

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。これまで、MSP の検出法を遺伝子レベルで実施してきたが、ウイルスの抗原レベルでの検討を行った。MSP の B5R 遺伝子の共通抗原と MSP の B5R 特異的抗原 4 種類をウサギに接種し、それぞれの抗血清を作製した。また、ウサギ由来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性が確認できた。更に、その中で最も高い反応性を示した 2 種類の抗原 (B5R N 末端及び C 末端) からペプチドを合成し、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できることを検討した。

研究協力者

氏名・所属研究機関名・職名

朴ウンシル(国立感染症研究所・獣医科学部・主任研究官)

Milagros Virhuez Mendoza(国立感染症研究所・獣医科学部・研究員)

原田倫子(国立感染症研究所・獣医科学部・研究員)

宇田晶彦(国立感染症研究所・獣医科学部・室長)

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°C 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°C 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 の検査結果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天然痘感染者を血清学的に鑑別できる抗原を作製し、それを用いた診断系の開発目的とした。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原検出に利用できるかを検討した。

B. 研究方法

1. ELISA 法の抗原作製及び交差性検討

血清学的診断法開発及び特異性検証のため、ELISA 法に用いるオルトポックスウイルスの抗原を作製した。牛痘ウイルス、サル痘ウイルス、又は、ワクシ

ニアウイルスを Vero E6 細胞、又は、RK13 細胞に接種し、感染後 3 日目に 1% NP-40 により氷上で反応させ、3,000rpm、15 分遠心後、上清を回収した。それぞれの抗原(0.5 μ g/ウェル)をワクシニアウイルス、又は、サル痘ウイルスに対する抗体を 1 次抗体として、protein A/G(1:2000)を 2 次抗体として用いて反応性を測定した。

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の開発

1) 抗原としてのペプチド合成

昨年度大腸菌発現系を用いて作製した Ag1 及び Ag2-1 抗原は 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 に対する抗体は反応性を示す。また、Ag3 抗原は B5R の C 末端に該当するため、B5R 全長を保有する LC16mO 及び MSP に対する抗体のみが認識できる。更に、昨年度までの結果から LC16m8 及び LC16mO に対するウサギ由来抗血清が高い反応性を示した Ag2-1 (B5R46-86) 及び Ag3(B5R237-275)抗原を血清学的診断における抗原の候補とし、それぞれの配列からペプチドを合成した(図 1)。

2) Luminex ビーズを用いたペプチドの特異性確認

Avidin-biotin 反応原理に基づいて血清学的診断を実施するために、avidin が付加された luminex ビーズを用いて flow cytometry により血清学的診断を実施した。また、ペプチドはそれぞれの N 末端に biotin 化した。Ag2-1 のペプチドは DW、Ag3 のペプチドは DMSO に溶かした。まずは、dot blot 法により、ペプチドの特異性を確認した。特異性が確認されたペプチドを用いて flow cytometry により血清学的診断系の確立を試みた。Avidin 化された luminex ビーズを 0.02 μ M のペプチドと反応させ、1 次抗体としては LC16mO-B5R に対するウサギ由来抗血清(1:100)、LC16m8-B5R に対するウサギ由来抗血清(1:100)、Ag2-1 及び Ag3 に対するウサギ由来抗血清(1:100)を用いた。陰性対照群として HSV-1 gE1 に対するペプチド及び免疫前のウサギ由来抗血清(1:100)を用いた。2 次抗体は Alexa fluor 647 donkey anti-rabbit (1 : 1000)、R-Phycoerythrin Goat Anti-Human IgG (1:1000)を用いた(図 2)。

3) ヒト血清を用いた flow cytometry による血清学的診断

購入したヒト血清(BIOPREDIC International 社)を用いて、2)の luminex ビーズを用いた flow cytometry 法により、血清学的診断を行った。ヒトの血清は女性及び男性から 2019 年~2021 年度に集められ、年齢は 18 歳~57 歳に分布していた。それらの血清を 1:10 に希釈し、検出に用いた。

【倫理面への配慮】

なし

C. 研究結果

1. ELISA 法の抗原作製及び交差性検討

牛痘ウイルス、サル痘ウイルス、ワクシニアウイルス感染 Vero E6、RK13 細胞から ELISA 抗原を作成した。1 次抗体としてワクシニアウイルス及びサル痘ウイルスに対する抗体を用いて抗原性を確認した。その結果、いずれも高い O.D.値が得られ、また、オルトポックスウイルス間の交差性も示唆された。サル痘ウイルス(Zr-599 株)の Vero E6 由来抗原が最も強い反応性を示したので、以降の実験ではこの抗原を ELISA 法による検出系で用いることにした(図 3)。B5R に対するウサギ由来抗血清を用いて ELISA を行うと、10-20 倍希釈率で弱い O.D.値が得られた。

