

エンドトキシンの定量に有用なヒト単球株化細胞を見つけた。この細胞を使って、ワクチンのエンドトキシン安全性を簡便に調べることができるかもしれない。この演題は抗体とは関係ないが、ワクチン安全性の研究を臨床家に紹介する目的で話していただいた。

GFP 遺伝子挿入麻疹ウイルス AIK-C を用いた麻疹中和抗体測定法

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 I）

駒瀬 勝啓（北里研究所 生物製剤研究所）

木村 慶子（慶応義塾大学 保健管理センター）

関口真一郎、新庄 正宣（慶応義塾大学 小児科）

麻疹は未だに感染症サーベイランスに 2~3 万人が報告され重要なウイルス感染症である。麻疹は一度罹患すると終生免疫を維持し、ワクチン接種後獲得した抗体も長期間持続するものと考えられてきた。抗体は麻疹流行期に不顕性感染を繰り返すことにより維持されている事があきらかとなった 1, 2)。ワクチン接種率は全国平均で 80%を超えるようになり流行規模も小さくなり不顕性感染の機会が減少することで獲得した抗体のレベルが低下し secondary vaccine failure (SVF) の症例が増加してきている。しかしながら、未だに麻疹は流行を繰り返しているため、院内感染の予防、個人防衛のために麻疹抗体を測定しワクチン接種をやるかどうかを決定する機会が多い。免疫能の有無を知るためには HI 抗体は感度が低く、中和抗体(NT)測定が最も信頼性の高い検査である。しかしながら手順の煩雑さから、PA, EIA 抗体測定が実施されている。麻疹ウイルスの CPE を数値化し NT 価の測定を自動化するために麻疹ウイルス遺伝子の中に GFP 遺伝子を挿入した組み換え麻疹ウイルスを構築しこれを challenge virus として用いる麻疹ウイルス NT 測定法を開発した。

【対象と方法】1980 年から都内私立小学校 1, 4 年生を対象に健康管理の目的で採取した血清を対象とした。麻疹ウイルス AIK-C 株の全長 cDNA の P/M junction に Asc I 制限酵素部位を導入し GFP 遺伝子を挿入した GFP-MVAIK を構築した(Fig. 1)。組み換え cDNA プラスミドを N, P, L 発現プラスミドとともに B95a 細胞に transfection し、T7RNA polymerase の存在下で感染性ウイルスを回収した。B95a 細胞、Vero 細胞に感染させ UV 下で GFP 蛍光発光が観察され、抗麻疹ウイルス抗体で蛍光抗体染色をおこない GFP 発現細胞に麻疹ウイルス抗原が発現していた。GFP-MVAIK を Challenge virus として使用し CPE の出現は蛍光 microplate リーダー(Bio-Tech FLx800)をもちいて蛍光強度で数値化できた。

【結果】血清 No. 326, 333, 445 の血清を用いて Vero 細胞 24 穴プレートでの plaque 減少法と B95a 細胞 96 穴 100% CPE 抑制法の比較をおこなった。Vero 細胞での 50% plaque reduction assay で 8x, 110x, 11x となり、90% reduction では <4x, 36x, 6x となる。ウイルスコントロールの蛍光強度は 4000 FU で各 well の蛍光強度を Fig 2-B に示し、50% FU reduction assay ではそれぞれ、26x, 104x, 20x となり、90% FU reduction では 5x, 24x, 6x の NT 抗体価を示した。通常広く実施されている B95a 細胞を用いた 100% CPE 抑制法の結果を UV 下で Fig. 2-C に示した。CPE の出現は GFP 発光として白い spots として観察される。各希釈系列の平均 FU を数値で示した。Cell control は 658, 674, 680 FU を示し、CPE が出現した血清 No.445 の 1:16 希釈、No. 333 の 1:64 希釈、No. 326 の 1:8 で FU の増強を認め、NT 抗体価は血清 No. 326 (4x), 血清 No. 333 (32x), 血清 No 445 (8x) と判定された。

GFP-MVAIK は GFP 発現を蛍光強度として数値化し、NT 抗体価判定のブラック数の計算、CPE の出現を顕微鏡下で観察する過程を自動化でき大量の血清を処理する血清疫学調査に有用である。

Fig. 1

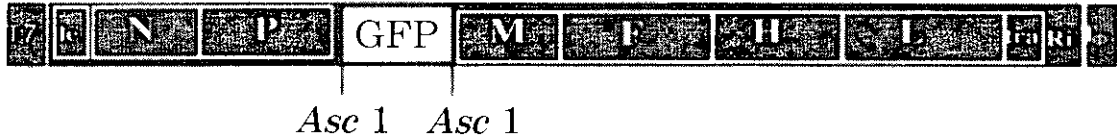


Fig. 2-A

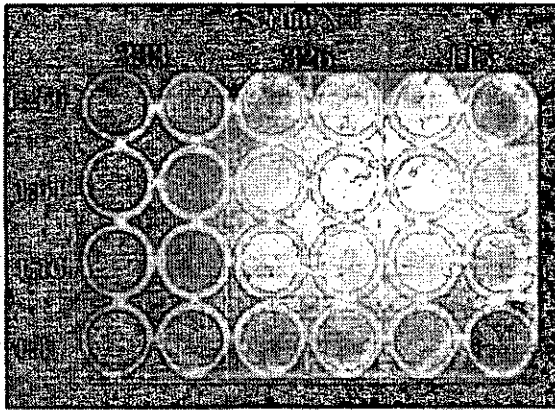


Fig. 2-C

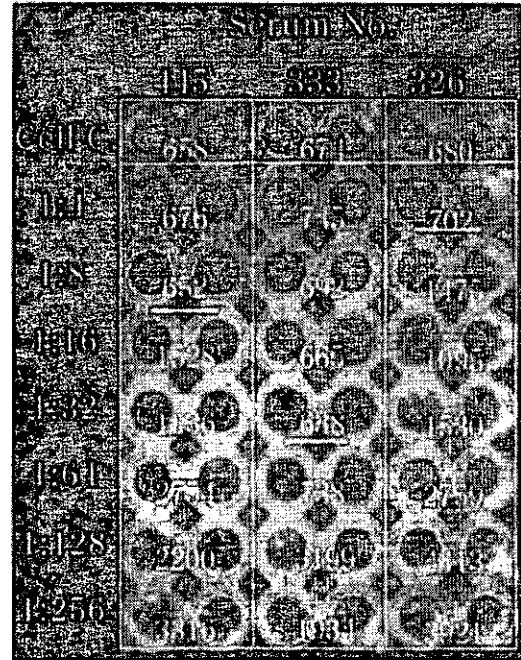
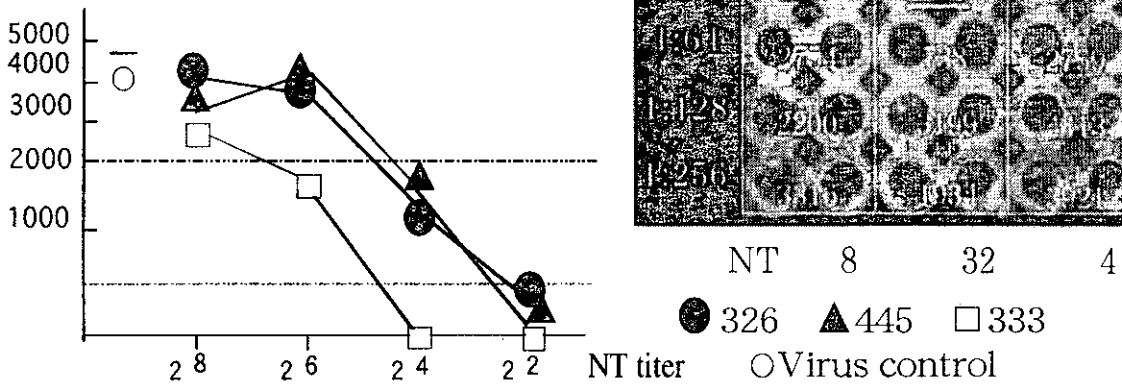


