

- 2) 麻疹ウイルス HI 法におけるコントロールサーベイの結果は、中心値から  $\pm 1$  管差内であった。
- 3) ムンプスウイルス HI 法は、中心値から  $\pm 1$  管差内であった。
- 4) 風疹ウイルス HI 法は、 $\pm 1$  管差内であった。
- 5) EBV VCA IgG FA 法は、中心値から  $\pm 1$  管差内であった。
- 6) EBV EBNA FA 法は、 $\pm 1$  管差内であった。

【考案】ウイルス技術連絡会では、年度毎に重要と思われる検査法についてコントロールサーベイを行い、方法の統一化について検討している。しかし、ウイルス抗体検査法では、標準物質がないこと、明確な標準法がないことなどが問題となっている。インフルエンザウイルス HI 法については、使用する血球がヒト O 型、ニワトリ、七面鳥など幾つかあり、今後どのように統一していくか、あるいは、検査結果さえ同じであればこのまま行なっていくのか等の問題がある。また EIA 法については、試薬メーカーから市販されているキットによって表示法が異なることで、臨床側において結果解釈するうえで混乱が生じたりしている。IgM 間接法では、血中のリウマチ因子の影響を除去するために前処理が必要であったり、IgM 捕捉法では、希釈定量性に欠けるきらいがあるという問題がある。CF 法では免疫血清とヒト血清において box titration の結果が、感染時期の違いにより差異が生じるなどの問題がある。実際には、検査センターごとにそれぞれの抗体検査方法は、若干異なっているのが実状ではあるが、コントロールサーベイを行なうことにより検査結果については、ほぼ一致した結果が得られるようになった。今後もウイルス検査法における種々の問題を検討していくつもりである。また昨今、インフォームドコンセントなしに目的とする検査以外の検査を実施することを防止することから、プール血清の作製すら禁止する動きがあるが、ウイルス抗体検査の精度を保つうえでヒト血清の使用は、必要不可欠であると考えられることから、諸先生方にご討議、ご結論頂ければ幸いです。

## BCG が DPT ワクチンに及ぼす影響の検討

高橋 宜聖、阪口 雅弘、竹森 利忠 (国立感染症研究所 免疫部)  
井上 栄 (国立感染症研究所 感染症情報センター)

### [目的]

幼児期におけるBCG接種は、様々な抗原に対する免疫応答を修飾し、ヒト、マウスモデルの双方においてアレルギーやインスリン依存性糖尿病の発症頻度を低下させることが報告されている。このことは、幼児期におけるBCG接種が同時期に接種される他のワクチンの免疫応答に何らかの影響を及ぼし、予防接種の効果に変化をきたす可能性を強く示唆する。

BCGと比較的近い時期に接種されるDPTワクチンは、毒素の中和抗体を誘導することによりワクチン効果を発現する。しかしこれまでのところ、BCGがDPTにより誘導される抗体産生応答にどのような影響を及ぼすのか明らかにされてない。そこで本研究では、BCGの存在下でDPTワクチンを接種した場合、百日咳 (P) 毒素に対する抗体産生応答がどのように修飾されるのかマウスモデルを用い検討した。さらに、P毒素に対するT細胞のサイトカイン産生に与える影響も併せて検討し、BCGの効果がT細胞サイトカイン産生パターンの修飾によるものかどうか検討した。

### [材料と方法]

マウス：新生児のBALB/cマウスを使用した。

ワクチン接種：生後1週のマウスにBCG ( $2 \times 10^5$ 、 $10^6$  CFU) とともに沈降精製DPTワクチン (20  $\mu$ g 武田薬品) を腹腔内投与した。コントロール群としてDPTワクチンのみを投与したものを設けた。投与6週間後に各マウスから採血し、血中のP毒素に対するIgG1、IgG2a、IgE抗体価をELISA法により測定した。さらに脾臓由来CD4<sup>+</sup>T細胞をin vitroにおいてP毒素で刺激し、培養上清中に産生されるIL-4とIFN- $\gamma$ の量を測定した。

### [結果]

BCGを投与すると、P毒素に対するIgG抗体産生応答が有意に増加するのに対し、IgE抗体産生応答は有意に低下した (Figure 1)。さらにIgGサブクラスごとに解析を行ったところ、IgG抗体産生の増加には、IgG2aサブクラスの増加が関与していた (Figure 1)。最後にP毒素特異的なT細胞のIL-4とIFN- $\gamma$ の産生量を調べたところ、BCGの投与によりIFN- $\gamma$ の産生量が2倍以上増加する一方でIL-4の産生量が4分の1程度に低下していた (Figure 2)。

## [考察]

DPTワクチンに含まれるP毒素とアラムには、IgE抗体産生応答を増強するアジュバント活性があるため、幼児期での複数回の接種がアレルギー誘発の引き金となる可能性が指摘されている。今回、マウスモデルを用いてBCGがDPTワクチンに及ぼす影響を調べたところ、P毒素に対するIgG抗体産生応答を増強する一方、IgE抗体産生応答を抑制することが明らかとなった。以上の結果は、BCGがDPTによるワクチン効果を抑制することなく、アレルギー誘発の危険性を低減させる可能性のあることを示唆するものである。今後、BCGとDPTワクチンの接種間隔、接種量などの条件を、人で実際に行われている条件に近づけた際に同様な効果が現れるかどうか検討を進める予定である。

