弱毒ポリオウイルス Sabin 株による 不活化ワクチン調製の試み

安 部 忍 八 巻 厚 司 土 居 穰

財団法人 日本ポリオ研究所

(受付: 昭和61年 1 月28日)

総 括

弱毒ポリオウイルス 1, 2, 3 型 Sabin 株感染培養液を濃縮精製し, 安全性の高い不活化ワクチンを調製した。そして, 同様の方法で調製した強毒ウイルスの不活化ワクチンとの比較検討を行った。不活化過程での D 抗原の安定性は, 特に 1 型強毒株の Mahoney が悪く, それに反して弱毒株の Sabin 1 の D 抗原は不活化後もよく保たれていた。また, モルモットに対する免疫原性の試験では, 弱毒ウイルスの不活化ワクチンでも強毒ウイルスをよく中和させる抗体を産生させた。

不活化ワクチンの製造過程に於ける免疫原性の管理は, 寒天ゲル内沈降法 (agar gel diffusion) による D 抗原の定量により行った。この方法は再現性が高く in vivo での免疫原性とも良く一致するため, 不活化ワクチン調製過程での品質管理に非常に有用であることが確められた。これらの結果から弱毒株による安全で高力価の不活化ワクチン製造の可能性が拓れた。

序 文

一旦麻痺型疾患に罹ると, 悲惨な一生を強いられるポリオは, 1955年に不活化ワクチン (ソークワクチン) が, また, 1959~1961年に弱毒経口生ポリオワクチン (セイビンワクチン) が導入されて以来, 先進諸国では劇的に減少し, ヨーロッパ諸国や北米, 日本で野生株はほとんど排除されたと言われている。これらの成果をもたらした 2 つのワクチンのうち弱毒生ワクチンで効果をあげて

いる国は, アメリカ, イギリス, フランス, カナダ, キューバ, ブラジル, 日本など, 世界のほとんどの国であり, 不活化ワクチンのみで効果をあげてきた国は, オランダ, スカンジナジア 3 国, アイスランドなどがある。

しかし, この様に劇的な効果をあげた 2 つのポリオワクチンにも各々利点と問題点があり, 両者が導入されて以来多くの議論がなされてきた^{7,11,12,15)}。その中で最も議論が多い点は, 生ポリオワクチンでは稀にはあるがワクチン関連症例があることであり²¹⁾, 不活化ワクチンの場合は効果が弱く繰り返し免疫が必要なこととコストが高いことである。

しかし, 後者の不活化ワクチンの場合, 近年細胞培養やウイルスの濃縮精製技術の向上で, 力価が高く安価なワクチン製造が可能となり^{18,19,20)}, 不活化ワクチンが生ワクチンより安全である事を強調した報告がある¹⁵⁾。

いずれのワクチンを使用するにしても, 未だに開発途上国では強毒野生株の流行により麻痺患者が出ており, 1 名の患者に対して数百人の不顕性感染者がある²⁾ ポリオウイルスの疫学的特徴からすれば, 流行がみられなくなった国々でもワクチン接種の緩和をするべきでなく, むしろ強化により¹⁾ 強毒野生株流行の鎖を断ち切らなければならないというのが世界的コンセンサンスである。

我が国のポリオは, 1974~1984年の10年間で13名の患者しか出ておらず強毒野生株は殆んど排除されたと考えられている。従って, 今後ポリオに対する感受性のある者が蓄積することのないよう, 経口生ポリオワクチンを継続投与しなければならないが, この時間問題になるのは如何にして関連症例を無くすか, ということである。この問題の対策としては, 遺伝的に安定な生ワクチン用タネウイルスの樹立の研究^{4,13)} の他に, 免疫機能の低下している人達に対して生ワクチン以外の方法で免疫を賦与する検討が必要である。Salk によれば¹⁵⁾, 米国で 1969

Preparation of Inactivated Poliomyelitis Vaccine with Attenuated Sabin Strains by Shinobu ABE, Atsushi YAMAKI and Yutaka DOI (Japan Poliomyelitis Research Institute).

〒189 東京都東村山市久米川町 5-34-4

～1977年までの9年間で、直接生ワクチンを受けて麻痺を起したと思われる関連症例24例中9例が免疫異常であったという報告、また Melnick は同じく米国で、1969～1980年の11年間で、ワクチン関連症例を含めた全ポリオ麻痺患者 185 例中11例が免疫異常者であったとの報告¹²⁾がある。このような事実は、免疫異常者や免疫抑制剤による治療を受けている所謂ハイリスク児のポリオに対する免疫には特別な配慮がなされなければならないことを示唆⁶⁾しており、これ等のヒト達の免疫は、不活化ワクチンが理想的であろう。我が国でも、このようなハイリスクの子供達のために、補助的ワクチンとして、不活化ワクチンの部分的使用を望む声がある。

我々はこの要望にこたえるため、過去の不活化ワクチンより安全で効果の高い不活化ワクチンをつくる目的で本研究を進めてきた。

本研究の特色の1つは、従来不活化ワクチンの調製に強毒ウイルスが用いられてきたが、これを弱毒ウイルスの Sabin 株に取って変えようとしたことである。これは我が国ですでに強毒野生株が排除されている現在、たとえ行き届いた製造施設でも強毒ウイルスを大量に扱う事は常に強毒ウイルスによる環境汚染の心配が存在する事になるからである。またワクチン投与を受ける側にとっても、過去に米国で経験したワクチン中の生残強毒ウイルスによる事故¹⁴⁾などの心配もない、安全なワクチンとなろう。

本研究は予備的研究として、ウイルス増殖用に初代サル腎細胞でなく HEp-2 細胞を用いてワクチンの作製を試みた。そして、ウイルス浮遊液は効率良く濃縮精製して、かつて我が国で使用した不活化ワクチンに較べ 100 倍以上の免疫原性を有する高濃度の不活化ワクチン

