

図4. Hib ワクチンキャリアー蛋白の破傷風免疫原性(マウス)

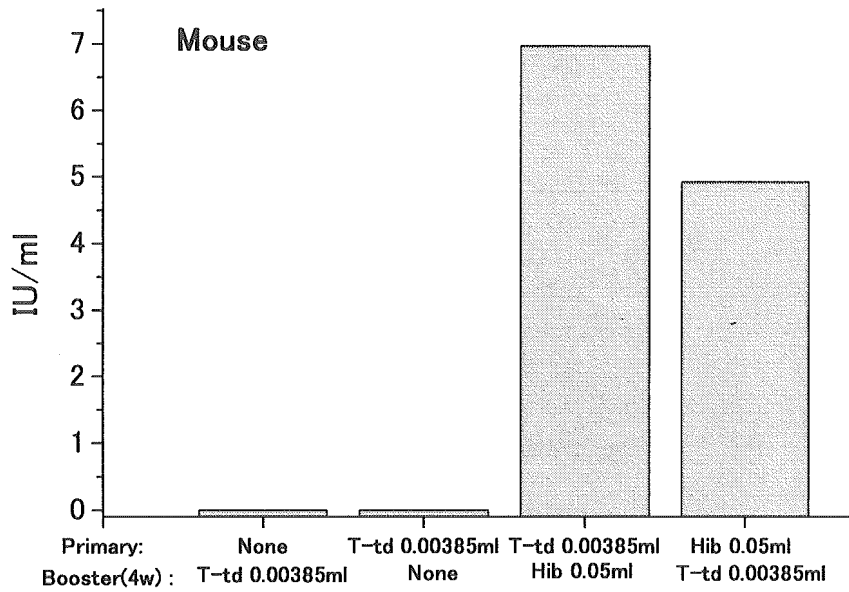
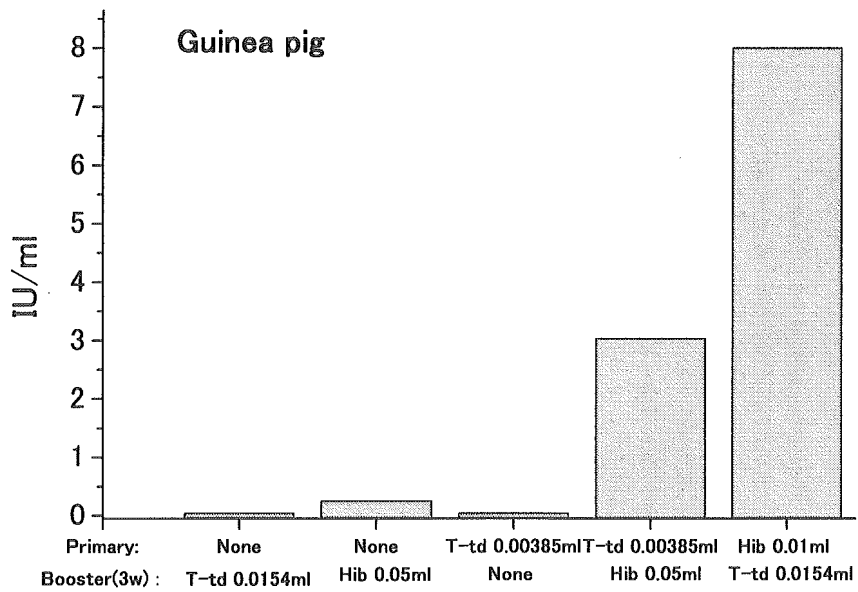


図5. Hib ワクチンキャリアー蛋白の破傷風免疫原性(モルモット)



7. 黄熱ワクチンにおける混入ニワトリレトロウイルス 遺伝子の検出に関する研究

分担研究者 倉根 一郎(国立感染症研究所ウイルス第一部部長)

研究協力者 高崎 智彦、田島 茂(国立感染症研究所ウイルス第一部)

