

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  
研究分担者 吉河 智城

研究要旨:高度弱毒化痘そうワクチン株 LC16m8(m8)はその高い安全性と免疫原性を利点として組換えワクチンベクターとしての応用が可能であると考えられる。そこで我々は当研究班に於いて確立した、m8 の遺伝子操作を行うシステム(m8-BAC システム)を用いて COVID-19 のワクチン開発を行っている。昨年度までに、SARS-CoV-2 が細胞に感染する際に使用するエンベロープ糖タンパク質、スパイク(S)の全領域を発現する組換え m8(m8-S\_full)はハムスターを用いた SARS-CoV-2 感染動物モデルにおいて高いワクチン効果を示すことを明らかにした。そこで本年度はそのワクチン効果を更に高めるために、S タンパク質に中和抗体誘導能の高い pre fusion state の状態を維持するためのアミノ酸変異を導入した組換え m8(m8-S-2P、m8-S-HexaPro)を作製した。これらの組換え m8 を免疫したハムスターに SARS-CoV-2 を感染させたところ、m8-S\_full 免疫群と同程度に肺中のウイルス量を強く抑制した。特に m8-S-2P、m8-S-HexaPro 免疫群は m8-S\_full 免疫群と比べて肺中のウイルス量が検出限界以下の個体数が多い傾向があった。血中の中和抗体価は m8-S-2P、m8-S-HexaPro を免疫した群が m8-S\_full を免疫した群よりも高い傾向があった。これらの結果より、S-2P、S-HexaPro 遺伝子を保持する組換え m8 は野生型の S 遺伝子を保持する組換え m8 を比べて中和抗体の誘導能が高く、そのためワクチン効果が高くなることが示唆された。

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我々は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。また pLC16m8.8S-BAC 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。このシステムは 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 COVID-19 ワクチン開発を目的とする。去年度は 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(m8-S、m8-S1、m8-S2)のワクチン効果を検証した結果、m8-S が他よりも優れていることを明らかにした。S タンパク質の 3 次構造は、エントリーレセプターである ACE2 に結合する時の pre fusion state と、ウイルスと感染細胞膜との融

合時に構造が変化した post fusion state に区別される。ウイルス中和能を持つ抗体の誘導は pre fusion state が post fusion state よりも有利であると考えられており、現行の幾つかの COVID-19 ワクチンについても pre fusion state の状態を維持するために 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)が使用されている。本年度の研究は、野生型の S と比較してこの S-2P、または S-2P から更に 4 カ所のアミノ酸をプロリンに置換した S(S-HexaPro)遺伝子を保持する組換え m8 を作製して、そのワクチン効果についてハムスターを用いた SARS-CoV-2 感染動物モデルにより検証した。

B. 研究方法

昨年度に作製した、m8 の全ゲノムを保持する BAC プラスミド pCL16m8.8S-BAC に SARS-CoV-2 WK-521 株の S 遺伝子を導入したもの(pCL16m8.8S-S\_full)をベースに、その S 遺伝子の 986、987 番目のアミノ酸をプロリンに置換したものと、これに加えて 4 カ所、計 6 カ所をプロリンに置換したものを作製した。これらの BAC プラスミドから組換え m8 をリカバリーした(それぞれ m8-S\_full、m8-S-2P、m8-S-HexaPro)。in vitro に於いての各組換え m8 感染細胞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。次にワクチン効果を検証するために、これらの組換え m8 と、対照として野生型の m8 1x10<sup>6</sup> 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 1)。最終免疫より 2 週間後に SARS-CoV-2 WK-521 株  $1 \times 10^3$ 、または  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/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 TCID<sub>50</sub> 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-S-2P、m8-S-HexaPro 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 2)。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 抗体に対して特異的なバンドが確認された。m8-S-2P、m8-S-HexaPro は 2カ所、または 6カ所のアミノ酸をプロリンに置換したのみの変異体のため、S<sub>full</sub> と分子量などに違いは無く、また S タンパク質発現量にも大きな違いは見られなかった。

次に予め m8-S<sub>full</sub>、m8-S-2P、m8-S-HexaPro、そして陰性対照として m8 を免疫したハムスターに  $1 \times 10^3$ 、または  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> の 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。ハムスターの体重は特に  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> の SARS-CoV-2 をチャレンジした実験に於いて差が顕著となった。陰性対照である m8 免疫群では感染後 4 日目まで体重が減少していた一方で、m8-S<sub>full</sub>、m8-S-2P、m8-S-HexaPro を免疫したハムスターでは感染 2 日目以降は体重が回復していた。この傾向は  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub> の SARS-CoV-2 をチャレンジした実験に於いても同様であった。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<sub>full</sub>、m8-S-2P、m8-S-HexaPro 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-2P、m8-S-HexaPro を免疫した群の個体について、ウイルス量が検出限界以下の個体が m8-S<sub>full</sub> を免疫した群の個体よりも多い傾向があった。

