

厚生科学研究費補助金研究報告書

研究課題名：経鼻麻しんワクチン開発研究

課題番号：H10-医薬-046

主任研究者 齊加志津子（千葉県血清研究所）

分担研究者 鈴木一義、木所 稔、大川時忠、伊藤浩三

（千葉県血清研究所）

小船富美夫、佐多徹太郎（国立感染症研究所）

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

総括研究報告書

経鼻麻しんワクチン開発に関する研究

主任研究者 齋加 志津子 千葉県血清研究所 研究開発部

研究要旨

麻しんワクチン TD97 株の高力価ウイルスを3頭のサルに経鼻接種し、接種後4週目の中枢神経組織を検査したところ、病変及びウイルス抗原は認められず、PCR法によるウイルスRNAの検出も陰性であり、ウイルス遺伝子の中枢神経への残留性に対する安全性を示す成績であった。また、 10^6 または 10^5 TCID₅₀/mlのTD97株ウイルス液0.3mlを6頭のサルの気管内に直接投与し、呼吸器系に対する安全性を検討したところ、呼吸器系組織に病変及び抗原は認められず、臨床的にも胸部X線写真に異常は見られず、本ウイルスの経鼻接種方式は呼吸器系に対して極めて高い安全性を持つことが示された。また、TD97株ウイルス経鼻接種サルによる接触感染の可能性を調べるために、4頭の接種サルに接種と同時に未接種サルをそれぞれ同居させたところ、未接種サルへの感染は全く起こらず、接触感染に対する安全性の高さが示された。ワクチン経鼻接種サルの血中抗体は7頭のサルで調べられ、HI抗体は6頭が陽転し、中和抗体は7頭全て陽転し、抗体価も比較的高く、満足すべき免疫原性と考えられた。この7頭の唾液中の局所IgA抗体を測定し、7頭中5頭でIgA抗体産生が認められた。これは本ワクチンの皮下接種法に対する優位性を示すものと考えられる。また、強毒野外株またはTD97株接種サルの末梢血中の総リンパ球数とCD4及びCD8陽性リンパ球数を計測したところ、前者では接種後にこれらの著明な減少が起こるのに対し、後者ではこれが認められず、本ワクチン株の接種後に起こる免疫不全に対する安全性が示唆された。これらの試験により、TD97株経鼻接種ワクチンのサルにおける有効性と安全性の試験はほぼ完了したとみなされた。

分担研究者 鈴木一義¹⁾、木所 稔¹⁾、大川時忠¹⁾、伊藤浩三¹⁾、小船富美夫²⁾、佐田徹太郎²⁾
1) 千葉県血清研究所、2) 国立感染症研究所

A. 研究目的

はしかはその感染力と重症度において乳幼児では最も重要な感染症であり、途上国においてはWHO等の努力によるワクチンの普及によって状況は改善されつつあるが、

依然として乳幼児の感染症による死亡原因の第一位となっている。本ワクチンは従来皮下に接種されていた麻しん生ワクチンをそのまま経鼻接種しようとするもので、医師及び器材の不足している途上国において有用性が期待される。

本ワクチンは現行の麻しんワクチンTD97株を専用の経鼻噴霧器を用いて定量的に鼻腔内へ投与するものであり、その有効性と安全性を麻しんウイルスに対して唯一の感受性動物と考えられるサルを用いて検証してきた。これまで、有効性に関して抗体の持続性と強毒株の攻撃に対する防御能が証明され、安全性に関しては、サル体内におけるワクチン株の弱毒性の証明と、鼻腔粘膜から嗅神経を経る直接の中樞神経への侵襲性はほぼ否定される成績が得られている。

今年度はまず、麻しん罹患後数年を経て発症する遅発性中樞神経感染症であるSSPE（遅発性硬化性全脳炎）に対する安全性を検証するために、サル中樞神経におけるウイルスの残留性を検討した。次に、接種部位が鼻腔内であることから、呼吸器系への安全性をみるために、ワクチンウイルスの気管内接種試験を行った。更に鼻腔内へ生ウイルスを噴霧接種することから、接触感染の可能性を検証するため、未接種サルとの同居感染試験を行った。またこの試験において、経時的に免疫反応を追跡して、経鼻接種法の有効性評価の一環とした。

B. 研究方法

ウイルス：千葉県血清研究所の現行麻しんワクチンウイルスTD97株をワクチン

ウイルスとして用いた。TD97株は市販ワクチンと同じニワトリ胚（CE）細胞で4代継代したウイルスを用いた。野外強毒ウイルスには小船が分離し、B95a細胞で増殖させたHL株を用いた。

サル：ワクチンウイルス接種試験には、日本において9週間の検疫を終了した健康なカニクイサルを使用した。野外ウイルス接種試験には国立感染症研究所筑波霊長類センターで飼育した健康なカニクイサルを用いた。後者の試験はバイオハザードを考慮して、感染症研究所村山支庁で実施したためである。すべてのサルは試験前に麻しん抗体が陰性であることを確認した。

サルへの経鼻接種：経鼻噴霧器を用い、一定のウイルス力価のワクチン株又は野外株ウイルス液を両鼻腔に0.25mlずつ計0.5ml/頭接種した。

経鼻噴霧器：経鼻接種用に開発したシリンジとピストンが一体となった定量噴霧器で、プラスチックの弾性を利用して1回に0.25ml吸引し、器具先端を鼻腔内に挿入してピストンを押すことにより、内容物が霧状に噴出する。

サルへの気管内接種：サルをケタラールとアトロピン（0.8mg/頭）で麻酔し、キシロカイン（80mg/g）を喉頭蓋に一吹きした後、気管内チューブ（PVソフト12Fr）を口腔より喉頭蓋を経て気管内に約2cm挿入する。気管内チューブを通してカテテルチューブ（3Fr）を気管内に挿入し、カテテルチューブの外端より、注射器で一定量のウイルス液を気管内へ注入した。