研究要旨 現行の黄熱ワクチンはニワトリ胚細胞を用いて増殖させている。近年ニワトリ胚細胞を用いて生産されている麻疹およびおたふく風邪ワクチンに、ニワトリ胚線維芽細胞に由来する内在性ニワトリレトロウイルス (EAV) および内在性ニワトリレトロウイルス (ALV-E) の粒子が混入していることが示された。最近、黄熱ワクチンにもこれらの粒子の混入が認められたという報告がなされた。そこで我々が所有する黄熱ワクチンにこれらのウイルス RNA および DNA が混入しているかを調べた。日本で使用している YF-VAX4 ロット 6 バイアルを蒸留水で溶解後 RNA を抽出し、ALV-E に特異的なプライマーを用いて RT-PCR および PCR を行った。調べたすべてのロットにおいて RT-PCR および PCR 産物が得られた。次に RNA 溶液を DNaseI で処理後 RT-PCR および PCR を行ったところ、RT-PCR 産物に比べ PCR 産物の量が顕著に低下した。このことから、YF-VAX には E-ALV RNA および DNA が混入していることが明らかとなった。一方、外来性 ALV の混入についても調べたが、RNA、DNA ともに検出されなかった。これまでの報告から、ALV-E がヒトに感染する可能性は非常に低いと考えられるが、更なる検討および混入防止策が求められる。

A. 研究目的

黄熱ワクチンは黄熱の発症を回避するための非常に効果的な手段となっており、これまでに 400 万 dose 以上の黄熱ワクチンがアフリカや南米の熱帯地方の黄熱病流行地域で生活する人々、およびこれらの地域への旅行者に接種され実績を挙げている。現行の黄熱ワクチン (17D 株) は弱毒生ワクチンであり、麻疹ワクチンやおたふく風邪ワクチンと同様にニワトリ胚細胞を用いて増殖させている。外来性トリ白血ウイルス(ALV)などのニワトリ病原体の混入を防ぐため、これらのワクチンの製造に用いる胚細胞は SPF 状態で生育されたニワトリに由来するものを使用している。それにも関わらず低レベルの逆転写酵素活性が麻疹およびおたふく風邪ワクチンで検出された。その後の麻疹ワクチンでの研究から、この活性は内在性トリウイルス (EAV) および内在性 ALV

(ALV-E) に由来することが突き止められた。一方、黄熱ワクチンに関しては、逆転写酵素活性は確認されていないものの、逆転写酵素タンパクが検出され、さらに EAV および ALV-E 粒子が検出され、黄熱ワクチンにもこれらの内在性レトロウイルスが混入していることが明らかとなった (Hassain A.I. et al. 2003. Identification and characterization of avian retroviruses in chicken embryo-derived yellow fever vaccines: investigation of transmission to vaccine recipients. *J. Virol.* 77: 1105-1111.)。黄熱ワクチン接種者においてこれらのウイルスゲノムは検出されておらず、またこれらのウイルス抗原に対する抗体も検出されないこと、さらにこれらのウイルスがマウスで病原性を示さないことから、今のところワクチンの安全性には問題ないとされている。しかし、安全性および今後の対策に関する議論は十分とはいえない。今回我々は、日本で接種されている黄熱ワクチンに ALV-E が混入しているかを調べた。同時に外

来性 ALV 混入についても検討を加えた。

B. 研究方法

黄熱ワクチンは日本で用いられている VF-VAX 4 ロットを用いた。凍結乾燥品を 2×10^5 /ml 以上の PFU になるように蒸留水で溶解後、200 μ l から High Pure viral RNA purification kit (Roche)を用いてウイルス RNA 液を調整し、RT-PCR および PCR に用いた。ウイルス RNA 液に混入する DNA あるいは RNA を除去するため、cDNA 合成あるいは PCR の前にウイルス RNA 液を DNase I あるいは RNase A で処理した。cDNA 合成および PCR に用いた ALV-E および外来性 ALV 特異的プライマーは Hussain らの論文より引用した。増幅産物は 2%アガロースゲル電気泳動により解析した。