Fig. 2-B



Edmonston

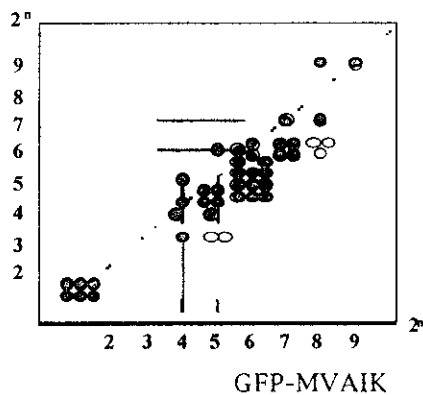


Fig. 3-A Edmonston 株との比較

ChicagoD3

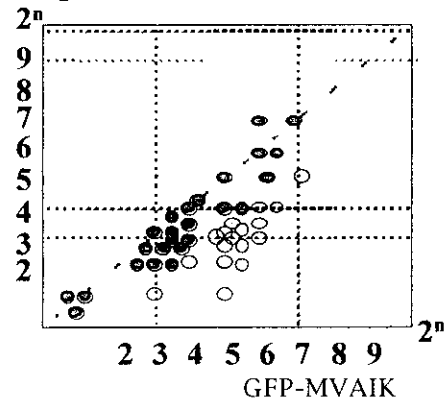


Fig. 3-B Chicago type D3 との比較

GFP-MVAIK と Edmonston 株との抗原性の比較をおこなったが抗原性の有意差は認められなかった(Fig. 3-A)。1997-1999年に流行した Chicago-type D3 と比較をすると MV-AIK に対する抗体価より低い値を示し抗原性に変化が認められる事があきらかとなった(Fig. 3-B)。

SLAM/Vero 細胞を用いた麻疹中和抗体価の測定

齋藤 義弘、坂田 宏子、田代 真人（国立感染症研究所ウイルス第3部）

【目的】 麻疹中和抗体の測定にはこれまで Vero 細胞や B95a 細胞が用いられてきた。野生株麻疹ウイルスのレセプターとして signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) が発見され、SLAM を発現させた Vero 細胞が九州大学の柳教授らによって樹立された。今回われわれはこの SLAM/Vero 細胞を用いて麻疹中和抗体価を測定し、その有用性について検討した。

【方法】 中和試験の攻撃用ウイルスとしては、実験室株の Edmonston 株（遺伝子型 A 型）と麻疹野外株の一の瀬株（遺伝子型 D3）を用いた。麻疹陰性血清ならびに標準血清を含む非働化したヒトの血清 $120\mu\text{l}$ を 96 穴マイクロプレート上で 2 倍階段希釈し、 1ml あたり 1000TCID_{50} のウイルスを含むように希釈した攻撃用ウイルス液 $120\mu\text{l}$ を加えて混和、 37°C で 30 分、室温で 30 分、さらに 4°C で 1 晩中和した。このウイルス・血清混合液 $200\mu\text{l}$ を、別の 96 穴マイクロプレートで単層形成させた Vero 細胞、B95a 細胞、SLAM/Vero 細胞に接種し、培養を継続した。培養細胞を 14 日後まで観察し、細胞変性効果の完全抑制を指標として中和抗体価を算出した。

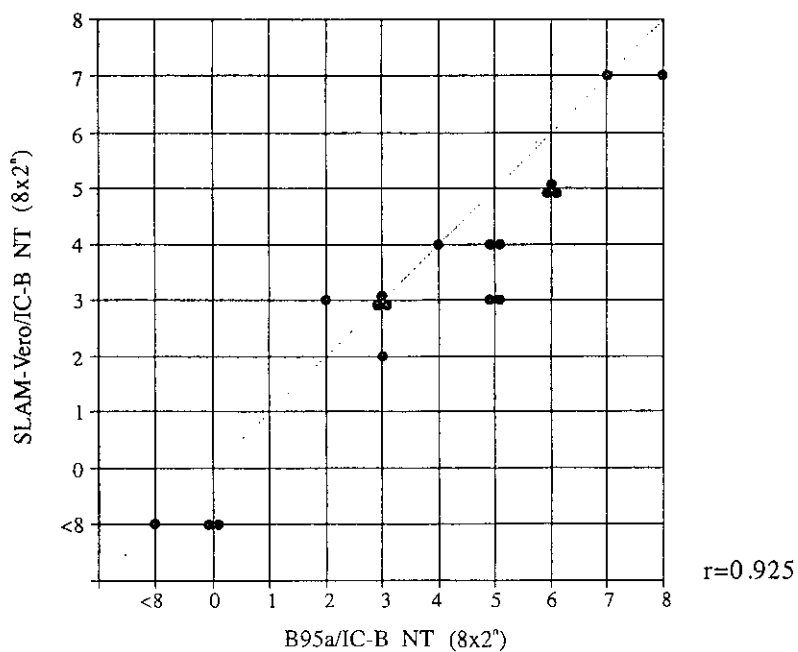
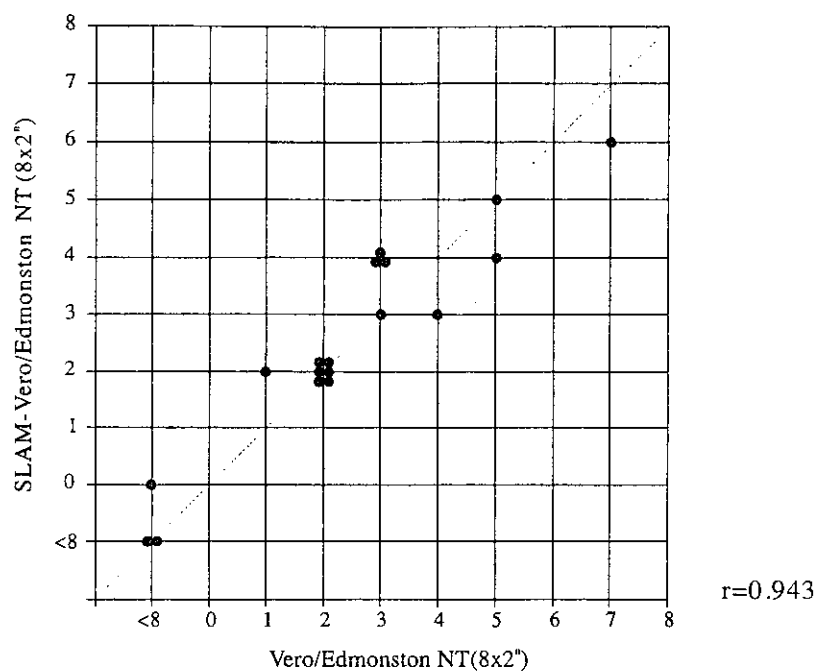
【結果】 SLAM/Vero 細胞を用いた中和試験では、明瞭な細胞変性効果が観察され、接種後 7 日目で中和抗体価が測定できた。Vero 細胞/Edmonston 株の系と SLAM/Vero 細胞/Edmonston 株の系との相関係数は 0.943、B95a 細胞/一の瀬株の系と SLAM/Vero 細胞/一の瀬株の系との相関係数は 0.925 で、従来の中和試験とよく相関していた。また血球凝集抑制試験やゼラチン粒子凝集反応ともよく相関していた。

