

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（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

経鼻麻疹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

麻疹ウイルスの中枢神経系（CNS）への侵入性と残留性を検討するために、強毒ウイルスとワクチンウイルス TD97 株をそれぞれカニクイサル 2 頭ずつに経鼻接種し、経時的に体液を採取して前者は 6 週目に後者は 4 週目に解剖した。HL 株接種サルでは、RT-PCR 法によるウイルス RNA(MV-RNA)の検出において、血液からは 1 週から 5 週あるいは 6 週まで検出され、髄液からは 1 頭のから検出された。脳組織では 2 頭の嗅球と 1 頭の脊髄から検出された。髄液の細胞増多症は、いずれの個体においても強く惹起された。また病理学的検索では 6 週目の脳組織全般及び脊髄に軽度のウイルス性病変が見られ、これらの成績から接種後 3～4 週頃の比較的遅い時期におけるウイルスの CNS 侵入が示唆された。この試験で、6 週目の嗅球から MV-RNA が検出されたが、多くの傍証から嗅神経経由のウイルス感染はなかったと推定されるが、強毒ウイルスの CNS 侵入時期と侵入機構の解明は必要と考えられた。一方この試験で、TD97 株接種サルでは 2 頭中 1 頭の 1 週目咽頭拭い液から MV-RNA が検出された他は、血液、髄液及び組織から全く検出されず、CNS に病変は見られず、CNS へのウイルス侵入は無かったものと判断され、TD97 株経鼻接種法の CNS への安全性が再確認された。

TD97 株の $10^{6.7}$ PFU/頭と $10^{5.2}$ PFU/頭のウイルスを、経鼻接種法と皮下接種法で接種し、経時的に抗体産生能の比較を行った。血中抗体は両者とも良好な産生を示して差は見られなかった。唾液中の分泌性(SC)-IgA 抗体は経鼻接種法の方が高く産生される傾向が認められた。この経鼻接種サルに対し接種後 10 ヶ月目に HL 株を経鼻的に攻撃接種し、1 週目に解剖して感染防御能を調べたところ、体液から感染性ウイルス、及び MV-RNA は全く検出されなかった。病理学的には 4 頭中 2 頭のリンパ組織の一部に弱い麻疹特異病変が認められたが、その他に病変はなく、HL 株の増殖性及び病原性はほぼ完全に抑制された。

以上の試験において、TD97 株接種サルからの MV-RNA 検出の結果から、経鼻接種では、初期感染部位が皮下接種の場合と異なり血中抗体に影響を受けにくい局所である可能性が示唆され、移行抗体を有する乳児に対してより有効性の高い投与方法である可能性が示唆された。

今年度は、今までのカニクイザルを用いた安全性試験の成績を基に、GLP に準拠したカニクイザルでの単回投与毒性試験を実施した。その結果、本剤の経鼻投与及び気管内投与によって毒性は惹起されなかった。これは、今までの試験結果と一致するものであった。

分担研究者 鈴木一義¹⁾、齋加志津子¹⁾、木所 稔¹⁾、
大川時忠¹⁾、小船富美夫²⁾、佐多徹太郎²⁾

1) 千葉県血清研究所、2) 国立感染症研究所
研究協力者 青木敦子¹⁾、岡田晴恵²⁾、網 康至²⁾、
須崎百合子²⁾、片山未来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ける接種法の簡便化と、より広範な免疫賦与という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。昨年までの報告で、有効性に関しては、ワクチンの経鼻接種による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、また唾液中の局所 IgA 抗体の産生も証明された。安全性に関しては、経鼻接種法に伴う危険性として考慮されるべき鼻腔粘膜から嗅神経を経る中枢神経 (CNS) 侵襲性と呼吸器系への病原性及び接触感染性に

関して高度の安全性を示す成績が得られ、またワクチン株ウイルスの CNS への残留性を否定する成績も得られた。

今年度は安全性に関して、CNS 残留の前段階として起こる可能性がある CNS への侵入性を経時的に検討し、有効性に関しては、ワクチン株の経鼻接種法と皮下接種法の抗体産生能を比較し、更に経鼻接種サルに対して再度感染防御能の検討を行った。加えて、GLP に準拠したカニクイザルでの単回投与毒性試験を実施した。

B. 研究方法

ウイルス：前年度報告書と同様に現行麻疹ワクチンウイルス TD97 株と野外強毒ウイルス HL 株を用いた。

カニクイサル：前年度報告書と同様に、日本において9週間の検疫を終了した健康な東南アジア産サル及び国立感染症研究所筑波霊長類センター (TPC) 繁殖サルを用いた。すべてのサルは試験前に麻疹抗体が陰性であることを確認した。

経鼻接種法：前年度報告書と同様に専用の定量経鼻噴霧器を用いて鼻腔内接種した。

ウイルス力価測定法：前年度と同様の方法を用いた。

血中麻疹抗体価測定法：HI 抗体価と中和 (NT₅₀) 抗体価を前年と同様の方法で測定した。

唾液中麻疹分泌性 IgA 抗体価測定法：前年度と同様に OraSure により採取した唾液中の麻疹特異的分泌性(SC-)IgA 抗体価を測定した。

麻疹ウイルス RNA の検出：前年度と同様の方法で RT-PCR 法によって組織、末梢血、髄液及び咽頭拭い液中の麻疹ウイルス RNA (MV-RNA) の検出を行った。

体液からのウイルス回収：末梢血はリンフォプレップ (NYCOMED Pharma A/S,Oslo) を用いてリンパ球画分を分離し、髄液は無処理でそれぞれウイルス力価を測定した。

末梢血及び髄液中の白血球数の測定：末梢血はチルク液 19 に対して 1 の割合で混合し、髄液はサムソン液 1 に対して 9 の割合で混合し、Thoma 計算盤により白血球数を計測した。

組織の病理及び免疫化学的検査：病理検査は前年度と同様の方法で行った。免疫化学検査は免疫サルへの強毒株攻撃試験で、前年度の ABC 法に代わって凍結した生の組織を用いる蛍光抗体法を用いた。これは常法通り採取した組織を n-Hexan 中で急速凍結し、クリオスタットで作成した薄切標本をアセトンで固定し、抗麻疹ウサギ血清 2000 倍希釈液と反応させ、洗浄後 FITC ラベル抗ウサギ IgG 山羊血清 20 倍希釈液と反応させ特異蛍光を観察した。

