

F. 健康危険情報

本年度においては幸い発生しなかった。

G. 研究発表 (論文発表)

- 1) Takeshi Ichinohe, Takeshi Kurata, Hideki Hasegawa, et al : Protection Against Influenza Infection by Intranasal Vaccine with Surf Clam Microparticles (SMP) as an Adjuvant . J. Med. Virology, 78:954-963,2006
- 2) Yasuko Asahi-Ozaki, Takeshi Kurata, Hideki Hasegawa et al : Intranasal admisistration of adjuvant-combined recombinant influenza virus HA vaccine protects mice from the lethal H5N1 virus infection. Microbes & Infection, 8:2706-2714, 2006
- 3) Tung Gia Phan, Toshimasa Kuroiwa, Hiroshi Ushijima et al : Changing distribution of Norovirus genotypes and genetic analysis of recombinant GLLb among infants and children with diarrhea in Japan. : J.Med.Virology, 78:971-978, 2006
- 4) Tung Gia Phan, Fumihiko Yagyu, Hiroshi Ushijima et al : Viral gastroenteritis and genetic characterization of recombinant Norovirus circulating in Eastern Russia. :Clin. Lab. 52:247-253,2006
- 5) Tung Gia Phan, Hainian Yan, Hiroshi Ushijima et al :Novel recombinant Norovirus in China. : Emerging Infectious Diseases, 12:857-858 (letters) , 2006
- 6) Tung Gia Phan, Shoko Okutu, Hiroshi Ushijima et al : Novel recombinant Sapovirus, Japan. : Emerging Infectious Diseases 12:865-867 (letters) , 2006
- 7) Tung Gia Phan, Quang Duy Trinh, Hiroshi Ushijima et al: Outbreak of Sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Osaka City, Japan

during 2004-2005: J. Med. Virology,78: 839-846,2006

- 8) Michiko Okame, Shiho Akihara, Hiroshi Ushijima, et al : Existence of multiple genotypes associated with acute gastroenteritis durring 6-year survey of Norovirus infection in Japan.:J. Med. Virology, 78:1318-1324,2006
- 9) Tung Gia Phan, Hideaki Shimizu, Hiroshi Ushijima, et al: Human adenovirus type 1 related to feline adenovirus: evidence of interspecies transmission. Clin. Lab. 52: 515-518,2006
- 10) Tung Gia Phan, Sayaka Takanashi, Hiroshi Ushijima, et al: Detection and genetic characterization of Norovirus strains circulating among infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2004-2005. : Clin. Lab.,52:519-525,2006
- 11) Tung Gia Phan, Hainian Yan, Hiroshi Ushijima , et al : Novel intragenotype recombination in Sapovirus., Clin. Lab., 52:363-366,2006
- 12) Tung Gia Phan, Pattara Khamrin, Hiroshi Ushijima, et al : Genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan in 2004-2005. : Infection, Genetics and Evolution,7:247-253,2007
- 13) Tun Gia Phan, Quang Duy Trinh, Hiroshi Ushijima, et al : Emergence of new variant rotavirus G3 among infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2003-2004. : Clin.Lab.53:xxx-xxx,2007
- 14) Hideaki Shimizu, Tung Gia Phan, Hiroshi Ushijima et al : An outbreak of adenovirus serotype 41 infection in infants and children with acute gastroenteritis in Maizuru City, Japan.Infection, Genetics and Evolution, 7:279-284, 2006
- 15) T.G.Phan, Q.D.Trinh, H.Jshijima, et al:

Emergence of rare sapovirus genotype among infants and children with acute gastroenteritis in Japan. : Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 26:21-27, 2007

16) 高山直秀、崎山弘、宮村達男、加藤達夫、梅本哲：麻疹、風疹、ポリオ生ワクチン2005年全国累積接種率調査結果、日本医事新報、4299:69-74、2006

17) 五島典子、中野貴司、長尾みずほ、庵原俊昭：インフルエンザ罹患時の異常言動に関する臨床的検討、小児感染免疫、18:371-376、2006

参考論文

1) Yoshiaki Arimura, Kaori Tanaka, Hiroyuki Tsutsumi, et al :Intractable colitis associated with chronic granulomatous disease. : J. Med. Microbiology, 55:1587-1590,2006