Figure 1. BCGがP毒素特異的抗体産生応答に与える影響

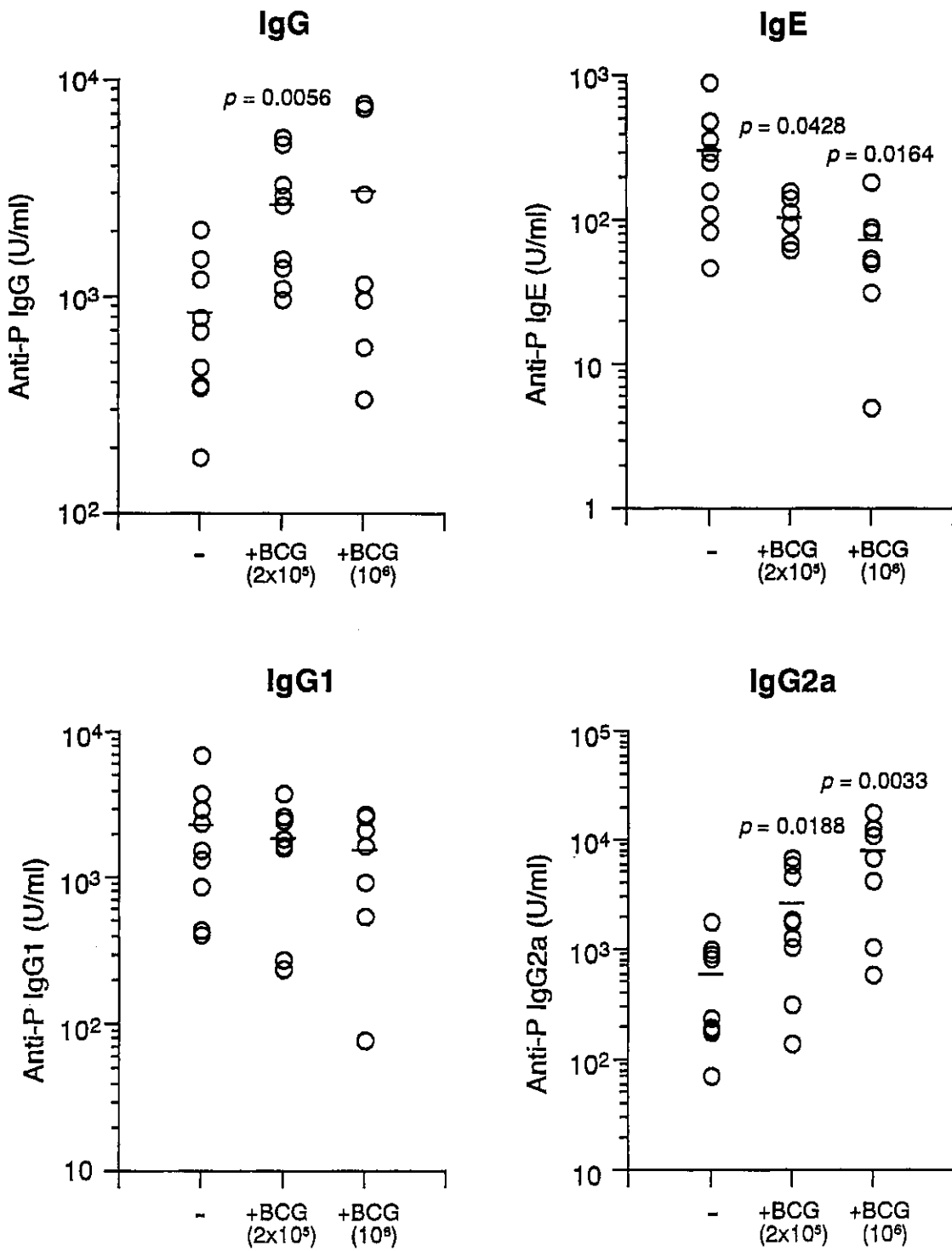
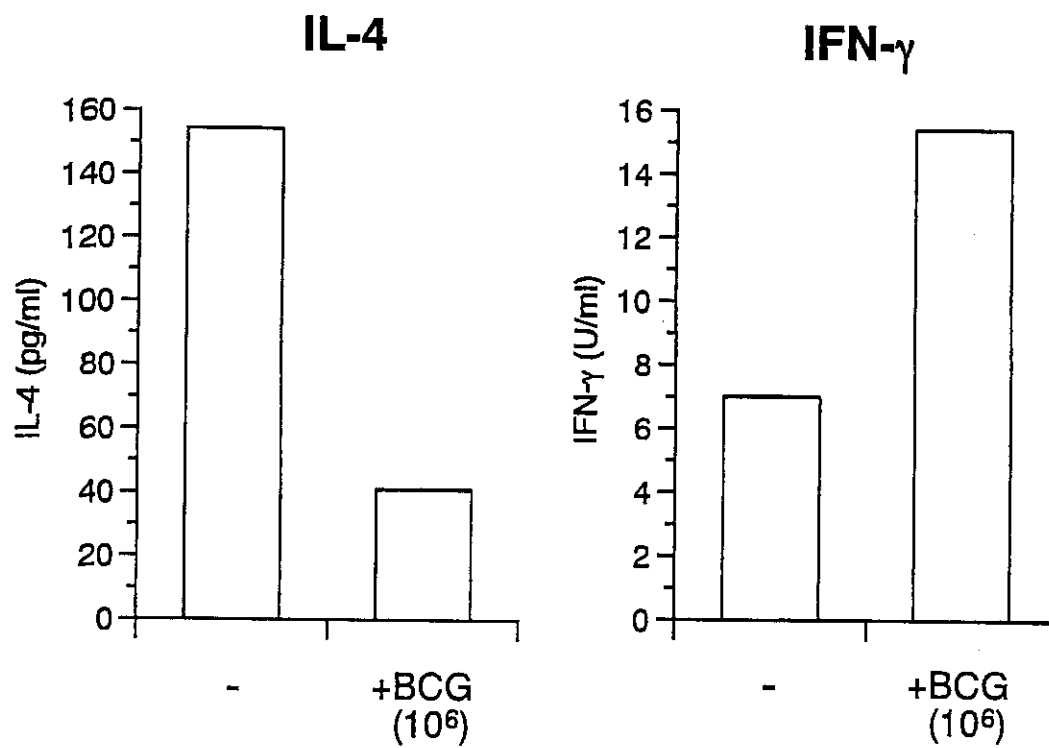


Figure 2. BCGがT細胞のサイトカイン産生に与える影響



# 1994年から1996年における 日本脳炎ワクチン接種時の全身性即時型アレルギー反応例

阪口 雅弘 (国立感染症研究所 免疫部)  
井上 栄 (感染症情報センター)

## 【目的】

日本において1993年から生ワクチン接種後、アナフィラキシーを起こす例が認められ、その原因アレルゲンが安定剤としてワクチンに含まれるゼラチンであることが分かった[1-5]。1994年から1996年までの3年間の生ワクチン接種後のアレルギー反応の発生状況について調べたところ、その副反応発生数は1994年から増加を続け、最も発生が多かった1996年度においてゼラチンを含む生ワクチン接種後のアナフィラキシーの発生率を推定したところ、100万doseあたりそれぞれ麻疹8.13、ムンプス7.80、風疹8.33、水痘18.8であった[6]。しかし、日脳ワクチン接種後、アナフィラキシーを含む即時型および非即時型アレルギー副反応については報告されていたが[7-9]、この時期の発生率についてはこれまで調べられていなかった。今回、1994年から1996年までの3年間のワクチン接種後のアレルギー反応の発生状況について調べた。

## 【方法】

患者：1994年4月から1997年3月まで3年間に日脳ワクチン接種後のアナフィラキシーを含む全身性即時型副反応(1時間以内の副反応)を起こした患者で、国立感染症研究所およびワクチンメーカーにその血清検体を送られてきた19例(3才から14才、平均年齢5才5ヶ月)について検討した。全身性即時型副反応は大きく2つに分類した。1つは麻疹を起こした症例でゼラチン特異IgE抗体が認められた[7]。これらのアレルギー反応の原因アレルゲンは、ワクチンに含まれるゼラチンであると考えられた。他方は麻疹等の皮膚反応を伴わない副反応(アナフィラキシー)を起こした症例でゼラチン特異IgE抗体は検出されなかった[8]。特異的IgE抗体の測定：患者血清中のゼラチン特異IgE抗体の測定はCAP法にて行った[2]。

## 【結果および考察】

1994年には全身性即時型副反応は認められなかったが、1995年に麻疹等の皮膚反応を伴わない副反応(アナフィラキシー)を起こした症例がはじめて2例認められた(表1)。1996年に8例が認められ、その発生率は100万doseあたり2.09であった。これら10例(平均年齢6才7ヶ月)すべてゼラチン特異IgE抗体が認められなかった。現在のところ、この副反応の起こるメカニズムについては不明である。

同様に1995年に初めて日脳ワクチン接種後、麻疹を起こした症例が認められた。1996年には8例が報告され、その発生率は100万doseあたり2.09であった。これら9例中(平均年齢4才1ヶ月)、7例においてゼラチン特異IgE抗体が認められた。これらの副反応の多くは、アレルゲンをゼラチンとしたゼラチンアレルギーがその原因と考えられた。

1994年から1996年の3年間に日脳ワクチン接種後、19例に即時型全身アレルギー反応が認められた。アナフィラキシーの発生率は、生ワクチンに比べ、低かった。また、生ワクチンによる全身性即時型アレルギー反応が93年から認められたが、日脳ワクチンにおいては1995年から初めて認められるようになった。この遅れは、日脳ワクチンの接種年齢が麻疹ワクチンの接種年齢に比べ、高いからだと考えられた。

【文献】

1. 小倉英郎, 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 7, 115-118, 1995
2. 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 96, 563-565, 1995
3. 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 98, 1058-1061, 1996
4. 山中 樹, 綿谷靖彦, 熊谷卓司, 千葉峻三, 大野典子, 斎藤三郎, 菅原由人, 栗本文彦, 阪口雅弘, 井上 栄: 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 3795, 37-41, 1997.
5. Sakaguchi M, Yamanaka T, Ikeda K, Sano Y, Fujita H, Miura T, Inouye S: Systemic immediate-type reactions including anaphylaxis to gelatin in varicella vaccine. J Allergy Clin Immunol 99, 263-264, 1997
6. Sakaguchi M, Nakayama T, Fujita H, Toda M, Inouye S: Minimum estimated incidence in Japan of anaphylaxis to live virus vaccines including gelatin. Vaccine 19, 431-435, 2000
7. Sakaguchi M, Yoshida M, Kuroda W, Harayama O, Inouye S: Systemic immediate-type reactions including anaphylaxis to gelatin in Japanese encephalitis vaccine. Vaccine 15, 121-122, 1997
8. Sakaguchi M, Inouye S: Two patterns of systemic immediate-type reactions to Japanese encephalitis vaccines. Vaccine 16, 68-69, 1998
9. Sakaguchi, M., Miyazawa, H, Inouye, S.: Specific IgE and IgG to gelatin in children with systemic cutaneous reactions to Japanese encephalitis vaccines. Allergy, in press.

