

厚生省
平成10年度

ワクチニアウイルス等の安全性と
ワクチン接種に関する研究班

研究報告書

平成11年3月

主任研究者 倉田 毅
(国立感染症研究所感染病理部長)

ワクチニアウイルス等の安全性とワクチン接種に関する研究班員名簿

研究者名	分 担	所 属	役 職
倉田 毅	班 長	国立感染症研究所感染病理部	部長
吉倉 廣	研究協力者	国立感染症研究所	副所長
田代 真人	研究協力者	国立感染症研究所ウイルス製剤部	部長
森川 茂	研究協力者	国立感染症研究所ウイルス1部	室長
杉山 和良	研究協力者	国立感染症研究所バイオセーフティ管理室	室長
小島 朝人	研究協力者	国立感染症研究所感染病理部	室長
宮村 達男	研究協力者	国立感染症研究所ウイルス2部	部長
梅田 珠実	研究協力者	国立感染症研究所国際協力室	室長
橋爪 壮	研究協力者	日本ポリオ研究所	理事長
神谷 齊	研究協力者	国立療養所三重病院	院長
山西 弘一	研究協力者	大阪大学医学部微生物学	教授
十字 猛夫	研究協力者	日赤医療センター血液センター	所長
山田 章雄	研究協力者	国立感染研筑波医学実験用霊長類センター	センター長
橋本 雄之	研究協力者	国立感染症研究所遺伝子資源室	室長

目 次

1. ワクチニアウイルス等の安全性とワクチン接種に関する研究班
総括研究報告書（平成10年度） 1
主任研究者：倉田 毅（国立感染症研究所感染病理部長）
2. ワクチニアウイルスを用いた組換え DNA 実験における安全性に関する研究 5
研究協力者：橋本 雄之（国立感染症研究所遺伝子資源室長）
3. DNA 組換えワクチニアウイルスのウイルス学的、感染病理学的検討 7
研究協力者：小島 朝人（国立感染症研究所感染病理部）
倉田 毅（国立感染症研究所感染病理部）
4. 痘瘡ワクチン既接種者および未接種者の組み換えワクチニア実験に関して； 10
痘瘡ワクチンの問題点と現状
研究協力者：森川 茂（国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室長）
5. モンキーポックスウイルス（MPV）の研究 12
研究協力者：宮村 達男（国立感染症研究所ウイルス第2部長）
加藤 賢三（国立感染症研究所ウイルス第2部腫瘍ウイルス室長）
田中 幸江（国立感染症研究所ウイルス第2部腫瘍ウイルス室）
市橋 康夫（新潟大学医学部ウイルス学教室助教授）
大家 正泰（新潟大学医学部ウイルス学教室助助手）
6. 弱毒痘瘡ワクチン株 LC16m8 に関する研究 13
研究協力者：橋爪 壮（財団法人日本ポリオ研究所長）
7. バイオセーフティ上の問題に関する研究：ワクチニアウイルス等の安全な取り扱い 16
研究協力者：杉山 和良（国立感染症研究所バイオセーフティ管理室長）

I. 総括研究報告

総括研究報告書

1. ワクチニアウイルス等の安全性と ワクチン接種に関する研究班

主任研究者 倉田 毅 国立感染症研究所感染病理部長

研究要旨 天然痘が根絶されて（1977年10月）、既に20年が経過した。それと同時に種痘が中止され、現在に至っている。即ちわが国において、21、22歳以下の世代はいわゆる種痘を受けてはいない。一方大学、大学院の生物・医学系の研究室では最近組換えDNA実験のベクターとして、ワクチニアウイルスを用いることが多くなっている。DNAサイズが大きいこと、増殖が早く、効率がよいことから、実験材料としては最適である。また1996年から1997年にかけてザイール（現コンゴ民主共和国）中央部でサル痘（monkeypox）が511名発生した。大部分はワクチン接種を受けていない世代であった。1980年代前半に発生したアフリカ中央部（中央アフリカ、ザイール）においても、ワクチン未接種の患者が多数であった。天然痘以外のボックスウイルスは空気感染ではなく、接触感染である。この研究ではワクチニア等ボックス系ウイルスの研究、実験に携わる人の安全確保とワクチン接種の必要性（我が国には橋爪により開発された現在世界で最も優れた弱毒生ワクチン LC16m8 株がある）、あるいはウイルス接触時の免疫グロブリン投与等の有効性、安全性等と共に必要性について検討し、わが国における行政対応の基礎とする。

主任研究者：

倉田 毅： 国立感染症研究所感染病理部長

研究協力者：

吉倉 廣： 国立感染症研究所
田代 真人： 国立感染研ウイルス製剤部
森川 茂： 国立感染研ウイルス1部
杉山 和良： 国立感染研バイオセーフティ管理室
小島 朝人： 国立感染研感染病理部
宮村 達男： 国立感染研ウイルス2部
梅田 珠実： 国立感染研国際協力室
橋爪 壮： 日本ポリオ研究所
神谷 斎： 国立療養所三重病院小児感染症
山西 弘一： 大阪大学医学部微生物学
十字 猛夫： 日赤医療センター血液センター
山田 章雄： 国立感染研筑波医学実験用
霊長類センター
橋本 雄之： 国立感染研遺伝子資源室

以上13名

A. 研究目的

ワクチニアウイルス等のボックス系ウイルスを扱う者、患者を扱う医療関係者に、WHO および米国ではワクチニアのワクチン接種を勧めているかあるいは義務化している。また米国では、実験事故あるいは思わぬ接触（患者等）の際に、免疫グロブリンの投与も勧めている。またそれら（ワクチン、免疫グロブリン）の用意がされている。わが国には、それらの用意は現在全く無い。国家備蓄とされていたワクチニア（池田、リスター等株）のワクチンも既に有効期限切れとなっており、上記ワクチニアウイルス等の事故に対する対応手段はない。この研究では、ワクチニアウイルスをベクターとする組換えDNA実験に携わるワクチン未接種世代の研究者に対する①ワクチン（LC-16 弱毒株）の接種の必要性、②免疫グロブリン（ワクチニアウイルスに特異的）の必要性と効力等について、弱毒生ワクチンを作製する（千葉県血清研究所に依頼）とともに、既ワクチン接種者から、免疫グロブリンを採取し、有効グロブリンの入手が可能かどうかを検討することを目的とする。最近ワクチニアウイルス（カナリアボックス等を

