

人体用乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチン  
に関する研究

坂本國昭

1990



人体用乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチンに関する研究

化学及血清療法研究所

坂本國昭

1990

# 目 次

I	緒 言	1
II	実験材料および方法	6
1.	ワクチン調製	6
(1)	使用ウイルス	6
(2)	使用発育鶏卵	6
(3)	CE細胞の調製	6
(4)	ウイルス培養	7
(5)	ウイルスの採取および不活化	7
(6)	濃縮および精製	7
(7)	凍結乾燥	8
(8)	感染価測定	8
(9)	赤血球凝集価（HA価）測定	8
(10)	力価試験	9
(11)	不活化試験	9
2.	ワクチンの経時安定性試験	10
(1)	被験ワクチン	10
(2)	保存条件	10

(3) 試験項目および試験 .....	10
3. マウスおよびラットにおける急性毒性試験 .....	10
(1) 実験動物および飼育条件 .....	10
(2) 被験ワクチンおよび投与 .....	11
(3) 観察およびLD <sub>50</sub> 値算出 .....	11
4. モルモットにおける全身性アナフィラキシー試験 .....	12
(1) 実験動物および飼育条件 .....	12
(2) 被験ワクチンおよび投与 .....	12
(3) 観察 .....	13
5. サルに対する安全性と中和抗体産生能試験 .....	13
(1) 被験ワクチン .....	13
(2) 実験動物 .....	13
(3) ワクチン注射および採血 .....	13
(4) 中和抗体価測定 .....	14
6. ヒトに対する安全性と中和抗体産生能試験 .....	14
(1) 被験ワクチン .....	14
(2) ワクチン被接種者 .....	15
(3) ワクチン注射 .....	15
(4) 中和抗体価測定 .....	16
7. 暴露後治療効果試験 .....	16

(1) ワクチン被接種者 .....	16
(2) ワクチン投与 .....	16
Ⅲ 成 績 .....	17
1. ワクチン調製法に関する基礎的研究 .....	17
1) CE細胞調製法の比較 .....	17
2) CE細胞におけるウイルスの増殖 .....	17
3) ベータープロピオラクトンのウイルス不活化作用 .....	17
4) メンブランフィルターのウイルス濾過に及ぼす影響 .....	18
5) 限外濾過—超高速遠心法のウイルス濃縮および精製効果 .....	18
6) 蔗糖密度勾配遠心法のウイルス濃縮および精製効果 .....	18
7) ワクチンの力価 .....	19
8) ワクチンの経時安定性 .....	19
2. ワクチンの安全性と抗原性 .....	20
1) マウスおよびラットにおける急性毒性 .....	20
(1) 一般症状 .....	20
(i) 静脈内投与 .....	20
(ii) 経口投与 .....	22
(iii) 皮下投与 .....	22
(2) LD <sub>50</sub> 値 .....	23

(i) 静脈内投与 .....	23
(ii) 経口投与 .....	24
(iii) 皮下投与 .....	24
(3) 剖検所見 .....	24
2) モルモットにおける全身性アナフィラキシー .....	25
(1) 静脈内惹起注射 .....	25
(2) 皮下惹起注射 .....	26
3) サルに対する安全性と中和抗体産生能 .....	26
(1) 注射局所および全身反応 .....	26
(2) 中和抗体の産生 .....	26
3. ヒトに対する安全性と中和抗体産生能 .....	27
(1) 注射局所および全身反応 .....	27
(2) 中和抗体の産生と持続期間 .....	29
(3) 暴露後治療効果 .....	31
IV 考 察 .....	33
V 総括および結論 .....	44
VI 謝 辞 .....	50

VII 参 考 文 献 .....	51
付 表 : 1 ~ 2 4 .....	66
付 図 : 1 ~ 1 2 .....	90
英 文 要 旨 .....	102

# 1 緒 言

狂犬病ウイルスは、Rhabdovirus 科の Lyssavirus 属に分類される砲弾型のウイルスで、中心は単鎖RNAと蛋白からなるらせん構造が、転写酵素と膜を含む筒状のNucleocapsidを形作り、その周囲を外被膜が包み、これに突起が全面に並ぶ、長さ約180nm、径約80nmのウイルスである。

狂犬病は、この街上毒ウイルスに感染した動物の唾液腺で増殖したウイルスが、唾液に排出され、咬傷により感染し、一旦感染局所で増殖した後、あるいは直接、末梢神経に入り、脳炎をおこして発病する<sup>53, 59, 64, 70</sup>。

潜伏期は非常に長く、小動物でも2週間から数ヶ月におよび、ヒトでは1～3ヶ月が最も多いが、3年以上という長い場合もある。全ての哺乳類に感染し、発病した場合、死亡率100%といわれる恐ろしいウイルス病であり、感染・発病を防ぐには、ワクチン以外に効果的な方法はない。

狂犬病ワクチンの歴史は、フランスのPasteurに始まる。1885年、Pasteurは狂犬病ウイルスをウサギの脳で継代し、固定化に成功したのち、この固定毒に感染したウサギの脊髄をとり出し、KOHとともに乾燥減毒してワクチンを開発した。

その後、ワクチンの力価を上げるため、脊髄から、ウイルス濃度の高い脳に切り替えられ研究が進んだ。



1919年に、イギリス人・Sempleによって、ウサギまたはヤギ脳乳剤を石炭酸で不活化したワクチンがインドで開発され、ヒト用、動物用ワクチンとして世界の主流を占めるようになった。

日本では、1921年梅野、押田らにより固定毒感染ウサギまたはイヌ脳乳剤をグリセリンで減毒したワクチンが開発され、イヌの予防接種に用いられた<sup>34)</sup>。

その後、1953年にSemple型のワクチンを採用<sup>33, 30)</sup>、イヌ用およびヒト用に使用されてきた。1960～1973年は、紫外線で不活化したSemple型ワクチンも併用されてきた<sup>40)</sup>が、ヒトでは1973年以来、副作用（注射後麻痺）の原因物質とされている脳由来のミエリンを含まない感染哺乳マウス脳を、石炭酸あるいは紫外線で不活化したFuenzalida型のワクチンが開発され、不活化狂犬病ワクチン（以下 SMBワクチン）として生物学的製剤基準で規定されて1980年まで使用されてきた。

しかし、このワクチンも脳組織を原材料としており、低速遠心で脳物質を沈殿除去するほかは、脳物質を特に除去、精製することなく製品化しているため、依然として副作用の可能性が残されている。

ヒトにおける狂犬病ワクチンは、一般のワクチンと異なり、感染前に予防的に使用する方法ではなく、狂犬病罹患動物による咬傷など、狂犬病ウイルスに暴露した直後からワクチン注射を行う、いわゆる治療的使用法である。これは、狂犬病の潜伏期が長いこと、感染が動物の咬傷によることが、はっきりしてい

ることと同時に、全身麻痺を起したり死亡するヒトが1,000～2,000人に1人という、ワクチンの副作用を懸念するためであった。それゆえ、ウイルス暴露前に予防的に使用するのは、狂犬病ウイルス感染の危険度の高いヒト（研究室、検査室の職員、医師、獣医師、検疫所職員、野犬捕獲員など）の一部に限られ、大量に使用されている諸外国では、稀に副作用を認めている<sup>40)</sup>。

副作用の原因は、ワクチン原材料の脳組織に含まれる、ミエリンを構成するリポ蛋白質によるアレルギー反応であることがわかってきた。このことより、脳組織を含まない狂犬病ワクチンの研究が各国で行われ、アヒル胚 (Peck, 1955)<sup>63)</sup>、ニワトリ1日卵胚 (Yoshino, 1963)<sup>96)</sup> 由来狂犬病ワクチンを経て、ハムスター腎臓細胞 (Kissling, 1963)<sup>37)</sup>、ヒト2倍体細胞 (Wiktor, 1965)<sup>85)</sup>、およびニワトリ胚細胞 (Kondo, 1965)<sup>38, 39, 43)</sup> 由来組織培養不活化狂犬病ワクチンの開発研究が展開されてきた。

狂犬病のない国は、オーストラリア、ニュージーランド、ニューギニア、北  
欧3国、ポルトガルなどの少数の国々と、イギリス本国、日本、台湾、シンガ  
ポール、グアム、ハワイなどの小さな島国または地域だけであるが、フィリピ  
ン、スリランカ、インドネシア、カリブ海諸国は島国でも濃厚な常在地となっ  
ている。

北アメリカ、ヨーロッパなどでは、野生動物（キツネ、オオカミ、スカンク、  
コウモリなど）と、それらに噛まれたウシ、ヒツジ、ウマなどの放牧家畜に多

く（年間約2,500～20,000頭），ヒトの死亡例は，重要な感染源であるイヌ，ネコへの予防対策が進んでいるため非常に少ない（0～5名）。

これに反し，東南アジア，インド，中東アフリカ，メキシコを含む中南米諸国では，経済，宗教，教育，習慣などからの障害が多く，対策が不徹底で野放しの地域も広く，イヌ，ネコの狂犬病が多いのでヒトの狂犬病も多い。

フィリピンでは，年間約25,000頭のイヌが狂犬病で死亡している。

タイにおけるイヌの飼育頭数は1,000万頭以上（人口：5,000万人）といわれ，毎年14万人以上がイヌに噛まれ狂犬病の治療をうけており，そのうち200～300人が死亡している。

インドでは，年間50万人をこえるヒトが狂犬に噛まれ，そのうち2万人が死亡している。

1985年のWHO統計によると，全世界のヒトの狂犬病死亡数は21,676人と報告されている<sup>10)</sup>。

日本では，1950年（昭和25年）に狂犬病予防法が施行され，イヌへの予防接種が功を奏し，1957年以来，発生はみられていない<sup>33, 34, 35)</sup>。しかし，最近，海外で狂犬病罹患動物の咬傷をうけて帰国する例もみられるようになり，また，特に東南アジア，中近東，アフリカおよび南アメリカなどの狂犬病常在地<sup>41, 42)</sup>に向け出国するヒトも増加し，罹患する機会が多くなってきている<sup>62)</sup>。

このような背景のもとに，予防的に使用可能で副作用の少ない組織培養ワク

チンの開発を考え、国立予防衛生研究所・近藤技官の技術指導のもとに、1974年以來、実験を重ねた結果、ニワトリ胚由来の乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチン（以下TCワクチン）の製品化に成功した。

## II 実験材料および方法

### 1. ワクチン調製

#### (1) 使用ウイルス

予研より分与された、CE細胞に馴化した狂犬病ウイルスHEP Flury clone S株を原株ウイルスとした。この株は、Johnson がヒトの狂犬病から分離し、ニワトリヒナで継代した後、Koprowskiがニワトリ胚に130代以上馴化して弱毒化したものを、吉野が1日卵胚に馴化し、さらに近藤が7日齢卵のニワトリ胚細胞に、無血清培地を用いて100代以上継代して得られた、高度に弱毒化されたウイルス株である<sup>96)</sup>。

この原株ウイルスを、発育ニワトリ卵胚の初代細胞に、TC Medium199（血清無添加）を用いて培養し、種ウイルスとした。

#### (2) 使用発育鶏卵

すべて、特定の伝染性疾患に感染していないニワトリ群（SPFニワトリ）より採取したものを使用した。

SPFニワトリ卵は、当研究所・阿蘇支所によって生産・供給されたもので、Table 1 に記載したニワトリ病病原体に感染していないことが確認されている。

#### (3) CE細胞の調製

頭部を除去した7～10日齢ニワトリ胚を、はさみで細切した後、0.05～0.2%

のトリプシン(Difco, 1:250)を加え, ①カピラリーにてピペティング, ②マグネチックスターラーにて室温, 20分2回, ③同じく4℃, 60分間の3通りの方法で細胞分散を行い, 分散した細胞を5%コウシ血清を含むYLE培地に, 1 mlあたり $2 \times 10^6$ 個になるように細胞浮遊液をつくり, ルー瓶に100mlずつ小分けし, 37℃で20時間培養した。

#### (4) ウイルス培養

単層形成の良好な培養細胞を, M/100PBS(pH7.1)で洗浄し, 血清成分を1ppm以下にした後, M.O.I.=0.01になるように調製した種ウイルスを, ルー瓶1本あたり4 mlずつ接種し, 37℃, 60分間静置し, ウイルスの細胞への吸着を図った後, TC Medium199を100ml加え, 35℃で6日間培養した。

#### (5) ウイルスの採取および不活化

6日間培養した後, 採取したウイルス浮遊液をメンブランフィルターで濾過し, 濾過後のウイルス浮遊液に, ベータプロピオラクトン(BPL)を0.02 $\nu$ / $\nu$ %になるように添加し, 37℃の温浴中で60分間加温し不活化, さらに完全なウイルス不活化を行うため, 同一操作を1回繰り返した。

#### (6) 濃縮および精製

不活化ウイルス浮遊液を, 限外濾過装置(旭化成Model 2B Module AHL-2010, 分画分子量5万)により10~15倍濃縮し, 濃縮した不活化ウイルス浮遊液をさらに超高速遠心機(日立55P)にて遠心(59,000 $\times$ G, 4時間)し, ウイルス沈渣



を回収，また，蔗糖密度勾配遠心法（Model K II）を用いウイルス画分を採取，それぞれ原量の1/15のM/100PBS(pH7.1)に浮遊し原液とした。

#### (7) 凍 結 乾 燥

原液に乳糖15<sup>w/v</sup> %，グルタミン酸ナトリウム0.2 <sup>w/v</sup> %，ゼラチン0.04<sup>w/v</sup> %を加えたM/100PBS(pH7.1)を等量添加し，メンブランフィルターで濾過して最終バルクを調製，2 mlバイアルに1 mlずつ小分し凍結乾燥した。

#### (8) 感 染 価 測 定

検体をM/75PBS(pH7.4)で希釈，生後4日以内の哺乳マウス10匹以上を1群とし，それぞれの希釈に1群ずつを用い，1匹あたり0.02mlを脳内に注射した後21日間観察し，LD<sub>50</sub>値を求めた。

#### (9) 赤血球凝集価（HA価）測定

マイクロトレイ法により実施した。すなわち，ウシアルブミン（BA），あるいは卵白アルブミン（EA）を0.4 <sup>w/v</sup> %に添加した硼酸カセイソーダ緩衝食塩水（BBS, pH9.0）0.025mlに，検体0.025mlを加え2倍階段希釈する。つぎに，Dextrose-gelatin-veronal（DGV）で8 <sup>v/v</sup> %に希釈した新鮮ガチョウ血球，あるいは10<sup>v/v</sup> %の1日ニワトリヒナ・ホルマリン固定血球をVirus adjusting diluent（VAD, pH6.1）で0.5<sup>v/v</sup> %になるように血球浮遊液を作り，その0.05mlを検体希釈後に加え，トレイを氷上で冷却しながら冷室（4℃）に1時間静置し判定した。

## (10) 力 価 試 験

力価試験には、Habel法（攻撃変量法）<sup>31)</sup>およびNIH法（免疫変量法）<sup>72)</sup>

を用いた。

Habel法：体重約12gのマウス10匹以上を1群とし、その5群の動物に1匹あたり試料0.25mlずつを6回、1日おきに腹腔内に注射する。初回免疫注射の14日後に、ワクチン非注射の対照マウスとともに、各希釈の攻撃ウイルス（CVS）を0.03mlずつ脳内に注射して14日間観察し、各々LD<sub>50</sub>値を求め比較した。

NIH法：検体および参照品（狂犬病ウイルス西ヶ原株感染哺乳マウス脳乳剤を紫外線で不活化し凍結乾燥）をそれぞれ5倍階段希釈し、それぞれ4段階つくる。体重約12gのマウス10匹以上を1群とし、各希釈に1群ずつを用い1匹あたり0.5mlずつを2回、1週間隔で腹腔内に注射する。第1回免疫注射の2週間後に各群の動物に、1匹あたりCVS 0.03ml (50LD<sub>50</sub>)ずつを脳内に注射して14日間観察し、検体と参照品のED<sub>50</sub>値の比を求め判定した。

## (11) 不 活 化 試 験

検体およびその10倍希釈液の各々を、生後4日以内の哺乳マウス10匹以上に、1匹あたり0.02ml脳内に注射して21日間観察した。

また、生後約4週のハムスター5匹以上の脳内に、1匹あたり検体0.05mlを注射して21日間観察した。

## 2. ワクチンの経時安定性試験

### (1) 被験ワクチン

保存試験には、Lot 1, Lot 2, Lot 3, Lot 4 および Lot 5 を使用した。

力価はHabel 指数でそれぞれ $10^{5.02}$ ,  $10^{5.13}$ ,  $10^{4.64}$ ,  $10^{5.62}$  および  $10^{5.60}$  であった。

### (2) 保存条件

4℃および37℃恒温室に、遮光して36ヶ月間保存したワクチンについて試験した。

### (3) 試験項目および試験

4℃保存においては、外観、含湿度、水素イオン濃度（pH）、無菌性、異常毒性および力価について試験した。

37℃保存においては、外観、pH、異常毒性および力価について試験した。

なお、各試験は生物学的製剤基準（厚生省薬務局監修・1979）に従って行い、保存は各ロットとも調製日より開始した。

## 3. マウスおよびラットにおける急性毒性試験

### (1) 実験動物および飼育条件

5週齢の雌雄ddY系マウス（静岡実験動物農業協同組合）およびWistar系ラット（熊本・井上実験動物）を購入し、当研究所で1週間の飼育観察を行った

後、順調な体重増加を示した健康なものを選び試験に供した。

試験開始時の体重は、マウス22～25g、ラット135～158gであった。用いた動物数はマウスおよびラットとも、1投与量あたり雌雄各10匹とし、1ケージあたりマウスは10匹、ラットは5匹ずつで飼育観察した。

各動物は室温を21～24℃、相対湿度50～60%に調節した環境下で、固型飼料（日本農産株式会社製）と瓶給水により飼育した。

なお、経口投与の動物は、投与前16時間絶食させて使用した。

## (2) 被験ワクチンおよび投与

TCワクチンLot 8 およびSMB ワクチンLot 31を用いた。TCワクチンは日局注射用蒸留水で、規定の2倍濃度になるように溶解したものを試料とし、SMBワクチンは用時よく振とうして使用した。

静脈内投与は尾静脈より、皮下投与は背部皮下にそれぞれ投与し、経口投与は金属製胃ゾンデを用いて強制投与した。

静脈内投与の速度は、いずれもマウスは0.5ml/min、ラットでは2ml/min、とした。

## (3) 観察およびLD<sub>50</sub>値算出

ワクチン投与後、動物の一般行動、症状、体重の推移および致死経過を14日間観察した。死亡した動物は速やかに剖検を行い、生存した個体は2週間後に致死せしめ剖検を行った。

LD<sub>50</sub>値の算出は、投与後2週間の死亡率にもとづき、Probit法<sup>44)</sup>に従いその95%信頼限界とともに算出した。

#### 4. モルモットにおける全身性アナフィラキシー試験

##### (1) 実験動物および飼育条件

4～5週齢の雌、Hartley系モルモット(株式会社・九動)を購入し、当研究所で1週間飼育して観察を行った後、順調な体重増加を示した健康なものを選び試験に供した。

試験開始時の体重は、250～300gであった。用いたモルモット数は、TCワクチンおよびSMBワクチンには各々16匹ずつ、対照の健康ウマ血清には4匹とし、1ケージあたり4匹ずつ飼育観察した。

モルモットは室温を21～24℃、相対湿度50～60%に調節した環境下で、固型飼料と瓶給水により飼育した。

##### (2) 被験ワクチンおよび投与

TCワクチンLot 8およびSMBワクチンLot 31を用いた。対照として健康ウマ血清Lot 1210を用いた。TCワクチンは日局注射用蒸留水で溶解したものを試料とし、SMBワクチンは用時よく振とうして使用した。

感作注射として、ワクチン群には各ワクチンを腹腔内に1.0 mlずつ、対照群には健康ウマ血清を腹腔内に0.1 mlずつ、第1日、3日、5日の計3回注射し

た。

惹起注射では、各々のワクチン群を4分し、それぞれのワクチンを2群には静脈内に0.2 ml、他の2群には皮下に1.0 ml、対照群は2分し、健康ウマ血清を1群には静脈内に0.2 ml、他群には皮下に1.0 ml、各々第15日または第22日に注射した。

### (3) 観 察

検体投与後、モルモットの一般行動、症状および致死経過を7日間観察した。

## 5. サルに対する安全性と中和抗体産生能試験

### (1) 被 験 ワ ク チ ン

TCワクチンLot 4を使用した。

### (2) 実 験 動 物

カニクイザル（マレーシア産）、体重：1.5～3.5 kg、年齢：2.5～5.