Table 1 Incidences of systemic immediate-type reactions to JE vaccines in vaccinees

| Year | Doses<br>(in millions) | Anaphylaxis without<br>Cutaneous symptoms |                   | Cutaneous and/or<br>respiratory symptoms |                   |
|------|------------------------|---|-------------------|--|-------------------|
|      |                        | Incidence                                 | Rate <sup>a</sup> | Incidence                                | Rate <sup>a</sup> |
| 1994 | 4.76                   | 0   | 0                 | 0  | 0                 |
| 1995 | 3.42                   | 2(0) <sup>b</sup>                         | 0.585             | 1(1)                                     | 0.292             |
| 1996 | 3.83                   | 8(0)                                      | 2.09              | 8(6)                                     | 2.09              |

<sup>a</sup> The number of case per million doses of JE vaccine

<sup>b</sup> Number in parentheses is the number of children with anti-gelatin IgE

# ゼラチン(I型コラーゲン)によるアレルギー反応の抗原部位の検討

阪口 雅弘 (国立感染症研究所 免疫部)

井上 栄 (感染症情報センター)

堀 久江 (東京医科歯科大学 難治疾患研究所)

## 【目的】

生ワクチン接種後に副反応としてアナフィラキシーを起こす例があり、これらの子供の血清中にゼラチンに対するIgE抗体が高頻度に存在することが分かった[1-3]。また、ゼラチンが含まれている水痘、日本脳炎ワクチンに対して全身性即時型アレルギー反応を起こした症例においてもゼラチン特異IgE抗体保有例が多く認められた[4,5]。さらにゼラチンを含む食品に対して全身性即時型アレルギー反応を起こした症例も認められた[3]。最近、このゼラチンの主要なアレルゲンはウシI型コラーゲン $\alpha$ 2鎖であることが分かった[6]。今研究においては、より安全なゼラチンを開発するため、そのI型コラーゲン $\alpha$ 2鎖をクローニングして[7]、そのIgE抗体の結合部位について検討したので報告する。

## 【材料と方法】

試料：安定剤としてゼラチンを含んでいるワクチン接種後、アナフィラキシーを含む即時型アレルギー反応を惹起した小児15例から得られた血清およびゼラチン含有の菓子(グミ)を食べた後即時型アレルギー反応を惹起した小児1例から得られた血清。

I型コラーゲンおよび組み換え蛋白の作成：I型コラーゲンはウシ皮膚より抽出、食塩分画法にて精製し、100℃、5分間熱処理したものを抗原として用いた。組み換え蛋白はウシI型コラーゲン $\alpha$ 2鎖cDNAのフラグメント(アミノ酸残基として約200残基)をバクテリア発現ベクター(pRSET, His-Tag)に組み換え、融合蛋白を作製し、ニッケル吸着カラムで精製した(Fig 1)。

IgE抗体の測定：コラーゲンならびに組み換え蛋白質に対するIgE抗体は蛍光ELISAを用いて測定した[8]。

## 【結果】

ウシ $\alpha$ 2鎖100kDa(約1000アミノ酸残基)に対応する5個の組み換え蛋白, I(1<sup>N</sup>~212), II(213~418), III(419~662), IV(663~890), V(882~999)を用いて患者血清との反応性を検索した(Fig 1)。患者血清16例中14例がIIIに、5例がIIに、3例がVに陽性反応を示した(Table 1)。さらに組み換え蛋白III(419~662)について3つの部位, IIIa(418~510), IIIb(491~588), IIIc(572~662)に対応するcNA fragmentを作成し、融合蛋白を発現、精製した(Fig 1)。これら融合蛋白に対する反応性を調べたところ、III(419~662)に陽性の14検体はIIIaに反応し、抗原部位は419~510の約100残基に局在することが明らかとなった(Fig 2)。ただし症例4でIIIbにも強い反応性が見とめられる例もあり、抗原部位は複数あることが示唆された。これらの蛋白をCNBr、Lys-endopeptidase処理しても抗原性に変化は認められないことから、メチオニンおよびリジン残基は抗原部位に含まれないと推測される。

## 【考察】

I型コラーゲンは特徴的な(Gly-Pro-X)の繰り返し配列をしている分子量100kDaの $\alpha$ 1鎖2本と $\alpha$ 2鎖1本が三重ラセンを構成しており、コラーゲンに特異的なアミノ酸であるHydroxyprolin, Hydroxylysinがあり、コラーゲンの高次構造の安定化に寄与している。これらの構造は種をこえて広く保存されており、ウシとヒトとの相同性は $\alpha$ 1鎖で97%、 $\alpha$ 2鎖92%



と高く、コラーゲンの免疫原性は非常に低いと考えられてきた。しかし、近年ゼラチンアレルギーの抗原物質がI型コラーゲン、さらにウシ $\alpha 2$ 鎖にあることを解明した。今回さらに $\alpha 2$ 鎖の部分組み換え蛋白を作成し、その抗原性を調べたところ、IIIa(418~510)100アミノ酸配列上に主要なIgE抗体の結合部位が存在することが明らかになった(Fig 3)。低アレルギー性のゼラチン作成には、これらの抗原性の部位を除去する必要で、そのためにはさらに詳細なエピトープ同定が必要とされ、現在IIIaの細部アミノ酸配列の組み換え蛋白を作成、検討中である。

【文献】

- 1 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.
- 2 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* 96:563-5,1995
- 3 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* 98: 1058-61, 1996
- 4 Sakaguchi M, Yamanaka T, Ikeda K, Sano Y, Fujita H, Miura T, Inouye S.: Systemic immediate-type reactions including anaphylaxis to gelatin in varicella vaccine. *J Allergy Clin Immunol* 99: 263-264, 1997
- 5 Sakaguchi M, Yoshida M, Kuroda W, Harayama O, Inouye S: Systemic immediate-type reactions including anaphylaxis to gelatin in Japanese encephalitis vaccine. *Vaccine* 15: 121-2, 1997
- 6 Sakaguchi M, Hori H, Hattori S, Irie S, Imai A, Yanagida M, Miyazawa H, Toda M, Inouye S.: IgE reactivity to  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  chains of bovine type I collagen in children with bovine gelatin allergy. *J Allergy Clin Immunol* 104: 695-699, 1999.
- 7 Shirai T, Hattori S, Sakaguchi M, Inouye S, Kimura A, Ebihara T, Irie S, Nagai Y, Hori H. : The complete cDNA coding sequence for the bovine pro  $\alpha 2(I)$  chain of type I procollagen. *Matrix Biology* 17: 85-8, 1998
- 8 Sakaguchi M, Hori H, Ebihara T, Irie S, Yanagida M, Inouye S: Response of IgE in bovine gelatin-sensitive children to gelatins from various animal. *Immunology* 96,286-290, 2000

