

風疹ワクチン TO-336 株の性状について

牛島 廣治、柿沢 淳子、沖津 祥子（東京大学大学院医学研究科国際保健学専攻発達医科学）

【目的】風疹ウイルスは *Togaviridae* 科に属する、約 10,000 塩基の 1 本鎖+RNA ウイルスである。5'末端側に 2つの非構造蛋白 (p150 と p90) と 3'末端側に 3つの構造蛋白 (C、E₂、E₁) が code されている。風疹自体は通常軽い疾患で予後も悪くないが、妊娠初期の未免疫の女性が感染すると生まれる新生児に聾、白内障などの先天疾患が生じることから、これらを防ぐためワクチンが開発されている。日本で使用されているワクチン株は野生株を低温で継代することにより、小型プラークを形成する低温感受性株を樹立したものである。ワクチンの弱毒化機構解明のため、TO-336 ワクチン株 (TO-336vac) とその親株である TO-336 野生株 (TO-336wt) のゲノム配列を決定し、弱毒化に関わる変異部位の特定を試みた。

【方法】TO-336vac および親株 TO-336wt はウサギ腎細胞で培養し、培養上清よりウイルス粒子を集め濃縮した後、ウイルス RNA を抽出した。それぞれ cDNA を作成して配列決定を行った。2つの株の配列を他のワクチン株 (RA27/3 および Cendehill)、野生株 (Therien、M33) と比較した。構造蛋白 (SP) 領域 (3189 塩基) の系統解析は CLUSTAL W で行った。

【結果】TO-336vac と TO-336wt のゲノムは 3'-poly A tract を除いて 9762 塩基から成り、5'から 3'へ順に 40 塩基の 5'-untranslated region (UTR)、6348 塩基の NSP-ORF、123 塩基の UTR、3189 塩基の SP-ORF、62 塩基の 3'-UTR があつた。それぞれの塩基数は Therien、M33、RA27/3 と同一であつた。

TO-336vac と TO-336wt には塩基レベルで 21 個の違いがあつた。13 塩基は NSP-ORF 内、5 塩基は SP-ORF 内、そして各 UTR に 1 塩基ずつであつた。これらの変異は 10 残基のアミノ酸置換をおこした。10 置換のうち 8 個は NSP-ORF でおこり 2 個は SP-ORF でおきた。NSP-ORF でおきた 8 個のアミノ酸置換のうち、4 個 (aa 320、501、573、704) は未知の機能領域であり、2 個 (aa 1154、1159) は protease motif、2 個 (aa 1351、1559) は helicase motif 内であつた。SP-ORF 内の 2 残基 (aa 890、954) は E1 gene 内であつた (表 1)。

この変異のおこつた 21 塩基について 2 種類の TO-336 株の配列を他の 4 つの株 (野生株である Therien と M33、ワクチン株である RA27/3 と Cendehill) と比較した。まず、この 21 塩基は比較に用いた 4 株においては同一であつた。8 変異において TO-336vac は他の 4 株と同一であるが TO-336wt とは異なつていた。そして他の 13 変異において TO-336wt は他の 4 株と同一であるが TO-336vac とは異なつていた。すなわち 3 種のワクチン株では 21 個の変異のうち 8 変異について共通していた。

5'UTR の nt 36 に変異が見られたが、TO-336vac の 5'UTR の予想 2 次構造は TO-336wt と同一であつた。

TO-336vac、TO-336wt、および他の 4 株の SP-ORF の系統解析の結果より 3 つのワクチン株はそれらの間で緊密な関係を示さず、1 つの cluster を作らなかつた。TO-336vac は TO-336wt の弱毒過程によって起きたのみならず、遺伝子的に TO-336wt に由来することが図 1 に示すように証明された。

【考察】1964-1965年の沖縄に始まり、1966年に日本全国でおこった風疹の流行により、日本における風疹ワクチンの開発は始まった。TO-336vacは1967年の富山県の患者より得られ、GMK細胞で単離されたウイルスに由来する。臨床評価と平行しながら、29-32°CにおいてGMK細胞で7代、モルモット腎細胞で20代、ウサギ腎細胞で3代培養して弱毒化した後、安全で効果的であるとして1975年に認可された。TO-336vacは副反応である関節症状の出現頻度はRA27/3と比べて少ないが、抗体の永続性ではRA27/3が優れている。

弱毒化の決定遺伝子を同定するためにワクチン株とその親株である野生株とを比較することは、最も信頼の置ける手段である。2つのワクチン株、RA27/3とCendehillはすでに配列決定されており、野生株Therienと比較されている。これらのワクチン株の親株は最早存在しないので、親株との比較はされていない。今回の報告はワクチン株とその野生親株の配列決定をした最初の報告である。TO-336vacとその親株TO-336wtとを比較すると核酸レベルで21個の違いがあり、それは結果として10個のアミノ酸置換となった。RA27/3とTherienおよびM33を比較した報告では5'-UTRにおける1個の核酸変異と17個のアミノ酸変異が認められ、これが弱毒化の候補とされている。今回の報告でTO-336vacの変異がRA27/3より少ないことはTO-336vacでは弱毒化とは関係のない変異が少ないことを示している。

Ra27/3の研究では細胞培養における弱毒化決定遺伝子が、5' 816 nt、NSP-ORF、SP-ORFの3つの領域にマップされた。5' UTR内ではRA27/3株での特異的弱毒化変異がnt 7に見いだされた。しかし、これらの変異はTO-336vacとTO-336wtには共有されなかった。Cendehillの研究では関節細胞への限定的侵襲の決定遺伝子はNSP-ORFにマップされた。これらの研究を考慮すると今回の報告におけるNSP-ORFの全8個のアミノ酸変異とSP-ORFの2個のアミノ酸変異、5'UTRにおける1個の核酸変異はTO-336vacの弱毒化変異の候補となる可能性がある。今後の課題はTO-336vacとTO-336wtの感染性cDNA cloneを作り、温度感受性やプラーク形態に対応する決定遺伝子のマップを作るためにそれらの組換え体を作ることと考えられる。

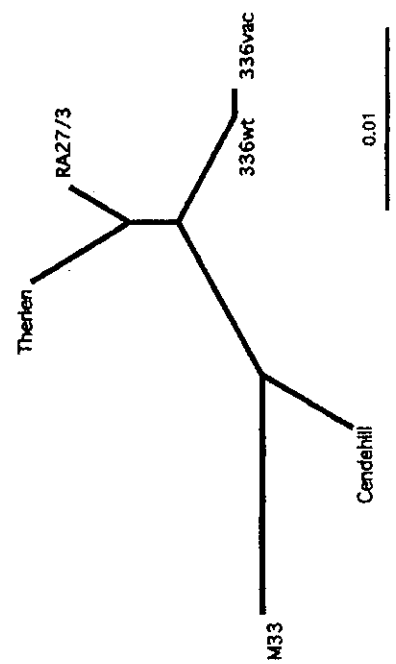
【文献】Kakizawa J, Ushijima H, *et al.*: Mutations of rubella virus vaccine TO-336 strain occurred in the attenuation process of wild progenitor virus. *Vaccine*, 19: 2793-2802, 2001.

表1. TO-336vacと他のワクチン株、野生株との核酸、アミノ酸の相違

Coding region	Functional domain	Nucleotide position	Amino acid position	Differences																	
				TO-336wt			TO-336vac			RA27/3			Cendehill			Therien			M33		
				nt	aa		nt	aa		nt	aa		nt	aa		nt	aa		nt	aa	
5'UTR		36		U			U			U			U			U			U		
NSP	Unknown	999	320	C	A		A	E		E	A		E	A		E	A		E	A	
NSP	Unknown	1327	429	U	C		U	U		U	U		U	U		U	U		U	U	
NSP	Unknown	1483	481	C	A		C	C		C	C		C	C		C	C		C	C	
NSP	Unknown	1541	501	U	C		U	R		U	C		U	C		U	C		U	C	
NSP	Unknown	1708	556	U	C		U	U		U	U		U	U		U	U		U	U	
NSP	Unknown	1757	573	C	H		U	Y		C	H		C	H		C	H		C	H	
NSP	Unknown	2150	704	C	H		A	N		A	N		A	N		A	N		A	N	
NSP	Protease	3500	1154	U	F		C	L		C	L		C	L		C	L		C	L	
NSP	Protease	3516	1159	A	N		G	S		A	N		A	N		A	N		A	N	
NSP	Protease	3619	1193	U	C		C	C		C	C		C	C		C	C		C	C	
NSP	Helicase	4091	1351	A	N		G	D		A	N		A	N		A	N		A	N	
NSP	Helicase	4715, 4716	1559	G, U	V		A, C	T		A, C	T		A, C	T		A, C	T		A, C	T	
SGUTR		6479		C	U		U	U		U	U		U	U		U	U		U	U	
SP	Capsid	6583	24	C	U		U	C		C	C		C	C		C	C		C	C	
SP	Capsid	6649	46	C	U		U	C		C	C		C	C		C	C		C	C	
SP	Capsid	6958	149	C	U		U	C		C	C		C	C		C	C		C	C	
SP	E1	9180	890	A	H		G	R		A	H		A	H		A	H		A	H	
SP	E1	9371	954	G	V		C	L		G	V		G	V		G	V		G	V	
3'UTR		9716		U	C		C	C		C	C		C	C		C	C		C	C	

