

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。

各免疫群の体重変化については、図 7 に示すように、非免疫群では WR チャレンジ後 3 日目以降急激に体重減少がみられ、最終的に減少率は約 35%に達した。一方、LC16m8 免疫群ではいずれの免疫量においても体重減少は確認されなかった。

各検体接種群の症状変化については、図 8 に示すように、非免疫群ではチャレンジ後早期に症状が現れ、症状が急激に悪化した。一方、LC16m8 免疫群では症状は全く認められなかった。

d) マウス WR チャレンジ実験 2

【免疫後 1 週目の WR チャレンジ】

表 2 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 免疫群及び L0 免疫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、非免疫群で 5 日であったのに対し、LC16m8 免疫群又は L0 免疫群では >14 日であった。LC16m8 免疫群及び L0 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。

各免疫群の体重変化については、図 9 に示すように、非免疫群では WR チャレンジ後 2 日目以降急激に体重減少がみられ、最終的に減少率は約 35%に達した。一方、LC16m8 免疫群及び L0 免疫群ではチャレンジ後初期に約 5%の体重減少がみられたが、その後順調に回復した。

各検体接種群の症状変化については、図 10 に示すように、非免疫群ではチャレンジ後早期に症状が現れ、症状が急激に悪化し

全例が死亡した。一方、LC16m8 免疫群及び L0 免疫群では症状は全く認められなかった。

【免疫後 3 週目の WR チャレンジ】

表 2 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。L0 免疫群では 2.5×10^2 PFU 免疫群では死亡例があり 3/5 であったが、その他の免疫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、非免疫群で 5.2 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、いずれの免疫量においても非免疫群よりも統計上有意に長かった。L0 免疫群では 2.5×10^2 PFU 免疫群は 10.4 日であり、その他の免疫群では >14 日であった。L0 免疫群の平均生存期間は、 2.5×10^2 PFU 免疫群と非免疫群との間には有意差は確認できなかったが、その他の免疫群は非免疫群よりも統計上有意に長かった。

各免疫群の体重変化については、図 11 に示すように、非免疫群では WR チャレンジ後 2 日目以降急激に体重減少がみられ、最終的に減少率は約 35%に達した。LC16m8 免疫群では、チャレンジ後初期に最大 10%程度の体重減少がみられたが、その後順調に回復した。L0 免疫群では 2.5×10^2 PFU 免疫群で死亡 2 例に起因する最大 10%程度の体重減少がみられた。その他の免疫群ではチャレンジ後初期に約 5%の体重減少がみられたが、その後順調に回復した。

各検体接種群の症状変化については、図

12 に示すように、非免疫群ではチャレンジ後早期に症状が現れ、症状が急激に悪化し全例が死亡した。LC16m8 免疫群では 2.5×10^2 PFU 免疫群及び 2.5×10^3 PFU 免疫群でチャレンジ後初期から中期にかけて症状(毛並みの乱れや逆毛)がみられたが、その後完全に回復した。その他の免疫群では症状は全く認められなかった。L0 免疫群では 2.5×10^2 PFU 免疫群で 2 例が症状の悪化に伴い死亡した。その他の免疫群では症状は全く認められなかった。

【免疫後 7 週目の WR チャレンジ】

表 2 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。LC16m8 免疫群では 2.5×10^2 PFU 免疫群では死亡例があり 4/5 であったが、その他の免疫群では観察終了時まで死亡例は無く 5/5 であった。L0 免疫群では 2.5×10^2 PFU 免疫群では死亡例があり 4/5 であったが、その他の免疫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、非免疫群で 4.8 日であったのに対し、LC16m8 免疫群では 2.5×10^2 PFU 免疫群は 12.2 日であり、その他の免疫群では >14 日であった。LC16m8 免疫群の平均生存期間は、いずれの免疫量においても非免疫群よりも統計上有意に長かった。L0 免疫群では 2.5×10^2 PFU 免疫群は 12.4 日であり、その他の免疫群では >14 日であった。L0 免疫群の平均生存期間は、いずれの免疫量においても非免疫群よりも統計上有意に長かった。

各免疫群の体重変化については、図 13 に示すように、非免疫群では WR チャレンジ後 3 日目以降急激に体重減少がみられ、最終

的に減少率は約 30%に達した。LC16m8 免疫群では、 2.5×10^2 PFU 免疫群及び 2.5×10^3 PFU 免疫群でチャレンジ後中期までに最大 15%程度の体重減少がみられたが、その後順調に回復した。その他の免疫群ではチャレンジ後初期に 10%程度の体重減少がみられたが、その後順調に回復した。L0 免疫群では 2.5×10^2 PFU 免疫群でチャレンジ後中期までに最大 15%程度の体重減少がみられたが、その後順調に回復した。その他の免疫群ではチャレンジ後初期に 10%程度の体重減少がみられたが、その後順調に回復した。

各検体接種群の症状変化については、図 14 に示すように、非免疫群ではチャレンジ後早期に症状が現れ、症状が急激に悪化し全例が死亡した。LC16m8 免疫群では、 2.5×10^2 PFU 免疫群で 1 例が症状の悪化に伴い死亡した。 2.5×10^3 PFU 免疫群でもチャレンジ後初期から中期にかけて症状(毛並みの乱れや逆毛)がみられたが、その後完全に回復した。その他の免疫群では症状は全く認められなかった。L0 免疫群では 2.5×10^2 PFU 免疫群で 1 例が症状の悪化に伴い死亡した。その他の免疫群では症状は全く認められなかった。

D. 考察

今回、SCID マウスや免疫抑制剤 CsA 投与マウスを用いた安全性評価実験において、LC16m8 ワクチンが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。このことは、生ワクチンの接種禁忌対象である免疫不全又は抑制状態の患者に対する安全性を示唆するものであった。また、今後、近年患者が増大しているアトピー性皮膚炎や湿疹患者を想定した動物実

験モデルでの研究も、本ワクチン LC16m8 の使用を想定した場合、重要であると考える。

マウスを用いた有効性評価実験において、LC16m8 ワクチンは WHO の天然痘撲滅活動時に使用された Lister(Elstree)株と同等の感染防御効果があることを示す成績が得られた。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。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更なる詳細な研究が必要である。

一方、最近の研究においては、ワクシニアウイルスの宿主細胞に対する親和性(感染性)又は増殖性に関する細胞レベルでの評価研究や、病原性や免疫原性に関する遺伝子レベルから蛋白質レベルま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。

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、製造したロットを用いて実施した安全性及び有効性評価動物実験において、LC16m8 株樹立時に確認された成績と同様に、本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。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

