

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

分担研究課題：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

分担研究者：森川 茂 (国立感染症研究所ウイルス第 1 部)

協力研究者：緒方もも子、西條 政幸、倉根一郎 (同、ウイルス第 1 部)、
永田典代 (同、感染病理部)

研究要旨：バイオテロ対策として細胞培養痘そうワクチンの製造が再開されている。本ワクチン株である LC16m8 株は、Lister 株から低温馴化により LC16 株、LC16mO 株を経由して作製された株である。初代ウサギ腎細胞でのプラーク形成温度上限は、Lister 株では 41°C 以上であるのに対し、LC16 株、LC16mO 株、LC16m8 株は 41°C ではプラークを形成しない。本研究では、LC16mO 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、LC16mO 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。

A. 研究目的

バイオテロ対策の一環として乾燥細胞培養痘そうワクチンの製造が再開され国家備蓄されている。本ワクチンに用いられるワクチニアウイルス LC16m8 株は、Lister 株を親株として、LC16 株、LC16mO 株を経由して低温馴化、小サイズポック形成株として選択された株である。LC16m8 株と直近の LC16mO 株の性状の差は、表 1 に示すように発育鶏卵漿尿膜(CAM)でのポックサイズ、Vero 細胞での増殖性が主たるもので、これは B5R 遺伝子の Open reading frame (orf)の

nuc 274G が LC16m8 株では欠損しているため、本来の B5R 蛋白 (317 アミノ酸からなる膜蛋白) が発現されず、92 アミノ酸からなる欠損型の B5R 蛋白が産生されることによる (Takahashi-Nishimaki F ら *Virology*, 181:158-64, 1991 及び Takahashi-Nishimaki F ら *J Gen Virol.*,68:2705-10, 1987)。近年、LC16m0 株、LC16m8 株のほぼ全遺伝子配列を解析した結果、B5R 遺伝子の変異以外には 5 塩基のみ異なることが明らかになった (Morikawa S ら *J.Virol.*, 79(18):11873-91, 2005)。LC16m8 株を過剰に継代増殖させる

と、B5R 遺伝子に nuc 274G の欠失を相補する変異が導入され、LC16mO 株に類似した性状を持つウイルスが生じるが、温度感受性に関するリバータントの出現の有無、非許容温度での増殖率の低下の機構やその責任遺伝子に関しては、明らかにされていない。本研究では、これらを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

- 1) 温度感受性のリバータント出現の有無：LC16m8 株は、B5R 遺伝子の変異により Vero 細胞での増殖が極めて悪いため、Vero 細胞で効率良く増殖する LC16mO 株を用いた。また、Lister 株から温度感受性クローン LO#6 を得て対照に用いた。LC16mO 株および LO#6 を Vero E6 細胞に感染させ 40.5°C で培養してウイルスを回収し、Vero E6 細胞に感染させ 35°C で増殖させ高力価のウイルスを得た。これを Vero E6 細胞に感染させて同様に 40.5°C 培養、35°C 増幅を繰り返し 5 回行った。
- 2) 温度感受性の機構の解析：LC16mO 株、Lister 株由来温度非感受性クローン LO#4 を Vero E6 細胞に感染させ経時的に ApoPercentage キットを用いて Apoptosis の解析を行った。また、両ウイルスを Vero E6 細胞に感染させ 35°C、41°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。
- 3) 温度感受性責任遺伝子のマッピング：

LO#4 DNA から PCR により 9-14kbp の全長をカバーする amplicon を作製し、LC16mO 株感染細胞にトランスフェクションして温度感受性の complementation が可能か否かにより責任遺伝子部位のマッピングを行った。
(倫理面への配慮：ヒト検体、動物は使用していないため該当しない。)

C. 結果

- 1) 温度感受性のリバータント出現の有無：非許容温度での培養と許容温度でのウイルス増殖を繰り返すと、対照の LO#6 では 3 代継代後に非許容温度で増殖可能なリバータントが出現した。一方、LC16mO 株では 5 代継代しても温度感受性のリバータントは出現しなかった。このことから、LC16mO 株の温度感受性責任遺伝子は、リバージョン不能な変異か責任遺伝子が複数存在することが示唆された。
- 2) 温度感受性の機構の解析：LC16mO 株、LO#4 感染細胞を 35°C で培養すると両者とともに典型的なワクチニアウイルス粒子形成過程が認められ、多数の細胞内感染性粒子(IMV)が細胞室内に蓄積していた。一方、LC16mO 株の非許容温度である 41°C 培養では、LO#4 と比べて粒子数は少ないものの、LC16mO 株感染細胞でも IMV の形成が認められた (図 1)。LC16mO 株感染細胞は非許容温度では、ミトコンドリアの顕著な形態異常も認められた。この結果は、温度感受性遺伝

子が IMV 形成に係る遺伝子ではないことを示唆する。また、LC16mO 株感染細胞では、非許容温度において apoptosis 誘導が LO#4 感染細胞と比較して早期に起きることが明らかとなった (図 2)。

- 3) 温度感受性責任遺伝子のマッピング：
LO#4 DNA から PCR により 9-14kbp の全長をカバーする 22 種類の amplicon を作製して、それぞれの amplicon を LC16mO 感染細胞にトランスフェクトして非許容温度で培養した結果プラーク形成は認められなかった。そこで、PCR-amplicon を複数混合して同様にトランスフェクトして培養すると、LO#4 遺伝子の right 側 60kbp 領域の amplicon を混合してトランスフェクトした場合にプラーク形成が認められた (図 3)。この結果は、少なくとも近接しない 2 遺伝子が温度感受性の責任遺伝子であることを示唆する。

