

(2) 皮下接種群

攻撃後解剖時期		1 週		4 週		
サル番号		6 4 1	8 1 1	0 6 1	1 1 1	6 1 9
中枢神経系	前頭葉	—	—	—	—	—
	側頭葉	—	+ <sup>m</sup>	—	—	—
	後頭葉	—	+ <sup>m,ch</sup>	—	—	—
	視床	—	—	—	—	—
	小脳	—	—	—	—	—
	脳橋	—	—	—	—	—
	延髄	—	—	—	—	—
	脊髄	—	—	—	—	—
	嗅球	—	—	—	—	—
	嗅球根部	—	—	—	—	—
	嗅神経	—	—	—	—	—
	リンパ系	顎下リンパ	—	—	—	—
腋窩リンパ		—	—	—	—	—
鼠径リンパ		—	—	—	—	—
腸管膜リンパ		—	—	—	—	—
胸腺		++ <sup>gc</sup>	—	—	—	—
その他組織	扁桃	—	—	+ <sup>ci</sup>	+ <sup>ci</sup>	+ <sup>ci</sup>
	鼻粘膜	—	—	—	—	—
	肺臓	—	—	—	—	—
	気管	—	—	—	—	—
	気管支	—	—	—	—	—
	脾臓	—	—	—	—	—
	肝臓	—	—	—	—	—
	腎臓	+ <sup>in</sup>	—	+ <sup>in</sup>	+ <sup>in</sup>	+ <sup>in</sup>
心臓	—	—	—	—	—	

—, 病変なし; +, 軽度; ++, 中程度; +++, 重度

gc, 胸腺のリンパ節に巨細胞出現; in, 腎臓の尿細管に細胞浸潤; m,ch 後頭葉, 側頭葉の軟膜に細胞浸潤と側脳室の脈絡叢に細胞浸潤; ci, 扁桃の腺小葉間に細胞浸潤; in, 腎臓の尿細管間質に細胞浸潤

(3) ワクチン非接種対照群

サル番号		0 2 1	3 1 1
攻撃後解剖時期		1 週	1 週
中枢神経系	前頭葉	—	—
	側頭葉	—	—
	後頭葉	+ <sup>m</sup>	—
	視床	+ <sup>m</sup>	—
	小脳	+ <sup>ch</sup>	—
	脳橋	+ <sup>pc, ch</sup>	—
	延髄	+ <sup>m</sup>	—
	脊髄	+ <sup>m</sup>	—
	嗅球	ND	—
	嗅球根部	—	—
	嗅神経	—	—
	リンパ系	顎下リンパ	—
腋窩リンパ		—	—
鼠径リンパ		—	+ <sup>gc, agg, n</sup>
腸管膜リンパ		+ <sup>~</sup> ++ <sup>gc, agg, n</sup>	—
胸腺		++ <sup>~</sup> +++ <sup>gc, agg, n</sup>	++ <sup>gc, agg, n</sup>
その他組織	扁桃	+ <sup>ci</sup>	+ <sup>ci</sup>
	鼻粘膜	—	—
	肺臓	+ <sup>ip</sup>	—
	気管	—	—
	気管支	—	—
	脾臓	—	—
	肝臓	—	—
	腎臓	+ <sup>in, gc, agg, n</sup>	+ <sup>in</sup>
	心臓	—	—

—, 病変なし; +, 軽度; ++, 中程度

m, 脳脊髄の髄膜に細胞浸潤; pc, ch h, 脳橋実質の血管周囲に細胞浸潤; ci, 腺小葉間に細胞浸潤; gc, agg, n, リンパ節, 胸腺, 腎臓などに巨細胞の出現とその細胞凝壊壊死; ip, 肺の間質に細胞浸潤; in, 腎尿管の間質に細胞浸潤

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 1

受動免疫存在下での麻しんワクチンの抗体反応

分担研究者 齋加 志津子（千葉県血清研究所）、小船富美男（国立感染症研究所）

研究要旨

開発途上国で麻疹撲滅のためのワクチンとして要求される移行抗体存在下でのワクチンの有効性をみるため、カニクイザルに受動免疫存在下でワクチンを経鼻または皮下接種し、その後 HL 株で攻撃し、その抗体反応を比較した。その結果、経鼻及び皮下両接種方法により、明らかにプライミングが成立し、ワクチンの効果が認められた。また、血中抗体反応からみると、皮下接種の方が接種経鼻よりも有効である成績であった。

研究協力者 鈴木一義，青木敦子，森田和子（千葉県血清研究所）

接種法は皮下接種法よりも移行抗体の影響を受けにくいと推察されたので、これを検証するため、受動免疫存在下で経鼻と皮下接種によるワクチンの効果を比較した。

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しん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。また、麻疹が常在している途上国においては、麻疹罹患年齢が低いこと母親由来の移行抗体を持つ乳児期早期に有効な麻疹ワクチンが求められている。経鼻接種法と皮下接種法は接種されたウイルスの一次増殖部位が異なることがこれまでの成績から示唆されており、経鼻

B. 方法

1. 動物

新日本科学（株）で繁殖された抗麻疹抗体陰性の健康なカニクイザル、雌、3～4歳を使用した。1頭ずつアイソレーター中で飼育した。

2. ウイルス株

ワクチン株は千葉県血清研究所製造弱毒生麻疹ワクチン TD97 株を、強毒株は小船博士が B95a 細胞で分離した HL 株を用いた。

1. 受動免疫用抗体

麻疹に自然感染し高い抗麻疹抗体価を示すカニクイザルの血清を硫酸分画により精製した。50%及び 30%硫酸飽

和を行った後 1/100M 燐酸緩衝液 (pH7.6) で透析しγグロブリン画分を得た。これに含まれる抗麻疹 HI 抗体は  $2^9$ , 中和抗体価は  $2^{13.3}$  であった。

### 3. 受動免疫試験

サルγグロブリンをサルの筋肉内に接種した場合、得られる血中抗体価は接種されたものが全血液量で稀釈された価になると推定し、 $2^3$  または  $2^4$  の血中 HI 抗体の受動免疫を得るように、サルγグロブリンを 1.2ml/kg またはその 2 倍量をカニクイザルにそれぞれ 1 頭ずつ筋肉内に接種した。接種前、接種後 1, 3 日後及び 1 週毎に 12 週まで採血した。血清について、抗麻疹抗体を HI, 中和及び PA 法で測定し、その減衰を追跡した。

### 4. 受動免疫存在下でのワクチン接種

サルγグロブリンを 1.2ml/kg 筋肉内に接種し、翌日 TD97 株麻疹ワクチンを経鼻または皮下にそれぞれ 5 頭ずつのサルに  $10^{5.2}$ TCID<sub>50</sub>/頭接種した。接種前、接種後 6 週までは 1 週毎に、それ以降は 3 ヶ月後まで 1 ヶ月毎に血清を採取し、抗麻疹抗体を HI, 中和及び PA 法で測定した。