TO-336vacとTO-336wtにおける変異を他の4つの株:RA27/3とCendehill (ワクチン株)、TherienとM33(野生株)と比較した。blankはアミノ酸置換がないことを意味する。

図1. TO-336vac、TO-336wtと他のワクチン、野生株の系統樹。6株のウイルスはSP-ORF配列を使用し、CLUSTAL Wで解析した。



インフルエンザの予防における上気道の IgA 抗体の役割

倉田 毅 (国立感染症研究所)、田村 慎一 (大阪大学微生物病研究所)

【目的】

これまでワクチンを経鼻免疫したマウスにおいて、上気道に分泌型 IgA 抗体を誘導することが、変異を繰り返しながら流行するインフルエンザウイルスの感染防御上最も重要であることが示唆されている。その理由は、ワクチンに特異的な分泌型 IgA 抗体が、多量体に基づくその交叉反応性によって、血中の単量体の IgG 抗体に比較して、ワクチン株と流行ウイルス株が異なる場合にも高い交差感染防御能力を有しているからである。このことを直接的に証明するために本研究では、種々の A 型インフルエンザワクチンをアジュバントと共に経鼻免疫した pIgR (IgA の外分泌輸送に関与する多量体抗体受容体) 欠損マウスにおいて、分泌型 IgA 抗体不在条件で、ワクチン株とは異なるウイルス株の感染 (流行) に対する交叉防御能がどのようになるかを検討した。これによって、変異ウイルスに対する交叉防御能が分泌型 IgA 抗体の誘導によって準備されることを直接的に証明することを目的とした。

【方法】

pIgR-KO マウス: マウス pIgR 遺伝子の exon 2 が欠損した KO マウスが、ヤクルト中央研究所の Shimada et al.によって開発された。まず、雄の pIgR 遺伝子の exon 2 欠損キメラマウスと BALB/c マウスの交配によってヘテロ接合体マウスが作られ、その F1 マウスが BALB/c マウスと戻し交配された。その F2 のヘテロ接合体マウスがさらに BALB/c マウスと戻し交配され、その 10 世代以上の繰り返しによって生み出された pIgR-KO BALB/c マウスが実験に使用された。

ワクチン: 抗原性の異なる A 型の H1N1 亜型のインフルエンザウイルス、A/PR/8/34 (A/PR8)、A/Yamagata/120/86 (A/Yamagata)、A/Beijing/262/95 (A/Beijing)、B/Ibaraki/2/85 (B/Ibaraki)由来の HA ワクチン(split-product virus vaccine)は、Davenport 等の方法に従って北里研究所で作られたものを用いた。

免疫: 野生型(pIgR+/+)及び pIgR-KO (pIgR^{-/-}、ホモ接合体)の BALB/c マウス (6—8 週齢、雌及び雄) が、1 群 5—6 匹ずつ使用された。一回免疫方式の実験においては、マウスは、麻酔条件下で、CTB* [コレラ毒素(CT)の無毒の成分である B サブユニット(CTB)に微量の毒素を添加したもの] と混合した HA ワクチンを、左右鼻孔から 1 μ l ずつ点鼻投与することによって免疫された。二回免疫方式の実験においては、マウスは、CTB* と混合した HA ワクチンを経鼻免疫 4 週間後、ワクチンのみを点鼻追加免疫された。

感染: マウスに、麻酔条件下で、マウスに馴化した A/PR8 ウイルス (10^4 EID₅₀) を、左右鼻孔から 1 μ l ずつ点鼻投与することにより上気道に限局した感染をした。この方法によっては主として上気道に感染が成立するのみで致死的ではなく、鼻洗浄液中のウイルス価が感染後 3—5 日に極大値に達し、11 日には検出限界以下になった。この上気道感染条件を、インフルエンザ

のモデルとして用いた。また、麻酔条件下で、A/PR8 ウイルス (10^4 EID₅₀) を、片方の鼻孔から 20 μ l 点鼻投与すると、全気道に感染が起こり、感染 7 日目に殆どのマウスが肺炎死した。この全気道致死感染条件は、ウイルス性肺炎のモデルとして用いた。

鼻洗浄液及び血清材料： 麻酔条件下のワクチン免疫マウスの心臓から全採血し、その血清を分離して IgA 及び IgG 抗体応答測定のための材料とした。また、全採血後のマウスから頭部を切り離し、その鼻腔を 0.1%BSA を含む 1ml の PBS で 3 回洗浄することによって得られた鼻洗浄液を、IgA 及び IgG 抗体応答測定及びウイルス価測定のための材料とした。

抗体応答： 鼻洗浄液及び血清の IgA 及び IgG 抗体価を ELISA 法により測定した。

ウイルス価： ワクチン免疫マウスにチャレンジ感染して 3 日目の鼻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、免疫マウスの上気道における感染防御の指標とした。

【成果】

ワクチンを免疫した野生型(pIgR+/+)マウスにおける A/PR8 ウイルスの全気道感染に対する抗体応答と感染防御

BALB/c マウスに A 型の H1N1 亜型の A/PR8、A/Yamagata、A/Beijing ウイルス由来のワクチン、および B/Ibaraki ウイルス由来のワクチンを CTB* と共に経鼻免疫し、4 週間後致死量の A/PR8 ウイルスをチャレンジ感染（全気道感染）して、3 日後の鼻洗浄液、肺洗浄液及び血清の IgA 及び IgG 抗体応答及び鼻洗浄液と肺洗浄液のウイルス価を検討した。その結果、上気道では、A/PR8 ワクチンを免疫したマウスで完全な防御が、また、A/Yamagata 及び A/Beijing ワクチン免疫マウスで部分的な防御が認められた。また、B/Ibaraki ワクチン免疫マウスでは全く防御が認められなかった。この交叉防御と平行して、A/Yamagata 及び A/Beijing ワクチン免疫マウスの鼻洗浄液中に A/PR8 の HA 分子と交叉反応する IgA 抗体の出現が認められた。一方、下気道では、A/PR8 ワクチンを免疫したマウスでは完全な防御が成立するものの、A/Yamagata 及び A/Beijing ワクチン免疫マウスでは低レベルの部分防御しか認められなかった。このような条件では、肺洗浄液中における A/PR8 の HA 分子と交叉反応する IgA 抗体の出現も低レベルであった。以上の結果から、変異ウイルスの感染に対する交叉防御能が、主に上気道の分泌型 IgA 抗体の存在に依存していること、また、分泌型 IgA 抗体が多く検出される上気道において下気道におけるよりも強く認められることが確かめられた。

ワクチンを免疫した pIgR-KO (pIgR-/-)マウスにおける A/PR8 ウイルスの上気道感染に対する抗体応答と感染防御

分泌型 IgA 抗体が変異ウイルスの感染に対する交叉防御に直接関与していることを明らかにするために、pIgR-KO (pIgR-/-)BALB/c マウスに、H1N1 亜型の A/PR8、A/Yamagata、A/Beijing ワクチン、および B/Ibaraki ワクチンを CTB* と共に経鼻免疫した。4 週間後少容量の A/PR8 ウイルスをチャレンジ感染（上気道限局感染）して、3 日後の鼻洗浄液及び血清の IgA 及び IgG 抗体応答及び鼻洗浄液のウイルス価を検討した(Figure 1)。その結果、野生型(pIgR+/+)マウスにおい

