

厚生労働科学研究
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

ワクチンの安全性向上のための
品質確保の方策に関する研究

平成16年度研究報告書

平成17年3月

主任研究者：竹 中 浩 治
（財）予防接種リサーチセンター

厚生労働科学研究
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業
ワクチンの安全性向上のための品質確保の方策に関する研究

総括研究報告書 ……………主任研究者 竹中浩治… 1

I. ワクチンの副反応発生機序と安全性のための品質確保に関する基礎医学的研究

分担研究報告書 ……………分担研究者 倉田 毅… 11

研究協力者 阪口雅弘

1. 風疹ウイルスの遺伝子型に関する研究—外国の株を用いた研究—……………牛島廣治他… 18
2. おたふくかぜ生ワクチン接種後の発症例報告……………加藤 篤他… 22
3. ムンプスウイルスの遺伝子タイプによる生物学的性状の差……………中山哲夫他… 26
4. 麻疹ウイルスの温度感受性に関与する遺伝子……………中山哲夫他… 31
5. LAMP 法による麻疹、風疹、ムンプスウイルスの迅速診断 ……………中山哲夫他… 35
6. 不活化ポリオ混合沈降精製百日せきジフテリア破傷風ワクチン (DTaP-IPV) の
局所反応に関する検討……………堀内義信他… 41
7. キチン微粒子 (CMP) をアジュバントとして用いた経鼻インフルエンザ
ワクチンによる感染防御……………長谷川秀樹他… 43
8. 低アレルゲン性ゼラチン開発のための基礎的研究……………阪口雅弘他… 46
9. 経鼻高力価不活化 influenza virion ワクチン被接種者における
特異的免疫の動態……………熊谷卓司他… 52
10. わが国におけるロタウイルス G 血清型の 20 年にわたる変動
—ロタウイルスワクチンの開発に向けて—……………牛島廣治他… 59

II. ワクチンの安全性と有効性に関する臨床医学的研究

分担研究報告書 ……………分担研究者 神谷 齊… 63

研究協力者 栗屋 豊

岡田賢司

1. 水痘ワクチン前方視的調査全国集計 (第 11-2 報、平成 15 年度修正版) ……神谷 齊他… 70
2. 水痘入院症例の把握：水痘ワクチンの定期接種化に向けて……………藤田綾乃他… 73
3. マウスを用いた沈降精製 DPT ワクチンの局所反応に関する研究
—病理組織像の経時的変化—……………長岡千春他… 76
4. 非血縁臍帯血移植後に百日咳を発症した思春期男児
—臍帯血移植患者における百日咳ワクチンの必要性について—……………鈴木信寛他… 81
5. 小児生体肝移植後における生ワクチン接種について (第二報) ……………新庄正宜他… 83

6. ワクチン接種による免疫機能の変動と能動免疫獲得—免疫機能に 問題のある小児の場合における検討—	近藤直実他	84
7. アレルギー児への予防接種状況のアンケート調査	鳥谷部真一他	90
8. 卵アレルギーがある小児への麻疹ワクチンの接種	国富泰二他	93
9. 当院における小児百日咳の現状	西村直子他	95
10. インフルエンザ感染症の HI 抗体とワクチン接種の効果	高平 好美	98
11. 小児がん患児におけるインフルエンザワクチン接種後の抗体反応	住江愛子他	106
12. 子どもたちが規定回数の DPT 接種を済ませた家庭内における百日咳の 伝播に関する検討	中野貴司他	108
13. 千葉県における小児インフルエンザ菌髄膜炎の罹患率 (2003-2004) と ワクチン導入に向けての課題	上原すゞ子他	110
14. 当科における定期予防接種の実施状況および副反応に関する研究 (第 8 報)	荒川浩一他	112
15. ワクチン接種後の副反応調査 1993-2004	中山哲夫他	113
16. 2 期接種としての DPT ワクチンの抗体反応と副反応	岡田賢司他	116
17. ジフテリア・破傷風 (DT) トキソイド第 2 期予防接種副反応 (第 9 報) —乳幼児期に接種された DTaP ワクチンと DT トキソイドとの互換性—	岡田賢司他	118
18. 予防接種要注意者の現状—福岡県予防接種センター平成 15・16 年度報告—	岡田賢司他	121
19. 2003-2004 年シーズンにおける横浜市内における 1 歳未満インフルエンザ・ ウイルス感染児に関する検討	森 雅亮他	123
20. Effect of Oseltamivir on the Course of Fever Following Influenza Virus Infection in Children	Eitaro Suzuki 他	135
21. BCG 接種後に皮膚結核様病変を呈した 3 例	細矢光亮他	142
22. ムンプスワクチン星野株接種後の急性耳下腺腫脹合併率と家族内二次感染の検討	庵原俊昭他	146
23. 日本脳炎ワクチン接種後に急性脳髄膜炎を発症した 1 例	香川県立中央病院小児科	148
24. ポリオワクチン接種後に特発性血小板減少性紫斑病を発症した 1 男児例	高橋朋子他	149
25. 麻疹ワクチン関連熱性けいれんの一乳児例	泉 達郎他	150
26. ハイリスク児・者に対する接種基準と副反応に関する研究	前川喜平他	152
27. てんかん接種基準案による前方視的アンケート調査—難治てんかんに 対する予防接種実施に関する多施設共同調査—	伊予田邦昭他	155
28. West 症候群における ACTH 治療後の免疫学的検討	松石豊次郎他	159
29. West 症候群の ACTH 治療後における免疫学的評価に関する前方視的検討 (第 1 報)	永井利三郎他	160

30. 一重症心身障害児施設に於ける麻疹赤血球凝集阻止 (HI) 抗体価の
保有状況と麻疹ワクチン接種に対する抗体反応について
—麻疹の免疫状態判定に於ける HI 抗体価の意義について— ……町田裕一他…163
31. 重症心身障害病棟におけるインフルエンザワクチン接種方法の検討 ……小倉英郎他…169
32. 重症心身障害児に対するインフルエンザワクチン 1 回接種の抗体反応に関する検討
……………小倉英郎他…176
33. 藤沢市小児科医に対するアレルギー児への予防接種実施状況アンケート調査
……………菅井和子他…179
34. 卵アレルギー患児へのインフルエンザワクチン接種に関する検討 ……阿部祥英他…183