の調製が可能となった。また、中和抗体産生を担う D 抗原を、gel diffusion test¹⁶⁾ で再現性高く定量して、in vitro で免疫原性の管理がおこなえることを確認した。

材料と方法

1. ウイルスと細胞：弱毒ポリオウイルス 1, 2, 3 型は、Sabin 株 (1 型; LSc, 2 ab., 2 型; P712, ch 2 ab., 3 型; Leon, 12a₁ b.) を用い、強毒ポリオウイルスは、1 型 Mahoney 株, Brunhilde 株 (国立予研, 中野稔博士より分与), 2 型 MEF-1. LB 株 (国立予研, 戸塚敦子博士より分与), そして 3 型 Saukett 株を用いた。

ウイルス増殖には、マルチトレイ (NUNC 社製, 培養面積 6,600 cm²) または、ルー瓶に培養した HEp-2 細胞を用いた。細胞培養液は、7% 仔牛血清, 0.1% yeast extract, 0.15% NaHCO₃, それに 200 u/ml にペニシリン, 200 γ /ml にストレプトマイシンを加えた LE 培地を用いた。

ウイルスは細胞に接種後 36 C に 40～50 時間おき、CPE がピークに達した時点でプールし、-20 C で凍結させた。Sabin 1 は HEp-2 細胞で 1 代, 他のウイルスは 2 代増殖させて以下の実験に用いた。

2. ウイルスの濃縮と精製：Table 1 に示す手順により、約 20 l の粗ウイルス液を単位バッチとして、汙過 (Pall filter, BP and BA filter) によって、細胞残滓を除いた。次に限外汙過 (Millipore, Pericon) によって、容量で約20倍濃縮した。この限外汙過 (Ultrafiltration 以下 UF) 濃縮ウイルスの段階で、バクテリアや他のウイルスの汚染の否定、感染価の測定を行い、合格したバッチについてプールし以下の実験の出発ウイルス

Table 1 Practical examples of poliovirus type 1 during a course of concentration and purification.

Steps of processing	Volume	PFU per ml	
		Mahoney	Sabin 1
1 Crude virus suspension	100 L	10 ^{8.38} (100 %)*	10 ^{8.10} (100 %)
2 Clarification by filtration	100 L		
3 Concentration by ultrafiltration	5 L	10 ^{9.63} (89 %)	10 ^{9.31} (81 %)
4 Further concentration by ultracentrifugation	360 ml		
5 Sonication	360 ml		
6 Clarification by centrifugation	360 ml		
7 Purification by gel filtration	540 ml	10 ^{10.63} (95 %)	10 ^{10.17} (63 %)

* =Recovery ratio from crude virus suspension.

Fig. 1 Conversion of antigenicity from D to C by heating (Sabin 1).

Purified Sabin 1 D antigen was heated at 56°C for 30 min.

To the heated antigen CsCl was added at the concentration of 1.34 g/ml and then centrifuged at 100,000 g for 20 hours at 4°C. Approximately 0.2 ml of fractions were collected through bottom puncture. The peak of D antigen at 1.34 g/ml was converted to a peak of C antigen at density 1.28 g/ml. When native D antigen was centrifuged with CsCl there was a single peak at density 1.34 g/ml as shown in Fig. 6.

材料とした。

更に濃縮するために、UF 濃縮ウイルスにグラチンを最終 0.1% に加え、4°C で 100,000 g 4 時間の超遠心 (日立 65 P, RP 42 ローター) を行った。1 回の処理単位として、UF 濃縮ウイルス 70 ml から得た沈渣を 5 ml の 0.1 Mol, P. B. (Phosphate buffer) ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5.2 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 23.8 g を D. W. にとかし 1,000 ml とする。) に浮遊し、200 W, 2 分の音波処理 (久保田, 200M) 後 12,000 g, 10 分の遠心分離を行い上清を採取した。

精製は、この濃縮ウイルス液 (約 280 倍) を DEAE Sepharose CL-6 B によるゲル濾過によって行った。即ち、直径 1.5 cm 長さ 30 cm の column にゲルを詰め、5 ml の濃縮ウイルス液を添加し、0.1 Mol. P. B. で溶出を行った⁸⁾。これの 1 ml 毎の fraction について、260 及び 280 nm の吸光度を測定し、ウイルス分画のピークのみをプールして精製 D 抗原とした。

3. 抗血清の作製: 使用した免疫抗原は、精製 D 抗原または、この D 抗原を加熱処理した C 抗原である。抗原の濃度は、D 抗原が $10^{9.2} \sim 10^{9.8}$ PFU/ml, C 抗原は加熱前の感染価で $10^{9.5} \sim 10^{10.0}$ PFU/ml である。

C 抗原の調製のための加熱条件は、次の実験の結果に基き、Sabin 株は 56°C, 30 分、強毒株は 60°C, 60 分で行った。即ち、Fig. 1 に示すように熱処理後のウイルスを、CsCl 等密度勾配遠心法でみると、Sabin 1 は 56

Fig. 2 Conversion of antigenicity from D to C by heating (Mahoney).

D antigen of Mahoney was heated at 56°C for 30 min. (A), at 56°C for 60 min. (B) and at 60°C for 60 min. (C). Procedures of isopycnic centrifugation and fractionation were same as in Fig. 1.

Fig. 3 Schemes of gel diffusion plate and templates.

The diameter of each hole in the template is 3 mm. The distance from center of each peripheral hole to the central one is 6 mm.

a=frame, b=1% agar (1.0 mm.H.), c=template (3.0 mm. H.), d=glass plate.

