

バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法の確立，
及び細胞培養痘そうワクチンの有効性，安全性に関する研究

分担報告書

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・所長秘書室
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抗体陽性率は経時的な低下傾向が認められた。Proteome Microarray Chip を用いたプロテオミク解析を行った結果，LC16m8 接種後の中和抗体価とプロテオミク解析における反応強度に相関が見られた抗原は 11 種類あった。そのうち，LC16m8 接種 30 日後と比較して接種 1 年後にプロテオミク解析における反応強度が有意に低下した抗原は A11R, A13L, A17L であった。
アフリカ，中東の地域では，サル痘ウイルスの OutBreak が多数報告されており，ヒトヒト感染は 5 代まで確認されている。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サル痘ウイルスに対する中和抗体について再調査した結果，痘そうワクチン LC16m8 のサル痘ウイルスに対する中和抗体免疫誘導能が確認された。

研究協力者

橋爪壯・千葉大学名誉教授

新村靖彦・一般財団法人化学及血清療法研究所

上村千草・一般財団法人化学及血清療法研究所

内田梓・一般財団法人化学及血清療法研究所

金原知美・一般財団法人化学及血清療法研究所

丸野真一・一般財団法人化学及血清療法研究所

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ドアの成人対象者（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ドアの対象者）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。

天然痘患者の発生が認められていた 1970 年代と現在の痘そうワクチンの使用目的や状況を比較分析した。接種回数が異なること及びその調査研究がほとんど行われていないことに注目し，マウスを用いたワクチン接種回数（国内外のワクチン株の組合せ接種含む）と免疫賦活効果に関する調査を実施した。

研究において，LC16m8 単回接種 4 年後の中和抗体（Anti-Lister PRNT）陽性率につ

いて、初回接種群では低下傾向が認められたことから、LC16m8により誘導された抗体が認識する抗原タンパク群の軽時的な変化を調査するために、ワクチニアウイルスWR株の95%以上の構成タンパクを網羅するProteome Microarray Chipを用いたプロテオミク解析を実施した。

また、本邦の国際貢献では、PKOの積極的平和貢献活動が実施され、自衛隊及び医療関係者等の関係者のアフリカ、中東への派遣が急増している。これらの地域では、WHOの勧告も指摘しているように、サル痘ウイルスのOutBreakが多数報告されている。サル痘ウイルスの感染は、近年のアフリカでのWHO及びCDCの調査チームによる報告によると、ヒトヒト感染は、5代(7代まで確認されたことの情報あり)まで確認されたこと、天然痘ワクチン未接種世代の若い世代に多いこと明らかとされている。LC16m8を1回接種された成人対象者に対するサル痘ウイルス中和抗体測定の調査が必要と考え、本研究を開始した。

B. 研究方法

1. ワクチン接種誘導抗体が認識する抗原プロファイルの経時的な調査

本調査研究では、154名の種痘歴の無い健康成人において米国承認備蓄ワクチンDryvaxを比較対照として2004~2005年に米国で実施された細胞培養弱毒痘そうワクチンLC16m8の第I/II相無作為二重盲検臨床試験で取得されたサンプルを用いて解析を行った。

中和抗体の持続を評価するために、痘そうワクチン接種前、接種30日後、60日後、180日後及び360日後のAnti-Dryvax PRNT₅₀のデータを解析し、Anti-Dryvax PRNT₅₀が接種前の値の4倍以上となった場合を抗体陽性として抗体陽性率を算出した。

加えて、LC16m8接種者11名について、接種前、接種30日後、接種360日後に採取された血清サンプルを用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。

2. サル痘ウイルスに対する中和抗体免疫誘導能の調査

本調査研究では、種痘歴の無い健康成人において米国承認備蓄ワクチンDryvaxを比較対照として2004~2005年に米国で実施された細胞培養弱毒痘そうワクチンLC16m8の第I/II相無作為二重盲検臨床試験で取得されたサンプル血清(LC16m8接種者26名、Dryvax接種者24名)を用いて実施したサル痘ウイルス中和抗体測定結果について、痘そうワクチンLC16m8接種30日後のAnti-MonkeyPox PRNT50 (Congo-8)のデータを再解析し、Anti-MonkeyPox PRNT50が10倍希釈以上となった場合を抗体陽性として抗体陽性率を算出した。

