

経口脂肪酸摂取によるアルツハイマー病の発症予防法 開発に関する研究

所属:国立長寿医療センター研究所 アルツハイマー病研究部

研究者:道川 誠

研究要旨:経口脂肪酸摂取によって、アルツハイマー病病理である脳内 A β 沈着抑制効果ならびに認知機能障害予防効果を検討するプロジェクトである。その目的のために、アルツハイマー病モデル動物に様々な脂肪酸構成を変化させた餌を長期投与し、脳内 A β 沈着ならびに認知機能進行に対する予防効果を評価し、そのメカニズムの解明を行った。本年度は、アラキドン酸含有餌の摂取によってアルツハイマー病モデル動物脳における A β 沈着が抑制されること、脳内炎症分子の産生を抑制することを明らかにした。

分担研究者

- (1) サントリー株式会社 健康科学研究所
河島 洋
- (2) サントリー株式会社 健康科学研究所
紺谷 昌仙
- (3) 福祉村病院長寿医学研究所 赤津 裕康

A. 研究目的

研究活動の概要

経口脂肪酸摂取によるアルツハイマー病病理である脳内 A β 代謝ならびに認知機能障害に対する予防効果を検討する。そのために、アルツハイマー病モデル動物に様々な脂肪酸構成を変化させた餌を長期投与し、脳内 A β 沈着ならびに認知機能進行に対する予防効果の評価と、そのメカニズムの解明を行う。さらに、ヒト脳サンプルにおける脂肪酸解析と A β 沈着との関連を解析する。

B. 研究方法

アルツハイマー病モデルマウスの Tg2576 マウスに各種脂肪酸を含む餌を長期間摂餌(9ヶ月齢から 17ヶ月齢)させた後、脳を回収、ELISAによる A β 量の定量、thioflavin S 染色や抗 A β 抗体を用いた免疫染色による老人斑形成について評価を行った。その結果、とくにアラキドン酸を摂餌した Tg2576 で脳内 A β 沈

着の抑制が認められた。この結果を踏まえ、更にアラキドン酸が A β 産生、分解、除去といった A β 代謝に及ぼす影響を検討する(以上、道川)。また、赤津らは、ヒト組織、血液、髄液を用いて細胞膜、脂質・脂肪酸の変化、 β ・ γ セクレターゼ活性および A β 分解活性への影響、疾患・病態との関連を検討する。各種脂肪酸を含む餌の作成ならびにマウス・ヒト脳、各種臓器の脂肪酸解析では、モデルマウス(17月齢)から大脳皮質、肝臓、血液(血漿、赤血球)を採取し、それぞれの組織より油脂を抽出した上で、薄層クロマトグラフィーでリン脂質画分を分離し、メチルエステル体に誘導した後に、ガスクロマトグラフィーにより、脂肪酸の同定および定量を行った。(サントリー研究所 河島、紺谷)。

(倫理面への配慮)

動物実験、遺伝子組換え実験およびヒト由来試料を用いる実験については、研究計画申請を当該研究施設に提出し、その内容については倫理委員会または実験動物倫理委員会によって法令(下記を参照)に定められた基準への適合性について審査され、承認を得て行う。動物実験については、わが国における「動物の愛護及び管理に関する法律」、「厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知における基本指針」、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」、「動物の処

分方法に関する指針」等の遵守、また遺伝子組換え実験においては、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」、ヒト由来試料を用いる実験においては、生命倫理面および個人情報管理面で最大限の努力を払い、「ヘルシンキ宣言」などの法令等を遵守して研究を行う。

C. 研究成果

[$A\beta$ 産生/分解に及ぼす影響] アラキドン酸摂取が $A\beta$ 沈着量を減少させたことから、 $A\beta$ 代謝に関連する酵素発現について検討した。評価した酵素は $A\beta$ 産生酵素の BACE1、PS1 と $A\beta$ 分解酵素の neprilysin、IDE、ACE である。その結果、アラキドン酸摂取マウスの上記酵素の発現量に有為な差は認められなかった。

また、*in vitro* の系を用いて、細胞へのアラキドン酸処理が $A\beta$ 産生量を減少させるかどうかを検討した。初代培養ラット神経細胞を調製し、アラキドン酸を処理した。その後、培地中の $A\beta$ 量を ELISA で定量したところ、予想に反して培地中の $A\beta$ 量は有意に増加した。

以上の結果から、アラキドン酸が $A\beta$ 代謝に及ぼす影響としては、むしろ産生増加に働く可能性が明らかになり、この結果からは *in vivo* の結果を説明できないと考えられた。

[$A\beta$ 除去に及ぼす影響] 脳内の $A\beta$ は、ミクログリアによって分解、除去されることから、アラキドン酸がミクログリアの活性化に影響を及ぼすかを検討した。ミクログリアのマーカータンパク質である Iba-1 で免疫染色をした結果、アラキドン酸群のマウスの脳に、活性化ミクログリアの形態を示す細胞を多く観察した。ミクログリアの数は、各餌の間に差はなかったことから、アラキドン酸はミクログリアの活性化を介して、 $A\beta$ 量を減少させる可能性が示唆された。

「ヒトサンプルの準備」剖検を行い、病理サンプル 20 例、血液サンプル 50 例の収集を行った。また髄液、血液のサンプル収集に向けての準備を開始し、50 名以上より承諾の回答を得た。

「サントリー研究所における脂肪酸解析」血

漿リン脂質中のアラキドン酸 (ARA) 組成は、対照飼料群 (6.5±1.1%) に対し、ARA 配合飼料群 (17.8±2.7%)、ARA+ドコサヘキサエン酸 (DHA) 配合飼料群 (17.7±1.7%) で増加し、DHA 配合飼料群 (4.3±0.5%) では減少していた。一方、DHA 組成は対照飼料群 (8.6±0.8%) に対し、DHA 配合飼料群 (12.2±0.9%)、ARA+DHA 配合飼料群 (10.0±0.7%) で増加し、ARA 配合飼料群 (7.4±1.0%) で減少した。この傾向は赤血球膜リン脂質中脂肪酸組成、肝臓リン脂質中脂肪酸組成においても同様であった。

大脳リン脂質中の脂肪酸組成については、対照飼料群、ARA 配合飼料群、DHA 配合飼料群、ARA+DHA 配合飼料群の 4 群間で大きな変化は観察されなかった

D. 考察

現在、アラキドン酸がミクログリアを活性化することが可能か、アラキドン酸による活性化したミクログリアは、実際に $A\beta$ を除去できるかどうか、という視点からも検証を行っている。また、今回のモデルマウス脳の解析結果を検証し、さらにメカニズム解析をさらに進めるために、現在モデルマウスに脂肪酸組成を変化させた餌の長期投与実験を行っている。解析結果は、来年度上半期には明らかになる予定である。またアラキドン酸を含む餌が認知機能にどのような影響を与えるかについても合わせて解析予定であり、これについてもマウスモデルに脂肪酸組成を変化させた餌の長期投与を行っている。

E. 結論

アラキドン酸を豊富に含む餌による長期飼育によって、脳内 $A\beta$ 沈着上昇は有意に抑制された。そのメカニズムとして、ミクログリアの活性化を介して、 $A\beta$ 量を減少させる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表
該当なし。

2.学会発表

該当なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許出願

なし。

2.実用新案登録

なし。

3.その他

なし。

弱毒生ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究

所 属 財団法人 化学及血清療法研究所 品質管理部
研究者 大隈 邦夫
研究期間 平成 18 年 4 月～平成 21 年 3 月

研究要旨:

弱毒生ウイルスワクチンを代表して、乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 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非臨床または臨床研究を行い、痘そうワクチン LC16m8 は国際的に最も優れた天然痘テロ対抗薬の一つであることを示した。

分担研究者:

- (1) 国立感染症研究所 ウイルス第一部
倉根 一郎、森川 茂、西條 政幸
- (2) 国立感染症研究所 感染病理部
佐多 徹太郎、永田 典代
- (3) 自衛隊中央病院
桑原 紀之、中村 幸嗣、藤井 達也
- (4) 防衛医科大学校 防衛医学研究センター
高瀬 凡平、金谷 泰宏
- (5) 慶應義塾大学 医学部
竹内 勤、齋藤 智也
- (6) (財)化学及血清療法研究所 第一製造部
横手 公幸

A. 研究目的

本研究では、弱毒生ウイルスワクチンを代表して、生物テロ対抗薬として国家備蓄用に製造されている乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 について、品質、生産性の向上の研究並びに安全性及び有効性に関する非臨床及び臨床的な研究成績を取得することを目的とした。更に、痘そうワクチン LC16m8 株について最近の科学水準において必要な追加解析に関する調査を実施することも目的とした。このためには、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、痘そうワクチン LC16m8 株に関する更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、非臨床及び臨床両面から安全性と有効性に関する成績を取得することを目的とした。

B. 研究方法

- a) 弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の力価試験、特性解析、有効性及び安全性評価に関する研究—細胞培養痘そうワクチンの温度感受性試験法に関する研究—

現在、細胞培養痘そうワクチンの力価試験、安定性試験、表示確認試験に用いられている「発育鶏卵の漿尿膜上におけるポック形成単位測定法」は、多数の発育鶏卵を用いる試験法で、試験者の手技の習得に時間がかかること、また鶏卵のロットによりウイルス感受性が異なることがあり、更に近年のトリインフルエンザの流行により鶏卵の入手が困難になるおそれがあることなど、問題点も多い。そこで、新たな力価測定法として、「ブランク形成単位測定法」の有用性を比較検討した。