カニクイザルを用いた単回投与毒性試験：

千葉県血清研究所乾燥弱毒生麻疹ワクチン (ロット番号 C4-6) を使用した。このロットのウイルス力価は $10^{5.0}$ PFU/mL で

あった。1 バイアルを注射用水 (日本薬局方、ロット番号 163) 0.7 mL で溶解後使用した。

試験動物は、4 及び 5 才のカニクイザル (Purpose-bred, 麻疹フリー, 株式会社新日本科学生産) 雌雄各 10 匹を検疫済みのカニクイザルの中から選抜し、投与前に約 3 週間の馴化期間を設けた。この間に一般状態観察、摂餌量測定、血液学的検査、血液生化学的検査及び X 線検査を実施し、その結果、異常がみられなかった雌雄各 7 匹 (群分け時の体重：雄 2.56 ~ 3.65 kg, 雌 2.37 ~ 2.75 kg) を使用した。投与経路は、臨床適用経路及びその苛酷条件となる経路として経鼻及び気管内投与とした。投与量は経鼻投与においては、現行の皮下接種と同量の 0.5 mL/body とした。気管内投与においては設定している経鼻投与の投与量 (0.5 mL) の半量以上である 0.3 mL が気管内に流入するという苛酷条件を設定し、0.3 mL/body とした。投与回数は臨床適用回数に準じて、単回投与とした。

経鼻投与は専用の鼻腔内噴霧器 (キートロン社製) を鼻腔内に挿入し、片側 0.25 mL ずつ、両鼻腔に噴霧接種した。気管内投与は塩酸ケタミン (約 15 mg/kg, Sigma Chemical Co., i.m.) 及び硫酸アトロピン (0.05 mg/kg, Sigma Chemical Co., i.m.) 麻酔下で、キシロカインスプレー (リドカイン 80 mg/kg, 藤沢薬品工業株式会社) を喉頭部に 1~2 回吹き付けた後、喉頭鏡を用いて口腔からカテーテルチューブを挿入し、注射筒で被験物質の一定量 (0.3 mL) を気管内に注入接種した。

試験動物の群構成は以下の通りである。

群	試験物質	投与量**	投与経路	動物数 (動物番号)	
				雄	雌
1	対照*	0	経鼻	2(1,2)	1(3)
2	麻疹ワクチン	0.5	経鼻	2(4,5)	2(6,7)
3	対照*	0	気管内	1(8)	2(9,10)
4	麻疹ワクチン	0.3	気管内	2(11,12)	2(13,14)

* エアーのみを投与した。

** mL/body

馴化期間中は毎日 1 回、投与日は投与前 1 回、投与直後より 6 時間は毎時、以後 1 日目より 13 日目までは毎日 2 回（午前及び午後）、及び剖検日に 1 回、全例について動物の生死と併せて観察した。また、1 日 1 回、鼻腔鏡を用いて鼻腔内の肉眼観察を同時に行った。

馴化開始日より毎日、全例について給餌個数と残余個数を記録し、その差を 1 日あたりの摂餌量 (g) として算出した。

馴化期間中に 2 回及び投与日（投与前）、投与後 6、13 日目及び剖検日に全例について電子天秤（EP-41KA、株式会社エー・アンド・デイ）を用いて測定した。

全例について馴化期間中 1 回、投与 6 及び 13 日目に採血し、赤血球数（RBC）、白血球数（WBC）、血小板数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、MCV、MCH、MCHC、網状赤血球数、白血球分類並びにプロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間を測定した。

全例について馴化期間中 1 回、投与 6 及び 13 日目に採血し、ASAT、ALAT、LDH、CPK、 γ -GTP、CPK、総ビリルビン、総蛋白、アルブミン、総コレステロール、トリグリセリド、ブドウ糖、尿素窒素、クレアチニン、無機リン、Ca、Na、K 及び Cl を測定した。

全例について馴化期間中 1 回ケタミン

麻酔下（約 10 mg/kg, i.m., Sigma Chemical Co.）で、3 及び 4 群全例について剖検日（剖検前）にペントバルビタールナトリウム水溶液麻酔下で、ポータブル X 線装置（DOP-82S-120-D 型、株式会社日立メディコ）を用いて、胸部の X 線撮影を行い、臨床的に病変の判断を行った。

投与後 14 日目に、全例についてペントバルビタールナトリウム（東京化成工業株式会社）水溶液（64.8 mg/mL, 0.4 mL/kg）の前腕橈側皮静脈内投与による麻酔下で体重を測定後放血致死させ、器官及び組織を観察した。全例の主要組織についてヘマトキシリン・エオジン（H.E.）染色して鏡検した。また、凍結切片を作製し、アセトンで 10 分間処理した後、蛍光抗体間接法で抗原を染色し鏡検した。

C. 研究結果

1. 経鼻接種麻疹ウイルスの中枢神経侵入性試験

TPC 繁殖の体重 2.2～3.9kg の健康な雄のカニクイサル 4 頭を用い、うち 2 頭に $10^{5.75}$ TCID₅₀/ml の HL 株を両鼻腔に 0.25ml ずつ（ $10^{5.45}$ TCID₅₀/頭）接種し、他の 2 頭に $10^{7.0}$ PFU /ml の TD97 株を同様に（ $10^{6.7}$ PFU/頭）接種した。接種日及び接種後 1 週間毎に検体を採取し、HL 株接種サルは 6 週目に、TD97 株接種サルは 4 週目に解剖し検体を採取した。

1.1 抗体反応

1.1.1 血中抗体の推移

血中麻疹 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。HL 株を接種した 2 頭のサルは HI 抗体は接種後 2 週目より、中和抗体は 1 週または 2 週目より陽転しその抗体価は高値であった。TD97 株接種の 2 頭も両抗体とも 2 週目より陽転した。

1.1.2 唾液中及び鼻汁中の SC-IgA 抗体

唾液中の麻疹 SC-IgA 抗体価の推移は図 1 及び表 2 の通りであった。HL 株接種の 2 頭のサルでは 2 週或いは 3 週目より抗体上昇が見られた。TD97 株接種サルでは 2 頭とも 2 週目より有意の抗体上昇が見られ、うち 1 頭では 3 週目にピークが見られたが全体に低値であった。

