

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 国立感染症研究所感染病理部
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 組換えワクチンの開発が進んでいるが、この有効性と安全性の評価が必要とされている。本研究では昨年に引きつづき、新型コロナウイルス SARS-CoV-2 の組換えワクチンの有効性と安全性評価を行った。病変像等の評価結果を数値化することでデータを可視化し結果の明確化を図ることで有効性およびワクチン免疫後の疾患増悪のリスク評価のための評価系の構築を試みた。スコアリングによる検証の結果、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、その免疫効果が明白となった。一方、ワクチン関連疾患増悪に関しては組織病変、ウイルス抗原およびフィブリン沈着のスコアリング結果について個別に精査したものの、疾患増悪リスクの判断根拠に欠けた。今後はサイトカイン・ケモカインなどの炎症因子や細胞マーカーなど複数の指標を検討する必要がある。

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

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、痘瘡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。

本研究では、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の有効性と安全性について病理学的評価を行っている。昨年度は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 領域および S2 領域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、ワクチン免疫後の疾患増悪に関連するのかが詳細な解析が必要と考えた。そこで、病変像の評価結果を数値化することでデータを可視化し結果の明確化を図った。

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し、スコアリングを試みた。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ており、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。 1×10^6 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対し、 1×10^3 TCID₅₀ 量の SARS-CoV-2 (A 系統、WK-521 株) を経鼻接種し攻撃試験とした。

ウイルス接種 4 日目の個体(一群 5 匹)の肺(右中葉・右後葉・副葉および左肺)につ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た。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とフィブリン抗原の検出を行い、次の様にスコアリングを行った。

【組織病変スコア】0、炎症を認めない。1、切片上の 30%未満に炎症像を認める。2、切片上の 30-70%の範囲に炎症像を認める。3、切片上の 70%以上に炎症像を認める。+1、肺葉内に出血あるいは水腫が認められた場合はスコアに+1加える。

【ウイルス抗原スコア】0、抗原を認めない。1、対物レンズ 4 倍での観察下、抗原陽性細胞が 2-3 か所で観察される。また、対物レンズ 10 倍での観察下、4-8 か所で観察される。2、対物レンズ 4 倍での観察下、抗原陽性細胞が 4-6 か所で観察される。また、対物レンズ 10 倍での観察下、9-12 か所で観察される。3、対物レンズ 4 倍での観察下、抗原陽性細胞が多数(13 か所以上)観察される。

【フィブリン沈着スコア】0、フィブリン抗原を認めない。1、細気管支を中心として対物レンズ 20 倍での観察下、

視野全体の50%以下が陽性、限局的あるいは1カ所のみ観察される。2、同様の観察方法で視野全体の50%以上が陽性、広範、あるいは3カ所で観察される。

【倫理面への配慮】

当該分担研究者においては、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。

C. 研究結果

非免疫群において接種4日目の肺にウイルス抗原を伴う種々の段階の急性肺炎所見が認められた(図A、m8群)。一方、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(図A、m8-S-full群)。4群についてスコアリングを行った結果、病変スコア(図B)、ウイルス抗原スコア(図C)ともに他の群に比較して低値であり、非免疫群より有意に低い値を示した。一方、非免疫群に比べてS1領域およびS2領域免疫群はいずれのスコアもやや低値を示すものの、有意差は得られなかった。ウイルス抗原スコアにおいて、S1領域免疫群はスパイク全長免疫群に比して有意に高いスコアを示した。さらに、疾患増悪の指標の一つとして血管の傷害を示唆するフィブリン沈着について検討した(図D)。その結果、スパイク全長免疫群ではフィブリンの沈着は認められなかった一方、非免疫群とS1領域およびS2領域免疫群ではフィブリンの沈着が観察された。S1領域およびS2領域免疫群では病変やウイルス抗原スコアは比較的低値であったものの、高い個体が存在した。これらの個体についてフィブリン沈着との関連を精査したが、特に高値を示すこ

とはなかった。

D. 考察

病理学的解析結果から、S全長の免疫は感染と肺炎を抑制には十分であったが、S1領域およびS2領域の免疫では不十分と判断された。一方でワクチン関連疾患増悪に関しては組織病変、ウイルス抗原およびフィブリン沈着のスコアリングを併せて個別に精査したものの、特に注視すべき所見はなかった。しかしながら、これらの指標のみでは疾患増悪を判断するための根拠には乏しく、サイトカイン・ケモカインなどの炎症因子や細胞マーカーなど複数の指標が必要と考えられた。また、現状のスコアリング法は主観的であることが否定出来ないことから、客観性をもたすために画像認識機械学習システムの活用も考慮に入れる必要がある。