生物学的製剤基準では当該ワクチンの温度感受性を確認する「マーカー試験」の一つとして「増殖温度感受性試験」が規定されている。しかし本試験は、1) 幼若ウサギの初代腎細胞を用いるため、可能であれば動物を使用しない代替法を用いることが望ましいこと、2) LC16m8 株感染細胞は 41℃でも死滅するため、低希釈では多くの細胞が感染により死滅してブランク形成の有無の判定が難しいことから、初代ウサギ腎細胞およびウサギ腎細胞の株化細胞である RK13 細胞を用いて、35℃と 41℃での LC16m8 株と Lister 株の一次増殖を測定し、より有効な温度感受性試験法の開発を検討した。

- b) 弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の安全性評価における病理学的研究—種痘後の副反応評価動物モデルの構築のための病理学的研究—

乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 の安全性評価の一環として、接種禁忌または要注意対象である湿疹またはアトピー性皮膚炎患者およびその既往歴者に対する安全性評価を目的として、種痘性湿疹リスク評価動物モデルの構築を試みている。その病理学的解析のための基礎検討として、すでに行った各種実験動物を用いたボックスウイルス感染実験で作製した、皮膚組織標本でのボックスウイルスによる皮

膚病変を病理学的に再検討し、皮膚におけるウイルス動態と病変形成について基礎検討を行った。

c) 弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の力価試験、特性解析、遺伝子機能解析に関する研究—細胞培養痘そうワクチンの温度感受性に関する研究—

乾燥細胞培養痘そうワクチンの製造承認株である 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℃以上であるのに対し、LC16 株、LC16mO 株、LC16m8 株は 41℃ではプラークを形成しない。LC16m8 株の温度感受性とウイルスの弱毒化との関連は不明であるが、弱毒化の機構を分子生物学に解明することは、乾燥細胞培養痘そうワクチンの安定性・安全性を理解する上で必要である。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、Bacmid による相補試験法を確立し、詳細に解析した。

d) 弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の霊長類におけるサル痘発症予防:長期予防効果に関する検討

カニクイザルにサル痘ウイルス(Zr-599 株)を皮下接種経路で感染させ、その直後に痘そうワクチン LC16m8 を接種、または痘そうワクチン LC16m8 接種後時間をあけてサル痘ウイルスを感染させることにより、乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 のカニクイザルへの 1 回接種によるサル痘発症予防効果誘導に必要な時間および誘導された効果の長期持続能について検討した。

e) 弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の疫学的有効性及び安全性評価に関する研究

既接種世代(1975 年以前に出生)における乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 接種前の抗体保持状況に関する調査を実施した。次に、バイオテロ対処の観点から痘そうワクチン LC16m8 の接種(種痘)を実施された健康成人を対象として、本ワクチンの疫学的な有効性と安全性評価について検討した。

f) 弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の疫学的安全性評価に関する研究

米国備蓄痘そうワクチン Dryvax では接種後の重篤な心膜炎・心筋炎の合併が懸念されている。これまで痘そうワクチン Dryvax における心膜炎合併頻度は 10 万人あたり 16 名程度と報告されている。また、死亡例も報告されており、我々が臨床適応拡大を考えている乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8

においても、同様の重篤心膜炎の合併が懸念される。心膜炎副作用の診断は、臨床症状、血清検査、心電図よりなされる。2002 年以来約 8000 名以上の成人に乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 を接種しているが、これまでに心膜炎を示唆する臨床症状や血清 troponin T 値異常は認められない。しかし、心電図所見の詳細は十分に検討されていない。今回は心筋障害に関係する心電図指標を検討し、これまで痘そうワクチン LC16m8 を接種した症例から一部の症例を任意に抽出し痘そうワクチン LC16m8 接種前後の心電図記録を解析した。さらに、年齢性を適合させた対照例の経時的な心電図変化と比較検討した。また、心電図から得られる心筋障害と相関する心拍変動指標についても検討を加えた。

g) 弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の疫学的有効性及び安全性評価における統計学的研究

弱毒生痘そうワクチン LC16m8 株は 1970 年代に小児にて臨床研究が行われ、非弱毒痘そうワクチン株と同等またはそれ以上の免疫原性を有していることが確認されていた。しかしながら、成人および既接種者に対する免疫原性に関する臨床研究はこれまで行われてこなかった。本研究では、乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 のヒトにおける有効性の判定のため、ヒトへの接種による免疫原性を中和抗体価で評価した。また、接種株に対する中和抗体価同様、天然痘根絶前にフィールドで使われていたワクチン株に対しても同等な中和抗体価上昇を認めるかどうか検討した。さらに、近年取り入れつつあるプロテオミクス解析による手法を取り入れ、主要抗原への免疫反応を調査した。

h) 弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の長期保管に伴う検討及び品質向上に寄与する評価系の検討

乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 の安定性評価を行い、長期保管安定性に関するデータを取得した。また、製造後の乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 の保管には、少なくとも 2 種類の冷凍庫が使用されているが、保管温度の安定性を重視して自動霜取りを行わないものと、霜取り機能を重視して温度の変動のあるものがある。そこで、異なる機種種の冷凍庫保管での力価変動の差と同一機種種の異なる冷凍庫での保管による力価変動の差に関して検討し、これまでのワクチン保管状況が適切であったかを検討した。

新規の品質管理試験の導入、細胞基材由来不純物の測定系構築、ウサギコロニー及び初代ウサギ腎細胞の安全性確認と迷入ウイルス否定試験実施等、

品質向上に寄与する評価系の検討を行った。

i) 動物モデルを用いた弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の安全性及び有効性に関する基礎的研究

国内外の痘そうワクチン製剤及びワクチニアウイルスの研究動向を調査評価し、乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 が天然痘テロ対抗医薬品に求められると想定される要件を満足しているかについて評価するために、動物モデルを用いて安全性及び有効性検討を行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え体の作製は、文部科学省の承認を得た上で行った。動物実験は、国立感染症研究所または化学及血清療法研究所(化血研)の実験動物倫理委員会の承認を得た上で行った。臨床調査研究は、臨床研究の指針を踏まえるとともに、自衛隊中央病院倫理委員会の承認を得た上で行った。

C. 研究結果

a) 弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の力価試験、特性解析、有効性及び安全性評価に関する研究—細胞培養痘そうワクチンの温度感受性試験法に関する研究—

本研究では、より精度の高い力価測定を可能とするため「プラーク形成単位測定法」の有用性を検討した結果、「発育鶏卵の漿尿膜上におけるポック形成単位測定法」より精度が高いことが明らかとなった。

一方、生物学的製剤基準では「マーカー試験」の一つとして、「増殖温度感受性試験」が規定されているが、より適切な試験法の可能性を検討した結果、RK13 細胞を用いたウイルスの一次増殖測定試験法が有望な代替え法であると考えられた。

b) 弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の安全性評価における病理学的研究—種痘後の副反応評価動物モデルの構築のための病理学的研究—

ボックスウイルス感染後の各種実験動物における皮膚病変について病理学的に再検討した。弱毒生痘そうワクチン LC16m8 株のウサギ皮膚増殖試験では、接種1週間目でウイルス抗原が検出された。また、サル痘ウイルス皮下接種後の痘瘡あるいは発痘の大きさはいずれも接種後2週目がピークであった。一方で SCID マウス標本において発痘観察は4週目でも可能であったが、ウイルス抗原は陰性であった。

c) 弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の力価試験、特性解析、遺伝子機能解析に関する研究

—細胞培養痘そうワクチンの温度感受性に関する研究—

乾燥細胞培養痘そうワクチンの製造承認株である LC16m8 株の温度感受性とウイルスの弱毒化との関連は不明であるが、弱毒化の機構を分子生物学に解明することは、乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 の安定性・安全性を理解する上で必要である。本研究では、LC16m8 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、1)LC16m8 株では温度感受性のリパータントは容易にはできないこと、2)温度感受性の責任遺伝子が近接しない領域に複数存在することが示唆された。そこで、これらをより詳細に解析可能な Bacmid による相補試験法を確立し、3)LC16m8 株、LC16m8 株にみられる A56R の 15 塩基の欠失が、部分的に温度感受性に関与することを明らかにした。

d) 弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の霊長類におけるサル痘発症予防:長期予防効果に関する検討

カニクイザルにサル痘ウイルス(Zr-599 株)を皮下接種経路で感染させ、その直後に痘そうワクチン LC16m8 を接種、または痘そうワクチン LC16m8 接種後時間をあけてサル痘ウイルスを感染させることで、乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 のカニクイザルへの1回接種によるサル痘発症予防効果誘導に必要な時間および誘導された効果の長期持続能について検討した結果、1)サル痘ウイルスに感染したと考えられる時点で痘そうワクチン LC16m8 を接種することによりサル痘の軽症化を誘導することが可能であること、2)痘そうワクチン LC16m8 接種1週間後には、サル痘の発症を完全に予防すること、3)痘そうワクチン LC16m8 接種によるサル痘発症予防効果は接種2~3週間後に最も高く、4週間後には若干低下すること、4)その効果は接種1年後においても同等に持続していること、が明らかにされた。

e) 弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の疫学的有効性及び安全性評価に関する研究

痘そうワクチン既接種世代における未接種者割合を調査した結果、接種回数が1回と推定される世代において未接種者の割合が高く、2回以上のワクチン接種を受けた世代においては、未接種者の割合が低い傾向が見られた。

バイオテロ対処の観点から乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 の接種を実施された健康成人を対象に調査した結果、有効性評価の指標となる善感率については、接種者全体で 92.3%、初回接種 95.2%、再接種者 89.8%と、再接種者で有意に低い傾向が示された($p < 0.001$)。更に、痘そうワクチン接種履歴の異なる

