

## 第39回小島三郎記念文化賞

# 細胞培養弱毒痘瘡 LC16m8 株ワクチンの開発

Development of the attenuated smallpox vaccine, LC16m8, produced by cell culture

はし づめ そう  
橋 爪 壮  
So HASHIZUME

### はじめに

今回図らずも表記の業績に対して小島三郎記念文化賞を受賞することとなった。なにしろこの仕事は4半世紀ほど前に行った仕事で、このワクチンの製造承認が下りた翌年1976年にはWHOの痘瘡（天然痘）撲滅計画が進み、日本では種痘（痘瘡ワクチンの接種）が中止になったので、当時種痘研究班に属された先生方以外にご存じない方も多かろうと思われるので、開発された背景などを含めて述べてみたい。

### I. 痘瘡ワクチン、種痘とは

痘瘡の予防に痘瘡ワクチンが有効であることは1798年のJennerの報告以来次第に世界中に広まり用いられるようになった。WHOの痘瘡撲滅計画が見事に成功した要因の1つは安価でよく効くワクチンがあったればこそであった。

日本に痘苗（痘瘡ワクチン）が伝えられたのは1813年に中川五郎治がロシアから持ち帰ったとの説もあるが、はっきりしているのはモーニケ（Mohnike, O.G.J.）の斡旋により1849年に長崎に牛痘瘡が到着し、その後このウイルスをウシで継代することに成功し、日本全国に急速に牛痘種痘法が広まった。その後もたびたび外国から痘苗株の分与を受けている。詳しくは添川正夫著『日本痘苗史序説』<sup>1)</sup>を参照されたい。ここで牛痘と書いているが、現代のウイルス学では種痘に使われていたウイルスは牛痘（cowpox）ウイルスとは異なるウイルスで、ワ

クチニア・ウイルス（vaccinia virus）であることが明らかになっているので、以後このウイルスをワクチニアと呼ぶことにする。

### II. 世界で用いられていた痘瘡ワクチン株とその製造法

ところで、現代のように冷凍保存技術もない時代にはウイルスは動物から動物、あるいはヒトに継代して維持された。したがって、痘瘡ワクチン株は国によりさまざまな継代法で維持されてきており、多種類のワクチン株が存在した。例えば米国ではNew York City Board of Health (NYBH) 株、英国を中心とした国々ではLister 株、ソ連ではEM63 株、日本では池田株、大連1株などが使用されていた。

製法は仔牛（犢）の腹側の皮膚を剃髪消毒後に接種刀で傷をつけ、そこにウイルス液を塗布し、発痘後これを掻き取り、乳剤として希釈液と混合し製造していた。

### III. 弱毒痘瘡ワクチン LC16m8 が開発された背景

日本でポリオの恐慌が収まった1960年代後半から、DPT接種後の死亡事故などを契機に予防接種の副作用問題が急速に社会問題となってきた。種痘についても、Marennikovaの Mausなどを用いた各種ワクチニア株の比較試験の情報などから、日本で使用されてきた池田株、大連1株はLister 株、EM63株よりも病原性が強いのではないかという疑惑が生じ、種痘研究班で1968～1971年にかけて、池田株、

Lister 株, EM63 株の比較臨床試験が行われた。また米国の Kemp のところで検討されていた弱毒の CV1-78 株については 1971~1973 年に, 国産の LC16m0 と LC16m8 株ワクチンについては 1973~1974 年に試験が行われた。この結果 LC16m8 株ワクチンは副作用が少なく, 善感率も従来のワクチン株と変わりなく, 抗体価の上昇も Lister 株と同程度かやや良いことが証明され<sup>2)</sup>, 1975 年にワクチン株として製造承認された。

