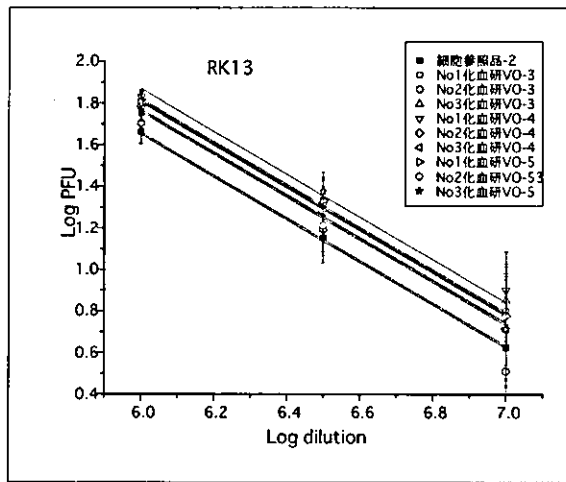
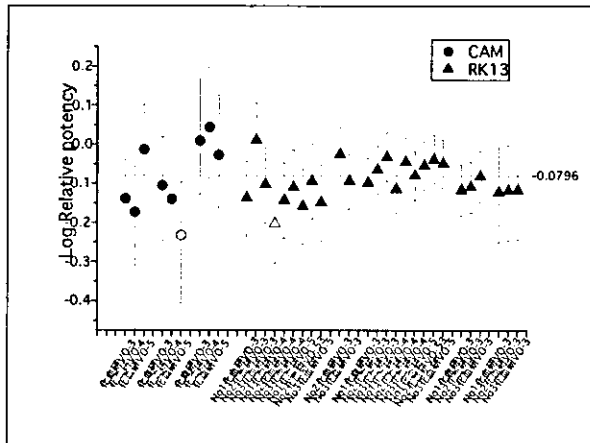


図5. ブラック法の平行線定量法による解析



RK13によるブラック数の対数を用いて平行線定量法による参照品に対する相対力価を求めることができるか検討した結果、ボックス法と同様、検体間の用量反応回帰の平行性は否定されず、検体の力価を参照品に対して相対的に求めることが確認された。

図6. 参照品に対する相対力価の比較



平行線定量で求めた参照品に対する各ロットの相対力価について、ボックス法とRK13におけるブラック法について比較した。その結果、絶対値を用いた場合、両方法の間で力価に明らかな相違が認められたが、相対力価の場合、図に示したように両方法で一致した結果が得られることが確認された。

平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）  
（分担）研究報告書

痘そうワクチンの備蓄戦略の為の品質向上、生産性向上に関する研究

分担研究課題：先行研究のレビュー及び基礎的研究（国内研究の状況）

分担研究者：横手公幸 財団法人 化学及血清療法研究所  
協力研究者：橋爪 壯 財団法人日本ポリオ研究所 理事  
協力研究者：介田 毅 国立感染症研究所 所長  
協力研究者：佐多徹太郎 国立感染症研究所 感染病理部部长  
協力研究者：金谷泰宏 防衛医科大学校防衛医学研究センター異常衛生環境研究部門 助教授  
協力研究者：船津昭信 財団法人 化学及血清療法研究所長・理事長  
協力研究者：田代 昭 財団法人 化学及血清療法研究所 常務理事  
協力研究者：藤田春雄 財団法人 化学及血清療法研究所 品質管理部  
協力研究者：志垣隆道 財団法人 化学及血清療法研究所 病理部安全性試験センター  
協力研究者：松井 元 財団法人 化学及血清療法研究所 病理部安全性試験センター  
協力研究者：坂口正士 財団法人 化学及血清療法研究所 第二研究部第一室  
協力研究者：原田精一 財団法人 化学及血清療法研究所 品質管理部  
協力研究者：嶽本澄代 財団法人 化学及血清療法研究所 品質管理部第二課  
協力研究者：金原知美 財団法人 化学及血清療法研究所 第一製造部長付  
協力研究者：新村靖彦 財団法人 化学及血清療法研究所 第一製造部長付

研究要旨：乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 は、有効性を保持しながら弱毒に成功した世界で唯一のワクチンである。しかしながら、このワクチンは承認後、すぐにワクチン接種が中止されたことから、広く使われる機会なく、永い間製造されることもなかった。近年の天然痘ウイルスによる生物テロ対策の一環として、この痘そうワクチン LC16m8 は生物テロ対抗医薬品として、国家備蓄が行われることとなった。本研究では、弱毒国内外の痘そうワクチン及びワクチニアウイルスの研究動向を調査評価し、現在製造されている痘そうワクチン LC16m8 の評価を品質・安全性に関する評価を行った。特に安全性に関しては、痘そうワクチン LC16m8 が作出時に検討されたサル神経毒性試験を現在の製造備蓄ロットで追試し、同様な成績を得た。また、新たに免疫不全 SCID マウス等を用いて評価を行った。加えて、今後検討すべき特性、有効性の検討課題を明らかにした。

A. 研究目的

本研究では、現在備蓄の為に製造されて

いる痘そうワクチンロットの品質・安全性

評価を目的とする。また、国内外の痘そう

ワクチン及びワクチニアウイルスの研究動向を調査評価し、さらなる科学的データを集積し、現行ワクチンの品質向上の検討課題を明らかにする。

## B. 研究方法

### a) ブラックサイズ測定実験

LC16m8 株は、財団法人 化学及血清療法研究所（以下、化血研）で製造したワクチン液を使用した。LC16m0 株と Lister Original (LO)株は、千葉県血清研究所より入手し化血研で培養したものをを使用した。

各株を RK13 細胞に接種し、37°C、7 日間培養した。顕微鏡を用いて形成された各株のブラック (63~202 個) サイズを測定し、その平均を求めた。

### b) ウサギ皮膚刺激性実験

#### 【使用ウイルス】

LC16m8 株は、化血研で製造したワクチン液を使用した。LC16m0 株と Lister Original (LO)株は、千葉県血清研究所より入手し化血研で培養したものをを使用した。

