

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

### 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: COVID-19 の世界的流行に伴い、ワクチン開発が急ピッチで行われている。既に実用化されているものもあり、そのワクチン効果も確認され始めている。しかしながら、より有効性、費用効果、安全性などで優れたワクチンが開発される可能性を鑑みて、その開発研究は引き続き行われるべきであると考え。これまでに我々は高度弱毒化痘そうワクチン株 LC16m8 (m8) の全ゲノムを大腸菌人工染色体 (Bacterial Artificial Chromosome; BAC) に導入した BAC プラスミド pLC16m8.8S-BAC を作製し、このプラスミドと大腸菌の遺伝学を用いて容易に m8 の遺伝子操作を行うシステム (m8-BAC システム) が確立されている。このシステムを用いて本年度は SARS-CoV-2 が細胞に感染する際に使用するエンベロープ糖蛋白質、スパイク(S)の全領域、細胞表面の感染セレプターに結合する領域(S1)、その後膜融合を担う領域(S2)のそれぞれを発現するウイルス(それぞれ m8-S、m8-S1、m8-S2) を作製する事に成功した。また、これらの組換え m8 が感染した細胞で遺伝子が発現していることを確認した。今後はマウス血中の中和抗体の誘導能、そして、SARS-CoV-2 に感受性を持つハムスターを用いたワクチン効果について検証を行う予定である。

#### 研究協力者

氏名・所属研究機関名・職名

三須政康・国立感染症研究所ウイルス第一部・協力研究員

#### A. 研究目的

これまでに当研究班では高度弱毒化痘そうワクチン株 LC16m8 (m8) の全ゲノムを大腸菌人工染色体 (Bacterial Artificial Chromosome; BAC) に導入した BAC プラスミド pLC16m8.8S-BAC を作製している。このプラスミドと大腸菌を用いて容易に m8 の遺伝子操作を行うシステム (m8-BAC システム) が確立されている。更にこの BAC プラスミドへ外来遺伝子の導入を容易に行うために既存の組換えシステム (Red/ET 法) を更に改良し、より簡便で迅速なシステムの確立を行ってきた。このシステムは m8 の高い安全性と免疫原性を利点とする組換えワクチンの作製に利用できる。2020 年からの COVID-19 の世界的流行に対して、m8 をベースとした組換え SARS-CoV-2 ワクチン開発を目的とする。本年度は SARS-CoV-2 が細胞に感染する際に使用するエンベロープ糖蛋白質、スパイク(S)の全領域、細胞表面の感染セレプター

ーに結合する領域 (S1)、その後膜融合を担う領域 (S2) のそれぞれを発現するウイルスを作製する。

#### B. 研究方法

BAC プラスミド pLC16m8.8S-BAC に含まれる m8 ウイルスゲノム中の遺伝子 A46R と A47L 間の非翻訳領域に SARS-CoV-2 の S, S1 または S2 遺伝子をワクシニアウイルス特異的なプロモーターと共に Red/ET 法により導入した。作製した BAC プラスミドをヘルパーウイルスである鶏痘ウイルスと共に 293FT 細胞へトランスフェクション/インフェクションする事で感染性を持つ組換え m8 をリカバリーした。リカバリーしたウイルスが SARS-CoV-2 の遺伝子を保持しているかをサンガーシーケンスにより確認すると共に、これらの遺伝子がタンパク質として発現しているかは組換え m8 を感染させた RK13 細胞を、ウサギ抗 SARS-CoV-2 S1 または S2 抗体を用いて免疫蛍光法 (IFA) により確認した。

#### 【倫理面への配慮】

動物実験は、国立感染症研究所の動物実験委員会からの許可のもとに実施された。

## C. 研究結果

現時点での進捗を図 1 に示す。SARS-CoV-2 の S, S1 または S2 遺伝子を保持する BAC プラスミドを作製した。ここから感染性のある組換え m8 (m8-S, m8-S1, m8-S2) をリカバリーし、今後の実験に必要な量のウイルスを調整した。調整したウイルスの力価は  $1\sim 3\times 10^7$  PFU/ml 程度となり、以降の実験に十分な量であった。また、m8 を感染させた RK13 細胞を用いて IFA により確認した。図 2 (抗 S1 抗体で染色)、図 3 (抗 S2 抗体で染色) に示すとおり、遺伝子の発現が期待される組換え m8 感染細胞にのみ反応しており目的の組換え m8 が作製できていることが確認された。

