

厚生労働科学研究費補助金

国際健康危機管理ネットワーク強化研究事業

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

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大隈 邦夫

平成18（2006）年 3月

平成17年度厚生労働科学研究費補助金

国際健康危機管理ネットワーク強化研究事業

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

平成17年度 研究組織

主任研究者（班長）

大隈邦夫 財団法人 化学及血清療法研究所 品質管理部長

分担研究者

倉根一郎 国立感染症研究所 ウイルス第一部長

佐多徹太郎 国立感染症研究所 感染病理部長

森川 茂 国立感染症研究所 ウイルス第一部 第一室長

金谷泰宏 防衛医科大学校防衛医学研究センター 助教授

高瀬凡平 防衛医科大学校防衛医学研究センター 助教授

横手公幸 財団法人 化学及血清療法研究所 第一製造部 主任部員

研究協力者(順不同)

倉田 毅 国立感染症研究所 所長

堀内義信 国立感染症研究所 細菌第二部第五室長

西條政幸 国立感染症研究所 ウイルス第一部 主任研究官

緒方もも子 国立感染症研究所 ウイルス第一部 主任研究官

網 康至 国立感染症研究所 動物管理室 主任研究官

長谷川秀樹 国立感染症研究所 感染病理部第二室長

永田典代 国立感染症研究所 感染病理部 主任研究官

佐藤由子 国立感染症研究所 感染病理部

斉藤智也 ジョンスホプキンス大学

藤井達也 自衛隊中央病院 内科

松村琢也 自衛隊阪神地区病院

橋爪 壯 千葉大学 名誉教授

平山宗宏 社団法人 恩賜財団母子愛育会 日本子供家庭総合研究所長

船津昭信 財団法人 化学及血清療法研究所 所長・理事長

田代 昭 財団法人 化学及血清療法研究所 常務理事

岡 徹也 財団法人 化学及血清療法研究所 常務理事

寺野 剛 財団法人 化学及血清療法研究所 第一製造部長

倉永雅彦	財団法人	化学及血清療法研究所	第一製造部第二課長
志垣隆通	財団法人	化学及血清療法研究所	病理部次長
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 主任部員
久米田幸介	財団法人	化学及血清療法研究所	品質管理部長付
土山浩文	財団法人	化学及血清療法研究所	品質管理部長付
上田謙二	財団法人	化学及血清療法研究所	第一製造部長付
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
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
熊丸哲也	財団法人	化学及血清療法研究所	第一製造部第二課
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
佐藤 梓	財団法人	化学及血清療法研究所	第一製造部長付
永井千草	財団法人	化学及血清療法研究所	第一製造部長付

## 目 次

### I. 総括研究報告

- 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 -- 1  
主任研究者 大隈 邦夫

### II. 分担研究報告

1. 高度弱毒化細胞培養痘そうワクチン(LC16m8)は霊長類カニクイザル  
におけるサル痘の発症を防止する ----- 10  
倉根 一郎
2. 細胞培養痘そうワクチンLC16m8株の温度感受性に関する研究  
----- 17  
森川 茂
3. 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  
----- 25  
佐多 徹太郎
4. 天然痘ワクチンLC16m8の安全性及び有効性の評価について  
----- 28  
金谷 泰宏、高瀬 凡平
5. 先行研究のレビュー及び基礎的研究(国内研究の状況) ----- 33  
横手 公幸
6. LC16m8の生産方法の検討 ----- 56  
横手 公幸
7. 有効性の維持の基礎的検討 ----- 66  
横手 公幸、森川 茂

- III. 資料 ----- 79

平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金  
(国際健康危機管理ネットワーク強化研究事業)

総括研究報告書

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

主任研究者：大隈 邦夫 (財) 化学及血清療法研究所 品質管理部長

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、すぐに定期接種が中止されたことから、広く使われることなく、保管されていた。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 は生産再開が必要となり、本研究では、痘そうワクチンの品質向上及び生産方法の研究並びに安全性及び有効性に関する研究を行い、以下の結果を得た。

- 1) サル痘ウイルス感染霊長類モデルとして、カニクイザルに  $10^6$  PFU (plaque forming unit) のサル痘ウイルス Liberia 株を、経鼻的噴霧法で感染させ、感染性ウイルス血症レベル、Light Cycler-PCR によるウイルスゲノム血症の定量、臨床症状を調べ、LC16m8 の 1 回接種免疫サル群でサル痘の発症は完全阻止され、その効果は LC16m8 の親株である Lister 株 1 回接種とほぼ同等であった。
- 2) LC16m0 株の温度感受性の安定性、責任遺伝子のマッピング等に関して解析した結果、LC16m0 株は、非許容温度では感染早期にアポトーシスを誘導すること、温度感受性のリバータントはできないことが明らかになった。また、温度感受性の責任遺伝子が複数存在することが示唆された。
- 3) 痘そうウイルス脳内接種後のカニクイザルの中枢神経系組織について追加検索を行った結果、Lister 株脳内接種後に瀕死となったカニクイザルの中枢神経系組織の髄膜において線維性肉芽組織の形成を伴う激しい髄膜炎が認められ、ウイルス抗原陽性細胞は血管内皮細胞、線維芽細胞であると推察され、神経細胞におけるウイルス増殖は確認されなかった。一方、LC16m8 株接種群では中枢神経系にウイルス抗原は検出されなかった。
- 4) 痘そうワクチン LC16m8 は、成人においてもその安全性が高いことが示された。有効性は、未接種世代に対する接種において善感率 94.4% と高い値を示し、中和抗体価においても 93% に陽転が認められた。
- 5) 生ワクチンの接種禁忌対象である免疫不全患者又は免疫抑制療法を受けている患者を想定して、免疫不全 SCID マウス又は免疫抑制剤サイクロスポリン A (CsA) 投与マウスを用いて評価を行い、痘そうワクチン LC16m8 の安全性を確認した。また、ワクシ

