬病ウイルス G 蛋白質が組み換えられている陽性コロニーを選別し、中間体組換えワクシニアウイルスとした。初代中間体組換えワクシニアウイルスは 10 個中 10 個全て狂犬病ウイルス G 蛋白質発現陽性であった。そこで、RK13 細胞に感染した時に、mCherry と狂犬病ウイルス G 蛋白質ともに陽性のコロニー数/mCherry 陽性コロニー数を組換えワクシニアウイルス産生効率とし、効率が高い中間体組換えワクシニアウイルスを選別した。上記の過程を 3 回繰り返し、組換えワクシニアウイルスをプラーク純化法により精製した。

現在、プラーク純化した中間体組換えワクシニアウイルスから mCherry 遺伝子を除去する段階に入り、中間体組換えワクシニアウイルスを RK13 細胞に感染させ、選択薬剤を抜いたアガロースゲルで培養した。その後、mCherry の発光が認められないプラークを 10 個回収し、蛍光抗体法により狂犬病ウイルスの G 蛋白質が発現している組換えワクシニアウイルスを選別した。現在、プラーク純化を 3 回繰り返し、最終的な狂犬病ウイルス G 蛋白質発現組換え LC16m8 を作製中である。

#### D. 考察

細胞培養ワクチン株である LC16m8 の品質管理にあたって、ウイルスレベルで MSP を検出できる抗体の作製を試みている。まず、LC16m8 と MSP の共通抗原の作製に成功し、LC16mO-B5R に対するウサギ由来抗血清で特異性が確認された。また、MSP の B5R 特異的抗原は LC16mO-B5R に対するウサギ由来抗血清とは反応するが、LC16m8-B5R に対するウサギ由来抗血清とは反応しないことが示された。ワクチン免疫血清とは反応しない B5R 抗原として特異性が確認された。その抗原を用いて現在ウサギ由来抗血清を作製中である。

### 3.その他 なし

また、作製できた特異抗原は細胞培養ワクチン接種者とバイオテロに用いられる可能性のある天然痘ウイルスやサル痘ウイルス感染者の血清から鑑別診断に応用できることが期待される。

更に、LC16m8 は弱毒化生ワクチン株として有用性が高いと考えられ、組換えワクチンのベクターとして活用を試みた。そのターゲットとして、人獣共通感染症の中でも最も致死率が高い狂犬病ウイルスの組換えウイルスワクチン開発を目指した。特に野生動物での狂犬病の蔓延を予防するために、餌に狂犬病ワクチンを入れて野生動物を免疫する方法が考えられる。餌に活性のあるウイルスを入れるためには、熱に安定なポックスウイルスがベクターとして優れていると考えられる。現在、狂犬病ウイルスの G 蛋白質を発現する組換えワクシニアウイルスを中間体まで作製でき、レポーター遺伝子である mCherry 遺伝子を除去する段階に着手している。作製する狂犬病ウイルス G 蛋白質組換えワクシニアウイルスは安全性、免疫原性、そして熱安定性が高いことが推察され、動物用ワクチンの開発に寄与すると期待できる。

#### E. 結論

細胞培養痘そうワクチン株である LC16m8 と MSP を鑑別できる特異的抗原が作製できた。更に、これら抗原は痘そうワクチン株接種者と天然痘ウイルスやサル痘ウイルス感染者を血清学的に鑑別診断できると期待された。現在、その抗原を用いて、ウサギ由来抗血清を作製中である。この抗血清はワクチン株に存在する MSP を特異的に検出できることが期待される。また、LC16m8 を狂犬病ウイルス G 蛋白質発現組換えワクシニアウイルスとして応用し、開発中である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 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