5才、性別：雄1頭、雌7頭、計8頭を使用した。

### (3) ワクチン注射および採血

TCワクチンを日局注射用蒸留水に、用時溶解したものを試料とした。

サル8頭の胸部皮下に1 mlずつ1日1回連続10回注射し、局所および全身反応について3ヶ月間観察した。中和抗体価測定のため、注射前、注射後5日、7日、10日、14日、22日、28日および35日に股動脈より2 mlずつ



採血した。

#### (4) 中和抗体価測定

被験血清を56℃、30分間非働化後、5倍階段希釈する。希釈した各々の血清に等量の狂犬病ウイルス CVS株 (100LD<sub>50</sub>/0.03ml) を加えてよく混和した後、37℃、90分間静置する。体重約14~16g のマウス5匹を1群とし、各々の希釈血清とウイルスとの混合液に1群ずつを用い、1匹あたり0.03mlずつ脳内に注射し14日間観察、ED<sub>50</sub>値を算出した<sup>7)</sup>。10倍以上の抗体価 (ED<sub>50</sub>)を示すものを陽性とした。

### 6. ヒトに対する安全性と中和抗体産生能試験

#### (1) 被験ワクチン

当研究所のボランティアについては、Lot 5, Lot 13, Lot 5502 および Lot 5601を用いた。ワクチンの力価はそれぞれ10<sup>5.61</sup> (Habel指数), 10<sup>4.64</sup> (Habel指数), 1.53 (Antigenic value) および1.20 (Antigenic value) であった。

また、海外青年協力隊員については、Lot 10, Lot 11, Lot 12, Lot 13, Lot 14, Lot 15, Lot 16, Lot 5501, Lot 5502, Lot 5601, Lot 5701, Lot 5702 および Lot 5801を用いた。

## (2) ワクチン被接種者

当研究所職員の成人男子14名（20～56才）および女子21名（19～42才），計35名の志願者および国際協力事業団・海外青年協力隊員 2,447名（20～35才）である。

## (3) ワクチン注射

第1グループ（成人男子10名，女子1名，計11名）の志願者の上腕皮下に，1 mlを1回量として2週間の間隔で2回，6ヶ月後に3回目を注射した。そのうち男子3名は，3回目注射後3年3ヶ月目に，さらに1 ml 1回の追加注射を行った。また，男子3名，女子1名については，第3回注射後1年9ヶ月目に1回の追加注射を行い，その後3週，1年4ヶ月目に，それぞれ1 mlを追加注射し，注射局所および全身反応について観察した。

第2グループ（成人男子4名，女子2名，計6名）の志願者の上腕皮下に，1 mlを1回量として3週間隔で2回，1年4ヶ月後に3回目を注射し，注射局所および全身反応について観察した。

第3グループ（成人女子18名）の志願者の上腕皮下に，1 mlを1回量として4週間の間隔で2回注射し，注射局所および全身反応について観察した。

第4グループ（成人男子1名）の志願者の上腕皮下に，1 mlを1回量として2週間隔で2回，6ヶ月後に3回目を注射した。その後，1年6ヶ月目

に第1回の追加注射，3週後第2回，さらに1年2ヶ月後に第3回の追加注射を行い，さらにWHO方式（ワクチン1 mlを1回量として，0日，3日，7日，15日，30日および90日目に計6回の注射）による連続注射を行い，注射局所および全身反応を観察した。

#### (4) 中和抗体価測定

サルの中和抗体価測定に用いた方法（マウス中和試験法）<sup>7)</sup>により測定した。なお，5倍以上の中和抗体価を示すものを陽性とした。

### 7. 暴露後治療効果試験

#### (1) ワクチン被接種者

海外で狂犬病あるいは狂犬病の疑いのあるイヌおよびサルの咬傷を受けたヒト17名について実施した。

#### (2) ワクチン投与

TCワクチン1 mlを1回量として，WHO方式に準じた方法により投与した。なお，この試験は東京大学医科学研究所附属病院院長故大谷杉士博士に依頼した。

#### 1. ワクチン調製法に関する基礎的研究

##### 1) CE細胞調製法の比較

CE細胞の調製法としてDulbecco法, Bodian法およびYoungner法を比較した。Table 2に示すように, 10日齡ニワトリ胚を用いた場合, マグネチックスターラーによる4℃, 60分間消化のBodian法と, 同じくマグネチックスターラーを用いた室温, 20分間2回消化のYoungner法のいずれも, Dulbecco法との間に差は認められず, いずれの細胞分散法を用いても細胞調製が可能であることがわかった。

##### 2) CE細胞におけるウイルスの増殖

HEP Flury 狂犬病ウイルスは, 高アルカリ(pH7.8~8.0)に維持することで, CE細胞によく増殖し, ウイルス接種6日で最高値 $10^{7.0} \sim 10^{7.5}$ LD<sub>50</sub>/mlに達し, 赤血球凝集価(HA価)は32~128倍を示した。ウイルス感染価とHA価の推移を示すとFig. 1のごとくであった。これらの成績をもとに, ウイルス採取時期を, ウイルス接種後概ね6日とした。

##### 3) ベータープロピオラクトンのウイルス不活化作用

メンブランフィルター濾過後のウイルス浮遊液にBPLを0.02%<sub>v/v</sub>になるように加え, 37℃温浴中で60分間加温し, 不活化時間を検討した。

Fig. 2 に示すように、ウイルスは37°C、45分で完全に不活化されたが、ワクチンの安全性を考慮し、ウイルスの不活化を確実なものとするために、同一操作を1回繰り返し実施した。

#### 4) メンブランフィルターのウイルス濾過に及ぼす影響

ウイルス採取時に用いるメンブランフィルターのウイルス濾過に及ぼす影響を見るために、製造会社5社のメンブランフィルターについて比較検討した。Fig. 3 に示すように、従来から使用していたS社のメンブランフィルターでは、HA価で比較した場合87.5%のロスを認めた。他のM社、P社およびF社のメンブランフィルターでも50%のロスを認めたが、G社のメンブランフィルターには全くロスが認められなかった。

#### 5) 限外濾過－超高速遠心法のウイルス濃縮および精製効果

限外濾過－超高速遠心の結果、Table 3 に示すように、TCワクチンの蛋白窒素含量は、平均 0.021mg/ ml で、SMB ワクチンと比較して1/20量であった。ワクチンのロット間にバラツキが認められたが、棄却検定の結果、異常値は認められなかった。

#### 6) 蔗糖密度勾配遠心法のウイルス濃縮および精製効果

蔗糖密度勾配遠心の結果、Fig. 4 に示すようにNo. 8～No.16の画分にHAn-inが分画された。これらの画分をpoolしてワクチンを調製した。HA価32倍、蛋白窒素含量 0.007mg/ ml で、限外濾過－超高速遠心法で調製したワクチ

ンより3倍の精製度を示した。

## 7) ワクチンの力価

限外濾過および超高速遠心法により調製したTCワクチンの力価を、Table 4およびTable 5に示した。生物学的製剤基準では、Habel法の場合、免疫群と無処置対照群とのLD<sub>50</sub>値の差が10<sup>3</sup>以上を合格としており、またNIH法では、検体と参照品とのED<sub>50</sub>値の比が0.3以上を合格としており、いずれも基準に適合する力価を示した。ワクチンの力価と蛋白窒素含量とに相関は認められなかった（相関係数  $r = -0.036$ ）。

## 8) ワクチンの経時安定性

4℃および37℃での経時安定性試験における、TCワクチンの力価および含湿度の推移をFig. 5に示した。

TCワクチンを4℃に保存した場合、36ヶ月の保存期間中、力価はワクチン調製直後とほとんど同じ成績を示したが、含湿度は保存経過とともに若干の上昇傾向が認められた。しかし、いずれも基準（3%以下）に適合していた。

また、同時に行ったTCワクチンの外観、pH、無菌性、異常毒性についての経時的変化は認められなかった。

TCワクチンを37℃に保存した場合、Fig. 5に示すように、力価は保存6ヶ月より低下の傾向がみられ、36ヶ月でおよそ10<sup>3.4</sup>となり、ワクチン調製



直後に比べ、約 $10^{1.0} \sim 10^{1.7}$ の低下が認められたが、なお基準に適合していた。また、TCワクチンの外観、pH、異常毒性についての経時的変化は認められなかった。

## 2. ワクチンの安全性と抗原性

### 1) マウスおよびラットにおける急性毒性

#### (1) 一般症状

##### (i) 静脈内投与

マウス：TCワクチンの投与量は、人体使用濃度のワクチン量として、48 ml/kg (0.48 ml/10g)  $\sim$  120 ml/kg (1.20 ml/10g)の5用量段階（公比1.25）とし、SMBワクチンの投与量は16 ml/kg (0.16 ml/10g)  $\sim$  39 ml/kg (0.39 ml/10g)の5用量段階（公比1.25）とした。マウスの静脈内投与の耐容投与量は0.5 ml/10g<sup>80)</sup>とされているが、本実験では投与最大用量の0.6 ml/10g（人体使用濃度のワクチン量として120 ml/kg）まで投与した。TCワクチン投与群のいずれにおいても、臨床所見、異常行動を示すものは認められなかった。

SMBワクチン投与群においては、0.16 ml/10g (16 ml/kg) 投与群は、いずれも臨床所見、異常行動を示すものは認められなかった。しかし、0.20 ml/10g (20 ml/kg) 投与群では、雄10匹中2匹、雌10匹中2匹、0.25 ml/10g

(25ml/kg) 投与群では、雄10匹中3匹、雌10匹中2匹、0.31ml/10g (31ml/kg) 投与群では、雄10匹中5匹、雌10匹中6匹、0.39ml/10g (39ml/kg) 投与群では、雌雄10匹ずつ全例が投与後直ちに死亡した。生存マウスにおいては異常は認められなかった。

ラット：TCワクチンの投与量は、人体使用濃度のワクチン量として、39ml/kg (3.9ml/100g)～95ml/kg (9.5ml/100g)の5用量段階（公比1.25）とし、SMB ワクチンの投与量は、12.8ml/kg (1.28 ml/100g)～31ml/kg (3.1 ml/100g)の5用量段階（公比1.25）とした。ラットの静脈内投与の耐容投与量は、4.0 ml/100g<sup>80)</sup>とされているが、本実験では投与最大用量4.7 ml/100g（人体使用濃度のワクチン量として95ml/kg）まで投与した。

TCワクチン投与群のいずれにおいても、臨床所見、異常行動を示すものは認められなかった。

SMB ワクチンの投与群においては、1.28ml/100g 投与群のいずれも臨床所見、異常行動を示すものは認められなかった。しかし、1.6 ml/100g 投与群では、雄10匹中2匹、雌10匹中1匹、2.0 ml/100g 投与群では、雄10匹中4匹、雌10匹中4匹、2.5 ml/100g 投与群では、雄10匹中5匹、雌10匹中7匹、3.1 ml/100g 投与群では、雌雄10匹ずつ全例が投与後直ちに死亡した。

生存ラットにおいては異常は認められなかった。

## (ii) 経口投与

マウス：TCワクチンの投与量は、人体使用濃度のワクチン量として、48 ml/kg (0.48 ml/10g) ~ 120ml/kg (1.20ml/10g) の5用量段階（公比1.25）とし、SMB ワクチンも同様に投与した。マウスの経口耐容投与量は、0.5 ml/10g程度<sup>80)</sup> と思われるが、本実験では投与最大用量 0.6ml/10g（人体使用濃度のワクチン量として120 ml/kg）まで投与した。

TCワクチンおよびSMB ワクチン投与のいずれの投与群においても、臨床所見、異常行動を示すものは認められなかった。

ラット：TCワクチンの投与量は、人体使用濃度のワクチン量として、48 ml/kg (4.8ml/100g)~120 ml/kg (12.0 ml/100g)の5用量段階（公比1.25）とし、SMB ワクチンも同様に投与した。ラットの経口耐容投与量は、5.0 ml/100g 程度<sup>80)</sup> と思われるが、本実験では投与最大用量 6.0ml/100g（人体使用濃度のワクチン量として120 ml/kg）まで投与した。

TCワクチンおよびSMB ワクチン投与のいずれの投与群においても、臨床所見、異常行動を示すものは認められなかった。

## (iii) 皮下投与

マウス：TCワクチンの投与量は、人体使用濃度のワクチン量として、48 ml/kg (0.48ml/100g)~120ml/kg (1.20ml/10g) の5用量段階（公比1.25）とし、SMB ワクチンも同様に投与した。マウスの皮下耐容投与量は、

0.5ml/10g程度<sup>80)</sup>と思われるが、本実験では投与最大用量 0.6ml/10g

(人体使用濃度のワクチン量として 120ml/kg)まで投与した。

TCワクチンおよびSMB ワクチン投与のいずれの投与群においても、臨床所見、異常行動を示すものは認められなかった。

ラット：TCワクチンの投与量は、人体使用濃度のワクチン量として、48ml/kg (4.8ml/100g)～ 120ml/kg (12.0ml/100g)の5用量段階 (公比1.25)とし、SMB ワクチンも同様に投与した。ラットの皮下耐容投与量は 5.0ml/100g 程度<sup>80)</sup>と思われるが、本実験では投与最大用量 6.0ml/100g (人体使用濃度のワクチン量として 120ml/kg)まで投与した。

TCワクチンおよびSMB ワクチン投与のいずれの投与群においても、臨床所見、異常行動を示すものは認められなかった。

## (2) LD<sub>50</sub>値

### (i) 静脈内投与

マウス：Table 6に致死率を示した。TCワクチン投与群においては、投与可能な最大用量を与えたが致死マウスはみられず、LD<sub>50</sub>値を算出するまでにはいたらなかった。

しかし、SMB ワクチン投与群では、雌雄とも20ml/kg (0.20ml/10g)投与群より致死マウスがみられ、39ml/kg (0.39ml/10g)投与群では全例が死亡し、雄マウスのLD<sub>50</sub>値は30.0ml/kg (0.3ml/10g)、雌マウスのLD<sub>50</sub>値は

29.0ml/kg (0.29ml/10g), 雌雄あわせたLD<sub>50</sub>値は29.5ml/kg (0.295ml/10g)

であった。雌雄マウスのLD<sub>50</sub>値にはほとんど差は認められなかった。

ラット:Table 7に致死率を示した。TCワクチン投与群においては、投与可能な最大用量を投与したが致死ラットはみられず、LD<sub>50</sub>値を算出することはできなかった。SMB ワクチン投与群では、雌雄とも16ml/kg (1.6ml/100g)投与群より致死ラットがみられ、31ml/kg (3.1ml/100g)投与群では全例が死亡し、雄ラットのLD<sub>50</sub>値は21.5ml/kg (2.15ml/100g), 雌雄あわせたLD<sub>50</sub>値は22.2ml/kg (2.22ml/100g)であった。雌雄ラットのLD<sub>50</sub>値にはほとんど差は認められなかった。

### (ii) 経口投与

マウスおよびラットの致死率をTable 8およびTable 9に示した。各ワクチンの投与群において、経口投与可能な最大用量を投与したが致死マウスおよび致死ラットはみられず、LD<sub>50</sub>値を算出することはできなかった。

### (iii) 皮下投与

マウスおよびラットの致死率を、Table 10およびTable 11に示した。各ワクチンの投与群において、皮下投与可能な最大用量を投与したが、致死マウスおよび致死ラットはみられず、LD<sub>50</sub>値を算出することはできなかった。

### (3) 剖検所見

静脈内投与において死亡したマウスおよびラットは直ちに、また、各投

与群の生存マウスおよびラットは試験終了時に全例解剖し、各臓器の内眼的観察を行ったが、何ら異常所見は認められなかった。

## 2) モルモットにおける全身性アナフィラキシー

### (1) 静脈内惹起注射

TCワクチンによりモルモットを感作後、第15日または第22日に惹起注射を行った。

Table 12に示すように、惹起注射としてTCワクチンおよびSMB ワクチンを用いた場合、7日間の観察期間中、全く異常を認めなかった。

SMB ワクチンにより感作後、SMB ワクチンおよびTCワクチンを惹起注射として用いた場合、TCワクチンでは7日間の観察期間中、全く異常を認めなかったが、SMB ワクチンを用いて第15日に惹起注射を行った場合、2匹とも投与直後より5分間、前肢を噛む動作をし、その後正常に復した。第22日に惹起注射を行った場合、1匹は全く異常を認めなかったが、他の1匹は注射直後より鼻を擦り、くしゃみ、耳搔き、後肢を噛む動作をし、歩行異常を示し、典型的なアナフィラキシー症状を示した。しかし、10分後には正常に復した。

対照とした健康ウマ血清投与群においては、第15日惹起注射群の場合、注射直後ないし2分後より鼻擦り、くしゃみ、けいれん、横臥または伏臥など、典型的なアナフィラキシー症状を示し、1匹は5分後、他の1匹は

翌日死亡した。

第22日惹起注射の場合、注射直後より鼻擦り、くしゃみ、けいれん、横臥、飛び上りなど、典型的なアナフィラキシー症状を示し、2匹とも5分後に死亡した。

## (2) 皮下惹起注射

Table 13に示されるように、TCワクチンおよびSMB ワクチン投与群とも、全く異常を認めなかった。また、対照とした健康ウマ血清投与群においても、異常は認められなかった。

## 3) サルに対する安全性と中和抗体産生能

### (1) 注射局所および全身反応

注射局所の発赤、腫脹および硬結について初回注射後3ヶ月間観察したが、全く異常は認められなかった。また、食欲、元気および体重等、全身反応も全く認められなかった。

### (2) 中和抗体の産生

ワクチン注射後の中和抗体価の推移を、Table 14およびFig. 6に示した。初回注射後5日目で、8頭中1頭(12.5%)が10倍の中和抗体価を示し、10日目では全8頭が抗体陽性(10倍以上)となり、平均抗体価は33倍となった。14日目には著しい抗体上昇を認め、平均抗体価は560倍に達した。以後、22日目には1,060倍、28日目には1,520倍、最終試験日の35日目に

は1,770倍に達し,本TCワクチンが高い中和抗体産生能を有することが確認された。

### 3. ヒトに対する安全性と中和抗体産生能

#### (1) 注射局所および全身反応

当研究所の成人男子14名,女子21名,計35名の志願者について,TCワクチン1 mlを,2週間隔,3週間隔および4週間隔で,それぞれ2回上腕皮下に注射し,さらに初回注射後6ヶ月および1年4ヶ月目に追加注射し,注射による局所および全身反応を観察(但し,3回目の注射は成人男子14名,女子1名)した。

Table 15に示すように1回目注射では局所の発赤9%(3/35),腫脹6%(2/35),疼痛23%(8/35)およびかゆみ6%(2/35)が認められた。

2回目の注射では局所の発赤31%(11/35),腫脹3%(1/35),疼痛20%(7/35)およびかゆみ17%(6/35)が認められた。

3回目の注射では局所の発赤7%(1/15),腫脹13%(2/15),疼痛7%(1/15)およびかゆみ7%(1/15)が認められたが,いずれの反応も一過性で,注射後24~72時間に消失した。