金原知美、倉永雅彦、横手公幸、新村

靖彦、大隈邦夫、橋爪壯。『乾燥細胞培養痘そうワクチンの安全性評価』。第53回日本ウイルス学会学術集会（2005年11月、横浜）

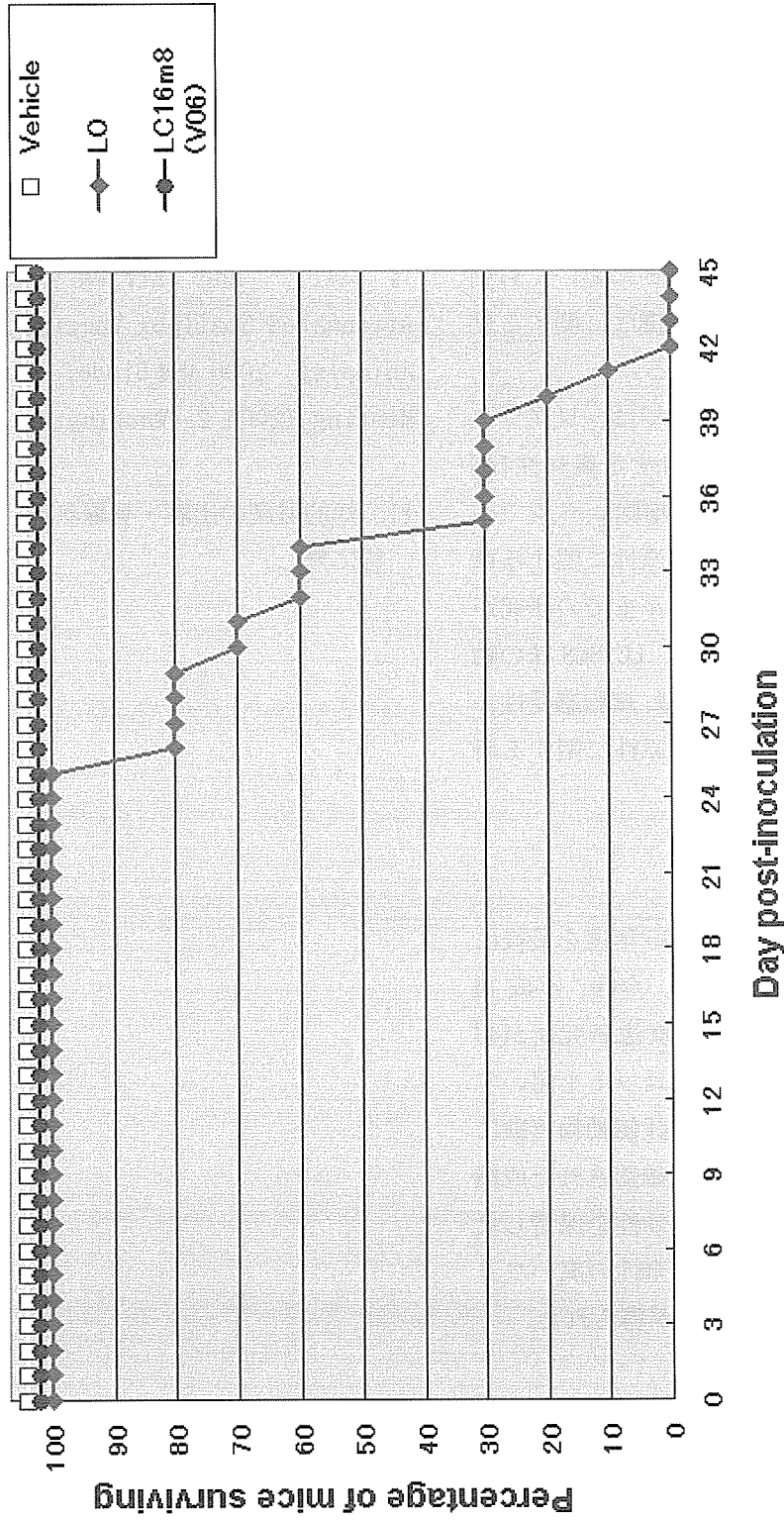
H. Yokote, Y. Shinmura, A. Satou, T. Kanehara, M. Kuranaga, K. Ohkuma, T. Oka, A. Funatsu, S. Morikawa, M. Saijo, I. Kurane, T. Kurata, So Hashizume. 『 Safety and Efficacy Study of Attenuated Smallpox Vaccine LC16m8 in Animals』 2006 ASM Biodefense Research Meeting (2006.2. Washington, DC, USA)

H. 知的財産の出願・登録状況

特に無し。

以上

Figure 1. Survival



Strain	Dose (log ₁₀ PFU)	Survival Rate	Mean Survival Time (days)
Vehicle	-	5/5	>45
LO	5.4	0/10	33.2
LC16m8	5.4	10/10	>45

$P < 0.001$

図2. Clinical scores

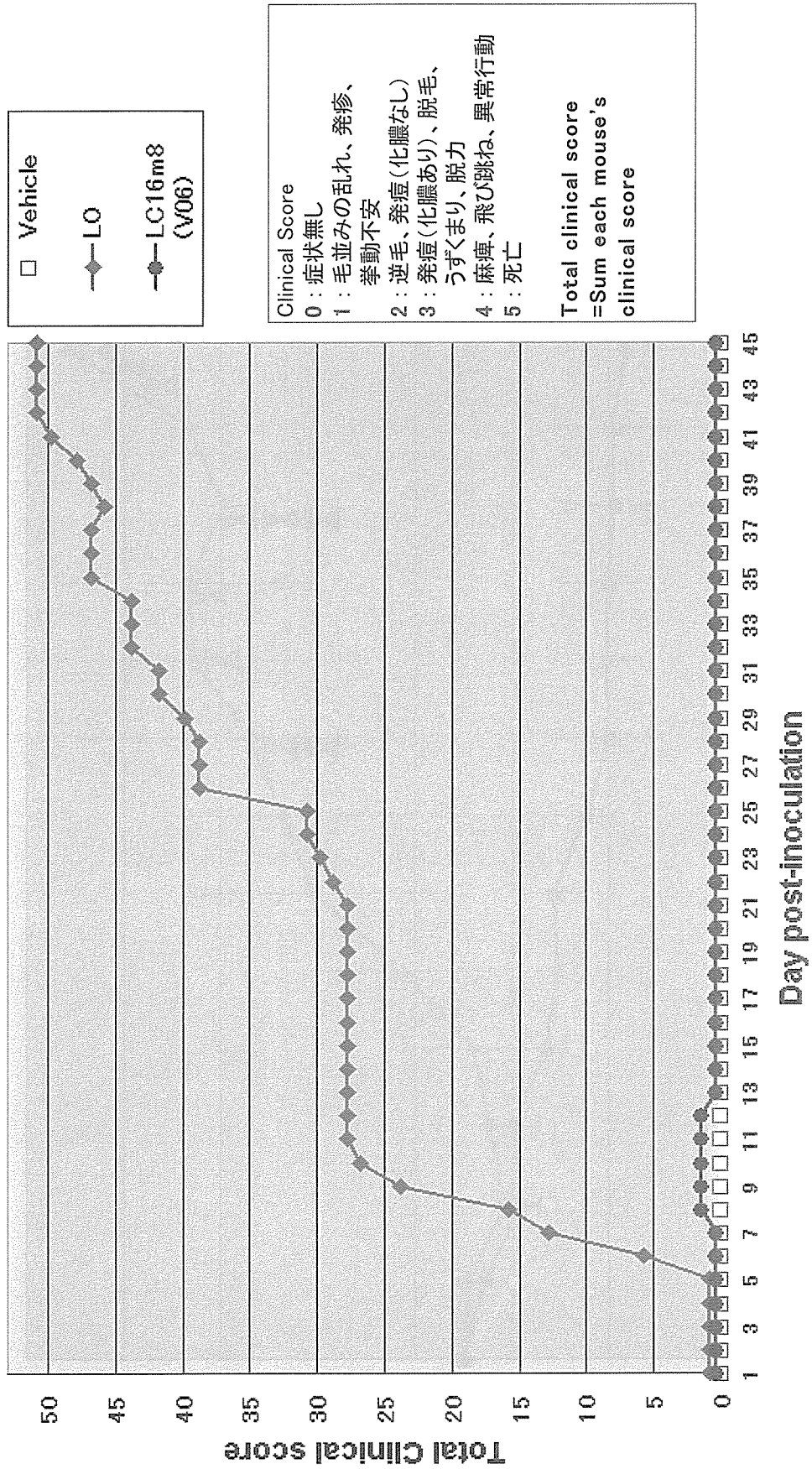
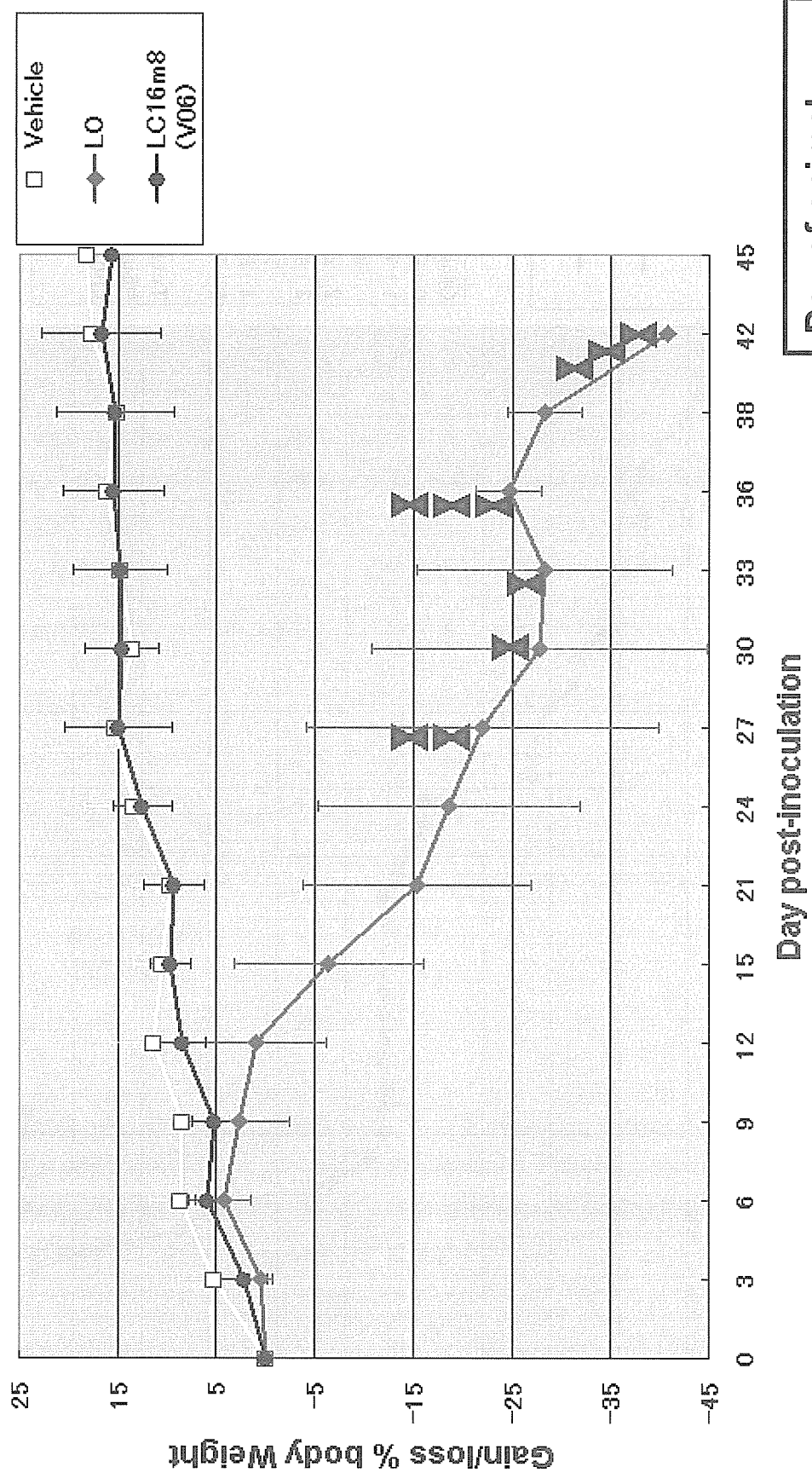


