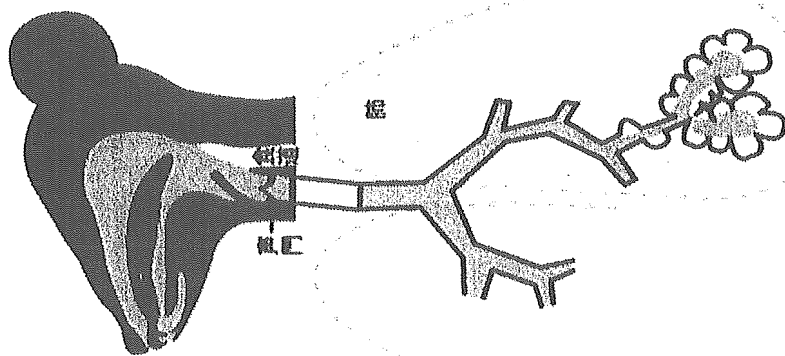


マウスの気道の各部位の表面積と粘液（あるいは漿液）の体積及びアジュバント併用経鼻ワクチンを投与され防御が成立したマウスの気道の各部位におけるPR8 HAIに特異的なIgA及びIgG抗体の測定値とそれらの分布及び濃度の推定値

マウスの気道	表面積 (mm ²)	粘液あるいは漿液 体積(mm ³)	測定値(μg) IgA IgG	分布(%) IgA IgG	濃度(μg/ml) IgA IgG
上気道	299	3.0 (粘液)	65.6 17.2 (鼻洗浄液)	73.6 5.8	22.0 5.7 (粘液)
粘膜上皮細胞	20	0.2 (粘液)	4.5 0.8 (気管洗浄液)	5.1 0.3	21.4 3.6 (粘液)
下気道	260	2.6 (粘液)	15.5 9.5	17.4 3.2	5.9 3.6 (粘液)
気管支 ~気管細支	217.433	21.7 (漿液)	3.5 271.5	3.9 90.8	0.15 12.3 (漿液)
呼吸気管細支 ~肺胞			23.5 281.8 (気管肺洗浄液)	(100%)(100%)	0.16 12.5 (血清)
(*液層の高さを、 粘液に関して0.01mm、 漿液に関して0.001mmと仮定。)					



ゼラチンアレルギー児における ヒト I 型コラーゲンに対する IgE 反応性の検討

阪口 雅弘（国立感染症研究所免疫部） 宮沢 博（杏林大学）

堀 久江（東京医科歯科大学難治研） 井上 栄（大妻女子大学）

【目的】

日本において生ワクチンや不活化ワクチン接種後にアナフィラキシーを起こす例があり、ワクチンに含まれるゼラチンが原因であることが明らかになった(1-4)。その発生率は100万接種あたりで4-10であった(5)。日本においてゼラチンが食事性アレルギーの原因となることも報告した(6)。また、エリスロポエチン製剤や座薬投与後のアナフィラキシーもゼラチンが原因であることが判った(7,8)。さらにウシ I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖がゼラチンアレルギーの主要アレルギーとなっていることも明らかになった(9)。最近、米国においても、ワクチン接種後のアナフィラキシーの原因アレルギーはゼラチンであることがCDCの調査で示唆されている(10)。世界的にゼラチンを含むワクチンおよび薬剤の安全性を確保するために、アレルギー性のない安定剤の開発が急務となっている。本研究において組換え体ヒトコラーゲンに対するIgE反応性を検討したので報告する。

【材料と方法】

患者：ワクチン接種後、アナフィラキシーを含むアレルギー性反応を起こした小児の中で抗ゼラチン抗体価の測定の目的のため、全国の臨床医の先生方から国立感染症研究所に送付された血清の中で比較的抗体価の高い50例の血清が選ばれた。陰性対照としてワクチン接種後、アレルギー性反応を起こさなかった小児50例が中山哲夫先生（北里研究所）から供与された。

組換え体ヒトI型コラーゲン：組換え体ヒトI型コラーゲンおよび組換え体ヒト・ゼラチンはDr. D. Olsen (FibroGen, South San Francisco, CA)より、供与された。

【結果】

ゼラチンアレルギーの小児の中における精製ヒト・I型コラーゲンに対するIgE抗体を測定した (Fig 1)。ウシ・I型コラーゲンに比べ明らかに抗体価は低いが、ヒト・I型コラーゲンに対するIgEの反応性が認められた。陰性対照としてワクチン接種後、アレルギー性反応を起こさなかった小児50例は、ウシおよびヒトコラーゲンに対するIgEの反応性は認められなかった。また、ヒト・コラーゲンに対するIgG抗体の反応性はIgEと同様にゼラチンアレルギーの小児に認められ、陰性対照群には認められなかった (data not shown)。次にヒト・コラーゲンに対する反応性が強い小児3例(no. 1-3)と、ヒト・コラーゲンに反応しない小児3例 (no.4-6)における組換え体ヒト・コラーゲンに対する反応性を調べた (Fig 2)。ヒト・コラーゲンに対する反応性を持つ小児は、精製ヒト・コラーゲンと同様に組換え体ヒト・コラーゲンにもIgE反応性を保持していたが、ヒト・コラーゲンに反応しない小児は、組換え体ヒト・コラーゲン反応しなかった。

次にウシとヒトコラーゲンの間のIgE交差反応性を調べた (Fig 3)。ヒト・コラーゲンに対するIgE抗体の反応性はウシ・コラーゲンによってほとんどinhibitionされた。このヒト・コラーゲンに対する反応性は、ウシコラーゲンの交差反応性であることが判った。IgE反応性の少ない組換え体ヒト・コラーゲン断片を作製するため、ヒトとウシのシークエンスを比較して出来るだけ、相同性の高い部分の組換え体コラーゲン断片 (ゼラチン) (8.5kDa)を作成した。この組換え体タンパクに対する反応性を調べたところ、ヒト・コラーゲンに対する反応性を持つ小児の血清中のIgE抗体は反応しなかった (Fig 4)。

【考察】

本研究においてゼラチンアレルギー小児の中でヒト・I型コラーゲンに対するIgE抗体を持つ者が存在することが明らかになった。これらの小児はヒト・コラーゲンに対するIgG抗体の反応

性も保持していた。この現象は組換え体ヒト・コラーゲンでも確認できた。この機序に関しては、ウシとヒトコラーゲンの間のIgE反応性から、ウシコラーゲン特異IgE抗体のヒト・コラーゲンに対する交差反応性であることが推定された。このような自己抗体を保有することが、どのような影響を及ぼすのか、現在の所、不明である。ヒト・コラーゲンに対する反応性を持つ小児の血清中のIgE抗体は、この組み換え体ヒト・ゼラチンの断片に反応しなかったので、組換え体ヒト・ゼラチンはアレルゲン性の低い安定剤として有望であると考えられた。

【文献】

1. Sakaguchi M, Ogura H, Inouye S. :IgE antibody to gelatin in children with immediate-type reactions to measles and mumps vaccines. *J Allergy Clin Immunol* 96: 563-565, 1995.
2. Nakayama T, Aizawa C, Kuno-Sakai H.: A clinical analysis of gelatin allergy and determination of its causal relationship to the previous administration of gelatin-containing a cellular pertussis vaccine combined with diphtheria and tetanus toxoids. *J Allergy Clin Immunol* 103: 321-325, 1999.
3. Taniguchi K, Fujisawa T, Ihara T, Kamiya H. : Gelatin-induced T-cell activation in children with nonanaphylactic-type reactions to vaccines containing gelatin. *J Allergy Clin Immunol* 102: 1028-1032, 1998.
4. Sakaguchi M, Inouye S.:Systemic allergic reactions to gelatin included in vaccines as a stabilizer. *Jpn J Inf Dis* 53:189-195, 2000.
5. Sakaguchi M, Nakayama T, Fujita H, Toda M, Inouye S.:Minimum estimated incidence in Japan of anaphylaxis to live virus vaccines including gelatin. *Vaccine* 19:431-436, 2000.
6. Sakaguchi M, Nakayama T, Inouye S. :Food allergy to gelatin in children with systemic immediate-type reactions including anaphylaxis to vaccines. *J Allergy Clin Immunol* 98: 1058-1061, 1996.
7. Sakaguchi M, Kaneda H, Inouye S.: A case of anaphylaxis to gelatin included in erythropoietin products. *J Allergy Clin Immunol* 103: 349-350,1999.
8. Sakaguchi, M. Inouye S. :Anaphylaxis to gelatin containing rectal suppositories. *J Allergy Clinical Immunol* 108: 1033-1034, 2001.
9. Sakaguchi M, Hori H, Hattori S, Irie S, Imai A, Yanagida M, Miyazawa H, Toda M, Inouye S.:IgE reactivity to alpha1 and alpha2 chains of bovine type 1 collagen in children with bovine gelatin allergy. *J Allergy Clin Immunol* 104:695-699, 1999.
10. Pool V, Braun MM, Kelso JM, Mootrey G, Chen RT, Yunginger JW, Jacobson RM, Gargiullo PM.: Prevalence of anti-gelatin IgE antibodies in people with anaphylaxis after measles -mumps-rubella vaccine in the United State. *Pediatrics* 110:e71, 2002.