含む) をベクターとして組換え DNA 実験に携わる人も増加しており、アトピー性皮膚炎の若年層の増加も目立ち、実験室感染を防ぎ、サル痘の流行地へ入る人々、あるいは医療関係者への接種を含めて、さらに感染者の発症を抑制する方法を開発検討し、あるいは流行地への国際協力等の基礎資料を作り、わが国の対応等について早急に検討する必要がある。

B. 研究方法

過去の種痘による免疫持続の判定とワクチニアウイルス弱毒株 LC16m8 の作成 (委託)、免疫性の検討、さらに若手既種痘者でのワクチンの有効性を検討し、(このワクチンによる副反応はほとんどはない点で旧来の株による種痘とは大きく異なる) 血清を得て、免疫グロブリン分画を作成し、その in vitro、in vivo でのウイルス増殖抑制効果を検討する。

1. 既種痘を受けたヒトの現在の抗体保有調査 (中和抗体) (実験室関係者)
2. LC16m8 株のワクチンの小動物、既種痘者における抗体誘 効果の検討
3. LC16m8 接種小動物における通常ベクターとして用いられている WR 株等の感染力の感染病理学的基礎検討と共に神経侵襲性について検討する。
4. 抗 LC16m8 抗体 (免疫グロブリン) の小動物とヒトにおける誘導と精製、またその精製抗体のワクチニアウイルス感染防御効果の検討
5. ワクチニアウイルス等のボックスウイルスの扱いに関するバイオセーフティ上の問題点とその解決法の検討
6. 世界のボックスウイルス感染の現状の調査と世界各国の対応の調査を行なう。
7. 2 年後には若年研究者世代へのワクチン対応、免疫グロブリン投与等の有効性、安全性、必要性等につき研究班としての判断を出す。
8. 今回のザイール株でモノクローナル抗体と反応しない株についての生物学的性状の解析を行なう。
9. MPV 分離株の簡易鑑別法の開発を行なう。

C&D. 研究結果と考察

1998 年度においては

- 1) ワクチン：この研究に最も重要なワクチニアワクチン (LC16m8) については、研究承認がおりた時点で製造を依頼した (千葉県血清研究所)。このワクチンは天然痘根絶 (1977 年 10 月) も間近となったときに完成し承認され、一部が国家備蓄となった

ものである。特徴は神経病原性がないことから最も期待されたが、天然痘根絶後は使用されることはなかった。現在バイオセーフティ上ワクチニアウイルスは弱毒性ワクチンを含めてレベル 2 扱いとなっている。しかし GMP 上我が国にはレベル 2 対応 (即ち P2) 製造施設はなく、生物製剤の扱い上は国家承認ワクチンとはすることができず、試験研究用として用いることとした。

(力価、安全性等のチェック項目は、検定品と同様である。GMP が P2 対応となっていないため製品の質は全く同等であるが、このような扱いとなる。) 完成はメーカーの作業スケジュール上去年度はずれ込む。

- 2) 抗体測定：過去種痘は“善感”を指標としており抗体測定により判定されたことはなかった。種痘廃止後 20 年が経過し、その間に進歩した測定法により抗体捕捉が可能かどうかを見るため既ワクチン被接種者、未接種者の血清を集積している。
- 3) ベクターとして用いられるワクチニアウイルス：現在世界各国で DNA 組換え実験の発現ベクターに汎用されているワクチニアウイルスの WR 実験室株、WHO ワクチンに用いられた LO 株、LO 株由来の弱毒 LO16 原株 (mO 株)、mO 由来で第 2 世代ワクチン LC16m8 株 (m8 株) と、およびそれらの組換えウイルス株について培養系でウイルス学的性状を検討した。その結果これら各ウイルス株はそれぞれ固有の複製・増殖性を安定に維持していること、これらの組換えウイルス株は導入遺伝子を安定に保持し、かつ安定に発現していることが示された。
- 4) サル天然痘 (マンキーボックス)：野外分離株の性状比較をしたところ、塩基配列、制限酵素切断像、モノクローナル抗体との反応性を見ると、1996-97 年のザイールでの流行株と、それ以前 (1980 年代初め) の株との間で大きく変わった証拠は見られなかった。
- 5) 我が国でのワクチニアウイルスを用いた組換え DNA 実験：平成 8 年から 10 年度の計画で、ベクターとして用いられるワクチニアウイルスの株は高度弱毒株 LC16m8 と向神経性のある WR 株であった。また実験にはワクチンを目指して、組換えワクチニアウイルス粒子が産生されるものと、別のウイルスの産生のためにベクターとして用いるワクチニアウイルス粒子の産生はおこらないタイプのものがあった。いづれにしてもウイルスとしての封じ込めレベル

P2 で実施されていた。今後、ワクチニアウイルスそのものに触れずにすむようにその増幅する段階を経ずにベクターとして組換え実験に用いる形にできるか検討する必要がある。

- 6) ワクチニアウイルスの病原体としての取り扱い：CDC/NIH および国立感染症研究所の「病原体等の取扱い規定」出はいずれもクラス 2 に分類され、P2 施設が必要とされる。さらにワクチンの製造には GMP 上 P2 施設が要される。我が国にはこれに対応しうる製造施設はない。

E. 結 論

次年度では製造されたワクチンを用い既被接種者、未被接種における反応を見ると共に、我が国において将来 DNA 組換え実験においてワクチニアウイルスをベクターとして用いる際の安全のため、ワクチン投与に関するマニュアルを作成する。

