

弱毒痘苗株 LC16m8 の開発とこのワクチンの現況

橋 爪 壮*

はじめに

わが国における 1960 年代以降の種痘研究の経緯については平山先生が本誌にすでに書かれており¹⁾、そのなかで弱毒痘苗株 LC16m8 の接種成績などについても紹介されているので、ワクチンに関心のある先生方はすでにご存知のことで今更筆者が述べることもないように思われるが、平山先生のお勧めもあり、このワクチン株の開発の状況と、かつてこのワクチンの開発研究と製造を行っていた千葉血清研究所が閉鎖になり、このワクチンの製造が化学及血清療法研究所（化血研）に移譲されて後の現況について述べてみたい。

I. 細胞培養弱毒痘瘡ワクチンの開発をなぜしようと考えたか

筆者の長男に種痘をしたとき、高熱でけいれんを起こすのではないかと心配したほどの副作用を経験した。筆者が手がけた最初のワクチンはポリオの不活化ワクチンであった。ついでポリオ生ワクチンの製造に携わることになり、いずれのワクチンも副作用が極めて少ない。これらのワクチンと比較し、痘苗は副作用の点でワクチンとはいえないのではないかと考えるようになった。当時最も信頼していた同僚の宮村先生にこの考えを話したところ彼女も同意見であったので、痘瘡ワクチン株の弱毒化を始めることにした。

1960 年代に入り千葉県血清研究所（千葉血清）所長の越後貫博先生から乾燥無菌痘苗の製造を命ぜられた。筆者は細胞培養ワクチンばかり手がけてきたので、ウシを使用して無菌の粗苗（痘苗の

原料）の製造の困難さを痛いほど思い知らされた。ウシは管理しやすいように仔ウシを使ったが、いくらウシの管理を厳重にしても無菌粗苗は作れないことを経験した。そこで無菌痘苗を製造するには細胞培養を用いるほかないと考え、細胞培養ワクチン株の開発を目指した。

II. 細胞培養弱毒痘瘡ワクチン株開発への道筋

1. 親株の選定

千葉血清の痘苗製造株は池田株であったが、弱毒する親株としては池田株ではなく、池田よりやや弱毒ではないかといわれ、WHO の天然痘撲滅計画でも大量に使用されてきた Lister 株を親株とすることにした。

2. 増殖細胞系の選定

旧来の痘苗はウシの皮膚にワクチニアウイルスを接種し、発痘してから皮膚組織を掻き採り、これを乳剤にして製造していた。したがってウシ腎臓細胞系を第 1 の増殖系候補とした。また、長らく痘苗の製造に携わってきた先輩の話で、ウシでの発痘が悪くなった場合、しばしばウサギで継代してから再びウシに戻すと発痘がよくなるということを知っていたので、第 2 の候補としてウサギ腎臓細胞系を試験することにした。

ウシ腎細胞系とウサギ腎細胞系で Lister 株の増殖試験を行ったところウサギ腎細胞系でのウイルス増殖がよかったので、以後この系を用いることとした。当時ワクチン製造には継代細胞は用いるべきでないという考えが常識であったので、すべて初代細胞を用いることにした。なお生後 1 か月以上のウサギ腎臓を培養したとき、しばしば

* 千葉大学名誉教授

Formy agent によると思われる細胞変性がみられたので、使用ウサギは生後 2 週以内の仔ウサギとした。

3. 弱毒化の方法

弱毒株を得る方法として、自然の宿主を人為的に他の宿主に変えての継代、あるいは培養温度を変え継代し弱毒株を得ることは Pasteur 以来の方法であった。1960 年代、唯一最も確からしい弱毒化の方法は Sabin のポリオ生ワクチンで確立されていた温度感受性変異 (ts) 株を選択することであった。この手段は筆者が麻疹、風疹ワクチン株を作製するときも愛用していたし、特に痘苗で問題になる副作用の一つは種痘後脳炎だったので、中枢神経系に対する弱毒化に ts 変異株の作出が最適と考えた。もっとも、この当時一般的には種痘後脳炎は、主としてその病理像からアレルギー性脳炎と考えられていた。しかし、種痘後脳炎は初種痘で起こるし、何がアレルゲンになるのかなど、その機序についてはほとんど触れられていなかった。筆者は接種されたウイルスが原因であろうと考え、弱毒化に Lister 株を 30°C で継代し、ts 変異株を選択することにした。