Fig 1 IgE reactivity to bovine and human collagen in patients

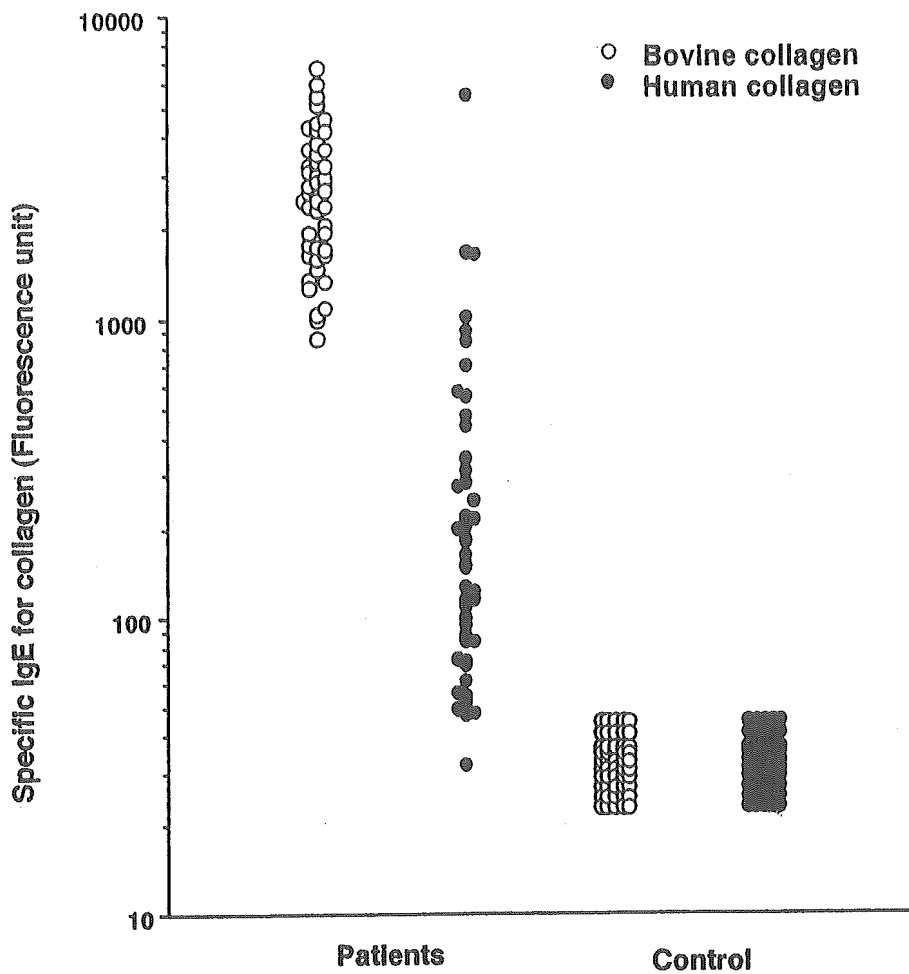


Fig 2 IgE reactivity to recombinant human collagen

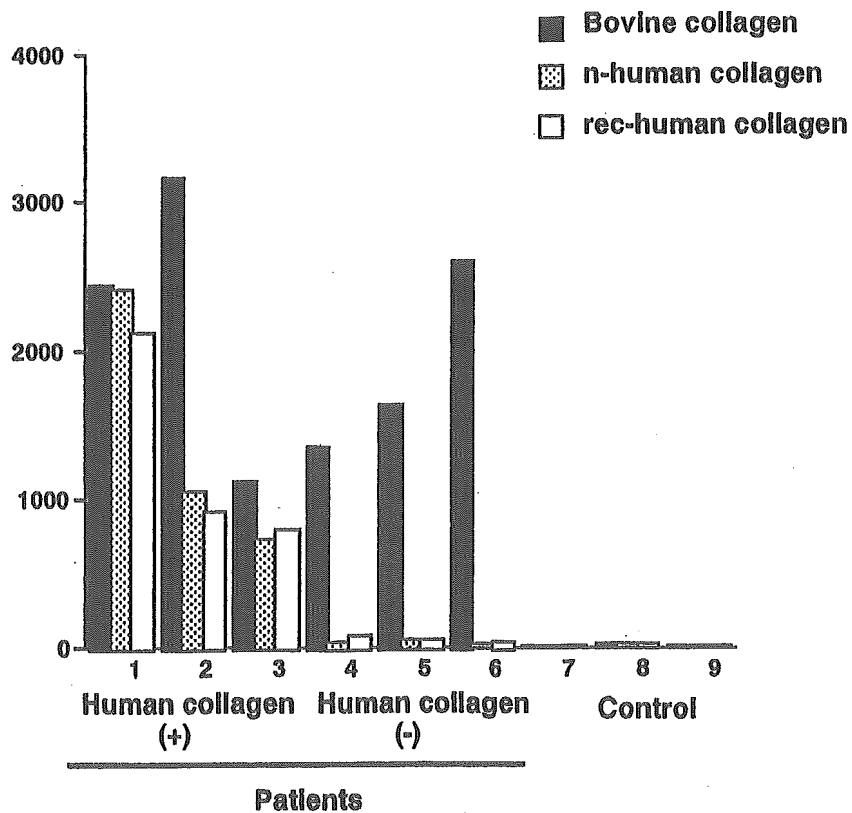


Fig 3 Cross-reactivity between bovine and human collagen

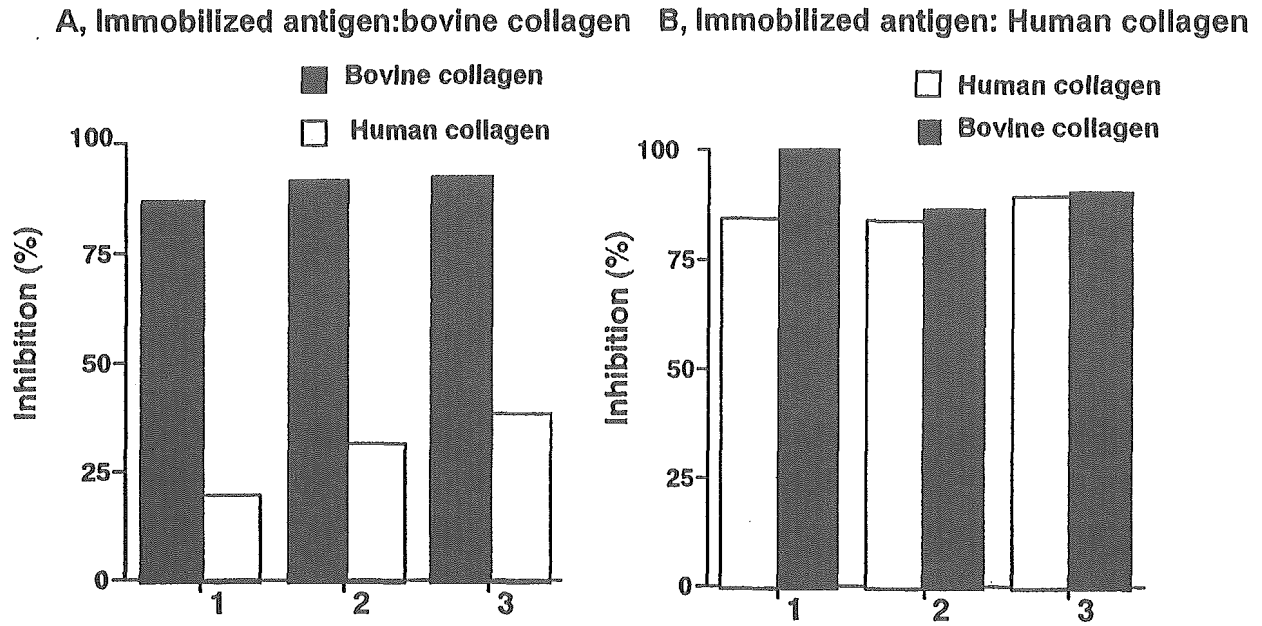
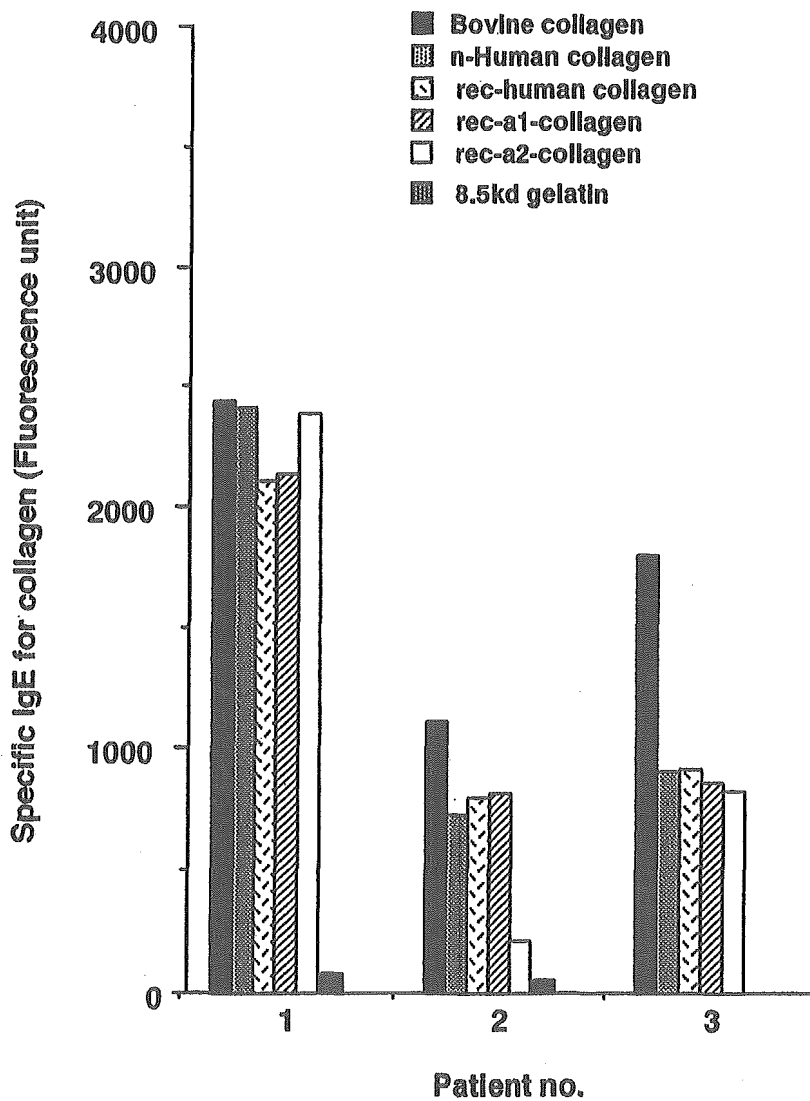


Fig 4 IgE reactivity to 8.5 kd human gelatin fragment



国内外の沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン(DTaP) 初回接種時の局所反応原性の検討

堀内 善信、片岡 紀代、山本 明彦、永田 典代、落合 雅樹、
豊泉 裕美、小宮 貴子、岩城 正昭、福田 靖、高橋 元秀、
荒川 宜親、倉田 毅 (国立感染症研究所)

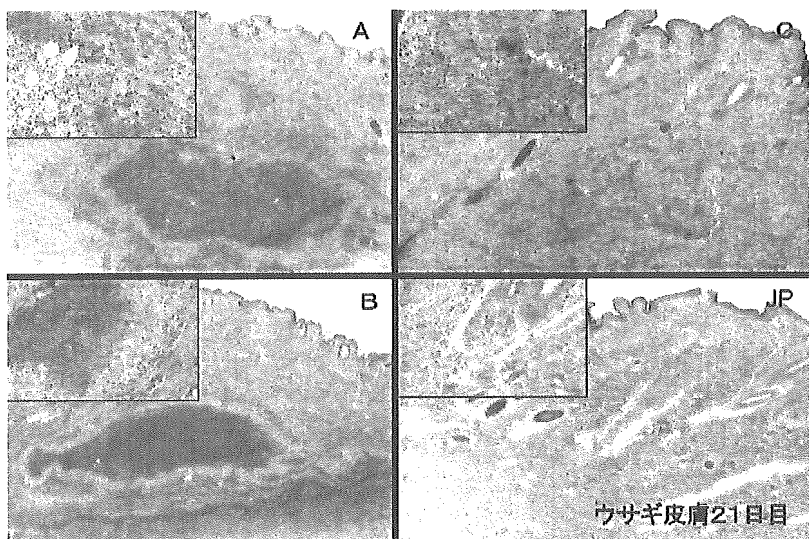
DTaP 接種時の局所反応は米国、カナダ、オーストラリア等海外でも大きな問題となっている。昨年度マウスモデルでの検討により、我が国では 1991 年の基準改正(残存百日咳毒素(PT)活性基準の改良)を経て、特に追加接種時の激しい局所反応について改善が見られている可能性を報告した。近年のワクチン国際化にあたり、海外の DTaP の局所反応原性についても評価をしておく必要があると思われる。今回は海外の DTaP 初回接種時の局所反応原性について、国産品との比較評価を行ったので報告する。

【材料と方法】

海外3社および国産のDTaPを用いた。それぞれ生物学的製剤基準に基づき、ジフテリア、破傷風、百日せきの力価および毒性試験を行った。局所反応原性を検討するため、マウス足蹠にワクチンを 50 μ l 接種し、経日的に対照足との肥厚の差を計測した。またウサギ背部皮内にワクチン 0.1ml を投与し、経日的にマウス足蹠およびウサギ皮膚注射局所の病理組織学的検討を行った。

