

Table 1 Children with anaphylaxis to vaccine and anti-gelatin IgE levels in the serum

Children			Vaccines		Reaction to vaccine	Time of onset (min)	Anti-gelatin IgE (Ua/ml)
No.	Age	Sex	Vaccine	Amount* of gelatin			
1	3yr 6mo	M	Mumps	1.0	Urticaria, wheezing	30	34.0
2	1yr 11mo	M	Measles	1.5	Urticaria, airway obstruction with wheezing	10	251 [§]
3	1yr 6mo	M	Mumps	1.0	Urticaria, wheezing cough	5	15.0
4	1yr 8mo	F	Measles	1.5	Urticaria, airway obstruction with wheezing	15	42.5
5	4yr 11mo	F	Mumps	1.0	Urticaria, wheezing cough	15	30.7
6	2yr 1mo	M	Measles	1.5	Urticaria, cough	15	11.0
7	3yr 11mo	M	Measles	1.0	Urticaria, hypotension	10	11.8
8	2yr 9mo	M	Rubella	1.0	Urticaria, wheezing cough	15	62.9
9	1yr 7mo	F	Measles	1.5	Urticaria, airway obstruction with wheezing	20	24.4
10	1yr 8mo	F	Measles	1.5	Urticaria, cough	15	28.0

*mg per shot

[§]Serum which had more than 100 Ua/ml as specific IgE were diluted and measured.

