

Table 3 Distribution of HLA-DPB1 alleles among patients and control group

DPB1	Patients group (n=49)		Control groups (n=240)		Statistical tests		
	n	%	n	%	OR	P	Pc
0201	20	40.9	102	42.5	0.93	0.83	6.6
0202	2	4.1	12	5.0	0.81	0.79	6.3
0301	5	10.2	18	7.5	1.40	0.52	4.2
0401	1	2.0	28	11.7	0.16	0.041	0.33
0402	16	32.7	37	15.4	2.66	0.0045	0.036
0501	36	73.5	135	56.3	2.15	0.025	0.20
0601	1	2.0	3	1.3	1.65	0.67	5.3
0901	6	12.2	52	21.7	0.50	0.13	1.1

Table 4 Two-locus analysis of genetic risk to gelatin allergy

a. Basic data

DQB1*0303	DPB1*0402	Patients	Control
+	+	6	6
+	-	21	71
-	+	10	31
-	-	12	132

b. Two-by-two comparison

Test	Comparison	Odds	p
[1]	+- vs --	3.25	0.0017
[2]	-- vs --	3.55	0.0050
[3]	++ vs +-	3.10	ns(0.089)*
[4]	++ vs +-	3.38	0.043
[5]	+- vs -+	0.92	ns(0.84)
[6]	++ vs --	11.00	0.000014

*ns; not significant (p >0.05).

【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* 91:867-72,1993.
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. Nakayama T, Aizawa C, Kuno-Sakai H. A clinical analysis of gelatin allergy and determination of its causal relationship to the previous administration of gelatin-containing a cellular pertussis vaccine combined with diphtheria and tetanus toxoids. *J Allergy Clin Immunol* 103: 321-325, 1999.
4. Taniguchi K, Fujisawa T, Ihara T, et al. Gelatin-induced T-cell activation in children with nonanaphylactic-type reactions to vaccines containing gelatin. *J Allergy Clin Immunol* 102: 1028-32, 1998.
5. Sakaguchi M, Nakayama T, Fujita H, et al. Minimum estimated incidence in Japan of anaphylaxis of live virus vaccines including gelatin. *Vaccine* 19:431-436, 2000.
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* 98: 1058-61, 1996.
7. Sakaguchi M, Kaneda H, Inouye S. A case of anaphylaxis to gelatin included in erythropoietin products. *J Allergy Clin Immunol* 103: 349-350,1999.
8. Sakaguchi, M. and Inouye, S. Anaphylaxis to gelatin containing rectal suppositories. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 108: 1033-1034, 2001.
9. Sakaguchi M, Hori H, Hattori S, et al. IgE reactivity to alpha1 and alpha2 chains of bovine type 1 collagen in children with bovine gelatin allergy. *J Allergy Clin Immunol* 104:695-699, 1999.
10. Tautz C, Rihs HP, Thiele A, et al. Association of class II sequences encoding DR1 and DQ5 specificities with hypersensitivity to chironomid allergen Chi t I. *J Allergy Clin Immunol* 93: 918-925, 1994.
11. Kumai M, Miyakawa N, Adachi T, et al. Association between HLA antigens and birch pollen allergy in Japanese subjects. *Am J Rhinol* 4:19-23,1990.
12. Hori T, Kamikawaji N, Kimura A, et al. Japanese cedar pollinosis and HLA-DP5. *Tissue Antigens* 47:485-491,1996.
13. O'Brien RM, Tait BD, Varney MD, Thomas WR. HLA-DPB1 alleles in house dust mite allergic patients. *Eur J Immunogenet* 26:281-284, 1999.
14. Kumagai T, yamanaka T, Wataya Y, et al. A strong association between HLA-DR9 and gelatin allergy in the Japanese population. *Vaccine* 19:3273-3276, 2001.

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）

小宮 貴子、高橋 元秀（国立感染症研究所 細菌・血液製剤部）

井上 栄（大妻女子大学・家政学部）

[目的]

幼児期のBCG接種は、様々な抗原に対する免疫応答を修飾し、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例がいくつか報告されている。このことは、幼児期のBCG接種が他のワクチンにより誘起される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示唆する。

幼児期のBCG接種が、他の予防接種に与える影響を動物モデルを用い詳細に解析した例はこれまでにない。しかし、このような基礎的知見の集積は、BCGと他のワクチンの接種順序、間隔、接種量等の至適化に必要であり、最も効果的に予防接種を遂行する上で不可欠である。これまで私たちは、BCGと近い時期に接種されるDPTワクチンに着目し、DPTワクチンにより誘起される抗体産生がBCG接種によりどのような影響を受けるのか解析してきた。本年度では、抗ジフテリア毒素抗体産生応答に与えるBCGの影響を評価したので、その結果を報告する。

[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（ 2×10^5 または 10^6 CFU）とともに沈降精製DPTワクチン（20 μ 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、血中の抗ジフテリア毒素抗体価をELISA法により測定した。さらに、VERO細胞を用いた培養細胞法により、ジフテリア毒素の中和活性を測定した。

[結果]

BCG同時接種群では、抗ジフテリア毒素IgG抗体価が有意に増加したが、抗ジフテリア

毒素IgE抗体価は有意に低下することが判明した（Figure 1）。しかし、血清抗体によるジフテリア毒素の中和活性に有意な差は認められなかった（Figure 2）。以上の結果から、BCG接種には中和活性を低下させることなくIgE抗体価を減少させる作用のあることが明らかとなった。

[考察]

DPTワクチンはIgE抗体産生を増強するアラムアジュバントと百日咳毒素を含むため、幼児期の複数回接種によりアレルギー発症の危険性を増加させる可能性が危惧されている。今回、BCG接種はDPTワクチンにより誘起される中和抗体活性を低下させることなく、IgE抗体産生を有意に抑制することが明らかとなった。この結果は、BCG接種がDPTワクチンの予防接種効果を損なうことなく、アレルギー発症の危険性を低減する可能性を示唆するものであり、今後、このBCGの効果を最大限に引き出す接種スケジュールの検討が必要であると考えられる。

