

Figure 3. Nucleotide plot-similarity analysis across sixteen genomic sequences. It was generated using the Plotsimilarity program in the GCG software package. A 10-nt window was used to screen the genomes and the similarity score within each window was plotted on the y-axis.

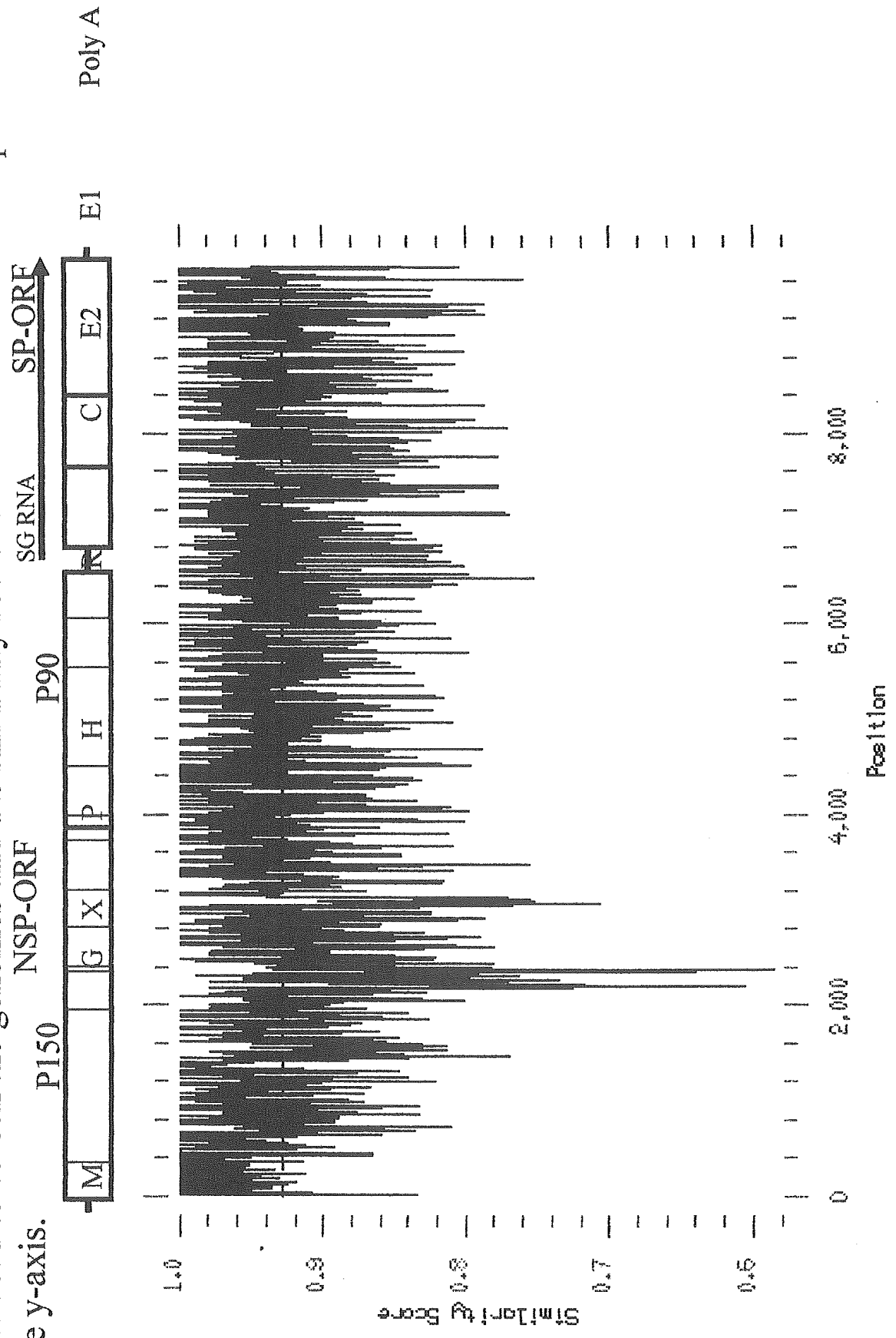
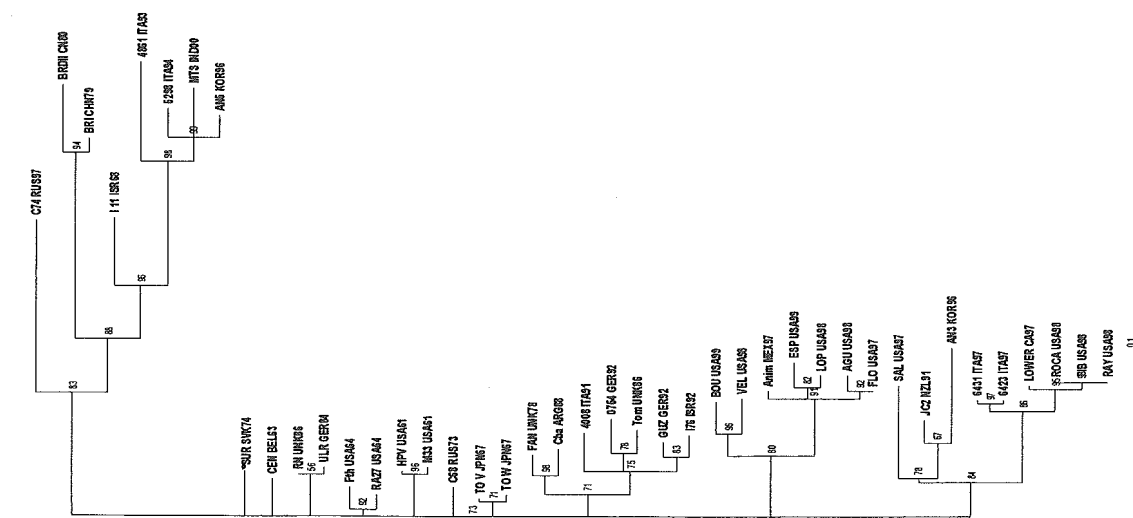
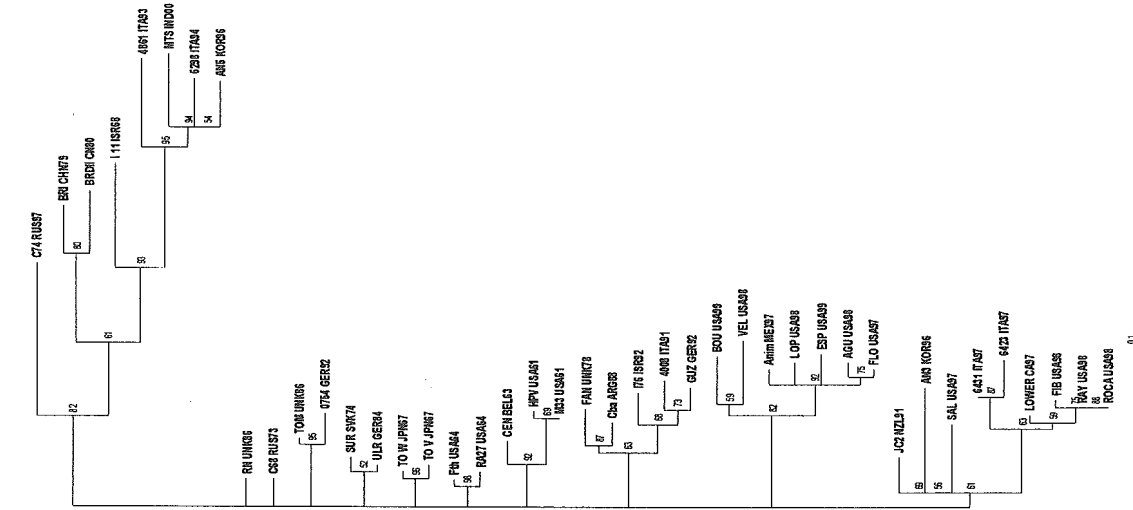


Figure 4. Phylogenetic analysis of the NS protease, SG promoter and E1 regions, SG promoter and E1 regions. The phylogenetic trees were built with the nonstructural protease sequences (nts 3035-3973), sub-genomic promoter region sequences (6351-6829) and E1 sequences (8731-9469) of 42 viruses by tree-puzzle program (version 5.2) with 50,000 puzzle step. Numbers indicated the reliability values for each grouping.

