

## 乾燥細胞培養痘そうワクチン「LC16・チバ」成人接種の評価

窪谷 弘子, 平山 久子, 伊藤 浩三, 丸山 典彦<sup>1)</sup>, 堀内 清<sup>2)</sup>The evaluation of vaccination in adult with freeze-dried smallpox vaccine  
(LC16m8 strain) prepared in cell cultureHiroko KUBONOYA, Hisako HIRAYAMA, Kozo ITO  
Fumihiko MARUYAMA<sup>1)</sup>, Kiyoshi HORIUCHI<sup>2)</sup>

## I はじめに

天然痘(痘瘡)は1980年5月にWHO総会により地球上からの根絶宣言が発表されている。国内の種痘は、明治政府の種痘法制定後、全国民に牛生体皮膚を用いて製造された牛皮型ワクチン<sup>1)</sup>が義務接種されてきた。1954年以後原発真性の患者発生が無く、種痘後に稀に起こる、重い副反応、死亡事故がクローズアップされた。特に、1970年には「種痘禍」と称され、マスコミに大きく報道されて社会問題となった。これらの事象を背景とし、WHO天然痘根絶計画の進展により国内侵入の恐れが無くなったことから、1976年を最後に痘瘡ワクチンは定期接種から除外されている。種痘廃止直前の1975年に安全性と有効性に優れた特徴のある乾燥細胞培養痘そうワクチン「LC16・チバ」(販売名、以下「LC16・チバ」と省略)が千葉県血清研究所で開発され<sup>2)</sup>、製造承認を取得した。このワクチンは、牛皮型ワクチン製造ウイルス株の中で高い安全性評価のあったLister株を初代仔ウサギ腎臓細胞に30℃の低温で継代馴化し、ブラッククロニングにより作出された。その特徴は、牛皮型ワクチン種痘後に認められる共通の副反応の向神経病原性を低下させ、免疫原性は牛皮型ワクチンと同等に保有する性質を持ち、世界で唯一製造許可の認められた、細胞培養弱毒天然痘ワクチンである。

ワクチン開発時の状況から、小児への初種痘に関しての有効性、安全性情報<sup>3)</sup>はあるが、「LC16・チバ」を成人に使用する場合及び抗体保有者への再(追加)種痘の評価については不明な点が多い。近年、バイオテロリズムによる天然痘の再興が懸念されており、2001年に「LC16・チバ」の国内備蓄が策定され、20余年ぶりに製造が再開された。生物学的製剤製造衛生上の観点から製造従事者に対して、既存の研究者用「LC16・チバ」を接種する機会を得た。「LC16・チバ」の有効性については、RK13細胞を用いたブラック中和法により被接種者の血中抗体産生を評価した。また、調査票による安全性の評価を行った。これらの評価過程において、18から90歳まで120名の痘瘡抗体保有状況調査を併せて実施し、「LC16・チバ」使用に関して若干の考察を加えたので報告する。

なお、本調査、研究成果の公表等に関しては、千葉県衛生研究所疫学倫理審査委員会の承認を得たものである。

## II 材料と方法

「LC16・チバ」の接種は、製造従事者57名(年齢19から65歳、男12名、女45名)に対して、製品添付文書の接種時の注意事項に準じ、凍結乾燥品を添付の溶剤で溶解後、二又針の先端部で液の浸し採りを行い、上腕外側で上腕三頭筋起始部の直径5mmの範囲へ10回(初種痘は5回)皮膚圧迫による多刺法で行った。

「LC16・チバ」の接種後の発熱、その他の臨床症状の観察は調査票により14日間記録され、被接種者の48名から回収し集計した。なお、局所反応の観察は接種後10日目に実施した。

被検血清は、「LC16・チバ」接種前採血に協力の得られた17名と接種後3から4週目に被接種者の54名から採血を行い、遠心分離後56℃30分非働化して使用した。また、従前の牛皮型痘瘡ワクチン(大連株、池田株、Lister株)による抗体保有と「LC16・チバ」追加(再)接種による抗体応答及び緊急接種時における優先接種対象者の選定等について考察するため、都内の医学系専門学校生66名(年齢18から54歳)及び都内の医院受診者37名(年齢32から90歳)の保存血清を使用した。