D. 考察

本研究から、LC16mO 株の温度感受性は、非許容温度では感染早期にアポトーシスが起きて感染性ウイルスが充分形成されないことによると思われる。非許容温度でも IMV 様粒子形成が見られることから、温度感受性は後期遺伝子群の発現低下や粒子形成不全によるものではないと考えられる。一方、温度感受性のリバータントは LC16mO 株では極めて生じにくいことが明らかになり、これは、相補実験から責任遺伝子が複数存在する可能性が示唆されるこ

と矛盾しない。細胞培養痘そうワクチンに用いられる LC16m8 株の温度感受性も同様と考えられる。温度感受性と神経病原性が Lister 株と比較して極めて低いことが関連するの否かは不明であるため、今後その関連に関して明らかにする必要がある。

E. 結論

LC16mO 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、LC16mO 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。このことから LC16m8 株の温度感受性は極めて安定な形質であると考えられる。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Morikawa S, Sakiyama T, Hasegawa H, Saijo M, Maeda A, Kurane I, Maeno G, Kimura J, Hirama C, Yoshida T, Asahi-Ozaki Y, Sata T, Kurata T, Kojima A. An attenuated LC16m8 smallpox vaccine: analysis of full-genome sequence and induction of immune protection. *J Virol.* 79(18): 11873-91, 2005
- 2) Hatakeyama S, Moriya K, Saijo M, Morisawa Y, Kurane I, Koike K, Kimura S, Morikawa S. Persisting humoral antiviral immunity within the Japanese population after the discontinuation in 1976 of routine smallpox vaccinations.

Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12(4) :
520-524, 2005

2. 学会発表

- 1) Saijo M, Ami Y, Nagata N, Hasegawa H, Fukushi S, Mizutani T, Iwata N, Suzaki Y, Sata T, Kurane I, Morikawa S. Highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, protects monkeys from monkeypox. XIIIth International Congress of Virology. 2005年7月, San Francisco, CA, USA
- 2) Saijo M, Ami Y, Nagata N, Hasegawa H, Fukushi S, Mizutani T, Iwata N, Suzaki Y, Sata T, Kurane I, Morikawa S. Protection of non-human primates from monkeypox by highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, that lacks expression of B5R membrane protein. US-Japan Cooperative Medical Science Program 39th Virology Panel Meeting. 2005年7月, San Francisco, CA, USA
- 3) 西條政幸, 網康至, 永田典代, 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 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 (続報). 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜

H. 知的財産の出願・登録状況

特に無し。

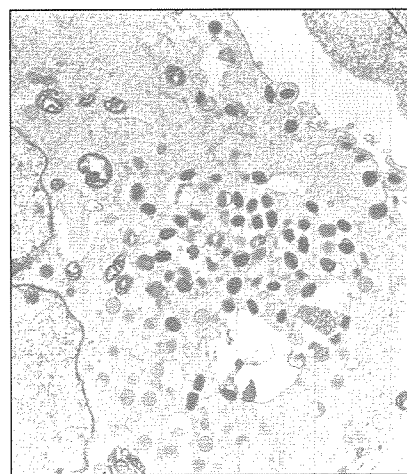
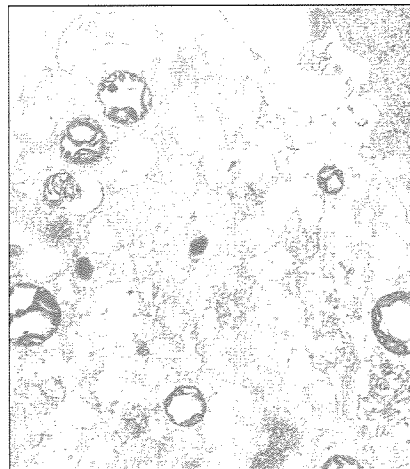
表1. ワクチニアウイルスの性状

(ピンク色はB5Rによるm0とm8の性状の差)

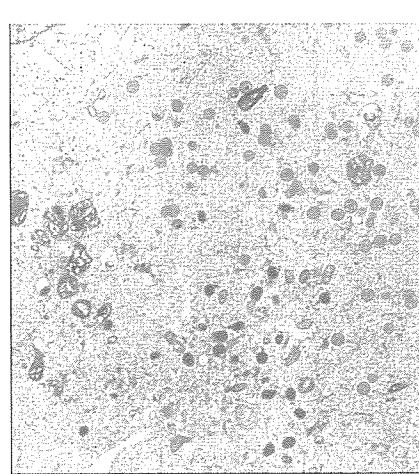
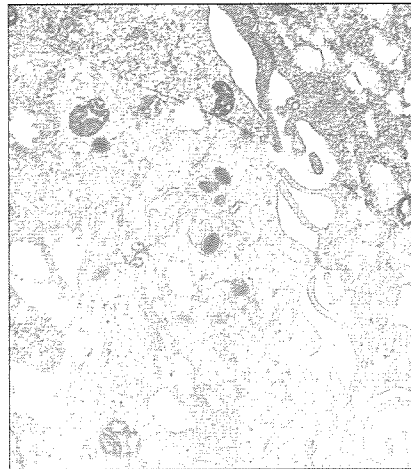
| | Lister | LC16 | LC16m0 | LC16m8 |
|---------------------------|---------|--------|--------|---------|
| Ceiling temp in PRK cells | > 41 °C | 41 °C | 41 °C | 40.5 °C |
| Plaque size in PRK cells | Large | Medium | Medium | Medium |
| Pock size on CAM | Large | Large | Medium | Small |
| Growth in CAM | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Growth in CEF cells | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Growth in Vero cells | +++ | +++ | +++ | + |
| Growth in PRK cells | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Growth in rabbit brain | ++ | + | + | +/- |
| Growth in monkey brain | +++ | + | + | + |
| Neurovirulence in rabbit | + | - | - | - |