全身反応は,注射2回目に頭痛3%(1/35),注射3回目に頭痛7%(1/15)が認められたが,その程度は軽く注射後24時間には消失した。その他の



局所反応および全身反応を示す者は認められなかった。

次に、1 ml 3回の暴露前免疫（基礎免疫）終了後、さらに数回の追加注射した者について、注射局所および全身反応を観察した。

Table 16に示すように、1回の追加注射を受けた成人男子8名、女子1名については、局所反応および全身反応とも、いずれも認められなかった。

2回目の追加注射を受けた成人男子5名、女子1名については、局所の疼痛17% (1/16)が認められた。3回目の追加注射を受けた成人男子4名、女子1名については、局所の腫脹20% (1/15)、疼痛40% (2/5)、かゆみ20% (1/5)が認められた。

連続11回注射を行った1名については、局所の腫脹、疼痛がそれぞれ認められたが、反応が増強するようなことはなかった。また、追加注射による全身反応は、いずれも認められなかった。

国際協力事業団・海外青年協力隊員 2,447名 (20~35才) に、1 mlを1回量として1ヶ月間隔で2回、その後6ヶ月目に3回目の注射を行い、注射局所の反応および全身反応について調査を行った。(Table 17)。本調査では、局所の発赤・腫脹 1.1% (27/2,447)、疼痛 0.3% (8/2,447)、全身症状として37℃台の発熱 0.2% (6/2,447) を認めたにすぎず、本TCワクチンの安全性が確認された。

## (2) 中和抗体の産生と持続時間

第1グループ：TCワクチン1 mlを1回量とし、2週間隔で2回、さらに2回目注射後6ヶ月目に1回、計3回の注射を行ったグループでは、Table 18, Fig. 7に示すように、2回目注射後2週で平均抗体価27倍 (< 5 ~ 235倍) ・抗体陽性率90%のピークに達し、以後漸次下降し、6ヶ月後には平均抗体価5倍以下 (< 5 ~ 15倍) ・抗体陽性率60%に低下した。この時点で3回目の注射を行ったところ、注射後1週間で急速に抗体の上昇を認め、平均抗体価125倍 (46 ~ 766倍) ・抗体陽性率100%のピークに達し、以後1ヶ月まで、ほぼ同程度の平均抗体価107倍 (69 ~ 166倍) ・抗体陽性率100%の高い値を示したが、6ヶ月後には平均抗体価5倍以下 (< 5 ~ 42倍) ・抗体陽性率78%に低下した。

さらに、抗体陰性期の3年3ヶ月後に1 ml 1回の追加注射を行ったところ、Table 19, Fig. 8に示すように、注射後1週より抗体の産生を認め、2週でピークの平均抗体価98倍 (46 ~ 163倍) ・抗体陽性率100%と、初回注射よりも高い値を示し、抗体価も速やかに上昇した。以後、2ヶ月後も平均抗体価50倍 (8 ~ 282倍) ・抗体陽性率100%を示した。

3回目注射後1年9ヶ月目に1回、つづいて3週後に2回目、その後の1年4ヶ月目に3回目の追加注射を行ったところ、Table 20, Fig. 9に示すように、1回追加注射後3週で平均抗体価68倍 (11 ~ 165倍) ・抗体陽性

率 100%を示した。

2 回目追加注射後は、1 年 4 ヶ月経過後も平均抗体価12倍（7～19倍）

・抗体陽性率 100%を示した。

3 回目追加注射後は、1 週後平均抗体価84倍（56～ 188倍）・抗体陽性率 100%，2 週後および1 ヶ月後も、ほぼ同程度の平均抗体価96～69倍の高い抗体価を認め、2 ヶ月後も平均抗体価29倍（11～69倍）・抗体陽性率 100%を保持していた。

第 2 グループ：TCワクチン 1 ml を 3 週間隔で 2 回注射後、1 年 4 ヶ月目に 3 回目の注射を行ったグループでは、Table 21, Fig. 10 に示すように、初回注射後 3 週では全ての者が抗体陰性であり、2 回目注射後 4 週で平均抗体価21倍（9～46倍）・抗体陽性率 100%を示した。しかし、1 年 4 ヶ月後には平均抗体価 5 倍以下（<5～48倍）・抗体陽性率25%に低下した。この時点で 3 回目の注射を行ったところ、1 週後平均抗体価 196倍（38～826倍）・抗体陽性率 100%に達し、以後 2 ヶ月後も平均抗体価72倍（33～188倍）を維持した。

第 3 グループ：TCワクチン 1 ml を 4 週間隔で 2 回注射したグループでは、Table 22, Fig. 11 に示すように、初回注射後 4 週の平均抗体価は 5 倍以下（<5～56倍）・抗体陽性率56%であったが、2 回目注射後 2 週で平均抗体価49倍（7～313倍）・抗体陽性率 100%を示した。これは、先の 2 週

間隔および3週間隔で注射したグループより高い値を示したことになる。

第4グループ：成人男子1名について、TCワクチンの頻回注射を行った場合の成績をTable 23, Fig. 12 に示した。

初回注射後2週で抗体価219倍、2回目注射後2週で229倍を示し、以後漸次下降したが、6ヶ月後も、なお8倍の抗体価を示した。3回目注射後は、2週後74倍、3週後11倍の抗体価を示したが、6ヶ月後は5倍以下に低下した。1年10ヶ月後に1回追加注射を行ったところ、3週後に13倍の抗体価を示したが、1年2ヶ月後には再び5倍以下に下降した。この時点でWHO方式の連続注射を行ったところ、抗体価は3日後21倍、7日後19倍、15日後69倍と上昇し、1ヶ月後46倍および3ヶ月後には19倍と推移し、ワクチン注射回数の割には、それ程高い抗体価は得られなかった。

しかし、合計5回の注射を行った場合、次の6回目の注射後は、3日目で21倍の抗体価を示した。

### (3) 暴露後治療効果

TCワクチンの狂犬病発症阻止効果をみるために、海外で狂犬病あるいはその疑いのあるイヌおよびサルの咬傷を受けた17名にワクチン注射を行った。

Table 24に示すように、狂犬病のイヌに噛まれた者4名、狂犬病の疑いのあるイヌに噛まれた者8名、狂犬病の疑いのあるサルに噛まれた者2名

狂犬病であるかどうか不明なイヌに噛まれた者3名の計17名に、WHO方式に準じて連続注射を行った結果、全例が死を免れ、本TCワクチンの狂犬病発症阻止効果が実証された。

組織培養によるワクチンを開発するにあたって基本的に重要なことは、それが大量に製造される時、容易に入手可能な動物細胞であるかどうかということである。我が国におけるヒト用ワクチンは、生物学的製剤基準で、初代細胞を使用することが義務づけられており、したがってBHK-21細胞やVero細胞など、狂犬病ウイルスに比較的感受性が高く、細胞調製が簡単な株化細胞を使用することはできなかった。

Kisslingら<sup>87)</sup> が発表したハムスター腎臓細胞、van Wezelら<sup>81)</sup> のイヌ腎臓細胞などは、材料であるハムスター、あるいはイヌの供給、培養の度ごとの動物の殺処分を考えると、量産を必要とするワクチンの製造には不向きと考えられた。またWiktorら<sup>85)</sup> のヒト2倍体細胞に関しても、その種細胞の維持が困難なこと、ウイルス培養にヒトの血清あるいはヒト血清アルブミンが必要など、多くの難点が考えられた。

Yoshino ら<sup>96)</sup> のニワトリ1日卵胚の研究によって、狂犬病ウイルスがニワトリ胚で増殖することが判っていたことから、Kondo<sup>38)</sup> は7日卵を用いて狂犬病ウイルスの培養を行い好成績を得た。

この成績と、材料のニワトリ卵が安価で供給に不安がないことから、組織培養狂犬病ワクチンの製品化にニワトリ胚を選択した。

近藤はDulbecco法により細胞浮遊液を調製したが、この方法は大量の細胞を調製するためには人手と時間を要するため、この問題を解決する必要があった。

このため、当時、日本脳炎ワクチンのプラック中和試験に用いられていた、マグネチックスターラーによる細胞消化法を応用し、トリプシン濃度、トリプシン消化温度、トリプシン消化時間の細胞に及ぼす影響を検討した。

この結果、トリプシン濃度0.05%、4℃・60分間消化のBodian法と、同じくトリプシン濃度0.05%、室温・20分間2回のYoungner法のいずれも、Dulbecco法と変らない成績が得られ、いずれの方法を用いても細胞調製が可能であることがわかった。

次の問題は、狂犬病ウイルスの増殖が遅いため、培養した細胞を長く（1週～2週間）維持させることであった。細胞の代謝を抑え、細胞のガラス面への付着を良くするためには、ウイルス培養期間中、血清を含まない培地を用いることはわかっていたが、それにもかかわらず、ウイルス採取時の7日目には、単層細胞がガラス面から脱落しているものが多くみられた。この原因は、ウイルス接種時のウイルス希釈液（199培地）のpHが、ウイルス吸着時間中（60分間）に接種時のpH7.8～8.0から9.0と、高アルカリに変化したための細胞へのダメージと判断、ウイルス希釈液をpH変動の少ないPBSに変えることで、単層細胞を2週間維持させることができ、この問題を解決した。

このようにして調製した細胞を用いて狂犬病ウイルスの培養を行ったが、得

られるHA価は2～4倍と低く、いかに濃縮を行っても到底ワクチンとしては成りえなかった。Yoshinoら<sup>94)</sup>は、狂犬病ウイルスは維持培地のpHを8.2～9.0にあげる方が、pH7.4より良く増殖することを報告しており、この方法を応用することにした。しかし、pHをあまり上げすぎると単層細胞の維持が悪く、7日間の培養を維持することはできなかった。そこで、pHを従来の7.4から7.8～8.0に調節することで、単層細胞のガラス面への付着にも影響を与えず、良好なウイルス増殖（HA価128倍、LD<sub>50</sub>値10<sup>7.5</sup>）を得るに至った。

次にウイルスの不活化方法について検討した。ワクチンにはできるだけ化学物質を含ませないことが基本となる。そこでTCワクチンの不活化には、従来からヒト用、イヌ用ワクチンの不活化に使用されていた紫外線照射法を用いて行ったが、維持培地(199培地)の中に含まれるフェノールレッドの色が紫外線の照射を遮断し、従来の4,700  $\mu$ w/cm<sup>2</sup>の強度では、流速を1/2の速度(1分間に28ml)に落としても、不活化を十分に行うことができなかった。不活化に多くの時間を要することで、この方法は量産に不向きと考えた。

また、ホルマリンでは不活化に1ヶ月以上の日数を要することから、不活化時間が短く、しかも急速に加水分解され無害な物質になるとされているベータプロピオラクトンを、ウイルスの不活化剤に選び検討した。37℃に加温することで、ウイルスは45分で速やかに不活化され、HA価の失活も全く認められなかった。したがって、この方法を狂犬病ウイルスの不活化に用いることにした。



培養ウイルスそのものを不活化したワクチンでは未だ力価が低く、これをどのように濃縮・精製するかが、次の問題であった。各国のワクチンをみても、ポリエチレングリコール法<sup>42)</sup>、ゾーナル遠心法<sup>10, 14, 15, 32, 50, 77, 79)</sup>、限外濾過法<sup>1, 79)</sup>などの種々の方法が試みられている。

近藤はポリエチレングリコールで濃縮・精製しているが、無菌性と大量処理の問題からこの方法をやめ、日本脳炎ワクチンの濃縮・精製に使用していた限外濾過濃縮—超高速遠心法を組合わせて応用することで、無菌性および大量処理にも問題のない濃縮・精製法を確立、この問題を解決することができた。また、インフルエンザワクチンの精製に使用していた蔗糖密度勾配遠心法によっても、濃縮・精製が可能であったが、無菌性に問題があり、この方法による濃縮・精製の採用を見合わせた。

TCワクチンの開発・製品化において、次に解決しなければならなかった大きな問題点は、多大のロス（80%以上）を生じるということで、ポアサイズ0.45  $\mu\text{m}$  のメンブランフィルターによる、ウイルス浮遊液の除菌濾過ができないことであった。したがって、ニワトリ胚の取り出しから凍結乾燥までの全工程にわたって、神技ともいえる完全無菌作業を余儀なくされていた。

この原因は、狂犬病ウイルスが180nmと大きなウイルスであるからという、単なるメンブランフィルターのポアサイズとの関連からではなく、使用したメンブランフィルターの蛋白吸着作用に最大の原因があるのではないかと考え、

フィルターメーカー5社のサンプルを取りよせ、吸着ロスの度合いを比較検討した結果、ウイルス吸着作用のないメンブランフィルターを見つけることができた。これにより、濾過工程の導入が可能となったことは、TCワクチンの開発に大きな礎となった。

以上のような経緯を経て開発したTCワクチンについて、その安全性、効果等について、さらに検討を進めた。

本TCワクチン開発に使用した狂犬病ウイルス HEP Flury株は、ニワトリ胚に高度に継代、馴化したものであり、成熟マウス<sup>30)</sup> はもちろん、Arai<sup>6)</sup>によればヌードマウスおよび免疫抑制剤のCyclophosphamideで処理したマウスに対しても、これを致死させることはできないと報告しており、ウイルス自体の安全性も示唆されていた。

本TCワクチンは、蛋白窒素含量測定の結果、 $0.021\text{mg/ml}$ と従来のSMBワクチンの $1/20$ と少なく、マウスおよびラットを用いた急性毒性試験でも、 $LD_{50}$ 値は経口、皮下投与でマウス、ラットとも $120\text{ml/kg}$ 以上、静脈内投与でマウス $120\text{ml/kg}$ 以上、ラット $95\text{ml/kg}$ 以上であった。また、モルモットを用いたアナフィラキシー試験、サルに対する接種試験で、その安全性が極めて高いことが確認された。

経時安定性試験では、 $4^{\circ}\text{C}$ の保存で36ヶ月間品質に変化を認めず、 $37^{\circ}\text{C}$ の保存でも1～3ヶ月間は、力価の急激な低下がみられないなど、外部温度に対す

る安定性も確認され、熱帯地域の狂犬病常在地でのTCワクチン使用の可能性も示唆された。

動物を用いた試験でその安全性を確認した後、さらに、ヒトに対する安全性と中和抗体産生能、暴露前免疫における注射間隔の抗体産生に及ぼす影響、狂犬病発症阻止効果について詳細に検討を行った。

暴露前免疫（1 ml 3回）における注射局所の反応は、それぞれ発赤、腫脹、疼痛、かゆみが、わずかに見られたが、いずれの反応も一過性で注射後24～72時間には消失した。全身反応は、注射2回目および3回目に頭痛を認めたが、その出現もそれぞれ3%および7%と低く、また、その程度も軽く、注射後24時間には消失した。また、追加注射による反応の増強は認められなかった。

これらの成績は、フランス・メリュール研究所製のヒト2倍体細胞由来ワクチンを用いたKuwert<sup>45-47)</sup>、Andersonら<sup>2, 3)</sup>の報告と、ほぼ同じような成績であった。

しかし、Nicholsonら<sup>61)</sup>の報告によると、同じくヒト2倍体細胞由来ワクチンを用いた実験で、皮下ルートによる追加注射では、しばしば疼痛を伴ったこと、また、皮内ルートでは、注射部位の発赤が実に91%に達したと報告している。また、ニワトリ胚由来ワクチンを用いた実験<sup>60)</sup>でも、皮内ルートでは疼痛は少ないが、発赤、腫脹、かゆみが増強したと報告している。

皮内注射による副反応の出現率の高い報告は、Cox<sup>20)</sup>、Aokiら<sup>5)</sup>も報告して

おり、効果的な皮内ルートも、今後、多少の議論を呼びそうである。

これらの成績を総合的に見てみると、本TCワクチンの注射局所および全身反応は、現在欧米で実用化されているヒト2倍体細胞由来ワクチンにくらべて、同程度あるいは、むしろ軽いものと思われる。

狂犬病中和抗体価の測定法に関して、マウス法<sup>28, 67)</sup>、ブラック法<sup>60, 83, 84, 95)</sup>、HADブラック法<sup>75)</sup>、HAD<sup>-</sup>ブラック法<sup>57)</sup>、HI試験<sup>51)</sup>、酵素抗体法<sup>8, 9, 27, 52)</sup>、免疫電気泳動法<sup>23)</sup>、蛍光抗体法<sup>67, 76)</sup>、BAP法<sup>73)</sup>など、種々の研究がなされているが、本実験には、WHO報告に記載されているマウス中和試験法<sup>7)</sup>を応用した。

抗体は2回目の注射から2週後に最高値（平均抗体価27倍）に達し、以後6ヶ月持続した。3回目注射後は抗体の上昇は速やかで、1週後に最高値（平均抗体価125倍）に達しており、以後6ヶ月持続した。抗体陰性期に追加注射を行った場合、1週後より抗体の産生を認め、2週後に最高値（平均抗体価98倍）に達し、明かにブースター効果が認められた。

また、連続注射を行った者についての試験では、6回目の注射により3日目に既に21倍の抗体価を示したことは、暴露後免疫における基礎免疫の重要性が示されたといえよう。

暴露前免疫における注射間隔（2週間、3週間、4週間）の違いによる抗体産生では、2週間隔－3週間隔－4週間隔の順で高い値を示した。Kuvertら<sup>46)</sup>

も、暴露前免疫における注射間隔について検討しており、4週間隔3回注射が勝れていると報告している。また、近藤（日本短波放送・放送内容集、1980）も4週間隔を推奨しており、これらの成績と合わせて、少なくとも暴露前免疫時の注射間隔は、4週をおいた方が効果的であるといえよう。

抗体の持続期間に関しては、Kuwertら<sup>45, 46)</sup>は4週間隔3回注射で、少なくとも18ヶ月間持続したこと、同じく0日、3日、7日、14日、30日、90日の計6回注射（暴露後免疫）で、ワクチン開始後745日間持続したと報告している。本TCワクチンの場合も、3回目注射後21ヶ月（630日）間も50%の者に11~14倍の抗体価を維持していたこと、2回の追加注射後16ヶ月（480日）間も平均抗体価12倍（7~19倍）を維持していたことは、これらヒト2倍体細胞由来ワクチンと比較して、同程度の免疫原性を有しているといえよう。

ワクチンによる狂犬病発症防御機序は、未だ十分解明されていないが、ワクチン投与により生体にはマクロファージ活性化、リンパ球感作、インターフェロン産生および抗体産生等の生体応答が考えられている。三舟らとともにマウスを用いたワクチンの狂犬病発症防御機序の解明<sup>54~56)</sup>では、ウイルス感染前に抗体を移入した場合、低い抗体レベルでも安全に発症を防御すること、また、発症防御の主役はIgGであり、IgM抗体には発症阻止能力がほとんどないことが判明した。さらに、本TCワクチン投与により、インターフェロンが早期に誘発されることを経験した。

Sikesら<sup>74)</sup> は、感染防御に抗体が重要な役割を果たしていること、Baerら<sup>12, 13)</sup>, Wiktorら<sup>87)</sup> は、発症阻止にインターフェロンの重要性を報告しており、狂犬病の感染・発症防御に、本TCワクチンを用いることの有用性が示唆されているといえよう。

事実、今回の実験の中で、1 ml 3回の暴露前免疫を終了した海外青年協力隊員 2,447名のうち2名が、その後、真性狂犬病動物に噛まれながら、いずれも発症を免れていること、海外で狂犬病の疑いがある動物に噛まれたヒト17名に、TCワクチンを投与して全員が発症を免れたことは、狂犬病の予防に、事前に免疫を与えることの重要性と同時に、狂犬病ウイルス暴露後に本TCワクチンを投与しても、狂犬病の発症を阻止することが可能であることを物語っている。

しかしながら、近年、モノクローナル抗体を用いた狂犬病ウイルスの抗原分析が行われるようになり<sup>17, 18, 20, 35)</sup>、野外株と弱毒固定株との間に抗原的に差があることが報告されてきている。

本ワクチン開発で使用した狂犬病ウイルス HEP Flury株について、広くワクチン株として使用されているPasteur株 (PV) と力価試験の攻撃用ウイルスである CVS株、さらに弱毒固定株である ERA株とのウイルスG蛋白アミノ酸のホモロジー解析が、京都大学のMorimotoら<sup>58)</sup> によって報告されている。