2) 富樫武弘：小児期の脳症－診断と治療、総合臨床、55:2850-2854,2006

3) 富樫武弘、館睦子、高瀬愛子、藤田晃三：麻疹撲滅に向けての実践的研究－札幌市から麻疹ゼロへ－、第31回札幌市医師会医学会誌、93-94,2006

4) 神谷齊、加藤達夫、富樫武弘、他：小児急性化膿性中耳炎における肺炎球菌血清型に関する疫学調査、感染症学雑誌、81:59-66、2007

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

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
平成 16 年度 分担研究報告書

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、子どもから青春期中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させ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を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与する遺伝子

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 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が可能である。

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 抗原に関しても必ずしも 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

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

平成 17 年度 分担研究報告書

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) AIK-C 株を生ワクチンウイルスベクターとして外来遺伝子を組み込んだ組換え麻疹ウイルスワクチンを作製した。2) ムンプスの既往歴、ワクチン接種歴があつて急性耳下腺炎の症状を呈し再感染が疑われた症例についてウイルス学的検討を行い、ムンプスウイルスの再感染・顕性発症が存在することを明らかにした。3) ムンプスウイルス感染症におけるワクチン株と野生株を鑑別できる領域に RT-LAMP primers を設定し効率よくムンプスウイルス遺伝子を増幅し鑑別できる方法を確認した。4) ムンプスウイルスの人での神経病原性を調べる動物モデルとして乳飲みラット実験系の妥当性を検討したところ、人の神経病原性と相関する結果が得られ、有望なモデル系であることが判った。5) 風疹ウイルスの 5 つの遺伝子型の 6 株において全遺伝子の決定と、8 つの遺伝子型を代表する 26 株の NS プロテアーゼ (NSP)、SG プロモーター (SGP) の解析を行った。6) 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ることにより、自然免疫を誘導し粘膜免疫を成立させることが判った。7) 不活化全粒子インフルエンザワクチンの経気道接種を人で行い、抗原特異的な抗体産生およびリンパ球増殖反応が見られた。8) 国産および海外の DTaP ワクチンを用いて、ワクチン接種局所における反応性の比較、評価を行うためのマウスモデルを開発した。9) マウスの DTaP 接種群において、DTaP 抗原特異的な Th 2 系サイトカイン (IL-4, IL-5) 産生増加を認めた。

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) ワクチンが開発されていないウイルス、または現行ワクチンでは有効性・安全性に問題があるウイルスに対して、製造承認され広く使用され安全性の保証されている AIK-C 株を生ワクチンウイルスベクターとして外来遺伝子を組み込んだワクチンを作製することを目的とした。2) ムンプスウイルスは、急性耳下腺炎をおこし、自然感染後には終生免疫を獲得し耳下腺炎を繰り返すことは無いと考えられてきた。一方、臨床的には急性耳下腺炎を繰り返す児を経験する事は多く、再発性耳下腺炎として曖昧な診断がなされている。急性耳下腺の原因としてはムンプスウイルス以外にサイトメガロウイルス、パラインフルエンザウイルス等のウイルス感染症

