

Hiraide E, Wakatsuki Y, Kiyono H, Hachimura S. Two distinct epitopes on the ovalbumin 323-339 peptide differentiating CD4 T cells into the Th2 or Th1 phenotype. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76(10):1979-81, 2012

Kunisawa J, Kiyono H. Immune regulation and monitoring at the epithelial surface of the intestine. *Drug Discov. Today* 18(1-2):87-92, 2013

Sato S, Kaneto S, Shibata N, Takahashi Y, Okura H, Yuki Y, Kunisawa J, Kiyono H. Transcription factor Spi-B-dependent and -independent pathways for the development of Peyer's patch M cells. *Mucosal Immunol.* in press, 2013

Kusu T, Kayama H, Kinoshita M, Jeon SG, Ueda Y, Goto Y, Okumura R, Saiga H, Kurakawa T, Ikeda K, Maeda Y, Nishimura J, Arima Y, Atarashi K, Honda K, Murakami M, Kunisawa J, Kiyono H, Okumura M, Yamamoto M, Takeda K. Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 7 controls Th17 cell responses through regulation of luminal ATP in the small intestine. *J. Immunol.* 190(2):774-83, 2013

○ Kong IG, Sato A, Yuki Y, Nochi T, Takahashi H, Sawada S, Mejima M, Kurokawa S, Okada K, Sato S, Briles D, Kunisawa J, Inoue Y, Yamamoto M, Akiyoshi K, and Kiyono H. Nanogel-based PspA intranasal vaccine

prevents invasive disease and nasal colonization by *Pneumococcus*. *Infect. Immun.* in press, 2013

2. 学会発表

<国外>

Kiyono H. Gordon Research Conferences: Glycolipid & Sphingolipid Biology, Invited Speaker, "Role of glycolipid/S1P in the regulation of mucosal immunity", Lucca, Italy. April 2012

Kiyono H. Molecular Immunology & Immunogenetics Congress 2012, Invited Speaker, "MucoRice: Rice-based Oral Vaccine Development", Antalya, Turkey. April 2012

Kiyono H. The 4th Microbial Pathogenesis & Immunity Symposium, Invited Speaker, "Mucosal Innate Immune System for Mucosal Inflammation and Elimination", Seoul, Korea. May 2012

Yuki Y, Kong IG, Sato A, Nochi T, Mejima M, Kurokawa S, Hiroiwa T, Fukuyama Y, Sawada S, Takahashi H, Akiyoshi K, Kiyono H: Adjuvant-free nanogel-based PspA nasal vaccine for the induction of protective immunity against *Pneumococcus*. The American Association of Immunologists (AAI) Boston, USA (2012)

Kiyono H. The 19th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, Invited Speaker,

“Molecular Understanding for Physiology and Pathology”, “Mucosal integrated immunological seesaw between mutualization and elimination in the intestine.”, Seoul, Korea. August 2012

Kiyono H. The 10th International Congress on Plant Molecular Biology, Invited Speaker, “MucoRice: Fusion of Mucosal immunology and plant biology led to the development of rice-based oral vaccine”, Jeju, Korea. October 2012

Kiyono H. The 35th General Meeting of Turkish Society of Microbiology, Invited Speaker, “Spick and Span in Intestinal Immunity: From Mucosal Homeostasis to Vaccine Development”, Izmir, Turkey. November 2012

<国内>

Kiyono H. The Joint Symposium of the 7th International Symposium of the Institute Network, Invited Speaker, “Mucosal decisions for mutualism, inflammation and elimination”, Sendai, Japan. June 2012

清野宏. 第12回日本抗加齢医学会総会、招待講演者、基礎科学 5:腸内フローラ“粘膜免疫による腸内細菌共生制御機構”、横浜、2012年6月

清野宏. 第5回日本口腔検査学会総会・学術集会、招待講演者、“粘膜免疫：口腔から始まる最大の免疫システム”、東京、2012年8月

Kiyono H. STS Forum 9th Annual Meeting,

Session B, Invited Speaker, Mucosal Vaccine for the Control of Infectious Diseases, Kyoto, Japan. October 2012

Kiyono H. The 34th Naito Conference on Infection, Immunity and their Control for Health, Invited Speaker, Mucosal Barrier, Pathogen and Vaccine, “Spick-and-span in mucosal vaccine development”, Sapporo, Japan. October 2012

清野宏. あいちサイエンスフェスティバル 2012 市民向け講演会「先端科学技術と社会」, 招待講演者、“未知との遭遇：腸という最大の免疫システム”, 名古屋、2012年10月

Kiyono H. IEIIS 2012 Homeostatic Inflammation Symposium, Invited Speaker, “Mucosal integrated immunological seesaw between physiological and pathological inflammation”, Tokyo, Japan. October 2012

清野宏. ポスト日本ワクチン学会シンポジウム・サテライトシンポジウム「次世代感染症ワクチンの開発をめざして」、招待講演者、粘膜ワクチン開発へ向けて最先端研究の動向”、東京、2012年11月

清野宏. 第41回日本免疫学会学術集会、招待講演者、トークレビュー：粘膜免疫最近の展開、神戸、2012年12月

清野宏. 第14回神田川腎セミナー、招待講演者、粘膜免疫による共生と排除の統合的制御、東京、

2013年1月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

課題2. 注射型と粘膜型ワクチンの有効性と安全性における相違点の理論基盤構築

課題3. ウイルス株間の防御抗原の交差反応性と防御効果についての科学的根拠とその応用

「経鼻インフルエンザワクチンの有効性と安全性の理論基盤構築に関する研究」

分担研究者：長谷川 秀樹(国立感染症研究所 感染病理部)

協力研究者：相内 章(国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター)

鈴木 忠樹(国立感染症研究所 感染病理部)

研究要旨：経鼻インフルエンザワクチンは、上気道粘膜上に分泌型 IgA 抗体を誘導し感染自体を阻止することが可能である。これは主にマウスを用いた実験において証明されてきたが、ヒトはこれまでの感染やワクチン接種によりインフルエンザウイルスに対する基礎免疫を有しており、マウスとは異なり免疫学的に無垢な状態ではない。この基礎免疫が、経鼻ワクチン接種で誘導される抗体応答に与える影響は、現在のところ明らかになっていない。本研究では、感染、経鼻あるいは皮下ワクチン接種の履歴がある場合に、その後行われる経鼻あるいは皮下ワクチン接種により誘導される抗体応答を明らかにすることを目的とした。その結果、経鼻ワクチン接種は皮下ワクチン接種と比較した場合、抗原性の異なるウイルス感染による基礎免疫を有する個体においても、攻撃ウイルスの増殖を抑える効果が高いことが明らかになった。

A. 研究目的

我々が実用化を目指し研究を行っている経鼻インフルエンザワクチンは、注射により接種される現行のインフルエンザワクチンとは異なり、全身性の血中 IgG 抗体に加えて感染の場となる上気道粘膜上に分泌型 IgA 抗体を誘導することが明らかとなっている。粘膜上に準備される分泌型 IgA 抗体により、感染自体を阻止することが可能になると期待されている。またマウスを用いた実験から、この分泌型 IgA 抗体は IgG 抗体と異なり、変異により抗原性を変えたウイルスに対する交叉防御能が高いことが明らかになっている。

経鼻インフルエンザワクチン研究のモデル動物のマウスとは異なり、ヒトはインフルエンザウイルスに対して過去の感染やワクチン接種により基礎免疫を有しており、免疫学的に無垢(ナイーブ)な状態ではない。2009 年の世界的大流行(パンデ