て、A/PR8 ワクチンを免疫したマウスで完全な防御が、また、A/Yamagata 及び A/Beijing ワクチン免疫マウスで部分的な防御が認められたのに、pIgR-KO (pIgR^{-/-})マウスでは、A/PR8 ワクチン免疫マウスで防御が不完全になり、また、A/Yamagata 及び A/Beijing ワクチン免疫マウスでは交叉防御能が低下した。pIgR-KO (pIgR^{-/-})マウスにおけるこの防御能の低下と平行して、A/PR8、A/Yamagata 及び A/Beijing ワクチン免疫マウスの鼻洗浄液中に A/PR8 の HA 分子と交叉反応する IgA 抗体の出現の抑制が認められた。一方、pIgR-KO (pIgR^{-/-})マウスの血中には、pIgR 機能抑制による IgA 抗体の分泌抑制の結果として、A/PR8 の HA 分子と交叉反応する IgA 抗体の蓄積が認められた。以上の結果から、変異ウイルスの感染に対する交叉防御能が、上気道の分泌型 IgA 抗体に依存していることがより直接的に示された。

ワクチンを2回免疫方式で免疫した pIgR-KO (pIgR^{-/-})マウスにおける A/PR8 ウイルスの上気道感染に対する抗体応答と感染防御

pIgR-KO (pIgR^{-/-})BALB/c マウスを二回免疫方式で免疫した時にも、IgA の分泌抑制に伴って変異ウイルス感染に対する交叉防御能が抑制されるかどうかを検討された(Figure 2)。即ち、H1N1 亜型の A/PR8、A/Yamagata、A/Beijing ワクチン、および B/Ibaraki ワクチンを CTB*と共に経鼻免疫し、4週間後それぞれのワクチンのみを追加免疫した。その2週間後少容量の A/PR8 ウイルスを上気道限局チャレンジ感染して、3日後の抗体応答とウイルス価を検討した。その結果、野生型(pIgR^{+/+})マウスにおいて、A/PR8、A/Yamagata 及び A/Beijing ワクチンを免疫したマウスで完全な防御が認められたのに、pIgR-KO (pIgR^{-/-})マウスでは、A/Yamagata 及び A/Beijing ワクチン免疫マウスで防御が不完全になった。また、pIgR-KO (pIgR^{-/-})マウスにおけるこの防御能の低下と平行して、A/Yamagata 及び A/Beijing ワクチン免疫マウスの鼻洗浄液中に A/PR8 の HA 分子と交叉反応する IgA 抗体の出現の抑制が認められた。以上の結果から、変異ウイルスの感染に対する交叉防御能が、上気道の分泌型 IgA 抗体に依存していることが二回免疫方式によっても示された。

【考察】

これまで Mbawuiké 等が、CTB*併用経鼻インフルエンザワクチンを免疫した IgA-KO マウスが、致死量のウイルス（ワクチンと同じ株）のチャレンジ感染に対して完全に防御することを示し、それと平行して粘膜と血清中に HA 分子と反応する IgG と IgM 抗体が出現していることを報告している。このことから彼らは、粘膜の IgA 抗体はインフルエンザウイルス感染の防御には必要ないと主張している。しかしながら気道粘膜の IgA 抗体が IgG 抗体よりも優れている点は、インフルエンザウイルスの侵入門戸である上気道に大量に分布し、変異ウイルスの感染に対する交叉防御の能力を準備することであり、彼らの IgA-KO マウスを用いた実験系ではこの交叉防御の能力が検討されていない。そこで我々は、変異ウイルスの感染に対する交叉防御能が上気道の分泌型 IgA 抗体の存在に依存していることをより直接的に立証するために、pIgR-KO マウスを用いて実験した。実験結果は、pIgR-KO マウスの上気道における IgA 抗体分泌能力の低下と良く相関して、交叉防御能力の低下が認められることをしめしている。従って、経鼻ワクチンによって

上気道の粘膜上に積極的に分泌される IgA 抗体が、A 型の同じ亜型内の様々な変異ウイルス株の上気道感染に対して交叉防御を準備することを示している。

【結論】

A 型の H1N1 亜型内のウイルス株由来の HA ワクチンをアジュバントと共に経鼻免疫した pIgR (IgA 抗体の外分泌輸送に関与する多量体抗体受容体) 欠損マウスにおいて、ワクチン株とは異なるウイルス株による感染 (流行) に対する交叉防御能がどのようになるかを検討した。その結果、上気道への IgA 抗体分泌抑制に伴って変異ウイルスの感染に対する交叉防御能が低下することが明示された。これらの結果から、アジュバント併用経鼻インフルエンザワクチンによって上気道に準備される変異ウイルスの感染に対する交叉防御能力が、上気道の分泌型 IgA 抗体に依存していることが直接的に示された。

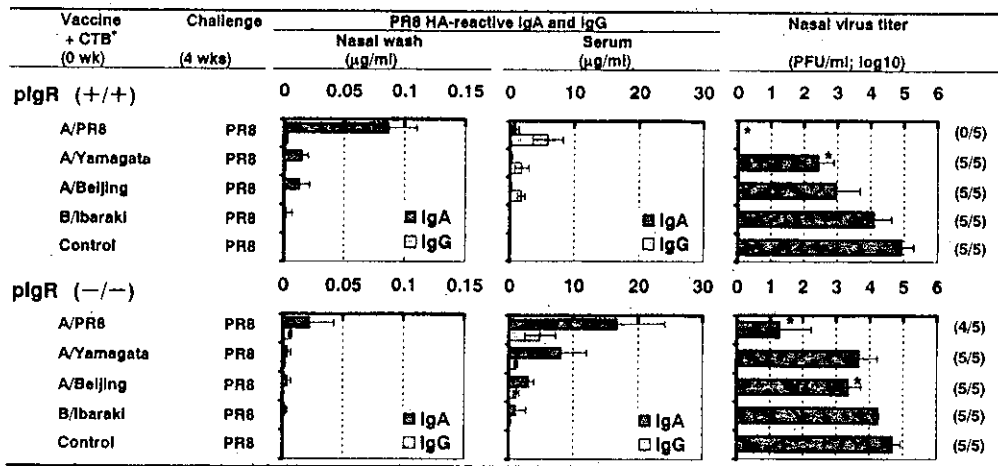


Figure 1. HA-reactive Ab responses and protection against virus infection in wild-type and pIgR-KO mice immunized i.n. with CTB*-combined different inactivated vaccines and challenged by an upper RT infection with an A/PR8 virus suspension (2 µl) 4 wk later. Three days after the challenge, nasal wash and serum specimens from each group of five mice were obtained for anti-A/PR8 HA IgA and IgG Ab titration and for virus titration as an index of protection. Each bar represents the mean A/PR8 HA-reactive IgA or IgG Ab titer ± SD in nasal wash or serum, or the mean virus titers (PFU per milliliter) ± SD in nasal wash. ★, The significant difference from the B/Ibaraki vaccine-immunized mice ($p < 0.05$) in mean values among the groups within the wild-type mice or within the pIgR-KO mice.

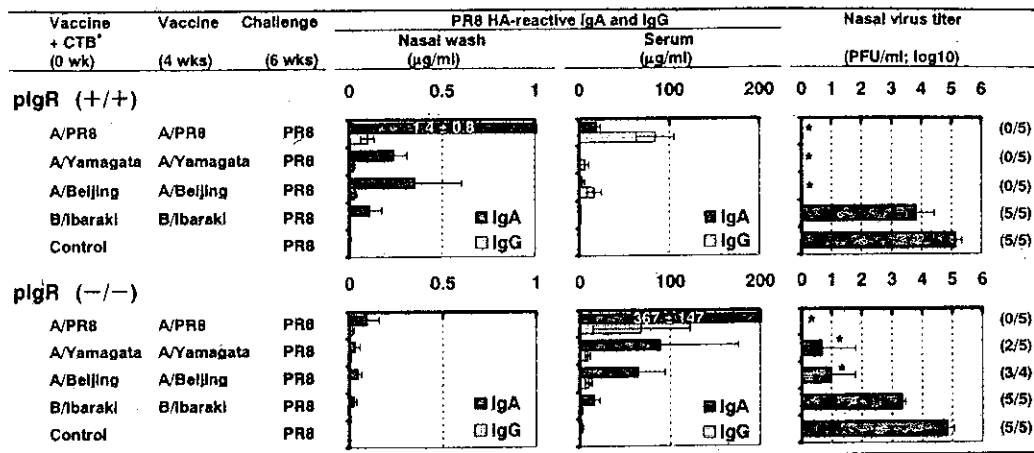


Figure 2. HA-reactive Ab responses and protection against virus infection in wild-type and pIgR-KO mice which received a primary i.n. immunization with CTB (1 µg)-combined vaccines (5 µg) and, 4 wk later, a secondary i.n. immunization with the respective vaccines (5 µg). Two weeks after the second immunization, mice were challenged by upper RT infection with an A/PR8 virus suspension; 3 days after the challenge, nasal wash and serum specimens were obtained to measure Ab titers and virus titers.

