

201225018A

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

小児臓器移植前後における
ワクチン接種の安全性と有効性に関する研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 齋藤 昭彦

平成 25 (2013) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

I. 総括研究報告

- 小児臓器移植前後におけるワクチン接種の安全性と有効性に関する研究2
研究代表者 齋藤 昭彦

II. 分担研究報告

1. 小児臓器移植前後におけるワクチン接種の安全性と有効性に関する研究.....8
研究分担者 笠原 群生
2. 小児臓器移植前後におけるワクチン接種の安全性と有効性に関する研究.....10
研究分担者 竹田 誠

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

.....20

IV. 研究成果の刊行物・別刷

.....22

I. 総括研究報告

小児臓器移植前後におけるワクチン接種の安全性と有効性に関する研究

研究代表者 齋藤 昭彦 新潟大学大学院医歯学総合研究科小児科学分野 教授

研究要旨

肝移植は、肝、代謝疾患に罹患し、内科的治療に限界のある小児患者に対する最終的な治療手段である。小児の生体肝移植の適応患者は、多くが乳幼児であり、肝移植後に免疫抑制薬を服用し続けるため、様々な感染症に対して脆弱であり、感染すると重症化し、また、後遺症を残したり、死亡するおそれがある。それらの感染症の中で、特にワクチンで予防できる疾患（VPD: Vaccine Preventable Diseases）に関しては、可能な限りワクチンを接種し、その予防と万が一罹患した場合には、その軽症化に努めることが重要である。国立成育医療研究センターでは 2005 年 11 月から 2013 年 2 月までに 230 例を超える生体肝移植を施行してきた。生体ドナーには重篤な合併症を認めず、レシピエント生存率 92%（全国平均生存率 86.6%）と成績良好である。当センターでは、生体肝移植を受けた患者が VPD から守られるように、積極的なワクチン接種を推奨しているが、肝移植前後のワクチンの有効性、安全性を示すデータは少なく、特に小児では、極めて乏しい。本研究の目的は、当センターにおいて、生体肝移植を受けた、あるいは、生体肝移植予定の小児の客観的な免疫学的評価を行い、効果があり、かつ安全なワクチン接種スケジュールの作成を行うことである。最終年度である平成 24 年度は、検体の採取を継続しながら、データを解析し、接種後の免疫機能を主に液性免疫の面から評価した。これらのデータは、肝移植患者における客観的データに基づく予防接種スケジュールを作るための基礎データとなる。一方で、これらの情報は、生体肝移植患者にとどまらず、同様の免疫抑制剤を服用する腎移植患者、化学療法後の患者、更には、今後普及する可能性のある死体患者からの移植後の患者に対しても、重要な情報になるものと考えられる。

研究分担者

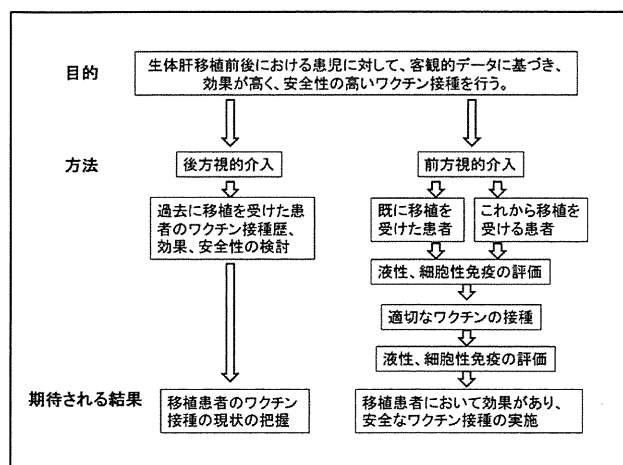
笠原 群生	国立成育医療研究センター移植外科 医長
竹田 誠	国立感染症研究所ウイルス第 3 部 部長

A. 研究目的

肝移植後の児は、移植後、免疫抑制剤を常時服用し、免疫不全状態におかれる。これらの感染症に脆弱な子どもたちを様々な感染症、特にワクチンで予防できる疾患（VPD: Vaccine Preventable Diseases）から守るのは、我々の責務である。国立成育医療研究センターでは、肝移植患者に対し

て、積極的なワクチン接種を推奨しているが、肝移植後の患者に対して、推奨される予防接種スケジュールは存在しない。当センターでは、1) 不活化ワクチンの接種は肝移植術後 1 年以上、生ワクチンの接種は 2 年以上経過、2) 肝機能・全身状態が良好（ワクチン接種予定の 6 か月以内に拒絶反応、感染症のエピソードがない）、3) 免疫抑制療法が低用量のカルシニューリン阻害剤による単剤投与、以上の条件を満たすものにワクチン接種を実施してきたが、その開始時期、適応に関しては、経験的などころが多く、科学的根拠に乏しい。