【考察】 SLAM/Vero 細胞は、Vero 細胞、B95a 細胞とともに麻疹の中和試験に使用できる。Vero 細胞を指示細胞として使用する場合には、攻撃ウイルスは実験室株しか使用できず、一方 B95a 細胞の中和試験においては、EB ウイルスを排出することからバイオセーフティ上問題があり、実験室株を攻撃ウイルスとして使用する場合には、予め B95a 細胞で 2~3 代ウイルスを馴化する必要がある。これに対して SLAM/Vero 細胞では、実験室株と野外株の両者を馴化することなく使用できる。またワクチン株によって誘導される抗体が、流行株に対しても有効であるかなど、麻疹ウイルス株間の抗原性の違いを比較するのに役

立つものと考えられる。ただし、SLAM/Vero 細胞は、継代を重ねていくと SLAM の発現が低下する可能性があり、定期的に細胞の性状をチェックする必要がある。

謝辞

SLAM/Vero 細胞を分与して頂いた九州大学の柳 雄介先生に深謝します。



麻疹感染の Secondary Vaccine Failure (SVF) の診断法

佐藤 威、岡田 晴恵、田代 真人 (国立感染症研究所ウイルス3部)

[目的]

我が国における弱毒生麻疹ワクチンは1969年より接種が開始された。以来ワクチンの接種により麻疹に対して高率に防御効果を示してきた。しかし、麻疹ワクチンの接種率は毎年約75%前後と低いために毎年各地で小規模の流行がある。また、最近の麻疹患者は乳幼児ばかりでなく中学生、成人が麻疹に罹患し高齢化しつつある。これらの麻疹患者には、幼児期に麻疹ワクチンを接種したにも拘わらず自然麻疹に罹患する者が多数含まれるようになった (SVF:Secondary Vaccine Failure)。今回、我々はSVFと初感染症例との血清学的鑑別診断法を確立するためにIgG Avidity 測定の方法検討を行った。

[方法]

デンカ生研社製麻疹 IgG 抗体測定用 ELISA キットを用い IgG の Avidity (親和性) をしらべた。200 倍希釈血清サンプルを麻疹ウイルス抗原固相化 96 穴マイクロプレートに加えた。抗原抗体の結合物を 6M-Urea (尿素) で室温 5 分間処理を行った。これを 3 回繰り返し麻疹ウイルス抗原に結合力の弱い IgG を除いた。残留した IgG 抗体をキットの方法によって測定した。IgG の Avidity の比率は、Urea 処理後の IgG の吸光度が Urea 未処理 IgG の吸光度に対する比率を求めた。15%以下を Low avidity, 15~25%を境界領域と 25%以上を High avidity とした。

[結果]

1. IgG の親和性を測定するための反応条件の検討を行った。同一の初感染麻疹患者より発疹出現日から 4 ヶ月後まで経時的に採血した血清及び麻疹抗体陽性の成人 20 人の血清を用いた。0, 2, 4, 6, 8M 各濃度の Urea で 3 回処理を行ったところ、6M-Urea 処理が感染初期から回復期までの IgG Avidity 値に明瞭な変化を確認する事が出来た。
2. IgM 抗体は初感染でも SVF でも出現するので両者の鑑別には必ずしも役に立たない。
3. 2002 年 3 月に北茨城地方では麻疹の集団発生があった。これら麻疹患者の中には幼児期に麻疹ワクチンを接種したにもかかわらず今回麻疹に罹患した者 (SVF) が多数含まれていた。これらの患者血清について、IgG Avidity の変化を調べた結果、SVF では初期から High avidity であったが、初感染者では Low avidity であり回復期に初めて High avidity に変化した。

[考察]

麻疹 IgG 抗体の Avidity を測定する条件を確立した。これを用いて麻疹の初感染と SVF の鑑別が可能となった。SVF の IgG の Avidity により診断する際には、発疹後 1 ヶ月以内に血清サンプルを得る事が重要である。SVF の確定診断によりワクチンの追加接種によるブースターの必要性がより明確にしたものと考えられる。

臨床医から見た麻疹ウイルス抗体測定法の問題点

高山 直秀（東京都立駒込病院小児科） 松永 貞一（永寿堂医院）

〔目的〕 臨床現場では麻疹既往歴の調査および麻疹ワクチン接種の効果判定のために、簡便で感染防御との相関が高い検査方法が求められている。今回は乳幼児と若年成人の血清検体について、臨床現場で比較的容易に測定できる麻疹HI抗体、PA抗体、PHA抗体を測定してそれぞれの長所短所を検討した。

〔方法〕 何らかの疾患の診断と治療のために受診した小児から保護者の同意を得て採血を行うと同時に麻疹ワクチン接種歴、麻疹罹患歴を聴取した。また、研修医として採用された医師から本人の同意を得て麻疹抗体測定のために採血を行った。麻疹HI抗体検査は某検査センターに依頼し、麻疹PA抗体測定は富士レビオ社製の検査キットを、麻疹PHA抗体測定はデンカ生研社製の測定キットを用いて測定した。

〔結果〕 HI抗体価が8倍未満と判定された検体でもPA抗体およびPHA抗体は陽性に判定されるものがあった。同一検体ではHI抗体価が最も低く、PA抗体価が最も高い結果となる例が多かったが、PA抗体よりもPHA抗体の方が高い値となる例も少数みられた。

〔考案〕 HI抗体測定法は以前から広く臨床現場で用いられ、簡便で感染防御レベルを反映すると考えられているが、血球の入手が困難になりつつあることと、HI抗体陰性と判定された検体中にも他の測定法で陽性と判定されるものがある。PHA抗体測定法はHI抗体測定法よりも感度がよく、抗HA抗体を測定しているため、感染防御レベルとの相関も期待できるが、まだ十分検討されていない点が問題点である。PA抗体測定法はHI抗体測定法やPHA抗体測定法よりも簡便で、非常に高い抗体価が得られるが、感染防御レベルとの相関がまだ明らかでない点が問題点である。なお、感染防御レベルを判定するためには中和抗体の測定が現存する抗体測定法の中で最も優れていることは一般に認められているが、測定可能な施設に限られるうえ、結果が得られるまでに少なからぬ時間を要するため今回は検討対象から省いた。

