

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 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、MSP の検出法を簡便化し、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。そこで、LC16m8 及び MSP の B5R 遺伝子の共通抗原と MSP の B5R 特異的
抗原 4 種類を接種し、それぞれに対する抗血清を作製した。また、得られた抗血清を用いてサル痘ウイル
ス及び牛痘ウイルスの抗原検出を試みた結果、どちらも検出でき、ポックスウイルスの抗原に対する交差
反応性が確認できた。更に、これら 4 種類の抗原を用いて、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系の開発を行っている。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 を作製し、ワクチンとしての実用性確認のため、増殖性を確認している。

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・感
染病理部)

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℃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℃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。
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)解析及び主
要 MSP を検出する定量的 PCR 法解析によりバイ
オアッセイで得られた MSP の情報と同等の成績
が得られることを確認した。また、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
種者と感染者を血清学的に鑑別できる抗原を作製
し、それをを用いた診断系の開発も目的とする。尚、
ポックスウイルスに対する抗体は交差性が認めら
れることから、作製できたウイルス由来の抗血清
がバイオテロ際、サル痘ウイルス、牛痘ウイルスを
含むポックスウイルスの感染が生じた際に抗体検
出するための抗原検出に利用できるかを検討した。
一方、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) ウサギ由来抗血清の作製

昨年度作製できた LC16m8、LC16mO 及び MSP の B5R の共通抗原 3 種類 (Ag1, Ag2-1, Ag2-2)、LC16mO 及び MSP のみの B5R 抗原 1 種類 (Ag3) それぞれ 400 μ g (図 1) をアジュバントと同量混合し、ウサギに 5 回皮下免疫した。その後、抗体の上昇を確認し、全血を採取し、採取的抗血清を得た。抗体価がプラトーに達したため、全血を採取し、最終的抗血清を得た。

2) ウサギ由来抗血清の力価測定及び反応性確認
共通抗原 Ag1, Ag2-1, Ag2-2 をそれぞれ免疫し、経時的に抗体の上昇を確認した結果、Ag2-2 に対する抗体の反応性が悪かったため、Ag2-2 に対する抗体は本実験から除外した。それ以外の Ag1, Ag2-1, Ag3 は抗体の反応性が綺麗に認められた。そこで、B5R に対する特異性を確認するために、LC16mO の B5R, LC16m8 の B5R を pTOPO-4 ベクターにクローニングし、HEK 細胞に transfection した。Transfection 後 2 日目でウサギ由来の抗血清を用いて蛍光抗体法により反応性を確認した。また、ウサギ由来の抗血清のワクシニアウイルス抗原検出可能性を検証するために、LC16m8, LC16mO 及び MSP を RK13 細胞に感染させ、感染後 1 日目で蛍光抗体法により、抗体の力価を測定した。

3)

2. 天然痘ウイルス感染者及び LC16m8 ワクチン接種者の血清学的鑑別診断

Ag1, Ag2-1 は B5R の N 末端に該当するため、それらに対する抗血清は LC16m8, LC16mO 及び MSP すべてを認識できる。また、Ag3 は B5R の C 末端に該当するため、それに対する抗血清は B5R 全長を保有する LC16mO 及び MSP のみを認識できる。また、日本では 1976 年まで種痘が実施されたが、その当時は B5R 全長を保有するウイルスを用いて行われた。そのため、天然痘ウイルス感染者の血清としては種痘歴のある 50 代以上ヒト由来の血清を用いた。LC16m8 ワクチン接種者の血清としては種痘歴のない若年層で LC16m8 ワクチンを接種したヒト由来の血清を用いた。抗原としては Ag1, Ag2-1, Ag3, GST タグのみの Mock の精製及び非精製蛋白質を用いた。それらの抗原 (0.1~5 μ g) 及びヒト由来の血清 (1:500) を用いて、immunoblot 法により、鑑別診断を実施した。2 次抗体としては Goat anti-Human IgG (1:2000) を用い