ミック)を引き起こした新型インフルエンザウイルス[A(H1N1)pdm09]は、これまでの季節性インフルエンザウイルス[A(H1N1)]とは抗原性が大きく異なったため、当初 A(H1N1)pdm09 に対するワクチンは 2 回の接種が推奨された。しかしながら、健康成人では 1 回の接種で十分な抗体応答がみられることが明らかとなった。これは、健康成人が有しているインフルエンザウイルスに対する基礎免疫が、A(H1N1) pdm09 のワクチン接種により誘導される免疫応答に影響を及ぼした可能性を示唆している。

経鼻インフルエンザワクチンにおいて、既存の基礎免疫が及ぼす影響は現在明らかになっていない。そこで本研究では、経鼻あるいは注射によるワクチン接種により基礎免疫を構築したマウスに対して、改めてインフルエンザワクチンの接種を行い、誘導される抗体応答に対して基礎免疫が与える影響を検討した。

B. 研究方法

1) マウス

6~8 週齢、雌の BALB/c マウスを一群 5 匹で利用した。動物への処置は国立感染症研究所の定める動物実験実施規定に則り、苦痛を与えないように考慮した。

2) ウイルスおよびワクチン

インフルエンザウイルスとして、代表的な実験室株である A/Puerto Rico/8/34 (PR8 株、H1N1)、および 2009 年のパンデミックの際に国内で分離され、その後マウスに対して馴化を行った A/ Narita/1/09 (NRT 株、(H1N1)pdm09)を用いた。またワクチンとして、各ウイルス株をホルマリンにより不活化した全粒子不活化粒子(全粒子不活化ワクチン)を用いた。

3) 基礎免疫の構築

ウイルス感染による基礎免疫は、1000 pfu/4 μ L の PR8 株あるいは NRT 株を片鼻 2 μ l ずつ経鼻接種することにより構築した。経鼻インフルエンザワクチン接種による基礎免疫は、総タンパク量で 1 μ g/4 μ L の PR8 株あるいは NRT 株全粒子不活化ワクチンを片鼻 2 μ L ずつ経鼻接種することにより構築した。また、注射インフルエンザワクチン接種による基礎免疫は、総タンパク量で 1 μ g/50 μ L の PR8 株あるいは NRT 株全粒子不活化ワクチンを頸部背面の皮下に 50 μ L 投与することにより構築した(図 1)。本研究では、ワクチンの総タンパク量を 1 μ g/匹としたが、NRT 株の免疫原性は PR8 株と比べて弱い傾向にあることが指摘されている。

4) ワクチン接種と攻撃感染

基礎免疫の構築から 3 週間後に、NRT 株全粒子不活化ワクチンの経鼻あるいは皮下接種を行った。接種法は、上述と同じ方法で行った。さら

にその 2 週後に、一匹あたり 1000 pfu の NRT 株の攻撃感染を行った(図 1)。攻撃感染は、感染による基礎免疫の構築と同様にウイルス液を片鼻 2 μ L ずつ(計 4 μ L)滴下する上気道感染モデルにて行った。

感染 3 日後に安楽殺を行い、血清および鼻腔洗浄液を回収した。鼻腔洗浄液は、1% BSA を含む PBS(-) 1 mL で上気道を繰り返し 3 回洗浄することで回収した。

5) 血清および鼻腔浄液中の抗体応答の検討

バキュロウイルス発現系を用いて作製した A/NRT ウイルス組換えヘマグルチニン(HA)を抗原とした ELISA により、血清中 IgG 抗体応答、鼻腔洗浄液中 IgA 抗体応答を定量した。

6) ウイルスの定量

MDCK 細胞を用いたプラークアッセイ法により、鼻腔洗浄液中のウイルス価を算出した。MDCK 細胞に希釈した鼻腔洗浄液を 200 μ L 添加し、37°C の培養器内で 1 時間の吸着操作を行った。その後、細胞を洗浄しアガロース添加培地を重層して 37°C で 40 時間培養した。アガロース培地を剥離したのちに、クリスタルバイオレット染色液で染色し、プラーク数を数え、ウイルス価の算出を行った。

C. 研究結果

本研究では、PR8 株の感染、経鼻あるいは皮下ワクチン接種、または NRT 株の感染、経鼻あるいは皮下ワクチン接種により基礎免疫を構築したマウスに対して、NRT 株の経鼻あるいは皮下ワクチンを接種しその後の NRT 株による攻撃感染を行った際に、ワクチン接種により誘導される抗体応答に基礎免疫が与える影響と攻撃感染ウイルスの増殖抑制効果を検討した。

各基礎免疫を有する個体に関して NRT 株

の皮下ワクチン接種を施した場合、後の NRT 株の攻撃に対して防御効果が認められたのは、NRT 株の感染による基礎免疫を有する個体のみであった(表 1)。同様に、各基礎免疫を有する個体に関して NRT 株の経鼻ワクチンを施した場合、NRT 株感染による基礎免疫を有する個体に加えて、PR8 株感染そして NRT 株経鼻ワクチン接種による基礎免疫を有する個体の順にウイルスの増殖抑制効果が得られた(表 1)。

次に、PR8 株あるいは NRT 株の感染による基礎免疫を有する個体に対して NRT 株の経鼻あるいは皮下ワクチン接種を行った場合に誘導される NRT 株 HA 特異的な抗体応答を検討した。血清中の IgG 抗体応答は、NRT 株の経鼻あるいは皮下ワクチン接種を行った場合においても、PR8 株の感染基礎免疫を有する個体と比べて NRT 株の感染基礎免疫を有する個体において優位に強く誘導されて誘導されていた。これに対して鼻腔洗浄液中の IgA 抗体応答は、NRT 株の皮下ワクチン接種を行う場合は PR8 株と比べて NRT 株の感染基礎免疫を有する個体において強く誘導されて誘導されていたが、NRT 株の経鼻ワクチン接種を行う場合には NRT 株感染基礎免疫とほぼ同等に PR8 株の感染基礎免疫を有する個体でも誘導されていた。

さらに、ワクチン接種による基礎免疫を有する個体間での NRT 株 HA 特異的な抗体応答を検討した。血清中 IgG 抗体応答は、NRT 株の経鼻あるいは皮下ワクチン接種を行った場合においても、皮下ワクチン接種による基礎免疫を有する個体で高い傾向にあり、PR8 株と NRT 株の間で差はみられなかった。鼻腔洗浄液中の IgA 抗体応答は、経鼻ワクチン接種の場合には、経鼻ワクチン接種による基礎免疫を有する個体で高い傾向にあり、ワクチン株の差異は認められなかったが、皮下ワクチン接種の場合には抗体応答が認められなかった。

D. 考 察

本研究では、昨年度に引き続き経鼻インフルエンザワクチン接種において、以前のウイルス感染歴やワクチン接種歴が与える影響を検討した。

NRT 株の感染による基礎免疫があれば、経鼻あるいは皮下ワクチン接種でも NRT 株による攻撃感染を防御することができた。PR8 株の感染履歴がある場合には、皮下ワクチン接種では攻撃感染を防御することができなかったが、経鼻ワクチン接種では気道粘膜上に分泌型 IgA 抗体を誘導することで、ウイルス増殖を抑えることができた。またワクチン接種による基礎免疫の影響を考えた場合、NRT 株の経鼻ワクチン接種による基礎免疫を有し NRT 株の経鼻ワクチン接種を行った個体のみ、攻撃感染のウイルス増殖を抑制する効果が得られた。ワクチン接種で構築された基礎免疫を有する個体においては、皮下ワクチンの追加接種により血清中の NRT 株特異的な IgG 抗体の応答は認められたが、感染を抑える分泌型 IgA 抗体は認められなかった。

