

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

加藤 篤、木所 稔、田代 真人（国立感染症研究所ウイルス第三部）

永田 典代、岩田奈織子、佐多徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）

網 康至（国立感染症研究所動物管理室）

【背景と目的】

流行性耳下腺炎、通称おたふくかぜは、耳下腺の腫脹、発熱や全身倦怠感、食欲不振、頭痛などを特徴とするムンプスウイルスによって引き起こされる主に幼児の感染症である。おたふくかぜを予防する唯一の方法は乾燥弱毒生おたふくかぜワクチンの接種である。わが国のおたふくかぜワクチンは 1981 年に初めて弱毒生ワクチンとして出荷され、一時期麻疹、風疹ワクチンと混合して MMR ワクチンとして定期接種された時期もあった。しかし、ワクチンの副反応としての無菌性髄膜炎が無視できないレベルに達したために定期接種が中止され、現在は単味ワクチンとして任意接種されている。

国産おたふくかぜワクチンの副反応として引き起こされる無菌性髄膜炎の頻度は、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、わが国のおたふくかぜワクチンに比べて 1/100 以下と言われており、海外ワクチンに比べて国産品が劣っている事は否定できない(表)。これが唯一の理由とは言えないが、わが国のおたふくかぜワクチン接種率は先進諸国で最低の部類になっている。そのため、度々全国的な流行が起きている。流行発生後、集団内を抵抗力をもった児童が占めるに従って流行は沈静化する、しかし、抵抗力を持たない児童が補充されて一定割合以上になると流行が再燃する。このサイクルは、だいたい、3~4 年である。今回は、2000 年後半から 2002 年にかけて流行期を迎え、2005 年から今年にかけて再び流行の兆しをみせている。

ムンプスウイルスには血清型は無いが、ウイルス遺伝子を解析すると若干の多様性があり、それに基づき A~K の 11 種類の遺伝子型に分ける事ができる。前回の流行期には、G または K 遺伝子型が主に分離された。今回の流行においては、今の所は、分離した株はすべて G 遺伝子型に属しており前回の 2000 年~2002 年の流行とウイルス学的には大差ないものと予想している。

流行を繰り返さないためには、副反応の少ない優れた国産ワクチンの開発、あるいは海外品の導入が望まれる。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、今回我々は手始めに、ムンプスウイルスのヒトでの神経病原性を測定する動物試験として報告されている乳飲みラット実験系の妥当性を検討した。

【材料と方法】

<動物及び接種方法、接種量> SPF LEW/Crj (Lewis) 妊娠メスラットを日本チャールス・リバー株式会社より購入し、生まれて 24 時間以内の乳飲みラットを実験に使用した(図 1)。接種量 100 pfu/ 10 ul で左視床に接種した。接種後、30 日目に脳の採取し、固定後の脳断面に於ける水頭症の発生により評価した。

<ムンプスウイルス> 髄膜炎の発生頻度が自然感染患者の 10%程を占めたとされる I 遺伝子型の Odate-1 株(秋田衛生研究所よりの分与)、前回 2002 年の流行時に分離された髄膜炎発生頻度 2%程の K 遺伝子型の 02-49 株(新潟衛生研究所よりの分与)、ワクチン株として B 遺伝子型の国産ワクチン A 株と B 株及び、A 遺伝子型の海外ワクチン Jerryl-Lynn 株を用いた(表)。

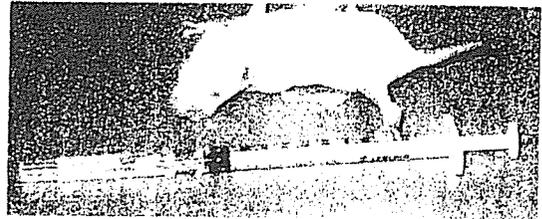


図1. 接種3日目のラット

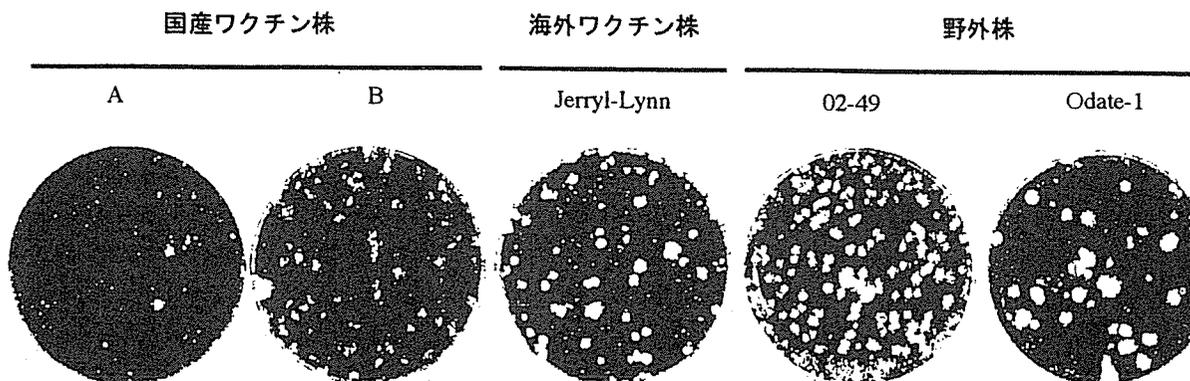
<ウイルスブラックと力価> Vero 細胞を用いたブラックタイトレーション法によりウイルスの力価を測定した。6 穴プレートに均一になるように細胞を培養し、培地を抜き取った後に 0.1 ml の希釈したウイルスを 37℃で 1 時間吸着させた。0.5% (w/v) アガロースを含む MEM 培地を重層し、1 週間培養後に細胞を 0.5% (v/v) グルタルアルデヒド溶液で固定し、アガロースを除いた後にアミドブラック 10B で染色し、出現したブラックの形状観察を行った。ブラック数と希釈率からウイルス力価を算出した。

