

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る。昨年度までに我々は高度弱毒化痘そうワクチン株 LC16m8(m8)をベースとして、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組換え m8(それぞれ m8-S、m8-S1、m8-S2)を作製した。今年度はこれらの組換え m8 についてそのワクチン効果を SARS-CoV-2 に感受性を持つハムスターを用いた動物モデルにより検証を行った。その結果特に m8-S を免疫したハムスターにおいて高いワクチン効果が確認された。来年度は高いワクチン効果を示した m8-S について、その S 遺伝子に変異を導入し免疫原性を高めることによる更なるワクチン効果の増強を行う。また、近年世界的に変異株が席巻している状況を鑑みて、所謂デルタ株、オミクロン株に対しての m8-S のワクチン効果を検証する。

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において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た。これらのシステムは 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。本研究は 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組換え m8 のワクチン効果についてハムスターを用いた SARS-CoV-2 感染動物モデルで検証する。

B. 研究方法

昨年度までに作製した SARS-CoV-2 WK-521 株の S、S1、S2 遺伝子をコードする組換え m8(m8-S<sub>full</sub>, m8-S1, m8-S2)の *in vitro* に於ける感染細胞での遺伝子発現をウェスタンブロッティングにより確認した。これらの組換え m8 と、対照として野生型の m8  $1 \times 10^6$  PFU/100ul をシリアンハムスターに 2 週間間隔で 2 回皮内接種した(図 2)。最終免疫より 2 週間後に SARS-CoV-2 WK-521 株  $1 \times 10^3$  TCID50/80ul を経鼻接種によりチャレンジした。その 4 日後にハムスターを安楽死処置し、肺、血清を採取した。肺乳剤中に含まれる SARS-CoV-2 の量を TCID50 法にて求めると共に、血清中の SARS-CoV-2 WK-521 株に対する 100%中和抗体価についてもバイオアッセイにより決定した。

【倫理面への配慮】

ハムスターを用いた動物実験は国立感染症研究所 動物実験実施規程を遵守して行った。

C. 研究結果

m8-S<sub>full</sub>、m8-S1、m8-S2 の *in vitro* での遺伝子発現をウェスタンブロッティングにより確認した(図 1)。組換え m8 を感染させた RK13 細胞では予想される分子量の位置に抗 S1 または抗 S2 抗体特異的なバンドが確認された。

次に予め m8-S\_full、m8-S1、m8-S2、そして対照として m8 を免疫したハムスターに SARS-CoV-2 をチャレンジした後 4 日間の体重推移と、4 日目の肺中のウイルス量、及び血中の中和抗体価を図 3 に示す。ハムスターの体重の推移は最も体重が減少した感染 2 日後であっても 7%程度であり、群内の標準偏差も大きいため厳密な比較は出来ないながらも、対照群である m8 と比較して m8-S\_full、m8-S1、m8-S2 は体重の減少が緩やかであった。感染 4 日後の肺中のウイルス量は m8 を免疫しておいた群と比較して m8-S\_full、m8-S1、m8-S2 を免疫した群は有意にウイルス量が減少していた。特に m8-S\_full 免疫群は 5 匹中 2 匹でウイルス量が検出限界以下となっており、そのワクチン効果は m8-S1、m8-S2 を大きく上回った。血中の中和抗体価は肺中のウイルス量が最も少なかった m8-S\_full が最も高かった。興味深いことに肺中のウイルス量が m8-S1 よりも少ない m8-S2 の中和抗体価は検出限界以下となった。