【倫理面への配慮】

本調査研究で再解析した臨床試験成績は、米国FDAに了承されたプロトコルに従い、米国GCPに準拠して実施された臨床試験で取得された成績であることを確認した。

C. 研究結果

1. ワクチン接種誘導抗体が認識する抗原プロファイルの経時的な調査

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-Dryvax PRNT)の持続を調査するために、化血研が種痘歴の無い健康成人154名において米国承認備蓄ワクチンDryvaxを比較対照として2004~2005年に米国で実施した細胞培養弱毒痘そうワクチンLC16m8の第I/II相無作為二重盲検臨床試験で取得された成績を再解析した。中和抗体陽性率は接種30日後にLC16m8群では98%(118/120)、Dryvax群では100%(24/24)であったが、接種360日後ではそれぞれ84%(81/97)、88%(15/17)となり、ワクチン株に関係無く抗体陽性率に低下傾向が認められた(表1)。

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。

LC16m8接種者11名について、接種前、接種30日後、接種360日後の個人毎の

PRNT₅₀の推移を図1に示し、Dryvax に対する中和抗体の持続により、以下の2つのグループに分けて解析を行った。

Group A: LC16m8 接種30日後及び接種360日後で抗体価を維持していた被験者(4名)

Group B: LC16m8 接種30日後から接種360日後で抗体価が明らかに低下した被験者(7名)

52個の認識抗原のうち、Dryvax に対する中和抗体価とプロテオミク解析における反応強度に相関がみられた11種類の抗原群を表2に示し、この11種類の抗原群について、グループ毎の比較を行った。接種前と比較して蛍光強度に有意差が見られた抗原を表3及び表4に示した。

Group A では、接種前と比較して接種30日後の蛍光強度が有意に高かった抗原は A17L, D8L, A10L, D13L, A11R, H3L, A26L, A27L であり、そのうち A17L, D8L, A10L, D13L, A11R, H3L, A27L は接種1年後まで有意に高かった。また、A11R は接種30日後と比較して360日後では蛍光強度が有意に低下した。

Group B では、接種前と比較して30日後の蛍光強度が有意に高かった抗原は D8L, A27L, D13L, A17L, H3L, I1L, A10L, A13L, A33R であり、そのすべての抗原が接種360日後まで有意に高かった。また、A13L と A17L は接種30日後と比較して360日後では蛍光強度が有意に低下した。

2. サル痘ウイルスに対する中和抗体免疫誘導能の調査

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-MonkeyPox PRNT50)を調査するために、化血研が種痘歴の無い健康成人において米国承認備蓄ワクチン Dryvax を比較対照として2004~2005年に米国で実施した細胞培養弱毒痘そうワクチン LC16m8 の第I/II相無作為二重盲検臨床試験で取得された成績(LC16m8 接種者26名, Dryvax 接種者24名)を再解析した。希釈率10倍以上の中和抗体陽性率は接種30日後に LC16m8 群では97%(25/26), Dryvax 群では100%(24/24)

と同様であった。また GMT は、それぞれ112, 352 となり、Anti-Dryvax PRNT50 と同様に高さの違いがみられた(表5)。

更に、本邦の海外派遣者における LC16m8 接種者19名(初回接種者12名, 再接種者7名)の Anti-MonkeyPox PRNT50 の測定を行っており、現在測定中である。

D. 考察

研究において、LC16m8 単回接種4年後の中和抗体(Anti-Lister PRNT)陽性率について、再接種群では経時的な変化は認められなかったが、初回接種群では低下傾向が認められ、これに起因している抗原群をプロテオーム解析によって調査してきた。

更なる検証の為に、2004~2005年に米国で実施された細胞培養弱毒痘そうワクチン LC16m8 の第I/II相無作為二重盲検臨床試験で取得されたサンプルを用いて中和抗体(Anti-Dryvax PRNT)の持続を調査した。中和抗体陽性率は LC16m8 群とその比較対照とした Dryvax 群ともに接種30日後に最高値となり、その後接種360日後まで徐々に低下した。なお、中和抗体価及び抗体陽性率の低下傾向はワクチン株に関係無く確認されたことから、LC16m8 株という弱毒株に特有の事象ではないと考えられる。