【結果】

ウイルスブラックの性状

野外株 Odate-1 株と 02-49 株は、どちらも Vero 細胞で非常に大きく、縁辺部の形状のはっきりとしたブラックを形成した。一方、国産ワクチン株 A 株と B 株は小さなブラックを形成し、特に A 株にはピンホール状の多数のブラックが、B 株では A 株に比べて大きいものの縁辺部の形状のはっきりしないブラックが観察された。この条件下で海外のワクチン株である Jerryl-Lynn 株は、野外株よりはやや小さいが、国産ワクチンに比べて大きくて縁辺部がはっきりしたブラックを形成した。(図 2)。

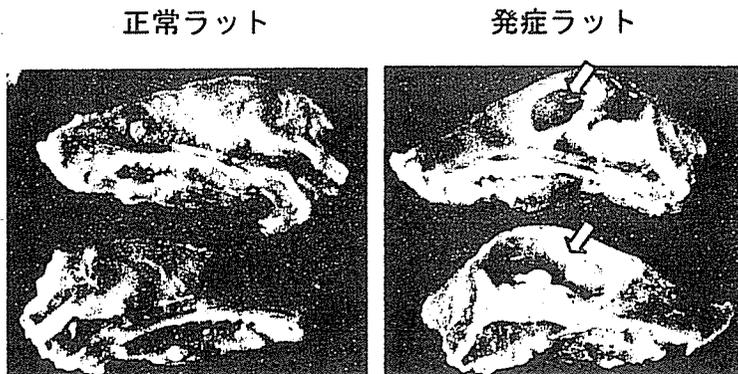
図2. ムンプスウイルス株とブラックの形状



ラット接種成績

Rubinら(*J. Virol.*, 72:8037-8042, 1998)の方法に従い、神経病原性の異なる5株のムンプスウイルス (100 pfu / 10 ul)を脳内接種した。接種後30日目に脳を採取し、脳内の拡張の様子から水頭症発生の有無(図3)を評価した。

図3. ラット頭部縦断面



野外株については、4~5匹、ワクチン株については9~10匹について調べた(表)。野外株では水頭症の発症が認められたが、ワクチン株では認められなかった。このことから、ヒトでの髄膜炎発生頻度と、ラットの水頭症発生頻度の間には、大雑把にはある程度の相関があるように思われた。国産と海外のワクチン株内では、今回の試験では差は認められなかった。

株		遺伝子型	ラット* 水頭症頻度	ヒト 髄膜炎頻度
野外株	Odate-1	I	3 / 4 (75%)	~10%
	02-49	K	2 / 5 (40%)	~2%
ワクチン株	国内	A	0 / 10 (0%)	~0.1%
		B	0 / 9 (0%)	~0.1%
	海外	Jerryl-Lynn	A	0 / 10 (0%)

*乳飲みラット1匹あたり100 pfu/10 ulで脳内接種したときの頻度

表 ラットを用いた神経毒力試験とヒトでの髄膜炎発症頻度

【考察】

現在、国産のおたふくかぜ生ワクチン3株が出荷されており、いずれもB遺伝子型に属している。ワクチンの有効性という観点からは、2000年~2002年に全国規模で流行したG遺伝子型株、K遺伝子型に属する新しい株に対しても機能することが知られている。また、2005年から始まった流行も今の所G遺伝子型の株が主体と予想され、現行国産ワクチンで対処できるものと予想される。一方、安全性の観点からは、海外のおたふくかぜ生ワクチンJerryl-Lynn株に比べて副反応としての無菌性髄膜炎の発生率が高く(表)、ワクチンを普及させ接種率を向上させるための障害とな

っている。よりよいおたふくかぜ生ワクチンの導入あるいは開発が求められているのが現状である。

ワクチンの安全性を評価する品質管理方法として、現在でもいくつかの試験がワクチン製造所の自家試験、並びに国家試験でも行われている。なかでもブラックサイズマーカー試験は、小さなブラックを作るウイルスはヒトでの病下性が低下している証しとして導入されたが、国産ワクチンより副反応率の低い Jerryl-Lynn 株のブラックサイズが国産ワクチンよりも大きく明瞭であることから、既にマーカー試験本来の意味は失なわれていると解釈できる(図 1)。サルを用いた弱毒確認試験も行われているが、とてもヒトでの発生頻度が 0.1%程度の神経病原性を定量的に検出できるほど鋭敏ではない。今後、新しいワクチンを開発するためにも、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。

ハムスターあるいはマウスを用いた脳内接種試験(McCarthy ら、*J. Med. Virol.*, 5:1-15, 1980)があるが、ハムスターの脳内接種試験成績を基に開発された国産ワクチンのヒトでの副反応発生率をみる限り、ヒトの神経病原性との相関は低いと言わざるを得ない。その他に乳飲みラット(Rubin ら、*J. Virol.*, 72:8037-8042, 1998, *ibid.*, 74:5382-5384, 2000)とマーモセット(Saika ら、*J. Med. Virol.*, 66:115-122, 2002)を用いた試験が報告されている。今回我々は、Rubin らの方法に従って明らかに無菌性髄膜炎発症頻度の高い野外株と低いワクチン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伺えた。