Figure 3. Body weight change



Day of animal deaths is noted ∇ .

4. Effects of cyclosporine A on immunocytes

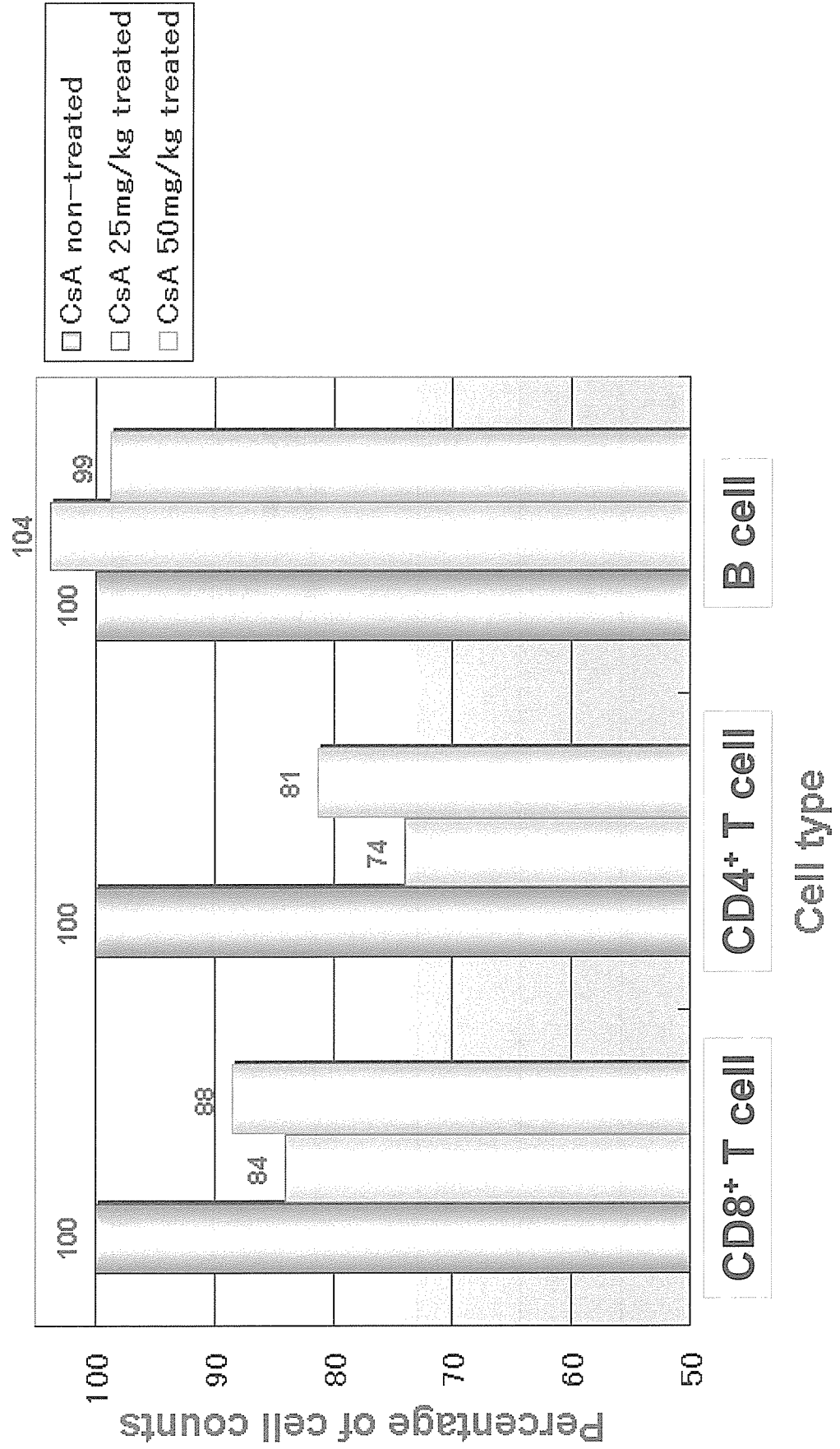


図5. Clinical scores

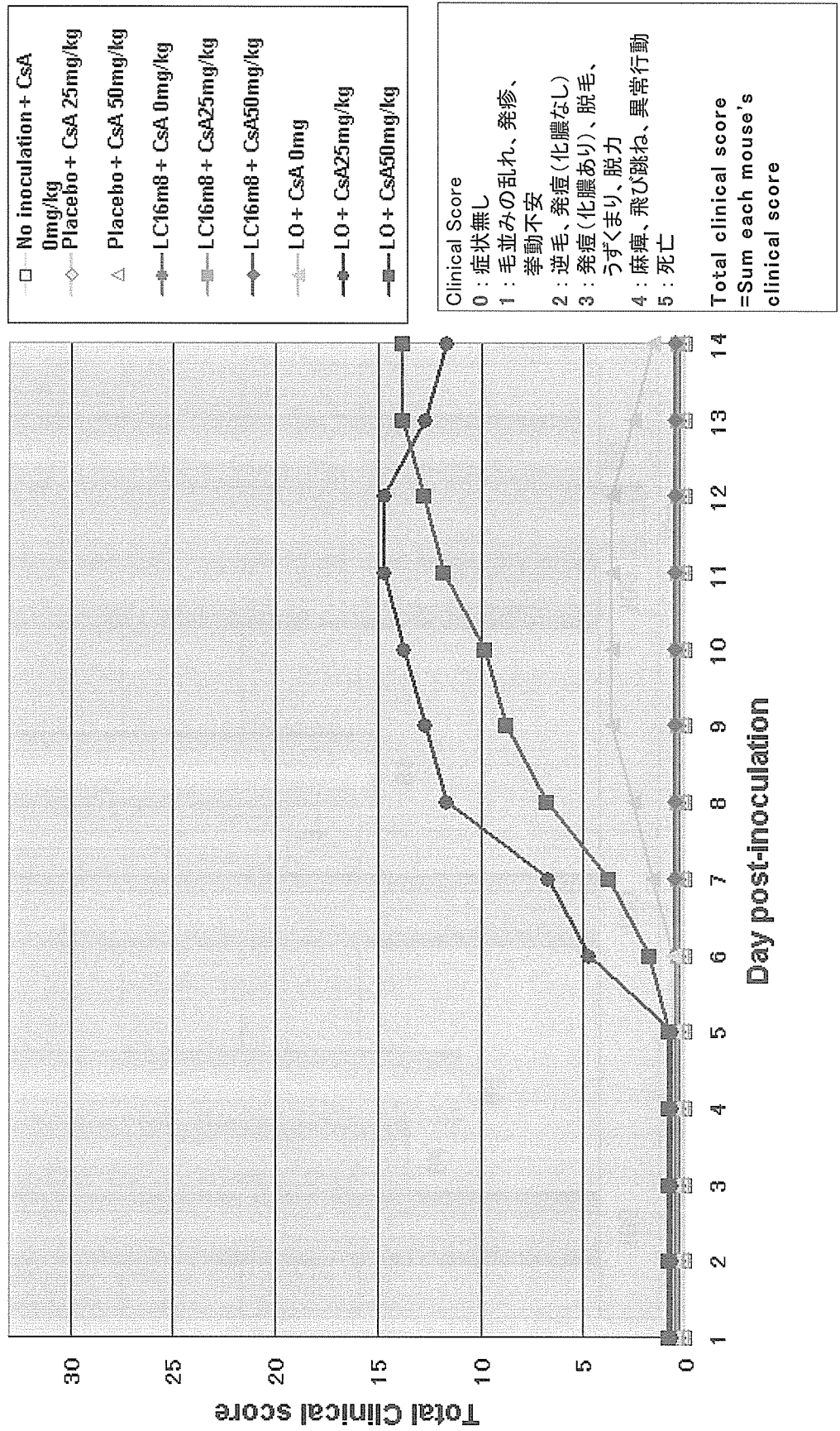


Figure 6. Body weight change

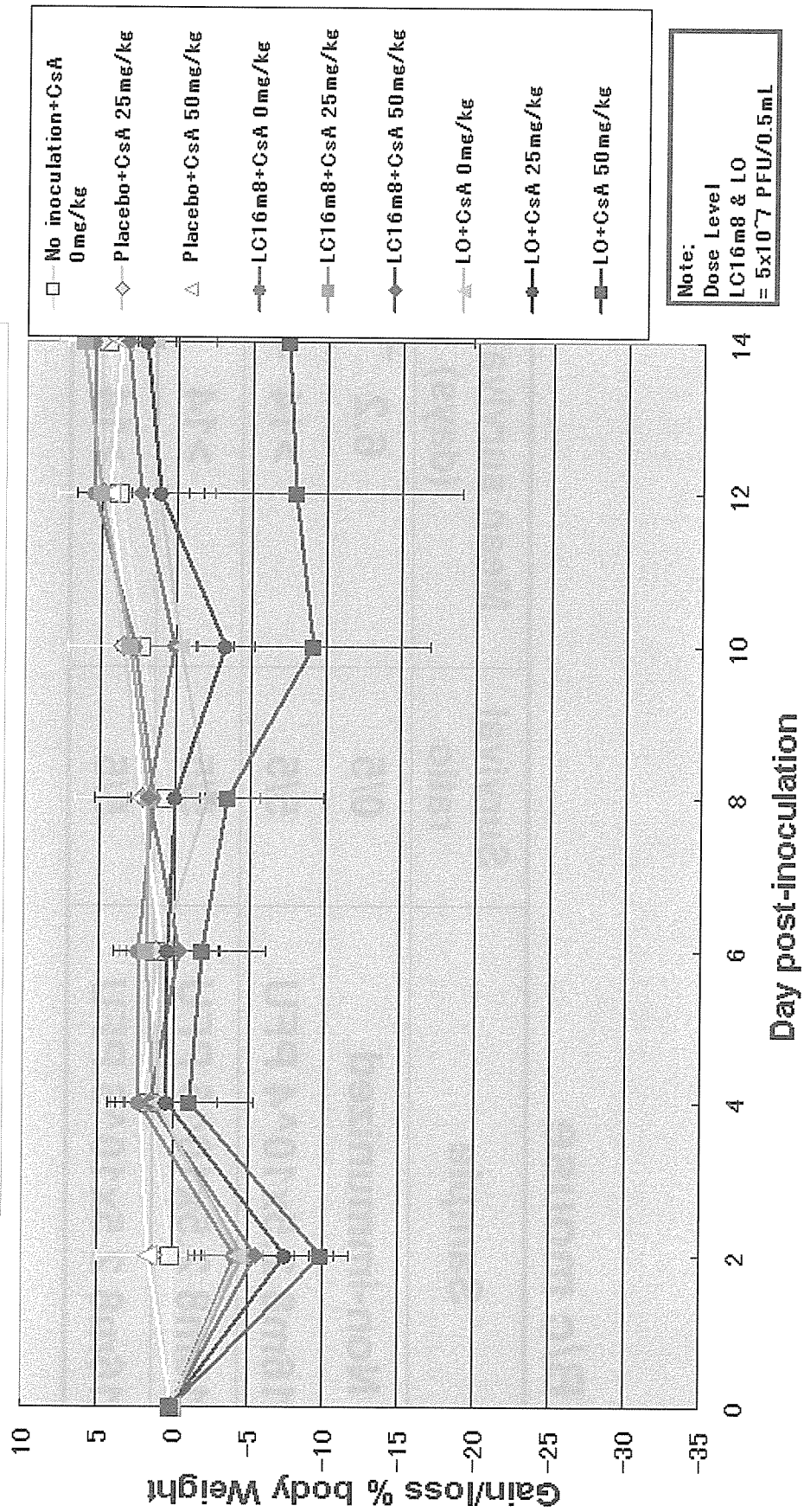