鼻汁中の SC-IgA 抗体価は図 2 及び表 3 の通りであった。HL 株接種の 2 頭及び TD97 株接種の 1 頭に有意の抗体産生が見られた。抗体価は唾液中の値より低目であるが、これは鼻腔拭い液を 1ml PBS に懸濁させたものであり、鼻汁の採取料は唾液より微量であるから、両者の抗体価はそのまま比較できない。

1.2 病理組織学的検査成績

HL 株と TD97 株をそれぞれ接種した各 2 頭のサルの病理組織学的検査成績は表 4 の通りであった。HL 株接種サルは接種後 6 週において脳全般に軽度の髄膜炎病変と脊髄に血管周囲性細胞浸潤が見られたが、リンパ系組織の病変は消退したためか微少であった。TD97 株接種サルでは CNS に病変は認められなかった。

1.3 末梢血からの感染性ウイルスの回収及び体液及び組織からの MV-RNA の検出

1.3.1 末梢血からの感染性ウイルスの回収

末梢血からの感染性ウイルスの回収成績は表 5 の通りであった。HL 株接種サル 2 頭は 1 週目検体から低力価のウイルスが回収されたが、2 週目以後は回収されなかった。TD97 株接種サルからは全く回収されなかった。

1.3.2 末梢血リンパ球、咽頭拭い液、髄液及び組織からのウイルス RNA の検出

サルの体液からの RT-PCR 法による MV-RNA の検出成績は表 6 の通りであった。HL 株接種した 2 頭のサルでは、末梢血からは 1 頭は 1 週目から 5 週目まで、他の 1 頭は最終の 6 週目まで検出された。咽頭スワブからは 2 頭とも 1 週目と 2 週目で検出され、うち 1 頭は 5 週目からも検出された。髄液からは 2 頭中 1 頭で 4 週目のみで検出された。一方、TD97 株を接種した 2 頭においては、うち 1 頭の 1 週目咽頭スワブのみから検出されたが、末梢血及び髄液からは検出されなかった。

サルの組織からの MV-RNA の検出成績は表 7 の通りであった。HL 株接種サルにおいて CNS からは嗅球と脊髄の一部で MV-RNA が検出され、リンパ組織からも検出された。TD97 株接種サルの組織からは検出されなかった。

1.4 髄液中の白血球数の変動

ウイルス接種後の髄液中の白血球数の推移は図 3 及び表 8 の通りであった。HL 株を接種した 2 頭のうち、髄液から MV-RNA が 4 週に検出された #4197 サルでは 4 週に細胞増多が始まり 5 週、6 週と強い増多症が起こった。他の 1 頭も 5 週に細胞増多が

始まり6週に強い増多症が見られた。TD97株を接種した2頭では4週まで細胞増多は認められなかった。

2. TD97 株の経鼻接種法と皮下接種法の有効性比較試験

1.7~3.0kg で9週検定を終了した健康なカニクイサル8頭を2群に分け、1群の4頭に 10^7 PFU/ml または $10^{5.5}$ PFU/ml のTD97 株ウイルスを、それぞれ2頭ずつに両鼻腔に 0.25ml ずつ経鼻接種した。他群の4頭には同じ2種の力価のウイルスを、それぞれ2頭ずつに 0.5ml ずつ皮下接種した。両群の2頭ずつの接種量はそれぞれ $10^{6.7}$ PFU/0.5ml/頭と $10^{5.2}$ PFU/0.5ml/頭となった。経鼻接種サルは接種後5週まで、皮下接種サルは4週まで、1週ごとに血液、唾液及び咽頭拭い液を採取した。

2.1 抗体反応の比較

2.1.1 血中抗体価の推移

TD97 株ウイルスを経鼻または皮下接種したサルの血中麻疹抗体価の推移は表9及び図4の通りであった。HI 抗体価は経鼻接種サルでは接種後3週まで上昇が見られ、皮下接種サルでは2週で上昇が止まるという違いは見られたが、共に良好な抗体産生を示し両者に明瞭な差は見られなかった。

2.1.2 唾液中の分泌性 IgA 抗体価の推移

OraSure で採取した唾液中の麻疹特異的分泌性(SC)-IgA 抗体価の産生状況は図5の通りであった。経鼻接種サルは4頭中3頭に明瞭な抗体産生が見られ、一方、皮下接種サルでは4頭中2頭に抗体上昇が認められたが、前者の方がより高く産生される傾向が認められた。

2.2 末梢血リンパ球及び咽頭拭い液からのウイルス RNA 検出に関する比較

末梢血リンパ球及び咽頭拭い液からのRT-PCR 法による経時的 MV-RNA の検出成績は表10の通りであった。経鼻接種サルでは4頭中1頭の1週目の咽頭拭い液のみから MV-RNA が検出され、一方皮下接種サルでは4頭中2頭の末梢血リンパ球1週目検体のみから検出され、顕著な対比を示した。

3. 麻疹ワクチン経鼻接種サルへの強毒株攻撃試験

ワクチンウイルス TD97 株の経鼻接種法と皮下接種法の比較試験で用いた前者のサル4頭に対して、接種後約10ヶ月目に強毒ウイルス HL 株を経鼻法で攻撃接種した。接種量は $10^{5.2}$ TCID₅₀/ml のウイルス液を両鼻腔に 0.25ml ずつ各2回、計 $10^{5.2}$ TCID₅₀/ml/頭であり、1週目に解剖してその防御効果を調べた。なお、非免疫の対照サルは、これまでの成績を利用できると考え、今回は置かなかった。

3.1 抗体価の推移

3.1.1 血中抗体価

経鼻免疫サルへの HL 株攻撃による血中 HI 及び中和(NT₅₀)抗体価の推移は表11の通りであった。HL 株攻撃後1週目で、攻撃前 HI 抗体価が 2^4 或いは 2^5 のサルでは追加免疫効果による抗体上昇が見られたが、攻撃前 HI 価が 2^6 以上の2頭では追加免疫効果は見られず、うち1頭では逆に抗体低下が見られた。

3.1.2 唾液中の分泌性 IgA 抗体価

OraSure で採取した唾液中の麻疹特異的分泌性(SC)-IgA 抗体価の推移は表 12 の通りであった。TD97 株免疫時の抗体価推移も併記した。免疫後 10 ヶ月において、SC-IgA 抗体価は 4 頭中 3 頭は検出限界以下に低下しており、これら 4 頭への HL 株攻撃によって、唾液中 SC-IgA 抗体価については追加免疫効果が 4 頭とも認められなかった。

