

よび投資を必要とする点である。ローラボトル法は比較的単純であり、設備投資などはそれほど要しない。なお、培養液あたりのウイルスの収率は、上述したように、ローラボトル法の方が少し上回っている（ローラボトル法、 $10^{10.2}$ PFU/200 ml：マイクロキャリア法： 0.4×10^{10} pfu/200 ml）。ただし、製造しているワクチンが異なるために厳密な比較はできない。上述した方法ではいずれもウサギ腎臓細胞を用いて LC16m8 ないし LC16mO の組み換えウイルスの製造を行っているが、鶏胚細胞を用いた rDIs/SIVgag の生産もほぼ同様に行えると思われる。なお、製造したあとの、ワクチンの品質検査については、以下の項目を含む、多くの検査が必要であるが、ここでは簡単な記載にとどめたい。

- ・ウイルス価の測定
- ・マイコプラズマを含む汚染微生物の試験
- ・汚染ウイルスの試験
- ・培養細胞の癌原性試験
- ・組み換えウイルスの遺伝的安定性：継代接種
- ・感染防御能
- ・副作用試験

E. 結論

上述したような調査研究の結果、次のような結論に達した。まず、開発の初期の段階では、技術的にも容易で大きな投資を必要としないローラボトル法が推奨される。次

に、プロジェクトが発展し、たとえば、アフリカを含め世界的に大量のワクチン生産を行うためにはマイクロキャリア法が好ましい。なお、本調査研究は細胞培養に焦点を絞ったが、鶏胚を用いた生産を否定するものではない。

F. 健康危険情報

関係しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

杉本 正信 (2002) バイオテロで蘇る国産天然痘ワクチン 長崎大学熱帯医学研究所同門会誌 31号 36-40.

杉本 正信、大石 和恵、木所 稔、橋爪 壮 (2003) 国産天然痘ワクチンの新たな役割 (投稿準備中)

2. 学会報告

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

なお、弱毒ワクチニアウイルス株を用いた組み換えウイルス作製およびその製造に関する詳細な調査については末尾に添付した資料を参照していただきたい。

添付資料：弱毒ワクチニアウイルス株をベクターに用いた
組換えワクチンの性質および製造に関する詳細な調査

分担研究員：杉本 正信（協力研究員：大石和恵、木所 稔）

（この調査の内容は、杉本、大石、木所および LC16m8 の開発者である橋爪壮博士との連
名で専門誌に総説として投稿予定である。）

はじめに

1976年我が国では、それまで種痘に使用されていたワクチニアウイルス（VV）である Lister 株を改良した LC16 株系列の弱毒ワクチン株、LC16m0 および LC16m8 株、が千葉県血清研究所（当時）の橋爪らにより開発された（橋爪、1972: Hashizume et al., 1975: Hashizume et al., 1985）。LC16m8 株は弱毒痘苗として採用されたが、同年我が国では定期接種としての種痘を事実上中止したため、実用には至らなかった。さらに、世界保健機関（WHO）による天然痘根絶宣言により、1980年には法律的にも種痘は廃止された。それから20年以上を経た2001年9月11日に米国で発生した同時多発テロにより、生物化学兵器によるテロも懸念されるようになり、天然痘ウイルスによるバイオテロが現実味を帯びてきた。この事件を境に、天然痘ウイルスやその流出の噂がマスメディアの活字となって人々の目にも触れるようになった。米国ブッシュ大統領は2002年12月13日に、兵士や救急医ら100万人に天然痘ワクチンを接種すると発表し、自らもワクチン接種を済ませた（2002年12月29日、朝日新聞朝刊）。わが国においても数百万人分の LC16m8 株の備蓄ワクチンが準備された。役割を終えたように見えた国産天然痘ワクチンである LC16m8 株は再び蘇ろうとしている。

それ以前にも、VV は別の観点から注目された。1982年に米国の Paoletti et al. (1982) および Moss et al. (1982) のグループがそれぞれ独立に、VV をベクターに用いた組み換えウイルス（RVV）を発表した。この手法を用いると、VV の中に、相同組み換えの原理を利用して、他の病原体の抗原遺伝子を複数発現する RVV を作製できる。たとえば、炭疽菌、インフルエンザウイルス、エイズウイルスの感染防御抗原を発現する RVV を作製すれば、一つの RVV ワクチンの接種で、天然痘ばかりでなくこれら三つの感染症に対する免疫が同時に得られるという理屈になる。この研究により、VV にはベクターとしての新たな価値が見い出された。

杉本（国立予防衛生研究所、当時）は、1983年から国産の優秀なワクチン株である LC16

mO および LC16m8 株を RVV のベクターに使用するのが適当であると考え、これらワクチン株を開発した橋爪（この時点では千葉大学医学部に移る）らと共同して RVV ワクチンの開発研究およびベクターである親株の分子生物学的研究を開始した。この研究開発は杉本らにより東燃株式会社のバイオグループでさらに展開され、その中には今日ほぼ実用段階に達した、牛痘ウイルスの抗原を組み込んだ RVV ワクチン（当時東大医科研の山内らと共同開発）も含まれる。また、バイオテロを念頭に、LC16m8 株の全塩基配列決定の作業が木所らを中心に千葉県血清研究所でほぼ完了した。最近のこのような新たな展開を踏まえ、筆者らは国産天然痘ワクチンである LC16m8 株とその親株である LC16 および LC16mO の総説を纏める必要性を感じ、筆をとった次第である。なお10年ほどまえに LC16mO とその組み換えワクチンについて書いたの筆者らの総説（Sugimoto and Yamanouchi, 1994）も併せて参照していただきたい。