中和試験に使用したワクシニアウイルスは、「LC16・チバ」の親株であるLister(Elstree)(LO)株を用いた。また、試験の一部でワクチンの抗原性を調査するため、「LC16・チバ」の製造用マスターシードウイルス(m8)株を使用して交叉中和試験を実施した。

中和試験に用いた細胞は、RK13細胞を増殖培養液(5%牛胎児血清、0.11%重曹加イーグルMEM液)に浮遊し、6ウェルマルチプレート(Φ35mm)を用い、37℃、5%炭酸ガス培養器で2日間静置培養して使用した。

中和検体は、予めウイルス価を測定し、200PFU/100μLに希釈した中和試験用ウイルスと希釈液(1%牛胎児血清及び0.15%重曹加イーグルMEM液)で4倍段階希釈した被検血清を等量混和し37℃2時間、更に4℃一夜感作して作製した。

ウイルス感作中和検体及び対照ウイルス液の細胞への接種は、ウェル当り100μLとし、35℃60分間吸着後、一次重層寒天液(0.8%アガロースを含む、2%牛胎児血清及び0.15%重曹加イーグルMEM液)をウェル当り4mL重層した。35℃5日間培養し、二次重層寒天液(0.8%アガロース及び0.005%ニュートラルレッドを含む、2%牛胎児血清及び0.15%重曹加イーグルMEM液)をウェ

千葉県衛生研究所

1) 日本赤十字社

2) Glaxo SmithKline

(2005年1月27日受理)

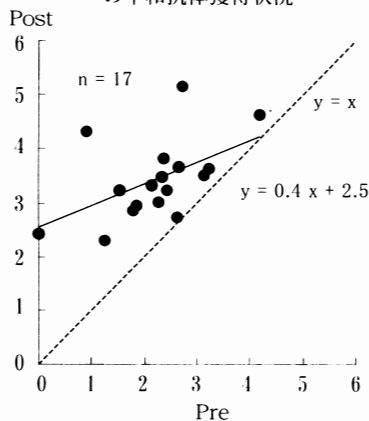
ル当り 2 mL 重層の後、翌日出現ブラック数を計測した。対照ウイルスに対する50%ブラック抑制率を示す血清希釈倍数を算定し、被検血清の中和価とした。

### III 成績

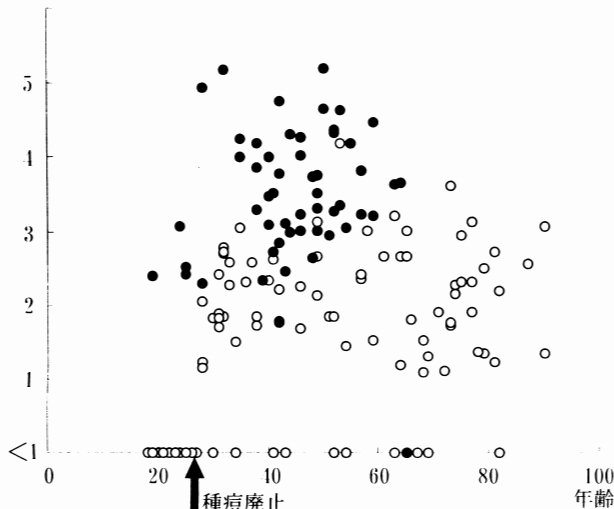
図-1は、「LC16・チバ」接種前後に採血の得られたペア血清17名の成績である。「LC16・チバ」接種後の全例に抗体価の上昇が観察され、接種前の平均中和抗体価は $4^{2.0}$ 、接種後の平均中和抗体価は $4^{3.3}$ と明らかに接種後の中和抗体の上昇が認められた。また、接種前抗体価が低いほうが、接種後、高い抗体価獲得傾向を示した。

中和抗体を測定した被検血清の全ての成績は、図-2に年齢別中和抗体価としてプロットした。ワクチン被接種者54名のうち、1名(65歳, 女)を除く53名に中和抗体の保有を認めた。27歳以下のワクチン接種歴のない(初種痘)成人4名の「LC16・チバ」接種後の平均中和抗体価は $4^{2.0}$ であった。また、初種痘者を除く、28歳以上の追加(再)接種者50名の平均中和抗体価は $4^{3.55 \pm 0.91}$ であり、同世代53名が保有していた平均中和抗体価は $4^{1.83 \pm 1.02}$ であった。