E. 結 論

ヒトは、マウスと異なり免疫学的にナイーブな状態にはない。したがって、ワクチンにより誘導される防御効果は、すでに有する基礎免疫の状態が影響を及ぼすことが考えられる。現行の注射によるワクチン接種だけで獲得される基礎免疫では、新しい抗原性を有するウイルスが流行った時には効果が得られない可能性が示唆された。NRT 株の上気道攻撃感染の系においては、全粒子不活化ワクチンを用いた経鼻インフルエンザワクチンの 2 回接種により防御効果を得ることができ、ウイルス感染の経験があれば 1 回のワクチン接種で十分な防御効果が得られることが明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T. Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam. *Mod Pathol.* 2012 Nov 23. doi: 10.1038/modpathol.2012.193. [Epub ahead of print]
- 2) Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, Yamazaki C, Yano T, Iizuka A, Hemmi H, Tanaka T, Saito M, Sugiyama M, Fukuda Y, Ohta T, Sato K, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H, Toyama-Sorimachi N, Kohara H, Nagasawa T, Kaisho T. Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. *Blood.* 2012 Oct 11. [Epub ahead of print]
- 3) van Riet E, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H. Mucosal IgA responses in influenza virus infections: thoughts for vaccine design. *Vaccine.* 2012 Aug 31;30(40):5893-900. Epub 2012 Jul 24.
- 4) Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T. Mechanism of Drug Resistance of Hemagglutinin of Influenza Virus and Potent Scaffolds

Inhibiting Its Function. *ACS Chem Biol.* 2012 Jan 13.

- 5) Aina A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine. *J Med Virol.* 2012 Feb;84(2):336-44.

2. 学会発表

- 1) 長谷川秀樹:次世代ワクチンとしての経鼻インフルエンザワクチン。第60回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012年11月
- 2) 山本典生、浅沼秀樹、佐藤佳代子、中内美奈、高橋仁、許斐奈美、相内章、長谷川秀樹、田代真人:細胞培養もしくは鶏卵で製造されたインフルエンザワクチンの品質管理試験および免疫応答への影響。第60回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012年11月
- 3) 川口晶、鈴木忠樹、相内章、佐藤由子、信澤枝里、田代真人、長谷川秀樹:喘息発作誘発モデルを用いたインフルエンザウイルス感染症の病態解析。第60回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012年11月
- 4) 池田千将、伊藤良、相内章、鈴木忠樹、田村慎一、田代真人、浅沼秀樹、長谷川秀樹:基礎免疫を有する個体に対する経鼻投与型インフルエンザワクチン効果。第60回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012年11月
- 5) 泉地恭輔、相内章、鈴木忠樹、浅沼秀樹、長谷川秀樹:経鼻投与型インフルエンザワクチンによるマウス母子免疫の解析。第60回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012年11月

- 6) 鈴木忠樹、川口晶、相内章、田村慎一、伊藤良、小田切孝人、田代真人、長谷川秀樹：インフルエンザワクチン経鼻接種により鼻腔内に誘導される分泌型 IgA 抗体の性状解析。第 16 回日本ワクチン学会学術総会(横浜) 2012 年 11 月
- 7) 相内章、池田千将、伊藤良、鈴木忠樹、泉地恭輔、田村慎一、田代真人、浅沼秀樹、長谷川秀樹：感染あるいはワクチン接種歴が経鼻投与型インフルエンザワクチンにより誘導される抗体応答に対して与える影響。第 16 回日本ワクチン学会学術総会(横浜) 2012 年 11 月
- 8) Elly van Riet, Ainai A, Ito R, Senchi K, Suzuki T, Tamura S-I, Tashiro M, Hasegawa H: Characteristics of IgA versus IgG human monoclonal antibodies cloned from human plasma cells induced upon intranasal H5N1 vaccination. 第 16 回日本ワクチン学会学術総会(横浜)2012 年 11 月
- 9) Hasegawa H, Ainai A, Suzuki T, Tamura S-I, Tashiro M, Kurata T: Analysis of protective immune responses after intranasal administration of an inactivated whole-virion influenza vaccine in human. 第 16 回日本ワクチン学会学術総会(横浜)2012 年 11 月
- 10) 浅沼秀樹、相内章、佐藤佳代子、許斐奈美、岸田典子、長谷川秀樹、山本典生、田代真人：野外株より細胞培養インフルエンザワクチンの種候補株を選定する基準の検討。第 16 回日本ワクチン学会学術総会(横浜) 2012 年 11 月
- 11) 山崎達也、二宮大輔、長島麻里亜、荒井由佳、手嶋保智、長谷川秀樹、相内章、藤本陽、千葉丈：インフルエンザ中和抗体発現プラスミドを用いた受動免疫法の応用研究～長期的なウイルス防御効果と免疫不全マウスへのウイルス防御効果の検討～第 16 回日本ワクチン学会学術総会(横浜)2012 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得(出願)
なし
2. 実用新案登録
なし

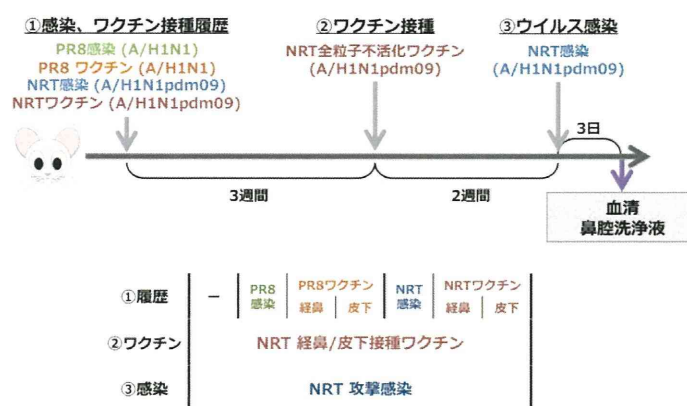


図 1. 実験スケジュール

PR8 株あるいは NRT 株の感染、経鼻あるいは皮下ワクチン接種により基礎免疫を構築したマウスに対して、NRT 株の経鼻あるいは皮下ワクチン接種を行った。その後 NRT 株の上気道感染を行い、感染 3 日後の鼻腔洗浄液ウイルス価ならびに血清あるいは鼻腔洗浄液中の NRT 株 HA 特異的な抗体応答を評価した。

表 1. 攻撃感染 3 日後の鼻腔洗浄液中ウイルス価の比較

		基礎免疫の構築						
		無	PR8			NRT		
			感染	経鼻 ワクチン	皮下 ワクチン	感染	経鼻 ワクチン	皮下 ワクチン
NRT ワクチン	経鼻	×	○	×	×	◎	△	×
	皮下	×	×	×	×	◎	×	×

* ウイルス増殖抑制効果が、非常に高い(◎)、高い(○)、認められる(△)、認められない(×)

課題2. 注射型と粘膜型ワクチンの有効性と安全性における相違点の理論基盤構築

課題3. ウイルス株間の防御抗原の交差反応性と防御効果についての科学的根拠とその応用

(分担) 迫田 義博 北海道大学大学院獣医学研究科 動物疾病制御学講座准教授

研究要旨: H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスは、家禽に対するワクチンを常用している国で抗原変異株の出現が加速している。そのため H5 プレパンドミックワクチンは、将来出現する H5 パンデミックウイルスとは抗原性が異なることが前提と考えられる。そこで、近年国内外で分離された H5N1 ウイルスの遺伝子と抗原性の解析を行い、その多様性を継続して調べた。その結果、現在流行している H5N1 ウイルスは、1996 年香港で初めて出現したウイルスの抗原性とは異なる変異株がその主流であった。そこで、A/duck/Hokkaido/Vac-3/2007 (H5N1) 株から不活化全粒子ワクチンを試製し、経鼻接種によりマウスを免疫後、これらの抗原変異株で攻撃した。その結果、今回用いた H5N1 抗原変異株に対しても不活化全粒子ワクチンは有効な免疫を誘導できることが分かった。しかし、ウイルスの抗原変異が速いので、今後もワクチンの有効性の評価を継続する必要がある。また、新型インフルエンザウイルスとして出現する可能性が高い H5 亜型以外のウイルスに対しても同様の準備を強化する必要がある。

