

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)
「新興・再興感染症流行時の血液製剤の安全性確保のための研究」

分担研究報告書
中和抗体価測定系の改良と検証
(Mpox ウィルスに対する血清中和抗体価測定系の改良と検証)

研究分担者： 相内 章（国立感染症研究所 感染病理部 室長）
研究協力者； 上野 莉（国立感染症研究所 感染病理部 任期付研究官）
鈴木忠樹（国立感染症研究所 感染病理部 部長）

研究要旨：エムポックスに関しては、リアルタイム PCR による検査系は構築されているが、抗体検査は候補となる抗原が多種類存在することが影響し、標的とする抗原が明確に決まっていない。このような状況においては、機能的な抗体、つまりウイルス感染を阻害する中和抗体応答の評価が最適であると考えられる。古典的にはブラーク減少法を用いた中和抗体価測定が行われてきたが、作業が煩雑かつ血清希釈が限られてしまい、一回の測定で中和抗体価を確定できない場合があり、多検体の測定に応用できないという問題があった。本研究課題では、より簡便で多検体の測定を可能とする感染細胞で形成されるフォーカスを標識抗体で検出するフォーカス減少法を用いた中和抗体価測定系を検討し、現時点において至適な測定系を構築することに成功した。

A. 研究目的

血液製剤はヒトの血液を原材料としている。血液製剤における既知ウィルスに関する安全性は、日本赤十字社による献血血液における高感度な抗体・抗原検査、個別核酸増幅検査の導入や血漿分画メーカーにおける製造工程における病原体の除去・不活化処理の導入により、感染リスクが低下し、高い安全性が確保されている。未知の新興感染症あるいは検査系が構築されていない再興感染症に関しては、無症候ドナーからの献血・輸血により感染する可能性があるため、献血血液の安全性を確保するためには、高感度な抗体・抗原検査ならびに製造工程

中の不活化評価法を構築する必要が生じる。

2022 年に世界的な流行のあったエムポックスは Clade IIb によるものであったが、現在アフリカにおいて Clade I ならびに Ib によるエムポックスが流行しており、海外では散発的な輸入症例の報告が続いている。エムポックスに関しては、リアルタイム PCR による検査系は構築されているが、抗体検査は候補となる抗原が多種類存在することが影響し、標的とする抗原が明確に決まっていない。このような状況においては、機能的な抗体、つまりウイルス感染を阻害する中和抗体応答の評価が最適であると考えられる。本研究課題では、より簡便で

多検体の測定を可能とする感染細胞で形成されるフォーカスを標識抗体で検出するフォーカス減少法を用いた中和抗体価測定系の構築を行うことを目的とした。

B. 研究方法

使用したウイルスとその調製

国内の痘そうワクチン株であるワクチニアウイルス LC16m8 株、ならびにエムポックスウイルス (MPXV) である SPL2A7 株 (Clade IIb) を使用した。これらウイルスは国立感染症研究所ウイルス第一部より頂いた。

本実験用として、LC16m8 はウサギ腎由来細胞株 RK-13 細胞を用いて、SPL2A7 株はアフリカミドリザル腎由来細胞株 Vero E6 細胞を用いてそれぞれウイルスを増やした。5% FBS を含む DMEM 培地に懸濁したそれぞれの細胞を 75 cm² T フラスコに播種・培養し、フルシート状になったところで、培地を 2% FBS を含む DMEM 培地（以下、2% DMEM）に置換、その後 MOI = 0.01 でそれぞれのウイルスを感染させた。細胞の観察を行いながら培養を継続し、半分程度の細胞に細胞変性効果 CPE が認められた培養 3 日目にフラスコを回収した。回収したフラスコは -80°C 冷凍庫にて凍結、その後融解することで細胞を破碎した。破碎細胞の懸濁液を回収して、遠心分離により得られた上清をそれぞれのウイルス液とし、小分け分注したのちに -80°C で使用時まで保存した。なお、以下の実験を含め、ウイルスを使用する過程は全て BSL3 実験室で実施した。

ウイルス力価の測定

調製したウイルスの力価 (focus forming unit/mL) の算出は、RK-13 細胞と Vero E6 細胞それぞれに対して実施した。調製したウイル