3.2 組織学的検査成績

HL 株攻撃後 1 週目のサルの組織学的検査成績は表 13 の通りであった。病理学的検査成績は表の左欄の通りで、4 頭中 2 頭の一部リンパ系組織に麻疹特異的巨細胞が認められたが、いずれも胚中心中の微少な巨細胞で、各リンパ球の細胞膜が認められる程度の弱い融合像であった。その他に病変は認められなかった。蛍光抗体法による検査成績は表の右欄の通りで、いずれの組織からもウイルス抗原は検出されなかった。免疫化学検査(ABC)法の組織切片は病理検査のそれとほぼ同一部位であるが、蛍光抗体法の検体は病理検査のそれとは同一臓器の異なる部位から採取するから、両者で幾分異なる成績となることもあり得ると思われる。

3.3 体液からの感染性ウイルスの回収及びウイルス RNA の検出

3.3.1 体液からの感染性ウイルスの回収

末梢血リンパ球及び髄液からの感染性ウイルスの回収成績は表 14 の通りであった。攻撃後 1 週目において、4 頭の体液から感染性ウイルスは全く回収されなかった。

3.3.2 体液からのウイルス RNA の検出

体液からの MV-RNA の検出成績は表 15 の通りであった。HL 株攻撃 1 週間において、末梢血リンパ球、咽頭拭い液及び髄液から MV-RNA は全く検出されなかった。

3.4 末梢血中の白血球数の変動

末梢血中の白血球数の推移は表 16 の通りであった。攻撃前の 2 回の測定値に変動の大きいものがあり、また部分的な凝血もあり攻撃後との比較が不明確であるが、HL 株の経鼻接種ではこれまでの成績で、30～60%の白血球減少が惹起されており、本攻撃試験ではそのような白血球減少症は起こらなかったものと判断された。

4. カニクイザルを用いた単回投与毒性試験

いずれの群においても、一般状態、摂餌量、体重、血液学的検査及び血液生化学検査に被験物質投与に起因すると考えられる変化はみられなかった。また、気管内接種群の X 線検査においても、異常所見はみられなかった。

剖検において被験物質群に異常所見はみられなかったが、経鼻投与対照群の雄 1 例(No. 8)で、腋窩リンパ節、鼠径リンパ節、肺門リンパ節及び腸間膜リンパ節の腫大、甲状腺の嚢胞ならびに脾臓濾胞の明瞭化がみられた。経鼻投与対照群の雌 1 例(No. 9)では胃に赤色巣がみられた。

病理組織学的検査では、いずれの群においても被験物質投与に起因すると考えられる変化はみられなかった(Tables 8-1～8-7)。なお、剖検で経鼻投与対照群の雄 1 例(No. 8)に、腋窩リンパ節、鼠径リンパ節、肺門リンパ節及び腸間膜リンパ節の

腫大が見られたが、これは、病理組織学的検査ではリンパ濾胞の腫大であり、脾臓濾胞の明瞭化もリンパ濾胞の腫大であった。また、同例の甲状腺の嚢胞は組織学的にも濾胞であった。経鼻投与対照群の雌1例(No. 9)にみられた胃の赤色巣は粘膜固有層の出血及び炎症細胞浸潤であった。

蛍光抗体間接法による免疫組織学的検査では、いずれの群においても被験物質投与に起因すると考えられる変化はみられなかった。

気管及び気管支の上皮の杯細胞に陽性反応がみられたが、対照群にもみられる程度の変化で、意義のある変化とは判断しなかった。

D. 考察

サルへの経鼻接種麻疹ウイルスの CNS における残留性は、昨年度の試験で TD97 株については否定されたが、HL 株接種サルではウイルス RNA 血症が4週の解剖時まで続いて、有効な成績が得られなかった。今年度は HL 株接種サルは観察期間を6週まで延ばして、ウイルスの CNS 侵入性についても検討した。HL 株接種サルにおいて、髄液中の白血球数の変動は、#4197 サルでは細胞増多が4週から起こり5週と6週に強い増多症が惹起されている。髄液の細胞増多症はウイルスの CNS への侵入によって起こったと推定されるが、同サルの4週目髄液中から MV-RNA が検出されていることはこの推定を裏付けるものである。他の1頭の#3962 サルでも髄液細胞増多症が5週に認められ6週に強い増多症が起きており、このサルでは髄液からの MV-RNA の検出は見られなかったが、前述のサルと

の相似性から、このサルも CNS へのウイルス侵入が起こり、これにより細胞増多症が惹起されたことが強く示唆される。また病理組織学的検索で、この2頭の6週目の CNS 全般にウイルス性と考えられる軽度の病変が起こっており、この成績も CNS へのウイルス侵入を示唆するものである。

ウイルスの CNS への侵入時期について考察すると、2頭の末梢血からは5週或いは6週まで MV-RNA が検出されており、この長期に続くウイルス RNA 血症により、脳血管関門(BBB)からウイルスが CNS に侵入したものと推定されるが、侵入時期は、髄液4週目検体からの MV-RNA の検出、髄液細胞増多症の4週以後での惹起及び CNS の組織病変が6週でも認められたことから、接種後3～4週頃の比較的遅い時期とするのが考えやすい。しかし、HL 株を含む強毒株を皮下接種されたサルにおいて、接種後6日の早期に脳から感染性ウイルスが分離されたという成績があり¹⁾、またヒトにおいて、発疹出現後2～5日の麻疹急性期に、髄液から高率にウイルスが分離されたという報告があり²⁾、CNS への侵入時期と侵入機構の詳細な解明実験が必要と思われる。

次に CNS への残留性について考察すると、HL 株接種サルでは2頭の嗅球と1頭の頸髄に MV-RNA が検出された。麻疹ウイルス RNA が健常人61人(平均年齢54.4歳)中11人の CNS から検出されたという報告があり³⁾、MV-RNA の CNS への残留は病原性を伴わず通常起こりうるものと考えられる。しかし本試験では特に嗅球から検出されており、嗅神経経由のウイルス感