乳幼児のインフルエンザ HA ワクチン接種時における 特異的免疫の動態

熊谷 卓司、古川 秀嗣、長田 伸夫（札幌小児アレルギー感染症研究会）

永井 和重、堤 裕幸（札幌医大小児科）

奥井 登代、伊木 繁雄、矢野 昭起（北海道立衛生研究所）

中山 哲夫（北里生命科学研究所）

奥野 良信（大阪府立公衆衛生研究所）

神谷 齊（国立三重病院）

1. 研究目的

インフルエンザワクチンが成人ならびに年長児において一定の予防あるいは症状軽減効果があることについては多くの報告からほぼ consensus が得られている¹⁾。しかしながら、乳幼児については極めて乏しい研究成果が得られているにすぎず²⁾、疫学的ならびに免疫学的検討が待たれている。

ワクチンが付与する免疫の性質は理想的には自然感染と同等以上である事が望ましいが通常はやや減弱した免疫応答が得られるにすぎず、特にインフルエンザワクチンは不活化ワクチンであることからこの限界を免れ得ない。そこでワクチン被接種者において、得られた免疫が自然感染に比して何が同等で、何が不完全あるいは異なっているかを比較することがワクチン開発あるいは対象者拡大の際に、必要不可欠な条件である。

著者らは一昨年、インフルエンザ自然感染患者における特異的ならびに非特異的細胞性免疫の消長について、予備的研究として自然感染の急性期に複数回の採血を行い、経時的な免疫反応の動態を詳細に検討するというアプローチを試みた。その結果、Directigen FluA 陽性であり臨床症状が出現したにもかかわらず、抗体反応が低値にとどまった症例が観察された一方で、観察し得た全症例において強い特異的細胞性免疫反応が検出された。さらに年長児ワクチン被接種者についての検討を行った。ワクチン接種に際して複数回の採血を試み、抗体反応、インフルエンザ特異的リンパ球増殖反応試験および NK 細胞活性測定を行い興味ある知見を得た。そこで 01/02 シーズンは、乳児院でのインフルエンザワクチン接種に際し、その前後にインフルエンザウイルス特異的血清抗体測定、リンパ球増殖反応試験を行い検討を試みたので報告する。

2. 研究対象と方法

(1)研究対象

乳幼児におけるインフルエンザワクチン接種後に獲得される免疫の性質を検討する目的で、北海道立中央乳児院に入所している月齢 6 ヶ月から 31 ヶ月の乳幼児 22 名(男児 11 例, 女児 11 例, 平均月齢 14.7 ヶ月)を検討対象とした。月齢 12 ヶ月未満の乳児は 10 例であった。採血はワクチン接種当日に接種前検体を採血し, 2 回目接種完了日からおおむね 3 週間後に接種後検体を採取した。対象者の保護者から informed consent を得た。

(2) ウイルス抗原

インフルエンザウイルス特異的リンパ球増殖反応試験に使用したウイルス抗原は 01/02 期のワクチン株ウイルスである A/ニューカドニア/20/99(H1N1), A/パナマ/2007/99(H3N2), B/ヨネバーク/5/99 を発育鶏卵で増殖させ, 蔗糖濃度勾配遠心法により精製しホルマリンで不活化した virion を用いた。希釈前のそれぞれの抗原力価は HA 蛋白に換算して各々 1475, 4495, 1182 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

赤血球凝集抑制反応(HI)抗体測定用の抗原としては同様に 01/02 シーズンのワクチン株である A/ニューカドニア/20/99(H1N1), A/パナマ/2007/99(H3N2), B/ヨネバーク/5/99 を用いた。

(3) 血清抗体価測定

赤血球凝集抑制反応(HI)を用いた。使用血球は人 O 型赤血球である。

(4) インフルエンザウイルス特異的リンパ球増殖反応試験(lymphocyte proliferation test: LPT) ³⁾

今研究の対象が乳幼児であることに鑑み, 一昨年検討を行ってその有用性を確認した微量全血培養法(Whole blood microculture assay)を採用した。本法は全血から単核球を分離せず, 従って必要採血量が極めて少量(1 検体当たり 0.5ml 前後)である。具体的にはヘパリン加末梢血を RPMI1640 培養液で 10 倍希釈し, この希釈液を U 型 microplate に各 well 200 μl ずつ分注した。さらに, 種々の濃度に希釈したウイルス抗原および対照としての PBS を 20 μl ずつ各希釈について 3 well に添加し, 37°C の炭酸ガス培養器で 7 日間培養した。培養終了の 24 時間前に ³H-thymidine 0.2 μCi を各 well に添加した。Multiple automated sample harvester (MASH) を用いて得られた単核球付着 glass fiber filter の radioactivity を液体シンチレーションカウンターでカウントし, ウイルス抗原添加, 対照抗原添加培養の uptake ratio すなわち stimulation index(S.I.) を算定した。S.I. ≥ 3.0 を陽性とした。

抗原の至適濃度については文献上, 0.05-0.4 μg HA/ml であることが分かっており, また抗原を最終濃度 0.5, 1.5, 4.0 HA/ml になるように希釈して行った titration の結果, 1.5 または 4.0 HA/ml の希釈列で peak 値を得たので以後の検討はこの希釈の抗原を用いて行った。

(5)統計学的方法

HI 抗体価ならびに特異的リンパ球活性推移の月齢による比較は SAS 統計パッケージによる 2 標本 Wilcoxon 検定および 2 標本 t 検定(一部 Welch 検定)を用いた。

3. 研究結果

Figure 1 および Figure 2 にワクチン接種前後の HI 抗体価ならびにリンパ球増殖反応試験(LPT)の結果を示す。

HI 抗体価については、12ヶ月齢以上の被接種者 12 例中、10 例において H1N1, H3N2, B の全ての抗原に対して感染阻止能の指標とされている HI 価 40 倍以上を示した。これに対して 12ヶ月齢未満の乳児例においては H1N1, H3N2, B の全ての抗原に対して HI 価 40 倍以上を示したのは 10 例中 3 例にとどまった。2 例においては H1N1, H3N2, B の全ての抗原に対して HI 価 40 倍に達しないと言う結果であった。

LTP 値については、12ヶ月齢以上の児 12 例中 9 例において post の検体で H1N1, H3N2, B の全ての抗原に対して高い反応性を示した。pre の時点での SI 値より post

