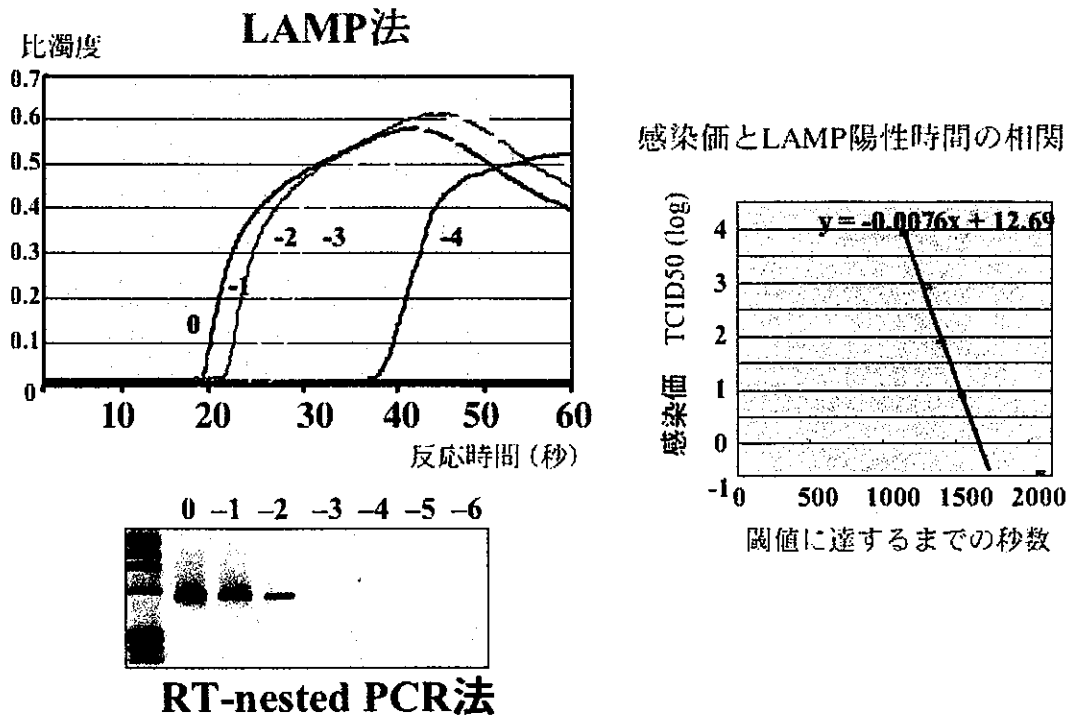


検出限界は 10^{-4} 希釈まで検出可能である。200 μ l から RNA を抽出し 25 μ l に浮遊しその 5 μ l の RNA を使用することから LAMP 法の検出感度は 0.1-0.2 TCID₅₀ と算出され、臨床検体からも高率に検出され RT-PCR よりも高い検出感度であった。RT-PCR は cDNA 合成後 PCR 2 回を行うため結果を得るまでには 6-8 時間かかるが LAMP 法で RNA 抽出後 1 時間以内に結果を得ることができる。Real-time PCR 法も報告されているが検出感度も RT-PCR と同程度もしくは低い (5, 6)。Real-time 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が可能であり、麻疹ウイルスの感染価を LAMP 法で比濁度 0.1 を超えて陽性となるまでに時間から検量できる (図 3)。

図 3 麻疹ウイルス遺伝子増幅法 RT-PCR と LAMP 法の比較



LAMP 法の今後の展望

LAMP 法は DNA 増幅法として開発され、DNA ウイルスとして HHV6, 7 の LAMP 法が報告されている (7, 8)。DNA ウイルスとして水痘 (9), Adenovirus (10) の LAMP 法が報告されている。RNA ウイルスとしては West Nile ウイルス (11) が報告されており、既に、SARS (12) の LAMP 法が報告されておりキット化されている。更に、H5N1 のウイルス感染症において LAMP 法が有用であり、我々もムンプス (13)、麻疹・RSV・風疹ウイルス (投稿準備中) の迅速遺伝子診断に有用であることが解った。ウイルス以外にも結核菌 (14)、寄生虫 (15) の LAMP 法が報告され、既に、病原大腸菌 (16)、レジオネラ (17) の増幅法が確立されキット化されている。

感度、特異性、迅速性、簡便性と迅速診断に必要とされている条件を備えている LAMP 法は遺伝子迅速診断キットとして広く応用される可能性を持っている。RNA, DNA を抽出して 60 分以内に結果を得ることができるが、遺伝子抽出に 20 分がかかることから、迅速診断キットとして普及するには迅速遺伝子抽出法と簡易型比濁計の開発が必要となってくる。病原体の遺伝子診断だけでなく定量的測定も可能であり、ウイルスの動態を検索可能となる。また、サイトカイン mRNA の定量的同定も可能であり real-time LAMP は real-time PCR より機械自体も試薬も安価であることから定量的遺伝子解析の面への応用が期待される。

表 1 既に報告されている病原微生物の LAMP 法による検出

1) ウイルス

DNA ウイルス

HHV 6 & 7 (ref.7, 8)、水痘 (ref. 9)、Adenovirus (ref. 10)

RNA ウイルス

West Nile virus (ref. 11)、SARS coronavirus (ref. 12)、
ムンプス (ref. 13)、H5N1 トリ型インフルエンザ、麻疹、風疹、
Respiratory syncytial virus (投稿準備中)

2) 細菌

結核 (ref. 14)、O157 (ref. 16)、Legionella (ref. 17)

3) 真菌、寄生虫 (ref. 15)、その他

LAMP 法の詳細は栄研化学株式会社 Eiken GENOME SITE

(<http://loopamp.eiken.co.jp/j/index.html>)

文献

- 1) Notomi T, et al.: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 28: e63. 2000
- 2) 牛久保 宏: LAMP 法の原理—遺伝子の簡易・迅速な増幅法— ウイルス 54. 107-112. 2004
- 3) Nagamine K, et al.: Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template. Clin Chemistry 47: 1742-1743. 2001.
- 4) Mori Y, et al.: Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. J Biochem Biophys Methods 59. 145-157. 2004
- 5) Ozoemena LC, et al.: Comparative evaluation of measles virus specific TaqMan PCR and conventional PCR using synthetic and natural RNA templates. J Med Virol 73: 79-84. 2004

- 6) Gueudin M, et al.: Quantitation of respiratory syncytial virus RNA in nasal aspirates of children by real-time RT-PCR assay. *J Virol Method* 109: 39-45. 2003
- 7) Ihira M,: Rapid diagnosis of human herpes virus 6 infection by a novel DNA amplification method, loop-mediated isothermal amplification. *J. Clin Microbiol* 42. 140-145. 2004
- 8) Yoshikawa T,: Detection of human herpesvirus 7 DNA by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol* 42. 1348-1352. 2004
- 9) Okamoto S, et al.: Rapid detection of varicella-zoster virus infection by a loop-mediated isothermal amplification method. *J Med Virol* 74. 677-682. 2004
- 10) Wakabayashi T, et al.: Rapid and sensitive diagnosis of adenoviral keratoconjunctivitis by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Curr Eye Res* 28. 445-450. 2004
- 11) Parida M, et al.: Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J. Clin. Microbiol.* 42. 257-263. 2004.
- 12) Thai HTC, et al.: Development and evaluation of a novel Loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Clin Microbiol* 42. 1956-1961. 2004.
- 13) Okafuji T, et al.: A Rapid Diagnostic Method for the Detection of Mumps Virus Genome by Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP). *J Clin Microbiol* (印刷中)
- 14) Iwamoto T, et al.: Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. *J Clin Microbiol* 41: 2616-2622. 2003
- 15) Kuboki N, et al.: Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. *J Clin Microbiol* 41. 5517-5524. 2003
- 16) Maruyama F, et al.: Detection of bacteria carrying the *stx2* gene by in situ loop-mediated isothermal amplification. *Appl Environ Microbiol* 69. 5023-5028. 2003
- 17) 安中敏光、他: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法によるレジオネラ属菌の検出 *日本臨床微生物学雑誌* 13. 19-25. 2003