染を疑う必要がある。しかし、本試験では以下に挙げる①～④の理由から、麻疹ウイルスは嗅神経経由ではなく、BBB 経由で CNS に侵入したものと推定される。① 本ケースでは 5 週から 6 週までウイルス RNA 血症が続き、髄液内細胞増多症が 4 ～ 6 週に起こり、1 頭の 4 週目髄液から MV-RNA が検出され、更に 6 週目の CNS に広範なウイルス性病変が認められたが、一方鼻粘膜、嗅神経及び嗅球に病変が認められず、これは BBB 経由の侵入を示唆している。② これまでの HL 株サル経鼻接種試験において、接種後 6 日及び 10 日という早期に、鼻粘膜に病変が生じている場合でも嗅神経の感染は見られていない⁴⁾。③ 麻疹ウイルスの CNS への侵入は、脳血管内皮細胞へのウイルス感染による BBB 侵入が疑われており⁵⁾、また同じモビリウイルス属のジステンパーウイルスでは上記ルートのほか、ウイルス感染単核球による BBB からの侵入が報告されている^{6,7)}。単核細胞が主要な感染ターゲットの一つである麻疹ウイルスもこの侵入経路が考えられる。④ 神経感染性のウイルスであるヘルペスウイルスやポリオウイルスでも嗅神経経由の CNS 感染は証明されていない⁸⁾。

しかし麻疹ウイルスの嗅神経経由の CNS 感染を明瞭に否定するためには、本報の嗅球で検出された MV-RNA の侵入ルートの解明は必要であり、前述の強毒ウイルスによるサル CNS への侵入時期と侵入機構の解明のための実験は、この疑問も明らかにすることが期待される。

本試験においても、TD97 株接種サルでは血中から MV-RNA は 4 週まで全く検出

されず、当然髄液からの検出も髄液細胞増多症も起こらず、CNS に病変は見られず、CNS へのウイルス侵入はなかったものと見なされ、TD97 株経鼻接種法の CNS への安全性が再確認された。なお、HL 株接種サルの咽頭拭い液からは MV-RNA が 2 頭で 1 週目と 2 週目から検出され、更にうち 1 頭では 5 週目からも検出されたが、このことは血中にウイルス RNA の存在する間は咽頭にも分布することがあり、他への感染を起こす可能性のあることを示した。

ワクチンウイルス TD97 株の経鼻接種法と皮下接種法の有効性比較試験では、血中の HI 及び NT₅₀ 抗体産生は両者に差は見られず共に良好であり、唾液中の SC-IgA 抗体は予想通り経鼻法の方が良好な産生を示す成績が得られた。感染防御に重要と考えられる細胞性免疫能については今回比較出来なかったが、抗体産生に関しては経鼻接種法は従来の皮下接種法に劣らないという成績が得られた。

この試験の経鼻接種サル 4 頭に対しては接種後 10 ヶ月目に HL 株の攻撃試験を行った。この試験は本ワクチン研究の初期に実施しており、TD97 株経鼻免疫の有効な感染防御効果を確認しているが⁹⁾、この時の経鼻免疫及び経鼻攻撃はいずれもマイクロピペットによる注入法であった。今回は経鼻接種専用開発された鼻腔内定量噴霧具を用いて、免疫及び攻撃を行った。結果は前と同様にほぼ完全な感染防御効果が見られた。即ち、これまでの成績で、非免疫サルに対する HL 株経鼻接種では、1 週間後において、組織学的にはリンパ系組織全体に強い麻疹特異的病変が生じ、末梢血に 30

～70%の白血球減少症が惹起され、末梢血リンパ球からは感染性ウイルスが回収された^{4,9)}。また体液からのウイルス RNA の検出では、本報及び前年度報告にあるように、末梢血リンパ球では接種後5週或いは6週まで、咽頭拭い液では接種後2週までは検出されていた。これに対して本報の攻撃試験では、接種後1週目の組織病変は4頭中2頭の一部のリンパ組織に微弱な特異反応が認められたのみであり、また末梢血の明瞭な白血球減少症は見られず、体液からの感染性ウイルスの回収及び MV-RNA の検出は全く認められなかった。これは HL 株の増殖性と病原性ほぼ完全に抑制し、サルを強毒株の攻撃からほぼ完全に防御したと見なすことができる。

唾液中に生起される SC-IgA 抗体は本報告の経鼻接種法と皮下接種法の比較試験でも見られたように、接種後2週或いは3週目にピークとなり以後急速に減衰している。しかし SC-IgA 抗体は微生物の感染門戸となるあらゆる粘膜組織に分布して、粘膜の分泌液中最も量が多く、局所免疫の主役をなすと考えられているので¹⁰⁾、免疫のメモリーは残るのではないかと考えていた。しかし経鼻免疫サルへの攻撃試験で見られたように、麻疹特異的な SC-IgA 抗体は攻撃時には4頭中3頭からは検出できず、麻疹ウイルスの再曝露によっても4頭とも抗体の上昇は見られず、メモリーの存在は確認できなかった。

動物の粘膜全体に大量に分布する SC-IgA 抗体は実際に感染防御にどのような形で関与するのであろうか。或いはこれらとは違う役割を持つのであろうか。

TD97 株の経鼻接種法と皮下接種法比較試験における体液からの MV-RNA 検出試験で、経鼻接種サルは4頭中1頭の咽頭スワブ1週目検体のみから、一方皮下接種サルでは4頭中2頭の末梢血リンパ球1週目検体のみから MV-RNA が検出された。また CNS 侵入性試験においても、TD97 株経鼻接種サルは2頭中1頭の咽頭スワブ1週目検体のみから検出され、TD97 株の経鼻接種法では MV-RNA は咽頭スワブのみから検出され、血液からは検出されない。これらの成績は接種法によってウイルスの初期増殖部位が異なっている可能性を示唆しており、経鼻接種法では接種初期において、血液に曝される部位よりも、接種局所でより多く増殖することが推定される。麻疹の常在している途上国では麻疹の感染年齢が低く、母からの移行抗体を持つ乳児に有効な麻疹ワクチンが求められており、Edmonston Zagreb 株が挫折して以来、現在これに適したワクチンを模索中であるが、本ワクチンの成績は、皮下接種ワクチンよりも初期増殖が血中移行抗体の影響を受けにくいことが推定され、乳児用ワクチンとしての期待を抱かせる。