NPS_6351-6829_42s



SGP_6351-6829_42s



E1_8731-9469_42s

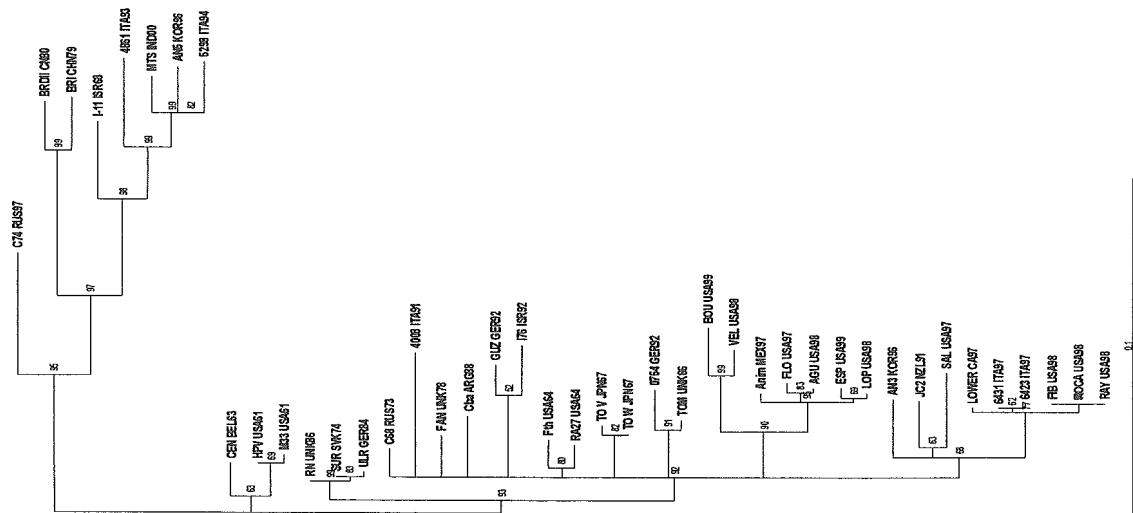


Figure 5. Western blot assay of two genetic clades virion proteins. Virions of six of clade1 (Fth, M33, RA27, Cba, 6423 and Anima) and three of clade2 (I-11, Anam5 and C74) strains were purified and subjected on 10% SDS-polyacrylamide gel and probed with Mabs against the three rubella virus structural proteins.

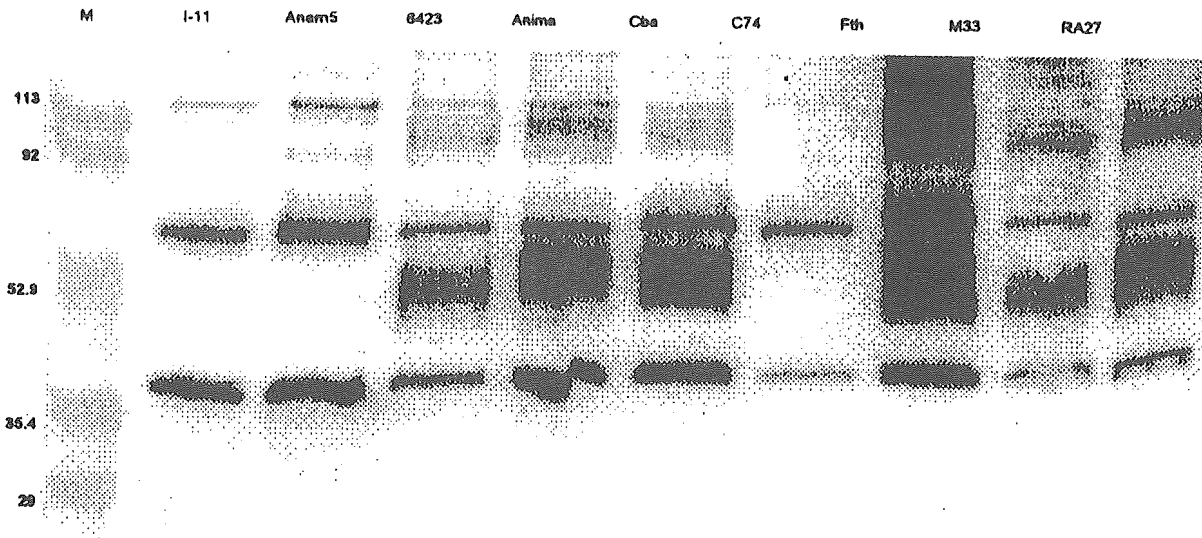


Table 1. Comparison of differences in the nucleotide sequences of six genotypes with RV1A genotypes consensus. Percentage was shown.

Strains	Genotypes	GC	Difference	5'-UTR	NSP-ORF			J-UTR	SP-ORF				3'-UTR
					NSP	P150	P90		SP	C	E2	E1	
Cba_ARG88	RV1B	69.62	3.5	10	3.2	3.5	2.7	5	3.9	3.7	4.5	3.8	5.1
Anima_MEX97	RV1C	70.03	4.6	5	4.2	4.5	3.8	6.7	5.1	5.7	6	4.3	10.1
6423_ITA97	RV1E	69.67	4.5	7.5	4.2	4	4.4	4.2	5.3	5.1	6.4	4.7	5.1
Anam5_KOR96	RV2A	69.6	8.4	5	8.4	8.4	8.3	10.1	8.5	8.8	9.3	7.7	8.5
I-11_ISR68	RV2A	69.21	7.7	10	7.2	7.7	6.4	9.2	8.4	7.8	9.8	7.9	11.9
C74_RUS97	RV2C	69.34	6.7	7.5	6.5	6.6	6.5	9.2	6.9	6.3	7.8	6.7	3.4
BRI_CHN79*	RV2B	69.42	7.9	12.5	7.5	7.8	7	11.7	8.6	7.3	10	8.5	11.9
Anam5 vs I-11	RV2A	.	5.4	10	5.3	5.4	5.2	5.8	5.5	5.8	6.5	4.7	6.8

Table 2. Pairwise genetic distances and observed distances among sixteen genomes. The genetic distance was estimated by tree-puzzle program (version 5.2) with setting of TN93 substitution model. The observed distance was computed by Old distance program in the GCG software package.