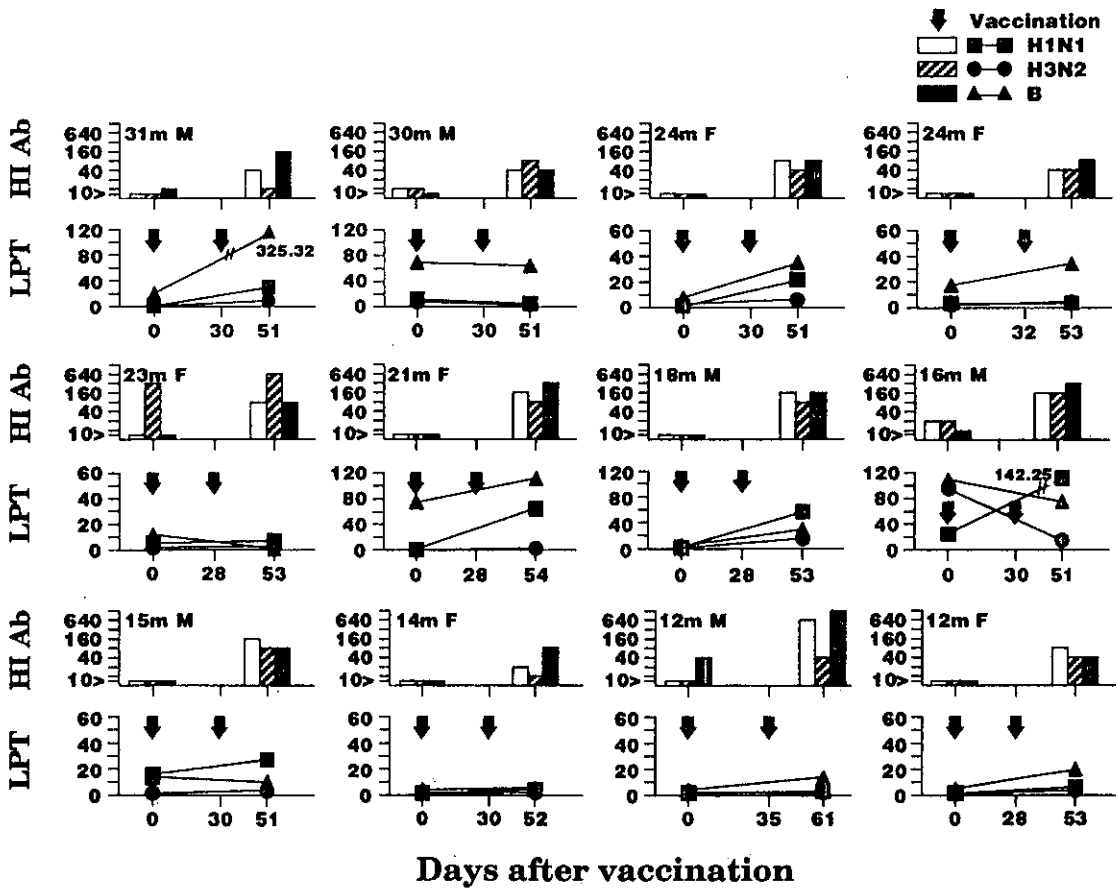


Figure 1. Acquisition of HI antibody and lymphocyte responses directed against influenza virus antigen in influenza vaccine recipients of more than or equal to 12 month old. Abscissa represents days after vaccination. Ordinate the HI titer and the stimulation index (SI) of lymphoproliferative response to influenza virus antigen. Open, shaded and closed columns show HI titer to H1N1, H3N2 and B antigens, respectively. Closed box, circle and triangle represent stimulation indices to H1N1, H3N2 and B antigens, respectively. Numbers correspond to age in month of patients and M or F represent gender.

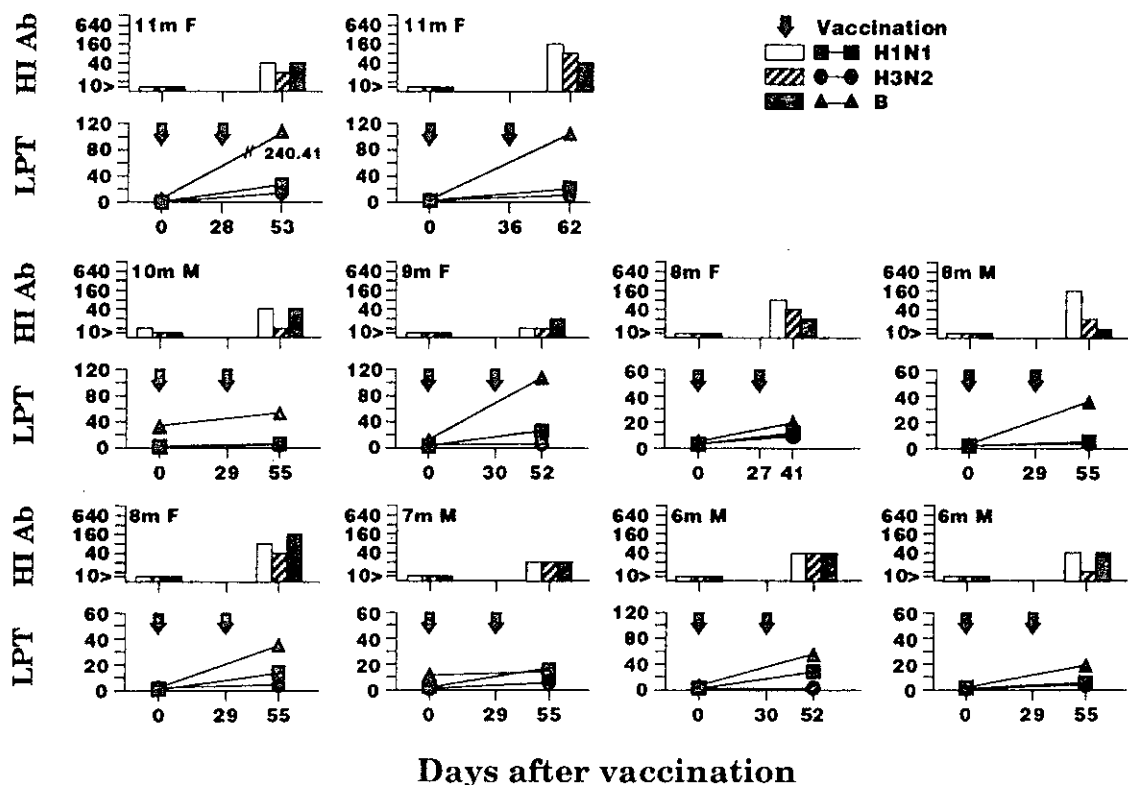


Figure 2. Acquisition of HI antibody and lymphocyte responses directed against influenza virus antigen in influenza vaccine recipients of less than 12 month old. Abscissa represents days after vaccination. Ordinate the HI titer and the stimulation index (SI) of lymphoproliferative response to influenza virus antigen. Open, shaded and closed columns show HI titer to H1N1, H3N2 and B antigens, respectively. Closed box, circle and triangle represent stimulation indices to H1N1, H3N2 and B antigens, respectively. Numbers correspond to age in month of patients and M or F represent gender.

の値が低下した例が見られた。一方、12ヶ月齢未満の乳児例においては10例中9例においてpostの検体でH1N1, H3N2, Bの全ての抗原に対して陽性反応を示した。

これらの結果について、対象を月齢12カ月未満の乳児、および月齢12カ月以上の幼児に分けて抗体価の上昇、細胞性免疫活性の上昇の程度について統計学的に検討した。HI抗体価の推移については、乳児におけるH3N2, Bに対する抗体価の上昇値がいずれの検定法によっても幼児に比して有意に低いという結果であった(表1)。一方、インフルエンザウイルス特異的細胞性免疫活性の上昇については幼児群、乳児群において差が見られなかった(表2)。

4. 考 按

インフルエンザワクチンの接種対象を乳幼児にまで積極的に拡大しようとする動きがあり我が国の臨床現場ではすでに多くの乳幼児がインフルエンザワクチンの接種を受けている。しかしながら具体的な有用性を示す研究成績、特に疫学的な研究は極めて少ない。大規模なpopulation based studyは喫緊の課題である。一方、

表 1

変数	検査時期	代表値	<12ヵ月	>=12ヵ月	P値 (両側)	検定名	差 [<12]-[>=12]	両側95%信頼区間	
			n=10	n=12				下限値	上限値
H1N1	接種前	中央値	-1.00	-1.00	0.658	2標本Wilcoxon検定			
		平均値	-0.90	-0.75	0.498	2標本 t 検定	-0.15	-0.60	0.30
	接種後	中央値	2.00	3.00	0.173	2標本Wilcoxon検定			
		平均値	2.30	3.17	0.135	2標本 t 検定	-0.87	-2.03	0.29
H3N2	接種前	中央値	-1.00	-1.00	0.109	2標本Wilcoxon検定			
		平均値	-1.00	-0.25	0.169	2標本 t 検定(Welch)	-0.75	-1.92	0.42
	接種後	中央値	1.00	2.50	0.038	2標本Wilcoxon検定			
		平均値	1.20	2.50	0.041	2標本 t 検定	-1.30	-2.54	-0.06
B	接種前	中央値	-1.00	-1.00	0.109	2標本Wilcoxon検定			
		平均値	-1.00	-0.58	0.137	2標本 t 検定(Welch)	-0.42	-1.01	0.18
	接種後	中央値	2.00	3.00	0.002	2標本Wilcoxon検定			
		平均値	1.70	3.67	0.002	2標本 t 検定	-1.97	-3.11	-0.82