## D. 考察

本年度は SARS-CoV-2 の S 遺伝子を保持する組換え m8 の作出に成功した。混研究で用いた m8-BAC システムにてリカバリーしたウイルスは導入された外来遺伝子以外の外来遺伝子は保持していない。つまり、ワクチンとして使用した際に、余分な外来遺伝子による予期せぬ副反応が生じることはない。

現在、m8-S1, m8-S2 そして m8-S をマウスに接種して、血中の中和抗体の誘導能の検証、そして、SARS-CoV-2 に感受性を持つハムスターにこれら組換え m8 を接種した後に SARS-CoV-2 をチャレンジして、そのワクチン効果を検証する実験を行っている。次年度以降はこれらの動物実験結果を解析し有効性の検証を行っていく予定である。

## E. 結論

m8 をベースとした組換え SARS-CoV-2 ワクチン開発の第一歩となる、S1, S2 そして S 全領域の遺伝子を保持し、感染細胞で発現する組換え m8 の作製に成功した。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tomoki Yoshikawa, Satoshi Taniguchi, Hirofumi Kato, Naoko Iwata-Yoshikawa, Hideki Tani, Takeshi Kurosu, Hikaru Fujii, Natsumi Omura, Miho Shibamura, Shumpei Watanabe, Kazutaka Egawa, Takuya Inagaki, Satoko Sugimoto, Supranee Phanthanawiboon, Shizuko Harada, Souichi Yamada, Shuetsu

Fukushi, Shigeru Morikawa, Noriyo Nagata, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo. A highly attenuated vaccinia virus strain LC16m8-based vaccine for severe fever with thrombocytopenia syndrome. PLoS Psthog. Feb 3;17(2):e1008859, 2021.

### 2. 学会発表

- 1) 吉河智城. 高度弱毒化痘そうワクチン株 LC16m8 をベースとした SFTS ワクチンの開発. 第 24 回日本ワクチン学会学術集会, 名古屋 (Web 開催) (2020.12)