#### IV. 仔牛製造から細胞培養製造へ

1962 年に厚生科学研究費による無菌の凍結乾燥痘苗の開発研究にワクチンメーカー 7 社が参加して始められた。千葉血清研究所 (以下千葉血清) も分担することとなり, このとき仔牛により, 無菌痘苗を製造することがいかに難しいかを身をもって体験した。私は最初にサル腎細胞を用いた不活化ポリオワクチンの製造からワクチン製造に携わったため, 痘瘡ワクチンも細胞培養にすべきと考えた。また同時に当時使用されていた痘苗のような副作用の強いワクチンはワクチンとはいえないのではないかと考え, 細胞培養系でワクチニア株の弱毒化を目指すことにした。

ウシで発痘が悪くなったときは, ウサギで継代した後ウシに戻るのが良いということを知り, 痘苗製造担当者から聞いていたので, 使用する細胞としてウシ腎細胞とウサギ腎細胞を選択し, Lister 株の増殖を調べてみたところ, ウサギ腎細胞のほうがウシ腎細胞より増殖が良かったので, 以後ウサギ初代腎細胞を用いることにした。

弱毒化の方法として, ポリオで実績のある高温非増殖性の温度感受性変異株 (ts) を選択することとし, ウイルス培養は 30C で継代した。継代暦を図 1 に示す。

#### V. サルによる神経病原性試験

ウサギ腎細胞で 36 代継代した時点で, ts 変異の LC16 株を樹立した。この株の神経病原性をウサギの脳内接種後 6 日目に脳内ウイルス量を測定したところ, LO (親株) では  $10^{5-7}$  接種したものでも臨床症状を示し,  $10^{6-7}$  では死亡例もみられたが, LC16

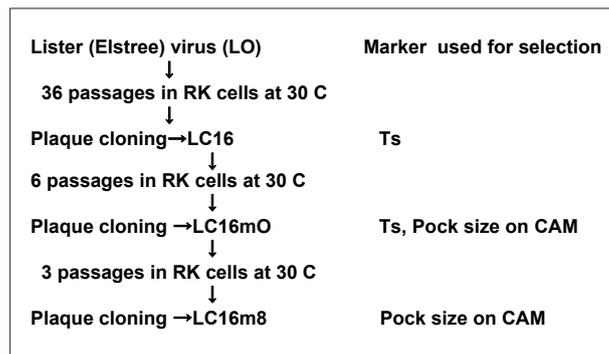


図 1 Establishment of LC16m8 strain

は  $10^{6-7}$  を接種しても臨床症状は認められず, 脳内から回収されるウイルス量は LO (親株) より低く, その差は  $10^{5-7}$  摂取したウサギ群で著しかった。また LO 株は 41C でも増殖するが, LC16 はまったく増殖できず ts 変異株であることを確認した。

幸いなことに LC16 が樹立できた直後に当時国立予防衛生研究所 (以下予研) の部長をされていた故多ヶ谷勇先生からサルによる各種ワクチニア株の神経病原性の比較試験を計画しているが, サル舎の都合で予研ではできないので千葉血清で引き受けてほしいという依頼があり, この試験に LC16 株を含めることのできることをこの試験をお引き受けすることになった。

この実験は当時, 日, 米, 英, ソ連で痘瘡ワクチン株として使用されていた 4 株と弱毒株 3 株, 計 7 株について各株  $10^6$  から  $10^8$  まで 3 希釈, 各希釈 1 群 3 匹のサルを用いた実験で, 現在でも考えられないような贅沢な試験であった。

接種ウイルス液として, LC16 はウサギ腎細胞で 30C に培養したウイルス液を, 他の 6 株は漿尿膜で増殖させたウイルスをフロロカーボン処理後, 蔗糖密度勾配遠心で精製したウイルス液を, 片側の視床に 0.5ml 接種した。

この結果, 弱毒株とされていた CV1-78 株は最も病原性が強く, 次いで池田株であった。NYBH, EM63, Lister 株は CV1-78 株, 池田株よりやや弱く, DIs (多ヶ谷らが大連 1 株より樹立した超弱毒株) と LC16 は最も弱い性質を示した (表 1, 図 2)<sup>3)</sup>。

また接種サルの脳内からの蛍光抗体法による抗原検出には東大医科学研究所の故青山友三先生のご支援を頂いた。その結果, 接種後 4~7 日に死亡するサルの髄膜脳炎例では病変局所に抗原が検出され