Fig 1 IgE reactivity to bovine gelatin and type I collagen

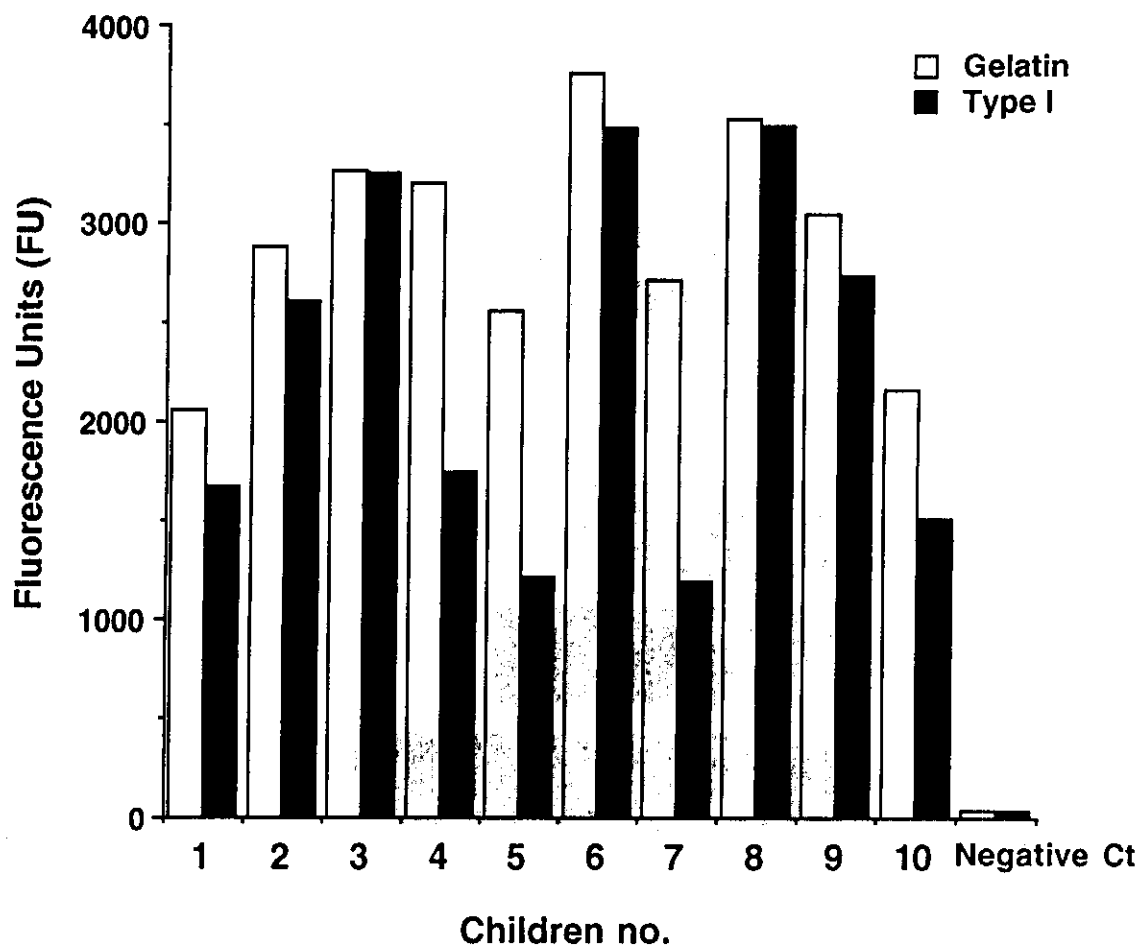


Fig 2 IgE reactivity to α 1 and α 2 chains

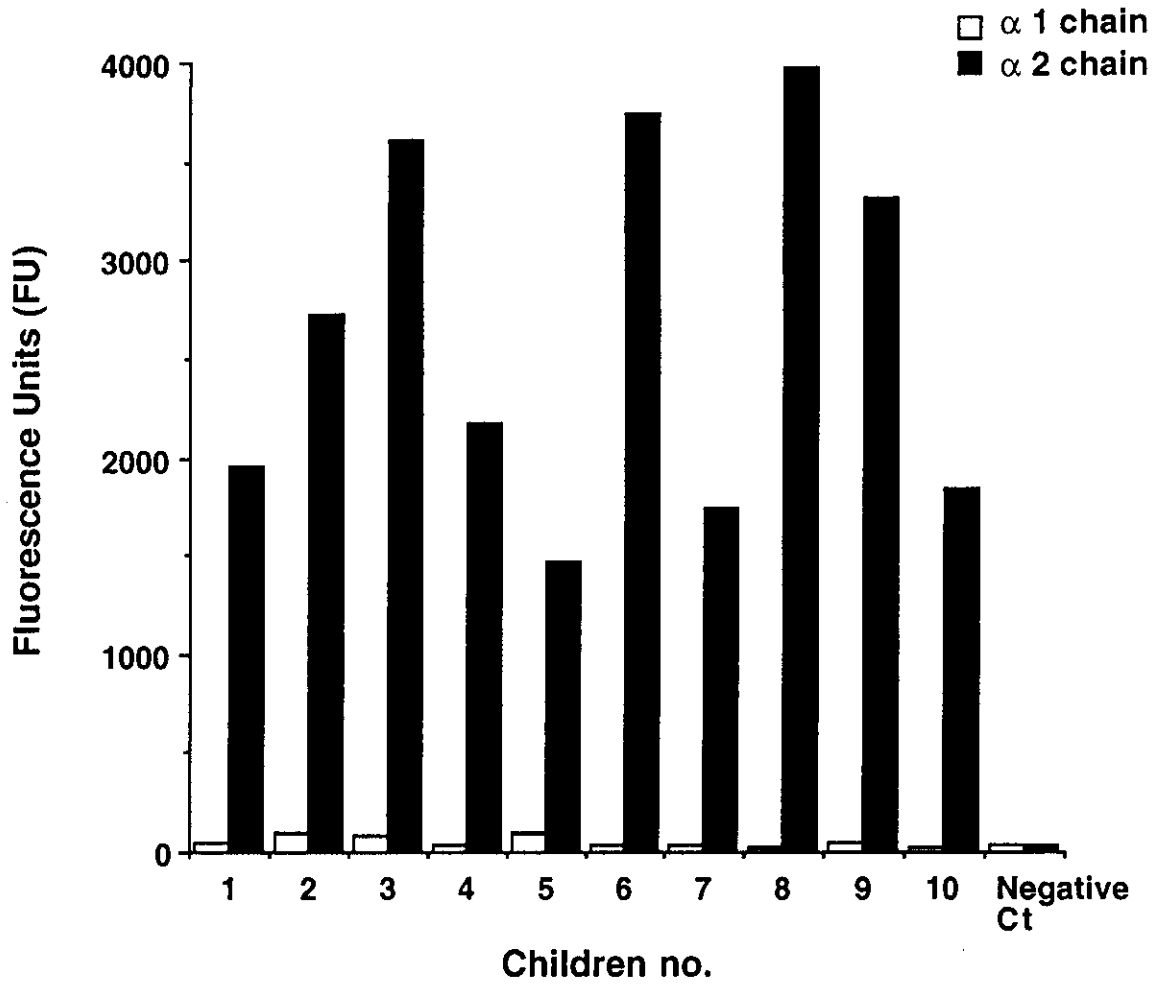
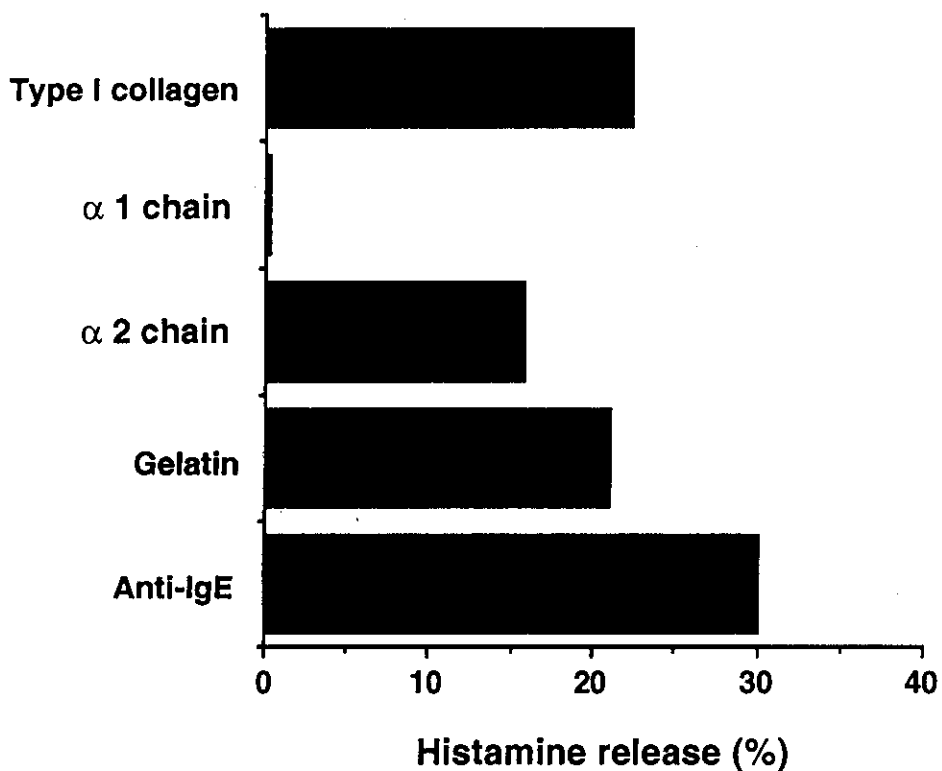


Fig 3 Histamine release from the mast cells



ゼラチンアレルギー成立におけるゼラチン含有三種混合 (DPT) ワクチンの意義 (第2報)

熊谷卓司, 古川秀嗣, 鎌田 誠, 五十嵐千春,
由利賢次, 我妻浩治 (札幌小児アレルギー感染症研究会)
尾崎隆男, 木戸真二 (愛知県厚生連昭和病院小児科)
小島弘幸, 斎藤明子, 矢野昭起 (北海道立衛生研究所)

1. 研究目的

ゼラチンに対してアレルギー反応が惹起されることが明らかにされて以来¹⁾, 多くの症例が報告されてきた²⁻¹⁰⁾. 今日ではゼラチンがアレルギーを引き起こす原因物質であることは動かしがたい事実として受け入れられるようになり, ワクチンからも不必要なゼラチンが急速に除かれるようになっていいる. そのためもあってか最近ではワクチン接種に伴う発疹等の副反応の発生頻度も著しく減少しており, ゼラチンアレルギーは解決済みの問題であるかのような論調も一部にみられる. しかしながら, ゼラチンがいかなる経過で感作を引き起こすか, すなわち発症病理についての研究に進展はみられないし, なぜ最近になって急速にゼラチンアレルギーの症例が多発したかと言う疑問に対する回答についても推測の域を出ていないのが現状である. ワクチンに限らず, 生物製剤にはこれからも添加物が必要であることを考えると, 可能な範囲で学問的に原因の追及をしておくことは不可欠であり, それはまたこのような新たな事態に遭遇した医療関係者にとって義務の一つであるとも思われる.

著者らは昨年の本班会議において, DPT接種に際してみられた副反応症例について検討し, ゼラチン含有DPTワクチンがuniversalに感作を引き起こすことを報告した¹¹⁾. 今回, 前回の報告には含まれなかった集団のデータを得たので, 一部重複するが前回の成績とともに整理して検討したので報告する.