[図-1] 「LC16・チバ」種痘後の中和抗体獲得状況



中和抗体価(4<sup>n</sup>)



[図-2] 年齢別痘瘡抗体保有状況と「LC16・チバ」種痘

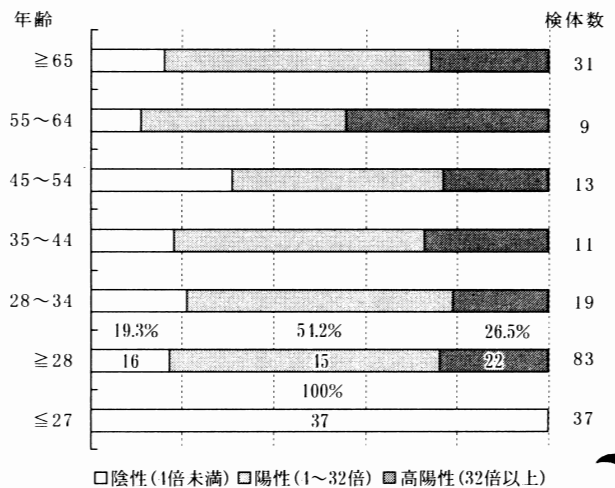
○: 保有抗体価 ●: 「LC16・チバ」接種後抗体価  
28歳以上の追加(再)接種者50名の平均抗体価:  $4^{3.55 \pm 0.91}$   
追加接種者同世代53名の保有平均抗体価:  $4^{1.83 \pm 1.02}$

年齢層別抗体保有状況の集計結果は、図-3のとおりである。中和抗体価4倍未満の陰性者数は、27歳以下の37名全例(100%)と28歳以上83名中16名(19.3%)であった。28歳以上の22名(26.5%)に中和抗体価 $4^{2.0}$ 以上の高い抗体保有者を認めた。なお、28歳以上の抗体保有者67名の平均抗体価は $4^{2.18}$ であった。

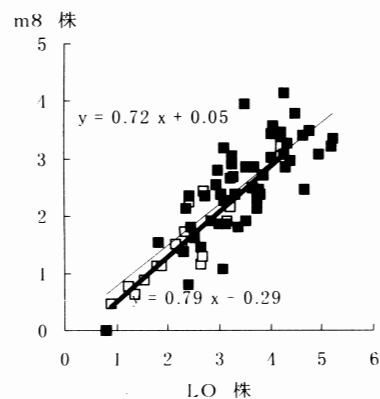
図-4は、「LC16・チバ」接種前血清のうち、27歳以下の1名を除く16名と接種後血清53名の検体について、「LC16・チバ」の親株であるLO株(y軸)と製造用マスターシードウイルスm8株(x軸)とを用いた交叉中和試験成績である。過去に受けた牛皮型ワクチンによる保有抗体である接種前グループと今回の「LC16・チバ」接種後グループの中和反応能に差異は認められなかった。

安全性については、48名からの調査票が回収され、集計結果は表-1のとおりであった。全身反応として、1名が「LC16・チバ」接種後5日目に一過性の発熱(37.6℃)と倦怠感を認め、他は37.5℃以上の明らかな発熱は認められなかった。また、1名が接種4日目に一過性の眩暈、嘔吐を認めたが、因果関係は不明であった。局所反応として、接種部位の掻痒感を訴える者が8名(16.7%)いた。接種後10日目の局所発赤は最大径17mm(平均径7mm)以下であった。

[図-3] 年齢層別痘瘡抗体保有状況



[図-4] 交叉中和試験



□Pre (n=16) ■Post (n=53)

[表-1] 「LC16・チバ」種痘の安全性

		小児 <sup>*1</sup>	成人
調査対象者	年齢	0~7	19~65
	初種痘者数	9,538	4
	再種痘者数	0	53
発熱者 <sup>*2</sup>	調査数	8,544	48
	発熱者数	663	1 <sup>*1</sup>
	発熱者率(%)	7.8	2.1
その他の反応	種痘性湿疹	1	0
	自己接種	9	0
	副痘	28	0
	種痘疹	8	0
	熱性痙攣	3	0
	搔痒感	n.d.	8
	眩暈・嘔吐	n.d.	1 <sup>*3</sup>
局所発赤径 <sup>*3</sup>	調査数	1,449	24
	平均径(mm)	18.9	7.3