継代 30 代くらいで ts 株の出現に気がつき、36 代で plaque cloning し、ブラックサイズが親株より小さい ts 株を選択し、これを LC16 株と命名した。

マウス、ウサギの脳内接種試験により LC16 株は中枢神経に対する病原性が極めて弱いことを確信した。

幸いなことに、この頃国立予防衛生研究所（現在の国立感染症研究所）の腸内ウイルス部長の多ヶ谷先生から「ソ連の研究者が各国のワクチニア株についてローゼンツを使いそれらの病原性を調べ、日本の株は病原性がやや強いという報告をしているが、僕はこれをサルで確かめてみたいと思ひ、科研費を申請したところ通った。しかし、今、予研ではサル舎の余裕がないので、この試験を君のところでやってもらえないだろうか」との相談があった。このとき、筆者はもしできるなら LC16 株をこの試験に入れていただけないかとお願いしてみた。多ヶ谷先生はこの申し出を快く受け入れてくださり、この試験を千葉血清ですること

になった。試験したウイルス株は CV1, NYBH, 池田, Lister, EM63, DIs, LC16 の 7 株で、LC16 以外のすべての株は予研の腸内ウイルス部で準備された。各株 10^{-6} ~ 10^{-8} の 3 段階希釈、1 希釈 3 頭のサルに接種した贅沢な実験であった。この成績は 1972 年にオランダのユトレヒトで開かれた国際 Smallpox vaccine シンポジウムで発表した²⁾。この試験で驚いたことは、弱毒株とされていた CV1 (Kempe らが弱毒株として米国で研究していた)³⁾ は予想外に神経病原性が強く NYBH 株 (CV1 の親株) よりむしろ強いこと、池田、米国で痘苗株として使用されていた NYBH (New York City Board of Health) 株はほぼ同程度で、Lister 株、ソ連で使われていた EM63 株はこれらより若干弱かったが、多少の差はあるもののほぼ同程度の病原性を有すること、それに比べ LC16 は DIs 株と同程度に極めて弱毒であったことであった。なお DIs は増殖しないはずなので、 10^8 の濃度はかなり混濁した濃厚溶液であったのでウイルス増殖による反応というより異物反応であったかもしれない。

4. LC16 から LC16m8 へ

LC16 についてウサギの皮膚増殖試験、抗体産生能試験なども終わっており、この株が弱毒株であることを確信したので、上記のオランダの会議に出席する前に南谷幹夫先生にお願いして小規模の接種試験をしていただいた。

約 2 週間の海外旅行であったが、旅行中ある夜南谷先生が機嫌を悪くしている夢をみた。もしかしたら、LC16 の接種試験で何かあったのではないかと気になり、帰国早々南谷先生を訪問し、接種成績についてお聞きした。その結果、接種者のなかで 2 名ほど痂皮形成の遅い子がおり、これでは自己接種が多くなる危険性があるのではないかとのご忠告を受けた。

そこで、この問題を解決するために、筆者は一つにはより皮膚増殖の悪い変異株を選定すること、2 つ目は池田など他の株では感染初期に出現する S 抗原が Lister 系ではできないと聞いていたのでこれが関係しているのではないかと考え、この 2 つについて検討を進めることにした。

鶏卵の漿尿膜 (CAM) は 3 層からなっており、そ

表 1 Lister 株由来ワクチニアウイルス LC16m8 株の経歴

Lister (Elstree) Virus (LO)	Marker used for Selection
↓	
36 passages in RK cells at 30°C	
↓	
Plaque Cloning → LC16	ts, Plaque size
↓	
6 passages in RK cells at 30°C	
↓	
Plaque Cloning → LC16m0	ts, Plaque size, Pock size on CAM
↓	
3 passages in RK cells at 30°C	
↓	
Plaque Cloning → LC16m8	ts, Plaque size, Pock size on CAM