彼らによると、HEP Flury株のG蛋白cDNAの塩基配列は、PV株、CVS株およびERA株のそれらと比較して、アミノ酸レベルで90%以上のホモロジーを示して

いたと報告している。このことは、本TCワクチンに使用したウイルスが、これらの弱毒株に対して、それほど変異は起こしていないということがいえる。しかし、狂犬病の発症を100%阻止することが目的であるワクチンの開発におけるウイルス株の改良にあたっては、このウイルスの変異性について十分注意を払っていくことが重要といえよう。

現在、WHOで認められている組織培養狂犬病ワクチンには、ヒト2倍体細胞ワクチン、ウシ胎児腎臓細胞ワクチン、イヌ腎臓細胞ワクチンおよびニワトリ胚細胞ワクチンがある(W. H. O. Report, 1980)が、いずれも濃縮を余儀なくされ、ワクチンのコスト高がネックとなり、狂犬病常在地である発展途上国へのTCワクチンの供給が非常に困難を強いられている。

これらの問題を解決するために、外国では細胞培養面積を多くしてウイルスの収量を上げる、ビーズ培養法<sup>81, 82)</sup>によるワクチンの製造も検討されている。経口投与による生ワクチンの研究が動物<sup>11, 21, 22, 78, 88~90)</sup>では行われているが、人体への応用は未だ確立されていない。

近年、狂犬病ウイルスの感染防御抗原に関する研究<sup>4, 19, 24~26, 48, 49, 66, 71)</sup>が盛んに行われ、Glycoprotein(G蛋白)に感染防御能があることが判明、そのアミノ酸配列も解明<sup>4, 36, 66, 92)</sup>されてきている。したがって、ワクチンの大幅なコスト低減が期待される遺伝子組換え<sup>36, 65, 66, 68, 71, 86, 92)</sup>による第2世代ワクチンの実用化も、そう遠くはないかもしれない。

ワクチンの使用方法に関して、WHOでは狂犬病ウイルス暴露前のワクチン投与方法として、1ヶ月間隔で2回、さらに6ヶ月後1回の計3回、1 mlを皮下注射すること、また、狂犬病ウイルス暴露後は、できるだけ速やかにワクチン注射を開始し、その第1回目を0日とし、以後3、7、14、30、90日の計6回、1 mlを皮下注射するように推奨している。今回開発した乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチンは、力価およびヒトにおける中和抗体産生能試験の成績から、WHOの推奨するワクチン投与方法にも十分対応できるものと判断された。



我が国におけるニワトリ胚由来の乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチンの実用化を図るため、国立予防衛生研究所の技術指導のもとに、1974年以来TCワクチンの開発のための実験を重ね、有効性については従来の哺乳マウス脳由来の不活化狂犬病ワクチン基準を十分に満足し、副作用の危険性を遙かに低減するTCワクチンの製品化に成功し、次のような成績を得た。

1. ワクチン調製法に関する基礎的研究

1) CE細胞調製法の比較実験では、従来のピペッティングによる細胞分散法と、マグネチック・スターラーを用いた室温20分間2回および4℃60分間の細胞分散法との間に差は認められず、いずれの細胞分散法を用いても、細胞調製が可能であることがわかった。

2) HEP Flury 狂犬病ウイルス株を、ニワトリ胚細胞に接種し35℃で培養した場合、維持培地のpHを7.8～8.0に維持することで、単層細胞の維持も良く、ウイルスは接種後6日に最高値( $10^{7.0} \sim 10^{7.5}$  LD<sub>50</sub>/ml, HA価32～128倍)を示した。この成績より、ウイルス採取時期をウイルス接種後6日とした。

3) 狂犬病ウイルスの不活化は、ベータープロピオラクトンを0.02<sup>v</sup>/v%になるように添加し、37℃の温浴中に45分間おくことで完全に不活化されたが、ワクチンの安全性を考慮し、さらに1回、同一操作を繰り返し実施した。

4) ウイルス吸着作用のないG社製メンブランフィルターを用いることにより、濾過によるウイルスのロスを防止することが可能となり、ワクチン調製工程中にウイルス浮遊液の除菌濾過工程を導入することができた。

5) 限外濾過－超高速遠心法により調製したTCワクチンの平均蛋白窒素含量は、 $0.021\text{mg/ml}$ であり従来のSMBワクチンの約 $1/20$ であった。また、蔗糖密度勾配遠心法により調製したワクチンの平均蛋白窒素含量は、 $0.007\text{mg/ml}$ であり、限外濾過－超高速遠心法で調製したワクチンの $1/3$ 量を示したが、無菌性に問題があることから、ウイルス浮遊液の濃縮・精製には、限外濾過－超高速遠心法を採用した。ワクチンのロット間に蛋白窒素含量のバラツキを認めたが、棄却検定の結果、異常値は認められなかった。

6) TCワクチンの力価はHabel指数で $10^{4.64} \sim 10^{5.75}$ 、Antigenic value(A.V.)で $1.0 \sim 13.2$ を示し、いずれも基準に適合した。ワクチンの力価と蛋白窒素含量とに相関は認められなかった(相関係数 $r=-0.036$ )。

7) TCワクチンを $4^{\circ}\text{C}$ の恒温室に保存した場合、36ヶ月間全ての項目(外観、含湿度、水素イオン濃度、無菌性、異常毒性および力価)において変化は認められなかった。

$37^{\circ}\text{C}$ の恒温室に保存した場合、6ヶ月より若干の力価の低下が認められたが、36ヶ月でもなお従来のSMBワクチンの力価試験の基準に適合する成績であった。力価試験以外の全ての項目(外観、水素イオン濃度、異常毒性)において変化

は認められず、TCワクチンの外部温度に対する安定性が確認された。

## 2. ワクチンの安全性と抗原性

1) TCワクチンのマウスおよびラットにおける急性毒性を、SMBワクチンを対照として比較検討した結果、TCワクチンをマウスおよびラットに投与可能な最大量（マウス静脈内、経口投与および皮下投与で  $120\text{ml}/\text{kg}$ 、ラットの静脈内投与で  $95\text{ml}/\text{kg}$ 、経口および皮下投与で  $120\text{ml}/\text{kg}$ ）を投与したが、致死動物は見られず、したがって  $\text{LD}_{50}$  値を算出することはできなかった。また、いずれの投与量においても毒性を示すような所見は全く認められなかった。

対照として用いた SMBワクチンでは、経口および皮下投与の場合、投与可能な最大量を投与したが致死動物は見られず、 $\text{LD}_{50}$  値を算出することはできなかったが、静脈内投与では、マウスの場合  $20\text{ml}/\text{kg}$  より致死動物が見られ、 $\text{LD}_{50}$  値では雄で  $30\text{ml}/\text{kg}$ 、雌で  $29\text{ml}/\text{kg}$  であり、ラットの場合は  $16\text{ml}/\text{kg}$  より致死動物が見られ、 $\text{LD}_{50}$  は雄で  $23.3\text{ml}/\text{kg}$ 、雌で  $21.5\text{ml}/\text{kg}$  であり、TCワクチンの安全性が示唆された。また、いずれの動物においても性差は認められなかった。

2) TCワクチンの抗原性を検討するためのモルモットを用いた全身性アナフィラキシー試験では、TCワクチンについては全例陰性であった。対照として用いた SMBワクチンでは、皮下惹起注射の場合、全例陰性であったが、静脈内注射の場合、4匹中3匹が軽度のアナフィラキシー症状を示し、TCワクチンのアレルギー原性の低さが認められた。

3) TCワクチンのサルに対する安全性と中和抗体産生能に関する試験では、TCワクチンに8頭のサルの胸部皮下に1 mlずつ連続10回注射し、局所および全身反応について3ヶ月間観察したが、注射局所および全身反応に全く異常は認められなかった。同時に血中中和抗体価をマウス中和試験法で測定した結果、初回注射後5日目で8頭中1頭(12.5%)が10倍の抗体価を示し、10日目では全例が抗体陽性となり、平均抗体価は33倍であった。以後、高い抗体価の上昇持続が認められ、最終試験日の35日目には1,770倍に達し、TCワクチンのサルに対する安全性と、良好な中和抗体産生能が確認された。

### 3. ヒトに対する安全性と中和抗体産生能

TCワクチンのヒトに対する安全性と中和抗体産生能について、当研究所成人男子14名、女子21名、計35名の志願者にTCワクチン1 mlを1回量として、2週間隔、3週間隔および4週間隔でそれぞれ2回注射し、6ヶ月後および1年4ヶ月後に3回目を注射、さらに適当な間隔をおいて追加注射を行い、局所反応および全身反応を観察するとともに、中和抗体の産生と持続について検討した結果、人おける安全性では、1回の注射で局所の発赤9%(3/35)、腫脹6%(2/35)、疼痛23%(8/35)、かゆみ6%(2/35)、2回目の注射では局所の発赤31%(11/35)、腫脹3%(1/35)、疼痛20%(7/35)、かゆみ17%(6/35)、3回目の注射では局所の発赤7%(1/15)、腫脹13%(2/15)、疼痛7%(1/15)、かゆみ7%(1/15)が認められたが、いずれの反応も一過性で注射後24~72時間には消失し

た。

全身反応は2回目の注射で頭痛3%(1/35), 3回目の注射では7%(1/15)を認めたが, その程度は軽く注射後24時間には消失した。その他の局所反応, 全身反応は認められなかった。また, 追加注射による反応の増強は認められなかった。

さらに, 国際協力事業団・海外青年協力隊員 2,447名に行った暴露前免疫に関する調査では, 局所の発赤, 腫脹を認めたものが27名(1.1%), 注射部位の疼痛8名(0.3%), 全身症状として37℃台の発熱6名(0.2%)を認めた程度であった。

中和抗体の産生と持続期間に関しては, 抗体は2回目注射後2週で最高値(平均抗体価27倍・抗体陽性率90%)に達し, 以後6ヶ月間持続した。3回目注射後は抗体の上昇は早く, 1週で最高値(平均抗体価125倍・抗体陽性率100%)に達し, 以後6ヶ月間持続した。さらに抗体陰性期に1mlの追加注射を行ったところ, 1週より抗体の産生を認め, 2週で最高値(平均抗体価98倍・抗体陽性率100%)に達し, 明らかにブースター効果が認められた。

初回注射間隔の違いによる抗体産生を比較したところ, 4週間隔が一番高い値を示したことから, 暴露前免疫における初回注射間隔を4週間とした。

狂犬病ウイルス暴露後の治療効果について, 海外で狂犬病あるいはその疑いのある動物(イヌ, サル)の咬傷を受けた17名に対して, TCワクチン注射を行

った結果、全員が発症を免れ、本TCワクチンの暴露後治療効果が実証された。

今回開発した乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチンは、蛋白窒素含量が0.021mg/mlと少なく、一般のワクチンに含まれるような防腐剤（ホルマリン、チメロサルなど）を含んでおらず、脳組織を用いた従来のワクチンとくらべて、マウスおよびラットを用いた毒性試験、モルモットを用いたアナフィラキシー試験、サルおよびヒトに対する接種試験で、その安全性と有効性が極めて高いことが確認された。

本TCワクチンは凍結乾燥品であるため、4℃および37℃における経時安定性も良く、狂犬病発生の多い熱帯地方での使用も十分可能な成績が得られた。

1885年、Pasteurのウサギ脊髄乾燥減毒ワクチンに始まる狂犬病ワクチン開発の長い歴史の中で、副反応が少なく、狂犬病発症阻止効果の高い、新しいタイプのワクチン（組織培養ワクチン）を開発することができた。

稿を終るに臨み、本研究について懇切なる御校閲を賜りました麻布大学教授田淵清博士，同清水武彦博士ならびに同小西信一郎博士に対して心から感謝の意を表しますとともに，多くの御助言を賜りました国立予防衛生研究所ウイルス・リケッチア部ウイルス第2室長故近藤昭博士，人に対するワクチンの安全性と効果に関する資料を御提供いただきました東京大学医科学研究所附属病院院長故大谷杉士博士に衷心より感謝の意を表します。

また，本研究の機会を与えて下さいました(株)化学及血清療法研究所所長野中実男博士および終始御指導をいただきました同研究所理事山田昭博士，江藤正信博士に深謝いたします。

尚，本研究の遂行に御協力いただきました(株)化学及血清療法研究所第一製造部第二課の各位に深謝いたします。

## VII 参 考 文 献

- 1) Aaslestad, H.G. and Wiktor, T.J. : Recovery of protective activity in rabies virus vaccines concentrated and purified by four different methods. *Appl. Microbiol.*, 24 : 37-43, 1972.
- 2) Anderson, L.J., Sikes, R.K., Langkop, C.W., Mann, J.M., Smith, J.S., Winkler, W.G., and Deitch, M.W. : Post-exposure trial of a human diploid cell strain rabies vaccine. *J. Infect. Dis.*, 142 : 133-138, 1980.
- 3) Anderson, L.T., Winkler, W.G., Hafkin, B., and Keenlyside, R.A. : Clinical experience with a human diploid cell rabies vaccine. *JAMA*, 244 : 781-784, 1980.
- 4) Anilionis, A., Wunner, W.H., and Curtis, P.J. : Structure of the glycoprotein gene in rabies virus. *Nature*, 294 : 275-277, 1981.
- 5) Aoki, F.Y., Tyrrell, D.A.J., and Hill, L.E. : Immunogenicity and acceptability of a human diploid cell culture rabies vaccine in volunteers. *Lancet*, 22 : 660-662, 1975.
- 6) Arai, Y. : Virulence of chick embryo fibroblast passaged Flury HEP rabies virus and its revertants in mice. *Microbiol. Immunol.*, 29 : 811-823, 1985.
- 7) Atanasiu, P. : Quantitative assay and potency test of antirabies serum and



immunoglobulin. Laboratory techniques in rabies. Geneva, W.H.O. : 314-318, 1973.

- 8) Atanasiu, P. and Perrin, P. : Micromethod for rabies antibody detected by immunoenzymatic assay with staphylococcus protein A. *Ann. Microbiol.*, 130 : 257-268, 1979.
- 9) Atanasiu, P., Savy, V., and Gibert, C. : Rapid immunoenzymatic technique for titration of rabies antibodies IgG and IgM results. *Med. Microbiol. Immunol.*, 166 : 201-208, 1978.
- 10) Atanasiu, P., Tsiang, H., Reculard, P., Aguilon, F., Lavergne, M., and Adamovicz, Ph. : Zonal centrifuge purification of human rabies vaccine obtained on bovine fetal kidney cells. Joint W.H.O./ IABS symposium on the standardization of rabies vaccines for human use produced in tissue cultures (Rabies III), Marburg/Lahn 1977. *Develop. Biol. Standard.*, 40 : 35-44, 1978.
- 11) Baer, G.M., Abelseth, M.K., and Debbie, J.G. : Oral vaccination of foxes against rabies. *Am. J. Epidemiol.*, 93 : 487-490, 1970.
- 12) Baer, G.M., Shaddock, J.H., Moor, S.A., Yager, P.A., Baron, S.S., and Levy, H.B. : Successful prophylaxis against rabies in mice and rhesus monkeys. The interferon system and vaccine. *J. Infect. Dis.*, 136 : 286-291, 1977.

- 13) Baer, G.M. and Yager, P.A. : A mouse model for post-exposure rabies prophylaxis. The comparative efficacy of two vaccines and of antiserum administration. *J. Gen. Virol.*, 36 : 51-58, 1977.
- 14) Barth, R., Gruschkau, H., Bijok, U., Hilfenbaus, J., Hinz, J., Milcke, L., Moser, H., Jaeger, O., Ronneberger, H., and Weinmann, E. : A new inactivated tissue culture rabies vaccine for use in man. Evaluation of PCEC vaccine by laboratory test. *J. Biol. Standard.*, 12 : 29-46, 1984.
- 15) Barth, R., Gruschkau, H., Jaeger, O., Milcke, L., and Weinmann, E. : Purified chick embryo cell rabies vaccine for human use. *Behring Inst. Mitt.*, 76 : 142-154, 1984.
- 16) Bogel, K. and Motschwiller, E. : Incidence of rabies and post-exposure treatment in developing countries. *Bull. W.H.O.*, 64 : 883-887, 1986.
- 17) Coulon, P., Rollin, P., Aubert, M., and Flamand, A. : Molecular basis of rabies virus virulence. I. Selection of avirulent mutants of the CVS strain with anti-G monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.*, 61 : 97-100, 1982.
- 18) Coulon, P., Rollin, P., and Flamand, A. : Molecular basis of rabies virulence. II. Identification of a site on the CVS glycoprotein associated with virulence. *J. Gen. Virol.*, 64 : 693-696, 1983.

- 19) Cox, J.H., Dietzschold, B., and Schneider, L.G. : Rabies virus glycoprotein. *Infect. Immun.*, 16 : 754-759, 1977.
- 20) Cox, J.H. and Schneider, L.G. : Prophylactic immunization of humans against rabies by intradermal inoculation of human diploid cell culture vaccine. *J. Clin. Microbiol.*, 3 : 96-101, 1976.
- 21) Debbie, J.G. : Use of inoculated eggs as a vehicle for the oral rabies vaccination of red foxes. *Infect. Immun.*, 9 : 681-683, 1974.
- 22) Debbie, J.G., Abelseth, M.K., and Baer, G.M. : The use of commercially available vaccines for the oral vaccination of foxes against rabies. *Am. J. Epidemiol.*, 96 : 231-235, 1972.
- 23) Diaz, A.M. and Myeres, D.M. : Determination of serum neutralization antibodies to rabies virus by a modified counter-immunoelectrophoresis test. *J. Clin. Microbiol.*, 12 : 175-179, 1980.
- 24) Dietzschold, B., Cox, J.H., and Schneider, G. : Structure and function of rabies virus glycoprotein. *Develop. Biol. Standard.*, 40 : 45-55, 1978.
- 25) Dietzschold, B., Wiktor, T.J., Wunner, W.H., and Varrichio, A. : Chemical and immunological analysis of the rabies soluble glycoprotein. *Virology*, 124 : 330-337, 1983.

- 26) Dietzschold, B., Wunner, W.H., Lopes, A.D., Smith, C.L., and Koprowski, H. : Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80 : 70-74, 1983.
- 27) Engvall, E. and Perlmann, P. : Enzyme-linked immunosorbent assay ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. J. Immunol., 109 : 129-135, 1972.
- 28) Fitzgerald, E., Cabasso, J.S., Smith, J.S., and Rastogi, S.C. : A collaborative study on the testing of rabies immune globulin by the mouse neutralization test and the rapid fluorescent focus inhibition test. J. Biol. Standard., 7 : 67-72, 1979.
- 29) Flamand, A., Wiktor, T.J., and Koprowski, H. : Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies-related virus proteins. J. Gen. Virol., 48 : 105-109, 1980.
- 30) Gorski, J., Kozicki, J., and Gorska, C. : Preliminary evaluation of pathogenic and immunogenic properties of the Flury LEP and HEP strains of rabies virus multiplied in chick embryo fibroblasts. Acta Microbiol. Pol. Ser. A., 6 : 123-130, 1974.

- 31) Habel, K. : Modified Habel for potency. Laboratory techniques in rabies. Geneva, W.H.O. : 278, 1973.
- 32) Hilfenhaus, J., Kohler, R., Barth, R., Majer, M., and Muler, R. : Large scale purification of animal viruses in the RK model zonal ultracentrifuge. J. Biol. Standard., 4 : 263-271, 1976.
- 33) 岩淵秀夫 : 世界における狂犬病の流行と防疫. 北里メデイカルニュース, 197 : 1-19, 1970.
- 34) 岩淵秀夫 : 狂犬病の流行と予防の変遷. 日本獣医師会雑誌, 23 : 367-376, 1970.
- 35) Kaplan, M.M. and Koprowski, H. : Rabies. Sci. Am., 3 : 90-93, 1980.
- 36) Kieny, M.P., Lathe, R., Drillien, R., Spehner, D., Skory, S., Schmitt, D., Wiktor, T.J., Koprowski, H., and Lecocq, J.P. : Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. Nature, 312 : 163, 1984.
- 37) Kissling, R.E. and Reese D.R. : Anti rabies vaccine of tissue culture origin. J. Immunol., 91 : 362-368, 1963.
- 38) Kondo, A. : Growth characteristics of rabies virus in primary chick embryo cells. Virology, 27 : 199-204, 1965.
- 39) 近藤昭 : 狂犬病組織培養ワクチンの抗原性. 臨床とウイルス, 3 : 19-24, 1975.