血中の中和抗体価は m8-S-2P、m8-S-HexaPro を免疫した群が m8-S<sub>full</sub> を免疫した群よりも高い傾向があった。m8-S-2P、m8-S-HexaPro 間については肺中のウイルス量や、中和抗体の誘導能について大きな差は確認できなかった。

### D. 考察

本年度は SARS-CoV-2 の S 遺伝子のアミノ酸に中和抗体誘導能の増強が期待できる変異を導入した組換え m8 を作製し、そのワクチン効果をハム

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、野生型の S 遺伝子を保持する m8-S<sub>full</sub> と比較して m8-S-2P、m8-S-HexaPro は肺中のウイルス量を検出限界以下にまで抑制する傾向がより強く見られることより、より高いワクチン効果を発揮することが示唆された。一方で今回の研究ではワクチン抗原とチャレンジウイルスの株が同一であったことから、野生型の S 遺伝子を保持する m8-S<sub>full</sub> であっても非常に効果的に肺中のウイルス量を抑制しており、m8-S-2P、m8-S-HexaPro の有効性が劇的に確認されることは無かった。加えて、m8-S-2P、m8-S-HexaPro 間については肺中のウイルス量や、中和抗体の誘導能について大きな差は確認できず、そのワクチン効果に大きな違いは無いことが示唆された。今後はチャレンジウイルスにオミクロン株などを用いて m8-S-2P、m8-S-HexaPro の効果を検証する予定である。

また、S 遺伝子は S-2P を使用して、マトリックス遺伝子(M)やのエンベロップ糖タンパク質遺伝子である 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 遺伝子のアミノ酸に中和抗体誘導能の増強が期待できる変異(S-2P、S-HexaPro)を導入した組換え m8 を作製し、そ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、S-2P、S-HexaPro 遺伝子を保持する組換え m8 は野生型の S 遺伝子を保持する組換え m8 を比べて中和抗体の誘導能が高く、そのためワクチン効果が高くなることが示唆された。

### F. 健康危険情報

無し

### G. 研究発表

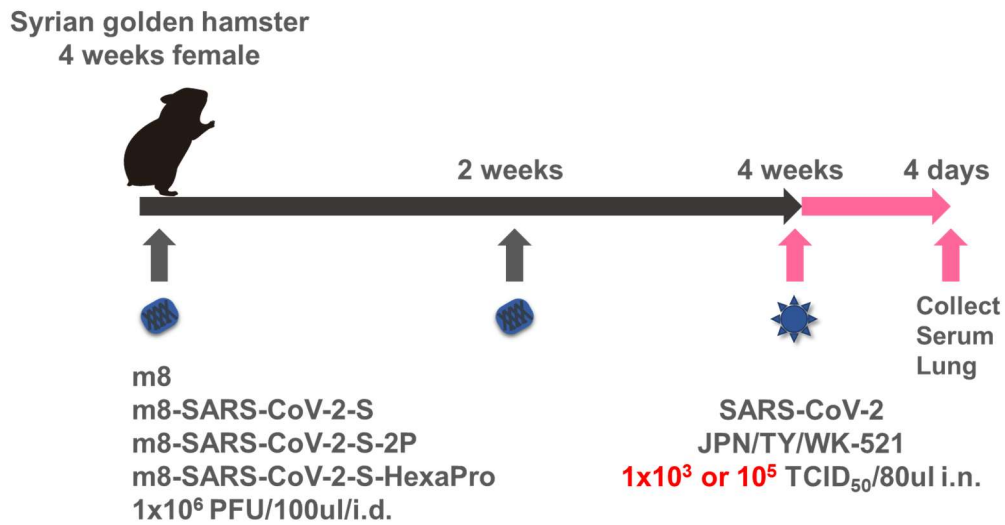
1. 論文発表  
無し
2. 学会発表  
無し

### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
無し
2. 実用新案登録  
無し
3. その他  
無し