F. 研究発表

1. 論文発表（別紙の通り）

1. Watanabe, T., Morikawa, S., Suzuki, K., Miyamura, T., Tamaki, K., and Ueda, Y.: Two major antigenic polypeptides of Molluscum Contagiosum virus. *J. Infect. Dis.*, 177, 284-292, 1998.
2. Okada, H., Morikawa, S., and Tashiro, M.: HIV-1 Nef binding protein expressed on the surface of murine blood cells. *Med. Microbiol. Immunol.*, 186, 201-207, 1998.
3. Watanabe, T., Morikawa, S., Suzuki, K., Miyamura, T., Tamaki, K., and Ueda, Y.: Immunoreactive proteins of Molluscum Contagiosum virus type 1, 1v, and 2. *J. Infect. Dis.*, 178, 1231, 1998.
4. Saijo, M., Suzutani, T., Itoh, K., Hirano, Y., Muron, K., Niikura, M., and Morikawa, S. Nucleotide sequence of thymidine kinase gene of sequential acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 recovered from a child with Wiskott-Aldrich syndrome: evidence for reactivation of acyclovir-resistant herpes simplex virus. *J. Med. Virol.*, 1999 (in press)..
5. Amano, H., Morikawa, S., Shimizu, H., Shoji, I., Kurosawa, D., Matsuura, Y., Miyamura, T., and Ueda, Y.: Identification of the canarypox virus thymidine kinase gene and insertion of foreign genes. *Virology*, 1999 (in press)..
6. Yasuda, S., Iwasaki, M., Oka, S., Naganawa, S., Nakasone, T., Honda, M., Sata, T., Kojima, A., Matsuda, S., Takemori, T., and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Detection of HIV-Gagp24-specific antibodies in sera and saliva of HIV-1-infected adults and in sera of infants born to HIV-1-infected mothers. *Microbiol. Immunol.*, 42, 305-311, 1998.
7. Tokunaga, K., Kiyokawa, E., Nakaya, M., Otsuka, N., Kojima, A., Kurata, T. and Matsuda, M.: Inhibition of human Immunodeficiency virus type 1 virion entry by dominant-negative Hck. *J. Virol.*, 72, 6257-6259, 1998.
8. Tokunaga, K., Kojima, A., Kurata, T., Ikuta, K., Akari, H., Koyama, H., Kawamura, M., Inubushi, R., Shimano, R. and Adachi, A.: Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by Nef is producer cell-dependent. *J. Gen. Virol.*, 78, 2447-2453, 1998.
9. Tokunaga, K., Kojima, A., Kurata, T., Ikuta, K., Inubushi, R., Shimano, R., Kawamura, M., Akari, H., Koyama, H. and Adachi, A.: Producer cell-dependent requirement of the Nef protein for efficient entry of HIV-1 into cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 250, 565-568, 1998.
10. Tokunaga, K., Ikuta, K., Adachi, A., Matsuda, M., Kurata, T. and Kojima, A.: The cellular kinase binding motifs (PxxP and RR) in human immunodeficiency virus type 1 Nef protein are dispensable for producer cell-dependent enhancement of viral entry. *Virology* (in press).

II. 研究報告

2. ワクシニアウイルスを用いた組換えDNA 実験における安全性に関する研究

研究協力者 橋本 雄之（国立感染症研究所遺伝子資源室長）

研究要旨

平成8年から10年度の計画で、ベクターとして用いられるワクシニアウイルスの株は高度弱毒株LC16m8と向神経性のあるWR株であった。また、実験にはワクチンをめざして、組み換えワクシニアウイルス粒子が産生されるものと、別のウイルスの産生のためにベクターとして用いるワクシニアウイルス粒子の産生は起こらないタイプのものがあった。いずれにしてもウイルスとしての封じ込めレベルP2で実施されていた。今後、ワクシニアウイルスそのものに触れずにすむように、その増幅する段階を経ずにベクターとして、組換え実験に用いる形にできるか検討する必要がある。

A. 研究目的

我が国の生物・医学系の大学および研究機関において、組換えDNA実験のベクターとして、DNAサイズが大きく、増殖が早く効率がよいことから、ワクチニアウイルスを用いることが多くなっている。一方、天然痘根絶以来20年が経過し、実験従事者として多数を占めるようになってきた20代前半の人たちは種痘を受けていない。従って、ワクシニアウイルスを用いる組換えDNA実験を実施するにあたって、従来の封じ込めだけで妥当かどうかを検討することが必要となった。そこで、本研究ではその実施の状況を把握すると共に、安全に目的の実験を遂行しうる手立てを検討する事を目的とする。

B. 研究方法

当研究所および科学技術庁に提出されて実施が承認された実験計画書に基づいて、実施の状況を把握する。

ベクターとして使われているワクシニア株およびそのベクターとしての使用方法を計画、文献等で調べ、より安全な使用方法がないかどうか、検討する。

C. 研究結果

1. 取り扱い上の安全性としては異種DNAを組み込んだベクターを作製する前のワクシニアウイルスを取り扱う段階と作製された組み換えワクシニアウイルスを扱う段階の安全性が問題となる。

前者はウイルスそのものの危険性と変わらない。日本の場合は弱毒ワクチン株LC16m8が用いられているが、外国由来の場合はWR株など向神経性が残っているものも用いられている。後者の場合はワクシニアウイルスチミジンキナーゼ遺伝子中に異種遺伝子を挿入したもので、ウイルスとしての病原性はさらに弱くなっている。

2. 平成8年から10年度において感染研からワクシニアウイルスをベクターとして使用する実験計画は13件申請されている。ワクシニアウイルスベクターに他のウイルス蛋白遺伝子を組み込んで、生じた組換えワクシニアウイルスを回収してワクチンとして用いることを目的としたものをはじめ、細胞内で、他のウイルス蛋白を大量発現させて、当該蛋白質の免疫原性などの解析をおこなうもの、同様に外来の蛋白質遺伝子を組み込んで、ワクシニアの広宿主域を利用して遺伝子導入を試みるものなどがあり、その場合、系としてはワクシニアウイルス粒子

が生じるものである。一方、T7ポリメラーゼをワクシニアベクターにつないで酵素として発現させて、T7プロモーターの下流にあるウイルスの各種タンパク遺伝子の転写を細胞質内で行わせる一方、そのウイルスcDNAからゲノムRNAを産生させ、最終的にそのウイルス粒子を産生する目的のものがあ
り、その場合にはワクシニアウイルス粒子の産生は不必要なので、粒子の生じない株 (modified vaccinia virus Ankara) が用いられている。
いづれにしても動物培養細胞系で感染性ウイルスが生ずる系として科学技術庁に申請し、封じ込めレベルとしてはP2 (BSL2) で承認され、実施されてきたものである。

3. 問題点はこうした実験に天然痘予防ワクチン接種を経験しない年齢層 (24歳以下) が実験従事者 (1課題に4人の従事者として3年で約50人) として加わってくる場合に病気として常在しなくなったウイルスに接触する危険性をどう判断するかである。実験としては上記のように組換えDNA実験による危険性の増大は考えられず、ベクターとして使うべきワクシニアウイルスの精製など通常のウイルス実験の段階での危険性を考慮することになる。

4. ウイルスワクチンとしては粒子として回収することが必須であるが、用いる株は弱毒株に限定して、その有用なベクターを準備して用いる事が勧められる。また、異種遺伝子を細胞に導入するベクターとして用いる場合は細胞への吸着、侵入能があり、遺伝子の発現はあるが、ワクシニアウイルスの産生がないもの(上記MVA株など)があれば、安全性が高まるので、今後はその点の可能性を探る必要がある。