#### 【使用動物】

生後 13 週 (体重 2.5~3.1kg) のウサギ (JW、雄、スキンアイランドフリー) を (株) バイオテック (鳥栖市、佐賀県) より購入した。

#### 【接種】

LC16m8 ワクチン液は  $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ PFU/mL、LC16m0 株及び LO 株は  $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ PFU/mL となるように 10 倍段階希釈した検体 0.1mL ずつを毛刈りしたウサギの背部に皮内接種した (各希釈倍率のウイルス液につき 2 箇所/ウサギで 3 羽ずつ接種した)。

#### 【判定】

接種後 3 日目に、生じた発赤径を測定した。測定した発赤径 10mm 以上のものを陽性として各検体の 50% 発赤量 ( $ErD_{50}$ ) を Reed-Muench 法を用いて算出し、 $\log_{10}$  PFU 値で表示した。

### c) 成熟マウス脳内投与実験

#### 【使用ウイルス】

LC16m8 株は、化血研で製造したワクチン液を使用した。LC16m0 株と Lister Original (LO)株は、千葉県血清研究所より入手し化血研で培養したものをを使用した。

#### 【使用動物】

ddY マウス (生後 5 週齢、雌、SPF) を (株) 日本 SLC (浜松市、静岡県) より購入した。

#### 【接種】

希釈して  $1 \times 10^8$  PFU/mL に調製した各検体 0.03mL を、1 群 5 匹又は 6 匹のマウスに脳内接種した。

#### 【評価】

接種後 21 日間観察し、観察 21 日目の生存率と平均生存期間 (日) を算出した。

観察 21 日目の平均生存期間については Log-rank test 法を用いて、LC16m8 株接種群と LO 株接種群との間で有意差検定を行った。

### d) 幼若マウス脳内投与実験

#### 【使用ウイルス】

LC16m8 株は、化血研で製造したワクチン液を使用した。LC16m0 株と Lister Original (LO)株は、千葉県血清研究所より入手し化血研で培養したものをを使用した。

#### 【使用動物】

哺乳 ICR マウス (生後 3 日齢、SPF) を (株) 日本 SLC (浜松市、静岡県) より購入した。

#### 【接種】

希釈して  $1 \times 10^5$  PFU/mL に調製した各検体 0.02mL を、1 群 10 匹のマウスに脳内接種した。

【評価】

接種後 21 日間観察し、観察 21 日目の生存率と平均生存期間 (日) を算出した。

観察 21 日目の生存率については Fisher's exact test 法を用いて、平均生存期間については log-rank test 法を用いて、LC16m8 株接種群と L0 株接種群との間で有意差検定を行った。

e) 幼若マウス脳内投与 LD50 測定

【使用ウイルス】

LC16m8 株は、化血研で製造したワクチン液を使用した。Lister Original (L0) 株は、千葉県血清研究所より入手し化血研で培養したものを使用した。

【使用動物】

哺乳 ICR マウス (生後 5 日齢、SPF) を (株) 日本 SLC (浜松市、静岡県) より購入した。

【接種】

LC16m8 ワクチン液は  $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$  PFU/mL、L0 株は  $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$  PFU/mL となるように 10 倍段階希釈した検体 0.02mL を 1 群 10 匹のマウスに脳内接種した。

【評価】

接種後 21 日間観察し、観察 21 日目の死亡率を算出した。

観察 21 日目の死亡率より Reed-Muench 法を用いて、50% Lethal Dose ( $LD_{50}$ ) を算出し、 $\log_{10}$  PFU 値で表示した。

f) サル脳内投与実験

【使用ウイルス】

LC16m8 株は、化血研で製造したワクチン液を使用した。Lister Original (L0) 株は、

千葉県血清研究所より入手し化血研で培養したものを使用した。

【使用動物】

カニクイザル (3~4 歳、雌) を (株) 新日本科学 (鹿児島市、鹿児島県) より購入した。

【接種】

痘そうウイルス抗体陰性のカニクイザル 6 匹/群に、L0 株及び LC16m8 株の  $2 \times 10^7$  PFU を左側大脳の視床内に接種した。接種は塩酸ケタミン麻酔下で行い、手技は生物学的製剤基準に掲載されている生ワクチンのサル神経毒力試験で実施されている方法に準じた。

【評価】

接種後 14 日間、一般状態を毎日観察した。生存例は接種後 14 日目に塩酸ケタミン麻酔下で放血安楽死させて剖検し、全身の諸器官を肉眼的に観察した。死亡例は発見次第、剖検した。

【ウイルス分離】

剖検観察後、脳 (頭頂葉、脈絡叢の周辺組織、髄膜)、脊髄 (頸部膨大部、腰部膨大部)、心 (心房、心室、心嚢) を採取した。採取した各組織は、ガラスビーズ ( $\phi 0.5$ mm、Biospec Products Inc.) を用いて乳鉢ですり潰し乳剤化した。乳剤を 3 回凍結融解後、RK-13 細胞を用いたブラックアッセイ法でウイルス含量を測定した。

g) SCID マウス腹腔内投与実験

【使用ウイルス】

LC16m8 株は、化血研で製造したワクチン液を使用した。LC16m0 株と Lister Original (L0) 株は、千葉県血清研究所より入手し化血研で培養したものを使用した。

【使用動物】

SPF/VAF マウス (生後 6 週齢、雌、C. B-17/ Icr Crj-scid/ scid) を日本チャールスリバー株式会社 (横浜市、神奈川県) から購入した。

#### 【接種】

SCID マウスはピクリン酸によりマーキングを行い個体識別した。希釈して  $10^{7.3}$  PFU/mL または  $10^{5.6}$  PFU/mL に調製した各検体を 0.5mL ずつ、1 群 5 匹の SCID マウスに腹腔内接種した。

#### 【評価】

接種後 28 日間観察し、観察 28 日目における生存率及び平均生存期間 (日) を算出した。観察期間中、表 1 に示すスコア基準を用いて各個体の症状を評価し、各観察日における検体接種群毎のスコア合計を算出した。また、観察 6 日目から 3 日 (一部 4 日) 間隔で体重測定し、各測定日の検体接種群毎の体重平均を算出し、測定開始日 (観察 6 日目) の平均値を基準とする変化率を算出した。

