

201225018B

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 22 年度～ 24 年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告

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. 研究成果の刊行に関する一覧表……………24

III. 研究成果の刊行物・別刷……………30

I . 総合研究報告

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。平成 22 年度は、過去に当センターで行われた生体肝移植患者 110 名に行われたワクチン接種について、移植前と移植後に分け、接種されたワクチンの種類、副反応、各疾患に対する罹患歴を後方視的に調査し、生体肝移植患者に対するワクチン接種が安全にかつ効果的に実施されていることを明らかにした。平成 23 年度は、移植前後の患者からの検体の採取を開始し、検体を処理し、検査を開始した。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であろう。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

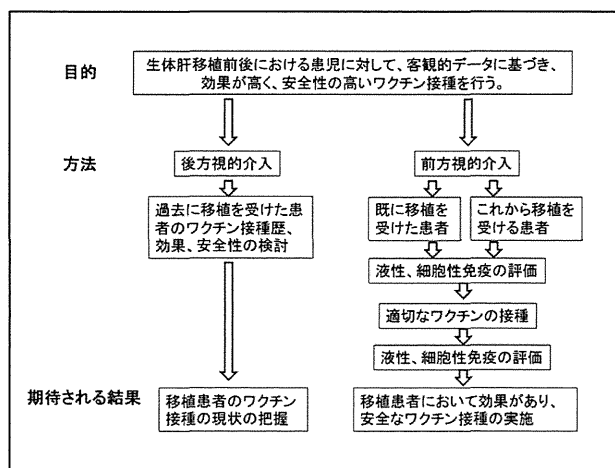
A. 研究目的

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

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 肝移植を実施した児の肝移植前後のワクチン接種歴とその効果、安全性の検証

2005年11月から2010年8月までに国立成育医療研究センターで実施された生体肝移植患者110名に行われた予防接種について、移植前と移植後に分けて接種されたワクチンの種類、接種後の副反応、その後の各疾患に対する罹患歴、ワクチンの効果を後方視的に調査し、その有効性、安全性について検討した。抽出されるデータは、患者の年齢、基礎疾患、ワクチンの種類と接種日、肝移植実施日、各疾患に対する罹患の有無、免疫抑制剤の服用と期間、副反応などである。

② 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

患者の免疫能の評価として、接種前の液性免疫の評価として、各種抗体価の測定、そして、細胞性免疫機能の評価する。また、移植時には、2つの検査を実施し、既に接種したワクチンの効果を液性免疫、細胞性免疫の機能をとって評価する。また、移植前に接種可能なワクチンは、同時接種で可能な限り接種を推奨する。

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する。

3) 研究開始時に既に生体肝移植が終了している患者の評価

研究開始時に既に移植の終了した患者では、研究に参加した時点で、同様の液性免疫、細胞性免疫の評価を実施する。特定のワクチン接種を行った場合は、その特定の抗体価を定量し、効果を判定する。

③ 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）

細胞性免疫の機能評価のために、麻疹、水痘、風疹抗原の刺激によって、リンパ球の IFN- γ のサイトカイン産生を見る ELISPOT と IFN- γ mRNA を検出するための Real-time PCR 法を確立する。これによって、液性免疫だけではなく、細胞性免疫の機能を定量的に測定することが可能となる。精細な方法に関しては、分担研究者（竹田誠）の報告書を参照のこと。

④ 肝移植患者に対する予防接種ガイドラインの基礎的データの蓄積

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ガイドラインの基礎的データとする。

C. 研究結果

①肝移植前の生ワクチン接種後の液性免疫の評価

移植前の 44 名の患者（年齢の中央値: 40 ヶ月、44% が男性）における各生ワクチンに対する液性免疫機能の評価した。基礎疾患としては、胆道閉鎖症が 30 症例（68%）を占め、劇症肝炎が 7 症例（16%）、その他が 7 症例（16%）であった。これらの症例で、麻疹、風疹、水痘、ムンプスワクチン後のそれぞれの抗体陽転率は、71%、85%、68%、50%であった。その接種年齢と陽転率には、負の相関が見られた。12 か月以前に生ワクチンを接種した患者と 12 か月以降に接種した患者を比較すると、麻疹、風疹、水痘、ムンプスワクチンの陽転率は、それぞれ、21.7% / 70.7% ($p = 0.0002$)、86.4% / 90.4% ($p = 0.68$)、45.5% / 78.9% ($p = 0.011$)、44.4% / 60.5% ($p = 0.38$)であり、特に麻疹、水痘ワクチンにおいて、乳児で優位に低いことが明確らとなった。

