

バックグラウンドデータとの比較ができないので明確ではないが、死亡例発生はワクチン投与との時間的関連が認められた。

7. 黄熱ワクチンの品質評価に関する研究

分担研究者 倉根 一郎 (国立感染症研究所ウイルス第一部長)

共同研究者 高崎 智彦(国立感染症研究所)、飯塚 信二(厚生労働省横浜検疫所)

研究要旨 2001年に黄熱ワクチンの重大な副作用に関する報告があった。そのため、輸入黄熱ワクチンの検査法に関する検討をおこなった。現在輸入後に実施されている無菌試験、異常毒性試験に加えて、生ワクチンのウイルス力価試験およびウイルス同定試験を、プラーク形成法、遺伝子増幅法を用いることにより、確立することが十分可能である。

A. 研究目的

黄熱ワクチンは、1927年に Asibi という患者から分離された黄熱ウイルスを、弱毒化した生ワクチンである。ワクチンはワクチン株ウイルスを発育鶏卵に接種して作られている。日本で使用されているワクチンは Avantes Pasteur 社から輸入したもので、厚生労働省食品保健部からの依頼により国立感染症研究所で無菌試験・異常毒性試験を実施しているのみである。黄熱ワクチンは世界的に副作用の少ない安全性の高いワクチンとして知られている。しかし、2001年に死亡例を含む重大な副作用の報告があった。そこで、今回ウイルス同定および力価試験法について検討した。

B. 研究方法

1. 力価試験

Vero 細胞 9013 株および Vero 細胞 E6 株を 6 穴プレートに単層培養し、ワクチン液を接種し、1%メチルセルロース MEM (5%FCS 加) を上層し、7日後に10%ホルマリン液により固定後、メチレンブルー染色液により染色し、プラーク数を計測した。

2. RT-PCR 法

ウイルス RNA の抽出は、High pure viral RNA 抽出キット (Roche 社) を用いた。

(1) プライマー

- ① P1; 5' -TACCCTGGAGCAAGACAAGT-3'
P2; 5'-GCTTTTCCATACCCAATGAA-3'
- ② P1; 5' -TACCCTGGAGCAAGACAAGT-3'
P3; 5'-CACAAGTGAATTTGGCG-3'

(2) First PCR の増幅条件

逆転写反応	53℃	20分
First denaturing	92℃	2分
PCR(35 サイクル)		
Denaturing	92℃	1分
Annealing	53℃	1分
Extension	72℃	1分
Final extension	72℃	5分

(3) Second PCR の増幅条件

First denaturing	92℃	2分
PCR(25 サイクル)		
Denaturing	92℃	1分
Annealing	53℃	1分
Extension	72℃	1分
Final extension	72℃	5分

3. TaqMan PCR 法

Primer & Probe

Forward

Rt17D929: gTCgTgATTgCCCTACTggT

Reverse

Rt17D1127: TCTggACgACTCCACTCCTT

Probe

YF17D8311:

FAM-CCgCAgCAATgTCACATTTACTgT-TAMRA

リアルタイム PCR 増幅条件

48°C 30min.

95°C 10min.

95°C 15sec.

60°C 1min.

C. 研究結果

1. ウイルス力価の測定

黄熱ワクチンのウイルス力価を測定するため Vero 細胞を用いてプラーク形成試験を実施した。その結果、接種後 6 から 8 日目にプラークを形成した。形成したプラークは、図 1 に示す如く、直径 1mm から 2mm の大きさで極めて小さいが、測定は十分可能な明瞭なプラークである。測定の結果、同一バイアルのものを Vero9013 細胞と VeroE6 細胞で測定した場合、Vero9013 細胞では、 3.1×10^5 pfu/ml であり、VeroE6 細胞では、 2.4×10^5 pfu/ml であった。

2. PCR による遺伝子の検出

PCR による増幅の結果を図 2 に示す。その感度は、ワクチンを 10^4 希釈した段階で検出可能であった。これは、Vero9013 細胞によるプラーク測定結果から計算した場合、0.6 pfu/tube であった。Semi-nested PCR を実施した場合は、図 1 の下段に示す写真の如く、さらに 10 倍感度が上昇することが、確認された。

3. リアルタイム PCR による遺伝子の同定

リアルタイム PCR (TaqMan 法) の結果を図 3 に示す。感度は 0.1 pfu/tube であり、上記の PCR 法より、やや感度は良かったが、Semi-nested PCR とは、ほぼ同等と考えられた。

D. 考察

Vero 細胞を用いて黄熱ワクチンウイルスの力価を測定した場合、Vero 細胞の細胞株の違いにより、ウイルス力価 (プラーク数) が異なった。Vero9013 細胞が、VeroE6 細胞に比べて感受性が高かった。このことから、力価試験に際しては、Vero 細胞を用いる場合でもその細胞株の種類を限定する必要があると考えられる。たとえば、Vero9013 細胞を使用すると決めた場合でも、ある程度の数のロットに関して、ウイルス力価を測定し、どの程度の範囲内での変動があるのかというところを、ワクチン製造メーカーの自家試験結果と比較検討し、独自の基準を制定する必要があると考えられる。