組織中のウイルスRNAの検出：麻しん

ウイルス接種サルの解剖時に各組織を採取してただちに -80°C に凍結し、後に融解して後述の RT-PCR 法にて麻しんウイルス RNA (MV-RNA) の検出を行った。

咽頭拭い液中の MV-RNA の検出：接種後 1 週毎に綿棒で咽頭拭い液を採取し、1 ml 生理食塩液中に浸潤して -80°C に保存して、後に融解して RT-PCR 法にて MV-RNA の検出を行った。

末梢血中の MV-RNA の検出：接種後 1 週毎に EDTA-Na 管に採取した全血について、或いはこれよりリンホプレップで分画したリンパ球分画について RT-PCR 法にて MV-RNA の検出を行った。

RT-PCR：試験サルの末梢血、咽頭拭い液及び組織中の MV-RNA を検出するために、RNeasy キット (QIAGEN 社) を用いマニュアルに従って検体から総 RNA を抽出した。RT 反応と 1 段目 PCR はワンステップ RNA-PCR キット (AMV) (宝酒造) を、2 段目 PCR は ExTaq Premix (宝酒造) を用いて行った。RT 反応では (+) センス RNA のみを鋳型とするよう、アンチセンスプライマー (NP 遺伝子内を認識) を用いて cDNA を合成した。1 段目の PCR は NP 遺伝子内の 405 から 1326 番目の領域を、2 段目の PCR では 679 から 1037 番目の領域を増幅した。PCR 産物は、1.5% アガロースゲル上で電気泳動し、SYBR Green で染色後、UV トランスイルミネーターによって目的バンドの検出を行った。

サル胸部 X 線写真撮影：気管内接種サルについて、接種前と接種後 9 日目に動物病院 (千葉市稲毛区、ファミリー動物病院 院

長 杉山芳樹) において胸部 X 線写真を撮影した。(300 mA、0.02 sec、54 Kvp、リスなし) 撮影したフィルムの臨床診断は国立感染症研究所感染病理部 佐多徹太郎先生 (エイズセンター第 2 室長、本研究の分担研究者) と順天堂大学呼吸器病理医師熊坂利夫先生 (第 1 病理学教室講師) が行った。

組織標本の作成：中枢神経、リンパ系、呼吸器系を中心に各臓器を採取し、10% ホルマリン-PBS 液に浸潤し固定後、常法に従いパラフィン切片を作成した。スライドガラスは MPS コートスライドガラスを用いた。パラフィン切片は複数枚作成し、病理検査及び免疫組織化学検査に用いた。

組織の病理検査：常法に従いパラフィン切片にヘマトキシリン-エオジン染色を施し鏡検した。

免疫組織化学染色：パラフィン切片を脱パラフィン、水洗後、0.3% メタノール水溶液で 30 分、5% 正常血清で 15~20 分処理後、抗麻しんウイルス NP 抗体を 4°C で一晩反応させ、酵素標識ストレプトアビジン-ビオチン法で抗原を染色した。発色試薬には DAB を用いた。抗麻しんウイルス NP 抗体は組み替え DNA 法により麻しんウイルス NP 蛋白を作成し、それをウサギに免疫して作成した。

末梢血リンパ球数の測定：ウイルス接種前及び接種後のサル末梢血中の総リンパ球数と CD4 及び CD8 陽性リンパ球数の変動を、抗サル CD3 (FN-18)、Leu-3a、Leu-2a マウスモノクローナル抗体を用いてフローサイトメトリー (コールター社エクセル) で解析した。

ウイルス力価測定：TD97株のウイルス力価測定には Vero 細胞を、HL 株には B95a 細胞を用いた。24 ウェルマイクロプレートに播種された細胞に、適当に希釈されたウイルス液を1ウェル当たり50 μ l 接種し、TD97株はCPE法 (TCID₅₀/ml) またはブラック法 (PFU/ml) で、また HL 株はCPE法 (TCID₅₀/ml) 測定した。

麻しん抗体の測定：HI抗体価と中和抗体価 (NT₅₀) を測定した。HI抗体価は新鮮ミドリサル赤血球とデンカ生研HA抗原 (豊島株) を用い測定した。中和抗体価は Vero 細胞と攻撃ウイルスとして豊島株を用いた50%ブラック減少法により求めた。

唾液中の麻しん IgA 抗体測定：サルに唾液採取用の OraSure (Epitope 社製) のパッドをくわえさせ、パッドに十分唾液が浸みこんだ後に取り出して添付の保存液に入れ、遠心を行って唾液を採取した。採取した唾液は-20℃に保存した。麻しん IgA 抗体は麻しんウイルス IgG 抗体測定用検査薬“エンザイグノスト麻疹/IgG”を利用し、添付されている酵素標識抗 IgG 抗体の代わりに酵素標識抗 IgA 抗体 (MBL 社製) を用いて測定した。唾液はキット添付の検体希釈液で2倍に希釈して測定に用いた。ELISA 価は唾液参照品の標準直線から中和抗体価相当単位 (unit) として求めた。

唾液参照品の作製：カニクイサル4頭に麻しん野外株 (HL) を頻回経鼻投与した後、唾液を採取してプールした。プールした唾液について中和抗体価、ELISA-IgA 抗体及び ELISA-IgG 抗体を測定した。

C. 研究結果

1. 経鼻接種によるワクチン株及び野外株麻しんウイルスの中樞神経残留性試験

TD97株ウイルスは体重3.0~3.2kgのカニクイサル3頭に10^{7.0}TCID₅₀/mlのウイルス液を両鼻腔に0.25mlずつ接種した。HL株ウイルスは2.4~4.1kgのカニクイサル4頭に10^{5.75}TCID₅₀/mlのウイルス液を同様に接種した。接種後1週間毎に検体を採取して、4週目に解剖し剖検後組織検体を採取した。