スを、2% DMEM を用いて 10 倍希釈からの 2 倍希釈系列を調製した。96 ウエルプレートに細胞を播種しフルシート状になったところで BSL3 実験室に持ち込み、培養上清を完全に除いた後にウイルスの希釈液を 100 μL ずつ細胞に添加し、37°C CO₂ インキュベーターに静置し 16-24 時間培養した。培養後 10% ホルマリン緩衝液を添加し、1 時間室温にて細胞を固定・不活化した。その後のフォーカス検出は、次項に示した方法で実施し、フォーカス数をカウントすることで力価を算出した。

フォーカス減少法 (Focus Reduction Neutralization Test, FRNT) の手順

FRNT 法は、基本的に以下の手順に従い実施した。試験血清ならびにフォーカス検出用の抗体として、当部に保存されていた LC16m8 感染ウサギ回復期血清から硫安分画により粗精製した IgG 分画（以下、ウサギ抗 LC16 IgG 分画）を使用した。このウサギ抗 LC16 IgG 分画の 2 倍段階希釈系列 (60 μL) を 2% DMEM を用いて調製した。ここに約 200 focus/50 μL となるように 2% DMEM で希釈した各ウイルスを 60 μL ずつ添加し（合計 120 μL）、その後 37°C CO₂ インキュベーターに静置し 20-24 時間培養を行った。96 ウエルプレートに細胞を播種しフルシート状になったところで BSL3 実験室に持ち込み、培養上清を完全に除いた後に上述の血清・ウイルス混合液から 100 μL を細胞に添加し、37°C CO₂ インキュベーターに静置し 16-24 時間培養した。培養後 10% ホルマリン緩衝液を添加し 1 時間室温にて細胞を固定・不活化した。ホルマリンを除き水道水でプレートを洗浄した後に、0.5% Triton X-100 を含む DPBS を添加し、固定細胞の透過処理を 15 分行った。その後、希釈したウサギ抗 LC16 IgG 分画を添加し、室温にて 1 時間

培養を行った。PBS-Tween で各ウェルを洗浄後、2,000 倍に希釈した HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Promega) を添加し、室温にて 1 時間培養を行った。PBS-Tween で洗浄後、基質として TrueBlue Peroxi-dase Substrate (KPL) を添加し、フォーカスの染色を行った。プレートは超純水で洗浄したのちに乾燥させ、フォーカスのカウントは ELISpot アナライザー (CTL) を用いて行った。FRNT の測定は 3 点測定（血清希釈は 1 検体に関して 3 列独立して実施）で実施した。ウイルスのみを添加したウェル 3 点の平均フォーカスカウントの 50% をカットオフ値とし、このカットオフ値を下回るフォーカスカウント数を有する血清の最大希釈倍率を列ごとの中和抗体価とし、列ごとに得られた 3 点の幾何平均値をその血清の中和抗体価とした。

FRNT における検討項目

- フォーカス検出に用いる抗体の検討
ウサギ抗 LC16 IgG 分画に加えて、ウサギ抗 LC16 IgG 分画調製の元になった LC16m8 感染ウサギ血清、ならびに LC16m8 の親株である LC16m0 感染ウサギ血清を検討した。
- FRNT に使用する細胞
RK-13 細胞あるいは Vero E6 細胞を用い、LC16m8 ならびに SPL2A7 それぞれのウイルスに関して上述の手順に則り、FRNT を実施した。
- FRNT において血清とウイルスの混合液を細胞に添加してからの培養時間の検討
調製した血清希釈系列とウイルスの混合液を細胞に添加してから、10% ホルマリン添加による感染細胞の固定・不活化するまでの培養時間を 16 時間、24 時間で検討した。