図表

## 免疫、チャレンジのスケジュール

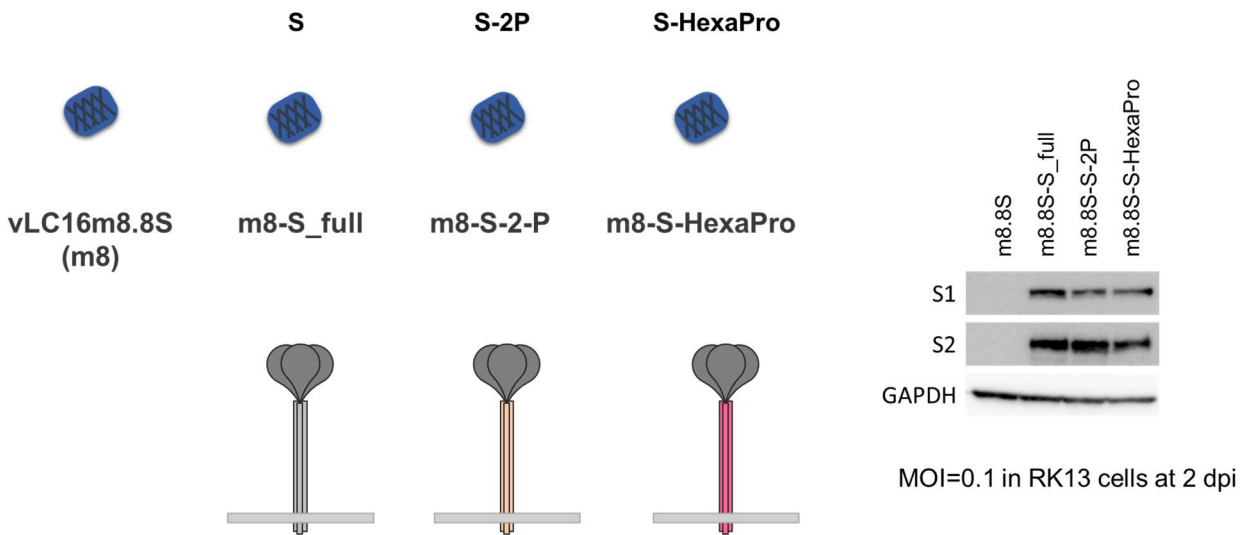


作製した組換えm8のワクチン効果についてハムスターを用いて検討した

図1 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

## スパイクタンパク質プロリン置換変異体

S proteins are based on Japan/TY/WK-521/2020

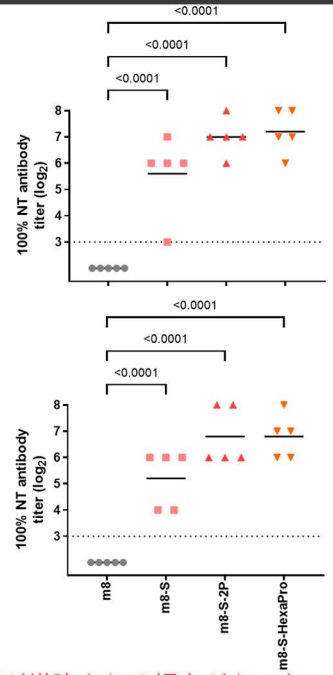
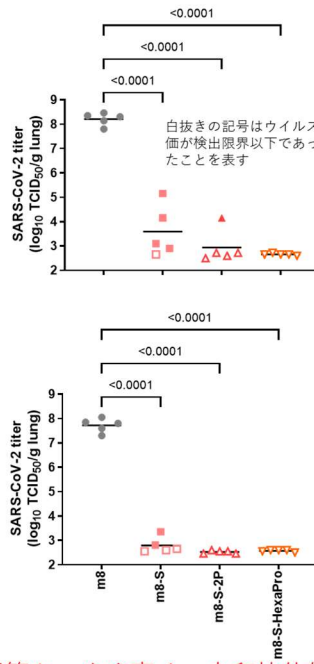
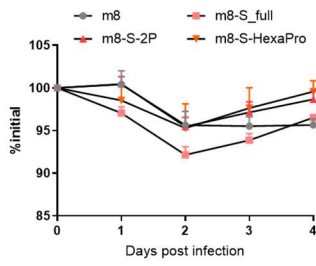


免疫原性の増強が期待できるS遺伝子のS2領域のプロリン置換変異体を保持する組換えm8を作製した

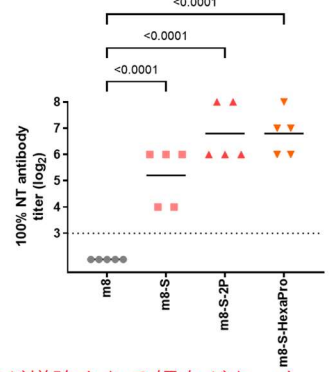
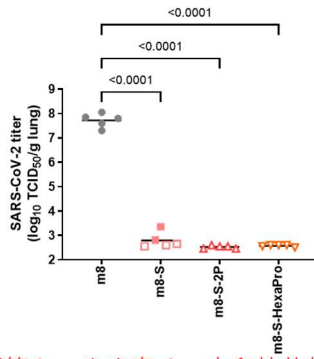
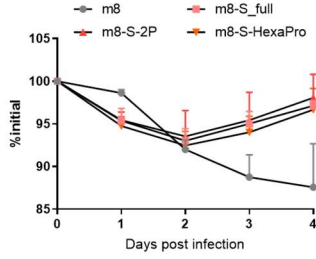
図2 SARS-CoV-2 の S (S\_full)、プロリン置換変異体 (S-2P、S-HexaPro) 遺伝子を持つ組換え m8 と、その感染細胞での遺伝子発現

# 体重変化、ウイルス量、中和抗体価

$10^3$



$10^5$



プロリン置換変異体のワクチン効果は野生型と同等か、やや高く、中和抗体価の誘導が増強される傾向があった

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