- 40) 近藤昭 : 狂犬病ワクチン. 最新医学, 32 : 1,673-1,678, 1977.
- 41) 近藤昭 : 世界の狂犬病とその対策について. 食品衛生研究, 32 : 863-873, 1982.
- 42) Kondo, A. : Pre-immunization and post-exposure treatment with inactivated rabies vaccine of chick embryo cell culture origin. Joint W.H.O./IABS symposium on the standardization of rabies vaccines for human use produced in tissue cultures(RabiesIII), Marburg/Lahn 1977. Develop. Biol. Standard., 40 : 147-153, 1978.
- 43) Kondo, A., Takashima, Y., and Suzuki, M. : Inactivated rabies vaccine of chick embryo cell culture origin. Symp. Series Immunol. Standard., 21:182-189, 1974.
- 44) 黒川正身 : バイオアッセー, 生物定量法, その医学生物学領域での適用. 近代出版 : 132-149, 1978.
- 45) Kuwert, E.K., Marcus, A., Helm, E.B., Wiktor, T.J., and Koprowski, H. : Post-exposure use of human diploid cell culture rabies vaccine. Zentralbl. Bakteri-ol. Parasitenk. Infektionskr. Abt. I. Orig., 239 : 437-458, 1977.
- 46) Kuwert, E.K, Marcus, I., and Hoher, P.G. : Neutralizing and complement-fixing antibody response in pre-and post-exposure vaccinees to a rabies vaccine produced in human diploid cell. J. Biol. Standard., 4 : 249-292, 1976.

- 47) Kuwert, E.K., Marcus, I., Hoher, P.G., Werner, J., Iwand, A., and Helm, E.B.: Immunogenität, Wirksamkeit und Verträglichkeit einer Tollwutgewebekulturvaccine(HDCS-Impfstoff) beim Menschen. Med. Kli., 72 : 797-805, 1977.
- 48) Lafon, M., Wiktor, T.J., and MacFarlan, R.I. : Antigenic sites on the CVS rabies virus glycoprotein. Analysis with monoclonal antibodies. J. Gen. Virol., 64 : 843-851, 1983.
- 49) Lai, C.Y. and Dietzschold, B. : Amino acid composition and terminal sequence analysis of the rabies virus glycoprotein. Biochem. Biophys. Res. Commun., 103 : 536-542, 1981.
- 50) Lavender, J.F. and van Frank, R.M. : Zonal centrifuged purified duck embryo cell culture rabies vaccine for human vaccination. Appl. Microbiol., 22 : 358-365, 1971.
- 51) Mannen, K., Ishikawa, K., Tachibana, J., and Mifune, K. : Method of increasing the sensitivity of the haemagglutination inhibition test for rabies virus antibody. Bull. W.H.O., 62 : 883-892, 1984.
- 52) Mannen, K., Mifune, K., Sanden, F.L.R., Smith, J.S., Yager, P.A., Sumner, J.W. Fishbein, D.B., Tong, T.C., and Baer, G.M. : Microneutralization test for rabies virus based on an enzyme immunoassay. J. Clin. Microbiol., 25 : 2,440-

- 2,442, 1987.
- 53) 松本清一 : 狂犬病ウイルス研究の現状. モダンメディア, 24 : 16-22, 1978.
- 54) 三船求真人, 七条明久, 牧野芳大, 竹内恵理子, 山田昭, 坂本国昭 : 狂犬病の発症  
機転と生体防御. 第3回阿蘇シンポジウム記録, 南山堂 : 136-147, 1979.
- 55) Mifune, K., Shichijo, A., Makino, Y., Takeuchi, E., Yamada, A., and Sakamoto,  
K. : A mouse model for the pathogenesis and post-exposure prophylaxis of  
rabies. Microbiol. Immunol., 24 : 835-845, 1980.
- 56) Mifune, K., Takeuchi, E., Napiorkowski, P.A., Yamada, A., and Sakamoto, K. :  
Essential role of T cells in the post-exposure prophylaxis of rabies in mice.  
Microbiol. Immunol., 25 : 895-904, 1981.
- 57) Minamoto, N., Kurata, K., Kaizuka, I., and Sazawa, H. : Use of the hemadsor-  
ption phenomenon for determining virus and neutralizing antibody titers of  
rabies. Infect. Immun., 13 : 1,454-1,458, 1976.
- 58) Morimoto, K., Okubo, A., and Kawai, A. : Structure and transcription of  
the glycoprotein gene of attenuated HEP-Flury strain of rabies virus. Virolo-  
gy, 173 : 465-477, 1989.
- 59) Murphy, F.A. : Rabies pathogenesis. Brief review. Arch. Virol., 54 : 279-297,  
1977.



- 60) Nicholson, K.G., Farrow, P.R., Bijok, U., and Barth, R. : Pre-exposure studies with purified chick embryo cell culture rabies vaccine and human diploid cell vaccine. *Vaccine*, 5 : 208-210, 1987.
- 61) Nicholson, K.G., Turner, G.S., and Aoki, F.Y. : Immunization with a human diploid cell strain of rabies virus vaccine. Two-year results. *J. Infect. Dis.*, 137 : 783-788, 1978.
- 62) 大谷杉士 : 狂犬病ワクチン. *臨床と微生物*, 12 : 541-548, 1985.
- 63) Peck, F.B., Powell, H.M., and Culberston, C.G. : A new antirabies vaccine for human use. Clinical and laboratory results using rabies vaccine made from embryonated duck eggs. *J. Lab. Clin. Med.*, 45 : 679-683, 1955.
- 64) Petrovic, M. and Timm, H. : Experimentelle Beitrag zur Pathogenese der Tollwut. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Abt. I. Orig.*, 211 : 149-161, 1969.
- 65) Prehaud, C., Coulon, P., Lafay, F., Thiers, C., and Flamand, A. : Antigenic site II of the rabies virus glycoprotein. Structure and role in viral virulence. *J. Virol.*, 62 : 1-7, 1988.
- 66) Prehaud, C., Takehara, K., Flamand, A., and Bishop, D.L. : Immunogenic and protective properties of rabies virus glycoprotein expressed by baculovirus

- vectors. *Virology*, 173 : 390-399, 1989.
- 67) Rosanoff, E.I. : The potency of rabies vaccines as determined by the induction of antibody in mice. *J. Biol. Standard.*, 7 : 1-7, 1979.
- 68) Rupprecht, C.E., Wiktor, T.J., Johnston, D.M., Hamir, A.N., Dietzschold, B., Wunner, W.H., Glickman, L.T., and Koprowsky, H. : Oral immunization and protection of raccoons with a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 : 7,947-7,950, 1986.
- 69) Salaun, J.J. : Etude du virus rabique par la methode des plages. *Ann. Biol. Clin.*, 36 : 23-25, 1978.
- 70) Schneider, L.G. : Die Pathogenese der Tollwut bei der Maus. I. Die Virusausbreitung vom Infektionsort zum Zentralnervensystem. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Abt. I. Orig.*, 211 : 281-308, 1969.
- 71) Seif, I., Coulon, P., Rollin, P.E., and Flamand, A. : Rabies virulence. Effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. *J. Virol.*, 53 : 926-934, 1985.
- 72) Seligmann, E.B. : The NIH test for potency. *Laboratory techniques in rabies*. Geneva, W.H.O. : 279-286, 1973.

- 73) Shichijo, A., Mifune, K., Sakamoto, K., and Yamada, A. : Sensitivity of the BIOTIN-AVIDIN-PEROXIDASE technique for rabies virus neutralizing antibody assay and the measurement of neutralizing antibodies of vaccinated human sera. Japan J. Trop. Med. Hyg., 11 : 217-224, 1983.
- 74) Sikes, R.K., Cleary, W.F., Koprowski, H., Wiktor, T.J., and Kaplan, M.M. : Effective protection of monkeys against death from street virus by post-exposure administration of tissue culture rabies vaccine. Bull. W.H.O., 45 : 1-11, 1971.
- 75) Smith, A.L., Tignor, G.H., Mifune, K., and Motohashi, T. : Isolation and assay of rabies serogroup viruses in CER cells. Intervirology, 8 : 92-99, 1977.
- 76) Smith, J.S., Yager, P.A., and Baer, G.M. : A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. Bull. W.H.O., 48 : 535-541, 1973.
- 77) Sokol, F., Kuwert, E., Wiktor, T.J., Hummeler, K., and Koprowski, H. : Purification of rabies virus grown in tissue culture. J. Virol., 2 : 836-849, 1968.
- 78) Steck, F., Wandeler, A., Bichsel, P., Capt, S., Hafliger, U., and Schneider, L.G. : Oral immunization of foxes against rabies. Comp. Immunol. Microbiol.

Infect. Dis., 5 : 165, 1982.

- 79) Sureau, P., Rollin, P., and Loucq, C. : De la immunitaire humorale au vaccin rabique purifie pasteur apres traitement post-exposition. Ann. Virol., 135 : 277-284, 1984.
- 80) 津田恭介, 野上寿 : 医薬品開発基礎講座V, 薬効の評価(2), 前臨床試験および臨床薬理試験, 地人書館 : 67-79, 1973.
- 81) van Wezel, A.L. and van Steenis, G. : Production of an inactivated rabies vaccine in primary dog kidney cells. Develop. Biol. Standard., 40 : 69-75, 1978.
- 82) van Wezel, A.L., van Steenis, G., and Hannik, C.A. : New approach to the production of concentrated and purified inactivated polio and rabies tissue culture vaccines. Develop. Biol. Standard., 41 : 159-168, 1978.
- 83) Wiktor, T.J. and Clark, H. : Application of the plaque assay technique to the study of rabies virus neutralizing antibody interactions. Ann. Microbiol., 124 : 271-282, 1973.
- 84) Wiktor, T.J. and Clark, H. : Comparison of rabies virus strains by means of the plaque reduction test. Ann. Microbiol., 124 : 283-287, 1973.
- 85) Wiktor, T.J. and Koprowski, H. : Successful immunization of primates with

- rabies vaccine prepared in human diploid cell strain WI-38. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 118 : 1,069-1,073, 1965.
- 86) Wiktor, T.J., MacFarlan, R.I., Reagan, K.J., Dietzschold, B., Curtis, P.J., Wunner, W.H., Kiney, M.P., Lathe, R., Lecocq, J.P., Mackett, M., Moss, B., and Koprowski, H. : Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 : 7,194-7,198, 1984.
- 87) Wiktor, T.J., Postec, B., Ho, M., and Koprowski, H. : Role of interferon induction in the protective activity of rabies vaccine. *J. Infect. Dis.*, 126 : 408-418, 1972.
- 88) Winkler, W.G. and Baer, G.M. : Rabies immunization of red foxes with vaccine in sausage baits. *Am. J. Epidemiol.*, 103 : 408-415, 1976.
- 89) Winkler, W.G., Mclean, R.G., and Cowart, J.C. : Vaccination of foxes against rabies using ingested baits. *J. Wildl. Dis.*, 11 : 382-388, 1975.
- 90) Winkler, W.G., Shaddok, J.H., and Williams, L. : Oral rabies vaccine. Evaluation of its infectivity in three species of rodents. *Am. J. Epidemiol.*, 104 : 294-298, 1976.
- 91) 屋部憲清, 吉田紀彦, 小池生夫 : インドネシアにおける狂犬病. *食品衛生研究*, 32

: 847-861, 1982.

- 92) Yelverton, E., Narton, S., Obijeski, J.F., and Goeddel, D.V. : Rabies virus glycoprotein analogs. Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Science*, 29 : 614-620, 1983.
- 93) 横田強 : 狂犬病の予防. *モダンメディア*, 27 : 20-26, 1981.
- 94) Yoshino, K., Kishie, T., Hashimoto, M., and Yanagi, K. : Effect of alkaline maintenance medium upon the growth of rabies virus in chick embryo cells *Arch. Virol.*, 47 : 31-38, 1975.
- 95) Yoshino, K. and Morishima, T. : An improvement in the plaque assay of rabies virus in chick embryo cells. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 34 : 40-50, 1971.
- 96) Yoshino, K., Suzuki, M., and Kondo, A. : Infection of the one-day old fertile hen's egg with rabies virus. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 10 : 698-711, 1960.

Table 1. Pathogenic agents in hen diseases and examination schedule

Pathogenic agents	Examination schedule and number of animals examined				Test ** used	Remarks
	1st exam.		2nd and subsequent exam.			
	Time of exam.	Percent-age of animals examined	Time of exam.	Percent-age of animals examined		
Newcastle disease virus	8-12 weeks of age	20	Every 3 months	10	HI	All animals including positive and inmate groups sacrificed. #
Avian infectious bronchitis virus	"	"	"	"	AGP	"
Avian leukosis virus (subgroup A,B)	"	"	"	"	SN	"
Avian encephalomyelitis virus	"	"	"	"	AGP	"
Infectious laryngotracheitis virus	"	"	"	"	AGP	"
Reticuloendotheliosis virus	"	"	"	"	AGP	"
Marek's disease virus	"	"	"	"	AGP	"
Infectious bursal disease virus	"	"	"	"	AGP	"
Avian reovirus	"	"	"	"	AGP	"
Avian adenovirus	"	"	"	"	AGP	"
Haemophilus gallinarum	"	"	"	"	HI	"
Salmonella pullorum	"	100	"	100	AGG	"
Mycoplasma gallisepticum	"	"	"	"	AGG	"
Mycoplasma synoviae	"	"	"	"	AGG	"
Fowl pox virus	All animals examined daily				CO	Animals in the positive group sacrificed.
Salmonella (other than S. pullorum)	"	"	"	"	CO	All animals including positive and inmate groups sacrificed.

\* "Inmate group" means a group of animals not completely isolated from the positive group.

\*\* HI : Hemagglutination-inhibition test  
 AGP: Agar gel precipitin test  
 SN : Serum neutralization test  
 AGG: Hemagglutination test  
 CO : Clinical observation

Table 2. Trypsinization of chick embryo

	Method		Age of embryo ( Days )	Concentration of trypsin ( % )	Ratio of cell yield	HA titer
1	Pipetting	R.T.	5 ~ 7	0.2	0.6	128
2	Flask	Cold Room	10	0.05	1	128
	Stirrer	60minX 1				
3	Flask	R.T.	10	0.05	1	128
	Stirrer	20minX 2				

1 : Dulbecco ( Kondo's modification )

2 : Bodian

3 : Youngner

R.T. : Room temperature



Table 3. Protein nitrogen content of the dried inactivated tissue culture rabies vaccine

LotNo.	Protein N content *	Lot No.	Protein N content
1	0.024	5601	0.030
2	0.008	5701	0.037
3	0.012	5702	0.023
4	0.029	5801	0.025
5	0.017	5803	0.020
6	0.012	5804	0.024
7	0.012	5901	0.030
5501	0.012	5902	0.021
5502	0.012	6202	0.027
Mean			0.021

\* : mg/ml

Table 4. Potency of the dried inactivated tissue culture rabies vaccine

Lot No.	1	2	3	4	5	6	7
Untreated mice LD50	-6.84 10	-6.58 10	-7.15 10	-6.43 10	-6.43 10	-6.90 10	-6.90 10
Vaccinated mice LD50	-1.82 10	-1.45 10	-2.51 10	-0.81 10	-0.83 10	-1.15 10	-1.23 10
Potency †	5.02 10	5.13 10	4.64 10	5.62 10	5.60 10	5.75 10	5.67 10

† : Expressed as Habel index

Vaccines were evaluated for their neutralizing activity by using the Habel test. Potency must be at least  $10^3$  to pass the test.

Table 5. Potency of the dried inactivated tissue culture rabies vaccine

Lot No.	Potency (A.V.)*
5501	1.7
5502	1.0
5601	1.2
5701	1.0
5702	4.5
5801	2.6
5803	10.8
5804	13.2
5901	6.7
5902	5.0
6202	2.4

\* : Antigenic value

Vaccines were evaluated for their neutralizing activity by using the mouse neutralization test. Potency must be at least 0.3 to pass the test.

Table 6. Results of rabies vaccine acute toxicity tests in mice

Test substance	Animal species	Route of administration	Doses (ml/kg)a)	No. died/		LD <sub>50</sub> /ml/kg a)	
				No. survived		Male	Female
				Male	Female		
Dried tissue culture			48	0/10	0/10		
Inactivated rabies vaccine			60	0/10	0/10		
			76	0/10	0/10	>120	>120
			95	0/10	0/10		
	Mouse	i.v. b)	120	0/10	0/10		
Inactivated rabies vaccine			16	0/10	0/10		
			20	2/8	2/8	30.0	29.0
			25	3/7	2/8	(23.2-38.9)	(24.6-65.1)
			31	5/5	6/4		
			39	10/0	10/0		

a) Expressed as equivalent human dose

b) Vaccines were administered by injection in a caudal vein

Based on the mortality rate for 2 weeks following administration, the LD<sub>50</sub> of the vaccines was calculated by the probit method along with its 95% confidence limit.

Table 7. Results of rabies vaccine acute toxicity tests in rats

Test substance	Animal species	Route of administration	Doses (ml/kg)a)	No. died/No. survived		LD <sub>50</sub> /ml/kg a)	
				Male	Female	Male	Female
Dried tissue culture inactivated rabies vaccine			39	0/10	0/10		
			48	0/10	0/10		
			60	0/10	0/10	>95	>95
			76	0/10	0/10		
Inactivated rabies vaccine	Rat	i.v. b)	12.8	0/10	0/10		
			16	2/8	1/9	23.3	21.5
			20	4/6	4/5	(18.2-29.8) (18.9-26.1)	
			25	5/5	7/3		
			31	10/0	10/0		

a) Expressed as equivalent human dose

b) Vaccines were administered by injection in a caudal vein

Based on the mortality rate for 2 weeks following administration, the LD<sub>50</sub> of the vaccines was calculated by the probit method along with its 95% confidence limit.

Table 8. Results of rabies vaccine acute toxicity tests in mice

Test substance	Animal species	Route of administration	Doses (ml/kg)a)	No. died/		LD <sub>50</sub> /ml/kg a)	
				No. survived		Male	Female
				Male	Female		
Dried tissue culture inactivated rabies vaccine			48	0/10	0/10		
			60	0/10	0/10		
			76	0/10	0/10	>120	>120
			95	0/10	0/10		
			120	0/10	0/10		
Inactivated rabies vaccine	Mouse	per os	b)	25	0/10	0/10	
				31	0/10	0/10	
				39	0/10	0/10	>60
				48	0/10	0/10	>60
				60	0/10	0/10	

a) Expressed as equivalent human dose

b) Vaccines were administered per os compulsorily through a metal gastric catheter

Based on the mortality rate for 2 weeks following administration, the LD<sub>50</sub> of the vaccines was calculated by the probit method along with its 95% confidence limit.

Table 9. Results of rabies vaccine acute toxicity tests in rats

Test substance	Animal species	Route of administration	Doses (ml/kg)a)	No. died/ No. survived		LD <sub>50</sub> /ml/kg a)	
				Male	Female	Male	Female
Dried tissue culture inactivated rabies vaccine			48	0/10	0/10		
			60	0/10	0/10		
			76	0/10	0/10	>120	>120
			95	0/10	0/10		
			120	0/10	0/10		
Inactivated rabies vaccine	Rat	per os b)	25	0/10	0/10		
			31	0/10	0/10		
			39	0/10	0/10	>60	>60
			48	0/10	0/10		
			60	0/10	0/10		

a) Expressed as equivalent human dose

b) Vaccines were administered per os compulsorily through a metal gastric catheter

Based on the mortality rate for 2 weeks following administration, the LD<sub>50</sub> of the vaccines was calculated by the probit method along with its 95% confidence limit.