C. 研究結果

ウイルス RNA 液について ALV-E 特異的プライマーを用いて RT-PCR を行なったところ、ALV-E に由来すると考えられる増幅断片が今回調べたすべてのロットで得られた(図 1 写真左側)。しかしウイルス RNA 液について逆転写反応をおこなわずに PCR を行なった場合にも同様の増幅断片が得られた(図 1 写真右側)。一方 17D 感染 Vero 細胞の培養上清より回収したウイルス RNA 液では増幅断片は得られなかった。これより調べたすべてのロットに ALV-E の DNA が存在することが明らかとなった。しかしこの実験で ALV-E RNA の存在を断定することはできなかった。そこで次にウイルス RNA 液を DNase I 処理し DNA を分解したのちに PCR および RT-PCR を行なった(図 2 左側の写真)。DNase I 処理により、PCR で検出される増幅断片の量は著しく減少したが、RT-PCR 産物はほとんど変化が見られなかった。さらに詳細に解析するため、ウイルス RNA 液を DNase I、RNase A、あるいはこれら両方で処理後、PCR および RT-PCR を行なった(図 2 右側の写真)。DNase I 処理では RT-PCR のみで、RNase A 処理では PCR および RT-PCR の両方で増幅が確認されたが、両方で処理すると PCR および RT-PCR の両方で増幅はおこらなくなった。またこれらの断片が ALV-E に由来する

ことを、ダイレクトシーケンス法により確かめた。以上よりウイルス RNA 液には ALV-E DNA および RNA の両方が存在していることが明らかとなった。我々が所有する黄熱ワクチンに外来性 ALV が混入しているかを調べるため、外来性 ALV 特異的プライマーを用いて同様に調べた(図 3)。我々の系では、外来性 ALV の DNA および RNA は検出されなかった。

D. 考察

今回の解析で我々は Hussain らの報告と同様に黄熱ワクチンから ALV-E RNA および DNA を検出した。よって国内で接種されている黄熱ワクチンには、ALV-E 粒子および ALV-E がゲノムに組み込まれている細胞あるいはその残骸が含まれていると結論される。ヒトに対する ALV-E の病原性に関しては、これまでの報告からは否定的である。しかし、黄熱ワクチン接種者血清内の抗 ALV-E 抗体やウイルス RNA が検出されないのは、検出感度の問題である可能性もある。また ALV-E はレトロウイルスであるため、宿主ゲノムに組み込まれ、それにより自身の発現が抑制されている可能性がある。この場合、RNA を検出するのは難しい。さらに組み込まれた場所によっては、その周辺の遺伝子に何らかの影響を及ぼすことがあるかもしれない。今後、黄熱ワクチン接種者において、ALV-E が宿主ゲノムに組み込まれているかどうかを確認する必要があると考えられる。またヒトへの病原性も長期的に観察する必要がある。どのような細胞にも内在性レトロウイルスは存在しており、ヒトのゲノムの 40%はこのようなウイルスあるいはその残骸と考えられている。すなわち内在性レトロウイルスをコードしない動物細胞はない。従って、内在性レトロウイルス混入を防ぐには、これらのウイルス粒子を放出しない細胞を用いるしかないであろう。

E. 結論

日本国内で接種されている輸入黄熱ワクチンに ALV-E の粒子が混入していることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. なし

2. 学会発表

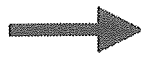
1. 田島茂。黄熱ワクチンへの ALV 混入に関する研究。 第 10 回トガ、フラビ、ペスチウイルス研究会。2003 年 10 月 26 日、京都。