Ⅲ. ワクチンの意義と安全性の健康教育と情報伝達に関する研究

- 分担研究報告書 ……分担研究者 岡部信彦…191
研究協力者 宮崎千明
1. 小児急性神経系疾患における病原体別解析：病型、季節、年齢 ……宮崎 千明…196
2. 小児急性神経系疾患 (AND) 調査における Haemophilus influenzae 菌
b 型 (Hib) および肺炎球菌性髄膜炎 ……宮崎 千明…203
3. 2004 年、奈良県内における小児急性神経疾患発生状況調査 ……西野正人他…207
4. わが国における年齢別麻疹、風疹、MMR ワクチン接種状況と麻疹、
風疹感受性人口の推計 (感染症流行予測調査より) ……多屋馨子他…212
5. 栃木県下の 4 市町における BCG 累積接種率 ……高山 直秀…220
6. 石川県中央保健福祉センター管内における BCG 累積接種率 ……川島ひろ子他…222
7. BCG ワクチン全国累積接種率調査 ……高山直秀他…223
8. 県内の麻しん累積接種率調査からの一考 ……久田美子他…225
9. 保育所における麻疹ワクチンの累積接種率調査 ……崎山 弘他…228
10. 予防接種率の世帯調査に関する基礎的検討 ……橋本修二他…232
11. 麻疹の Elimination を目指して ……岡藤 輝夫…233
12. 麻疹ワクチン接種開始年齢の変更が予防接種率及び麻疹発症年齢に及ぼす影響
……………山本 光興…238
13. 麻疹ワクチン年齢別接種数 ……井手 邦彦…243
14. 全数把握による予防接種率調査 ……福井県小児科医会…246
15. 足立区における予防接種率向上対策 ……和田紀之他…248
16. 保育園における感染症の発生状況と予防対策調査報告 ……和田紀之他…257
17. 医療従事者におけるワクチン予防接種可能疾患対策に関する検討 ……中野貴司他…265
18. 病院職員における風疹アウトブレイクとワクチン接種による院内感染対策
……………根路銘安仁他…268

19. 大学生の麻疹抗体価の分析－2000～2001年の大流行前後の比較－ ……脇口 宏他…272
 20. 麻疹定期予防接種の効果：麻疹患児に曝露した看護学生の観察 ……植田浩司他…275

IV. ワクチンの安全性と有効性を確保するための情報収集とネットワーク構築に関する研究

分担研究報告書 ……分担研究者 平山宗宏…281
 研究協力者 富樫武弘

1. BCG 接種及び麻疹・風疹ワクチンの二回接種に関するアンケート調査成績
 ……平山 宗宏…285
2. 重症複合免疫不全症と BCG 接種について ……蒲池 吉朗…291
3. BCG 接種対象者年齢の変更に関する認知度および広報について
 －接種対象者の保護者に対するアンケート調査－ ……有本晃子他…292
4. 予防接種法・結核予防法の改正による市町村の対応について：風疹
 および BCG 接種を例として ……平岩 幹男…296
5. 北海道麻疹ゼロ作戦 ……富樫 武弘…299
6. 開業医から見た今季のインフルエンザを含む感染症の大流行についての報告
 ……桃井富士麿…302
7. 福島市のインフルエンザ情報現況についての追加報告 ……桃井富士麿…304
8. インフルエンザ発生状況の年次推移（昭和 53 年～平成 17 年まで 28 年間）
 ……鈴木邦明他…305
9. 2005/2004 シーズン門真市のインフルエンザとインフルエンザワクチン
 について（中間報告） ……馬場宏一他…307
10. インフルエンザ発症に寄与する要因の解析 ……鈴木英太郎他…309
11. 平成 16 年群馬県太田市における風しん流行阻止対策および問題点 ……石川和夫他…318
12. 群馬県太田市立中学 2 年生の風しん抗体価をもとに風しんワクチンの
 抗体価持続期間について検討 ……石川和夫他…322
13. 風疹ウイルス抗体検査からみた風疹流行状況 ……阿部優子他…327
14. 入学児童予防接種状況調査報告（10 報）さいたま市平成 17 年度入学予定者
 ……太田耕造他…331
15. 乳幼児・就学前児における定期予防接種実施状況－追跡調査による
 各年齢別接種率と就学児健診での接種歴調査－ ……太神和廣他…333
16. 個別接種外来 20 年の変遷 ……宮津 光伸…337
17. 安全で質の高い麻疹ワクチン接種のための医療機関自己チェック表を
 用いた介入的研究 ……山崎嘉久他…340
18. 麻疹ワクチンの接種率と質の向上をめざして ……宮津光伸他…350
19. 愛知県におけるポリオワクチン調査 [2004 年] ……宮津光伸他…353
20. 母体血および臍帯血の麻疹中和抗体価 3 年間の比較検討 ……庵原俊昭他…356

