

表7 麻疹ワクチンウイルス株 (TD97株) 気管内接種サルの
病理組織学的検査成績

	臓器又は部位	サル 個 体 番 号					
		1 1 1 0	1 1 1 2	4 9 3	4 9 6	5 0 1	5 0 4
中 枢 神 経 系	前 頭 葉	—	—	—	—	—	—
	側 頭 葉	—	—	—	—	—	—
	後 頭 葉	—	—	—	—	—	—
	視 床	—	—	—	—	—	—
	小 脳	—	—	—	—	—	—
	橋	—	—	—	—	—	—
	延 髄	—	—	—	—	—	—
呼 吸 器	脊 髄	—	—	—	—	—	—
	気 管	—	—	—	—	—	—
	気管支・肺門リンパ ^o 肺	—	—	—	—	—	—
リ ン パ 系 組 織	扁 桃	+ ¹⁾	—	—	+ ¹⁾	—	—
	胸 腺	—	—	—	—	—	—
	脾 臓	—	—	—	—	—	—
	顎下リンパ ^o 節	—	—	—	—	—	—
	腋下リンパ ^o 節	—	—	—	—	—	—
	鼠径リンパ ^o 節	—	—	—	—	—	—
腸間膜リンパ ^o 節	—	—	—	—	—	—	
そ の 他 臓 器	心 臓	—	—	—	—	—	—
	肝 臓	—	—	—	—	—	—
	腎 臓	—	—	—	—	—	—

