

我が国で開発され、備蓄されている細胞培養痘そうワクチンの有効性、安全性、生産性向上  
および国内外のバイオテロ対策のあり方に関する研究

分担報告書

細胞培養弱毒生痘そうワクチンの有効性及び安全性評価、特性解析、品質試験法改善、生産性に関する研究

所 属 KMバイオロジクス株式会社  
研究開発本部 製品開発部 部長  
研究分担者 園田 憲悟

研究要旨:

LC16m8 は世界で 2 つしかない第 3 世代のワクチン(安全性が高い弱毒株由来)の一つで、且つ、現在世界で唯一、安定的な生産・供給体制が整備された痘そうワクチンであることから、国際的にも注目されている。本邦の国際貢献海外派遣先であるアフリカ地域では、サル痘ウイルスの散発的な流行が報告されており、近年の調査ではヒトからヒトへの伝播が発生し、痘そうワクチン未接種の若い世代に発症者が多いことが報告されている。そこで、痘そうワクチン LC16m8 を 1 回接種された成人初回接種者について調査した結果、痘そうワクチン LC16m8 は、米国で承認、備蓄されている第 1 世代の痘そうワクチンである Dryvax と同程度のサル痘ウイルスに対する中和抗体誘導能を有することが示唆された。一方で、その持続については、Dryvax と同様に、経時的な減衰傾向が認められた。

研究協力者

氏名・所属研究機関名・職名

新村 靖彦・KMバイオロジクス株式会社研究開発本部製品開発部開発第四課・課長

A.研究目的

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第 3 世代の弱毒生ウイルスワクチンで、本邦では 1975 年に製造承認が認可された(凍結乾燥製剤は 1980 年に認可された)。

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 I 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。

本邦の国際貢献では、国連の平和維持活動(PKO)への積極的貢献活動が行われ、自衛隊及び医療従事者等の関係者のアフリカ、中東への派遣が行われている。アフリカ地域では、WHO の報告によると、1981 年から 1986 年及び 1996 年から 1997 年に数百例規模のヒトでのサル痘ウイルスの大流行(アウトブレイク)が発生し、その後も散発的なアウトブレイクが発生している。近年では特に患者からその家族へのウイルス伝播、つまり、ヒトからヒトへの感染が患者発生地域における流行拡大に起因していること、また、痘そうワクチン未接種の若い世代において発症者が

多いことが報告されている(Rimoin et al. 2010, Nolen, et al. 2016)。

以上の背景より、痘そうワクチン LC16m8 を 1 回接種された成人対象者においてサル痘ウイルスに対する中和抗体の獲得状況の調査が必要と考え、平成 28 年度より調査研究を開始している。今年度は中和抗体の持続状況の調査を実施した。

B.研究方法

本調査研究では、過去に種痘歴の無い健康成人(初回接種者)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、平成 29 年度の調査対象者として選定した被験者(LC16m8 接種者 23 名及び Dryvax 接種者 7 名)の保存血清検体(各被験者のワクチン接種後 60 日目、180 日目または 360 日目の採取血清)を用いて実施した。なお、調査対象者は各ワクチン接種群の被験者のうち、接種後 30 日目に採取した血清中のワクチニアウイルス NYCBH 株に対する中和抗体価(Anti-NYCBH PRNT<sub>50</sub>)が 320 から 1280 の範囲の者から両群で高低の偏りが可能な限り無いように選定した(表 1)。

サル痘ウイルスに対する中和抗体価測定は米国の試験受託機関である Southern Research (2000 9th Avenue South, Birmingham, AL 35205, USA)へ委託し、供試検体は盲検状態で提供した。測定は研究者分担

者が承認した試験プロトコル及び Southern Research 社の作業手順書(SOP)に従い、Vero E6 細胞を用いて実施され、血清中のサル痘ウイルス(Zaire-79 株)に対する中和抗体価(Anti-Monkeypox PRNT<sub>50</sub>)を50%プラーク減少法により算出した。

#### 【倫理面への配慮】

本調査研究は、KMバイオロジクス株式会社の研究倫理審査委員会の審査を受け、2018年8月23日付で研究期間延長承認を得て実施した(受付番号17-05)。また、個人を特定できないように措置を講じた上で研究を実施した。

#### C.研究結果

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験者が獲得したサル痘ウイルスに対する中和抗体応答の持続状況を調査するために、過去に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年に化血研が米国で実施した細胞培養弱毒生痘そうワクチンLC16m8の第I/II相無作為二重盲検臨床試験で取得され長期間凍結保存しているヒト血清を用いて、サル痘ウイルスに対する中和抗体価測定を実施した。各被験者のワクチン接種後60日目、180日目または360日目の採取血清における Anti-Monkeypox PRNT<sub>50</sub>を表1に示す。次に、今回調査した各被験者のワクチン接種後最長時点(180日目または360日目時点)での中和抗体陽性率は、Anti-Monkeypox PRNT<sub>50</sub>が $\geq 10$ を陽性基準とした場合、LC16m8群では17%(4/23)、Dryvax群では43%(3/7)であり、両群は同等であった。また中和抗体陽性者における Anti-Monkeypox PRNT<sub>50</sub>の幾何平均(GMT)は、LC16m8群では17、Dryvax群では66であった(表2)。