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

合成 Ag2-1 及び Ag3 の特異性を dot blot 法により確認した。その結果、Ag2-1 に対するウサギ由来抗血清は Ag2-1 ペプチドのみ、Ag3 に対するウサギ由来抗血清は Ag3 ペプチドのみを検出した(図 4)。また、ワクシニアウイルスに対するウサギ由来抗血清は両方検出できたため、ペプチドの特異性は確認できた。

Avidin 化されたビーズと biotin 化されたペプチドを反応させ、flow cytometry 法により、抗体との反応性を検討した。その結果、LC16mO-B5R に対するウサギ由来抗血清は Ag2-1 に中程度、Ag3 に強度の反応性を示した。LC16m8-B5R に対するウサギ由来抗血清は Ag2-1 のみに強い反応性を示した。更に、Ag2-1 に対するウサギ由来抗血清は Ag2-1 ペプチドのみ、Ag3 に対するウサギ由来抗血清は Ag3 ペプチドのみを特異的に認識できた(図 5)。

購入したヒトの血清(n=26)を用いて診断系としての有用性を検証した。天然痘ウイルス等の感染者及び LC16m8 以外のワクチン接種者の血清は Ag2-1 及び Ag3 両方、LC16m8 ワクチン接種者の血清は Ag2-1 のみに反応性を示すことが予想された。結果、1 検体は Ag2-1 ペプチド、2 検体は Ag3 ペプチドに強い反応性を示した(図 6)。この 3 検体の血清を ELISA 法により特異性を精査した。サル痘ウイルス(Zr-599 株)を Vero E6 細胞に感染させ、作製した抗原が陽性抗体に対して最も良い反応性を示したため、サル痘ウイルス由来抗原を ELISA 法に用いた。その 3 検体を 100 倍に希釈し、ELISA 法を実施した結果、1 検体が陽性、2 検体は擬陽性~陽性であったが、luminex ビーズを用いた flow cytometry 法の陽性検体ではなかった。ELISA 法において陽性を示した 3 検体を 2 倍階段希釈し、実施すると濃度依存的に反応性が減少するため、サル痘ウイルスの抗原に対して真の陽性反応を示したと考えられる。その血清は最も強い反応性を示し、50 代後半のヒト由来であり、天然痘ウイルスに対するワクチンを接種していると思われる。

D. 考察

LC16m8 及び LC16mO B5R の共通領域に当たる N 末端の Ag2-1 は Ag2-2 に対するウサギ由来抗血清を含め、LC16m8-B5R 及び LC16mO-B5R に対するウサギ由来抗血清が検出でき、特異性が確認できた。また、LC16mO や LC16m8 変異体の B5R のみの領域に当たる C 末端の Ag3 は Ag3 に対するウサギ由来抗血清、LC16mO-B5R に対するウサギ由来抗血清のみが反応を示し、オルソポックスウイルス感染者や 70 年代以前の天然痘ウイルスワクチン接種者由来の B5R 全長に対する抗体を血清学的に検出できることが示唆された。

その 2 種類の抗原の配列からペプチドを合成し、dot blot 法を実施、特異性を確認した。次に、実際のヒト血清を用いて血清学的に検出できるかを試したが、反応性が弱く、他の手法により結果を確認する必要があった。そこで、感度が高いとされる flow cytometry 法により血清学的検出を試みた。その結果、それぞれの特異的ウサギ由来抗血清は綺麗に反応性を示し、ヒト血清は 3 検体ほど陽性とされるシグナルが得られた。しかし、オルソポックスウイルスの抗原を用いた ELISA 法によりその特異性を確認すると、その 3 検体は陰性となった。ELISA により最も強い反応を示したヒトは 50 代後半であり、天然痘ウイルスに対するワクチン接種者であると考えられる。B5R に対するウサギ由来抗血清はオルソポックスウイルスに対する力価が低いこと、dot blot 法、flow cytometry 法の結果を踏まえると、B5R に対する抗体がかなり少ない可能性が考えられた。

E. 結論

Ag2-1 及び Ag3 の蛋白質抗原及びペプチドはそれ

ぞれ特異性が確認され、オルソポックスウイルス感染者や 70 年代以前の天然痘ウイルスに対するワクチン接種者を血清学的に検出できる可能性が示唆された。しかし、オルソポックスウイルスに対する抗体の中で、B5R に対する抗体の量が少ない可能性があり、更なる工夫が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

ビルヘスメンドーサ ミラグロス、朴ウンシル、石嶋慧多、黒田雄大、立本完吾、井上雄介、原田倫子、西野綾乃、山本つかさ、吉河智城、下島昌幸、海老原秀喜、森川 茂、前田 健「Differentiation of smallpox live attenuated vaccine (LC16m8) from the other orthopoxviruses」第 165 回日本獣医学会学術集会、神奈川県相模原市・麻布大学、2022 年 9 月 6 日～8 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