Figure 1. The effect of BCG on anti-Diphtheria toxin antibody response

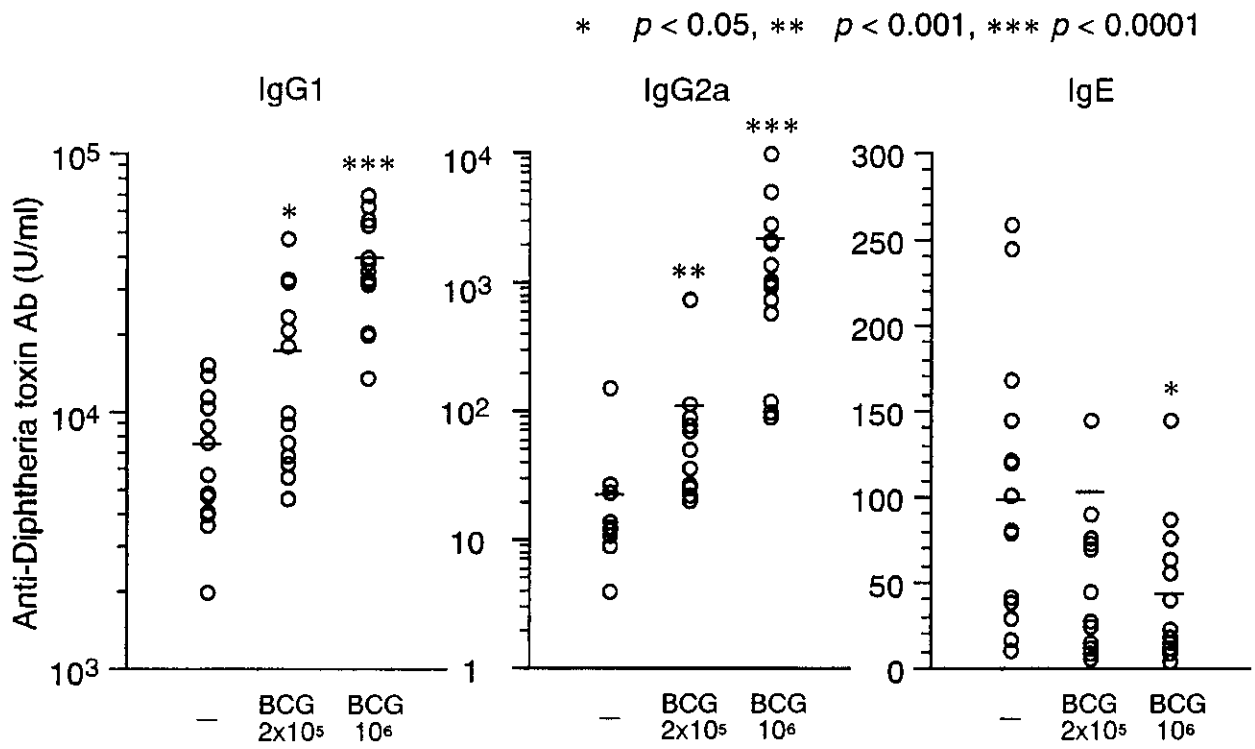
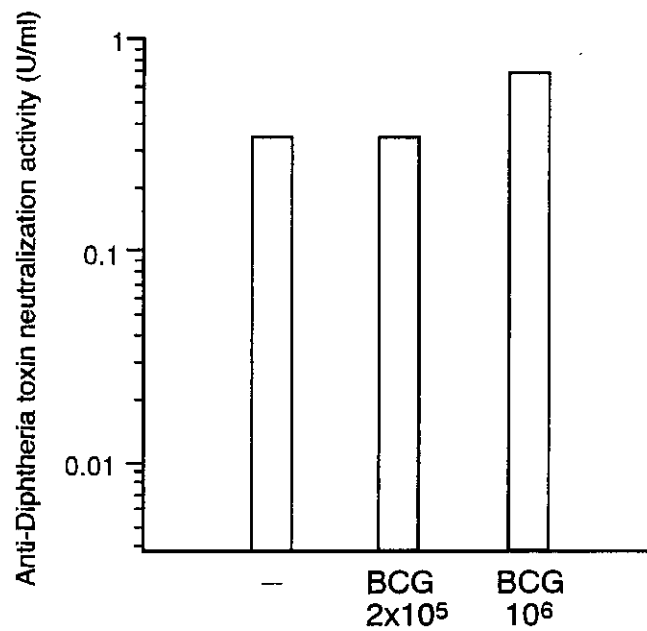


Figure 2. The effect of BCG on neutralizing antibody response



変異コレラ毒素併用経鼻インフルエンザワクチン によって誘導される防御免疫応答

倉田 毅、田村 慎一、(国立感染症研究所)

【目的】

我々はこれまで、マウスを用いた実験系において、現行の不活化インフルエンザワクチンを、微量(0.2%)のコレラ毒素(CT)を含むそのBサブユニットをアジュバントとして経鼻投与することにより、上気道上に交叉反応性の高い分泌型IgA抗体を準備できること、それによってワクチン株と流行ウイルス株が異なる場合でもウイルス感染を予防効できると報告してきた。また、これまでの我々の実験から、この経鼻インフルエンザワクチンのアジュバントとして、山本らによって報告されたコレラトキシンの変異毒素であるCT112K(AサブユニットのN末から112番目のグルタミン酸をリシンに置換したもの)が安全かつ有効であることが示されている。本研究では、ヒトへの投与を前提として、このCT112K併用インフルエンザワクチンが、インフルエンザの防御に有効などのような免疫応答を誘導するのかをマウスを用いて検討した。

【方法】

免疫; BALB/c マウスに、インフルエンザワクチン(H1N1 亜型、A/PR/8/34 ウイルス由来、最小有効濃度 0.1 μ g) をアジュバント (0.1 μ g) と共に初回投与し、4週間後に同じ A/PR/8/34(PR8) 由来の HA ワクチン(0.1 μ g) のみを追加する免疫する二回投与方式を用いた。ウイルス価; 追加ワクチン投与後2週間目に致死量のウイルスを感染し、その1-3日の鼻及び肺の洗浄液のウイルス価を、MDCK細胞を用いたブラック法により測定した。鼻関連粘膜リンパ組織(NALT)及び脾臓の抗体産生細胞(AFC)数; NALT及び脾臓のリンパ球を取り出し、AFC数をELISPOT法により測定した。抗体応答; ELISA 法により測定した。DTH; 惹起抗原を注射後24時間の足跡の腫脹により判定した。CTL 活性; 免疫マウスの脾臓のリンパ球を感染細胞存在下で培養し、5日後のリンパ球による⁵¹Cr 標識感染細胞からの⁵¹Cr 放出により測定した。

【成果】

(1) 免疫条件と感染防御効果: ヒトでの安全性の観点から、最適ワクチン投与条件として、BALB/c マウスに、インフルエンザワクチン(H1N1 亜型、A/PR/8/34 ウイルス由来、最小有効濃度 0.1 μ g) をアジュバント(0.1 μ g)と共に初回投与し、4週間後に同じ A/PR/8/34(PR8)由来の HA ワクチン(0.1 μ g)のみを追加免疫した。また、この追加ワクチン投与後2週間目に致死量のウイルスを感染し、その1-3日の鼻及び肺のウイルス価を測定し予防効果を判定した。その結果、この投与方式において、初回投与のみの対照群では鼻で完全なまた肺では部分的な防御がみとめられ、2回投与の実験群では、鼻でも肺でも完全な防御が認められた。しかも、鼻及び肺のウイルス価は、ウイルス感染 1 日目から検出限界以下になり、防御機構が感染直後にはじまり、感染 1 日目後には完了していることが示された。次に、このような 2 回免疫方式でどのような抗体、およびT細胞免疫応答が誘導されるかを検討した。

(2) 抗体応答: 鼻咽頭粘膜関連リンパ組織(NALT)には 1 回投与 7 日目に低レベルの

IgA, IgG, IgM 抗体産生細胞(AFC)が検出され、2 回投与 5 日目には、高いレベルの IgA, IgG と中等度の IgM AFC が検出された。また、脾臓では 1 回投与 7 日目に低レベルの IgA, IgG, IgM AFC が検出され、2 回投与 5 日目には高いレベルの IgG, IgM と中等度の IgA AFC が検出された。また、AFC の出現と相関して、1 回投与 4 週目では、低レベルの鼻洗浄液中の抗 PR8 HA IgA、血清中の抗 PR8 HA IgG 抗体応答が誘導された。2 回投与 2 週目では、高いレベルの IgA と IgG が誘導された。即ち、初回免疫により誘導される低レベルの抗体応答は部分的な感染防御能に、また、追加免疫により誘導された高い抗体応答は完全な感染防御と相関していることが示された。

(3) DTH 応答: 1 回免疫後 7 日目にピークの遅延型過敏 (DTH) 応答が検出され、2 回免疫後 3 日目に DTH 応答が加速誘導されたが、その後チャレンジウイルスを感染した 2 週目までに応答は低下した。即ち、初回免疫及び追加免疫により誘導される DTH 応答と感染防御能の間に相関性が認められなかった。

(4) CTL 応答: 2 回投与後 2 週目の脾細胞には CTL 誘導能力がなかったが、その脾細胞を培養して 5 日目の細胞にはウイルス感染群の約半分のメモリー CTL 活性が検出された。即ち、チャレンジウイルスを感染した追加免疫後 2 週目に CTL 活性が検出されず、CTL メモリー活性のみ検出されることから、CTL 応答と感染防御能の間に相関性が認められなかった。