D.& E. 考察と結論

実験としては上記のように組換えDNA実験による危険性の増大は考えられず、ベクターとして使うべきワクシニアウイルスの精製など通常のウイルス実験の段階での危険性を考慮することになる。

従って、ワクシニアウイルス粒子そのものを取り扱う段階をなくすには、例えば、異種遺伝子を細胞に導入するベクターとして用いる場合は細胞への吸着、侵入能はあり、遺伝子の発現はあるが、ワクシニアウイルスの産生がないものであれば、安全性が高まるので、今後はその点の可能性を探る必要がある。

F. 研究発表

本研究に関連した発表はない。

3. DNA 組換えワクシニアウイルスのウイルス学的、感染病理学的検討

研究協力者 小島 朝人 (国立感染症研究所感染病理部)
倉田 毅 (国立感染症研究所感染病理部)

研究要旨 世界各国で DNA 組換え実験の発現ベクターに汎用されているワクシニアウイルスの WR 実験室株、WHO でワクチンに用いられた LO 株、LO 株由来の弱毒 LC16 原株(mO 株)、mO 株由来で日本の第 2 世代ワクチンに認可された LC16m8 株(m8 株)、およびそれらの DNA 組換えウイルス株について、培養系でウイルス学的性状を検討した。その結果、これら各ウイルス株は、それぞれ固有の複製・増殖能を安定に維持していること、これらの組換えウイルス株は導入遺伝子を安定に保持し、且つ、安定に発現していることが示された。動物個体を用いた感染病理学的検討に進む基盤は整えられたものと思われる。

A. 研究目的

WHO 痘瘡根絶計画の成功で生ワクチンの役割を終えたワクシニアウイルスは、現在 DNA 組換え実験のベクターとして汎用されている。その多くは WR 実験室株で、哺乳動物細胞の遺伝子発現ベクターに用いられている。他方、天然痘を根絶しうるワクチン効力を活用して、DNA 組換え生ワクチン開発研究も各国で推進されている。この場合、アンカラ株、コペンハーゲン株、NYBH 株等各国で使用されたワクチン株がベクターに使用されている。日本では現存ワクチン株の中で最も弱毒の LC16 株が活用されている。そこで本研究は、(I)WR 実験室株；WHO/日本/英国で種痘に用いられた LISTER 原株(LO)；日本で開発された LO 株由来の温度感受性弱毒 LC16 変異原株(mO)；第 2 世代痘瘡ワクチンに認可された mO 株由来の LC16m8 株(m8)、及び、(II)それらの DNA 組換えウイルスについて、(A)ウイルス学的・ウイルス感染病理学的検討を加え、(B)各ワクシニアウイルス株とこれをベクターにした組換えウイルスの性状を明らかにし、(C)ベクターとしてあるいはワクチンとしての安全性の検討に資するものとする。

B. 研究方法

DNA 組換えワクシニアウイルス株：異種遺伝子をチミジンキナーゼ(TK)遺伝子 EcoRI サイトに導入された組換えワクシニアウイルスは、既に作製・保管されていた、B 型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg)遺伝子組み換え WR 株(WRPHB)、LO 株(LOPHB)、mO 株(mOPHB)、m8 株(m8PHB)の各初代株より、ウイルスストックを調製した。また、HBsAg 遺伝子以外の異種遺伝子がワクシニアウイルス TK 遺伝子の同一サイトに導入され

た組み換え mO 株については、同一の標準作製法に従った相同性組換えにより作製・純化後、同様の方法でウイルスストックを調製した。ワクシニアウイルス野生株；ワクシニアウイルスの実験室 WR 株、WHO ワクチン LO 株、弱毒 LC16 原株(mO 株)、日本の第 2 世代ワクチン m8 株についても、上記の DNA 組換えワクシニアウイルスと同様にウサギ腎細胞に由来する RK-13 細胞で増幅後、同様の方法でウイルスストックを調製した。ウイルス感染価の測定：調製した各ウイルスストックの感染価はブランク法で測定した。即ち、各ウイルスの 10^6 , 3×10^6 , 10^7 希釈を 6 穴マルチプレートの RK-13 細胞にデュープリケイトでそれぞれ 2 プレートずつ計 4 ウェルに感染させ、2 日後のブランク数をニュートラルレッド染色後カウントした。なお、異種遺伝子の導入で TK 遺伝子が不活化された組換えウイルスは BUdR 抵抗性になるため、143TK⁻細胞を用いて BUdR 存在下で同様のブランクアッセイを行い、純化度の検定を行なった。導入遺伝子の発現：RK-13 細胞に各組換えウイルスを moi=2 で感染させ、24 時間後の細胞抽出液および培養上清について、導入遺伝子産物発現の確認を行なった。検出法は、それぞれ導入遺伝子産物に特異的な抗体を用いた ELISA 法、あるいはウエスタンブロット法で行なった。

C. 研究結果および考察

ワクシニアウイルスは極めて安定なウイルスの 1 つとして知られている。しかし、本研究においては、WR 実験室株から日本の第 2 世代ワクチン m8 株までの、性質の異なる複数のウイルス株と、その遺伝子組換えウイルスは TK 遺伝子 EcoRI サイトという同一部位に、それぞれ異なった別種遺

伝子が導入されている株を比較検討の対象にしている。これらウイルス株は作製・保管された時期がそれぞれ異なることから、研究材料として満足すべき当初の性質を安定に保持しているか否かの検討・確認が必要とされた。そこで、各種野生株、組換え株を同一の RK-13 細胞を用いて継代・増幅してウイルスストックを調製し、ウイルス感染価をプラークアッセイで測定した。その結果、野生株・組換え株を問わず、何れのウイルスも 108pfu/ml 以上の高い感染価を示した。また、強毒・弱毒の指標の 1 つになっているプラークサイズにおいても、それぞれストックされた当時と同等の成績を示した。これらの結果から、本研究の対象に選択した各種ワクシニアウイルス株は、培養細胞系における複製・増殖能を安定に維持していることが示された。

組換えウイルスは TK 遺伝子中に異種の遺伝子が導入されたため、TK 遺伝子が破壊され、BUdR 存在下でも複製・増殖が可能である。これに対して野生株は、TK 遺伝子の作用で BUdR をゲノム内に取り込むため複製・増殖できなくなる。この点について、143TK 一細胞を用いて BUdR +/- で組換えウイルス株の増殖性を検討したところ、組換えウイルスは BUdR の有無に拘わらず同等の感染価を示した。次に、各組換えウイルスの導入遺伝子発現について検索した。HBsAg は市販の抗原測定キットを用い、HIV-1 Gag は p24 ELISA 及びウエスタンブロット法で、 β -Galactosidase は酵素活性測定法で定量した。その結果、何れの導入遺伝子も保管中に発現量が低下するような変化を生じることなく、安定に維持されていたことが示された。免疫プラーク染色法で、それぞれ 100~200 個のウイルスを個々に検索した場合でも、発現陰性の組換えウイルスは検出されなかった。これらの結果は、導入遺伝子が安定に保持され、且つ、安定に発現されていることを示している。