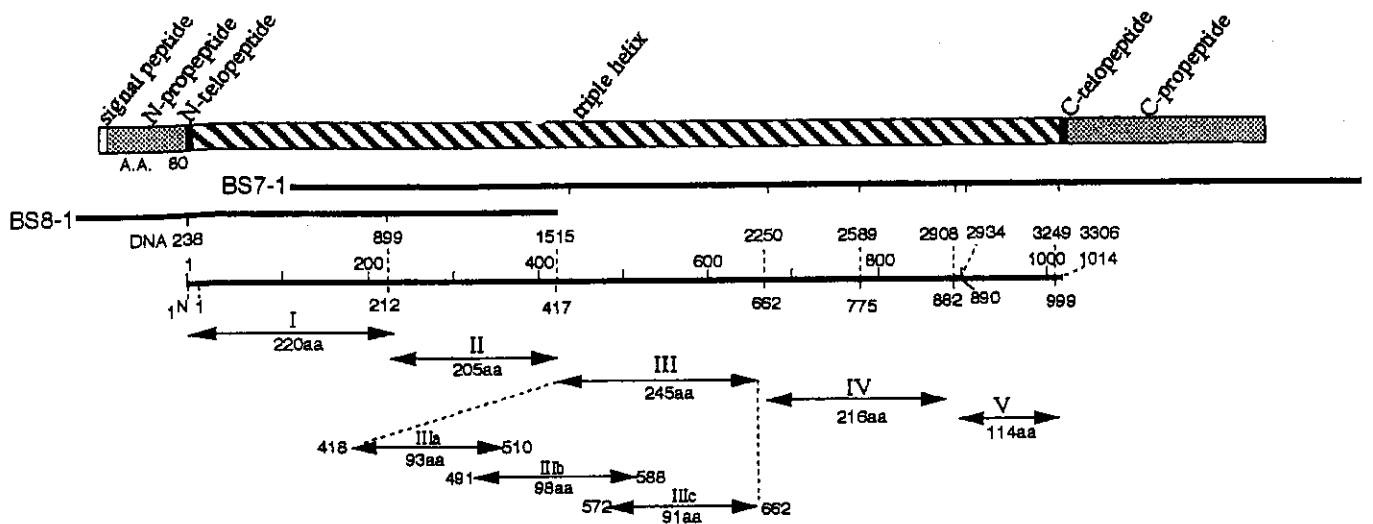


Figure 1. A schematic representation of the collagen  $\alpha 2(I)$  chain and its recombinant proteins. Recombinant proteins I, II, III, IIIa, IIIb, IIIc, IV and V are prepared from bacterial expression vector pRSET.

Table 1. Reactivity of anti-gelatin IgE to recombinant proteins for  $\alpha 2$  chain of type I collagen

| Child no. | Type I collagen<br>(FU) | Recombinant proteins of $\alpha 2$ chain |               |                |               |              |
|-----------|-------------------------|--|---------------|----------------|---------------|--------------|
|           |                         | I<br>1N-212                              | II<br>213-417 | III<br>418-662 | IV<br>663-890 | V<br>882-999 |
| 1         | 2600                    | -  | -             | +              | ++            | -            |
| 2         | 1019                    | -  | +++           | ++             | -             | -            |
| 3         | 2800                    | -  | -             | +++            | -             | ±            |
| 4         | 1773                    | -  | ±             | +++            | -             | ±            |
| 5         | 868                     | -  | ±             | +++            | -             | ±            |
| 6         | 2116                    | -  | -             | +++            | ±             | ±            |
| 7         | 772                     | -  | +++           | ±              | +             | +++          |
| 8         | 1494                    | -  | -             | +++            | -             | -            |
| 9         | 814                     | -  | +             | +              | -             | -            |
| 10        | 2179                    | -  | ++            | -              | -             | -            |
| 11        | 834                     | -  | -             | +++            | +             | -            |
| 12        | 1947                    | -  | -             | +              | ±             | -            |
| 13        | 1833                    | -  | -             | +++            | -             | -            |
| 14        | 1152                    | -  | +             | +              | ±             | ±            |
| 15        | 2455                    | -  | ±             | +++            | -             | -            |
| 16        | 1820                    | -  | +             | +              | +             | ±            |

The results are expressed as a percentage of the binding of IgE to each recombinant proteins compared with that to bovine type I collagen: , +++  $\geq 75\%$ , 75% > ++  $\geq 50\%$ , 50% > +  $\geq 25\%$ , 25% > ±  $\geq 5\%$ , - < 5%

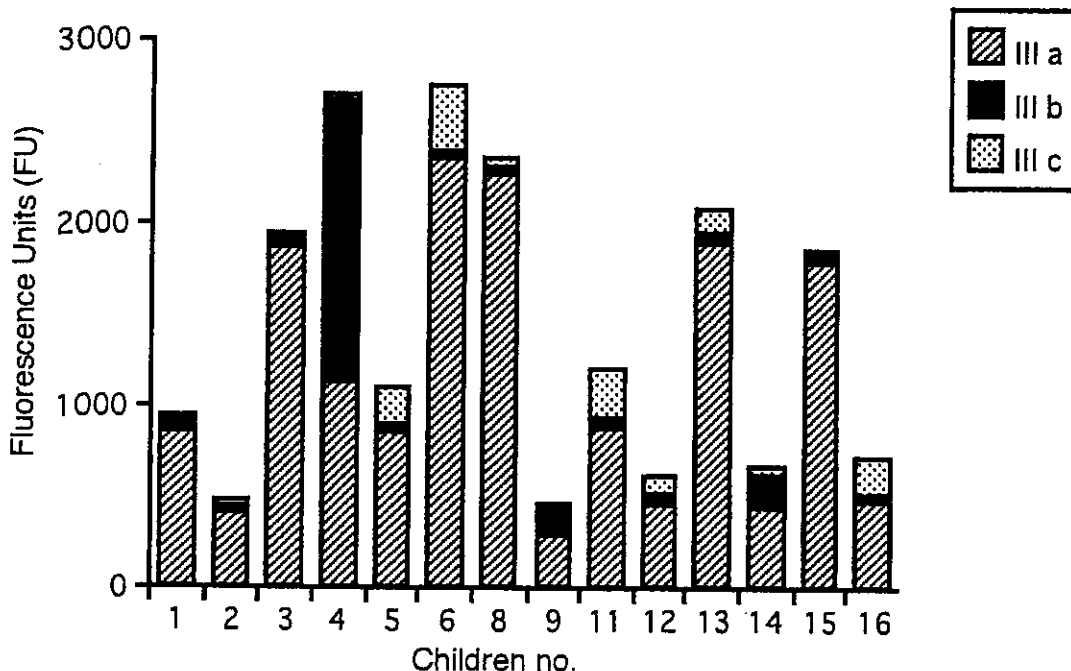


Figure 2. Reactivity of the sera from children with systemic allergic reaction to recombinant proteins of bovine  $\alpha 2$  (I) chain.  
Amino acid sequence: III a: 418-510, IIIb:491-588, IIIc: 572-662

Figure 3. Amino acid sequence in bovine  $\alpha 2$  chain of putative epitope for specific IgE antibody from children with anaphylaxis to vaccines

|        |            |        |         |        |        |        |        |            |        |         |     |
|--------|------------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|------------|--------|---------|-----|
| Bovine | SGPVGPPGNP | GANGLP | GAKG    | AAGLPG | VAGA   | PGLPGR | GIP    | GPVGAAGATG | 250    |         |     |
| Human  |            | T      |         |        |        |        |        | P T        |        |         |     |
| Bovine | ARGLVGE    | PGP    | AGSKGES | GNK    | GEPGAV | QPG    | PPGPS  | GEEGK      | RGSTGE | IGPA    | 300 |
| Human  |            |        |         |        | SA PQ  |        |        |            | PN A S |         |     |
| Bovine | GPPGPP     | GLRG   | NPGSR   | GLPGA  | DGRAG  | VMGPA  | GSRGAT | GPAG       | VRGPN  | GDSGR   | 350 |
| Human  |            | S      |         |        |        |        | S      |            |        | A       |     |
| Bovine | PGEPGL     | MGPR   | GFPGSP  | GNIG   | PAGKE  | GPVGL  | PGIDGR | PGPI       | GPAGAR | GEPG    | 400 |
| Human  |            | L      |         |        |        |        |        |            |        | V       |     |
| Bovine | NIGFPG     | PKGP   | SGDPG   | KAGEK  | GHAGL  | AGARG  | APGPD  | GNGA       | QGPPG  | LQGVQ   | 450 |
| Human  |            | T      |         |        |        |        |        |            |        | P       |     |
| Bovine | GGKGEQ     | GPAG   | PPGFQ   | GLPGP  | ACTAGE | ACKP   | GERGEP | GEEG       | EPG    | PAGARGE | 500 |
| Human  |            |        |         |        | S P V  |        | LH     |            |        | P       |     |
| Bovine | RGPPGE     | SGAA   | GPTGP   | IGSRG  | PSGPP  | PGDGN  | KGEPG  | VVGAP      | GTAGP  | SGPSG   | 550 |
| Human  |            |        |         |        |        |        |        |            |        | V       |     |
| Bovine | LPGERG     | AAGI   | PGGKGE  | KGET   | GLRGD  | IGSPG  | RDGARG | APGA       | IGAPG  | PAGAN   | 600 |
| Human  |            |        |         |        | P      | E N    |        | H V        |        | T       |     |
| Bovine | GDRGEA     | GPAG   | PAGPR   | GRGS   | PGERGE | VGPA   | GPNGF  | FAGPAG     | AAGQP  | GAKGE   | 650 |
| Human  |            | A      |         |        |        |        |        |            |        |         |     |
| Bovine | RGTKGP     | KGEN   | GPVGP   | TGPVG  | AAGPS  | GPNGP  | PGPAG  | SRGDG      | GPPGAT | GFPG    | 700 |
| Human  | G          |        | V       |        |        | A      |        |            |        | M       |     |