H. 知的財産権の出願・登録状況

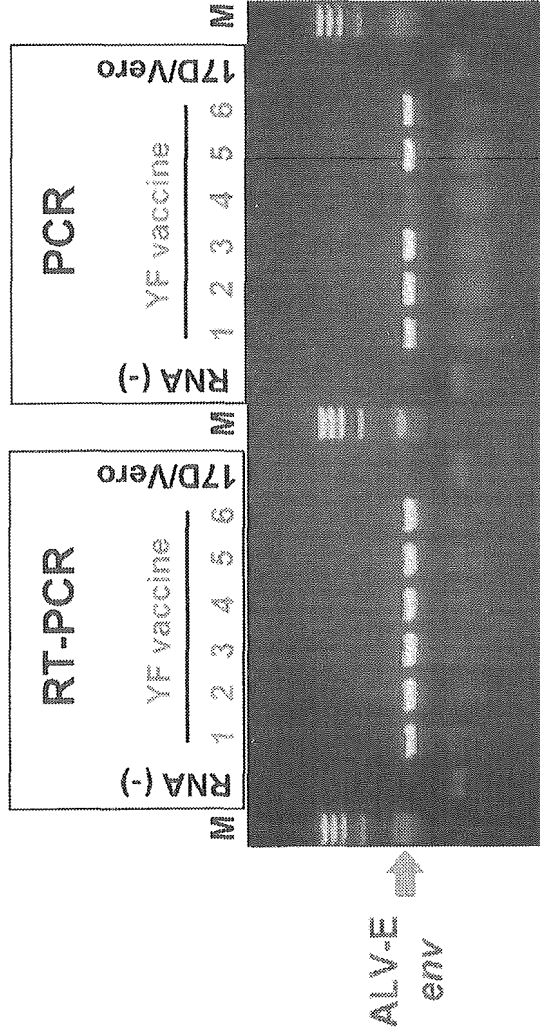
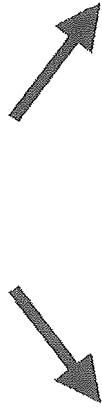
特になし。

1. YF-VAX (live 17D virus), UA055AC (A)
2. YF-VAX (live 17D virus), UA055AC (B)
3. YF-VAX (live 17D virus), UA055AC (C)
4. YF-VAX (live 17D virus), UA422AA
5. YF-VAX (live 17D virus), UA149AB
6. YF-VAX (live 17D virus), UA361AB

YF vaccine



RNA回収



-ALV DNA の存在を確認した(DNAのコンタミネーション)。
-ALV RNA の存在...?

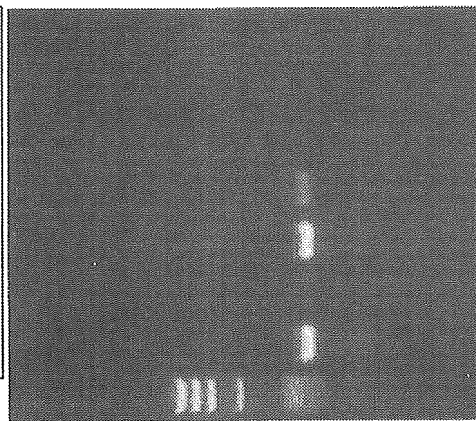
図1 YF ワクチンへの内在性ALV混入の検査(1)

DNase I 処理
(DNA の除去)

(RT-)PCR

YF vaccine		RNA (-)	
1	2	-	+
+	-	+	-

RT reaction M



ALV-E
env

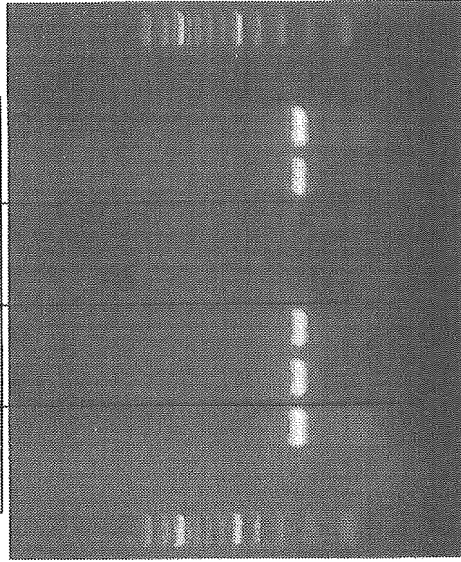
(RT-)PCR

YF vaccine no.1			
+	-	+	-
+	-	+	-
-	+	+	-
-	+	-	+

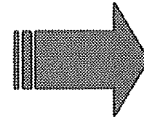
DNase I

RNase A

RT reaction M



ALV-E
env



- 内在性ALV RNA の存在を確認した。
- (RT-)PCR産物の塩基配列からも、ALVであることを確認した。

図2 YF ワクチンへの内在性ALV混入の検査(2)