た。予想としては天然痘ウイルス感染者の血清 (種痘歴のあるヒト由来の血清) は Mock 抗原以外の Ag1, 2-1, 3 を、LC16m8 ワクチン接種者の血清は Ag1, Ag2-1 のみを認識できる。

3. ウサギ免疫血清を用いたサル痘ウイルス、牛痘ウイルス抗原の検出法の検討
ワクシニアウイルスの B5R はサル痘ウイルスの B6R、牛痘ウイルスの B4R と 94~98% のアミノ酸相同性を示し、それぞれに対する抗体が交差する。そこで、サル痘ウイルスの B6R、牛痘ウイルスの B4R を pCAGGS ベクターにクローニングし、HEK 細胞に transfection した。Transfection 後、2 日目の細胞をアセトンにより固定し、作製した抗血清を用いて蛍光抗体法により、反応性を確認した。また、実際のウイルス抗原検出検討のために、サル痘ウイルス Zr599 株 (国立感染症研究所・ウイルス 1 部から分与) を Vero E6 細胞に感染させ、感染後 2 日目で作製したウサギ由来の抗血清を用いて蛍光抗体法により、反応性を観察した。また、この際にサル痘ウイルス感染サル由来の抗血清 (国立感染症研究所・ウイルス 1 部から分与) を陽性対照として用いた。

4. 狂犬病ウイルスの組換えワクチン開発

昨年度までに 2020 年に国内で分離された街上市毒である狂犬病ウイルス (Toyohashi 株) の G 蛋白質遺伝子を組み替えた狂犬病ウイルス G 蛋白質組換えワクシニアウイルスの中間体まで作製できた。その中間体は狂犬病ウイルスの G 蛋白質のみではなく、レポートとして mCherry を保有しているため、レポート遺伝子を除去する作業を実施した。その後、プラーク純化法により精製し、P1 の狂犬病ウイルス G 蛋白質組換えワクシニアウイルスを作製した。現在、ワクチンとしての実用化検証の最初段階として、RK13 細胞における増殖性を確認している。

【倫理面への配慮】

動物実験にあたって、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 の鑑別検出のための抗体作製
LC16mO 及び LC16m8 の B5R5 回免疫後、最終的に得られた抗血清の B5R に対する特異性を LC16m8 及び LC16mO の B5R を transfection した細胞を用いて、確認し、その力価を測定した。結果、共通抗原 (Ag1, Ag2-1) に対するウサギ抗血清の力価は LC16m8 及び LC16mO に対して 800~1600 倍であった。また、LC16mO 及び MSP のみの B5R に対するウサギ抗血清 (Ag3) は LC16mO の B5R のみに反応し、1600 倍まで上昇していた (図 2)。
また、LC16m8, LC16mO 及び MSP の感染細胞を

用いた力価測定の結果、Ag1, Ag2-1 に対するウサギ抗血清は 1:100-1,600 倍、Ag3 に対するウサギ抗血清は LC16m8 に対しては反応性を示さず、LC16mO 及び MSP に対して 1:1,600 以上の力価が得られた。

2. 天然痘ウイルス感染者及び LC16m8 ワクチン接種者の血清学的鑑別診断

精製及び非精製タンパク質 (Ag1, Ag2-1, Ag3, GST Mock) をウサギ抗血清を用いて immunoblot 法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: 29.09kDa) が認められた。それぞれの抗原を 0.1 から 5 μ g まで濃度を変え、種痘歴のあるヒト由来の血清 (天然痘ウイルス感染者の血清, 1:500) 及び LC16m8 ワクチンのみ接種者の血清 (1:500) を用いて immunoblot 法により、鑑別できるかを確認した。その結果、抗原 0.1 μ g に対してはすべて陰性であったため、0.1 μ g は抗原量が少ないことが示唆された。1~5 μ g の抗原を用いた immunoblot 法では種痘歴のあるヒト由来の血清及び LC16m8 ワクチンのみ接種者の血清共に Mock 抗原を含む 4 種類の抗原に反応し、GST tag に非特異的に反応することが分かった。