### 5. 感染防御試験

受動免疫存在下でワクチンを経鼻または皮下接種されたそれぞれ 5 頭ずつのサルの感染防御効果をみるため、ワクチン接種後 12 週目に HL 株で攻撃した ( $10^{5.2}$  TCID<sub>50</sub>/頭 経鼻接種)。対照として、受動免疫後ワクチン接種をしていない 2 頭も同様に攻撃した。それぞれの群の内 2 頭ずつ及び対照のサル 2 頭は攻撃後 1 週目に解剖した。残

り 3 頭ずつは 4 週後解剖した。解剖は深麻酔下で実施した。攻撃前及び攻撃後 1 週毎に、血液を採取し、血中抗麻疹抗体を HI, 中和, PA 及び ELISA 法 (IgM 及び IgG) で測定した。

### 6. 抗体測定

抗麻疹抗体は麻疹 HA 抗原 (デンカ生研) を用いた HI 抗体, Vero 細胞及び攻撃ウイルスとして豊島株を用いた 50%ブランク減少法による中和抗体, セロディア PA キット (富士レビオ) による PA 抗体並びにエンザイグノスト麻疹/IgM (DADE BEHRUNG) による IgM 抗体を測定した。

(倫理面への配慮) サルを扱う時は可能な限り苦痛を与えないように配慮した。

## C. 結果

### 1. 受動免疫の減衰

サルγグロブリン 1.2ml/kg 及びその倍量の 2.4ml/kg をそれぞれ 1 頭ずつのカニクイザルに筋肉内接種したところ、翌日の血中抗体価は、1.2ml/kg 接種サル (No.97311) が HI,  $2^3$ , 中和,  $2^{5.3}$ , PA,  $2^6$  で、2.4ml/kg 接種サル (No.97021) が HI,  $2^3$ , 中和,  $2^{6.7}$ ; PA,  $2^7$  であった。その後の抗体価の推移を表 1, 図 1 に示した。得られた中和抗体価は直線的に減衰し、その傾きはそれぞれ -0.45, -0.42 とほぼ同じ価を示し、中和抗体価は接種後 8 または 9 週目に検出限界以下になった。半減期は 2.4 週であった。

### 2. 受動免疫存在下でのワクチン接種による抗体反応

サルγグロブリンを 1.2ml/kg を 10 頭のカニクザルの筋肉内に接種したところ、翌日の血中 HI 抗体価は  $2^3 \sim 2^4$  であった。この時に、 $10^{5.2}$  TCID<sub>50</sub> のワクチン (TD797 株) を経鼻または皮下に 5 頭ずつ接種しその後の抗体価の推移を調べた。中和抗体反応を表 2 (1) 及び図 2 に示した。ワクチン接種により顕著な抗体反応は認められなかったが、1.2ml/kg のγグロブリンを筋肉内に接種した場合中和抗体価は 8 週後に検出限界以下になるのに対して、経鼻ワクチン接種群 9 頭及び皮下接種群 5 頭は 12 週後でも中和抗体を保持していた。その価は皮下接種群の方が経鼻接種群よりも高かった。IgM 抗体は全てのサルで上昇が認められたが、経鼻接種に比べて皮下接種の方がより高く誘導された。IgM 抗体のピークは接種後 2 週ないし 3 週目で、皮下接種群の方が経鼻接種に比べて若干遅れる傾向がみられた (表 2 (3) 及び図 3)。

### 3. 感染防御試験

受動免疫存在下でワクチンを経鼻または皮下接種し、その後 12 週後に HL 株で攻撃したところ、受動免疫のみのサル 2 頭は 1 週後抗体反応を認めなかった。ワクチン皮下接種群の 1 頭 (#061) は若干抗体価が上昇しただけであった。その他の 9 頭は 1 週後から中和抗体の顕著な上昇を認めた (表 4 (1), 図 4)。IgM 抗体価は経鼻接種群が 5 頭全頭に明らかな上昇を認めたのに対して、皮下接種群では若干上昇したのみであった。(表 4 (3), 図 5)

### D. 考察

麻疹が常在している途上国においては、麻疹罹患年齢が低いため母親由来の移行抗体を持つ乳児期早期に有効な麻疹ワクチンが求められている。ワクチンを経鼻または皮下に接種後 RT-PCR で末梢血リンパ球及び咽頭拭い液中のウイルス RNA の検出を行うと、皮下接種の場合は末梢血リンパ球から、経鼻接種の場合は咽頭拭い液から検出されている<sup>1)</sup>。このことは両接種法により体内に入ったワクチンウイルスの増殖部位は異なり、経鼻接種法の場合は末梢血リンパ球中でよりも上気道粘膜局所で増殖しやすいと考えられる。それゆえ、経鼻接種法は皮下接種法よりも移行抗体の影響を受けにくいことが推察される。

このことを検証するため、受動免疫存在下でワクチンを経鼻または皮下に接種しその有効性を抗体反応からみた。サルγグロブリン (HI 抗体  $2^9$ , 中和抗体価  $2^{13.3}$ ) を 1.2ml/kg サルの筋肉内に接種したところ、翌日の血中抗体は HI,  $2^3$ , 中和,  $2^{5.3}$ , PA,  $2^8$  であった。得られた中和抗体価は直線的に減衰し、半減期は 2.4 週であった。中和抗体価は接種後 8 週目に検出限界以下になった。一方、同量の受動免疫を与えたサルに、翌日  $10^{5.2}$  TCID<sub>50</sub> のワクチン (TD797 株) を経鼻または皮下に 5 頭ずつ接種したところ、顕著な抗体反応は認められなかったが、抗体の減衰は、受動免疫のみのサルのそれと比べると緩やかで、経鼻ワクチン接種群 4 頭及び皮下接種群 5 頭は 12 週後でも中和抗体を保持していた。その価は皮下接種群の方が経鼻接種群よりも高かった。また、IgM 抗体の上昇は全てのサルで認め

られたが、中和抗体と同様、経鼻接種に比べて皮下接種の方がより高く誘導された。IgM 抗体が誘導されたこと、また、中和抗体価の減衰が緩やかになったことからみて、受動免疫存在下で経鼻または皮下接種ワクチンによるプライミングは成立したものと考えられた。ワクチン接種後 12 週後に HL 株で攻撃したところ、皮下接種群の 1 頭は殆ど抗体反応が認められず、ワクチン接種により完全に HL 株の増殖を防御したと考えられた。他の 9 頭は攻撃 1 週後に 2 次抗体反応と考えられる顕著な中和抗体の上昇を認めており、明らかにワクチン接種によりプライミングが成立し、メモリーが残っていたことを示しており、ある程度の感染防御効果があったと考えられる。麻しんの免疫には細胞性免疫が重要な役割を担っている。今後、液性免疫のみでなく、細胞性免疫からもワクチンの有効性を検討する必要がある。

#### 参考文献

- 1) 齊加志津子：厚生科学研究費補助金研究報告書 経鼻麻しんワクチン開発研究 平成 11 年度

#### E. 結論

受動免疫存在下で TD97 株を経鼻または皮下に接種したところ、明らかにプライミングが成立し、ワクチンの効果が認められた。液性抗体反応のみから判断するならば、皮下接種の方が経鼻接種よりも有効である成績であった。