②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、カルシニユリン阻害薬 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。

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

この研究では、肝移植前後の児の予防接種を実施する上で、後方視的そして前方視的検討を行うことによって、より客観的なデータを基に効果があり、かつ安全な接種を行うことをその目的としている。今回の検討では、肝移植患者における生ワクチン接種は、1) 肝移植後 2 年以降、2) 全身状態が安定、3) 免疫抑制剤が 1 剤、かつ低用量という条件を満たしていれば、安全に実施されていることが判明した。しかしながら、その液性免疫の評価からは、麻疹、水痘、ムンプスの抗体陽転率は 60-70% と低く、特に 2 回接種の必要性が示唆された。また、水痘ワクチンで見られるワクチン失敗例は、ステロイド薬投与歴との関連があり、これらの治療歴を受けた患者では、追加接種の必要性が示唆された。

細胞性免疫の評価に関しては、麻疹、風疹、水痘において、現時点で得られた ELISPOT の結果と抗体陽転率との間に相関は見られなかった。それぞれ

の感染症に対する ELISPOT 法による細胞性免疫の評価を確立したが、実際の患者検体においては、そのバックグラウンドのばらつきがあり、今後、より多くの検体の解析と、これらのワクチン接種を終了した、あるいは、疾患に罹患した免疫正常の小児に対する評価が必要であると考えられた。

今後、既に採取された検体の解析、及び、更なる検体の採取と解析を進めていく予定であるが、これらの結果を総合して最終的には、それぞれの患者の年齢、基礎疾患、免疫抑制薬の量などに応じて、テラーメイドのワクチン接種を検討しなくてはならないと考える。また、これらの基礎データは、肝移植患者の予防接種ガイドラインの基礎的なデータとなるであろう。

E. 結論

肝移植前後のワクチン接種は、一定の条件で安全に接種されているが、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。生ワクチン接種後の抗体価をみるとその抗体陽転率は 60-70% にとどまり、それぞれの疾患に確実に守られていない現実がある。児に効果があり、安全な接種を実施する上でも、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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

国際学会での発表

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, October, 2012.

Transplantation 2011 27;92:930-5.

国内の学会発表

勝田友博他 生体肝移植前後のワクチン接種の
現状 第14回日本ワクチン学会学術集会 東京
都 2010/12/11

齋藤昭彦 日本の予防接種制度について考える
—日本小児科学会推奨の予防接種スケジュール
から見えてくる現状と課題— 新潟県小児保健
研究会 新潟市 2011/9/16

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
—不活化ポリオワクチン導入をむかえて— 第44
回日本小児感染症学会 北九州市 2012/11/17

国内の雑誌での発表

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 に掲載された文献

Saitoh A, Sakamoto S, Fukuda A, Shigeta T,
Kakiuchi T, Kamiyama S, Katsuta T, Shoji K,
Ogimi C, Kasahara M. Universal Preemptive
Therapy for Cytomegalovirus Infections in
Children after Live-Donor Liver Transplantation.

Saitoh A, Nagai A, Tenjinbaru K, Li P, Vaughn
DW, Roman F, Kato T. Persistence of
immunological response six months after
vaccination with an AS03-adjuvanted H1N1
2009 influenza vaccine: an open-label,
randomised trial in Japanese children aged 6
months to 17 years. *Hum Vaccin &
Immunother* (accepted).

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

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。健康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、個人情報保護を保護する。

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

Imadome 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*. 2012 Nov; 6(7): 748-57.

2. 学会発表

[教育講演]

1. Kasahara M: Symposium VI. Immunologic problems after liver transplantation, De novo autoimmune hepatitis & PSC (Invited lecture), Seoul National University Hospital International Organ Transplantation Symposium. Seoul, Korea, 2012/11/24
2. 阪本靖介, 笠原群生: 教育セミナー 臓器移植後の感染症「肝移植後の感染症」第48回日本移植学会, 愛知, 2012/9/22
3. 笠原群生: 「移植と感染症」JATCO 総合研修会講義, 東京大学, 2012/11/18

[学会発表]