しかし、ヒトでの無菌性髄膜炎発症頻度に明らかな違いがある国産ワクチン株と海外 Jerryl-Lynn 株の差を示すには至っておらず、ヒトでの発生頻度が 0.1%程度のものを測定可能にする工夫が必要である。たとえば、病理組織化学的パラメーターの導入、用いるラットの匹数を増やす、あるいは接種ウイルス量を増やす事等の追加検証が考えられる。また、未だ限られた株での試験成績であるので、用いる野外株並びにワクチン株の数を増やしてヒトでの神経病原性と何処まで相関するのかを詳しく検証する必要があると思われた。

【結 語】

おたふくかぜ生ワクチンを普及させるためには、ワクチンの安全性と有効性をきちんとモニターしていく必要がある。なかでも神経病原性を鋭敏に測定できる優れた動物実験系を開発し、新しいワクチンの開発あるいは現行ワクチンの品質管理に応用することが強く求められている。

わが国におけるロタウイルス G 血清型の 20 年にわたる変動 —ロタウイルスワクチンの開発に向けて—

牛島 廣治、朱 蕾、Phan TG、沖津 祥子

(東京大学大学院医学系研究科国際保健学専攻発達医科学)

〔緒言と方法〕ロタウイルス胃腸炎は乳幼児のウイルス性胃腸炎として重要な疾患であるとともに、開発途上国での小児の主要死亡原因として問題視されている。現在、ロタウイルスのワクチンの開発および市販化に向けての作業が進んでいる。流行しているロタウイルスの血清型を知ることはより効果的なワクチンを開発するために必要なことである。さらにロタウイルスの遺伝子レベルでの解析も必要になってくる。ロタウイルスの血清型は型特異的なモノクローナル抗体が作製され市販化されることにより簡便になった。しかしながら、市販されているモノクローナル抗体に反応しないロタウイルスが見出されるようになった。一方、型特異的プライマーを用いた RT-PCR は、費用がかかるが G タイプ (VP7 遺伝子) とともに P タイプ (VP4 遺伝子) も決めることが出来、ウイルスの動向をみるのに有用である。

我々は、1984年から現在に至るまで、札幌、東京、舞鶴、大阪、佐賀（あるいは久留米）の病院およびクリニックの外来から小児の糞便検体を得て、ロタウイルス型別のモノクローナル抗体を用いた酵素抗体法あるいは型特異プライマーを用いた RT-PCR で G 血清型（遺伝子型）を経年的に調べてきた。毎年約500検体でそのうち30%前後がロタウイルス陽性であった。ここでは全国の成績をまとめて各血清型の割合を図示した。また、9型については、遺伝子解析の結果を含めて報告する。

〔結果〕図1には、G血清型の変動を示した。1980年後半より G1 が40%から次第に上昇して、1990年代には80-90%を示すようになった。しかしながら2000年ごろから急激に1型が減少してきて2002-2003年には10%以下となった。G2は時に20%位を示すことがあり、2000年から2002年頃には30-40%を示した。

2002-2003年には G3, G4 が比較的上昇してきたが、今後の推移を見る必要がある。G9については世界的傾向とも関連し1999年-2003年に20%前後を示した。現時点では急激な上昇はみられない。図2は G9 の全塩基配列での比較を示す。現在 G9 は3つの亜型(lineage)に分けられる。その中で、116E (インドでの株) は G9-I に、1980年代のわが国の AU32 や F45 は G9-II に、我々の1998-2002年の検体は G9-III に属した。G9-III のなかでも1998-1999年のものは1999-2002とはやや異なる傾向を示した。

〔考察〕ロタウイルスの G 血清型の頻度が年によって変化していることがわかった。特に1990年代には1型が多くを占めていたが、2000年代になって著しく減少した。この事は、多くの日本人が G1 に対する抗体を持つようになったため、G1 の伝播が少なくなったためかもしれない。しかしながら今後、納得できる説明を求めて研究が必要である。G9 は世界的な流行が見られたが、我々の報告では20%位までの頻度で見られたに過ぎない。一方、タイ国チェンマイでは G9 が最近90%以上までに上昇している (私信)。1980年

代にG9型がわが国で認められている（F45, AU32）が、当時我々はモノクローナル抗体を得ることができず、またRT-PCRでの検査が開発されていなかったためG9の成績を持ち合わせていない。さらに当時の検体を現在持ち合わせていないため今後検査を行うことができない。9型の中でも、亜型が変化してきていることがわかった。この事は9型だけでなく1-4型にも共通することと思われる。このようにしてロタウイルスにおいて大きな血清型の変化を認めながら、また同一血清型内での変異による亜型が流行しているように思われる。この原因には抗体保有率や世界的なウイルスの移動や新しい組換えなどが考えられるが今後の検討課題である。

（謝辞）これらの検体採取は、兼次邦男、金保洙、山本あつ子、西村修一、上田勇一、中谷茂和、西村忠史、杉田久美子、黒岩利正、本廣 孝の諸先生のご協力によった。

参考文献

- 1) Zhou Y, Li L, Kim B, Kaneshi K, Nishimura S, Kuroiwa T, Nishimura T, Sugita K, Ueda Y, Nakaya T, Ushijima H. Rotavirus infection in children in Japan. *Pediatric International*. 42:428-439, 2000
- 2) Zhou Y, Supawadee J, Khawan C, Tonusin S, Peerakome S, Kim B, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Akatani K, Maneekarn N, Ushijima H. Characterization of human rotavirus serotype G9 isolated in Japan and Thailand 1995 to 1997. *J Med Virol* 65:619-628, 2001.
- 3) Zhou Y, Li L, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Distribution of human rotaviruses, especially G9 Strains, in Japan from 1996 to 2000. *Microbiol & Immunol* 47, 591-599, 2003.