in "Vaccinia viruses as vectors for vaccine antigens" (GV Quinnan, Ed) pp87-99 (1985)
Elsevier, Amsterdam/NY/Oxford

図1. ワクチニアウイルス感染Vero E6細胞での粒子形成



LO#4



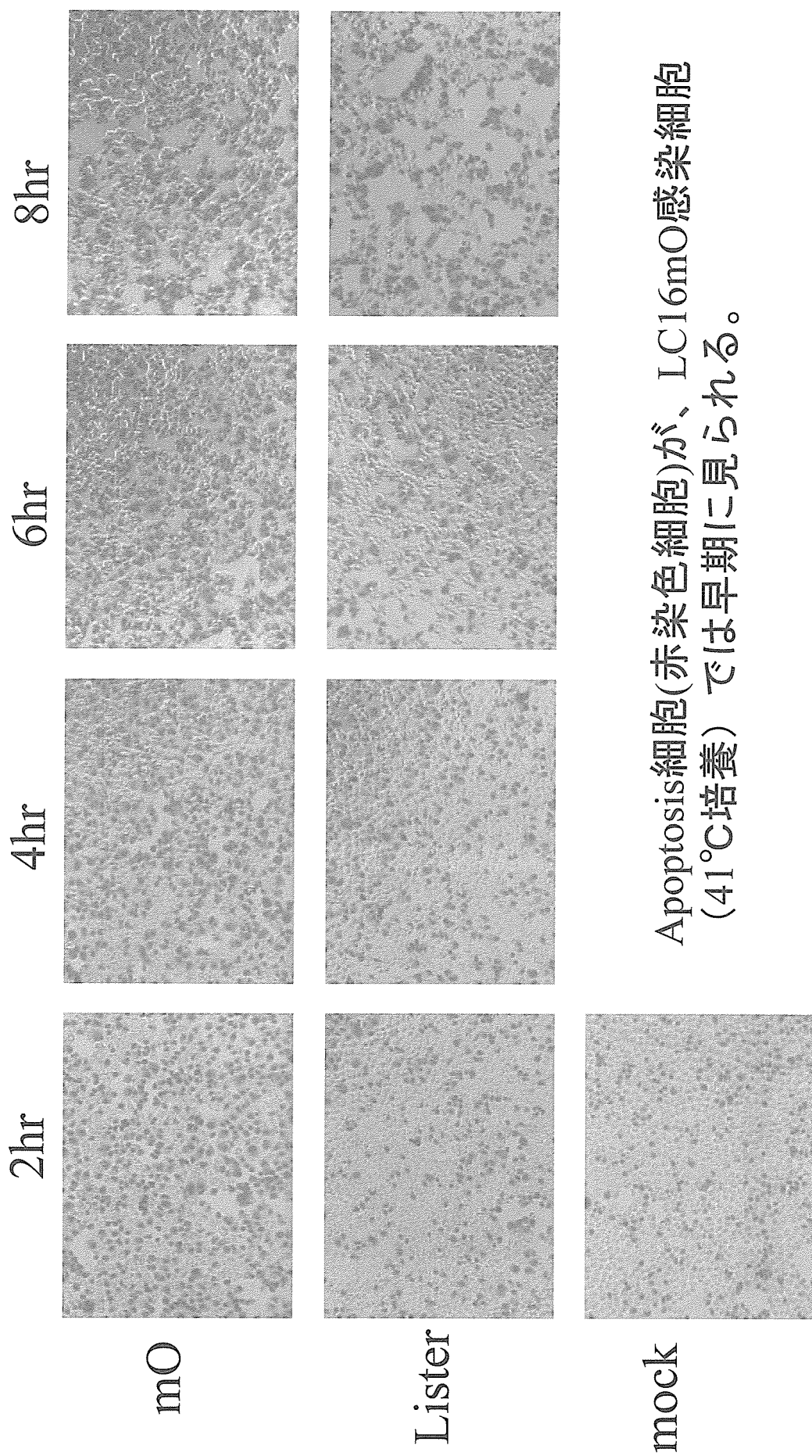
LC16mO

IMV様のウイルス粒子は、LC16mO (41C)でも出て来ている。

41C

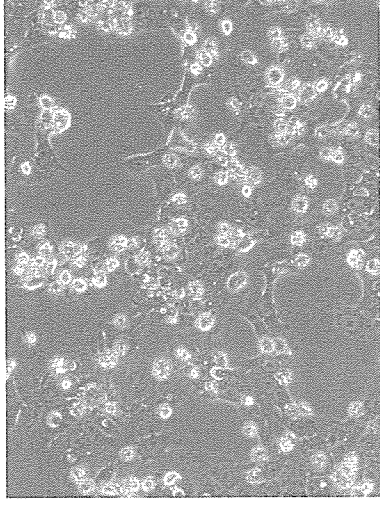
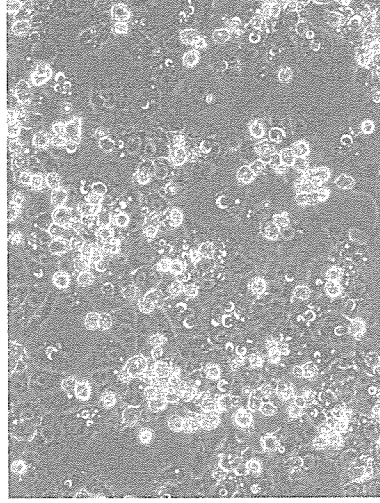
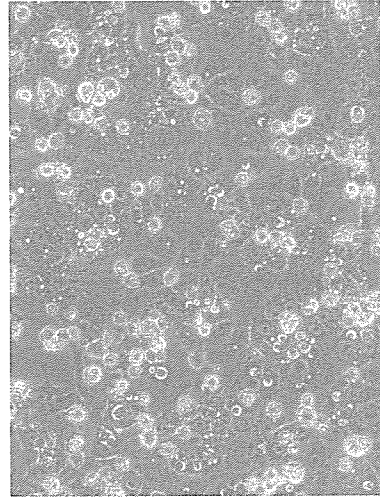
35C

図2. ワクチニアウイルス感染細胞でのアポトーシス誘導



Apoptosis細胞(赤染色細胞)が、LC16mO感染細胞(41°C培養)では早期に見られる。

図3. Complementation of ts-phenotype by transfection of
LO#4-PCR amplicons



mO + LO4(41)-PCR-gr1

+ LO4(41)-PCR-gr2

+ LO4(41)-PCR-gr3

LO#4のright側のPCR産物の
mixtureにより温度感受性が相補される

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

「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事業」

分担研究者：佐多徹太郎（国立感染症研究所、感染病理部）

協力研究者：永田典代、佐藤由子（国立感染症研究所、感染病理部）

松井 元、志垣隆通（財団法人化学及血清療法研究所、病理部）

新村靖彦（財団法人化学及血清療法研究所、第一製造部）

研究要旨

乾燥細胞培養痘そうワクチンのサル神経毒力試験の評価方法を検討、確立することを目的とし、平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金 厚生労働科学特別研究事業「痘そうワクチンの備蓄戦略のための品質向上、生産性向上に関する研究」において実施されたサル神経毒力試験で作製された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。その結果、Lister Original 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た。免疫組織化学染色法による解析によって、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。

A. 研究目的