表1  $\gamma$ グロブリン接種後のカニクイザルの抗体価 ( $2^n$ ) の推移

ワクチン接種後期間	サル番号					
	0 2 1			3 1 1		
	HI	NT	PA	HI	NT	PA
0	<3	<2	<2	<3	<2	<2
1d	3	6.7	7	3	5.3	6
2d	3	6.8	7	3	5.5	6
1w	3	6.2	6	<3	5.2	6
2w	<3	5.8	5	<3	5.6	5
3w	<3	5.3	4	<3	4.6	4
4w	ND	4.7	3	ND	4.5	4
6w	ND	3.2	2	ND	3.3	3
8w	ND	<2	2	ND	2.4	3
9w	ND	<2	ND	ND	<2	ND
10w	ND	<2	<2	ND	<2	2
12w	<3	<2	<2	<3	<2	<2

サル# 0 2 1には 2.4ml/kg, # 3 1 1には 1.2ml/kg の $\gamma$ グロブリンを筋肉内接種した。  
ND, 試験していない。

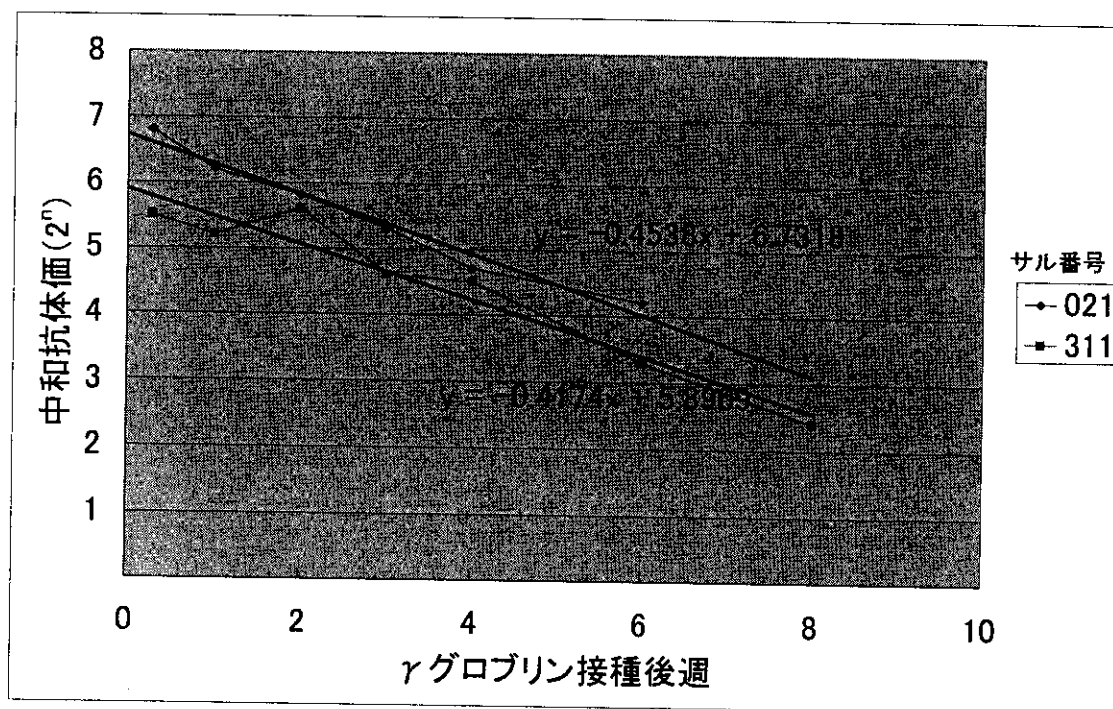


図1  $\gamma$ グロブリン接種後の中和抗体価の推移

表2 受動免疫存在下でのワクチン接種後の抗体反応

(1) 中和抗体価 (2<sup>n</sup>)

ワクチン 接種後週	経鼻接種サル番号					皮下接種サル番号				
	011	221	161	261	821	641	811	061	111	619
0	6.1	6.3	6.5	6.4	6.6	6.3	5.9	5.4	5.2	6.7
1	5.5	5.1	4.9	5.0	6.3	6.2	6.3	4.7	5.0	7.3
2	4.4	5.4	4.8	4.9	5.4	7.0	6.2	5.1	4.8	7.3
3	4.3	6.8	4.5	4.5	5.3	6.8	5.2	4.8	4.8	4.4
4	3.6	6.2	4.8	4.7	4.7	8.0	5.1	6.1	5.2	4.7
5	3.6	5.6	5.1	4.6	4.4	7.6	5.0	5.8	5.6	4.7
6	3.1	5.6	3.9	4.6	4.3	6.8	5.7	5.8	6.8	4.6
8	<2	5.4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	<2	5.6	ND	ND	N	ND	ND	ND	ND	ND
12	<2	6.1	4.2	2.9	3.8	7.6	4.8	5.8	6.8	4.0

(2) HI 抗体価 (2<sup>n</sup>)

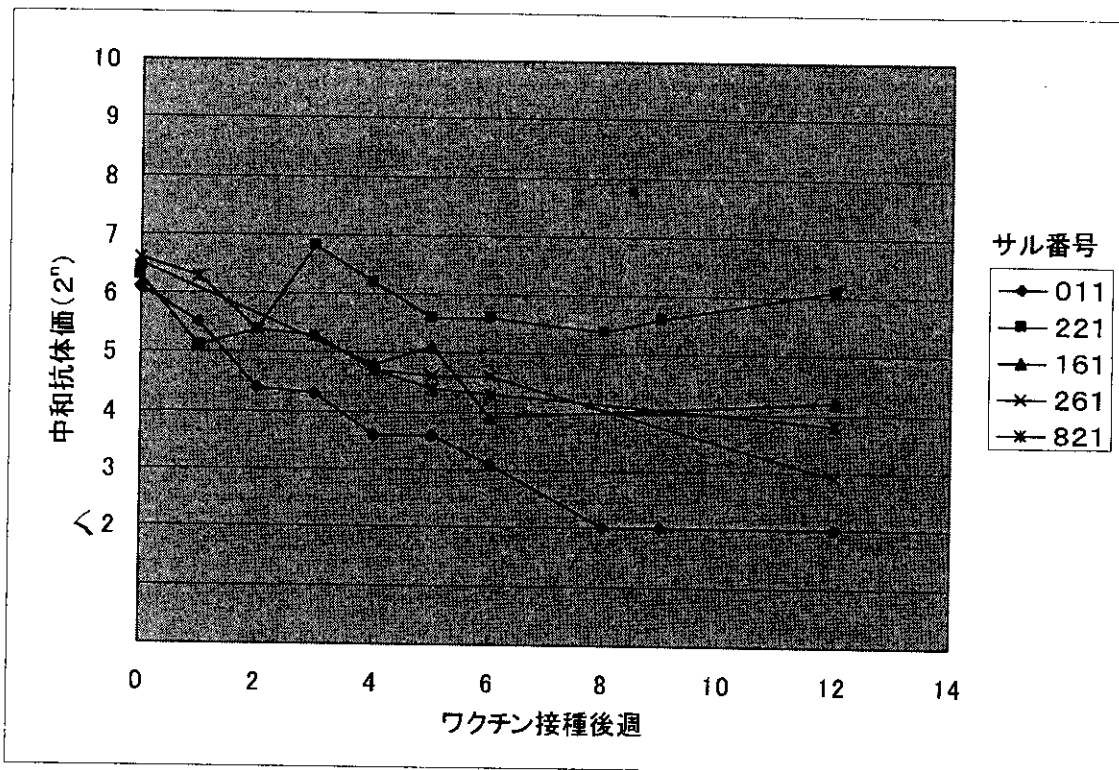
ワクチン 接種後週	経鼻接種サル番号					皮下接種サル番号				
	011	221	161	261	821	641	811	061	111	619
0	3	3	4	4	4	4	3	4	4	4
1	<3	<3	3	3	3	4	4	3	3	3
2	<3	<3	3	3	3	5	4	4	4	3
3	<3	4	<3	<3	<3	6	4	4	6	4
4	<3	4	<3	<3	<3	6	4	4	6	4
5	<3	4	<3	<3	<3	7	4	4	6	3
6	<3	4	<3	<3	<3	7	4	5	6	3
12	<3	4	<3	<3	<3	6	4	4	6	3

