

感染性ウイルスの回収



図1. RSV G, F 遺伝子を挿入した組換え麻疹ウイルスの作成/RSV-G

AIK-RSV F

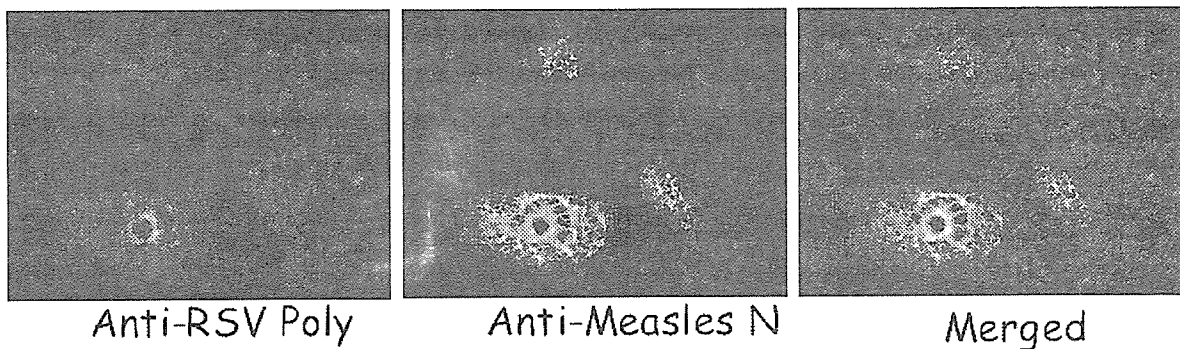


図2. 組み換え麻疹ウイルスの麻疹ウイルス抗原、RSV 抗原の発現

- 4) 挿入した遺伝子は 15 代継代しても脱落することなく安定して RSV G 蛋白を発現した。
- 5) 麻疹ワクチン AIK-C の生物学的特性である ts の性状は保持されていた。

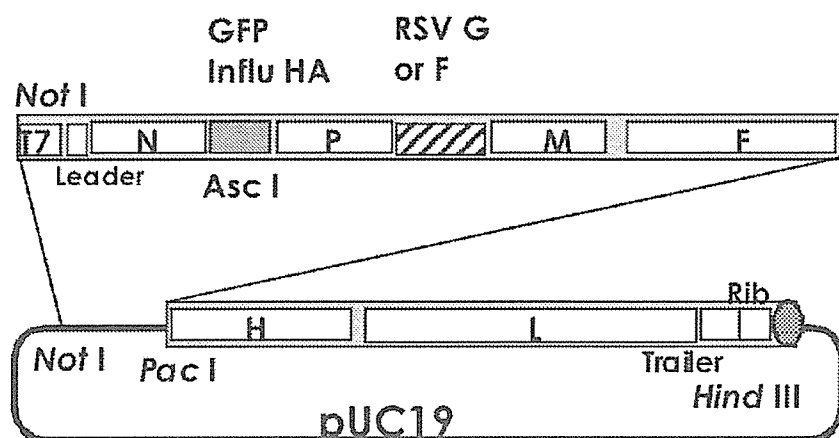
【考案】

麻疹ワクチンウイルス AIK-C 株を安全なウイルスベクターとして P/M junction に RSV の G, F 遺伝子を挿入し各蛋白を発現する組換え麻疹ウイルスを作成できた。RSV G 蛋白を発現する MVAIK/RSV-G は感染性ウイルス粒子を産生するが RSV F 蛋白を発現する MVAIK/RSV-F は cell-association が強く上清中へのウイルス放出が少ないことが解った。その原因は不明であるが、ワクチン候補株としてはウイルス粒子を形成する方が望ましいため F 蛋白の膜貫通領域を欠失させた遺伝子をクローニングし組換えウイルスを作成している。

未だ、有効なワクチンが開発させていない RSV 感染症に対して経鼻生組換えワクチンとし

て利用できる可能性がある。ワクチンとして利用できる以外に、RSVの病態解析にも応用できる物と考えられる。

昨年度作成したムンプスウイルス HN, F 遺伝子を発現する組換え麻疹ウイルスと共に感受性動物であるコットンラットに接種し免疫能検討する予定である。また、組み換え麻疹ウイルスの実験動物でのウイルス動態を検索するために N/P junction に GFP, P/M junction に RSV-G 遺伝子を導入した組み換えウイルスを作成した。GFP、RSV-G の発現が確認でき麻疹 AIK-C をウイルスベクターとして2箇所異なるウイルス抗原を挿入し多価組換え麻疹生ワクチンを開発中である。



まとめ

製造承認され広く使用され安全性が担保されている AIK-C 麻疹ワクチン株をベースとした reverse genetics の技法を確立し AIK-C 株を生ワクチンウイルスベクターとして、未だワクチンが開発されていないウイルスとして Respiratory syncytial virus (RSV) の G, F 蛋白遺伝子を挿入した cDNA から、RSV G, F 蛋白を発現する組換え麻疹ワクチンを回収した。

百日咳 RT-LAMP 法の開発

中山 哲夫、藤野 元子（北里生命科学研究所ウイルス感染制御 I）

百日咳は無細胞型百日咳・ジフテリア・破傷風ワクチン(DTaP)が開発され1981年から市販され、ワクチン接種率も90-95%近くとなり報告される百日咳の患者数は減少してきた。しかしながら、近年青年層を含めた成人の百日咳が問題となっている。成人の百日咳は典型的な症状をとることが少なく長引く咳が唯一の症状であることがある。こうした持続性咳嗽患者の中に百日咳が存在し、家庭内に持ち込みDTaP接種前の乳幼児の百日咳の原因となっている。

わが国のサーベイランスシステムでは成人の感染症情報を把握することができないため成人の百日咳が増加傾向にあるかどうかは不明である。臨床診断が困難であるために百日咳を疑って検査を行う必要がある。細菌の分離は検出率が低く、また、PCRといった遺伝子診断を行える施設が限られている。青年、成人の百日咳の状況を把握するため、乳幼児の百日咳を含め、簡便で感度の高い迅速診断法の開発が望まれている。我々は、ウイルス感染症の遺伝子迅速診断法として麻疹、風疹、ムンプス、RSVのLoop-mediated isothermal amplification (LAMP)法を報告してきた。LAMP法は200-250塩基領域をtargetとして特異的なLAMP primerを設定し、63°Cの恒温でDNAの増幅反応が進む特異性、感度共に高いDNA増幅法である。臨床検体から遺伝子を抽出後60分以内に結果が得ることができる方法で、臨床現場での迅速診断法として期待されている。

【方法】

百日咳菌東浜株を増菌させ 2.5×10^5 cfu/100ulの菌液を調整した。菌液100ulよりDNAを抽出し95°C3分間denature後10倍階段希釈を作成した。百日咳Inter sequence 481 (IS481)にLAMP primerを設定した(図1)。菌体抽出DNAを鋳型としてLAMP法と、PCR法を行った。同様にパラ百日咳菌液 1.5×10^5 cfu/100ulを作成した。