## 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

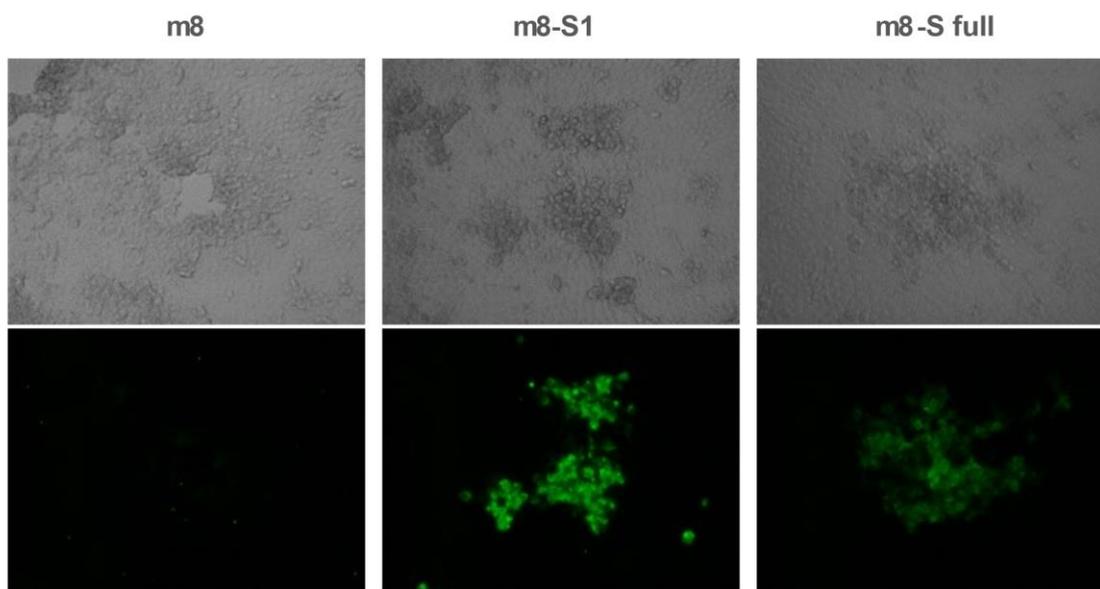
図表

# LC16m8-based Vaccine for COVID-19

	S1	S2	S full
BAC plasmid construction	 <b>Finished</b>	 <b>Finished</b>	 <b>Finished</b>
Virus recovery	<b>Finished</b>	<b>Finished</b>	<b>Finished</b>
Virus expansion	<b>Finished</b>	<b>Finished</b>	<b>Finished</b>
protein expression (IFA, western)	<b>Confirmed (IFA)</b>	<b>Confirmed (IFA)</b>	<b>Confirmed (IFA)</b>
Antigenicity (IFA, Neut.)			
Vaccine efficacy (Virus titer in lung)		<b>On going</b>	

図 1 組換え m8 作製の進捗

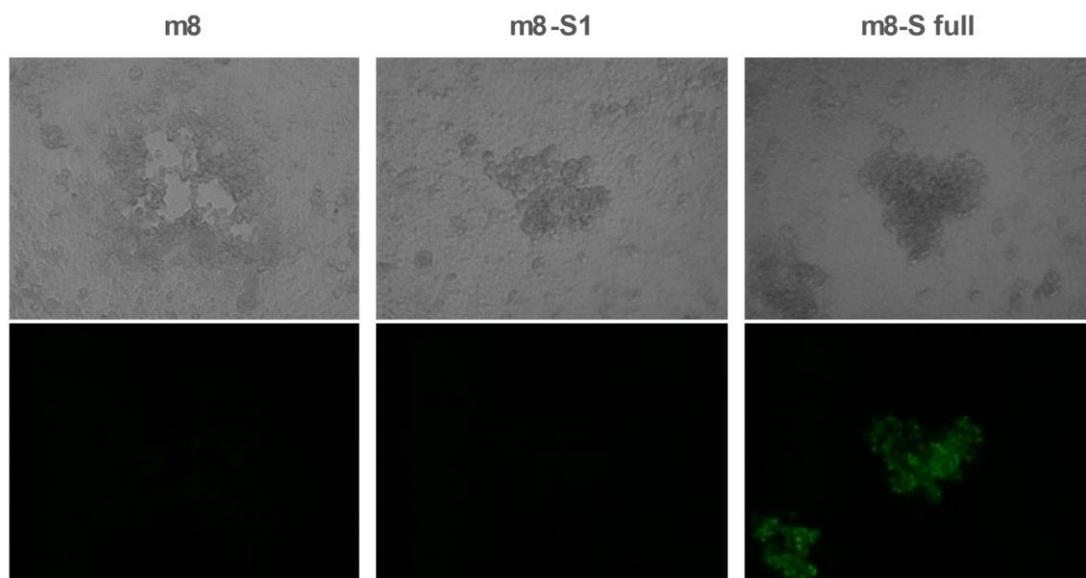
## S1 Protein Expression in The Infected RK13 Cells



1<sup>st</sup> Ab: Rabbit anti-SARS-CoV-2 S1 pAb (1ug/ml)  
2<sup>nd</sup> Ab: Anti-Rabbit IgG-Alexa488 (1/500 dil.)

図 2 BAC プラスミドからリカバリーした野生型 m8(m8), m8-S1, m8-S(m8-S full) 感染細胞を抗 SARS-CoV-2 S1 抗体で染色した. 上図は位相差顕微鏡蔵, 下図は蛍光染色像である.

## S2 Protein Expression in The Infected RK13 Cells



1<sup>st</sup> Ab: Rabbit anti-SARS-CoV-2 S2 pAb (1ug/ml)  
2<sup>nd</sup> Ab: Anti-Rabbit IgG-Alexa488 (1/500 dil.)

図3 図2と同様に感染細胞を抗 SARS-CoV-2 S2 抗体で染色した. 上図は位相差顕微鏡蔵, 下図は蛍光染色像である.