風疹ワクチン高橋株の reverse genetics 法の確立

中山哲夫¹⁾、坂田真史¹⁾、駒瀬勝啓²⁾

1) 北里生命科学研究所 ウイルス感染制御 I

2) 国立感染症研究所 ウイルス第三部第二室

【目的】弱毒風疹生ワクチン高橋株は 1960 年代後半に我が国で分離された野生株をウサギ辜丸細胞、ウサギ腎細胞で継代し低温馴化株を樹立し生ワクチンとして製造している。弱毒のマーカ―としての生物学的性状に關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ことを目標とした。こうした解析には感染性 cDNA クロ―ンを作製し組換えウイルスを回収する reverse genetics の system を確立する必要がある。

【方法】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 pUC18 ベクターの multicloning site を利用し風疹ウイルス内に存在する制限酵素部位を利用し全長 9762 塩基を組み込んだプラスミドを構築した。遺伝子発現のプロモーターには T7、または SP6 プロモーターの下流に風疹ウイルス遺伝子を配した。reverse genetics 法により作製するウイルスの遺伝子マーカ―としてアミノ酸変異を起こさないように 9647 位の遺伝子 T→A に置換し組換えウイルスの遺伝子マーカ―とした。in vitro RNA を合成し Vero 細胞に transfection した。風疹ウイルス感染価の測定は Vero 細胞単層培養に plaque 形成法で算出した。

【結果】

- 1) ワクチンシードウイルスから RT-PCR で 6 フラグメントを増幅し Nde I, Nhe I, Bgl II, Asc I, Pst I の制限酵素部位を利用し全長 cDNA を構築し pUC18 multicloning site の Hind III, Eco RI にクローニングした。T7, SP6 プロモーター配列を付加し 9647 位の T と A に置換した (図 1)。In vitro RNA 合成し作製した RNA を電気泳動し構築したサイズの RNA が合成されていることを確認した (図 1)。

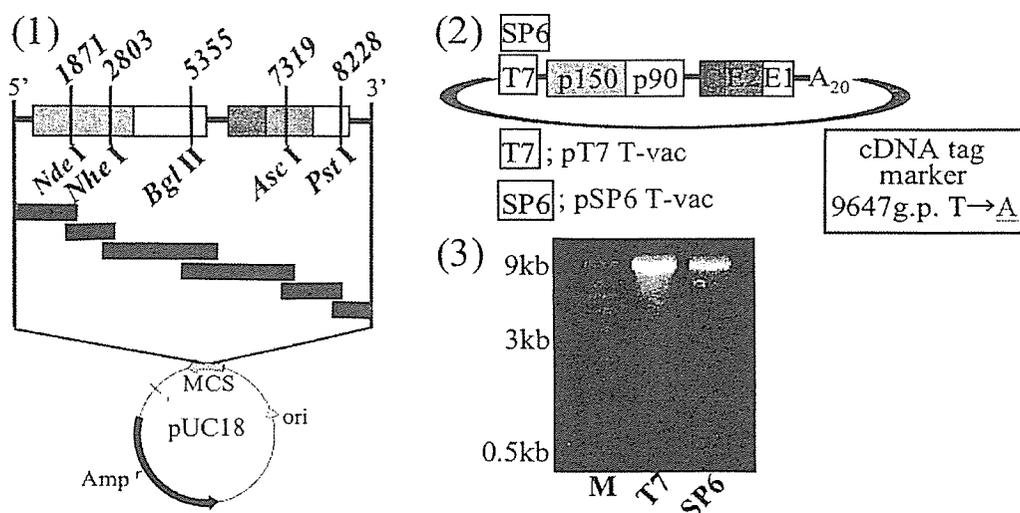


図 1 風疹ウイルス感染性 cDNA の構築

- 2) 合成した RNA を Vero 細胞、RK13 細胞に transfection し経時的に培養上清中のウイルス量を測定した。24 時間後には感染性ウイルスが検出され RK13 細胞では 48 時間後、Vero 細胞では 96 時間後にはピークに達しその後は変化がなかった。ウ

ウイルス回収効率は Vero 細胞の方が RK13 細胞と比較して約 10 倍程度高い事が明らかとなった (図 2)。

- 3) 回収されたウイルスの遺伝子を解析し 9647 位の遺伝子は A で、高橋ワクチン株は T であった (図 3)。組換え風疹ウイルスの tag 遺伝子マーカーとして導入した変異をもっているウイルスを回収できた。導入した変異により新たな Sph I 制限酵素部位ができる事になり高橋ワクチン株では切断できないが組換えウイルスの RT-PCR 産物は Sph I で切断された。
- 4) 1960 年代後半に分離された風疹野生株と遺伝子配列の違いを検討した。構成蛋白遺伝子領域 C 蛋白領域で 4 アミノ酸、E2 蛋白で 8 カ所、E1 蛋白で 5 アミノ酸の差を認めた。非構成蛋白 p150 では 15 アミノ酸、p90 には 1 カ所のアミノ酸に変異を認めた。