3. ウサギ由来抗血清を用いたサル痘ウイルス、牛痘ウイルス抗原の検出法の検討

牛痘ウイルスの B4R、サル痘ウイルスの B6R を transfection した HEK 細胞を用いた蛍光抗体法により、ウサギ抗血清のそれぞれの蛋白質に対する反応性を確認した。その結果、Ag1, Ag2-1, Ag3 に対するウサギ抗血清すべてはこれらの蛋白質に対して 1:1,600 倍の力価を示し、検出可能であることが分かった。Transfection した細胞の抗原は強制的に発現させた蛋白質であるため、感度が高すぎる可能性が考えられ、実際のサル痘ウイルスを感染させた Vero E6 細胞を用いて反応性を確認した (図 3)。また、陽性対照としてサル痘ウイルス感染サルの血清を用いた。その結果、サル痘ウイルス感染サルの血清は 1:25,600 倍以上の力価が確認された。また、Ag1, Ag2-1 に対するウサギ抗血清は 1:3,200~12,800 倍、Ag3 に対するウサギ抗血清は 1:12,800~25,600 倍以上で、感染サルの血清とほぼ同等の力価を示した。この結果から、自然界のウイルスも検出可能であることが確認された。

4. 狂犬病ウイルスの組換えワクチン開発

昨年度までプラーク純化した中間体組換えワクシニアウイルスが作製できた。本年度は、その中間体組換えウイルスから 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 蛋白が発現している組換えワクシニアウイルスを選別した。このようなプラーク純化を 3 回繰り返して、最終的な狂犬病ウイルス G 蛋白発現組換え LC16m8 を作製した。こちらの組

換えウイルスを RK13 細胞を撒いた 96 well のマイクロプレートに感染させ、蛍光抗体法により確認した結果、CPE が確認される細胞はすべて狂犬病ウイルス G 蛋白質に対する抗体に陽性を示し、mCherry は陰性を示した (図 4)。このウイルスを P1 として seed virus とした。現在はワクチンとしての実用性に向けての最初の確認段階として RK13 細胞における増殖性を確認している。

D. 考察

本研究では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一つの目的としている。まず、昨年度まで作製できた LC16m8, LC16mO 及び MSP の B5R 共通抗原 (Ag1, Ag2-1, Ag2-2) 及び LC16mO 及び MSP の B5R 特異的抗原 (Ag3) を用いて、本年度はそれぞれの抗原に対するウサギ由来抗血清が作製できた。Ag1, Ag2-1 に対するウサギ抗血清は LC16m8, LC16mO 及び MSP の B5R を特異的に認識でき、それぞれのウイルス感染細胞においても特異的に検出できた。また、Ag3 に対するウサギ抗血清は LC16mO 及び MSP の B5R 及びそれらのウイルスの感染細胞のみを特異的に認識できた。そのため、これらの抗体を用いて、flow cytometry や蛍光抗体法により、ウイルスレベルでの MSP を検出できることが示唆された。今後、これらのウサギ抗血清を用いた flow cytometry を実施し、LC16m8、又は、MSP 感染細胞を特異的に検出できることを検証する予定である。

また、作製できた抗原の中で Ag3 は LC16mO 及び MSP の B5R 全長の C 末端に該当するため、全長の B5R を保有するウイルス感染血清のみが反応する。そのため、バイオテロを想定した際に天然痘ウイルスやサル痘ウイルスの感染者の血清は Ag3 に反応することが想定されたため、それらの抗原を用いて immunoblot 法によりワクチン接種者の血清との鑑別診断を試みた。しかし、今回用いた Ag1, Ag2-1, Ag3, GST mock 抗原に対して全て反応したため、組換え蛋白質に付与している GST への非特異的反応の結果であることが考えられた。今後、GST tag を除去する作業等を行い、抗原の検討を行う予定である。本年度作製できたウサギ抗血清は牛痘ウイルスの B4R、サル痘ウイルスの B6R を検出できたため、少なくともワクシニアウイルス、サル痘ウイルス及び牛痘ウイルスに対する抗体は交差することが分かった。この結果から自然界にポックスウイルス感染が発生した際、又は、バイオテロ等による天然痘ウイルスやサル痘ウイルスの感染が発生した際、日本国内の野生動物における疫学調査等にウサギ抗血清を用いた抗原検出及び診断が可能であると期待される。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、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、最終的な狂犬病ウイルスの G 蛋白質を発現する組換えワクシニアウイルスが作製できたため、ワクチンとしての実用化に向けた第一検証として RK13 細胞における増殖性を確認している。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及び抗体が作製できた。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鑑別診断に用いるために、更なる抗原検討を実施する予定である。これら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ため、flow cytometry 法等による検出法を確立する予定である。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、ワクチンとしての実用化に向けて検証中である。

