

表 1

<市立舞鶴市民病院でのロタウイルス感染症（2冬期）医療費>

1. 外来診療のみの患児	31名
外来受診回数	1～4回（平均2.3回）
投薬日数	3～12日（平均6.3日）
診療点数合計	46,916点（1点10円）
1例平均診療費	15,130円
2. 入院加療の患児	25名
入院日数	2～10日（平均5.4日）
診療点数合計	303,384点（1点10円）
1例平均診療費	121,350円

表 2

<舞鶴共済病院でのロタウイルス感染症医療費>

1. 外来診療のみの患児	40名
外来受診回数	1～4回（平均1.9回）
投薬日数	1～10日（平均4.5日）
診療点数合計	39,496点（1点10円）
1例平均診療費	9,870円
2. 入院加療の患児	16名
入院日数	3～8日（平均5日）
診療点数合計	174,133点（1点10円）
1例平均診療費	102,430円

表 3

< 2 病院から推定した舞鶴市のロタウイルス感染症医療費 >

外来	1, 528, 920円
入院	8, 011, 080円
合計	9, 540, 000円

< 日本全体でのロタウイルス感染症医療費 >

(日本の人口を1億3千万人として)

外来	20億円
入院	105億円
合計	125億円

表 4

< 市立舞鶴市民病院から推定した舞鶴市のロタウイルス感染症医療費 >

外来	1, 331, 510円
入院	7, 827, 120円
合計	9, 158, 630円

< 日本全体でのロタウイルス感染症医療費 >

(日本の人口を1億3千万人として)

外来	16億円
入院	101億円
合計	125億円

表 5

<舞鶴共済病院から推定した舞鶴市のロタウイルス感染症医療費>

外来	1,638,580円
入院	6,965,260円
合計	8,603,840円

<日本全体でのロタウイルス感染症医療費>

(日本の人口を1億3千万人として)

外来	21億5千万円
入院	91億円
合計	112億5千万円

表 6

<日本と米国の比較>

	人口	医療費
米国	2億6千万	520億円
日本	1億3千万	125億円

## ロタウイルス下痢症の疾病負担

——地域における入院患者からの考察——

中込 治 (秋田大学医学部微生物学講座)

【目的】ロタウイルスが小児期の重症下痢症の主要な病因であることが確立されて久しい。ロタウイルスによる重症下痢症を予防することを目的に、米国を中心に複数のグループがワクチンの研究開発に取り組んできた。このうちの一つである米国NIHとワイス-エアストのグループが開発した4価混合遺伝子組換え体生ワクチンであるRRV-TVワクチンが1998年夏に米国で認可された。さらに、米国予防接種諮問委員会 (ACIP) はこのRRV-TVを生後2、4、6ヶ月の乳児のすべてに接種するuniversal immunizationを勧告することにしたようである。

わが国でのロタウイルスワクチンの必要性を論じるにあたっては、ロタウイルスによる下痢症入院患者が全下痢症入院患者のどのくらいを占めているのか (ロタウイルス下痢症の相対的重要性)、また、地域に生まれた小児がどの程度の頻度でロタウイルスによる重症下痢症に罹患し、入院治療を受けているのか (ロタウイルス下痢症の絶対的重要性) という情報が必要である。わが国にはこの様なロタウイルスワクチンの導入の必要性を論じる根拠となる疾病負担 (disease burden) を評価した研究が少ないことに鑑み、本研究では、ロタウイルス下痢症の疾病負担がどの程度であるかを入院患者数を指標に推定することを目的とした。

【方法】秋田県の県南に位置する本荘市を中心とする本荘保健所管区は1市10町からなり、birth cohortはおおよそ1,200人である。この地域の小児患者が入院する病院は大部分がY総合病院である。そこで、Y総合病院で下痢症により入院した小児患者数を調べることにより、(1)下痢症入院患者に占めるロタウイルス下痢症患者の割合および(2)この地域で年間一人当たりロタウイルス下痢症により入院する頻度を計算した。

【結果】1987年から1996年の10年間にわたる下痢症による入院患者総数は2,707人であり、このうち96%に便中のロタウイルス抗原検索が施行された。この結果、下痢症で入院した小児患者 (0から15歳未満) に占めるロタウイルス下痢症患者の割合は平均39%であった。この10年間の下痢症による入院患者数は57人から150人の範囲にあり、このうちロタウイルス下痢症の占める割合は33%から49%の範囲にあった。

1987年から1996年にかけてのこの地域のbirth cohortは1,475人から1,019人に減少した(平均1,225人)。従って、1才未満の乳児がロタウイルス下痢症により入院する頻度は約0.03 episode/child/yearであった。また、5歳未満(0-4歳)の累積罹患率は約0.08 episode/childであった。従って、秋田県の県南地域では生まれてから5歳に達するまでにおよそ13人に一人がロタウイルスによる下痢症のため入院治療を受けていたと推定される。

**【考察】**ラッセクス凝集反応やELISAによりロタウイルス下痢症の病原診断が容易に行えるようになったことにより、ロタウイルス下痢症の大部分が軽症の下痢症であることがわかった。ロタウイルスによる疾病の頻度が不顕性感染から重症下痢症に至るまで広範囲にわたっていること、重症下痢症ほどその頻度が少ないこと自体は正しいが、その一方で、ロタウイルス下痢症全体が軽い病気でありワクチンも必要はないという短絡的な考えに結びつきかねない。過去20年間における下痢症の治療には経静脈輸液法や経口補液法(ORS)など著しい進展があった。しかし、治療法の進歩は病気の発生頻度には本来影響を与えないので、予防の必要性とは別の次元の議論である。本研究の結果は、重症下痢症に占めるロタウイルス下痢症の割合が現在に至るまで約39%と変化していないことを示しており、本疾患の小児期における相対的重要性が減じていないことを物語っている。

また、本研究から8%の小児が生後5年以内にロタウイルス下痢症で入院していると推定され、ロタウイルス下痢症の絶対的重要性が高いことを示している。ロタウイルスは抗体保有率の推移からみて生後5年以内にはほぼ100%の小児が感染すると見なされるから、90%以上が入院を必要としない比較的軽症の下痢症であったということも推測される。本研究の結果は、厳密にbirth cohortを追跡調査したものではなく、さまざまなバイアスを考慮する必要がある。しかし、すべての重症下痢症患者がY総合病院へ入院するとの仮定はoverestimateであろうから、8%という数字は最低線に近いものと推定される。また、ただちにこの数値を全国に敷衍することが可能かどうかは不明である。結論として、わが国においてもロタウイルスによる疾病負担が相当程度あることが推測され、ロタウイルスワクチンが費用効果の上から有用である可能性は高い。

