

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

分担研究課題名 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの安全性評価における病理学的研究

所 属 感染病理部
研究分担者 永田 典代

研究要旨: 新興感染症に対する新規ワクチンとして LC16m8 組換えワクチンの有効性と安全性の評価が必要とされている。今年度は、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の原因ウイルスである SARS-CoV-2 に対するワクチン開発で作出された SARS-CoV-2 と LC16m8 の組換えウイルスを皮下免疫後、攻撃接種を行ったシリアンハムスターの肺組織について病理学的解析を行った。スパイクタンパク全長を発現する組換えワクチン免疫群では、完全なウイルス排除には至らなかったものの、その免疫効果が認められた。

研究協力者

氏名・所属研究機関名・職名

志和 希・国立感染症研究所・感染病理部・研究員
吉河智城・国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任
研究官

521 株)を経鼻接種し、4 日目の個体(一群 5 匹)の肺組織を用いて常法どおりホルマリン固定パラフィン包埋組織標本を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色、免疫組織化学法によるウイルス抗原の検出を行い、病理組織学的解析を行った。

A. 研究目的

痘瘡ワクチンの安全性・有効性における病理学的理解は、依然、不十分である。また、天然痘のワクチン株の一つである、LC16m8 を動物由来のオルソポックスウイルス感染症対策に応用できると考えられているが、その有効性、安全性の評価が必要とされている。本年度は本研究班で開発された、LC16m8 組換えウイルスを利用した SARS-CoV-2 に対する新規ワクチンを免疫後、感染実験に供した動物の組織標本の病理学的解析結果について報告する。

【倫理面への配慮】

動物実験等の実施は担当しておらず、ホルマリン固定組織標本を分与後、研究を実施した。ただし、本動物実験の実施にあたっては“厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針”および機関内規程を遵守した。遺伝子組換え実験に関しては、“遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性確保に関する法律”を遵守し、国立感染症研究所の指針に則って実施した。本実験は、大臣確認実験が含まれるため、文部科学大臣による拡散防止措置の確認後に実施した。感染実験は、「国立感染症研究所・病原体等安全管理規定」に従いバイオセーフティレベルを遵守し取り扱った。

B. 研究方法

COVID-19 に対するワクチン開発のために作出された SARS-CoV-2 と LC16m8 の組換えウイルスを皮下免疫後、SARS-CoV-2 を経鼻接種されたシリアンハムスターの肺組織について病理組織学的に検索を行った。

なお、具体的には、組換えワクチンは SARS-CoV-2 ウイルスのスパイクタンパク S1 領域、S2 領域、あるいは全長の遺伝子を、細菌人工染色体 (BAC) に LC16m8 の全ゲノムを導入した BAC プラスミドを用いた LC16m8-BAC システムにより、それぞれ LC16m8 の A46R と A47L 遺伝子間に導入したものをを用いた。非免疫群には LC16m8-BAC システムによりリカバリーした野生型の LC16m8 を用いた。1×10⁶ PFU の LC16m8 組換えウイルスをそれぞれ 2 週間隔二回免疫したシリアンハムスターに 1×10³ TCID₅₀ 量の SARS-CoV-2 (A 系統、WK-

C. 研究結果

非免疫群において接種 4 日目の肺に SARS-CoV-2 の増殖を伴う種々の段階の急性肺炎所見が認められた(図一列目、m8 群)。病変は細気管支～肺胞野を中心に形成され、炎症反応が比較的弱い部分においてウイルス抗原陽性細胞が多数認められた(図、一列目上段)。また、炎症が比較的強い部分ではリンパ球、マクロファージ、好中球を混じ、出血を伴った。S1 および S2 免疫群では、非免疫群よりやや激しい炎症反応を伴う急性肺炎所見が認められた(図二、三列目、m8-S1 および m8-S2)。好中球、リンパ球、マクロファージを混じ、出血を伴う炎症巣においてウイルス抗原陽性細胞が観察された。スパイク全長免疫群では、リンパ球

の浸潤を伴った細気管支腔内の脱落上皮にウイルス抗原を認めるのみで、肺胞野において急性肺炎を示唆する所見はなかった。

D. 考察

SARS-CoV-2 のワクチン開発の際に考慮すべき点として、ワクチン関連疾患増悪がある。これは、過去の RS ワクチン、麻疹ワクチン等の臨床試験で観察されており、不完全な免疫や Th2 傾向の強い免疫応答が原因とされ、このような個体にウイルスが感染した際に疾患が増悪する事象である。1960年代のRS不活化ワクチン開発において、免疫した小児で死亡例を含めた重症例が比較的多く報告され、剖検例では重篤な好酸球性肺炎が観察された。従来 SARS-CoV や中東呼吸器症候群 MERS-CoV に対するワクチン開発時にマウスやフェレットで好酸球性肺炎あるいは急性肝炎としてワクチン関連疾患増悪が観察されたことから、COVID-19 のワクチン開発においても注意すべき事項として挙げられている。一方、シリアンハムスターにおいてはこれまでに好酸球性肺炎像は報告されていない。本研究において、スパイク全長の免疫によって一定の感染抑制効果が認められた。一方、S1 および S2 のみの免疫では感染防御に十分な免疫は成立しておらず、非免疫群に較べてやや強い炎症像が観察された。好酸球浸潤は観察されなかったものの、疾患増悪に関連するのかが詳細な解析が必要である。今後、その範囲も考慮した