乾燥細胞培養痘そうワクチンのサル神経毒力試験の評価方法を検討し、確立することを目的とする。すでに平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金 厚生労働科学特別研究事業「痘そうワクチンの備蓄戦略のための品質向上、生産性向上に関する研究」において 2 種類の痘そうウイルスを用いてサル神経毒力試験が行われた。本試験で作製された病理標本について病理学および免疫組織学的にウイルスの局在と病変につ

いて追加検討し、本製剤におけるサル神経毒力試験法の評価方法について検討した。

B. 研究方法

本研究では、サル神経毒力試験に供した動物のうち、Lister Original 株 (2×10^7 PFU 量、大脳左側視床接種) 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用いた。これらは 10%ホルマリン緩衝液による固定

後、常法どおり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。また、ウイルス抗原を検出するために、抗ワクチニアウイルスウサギ血清を用いて Labeled StreptAvidin-Biotin (LSAB)法（ダコLSABキット、DakoCytomation）による免疫組織化学染色を行った。同時にウイルス抗原陽性細胞の分類を行うため、脳・脊髄についてはglial fibrillary acidic protein (GFAP)、マクロファージ（HAM56）、MAP2 抗原の検出もあわせて行った。

C. 研究結果

LC16m8 接種群においては接種痕付近の大脳皮質から脊髄において、限局性の小円形の細胞の軽度な浸潤が見られ、いずれの組織においてもウイルス抗原は陰性であった。また、心、肝、脾において著変は認められず、ウイルス抗原も陰性であった。Lister Original 株接種群の死亡例においては、いずれも髄膜炎が認められた。髄膜炎の最も強かった例では、病理組織的に接種痕付近の大脳皮質から脊髄まで連続的に線維素性肉芽組織の形成を伴う髄膜炎が認められた。接種痕付近の左側大脳皮質のくも膜下腔では線維素を含む肉芽組織が増生し、それは皮質表層部を巻き込んでいる。線維性肉芽組織の増生は接種反対側の右脳にまで及び、線維間のおそらく線維芽細胞(HAM56 陰性)の細胞質がウイルス抗原陽性であった（図1）。肉芽組織は GFAP 陽性グリア細胞によっ

て周囲を囲まれており、周囲の実質には HAM56 陽性マクロファージ細胞の浸潤がみられる。また、実質の空胞化を伴っている。

（図2）。これらの細胞はウイルス抗原陰性であった。小脳においては第四脳室およびその周囲の実質を巻き込み線維性肉芽組織の増性がみられ、線維間の細胞でウイルス抗原が陽性であった。小脳皮質の一部でプルキンエ細胞の配列の乱れがあり、神経細胞の変性が認められた。いずれの神経細胞においてもウイルス抗原は検出されなかった。なお、心、肝、脾にはウイルス抗原は検出されなかった。接種後 8 日目に死亡した 1 例では心筋の変性・壊死とそれに伴う好酸球および好中球の浸潤が広範囲に認められたが、ウイルス抗原は陰性であった。