## 麻疹ウイルスレセプター CD46 の遺伝子多型の検討

楠原 浩一、佐々木由佳、

高林 明、原 寿郎（九州大学医学部小児科）

### 【目的】

CD46は補体制御因子membrane cofactor protein (MCP) として知られていた蛋白質であるが、1993年に麻疹ウイルス (MV) の細胞レセプターとしても機能していることが明らかにされた。私たちは、正常成人および小児科患者を対象に、CD46 遺伝子の翻訳開始コドンからMV結合部位 SCR(short consensus repeat)-1, 2までのアミノ酸をコードする領域の塩基配列を調べ、同部位の遺伝子多型の有無を検討した。

### 【対象と方法】

#### 1) 対象：

正常成人 7例  
小児科患者 28例

#### 2) cDNAの作成：

対象者の末梢血単核球からmRNAを抽出し、さらにFirst Strand cDNA合成キット (Pharmacia)を用いてcDNAを作成し、PCRのtemplateとした。

#### 3) PCRとsequencing

CD46のcDNA 3 か所に設定したprimerを用いてsingle PCRまたはsemi-nested PCRを行い、direct sequencingによってexon 1の翻訳領域およびexon 2～exon4 (SCR-1, 2をコード)の塩基配列を決定した。

### 【結果】

#### 1) exon 1の翻訳領域

報告されているCD46 cDNAの塩基配列と全例が一致した。

#### 2) exon 2～exon4

35例中、2例にアミノ酸置換を伴う塩基置換、1例にアミノ酸置換を伴わない塩基置換をみとめた。3例の塩基置換の位置は全て異なっていた。

### 【考察】

CD46の遺伝子についてはこれまでrestriction fragment length polymorphism (RFLP)が報告されているが、塩基配列そのものを解析した多型の報告はない。今回、多型とするほど高頻度ではないものの、MV結合部位にアミノ置換を伴う塩基置換が見出された。最近、MVの野生株はCD46以外の未知の細胞レセプターを使用しており、CD46はもっぱらMVの実験室株/ワクチン株の細胞レセプターとして機能しているのではないかとの報告がなされているため、現在、麻疹生ワクチンのvaccine failureの症例におけるCD46遺伝子の塩基配列の解析を進めている。

## 麻疹ワクチン低応答者の末梢血単核球 CD46 の特徴

鳥谷部真一、内山 聖（新潟大学医学部小児科）

### 【目的】

麻疹ワクチンは被接種児の約 95%以上に特異抗体を生じ、麻疹に対して長期間の感染抵抗性をもたらす。しかし獲得される麻疹抗体価には個人差があり、一部の児では特異抗体が得られなかったり、得られた抗体価が低く時間の経過とともに検出されなくなる例がある。

麻疹ウイルスワクチン株は CD46 を介して細胞に結合する。したがって CD46 の性質に違いがあれば麻疹ワクチンに対する免疫応答に差異が生じる可能性がある。今回、末梢血単核球を用いて麻疹ワクチン接種後の抗体価の個人差に CD46 の性質の違いが関与しているかを検討した。

### 【対象および方法】

麻疹ワクチン接種後 6 年から 10 年経過した児 98 名（男児 55 名、女児 43 名）のうち、麻疹 HI 抗体価が 8 倍未満の児 6 名と 128 倍以上の児 10 名を対象とした。前者を Non-responder (NR) 群、後者を Hyper-responder (HR) 群として両者を比較した。両者の内訳は NR 群が男児 4 名、女児 2 名、年齢 6-10 才（平均 8.0 才）で、HR 群は男児 6 名、女児 4 名、年齢 6-10 才（平均 8.0 才）であった。

末梢血を採取し比重遠心法で単核球を分離した。末梢血単核球上の CD46 の発現量を抗 CD46 抗体モノクローナル抗体 (E4.3) を用いてフローサイトメトリーで検討し、単球およびリンパ球それぞれについて mean fluorescence intensity (MFI) を測定した (図 1)。また CD46 蛋白の分子量は Western blot で調べた。

次に末梢血単核球から total RNA を抽出し oligo (dT) primer を用いて cDNA を作成した後、CD46 の SCR1 領域から SCR4 領域、あるいは SCR4 領域から CY 領域を増幅できるように作成した primer で PCR をおこなった (図 2)。泳動後のバンドを精製して direct sequence 法でそれぞれの塩基配列を決定した。一部はクローニングの後、塩基配列を決定した。

### 【結果】

フローサイトメトリーで測定した単球上の CD46 の MFI とリンパ球上の CD46 の MFI の間には  $r=0.96$  で有意 ( $p<0.01$ ) の正の相関がみられた。単球およびリンパ球上の CD46 の MFI は NR 群と HR 群で差がなかった。

Western blot では CD46 は主に約 65kD ( $\alpha$  isoform) と 55kD ( $\beta$  isoform) の

2本のバンドとして認められた(図3)。NR群の6例のCD46は全て $\alpha/\alpha$ 型であり、HR群のCD46は $\alpha/\alpha$ 型が6例、 $\alpha/\beta$ 型が4例であった。 $\beta/\beta$ 型は今回の症例の中にはなかった。

SCR1領域からSCR4領域までを増幅するように設計したprimerを用いたRT-PCRでは、全ての症例で単一のバンドがみられた。またその遺伝子配列にはとくに変異を認めなかった。

SCR4領域からCY領域までを増幅するように設計したprimerを用いてRT-PCRをおこなうと4本のバンドがみられた(図4)。これらの塩基配列を決定したところ、476bpのバンドはSTBC/CY1、430bpはSTC/CY1、383bpはSTBC/CY2、337bpはSTC/CY2であった。STABC/CY2はいずれの児からも得られなかった。PCRのサイクル数が少ないと1-2種類のisoformのみが増幅され、mRNAレベルでどのisoformが優位に発現しているか推測できた。NR群ではSTBC/CY2が有意に発現している児が3例、STBC/CY1とSTBC/CY2がほぼ同程度発現している児が3例だった。HR群では、STBC/CY1とSTBC/CY2が同程度有意に発現しているものが3例、STBC/CY2+STC/CY2が4例、STBC/CY2が1例、STBC/CY1が1例、STC/CY1+STBC/CY2が1例みられた。これらのPCR産物の遺伝子配列にはとくに変異を認めなかった。