肝移植前のワクチン接種の有効性、安全性を規定する大きな要因は、患者の年齢である。特に水痘、麻疹、ムンプス、風疹などの生ワクチンは生後1歳から接種することが推奨されているが、肝移植の患者の約半数は、1歳未満の患者であり、1歳未満の児における接種の安全性と有効性に関しては、確実なデータが存在しない。一方で、移植患者では生ワクチンの安全性を確認するデータは存在するものの(Vaccine 2008;26:6859-63.)、インフルエンザワクチンに対しては、効果が弱いというデータも存在する(Clin Infect Dis 2008;46:712-8)。これらに大きな影響を与えるのが、患者の年齢や、免疫抑制薬の量、種類、患者の基礎疾患などである。したがって、より客観的な指標をもって、効果があり、安全なワクチン接種が行えるように、年齢、免疫抑制剤の種類、量などに基づいて、接種後の抗体価の測定、細胞性免疫機能の評価を移植後の患者に行い、データを蓄積することが重要である。それらのデータに基づいて、効果があり、かつ安全性の高いワクチンスケジュールを作成し、それを国内外に提供することがこの研究の目的である。本研究の大きな特徴は、国内で最大の小児肝移植症例数を誇る国立成育医療研究センターにおいて、今後、多くの患児の研究への参加が期待でき、より多くのデータの集積が期待できること、また、研究の開始前に既に150名のワクチン接種を受けた生体肝移植患者がおり、それらの患者に対するワクチンの効果と安全性の調査が行えることである。



B. 研究方法

① 生体肝移植前後のワクチンの効果、安全性の前方視的調査

1) 生体肝移植前の患者の評価

国立成育医療研究センターでは、2013年2月までに230例を超える肝移植が行われ、既にこの研究に90名を超える患者が参加した。患者に対しては、移植前に接種できるワクチンについては、その年齢も考慮しつつ、可能な限り接種を推奨してきた。その際、まず患者の免疫能の評価として、接種前の各種抗体価と細胞性免疫機能の評価した。また、移植入院時、同様の検査を行い、既に接種済みのワクチンの効果を抗体価、細胞性免疫機能を用いて評価した。

2) 生体肝移植後の患者の評価

移植後は、移植後1, 3, 6, 9, 12, 18, 24カ月に同様の抗体価、細胞性免疫機能の評価を実施してきた。その決定因子として、年齢、免疫抑制剤の種類、投与量などがあげられる。

3) 研究開始時に既に生体肝移植が終了している患者

研究開始時に既に移植の終了した患者においては、研究に参加した時点で、同様の検査を行い、免疫状態を把握してきた。特定のワクチン接種後は、その特定の抗体価を定量し、効果を判定した。

4) 生体肝移植患者に対するワクチンスケジュールの基礎的データの作成

以上の研究の結果から得られたデータを蓄積し、生体肝移植患者に効果があり、かつ安全なワクチン接種が実施できるためのスケジュールの基礎的データとする。

② 免疫学的評価

1) 液性免疫能 (B細胞機能)

生ワクチンに対する液性免疫能の評価を行うため、麻疹、風疹、水痘、ムンプスに対して、前二者に対して、Hemagglutinin inhibition (HI)、後二者に対して Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)、ELISAによって、その評価を行う。

2) 細胞性免疫能（T 細胞機能）

細胞性免疫は、抗体産生を担う B 細胞の機能をコントロールしており、その機能は、多岐にわたる。特に細胞障害 T 細胞の機能は、抗原に対して生体が反応する重要な役割を果たしている。この機能評価を行うにあたり、麻疹、水痘、風疹抗原の刺激による IFN- γ などのサイトカイン産生を見る ELISPOT を開発した。精細な方法は、分担研究者（竹田誠）の報告書を参照のこと。

C. 研究結果

①肝移植後の生ワクチン接種後の液性免疫評価

移植後約 2 年経過し、全身状態が良好で、カルシニューリン阻害薬 1 剤である条件を満たした条件を満たす児に麻疹、風疹、水痘、ムンプスのワクチンを接種し、その後の抗体価を、それぞれ、30, 30, 23, 28 患者で調査した。それぞれの年齢の中央値は、49, 49, 49, 53 ヶ月であった。それぞれの基礎疾患は、胆道閉鎖症 (53%, 57%, 61%, 59%)、代謝性疾患 (23%, 23%, 17%, 11%)、劇症肝不全 (13%, 13%, 4%, and 15%)、その他 (10%, 7%, 17%, and 19%)であった。1 人の患者を除いて、全ての患者は低用量のタクロリムスを服用しており、接種時のトラフ中央値は、それぞれ、1.7, 1.8, 1.8, 1.7 $\mu\text{g/ml}$ であった。

抗体陽転率を比較すると、麻疹、風疹、水痘、ムンプスでそれぞれ、73.3% (22/30), 100% (30/30), 69.6% (16/23), 60.7% (17/28)であった。多変量解析によっても他の因子は、抗体価に影響をあたえていなかった。また、ワクチン接種後、重篤な副反応は、みられなかった。

②肝移植後の生ワクチン接種後の細胞性免疫評価

ELISPOT による細胞性免疫評価を抗体陽転率と比較したが、相関は見られなかった。尚、ELISPOT の結果の解釈に関しては、それぞれの検体のバックグラウンドの反応に差があり、より多くの検体の解析と、正常小児の検体の検討が必要である。

③水痘ワクチン接種後のワクチン失敗例の (Vaccine Failure) の検討

水痘ワクチンを移植前後に接種した 82 名の中で、29 名の患者で水痘の病歴がなく、水痘ワクチンを接種した患者の内、14 名 (48%)がワクチン失敗例で、残りの 15 例(52%)が抗体陽性であった。ステロイドの使用をワクチン接種の 3 か月以内の prednisolone による治療、並びに 6 か月以内の methylprednisolone 静注による治療と定義すると、ステロイド使用歴は、ワクチン失敗群に多く (43%)、コントロール群に少ない (7%) ことが分かった ($P < 0.05$)。一方で、2 群の基本情報 ($P > 0.13$)、他の因子($P > 0.17$)に関しては、両者に差を認めなかった。また、多変量解析では、ステロイド使用歴のみがワクチン失敗群の唯一の危険因子であることが分かった (adjusted OR: 10.5; 95% CI: 1.1 - 103.5)。

