

### 【方法】

感染研設定 Vero 細胞法を一部変更して中和試験を行った。解析に1点のデータのみを用いるチャート法を含め、今回、新たに、2点のデータを用いる「2点 plot 法」及び3点のデータを用いる「最小二乗回帰法」を考案して、これらの解析法の検討を行った。検討には、主にヒト血清を用いた。

### 【結果】

検討の結果、「最小二乗回帰法」を解析法として採用した。

本解析法を用いた Vero 細胞法は、高い「特異性」、「直線性」、「精度」を示した。また、チャート法を用いた CE 細胞法との良好な相関性を示した。

### 【考案】

本解析法は、最小二乗法を用い、相関係数を指標とすることにより、異常値の判別が比較的容易となり、高い信頼性を示す。また、それぞれの中和抗体価に応じた血清希釈倍数を明確に設定した希釈法を定め、解析に使用する3点の選択の明確な基準を定めたことにより、解析における判断の個人差などの不確定要素を排除した。

また、本解析法は、適当な表計算ソフト等を用い解析プログラムを作成することにより、より簡便に中和抗体価の算出が可能となる。コンピュータによる解析が容易となった現在においては、換算表等を作成するより、これらの表計算ソフトを積極的に活用した方が、より効率的であると判断した。

## 風疹胎児感染の遺伝子診断結果から見た 母親の風疹抗体価の診断上の意義

加藤 茂孝、源原 博子、太田 妙子

福島 雅夫、種村 光代（国立感染症研究所 ウイルス製剤部）

### 〔目的〕

妊婦の風疹抗体の診断上の意義について長年相談を受けてきたが、ここ数年は、風疹抗体価から妊娠中の風疹感染が疑わしい症例の全てにおいて、胎児由来組織における風疹ウイルス遺伝子の検出は陰性であった。従ってそれらの殆どは不顕性再感染によるものと思われる。風疹胎児感染の実態把握と共に、母親の風疹抗体価の診断上の意義の変遷について3つの年代（1992, 1997, 2001年）に分けて比較検討した。

### 〔方法〕

1992年75例、1997年34例、2001年29例の、計138例について比較した。各年の遺伝子診断依頼症例の全数である。胎盤絨毛、羊水、臍帯血のいずれかで風疹ウイルス遺伝子陽性の場合、胎児感染陽性と判定した。母親の風疹抗体はHI抗体価とIgMEIA(Index)を測定した。IgMEIAキットは殆どの場合デンカ生研製のものが使われているが、このキットは、1994年12月試薬の改訂があり、indexがわずかに低く設定替えされている。定点観測による年次別風疹患者発生情報と病院へのアンケートによる先天性風疹症候群(CRS)の発生数を考慮に入れて、結果を考察した。

### 〔結果〕

- 1) 1992年、1997年、2001年における母親の発疹の発現率はそれぞれ、60.0%、35.5%、0%と減少しており、2001年には顕性感染者は無かった。
- 2) 測定可能であった例における平均HI抗体価(log2)は、1992年8.64（顕性）、8.83（不顕性）、1997年8.22（顕性）、8.14（不顕性）、2001年8.66（不顕性）であり、各年代間および症状の有無によって、大きな差はなかった。
- 3) 測定可能であった例における平均IgMEIA価(index)は、1992年7.88（顕性）、6.05（不顕性）、1997年5.17（顕性）、2.31（不顕性）、2001年3.64（不顕性）であり、年を経る毎に減少していた。また、症状有の方が症状無より高かった。
- 4) 遺伝子診断の陽性率は、1992年31.1%、1997年0%、2001年0%であった。胎児感染率は、年々減少しており、最近では遺伝子診断で見ると限りゼロである。
- 5) 妊娠の結果は、1992年異常無し52例、人工流産19例、自然流産3例、不明1例、1997年異常無し29例、人工流産1例、CRS1例、心臓奇形1例、子宮内胎児死亡1例、早産死1例、2001年異常無し14例（2002.2.10現在判明分）。1997年のCRSは、母親が顕性感染し臍帯血の採取も依頼したが、技術的に不可能と言うことで羊水のみが送られて

きた例。羊水の風疹ウイルス遺伝子診断上の信頼度は98-99%であり、この例は残り1-2%に属する。心臓奇形の1例は、新生児の風疹IgM抗体が陰性であったことから風疹以外の原因が考えられた。また、子宮内胎児死亡1例、早産死1例は双胎の例で原因不明である。

[考察]

1) 風疹患者の発生数は1999年から、それ以前に比べて大きく減少しており、もはや全国規模の流行は起こらなくなったと考えられる。2000年、2001年は更に減少しており、妊婦が風疹に感染する機会は大きく減少している。

2) 実際に、CRSの発生数は1999年より大幅に減少し、1999年1例、2000年3例、2001年2例となり、ゼロになる年も近いと思われる。

3) 妊婦における風疹抗体は、母親に発疹発現が無かった場合、たとえHI抗体価が高くとも、IgMEIA(index)が高くなければ、その殆どが不顕性再感染と考えられる。再感染によるCRSのリスクは初感染のリスクの約1/100と考えられるので、そのリスクは極めて小さいものである。逆に、IgMEIA(index)が高ければ、不顕性初感染を疑い、遺伝子診断などで胎児感染の有無を慎重に判定する必要がある。