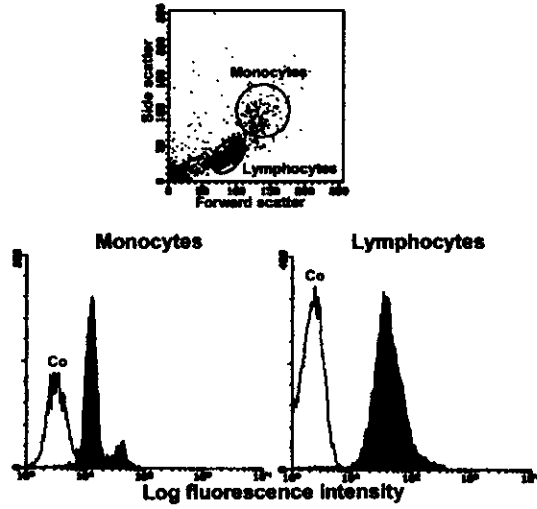
### 【考案】

CD46の各領域のうち、麻疹ウイルスが結合する領域はSCR1およびSCR2であるが、それ以外の領域に変異を導入しても麻疹ウイルスの結合や合胞体形成が変化するという報告がある。したがってCD46のいずれの領域の異常も麻疹ワクチンの結合性を変化させる可能性があるが、現在までにCD46の先天性欠損や遺伝子異常の報告はない。今回の検討でもNR群でCD46の発現に低下はなく、各領域の遺伝子異常もみられなかった。

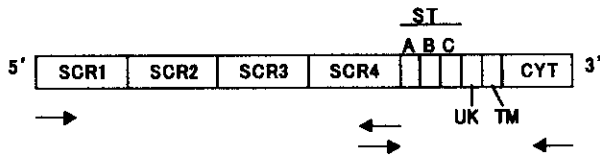
CD46はST領域、TM領域、およびCY領域のalternative splicingにより多数のisoformを生じ、健常人の末梢血では蛋白レベルで2種類( $\alpha$ 、および $\beta$ )、mRNAレベルで4種類(STBC/CY1、STBC/CY2、STC/CY1、およびSTC/CY2)のisoformが発現している。今回検討したNR群の6例すべてが $\alpha/\alpha$ 型であり、長いST領域を持つisoform(STBC/CY1あるいはSTBC/CY2)のみが発現していた。麻疹ウイルスはSTBCおよびSTCどちらのSTを持つisoformにも感染しうるが、STCはSTBCよりも麻疹ウイルスレセプターとして100倍有効である。したがってNP群で麻疹ワクチンに対する抗体産生が悪い理由としてこのisoformの偏りが関係している可能性がある。ただ健常人でも末梢血単核球に発現しているCD46は $\alpha/\alpha$ 型 $>$  $\alpha/\beta$ 型 $>$  $\beta/\beta$ 型の順に多く、また今回の検討の対象とした症例数も少なかった。今後さらに詳しい検討が必要であると考えられる。



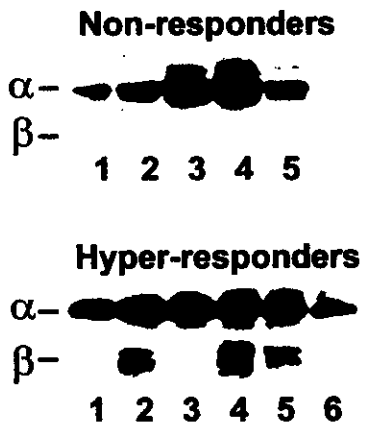
☒ 1



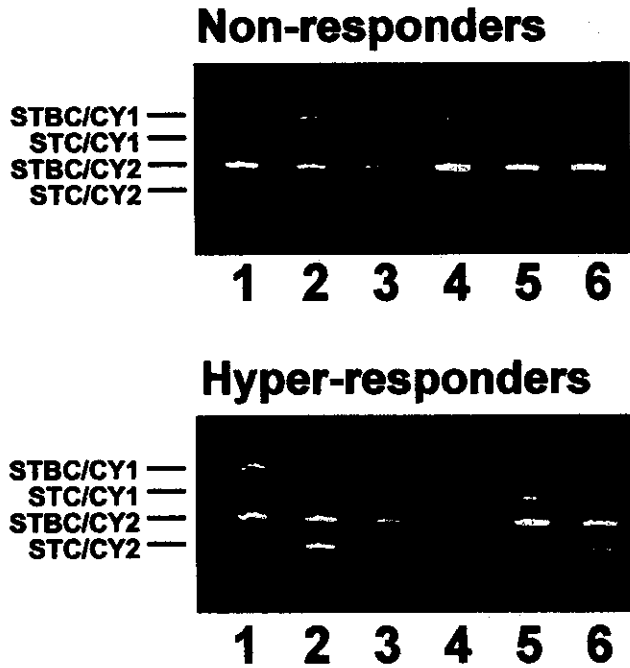
☒ 2



☒ 3



☒ 4



## 麻疹ウイルスとムンプスウイルスの分子疫学調査

中山 哲夫 (北里研究所 ウイルス)

山中 樹 (山中たつる小児科)

落合 仁 (落合小児科)

園田さとみ (東京都済生会中央病院 小児科)

柏木 保代、高見 剛 (東京医科大学 小児科)

庵原 俊昭、神谷 齊 (国立療養所三重病院 小児科)