【結果】

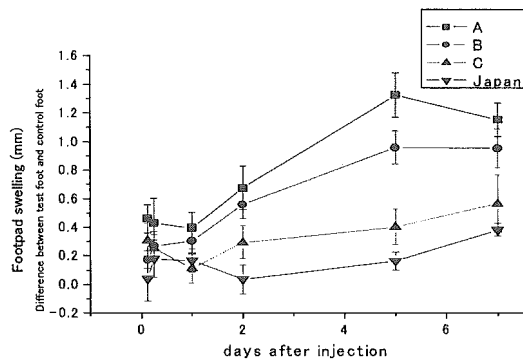
海外3社のDTaPについて国内基準による評価を行ったところ、ジフテリア、破傷風、百日せきの各力価、白血球増多(LP) およびヒスタミン増感(HS) 試験のいずれも現国内市販ワクチンに匹敵する結果であったが、国内市販ワクチンに比べ強いマウス体重減少活性が認められた。



ウサギ背部皮内にワクチン 0.1ml を接種して局所刺激作用を比較したところ、海外のワクチンでは国内ワクチンに比べて明らかに強い硬結の長期に亘る残存が認められた。接種部位における病理組織学的解析の結果、製品によって程度は異なるが、海外のワクチンの場合種部周囲に強い炎症を惹起する事が

わかった。特に好酸球の細胞浸潤が著しく、急性期における組織の強い壊死が観察された。一方日本のワクチンでは軽度の細胞浸潤が観察されるのみであった。海外ワクチン接種部では、壊死

巢での結合組織増殖により硬結が形成されたと考えられた。図1に接種 21 日目での病理組織を示す。またマウス足蹠にワクチンを 0.05ml 接種した場合の腫脹反応による局所反応原性の比較を行



った結果、ウサギ同様、海外のワクチンを接種したマウスで日本のワクチンに比べて強い腫脹が認められた。特に3社のうち2社のワクチンで、明らかに日本のワクチンとは異質の著しい足蹠腫脹が認められた。ワクチン間の腫脹の差が顕著な5日目における接種部位の病理組織学的解析の結果、海外 3 社いずれを接種した場合も、接種物と思われる物質を取り巻き、筋層も含めた極めて激しい組織破壊と炎症性細胞反応が観察された。一方、我が国のワ

クチンを接種したマウス足蹠では接種物の沈着は見られず、軽度の炎症性細胞反応が認められるのみであった。すなわちウサギ、マウスとも、海外ワクチンは国内ワクチンに比べてより強い局所反応原性を有していること示唆する結果が得られ、ワクチンの国際化を考えると、我が国に導入する場合に備え海外ワクチンの安全性の向上が望まれる。