21. 初妊婦の風疹 HI 抗体保有—経過措置対象者とそれ以前の世代の比較— …友田隆士他…359

V. 高齢者に対するワクチンの意義と安全性に関する研究

分担研究報告書 ……………分担研究者 松本慶蔵…363

研究協力者 大石和徳

山谷睦雄

1. 長崎県島原半島の一地方病院における 02 年～05 年のインフルエンザ

感染症患者の状況…ワクチン接種との関係について……………出川 聡他…369

2. 当院における過去 5 年間の肺炎球菌性肺炎を元に検討した「肺炎球菌ワクチン」を

地域全体で施工した場合の費用対効果に関するシュミレーション……………川上 健司…372

3. 寝たきり高齢者における肺炎球菌ワクチン投与の有効性に関する研究……………山谷睦雄他…374

4. 慢性呼吸器疾患におけるインフルエンザワクチンと肺炎球菌ワクチン

併用接種の効果……………黒木麗喜他…376

5. 23 価肺炎球菌ワクチンの副反応 2 症例 ……………宮津 光伸…378

6. 高齢者 (65 歳以上) のインフルエンザ予防接種に関する研究 ……………杉下由行他…379

VI. 研究班員名簿 ……………383

総括研究報告書

主任研究者

竹 中 浩 治

ワクチンの安全性向上のための品質確保の方策に関する研究 総括研究報告書

主任研究者 竹中 浩治（財団法人予防接種リサーチセンター理事長）

研究の概要

本研究は5課題について分担研究者の下に研究を行い、以下の成績を得た。

1. ワクチンの副反応発生機序と安全性のための品質確保に関する基礎医学的研究

米国で分離された風疹ウイルス株4株について遺伝子の全塩基配列を決定し、わが国で報告された株と比較検討した。また、おたふくかぜワクチン接種後の副反応を疑う4例から分離されたウイルスの解析を行い、現行ワクチンのさらなる改良の必要性が示唆された。わが国で流行してきたムンプスウイルスと麻疹ウイルスの分子疫学的検討を行い、遺伝子変異について検討した。新しい遺伝子増幅法の LAMP 法によるウイルスの迅速診断を実用化した。ポリオ不活化ワクチンの実用化に関連して、海外で製造されている DTaP-IPV ワクチンと国産試作ワクチンについてマウス及びウサギの系で局所反応原性の比較検討を行い、国産ワクチンの反応の弱いことを認めた。また、経鼻インフルエンザ不活化ワクチンのアジュバントとしてキチン微粒子が有用であることを見出し、実用化に近づいた。

2. ワクチンの安全性と有効性に関する臨床医学的研究

水痘ワクチンの効果に関する10年間の調査では接種者中水痘罹患者は19.2%であった。免疫機能に異常のある患児やアレルギー患児へのワクチン接種の安全性と必要性、小児に対するインフルエンザワクチンと抗インフルエンザ剤の効果と安全性につき臨床報告がなされた。インフルエンザ菌髄膜炎の罹患状況の調査から同ワクチン早期導入が要望された。各種ワクチンの副反応の調査と症例の報告がなされ、また、ハイリスク児・者に対するワクチン接種として、てんかん等けいれん性疾患患児、重症心身障害児に対するワクチン接種の必要性から安全性と効果が調査され、接種基準が提案された。

3. ワクチンの意義と安全性の健康教育と情報伝達に関する研究

ワクチンの安全性を議論する際の基盤として、副反応に紛らわしい急性神経系疾患の発生頻度調査とその分析成績が報告された。ワクチン接種率を能率よく算出するための調査方法が論じられ、また地域における麻疹やBCGの累積接種率の算定が試行された。また、麻疹ワクチンの早期接種と接種率向上の勧奨についての実績、保育所における保護者や関係者への啓発活動の重要性が報告された。感染症流行予測調査の成績分析から、2003年度での麻疹と風疹の感受性者数を推定し、麻疹・風疹の混合ワクチンを利用した二回接種の早期実現が要望された。医療関係者・学生の感染症の抗体検査が試行され、院内感染予防のためにワクチン接種の必要性が示された。

4. 高齢者に対するワクチンの意義と安全性に関する研究

65歳以上の高齢者に対するインフルエンザワクチン接種率は向上したが、今シーズンのワクチンの発病予防効果は十分ではなかった。肺炎球菌ワクチンは2001年以降接種が

進み、施設における効果判定の試行が開始された。インフルエンザワクチンと肺炎球菌ワクチン併用の意義を確認するための臨床試験も開始された。

5. ワクチンの安全性有効性を確保するための情報収集とネットワーク構築に関する研究

乳幼児期のBCG接種方式の変更に対する意見を全国的に小児科医に求め、BCGを生後3月未満に行うことは原則として避けるべきこと、接種時期には余裕を持たせるべきであることなどが要望された。麻疹、風疹ワクチンを2回接種方式にする場合の2回目の接種時期については、接種率を高く保つために小学校就学前の時期がよいとの意見と、追加免疫効果の点から小学校高学年ないし中学生時期がよいとする意見に分かれた。また、ワクチン対象疾患の発生状況、予防接種率向上等に関する情報として、北海道における「はしかゼロ作戦」や群馬県等での風疹対策ほか、各地での実績が報告された。インフルエンザの流行状況とワクチン効果の解析の報告が各地からなされたが、小児に対するワクチン接種の効果には限界があった。ワクチン接種率の把握のためには、就学前健診の活用などの調査成績や医療機関における協力体制についての実例が報告された。麻疹、風疹の抗体保有状況に関しては、母体血と臍帯血についての抗体価の調査がなされ、麻疹流行時や妊娠可能年齢者への対応が必要であることが報告された。

A. 研究目的

(財) 予防接種リサーチセンターは、その設立の趣旨に則り、予防接種に関する情報の収集と提供、研究、健康被害者の支援・福祉等についての事業を展開している。その実績を踏まえ、全国的な情報収集とワクチン研究のために、基礎医学、臨床医学、疫学・検査に関わる専門学者、ワクチン学者、ワクチンメーカー等のネットワークを構築し、より安全性と有効性の高いワクチンの開発・改良とその品質を確保することを目的として本研究を実施する。

B. 研究方法

本研究は各地の研究者、臨床医の協力を求めることによって構築した全国的ネットワークを通じて臨床的、疫学的、病因分析的情報の収集と分析を行った。研究は別記の5課題につき、各分担研究者が研究協力者と共にワクチンの安全性と有効性の向上のための改良、開発研究及び必要な情報の分析方法や地域におけるワクチン接種のあり方等について検討した。年度末には研究班総会において調査・研究成績を検討してワクチンの安全性や接種実施方法等につき要望事項を取りまとめると共に、今後必要な研究について討議した。