#### D.考察

本研究により、過去に種痘歴の無い健康成人において、痘そうワクチンLC16m8は米国で承認、備蓄されている第1世代痘そうワクチンであるDryvaxと同程度のサル痘ウイルスに対する中和抗体誘導能を有することが示唆された(平成29年度報告済み)。1980年の天然痘撲滅宣言を受けて、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無く、また既接種者においても本研究班でのこれまでの研究成果で示されているように、ワクチニアウイルス Lister 株等のポックスウイルスに対する中和抗体が接種後の年数を経て徐々に陰性化しているヒトの割合が高まりつつあることが懸念される。また、アフリカ地域のサル痘アウトブレイ

クでは痘そうワクチン未接種の若い世代において発症者が多いことが報告されている。そこで、痘そうワクチンLC16m8により誘導されたサル痘ウイルスに対する中和抗体応答の持続について調査した結果、LC16m8接種群ではDryvax接種群と同様に、経時的な減衰傾向が認められ、陽性率は共に50%を下回った。なお、本調査では対象とする検体調達の困難さから、採取以降約15年間にわたり凍結保管しているヒト血清を用いたため、長期保管中の検体特性の経年劣化による影響は否定できない。

#### E.結論

細胞培養弱毒生痘そうワクチンLC16m8を1回接種された過去に種痘歴の無い成人被験者について調査した結果、痘そうワクチンLC16m8は、米国で承認・備蓄されている第1世代の痘そうワクチンであるDryvaxと同程度のサル痘ウイルスに対する中和抗体誘導能を有することが示唆された。一方で、その持続については、Dryvaxと同様に、経時的な減衰傾向が認められた。一方で、痘そうワクチンLC16m8により誘導されたサル痘ウイルスに対する中和抗体応答については、その持続を含めて、調査対象者数を増やし成績を補充するなど、更なる調査研究が必要であると考えられた。

#### F.健康危険情報

該当なし

#### G.研究発表

##### 1. 論文発表

該当なし

##### 2. 学会発表

- 1) Yasuhiko Shinmura, Shota Takagi, Masaya Yoshimura, Kazuhisa Kameyama, Kengo Sonoda, Yoichiro Kino, Sutee Yoksan, Takashi Fujii, Single administration of live-attenuated tetravalent dengue vaccine candidate, KD-382, induced long-lasting (>2 years) neutralizing antibody against all four serotypes in cynomolgus monkeys, The American Society of Tropical Medicine and Hygiene Annual Meeting 2017
- 2) Shota Takagi, Masaya Yoshimura, Kazuhisa Kameyama, Yasuhiko Shinmura, Kengo Sonoda, Yoichiro Kino, Takashi Fujii, Evaluation of the effect of pre-existing immunity against dengue on neutralizing antibody response induced by a live attenuated tetravalent dengue vaccine candidate, KD-382, in cynomolgus monkeys, The American Society of Tropical Medicine and Hygiene Annual Meeting 2017
- 3) 吉村昌也, 高木翔太, 亀山和久, 新村靖彦, 園

田憲悟, 来海和彦, 4価弱毒生 Dengue ワクチン開発品のカニクイザルにおける中和抗体応答評価, 第54回日本ウイルス学会九州支部総会、2017年

- 4) 吉村昌也, 高木翔太, 亀山和久, 新村靖彦, 園田憲悟, 城野洋一郎, 藤井隆, 4価弱毒生 Dengue ワクチン開発品のカニクイザルにおける中和抗体応答評価, 第52回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2017年
- 5) Yasuhiko Shinmura, Yoichiro Kino, Sutee Yoksan, Kengo Sonoda, Single dose of live attenuated tetravalent dengue vaccine elicits well-balanced immune response for all four serotypes without viremia in monkeys, The 6th Asian Vaccine Conference 2017
- 6) Hiroyuki Yokote, Kengo Sonoda, Japanese Vaccine Development. U.S. – JAPAN ANNUAL MEDICAL BIODEFENSE RESEARCH SYMPOSIUM, 2016
- 7) Kengo Sonoda, Session I: Manufacturing for Investigational Products, Chemical Manufacturing Control for Submission, 16<sup>th</sup> Thailand Towards Excellent in Clinical Trials Annual Meeting 2016
- 8) Kengo Sonoda, Session I: Manufacturing for Investigational Products, Manufacturing for Investigational Products, 16th Thailand Towards Excellent in Clinical Trials Annual Meeting 2016
- 9) Kengo Sonoda, Experiments of Vaccine Development for Flavivirus Infectious Diseases. Workshop on Cooperation Studies for Zika Virus between Japan and Brazil, 2016