2. 研究対象と方法

研究は1997年5月から1998年4月まで, 札幌市4施設, 江南市1施設の小児科外来で行われた. 対象はゼラチン含有DPTワクチン1期被接種者153例中, 副反応として局所の腫脹を呈した症例37例(男児24例, 女児13例, 年令4ヶ月から2才6ヶ月)およびゼラチンを含まないDPTワクチン1期被接種者38例中, 副反応として局所の腫脹を呈した症例8例(男児3例, 女児5例, 年令8ヶ月から3才5ヶ月), さらにゼラチン含有DPTワクチン1期被接種者で副反応を呈さなかった10症例(男児5例, 女児5例, 年令9ヶ月から1才9ヶ月), ゼラチンを含まないDPTワクチン1期被接種者で副反応を呈さなかった10症例(男児5例, 女

児5例,年令7ヶ月から1才6ヶ月)である。副反応は接種局所の発赤,腫脹が中心で,1例のみ全身小発赤疹を呈した。

ゼラチン特異的IgE抗体は蛍光ELISA法にて測定した。陽性限界は0.05 Ua/ml以上とした。

ゼラチン特異的リンパ球増殖反応試験(LPT)では 2.5×10^6 /mlの末梢血リンパ球を至適濃度のゼラチン抗原存在下に5日間培養し最後の24時間に ^3H -Thymidineで標識しカウント後,抗原添加,非添加培養のuptake ratioすなわちstimulation index(SI)を算定した¹²⁾。SI 1.5以上を陽性値とした。ゼラチン特異的IL-2反応性試験(AIR)は三菱化学ビーシーエルにて施行した¹²⁾。 1×10^6 /mlの末梢血リンパ球を至適濃度のゼラチン抗原添加および非添加で5日間培養後,IL-2を添加し更に3日間培養し,蛍光色素を加え,IL-2添加時と非添加時の蛍光度を測定し両者の比をIL-2反応性,すなわちstimulation index(SI)として表した。ゼラチン抗原添加および非添加培養時のSIの差(SI increment) 0.08以上を陽性と判定した。LPTおよびAIRのいずれかまたは両方陽性であったものをゼラチン特異的細胞性免疫反応陽性と判定した。

統計学的方法は対象群の検定に一元分散分析,LPTにおけるSI,AIRにおけるSI incrementの検定にはMann-Whitney U testを用いた。ゼラチンの有無と細胞性免疫反応の関係についてはFisher's exact testを用いた。全て両側検定で行い,P値 0.05未満を統計学的に有意とした。

3. 結果

ゼラチンの有無,副反応の有無によって整理した各症例群の特徴をTable 1に示す。副反応はゼラチン含有DPT副反応症例37例中34例(92%)において第2回目接種以降で発生していた。第1回目接種後の3例では副反応は接種後数日以降に出現した。一方,ゼラチンを含有していないDPT副反応症例では75%の症例で第2回目以降に発症していた。

今回の検討対象となった症例のIgE抗体は全例陰性であった。

Figure 1 (top)にゼラチンを含有するDPT副反応例におけるリンパ球増殖反応(LPT)の結果をSI値で示した。アスタリスク(*)は陽性を示す。37症例中34例(92%)が陽性であった。一方,IL-2反応性試験(AIR)では36症例に施行し31例(86%)が陽性であった(Figure 1,bottom)。28症例はLPT,AIR両方で陽性を示し,5症例,3症例については各々LPT,AIRのみが陽性であった。37症例全例がLPTまたはAIRのどちらかあるいは両方の検査法で陽性であった。

Figure 2 (top)にゼラチンを含有するDPTワクチンを接種して副反応を示さなかった10症例の結果を示す。8例(80%)がLPTで陽性であった。AIRは9症例のみで検討可能であったが,4例(44%)で陽性であった。2症例はLPT,AIR両方で陽性を示し,5症例,2症例については各々LPT,AIRのみが陽性であった。10症例全例がLPTまたはAIRのどちらかあるいは両方の検査法で陽性であった。

ゼラチンを含有しないDPTワクチン副反応例8症例のLPTおよびAIRの結果をFigure 2 (middle)に

示す。症例2でAIRのみが陽性であった(13%)。

ゼラチン含有しないDPTワクチンを接種して副反応を示さなかった10症例の結果をFigure 2 (bottom)に示す。症例3でLPTのみが陽性であった(10%)。

Table 2に結果のまとめを示す。対象症例を副反応の有無で整理すると、LPTにおけるSI値については有意差を認めなかったが(3.653 +/- 2.571 vs. 2.181 +/- 0.557, P=0.23), AIRにおけるSI incrementについては有意差を認めた(0.342 +/- 0.394 vs. 0.119 +/- 0.218, P=0.0074)。そこで副反応の有無別に今回の症例を2群に分けて検討した。副反応を認めた症例における細胞性免疫反応の陽性率はゼラチン含有DPT被接種群で有意に大きかった(100% vs. 13%, P<0.0001)。同様に副反応を認めなかった症例における細胞性免疫反応の陽性率はゼラチン含有DPT被接種群で有意に大きかった(100% vs. 10%, P=0.0001)。

4. 考 按

三宅らによって予防接種の副反応にゼラチンアレルギーが関与していることが知られるようになって以来¹⁾, 多くのワクチンによるゼラチンアレルギー症例の報告が見られるようになった。これまでの研究によりワクチンに含まれるゼラチンに対してIgEならびに細胞性免疫の関与するアレルギー反応が惹起されることが明らかにされている¹²⁾。しかしながらこれらのアレルギー症例がどのようにゼラチンに感作されたか、すなわちprimary sensitization processは必ずしも明らかになってはいない。一方、一部のDPTワクチンにはゼラチンが製造過程のcarry overの形で含有されることが知られ、adjuvantとともに注射されることから感作過程に関与することが懸念されていた。

非即時型の副反応症例では通常ゼラチン特異的IgE抗体は陰性であり、これらの症例への診断的approachは今のところリンパ球の抗原特異的増殖反応にもとづく方法しか手だてがない¹²⁾。事実、ゼラチン含有DPTワクチン被接種者でのゼラチン特異的IgE抗体陽性率は決して高くはない¹³⁾。従って、非即時型の副反応を認めた症例、あるいは副反応を認めないゼラチン含有ワクチン被接種者を対象とした研究にはゼラチン特異的細胞性免疫反応を用いる必要があると思われた。