A. 研究目的

多岐にわたるインフルエンザワクチンの種類、投与方法、アジュバントによる免疫原性誘導のメカニズムを解明することにより、より安全で有効性の高いインフルエンザワクチン開発に必須な生物学的、医学的理論基盤を構築することを目的とする。特に、新型インフルエンザウイルスの出現に備えたワクチンの準備として、H5亜型ウイルスに対する安全で有効性の高いワクチンの開発が必要である。しかし、H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスは、家禽に対するワクチンを常用している国で抗原変異株が出現している。そのため準備するワクチンは、幅広い抗原性のH5N1ウイルスに対して効果があることが望まれる。そこで、ワクチン株と抗原性が異なるH5N1ウイルスに対しても効果が認められるようなワクチンの種類、投与方法、アジュバントなどを検討する必要がある。そこでまず、現在世界で流行しているH5N1亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルス感染症のサーベイランスを実施し、分離ウイルスの遺伝子と抗原性の解析を行う。さらにこれらの成績を考慮したワクチン株の選抜、ワクチンの種類、投与方法、アジュバントなどを詳細に検討する。これらの研究は、H5亜型のみならず、H9やH7亜型ウイルス

など、新型インフルエンザウイルスとして出現する可能性が高いウイルスに対するワクチン開発戦略に有用な生物学的、医学的理論基盤を構築することができる。

B. 研究方法

日本、モンゴル、ベトナム、ロシアにおいて採取した渡りガモ、ハクチョウおよび家禽の糞便およびぬぐい液からウイルス分離を試みた。分離されたH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの遺伝子と抗原性を過去に分離されたウイルスのそれと比較した。

野生水禽から分離された非病原性鳥インフルエンザウイルス由来のワクチン株

A/duck/Hokkaido/Vac-3/2007 (H5N1) (Vac-3) でマウス用の不活化全粒子経鼻ワクチンを試製した。免疫後、クレード2.3.2.1に属する

A/duck/Vietnam/OIE-2533/2011 (H5N1)で攻撃し、攻撃3日目の肺からのウイルス回収と14日間の臨床症状を観察した。

野生水禽から分離されたA/duck/Hokkaido/5/1977 (H3N2)を豚の鼻腔内に接種し、回収した鼻腔ぬぐい液中のウイルスを次の豚に接種継代した。継代したウイルスのHA上のアミノ酸変異とヒト型のシアル酸レセプターに対する親和性の変化を解析し

た。

C. 研究結果

家禽と野鳥の気管ぬぐい液および糞便8,316検体から合計165株のインフルエンザウイルスを分離同定した。これらのウイルスのHA亜型はH2からH13の12の亜型に、NA亜型はN1～N9の9つの亜型に区分された。2012年ベトナムで分離されたH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスは、遺伝子型でクレード1.1と2.3.2.1に分類された。このクレード1.1と2.3.2.1のウイルスの抗原性を1996年香港で初めて出現したH5N1ウイルスのそれとHI試験で比較したところ、これらの株は1996年の分離株と比べ抗原性に大きな差があることがわかった。この抗原変異には家禽におけるワクチン接種が強く関わっていると考えられる。

Vac-3ワクチンを経鼻接種したマウスの鼻腔中からワクチン株に対する分泌型IgA抗体が検出された。またA/duck/Vietnam/OIE-2533/2011 (H5N1)で攻撃3日後の肺乳剤中のウイルス感染価を調べたところ、ワクチンに含まれる抗原量に比例してウイルスの回収量が下がった。この傾向は攻撃後のマウスの体重変化でも認められた。以上より、不活化全粒子ワクチンの経鼻接種は、現在野外で流行している抗原変異株に対して有効なワクチン効果を賦与することが証明された。

A/duck/Hokkaido/5/1977(H3N2)を豚の鼻腔内で3代継代したウイルスはHAの226番目と228番目にアミノ酸の置換が認められ、トリ型シアル酸レセプターからヒト型シアル酸レセプターへの親和性が上昇した。本結果はH5亜型以外の鳥インフルエンザウイルスも豚での増殖脳を獲得することにより新型インフルエンザウイルスとして出現する可能性があることを示している。

D. 考察

抗原変異株に対しても有効なワクチン株の選定、ワクチンの種類、投与方法について成績が得られた。しかし、ウイルスの抗原変異が速いので、今後もワクチンの有効性の評価を継続する必要がある。

E. 結論

本研究結果から、新型インフルエンザウイルスとして出現する可能性が高いウイルスに対するワクチン開発戦略に有用な生物学的、医学的理論基盤を構築することができた。今後H5のみならず、新型インフルエンザウイルスとして出現する可能性の

ある亜型ウイルスに対して抗原性を考慮したワクチン株の選抜と試製ワクチンの評価が引き続き必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Sakoda Y, Okamatsu M, Isoda N, Yamamoto N, Ozaki K, Umeda Y, Aoyama S, Kida H: Purification of human and avian influenza viruses using cellulose sulfate ester (Cellufine Sulfate) in the process of vaccine production. *Microbiol Immunol* 56, 490-495, 2012
- (2) Sakoda Y, Ito H, Uchida Y, Okamatsu M, Yamamoto N, Soda K, Nomura N, Kuribayashi S, Shichinohe S, Sunden Y, Umemura T, Usui T, Ozaki H, Yamaguchi T, Murase T, Ito T, Saito T, Takada A, Kida H: Reintroduction of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus by migratory water birds, causing poultry outbreaks in 2010-2011 winter season in Japan. *J Gen Virol* 93, 541-550, 2012.
- (3) Nomura N, Sakoda Y, Soda K, Okamatsu M, Kida H: An H9N2 influenza virus vaccine prepared from a non-pathogenic isolate from a migratory duck confers protective immunity in mice against challenge with an H9N2 virus isolated from a girl in Hong Kong. *J Vet Med Sci* 74, 441-447, 2012.
- (4) Nomura N, Sakoda Y, Endo M, Yoshida H, Yamamoto N, Okamatsu M, Sakurai K, Hoang NV, Nguyen LV, Chu HD, Tien TN, Kida H: Characterization of avian influenza viruses isolated from domestic ducks in Vietnam in 2009 and 2010. *Arch Virol* 157, 247-257, 2012.
- (5) Arikata M, Itoh Y, Okamatsu M, Maeda T, Shiina T, Tanaka K, Suzuki S, Nakayama M, Sakoda Y, Ishigaki H, Takada A, Ishida H, Soda K, Pham VL, Tsuchiya H, Nakamura S, Torii R, Shimizu T, Inoko H, Ohkubo I, Kida H, Ogasawara K: Memory immune responses against pandemic (H1N1) 2009 influenza virus induced by a whole particle vaccine in cynomolgus monkeys carrying

Mafa-A1*052ratio02. PLoS One 7, e37220, 2012.