本稿は4人による共著であるが、LC16mO および LC16m8 株の開発の部分と全体の校閲については橋爪が、この2つの株の分子生物学的解析とそれを用いた RVV については杉本が、特にリンダペスト（牛痘）ワクチンについては大石が、そして LC16m8 株の製造技術や RVV を用いた抗原の大量発現については木所が中心になって担当した。

LC16 株

LC16mO や LC16m8 の親株である Lister (Elstree) 株は WHO の天然痘撲滅作戦に広く世界中で使用された。当時世界中で用いられていた病苗株の中で Lister 株は最も副作用が少ないとされていたが、この株は1) ごく稀に種痘後脳炎のような重篤な副作用を引き起こすこと、2) ワクチンの生産は Lister 株を牛の全身の皮膚に接種し、できた膿瘍から取り出すという原始的な手法によっており、無菌性を保証することが容易ではない、という欠点を持っていた。橋爪ら（橋爪、1972; Hashizume et al., 1975; Hashizume et al., 1985）はこのような問題点を解決するために、Lister 株を初代ウサギ腎臓細胞（PRK）で継代培養し、その中から、40.8 °C 以上では増殖しない温度感受性株として LC16 株を樹立した（図1）。

LC16 株はサルの中樞神経系に対する病原性が、親株の Lister 株や当時ワクチンに使用されていた他の株に比べ大きく減弱していたが、ウサギの皮膚での増殖性はむしろ亢進していることが判明した。そこでさらに PKR での継代を重ね、より小さなポックを形成する LC16mO 株を選択した。LC16mO は約 1000 人に接種された。しかし LC16mO 株でも皮膚での反応がやや強かったために、LC16mO 株からさらにポックサイズが小さい株として LC16m8 株が樹立された。LC16mO に比較し LC16m8 は皮膚増殖能が弱いが抗体誘導能は親株の Lister 株とほぼ同程度であり、また安全性では明らかに優れている。この株は、ウサギ腎臓の初代培養細胞を用いて製造できる点も大きな改善点であった。事実、LC16m8 株は、1974 年から 1975 年にかけて 10 万人の子供に接種され、その安全性が確認され、正式なワクチン株として厚生省から認可された。Lister 株に比較し LC16mO と LC16m8 の最大の利点は、ウサギやサルの脳でのウイルス増殖能が非常に低い（図 2）、すなわち、神経毒性が低い、ことである。このことは脳炎のような副作用の危険性がきわめて低いことを示している。Lister、LC16mO および LC16m8 株の性質はまとめて表 1 に示されている。

杉本らのグループは、LC16mO 株をベクターに用いて各種の組み換えワクチンの作製を行うかたわら、LC16mO と LC16m8 株の分子生物学的解析に着手した。たまたま、LC16mO 株と LC16m8 株のゲノム DNA の *Hind*III 断片の一つを制限酵素 *Xho*I で切断したところ、2 つの株で切断のされ方が異なることが分かった(Sugimoto et al., 1985)。このような制限酵素の切断点の差異はゲノム DNA のほか部位にもあることが後で判明したので、二つの株のプラークサイズの違いはこの部位に存在する遺伝子によるとは必ずしも言えない。しかし、当初のこの単純な仮定は結果としては正しかった。Takahashi-Nishimaki et al. (1987, 1991) は LC16m8 を感染させた細胞に、LC16mO の種々の DNA 断片をトランスフェクトし、出現するプラークを調べたところ、この部位を含む DNA を加えたときのみ大きなプラークサイズのウイルスが単離された。DNA の領域を狭め、その狭めた領域の

DNAの塩基配列を決めることで、プラークサイズと宿主依存性に関与する遺伝子に到達し、*ps/hr* と名づけた。名前の由来を説明すると、*ps* は plaque size を、*hr* は host range を示す。小さなプラークサイズの LC16m8 ではこの遺伝子に1塩基変異が認められ、そのために frame-shift が生じることが確認された。また、小さなプラークを形成する LC16m8 株に LC16mO の *ps/hr* 遺伝子を導入すると LC16mO と同程度の大きさのプラークを形成する株 (LOTC) も得られることが確認された。Goebel et al. (1990) はこの時点で既に、VV の Copenhagen 株の全塩基配列を決定しており、機能は不明であったがその中に *B5R* という遺伝子があった。*ps/hr* と *B5R* 遺伝子は同一であることが確認された。そこで本稿では以後この遺伝子の名称としては *B5R* を採用することとする。この発見は他の研究者によっても別の VV 株で追認され、*B5R* 遺伝子産物は主に培養上清中に放出される extracellular enveloped virus (EEV) (細胞外性被覆ウイルス) のエンベロープ (外皮) に存在し、隣接の細胞にウイルスが感染・伝播するとき、感染効率を高める働きをする蛋白質であることも明らかにされた (Engelstad and Smith, 1993)。この事実は、*B5R* 遺伝子産物がプラークサイズとホストレンジに関わっているという知見によく一致している。筆者らの発見後、この分野の研究は Smith らのグループを始めとして多くの研究者により活発になされている (総説、Smith et al., 2002)。その一端を紹介しておきたい。VV は2種類の形態的に異なるタイプをとる。一つは intracellular matur virus (IMV) (細胞内性成熟ウイルス) でいま一つは先に述べた EEV である。EEV は体内で細胞から細胞への伝播に必要で、*B5R* 遺伝子産物が欠落すると、筆者らが発見したようにプラークサイズが小さくなり、また、EEV の産生量が 1/10 以下になる。LC16m8 株に限らず、*B5R* の欠落した VV は体内での伝播範囲が限定され、弱毒化する (Mathew et al., 1998) (図3)。