の他にも唾液腺石による閉塞、細菌性感染を鑑別診断すべきである。ムンプス自然感染における無菌性髄膜炎の頻度を調査した際に、ウイルス学的にムンプス感染症と診断された 1075 例におけるムンプス再感染例の有無について検討した。3) ムンプスワクチンは任意接種のワクチンとして使用されているが接種率は低くムンプスは毎年流行を繰り返している。無菌性髄膜炎の頻度は約 3,000-10,000 接種機会に 1 例の頻度であると報告されている。野生株の流行があるなかでワクチン接種を行うことから、ワクチン接種後の副反応症例の中には野生株による反応が紛れ込んでくる可能性がある。ワクチン株と野生株を効率よく簡便に鑑別できる方法が必要である。4) 新しいムンプスワクチンを開発するため、さらに現行ワクチンの安全性確認のためにも、ヒトでの神経病原性を鋭敏に閏知する実験系が必要とされている。本研究ではムンプスウイルスのヒトでの神経病原性を調べる動物モデルとして乳飲みラット実験系の妥当性を検討した。5) 風疹ウイルスの地域、時代による違いを分子疫学的に知るために、これまでに分離された風疹ウイルスの遺伝子型間の関係を明らかにすることを目的とした。本研究では 5 つの遺伝子型の全遺伝子の決定と、8 つの遺伝子型を代表する株の NS プロテアーゼ (NSP)、SG プロモーター (SGP) の解析を行った。6) ワクチンにおいて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 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) を経鼻アジュバントとしての効果を検討した。7) 乳幼児に対する有効なインフルエンザワクチン開発は重要な課題の 1 つである。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。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。8) DTaP 接種時の局所反応は米国、カナダ、オーストラリア等の海外でも問題となっている。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。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、評価をマウスモデルを使って検討した。9) 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 D T a P 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 T h 1 / T h 2 反応の面からマウスを用いて検討した。

B. 結果と考察

1) 外来性蛋白を発現する組み換え麻疹 AIK-C 株の確立

麻疹ワクチン AIK-C 株は Vero 細胞に small plaque を誘導し、39-40℃の増殖は 33℃の 1 万分の 1 という温度感受性 (temperature sensitivity; ts) を有している。Vero 細胞に small plaque を作り細胞融合能が低いことは F 蛋白 278 位のアミノ酸が Leu であること、ts の性状は P 蛋白 439 位の Pro が AIK-C の生物学的性状を担っていることを報告してきた。製造承認され広く使用され安全性の保証されている AIK-C 株を生ワクチンウイルスベクターとして P/M

junction に外来遺伝子約 3000 塩基 (GFP 遺伝子、 β gal、ムンプスウイルス HN) を組み込んだ組換え麻疹ウイルスワクチンを作製できた。未だ有効なワクチンが開発されていないウイルス感染症に対する応用が考えられる。

2) ムンプスウイルスは再感染・顕性発症することがある

ムンプスウイルスは、急性耳下腺炎をおこし、自然感染後には終生免疫を獲得し耳下腺炎を繰り返すことは無いと考えられてきた。臨床的にはムンプス再感染が強く疑われる症例を経験する事は多く、耳下腺腫脹を認め来院した児で既往歴、ワクチン接種歴を有し再感染が疑われた症例を検討した。血清 Ig G EIA avidity を測定し、再感染と考えられた症例の咽頭拭い液からウイルス分離、遺伝子が検出されることが明らかとなった。既往歴のある再感染例では血清 LAMP 陽性率が低くウイルス血症をおこしにくいと考えられたが、ワクチン接種歴を有する再感染例は初感染と同様ウイルス血症が認められる。ウイルス学的にもムンプスウイルスの再感染による顕性発症が認められる事が明らかとなった。

3) RT-LAMP 法を用いたムンプスウイルス星野株と野生株との鑑別

ムンプス星野ワクチン株と野生株の鑑別は、臨床検体から RNA を抽出し RT-PCR を行い特異的な制限酵素を用いてその切断パターンで判定する RT-PCR RFLP を行ってきた。RT-PCR 法よりも感度の高い RT-LAMP 法を開発し、ワクチン株と野生株を鑑別できる領域に RT-LAMP primers を設定し、検出感度は 0.03TCID₅₀/sample であった。臨床検体からウイルス RNA を抽出し LAMP 反応、Sca I 制限酵素処理、電気泳動と一連の操作は約 2 時間で最終判定できる。ワクチン接種後の副反応例の判定を容易なものとし精度の高い市販後調査を行うことができる。