表1 Mortality of the monkeys inoculated into the thalamus with different vaccinia strains

Virus strain	Inoculum	Rate of Death	LD50
Ikeda	2x10 <sup>8</sup>	3/3	≤ 6.3 x10 <sup>5</sup>
	2x10 <sup>7</sup>	3/3	
	2x10 <sup>6</sup>	3/3	
NYBH	2x10 <sup>8</sup>	3/3	2.9x10 <sup>6</sup>
	2x10 <sup>7</sup>	3/3	
	2x10 <sup>6</sup>	1/3	
CV1-78	2x10 <sup>8</sup>	3/3	≤ 6.3 x10 <sup>5</sup>
	2x10 <sup>7</sup>	3/3	
	2x10 <sup>6</sup>	3/3	
Lister	2x10 <sup>8</sup>	6/6	6.3x10 <sup>6</sup>
	2x10 <sup>7</sup>	5/6	
	2x10 <sup>6</sup>	1/6	
EM63	2x10 <sup>8</sup>	2/3	1.4x10 <sup>7</sup>
	2x10 <sup>7</sup>	2/3	
	2x10 <sup>6</sup>	1/3	
LC16	2x10 <sup>8</sup>	0/3	≥ 6.3x10 <sup>8</sup>
	2x10 <sup>7</sup>	0/3	
	2x10 <sup>6</sup>	0/3	
DIs	2x10 <sup>8</sup>	0/3	≥ 6.3x10 <sup>8</sup>
	2x10 <sup>7</sup>	0/3	
	2x10 <sup>6</sup>	0/3	

た。LC16 接種サルで 5, 7, 14 日に屠殺剖検したサルでは特異的蛍光は弱い、全く認められない。比較のために NYBH と EM63 株の成績を表 2 に示す。

低濃度のウイルスを接種され、死亡しなかったサルの接種後 14 日の剖検例では一般的にウイルス抗原は検出できないが、間接蛍光抗体法により髄膜と実質の小血管周囲および、血管周囲に細胞浸潤のある部位に IgG の存在が認められた<sup>3)</sup>。このことは後に倉田らにより種痘後の髄膜脳炎症例で、局所の血管周囲の抗体除去の処理をすると抗原が検出される例があることから、血管周囲に抗原抗体結合体が形成されていることが明らかになった。この成績は、種痘後脳炎の発生機序を示唆するのではないかと考えられ、この研究の大きな成果の 1 つと考えている。

幸運にもこの実験に超弱毒株の DIs, LC16 と弱

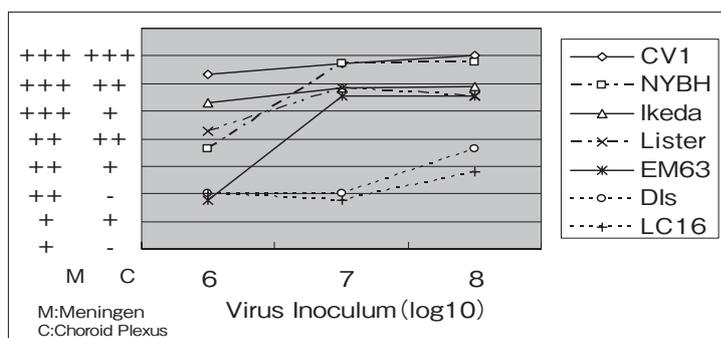


図2 The severity of inflammation in the meninges and choroid plexus in the monkeys inoculated with vaccinia strains

表2 Specific Immunofluorescence in the CNS of the monkeys inoculated NYBH, EM63, LC16 strains