Welch : 不等分散の場合の t 検定

表 2

変数	検査時期	代表値	<12ヵ月	>=12ヵ月	P値 (両側)	検定名	差 [<12]-[>=12]	両側95%信頼区間	
			n=10	n=12				下限値	上限値
H1N1	接種前	中央値	1.9	1.9	0.468	2標本Wilcoxon検定			
		平均値	1.9	6.0	0.093	2標本 t 検定(Welch)	-4.1	-9.3	1.0
	接種後	中央値	15.3	14.3	0.869	2標本Wilcoxon検定			
		平均値	16.0	30.9	0.242	2標本 t 検定(Welch)	-14.9	-42.5	12.7
H3N2	接種前	中央値	1.9	1.7	0.921	2標本Wilcoxon検定			
		平均値	2.0	9.9	0.330	2標本 t 検定(Welch)	-7.9	-25.7	9.9
	接種後	中央値	4.8	3.5	0.339	2標本Wilcoxon検定			
		平均値	6.5	5.8	0.749	2標本 t 検定	0.6	-3.3	4.5
B	接種前	中央値	5.3	12.7	0.070	2標本Wilcoxon検定			
		平均値	8.6	28.5	0.086	2標本 t 検定(Welch)	-19.9	-44.1	4.3
	接種後	中央値	45.1	31.8	0.307	2標本Wilcoxon検定			
		平均値	68.7	60.4	0.815	2標本 t 検定	8.2	-64.1	80.5

Welch : 不等分散の場合の t 検定

臨床効果をもたらす mechanism を明らかにするためのウイルス学的あるいは免疫学的な基礎的検討も重要な課題である。ワクチン効果の検討において大規模臨床試験と基礎的研究は車の両輪のような関係にある。著者らの今回の検討は後者の立場に幾ばくかの新知見を加えようとする試みであった。

抗体反応については幼児例では比較的良好な成績が得られたが、乳児例では3つの抗原全てに有意な反応を示す例が幼児に比して明らかに少なく、さらに統計学的にも有意差を認めた。今回の検討では例数の限界から十分な statistical power が得られず、その為 H1N1 については有意差が得られなかった可能性がある。この点については乳児例の大規模かつ複数年度にわたる研究が求められよう。

今回乳児例において抗体獲得が年長児に比して弱い可能性が示唆されたが、それが事実であるならばその原因について検討が必要と思われる。我が国においては、ワクチン接種量が 0.1, 0.2, 0.3, 0.5ml と4段階に分かれている。このワクチンが booster 効果のみを目指すものであれば接種量の検討はさして問題とはならないと思われるが、priming 効果をも目指すものであれば特に乳児および若年幼児におけ

るワクチン接種量の検討は避けて通れない課題であると思われる。不活化ワクチンで自然感染に相当する、あるいはそれに極めて近い priming 効果を得ようとするならば追加される抗原量はある程度の量が必要であり、0.1ml の接種量が適当であるか否かについての議論が必要であろう。この検討のためには、現行のワクチン接種量を超える接種量追加のもとでの免疫反応の検討が必要となろう。

インフルエンザ抗原に対するリンパ球の反応性については、月齢別の検討で乳児と幼児の反応性に統計学的有意差は認められなかった。一部の症例で予想されたような booster 効果は見られず pre の時点での SI 値より post の値が低下した例が見られた。一昨年、ワクチン学会に報告した time kinetics の検討の際に見られたような booster dose のあとにむしろ活性が低下した例と同様の経時推移が今回も観察された可能性が考えられる。

9ヶ月齢の児において pre の時点で H3N2 抗原に対して陽性の LPT 値を示した例がみられたが、2001年1月20日出生の児であった。新生児のインフルエンザをみることもあることから生後まもなくインフルエンザに罹患していた可能性が考えられる。罹患歴については今回の対象例が乳児院収容者であることから保護者からの情報が限られており明らかに出来なかった。

リンパ球の反応性は subtype の異なる抗原に対しても認められることが知られているが、H1N1 に対する反応と H3N2 に対する反応性に大きな解離がみられた例が散見された。その原因については不明である。

インフルエンザ B 抗原に対するリンパ球の反応性については、インフルエンザの流行を経していない月齢の6ヶ月児においても pre の時点で高いリンパ球の反応性を示した。また post においても SI 値 200 から 300 を越す反応性が得られており、ワクチン被接種者における反応性としては異例に高い値であった。このことから B 抗原には一部 mitogenic な活性があることが想像されるが、これまでのその様な報告はなく、今後の検討課題と思われた。

インフルエンザ自然感染、ワクチン接種後の末梢血リンパ球を用いた細胞性免疫検討の意義については議論がある。リンパ球増殖反応試験で検出されるリンパ球活性は主たる effector mechanism である CTL とは異なるものであるという議論と、基本的には粘膜局所の感染であるインフルエンザにおいて末梢血リンパ球を用いた検討が妥当であるかという議論である。前者については B-cell response にとって CD4 T cell help が不可欠であること、ウイルス特異的 CD8+ T cells の増殖を CD4 T cell が promote することによって CD4, CD8 T cell の両者が感染ウイルスの生体からの駆逐に働いていることは良く知られている事実である⁴⁾。後者については、近年 systemic な免疫組織とは独立して mucosal immune system が稼働しているという成績が蓄積されつつある。これに対して最近、動物実験であるが、ウイルス特異的な粘膜リンパ球と末梢血リンパ球の性格を分析して、共通の細胞から分化したものであるとの成績が発表された⁵⁾。さらにインフルエンザウイルスが肺局所にとどまっているにもかかわらず、それに対して反応する CD4 effector T cell は近傍

リンパ節他の全身で増殖した後に肺に向かうという trafficking があることが観察された⁶⁾。これらの成績は粘膜局所リンパ球と末梢血リンパ球が全く独立して抗ウイルス作用を担っているわけではないことを示しており、末梢血を検体とした研究が必ずしも妥当性を欠くとは言えないように思われる。局所の sIgA と血清抗体の関係にも似るが、本質的には臨床的なインフルエンザに対する発症防御能との関係で議論されるべきものと思われる。

今回は、22 例の乳幼児を対象として、比較的時系列のそろった検討を行うことが出来た。インフルエンザは例年ワクチン株の変更があり、また流行株の変化もみられることから単年度の観察で結論を導くことは適当でない。今回のような検討を継続的に行うことで成人、年長児で蓄積されたような知見が乳幼児群においても得られることが期待される。今般は全血培養法を用いたが、採血量の観点からは被検者の負担が軽く、また実験手技の面では、煩雑さが著しく軽減され大規模な検討に耐えうる方法として優れていると思われた。

今後の課題としては、経鼻接種ワクチンのような生ワクチン被接種児における免疫反応の検討に不可欠な CTL の assay 系の確立が求められる。既に知られている ⁵¹Cr-release assay はその感度、検体量の制約から乳幼児の検討に適当でないことは明らかである。検体量が少なくても済む感度の高い assay 系の検討が必要である。

(謝 辞)

統計学的検討について御教示いただいた化学及血清療法研究所松尾富士男氏、血清抗体価測定をしていただいた阪大微研会観音寺研究所に深謝いたします。

(文 献)

1. Neuraminidase inhibitors for treatment of influenza A and B infections [published erratum appears in MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1999 Dec 17;48:1139]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1999;48:1-9.
2. Mbawuike IN, Piedra PA, Cate TR, Couch RB. Cytotoxic T lymphocyte responses of infants after natural infection or immunization with live cold-recombinant or inactivated influenza A virus vaccine. J Med Virol. 1996;50:105-11.
3. Kumagai T, Chiba Y, Wataya Y, et al. Development and characteristics of the cellular immune response to infection with varicella-zoster virus. J Infect Dis. 1980;141:7-13.
4. Doherty PC, Topham DJ, Tripp RA, et al. Effector CD4+ and CD8+ T-cell mechanisms in the control of respiratory virus infections. Immunol Rev 1997;159:105-17.
5. Musey L, Ding Y, Cao J, et al. Ontogeny and specificities of mucosal and blood human immunodeficiency virus type 1-specific CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. J Virol 2003;77:291-300
6. Roman E, Miller E, Harmsen A, et al. CD4 effector T cell subsets in the response to influenza: heterogeneity, migration, and function. J Exp Med 2002;196:957-68.