4) ムンプスウイルス、おたふくかぜ生ワクチンの神経病原性評価

わが国のおたふくかぜワクチンによる無菌性髄膜炎の発生頻度は、自然感染した場合に起こる頻度に比べれば十分に低いものである。しかしながら、海外で用いられているおたふくかぜワクチンの多くに含まれる Jerryl-Lynn 株の副反応発生率は、それよりはるかに低い。国産のおたふくかぜワクチンは、かつてムンプスワクチン研究班が主体となって乳飲みハムスターの脳内接種実験で Jerryl-Lynn 株より病原性が少ない優れた株として選別され、カニクイザルを用いた試験、さらにヒトでの臨床試験で有効性と安全性が確認され上で承認された経緯を持つ製剤である。にもかかわらず、実際に多くのヒトに接種されると Jerryl-Lynn 株より神経病原性が高いものであった。これは、用いた動物実験がヒトでの病原性を反映していないか、あるいは、感度が期待された程ではなかったことを意味する。そこで、新たな試験方法導入を目指して米国 FDA の Rubin らによって研究された乳飲みラット実験系の妥当性を検討した。無菌性髄膜炎発症頻度の高い野外株 2 株と低いワクチン株 2 株を乳飲みラットの脳内に接種したところ、確かに野外株では水頭症の発症頻度が 40~75%、ワクチン株である国産 A、B 株と海外 Jerryl-Lynn 株では 0%になり、ヒトの神経病原性と相関する結果が得られ、有望な試験方法であることが判った。

5) 風疹ウイルス分離株の多様性について

風疹ウイルスの遺伝子型間の関係を明らかにするために、5つの遺伝子型の 6 株において全

遺伝子の決定と、8つの遺伝子型を代表する26株のNSプロテアーゼ(NSP)、SGプロモーター(SGP)の解析をおこなった。既に全遺伝子配列が報告されている2つの遺伝子型の10株とともに、総計7つの遺伝子型の16株において比較した結果、ともに同じ長さの2つのORFと3つの非翻訳領域があった。ただ遺伝子型2Aの2株においてSGP領域において1塩基短かった。塩基配列において遺伝子の最大の変異は9%であった。NSP1,SGPおよびE1領域で8遺伝子型の42株で系統樹を調べたところ、全て同じ系統樹が書けた。以前はE1領域のみの報告であったがNSP1,SGP、E1ともに風疹ウイルスの全体、組み換え、進化を理解するのに有用であることがわかった。興味深いことは遺伝子型2Aに加えて、遺伝子型1BにおいてSGP領域に僅かの変異が見られた。したがってSGP領域が遺伝子型を決めるのに有用なことが示唆された。さらにE2領域でClade1に反応するモノクローナル抗体がClade2(遺伝子型2A,2Bおよび2C)のどのウイルスとも反応しないことがわかり、2つのCladeの鑑別がウエスタンブロット法で可能なことがわかった。

6) 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

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。

7) 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

成人9例、年長児3例を対象として、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。血清HI抗体価が全く誘導されなかったが唾液ELISA IgA、IgGについてはいずれも12例中10例で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。細胞性免疫反応については、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。

8) 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

海外および国産の DTaP をマウス足蹠皮下、ウサギ背部皮内およびマウス大腿筋にそれぞれ 0.05ml、0.1ml または 0.05ml 接種し、経日的に腫脹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 日目に接種局所の病理組織学的検討を行った。その結果、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、国産ワクチンに比べて海外ワクチンで一貫して強い炎症が観察された。こうした炎症像の差はワクチンの性状の違いを反映しており、人においても同様の違いが認められる可能性が高い。このような詳細な比較、評価は臨床的には不可能である。今回のような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の同等性確認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。

9) DTaP三種混合ワクチン接種後のTh1/Th2反応

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。DTaP接種群のDTaP抗原で刺激をしたリンパ球において、Th2系サイトカイン（IL-4、IL-5、IL-10）分泌増加を認めた。今回の実験結果においては、DTaP接種は、液性免疫（Th2反応）を優位に誘導した。