今回の検討で、ゼラチン含有DPTワクチン被接種者では副反応の有無に拘わらず、全例ゼラチンの感作を受けていることが明らかとなった。アジュバントと共に接種されるとはいえ、microgram単位のゼラチンが全例に感作を付与したということは驚くべき事実である。また、たった1回の被接種者でも細胞性免疫反応が陽性であったことは、ゼラチン含有ワクチンの市場シェアが75%であった事と共に考えると、相当数の日本人小児人口がゼラチンに一度は感作されたことを意味しており、大きな問題であると言わざるを得ない。今回の成績はゼラチン含有DPTワクチンが被接種者にuniversalに感作を引き起こすことを示した初めてのlaboratory-based evidenceである。将来起こってくるかも知れないアナフィラキシーを含むゼラチンアレルギー反応に対する対応準備が第一線の臨

床家にとって必要不可欠であり、そのためにもこれらの事実が関係機関を通じて周知徹底されることが必要であると思われる。

さらに、ゼラチン不含有ワクチン副反応例で少数ではあれ(10~13%)細胞性免疫反応陽性を示す症例があったが、食餌を含むワクチン以外の感作ルートを考慮せざるを得ない例がゼラチンアレルギー患者群の中に存在することを示していると思われた。このことはワクチンから全てゼラチンが除かれてもゼラチンアレルギーが依然として発生し続ける可能性を示しており、将来アレルギー学上の問題になると思われる。

今後の検討課題として、ゼラチンに感作されたDPTワクチン被接種者のうちどのような患者群が将来ゼラチン特異的IgEを産生するようになるか、あるいはこのリンパ球レベルの感作がどの程度の期間持続するのかという問題が残されている。

(文 献)

1. 三宅健, 河盛重造, 吉田隆実. アレルギー患者血清中に存在する麻疹ワクチン成分に対する特異IgE抗体の検討. 日本小児科学会雑誌 1988;92:1502-5.
2. Kelso JM, Jones RT, Yunginger JW. Anaphylaxis to measles, mumps, and rubella vaccine mediated by IgE to gelatin. *J Allergy Clin Immunol* 1993;91:867-72.
3. 小倉英朗, 小倉由紀子, 友田隆士, 倉繁隆信, 阪口雅弘, 井上栄 . 麻疹ワクチン接種後, アナフィラキシーを来したゼラチンアレルギー児の1例. 小児感染免疫 1995;7:115-8.
4. 望月康弘, 中山哲夫. 麻疹及びおたふくかぜワクチン接種後の発疹を主とする副反応に関する検討. 日本小児科学会雑誌 1995;99:873-4.
5. Sakaguchi M, Ogura H, Inouye S. IgE antibody to gelatin in children with immediate-type reactions to measles and mumps vaccines. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96(4):563-5.
6. Sakaguchi M, Nakayama T, Inouye S. Food allergy to gelatin in children with systemic immediate-type reactions, including anaphylaxis, to vaccines. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98(6 Pt 1):1058-61.
7. 山中樹, 綿谷靖彦, 熊谷卓司, 他. 予防接種副反応とゼラチンアレルギーに関する研究. 日本医事新報 1997;3795:37-41.
8. Sakaguchi M, Yoshida T, Asahi T, Aoki T, Miyatani Y, Inouye S. Development of IgE antibody to gelatin in children with systemic immediate-type reactions to vaccines. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99(5):720-1.
9. Sakaguchi M, Yoshida M, Kuroda W, Harayama O, Matsunaga Y, Inouye S. Systemic

- immediate-type reactions to gelatin included in Japanese encephalitis vaccines. *Vaccine* 1997;15(2):121-2.
10. Sakaguchi M, Yamanaka T, Ikeda K, Sano Y, Fujita H, Miura T, et al. IgE-mediated systemic reactions to gelatin included in the varicella vaccine. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99(2):263-4.
11. 熊谷卓司, 他. ゼラチンアレルギー成立におけるゼラチン含有三種混合ワクチン(DPT)の意義. 厚生省「予防接種の効果と副反応の追跡調査及び予防接種の社会経済効果に関する研究」, 平成10年度研究報告書.
12. Kumagai T, Yamanaka T, Wataya Y, Umetsu A, Kawamura N, Ikeda K, et al. Gelatin-specific humoral and cellular immune responses in children with immediate- and nonimmediate-type reactions to live measles, mumps, rubella, and varicella vaccines. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100(1):130-4.
13. 堺春美, 中山哲夫, 相沢主税. 生ワクチンのゼラチンアレルギーに及ぼす沈降ワクチンの影響について. *臨床とウイルス* 1996;24(3):210-9.

Table 1: Characteristics of the subjects

Subjects No.	Gelatin in DTP	Adverse reaction	Gender		Age (+/- SD)
			Male	Female	
37	(+)	(+)	24	13	11.2m (+/- 7.2)
10	(+)	(-)	5	5	15.0m (+/- 4.1)
8	(-)	(+)	3	5	13.5m (+/- 6.3)
10	(-)	(-)	4	6	10.4m (+/- 3.0)

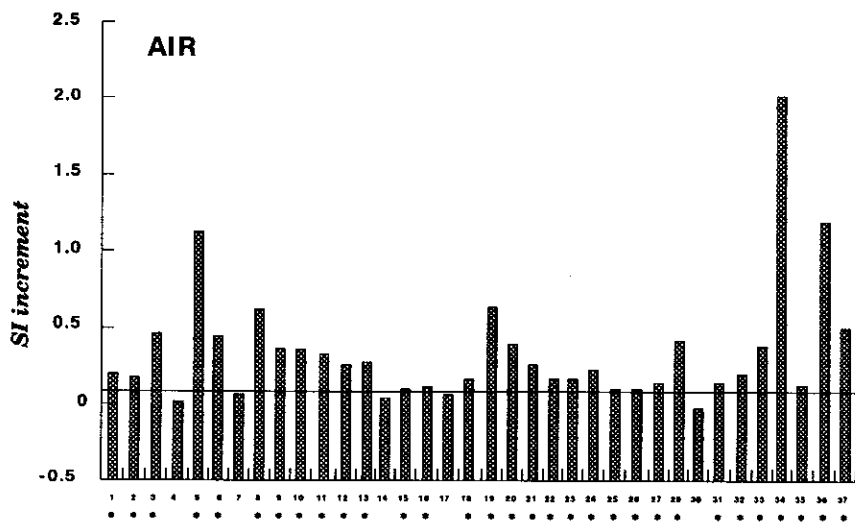
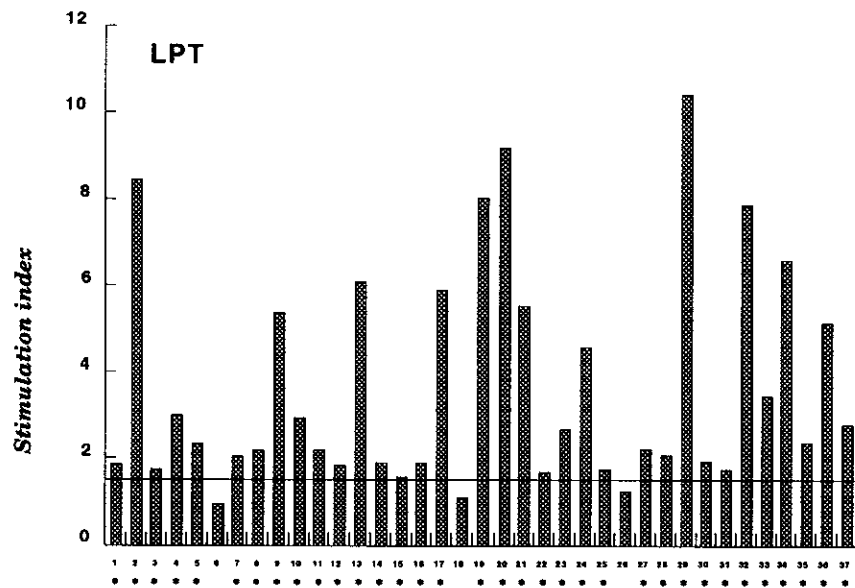