Vero 細胞を用いた不活化日本脳炎ワクチンの開発

石川 豊数、村木 優子、高原日出夫、藤田 武、大西 敏之、
石橋 正英、上田 重晴（財団法人 阪大微生物病研究会）

【目的】

日本脳炎は日本脳炎ウイルスによって起こる急性疾患であり、致死率が高く回復しても重篤な後遺症を残す率が高い。患者の発生は我が国のみならず、アジアモンスーン地域さらにはオーストラリアの一部まで及ぶと報告されている。日本脳炎ワクチンは、これらの国々に居住する人々はもとより、これらの国々への旅行者にとっても非常に重要なワクチンである。

我が国で現在使用されている日本脳炎ワクチン（以下、「現行ワクチン」）は、安全性及び有効性がともに非常に優れたワクチンであるが、材料にマウス脳を使用することから、ア）品質管理上の問題（マウスからの迷入ウイルス及びマウス脳成分の残存を完全に否定出来ない）、イ）ワクチン製造コストが高い、ウ）動物愛護、エ）ワクチンの生産がマウスの供給に依存する等の問題がある。

我々は、これらの問題を解消するとともに、より品質が管理された材料を使用し、より計画的にワクチンの製造が出来る方法として、Vero 細胞で増殖させたウイルスを使用した不活化日本脳炎ワクチンの開発を行ってきた。

以下、臨床試験用試作ワクチン（以下、BK-VJE）に関し、動物での薬効及び安全性について報告する。

【材料と方法】

1. BK-VJEの製造方法と製剤

BK-VJEは、American Type Culture Collection (ATCC) から購入した Vero 細胞を用いて確立したセルバンクシステム、北京-1 株を用いて確立したシードロットを使用して、製造スケールで連続3ロット製造した。

BK-VJEの製造用細胞である Vero 細胞は、不活化ポリオワクチンの製造用細胞として海外で使用実績があり、WHOもワクチン製造用細胞として承認している細胞である。ワクチン製造用のセルバンク及びこれに由来する各継代レベルの細胞は、WHOのワクチン製造用細胞の基準に適合することを確認している。

BK-VJEの製造用種ウイルス株は、現行ワクチンと同じ北京株であり、ウイルスを Vero 細胞で継代しても製造の範囲内では構造蛋白をコードする遺伝子（Core, PreM, Envelope）は変化しないことを確認している。

ワクチンの製造方法は、上述の Vero 細胞をマイクロキャリアに付着させて増殖させた後、種ウイルスを接種し牛血清を含まない培養液でウイルスを培養した。得られたウイルス浮遊液を濃縮し、ホルマリンによりウイルスを不活化した後、硫酸プロタミン処理、さ

らに、蔗糖密度勾配超遠心法を2回繰り返して精製した。ウイルス画分を透析・濾過したものをワクチン原液とし、BK-VJEはこのワクチン原液を希釈調製し、安定剤を加え、凍結乾燥して作製した。

尚、BK-VJEにはチメロサル等の保存剤は使用していない。

2. マウスにおける薬効薬理試験

1) 中和抗体産生能

4週齢の雌マウス10匹を1群とし、BK-VJE、現行ワクチン及び参照品（現行ワクチンの力価試験用参照品）を7日間隔で2回腹腔内に投与し、2回投与後7日後に採血された血清について日本脳炎ウイルスに対する中和抗体価を測定した（生物学的製剤基準の日本脳炎ワクチン力価試験法に準じた。）。

2) 攻撃試験における防御能

3.5週齢の雌マウス10匹を1群とし、BK-VJE及び現行ワクチンを4倍階段希釈してそれぞれを7日間隔で2回皮下投与し、2回投与7日後に致死量の日本脳炎ウイルス北京株を各マウスの静脈内または腹腔内に攻撃した。攻撃後21日間マウスの生死を観察し、22日目の生残数から防御能（ED₅₀）を算出した。

3. 一般薬理試験

1) ラットの尿排泄に及ぼす影響

7週齢の雄ラット6匹を1群とし、BK-VJEを臨床投与量の10倍量にあたる0.35mL/kgを、対照として生理食塩液を同量それぞれ皮下投与した直後に、それぞれに生理食塩液を20mL/kg経口投与し、投与後6時間まで1時間毎に個別別に採尿し、尿量を累積的に測定した。また、投与後6時間分の畜尿中のNa⁺、K⁺、Cl⁻量についても測定した。

2) 麻酔ウサギの呼吸器に及ぼす影響

10週齢以上の雄ウサギ4匹を1群とし、BK-VJEを臨床投与量の10倍にあたる0.35mL/kgを、対照として生理食塩液を同量皮下投与した後、一定時間毎に2時間後まで呼吸数及び1回換気量を測定した。

4. 毒性試験

1) ラット単回投与毒性試験

5週齢の雌雄ラット各5匹を1群とし、BK-VJEを臨床投与量の10倍にあたる0.35mL/kg、100倍量にあたる3.5mL/kgを皮下投与、対照として生理食塩液を3.5mL/kg皮下投与した。14日間一般状態、体重を観察した後、15日目に麻酔下で腹大動脈を切断・放血して安楽死させ、剖検した。

2) イヌ単回投与毒性試験

6ヶ月齢の雄ビーグル犬2匹を1群とし、BK-VJEを臨床投与量の10倍にあたる0.35mL/kg、100倍量にあたる3.5mL/kgを皮下投与、対照として生理食塩液を3.5mL/kg皮下投与した。14日間一般状態、体重、摂餌量を観察し、15日目に麻酔下で総頸動脈及び腋窩動脈より放血して安楽死させ、剖検した。

3) ラット反復投与毒性試験

5週齢の雌雄ラット各12匹を1群とし、BK-VJEを臨床投与量の10倍にあたる0.35mL/kgを7日間隔で4回背部皮下投与、対照として生理食塩液を0.35mL/kg同様に投与した。28日間一般状態、体重及び摂餌量を観察した。投与開始前日及び投与期間最終週に各群6例について眼科学的検査を実施した。投与後最終週に各群6例から新鮮尿を採取し、尿検査を実施した。29日目に麻酔下で後大静脈より採血し、血液学的検査、血液生化学的検査を実施した。さらに、腹大動脈を切断・放血して安楽死させた後、剖検するとともに各種器官を採取し器官重量を測定した。採取した器官について病理組織学的検査を実施した。

4) イヌ反復投与毒性試験

5～6ヶ月齢、体重8.6～9.5kgの雌雄ビーグル犬各3匹を1群とし、BK-VJEを臨床投与量の10倍にあたる0.35mL/kgを7日間隔で4回背部皮下投与、対照として生理食塩液を0.35mL/kg同様に投与した。28日間一般状態、体重及び摂餌量を観察した。投与開始前、14日目及び29日目に採血し、血液学的検査及び血液生化学的検査を実施した。投与開始前及び26日目に眼科学的検査と心電図検査及び尿検査を実施した。29日目に麻酔下で総頸動脈及び腋窩動脈より放血して安楽死させた後、剖検するとともに各種器官を採取し器官重量を測定した。採取した器官について病理組織学的検査を実施した。

5) 局所刺激性試験 (筋肉刺激)

13週齢の雌雄ウサギ各6匹を1群とし、被験物質群ではBK-VJEを右後肢大腿部外側広筋中央部に、左脚の同部位に生理食塩液をそれぞれ0.5mL注射した。陽性対照群では、右後肢大腿部外側広筋中央部に0.425W/V%酢酸液を、左足の同部位に1.7W/V%酢酸液を1.0mLずつ注射した。投与日から剖検までの間、一般状態を観察するとともに全ての動物について投与直前と剖検時の体重を測定した。投与後、2及び7日に各群の3匹ずつを麻酔下で腹大動脈より放血して安楽死させた後、投与部位の筋肉組織を摘出し、肉眼的に観察するとともに病理組織学的検査を実施した。

【結果】

1. マウスにおける薬効薬理試験

1) 中和抗体産生能

BK-VJE、現行ワクチン及び力価試験用参照品を投与した各群の中和抗体価は、それぞれ $10^{3.76}$ 、 $10^{3.23}$ 、 $10^{3.17}$ であった。

2) 攻撃試験における防御能

BK-VJE及び現行ワクチンの静脈内攻撃試験における防御能(ED_{50})は、それぞれ519倍($4^{4.51}$)、256倍($4^{4.00}$)であり、腹腔内攻撃試験における防御能(ED_{50})は、それぞれ630倍($4^{4.65}$)、657倍($4^{4.68}$)であった。

2. 一般薬理試験

1) ラットの尿排泄に及ぼす影響

BK-VJE投与群と対照群(生理食塩液投与)における投与後6時間までの1時間毎

の個体別尿量に有意な差は認められなかった。畜尿中の Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 量についても BK-VJE 投与群と対照群との間に有意な差は認められなかった。