1. Funaki T, Shoji K, Miyata I, Sakamoto S, Kasahara M, Yoshii H, Saitoh A, Miyairi I: Efficacy of Live Attenuated Vaccines in Children Prior to Living Donor Liver Transplantation. 第50回米国感染症学会, サンディエゴ, 2012/10/20
2. 庄司健介, 船木孝則, 阪本靖介, 笠原群生, 齋藤昭彦, 宮入烈: 小児生体肝移植後の血流感染症に関する危険因子についての検討. 第11回東日本肝移植周術期研究会, 東京, 2012/3/3
3. 中野夏子, 中澤温子, 今留謙一, 松岡健太郎, 大喜多肇, 福田晃也, 阪本靖介, 笠原群生, 松井陽: EBウイルス感染により肝不全をきたした3例. 第39回日本小児栄養消化器肝臓学会, 大阪, 2012/7/14-15
4. 庄司健介, 阪本靖介, 笠原群生, 齋藤昭彦, 宮入烈: 小児生体肝移植後の血流感染症に関する検討. 第48回日本移植学会, 名古屋, 2012/9/22

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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】175 検体の生体肝臓移植前後の小児の細胞性免疫能を ELISPOT 法により測定した。核画分を用いることで、特異性を向上できることを明らかにした。IE62 を単独で高度発現させた細胞を用いて細胞性免疫能を定量化できるが、感染細胞を抗原とした場合との間の相関には限界があった。【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】風疹ウイルスに対する細胞性免疫解析法確立のため、風疹ウイルス特異的 ELISPOT assay 法の至適条件の検討を行い、当室における風疹ウイルスに対する細胞性免疫解析法を整備した。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. 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 感染細胞を PBS で洗浄後、PBSに懸濁し超音波破碎後、遠心により細胞抽出液を得、ELISPOT 用の抗原とした。また、未感染細胞も同様に処理し、陰性対照とした。細胞抽出液中のウイルス抗原の相対量は、抽出液を段階希釈後、ELISA プレートにコーティングし、IE62 及び gE に対するモノクローナル抗体・ペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体と反応させ、ABTS で発色し、その吸光度を比較することで決定した。
- 2) ELISPOT 反応:疎水性 PVDF フィルターのプレート(IP)に 200ng/50 μ l/well で抗ヒトインターフェ

ロン(IFN)- γ 抗体(Thermo Scientific)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 バイアル当たり約 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 当たり 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 抗体反応、PBS4 回洗浄、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン反応、PBS 回洗浄し、最後に 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、表1に示した基準により分類した。
- 4) 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。
- 5) 核分画の調製:細胞沈殿を PBS(-)で洗浄後、氷冷した低張液に懸濁し、Dounce homogenizer で細胞を破碎し、遠心して得られた沈殿(=核画分)を PBS(-)に Bioruptor により超音波処理を行い、核抽出液を得た。

2.ヒト IFN- γ mRNA の定量

IFN- γ mRNA 検出のためのプライマー、プローブは、Taqman gene expression assay kit

(Hs00989291_m1, Applied Biosystems)として購入し、One-step RT-PCR Master Mix reagent (Applied Biosystems)を用いて ABI7700 で定量を行った。PCR 反応の温度は、 $1 \times [48^\circ\text{C} 30 \text{ 分}]$, $1 \times [95^\circ\text{C} 10 \text{ 分}]$, $40 \times [95^\circ\text{C} 15 \text{ 秒}, 60^\circ\text{C} 1 \text{ 分}]$ で行った。IFN- γ 発現のスタンダードとして、V-Oka 感染ヒト二倍体細胞の Total RNA を段階希釈したものを用いた。RNA 発現内部標準として G6PD のプライマープローブセットを用い、得られた結果は Ct 法により数値化した。

【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 ウエルメンブレンフィルタープレート 1 ウエルに $100 \mu\text{l}$ 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】

1) 風疹ウイルスにおける HLA-A24 拘束性 CTL エピトープのスクリーニング

風疹ウイルス特異的 T 細胞定量 ELISPOT 法の抗原として、風疹ウイルスのエプトープペプチドを用いることとし、検索を行った。風疹ウイルスタンパクのアミノ酸配列から NetMHC 3.2 Server ソフトウェアプログラムを用いて日本人に最も多い HLA 型である HLA-A24 (A*2402)に高親和性を持つと推定される 9 アミノ酸残基からなるペプチド 10 種を選び、合成した。この中には HLA-A2 (A*0201)にも親和性を持つと予測されたペプチドも含まれていた。HLA-A*2402 分子を発現するマウス胸腺由来細胞 RMA-S-h β 2m-HLA-A*2402 に各々のペプチドを負荷後、HLA-A 分子の細胞表面発現変化を FACS にて解析した。