1)リンパ節濾胞に巨細胞出現。病変は軽度。

写真2 ワクチン株接種サルの扁桃における巨細胞

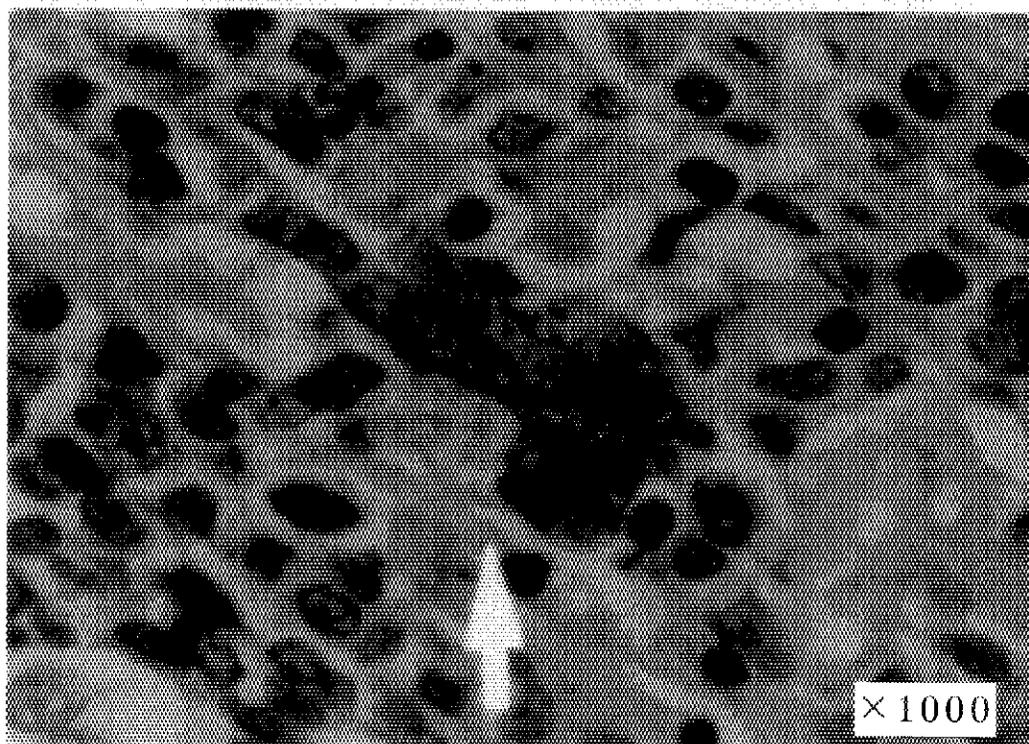
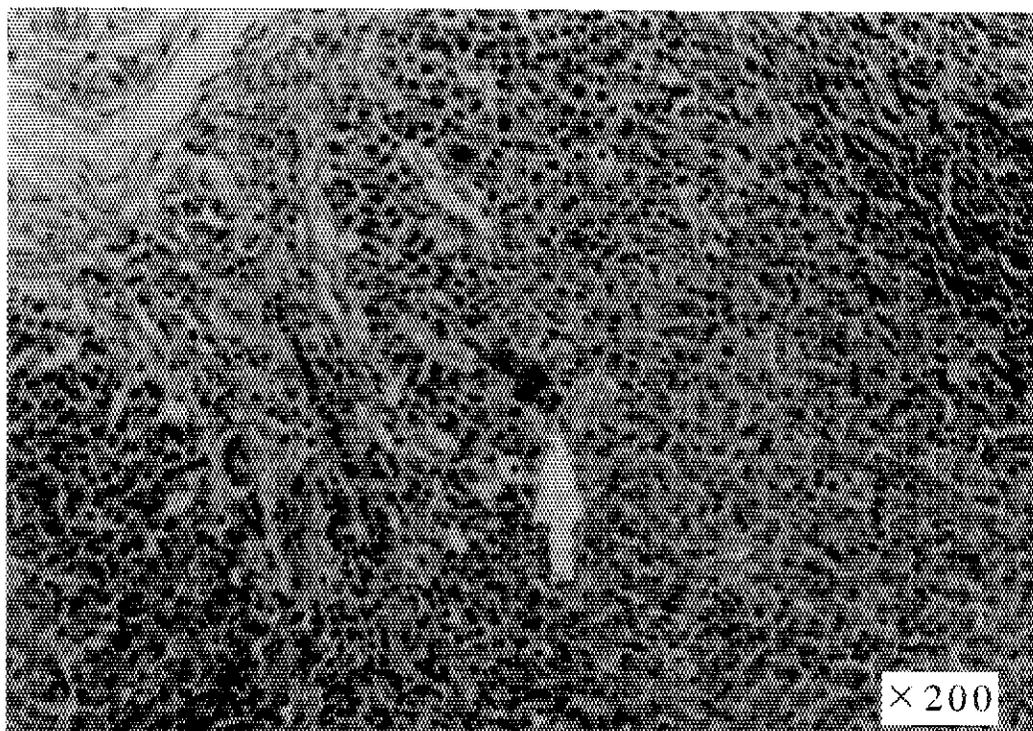


表8 麻疹ワクチンウイルス株 (TD97 株) 経鼻接種サル
及び非接種同居サルの麻疹抗体価

	接種ウイルス価	サル 個体番号	H I 抗体価 (2 ⁿ)					中和抗体価 (2 ⁿ)						
			0週	1週	2週	3週	4週	5週	0週	1週	2週	3週	4週	5週
接種群	高力価	1 1 1 7	<3	<3	7	9	8	8	<2	2.5	10.9	11.7	11.1	11.3
		1 1 2 4	<3	<3	4	6	6	6	<2	<2	7.1	7.9	7.8	8.7
	中力価	1 1 4 0	<3	<3	4	6	6	6	<2	<2	8.2	8.9	9.6	9.0
		1 1 4 8	<3	<3	6	7	7	7	<2	<2	9.3	10.6	11.1	10.8
非接種群		1 1 2 8	<3	<3	<3	<3	<3	<3	NT	NT	NT	NT	NT	NT
		1 1 3 7	<3	<3	<3	<3	<3	<3	NT	NT	NT	NT	NT	NT
		1 1 4 1	<3	<3	<3	<3	<3	<3	NT	NT	NT	NT	NT	NT
		1 1 4 2	<3	<3	<3	<3	<3	<3	NT	NT	NT	NT	NT	NT

注) 高力価; 10⁷PFU/ml のウイルスを 0.25ml ずつ両鼻腔に接種 (=5×10⁶PFU/頭)