D. 考察

肝移植前、そして移植後にどのようなスケジュールでワクチン接種を勧めるかは、免疫抑制下にある児を VPD から守るためには、極めて重要な課題である。残念ながら、その基準となるデータは未だ存在せず、それぞれの患者の年齢、基礎疾患、免疫抑制剤の種類、量などによって、その適応が異なる。今回、麻疹、風疹、水痘、ムンプスの生ワクチン接種後の液性免疫の評価を中心にデータの解析を行ったが、移植患者における抗体陽転率は、特にムンプス、水痘、麻疹の順に低く、今後の追加接種の必要性を示唆した。また、同時に実施している細胞性免疫の評価である ELISPOT の一部を解析したが、抗体陽転率との相関は見られず、また、それぞれの検体のバックグラウンドの反応に差がみられ、今後、より多くの検体の解析と、正常小児の検体の検討が必要であると考えられた。

E. 結論

肝移植前後のワクチン接種は、客観的なデータに乏しく、その接種に関する明確な基準は存在しない。児に効果があり、安全な接種を実施する上で、現在研究に参加し、検体採取を実施している患者の液性免疫、細胞性免疫の両面からのデータの蓄積をする事は極めて重要である。今後、研究を継続し、データの更なる蓄積、そして解析を行い、最終的に肝移植患者の予防接種のガイドライン作りに役立てたい。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

Funaki T, Shoji K, Miyata K, Sakamoto K, Kasahara M, Yoshii H, Miyairi I, Saitoh A. Efficacy of Live Attenuated Vaccines in Children Prior to Living Donor Liver Transplantation. Infectious Disease Society of America 50th Annual Meeting, San Diego, CA, USA October, 2012.

国内の学会発表

齋藤昭彦 新生児をワクチンで予防できる病気から守るために 第48回日本周産期・新生児医学会学術集会 大宮市 2012/7/8

齋藤昭彦 日本の予防接種制度の現状と課題、そして未来 シンポジウム、司会、演者 皮下接種と筋肉内接種 第61回日本感染症学会 東日本地方会学術集会 東京都 2012/10/10

齋藤昭彦 これからのポリオワクチン接種
ー不活化ポリオワクチン導入をむかえてー 第44回日本小児感染症学会 北九州市 2012/11/17

国内雑誌での発表

齋藤昭彦 基礎疾患をもつ小児に対する同時接種によるワクチン接種 日本小児科学会雑誌 2012;116: 823-6.

Peer-Reviewed Journals に掲載された記事

Saitoh A, Okabe N. Current Issues with the Immunization Program in Japan: Can we Fill the "Vaccine Gap"? *Vaccine* 2012 30:4752-6.

Saitoh A, Nagata S, **Saitoh A**, Tsukahara Y, Vaida F, Sonobe T, Kamiya H, Naruse T, Murashima S. Perinatal Immunization Education Improves Immunization Rates and Knowledge: A randomized controlled trial. *Prev Med* (accepted).

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

II. 分担研究報告

分担研究報告書

小児臓器移植前後におけるワクチン接種の安全性と有効性に関する研究

研究分担者 笠原群生 所属 国立成育医療研究センター

研究要旨

小児肝移植前後におけるワクチン接種の安全性と有効性

A. 研究目的

固形臓器移植後の免疫不全状態においては種々の感染症に罹患する頻度が高い。移植後は移植前に自然感染もしくは予防接種によって得られた免疫能が経年的に低下するために予防接種によって発症の予防もしくは症状の軽減が期待できる場合はその実施が推奨される。健常者への予防接種と異なり、副反応に対する注意が必要であるがその実施に際しては個々の症例に応じて対応する必要がある。現在確立されていない固形臓器移植後のワクチン接種の安全性を確立する。

B. 研究方法

肝移植後半年経過した症例に対し、計画的にワクチン接種を実施し、抗体獲得能を評価した。

（倫理面への配慮）

当該治療の成果は、学会報告や学術雑誌、データベース上で公表されることがあるが、匿名化を行うなど、個人情報保護を確保する。

C. 研究結果

2005年11月～2013年2月末までに231例の肝移植を実施した。肝移植後患者で免疫抑制剤投与中の患者に、計画的にワクチン接種を実施した。重篤な副作用を認めず、免疫抑制状態であっても、安全にワクチン接種が可能であった。

D. 考察

肝移植成績は92%と良好であった。乳児期に肝移植を受ける患者では、術前肝不全のためにワクチン接種が不可能なことがあり、術後に麻疹

・風疹・水痘感染症が固形臓器移植後に重篤化することがある。今回安全にワクチン接種が可能であることが証明されたが、今後個々の患者の免疫抑制剤使用状況・細胞分画を検討し、免疫能に応じたワクチン接種プロトコルを検討し、固形臓器移植後の感染症罹患の危険性を低下させ、移植成績の更なる向上を考慮すべきである。