対象者の既存免疫に与える痘そうワクチン LC16m8 接種の影響を評価するために、WR株を抗原ウイルスとする Proteome Microarray Chip を用いて痘そうワクチン LC16m8 接種者の血清(抗体)による抗原認識特異性解析を行った結果、痘そうワクチン LC16m8 による初回接種、過去の Lister 株による接種、痘そうワクチン LC16m8 によるブースター接種で上昇する抗体プロファイルは、抗ワクチニア免疫グロブリン(VIG)や天然痘罹患後血清の抗体プロファイルと主要な抗原について高い共通性を示した。

副反応については、これまでに種痘後脳炎・脳症、皮膚合併症や心筋炎などの重篤な有害事象は発生していない。

f) 弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の疫学的安全性評価に関する研究

約 8000 名の乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 接種群症例のうち心膜炎・心筋炎を示唆する臨床症状を有する例や血清 troponin T 値の異常を示す症例は認められず、症状、血清検査からは痘そうワクチン LC16m8 接種の安全性が確認された。そのうち一部の症例を任意に抽出し痘そうワクチン LC16m8 接種前後の心電図記録を解析した。さらに、年齢性を適合させた対照例の経時的な心電図変化と比較検討した。また、心電図から得られる心筋障害と相関する心拍変動指標についても検討を加えた。その結果、痘そうワクチン LC16m8 接種後の心電図では約 8% の低頻度で非特異的な心電図異常が認められ、心拍変動指標の変化も認められたが臨床的に問題となるものはなかった。

g) 弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の疫学的有効性及び安全性評価における統計学的研究

本研究では、健康成人における乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 接種による免疫原性を中和抗体価およびプロテオミク解析で評価を行い、初回接種者及び既接種者は共に痘そうワクチン LC16m8 接種により中和抗体価は十分な上昇を認め、かつ、主要なウイルス抗原群に対する抗体価の上昇を認めた。これにより、痘そうワクチン LC16m8 の高い免疫原性が示された。

h) 弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の長期保管に伴う検討及び品質向上に寄与する評価系の検討

乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 の長期保管における安定性評価に関する検討を行った結果、旧千葉県血清研究所製造の国家備蓄終了品では最長 60 ヶ月目まで、化血研製造ロットでは 36 ヶ月目まで、

力価の変化は認められず、その他の規格試験もいずれも適合である保存安定性成績が得られた。また、冷凍保存による容器の気密性への影響がないことが確認された。これを受けて、生物学的製剤基準の有効期限は 3 年から 4 年へ延長された。しかし、品質確認(安全性・有効性)に重要な試験法の精度向上や追加試験法の確立等の検討が必要であり、更なる有効期限の延長はしない方針が関係機関の間で合意された。

今般製造された乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 は、これまで 2 種類の異なる冷凍庫に保管されている。そこで冷凍庫の温度状況と保管による力価推移に有意な差があるかを解析した結果、異なる温度条件の冷凍庫で 48 ヶ月保管されたロットでは、ワクチン製造時に比べ力価の低下がなかったことから、当該ワクチンの保管が有効に行われていることが明らかとなった。

品質管理試験方法の検討においては、生物学的製剤基準の力価試験改定案についてパブリックコメントの募集が行われ、今年度(平成 20 年度)末の改定となる見込みである。MSP 含有率試験については、1 mm 以上のプラークを MSP と定義することで、現在の試験法の頑健性を向上できることが示唆された。マーカー試験(ふ化鶏卵漿尿膜接種試験)に関して、今回 RK13 細胞を用いたプラーク法で現行法よりも分離能が高いことが分かった。

新規品質管理試験として、乳のみマウスの神経毒力試験を確立し、品質管理部門において適正に実施できることを確認した。また、ワクチン中の初代ウサギ腎細胞由来の不純物として、蛋白及び核酸を定量する測定系を構築した。

培養基材である初代ウサギ腎細胞について、造腫瘍性試験、オンコウイルス試験を実施した結果、いずれも陰性であった。また、ウサギコロニーから採取した血清について、EMEA が推奨する 14 種類のウサギ感受性ウイルスの試験を実施した結果、全て陰性であった。さらに、初代ウサギ腎細胞について、Co-cultivation 試験、Induction PERT、TEM を実施した結果、いずれも陰性であった。以上より、初代ウサギ腎細胞のワクチン培養基材としての安全性が確認された。また、抗ワクチニアウイルス標準血清選定を目的とする英国 NIBSC 主導の国際的な研究ネットワークへ参加した。

i) 動物モデルを用いた弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の安全性及び有効性に関する基礎的研究

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、国内外の痘そうワクチン製剤及びワクチニアウイルスの研究動向を調査評価し、

今般国家備蓄のために再製造されている乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 が天然痘テロ対抗医薬品に求められると想定される要件を満足しているかについて動物モデルを用いた検討を行った。

安全性評価においては、皮膚合併症発生リスクを評価する上で一つの指標となると考えられる皮膚増殖性に関しては、痘そうワクチン LC16m8 が米国備蓄痘そうワクチン Dryvax と比較しても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。さらに、可能な限り多くの人々に接種可能であるかを評価するために、アトピー性皮膚炎患者における痘そうワクチンの安全性評価動物モデル候補を考案した。

有効性評価においては、痘そうワクチン LC16m8 は天然痘撲滅時に主力を担ったワクチン株である Lister 株と同様に、単回接種で免疫後早期から誘導され、長期間持続可能な高い防御免疫を賦活することができる優れたワクチンであることを示す成績が得られた。その免疫後早期の防御効果は、細胞性免疫が主要な役割を担い、加えて非特異的な自然免疫が関与している可能性が示唆された。

D. 考察

本研究では、弱毒生ウイルスワクチンを代表して、乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 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非臨床または臨床的研究を実施した。

まず、LC16m8 株の特性解析については、温度感受性の解析とその責任遺伝子の探索を実施し、その責任遺伝子としては LC16mO 株、LC16m8 株にみられる A56R の 15 塩基の欠失が、部分的に温度感受性に関与することが明らかになった。また、温度感受性の責任遺伝子がこれ以外にも存在することが明らかとなった。このことから LC16mO 株同様、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。今後の研究により、温度感受性遺伝子の更なる同定とそれに続く LC16m8 株の安全性機序(弱神経毒性等)の解明が期待される。

動物モデルを用いた安全性評価については、様々なワクチニアウイルス接種動物の病理組織学的分析を踏まえて、今回提案された種痘性湿疹評価動物モデル候補は今後も検討の余地があるものの、近年増大しているアトピー性皮膚炎や湿疹患者及びその既往歴者に対する本痘そうワクチン LC16m8 の安全性評価ツールとして期待される。

健康成人への使用実績においても、重篤な有害事象は発生しておらず、過去小児で行われた臨床研究の結果を良く再現する痘そうワクチン LC16m8 の高い安全性を示す成績を得られている。更に、今回の心臓 MRI 法を用いた予備調査より、心拍変動指標

(MEAN-RR、SDNN、CVRR)は痘そうワクチン LC16m8 接種による心筋障害心電図指標となりうる可能性がある。また、痘そうワクチン LC16m8 接種後の心電図異常の低頻度(8%)は痘そうワクチン LC16m8 接種によるミネソタコードの1段階以上の心電図悪化の頻度が他の痘そうワクチンの 15.7%に比較し低頻度である可能性が示唆された。つまり、痘そうワクチン LC16m8 接種の心臓合併頻度は報告されている他の痘そうワクチン株と比べ低値である可能性が示唆された。

有効性評価においては、サルとマウスを用いた単回接種後早期及び長期、曝露後における発症抑制効果評価実験が実施され、痘そうワクチン LC16m8 が天然痘撲滅時に主力を担ったワクチン株である Lister 株と同様に、あらかじめ同ワクチンを接種することにより天然痘発症予防効果が期待されるだけでなく、曝露後接種により治療的ワクチン効果が期待できることを示唆する成績が得られた。また、痘そうワクチン LC16m8 接種により誘導される天然痘発症予防効果は、比較的長期にわたり持続するものと考えられる。

次に、健康成人への使用実績においても、再製造した乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 は過去小児で行われた臨床研究結果を良く再現する高い抗体陽転率を示した。更に、痘そうワクチン LC16m8 による初回接種者、および過去に Lister 株により1回接種を受け、痘そうワクチン LC16m8 によるブースター接種を行った再接種者において、接種後血清の抗体プロファイル解析を行った結果、中和・防御に関係する抗原群(D8L, A27L, A17L, H3L, A33R)について高い割合で陽転しており、痘そうワクチン LC16m8 の天然痘に対する防御効果を支持する結果が得られた。D8L, H3L の抗体価が中和抗体価と特に高い相関を示しており、中でも D8L が中和抗体の重要な抗原である可能性が示唆された。

製造・品質管理工程における研究では、生物学的製剤基準に示されている現行のマーカー試験である増殖温度感受性試験や力価測定試験法について、最近の科学水準での再解析・評価が実施され、代替試験法の提案がなされた。特に、細胞培養痘そうワクチンの力価試験法等の代替試験法検討では、本研究で得られた成績をもとに、生物学的製剤基準の改正の方向で検討を進めた結果、平成 20 年度の改正により、プラーク試験法が採用される見通しとなった。更に、マーカー試験のポックサイズを測定する試験法でも、発育鶏卵を使用するため、マーカー試験の代替法も早期に結論を出して生物学的製剤基準の改正に関する提案をする必要がある。