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、片岡 紀代、山本 明彦、永田 典代、原嶋 綾子、長岡 芳昭、
落合 雅樹、豊泉 裕美、蒲地 一成、荒川 宜親、倉田 毅 (国立感染症研究所)

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いる現状で、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・検討を行ったので報告する。

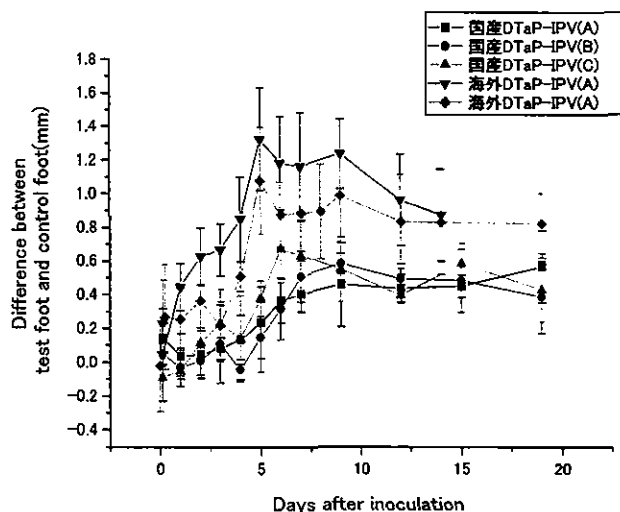
【材料と方法】

海外2社の市販DTaPおよびDTaP-IPV並びに国内5社の市販DTaPおよび試作DTaP-IPVについて生物学的製剤基準に基づき、百日せき毒性試験によりIPV追加の影響を調べた。また、局所反応原性を検討するため、マウス足蹠にワクチンあるいは対照として生理食塩水 50 μ l を接種し、経日的にワクチン接種足と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、経日的に腫脹を計測し、接種3週後の皮膚を撮影、記録した。また追加接種時の局所反応原性の評価のためマウス大腿部筋肉にワクチン 0.1ml を1ヶ月間隔で2回接種し、その10日後より連日 2.5 μ g のインドメタシンの腹腔投与を行った。2回目免疫の2週後にワクチン濃度のジフテリアトキソイド(Dtd)、IPV あるいは生理食塩水 50 μ l を足蹠皮下に投与し、12時間後の接種足と対照足との肥厚差を計測した。

【結果】

白血球増多(LP) およびヒスタミン増感(HS)試験については、海外および国内ワクチン

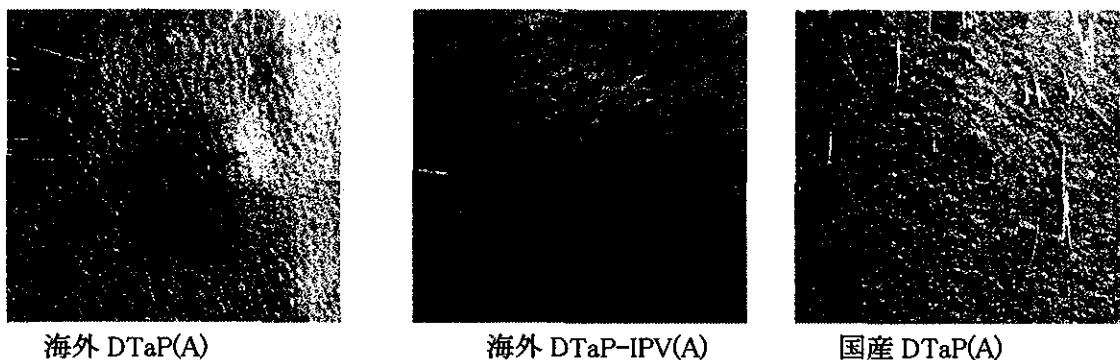
図 1



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、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

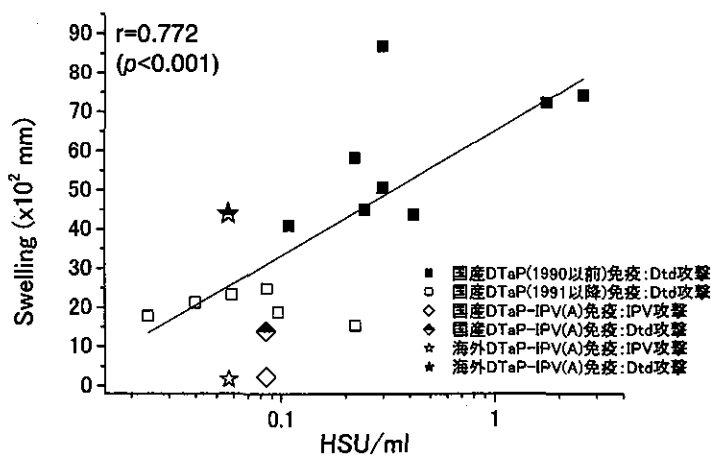
社製品および国内他社の製品についても同様の結果が得られた。図 1 に代表的な海外および国産の DTaP-IPV の結果を示す。また、ウサギ背部皮内にワクチン 0.1ml を接種して局

図 2



所刺激作用を比較したところ、マウス足趾と同様、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。図 2 に接種 3 週後のウサギ皮膚接種局所を示した。他社の製品でも結果は同様であった。さらに材料と方法に記載したように追加接種時の局所反応に対する感作能を調べた。その結果図 3 に示すように、海外および国産の DTaP-IPV とも

図 3



IPV 追加接種に対する感作は示

さなかったが、Dtd 追加接種

に対しては、国産ワクチンでは感作は認めなかったが、海外A社 DTaP-IPV ワクチンで、HS 活性は弱いにもかかわらず 1980 年代中頃の国産 DTaP に

匹敵する感作能が認められた。考察：海外では局所反応が重要視されていないが、米国の副反応情報データベース(VARES)

を見ると、DTaP に関する局所反応の件数が大半を占めている。米国では、筋肉内接種であるがそれでも腫脹の頻度が高かった。一方、我が国では局所反応はかつてほど深刻ではないが今なお問題とされている。我が国のワクチン接種は皮下投与により行われているが、海外製 DTaP ワクチン及び DTaP-IPV ワクチンは通常筋肉内接種されている。今回、2種の動物モデルで海外製品と国内製品を皮下投与したところ、腫脹の程度に顕著な違いが認められた。また HS 活性が低いにもかかわらず、追加接種時の Dtd に対して著明な感作能を示した。従ってこうした感作能は、国産 DTaP の場合残存 HS 活性に相関したが、本来現在の試験では必ずしも評価し得ない百日咳毒素の活性と考えられ、評価法の早期の確立が求められる。

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、一戸 猛志 (国立感染症研究所感染病理部)

倉田 毅 (国立感染症研究所)