RVV ワクチン

RVV の作製にあたっては外来遺伝子を、VV の増殖の妨げにならない部位に挿入する。そして、挿入した遺伝子が破壊されたことをマーカーにして RVV を選択する。筆者らは共

同研究者である京大ウイルス研究所（当時）の志田らが開発した *haemagglutinin (HA)* 遺伝子を挿入部位として主に使用した (Shida et al., 1987)。RVV ではこの遺伝子が破壊されるためにプラークはニワトリ赤血球と結合できなくなり白く、赤いプラークを形成する野生株と区別することができる。他に *thymidine kinase (TK)* も挿入部位として用いられた (Mackett et al., 1982)。挿入した外来抗原はなるべく大量に発現する必要があり、強いプロモーターを使用する試みがなされた。そのために、VV の感染初期に使用される 7.5-kDa プロモーターと、感染後期に使用される A-type inclusion body プロモーターを組み合わせたプロモーターを工夫した (Funahashi et al., 1991)。RVV にすると親株ウイルスより増殖能が一般に低下するので、比較的増殖の強い LC16mO がベクターとして採用された。筆者らのグループが作製した RVV には、B 型肝炎ウイルス、ウシ白血病ウイルス、ヒト成人病白血病ウイルス、牛疫ウイルス、麻疹ウイルスなどの抗原を発現するものがある。また、他のグループの研究者により、LC16mO 株に日本脳炎ウイルス、後天的免疫不全ウイルス (HIV)、帯状疱疹ウイルス (VZV) の抗原を発現する RVV が作製された (表 2)。この中で、大形動物での感染防御実験を行ったにウシ白血病および牛疫ワクチンについて少し詳しく述べたい。

ウシ白血病ワクチンと牛疫ワクチン

ウシ白血病ワクチン：牛白血病ウイルス (BLV) はウシやヒツジに B 細胞由来の白血病を引き起こすレトロウイルスである。筆者らは、井川（当時理化学研究所）および大島、岡田ら（当時岩手大学農学部）との共同で、主要な防御抗原である BLV の外被糖タンパク質 (env) 遺伝子を発現する RVV を構築し、ヒツジにおける感染防御実験を行った。ワクチン接種群では、コントロール群に比べて攻撃接種後のリンパ球におけるウイルス量が著しく抑制されていることが明らかになった (Ohishi et al., 1991)。ヒツジにおいて、この組換えワクチン接種のみでは有意な抗体価は検出されず、攻撃接種後に急激に抗体価の上昇が見られた。これとは対照的に、このワクチンは BLV 特異的な CD8+T 細胞を主とした遅延型アレルギー

反応と末梢血リンパ球の増殖分裂反応を誘導した (Okada et al., 1993)。これらの結果は細胞性免疫が BLV の増殖抑制に関与していることが示唆している。そこでさらに、BLV を接種して人為的に作出した感染ヒツジに、この組換えワクチンを接種した。その結果、ワクチン接種群ではコントロールに比べて BLV の増殖が抑制されることが明らかになった (Ohishi et al., 1991)。感染防御実験に用いた動物における BLV 量、抗ウイルス抗体価、末梢リンパ球の特異的増殖分裂反応との相関を調べた結果、BLV 量とリンパ球増殖反応との間に有意な逆相関関係が見られた (Ohishi et al., 1992) (図 4)。このように組換えワクチンの誘導する細胞性免疫が、レトロウイルスの増殖を抑制することが示唆された。特に、レトロウイルスキャリアーにおける有効性を大型動物によって実験的に証明できたことは、同じレトロウイルスに属するヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV) やヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染者の予防や免疫治療を考えるうえで大きなヒントを与えると思われる (Sugimoto et al., 1994; 杉本、大石 1996)。

牛痘ワクチン：牛痘はパラミクソウイルス科、モービリウイルス属に属する牛痘ウイルス (Rinderpest virus) によって引き起こされる大形反芻動物における急性の伝染病で、牛は感受性の高い自然感染宿主である。牛痘は、今世紀初頭までに先進国ではほぼ制圧されたが、現在でもインド、アフリカ、中近東などを中心に発生が続いており、その根絶は流行国での畜産における最重要課題である。また、東アフリカでは牛痘ウイルスに対して感受性が高い水牛、クードウー、キリンなどの野性動物の大量死も報告されている。現行の生ワクチンは、ケニアで分離された Kabete O 株を牛腎臓由来の培養細胞で継代して弱毒化した生ワクチン (RBOK) である。このワクチンはアフリカでの国際的な牛痘根絶キャンペーン (JP15) で用いられ大きな成果を挙げたが、最後まで根絶できない地域が残り、そこが次の流行をもたらすこととなった。その理由の 1 つとしてこのワクチンの熱安定性が高くないことが考えられた。牛痘流行国は天然痘根絶に耐熱性の種痘ワクチンが効力を発揮した地域重なることから、組み換え VV ワクチンが有効であると考えられた。