E. 結論

免疫抑制状態であっても、安全にワクチン接種が可能であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

<英語論文>

1. Kasahara M, Sakamoto S, Kanazawa H, Karaki C, Kakiuchi T, Shigeta T, Fukuda A, Kosaki R, Nakazawa A, Ishige M, Nagao M, Shigematsu Y, Yorifuji T, Naiki Y, Horikawa R: Living-donor liver transplantation for propionic acidemia. *Pediatr Transplant*. 2011 Dec 7.
2. Sakamoto S, Kasahara M, Shigeta T, Fukuda A, Kakiuchi T, Miyasaka M, Nosaka S, Nakano N, Nakagawa A, Horikawa R: Living Donor Liver Transplantation for Multiple Intrahepatic Portosystemic Shunts Following Involution of Infantile Hepatic Hemangiomas *Journal of Pediatric Surgery*. *Journal of Pediatric Surgery* 2011 Jun;46(6):1288-91
3. Fukuda A, Sakamoto S, Shigeta T, Kakiuchi T, Matsuno N, Tanaka H, Kitamura M, Nosaka S, Nakazawa A, Kasahara M: Hepatobiliary

scintigraphy for the assessment of biliary stricture after pediatric living donor liver transplantation for hepaticojejunostomy reconstruction: the value of the excretion rate at 60 min. *Pediatr Transplant*. 2011 Sep; 15(6):594-600.

<日本語論文>

1. 笠原群生, 今留兼一, 阪本靖介, 金澤寛之, 重田孝信, 福田晃也, 垣内俊彦, 唐木千晶, 中澤温子: EB ウイルス感染症モニタリングによる肝移植後の至適免疫抑制療法. *今日の移植* 2011; 24(6), 577-580
2. 笠原群生, 阪本靖介, 重田孝信, 田中秀明, 垣内俊彦, 福田晃也: 先天性門脈欠損症に対して左腎静脈門脈吻合を施行した生体肝移植手術. *手術* 2011; 65(5), 607-611
3. 笠原群生, 堀川玲子: 肝移植による代謝疾患の治療. *小児科*, 2011; 52(121), 763-1770
4. 笠原群生, 阪本靖介, 垣内俊彦, 福田晃也, 重田孝信, 中澤温子, 松井陽: 胆汁うっ滞症に対する肝移植の問題点. *小児内科* 2011; 43(6), 1077-1081
5. 田中久子, 瀧本哲也, 阪本靖介, 福田晃也, 垣内俊彦, 重田孝信, 中澤温子, 笠原群生: 国立成育医療研究センターにおける小児生体肝移

植の実態(第1報)—小児肝移植のデータベース構築に向けて—. *移植* 2011; 46(4/5), 325-334

2. 学会発表

1. 笠原群生: Novartis CCPF Research Grant 2010 受賞講演 EB ウイルス感染症モニタリングによる肝移植後の至適免疫抑制療法に関する研究. *Ciclosporin Pharmacology Clinical Forum* 2011, 名古屋, 2011/7/30
2. 笠原群生: 国際シンポジウム6 ここまで到達した小児の臓器移植—外科医からのメッセージ—ここまで到達した小児の肝移植. 第114回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011/8/14
3. 笠原群生: ランチョンセミナー「小児肝移植のトピックス」. 第38回日本小児栄養消化器肝臓学会, 盛岡, 2011/10/9

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

厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

小児臓器移植前後におけるワクチン接種の安全性と有効性に関する研究

研究分担者 竹田 誠¹

研究協力者 井上直樹²、金井亮輔²、染谷健二¹、岡本貴世子¹

¹国立感染症研究所ウイルス第三部、²国立感染症研究所ウイルス第1部

研究要旨

【水痘に関して】72 検体の移植前後の小児の細胞性免疫能を ELISPOT 法により測定した。小児の水痘帯状疱疹ウイルスに対する細胞性免疫は、成人に比べ低いレベルである。IE62 が主要な細胞性免疫の標的であり、単独で高度発現させた細胞を用いても一定の感度があることが示された。しかしながら、完全な相関はなく、VZV 感染細胞の代用とならないことが明らかになった。【麻疹に関して】測定条件を検討することで、ELISPOT 法により 166 検体の患者リンパ球から麻疹特異的な IFN- γ 産生細胞を検出することができた。今のところ、抗原刺激量は、MOI= 0.5、刺激時間は 48 時間が至適条件と考えられる。【風疹に関して】風疹ウイルス特異的 T 細胞検出 ELISPOT assay 法の至適条件の検討を行い、風疹ウイルスに対する細胞性免疫解析法を確立した。この方法により、小児肝移植患者の風疹ウイルス抗原特異的細胞性免疫の評価を行った。被験者の年齢、健康状態によって細胞性免疫の反応性が異なる可能性が示唆された。

A. 研究目的

生体肝移植後の児は、免疫抑制剤を常時服用し免疫不全状態におかれる。これらの脆弱な子供達を様々な感染症、特にワクチンで予防できる疾患から守るのは、われわれの責務である。しかしながら、移植後の患者に対しては、推奨されるワクチンスケジュールが存在しない。特に水痘、麻疹、風疹などの生ワクチンは生後1歳以降に接種することが推奨されているが、生体肝移植の患者の約半数は、1歳未満の患者であり、その年齢における接種の安全性、有効性は不明である。したがって、より客観的な指標をもって、効果があり、安全なワクチン接種が行えるように、特に水痘、麻疹、風疹について細胞性免疫機能の評価を移植前後の患者に行い、データを蓄積することが本分担研究の目的である。

B. 研究方法

【水痘に関して】

1. 臓器移植患者検体における VZV 特異的細胞性免疫能の定量

1) 抗原の調製:モルモット線維芽細胞 GPL に水痘ワクチン株 V-Oka を MOI 0.01 程度で感染後 7 日目に細胞を回収した。細胞を PBS で洗浄後、T75 フラスコ当り 10 ml の PBS に懸濁し超音波破碎後、遠心上清を ELISPOT 用の抗原とした。また、未感染細胞から同様に得た抽出液を陰性対照とした。

