

学位申請論文

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

【論文要旨】

坂 本 國 昭

1990

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ケ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ため、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ものは、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℃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℃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—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—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 21.5/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 1ml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

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 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。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。