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

1) Mendoza MV, Park E, Ishijima K, Kuroda Y, Tatemoto K, Inoue Y, Harada M, Morikawa S, Saijo M, Maeda K. Differentiation of live attenuated vaccine from the other orthopoxviruses. 第 68 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2021.11)

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

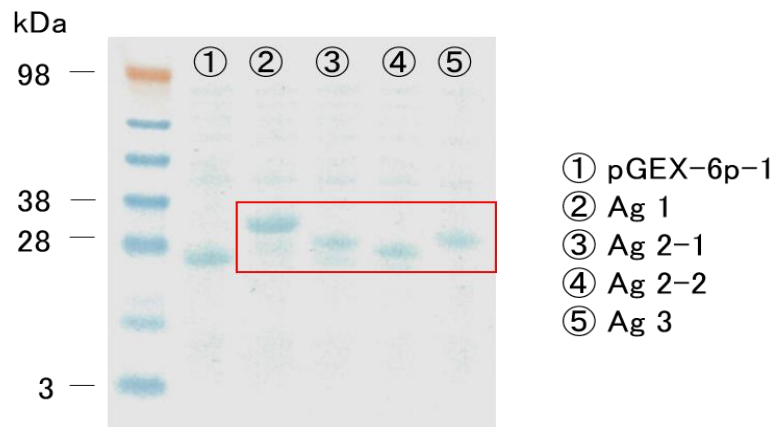
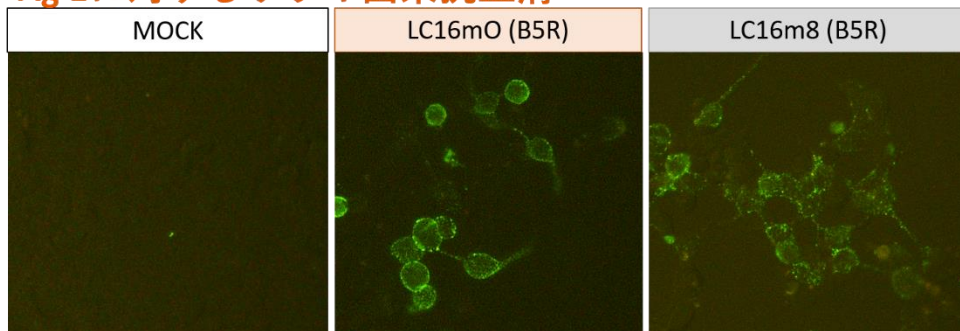