C. 研究結果

最初に、試験用に調製した各ウイルスの RK-13 細胞ならびに Vero E6 細胞に対する力価 (focus forming unit/mL) を実施した。この時、フォーカス検出に使用する抗体として、ウサギ抗 LC16 IgG 分画に加えて、ウサギ抗 LC16 IgG 分画調製の元になった LC16m8 感染ウサギ血清、ならびに LC16m8 の親株である LC16m0 感染ウサギ血清を検討した。LC16m8 あるいは LC16m0 感染ウサギ血清を用いた場合、十分なフォーカスを検出できる希釈倍率にしてしまうと、それに伴いバックグラウンドが高くなってしまい、ELISpot リーダーでのフォーカスカウントが難しくなることが明らかになった。このためフォーカス検出には、LC16m8 感染ウサギ血清から IgG を粗精製したウサギ抗 LC16 IgG 分画を使用することにした。

次に、LC16m8 および SPL2A7 の FRNT に共通して使用できる細胞として、RK-13 細胞と Vero E6 細胞の比較を行った（図 1）。LC16m8 は、ウイルス液を細胞に添加してから 16 時間培養で、ウイルスを増やす際に推奨される RK-13 細胞を用いた場合フォーカスは明瞭に認められるが、Vero E6 細胞を使用した場合は RK-13 細胞と比較してフォーカスサイズは小さくなるものの ELISpot アナライザーで十分にカウントできるサイズであった。SPL2A7 は、同じく 16 時間培養では RK-13 細胞では増殖が遅くフォーカスが小さくカウントが難しかったが、Vero E6 細胞では大小サイズの異なるフォーカスが存在するものの問題なくカウントすることができた。Vero E6 細胞を用いて 24 時間培養するとフォーカスが大きくなり融合してしまうため、逆にカウントが難しくなることが明らかとなった。以上から、

LC16m8ならびにSPL2A7のFRNTにはVero E6が適していると考えた。

最後に、ウサギ抗 LC16 IgG 分画を測定対象となる血清とみなした FRNT を実施した。使用する細胞と血清・ウイルス混合液を細胞に添加してからの培養時間を見て評価を行った(図 2)。LC16m8に対する FRNT では、16 時間の培養で RK13 細胞あるいは Vero E6 細胞を使用した場合でも血清濃度に依存して傾きの大きいフォーカスの減少・増加が認められた。SPL2A7に対する FRNT では、培養時間にかかわらず血清濃度に依存したフォーカス数の減・少・増加は緩やかであり、フォーカスカウントのカットオフ値を下回る血清倍率を見出すことができかかった。これに対し Vero E6 細胞を使用した場合、血清濃度に依存したフォーカス数の減少・増加の傾きは、RK13 細胞の場合と比較して大きくなり、カットオフ値を下回る血清の最大希釈倍率つまり中和抗体値を得られるようになった。24 時間培養の場合は、図 1 に示した通りフォーカスの融合が認められるせいか血清濃度に依存したフォーカス数の減少の傾きに凸凹が生じてしまい中和抗体値を得ることが難しくなった。

D. 考 察

FRNT に使用する細胞の検討と血清・ウイルス混合液を細胞に添加してからの培養時間を検討することで、1 回のアッセイで中和抗体値の値をつけることが可能になった。LC16m8 に関しては、血清濃度の高いところではフォーカスが完全に消失し、血清の希釈に伴いフォーカスが出現するために明瞭に中和抗体値を算出することが可能であった。これに対し、MPXV に関しては血清濃度が高くてもフォーカスが消失することはなく、血清の希釈に伴いながらかにフォーカスが

増加する傾向が認められた。これは、MPXV には主に EEV (Extracellular Enveloped Virus) と IMV (Intracellular Mature Virus) のウイルス形態が存在するためか、大小のサイズの異なるフォーカスが出現することが原因であると考えられた。MPXV の表面抗原に対するモノクローナル抗体を用いてフォーカスを検出することで改善する可能性もあり、系の改良は引き続き必要である。

E. 結 論

ワクチニアウイルスである LC16m8 ならびに MPXV である SPL2A に対する FRNT を行うにあたり、Vero E6 細胞を用いて 16 (~20) 時間が適していた。フォーカスの検出には、ウサギ抗 LC16 IgG 分画が十分に使用可能であることが明らかとなった。また、ラーク減少法を用いた中和試験では血清の希釈範囲が狭く、一度のアッセイで中和抗体値が定まらない場合は、更に血清を高希釈倍率で希釈系列を調製し再度試験を行う必要があったが、FRNT では血清希釈倍率が 8~131,072 倍の 15 点で 1 回の試験で値をつけることが可能である。以上から、現時点において至適な FRNT の構築はできたと判断できる。今後、更に改良を進める予定である。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Okumura N, Morino E, Nomoto H, Yanagi M, Takahashi K, Iwasaki H, Uemura Y, Shimizu Y,