発表論文

1. Okafuji T, Yoshida N, Fujino M, Motegi Y, Ihara T, Ota Y, Notomi T, Nakayama T. Rapid diagnostic methods for detection of mumps virus genome by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol* 43: 1625-1631, 2005
2. Kuroiwa Y, Nagai K, Okita L, Yui I, Kase T, Nakayama T, Tsutsumi H. A phylogenetic study of human respiratory syncytial viruses group A and B strains isolated in two cities in Japan from 1980-2002. *J Med Virol* 76: 241-247, 2005
3. Fujino M, Yoshida N, Yamaguchi S, Hosaka N, Ota Y, Notomi T, Nakayama T. A simple method for the detection of measles virus genome by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *J Med Virol* 76: 406-413, 2005
4. Jin L, Rima B, Brown D, Orvell C, Tecele T, Afzal M, Uchida K, Nakayama T, Song J-W, Kang C, Rota PA, Xu W, Featherstone D. Proposal for genetic characterisation of wild-type mumps strains: preliminary standardisation of the nomenclature. *Arch Virol* 150: 1903-1909, 2005
5. Ushio M, Yui I, Yoshida N, Fujino M, Yonekawa T, Ota Y, Notomi T, Nakayama T. Detection of respiratory syncytial virus genome by subgroups-A, B specific reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J Med Virol* 77:

121-127, 2005

6. Komase K, Nakayama T, Iijima M, Miki K, Kawanishi R, Uejima H. The phosphoprotein of attenuated measles AIK-C vaccine strain contributes to its temperature-sensitive phenotype. *Vaccine* 24: 826-834, 2006
7. Uejima H, Nakayama T, Komase K. Passage in Vero cells alters the characteristics of measles AIK-C vaccine strain. *Vaccine* 24: 931-936, 2006
8. Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Foy E, Loo Y-M, Gale JM, Akira S, Yonehara S, Kato A, Fujita T. Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in Antiviral Innate Immunity. *J Immunol* 175:2851-2858, 2005
9. Sakaguchi T, Kato A, Sugahara F, Shimazu Y, Inoue M, Kiyotani K, Nagai Y, Yoshida T. AIP1/Alix is a binding partner of Sendai virus C protein and facilitates virus budding. *J Virol* 79:8933-8941, 2005
10. Kubota T, Yokosawa N, Yokota S, Fujii N, Tashiro M, Kato A. Mumps virus V protein antagonizes interferon without the complete degradation of STAT1. *J Virol* 79:4451-4459, 2005
11. Ali M, Ushijima H. Perception of men on role of religious leaders in reproductive health issues in rural Pakistan. *J Biosoc Sci* 37: 115-122, 2005.
12. Phan TG, Okame M, Nguyen TA, Nishimura S, Nishimura T, Yamamoto A, Okitsu S, Ushijima H. Genetic diversity of sapovirus in fecal specimens from diarrheal children in Japan during 2002 and 2003. *J Med Virol* 150: 1415-1424. 2005
13. Yagyu F, Ushijima H. Determination of HIV-1 subtypes (A-D, G, CRF01_AE) by PCR with novel designed primers. *J Med Virol* 76:16-23, 2005.
14. Oka T, Katayama K, Ogawa S, Hansman G, Kageyama T, Ushijima H, Miyamura T, Takeda N. Proteolytic processing of sapovirus ORF1 polyprotein. *J Virol* 79: 7283-7290, 2005.
15. Ali M, Hotta M, Kuroiwa C, Ushijima H. Emergency obstetric care in Pakistan: potential for reduced maternal mortality through improved basic EmOC facilities, services, and access. *Int J Gynecol Obstetrics* 91: 105-112, 2005.
16. Phan TG, Nguyen TA, Yan H, Okitsu S, Ushijima H. A novel RT-multiplex PCR for enterovirus, hepatitis A and E viruses and influenza A virus among infants and children with diarrhea in Vietnam. *Arch Virol* 150: 1175-1185, 2005
17. Phan TG, Okame M, Nguyen TA, Nishio O, Okitsu S, Ushijima H. Genetic diversity of sapovirus in fecal specimens from infants and children with acute gastroenteritis in Pakistan. *Arch Virol* 150: 371-377, 2005
18. Hansman GS, Natori K, Oka T, Ogawa S, Tanaka K, Nagata N, Ushijima H, Takeda