上記のような背景の下に、山内（当時、東大医科研）と杉本らは牛疫ウイルスの主要な防御抗原である赤血球凝集タンパク質(HA)遺伝子を LC16mO 株に挿入した RVV の開発を開始した (Tsukiyama et al., 1989; Asano et al., 1991)。作製したワクチンの凍結乾燥品は 45 °C で一ヶ月保存してもウイルスタイターが高いまま維持され、ベクター株と同様熱安定性が高いことが確認された。英国と米国のグループも同時に VV をベクターとした組換えワクチンを開発したが、1989 年の国際獣医事務局(OIE)の専門家会議での検討の結果、安全性の高い LC16mO 株を用いた RVV ワクチンが受け入れ可能なワクチンとして推奨された (OIE report, 1989)。感染防御実験は Barrett (英国 Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory) と共同研究で行われた。ワクチンウイルスの伝播の可能性を最小限にするために RVV を皮下接種し、3, 6 週後に強毒牛疫ウイルス Saudi 1/81 株で攻撃接種した (Yamanouchi et al., 1993)。さらに、ワクチンの長期免疫持続を調べるために接種後 1, 2, 3 年後に同様の攻撃接種を行った (Inui et al., 1995; Ohishi et al., 2000)。野外での使用を考慮し、追加免疫は一切行なわなかった。一連の感染防御実験の成績を表 3 にまとめた。ワクチン接種後 3, 6 週ならびに 1 年後の攻撃接種に対して、牛は臨床症状や白血球減少をまったく示さず、目の粘膜や末梢血からウイルスは検出されなかった。2 年および 3 年目の攻撃接種に対して、5 頭中 4 頭、あるいは 6 頭全頭のワクチン接種牛が耐過した。防御された牛のうち 1 または 2 頭は臨床症状を示さなかった。残りの 3 または 4 頭は一過的な発熱や白血球減少を示したのみで回復した。完全防御を示した 1 頭以外のすべてから、極めて微量のウイルスが一過的に分離された。これとは対照的に、コントロール群は高熱、重篤な粘膜異常、食欲不振、重度の白血球減少症などが観察され、さらに牛疫の末期的症状である重度の消耗性の下痢が見られたために安楽死となった。2 年目の実験で死亡した 1 頭のワクチン接種牛は、攻撃接種後微弱な発熱とわずかな口内炎をコントロール群よりも遅れて示したが、その後、細菌感染による重篤な症状を呈したために安楽死させた。以上の結果から、RVV ワクチンは強毒牛疫ウイルスから牛を防御し、その効果は少なくとも 3 年間は継続することが示された。

ここで用いた攻撃接種はきわめて厳しい条件であり、自然感染において十分に防御可能な免疫が長期間にわたって動物に賦与できると考えられる。このように筆者らが開発した RVV ワクチンは、熱安定性、安全性試験とともに (OIE)の基準をすべて満たすことが確認された。最近、この RVV ワクチンは、従来の牛疫ワクチンの接種が中止されて抗体調査による監視が行われている暫定的根絶宣言地域での緊急接種用ワクチンとして注目を集めている。これらの地域で牛疫の発生があった場合、ワクチン接種と自然感染との区別が抗体検査で可能な RVV ワクチンの使用が有効であると考えられるからである (山内 2001)。

RVV の誘導する免疫と防御効果の関連について触れておきたい。HARVV ワクチンは、感染防御では有効性が示されたが、液性免疫の誘導が現行の生ワクチンにくらべてきわめて低かった。しかし、すべての感染防御実験において攻撃接種後に急速な抗体価の増加が観察された。すなわち、ワクチン接種3年後の個体では、抗体価は検出限界ぎりぎりのレベルで、有意なリンパ球増殖反応も認められなかったが、攻撃接種後にはどちらも急速に上昇し、発熱等のわずかな症状を示すだけで牛はすべて耐過した。牛疫ウイルス核タンパク質(N)遺伝子の RVV (以下 N 組換えワクチン) による感染防御実験の結果についても簡単に触れたい。細胞性免疫の誘導については、N 組換えワクチンを用いて詳細に調べられ、牛において特異的リンパ球増殖反応と細胞障害性(CTL)反応が観察された (Ohishi et al., 1999)。しかしながら、この N 組換えワクチンは同条件の強毒株による攻撃接種による発症を遅らせることはできたものの、防御するまでにはいたらなかった。これらのことを総合すると、強毒株の攻撃接種に対する防御のためには中和抗体の存在が必須であるが、それは組換えワクチンが誘導する程度の量で可能であり、その後、2次的に強く誘導される中和抗体や CTL が感染防御に重要であると推測された。ヒト麻疹においても細胞性免疫の低下した患者では重篤化することが知られており、細胞性免疫を強く賦与できる RVV は牛疫を含むモービルウイルス感染に対して有用なワクチン候補であると考えられる。