2) ELISPOT 反応:疎水性 PVDF フィルターのプレート(IP)に抗ヒトインターフェロン(IFN)- γ 抗体を加えて4°Cで一晩コーティングした。成育医療センターより届けられたセルバンカーに懸濁された 1

バイアル当り約 10^6 個の末梢血単核球(PBMC)に、37°Cに加温した 5%FBS/RPMI1640 を加えて解凍し、抗体をコートしたプレートに 1well 当り 1 ないし 2×10^5 個の細胞を加え、さらに抗原を 1.6 μ g ずつ加えて 38 時間培養した。培養液を除き、PBS4 回洗浄後、ビオチン標識ヒト IFN- γ 抗体と反応し、再度 PBS で 4 回洗浄した。ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと反応後、PBS で 4 回洗浄後、TMB により発色させた。陽性対照として、PHA 0.4 μ g を添加した well を用意した。毎回の試験の成立を確認するために、健常ボランティアの同一検体を用いた。

3) スポット数の計測:健常ボランティアのスポットが期待される範囲であることを確認した後、実体顕微鏡下で計数した。結果は、事前に設定した基準により分類した。

2. 遺伝子導入細胞からの核及び細胞質画分の調製

1) 遺伝子導入法:6 穴プレートにまいた 293 T細胞に、リン酸カルシウム法を用いて 4 μ g の IE62 発現ベクターDNA を導入した。2 日間培養後、細胞を回収した。

2) 分画:細胞沈殿を PBS 洗浄後、氷冷した低張液に懸濁し、Dounce homogenizer で細胞を破碎した。細胞破碎液を遠心後、沈殿(=核画分)に PBS を加えて Bioruptor により超音波処理を行い、遠心上清を核抽出液とした。

【麻疹に関して】

麻疹含有ワクチンを接種した肝移植児より分離された末梢血リンパ球 (166 検体)の麻疹特異的細胞免疫応

答を IFN- γ ELISPOT 法により測定した。末梢血リンパ球は 10^5 cells/ml となるよう、10%FCS を含む RPMI-1640 培養液に浮遊させ、96 ウェルメンブレンフィルタープレート 1 ウェルに $100 \mu\text{l}$ ずつ加えた。刺激抗原は、麻疹ウイルス Edmonston 株を M.O.I= 0.5 となるように用いた。陰性コントロールには、刺激抗原調製に用いる Vero 細胞の培養上清を、陽性コントロールには PHA (phytohemagglutinin) を $0.5 \mu\text{g}/\text{well}$ で用いた。ウイルス接種後のリンパ球は 48 時間培養し、IFN- γ 陽性細胞の検出には、ヒト IFN- γ ELISPOT キット(ベクトン・ディッキンソン)を用いた。

【風疹に関して】

前年度に条件の最適化を行った風疹ウイルス特異的細胞性免疫の評価系として用いる ELISPOT 法について、健康成人検体を用いて検出性能を確認した。これを用いて、実際の移植患者検体を用いて風疹ウイルス特異的細胞免疫の評価を行った。

1) 健康成人検体を用いた性能の確認

国立成育医療センターより送付されたワクチン接種前または接種後の健康成人から同意を得て採取したヒト末梢血単核球(PBMC)を用い、前年度に検討した条件下(不活化精製ウイルス抗原量 $1\text{--}1.5 \mu\text{g}/\text{well}$ 、細胞数 $1\text{--}2 \times 10^5$ cells/well)、市販の human IFN- γ ELISPOT kit (BD #551849)にて ELISPOT 反応を行った。ウイルス抗原におけるスポット数が 5 個以上かつ、培養上清のみを添加したネガティブコントロールに対し 2 倍以上スポットのあるものを陽性とし、検出性能を確認した。

2) 小児肝移植患者検体の風疹ウイルス特異的細胞性免疫の測定

これまでに検討を行った条件を用いて、国立成育医療センターより送付された小児肝移植患者検体の ELISPOT assay を実施した。ウイルス抗原におけるスポット数が 5 個以上かつ、ネガティブコントロールに対し 2 倍以上スポットのあるものを陽性とし、風疹ウイルス特異的細胞性免疫の評価を行った。

倫理面への配慮

【水痘に関して】本研究は材料として健康人ボランティアから得たヒト末梢血を使用した。成育医療センター研究所倫理委員会及び国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査会において承認された内容に則り、採血の際に十分な説明を行った上で同意を得た。また、検体から個人が特定できないように検体を管理することで、個人情報の保護に配慮して研究が実施された。

【風疹に関して】国立感染症研究所ヒトを対象とする

医学研究倫理審査会において、健康人ボランティア検体の使用について別途申請し承認を得た。採血は国立成育医療センターにて実施され、検体から個人が特定できないよう検体のみが国立感染症研究所ウイルス第三部に送付された。したがって、検体個人情報 は国立感染症研究所ウイルス第3部には提供されていない。

C. 研究結果

【水痘に関して】

1. 臓器移植患児の VZV 特異的細胞性免疫能の解析

水痘ワクチン接種前後の臓器移植患者末梢血から分離した末梢血単核球(PBMC)検体における VZV 特異的細胞性免疫の定量を行った。本年度は、生体肝移植患者検体 72 検体が成育医療センターより送付された。今回得られたデータを分類すると、「明らかな細胞性免疫反応が認められる」検体が 4 検体であった。「VZV 特異的細胞性免疫反応が認められるが反応が弱い、または非特異的な反応が見られる」検体が 8 検体、「VZV 特異的細胞性免疫反応が認められない」検体が 16 検体、「細胞性免疫が認められない」検体が 27 検体、「判定不能」の検体が検体で 17 検体であった。