(3) IgM 抗体価 (OD)

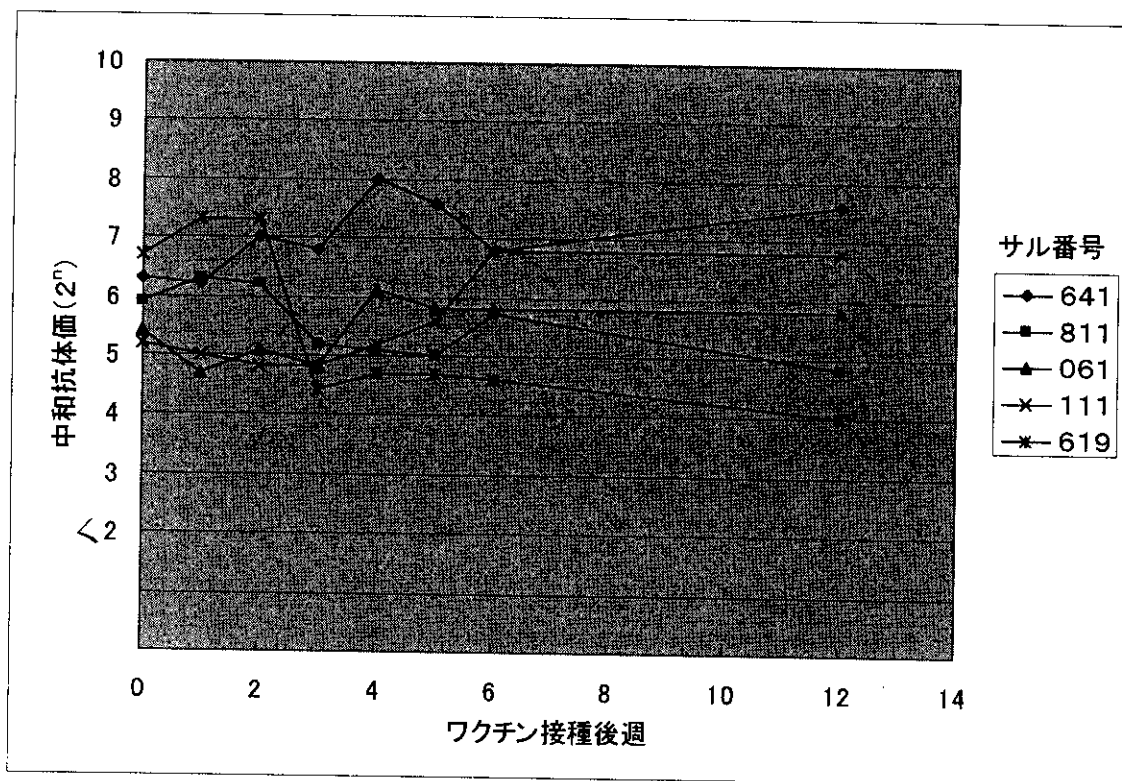
ワクチン 接種後週	経鼻接種サル番号					皮下接種サル番号				
	011	221	161	261	821	641	811	061	111	619
0	0.038	0.019	0.094	0.002	0.006	0.013	0.025	0.068	0.003	-0.037
1	0.025	0.016	0.161	-0.003	0.011	0.035	0.025	0.086	0.035	0.000
2	0.066	0.195	0.216	0.035	0.038	0.293	0.349	0.519	0.246	0.224
3	0.228	0.19	0.16	0.059	0.107	0.306	0.214	0.369	0.161	0.290
4	0.121	0.167	0.158	0.045	0.089	0.309	0.18	0.308	0.141	0.147
5	0.073	0.117	0.139	0.033	0.055	0.283	0.083	0.311	0.126	0.086
6	0.042	0.103	0.111	0.016	0.038	0.157	0.079	0.275	0.102	0.069
12	0.010	0.000	0.067	0.001	0.003	0.077	0.056	0.164	0.019	-0.052