C. 研究成績

本研究は5課題について分担研究者の下に研究を行い、以下の成績を得た。

1. ワクチンの副反応発生機序と安全性のための品質確保に関する基礎医学的研究

(分担研究者：倉田毅)

①米国で分離された風疹の4ウイルス株について遺伝子の全塩基配列を決定し、わが国で報告された株と比較検討した。②おたふくかぜワクチン接種後、ムンプスや無菌性髄膜炎を発症した4例から分離されたウイルスの解析を行った。ワクチン接種時の注意や現行ワクチンのさらなる改良の必要性が示唆された。③わが国で流行してきたムンプスウイルス

スの分子疫学的検討を行い、遺伝子変異について検討した。④わが国で流行した麻疹ウイルスの分子疫学調査を行い、重症患者から分離されたウイルスの特性等を検討した。⑤新しい遺伝子増幅法の LAMP 法を用い、麻疹、風疹、ムンプスウイルスの検出について迅速診断が可能であることを証明した。⑥ポリオ不活化ワクチンの実用化に関連して、海外で製造されている DTaP-IPV ワクチンと国産試作ワクチンについてマウス及びウサギを用いたモデルにより局所反応原性の比較検討を行ったところ、国産ワクチンの反応が明らかに弱かった。⑦経鼻インフルエンザ不活化ワクチンのアジュバントとしてキチン微粒子を用いて感染防御能産生をマウスにおいて確認し、安全性の高いことからヒトへの応用が期待される。⑧高力価の不活化インフルエンザビリオンワクチンの試験接種を行い、ある程度の抗体獲得を認めたが、なお検討が必要である。⑨低アレルゲン性のゼラチン開発の基礎的検討を行った。

2. ワクチンの安全性と有効性に関する臨床医学的研究 (分担研究者：神谷齊)

①水痘ワクチンの効果に関する前方視的調査は 10 年に亘って行ってきたが、返答の得られた 576 例中水痘罹患率は 19.2 %であった。このワクチンの定期接種採用の要望意見が出された。②現行 DaPT ワクチン接種後の局所反応は、アジュバントによるワクチン成分の貯留やアレルギーの関与等が関係していると報告された。③免疫機能に異常のある患児やアレルギー患児へのワクチン接種の安全性と必要性、小児に対するインフルエンザワクチンと抗インフルエンザ剤の効果と安全性につき臨床報告がなされた。また、ワクチン接種済児のいる家族内での百日咳伝播状況が調査された。④インフルエンザ菌髄膜炎の罹患状況からの同ワクチン早期導入が要望された。⑤各種ワクチンの副反応の調査と症例の報告がなされ、因果関係が討議された。⑥ハイリスク児・者に対するワクチン接種として、てんかん等けいれん性疾患患児、重症心身障害児に対するワクチン接種の必要性から安全性と効果が調査され、接種基準が提案された。

3. ワクチンの意義と安全性の健康教育と情報伝達に関する研究 (分担研究者：岡部信彦)

①ワクチンの安全性を議論する際の基盤として、副反応に紛らわしい急性神経系疾患の発生頻度調査とその分析成績が報告された。②ワクチン接種率を能率よく算出するための調査方法が論じられ、また地域における麻疹や BCG の累積接種率の算定が試行された。③麻疹ワクチンの接種率向上と 12 月～15 月の早期に行うことの勧奨についての実績、保育所における感染症とワクチン接種率との関連から保護者や関係者への啓発活動の重要性が報告された。④感染症流行予測調査の成績分析から、2003 年度の 0～59 歳における推計感受性者は、麻疹で約 300 万人、風疹で約 1000 万人であり、2 歳以降で感受性が高いのは、麻疹では 5～9 歳群と 25～29 歳群 (約 40 万人)、次いで 10～14 歳、15～19 歳 (20 万人前後) であった。風疹では 5 歳以上で各年齢群 (5 歳刻み) とともに 60～120 万人に上り、女子だけを見ると 5～9 歳、10～14 歳で約 40 万人、15～34 歳で各年齢群ともそれぞれ約 20 万人であった。麻疹・風疹の混合ワクチンを利用した二回接種の早期実現が要望される。⑤医療関係者、医療に従事する希望の学生に対する感染症の抗体検査が試行され、院内感染予防のために感受性者へのワクチン接種の必要性が要望された。

4. 高齢者に対するワクチンの意義と安全性に関する研究（分担研究者：松本慶蔵）

① 65 歳以上の高齢者に対するインフルエンザワクチン接種率は、公的助成が行われるようになってから向上して欧米と同程度となり、施設職員に対する接種も重要であり、その努力も進んでいる。今シーズンのA病院のインフルエンザ患者のA型 108 例、B型 108 例ではワクチン接種者率がA型群で 52.8 %、B型群で 32.4 %であって、感染者の中にワクチン接種者が比較的多く認められた。②肺炎球菌ワクチンは 2001 年以降接種が進み、今日までに 47 万名（高齢者の 2.2 %）となった。施設における効果判定の試行も開始され、発熱日数、肺炎による入院率において接種群が有意に低い成績が得られた。③インフルエンザワクチンと肺炎球菌ワクチン併用の意義を確認するための臨床試験が開始された。

