

分担研究報告書

痘そうワクチン LC16m8 接種者における中和抗体持続に関する調査研究

所 属 一般財団法人 化学及血清療法研究所  
ワクチン事業部門 開発部  
研究分担者 横手 公幸

研究要旨：

LC16m8 を 1 回接種された健康成人の約 4 年後の抗体陽性率は初種痘群において低下傾向が認められた。Proteome Microarray Chip を用いたプロテオミック解析を行った結果、種痘 4 年後まで抗体陽性であった被験者群において、種痘前と比較して種痘 1 ~ 7 か月後の蛍光強度が有意に高かった抗原は 6 種類あり、そのうち A27L, A10L は種痘 4 年後まで有意に高かった。また、種痘 4 年後で陰性であった被験者群において、種痘前と比較して種痘 1 ~ 7 か月後の蛍光強度が有意に高かった抗原は 7 種類あり、そのうち A11R, A34R, D8L は種痘 4 年後では有意に低下した。

研究協力者

- (1) 千葉大学 名誉教授  
橋爪 壮
- (2) 一般財団法人化学及血清療法研究所  
新村 靖彦、上村 千草、内田 梓、金原 知美、  
丸野 真一、宮本 誠二

A. 研究目的

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化に成功した生ウイルスワクチンで 1975 年に製造承認が許可された。当時の痘そうワクチンの定期接種は、小児に対して予防目的で池田株、大連 株や LC16m8 の親株である Lister 株が 3 期、3 回の接種が実施されていたが、WHO（世界保健機関）の天然痘根絶計画が進み、日本では 1976 年に痘そうワクチンの定期接種が中止となった。

近年天然痘ウイルスによる生物テロの危険性が指摘されたことを受けて、わが国ではこの痘そうワクチン LC16m8 がテロ対抗医薬品として 2001 年以降再製造、国家備蓄されている。また、天然痘テロに対する危機管理対策としてファーストレスポンスの成人対象者（初種痘者及び再種痘者）に対して LC16m8 が 1 回接種されている。

一方、天然痘流行期に WHO は、天然痘曝露に対する最大限の防御レベルが要求される人（ファーストレスポンスの対象者）に対しては、毎年の追加接種を推奨していた。また流行期の疫学調査や種痘経験者に対する最近の血清学的調査（抗体測定）等の文献によると、従来の痘そうワクチ

ンについては、2~3 回の種痘後 10~30 年程度経過した時点においても天然痘の発症または重症化を阻止可能なレベルの抗体が保持されていることが報告されている。

以上の背景より、近年 LC16m8 を 1 回接種された成人対象者に対する免疫持続の調査が必要と考え、本研究を開始した。

B. 研究方法

1) 血清検体

バイオテロ対処の観点から細胞培養弱毒痘そうワクチン LC16m8 が接種され、種痘前、種痘後 1 カ月後、4 カ月後及び 7 か月後に採取された血清サンプルが保管されている自衛隊員のうち、本研究に同意の得られた 39 名（初種痘：24 名、再種痘 15 名）より採取した血清サンプルを用いた。これらの大部分が採血された時点で種痘後 4 年経過していた。

2) 評価

【中和抗体価測定】

LC16m8 ワクチン種痘前、種痘 1 カ月後、4 カ月後、7 か月後、及び約 4 年後の各時期に採取された血清検体について、中和抗体価を測定した。中和抗体価の測定は Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT)により行い、50%のプラーク減少時の抗体価（PRNT<sub>50</sub>）を判定した。チャレンジウイルスは、WHO の天然痘根絶計画で主軸を担った Lister 株を用いた。なお、PRNT<sub>50</sub> が 128 倍以上の場合を抗体陽性と判定した。

### 【プロテオミック解析】

24名の初種痘群から、種痘前、種痘1か月又は4か月又は7か月後、種痘約4年後に採血された血清が3ポイント全て揃っている11名の被験者の血清検体について、ワクチン接種により誘導された抗体による認識抗原たん白質群をVaccinia Western Reserve (WR) specific-Proteome Microarray Chipを用いて解析した。なお、この解析はAntigen Discovery, Inc. (Irvine, CA, USA)へ委託し実施した。

### 【倫理面への配慮】

本調査研究の実施に当たっては、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。(No.16-004.平成16年8月30日、No.18-022.平成18年12月21日、No.21-001.平成21年6月10日)