Genotypes	TO-V	TO-W	TO-Y	CEN	M33	RV1A	ULR	SUR	RA27	Fth	CB4	APM	S423	RV2C	L-11	AN5	BR1	BRD1
TO-W_JAP67	0.0022	0.02134	0.02981	0.02134	0.02981	0.02141	0.02234	0.0146	0.01803	0.02808	0.04292	0.04143	0.09065	0.11261	0.13167	0.1216	0.13205	
TO-V_JAP67	0.0193	0.02199	0.0305	0.02205	0.02299	0.0152	0.01865	0.02822	0.03161	0.05	0.04798	0.08516	0.10793	0.12613	0.11579	0.12519	0.13198	
CEN_BEL33	0.0259	0.0264	0.0181	0.02768	0.02346	0.0259	0.03274	0.04162	0.03311	0.05115	0.04928	0.0913	0.11118	0.13312	0.12031	0.12804	0.13111	
M33_USA61	0.0199	0.0204	0.0197	0.0208	0.0367	0.02134	0.02464	0.03516	0.05137	0.04932	0.09354	0.11279	0.13298	0.13525	0.12625	0.13457	0.14272	
ULR_CER84	0.0135	0.014	0.0162	0.0259	0.0176	0.0191	0.01052	0.02498	0.02427	0.05141	0.05151	0.05141	0.1023	0.12161	0.13864	0.13231	0.14272	
RA27_USA64	0.0164	0.0169	0.026	0.026	0.0217	0.0099	0.02201	0.022	0.0343	0.0406	0.0406	0.05756	0.11867	0.13766	0.15434	0.1455	0.15261	
CB4_ARG88	0.0348	0.0353	0.0398	0.0442	0.04	0.04	0.0323	0.0343	0.0351	0.0406	0.0406	0.0504	0.11144	0.13336	0.14965	0.13654	0.14759	
APM_MEX97	0.0627	0.0628	0.06	0.0637	0.0624	0.0641	0.0653	0.068	0.0747	0.0719	0.0719	0.10583	0.12562	0.11759	0.12472	0.12472	0.12472	
S423_ITA97	0.0726	0.0729	0.0708	0.0728	0.0718	0.0712	0.0727	0.0736	0.0812	0.0812	0.0812	0.0695	0.077	0.0538	0.07373	0.10049	0.10443	
C74_RUS97	0.0799	0.0801	0.0788	0.081	0.0805	0.0799	0.0805	0.0821	0.0872	0.0865	0.0865	0.077	0.077	0.0868	0.0759	0.12186	0.12829	
L-11_USR68	0.076	0.0763	0.0738	0.076	0.075	0.0758	0.0767	0.0778	0.0801	0.0801	0.0801	0.0825	0.0747	0.0868	0.0759	0.0759	0.02372	
AN5_MOR96	0.0811	0.0814	0.0785	0.0807	0.0789	0.0799	0.0813	0.0818	0.085	0.085	0.085	0.0874	0.0865	0.0784	0.0793	0.0793	0.02372	
BR1_CHN79																		
BRD1_CNS0																		

Table 3. Summary statistical maximum likelihood parameter estimates of genomes and functional regions. Parameters were estimated with sixteen virus sequences by tree-puzzle program with setting of TN93 substitution model.

Regions	Similarity%	GC%	K	YFR	α	d	Sites	No. of Constant Sites (%)
Full-length	99.8-91.3	69.5	7.4	2.82	0.2	0.079 / 0.002-0.154	9762*	7751(79.4)
NS-ORF	99.8-91.1	70	7.55	2.72	0.2	0.077 / 0.002-0.159	6351	5076(79.9)
P150	98.7-90.7	71.8	6.34	2.44	0.21	0.08 / 0.0026-0.169	3903	3090(79.1)
P90	99.9-91.8	67.2	12.65	3.33	0.19	0.075 / 0.001-0.152	2448	1988(81.2)
MTR	100-94.8	67.4	8.91	2.73	0.2	0.025 / 0-0.068	210	190(90.5)
HVR	99.7-78.8	80.8	4.59	1.71	1.08	0.153 / 0.003-0.372	321	188(57.8)
XDR	99-89.2	74.3	6.44	1.03	0.25	0.093 / 0-0.218	507	386(76.1)
NPSR	98.7-90	72.9	6.07	2.43	0.25	0.077 / 0.003-0.166	900	707(78.6)
HLR	99.8-90.6	68.6	9.64	3.24	0.27	0.068 / 0.004-0.164	756	608(80.4)
RDRPR	100-91.6	66.9	12.74	2.98	0.15	0.08 / 0-0.172	1563	1273(81.4)
SP-ORF	99.8-91	69.3	7.04	3.02	0.23	0.081 / 0.001-0.158	3192	2522(79.0)
C-GENE	99.9-90.6	72.8	7.3	3.8	0.24	0.082 / 0.001-0.187	900	710(78.9)
E2-GENE	100-90	70.9	5.98	2.97	0.32	0.084 / 0-0.162	846	640(75.7)
E1-GENE	99.9-90.8	66.2	7.18	2.64	0.18	0.077 / 0.001-0.153	1448	1172(81.1)
3'CGE	100-91.2	65	11.65	2.99	0.29	0.082 / 0-0.126	307	245(79.8)
NPS*	100-89.5	73	5.65	2.26	0.3	0.072 / 0-0.16	939	671(71.6)
SGP*	100-89.3	69.9	5.15	2.67	0.32	0.073 / 0-0.17	479	336(70.1)
E1*	100-89.4	67.4	6.41	3	0.22	0.077 / 0-0.19	739	547(74)

* 9761 length in RV2A genotype viruses

† Translated sites / Transversion sites

‡ Pyrimidine transitions (T→C) / Purine transitions (A→G)

合成二重鎖 RNA[poly(I:C)]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：インフルエンザワクチンで交叉防御効果が期待される分泌型 IgA を粘膜上に誘導する為にはワクチンの粘膜への投与が不可欠であり、またワクチンと同時にアジュバントの併用が必要である。今回我々は Toll-like receptor(TLR)3 のリガンドとして知られる二重鎖 RNA を経鼻インフルエンザワクチンのアジュバントに用いその分泌型 IgA 及び IgG 抗体誘導能、感染防御能についてマウスのインフルエンザモデルを用いて検討した。Poly(I:C)アジュバントを PR8 (H1N1) ワクチンと共に 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。合成二重鎖 RNA は TLR3 を介し自然免疫を誘導し粘膜免疫を誘導できることがわかった。

【目的と意義】

現行の皮下接種インフルエンザワクチンの場合、ワクチン株に対する IgG が誘導され流行株がワクチン株と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。そこでワクチンの接種ルートを変え交叉防御能を有する粘膜での分泌型 IgA 抗体を誘導する事がより効果的なワクチン開発には必要である。粘膜での分泌型 IgA を誘導するにはワクチンを粘膜に接種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。そこで内因性インターフェロン誘導のために既にヒトへの投与も行われた事があり TLR3 を介して自然免疫を活性化する事が知られている合成二重鎖 RNA, poly(I:C)を用い、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二重鎖 RNA、poly(I:C)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：poly(I:C)、ポリイノシンポリシチジン酸[polyinosinic-polycytidylic acid, poly(I:C)] 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1 μ g とアジュバントとして poly(I:C) 0.1 μ g, 1 μ g, 3 μ g, 10 μ g, 及び熱変性を加えた poly(I:C) 10 μ g 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 1×10^2 PFU のマウス馴化 PR8 ウイルスを片鼻 1.2 μ l 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。さらに IgG のサブクラスを測定した。ウイルス価は MDCK 細胞を用いたブランク法で測定した。

【結果】

抗体応答

Poly(I:C)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 poly(I:C) 1-10 μ g を経鼻接種すると特異的 IgA 及び IgG 応答が見られた。Poly(I:C) 3 μ g 及び 10 μ g では1回接種のみで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。

また熱変性を加えた poly(I:C)をアジュバントとして用いると抗体応答は見られなくなった。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すると 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。Poly(I:C) をアジュバントに用いた時の IgG 抗体のサブタイプを CTB*を用いた時と比較した結果、図2に示すごとく poly(I:C), CTB*共に IgG1, IgG2a ほぼ同量認められた。

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1に示すごとく 10 μ g, 3 μ g, 1 μ g の poly(I:C)と共にワ

クチン接種した群において 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、熱変性を加えた poly(I:C)をアジュバントとした場合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/Ibaraki のそれぞれのワクチンを poly(I:C)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/Ibaraki 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】

合成二重鎖 RNA, poly(I:C)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 poly(I:C)は TLR3 のリガンドとして働き自然免疫を誘導し IgA 応答等の獲得免疫との架け橋として働くと考えられる。

【結論】

現在のインフルエンザワクチンはその効果の点でまだまだ改良の余地がありアジュバント併用経鼻ワクチンが新しいワクチンの候補であると考え。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。安全で効果のあるアジュバントの開発が望まれている状況において今回その粘膜アジュバント作用が示された二重鎖 RNA 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。

論文発表

1. 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.
2. 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*, 2005 Mar;79(5):2910-9.