RK : Rabbit kidney, ts : temperature sensitive, CAM : Chorioallantoic membrane

の一番上層（外側）は外胚葉性であるので、ワクチニアウイルスを接種した場合ここで形成されるポックが小さいほど皮膚増殖が悪いのではないかと考え、ポックサイズをマーカーとして変異株を選定することにした。

すなわち、LC16 を 30°C でさらに 6 代継代し、RK 細胞での plaque size が比較的小さく〔後でみつけた LC16m8 に比べればやや大きいので中程度 (m) の大きさとした〕、CAM 上のポックが小さいものを選びこれを LC16m0 とした。

LC16m0 をさらに 3 代継代後、plaque が LC16m0 より小さく、CAM 上で小ポックを作る clone を選び、これを cloning し、この株を LC16m8 と命名した。幸いなことにウサギの皮膚接種試験でこの株の皮膚増殖が弱いことを確かめることができた。

LC16m8 の継代歴を表 1⁴⁾に、Lister 系の変異各株の性状を表 2⁵⁾に示す。

このように皮膚増殖の弱い株を選択したので、その免疫原性が弱すぎるのではないかと心配したが、ウサギの皮下接種法で L0, LC16m0, LC16m8 の 3 株につき比較試験したところ HI, NT 抗体とも LC16m0 が最もよく、LC16m8 は L0 とほぼ同程度であった。

1966 年に発足した種痘研究班は 1968 年より各種の痘瘡ワクチンの比較試験を行ってきた。池田株は 1968～1970 年に、Lister 株は 1968～1971 年

にかけ、EM63 は 1969～1970 年に、CV1 は 1971～1973 年に、LC16m0 と LC16m8 はかろうじてこの試験に間に合い、1973～1974 年にかけ LC16m8 は約 50,000 例に、LC16m0 は約 3,000 例に接種された。これらの株の接種成績を表 3 に示す⁵⁾。善感率は Lister よりややよいくらいで問題なく、接種局所の硬結径が他株に比し小さいこと、発熱率が旧来のワクチン株に比べ著しく低い特徴があった。約 10,000 例について詳細な調査が行われたが、幸いなことに軽度な皮膚合併症と熱性けいれん 3 例だけで、問題となるような重篤な副作用はみられなかったと報告されている⁶⁾。

この種痘研究班の成績から 1975 年に厚生省の製造承認を受け、製品として出せるようになったが、わが国では 1976 年に法律を改正し、定期種痘を中止したので、LC16m8 ワクチンは実際にはほとんど使われず、緊急事態用に備蓄されるワクチンの一つとなった。このワクチンは一般には使われなかったが、Orthopox グループのウイルスを取り扱う一部の研究者および海外に派遣された自衛隊員に使用された。

III. ワクチン研究その後の発展

1. B5R 遺伝子に関連する研究

杉本らは m8 あるいは m0 株のプラックが小さいこと、また m8 が Vero 細胞での増殖性が悪い性質を示す遺伝子部位を特定し、この遺伝子を

表 2 LC16 系ワクチニアウイルスの性状

	LO	LC16	LC16mO	LC16m8
増殖不能温度 (RK cell)	>41°C	41°C	41°C	40.5°C
ブラックサイズ (RK cell)	L	M	M	S
ポックサイズ	L	L	M	S
各種細胞における増殖性				
CAM	+++	+++	+++	+++
Vero	+++	+++	+++	+
RK	+++	+++	+++	+++
CEF	++	++	++	++
中枢神経病原性				
増殖性				
ウサギ	++	+	+	±
サル	+++	+	+	+
マウス	+	+	-	-
侵襲性				
マウス	+++	+	-	-
皮膚増殖性				
ウサギ	+++	+++	++	+
抗体産生能				
ウサギ	++	+++	+++	++