発現用ツールとしての LC16mO 株

これまで、効率の良い発現系として多くのウイルスベクターが用いられてきた。なかでも VV ベクターは、適切な発現蛋白質の翻訳後修飾、高い発現効率、広い宿主領域、外来遺伝子に対する大きな許容量 (35 kb)、等の多くの利点を持つ。特に蛋白質の糖鎖修飾がほ乳類細胞と異なるバキュロウイルスベクターに対して VV ベクターでは適切なほ乳類細胞株を選択することによって正確な糖鎖修飾が可能である点で、有利である。反面、VV はヒトに対する病原性が利用の障害となってきた。しかし、LC16mO 株、LC16m8 株は上述したように乳幼児を対象とした臨床応用試験において高い安全性が立証された高度弱毒化ワクチン株であるため、病原性の問題を回避できる。

VV は独自の転写系を持つため、VV ベクター系では VV 由来のプロモーターによって外来遺伝子を発現させる。志田のグループ (Jin et al., 1994) は cowpox virus A type inclusion body gene(ATI)由来プロモーターの下流に、改変を加えた p7.5KDa プロモーターを複数個重複させた配列とを連結した強力な合成プロモーター、PSFJ1-10、PSFJ2-16 を開発した。

Kidokoro et al. (2002)は、安全性の高いLC16mO 株と高発現の合成プロモーターPSFJ2-16、更にヒスチジンタグ(his-tag)によるアフィニティークロマトグラフィー(AC)を組み合わせることにより、麻疹ウイルス(MV)の H 蛋白質(MVH)を、高い生物活性と抗原性を保持したまま大量発現させ、それを 1 段階精製によって効率的かつ高純度に精製する方法を確立した。

MVH は MV が宿主細胞に侵入する際、細胞膜上のレセプター分子 (CD46, moesin , SLAM など)に結合し、同時にもう一つの膜蛋白質である膜融合蛋白質 (MVF) の融合活性発現を補助し MV 感染の第 1 段階を司る重要なウイルス構成成分 の 1 つである。MVH の正確な細胞内輸送や多量体化に伴う生物学的活性の発現には適切な蛋白質の翻訳後修飾が必須である事が知られている。

従来の MVH 精製法は、主に精製ビリオンを出発材料として界面活性剤による可溶化やプロテアーゼによる解裂によって行われてきた。しかし、こうした方法ではビリオンの精製に大きな労力とコストを必要とし、かつ収量が低い欠点がある。加えて MVH 以外のウイル

ス抗原の迷入を完全には排除できない。単クローン抗体による AC を用いた方法も報告されているが、抗原を溶出する際の低 PH や変性剤による蛋白質の変性を避けられない。

我々は MVH の終止コドンの直前に His-tag 配列を導入した cDNA を PSFJ2-16 に連結し (pSFTDH/HisC2)、LC16mO 株に導入した RVV を作成した (mOTDH/HisC2) (図 5)。この RVV から発現された組換え MVH (TDH/HisC2) は感染細胞で細胞表面に輸送され、野生型 MVH と同様の赤血球凝集能と MVF の膜融合活性補助能を発現した。この組換え MVH は RVV 感染細胞ライゼートから非変性条件下での Ni^{2+} ·imino-diacetic acid sepharose (Ni^{2+} IDA)カラムによる 1 段階精製で、大量かつ高純度に精製された (図 6) (2.8 mg / 10^8 cells , 純度 98%)。この結果は従来の MVH 精製法に比べ少なくとも 400 倍効率的であることを示している。その発現量はバキュロウイルス発現系にも匹敵するものである。それでいながら、バキュロウイルスで観察されるような翻訳後修飾が不完全な MVH 分子は検出されず、精製標品は従来の報告にはないような高い HA 比活性を保持していた (2048HAU/ μg)。精製組換え MVH の抗原性を調べるため、これらの抗原を用いた ELISA 法で得られたヒト血清検体の ELISA 抗体価と、同一血清検体の中和抗体価との相関係数を求めたところ、従来の報告に比べ高い値 ($R^2=0.84$, $p<0.05$) を示し、精製 MV ビリオンを用いた場合 ($R^2=0.69$, $p<0.05$) よりも高い値を示した。

このように VV 発現系と His-tag による AC 精製法を組み合わせることによって膜糖蛋白質をその機能と構造とを保持した状態で大量に且つ高純度に調製にすることが可能になった。この系を用いることで様々な蛋白質、特に翻訳後修飾がその機能や構造に必須である蛋白質の大量調製が可能になり、蛋白質の構造解析や機能解析にも有効なツールとなりうる事が証明された。

RVV は単クローン抗体作製の際の効率の良い免疫手段としても、時に非常に有用である。例えば、HIV の逆転写酵素を発現する RVV 接種により、中和活性を持つ単クローン抗体が得られている (Chiba et al., 1997)。

製造方法

ローラボトル法： 橋爪らによる LC16 株の開発が行われるまでは、天然痘ワクチンの製造は、VV を牛の全身の皮膚に接種し、その膿汁からウイルスを得るといった、極めて原始的な方法によっていた。そのために、製造工程中に菌の混入を避けることは事実上不可能であり、工程管理は至難の業であった。LC16m8 株は、ウサギ腎臓の初代培養細胞を用いて製造され、これも大きな技術的進歩であった。

