

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ホルマリン不活化 intact virion 自体に adjuvant 活性があるという報告もあり<sup>7)</sup>、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

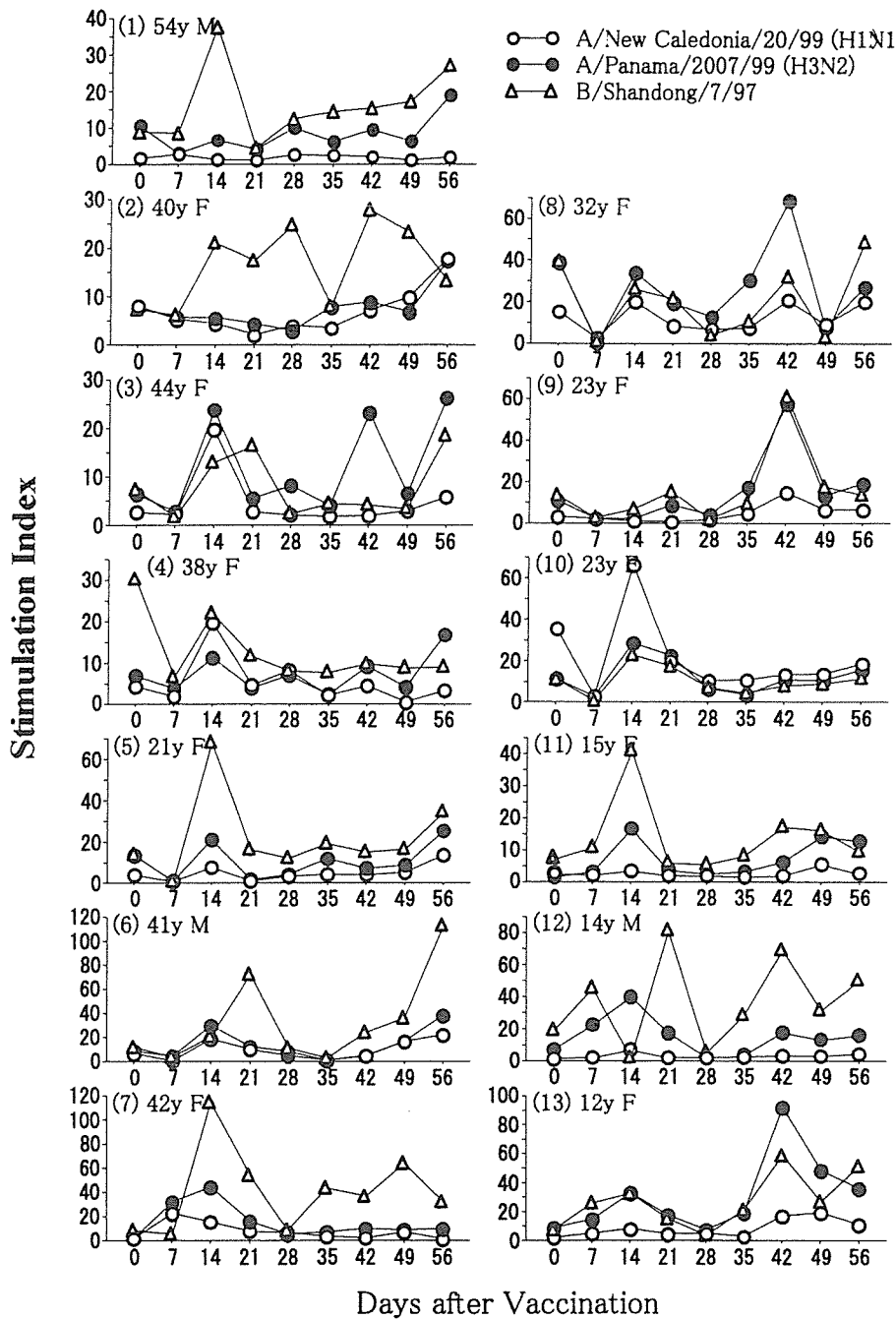


Figure 3. Kinetics of lymphoproliferative response expressed as stimulation indices directed against heterologous influenza virus antigen in subjects inoculated with nasal inactivated whole virion influenza vaccine. Immunization was performed on the day of the first (day 0) sampling and 4 weeks after 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<sup>8,9)</sup>。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<sup>3)</sup>、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<sup>3)</sup>。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 をもたらす 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す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<sup>4)</sup>。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<sup>10-14)</sup>。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-Luijtzte, 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.