#### D. 考察

本年度は SARS-CoV-2 の S 遺伝子を保持する組換え m8 のワクチン効果についてハムスターを用いた SARS-CoV-2 感染動物モデルで評価した。その結果、特に S 遺伝子全長を保持する m8-S\_full が最も高いワクチン効果を示すことを明らかにした。つまり今後の m8 をベースとした COVID-19 ワクチン開発において S 遺伝子は全長を保持することを前提として、更なる改良を行うべきであると考え。既報では S 遺伝子の 986、987 番目のアミノ酸をプロリンに置換した S(S-2P 変異)は S タンパク質の免疫原性を増強するとされており、更に S 遺伝子内の 986、987 番目のアミノ酸に加えて 4 カ所のアミノ酸をプロリンに置換したもの(S-HexaPro 変異)は S-2P 変異以上に抗原の安定性が増加するとされている。そこでこれらの変異を導入した組換え m8 の作出、更には S 遺伝子だけでなく、マトリックス遺伝子(M)や S と同様に SARS-CoV-2 のエンベロープ糖蛋白質である E、核タンパク質である NP を保持し、ウイルスの VLP を感染細胞で発現する組換え m8 を作出、そのワクチン効果の検証を行う予定である。

#### E. 結論

本年度は SARS-CoV-2 の S 遺伝子を保持する組換え m8 のワクチン効果についてハムスターを用いた SARS-CoV-2 感染動物モデルで評価した。その結果、特に S 遺伝子全長を保持する m8-S\_full が S1 遺伝子、S2 遺伝子のみを保持する組換え m8 と比較して高いワクチン効果を示すことを明らかにした。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yoshikawa T. Third-generation smallpox vaccine strain-based recombinant vaccines for viral hemorrhagic fevers. 39(41):6174-6181. doi: 10.1016/j.vaccine.2021.09.001
- 2) Yoshikawa T. Vaccine Development for Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome. Viruses. 13(4):627. doi: 10.3390/v13040627