D. 考察

平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金厚生労働科学特別研究事業「痘そうワクチンの備蓄戦略のための品質向上、生産性向上に関する研究」において実施されたサル神経毒力試験で作製されたワクチン脳内接種後のカニクイザルの中樞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 Original 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。

E. 結論

痘そうワクチンは株によってはサル脳内接種によって髄膜炎を発症することを組織学的に確認した。また、ウイルス増殖との因果関係は不明であったが、心筋炎所見を確認した。痘そうワクチンの神経毒力試験において中枢神経系組織と心を含む主要

臓器を検索対象とすることが必要である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし。

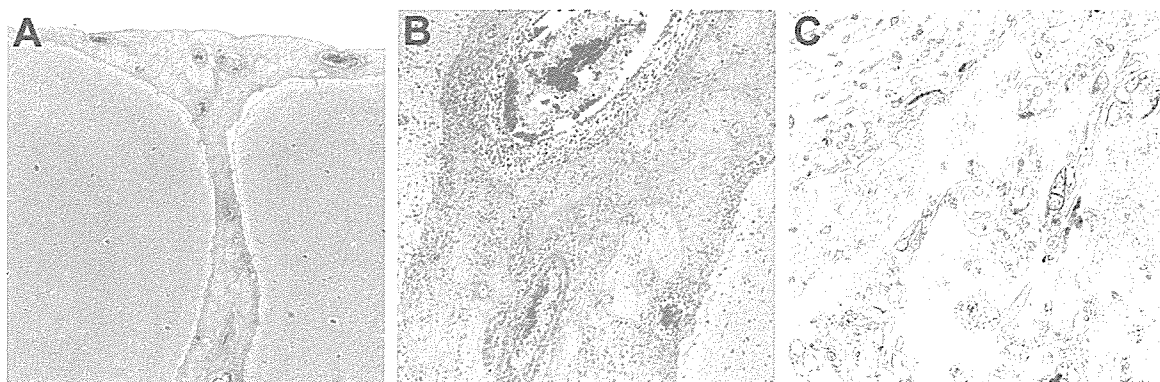


図1 Lister Original 株脳内接種後8日目に死亡したカニクイザルの大脳皮質。図は接種反対側の右脳大脳皮質くも膜下腔に形成された線維性肉芽組織により肥厚した髄膜。(A.撮影倍率20倍およびB.100倍、ヘマトキシリン・エオジン染色。C.撮影倍率400倍、免疫組織化学染色によるウイルス抗原野検出)

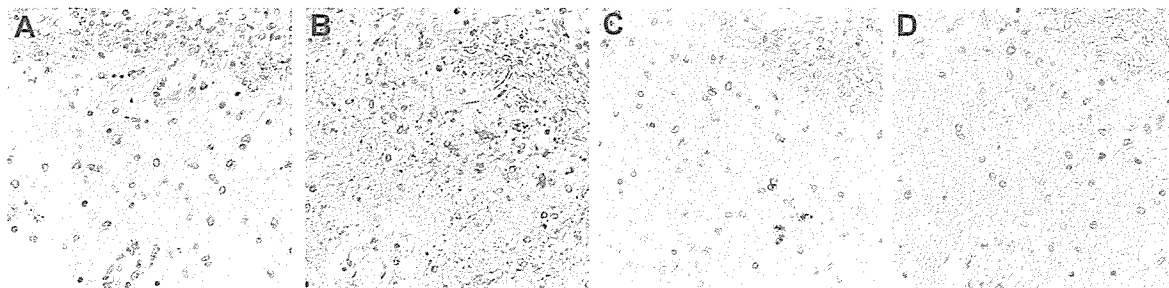


図2 くも膜下腔に形成された線維性肉芽組織と脳実質の境界部分の拡大。いずれも撮影倍率400倍、免疫組織化学染色。A. ウイルス抗原。B. GFAP 抗原。C. HAM56 抗原。D. MAP2 抗原。

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

天然痘ワクチン LC16m8 の安全性及び有効性の評価について

| | | | |
|-------|------|-------------------|-----|
| 分担研究者 | 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 |
| 研究協力者 | 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 | |

研究要旨

LC16m8 ワクチンは、国産の組織培養弱毒痘瘡ワクチンとして開発されたものであるが、予防接種法下における種痘は 1976 年以降実施されていない。このため、本ワクチンの成人に対する安全性及び有効性については調査されていない。本研究においては、安全性及び有効性について調査を行うとともに、世代間の違いについて検討を行い、過去の接種歴がこれらに大きく影響することを確認した。

A 研究目的

LC16m8 は、Lister 株由来の細胞培養弱毒痘瘡ワクチンとして我が国で 1970 年代末に製造され、1974 年から 1976 年にかけて 10 万人以上の小児に対する臨床試験が実施されている。しかしながら、WHO の天然痘根絶計画に使用されることはなく、1976 年以降その使用は行われていない。一方で、同時多発テロ以降、生物テロ発生時における危機管理の観点から新たに製造が再開されたところであるが、その安全性及び有効性について今日の医療水準に照らして評価する必要性が出てきた。