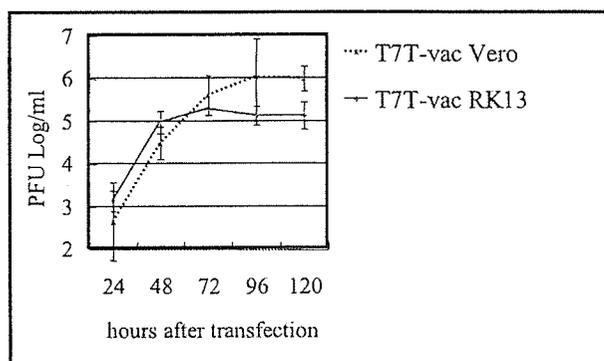


図 2 感染性ウイルスの回収

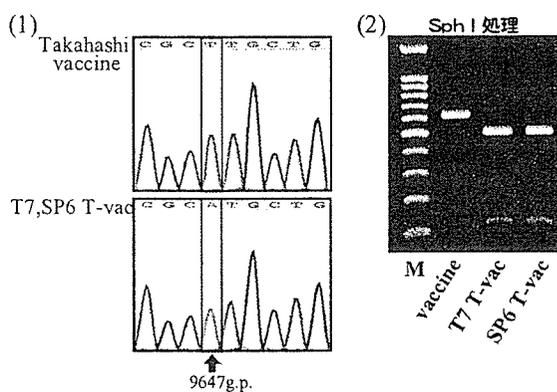


図 3 回収したウイルスの遺伝子

まとめ

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。

百日咳 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である。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が、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。百日咳LAMP法を開発することで迅速診断が可能となり百日咳の実態を把握するためには有用な検査法と考えられる。

【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。

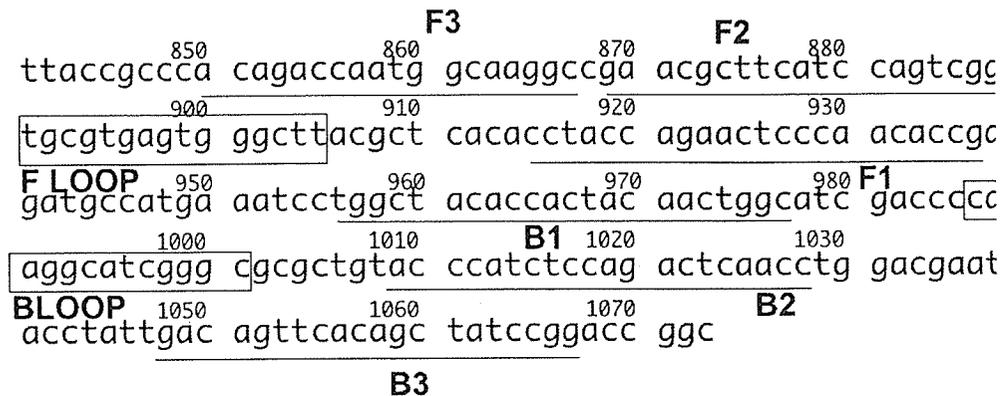
【結果】

- 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。



Pertussis LAMP for IS481

IS481 F3; 5'-ACAGACCAATGGCAAGGC-3'

IS481 B3; 5'-CCGGATAGCTGTGAACTGTC-3'

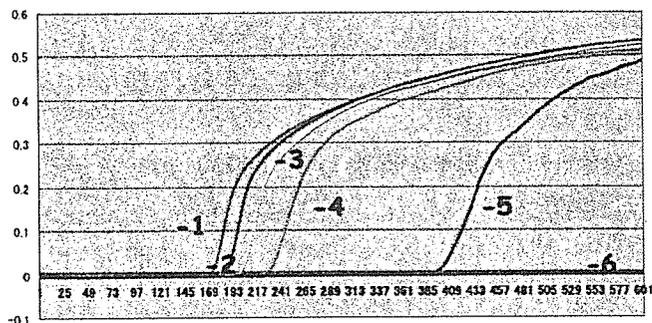
IS481 FIP; 5'-CGGTGTTGGGAGTTCTGGTAGGGAACGCTTCATCCAGTC-

IS481 BIP; 5'-TGGCTACACCACTACAACCTGGCGGTTGAGTCTGGAGATGC-

IS481 F LOOP; 5'-AAGCCCACTCACGCAAGG-3'

図1 百日咳 IS481 LAMP primer の設定

Real time LAMP for IS481



-1 -2 -3 -4 -5 -6



Tohama strain 2.5×10^5 cfu/100 ul

図2 百日咳 IS481 LAMP 法の検出限界

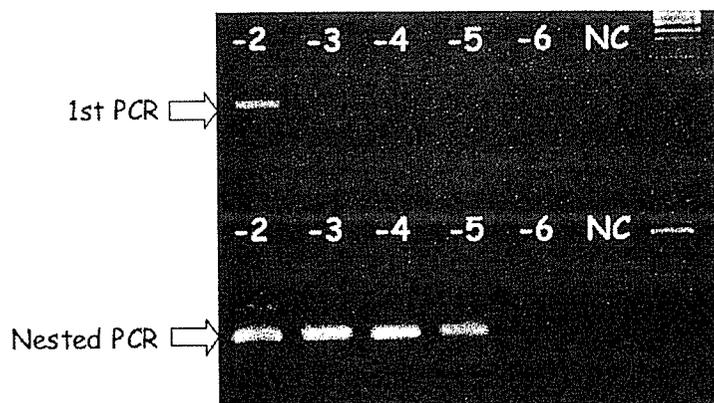


図3 百日咳 IS481 遺伝子領域の PCR

まとめ

百日咳菌の分離は検出率が低く、また、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。このシステムを利用し臨床検体をもちいて検討が必要である。