表 1 : スコア基準

スコア	症状内容
0	症状無し
1	毛並みの乱れ、発疹 挙動不安
2	逆毛、発痘 (化膿無し)
3	発痘 (化膿あり)、脱毛、 うずくまり、脱力
4	麻痺、飛び跳ね 異常行動 (ふらつき等)
5	死亡

### C. 研究結果

#### a) ブラックサイズ測定実験

Lister 株、LC16m0 株及び LC16m8 株各株のブラックサイズの平均値/標準偏差は、  
4.00/0.72、2.01/0.62、0.46/0.15 (mm)

であった。(図 1、2)

#### b) ウサギ皮膚刺激性実験

生後 13 週 (体重 2.5~3.2kg) のウサギ (JW、♂) を用いて、化血研製造ロット (LC16m8)、LC16m8 株の直接の親株である LC16m0 株及びワクシニアウイルスである Lister Original (L0) 株の皮膚増殖性を評価した。

表 2 に示すように、LC16m8 については、化血研製造 Lot V01 接種群が  $10^{4.2}$ PFU、化血研製造 Lot LC0315 接種群が  $10^{4.5}$ PFU であった。LC16m0 接種群は  $<10^{1.0}$ PFU であった。L0 接種群は  $10^{1.0}$ PFU であった。以上のように、LC16m8 接種群の  $ErD_{50}$  値は LC16m0 及び L0 接種群よりも、 $10^3$  倍以上高いことが確認された。

#### c) 成熟マウス脳内投与実験

図 3 に示すように、観察 21 日目の生存率については、L0 接種群が 2/6、LC16m0 接種群が 4/5 であったのに対して、LC16m8 接種群では死亡は無く 5/5 であった。観察 21 日目の平均生存期間については、L0 接種群が 10 日、LC16m0 接種群が 17.6 日であったのに対して、LC16m8 接種群では死亡は無く  $>21$  日であった。LC16m8 接種群の平均生存期間は L0 接種群よりも統計上有意に長かった。

#### d) 幼若マウス脳内投与実験

図 4 に示すように、観察 21 日目の生存率については、L0 接種群が 1/10、LC16m0 接種群が 1/10 であったのに対して、LC16m8 接種群では 7/10 であった。LC16m8 接種群の生存率は L0 接種群よりも統計上有意に高かった。観察 21 日目の平均生存期間に

については、L0 接種群が 6.3 日、LC16m0 接種群が 6.1 日であったのに対して、LC16m8 接種群では 17.1 日であった。LC16m8 接種群の平均生存期間は L0 接種群よりも統計上有意に長かった。

#### e) 幼若マウス脳内投与 LD50 測定

表 3 に示すように、L0 接種群では  $10^{1.6}$  PFU であったのに対して、LC16m8 接種群では  $10^{5.0}$  PFU であり、両者の LD<sub>50</sub> 値には  $10^3$  以上の差があった。

#### f) サル脳内投与実験

一般状態観察の結果については、表 4 に示すように、L0 接種群では 6 例中 3 例が接種後 3、5、8 日目にそれぞれ死亡し、他の 3 例は接種後 14 日目まで生存したが、いずれの動物にも右側手肢の麻痺がみられた。一方、LC16m8 接種群ではいずれの動物においても、死亡及び手足の麻痺等の異常は認められなかった。

剖検の結果については、表 5 に示すように、L0 接種群では死亡した 1 例に硬膜の脳への癒着が認められた。他の動物には異常はなかった。一方、LC16m8 接種群ではいずれの動物においても、異常は認められなかった。

ウイルス分離の結果については、表 6、表 7 に示すように、L0 接種群のうち、死亡した 3 例では、脳由来組織からは  $10^{4.1} \sim 10^{6.2}$  PFU/g のウイルスが、脊髄由来組織からは  $10^{5.8} \sim 10^{6.6}$  PFU/g のウイルスが検出された。心臓由来組織からはウイルスは検出されなかった。また、生存した 3 例では、いずれの組織からもウイルスは検出されなかった。一方、LC16m8 接種群では、脳、脊髄及び心臓由来のいずれの組織においても、ウイル

スは検出されなかった。

#### g) SCID マウス腹腔内投与実験

図 5 に示すように、観察 28 日目における生存率については L0 接種群及び LC16m0 ( $10^7$  PFU) 接種群では 0/5 であり、LC16m0 ( $10^{5.3}$  PFU) 接種群では 3/5 であったのに対し、LC16m8 接種群では観察終了時まで死亡例は無く 5/5 であった。

平均生存期間については、L0 接種群で 14 日、LC16m0 ( $10^7$  PFU) 接種群で 18.2 日、LC16m0 ( $10^{5.3}$  PFU) 接種群で 26.4 日であったのに対し、LC16m8 接種群では  $\geq 28$  日であった。

各検体接種群の体重変化については、図 6 に示すように、L0 接種群及び LC16m0 ( $10^7$  PFU) 接種群では測定開始日以降徐々に体重減少がみられ、最終的に減少率は約 30% に達した。LC16m0 ( $10^{5.3}$  PFU) 接種群では測定 9 日目から徐々に体重減少がみられ、最終的に減少率は約 20% に達した。一方、LC16m8 接種群では Vehicle 接種群と同様に順調に体重が増加した。

各検体接種群の症状変化については、図 7 に示すように、L0 接種群、LC16m0 ( $10^7$  PFU) 接種群及び LC16m0 ( $10^{5.3}$  PFU) 接種群では接種後早期に症状が現れ、症状の進行も速かった。一方、LC16m8 接種群では観察期間の終盤に 1 例で症状が認められた。

#### D. 考察

痘そうワクチンの LC16m8 株のブラックサイズは、LC16m8 を CAM でのサイズの選択によるクローン樹立と同様に、Lister 株より 1/10 と小さかった。一方、最近の研究においては、ワクチニアウイルスに関する多くの細胞レベルでの評価研究や、遺伝子