考察: ワクチンの安全性に関する社会的基準は、国により、また状況により異なる。すなわち感染症が蔓延している状況下では、多少の副反応より予防効果が重視されるが、疾病あるいは疾病による死亡がほとんど無い状況では、ワクチンの安全性に対する社会的要求は厳しいものになり、その要求を満たさないと接種拒否等のおそれさえ考えられる。すなわち予防接種の安全性規格をワクチンのない時代の感染症による被害と比較しても、社会的に受け入れられる保証はない。またワクチンの場合、初回、追加と複数回接種が必要な場合が一般的で、国内で用いられる同種のワクチンの互換使用は避けられない。製造所は製品のロット間の品質の変動を一定の範囲に収める責任があり、更に国は、同種ワクチンの互換使用の場合の安全性、有効性を保証する責任がある。従って従来同種ワクチンには統一基準が適用されてきた。認可承認に際して、予防接種の有効性、安全性のために、国内の同種ワクチンに対しては適当な規格試験法での評価に基づく統一基準による管理が必要である。その際、試験の施設間変動を容認することで、実質的に製造所毎に別基準適用と同様な事態となることを避けるため、一カ所での規格試験による管理に基づく最大限の互換性確保が求められ、国はその責任を今後も果たす必要がある。

マウスモデルを用いた沈降精製の DPT ワクチンおよび DT 混合トキソイド追加接種時の局所反応原性の検討

堀内 善信、山本 明彦、永田 典代、落合 雅樹、
片岡 紀代、豊泉 裕美 (国立感染症研究所)
岡田 賢司 (国立療養所南福岡病院)

我が国の沈降精製 DPT および DT 予防接種については、追加接種時の局所反応が問題とされてきた。この問題は接種技術が大きく影響すると考えられている。我々は追加接種時のワクチン側関連因子に関するマウスを用いた評価モデルを作成し、現行ワクチンの評価を行ったので報告する。

【材料と方法】

免疫用抗原：試験百日せきワクチン(aP-Ag)：Tタイプワクチンと同等組成(FHA、PT およびその他の抗原)の抗原を 0.8%ホルマリンにて 37°C 2 週間減毒後透析。

試験 DPT ワクチン(Exp-DTaP)：1ml 中に aP-Ag 120 μ g、ジフテリアトキソイド(D-td) 30Lf、破傷風トキソイド 10Lf および Al(OH)₃ ゲル 0.15mgAl を含むよう調製。

PT 加 DT トキソイド(DT-PT)：上記 Exp-DTaP で aP-Ag に代わり精製 PT 4 μ g/ml あるいは 2 μ g/ml を含む抗原液 DT-PT-4 μ g、DT-PT-2 μ g および PT を含まない DT-td を調製。

DT-td：上記 Exp-DTaP に aP-Ag を加えないものと同等の沈降 DT トキソイドを調製。

市販 DTaP ワクチン：1990 以前のワクチン 8 ロットおよび 1991 年以降のもの 6 ロットを用いた。

攻撃用抗原：aP-Ag120 μ g、ジフテリアトキソイド(D-td)30Lf、破傷風トキソイド(T-td)10Lf およびそれぞれ Al(OH)₃ ゲル 0.15mgAl を含む各溶液を調製。足蹠攻撃に用いた。

ヒスタミン増感(HS)活性：感作 4 日、11 日について生物学的製剤基準に基づき計測した。

実験：8 週齢 BALB/c(CRJ)マウス大腿筋に上記各抗原 0.3ml を 1 ヶ月間隔で 2 回免疫、2 週後に攻撃用抗原 50 μ l をマウス足蹠に攻撃、あるいは同様に 1 ヶ月間隔で上記各抗原 0.1ml を免疫、2 週後に攻撃する際 3 日前よりインドメタシン 2.5 μ g を連日腹腔投与した。

対照足に生理食塩液を攻撃、レーザー肥厚計で攻撃足の対照足に対する相対肥厚を測った。

【結果と考察】Exp-DTaP 免疫マウスを攻撃用 D-td(a)、T-td(b)、aP-Ag(c)で攻撃し、経時的に足蹠肥厚を計測した。結果は

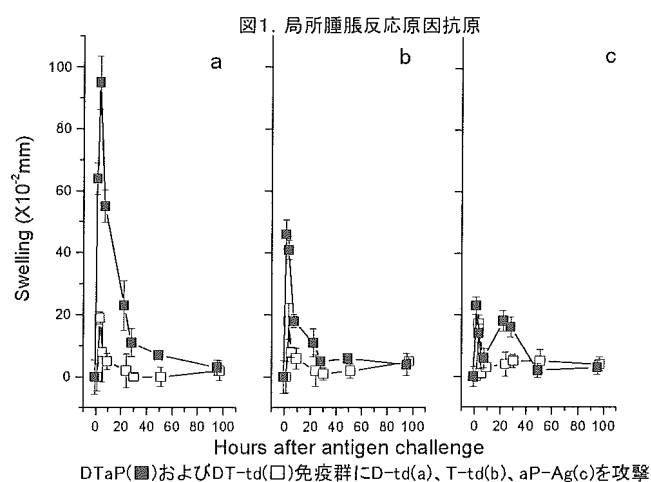
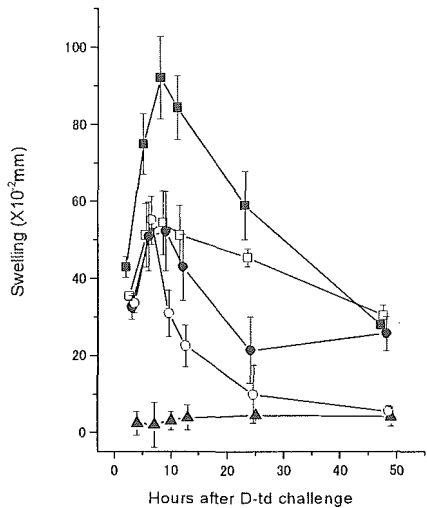


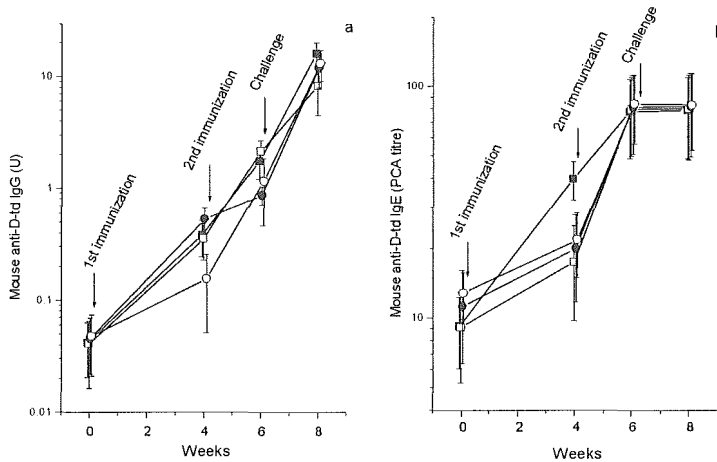
図 1 に示したように、抗原量は攻撃抗原中 aP-Ag が最も多かったにも関わらず、D-td 攻撃により最も強い腫脹が観察された。そこで D-td に対する感作の要因を探るため、まず免疫用抗原 Exp-DTaP、DT-PT-4 μ g、DT-PT-2 μ g および

図2.追加接種時の局所腫脹に対する感作



DT-PT4 μ g(■)、DT-PT2 μ g(□)、Exp-DTaP(●)、DT-td(○)免疫および対照(▲)マウスのD·tdによる局所腫脹

図3. 各種免疫抗原での免疫群の抗体産生



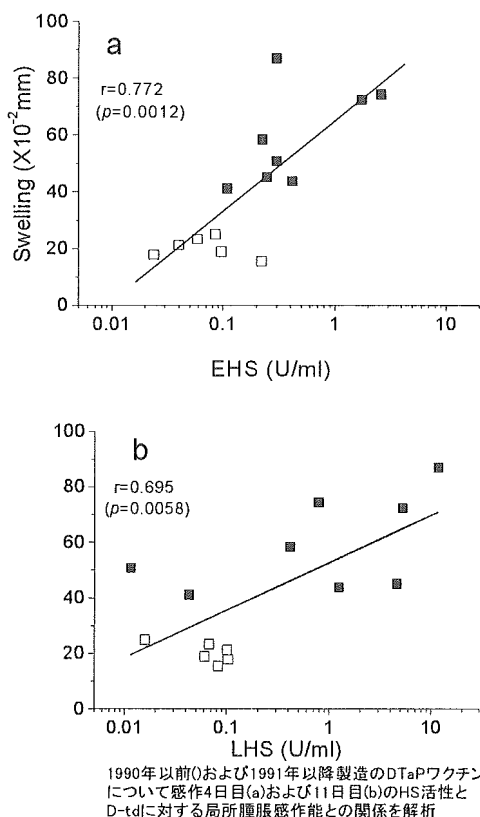
DT-PT4 μ g(■)、DT-PT2 μ g(□)、Exp-DTaP(●)、DT-td(○)免疫および対照(▲)マウスの抗D-IgG(a)およびIgE(b)価