(5) 交差感染防御: 抗体応答と感染防御とが相関していることが示されたので、両者の相関性をさらに詳細に明らかにするために、感染株と異なるワクチン株をもちいて、この 2 回免疫方式で免疫した時の交差抗体の出現と交差防御の関連を検討した。その結果、上気道(鼻)では感染株に交叉する IgA 抗体が誘導され、感染に対しては同じ A 型内で強い交叉防御が認められた。一方、下気道(肺)では交叉 IgA がほとんど検出されず、交叉防御がほとんど認められなかった(図 1)。

【考察】

以上の結果により、CT112K 併用ワクチンの 2 回免疫方式によって、インフルエンザウイルス抗原に対する抗体応答、DTH 応答、CTL 応答などの獲得免疫応答が誘導されることが示された。これらの応答の中で、抗体応答が、初回免疫よりも 2 回免疫によって強化される防御機構として、しかも、感染直後から作用し感染 1 日目後には完了する防御機構として、この免疫方式での感染防御に最も重要な役割を果たしていることが示された。さらに、上気道でのウイルス感染防御において IgA 抗体応答が、また、下気道でにおいて IgG 抗体応答が重要な役割を果たしていることが示された。さらに、ウイルスの侵入門戸である気道粘膜において分泌型 IgA 抗体の変異ウイルスに対する交叉反応性が高く、ワクチン株と流行ウイルス株が異なる場合にもこの CT112K 併用経鼻接種ワクチンの有効性が確認された。

【結論】

最小有効濃度(0.1 μ g)のインフルエンザワクチンと CT112K を共に初回投与し、4 週間後に PR8HA ワクチン(0.1 μ g)のみを追加するこの経鼻ワクチンの BALB/c マウスにおける最適投与条件において、誘導される獲得免疫応答のうち、抗体応答、特に、上気道の IgA 抗体応答が、また、下

気道ではIgG 抗体応答がウイルス感染阻止に最も重要な役割を果たしていることが示された。さらに、粘膜のIgA 抗体は変異ウイルスに対する交叉反応性が高く、ワクチン株と流行ウイルス株が異なる場合にもこのCT112K 併用経鼻インフルエンザワクチンが有効であることを示唆していた。

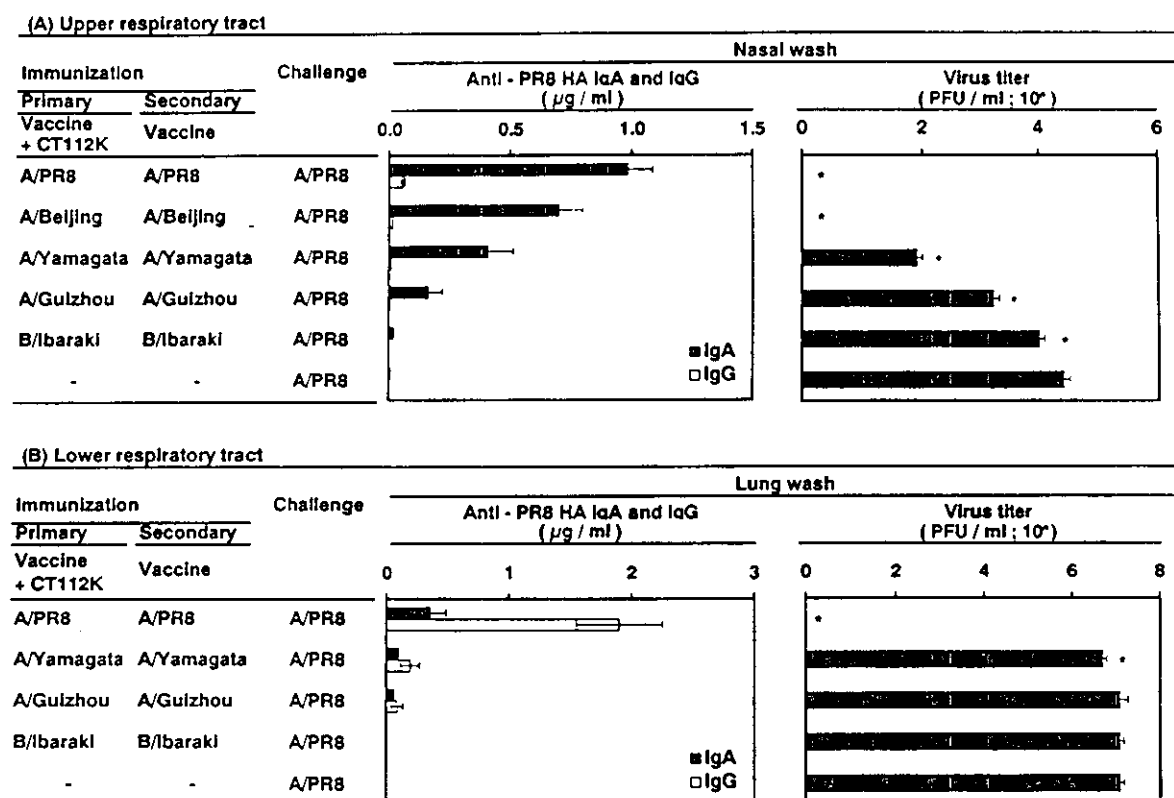


Figure 1. PR8 HA-reactive Ab responses and protection against influenza virus infection in mice that received a primary intranasal administration of CT112K combined with different inactivated vaccines that were prepared from A/PR8 (H1N1), A/Beijing (H1N1), A/Yamagata (H1N1), A/Guizhou (H3N2) and B/Ibaraki viruses, and a secondary intranasal administration of the respective vaccines 4 weeks later. Two weeks after the secondary immunization, mice were challenged by either an upper RT infection (A) or a total RT infection (B). Three days after the challenge, nasal wash specimens from mice challenged by an upper RT infection (A) or lung wash specimens from mice challenged by a total RT infection (B) were obtained for anti-PR8 HA IgA and IgG Ab titration and for virus titration. Each bar represents the mean PR8 HA-reactive or IgG titer \pm SD in nasal and lung washes or the mean virus titers \pm SD in nasal and lung washes. Mice with virus titers below the limit of detection (less than 5 PFU/ml) were considered to have cleared the infection, and the value 0 was assigned for the purpose of statistical analysis. Asterisk (*) indicates significant difference from nonimmunized control mice ($p < 0.05$) in mean nasal wash and lung wash virus titers.

麻疹ウイルスの変異と流行株対応麻疹ワクチンの可能性

中山 哲夫、藤野元子（北里生命科学研究所 ウイルス感染制御）

駒瀬 勝啓（北里研究所 生物製剤研究所 開発研究室）

麻疹は安全で有効な高度弱毒麻疹生ウイルスが開発され罹患者数は減少してきている。アメリカでは麻疹・風疹・ムンプス三混生ワクチンの複数回接種を強化することにより土着の麻疹ウイルスは撲滅され、発症する麻疹はすべて外国から輸入感染例であることが報告されている。我が国では麻疹ワクチンの接種率は平均でやっと 80%となった。しかしながら、麻疹の流行をコントロールするには不十分であり、感染症サーベイランスには毎年 2-3 万人の麻疹患者が報告され、実際には約 20-30 万人の患者が発症しているものと想定される。近年、ワクチン接種後免疫能を獲得し数年後に免疫能が減衰することにより麻疹に罹患する Secondary vaccine failure (SVF) が問題となっている。麻疹は一度罹患すると二度と罹患しないことから終生免疫であると考えられ麻疹ワクチン接種後の免疫能も同様に長期間持続するものと考えられた。麻疹がコントロールされずに流行している状況では麻疹抗体が減衰しても、麻疹に再感染し発症しないが booster 刺激となる不顕性感染を繰り返すことで高い抗体価が維持できたものと考えられている。最近では、特に、麻疹ワクチンの中途半端な普及により不顕性再感染を受ける機会が少なくなり、免疫能の減衰により成人になって、麻疹に罹患する成人麻疹が問題となっている。