更に、この接種4年後の抗体価の低下に起因する抗原群が、1年後でも既に低下しているのかについて調査するため、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、LC16m8 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、これらの認識抗原群は、LC16m8 接種4年後までの認識抗原群とほぼ類似しており、他の研究において防御や中和に重要であると言われている抗原を含んでいた。これらの抗原群のうち、中和抗体価(Anti-Dryvax PRNT)とプロテオミク解析における反応強度の間に相関が見られた抗原群は11種類であった。

また、接種1年後まで Dryvax に対する中和抗体を維持していた被験者群において、接種前と比較して接種30日後の蛍光強度が有意に高かった抗原は8種類あり、そのうち A11R は接種30日後から1年後で有意に低下した。また、接種30日後から1年後で Dryvax に対する中和抗体価が明ら

かに低下した被験者群において、接種前と比較して接種 30 日後の蛍光強度が有意に高かった抗原は 9 種類あり、そのうち A13L と A17L は接種 30 日後から接種 1 年後では有意に低下した。中和抗体価の持続によって 2 つの被験者群に分けて解析を行ったが、2 つの被験者間に明確な違いは見られなかった。しかし、A11R と A13L は、4 年後の中和抗体価及び陽性率の低下に起因していると考察した抗原群である。接種 1 年後の結果であり接種 4 年後の途中の過程にあると考えると、A11R と A13L は 1 年後で既に低下が始まっている抗原群であり、これらが中和抗体価の低下に起因する抗原群の一部であることが考察された。

この中和抗体価及び抗体陽性率の低下傾向に起因する認識抗原については被験者数を増やし更に慎重に検証していく必要があると考えられた。加えて、LC16m8 追加接種の要否に関する議論も必要であると考えられた。

また、アフリカ、中東の地域では、サル痘ウイルスの Outbreak が多数報告されており、ヒトヒト感染は 5 代まで確認されている。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サル痘ウイルスに対する中和抗体について再調査した結果、痘そうワクチン LC16m8 のサル痘ウイルスに対する中和抗体免疫誘導能が確認された。

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、抗体陽性率に経時的な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、LC16m8 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、LC16m8 接種後の中和抗体価とプロテオミク解析における反応強度に相関が見られた抗原は 11 種類あった。そのうち、LC16m8 接種 30 日後から 1 年後の反応強度が有意に低下した抗原は A11R、A13L、A17L であった。

この中和抗体価及び抗体陽性率の低下

傾向に起因する認識抗原については被験者数を増やし更に慎重に検証していく必要があると考えられた。加えて、LC16m8 追加接種の要否に関する議論も必要であると考えられた。

これらワクチン株と同類のワクチニア株である Lister 株に対する中和抗体 (Anti-Lister PRNT) 測定によるワクチンの免疫原性の評価結果が、人に感染性及び病原性を有する他のポックスウイルス、例えば天然痘やサル痘等への免疫原性が相関するかなどは、ワクチンの有効性評価において重要な研究課題である。

特にサル痘ウイルスに関しては、米国での愛玩動物のリズガルからの Outbreak 報告や、アフリカ・中東での多数の Outbreak 及び死亡例の報告など感染拡大と WHO 調査チームによる調査が進むにつれて、その実態が重大であることが明らかとなっている。

一方、1980 年天然痘撲滅に際し、全世界での痘そうワクチン接種が中止され、本邦においても 1976 年に痘そうワクチン定期接種が中止され、40 歳以下の世代では痘そうワクチン接種歴がなく、また既接種者においても本研究での研究成果でも明らかのように、抗体陰性化している人の割合が高いことが推察された。

本研究においては、本邦の国家備蓄ワクチンである痘そうワクチン LC16m8 のサル痘ウイルスに対する中和抗体誘導能の評価とその持続を検討することである。

米国で実施した細胞培養弱毒痘そうワクチン LC16m8 の第 I/II 相無作為二重盲検臨床試験での成績を再解析した結果、LC16m8 は米国承認備蓄ワクチン Dryvax と同様の抗体陽転率を示したことから、同様の中和抗体免疫誘導を有すると考えられた。一方、中和抗体価 (GMT) は、Dryvax に比べて低い値であったが、これは中和抗体法 (50% プラーク減少法) の Plaquing Virus Strain の種類によって変化することが知られており、その傾向を示したものと考えられた。