ND, 試験していない。



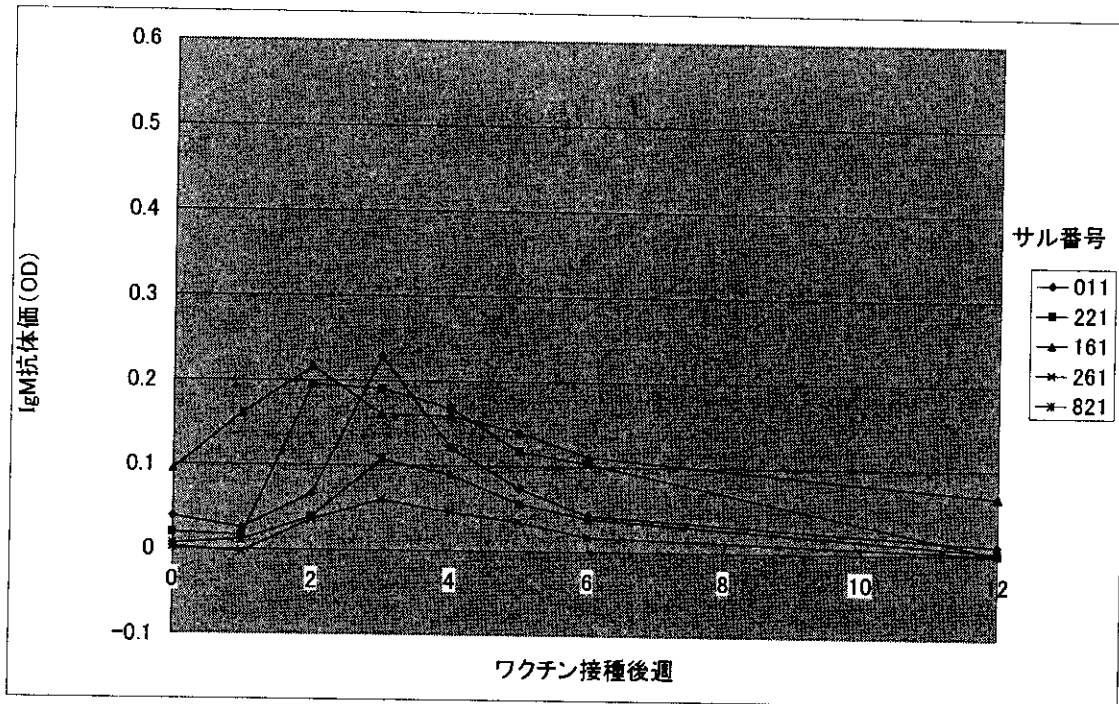


(1) 経鼻接種群

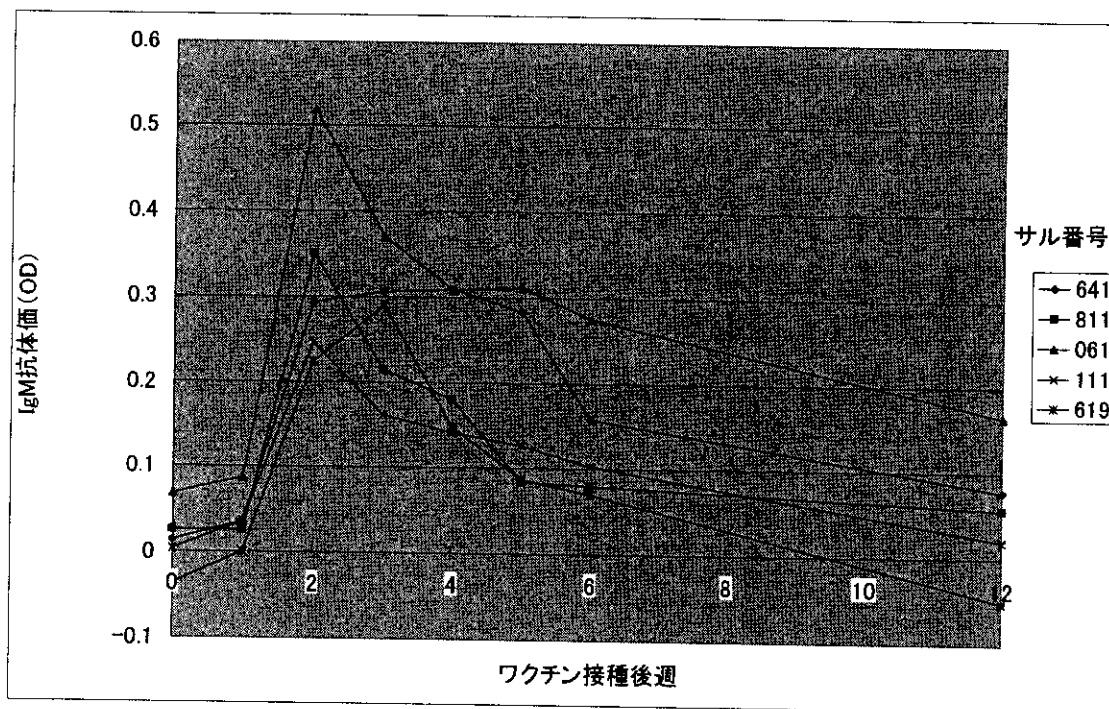


(2) 皮下接種群

図2 受動免疫存在下でのワクチン接種後中和抗体価の推移



(1) 経鼻接種群



(2) 皮下接種群

図3 受動免疫存在下でのワクチン接種後 IgM 抗体価の推移

表3 受動免疫存在下でのワクチン接種サル感染症防御試験—抗体反応

(1) 中和抗体

攻撃後週	経鼻接種群サル番号					皮下接種群サル番号					対照群サル番号	
	011	221	161	261	821	641	811	061	111	619	021	311
0	<2	6.1	4.2	2.9	3.8	7.6	4.8	5.8	6.8	4.0	<3	<3
1	6.7	>8	12.5	11.8	9.9	>8	>8	6.8	8.1	6.6	<3	<3
2	ND	ND	14.4	15.4	15.9	ND	ND	6.9	13.2	14.0	ND	ND
3	ND	ND	14.8	15.6	14.6	ND	ND	6.8	12.7	13.8	ND	ND
4	ND	ND	14.5	13.9	14.4	ND	ND	6.6	11.8	13.7	ND	ND

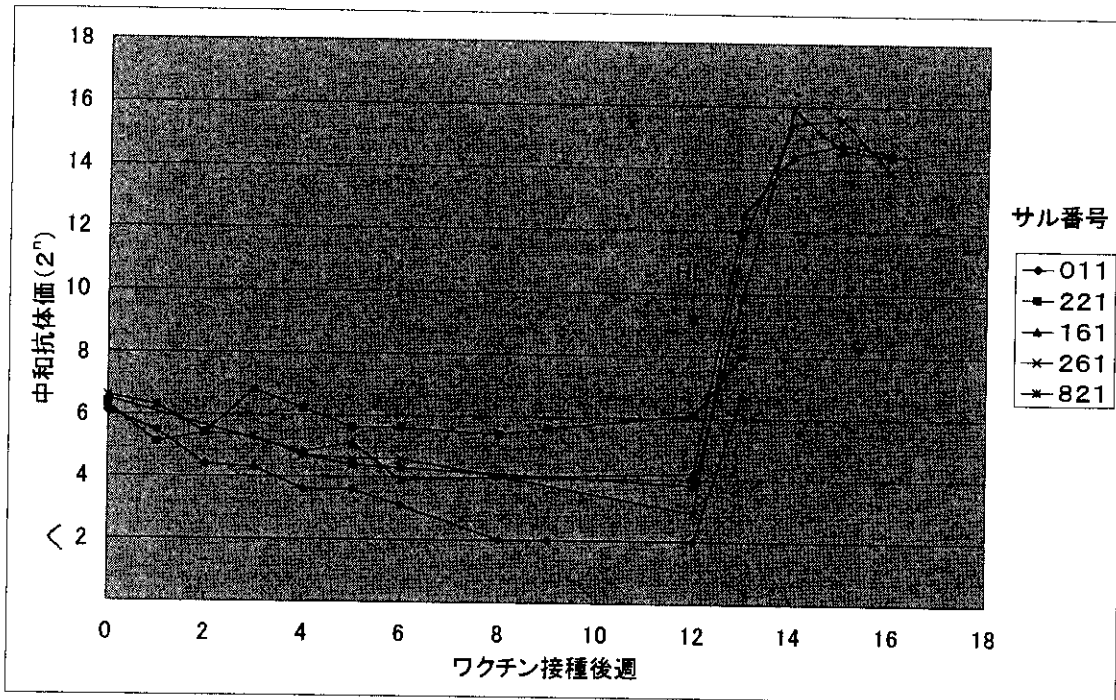
(2) HI 抗体

攻撃後週	経鼻接種群サル番号					皮下接種群サル番号					対照群サル番号	
	011	221	161	261	821	641	811	061	111	619	021	311
0	<3	4	<3	<3	<3	6	4	4	6	3	<3	<3
1	7	8	9	8	8	6	6	4	6	5	<3	<3
2	ND	ND	12	12	12	ND	ND	5	10	10	ND	ND
3	ND	ND	12	12	11	ND	ND	4	11	11	ND	ND
4	ND	ND	12	11	11	ND	ND	4	10	11	ND	ND