PCR 法に関しては、0.6 pfu/tube という極めて良好な感度が確認された。黄熱ワクチンウイルス (17D 株) の同定のためには、リアルタイム PCR (TaqMan 法) によりその遺伝子配列に関して特異的なプローブで、PCR 産物を検出することによって、極めて少量の検体で迅速に同定できることが確認された。

E. 結論

黄熱ワクチンに関する重大な副作用情報が報告されたことから、わが国における輸入黄熱ワクチンの試験項目も、見直す必要があると考えられる。無菌試験・異常毒性試験以外に少なくとも、ウイルス力価試験および同定試験は、追加すべき試験と考えられる。そのための方法を検討した結果、比較的短時間で検査が可能であることが示唆された。今後あらかじめデータを蓄積することで、基準を作成することが可能である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 高崎智彦. 感染症の話「黄熱」. 感染症週報 23.9-12. 2002
2. 多賀賢一郎, 井村俊朗, 林 昭宏, 鎌倉

- 和政、橋本 智、高崎智彦、倉根一郎、
内田幸憲. 日本人ボランティアにおける
黄熱ワクチン接種後の抗体獲得に関する
検討. 感染症学雑誌. 76.738-746. 2002
3. 高崎智彦. 黄熱, その他のアルボウイルス
感染症. 小児科診療 65.2077-2081.
2002

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

図1

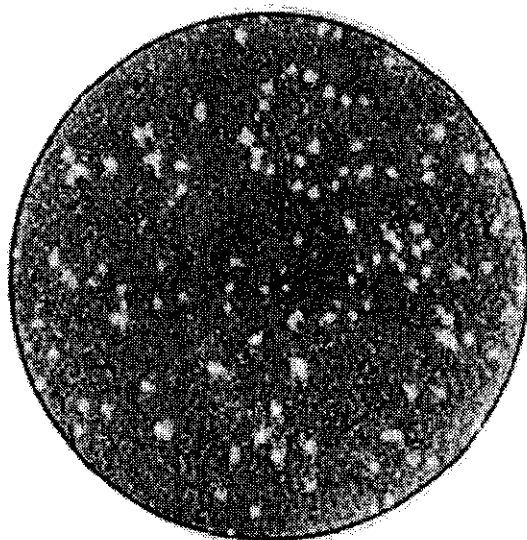


図2

YF vaccine (17D) PCR

<First PCR>

0 -1 -2 -3 -4 -5 -6 -7 + -

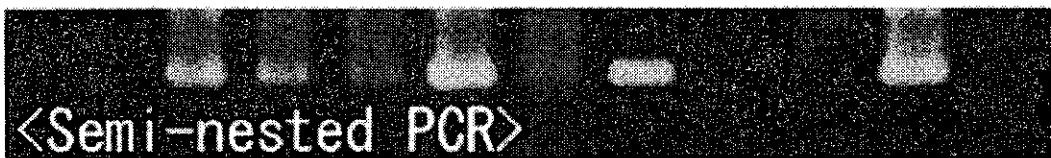
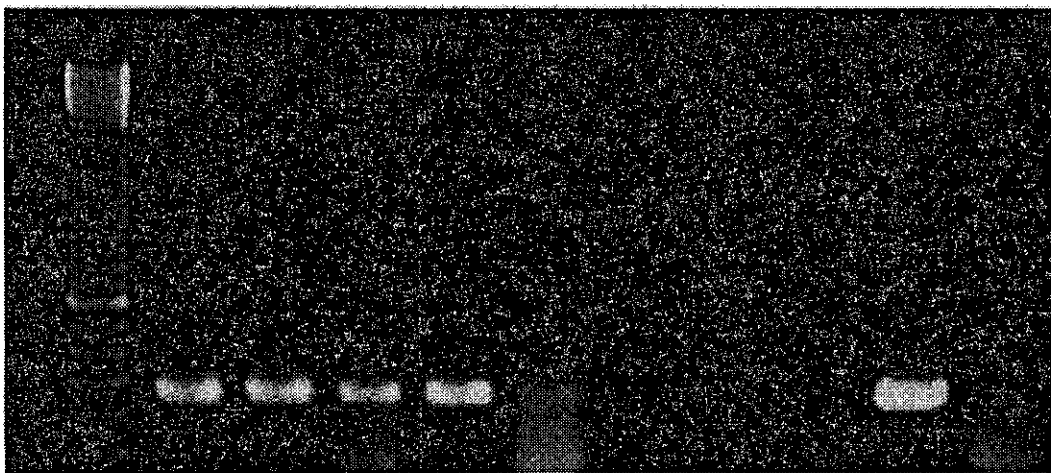
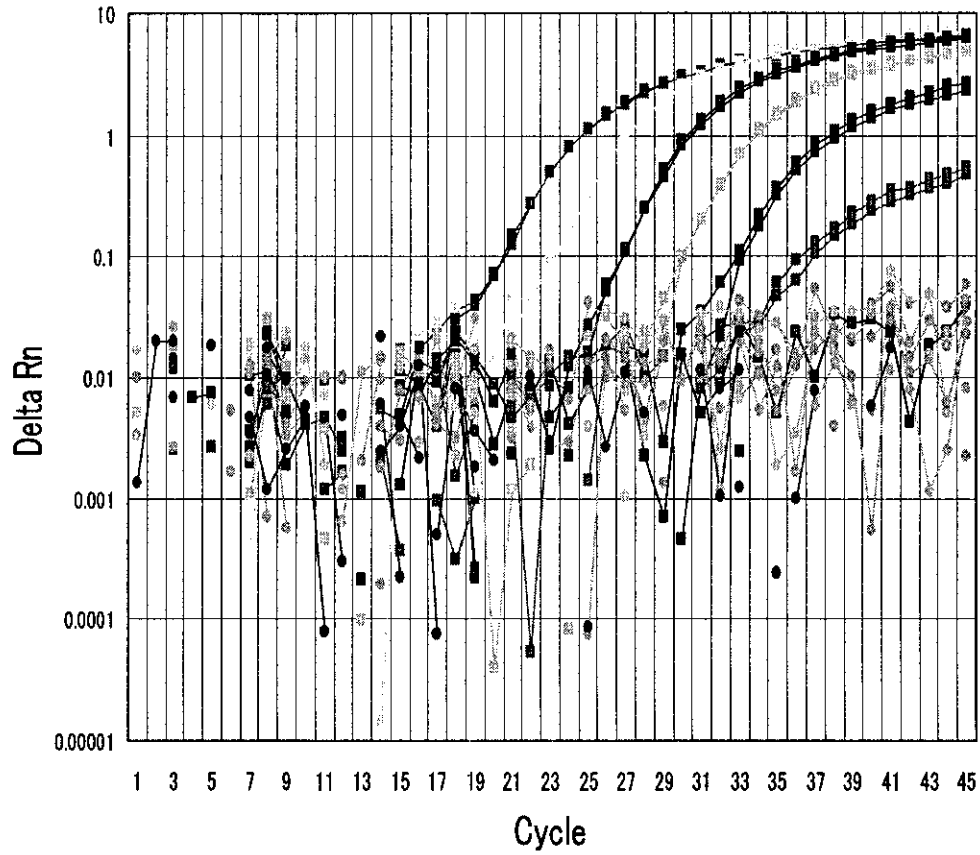