痘瘡ワクチンの接種は、皮内・皮下ルートで行われる。本年度の培養系におけるチェック・確認で満足すべき安定性・遺伝子発現が保証された各種ウイルス株を実験小・中動物に接種し、ウイルス学的・感染病理学的検討に進む基盤はほぼ整えられたものと思われる。ワクチン接種を模した皮内・皮下接種実験のみならず、ウイルス血症後生じてくる種痘後脳炎という、安全性の特に問題となる点についても検討するため、静脈内・腹腔内接種実験による脳・神経系の検索も企画する必要があるものと思われる。

D. 結論

- 1) ワクシニアウイルス WR 株、LO 株、mO 株、

m8 株及びこれらの組換えウイルスは、それぞれ固有の複製・増殖能を安定に維持していた。

- 2) 組換えウイルス株は導入遺伝子を安定に保持し、且つ、安定に発現していた。
- 3) 以上のことより、動物個体を用いた感染病理学的検討を行う基盤が整えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yasuda,S., Iwasaki,M., Oka,S., Naganawa,S., Nakasone,T., Honda,M., Sata,T., Kojima,A., Matsuda,S., Takemori,T., and Tsunetsugu-Yokota,Y.: Detection of HIV-Gagp24-specific antibodies in sera and saliva of HIV-1-infected adults and in sera of infants born to HIV-1-infected mothers. *Microbiol. Immunol.*, 42, 305-311, 1998.
- 2) Tokunaga,K., Kiyokawa,E., Nakaya,M., Otsuka,N., Kojima,A., Kurata,T. and Matsuda,M.: Inhibition of human Immunodeficiency virus type 1 virion entry by dominant-negative Hck. *J. Virol.*, 72, 6257-6259, 1998.
- 3) Tokunaga,K., Kojima,A., Kurata,T., Ikuta,K., Akari,H., Koyama,H., Kawamura,M., Inubushi,R., Shimano,R. and Adachi,A.: Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by Nef is producer cell-dependent. *J. Gen. Virol.*, 78, 2447-2453, 1998.
- 4) Tokunaga,K., Kojima,A., Kurata,T., Ikuta,K., Inubushi,R., Shimano,R., Kawamura,M., Akari,H., Koyama,H. and Adachi,A.: Producer cell-dependent requirement of the Nef protein for efficient entry of HIV-1 into cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 250, 565-568, 1998.
- 5) Tokunaga,K., Ikuta,K., Adachi,A., Matsuda,M., Kurata,T. and Kojima,A.: The cellular kinase binding motifs (PxxP and RR) in human immunodeficiency virus type 1 Nef protein are dispensable for producer cell-dependent enhancement of viral entry. *Virology* (in press).

2. 学会発表

- 1) Hoshikawa,N., Yoshihara,K., Yasuda,A., Kurata,T. & Kojima,A.: Vif: non-specific incorporation into Gag particles, and no

influence on particle formation, processing and maturation. 12th World AIDS Conference Vol.1 Basic Science, pp19-23, Monduzzi Editore, 1998.

- 2) Yoshihara,K., Yasuda,A., Hoshikawa,N., Kurata,T., Chiba,J. & Kojima,A.: Antigenicity of chimeric HIV-like particles carrying repeats of an HCV core epitope. 12th World AIDS Conference Vol.1 Basic Science, pp283-287, Monduzzi Editore, 1998.
- 3) Yasuda,A., Moriishi,E., Kurata,T. & Kojima,A.: Antigenicity of HIV-1-like Gag-V3 chimeric particles expressed by a recombinant vaccinia system. 12th World AIDS Conference Vol.1 Basic Science, pp277-282, Monduzzi Editore, 1998.
- 4) 徳永研三、生田和良、足立昭夫、松田道行、倉田 毅、小島朝人：ウイルス粒子のエントリーにおける HIV-1Nef のウイルス産生細胞株依存的な要求性。第 46 回日本ウイルス学会総会、1998 年 10 月、東京。
- 5) 寺尾圭一、大場浩美、曾我孝利、友澤尚徳、小島朝人、倉田 毅、千葉 丈：HIV の逆転写酵素を阻害する組換え抗体断片による CD4 陽性ヒト培養細胞の細胞内免疫。第 46 回日本ウイルス学会総会、1998 年 10 月、東京。
- 6) 吉原清美、安田幹司、北川善紀、干川就可、倉田 毅、千葉 丈、小島朝人：2 種の異なるエピトープを同一粒子中に集合させた複合 HIV-1 Gag キメラ粒子の作製と抗原性解析。第 46 回日本ウイルス学会総会、1998 年 10 月、東京。
- 7) 清川悦子、徳永研三、中矢実江、大塚尚美、倉田 毅、小島朝人、松田道行：チロシンリソ酸化酵素による HIV 粒子の感染効率の制御。第 46 回日本ウイルス学会総会、1998 年 10 月、東京。
- 8) 小島朝人、吉原清美、安田幹司、千葉 丈、倉田 毅：異種エピトープを挿入した HIV-1Gag 蛋白の自己集合による複合モザイク粒子抗原の構築と抗原性解析。第 2 回日本ワクチン学会総会、1998 年 11 月、豊中。
- 9) Chiba,J., Ohba,H., Nakano,M., Soga,T.,Terao,K., Yasuda,A., Kojima,A.and Kurata,T.: Generation of neutralizing antibodies to the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 by immunizing of mice with an infectious vaccinia virus recombinant. 第 2 回日本ワ

クチン学会総会、1998 年 11 月、豊中。

4. 痘瘡ワクチン既接種者および未接種者の組み換えワクチニア 実験に関して；痘瘡ワクチンの問題点と現状

協力研究者 森川 茂（国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室長）

研究要旨 ワクチニアウイルスは、痘瘡に対する生ワクチンとして非常に有効であり痘瘡根絶に貢献した。1977年のソマリアでの患者を最後に自然感染による痘瘡患者は見られなくなり、1980年にWHOは痘瘡の根絶を宣言した。そのため種痘の必要がなくなり、痘瘡ワクチンの生産は行われなくなった。しかし、ワクチニアウイルスが外来遺伝子を発現する有力なベクターとして広く使用されたり、monkeypoxによるヒトサルポックスの近年の流行など、種痘の必要と思われるケースが出てきた。これらの現状と問題点に関して考察した。