ニアウイルス WR 感染防御マウス実験を実施し、有効性を確認した。

- 6) 痘そうワクチン LC16m8 の生産性向上に関して、ウイルス吸着条件、ハーベストタイミング等の工程条件について検討を行った。
- 7) 有効期限の延長の基盤となる精度を有する品質試験成績を蓄積することを目的として、予備的検討を行い、原液においては、24 ヶ月までの安定性を確認した。また、長期的に安定した力価試験の実施が望まれる為、ブラック法を用いた力価試験に関する検討を行い、分析法バリデーションを実施し、現行のボック法と同等以上の精度を有していることを確認した。

分担研究者：

倉根一郎

国立感染症研究所ウイルス第一部部長

佐多徹太郎

国立感染症研究所感染病理部部長

森川 茂

国立感染症研究所ウイルス第一部第一室長

金谷泰宏

防衛医科大学校防衛医学研究センター

助教授

高瀬凡平

防衛医科大学校防衛医学研究センター

助教授

横手公幸

(財)化学及血清療法研究所第一製造部主任部員

#### A. 研究目的

本研究では、製造再開されている痘そうワクチン LC16m8 のロットの品質・安全性評価と、生産性の向上の研究並びに臨床的安全性及び有効性に関する研究をすることを目的とする。このためには、国内外の痘そうワクチン及びワクシ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とともに、安全性と有効性に関する成績を得ることが重要である。

LC16m8 の有効性を、LC16m8 が霊長類におけるサル痘の発症を阻止するか否かを検討し、LC16m8 のヒトでの天然痘の発症阻止力を検討することは重要である。

安全性評価においては、痘そうウイルスの中枢神経系組織への病理学的検査並びにウイルス検査による影響の評価、また抑制療法を受けている患者等を想定した免疫不全 SCID マウス又は免疫抑制剤サイクロスポリン A(CsA) 投与マウスを用いた評価を行う。加えて、人での使用実績に基づく調査解析が重要である。有効性評価に関しては、マウスやサルなどの動物を用いた感染防御阻止実験並びに人での使用実績に基づく調査解析が重要である。生産性の向上に関しては、現在製造法が生産効率の点で改善・改良すべき各条件に関する研究を行う。

また、ワクチンの有効な保存方法と有効期限についての知見により、長期的なワクチン備蓄戦略に資する基礎資料を得ることが期待される。

#### B. 研究方法

a) サル痘ウイルス感染霊長類モデル

Lister 株免疫サル群と LC16m8 株免疫サル群を各々カニクイザル (*Macaca fascicularis*) 3 頭づつ、あらかじめ二股針を用いて Lister 株または LC16m8 株を右上腕に接種した。非免疫サル群を 2 頭とした。免疫後 5 週間目に  $10^6$  PFU の Liberia 株を鼻腔内接種した。チャレンジウイルス接種後、毎日、食餌摂取量、飲水量、活動性、便性状を観察し、2-4 日おきに麻酔下で体重、体温を測定し、さらに採取した。ウイルス血症、ウイルスゲノム血症、血中サイトカイン、病理学的解析、抗体検出の各検査を行った。

b) 温度感受性に関する研究

LC16m0 株および Liser 株を Vero E6 細胞で  $40.5^{\circ}\text{C}$  で培養、ウイルス回収した後、Vero E6 細胞で  $35^{\circ}\text{C}$  で増殖させた。これを繰り返し 5 回行った。Apo Percentage キットを用いて Apoptosis の解析を行った。Vero E6 細胞に感染させ  $35^{\circ}\text{C}$ 、 $41^{\circ}\text{C}$  で培養し 25 時間後に細胞を固定して電子顕微鏡によりウイルス粒子形成を解析した。責任遺伝子部位のマッピングを行った。

c) 痘そうウイルス脳内接種後のカニクイザルの中枢神経系組織検査

サル神経毒力試験に供した動物のうち、Lister 株接種群の死亡例 3 頭と生存 1 例、および LC16m8 株接種群 2 例 (いずれも生存) から摘出した脳・脊髄、心、脾、肝のパラフィン包埋ブロックを固定後、パラフィン包埋切片を作製した。脱パラフィン後、一部はヘマトキシリン・エオ

ジン染色あるいはクリューバー・バレラ染色 (脳・脊髄のみ) を実施した。ウイルス抗原を検出のために、抗ワクシニアウイルスウサギ血清を用いた免疫組織化学染色を行った。

d) 正常健康人への痘そうワクチン LC16m8 使用実績評価

LC16m8 を接種した正常健康人の接種前後の中和抗体価を測定するとともに、その副作用の発生について、各世代毎に分けて検討を行った。

e) マウスを用いた安全性・有効性評価

1. SCID マウス Scarification 接種実験

LC16m8 ワクチン液、及び Lister 株を希釈して  $10^8$  PFU/mL に調製した各検体を 1 群 10 匹の SCID マウスに二又針 (NVI 社製、オランダ) を用いて、尻尾の付根に 15 回乱切接種 (scarification) した。

接種後 45 日間観察し、観察 45 日目における生存率及び平均生存期間 (日) を算出した。

2. CsA 投与マウス腹腔内接種実験

C57BL/6 マウスに CsA を実験検体接種前日から接種後 14 日目まで毎日、25 又は  $50\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$  の条件で、マウスの頸背部に皮下投与した。LC16m8 ワクチン液、及び Lister 株を希釈して  $10^8$  PFU/mL に調製した各検体  $0.5\text{mL}$  を、1 群 6 匹の CsA 投与マウスに腹腔内接種し、観察 14 日間の体重減少と臨床症状を観察した。

3. マウス WR チャレンジ実験

1 群 5 匹の BALB/c マウスに LC16m8 ワクチン液及び Lister 株を希釈して  $10^{7, 8, 9}$  PFU/mL 又は、 $10^{5, 6, 8, 9}$  PFU/mL に調製した各検体を二又針(NVI 社製、オランダ)を用いて、尻尾の付根に 15 回乱切接種 (scarification)した。免疫 3 週間後に、麻酔下で、 $10^6$  PFU のワクシニアウイルス Western Reserve (vv-WR) 株を鼻腔内接種した。チャレンジ後 14 日間観察し、観察 14 日目の生存率と平均生存期間 (日) を算出した。

