

氏名(本籍)	坂本國昭(熊本県)
学位の種類	獣医学博士
学位記番号	乙第287号
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	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
論文審査委員	(主査) 教授 田 淵 清 (副査) 教授 清 水 武 彦 教授 小 西 信一郎

論文内容の要旨

わが国における人体用不活化狂犬病ワクチンは、1953～1973年は狂犬病固定毒西ヶ原株感染ウサギまたはヤギ脳乳剤に、石炭酸を加えて不活化した Semple 型ワクチンが用いられ、また、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。

1973年以降は、副反応(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除去するほかは、脳物質を特に除去することなく製品化しているので、依然として副反応の可能性が残されている。それ故、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)の一部にかぎられ、大量に使用されている諸外国では副反応を認めている。

わが国では、1950年(昭和25年)に狂犬病予防法が施行され、イヌへの予防が功を奏し1957年以来発生は見られていないが、最近、海外で狂犬病罹患動物の咬傷をうけて帰国する人も見られるようになり、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。

このような背景のもとに、予防的に使用可能で副反応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年以来実験を重ねた結果、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(SMB 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ニワトリ胚由来の乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチン(TC ワクチン)の実用化に成功し、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) 大量培養に適する CE 細胞調製法の検討を行った結果、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°C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 ($10^{7.0} \sim 10^{7.5}$ LD50/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、ベータプロピオラクトンを0.02v/v%になるように添加し、37°C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) 限外濾過一超遠心法により調製した TC ワクチンの平均蛋白窒素量は、0.021mg/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量は0.007mg/mlであり、限外濾過一超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・精製には限外濾過一超遠心法を採用した。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 1.0～13.2 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°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°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 120ml/kg, ラットの静脈内投与で 95ml/kg, 経口および皮下投与で 120ml/kg) を投与したが、致死動物は見られず、したがって LD50 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、LD50 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 20ml/kg より致死動物が見られ、LD50 値は雄で 30ml/kg, 雌で 29ml/kg であり、ラットの場合は 16ml/kg より致死動物が見られ、LD50 値は雄で 23.3ml/kg, 雌で 21.5ml/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 ワクチンを 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日目まで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

当研究所成人男子14名、女子21名、計35名の志願者について、TCワクチン1ml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置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。ヒトにおける安全性では、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。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、海外で狂犬病罹患犬(4頭)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、蛋白質含量が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比べて、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。

また、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、1ml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、1mlを皮下注射するように推奨している。今回開発したTC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。

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。

論文審査の結果の要旨

狂犬病は *Rhabdoviridae* 科の狂犬病ウイルスによって起こる人畜共通伝染病であって、いったん感染すれば比較的長い潜伏期の後に発症し、重篤な神経症状を伴い高い致死率を示す疾患である。本症の発症は、日本・オーストラリア・ニュージーランド・英国・スウェーデンなどの島国・半島国を除き、現在なお全世界的に認められており、特にアジア・アフリカおよび南アメリカ各国では人を含む各種動物での自然発症が多数報告されている。

人体用の不活化狂犬病ワクチンは予防的に応用されるのみならず、感染後免疫（post exposure vaccination）用としても応用されて効果を発揮してきた。しかしながら、従来の Semple 型および Fuenzalida 型ワクチンでは脳組織由来物質によって惹起される副作用（注射後麻痺）が常に問題となり、より安全なワクチンの開発が望まれていた。

このような背景のもとに、著者は SPF ニワトリ胚（CE）初代培養細胞にて狂犬病ワクチンの開発を企画し、従来の Fuenzalida 型の SMB（Sucking Mouse Brain）ワクチンに比較して、より高い免疫力価を保有し、かつ安全性の高い“人体用乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチン”の実用化に成功した。本論文の概要は次のとおりである。

1. ワクチン調製法に関する基礎的研究

狂犬病ワクチン株（HEP Flury clone S）を初代 CE 培養細胞にて増殖させ、高力価ワクチンを調製するための生産体制について検討した結果、次の 7 点が明かとなった。

- 1) 大量培養のための CE 細胞の分散法としては 3 法（Dulbecco 法、Bodian 法、Younger 法）のいずれも適用可能であった。
- 2) ワクチン株を CE 細胞に接種して 35°C で培養する場合、維持培地の pH を 7.8～8.0 に保持することにより、ウイルス力価はウイルス接種後 6 日で最高値の $10^{7.0} \sim 10^{7.5}$ LD₅₀/ml（HA 価；1:32～128）に達した。
- 3) ウイルスの不活化は 0.02%（v/v）β-プロピオラクトン存在下・37°C・45 分間の作用にて完全であったが、安全性確保の面から同一操作をさらに 1 回繰り返すこととした。
- 4) ウイルス吸着性のないメンブランフィルター（G 社製）の存在が明らかとなり、ワクチン調製工程にウイルス液の除菌濾過の導入が可能となった。
- 5) TC ワクチンの蛋白 N 量は、限外濾過一超遠心法（MW 5×10^4 ； 5.9×10^4 G 4 時間）により調製したもので 21 ± 8 μg/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て調製したものでは蛋白 N 量が 7 μg/ml レベルに低減したが、無菌性に問題があることから、前者を採用することとした。