1.1 抗体反応

1.1.1 血中抗体の推移

血中麻しんHI抗体価及び中和抗体価の推移は表1のとおりであった。TD97株を接種したサルのHI抗体価は3頭中2頭が陽転したが中和抗体価は3頭とも陽転した。HL株接種サルでは4頭とも両抗体が陽転し、抗体価も高値であった。

1.1.2 唾液中のIgA抗体

1.1.2.1 唾液参照品の性状

研究方法で述べた唾液参照品の麻しん中和抗体価 (NT₅₀) は2^{2.3}であった。この唾液を2倍階段希釈し、ELISAで麻しんIgG抗体及びIgA抗体を測定した。唾液の濃度が最も高い希釈 (2倍) における吸光度はIgG抗体で0.068、IgA抗体では0.879であり、唾液中の抗体はその大部分がIgA抗体であると見なし得た (図1)。IgA抗体の濃度と吸光度の関係を両対数でプロットしたところ直線関係が認められた (図2)。この唾液のELISA力価を中和抗体の価、すなわち2^{2.3}=4.9unitとし、この標準

直線から検体の ELISA 力価 (EU) を求めたので、得られた EU は中和抗体価に相当する価と考えられる。

1.1.2.2 唾液中 IgA 抗体の推移

HL 株または TD 9 7 株を接種したサル
の唾液中麻しん IgA 抗体価の推移は表 2、
図 3、図 4 のとおりである。TD 9 7 株接
種サルの接種時の一部検体で非特異反応が
みられたが、3 頭中 2 頭は接種後 1 週目或
いは 2 週目に低いながらも IgA 抗体の明ら
かな上昇が認められた。HL 株接種サルで
は 4 頭中 2 頭に接種後 2 週目に強い上昇が
みられ、3 週目には若干低下し、4 週目に
再び上昇がみられた。他の 2 頭は若干上昇
傾向があるものの明らかな上昇はみられな
かった。

1.2. 各組織の病理学的及び免疫学的検査 成績

TD 9 7 株を接種した 3 頭及び HL 株を
接種した 4 頭の病理組織学的検査成績は表
3 のとおりであった。

TD 9 7 株接種サルでは扁桃にごく軽度
のリンパ球浸潤がみられたのみで、中枢神
経系を含めて他の組織に病変は認められな
かった。

一方、HL 株接種サルでは中枢神経系に
おいて 1 頭の後頭葉に軽度の髄膜炎がみら
れた。呼吸器系では同じ 1 頭の気管及び肺
に軽度のウイルス性病変が認められた。ま
た、鼻腔粘膜に 4 頭中 3 頭でリンパ球浸潤
による軽度の鼻炎がみられたが、嗅神経に
異常は認められなかった。なお、この 4 頭
のリンパ系組織に病変は認められなかった。
これは従来の成績と異なっているが、接種
後 4 週を経ているために病変が消失したも

のと推察される。

また、これらの組織のうちその他臓器を
除く全ての組織について免疫組織化学的検
査を実施したが、麻しんウイルス抗原は 7
頭全ての組織において陰性であった。

1.3 咽頭拭い液、末梢リンパ球及び組織 からの MV- RNA の検出

TD 9 7 株または HL 株接種サルの咽頭
拭い液及び末梢血リンパ球について、RT-
PCR 法によって MV- RNA の検出を行っ
たところ表 4 の結果が得られた。DNA 電
気泳動像の一部を写真 1 に示した。検出の
感度は TD 9 7 株が 1 PFU まで、HL 株
が 0.1 PFU まで検出可能であった。TD
9 7 株接種サルからは咽頭拭い液及び末梢
血リンパ球ともに、いずれの時期からも
MV- RNA は検出されなかった。一方、H
L 株接種サルでは咽頭拭い液からは 3 頭で
接種後 1 週目と 2 週目に、他の 1 頭で 2 週
目と 3 週目に陽性となった。また、末梢血
リンパ球については接種後 1 週目から 4 週
目まで 4 頭全てから MV- RNA が検出さ
れた。

これら 7 頭からサルの接種後 4 週目に採
取した各組織における MV- RNA の検出
成績は表 5 のとおりであった。TD 9 7 株
接種の 3 頭からは、脳を含めていずれの組
織からも MV- RNA は検出できなかった。
HL 株接種サルは、予期に反して前述のよ
うに、組織採取時の 4 週目においても末梢
血リンパ球中の MV- RNA が陽性となっ
たので、各組織中の MV- RNA 存否を正
確に検査することは不可能となった。そこ
で、参考用として 4 頭中 1 頭について検出
を行った。末梢血リンパ球中の MV- RNA

陽性を反映し、リンパ球の集まるリンパ組織は全て陽性となった。

1.4 末梢血リンパ球の変動

TD97株またはHL株経鼻接種サルの末梢血における総リンパ球数、CD4⁺、CD8⁺細胞数及びCD4/CD8比の推移は表6のとおりであった。HL株接種群においては、接種後のリンパ球の減少が著しく、T細胞ではCD4⁺細胞の方が、CD8⁺細胞よりも減少率が大きく、これらの減少傾向は4週目まで持続していた。一方TD97株接種の3頭のサルでは接種後のリンパ球の減少はみられずCD4⁺細胞の減少もなく、HL株とは著しい違いを示した。

2. ワクチン株麻しんウイルスの気管内接種試験

麻しん抗体陰性で体重2.0~3.4kgのカニクイサル6頭にTD97株ウイルスを「研究方法」で述べた方法で気管内に接種した。6頭中3頭には10^{6.0}TCID₅₀/mlのウイルスを0.3ml、他の3頭には10^{5.0}TCID₅₀/mlのウイルスを0.3ml接種し、接種前と接種後9日目に胸部X線写真を撮影し、10日目に解剖して組織検体を採取した。