#### H. 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

3. その他  
該当なし

表 1. 痘そうワクチン接種後のサル痘ウイルスに対する各被験者の中和抗体価

Sample ID*	Vaccine	平成 29 年度調査成績（報告済）			平成 30 年度調査成績	
		Days after vaccination	Anti-NYCBH PRNT50	Anti-Monkeypox PRNT50	Days after vaccination	Anti-Monkeypox PRNT50
HS001	LC16m8	0	<10	<10	60	<10
HS002		30	320	23	180	<10
HS003	Dryvax	0	<10	<10	180	<10
HS004		30	320	157	360	<10
HS005	LC16m8	0	10	<10	180	<10
HS006		30	320	<10	360	<10
HS007	LC16m8	0	<10	<10	180	<10
HS008		30	320	123	360	13.4
HS009	Dryvax	0	<10	<10	180	222.1
HS010		30	1280	<10	360	75.9
HS011	LC16m8	0	<10	<10	180	36.5
HS012		30	320	138	360	29.9
HS013	LC16m8	0	<10	<10	180	<10
HS014		30	320	39	360	<10
HS015	LC16m8	0	<10	<10	180	<10
HS016		30	320	<10	360	<10
HS017	LC16m8	0	<10	<10	180	<10
HS018		30	320	30	360	<10
HS019	LC16m8	0	10	<10	60	<10
HS020		30	640	23	180	<10
HS021	LC16m8	0	<10	<10	180	19
HS022		30	320	27	360	14.7
HS023	Dryvax	0	<10	<10	60	80
HS024		30	320	204	360	117
HS025	Dryvax	0	20	<10	180	<10
HS026		30	640	74	360	<10
HS027	LC16m8	0	<10	<10	180	<10
HS028		30	320	80	360	<10
HS029	LC16m8	0	<10	<10	60	<10
HS030		30	640	26	180	<10
HS031	Dryvax	0	<10	<10	180	<10
HS032		30	320	150	360	<10
HS033	Dryvax	0	20	<10	60	93.5
HS034		30	1280	192	180	33.1
HS035	LC16m8	0	10	<10	180	<10

Sample ID*	Vaccine	平成 29 年度調査成績（報告済）			平成 30 年度調査成績	
		Days after vaccination	Anti-NYCBH PRNT50	Anti-Monkeypox PRNT50	Days after vaccination	Anti-Monkeypox PRNT50
HS036		30	320	64	360	<10
HS037	LC16m8	0	<10	<10	60	<10
HS038		30	640	<10	180	<10
HS039	LC16m8	0	20	19	180	17.2
HS040		30	640	120	360	16.9
HS041	LC16m8	0	<10	<10	180	<10
HS042		30	640	155	360	<10
HS043	LC16m8	0	10	<10	180	<10
HS044		30	640	111	360	<10
HS045	LC16m8	0	<10	<10	180	<10
HS046		30	640	<10	360	<10
HS047	Dryvax	0	10	<10	180	<10
HS048		30	320	103	360	<10
HS049	LC16m8	0	80	<10	180	<10
HS050		30	640	129	360	<10
HS051	LC16m8	0	<10	<10	180	<10
HS052		30	320	<10	360	<10
HS053	LC16m8	0	<10	<10	60	<10
HS054		30	640	71	180	<10
HS055	LC16m8	0	<10	<10	60	<10
HS056		30	320	82	180	<10
HS057	LC16m8	0	80	<10	180	<10
HS058		30	320	26	360	<10
HS059	LC16m8	0	<10	<10	60	<10
HS060		30	320	73	180	<10

\* Sample ID は平成 29 年度に付与した HS 連番を示す。

表 2. 痘そうワクチン接種後のサル痘ウイルスに対する中和抗体陽性率

Vaccination	Anti-NYCBH PRNT		Anti-Monkeypox PRNT			
	LC16m8	Dryvax	LC16m8		Dryvax	
N	23	7	23		7	
Days after vaccination	30	30	30	<b>180 or 360</b>	30	<b>180 or 360</b>
Seroconversion Rate*	100% (23/23)	100% (7/7)	78% (18/23)	<b>17%</b> <b>(4/23)</b>	86% (6/7)	<b>43%</b> <b>(3/7)</b>
GMT**	420	525	35	<b>17</b>	86	<b>66</b>

\*10 倍以上の中和抗体価を獲得した者を陽性と判定

\*\*GMT: Geometric mean titer (中和抗体陽性者の抗体価のみを対象とした)