(RT-)PCR

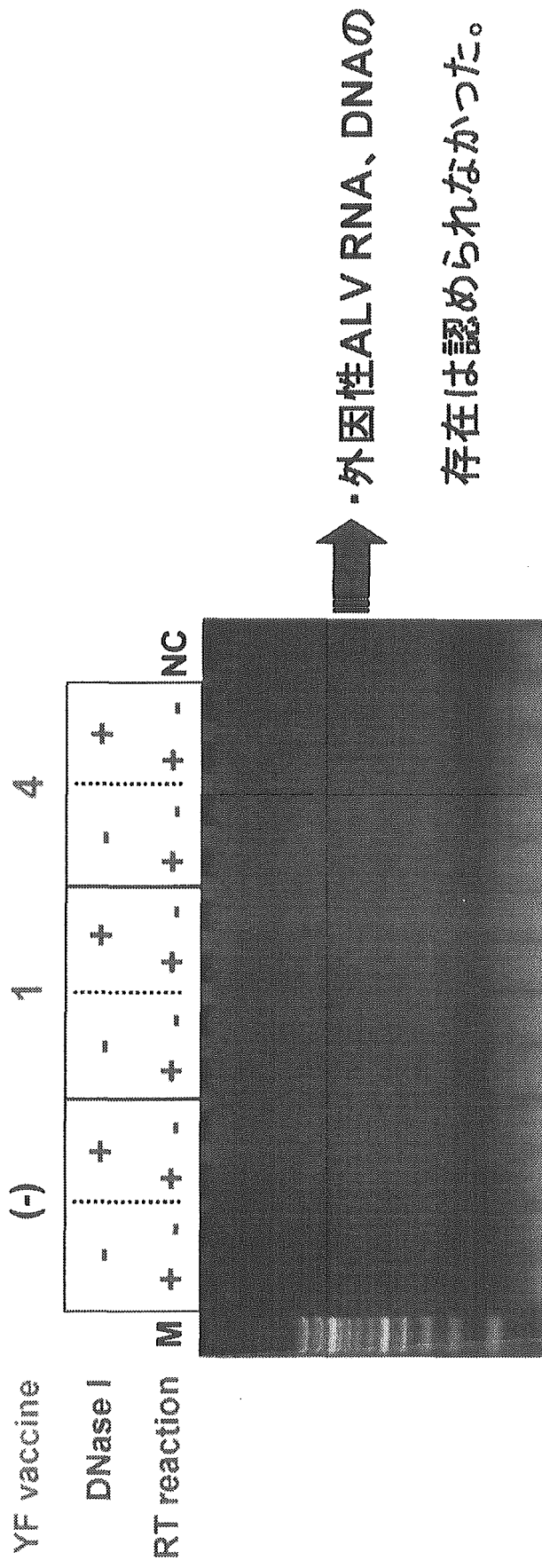
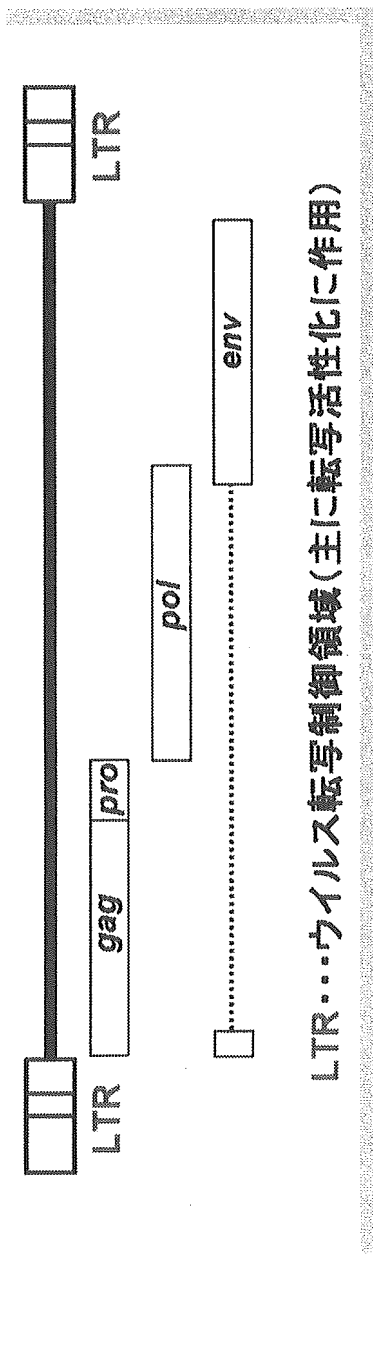