レベル、蛋白レベルでの研究が盛んに行われている。今後 LC16m8 株の物性に関しても、遺伝的表現型、細胞感受性、遺伝子解析、抗原性・免疫原性に関する研究が必要である。

動物を用いた安全性評価実験においては、ウサギ皮膚刺激性実験結果及びサル脳内投与実験結果は、LC16m8 株樹立時に検討された結果と同様であった。また、今回新たに成熟マウス脳内投与実験、幼若マウス脳内投与実験、SCID マウス腹腔内投与実験を実施し、LC16m8 株の高い安全性成績を得た。特に SCID マウス腹腔内投与実験は、生ワクチンの接種禁忌である免疫抑制状態の患者に対する安全性を示唆するものであり、更なる検討が必要と考える。例えば、近年患者が増大しているアトピーや湿疹患者において、免疫抑制剤の使用が行われていることから、このような動物実験モデルでの研究は、本ワクチン LC16m8 の使用を想定した場合、必要である。

最近の研究では、マウス、ウサギ、サルを用いた有効性動物実験が多く発表されている。本ワクチン LC16m8 においても免疫原性、感染防御、免疫の機序に関する研究が必要である。

#### E. 結論

痘そうワクチンは、昭和 55 年度を最後に製造が行われていなかった。今回、平成 14 年に財団法人 化学及血清療法研究所が製造承認を承継し、平成 15 年に財団法人 化学及血清療法研究所において製造したロットを用いて、過去取得された安全性動物実験を実施した結果、同様な安全性が高いことを示す成績が得られた。