図 1

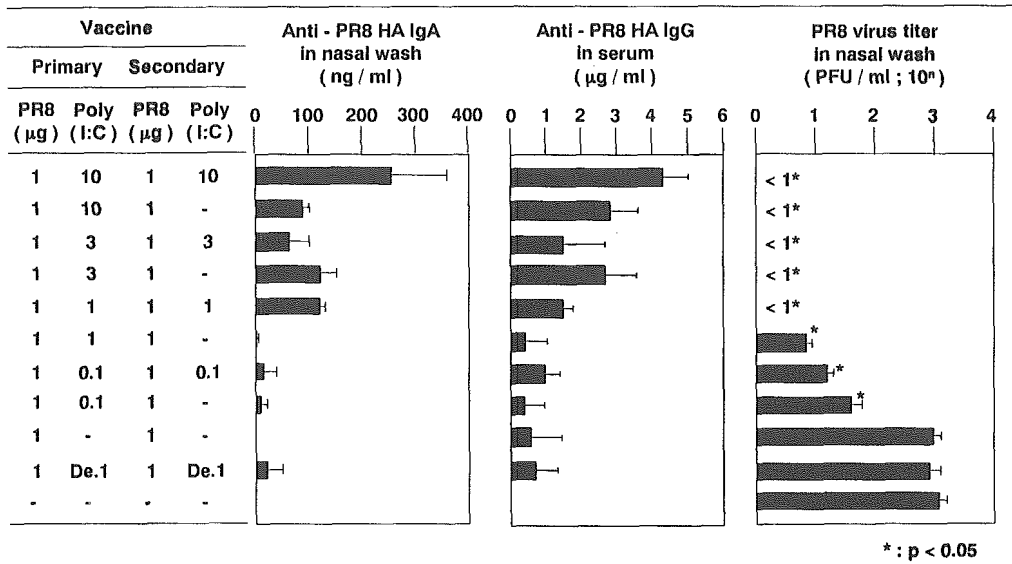
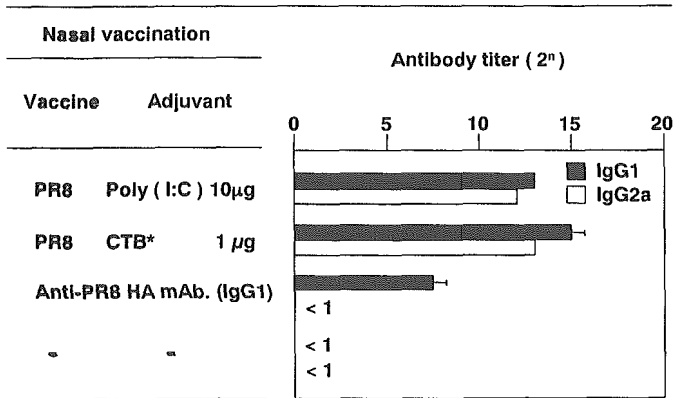


図 2



経気道不活化全粒子インフルエンザワクチン被接種成人および年長児における特異的免疫応答の経時的推移

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

乳幼児に対する有効なインフルエンザワクチン開発は焦眉の課題である。インフルエンザ virion はその構造自体に adjuvant 活性があることが知られ、adjuvant 無添加でも有効な免疫原性を発揮することが期待される。著者らは昨年、経鼻接種高度精製不活化インフルエンザ virion に対する免疫応答を検討し報告したが、今回は delivery route として咽頭・気管を考え吸入による接種を試みそれに対する免疫応答について検討したので報告する。さらに今回は確実な一次免疫応答を検討するため、ワクチン株として通常日本人が感作されていることが考えられない H5 トリインフルエンザ株を使用した。

2. 研究対象と方法

(1)研究対象

成人 9 例（男性 2 名、女性 7 名、22-55 歳、平均年齢 37.8 歳）、年長児 3 例（17、15、14 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(R(Duck/Mongolia/54/01-Duck/Mongolia/47/01)(H5N1)) 500 µg 蛋白をネブライザーを用いて吸入接種し、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 2 週間毎に検体を継続的に採取し合計 5 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ワクチンとして使用した H5N1 株の他に、2004/2005 期のワクチン株ウイルスである A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/Wyoming/3/2003(H3N2), B/Shanghai/361/2002 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。

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も heterologous 抗原として 2004/2005 シーズンの同上のワクチン株および homologous 抗原として R(Duck/Mongolia/54/01-Duck/Mongolia/47/01)(H5N1)を用いた。

(Disclosure document: This H5N1 virus is non-pathogenic to chickens and a reassortant virus generated from non-pathogenic H5N2 and H7N1 viruses in the laboratory of Dr. Kida, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Japan. These H5N2 and H7N1 viruses were isolated from fecal samples of healthy migrating ducks. Viruses were propagated in eggs and concentrated through zonal centrifugation twice. Also, this particular antigen preparation was repeatedly treated with formaldehyde for inactivation and dialyzed against phosphate buffered saline twice. Inactivation was confirmed by inoculation into eggs.)

(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)血清, 唾液 ELISA IgA, IgG 抗体測定¹⁾

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)²⁾

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。

(6)統計学的方法

5 回の検体採取時期間での特異的リンパ球活性の比較は StatFlex ソフトウェアによる nonparametric repeated-measures analysis of variance (Friedman's test)を用い, 続いて post test として Dunn 検定を用いた。また, 血清, 唾液抗体価の推移についても Friedman's test を用いて検討した。

3. 研究結果

(1) 血清 HI 抗体価推移

12 例全ての被接種者においてワクチン接種前検体ですでに A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/Wyoming/3/2003 (H3N2), B/Shanghai/361/2002 抗原に対して \geq 1: 20 to \geq 1: 1280 の範囲の血清 HI 抗体価が観察された。しかしながら, 今回の経粘膜投与ワクチンはこれらの heterologous な抗原に対して接種後, 有意(2 管, 4 倍以上)な HI 抗体の上昇を誘導し得なかった。R(Duck/Mongolia/54/01-Duck/Mongolia/47/01)(H5N1)抗原に対しては全例ワクチン接種前検体で陰性 (<1:10) でワクチン接種後も HI 抗体の誘導は見られなかった。トリインフルエンザ抗原に対する HI 抗体価測定に使用した血球がヒト O 型血球であったことには議論の余地がある。

(2) 血清 ELISA IgG, IgA 抗体価

Table 1 にワクチン接種前後の homologous 抗原 (H5N1) に対する血清 ELISA IgG, IgA 抗体価の推移を示す。4 例で血清 IgG 抗体, 7 例で血清 IgA 抗体の上昇を認めた。Friedman's test により明らかな有意差を認めた。

(3) 唾液中 IgA, IgG 抗体価

Homologous 抗原 (H5N1) に対する唾液中 IgA, IgG 抗体価の推移を Table 2 に示す。被接種者 12 例中 10 例で, 唾液中 IgA, IgG 抗体価の上昇が観察された。同様に, Friedman's test により明らかな有意差を認めた。