Mizushima D, Fukushima K, Kinai E, Shiojiri D, Itoda I, Onoe Y, Kobori Y, Nakamura F, Tokita D, Sugiura W, Ueno S, Ainai A, Mine S, Suzuki T, Ohmagari N, Ujiie M. LC16m8 for Pre-exposure Prophylaxis against Mpox in a High-Risk Population: An Open-Label Randomized Trial. Clin Infect Dis. 2025 Feb 21:ciaf074. doi: 10.1093/cid/ciaf074. Epub ahead of print. PMID: 39982831.

2. 学会発表

1. 上野 葉, 佐高明子, 峰宗太郎, 小島朝人, 海老原秀喜, 森野英里子, 氏家無限, 鈴木忠樹, 相内 章. フォーカス減少中和試験を用いたサル痘ウイルスに対する中和抗体価測定系の確立. 第 71 回日本ウイルス学会, 名古屋, 2024.11.
2. 相内 章, 上野 葉, 峰宗太郎, 佐高明

子, 小島朝人, 海老原秀喜, 森野英里子, 氏家無限, 鈴木忠樹. サル痘ウイルスに対する効率的な新規中和抗体価測定系の構築. 第 28 回日本ワクチン学会 第 64 回日本臨床ウイルス学会 合同学術集会, 名古屋, 2024.10.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得(出願)
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図1. ウイルス接種後のフォーカス像

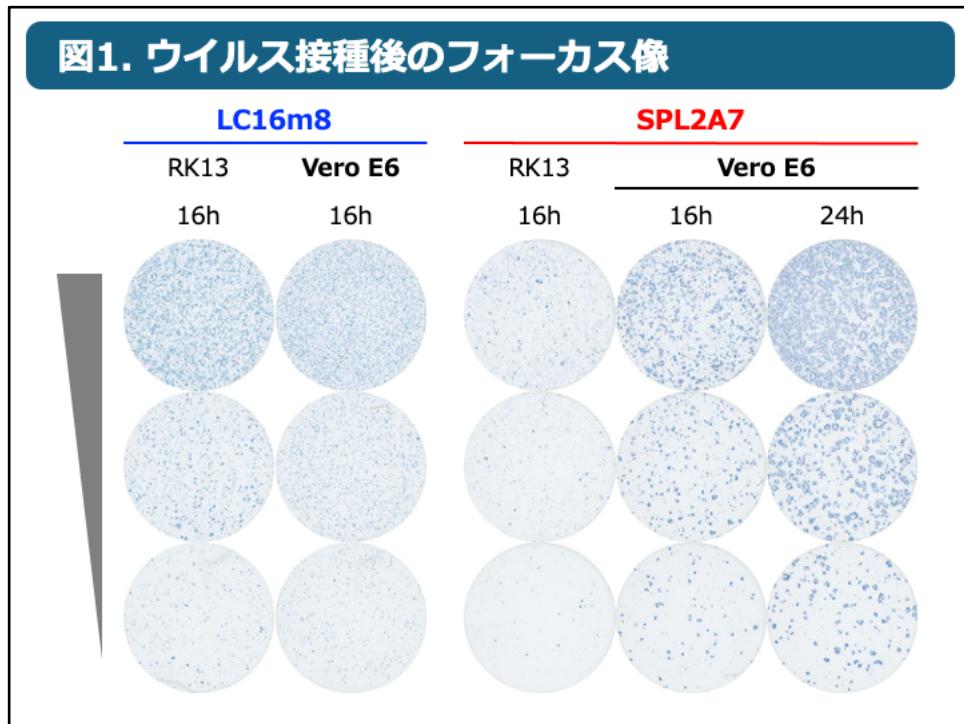


図2. 特異的血清の希釈系列とフォーカスの関係

LC16m8感染ウサギ血清から得たIgG分画を用いたFRNTによる中和試験