表、2001年(1-12月) 出生前風疹ウイルス遺伝子診断の症例

発疹	HI	妊婦週日	IgM	妊婦週日	羊水	妊婦週日	臍帯血	妊婦週日	転帰	性別	在胎週数	体重(g)	IgM	
-	1024	12.5	1.21	16.5	-	19.5	nt		健常児	女	39.5	3260	-	ワクチン(+)
-	512	9.3	1.49	11.5	-	15.6	nt		健常児	女	37.5	3078	-	ワクチン歴(+)
-	256	12.2	12.39	16.2	-	19.4	-	19.4	健常児	男	40	3296	-	
-	1024	13.5	0.07	17.5	-	19.3	nt		健常児	男	39.1	2890	-	
-	1024	10.5	11.8	12.5	-	19.5	-	19.5	健常児	女	39.1	2804	-	history(+)
-	256	9	3.16	9	-	16	nt		健常児	男	36.2	2228	-	HI128
-	64	16	1.45	16	-	18.4	nt		健常児	女	42.1	3014	-	ワクチン(+)
-	256	11.5	1.19	14.5	-	17.6	nt						-	history(+)
-	512	7.1	2.07	7.1	-	20	nt		健常児	女	40.6	2250	-	ワクチン(+)
-	256	9.2	1.07	12.2	-	17.2	nt		健常児	男	41.5	3484	-	
-	256	7.4	1.27	9.3	-	13.6	nt						-	ワクチン(+)
-	256	11.2	0.95	15.2	-	20.5	nt						-	history(+)
-	256	10.6	2.5	8.6	-	16.5	nt		健常児	女	40.3	2948	-	ワクチン接種
-	512	17.3	1.85	17.3	-	20.6	nt		健常児	男	41.1	3200	-	history(+)
-	256	7	1.63	1.63	-	18.2	nt		健常児	女	40.6	2928	-	
-	128	10.5	1.37	11.3	-	19	nt		健常児	女	40.3	3092	-	
-	128	12	1.84	16	-	18	nt						-	
-	1024	8.5	1.04	9.4	-	15.5	nt		健常児	男	36.2	2815	-	
-	1024	9.3	0.9	9.3	-	18	nt						-	
-	1024	8.4	0.6	15.4	-	15.4	nt						-	
-	256	10.3	6.3	10.3	-	19.5	-	19.5					-	
-	1024	15.6	1.18	15.6	-	20	nt						-	
-	1024	11.4	0.16	15.4	-	18.1	nt						-	
-	64	10.2	1.67	10.2	-	15.6	nt						-	
-	1024	8.4	9.03	9.5	-	16	nt						-	-2yでHI512
-	512	10.5	1.21	12.5	-	17.4	nt						-	
-	256	8.3	-	13.3	-	15	nt						-	
-	2048	8.2	0.28	11.5	-	14.5	nt						-	
-	256	6.1	4.78	6.1	-	14.1	nt						-	

## 風疹ウイルス抗原をコートしたアパタイト・ナイロン 複合体粒子凝集法による風疹 IgM 抗体の検出

海野 幸子、田代 真人（国立感染症研究所 ウイルス製剤部）

山本 晃、黒沢 八重、小浜 友昭、中山 幹男（旭光学工業株式会社）

倉根 一郎（国立感染症研究所 ウイルス第一部）

【目的】大掛かりな機器を必要とせず、簡便で短時間に風疹 IgM抗体を検出できる診断薬を開発することを目的に研究を行った。

風疹は、妊婦において胎児に先天性奇形を引き起こす可能性があることから、その感染予防と診断は極めて重要である。風疹ワクチン導入の遅れている開発途上国において未だ多くの風疹感染があり、感染の拡大を防ぎ、適切な予防措置をとるために風疹の的確な診断が必要である。そのために安価で特異性の高い風疹の診断薬の開発は有益である。

【方法】風疹ウイルス（M-33株）感染 BHK21細胞の培養液を濃縮、精製してウイルス抗原を得た。その抗原をナイロンビーズを核とするヒドロキシアパタイトのビーズに結合させた。あらかじめ抗ヒトIgM抗体を吸着させた 96穴V底プレートに、100倍から2倍段階希釈した試料を室温で30分処理してIgM抗体を補足させた後、プレートを蒸留水で洗浄した。次いで抗原をコートしたビーズ懸濁液を加えて、室温で2時間静置した。風疹IgM抗体が存在するとビーズは抗体と結合してあたかも凝集しているかのような像を、無い場合はウェルの底に集まって沈降像を呈する。凝集像を示す血清の終末希釈の逆数を抗体価として表した。

【結果】1) 培養液から風疹ウイルスを濃縮精製する方法として、PEG によるウイルスの沈降、限外ろ過膜によるろ過或いはヒドロキシアパタイトカラムを用いたクロマトグラフィーのそれぞれと蔗糖密度勾配遠心法を組み合わせで行った。得られた精製ウイルスの比活性は、400～890HA/mg蛋白だった。これを抗原に用いた。

2) 抗体陰性血清で希釈した IgM抗体陽性血清を試料として、ビーズに結合させる抗原濃度を検討した。0,075～6mg/mlの抗原濃度の範囲では、得られる抗体価は抗原濃度に依存し、6mg/ml の抗原が最も高い抗体価を与えた。以下の実験はウイルス抗原濃度 6mg/mlで行った。

3) 風疹自然感染及び風疹ワクチン接種後時間経過を追って採取された血清の本法による抗体価をIgM 捕捉EIA（デンカ）の結果と比較した。一例を図1に示した。本法による抗体測定で IgM抗体の経時的上昇が、EIA と同様に検出できた。しかし抗体産生の極く初期の低IgM抗体の検出感度がEIAより若干低くかった。

4) 3) の試料も含め124試料のIgM抗体価を本法とIgM 捕捉EIAで測定し、両者の相関性を調べた。相関係数は 0.8を示した(図 2)。EIAによる風疹IgM陰性でIgG陽性のリュウマチ患者の血清は、本法でもIgM抗体陰性となり、非特異的反応は認められなかった。

【考察】本法によるIgM抗体測定の結果は、既に診断に用いられているIgM捕捉EIAの結果と相関した。陰性血清やリュウマチ因子による非特異的反応は見られず、特異性と定量性が認められた。本法の感度は、比較に用いたEIAよりもわずかに低いように思われた。しかし、本法はEIAに比べ大掛かりな機器を必要とせず、操作も容易で、所要時間も短かく、今回の開発の目的にかなっている。今後更に本法による測定例を増やして、その特異性と感度を検証し、実用化の検討を行う。

このような本法の優れた特性を決める要件の一つは、使用する風疹ウイルス抗原の精製度である。これまで行った風疹ウイルスの濃縮精製のいずれの方法にもウイルスの収量と精製度に一長一短があった。如何に精製度の高い風疹ウイルスを大量に調製するかが、目下大きな課題である。