5. ワクチンの安全性と有効性を確保するための情報収集とネットワーク構築に関する研究（分担研究者：平山宗宏）

①結核予防法の改正に伴う乳幼児期のBCG接種方式の変更に対する意見を全国的に小児科医に求め、各地から 511 通の返答が寄せられた。主な意見としては、BCGを生後3月未満に行うことは、免疫不全児の重症副反応を考慮して避けるべきである。接種時期には余裕を持たせるべきである。医師の研修を考慮すべきである。などであり、重症複合免疫不全症の播種性BCG症の症例も報告された。②麻疹、風疹ワクチンを2回接種方式にする場合の2回目の接種時期について同様に意見を求めたところ、小学校就学前の時期がよいとの意見が 511 名中 262、51.3 %であり、中学生時期がよいとする意見が 174、34.0 %であった。③ワクチン対象疾患の発生状況、予防接種率向上等に関する情報として、北海道における「はしかゼロ作戦」の成果の他、1歳の誕生日での麻疹ワクチンキャンペーンが有効である報告があった。「インフルエンザの流行状況とワクチン効果の解析」の報告が各地からなされた。小児に対するワクチン接種の効果には限界があった。「風疹対策」に関連しては、市独自事業としての風疹ワクチンの任意接種分に対する無料ないし助成制度や接種勧奨によって流行を制圧した実績や風疹 IgM 抗体陽性率の推移の全国の状況などが報告された。「就学前健診に際してのワクチン接種状況」の活用や「医療機関における協力体制」についても実例が報告された。「抗体保有状況」に関しては、母体血と臍帯血についての抗体価の調査がなされ、麻疹は乳児は9か月時には 65 %の感受性者がいるので、麻疹流行時にはワクチン接種年齢を9月頃まで引き下げる必要のあること、初妊婦の保有率が低下していることから、妊娠可能年齢者への対応が必要であることが報告された。

D. 考察

各研究成績の中でも述べたように全国から収集された臨床・疫学的調査成績と基礎医学的研究成績から、ワクチンの安全性と有効性に関わる品質確保と新ワクチンの開発、採用の必要性和要望について次の如く要約された。

①分子疫学調査から、わが国で流行しているワクチン対象疾患のウイルスは、現在のところワクチン効果に影響が起るほどの変異は起こっていない。②インフルエンザワクチン接種率は上がってきているが、その発病阻止効果は十分ではないので、より効果があると

期待される経鼻不活化ワクチンの開発が期待される。アジュバントとしてキチン微粒子が有望である。③けいれん疾患児、重症心身障害児等リスク児にもワクチン接種が必要であることから、接種基準が作成された。④水痘ワクチンの定期接種採用、インフルエンザ菌ワクチンの早期採用、DPTとポリオ不活化混合ワクチンの実用化、インフルエンザワクチンと肺炎球菌ワクチンの併用の推進などが要望された。⑤ワクチンの安全性確保の基礎資料としてワクチン副反応に紛らわしい急性神経系疾患の実態調査成績が分析され、新たな調査が計画されている。また副反応を疑う症例が収集された。⑥ワクチン接種率を能率よく算出するための方法が試行され、また各地から累積接種率の把握や接種率向上の実績が報告された。⑦麻疹・風疹制圧のための各地の活動状況が報告され、麻疹・風疹の抗体保有状況等から混合ワクチンを用いた二回接種の実現が要望された。二回目の接種時期については接種率を高く保つための就学前の時期と、追加免疫効果を重視する小学校高学年ないし中学生の時期の二案が提示された。⑧BCG接種方式の変更については、生後3月未満への接種の制限や余裕をみた定期接種期間等の要望が示された。

本研究の成果と提案は、今後のワクチンの安全性と有効性、および接種率の向上のために活用する。

E. 発表文献

各分担研究報告書に記載する。

I. ワクチンの副反応発生機序と
安全性のための品質確保に
関する基礎的研究

分担研究者

倉 田 毅

ワクチンの副反応発生機序と 安全性のための品質確保に関する基礎医学的研究

分担研究者 倉田 毅 (国立感染症研究所)

研究協力者 阪口 雅弘 (理化学研究所)

研究要旨

ワクチンの副反応発生機序と安全性のための品質確保に関する基礎医学的研究において次のような研究成果が得られた。1) 米国で分離された遺伝子型 I と II に属する 4 つの風疹ウイルス株について全塩基配列を決定し、我が国で報告されたウイルス株と比較・検討した。2) ムンプスワクチンを接種した幼児において、流行性耳下腺炎、あるいは無菌性髄膜炎と診断された 4 例について、ウイルス分離し、そのウイルスの解析研究を行った。3) 我が国に流行してきたムンプスウイルスの分子疫学調査を行い、そのムンプスウイルスの Genotype B, G の細胞親和性の差に関与する遺伝子変異について検討した。4) 我が国に流行してきた麻疹ウイルスの分子疫学調査として、本研究では N-P 蛋白の相互作用に関連する遺伝子領域について検討した。5) 新しい遺伝子増幅法として Loop-mediated amplification (LAMP) 法が開発されている。本研究において麻疹、ムンプス、風疹ウイルスの遺伝子診断を LAMP 法で行い、従来の RT-PCR 法と検出感度を比較・検討した。6) 海外で製造されている DTaP-IPV と国内で作製した 5 社の DTaP-IPV 試作ワクチンについて、マウス及びウサギを用いたモデルにより局所反応原性の比較・検討した。7) 経鼻インフルエンザワクチンのアジュバントとしてキチン微粒子を用いその感染防御能についてマウスモデルを用い検討を行った。8) 人に不活化インフルエンザワクチンを経鼻接種し、末梢血および唾液中のそれに対する抗原特異的免疫応答を検討した。9) ゼラチンの主要アレルゲンの I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖の IgE 抗体結合エピトープを切断する酵素処理を行い、低アレルゲン性ゼラチン開発の基礎的検討を行った。

A. 研究目的

感染症から国民の健康を守るためには、安全で効果的なワクチンが不可欠である。特にワクチン接種率を増加されるためには、より安全なワクチンが求められている。本研究は、より安全で効果的なワクチンへの改良・開発のために、ワクチンの副反応発生機序と安全性のための品質確保に関する基礎医学的研究を行うことが目的である。具体的な各研究の目的として 1) 米国など先進国の風疹ウイルス感染症の分子疫学的研究は、子どもから青春期での感染に変わってきている。風疹ウイルスの遺伝子型の解析は風疹の流行の抑制と先天性風疹症候群の抑制に役立つと考えられる。2) ムンプスワクチンには、自然感染に比べて少ないながらも流行性耳下腺炎を発症する場合、あるいは無菌性髄膜炎を発症する場合があります。ワクチン接種後にこれら症状を呈した