カニクイザルを用いた経鼻投与乾燥弱毒生麻疹ワクチンの単回投与毒性試験は、乾燥弱毒生麻疹ワクチンを従来の皮下接種から経鼻接種に変更するにあたり、その安全性をみるため、乾燥弱毒生麻疹ワクチン 0.5 mL/body を雌雄各 2 匹のカニクイザルに単回経鼻投与し、毒性の発現の有無を調べた。また、経鼻投与の苛酷条件として、乾燥弱毒生麻疹ワクチン 0.3 mL/body を雌雄各 2 例に気管内投与した。いずれの投与経路についても対照として雌雄各 2 匹ないし

1 例にエアーのみを投与した。

いずれの群及びいずれの投与経路においても一般状態観察、摂餌量、体重推移、血液学的検査、血液生化学的検査、X線検査、剖検、病理組織学的検査及び免疫組織学的検査で被験物質投与に起因すると考えられる変化はみられなかった。

以上の結果から、本試験条件下では、乾燥弱毒生麻疹ワクチン 0.5 mL/body 経鼻投与及び 0.3 mL/body 気管内投与は、毒性を惹起しなかったと判断した。

参考文献

- 1) 小船富美夫：麻疹ウイルス研究の最近の進歩－B9 5a 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) 目黒英典，他：麻疹の中枢神経合併症の発生機序に関する研究-麻疹急性期髄液からのウイルス分離，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 平成元年 3 月：30-31, 1989
- 3) 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
- 4) 鈴木一義：経口経鼻麻疹ワクチンの開発，途上国向けワクチン研究開発事業，平成 8 年度研究報告書，1997 年 3 月
- 5) Kirk J, et al: Cerebral endothelial cell infection by measles virus in subacute sclerosing panencephalitis: Ultrastructural and in situ hybridization evidence. Neuropathol

Appl Neurobiol 17:289-297, 1991

- 6) Axthelm MK, Krakowka S: Canine distemper virus: The early blood-brain barrier lesion. Acta Neuropathol 75: 27-33, 1987
- 7) Appel MJG: Pathogenesis of canine distemper. Am J Vet Res 30. 1167-1182, 1969
- 8) Johnson RT, Griffin DE: Pathogenesis of viral infections. Handbook of clinical Neurology 36. Infection of the nervous system. Part II. North-Holland Publishing Co. Amsterdam: 15-37, 1978
- 9) 鈴木一義：経口経鼻麻疹ワクチンの開発，途上国向けワクチン研究開発事業，平成 6 年度研究報告書，1995 年 3 月
- 10) Roitt IM: The secretory immune system protects the external mucosal surfaces. ESSENTIAL IMMUNOLOGY 9th Ed: Blackwell Science, Ltd London: 263-264, 1997

E. 結論

本年度のサル接種試験において，TD97 株を用いる経鼻接種ワクチンの中枢神経系に対する安全性が確認された。また皮下接種法との比較試験において，血中抗体産生能は同等で局所 IgA 抗体産生能はより高い傾向が認められた。また強毒株の攻撃に対してほぼ完全な感染防御能を示した。本ワクチンは皮下接種法に比して移行抗体の影響を受けにくい可能性が示唆され，途上国

での使用に適するワクチンとしての可能性
がより高まったと考えられる。GLP に準
拠した単回投与毒性試験においても本剤の
安全性が確認された。

F. 研究発表

1. 学会発表

鈴木一義，齋加志津子，木所 稔，大川時
忠，堀内 清（千葉県血清研究所），小船
富美夫，佐多徹太郎，倉田 毅（国立感染
症研究所）：経鼻麻疹ワクチンのサルにお
ける安全性と有効性の検討．第3回日本ワ
クチン学会学術集会：演題 G-6：平成 11
年 11 月

表 1 HL 株又は TD97 株経鼻接種サル の 血中麻疹抗体価の推移

ウイルス 株	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	6週	0週	1週	2週	3週	4週	5週	6週
HL株	3962	<3	<3	8	9	9	9	8	<2.0	<2.0	13.2	13.0	13.0	12.1	12.9
	4197	<3	<3	8	9	≥9	≥9	≥9	<2.0	4.9	12.9	12.6	13.0	13.3	13.9
TD97株	4289	<3	<3	3	5	5	NT	NT	<2.0	<2.0	6.9	8.9	9.0	NT	NT
	4294	<3	<3	3	6	5	NT	NT	<2.0	<2.0	5.4	8.6	8.6	NT	NT