2) ヒト末梢血単核球(PBMC)を用いた HLA-A24 拘束性 CTL エピトープの決定

HLA-A24/A2 のヒト PBMC を用いて T 細胞増殖試験 (^3H チミジン取込み法)による HLA-A24 拘束性 CTL エピトープの決定を試みた。

3) ウイルス抗原量の検討

不活化精製ウイルスを抗原とし、MR ワクチン接種後 2 年を経過した健常ヒト末梢血単核球(PBMC)を用い

て T 細胞増殖試験 (^3H チミジン取込み法)により、T 細胞活性化に必要な抗原量を推定した。

4) 末梢血単核球(PBMC)数の検討

MR ワクチン接種前と接種 20 日後の健康人ボランティアの PBMC を試料とし、不活化精製ウイルスを抗原として市販の human IFN- γ ELISPOT kit (BD #551849)を用いて至適 PBMC 数の検討を行った。

5) 健康成人検体を用いた検出性能の確認

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、これまでに検討した条件下(不活化精製ウイルス抗原量 $1-1.5 \mu\text{g}/\text{well}$ 、細胞数 $1-2 \times 10^5$ 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。

6) 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。承認内容に基づき十分な説明を行った上で同意を得て採血した。検体から個人が特定できないように検体を管理し、個人情報保護に配慮して研究を実施した。または、国立成育医療センターにて採血し、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。この場合、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. VZV 特異的細胞性免疫能の解析法の至適化

VZV 特異的細胞性免疫の定量系を整備するため、(独)医薬基盤研究所・感染制御プロジェクト・森康子先生より ELISPOT 法の技術移転を受け、本研究室で方法の至適化を行った。

- 1) 抗原:水痘ワクチン株を感染させたヒト 2 倍体線維芽細胞 HEL 及びモルモット線維芽細胞 GPL の両抽出液を比較検討したところ、抗原として同等に機能した。
- 2) ELISPOT プレートのフィルター材質:セルロース混合エステルフィルターのプレート(HA)と疎水性 PVDF フィルターのプレート(IP)を比較した。それぞれのプレートを用いて同一条件で ELISPOT を行い、検出感度に差はないが、IP の方がバックグラウンドの程度が低かった。
- 3) 抗体量・抗原量・PBMC 数の検討:スポットの判別及び計数がより容易な染色像が得られ、かつ可能な限り使用量を抑えることができる条件を検討した。補足抗体量、検出抗体量、抗原添加量及び PBMC 数それぞれについて異なる量を組み合わせて用いた ELISPOT を行い、最適条件を決定した。

2. 臓器移植患児の VZV 特異的細胞性免疫能の解析

- 1) 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 PBMC を用いて、VZV 特異的細胞性免疫反応を定量した。この 3 年間で、生体肝移植患者の PBMC164 検体と腎移植患者の PBMC11 検体、総計 175 検体が成育医療センターより送付された。得られたデータを分類すると、(A)「明らかな細胞性免疫反応が認められる」検体が 25、(B)「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 23、(C)「VZV 特異的細胞性免疫反応が認められない」検体が 51、(D)「細胞性免疫が認められない」検体が 46、(E)「判定不能」の検体が 30 であった。水痘ワクチン接種の時期、基礎疾患、移植時の免疫抑制剤、患児の年齢などとの関係は、成育医療センターにおいて解析されている。
 - 2) これまでの検体の結果を解析してみると、たとえば明らかな反応が認められる場合(A)であっても、成人ボランティアと比較して、小児における細胞性免疫反応は低いものであった(図 1)。
- #### 3. 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 特異的細胞性免疫反応の定量法の樹立及び特異性・感度の向上を目指し、以下の検討を行った。

1) リアルタイム PCR 法を用いた IFN- γ mRNA 発現定量系

IFN- γ mRNA 発現を定量することにより細胞性免疫能をより感度よく定量できないか検討した。健常人 PBMC を、未処理もしくは PHA 存在下で 38 時間培養して得た Total RNA を用いて IFN- γ mRNA を定量したが、VZV 特異的免疫応答を検出するには感度が不十分であると判断された。

2) 感染細胞の核画分を用いた特異性及び感度の向上

従来用いられてきたヒト 2 倍体細胞の代わりに、GPL 細胞を感染に用いても同等の抗原性が得られ、非特異的反応も低減できた。さらに、感染細胞から核画分を調製し抗原とすると、未感染細胞では非特異反応がさらに低減し、感染細胞では、細胞全体を用いた場合と同程度の抗原性が得られることが明らかとなった(図 2)。