細胞培養痘そうワクチンの培養基材であるウサギコロニー及び培養基材である初代ウサギ腎細胞の

様々なウイルス試験及び初代ウサギ腎細胞の安全性確認により、原材料の外来性ウイルス否定と安全性が十分に示された。

製剤の保存安定性評価については、製造後の乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 の保管には、少なくとも2種類の冷凍庫が使用されているが、その庫内温度状況と庫内の霜の状況を明らかにした。いずれの冷凍庫でもワクチンの力価低下はなく適切な保管であることが確認できた。乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 は、生物学的製剤基準に規定されている-20℃以下で保存した場合、規格試験に関しては60 ヶ月までは安定であることが示された。また、冷凍保存による容器の気密性への影響がないことが確認された。これを受けて、生物学的製剤基準の有効期限は3年から4年へ延長された。一方、備蓄品としてさらに長期にわたる保管を行う場合、ワクチンの品質を担保するためには、安全性を評価するための追加試験法の構築検討や力価試験法及びマーカー試験等の試験方法の更なる向上が望まれる。併せて、容器・施栓系の評価についても検討を継続する必要がある。さらに、ワクチンの品質向上の基盤となる新規試験法の検討や中和抗体価測定法の至適化など、ワクチンの安全性及び有効性に関するデータの蓄積を引き続き行っていく必要がある。

E. 結論

2002 年より化血研で製造され生物テロ対抗薬として国家備蓄されている乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 は、近年、健康成人へ接種されているが、過去の小児での臨床研究成績と同様に、種痘後脳炎・脳症、皮膚合併症や心筋炎などの重篤な有害事象は発生しておらず、高い安全性が再確認されている。

有効性については、サルやマウスを用いた感染・発症阻止実験を実施し、この痘そうワクチン LC16m8 が天然痘撲滅時に主力を担ったワクチン株である Lister 株と同様に、単回接種で免疫後早期から高い防御効果を発揮し、その効果を長期間持続可能な優れたワクチンであることが示された。また、健康成人への使用実績においても高い中和抗体獲得率を示し、抗体による抗原認識においても中和・防御に係る抗原群について高い割合で陽転しており、痘そうワクチン LC16m8 の天然痘に対する防御効果を支持する結果が得られた。

細胞培養痘そうワクチン LC16m8 の原材料であるウサギコロニー及び培養基材である初代ウサギ腎細胞に対する様々なウイルス試験及び初代ウサギ腎細胞の安全性確認により、原材料の外来性ウイルス否定と安全性が十分に示された。

乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 は長期保存

しても力価は安定であることが示されたが、長期保管後のワクチン品質の担保に関しては、今後も品質確認に重要な試験法の精度向上や安全性及び有効性を担保するために必要な追加試験法の確立等の検討が必要である。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Ogata, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Sata, T., Kurata, T., Kurane, I., Morikawa, S.: LC16m8, a highly attenuated vaccinia virus vaccine lacking expression of the membrane protein B5R, protects monkeys from monkeypox. *J Virol.* 80(11); 5179-88, 2006
- 2) 西條政幸 : ウイルス講座「天然痘」. 感染制御 2; 342-346, 2006
- 3) 西條政幸 : 根絶されたはずの天然痘の今. 小児科臨床 60; 149-154, 2007
- 4) Shinmura, Y., Yokote, H.: Safety evaluation the attenuated smallpox vaccine LC16m8 in animals. *Sci. Rep. Chemo-Sero-Therap. Res. Inst.* 16; 50-60, 2007
- 5) Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Ogata, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Iizuka, I., Sakai, K., Sata, T., Kurata, T., Kurane, I., Morikawa, S.: Diagnosis and assessment of monkeypox virus (MPXV) infection by quantitative PCR assay: differentiation of Congo Basin and West African MPXV strains. *Jpn J Infect Dis.* 61(2); 140-2, 2008
- 6) 北本憲利, 森川茂, 西條政幸, 加藤陽二, 田中智之: 抗ワクシニアウイルス単クローン抗体のサル痘ウイルスに対する反応性とその有用性. *感染症学雑誌* 82; 224-225, 2008
- 7) Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I.: Real-time quantitative polymerase chain reaction for virus infection diagnostics. *Exp Opin Med Diagnost* 2: 1155-1171, 2008
- 8) Takase, B., Nagata, M.: Delayed Enhancement Morphology on Cardiac Magnetic Resonance Imaging is Correlated With Signal-averaged Electrocardiogram and QT Dispersion in Myocardial Infarction. *Angiology.* 2009 Jan 4. [Epub ahead of print]
- 9) Saito, T., Fujii, T., Kanatani, Y., Saijo, M.,

Morikawa, S., Yokote, H., Takeuchi, T., Kuwabara, N.: Clinical and Immunological Response to Attenuated Tissue-Cultured Smallpox Vaccine LC16m8. JAMA. 301(10); 1025-1033, 2009

2. 学会発表

国内学会

- 1) 西條政幸, 網康至, 須崎百合子, 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 緒方もも子, 福士秀悦, 水谷哲也, 倉根一郎, 佐多徹太郎, 倉田毅, 森川茂: サル痘ウイルス Zr-599 株(コンゴ盆地型)と Liberia 株(西アフリカ型)の霊長類における病原性. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会(名古屋, 2006 年 11 月)
- 2) 新村靖彦, 金原知美, 佐藤梓, 永井千草, 倉永雅彦, 横手公幸, 寺野剛, 大隈邦夫, 橋爪壯: Investigation into the Protection Mechanisms of Attenuated Smallpox Vaccine LC16m8. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会(名古屋, 2006 年 11 月)
- 3) 佐藤梓, 金原知美, 永井千草, 新村靖彦, 倉永雅彦, 横手公幸, 寺野剛, 大隈邦夫, 橋爪壯: Establishment of PRNT Assay Method for Smallpox Vaccines. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会(名古屋, 2006 年 11 月)
- 4) Saijo, M.: Cytokine responses in monkeys infected with monkeypox virus: xSAMPLES Japan seminar. (Yokohama, 2007. 5)
- 5) 西條政幸, 網康至, 須崎百合子, 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 緒方もも子, 福士秀悦, 水谷哲也, 飯塚愛恵, 酒井宏治, 佐多徹太郎, 倉根一郎, 森川茂: 高病原性コンゴ盆地型サル痘ウイルス(MPXV)と低病原性西アフリカ型 MPXV の鑑別可能な定量的 PCR 法による MPXV 感染症の診断. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会(札幌, 2007 年 10 月)
- 6) 新村靖彦, 永井千草, 佐藤梓, 松井元, 横手公幸, 志垣隆通, 寺野剛, 大隈邦夫, 岡徹也, 橋爪壯: Investigation of Risk Evaluation Animal Model for Severe Skin Complications Caused by Live Vaccines. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会(札幌, 2007 年 10 月)
- 7) 永井千草, 新村靖彦, 佐藤梓, 松井元, 佐々木巧, 横手公幸, 志垣隆通, 寺野剛, 大隈邦夫, 岡徹也, 橋爪壯: Evaluation study of the long-term protective efficacy induced by attenuated smallpox vaccine LC16m8. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会(札幌, 2007 年 10 月)
- 8) 西條政幸, 網康至, 永田典代, 長谷川秀樹, 福士秀悦, 水谷哲也, 飯塚愛恵, 佐多徹太郎, 倉田毅, 倉根一郎, 森川茂: 高度弱毒化天然痘ワクチン LC16m8 の暴露後使用時の天然痘予防効果: 霊長類におけるサル痘モデルによる検討. 第 11 回日本ワクチン学会学術集会(横浜, 2007 年 12 月)
- 9) 横手公幸, 新村靖彦, 佐藤梓, 永井千草, 松井元, 佐々木巧, 志垣隆通, 寺野剛, 大隈邦夫, 岡徹也, 橋爪壯: バイオテロ対抗薬としての痘そうワクチン LC16m8 に関する研究. 第 11 回日本ワクチン学会学術集会(横浜, 2007 年 12 月)
- 10) 飯塚愛恵, 西條政幸, 網康至, 須崎百合子, 永田典代, 長谷川秀樹, 緒方もも子, 酒井宏治, 塩田智之, 中内美名, 福士秀悦, 水谷哲也, 倉根一郎, 森川茂: Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法によるサル痘迅速診断. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会(岡山, 2008 年 10 月)
- 11) 西條政幸, 網康至, 須崎百合子, 永田典代, 長谷川秀樹, 飯塚愛恵, 塩田智之, 緒方もも子, 酒井宏治, 中内美名, 福士秀悦, 水谷哲也, 倉根一郎, 森川茂: 劇症型サル痘に関する解析: 性状, ウイルス学的所見, 病理. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会(岡山, 2008 年 10 月)
- 12) 金原知美, 新村靖彦, 佐藤梓, 永井千草, 松井元, 横手公幸, 志垣隆通, 大隈邦夫, 岡徹也, 橋爪壯: Evaluation study on the long-term protective efficacy and antibody response induced by attenuated smallpox vaccine LC16m8. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会(岡山, 2008 年 10 月)
- 13) 西條政幸, 網康至, 永田典代, 長谷川秀樹, 福士秀悦, 水谷哲也, 飯塚愛恵, 塩田智之, 佐多徹太郎, 倉田毅, 倉根一郎, 森川茂: 高度弱毒痘そうワクチン LC16m8 の霊長類におけるサル痘発症予防: 長期予防効果に関する検討. 第 12 回日本ワクチン学会学術集会(熊本, 2008 年 11 月)
- 14) 齋藤智也, 横手公幸, 金谷泰宏: プロテオミクスチップによる天然痘ワクチン LC16m8 の抗原解析. 第 12 回日本ワクチン学会(熊本, 2008 年 11 月)
- 15) 佐藤梓, 新村靖彦, 永井千草, 横手公幸, 千北一興, 大隈邦夫, 岡徹也, 橋爪壯: 動物モデルを用いた細胞培養痘そうワクチン LC16m8 の安全性・有効性に関する検討. 第 12 回日本ワクチン学会学術集会(熊本, 2008 年 11 月)
- 16) 嶽本澄代, 佐藤繭子, 久米田幸介, 熊丸哲也, 大隈邦夫, 森川茂, 倉根一郎: 痘そうワクチン