【結果】

- 1) LAMP法で 2.5×10^5 cfu /100ulの東浜株のDNA抽出ゲノムの 10^{-5} 希釈まで検出できた。パラ百日咳は百日咳LAMP法では増幅できなかった(図2)。LAMP産物を電気泳動しLAMP産物特有のLadder patternを示した(図2)。
- 2) IS481のLAMP primer領域を増幅するPCR用のPrimerを設定しPCRを行った。結果を図3に示した。First PCRでは 10^{-3} までの遺伝子が増幅され、nested PCRではLAMP法とおなじ感度で 10^{-5} までの遺伝子が増幅された(図3)。

【考按】

IS481領域に設定したLAMP法は2.5 cfu/100ulの百日咳菌を検出可能であり、single assayあたりでは0.1 cfuが検出可能レベルと算出された。LAMP法の感度はnested PCRに匹敵し簡便性が大きなメリットである。百日咳菌群のなかには*B. parapertussis*, *B. holmesii*, *B. bronchiseptica*, *B. hinzii*が存在し*B. parapertussis*とは交差反応を示さなかったが、他の*Bordetella*属との反応性を確認する必要がある。しかし、これらは臨床的には、優位菌種ではなく百日咳の臨床検査に応用できると考えられる。成人百日咳は典型的な症状をとることがすくなく、百日咳を念頭に検査を行い成人百日咳の実態を調査し、欧米諸国と同様に成人百日咳の増加が明らかとなればDTaPワクチン接種方式の再考が

必要となる。

```

          F3          F2
      850      860      870      880      890
      ttaccgcccc cagaccaatg gcaaggccga acgcttcatc cagtcggcct
      900      910      920      930      940
      tgcgtgagtg ggcttacgct cacacctacc agaactccca acaccgagcc
      F LOOP 950      960      970      980      990
      gatgccatga aatcctggct acaccactac aactggcatc gaccacacca
      1000      1010      B1 1020      1030      1040
      aggcattcggg cgcgctgtac ccatctccag actcaacctg gacgaatata
      BLOOP 1050      1060      1070      B2
      acctattgac agttcacagc tatccggacc ggc
  
```

B3

Pertussis LAMP for IS481

IS481 F3; 5'-ACAGACCAATGGCAAGGC-3'

IS481 B3; 5'-CCGGATAGCTGTGAACTGTC-3'

IS481 FIP; 5'-CGGTGTTGGGAGTTCCTGGTAGGGAACGCTTCATCCAGTCGG-3'

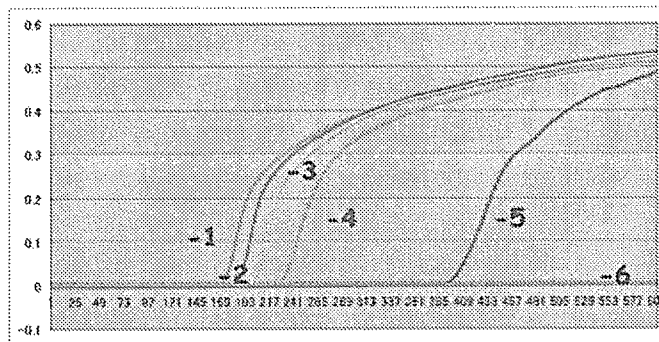
IS481 BIP; 5'-TGGCTACACCACTACAACCTGGCGGTTGAGTCTGGAGATGGGT-3'

IS481 F LOOP; 5'-AAGCCCACTCACGCAAGG-3'

IS481 B LOOP; 5'-CACCAAGGCATCGGGC-3'

図1 百日咳 IS481 LAMP primer の設定

Real time LAMP for IS481



Tohama strain 2.5×10^5 cfu/100 ul

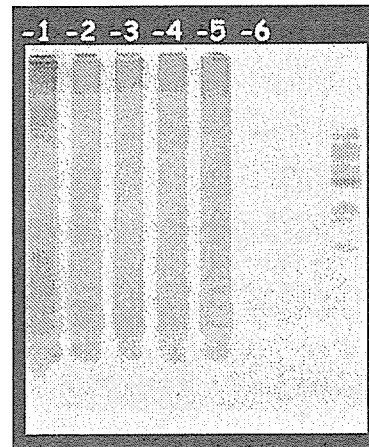


図2 百日咳 IS481 LAMP 法の検出限界

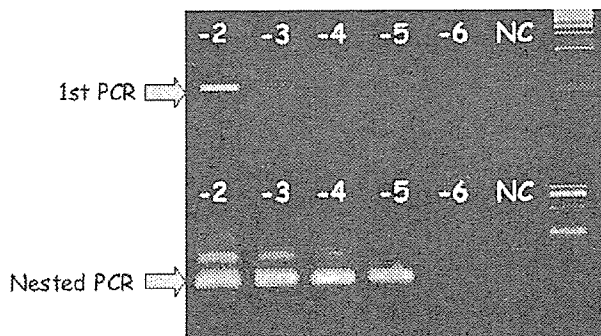


図3 百日咳 IS481 遺伝子領域の PCR

まとめ

百日咳菌の分離は検出率が低く、また、PCR といった遺伝子診断を行える施設が限られている。乳幼児の百日咳、青年、成人の百日咳の状況を把握するためには、簡便で感度の高い迅速診断法の開発が望まれている。LAMP 法は 200-250 塩基領域を target として特異的な LAMP primer を設定し、63°C の恒温で DNA の増幅反応が進む特異性、感度共に高い DNA 増幅法で、今回、百日咳菌の IS 481 領域に特異プライマーを設定し 2.5 cfu/100ul (0.1 cfu/single assay) の感度で検出可能な百日咳 LAMP 法を開発した。

DPT-不活化ポリオウイルス混合ワクチン (DPT-sIPV) の免疫原性

堀内 善信、武田 直和、白土 東子 (国立感染症研)、小幡 朗 (デンカ生研)
東 雍 (阪大微研)、末原 章宏 (武田薬品)、塩先 巧一 (化血研)
宮澤美和子、太田 芳宏、安部 忍、清水 文七 (日本ポリオ研究所)
脇田 隆字、宮村 達男 (国立感染症研)

不活化ポリオワクチンについて、昨年までに我が国の沈降精製三混ワクチン(DPT)はほとんど局所反応原性を示さず、試作sIPV混合による影響もないことを報告した。今回は免疫原性評価のための力価試験法およびそのための標準品の安定性の確認を行った。またDPT-sIPVの種々の試作品についてsIPVの免疫原性を比較した。