Virus strain	Inoculum per monkey	Days p.i.	Cerebrum			Spinal cord				
			Me	Ep	Ch.pl.	C		L		
			Me	R.n.	Me	R.n.	Me	R.n.		
NYBH	2x10 <sup>8</sup> PFU	3	++	+	+++	++	NT	++	++	
		6	++	+	+++	++	NT	++	+	
	2x10 <sup>7</sup> PFU	5	++	+	++	++	-	++	+	
		4	++	-	++	++	+	++	+	
	2x10 <sup>6</sup> PFU	6	++	NT	NT	++	+++	+	NT	
		14	-	-	-	+	+	-	-	
EM63	2x10 <sup>8</sup> PFU	5	+++	+	NT	++	+	++	NT	
		14	+	-	NT	-	-	-	-	
	2x10 <sup>7</sup> PFU	5	+	NT	NT	+	+	+	-	
		14	+++	-	NT	NT	NT	+	-	
	2x10 <sup>6</sup> PFU	14	-	-	NT	-	-	-	-	
		14	-	-	-	-	-	NT	NT	
	LC16	2x10 <sup>8</sup> TCID50	5	+	-	NT	+	-	+	-
			7	-	-	NT	+	-	-	-
		2x10 <sup>7</sup> TCID50	14	+	-	-	+	+	+	-
			14	-	-	-	-	-	-	-
2x10 <sup>6</sup> TCID50	14	-	-	-	-	-	NT	NT		
	14	-	-	-	-	-	-	-		

毒株とされていた CV1-78 株が組み込まれていたことである。この3株の比較から、私はワクチニアの病原性は①抹梢（皮膚）での増殖性、②抹梢から中枢神経への侵襲性、③中枢神経での増殖性の3つの因子が関係するのではないかと考えるようになり、以下の実験を行った。

### VI. 皮膚増殖の比較試験

サル神経病原性の成績を得たので、早速小規模の接種試験を臨床研（駒込病院）の南谷幹夫先生にお願いした。この試験で、痘疱の痂皮形成が34例中2例に著しく遅れる症例があったとの報告を頂き、自己接種など皮膚合併症を少なくするため、皮膚増殖のより弱い変異株を選択すべきと考えた。

発育鶏卵の漿尿膜の外側（卵殻に面した側）は上皮性（ectoderm）細胞でできているので、ワクチニアを漿尿膜上に接種したとき作られるポックの大きさが皮膚増殖の指標となる遺伝的マーカーになるのではないかと考え、これを指標に変異株の選択を行った。すなわち LC16 から6代継代後にポックサイズの中等度の LC16mO を、これからさらに3代継代後にポックサイズの小さい（1mm 前後）LC16m8 をクローニングした<sup>4)</sup>。

これらの株を階段希釈（ $10^2 \sim 10^6$ ）し、ウサギの皮内に接種した後、現れる発赤径が10mm以上を陽性とし、その50%発赤量を求めた。幸いなことに予想が的中し、LCm8 は  $10^{3-9}$  ともっとも弱く、CV1-78 と LCmO は LC16 よりはやや弱い  $10^{2-5}$  という結果を得た<sup>5)</sup>。

### VII. 抹梢から中枢神経への侵襲性の比較試験

LO, LC16, LC16mO, LC16m8, および CV1-78 の5株について、腹腔内に  $10^{7-3}$  のウイルスを接種し、ウイルスを接種後、その半数のマウスには直ちにコルチゾン 2mg を皮下注射し、接種の翌日より経日的に、各群5匹ずつのマウスを用いて、その血中ウイルス量と脳内のウイルス量を測定し、ウイルスが抹消より中枢神経に侵入し増殖する性質を調べた。

LO および CV1-78 株では、コルチゾン処置群も無処置群でも5～7日の間にウイルスは脳内から検出された。LC16 では無処置群は接種後2日より血

中ウイルス量も急速に低下し、脳内からウイルスは検出されなかったが、コルチゾン処置群では  $10^3$  程度のウイルス血症が6日まで続いたためか、5日に  $10^2$  と6日に  $10^1$  のウイルスが検出された。LC16mO と LC16m8 株では無処置群はもちろんのこと、コルチゾン処置群マウスでも脳内からウイルスは検出できなかった（図3～5）<sup>4, 5)</sup>。