### C. 研究結果

天然痘テロに対する危機管理対策として、細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8 を1回接種された成人被接種者が獲得した中和抗体の持続を調査した。まず初種痘者24名、再種痘者15名の計39名について調査を実施した。LC16m8 ワクチン種痘前、種痘1ヵ月後、4ヵ月後、7ヵ月後、及び約4年後のPRNT<sub>50</sub>のGMT(幾何学平均値)及び抗体陽性率を表1に示した。

初種痘群及び再種痘群の中和抗体陽性率はそれぞれ、LC16m8 ワクチン種痘前では17%(2/12)及び100%(13/13)、種痘1ヵ月後では56%(5/9)及び87%(13/15)、4ヵ月後では86%(6/7)及び92%(11/12)、7ヵ月後では80%(4/5、初種痘群のみ測定)、約4年後では58%(14/24)及び93%(14/15)であった。

次に、LC16m8 接種により誘導された抗体による認識抗原たん白質群をVaccinia WR specific-Proteome Microarray Chipを用いて解析した。24名の初種痘群から、種痘前、種痘1か月又は4か月又は7か月後、種痘約4年後の血清がそろっている11名の被験者について、個人毎のPRNT<sub>50</sub>の推移を図1に示した。

11名の被験者は抗体陽性率により、以下の3つのグループに分けて解析を行った。

Group A: LC16m8 種痘1-7ヶ月後及び種痘約4年後で陽性であった被験者(5名)

Group B: LC16m8 種痘1-7ヶ月後は陽性であったが、約4年後では陰性の被験者(4名)

Group C: LC16m8 種痘後全ての時期で陰性の被験者(2名)

Group A, Group B, Group Cにおいて、LC16m8 ワクチン接種による抗原認識パターンをヒートマッ

プとして図2に示した。

各グループ毎に、種痘前と比較して蛍光強度に有意差が見られた抗原を表2、表3及び表4に示した。Group Aでは、種痘前と比較して種痘1-7か月後の蛍光強度が有意に高かった抗原はA13L, A26L, A27L, A33R, D13L, A10Lであり、そのうちA27L, A10Lは種痘4年後まで有意に高かった。また、A13Lは種痘1-7か月後と比較して種痘4年後では蛍光強度が有意に低下した。Group Bでは、種痘前と比較して種痘1~7か月後の蛍光強度が有意に高かった抗原はA11R, D13L, D8L, A34R, H3L, A27L, A10Lであった。また、A11R, D6R, A34R, D8Lは種痘1-7か月後と比較して種痘4年後では蛍光強度が有意に低下した。

### D. 考察

本研究では、天然痘テロに対する危機管理対策として、細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8 を1回接種された成人被接種者が獲得した中和抗体(Anti-Lister PRNT)の持続を調査した。

中和抗体陽性率については再種痘群では経時的な変化は認められなかったが、初種痘群では低下傾向が認められ、約4年後には抗体陽性率が約60%となった。この低下傾向について原因調査するため、ワクチニアウイルスWR株の95%以上の構成たん白質を網羅するProteome Microarray Chipを用いて、ワクチン接種により誘導された抗体の認識ウイルス抗原を調査した。種痘4年後まで抗体陽性であった被験者群において、種痘前と比較して種痘1~7か月後の蛍光強度が有意に高かった抗原は6種類あり、そのうちA27L, A10Lは種痘4年後まで有意に高かった。また、種痘4年後で陰性であった被験者群において、種痘前と比較して種痘1~7か月後の蛍光強度が有意に高かった抗原は7種類あり、そのうちA11R, A34R, D8Lは種痘4年後では有意に低下した。これらの抗原群が4年後の中和抗体価及び抗体陽性率の低下に起因していると考察された。今後、さらに各接種時期におけるグループ間の蛍光強度の解析や個人毎の解析を実施する。

### E. 結論

天然痘テロに対する危機管理対策として、細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8 を1回接種された成人被接種者が獲得した中和抗体の持続を調査した結果、再種痘群では抗体陽性率に経時的な変化は認められなかったが、初種痘群では低下傾向が認められた。この低下傾向について原因調査するため、ワクチニアウイルスWR株の95%以上の構成たん白質を網羅するProteome Microarray

Chip を用いて、ワクチン接種により誘導された抗体の認識ウイルス抗原を調査した。その結果、種痘4年後まで抗体陽性であった被験者群において、種痘4年後まで反応強度が有意に高かった抗原はA27L, A10Lであり、また、種痘1-7か月後では抗体陽性であったものの、種痘4年後で陰性であった被験者群において、種痘4年後の反応強度が有意に低下した抗原はA11R, A34R, D8Lであった。これらの抗原群が4年後の中和抗体価及び抗体陽性率の低下に起因していると考察された。