千葉県血清研究所ではローラボトル法によりワクチン製造を行い、昨年（2002 年）の緊急製造もこの方法により行われた。基本的には現行の風疹生ワクチンの製造方法と同様である。幼齢ウサギの腎臓を無菌的に摘出し、トリプシン等のプロテアーゼ（現在は細菌由来のディスパーゼを使用）により細胞を 1 個 1 個に分散させる。それを増殖培地（4%FCS と 4%CS を含む LH 培地）に浮遊させローラボトル当たり 5×10^8 の細胞を播き込む。37℃ で 4 日間回転培養し、細胞が confluent になった状態で種ウイルスを $\text{moi}=1.0$ で接種する。ウイルスを吸着後細胞表面を培地で 3 回洗い、維持培地（0.2%gelatin を含む 199 培地）を加え、細胞全面に CPE が現れるまで 30℃ で 2～3 日回転培養する。ウイルスのハーベストは、ローラボトルを振とうすることにより感染細胞を浮遊させ、これを低速遠心で回収することにより行う。風疹ウイルスとは異なり VV の場合、培養上清に放出されるウイルス量は全体の 1/10 程度しかないため、細胞画分のみをワクチンに使用する。この細胞沈さを少量の培地で再浮遊し、細胞内のウイルスを分散させるため超音波処理を施し、細胞片を除くため再び遠心処理を行い、その上清をワクチン原液として用いる。通常ウイルスの yield はローラボトル当たり $10^{10.2}$ PFU 程度である。ワクチン原液を適当な希釈倍率で希釈し安定剤としてのソルビトールとペプトンをそれぞれ最終濃度 5%加えて凍結乾燥する。前述したように、開発当時組織培養による凍結乾燥痘苗は最先端の技術によるものであった。

マイクロキャリア法： 一方、牛痘の RVV ワクチンをウシでの感染防御実験に使用するために、桃木ら（1988）（当時、東燃株式会社基礎研究所）によりマイクロキャリア法

が使用された。この凍結乾燥ワクチンが上述したウシでの感染防御実験に使用された。その概略は次の通りである。

ウサギ腎臓の樹立細胞株 RK-13 をマイクロキャリアー（サイトデックス 1、ファルマシア社製）に付着させ、スピナーフラスコを用いて、攪拌培養した。培養期間は 5～6 日間程度である。マイクロキャリアーの表面を細胞がほぼ覆ったのを確認し、ウイルス液を滴下して感染させた。培地交換を行うと 2 日ほどでウイルス量はほぼ最大に達した。気相は 5% 炭酸ガス-95% 空気を用いたが、酸素を補給することでウイルスの産生量が増加することが分かった。2 リットルのスケールでの培養では、 4×10^{10} pfu 程度のウイルスを得ることができた。

その後のウイルスの精製方法などは、上述したローラボトル法と基本的には同じである。また、後述する Acambis 社と Baxter 社による ACAM2000 の製造は、Vero 細胞を用いて行ったが、細胞培養は無血清培地を使用したマイクロキャリアー法を用いている。

バイオテロ対策のための LC16m8 株

開発から 20 年以上を経過した今日、国産弱毒株である LC16 株は、バイオテロの対策のために三度蘇ろうとしている。天然痘ウイルスはなぜバイオテロの手段として恐れられているのであろうか。その理由としては、このウイルスの毒性が高いことのほかに、非常に感染力が強いことが挙げられる。すでに述べたようにこの仲間のウイルスは熱安定性が高く、凍結乾燥した天然痘ウイルスを撒布したりすれば、その感染力は計り知れない。それは単なる“粉”なので、テロリストはワクチン接種をしておけば、自分は感染することなく、非常に容易に撒布し、人々を恐怖に陥れることができる。

世界から天然痘の根絶が宣言された後でも、天然痘ウイルスは研究室の冷凍庫の中に保管されていた。それをすべて廃棄してしまえば、地球上からは文字通り天然痘を根絶することになる。そこで、それも含めて全ての天然痘ウイルスをこの地上から廃棄するべきかどうかで議論があったが、1999 年 5 月の WHO 総会で、現在アメリカ合衆国とロシア共和

国の2国に保存されている天然痘ウイルスを、研究目的のため2002年まで保存することが決議された。しかし、米厚生省は2002年末に行うことが国際的に決まっている天然痘ウイルスの廃棄を当面行わないことを決定、WHOなどに伝えた。同時多発テロや炭疽菌テロなどで、天然痘を使った生物テロへの懸念が強まったことが方針転換の理由である。また、旧ソ連の崩壊に際して、ロシア共和国にストックされていた天然痘ウイルスが科学者とともに他国に散逸し、テロの手に渡る可能性が出てきたことも、マスコミなどで報じられている。

冒頭でも述べたように、米国では兵士など一部の人に対する天然痘ワクチンの接種を開始した。ワクチン接種を義務づけていた1960年代、100万人に対し12人が脳炎に、39人が極めて重い全身の発疹に襲われ、1ないし2人が死亡した。米国の人口は約2億8千万人である。世論調査では65%の人が接種を希望しているということであるが、希望している人全員に接種すると、単純計算で180人から360人の死者が出ることになる。日本政府も千葉県血清研究所にLC16m8の生産を依頼した。しかし、千葉県は千葉県血清研究所が企業的に成り立たないといった理由から、依頼されたワクチンを製造した後に、その閉鎖を決定した。今後は熊本市にある化学及血清治療法研究所が製造を担う。現在250万人の備蓄がすでにあり、厚生省は5年間で2500万人分のワクチン備蓄を目指すとのことである（2002年12月29日、朝日新聞朝刊）。