C, 30 分の加熱により 1.34 g/ml のピークはなくなり, 1.28 g/ml の empty capsids の密度に移動した。一方 Mahoney 株は, Fig. 2 に示すように, 56 C, 30 分加熱しても 1.34 g/ml のピークは相当量残っており, 60 C, 60 分加熱により, 大部分のウイルス粒子が 1.28 g/ml の密度となり, 殆んど C 抗原に変わったと考えられた。

動物はウサギとモルモットを用いた。ウサギについては, 皮下に 2 日続けて 10 ml, 4 週間後に静脈内に 10 ml, 更に 4 週間後に静脈内に 10 ml 接種し, 最後の接種の 7 日後に心臓より全採血した。モルモットについては, 1 週間間隔で 3 回腹腔内に各 1.0 ml の抗原を接種し, 4 週間後再び腹腔内に 1.0 ml 接種し, 7 日後に心臓より全採血を行なった。

得られた抗血清は, 中和試験, CF 試験そして gel diffusion を行ない, 良好と認めた抗血清について, プールまたは個体別のままで standard 抗血清とし, 以下の各試験に用いた。

4. Gel diffusion test : Gel diffusion test は, Ramshorst らの方法¹⁶⁾ を一部修飾して行なった。Fig. 3 に示すように, 水平に静置したガラス板の上にフィルム (FMC 社製, ゲルボンドフィルム) を敷き, 外ワクを取りつける。そしてワクの中に 1% Difco Bacto agar-P. B. S. (NaCl 8.0 g, NaHPO₄ 1.4 g, D. W. 1,000 ml, pH 7.2) を厚さ 1 mm にまき凝固させる。更に agar の上に template を静かに置く。

Template の中心の穴に一定希釈の抗血清, 周囲の 6 つの穴にそれぞれ同じ濃度の被検抗原を 20 μ l ずつ入れる。このように調製したプレートを, 20 C の多湿の状態に 2 日間置き, 2 日目に外ワクと template をはずし, gel の載ったフィルムを取り出す。Gel の上に濾紙を重ね, 更にその上に 250 cm² 当り約 4 kg の錘を重さが gel 全体にかかるように載せ, 36 C で通風の良い場所に 2 時間程置き半乾燥させる。Agar がフィルム上に薄く貼り付いた状態になったら, 0.25% コオマジーブリリアントブルー (希釈液は, メタノール 5 : 酢酸 1 : D. W. 5) で 1~2 分間染色する。次に希釈液のみで過染

Fig. 4 A titration of D antigen by the gel diffusion test (Sabin 3).

Fixed concentration of standared rabbit serum was filled into each center hole of the template. Sample A (a, b and c) and B (d, e and f) of inactivated Sabin 3 were filled into peripheral six holes. Diluted standard D antigen of Sabin 3 (1:4; g and h, 1:8; i and j, 1:16; k and l) were filled into peripheral six holes.

色分を脱色し、青色の沈降線がよく現れたら脱色を止め、温風で乾燥させる (Fig. 4).

D抗原の測定は、出来上った染色標本を写真用の引き伸し器で、5倍に拡大し、6角形になっている沈降線の相対する辺の内側の最短距離 (line distance) を測定する事に始まる。1つの template での6角形で3カ所を測定し、3つの平均値をその template での line distance とした。この line distance は、抗血清濃度を一定にし、抗原量を通減希釈するとき、抗原希釈倍数に比例して大きくなり、この関係は、非常に再現性が高いものであった。

Gel diffusion test で決定する D 抗原価の単位 (D unit) は、van Wezel らの成績¹⁷⁾を参考にして、各ウイルス株の精製ウイルス液の $10^{6.15}$ PFU を 1 D unit とした。試験毎のバラツキを最少限に抑えるため test 毎に -80°C に小分保存した D 抗原を標準として用いた。

試験サンプルの D unit の測定は、2倍階段希釈した標準 D 抗原の line distance から得られた標準直線に、試験サンプルの line distance をあてはめて計算した。即ち、標準 D 抗原の line distance を縦軸に、抗原希釈を横軸におき、各希釈から得られた line distance から、標準回帰直線を求めた。試験サンプルについては、一定濃度について複数の template を用い、全ての line distance の平均値を求め、標準回帰直線式に代入して D unit を計算した。

5. フォルマリン添加不活化ウイルスの調製：不活化ウイルスの調製方法は、Goldblum らの方法⁵⁾によった。先ず濃縮精製して得た D 抗原に等量の蒸留水を加えて2倍に希釈し、これに NaHCO_3 の含まれていない2倍濃度の medium 199 を等量を加えた。更に安定剤として glycine を最終 0.5% に加えた後 0.5 N 酢酸で pH を 7.0 に調整した。そしてポアサイズ $0.22\ \mu\text{m}$ で汙過を行ない (汙過後に不活化前のサンプルを採取)、不活化は、フォルマリンを最終 1:4,000 に加え、 37°C 、12日間行なった。不活化期間中経時的に感染価測定用と、等密度勾配遠心用の各サンプルを採取した。

感染価測定用サンプルは、氷水で冷却し NaHSO_3 を $0.044\ \text{mg/dl}$ に加え、フォルマリンを中和した後試験に供した。遠心用のサンプルも冷却し NaHSO_3 を加えた後、その $5.0\ \text{ml}$ に CsCl $2.38\ \text{g}$ を加えて溶解後、 $35,000\ \text{rpm}$ ($100,000\ \text{g}$)、20時間の超遠心 (日立 65P, RPS 50 ローター) を行なった。超遠心後、遠心管底より内容を滴下し、約 $0.3\ \text{ml}$ の fraction に分けた。各 fraction について、密度の測定、 $260\ \text{nm}$ と $280\ \text{nm}$ での吸光度の測定、そして gel diffusion test での D unit の測定を行なった。12日間の不活化後 $0.026\ \text{mg/dl}$ に