Table 1. ワクチン接種後の H5 homologous 抗原に対する血清 ELISA 抗体価推移

被験者	血清 I g G					血清 I g A				
	0d	14d	28d	42d	56d	0d	14d	28d	42d	56d
# 1	<100	<100	<100	<100	<100	<100	100	400	100	400
# 2	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	400
# 3	<100	<100	100	<100	400	<100	<100	<100	<100	100
# 4	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
# 5	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	100
# 6	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
# 7	<100	<100	<100	100	100	<100	<100	<100	<100	<100
# 8	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	100	100
# 9	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	100
# 1 0	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
# 1 1	<100	<100	<100	<100	400	<100	<100	<100	<100	100
# 1 2	<100	<100	<100	<100	100	<100	<100	<100	<100	<100

Table 2. ワクチン接種後の H5 homologous 抗原に対する唾液 ELISA 抗体価推移

被験者	唾液 I g G					唾液 I g A				
	0d	14d	28d	42d	56d	0d	14d	28d	42d	56d
# 1	<4	<4	<4	4	<4	<4	<4	<4	4	<4
# 2	<4	<4	16	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4
# 3	<4	<4	64	64	64	<4	16	16	64	256
# 4	<4	<4	<4	4	<4	<4	<4	<4	16	<4
# 5	<4	<4	<4	4	<4	<4	<4	<4	16	<4
# 6	<4	<4	<4	256	64	<4	<4	4	256	64
# 7	<4	<4	<4	<4	16	<4	<4	<4	<4	16
# 8	<4	16	<4	<4	<4	<4	16	<4	<4	<4
# 9	<4	<4	<4	<4	4	<4	<4	<4	<4	4
# 1 0	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4
# 1 1	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	4
# 1 2	<4	<4	<4	<4	16	<4	16	64	64	256

(4) 唾液中 IgA 抗体の交差反応性についての検討

唾液中 IgA 抗体の交差反応性 (heterosubtypic immunity) について検討するために, homologous (H5N1) 抗原に対して高い反応性を示した被接種者 6, 12 について heterologous な H1, H3, B に対する ELISA IgA 抗体価を測定した (Table 3). Heterosubtypic な H1, H3 抗原に対してばかりでなく, heterotypic な influenza B 抗原に対しても高い抗体価の誘導が観察された。

Table 3. 唾液 IgA 抗体価 (交差反応性)

被験者	ELISA抗原	唾液 I g A				
		0d	14d	28d	42d	56d
# 6	H5N1	<4	<4	4	256	64
	H1N1	<4	<4	16	1024	1024
	H3N2	<4	<4	<4	256	256
	B	<4	<4	64	1024	256
# 1 2	H5N1	<4	16	64	64	256
	H1N1	<4	64	256	256	1024
	H3N2	<4	<4	16	<4	256
	B	<4	<4	16	16	256

(5) 特異的リンパ球増殖反応の推移 (Figure)

接種前検体ですでに H1, H3, B ばかりでなく, immunological に naïve な抗原である H5N1 に対しても比較的高い特異的リンパ球活性が検出された. 接種 2 週後の検体ではやや特異的リンパ球活性が低下する傾向を見せた後, 4, 6, 8 週目検体では高値を示した. Friedman 検定では全ての抗原に対してリンパ球活性が dynamic に変化していることが示され (全ての抗原に対して $P < 0.0001$), post test としての Dunn 検定 (多重比較法, Q'表を用いた第 1 列対照群との比較) では Table 4 に表した如く, H1, H3 抗原に対しては第 6 週の検体が, B, H5 抗原に対しては第 6 ないし 8 週の検体がピークを示していた.

4. 考 按

今回の研究は昨年の報告に引き続いて行った, 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不活化 influenza whole virion を用いたヒトでの pilot study である.

血清 HI 抗体価が全く誘導されなかったが, トリインフルエンザと現在ヒトに流行を起こしているインフルエンザウイルスは receptor 親和性に違いがあり, トリインフルエンザについては馬血球を用いた HI 抗体価測定が必要であるという報告があり, 現在検討中である³⁾. 昨年の報告にも述べたが, 免疫ルートが粘膜である場合は最も強い免疫応答は粘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^{4,5)}. しかしながら, 粘膜免疫は systemic immune system をも刺激する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. 昨年と異なり, 今般の結果では一部の被接種者とはいえ血清 ELISA IgG, IgA 抗体が少なくとも homologous な H5N1 抗原に対しては誘導されたことは注目に値すると思われる.

唾液 ELISA IgA, IgG についてはいずれも 12 例中 10 例で homologous H5N1 抗原に対して陽性反応が検出され, 今回の免疫ルートが少なくとも粘膜免疫について一次抗体応答反応を効率的に誘導できる可能性を強く示唆した成績であった. さらに注目すべき点は, 今回の免疫方法で heterosubtypic ばかりでなく heterotypic な唾液 IgA 抗体が誘導されたことを示す成績が得られたことである. これは今回

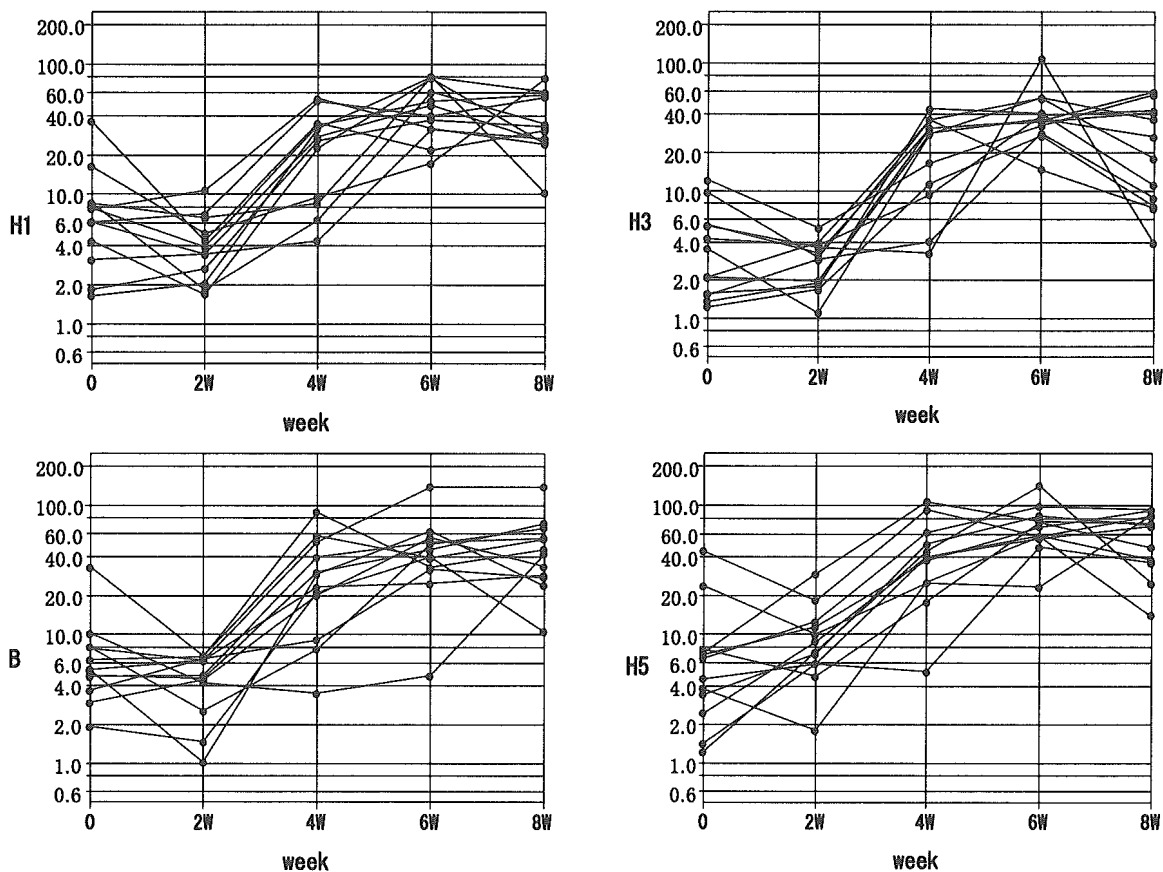


Figure. Kinetics of lymphoproliferative response expressed as stimulation indices directed against heterologous (H1,H3,B) as well as homologous (H5N1) influenza virus antigen in subjects inoculated intrabronchially with inactivated whole virion influenza vaccine. Immunization was performed on the day of the first (day 0) sampling and 4 weeks after the first vaccination (day 28). Five consecutive blood specimens were obtained biweekly. Abscissa represents weeks after vaccination and ordinate the stimulation index (log-transformed).