ウエストナイル熱と血清診断法

倉根 一郎、高崎 智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部）

ウエストナイルウイルスは 1937 年ウガンダにおいて熱発患者から初めて分離されたウイルスである。日本脳炎ウイルス、デングウイルス等とともに、フラビウイルス科、フラビウイルス属に分類されるウイルスであり、自然界では鳥と蚊の間で維持されている。ヒトの感染は、感染蚊の吸血によって起こる。しかし、通常は感染したヒトを非感染蚊が吸血したとしても、蚊の感染は起こらない。ウエストナイルウイルス感染症は過去アフリカ、ヨーロッパ、西アジアにおける流行が報告されていたが、アメリカ大陸においては、1999 年アメリカ合衆国のニューヨーク市周辺で初めて患者発生があった。その後、年毎に侵淫地域は拡大し、2003 年 1 月現在、約 4,000 人の患者と 250 人を超す死亡者が報告されている。現在のところ日本への侵入はない。

目的：

ウエストナイルウイルス感染の診断には病原体・血清診断が重要である。フラビウイルス間には免疫学的に交叉反応が存在するため、ウエストナイルウイルスが他のフラビウイルス侵淫地域に侵入した場合には血清診断において特に注意が必要となる。本研究においては、ウエストナイル熱の血清診断法の確立と他のフラビウイルスとの鑑別法の確立を目的とした。

方法：

ウエストナイル特異的抗体検出のため IgM 捕捉 ELISA 法や中和法の確立を行い、さらに他のフラビウイルスとの鑑別を検討した。

結果：

- 1) ウエストナイル IgM 捕捉 ELISA 法と中和法を確立した。
- 2) 日本脳炎患者とウエストナイル熱患者血清間には交叉反応が認められるが、両ウイルスに対する抗体測定系を平行して使用することにより鑑別できる。

ELISA 法による肺炎球菌血清型特異的 IgG 定量

齊藤 剛、高野 昇一 (株BML 研究開発本部)

新井 智、岡部 信彦 (国立感染症研究所感染症情報センター)

[目的] 近年、肺炎球菌を起因菌とする呼吸器疾患は、その耐性菌等の増加に伴い、治療が困難になるケースが増えている。日本国内では 23 価ワクチンが認可されており、予防接種の重要性が高まっているが、ワクチンの効果を把握するには、血清中の抗体価を測定することが必要となる。しかしながら、従来から行われてきた RIA 法は操作が煩雑で、一般の検査施設ではほとんど行われていないのが現状である。今回、英国ロンドン大学 WHO Reference Laboratory で実施されている標準的な ELISA 法に基づき、ワクチンを接種した健常者ボランティアの血清中の莢膜型特異的 IgG を測定した。この結果をもとに、ワクチン接種の効果について評価したので報告する。

[材料] GCP に準じインフォームドコンセントを得た健常者ボランティア 30 名に対し、日本国内で承認されている 23 価肺炎球菌ワクチンを接種した。接種前および接種 4 週間後の血液を採取、血清を分離し測定材料とした。また、検量線作成に用いる標準血清として、米国 FDA より供給された血清を使用した。

[方法] 肺炎球菌莢膜多糖類を型別にコーティングしたマイクロタイタープレートに、希釈した標準血清、または被験血清を添加し、型特異的抗体反応を行った。標準血清と被験血清の希釈は、あらかじめ非特異反応に関わる抗 CWPS (Pneumococcal Cell Wall Polysaccharide) 抗体を中和するため、CWPS を含む緩衝液を用いて、室温で 30 分間インキュベートした。検出用二次抗体としてアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体、基質として *p*-Nitrophenylphosphate を用い、405/630nm の吸光度を測定し、標準血清で作成した検量線からヒト血清中の抗体価を決定した。

[結果] 日本国内で比較的感染率の高い 4 種 (6B、14、19F、23F) の莢膜型について、健常者ボランティア 30 名のほとんどで、接種後の抗体価上昇が確認された。上昇率は数倍から数百倍まで個人によって差が見られた。14 型については、接種前の抗体価平均値は他の型と同等の値であったが、接種後の抗体価平均値は他の型に比べて高く、上昇率も大きかった (表)。一方、2 倍以上の抗体価上昇を示した割合は、6B 型、14 型、19F 型、および 23F 型それぞれ、73.3%、86.7%、70.0%、および 76.7%であった。ワクチン接種前後の抗体価を比較した相対的な評価では、抗体反応は良好であった。

表. 健常人ボランティア 30 名における、23 価肺炎球菌ワクチン接種前後の平均抗体価と平均増加倍率

血清型	平均定量値 ($\mu\text{g/ml}$)		平均増加倍率
	接種前	接種後	
6B	2.71	11.12	4.4
14	3.35	40.75	31.0
19F	4.92	14.99	4.3
23F	2.19	10.58	7.7

E 型肝炎抗体検出系の開発

李 天成、武田 直和（国立感染症研究所ウイルス第二部）

E 型肝炎ウイルス（HEV）は経口伝播型非 A 非 B 型肝炎の重要な病因ウイルスのひとつである。まだ増殖のための培養系はない。組換えバキュロウイルスを用いて、アミノ末端から 111 アミノ酸を欠失した構造蛋白を発現することによってウイルス様中空粒子（VLPs）を作製することに成功した。この VLPs はネイティブなウイルス粒子と同じ抗原性、免疫原性を有し、大量かつ高純度に抗原を調製することができる。VLPs を用いて、特異性が高くかつ高感度の抗体検出 ELISA 法を確立した。この抗体検出 ELISA 法は E 型肝炎の疫学調査及び非 A 非 B 非 C 型肝炎の原因ウイルスの診断に有用である。

ヒトパピローマウイルス感染中和抗体について

神田 忠仁 (国立感染症研究所・遺伝子解析室)

ヒトパピローマウイルス (HPV) は、環状 2 本鎖 DNA をゲノムとし、L1 及び L2 の 2 種の蛋白質からなる正二十面体キャプシドを持つ。HPV の増殖を許す実用的な培養細胞系は無い。組み換えバキュロウイルス等を利用して L1 ないし L1 と L2 を大量に発現させると核内に形成されるキャプシド様の粒子 (L1-キャプシドないし L1/L2-キャプシド) や L1/L2-キャプシドに発現プラスミドを組み込んだ感染性偽ウイルスを使って研究が進められている。HPV はゲノムの塩基配列の相同性に基づいて 80 以上の遺伝子型に分類されているが、このうち高リスク型と呼ばれる HPV (16、18、30、31、33、52、58 型等) の感染が、子宮頸癌、肛門周囲癌、陰茎癌等の原因となっている。HPV の感染をワクチンで予防できれば、これらの癌を根絶することが可能と期待され、WHO はワクチンの開発を呼びかけている。