2. VZV 細胞性免疫測定系の感度向上のための検討

より簡便・迅速な VZV 特異的細胞性免疫能の定量法の樹立及び特異性・感度の向上を目指した。昨年度の研究において、VZV 核抗原 IE62 は強い CTL 応答を引き起こすことが知られていることから、IE62 遺伝子を 293T 細胞に導入し、高度に発現させた細胞より核画分を調製し、そのライセートを抗原とすることで、非特異反応を低下させることができることを示した。この系の有用性を検討するため、20 人の成人ボランティアについて VZV 感染細胞を抗原とした場合と比較した(図1)。その結果、感染細胞抽出液と IE62 発現細胞の核抽出液を抗原とした場合、両者の細胞性免疫反応には一定の相関はあるものの、IE62 抽出液を抗原として用いるには限界があることが示された。

【麻疹に関して】

抗原刺激により出現した平均スポット数が 5 個以上、かつ陰性コントロールの平均スポット数との差が 2 倍以上あるものを陽性反応と判定し、平均スポット数が 5 個以上、10 個未満を弱い陽性反応、10 個以上 20 個未満をやや強い陽性反応、20 個以上を強い陽性反応とランクづけした。その結果、19 検体が弱い陽性反応、10 検体がやや強い陽性反応、5 検体が強い陽性

反応と判定できた。

【風疹に関して】

1) 健康成人検体による検出性能の確認

国立生育医療センターより送付された健康成人 PBMC のうち、ムンプスワクチン接種後 (C03)、風疹ワクチン接種後 (C04)、ワクチン非接種 (C06, C08) の検体を用いて ELISPOT assay により、風疹ウイルス特異的 T 細胞数を測定した (表1)。ムンプスワクチン接種後検体および、ワクチン非接種検体では、スポットの出現は見られず、風疹ワクチン接種後検体 C04 において、コントロールの約4倍のスポットが観察された。PHA および Ionomycin によるマイトジェン刺激による反応はすべての検体で陽性であったので、測定系に問題は無いと考えられた。小児肝移植患者検体の風疹ウイルス特異的細胞性免疫の評価には、本条件を用いることとした。

2) 小児肝移植患者検体の風疹ウイルス特異的細胞性免疫の測定

国立成育医療センターより送付された小児肝移植患者検体のうち、これまでに 139 検体に対して ELISPOT assay を行った。

陰性は 126 検体、陽性は 6 検体、細胞数が少なく測定不可能と考えられたものが 1 検体であった (表2)。一方、陰性と判定された検体の中には、ネガティブコントロールで、比較的多数のスポット (7-30 スポット) が出現したものが 6 検体存在した (図)。また、陰性検体には、風疹ワクチン接種後 2 ヶ月の患者検体が少なくとも 3 検体含まれていた。

D. 考察

【水痘に関して】

昨年度から見られた現象ではあるが、成人ボランティアと比較して、予想外に判定不能となる検体が多かった。これは、小児の反応性が成人に比して弱いこと、その一方で、基礎疾患及び移植に伴う免疫抑制の効果などから非特異的反応が強く、陽性陰性の差が小さく、判定が困難となっている可能性がある。今後、VZV 感染の既往の有無 (特異的抗体で判断)、年齢などで対象を分類して解析することで小児における VZV 特異的細胞性免疫の基準を明確にしていけることができると考えられる。また、非特異的反応のために判定不能となった検体については、感染細胞もしくは IE62 発現細胞の核画分を用いて、半定量的な解析をすることを考えている。

IE62 を高度に発現させた細胞より調製した核画分を用いることで、アッセイの特異性が向上し、結果として、陽性判定に用いるカットオフを下げることができる

ことが明らかになったことから、感度の向上につながることを期待される。しかし一方で、感染細胞抽出液を抗原とした場合と IE62 発現細胞の核抽出液を抗原とした場合で、完全な相関とならないことから、IE62 以外の蛋白も抗原として機能していると考えられた。

【麻疹に関して】

前年度の研究では、ELISPOT 反応の至適条件を検討する必要があることを報告した。本年度の研究では、それをふまえて条件検討を行い、抗原刺激量、培養時間を決定してから肝移植児検体の測定をおこなった。成人ボランティアのリンパ球を用いて抗原刺激量、刺激時間を検討したところ、抗原刺激量は MOI= 0.5、刺激時間は 48 時間が良いことが明らかになった。この条件を用いて患者検体を測定したところ、34 検体 (弱陽性:19、やや強い陽性:10、強い陽性:5) で陽性反応を確認することができた。一方で、マイトジェン (PHA) による刺激を加えても反応しない検体があることが複数確認されている。これらの原因が免疫抑制剤の服用によるものなのか、それとも他に要因があるのか検討を行う必要がある。さらに、免疫抑制剤投与児に対するワクチン効果の判定には、液性免疫反応、生化学的検査結果を含めた総合的な検討が必要であろうことが示唆される。

【風疹に関して】

本検討で決定した ELISPOT assay の条件は、実際に検討した検体数は少ないものの、健康成人検体では特異性が高く、臨床検体の測定に適用できると判断し、小児肝移植患者検体の測定に用いることとした。