図1

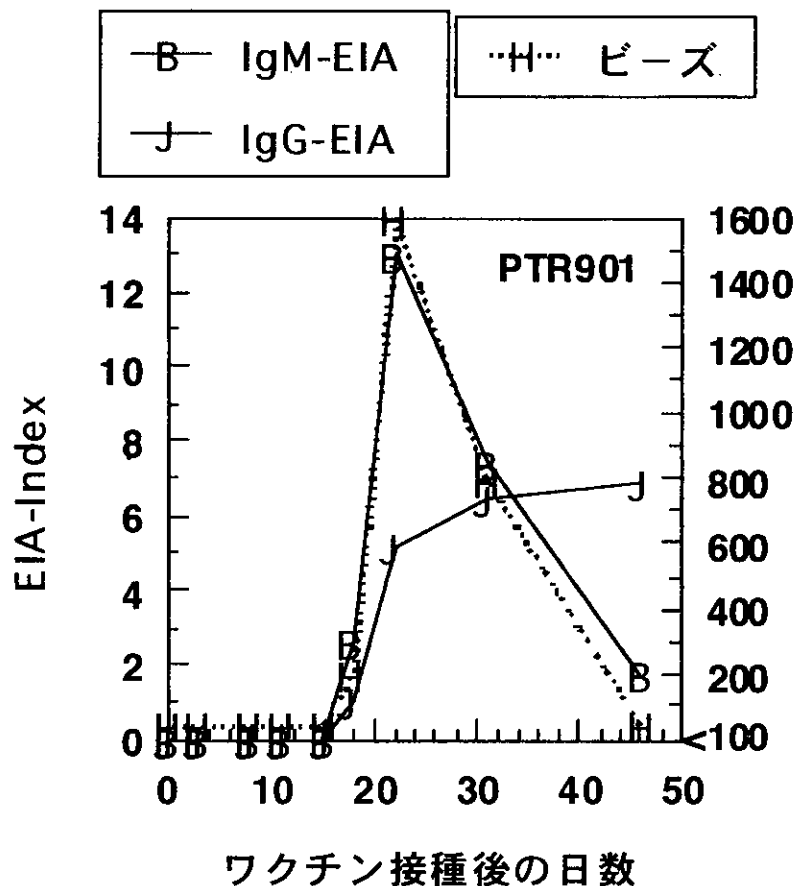
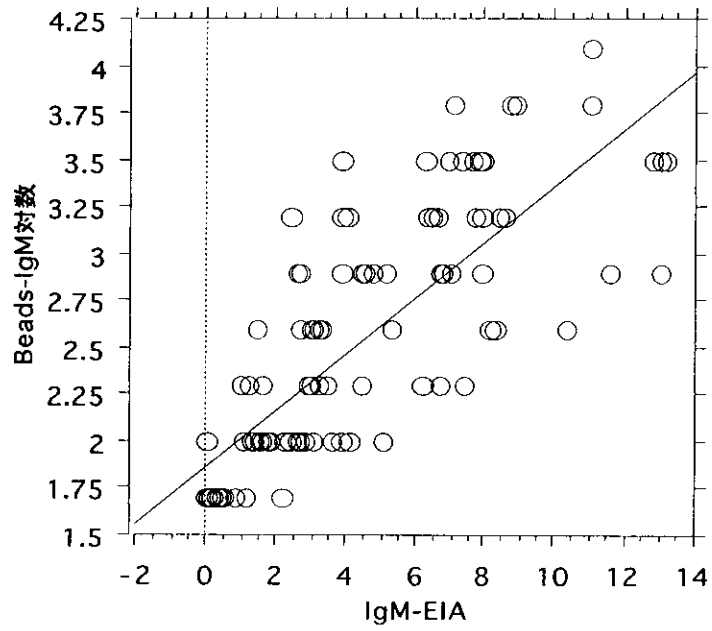


図2



相関係数

	IgM-EIA	Beads-IgM対数
IgM-EIA	1.000	.816
Beads-IgM対数	.816	1.000

124 観測資料を計算に使用。

## セラミック-ナイロン複合体粒子凝集法による抗 HIV-IgG の検出

山本 晃、黒澤 八重（旭光学工業）

本田 三男、仲宗根 正（感染研、エイズ研究センター）

中山 幹男、高橋 智彦、倉根 一郎（感染研、ウイルス1部）

【目的】抗ヒト IgG 抗体をコートしたアパタイトセラミック-ナイロン複合体粒子を作成し、それを用いた粒子凝集法によるヒト血清試料中の特異抗体検出法を開発した。今回我々は上記の粒子凝集法を用いて、ヒト血清試料中の抗 HIV-IgG の検出を試み、新しい抗体検出法の有効性を検証した。

【方法】アパタイトセラミック-ナイロン複合体粒子は、着色ナイロン粒子にメカノフュージョン法によりヒドロキシアパタイト薄膜を形成させ調製した。この複合粒子に抗ヒト IgG およびカゼインを吸着させて、ヒト IgG 検出用の粒子を得た。一方、96穴マイクロプレートには、HIV のコア蛋白質である p24 リコンビナント抗原を濃度  $0.5 \mu\text{g/ml}$  でコートした後、カゼイン溶液でブロック処理を行った。

凝集反応には、HIV 感染を疑われたヒト血清 100 検体および、健常日本人血清 68 検体を用いた。血清試料は 1 : 100 から 1 : 12,800 倍までマイクロプレート上で希釈し、抗原と室温下 1 時間反応させマイクロプレートを洗浄した。抗ヒト IgG 抗体を固相化した粒子の懸濁液  $100 \mu\text{l}$  を滴下し、約 1 時間の静置後、凝集像を観察した。

【結果】粒子凝集法による抗 HIV-IgG 検出の結果は、市販の抗 HIV 抗体検出キット（ウェスタンブロット法）を用いて行った抗体検査の結果と 1 例を除いて全て一致した。抗 HIV-IgG 陰性血清試料は、68 例全てが粒子凝集法においても陰性を示した。

【考察】昨年度の本研究会において、我々は同様の方法を用いることにより、抗ムンプスウイルス-IgG の検出が可能であることを報告した。本法の有用性をさらに検証するために、本年度は抗 HIV-IgG の検出を試み、本法が抗 HIV-IgG の検出にも適用可能であることが示唆された。これらの結果から推測すると、本法における抗ヒト IgG 抗体をコートした粒子は、ELISA 法における酵素標識抗体と同様に、マイクロプレート上の抗体分子を可視化するという機能を有していると考えられる。

# ELISA によるヒト血清中の抗ポリオウイルス抗体価の測定

## —抗体価算出方法の検討—

宮沢美和子、堀江 均、清水 文七、橋爪 莊 (財 日本ポリオ研究所)

### 【目的】

ポリオ根絶計画を進めていくうえで、ポリオウイルスサーベイランスを強化することは必須であり、その際ヒト血清中の抗ポリオウイルス中和抗体価を把握することが重要となってくる。従来、血清中の中和抗体価測定には培養細胞による中和法が行なわれてきた。しかし、無菌操作や細胞培養など煩雑な操作を必要とするうえ、無菌室等を備えた施設でしか行うことができないことや、結果の判定までに1週間程度必要であるため、迅速検査として実施することができない等の問題があった。そこで、簡便かつ迅速に行うことができる ELISA によるポリオウイルス抗体価測定を試みた。

### 【材料と方法】

ELISA は、まず一定量の各血清型ワクチンウイルス（不活化または生ウイルス）と希釈した被検血清を等量混合し、36℃で3時間加温後4℃で一晩静置した。次に、これを各型特異的に反応する抗ポリオウイルスモノクローナル抗体をコートしたプレートに移し、36℃1時間加温を行った。その後抗ポリオウイルスウサギ血清、HRP0 標識抗ウサギ IgG 抗体を順次反応させ、発色後 492 nm の吸光度を測定した。既定量の抗体価の標準血清についても同様に操作を行い、その吸光度から回帰直線を作成した。同様に各血清サンプルについても回帰直線を作成し、平行線定量法によりサンプル中の抗体価を算出した。被検血清として生ポリオワクチンを接種したヒト血清を使用した。培養細胞による中和法は HEp-2C 細胞を用いたマイクロ法で行った。