図3 YF ワクチンへの外因性ALV混入の検査



LTR...ウイルス転写制御領域(主に転写活性化に作用)

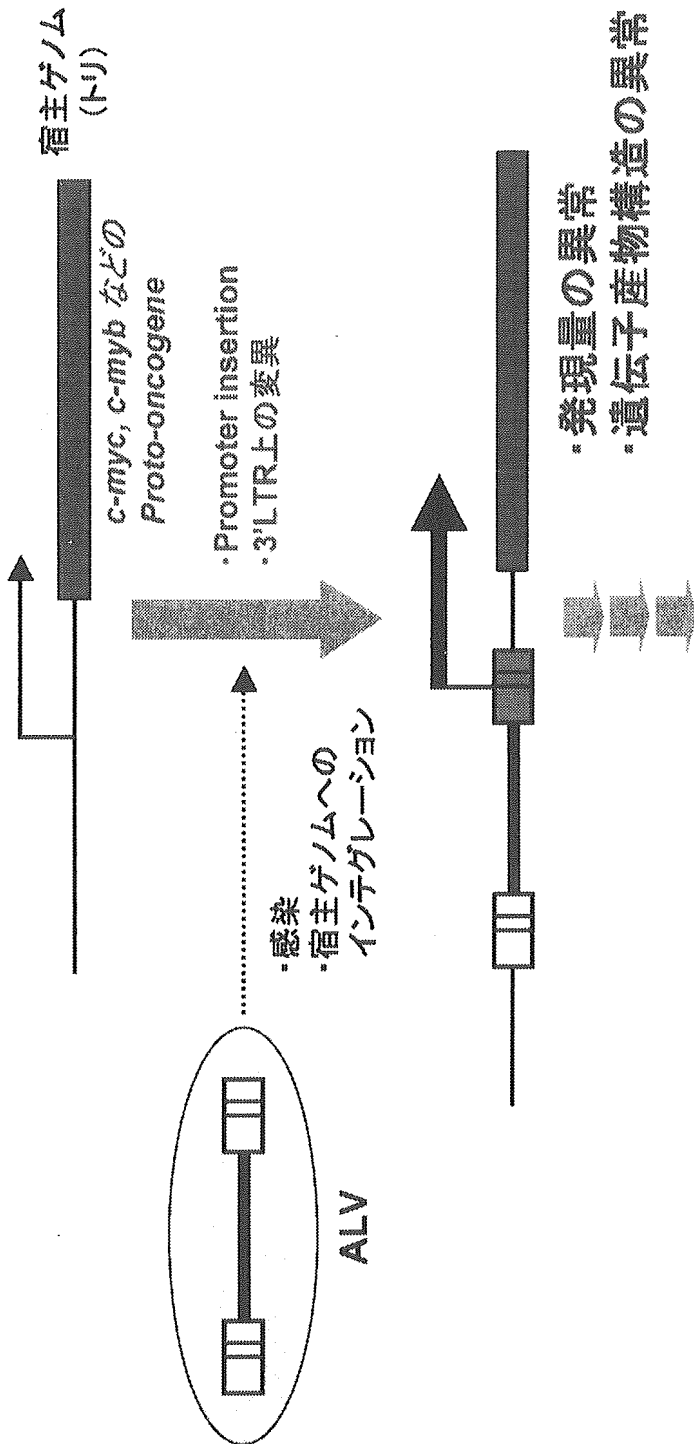


図4 Avian Leukosis Virus (ALV) (外因性ALV)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Ochiai M, Kataoka M, Toyozumi H, Yamamoto A, Kamachi K, Arakawa Y, Kurata T, Horiuchi Y	Endotoxin content in <i>Haemophilus influenzae</i> type b vaccine:	Jap J Infect Dis	In press		2004
Tanaka Y, Kasai M, Taneichi M, Naito S, Kato H, Mori M, Nishida M, Maekawa N, Yamamura H, Komuro K, Uchida T	Liposomes with differential lipid components exert differential adjuvanticity in antigen-liposome conjugates via differential recognition by macrophages.	Bioconjug Chem	In press		
Uchida T	Surface-linked liposomal antigen induces IgE-selective unresponsiveness in a T-cell independent fashion.	Current Drug Targets	3	119-135	2003
Uchida T	Stx-liposome conjugates as candidate vaccines.	Drugs of Today	39	673-693	2003
Kawakami C, Saito T, Nakaya Y, Nakajima S, Munemura T, Saikusa M, Noguchi Y, Fujii K, Takaoka M, Ito R, Saito T, Odagiri T, Tashiro M	Isolation of influenza A H1N2 viruses from an outbreak in Yokohama City during the 2001-2002 influenza season in Japan.	Jpn J Infect Dis	56	110-113	2003
Takahashi H, Kuroki T, Watanabe Y, Yamai S, Watanabe H	Identification of <i>tet(B)</i> , 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.	Bioconjug Chem	13	744-749	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
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 Clin Microbiol	40	3035-3037	2002
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
Asahi Y, Yoshikawa T, Watanabe I, Iwasaki T, Hasegawa H, Sato Y, Shimada S, Nanno M, Matsuoka Y, Ohwaki M, Iwakura Y, Suzuki Y, Aizawa C, Sata T, Kurata T, Tamura S	Protection against influenza virus infection in polymeric Ig receptor knockout mice immunized intranasally with adjuvant-combined vaccines.	J Immunol	168	2930-2938	2002
Yoshikawa T, Asao Y, Akimoto S, Ozaki T, Iwasaki T, Kurata T, Goshima F, Nishiyama Y	Latent infection of human herpesvirus 6 in astrocytoma cell line and alteration of cytokine synthesis.	J Med Virol	66	497-505	2002
Kato A., Ohnishi Y, Hishiyama M, Kohase M, Saito S, Tashiro M, Nagai Y	The amino-terminal half of Sendai virus C protein is not responsible for either counteracting the antiviral action of interferons or down-regulating viral RNA synthesis.	J Virol	76	7114-7124	2002