表 3 痘苗・ワクチン別局所反応と発熱率

痘苗・ワクチン株	調査期間	調査数	善感率	平均直径 (mm)		発熱率
				発赤	硬結	
池田	1968~1970	1,506	99.1	22.9	18.2	25.0
エクアドル EM63	1969~1970	1,846	67.5	19.2	17.4	21.3
リスター	1968~1971	3,662	93.7	17.6	15.3	26.6
CV-1	1971~1973	22,976	92.4	21.1	16.8	8.5
LC16mO	1973~1974	829	94.8	19.6	14.5	12.1
LC16m8	1973~1974	10,578	95.1	18.4	6.1	7.7

ps/hr (plaque size/host range) gene とした⁷⁾。これは後にワクチニアウイルスの全塩基配列が明らかにされ、ps/hr gene は B5R 遺伝子と同一部位であることが判明した⁸⁾。現在は一般的には ps/hr gene と呼ばず B5R gene というようになっている。

現在のワクチン製造では品質の安定性を確保するために、種ウイルス (master seed virus : MSV) から 3 代とか 5 代以内で製品を作るというシステムになっている。LC16m8 の場合 MSV を数代継代すると、m8 本来の plaque よりやや大きい中型の plaque が出現し、継代ごとにその比率が高くなる。中型 plaque が全体の 5% 以上になると病原性もやや強くなる傾向が認められた。化血

研ではこの問題を解決するため、製法を検討し、現在の製品は中型ブラックを作るウイルスの混在する比率は MSV と同程度で製造上問題とならないようにすることに成功している。しかし、木所らはこの問題の解決のため、B5R gene を除去し、継代しても安定した株を作製することに成功した⁹⁾。

2. 製造施設の変更

LC16m8 ワクチンは千葉血清で開発し、製造していたが、2002 年 9 月に千葉血清は事業を中止することになり、このワクチンの製造を 2002 年 7 月に化血研に移譲することになった。わが国では 2001 年 9 月の米国のテロ事件以降、痘瘡ワクチンの製造が再開され、2002 年 3 月には国家備蓄され

ることになった。したがって2002年7月以降は化血研で備蓄ワクチンの製造が継続されることになった。

化血研はこのワクチンの需要が世界的に必要とされることを想定してか、このワクチン製造に米国FDAの助言も参考にし、最新の製造設備基準を満たす新たな施設の建設をし、現在すでに稼働している。

一方、研究面で、筆者らがLC16m8の開発当時ではできなかったことも横手氏をはじめとする化血研の研究者の方々のご尽力により、次々と新しいdataが蓄積され、これらの成績は毎年開かれるASMのBiodefence & Emerging Disease Research Meetingに2006年以来毎年発表してきたし、厚生労働科学研究費の援助もあり、感染研、防衛医科大学校の先生方の協力により多くの研究発表がなされてきた。

研究の中心はワクチンの安全性と有効性の検証であったと思う。安全性に関しては主に化血研が^{10,11)}、有効性に関しては化血研、感染研、ときに米国の研究者も加わり遂行された^{12~14)}。また基礎的研究としては弱毒化の本体を探るためm8の遺伝子の全領域の塩基配列も決定した¹⁵⁾。

他方、防衛医科大学校と自衛隊中央病院の先生方は自衛隊で2002~2005年にLC16m8ワクチンの接種を受けた初種痘者1,529名と、再種痘と考えられる1,692名について詳細な調査を行った。この結果、初種痘者の善感率は94.4% (1,443/1,529)で、軽度のアレルギー性皮膚炎と多形性発赤症(erythema multiforme)が1例ずつみられたが、種痘後脳炎、脳症、心筋・心膜炎などの重篤な有害事象は1例もみられなかったという¹⁶⁾。この成績は日本で初めて行われた貴重な大人の調査であった。

おわりに

LC16m8が完成した時点で、すでにWHOの世界天然痘撲滅計画が軌道に乗り、定期種痘が廃止されることが予測された。ある先生からはせっかく開発できたのに残念だったね、などと慰められたこともあった。ただ筆者はJennerに始まった痘瘡ワクチンはLC16m8で終わると思いがあがった