DT-td を免役し、D-td 攻撃に対する感作の程度を比較した。その結果図2に示すように、何れの免疫群でも非免疫対照(▲)に比べるとD-td 攻撃に対して有意な腫脹を示した。中でもDT-PT-4 μ g 免疫群(■)で最も強い腫脹が観察された。いずれの場合も攻撃約10時間後に最大腫脹を示し、その程度はDT-PT-4 μ g 群を除いてほぼ同程度であったが、その後の残存の程度をみると、DT-PT-2 μ g(□)、Exp-DTaP(●)、DT-td(○)の順に強い腫脹の残存が認められた。すなわち、全ての免疫抗原のD-td量は等しいに関わらず、PT活性に相関するかたちでD-tdによる局所腫脹反応への感作が認められた。そこでこの感作の機構を調べるため、免疫、攻撃各々の直前および攻撃後2週目に尾静脈から部分採血して、血中のD-特異IgG、IgEを測定した。

その結果図3に示すように、D-特異IgG、IgEともに免疫群間に腫脹反応の差を説明し得るような違いは認められなかった。従ってD-td攻撃に対する感作は、細胞性免疫を介したものである可能性が示唆された。これまでの処、感作の詳細な機構は不明であるが、一応ワクチン側の因子として、残存PT活性がD-tdによる局所反応に対する感作能を示す可能性が示唆された。そこで、このモデルを用いて実際の市販

DTaP ワクチンについて、D-td に対する局所反応感作能の評価を行ってみた。PT 残存活性に関しては、保存期間中の PT 活性の毒性復帰を制御するため、1991 年に加温検体の HS 試験が導入された。具体的には、検体ワクチンを 37°C 4 週間加温した後、HS 活性復帰の有無を確認する試験である。このことにより従来に比べ減毒条件が強化され、残存 PT 活性の低下が認められた。そこで 1991 年より前に製造され、長期氷室保存により PT 活性の部分的復帰がみられていると思われる検体 8 ロットと、基準改正以降の検体 6 ロットをマウス

図4. DTaP ワクチン残存 HS 活性と局所腫脹感作能



に免役し、D・tdによる局所腫脹反応に対する感作能を調べることにした。これらの検体について、マウス投与4日目(EHS)および11日目(LHS)にヒスタミン攻撃を行い、30分後の直腸体温降下を利用してそれぞれHS活性を測定した。得られた活性値と局所腫脹反応の間の相関分析を行ったところ、図4のように、両HS活性とも局所腫脹反応との間に有意な相関を示した。また1991年の基準改正以前のワクチン(■)は、残存HS活性に依存した局所腫脹反応感作能を示したが、基準改正以降のワクチン(□)はこうした感作能を示さなかった。実際には局所反応には接種技術をはじめ様々な要因が関わることが知られている。今回作成した局所反応モデルは、あくまでワクチン側の要因に絞って評価する為のものである。またワクチンの安全性からみると、ワクチン側の要因として、基本的には臨床的に局所腫脹反応に対する感作能がなくなれば、一応可能な問題解決の措置は済んでいると考えてよいことになる。

いことになる。

今回作成した局所反応モデルが臨床的局所反応を反映したワクチン側の因子解析モデルになり得ているかどうかは、実際に初回免疫を1991年以降のDTaPで受けた場合とそれ以前のワクチンで受けた場合についてDT追加免疫での局所反応の発生および程度を臨床的に比較する調査により判定しうる。こうした調査結果は、臨床関連性のある安全性試験法確立の点からも大変重要な意味を持つ。今後海外からのワクチン導入の可能性も考える必要があるとすると、そうしたワクチンも含めた国内でのワクチンの互換使用での安全性、有効性が問題となる。これまで我が国では、百日咳菌抗原組成に違いのあるDTaPワクチンが互換使用されてきた。この場合、現在の接種方法をとる限り基本的にはIgGおよび細胞性免疫を誘導することになり、特に長期免疫記憶ということでIgG誘導が主たる百日せきワクチン有効性の機構と考えられる。この場合PTに対する抗毒素免疫誘導が重要ということになり、いずれのワクチンも一定程度のPTトキシイドを含んでおり、互換使用に問題が生じなかったと考えられる。しかし海外ワクチンの場合、臨床評価はなされていても、それが我が国の免疫スケジュールに合致したものであったかどうか問題となる。有効で安全な予防接種のためには、我が国の既存ワクチンとの互換性が不可欠であるが、その確認の為にも、ますます臨床関連性の立証された品質管理試験法が重要になるものと思われる。

マウスを用いた DPT 三種混合ワクチン接種後の 局所反応に関する研究

本庄 綾子、勝田 友博、立山 悟志、松宮 千春、徳竹 忠臣、
五島 文恵、有本 寛、加久 浩文、中島 夏樹、五島 敏郎、
加藤 達夫（聖マリアンナ医科大学小児科）

【目的】

わが国において、無菌体百日咳ワクチンを含む沈降精製DPTワクチンの接種が行われるようになって以来、全菌体百日咳ワクチンを使用していた当時に問題となっていた、発熱やけいれん、脳症などの重篤な副反応は著明に減少したが、局所反応としての発赤・腫脹・硬結はいまだに認められている。平成7年から13年における発生頻度の累計報告では1期初回1回目は18.4%、2回目30.2%、3回目23.1%、追加接種後41.9%であった。しかし、そのメカニズム、原因は現在のところ不明である。今回我々は、それらを解明する目的で、マウスの腹部に沈降精製DPTワクチン（以下DPT）、沈降DTトキソイド（以下DT）、沈降Tトキソイド（以下T）、添加物であるチメロサル、塩化アルミニウム、ホルマリンを別々に接種し、引き続き起こる局所反応について、病理学的に検討を行った。

【方法】

生後8週齢のICR系SPF雄マウスを、DPT群、DT群、T群、チメロサル0.1mg/ml接種群、塩化アルミニウム0.2mg/ml接種群、ホルマリン0.01%接種群、生理食塩水接種群（以下コントロール群）に5匹ずつ分け、腹部を除毛後、各0.5mlを4週毎に2回、腹部皮下に接種した。そして接種部位の肉眼的観察の結果判定は毎回、接種後1週目に行った。また、2回接種1週後に病理組織検査を行い、組織の判定基準として、細胞浸潤なし、わずかにあり、中等度、著明の4段階に分類した。

【結果及び考案】

肉眼的観察では、ワクチン接種全ての群において1回接種後1週目は異常所見はなかったが、4週目の観察でDPT群1匹とT群1匹に、局所反応と思われる長径約5ミリ、境界明瞭な硬結を認めた。また、2回接種後1週目の観察でDPT群、T群で更に3匹、DT群で新たに4匹に同様の硬結を認めた。添加物接種群、コントロール群は2回の接種を通じて異常所見はなかった（表1）。

病理組織検査において、ワクチン接種群は全てに細胞浸潤を認め、その程度はDPT>DT>Tの順となった。添加物接種群は肉眼的変化が認められなかったにもかかわらず、病理組織検査でチメロサルは5匹中3匹、塩化アルミニウムは5匹全て、ホルマリンは5匹中1匹に細胞浸潤を認めた（表2）。

ワクチン接種群については、一つの組織標本に2ヶ所の反応部位が存在しているものがあり、1回目と2回目の接種、それぞれより生じた硬結であると考え、この2ヶ所で出現している主な細胞の違いから時間経過を推測した。反応を起こしたマウス全てに共通して、好中球の浸潤と中心部の壊死といった急性炎症に特徴的な像が得られた。1回目接種後、つまり接種してから5週間経ったと推測される組織には形質細胞、リンパ球、線維芽細胞といった慢性炎症への移行を示す細胞が目立っていた。2回目接種後、つまり接種してから1週間しか経っていないと推測される組織には組織球や好酸球が出現しており、局所反応にアレルギーが関与していることを示唆していた。また、アレルギー反応の場合、病理組織学的に好酸球の方が組織球よりも後から出現することより、DPTではすでに好酸球が目立っていて、DT、Tではまだ組織球の方が目立っているという所見は、DPTが、DTやTに比べて局所反応を起こす変化が早く進んでいる可能性が考えられる。