研究要旨：キチン微粒子(CMP)は強力なマクロファージの刺激物質として知られ免疫応答を刺激することが知られている。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。PR8 (H1N1) ワクチンをキチン微粒子と共に BALB/c マウスに経鼻接種を行うことにより鼻腔洗浄液中に PR8 の HA 特異的な IgA 及び血清中に IgG を誘導することができさらにチャレンジウイルス感染に対し感染を完全に防御することが可能であった。さらにワクチン株とチャレンジ株が異なる場合においても交叉防御能が見られた。天然物由来であるキチン微粒子はその安全性及び有効性から経鼻アジュバントとして有望であることがしめされた。

【目的と意義】

現行のインフルエンザ皮下注射ワクチンの場合、ワクチン株と流行株が一致するとき予防効果が期待できるがワクチン株と流行株が一致しないとき予防効果が著しく減少する。そこで交叉防御能をゆうする粘膜での分泌型 IgA 抗体を誘導するには、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。これまで、有効なアジュバントとしてコレラトキシンや大腸菌易熱性毒素やその変異体が用いられてきたが、その使用については安全性に疑念がでており、新たな安全性の高いアジュバントが求められている。そこでマクロファージを活性化する事がい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。

【材料と方法】

HA ワクチン：ワクチンは北里研究所で作成された Influenzavirus A,; A/Puerto Rico/8/34 (A/PR8; H1N1), A/Yamagata/120/86 (A/Yamagata; H1N1), A/Guizhou/54/89 (A/Guizhou, H3N2) *influenzavirus B*, B/Ibaraki/2/85 (B/Ibaraki)、それぞれの HA ワクチンを用いた。

アジュバント：キチン微粒子 (Chitin Microparticles, Sigma-Aldrich, Poole, UK) :1-20 μ m 大の微粒子。CTB*: コレラトキシン B サブユニット、0.1%コレラトキシン入り, Sigma, St. Louis, MO

マウス：6-8週齢のメス BALB/c マウス（日本 SLC）

ウイルス：マウス馴化 A/Puerto Rico/8/34 (A/PR8; H1N1)をチャレンジに用いた。

ワクチン接種と抗体測定

1群5匹の BALB/c マウスにエーテル麻酔下に HA ワクチン1μg とアジュバントとしてキチン微粒子 10μg, 100μg, CTB* 1μg をそれぞれ用い経鼻接種を行った。第1回目の接種後4週間及び6週間後に追加免疫を行い最終免疫の2週間後に鼻腔洗浄液、血清の回収及びウイルスチャレンジを行った。ウイルスチャレンジは 1×10^3 PFU のマウス馴化 PR8 ウイルスを片鼻 1.2μl ずつ両鼻に接種した。

回収された鼻腔洗浄液及び血清中の抗体価は ELISA 法を用いて HA 特異的 IgA 及び IgG の測定を行った。ウイルス価は MDCK 細胞を用いたプラーク法で測定した。

結果

キチン微粒子アジュバント併用インフルエンザワクチンを経鼻接種後の鼻腔洗浄液中の HA 特異的 IgA と血清中の HA 特異的 IgG の抗体価を図1に示した。

図に示すごとく PR8 ワクチンと CMP100μg を経鼻接種すると CTB*をアジュバントとして用いた場合と同等の特異的 IgA 及び IgG 応答が見られた。CMP を 10μg に減らしても有意な抗体応答がみられた。これらの抗体応答はアジュバントを用いないワクチンのみの接種では見られなかった。

アジュバント併用経鼻インフルエンザワクチンの交叉防御能を調べるために型の異なるウイルスのワクチンをアジュバントと共に経鼻接種したその結果、図1に示すごとく A/Yamagata(H1N1), A/Guizhou (H3N2), B/Ibaraki について PR8 と交叉反応する鼻腔洗浄液中に IgA が検出された。

図1

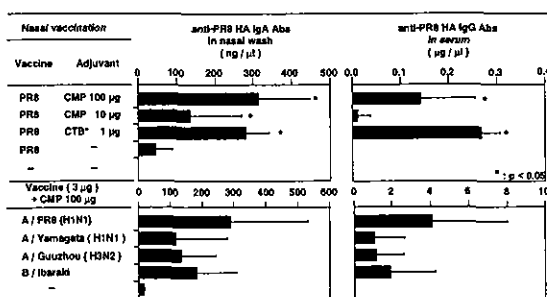
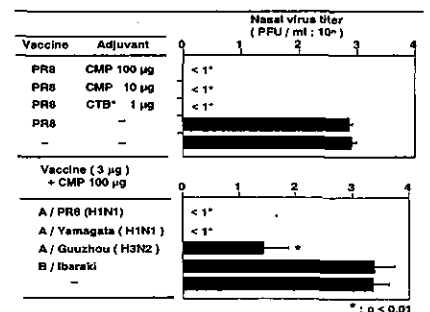


図2



感染防御

アジュバント併用インフルエンザワクチンを経鼻接種後1匹あたり100pfuのインフルエンザウイルスチャレンジ感染を行った。図2に示すごとく100μg, 10μgのCMPと共にワクチ

ン接種した群において CTB*を用いた場合と同様 PR8 (H1N1) ウイルスのチャレンジを完全に防御した。ワクチンのみの接種ではまったく防御効果が見られなかった。

交叉防御能を調べるため、A/Yamagata(H1N1), A/Guizhou (H3N2), B/Tbaraki のそれぞれのワクチンを CMP をアジュバントに用い経鼻接種後 100pfu の PR8(H1N1)インフルエンザウイルスチャレンジを行った。結果は同じ H1N1 である A/Yamagata は完全防御が成立し、A/Guizhou(H3N2)は部分防御、B/Tbaraki に関しては感染抑制効果がまったく見られなかった。

考察

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ばあい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。

結論

不活化ワクチンを経鼻粘膜接種することは粘膜免疫誘導に有用であり粘膜を介して感染する様々な病原体に対して有効である。しかし不活化ワクチンでの粘膜免疫誘導のためにはアジュバントが必要であり、ヒトでの応用が可能な新しいアジュバントの開発が望まれている状況である。今回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。

論文発表

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*, 2005 Jan; 75:130-136.
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*

低アレルギー性ゼラチン開発のための基礎的研究

阪口 雅弘 (理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター)

宮沢 博 (杏林大学)、堀 久江 (東京医科歯科大学 難治研)

服部 俊治、蛭原 哲也、入江 伸吉 (ニッピ バイオマトリックス研究所)

井上 栄 (大妻大学)

【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)。また、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)。さらに、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)。ウシコラーゲンI型 $\alpha 2$ 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判った(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の調査で明らかになった(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、低アレルギー性ゼラチンの開発が急務となっている。我々は低アレルギー性ゼラチンの開発の基礎的な研究として、ゼラチンの主要アレルギーのI型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖のIgE抗体結合エピトープの解析を行ない、**485-IPGEFGLPGP-494**が主要なIgE結合エピトープであることを明らかにした(11)。本研究ではこのエピトープを切断する酵素処理において低アレルギー性のゼラチンの開発の基礎的検討を行ったので報告します。

【材料と方法】

患者：ゼラチンを含んでいるワクチン接種後、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15例から血液が得られた。

IgE抗体の測定：蛍光ELISA法にてコラーゲンおよび各に対するIgE抗体を用いて測定した(11)。

ELISA inhibition法：アレルギー性の定量に患者血清を使用したELISA inhibition法を用いた(12)。

【結果および考察】

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(図1)。その切断されたペプチド1, 2は切断前のペプチドに対するIgE抗体活性をまったく阻害しないことから、この切断により、IgEエピトープ・ペプチド

はアレルギー性を失うことが明らかになった (図2)。次にコラーゲン I 型にペプシンを反応後、HPLC の分離パターンを見たところ、数万以下の幅広いバンドが確認できた (図3)。この酵素分解コラーゲンを SDS-PAGE で分析すると数万以下の幅広いピークを示すことが判った (図4)。この酵素分解コラーゲンのアレルギー性を調べるために、患者血清を用いた IgE-ELISA inhibition 法を行ったところ、アレルギー性が 1/10 程度に低下することが明らかになった (図5)。

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。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の分子量であると考えられた。低アレルギー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。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、明らかになっている。そのため、現在、国際的にも低アレルギー性のゼラチンの開発が急務となっている。特に米国のワクチンは低開発国向けに輸出されているので、ワクチンの安定性の保持は重要な課題になっている。

【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 of 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.