Figure 1
Gelatin specific lymphoproliferation response (top) and IL-2 responsiveness (bottom) among recipients of gelatin containing vaccine with adverse reactions. The horizontal line defines the positive negative cut off point while asterisks identify subjects with positive responses.

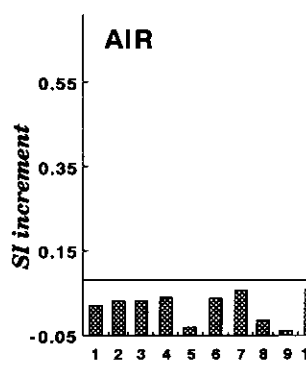
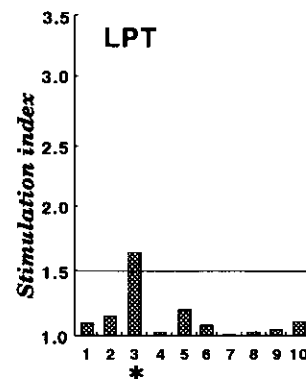
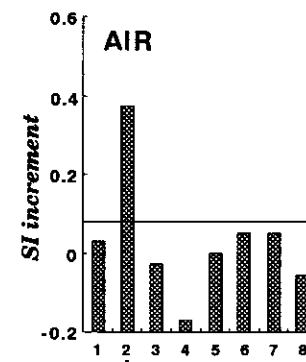
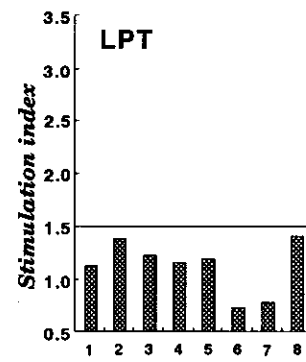
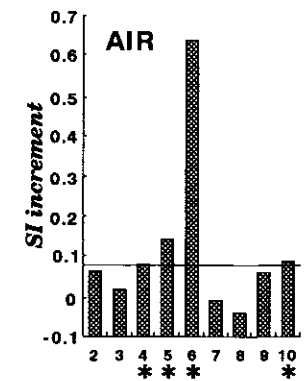
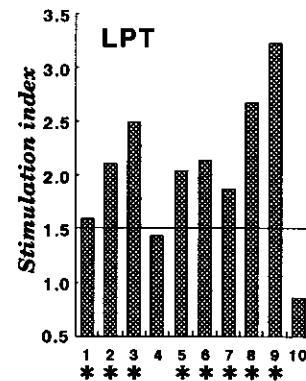


Figure 2
Gelatin specific lymphoproliferation response and IL-2 responsiveness in recipients of gelatin containing vaccine without adverse reactions (top), in recipients inoculated with non-gelatin DTP who reacted adversely (middle); and those who did not react adversely (bottom). The horizontal line shows the positive negative cut off point and asterisks identify subjects with positive responses.

Table 2: Gelatin-specific cell-mediated immune responses in subject groups

Subjects No.	Gelatin in DTP	Adverse reaction	No. Positive(%)		Test Results				No. Positive(%) in CMI
			LPT	AIR	LPT (+)	LPT (-)	AIR (+)	AIR (-)	
37	(+)	(+)	34 (92%)	31/36 (86%)	28	5	3	0	37 (100%)
10	(+)	(-)	8 (80%)	4/9 (44%)	2	5	2	0	10 (100%)
8	(-)	(+)	0 (0%)	1 (13%)	0	0	1	7	1 (13%)
10	(-)	(-)	1 (10%)	0 (0%)	0	1	0	9	1 (10%)

麻疹患者における免疫抑制機序の解析

岡田 晴恵、田代 真人、小船富美夫、
佐藤 威（国立感染症研究所ウイルス製剤部）
土屋 喬義（土屋小児病院）
高山 直秀（東京都立駒込病院小児科）
武内 可尚（川崎市立川崎病院小児科）
宮塚 幸子（神奈川衛生看護専門学校付属病院）

1. 研究目的

麻疹ウイルス感染は一過性の強い免疫抑制を誘導し、このためにしばしば致死的な日和見感染症をもたらすので、特に発展途上国においては麻疹の制圧は大きな問題となっている。一方、WHOによる拡大予防接種計画（EPI）に基づいて弱毒生ワクチンの接種が世界的に進められているが、ここ数年来のHIV感染者が増加している状況において、これらの免疫不全患者に生ワクチンを接種した場合の安全性に関しては結論が出ておらず、これらの解明が麻疹根絶計画を推進する上で強く望まれている。しかし、多くの先進諸国においては麻疹は既に制圧されており、麻疹患者における免疫抑制機序について、最新の解析方法を駆使して解析することが不可能になっている。そこで、麻疹の流行が依然続いている我が国に対して、これらの解明を進めることが期待されている。

麻疹ウイルス感染における免疫抑制の機序については、ウイルス感染リンパ球の死滅、感染細胞表面の麻疹レセプターであるCD46分子のダウンレギュレーション、ウイルス感染によって誘導されるサイトカインを介した免疫抑制などが報告・示唆されているが、いずれも麻疹病態を十分には説明できず不明の点が多い。我々は、麻疹患者における非感染リンパ球の著明な減少とリンパ球の成熟抑制に着目して、野生株麻疹ウイルス感染により誘導される免疫抑制機序を分子レベルで解析し、弱毒生ワクチンとの比較検討を進めている。今回は、各年齢層の麻疹患者の末梢血について、免疫担当細胞数の消長、免疫機能とアポトーシスに関わる各種細胞マーカーおよびサイトカインの変動を経時的に解析し、麻疹患者における免疫抑制の実態を検討した。