9. Zahradnik, J.M., Kasel, J.A., Martin, R.R., Six, H.R. & Cate, T.R. 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.
10. Armstrong, S.J. & Dimmock, N.J. 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.
11. Mazanec, M.B., Kaetzel, C.S., Lamm, M.E., Fletcher, D. & Nedrud, J.G. Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin A antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:6901-5.
12. Mazanec, M.B., Coudret, C.L. & Fletcher, D.R. Intracellular neutralization of influenza virus by immunoglobulin A anti-hemagglutinin monoclonal antibodies. *J Virol* 1995;69:1339-43.
13. Fujioka, H., Emancipator, S.N., Aikawa, M. et al. Immunocytochemical colocalization of specific immunoglobulin A with sendai virus protein in infected polarized epithelium. *J Exp Med* 1998;188:1223-9.
14. Feng, N., Lawton, J.A., Gilbert, J. et al. Inhibition of rotavirus replication by a non-neutralizing, rotavirus VP6-specific IgA mAb. *J Clin Invest* 2002;109:1203-13.

# 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<sup>1)</sup>

96 穴 ELISA plate に 1 $\mu$ 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)<sup>2)</sup>

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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 <sup>3</sup>H-thymidine 0.2  $\mu$ 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.

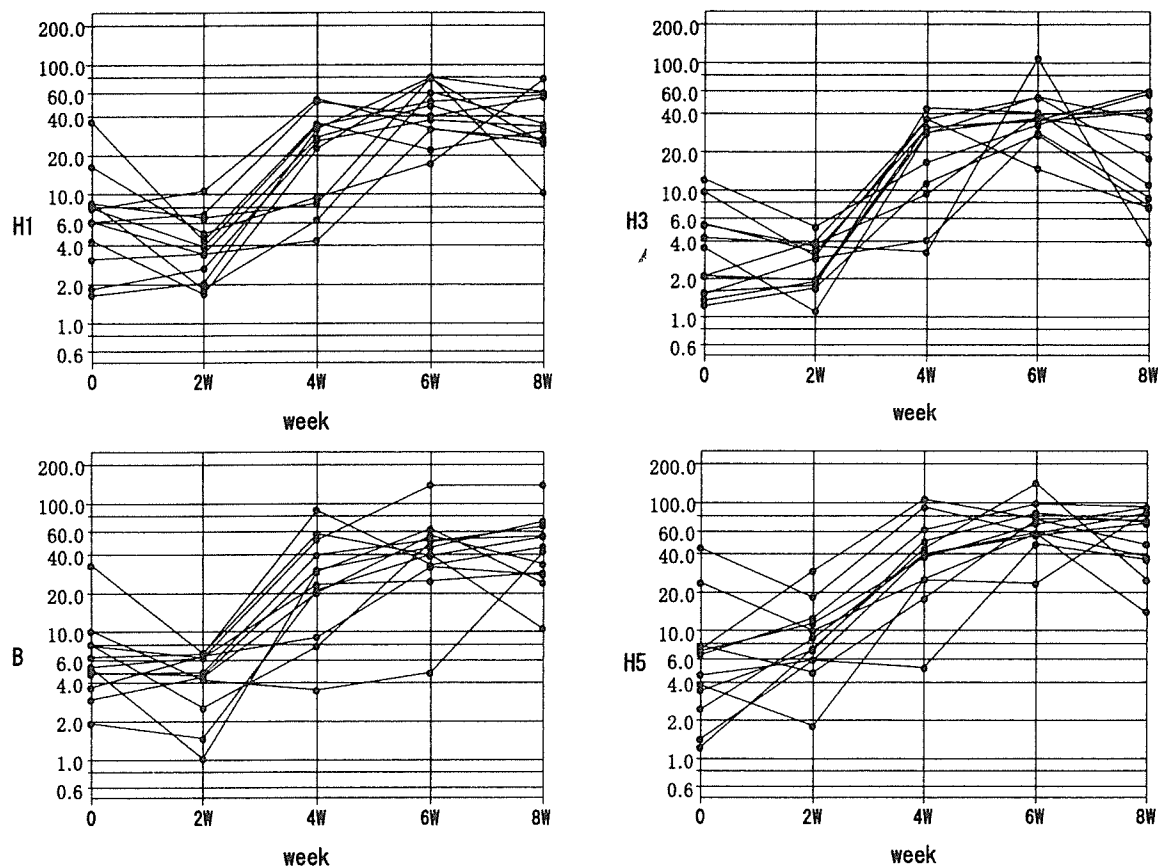
4. 考 按

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<sup>3)</sup>. 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<sup>4,5)</sup>. 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、昨年の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<sup>6)</sup>、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<sup>7-11)</sup>。

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 を繰り返す、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。この事実を、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<sup>12)</sup>。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<sup>13)</sup>。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, Homick 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. Casetti 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.