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 隆宇、宮村達男(国立感染研)

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】

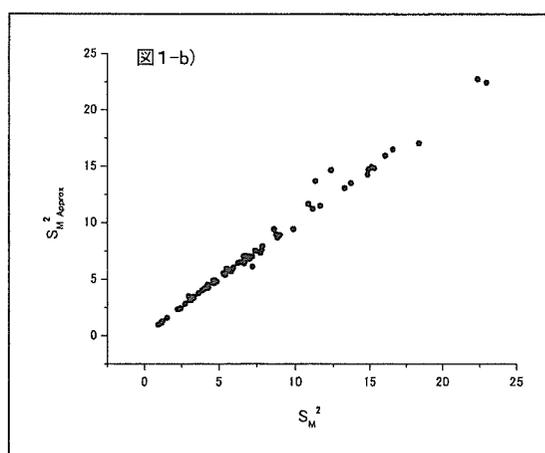
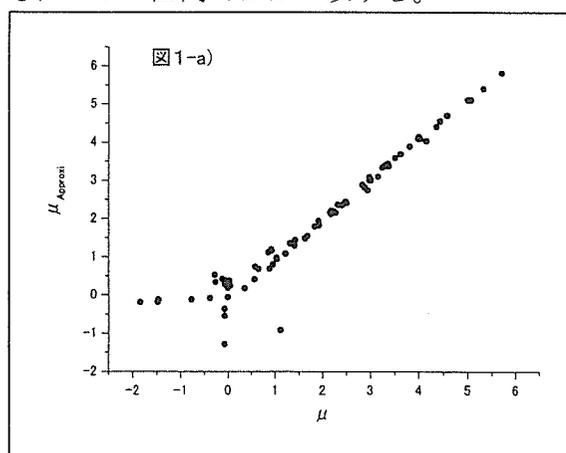
IPVの力価試験は、参照品および検体ワクチンの適当な数希釈を免疫したラット血中の中和抗体価より、検体ワクチンの免疫原性を参照品に対して相対的に評価する方法である。このときワクチンの力価や濃度によっては中和抗体が検出レベルを下回る不応答動物がみられる。不応答動物を含む群は、検出限界値のところで切れた分布、すなわち打ち切り標本となっており、平均抗体価等は最尤推定をすることになる。しかし計算が容易でないことから、今回、近似推定法を作成した。近似法では、検出限界以上の値の平均値を mY 、検出限界値を含む実測値の分散を S^2 とすると、平均抗体価の推定値 μ_{Approx} は、

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

分散の近似値 $S_{M^2}^2_{Approx}$ は

$$S_{M^2}^2_{Approx} = s^2(0.6297 + 0.2947 * \exp(h/0.3195) + 0.03447 * \exp(2h/0.3195))$$

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。

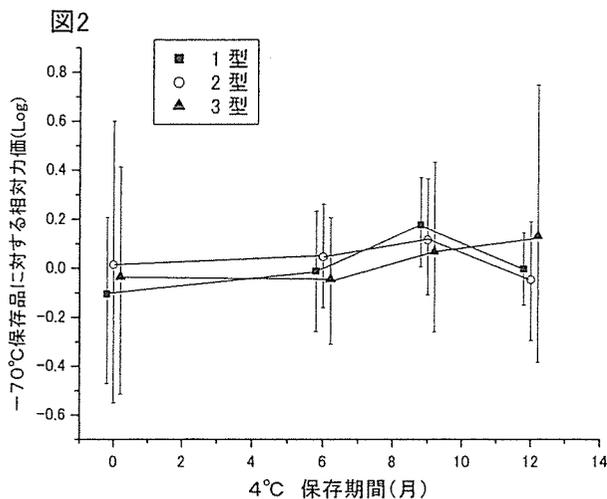


そこで本試験においてはこの平均抗体価および分散の近似計算値を用いることで十分と考えられ、計算のための簡易計算シートを作成した。ただし近似推定式の定数はさらに蓄積データにより改良のための微調整をはかっていくことが望ましい。

【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

めの基底条件保存品として同時に一定数量を-70℃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℃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



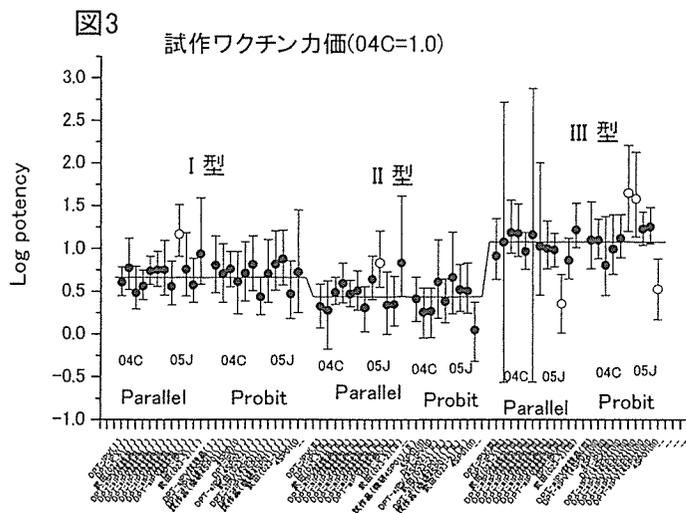
1に示す結果となった。各型について0～12ヶ月の相対力価は均一性が否定されず、いずれも有意な変化がなく安定であることが確認された。