場合に、(1) ワクチンによる免疫力が効率よく得られなかったために自然感染を起こしてしまう場合と、(2) 接種したワクチンが同様の疾病を起こしてしまう場合が考えられ、実例によって検証することを試みた。3) 我が国では、2000 年からはムンプスウイルスの genotype G が主流株で地域的に D, I, L も流行し、現在も地域的に genotype の分布に差が認められる。我が国のワクチン株はすべて genotype B である。本研究においてはウイルスの遺伝子タイプによる細胞親和性について比較・検討を行った。4) 麻疹ウイルスは negative sense RNA ウイルスで遺伝子の変異も少なく単一の抗原性を有しその性状も変化はないと考えられてきた。最近、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明らかになり、N-P 蛋白の相互作用に関連する遺伝子領域を特定することを検討した。5) LAMP 法の特徴は denature, annealing, extension の温度変化を必要とせずに 60-65℃ の一定温度で DNA を増幅できることで、そのためには 2 本鎖 DNA をはがしながら DNA を合成する *Bst* DNA polymerase と独創的な primer の設定が重要である。本研究では、麻疹、ムンプス、風疹ウイルスの遺伝子診断を LAMP 法で確立し、従来法の RT-PCR 法と検出感度を比較・検討することを目的とした。6) 生ポリオワクチン接種により、極稀であるがワクチン由来の麻痺が報告されており、不活化ポリオワクチン (IPV) の開発が急がれている。海外では IPV 単独ワクチンではなく DTaP ワクチンと組み合わせた DTaP-IPV ワクチンが主流となっている。米国の副反応情報を見ると DTaP 同様、局所反応の発生頻度が高いことがわかる。そこで、海外での DTaP-IPV と国内で作製した 5 社の DTaP-IPV 試作ワクチンについて比較・検討することが本研究の目的である。7) 交叉防御能を有する粘膜での分泌型 IgA 抗体を誘導するには、インフルエンザワクチンを粘膜に投与することが必要であるが、高い免疫応答を誘導するにはアジュバント併用が不可欠である。マクロファージを活性化する事が知られている天然物由来のキチン微粒子は安全であり、その経鼻アジュバントとしての効果が示されればその意義は大きい。そこで本研究では経鼻アジュバントとしてのキチン微粒子の効果を検討した。8) 不活化インフルエンザワクチンを経鼻接種することで亜型特異性を越えた交差免疫を誘導することが最近、報告されるようになった。本研究においては高力価の不活化インフルエンザウイルス粒子を人に経鼻接種し、その免疫応答を検討することを目的とした。9) 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ゲンはゼラチンであることが CDC の調査で明らかになった。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、低アレルゲン性ゼラチンの開発が急務となっている。ゼラチンの主要アレルゲンの I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖の IgE 抗体結合エピトープを切断する酵素処理を行い、低アレルゲン性のゼラチンの開発の基礎的検討を目的とした。

B. 結果と考察

1) 風疹ウイルスの遺伝子型に関する研究

米国で分離された4つの風疹ウイルス株について全塩基配列を決定し、日本で分離・報告された株と比較した。風疹ウイルスは大きく2つの遺伝子型がありGIは世界的にみられGIIはアジアの国で見られる。GIはさらにA-Fに群別化される。またGIIはIIA, IIB, GIIC群に分けられる。本研究で分析した米国のウイルスは2つのORFsを有し、また3つの非翻訳領域を有していた。GIの株は9762の塩基からなり、GIIは9761の塩基で1塩基UTRの結合部位が短くなっていた。カプシド、E1およびE2のモノクローナル抗体の混合抗体は精製したウイルスと反応したが、GIIではE2のバンドが欠如していた。このことから遺伝子型特異な抗原性の存在が示唆された。この4つの株において系統樹の作成ができた。全塩基配列、NSP、SPと比較しても以前の報告したE1領域と同じようにGI, GIIに分けることができた。

2) ムンプスワクチン接種後の発症例報告

ムンプスワクチン接種後の流行性耳下腺炎や無菌性髄膜炎発症を発症した4例について検討した。報告された1つの症例は、ワクチン接種後2年以内に、野外株に感染して発症した例であると考えられた。ワクチン免疫が新型株に対して有効に機能しなかった為に流行性耳下腺炎になったのではなく、ワクチンの接種が適切に行われなかったために、免疫が惹起できずに野外株に感染して発症した例であると思われた。他の3症例は、ワクチン接種後、ワクチン株により発症した例であると考えられた。これらの症例の内、2症例に関してはワクチンの弱毒化の程度が低いために接種されたヒトによっては接種後に自然感染と区別が付けられないような発症があり得る事を示すものであり、注意が必要である。他の1症例は接種後40日を経過した後の無菌性髄膜炎発症である点、かつ発症後12日間も症状が続いたという点で特異である。

3) ムンプスウイルスの遺伝子タイプによる生物学的性状の差

日本だけでなくGenotype Gはヨーロッパでも流行し、ムンプスウイルスの流行には地域差がなくなってきた。genotype BとしてHoshinoワクチン株、genotype GとしてMie 2, A158, K2, M130, OT III, SV13の各株を用いた。genotype B, G群のF, HN領域の塩基配列の結果から類推されるアミノ酸配列の異なる部位は、F蛋白発現領域で9カ所、HN蛋白発現領域で15カ所の変異を認めた。日本で流行してきたgenotype B, Gの抗原性に大きな差はなかったが、B95a細胞における細胞融合能に差が認められた。この生物学的性状はF蛋白383位のアミノ酸の差が重要なポイントであることが明らかとなった。F蛋白は細胞内proteaseによりF1とF2に解裂しF1のN末端にはFusion domainが存在しheptad repeat 1 (HR-1)とheptad repeat 2 (HR-2)が分子内結合し3量体を形成している。