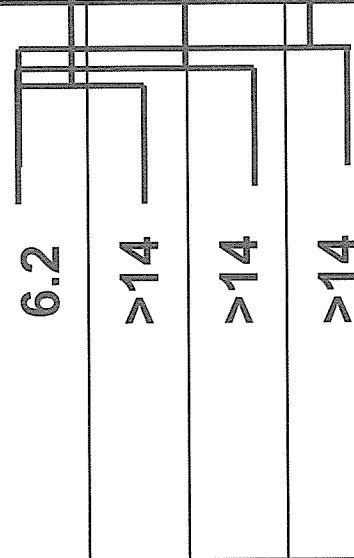


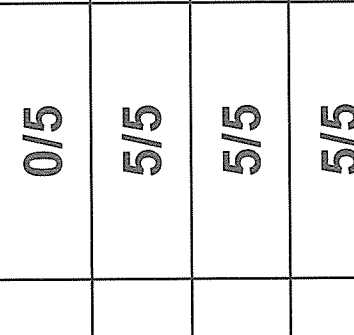
表1. Survival

BALB/c mouse

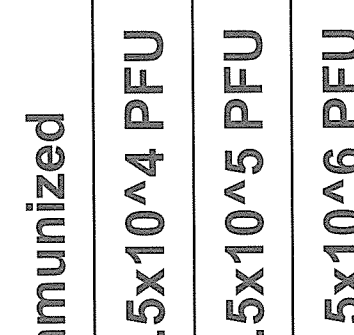
Sample	Survival ratio	Mean survival time (days)
Non-immunized	0/5	6.2
LC16m8 2.5×10^4 PFU	5/5	>14
LC16m8 2.5×10^5 PFU	5/5	>14
LC16m8 2.5×10^6 PFU	5/5	>14