考えをもったことも事実だった。

痘瘡ワクチンは9・11に続く炭素菌のテロ事件以来 emerging diseases の防御に欠かせないワクチンとして注目されるようになった。米国では旧来のワクチンよりよいと思われる細胞培養ワクチンACAM 2000を採用し接種を行っていたが、心膜・心筋炎の副作用が起り問題となっている。副作用のないワクチンとしてMVAも国家備蓄したが、高価なこと、少なくとも2回の接種を必要とすることなど問題があり、一般の接種には適さず困っている。

化血研のこれまでの絶えざる努力が実を結び、米国の関心を高め、2011年2月に米国保健福祉省・生物医学先端研究開発局(BARDA)とLC16m8開発研究費として今後5年間に3,400万ドルの供与を受けることが決まったことは誠に喜ばしい。

文 献

- 1) 平山宗宏：種痘研究の経緯。小児感染免疫 20：65-71, 2008
- 2) Hashizume S, Morita M, Yoshizawa H, et al：Intracerebral inoculation of monkeys with several vaccinia strains. Internal symposium on smallpox vaccines. Bilthoven Symp Ser Immunobiol Stand 19：325-331, 1973
- 3) Kemmpe CH, Fulginati V, Minamitani M, et al：Smallpox vaccination of eczema patients with a strain of attenuated live vaccinia (CV-1-78). Pediatrics 42：980-985, 1968
- 4) 橋爪 壮：新しい弱毒痘瘡LC16m8株ワクチンの開発。モダンメディア 50：28-33, 2004
- 5) 橋爪 壮：新しい弱毒痘瘡株LC16m8の基礎。臨床とウイルス 3：229-235, 1975
- 6) 山口正義, 木村三生夫, 平山宗宏：種痘研究班研究報告書一厚生省特別研究。臨床ウイルス 3：269-279, 1975
- 7) Takahashi-Nishimaki F, Funabashi S, Miki K, et al：Regulation of plaque size and host range by vaccinia virus gene related to complement system protein. Virology 181：158-164, 1991
- 8) Goebel SJ, Johnson GP, Perkus ME, et al：The complete DNA sequence of vaccinia virus. Virology 179：247-266, 517-263, 1990

- 9) Kidokoro M, Tashiro M, Shida H : Genetically stable and fully effective smallpox vaccine strain constructed from highly attenuated vaccinia LC16m8. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 : 4152-4157, 2005
- 10) Shinmura Y, Yokote H : Safety evaluation of attenuated smallpox vaccine LC16m8 in animals. *Sci Rep Chemo-Sera-Terap Res Inst* 16 : 50-60, 2007
- 11) Yokote H, Shinmura Y, Satou A, et al : Safety and efficacy study of attenuated smallpox vaccine LC16m8 in animals. ASM, Biodefence and Emerging Disease Research Meeting, Washington D. C, 2006
- 12) Yokote H, Shinmura Y, Satou A, et al : Highly attenuated smallpox vaccine LC16m8 protects mice against lethal arthropoxvirus challenge over the long term. ASM, Biodefence and Emerging Disease Research Meeting, Washington D. C, 2008
- 13) Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, et al : LC16m8 a highly attenuated vaccinia virus vaccine lacking expression of the membrane protein B5R, protects monkeys from Monkeypox. *J Virol* 80 : 5179-5188, 2006
- 14) Yokote H, Shinmura Y, Kanehara T, et al : Long-term protective efficacy and antibody response induced by a single dose of attenuated smallpox vaccine LC16m8. ASM, Biodefence and Emerging Disease Research Meeting, Washington D. C, 2009
- 15) Morikawa S, Sakiyama T, Hasegawa H, et al : An attenuated LC16m8 smallpox vaccine : Analysis of full-genome sequence and induction of immune protection. *J Virol* 79 : 1173-1191, 2005
- 16) Saito T, Fujii T, Kanatani Y, et al : Clinical and immunological response to attenuated tissue-cultured smallpox vaccine LC16m8. *JAMA* 301 : 1025-1033, 2009

* * *