Table 4. Dunn's test for LPT

	pre	2w	4w	6w	8w
H1	***	n.s.	n.s.	P<0.002	P<0.02
H3	***	n.s.	P<0.05	P<0.001	P<0.01
B	***	n.s.	n.s.	P<0.001	P<0.001
H5	***	n.s.	P<0.005	P<0.001	P<0.001

の免疫方法が、連年にわたって drift する influenza 抗原に合わせたワクチン株選択・変更を余儀なくされてきた今までの不活化ワクチンの限界を打ち破る可能性を示唆している。

これらの観点から、血清ならびに唾液の中和抗体活性、特に交差免疫を示した唾液検体の検討には大きな興味を持たれるが、現在鋭意進行中である。さらに、昨年報告でも述べた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にも拘わらず、その IgA 抗体は交差中和活性を示さなかった事実と関連して⁶⁾、粘膜 IgA については intracellular neutralization のメカニズムを含むさらなる検討が必要であろう⁷⁻¹¹⁾。

細胞性免疫反応については、接種前検体ですでに H1, H3, B ばかりでなく、immunological に naïve

な抗原である H5N1 に対しても比較的高い特異的リンパ球活性が検出された。Influenza A 亜型間では少なくともリンパ球増殖反応は cross reactivity を示すことが知られているので驚くべきことではない。しかしながら、booster response で有るはずの H1, H3 抗原に対しても peak response が第 4 から第 8 週に見られたことは、細胞性免疫の観点からはワクチン接種は 2 回必要であることを示唆している可能性がある。Influenza B 抗原に対しても、booster response が見られたことは唾液 IgA 抗体に heterotypic に B 抗原に対する交差免疫応答が見られたことと関連して興味を持たれる。経時推移に関して、第 2 週に接種前値に比してややリンパ球活性の低下が見られたが、これは検体が末梢血であり、systemic compartment で有ることから他の immunological compartment との間における活性リンパ球の re-distribution を観察した可能性があると考えた。

今後の課題として、インフルエンザウイルス抗原 peptides を用いた 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) 活性を検討するための ELISPOT assay system を構築し、自然感染との比較が可能になった後に、現在凍結保存中のリンパ球における CTL 活性を検討する予定である。この CTL assay system はこれから開発されるインフルエンザワクチンの monitoring system としても利用可能であることから鋭意努力中である。

インフルエンザは先にも述べたように、毎年のように drift を繰り返し、自然感染を経過しても次の年にはまた感染を繰り返す可能性がある。この事実は、インフルエンザワクチン開発においては、従来のワクチンで試みられてきた出来るだけ自然感染に近い免疫を付与しようとする態度では不十分であることを示している。態様はやや異なるが、HIV, hepatitis C virus, human papillomavirus などは初感染は極めて軽度あるいは無症状に経過して慢性感染に移行し、長期間の後に重大な結果をもたらすことから、self-limiting な感染症と異なったワクチン開発態度、すなわち自然感染で得られる以上の免疫を付与するワクチンが必要と考えられる様になった¹²⁾。インフルエンザは self-limiting な疾患ではあるがその burden があまりにも大きいことからやはり自然感染とは異なる免疫を付与するワクチン開発をしようとする発想の転換が必要であろう¹³⁾。著者らは、一つのワクチン株で universal な免疫をもたらすワクチンを目指す態度が今こそ求められていると考えている。

(謝 辞)

血清 HI 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. 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.
2. Kumagai T, Nagai K, Okui T, Tsutsumi H, Nagata N, Yano S, et al. Poor immune responses to influenza vaccination in infants. *Vaccine* 2004;22:3404-10.
3. Stephenson I, Wood JM, Nicholson KG, Charlett A, Zambon MC. Detection of anti-H5 responses in human sera by HI using horse erythrocytes following MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 vaccine. *Virus Res* 2004;103:91-5.
4. Kasel JA, Fulk RV, Togo Y, Hornick RB, Heiner GG, Dawkins AT, Jr., et al. Influenza antibody in human respiratory secretions after subcutaneous or respiratory immunization with inactivated virus. *Nature* 1968;218:594-5.
5. Zahradnik JM, Kasel JA, Martin RR, Six HR, Cate TR. Immune responses in serum and respiratory secretions following vaccination with a live cold-recombinant (CR35) and inactivated A/USSR/77 (H1N1) influenza virus vaccine. *J Med Virol* 1983;11:277-85.
6. 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.
7. Armstrong SJ, Dimmock NJ. Neutralization of influenza virus by low concentrations of hemagglutinin-specific polymeric immunoglobulin A inhibits viral fusion activity, but activation of the ribonucleoprotein is also inhibited. *J Virol* 1992;66:3823-32.
8. Mazanec MB, Kaetzel CS, Lamm ME, Fletcher D, Nedrud JG. Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin A antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:6901-5.

- antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:6901-5.
9. Mazanec MB, Coudret CL, Fletcher DR. Intracellular neutralization of influenza virus by immunoglobulin A anti-hemagglutinin monoclonal antibodies. *J Virol* 1995;69:1339-43.
 10. Fujioka H, Emancipator SN, Aikawa M, Huang DS, Blatnik F, Karban T, et al. Immunocytochemical colocalization of specific immunoglobulin A with sendai virus protein in infected polarized epithelium. *J Exp Med* 1998;188:1223-9.
 11. Feng N, Lawton JA, Gilbert J, Kuklin N, Vo P, Prasad BV, et al. Inhibition of rotavirus replication by a non-neutralizing, rotavirus VP6-specific IgA mAb. *J Clin Invest* 2002;109:1203-13.
 12. Berzofsky JA, Ahlers JD, Janik J, Morris J, Oh S, Terabe M, et al. Progress on new vaccine strategies against chronic viral infections. *J Clin Invest* 2004;114:450-62.
 13. Casseti MC, Couch R, Wood J, Pervikov Y. Report of meeting on the development of influenza vaccines with broad spectrum and long-lasting immune responses, World Health organization, Geneva, Switzerland, 26-27 February 2004. *Vaccine* 2005;23:1529-33.

沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン (DTaP) 局所反応原性評価モデル

片岡 紀代、山本 明彦、永田 典代、落合 雅樹、豊泉 裕美
高橋 元秀、荒川 宜親、倉田 毅、堀内 善信 (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問題となっている。昨年度ウサギ背部皮内での炎症を指標に、海外の DTaP ワクチンと国産ワクチンで局所反応性に著明な差のみられることを報告した。特に臨床評価では病理組織学的評価は不可能であることから、信頼性の高い局所反応原性評価には動物モデルが必要である。しかし動物試験結果は、常に臨床反応との対応が問題となる。今回、国産の DTaP および海外の DTaP ワクチンを用いて、ワクチンの局所反応原性の比較、評価を行うためのモデルを開発したので報告する。

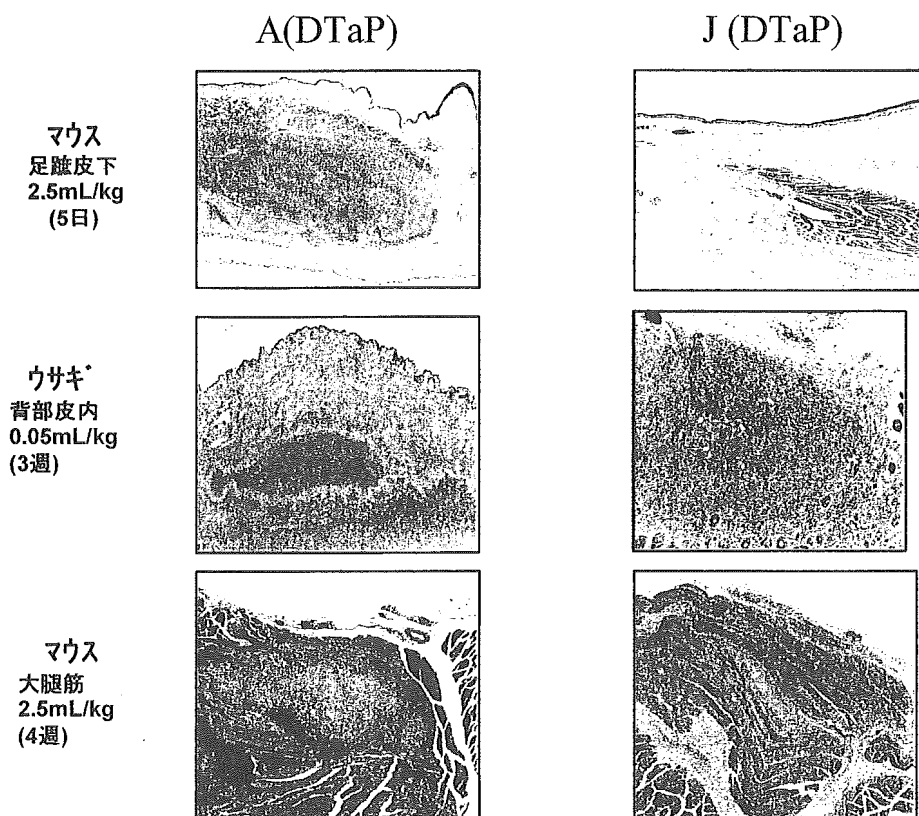
【材料と方法】

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、DTaP の毒性試験を行った。局所反応原性を比較、検討するため、マウス足蹠皮下、ウサギ背部皮内およびマウス大腿筋にワクチンをそれぞれ 0.05ml、0.1ml または 0.05ml 接種し、経日的に肥厚あるいは炎症を観察した。さらにそれぞれ接種 5 日、21 日あるいは 28 日目に接種局所を採取、病理組織学的検討を行った。

【結果】 海外の DTaP について国内基準による毒性試験を行ったところ、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、国産ワクチンに比べ強いマウス体重減少活性が認められた。昨年度ウサギ背部皮内にワクチン 0.1ml (0.04 ml/kg) を接種して比較し、海外のワクチンでは国産ワクチンに比べて明らかに強い硬結の長期に亘る残存を認め、病理組織学的解析の結果、接種部周囲に国産ワクチンではみられない好酸球の細胞浸潤および急性期における組織の壊死を伴う強い炎症を惹起する事を報告した。こうした海外および国産ワクチンの違いがウサギ皮内に特異的か、他の動物や部位でも普遍的にみられるワクチンの性状差であるかを確認するため、これらのワクチンをさらにマウス足蹠皮下およびマウス大腿筋に接種して比較した。マウス足蹠にワクチン 0.05ml (2.5 ml/kg) を接種した場合、ウサギ同様、日本のワクチンに比べて海外のワクチン接種マウスで強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、海外ワクチンの場合、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、国産ワクチンの場合接種物の沈着は見られず、軽度の炎症性細胞反応を認めるのみであった。海外では DTaP は多くの場合筋肉内に接種されている。そこでマウス大腿部筋肉内にワクチンを 0.05ml (2.5 ml/kg) 接種し、経日的に大腿筋接種部位の肉眼的観察を行うとともに病理組織学的解析を行った。肉眼的には筋膜

を通して接種物の沈着が観察されるが、日を追って接種したワクチン間に違いが認められるようになる。それに応じて病理組織学的にもワクチンによる炎症像の違いが顕著になる。

すなわち、海外と国産の DTaP の局所反応性を動物で比較したところ、図に示すように動物種(ウサギ、マウス)、接種量(2.5 ml/kg、0.04 ml/kg)および接種部位(足蹠皮下、背部皮内、大腿筋)によらず、一貫して同様な差が認められた。従って、こうした炎症像の差は特定の動物モデルでの現象というより用いたワクチンの性状の違いを反映している可能性が高く、人においても同様の接種局所における反応の違いが認められる可能性が高い。



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。疾病による重篤な被害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。今回 DTaP の局所反応原性について、動物種、接種量および接種部位を変えて2種類の同種ワクチンを比較した。こうした比較により、病理組織学的に一貫して炎症像の差が見られた場合、比較したワクチン自体の局所反応原性の違いということになり、その違いは人においても見られる可能性が否定できなくなる。また新規ワクチンについて、今回のようなワクチンの違いが観察できる条件下で、既存の最も安全なワクチンと同等性が確認されることを臨床試験の許可条件とすることで、一旦実現した安全性が以降のワクチンで一貫して保持されることになる。また臨床的には不可能な詳細な安全性評価ができることから、臨床試験で新たな問題が見いだされない限り、従来に比べ高度の安全性確認がされることになる。また臨床的に確認の必要な内容も軽減できる可能性が考えられる。

DTaP 三種混合ワクチン接種後の Th1/Th2 反応

勝田 友博、本庄 綾子、立山 悟志
長岡 千春、徳竹 忠臣、有本 寛、
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〕

近年、百日咳感染防御には液性免疫のみならず、細胞性免疫の重要性が指摘されている。現在わが国で使用されている acellular pertussis vaccine を含むDTaP三種混合ワクチン接種後の百日咳に対する免疫応答のメカニズムをTh1/Th2反応の面から検討した。

〔方法〕

BALB/cマウス(6週齢)をDTaP接種群とコントロール群(生理食塩水接種)にわけ、大腿内側に4週間隔で計2回0.1mlを筋注した。2回接種4週後、脾臓よりリンパ球を分離し非特異的刺激としてPHA、百日咳特異的刺激としてPT、FHA、及びDTaP自体と共に37℃、5% CO₂にて培養し、72時間後に培養上清を採取しIFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10をELISA、フローサイトメーターにて測定した。

〔結果〕

刺激物質別に評価した場合、DTaP接種群に対して、DTaP自体で刺激をした群においてTh2系サイトカイン(IL-4、IL-5、IL-10)分泌増加を認めた。DTaP接種群においては、PT、FHA単独刺激群においても、DTaP直接刺激にはやや劣るがTh2系サイトカイン分泌増加傾向を認めた。逆に、それらの群においては、Th1系サイトカイン(IFN- γ 、IL-2)の分泌は、並存は認めたが、抑制傾向を示した。