ワクチンの有効性は動物のパピローマウイルスで確認された。ワタノオウサギパピローマウイルス (CRPV) では、病変部から回収したウイルス粒子を不活化して接種すれば感染を防ぐことが示された。ついで大腸菌で作った L1 の一部を接種しても効果がないこと、L1-キャプシドを抗原とすると感染をほぼ完全に防ぐことが示された。そこで、HPV でも L1-キャプシドを感染予防ワクチンに利用できると期待され、現在、米国では HPV16 型 L1-キャプシドをヒトに投与して、安全性と有効性を調べる臨床試験が進められている。最近、これまでの成績が発表され、このワクチンは HPV16 型の感染を防いでいることが示された。しかし、L1-キャプシドによって誘導される抗体は、極めて型特異性が高い。即ち、16 型の L1-キャプシドを接種すると、得られる抗体は 16 型のみを中和する。従って、L1-キャプシドをワクチン抗原とする場合、HPV の各型に対するワクチンを個別に用意することが必要となる。10 以上の型に発癌性があるとされるので、これらにどう対応するかが L1-キャプシドワクチンの残された課題である。

一方、抗 L2 抗体による感染中和は型特異性が低く、中和活性を持つ L2 抗体を誘導できるワクチンは、複数の HPV 型の感染を一度に予防できる可能性がある。ウシパピローマウイルス 4 型の L2 を大腸菌で作り、ウシに免疫すると感染を防ぐことから、L2 にも中和エピトープが存在することがわかった。HPV16 型 L2 (全長 473 アミノ酸) のアミノ酸 108-120 領域はキャプシド表面に露出しており、この領域に抗体が結合すると細胞への感染が阻害されることがわかった。この領域のアミノ酸配列は型間で極めてよく保存されており、HPV の細胞への侵入に際して、この領域で細胞表面の蛋白質に結合するらしい。HPV16 型のアミノ酸 108-120 領域を認識する抗体は、少なくとも 6、11、18、52、及び 58 型とも反応する。アミノ酸 108-120 領域の配列を持つ合成ペプチドをマウスに経鼻接種すると、血清中と粘膜にそれぞれ中和活性を持つ IgG と IgA が誘導される。最近このペプチドをボランテアに経鼻接種する試験を行ったところ、安全性が示されるとともに、一部の被験者の血中に中和抗体が誘導された。L2 を標的とするワクチンによって、同時に複数の型の HPV 感染を防御できる可能性が示されている。

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

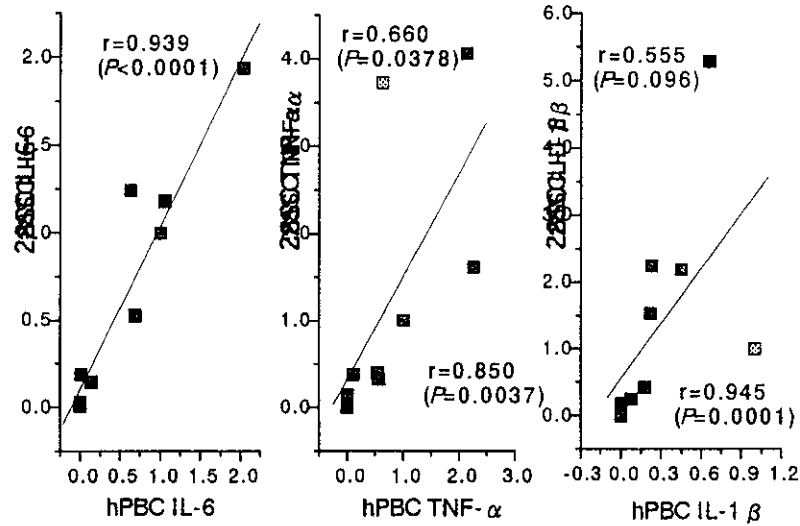
山本 明彦、落合 雅樹、片岡 紀代、豊泉 裕美、
蒲地 一成、堀内 善信（国立感染症研究所・細菌第二部第五室）

【目的】ワクチンを含め生物製剤へのエンドトキシン混入は製剤の安全性管理上重要な問題である。一般に各製剤のエンドトキシン試験規格値は、健常人 1 kg 体重当たり 1 時間に 5EU まで投与可能として、計算で求められる事が多い。我が国の生物学的製剤基準では、製剤のエンドトキシンに対する漸進的ナリムルス活性阻害や生体内共同作用による活性増強等、複雑なバリデーションのもとに規格値が設定されてきた。この場合、特にヒトに於ける反応への外挿の為の適当な反応系がなく、ヒトでの反応制御にとっての妥当な規格値設定が困難であった。この問題を解決すべく、ヒト由来株化細胞を用いて検討を行ったので報告する。

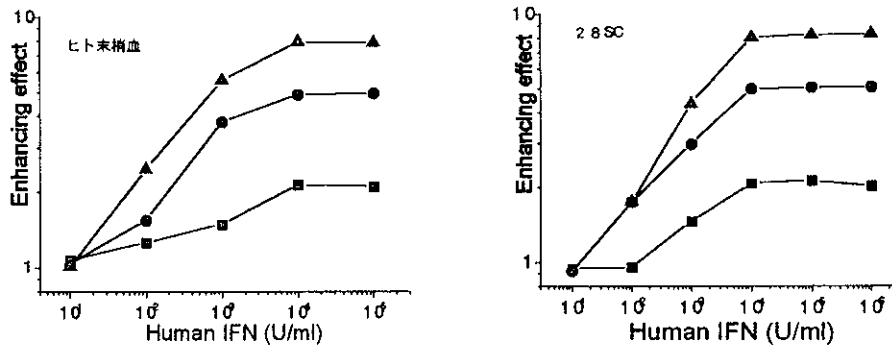
【材料と方法】局方エンドトキシン標準品および市販各種 Westphal エンドトキシンを反応系のバリデーションに用いた。特にエンドトキシンとの生体内相互作用の顕著な製剤として、ヒトインターフェロン製剤を用いて試験法のバリデーションを行った。ウサギ発熱試験およびエンドトキシン試験は生物学的製剤基準に基づき実施した。試験法確立のため THP-1 (ATCC TIB 202), P31/FUJ (JCRB0091), P39/TSU (JCRV0092), MD (ATCC CRL 9850), 90196B (ATCC CRL 9853), EL1 (ATCC CRL 9854), 28SC (ATCC CRL 9855), KMA (ATCC CRL 9856) およびマウスモノサイト系細胞 RAW264.7 (ATCC 71)について、比較評価した。また候補試験法についてはヒト血液に於ける *in vitro* サイトカイン誘導試験結果との比較により評価した。ワクチンへのエンドトキシン試験法適用可能性検討のため、インフルエンザ HA ワクチン数ロットを用いた。

【結果と考案】インフルエンザ HA ワクチンの中に、相当強いリムルス陽性反応を示しエンドトキシン試験法適用が困難なロットが見いだされた。そのリムルス反応性についてエンドトキシンと比較した結果、生物活性がなく、物理化学的性状もエンドトキシンと異なるものである可能性が考えられた。そこで別途の試験法を検索する事とした。各種のエンドトキシンについて検討した処、エンドトキシン試験とウサギ発熱試験結果は一致しないことが判明した。またこの両試験法の結果はともにヒト末梢血に於ける *in vitro* TNF- α , IL-6 および IL-1 β 産生の何れとも一致しない事が判明した。