3) VZV の特定遺伝子を発現させた細胞から調製した抗原を用いた特異性・感度の向上

VZV 粒子中の糖蛋白 E(gE) 及び核抗原 IE62 は強い CTL 応答を引き起こすことが知られている。そこで、これらの遺伝子を細胞に導入し、高度に発現させた細胞より抗原を調製し、ELISPOT に用いることを試みた。その結果、GPL 細胞は遺伝子導入効率が低いため、十分な抗原性が確保できなかった。一方、293T 細胞は高効率な発現が得られるが、ベクターのみを導入した細胞のライゼートを用いた場合にも非特異的なスポットが見られた。そこで、感染細胞と同様に IE62 導入 293T 細胞について核画分を調製し、抗原として用い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。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(図 3)。

【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) 風疹ウイルスにおける HLA-A24 拘束性 CTL エピトープのスクリーニング
in vitro において HLA-A*2402 分子と結合する風疹ウイルスタンパク由来ペプチド 7 種を決定した (表1)。この中には HLA-A*2 にも親和性を持つと予想されたペプチド 1 種も含んでいた。
- 2) ヒト末梢血単核球(PBMC)を用いた HLA-A24 拘束性 CTL エピトープの決定
MR ワクチン接種後2年を経過した HLA-A24/A2 の健常ヒト末梢血単核球 (PBMC) および MR ワクチン接種前と接種 20 日後の健常人ボランティアの PBMC(HLA タイプ不明)を用いた T cell proliferation assay では、1)で決定した候補ペプチド7種すべて、stimulation index (抗原刺激有り cpm/抗原刺激なし cpm)は 1.0 以下であり、T 細胞の増殖が見られなかった。
- 3) ウイルス抗原量の検討
MR ワクチン接種後2年を経過した HLA-A24/A2 の健常ヒト末梢血単核球 (PBMC)を用いた T cell proliferation assay では、不活化精製ウイルス量 (タンパク量)0.1 μ g/well で stimulation index は 5.0、1 μ g/well で 11.0 と T 細胞の増殖が見られた。検討に用いた PBMC は MR ワクチン接種後2年を経過していたにも関わらず、抗原量に依存して stimulation index の増加が見られた。既報の知見を考え合わせてウイルス抗原量は 1 μ g/well が適していると考えた。
- 4) 末梢血単核球(PBMC)数の検討
ワクチン接種前後の PBMC を用いた IFN- γ ELISPOT assay では、 $1-2 \times 10^5$ cells/well の条件下で良好な結果が得られた (表2)。
- 5) 健康成人検体を用いた検出性能の確認
健常成人 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3)。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、測定系に問題はないと考えられた。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。

- 6) 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

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4)。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】

VZV 特異的細胞性免疫能の解析に用いた基準は、医薬基盤研究所感染制御プロジェクトで成人に対して用いられているものと同一であるが、本研究では、予想外に判定不能となる検体が多かった。感染研のボランティアから得られた検体でも、こうした判定不能となるような検体はなく、今回対象としている小児の年齢、基礎疾患及び移植に伴う免疫抑制の効果などから、こうした非特異的の反応が発生している可能性がある。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 特異的細胞性免疫能の基準を明確にしていくことができると考えられる。例えば、腎移植患者 11 検体中 2 検体にみが判定不能で、残りは細胞性免疫反応陽性であるのに対して、肝移植患者では、164 検体中 30 検体が判定不能、46 検体に細胞性免疫が認められないという違いがある。

非特異的の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。

今回、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。

【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】

細胞性免疫誘導の解析には効率よく細胞障害性 T 細胞を活性化する抗原が不可欠である。本研究では、風疹ウイルスのエピトープペプチドを ELISPOT assay の抗原に使用するため、エピトープのスクリーニングを行った。HLA-A*2402 分子を発現するマウス胸腺由来細胞 RMA-S-h β との結合が見られたが、実際のヒト PBMC の T 細胞増殖試験では、T 細胞の活性化が見られなかったため、不活化精製ウイルスを抗原とすることにした。市販の不活化精製ウイルスを抗原として ELISPOT assay の検討を行ったところ、使用キット:BD human IFN- γ ELISPOT kit (BD #551849)、抗原:不活化精製風疹ウイルス 1 μ g/well、末梢血単核球数:1~2 \times 10⁶/well の条件で風疹ウイルス特異的 T 細胞を定量可能であると考えられた。健常成人検体で決定した ELISPOT assay の条件は特異性が高く、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い可能性が示唆された。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いないため、詳細は不明である。