2. 材料と方法

潜伏期から発疹出現後60病日までの間に経時的に採取した乳児から30歳までの麻疹患者約70名および対照健常人の末梢血について、B95a細胞を用いたウイルス分離およびゼラチン粒子凝集（PA）法による血清麻疹抗体価の測定を行った。また、末梢血単核球（PBMC）画分について、サブセット別のリンパ球数の測定、サブセット別の感染細胞数の定量、および細胞表面および内部に分布する約80種類の各種細胞マーカー分子、CD95（Fas）またはTRAIL等の第2経路を介するアポトーシス被誘導能および各種サイトカインの変動などをフローサイトメトリーおよびELISAで解析

した。解析方法の詳細に関しては別に報告する予定である。

3. 結果と考察

(1) 潜伏期にはP B M C画分に少数の感染リンパ球が検出されたが、通常の経過では発疹出現後には消失していた。しかし、麻疹患者70名中で死亡例1例を含む4例の重症化患者については、発疹出現後にも1週間に亘って感染細胞が検出された。

(2) 麻疹患者では、発疹出現時には既に重篤なリンパ球減少状態になっていた。C D 4 T細胞数は正常の50～10%前後にまで著明な減少が認められたが、C D 8 T細胞の減少が更に激しかった。C D 8 T細胞減少によってCD4/CD8比はかえって高い値を示すこととなり、これは比較的早く起こるCD8T細胞数の回復傾向によって正常値に戻った。従って、C D 4 / C D 8 比はH I V感染の場合とは異なって、麻疹病態の指標としては必ずしも適当ではない。また、B細胞の著明な減少も認められ、CD45発現リンパ球中で2～7%までに減少していた。これらのリンパ球数の著明な減少は、年少者では10日前後で回復傾向が認められたが、10歳以上の年長者では一カ月以上持続し、回復には長時間を要した。従って、麻疹患者における末梢血リンパ球の減少は、従来から報告されているような感染細胞死のみでは到底説明できず、その数千倍の非感染細胞が短期間に死滅していることが強く示唆された。

(3) C D 4 T細胞、C D 8 T細胞、B細胞の著明な減少とは逆に、NK細胞数が著明に増加していた。これは、特異的免疫機能を担うTおよびBリンパ球の量的および機能的な低下をNK細胞が代償している可能性がある。また細菌等による二次感染例を除き、単球系および好中球の絶対数には大きな変化は認められなかった。

(4) 健常人のリンパ球にはアポトーシス関連分子の発現は認められなかった。一方、麻疹患者では、潜伏期において、C D 4 およびC D 8 T細胞にC D 9 5 (Fas)およびTRAILを含む第2経路のアポトーシス関連分子の著明な発現が認められた。その後急速にリンパ球数の減少が起こり、この時期にほぼ一致して発疹が出現した。発疹出現後には、T細胞表面のT R A I L等の第2経路関連分子の発現は低下したが、C D 9 5は依然強く発現していた。従って、麻疹ウイルス感染者においては、潜伏期では第2経路によるアポトーシスが、一方、発症後には第1経路によるアポトーシスが非感染細胞死の主な機序であることが示唆された。

(5) 麻疹患者のB細胞にはCD40が強く発現しており、同時期のT細胞上にはCD40Lの発現の増強が認められた。麻疹ウイルス感染によりB細胞の急激な減少が認められたが、このB細胞減少にはCD40-CD40L分子結合を介するアポトーシス誘導シグナル伝達系の関与が示唆された。

(6) 麻疹患者では、発症後の早い時期にナイーブT細胞の消失が認められ、逆にメモリーT細胞と活性化T細胞の著明な増加が認められた。また、感染患者のうちの重症例では、末梢血中にC D 4 とC D 8 両方を発現している未成熟T細胞の数が正常人の10～40倍に増加していた。この患者の末梢血ではCD34発現細胞の増加が同じ程度に認められた。これらの成績から、麻疹患者では、免疫担当細胞死に対して新たな細胞の供給が行われてはいるが十分には代償されておらず、重症例においては免疫担当細胞

の成熟および供給が強く抑制されていることが示唆された。

(7) 以上の変化は、1歳未満の乳児および年長者で強く起っていた。一般的に、1-5歳までの幼児では症状も比較的軽症であり、リンパ球数および細胞マーカーの変化も比較的軽度であったが、10歳を過ぎるころから加齢とともに重症化の傾向を示し、免疫抑制状態を反映するリンパ球数の減少と細胞マーカーの変化も激しいことが明らかとなった。特に成人患者ではこの傾向が著明であり、麻疹の重篤化が免疫機能の成熟と関連することが示唆された。

4. まとめ

麻疹患者では、発疹出現前の潜伏期からCD4 T、CD8 TおよびB細胞の広範なサブセットの非感染細胞がアポトーシスによって急激かつ大量に死滅していることが示された。これによって引き起こされるリンパ球の減少が、免疫不全・抑制の主因と考えられる。また、非感染細胞のアポトーシスには、潜伏期と発症後とは異なる二相性の機序が関与していることが示唆された。

さらに、重症患者では、免疫担当細胞の成熟と供給の抑制が起こり、これにより免疫不全状態の長期間の持続が起きると考えられる。これは免疫機能が成熟した年長者ほど著明であり、高年齢者における麻疹感染の重篤化や回復過程の遅延に関連すると考えられる。

今後、これらの非感染細胞死および免疫担当細胞の成熟抑制の分子機構を解明するとともに、弱毒生ワクチン接種と野生株ウイルス感染との比較検討、新生児麻疹、成人麻疹およびワクチン接種後の感染例についての検討を進めていく予定である。

5. 研究発表

1) Okada, H., Takei, R., and Tashiro, M. Inhibition of HIV-1 Nef-induced apoptosis of uninfected human blood cells by serine/threonine protein kinase inhibitors, fasudil hydrochloride and M3. *FEBS Lett.* 422: 363-367, 1998

2) Okada, H., Morikawa, S., Tashiro, M. HIV-1 Nef binding protein expressed on the surface of murin blood cells. *Med. Microbiol. Immunol.* 186 ; 201-207, 1998