ヒト末梢血培養と28SC細胞とのエンドトキシンに対する反応の相関



ヒトインターフェロン α (■) β (●) γ (▲)による容量依存的なエンドトキシンの活性増強：ヒト末梢血及び28SC細胞を用いて



8種類のヒトモノサイト細胞系についてIL-6産生を比較したところ、THP-1と28SCのみがエンドトキシンに対して用量依存的な反応性を示した。またTHP-1はIL-6、TNF- α およびIL-1 β 何れの産生に於いても非常に高感度の反応性を示したが、ヒト末梢血の反応性と一致しないことがわかった。一方28SC細胞は各種エンドトキシンとの反応性のみならず、ヒトインターフェロンによるエンドトキシン活性増強の検出についてもヒト末梢血と同様な反応性を持つことが示され、製剤のエンドトキシン汚染についてのヒトでの反応性予測に有効な手段を提供する可能性が示唆された(図)。既にエンドトキシン試験法の適用されている生物学的製剤もあるが、今後この方法による規格値の妥当性再確認と、今後適用の検討を行う場合のバリデーションが重要となる。

Ⅱ. 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

研究協力者

宮 崎 千 明

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（福岡市立西部療育センター）

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、昨年度に引き続き全国の臨床医家、疫学者の協力を求めて必要な情報を収集した。

現在わが国で、ワクチンにより予防可能な疾患のうち、もっとも問題なのは麻疹である。麻疹抗体保有状況では、高齢者は自然のブースターを受けていて高い水準にあったが、若い親の年代では抗体価が比較的低く、新生児へは 1.8 倍程度濃縮されて経胎盤移行しているが、移行抗体は生後 6 月頃には軽症麻疹に罹患しうるレベルに低下すること、ワクチン株に対するより最近分離ウイルス株に対する抗体価が低いことが判明した。また、予防接種による抗体価の低下による麻疹罹患（secondary vaccine failure、SVF）は中学生年代以下でも認められていることから、麻疹ワクチンの二回接種を考慮すべき時期に来ていると考えられた。

麻疹とムンプスで変異ウイルス株の流行が発見されていることと合わせて、ワクチンの効果とその持続について十分なサーベイランスの継続が重要である。

ムンプス及びそのワクチンの前方視的研究（3 年計画）の中間報告によれば、ムンプス自然罹患時の髄膜炎合併率は 1.2 % であり、ワクチン接種後の発生率は 0.05 % であった。

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から小児急性神経系疾患の広範囲な調査が行われ、最終年度に向けて集計が行われている。

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、書類によって研究協力者との情報交換を行う一方、第四班と連携して、より正確な予防接種率等の把握方式について関係班員による検討会を開催して検討を行った。年度末には全員の出席を求める総会を開催し、報告と討議を行った。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最終年度に向けての研究を依頼した。

C. 研究結果

1. 麻疹ワクチンの検討

麻疹の罹患状況については、本年度も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ているが、本年度は、新生児、年長児、成人、高齢者について抗体保有状況が検討された。高齢者は自然罹患とその後のブースターを受けており高い抗体レベルを維持していたが（多屋、他）、経胎盤移行抗体では、今回検討した21例の母体では全員抗体陽性であったが、25歳以下では26歳以上に比して有意に低値であった。臍帯血へは母体より1.8倍ほど濃縮移行していたが、抗体価は生後6月で軽症麻疹に罹患しうるレベルまで低下し、9月で消失すると判断された。また、抗体価はワクチン株に対するより最近分離株ウイルスに対して低値であった（庵原他）。今後とも流行株に対するワクチン効果について継続的なチェックが必要である。

ワクチン既往がある罹患患者について、primary vaccine failure (PVF) か SVF かを抗体アビディティで検索したところ、接種後数年以内でも修飾麻疹に罹患することが判明した（中野他）。検査法では、HI や PHA 陰性でも NT 陽性例が認められる（布上他）。また、中学生と成人の麻疹抗体価を PA 法で検索した成績では、中学生の方が低く、野外株ウイルスによるブースターを受ける機会の減少していることが推察された（奥野他）。

以上の成績を総合して麻疹根絶を目指すためには、麻疹ワクチンの接種率を上げる努力を続けるとともに、わが国でも麻疹ワクチンの2回接種を考慮すべき時期にきていると考えられた。

2. おたふくかぜワクチンの副反応調査成績

日本外来小児科学会では、2000年1月からおたふくかぜワクチン後の副反応調査を前方視的に開始している。中間報告では、ムン

プス自然罹患例での無菌性髄膜炎の合併頻度は1.2%、ワクチン後の髄膜炎は0.05%である（永井他）。

3. 日本脳炎ワクチン有無別抗体保有率

4歳以下の幼児について調査したところ、3～4歳での接種率は47%、接種群の抗体保有率は88%、未接種群では地域により0～38%であり、日本では今なお日本脳炎ウイルスの感染リスクが存在することが明らかとなった（新井他）。

4. ポリオワクチンについて

ポリオ生ワクチンは、わが国では2回接種のみでめざましい効果を上げているが、愛知県では2002年に抗体検査を希望した96例について調査したところ、I型、II型の抗体陽性率は良好であり、III型は不十分であった。未接種者3名は7～17歳であったが、全型とも陰性であった（宮津他）。

ポリオ生ワクチンを不活化ワクチンに切り替える戦略変更は、ハイチ・ドミニカにおける生ワクチン由来ウイルスによるポリオ流行の発生と、わが国では接種児からの感染による父親の麻痺発症例が相次いだこともあって可及的速やかなことが望ましいと論じられた。国産不活化ワクチン（日本ポリオ研究所）はセーピンの生ワクチン株を使用しており、製造上の安全性が高く、また万一のハイチのごときポリオ再流行に備えた生ワクチンの備蓄にも繋がることから有利であり、早期の実用化が望まれた。また、乳児への接種を考える時、注射回数の増加は望ましくないので、DPTとの混合ワクチンの実用化が要望された。

一方、各国のポリオ根絶へのキャンペーンを方式を今後麻疹に向けていくべきとの意見も出された（中野他）。

5. 小児急性神経系疾患 (AND) 調査

2001年1月から2002年12月までの2年間に小児科に入院したAND症例(18疾患群)について、全国の15の地域で調査が行われ、

集計中である。最終年度に報告されるが、最近 10 年間に行われた 3 調査についての傾向が報告された（宮崎）。奈良県下については今年度に報告されている。奈良県下の 2002 年の AND389 例中、細菌性髄膜炎は 14 例であり、インフルエンザウイルスによるものは 6 例であった（西野、吉岡）。

6. その他

水痘、麻疹、風疹、ムンプスに対する経胎盤移行抗体保有状況（西村他）、MMR ワクチンを 2 回受けていたにも関わらず修飾麻疹に罹患した姉妹例（秋元他）、麻疹ワクチンと風疹ワクチンを混合して接種したところ、局所反応、抗体獲得状況とも個別接種の場合と差のなかった成績（友田他）、ジフテリアが疑われた症例で診断ならびに患児の取り扱い、治療に苦慮した経験が報告された（秋元他）。