図3 TaqMan PCR の結果

Delta Rn vs Cycle



- 赤 10^4 pfu/tube
- 黄 10^3 pfu/tube
- 青 10^2 pfu/tube
- 黄緑 10 pfu/tube
- 紫 1 pfu/tube
- 桃 0.1 pfu/tube

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
種市麻衣子 内田哲也	完全フロイントア ジュバントのIgE 産生抑制機構	矢田純一	臨床免疫	科学評論社	東京	2002	102- 106

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Takahashi H, Kuroki T, Watanabe Y, Yamai S, Watanabe H	Identification of <i>tef</i> (B), encoding high-level tetracycline resistance, in <i>Neisseria meningitides</i> .	Antimicrob Agent Chemother	46	4045-4046	2002
Nakano Y, Mori M, Yamamura H, Naito S, Kato H, Taneichi M, Tanaka Y, Komuro K, Uchida T	Cholesterol inclusion in liposomes affects induction of antigen-specific IgG and IgE antibody production in mice by a surface-coupled liposomal antigen.	Bioconjugate Chemistry	13	744-749	2002
Naito S, Taneichi M, Kato H, Ami Y, Suzaki Y, Mori M, Nakano Y, Yamamura H, Morokuma K, Ohkuma K, Miyake H, Kiniwa M, Komuro K, Uchida T	Selective inhibition of systemic anti-OVA IgE production in response to oral preadministration with OVA-liposome conjugates.	Int Arch Allergy Immunol	129	in press	2002
Takahashi H, Kuroki T, Watanabe Y, Yamai S, Tanaka H, Inoue H, Watanabe H	Isolation of a <i>Neisseria meningitidis</i> strain from healthy carrier that is deficient in γ -glutamyl aminopeptidase activity.	J Cline Microbiol	40	3035-3037	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Taneichi M, Naito S, Kato H, Tanaka Y, Komuro K, Uchida T.	T cell-independent regulation of IgE antibody production induced by surface-linked liposomal antigen.	J Immunol	169	4246-4252	2002
Takahashi H, Watanabe H	Transconjugation of incompatibility group Q-broad host range vector into <i>Neisseria meningitidis</i> and its availability as genetical tools.	Microbiology	148	229-236	2002
多賀賢一郎、井村俊朗、林 昭宏、鎌倉和政、橋本智、高崎智彦、倉根一郎、内田幸憲	日本人ボランティアにおける黄熱ワクチン接種後の抗体獲得に関する検討	感染症学雑誌	76	738-746	2002
高崎智彦	黄熱, その他のアルボウイルス感染症	小児科診療	65	2077-2081	2002