また、痘そうワクチン LC16m8 のサル痘ウイルスに対する免疫の持続に関しては、現在測定中である。その結果によっては、このサル痘ウイルスに対する中和抗体価及び抗体陽性率については被験者数を増

やし更に慎重に検証していく必要がある
と考えられた。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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) Yokote H, Shinmura Y, Kanehara T, Maruno S, Kuranaga M, Matsui H, Hashizume S. Vaccinia virus strain LC16m8 defective in the B5R gene keeps strong protection comparable to its parental strain Lister in immunodeficient mice. Vaccine. 33:6112-6119,2015
- 3) Nishiyama Y, Fujii T, Kanatani Y, Shinmura Y, Yokote H, Hashizume S. Freeze-dried live attenuated smallpox vaccine prepared in cell culture “LC16-KAKETSUKEN” Post-marketing surveillance study on safety and efficacy compliant with Good Clinical Practice. Vaccine. 33:6120-6127, 2015
- 4) Eto A, Saito T, Yokote H, Kurane I, Kanatani Y. Recent Advances in the Study of the Live Attenuated Cell-Cultured Smallpox Vaccine LC16m8. Vaccine. 33:6106-61, 2015
- 5) Hayakawa T, Aoi T, Bravery C, Hoogendoorn K, Knezevic I, Koga J, Maeda D, Matsuyama A, McBlane J, Morio T, Petriccioni J, Rao M, Ridgway A, Sato D, Sato Y, Stacey G, Sakamoto N, Trouvin JH, Umezawa A, Yamato M, Yano K, Yokote H, Yoshimatsu K, Zorzi-Morre P. Report of the international conference on regulatory endeavors towards the sound development of human cell therapy products. Biologicals. 43(5):283-97,2015

- 6) Mottate K, Yokote H, Mori S, Horita A, Miyatsu Y, Torii Y, Kozai Y, Iwaki M, Takahashi M, Ginnaga A, Retrospective survey to evaluate the safety and efficacy of Japanese botulinum antitoxin therapy in Japan Toxicon. 110:12-18, 2016

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)
- 4) 江藤亜紀子, 齋藤智也, 横手公幸, 金谷泰宏. 天然痘ワクチン初回接種時の抗体産生に関する日米研究の比較. 第 19 回日本ワクチン学会学術集会 愛知(2015.11)
- 5) 江藤亜紀子, 上村千草, 金原知美, 齋藤智也, 横手公幸, 金谷泰宏. 天然痘ワクチン LC16m8 による感染防御成立時の抗体産生の網羅的解析. 第 20 回日本ワクチン学会学術集会 東京(2016.10)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表 1 . 痘そうワクチン接種後の中和抗体価及び抗体陽性率 (Anti-Dryvax PRNT)

ワクチン	接種前	接種 30 日後		接種 60 日後		接種 180 日後		接種 360 日後	
	GMT	GMT	陽性率	GMT	陽性率	GMT	陽性率	GMT	陽性率
LC16m8 (N=125)	12	367	98% (118/120)	207	97% (115/120)	109	89% (101/114)	91	84% (81/97)
Dryvax (N=24)	14	1,208	100% (24/24)	433	96% (22/23)	330	91% (21/23)	174	88% (15/17)

GMT: Geometric mean titer

陽性判定基準: 接種前の抗体価の 4 倍以上の抗体価を獲得した者を陽性と判定

表 2 . LC16m8 接種後の中和抗体価 (Anti-Dryvax PRNT) と
プロテオミク解析における反応強度に相関が見られた抗原群 (11 種)

Membrane		Core (2)	Other (3)
EEV (1)	IMV (5)		
A33R	H3L	A10L	A11R
	D8L	I1L	D13L
	A17L		A26L
	A13L		
	A27L		

A33R: EEV membrane phosphoglycoprotein, H3L: IMV heparin binding surface protein, D8L: IMV membrane protein, A17L: IMV membrane protein, A13L: IMV membrane protein, A27L: IMV surface protein, A10L: precursor p4a of core protein 4a, I1L: putative DNA-binding virion core protein, A11R: hypothetical protein, D13L: rifampicin target, A26L: cowpox A-type inclusion protein.