免疫能の減衰だけではなく、麻疹ウイルスは一本鎖 RNA ウイルスであり遺伝子の変異を起こしやすいことが知られている。従来、麻疹ウイルスは血清学的に単一の抗原性を有し株間における抗原性の差はないものとされていた。しかしながら、ワクチンの普及による抗体のプレッシャーによるためか、麻疹ウイルス遺伝子の変異率が早くなっている事が報告されている。特に CTL 活性の target と考えられている N 蛋白 C 末端の 500 塩基は変異が大きく、ついで、抗体が認識するエンベロープ蛋白の赤血球凝集素抗原 (hemagglutinin ; H) 蛋白領域に変異が多いと報告され、世界の麻疹ウイルスは現在 8 群 21 の genotype に分類されている。世界で流行している株は地域ごとに特徴があり、我々は、我が国で流行した最近の麻疹ウイルスの遺伝子の変化、ウイルスの抗原性の変化等について検討した。

1) 最近流行株の遺伝子解析最近流行株の genotype 分類

我々は 1984 年からの麻疹ウイルス野生流行株の塩基配列の調査を続け、1985 年以前

の野生流行株は genotype C1 に属し、1985~1990 年の流行株は D3, 1990~95 年の流行株は D5 に属することを報告した。1997 年以降の分離株について以前の報告例と併せて H 蛋白領域の系統樹解析の結果を図 1 に示した。Japan <85 は 84-E, 84-K, 84-S の 3 株の consensus sequence をしめし JPN 1985-1990 は 1985 年から 1990 年の間に流行した D3 の consensus sequence、JPN 1990-1995 は 1990~1995 年流行株の consensus sequence を示した。1997 年分離株 97-S、1999 年分離株 99-Y は D3 に属する。しかしながら、1985~1990 まで日本で流行していた株とは異なり、1989 年にアメリカの Chicago で分離された株と同じ cluster に属するものであった。2000 年に分離された株 2000-O、2000-K は D5 に属し、2000-S は H に属する株であった。最近流行株は D5 が主体で中国由来株 (genotype H) の流行が認められた。

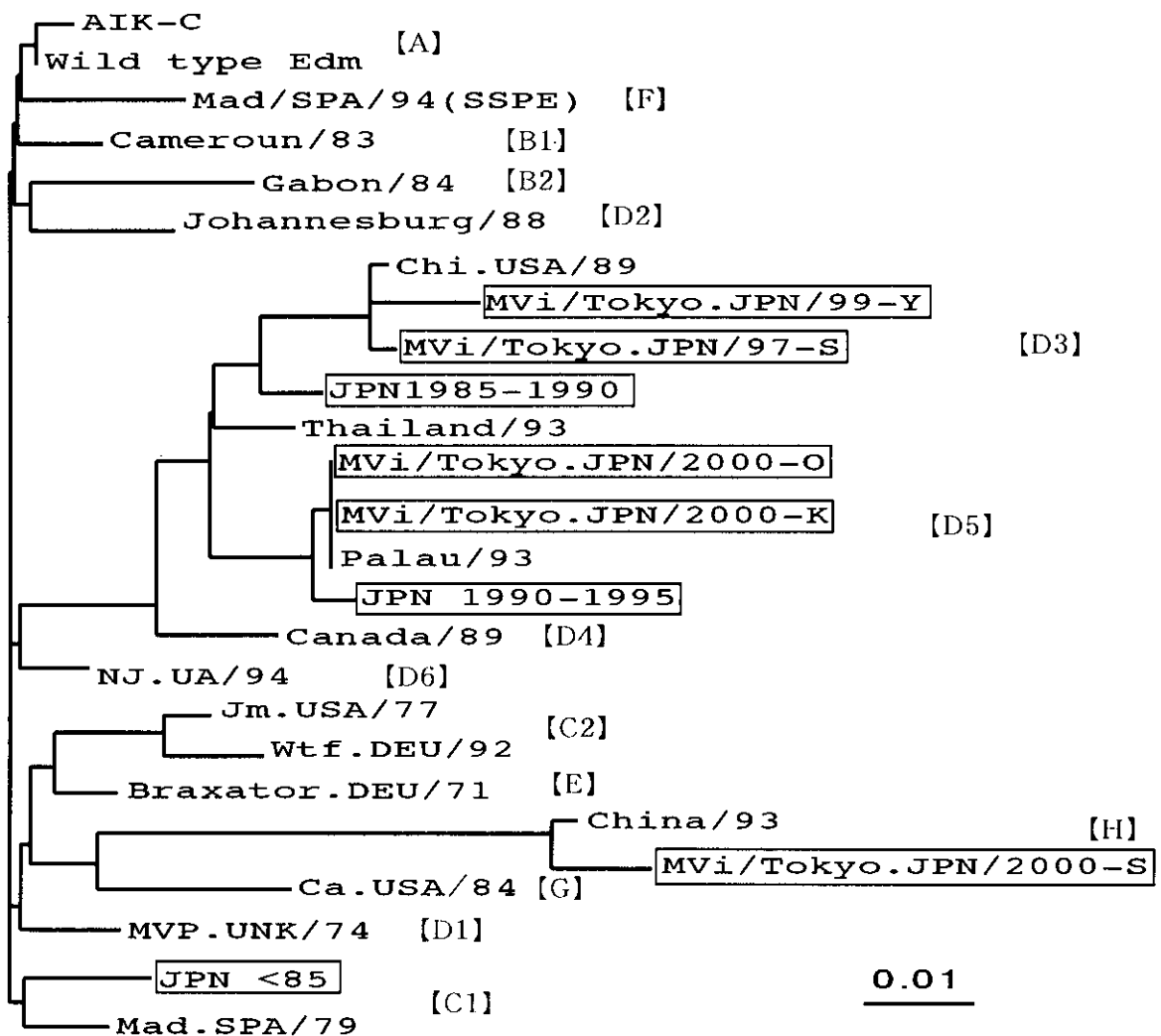


図 1 麻疹ウイルス細菌流行株の H 蛋白領域の系統樹解析

2) H 蛋白の変化

AIK-C 株、Edmonston 株、D3 に属する 87-K、Chicago type D3 の 99-Y, genotype H の 2000-S 株を Vero 細胞もしくは B95a 細胞で増殖させ蔗糖密度超遠心精製し Western blotting 後麻疹免疫血清で ABC 染色を行った。結果を図 2 に示した。H 蛋白の泳動度に差を認め、Edmonston 株、AIK-C 株、C1 に属する 84-S は分子量 78KD であるが、D3, D5 に属するウイルスの泳動度は遅く分子量は 80-82KD と大きくなっている。H に属する 2000-S は Edmonston 株と同じ泳動度分子量 78KD とと思われる。この差は H 蛋白 416 位のアミノ酸の違いにより genotype D3, D5 では糖鎖付加部位が新たに出現したためと考えられる。