麻疹ワクチンの接種率は、73%と諸外国に比べていまだに低く麻疹患者は感染症サーベイランスに毎年約 2-3 万人の報告がみられ、ムンプスワクチンも MMR ワクチンが 1993 年に中止になりその接種率は低く、最近 10 年間では最大の流行が続いている。麻疹、ムンプスウイルスともに RNA ウイルスであり、RNA ウイルスは変異率が高くウイルスの変化には注意する必要がある。また、近年の交通手段の発達から、ヒトの動きに伴い、ウイルスも日本から外国に輸出したり、外国のウイルスが日本に入ってくる可能性がある。野生株ウイルスの伝搬経路を推測し効率よく予防接種をすすめるために流行株の遺伝子学的特徴を把握しておく必要がある。我々は、1984 年からの麻疹ウイルスが 3 群の Genotype A, B, C に分類され<sup>1,2)</sup>、ムンプスウイルスは 1976 年からの流行株は 2 群の Genotype A, B に分類され A 群は A1, A2, A3 の Subtype に分類されることを報告した<sup>3)</sup>。

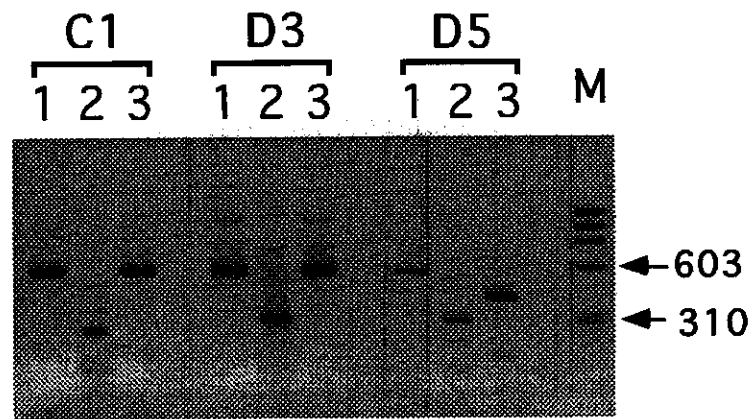
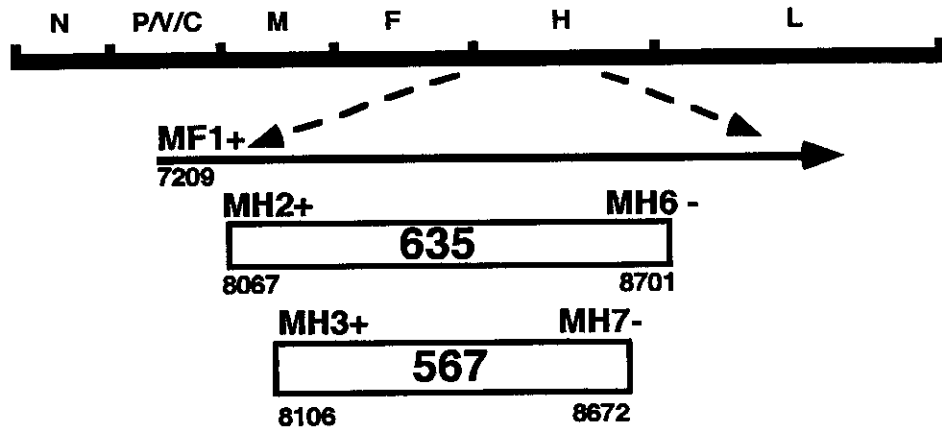
WHO は予防接種拡大計画(EPI)の Target として麻疹の撲滅を目指しており、そのためには野生流行株の伝播を知る事が必要であり、世界の麻疹ウイルスの遺伝子学的分類を提唱し、現在、Subtype を含めて A, B1, B2, C1, C2, D1, D2, D3, D4, D5, D6, E, F, G, H の 8 群に分類している<sup>4)</sup>。ムンプスウイルスの国際分類についても A, B, C, D, E, F の 6 群の Genotype 分類が提唱されている<sup>5)</sup>。我々がおこなってきた日本のウイルスの Genotype 分類と比較して表 1 に示した。

表 1 麻疹、ムンプスウイルスの遺伝子分類

麻疹		ムンプス	
国際分類 <sup>4)</sup>	日本の株 <sup>1,2)</sup>	国際分類 <sup>5)</sup>	日本の株 <sup>3)</sup>
C1	A(-1984)	B	A1, A2, A3(1976-)
D3	B(1985-1989)	D	B(1993-)
D5	C(1990-)		

分子疫学調査を簡便におこなうために、咽頭拭い液から麻疹ウイルスゲノムを H 領域の RT-PCR で増幅し、C1, D2, D3 の Genotype 分類は Sequence をしないで Sau3A I, Sac I の制限酵素を用いて RFLP 法で鑑別する方法を開発し図 1 に示した。ムンプスウイルスの RT-PCR 法と、A1, A2, A3, B の Genotype 分類には ApaI I, BamH I, EcoR V を用いて RFLP をおこなっておりその方法を図 2 に示した。