### 【結果】

生ポリオワクチンを接種したヒト血清中の ELISA による抗ポリオウイルス抗体価は、中和法との結果との間に高い相関性が見られた。被検血清との反応に使用するウイルスに不活化ウイルスを使用しても、生ウイルスを使用した場合との間に差は見られなかった。また、今回平行線定量法により抗体価の算出を行ったが、50%吸光度が減少したときの血清希釈倍率を抗体価とする従来の方法と比べて中和法との相関性が高かった。

### 【考察】

ポリオウイルス根絶に伴って、ポリオウイルスの封じ込めが厳しくなり、限られた施設でしか生ウイルスを取り扱うことができなくなることが予想される。そのため、今回報告した不活化ポリオウイルスを使用した ELISA の系は、そのような状況下でもポリオウイルスサーベイランスの際に大量に得られるヒト血清の抗体価測定に有効に利用できることが期待される。



## B型肝炎ワクチンの試験管内力価試験法の検討

清原 知子、戸塚 敦子、佐藤知子

(国立感染症研究所 ウイルス製剤部不活化ウイルスワクチン室)

【目的】 現在、我が国ではB型肝炎ワクチンの力価測定として*in vivo*試験を行っている。これはマウスにワクチンを接種し、産生された抗HBs抗体をELISA法などで測定する方法である。一方、欧米では*in vivo*試験と共に試験管内 (*in vitro*) 試験が採用されている。*in vitro*試験はワクチンに含まれるHBs抗原量をELISA法等で測定するものである。*in vivo*、*in vitro*のいずれもリファレンスワクチンに対する相対力価で評価する。1997年にDobbelaerらは組み換えB型肝炎ワクチンの*in vitro*試験の方法およびリファレンスについて報告を行い、各ワクチンメーカー固有のリファレンス(ワーキングリファレンス)が必要なこと等を指摘した。今回我々は国内に流通するワクチンについて*in vitro*試験を行い、今後の可能性について検討した。

### 【材料・方法】

#### 材料

現行の*in vivo*試験でナショナルリファレンスとして使用している参照ワクチン LotP3 (Ref.)、及び国内で流通しているワクチンの中から4社(A,B,C,D)、各5ロット(1-5)ずつを使用した。各社特定の1ロット(A-1, B-1, C-1, D-5)をそれぞれのワーキングリファレンスとした。

#### 試験方法の検討

各サンプルについて異なる条件の抗原回収操作を行い、ELISAに及ぼす影響を比較した。ELISAには研究室で作製したKitと市販のKit(エンザイグノストHBsAg5.0: デイド・ベアリング社)を使用した。

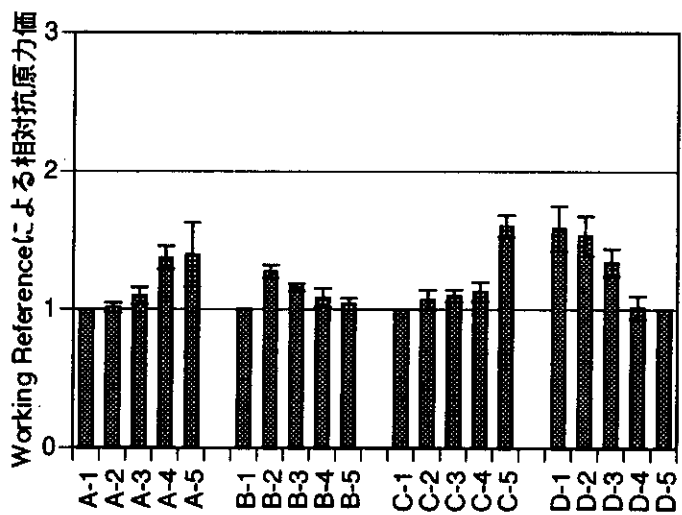
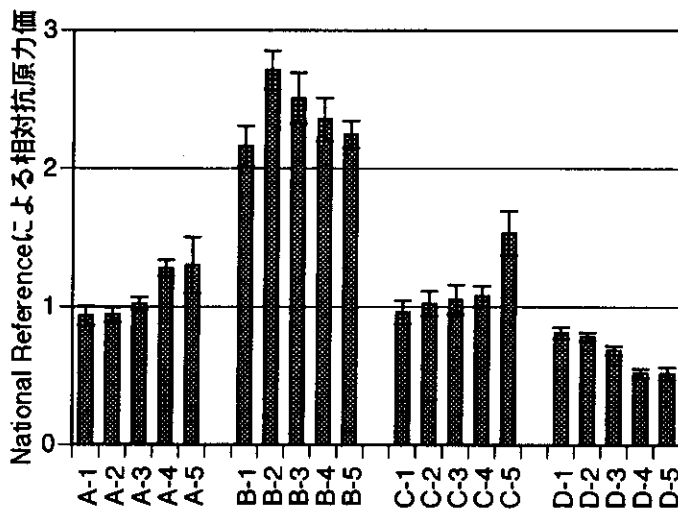
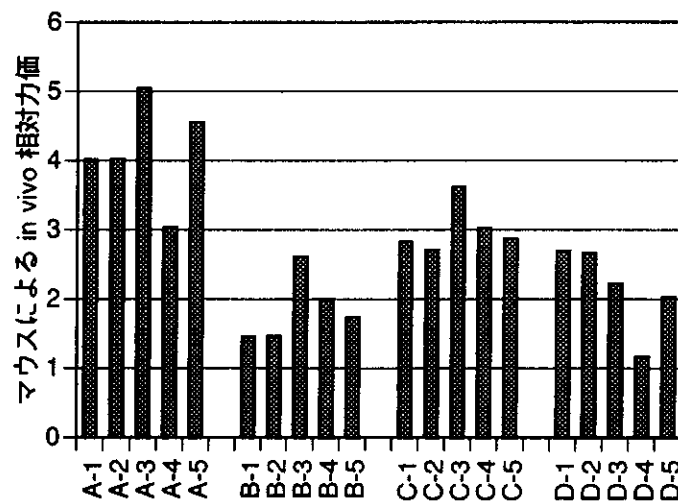
#### ナショナルリファレンスとワーキングリファレンスの比較