【力価試験法】

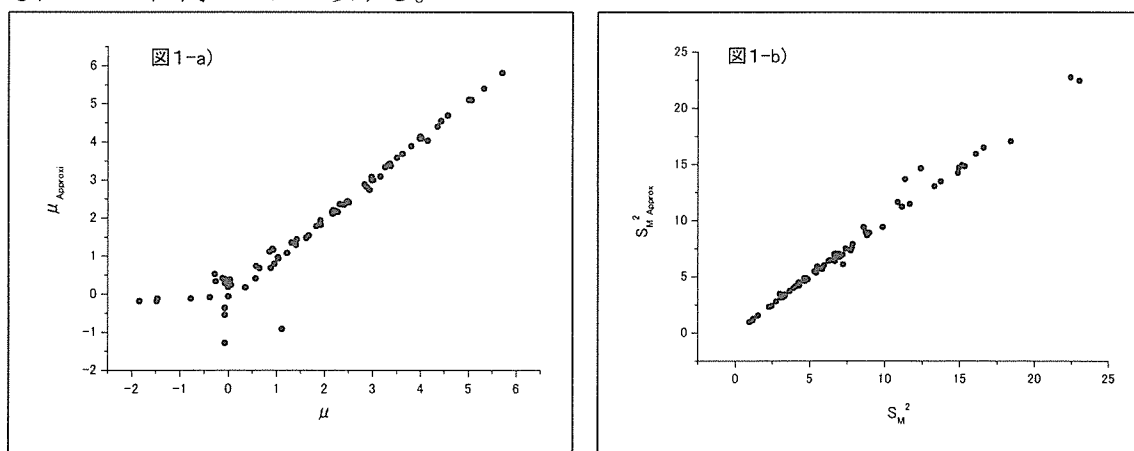
IPVの力価試験は、参照品および検体ワクチンの適当な数希釈を免疫したラット血中の中和抗体価より、検体ワクチンの免疫原性を参照品に対して相対的に評価する方法である。このときワクチンの力価や濃度によっては中和抗体が検出レベルを下回る不応答動物がみられる。不応答動物を含む群は、検出限界値のところで切れた分布、すなわち打ち切り標本となっており、平均抗体価等は最尤推定をすることになる。しかし計算が容易でないことから、今回、近似推定法を作成した。近似法では、検出限界以上の値の平均値を mY 、検出限界値を含む実測値の分散を S^2 とすると、平均抗体価の推定値 μ_{Approx} は、

$$\mu_{Approx} = mY(-1.579 * h + 1.068),$$

分散の近似値 S_M^2 は

$$S_M^2 = s^2(0.6297 + 0.2947 * \exp(h/0.3195) + 0.03447 * \exp(2h/0.3195))$$

として得られ、図1-a)、b)に示す様に、各々の近似推定値は最尤推定値、 μ および S_M^2 とそれぞれ > 0 の区間でほぼ一致する。

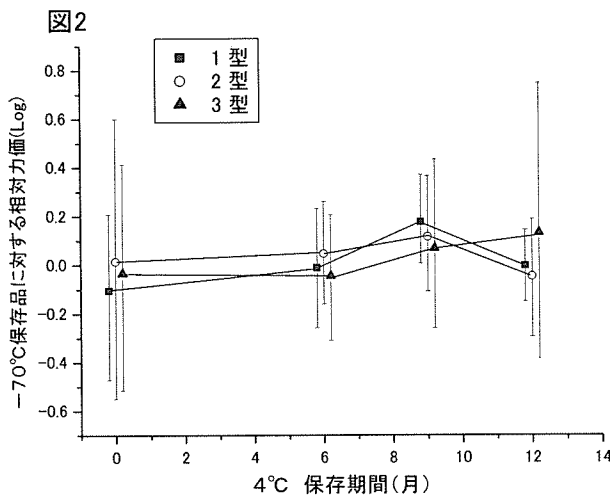


そこで本試験においてはこの平均抗体価および分散の近似計算値を用いることで十分と考えられ、計算のための簡易計算シートを作成した。ただし近似推定式の定数はさらに蓄積データにより改良のための微調整をはかっていくことが望ましい。

【標準品の安定性評価】

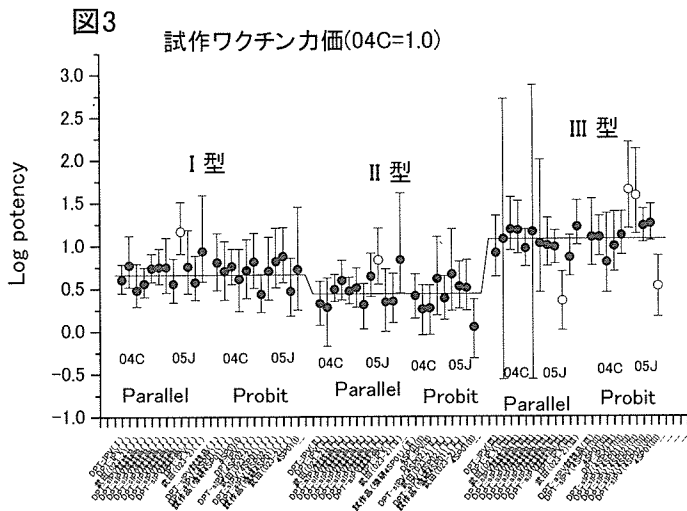
参照品の更新ロット候補品(05J)が作成された。05Jは4℃に保存しており、その安定性評価のた

めの基底条件保存品として同時に一定数量を -70°C に保存した。調製直後、6ヶ月後、9ヶ月後および12ヶ月後に 4°C 保存品の力価を基底条件保存品に対して相対的に求めたところ、図1に示す結果となった。各型について0~12ヶ月の相対力価は均一性が否定されず、いずれも有意な変化がなく安定であることが確認された。



【DPT-sIPV試作品の力価】

各製造のDPT-sIPV試作ワクチンおよび共通の試作DPT-sIPV試作品について、感染研、デンカ生研、阪大微研、武田薬品、化血研、日本ポリオ研で力価を測定し、現参照品の04Cおよび次期参照品候補の#05Jの双方に対する相対力価を求め、比較した。またその際、



WHOの方法である型ごとに異なるカットオフ値(浮動カットオフ値)を用いて求めた陽性率によるプロビット法との比較を行った。各検体の全参加施設での相対力価の測定結果は、均一性が否定されず、施設間でよく一致することが確認された。そこで検体毎に加重平均値を求め、図3にまとめて示した。今回の成績では近似最尤法と浮動カットオフ値によるプロビット法で一致した結果がえられた。ただ浮動カ

ットオフ値を用いる限り、参照品との相対比較はできるが必ずしも実際の抗体価を反映した値ではないことから、例えば参照品の安定性モニターなどができないことになる。この点実際の抗体価を用いた平行線定量法の方が有用と考えられる。一部の成績(○)をのぞき、全施設で共通に測定したDPT-sIPV試作品1件と各社で作成したDPT-sIPV試作品は、全て誤差の範囲で同等の力価であることが確認された。すなわち国内で製造される可能性のあるDPT-sIPVは、全て同等の免疫原性を持つことが期待され、接種の際に区別することなく互換的に用いても問題ないことを示唆する結果となった。