【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 1)、中山哲夫 1)、永井崇雄 2)
1)北里生命科学研究所 ウイルス感染制御、 2)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、鼻咽頭吸引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。検体は 3000rpm, 10 分遠心し上清中の 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た。

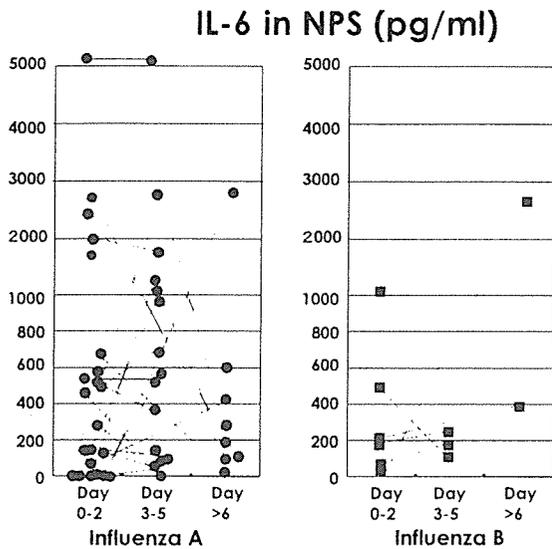


図1 鼻咽頭吸引液中の IL-6

γ

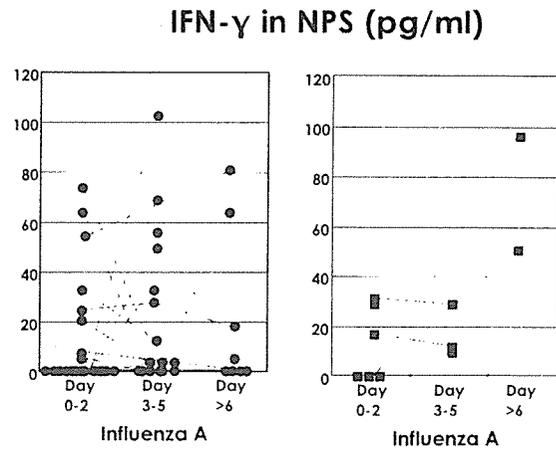


図2 鼻咽頭吸引液中の IFN-

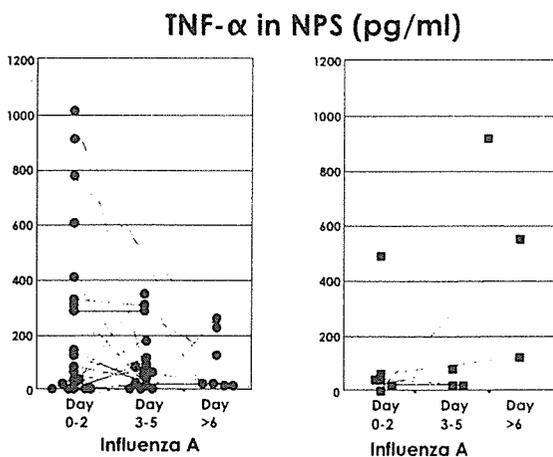


図3 鼻咽頭吸引液中の TNF- α

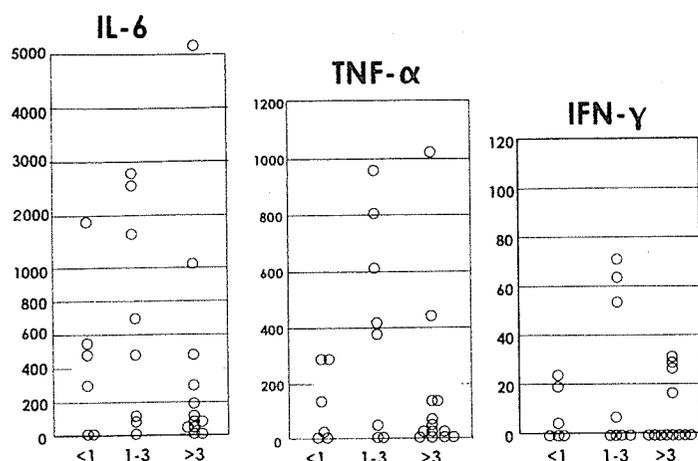


図4 年齢別の IL-6, TNF- α , IFN γ

【考察】

インフルエンザ脳症の発症機序は、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、インフルエンザウイルス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、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。鼻汁・鼻咽頭吸引液を対象としてサイトカインを測定したため、MEM 培養液で希釈されて一定の希釈倍率とはならない。しかしながら、ほぼ一定の条件で検体を採取しており、絶対的な数値ではないが、希釈された検体でも高値のサイトカインが局所で産生されていることが明らかとなった。年齢によるサイトカイン産生の比較は、さらに症例数を増やした検討が必要と考えられた。