NaHSO_3 , $0.09\ \text{Mol.}$ に EDTA を加え不活化ワクチンとした。

6. モルモットによる不活化ワクチンの力価試験：不活化ワクチンの中和抗体産生能を調べる力価試験は、かつて我が国で実施されていた、急性灰白髄炎ワクチン基準¹⁰⁾ののっとり行なった。

動物は体重約 $250\ \text{g}$ のモルモットを使用した。不活化ワクチンは原則として不活化前の感染価で $10^{6.5}$ 、 $10^{5.5}$ 、 $10^{4.5}$ 、 $10^{3.5}$ PFU/ml に希釈し、1希釈当り8匹のモルモットを使用した。免疫方法は、モルモットに2週間間隔で2回 $1.0\ \text{ml}$ を皮下に接種し、2回目の接種の7日後に心臓より全採血を行なった。

中和試験は、約 $100\ \text{TCID}_{50}/0.1\ \text{ml}$ の攻撃ウイルスと無希釈のモルモット血清とを等量混合し、 37°C 、3時間、更に 4°C で一夜中和した後、2本の GMK-2 細胞 (アフリカミドリザル腎由来継代細胞) のローラーチューブに $0.2\ \text{ml}$ ずつ接種し、 36°C で7日間観察する方法によった。2本のローラーチューブのうち1本でも CPE が抑えられれば、抗体陽性とした。ワクチンの力価は、試験に用いたワクチンの各希釈での抗体陽性モルモットと陰性モルモットの数から Reed and Muench の方法で計算し、ワクチン原液からの希釈倍数の10の指数で表わす A. E. L. V. (antigenic extinction limiting value; 50%抗原性有効限界値)¹⁰⁾で表した。

7. 感染価の測定と中和抗体価の測定：感染価は、GMK-2 細胞を用い、plaque 法によった。

抗血清の中和抗体価測定は、階段希釈した抗血清と、 $100\ \text{TCID}_{50}/0.025\ \text{ml}$ の攻撃ウイルスを等量混合し、 36°C で2時間中和後 microplate (Falcon Micro Test II) に培養した GMK-2 細胞に $0.05\ \text{ml}$ 宛接種し、 36°C で7日間観察する方法によった。

8. 補体結合試験：補体結合試験は、市販 (デンカ生研) の補体及び感作羊血球を用い、50%溶血法による Micro 法⁹⁾によった。

結 果

1. 濃縮と精製：ポリオウイルス 1, 2, 3 型の Sabin 株及び強毒株のそれぞれについて、約 $100\ \text{l}$ の粗ウイルス液をつくり、Table 1 に示した手順により濃縮、精製し D 抗原を調製した。いずれのウイルス株についても 10^8 PFU/ml 以上のウイルス液を出発材料とした。限外汙過による20倍濃縮の段階で80%以上のウイルスが回収でき、DEAE Sepharose CL-6B ゲル汙過による精製までの段階で約280倍濃縮となった。この時のウイルス液は、 10^{10} PFU/ml 以上で、回収率は粗ウイルス液から計算して50%以上であり効率良く回収できた。

Fig. 5 Purification of concentrated virus suspension with DEAE Sepharose CL-6B gel filtration (Sabin 1).

Five milliliter of concentrated and clarified (processed to step 6 shown in Table 1) virus suspension were loaded on ϕ 1.5 cm $\times$ 30 cm column and then eluted with 0.1 Mol. P. B. (pH 7) and approximately 1.0 ml of fractions were collected.

Fractions from No. 20 to 31 were pooled as purified D antigen in this case.

Fig. 5 にゲル濾過による精製の代表的なパターンとして Sabin 1 の溶出の例を示した。

この場合 20~31 番の fraction をプールして D 抗原とした。この D 抗原の 260 nm での吸光度は 0.692 で、280 nm では 0.366 であり、比率 260/280 nm は 1.89 であった。また CF 価は抗 D 血清に対し 320 単位、抗 C 血清に対し 20 単位であった。

他の株についての結果も差異はなく、260 nm と 280 nm の吸光度及び等密度勾配遠心の結果などで精製度の高さを確認した。

Sabin 1 の濃縮精製過程での蛋白窒素量をマイクロケルダール法で測定すると、Table 1 の限外濾過20倍濃縮ウイルス液は 0.516 mg/ml であったが精製 D 抗原では 0.022 mg/ml であり、投与量当りで WHO の requirements²²⁾ で示されている蛋白窒素量を充分下回るまで精製されていた。更にこの精製度を確認するために、CsCl による等密度勾配遠心を行ない分画すると Fig. 6 に示すように C 抗原の存在を意味する密度の軽い山はな

Fig. 6 Fraction pattern of purified D antigen by isopycnic centrifugation (Sabin 1).

CsCl was added to purified D antigen (processed to step 7 shown in Table 1) at the concentration of 1.34 g/ml. And then centrifuged and fractionated in same manner as in Fig. 1. In this case, infectivity of No. 7 was 10^{12} PFU/ml.

く、1.34 g/ml のポリオウイルス完全粒子の密度の位置に単一な大きなピークが確認された。このピークは、 10^{12} PFU/ml と高い感染価を示した。

ゲル濾過により精製したウイルスは、0.1 Mol. P. B. に浮遊されているが、このウイルスについて 4 C, -20 C, -70 C での安定性を調べた結果、3 カ月間ではほとんど感染価の減少はみられなかった。しかし、安全のため D 抗原は全て -80 C に保存した。また、標準 D 抗原は試験の再現性を高めるため 1 ml ずつ小分して -80 C に保存し、各試験毎に新たに融解したものを用いた。

2. 抗 D, 抗 C 血清: 補体結合試験や gel diffusion による D, C 抗原の定量には、各々の抗原に特異的な抗血清が必要である。そこで精製 D 抗原あるいは、加熱して得た C 抗原をウサギやモルモットに免疫し、得られた抗血清の中で特異性の高いものを選んで用いた。

いずれの株のウイルスについても、D 抗原に対する抗血清の中和抗体は高く型特異的であった。これら抗 D 血清の CF 抗体には、C 抗原との交差反応が現れたが D 抗原に対する抗体価の方が 4~32 倍高かった。

C 抗原に対する抗血清は、中和抗体は低く、CF 抗体には D 抗原との交差反応が認められたものの、C 抗原に対する抗体価の方が 5~16 倍高かった。

Table 2 に Sabin 1 と Mahoney に対するウサギとモルモットの抗 D, 抗 C 血清の中和、CF 価と gel diffu-

Table 2 Specificity of antisera against poliovirus type 1 D and C antigens.