 P = 0.002

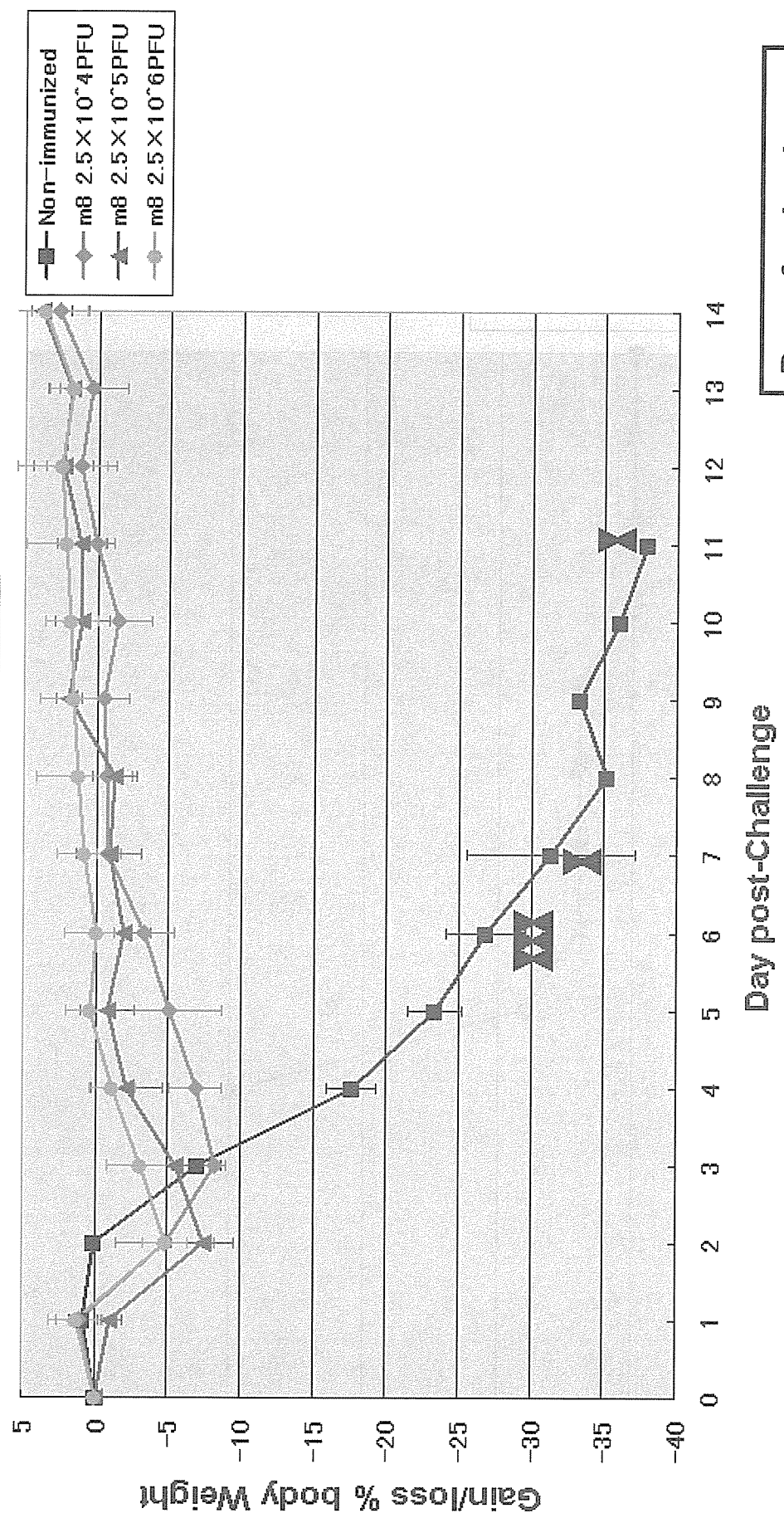


 P = 0.002



 P = 0.002

Figure 7. Body weight change



Day of animal deaths is noted X.

図8. Clinical scores

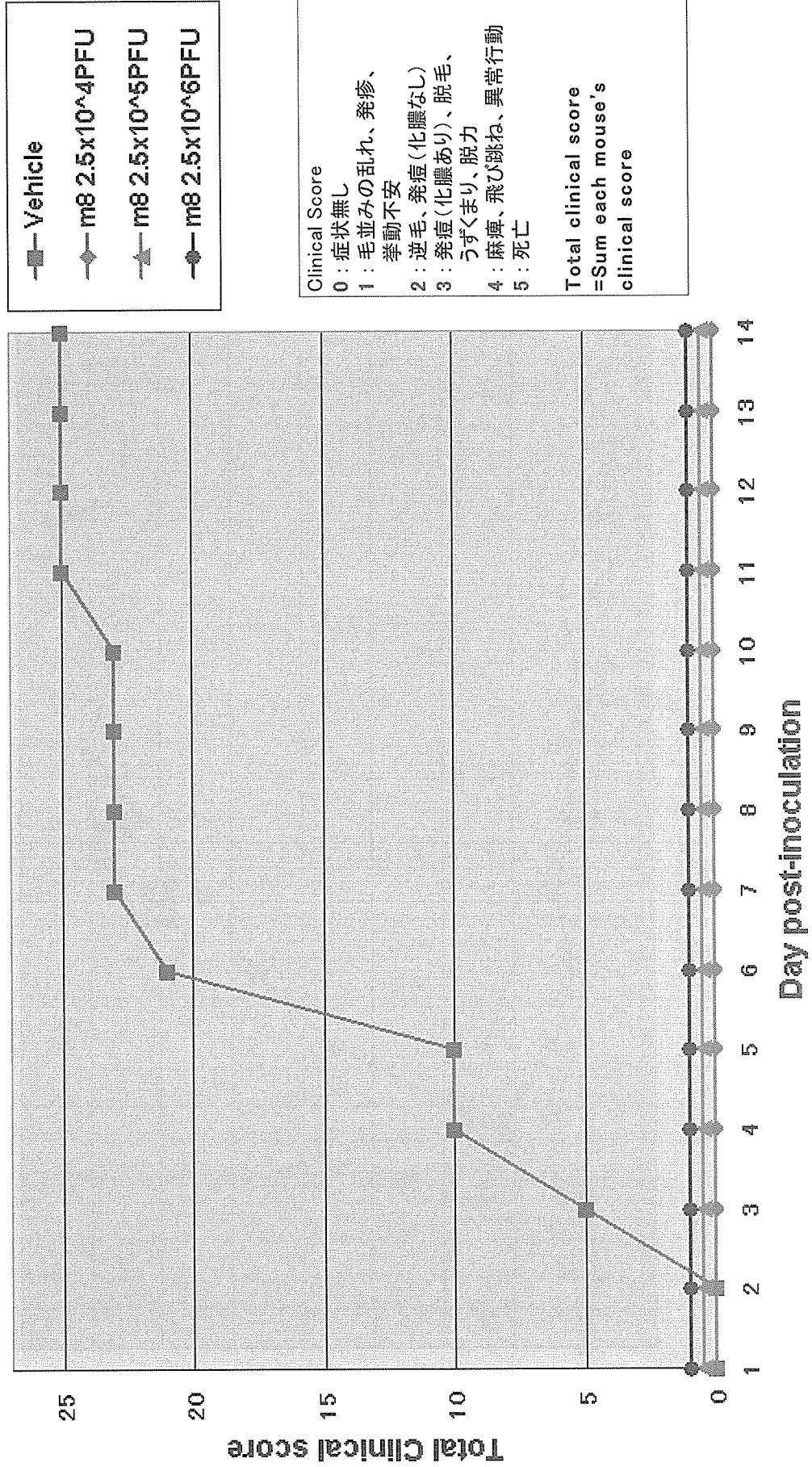


表2. Survival

1 week post-vaccination

Sample (PFU)	Survival ratio	Mean survival time (days)	Log rank test
Non-immunized	0/5	5	—
LC16m8 2.5x10 ⁵	5/5	>14	P=0.002
LO 2.5x10 ⁵	5/5	>14	P=0.002

3 week post-vaccination

Sample (PFU)	Survival ratio	Mean survival time (days)	Log rank test
Non-immunized	0/5	5.2	—
m8 2.5x10 ⁶	5/5	>14	P=0.002
m8 2.5x10 ⁵	5/5	>14	P=0.002
m8 2.5x10 ³	5/5	>14	P=0.002
m8 2.5x10 ²	5/5	>14	P=0.002
LO 2.5x10 ⁵	5/5	>14	P=0.002
LO 2.5x10 ³	5/5	>14	P=0.002
LO 2.5x10 ²	3/5	10.4	P=0.083

7 week post-vaccination

Sample (PFU)	Survival ratio	Mean survival time (days)	Log rank test
Non-immunized	0/5	4.8	—
m8 2.5x10 ⁶	5/5	>14	P=0.002
m8 2.5x10 ⁵	5/5	>14	P=0.002
m8 2.5x10 ³	5/5	>14	P=0.002
m8 2.5x10 ²	4/5	12.2	P=0.011
LO 2.5x10 ⁵	5/5	>14	P=0.002
LO 2.5x10 ³	5/5	>14	P=0.002
LO 2.5x10 ²	4/5	12.4	P=0.005