ナショナルリファレンスとワーキングリファレンスに対する各ワクチンの相対抗原力価を算出し、*in vivo*相対力価と比較検討した。

【結果と考察】 Dobbelaerらの報告では抗原回収操作は不要であるとされていたが、今回使用したワクチンにはこの操作を必要とするものもあった。

ELISAのOD値から相対抗原力価を算出する際、ナショナルリファレンスを使用すると、各メーカー間の相対抗原力価の差が大きかった。この要因として、サブタイプの違い、アジュバントの種類などが挙げられる。メーカー間の差はワーキングリファレンスを使用することで補正できた。

以上のことから国内で流通しているワクチンを*in vitro*試験で評価する場合は抗原回収操作を含む試験方法とワーキングリファレンスを設定する必要があると示唆された。また、*in vivo*と*in vitro*の結果が必ずしも相関するものではないことから、*in vitro*試験においては相対抗原力価だけでなく、抗体誘導活性を確認する試験を併用することが望ましい。



マウスによる in vivo相対力価（上）、  
National Referenceによる相対抗原力価（中）、  
Working Referenceによる相対抗原力価（下）

## 単クローン抗体による A 型肝炎ウイルス抗原定量上の問題点

戸塚 敦子、清原 知子、佐藤知子（国立感染症研究所 ウイルス製剤部）

【目的】 A 型肝炎ウイルス（HAV）はピコルナウイルス科ヘパトウイルス属に分類されている。HAV は 1～7 の遺伝子型に分類され、1 型、3 型には A と B の亜型が存在する。このうちヒトからは 1, 2, 3, 7 型が分離されているが、ウイルス構造蛋白の相同性は高く、既知の中和抗原関連部位のアミノ酸残基はほとんど一致している。HAV は血清型がひとつであり、回復期血清等による反応性から株間の抗原性の違いがないとされている。しかしながら、われわれは抗 HAV 単クローン抗体（mAb）の中にはウイルス遺伝子型 1A、1B、3B に対し、特異的な反応を示すものを認めている。HAV の構造蛋白上には、遺伝子型特異的なアミノ酸置換が存在し、1A 型と 1B 型の間には 2 ヶ所、1 型と 3 型では 14 ヶ所に違いが認められる。われわれは 3B 型感染性 cDNA クローンに、1 型特異的なアミノ酸への変異をもたらす塩基置換を導入し、その転写 RNA を培養細胞に接種後、増殖した HAV と mAb との反応性を調べることにより、mAb の特異性を決定する置換部位を確認した（戸塚敦子等、第 47 回日本ウイルス学会、1999 年横浜）。こうした特異的な反応性を示す mAb を抗原定量キットの検出系に使用すると、ウイルス株によっては正しい定量値が得られず、また実験ごとのばらつきも大きい。

今回はビオチン化したポリクローナル抗体（pAb）または mAb と各 HAV 株との反応を、ウイルス量と抗体濃度を変えて ELISA により詳細に検討した。

【方法】 1 種類の抗体と 3 種類の HAV 抗原の反応を調べるために、抗 HAV ウサギ pAb を固相化した 96 ウェルプレート 3 枚を用いた。HAV 抗原としては、精製した KRM031p52（遺伝子型 1A）、TKM005p51（1B）、KRM003p72（3B）を OD260nm 値より計算して 10 μg/ml に希釈して、等量の 1:2000 ホルマリンを加え、37℃ で不活化したものをストックとした。各抗原について 0.1%ゼラチン加 PBS-T で 1:500（10 ng/ml）から 2 倍階段希釈を 4 段階 3 系列作り、A 列に希釈液、また 3 種類の各抗原各希釈を順次 1 から 12 列の 7 ウェル（B～H）に加えた。3 枚の抗体固相化プレート毎に異なる配置に各抗原希釈が入るように工夫した。4℃ 終夜反応後、プレートを洗い、0.5 log 階段希釈したビオチン化抗 HAV 抗体を A4～A9 の各 1 ウェルと B～H の各 12 ウェルに順次加え、37℃ で 2 時間おき、洗浄後 HRPO-アビジンを 37℃ で 1 時間反応させた。3 枚のプレートの結果を合わせ、各ビオチン化抗体濃度ごとに、測定吸光度の log 値と、3 種類の抗原希釈の log 値とから平行線定量法により 1A 型に対する相対力価として計算した。

【結果】 今回の解析には、3B 免疫ウサギ pAb、1A 感染ヒト pAb、1A 免疫により得られた 2 種類の mAb（A21, A24）、1B 免疫により得られた 3 種類の mAb（B4, B7, B8）、3B 免疫により得られた 11 種類の mAb（F8, F12, F31, F42, F59, F60, F87, E2, E24, E34, E75）を用いた。ELISA 試験により抗体濃度依存的に各抗原量での反応 OD 値は上昇したが、ある抗体濃度以上では頭打ちとなり飽和閾値に達した。ほとんどの mAb は HAV 遺伝子型特

異的な反応は示さず、1A型に対する1B、3B型HAVの相対力価は1に近かった。これらの中には高希釈領域で僅かの特異性を示す抗体も存在した。

しかしながら3種類のmAbは、強いHAV遺伝子型特異的な反応性を示した。3B型免疫によるmAb E34は低濃度では1A型とはほとんど反応しないため、低濃度領域では1B型と3B型の1A型に対する相対力価は80を超えた。しかしE34の濃度が上がるにつれて1A型との結合性が増すために、相対力価は抗体濃度が高くなるにつれて漸次低下し、1:100希釈では1.8となった。また1B型免疫によるmAb B8は1A型と1B型には同程度の反応性を持つのに対し、3B型HAVとの反応性が低く、その反応も抗体濃度依存性であるため、1B型の1A型に対する相対力価は抗体濃度にかかわらず1に近い値を示し、一方3B型の力価は0.17から0.9と抗体濃度の増加につれて上昇した。また1A型免疫によるmAb A21は3B型に対してはB8同様の低い反応性を示し、1B型に対しても1A型と比べると少し低い反応性を示す抗体であった。このことから、E34とB8の適当な希釈を用いると、未知のHAVの遺伝子型が推定できることが明らかになった。

B8抗体で反応時間の影響を調べた。抗体の反応時間が短いほど、3B型の相対力価は低く算定される傾向が認められたが、反応時間は抗体濃度ほどの影響を示さなかった(表1)。

【考察】最近の市販キットには、mAbが使用されているものが多い。HAワクチン参照品設定のためのWHO国際共同研究においては、抗原定量の標準法として採用されたキット(抗HAV抗体測定用ELISAキットであるが、抗原測定も可能であった)のHRPO-mAbがB8の性状と一致していたため、1A型参照品候補に対する3B型候補の力価が低く算定された。またin house試験では算定力価の研究室間のばらつきが大きかったが、これも一部の研究室で使用された抗体がB8様の特異性を持っていたという推定と、低い抗体濃度によるウイルス株特異性の増強のためと説明できる。