ところで、米国が注文した2億ドーズ以上の天然痘ワクチンは、残念ながらLC16m8株ではなく、英国のAcambis社が、米国のBaxter社のVero細胞の培養技術と組んで開発したACAM2000株である。ACAM2000株は、元々はNew York City Board of Health（NYCBH）株由来である。両社はこのワクチンを米国ばかりでなく、ヨーロッパやアジアの各国にも売り込み中である。筆者ら（橋爪、杉本）は世界保健機関（WHO）で天然痘の撲滅に尽力された蟻田功博士、英国のImperial CollegeのGeoffrey L. Smith教授およびAcambis社/Baxter社のスタッフの方たちを交えてそれぞれのワクチンの長所、短所などについて議論をもつ

機会があった。いずれも細胞培養で製造できる点は共通であるが、LC16m8 株では B5R 遺伝子が変異のために欠損しているが、ACAM2000 株はこの遺伝子が正常である点で両者は大きく異なる。そのために、LC16m8 はより弱毒性であり、安全性の面で優れているが、B5R タンパク質を欠損しているために、免疫力が落ちている可能性が指摘された。重要な問題なので、以下、少々詳しく述べたい。精製した B5R タンパク質でウサギを免疫すると VV に対する中和抗体が誘導されるが、不思議なことに、自然感染やウイルス粒子で免疫すると中和抗体は産生されない(Galmiche et al., 1999)。B5R タンパク質はいわゆる "hidden epitope" と思われる。また、200 種類ほどのタンパク質から構成されている VV には B5R 以外にも多くの抗原が含まれる。さらに、天然痘ウイルスや VV に対する感染防御には、中和抗体ばかりでなく細胞性免疫も重要な役割を果たすと考えられている。したがって、筆者らは B5R の欠損が感染防御の点で大きな欠点とはならないと考えている。しかし、参加者は、適当な動物実験で LC16m8 株を含めた天然痘ワクチンの感染防御能力を動物実験で確かめる必要があるという点では意見が一致した。具体的には、致死量の VV を用いたマウスおよび monkeypox を用いたサルでの攻撃接種の実験系で、ワクチンの感染防御能を評価する方法が考えられる。実際には、それぞれのワクチンの特徴を生かし、使い分けることも考えられる。たとえば、天然痘ウイルスにさらされる危険性が高いが、体は頑健な軍隊のような対象には効果に力点をおいた ACAM2000 株を、そして乳幼児や老人など抵抗性の弱い対象に対しては安全性に重きを置いた LC16m8 を使用するという事も可能であろう。

いささか余談にはなるが、バイオテロという機を捉え、いち早く培養細胞を使用し、ワクチン株の開発を行い、米国をはじめ各国に販売している、Aambis 社や Baxter 社のたくましさには脱帽する思いであり、開発でははるかに先行していた LC16m8 株が遅れを取ったのは残念でもある。

天然痘ウイルスによるバイオテロに向けて、どのような具体策を採るべきかという点については、蟻田による最近の論文 (Arita, 2002) に詳しく述べられている。ここではその中

から、いくつかのポイントを紹介するにとどめたい。米国の疾病管理予防センター（Centers for Disease Control and Prevention: CDC）ではワクチン接種の効果は3～5年間は継続すると発表している。しかし、実際に過去のデータを分析してみると、10～20年間有効な例が数多く見られる。したがって、現在でもかなりの人々が感染防御能を持っている可能性が高い。このような事実も踏まえ、現在の時点ですべての人にワクチン接種をする必要はないが、万一の場合への備えは怠りなくしておくべきである。現在 LC16m8 の備蓄が進められているが、このワクチン株は実際に流行地での接種はなされたことがないので、上述したような感染防御実験を中心とした LC16m8 に関する研究が肝要である。以上が博士の結論であり、筆者らもこの意見に同意するものである。

おわりに

生物界を広く見渡すと、残念ながらそこには仁義なき戦いが繰り広げられているという現実を否定できない。バイオテロに対する防備を固めるのは国家としての基本的義務であろう。バイオテロに対抗するためには LC16m8 といった弱毒 VV の基礎研究も欠かせない。「備え有れば憂い無し」という諺はこの場合にもあてはまる。LC16m8 の全塩基配列は、木所らの千葉県血清研究所のグループがほぼ完了した。この分野の基礎研究は厚生労働省および防衛庁にとっても重要な課題となったために、国立感染症研究所で再開され、LC16m8 の塩基配列の決定も計画中のことである。また、橋爪および杉本と共に国立予防衛生研究所で RVV ワクチン開発と一緒にスタートさせた、日本ゼオンの安田幹司博士が、ファウルボックスを用いた RVV ワクチン開発に成功し米国で製造販売している（Ogawa et al., 1990）と聞いているが、これは朗報である。RVV が、狂犬病ワクチンを唯一の例外として実用化に至っていない理由としては、野外に接種したときに、動物から動物、あるいは人への間への伝播、ワクチン株からの強毒株の出現といった危険性が無いということに対して、完全な社会的なコンセンサスが得られていないからである。しかしながら、長らく種痘を行ってきた人類の経験からしてこのような危険性は極めて低いであろう。狂犬病ワクチン