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

平成 16 年度 分担研究報告書

分担研究者 神谷 齊

研究協力者 前川 喜平

栗屋 豊

岡田 賢司

研究要旨

ワクチンの安全性と有効性について特に一般的なワクチンの安全性と有効性の問題につき個々のワクチンについて問題点をまとめた。また、基礎疾患を持つハイリスク小児に対するワクチン接種は必要でありながら副反応の出現が危惧され保護者の心配も多い。各基礎疾患別に研究成果をまとめた。すなわち喘息、アトピー性皮膚炎、鼻アレルギーを持つ人への安全な接種の方法、最近症例が増えてきた骨髄移植、生体肝移植症例等免疫抑制剤を使用している症例への安全なワクチン接種のあり方、てんかんを持つ児への基準案、子どもに多いウェスト症候群に対する免疫学的評価、重症心身障害児に対する接種基準の統一の試みなど臨床に有効に利用できる研究に努力した。

A. 研究目的

世界におけるポリオ流行の局在化と根絶の近いことから、わが国でもポリオワクチンの実用化に向けての研究が早急に必要である。麻しん、風しん等の生ワクチンは1回接種法であったが、10歳代から抗体低下が指摘されることから、自然感染によるブースター機会の低下も考慮して追加接種の必要性を調査研究する。また乳幼児へのワクチン接種のスケジュール変更が考慮されるとき（BCG等）安全性の確保、接種率の維持・向上と小児への負担増回避のため、混合ワクチンの開発、採用についても研究する。

重症心身障害児（者）、癲癇、強度のアレルギー疾患、腎臓病、小児がん等の基礎疾患を持った児に対する予防接種のあり方について検討し安全かつ有効な接種を目指す。

また欧米常用され、わが国でも新たに採用を考慮すべきワクチン、特に小児用、高齢者用のワクチンにあってはその安全性において継続的追跡研究を行う。

B. 研究方法

中心的研究は分担研究者、研究協力者が行ったが、全国の予防接種に関係する臨床医学、疫学、ワクチン研究者、地域における予防接種の指導的立場の臨床医等に依頼状を送り研究に参加していただける方の協力を得て研究成果の報告をいただいた。各研究者により研究方法は統一はしていないが、それぞれやりやすい方法でデータを集め検討を加えた。年度末には研究協力者全員が参加する総会が実施され報告と討議を行いその報告をまとめた。

倫理面への配慮：本研究はアンケート調査、個別の症例検討が含まれるが、

個人が特定されるような情報は含まれないように注意し、症例等は機密保持にも注意した。

C. 研究成果

1. 水痘ワクチンの定期接種化に向けて検討

水痘ワクチンは世界では米国で定期接種化され接種率の向上に伴って、水痘の流行疫学に明らかな変化が認められ、流行の現象と共に合併症、死亡率の大幅な減少が認められ、コストベネフィットも明らかになってきている。残念なのはわが国の高橋博士によって開発されながら使用成績の向上が今一步であることである。その理由のひとつに接種後の再罹患があげられているが、今回の10年間の追跡調査による報告では、罹患なし80.2%、ワクチン接種後罹患あり19.2%でありしかもその症状は非常に軽度であり、ワクチン効果は十分あるとのことであった。また再感染率も他の報告とほぼ同様で20%程度であり使用に十分耐えるものとの研究成果であった。

入院症例に就いて藤田保健衛生大学を中心に愛知県下3つの総合病院での4-10年間の検討では小児9例、成人64例の入院症例が集まり毎年5例前後が入院し、皮膚感染症、肺炎、中枢神経合併症等で入院し基礎疾患免疫不全のあるものでは予後が悪いことが報告され、全国調査をすればさらに実態がはっきり知ると思われる。それにより本ワクチンの定期接種化の必要性も明らかにすることが出来ると思われる。

2. DPT ワクチンの問題点

局所反応についてマウスを用いた研究では、臨床で見られる1回目の接種では、局所腫脹は接種24時間後と7日目ころにピークがある。その理由についての研究では24時間後は好中球浸潤、7日目は組織球（繊維芽細胞）の浸潤が見られた。また2回目接種群は接種1-2日目の局所反応として好中球浸潤がありその後は比較的軽症化されることも一致した。まだ完全な解明には到っておらず原因究明には更なる研究が期待される。

百日せきの患者数はむしろ増加の傾向にある。罹患例ではDPTワクチンの接種時期が1歳を過ぎている症例が多く、早期の接種が要望されている。また成人が長期に咳をしているときには、百日せきを念頭において外来で細菌培養検査を確実にする必要がある。

3. 移植患者における予防接種

臍帯血移植患者では抗原に未感作であるためワクチン接種の必要性が強調されている。今回は百日せきワクチンの必要性について7歳を越える年長児でも必要性があることの報告があった。また生体肝移植児に対するワクチン接種は一定の条件下でやれば免疫反応はよいという成果が報告された。免疫不全（部分型DiGeorge症候群）乳児一過性低ガンマグロブリン血症等であっても各種ワクチンの接種により全体的に全体的な免疫機能の賦活や抑制が起こると報告され、ワクチン接種後の免疫反応はおおむね十分とされた。

4. アレルギー児への予防接種

麻しんワクチンの接種は卵アレルギー児でも特に問題ないとガイドラインでも書かれているが2003年からは卵接種後のアナフィラキシー既往のある小