の品質向上に寄与する評価系等の構築及び適格性確認. 第 12 回日本ワクチン学会学術集会 (熊本, 2008 年 11 月)

国際学会

- 1) Yokote, H., Shinmura, Y., Kanehara, T., Ohkuma, K., Oka, T., Funatsu, A., Morikawa, S., Saijo, M., Kurane, I., Kurata, T., Hashizume, S.: Safety and efficacy study of attenuated smallpox vaccine LC16m8 in animals. 4th ASM Biodefense & Emerging Diseases Research Meeting (Washington DC, USA, 2006. 2)
- 2) Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Ogata, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Sata, T., Kurata, T., Kurane, I., Morikawa, S.: Highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, lacking B5R membrane protein expression protects monkeys from monkeypox. 12th International Conference of Infectious Diseases (Lisbon, Portugal, 2006. 6)
- 3) Yokote, H., Shinmura, Y., Satou, A., Kanehara, T., Ohkuma, K., Oka, T., Funatsu, A., Morikawa, S., Saijo, M., Kurane, I., Kurata, T., Hashizume, S.: Safety and efficacy of attenuated smallpox vaccine LC16m8 in animals. 12th International Conference of Infectious Diseases (Lisbon, Portugal, 2006. 6)
- 4) Yokote, H., Shinmura, Y., Kanehara, T., Satou, A., Nagai, C., Terano, T., Ohkuma, K., Oka, T., Funatsu, A., Morikawa, S., Saijo, M., Kurane, I., Hashizume, S.: Explicit Comparison of Smallpox Vaccines by PRNT Titer Requires Standardization of PRNT Methods. International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance (Vienna, Austria, 2007. 2)
- 5) Yokote, H., Shinmura, Y., Nagai, C., Satou, A., Kanehara, T., Sasaki, T., Matsui, H., Terano, T., Ohkuma, K., Oka, T., Funatsu, A., Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I., Kurata, T., Hashizume, S.: Efficacy and Safety Evaluation of Attenuated Smallpox Vaccine LC16m8. International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance (Vienna, Austria, 2007. 2)
- 6) Lee, S.L., Di Caro, A., Favier, A.L., Grolla, A.R., Lacote, S., Morikawa, S., Nitsche, A., Olivera, H., Zimmermann, P., Damon, I.: Smallpox Diagnostics: Global Preparedness. International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance (Vienna, Austria, 2007. 2)
- 7) Saito, T., Kanatani, Y., Fujii, T., Matsumura, T., Takeuchi, T., Yokote, H., Kuwabara, N.: Immunogenicity and Adverse Events of 3rd Generation Live-Attenuated Smallpox Vaccine LC16m8 in adult vaccination program in Japan, 2002-2006. International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance (Vienna, Austria, 2007. 2)
- 8) Shinmura, Y., Sasaki, T., Matsui, H., Kuranaga, M., Yokote, H., Terano, T., Ohkuma, K., Oka, T., Funatsu, A., Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I., Hashizume, S.: Investigation into the Protection Mechanisms of Attenuated Smallpox Vaccine LC16m8. 5th ASM Biodefense & Emerging Diseases Research Meeting (Washington DC, USA, 2007. 2)
- 9) Yokote, H., Kanehara, T., Satou, A., Nagai, C., Terano, T., Ohkuma, K., Oka, T., Funatsu, A., Morikawa, S., Saijo, M., Kurane, I., Hashizume, S.: Establishment of PRNT Method for Smallpox Vaccines. 5th ASM Biodefense & Emerging Diseases Research Meeting (Washington DC, USA, 2007. 2)
- 10) Saito, T., Fujii, T., Matsumura, T., Takase, B., Takeuchi, T., Yokote, H., Kuwabara, N., Kanatani, Y.: Adverse Events in Adult Smallpox Vaccination Program With 3rd Generation Live-Attenuated Vaccinia Vaccine LC16m8 in Japan, 2002-2006. 5th ASM Biodefense & Emerging Diseases Research Meeting (Washington DC, USA, 2007. 2)
- 11) Saijo, M.: Highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, lacking B5R membrane protein expression, protects monkeys from monkeypox. 1st US-Japan Medical Biodefense Research and Bioterrorism Symposium (Washington DC, USA, 2007. 6)
- 12) Saito, T.: Clinical and Immunological Response of the Attenuated Tissue-Cultured Smallpox Vaccine LC16m8 in Adults. 1st US-Japan Medical Biodefense Research and Bioterrorism Symposium (Washington DC, USA, 2007. 6)
- 13) Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Hasegawa, H., Iwata, N., Ogata, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Kurane, I., Kurata, T., Morikawa, S.: Therapeutic vaccination with a highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, for protection of nonhuman primates from monkeypox. 41th annual meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science (Baltimore, 2007. 7)

- 14) Yokote, H., Shinmura, Y., Satou, A., Nagai, C., Matsui, H., Terano, T., Ohkuma, K., Oka, T., Funatsu, A., Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I., Hashizume, S.: Highly attenuated smallpox vaccine LC16m8 protects mice against lethal orthopoxvirus challenge over the long term. 6th ASM Biodefense & Emerging Diseases Research Meeting (Baltimore, USA, 2008. 2)
- 15) Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Hasegawa, H., Iwata, N., Ogata, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Kurane, I., Kurata, T., Morikawa, S.: Post-exposure vaccination with a highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, for protection of nonhuman primates from monkeypox. 13th International Conference on Infectious Diseases (KL, Malaysia, 2008. 6)
- 16) Izuka, I., Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Hasegawa, H., Ogata, M., Sakai, K., Fukushi, S., Mizutani, T., Kurane, I., Morikawa, S.: The loop-mediated isothermal amplification-based diagnostics for monkeypox virus infection. 13th International Conference on Infectious Diseases (KL, Malaysia, 2008. 6)
- 17) Yokote, H., Shinmura, Y., Sasaki, T., Matsui, H., Kuranaga, M., Terano, T., Ohkuma, K., Oka, T., Funatsu, A., Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I., Hashizume, S.: LC16m8, an attenuated smallpox vaccine protects mice against lethal orthopoxvirus challenge from the early-stage to the long-term after vaccination. International Congress of Virology (Istanbul, Turkey, 2008. 8)
- 18) Yokote, H., Shinmura, Y., Kanehara, T., Satou, A., Nagai, C., Sasaki, T., Matsui, H., Chigita, K., Ohkuma, K., Oka, T., Funatsu, A., Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I., Hashizume, S.: Long-term protective efficacy and antibody response induced by a single dose of attenuated smallpox vaccine LC16m8. 7th ASM Biodefense & Emerging Diseases Research Meeting (Baltimore, USA, 2009. 2)

H. 知的財産の出願・登録状況

特に無し。

以上

弱毒生ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究

所属 財団法人 化学及血清療法研究所 品質管理部
研究者 大隈 邦夫

研究要旨:

弱毒生ウイルスワクチンを代表して、乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 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非臨床または臨床研究を行い、痘そうワクチン LC16m8 は国際的に最も優れた天然痘テロ対抗薬の一つであることを示した。

分担研究者:

- (1) 国立感染症研究所 ウイルス第一部 倉根一郎
- (2) 国立感染症研究所 感染病理部 永田典代
- (3) 国立感染症研究所 ウイルス第一部 森川茂
- (4) 国立感染症研究所 ウイルス第一部 西條政幸
- (5) 自衛隊中央病院 健康管理センター 藤井達也
- (6) 防衛医科大学校病院 集中治療部 高瀬凡平
- (7) 慶應義塾大学 医学部 齋藤智也
- (8) 化学及血清療法研究所 第一製造部 横手公幸

A. 研究目的

本研究では、弱毒生ウイルスワクチンを代表して、生物テロ対抗薬として国家備蓄用に製造されている乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 について、品質、生産性の向上の研究並びに安全性及び有効性に関する非臨床及び臨床的な研究成績を取得することを目的とした。更に、痘そうワクチン LC16m8 株について最近の科学水準において必要な追加解析に関する調査を実施することも目的とした。このためには、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、痘そうワクチン LC16m8 株に関する更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、非臨床及び臨床両面から安全性と有効性に関する成績を取得することを目的とした。

B. 研究方法

- a) 弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の力価試験、特性解析、有効性及び安全性評価に関する研究—細胞培養痘そうワクチンの保管条件による安定性に関する研究—

現在、乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 の有効期限は、これまでの保存による力価の推移等を考慮して延長されて 4 年になっている。本研究では、これまで 2 種類の異なる冷凍庫に保管されている 2 つ

のロットに関して、冷凍庫の温度状況と保管による力価推移に有意な差があるかを解析し、これまでのワクチン保管状況が適切であったかを検証した。

- b) 弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の安全性評価における病理学的研究—種痘後の副反応評価動物モデルの構築のための病理学的研究—

乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 の安全性リスク評価の一環として、本来は接種禁忌または要注意対象である湿疹またはアトピー性皮膚炎患者およびその既往歴者に対する安全性リスク評価を想定した種痘性湿疹リスク評価動物モデルの構築を試みている。その病理学的解析のための基礎検討として、これまで我々が実施したポックスウイルス感染実験後の動物の皮膚病変を病理学的に再検討した。

- c) 弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の力価試験、特性解析、遺伝子機能解析に関する研究—細胞培養痘そうワクチンの温度感受性に関する研究—

乾燥細胞培養痘そうワクチンの製造承認株である 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℃以上であるのに対し、LC16 株、LC16mO 株、LC16m8 株は 41℃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より詳細に解析可能な Bacmid による相補試験法を確立した。