Table 10. Results of rabies vaccine acute toxicity tests in mice

Test substance	Animal species	Route of administration	Doses (ml/kg)a)	No. died/		LD <sub>50</sub> /ml/kg a)	
				No. survived		Male	Female
Dried tissue culture inactivated rabies vaccine			48	0/10	0/10		
			60	0/10	0/10		
			76	0/10	0/10	>120	>120
			95	0/10	0/10		
			120	0/10	0/10		
Inactivated rabies vaccine	Mouse	s.c.	25	0/10	0/10		
			31	0/10	0/10		
			39	0/10	0/10	>60	>60
			48	0/10	0/10		
			60	0/10	0/10		

a) Expressed as equivalent human dose

b) Vaccines were administered by sc injection at the dorsal skin

Based on the mortality rate for 2 weeks following administration, the LD<sub>50</sub> of the vaccines was calculated by the probit method along with its 95% confidence limit.



Table 11. Results of rabies vaccine acute toxicity tests in rats

Test substance	Animal species	Route of administration	Doses (ml/kg)a)	No. died/No. survived		LD50/ml/kg a)	
				Male	Female	Male	Female
Dried tissue culture inactivated rabies vaccine			48	0/10	0/10		
			60	0/10	0/10		
			76	0/10	0/10	>120	>120
			95	0/10	0/10		
			120	0/10	0/10		
Inactivated rabies vaccine	Rat	s.c. b)	25	0/10	0/10		
			31	0/10	0/10		
			39	0/10	0/10	>60	>60
			48	0/10	0/10		
			60	0/10	0/10		

a) Expressed as equivalent human dose

b) Vaccines were administered by sc injection at the dorsal skin

Based on the mortality rate for 2 weeks following administration, the LD50 of the vaccines was calculated by the probit method along with its 95% confidence limit.

Table 12. Results of rabies vaccine systemic anaphylaxis tests  
(Intravenous eliciting injection)

Test substance		Day of eliciting	No. of animals	Results
Sensitizing injection	Eliciting injection			
Dried tissue culture inactivated rabies vaccine	Dried tissue culture inactivated rabies vaccine	15th day	1	No abnormality
			2	"
	Inactivated rabies vaccine	22nd day	3	"
			4	"
	Inactivated rabies vaccine	15th day	5	"
			6	"
		22nd day	7	"
			8	"
Inactivated rabies vaccine	Inactivated rabies vaccine	15th day	9	The animals bit their anterior limbs for 5 minutes after injection, but they were resumed normal.
			10	" "
	Inactivated rabies vaccine	22nd day	11	No abnormality
			12	The animals rubbed their snout, sneezed, pawed their ear, bit their anterior limbs, and showed an abnormal gait immediately after injection, but 10 minutes later their behavior was normal.
	Dried tissue culture inactivated rabies vaccine	15th day	13	No abnormality
			14	"
Dried tissue culture inactivated rabies vaccine	22nd day	15	"	
		16	"	
Normal equine serum	Normal equine serum	15th day	17	The animals rubbed their snout, sneezed, jumped up, showed spasm and paralysis in the back, and lay prone 2 minutes after injection. They died next day.
			18	The animals sneezed, jumped up, showed spasm and lay prone immediately after injection. They died 5 minutes after injection.
	Normal equine serum	22nd day	19	The animals sneezed, jumped up, showed spasm and lay prone immediately after injection. They died 5 minutes after injection.
			20	The animals rubbed their snout, jumped up, showed spasm and lay prone immediately after injection. They died 5 minutes after injection.

Guinea pigs given the sensitizing injection were injected either 1.0ml of the vaccine or 1.0ml of equine serum iv as the eliciting injection on the 15th or 22nd days. All animals were observed the behavior, symptoms and course to the death for 7 days.

Table 13. Results of rabies vaccine systemic anaphylaxis tests  
(Subcutaneous eliciting injection)

Test substance		Day of eliciting	No. of animals	Results
Sensitizing injection	Eliciting injection			
Dried tissue culture inactivated rabies vaccine	Dried tissue culture	15th day	21	No abnormality
	inactivated rabies vaccine		22	"
		22nd day	23	"
			24	"
Inactivated rabies vaccine	Inactivated rabies vaccine	15th day	25	"
			26	"
		22nd day	27	"
			28	"
Inactivated rabies vaccine	Inactivated rabies vaccine	15th day	29	"
			30	"
		22nd day	31	"
			32	"
Dried tissue culture inactivated rabies vaccine	Dried tissue culture	15th day	33	"
	inactivated rabies vaccine		34	"
		22nd day	35	"
			36	"
Normal equine serum	Normal equine serum	15th day	37	"
			38	"
		22nd day	39	"
			40	"

Guinea pigs were injected 3 doses each of either 1.0ml of the vaccine or 0.1ml of equine serum sc as the sensitizing injection on days 1, 3 and 5. Guinea pigs given the sensitizing injection were injected either 1.0ml of the vaccine or 1.0ml of equine serum sc as the eliciting injection on the 15th or 22nd days. All the animals were observed the behavior, symptoms and course to death for 7days.

Table 14. Changes in neutralizing antibody levels after vaccination

Monkey No.	Age (year)	Sex	Body weight Before injection	Neutralizing antibody level										
				5	7	10	14	22	28	35				
47	5.5	F	3.5	< 5	< 5	7	25	560	1,260	1,260	1,260	1,660	1,660	
5110	3.5	F	2.13	< 5	7	11	32	430	880	1,660	1,660	2,110	1,660	
5141	3.5	F	2.05	< 5	7	11	43	750	1,260	1,260	1,260	1,890	1,800	
5142	3.5	F	1.60	< 5	< 5	< 5	25	480	880	1,660	1,660	1,800	1,800	
5144	3.5	M	1.80	< 5	< 5	7	56	610	1,260	1,660	1,660	1,800	1,800	
5204	2.5	F	1.85	< 5	10	19	74	840	1,630	1,890	1,890	2,160	1,630	
5213	2.5	F	2.10	< 5	< 5	< 5	11	460	840	1,630	1,630	1,630	1,630	
5254	2.5	F	1.50	< 5	< 5	< 5	32	460	750	1,260	1,260	1,260	1,260	
Geometrical mean value				< 5	8	10	33	560	1,060	1,520	1,520	1,770	1,770	

Monkeys were injected sc with 10 doses of 1ml of dried inactivated tissue culture rabies vaccine per day and examined for neutralizing antibody level.

Table 15. Applied test of the dried inactivated tissue culture rabies vaccine

No. of injections	No. of volunteers	Local reactions				General reactions				
		Flare	Swelling	Induration	Pain	Itching	Others	Fever*	Headache	Others
1	35	3	2	0	8	2	0	0	0	0
2	35	11	1	0	7	6	0	0	1	0
3	15	1	2	0	1	1	0	0	1	0

\* 37.5°C or more is determined as (+)

Volunteers were injected sc with 1ml of dried inactivated tissue culture rabies vaccine at each injection.

Table 16. Booster test for the dried inactivated tissue culture rabies vaccine

No. of booster injections	No. of volunteers	Local reactions					General reactions			
		Flare	Swelling	Induration	Pain	Itching	Others	Fever*	Headache	Others
1	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	6	0	0	0	1	0	0	0	0	0
3	5	0	1	0	2	1	0	0	0	0
4	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
5	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
6	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
7	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
8	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0

\* 37.5 °C or more is determined as (+)

All volunteers had been received pre-exposure immunization of dried inactivated tissue culture rabies vaccine before booster injection.

Table 17. Member of Japan overseas cooperation volunteers received pre-exposure immunization of dried inactivated tissue culture rabies vaccine from 1978 to 1983

Countries of destination	Number of volunteers	Countries of destination	Number of volunteers
Philippines	174	Peru	42
Malaysia	193	Bolivia	31
Nepal	137	Paraguay	82
Bangladesh	133		
Sri Lanka	42	Syria	50
Thailand	33		
Maldives	10	Tunisia	54
Tonga	14	Morocco	89
Western Samoa	68	Ethiopia	31
Solomon Islands	10	Kenya	271
Papua New Guinea	27	Tanzania	118
Fiji	4	Malawi	324
		Zambia	118
Honduras	129	Ghana	138
Costa Rica	48	Liberia	38
		Senegal	39
1978-1979: Test vaccines were used; 662 persons.			
1980-1983: Licenced vaccines were used; 1,785 persons.		Total 2,447 persons	

Volunteers were injected sc with 2 times each of dried inactivated tissue culture rabies vaccine in Japan, and received 3rd injection from 6 to 12 months later in the countries to which they were dispatched.

Table 18. Changes in the level of neutralizing antibody after vaccination

Volunteers	Age	Sex	Neutralizing antibody titer											
			Before injection ↓	After 1st injection		After 2nd injection		After 3rd injection						
				2w ↓	2w	6w	6m ↓	1w	2w	1m	3m	6m	1y9m	3y3m
U . Y	39	M	<5	66	—	8	<5	766	631	166	15	19	<5	—
O . S	38	M	<5	38	76	5	10	—	282	—	19	11	—	—
S . K	29	M	<5	<5	7	<5	<5	46	19	69	7	<5	<5	—
I . M	35	M	<5	25	96	32	14	—	—	—	—	—	—	—
T . U	29	M	<5	15	235	43	15	56	126	—	12	42	14	—
M . A	21	F	<5	7	17	20	11	—	1023	—	42	8	11	—
N . S	51	M	<5	<5	5	<5	9	—	231	—	19	5	<5	<5
Y . A	50	M	<5	<5	<5	<5	<5	—	5	—	5	5	<5	<5
S . K	29	M	<5	56	33	8	<5	—	166	—	46	7	—	<5
Y . U	29	M	<5	219	229	44	8	—	74	—	11	<5	<5	—
O . H	30	M	<5	19	33	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Geometrical mean value			<5	13	27	7	<5	125	103	107	13	<5	<5	<5
Rate of positive antibodies (%) *			0	73	90	70	60	100	100	100	100	78	29	0

\* 5-fold or more increases are determined to be positive  
↓ Injection ( 1ml/s.c.)

Eleven volunteers were injected 3 times each of 1ml of dried inactivated tissue culture rabies vaccine.



Table 19. Changes in the level of neutralizing antibody after booster injection  
( Interval : 3y3m )

Volunteers	Age	Sex	Neutralizing antibody titer					
			After 3rd injection		After 1st booster injection			
			6m	3y3m ↓	1w	2w	1m	2m
N · S	51	M	<5	<5	77	163	92	56
Y · A	50	M	<5	<5	<5	46	14	8
S · K	29	M	7	<5	46	126	46	282
Geometrical mean value			<5	<5	15	98	39	50
Rate of positive anti-bodies (%) †			33	0	67	100	100	100

\* 5-fold or more increases are determined to be positive  
↓ Injection ( 1ml/s.c.)

Three volunteers received pre-exposure immunization were injected sc with 1ml of dried inactivated tissue culture rabies vaccine after 3 years and 3 months of 3rd injection while they have no neutralizing antibody.

Table 20. Changes in the level of neutralizing antibody after booster injection (Interval: 1Y9m, 3w, 1Y4m)

Volunteers	Age	Sex	Neutralizing antibody titer							
			After 3rd injection		1st booster	2nd booster	After 3rd booster injection			
			6m	1Y9m ↓	3w ↓	1Y4m ↓	1w	2w	1m	2m
U. Y	39	M	19	<5	69	11	56	63	69	46
S. K	29	M	<5	<5	11	7	188	84	69	11
T. U	29	M	42	14	165	14	126	96	69	19
M. A	21	F	8	11	165	19	38	165	69	69
Geometrical mean value			9	<5	68	12	84	96	69	29
Rate of positive antibodies (%)*			75	50	100	100	100	100	100	100

\* 5-fold or more increases are determined to be positive  
 ↓ Injection (1ml/S.C.)

Three volunteers received pre-exposure immunization were injected 3 times each of 1ml of dried inactivated tissue culture rabies vaccine sc after 1 year and 9 months of 3rd injection, 3 weeks after 1st booster and 1 year and 4 months after 2nd booster injection respectively.

Table 21. Changes in the level of neutralizing antibody after vaccination

Volunteers	Age	Sex	Neutralizing antibody titer									
			Before injection ↓	After 1st injection		After 2nd injection		After 3rd injection				
				3w ↓	4w	1y4m ↓	1w	2w	1m	2m		
N • F	30	M	<5	<5	9	—	—	—	—	—	—	—
K • K	20	F	<5	<5	46	<5	165	126	69	46	—	—
F • Y	56	M	<5	<5	—	<5	38	56	56	33	—	—
S • H	50	M	<5	<5	—	48	282	282	482	188	—	—
I • H	20	M	<5	<5	11	—	—	—	—	—	—	—
K • H	42	F	<5	<5	46	<5	826	126	211	96	—	—
Geometrical mean value			<5	<5	21	<5	196	126	141	72		
Rate of positive antibodies (%) *			0	0	100	25	100	100	100	100	100	100

\* 5-fold or more increases are determined to be positive  
↓ Injection ( 1ml/s.c.)

Six volunteers received 2 times each of 1ml of dried inactivated tissue culture rabies vaccine were injected sc with 1ml of the vaccine after 1 year and 4 months of injection while they have no neutralizing antibody.

Table 22. Changes in the level of neutralizing antibody after vaccination

Volunteers	Age	Sex	Neutralizing antibody titer				
			Before injection ↓	After 1st injection		After 2nd injection	
				4w ↓	2w	1m	
N • I	20	F	<5	<5	46	46	
N • S	23	F	<5	19	46	46	
N • H	30	F	<5	18	46	19	
M • T	24	F	<5	9	282	69	
S • S	24	F	<5	56	313	345	
K • N	19	F	<5	<5	66	9	
N • M	20	F	<5	<5	53	7	
K • M	19	F	<5	19	56	69	
S • K	20	F	<5	<5	46	46	
K • S	19	F	<5	7	69	25	
I • N	21	F	<5	<5	11	11	
T • N	21	F	<5	7	33	46	
N • A	19	F	<5	<5	33	14	
Y • K	21	F	<5	<5	46	7	
H • N	19	F	<5	7	7	11	
T • Y	19	F	<5	<5	69	46	
I • T	19	F	<5	5	32	9	
K • H	21	F	<5	8	56	126	
Geometrical mean value			<5	<5	49	28	
Rate of positive anti-bodies (%) *			0	56	100	100	

\* 5-fold or more increases are determined to be positive  
 ↓ Injection ( 1ml/s.c.)

Eighteen volunteers were injected 2 times each of 1ml of dried inactivated tissue culture rabies vaccine sc at 4 weeks interval.

Table 23. Changes in the level of neutralizing antibody after vaccination  
( Frequent immunization )

Volunteer	Age	Sex	Before injection	Neutralizing antibody titer							
				After 1st injection	After 2nd injection	After 3rd injection	1st	2nd	After 3rd booster	After 8th booster injection	
Y . U	29	M	↓	2w ↓	2w 6w 6m ↓	2w 3m 6m 1y10m ↓	3w ↓	1y2m ↓	3d 7d 15d 1m 3m ↓ ↓ ↓ ↓ ↓	2w 3w 4w 5w	
			<5	219	229 44 8	74 11 <5 <5	13	<5	21 19 69 46 19	25 14 33 56	
			0	100	100 100 100	100 100 0 0	100	0	100 100 100 100 100	100 100 100 100	

\* 5-fold or more increases are determined to be positive  
↓ Injection (1ml/s.c.)

One volunteer was injected 11 times each of 1ml of dried inactivated tissue culture rabies vaccine sc.

Table 24. Use of dried inactivated tissue culture rabies vaccine for post-exposure treatment from 1979 to 1984

Countries (Persons exposed)	Persons exposed		Contact animals		Vaccine dose for treatment	Prognosis	
	Years	Sex	Age	Kind			Diagnosis
Nepal	1979	?	?	Dog	Suspected	12	Healthy
"	1980	M	9	Monkey	Suspected	6	"
"	1981	M	24	Dog	Unknown	6	"
India	1979	M	9	"	Suspected	12	"
"	1980	M	?	"	"	3	"
"	1981	M*	9	Monkey	"	6	"
Thailand	1980	M	?	Dog	"	7	"
"	1980	F	25	"	Rabies	6	"
"	1980	F	27	"	Unknown	6	"
"	1981	M	31	"	Rabies	6	"
"	1981	M**	?	"	Suspected	6	"
Egypt	1979	M	?	"	"	14	"
"	1980	M	9	"	"	20§	"
Burma	1979	M	?	"	Rabies	7	"
Costa Rica	1981	M	?	"	Suspected	6	"
Japan	1979	F	9	"	Negative	6	"
Liberia	1984	M	28	"	Unknown	2	"
"	1984	M	36	"	Rabies	6	"

Nationality: Japanese; \* : An Indian; \*\*: Thai. § Includes stored vaccine.

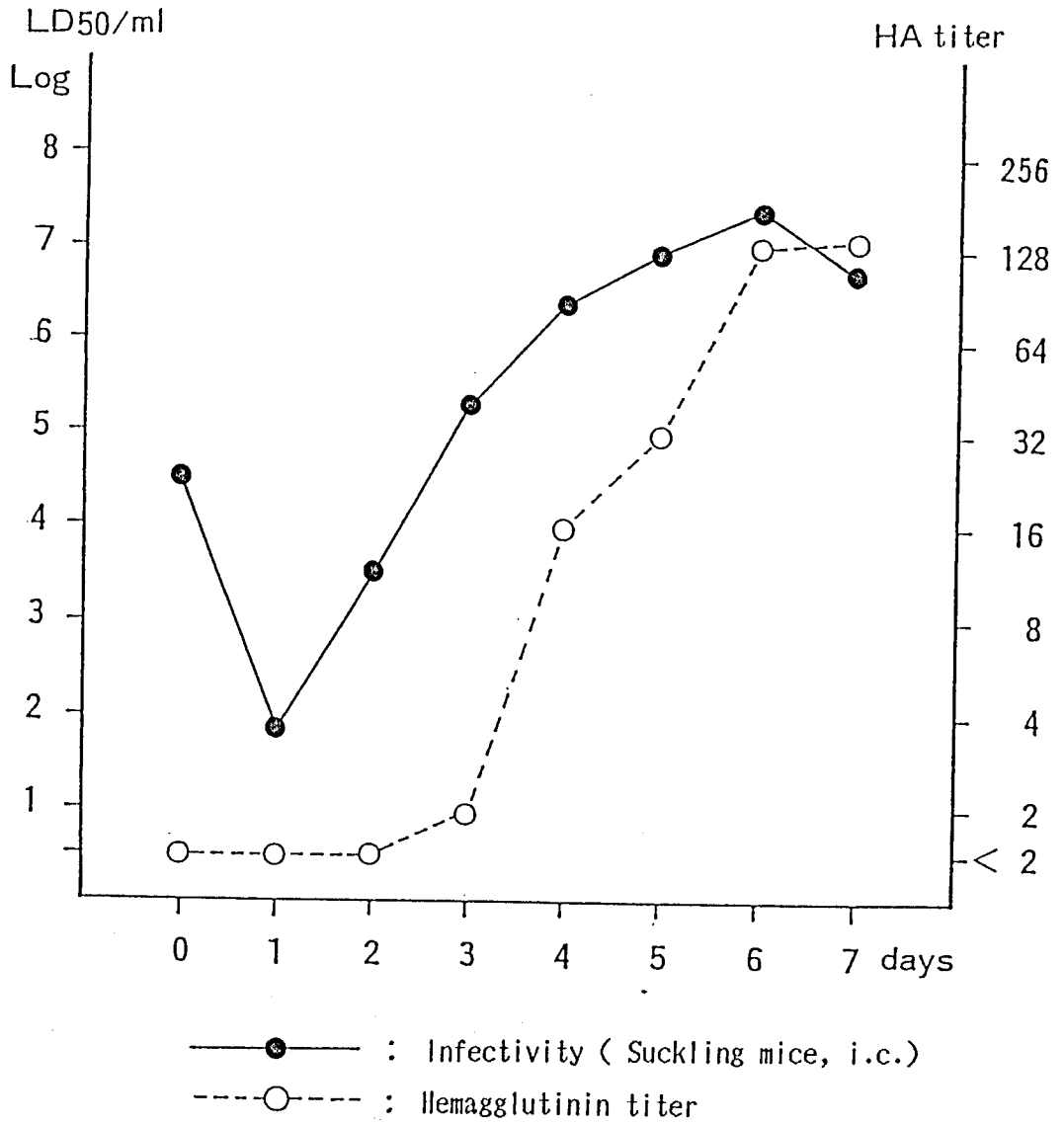


Fig. 1. Growth curves of rabies virus HEP Flury strain in chick embryo cell culture fluid at 35 °C