- (6) Okamatsu M, Sakoda Y, Hiono T, Yamamoto N and Kida H: Potency of a vaccine prepared from A/swine/Hokkaido/2/1981 (H1N1) against A/Narita/1/2009 (H1N1) pandemic influenza virus strain. *Virol J* 10, 47, 2013.
- (7) Shichinohe S, Okamatsu M, Yamamoto N, Noda Y, Nomoto Y, Honda T, Takikawa N, Sakoda Y and Kida H: Potency of an inactivated influenza vaccine prepared from a non-pathogenic H5N1 virus against a challenge with antigenically drifted highly pathogenic avian influenza viruses in chickens. *Vet Microbiol*, in press, 2013.

2. 学会発表

- (1) 「日本における高病原性鳥インフルエンザの流行疫学について」 迫田義博 第153回日本獣医学会学術集会学術シンポジウム「高病原性鳥インフルエンザ流行」(2012年、埼玉)
- (2) 「Reintroduction of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus by migratory water birds, causing outbreaks in 2010-2011 winter season in Japan」 Sakoda Y, Ito T, Saito T, Kida H. 8th International Symposium on Avian Influenza (2012年、イギリス)
- (3) 「ベトナムの家禽から分離されたインフルエンザウイルスの遺伝子と抗原性の解析」西達也、岡松正敏、野村直樹、山本直樹、Nam Van Hoang、Long Van Nguyen、Huy Duc Chu、Tien Ngoc Tien、櫻井健二、迫田義博、喜田宏 日本ウイルス学会北海道支部第46回夏季シンポジウム(2012年、伊達)
- (4) 「Chicken influenza virus recognizes SA α 2,3 Gal of different carbohydrate structure from that recognized by duck influenza virus as the receptor」Hiono T, Okamatsu M, Sakoda Y, Kida H. The 4th International Young Researcher Seminar for Zoonosis Control 2012 (2012年、札幌)
- (5) 「鳥インフルエンザウイルスがブタに感染す

るとSA α 2, 6Galレセプターを認識するウイルスが選択される」七戸新太郎、岡松正敏、迫田義博、喜田宏 第60回日本ウイルス学会学術集会 (2012年、大阪)

- (6) 「ベトナムの家禽から分離されたインフルエンザウイルスの遺伝子と抗原性の解析」西達也、岡松正敏、野村直樹、山本直樹、Nam Van Hoang、Long Van Nguyen、Huy Duc Chu、Tien Ngoc Tien、櫻井健二、迫田義博、喜田宏 第60回日本ウイルス学会学術集会 (2012年、大阪)
- (7) 「Global and national surveillance of animal influenza」National to Regional to Global Surveillance - a Path to One Health, Sakoda Y, Prince mahidol Award Conference 2013 (2013年、バンコク)
- (8) 「ニワトリのインフルエンザウイルスはニワトリ気管上皮に発現するフコシル化 α 2, 3シアル酸糖鎖をレセプターとして認識する」日尾野隆大、岡松正敏、西原祥子、高瀬明、迫田義博、喜田宏 2nd Negative Strand Virus-Japan Symposium (2013年、沖縄)
- (9) 「鳥インフルエンザウイルスがブタに感染するとSA α 2, 6Galレセプターを認識するウイルスが選択される」七戸新太郎、岡松正敏、迫田義博、喜田宏 2nd Negative Strand Virus-Japan Symposium (2013年、沖縄)

G. 知的財産の出願、登録状況

予定なし。

課題 4 : ワクチン・アジュバントによる副反応と副作用の分子メカニズム解明と解決方法の模索
課題 5 : ワクチンの「真」の有用性をヒトの検体を用いた免疫学的方法で検討する臨床研究

インフルエンザワクチンに対する IgE 抗体の感作は？

研究分担者：中山哲夫、熊谷卓司、庵原俊昭

【研究要旨】

2011/12 年のインフルエンザシーズンに化血研ワクチン接種後にアナフィラキシー反応が認められ、患者血清中にインフルエンザワクチンに対する IgE 抗体が検出された。幼児に多く発症し感作の原因を検討する必要がある。2011/12 シーズンのスプリットワクチン 2 回接種前後 3 ポイントのシリーズ血清 117 例、2009 年 H1N1Pdm の自然感染急性期と 2, 4 週後のシリーズ血清 42 例、H5N1 パンデミックワクチン接種前後 3 ポイント血清 190 例を対象とした。インフルエンザウイルス IgE 抗体の測定は既に報告されている EIA 法により測定し、臍帯血血清を陰性血清とし陰性血清との吸光度に対する比率で示した。1) 2011/12 季節性インフルエンザワクチン接種後で接種前の IgE 抗体の 2 倍以上に増加した割合は <4 歳は 9/27, 4-6 歳で 6/26, 7-9 歳で 6/37, >10 歳で 1/27 例で H1N1Pdm ワクチンに対する IgE 抗体レスポンスを示した。アナフィラキシー症例に匹敵する高い抗体価は 3/117 例のみであった。2) ソ連型、B 型のスプリットワクチン抗原に対しても同様のレスポンスを示した。3) 2009H1N1 Pdm 自然感染例 42 例では急性期、回復期の血清で IgE 抗体の変動は認めなかった。

自然感染例では IgE 抗体の変動は認めず、6 歳までの幼児でワクチン接種により IgE 抗体が増加する例がありワクチン接種により感作されていると想定された。必ずしもアナフィラキシー反応につながるものではないが、感作を重ねてゆく可能性があり継続的な検討が必要である。

分担研究者所属	氏名
北里生命科学研究所	中山哲夫
くまがい小児科	熊谷卓司
国立病院機構 三重病院	庵原俊昭

班員外研究協力者
鈴木英太郎、宮田章子、尾崎隆男、西村直子

A. 研究目的

2011/12 インフルエンザシーズンに 2 フェノキシエタノールを保存剤に使用した化血研のインフルエンザワクチン接種後の幼児学童にアナフィラキシー症例が報告された。アナフィラキシー症例ではインフルエンザワクチン製剤に対する IgE 抗体が検出された。それまでは年間少数例のアナフィラキシー反応は報告されていたが 2011/12 シーズンに顕著となった。その年からワクチン接種量が変更になり 3 歳までは 0.25ml、3 歳以上で 0.5ml と増量されたシーズンであった。2009 年は H1N1 パンデミックの流行した年であり 2009 Pdm 感染者で IgE が増加

し、重症例では高値の IgE が検出された事が知られている。2009Pdm 感染がインフルエンザウイルスの感作を惹起した可能性、毎年のワクチン接種が感作を進めている可能性、接種量の増加等が想定され感作の原因を検討する必要がある。

B. 研究方法

(1) 研究対象

2011/12 シーズンのスプリットワクチン 2 回接種前後 3 ポイントのシリーズ血清 117 例、2009 年 H1N1Pdm の自然感染急性期と 2, 4 週後のシリーズ血清 42 例、H5N1 パンデミックワクチン接種前後 3 ポイント血清 190 例を対象とした。

いずれの群も 20 歳以下で特に 12 歳までの小児例を対象とした。山口大学、札幌医科大学、国立療養所三重病院の倫理委員会で承認されている。

(2) ウイルス抗原

20011/12 シーズン季節性インフルエンザワクチ

ンに含まれている H1N1/California/07/2009, 2008/09 年の季節性インフルエンザに含まれた H1N1/Brisbane/59/2007, B/Brisbane/60/2008, H5N1 パンデミックワクチンは HA, NA タンパクが 2004 Vietnam 株、内部タンパクは PR8 由来の reverse genetics (RG)法により NIBR で作製された H5N1 パンデミックワクチン NIBRG-14 を使用した。