本研究で確立した ELISPOT assay は健常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) 175 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。
- 2) 核画分を用いることで、特異性を向上できることを明らかにした。
- 3) IE62 を単独で高度発現させた細胞を用いて細胞性免疫能を定量化できるが、感染細胞を抗原とした場合との間の相関には限界があった。

【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】

風疹ウイルスに対する細胞性免疫解析法確立のため、風疹ウイルス特異的 ELISPOT assay 法の至適条件の検討を行い、当室における風疹ウイルスに対する細胞性免疫解析法を整備した。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
 2. 金井亨輔、山田壮一、井上直樹: 水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) 日本ウイルス学会学会誌「ウイルス」60(2): 197-208. 2010
 - 3.
2. 学会発表
金井亨輔、谷口留美、湯華民、森康子、井上直樹. 水痘帯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. 水痘帯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	3. その他	なし
2. 実用新案登録	なし		

水痘に関して

表 1 . ELISPOT で得られた結果の分類基準

判定		判定要件
A:	明らかなVZV特異的細胞性免疫反応あり	<ul style="list-style-type: none"> ・PHA抗原添加で40個以上 ・VZV抗原添加で5個以上かつ++以上 ・陰性抗原添加で5個未満かつ2倍以上の差あり
B:	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	<ul style="list-style-type: none"> ・PHA抗原添加で40個以上 ・VZV抗原添加で5個以上かつ+以上 ・陰性抗原添加で5個未満または1.2倍以上の差あり
C:	VZV特異的細胞性免疫反応が認められない	<ul style="list-style-type: none"> ・PHA抗原添加で40個以上 ・VZV抗原添加で5個未満または+以下 ・陰性抗原添加で5個未満または差が1.2倍以下
D:	細胞性免疫反応が認められない	<ul style="list-style-type: none"> ・PHA抗原添加で40個未満
E:	判定不能	<ul style="list-style-type: none"> ・上記のいずれにも分類されないもの