3. その他  
該当なし。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Hiroyuki Yokote, Yasuhiko Shinmura, Tomomi Kanehara, Shinichi Maruno, Masahiko Kuranaga, Hajime Matsui and So Hashizume. Safety of attenuated smallpox vaccine LC16m8 in immunodeficient mice. Clin. Vaccine Immunol. 2014, 21(9):1261-66

##### 2. 学会発表

1) Paul N. Hudson, V. Olson, S. Smith, Z. Reed, A. Kondas, W. Davidson, H. Yokote, M. Saijo, S. Morikawa, I. Kurane, I. Damon. ASSESSING THE NEUTRALIZATION EFFICIENCY OF SERUM FROM LC16m8-VACCINATED INDIVIDUALS AGAINST TWO VARIOLA VIRUS STRAINS. 2014 International Poxvirus, Asfarvirus & Iridovirus Conference. Victoria, Canada (2014, 09)

2) 丸野真一, 金原知美, 新村靖彦, 横手公幸, 齋藤智也, 橋爪壮. 国産第三世代痘そうワクチン LC16m8 の WHO 推奨. 第18回日本ワクチン学会学術集会 福岡 (2014.12)

3) 江藤亜紀子, 齋藤智也, 西山靖将, 横手公幸, 金谷泰宏. 種痘による長期免疫に寄与する抗原の同定およびLC16m8株に対する影響についての解析. 第18回日本ワクチン学会学術集会 福岡 (2014.12)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

該当なし。

##### 2. 実用新案登録

該当なし。

表 1 . 痘そうワクチン LC16m8 接種後の中和抗体価(Anti-Lister PRNT)及び中和抗体陽性率

種痘歴	評価タイミング									
	種痘前		種痘 1 ヶ月後		種痘 4 ヶ月後		種痘 7 ヶ月後		種痘約 4 年後	
	GMT	陽性率	GMT	陽性率	GMT	陽性率	GMT	陽性率	GMT	陽性率
初種痘	40	17% (2/12)	323	56% (5/9)	815	86% (6/7)	404	80% (4/5)	214	58% (14/24)
再種痘	457	100% (13/13)	772	87% (13/15)	1274	92% (11/12)	-	-	716	93% (14/15)

GMT: Geometric mean titer

陽性判定基準: PRNT<sub>50</sub> ≥ 128

表 2 . 痘そうワクチン LC16m8 接種前と比較してプロテオミク解析における蛍光強度が有意に上昇した抗原

	種痘 1-7 か月後*	種痘 4 年後*
Group A	A13L, A26L, A27L, A33R, D13L, A10L	A27L, A10L
Group B	A11R, D13L, D8L, A34R, H3L, A27L, A10L	無
Group C	無	無

\* 有意差が大きい順に記載

表 3 . 痘そうワクチン LC16m8 接種 1-7 か月後と比較してプロテオミク解析における蛍光強度が有意に低下した抗原

	種痘 4 年後*
Group A	A13L
Group B	A11R, D6R, A34R, D8L
Group C	無

\* 有意差が大きい順に記載

表 4 . 蛍光強度に有意差が見られた抗原

Membrane		Core (1)	Other (4)
EEV (2)	IMV (4)		
A33R	A13L	A10L	A26L
A34R	A27L		A11R
	D8L		D13L
	H3L		D6R

A33R: EEV membrane phosphoglycoprotein, A34R: IEV and EEV membrane glycoprotein, A13L: IMV membrane protein, A27L: IMV surface protein, D8L: IMV membrane protein, H3L: IMV heparin binding surface protein, A10L: precursor p4a of core protein 4a, A26L: cowpox A-type inclusion protein, A11R: hypothetical protein, D13L: rifampicin target, D6R: 70kDa small subunit of early gene transcription factor VETF