インフルエンザ罹患時の鼻汁、鼻咽頭拭い液中のサイトカイン

酒井 忠和、中山 哲夫（北里生命科学研究所ウイルス感染制御）

永井 崇雄（永井小児科医院）

【はじめに】

インフルエンザ脳症の原因は過剰に産生されたサイトカインにより血管内皮障害を起こすことによると考えられている。血清中の Interleukin 6 (IL-6), Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) といったサイトカインが上昇することが報告されているがインフルエンザ感染の primary site の鼻汁、鼻咽頭拭い液(NPS)に関しては検討されていない。インフルエンザはウイルス血症をおこすことは稀で、インフルエンザ脳症でも抗原、ウイルス遺伝子は検出される事は極めて稀と考えられている。IL-6, TNF- α 等のサイトカイン産生細胞である単球、NK 細胞は血中ではウイルス刺激を受けることがなく感染局所でこれらのサイトカインが産生されていると考え局所の IL-6, TNF- α , Interferon- γ (IFN- γ) を測定した。

【対象と方法】

2005/2006 シーズンに外来を受診した患児で、鼻汁、鼻咽頭拭い液の迅速診断キットでインフルエンザ A, B 感染と診断され、複数回検体採取できた 28 例(5 ヶ月から 14 歳 ; A 型 22 例、B 型 6 例)を対象とした。咽頭拭い液は 3000rpm, 10 分遠心し上清を IL-6, IFN- γ , TNF- α を Quantikine Human IL-6, Human IFN- γ , Human TNF- α /TNFSF1A (R&D System) を用いて EIA 法で測定した。検量線からはずれた検体については 10 倍希釈し再測定した。

【結果】

発症日を 0 病日とし、0-2 病日、3-5 病日、6 病日以降の病日での NPS 中のサイトカインを図に示した。

1) IL-6

図 1 に NPS 中の IL-6 を示した。A 型インフルエンザ感染で 1000pg/ml 以上の高値を示した例が 5 例存在し、1 例は第 1、3 病日で 5623、5351pg/ml を示した。多くの症例で 0-2 病日と 3-5 病日は高いレベルをとり 6 病日以降は 1 例を除いて減少傾向が認められた。B 型インフルエンザ感染では 1 例が第 1 病日で 1025pg/ml を示したが他の例では急性期で 500pg/ml 以下であった

2) IFN- γ

図 2 に NPS 中の IFN- γ を示した。A 型、B 型インフルエンザ共に 103pg/ml 以下で推移し、0-2 病日で高値をとる例、3-5 病日で高値をとる例があり一定の傾向は観察されなかった。

3) TNF- α

図3に TNF- α の推移を示した。IL-6 が高値を示した例は TNF- α の値も高値を示した。多くの例で3-5 病日には低下傾向が観察された。

4) 年齢によるサイトカイン産生量

A 型の流行年で B 型の症例が少なく A, B 共に 0-2 病日に検体を採取できた 27 例について IL-6, IFN- γ , TNF- α の産生量を比較した。1 歳未満群 6 例、1-3 歳未満群 8 例、3 歳以上 13 例について比較した。IL-6 に関して年齢差はないように思われるが IFN- γ , TNF- α については 1 歳未満ではやや低いと思われる。