NT ; 試験実施せず

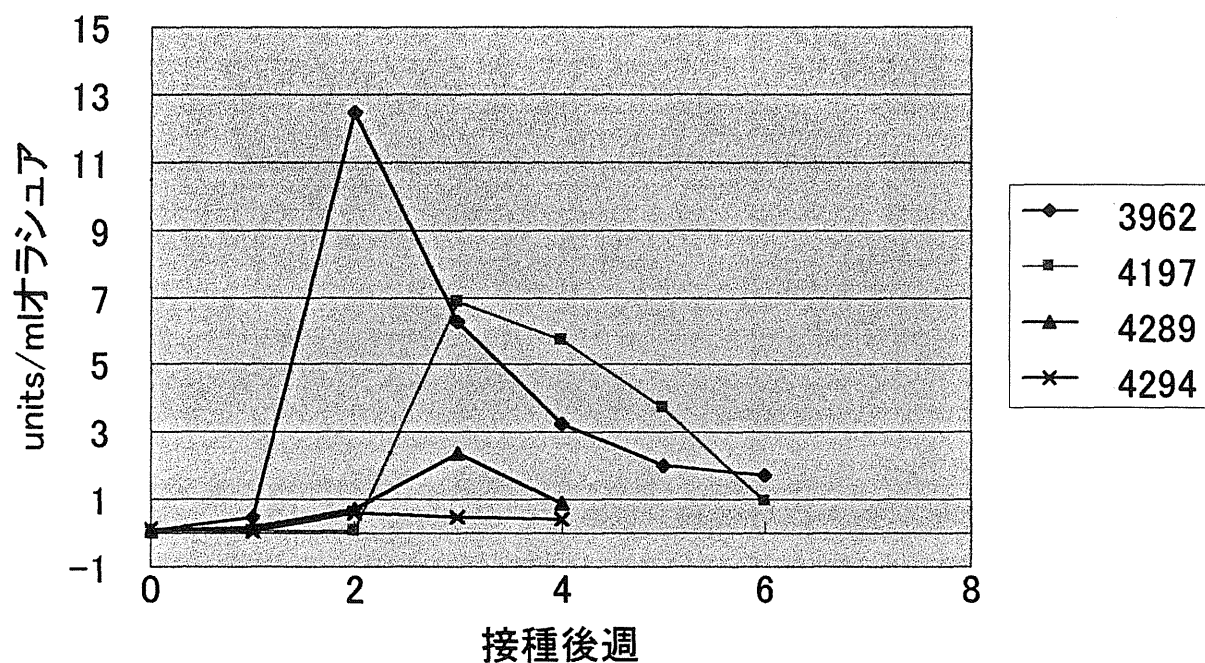


図1 HL 株又は TD97 株経鼻接種サルの唾液中麻疹分泌性 IgA 抗体価

表2 HL 株又は TD97 株経鼻接種サルの唾液中麻疹分泌性 IgA 抗体価

ウイルス株	サル番号	分泌性IgA抗体価 (units/ml)						
		接種時	1週	2週	3週	4週	5週	6週
HL株	3962	0.04	0.49	12.44	6.28	3.24	1.99	1.74
	4197	0.09	0.04	0.04	6.84	5.71	3.70	0.95
TD97株	4289	0.06	0.15	0.69	2.34	0.91	ND ¹⁾	ND
	4294	0.11	0.04	0.60	0.47	0.44	ND	ND

1) 試験実施せず

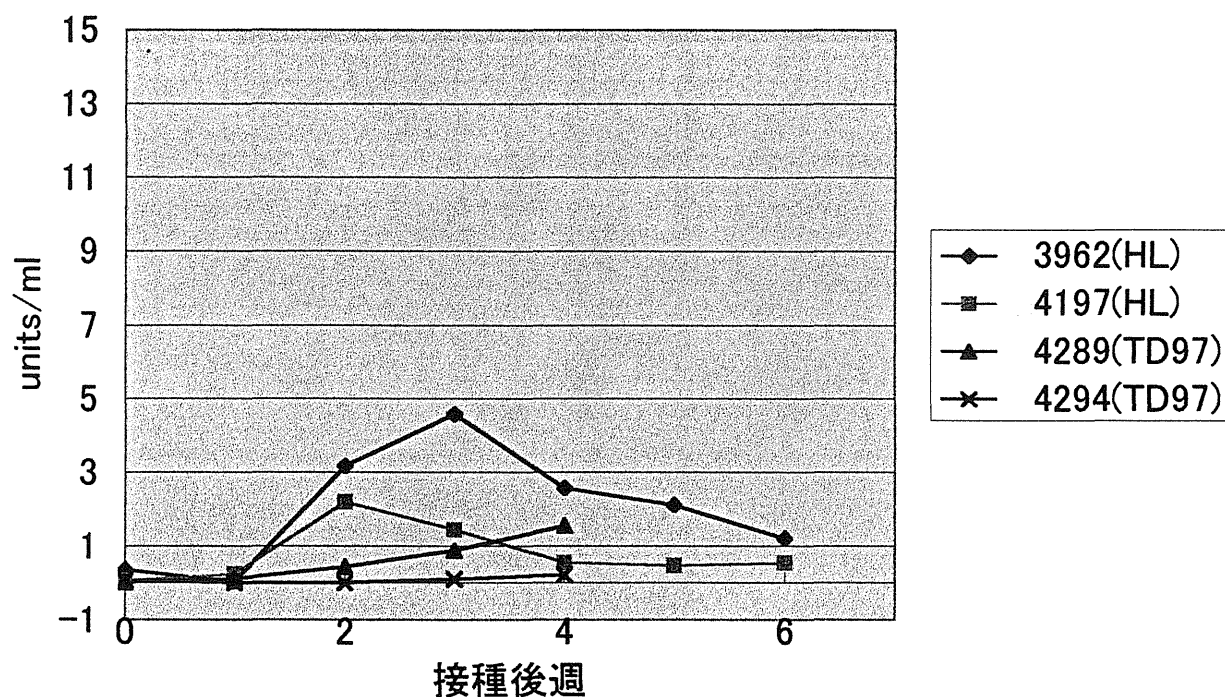


図2 HL 株又は TD97 株経鼻接種サルの鼻汁中の麻疹分泌性 IgA 抗体価

表3 HL 株又は TD97 株経鼻接種サルの鼻汁中の麻疹分泌性 IgA 抗体価

ウイルス株 サル番号		分泌性IgA抗体価 (units/ml)						
		接種時	1週	2週	3週	4週	5週	6週
HL株	3962	0.36	0.04	3.17	4.58	2.57	2.11	1.20
	4197	0.06	0.23	2.20	1.44	0.55	0.47	0.54
TD97株	4289	0.02	0.11	0.43	0.88	1.55	ND ¹⁾	ND
	4294	0.07	0.01	0.01	0.11	0.22	ND	ND

1) 試験実施せず

表 4 HL 株又は TD97 株経鼻接種サルの病理組織学的検査成績

臓器又は部位	HL 株接種サル		TD97 株接種サル	
	3962	4192	4289	4294
前頭葉	± ^M	—	—	—
後頭葉	—	± ^M	—	—
側頭葉	± ^M	± ^M	—	—
視床	—	—	—	—
中脳	± ^M	—	—	—
小脳	—	± ^M	—	—
脳橋	—	± ^M	—	—
延髄	± ^M	± ^M	—	—
脊髓	+ ^{PC}	+ ^{PC}	—	—
嗅球	—	—	—	—
嗅球根部	—	—	—	—
嗅神経	—	—	—	—
鼻粘膜	—	—	—	—
顎下リンパ節	—	—	+ ^{GC}	—
腋窩リンパ節	—	—	—	—
鼠径リンパ節	—	—	—	—
腸間膜リンパ節	—	—	—	—
扁桃	—	+ ^{GC}	—	—
胸腺	—	—	—	—
肺臓	—	—	—	—
気管	—	—	—	—
脾臓	—	—	—	—
肝臓	—	—	—	—
腎臓	—	—	—	—
心臓	—	—	—	—

—：病変なし，±：ごく軽度，+：中程度

M：軟膜に細胞浸潤（髄膜炎 meningitis），PC：軟膜の血管周囲に細胞浸潤（perivascular cuffing），CI：粘膜固有層に細胞浸潤（cell infiltration），GC：胚中心に巨細胞（giant cell）の出現