### 1 麻疹ウイルス流行株



1 Control, 2 *Sau3A* I, 3 *Sac* I

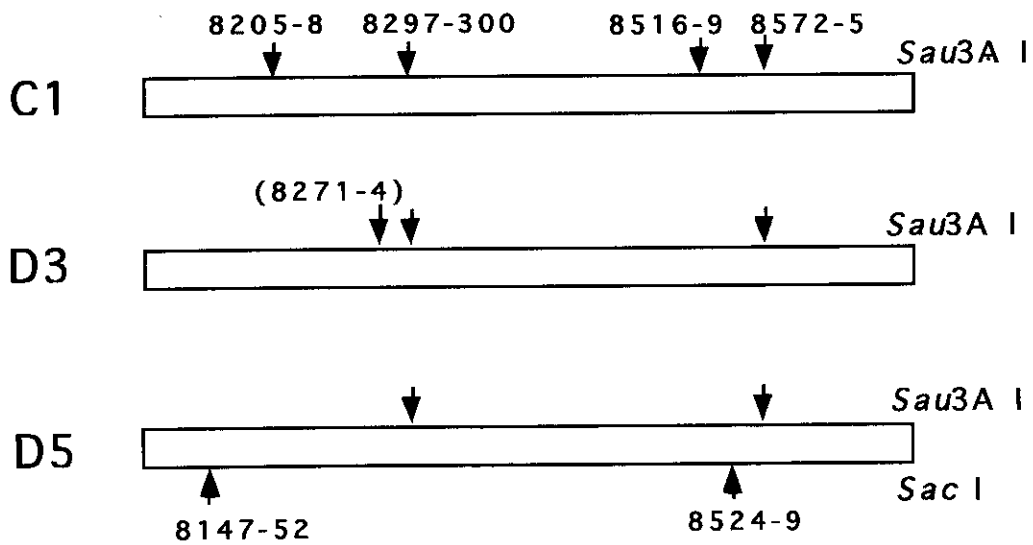
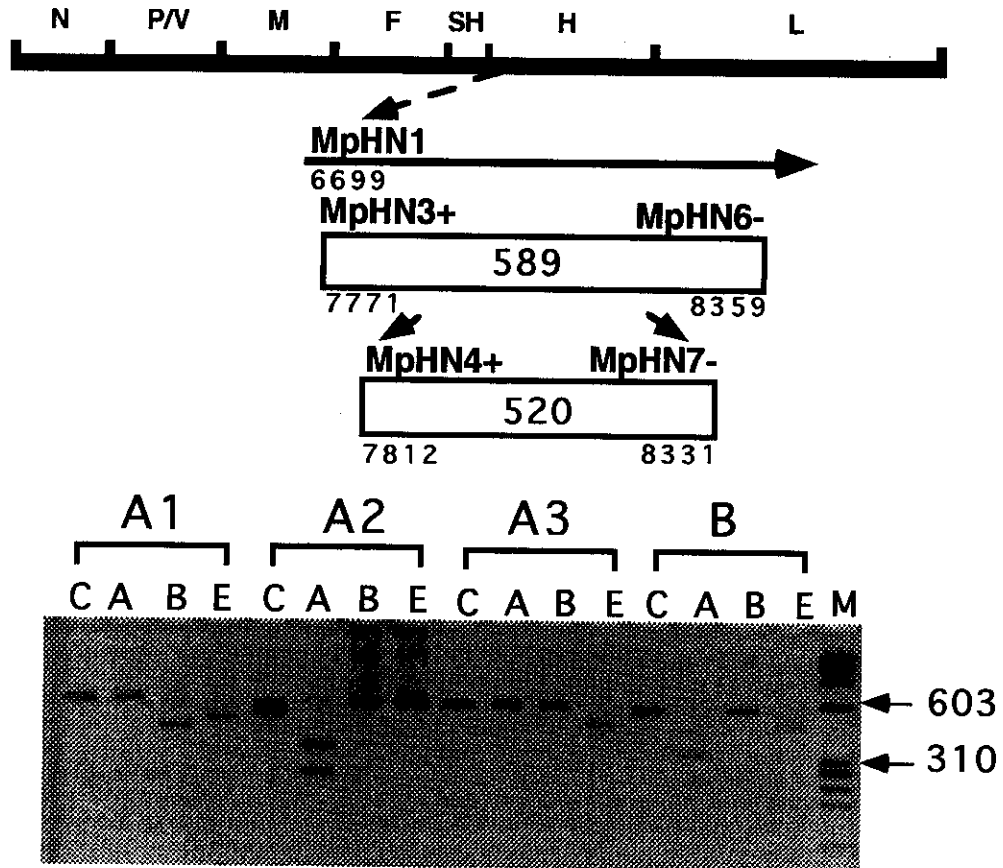


図1 麻疹ウイルスRT-PCRとRFLP



C: Control, A: *Apa*L I, B: *Bam*H I, E: *Eco*R V

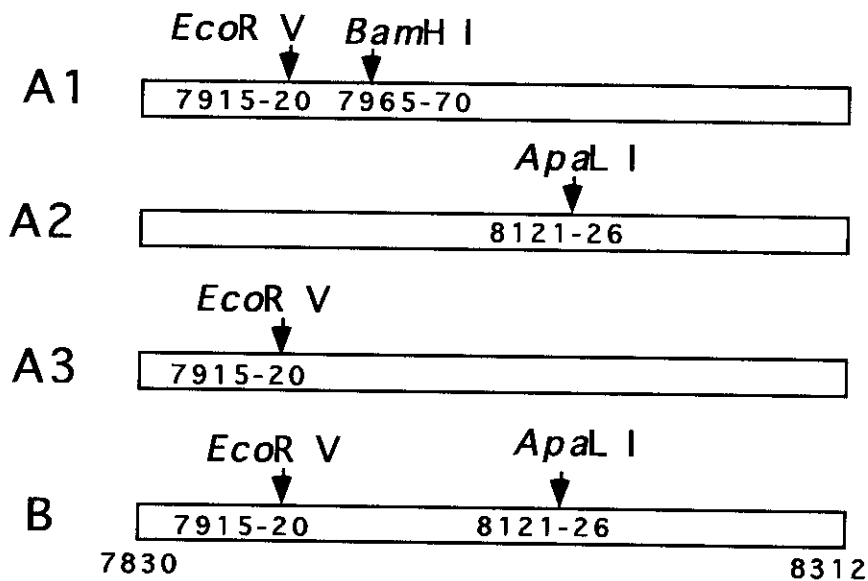


図2 ムンプスウイルスRT-PCRとRFLP

1995年から1996年の流行株26株、1994年から1997年までの東京での分離株32株の分類をおこない結果を表2に示した。札幌ではD5、東京では32株中28株がD5で4株はD3であったが、その4株は臨床的に同一患児からの感染でH領域以外のN領域の塩基配列も同じものであった。1994年以降主たる流行株はD5に属するウイルスが全国的に流行しているものと考えられる。

表2 麻疹ウイルス流行株

	C	D3	D5
札幌(1995-1996) n=26	0	0	26
東京(1994-1997) n=32	0	4	28

## 2 ムンプスウイルス流行株

1994-1997年までの東京で流行した29株、1993-1997年まで三重で流行した56株、1995年-1997年まで札幌で流行した135株の分類の結果を表3に示した。東京では1995年はA1が1株、A3が7株、Bが8株で、1997年は6株ともA3であった。三重県北部の桑名、四日市地域では1996-1997年19株がA3でBが1株、津、亀山地域では1993年からA3とBが混在しA2;1株、A3;13株、B;22株であった。札幌では1995年の流行はA2;13株、A3;43株、B;6株と3種類が混在流行し、1996年からはA2は消失し、A3とBの混在流行が続いている。