1) はじめに

現在、ワクチニアを用いた組み換え実験には、いくつかのウイルス株が用いられているが、WR株など比較的病原性の強い株が用いられることがある。また、monkeypox等の研究のため培養が行われることが想定される。これらの研究に従事する場合、感染防御の観点から、未種痘者においては、WHO、CDC(1)により種痘を行なうことが推奨されている。また、既接種者においては、種痘後10年以上経過した場合、再接種が望ましいとされる。しかし、現在ワクチンが生産されていないなど、いくつかの問題点が指摘されている。

2) 既接種者の免疫持続に関して

痘瘡ワクチンの効果に関しては、マウスボックスのマウス接種実験から推論して細胞性免疫、液性免疫ともに感染防御に関与すると考えられているが、種痘の過去のデータから、液性免疫不全者（無ガンマグロブリン欠症）と細胞性免疫不全者では後者にワクチン後の進行性種痘疹が見られたことから、より細胞性免疫が重要と考えられる。また、ワクチニアのウサギ感染実験からは、紫外線不活化ワクチニア免疫により中和抗体が誘導できるが、生ウイルス接種による抵抗性が弱いのにに対し(2)、粗精製S抗原免疫では、有意の中和抗体が検出できないが生ウイルス接種に完全に抵抗性を示すことから、より細胞性免疫が重要と考えられる(3)。

種痘後の抗体価に関する研究によると、初種痘後に95%以上に中和抗体、HI抗体(1:10ないしはそれ以上)が認められる(4)。また、種痘後10年では75%に抗体が認められ、3

回種痘した場合、30年後でも抗体が認められる(5,6)。どの程度の抗体があれば感染を阻止できるかは不明であるが、疫学的には種痘後少なくとも5年以上はワクチン効果が持続することが証明されている(7)。また、抗体価が1:10以上ある場合、再接種後にプライマリー反応が10%以下の接種者に認められるのに対し、抗体価が1:10以下の群では30%以上にプライマリー反応が認められる(8)ことから、感染防御の指標に、抗体価がある程度はなると考えられる。

3) 問題点

現在、我が国では、国家備蓄として有効期限の切れた乾燥痘瘡ワクチン12ロット(当初15ロットであったが、善感を起すに必要な 1×10^7 PFU/mlを下回った3ロットに関しては廃棄処分されている)が引き続き備蓄されているが(9)、これを組み換えワクチニア実験従事者への種痘に用いられることはない。我が国の痘瘡ワクチンは、池田株、Lister株をウシに接種して作製したものと細胞培養ワクチンであるLC16m8株があるが、現在はいずれも生産されていない。

今後、組み換えワクチニア実験従事者やmonkeypox等の実験従事者に種痘をするためには、副反応の低いと考えられ、また製法上からもLC16m8株が適していると考えられる(10)が、上述したように現在生産されていない。

また、種痘が可能である場合も、いくつかの問題点がある。ひとつは、種痘による副反応の問題で、極めてまれではあるが重篤な神経系合併症(種痘後脳炎)や皮膚合併症(進行性種痘疹、全身性ワクチニアなど)、自己接

種（種痘部位からの自己感染）があげられる。また、接触者への事故感染が考えられるため、充分留意する必要がある。

参考文献

- 1) Vaccinia (Smallpox) Vaccine Recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee (ACIP): MMWR recommendation and reports, 1991 / 40(RR14); 1-10
- 2) Ueda Y, Ito M, and Tagaya I. A specific surface antigen induced by poxvirus. *Virology* 1969 ;38:180-182
- 3) 北村敬 痘瘡ワクチン：日本のワクチン 1977; 2-26 (丸善株式会社)
- 4) Cherry JD, McIntosh K, Connor JD, et al. Primary percutaneous (smallpox) vaccination. *J Infect Dis* 1977;135:145-54.
- 5) Lublin-Tennenbaum T, Katzenelson E, El-Ad B, Katz E. Correlation between cutaneous reaction in vaccinees immunized against smallpox and antibody titer determined by plaque neutralization test and ELISA. *Viral Immunol* 1990;3:19-25.
- 6) El-Ad B, Roth Y, Winder A, et al. The persistence of neutralizing antibodies after revaccination against smallpox. *J Infect Dis* 1990;161; 446-8.
- 7) World Health Organization Expert Committee on Smallpox Eradication. Second report. WHO Tech Rep Ser 1972;493.
- 8) McIntosh K, Cherry JD, Benenson AS, et al. Standard percutaneous (smallpox) revaccination of children who received primary percutaneous vaccination. *J Infect Dis* 1977;135:155-66.
- 9) 乾燥痘そうワクチンの有効性確認のための試験について：平成 9 年度厚生省依頼試験報告書（国立感染症研究所）
- 10) 橋爪壮. 新しい弱毒痘苗株 LC16m8 株

の基礎. 臨床とウイルス 1975, 3: 229-235

研究発表

- 1) Watanabe, T., Morikawa, S., Suzuki, K., Miyamura, T., Tamaki, K., and Ueda, Y. (1998) Two major antigenic polypeptides of Molluscum Contagiosum virus. *J. Infect. Dis.*, 177, 284-292.
- 2) Okada, H., Morikawa, S., and Tashiro, M. (1998) HIV-1 Nef binding protein expressed on the surface of murine blood cells. *Med. Microbiol. Immunol.*, 186, 201-207
- 3) Watanabe, T., Morikawa, S., Suzuki, K., Miyamura, T., Tamaki, K., and Ueda, Y. (1998) Immunoreactive proteins of Molluscum Contagiosum virus type 1, 1v, and 2. *J. Infect. Dis.*, 178, 1231
- 4) 森川 茂(1998)：ウイルス性出血熱、臨床病理（検査微生物学(II)ーウイルスと原虫・寄生虫感染症の検査診断一）特 108, 105-110
- 5) 森川 茂(1998)：マールブルグ病、小児科臨床 51-12, 199-202
- 6) Saijo, M, Suzutani, T., Itoh, K., Hirano, Y., Muron, K., Niikura, M., and Morikawa, S. (1999) Nucleotide sequence of thymidine kinase gene of sequential acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 recovered from a child with Wiskott-Aldrich syndrome: evidence for reactivation of acyclovir-resistant herpes simplex virus. *J. Med. Virol.*, in press
- 7) Amano, H., Morikawa, S., Shimizu, H., Shoji, I., Kurosawa, D., Matsuura, Y., Miyamura, T., and Ueda, Y. (1999) Identification of the canarypox virus thymidine kinase gene and insertion of foreign genes. *Virology*, in press