⋯⋯⋯ Amino acid sequence of putative epitope

## 麻疹患者と麻疹生ワクチン接種者における免疫抑制病態の比較解析

岡田 晴恵、佐藤 威、田代 真人（国立感染症研ウイルス製剤部）  
岡部 信彦、井上 栄（同感染症情報センター） 片山 章（片山こどもクリニック）  
七条孝三郎（七条小児病院） 樋口 薫（樋口小児科医院）  
土屋 喬義（土屋小児病院） 高山 直秀（都立駒込病院小児科）  
安倍 隆、武内 可尚（川崎市立川崎病院小児科）

### 1. 研究目的

麻疹患者では一過性に強い免疫不全が誘導される。この免疫抑制の機序として、我々は非感染リンパ球の大量死と、骨髄・リンパ節におけるリンパ球の増殖・成熟抑制が主因であることを報告してきた。このリンパ球のアポトーシスは高度のリンパ球減少症を誘導し、強い免疫抑制を引き起こす。一方、ワクチン接種者ではこのような重症な免疫不全は起こらない。この麻疹におけるリンパ球減少機序および生ワクチンの弱毒化機構の解明と安全性の検証を目的として、麻疹患者とワクチン接種者について、末梢血リンパ球におけるアポトーシス関連分子の発現と血漿サイトカインの変動等を経時的に比較検討した。

### 2. 材料と方法

1～2歳の麻疹患者147名の末梢血201検体と同年齢の生ワクチン（AIK-C, Schwarz FF）接種者32名の58検体を用いた。経日的に採取した末梢血からPBMCと血漿を分離し、リンパ球サブセット別に感染細胞数およびアポトーシス・免疫応答関連因子の発現をフローサイトメトリーで解析した。また血漿サイトカインをELISAで、麻疹IgGとIgM抗体をPA法で定量し、臨床症状と併せて検討した。

### 3. 結果

3-1) 麻疹患者では発疹出現数日前よりリンパ球の減少が認められ、第1病日にはすべてのサブセットが正常値の10%以下にまで減少した（図1 a,c,e,g）。その後10日以内にT細胞数は回復したが、B細胞は長期に亘って減少したままであった（図1 g）。一方、ワクチン接種者では接種後7日目にすべてのサブセットが正常値下限まで一過性に減少したのみであった（図1 b,d,f,h）。

3-2) 麻疹患者では、発疹7日前からTRAIL系を介する広範な非感染リンパ球のアポトーシスが起り、発疹1～2日前からFasを介するアポトーシスに移行した（図2 a）。この末梢血からPBMCを分離し、RPMI培地で24時間培養して自然誘導性アポトーシス誘導率を解析した結果、野外ウイルス感染の感染を受けた麻疹患者では、TRAIL及びFasの発現時期に一致してアポトーシスが強く誘導された（図2 c）。一方、ワクチン接種児では、TRAIL及びFasの発現は認められず（図2 b）、アポトーシスの誘導も見られなかった（図2 d）。

3-3) 麻疹患者では、発疹出現時におけるリンパ球数の減少に対して、NK細胞の代償的増加が認められたが、何れも10日以内に回復した。この間の血漿サイトカインの変動を解析した結果、INF- $\gamma$ とその関連サイトカインであるIL18、IL10の著明な上昇が見られ、その他、可溶性FasおよびFasLの上昇が認められた。また、IL12の減少は認められなかった。一方、麻疹ワクチン接種児の1/3では、接種7日目に起こるリンパ球の軽度減少に一致して、IL18、IL10などのサイトカインも軽度の変動を示したが、明らかなアポトーシスは認められなかった（図3）。

3-4) 血清麻疹PA-IgGおよびIgM抗体の誘導は、ワクチン接種者においては麻疹患者に比べて明らかに低かった（図4）。

#### 4、考察

麻疹患者における免疫不全の誘導機構に関しては、これまでに多くのin vitro系における実験結果に基づいて、感染リンパ球の死滅や、ウイルス糖蛋白との接触によるリンパ球の分裂抑制が想定されてきたが、実際の麻疹患者における病態は不明のままであった。麻疹患者を対象とした我々の成績から、麻疹ウイルス感染によって、まずアポトーシスによる広範な非感染細胞死が起こることが示された。さらに、これに引き続いて、リンパ節や骨髄におけるリンパ球の分裂増殖と成熟が強く抑制されることが、麻疹における免疫抑制機構の本態であろう。そこで、この非感染リンパ球のアポトーシス誘導機序の解明が、麻疹における免疫不全誘導機序の解明の鍵となり、また弱毒生ワクチンの弱毒性の重要な指標となるものと考えられる。

麻疹患者の血漿には細胞・組織障害性の強いサイトカインの上昇が見られた。麻疹患者ではヘルパーTはTh1に強くシフトし、高濃度のINF- $\gamma$ が誘導されていた。過剰のINF- $\gamma$ 産生が組織障害を誘導して宿主を攻撃することが想定される。INF- $\gamma$ の産生誘導するサイトカインとしてはIL18とIL12が知られているが、in vitroでの麻疹ウイルス感染実験ではIL12は麻疹ウイルスによって産生抑制されることが報告されている。しかし、今回の患者データからIL12の産生抑制は健常者の範囲に留まっていた。

アポトーシスを誘導するサイトカインであるIL18の血中濃度がいくつかのウイルス感染症においても上昇することが報告されているが、麻疹患者においてもIL18は非常に高濃度に産生されていることが明らかになった。IL18は単独でもINF- $\gamma$ を誘導することが報告されていることから、このIL12とIL18の相乗効果とIL18単独による誘導の両方の機序によってINF- $\gamma$ が過剰産生され、これが細胞障害をもたらす一因となることが強く示唆された。また、IL18はINF- $\gamma$ により活性化されたマクロファージによっても産生され、逆にこのINF- $\gamma$ によってもIL18の産生が強く促進される。この様にINF- $\gamma$ とIL18のネットワークが、麻疹における非感染リンパ球のアポトーシスの誘導に重要な役割を担っているものと考えられる。IL18は、INF- $\gamma$ 産生の他にもFasL誘導と過剰な活性酸素分子種や酸化窒素などのラディカルの産生により、強く組織・細胞障害を起こすサイトカインとして知られており、劇症肝炎との関わりも報告されている。更に、麻疹患者で認められたIL18の上昇は、図2に示すFasLの発現増強にも関わっており、その結果、Fas-FasLを介するアポトーシス経路によって非感染細胞死をもたらす主因の一つと考えられる。

一方、IL18が誘導するサイトカインとしてはIL10が知られている。麻疹患者においては、感染後期においてIL18誘導性のIL10の上昇が見られたが、このIL10がINF- $\gamma$ の産生を抑制することによって、INF- $\gamma$ 産生の減少が起こり、その結果、これらのサイトカインが正常域へと回復し、それに伴って、末梢リンパ球数の回復が起こったものと考えられる。これらより、麻疹ウイルス感染では、INF- $\gamma$ およびIL18の過剰産生により、非感染細胞アポトーシスによる組織障害が強く起こり、その結果高度のリンパ球減少を誘導して強い免疫不全を誘導することが示唆された。