Figure 9. Body weight change

(Challenge at 1 week post-vaccination)

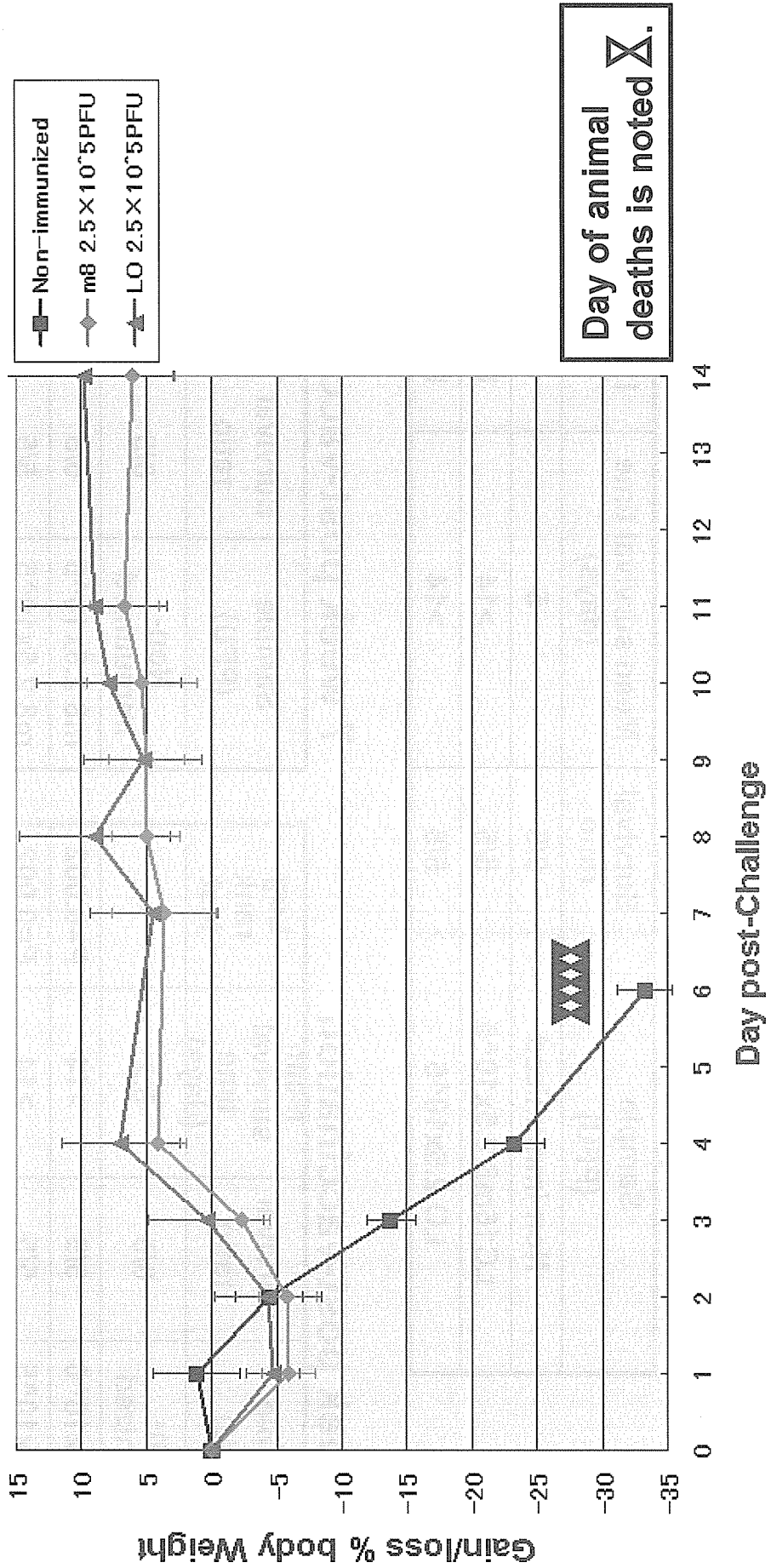


図10. Clinical scores

(Challenge at 1 week post-vaccination)

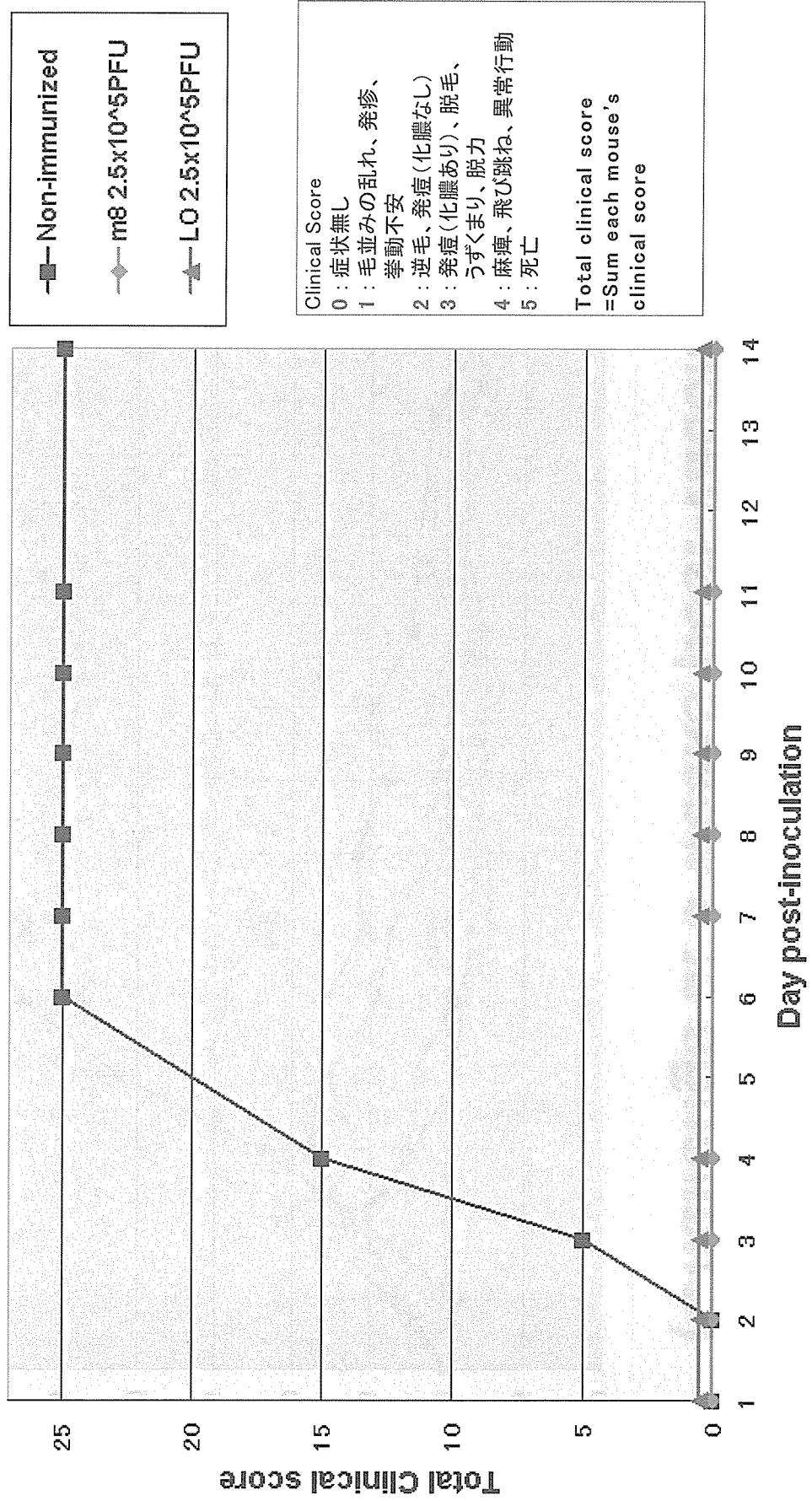


Figure 11. Body weight change

(Challenge at 3 weeks post-vaccination)