図表

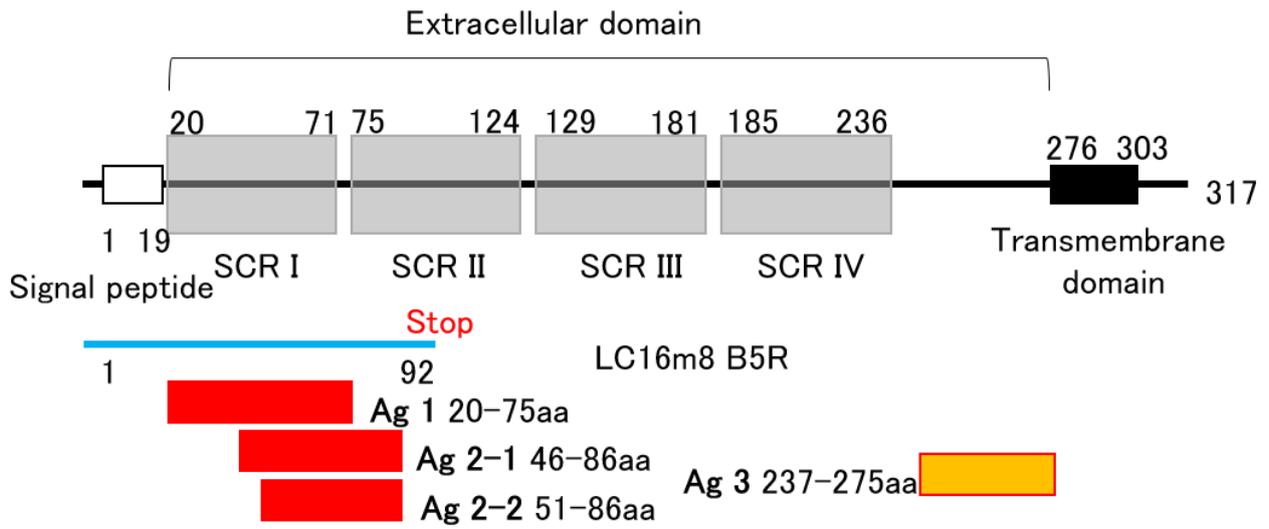


図 1. LC16m8 及び MSP の B5R 特異的抗原

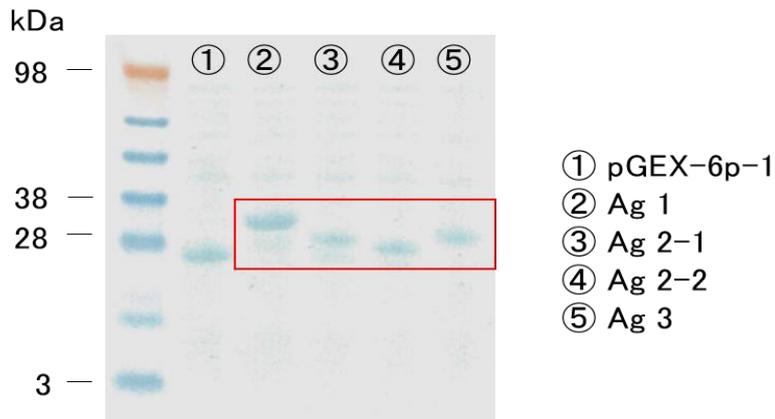


図 2.4 種類抗原の発現

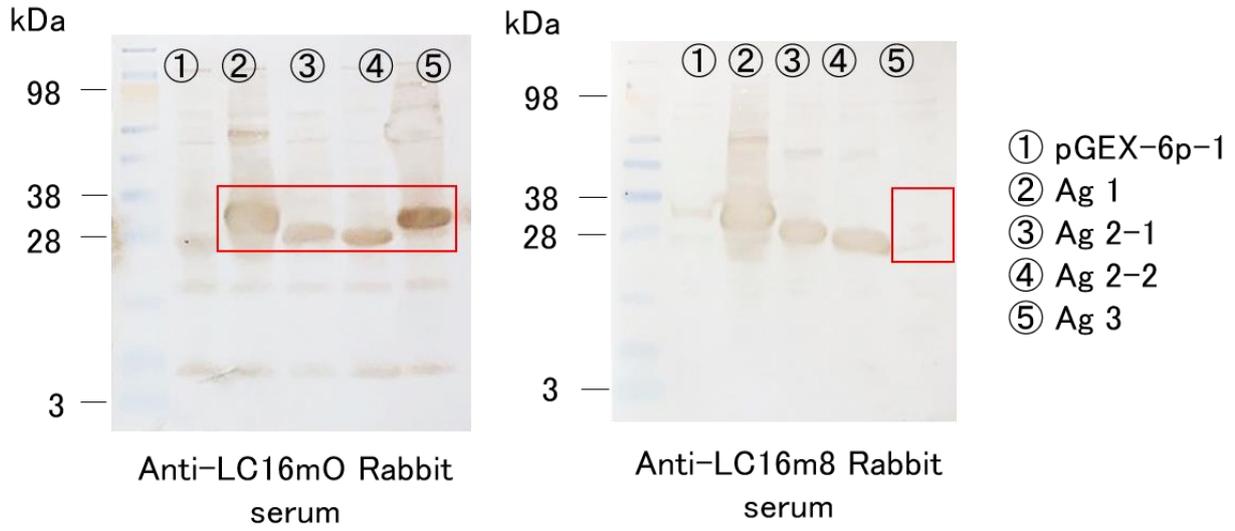