11. Hori H, Hattori S, InouyeS, Kimura A, Irie S, Miyazawa H, Sakaguchi M.: Analysis of major epitope of $\alpha 2$ chain of bovine type I collagen in children with bovine gelatin allergy. J Allergy Clin Immunol 110:652-657, 2002.

12.Sakaguchi M, Toda M, Ebihara T, Irie S, Hori H, Imai A, Yanagida M, Miyazawa H, Ohsuna H, Ikezawa Z, Inouye S.:IgE antibody to fish gelatin (type I collagen) in patients with fish allergy. J Allergy Clin Immunol 106:579-584, 2000.

図1 IgE エピトープを含むペプチドにおけるペプシン酵素反応後の HPLC 分離パターン

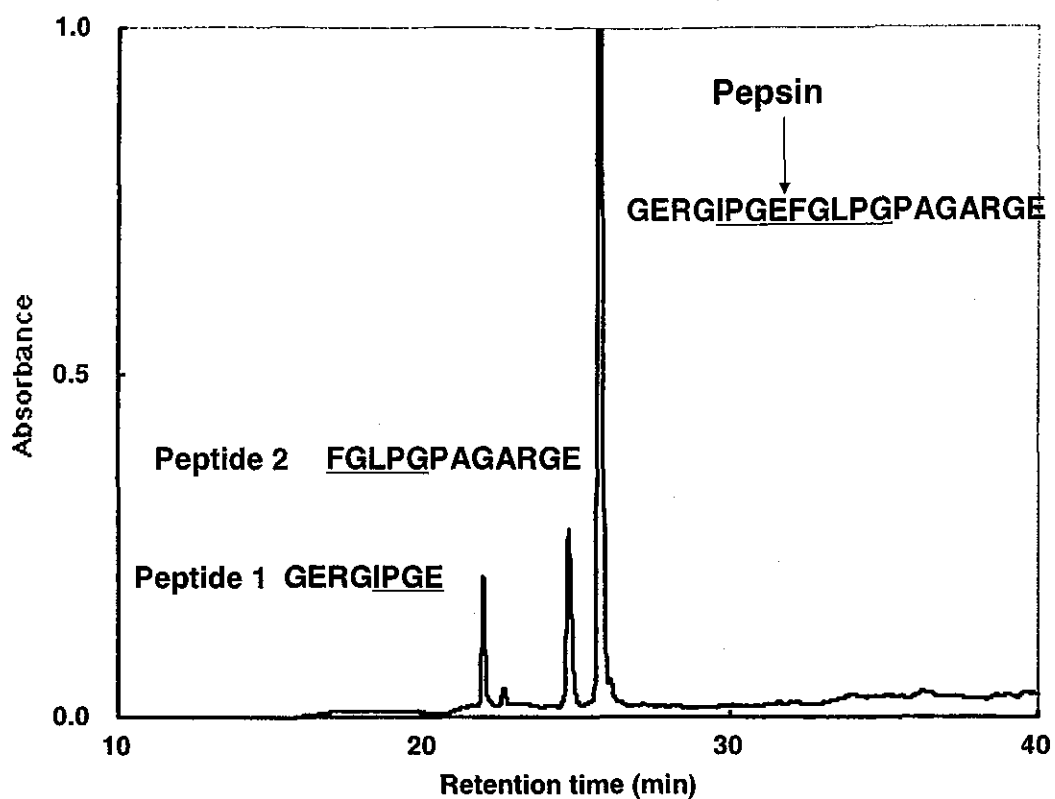


図2 患者血清を用いた IgE-ELISA inhibition 法によるペプシン酵素処理ペプチドのアレルゲン性の検討

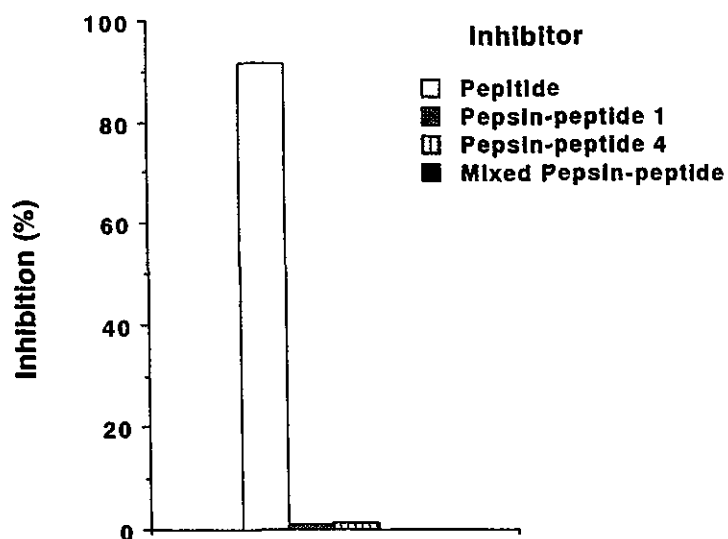


図3 コラーゲンI型におけるペプシン酵素反応後の HPLC 分離パターン

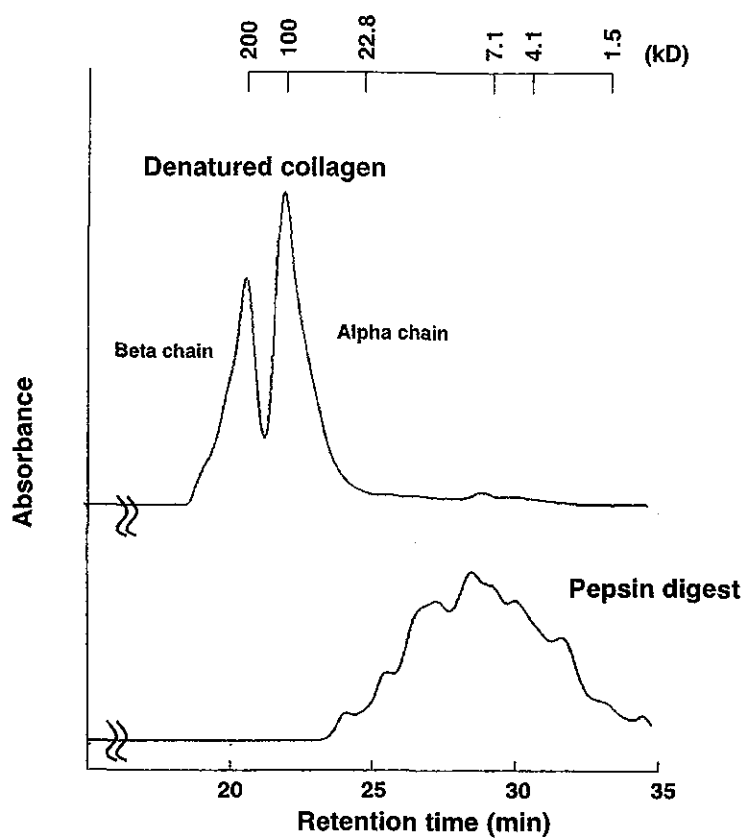


図4 コラーゲンI型におけるペプシン酵素反応後の SDS-PAGE

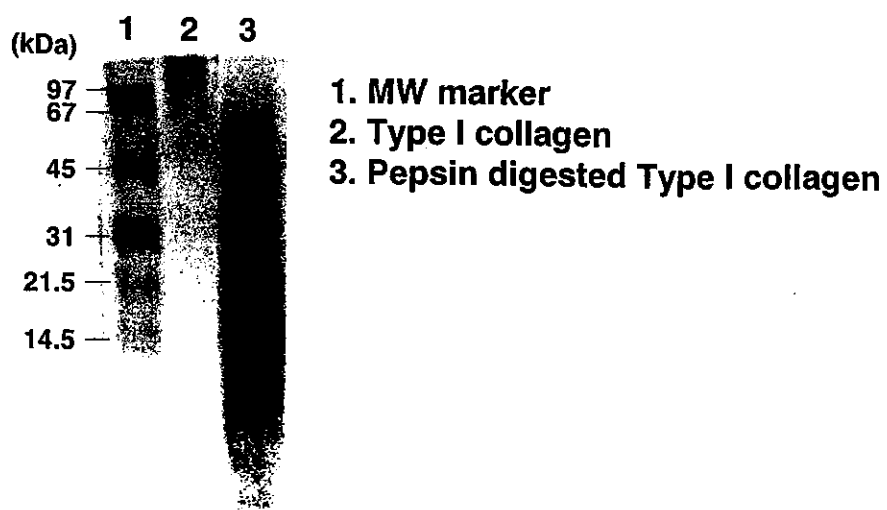
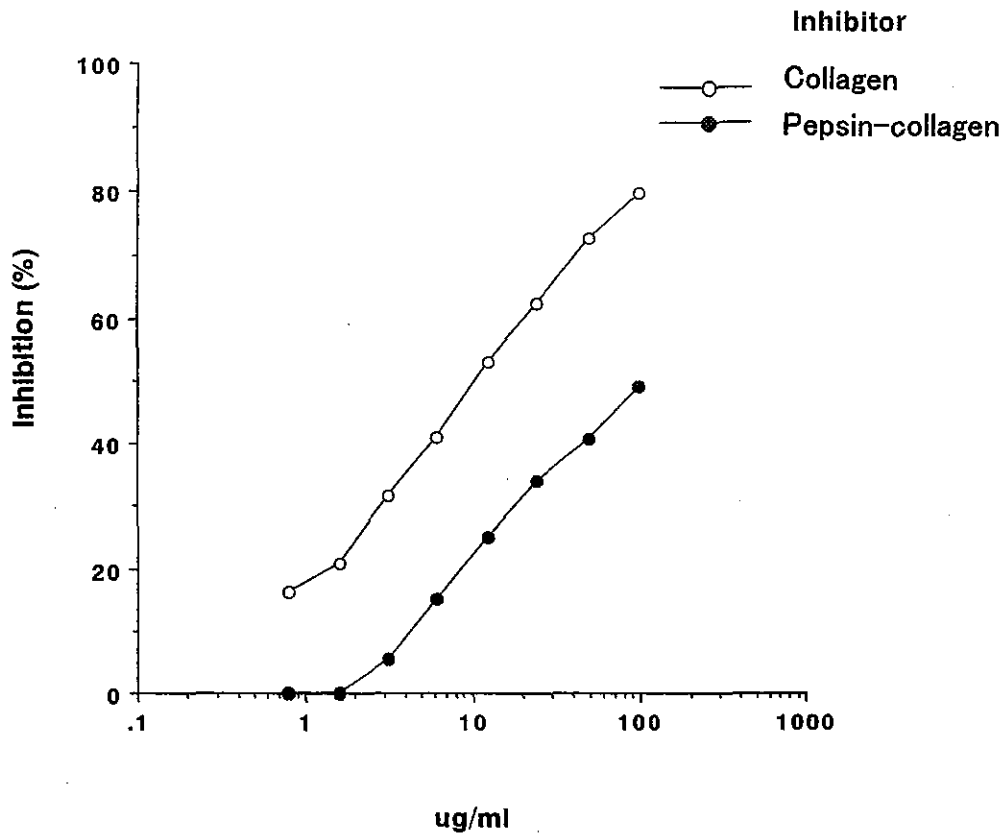


図5 患者血清を用いた IgE-ELISA inhibition 法によるペプシン酵素処理コラーゲン I 型のアレルギー性の検討



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、長田 伸夫（札幌小児アレルギー感染症研究会）

奥井 登代、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）

佐藤 昇志（札幌医科大学第1病理）

迫田 義博、喜 田 宏（北大獣医院微生物）

1. 研究目的