HAVのように株間の抗原性の違いが少ないウイルスであっても、異なる株間またはワクチン間の抗原濃度を抗原抗体反応により定量する場合には、使用する抗体の性質、濃度、反応時間に注意を払うべきである。抗体はmAbのミックスか、pAbが適当で、なるべく抗体濃度を高く、反応時間を長くすると正しい結果が得られる。一方mAbパネルを低濃度で使用すると、ウイルス株特異性が増加し、遺伝子型を超えた株の区別が可能となる。

表1. B8を使用した場合の1A型に対する各遺伝子型HAVの相対力価

遺伝子型		1B			3B		
		0.5h	1h	2h	0.5h	1h	2h
抗体希釈 (log)	-6.0	0.75	0.89	0.94	0.13	0.14	0.17
	-5.5	0.90	0.86	0.94	0.17	0.21	0.27
	-5.0	0.88	0.95	0.95	0.26	0.36	0.46
	-4.5	0.91	0.99	0.96	0.45	0.59	0.63
	-4.0	0.92	0.97	1.03	0.67	0.76	0.80
	-3.5	0.88	0.93	1.05	0.76	0.85	0.92
	-3.0	0.97	0.97	1.03	0.87	0.87	0.93

## 分担研究報告書

### Ⅱ. ワクチン改良の必要性 に関する臨床疫学的研究

# ワクチン改良の必要性に関する臨床疫学的研究

分担研究者 岡部 信彦（国立感染症研究所）

研究協力者 宮崎 千明（福岡市立あゆみ学園）

## 研究要旨

ワクチン改良が求められる問題点を解析してワクチンの発展に資するべく、全国の臨床医家、疫学者の協力を求めて必要な情報を収集した。

ワクチン種類別に検討した結果、早急に対策を立てる必要のある事項として、①麻疹流行の被害を防ぐために、麻疹ワクチンの接種率を上げ、かつ1歳に達したら早い時期に接種を受けるよう勧奨すること、②ハイティーンから20歳代の風疹抗体保有率の低いことから、風疹ワクチン接種を積極的に推進すべきことが要望された。これらの事項は、平成14年4月に改訂される母子健康手帳の記載に反映させ、また風疹については予防接種法の一部改訂に際して中学卒業生でも受けられるような経過措置がとられた。

ポリオについては、生ワクチンを不活化ワクチンに切り替えるべき時期にきており、このための措置を早急に検討すべきことが提議された。

また、予防接種対象疾患とその周辺疾患の実態を絶えず把握しておくことの必要性が指摘され、急性神経系疾患のごとき背景疾患の調査の継続が提案された。

## A. 研究目的

ワクチンの改良が要望される問題点等を把握するために、全国の臨床医等から情報を収集し、ワクチンの副反応や有効性、さらに背景にある予防接種対照疾患の状況を把握して解析する臨床疫学的調査研究を目的とする。

## B. 研究方法

全国のワクチン・予防接種に関する臨床医学、疫学、ワクチン研究者、各地域における予防接種事業の指導的立場の臨床医の協力を得て、ワクチン研究を臨床研究とコーディネートする形で実施した。本年度はまず書類によって研究協力者との情報交換を行い、研究及び調査結果の報告を得た上で、年度末に全員の出席を求める総会を開催し、検討を行った。また、ワクチンや予防接種に関する最新の知見を各地域の臨床・疫学研究者に伝え、現在直面している諸問題を解決に導くために次年度に向けての研究を依頼した。

## C. 研究結果

### 1. DPTワクチンの検討

さいたま市浦和地区では1979年より経年的にDPTワクチンの局所反応を、メーカー別に調査しているが、94年頃から、ワクチンの改良のためか各社とも局所反応の減少が目立っている。本年度も肘を越える強い発赤腫脹例は一例もなかった。福岡市の調査では、

D T 2 期の副反応は、現行 D P T ワクチンを受けた子どもたちが対象になってきた 1991 年頃から増加傾向にあったが、個別接種になったこと、接種方法について医師会から介入（指導）のあったことが奏効したのか、最近では減少してきていることが報告された。また現行無細胞百ワクになった D T a P とかつての D T w P を受けた若年成人の抗体価を比較したところ、ワクチン接種後 12 ～ 18 年を経ているにも関わらず D と T の抗毒素抗体価 F H A 抗体価に関してはいずれも D T a P の方が高く、副反応の少ないことと相俟って現行 D T a P ワクチンの優秀性が示された。

## 2. 麻疹ワクチンの検討

麻疹の罹患状況については、各地から小流行の報告があり、併せて年長児、成人の罹患、及び 1 歳未満の乳児の罹患例の増加が報告された。対策としては、ワクチン接種率の向上、とくに 1 歳に達したならば早期に接種を受けるよう周知させることの必要性が、多くの研究協力者から提言された。これらの意見を反映させて、平成 14 年 4 月から改正、配布される母子健康手帳には、「麻疹の予防接種は、1 歳になったらできるだけ早めに受けるようにしましょう」との注意書きを加えることになった。また、麻疹流行の大きかった地域では予防接種率が低かったこと、罹患者はほとんどが予防接種を受けておらず、ワクチン接種が無効であったり、抗体価の低下によって罹患した例は少ないことも報告された。現行ワクチンを高い接種率で実施することによって、麻疹流行は十分抑制されると考えられる。

## 3. 風疹ワクチンの検討

風疹予防接種は、経過措置による中学生年代の接種率が極めて低いことから、妊娠年齢女性の罹患による先天性風疹症候群の増加が危惧されている。年齢別の抗体保有率を調査した成績では、1 ～ 3 歳の感受性率は男 53 %、女 48 % であって流行の素地の高いこと、20 ～ 30 歳代では男 25 %、女 5 %（約 86 万人）が抗体陰性であることから流行時の被害の大きいことが示された。平成 13 年の予防接種法一部改正では、経過措置中の中学生以上の年代での風疹予防接種の勧奨について配慮された。

## 4. ポリオワクチンの検討

ポリオ生ワクチンの接種回数別、経年別に抗体保有状況を調査した成績では、1 回接種でもⅡ型は 95 %、Ⅰ型は 90 % の抗体獲得であったが、Ⅲ型は 60 % であった。2 回接種でⅠ型は 95 %、Ⅱ型はほぼ 100 %、Ⅲ型は約 80 % になった。西太平洋地域で野生株ウイルスが根絶された現在、生ワクチン服用者自身での麻痺発症や、服用児の父親が麻痺発症したケースが稀ながら存在しているので、近々不活化ワクチンに切り替えて世界的根絶を待つのが得策と考えられる。その方向への選択肢を挙げて検討が呼びかけられた。一方、マウス実験のレベルだが、不活化ポリオワクチンにアジュバント等を加えて経鼻接種し、抗体の上昇を見た報告された。注射を必要としない接種法として将来が注目される。