3) Okada, H., Seto, J. T., McQueen, N. L., Klenk, H.-D., Rott, R., and Tashiro, M. Determinants of pantropism of the F1-R mutant of Sendai virus: specific mutations involved are in the F and M genes. *Arch. Virol.* 143 ; 1-10, 1998

麻疹ワクチン接種経路の検討

——サルを用いた経鼻接種の試み——

小船富美夫、岡田晴恵、竹田 誠、井上 栄（国立感染研）、
鈴木一義、齊加志津子（千葉県血清研）、
三宅 健（三宅小児）、
野田雅博（広島保環セ）、
塚 春美（東海大小児）

〔はじめに〕

麻疹ウイルス（MV）は上気道の粘膜上皮細胞を侵入門戸とし所属リンパ組織で増殖、第二次ウイルス血症を経て全身感染する。発症までに要する数日間は各種サイトカイン、初期抗体の産生など宿主の防御機構の立ち上げに極めて重要である。この様な観点から考えると現行の皮下接種法は人為的な第二次ウイルス血症の作出に相当する。したがって、多量のウイルスが接種された場合、それがワクチンウイルスであっても宿主免疫機能の修飾、日和見感染症の誘発を招く可能性も考えられる。特に易感染宿主へのワクチン接種の安全性は重要な検討課題であると思われる。

麻疹はポリオに次ぐ撲滅標的疾患として予防接種拡大計画（EPI）が進行中である。EPIの主役はワクチンであり、98%以上のワクチン接種率達成し、麻疹を撲滅することを目標とするものである。

〔目的〕

本研究では末梢リンパ球の変動を指標に経鼻接種経路について検討し、安全かつ効果的なワクチンおよびワクチンの接種法を確立、WHOの推進するEPI活動に寄与することを目的とする。

〔材料と方法〕

サル：麻疹抗体陰性カニクイザル（2.3-4.5Kg）7頭を用いた。

ウイルス：野外MV-HL株（ $1.05.75\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ）、ワクチンウイルス：TD97株（ $1.07.0\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ）を用いた。

ウイルス接種：野外MV、TD97株ウイルスの0.25mlをそれぞれ1両側鼻腔内に各4頭、3頭に接種した。

末梢リンパ球の変動：ウイルス接種後7、14、21、28日に抗CD3、CD4およびCD8サブポプレーションの変動を抗サル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で解析した。

中和抗体価の測定：B95a細胞を指示細胞として、48穴プラスチックプレートを用いたウイルス中和試験を行った。

〔結果〕

1. リンパ球(CD4+, CD8+)の変動

1) ワクチンウイルス（TD97株）接種

ウイルス接種前のCD4/CD8は0.7~1.4（平均1.1）、接種後7日では4.2~5.7（平均4.7）に上昇し、14日で0.75~1.27（平均1.08）と接種前レベルを示した後、21日0.72~2.12（平均1.56）、28日3.22~3.89（平

均3.58)と再び上昇傾向を示した。また、各リンパ球の変動を検索した結果、経鼻接種では全く減少傾向を示さず、逆に増加傾向を示した(表-1)。

2) 野外MV-HL株接種

ウイルス接種前のCD4/CD8は1.0~2.1(平均1.4)、接種後7日では0.8~1.8(平均1.1)、14日で0.7~1.1(平均0.8)に下降した。21日~28日も同様の傾向を示し、野外MV接種では少なくともウイルス接種後28日以上リンパ球の減少を示すことが明らかにされた(表-2)。

2.特異抗体の産生

ウイルス接種後28日の血清サンプルについて抗MV中和抗体価を測定した結果、ワクチン株、野外MV株いずれにおいても特異抗体の上昇を認めた。

[考察]

ワクチン株の経鼻接種群は7日にCD4+細胞に増加傾向を示し、14日に減少傾向を示した。一方、野外MV株接種群ではCD4+、CD8+細胞いずれも著明に減少し、実験期間中持続した。経鼻接種は自然感染経路であり、粘膜免疫の成立にも有効な手段であり、注射器を要しないワクチン接種法として検討に値するものと思われる。

今後、経鼻接種の臨床応用には鼻粘膜より中枢神経系へのウイルス侵入の有無の検討および中枢神経系におけるウイルスRNAの残留性の検討が必要である。

今回の成績は接種ウイルスに基づく免疫抑制度を反映するものであり、CD4+、CD8+細胞の変動、CD4+/CD8+は病原性マーカーとしても有用と考えられる。さらに他のワクチン株についても検討する予定である。

表-1 TD97株経鼻接種による末梢リンパ球サブポピュレーションの変動

サル番号	接種前	7	14	21	28
588 Total lymph.	6783	8368	7397	7053	3952
CD4+	2523	7906	1931	3800	3604
CD8+	1782	1896	1519	2066	993
CD4/CD8	1.4	4.2	1.27	1.84	3.63
589 Total lymph.	3749	9342	2815	4386	6684
CD4+	1023	6659	538	2089	6024
CD8+	860	1160	437	956	1551
CD4/CD8	1.2	5.7	1.23	2.12	3.89
590 Total lymph.	1553	5173	1605	3257	2919
CD4+	350	3781	217	1097	2543
CD8+	502	878	289	1520	790
CD4/CD8	0.7	4.3	0.75	0.72	3.22

表-2 野外MV株経鼻接種による末梢リンパ球サブポピュレーションの変動

サル番号	接種前	7	14	21	28
4218 Total lymph	7731	2549	1979	2566	5051
CD4+	4197	828	614	796	1722
CD8+	1958	454	813	856	1176
CD4/CD8	2.1	1.8	0.8	0.9	1.5
4219 Total lymph	8831	2552	2999	5524	5935
CD4+	2971	1148	567	1033	764
CD8+	2131	1271	528	1301	1706
CD4/CD8	1.4	0.9	1.1	0.8	0.4
4220 Total lymph	5978	2195	1878	2208	2837
CD4+	2152	997	532	530	747
CD8+	1793	1110	679	459	668
CD4/CD8	1.2	0.9	0.8	1.2	1.1
4221 Total lymph	8219	1231	490	2129	3427
CD4+	1533	421	81	826	977
CD8+	1566	540	122	719	864
CD4/CD8	1.0	0.8	0.7	1.1	1.1