#### f) 製造法の条件検討

##### 1. 細胞基質と温度感受性の関連性検討

25 cm<sup>2</sup>カルチャーフラスコに各細胞を培養し、 $2 \times 10^5$  PFU/mL に調製した LC16m8 株を 1 mL ずつ接種した。37°C で約 1 時間吸着させた後、ウイルス維持培地 (3%FBS 添加 MEM 培地) で 3 回洗浄し、ウイルス維持培地を 6 mL 添加したものを 35°C、37°C または 39°C で 4 日間培養した。培養後、凍結融解によりウイルスを回収した。回収したウイルスは、RK-13 細胞を用いたブラックアッセイ法によりウイルス力価を測定した。

##### 2. 吸着温度の影響

25 cm<sup>2</sup>カルチャーフラスコに各細胞を培養し、 $2 \times 10^5$  PFU/mL に調製した LC16m8 株を 1 mL ずつ接種した。37°C または 40°C で約 1 時間吸着させた後、ウイルス維持培地 (3%FBS 添加 MEM 培地) で 3 回洗浄し、ウイルス維持培地を 6 mL 添加したものを 37°C で 4 日間培養した。培養後、凍結融解によりウイルスを回収した。回収したウイルスは、RK-13 細胞を用いたブラックアッセイ法によりウイルス力価を測定した。

##### 3. ウイルスハーベストのタイミングの検討

850 cm<sup>2</sup>ローラーボトルにウサギ初代腎細胞を培養し、 $1 \times 10^7$  PFU/mL に調製した LC16m8 株を 10 mL ずつ接種した。30°C で 1~2 時間吸着させた後、ウイルス維持培地を 90 mL 添加したものを 30°C で 4 日間培養した。培養開始から 48、69、74、79、93 時間後に観察を行い、顕微鏡下の CPE の状態を撮影し、各 CPE の数をカウントした。

##### 4. 吸着工程の有無

490 cm<sup>2</sup>ローラーボトルに培養した PRK 細胞に、 $8.3 \times 10^6$  PFU/mL に調製した LC16m8 株を 6 mL ずつ接種した。吸着を行わないものはただちに 54 mL の維持培地を追加し、30°C で培養を開始した、吸着を行うものは、30°C で約 2 時間吸着させた後、維持培地を 54 mL 追加し、30°C で培養を開始した。3 日間培養後、強く振とうすることにより細胞を剥がし、遠心により細胞と培養上清を分離した。約 1 割の培養上清に細胞を浮遊させ、ピペッティング後に凍結を行った。その後、凍結融解によりウイルスを回収した。培養開始から 33 時間後、55 時間後、及び 73 時間後に観察を行い、顕微鏡下の CPE の状態を撮影し、各 CPE の数をカウントした。

#### g) 安定性に関する予備検討

##### 1. 乾燥細胞培養痘そうワクチンの保存安定性試験

痘そうワクチンの 3 ロット (Lot No. V03、V04、V06) を -20°C ~ -35°C で保管した。保



存 3 ヶ月目は性状確認試験、含湿度試験、力価試験を測定した。力価試験に関しては、安定性試験の途中で試験法変更の可能性が あることから、ポック法及びブラック法両方で測定した。

## 2. 原薬の安定性実験

実際の保存条件である $-80^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ とそれより過酷な条件である $-20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ での安定性を確認するために、それぞれ 2 ロットの原薬を用いて比較検討した。

## 3. ブラック法とポック法の比較実験

参照細胞培養痘そうワクチン（参照品）及び痘そうワクチン 3 ロット (Lot No. V03、V04、V05) について、ふ化鶏卵の漿尿膜上接種による生物学的製剤基準に沿った測定法（ポック法）とウサギ腎由来の株化細胞である RK-13 細胞を用いたブラック法の結果について解析を行った。

## 4. ブラック法の分析法バリデーション

薬審第 755 号審査課長通知「分析法バリデーションに関するテキスト」に従いパラメータを選択し、ブラック法の分析法バリデーションを実施した。

## 5. 小分け材料の安定性評価

小分け製品の 1 次容器であるバイアル瓶とゴム栓（ブチルゴム）について、超低温 ( $-20^{\circ}\text{C}$  及び  $-80^{\circ}\text{C}$ )・長期保存条件における安定性の検討を行った。併せて、ガラスアンンプル化の検討にも着手した。

## 6. 小分剤の安定性評価

旧千葉県血清研究所製造の痘そうワクチン (Lot No. 2 及び No. 3) について、安定性

評価に着手した。

## C. 研究結果

### a) サル痘ウイルス感染霊長類モデル

本モデルにおいて、LC16m8 の霊長類におけるサル痘発症阻止力を、その親株である Lister と比較して検討した。非免疫サル群では、比較的症状が軽度ではあるが典型的なサル痘を発症し、さらに呼吸器（鼻咽腔、喉頭、肺臓）にサル痘ウイルスによる肉芽腫性病変や破壊性病変が出現していた。また、末梢血液検査において白血球減少は血小板減少が認められた。IL-6 および IFN- $\gamma$  の上昇も認められた。これら異常所見は、LC16m8 または Lister 免疫サル群においては全く認められなかった。つまり、LC16m8 は Lister 株と同様に霊長類においてサル痘発症を完全に阻止することが確かめられた。

### b) 温度感受性に関する研究

LC16m0 株の温度感受性の安定性、責任遺伝子のマッピング等に関して解析した結果、LC16m0 株は、非許容温度では感染早期にアポトーシスを誘導すること、温度感受性のリバータントはできないことが明らかになった。また、温度感受性の責任遺伝子が複数存在することが示唆された。