ワクチン添加物接種群については、反応部位は1ヶ所しか認められなかったが、同じ細胞浸潤でも、チメロサルと塩化アルミニウムでは異なる変化を示していた。どちらかというとならばチメロサルは好中球が多数出現した急性炎症、塩化アルミニウムは線維芽細胞、組織球が多数出現した慢性炎症を思わせる組織像が得られ、ホルマリンは特徴的な細胞浸潤はほとんど見られなかった。

以上より、DPT三種混合ワクチン接種後の局所反応には、D・P・T・塩化アルミニウム・チメロサルの中でいずれか一つが関わっているというよりも、これらの成分がそれぞれの機序で局所反応を起こし、その成分の種類が多いものほど強い局所反応が出現することがわかった。更に、局所反応は炎症に加え、時間経過と共にアレルギーによる反応も加わっているということが考えられた。

また、今回の研究では接種後1週目に観察をしたが、ヒトにおいては接種後1日目に局所反応が出やすいということから、接種直後からの経時的な変化を観察し、今回見られた硬結のみならず、ヒトにおける発赤・腫脹にあたる反応についての検討も必要であると思われた。

最後に今回の研究においてご協力頂いた、聖マリアンナ医科大学病理学教室 田所衛教授に深く感謝申し上げます。

表1. 肉眼的観察結果

【DPT 接種群】

マウス番号	1回接種	2回接種
①	—	—
②	—	+
③	—	+
④	—	+
⑤	—	+

【DT 接種群】

マウス番号	1回接種	2回接種
①	—	—
②	—	+
③	—	+
④	—	+
⑤	—	+

【T 接種群】

マウス番号	1回接種	2回接種
①	—	+
②	—	+
③	—	+
④	—	—
⑤	—	+

【チメロサル接種群】

マウス番号	1回接種	2回接種
①	—	—
②	—	—
③	—	—
④	—	—
⑤	—	—

【塩化アルミニウム接種群】

マウス番号	1回接種	2回接種
①	—	—
②	—	—
③	—	—
④	—	—
⑤	—	—

【ホルマリン接種群】

マウス番号	1回接種	2回接種
①	—	—
②	—	—
③	—	—
④	—	—
⑤	—	—

【コントロール群】

マウス番号	1回接種	2回接種
①	—	—
②	—	—
③	—	—
④	—	—
⑤	—	—

表2. 病理組織検査結果

— : 細胞浸潤なし
 ± : 細胞浸潤わずかにあり
 + : 細胞浸潤中等度
 ++ : 細胞浸潤著明

マウス 番号	DPT	DT	T	チメロサ ール	塩化アル ミニウム	ホルマリ ン	コントロ ール
①	+	+	+	±	+	—	—
②	+	++	±	±	+	—	—
③	++	+	+	±	+	—	—
④	+	±	+	—	+	—	—
⑤	++	+	+	—	±	±	—

ヘモフィルスインフルエンザ b 型菌 (Hib) ワクチンの問題点

高橋 元秀、落合 雅樹、小宮 貴子、岩城 正昭、福田 靖、
片岡 紀代、山本 明彦、豊泉 裕美、蒲池 一成、荒川 宜親、
堀内 善信、倉田 毅 (国立感染症研究所)

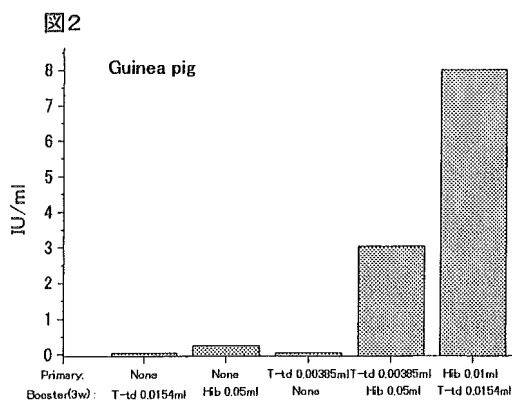
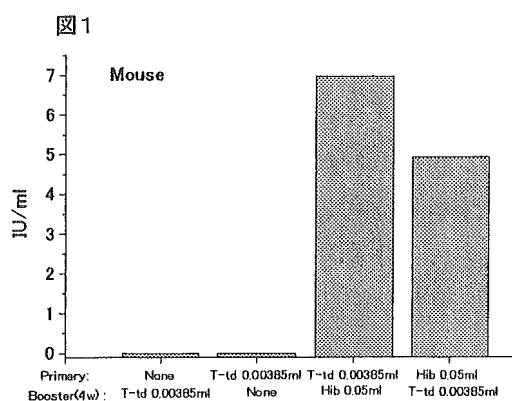
Hib 感染症は我が国でも乳幼児無菌性髄膜炎の主原因であり、ワクチンの導入が望まれる。そこで破傷風トキソイドをキャリアー蛋白として用いた Hib ワクチンについて、早期導入に際して解決すべき問題点を検討したので報告する。

【材料と方法】

海外で製造された破傷風トキソイドをキャリアーとした Hib ワクチン 4 ロットを入手し、エンドトキシン含有量を評価した。またキャリアーの破傷風トキソイドの免疫原性について、マウスおよびモルモットでの評価を行った。

研究結果

キャリアー破傷風トキソイドの免疫原性:マウスの実験(Redhead K. et al., (1994): Vaccine., 12, 1460-1466)で、Hib ワクチンのキャリアー破傷風トキソイドによる DPT 破傷風に対する過剰免疫の可能性が報告された。我々も日本の基準によるマウスでの定量的解析で、Redhead 等と同様 DTaP に Hib ワクチンを加えた場合、破傷風トキソイドの力価が DTaP 単独に比べ 5 倍以上増



強することを確認した。しかしこれまでのところモルモットの実験(Gupta R. K., et al., (1996): Dev. Biol. Stand., 86, 283-296.)でキャリアー蛋白にそうした破傷風力価の増強作用はないとされ、その後臨床的にも陽転率に対する影響評価により問題なしとされてきた。しかし初回を含め複数回の接種が行われることから、破傷風の追加接種による過剰免疫について、特に高感受性者に関する免疫応答の評価は安全性の点から重要である。今回、マウスに破傷風トキソイドあるいは Hib ワクチンの適当な希釈を 4 週間隔で 2 回それぞれ 0.5mL 続けて、あるいは交互に免疫した。モルモットの場合 3 週目にそれぞれ適当な希釈 1mL の追加接種を行った。その結果、マウス(図1)、モルモット(図2)いずれでも同様に、Hib ワクチンのキャリアー破傷風トキソイドによる明確な破傷風免疫原性が確認され、破傷風

トキソイドに対する過剰免疫に関する安全性評価の必要性を示す結果であった。今回の実験でも1回免疫では抗毒素産生は低く、米国基準に基づき、1回免疫でモルモットでの抗毒素産生が2単位を超えなかったことにより免疫原性がないとした Gupta 等の破傷風免疫原性を否定した実験は、解釈の間違いであったと考えられる。また臨床評価については、破傷風陽転率の評価等免疫抑制の否定が中心で、過剰免疫に関連した安全性評価としては、高感受性者の抗毒素産生評価が必要であると考えられる。

エンドトキシンと発熱性:Hib ワクチンは欧米で全菌百日せきワクチンが使われていた 1980 年代に開発されたものであり、同時に接種される全菌百日せきワクチンに比べると、内毒素含量は十分少

図3. インフルエンザb型菌ワクチン及び精製DPTワクチンのエンドトキシン活性

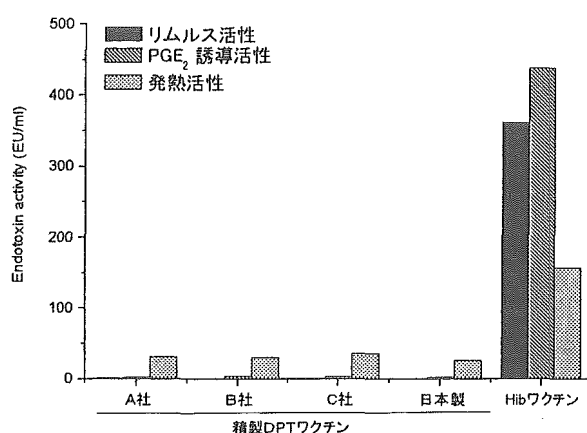


Table 1. LAL activity of Hib conjugate vaccines

Hib vaccine Batch	LAL activity (EU/dose)			Recovery percent of spiked endotoxin ¹⁾
	Mean	95% confidence interval		
A	164.2	139.1 – 193.5		103.4
B	173.7	137.5 – 220.4		104.9
C	79.3	62.4 – 100.1		97.1
D	22.5	17.8 – 28.4		94.3
E	13.9	10.9 – 17.7		91.3

¹⁾: Japanese reference standard endotoxin was spiked to each Hib vaccine batch.