一方、今回対象とした1～2歳の健常児に対しては、現行の弱毒生ワクチンはリンパ球減少も免疫抑制も起こさなかった。これが、現行生ワクチンの弱毒性を示しているものと考えられる。しかし、ワクチン接種者の一部でも、軽微なリンパ球減少と一部の組織障害性サイトカインの軽度上昇が認められたので、弱いながらもアポトーシスと免疫抑制が起こっているもの想定される。昨年報告したように、麻疹患者におけるリンパ球減少と免疫抑制の程度は年齢に依存しており、乳児と年長者・成人においてはより強く起こる。このことを考慮すると、1歳未満の乳児と年長児～成人、更にHIV感染者に対する現行生ワクチンの弱毒性と安全性を、同様の指標で検証する必要がある。

ワクチン接種者における血清抗体価は、麻疹患者に比べて明らかに低かった。ワクチン接種では野外株ウイルスの感染に比べてサイトカイン等の生体反応の誘導が極めて弱く、従って免疫抑制も軽微に留まるのであろうが、逆に、免疫賦与能力も低いものと考えられる。従って、再感染による追加免疫が起こらない場合には、ワクチン接種後に獲得された麻疹免疫は、自然麻疹罹患後の免疫に比べて、早期に減衰するものと考えられる。今後、ウイルス感染によってINF- $\gamma$ とIL18が誘導される機序と、成人、乳児を含む年齢別のサイトカイン変動を明らかにする方針である。

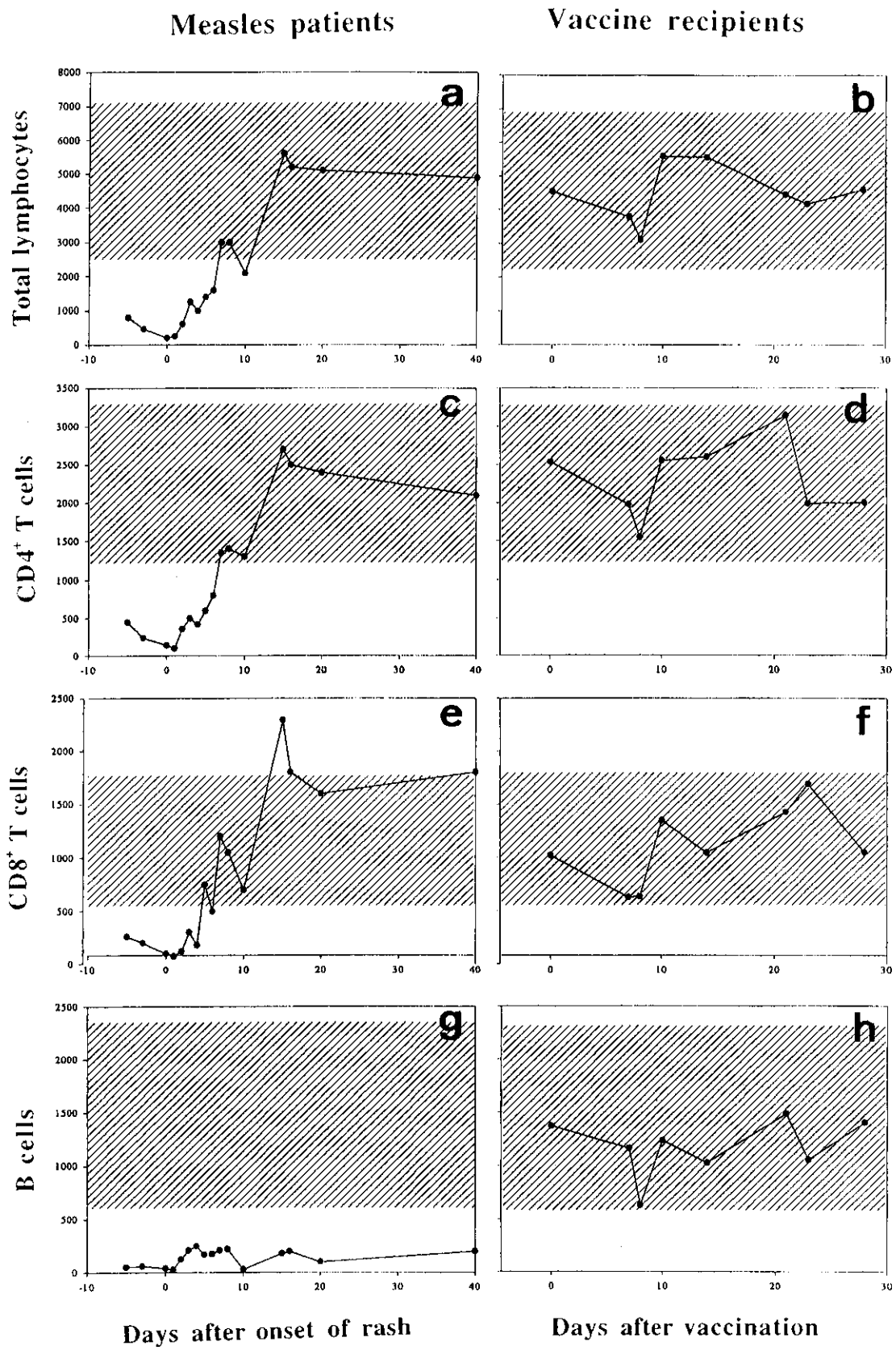
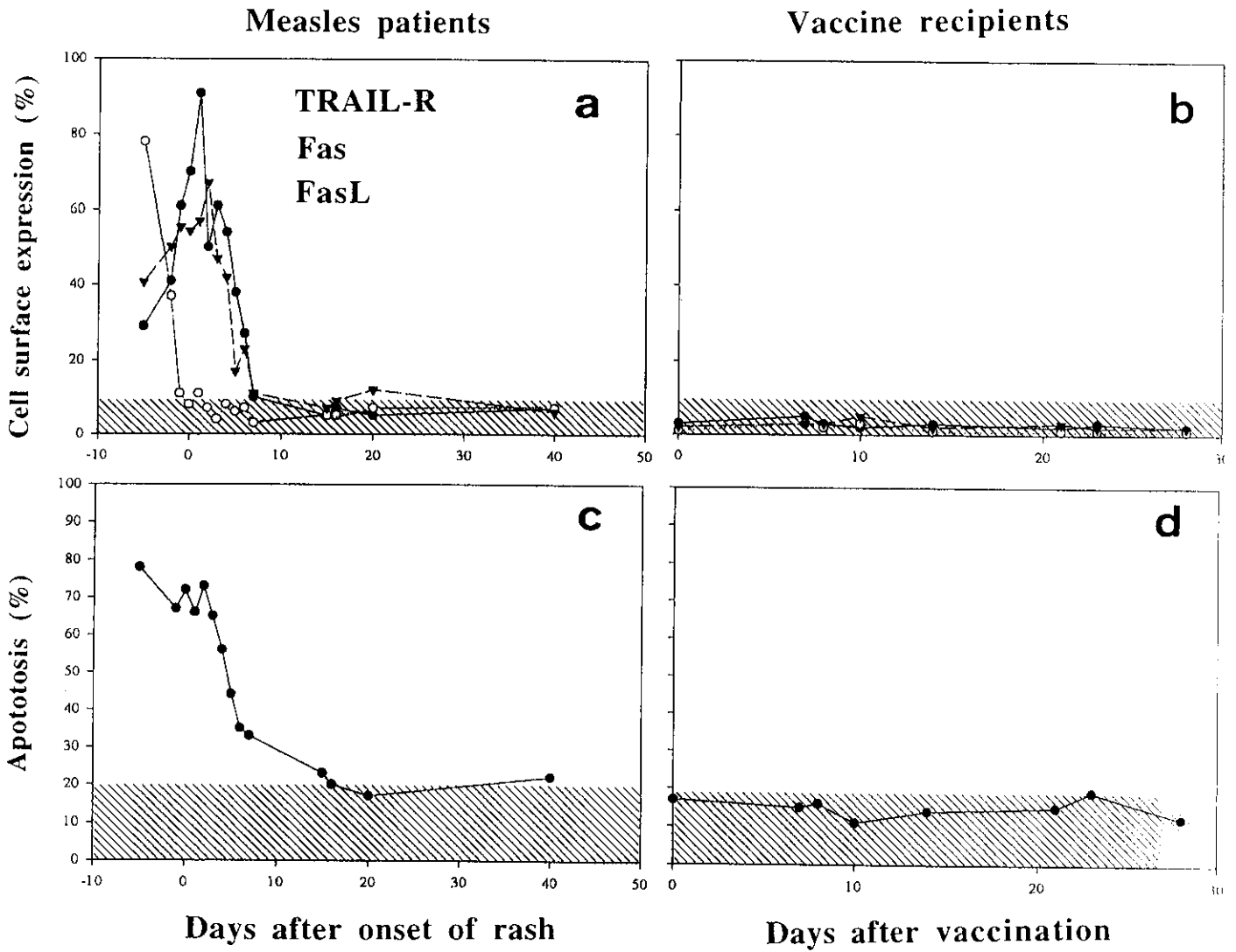
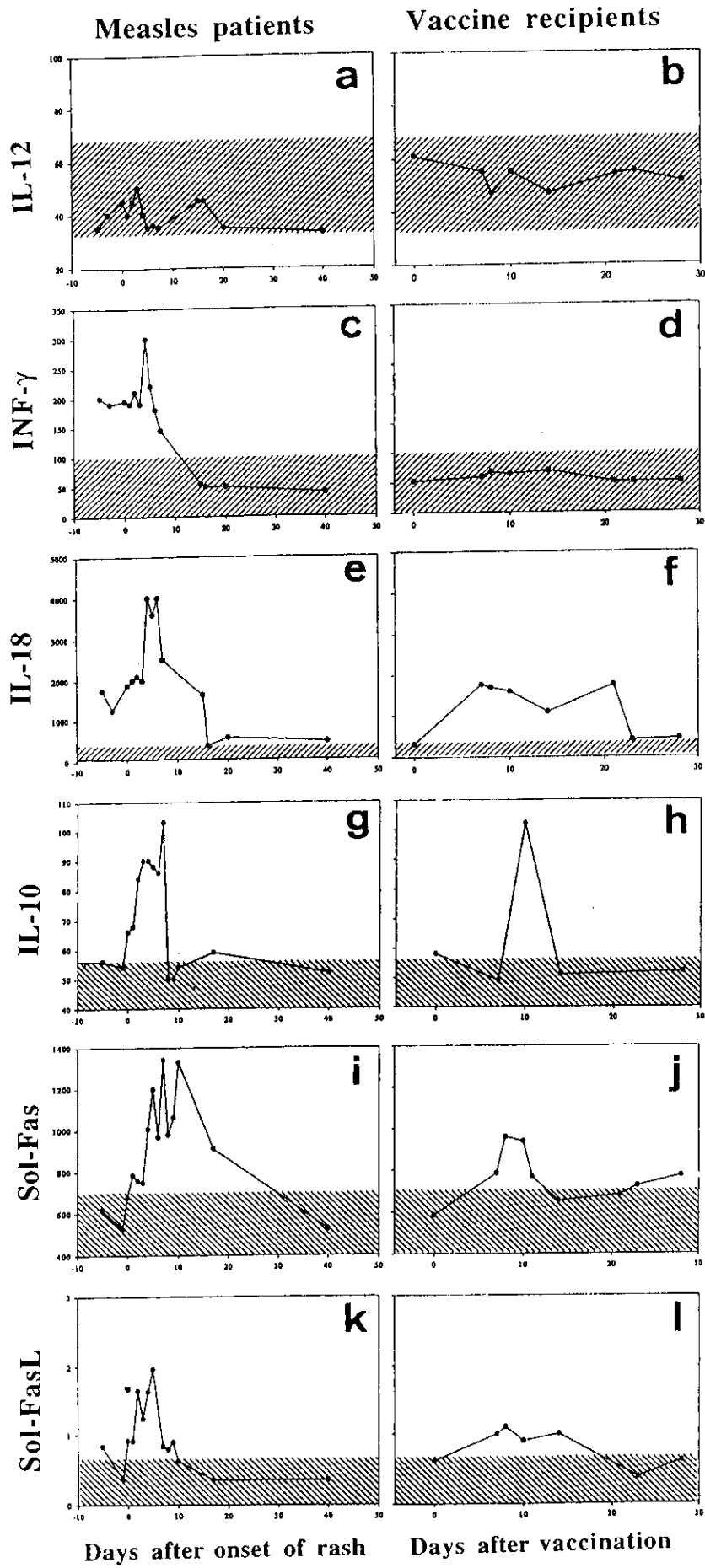