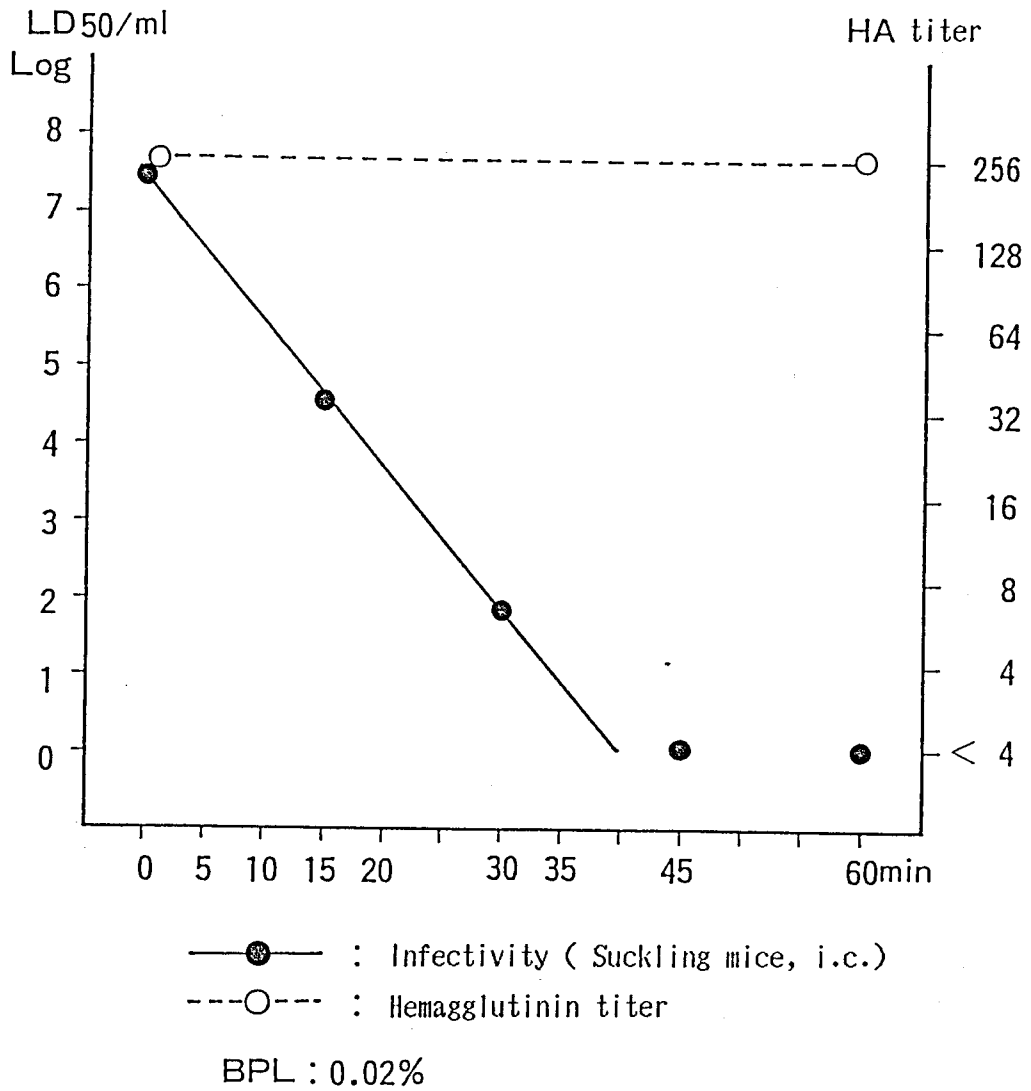
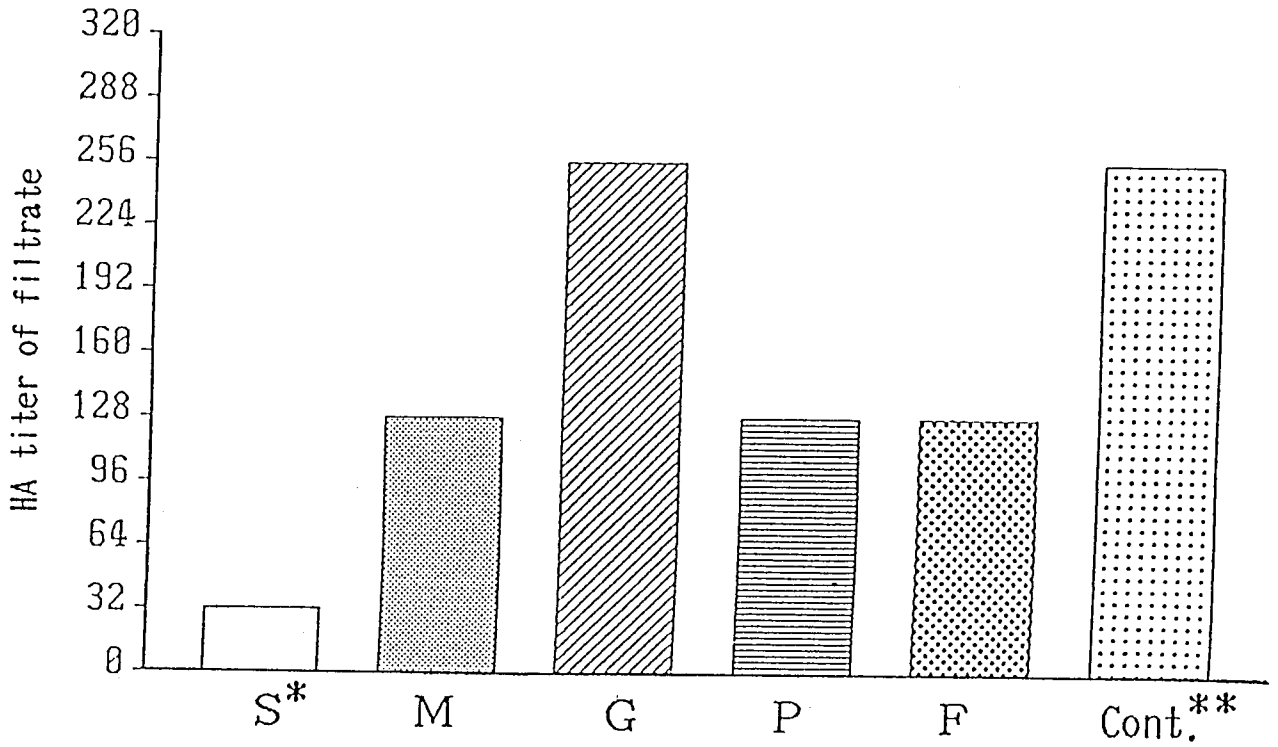


Fig. 2. Inactivation of rabies virus HEP Flury strain by BPL in 37 °C water bath for 60min





\* : Name of company

\*\* : Virus culture fluid before filtration

Fig.3. Comparison of virus filtration efficiency of membrane filters manufactured by 5 companies



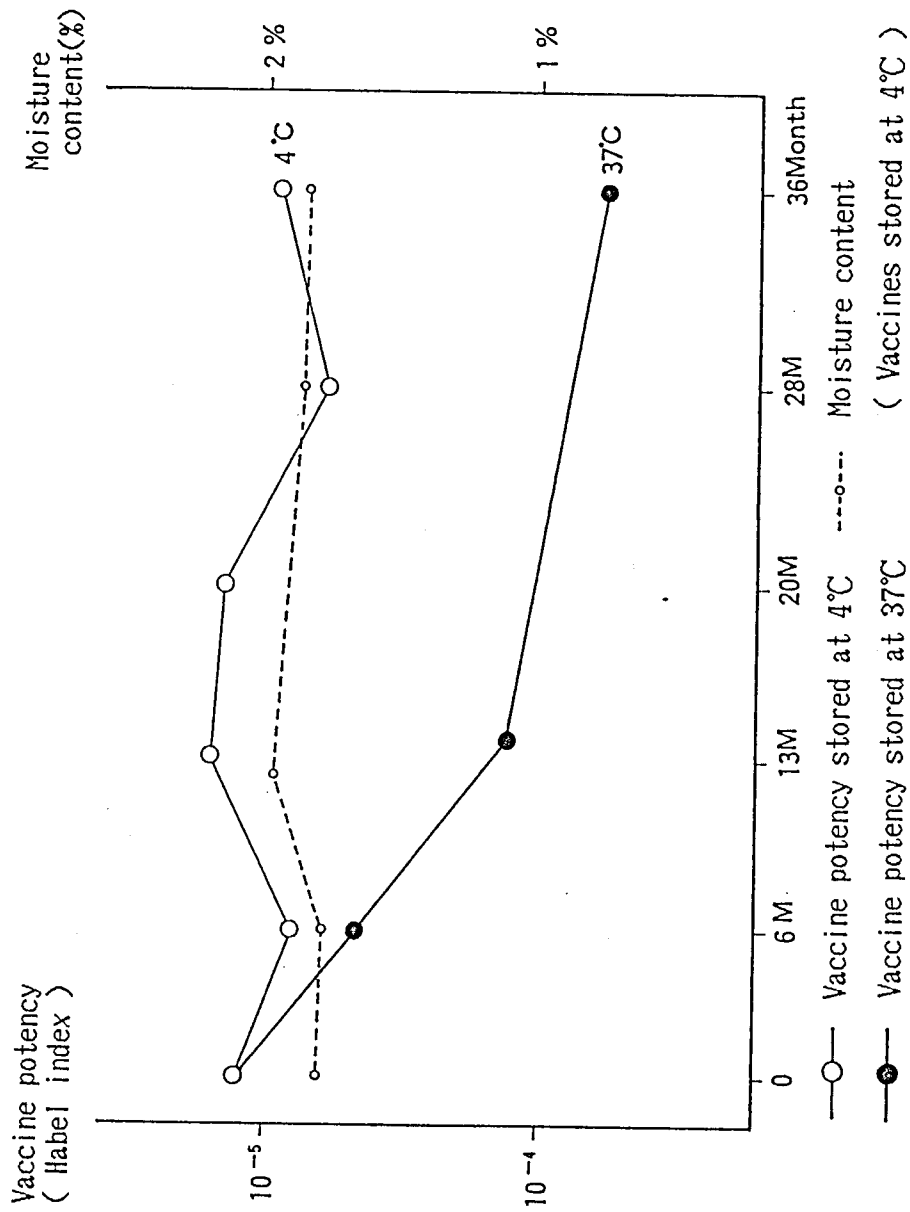


Fig.5. Stability of dried inactivated tissue culture rabies vaccines at 4°C and 37°C

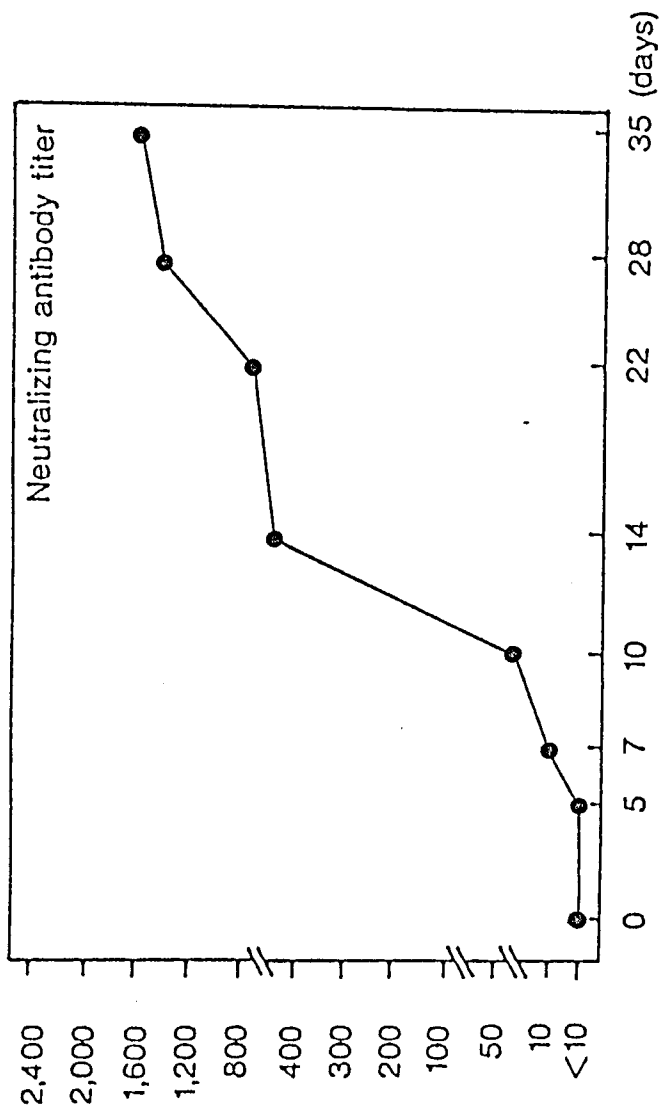


Fig.6. Trends of neutralizing antibody titer after vaccination

Monkeys were injected sc with 10 doses of 1ml of dried inactivated tissue culture rabies vaccine per day and examined for neutralizing antibody level.

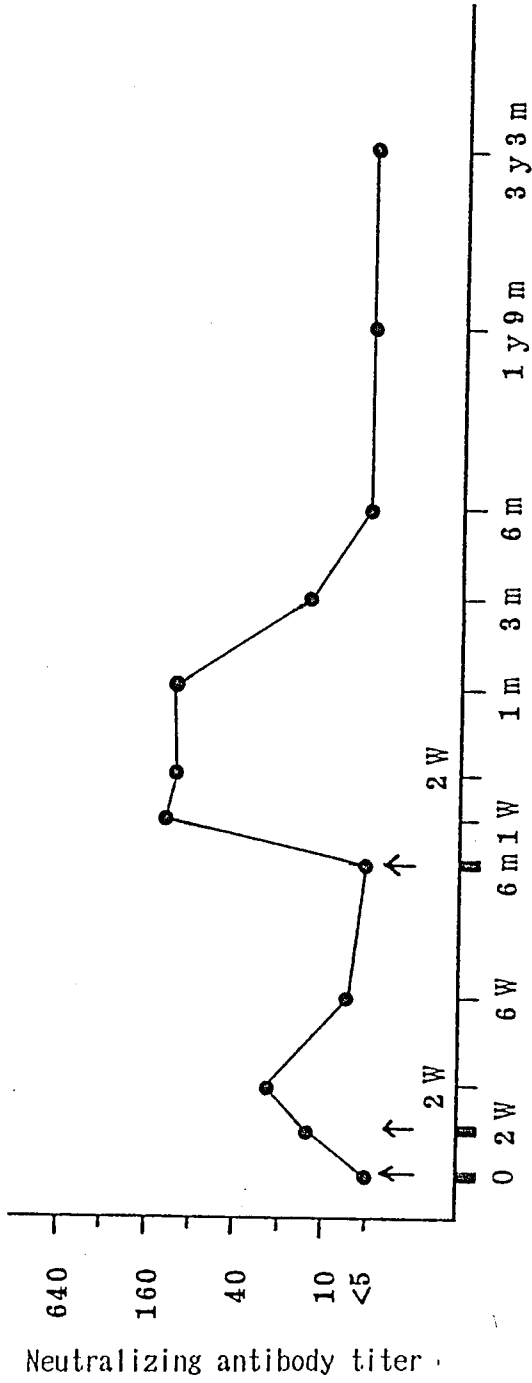


Fig. 7. Changes in the level of neutralizing antibody after vaccination

Average titer of eleven volunteers who were injected 3 times each of 1ml of dried inactivated tissue culture rabies vaccine.

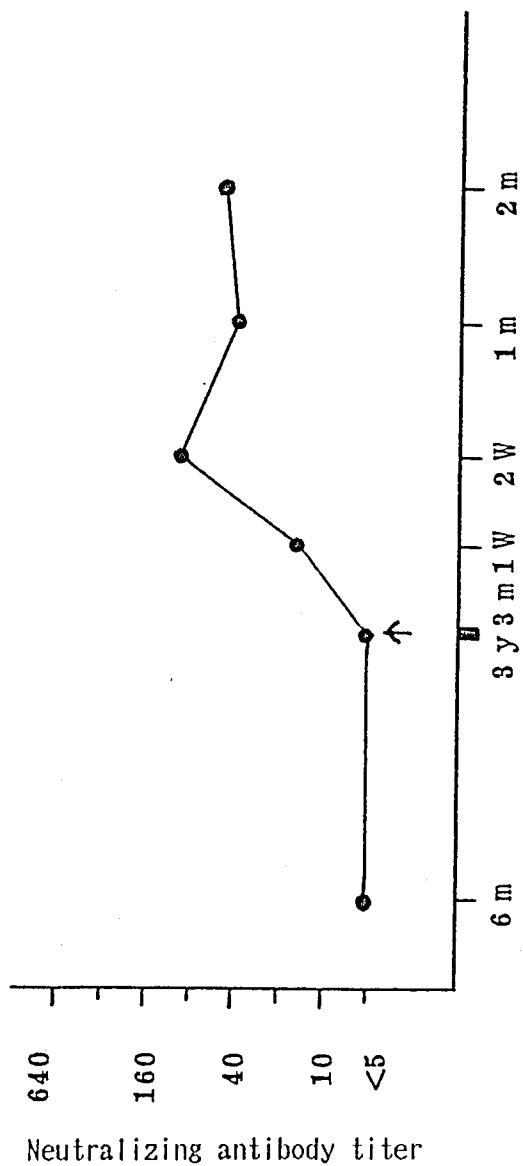


Fig. 8. Changes in the level of neutralizing antibody after booster injection (Interval : 3y3m)

Average titer of three volunteers who were received pre-exposure immunization and were injected sc with 1ml of dried inactivated tissue culture rabies vaccine after 3 years and 3 months of 3rd injection while they have no neutralizing antibody.

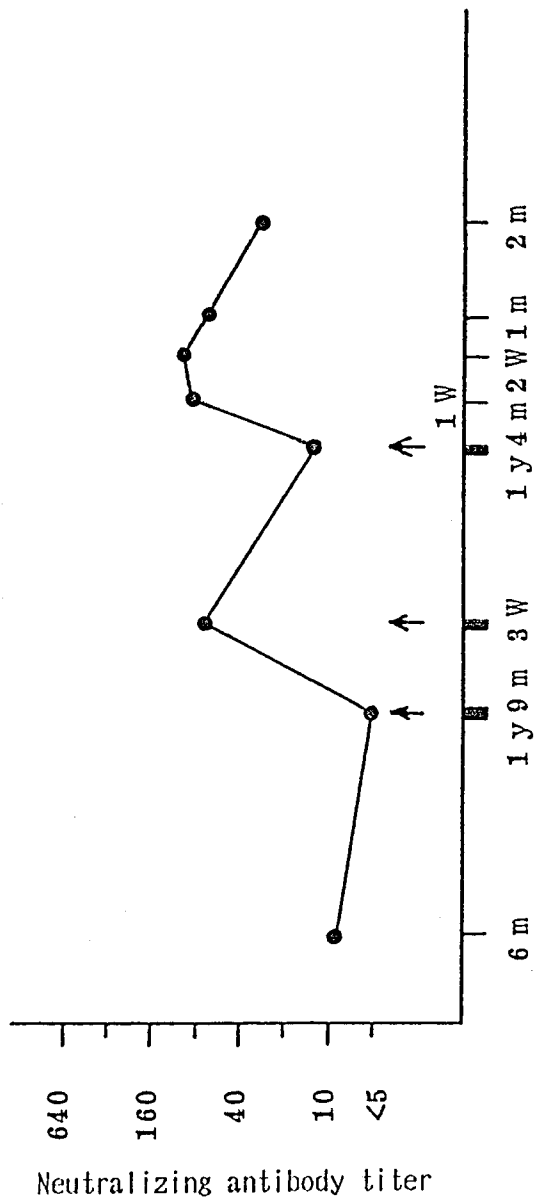


Fig. 9. Changes in the level of neutralizing antibody after booster injection (Interval: 1Y9m, 3w, 1Y4m)

Average titer of three volunteers who were received pre-exposure immunization and were injected 3 times each of 1ml of dried inactivated tissue culture rabies vaccine sc after 1 year and 9 months of 3rd injection, 3 weeks after 1st booster and 1 year and 4 months after 2nd booster injection respectively.