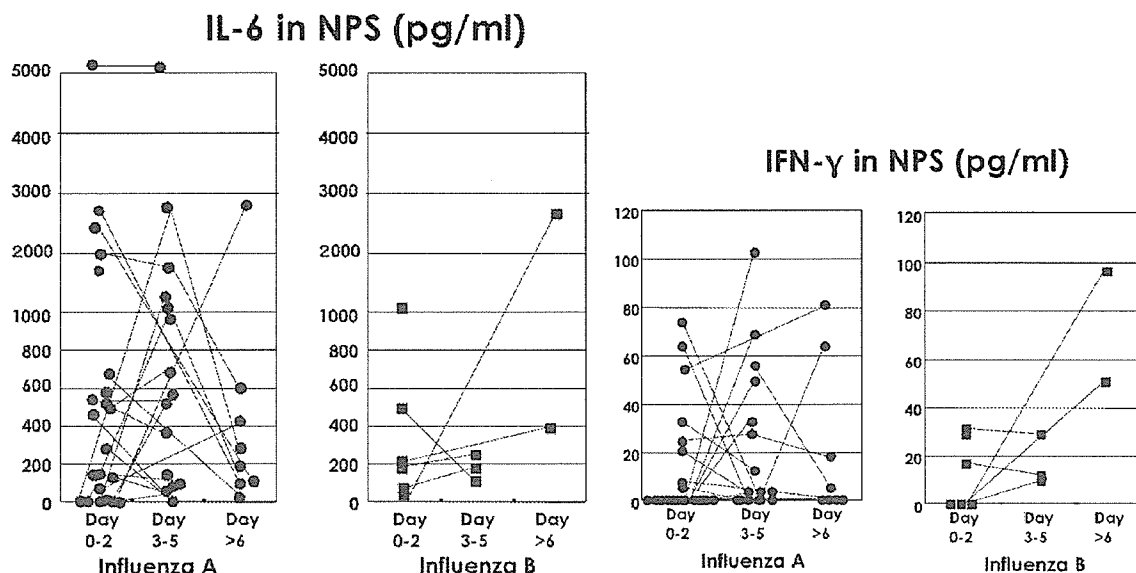


図1 NPS 中の IL-6

図2 NPS 中の IFN- γ

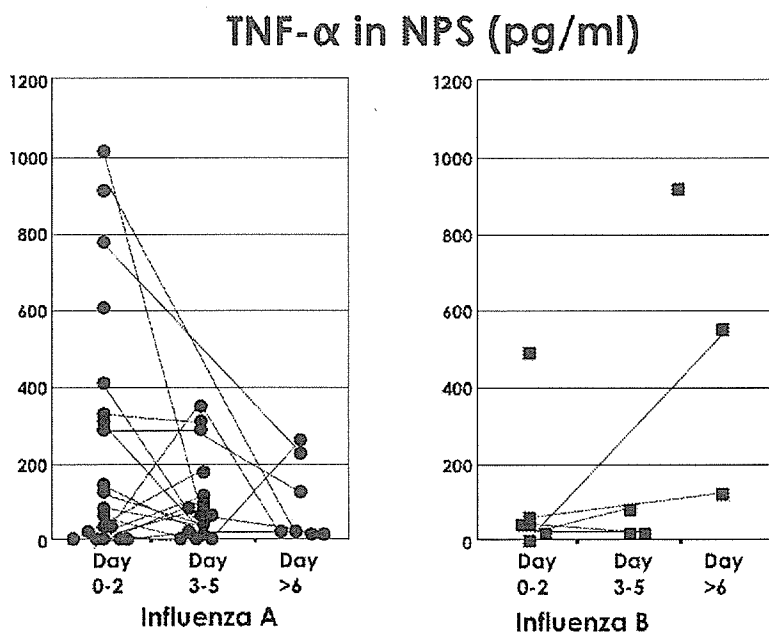


図3 NPS 中の TNF- α

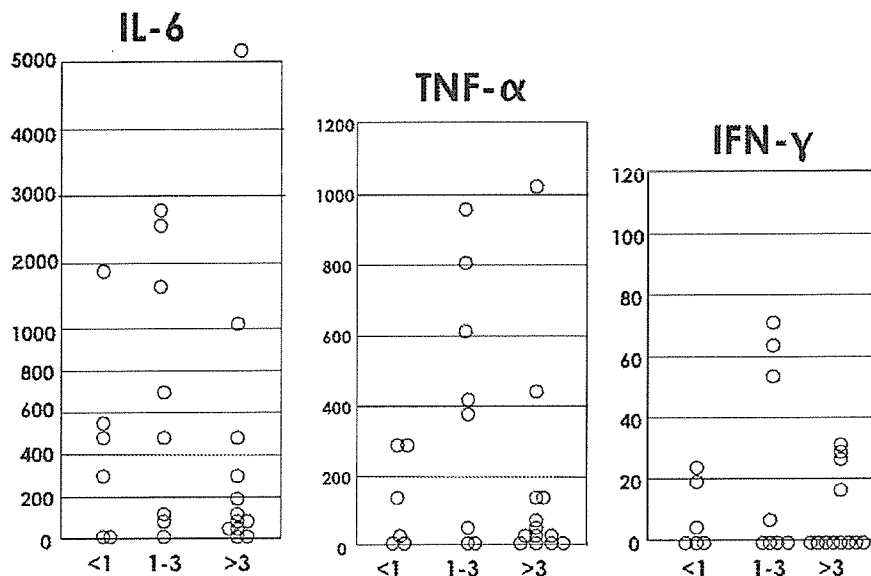


図4 年齢別の IL-6, TNF- α , IFN γ

【考察】

インフルエンザ脳症の発症機序が過剰に産生された IL-6, TNF- α によるサイトカインストームで血管内皮細胞の障害を来すと考えられている。ウイルス感染症の血清中のサイトカインについては多くの報告があり、インフルエンザ感染症では血清中の IL-6 値の上昇が知られているが 100pg/ml 前後であり、また TNF- α は 10pg/ml 前後とされている。今回、我々はインフルエンザ感染の primary site での炎症反応を知るために IL-6, IFN- γ , TNF- α の量を測定した。IL-6 と TNF- α は良く相関しており IL-6 が局所で長く検出され、TNF- α は 3-5 病日には減少することが明らかとなった。IL-6, TNF- α の産生細胞は NK 細胞、単球が主体で感染の primary site でのウイルス感染により IL-6, TNF- α の炎症性サイトカインが産生され血清中に報告されている量からみると桁外れに高くまず局所で大量に産生されていることが明らかとなった。NPS を対象としてサイトカインを測定したが、NPS は MEM 培養液で希釈されて一定の希釈倍率とはならないが、ほぼ一定の条件で検体を採取しており絶対的な数値とはならないが希釈された検体でも高値のサイトカインが局所に産生されていることが明らかとなった。年齢差によるサイトカイン量は症例数を増やした検討が必要と考えられる。

ヒトにおけるインフルエンザワクチン免疫 monitoring system の検討 —ELISPOT 法における HLA-クラス 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) 活性測定—

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)、脇坂 明美 (日赤血漿分画センター)

下澤久美子、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

現行の trivalent split HA vaccine の限界を指摘する成績が蓄積し¹⁾、また pandemic influenza に対する懸念が増大する中、新しい adjuvant, vaccine antigen, delivery route 開発の試みがなされつつある²⁾。これらの新しいワクチン関連 product は当初、動物実験でその免疫付与能およびウイルスチャレンジ試験による臨床的効果が検討されるが、ヒトへの応用を考慮する場合、必須の課題がヒトでの臨床的 efficacy の検討である。最終的には大規模臨床試験による疫学的有効性の証明が要求されるが、開発初期段階で少数臨床例における試験接種の試みと獲得される免疫の性格の検討が必要となる。その際に要求されることとなるのが獲得免疫の指標となる laboratory marker(s) である。ところがインフルエンザウイルス感染症においては感染防御に関与する surrogate marker が確定していないという事情があり^{3,4)}、そのため新しいワクチンを評価するに当たって systemic および local immunity に関係する液性ならびに細胞性免疫 marker(s) の測定系をそろえておく必要がある。

従来、インフルエンザワクチンによって誘導される免疫は種々の抗体測定法によって検討されてきた。しかし、生体防御に重要な役割を担っていると思われる HLA-クラス I 拘束性細胞障害性リンパ球 (CTL) 活性については、殊に小児において、殆ど検討されないまま今日に至っている。著者らは従来細胞性免疫測定法としてリンパ球刺激試験を用いてきたが、この方法は CTL を検出する系ではない⁵⁾。最近、Fukada らによって、日本人の 60 数%が有する HLA-A2402 に結合するインフルエンザウイルス (Flu)A および B の抗原 epitope が同定された⁶⁾。この epitope peptide を用いて C1R-A24 細胞を感作し、その感作細胞を抗原提示細胞として、interferon γ 産生 CD8+細胞を ELISPOT 法によって検出する系の確立をめざした。さらに急性期に検体採取を行い ELISPOT 法を施行するためには被検者が HLA-A24 陽性であることの確認を迅速に行う必要があり、そのために補体傷害試験を用いた HLA typing の導入を検討した。ワクチンによって誘導される免疫の性格を検討するためには、自然感染における CTL の挙動との比較が必要であり、初感染および再感染、あるいは年齢層別の成績の蓄積が求められる。基礎的条件設定のため、自然感染少数例で preliminary な検討を行ったので報告する。

2. 研究対象と方法

(1) 研究対象

DNA 法で確定した HLA-A*2402 陽性成人 2 例、補体傷害試験で HLA-A24 陽性であることを確認したインフルエンザ自然感染小児 3 例から末梢血を採取し単核球を分離した。成人 2 例は少なくとも過去 10 年以上インフルエンザ顕性発症の既往はなかった。

(2) 補体傷害試験

Terasaki plate に anti HLA-A24 マウス mAb (腹水を 1000 倍希釈したもの) および抗 A24 ヒト血清を 1 μ l/well 分注した。陽性対照には抗ヒト白血球 mAb、陰性対照には自己血清 (正確には血漿にトロンビ

ンを添加してトロンボプラスチンを除いたもの)を用いた。次に RPMI1640 に 2×10^6 /ml で浮遊させた末梢血単核球を $1 \mu\text{l}/\text{well}$ 分注し、室温で 30 分静置した。次いで補体としてウサギ血清(Veritas)を $5 \mu\text{l}/\text{well}$ 分注し、60 分室温で静置した。続いて 2%Trypan blue PBS を分注し、15 分後に洗浄して倒立顕微鏡下で観察、染色された死細胞をカウントした。最終的に被検者が HLA-A2402 であることの確認は HLA 研究所に依頼し、DNA 法で施行された。