小児肝移植患者検体の測定では、ワクチン接種後 2 ヶ月にも関わらず陰性と判定された検体、ネガティブコントロールでも非特異的に反応する検体が一部で見られた。ワクチン接種後 2 ヶ月で陰性と判定された 3 検体のうち、1 検体については HI 価 8 未満であり、ワクチンによる免疫を獲得していなかったことが示唆された。1 検体については移植後の採血であったため、免疫抑制剤の影響が考えられた。残りの 1 検体については HI 価 32 であること、移植前の採血であることから、風疹ウイルスに対する免疫は獲得していると考えられたため、本測定系で風疹ウイルス特異的 T 細胞を検出できなかったと考えられた。ネガティブコントロールで非特異的反応が見られた患者検体についてはワクチン接種歴等の情報がないため、詳細は不明である。

本研究で確立した ELISPOT assay は健康成人検体を用いて条件検討を行った測定系であるため、小児、健康状態、免疫抑制剤投与の有無、などのファク

ターが測定系に影響を及ぼしている可能性が考えられた。
今後さらに測定検体数を増やし、年齢、病状と免疫抑制剤使用の有無との関連を検討する予定である。

E. 結論

【水痘に関して】

- 1) 72 検体の移植前後の小児の細胞性免疫能を ELISPOT 法により測定した。小児の水痘带状疱疹ウイルスに対する細胞性免疫は、成人に比べ低いレベルである。
- 2) IE62 が主要な細胞性免疫の標的であり、単独で高度発現させた細胞を用いても一定の感度があることが示された。しかしながら、完全な相関はなく、VZV 感染細胞の代用とならないことが明らかになった。

【麻疹に関して】

測定条件を検討することで、ELISPOT 法により 166 検体の患者リンパ球から麻疹特異的な IFN- γ 産生細胞を検出することができた。今のところ、抗原刺激量は、MOI= 0.5、刺激時間は 48 時間が至適条件と考えられる。

【風疹に関して】

風疹ウイルス特異的 T 細胞検出 ELISPOT assay 法の至適条件の検討を行い、風疹ウイルスに対する細

胞性免疫解析法を確立した。この方法により、小児肝移植患者の風疹ウイルス抗原特異的細胞性免疫の評価を行った。被験者の年齢、健康状態によって細胞性免疫の反応性が異なる可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

金井亨輔、谷口留美、湯華民、森康子、井上直樹. 水痘带状疱疹ウイルス特異的細胞性免疫を誘導する抗原の探索 第 16 回日本ワクチン学会学術集会 横浜 2012 年 11 月

金井亨輔、湯華民、森康子、井上直樹. 水痘带状疱疹ウイルス特異的細胞性免疫を誘導する抗原の探索 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012 年 11 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

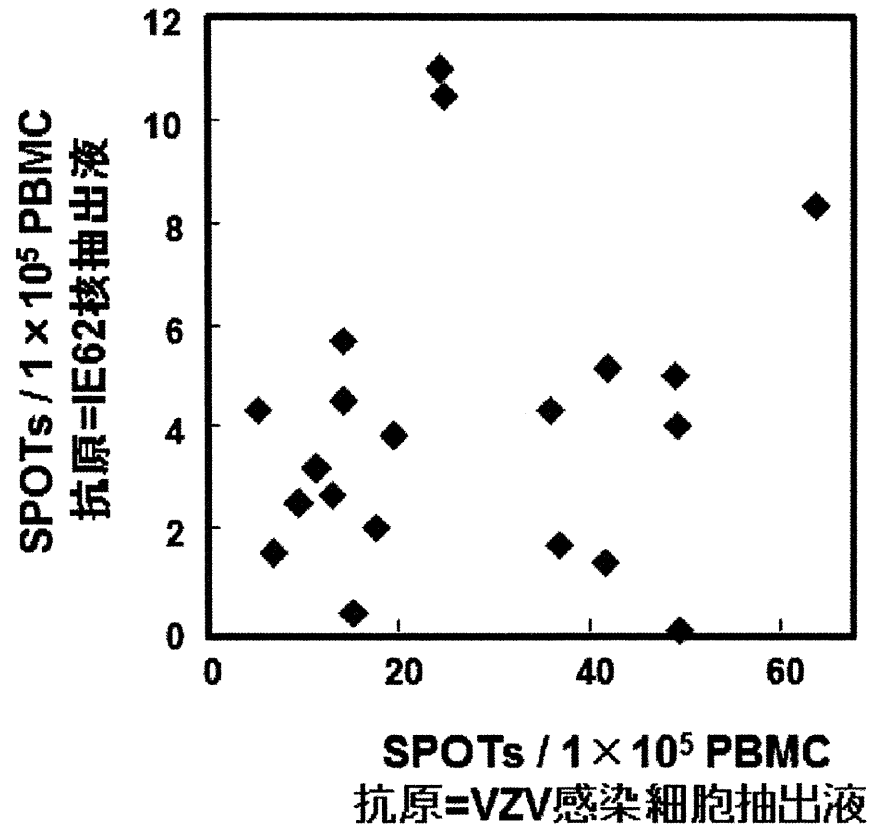
なし

3. その他

なし

水痘に関して

図1 IE62 核抽出液を抗原とした細胞性免疫反応の測定の信頼度



風疹に関して

表1 成人コントロール検体による至適条件の確認

number	cell number ($\times 10^5$)	medium		Ag		PHA	1 $\times 10^5$ 個あたりのスポット数		備考
			mean		mean		none	Antigen	
C03	2.4	0		0		+	0	0	ムンプスワクチン接種後
		0	0	0	0	+			
		0		0		+			
C04	2.4	0		28		+	0.275	11.66666667	風疹ワクチン接種後
		2	0.66	33	28	+			
		0		23		+			
C06	1.8	0		0		+	0	0.1833333333	Non-responder
		0	0	0	0.33	+			
		0		1		+			
C08	2	0		0		+	0	0.165	麻疹、風疹、ムンプスに対する免疫有り
		0	0	1	0.33	+			
		0		0		+			