Fig. 1.



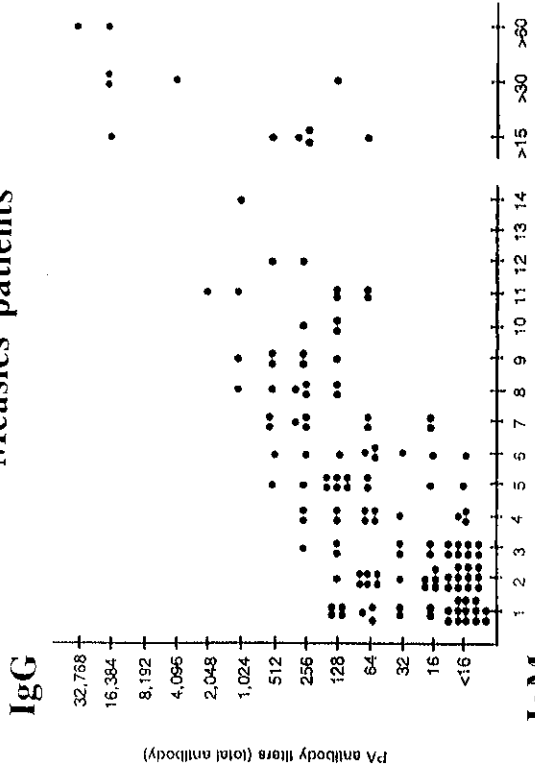
⊠ 2.



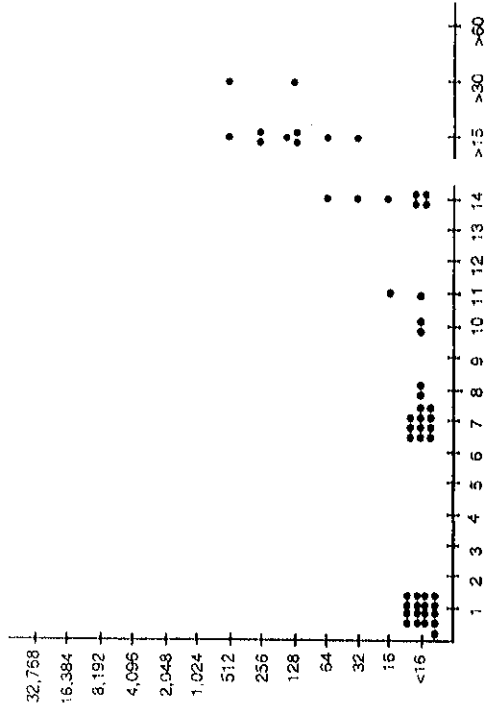
☒ 3.



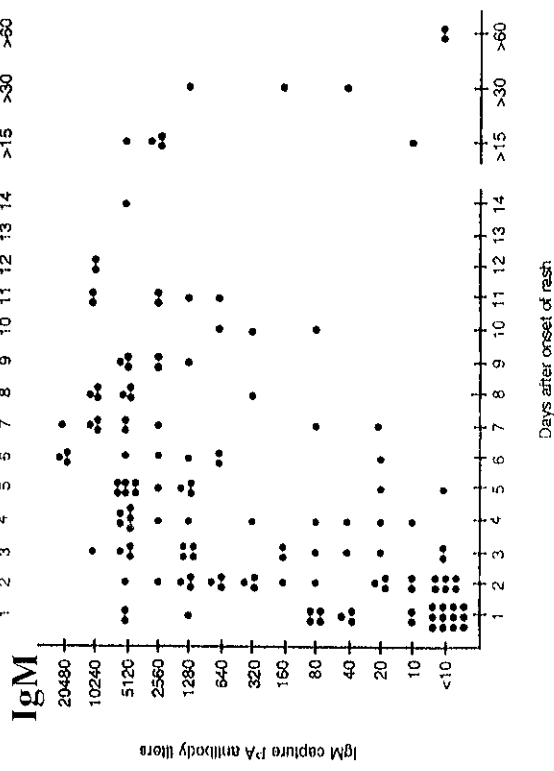
### Measles patients



### Vaccine recipients



### IgM



Days after onset of rash

Days after vaccination

4.