\*1: (資料) 種痘研究班研究報告書「臨床とウイルス」1975抜粋、引用<sup>10)</sup>

\*2: 種痘後14日間観察      \*3: 種痘後10日目観察

\*1: 種痘後5日目、一過性の発熱(37.6℃)と倦怠感

\*3: 種痘後4日目

#### IV 考察

種痘廃止後の痘瘡ワクチンの役割等については、北村の総説に詳しい<sup>7)</sup>。痘瘡ワクチンが廃止されて、1/4世紀の歳月が経過し、古典的な牛生体皮膚を用いる生産設備とその技術は途絶えている。生物学的製剤を製造するGMP体制の下で対応の容易な細胞培養による製造である「LC16・チバ」の存在は、米国をはじめ海外での評価、関心は非常に高く、天然痘テロ対応<sup>9)</sup>の非常用備蓄ワクチンとして世界で最も有力であると位置付けられている。

成人に対する「LC16・チバ」接種の有効性調査において、初種痘者の抗体獲得は平均4<sup>23)</sup>であり、ワクチン開発時に得られた小児における初種痘時の平均中和抗体価<sup>10)</sup>4<sup>23)</sup>と差異は認められなかった。従前の牛皮型ワクチンにおいて、初種痘より10から20年経過後でも、再種痘が善感を起こさせるに必要なワクチンの力価は初種痘におけるそれよりも5から10倍高い力価が必要であることが知られている<sup>9)</sup>。「LC16・チバ」は、1976年の予防接種法改正に際して、生後36から76ヶ月の間に一回だけ接種する方式として採用されたが、定期接種が中止され、本ワクチンの一般的な使用は行われていない。従って、抗体保有者に対して、従前の牛皮型ワクチンよりも弱毒(向神経病原性、その他副反応の発生が極めて低い)の進んだ株である「LC16・チバ」再種痘効果についての詳細は明らかでない。今回の調査で、接種前抗体価の低い者は高い者に比べ、より高い中和抗体獲得傾向が認められるとともに、追加接種における高い免疫賦与能力が観察され、有用性に問題が無いことを確認できた。このことはまた、将来ワクシニア組替えベクターワクチンの開発において、「LC16・チバ」製造株がベクターウイルスとして、極めて有用性の高いことを示唆してい

る<sup>9)</sup>。なお、接種後中和抗体を検出できなかった1名については、原因等の詳細な調査は実施していない。

「LC16・チバ」の感染防御能については、開発時の疫学状況から、実際に天然痘流行地で種痘に供される機会が無く、野外ウイルスに対する洗礼を受けていない。また、その後のウイルスゲノムDNA解析により、プラークサイズと密接な関係のあるB5R遺伝子<sup>23)</sup>が変異のため欠損していることが指摘されており、ワクチン株として感染防御の点で疑問視する考えと逆に大きな欠点ではないとする意見がある。ワクチン製造用ウイルス(m8)株と親株である(LO)株の中和抗体の抗原の同一性について、交叉中和試験により評価した結果は、差異は認められず、m8株には抗原的に問題となる欠陥がなく、ウイルス中和の抗原性において安定であり、有効性が充分担保されていることが示唆された。

「LC16・チバ」接種後の安全性については、特に重篤な症状を訴える者は無く、37.5℃以上の発熱者は2.1%と、小児への接種時の発熱の発現率<sup>10)</sup>7.8%に比べて低い率であった。接種部位の反応は、軽微で限局した反応であり、種痘疹、副痘、自己接種等の問題となるような副反応は認められなかった。

以上の成績から、小規模の調査成績であるが、成人に対する「LC16・チバ」の接種は、特に問題となる事項は認められず、有効性と安全性が担保されているものと考察された。