### VIII. 免疫原性について

LC16m8 株は LO あるいは LC16mO 株に比して

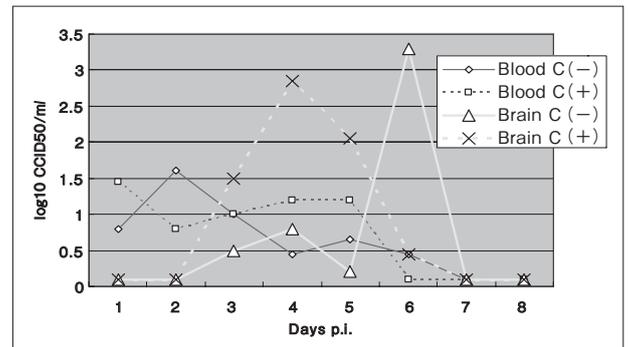


図3 Virus recovery from the blood and brain of mice inoculated i.p. with LO strain

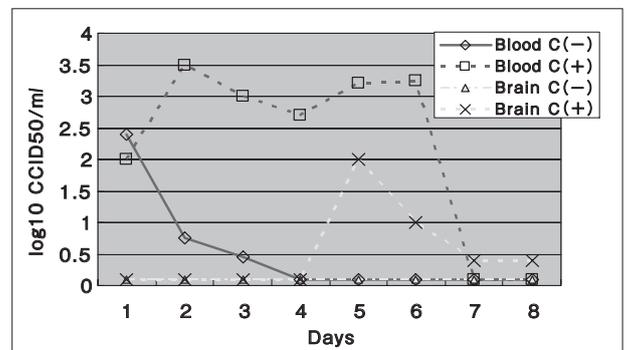


図4 Virus recovery from the blood and brain of mice inoculated i.p. with LC16 strain

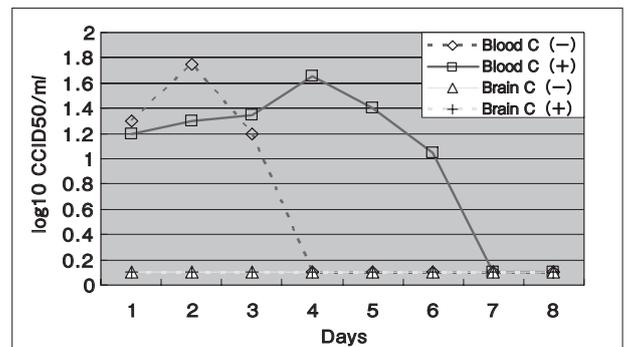


図5 Virus recovery from the blood and brain of mice inoculated i.p. with LC16m8 strain

表3 HI and NT antibody titer after inoculation with LO, LC16mO and LC16m8

Weeks p.i.	HI			NT		
	LO	LC16mO	LC16m8	LO	LC16mO	LC16m8
2	6.5	8.0	4.5	4.9	5.7	4.9
4	6.5	7.5	5.0	4.9	6.9	4.7
6	4.5	7.5	5.0	5.0	6.6	4.6
13	3.5	7.0	5.5	5.0	6.8	4.7

HI=2<sup>n</sup> NT=4<sup>n</sup>

皮膚増殖が悪いので、抗体産生能について比較してみました。これらの株を2羽ずつのウサギに10<sup>8</sup>PFUのウイルスを接種し、13週まで中和およびHI抗体価の変動を追跡してみた。

皮膚増殖が良かったLC16mOは中和抗体、HI抗体ともに最も上昇が良く、持続も良い。LC16m8の抗体産生能はほぼLO株と同程度であった(表3)。この成績の傾向は、後に行われたヒトの臨床試験で得られた成績とよく一致した<sup>2,4)</sup>。

### IX. 臨床試験成績<sup>2)</sup>

これまで述べてきたような基礎研究を踏まえ、前述のように種痘研究班でこの株の検討が取り上げられ、1973～1974年にかけて種痘研究班に属する全国の諸施設でLC16m8は約50,000例、またLC16mOは約3,000例の接種が行われた。LC16m8については詳細に臨床症状を観察することができた10,578例について成績が集計された。以下LC16m8についての成績の概略を述べる。