HLA typing の時間を短縮するために、実際には 0.5~1ml の EDTA 加全血を 1ml の Ficoll-Hypaque に重層し、2000rpm10 分間遠心して得た interface の細胞を 5ml の RPMI1640 で 1 回洗浄、pellet を Fisher tube に移し Fisher 遠心機で洗浄操作を行った。抗血清との incubation 30 分、補体添加後の incubation 60 分を含めても 2 時間を少し上回る程度の時間内で結果を得ることができた。

(3)ELISPOT assay

市販の BD™ELISPOT Kit (BD Biosciences Pharmingen, San Diego)を用いた。手順は添付の manual に従った。interferon γ あるいは granzyme B capture Ab を coat した ELISPOT plate に以下に述べるような条件で stimulator cells, 被検者末梢血単核球(effector cells)を共培養し、18 時間後に細胞を洗浄除去、interferon または granzyme B detection Ab を incubation、さらに Enzyme conjugate (Streptavidin-HRP)を反応させ、洗浄後 AEC Substrate Reagent で発色させ、immunospot analyzer でカウントした。

DNA 法で確認した HLA-A*2402 陽性成人 2 例から採取した末梢血単核球を AIM-V 培養液に 2×10^6 /ml の細胞濃度で suspend し、Flu A, B antigen epitope peptides, IL-2 を添加して 1 週間培養した。経過中に 2 回の medium change を行った。培養終了後、磁気ビーズを用いて CD8+細胞を単離し(MACS®system, Miltenyibiotec, Auburun), ELISPOT assay 系の検討を行い諸条件を決定した。target (stimulator) cells は HLA-A2402 transfected C1R 細胞に Flu A, B の抗原 peptides を $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるように加えて室温で 2 時間 incubate した後、 5×10^5 /ml に調製した。それを $100 \mu\text{l}/\text{well}$ 分注、培養した。

補体傷害試験で HLA-A24 陽性であることを確認したインフルエンザ自然感染小児 3 例について、発症後一定日数経過後に検体を採取し、Flu 抗原 peptides 特異的な interferon γ 産生細胞をカウントした。採取した末梢血から単核球を分離、さらに磁気ビーズを用いて CD8+細胞を単離し、前培養を行うことなく直ちに抗原 peptides 感作した target cells と共培養を開始し、ELISPOT assay を行った。

3. 研究結果

(1) HLA-A*2402 陽性成人 2 例における recall response

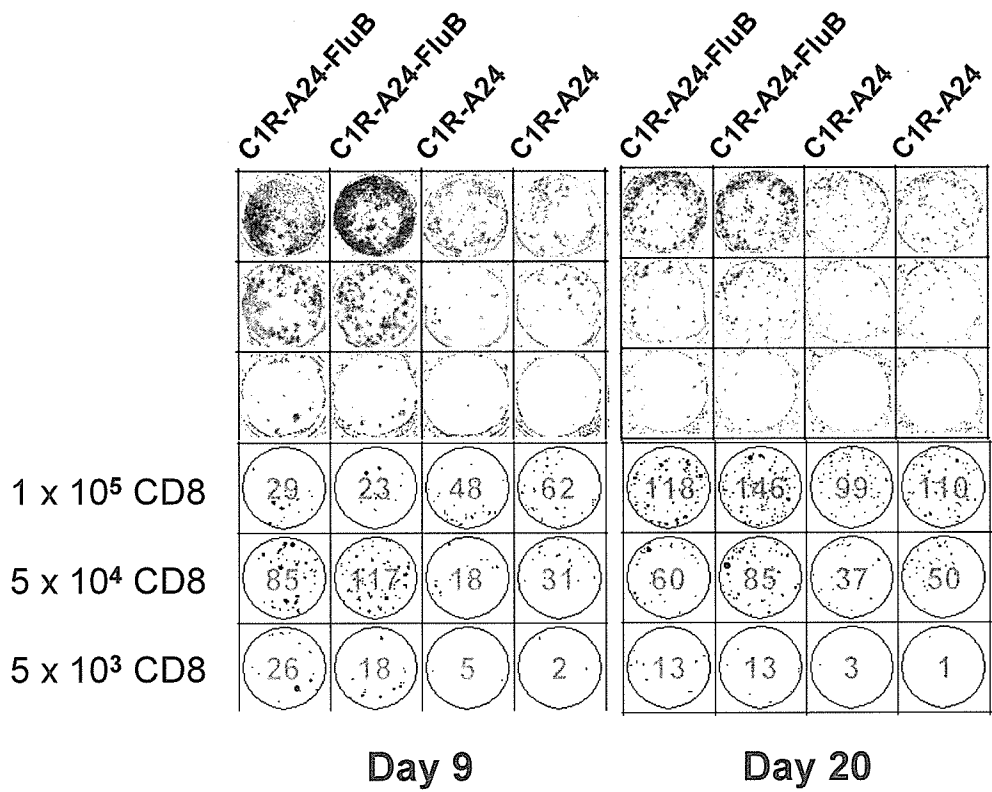
1 例は interferon γ , 他の 1 例は granzyme B 産生細胞を ELISPOT 法にて検出した。ELISPOT assay を行う前に Flu A, B epitope peptides, IL-2 を用いて刺激培養を行ったため、recall response を検出したことになる。いずれも CD8+陽性細胞 5×10^4 あたり数十から 100 個の spot を認めた。

(2) 自然感染小児における ex vivo response

3 例の小児 (12.7 歳男児, 4.9 歳男児, 6.1 才女児, 前者は Flu A, 後二者は Flu B 罹患を rapid test で確認) から急性期, 罹患後 2 週目, 同 3 週目に末梢血検体を採取した。前述の如く前培養することなく, ex vivo で抗原 peptide 特異的な interferon γ ELISPOT assay を行った。

図に 4.9 歳男児例の経過を representative case として示す。発症 day 9 で CD8 陽性細胞 5×10^4 あたり数十から 100 前後の spot を認めた。Immunospot analyzer の図と比較すると, spot の重なりによるカウント漏れがある可能性があり実際の spot 数はもう少し多いかも知れない。さらに day 20 でも day 9 よりは減少しているものの, かなりの spot 数が観察された。

他の 2 症例においても, 同様の経過が観察された。このことから, この assay 系は 5×10^5 /ml order の CD8+細胞が 1.5ml 回収されれば実施可能であることが分かった。



4. 考 按

今回、著者らは、検体採取が容易な第一線医療機関内に、補体傷害試験によって HLA-A24 を同定し得る態勢を構築することによって、患者が受診してからほぼ 2 時間あまりの間に該当患児が研究対象として eligible か否か判定することを可能にした。これにより、インフルエンザ急性期からの検体採取が可能となった。ELISPOT assay という検体要求量の極めて少ない方法と組みあわせることによって、成人・年長児の再感染ばかりではなく、乳幼児の初感染インフルエンザにおける CTL 活性を急性期から検討することが可能になったと考える。また、ある程度の dynamic range が有り、自然感染、ワクチン接種後のモニタリングシステムとして有用であると思われた。