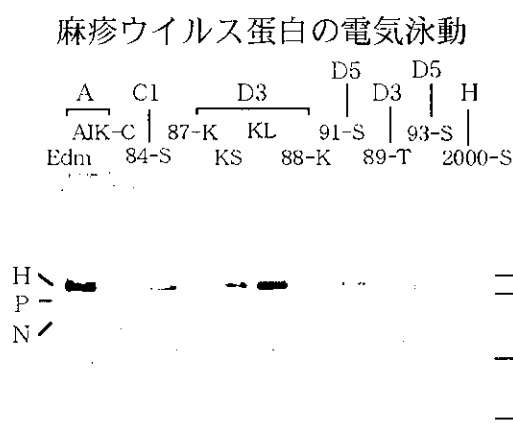


図 2 麻疹ウイルスの電気泳動

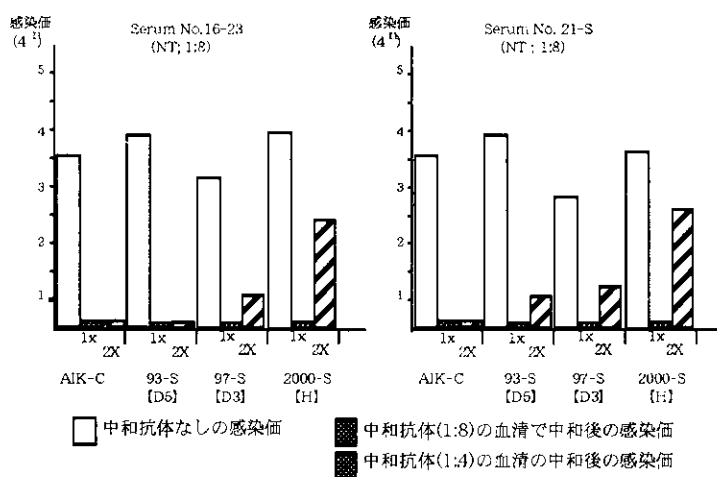


図 3 抗原性の変化

3) 最近流行株の抗原性の変化

麻疹ワクチン AIK-C は 1954 年に分離された Edmonston 株から弱毒したもので genotype A に属する。麻疹ワクチン AIK-C 接種後の血清の中で NT 抗体価の高い血清を用い各株に対する NT 抗体価を測定した。Edmonston 株に対して 2^7 の抗体価を示し、84-E, 84-K に対してそれぞれ $2^{6.7}$, $2^{7.3}$ の抗体価を示した。87-K の D3, 90-O, 90-K, 94-U の D5 群のウイルスに対しては $2^{6.5-7.3}$ の抗体価を示した。最近流行株の D3 Chicago type, H のウイルスに対しては $2^{5.7-6.3}$ と他の株に比べて低い抗体価を示したが、2 管以上の有意差は認められなかった。

ワクチン接種後 20 年経過し中和抗体が低下し NT 抗体価が 1:8 の血清 (No.16-23, 21-S) を用いて D5 の 93-S、Chicago type D3 の 97-S、genotype H の 2000-S のウイルスと中和させ中和されないで残ったウイルスの感染価を測定し結果を図 3 に示した。NT 抗体

価 1:8 の血清は AIK-C, 93-S, 97-S, 2000-S ウイルスを完全に中和した。この血清を 2 倍に希釈し NT 抗体 1:4 になるようにして同様に各ウイルス株と中和反応後感染価を調べた。97-S の Chicago type D3、2000-S の genotype は 1:4 の血清では完全に中和されずに残ったウイルスの増殖が認められた。

3) 異なる温度での増殖能

各 genotype に属する麻疹ウイルスを B95a 細胞に接種しウイルス増殖能を検討し結果を図 4 に示した。AIK-C は低温馴化株を plaque cloning した株であり 7 日後に 33°C で $10^{5.3}$ TCID₅₀/ml の感染価を示したが 39°C では全く増殖しなかった。D3 の 87-S は 33°C で $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml の感染価を示し、39°C では $10^{0.7}$ TCID₅₀/ml と 33-37°C 培養の感染価の 1/1000 以下に低下した。D5 の 93-S は 3 日までは 39°C で増殖しなかったが、7 日目では 33°C で増殖したウイルスの約 1/100 のウイルス増殖を認めるのみであった。Genotype H の 2000-S も 39°C では 33°C、37°C での増殖の 1/100 以下であった。Chicago type D3 の 99-Y は培養開始 3 日での 39°C のウイルス増殖は 33°C、37°C よりも高く $10^{4.3}$ TCID₅₀/ml の感染価を示した。

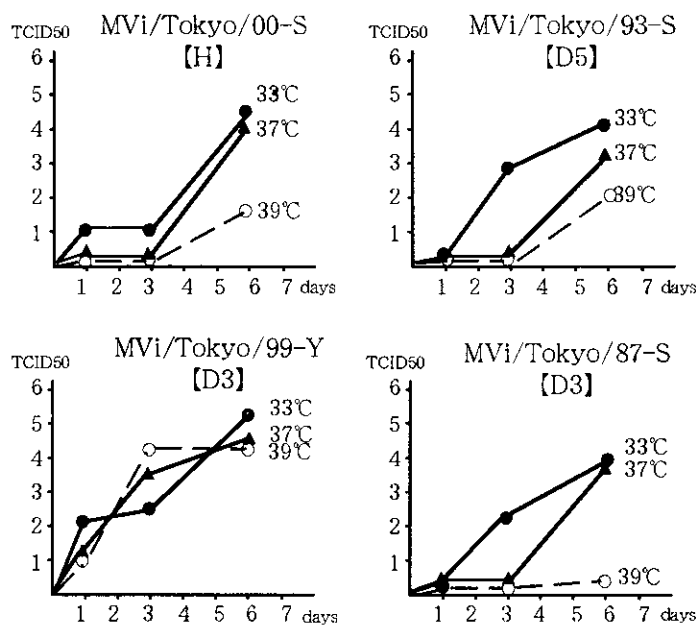


図 4 異なる温度下での増殖能

4) 流行株の H 蛋白を組み込んだ AIK-C キメラウイルスの作製

麻疹ウイルス流行株が遺伝子、蛋白レベルで変異し、ワクチン接種後の抗体の高いレベルでは中和できるが、低い抗体価の血清では中和できないウイルスが存在すること、39°C でもよく増殖するウイルスが存在することが明らかとなった。こうした変異に対応するために reverse genetics の技法を用いて AIK-C ワクチン株の H 蛋白翻訳領域を野生流行株 D3 に属する Mvi/Tokyo.JPN/87-K 株の H 蛋白に変えたキメラプラスミッドを構築

し図5に示したように N, P, L 発現プラスミッドとともに co-transfection し T7 RNA polymerase 下で感染性ウイルス MVAIK-H87-K を回収した。回収した MVAIK-H87-K の性状を B95a, Vero 細胞に plaque を形成するかどうかを検討し、AIK-C は Vero 細胞、B95a 細胞いずれにも plaque を形成したが、野生流行株 Mvi/Tokyo.JPN/87-K は Vero 細胞には plaque を形成せず、B95a 細胞に plaque を形成した。87-K 野生株の H 蛋白領域を組み込んだ MVAIK-H87-KS は野生株 Mvi/Tokyo.JPN/87-K と同様に B95a 細胞に plaque を形成したが、Vero 細胞には plaque は形成しなかった。

流行株のH蛋白遺伝子を組み込んだキメラAIK-CcDNAの構築

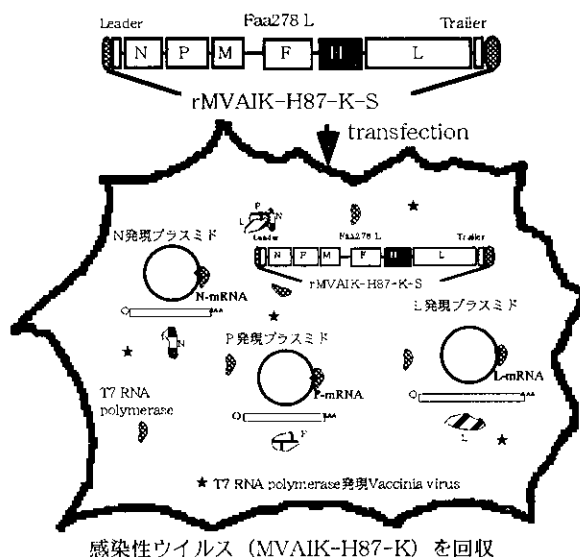


図5 AIK-C と野生株とのキメラウイルスの構築

構築したキメラウイルス MVAIK-H87-K の温度感受性を検討し図6に示した。AIK-C は 39℃では増殖しないが、野生株 Mvi/Tokyo.JPN/87-Kは 39℃でも増殖を認めた。MVAIK-H87-K は AIK-C の cDNA から回収した MVAIK-S と同様に 33℃では増殖するが 39℃では増殖を認めなかった。