そこで、本研究においては、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。さらに、中和抗体価の

測定に当たっては LC16m8 の他、NYCBH 由来の Dryvax を用いて比較検討を行った。

B 研究方法

(1) 対象者

対象者は、A 群 (1975 年以降の出生)、B 群 (1965～1974 年に出生した者)、C 群 (1955～1964 年に出生した者)、D 群 (1954 年以前に出生した者) に分け、同一の医師が、同一日に実施した者を対象とした。

(2) 接種手技

LC16m8 (化血研、熊本) ロット 1 を使用し、初回については、5 回、再接種については 10 回、2 又針 (JMS、広島) を用いて接種を行った。接種手技については、添付文書に従い、接種後 10～14 日の間で善感判定を行った。接種を受けた

者のうち、同意の得られた方については、接種前と接種後 30 日に血清を採取し-80 度で保存を行った。副反応については、判定医による聞き取りによる。

(3) 中和抗体測定

中和抗体の測定については、plaque reduction neutralization test (PRNT)を用いた。

60 度 20 分加熱処理した血清を 4 倍希釈し、各血清に 30~50pfu/ml の LC16m8 を加え、超音波で攪拌した後、35℃にて 15~18 時間培養し、RK13 細胞においてさらに 2 時間吸着させた。さらに、これらの RK13 細胞を MEM(5% FBS, 0.8% agarose)にて 35℃、5%CO₂ の条件下で 4 日培養を行った。細胞を neutral red にて染色した後、plaque 数を測定した。50%中和抗体価は、Probit 法により算出した。

Dryvax については、ウイルスの超音波処理は行わず、Vero-E6 細胞を使用し、培養温度条件は 37℃、培養時間は 2 日とした。50%中和抗体価の測定は Excel Spreadsheet により算出した。なお、接種後の LC16m8 を用いた PRNT で 16 倍以上、かつ Dryvax を用いた PRNT において接種後の力価が接種前の 4 倍以上のものを陽転 (Seroconversion) と判定した。

(4) 統計処理

接種前後の中和抗体価の比較については、Wilcoxon 法を用いた。また、相関係数については、Sperman 法を用いた。

(5) 倫理

自衛隊中央病院の倫理委員会の承認を得て実施した (16-004 : 平成 15 年 8 月 30 日)。

C 研究結果

1 善感率

善感率は、94.6% (A 群)、89.1% (B 群)、85.3% (C 群)、84% (D 群) と世代が高くなるにつれて

低下する傾向を示した。さらに、初回接種者は 94.4%、再接種者は 86.5%と再接種者の善感率は有意に低い値を示した。皮膚反応についても、初回で 11.8mm、再接種で 9.1mm と初回接種者において皮膚における反応が強くなる傾向を示した (図 1)。

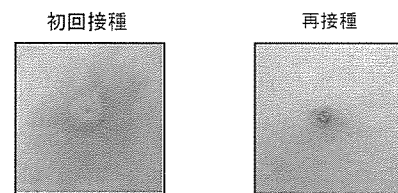


図1:初回及び再接種における皮膚反応

2 副反応

腋下リンパ節腫脹 (9.0%)、37.5℃以上の発熱 (2.0%)、かゆみ (0.7%)、感冒様症状 (0.6%) などが認められたが、心臓及び神経系の重篤な副反応は認められなかった。特に腋下リンパ節腫脹は、初回で 15.5%に認められたが、再接種者では 3.5%と低い傾向を示した。さらに、これらの症状の発生時期について検討を行ったところ、腋下リンパ節の腫脹の時期は、初回接種者においては 5.6 日、再接種者については 3.2 日と再接種者において有意に症状発生が早く出現することが示された ($p < 0.001$)。また、発熱についても同様の傾向が示された。

3 中和抗体

天然痘ワクチンの有効性については、善感率及び中和抗体価によって評価できるとされているが、本研究においては、LC16m8 及び Dryvax を用いた plaque reduction neutralization test (PRNT) により中和抗体価の測定を実施した。

接種前の抗体価については、いずれの手法によ

っても A 群は、他の群と比較して有意に低い値を呈した。また、LC16m8 を用いた PRNT と Dryvax を用いた PRNT の有意差を検討した結果、A～C 群はいずれも有意な差が認められなかったが、D 群においては $P=0.035$ と双方の測定系における差が認められた (表 1)。しかしながら、相関性については、A 群を除く B、C、D 群でいずれも相関係数が 0.5 を上回っており、双方の測定系については一定の相関が認められた。

次に、LC16m8 接種後の中和抗体価について検討を行ったところ、LC16m8 を用いた PRNT においては、B 群で有意に高い値を示し ($p<0.001$)、Dryvax を用いた PRNT においては、D 群で有意に高い値を示した ($p<0.001$)。なお、C 群においては有意な差は認められず、相関係数については、A 群では相関が弱く ($r=0.22$)、B、C、D 群ではいずれも $r>0.7$ と高い相関が得られた (図 2)。

D 考 察

LC16m8 ワクチンは、小児における調査結果と比較した場合、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、小児初回では 18.4mm と、成人においてはやや弱い傾向にあった。

特に副反応の発生の時期が初回接種者で有意に再接種者より遅れること等から、おそらく本ウイルスの特徴として局所において増殖し、その反応の一環として腋下リンパ節の腫脹が関与しているものと思われる。