### c) 痘そうウイルス脳内接種後のカニクイザルの中枢神経系組織検査

ワクチン脳内接種後のカニクイザルの中枢神経系組織について病理学的、免疫組織学的にウイルスの局在と病変について

追加検討を行った。ポックスウイルスは上皮細胞における増殖が電子顕微鏡学的にも確認されている。今回のLister株接種動物における髄膜炎組織の免疫組織化学染色結果から、脳内接種後に形成される髄膜炎はウイルス増殖の結果、形成されたものであり、ウイルス抗原陽性細胞は血管内皮細胞、線維芽細胞であると推察された。今回、神経細胞におけるウイルス増殖は確認されなかった。

#### d) 正常健康人への痘そうワクチンLC16m8使用実績評価

LC16m8ワクチンは、成人においても高い善感率が得られた。また、副反応については、小児と同様に腋下リンパ節腫脹が高い頻度で認められた。一方、皮膚における局所の反応については、やや弱い傾向にあった。

#### e) マウスを用いた安全性・有効性評価

##### 1. SCIDマウスScarification接種実験

生存率についてはLister接種群では0/10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10/10であった。

平均生存期間については、Lister接種群で33.2日であったのに対し、LC16m8接種群では>45日であった。LC16m8接種群の平均生存期間はLister接種群よりも統計上有意に長かった。

##### 2. CsA投与マウス腹腔内接種実験

サイクロスポリンA(CsA)を投与したマウスは、CD4陽性T細胞及びCD8陽性T細胞が約

20%減少していた。

症状変化については、Lister接種群では特徴的な症状(発疹及び発痘)が確認され、CsA投与マウスでは、非投与マウスと比較して症状の悪化が確認された。一方、LC16m8接種群では症状は全く確認されなかった。

体重変化については、CsA 50mg/kgを投与したLister接種群で観察期間後半に10%程度の体重減少が確認されたが、他の接種群では体重減少は確認されなかった。

#### 3. マウスWRチャレンジ実験

生存率については非免疫群では0/5であったのに対し、LC16m8免疫群ではいずれの免疫量においても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、非免疫群で6.2日又は5日であったのに対し、LC16m8免疫群ではいずれの免疫量においても>14日であった。LC16m8免疫群の平均生存期間は、非免疫群よりも統計上有意に長かった。

#### f) 製造法の条件検討

##### 1. 細胞基質と温度感受性の関連性検討

いずれの株においても、39℃培養におけるウイルス増殖性は37℃での増殖性とほとんど差がなかった。また、40℃培養におけるLC16m8とLC16m0株の温度感受性(37℃培養との力価の比)はほぼ同等であった。

MRC-5での温度感受性はRK-13細胞やVero E6細胞での温度感受性と比較して大いに低かった。

## 2. 吸着温度の影響

いずれのウイルスにおいても、吸着時の温度の違いはウイルスの増殖性にほとんど影響を与えなかった。このことから、ウイルスが細胞に入り込む過程においては温度の影響を受けないことが示唆された。

## 3. ウイルスハーベットのタイミングの検討

通常製造でハーベットを行っている67時間前後のタイミングの妥当性が示唆された。

## 4. 吸着工程の有無

吸着工程の有無にかかわらず、CPEの数にほとんど差がなかったことから、ウイルスの培養に吸着工程の有無が影響を与えないことが示唆された。

## g) 安定性に関する予備検討

### 1. 乾燥細胞培養痘そうワクチンの保存安定性試験

安定性試験開始時、3ヵ月後の測定結果は全て適合であった。

### 2. 原薬の安定性実験

原薬を $-80 \pm 5^\circ\text{C}$ に保存した結果、24ヵ月目まで力価の低下は認められなかった。 $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ に保存した場合、3ヵ月目までに力価の低下傾向が認められたが、その後24ヵ月目までに明らかな力価の低下は認められなかった。

### 3. ブラック法とポック法の比較実験

測定に用いた検体間に力価の異なるものが含まれており、測定法により有意な結果の違いが認められた。さらに測定法毎に施

設が異なると、結果に有意な違いが認められる可能性が示唆された(施設×方法の交互作用)。

測定法ごとでの比較では、施設間でよく一致した結果が得られていることが示されたが、ブラック法ではポック法より力価が平均約0.3 Log PFU程度高く計測される可能性が考えられた。

力価が7.7 Log PFUの場合、95%信頼区間は7.482~7.918、逆に力価8.0の場合の測定値は、信頼区間は7.782~8.218 Log PFUとなり、それぞれ有意に識別されると考えられた。

4. ブラック法の分析法バリデーション  
バリデーションの結果、評価したパラメータは全て判定基準に適合しており、試験法の適格性が確認された。

### 5. 小分け材料の安定性評価

小分け製品の1次容器であるバイアル瓶とゴム栓(ブチルゴム)について、超低温( $-20^\circ\text{C}$ 及び $-80^\circ\text{C}$ )・長期保存条件における安定性の検討を行った。JIS 架橋ゴムの物性評価に従い反発弾性試験、動的貯蔵弾性及び損失弾性試験等を実施した結果、使用温度が脆化温度(脆くなる温度) $-48^\circ\text{C}$ 以上であれば、バイアルとの密着性には問題はないことが確認された。尚、当該ゴム栓においては、 $-35^\circ\text{C}$ 付近に動的粘弾性ピークが確認できた。

また、ガラスアンプル化の検討にも着手し、痘そうワクチンでの情報収集に着手した。

### 6. 小分剤の安定性評価

旧千葉県血清研究所製造の痘そうワク

チン (Lot No. 2 及び No. 3) について、安定性評価に関する計画書 (プロトコール) を立案し、評価試験に着手する。

#### D. 考察

最近の研究においては、ワクシニアウイルスに関する多くの性状、安全性、有効性に関する研究がなされ、今後 LC16m8 株の物性に関しても、遺伝子解析、抗原性・免疫原性、安全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、親株である Lister 株接種動物における脳内接種後に形成される髄膜炎はウイルス増殖の結果、形成されたものであることが明らかとなり、一方、LC16m8 では観察されなかった。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リスク評価のために SCID マウス Scarification 接種実験と CsA 投与マウス腹腔内接種実験を実施し、LC16m8 株の高い安全性成績を得た。また、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。健康成人への使用実績においても過去小児で行われた臨床研究結果と同様な結果を得た。有効性においては、サルとマウスでの感染防御試験を実施し、LC16m8 が、天然痘撲滅に有効に使用されたワクチン株である Lister 株と同様な有効性を確認した。同様に健康成人への使用実績においても過去小児で行われた臨床研究結果と同様な結果と高い抗体陽転率を示した。今後本ワクチン LC16m8 においても安全性の機序並びに免疫原性、感染防御、免疫の機序に関する研究が必要である。