Antigen	Animal	Neut. titer against		CF titer against		Dilution for	
		Sabin 1	Mahoney	Sabin 1 D	Mahoney C	gel diff. test	
Sabin 1 D	Rabbit	450,000*	450,000	800**	200	400	40
do.	Guinea pig	80,000	80,000	400	100	320	20
Sabin 1 C	Rabbit	320	10	25	200	40	80
do.	Guinea pig	28	10	10	100	10	10
Mahoney D	Rabbit	28,000	40,000	NT***	NT	320	40
do.	Guinea pig	10,000	20,000	NT	NT	80	10
Mahoney C	Rabbit	10	56	NT	NT	10	160
do.	Guinea pig	10	10	NT	NT	10	40

* =Reciprocal serum dilutions vs. ca. 100 TCID₅₀ of virus in micro-method.

** =Reciprocal serum dilutions vs. 4 CF units of antigen in micro-method.

*** =Not tested.

sion 試験に使用する際の希釈倍数を示した。これらの抗D血清は全て中和試験では型特異的であり、CF試験によるD抗原の定量には、希釈することによりC抗原との交差反応を除外して行った。また、これらの抗血清のgel diffusion 試験での使用濃度では、他の型のD抗原はもちろん、同型のC抗原との反応もなく、細胞成分、牛血清などへの反応も認められなかった。

3. Gel diffusion test: D 抗原定量のための gel diffusion 試験術式確立のために先ず必要なのは、使用する抗血清の濃度の決定である。そのためには、template の中心の穴に 1:2 または 1:4 の充分濃厚な D 抗原を入れ、周囲の6つの穴に階段希釈した抗血清を入れて反応させ、最も明瞭な沈降線を形成する希釈倍数を決めた。抗血清の濃度が濃すぎると、沈降線の形成する

Fig. 7 Reproducibility of repeated D antigen titrations by gel diffusion test (Mahoney).

Fig. 8 Correlation of D antigen concentration and line distance for each type of poliovirus in gel diffusion tests.

Fig. 9 Decrease of infectivity during inactivation period.

6 角形は大きくなり周辺の抗原を入れた穴に近ずき、D 抗原の測定範囲は小さくなる。また、濃度が薄すぎると、沈降線が薄くなり、line distance が測定しにくくなる。従って、沈降線が明瞭で低濃度の抗原とも反応するような血清希釈を選んだ。

D 抗原の定量の場合は、上記の要領で決めた一定希釈の抗血清を中心の穴に入れ、周囲の 6 つの穴には階段希釈された一定濃度の抗原を入れた。

沈降線は、Fig. 4 で示す如く非常に明瞭で、抗原希釈倍数と line distance の関係は正比例しており相関係数は 0.99~1.00 の値を示した。繰り返しの test でも再現性は高く Fig. 7 に示した如く、test 毎のパラッキも少なく安定な回帰直線を示した。

Fig. 8 に 1, 2, 3 型弱毒株及び強毒株の標準 D 抗原と、それぞれに対する抗血清で行なった gel diffusion 試験の結果を示した。各ウイルス株での傾きはほぼ同じで、型間、株間での抗原濃度と line distance の関係に大きな違いはなかった。回帰直線の切片の値がウイルス

株によって異なるのは、標準 D 抗原の濃度の違いによるものと、抗血清の使用濃度の僅かな差によるものと考えられる。個々の試験サンプルの D 抗原量は、材料と方法で述べたように、試験サンプルといっしょに繰り返し試験して得た標準 D 抗原の標準回帰直線の式に、試験サンプルの line distance を代入して決定した。

4. 不活化ワクチンの調製： 不活化ワクチンの調製は、Sabin 株だけでなく、比較する目的で不活化ワクチンの調製用に広く用いられている 3 つの型の強毒ウイルスについても同様の方法で調製した。

濃縮精製した D 抗原にホルマリンを 1 : 4,000 に添加し、37C で行なった不活化過程での各ウイルスの感染価の減少を Fig. 9 に示した。

いずれのウイルスも 72 時間以内に 1 : 10 希釈でワクチンの中の生残ウイルスは検出できなくなった。

Sabin 1, 2 では、45 時間で感染性ウイルスは検出できなくなり、Sabin 3 はやや遅れた。どの型についても、Sabin 株と強毒株の不活化カーブに大きな相違は認めら

Table 3 Recovery of D units at post. inactivation

Virus	D units at		Recovery	(Recovery*)
	Pre. inact.	Post. inact.		
Sabin 1	1,800	1,500	85 %	(100 %)
Mahoney	8,900	2,600	29 %	(27 %)
Brunhilde	13,900	6,400	46 %	(60 %)
Sabin 2	3,600	3,000	83 %	(84 %)
MEF-1	9,400	9,300	99 %	(100 %)
Sabin 3	15,600	12,800	82 %	(86 %)
Saukett	8,900	6,300	71 %	(NT**)

* =Recovery of D units at the peak of 1.34 g/ml after isopycnic centrifugation.

** =Not tested.

Fig. 10 Fraction pattern of D antigen by isopycnic centrifugation during inactivation period (Sabin 1).