# 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源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

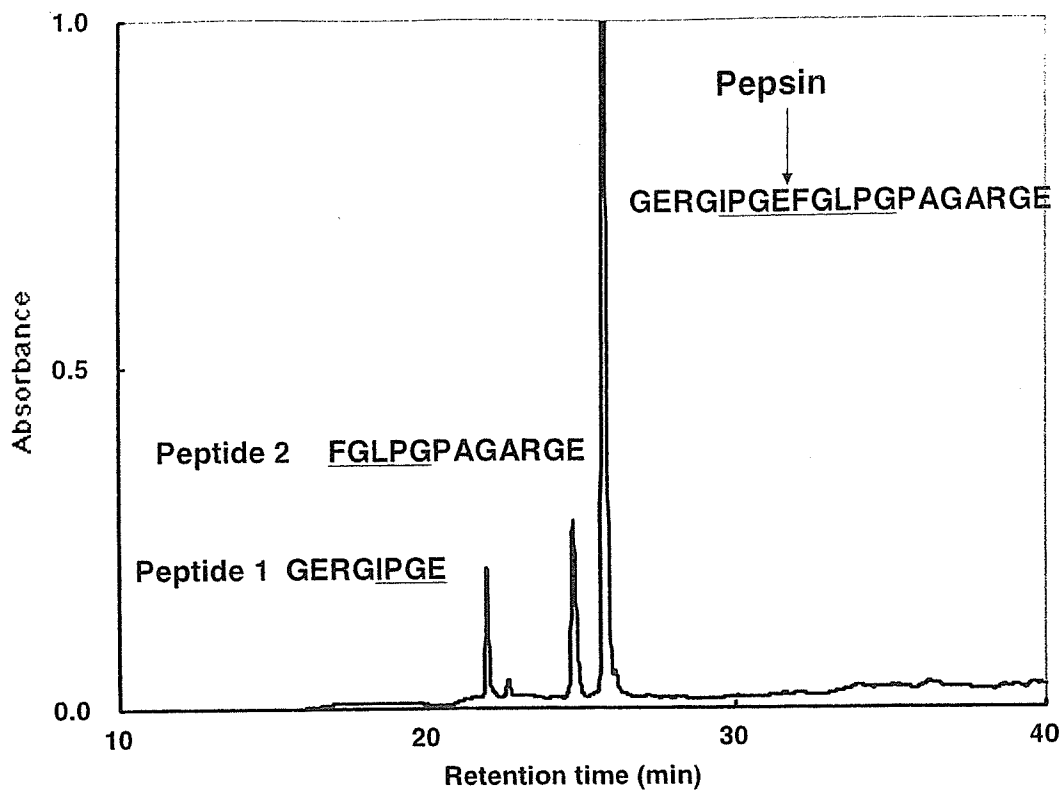


図2 患者血清を用いた IgE-ELISA inhibition 法によるペプシン酵素処理ペプチドのアレルゲン性の検討

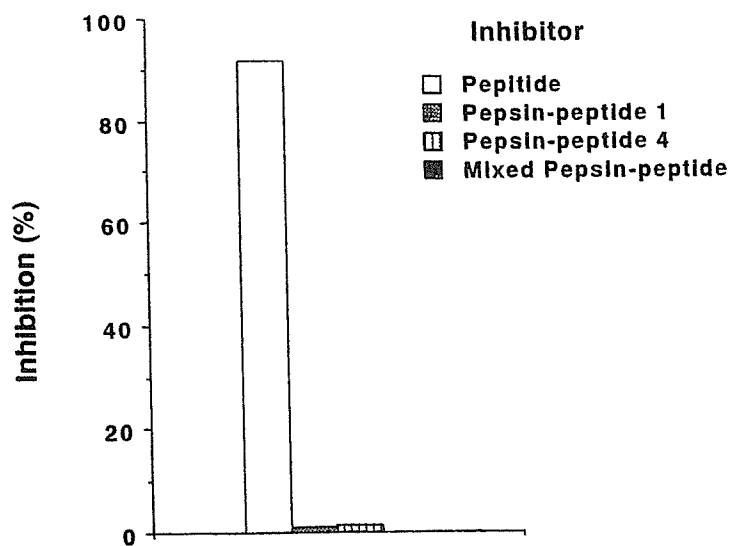


図3 コラーゲンI型におけるペプシン酵素反応後のHPLC分離パターン

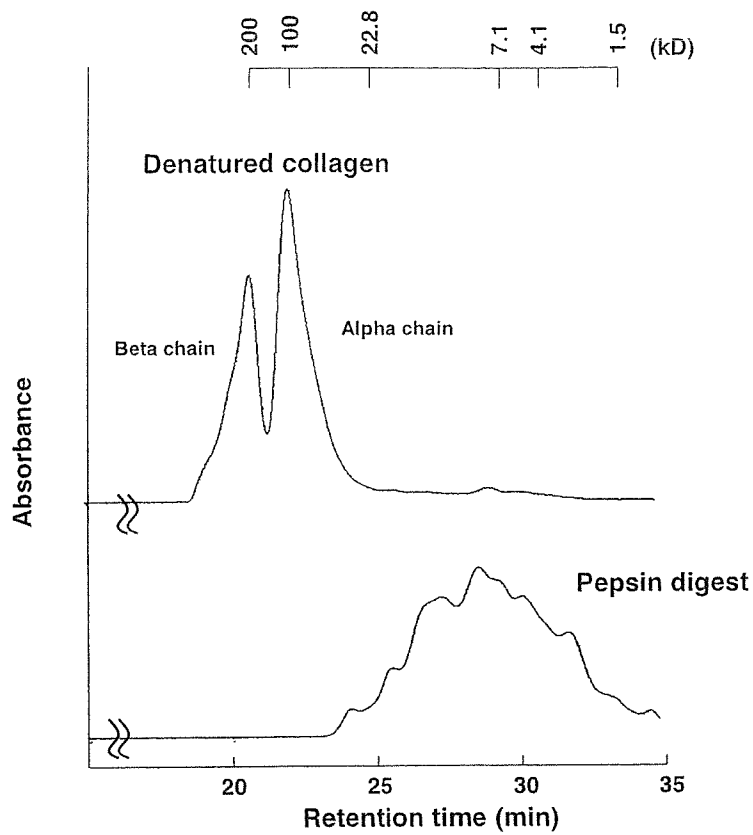


図4 コラーゲンI型におけるペプシン酵素反応後のSDS-PAGE