製造工程における、吸着の有無はウイル

スの増殖性と収率に影響を与えないことが確認され、またウイルス培養時のハーベストタイミングが、最適であることが確認された。今後更なる各製造工程における条件検討を実施することが必要であり、また、より感受性の高い細胞の探索が必要である。

安定性に関しては、製造における中間製品である原液・原薬の安定性を  $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 、 $-80 \pm 5^{\circ}\text{C}$  で検討した結果、 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$  に保存した場合、3 ヶ月目までに力価の低下傾向が認められたが、その後 24 ヶ月目までに明らかな力価の低下は認められなかった。長期的に安定した力価試験の為にブラック法を検討し、現行のポック法との高い相関性を示したことから、今後更なる検討を行う必要がある。

#### 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。動物実験を実施した結果、高い安全性が示され、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リスクの評価成績が得られた。有効性においてもサルとマウスでの感染防御実験において、感染阻止の効果を確認した。健康成人への使用実施では、過去小児で行われた臨床研究と同様な成績が得られた。痘そうワクチン LC16m8 製造条件に関する検討を行った結果、ウイルス吸着工程がウイルスの増殖性や収量に影響しないことが明らかとなり、今後の製造工程条件の検討が必要であることが示唆された。原薬の  $-20^{\circ}\text{C}$  保管では、2 年間安定な成績であった。

力価試験法として、ブラック法が安定で精度管理が容易と考えられた。

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

平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金  
(国際健康危機管理ネットワーク強化研究事業)

分担研究報告書

高度弱毒化細胞培養痘そうワクチン (LC16m8) は霊長類カニクイザルにおける  
サル痘の発症を阻止する

分担研究者 倉根一郎 (国立感染症研究所ウイルス第 1 部部長)  
協力研究者 西條政幸 (国立感染症研究所ウイルス第 1 部主任研究官)  
網 康至 (国立感染症研究所動物管理室主任研究官)  
長谷川秀樹 (国立感染症研究所感染病理部第 2 室室長)  
永田典代 (国立感染症研究所感染病理部主任研究官)  
森川 茂 (国立感染症研究所ウイルス第 1 部第 1 室室長)

研究要旨：近年、生物兵器のひとつとして痘そう（いわゆる、天然痘）ウイルスが用いられる危険性が指摘され、我が国においてもその危険性に対する備えの一環として、痘そうワクチンの再生産・備蓄が開始されている。その備蓄されている痘そうワクチンは、1970 年代に我が国で臨床応用が認可された LC16m8 株である。天然痘は既に地球上から根絶されているため、LC16m8 の天然痘予防効果を評価するには、痘そうウイルスに近縁で、かつ、霊長類において天然痘様疾患（サル痘）を発症させるサル痘ウイルスを用いて検討する必要がある。そこでサル痘ウイルス感染霊長類モデルを用いて、LC16m8 の効果を検討した。カニクイザルに  $10^6$  plaque forming unit のサル痘ウイルス Liberia 株を、それぞれ 2 頭のカニクイザルに、経鼻的噴霧法で感染させ、感染性ウイルス血症レベル、LightCycler-PCR によるウイルスゲノム血症の定量、臨床症状を調べた。LC16m8 の 1 回接種免疫サル群ではサル痘の発症は完全阻止された。その効果は LC16m8 の親株である Lister 株 1 回接種とほぼ同等であった。非免疫サル群では、典型的なサル痘を発症した。これらの成績は、LC16m8 はヒトにおいてもサル痘発症を予防し、さらに、天然痘の発症を予防することを示している。

A 研究目的

バイオテロリズムの危険性はかねてから指摘されていたが、2001 年 9 月 11 日のニューヨーク市とワシントン DC でのテロ事件、および、その後の炭疽菌によるバイオテロリズム事件の発生で現実のものになった。痘そう（いわゆる天然痘）ウイルスが

用いられるバイオテロリズムが発生した場合には、痘そうウイルスのヒトからヒトへの感染性と病原性の高さから、その被害は甚大なものとなることも予想される。その危険性に対応するため、我が国では痘そうワクチン LC16m8 株（以下、LC16m8）が再生産され、将来のバイオテロリズムの結果とし

て発生する天然痘の出現に備えている。LC16m8 は、Lister 株に由来するワクチンで、ウサギ初代腎細胞で増殖させ、それをもとに製造される細胞培養痘そうワクチンである。Lister 株や Dryvax 株痘そうワクチンに見られる重篤な副作用（全身性ワクチニア感染症、脳炎など）のないワクチンと考えられている。しかし、LC16m8 は、痘そうウイルスやサル痘ウイルスが分類されるオルソポックスウイルスが、全身感染を引き起こす際に重要な働きをする成熟ウイルス（extracellular enveloped virion, EEV）に対する中和抗体を誘導する膜タンパク B5R の遺伝子に 1 塩基欠損があり、完全な B5R を発現しない。そのため、LC16m8 の天然痘予防効果を疑問視する研究者もいる。そこで、本研究では、LC16m8 が霊長類におけるサル痘の発症を阻止するか否かを検討し、LC16m8 のヒトでの天然痘の発症阻止力を考察した。