中力価; 10^{5.5}PFU/ml のウイルスを 0.25ml ずつ両鼻腔に接種 (=1.5×10⁵PFU/頭)

NT; 未測定

表9 麻しんワクチンウイルス経鼻接種サル唾液中のIgA抗体

Monkey no	Weeks after inoculation					
	0w	1w	2w	3w	4w	5w
1124	0.112	0.112	2.662	1.007	0.851	0.400
1117	0.003	0.003	3.457	10.021	2.693	3.331
1140	0.003	0.018	0.232	0.121	0.029	0.001
1148	0.003	0.003	4.251	0.753	0.453	0.534

* IgA抗体はELISAで測定した。標準唾液の力価は中和抗体価に基づき設定した。

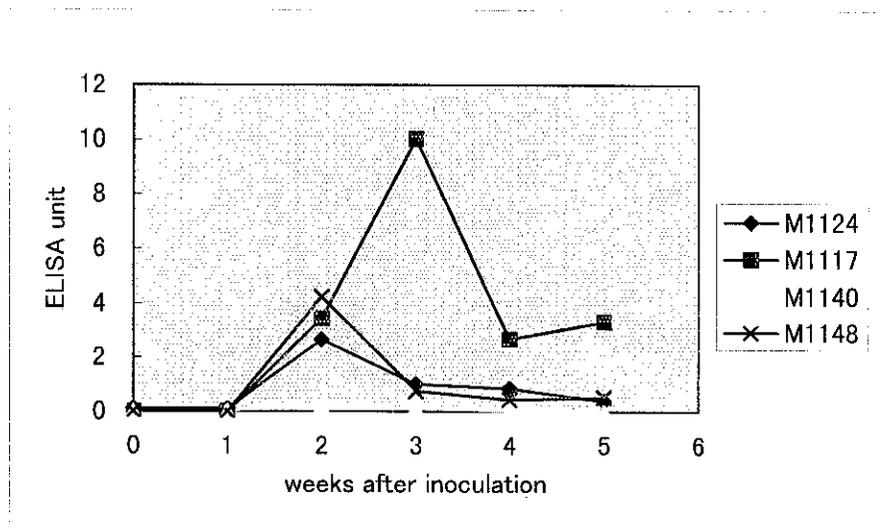


図5 TD97株経鼻接種サルの唾液中麻しんIgA抗体(2)

表10 麻疹ワクチンウイルス株 (TD97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
高力価 ウイルス 接種群	1117	総リンパ球数	2656	2728	5130	1907	5907
		CD4+リンパ球数	1132	1254	1204	735	1276
		CD8+リンパ球数	480	517	786	382	631
		CD4/CD8比	2.4	2.4	1.5	2.0	2.2
	1124	総リンパ球数	5344	2565	9570	2548	2656
		CD4+リンパ球数	1938	1236	1286	680	763
		CD8+リンパ球数	1027	573	1131	353	345
		CD4/CD8比	1.9	2.2	1.1	1.9	2.2
中力価 ウイルス 接種群	1140	総リンパ球数	4827	3127	6318	2220	10116
		CD4+リンパ球数	1787	1741	1306	997	1919
		CD8+リンパ球数	949	796	1271	497	1115
		CD4/CD8比	1.9	2.2	1.0	2.0	1.7
	1148	総リンパ球数	2445	1323	5291	2516	4293
		CD4+リンパ球数	882	373	906	848	1149
		CD8+リンパ球数	540	184	1066	646	775
		CD4/CD8比	1.6	2.0	0.8	1.3	1.5

注) 高力価; 10^7 PFU/ml のウイルスを 0.25ml ずつ両鼻腔に接種 ($=5 \times 10^6$ PFU/頭)

中力価; $10^{5.5}$ PFU/ml のウイルスを 0.25ml ずつ両鼻腔に接種 ($=1.5 \times 10^5$ PFU/頭)