- N, Katayama K. Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. *Arch Virol* 150: 21-36, 2005
19. Li L, Phan TG, Nguyen TA, Kim KS, Seo JK, Shimizu H, Suzuki E, Okitsu S, Ushijima H. Molecular epidemiology of adenovirus infection among pediatric population with diarrhea in Asia. *Microbiol Immunol* 49:121-128, 2005.
20. Hansman G, Yoshida H, Kuramitsu M, Katayama H, Takeda N, Ushijima H, Surenkhand G, Gantulga D, Kuroiwa C. Viral gastroenteritis in Mongolian infants. *Emerging Infect Dis* 11: 180-182, 2005
21. Yan H, Abe T, Gia Phan T, Anh Nguyen T, Iso T, Ikezawa Y, Ishii K, Okitsu S, Ushijima H. Outbreak of acute gastroenteritis associated with group A rotavirus and genogroup I astrovirus among adults in a mental health care facility in Japan. *J Med Virol* 75 475-481, 2005.
22. Phan TG, Tuan AN, Nishimura S, Nishimura T, Yamamoto A, Okitsu S, Ushijima H. Etiologic agents of acute gastroenteritis among Japanese infants and children: virus diversity and genetic analysis of sapovirus. *Arch Virol* 150: 1415-1424, 2005.
23. Wiens M, Korzhev M, Thakur NL, Perovic-Ottstadt S, Breter HJ, Ushijima H, Diehl-Seifert B, Muller I.M, Muller W.E.G. Innate immune defense of the sponge *Suberites domuncula* against bacteria involves a MyD88-dependent signaling pathway: Induction of a perforin-like molecule. *J Biological Chemistry* 280: 27949-27959, 2005.
24. Kano N, Lee S, Iwai K, Nagase T, Komatsu M, Muraki T, Ushijima H. A trial study on gender-based violence with ecological framework in one city in Ibaraki prefecture. *Ibaraki Pref. Medical Univ* 10: 75-84, 2005.
25. Phan TG, Nyuyen T, Shimizu H, Yagyu F, Okitsu S, Muller WEG, Ushijima H. Identification of enteroviral infection among infants and children hospitalized with acute gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. *J Med Virol* 77:257-264, 2005.
26. Yoshinaga M, Phan TG, Nguyen TA, Yan H, Okitsu S, Muller WEG, Ushijima H. Changing distribution of group A rotavirus G-types and genetic analysis of G9 circulating in Japan. *Arch Virol* 151:183-192, 2006
27. Muller WEG, Borejko A, Brandt D, Osinga R, Ushijima H, Hamer B, Krasko A, Xupeng Muller IM, Schroder HC. Selenium affects biosilica formation in the demosponge *Suberites domuncula*: Effect on gene expression and spicule formation. *FEBS J* 272: 3838-3852, 2005
28. Akihara S, Phan TG, Nguyen TA, Hansman G, Okitsu S, Ushijima H. Existence of multiple outbreaks of viral gastroenteritis among infants in a day care center in Japan. *Arch Virol* 150: 2061-2075, 2005.

