

表4 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 |
| | 項頭葉 | — | — | — | — | 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5 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 |

表6 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; 10⁷ PFU/ml のウイルスを 0.25ml ずつ両鼻腔に接種 (=5×10⁶ 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 (=1.5×10⁵ PFU/頭)

NT ; 未測定

表7 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。

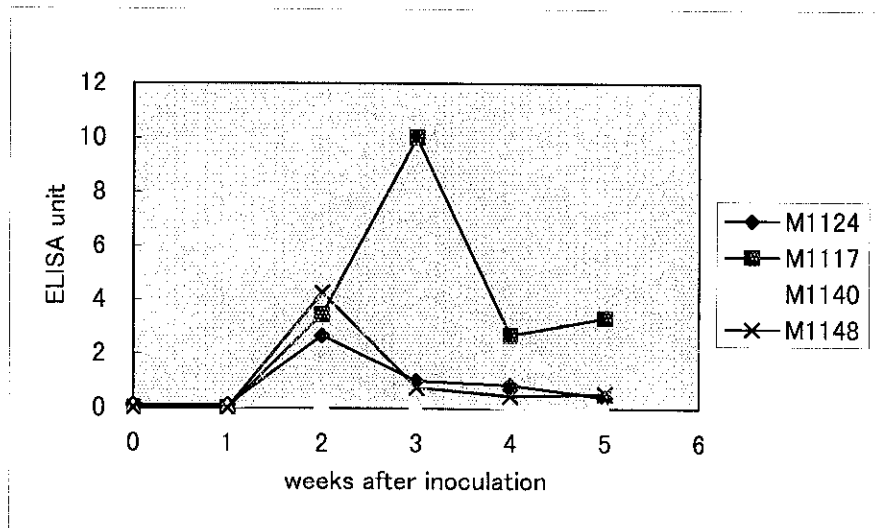


図5 TD97株経鼻接種サルの唾液中麻しんIgA抗体(2)

表8 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)

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書II

経鼻麻しんワクチン開発に関する研究

分担研究者 大川時忠 千葉県血清研究所、佐多徹太郎 国立感染症研究所

研究要旨

麻しんワクチンウイルス（TD97株）経鼻接種サルの中枢神経に、接種4週後において病変及びウイルス抗原は認められなかった。また、同ウイルスを気管内に接種したサルの10日目の呼吸器系に病変及びウイルス抗原は認められず、本ワクチンウイルスの経鼻接種法の呼吸器系に対する高度の安全性が示唆された。

A. 研究目的

経鼻麻しんワクチンのサル接種試験においてサルの各組織について、接種ウイルスによる病変及び侵襲に関して病理学的及び免疫組織化学的に検討を行い、ワクチンの安全性評価に資する。

B. 研究方法

サルでの中枢神経残留試験：分担研究報告書Iに述べたとおりに試験した。

サル気管内接種試験：分担報告書Iに述べたとおりに試験した。

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℃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作成した。

C. 研究結果

1. 経鼻接種ワクチン株及び野外株ウイルスの中枢神経残留性試験

ワクチンウイルス（TD97株）を接種した3頭及び野外ウイルス（HL株）を接種した4頭の病理組織学的検査成績は表1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ためと推察される。

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。

2. ワクチンウイルスのサル気管内接種試験

TD 9 7 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2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1)、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。

D. 考察

麻しんワクチン(TD 9 7 株)をサルに

経鼻接種した場合、その3週後の病理所見では50%のサルの扁桃に巨細胞形成を伴う病変が認められることが報告されているが¹⁾、今回の経鼻接種試験では軽度の炎症がみられたのみであり、巨細胞形成は全く認められなかった。これは、今回の試験の病理材料は、接種後4週目のものであるため、既に巨細胞が消失したものと考えられた。HL株接種サルでは4頭中1頭に中枢神経の後頭葉及び呼吸器系に軽度の病変が認められた。本野外ウイルス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^{2, 3)}、本試験での病変は経鼻接種により特に惹起されたものであるとはいえない。免疫化学検査ではワクチン株及び野外株接種サルの中枢神経に抗原は検出されず接種後4週目におけるウイルス抗原の中枢神経における残留性は本試験では否定された。

ワクチンウイルスのサル気管内接種試験においては、経鼻ワクチンの予定用量と同量またはそれ以上のウイルス量を直接気管内に投与するという苛酷な負荷を与えてもサルの呼吸器系の病変を起こさず、また、ウイルスの増殖も確認されなかった。従って、本ワクチンの経鼻接種法は呼吸器系に対して高度な安全性を持つとみなされた。

参考文献

- 1) 鈴木一義、他：経鼻麻しんワクチンの開発—サルによる有効性と安全性の検討 第43回ウイルス学会総会：演題 3074、1995
- 2) 永田典代、他：リンパ・上皮系組織における麻しんウイルス感染様式とその病変 第44回日本ウイルス学会総会

演題 2 E 1 4、1 9 9 6

- 3) 小船富美夫：麻しんウイルス研究の最近の進歩—B 9 5 a 細胞による麻しんウイルスの性状研究—。臨床とウイルス 2 2 : 2 3 3 - 2 4 5、1 9 9 4

E. 結論

高力価ワクチンウイルスを経鼻接種したサルの中樞神経において、接種後 4 週目に病変及びウイルス抗原は認められず、ウイルスの残存を示す証拠は得られなかった。また、ワクチンウイルスの気管内接種によっても、サルの呼吸器系に病変及びウイルス増殖が認められず本ワクチンの経鼻接種法の安全性が確認された。

表1. 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 | | | H L 株接種サル | | | |
|----------------------------|-----------|------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------|
| | | 5 8 8 | 5 8 9 | 5 9 0 | 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 | — | — | — | — | — | — | — |
| そ の 他 臓 器 | 腸間膜リンパ節 | — | — | — | — | — | — | — |
| | 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2. ワクチン株麻疹ウイルス気管内接種サルの病理組織学的検査成績

| | 臓器又は部位 | T D 9 7 株 接 種 サ ル 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 脊 髄 | - | - | - | - | - | - |
| 呼 吸 器 | 気 管 | - | - | - | - | - | - |
| | 気管支・肺門リンパ | - | - | - | - | - | - |
| | 肺 | - | - | - | - | - | - |
| リ ン パ 系 組 織 | 扁 桃 | + 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)リンパ節濾胞に巨細胞出現。病変は軽度。

写真1 ワクチン株接種サルの扁桃における巨細胞