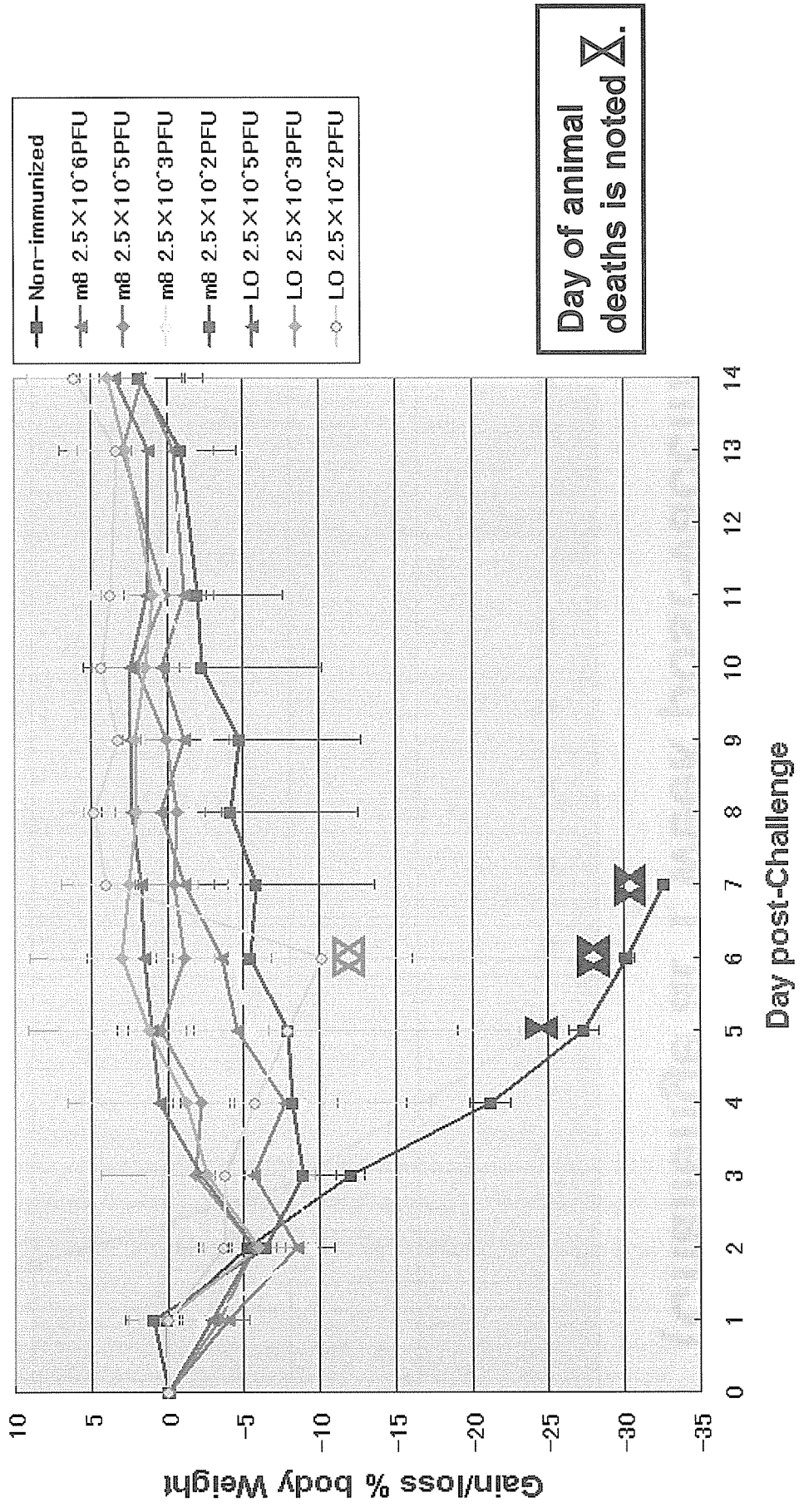


図12. Clinical scores

(Challenge at 3 weeks post-vaccination)

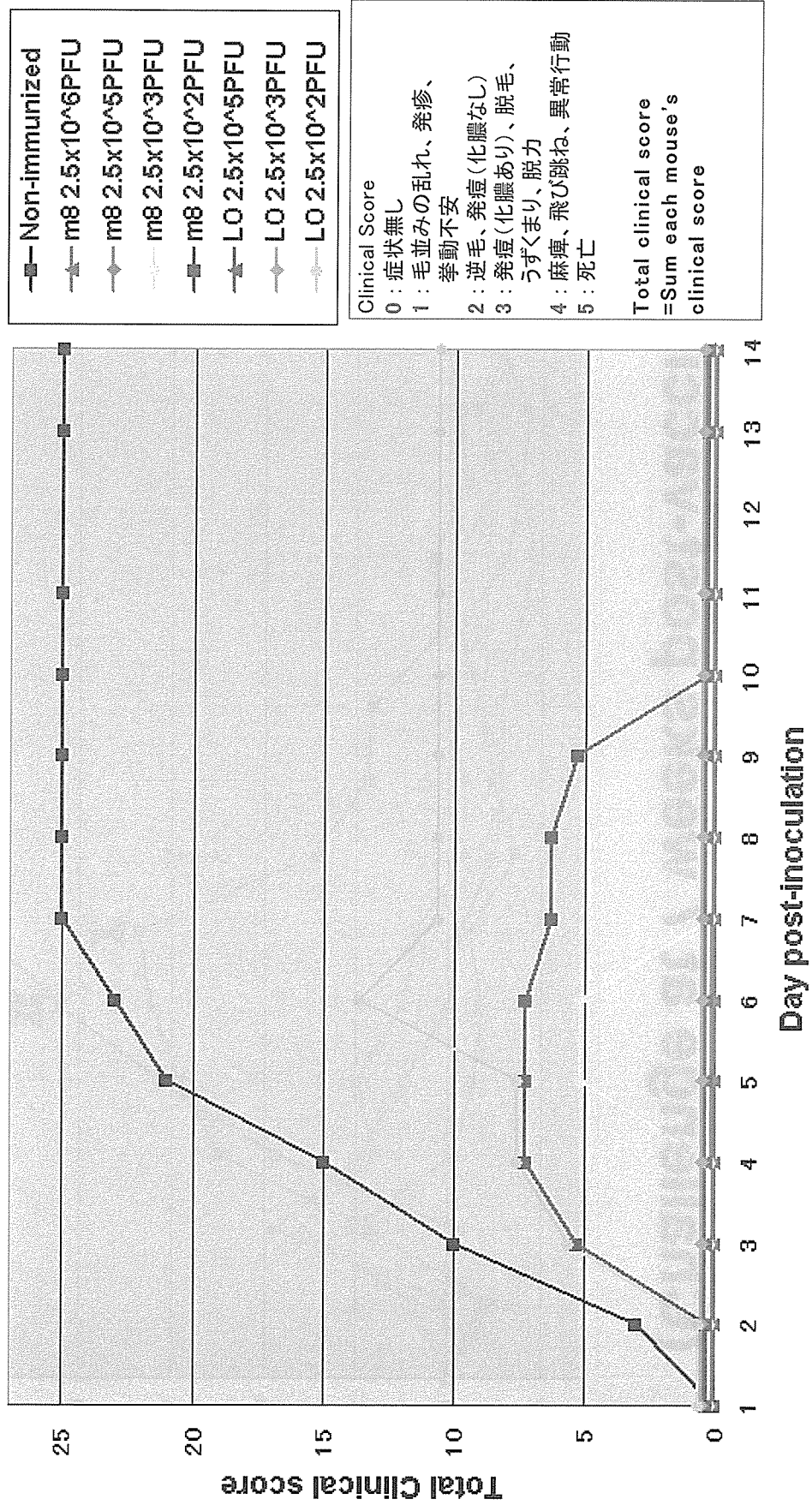
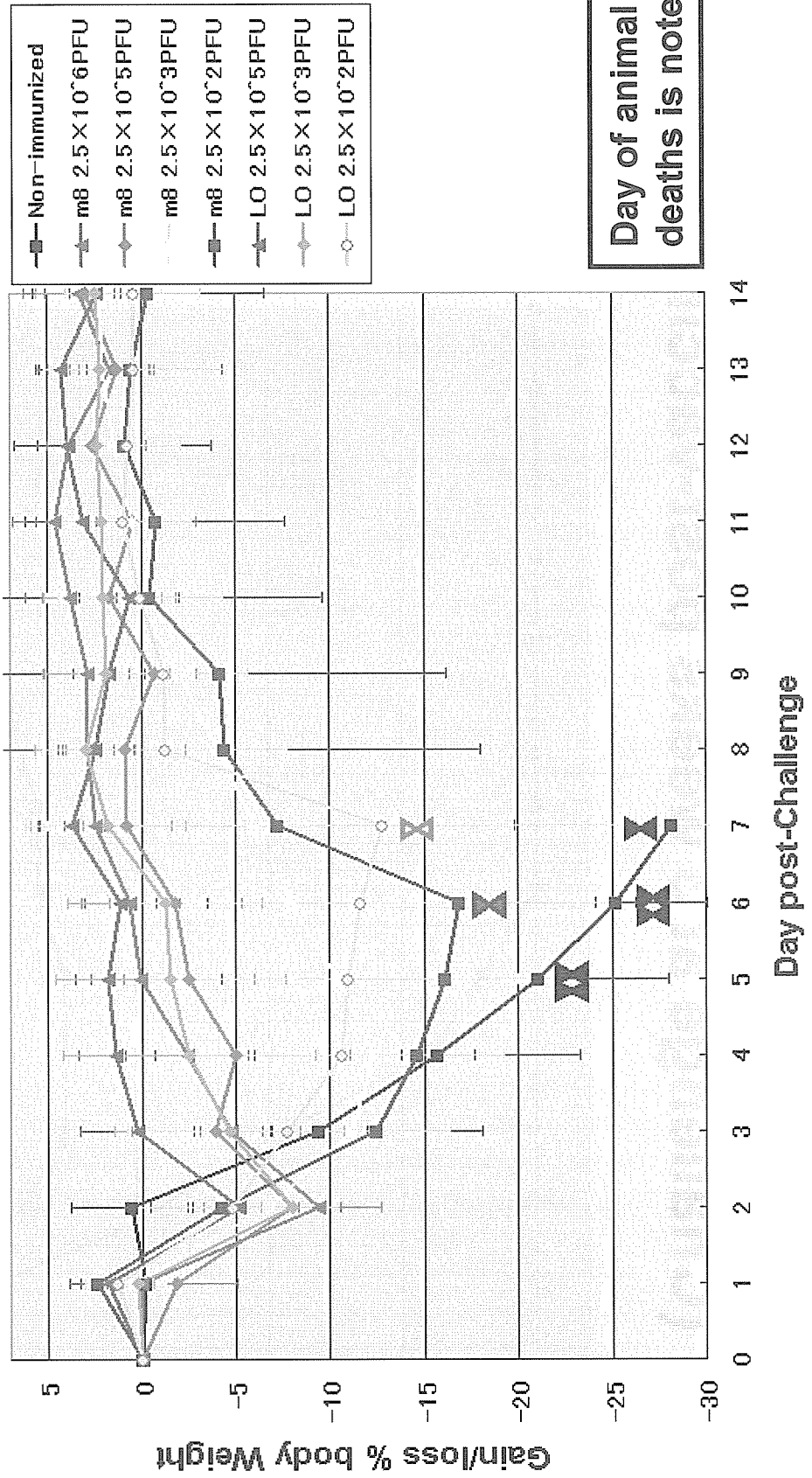