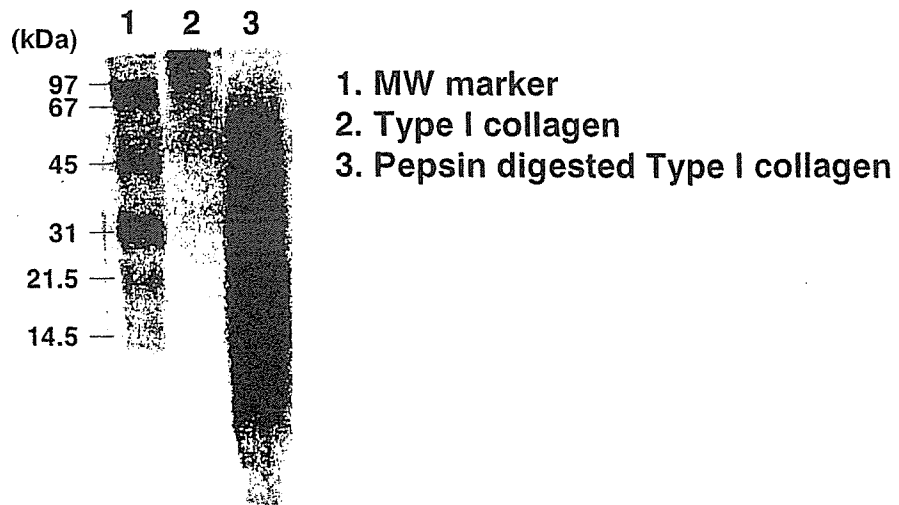
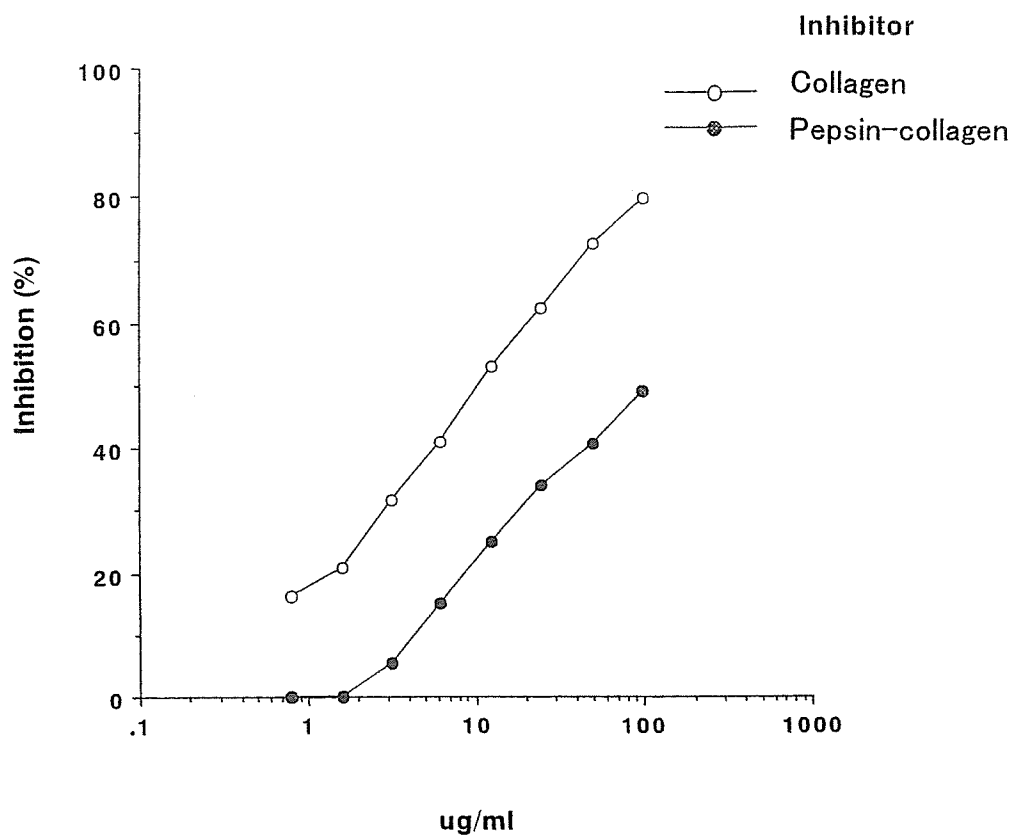




図5 患者血清を用いた IgE-ELISA inhibition 法によるペプシン酵素処理コラーゲン I 型のアレルギー性の検討





【結果】

- 1) 構築した pAIK- $\beta$ gal N/P、pAIK- $\beta$ gal P/M、pAIK- $\beta$ gal H/L の遺伝子配列の模式図を図1に示した。感染性ウイルス AIK- $\beta$ gal N/P、AIK- $\beta$ gal P/M を回収出来たが、pAIK- $\beta$ gal H/Lからは安定して感染性ウイルスを回収できなかった。
- 2) 回収されたウイルスを Vero 細胞に感染させ  $\beta$ galactosidase の発現を確認できた。AIK- $\beta$ gal P/M が  $\beta$ galactosidase を効率に発現しており麻疹ウイルス N 蛋白に対する monoclonal 抗体で染色すると麻疹ウイルス蛋白の発現も確認された。経時的にウイルス感染価を測定すると AIK- $\beta$ gal P/M のウイルスの増殖がよいことが明らかとなった (図2)。
- 3) ムンプスウイルス HN 遺伝子を P/M junction に挿入し pAIK-MpHN を構築し感染性ウイルス AIK-MpHN を回収した (図3)。Vero 細胞に感染させ麻疹ウイルスに対する polyclonal 抗体で染色し麻疹ウイルス蛋白の発現が確認され、同時にムンプス HN monoclonal 抗体で HN 遺伝子の発現が確認された (図4)。