#### F. 健康危険情報

特に無し。

#### G. 研究発表

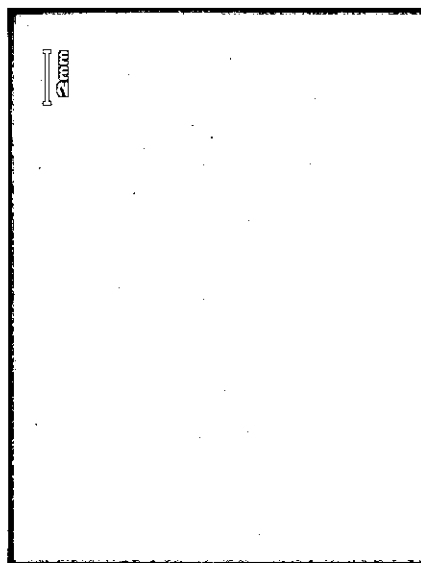
特に無し。

#### H. 知的財産の出願・登録状況

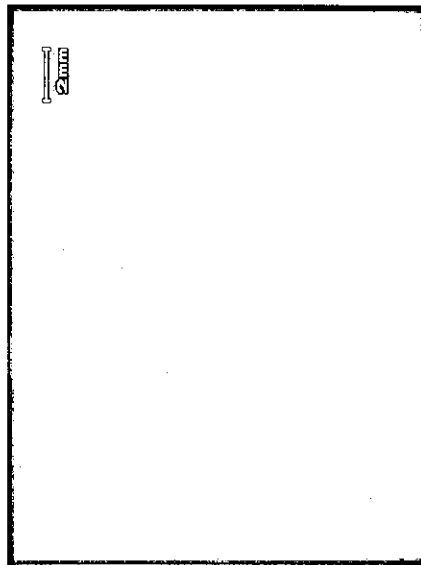
特に無し。

以上

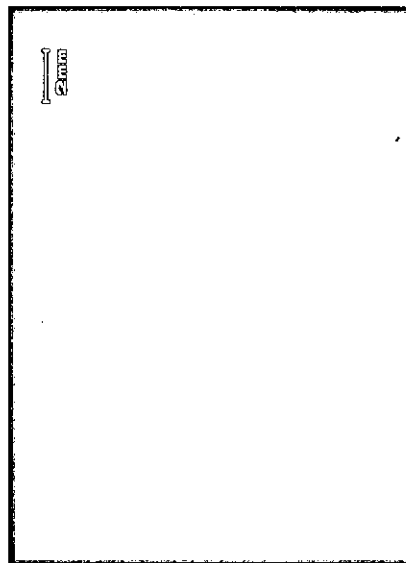
**図1: RK-13 assay におけるブラックサイズ**



**LO**



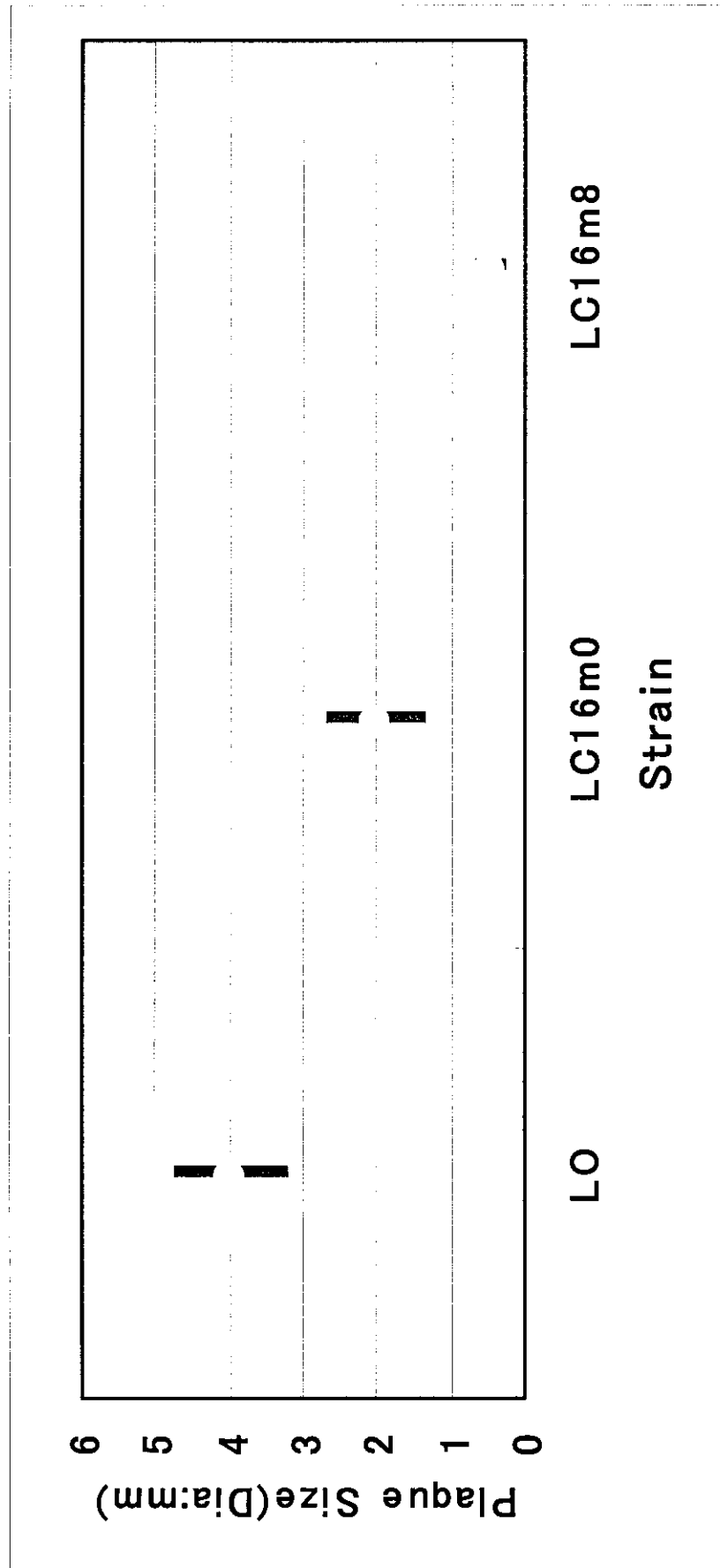
**LC16m0**



**LC16m8**



**図2: RK-13 assay におけるプラックサイズ**



**表2:Result of Rabbit Local Tolerance Test**

---

<b>Strain</b>	<b>LC16m8</b>	<b>LC16m0</b>	<b>LO</b>
---------------	---------------	---------------	-----------

---

<b>Lot No.</b>	<b>V01</b>	<b>LC0315</b>
----------------	------------	---------------

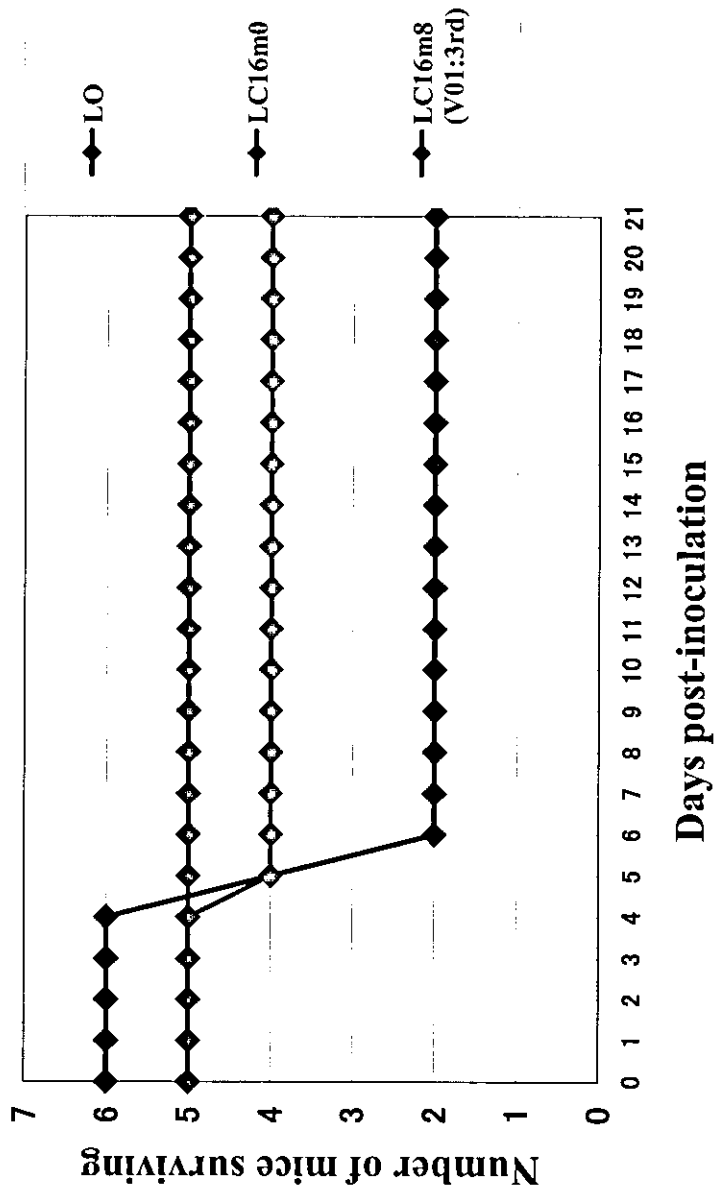
---

<b>*ErD<sub>50</sub></b>	<b>4.2</b>	<b>4.5</b>	<b>&lt;1.0</b>	<b>1.0</b>
--------------------------	------------	------------	----------------	------------