Figure 13. Body weight change

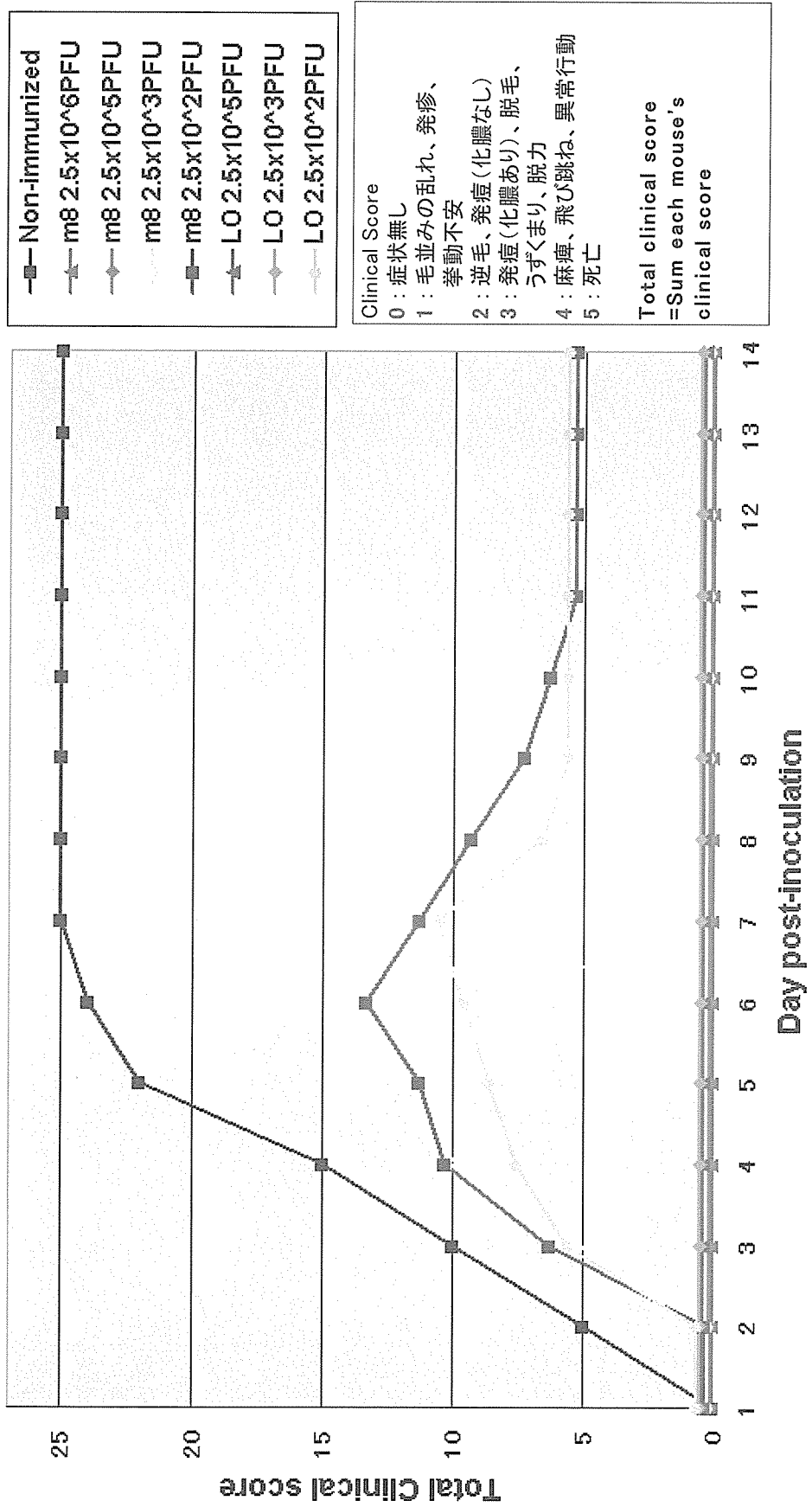
(Challenge at 7 weeks post-vaccination)



Day of animal deaths is noted X.

図14. Clinical scores

(Challenge at 7 weeks post-vaccination)



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：LC16m8の生産方法の検討

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：岡 徹也 財団法人 化学及血清療法研究所 常務理事
協力研究者：倉永雅彦 財団法人 化学及血清療法研究所 第一製造部第二課課長
協力研究者：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
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
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

研究要旨：天然痘ウイルスを用いた生物テロに対する対策を想定した場合、痘そうワクチンの生産方法の研究は大きな課題である。ワクチン製造の管理条件の最適化は、量的検討だけでなく、安定生産を行う為の品質管理に関する研究が重要である。本研究では、痘そうワクチン LC16m8 の品質向上、生産性向上のために、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。

A. 研究目的

痘そうワクチン LC16m8 は、弱毒生ウイルスワクチンであることから、その品質と生産性を確保するためには、製造管理条件が重要であり、今回その最適化を目的とした研究を実施した。

B. 研究方法

a) 細胞基質と温度感受性の関連性検討

【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。

【使用細胞株】

RK-13 細胞は千葉県血清研究所から入手し 5%FBS 添加 MEM 培地で培養したものを使用した。MRC-5 細胞は American Type Culture Collection (ATCC) から購入し 10%FBS 添加 MEM 培地で培養したものを使用した。Vero E6 細胞は国立感染症研究所から入手し 5%FBS 添加 D' MEM 培地で培養した