2.1 臨床観察及び剖検所見

接種サル6頭を接種後10日目まで観察したところ、食欲及び排便等に異常は見られず臨床的な異常は認められなかった。また、10日目の剖検では6頭とも肺等の臓器に異常は認められなかった。

2.2 各組織の病理学的及び免疫化学的検査成績

TD97株ウイルスを気管内に接種したカニクイサル6頭の病理組織学的検査結果は表7のとおりであった。病変は6頭中2頭の扁桃に軽度の巨細胞が出現したのみであり(写真2)、呼吸器系には全く病変が認められなかった。また、免疫組織化学的検査をその他臓器以外の全ての組織について実施したが、麻しんウイルス抗原は全ての臓器で陰性であった。

2.3 胸部X線写真による臨床診断

サル6頭の接種前及び接種後に撮影した胸部X線写真の臨床診断は呼吸器系の病理及び臨床の2人の医師によって行われ、6頭とも“格別な所見がなく、正常範囲”と診断された。

3. ワクチン株麻しんウイルス経鼻接種サルの同居感染試験

麻しん抗体陰性で体重1.7~3.0kgのカニクイサル8頭を用い、TD97株の力価10^{7.0}TCID₅₀/mlのウイルス液を2頭の両鼻腔に0.25mlずつ計0.5ml/頭接種し、10^{5.5}TCID₅₀/mlのウイルス液を他の2頭に同様に接種した。この4頭各々のアイソレーター中に未接種サル1頭ずつを接種時に同居させ、麻しん抗体価の推移を接種後5週まで調査した。

3.1 血中抗体の推移

8頭のサルの血中麻しんHI抗体価及び中和抗体価の推移は表8のとおりであった。ワクチンウイルスを接種した4頭のサルは、高力価及び中力価ともに血中抗体産生は良好で、いずれもHI抗体価は2⁶以上に上昇した。一方、非接種サル4頭では血中HI抗体産生は全くみられず、ワクチンウイ

ルス経鼻接種サルによる接触感染は起こらなかったものとみなされた。

3.2 唾液中のIgA抗体価の推移

ワクチンウイルスを経鼻接種した4頭のサルにおける唾液中麻しんIgA抗体価の推移は表9及び図5のとおりであった。4頭中3頭は接種2週後に2.7~4.2EUの上昇を示し、うち1頭は3週目に10.0EUというHL株と同等の抗体上昇を示した。残り1頭は抗体上昇が認められなかった。

3.3 末梢血リンパ球の変動

経鼻接種サル4頭の末梢血における総リンパ球数、CD4⁺、CD8⁺細胞数及びCD4/CD8比の推移は表10のとおりであった。試験1におけるTD97株接種サルと同様、ウイルス接種後のリンパ球及び各T細胞サブセットの明らかな減少傾向は認められなかった。

D. 考察

前年までのサル接種試験で、TD97株ウイルスの経鼻接種によって、鼻腔粘膜から直接嗅神経を経てウイルスが中枢神経(CNS)に侵入することは、ほぼ否定されている。このため、本経鼻接種ワクチンのCNSに対する病原性は、通常の皮下接種TD97株ワクチンと同等と推察されるが、一応SSPEに対する安全性を検証するために、ウイルス血症の消退すると考えられる接種後4週目に、CNS組織におけるMV-RNAの残留性を調査した。強毒ウイルスHL株は予想に反し、末梢血リンパ球中に1週から4週まで4頭全てにおいてPCR法によってMV-RNAが検出された。このため、HL株接種サルの各組織に

おける信頼性のあるMV-RNAの検出は不可能になった。一方、1週から4週までのTD97株接種サルは末梢血リンパ球中及び組織中にMV-RNAは全く検出されなかった。また、病理学的及び免疫組織化学的検索においてもTD97株接種サルのCNSに病変及びウイルス抗原は認められなかった。小船は野外麻しんウイルスのサル感染実験で通常でもかなり高率に末梢から脳内へウイルスが侵入する可能性のあることを示唆しており¹⁾、片山らはSSPE以外の病因死亡例の剖検脳組織から、PCR法でMV-RNAを61例中11例で検出しており²⁾ HaaseらもMS(多発性硬化症)及び健常人の脳からかなり高率(約60%)にMV-RNAが検出されたと報告しており³⁾、健常人の脳組織にもかなりの率でMV-RNAの残留していることが示唆されているが、本試験において接種後4週目という短期間において、CNSにおけるウイルス抗原及びMV-RNAの残留性が認められなかったという成績は、本ワクチンのCNS残留性に対する安全性保証の資料になると考えられた。更に、ヒトでのSSPEは1歳未満での罹患で起こりやすいという報告があるので幼児サルが入手できれば、これにおける麻しんウイルスのCNS残留性試験を実施する予定である。なお、HL株接種サルの4頭中1頭でCNSの後頭葉及び呼吸器系の一部に軽度の病変が認められたが、HL株は皮下接種によっても中枢神経及び呼吸器系に病変を起こすことが報告されており^{1, 4)}、本試験での病変は経鼻接種の故に特に惹起されたものとはいえない。

ワクチンウイルスのサル気管内接種試験

では、X線写真による臨床的診断においても、また病理学的及び免疫組織化学的検査においても呼吸器官に異常は認められなかった。ヒトの麻しん感染では呼吸器系の間質性肺炎や下気道での炎症性反応は正常人においても通常よくみられる反応であり、これによって問題となる臨床症状は通常現れないとされている⁵⁾。麻しんウイルスの経鼻接種においては通常 $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml またはそれ以下の感染価のウイルスを0.5ml鼻腔内に噴霧すると考えられるため、接種ウイルスの大半が鼻腔に留まり、気管に到達したウイルスも気道表面の繊毛運動等により殆どが排出され、吸気に乗って稀に肺まで達するウイルスは μ lの単位であると考えられる。今回の試験で $10^{5.0}$ または $10^{6.0}$ TCID₅₀/mlのウイルスを0.3ml直接気管内に投与するという通常では起こり得ない苛酷な負荷をかけても、組織学的にも臨床的にも呼吸器系に異常が認められなかったということは、TD97株を用いる経鼻接種方式は呼吸器系に対して極めて安全性の高い方式であると考えられる。