表3 各地域における年度毎のムンプスウイルス Genotype 分類

	A1	A2	A3	B	合計
東京 1994	0	0	3	1	4
1995	1	0	7	8	16
1996	0	0	2	1	3
1997	0	0	6	0	6
三重 1996	0	0	5	0	5
北部 1997	0	0	14	1	15
三重 1993	0	0	2	2	4
中部 1994	0	0	0	7	7
1995	0	1	1	4	6
1996	0	0	3	4	7
1997	0	0	7	5	12
札幌 1995	0	13	43	6	62
1996	0	0	45	10	55
1997	0	0	13	5	18
合計	1	14	151	54	220

麻疹ウイルスは全国的にD5がMajor typeとして流行し地域的にD3が流行して

いる。最近また、D3 の流行が東京都でもみられており、今後も観察を続けていく必要がある。ムンプスは地域毎に流行のパターンが違い、また年度によっても差が認められ数種類のウイルスが混在流行していることが明らかとなった。

諸外国で流行している株と日本独自の株を遺伝子学的に鑑別しその伝播経路を明らかにすることが可能となり、日本の流行野生株が外国の麻疹流行の感染源とならないようにワクチンの普及につとめなければならない。

#### 文献

- 1) Nakayama T et al. *Virus Research* 35;1-16,1995
- 2) Yamaguchi S et al. *J Med Virol* 52;113-120,1997
- 3) Kashiwagi Y et al. *Arch Virol* in press
- 4) WHO *Weekly Epidemiological Record* 73;265-272,1998
- 5) Wu L et al. *Vaccine* 16;281-285,1998

## ムンプス罹患者およびムンプスワクチン被接種者の咽頭ぬぐい液からの 経時的なウイルスゲノム検出の試み

永井 崇雄（永井小児科医院）

中山 哲夫（北里研究所）

### 目的：

ムンプスワクチンの副反応の頻度や重症度を検討するためには、自然の流行性耳下腺炎（ムンプス）との比較が必要になる。しかしながら、耳下腺やリンパ腺腫脹をきたす疾患は多々あり、ムンプスの臨床診断は必ずしも容易ではない。RT-PCR法によるウイルスゲノムの検出は感度が高く迅速性に優れ、株の由来まで同定できる利点がある。反面、あまりにも感度が高いため、過剰診断に陥らないかも危惧される。ムンプス罹患者およびムンプスワクチン被接種者の咽頭ぬぐい液から経時的にムンプスウイルスの検出を試み、RT-PCR法の診断的価値について現在検討している。

### 対象と方法：

当院では1998年12月から、耳下腺腫脹や発熱を呈し臨床的にムンプスが疑われた小児およびムンプスワクチン被接種者に、咽頭ぬぐい液採取の同意を得た後に、罹患者は初診時から耳下腺腫脹の消失するまで、ワクチン被接種者は接種当日から約1ヶ月に渡り、来院ごとに毎回咽頭ぬぐい液を採取し、ウイルス分離とRT-PCR法によるウイルスゲノムの検出を試みている。罹患者は今回とりあえず、1回でもRT-PCRが陽性となり複数回検体採取のできた13名（男児8名、女児5名、年齢は1歳から6歳、平均4.4歳）を検討対象とした。また、ワクチン被接種者は現時点では5名（すべて男性、年齢は2歳から31歳、平均9.8歳）で、このうち経時的に検討できたのはのは1名のみ（男児、4歳）である。

咽頭ぬぐい液は生理食塩水内に凍結保存し北里研究所に送付、RT-PCRを依頼した。その方法は、中山らの報告した（*J Med Virol* 52:195-199, 1997）常法に、RTの際にpoly Tプライマーを加えて実施された。検体はすべて同時にウイルス分離も行っているが、まだ結果が一部のみしか判定されていないため、今回は検討項目に含めていない。

結果と考察：

RT-PCRの結果は図に示したように、ムンプス罹患者の咽頭ぬぐい液で高率に陽性になった。経時的には、発症直後はほとんどが陽性で、多くの症例で経過中に一旦陰性化するが、回復期には再び陽性となった。発症9日後の検体でも3例中2例が陽性であった。ワクチン被接種者の咽頭ぬぐい液は、5名中4名は接種当日のみしか検討できていないがすべて陰性で、接種後32日まで計5回採取できたCase 2もどの時点でも陰性であった。

罹患者のRT-PCRが一旦陰性化した後、再び陽性になる理由は定かでないが、技術的な要因は考えにくい。ウイルス分離の結果も合わせ、症例数を増し検討が必要である。また、発症9日後までRT-PCRが陽性になると、過剰診断の危険性は残る。ただし、ワクチン被接種者からは検出されていないので、罹患者と接触のない場合は少なくとも検出されないのではと想像される。

今後は、回復期にいつまで検出されるか、もう少し期間を延ばした検討が必要であろう。さらに、潜伏期にいつから陽性になるか、同様に接触はあっても明らかに免疫があり発症しなかった者にもウイルスゲノムは検出されるかなど、対象を広げ検討したいと考えている。ワクチン被接種者についても、さらに数を増して経時的な検討を継続したい。