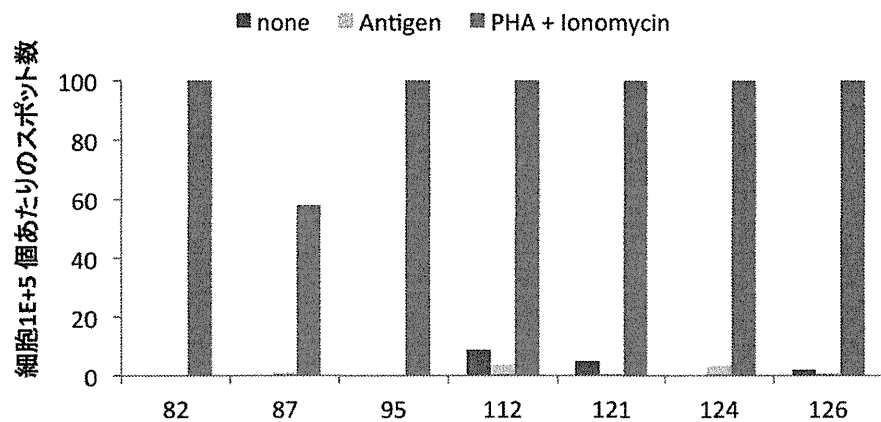
風疹に関して

表2 小児肝移植患者検体のELISPOT結果

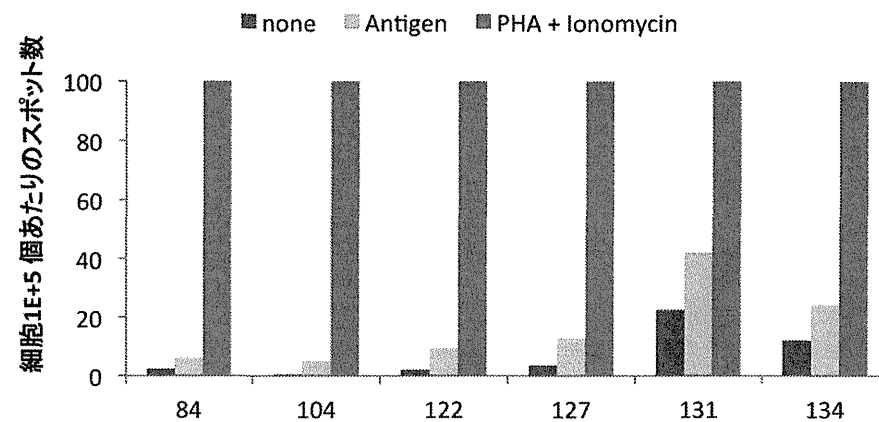
	検体数
陰性	132
陽性	6
測定不能	1
計	139

風疹に関して

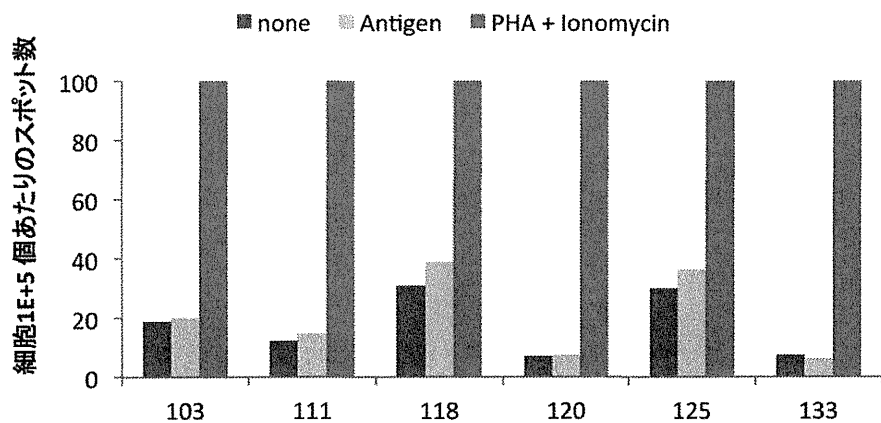
陰性検体(抜粋)



陽性検体



非特異反応検体



Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

無し

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
齋藤昭彦	基礎疾患をもつ小児に対する同時接種によるワクチン接種	日本小児科学会雑誌	116巻	823-826	2012
Saitoh A, Okabe N	Current issues with the immunization program in Japan: Can we fill the “vaccine Gap”?	Vaccine	30	4752-4756	2012
Saitoh A, Nagata S, Saitoh A, Tsukahara Y, Vaida F, Sonobe T, Kamiya H, Naruse T, Murashima S	Perinatal Immunization Education Improves Immunization Rates and Knowledge: A randomized controlled trial	Prev Med (accepted)			
Imadone K, Fukuda A, Kawano F, Imai Y, Ichikawa S, Mochizuki M, Shigeta T, Kakiuchi T, Sakamoto S, Kasahara M, Fujiwara S	Effective control of Epstein-Barr virus infection following pediatric liver transplantation by monitoring of viral DNA load and lymphocyte surface markers.	Pediatr Transplant	6(7)	748-757	2012