E. 結論

SARS-CoV-2のスパイクを発現するLC16m8組換えワクチンの有効性と安全性を評価するための病理学的評価方法を確立した。確立した評価法を活用し供与された新たな材料について解析を進めている。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表
該当無し

2. 学会発表
該当無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当無し

2. 実用新案登録
該当無し

3. その他
該当無し

図表

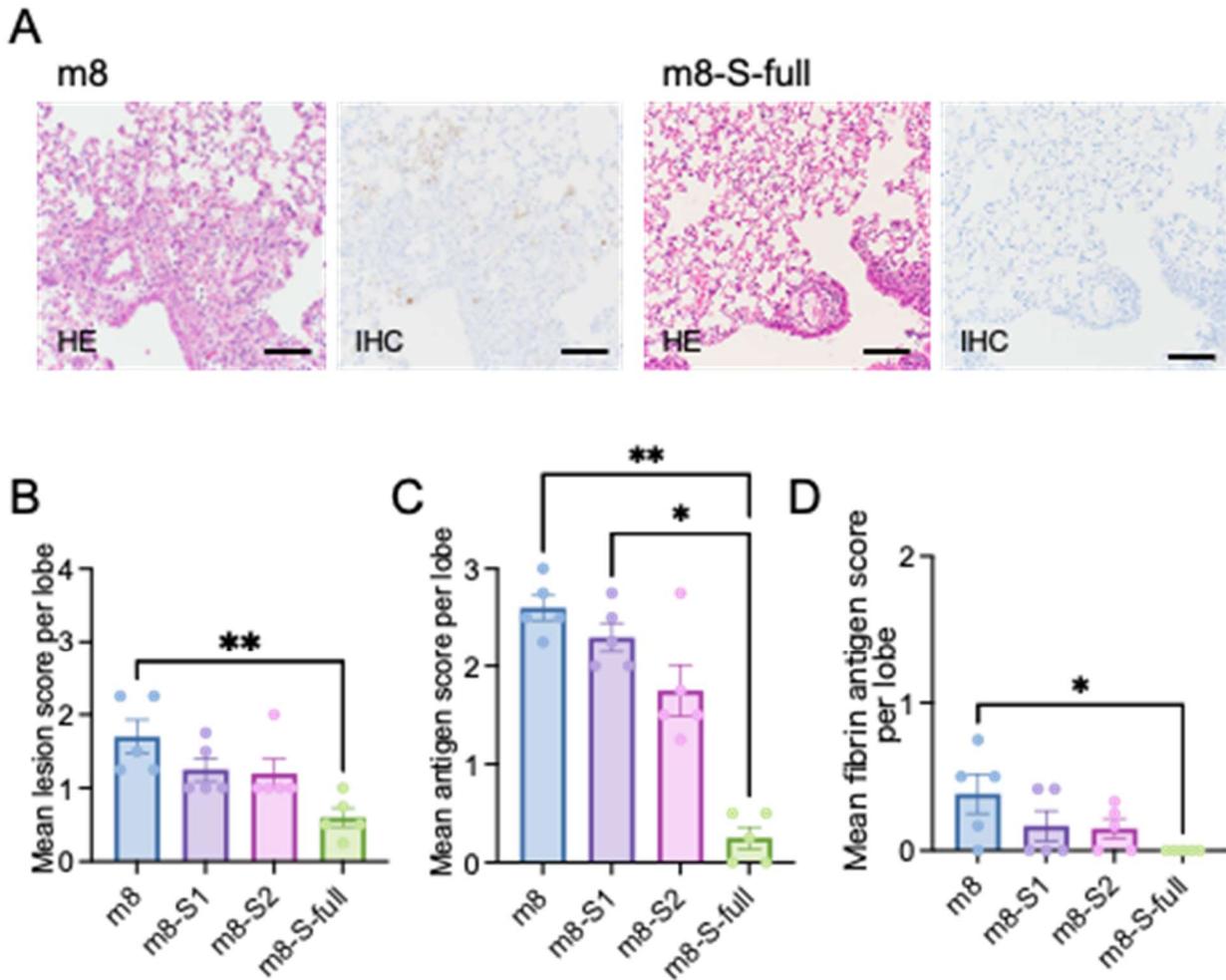


図 ワクチン免疫後のシリアンハムスターに対する SARS-CoV-2 攻撃試験。感染 4 日目の細気管支周囲の組織像とウイルス N タンパク抗原の検出結果(A)。HE、ヘマトキシリン・エオジン染色。IHC、SARS-CoV-2 の N タンパク抗体を用いた免疫組織化学法。各群(N=5)の組織病変スコア(B)、ウイルス抗原スコア(C)、フィブリン沈着スコア(D)の結果をグラフで示した。ドットは一個体あたりのスコア平均値。*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$: Kruskal-Wallis 検定後の Dunn 多重比較試験による対照群(m8 群)との比較解析結果。