(3) IgE subclass 抗体価測定

96 穴 ELISA plate にインフルエンザ HA ワクチン 10 g を coating し blocking 洗浄後 10 倍希釈血清を overnight で incubate する。翌日 blocking、洗浄後に peroxidase ラベルの抗ヒト IgE 抗体を反応させ発色基質を添加し、EIA 吸光度を測定した。臍帯血血清を陰性コントロールとしてその吸光度の何倍かで示した。

C. 研究結果

1) 20011/12 シーズン季節性インフルエンザワクチン接種後 H1N1/California/07/2009 に対する IgE 抗体の推移

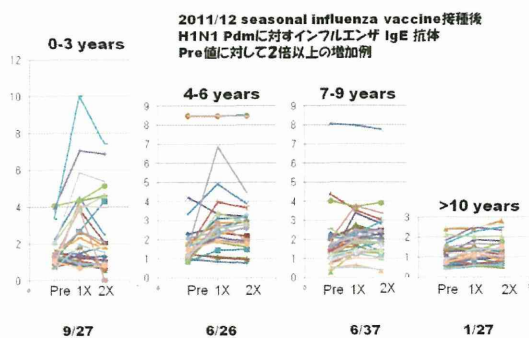


図 1. 2009Pdm に対する IgE 抗体

2011/12 季節性インフルエンザワクチン接種の 117 例の接種例を 0-3 歳、4-6 歳、7-9 歳、10 歳以上の年齢別に H1N1Pdm ワクチンに対する IgE 抗体の推移を図 1 示した。1 回接種後 2 回接種後の血清において接種前の値と比べて 2 倍以上上昇した例は 1—3 歳代では 9/27、4-6 歳で 6/26、7-9 歳では 6/37、10 歳以上では 1/27 であった。

同じく 117 例について H1N1/Brisbane/59/2007 の旧ソ連型のインフルエンザワクチンについても検討して図 2 に示した。IgE 抗体の産

生増加が認められた例は 6 歳以下に多く認められ 7 歳以上では増加する例は減少した。

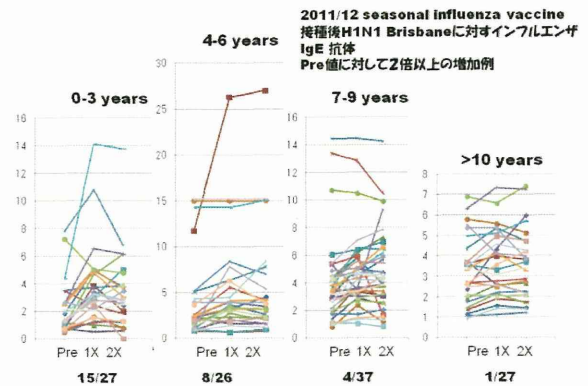


図 2. H1N1 旧ソ連型に対する IgE 抗体

同じく季節性インフルエンザ B/Brisbane/60/2008 に対する IgE 抗体の推移を図 3 に示した。1 回ワクチン接種の 4 週間後において A/H1N1 に比べると 7-9 歳時でも IgE 抗体の変動する例が増加した。

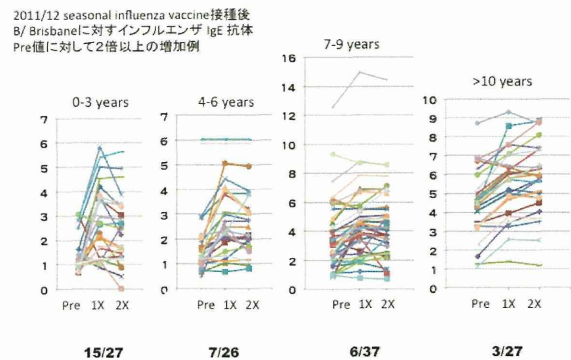


図 3. B 型に対する IgE 抗体

季節性インフルエンザワクチン接種により 6 歳以下の幼児においてワクチン成分に対する IgE 抗体の増加を認めたがアナフィラキシーをおこした症例の IgE 抗体のレベルを超える例は数例であったが、ワクチン接種で感作を増幅する事が考えられた。

2) H5N1 パンデミックワクチン接種後の IgE 抗体

季節性のインフルエンザワクチンと異なる製剤である H5N1 パンデミックワクチン接種後のシリーズ血清での IgE 抗体の推移を検討し結果を図 4 に示した。

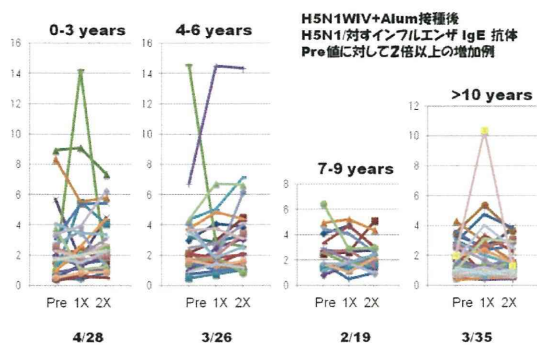


図4 H5N1 パンデミックワクチン接種後の IgE 抗体の推移

H5N1 パンデミックワクチンは全粒子不活化ワクチンにアルミアジュバントを加えた製剤で炎症性サイトカインを誘導し、乳幼児では中和抗体を誘導し、発熱も認められた。3歳以下で4/26、4-6歳では3/26、7-9歳で2/19、10歳以上で3/35例がワクチン接種により IgE 抗体が増加したが、季節性のスプリットワクチン接種後に比べると IgE 抗体の感作が低いように思われた。

3) 自然感染後の IgE 抗体の変動

季節性スプリットワクチン、H5N1 パンデミックワクチン接種は IgE 抗体の変動を認めたが、自然感染 42 例について検討した。結果を図 5 に示した。

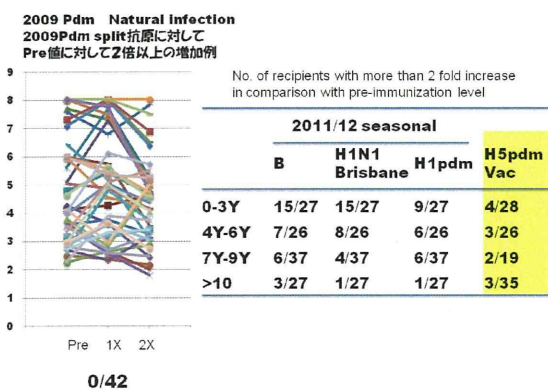


図5. 2009 パンデミック自然感染例の IgE 抗体

2009 年の H1N1 パンデミックの自然感染例 42 例は経過中急性期血清と比較して 2, 4 週で IgE 抗体の顕著な増加は観察されなかった。

季節性インフルエンザ、H5 パンデミック、

2009 H1N1 パンデミックの自然感染のインフルエンザワクチンに対する IgE 抗体が 2 倍以上のレスポンスを示した例を比較して図 5 に示した。季節性のスプリットワクチン接種では 6 歳以下の幼児で増加例が多く観察され 2009H1N1Pdm, (旧ソ連型)、B 型のインフルエンザワクチンの株に対しても同様であった。H5N1 パンデミックワクチン接種後では年齢層に関係なく 10%前後に IgE 抗体反応が観察された。

D. 考察

インフルエンザワクチン接種後のアナフィラキシー反応は毎年数例の報告は認められてきたが、2011/12 シーズンに増加しインフルエンザワクチン成分に対する IgE 抗体が検出された。ワクチン接種量が増えられた年で増量接種が関係するかと思われたが、化血研以外のワクチンではアナフィラキシー反応の増加は観察されず当該ワクチンがアレルゲンとして作用したものと考えられる。化血研インフルエンザワクチンは保存剤として 2 フェノキシエタノールを含んでいるが、他社製品と比較して抗原サイズ、化学的・物理的性状には明らかな差は認めなかったようでその原因は明らかとはなっていない。