---

**\*ErD<sub>50</sub> = 10<sup>n</sup> PFU**

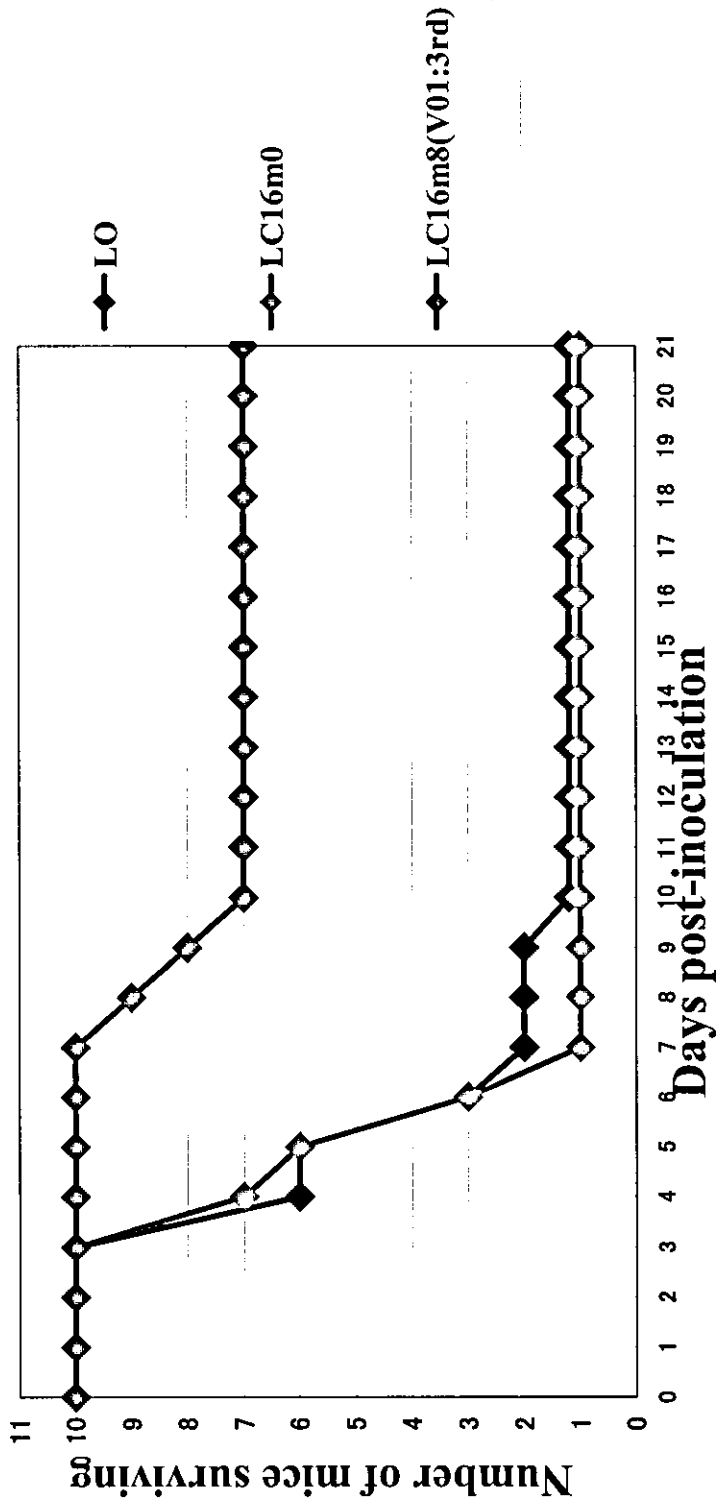
### Figure 3: Result of Adult Mice Neurovirulence Test



Strain	Survival Ratio	Mean Survival Time (days)
LO	2/6	10
LC16m0	4/5	17.6
LC16m8, Lot V01	5/5	>21

P = 0.0311

## 4: Result of Suckling Mice Neurovirulence Test



Strain	Survival Ratio	Mean Survival Time (days)
LO	1/10	6.3
LC16m0	1/10	6.1
LC16m8, Lot V01	7/10	17.1

$P = 0.0198$  (comparing LO and LC16m0)  
 $P = 0.0010$  (comparing LO and LC16m8, Lot V01)

**表3：Suckling Mouse Neurovirulence LD<sub>50</sub> Test**

Strain	Inoculation (log <sub>10</sub> PFU/mouse)	Mortality	Lethal Dose <sub>50</sub> (log <sub>10</sub> PFU)
LO	3.3	10/10	1.6
	2.3	7/10	
	1.3	5/10	
LC16m8 (V01)	5.3	6/10	5.0
	4.3	2/10	
	3.3	0/10	

**表4: General observation**

<b>Strain</b>	<b>Test Animal</b>	<b>General Health (Death)</b>	<b>Clinical Symptoms</b>
<b>LO</b>	<b>6 (female)</b>	<b>3/6</b>	<b>4/6</b>
<b>LC16m8 (Lot V01)</b>	<b>6 (female)</b>	<b>0/6</b>	<b>0/6</b>

**表5: Autopsy**

Inoculated substance	Inoculated volume (virus load)	Results		<Comparative data> Dr.Morita's report (1974)
		Dead monkeys	Survived monkeys	
Lister Original (n=6)	$2 \times 10^7$	Adhesion of meninges (1/3)	Normal	Dead monkeys Hyperplasia of meninges Increase of cerebrospinal fluid
LC16m8 (Lot V01) (n=6)	$2 \times 10^7$	None	Normal	Not information

**表6: Results of Virus Isolation (LC16m8)**

		Animal #						
		1	2	3	4	5	6	
Virus recovery from	Clinical symptoms	None	None	None	None	None	None	
	Brain	Parietal lobe (Right)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		Parietal lobe (Left)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Spinal cord	Plexus choroideus (Right)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		Plexus choroideus (Left)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		Meningis	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Heart	Regiones cervicales ampulla	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		Regiones lumbalis ampulla	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		Ventricle	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Pericardial membrane	Atrial	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		Pericardial membrane	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND : not detectable