経鼻麻疹ワクチン開発に関する研究

分担研究者 齋加志津子、鈴木一義、木所 稔、伊藤浩三 千葉県血清研究所
小船富美夫 国立感染症研究所

研究要旨

麻疹ワクチンウイルス株TD97株の中枢神経系（CNS）残留性を検討するために、高力価ウイルスを3頭のサルに経鼻接種し、接種後4週目に各組織のウイルスRNAの有無をRT-PCR法によって調べたところ、CNSを含む総ての組織において全頭で陰性であった。更に、呼吸器系への安全性を確認するために、 $10^{6.0}$ 又は $10^{5.0}$ 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、投与前後の胸部X線写真により呼吸器系の臨床診断をしたところ全頭で異常は認められなかった。次に経鼻接種によるウイルスの接触感染の可能性を調べるために、TD97株を経鼻接種した4頭のサルのそれぞれを接種と同時に非接種サルと同居させたところ、非接種サルへの感染は起こらなかった。これらの複数の試験で用いられたTD97株接種サル7頭の血中抗体は、HI抗体で6頭、中和抗体で7頭全頭が陽転した。加えて唾液中の麻疹ウイルス特異的局所IgA抗体価を測定したところ、5頭で上昇が認められた。さらに野外株（HL株）及びTD97株経鼻接種サルにおける末梢血中総リンパ球数とCD4及びCD8陽性リンパ球数の変動を調べたところ、野外株接種群では著明な減少を示したのに対して、ワクチン株接種群での減少はみられず、顕著な対比を示した。

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疹生ワクチンを

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疹ワクチン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疹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ーテルチューブ（3Fr）を気管内に挿入し、カテー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℃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、1ml生理食塩液中に浸潤して-80℃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 段階 PCR はワンステップ RNA-PCR キット (AMV) (宝酒造) を、2 段階 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 段階の PCR は NP 遺伝子内の 405 から 1326 番目の領域を、2 段階の 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。(300mA、0.02sec、54Kvp、リズなし) 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。

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

TD 9 7 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 4 週まで検体を採取した。

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。TD 9 7 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 $2^{2.3}=4.9$ unit 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 咽頭拭い液、末梢血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 3 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、HL 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4のとおりであった。TD97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。

1.3 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5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日目に解剖した。

2.1 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6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 7 及び図 5 のとおりであった。4 頭中 3 頭は接種 2 週後に 2.7~4.2 EU の上昇を示し、うち 1 頭は 3 週目に 10.0 EU 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 8 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。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 からも 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 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。

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⁴⁾。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、臨床的に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が、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頭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。麻疹罹患後の一時的免疫不全状態はこのリンパ球等の減少によるものと考えられ、ワクチン接種後のリンパ球等の減少の起こりにくい TD97 株は免疫抑制の影響を強く受けやすい途上国の乳幼児に用いるワクチンとして適している可能性がある。

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 細胞による野外麻疹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) Griffin DE, Bellini WJ: Chapter43 Measles Virus pp1267-1312 in Fields Virology 7th edition volume1. Lippincott-Raven Publisher,
- 5) Philadelphia, 1996

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た。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。

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、予防接種の効果的実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