アナフィラキシー反応をおこした患児の血清中にはインフルエンザワクチンに対する IgE 抗体が検出されており、その感作の原因をあきらかとするために本研究を行った。

季節性インフルエンザワクチン接種後の血清において 3 歳以下では 50%、4-6 歳では 30% の接種者において IgE 抗体の増加が認められその頻度は年齢とともに減少する。A・B 型による差は認めず同様の傾向であった。IgE 抗体が増加する例はワクチン接種後に HI 抗体レスポンスを認めている例が大多数を占めており免疫能獲得の経過の中で IgE 抗体のレスポンスを認めている。一方 2009Pdm の自然感染例 42 例は急性期の 2 倍以上の抗体反応を認めた例はなく自然感染では感作は成立せずワクチンによる感作が想定された。

ワクチンに含まれるインフルエンザ株の差は認めず、剤型の異なる H5 パンデミックワクチン接種後の 190 例の IgE 抗体レスポンスは季節性インフルエンザワクチンと異なり IgE 抗体応答を示す例は少なかった。また 190 例において

はIgG subclass抗体も測定しておりIgG4陽性の66例中11例、IgG4陰性の124例中27例にIgE抗体にレスポンスを認め有意差は認めなかった。IgG4はIgE抗体に抑制的に働くと考えられているが関連性は認められなかった。

現行のスプリットワクチンで感作が進んでいる可能性が想定され、一方、自然感染例はIgE応答が認められなかったことから、スプリットワクチン製剤はTh2応答に偏り、H5パンデミックワクチンは全粒子不活化+アルミアジュバント製剤でありTh1, Th2双方の反応が認められる事から感作の頻度に差が認められことが考えられる。

F. 研究業績

1 論文発表

- 1) Nakayama I, Kashiwagi Y, Kawashima H, Kumagai T, Ishii KJ, Ihara T. Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) enhanced inflammatory cytokine productions. Vaccine 30, 3885-3890, 2012.
- 2) Nakayama I, Kumagai T, Ishii KJ, Ihara T. Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) induced IgG1 and IgG4 antibody responses in young children. Vaccine 30, 7662-7666, 2012.
- 3) Matsubara K, Iwata S, Nakayama I. Antibodies against mumps virus component proteins. J Infect Chemother 18, 466-471, 2012.
- 4) Sawada A, Yamaji Y, Nakayama I. Mumps Hoshino and Torii vaccine strains were distinguished from circulating wild strains. J Infect Chemother 2012 DOI 10.1007/s10156-012-0515-3

G. 知的財産の出願、登録状況

なし

課題4：ワクチン・アジュバントによる副反応と副作用の分子メカニズム解明と解決方法の模索

課題5：ワクチンの「真」の有用性をヒトの検体を用いた免疫学的方法で検討する臨床研究

インフルエンザワクチン接種後のアナフィラキシー原因究明に関する検討

研究分担者：庵原 俊昭（国立病院機構三重病院小児科）

研究協力者：菅 秀、浅田和豊、長尾みづほ、藤澤隆夫（国立病院機構三重病院小児科）

研究要旨

2011/12 シーズン、2PE を防腐剤に入れた K 社のインフルエンザワクチン接種後にアナフィラキシーを発症した小児例が増加した。アナフィラキシー例はいずれもインフルエンザワクチンによるプリック試験で陽性を示し、インフルエンザワクチンに含まれる A(H1N1)、A(H3N2)、B の HA に対して高い IgE 抗体を保有しており、好塩基球もインフルエンザワクチンに含まれる A(H1N1)、A(H3N2)、B の HA 抗原刺激により活性化した。アナフィラキシー発症後早期の例では、2PE を含まないインフルエンザワクチンで刺激した時よりも、2PE 入りインフルエンザワクチンで刺激した時の方が高い活性化を示した。しかし、インフルエンザワクチン後にアナフィラキシーをおこさなかった卵アレルギー児では、インフルエンザワクチンに対する IgE 抗体は低値であり、好塩基球の活性化を認めなかった。以上の結果から、今までのインフルエンザワクチン接種によりインフルエンザワクチンに対する IgE 抗体を有している小児では、インフルエンザウイルス IgE 抗体が付着した好塩基球や肥満細胞が血液中に存在しており、2PE により一部重合したインフルエンザワクチン中の HA が IgE 抗体の架橋形成を誘導した結果、好塩基球や肥満細胞が活性化されヒスタミンを放出し、アナフィラキシーを発症させたと推察された。なお、インフルエンザワクチンによるアナフィラキシー発症に鶏卵アレルギーの関与を認めなかった。

A. 研究目的

ワクチン接種によるアナフィラキシーの診断には、皮膚テストや IgE 抗体測定などが報告されているが、ワクチンのどの成分によるものかについては十分に検討されていない。また、薬剤アレルギーに関しては DLST や好塩基球活性化試験の有用性について検討されているが、ワクチンについての検討は十分にされていない。

本研究では、インフルエンザワクチン接種後にアナフィラキシーを来した症例について、その原因を明らかにするとともに、インフルエンザワクチンによるアナフィラキシーにおける鶏卵アレルギーの関与につ

いても明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1)対象

対象はK社の2PE入りインフルエンザワクチン接種によりアナフィラキシーを発症した2～9歳の小児20人（65.3±22.7ヶ月：34～118ヶ月、インフルエンザワクチン接種歴7.9±3.1回：3～13回）、K社のワクチン接種後即時型蕁麻疹を発症した3歳児1人、4歳以上になっても耐性獲得が困難かつ食物によるアナフィラキシーの既往がある鶏卵アレルギー児10人、アナフィラキシー歴および鶏卵アレルギー歴がない小

児 15 人である。

保護者の同意を得たのち採血を含めた各種検査を行った。

2)皮膚プリック試験

インフルエンザワクチンやそのコンポーネント（インフルエンザワクチン製造前の A(H1N1)、A(H3N2)、B）でプリック試験を行い、紅斑径、膨疹径を測定した。なお、陰性コントロールとして生理食塩水、陽性コントロールとしてヒスタミンを用いた。膨疹が陰性コントロールよりも 3 mm以上大きい時、または陽性コントロールの 1/2 以上大きい時を陽性と判定した。

3)抗インフルエンザワクチン IgE 抗体の測定

各メーカーのインフルエンザワクチン、インフルエンザワクチン製造用に混合する前の A(H1N1)、A(H3N2)、B 抗原の蛋白量を 100 μ g/ml に調整後、96 穴マイクロプレートに抗原を固相し、その後 SuperBlocking Buffer でブロッキングした。標準血清（K 社インフルエンザワクチンによるアナフィラキシー 3 例の血清を用いて国立病院機構三重病院で作成、1,000 単位/ml と設定）および測定する血清（または血漿）をマイクロプレートに添加し、抗原と反応させた。その後、ビオチン標識抗ヒト IgE 抗体と反応させた後、ストレプトアビジン溶液と反応させ、基質(TMB)を添加後 1N 塩酸で反応を停止させ、吸光度を測定し抗体価を求めた。