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。20 題近くの報告が寄せられ、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、中学生年代の抗体価が低下しつつあり、軽症の傾向はあるものの罹患するケースが多く見出されていることから、わが国でも 2 回接種法を考慮すべき時期に来ている。また、現行ワクチンはなお有効ではあるが、変異株の流行が各地で多発しているため、流行株の継続的サーベイが重要である。流行株の変異はムンプスについても指摘されている。

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本年度も総会の席上で要望された。

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から急性神経系疾患 AND の全国的調査が行われ、最終年度に報告される。

報告文献：

- 1) 岡部信彦他：国内外における麻疹の状況、小児感染免疫、15 (1)、69～77、2003
- 2) 中山哲夫：麻疹ウイルスの変異とワクチンの効果、小児感染免疫、15 (1)、79～82、2003
- 3) 平山宗宏：これからのわが国のポリオ対策、小児感染免疫、14、(1)、1～2、2002
- 4) 成田光生他：IgG 抗体 avidity 測定による麻疹ウイルスワクチン関連症例に関する研究、小児感染免疫、15 (2) 掲載予定、2003
- 5) 宇加江進：年長児成人麻疹 27 例の臨床的検討、小児感染免疫、14(4)、344～348、2002
- 6) 宮前多佳子他：乳幼児結核における重症播種型結核の臨床的解析、小児感染免疫、14 (4)、317～323、2001

高齢者における麻疹抗体保有状況

多屋 馨子、岡部 信彦（国立感染症研究所感染症情報センター）

稲松 孝思（東京都老人医療センター）

目的：従来終生免疫と言われていた小児に好発するウイルス感染症（今回は麻疹を対象とした）に対する免疫が、高齢化社会に伴い、罹患後 60 年～90 年以上経過した時点でどの程度維持されているかを検討し、現在青壮年期にある人の抗体価と比較検討することを目的とした。

対象と方法：対象は、東京都老人医療センターを受診した 60 歳～90 歳代の者 165 名（60-80 歳代各 45 名、90 歳代 30 名）、コントロール群は 20-50 歳代の職員 33 名とした。男女比は、60 歳代 1：1.2，70 歳代 1：1.25，80 歳代 1：1.9，90 歳代 1：1.4，コントロール群 1：1.7 であり、高齢者群、コントロール群共に 1：1.2-1.9 と女性がやや多かった。方法は、対象者及びコントロール群計 213 検体の血清を用いてゼラチン粒子凝集（particle agglutination: PA）法による麻疹抗体価を測定した。PA 抗体価 1：16 以上を抗体陽性と判定した。90 歳代の 15 検体は同一者からの複数検体を含むため複数検体がある者についてはその平均抗体価を用いた。年齢群間の比較には一元分散分析法、多重比較検定（Scheffe's F）を用いた。統計ソフトには Statcel を使用した。

結果：対象者及びコントロール群の PA 抗体価は全例陽性で、1：16 の者は存在せず全例 1：32 以上であった。1：128 未満（1：32 及び 1：64）の割合は、60 歳代と 70 歳代は 2.2%、80 歳代は 4.4%、90 歳代 0%、コントロール群は 12.1%であった。年代群別幾何平均値を計算したところ、コントロール群の幾何平均値が 631.7 ($2^{9.05}$) と最も低く、90 歳代群が 1814.4 ($2^{10.6}$) で最も高値であった。年齢群間の比較では 90 歳代とコントロール群にのみ危険域 5%で有意差を認めた。

考察：PA 法を検査方法として用いた理由は、検出感度において赤血球凝集抑制（hemagglutination inhibition: HI）法に勝り、中和法ともよく相関し、また血清の前処理が不要であるため実施が簡便なためである。ただし、PA 法で陰性であれば麻疹感受性者であることは確実であるが、どのくらいの抗体価があれば麻疹の発症を防御できるかは今後の検討課題である。今回の検討結果から 60 歳以上ではコントロール群と比較して 1：128 以上の抗体価を保有しているものの割合が高かった。また、コントロール群より 90 歳代群の平均抗体価は有意に高値であり、これまでの日本の麻疹流行状況を考えると高齢者の方が自然のブースター効果を受ける機会が多かったことと、コントロール群はワクチン接種群が入っているため自然感染群より獲得した抗体が低かったことが考えられる。しかし、今後ワクチン接種率が徐々に上昇し、麻疹の流行そのものが抑制された場合、コントロール群の抗体価が今回検討した高齢者群と同等に維持される事は困難であると考えられる。今後は麻しんワクチン接種率を可能な限り高く維持し、その結果として麻疹の流行を完全に抑制すると共に、将来的には麻しんワクチンの複数回接種を検討する必要があると考える。

結論：これまでの日本の麻疹流行状況では、感染後 60 年から 90 年経過しても麻疹抗体価に減衰は認められなかった。現時点では集団レベルで高齢者に対する麻疹対策は必要ないと考えるが、個人レベルでは免疫が不十分と考えられる者が特にコントロール群で多く存在した。