- d) 弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の霊長類におけるサル痘発症予防:長期予防効果に関する検討

カニクイザルを用いたサル痘ウイルス感染動物モ

デルを用いて、痘そうワクチン LC16m8 により誘導されるサル痘発症阻止効果が、長期にわたり維持されるか否かを検討した。これまでの研究で、痘そうワクチン LC16m8 のカニクイザルへの 1 回接種は、接種後 6 ヶ月時において霊長類におけるサル痘の発症を予防することを示した。本研究では、痘そうワクチン LC16m8 接種 1 年後における霊長類におけるサル痘発症予防効果を検討し、痘そうワクチン LC16m8 の長期予防効果を検討した。具体的には、3 頭のカニクイザル (LC16m8 群) に痘そうワクチン LC16m8 を接種し、その約 1 年後に 10^6 PFU のサル痘ウイルス Zr-599 株を皮下接種経路で感染させた。また、2 頭 (Lister 群) には痘そうワクチン Lister 株を接種し、同様に処置した。1 頭 (Naive 群) にはワクチン接種せずに Zr-599 株を感染させた。

e) 弱毒生ウイルスワクチン (痘そうワクチン) の疫学的有効性及び安全性評価に関する研究

バイオテロ対処の観点から乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 の接種 (種痘) を実施された健康成人を対象として、本ワクチンの疫学的な有効性と安全性評価について検討した。

f) 弱毒生ウイルスワクチン (痘そうワクチン) の疫学的安全性評価に関する研究

米国備蓄痘そうワクチン Dryvax では接種後の重篤な心膜炎・心筋炎の合併が懸念されている。これまで痘そうワクチン Dryvax における心膜炎合併頻度は 10 万人あたり 16 名程度と報告されている。乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 は、痘そうワクチン Dryvax に比較し安全性が高い可能性が充分期待される。しかし、臨床例における十分な検討はなされていない。また最近の心循環診断技術の進歩により心筋障害を心電図で定量できることが期待されている。この中に心臓 MRI 法がある。痘そうワクチン LC16m8 の心臓副作用の鋭敏な指標として心臓 MRI 法が有用となるか否か予備検討を行うとともに、本年度は当初の予定を変更して、これまで痘そうワクチン LC16m8 を接種した症例から一部の症例を任意に抽出し痘そうワクチン LC16m8 接種前後の心電図記録を解析した。さらに、年齢性を適合させた対照例の経時的な心電図変化と比較検討した。また、心電図から得られる心筋障害と相関する心拍変動指標についても検討を加えた。

g) 弱毒生ウイルスワクチン (痘そうワクチン) の疫学的有効性及び安全性評価における統計学的研究

ワクチニアウイルス WR 株の抗原を用いた Proteome Microarray Chip を利用し、乾燥細胞培養

痘そうワクチン LC16m8 による初回接種者及び過去 1 回接種者への再接種において惹起される抗ポックスウイルス抗体の抗原評価を、特に中和・防御に関連する膜タンパクに着目して解析し、痘そうワクチン LC16m8 の初回接種、再接種による抗体価の変化を分析した。具体的には、接種前の抗体価、抗体価の接種前後比およびプロテオミックチップ抗体価と中和抗体価の相関を分析した。接種前抗体価の比較は t 検定を行った。抗体価の接種前後比の比較は、自然対数をとって t 検定を行った。中和抗体価とプロテオミックチップ抗体価の相関は、ピアソン相関分析により評価した。P<0.05 を統計学的有意と判断した。統計解析は STATA9.2 (StataCorp 社、米国) を用いて行った。

h) 弱毒生ウイルスワクチン (痘そうワクチン) の長期保管に伴う検討及び品質向上に寄与する評価系の検討

乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 の安定性評価を行い、長期保管安定性に関するデータを取得した。また、新規の品質管理試験の導入、細胞基材由来不純物の測定系構築、培養基材であるウサギコロニー及び初代ウサギ腎細胞の安全性確認と迷入ウイルス否定試験実施等、品質向上に寄与する評価系の検討を行った。

i) 動物モデルを用いた弱毒生ウイルスワクチン (痘そうワクチン) の安全性及び有効性に関する基礎的研究

国内外の痘そうワクチン製剤及びワクチニアウイルスの研究動向を調査評価し、乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 が天然痘テロ対抗医薬品に求められると想定される要件を満足しているかについて評価するために、動物モデルを用いて有効性及び安全性検討を行った。有効性については、予防的使用を想定し、痘そうワクチン LC16m8 による免疫効果の持続について評価した。一方、安全性については、天然痘のアウトブレイクが発生した場合多くの人々に接種されることが想定されることから、接種不適合又は要注意接種対象である湿疹またはアトピー性皮膚炎患者及びその既往歴のある者に対する痘そうワクチン LC16m8 の安全性評価を目的として、種痘性湿疹のリスク評価動物モデルの作製検討を行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え体の作製は、文部科学省の承認を得た上で行った。動物実験は、国立感染症研究所または化学及血清療法研究所 (化血研) の実験動物倫理委員会の承認を得た上で行った。臨床調査研究は、臨床研究の指針を踏まえるとともに、自衛隊中央病

院倫理委員会の承認を得た上で行った。

C. 研究結果

a) 弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の力価試験、特性解析、有効性及び安全性評価に関する研究—細胞培養痘そうワクチンの保管条件による安定性に関する研究—

現在製造後の乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 の保管には、少なくとも2種類の冷凍庫が使用されているが、保管温度の安定性を重視して自動霜取りを行わないものと、霜取り機能を重視して温度の変動のあるものがある。そこで、冷凍庫の庫内温度推移と状況を調査した結果、自動霜取り機能付きフリーザでは、霜取りが4回/日の頻度で行われ、それに伴い庫内の温度の振幅は20℃ほどあったが、霜の付着はなかった。一方、霜取り機能のないフリーザでは、庫内温度は非常に安定していたがワクチン納入時以外に扉の開閉を行っていないにも関わらず、庫内の上部は霜の付着が激しかった。このような条件で最大 48 ヶ月保管されているワクチンの2ロットの力価は、製造・出荷時から力価低下は認められず、いずれの保管温度条件でも問題がないことが分かり、どちらのフリーザの保管も適切であった。

b) 弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の安全性評価における病理学的研究—種痘後の副反応評価動物モデルの構築のための病理学的研究—

SCID マウスに対し、痘そうワクチン LC16m8 を再クローニングした m8rc 株の 10^9 PFU/dose を腹腔内接種し、接種後 4 週間目に安楽死により採取した皮膚病変部位を検索対象とした。発痘は接種 18 日目以降より観察され、4 週間目まで生残した。発痘部は中心部に痂皮形成を伴った表皮層の増生と表皮直下から筋層にまで浸潤した好中球、組織球、線維芽細胞の増生により形成されており、痂皮部では一部好中球の浸潤、バクテリアの集簇を認めた。ウイルス抗原はすべて陰性であった。これまでのボックスウイルス感染動物の病理解析結果から、封入体を含む細胞、ウイルス抗原の検出時期は限定されていると考えられた。

c) 弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の力価試験、特性解析、遺伝子機能解析に関する研究—細胞培養痘そうワクチンの温度感受性に関する研究—

これまでの解析から、LC16mO 株では温度感受性のリバータントは極めて生じにくいこと、隣接しない2箇所の Lister 株の遺伝子領域により LC16mO 株の温度感受性が相補されることから、2 遺伝子以上が温

度感受性に関与していると考えられている。より詳細な解析により、温度感受性遺伝子を同定するために、Bacmid にクローニングした Lister 株の遺伝子による相補試験を行った結果、これまでに温度感受性に関する遺伝子領域を含む Bacmid DNA で同様に相補が可能であった。得られた温度非感受性クローンには、細胞融合活性のあるものと無いものがあった。

一方、細胞融合活性のある LC16mO 株の A56R 遺伝子を Lister 株に組換えることにより本来細胞融合活性のない Lister 株が細胞融合活性を獲得したことから、LC16mO 株、LC16m8 株に見られる 15 塩基の欠失(5アミノ酸の欠失)が細胞融合活性を規定していることが明らかとなった。さらに、LC16mO 株の A56R 遺伝子をもつ Lister 株は、Lister 株と LC16mO 株の中間の温度感受性を示した。この結果と Bacmid 相補クローンに細胞融合のあるものと無いものがあることから、A56R の15塩基欠失は部分的に温度感受性に関与していることが明らかとなった。

d) 弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の霊長類におけるサル痘発症予防:長期予防効果に関する検討

サル痘発症予防効果が長期間持続するか否かを検討した結果、Naive 群個体では重篤なサル痘を発症したが、LC16m8 群では、サル痘ウイルスの接種部位に軽い潰瘍が認められるのみで、それ以外のサル痘症状は認められなかった。さらに、Lister 群では、サル痘ウイルス接種部位に紅斑が認められたものの、潰瘍性病変は認められず、サル痘症状は全く認められなかった。乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 の霊長類におけるサル痘発症予防効果は比較的長期間にわたり持続することが確認された。

e) 弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の疫学的有効性及び安全性評価に関する研究

バイオテロ対処の観点から乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 の接種(種痘)を実施された健康成人を対象として、本痘そうワクチン LC16m8 の疫学的な有効性と安全性評価を実施した。有効性評価の指標となる善感率については、接種者全体で 92.3%、初回接種 95.2%、再接種者 89.8%と、再接種者で有意に低い傾向が示された($p < 0.001$)。副反応については、これまでに重篤な有害事象は発生していない。軽度の副反応については腋下リンパ節腫脹が 7.8%、蕁麻疹等接種部以外の皮膚症状が 3.7%、37.5℃以上の発熱が 1.9%であった。

f) 弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の疫学的安全性評価に関する研究

乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 を接種した

症例から一部の症例を任意に抽出し痘そうワクチン LC16m8 接種前後の心電図記録を解析した。さらに、年齢性を適合させた対照例の経時的な心電図変化と比較検討した。また、心電図から得られる心筋障害と相関する心拍変動指標についても検討を加えた。その結果、痘そうワクチン LC16m8 接種後の心電図では約8%の頻度で非特異的な心電図異常が認められ、心拍変動指標の変化も認められたが臨床的には有意なものとは考えられなかった。

g) 弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の疫学的有効性及び安全性評価における統計学的研究

乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 による初回接種者、および過去に痘そうワクチン Lister 株により1回接種を受け、痘そうワクチン LC16m8 によるブースター接種を行った再接種者において、接種後血清の抗体プロファイル解析を行った。中和・防御に関係する抗原群(D8L, A27L, A17L, H3L, A33R)について高い割合で陽転しており、痘そうワクチン LC16m8 の天然痘に対する防御効果を支持する結果が得られた。D8L, H3L の抗体価が中和抗体価と特に高い相関を示しており、中でも D8L が中和抗体の重要な抗原である可能性が示唆された。

h) 弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の長期保管に伴う検討及び品質向上に寄与する評価系の検討

乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 の長期保管における安定性評価に関する検討を行った結果、旧千葉県血清研究所製造の国家備蓄終了品では最長60ヵ月目まで、化血研製造ロットでは36ヵ月目まで、力価の変化は認められず、その他の規格試験もいずれも適合である保存安定性成績が得られた。また、冷凍保存による容器の気密性への影響がないことが確認された。

品質管理試験方法の検討においては、生物学的製剤基準の力価試験改定案についてパブリックコメントの募集が行われ、今年度(平成20年度)末の改定となる見込みである。新規試験として、WHO ガイドラインに準じ乳のみマウス神経毒力試験を確立した。また、ワクチン中の初代ウサギ腎細胞由来の不純物として、蛋白及び核酸を定量する測定系を構築した。

培養基材である初代ウサギ腎細胞について、造腫瘍性試験、オンコウイルス試験を実施した結果、いずれも陰性であった。また、ウサギコロニーから採取した血清についてウサギウイルスの試験を実施した結果、全て陰性であった。さらに、初代ウサギ腎細胞について、Co-cultivation 試験、Induction PERT、TEM を実施した結果、いずれも陰性であった。以上より、初代

ウサギ腎細胞のワクチン培養基材としての安全性が確認された。加えて、対照細胞の継代培養方法を確立し、増殖が遅い迷入ウイルスの評価系を構築した。

また、抗ワクチニアウイルス標準血清選定を目的とする英国 NIBSC 主導の国際的な研究ネットワークへ参加した。

i) 動物モデルを用いた弱毒生ウイルスワクチン(痘そうワクチン)の安全性及び有効性に関する基礎的研究

今般国家備蓄のために再製造されている乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 が天然痘テロ対抗医薬品に求められると想定される要件を満足しているかについて動物モデルを用いた有効性及び安全性評価を行った。予防的使用を想定した有効性評価の結果、痘そうワクチン LC16m8 は天然痘撲滅時に主力を担ったワクチン株である Lister 株と同様に、単回接種で長期間持続可能な高い防御効果を誘導できる優れた痘そうワクチンであることを示す成績が得られた。一方、安全性評価については、可能な限り多くの人々に接種可能であるかを評価するために、アトピー性皮膚炎患者における痘そうワクチンの安全性評価動物モデル候補を考案した。

D. 考察

本研究では、弱毒生ウイルスワクチンを代表して、乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 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非臨床または臨床的研究を実施した。

まず、LC16m8 株の特性解析については、温度感受性の解析とその責任遺伝子の探索を実施し、その責任遺伝子としては LC16mO 株、LC16m8 株にみられる A56R の15塩基の欠失が、部分的に温度感受性に関与することが明らかになった。また、温度感受性の責任遺伝子がこれ以外にも存在することが明らかとなった。このことから LC16mO 株同様、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。今後の研究により、温度感受性遺伝子の更なる同定とそれに続く LC16m8 株の安全性機序(弱神経毒性等)の解明が期待される。

動物モデルを用いた安全性評価については、様々なワクチニアウイルス接種動物の病理組織学的分析を踏まえて、今回提案された種痘性湿疹評価動物モデル候補は今後も検討の余地があるものの、近年増大しているアトピー性皮膚炎や湿疹患者及びその既往歴者に対する本痘そうワクチン LC16m8 の安全性評価ツールとして期待される。

健康成人への使用実績においても、重篤な有害事象は発生しておらず、過去小児で行われた臨床研究の結果を良く再現する痘そうワクチン LC16m8 の高

い安全性を示す成績が得られている。更に、今回の心臓 MRI 法を用いた予備調査より、心拍変動指標 (MEAN-RR、SDNN、CVRR) は痘そうワクチン LC16m8 接種による心筋障害心電図指標となりうる可能性がある。また、痘そうワクチン LC16m8 接種後の心電図異常の低頻度 (8%) は痘そうワクチン LC16m8 接種によるミネソタコードの1段階以上の心電図悪化の頻度が他の痘そうワクチンの 15.7% に比較し低頻度である可能性が示唆された。

有効性評価においては、サルとマウスを用いた発症抑制効果の長期的な評価実験が実施され、痘そうワクチン LC16m8 が天然痘撲滅時に主力を担ったワクチン株である Lister 株と同様に、単回接種で高い防御効果を長期間持続可能な優れたワクチンであることが示された。これらの成績より、ヒトにおいても、痘そうワクチン LC16m8 接種により誘導される天然痘発症予防効果は、比較的長期にわたり持続するものと期待される。

次に、健康成人への使用実績においても、再製造した乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 は過去小児で行われた臨床研究結果を良く再現する高い抗体陽転率を示した。更に、痘そうワクチン LC16m8 による初回接種者、および過去に痘そうワクチン Lister 株により1回接種を受け、痘そうワクチン LC16m8 によるブースター接種を行った再接種者において、接種後血清の抗体プロファイル解析を行った結果、中和・防御に関係する抗原群 (D8L, A27L, A17L, H3L, A33R) について高い割合で陽転しており、痘そうワクチン LC16m8 の天然痘に対する防御効果を支持する結果が得られた。D8L、H3L の抗体価が中和抗体価と特に高い相関を示しており、中でも D8L が中和抗体の重要な抗原である可能性が示唆された。

製造・品質管理工程における研究では、生物学的製剤基準に示されている現行のマーカー試験である増殖温度感受性試験や力価測定試験法について、最近の科学水準での再解析・評価が実施され、代替試験法の提案がなされた。特に、細胞培養痘そうワクチンの力価試験法等の代替試験法検討では、本研究で得られた成績をもとに、生物学的製剤基準の改正の方向で検討を進めた結果、平成 20 年度の改正により、プラーク試験法が採用される見通しとなった。更に、マーカー試験のポックサイズを測定する試験法でも、発育鶏卵を使用するため、マーカー試験の代替法も早期に結論を出して生物学的製剤基準の改正に関する提案をする必要がある。

細胞培養痘そうワクチンの培養基材であるウサギコロニー及び初代ウサギ腎細胞の様々なウイルス試験及び初代ウサギ腎細胞の安全性確認により、培養基材の外来性ウイルス否定と安全性が十分に示された。

製剤の保存安定性評価については、製造後の乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 の保管には、少なくとも2種類の冷凍庫が使用されているが、その庫内温度状況と庫内の霜の状況を明らかにした。いずれの冷凍庫でもワクチンの力価低下はなく適切な保管であることが確認できた。乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 は、生物学的製剤基準に規定されている -20°C 以下で保存した場合、規格試験に関しては60 ヶ月までは安定であることが示された。また、冷凍保存による容器の気密性への影響がないことが確認された。一方、備蓄品としてさらに長期にわたる保管を行う場合、ワクチンの品質を担保するためには、安全性を評価するための追加試験法の構築検討や力価試験法及びマーカー試験等の試験方法の更なる向上が望まれる。また、容器・施栓系の評価についても、さらに検討する必要がある。

E. 結論

2002 年より化血研で製造され生物テロ対抗薬として国家備蓄されている乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 は、近年、健康成人へ接種されているが、過去の小児での臨床研究成績と同様に、種痘後脳炎・脳症、皮膚合併症や心筋炎などの重篤な有害事象は発生しておらず、高い安全性が再確認されている。

有効性については、サルやマウスを用いた感染・発症阻止実験を実施し、この痘そうワクチン LC16m8 が天然痘撲滅時に主力を担ったワクチン株である Lister 株と同様に、単回接種で免疫後早期から高い防御効果を発揮し、その効果を長期間持続可能な優れたワクチンであることが示された。また、健康成人への使用実績においても高い中和抗体獲得率を示し、抗体による抗原認識においても中和・防御に関係する抗原群について高い割合で陽転しており、痘そうワクチン LC16m8 の天然痘に対する防御効果を支持する結果が得られた。

細胞培養痘そうワクチンの培養基材であるウサギコロニー及び初代ウサギ腎細胞に対する様々なウイルス試験及び初代ウサギ腎細胞の安全性確認により、培養基材の外来性ウイルス否定と安全性が十分に示された。

乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 は長期保存しても力価は安定であることが示されたが、長期保管後のワクチン品質の担保に関しては、今後も品質確認に重要な試験法の精度向上や安全性及び有効性を担保するために必要な追加試験法の確立等の検討が必要である。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Ogata, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Iizuka, I., Sakai, K., Sata, T., Kurata, T., Kurane, I., Morikawa, S.: Diagnosis and assessment of monkeypox virus (MPXV) infection by quantitative PCR assay: differentiation of Congo Basin and West African MPXV strains. *Jpn J Infect Dis.* 2008 Mar; 61(2): 140-2.
- 2) 北本憲利, 森川茂, 西條政幸, 加藤陽二, 田中智之: 抗ワクシニアウイルス単クローン抗体のサル痘ウイルスに対する反応性とその有用性. *感染症学雑誌* 82: 224-225, 2008
- 3) Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I.: Real-time quantitative polymerase chain reaction for virus infection diagnostics. *Exp Opin Med Diagnost* 2: 1155-1171, 2008
- 4) Takase, B., Nagata, M.: Delayed Enhancement Morphology on Cardiac Magnetic Resonance Imaging is Correlated With Signal-averaged Electrocardiogram and QT Dispersion in Myocardial Infarction. *Angiology.* 2009 Jan 4. [Epub ahead of print]
- 5) Saito, T., Fujii, T., Kanatani, Y., Saijo, M., Morikawa, S., Yokote, H., Takeuchi, T., Kuwabara, N.: Clinical and Immunological Response to Attenuated Tissue-Cultured Smallpox Vaccine LC16m8. *JAMA.* 301(10): 1025-1033, 2009

2. 学会発表

国内学会

- 1) 西條政幸, 網康至, 須崎百合子, 永田典代, 長谷川秀樹, 飯塚愛恵, 塩田智之, 緒方もも子, 酒井宏治, 中内美名, 福士秀悦, 水谷哲也, 倉根一郎, 森川茂: 劇症型サル痘に関する解析: 症状, ウイルス学的検査所見, 病理. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会(岡山, 2008 年 10 月)
- 2) 飯塚愛恵, 西條政幸, 網康至, 須崎百合子, 永田典代, 長谷川秀樹, 緒方もも子, 酒井宏治, 塩田智之, 中内美名, 福士秀悦, 水谷哲也, 倉根一郎, 森川茂: Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法によるサル痘迅速診断. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会(岡山, 2008 年 10 月)
- 3) 水谷哲也, 山尾卓也, 江下優樹, 片野晴隆, 黒

田誠, 関塚剛史, 渡辺俊平, 明石博臣, 竹原一明, 木原悠希, 佐藤朝光, 西村美保, 酒井宏治, 福士秀悦, 西條政幸, 緒方もも子, 中内美名, 倉根一郎, 森川茂: ウイルスの網羅的検出法 (RDV 法) と次世代シーケンサーによる新しいウイルスの発見. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会(岡山, 2008 年 10 月)

- 4) 金原知美, 新村靖彦, 佐藤梓, 永井千草, 松井元, 横手公幸, 志垣隆通, 大隈邦夫, 岡徹也, 橋爪壯: Evaluation study on the long-term protective efficacy and antibody response induced by attenuated smallpox vaccine LC16m8. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会(岡山, 2008 年 10 月)
- 5) 西條政幸, 網康至, 永田典代, 長谷川秀樹, 福士秀悦, 水谷哲也, 飯塚愛恵, 塩田智之, 佐多徹太郎, 倉田毅, 倉根一郎, 森川茂: 高度弱毒痘そうワクチン LC16m8 の霊長類におけるサル痘発症予防: 長期予防効果に関する検討. 第 12 回日本ワクチン学会学術集会(熊本, 2008 年 11 月)
- 6) 齋藤智也, 横手公幸, 金谷泰宏: プロテオミクスチップによる天然痘ワクチン LC16m8 の抗原解析. 第 12 回日本ワクチン学会(熊本, 2008 年 11 月)
- 7) 嶽本澄代, 佐藤繭子, 久米田幸介, 熊丸哲也, 大隈邦夫, 森川茂, 倉根一郎: 痘そうワクチンの品質向上に寄与する評価系等の構築及び適格性確認. 第 12 回日本ワクチン学会学術集会(熊本, 2008 年 11 月)
- 8) 佐藤梓, 新村靖彦, 永井千草, 横手公幸, 千北一興, 大隈邦夫, 岡徹也, 橋爪壯: 動物モデルを用いた細胞培養痘そうワクチン LC16m8 の安全性・有効性に関する検討. 第 12 回日本ワクチン学会学術集会(熊本, 2008 年 11 月)

国際学会

- 1) Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Hasegawa, H., Iwata, N., Ogata, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Kurane, I., Kurata, T., Morikawa, S.: Post-exposure vaccination with a highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, for protection of nonhuman primates from monkeypox. 13th International Conference on Infectious Diseases (KL, Malaysia, 2008. 6)
- 2) Iizuka, I., Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Hasegawa, H., Ogata, M., Sakai, K., Fukushi, S., Mizutani, T., Kurane, I., Morikawa, S.: The loop-mediated isothermal amplification-based diagnostics for monkeypox virus infection. 13th

International Conference on Infectious Diseases
(KL, Malaysia, 2008. 6)

- 3) Yokote, H., Shinmura, Y., Sasaki, T., Matsui, H., Kuranaga, M., Terano, T., Ohkuma, K., Oka, T., Funatsu, A., Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I., Hashizume, S.: LC16m8, an attenuated smallpox vaccine protects mice against lethal orthopoxvirus challenge from the early-stage to the long-term after vaccination. International Congress of Virology (Istanbul, Turkey, 2008. 8)
- 4) Yokote, H., Shinmura, Y., Kanehara, T., Satou, A., Nagai, C., Sasaki, T., Matsui, H., Chigita, K., Ohkuma, K., Oka, T., Funatsu, A., Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I., Hashizume, S.: Long-term protective efficacy and antibody response induced by a single dose of attenuated smallpox vaccine LC16m8. 7th ASM Biodefense & Emerging Diseases Research Meeting (Baltimore, USA, 2009. 2)

H. 知的財産の出願・登録状況
特に無し。

以上

チオレドキシンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子 の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発

所 属 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
研究者 井上 達
研究期間 平成 18 年 4 月～平成 21 年 3 月

研究要旨 抗酸化反応性活性酸素種消去分子（チオレドキシン(TRX)など）に関連する生体異物各種相互作用や、誘導物質の誘導機構に関する基盤的研究と、食品等に対する測定系の構築やバイオマーカーの探索を含む個別課題の開発研究を進め、健康寿命の延伸に資する創薬・健康増進食品の開発を目指して実施した。TRX など抗酸化反応性活性酸素種消去分子の高発現性食品や医薬候補物質の探索に資する分子レベル（関連微量元素の HPLC/HR-ICP-MS 解析）、細胞生物学的レベル（植物抽出物のスクリーニングのための培養系の開発）、及び個体レベルでの、酸化的ストレスと TRX ならびにモデル物質としてのスルフォラファンとをめぐり生体異物応答を検討し、もってスクリーニングのアッセイ系となる実験系を探索した。別途推進した一部のニュートリジノミクス情報も各々の研究に適宜取り込んだ。これと平行して、酸化ストレスの関与が知られる脳虚血障害、糖尿病などの疾患や老化に対する抗酸化的効能を基軸として、TRX のさらなる作用機作に関する基盤研究と、TRX 誘導物質のスクリーニング系、測定系ならびに有効性にかかる医薬品、医薬部外品、食品等の開発研究との両面から探索を推進した。このうち基盤研究では、TRX のポリエチレングリコール修飾による血中濃度の持続時間の延長と、TRX の MIF との結合による TRX の MIF 由来の炎症の制御機構を見出し、開発研究としては、診断薬としての有用性の期待される電気化学発光免疫測定法による TRX 測定系および抗酸化分子の機能性評価法の開発に成功し、あわせて、新規機能食品の開発に向けた応用研究にも一定の前進をみた。

分担研究者

- (1) 京都大学ウイルス研究所 淀井淳司
- (2) レドックスバイオサイエンス株式会社
村田一夫/杉田憲治/茨木 裕
- (3) 三光純薬株式会社 研究開発部
山田雄二/浅井智英
- (4) 常盤薬品工業株式会社 開発研究所
森岡恒男
- (5) 日本トリム 樺山 繁

A. 研究目的

高齢化社会への移行のなかで、虚血性の心筋症や脳障害、あるいは高血圧、糖尿病などを包括した、adiponectin (AN)欠乏症（いわゆる生活習慣病）が注目されており、ここに関与する酸化的ストレスに対して内因性の抗酸化物質の誘導によるAN欠乏症や老化の進行を抑制する戦略に期待が寄せられている。当研究では、これに対して、抗がん性、抗老化作用で知られる酸化的ストレス応答性活性酸素種消去分子、チオレドキシン (TRX) 類の、高発現を促す食品類や医薬候補物質の探索のための標的となる生体異

物相互作用を検索することを目的としてきた。

即ち、本研究は、酸化的ストレスの消去に対して中心的な役割を果たすチオレドキシン (TRX) と、その活性維持に役割を果たす調節酵素に注目し、I. 分子、細胞、個体および作用機構の各分野に関する創薬課題基盤研究、II. TRXの誘導物質スクリーニング系、同測定系、医薬品等の開発を目標とする個別研究、並びに III. 対応する応答遺伝子のニュートリジノミクス解析によるサポートの3方面にわたる研究を以て、高齢化社会への移行に伴う虚血性の心筋症や脳障害、あるいは高血圧、糖尿病などの生活習慣病に対して、高齢者の健康保持、生活習慣病の克服に資することを目的とした。

B. 研究方法

各研究課題の研究遂行方法としては、Iでは、創薬課題基盤研究として、TRXなど抗酸化性活性酸素種消去分子の作用過程における関連微量元素の挙動解析、細胞レベルや遺伝子改変動物を用いた個体レベル研究による関連分子高発現性食品や化学物質の探索と応用に関する基盤研