Fig. 11 Fraction pattern of D antigen by isopycnic centrifugation during inactivation period (Mahoney).

れなかったが、2型強毒株のMEF-1は生残ウイルスが検出できなくなる迄に72時間を要した。濃縮精製ウイルスは、感染価が高いにもかかわらず不活化カーブは直線に近く、3日以内に不活化は終了するため、安全性の上でも問題はないであろう。

次に不活化後のD抗原の減少について検討した。Ta-

ble 3に示したように、Sabin 1, 2, 3はともに不活化後も80%以上のD抗原を維持していた。強毒株もMEF-1は99%, Saukettは71%のD抗原を維持していたが、Mahoneyは29%維持しているに過ぎなかった。

この結果は、不活化期間中経時的に取ったサンプルについての等密度勾配遠心による分析によっても確められ

Table 4 Potency of inactivated vaccine against homologous and heterologous intratypic poliovirus.

		Type 1				Type 2				Type 3			
Vaccine strain		Sabin 1		Mahoney		Sabin 2		MEF-1		Sabin 3		Saukett	
PFU/ml at pre. inact.		10 ^{9.34}		10 ^{10.10}		10 ^{9.89}		10 ^{10.24}		10 ^{10.22}		10 ^{10.10}	
Du/ml at post. inact.		1, 500		2, 600		3, 000		9, 300		12, 800		6, 300	
Potency	challenge virus	Sabin 1	Mahoney	Sabin 1	Mahoney	Sabin 2	MEF-1	Sabin 2	MEF-1	Sabin 3	Saukett	Sabin 3	Saukett
	a	4.96	4.13	4.72	4.70	5.49	5.01	5.62	6.07	5.54	5.47	5.15	5.60
	A. E. L. V. b	2.12	1.29	1.12	1.10	2.10	1.62	1.88	2.33	1.78	1.71	1.55	2.00
	c	1.78	0.95	1.31	1.29	2.01	1.53	1.65	2.10	1.43	1.36	1.35	1.80

a : A. E. L. V. (Antigenic Extinction Limiting Value) of vaccine.

b : A. E. L. V. per 10^{6.5} PFU/ml at pre. inactivation.

c : A. E. L. V. per 1 D unit/ml at post. inactivation.

た。Fig. 10 に示したように、Sabin 1 では12日間の不活化後でも不活化前と同様 1.34 g/ml の D 抗原のピークが保存されており、D 抗原から C 抗原への変化や、ウイルス粒子の密度の変化はなかった。しかし、Fig. 11 に示した Mahoney の場合、D 抗原は3日目までで一旦大きく低下し、9～12日の間でも更に大きく低下した。また、ウイルスの RNA と蛋白の量を示す 260, 280 nm の吸光度でも、不活化日数を経るに従って 1.34 g/ml の粒子のピークが減少していることを示している (Fig. 11)。そして、全ての株について不活化後の D 抗原の保存率と、等密度勾配遠心による 1.34 g/ml のピークの D 抗原の保存率は非常に近い値であった (Table 3)。

以上の結果から、Mahoney が不活化により D 抗原が低下する問題は残るが、Sabin 株や他の強毒株は充分 D 抗原を保持しており、不活化ワクチンとしての効有性が期待された。

5. モルモットによる力価試験： D 抗原の定量には、gel diffusion test が非常に有効な試験方法であることが示されたが、ワクチンとしての有効性を実証するためには、最終的に in vivo で中和抗体産生能の裏付けがなくてはならない。

Table 4 は、各型の Sabin 株及び強毒株で調製した不活化ワクチンの抗原量と、これらの不活化ワクチンで免疫したモルモット血清に対する中和試験から得たワクチンの力価を表わす A. E. L. V. を示したものである。

いずれの株で調製したワクチンも、ワクチン原液の A. E. L. V. は 4.13～6.07 と非常に高く、かつて我が国で強毒株を用いて作られていた不活化ワクチンの A.

E. L. V. が 2.0～3.0 であった事を考えると格段に高い (Table 4, A. E. L. V., a)。ワクチンで免疫して得たモルモット血清に対する中和試験は、いずれの株のワクチンについても攻撃ウイルスは Sabin 株と強毒株を用いたが、Mahoney 株ワクチン以外は全てワクチン株と homologous なウイルスで攻撃した方が A. E. L. V. は高く、株特異性が認められた。

各ワクチンの免疫原性を比較する際、出発抗原量が揃っていないため、Table 4 の a で示したワクチン原液の A. E. L. V. のみでは比較できない。そこで横断的な比較のため、b には各ワクチンの不活化前の 10^{6.5} PFU 当りの A. E. L. V. を、また、c には不活化後の 1 D unit 当りの A. E. L. V. を算出して表した。強毒株ワクチンの homo. ウイルスに対する 1 D unit 当りの A. E. L. V. は、Mahoney, MEF-1, Saukett それぞれ 1.29, 2.10, 1.80 で 2 型の MEF-1 が最も中和抗体ができ易く、次いで 3 型、1 型の順であった。このことは、諸外国での 3 価混合不活化ワクチン中の 1, 2, 3 型の D 抗原量が、それぞれ、40, 8, 32 D units であり、いずれの型も平均して中和抗体産生を促す抗原量にしている状況^{20, 22)}と良く一致している。

Sabin 株ワクチンの場合、1 D unit 当りの 1, 2, 3 型各ワクチンの homo. ウイルスに対する A. E. L. V. は 1.78, 2.01, 1.43 となり、免疫原性は 2, 1, 3 型の順で、前述の強毒ワクチンの順位とは異なっていた。しかし、これら各 Sabin 株ワクチンの強毒株ウイルスに対する A. E. L. V. は 1, 2, 3 型各々 0.95, 1.53, 1.36 で強毒株ワクチンと同じように 2, 3, 1