また、補体傷害試験は最少 0.5ml の末梢血で HLA typing が可能であり、外来での研究に有用であると思われた。HLA 研究の極めて初期に利用されていた古典的な方法であり、文書化されていないコツの様なものがある手技であるため、安定した成績が得られるまで習熟期間が必要であった。また注意点として、抗血清、Anti HLA-A24 マウス mAb、ウサギ補体などの reagent に十分信頼性のあるものを用いるべきであるという教訓を得た。一施設で完結する HLA-クラス 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)活性測定系を確立し得たと考えている。

BD Biosciences Pharmingen の granzyme B ELISPOT kit はかなり洗浄しても background に染色が残り、あまりきれいな結果を得ることができなかった。2 次抗体以降の reagent の非特異的付着の問題があるように思われた。granzyme B ELISPOT assay の kit は他の供給元がすでにあり、また最近では perforin の ELISPOT assay も開発された⁷⁾。CTL の effector molecule を検出し、effector mechanism に直接関係した反応を観察できるという意味において、granzyme B および perforin ELISPOT assay はより望ましい検索方法であると思われる。

末梢血リンパ球を用いた細胞性免疫の monitoring は感染の場、炎症組織と免疫組織間を結ぶ traffic としての末梢血内の細胞を specimen として用いており、評価をする際にはその限界を考慮する必要がある。

ある。殊に麻疹，風疹のような viremia を伴う systemic infection を引き起こすウイルス感染症と基本的には粘膜局所の感染症であるインフルエンザとを同列に論ずることは難しい。そのような観点からは，粘膜分泌物である粘液内の effector molecule の測定等もこれからの課題になってくる可能性があるろう。

(文 献)

1. Jefferson T, Smith S, Demicheli V, Harnden A, Rivetti A, Di Pietrantonj C. Assessment of the efficacy and effectiveness of influenza vaccines in healthy children: systematic review. *Lancet* 2005;365:773-80.
2. Hampson AW, Osterhaus AD, Pervikov Y, Kieny MP. Report of the second meeting on the development of influenza vaccines that induce broad-spectrum and long-lasting immune responses, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 6-7 December 2005. *Vaccine* 2006;24:4897-4900.
3. Mbawuike IN, Pacheco S, Acuna CL, Switzer KC, Zhang Y, Harriman GR. Mucosal immunity to influenza without IgA: an IgA knockout mouse model. *J Immunol* 1999;162:2530-7.
4. Nguyen HH, van Ginkel FW, Vu HL, McGhee JR, Mestecky J. Heterosubtypic immunity to influenza A virus infection requires B cells but not CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *J Infect Dis* 2001;183:368-76.
5. 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.
6. Fukada K, Makizumi K, Kino Y, Takiguchi M. Influenza virus-specific cytotoxic T cell epitopes frequently found in Japanese people. *Options for the control of influenza, Okinawa 2003*.
7. Zuber B, Levitsky V, Jonsson G, Paulie S, Samarina A, Grundstrom S, et al. Detection of human perforin by ELISpot and ELISA: ex vivo identification of virus-specific cells. *J Immunol Methods* 2005;302:13-25.

合成二本鎖 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高病原性鳥インフルエンザの感染防御

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：アジアを発端とした高病原性鳥インフルエンザの流行はヨーロッパ、アフリカへと広がりを見せ、ヒトでの感染例もアジアを中心に報告されている。その高い致死率と今後ヒトからヒトへの感染能を獲得した場合パンデミックを起こす可能性がある事から対策が急務である。本研究において自然免疫の刺激となる Toll-like receptor(TLR)3 のリガンドである合成二本鎖 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り血中の特異的 IgG および鼻腔洗浄液中の IgA 抗体を誘導し致死的な高病原性鳥インフルエンザ (H5N1) 感染を防御した。更に、ベトナム株で作製されたワクチンを用い抗原性の異なる香港株に対しても交叉防御が働く事がしめされた。合成二本鎖 RNA は TLR3 を介し自然免疫を誘導し粘膜免疫を誘導し高病原性鳥インフルエンザの感染防御に有効である事がしめされた。

【目的と意義】

アジアを発端として感染の広がりを見せ世界中に蔓延した高病原性鳥インフルエンザはヒトからヒトへの感染能を獲得するとヒトの新型インフルエンザとなりパンデミックを引き起こす可能性がある。それを未然に防ぐ為にはワクチンの接種が有効と考えられる。しかし現行法のワクチン接種法ではいくつかの問題点がある。その一つは高病原性鳥インフルエンザ(H5N1)が皮下接種で免疫応答が低く、不活化ワクチン単独では有効な中和抗体価が得られていないという事であり、もう一つは、現行の皮下接種インフルエンザワクチンの場合は、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。またどの株がパンデミックを起こすのか予測が不可能であり事前にパンデミックワクチンを準備する事は不可能である。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。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本鎖 RNA, poly(I:C)を用い、高病原性鳥インフルエンザの感染防御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本鎖 RNA, poly(I:C)を用いた高病原性鳥インフルエンザワクチンの感染防御効果の検討をした。

【材料と方法】

ワクチン：ワクチンは北里研究所で作成されたホルマリン不活化全粒子ワクチン NIBRG14 A/VT/JP1203/2004-PR8(H5N1)株を用いた。

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：ヒトの患者から分離された強毒株 A/Vietnam/1194/2004(H5N1)、A/HK/483/97 (H5N1)

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ホルマリン不活化全粒子ワクチン NIBRG14 1 µg とアジュバントとして poly(I:C) 0.1µg, 1µg, 10µg, 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 の強毒株 A/Vietnam/1194/2004(H5N1)、A/HK/483/97(H5N1) 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 法を用いてワクチン特異的 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】

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ワクチン特異的 IgA と血清中のワクチン特異的 IgG の抗体価を図1に示した。

図に示すごとく NIBRG14 ワクチンと poly(I:C) 1-10µg を経鼻接種すると特異的 IgA 及び IgG 応答が見られた。皮下接種群においては血清中の IgG 応答は見られたが鼻腔洗浄液中の IgA 応答はまったくみられなかった。鼻腔洗浄液中の IgA 抗体は 0.1µg のワクチンと 10µg の poly(I:C) で免疫した群まで 100U/ml 以上の高い抗体誘導が得られた。

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 の強毒株 A/Vietnam/1194/2004(H5N1)攻撃感染を行った。図1に示すごとく高い IgA 応答が見られた 0.1µg のワクチンと 10µg の poly(I:C) で免疫した群までにおいて3日後の鼻腔洗浄液中

での生きたウイルスは検出されなかったが生存率は80%であった。また、0.5 μ gのワクチンと10 μ gのpoly(I:C)と共にワクチン接種した群において100%の生存率が見られた。非免疫群において生存率は0%だった。