##### 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

図表

## Recombinant m8s Prepared for This Study

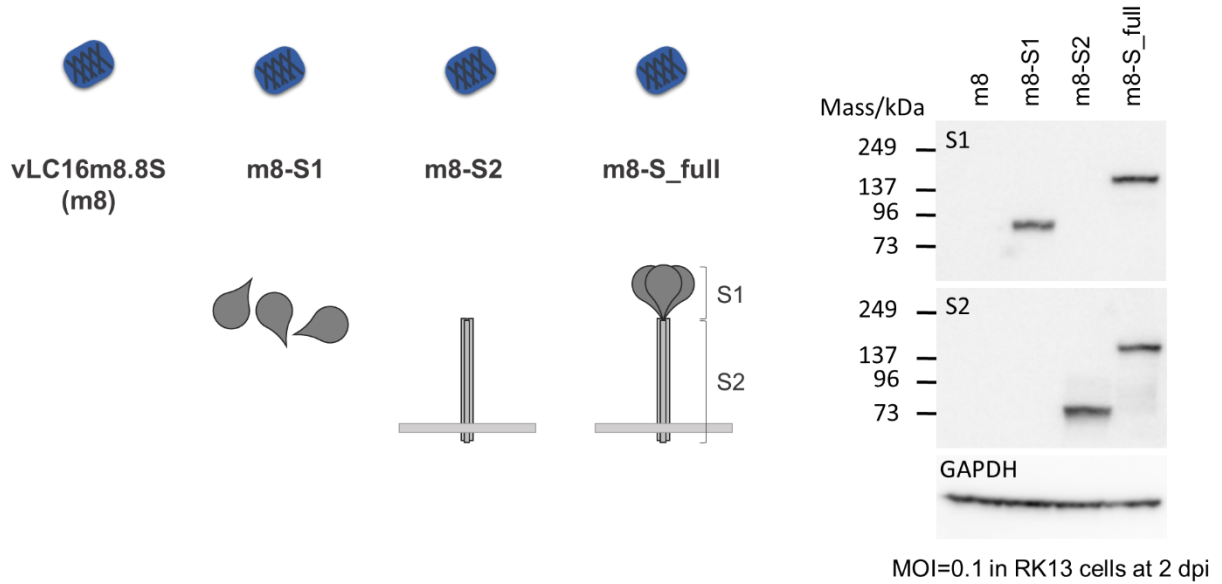


図1 SARS-CoV-2のS1、S2、S全長(S\_full)遺伝子を持つ組換えm8とその感染細胞での遺伝子発現

## Schedule

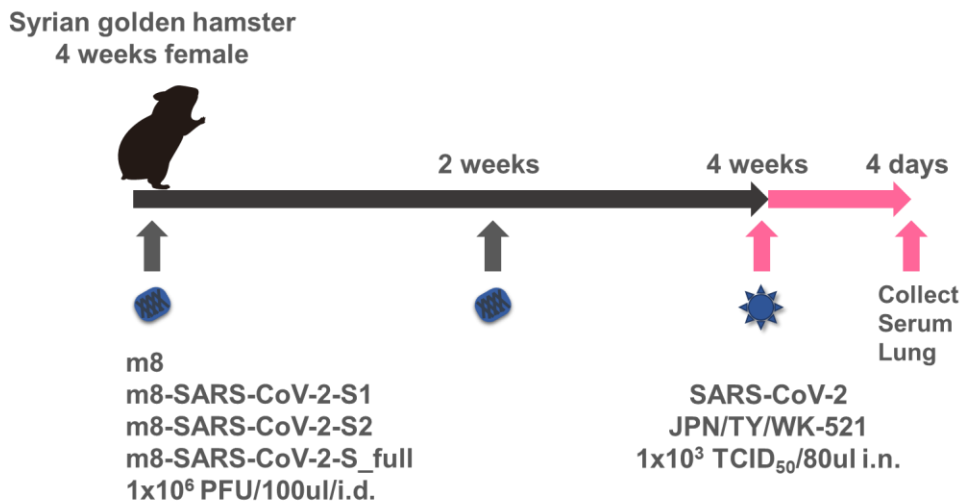


図2 SARS-CoV-2感染ハムスターモデルを用いた組換えm8のワクチン効果の検証

# The Results

At 4 days post SARS-CoV-2 challenge

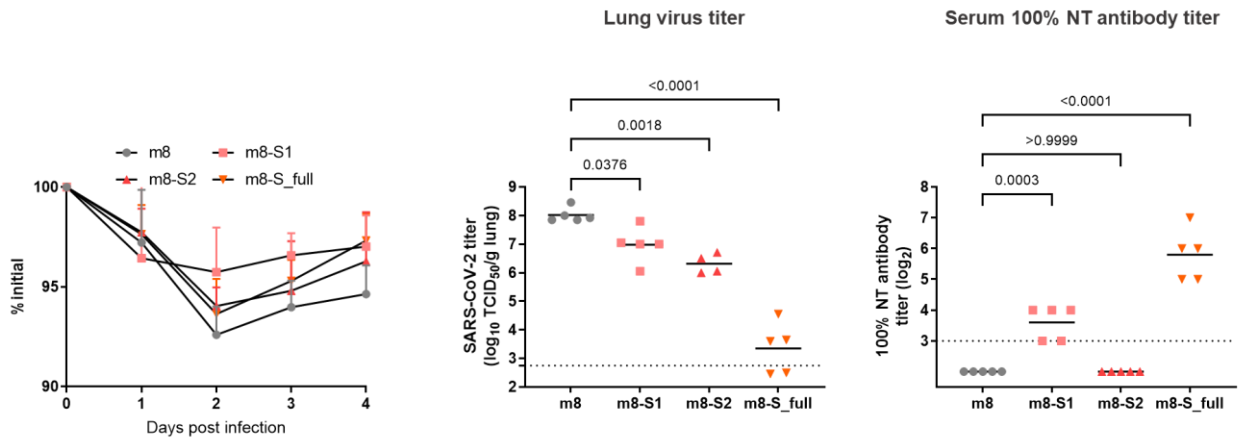


図3 SARS-CoV-2 チャレンジ後のハムスターの体重の推移、感染4日後の肺中のウイルス量、血中の中和抗体価