29. Akihara S, Phan GT, Nguyen TA, Okitsu S, Mueller WEG, Ushijima H. Identification of Sapovirus .Infection among infants in a day care center. *J Med Virol* 77:595-601, 2005.
30. Huy TTT, Ishikawa K, Ampofo W, Izumi T, Nakajima A, Ansah J, Tetteh JO, Nii-Trebi N, Aidoo S, Ofori-Addjei D, Sata T, Ushijima H, Abe K. Characteristic of Hepatitis B virus in Ghana: Full length genome sequences indicates the endemicity of genome E in West Africa. *J Med Virol* 78: 178-184, 2005
31. Ali M, Miyoshi C, Ushijima H: Emergency medical services in Islamabad, Pakistan: a public-private partnership. *Public Health.* 120:50-57, 2006.
32. Khamrin P, Peerakome S, Wongsawasdi L, Tonusin S, Sornchai P, Maneerat V, Khamwan C, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. Emergence of human G9 rotavirus with an exceptionally high frequency in children hospitalized with diarrhea in Chiang Mai, Thailand. *J Med Virol* 78: 273-280, 2005.
33. Phan TG, Nguyen TA, Kuroiwa T, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Nishimura T, Yamamoto A, Okitsu S, Ushijima H. Viral diarrhea in Japanese children: results from a one- year epidemiologic study. *Clin Lab* 51: 183-191, 2005
34. Phan TG, Nguyen TA, Yan H, Yagyu F, Kozlov V, Kozlov A, Okitsu S, Muller WEG, Ushijima H. Development of a novel protocol for RT-multiplex PCR to detect diarrheal viruses among infants and children with acute gastroenteritis in Eastern Russia. *Clin Lab* 51:429-435, 2005
35. Schroeder HC, Borelko A, Korzhev M, Tahir MN, Tremel W, Eckert C, Ushijima H, Mueller I, Mueller WEG. Co-expression and functional interaction of silicaten with gelectin: Matrix-guided formation of siliceous spicules in the marine demosponge *Suberites Domuncula*. *J Biol Chem* 2006 [E-Pub]
36. Muller WEG, Ushijima H, Batel R, Krasko A, Borejko A, Muller I, Schroeder HC. Novel mechanism for the radiation-induced bystander effect: nitric oxide and ethylene determination the response in sponge cells. *Mutation Res* 2006 [E-Pub]
37. 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. *J Med Virol* 75:130-136, 2005
38. Ichinohe T, Watanabe I, Ito S, Fujii H, Moriyama M, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Synthetic double-stranded RNA [poly (I:C)] combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. *J Virol* 79: 2910-2919, 2005

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
平成 18 年度 分担研究報告書

分担研究者 倉田 毅 (富山県衛生研究所)
研究協力者 阪口雅弘 (千葉大学)

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) 風疹ウイルスの感染性 cDNA から *in vitro* RNA 合成し RNA transfection を行い、風疹ウイルスを回収する Reverse genetics の手法を確立した。2) 母乳中の風疹 IgA 抗体を酵素抗体法で測定し、初乳により高く風疹 IgA 抗体が検出され、初乳と成乳では正の相関が見られた。3) 風疹ウイルス 8 ゲノタイプ中ののべ 13 のゲノムにおいて塩基およびコドンの使用パターンの解析をした。4) ヒト神経芽腫細胞におけるムンプスウイルス増殖性とそのウイルス株の無菌性髄膜炎の頻度を比較した。5) 麻疹ワクチンウイルス AIK-C 株をウイルスベクターとして RS ウイルスの 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製した。6) 百日咳菌の IS 481 領域に特異プライマーを設定し、高感度で検出可能な百日咳 LAMP 法を開発した。7) DPT-不活化ポリオウイルス混合ワクチン (DPT-sIPV) の標準化を行い、次期参照品の安定性評価および各社の DPT-sIPV 試作品の力価を測定した。8) インフルエンザ罹患時の鼻汁、鼻咽頭拭い液中の IL-6, TNF- α の炎症性サイトカイン測定を行った。9) ELISPOT 法による 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の測定を行った。10) poly (I:C) をアジュバントとして用いた高病原性鳥インフルエンザワクチンをマウスに経鼻接種し、感染防御能を検討した。