善感率は95.1%で従来の痘瘡ワクチンと差がなく、平均発赤径(10日目判定)18.4mm、平均硬結径6.1mm、発熱率7.7%で、従来のワクチンに比べ

明らかに反応が弱く、安全性が高いと判断された(表4)。

副作用として、種痘性湿疹1、自己接種9、種痘疹8、一過性の良性熱性痙攣3が観察されたが、幸いなことに重篤な副作用の報告は全くなかった。

LC16m8株ワクチンの免疫原性はHI抗体価、NT(中和)抗体価とも従来株ワクチンと差がみられず、また初回接種後6カ月および1年後に従来株による追加接種をしたところ、明らかな2次免疫反応を示し、細胞性免疫を含め十分強力な免疫を与えることがわかり、CV1-78株より優れた免疫原性を持つと判断された。

また村瀬らは、ワクチン接種後14日に脳波検査を行い、LC16m8株では56例中脳波異常を認める例は1例もなかったが、CV1-78株ワクチンで30例中1例(3.3%)に一過性の脳波異常が認められた。1972年に行われた木村らのLister株(旧来のワクチン)での成績では19例中5例(26.3%)に一過性の脳波異常が観察されており、これらの成績は動物実験で確認されたLC16m8株の向神経性の弱い性質を裏付ける成績と考えられた(表5)。

表5 各種痘瘡ワクチンによる種痘後の脳波検査成績(村瀬・小川,\*木村・福山 種痘研究班研究報告書)

ワクチン・接種方法	検査数	一過性脳波異常例数(%)
Lister*	19	5(26.3)
Lister + g-globulin	18	1( 5.6)
CV-1	30	1( 3.3)
CV-1 + g-globulin	19	0
LC16m8	56	0

表4 種痘株別反応の比較(種痘研究班報告書より)

ワクチン	調査年度	調査人数	善感率	平均発赤径	平均硬結径	発熱率	中和抗体価(検査数)
池田	1968-70	1,506	99.1	22.9	18.2	25.0	
エクアドル	1969-70	1,846	67.5	19.2	17.4	21.3	
リスター	1968-71	3,662	93.7	17.6	15.3	26.6	4 <sup>2.4</sup> (5)
CV-1	1971-73	22,976	92.4	21.1	16.8	8.5	4 <sup>1.9</sup> (6)
LC16mO	1973-74	829	94.8	19.6	14.5	12.1	4 <sup>3.0</sup> (15)
LC16m8	1973-74	10,578	95.1	18.4	6.1	7.7	4 <sup>2.5</sup> (97)

## おわりに

これまで述べたように、LC16m8株ワクチンの開発は基礎研究、臨床研究ともに多くの先生方のご支援とご協力により成し遂げられたもので、私一人が受賞することに忸怩たるものがあり、改めてご協力頂いた諸先生に深く謝意を奉げたい。

## 文 献

- 1) 添川正夫：日本痘苗序説，近代出版，1987.
- 2) 山口正義，木村三生夫，平山宗宏：種痘研究班研究報告書－厚生省特別研究，種痘後副反応および合併症の治験に関する研究－．臨床とウイルス，**3**:269-279, 1975.
- 3) M.Morita, Y. Aoyama, M. Arita, H. Amano, H. Yoshizawa, S.Hashizume, T. Komatsu, I. Tagaya: Comparative studies of several vaccinia virus strains by intrathalamic inoculation into cynomolgus monkeys. Arch. Virol. **53**: 197-208, 1977.
- 4) 橋爪 壯：新しい弱毒痘苗株 LC16m8 株の基礎．臨床とウイルス，**3**: 229-235, 1975.
- 5) S. Hashizume, H. Yoshizawa, M. Morita, K.Suzuki: Properties of attenuated mutant of vaccinia virus, LC16m8, derived from Lister strain. Vaccinia Virus as Vectors for Vaccine Antigens, Quinnan, Ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc.87-99, 1985.