## B 研究方法

- 1) カニクイザル. 8 頭のカニクイザル (*Macaca fascicularis*) を用いた。すべて体重 2300-2800g の雌サルである。
- 2) ウイルス: 国立感染症研究所ウイルス第 1 部に保管されているサル痘ウイルス Liberia 株を用いた。感染価の測定は、Vero 細胞を用いたプラークアッセイによった。
- 3) チャレンジ: 2 頭のカニクイザルには、 $10^6$  plaque forming unit (pfu) の Liberia 株を鼻腔内噴霧接種した（非免疫サル群）。3 頭のカニクイザル (Lister 免疫サル群) と別の 3 頭のカニクイザル (LC16m8 免疫サル群) には、それぞれ、あらかじめ二股針を用いて Lister 株または LC16m8 を右上腕に接種し、その 5 週間後に  $10^6$  pfu の Liberia 株を鼻腔内接種した。チャレンジウイルス接種後、毎日、食餌摂取量、飲水量、活動性、便性状を観察した。また、2-4 日おきに

麻酔下で体重、体温を測定し、さらに末梢血 (4-5ml) を採取した。

- 4) ウイルス血症: ヘパリン採血された末梢血液 3ml を 10ml の PBS で洗浄し、1500 回転/分で遠心処理した。次いでバフィーコート分画を採取し、その分画から常法に従い単核球細胞を採取した。採取された単核球細胞を Vero 細胞の単層とともに 2%FBS 含有 MEM で 7 日間共培養した。計 7 日間培養したところで、サル痘ウイルスによって形成されたプラーク数を測定した。尚、サル痘ウイルスは、細胞-細胞の感染の拡がりによってプラークを形成するため、この方法で得られたプラークは、血中に存在する感染性ウイルスを反映するものと考えられる。
- 5) ウイルスゲノム血症: Light cycler-polymerase chain reaction (LC-PCR) を用いてウイルスゲノム血症レベルを測定した。Forward プライマーには 5'-GAG ATT AGC AGA CTC CAA-3' を、LCRed プローブとして 5'-LCRed640-CTA GAT TGT AAT CTC TGT AGC ATT TCC ACG GC-3'-phosphorylation を、FC プローブとして 5'-GCA GTC GTT CAA CTG TAT TTC AAG ATC TGA GAT-3'-Fluorescein を、reverse プライマーとして 5'-TCT CTT TTC CAT ATC AGC-3' を用いた。これらのプライマーおよびプローブはサル痘ウイルスの ATI 遺伝子の塩基配列の特徴からデザインされた。LC-PCR は、LightCycler-PCR (Roche Diagnostics 社, Mannheim, ドイツ) を用いて行われた。尚、サンプルから、ウイルス遺伝子を Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics) を用いて精製した。遺伝子検出感度を決定するための標準遺伝子には、濃度があらかじめ計測されているサル痘ウイルス Liberia 株の部分 ATI 遺伝子が挿入された pGEM-T-easy ベクターを用いた。

- 6) 血中サイトカイン：血中 IL-6 および interferon (IFN)-gamma 濃度は、Human IL-6, Monkey IFN-gamma, (Biosource International 社) を用いて ELISA 法で測定された。
- 7) 病理学的解析：H & E 染色により、病理学的所見を解析し、抗ワクチニアウイルス抗体を用いた免疫組織化学染色法でサル痘ウイルス抗原を検出した。
- 8) 抗体検出：サル痘ウイルスに対する中和抗体価をプラーク減少法により測定し、ワクチニアウイルス抗原に対する抗体を、ワクチニアウイルスを抗原とした IgG ELISA 法により測定した。
- 9) 感染実験：カンクイザルを用いたサル痘ウイルスの感染実験は、国立感染症研究所の高度安全研究施設内で行われた。この感染実験は、国立感染症研究所実験動物委員会の承認のもとに行われた。

## C 結果

- 1) ワクチン接種部位の変化：LC16m8 接種部位の病変は、潰瘍形成の程度や衛生病変形成において Lister 接種部位の病変より軽度であった (図 1)。
- 2) 臨床症状：非免疫サル群には、チャレンジ後 10 日目以降に 10-20 個の水疱性皮膚病変が、大腿部、臀部、顔部、背部に出現した。同時に食欲の低下、活動性の低下が認められた。ほぼ 10%の体重減少が観察された (図 2)。感染後 16 日頃から症状の改善がみとめられた。一方、Lister 免疫サル群および LC16m8 免疫サル群には、全くサル痘ウイルス感染による症状は出現しなかった。
- 3) 末梢血液所見：非免疫サル群においては、急性期 (病初期) 白血球数および血小板の減少が認められたが、LC16m8 および Lister 接種サル群では、それらの所見は認められなかった。
- 4) 生化学的検査所見：非免疫サル群においては、CRP, GOT, GPT, LDH の上昇が認められたが、LC16m8 および Lister 接種サル群では、それらの異常所見は全く認められなかった。
- 5) 病理学的所見：肉眼的病理所見においては、非免疫サル群の肺臓に肉芽腫様病変が確認された (図 3)。また、頸部リンパ節や鼠径リンパ節の腫脹が認められた。鼻腔粘膜構造の壊死性病変が確認された。それらの病変には、免疫組織化学的検査によりサル痘ウイルス抗原が存在することが明らかにされた。一方、Lister 免疫サル群および LC16m8 免疫サル群においては、肉眼で確認される病変は認められなかった。
- 6) 抗体の推移：Lister または LC16m8 を接種後、2 週間目にはワクチニアウイルスに対する抗体の出現が認められた。ワクチン接種から 5 週目のチャレンジウイルス接種時には、サル痘ウイルスに対する中和抗体がすでに誘導されていた (図 4)。
- 7) サイトカイン血症：非免疫サル群においては、チャレンジウイルス接種後、1 週間以内に、IFN-gamma および IL-6 の血中濃度が高まり、10 日目以降に低下する傾向が認められた。Lister 免疫サル群および LC16m8 免疫サル群では、IFN-gamma の血中濃度の上昇は認められず、IL-6 はチャレンジウイルス感染初期に軽度の上昇を示した (図 2)。
- 8) ウイルス血症とウイルスゲノム血症：免疫サル群では、リンパ球か



らのウイルス分離検査によればチャレンジウイルス接種後 4 日目から 13 日にウイルスが分離された。LC-PCR によるウイルスゲノム血症の解析によると、ウイルスが分離され始めた 4 日目にはウイルスゲノムは検出されていないが、8 日目から 13 日目までの間でウイルスゲノム血症が認められた。一方、Lister 免疫サル群および LC16m8 免疫サル群では、ウイルス血症およびウイルスゲノム血症は確認されなかった (図 2)。