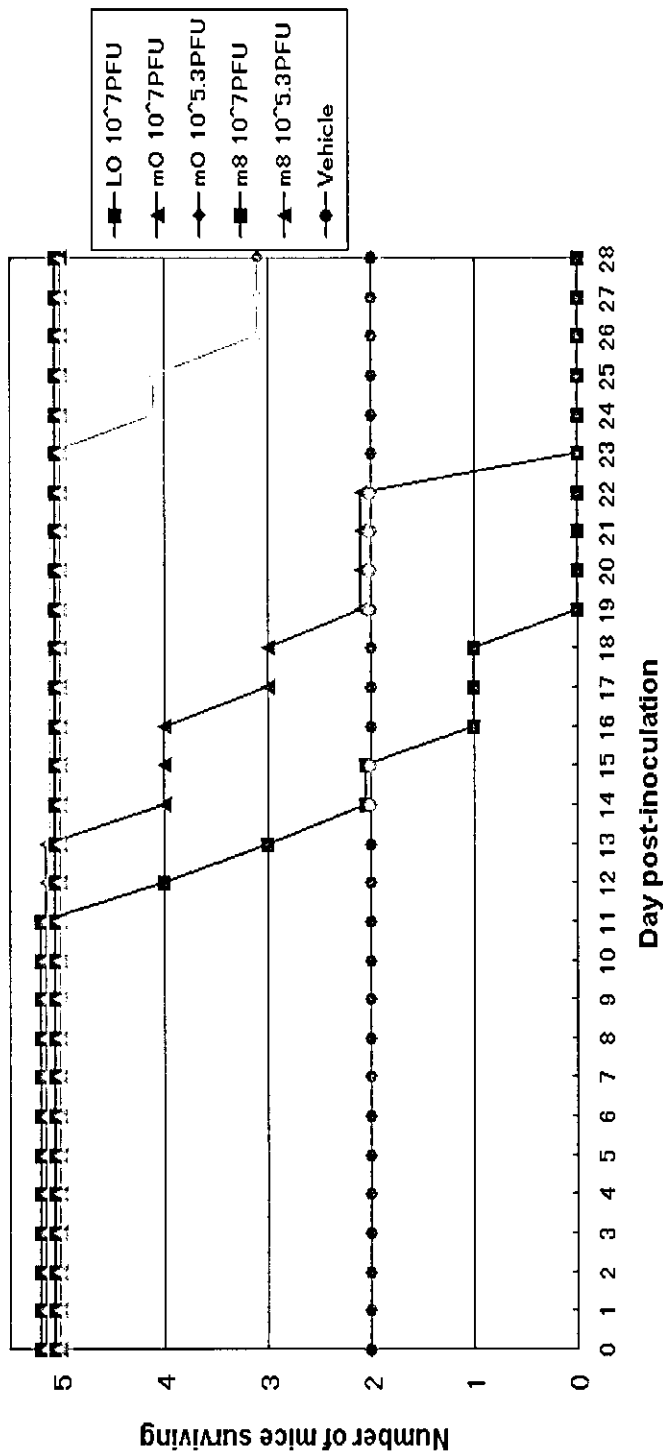


## 表7 : Results of Virus Isolation (LO)

		Animal #						
		7	8	9	10	11	12	
Virus* recovery from	Clinical symptoms	Dead on the 8th day P.I.	Dead on the 5th day P.I.	Paralysis on the 5-14th day P.I.	Paralysis on the 6-12th day P.I.	Paralysis on the 6-14th day P.I.	Dead on the 3rd day P.I.	
		6.1	5.4	ND	ND	ND	4.4	
	Brain	Parietal lobe (Right)	6.0	5.0	ND	ND	ND	4.5
		Parietal lobe (Left)	5.3	4.1	ND	ND	ND	4.4
		Plexus choroideus (Right)	4.1	5.4	ND	ND	ND	4.5
		Plexus choroideus (Left)	6.2	4.7	ND	ND	ND	4.5
	Spinal cord	Meningis	6.2	5.8	ND	ND	ND	6.2
		Regiones cervicales ampulla	6.6	6.1	ND	ND	ND	6.2
	Heart	Regiones lumbalis ampulla	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		Ventricle	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		Atrial	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		Pericardial membrane	ND	ND	ND	ND	ND	ND

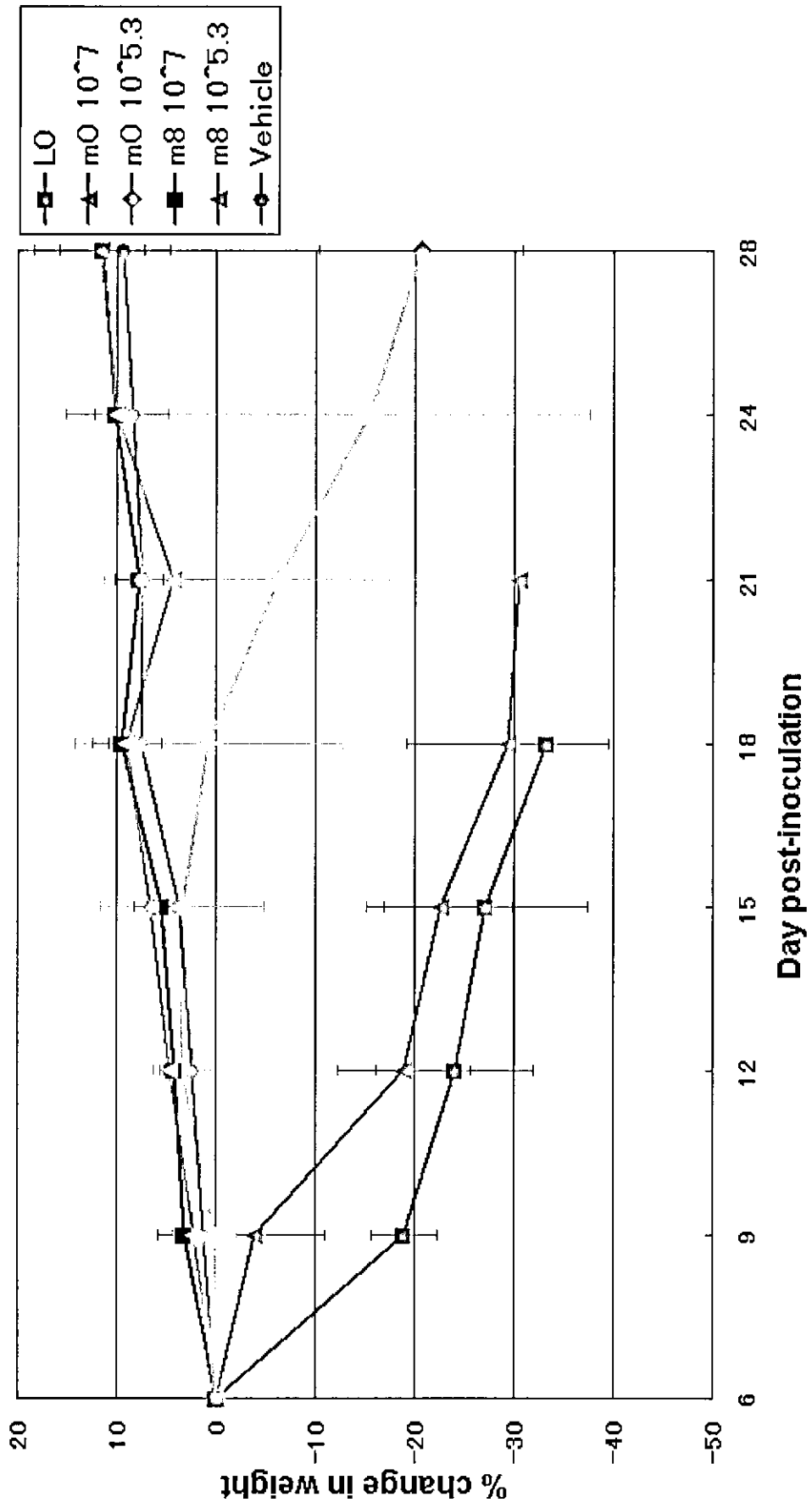
\* : Virus titer/tissue (log10 PFU/g), ND : not detectable, P.I. : post inoculation