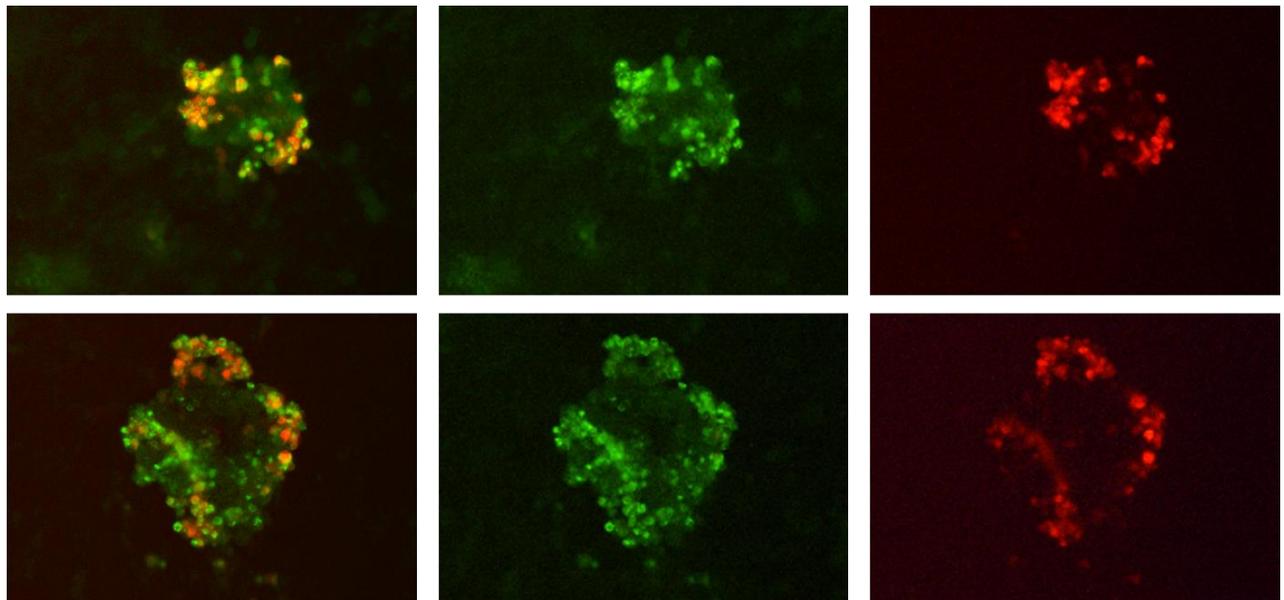


図 3. 4 種類抗原の特異性確認



Green: Rabies G protein (FITC)

Red: mCherry

図 4. 狂犬病ウイルス G 蛋白質発現組換えワクシニアウイルス