型の順で免疫原性は強くなっている。

この成績では、Sabin 株でワクチンをつくる際も、従来の強毒株で調製したワクチンと同様、1, 2, 3 型ウイルスの D 抗原量は、2 型を少なくし 3 型、1 型の順で多くすべきであることを示唆する結果であった。しかし、Sabin 株で不活化ワクチンを調製する際、WHO の requirements で示している如く 1, 2, 3 型各々を 40, 8, 32 D units の構成で良いかどうかは、今後更に多くの Sabin 不活化ワクチンロットを調製してデータを積む必要がある。

考 察

免疫不全や、免疫抑制剤を使用中のいわゆるハイリスクの子供達は、ワクチン関連症の危険があるため経口生ポリオワクチンの使用ができないが、我々は、これらのヒト達にも安心して使える安全性の高い不活化ワクチンを弱毒ウイルス株を用いて調製した。

従来、ポリオの不活化ワクチンは強毒株でつくられてきたが、弱毒株を用いて有効な不活化ワクチンをつくるのができれば、製造者及びその周囲にとって危険性が減少することになる。このような立場から我々は、Sabin 株で不活化ワクチンをつくり、それによって強毒ウイルスの感染を防衛できる中和抗体が産生される知見を得た。

ウイルスの増殖は、マルチトレでも行ったが、この方法は大量培養には適した方法であった。細胞は HEp-2 を用いたが、実際に不活化ワクチンを調製する際には、初代サル腎細胞か、他の適当な正常細胞を使うことになる。大量に得られたウイルス液は、限外濾過による濃縮、DEAE Sepharose CL-6B ゲル濾過による精製を行ったが、回収率及び精製度も高く、これらの方法はワクチン調製に非常に適した方法であることが確められた。

ポリオウイルスの有する D, C 2 つの抗原のうち、中和抗体産生を担う D 抗原の定量は、gel diffusion 法によった。この試験は、再現性が高く簡便な方法であるが、通常の濃縮していないウイルス濃度（約 10^9 PFU/ml 以下）では沈降線が現れず測定できないのが唯一の欠点である。そこで同法により測定した D 抗原の D unit は、van Wezel らの成績¹⁷⁾を参考に、標準 D 抗原の $10^{6.15}$ PFU/ml を 1 D unit/ml とし算出した。

ウイルスを確実に不活化するためには、不活化カーブが直線に近いことが望ましい。我々が用いた濃縮精製ウイルスは、感染価が高いにもかかわらず、72 時間以内で生残ウイルスは検出できなくなり、不活化カーブも直線に近かった (Fig. 9)。過去の経験から考えると、単位時間当りのウイルス不活化量は、crude ウイルス液よりも濃縮精製ウイルス液の方が多い。これは、精製により

夾雑蛋白が非常に減少しているのでフォルマリンがウイルスに効率良く効いたためであろう。そして、夾雑蛋白の凝集にとりこまれるウイルスが不活化をまねがれる危険性がなくなり完全な不活化が行なわれるであろう。

不活化後の D 抗原保存率は、Sabin 1, 2, 3, MEF-1, Saukett では全て 70 % 以上であったが、Mahoney だけは 30 % 以下であった (Table 3)。この Mahoney の D 抗原の減少は、不活化過程での 1.34 g/ml の粒子の減少から来たものである (Fig. 11)。Mahoney を含めて全ての株について、不活化後の D 抗原の保存率は、等密度勾配遠心での 1.34 g/ml の完全ウイルス粒子のピーク量の保存率と良く一致した (Table 3)。この結果は、Doel ら³⁾の不活化ポリオワクチン中の D 抗原を密度勾配遠心法により物理的に測定する方法を支持できるものである。

Mahoney の D 抗原のみが不安定なのは、この株特有なものであるかを調べるため、同じ 1 型の強毒株である Brunhilde についても不活化ワクチンの調製を試みた。その結果は、Table 3 に示した如く、Brunhilde の D 抗原の保存率は 46 % で、Mahoney と Sabin 1 の中間の安定性を示した。ポリオウイルス 1 型の中で株によって D 抗原の安定性が非常に異なる事は、興味深い問題である。Mahoney の D 抗原の安定性が悪い事について van Wezel¹⁹⁾は、もっと安定な株をみつけるか、安定剤の研究の必要性を指摘しているが、Sabin 株は有力な代替候補といえよう。

Sabin 株で不活化ワクチンをつくる場合、最も重要なことは、弱毒ウイルスで賦与した免疫が、強毒ウイルスに対し感染防衛ができるかということである。Table 4 より、不活化 Sabin 株の 1 D unit 当りの強毒ウイルスに対する A. E. L. V. は、1, 2, 3 型それぞれ 0.95, 1.53, 1.36 であり、不活化強毒株の強毒ウイルスに対するそれは、1.29, 2.10, 1.80 であった。この結果から、不活化 Sabin 株で不活化強毒株に相当する効果を与えるためには、1, 2, 3 型それぞれ不活化強毒株の 2.2, 3.7, 2.8 倍の D 抗原の増強が必要となろう。

今後、いくつかの Sabin 株不活化ワクチンを調製して、強毒株に対する A. E. L. V. を求め、強毒株ワクチンとの比較を行ない、それに匹敵する免疫原性を持たせるよう 1, 2, 3 型抗原の混合比を考える必要があらう。

いずれにしても、今回毒力の弱い Sabin 株による安全な、不活化ワクチンの強毒ウイルスに対する有効性が充分確認された。そして、この濃縮精製 D 抗原で調製された不活化ワクチンの A. E. L. V. は、非常に高く充分希釈して使用できる値であり、ジフテリア、百日咳、破傷風との混合ワクチンの調製も可能であろう。