## Figure 5: Survival rate and Mean survival duration

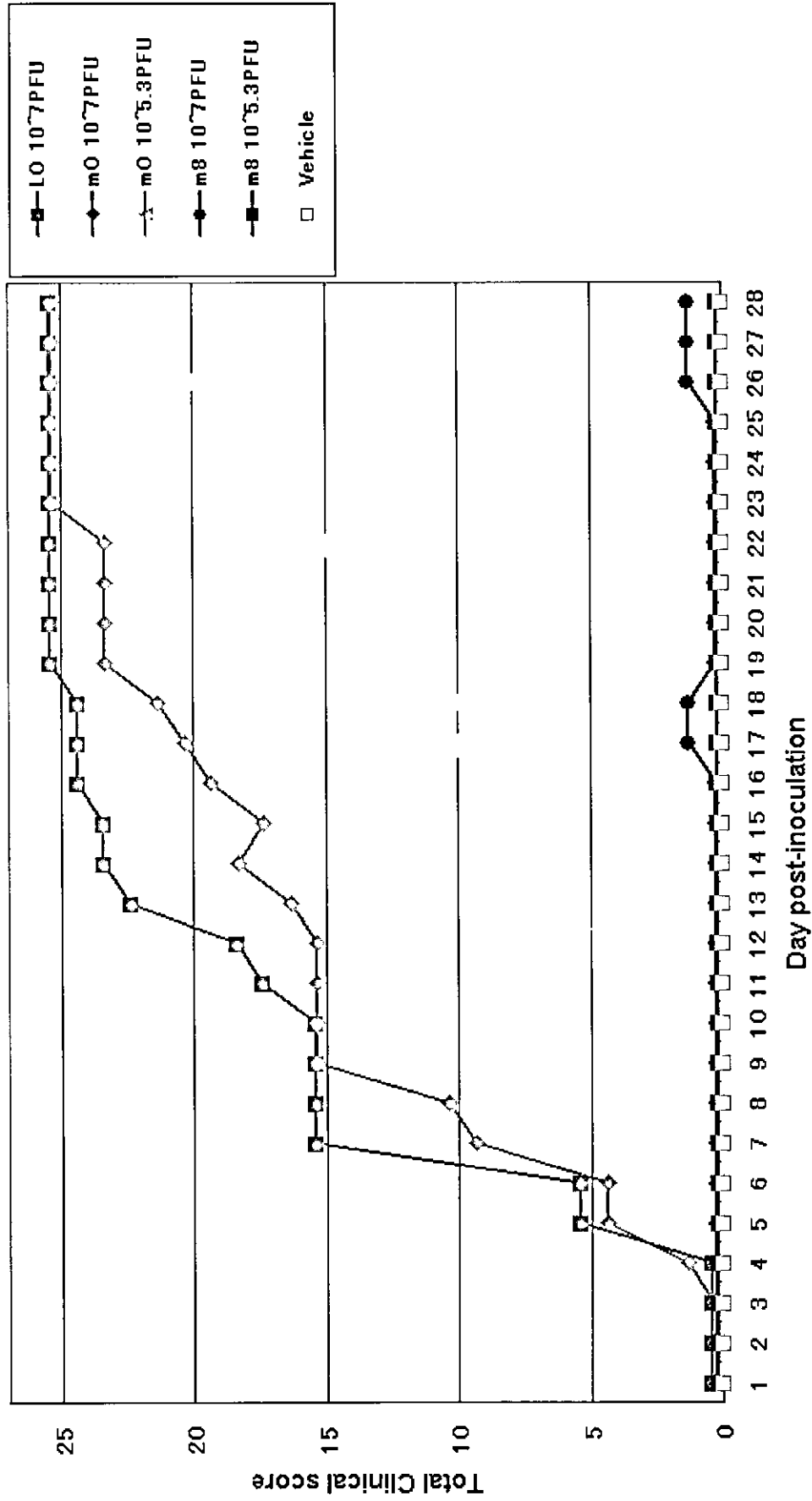


Strain	Dose (log <sub>10</sub> PFU)	Survival Rate	Mean Survival Time (days)
LO	7	0/5	14
LC16mO	7	0/5	18.2
	5.3	3/5	26.4
LC16m8	7	5/5	>28
	5.3	5/5	>28
Vehicle	-	2/2	>28

**Figure 6: Percentage Change in Weight**



## Figure 7: Clinical symptoms



Each groups total clinical score is the sum of each animal's highest score.