5. モンキーポックスウイルス (MPV)の研究

研究協力者 官村達男 国立感染症研究所ウイルス第二部 部長
加藤賢三 国立感染症研究所ウイルス第二部腫瘍ウイルス室 室長
田中幸江 国立感染症研究所ウイルス第二部腫瘍ウイルス室 研究員
市橋康夫 新潟大学医学部ウイルス学教室 助教授
大家正泰 新潟大学医学部ウイルス学教室 助手

研究要旨

アフリカザイールで1996～1998年夏にかけて流行した、熱性発疹性疾患の症例から分離されたモンキーポックスウイルスの性状解析を行った。

A. 研究目的

1958年に発疹性疾患を呈したカニクイザルから分離されたモンキーポックスウイルス (MPV) は、天然痘ウイルスと血清学的に同じグループに属するオルソポックスウイルスである。1996～1997～1998年夏に、ザイールにおいて MPV がヒトからヒトに伝播し、死亡者も出たという報告がなされている。本研究は、ザイールにおけるヒトでの流行株と、従来のサルからの分離株の生物学的性状の比較解析をすることにより、ヒトでの流行の原因を究明することを目的とする。

B. 研究方法

1) 遺伝子レベルでの解析

ヒトへの感染の原因のひとつとして、ウイルスの変異が挙げられる。米国 CDC の Esposito らによって最近、ヒトの死亡例から分離された株と、我々の研究室で保有している従来のサルからの分離株のゲノムの制限酵素切断パターン、及び塩基配列の違いを調べる。

2) 生物学的性状の比較

今までに天然痘ウイルスと対比して明らかになっている MPV の生物学的な性質：孵化鶏卵漿尿膜上でのポックの形態と色、ウサギ皮膚での出血性反応及びウイルス増殖、組織培養細胞（ウサギ腎臓、ブタ腎臓及び HeLa 細胞）での増殖、増殖可能温度等を両 MPV 株で比較検討する。

3) 抗原性の比較

昔、分離された MPV に対して作成されたモノクローナル抗体及びワクチニアウイルス (vv) に対

して作成されたモノクローナル抗体への反応性をしらべる。

C. 研究結果

モノクローナル抗体は vv 特異的、MPV 特異的なもの以外に共通に反応するものが存在した。これらの抗体を用いた抗原解析では、ほとんどの今回の分離株は従来株と区別することができなかった。ただ1株のみいづれの抗体とも反応しない株があり、この株のゲノムの制限酵素切断像は明らかに他の株と異なっていた。

D. 考察

今回分離された株の一部の塩基配列、制限酵素切断像、モノクローナル抗体との反応性をみると、従来株と大きく変わっている証拠はない。変わっている1株が採れているが、この株の分離状況、伝播性など、これからしらべる必要がある。

E. 結論

今回ザイールで流行したモンキーポックスウイルスを増やし、従来のウイルス株と比較した。

F. 研究発表

Ichihashi Y., Oie M., Kato K., Esposito J. and Miyamura T. Characterization of Monkeypoxviruses Isolated from the 1996-1997 Epidemic in Zaire. WHO Technical Advisory Group Meeting on Human Monkeypox, Geneva, 1998.

6. 弱毒痘瘡ワクチン株 LC16m8 に関する研究

研究協力者 橋爪 壮 (財)ポリオ研究所長

研究要旨 旧来の痘苗株は種痘後脳炎が問題であった。種痘後脳炎の発生機序としてアレルギー説が有力であったが、この発生は 1)初種痘に多く、2)2歳以下では髄膜脳炎の形を取ることが多い、3)株により発生頻度が異なる、4) γ グロブリンこの併用により発生が押さえられるなどのことからアレルギー説よりもワクチニアウイルスの髄膜への感染が原因であろうと考え、中枢神経系(CNS)に病原性の弱い弱毒変異ワクチニアウイルスの作出を試み、神経毒力が極めて弱く、皮膚増殖性は親株に比べ、やや弱い、免疫原性は親株と同等な性質を持つ弱毒変異株 LC16m8 株の作成に成功した。

A. 弱毒変異ワクチン株の作出経過

世界的に広く用いられてきた Lister 株を親株(LO)とし、初代ウサギ腎(RK)細胞で 30℃で 36 代継代し、ブラッククロニングを行い、25 株のクローンから 40℃培養 Vero 細胞でもっとも増殖の悪い ts 変異株 LC16 株を選択した。

この株の性質を LO 株と比較したところ、ウサギでの皮膚増殖性は LO 株よりもむしろ良く、脳内接種による CNS における増殖性は LO 株より著しく弱い。またサルの脳内接種により LO 株を含む各種の痘苗株および多ヶ谷らにより作られた弱毒 Dis 株、Kemp らにより米国で使用された弱毒痘苗株 CV1 とサルの CNS の増殖性を比較したところ LC16 は Dis と同等で、CV1 を含む他の株より著しく弱いことが判明した。

この株を用い少数の小児に接種試験を行ったところ 34 例注 2 例に痂皮形成が遅れる例が認められたので、自己接種を少なくする目的で、皮膚増殖性の更に弱い変異株の選択を試みた。選択のマーカとして発育鶏卵の漿尿膜(CAM)上の pock size を用いた。すなわち LC16 を RK 細胞で更に 6 代継代し、クロニングを行いポックサイズが比較的小さく均一なクローンを分離し、LC16mO とした。

LC16mO を RK 細胞で更に 3 代継代し、再度クロニングを行い、ポックサイズが極めて小さい LC16m8 株を分離した。

B. 神経病原性

神経系に対する病原性を論ずる場合、1)末梢での増殖性 2)末梢から CNS への侵襲性 3)CNS における増殖性に分けて検討する必要がある。そこで CNS における増殖性と CNS への侵襲性について検討した。

a. 中枢神経系での増殖性

サルの片側の視床内にウイルスを接種し、その病原性を比較した。成績は表の如く CV1、池田株が最も強く、その LD₅₀ は $6.3 \times 10^5 \geq$ 、次いで NYBH、Lister、EM63 の順となり Dis と LC16 は著しく弱くその LD₅₀ はいずれも $\geq 6.3 \times 10^8$ となった。