Takeuchi K, Takeda M, Miyajima N, Tanabayashi, K, Tashiro, M	Recombinant wild-type and Edmonston strains measles viruses bearing heterologous H proteins: role of H protein in cell fusion and host cell specificity.	J Virol	76	4891-4900	2002
Yamamoto A, Nakayama M, Kurosawa Y, Sugo K, Karsawa H, Ogawa T, Takasaki T, Tashiro M, Kurane I	Development of a particle agglutination assay system for detecting Japanese encephalitis virus-specific human IgM, using hydroxyapatite-coated nylon beads.	J Virol Meth	104	195-201	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
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
Hasegawa H, Kadowaki S, Watanabe I, Aizawa H, Takahashi H, Iwasaki T, Tamura S, Kurata T, Sata T	Persistent infection of influenza virus in irradiated mice and its prevention by intranasal vaccination.	Vaccine	20	1050-1057	2002
Hirose K. et al.	Antibiotic susceptibility of <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi and <i>Salmonella enterica</i> serovar Paratyphi A isolated from clinical patients in Japan	Antimicrobiol Agents Chemo	45	956-958	2001
Okada H, Sato TA, Katayama A, Higuchi K, Shichijo K, Tsuchiya T, Takayama N, Takeuchi Y, Abe T, Okabe N, Tashiro M	Comparative analysis of host responses related to immuno-suppression between measles patients and vaccine recipients with live attenuated measles vaccines.	Arch Virol	146	859-874	2001
Odagiri T, Kariwa H, Ohara Y	The influenza B virus BM2 protein may be involved in the ribonucleoprotein complexes through the binding with membrane protein M1.	International Congress Series	1219	411-419	2001
Shimoda M, Nakamura T, Takahashi Y, Asanuma H, Tamura S, Kurata T, Mizuochi T, Azuma N, Kannno C, Takemori T	Isotype-specific Selection of High Affinity Memory B Cells in Nasal-associated Lymphoid Tissue.	J Exp Med	194	1597-1607	2001
Fukuda K, Takahashi K, Iwata Y, Mori N, Gonda K, Horimoto T, Sawada T, Tashiro M, Yamaguchi K, Niwa S, Shigeta S	Immunological and PCR analyses for Borna disease virus in psychiatric patients and blood donors in Japan.	J Infect Dis	39	419-429	2001
Kato A, Ohnishi Y, Hohase M, Saito S, Tashiro M, Nagai Y	Y2 the smallest of the Sendai virus C proteins, is fully capable of both counteracting the anti-viral action of interferons and inhibiting viral RNA synthesis.	J Virol	75	3802-3810	2001