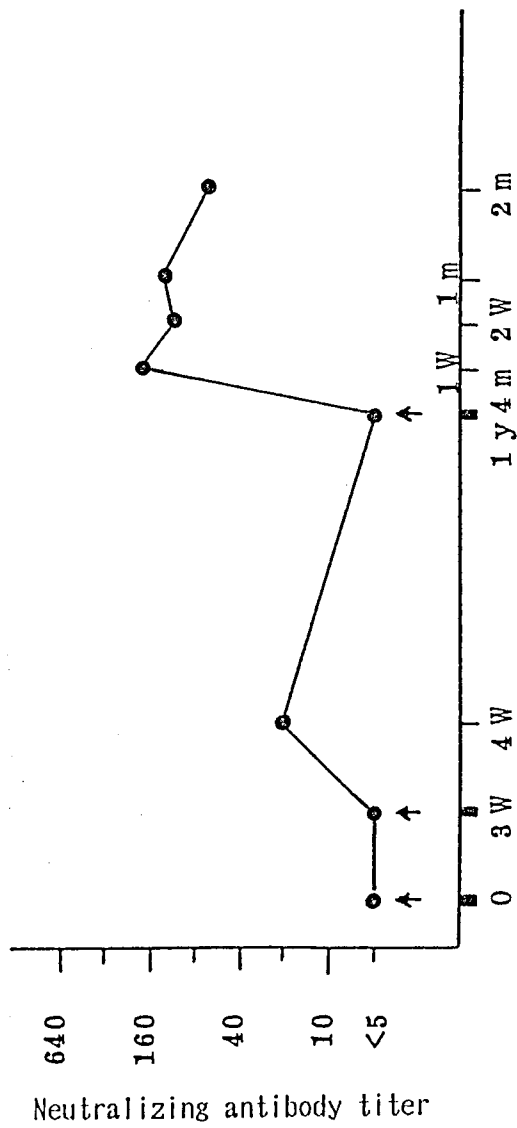


Fig. 10. Changes in the level of neutralizing antibody after vaccination

Average titer of six volunteers who were received 2 times each of 1ml of dried inactivated tissue culture rabies vaccine and were injected sc with 1ml of the vaccine after 1 year and 4 months of injection while they have no neutralizing antibody.



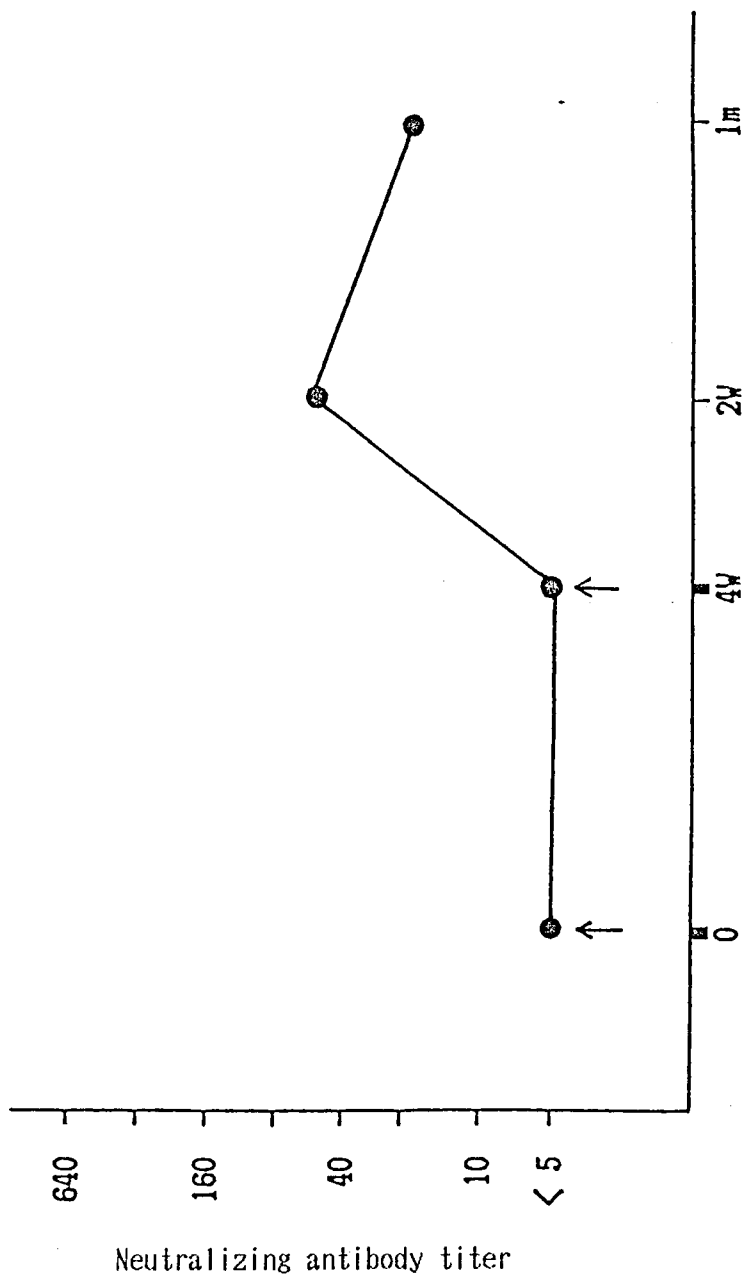


Fig. 11. Changes in the level of neutralizing antibody after vaccination

Average titer of eighteen volunteers who were injected 2 times each of 1ml of dried inactivated tissue culture rabies vaccine sc at 4 weeks interval.

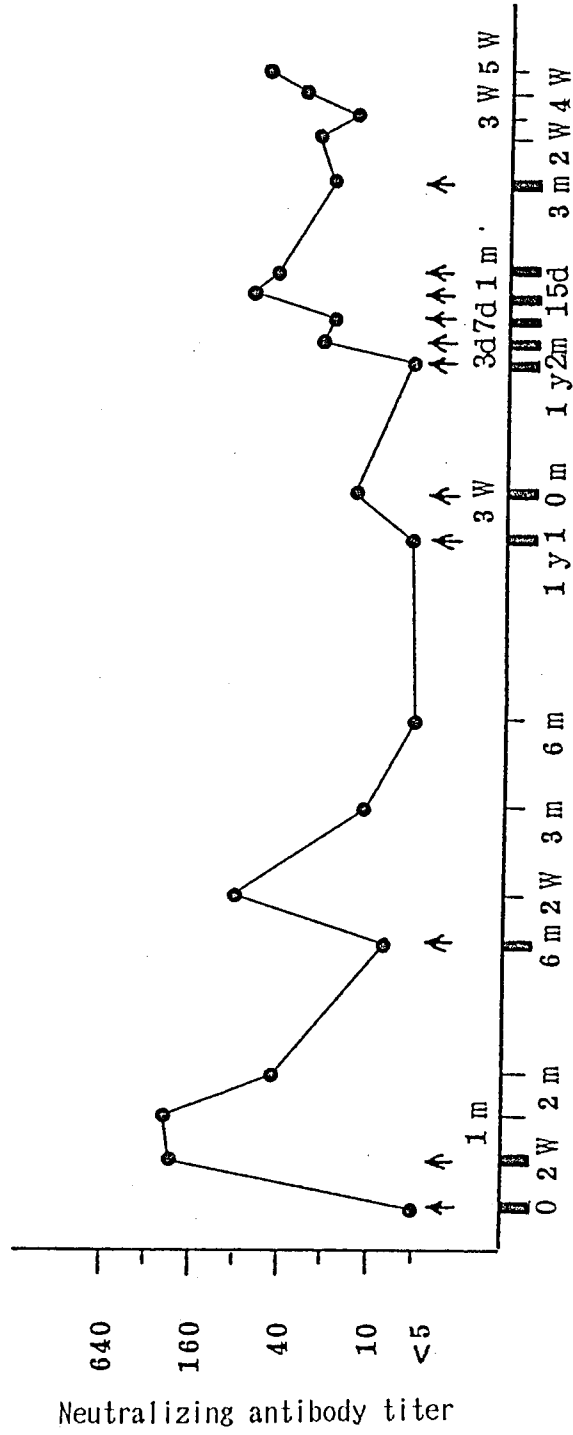


Fig. 12. Changes in the level of neutralizing antibody after vaccination (Frequent immunization)

One volunteer was injected 11 times each of 1ml of dried inactivated tissue culture rabies vaccine SC.

STUDIES ON THE DRIED INACTIVATED TISSUE  
CULTURE RABIES VACCINE FOR HUMAN USE

SUMMARY

KUNIAKI SAKAMOTO

1990

Inactivated rabies vaccines for humans previously used in Japan include Semple vaccine prepared from an emulsion of rabbit or goat brain infected with Nishigahara strain of fixed rabies virus inactivated with phenol, which was used from 1953-1973, and rabies vaccine inactivated by ultraviolet rays which was in use during the period 1960-1973.

In 1973, Fuenzalida vaccine was developed. It was prepared from infected suckling mouse brain free of myelin, which was culpable for adverse reactions of rabies vaccine, by treating with phenol or ultraviolet rays. Known as "Inactivated rabies vaccine", it is presently listed among the minimum requirement of biological products.

The existing rabies vaccine, however, has the potential of producing adverse reactions, since it is also made from nervous tissue and the manufacturing process involves no particular step of purification or elimination of brain substance except for low speed centrifugation.

Therefore, prophylactic pre-exposure application of the vaccine is limited at present to special high risk situations ( laboratory staffs, physicians, veterinarians, quarantine station personnel, dog catchers, etc. ).

No cases of rabies have been reported in Japan since 1957 because of enforcement of rabies prophylactic law in 1950 except for such patients as became infected abroad and suffered the disease after returning to Japan. In recent years the number of people who have been in hyperendemic areas ( South East Asia, Middle and Near East, Africa, South America, etc. ) abroad where occasions of rabies infection have been increasing, have increased.

Under such circumstances, since 1974 I have made efforts to establish a dried inactivated tissue culture rabies vaccine for prophylactic use based on the techniques developed by A.Kondo who was a technical officer at the National Institute of Health. As a result, dried inactivated tissue culture rabies vaccine for human use derived from chick embryo cell culture ( hereafter referred to as TC vaccine ) was successfully developed as a commercial product, which satisfactorily met the current requirement for inactivated rabies vaccine ( hereafter referred to as SMB vaccine ) on efficacy and extremely reduced the adverse reactions.

The details of studies are presented here along with the results obtained.

#### 1. Basic studies on preparation of TC vaccine

1) There was no difference in preparing CE cells suitable for large scale culture among the Dulbecco's method ( pipetting at room temperature for 2 min ), Bodian's method ( trypsinization with stirrer at cold room for 60 min ) and Youngner's method ( trypsinization with stirrer at room temperature 2 times for 20 min each ).

2) HEP Flury strain of rabies virus grown in massive culture at 35 °C and PH7.8-8.0 had an infectious titer of  $10^{7.0}$  -  $10^{7.5}$  LD50/ml with an HA titer of 1 : 32-128 at 6 days after inoculation. On the basis of these results the 6th-day virus culture fluid was harvested.

3) Complete inactivation of virus was achieved by adding of 0.02 v/v % BPL to the virus culture fluid at 37°C for 45 min. For caution's sake, the

same procedure was repeated.

4) Filtration procedure could be used for avoidance of microbe contamination in vaccine production using G company's membrane filter without virus adsorption.

5) The mean protein nitrogen content of the TC vaccines prepared by ultrafiltration and ultracentrifugation was 0.021mg/ml, or approximately 1/2 in comparison to the SMB vaccine. The mean protein nitrogen content of the TC vaccines prepared by sucrose density gradient centrifugation was 0.007mg/ml, or approximately 1/3 in comparison to the TC vaccine prepared by ultrafiltration and ultracentrifugation. Since this method has a possibility of microbe contamination, the ultrafiltration - ultracentrifugation method was rather used for concentration and purification of the virus. The variance of protein nitrogen contents was found among the TC vaccine lots, but it was not abnormal value as a criterion for external value.

6) The potency of the TC vaccine was ranged between  $10^{4.64}$  -  $10^{5.75}$  as a Habel index and between 1.0-13.2 as an Antigenic value, respectively. The TC vaccine fulfilled the current standard. There was no correlation between potency and protein nitrogen contents ( $r=-0.036$ ).

7) When the TC vaccine was stored in a thermostatic chamber for 36 months at 4 °C, no changes were observed in its appearance, moisture content, hydrogen ion concentration and potency, and neither abnormal toxicity nor contamination was seen. When the TC vaccine was stored for 6 months at 37 °C, there was a slight decrease in potency. However, it corresponded to the SMB vaccine potency test standard even after 36 months of storage.

There were no changes regarding items ( appearance, pH, abnormal toxicity ) other than potency. The stability of the TC vaccine to the external temperature was confirmed.

## 2. Safety and antigenicity of TC vaccine

1) A comparative acute toxicity test of the TC vaccine was carried out using mice and rats together with the SMB vaccine as control. The TC vaccine , even when administered in the highest possible dose for mice and rats, proved not to be lethal, so its LD50/ml was indeterminable. The maximum dose administered was 120ml/kg intravenously, orally or subcutaneously in mice, and 95ml/kg intravenously and 120ml/kg orally or subcutaneously in rats. The vaccine given in these doses produced no reactions indicative of toxicity. The SMB vaccine as control was administered in the highest possible dose when given by the oral or subcutaneous routes. No deaths occurred among the animals so treated, and hence the LD50 of the vaccine was also not determinable. The SMB vaccine, however, was lethal for some of the mice when administered intravenously in a dose of 20ml/kg or more, its LD50 being 30ml /kg in males and 29ml/kg in females. The vaccine also proved to be lethal for some of the rats when given by the same route in a dose of 16ml/kg or more, the LD50 being 23.3ml/kg in males and 21.5ml/kg in females. In this regard there was no significant difference between sexes in either species. These results strongly suggest that the TC vaccine can be safely used in humans, having no serious acute toxicity.

2) Systemic anaphylaxis tests were carried out in order to check the allergenic property of the TC vaccine. Tests were negative for all guinea

pigs given the TC vaccine. The guinea pigs given the SMB vaccine as control, all displayed negative results after a subcutaneous eliciting injection, but 3 of 4 guinea pigs demonstrated slight anaphylactic symptoms after an intravenous eliciting injection. These results revealed the TC vaccine to be less allergenic than the SMB vaccine.

3) Eight monkeys were given 10 successive subcutaneous injections of 1ml of the TC vaccine at a site of breast. Three-month observation of local and systemic reactions revealed no abnormalities. At the same time, the neutralizing antibody in the blood was titrated by means of the mouse neutralization test. One (12.5%) of the 8 monkeys demonstrated a neutralizing antibody titer of 1:10 on the 5th day. On the 10th day, the seroconversion was noted in all the monkeys, and the average level among all the monkeys was a titer of 1:33. The level increased remarkably and continued with high level of titer, and a titer of 1:1,770 on day 35. Based on these results, it was concluded that the TC vaccine had high productivity of neutralizing antibody and safety in monkeys.

### 3. Safety and productivity of neutralizing antibody of TC vaccine in human

One ml of the TC vaccine was injected into 35 adult volunteers (14 males and 21 females) twice at the interval of 2 weeks, 3 weeks or 4 weeks. To 11 of them the 3rd dose of 1ml was given 6 months after the 2nd injection, and 6 of them were given 1 year and 4 months after the 2nd injection, and a booster (1ml/dose) was given at proper interval respectively to observe local and systemic reactions. Changes of neutralizing antibody titer in the blood



were also studied in these 35 subjects. Flare(9 %:3/35), swelling(6%:2/35), pain(23 %: 8/35) and itchiness(6 %:2/35) at the 1st injection, flare(31 % :11/35), swelling(3 %:1/35), pain(20 %:7/35) and itchiness(17%:6/35) at the 2nd injection and flare(7 %:1/15), swelling(13 %:2/15), pain(7% : 1/15) and itchiness(7 %:1/15) at the 3rd injection were observed at the injection site, respectively. However, all reactions were disappeared within 24-72hrs. Headache in 3%(1/35) at the 2nd injection and in 7%(1/15) at the 3rd injection were observed , but these reactions were also disappeared within 24hrs. However, neither other local or systemic reactions nor an increase of reaction due to given booster were seen. Besides, 2,447 of Japan Overseas Cooperation volunteers receiving pre-exposure immunization revealed flare in 1.1%(27/2,447) and pain in 0.3 %(8/2,447) at the injection site slightly, and only a slight fever(around 37°C) in 0.2%(6/2,447) was observed as a systemic reaction. Two weeks after the 2nd injection, the neutralizing antibody titer reached a peak(mean titer=1:27 • seroconversion=90%) and thereafter it was maintained for 6 months. The neutralizing antibody titer rose rapidly after the 3rd injection, that is, the titer reached a peak (mean titer=1:125 • seroconversion=100 %) 1 week after the 3rd injection, and thereafter it was maintained for 6 months. When 1ml of booster injection was carried out while the neutralizing antibody was disappeared , the antibody titer again elevated rapidly 1 week after the injection, and reached a peak (mean titer=1:98 • seroconversion=100 % ) 2 weeks after the injection. Thus, the booster injection was determined to be effective enough. As for productivity of neutralizing antibody with different

intervals between 1st and 2nd injections at the pre-exposure immunization, 4-week interval was superior than 2-week or 3-week interval. From this results, the 4-week interval was decided to be the best for pre-exposure immunization.

Of seventeen persons suspected of exposing to rabies in 8 countries, four were exposed to rabid dogs, 8 to suspect dogs, 2 to suspect monkeys and 3 to unknown dogs. They were given post-exposure treatment with the TC vaccine. None revealed any sign of rabies infection. Thus, the effectiveness of post-exposure treatment with the TC vaccine was proved.

The TC vaccine newly developed with a chick embryo cell culture had less protein content (0.021mg/ml), no preservative (formalin or thimerosal), no serious acute toxicity in mice and rats, less allergenic property in guinea pigs, excellent induction of neutralizing antibodies in monkeys and humans and no severe local and systemic reactions in humans compared with the SMB vaccine derived from mouse cerebral tissue. These results strongly suggests that the TC vaccine can be used safely and effectively for prophylaxis to rabies infection in human. Besides, it is considered that the TC vaccine is sufficiently stable to withstand abnormal external temperature because of its freeze-dried form ; therefore, it can be used even in tropical areas where rabies is likely to occur.

The WHO recommends about the dosage and administration of rabies vaccine, that is, as the first 2 doses 1ml each should be given subcutaneously at interval of 1 month, followed by the 3rd dose of 1ml 6 months after the 2nd

injection for pre-exposure prophylaxis, and 6 doses of 1ml each subcutaneously on days 0, 3, 7, 14, 30 and 90 for post-exposure treatment. It was concluded that the TC vaccine satisfactorily can meet the dosage and administration of the rabies vaccine recommended by the WHO judging from the results of potency test and the neutralizing antibody response.

Here, a new type rabies vaccine ( Tissue culture ) which had no severe side effects and had high effectiveness for rabies prophylaxis was developed in the long history of the rabies vaccine development which had begun at Pasteur's vaccine derived from dried attenuated rabbit spinal cord at 1885.