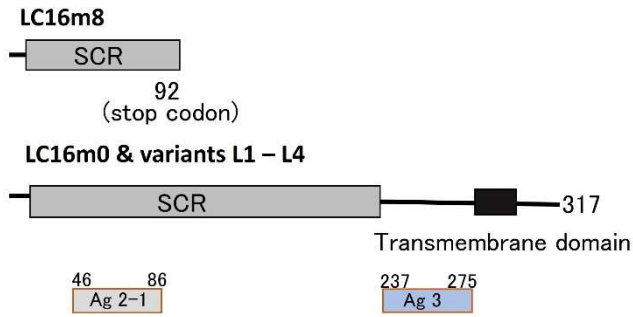
なし

2. 実用新案登録

なし

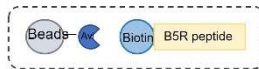
3. その他

なし



- B5R protein peptides (2mM):
- Ag2-1: soluble, diluted in DW
 - Ag3 : diluted in DMSO

図 1 ペプチド概要



Luminexビーズ protocol:

Bio-peptide	Target	保管濃度(使用量)
Ag 2-1	B5R N-terminal	2mM (10uL)
Ag 3	B5R C-terminal	2mM (10uL)
#9 (MOCK)	HSV1 gE1 67-73	2mM (10uL)
Blank	—	—

1st antibody:

Anti LC16m0-B5R serum and anti LC16m8-B5R serum (1/100 dilution)
 Anti B5R antibodies: Rabbit No 4, No 6 (1/100 dilution)
 Negative control : Rabbit No 4 pre-inoculation serum (1/100 dilution)

2nd antibody:

Alexa fluor 647 donkey anti-rabbit (1/1000 dilution)
 R-Phycoerythrin Goat Anti-Human IgG (1/1000 dilution)

図 2 Luminex ビーズ法のプロトコール

Ag : Zr599 Vero E6 cells

1stAb : vaccinia virus antibody

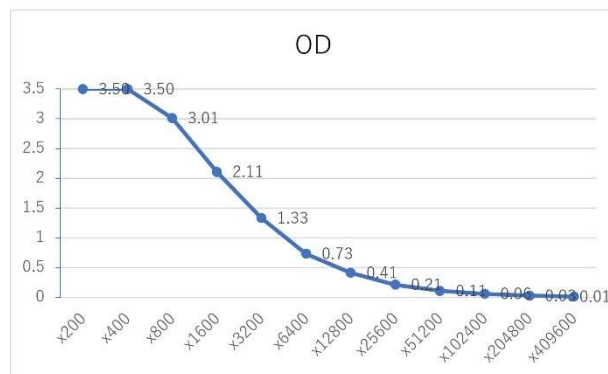


図 3 ELISA 結果

サル痘の Zr599 感染 VeroE6[細胞抽出物を抗原として用いた OD 値から、非感染細胞抽出物を用いた OD 値を引いた値を縦軸に示した。

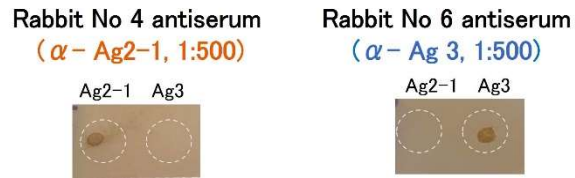


図 4 Dot blot 解析

合成ペプチドをメンブレンに滴下し、それぞれの抗体を用いて反応性を検討した

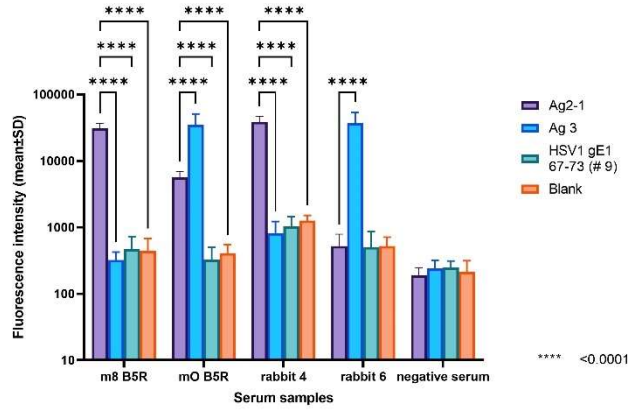


図 5 Luminex ビーズを用いた flow cytometry
Rabbit 4 は Ag2-1、Rabbit6 は Ag3 を免疫した

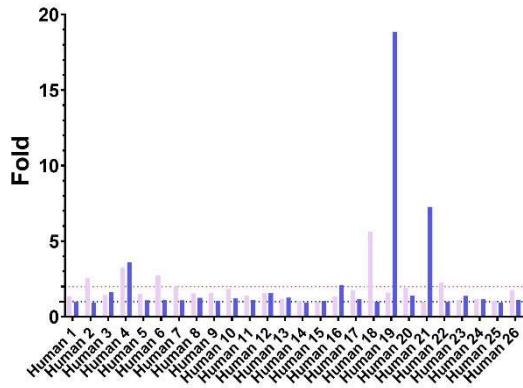


図 6 ヒト血清の flow cytometry 結果(ピンクは Ag2-1、青は Ag3 を抗原として用いた)