の欧米での野外散布でも特に問題はおきていないことも考えあわせると、このような危険性はかなり低いであろう。先にも述べたように、牛疫ワクチンは実用化に一番近い位置に有る。国立感染症研究所の本多三男博士を中心としたグループはタイとの共同で、BCGとVV (DIs 株) をベクターとしたエイズの組み換えワクチンを開発し、サルでの感染防御に成功し、実用化に一步近づいている (Nakasone et al., 2003)。バイオテロのために種痘を行うのであれば、その時に、エイズワクチンなどを目的としたRVV ワクチンを接種すれば、一石二鳥の役割を果たせるであろう。国産の優秀な種痘ワクチンであるLC16m8 が、将来バイオテロの防止とRVV ワクチンの両方で活躍することを期待したい。

謝辞

本論文について貴重なご意見をいただいた (財) 国際保健医療交流センター理事長の蟻田功理事長、貴重な資料をいただいた国立感染症研究所感染病理部の小島朝人室長および日本ゼオン株式会社安田幹司博士に深謝する。

文献

- Arita, I., *Duration of immunity after smallpox vaccination: a study on vaccination policy against smallpox bioterrorism in Japan*. *Jpn J Infect Dis*, 2002. 55(4): p. 112-6.
- Asano, K., Tsukiyama, K., Shibata, S., Yamaguchi, K., Momoki, T., Maruyama, T., Kohara, M., Miki, K., Sugimoto, M., Yoshikawa, Y., and et al. (1991). Immunological and virological characterization of improved construction of recombinant vaccinia virus expressing rinderpest virus hemagglutinin. *Arch Virol* 116, 81-90.
- Brochier, B., Kieny, M. P., Costy, F., Coppens, P., Bauduin, B., Lecocq, J. P., Languet, B., Chappuis, G., Desmettre, P., Afiademanyo, K., and et al. (1991). Large-scale eradication of rabies using recombinant vaccinia-rabies vaccine. *Nature* 354, 520-522.
- Chiba, J., M. Nakano, Y. Suzuki, K. Aoyama, H. Ohba, T. Kobayashi, A. Yasuda, A. Kojima, and T. Kurata. 1997. Generation of neutralizing antibody to the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 by immunizing of mice with an infectious vaccinia virus recombinant. *J Immunol Methods* 207:53.
- Engelstad, M., and Smith, G. L. (1993). The vaccinia virus 42-kDa envelope protein is required for the envelopment and egress of extracellular virus and for virus virulence. *Virology* 194, 627-637.
- Funahashi, S., Itamura, S., Iinuma, H., Nerome, K., Sugimoto, M., and Shida, H. (1991). Increased expression in vivo and in vitro of foreign genes directed by A-type inclusion body hybrid promoters in recombinant vaccinia viruses. *J Virol* 65, 5584-5588.
- Galmiche, M. C., J. Goenaga, R. Wittek, and L. Rindisbacher. 1999. Neutralizing and protective antibodies directed against vaccinia virus envelope antigens. *Virology* 254:71.
- Hashizume, S., Morita, M., Yoshizawa, H., Suzuki, K., Arita, M., Komatsu, T., Amano, H., and Tagaya, I. (1972) Intracerebral inoculation of monkeys with several vaccinia strains: An

approach to the comparison of different strains. International Symposium on Smallpox Vaccines, Bilthoven 1972; Symp. Series Immunobiol. Standards 19, 325-331.

橋爪 壮 (1972) 新規弱毒 VV 株、LC16m8、の基礎 臨床とウイルス 3 : 229-235

Hashizume, S., Yoshizawa, H., Morita, M., Suzuki, K. (1985) Properties of attenuated mutants of vaccinia virus. In: Vaccinia viruses as Vectors for Vaccine Antigens. (Ed. Quinnan, G.V.) Elsevier, Amsterdam, pp421-428.

Inui, K., Barrett, T., Kitching, R. P., and Yamanouchi, K. (1995). Long-term immunity in cattle vaccinated with a recombinant rinderpest vaccine. *Vet Rec* 137, 669-670.

Jin, N. Y., Funahashi, S., and Shida, H. (1994). Constructions of vaccinia virus A-type inclusion body protein, tandemly repeated mutant 7.5 kDa protein, and hemagglutinin gene promoters support high levels of expression. *Arch Virol* 138, 315-330.

Kato, T., Kitamura, K., Hayakawa, Y., Takahashi, M., Kojima, A., Sato, S., and Yamanishi, K. (1989). Transcription mapping of glycoprotein I (gpI) and gpIV of varicella-zoster virus and immunological analysis of the gpI produced in cells infected with the recombinant vaccinia virus. *Microbiol Immunol* 33, 299-312.

Kidokoro, M., Aoki, A., Horiuchi, K., and Shida, H. (2002). Large-scale preparation of biologically active measles virus haemagglutinin expressed by attenuated vaccinia virus vectors. *Microbes Infect* 4, 1035-1044.

Mackett, M., G.L. Smith, and B. Moss, Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982. 79(23): p. 7415-9.

Mathew, E., Sanderson, C. M., Hollinshead, M., and Smith, G. L. (1998). The extracellular domain of vaccinia virus protein B5R affects plaque phenotype, extracellular enveloped virus release, and intracellular actin tail formation. *J Virol* 72, 2429-2438.

桃木 利明、飯島 信司、小林 猛 (1988) マイクロキャリアによる動物細胞の培養とワ