4) 麻疹ウイルスの温度感受性に関する遺伝子

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。39℃で増殖する99-Yと39℃で増殖しない麻疹ワクチン株AIK-C株を用いてMini-genome assayによる麻疹ウイルスの転写・複製活性を検討した。Luciferase活性は麻疹ウイルスの転写、複製活性を反映し、39℃の増殖性はP蛋白が担っており、P蛋白のNo binding domainからcoiled coil regionがN蛋白N

core domainと結合し、さらにgenotype間の結合特異性はN蛋白N tailとP蛋白X domainで近縁遺伝子タイプのN-P蛋白とのinteractionが特異的に制御されていることが明らかとなった。

5) LAMP 法による麻疹、風疹、ムンプスウイルスの迅速診断

本研究では麻疹、ムンプス、風疹ウイルスの遺伝子診断を LAMP 法で行い、従来の RT-PCR 法と検出感度を比較した。4x10⁴ TCID₅₀/mL の麻疹ウイルスを用いて nested RT-PCR、LAMP 法の検出感度を調べた。RT-PCR 法では 10⁻³ 希釈まで検出され、LAMP 法の検出限界は 10⁻⁴ 希釈まで検出可能であった。200 μl から RNA を抽出し 25 μl に浮遊しその 5 μl の RNA を使用することから LAMP 法の検出感度は 0.1-0.2 TCID₅₀ と算出され、臨床検体からも高率に検出され RT-PCR よりも高い検出感度であった。RT-PCR は cDNA 合成後 PCR 2 回を行うため結果を得るまでには 6-8 時間かかるが LAMP 法で RNA 抽出後 1 時間以内に結果を得ることができる。Real-time PCR 法も報告されているが検出感度も RT-PCR と同程度もしくは低い。Real-time PCR の特徴は蛍光強度から検体のコピー数を算出できる利点がある。LAMP 法も real time に DNA 増幅を知ることができ、比濁度 0.1 を超えるまでの時間(秒数)をモニターすることでコピー数を知ることでも可能である。

6) 不活化ポリオ混合沈降精製百日せきジフテリア破傷風ワクチン (DTaP-IPV) の局所反応に関する検討

血球増多およびヒスタミン増感試験については、海外および国内ワクチンのいずれも同様に良好な結果であったが、海外の市販ワクチンは国内品に比べ強いマウス体重減少活性を示したが、いずれも IPV による顕著な影響は見られなかった。マウス足蹠腫脹反応では、海外 A 社及び日本 B 社についてそれぞれ DTaP と DTaP-IPV ワクチンの比較を行った結果、IPV 添加による著明な影響は見られなかったが、海外製と日本製の間には有意な差が認められた。また海外他社製品および国内他社の製品についても同様の結果が得られた。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、マウス足蹠と同様、IPV 追加による影響は見られず、海外製と国産品の差は顕著であった。

7) キチン微粒子 (CMP) をアジュバントとして用いた経鼻インフルエンザワクチンによる感染防御

キチン微粒子をアジュバントとして用いることによりワクチンの経鼻接種で粘膜での特異的 IgA 誘導と血清中の IgG を誘導することができ感染防御に非常に有用であることが示された。いままで粘膜免疫誘導によるインフルエンザウイルス感染防御の研究はコレラトキシン (CTB) や大腸菌易熱性毒素 (LT) などを用いて行われてきた。粘膜免疫誘導の重要性は示されてきたがヒトへの応用はその副作用により、進まなかったのが現状である。今回アジュバント効果がみとめられたキチン微粒子はカニの甲羅やえびの甲羅など天然物を原料とする安全な物質である。その作用機序はまだ不明な点

が多いがキチンには IL-12, IFN- γ , TNF- α などの Th1 関連サイトカインの誘導が知られており、ワクチンとともに経鼻接種された場合、鼻咽頭関連リンパ装置 NALT で直接抗原提示細胞に取り込まれ働いていると考えられる。その粘膜アジュバント作用が示されたキチン微粒子はヒトでの応用を考えた場合安全で有効なアジュバントとして有望であると考えられる。

8) 経鼻高力価の不活化 influenza virion ワクチン被接種者における特異的免疫の動態

成人 10 名と年長児 3 名に不活化 influenza virion ワクチンを鼻腔に接種し、さらに 4 週間後、同様の追加接種を行った。Homologous 抗原に関しては 13 例中 7 例において抗体価が 1:40 以上を示し、booster response は認められなかった。Heterlogus 抗原に対しても必ずしも booster response を誘導しなかった。Heterlogus 抗原に対する IgA 抗体は全症例の唾液で検出されなかった。しかし、ワクチン接種後、Heterlogus 抗原に対する特異的リンパ球増殖反応において活性の上昇が認められた。今後、ワクチン投与ルート、投与方法、投与量、抗原の選択等の検討が必要である。

9) 低アレルゲン性ゼラチン開発のための基礎的研究

ウシコラーゲン I 型 $\alpha 2$ 鎖の主要な IgE エピトープ (485-IPGEFGLPGP-494) を切断する酵素はそのアミノ酸配列からペプシンであることが予想された。この主要な IgE エピトープを含むペプチドを合成し、ペプシン酵素で反応させた。その反応サンプルを HPLC にかけて。それぞれのペプチドのアミノ酸配列を確認したところ、予想された位置で切断されていることが判った。この酵素で分解したコラーゲンのアレルゲン性を調べるために、患者血清を用いた IgE-ELISA inhibition 法を行ったところ、アレルゲン性が 1/10 程度に低下することが明らかになった。本研究におけるペプシン分解ゼラチンは、重量平均分子量が 7,600 と推定された。この分子量はワクチンや組み換えタンパク由来の生物製剤などのタンパク成分の安定化に十分な大きさであると考えられた。低アレルゲン性も確保されており、安定剤として有用であると思われる。