種痘後の有効性の判定については、接種部位の反応(善感)による方法が知られているが、今回は十分に精査していない。小児の「LC16・チバ」初種痘では、牛皮型ワクチンに比べて接種後の局所反応は3から4日遅れて10日目にピークがあるとされ、平均発赤(硬結)径18.9(6.3)mmと報告されている<sup>10)</sup>。今回の調査では、平均発赤径7.3mmと明らかに弱い反応であり、その原因には、年齢、接種方法の差異の他に、抗体保有者への再接種による反応と思われる。このことについては、牛皮型ワクチンの再接種の場合においても観察されており、「LC16・チバ」接種後の善感反応による有効性の判定を行う場合は、接種後の経日的観察により新たな判定日(観察日)の設定を考慮すべきであると思われる。また、接種を受けた個々人の有効性の判定は極めて重要となり、確実性を必要とすることから、煩雑な手技と結果の判定に時間を必要とする中和試験以外の血清学的な診断方法による簡便且つ確実な識別方法の検討が今後期待される。

天然痘に対する種痘の感染防御効果については、Dixonの集計が有名であり、初種痘後の年数と推定防御効果は、1年で99.9%、3年で99.5%、10年で87.5%、20年で50.0%、20年以上では推定不能とされている。また、天然痘根絶は効率のよいワクチン接種方法が採用された成果である。これらの過去の疫学的所見に基づき、天然痘感染予防に必要な免疫は、種痘善感者の示す平均の中和抗体レベルが必要であると推論されている<sup>9)</sup>。近年、バイオテロリズムによる天然痘の再興に関連する罹患、死亡率等の被害推計及び備蓄ワクチンの必要数の算定がなされている<sup>21)</sup>。天然痘の感染防御には、細胞性免疫が深く関与するとされており、液性免疫要因だけで推し量ることはできないながらも、今回の調査から、過去に種痘を受けた世代の約80%に4倍以上の中和抗体が認められ、約1/4(22/83, 26.5%)に感染予防免疫レベルの中和抗体価が保有されていることが判明したことは、予想外の調査結果であった。なお、各年齢層における抗体保有状況調査により、種痘歴の

ある者の抗体保有は種痘からの時間的経過年数（加齢）よりも、個体差によるばらつきが大きい傾向が認められた。従って、種痘歴のある世代では中和抗体の保有状況から、緊急時の優先接種対象世代の選定に直結するデータは得られなかった。天然痘によるバイオテロ発生を想定した、緊急時シミュレーションスタディーに基づき、感染者への接触程度、感染の危険性の程度等に応じて、ワクチン接種者を決定すること（追跡接種）、及びアウトブレイクの拡大に対応した地域住民への集団接種対応を図ることで異論の余地は無い。

## 謝 辞

本研究のワクチン製造、品質試験及びワクチンの接種、調査等々に深く関与された旧千葉県血清研究所職員諸氏、並びに、各年齢層の抗体調査にご協力を戴いた原勝（世田谷区医師会）、青山好作（国際鍼灸柔整専門学校）両氏に深謝いたします。

《本研究の要旨は、第42回千葉県公衆衛生学会（平成16年2月19日開催）で口演された。》

## 参考文献

- 1) 蟻田功：WHOの天然痘根絶事業。臨床とウイルス24：19-29, 1996
- 2) Arita I: Duration of Immunity after Smallpox Vaccination: A Study on Vaccination Policy against Smallpox Bioterrorism in Japan. Jpn.J.Infect. Dis., 55：112-116, 2002
- 3) 橋爪壮：新しい弱毒株Lc16m8株の基礎。臨床とウイルス3：229-235, 1975
- 4) Henderson DA, et al: Smallpox as a Biological Weapon, Medical and Public Health Management. JAMA, 281：2127-2137, 1999
- 5) Herrera E, et al: Functional Analysis of Vaccinia Virus B5R Protein: Essential Role in Virus Envelopment Is Independent of a Large Portion of the Extracellular Domain. J.Virol, 72:294-302, 1998
- 6) 北村敬：痘瘡ワクチン（痘苗）。日本のワクチン 改訂1版：1-26, 1977
- 7) 北村敬：痘瘡根絶と痘瘡ワクチンの今後。臨床とウイルス27：378-384, 1999
- 8) 森川茂 等：細胞培養痘そうワクチンの品質管理に関する研究。厚生労働科学特別研究事業（H15-特別-43）：1-61, 2003
- 9) 杉本正信 等：国産天然痘ワクチンの新たな役割。蛋白質核酸酵素48：1693-1701, 2003
- 10) 山口正義 等：種痘研究班研究報告書。臨床とウイルス3：269-279, 1975