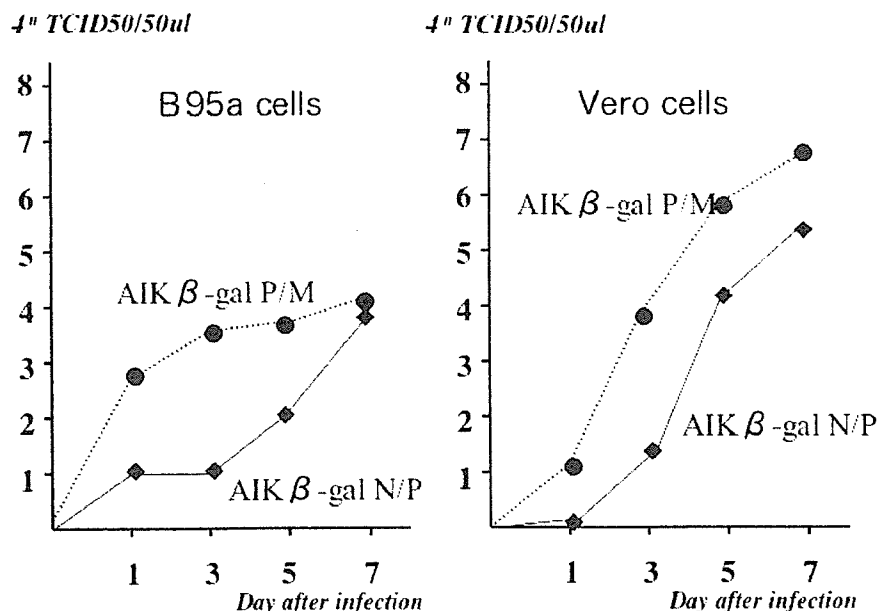


図2 AIK  $\beta$ -gal N/P と AIK  $\beta$ -gal P/M ウイルスの増殖能

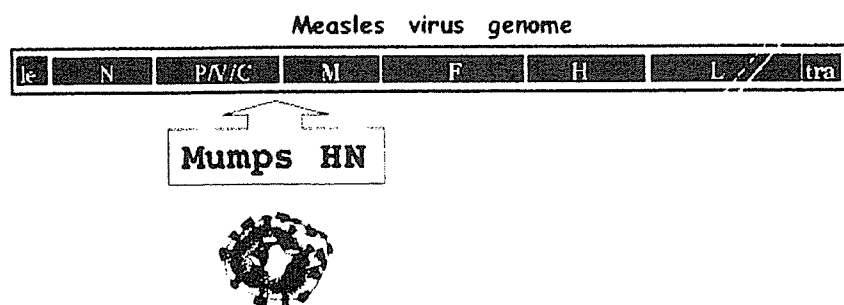


図3 ムンプス HN 遺伝子を挿入した遺伝子の構築

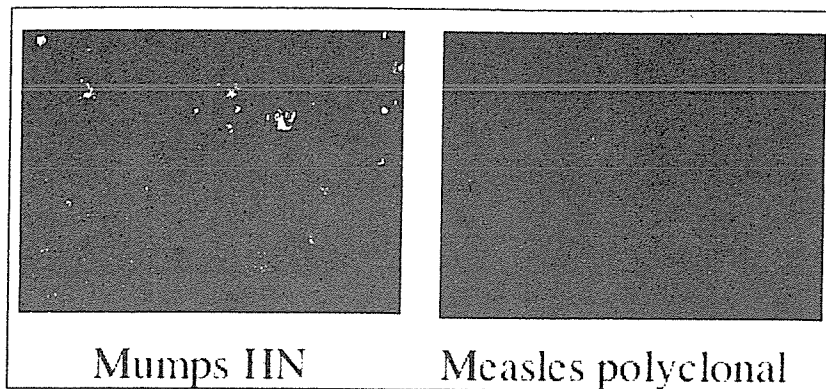


図4 組み換え麻疹ウイルスの麻疹ウイルス抗原、ムンプスウイルス抗原の発現

【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約 3000 塩基ぐらいまで挿入可能であることがわかっており、キメラワクチンウイルスベクターとしての展開が可能と考えられる。外来遺伝子挿入部位としては P/M junction に挿入したプラスミドから感染性ウイルスの回収率がよかったことは、麻疹ウイルスの gene order に沿って mRNA の量が減少することから外来遺伝子が N/P junction に挿入される事で P 蛋白 mRNA の量が減少し翻訳される量が低下しウイルスに転写・複製活性に必要な N-P-L 複合体を形成するときの N, P 蛋白の比率に影響するものと考えられる。ムンプスウイルス以外にも Respiratory syncytial virus (RSV) の様に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。