発表論文

1. Takahashi H, Sawa H, Hasegawa H, Nagashima K, Sata T, Kurata T.: Topoisomerase I dissociates human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase from genomic RNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 313:1073-8, 2004
2. Ueno T, Tokunaga K, Sawa H, Maeda M, Chiba J, Kojima A, Hasegawa H, Shoya Y, Sata T, Kurata T, Takahashi H.: Nucleolin and the Packaging Signal, Promote the Budding of Human Immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1). *Microbiol Immunol* 48:111-8, 2004
3. Hasegawa H, Katano H, Tanno M, Masuo S, Ae T, Sato Y, Takahashi H, Iwasaki T, Kurata T, Sata T.: BCL-6-positive Human Herpesvirus 8-associated Solid Lymphoma

Arising from Liver and Spleen as Multiple Nodular Lesions. *Leuk Lymphoma* 45:2169-72,2004

4. Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y, Sato Y, Hasegawa H, Sata T, Miyamura T, Shimizu H.: Differential localization of neurons susceptible to enterovirus 71 and poliovirus type 1 in the central nervous system of cynomolgus monkeys after intravenous inoculation. *J Gen Virol* 85:2981-9,2004

5. Hasegawa H, Ichinohe T, Strong P, Watanabe I, Ito S, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T.: Protection against influenza virus infection by intranasal administration of HA vaccine with chitin microparticles as an adjuvant. *Journal of Medical Virology*, Published Online: 12 Nov 2004

6. Ichinohe T, Watanabe I, Ito S, Fujii H, Moriyama M, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, and Hasegawa H.: Synthetic double-stranded RNA [poly (I:C)] combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. *Journal of Virology*, in press

7. Kato, A., Cortese-Grogan, C., Moyer, S. A., Sugahara, F., Sakaguchi, T., Kubota, T., Otsuki, N., Kohase, M., Tashiro, M., and Nagai, Y.: Characterization of the amino acid residues of Sendai virus C protein that are critically involved in its interferon antagonism and RNA synthesis down-regulation. *J Virol* 76:7114-24, 2004.

8. Nagai, Y., and Kato, A.: Accessory genes of the Paramyxoviridae, a large family of nonsegmented negative strand RNA viruses, as a focus of active investigation by reverse genetics. In Y. Kawaoka (ed.), *Biology of Negative Strand RNA Viruses: The Power of Reverse Genetics*, Springer-Verlag GmbH and Co. KG, *Curr Topic Microbiol Immunol* 283:198-248, 2004

9. Takahashi-Omoe, H., Omoe, K., Sakaguchi, M., Kameoka, Y., Matsushita, S. and Inada, T.: Production of virus-specific antiserum corresponding to sequences in the lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV) ORF6 protein. *Com Immunol Microbiol Infect Dis* 27: 47-55, 2004

10. Takahashi-Omoe, H., Omoe, K., Sakaguchi, M., Kameoka, Y., Matsushita, S. and Inada, T.: Analysis of protein expression by mammalian cell lines stably expressing lactate dehydrogenase-elevating virus ORF 5 and ORF 6 proteins. *Com Immunol Microbiol Infect Dis* 27: 81-92, 2004.

11. Takasuka, N., Fujii, H., Takahashi, Y., Kasai, M., Morikawa, S., Itamura, S., Ishii, K., Sakaguchi, M., Ohnishi, K., Ohshima, M., Hashimoto, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Takemori, T. and Tsunetsugu-Yokota, Y.: UV-inactivated SARS coronavirus vaccine

elicited systemic humoral immunity by subcutaneous injection of mice. *Int Immunol* 16:1423-30, 2004.

12. Ohmori, K., Sakaguchi, M., Kaburagi, Y., Maeda, S., Masuda, K., Ohno, A. and Tsujimoto, H.: A descriptive study of 85 dogs with suspected allergic reactions after vaccination in Japan. *Vet Rec* in press.

13. Ohmori, K., Sakaguchi, M., Maeda, S., Masuda, K., Ohno, K., Kaburagi, Y., Kurata, K., DeBoer, D.J. and Tsujimoto, H.: IgE reactivity to vaccine components in dogs that developed immediate-type allergic after vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* in press.

14. Olsen, D., Jiang, J., Chang, R., Duffy, R., Sakaguchi, M., Leigh, S., Lundgard, R., Ju, J., Buschman, F., Truong-Le, V., and Plarek, J.: Expression and characterization of a low molecular weight recombinant human gelatin. *Protein Expression Purification* in press.

15. Kumagai, T., Nagai, T., Okui, T., Tsutsumi, H., Nagata, N., Yano, S., Nakayama, T., Okuno, Y., Kamiya, H.: Poor immune responses to influenza vaccination in infants. *Vaccine* 22: 3404-10, 2004.

16. Inou, Y., Nakayama, T., Yoshida, N., Uejima, H., Yuri, K., Kamada, M., Kumagai, T., Sakiyama, H., Miyata, A., Ochiai, H., Ihara, T., Okafuji, T., Okafuji, T., Nagai, T., Suzuki, E., Shimomura, K., Ito, Y., Miyazaki, C.:

Molecular epidemiology of mumps virus in Japan and proposal of two new genotypes. *J Med Virol* 73:97-104, 2004.

17. Kumada, A., Komase, K., Nakayama, T.: Recombinant measles AIK-C strain expressing current wild-type hemagglutinin protein. *Vaccine* 22: 309-16, 2004

18. Ochiai M, Kataoka M, Toyozumi H, Yamamoto A, Kamachi K, Arakawa Y, Kurata T, Horiuchi Y.: Endotoxin Content in Haemophilus influenzae Type b Vaccine. *Jpn J Infect Dis* 57:58-9, 2004

19. Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Sato Y, Hatano I, Harashima A, Suzaki Y, Yoshii T, Hashikawa T, Sata T, Horiuchi Y, Koike S, Kurata T, Nomoto A.: Apoliomyelitis model through mucosal infection in transgenic mice bearing human poliovirus receptor, TgPVR21. *Virology* 321:87-100, 2004

<邦文>

加藤 篤 : ウイルス感染とインターフェロンシステムからの回避. *臨床免疫* 41, 611-16 , 2004