## 5. 日本脳炎ワクチンの検討

日本脳炎のブタ及びヒトの疫学調査によれば、日本脳炎ウイルスの侵淫状況は現在もお高い状況を保っているが、コガタアカイエカの生息状況とブタの飼育場所の限局化から感染機会が減り患者も減少してきているが、発生抑制にはなお予防接種が必要である。現行ワクチンはゼラチンを除去する改良を加え、即時型アレルギー性副反応が明らかに減少した。

#### 6. ムンプスワクチンと水痘ワクチンの検討

ムンプスワクチンの副反応として無菌性髄膜炎（AM）が問題となるが、現行3社のワクチンでの発症率は0.08%であり、自然罹患例での1.20%に比して明らかに有利であった。また保育園での流行に際しての有効性も明らかにされた。

水痘ワクチンの有効性の検討では、接種者のその後の罹患率は、456例中12.3%であり、症状は自然罹患よりも軽症であった。

#### 7. BCGの検討

近年の小児結核の経験の報告では、1歳児の粟粒結核と結核性髄膜炎の各1例と12～13歳の肺結核があり、1歳例はいずれもBCG既往がなく、13歳児2例ではBCG既往があった。乳児期のBCGは積極的に勧奨すべきである。

#### 8. 小児急逝神経系疾患（AND）調査について

これまでに行われてきたAND調査成績から、細菌性髄膜炎、脳炎・脳症の原因別修正報告が行われた。細菌性髄膜炎の再増加傾向、耐性菌問題、インフルエンザ脳症の急増など、今後注目して追跡・分析すべき点が指摘された。

#### 9. ワクチン副反応例の報告

最近では重症の副反応例は減少してきているが、検討を要する症例が各地から報告された。

### D. 考察と総括

本研究班では、ワクチン改良が求められる問題点を解析してワクチンの発展に資するべく、全国の臨床医家、疫学者の協力を求めて必要な情報を収集した。40題を越える報告が寄せられ、総会において発表、討議された。

ワクチン種類別に検討した結果、早急に対策を立てる必要のある事項として、麻疹流行の被害を防ぐために、麻疹ワクチンの接種率を上げ、かつ1歳に達したら早い時期に接種を受けるよう勧奨すること、ハイティーンから20歳代の風疹抗体保有率の低いことから、風疹ワクチン接種を積極的に推進すべきことが要望された。接種率向上を図るためには、平成14年4月からの母子健康手帳の改訂に当たって、1歳6か月、3歳、6歳の健診の時点で予防接種状況をチェックする欄を設けて未接種者に接種を勧奨すること、麻疹ワクチンは1歳になったら早く受けるようにとの注意書きを加えた。風疹については予防接種法の一部改訂に際して中学卒業生でも受けられるような経過措置がとられた。

ポリオについては、生ワクチンを不活化ワクチンに切り替えるべき時期にきており、このための措置を早急に検討すべきことが提議された。

また、予防接種対象疾患とその周辺疾患の実態を絶えず把握しておくことの必要性が指摘され、急性神経系疾患のごとき背景疾患の調査の継続が提案された。



## DPT 副反応調査報告 局所反応ロット別比較（第11報）

太田 耕造、阿部理一郎、瀬端 秀宣、手嶋 力男、阿部 恒保（浦和医師会）

### キーワード；DPT、局所反応

浦和医師会では昭和54年よりDPTワクチン接種後の局所の副反応について、本研究班に報告してきた。

平成13年5月より浦和市、大宮市、与野市が三市合併し新たに、さいたま市として発足したが、今回の報告はそれ以前の旧浦和市に於いて行われた調査結果である。

我々が調査の対象としている微研、北里、武田、化血研、各社のワクチンの継続的調査ではここ数年ワクチンの改良により各社共に局所反応の減少が目立っている。

アンケート回収率は前回、第10報で個別接種となり回収率が平均62.8%に上昇したことを報告したが、ひきつづき本会員が調査対象者に対し調査の意味などを説明することによって高い回収率を維持することができた。

### 調査方法

今回の調査期間は平成11年4月から13年9月までで、使用ワクチンは前期を4月～9月、後期を10月～3月とした6ヶ月単位で同一ロットを全市で統一し使用した。浦和市では平成6年10月の予防接種法の改正にともない個別接種が行われており、協力医療機関27医療機関においてDPT接種時に個別にアンケート用紙を保護者に手渡し、記入後投函してもらい回収する方法をとった。配布枚数は1期1回目1,000枚、2回目500枚、3回目500枚、1期追加1,000枚、合計2,000枚用意したが、実際に配付されたのは化血研 04C,1期1回目791枚,1期2回目406枚、1期3回目388枚、1期追加731枚で各々の回収率は69.5%,73.6%,63.1%,49.2%、平均63.8%、微研 3AA11,1期1回目792枚,1期2回目372枚、1期3回目402枚、1期追加731枚で各々の回収率は69.1%,76.3%,63.4%,60.4%、平均67.3%、微研 3AA13,1期1回目806枚,1期2回目394枚、1期3回目380枚、1期追加768枚で各々の回収率は72.3%,72.5%,63.1%,54.0%、平均65.5%、北里 66-1,1期1回目772枚,1期2回目381枚、1期3回目380枚、1期追加735枚で各々の回収率は67.1%,72.9%,66.1%,51.0%、平均64.3%、武田 HJ094B,1期1回目786枚,1期2回目387枚、1期3回目396枚、1期追加749枚で各々の回収率は74.3%,68.2%,65.6%,60.7%、平均67.2%、であった。前回の報告ではアンケートの回収率の平均が62.7%であったことから今回さらに回収率の向上が認められた。

### 調査結果

表1,2,3,4に各接種時期による副反応発現の様子を示した。接種部位の発赤については、24時間後、7日間いずれも、++：直径5cm以上、+：直径5cm以下、±：少し赤い、

-: 発赤なしとした。接種部位の硬結は、+: はっきり触れる、±: 少し硬くなっている、 -: 硬結なし、とした。発赤、硬結24時間後に関しては当然の事ながら一期一回目は程度、頻度ともに少ないが、一期二回目、三回目では各ロットも両者に目立った差は認めなかった。硬結、発赤ともに一期追加で程度、頻度が高く、過去の報告と有為な差は認めなかった。発赤7日目に関しては一期一回目に各ロットとも+の割合が多く一期一回目に発赤が長く残る傾向にあった。今回の調査ではアンケートの回収率は平均で65.6%で前回の62.7%を上回った。一方で一期追加に関する回収率が平均55.1%と目立って低かった。