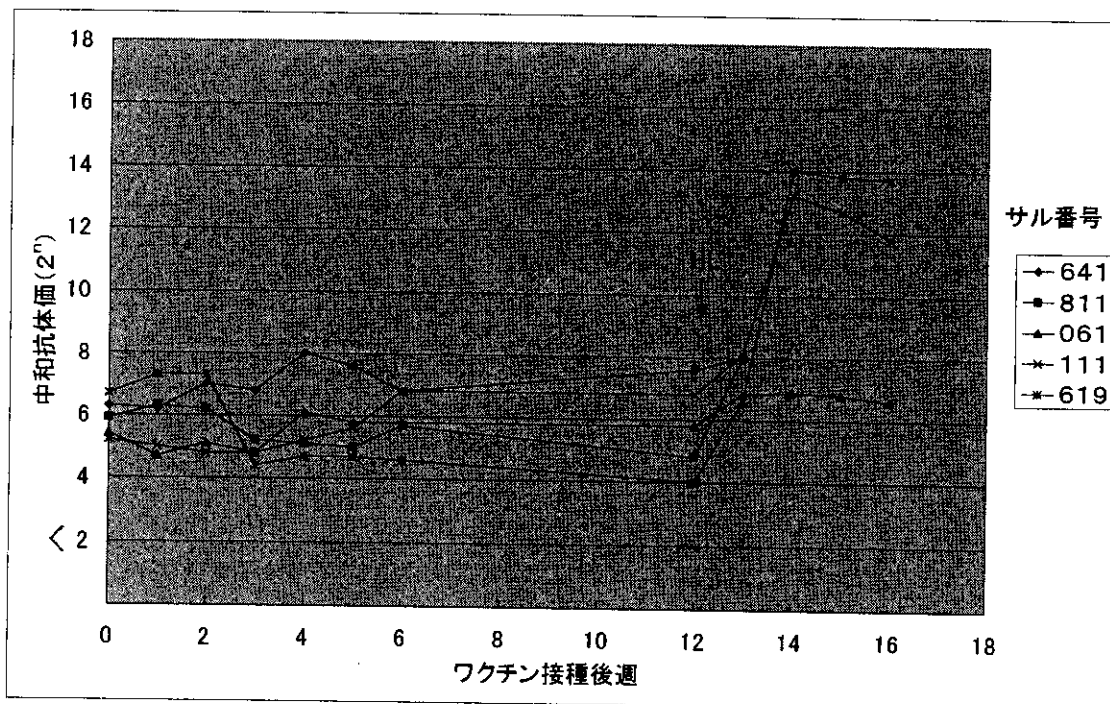
(3) IgM 抗体

攻撃後週	経鼻接種群サル番号					皮下接種群サル番号					対照群サル番号	
	011	221	161	261	821	641	811	061	111	619	021	311
0	0.010	0.000	0.067	0.001	0.003	0.077	0.056	0.164	0.019	-0.052	0.014	0.008
1	0.174	0.323	0.412	0.101	0.208	0.124	0.077	0.155	0.067	-0.038	0.013	0.012
2	ND	ND	0.452	0.194	0.602	ND	ND	0.186	0.065	0.068	ND	ND
3	ND	ND	0.378	0.148	0.459	ND	ND	0.181	0.069	0.061	ND	ND
4	ND	ND	0.283	0.109	0.353	ND	ND	0.164	0.058	0.084	ND	ND