キメラウイルス MVAIK-H87-K は、親株の AIK-C の *ts* を保持し野生株の Mvi/Tokyo.JPN/87-Kの細胞親和性を保持していることがあきらかとなった。

MVAIK-H87-K を B95a 細胞で増殖させ不連続蔗糖密度勾配超遠心法により精製ウイルスを作製し家兎に免疫し抗血清を得た。同様に AIK-C も精製し抗血清を作製した。Edmonston 株に対して抗 MVAIK-87-K 血清は 2^{10} 、抗 AIK-C 血清は 2^8 中和抗体価を示した。各分離株に対して1管以内に差で抗体価には差が認められなかった。免疫血清を 1:4 になるように希釈し各ウイルス株と 37℃ 1時間中和後中和されないで残ったウイルス液の感染価を測定し結果を図7に示した。MVAIK-H87-K に対する免疫血清が若干高い中和活性を示したが AIK-C, MVAIK-H87-K に対する免疫血清は同程度に中和した。

親株と遺伝子組み換え麻疹ウイルスの温度感受性の差

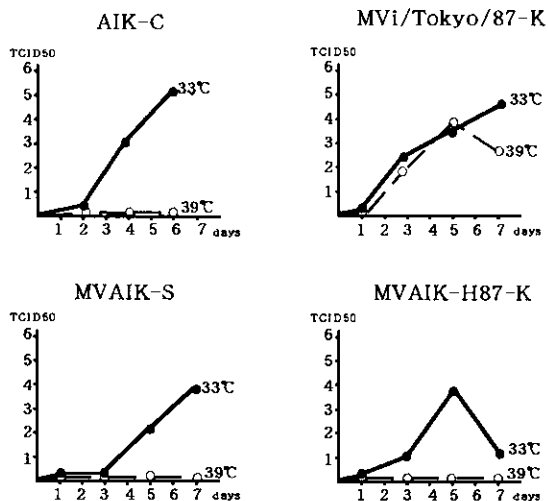


図6 キメラウイルスの温度感受性

免疫血清の中和抗体の低いレベルでの中和能

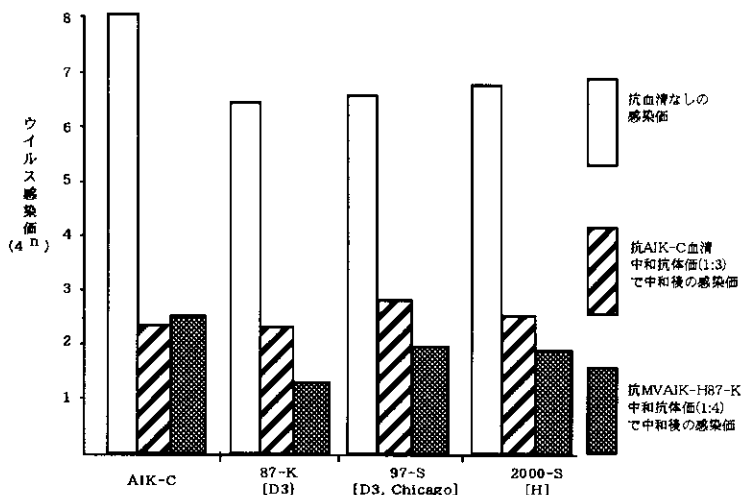


図7 免疫血清の中和能

考案

麻疹ウイルスの最近流行株は現在 genotype D5 が主流で中に中国由来株 genotype H が検出された。H蛋白の分子量の変化は H 蛋白 416 位のアミノ酸の変異による糖鎖付加部位の差によること、39℃でも増殖するウイルスが存在し、抗原性も変化していることがあきらかとなった。現行ワクチンは有効であると考えられるが、こうした変化に対応するために 1987 年流行株 genotype D3 のH蛋白領域を AIK-C ワクチン株のH蛋白に組み込んだキメラウイルスを構築し回収したウイルスは AIK-C の *ts* の性状を保持し、H蛋白の機能としての細胞細胞親和性は野生株の性状を示す事が明らかとなった。

百日咳抗体測定における標準品・参照品について

近田 俊文、蒲地 一成、岩城 正昭、堀内 善信、山本明彦
落合 雅樹、片岡 紀代、豊泉 裕美、荒川 宜親（国立感染症研究所）

【目的と背景】 百日咳診断において抗体測定は重要な診断材料の一つである。わが国の臨床現場では保険点数などの関係で百日咳菌凝集素価の測定が主に用いられるが、より感度の高い ELISA 法を使用して抗体（抗 PT、抗 FHA など）を測定することが望まれる。従来のプレート ELISA 法に比べて簡便かつ短時間で測定でき、高感度で特異性が高く再現性の良いビーズ（ボール）ELISA 法が国内で開発され 1992 年から市販されている。ELISA 法での抗体価測定には物差しとして抗体価既知の標準品または参照品を用いることが、測定施設間のばらつき解消や測定精度の向上のためにも必要である。百日咳関連では、マウスの抗体価測定には 1999 年に WHO で制定された国際標準品を用いて国際的に統一された国際単位で算出することができるが、ヒトの抗体価については国際標準品がまだ制定されておらず、provisional 参照品を用いて単位を算出している。今回は、百日咳抗体測定におけるこれら標準品、参照品の現状、さらに、私達が国際標準品の制定のために参加した WHO 国際共同研究の内容を紹介報告する。

【標準品、参照品の現状】 ヒトの抗体価測定のためには、抗百日咳毒素（PT）、抗繊維状赤血球凝集素（FHA）抗体価などが定義された参照品として、日本の JN1H-10（JN1H-13）と米国の US reference Pertussis Antiserum (human), Lots 3 and 4 などがある。マウスでは国際標準品として、PT、FHA、パータクチン（PRN）、線毛（FIM 2&3）に対する抗体価が定義された Anti-*B. pertussis* serum, (mouse): 1st WHO Reference Reagent 1999 がある。抗原としての PT も、2001 年に制定された国際標準品（JN1H-5）がある。

【WHO 国際共同研究】 英国 NIBSC が中心となり、9 カ国 13 研究室が参加した Evaluation of Proposed International Reference Reagent of Pertussis Antiserum (Mouse) 97/642 と 6 カ国 6 研究室が参加した Evaluation of Proposed International Standard of Pertussis Toxin Code JN1H-5 に、私達も参加し、国際標準品の制定のための測定データを提供した。これらは上記の国際標準品の制定に活用された。また、WHO Expert Committee on Biological Standardization への報告書作成にも協力した。

【考察】 百日咳抗体測定における標準品、参照品は、国際的にも国内的にも、まだ整備途中であり、今後、国際共同研究や国内共同研究を更に進める必要がある。これらの情報は、論文、報告書、学会発表などで、速やかに提示するように努めなければならないと考えられる。

IAHA 法による Mumps 抗体価測定の検討

多屋 馨子、長谷川斐子、岡部 信彦、井上 栄（国立感染症研究所 感染症情報センター）

【目的】1989年4月からMMRワクチンとして定期接種に導入されたおたふくかぜワクチンはワクチン株による無菌性髄膜炎の多発により1993年4月に中止された。感染症発生動向調査によると、昨年2001年は過去10年間で最大の流行となり、今年に入ってもこの流行は持続している。成人特に医療従事者の間でも発症があり院内感染対策上問題になっているとのことである。

従来 mumps 抗体価は CF 法、HI 法、NT 法、ELISA 法などが測定方法として用いられていたが、CF 法及び HI 法は感度が低くワクチン接種後の抗体測定には用いることができない。NT 法は細胞培養を行うこと、結果判定までの日数が長いことから多検体を用いた血清疫学調査には不向きである。ELISA 法は感度がよく現在最もよく使用されている方法であるが、titration ができないという問題点がある。そこで、titration が可能で HI 法より感度がよく NT 法より操作が煩雑でない方法を確立するために水痘や A 型肝炎で用いられている IAHA (immune adherence hemagglutination) 法を mump 抗体価の測定に用いることが可能かどうかを検討することを目的とした。