表5 HL株又はTD97株経鼻接種サル末梢血からの感染性ウイルスの回収

ウイルス株	サル 個体番号	接種後週数	
		1 週	2 週
HL株	3962	10 ¹⁾	<10
	4197	1.8×10 ²	<10
TD97株	4289	<10 ^{0.2 2)}	<10 ^{0.2}
	4294	<10 ^{0.2}	<10 ^{0.2}

1) SFU(Syncytium forming unit)/mL in B95a cells

2) TCID₅₀/mL in Vero cells

表6 HL株又はTD97株経鼻接種サル体液からの
ウイルスRNAの検出

ウイルス 株	サル 個体番号	検体	0週	1週	2週	3週	4週	5週	6週
HL株	3962	咽頭拭い液	-	+	+	-	-	+	-
		PBL	-	+	+	+	+	+	+
		髄液	-	ND	-	-	-	-	-
	4197	咽頭拭い液	-	+	+	-	-	-	-
		PBL	-	+	+	+	+	+	-
		髄液	-	-	ND	-	+	-	-
TD97株	4289	咽頭拭い液	-	-	-	-	-	NT	NT
		PBL	-	-	-	-	-	NT	NT
		髄液	-	-	-	-	-	NT	NT
	4294	咽頭拭い液	-	+	-	-	-	NT	NT
		PBL	-	-	-	-	-	NT	NT
		髄液	-	-	ND	ND	-	NT	NT

注) PBL; 末梢血リンパ球

- ; 麻疹ウイルスRNA陰性

+

ND; 検体無し

NT; 試験実施せず

表7 HL株又はTD97株経鼻接種サル組織からの
ウイルス RNA の検出成績

	臓器又は部位	HL株接種サル		TD97株接種サル	
		3962	4197	4289	4294
中枢神経系	前頭葉	-	-	-	-
	頂頭葉	-	-	-	-
	後頭葉	-	-	-	-
	視床	-	-	-	-
	小脳	-	-	-	-
	延髄	-	-	-	-
	第3脳室	-	-	-	-
	第4脳室	-	-	-	-
	嗅球根部	-	-	-	-
	嗅球	+	+	-	-
	頸髄膨大部	-	+	-	-
	腰髄膨大部	-	-	-	-
	嗅神経	-	-	-	-
	鼻腔粘膜	-	-	-	-
呼吸器	気管	ND	ND	ND	ND
	気管支・肺門リンパ	-	ND	-	-
	肺	-	-	-	-
リンパ系組織	扁桃腺	-	-	-	-
	胸腺	ND	-	-	-
	脾臓	-	+	-	-
	顎下リンパ節	-	+	-	-
	腋窩リンパ節	+	+	-	-
	鼠径リンパ節	+	+	-	-
	腸間膜リンパ節	+	-	-	-

注) - ; 麻疹ウイルス RNA 陰性

 + ; 麻疹ウイルス RNA 陽性

 ND ; 検体無し

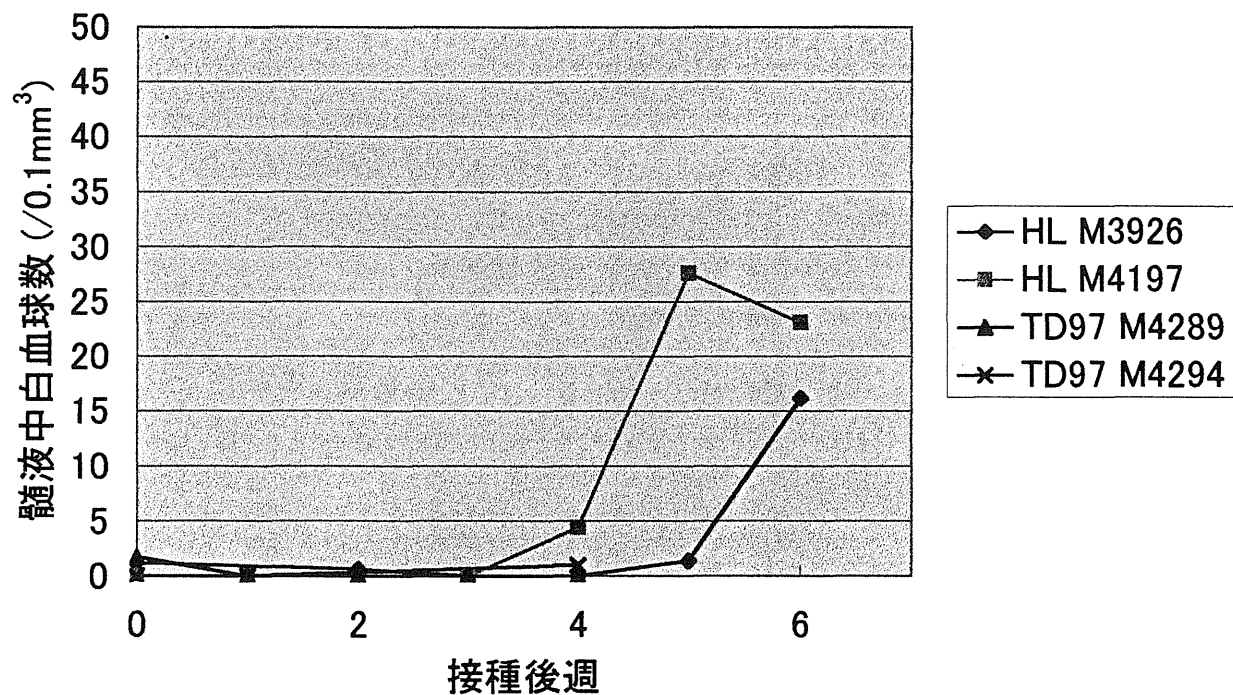


図3 HL 株又は TD97 株経鼻接種サルの髄液中の白血球数の変動

表8 HL 株又は TD97 株経鼻接種サルの髄液中の白血球数の変動

ウイルス株	サル番号	分泌性IgA抗体価 (units/ml)						
		接種時	1週	2週	3週	4週	5週	6週
HL株	3962	1.2	ND ¹⁾	0.6	0	0	1.4	16.2
	4197	0	0	ND	0	4.4	27.6	23.1
TD97株	4289	1.7	0	0	0	0	NT ²⁾	NT
	4294	0	0	ND	ND	1	NT	NT

1) 検体なし

2) 試験実施せず