4)好塩基球活性化試験

各メーカーのインフルエンザワクチンや

そのコンポーネントを抗原とし、陰性コントロールとして PBS を、陽性コントロールとして抗 IgE 抗体を用いた。方法は、Allergenicity kit を使用し、ヘパリン血全血に各濃度 (1/33、1/100、1/333、1/1000、1/3333) に希釈した種々の抗原で 1 時間刺激後、フローサイトメーターにより末梢血好塩基球の 3 カラー測定を行い、CD203+/CD3-/CD294+（活性化好塩基球のマーカー）細胞分画を定量的に評価した。10% 以上の好塩基球の活性化を認めた場合、陽性と判定した。なお、各ワクチンの刺激濃度は、インフルエンザワクチンに含まれる各コンポーネントの HA 含量が 30 μ gHA/ml であるため、各コンポーネントで刺激するときは、コンポーネントが 30 μ gHA/ml になるように調整してから使用した。

5)リンパ球幼若化試験(DLST)

2PE 入りインフルエンザワクチンを抗原として用いた。ヘパリン採血した血液に、指摘濃度に希釈したインフルエンザワクチンを添加し、5 日間培養したのち H³-thymidine を添加し、リンパ球の活性化を測定した。コントロールに比して 1.5 倍以上活性化された時陽性と判定した。

C. 研究結果

1)インフルエンザワクチンアナフィラキシー児のアレルギー素因の検討

気管支喘息あり・既往または疑い例（素因あり）が 10 人(50%)、蕁麻疹素因あり 5 人、鶏卵アレルギー素因あり 4 人、その他の食物アレルギー素因あり 4 人、アトピー性皮膚炎素因あり 2 人、花粉症素因あり 1 人、通年性アレルギー性鼻炎素因あり 1 人であり、13 名(65%)が何らかのアレルギー

性素因を有していた。なお、本邦小児のアレルギー素因率は70%である。

2)皮膚プリック試験

インフルエンザワクチンを用いてプリックテストを行った。インフルエンザワクチンによりアナフィラキシーをおこした児（アナフィラキシー児）3人および蕁麻疹を発症した1人は陽性であったが、コントロール8人はすべて陰性であった（図1）。なお、アナフィラキシー児は2PE入りインフルエンザワクチンにも、2PEが含まれていないインフルエンザワクチンにも陽性を示した。

3)抗インフルエンザワクチンIgE抗体の測定

2PE入りインフルエンザワクチンに対するIgE抗体は、アナフィラキシー児では20人中19人が200U/ml以上を示したのに対し、コントロール児では15人全例が200U/ml未満であった（図2）。この結果から、200U/ml以上を陽性と判定した。なお、アナフィラキシー児では20人中17人は500U/ml以上の高値を示した。

次に、各メーカーのインフルエンザワクチンに対するIgE抗体を測定したところ、アナフィラキシー児はすべてのメーカーのインフルエンザワクチンに対してIgE抗体を保有していた（図3）。更に発育鶏卵由来および培養細胞由来のAH1N1、AH3N2、Bに対するIgE抗体を測定した。アナフィラキシー児により各コンポーネントに対するIgE抗体の陽性パターンは異なっていたが、それぞれのコンポーネントにおいては、発育鶏卵由来に対しても組織培養に対してもIgE抗体はほぼ同等であった（図4）。

鶏卵アレルギー児10人の検討では、2人が200~500U/mlを示したが、残りの8人は陰性であった。

4)好塩基球活性化試験

CD203cはヌクレオチド分解酵素の一つであり、末梢血では好塩基球のみに発現し、IgEを介したアレルギー反応による好塩基球活性化表面マーカーである。

K社のインフルエンザワクチンを1/333の濃度で抗原刺激したとき、アナフィラキシー例では20例中17例が陽性であったのに対し、コントロールでは6例中全例が陰性、鶏卵アレルギー児では8例中全例が陰性であった（図5）。なお、アナフィラキシー例の中で陰性であった例には、好塩基球活性化に対して低反応児（抗IgE抗体活性化でも活性しない児）が含まれていた。

次に、アナフィラキシーを発症後130日以内に好塩基球活性化試験を行った8例を対象に、2PEの有無による好塩基球活性化について検討した。1/3333および1/1000の低濃度では、2PEが含まれていないインフルエンザワクチンと比べ、2PE入りインフルエンザワクチンで刺激した方が、有意に好塩基球が活性化された（図6）。なお、1/333よりも濃い濃度で刺激した時は、このような現象は認められなかった。

5)リンパ球幼弱試験(DLST)

アナフィラキシー児では4人中4人が陽性、卵アレルギー児では8人中8人が陽性、コントロール児では11人中9人が陽性であり（図7）、DLSTではインフルエンザワクチンによるアナフィラキシーの予見は困難な結果であった。

D. 考察

2011/2012 シーズンにおいて、K 社の 2PE 入りインフルエンザワクチン接種により 3~6 歳児を中心にアナフィラキシー例が例年よりも多数報告された。今回ブライトン委員会のアナフィラキシー基準を満たす症例を対象に、アナフィラキシー発症のメカニズムについて検討するとともに、アナフィラキシーを予見する方法について検討を行った。

2011/12 シーズンに報告のあったアナフィラキシー症例は、いずれもインフルエンザワクチン接種 30~60 分後頃に発症しており、時間的経過から IgE 抗体が関与する 1 型アレルギー反応と推測された。そこで、1 型アレルギーを検索するプリック試験を実施するとともに、昨年度確立したインフルエンザワクチンに対する IgE 抗体測定系とインフルエンザワクチンによる好塩基球活性化試験を用いて、アナフィラキシー発症メカニズムについて検討を行った。

まず、アナフィラキシーをおこした児のアレルギー素因を検討したところ、50%に気管支喘息の、20%に鶏卵アレルギーの素因を認めたが、幼稚園や小学校での素因率の調査結果と大きな違いを認めなかった。

今回行った 4 種類の試験では、プリック試験、抗インフルエンザワクチン IgE 抗体測定および好塩基球活性化試験は、アナフィラキシー発症と深く関係していた。また、インフルエンザワクチンの低い濃度での好塩基球活性化試験では、2PE を含むインフルエンザワクチンの方が 2PE を含まないインフルエンザワクチンよりも強い活性化を示した。

以上の結果から、今までのインフルエンザワクチン接種によりインフルエンザワクチンに対する IgE 抗体を保有している小児では、インフルエンザウイルス IgE 抗体が付着した好塩基球や肥満細胞が血液中に存在しており、2PE により一部重合したインフルエンザワクチン中の HA が IgE 抗体の架橋形成を誘導した結果、好塩基球および肥満細胞が活性化してヒスタミンを放出し、アナフィラキシーを発症させたと推察された。

以前からインフルエンザワクチンには発育鶏卵由来の成分が含まれており、鶏卵アレルギーとインフルエンザワクチンによるアナフィラキシーとの関連が疑われていた。しかし、今回の鶏卵アレルギー児での検討では、10 人中 2 人はインフルエンザワクチンに対する IgE 抗体は 200~500mU/ml の低い陽性を示したが、8 人に行った好塩基球活性化試験では全例陰性であり、鶏卵アレルギーは今回のアナフィラキシー発症に関与していない結果であった。

薬物アレルギーの検査に DLST がよく使用されている。今回の検査では、アナフィラキシー児も、コントロー児も、鶏卵アレルギー児もほとんどが、インフルエンザワクチンに対する DLST は陽性を示した。この結果から、インフルエンザワクチンに対する DLST はインフルエンザワクチンによるアナフィラキシーを診断する検査としては不適切と判断された。

なお K 社は 2012/13 シーズンのインフルエンザワクチンの防腐剤を 2PE からチメロサルに変更した。今シーズンのアナフィラキシー報告頻度は他のメーカーからの報告頻度と同程度であり、疫学的にも 2PE 入