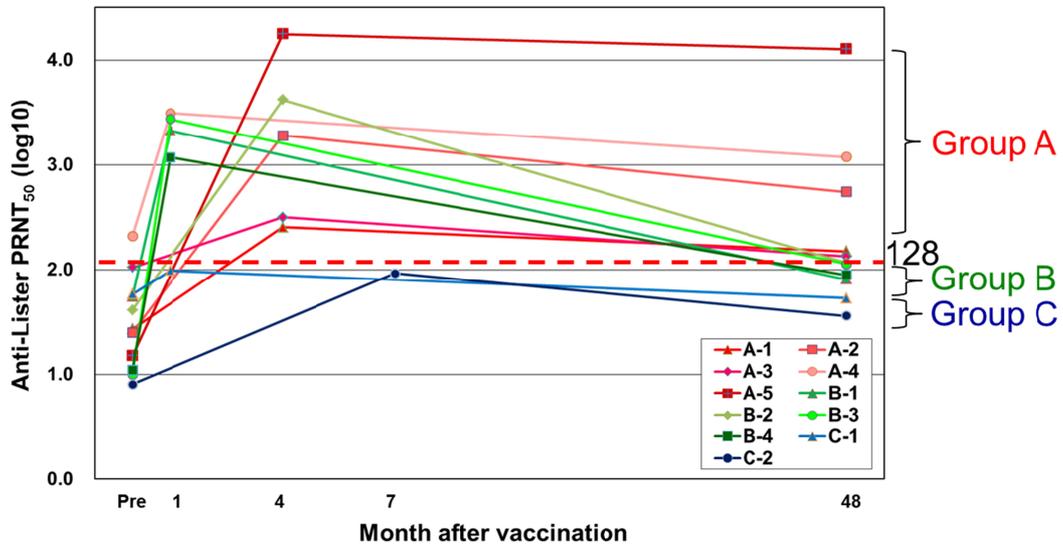


図 1. 痘そうワクチン LC16m8 接種後の中和抗体価推移 (個人別)

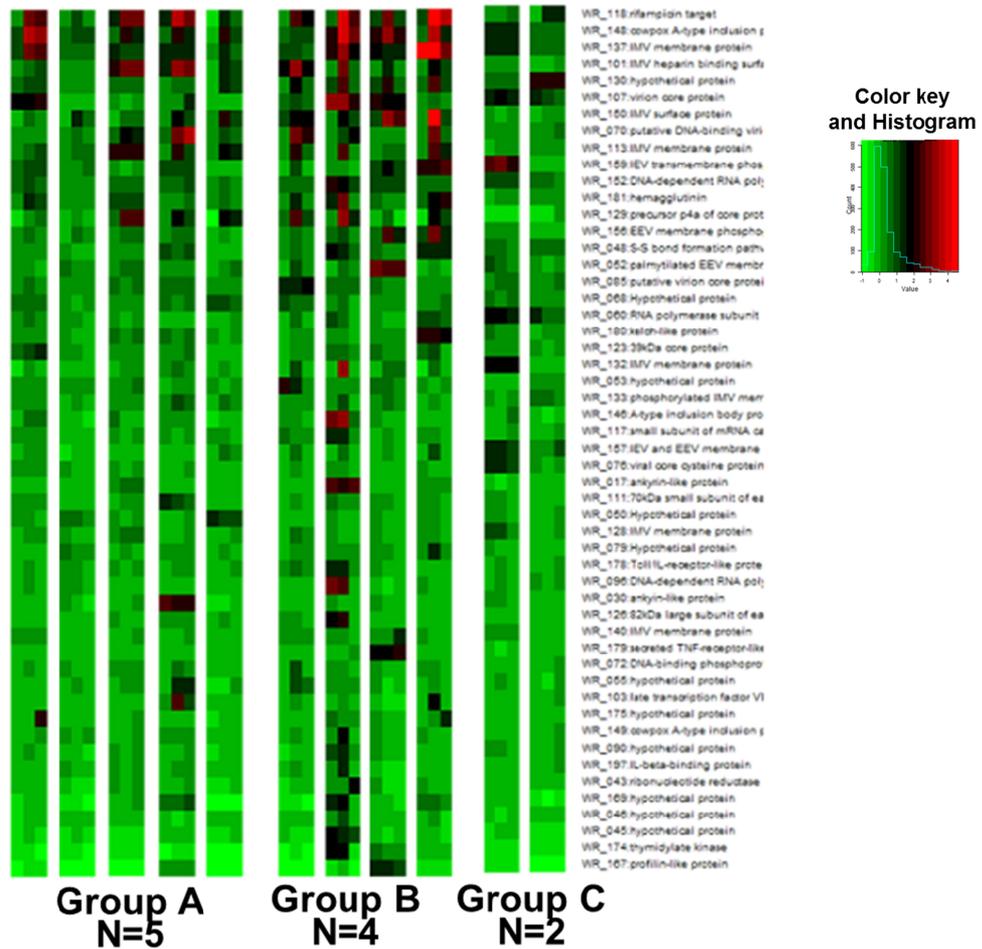


図 2. 痘そうワクチン接種後の認識抗原たん白質プロファイル(Heatmap)