現在広く用いられている不活化インフルエンザワクチンは小変異(drift)を繰り返すインフルエンザウイルスを追跡し毎年ワクチン候補株の選定を繰り返さなければならないという問題点を包含している¹⁾。そしてその有効性は流行株とワクチン株の類似性に依存しており、流行株と不一致である場合はその程度に応じてワクチンの予防効果は減弱する。株間の一致が見られる場合における効果についても議論が続いており²⁾、さらに乳幼児、特に乳児における有効性に疑問を投げかける成績が蓄積しつつある³⁾。一方で、我が国においてはインフルエンザ脳症に対する保護者の懸念もあり、幼児のインフルエンザワクチン接種率は世界で随一となっている。近い将来に予想される新型インフルエンザウイルスの出現とそれによるパンデミックに対する preparedness の観点からも現行の不活化インフルエンザワクチンを凌駕する効果があるワクチンの開発は愁眉の課題である。

最近、高田らは carrier, adjuvant を用いない不活化 whole virion influenza vaccine をマウスに経鼻接種し、亜型特異性をこえる交差免疫(cross-protective immunity, heterosubtypic immunity)を誘導することに成功した⁴⁾。さらに Heinen らは豚でインフルエンザ生ウイルス接種による交差免疫誘導に成功した⁵⁾。rodent model のみならず豚の系でも heterosubtypic immunity が誘導され得ることが証明された意義は大きく人での可能性に希望を抱かせる研究成果と思われた。

著者らは今般、少数の年長児、成人に比較的高力価の不活化 whole virion を経鼻接種し、それに対する特異的免疫応答を多数回の末梢血、唾液検体採取によって詳細に検討したので報告する。

2. 研究対象と方法

(1) 研究対象

成人10例（男性2名、女性8名、21-54歳、平均年齢35.8歳）、年長児3例（16、14、13歳、男児1名、女児2名）を対象として、高度精製フォルマリン不活化 influenza virion (A/Aichi/2/68 (H3N2)) 125 µgHA を鼻腔に滴下接種（左右鼻腔各々75µgHA）し、さらに4週間後に同様の追加接種を行った。接種前に1回目の耳下腺唾液、末梢血検体採取を行い以後1週間毎に検体を継続的に採取し合計9回、2ヶ月間の follow up を行った。耳下腺唾液は Stensen's duct より Lashley cup を用いて採取した。対象者から informed consent を得た。また本研究は日本外来小児科学会倫理委員会の認可を得ている。