#### D 考察

本研究においては、LC16m8 の霊長類におけるサル痘発症阻止力を、その親株である Lister と比較して検討した。非免疫サル群では、比較的軽微な症状を呈し、さらに呼吸器(鼻咽腔、喉頭、肺臓)にサル痘ウイルスによる肉芽腫性病変や破壊性病変が出現していた。また、末梢血液検査において白血球減少は血小板減少が認められた。IL-6 および IFN-gamma の上昇も認められた。これら異常所見は、LC16m8 または Lister 免疫サル群においては全く認められなかった。つまり、LC16m8 は Lister と同様に霊長類においてサル痘発症を完全に阻止することが確かめられた。

本研究では、サル痘ウイルス Liberia 株がチャレンジウイルスとして用いられた。このウイルスは、西アフリカ分離株でありコンゴ民主共和国で分離されている中央アフリカ型サル痘ウイルスよりも病原性が低いものと考えられている。非免疫サル群のサル痘の症状が比較的軽微であったのは、用いられたウイルス株の種類、接種経路、接種量によるものと考えられる。ただ、ヒトは痘そうウイルスに経鼻経路で感染し、天然痘を発症するので、LC16m8 の天然痘発症阻止力を評価するには、経鼻感染霊長類

モデルを用いるのが適当と考えられる。

#### E 結語

サル痘ウイルス感染サルモデルにおいては、LC16m8 はウイルス血症を完全にブロックし、サル痘症状の出現も阻止した。これらの成績から、LC16m8 はヒトでの天然痘の発症を阻止するものと考えられる。

#### F 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. (2004) Possible horizontal transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus from a mother to her child. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 57:55-57.
- 2) Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. (2004) Modification of endothelial cell functions by hantaan virus infection: prolonged hyper-permeability induced by TNF-alpha of hantaan virus infected endothelial cell monolayers. *Archives of Virology* 149. 1279-92.
- 3) Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. (2004) Phosphorylation of p38 MAPK and its downstream targets in SARS coronavirus-infected cells. *Biochemical Biophysical Research Communication* 319: 1228-1234.
- 4) Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. (2004) Importance of Akt signaling pathway for apoptosis in SARS-CoV-infected Vero E6 cells. *Virology* 327: 169-74.
- 5) Mizutani T, Fukushi S, Murakami M,

- Hirano T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. (2004) Tyrosine dephosphorylation of STAT3 in SARS coronavirus-infected Vero E6 cells. FEBS letter 5:577(1-2):187-92
- 6) Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. (2005) Recombinant nucleoprotein-based serological diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections. Journal of Medical Virology 75:295-299
2. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）  
特許取得：該当なし
3. 学会発表
- 1) Saijo M, Tang Q, Kurane I, Morikawa S. Molecular epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections in the Xinjiang Uygur Autonomous Region, P. R. China. 5th Japan-China Virology Conference. June, 2004, Osaka
- 2) Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Modification of endothelial cell functions by Hantaan virus infection: prolonged heperpermiability induced by TNF-alpha of Hantaan virus-infected endothelial cell monolayers. International Conference on Hantavirus infections. June 2004, Seoul, South Korea
- 3) 山田靖子, 水谷哲也, 高橋一朗, 福士秀悦, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂. SARS-CoV の継代培養による変異ウイルスの出現. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 4) 西條政幸, 福士秀悦, 荻野利夫, 田口文広, 水谷哲也, 松山州徳, 倉根一郎, 田代真人, 森川茂. SARS コロナウイルスの組換え核蛋白を抗原とした ELISA 法の開発を評価. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 5) 森川茂, 長谷川秀樹, 西條政幸, 前田秋彦, 倉根一郎, 尾崎泰子, 佐多徹太郎. 倉田毅, 小島朝人. ワクチニアウイルス LC16m8 株の有効性と遺伝子構造の解析. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 6) 西條政幸, 網康至, 永田典代, 須崎百合子, 緒方もも子, 福士秀悦, 水谷哲也, 長谷川秀樹, 岩田奈織子, 佐多徹太郎, 倉根一郎, 倉田毅, 森川茂. LC16m8 株痘そうワクチンによるカニクイザルにおけるサル痘発症予防効果. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 7) 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. ACE2 発現細胞を用いた SARS コロナウイルス感染の検討. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 8) 水谷哲也, 福士秀悦, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. SARS-CoV 感染細胞におけるアポトーシスに関するシグナル伝達系の網羅的検討. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 9) 水谷哲也, 福士秀悦, 村上正晃, 西條政幸, 倉根一郎, 平野俊夫, 森川茂. SARS コロナウイルスの感染に誘導されるシグナル伝達の解析. 第 27 回日本分子生物学会年会. 2004 年 12 月, 神戸
- 10) 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 倉根一郎, 西條政幸. Efficient replication of SARS coronavirus on the cells expression mouse ACE2. 第 27 回日本分子生物学会年会. 2004 年 12 月, 神戸

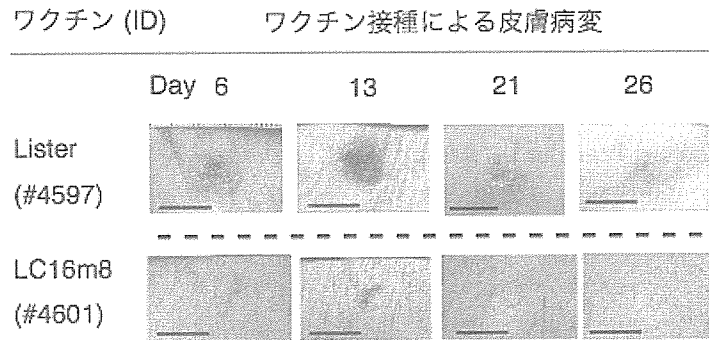


図 1. Lister (上段) および LC16m8 (下段) 接種部位の皮膚病変.