麻疹における病原体の変異と予防接種による獲得抗体の相関に関する研究

——分離年代の異なる麻疹ウイルス株によるNT抗体価の差異について——

塚 春美、木村三生夫（東海大学医学部）

小船富美夫、井上 栄（国立予防衛生研究所）

野田 雅博、徳本 静代（広島県保健環境センター）

岡 徹也、船津 雅彦（化学及び血清療法研究所）

【目的】

1950年代および1980年代以降に分離された麻疹ウイルス株では、モノクロナール抗体を用いた抗原解析の結果、その性状にいくつかの変化が認められている。現行の麻疹ワクチンはAIK-C株を含めてすべて1960年代に分離されたEdmonston-Enders由来であり、変異が蓄積されてきている野生麻疹ウイルス株とは、遺伝子レベルでの乖離が出てきている。本研究は麻疹ウイルスの遺伝子レベルの変化の蓄積が血清NT抗体価に影響を与えているかどうかを検討することにある。

【方法】

昨年度は、1958年に豊島により分離された代表的な実験室継代株である豊島株（抗原性はEdmonstonに酷似している）、国立感染症研究所1993年分離株である9304株、広島県保健環境センター1996年分離株である9631-01株の3株を使用して、ワクチン歴ありの血清と自然罹患例の血清についてNT抗体を測定し、比較検討した。今年度は豊島株と国立感染症研究所の小船が1984年に川崎で分離した一ノ瀬株ならびに同じく小船が1993年に分離した9301株を使用してワクチン歴ありの血清と自然罹患例の血清について、NT抗体を測定し、比較検討した。

ワクチン歴のない自然麻疹例（罹患から採血までの間隔は最短1年最長11年）12例の血清、また、麻疹ワクチン北里AIK-C株あるいはAIK-C株を含むMMRワクチン接種歴のある例の血清185検体、武田Schwarz FF8株接種歴のある例の血清12検体、微研CAM株単味またはCAMを含むMMRワクチン接種歴のある27例の検体、千葉血清TD97株接種歴のある例の血清12検体について検討した。

【結果】

図1に自然罹患例、ワクチン歴なし者の麻疹HI抗体価、麻疹NT抗体価（豊島株）と麻疹NT抗体価（一ノ瀬株）、麻疹NT抗体価(9301株)を比較したものを示す。いずれも極めて高い相関を示している。

図2にAIK-Cワクチン接種者の結果を示す。いずれも相互に極めて高い相関を示している。豊島株、一ノ瀬株、9301株のを用いた中和試験の結果は、お互いに上下1管以内のずれにとどまっている。

図3～図5はSchwarz FF8、CAM、TD97の接種例についての結果である。例数は少ないがいずれにおいても高い相関が認められた。

【考察】

昨年度の豊島株、9304株、9631-01株を使用して中和抗体価を測定し、本年度は豊島株、一ノ瀬株、9301株を使用して中和抗体価を相互に比較した。一ノ瀬株が出現した年である1984年を境に我が国の麻疹ウイルスの性状が大きく変化したことが報告されている。そのためEdmonston株由来のAIK-C、Schwarz、そしてEdmonston株にきわめて近いCAMワクチンの有効性についてあらためて検討する必要性が生じた。本研究はその一貫として行ったものである。これらの現行の麻疹ワクチンの接種を受けた者の血清は、1984年以降現在我が国で流行している麻疹ウイルスに対して豊島株に対するのと遜色ない中和活性を示した。したがって、本研究の結果からは、現行の麻疹ワクチンは現在流行している麻疹ウイルスに対してきわめて有効であるという結果を得た。

図1. 麻疹抗体価の相関(自然麻疹、ワクチン歴なし)

1-a. HI抗体価と中和抗体価 12症例

麻疹中和抗体価	4094											
	2048											
	1024								1	1		
	512						1					
	256					1						
	128				1							
	64				1	2						
	32		1		2							
	16											
	8											
	4											
	2											
<2		1										
	<8	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048		
	麻疹HI抗体価											

1-b. 中和抗体価(豊島株)と中和抗体価(一ノ瀬株) 12症例

麻疹中和抗体価	4094											
	2048											
	1024										2	
	512											
	256										1	
	128							2	1	1		
	64							1				
	32							3				
	16											
	8											
	4											
	2											
<2		1										
	<2	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
	麻疹中和抗体価 豊島株											

1-c. 中和抗体価(豊島株)と中和抗体価(9301株) 12症例

麻疹中和抗体価	4094											
	2048											
	1024										2	
	512											
	256										1	
	128									1		
	64							3	1			
	32						2					
	16						1					
	8											
	4											
	2											
<2		1										
	<2	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
	麻疹中和抗体価 豊島株											

図2. 麻疹抗体価の相関(北里)

2-a. HI抗体価と中和抗体価 185症例

麻疹中和抗体価	4094													
	2048												1	
	1024									1				
	512													
	256					1	2	1						
	128				2	26	7							
	64			4	30	13								
	32		6	26	20	3								
	16	2	19	16										
	8		4											
	4	1												
2														
<2														
	<8	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048				
	麻疹HI抗体価													

2-b. 中和抗体価(豊島株)と中和抗体価(一ノ瀬株) 185症例

麻疹中和抗体価	4094													
	2048													1
	1024													
	512												1	
	256										3			
	128							1	25	1				
	64							5	34	10				
	32					3	40	12						
	16				2	30	10							
	8				2	4								
	4			1										
2														
<2														
	<2	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048		
	麻疹中和抗体価 豊島株													

2-c. 中和抗体価(豊島株)と中和抗体価(9301株)183症例

麻疹中和抗体価	4094													
	2048													1
	1024													
	512												1	
	256									1				
	128									7	4			
	64							1	16	25				
	32					2	26	27						
	16					24	28	4						
	8				3	11								
	4			1	1									
2														
<2														
	<2	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048		
	麻疹中和抗体価 豊島株													

図3. 麻疹抗体価の相関(武田)

3-a. HI抗体価と中和抗体価 12症例

麻疹中和抗体価 豊島株	4094												
	2048												
	1024												
	512												
	256											3	
	128					2	2						
	64					1							
	32		1	2	1								
	16												
	8												
	4												
	2												
<2													
		<8	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048		
		麻疹HI抗体価											

3-b. 中和抗体価(豊島株)と中和抗体価(一ノ瀬株) 12症例

麻疹中和抗体価 一ノ瀬株	4094												
	2048												
	1024												
	512												
	256											2	
	128								1	4	1		
	64												
	32							3					
	16							1					
	8												
	4												
	2												
<2													
		<2	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
		麻疹中和抗体価 豊島株											

3-c. 中和抗体価(豊島株)と中和抗体価(9301株) 12症例

麻疹中和抗体価 9301株	4094												
	2048												
	1024												
	512												
	256											3	
	128								1	4			
	64												
	32							3					
	16							1					
	8												
	4												
	2												
<2													
		<2	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
		麻疹中和抗体価 豊島株											