(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としては03/04期のワクチン株ウイルスである A/ニューカド=7/20/99(H1N1)、A/ハマ/2007/99(H3N2)、B/山東/7/97 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フォ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734、1603、916µg/ml であった。

血清赤血球凝集抑制反応(HI)抗体および唾液 ELISA IgA, IgG 抗体測定用の抗原としては heterologous 抗原として 2003/2004 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/山東/7/97 および homologous 抗原として A/Aichi/2/68 (H3N2)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) 唾液 ELISA IgA, IgG 抗体測定⁶⁾

96 穴 ELISA plate に 1 μ g/ml の influenza virus を分注, 4°C overnight 静置。洗浄後, 5% skim milk 含 PBS を分注, 4°C overnight 静置。被検血清または唾液を duplicate で 2 倍階段希釈し, 室温で 1 時間静置。洗浄後, HRP-conjugated goat anti-mouse IgG or IgA (Jackson Immuno Research Laboratory, West Grove, PA) を分注し 4°C overnight 静置。TMB solution (Moss Inc., Pasadena, MD)で発色させ, microplate reader で測定, 有意最大希釈倍数の逆数をもって抗体価とした。

(5) 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⁾

微量全血培養法 (Whole blood microculture assay) を用いた。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 μ l 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 μ l 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 μ Ci 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. \geq 3.0 を陽性とした。

3. 研究結果

(1) 血清 HI 抗体価推移

Figure 1 にワクチン接種前後の HI 抗体価の推移を示す。全例接種前検体で H1, H3 に対して 1:40 以上を示した。A/Aichi/2/68 (H3N2) strain を用いた経鼻投与ワクチンは heterologous な抗原である A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/Panama/2007/99 (H3N2) および前抗体価が必ずしも高値ではなかった B/Shandong/7/97 に対しても血清 HI 抗体価レベルの booster response を誘導し得なかった。

Homologous 抗原である A/Aichi/2/68 (H3N2) に対しては 13 例中 7 例において前抗体価が 1:40 以上を示し, booster response は観察されなかった。症例 7 では前抗体価が低く抗体価の上昇が観察されたが, 症例 9 においては同様に前抗体価が低かったが抗体価の上昇は認めなかった。症例 10, 11, 12, 13 においては前抗体価が陰性で抗体価の上昇を示した。症例 10, 13 では 2 回接種後によりやく抗体価の上昇を認めた。

(2) 唾液中 IgA, IgG 抗体価

heterologous な抗原に対する IgA は全唾液検体で検出されなかった。さらに heterologous 抗原に対する IgG 抗体は検体量の制約から現在未検索である。

Homologous 抗原である A/Aichi/2/68 (H3N2) strain に対する唾液中 IgA, IgG 抗体価の推移を Figure 2 に示す。被接種者 13 例中 4 例は前検体で IgG 抗体を保有していた。前検体で陰性であった 9 症例も含め 12 例で 2 管以上の IgG 抗体価上昇を認めた。IgA 抗体価については全例有意な上昇を認めたが, 一般に抗体価は低値であった。

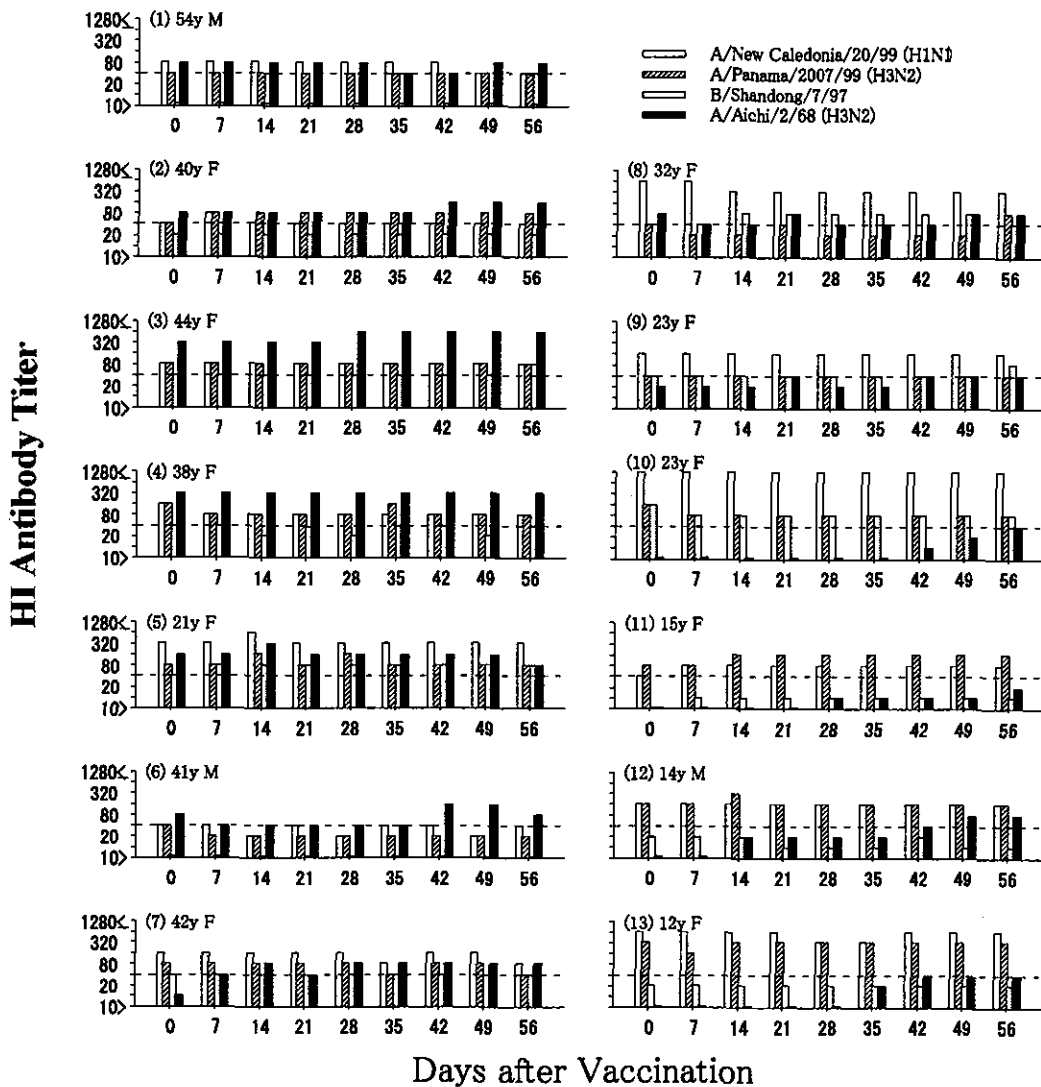


Figure 1. Kinetics of HI antibody titer directed against homologous and heterologous influenza virus antigen in subjects inoculated with nasal inactivated whole virion influenza vaccine. Immunization was performed on the day of the first (day 0) sampling and 4 weeks after the first vaccination (day 28). Nine consecutive blood specimens were obtained once a week. Abscissa represents weeks after vaccination and ordinate the HI titer. The horizontal broken line defines the point of 1:40 in HI titer.