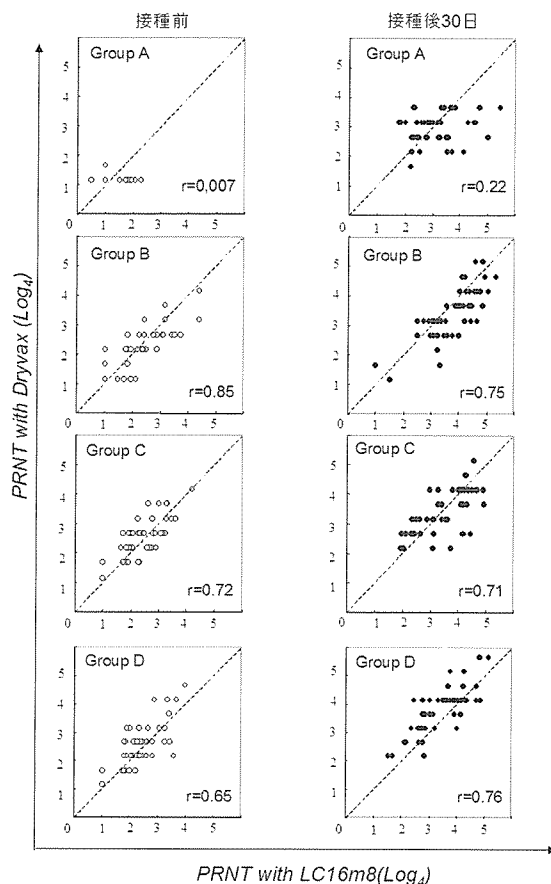


図 2 : LC16m8 及び Dryvax を用いた PRNT による中和抗体価の比較

○は接種前、●は接種後 30 日における中和抗体価を示す。

この点については、次年度以降、大隈班におけるモデル動物実験において明らかにされていくものと思われる。

年齢の高い層において善感率が低下することについては、既存の種痘による中和抗体の影響であることは、既にいくつかの論文によって報告されているところであるが、本調査によっても 1974 年以前に出生した世代において一定の中和抗体が存在していることが明らかになった。さらに、従来の LC16m8 のみによる抗体検査に加え、株の異なる Dryvax を用いた PRNT によって世代間の中和抗体の特徴に微妙な差が生じることが示された。

特にこの差は、接種後において顕著に認められ、

1965～1974 年に出生した世代については LC16m8 に強く反応し、1954 年以前に出生した世代については Dryvax に強く反応する抗体を有していた。これらは、我が国において、1970 年代以降、池田、大連株から Lister 株に切り替えてきたことも影響しているものと思われた。今後は、この抗体反応の差がウイルス抗原のどの部分と関与しているかについて検討を行う必要がある。一方、初回接種群については、当然ながら LC16m8 に対して高い反応性を示したが、Dryvax を用いた PRNT においても一定の反応を示し、陽転率としては 93%であった。

E 総括

LC16m8 は、従来の報告のとおり成人においてもその安全性が高いことが示された。

また、有効性については、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%に陽転が得られる等、旧来ワクチンと同等の有効性が示された。なお、当該ワ

クチンの免疫成立の機序及び免疫原性について引き続き検討する必要性が示唆された。また、米国における種痘ワクチンによる心膜炎の報告も指摘されていることから、本剤の接種後の管理についてさらに情報を収集する必要があるものと思われた。

G 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

T. Fujii, Y. Kanatani, T. Matsumura.

Clinical evaluation of attenuated smallpox vaccine LC16m8 in Japan.

ASM BIODEFENSE Research Meeting

(2006. 2. 15-18, Washington DC)

H 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし。

表： 各世代における LC16m8 接種前後の中和抗体価

| | <i>Status</i> | No. of subjects | PRNT with LC16m8 | PRNT with Dryvax | LC>DVX %(Rate) | Seroconversion %(Rate) | <i>P-value</i> |
|-------------------------|----------------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|---------------------------|----------------|
| | | | (LC) | (DVX) | | | |
| | | | GMT (95%CI) | GMT (95%CI) | | | |
| <i>Pre-vaccination</i> | | | | | | | |
| Group A | <i>Primary</i> | N=40 | 5(2-15) | 5(5) | | | 0.523 |
| Group B | <i>Revaccination</i> | N=48 | 17(4-330) | 16(5-124) | | | 0.351 |
| Group C | <i>Revaccination</i> | N=50 | 24(4-133) | 29(5-160) | | | 0.293 |
| Group D | <i>Revaccination</i> | N=50 | 27(4-152) | 33(10-320) | | | 0.035 |
| <i>Post-vaccination</i> | | | | | | | |
| Group A | <i>Primary</i> | N=40 | 86(13-983) | 63(20-160) | 60(24/40) | 93(37/40) | 0.137 |
| Group B | <i>Revaccination</i> | N=48 | 179(6-1,009) | 108(10-992) | 71(34/48) | 71(34/48) | <0.001 |
| Group C | <i>Revaccination</i> | N=50 | 121(16-764) | 115(20-640) | 42(21/50) | 58(29/50) | 0.524 |
| Group D | <i>Revaccination</i> | N=50 | 117(15-796) | 208(20-1,856) | 22(11/50) | 78(39/50) | <0.001 |

1 95%CI:95% confidential interval

2 P-value は、LC と DVX を比較。

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

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 千葉大学 名誉教授
協力研究者：船津昭信 財団法人 化学及血清療法研究所 所長・理事長
協力研究者：志垣隆通 財団法人 化学及血清療法研究所 病理部次長
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：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
協力研究者：佐藤 梓 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：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