PHAによる非特異的刺激においては、DTaP接種群のみならず生理食塩水接種群を含んだ全ての群で著明な各種サイトカイン分泌を確認した。

〔結語〕

一般的には、Th1反応とTh2反応は相互抑制作用を認める。過去の報告では、DTwP接種、及び百日咳自然罹患後はTh1反応すなわち細胞性免疫反応、DTaP接種後はTh2反応すなわち液性免疫反応を示すとされている。

DTaP接種によるTh2反応(液性免疫)誘導という結果は、細菌である百日咳感染においては一見有利であり、実際今日、本邦で使用されているDTaPの疾病予防効果は十分確認され、副反応の面でも、局所反応はやや強いもののPwで認められた発熱、ショック、脳症といった重篤な症状はほとんど認められなくなった。

しかし、実際の百日咳自然罹患後はTh1反応が優位であり、また近年の報告よると百日咳は細胞内寄生菌であり、その感染防御におけるTh1反応(細胞性免疫)の重要性も無視できない。

今回の実験結果においては、DTaP接種は、液性免疫(Th2反応)を優位に誘導し、同時に若干のTh1反応も並存している可能性を示唆する。

尚、データに関しては、現在統計処理中であり、現時点では有意差を確認できていないが、近日中にご報告させていただく予定である。

Figure1.各種刺激におけるIFN- γ 分泌(フローサイトメーター)

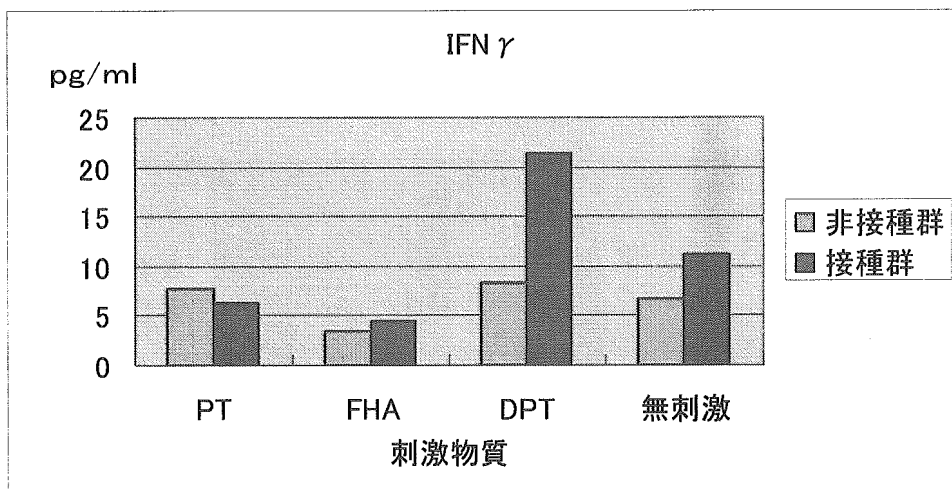


Figure2. 各種刺激におけるIL-2分泌(ELISA)

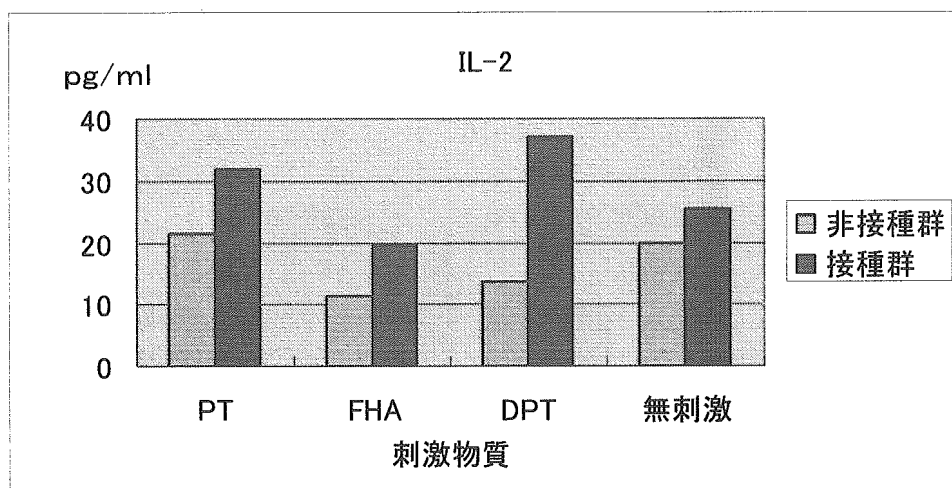


Figure3. 各種刺激におけるIL-4分泌(ELISA)

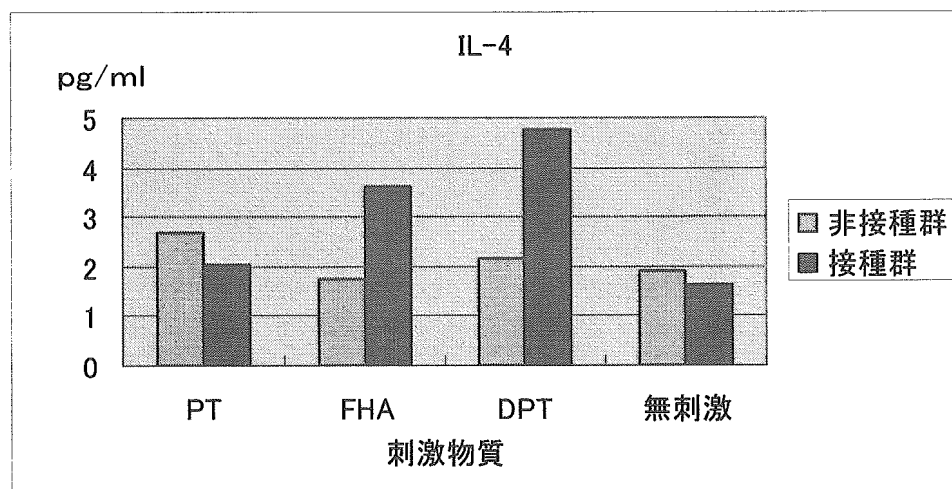


Figure4. 各種刺激におけるIL-5分泌(フローサイトメーター)

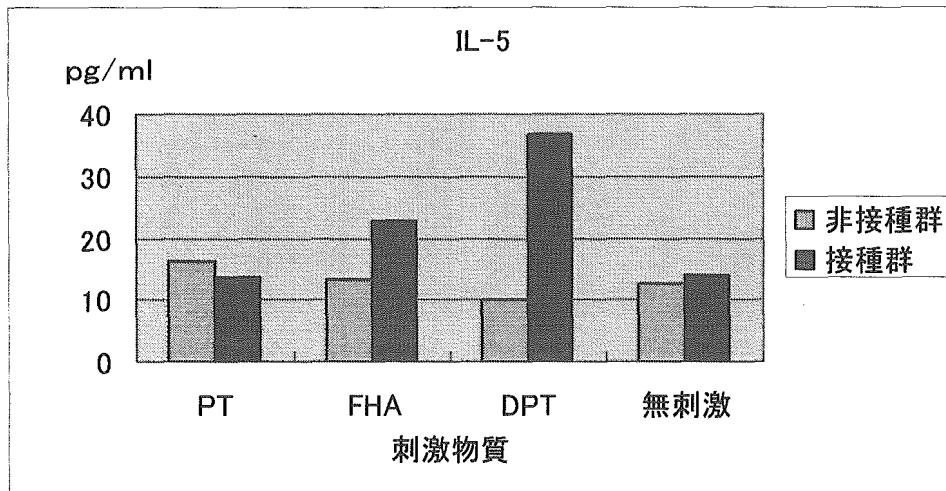


Figure5. 各種刺激におけるIL-10分泌(ELISA)