【方法】まず box titration を行い至適抗原濃度の決定を試みた。IAHA 法に用いる mumps virus 抗原として、市販されている CF 試験用抗原（デンカ生検）、HI 試験用 HA 抗原（HA 価 1:64 以上）（デンカ生検）、ワクチン株（星野株） $>10^4$ TCID₅₀/ml、Vero cell-adapted Enders (EY) 株 $10^{5.8}$ PFU/ml の4種類を用いた。補体は 1:100 希釈モルモット血清を用いた。血球はヒト O 型赤血球を 0.4% で使用した。血清は CF 抗体価測定用キットに添付されているモルモット免疫血清と HI, NT, ELISA 抗体価が既知のヒト血清 16 検体を使用した。

【結果】CF 抗体価測定用キットに添付されている CF 抗原を用いた box titration では 1:128 希釈抗原が至適抗原濃度であると判定された。HA 抗原では判定が困難であった。次に 1:128 希釈の CF 抗原を用いて mumps ウイルス抗体価既知のヒト血清を用いて抗体価を測定したところ、HI 抗体価 128、NT 抗体価 >8.5 、ELISA 抗体価 4050 の1検体のみ IAHA 抗体価 256 で、その他の検体（HI 抗体価 $<8\sim 64$ ）については <8 であった。ワクチン株及び EY 株を用いた box titration では感度が低く至適抗原濃度は判定できなかった。

【考察】モルモット免疫血清を用いた box titration では CF 抗原を用いた場合良好な反応が得られたが、ヒト血清においては HI 抗体価の感度を上回ることはなかった。ワクチン株、Enders 株を用いても感度が上昇しなかったことから、スクリーニングの方法として IAHA 法を用いるためにはさらに条件の変更が必要である。

HI、PHA、PA、NT法による麻疹抗体価の比較

坂田 宏子、斎藤 義弘、田代 真人（感染研ウイルス製剤部）

〔目的〕 麻疹抗体測定法としては赤血球凝集阻止（HI）法、受身血球凝集（PHA）法、受身凝集（PA）法、中和（NT）法およびELISA法などがある。方法によって難易度が異なり、また検出する抗体も同じではない。したがって目的によって適した方法を選択する必要があると考えられる。目的としては大きくは診断に有用な方法と抗体の保有状況を把握する方法に大別される。抗体の保有状況を把握する方法についてはさらに感染防御にたいして有効性を判断できるかどうかが課題となる。HI、PHA、PA法は凝集の有無で判定し、NT法は抗体によるウイルス力価の減少を調べるが、いずれも抗体価は血清の希釈で表現される。ELISA法は抗原に結合する抗体の量が吸光度で表示され、抗体の感染防御能との関連が不明である。HI、PHA法はウイルスの表面抗原であるHAタンパクに対する抗体を検出しており、中和抗体とともにウイルスの感染防御にはたらくと考えられている。PA法ではHAに加えて内部タンパクに対する抗体も検出している可能性がある。これらをふまえて、今回は主として抗体の保有状況を把握する方法として、麻疹の集団流行があった中学校の生徒の血清を用いてHI、PHA、PA法の比較検討を行うとともに、麻疹ワクチン接種歴のある中学生の麻疹流行後の麻疹抗体価の分布状況を調べた。また麻疹感染初期血清におけるHI、PHA、PA法の感度を比較した。

〔方法〕 麻疹が流行した東京の一中学校について、流行3カ月後に採取した172名の血清について、HI、PHA、PA価を測定した。HI試験はHA抗原としてtween-ether処理豊島株（自家製）を用い予研法で行った。PHA試験には麻疹-PHA（デンカ生研）を、PA試験にはセロデイアー麻疹（富士レビオ）のキットを使用した。中和抗体価はHI抗体陰性でPHA抗体陽性、PA抗体陽性の血清についてのみ50%ブラック減少法で求めた。抗体を測定した生徒については流行における罹患、麻疹既往、ワクチン接種の有無などを調査してある。19例の麻疹感染初期血清についてもウイルス分離とともにHI、PHA、PA価を測定した。比較の都合上、PA価も希釈倍数で表してある。

〔結果〕 1) この中学では、630名中28名に麻疹発症がみられた。今回の流行で発症を免れた144名の血清（麻疹既往のある例：18、麻疹既往がなく、ワクチンを受けていた例：126）の各抗体測定法による麻疹抗体の分布を図1に示した。自然麻疹既往者とワクチン接種者の平均的麻疹抗体価は、HI価で55：19、PHA価で637：240、PA価で776：358であった。PA法では自然麻疹既往者に他の抗体価に比べ高いPA価（4096倍）を示すものが多く存在した。2) 図2に各測定法により得られた麻疹抗体価の相関を示したが、PA法がPHA法よりさらに感度が高かった。3) 126例の未発症ワクチン接種者の内、麻疹HI抗体陰性者は19例存在したが、PHA法で6例、PA法では1例のみが陰性であった。HI(-)、PHA(+), PA(+)血清について感染防御抗体と考えられる中和抗体を測定したところ、中和抗体陽性はほぼ半数であった。以上の結果から低い抗体価をしめす血清においてはPA法の方が中和抗体価との乖離は高いと考えられる。4) 感染初期血清

の麻疹抗体価測定では PHA 法がもっとも感度が高かった。

【考察】麻疹に対する PHA, PA 法は感度が高く、抗体の有無を判断するには適した方法であるといえる。しかしワクチン接種者で HI 抗体陰性、PA 抗体陽性を示す血清については中和抗体陽性率がほぼ 50% であり、PHA, PA 価 128 倍から中和抗体陽性例が出現した。したがって 32~128 倍の PHA, PA 抗体価を示す抗体の感染防御能については検討する必要があるといえる。一般に中和抗体が感染防御に有効な抗体と考えられているが、中和抗体価も測定系により変動すること、近年の麻疹ウイルスは表面抗原の抗原性に变化が見られていることなどから、感染防御に対する有効性を判断するために適した方法の確立にはさらに検討が必要と思われる。

感染初期血清において PHA 法の感度が高いのは IgM 抗体を鋭敏に検出しているによるもので、健康人血清中の麻疹抗体に対する高感度性とあわせて麻疹抗体測定法として有用といえる。