#### まとめ

浦和医師会（旧浦和市医師会）では、昭和54年春よりDPTワクチンの副反応についてハガキによるアンケート調査を実施、報告して来た。平成11年3月の第10報に引き続き継続調査したので報告する。前回は報告したが、平成6年頃のワクチンから、発赤、硬結共に局所反応が減少して来たが、今回も同様の結果が得られた。肘をこえて腫脹する例は一例も報告されなかった。

アンケートの回収率は徐々に上がってきているが、これは協力医療機関において医師が個別にアンケート調査の必要性和重要性を保護者に説明することによるもので、今後もいっそうの努力が不可欠である。一期一回目、二回目、三回目は保護者の感心も高く回収率が高い傾向にあるが、追加となるとややその感心も薄れるのか回収率が下がるので、一期追加のデータは局所反応データとして最も重要であり、今後その点にも注目しながら回収率の向上に一層努力したい。近年はほとんどすべてのワクチンにおいて、ゼラチン無添加となり副反応の大きな原因の一つが取り除かれ、現場でもここ数年特に副反応の減少が実感される。今後チメロサル等の添加物に対する改善が進み、各社の積極的な対応もなされており関係各位の御努力に感謝するとともに、現場のデータと研究開発部門の密な連携によるより安全なワクチン開発を期待する。

表1 発赤24時間後

Lot.番号	一期一回目					一期二回目				
	++	+	±	-	例数	++	+	±	-	例数
	%	%	%	%		%	%	%	%	
化血研 04C	0.2	2.2	12.8	84.8	550	3.7	20.3	31.1	44.9	299
微研 3AA11	0.0	3.0	18.8	78.2	537	6.9	43.3	30.7	19.1	277
微研 3AA13	0.0	2.1	17.5	80.5	573	9.6	34.5	23.5	32.4	286
武田 HJ094B	0.2	6.5	33.2	60.1	584	4.2	27.7	36.7	31.4	264
北里 66-1	0.0	11.5	34.6	53.9	514	1.8	25.3	38.8	34.1	278

Lot.番号	一期三回目					一期追加				
	++	+	±	-	例数	++	+	±	-	例数
	%	%	%	%		%	%	%	%	
化血研 04C	0.8	14.5	31.8	52.9	245	8.7	31.5	27.0	32.9	360
微研 3AA11	4.9	24.9	33.1	37.1	245	24.5	36.4	21.5	17.6	437
微研 3AA13	6.4	23.4	28.9	41.3	235	16.0	34.4	24.3	25.3	407
武田 HJ094B	3.8	22.3	31.2	42.7	260	11.4	36.0	27.0	25.5	455
北里 66-1	4.8	15.3	37.8	42.2	251	8.6	33.2	31.4	26.8	375

表2 発赤7日間

Lot.番号	一期一回目					一期二回目				
	++	+	±	-	例数	++	+	±	-	例数
	%	%	%	%		%	%	%	%	
化血研 04C	0.9	11.6	11.0	76.5	536	0.0	4.2	11.5	84.3	286
微研 3AA11	0.6	18.7	13.2	67.6	524	0.4	4.1	16.9	78.7	267
微研 3AA13	0.4	16.1	13.5	70.1	273	0.4	2.2	12.1	85.3	273
武田 HJ094B	0.3	10.3	18.7	70.7	584	0.0	1.9	15.9	82.2	264
北里 66-1	0.0	5.0	12.2	82.9	518	1.5	2.6	13.9	82.0	278

Lot.番号	一期三回目					一期追加				
	++	+	±	-	例数	++	+	±	-	例数
	%	%	%	%		%	%	%	%	
化血研 04C	0.0	2.6	7.7	89.7	233	0.6	2.9	19.1	77.5	346
微研 3AA11	0.0	0.8	10.9	88.3	239	1.7	3.4	17.0	77.9	411
微研 3AA13	0.4	1.8	10.1	87.7	227	1.5	2.3	17.3	78.9	388
武田 HJ094B	0.0	1.5	11.2	87.3	260	1.1	4.0	12.3	82.6	455
北里 66-1	0.0	1.7	10.6	87.7	251	0.5	4.4	18.7	76.4	375

表3 硬結24時間後

Lot.番号	一期一回目				一期二回目			
	+	±	-	例数	+	±	-	例数
	%	%	%		%	%	%	
化血研 04C	0.9	6.3	92.8	541	11.5	31.2	57.3	295
微研 3AA11	1.1	9.3	89.6	536	12.9	44.6	42.4	271
微研 3AA13	0.7	7.0	92.3	569	13.6	41.2	45.2	279
武田 HJ094B	1.5	18.2	80.3	584	15.5	39.0	45.5	264
北里 66-1	3.1	25.5	71.3	509	11.9	38.4	49.6	268
Lot.番号	一期三回目				一期追加			
	+	±	-	例数	+	±	-	例数
	%	%	%		%	%	%	
化血研 04C	9.2	30.0	60.8	240	21.1	36.5	42.4	356
微研 3AA11	10.7	37.7	51.6	244	28.1	40.7	31.2	430
微研 3AA13	10.9	33.9	55.2	230	21.8	44.7	33.5	403
武田 HJ094B	6.9	35.8	57.3	260	20.2	41.8	38.0	455
北里 66-1	9.4	36.9	53.7	244	20.7	40.2	39.1	368

表4 硬結7日後

Lot.番号	一期一回目				一期二回目			
	+	±	-	例数	+	±	-	例数
	%	%	%		%	%	%	
化血研 04C	7.5	15.2	77.3	533	6.6	24.7	68.6	286
微研 3AA11	10.7	20.0	69.3	547	5.8	23.2	71.0	284
微研 3AA13	6.7	21.1	72.2	564	3.7	19.5	76.8	272
武田 HJ094B	9.4	23.6	67.0	584	3.4	26.1	70.5	264
北里 66-1	3.8	17.8	78.4	500	4.9	27.1	68.0	266
Lot.番号	一期三回目				一期追加			
	+	±	-	例数	+	±	-	例数
	%	%	%		%	%	%	
化血研 04C	3.5	16.1	80.4	230	5.2	25.1	69.7	347
微研 3AA11	2.1	13.8	84.2	240	3.7	19.4	76.9	407
微研 3AA13	3.6	14.7	81.8	225	2.1	16.0	81.9	387
武田 HJ094B	3.8	10.4	85.8	260	3.3	15.2	81.5	455
北里 66-1	4.3	14.7	81.0	119	4.8	21.1	74.1	355