専用の経鼻噴霧器を用いる本接種方式は従来の吸入方式とは異なり、ウイルスの飛散は起こりにくい、皮下接種法に比べると接触感染が起こりやすい感がある。そこで、サルへのワクチンウイルス経鼻接種時に未接種サルを同居させるという濃厚な接触環境を設定して接触感染の可能性を調べたところ、接種サルでは抗体が良好に産生されてウイルスが体内で十分増殖したと考えられるが、同居サルに感染は起こらなかった。従ってTD97株の経鼻接種方式は皮下接種方式に劣らず接触感染を起こしにくいと推察された。なお、本試験の接種サ

ルは経時的に咽頭拭い液及び末梢血を採取しており、これら検体中のウイルスの存否は現在検査中である。

経鼻接種方式の本ワクチンは局所抗体の産生が期待されたので、本試験の1と3において鼻汁よりも定量性が優ると推察された OraSure による唾液採取を行い、唾液中の局所IgA抗体の産生を調べた。HL株接種サルでは4頭中2頭に参照唾液を越える高単位のIgA抗体が産生され、TD97株接種の7頭では5頭に有意の抗体上昇が認められ、うち1とうでは参照唾液を高単位の抗体が産生され、本接種方式における局所IgA抗体の産生が確認された。現在、経鼻接種との比較のためのTD97株のサル皮下接種試験が進行しており、これとの比較により局所抗体産生における経鼻接種方式の優位性が明らかになることが期待される。

本試験の1と3において、末梢血リンパ球及び各T細胞サブセットの変動を調べたところ、野外株接種後にはこれらポピュレーションの著明な減少が起こったが、ワクチン株接種後には明瞭な減少は認められなかった。小船はB95a細胞で分離された野外ウイルス(IC-B株)を皮下接種されたサルではリンパ球及び各サブセットの著明な減少が起こり、一方Vero細胞で分離されサル体内での増殖性の劣るとみられる分離株(IC-B株)ではこれらの減少は殆どみられないことを報告しており¹⁾、麻しんウイルス接種後のリンパ球等の変動傾向はウイルスの体内での増殖性或いは病原性を反映していることが考えられる。特に麻しんウイルスの主要標的器官はヒト及びサルにおいて胸腺やリンパ節等のリンパ

系組織であることが示唆されており^{1, 6)}、これによってリンパ球減少が起こり、一時的免疫不全状態になると考えられる。TD 97株接種サルではこれまでの試験において、扁桃のみに軽度の病変が起こるのみで他のリンパ系組織に病変は認められず、接種後のリンパ球系の減少が見られないのはこの弱毒性を反映しているとみられる。免疫抑制の影響を強く受けて日和見感染などを誘発しやすいとみられる途上国の乳幼児用としてTD 97株は適した麻しんワクチンの可能性がある。

麻しんワクチンの感染防御効果には液性免疫とともに細胞性免疫の関与が考えられるので、本経鼻接種ワクチンによる細胞性免疫原性の検討を行った。サル末梢血リンパ球中の細胞障害性 T 細胞が産生する γ -IFN を ELISPOT 法で検出することにより麻しん特異的 T 細胞数を定量しようと考えたが、サルの γ -IFN に対する適切なモノクローナル抗体がなく、ヒトに対するそれでは良好な成績が得られず、サルでの細胞性免疫測定はまだ成功していない。しかし、ヒトでの測定は可能となっており、ヒトによる治験では用いることが出来るよう、更に実用性を高める検討を行っている。

参考文献

- 1) 小船富美夫：麻疹ウイルス研究の最近の進歩—B95a 細胞による野外麻しんウイルスの性状研究—臨床とウイルス 22: 233-245, 1994
- 2) 片山友子、他：PCR 法を用いた剖検脳組織における麻疹ウイルス遺伝子の検出。第 42 回日本ウイルス学会：演題 4069、1994
- 3) Haase AT, et al.: Measles virus nucleotide sequences-detection by hybridization in situ. Science 212:672-675, 1981
- 4) 永田典代、他：リンパ・上皮系組織における麻疹ウイルス感染様式とその病理。第 44 回日本ウイルス学会：演題 2E14、1996
- 5) Griffin DE, Bellini WJ: Chapter 43 Measles Virus pp1267-1312 in Fields Virology 7th edition volume 1. Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia, 1996
- 6) Chino F, et al.: Alteration of the thymus and peripheral lymphoid tissues in fatal measles. Acta Path Jpn 29: 493-507, 1979

E. 結論

本年度のサル接種試験において、本経鼻接種ワクチンの CNS 残留性、呼吸器系及び接触感染に対する安全性を実証する成績が得られ、サルを用いるワクチンの安全性に関する試験はほぼ終了したと考えられる。また、有効性に関しても血中抗体の産生は良好であり、皮下接種法では期待できない局所 IgA 抗体が産生されており、これは本ワクチンの優位性を示すものである。今後は現在進行中のワクチン株のサル皮下接種試験との比較検討を経て、ヒトによる治験に進むこととしたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

小船富美夫、岡田春恵、竹田誠、井上栄（国

立感染症研究所)、鈴木一義、齋加志津子
(千葉県血清研究所)、三宅健(三宅小児
科)、野田雅博(広島保環センター)、堺春
美(東海大小児科):麻しんワクチン経鼻
接種経路の検討ーサルを用いた経鼻接種の
試み. 予防接種の効果的实施と副反応に関
する総合研究 平成11年3月:17-20、
1999