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) 風疹生ワクチン高橋株の弱毒のマーカに関与する遺伝子を解析し、高温で増殖しない ts の性状を規定する遺伝子を特定するために、感染性 cDNA クローンを作製し、組換えウイルスを回収する reverse genetics の system を確立することを目的とした。2) 母乳中に風疹 IgA 抗体価と総 IgA 量、総蛋白量との関係を検討し、この風疹 IgA 抗体と妊娠中の血清中風疹抗体価 (HI 法) との関係进行明らかにすることを目的とした。3) 風疹ウイルスには GC の多い領域がある。GC が多いことがコドン使用にどう影響しているか調べるために、8 ゲノタイプの中で 13 ゲノムについて検討した。ここでは塩基組成とサブゲノムあるいはゲノムのコドン使用について調べた。4) ムンプスウイルスの神経病原性を評価できる系を比較検討し、無菌性髄膜炎発生頻度の低いワクチンの開発、あるいは既存ワクチンの安全性評価に役立てることを目的とした。5) 麻疹 AIK-C 株を生ワクチンウイルスベクターとして Respiratory syncytial virus (RSV) ウイルス遺伝子を組み込んだ組換え麻疹ウイルスワクチンを作製することを目的とした。6) 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、簡便で感度の高い百日咳菌の迅速診断法の

開発が望まれている。ウイルス感染症の LAMP 法を百日咳菌検出法として開発することを目的とした。7) DPT-不活化ポリオウイルス混合ワクチン (DPT-sIPV) 免疫原性評価を目的として、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。8) 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る。インフルエンザ感染の primary site の鼻汁、鼻咽頭拭い液の中のサイトカイン産生を調べることを目的とした。9) 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 HLA-クラス I 拘束性細胞障害性リンパ球 (CTL) 活性を調べた。すなわち、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 を用いた IFN-gamma 産生 CD8+細胞を ELISPOT 法によって検出する系の確立を目的とした。10) 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。新しいワクチンとして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の開発を目的とした。

B. 結果と考察

1) 風疹ワクチン高橋株の reverse genetics 法の確立

弱毒風疹生ワクチン高橋株のワクチンシードから genome RNA を抽出し RT-PCR で 6 フラグメントに分割し、風疹ウイルス内に存在する制限酵素部位を用いた全長 9762 塩基のプラスミドを構築した。感染性 cDNA から in vitro RNA 合成し RNA transfection を行い、風疹ウイルスを回収する Reverse genetics の手法を確立した。風疹高橋株は北里研究所で樹立した風疹ワクチン株で温度感受性のマーカーを有しており、ts の性状を規定する遺伝子領域の決定にこのシステムを利用し解析を進めている。

2) 母乳に含まれる風疹ウイルス抗体に関する研究 -第 1 報-

母乳中の風疹 IgA 抗体を酵素抗体法で測定を行った。初乳中がより高く検出され、初乳と成乳では正の相関が見られた。また、妊娠中の血清風疹抗体値と母乳中の抗体値は正の相関が見られた。しかし、妊娠中の血清風疹抗体値と風疹の既往あるいは接種歴とは関係は見られなかった。母乳の風疹に対する中和抗体についてはこれから検討する予定である。また、母乳の風疹予防については臨床を含めて今後検討する。さらに風疹 IgA の高い母親と低い母親とで同じくらい母乳を飲んだ時に小児がどれくらい風疹 IgA の抗体を保有したか定量化することが今後の課題と考えている。

3) 風疹ウイルスのゲノタイプ間のコドン シケーンズ解析の比較

風疹ウイルス 8 ゲノタイプ中の 13 のゲノムにおいて塩基およびコドンの使用パターンの解析をした。ゲノムは GC が多いウイルスであり、部位によってはその割合が異なる。HVR (hyper variable region) の GC 含有はコドンの第一および第二番目が高く、第三番目では低い。しかし全体的には GC はコドンの第三目に一番多く、次に第一番目、そして第二番目に多く見られた。異なるゲノタイプで特にコドン使用に差がなかった。HVR を除くと非ランダムなコドン使用であり、C で終わるコドンが主であった。全体的に突然変異圧が関係付けられた。Effective number of codon (Nc) とコドン 3 番目の GC 含有 (特に C) とは負の相関が見られた。実測 Nc plot と予測 Nc plot とは同様の突然変異圧を持っていた。しかし HVR では違っているようであった。

4) ムンプスウイルス、おたふくかぜ生ワクチンの神経病原性評価