ND, 試験していない。

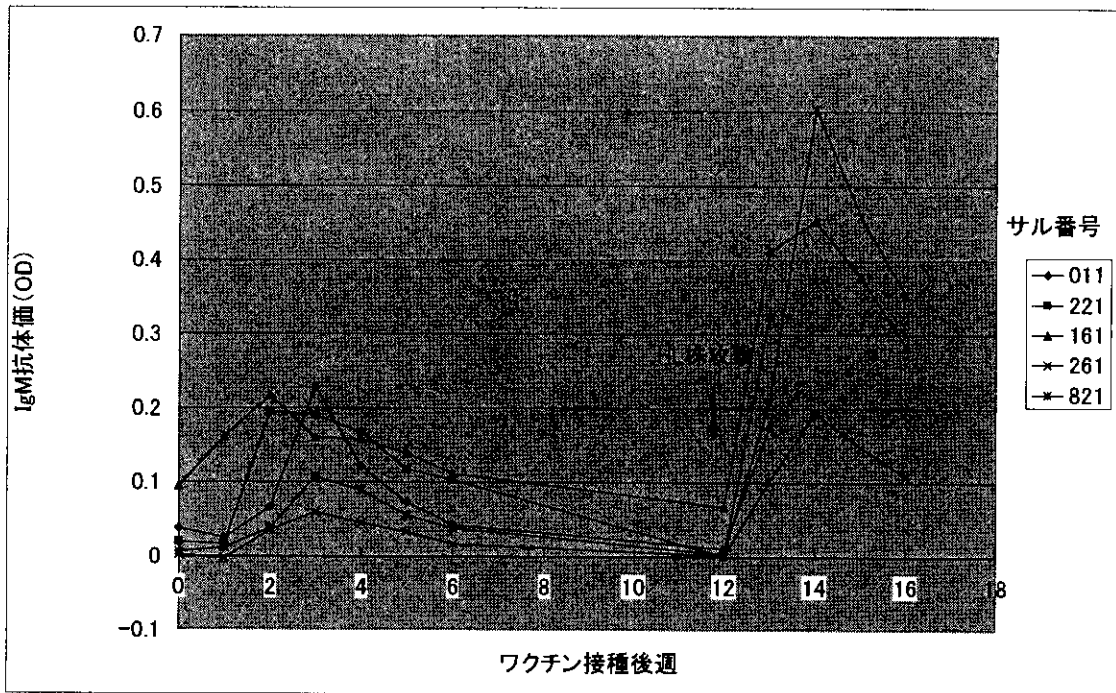


(1) 経鼻接種群

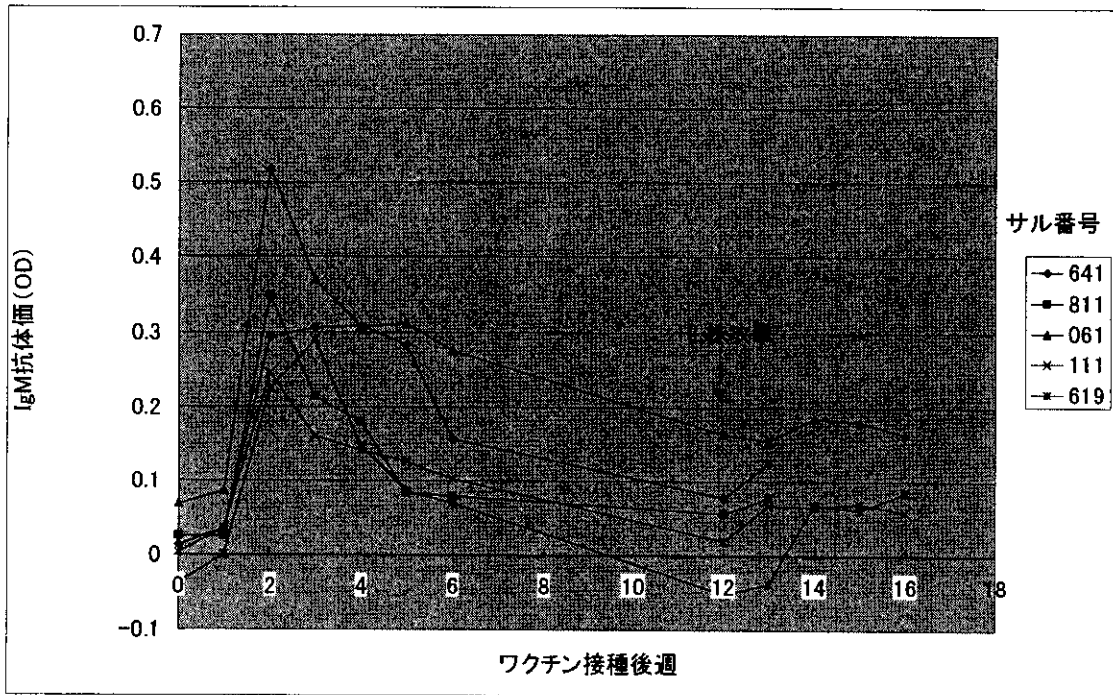


(2) 皮下接種群

図4 受動免疫存在下で TD97 株を経鼻または皮下接種し、12 週後に HL 株で攻撃した時の抗麻疹中和抗体反応



(1) 経鼻接種



(2) 皮下接種

図5 受動免疫存在下で TD97 株を経鼻または皮下接種し、12 週後に HL 株で攻撃した時の抗麻疹 IgM 抗体反応

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

2. 受動免疫存在下での経鼻麻疹ワクチンの感染防御試験—RT-PCRによるウイルス RNA の検出

分担研究者 木所 稔

（千葉県血清研究所）

研究要旨

開発途上国での乳児への麻疹ワクチン接種で問題となる，移行抗体存在下でのワクチンの有効性をみるため，カニクイザルに抗麻疹 IgG を投与後ワクチンを経鼻または皮下接種した後，HL 株で攻撃した。投与経路の違いによる有効性を比較検討するため，咽頭拭い液，末梢血リンパ球，各組織からのウイルス RNA 検出によりサル体内でのウイルスの動態を追跡した。その結果，経鼻及び皮下両接種方法により，HL 株の攻撃に対してウイルス増殖が抑制され，プライミングが成立していることが示唆された。皮下接種の方が接種経鼻よりも感染防御効果が高い傾向があった。

A. 研究目的

途上国においてはしかは依然として乳幼児の最も重要な感染症であり、感染症死亡原因の第一位となっている。また、麻疹が常在している途上国においては、麻疹罹患年齢が乳児期であるため、移行抗体を持つ乳児期早期に有効な麻疹ワクチンが求められている。皮下接種法とは異なり、経鼻接種法でのウイルスの一次増殖部位が鼻粘膜や咽頭等の局所であることがこれまでの成績から示唆されており、経鼻接種法は皮下接種法よりも移行抗体の影響を受けにくいと推察された。これを検証するため、受動免疫したカニクイザルにワクチンを経鼻および皮下接種し HL 株で攻撃後、RT-PCR 法で咽頭拭い液，末梢血リンパ球，各組織

から麻疹ウイルス RNA を検出することによりウイルスの動態を追跡し，ワクチンの効果を比較した。

B. 方法

1. 動物

新日本科学（株）で繁殖された抗麻疹抗体陰性の健康なカニクイザル，雌，3～4歳を使用した。1頭ずつアイソレーター中で飼育した。

2. ウイルス株

ワクチン株は千葉県血清研究所製造弱毒生麻疹ワクチン TD97 株を，強毒株は小船博士が B95a 細胞で分離した HL 株を用いた。

3. 働免疫用抗体

麻疹に自然感染し高い抗麻疹抗体価を示すカニクイザルの血清を硫酸分画により精製した。50%及び30%硫酸飽和を行った後1/100M 燐酸緩衝液 (pH7.6) で透析しγグロブリン画分を得た。これに含まれる抗麻疹 HI 抗体は $2^9$ 、中和抗体価は $2^{13.3}$ であった。

#### 4. 受働免疫及び感染防御試験

ワクチン非接種対照群としてサルγグロブリンを1.2ml/kg またはその2倍量カニクイザルにそれぞれ1頭ずつ筋肉内に接種した。また、ワクチン接種群として1.2ml/kg を10頭の筋肉内に接種し、その翌日翌日 TD97 株麻疹ワクチンを経鼻または皮下にそれぞれ5頭ずつのサルに $10^{5.2}$  TCID<sub>50</sub>/頭接種した。感染防御能をみるために、ワクチン接種後12週目にHL株で攻撃した ( $10^{5.2}$ TCID<sub>50</sub>/頭 経鼻接種)。対照群2頭も同様に攻撃した。それぞれの群の内2頭ずつ及び対照のサル2頭は攻撃後1週目に解剖した。残り3頭ずつは4週後解剖した。解剖は深麻酔下で実施した。

#### 5. 検体の採取

綿棒でサルの咽頭部を拭い、その綿球をRNA抽出液 (QIAGEN) 1mlの中に折り入れ咽頭拭い液を採取した。血液は鼠径静脈からEDTA-Na採血管に採血した。また、解剖時リンパ系組織 (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、胸腺、扁桃、脾臓) および鼻粘膜の小片をRT-PCR用に採取しドライアイスで瞬間凍結した後、 $-80^{\circ}\text{C}$ に保存した。

#### 6. RT-PCR

末梢血、咽頭拭い液及びリンパ系組織についてRT-PCR法にて麻疹ウイルスRNAの検出を行った。末梢血、咽頭拭い液及び組織中のウイルス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Z-Taq (宝酒造) を用いて行った。RT反応と1段階目のPCRはP遺伝子内の1807から2580番目の領域を、2段階目のPCRでは1973から2283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またはFMBIO II (宝酒造) によって目的バンドの検出を行った。

#### C. 結果

##### 1. 受働免疫存在下でのワクチン接種後ウイルスRNAの検出

経鼻接種群ではワクチン接種後1週目で5頭中2頭の咽頭拭い液からウイルスRNAが検出されたのに対し、皮下接種群では全く検出されなかった。

一方皮下接種群で接種後1週目の末梢血リンパ球からウイルスRNAが検出された (5頭中1頭) のに対し、経鼻接種群では末梢血リンパ球からウイルスRNAは全く検出されなかった。

##### 2. 感染防御試験

受働免疫存在下でワクチンを経鼻または皮下接種し、その12週後にHL株で攻撃

し、対照群及びワクチン接種した各群5頭中2頭は攻撃後1週で解剖し、残り3頭ずつを攻撃後4週で解剖し、それぞれの末梢リンパ球、咽頭拭い液、組織のウイルスRNAを検出した。