表1に示すようにロット間でエンドトキシン含量に大きな違いのあることが判明し、臨床での発熱性の評価を行う場合、用いたロットにより全く異なる結果となり、実用化についての安全性評価が困難であることが示唆された。

考察:ワクチンの安全性に関する社会的基準は、国により、また状況により異なる。すなわち全菌百日せきワクチンを用いている場合と精製百日せきワクチンが普及した状況下では、安全性基準に違いが生じ、かつて許容されていたものが受け入れられない状況になりうる。感染症あるいはそれによる死亡がほとんど無い状況では、ワクチンの安全性に対する社会的要求は厳しいものになり、その要求を満たさないと接種拒否等のおそれさえ考えられる。十分な科学的評価のもとに、有効で安心して受けられる Hib ワクチンの1日も早い導入が望まれる。

なく、百日せきワクチン単独と比較して Hib ワクチン同時投与による発熱率の上昇は無視できるものであったと考えられる。しかしその後精製百日せきワクチンが普及した後も、エンドトキシン除去等の製法の改良はなかった。今回 Hib ワクチンのエンドトキシン含量についての評価を行った。海外3社および国産のDTaPワクチンと比較したところ、図3に示すように、DTaP ワクチンに比べて Hib ワクチンにはかなりのエンドトキシンが含まれており、またこのエンドトキシンは明らかに発熱等の生物活性を示すことが確認され、安全性に関する慎重な評価が必要であることが示唆された。また臨床評価のためにはロット間の均一性が前提となることから、可能な範囲で Hib ワクチンのエンドトキシン含量に関するロット間均一性評価を試みた。その結果、

麻疹ウイルスの温度感受性

中山 哲夫、吉田菜穂子、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開発研究部門）

【目的】麻疹ウイルスは negative sense RNA ウイルスでインフルエンザウイルスと比較して遺伝子の変異が少なく単一の抗原性を有しその性状も変化はないように考えられてきた。我々は 1984 年から我が国に流行してきた麻疹ウイルスの分子疫学調査を継続し以下の結果を報告した。

- 1985 年以前は C1、1985-90 年は D3、1990-1997 年は D5、1997-1999 年までは Chicago-type D3、2000 年からは D5 に戻り H1 が検出されはじめ最近では H1 が主流株となってきた。
- 抗原性も少し変化しており、中和抗体価の高いレベルではすべての遺伝子タイプのウイルスを完全に中和する事ができるが、中和抗体の低いレベルでは Chicago-type D3、H1 の中には完全に中和されないウイルス株が存在する。
- Chicago-type D3、D5 の中に重症麻疹症例から分離されたウイルスの中に 39℃でもよく増殖する株が検出された。

39℃でもよく増殖する株はウイルス学的にも強毒であると考えられ、麻疹ウイルスのどの遺伝子がこの性状に関与するかを検討することを目的とした。

【対象と方法】①野生株：C1:2 株、D3: 4株、Chicago-typeD3: 11株、D5: 11株、H1: 8株を用いB95a細胞24wellに接種、33℃、39℃で培養し、day7における各温度での感染価の比率を検討した。②MVi/Tokyo/99-Y【Chicago-type D3】は39℃でもよく増殖し、H蛋白領域を麻疹ワクチン株AIK-CのH蛋白に組み込んだキメラウイルスを作成した。③MVi/Tokyo/99-Y【Chicago-type D3】、MVi/Tokyo/87-S【D3】、AIK-Cワクチン株のF、H発現プラスミドを作成し、T7 RNAポリメラーゼ下で33℃、39℃の温度条件で発現実験を行い、細胞融合能を検討した。④麻疹ウイルスの転写・複製活性を調べるために、麻疹ウイルスAIK-C株のleader, trailer sequenceの間の翻訳領域をluciferase reporter遺伝子に置換した麻疹ウイルス mini-genome を作成し、MVi/Tokyo/99-Y【Chicago-type D3】、MVi/Tokyo/2000-KA【D5】、AIK-C株のN、P、L発現プラスミドを作成し、mini-genomeと共にB95a細胞にco-transfectionし33℃、39℃で培養し、細胞内のluciferase活性を測定する事で麻疹ウイルスの転写・複製活性を検討した。

【結果】①genotype Chicago D3のウイルスには 39℃での増殖率が低下しない株が多く存在した。genotype D5の中にも最近分離株の中に高温下での増殖率が低下しない株が存在した。Chicago D3、D5で39℃での感染価が低下しないウイルスの中に麻疹死亡例(MVi/Tokyo/99-Y)、新生児麻疹(MVi/Tokyo/2000-KA)、麻疹脳炎、麻疹肺炎等、重症麻疹患者から分離されたウイルスが存在し、病原性と39℃での増殖能との関連の可能性が考えられた（図1）。

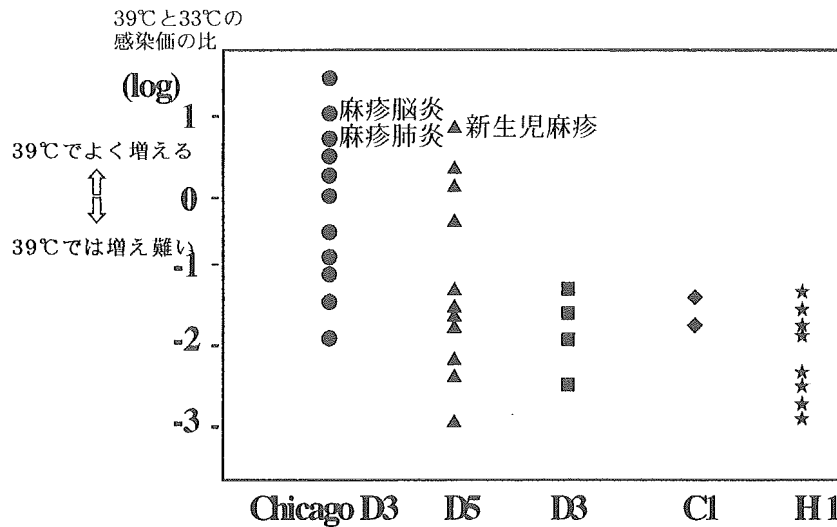


図1 麻疹ウイルスの39℃、33℃における増殖能の比

②MVi/Tokyo/99-Yは39℃でもよく増殖し、39℃、12時間でも不活化されにくい
がAIK-C株は39℃、12時間で1/1000の感染価に低下した。AIK-Cワクチン株のH蛋
白領域を野性株MVi/Tokyo/99-YのH蛋白に組み換えたMVAIK-99-Y-HはAIK-C
株と同様に39℃で不活化された (図2)。