## 狂犬病ワクチン接種後発生する 黄熱病ワクチンに対するアレルギー反応について

茅野 文利 (国立感染症研究所名誉所員)

狂犬病ワクチンを2回以上接種された人の約半数は、黄熱病ワクチンに対して皮膚反応が陽性になる。そこで、皮膚反応陽性者と陰性者にわけ、陽性者の非特異 IgE 値 (IU/ml) について狂犬病ワクチン接種による変動を調べた。2回接種の半年後、3回めの接種を行ない2週後、陽・陰性者共に採血し測定した。結果は表中 (1) に示す如く case 1 の最高値と case 2 の最低値を除けば、陽性者5例と陰性者5例の数値の間には大差は認められない。陽性者群は更に2週後 (3回接種から4週) 採血、その直後4回目接種を行なった。同接種後2週して採血、両採血ともに非特異 IgE 値が測定された結果は表中 (2) (3) に示す如く、case 3 を除いて各例とも (2) が最も高く、4回目接種が行なわれた (3) は必ずしも (2) より高い数値には到らなかった。250 IU/ml が基準値の下限とされているので、case 1 のみがそのカテゴリーに該当する。しかしながらこの基準値の下限は食品等全身アレルギーに適用される数値であるので、皮膚反応のような局所アレルギーでは、基準値の下限以下であっても数値の変動に意義があると思われる。表中 (1) (2) (3) に示された数値は、狂犬病ワクチン接種による何らかの IgE 産生の増減を示唆する。ちなみに試験期間中、いずれの被験者も食品等による蕁麻疹、発疹等のアレルギー反応をみていない。

特異 IgE は、ゼラチン、鶏卵アルブミン、鶏肉の3種類について、2回接種後半年して3回目接種後2週採血材料を検査したが、皮膚反応陽性例にも陰性例にも検出されなかった。

Case 3 は、黄熱病ワクチン (10X) 0.1ml 皮内接種後 20 時間して接種部位に発疹が出現した。これはインターロイキン4 (IL-4) による免疫反応の結果とされる (10% くらいの頻度でみられる)。IL-4 は広く即時型アレルギー反応に関与するものと云われ、皮内反応もその一つで、疑陽性もあるが 70~90% は再現性もあり、即時型アレルギーの存在を示すものである。

特異 IgE は未だ特定されないが、半年後のブースター接種でもゼラチン・鶏肉関係で検出されないところをみると、これまで調べなかった物質、例えば、不活化に使われたベクタープロピオラクトンがハプテンとして、ゼラチンか鶏卵タンパクと結合して抗原となっているかもしれないと想像される。

Skin Positive Reaction with Yellow Fever Vaccine after Rabies Vaccinations

| Case | Age | Sex | Non-specific IgE (IU/ml) |     |     | Specific IgE (Ua/ml) |      |       |         |
|------|-----|-----|--------------------------|-----|-----|----------------------|------|-------|---------|
|      |     |     | (1)                      | (2) | (3) | Gel.                 | Egg. | Fowl. | in each |
| 1    | 39  | M   | 351                      | 380 | 359 | <                    | 0.34 |       |         |
| 2    | 34  | M   | 76                       | 123 | 105 | <                    | 0.34 |       |         |
| *3   | 52  | M   | 84                       | 103 | 109 | <                    | 0.34 |       |         |
| 4    | 41  | M   | 40                       | 61  | 55  | <                    | 0.34 |       |         |
| 5    | 55  | M   | 41                       | 51  | 45  | <                    | 0.34 |       |         |
| 6    | 41  | M   | 36                       | 41  | 39  | <                    | 0.34 |       |         |

\* Delayed reaction, 20 hrs after skin test

Skin Negative Reaction as Above Tested

| Cage | Age | Sex | Non-specific IgE (IU/ml) |     |     | Specific IgE (Ua/ml) |      |       |         |
|------|-----|-----|--------------------------|-----|-----|----------------------|------|-------|---------|
|      |     |     | (1)                      | (2) | (3) | Gel.                 | Egg. | Fowl. | in each |
| 7    | 49  | M   | 96                       | ND  | ND  | <                    | 0.34 |       |         |
| 8    | 52  | M   | 83                       | ND  | ND  | <                    | 0.34 |       |         |
| 9    | 35  | M   | 59                       | ND  | ND  | <                    | 0.34 |       |         |
| 10   | 37  | M   | 51                       | ND  | ND  | <                    | 0.34 |       |         |
| 11   | 37  | F   | 16                       | ND  | ND  | <                    | 0.34 |       |         |
| 12   | 34  | M   | 2                        | ND  | ND  | <                    | 0.34 |       |         |

(1) Two weeks after 3rd rabies vaccination

(2) Four weeks after 3rd rabies vaccination, just before 4th its vaccination

(3) Two weeks after 4th rabies vaccination

Gel, Gelatin; Egg, Egg albumin; Fowl, Fowl flesh protein

ND, Not Done

# 麻疹ワクチンによる防御期間の検討

— ワクチン2回接種の必要性 —

小船富美夫、井上 栄 (国立感染症研)

## 【はじめに】

麻疹は途上国を中心に100万人におよぶ乳幼児の死亡要因となる小児の最重要感染症である。麻疹ウイルスはヒトのみを自然宿主とし、不顕性感染がない。有効なワクチンが準備されているなどの理由から、WHOはその撲滅を目標とするEPI (拡大予防接種計画) を推進している。EPIの主役はワクチンである。麻疹の場合、流行阻止には80%以上の、根絶には95%以上のワクチン接種率を維持する必要がある。

麻疹ワクチンが開発・導入された当時、わが国では毎年500名が麻疹で死亡していた。ワクチンの導入後30余年が経過し、その普及とともに大規模流行は小～中規模流行に姿をかえ、死亡者も10名程度に激減した。しかしながら、未だに毎年5～20万人が罹患し、その5～10%が入院加療を必要としている。

開発当初から、麻疹ワクチンは一度の接種で終生免疫が成立されるものと考えられてきた。しかし、近年、ワクチン既接種者の麻疹罹患 (SVF) が増加傾向にあるほかに、乳児麻疹、成人麻疹 (含妊婦麻疹) も増加傾向にあり、麻疹は小児科のみならず内科、産科、皮膚科などの対応疾患ともなっている。麻疹のこのような流行様式の変化はその予防対策にも新たな施策の必要性を示すものと考えられる。

## 【目的】

本研究ではワクチンによる感染防御期間を明らかにし、今後の麻疹予防対策に資することを目的としている。

## 【対象と方法】

1984年から2001年までに全国68医療機関のより提供された1246検体 (咽頭拭い液、末梢血液など) よりウイルス分離を試みた。これらから、ワクチン接種後1～20年に臨床的に麻疹と診断され、しかも発疹出現後4日以内に採取された57検体 (症例) を選択し、これらについてワクチン接種後罹患までの経年を整理した。さらにウイルス分離結果とを対比することでワクチンによる感染防御期間を検討した。

ウイルス分離は先に述べた方法 (臨床とウイルス 23, 60-62, 1995) に従った。

## 【結果】

麻疹に罹患したワクチン既接種者57症例をワクチン接種経年順に表-1にまとめた。1246症例からのウイルス分離率は67.0%、ワクチン未接種症例では77.6%と高率であった。ワクチン既接種者57症例 (SVF) からのウイルス分離率は56.1%であった。ワクチン接種後の経年別ウイルス分離率は1～5年=9/19 (47.4%)、6～10年=9/15 (60.0%)、11～15年=9/14 (64.3%)、16～20年=5/9 (55.6%) であった。2経年までに罹患した症例1～11のうちウイルス