文 献

- 1) Assad, F. (1979) : Poliomyelitis vaccination benefits-versus risk. *Dev. biol. Standard.*, 43 : 141-150.
- 2) Chin, J. (1984) : Can paralytic poliomyelitis be eliminated ? *Rev. Infect. Dis.*, 6, Suppl. 2 : S 581-S 585.
- 3) Doel, T. R., Osterhaus, A. D. M. E., van Wezel, A. L. and van Steenis, G. (1984) : The evaluation of a physical method for the quantification of inactivated poliovirus particles and its relationship to D-antigenicity and potency testing in rats. *J. Biol. Standard.*, 12 : 93-99.
- 4) 土居 穰, 伊東平八 (1979) : 経口生ポリオワクチン : Sabin 原ウイルスからの 1 型たね候補株の選択. ウイルス, 29 : 31-44.
- 5) Goldblum, N., Gotlieb, T. and Miller, G. (1957) : Production of formalinized poliomyelitis vaccine (SALK-TYPE) on a semi-industrial scale. *Bll. WHO.* 17 : 1001-1023.
- 6) Hara, M., Saito, Y., Komatsu, T., Kodama, H., Abo, W., Chiba, S. and Nakao, T. (1981) : Antigenic analysis of polioviruses isolated from a child with agammaglobulinemia and paralytic poliomyelitis after Sabin vaccine administration. *Microbiol. Immunol.*, 25 : 905-913.
- 7) Horstmann, D. M. (1982) : Control of poliomyelitis : A continuing paradox. *J. Infect. Dis.*, 146 : 540-551.
- 8) Horodniceanu, F., Panon, G., Le Fur, R. and Barme, M. (Paris) (1978) : Purification of poliovirus obtained from human diploid cells by means of DEAE-Sepharese. *Dev. biol. Standard.*, 42 : 75-80.
- 9) 井上 栄 (1973) : マイクロ法による補体結合試験. 臨床検査, 17 : 838~847.
- 10) 厚生省 (1960) : 不活化急性灰白髄炎ワクチン基準. 生物学的製剤基準 : 75-80.
- 11) Melnick, J. L. (1978) : Advantages and disadvantages of killed and live poliomyelitis vaccines. *Bull. WHO.*, 56(1) : 21-38.
- 12) Melnick, J. L. (1981) : Combined use of live and killed vaccines to control poliomyelitis in tropical areas. *Dev. biol. Standard.*, 47 : 265-273.
- 13) 中野 稔 (1983) : ポリオ 3 型ワクチン改良の要望と現状. 感染・炎症・免疫, 13 : 285-300.
- 14) Nathanson, N. and Langmuir, A. D. (1963) : The Cutter incident : Poliomyelitis following formaldehyde-inactivated poliovirus vaccination in the United States during the spring of 1955. II. Relationship of poliomyelitis to Cutter vaccine. *Am. J. Hyg.*, 78 : 29-60.
- 15) Salk, J. (1979) : Immunization against poliomyelitis : Risk/benefit/cost in a changing context. *Dev. biol. Standard.*, 43 : 151-157.
- 16) Van Ramshorst, J. D. and Polak, M. D. (1966) : The in vitro determination of the D antigen of poliomyelitis viruses. *Immunology*, 11 : 297-311.
- 17) Van Wezel, A. L., van Steenis, G., Hannick, Ch. A. and Cohen, H. (1978) : New approach to the production of concentrated and purified inactivated Polio and Rabies tissue culture vaccines. *Dev. biol. Standard.*, 41 : 159-168.
- 18) Van Wezel, A. L., van Herwaarden, J. A. M. and van de Heuvel-de Rijk, E. W. (1979) : Large-scale concentration and purification of virus suspension from microcarrier culture for the preparation of inactivated virus vaccines. *Dev. biol. Standard.*, 42 : 65-69.
- 19) Van Wezel, A. L. (1981) : Present state and developments in the production of inactivated poliomyelitis vaccine. *Dev. biol. Standard.*, 47 : 7-13.
- 20) Van Wezel, A. L., van Steenis, G., van der Mare, P. and Osterhaus, A. D. M. E. (1984) : Inactivated poliovirus vaccine : Current production methods and new developments. *Rev. Infect. Dis. Suppl. 2* : S 335-S 340.
- 21) WHO consultative group (1982) : The relation between acute persisting spinal paralysis and poliomyelitis vaccine-results of a ten-year enquiry. *Bull. WHO.*, 60(2) : 231-242.
- 22) WHO Exp. Comit. on Biol. Standard. (1982) : Requirements for poliomyelitis vaccine (inactivated). *WHO Techn. Rep. Ser.*, 673 : 40-84.

Preparation of Inactivated Poliomyelitis Vaccine
with Attenuated Sabin Strains

Shinobu ABE, Atsushi YAMAKI and Yutaka DOI
Japan Poliomyelitis Research Institute

Inactivated poliomyelitis vaccines were prepared with each type of concentrated and purified attenuated and virulent viruses (Sabin 1, 2, 3, Mahoney, Brunhilde, MEF-1 and Saukett). During inactivation period with formalin, no significant difference were observed for the decrease of virus infectivity between Sabin and virulent viruses. By analysis of D antigen content with gel diffusion test before and during inactivation period, type 1 Mahoney showed instability and could be recovered only 29 % of D antigen at the end of inactivation period, but Sabin type 1 showed good stability as well as other types of Sabin and virulent viruses.

In immunization tests with guinea pigs, inactiva-

ted Sabin viruses induced good seroconversion against not only homologous Sabin virus but also virulent virus.

These results indicate that it seems possible to make inactivated poliomyelitis vaccine with Sabin viruses having comparable immunogenicity to the vaccine from virulent viruses. By use of attenuated virus the safety of the vaccine is improved and the vaccine can be prepared in the facilities in which live oral vaccine is producing.

この研究は、財団法人日本ポリオ研究所 故理事長
伊東平八博士の御指導のもとに行なわれた。