スコア化を予定している。なお、ポックスウイルスに関連するポック形成を示唆する所見は得られていない。

E. 結論

SARS-CoV-2 のスパイク全長を発現する LC16m8 組換えワクチンを免疫後、感染実験に供した動物において一定の感染抑制効果が得られたことが病理組織学的に明らかとなった。ポックスウイルスに関連する組織病変は観察されていない。

F. 健康危険情報 特記事項なし

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
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

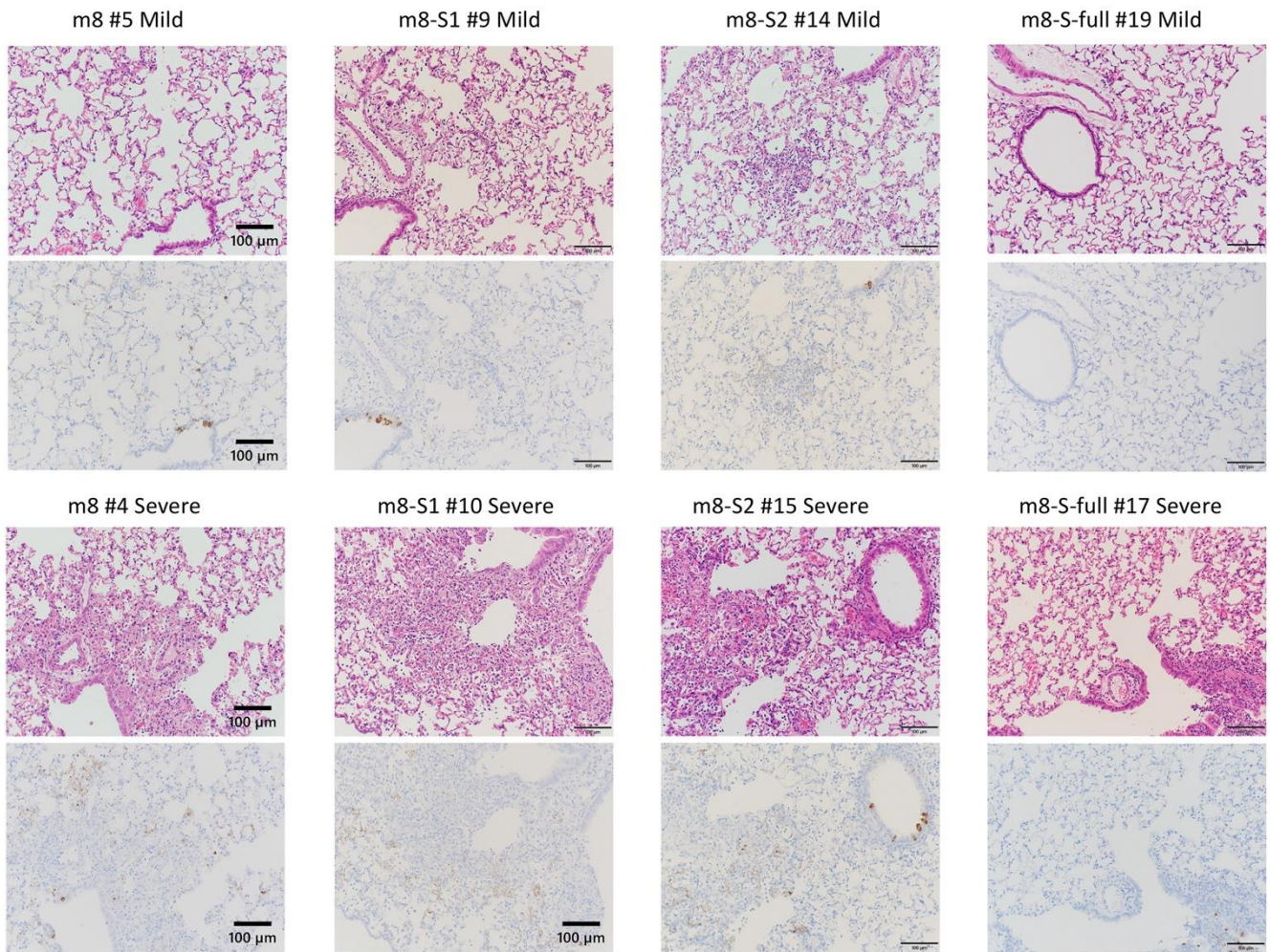


図 ワクチン免疫後に SARS-CoV-2 を経鼻接種したシリアンハムスターの肺組織像
 ヘマトキシリンエオジン染色と SARS-CoV-2 の N タンパク抗体を用いた免疫組織化学法。各群 (N=5) で細気管支周囲の肺胞野において比較的軽度の病変を示す個体 (Mild) と比較的強い病変を示す個体 (Severe) を提示した。