図1 年代別麻疹PA抗体保有状況

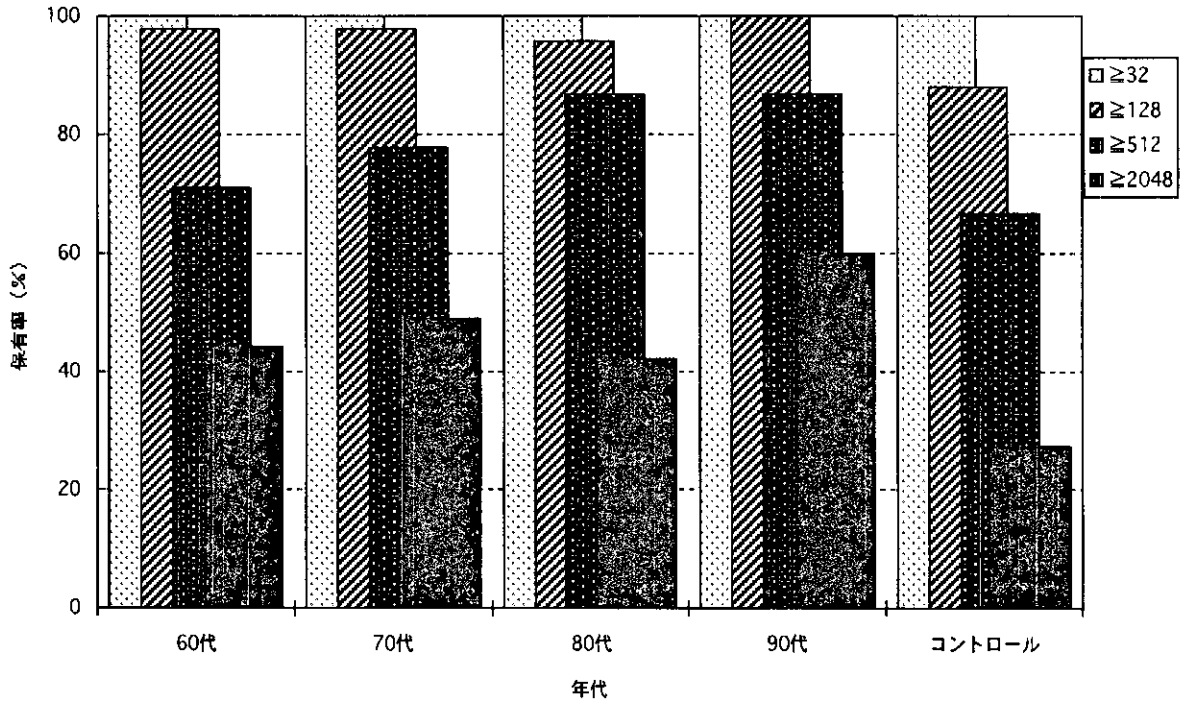
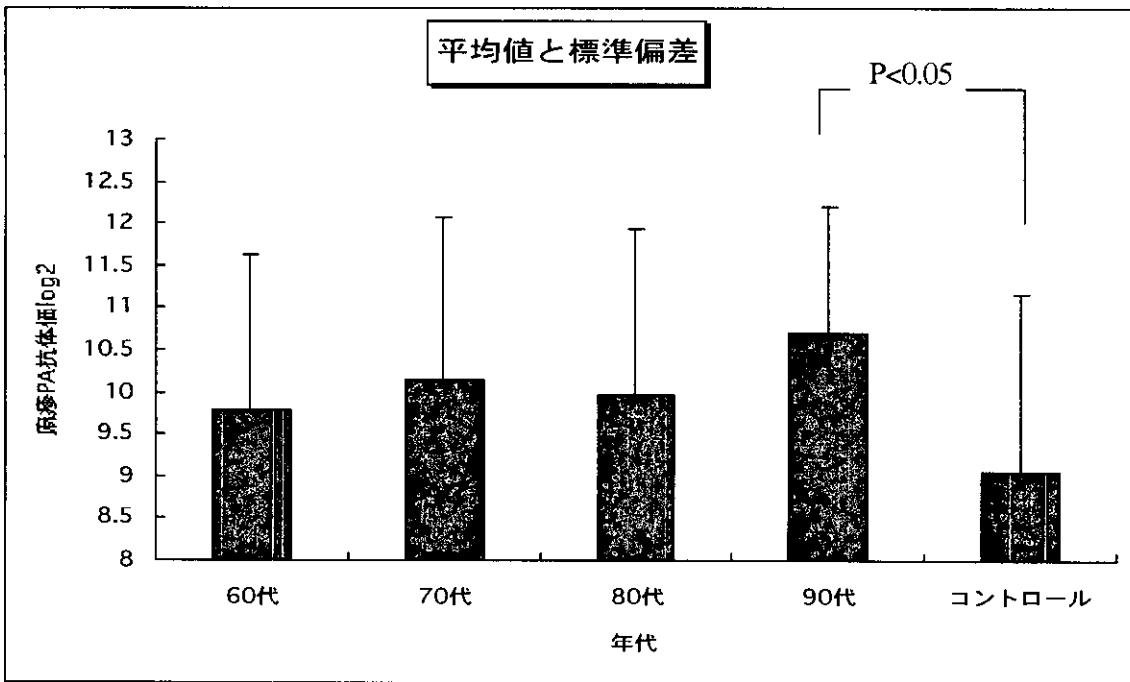


図2



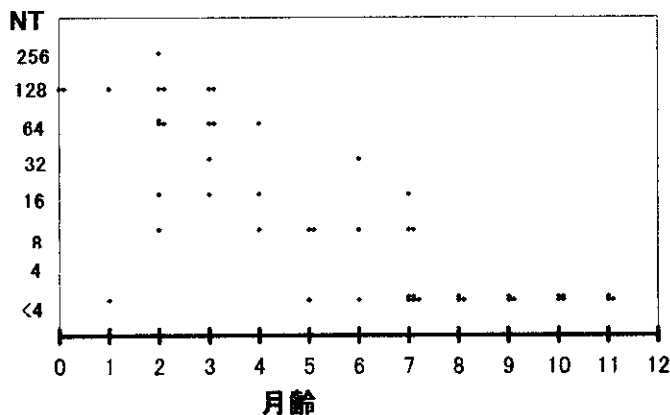
乳児の麻疹中和抗体保有状況（2002年川崎市）

武内 可尚、長 秀男、三田村敬子、山下 行雄、中尾 歩、
山本 敬一、林田 慎哉、大森 さゆ、松本 慎二、後藤 美和、
酒井 忠和（川崎市立川崎病院小児科）
岡田 晴恵、佐藤 威、田代 真人（国立感染症研究所生物製剤部）

2002年1月から11月の間に採取した乳児の血清について、麻疹中和抗体を測定した。図1は縦軸に抗体価を、横軸に月齢をとり、中和抗体価をプロットした。生後9ヶ月以降測定できる抗体保有例は認められなかった。図2は同じ血清の麻疹PA価をプロットしたもので、PA価でも生後9ヶ月以降では測定限界未満であった。また、生後6ヶ月までの27検体中3検体（11%）は既に中和抗体を保有しておらず、麻疹に感受性であった。

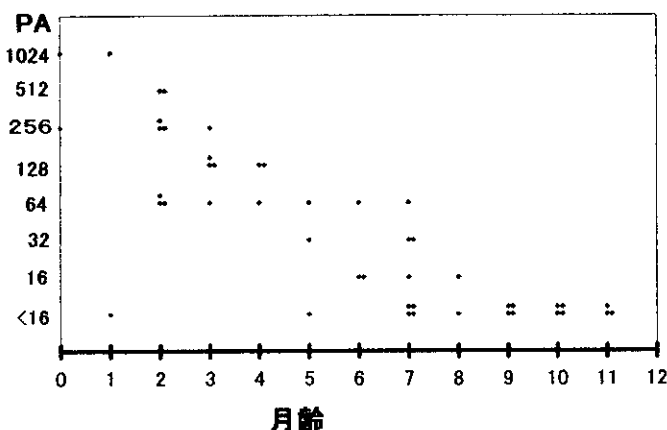
川崎市では1999年に18年ぶりの麻疹の流行に見舞われ、乳児麻疹や成人麻疹の重症例を経験した。2001年にはその影響が残り、乳児期後半に麻疹に罹患した例が確認された（平成14年度本研究班報告書83頁）。しかし2002年には、それを思わせる乳児期後半の高抗体価保有例は無く、再び非流行期に入ったものと思われる。川崎市の平成14年度中間報告では、1歳6ヶ月健診時の調査で、麻疹ワクチン接種済み率は88.1%にまで上昇している。

（図1）月齢別麻疹抗体価（NT）



1980年代前半の川崎市保育園児1万人の調査では、麻疹の罹患が最も多いのは1歳児であり、2番目は0歳児であったが、今もその傾向は変わっていない。当面の方針として、1歳前半での接種率をさらに高める努力を継続することの必要性は論をまたないが、大きな流行を前にしたときには、生後9ヶ月からの麻疹ワクチン接種を躊躇すべきではない。

（図2）月齢別麻疹抗体価（PA）



（図3）麻疹抗体価 NTとPAの相関