2) 麻酔ウサギの呼吸器に及ぼす影響

呼吸数及び1回換気量は、BK-VJE 投与群と対照群との間に有意な差は認められなかった。

3. 毒性試験

1) ラット単回投与毒性試験

BK-VJE 及び生理食塩液を投与したいずれの動物にも死亡、歩行異常、麻痺などの一般状態の変化は認められず、体重も BK-VJE を体重当たりの用量を変えて投与した2群と対照群の間に有意な差は認められず、剖検においてもいずれの動物にも異常は認められなかった。

2) イヌ単回投与毒性試験

BK-VJE 及び生理食塩液を投与したいずれの動物にも死亡、歩行異常、麻痺などの一般状態の変化は認められず、体重及び摂餌量も BK-VJE を体重当たりの用量を変えて投与した2群と対照群の間に有意な差は認められず、剖検においてもいずれの動物にも異常は認められなかった。

3) ラット反復投与毒性試験

BK-VJE 及び生理食塩液を投与したいずれの動物にも死亡、歩行異常、麻痺などの毒性症状をはじめとする一般状態の変化は認められなかった。体重、摂餌量、尿検査結果、眼科的検査結果、病理解剖及び病理組織学的検査結果に被験物質に起因する異常は認められなかった。血液学的検査の一部の試験項目において、BK-VJE を投与した群と対照群の間に有意な差が認められたが、いずれも正常値の範囲内であった。また、血液生化学的検査でごく軽微の変動が認められたが、いずれの器官・組織においても異常が認められなかったことから毒性学的に意義のない変化であると判断した。

4) イヌ反復投与毒性試験

BK-VJE 及び生理食塩液を投与したいずれの動物にも死亡、歩行異常、麻痺などの一般状態に異常は認められず、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、心電図検査、眼科的検査、器官重量および病理剖検検査においては BK-VJE に起因する変化は認められなかった。

病理組織学的検査で BK-VJE 投与群の一部の動物の投与部位において、軽度の細胞浸潤が認められたが、出血または組織の壊死を伴っていないことから、被験物質の皮下投与に起因した反応性の変化であると判断した。

5) 局所刺激性試験（筋肉刺激）

いずれの動物にも一般状態、体重の異常は認められなかった。

BK-VJE 投与部位では、肉眼的観察及び病理組織学的検査ともに軽度の変化が認められた。これらの変化は生理食塩液においても同様に認められ、変化の程度も同等であった。一方、陽性対照群では中等度以上の変化が認められ、特に 1.7W/V% 酢酸では投与後 7

日においても重度の変化が認められた。

【考察】

BK-VJEの有効性は、以下の理由から現行ワクチンと同等であると予想される。

1. 製造用ウイルス株は、現行ワクチンと同じ北京株である。
2. BK-VJEに含まれる Vero 細胞で増殖させたウイルスのウイルス粒子を構成する蛋白をコードする遺伝子は、現行ワクチンに含まれるマウス脳で増殖させたウイルスと同一である。
3. 両ワクチンの製造方法は、ウイルスを増殖させる宿主は異なるが、他の工程はほぼ同様である。
4. 両ワクチンに含まれる不活化ウイルス抗原の量は、ほぼ同量である。

今回、BK-VJEの有効性についてさらに調査するため、生物学的製剤基準の日本脳炎ワクチン力価試験法に準じて、BK-VJEをマウスに投与した結果、現行ワクチンと同様に力価試験用参照品より高い値の中和抗体を産生させることが確認され、また、マウスにおける静脈内または腹腔内攻撃試験においても、BK-VJEは現行ワクチンと同等の高い発症防御能を誘導することが確認されたことから、BK-VJEはヒトにおいても現行ワクチンと同等の有効性を有することが期待される。

BK-VJEの安全性については、製造に用いる Vero 細胞は WHO のワクチン製造用細胞の基準に準じた試験に適合していること、生物学的製剤基準の日本脳炎ワクチンの基準に適合していることから問題ないと考えられる。

今回、GLP適格下で一般薬理試験として、ラットの尿排泄に及ぼす影響及び麻酔ウサギの呼吸器に及ぼす影響を調査したが異常は認められず、また、毒性試験として、ラット及びイヌを用いた単回投与毒性試験、反復投与毒性試験を実施したが、いずれの試験においてもBK-VJEの毒性は認められなかった。さらに、ウサギを用いた局所刺激性試験では、BK-VJEの筋肉組織に対する障害性は生理食塩液と同等であることも確認され、安全性においても問題ないことが確認されたと考える。

一方、BK-VJEは現行ワクチンに含まれているチメロサル等の保存剤を含まないことから、安全性の面で改良されており、凍結乾燥製することにより安定性においても優れたワクチンとなっていると考える。

現在、健康成人を対象とした第I相臨床試験を終了し、第III相臨床試験（健康小児における検証的臨床試験）を開始した。

今後、これらの臨床試験における評価を経た後、出来るだけ早く実用に供したいと考える。

抗体測定法研究会の開催

井上 栄（国立感染研名誉所員） 宮沢 博（杏林大学）

第3回抗体測定法研究会を平成15年2月13日13-16時 感染研で開いた。出席者は、東京近辺のワクチン関係研究者・臨床家、全国のワクチンメーカー・検査試薬メーカー・臨床検査センターからの人で、約60人の出席があった。

演題は以下の10題があった（内容は本報告書に掲載）。特別講演として、倉根一郎・感染研ウイルス第1部長に「ウエストナイルウイルス：日本へくるか？ 診断法は？ ワクチンは？」を話していただいた。

各演題名と内容の要約は次の通り。1) 中山ら：GFPを発現する組換え麻疹ウイルスを用いた麻疹中和抗体測定法。蛍光蛋白遺伝子を導入した麻疹ウイルスを中和試験のchallengeウイルスとして使うと、結果判定をCPE顕微鏡観察でなく機械による蛍光測定で自動化できる。2) 斎藤ら：SLAM/Vero細胞を用いた麻疹中和抗体価の測定。麻疹ウイルス受容体SLAM遺伝子を組み込んだVero細胞を使うと実験室株と同様に野外株でもCPEが観察され、野外株に対する中和抗体活性を測定できる。3) 佐藤ら：麻疹感染のsecondary vaccine failure (SVF)の診断法。麻疹初感染後早期の低親和性IgG抗体はELISA反応後6M尿素で固相より剥がれるが、再感染時の高親和性抗体は剥がれないので、初感染と再感染とを区別できる。麻疹ワクチンが普及する過程でSVFが発生しやすくなると考えられるが、その把握に役立つだろう。4) 多屋ら：高齢者における麻疹抗体保有状況。高齢者の麻疹抗体価は青壮年の抗体価より高かった。野外株再感染によるブースターを受けてきた結果と考えられる。5) 高山ら：臨床医から見た麻疹ウイルス抗体測定法の問題点。PA法とPHA法とを比較した。麻疹既往者の血清ではPAの方がPHAより抗体価が高かった。一方、感染後早期の血清ではPHAがPAより高かった。これはPHAキットの方がIgM抗体検出の感度が高いためと考えられる。PA法では抗体価は反応系の最終希釈倍数で表しているが、血清希釈倍数で表すように変更するかとの質問には、メーカーはそうにする意図はないとの回答があった。6) 倉根ら：ウエストナイル熱と血清診断法。ウエストナイルIgM捕捉ELISAと中和試験を確立した。日本脳炎ウイルスとは交差反応があるが、両方で反応性に差があり、並行測定により両者は区別できる。7) 斉藤ら：ELISA法による肺炎球菌血清型特異的IgG定量。ロンドン大学WHO Reference Laboratoryで使われているELISAを導入した。標準血清は米国CDCから供給されたヒト血清であるが、今後の供給が保証されないので、動物の免疫血清と酵素標識プロテインGを使う系を考えている。感染防御レベルについては今後の課題である。8) 李ら：E型肝炎抗体検出系の開発。組換えバキュロウイルスを用いてE型肝炎ウイルスの中空粒子を作製し、それを抗原とするELISA系を作った。これを使って血清診断と血清疫学調査ができる。E型肝炎の3割は海外渡航歴がなかった。また全年齢の抗体保有率は5.4%で、地域差があった。9) 神田：ヒトパピローマウイルス感染中和抗体について。パピローマウイルスのL1/L2カプシド蛋白でウイルス様粒子を作ると、型共通の中和抗体を作らせるワクチンとなり得る。中和抗体活性は、ウイルス様粒子にβガラクトシダーゼ遺伝子DNAを取り込ませた偽ウイルスを使って測定できる。10) 山本ら：ヒトモノサイト株化細胞を用いた新しい発熱性物質試験法。生物製剤中の