- 6) TC ワクチンの力価は、Habel 指数で $10^{4.64} \sim 10^{5.75}$ 、抗原価で 1.0～13.2 と高力価であった。このワクチン力価と含有蛋白 N 量との相関は認められなかった。
- 7) 乳糖・グルタミン酸 Na・ゼラチン含有分散媒を用いて凍結乾燥した TC ワクチンは、4℃・36カ月間の保存にて全く異常を認めず、37℃保存の場合に 6カ月以後若干の力価低下があったが、36カ月目でも従来の SMB ワクチンの力価基準以上であって、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

TC ワクチンのマウスおよびラットに対する急性毒性、モルモットを用いた全身性アナフィラキシー反応並びにサルに対する注射局所と全身反応および中和抗体生産性について検討した結果、次のように TC ワクチンの安全性並びに免疫賦与の有効性が確認された。

- 1) マウスおよびラットにおける急性毒性：TC ワクチン（二倍濃縮レベル）を 3 ルート（静脈内、経口、皮下）で、それぞれ投与可能最大量を投与したが、致死例並びに毒性所見は全く認められなかった。対照の SMB ワクチンでは静脈内投与群に致死例があり、マウス LD₅₀ は 29～30 ml/kg、ラット LD₅₀ は、21.5～23.3 ml/kg であり、TC ワクチンのより高い安全性が認められた。
- 2) モルモット全身アナフィラキシー：TC ワクチンにてモルモットを感作した後、第 15 日目および 22 日目に惹起注射（静脈内、皮下）したが、アナフィラキシー反応は全例とも陰性であった。対照の SMB ワクチンでは静脈内惹起注射の場合、4 匹中 3 匹が軽度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) サルに対する安全性と中和抗体産生性：TC ワクチン 1 ml ずつをカニクイザル 8 匹の胸部皮下に連続 10 日注射して 3 カ月間観察したが、注射局所および全身反応は全く認められなかった。

血中中和抗体価（マウス中和試験法）は初回免疫注射後 10 日目に全例とも抗体陽転し、平均抗体価が 1：33 となり、35 日目の抗体価は 1：1,770 に達した。このように 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性が確認された。

3. ヒトに対する安全性と中和抗体産生能

ヒトの感染前免疫における TC ワクチンの安全性と中和抗体産生能について検討するとともに、ヒト感染後免疫における TC ワクチンの免疫効果について検討した結果、本ワクチンの有効性が認められた。

- 1) 感染前免疫；研究所の成人志願者 35 名（男性 14 人、女性 21 人）について TC ワクチン 1 ml をそれぞれ 2, 3, 4 週間隔で 2 回免疫注射し、その 6 カ月および 16 カ月後に 3 回目注射、さらに適当な間隔をおき追加免疫注射をおこない、注射局所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き検討した。1 回目注射の局所反応は発赤 9% (3/35)、腫脹 6% (2/35)、疼痛 23% (8/35)、痒覚 6% (2/35) であり、2 回目注射で発赤 31% (11/35)、腫脹 3% (1/35)、疼痛 20% (7/35)、痒覚 17% (6/35)、3 回目注射では発赤 7% (1/15)、腫脹 13% (2/15)、疼痛 7% (1/15)、痒覚 7% (1/15) が認められたが、いずれの反応も注射後 24～72 時間以内には消失する一過性のものであった。全身反応としての頭痛は 2 回目注射で 3% (1/35)、3 回目注射で 7% (1/15) に認められたが、その程度は軽く、注射後 24 時間以内に消失した。

国際協力事業団・海外青年協力隊員 2,447 人を対象とした本 TC ワクチンの感染前免疫注射に関する調査では、局所の発赤・腫脹 1.1% (27 人)、疼痛 0.3% (8 人)、37℃台の発熱 0.2% (6 人) が認め

られた。

中和抗体は2回目免疫注射後2週間で最高値（平均抗体価1：27）に達して6カ月間持続した。3回目注射後は1週間で最高値（平均抗体価1：125）に達して6カ月間持続した。さらに、抗体陰転期に追加免疫注射した場合には注射後2週間で最高値（平均抗体価1：98）に達し、明らかなブースター効果が認められた。なお、基礎免疫注射の2回目は4週間隔が最も効果的であった。

2) 感染後免疫：狂犬病ウイルス暴露後のヒトにおける本 TC ワクチンの治療効果は海外で狂犬病罹患犬の咬傷を受けた4名および狂犬病罹患疑似動物等（犬11頭，サル2頭）の咬傷を受けた13名に対して応用され、全員ともに発症を免れたことにより有効と認められた。

著者は本研究によって、安全性・免疫原性ともに優れた“人体用乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチン”の工業的製法を確立し実用化に成功した。本研究の成果は獣医微生物学並びに獣医公衆衛生学上に寄与するところ大であり、獣医学博士の学位を授与するにふさわしい業績と判定する。