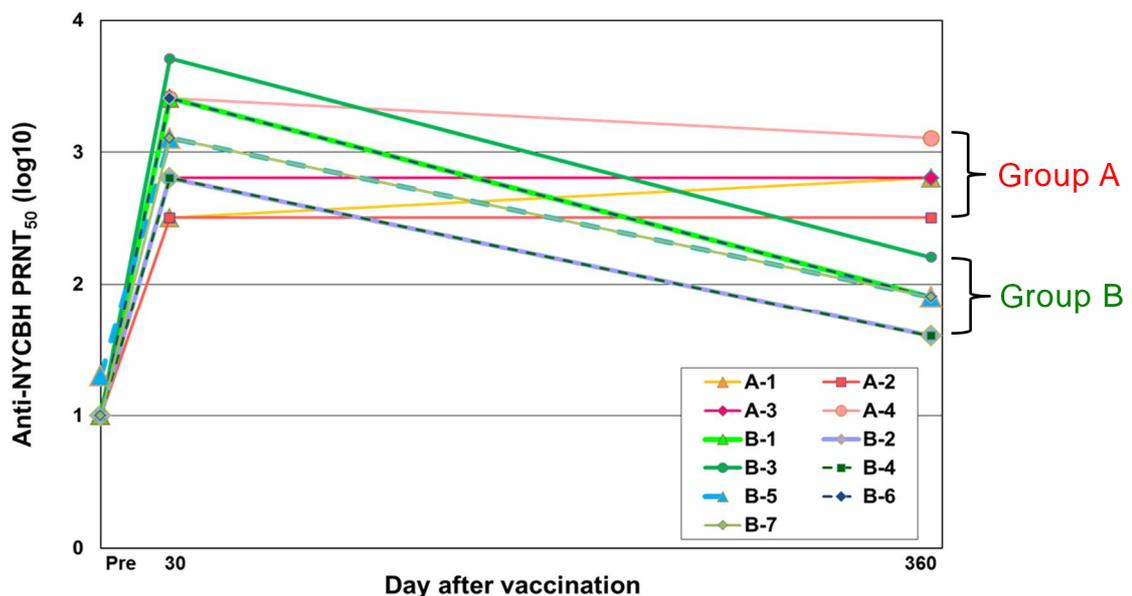


図 1 . 痘そうワクチン LC16m8 接種後の中和抗体価推移 (個人別)

表 3 . 痘そうワクチン LC16m8 接種前と比較してプロテオミック解析における蛍光強度が有意に上昇した抗原

	接種 30 日後*	接種 360 日後*
Group A	A17L , D8L , A10L , D13L , A11R , H3L , A26L , A27L	A11R , A27L , A10L , D13L , D8L , H3L , A17L , A33R
Group B	D8L , A27L , D13L , A17L , H3L , I1L , A10L , A13L , A33R	H3L , D13L , A10L , D8L , I1L , A27L , A13L , A17L , A33R

* 有意差が大きい順に記載

表 4 . 痘そうワクチン LC16m8 接種 30 日後と比較してプロテオミック解析における蛍光強度が有意に低下した抗原

	接種 360 日後*
Group A	A11R
Group B	A13L , A17L

* 有意差が大きい順に記載

表 5 . 痘そうワクチン接種後のポックスウイルスに対する中和抗体価及び抗体陽性率

Plaquing Virus Strain	Monkeypox(Cong-8)		Vaccinia(Dryvax)		Vaccinia(LC16m8)	
	Dryvax	LC16m8	Dryvax	LC16m8	Dryvax	LC16m8
Vaccine						
N	24	26	24	26	24	26
S/N*	100% (24/24)	96.2% (25/26)	100% (24/24)	100% (26/26)	100% (24/24)	100% (26/26)
GMT	352	112	932	329	447	733
95% CI	(219, 564)	(70, 179)	(585, 1483)	(228, 474)	(286, 696)	(400, 1343)

*陽性判定基準：10 倍以上の抗体価を獲得した者を陽性と判定

GMT: Geometric mean titer