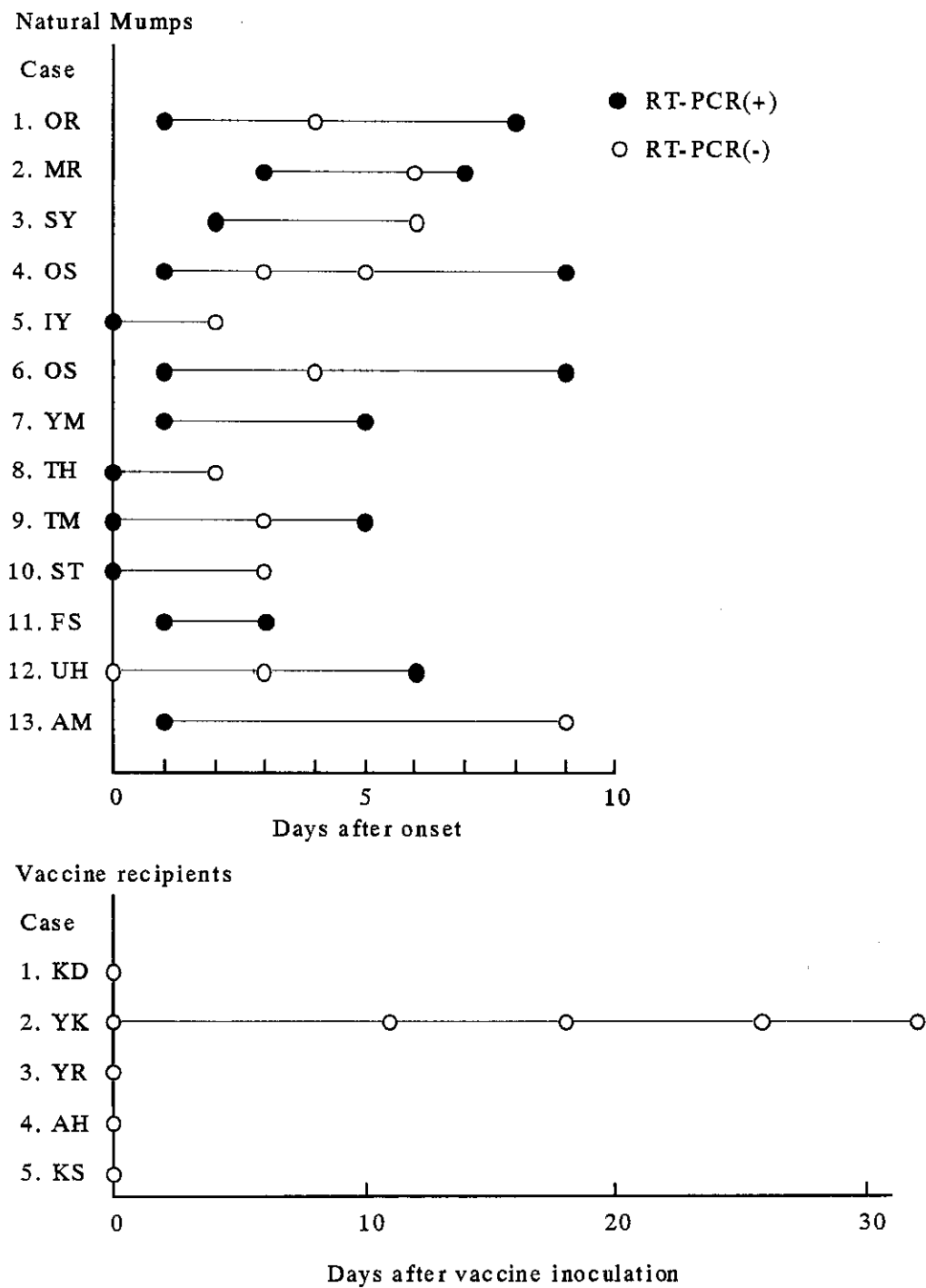


図 ムンプス罹患者とワクチン被接種者の咽頭ぬぐい液における経時的なRT-PCR結果

## マウスを用いた百日咳ワクチンの経鼻接種の試み

加藤達夫、石井理恵、神吉耕三、秋田博伸、五島敏郎、中島夏樹、  
加久浩文、有本 寛、五島文恵、箕原 豊、徳竹忠臣

(聖マリアンナ医科大学小児科学教室)

【目的】最近経粘膜ワクチンが開発され注目されている。今回我々はマウスに対しケイキサレートをアジュバントとした百日咳ワクチンの経鼻接種を試み、百日咳に対する血中IgG抗体、局所の分泌型IgA抗体及びリンパ球特異細胞性免疫の誘導について検討したので報告する。

【対象・方法】生後6-8週のBalb/cマウス（メス）を対象とし、化学及血清療法研究所より分与された百日咳PTワクチン原液、百日咳FHAワクチン原液、またはこれにアジュバントとしてのものである陽荷電のケイキサレートを加えたものを1回接種量が約100ngPNとなるように調整、4週ごとに3回吸気にあわせ経鼻注入接種した。接種後4週ごとに採血し、ELISA法で百日咳抗PTおよび抗FHA抗体価の測定を行った。同時に3回接種後4週で鼻腔洗浄液を採取し、百日咳抗PTおよび抗FHA抗体価をELISA法で測定した。また、マウスの脾臓細胞より分離した単核球をPTおよびFHAとともに培養し、その芽球化反応をサイミジンの取り込みにより検討した。

【結果】PT+FHA経鼻接種群において血中抗PT及び抗FHA IgG抗体と鼻汁中抗PT IgA抗体が上昇した（図1、2、3）。ケイキサレート加PT+FHA経鼻接種群では、鼻汁中抗FHA IgA抗体も上昇した（図4）。PTに対する特異細胞性免疫は各群ともに上昇を認めたが、ケイキサレートを加えたことによる有意な差はみられなかった（図5）。FHAに対する特異細胞性免疫はケイキサレートを加えたPT+FHA経鼻接種群でのみ強い反応を認めた（図6）。

【考按】血中抗PT及び抗FHA IgG抗体については、DPTワクチン接種群、PT+FHA接種群ともに経鼻接種により全例で血中抗体上昇が確認された。また、ケイキサレートを加えたことにより明らかな上昇が認められた。鼻腔洗浄液抗IgA抗体については、PT及びFHAともに皮下接種では上昇がみられず、経鼻接種で上昇を認めた。特にケイキサレートを加えることで抗体価は高値を示し、これはワクチンの経鼻接種にはケイキサレートがアジュバント効果を示すことを示す。特異細胞性免疫については、PTに対して各群において明らかな細胞性免疫の上昇を認め、一方、FHAに対する特異細胞性免疫能ではケイキサレートを加えた経鼻接種群で高い反応を示したことより、陽荷電レジンであるケイキサレートをアジュバントとして用いた経鼻接種法は、鼻汁洗浄液IgA抗体上昇を認めるのみでなく、血中IgG抗体の上昇および特異細胞性免疫能も付与出来る方法であると思われる。ただし、今後感染実験等により実際の感染防御効果についても評価する必要があると思われる。