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、生産再開されることとなった。本研究では、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、現在製造されている弱毒痘そうワクチン LC16m8 について安全性・有効性に関する評価を行った。安全性に関しては、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った。また、有効性に関しては、マウスを用いたワクシニアウイルス WR 感染防御実験を実施した。これらの実験から、LC16m8 ワクチンが有効性を保持したまま十分に弱毒化された安全性の高いワクチンであることを示す成績が得られた。加えて、今後検討すべき安全性、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安全性及び有効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。

B. 研究方法

a) SCID マウス Scarification 接種実験

【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 (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使用した。

【使用動物】

Severe Combined Immunodeficiency Disease (SCID) 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。1 群 10 匹の SCID マウスに希釈して 10^8 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 (接種量は $2.5 \mu\text{L}$ 程度と想定した)。

【評価】

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。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、検体接種日から 3 日 (一部 2 又は 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 (検体接種日) 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 |

b) CsA 投与マウス腹腔内接種実験

【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 (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使用した。

【使用動物】

C57BL/6 マウス (生後 7 週齢、雌、SPF) 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。

【CsA の投与及び免疫抑制効果確認】

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 50mg/kg/day の条件で、マウスの頸背部に皮下投与した。

CsA の免疫抑制効果を確認するために、観察終了後、マウスを剖検し脾臓を摘出した。検体を接種していない CsA 投与マウスから摘出した脾臓細胞において、CD4 陽性 T 細胞 (抗 CD3-FITC 抗体及び抗 CD4-PE 抗体染色)、CD8 陽性 T 細胞 (抗 CD3-FITC 抗体及び抗 CD8-PE 抗体染色) 及び B 細胞 (抗 CD45-PE 抗体染色) について Fluorescence Activated Cell Sorter (FACScan, BECTON DICKINSON) を用いて解析した。

【接種】

マウスは耳パンチ法によりマーキングし個体識別した。希釈して 1×10^8 PFU/mL に調製した各検体 0.5mL を、1群 6 匹の CsA 投与マウスに腹腔内接種した。

【評価】

接種後 14 日間観察した。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、実験検体接種日から 2 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（検体接種日）の平均値を基準とする変化率を算出した。

c) マウス WR チャレンジ実験 1

【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。ワクシニアウイルス Western Reserve (vv-WR) 株は、American Type Culture Collection (ATCC) より入手し化血研で培養したものを使用した。

【使用動物】

BALB/c マウス（生後 6 週齢、雌、SPF）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。

【免疫】

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。1 群 5 匹のマウスに希釈して $10^{7, 8, 9}$ 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（接種量は $2.5 \mu\text{L}$ 程度と想定した）。

【vv-WR チャレンジ】

免疫 3 週間後に、麻酔下で、 10^6 PFU の vv-WR を鼻腔内接種した。

【評価】

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。

観察 14 日目の平均生存期間については Log-rank test 法を用いて、LC16m8 免疫群と非免疫群との間で有意差検定を行った。

観察期間中、vv-WR チャレンジ日から毎日体重測定し、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（vv-WR チャレンジ日）の平均値を基準とする変化率を算出した。また、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。

d) マウス WR チャレンジ実験 2

【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 (LO) 株は、千葉県血清研究所より、ワクシニアウイルス Western Reserve (vv-WR) 株は American Type Culture Collection (ATCC) より入手し化血研で培養したものを使用した。

【使用動物】

BALB/c マウス（生後 5 週齢、雌、SPF）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。

【免疫】

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。1 群 5 匹のマウスに希釈して $10^{5, 6, 8, 9}$ 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（接種量は $2.5 \mu\text{L}$ 程度と想定した）。

【vv-WR チャレンジ】

免疫 1、3、7 週間後に、麻酔下で、 $10^{6.3}$ PFU の vv-WR を鼻腔内接種した。

【評価】

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。

観察 14 日目の平均生存期間については Log-rank test 法を用いて、非免疫群と LC16m8 又は L0 免疫群との間で有意差検定を行った。

観察期間中、vv-WR チャレンジ日から毎日体重測定し、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（vv-WR チャレンジ日）の平均値を基準とする変化率を算出した。また、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。

C. 研究結果

a) SCID マウス Scarification 接種実験

図 1 に示すように、観察 45 日目における生存率については L0 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、L0 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 L0 接種群よりも統計上有意に長かった。

各検体接種群の症状変化については、図 2 に示すように、L0 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

初期に 1 例で症状が認められた。

各検体接種群の体重変化については、図 3 に示すように、L0 接種群では接種後 6 日目以降徐々に体重減少がみられ、最終的に減少率は約 40%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。

b) CsA 投与マウス腹腔内接種実験

図 4 に示すように、サイクロスポリン A (CsA) を投与したマウスは、非投与マウスと比較して、CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞が約 20% 減少していることが確認できた。一方、B 細胞では減少は確認されなかった。このことは、T 細胞特異的な免疫抑制状態であることを示唆している。

各検体接種群の症状変化については、図 5 に示すように、L0 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。

各検体接種群の体重変化については、図 6 に示すように、CsA 50mg/kg を投与した L0 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。

c) マウス WR チャレンジ実験 1

表 1 に示すように、WR チャレンジ後 14 日目における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 日であったのに対し、LC16m8 免疫群で