水痘に関して

図1 成人健常ボランティアと移植患児におけるVZV細胞性免疫応答反応の比較

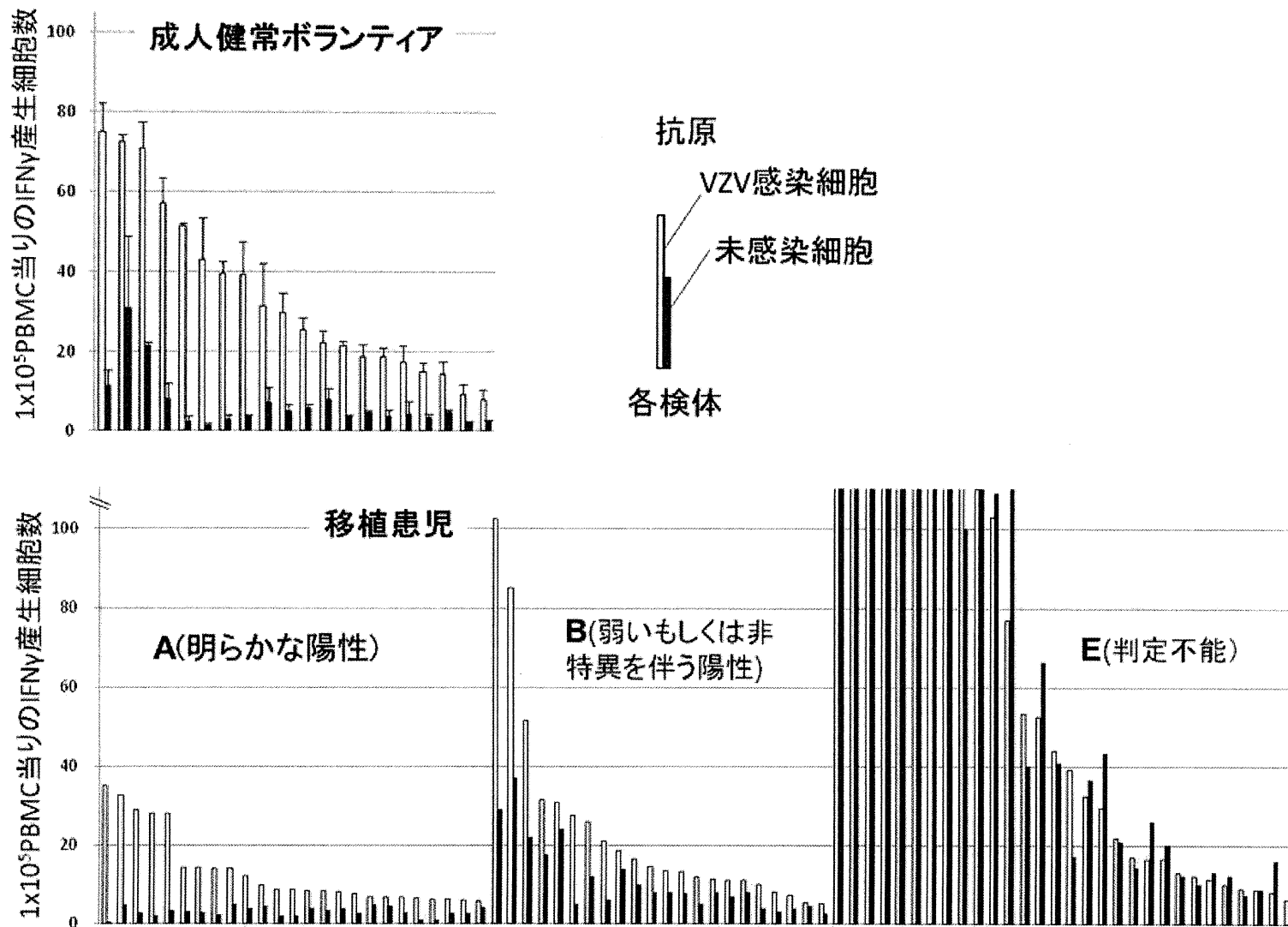


図 2. 感染細胞核分画を抗原とした場合の特異性・感度

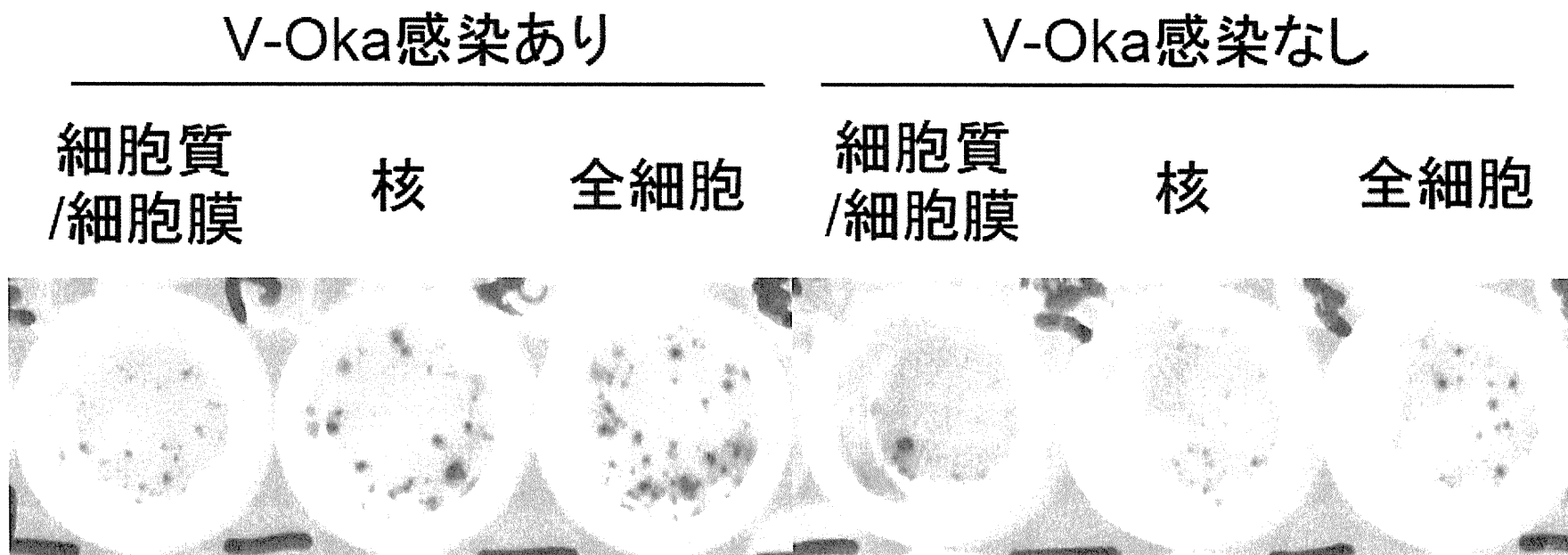
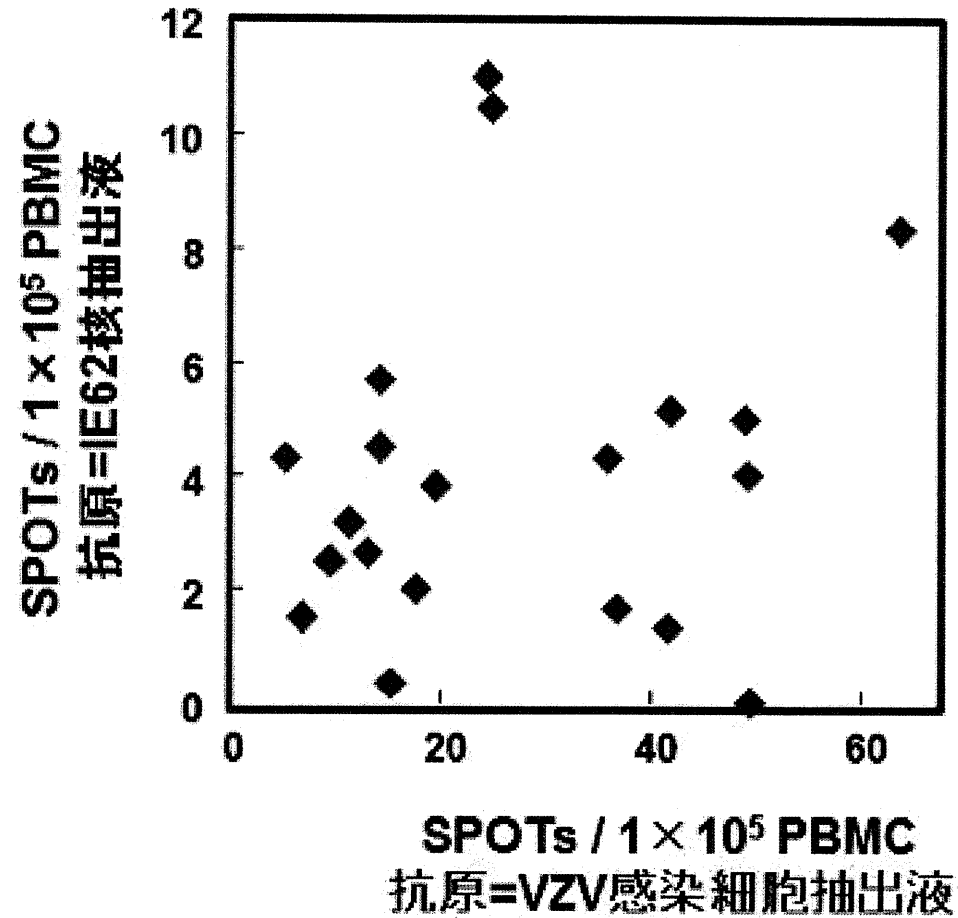


図 3. IE62 核抽出液を抗原とした細胞性免疫反応の測定の信頼度



風疹に関して

表1 健常成人ワクチン接種前後末梢血単核球(PBMC)による至適細胞数の検討

細胞数 (cells/well)	ワクチン接種前						ワクチン接種22日後					
	medium		ウイルス抗原		PHA + Ionomycin		medium		Ag		PHA + Ionomycin	
		mean		mean		mean		mean		mean		mean
1 × 10 ⁵	0		0		12		0		0		92	
	0	0	0	0	22	16.666667	0	0	0	0.3333333	94	83.333333
	0		0		16		0		1		64	
2 × 10 ⁵	0		0		62		0		0		167	
	0	0	0	0	54	57.666667	0	0	0	0	156	165.66667
	0		0		57		0		0		174	
5 × 10 ⁵	0		0		100		0		1		144	
	0	0	0	0	95	97	0	0	4	2.6666667	159	174.33333
	0		0		96		0		3		220	
1 × 10 ⁶	0		0		154		0		10		180	
	0	0	0	0	146	135.33333	1	0.6666667	8	10.666667	173	181.66667
	0		0		106		1		14		192	
2 × 10 ⁶	0		0		235		0		54		+	
	0	0	0	0.3333333	192	197.66667	0	0	48	48	+	+
	0		1		166		0		42		+	