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Horiuchi Y, Takahashi M, Konda T, Ochiai M, Yamamoto A, Kataoka M, Toyozumi H, Arakawa Y	Japanese experience and concepts in quality control of diphtheria tetanus acellular pertussis combined (DTaP) vaccines.	Jpn J Infect Dis	54	167-180	2001
Reickert T, Sugaya N, Fedson D, Glezen W, Simonen L, Tashiro M	The Japanese Experience with vaccinating schoolchildren against influenza.	New Engl J Med	344	889-896	2001
Layne SP, Beigelsdijk TJ, Taubenberger JK, Cox NJ, Gust ID, Hay AJ, Tashiro M, Lavanchy D	Global laboratory against influenza.	Science	293	1729	2001
Saito T, Lim W, Suzuki Y, Kida H, Nishimura S-I, Tashiro M	Characterization of a human H9N2 influenza virus isolated in Hong Kong.	Vaccine	20	125-133	2001
Asanuma H, Hirokawa K, Uchiyama M, Suzuki Y, Aizawa C, Kurata T	Immune responses and protection in different strains of aged mice immunized intranasally with an adjuvant-combined influenza vaccine.	Vaccine	19	3981-3989	2001
Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Harashima A, Hatano I, Suzaki Y, Yoshii K, Yoshii T, Nomoto A, Kurata T	Comparison of neuropathogenicity of poliovirus type 3 in transgenic mice bearing the poliovirus receptor gene and cynomolgus monkeys.	Vaccine	19	3201-3208	2001
Hagiwara Y, Tsuji T, Iwasaki T, Kadowaki S, Asanuma H, Chen Z, Komase K, Suzuki Y, Aizawa C, Kurata T, Tamura S	Effectiveness and safety of mutant Escherichia coli heat-labile enterotoxin (LT H44A) as an adjuvant for nasal influenza vaccine.	Vaccine	19	2071-2079	2001

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Hagiwara Y, Iwasaki T, Asanuma H, Sato Y, Sata T, Aizawa C, Kurata T, Tamura S	Effects of intranasal administration of cholera toxin (or Escherichia coli heat-labile enterotoxin) B subunits supplemented with a trace amount of the holotoxin on the brain.	Vaccine	19	1652-1660	2001
Chen Z, Kadowaki S, Hagiwara Y, Yoshikawa T, Sata T, Kurata T	Protection against influenza B virus infection by immunization with DNA vaccines.	Vaccine	19	1446-1455	2001
Umino Y, Tashiro M	Inhibition of rubella virus growth by Fungizone.	Vaccine	19	1369-1372	2001
Obuchi M, Odagiri T, Asakura K, Ohara Y	Association of L* protein of Theiler's murine encephalomyelitis virus with microtubules in infected cells.	Virology	289	95-102	2001