交叉防御能を調べるため、ベトナム株のワクチンをpoly(I:C)をアジュバントに用い皮下接種及び経鼻接種後100pfuの強毒株A/HK/483/97(H5N1)インフルエンザウイルス攻撃感染を行った。ワクチンの皮下接種群の生存率が80%だったのに対し、経鼻接種群では100%だった。

【考察】

合成二本鎖RNA, poly(I:C)をアジュバントとして用いることにより高病原性鳥インフルエンザ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。また、ワクチンの経鼻接種により抗原性の異なるH5N1インフルエンザウイルスに対する交叉防御が示された事より、パンデミックに備えたワクチンを考える場合今回用いたアジュバント併用経鼻ワクチンが現行の皮下接種法より優れている事が考えられる。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き、高病原性鳥インフルエンザの感染防御に働いたと考えられる。

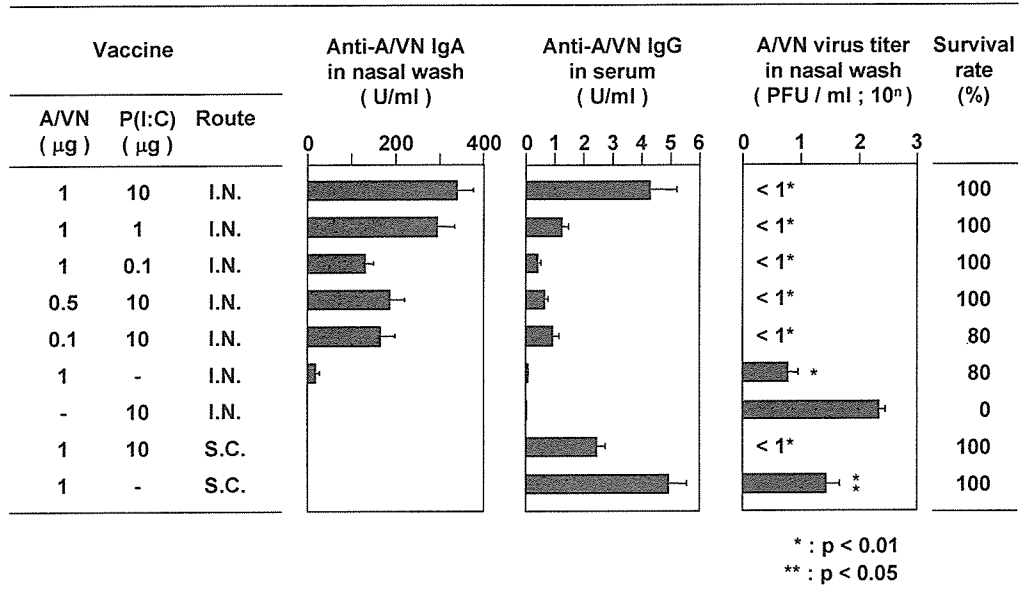
【結論】

高病原性鳥インフルエンザや今後パンデミックを起こす可能性のある新型インフルエンザに対して現行法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る。感染自体を粘膜で防御し交叉反応性のある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り特に流行株の予測が不可能な新型インフルエンザに対しては感染防御の有効な手段と考える。

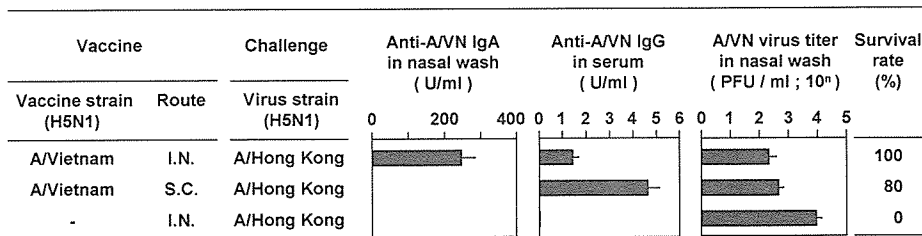
論文発表

1. Ichinohe T, Ito S, Kawaguchi A, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Moriyama M, Chiba J, Kurata T, Sata T, and Hasegawa H* Protection against influenza virus infection by intranasal vaccine with Surfclam Powder as a mucosal adjuvant. *J Med Virol*, 2006 78:954-963.
2. Asahi-Ozaki Y, Itamura S., Ichinohe T., Strong P., Tamura S., Takahashi H., Sawa H., Moriyama M., Tashiro M., Sata T., Kurata T., Hasegawa H., Intranasal administration of adjuvant-combined recombinant influenza virus HA vaccine protects mice from the lethal H5N1 virus infection. *Microbes Infect.* 2006 Oct;8(12-13):2706-14. Epub 2006 Aug 28.

☒ 1



☒ 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

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（国立病院機構三重病院）
前川 喜平（神奈川県立保健福祉大学）
粟屋 豊（聖母会聖母病院）
岡田 賢司（国立病院機構福岡病院）

研究要旨

本年は予防接種に関連した話題が多く特に MR ワクチンの 2 回接種の開始、日本脳炎ワクチンの積極的勧奨中止、DPT ワクチンの接種間隔の厳守等、我々も対応に追われた。研究班の報告にもそのような影響が現れており、制度の変化によるワクチン接種時、接種後の安全性の保証等の検討も見られた。また日本脳炎ウイルス感染は豚の社会ではいまでも残っており、ワクチン接種率の低下によるヒトへの影響が注目されている。又てんかん、重症心身障害児・者に対するワクチン接種は、熱性痙攣からスタートし本研究班でその在り方について、神経専門家のグループの援助を得て積極的に検討してきた。まだ不十分ではあるが、過去に接種から取り残され感染症罹患の危機にあった人たちが、このグループの研究によって接種方法の確立が出来てきたことは誠に意義深い、細かく成果を見て頂きたいと思っている。

A.研究目的

ワクチンの安全性については治験時の調査に始まり、発売後はメーカーが使用後の副反応調査を行って厚生労働省に報告する義務があり、医師等からの届け出によって管理されているが、その発生原因については接種医、被接種者、接種関係者(例えば市町村の担当職員)等の努力が大切である。それでも接種前の状況がすべて把握できるわけではなく、解決できないことも多い。この分担研究では現場の医師の協力により発生時のデータをできるだけ正確に把握することを目的としている。ワクチンは各種にわたりまとまりに欠ける欠点はあるが、今期は特に DPT(ジフテリア、破傷風B、百日咳)ワクチンとその抗体価の持続にも注目して検討した。その他単独ワクチンではあるが貴重な報告がきている。又この班では神経領域のハイリスク患者（てんかん患者、重症心身障害児・者）に対する安全な予防接種の在り方について検討した。特に今年度は欧米のこれらの疾患患者に対する実態も加えて検討することを目的とした。

B.研究方法

本研究の骨子は主として分担研究者とその研究協力者を中心に実施した。特に百日咳については岡田を中心に、成人領域の発生とワクチン効果について実際の症例を集めて検討し