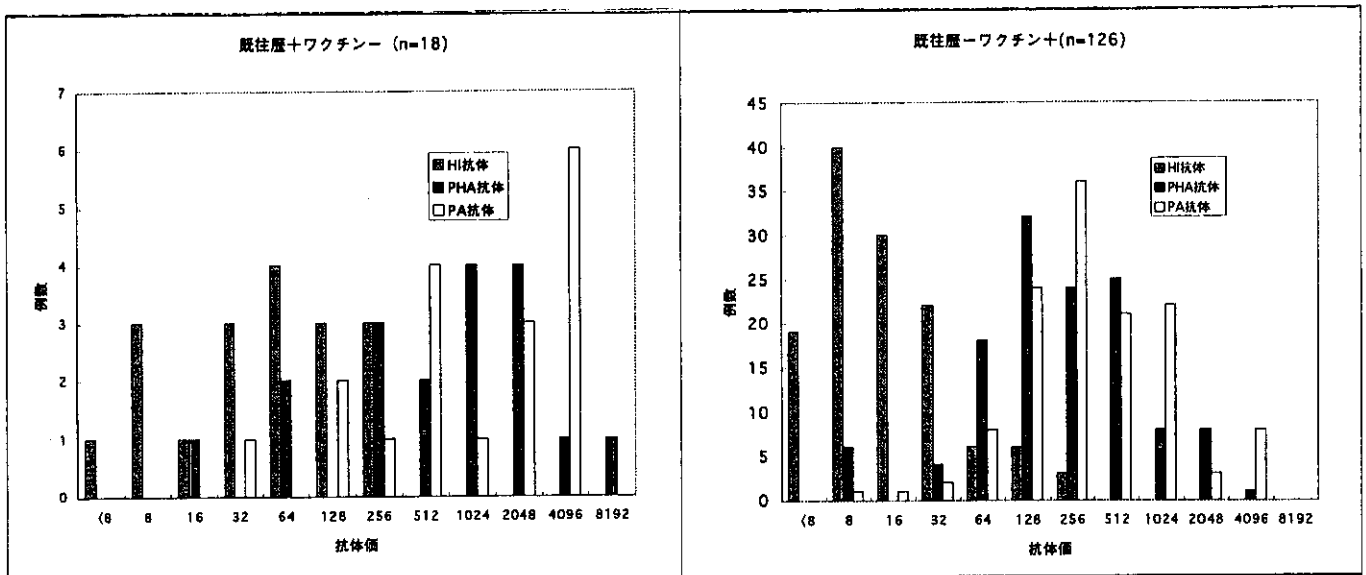


図1. HI, PHA, PA法による既往歴別の麻疹抗体価分布

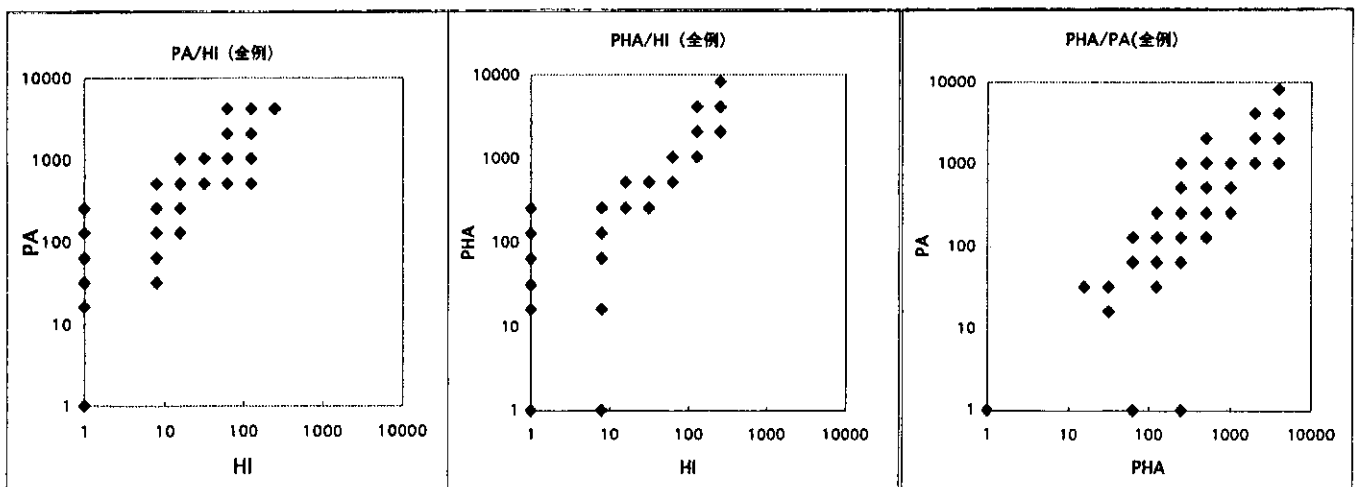


図2. HI, PHA, PA麻疹抗体価の相関

麻疹中和抗体測定法の比較

和山 行正、中嶋 治彦、前嶋 秀之、丹羽 正弘、
上本 裕、岩野 芳信（ウイルス検査技術連絡会中和分科会）

[目的]

麻疹中和法には、Vero 細胞を用いたいわゆる従来法と国立感染症研究所小船らにより cell line 化された B95 a 細胞を用いた方法がある。検査センターにおいては従来法が汎用されているが、ワクチン接種時の効果判定において二法の間で結果が乖離することのあることが指摘されている。そこで我々は今回これら二法を複数施設（6 施設）にていくつかの条件を変え比較検討したので報告する。

[方法及び材料]

材料として 6 施設での比較検討には同一 6 サンプルを用い、別に 1 施設にてワクチン接種サンプル 30 例を用いた。使用ウイルスは、豊島株及び Edmonston 株を用いた。小船博士より分与された B95 a 細胞をイーグル MEM 培地に馴化、単層培養できるようにして用いた。

方法として従来法に関しては、各施設にて実施している方法に準じて測定した。B95 a 法は、小船らの方法に準じて測定した。

[結果]

1. 細胞は B95 a 細胞を、攻撃ウイルスとして Edmonston 株を用いた場合、各施設の 6 サンプルの中和抗体価はすべて±1 管差内であった。同時に測定した、細胞は Vero 細胞、攻撃ウイルスは豊島株を用いた場合も前述した B95a 法とほぼ同様な結果であった。
2. 細胞は B95 a 細胞を、攻撃ウイルスとして豊島株と Edmonston 株を用いて同一検体を比較したところ豊島株の中和抗体価の方が高く、2 サンプルにおいて最大 3 管の違いがみられた。Vero 細胞を用いた検討でも同様な結果であった。
3. ワクチン接種サンプル 30 例に関しては B95 a 法の中和抗体価が従来法に比較して高かった。

[考案]

我々が実施した限りにおいて、従来法に比較して B95 a 法はワクチン接種時の中和抗体価測定には有用である可能性が示唆された。また、攻撃ウイルスの株の違いにより結果の異なる可能性も示唆された。このことから、標準化のためには、攻撃ウイルスの株も限定する必要があると考えられた。

また、B95 a 細胞の問題点として、EBV 粒子を排出していることは周知の事実である。昨今における成人の EBV 抗体陰性者群の増加或いは成人の伝染性単核症患者の散発の報告等からも、中和抗体測定施設ではこの B95 a 細胞の取り扱いに苦慮しているところもあるのが実情である。この点をどのように解決するかは難しい問題を内包していると考ええる。

今回の検討においては、測定したサンプル数も少ないことから今後サンプル数を増やして検討を重ねていく必要があると考える。

Vero 細胞を用いた日本脳炎ウイルス中和抗体価測定法 における解析法の確立

阿部 元治、葛原 祥二、城野洋一郎（助化学血清療法研究所 第二研究部第一研究室）

【目的】

日本脳炎ウイルスの抗体価測定法としては、一般的に、HI 試験や CF 試験に比べ、中和試験の方が感度が高く、機能的抗体を測定していることから、ウイルスからの感染防御を考察する際に理論的であると考えられている。

日本脳炎ウイルスの中和抗体価測定の標準法としては、これまで、CE 細胞を用いた系で中和試験を行い、感染研で設定された経験式であるチャート法を用い中和抗体価を算出するのが一般的であった。しかし、初代細胞である CE 細胞は調製法が煩雑であり、個体差に由来するばらつきの発生の可能性が危惧されている。これに対して、株化細胞である Vero 細胞は、取り扱いが比較的容易で、安定した結果が得られることが期待されている。これらの理由から、Vero 細胞を用いた中和抗体価測定法である Vero 細胞法への移行が進んでいる。ワクチン検定にも Vero 細胞法が導入され、現在、この移行期間中である。

我々は現在、細胞培養由来不活化日本脳炎ワクチンの開発を進めている。この臨床試験における有効性の指標としては、ウイルスからの感染防御の考察に最も適している中和抗体を測定することが重要であると考えた。また、その際に、今後一般的になると考えられる Vero 細胞法を導入することが望ましいと考えた。

現在、Vero 細胞法については、感染研から詳細なプロトコルが示されている。しかし、Vero 細胞法を用いた中和抗体価測定に関する詳細な解析法の報告はない。そこで、今回、感染研の示す Vero 細胞法を一部変更した試験法を用いて、日本脳炎ウイルス中和抗体価の解析法の確立を行った。また、マイクロソフトエクセルを用いて、中和抗体価を簡便に算出可能なプログラムの作成も行った。更に、本解析法を用いた Vero 細胞法と現行の CE 細胞法との相関性についても検討を行った。