Strain	LD ₅₀
CV1	$6.3 \times 10^5 \geq$
池田	$6.3 \times 10^5 \geq$
NYBH	2.0×10^6
Lister	6.3×10^6
EM63	1.4×10^7
Dis	$\geq 6.3 \times 10^8$
LC16	$\geq 6.3 \times 10^8$

LC16m8 と LC16 および LC16mO とのサルの脳内接種による病原性

はいずれも終末感染価が得られず LD₅₀ での比較はできなかったが、接種後 6 日の脳から検出されるウイルス量と、病理組織検査では LC16m8 が他よりもやや弱いという成績であった。

b. 末梢から CNS への侵襲性

LO, LC16 および LC16m8 の 10^{7.3} をマウスの腹腔内に接種し、その半数にはコルチゾン 2 mg を接種し、経日的にマウスを殺し、その血中ウイルス量と脳内ウイルス量を測定し、侵襲性を比較した。

LO 株ではコルチゾン処置しないマウスでも脳内から接種後 4-6 日にウイルスが検出され、コルチゾン処置マウスでは viremia の時期が長くなるとともに脳内から検出されるウイルス期間も長いことが認められた。

LC16 株ではコルチゾン処置をしない群では viremia は 2 日以降急激に減少し、脳内からは検出されない。しかしコルチゾン処置をした群は viremia も 1-7 日と持続し、ウイルス量も 10³ 程度みられ、脳内から 4-8 日にわたり検出された。

LC16m8 株ではコルチゾン処置をしない群は 3 日まで viremia はみられたが、脳内増殖は認められなかった。コルチゾン処置をした群では LC16 群より低い感染価の (10¹-10^{1.5}) viremia が 7 日までみられたが、脳内からウイルスは検出されなかった。

以上の成績より LC16m8 株は CNS における増殖性も弱く CNS への侵襲性も弱い弱毒株と考えられた。

C. ウサギの皮膚における増殖性と免疫原性

ポックサイズを皮膚増殖性のマーカーとして株の選択を行ったが、果たして実際にこのマーカーが皮膚増殖性と関連するか否かを検討するためウサギの皮内接種法により確かめた。

a. ウサギ皮膚における増殖性

ウサギの皮内に各種の濃度 (10 倍段階希釈) のウイルス液を 0.1 ml 接種し、その発赤径が 10 mm 以上を陽性とし、各株の 50% 発赤量 (ErD₅₀) を比較した。LC16 株は LO 株よりやや強く、LC16m8 株は CV1 株とほぼ等しく (ErD₅₀ = 10^{2.5}) LO 株よりやや弱い。

LC16m8 株は LC16m0 株より更に弱く、その ErD₅₀ は 10^{3.9} であり、ポックサイズの性質と良く相関した。

b. 免疫原性

LC16m8 株は皮膚増殖性が悪いので、免疫原性が LO あるいは LC16m0 株に比し悪いのではないかと懸念されたので、これらの株を家兎 2 羽に 10⁸ PFU ずつ接種し、2 週置きに採血し、13 週まで抗体価 (NT, HI) を追跡し、その抗体産性能と持続性を調べた。

中和抗体 (NT) 血球凝集抑制抗体 (HI) とともに LC16m8 は LO と同じ程度で、LC16m0 は LO よりもむしろ良い成績であった。

種痘研究班で行われた野外接種試験

a. 臨床成績

詳細に臨床症状を観察しえた 10,578 例の成績では、善感率 95.1%、平均発赤径 (10 日目判定) 18.4mm、平均硬結径 6.1mm、発熱率 (接種後 4-14 日の間) 7.7% で、種痘性湿疹 1、自己接種 9、種痘疹 8、一過性の良性熱性痙攣 3 があつたが、いずれも軽症で、従来 of 痘苗に比し明らかに反応が弱く安全性が高いと評価された。なおこの痘苗は 1974,75 の両年にわたり約 10 万人の子供に接種されたが、副作用による苦情は 1 件もなかった。

接種後 14 日に脳波検査を 56 例につき行ったが脳波異常を認めたものはなかった。他方 Lister 株では 19 例中 5 例 26.3% に脳波異常が認められた。この成績も LC16m8 株が向神経性の弱いことを裏付けるものと考えられた。

b. LC16m8 の免疫原性について

LC16m8 の免疫原性は表にみられるように HI 抗体価、NT 抗体価とも従来株に比して大差なく、また従来株による追加接種に当たり明らかな免疫反応を呈した。これらの成績からこの株は CV1 株より優れた免疫原性を持つと判断された。

痘苗株	経過月数	検査数	平均 HI 抗体価
LC16m8	1-1.5	513	$2^{3.3}$
	3-6	19	$2^{3.2}$
CV1	1-1.5	26	$2^{3.0}$
	3-6	26	$2^{3.6}$
Lister	1-1.5	7	$2^{4.3}$
	3-6	19	$2^{3.4}$

痘苗株	経過月数	検査数	平均 NT 抗体価
LC16m8	1-1.5	97	$4^{2.5}$
CV1	1-1.5	6	$4^{1.9}$
	3-6	11	$4^{2.0}$
Lister	1-1.5	5	$4^{2.4}$
	3-6	12	$4^{2.2}$

E. 結論

Lister 株を親株とし，RK 細胞で低温(30 C)継代および CAM 上でのポック・サイズをマーカーとしてえられた ts 変異株で小ポックを形成する LC16m8 株は動物実験系で，サルの CNS での増殖も弱く，マウスの実験による CNS への侵襲性も弱い株であり，皮膚の増殖性も比較的弱い株であるにもかかわらず，免疫原性は親株とあまり変わらないことが証明されたが，これらの性質は野外接種試験でも確認され，副作用が少なく，免疫効果も従来株に見劣りしない安全な種痘株であることが確認された。

F. 論文発表

1. 橋爪 壮：新しい弱毒痘苗株 LC16m8 株の基礎，臨床とウイルス 3:229-235, 1975
2. 山口正義ほか：種痘研究班報告書－厚生省特別研究：種痘後副反応及び合併症の治療に関する研究：臨床とウイルス 3:269-278, 1975
3. S. Hashizume, H. Yosizawa, M. Morita, K. Suzuki: Properties of attenuated mutant of vaccinia virus, LC16m8, derived from Lister strain, 87-99, 1985
4. S. Hashizume, M. Morita, H. Yoshizawa, S. Suzuki, M. Arita, T. Komatu, H. Amano, I. Tagaya: Intracerebral inoculation of monkeys with several vaccinia strains; an approach to the comparison of different strains.,