(3) 特異的リンパ球増殖反応の推移 (Figure 3)

今回は heterologous な抗原である A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/Panama/2007/99 (H3N2), B/Shandong/7/97 に対する反応のみが検出可能であった。

A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/Panama/2007/99 (H3N2) に対する反応では、全 13 例中 7 例 (症例 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10) が接種前検体で陽性反応を認め、接種 1 週後の検体では活性が低下し、2 週後にピークとなり、その後徐々に減弱した。4 例では (症例 7, 11, 12, 13) 接種前検体の活性は低く、接種後徐々に上昇し 2 週後にピークとなった。これら 11 例における 2 回目の接種に対する反応のピークは初回接種に比してやや遅く観察された。他の 2 例 (症例 1, 2) では、接種前に陽性であったが、接種後遅くに高い反応を呈するに至った。

B/Shandong/7/97 に対しては初回免疫、および追加免疫後に高い反応を呈した。

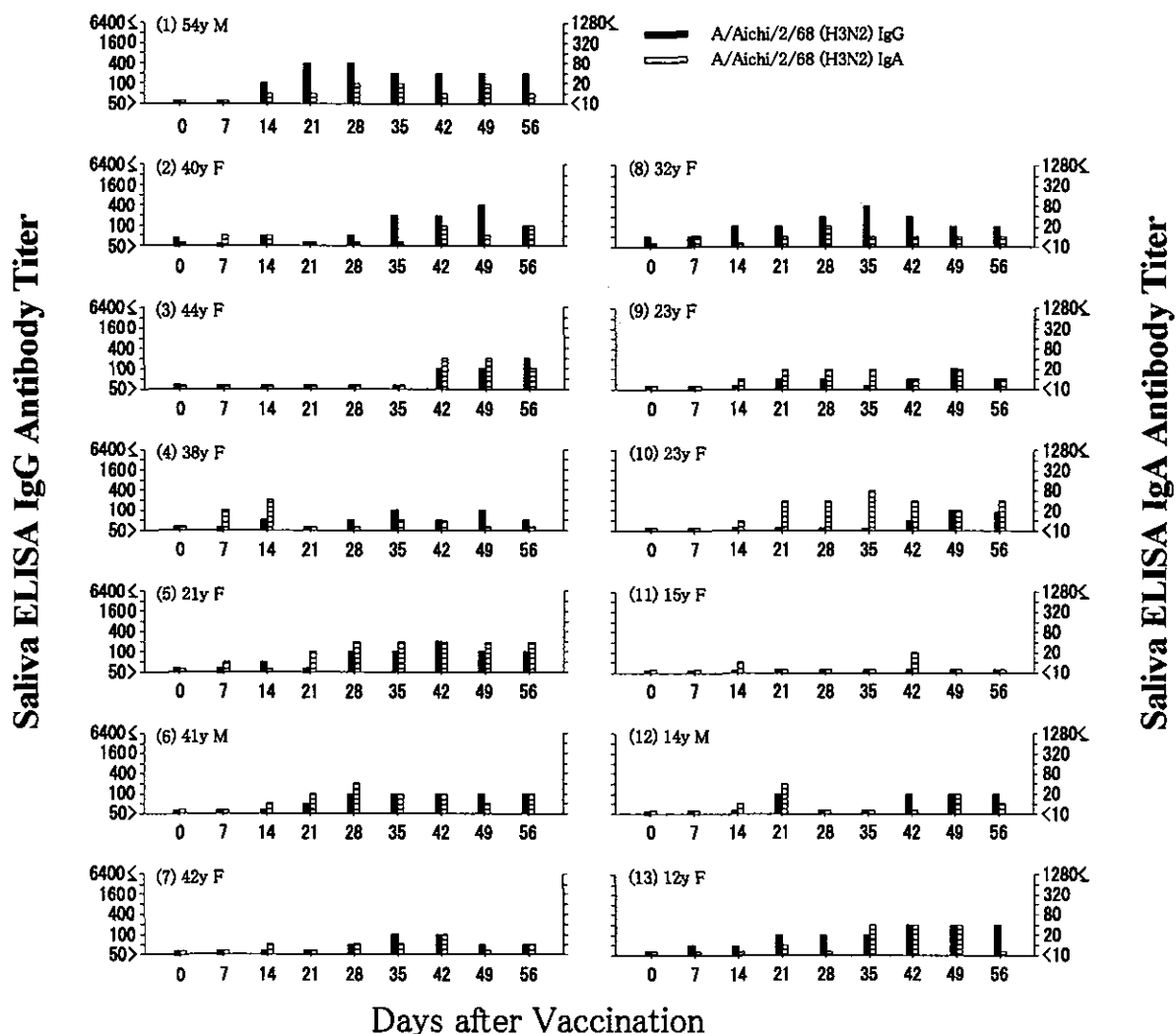


Figure 2. Kinetics of saliva ELISA IgG and IgA antibody titer directed against homologous influenza virus antigen (A/Aichi/2/68(H3N2)) in subjects inoculated with nasal inactivated whole virion influenza vaccine. Immunization was performed on the day of the first (day 0) sampling and 4 weeks after the first vaccination (day 28). Nine consecutive saliva specimens were obtained once a week. Abscissa represents weeks after vaccination and ordinate the ELISA IgG (left axis) and IgA (right axis) titer.

4. 考 按

今回の研究は、現行の不活化インフルエンザ HA ワクチンの効果にやや悲観的な観点からそれを replace し得るワクチン候補である経鼻不活化 influenza whole virion を用いたヒトでの pilot study である。目的は経鼻投与不活化 influenza whole virion が immunogen として homosubtypic のみならず hetero-subtypic な免疫を人において誘導し得るか否かについての検討である。

粘膜ワクチンには十分な免疫原性を担保するため adjuvant との併用が必要である場合が多いという課題がある。しかしながら、インフルエンザウイルスのフォルマリン不活化 intact virion 自体に adjuvant 活性があるという報告もあり⁷⁾、今回著者らは adjuvant 無添加の高度濃縮不活化 virion を immunogen として用いた。

動物を用いたワクチン投与実験であれば lethal challenge 後の生残数をもって outcome とすることが出来るが、人の場合は野外試験での罹患率・軽症化効果の観察、または接種前後の laboratory markers の比較によりワクチン効果を検定することとなる。しかしながら粘膜免疫については臨床の場で用いることが出来る assay 系に大きな限界がある。免疫ルートが粘膜である場合は最も強い免疫応答は粘