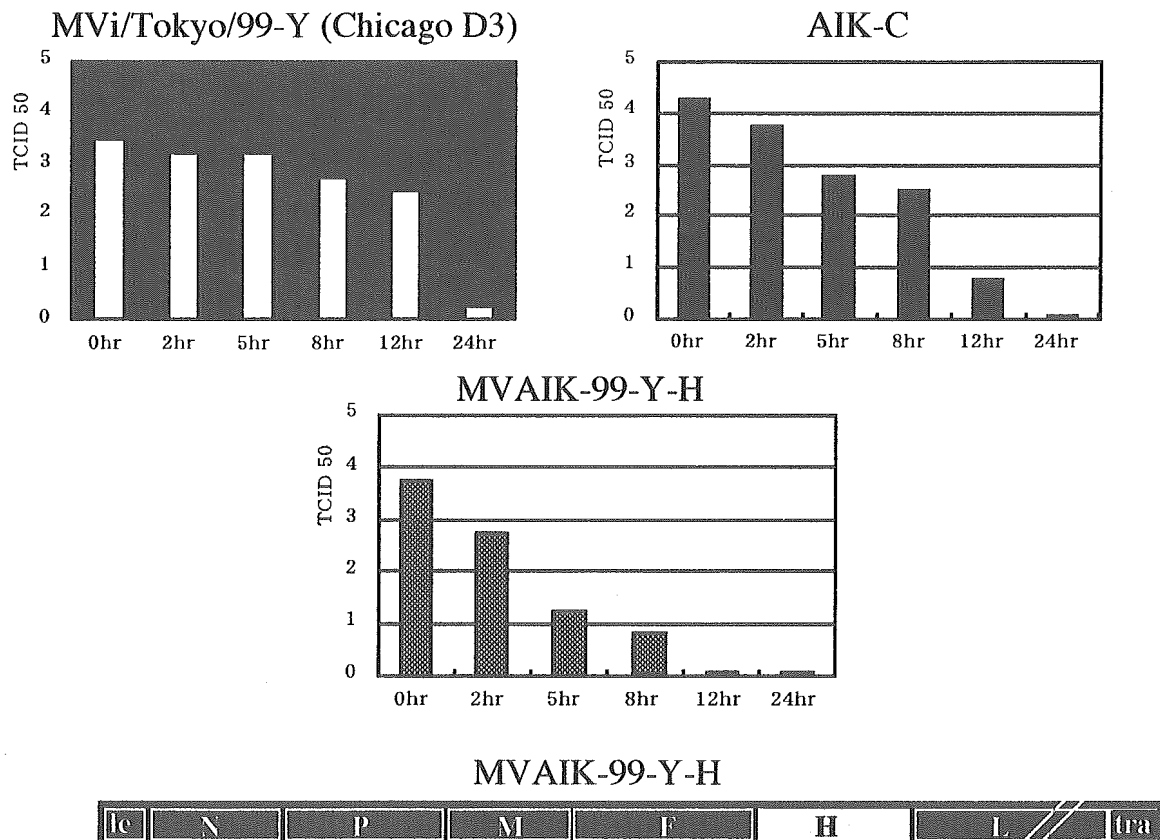


図2 野生株、ワクチン株、キメラウイルスの温度不活化

③AIK-Cワクチン株は39℃では増殖しないが、F、H蛋白発現プラスミドを39℃で発
現させると細胞融合が観察され、MVi/Tokyo/99-Y、MVi/Tokyo/87-Kから構築

したF, H発現プラスミドを同様に39℃で細胞融合をを誘導した。④37℃でmini-genome assayを行うとMVi/Tokyo/99-Yから構築したP蛋白発現プラスミドを用いた系 (p99-Y-P) は野生株のN蛋白発現プラスミドで高いluciferase活性が認められた (図3)。

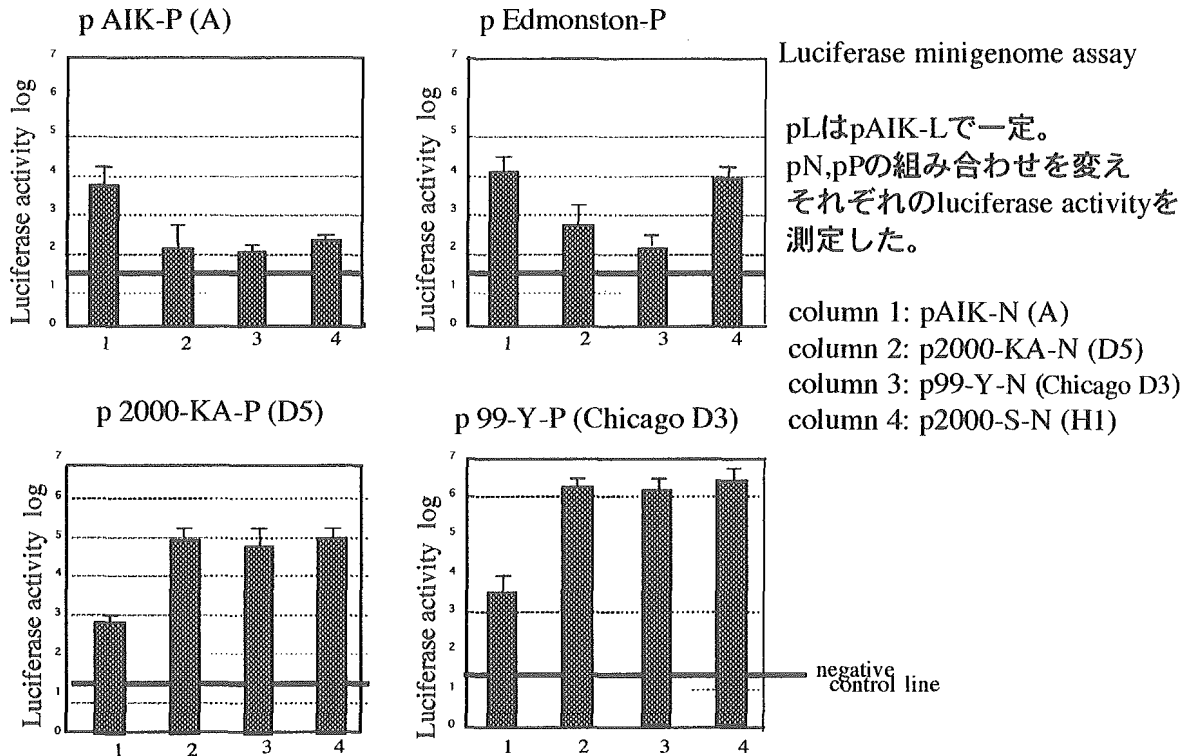


図3 ワクチン株、野生株のN, P発現プラスミドを用いたmini-genome assay

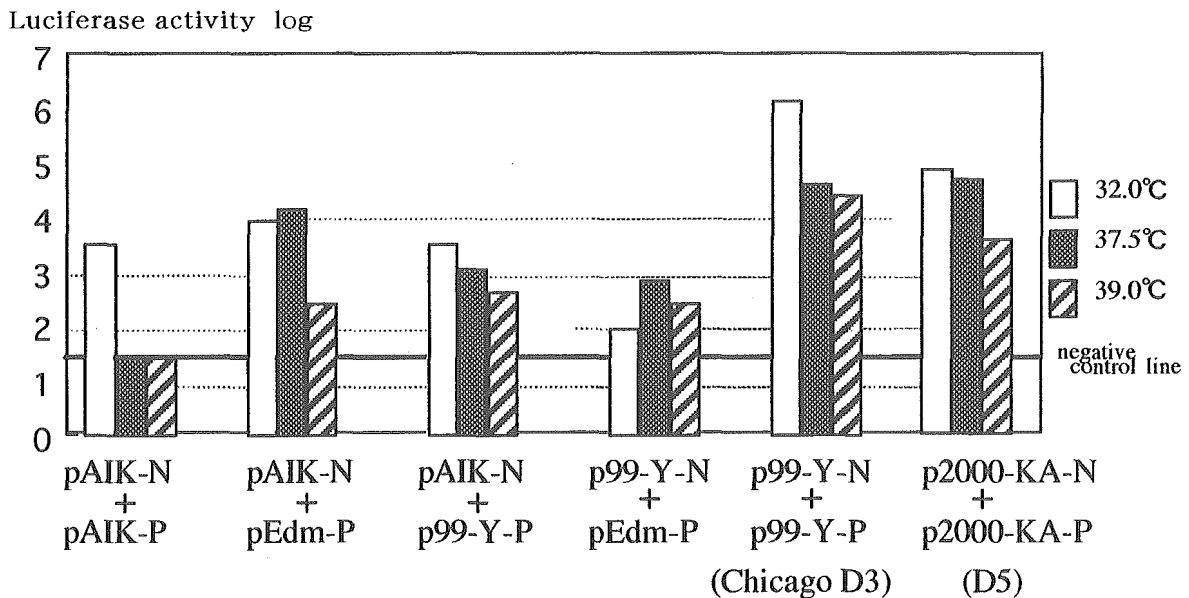


図4 32℃、37.5℃、39℃におけるmini-genome assay

⑤AIK-CのN, P発現プラスミドの組み合わせでは37.5℃、39℃ではluciferase活性は検出されず32℃で活性が認められるのみであった。一方、MVi/Tokyo/99-Y、

MVi/Tokyo/2000-KAから構築したN, P発現プラスミドは同種株同士の組み合わせで37.5℃、39℃でも高いluciferase活性を認めた(図4)。

【考按】重症麻疹患者から分離されたウイルスの中に39℃でもよく増殖するウイルスが見つかり、こうした特性は強毒株と考えられた。麻疹ワクチン株AIK-C株は39℃で増殖しないが、F, H発現プラスミドは39℃でも細胞融合を認めた事、野生株H蛋白を組み込んだウイルスはAIK-Cワクチン株と同様に不活化されたことからenvelop蛋白は39℃の増殖能とは関連しないことがあきらかとなった。Mini-genome assayによる麻疹ウイルスの転写・複製活性の検討により39℃の増殖性にはP蛋白が関与し近縁遺伝子タイプのN蛋白とのinteractionが必要であることがあきらかとなった。