対照群では、攻撃後1週目の咽頭拭い液、末梢血リンパ球、及び採取した組織全て(鼻粘膜は未採取)からウイルスRNAが検出された。

経鼻接種群では、末梢血中のウイルスRNAは3頭中2頭で3週以降に陰性化し(表2(1))、咽頭拭い液からは、3頭中2頭で2週以降に検出されなくなった(表2(2))。

皮下接種群の場合、末梢血中のウイルスRNAは全頭で3週以降に陰性化し、うち1頭は攻撃後全くウイルスRNAが検出されなかった(表2(1))。咽頭拭い液においても、全頭で3週以降に陰性化し、うち1頭は攻撃後全くウイルスRNAが検出されなかった(表2(2))。組織からのウイルスRNAは対照群の場合2頭とも全ての組織(鼻粘膜は未実施)から検出されたのに対し、いずれのワクチン接種群においても2頭中1頭では検出される組織が減少していた(表2(3))。しかし、攻撃後4週目での結果では、皮下接種群の3頭中1頭で全くウイルスRNAが検出されず、他の2頭においても検出される組織が半分ほどに減少したのに対し、経鼻接種群では、検出されない組織があるものの、3頭とも殆どの組織からウイルスRNAが検出された。

#### D. 考察

移行抗体存在下での経鼻接種麻疹ワクチ

ンの有効性を検証する目的で、今年度の実験を実施した。その中で抗体価や病理組織学的検討に加え、実験動物体内でのウイルス増殖の動態を感度良く把握することにより、有効性の判定をより正確に行う目的でRT-PCRによる麻疹ウイルスRNAの検出を行った。

ワクチン接種後の咽頭拭い液及び末梢血中のワクチンウイルスRNAは、経鼻接種では咽頭拭い液から、皮下接種では末梢血からのみ検出された(表1(1)及び(2))。これらの結果は昨年までの結果と一致し、経鼻接種と皮下接種とで接種後のワクチンウイルスの増殖部位が異なることを示唆する結果であった。

HL株による攻撃後の末梢血及び咽頭拭い液中のウイルスRNAは経鼻接種、皮下接種いずれにおいても1時的に陽性になるものの、3週目以降に殆どの固体で陰性化した。昨年度までの成績から、麻疹ウイルスに対して免疫の無いサルにHL株を接種した場合、末梢血中のウイルスRNAは接種後5週まで検出されることが確認されていることから、完全ではないものの麻疹ワクチンによって免疫系が感作され、攻撃によるウイルス増殖を抑制したことを示唆している。

解剖時の組織からのウイルスRNA検出では、攻撃後1週の場合に経鼻接種群、皮下接種群ともに対照群と差が認められ、2頭中1頭で組織からのRNA検出が陰性であった。攻撃後4週目では皮下接種群で部分的または完全に陰性化したのに対し、経鼻接種群ではごく一部の組織で陰性化するか1頭では全ての組織から検出された。非免疫サルにHL株接種後4週目の組織から



麻疹ウイルス RNA を検出した昨年度の成績では今回調べた全ての組織から RNA が検出されていることから、皮下接種群では明らかなウイルス増殖抑制が認められる。また、経鼻接種群においても若干のウイルス増殖抑制が働いていると考えられる。

経鼻接種群と皮下接種群とで、攻撃後のウイルス増殖の程度を比較するために、末梢血および咽頭拭い液中にウイルス RNA が検出されたサンプリングポイントの合計（経時変化）および解剖時に RNA が検出された部位の合計（体内分布）を 個体ごとに算出し、各群ごとの平均値を出し、ウイルス増殖の程度を表すスコアとした（表 3）。経鼻接種群および皮下接種群のスコアの平均は経時変化では 4.3 および 2.0、体内分布では 7.0 および 3.0 でいずれも経鼻接種に比べ皮下接種でウイルス

増殖抑制の程度が大きかった。

#### 参考文献

- 1) 齊加志津子：厚生科学研究費補助金研究報告書 経鼻麻しんワクチン開発研究 平成10年度

#### E. 結論

HI 抗体価で 8 倍の受働免疫を持つサルに TD97 株を経鼻または皮下に接種した場合、完全ではないものの、ある程度の感染防御が成立した。また、皮下接種と経鼻接種では皮下接種のウイルス増殖抑制効果がより大きい傾向が認められた。

#### F. 研究発表

なし

表 1 受動免疫存在下でのワクチン接種後サル末梢血及び咽頭拭い液からのウイルス RNA の検出

(1) 末梢血

ワクチン 接種後週	経鼻接種サル番号					皮下接種サル番号				
	011	221	161	261	821	641	811	061	111	619
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
6	ND	ND	-	-	-	ND	ND	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(2) 咽頭拭い液

ワクチン 接種後週	経鼻接種サル番号					皮下接種サル番号				
	011	221	161	261	821	641	811	061	111	619
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
6	ND	ND	-	-	-	ND	ND	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表2 受動免疫存在下でのワクチン接種サルの感染防御試験

HL 株攻撃後の末梢血, 咽頭拭い液及び組織からのウイルス RNA の検出

(1) 末梢血

攻撃後週	経鼻接種群サル番号					皮下接種群サル番号					対照群サル番号	
	011	221	161	261	821	641	811	061	111	619	021	311
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
2	ND	ND	+	+	+	ND	ND	-	-	+	ND	ND
3	ND	ND	-	-	+	ND	ND	-	-	-	ND	ND
4	ND	ND	-	-	+	ND	ND	-	-	-	ND	ND

ND ; 未実施

(2) 咽頭拭い液

攻撃後週	経鼻接種群サル番号					皮下接種群サル番号					対照群サル番号	
	011	221	161	261	821	641	811	061	111	619	021	311
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
2	ND	ND	-	-	+	ND	ND	+	-	-	ND	ND
3	ND	ND	-	-	-	ND	ND	-	-	-	ND	ND
4	ND	ND	-	-	+	ND	ND	-	-	-	ND	ND

(3) 組織

組織名	経鼻接種群					皮下接種群					対照群	
	1週*		4週*			1週*		4週*			1週*	
	011	221	161	261	821	641	811	061	111	619	021	311
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	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+
胸腺	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+
扁桃	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
脾臓	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
鼻粘膜	ND	ND	-	-	+	-	-	-	-	-	ND	ND

\* ; 解剖時の攻撃後週数

表3 受動免疫存在下でのワクチン接種サルの感染防御試験  
HL株攻撃後のサル体内におけるウイルス増殖のスコア

検体	経鼻接種群			皮下接種群		
	161	261	821	061	111	619
末梢血*	2	2	4	0	1	2
咽頭拭い液*	1	1	3	2	0	1
合計	3	3	7	2	1	3
平均	4.3			2.0		
組織**	7	6	8	0	4	5
平均	7.0			3.0		

\* ; 末梢血および咽頭拭い液中にウイルス RNA が検出されたサンプリングポイント数

\*\* ; 解剖時に RNA が検出された部位の数