図1. 4種類の抗原

Ag 1に対するウサギ由来抗血清



Ag 3に対するウサギ由来抗血清

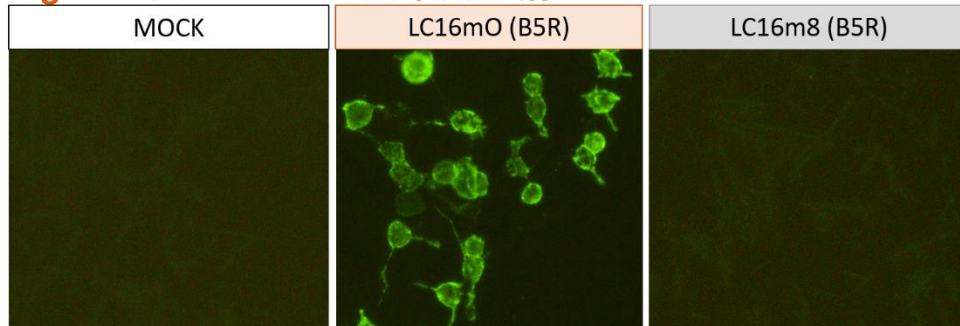


図2. 作製できたウサギ由来抗血清の特異性

サル痘ウイルスZr599感染Vero E6

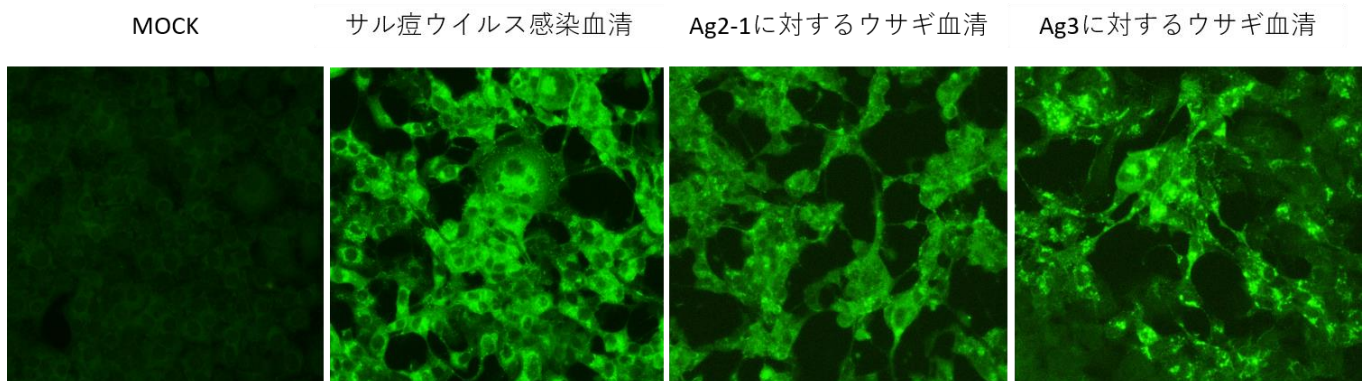


図3. サル痘ウイルスに対するウサギ由来抗血清の交差性確認

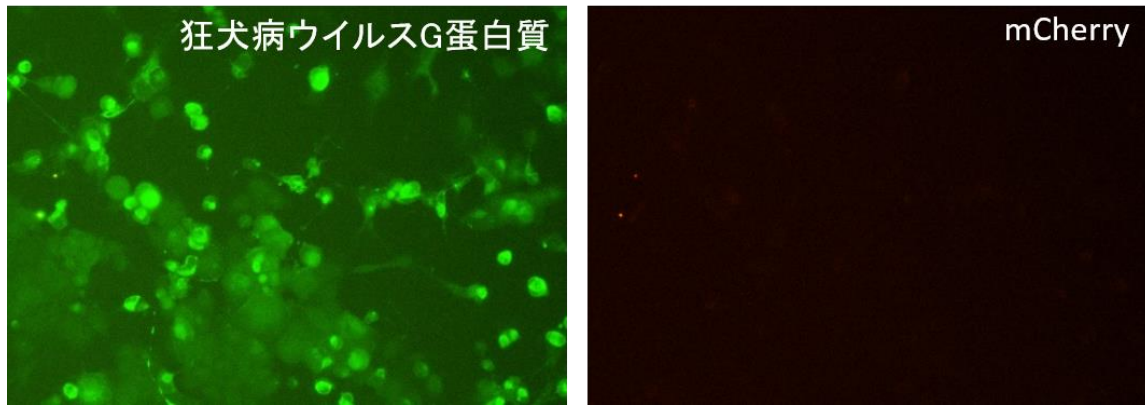


図 4. 狂犬病ウイルス G 蛋白質組換えワクシニアウイルス