表1 麻疹ワクチンウイルス株 (TD97 株) 及び野外株 (HL 株) 経鼻接種サルにおける血中抗体反応

	サル 個体番号	H I 抗体価 (2 ⁿ)					中和抗体価 (NT ₅₀ , 2 ⁿ)				
		0週	1週	2週	3週	4週	0週	1週	2週	3週	4週
ワクチン株接種群	588	<3	<3	4	6	5	<2.0	<2.0	6.2	7.8	8.4
	589	<3	<3	8	9	9	<2.0	<2.0	10.8	11.4	12.1
	590	<3	<3	<3	<3	<3	<2.0	<2.0	3.7	6.4	5.7
野外株接種群	4218	<3	<3	8	9	8	<2.0	6.5	NT	12.6	11.3
	4219	<3	<3	≥9	≥9	≥9	<2.0	3.6	>12.0	>12.0	>12.0
	4220	<3	<3	8	9	8	<2.0	3.2	>12.0	>12.0	12.3
	4221	<3	<3	3	7	7	<2.0	<2.0	9.0	11.4	9.6

NT ; 検査未実施

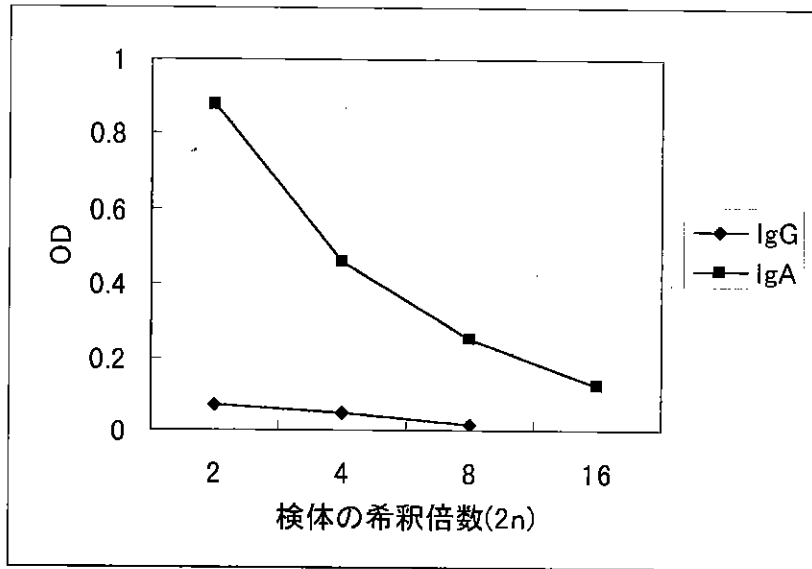


図1 参照唾液の麻疹 IgG 抗体と IgA 抗体

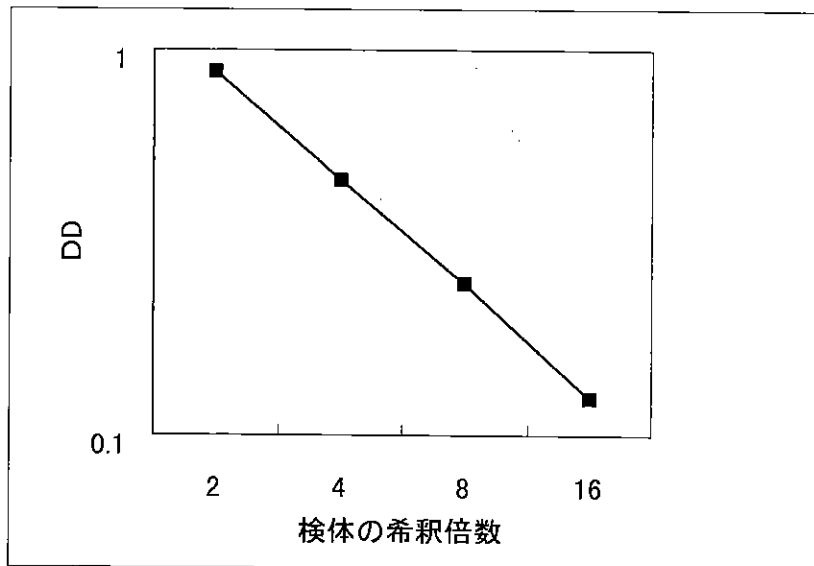


図2 麻疹 IgA 抗体の標準曲線

表2 麻疹ウイルス経鼻接種サル唾液中のIgA抗体

Virus strain	Monkey no	Weeks after inoculation				
		0w	1w	2w	3w	4w
HL	218	0.026*	0.120	0.427	0.726	0.993
	219	0.026	0.131	4.605	1.544	5.221
	220	0.026	0.026	10.107	5.794	10.935
	221	0.072	0.026	0.781	1.251	0.629
TD97	588	0.922	0.109	0.361	0.684	0.361
	589	0.026	0.228	1.529	1.721	0.400
	590	2.785	1.007	0.865	2.523	0.109