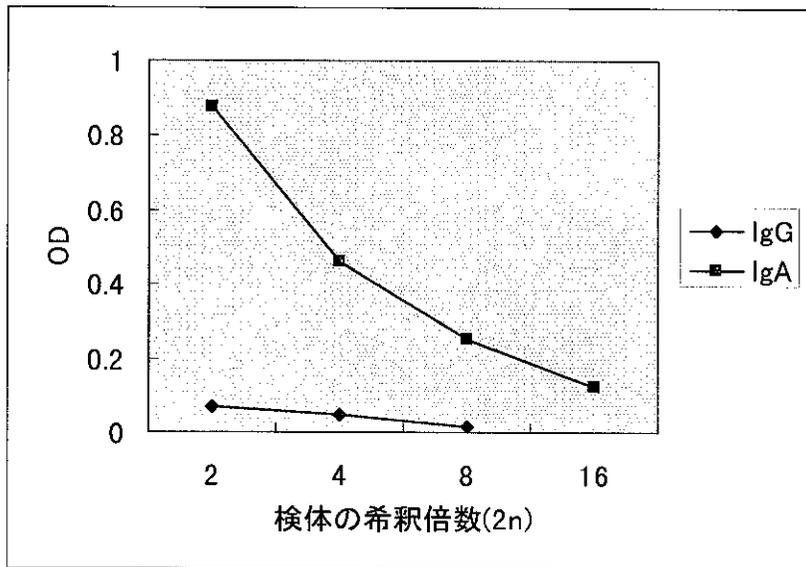


図1 参照唾液の麻疹 IgG 抗体と IgA 抗体

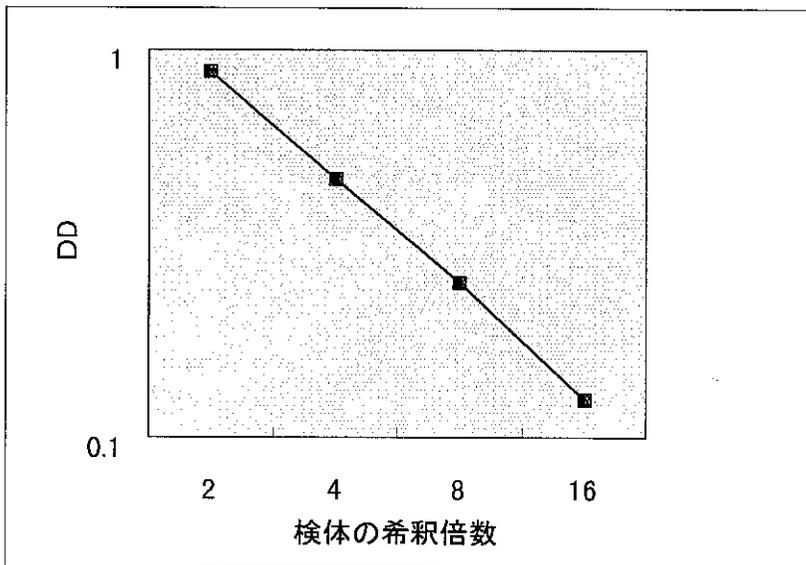


図2 麻疹 IgA 抗体の標準曲線

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

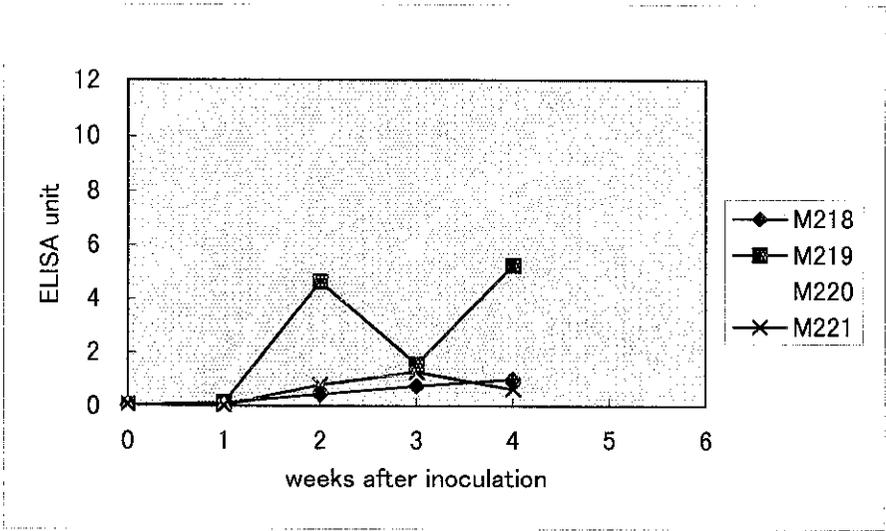


図3 HL株経鼻接種サルの唾液中麻しんIgA抗体

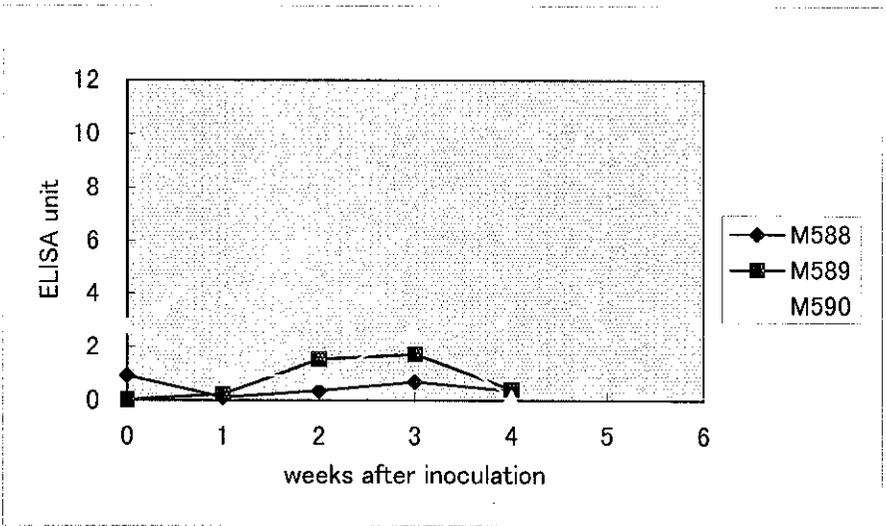


図4 TD97株経鼻接種サルの唾液中抗麻しんIgA抗体(1)

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

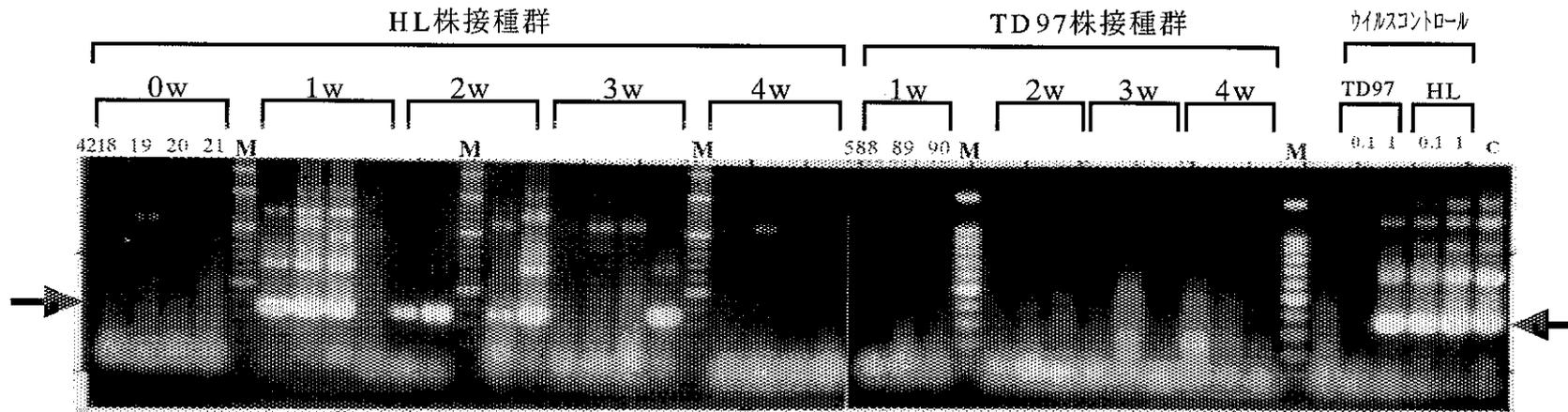
	サル 個体番号	咽頭拭い液					末梢血リンパ球				
		0週	1週	2週	3週	4週	0週	1週	2週	3週	4週
ワクチン株接種群	588	ND	-	-	-	-	ND	-	-	-	-
	589	ND	-	-	-	-	ND	-	-	-	-
	590	ND	-	-	-	-	ND	-	-	-	-
野外株接種群	4218	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
	4219	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
	4220	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
	4221	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+

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