図1

百日咳PT+FHA接種群における皮下接種と経鼻接種後の血中抗PT IgG抗体価の比較

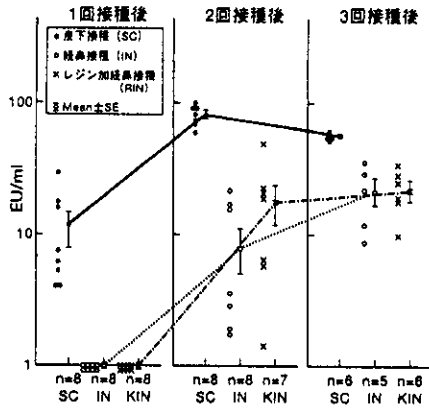


図2

百日咳PT+FHA接種群における皮下接種と経鼻接種後の血中抗FHA IgG抗体価の比較

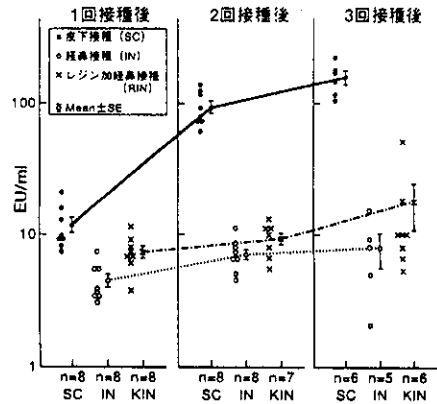


図3

各群における鼻汁洗浄液抗PT IgA抗体

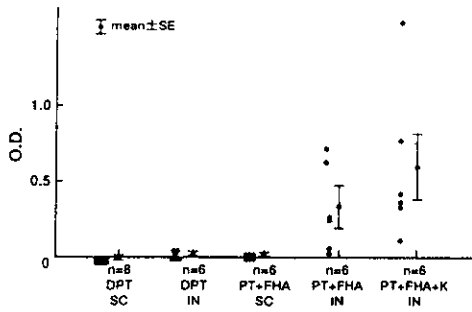


図4

各群における鼻汁洗浄液抗FHA IgA抗体

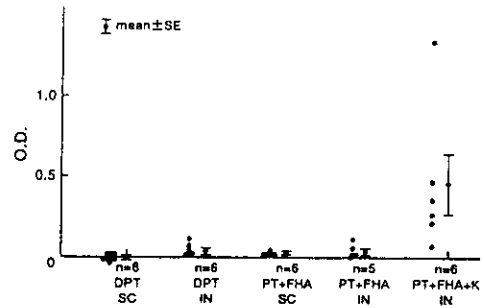


図5

各免疫群におけるPT 特異細胞性免疫

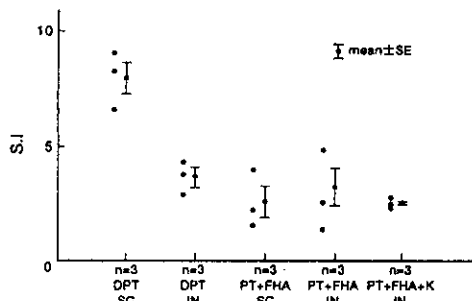
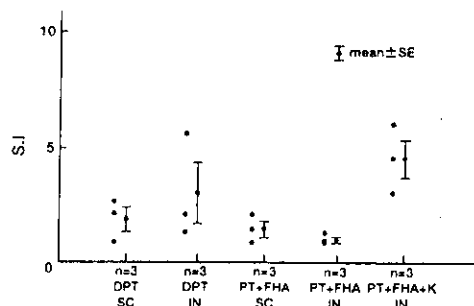


図6

各免疫群におけるFHA 特異細胞性免疫



# 変異コレラ毒素の経鼻インフルエンザワクチンのアジュバントとしての有効性

萩原由加利、田村 慎一、相沢 主税、倉田 毅

(国立感染症研究所感染病理部、北里研究所生物製剤研究所)

## 【目的】

我々はこれまでに、現行のインフルエンザワクチンをコレラ毒素 (CT) や大腸菌易熱性毒素 (LT) 等のアジュバントと共に経鼻接種することにより、上気道に分泌型 IgA 抗体が誘導され、それに伴い変異ウイルスにも対応する交叉感染阻止が準備されることを報告してきた。しかしながら、CT や LT の毒性がヒトに応用しようとする際に障害となっており、アジュバント活性を減ずることなく、毒性のみを低下させる工夫が必要である。また、CT や LT には共存する抗原や毒素に対する IgE 抗体を誘導する作用があり、この副反応の可能性についても検討が必要である。

そこで本研究においては、既に有効なアジュバント活性を示すことが報告されている、CT61F(CT の 61 番目を Ser から Phe に置換)や CT112K(112 番目を Glu から Lys に置換)を含めた変異 CT を作成し、それら変異 CT の経鼻インフルエンザワクチンにおけるアジュバントとしての有効性と共に、毒性や IgE 抗体誘導能について検討した。

## 【方法】

CT の N 末端から 7 番目(Arg から Lys)、61 番目(Ser から Phe)、112 番目(Glu から Lys)、118 番目(Gly から Glu)を 1 アミノ酸置換した CT7K、CT61F、CT112K、CT118E を構築した。各 CT の毒性は、マウス Y1 副腎腫瘍細胞の形態変化により調べた。BALB/c マウスに、インフルエンザ HA ワクチン(1 $\mu$ g あるいは 0.1 $\mu$ g)を native CT または各 mutant CT(1 $\mu$ g あるいは 0.1 $\mu$ g)と共に経鼻接種し、4 週間後同様に 2 次接種した。2 週間後、血清および鼻腔洗浄液を回収し、ELISA 法により血清 IgG、IgE および鼻洗浄液中 IgA を測定した。また、CT の B サブユニットに対する IgE 応答を PCA 法により調べた。

## 【結果】

(1) 2 次免疫後、2 週目の鼻洗浄液中の IgA 応答を測定した結果、4 つの変異 CT 併用群の応答は、native CT や LT7K と同程度に高かった。一方、血清 IgG 応答は、native CT と比較して低い傾向があるものの、ワクチン単独接種の対照群よりは優位に高かった。(2) 変異 CT のうち CT112K が最も毒性が低く、native CT の 1/25000 以下であった。また他の変異 CT の毒性も、いずれも 1/5000 以下まで低下していた。(3) 血清 total IgE 量を測定した結果、native CT と CT7K ではやや増加傾向が認められたものの、他の変異 CT では検出限界以下であった。また、CTB 特異的 IgE titer は全く増加しなかった。

## 【考察】

以上の結果より、今回検討した 4 種類の変異体の中では、既に報告されている CT112K が、経鼻接種インフルエンザワクチンの有効かつ安全なアジュバントとなる可能性が示唆された。