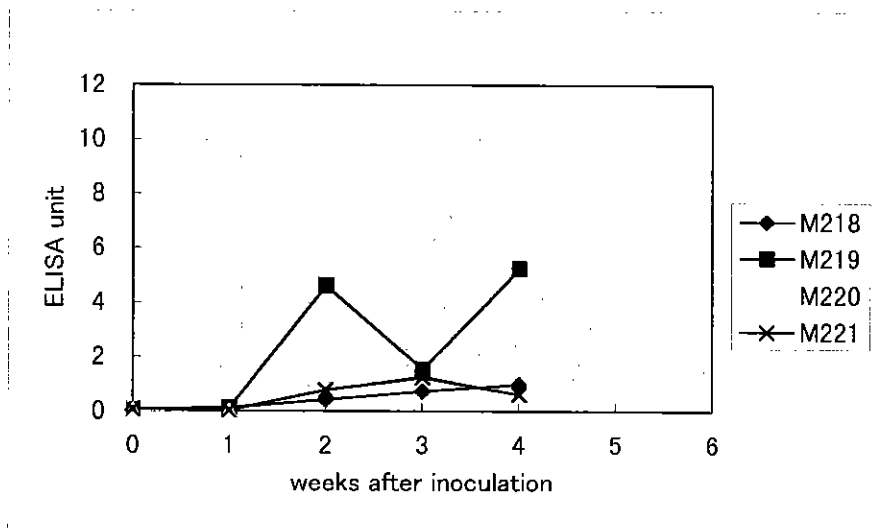


図3 HL株経鼻接種サルの唾液中麻しんIgA抗体

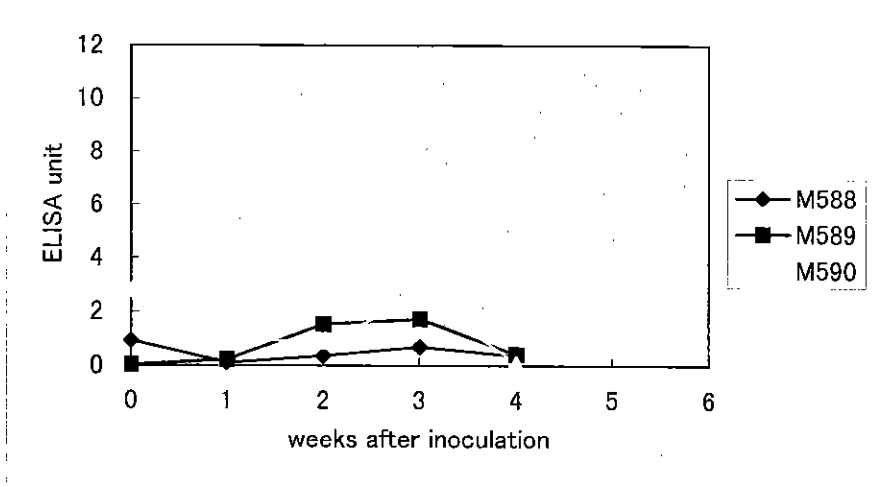


図4 TD97株経鼻接種サルの唾液中抗麻しんIgA抗体(1)

表3 麻疹ウイルス経鼻接種サルの病理組織学的検査成績

	臓器又は部位	TD97株接種サル			HL株接種サル			
		588	589	590	4218	4219	4220	4221
中枢神経系	前頭葉	--	-	-	-	-	-	-
	側頭葉	-	--	-	-	-	-	-
	後頭葉	-	-	-	-	+ ²⁾	-	-
	視床	-	-	-	-	--	-	-
	小脳	--	-	--	-	--	-	-
	橋	-	--	-	--	-	--	-
	延髄	-	-	-	-	-	-	-
	脊髄	-	-	-	-	--	-	-
	嗅球根部	-	-	-	-	-	-	-
嗅球	ND	-	-	-	-	ND	-	
	嗅神経	ND	ND	ND	-	-	-	-
	鼻腔粘膜	-	-	-	+ ³⁾	+ ³⁾	+ ³⁾	-
呼吸器	気管	--	-	-	-	+ ⁴⁾	-	-
	気管支・肺門リンパ	-	-	-	-	-	-	-
	肺	-	-	-	-	+ ⁵⁾	-	-
リンパ系組織	扁桃	ND	± ¹⁾	± ¹⁾	--	-	-	-
	胸腺	-	-	-	-	-	-	-
	脾臓	-	-	-	-	-	-	-
	顎下リンパ節	-	-	-	-	-	-	-
	腋下リンパ節	-	-	-	-	-	-	-
	鼠径リンパ節	-	-	-	-	-	-	-
腸間膜リンパ節	-	-	-	-	-	-	-	
その他臓器	心臓	-	-	-	-	-	-	-
	肝臓	-	-	-	-	-	-	-
	腎臓	-	-	-	-	-	-	-

1. 扁桃腺の粘膜下層にごく軽度のリンパ球の浸潤。巨細胞は無い。
2. 軽度の髄膜炎。
3. 鼻粘膜固有層に軽度のリンパ球の浸潤（鼻炎）。
4. 気管の固有層に軽度のリンパ球の浸潤。
5. 肺間質へのリンパ球の浸潤（軽度の間質性肺炎）。