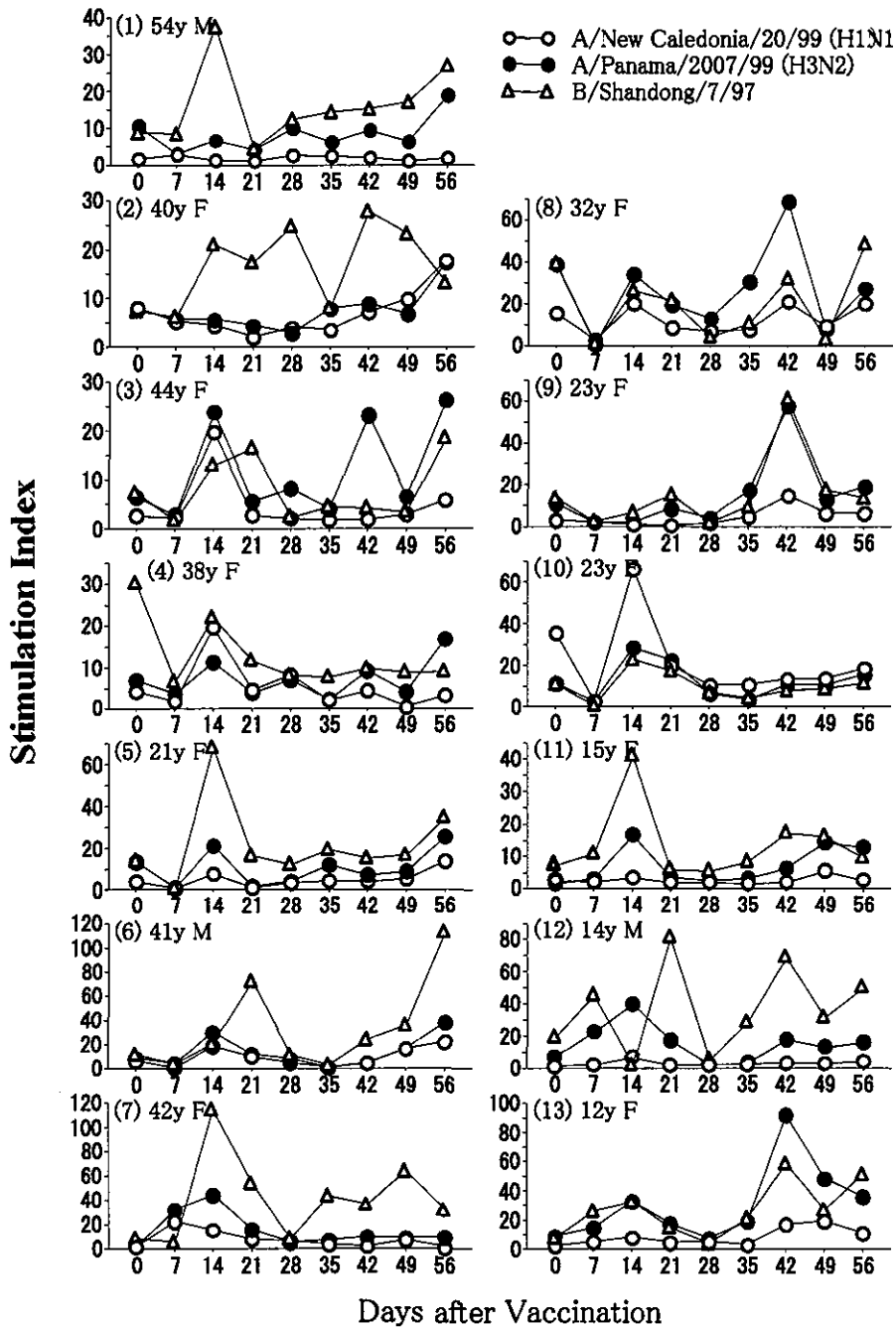


Figure 3. Kinetics of lymphoproliferative response expressed as stimulation indices directed against heterologous influenza virus antigen in subjects inoculated with nasal inactivated whole virion influenza vaccine. Immunization was performed on the day of the first (day 0) sampling and 4 weeks after the first vaccination (day 28). Nine consecutive blood specimens were obtained once a week. Abscissa represents days after vaccination and ordinate the stimulation index.

膜に起こることから、systemic immunity レベルで粘膜免疫ワクチンの評価をすることは必ずしも適当ではないし、血清抗体価に変動が無いあるいは低値であっても粘膜免疫刺激が不十分であるとは必ずしも言えない^{8,9)}。しかしながら、経鼻免疫は systemic immune system をも刺激する最も効率的な免疫ルートであることもまた知られており、systemic compartment の免疫の動態を検討する意味は存在する。得られた血清 HI 抗体価および唾液 IgA 抗体価の推移より液性免疫のレベルでは homotypic な免疫が

誘導されたことは確認されたが、heterosubtypic immunity が誘導された明らかな証拠は得られなかった。接種前検体ですでに heterosubtypic な抗原に対する抗体価が十分高かったため booster response (としての heterosubtypic immunity) が誘導されなかった可能性もあり³⁾、確定的な結論を下すことは困難である。一方、細胞性免疫反応においては追加免疫効果と思われる活性の経時的推移を観察し得た。

Influenza A 亜型間ではリンパ球増殖反応試験で交差免疫応答が見られることはすでに知られており予想された結果であるが、B/Shandong/7/97 に対する反応は説明が困難である。A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/Panama/2007/99 (H3N2) に対する反応より高い S.I. 値が得られたことから、以前にも報告したような非特異的反応が観察された可能性も否定出来ない³⁾。一方で多量の抗原を附加したときには A, B 間の型特異性も乗り越えることもあることが知られているが、今回の投与抗原量が特段に大量であったわけではなく、結果をそのメカニズムで説明するのは楽観が過ぎよう。

heterosubtypic immunity をもたらず mediator あるいはメカニズムが確定していないため、現在検索し得る immunological parameter の陰性結果のみをもって heterosubtypic immunity が成立していないとは必ずしも言えない。HLA-Class I 拘束性インフルエンザ抗原特異的細胞障害性リンパ球(CTL) 活性は有力な防御機構であるが人の臨床検体を対象とした実施が比較的容易な検出法は知られていない。CTL 活性は亜型間で共通のウイルスの内部抗原を target としており交差免疫をもたらず機構として有力であるが、そのみで十分に強力なメカニズムであれば一度のインフルエンザウイルス感染で交差免疫が誘導されるはずであり現実に起こっていることを十分に説明出来ない。高田らが誘導した交差免疫は粘膜 IgA 活性に依存していたが、興味深いことにその IgA 抗体は交差中和活性を示さなかった⁴⁾。これに関連して IgA が細胞内で新たに合成されたウイルスタンパクを中和する intracellular neutralization のメカニズムに関する成績も蓄積しつつある¹⁰⁻¹⁴⁾。しかしながら、臨床検体中の IgA について細胞内中和活性を測定する assay 系は存在しない。

このような観点から現時点での粘膜ワクチンの人への応用はそれによってもたらされる可能性のある交差免疫について surrogate な laboratory marker が無いまま進めざるを得ない状況である。粘膜分泌液中の IgA を当面は指標として、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ろう。

(謝 辞)

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. Charatan, F. Widespread flu in United States exposes shortage of vaccine. *Bmj* 2004;328:8.
2. Hilleman, M.R. Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine* 2002;20:3068-87.
3. Kumagai, T., Nagai, K., Okui, T. et al. Poor immune responses to influenza vaccination in infants. *Vaccine* 2004;22:3404-10.
4. Takada, A., Matsushita, S., Ninomiya, A., Kawaoka, Y. & Kida, H. Intranasal immunization with formalin-inactivated virus vaccine induces a broad spectrum of heterosubtypic immunity against influenza A virus infection in mice. *Vaccine* 2003;21:3212-8.
5. Heinen, P.P., de Boer-Luijtz, E.A. & Bianchi, A.T. Respiratory and systemic humoral and cellular immune responses of pigs to a heterosubtypic influenza A virus infection. *J Gen Virol* 2001;82:2697-707.
6. Okamoto, S., Kawabata, S., Fujitaka, H., Uehira, T., Okuno, Y. & Hamada, S. Vaccination with formalin-inactivated influenza vaccine protects mice against lethal influenza *Streptococcus pyogenes* superinfection. *Vaccine* 2004;22:2887-93.
7. Kang, S.M., Guo, L., Yao, Q., Skountzou, I. & Compans, R.W. Intranasal immunization with inactivated influenza virus enhances immune responses to coadministered simian-human immunodeficiency virus-like particle antigens. *J Virol* 2004;78:9624-32.
8. Kasel, J.A., Fulk, R.V., Togo, Y. et al. Influenza antibody in human respiratory secretions after subcutaneous or respiratory immunization with inactivated virus. *Nature* 1968;218:594-5.