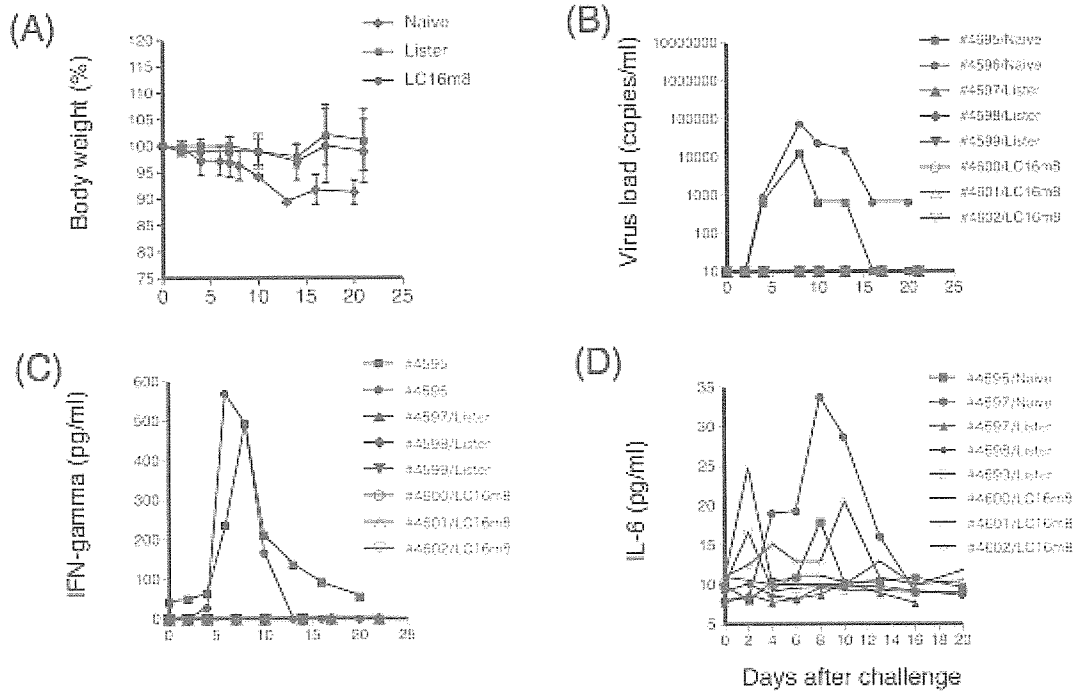


図 2. 非免疫サル群, Lister 免疫サル群, LC16m8 免疫サル群における, チャレンジウイルス接種後の体重 (A), ウイルス血症レベル (B), IFN-gamma (C), IL-6 (D) の推移.

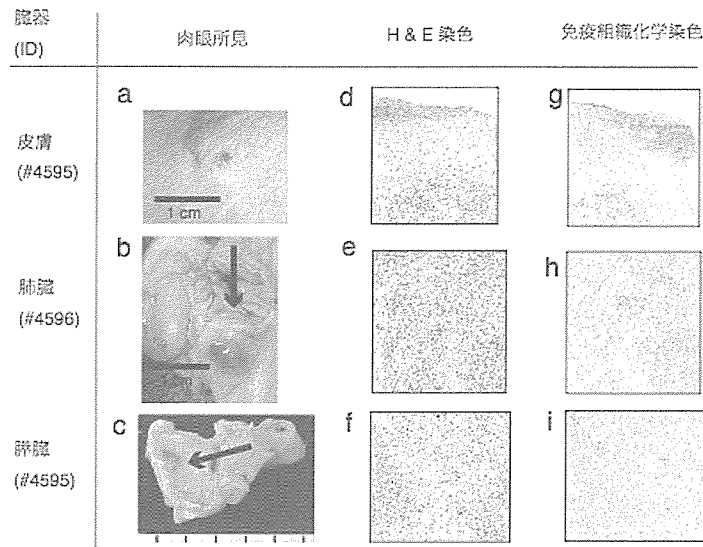


図 3. 非免疫サル群のサル痘ウイルス感染症に基づく病変 [皮膚 (上段), 肺臓 (中段), 脾臓 (下段)]. 肉眼的所見, H & E 染色所見, 免疫組織化学染色所見を示した.

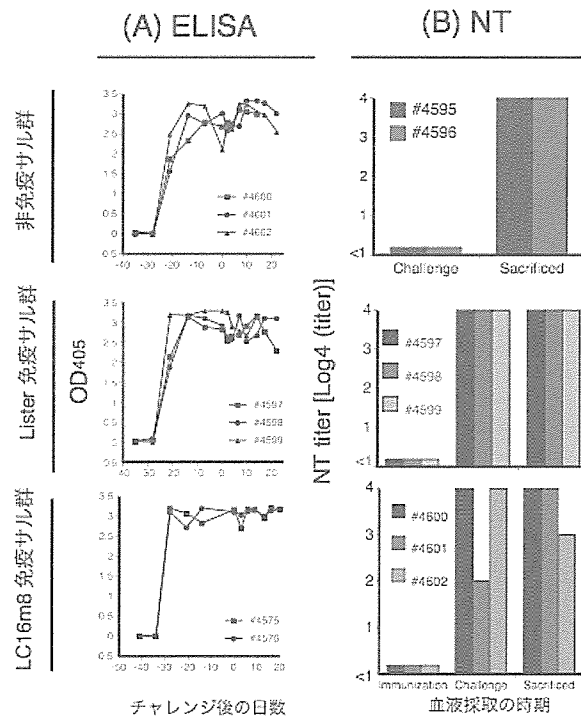


図 4. 非免疫サル群, Lister 免疫サル群, LC16m8 免疫サル群における, ワクチン接種から安楽殺 (チャレンジウイルス接種後約 3 週間目) までの IgG ELISA による抗体(血清 400 倍稀釈時の OD 値) (A), および, ワクチン接種前 (Immunization), チャレンジウイルス接種時 (Challenge), および, 安楽殺 (Sacrificed,) の中和抗体価 (B).