ND；検体無し

表4 麻疹ウイルス経鼻接種サル咽頭拭い液及び末梢血リンパ球からの
RT-PCRによるウイルスRNAの検出成績

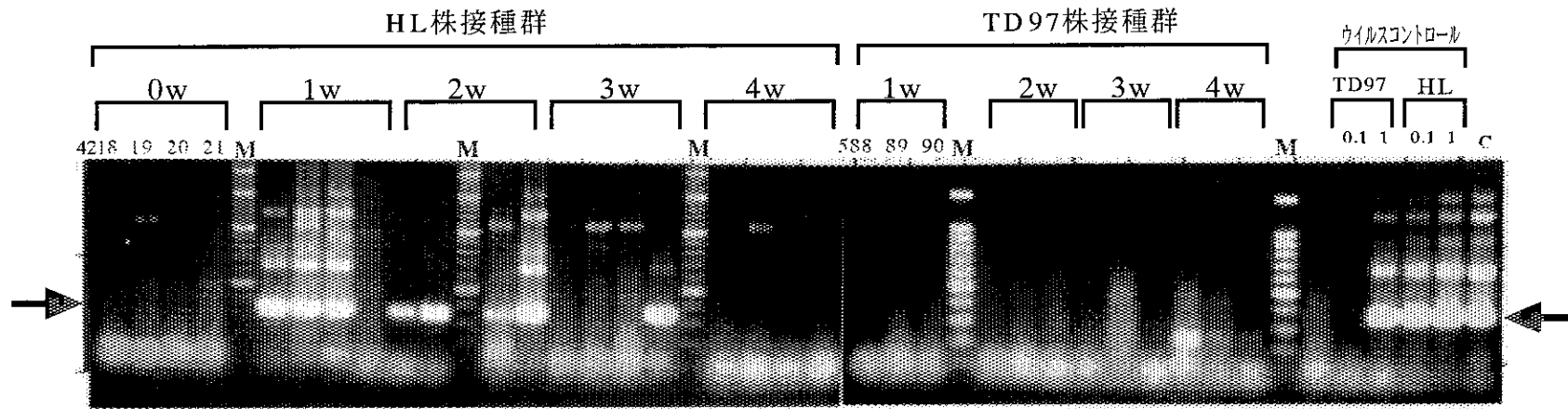
	サル 個体番号	咽頭拭い液					末梢血リンパ球				
		0週	1週	2週	3週	4週	0週	1週	2週	3週	4週
ワクチン株接種群	588	ND	-	-	-	-	ND	-	-	-	-
	589	ND	-	-	-	-	ND	-	-	-	-
	590	ND	-	-	-	-	ND	-	-	-	-
野外株接種群	4218	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
	4219	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
	4220	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
	4221	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+

注) - ; 麻疹ウイルス RNA 陰性

 + ; 麻疹ウイルス RNA 陽性

 ND ; 検体無し

写真1 RT-PCRによる麻しんワクチンウイルス及び野外ウイルス経鼻接種サル
咽頭拭い液からのウイルスRNAの検出



M; 分子量マーカー
C; 陽性コントロール

表5 麻疹ウイルス経鼻接種サル組織からの RT-PCR による
ウイルス RNA の検出成績

	臓器又は部位	TD97 株接種サル			H L 株接種サル			
		588	589	590	4218	4219	4220	4221
中枢神経系	前頭葉	—	—	—	+	NT	NT	NT
	頂頭葉	—	—	—	—	NT	NT	NT
	後頭葉	—	—	—	—	NT	NT	NT
	視床	—	—	—	—	NT	NT	NT
	小脳	—	—	—	—	NT	NT	NT
	延髄	—	—	—	—	NT	NT	NT
	第3脳室	—	—	—	—	NT	NT	NT
	第4脳室	—	—	—	+	NT	NT	NT
	嗅球根部	—	—	—	—	NT	NT	NT
	嗅球	ND	—	—	+	NT	NT	NT
	頸随膨大部	—	—	—	—	NT	NT	NT
腰随膨大部	—	—	—	—	NT	NT	NT	
	嗅神経	—	—	—	ND	NT	NT	NT
	鼻腔粘膜	—	—	—	+	NT	NT	NT
呼吸器	気管	—	—	—	+	NT	NT	NT
	気管支・肺門リンパ	—	—	—	+	NT	NT	NT
	肺	—	—	—	+	NT	NT	NT
リンパ系組織	扁桃	ND	—	—	+	NT	NT	NT
	胸腺	—	—	—	+	NT	NT	NT
	脾臓	—	—	—	+	NT	NT	NT
	顎下リンパ節	—	—	—	+	NT	NT	NT
	腋下リンパ節	—	—	—	+	NT	NT	NT
	鼠径リンパ節	—	—	—	+	NT	NT	NT
	腸間膜リンパ節	—	—	—	+	NT	NT	NT

注) — ; 麻疹ウイルス RNA 陰性

+

ND ; 検体無し

NT ; 試験未実施

表6 麻疹ワクチンウイルス株 (TD97株) 及び野外株 (HL株) 経鼻接種サルにおける末梢血リンパ球サブセットの変動

	サル個体番号	測定項目	接種前	1週	2週	3週	4週
ワクチン株接種群	588	総リンパ球数	6783	8368	7397	7053	3952
		CD4+リンパ球数	2523	7906	1931	3800	3604
		CD8+リンパ球数	1782	1896	1519	2066	993
		CD4/CD8比	1.4	4.2	1.27	1.84	3.63
	589	総リンパ球数	3749	9342	2815	4386	6684
		CD4+リンパ球数	1023	6659	538	2089	6024
		CD8+リンパ球数	860	1160	437	956	1551
		CD4/CD8比	1.2	5.7	1.23	2.12	3.89
	590	総リンパ球数	1553	5173	1605	3257	2919
		CD4+リンパ球数	350	3781	217	1097	2543
		CD8+リンパ球数	502	878	289	1520	790
		CD4/CD8比	0.7	4.3	0.75	0.72	3.22
野外株接種群	4218	総リンパ球数	7731	2549	1979	2566	5051
		CD4+リンパ球数	4197	828	614	796	1722
		CD8+リンパ球数	1958	454	813	856	1176
		CD4/CD8比	2.1	1.8	0.8	0.9	1.5
	4219	総リンパ球数	8831	2552	2999	5524	5935
		CD4+リンパ球数	2971	1148	567	1033	764
		CD8+リンパ球数	2131	1271	528	1301	1706
		CD4/CD8比	1.4	0.9	1.1	0.8	0.4
	4220	総リンパ球数	5978	2195	1878	2208	2837
		CD4+リンパ球数	2152	997	532	530	747
		CD8+リンパ球数	1793	1110	679	459	668
		CD4/CD8比	1.2	0.9	0.8	1.2	1.1
	4221	総リンパ球数	8219	1231	490	2129	3427
		CD4+リンパ球数	1533	421	81	826	977
		CD8+リンパ球数	1566	540	122	719	864
		CD4/CD8比	1.0	0.8	0.7	1.1	1.1