

厚生労働科学研究費補助金(平成25年度)

「Hib、肺炎球菌、HPV及びロタウイルスワクチンの各ワクチンの有効性、安全性並びにその投与方法に関する基礎的・臨床的研究」

ワクチンの投与方法：皮下注、筋肉注射の有効性・安全性に関する研究

研究分担者 中山哲夫 北里生命科学研究所

【研究要旨】我が国では大腿四頭筋拘縮症の問題から長い間ワクチンは皮下接種でおこなわれてきた。ヒトパピローウイルスワクチンのサーバリックスは Monophosphoryl lipid A (MPL)とアルミの複合アジュバント(AS04)を用いていることから筋注でワクチン接種が始まった。勧奨接種のワクチン接種後の組織像を検討し、アジュバントを含んだワクチン接種後では炎症性肉芽腫が形成され、こうした炎症性肉芽腫は癒痕化し6ヶ月から縮小傾向を認め1年でも結節が残っていることを昨年度までに明らかとした。平成25年度はマウスに筋注後早期に起きる反応を検討した。AS04複合アジュバントを含んだサーバリックス接種後3時間で筋肉組織中のIL-1 $\beta$ 、IL-6、G-CSFは非接種側の10倍以上の産生が認められ48時間までは数十倍～100倍にまで上昇した。一方、アルミアジュバントのみを含んだPCV、DPT、ガーダシル接種後IL-1 $\beta$ 、IL-6は非接種側の3倍程度の増加を認めた。G-CSFはDPT、ガーダシルで10倍以上の産生の増加が認められた。TNF- $\alpha$ はすべてのワクチンで接種後の産生能の増加は認められなかった。サーバリックス接種局所での炎症性サイトカインの上昇が認められたが血清中の炎症性サイトカインは他のワクチン接種後と比較して同等のレベルであった。ガーダシル、サーバリックス接種後から3-6時間後に炎症性肉芽腫が形成され多核白血球が遊走し炎症性肉芽腫を形成していた。接種後局所に産生されたG-CSFにより好中球が遊走し好中球は融解しDNAが漏出することで自然免疫系のdamage associated molecular patternにシグナルが入り炎症性サイトカインを産生し、CD4 helperを介する獲得免疫を誘導すると考えられた。

#### A. 研究目的

諸外国ではワクチンは筋注で接種されその安全性は確立されていると言える。2008年以降インフルエンザ桿菌(Hib)、肺炎球菌(PCV7)、Monophosphoryl lipid A(MPL)とアルミの混合アジュバントをもちいたヒトパピローマワクチン(HPV)サーバリックス、さらにはアルミ単味アジュバントのガーダシルと欧米で使用されているワクチンが相次いで認可された。HPVは筋注のワクチンとして接種が始まった。

昭和30年代後半から大腿四頭筋短縮症、筋拘縮症の報告が増加し、抗生剤と鎮痛解熱剤の混合接種が筋拘縮症の原因である事が整形外科学会から指摘され、これを受け小児科学会で筋拘縮症委員会が組織され、筋肉注射に安全な部位はなく、安全な年齢はない。筋肉注射の適応は通常の場合

において極めて少ない。との提言が出された。また、筋拘縮症委員会の報告書の中でヒトの筋拘縮症の病理組織所見は動物で再現できる事から筋注製剤は実験動物を用いて検証する事と提言されている。しかし、こうした検討は行われることなく、なし崩し的に筋注が行われている現状である。昨年度まで、現在認可されているワクチンの筋注と皮下接種の安全性を検討し、以下の結果を得ている。

- 1) 現在使用されているワクチンは筋注しても筋拘縮症に認められた広範な筋細胞の変性、壊死、繊維性萎縮は認めなかった。
- 2) アルミを含んでいないワクチンは何も反応がないか、物理的な刺激による損傷からの修復過程と思われる軽度の炎症反応が認められた。
- 3) アルミアジュバントを含有したワクチンを接種すると好中球やアルミを貪食したマクロファージが炎

症性肉芽腫を形成する。組織所見は筋注も皮下接種も同じ所見で6ヶ月から縮小傾向を認め筋注の方が早く吸収される傾向にあった。

2013年4月からHPVワクチンは勧奨接種となったが、接種後の慢性疼痛、疲労感、認知障害等の副反応が問題となり接種直後の疼痛が引き金となり心因性身体症状と考えられている。接種早期におこる局所反応の病態を検討することを目的としてマウスに筋注後の筋肉組織のサイトカイン、血清中のサイトカインを測定し、あわせて病理学的な検討を行った。

## B. 材料と方法

### B-1. 筋注と皮下注の病理所見の検討

使用したワクチンは、現在勧奨接種のワクチンとなっているDPT(北里第一三共)、Hib(サノフイー)、PCV7(ファイザー)、日本脳炎ワクチン(阪大微研)、HPVサーバリックス(GSK)、ガーダシル(MSD)をもちいた。各群3匹のBALB/cマウスに市販ワクチン0.1mlを左大腿筋肉内接種し3, 6, 24, 48時間後に麻酔後全採血し、筋肉組織を採取した。反対側にはPBS(-)を接種し同様に筋肉組織を採取した。サーバリックス、ガーダシル、日本脳炎接種群は接種組織を検討するために各2匹に接種し3, 6, 24, 48時間後の筋肉組織をホルマリン固定しHE染色とアルミ染色(lumogallion染色)を行った。

### B-2. サイトカインの測定

筋肉組織はprotease inhibitorを含む培養液中で破碎し遠心上清を0.45 μmのフィルターで濾過後BioPlex mouse cytokine panel(IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, Eotaxin, G-CSF, KC, MCP-1, and TNF-α)を用いてサイトカインを測定した。

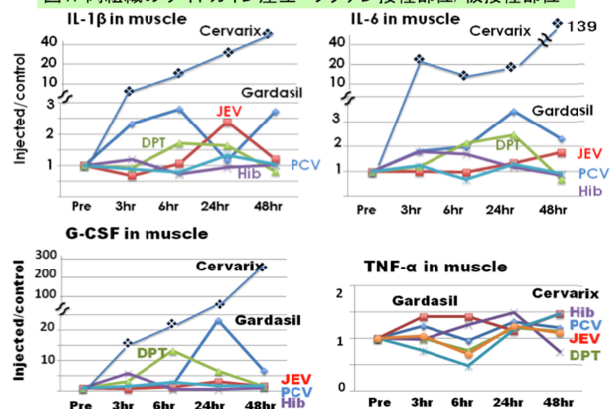
## C. 結果

### C-1. 各ワクチン接種早期の筋肉内のサイトカイン

48時間の観察期間中IL-2, IL-4, IL-10, Eotaxin, TNF-αには大きな変化は認めずTNF-αの各ワクチン接種後の変化を図1に示した。接種部位では非接種部位の0.5-1.5倍以内の変動で各ワクチン接種後に有意な変動は観察されなかった。

一方、IL-1β, IL-6, G-CSFの変化は大きく接種部位と非接種部位のサイトカインの比率を図1に示した。特にサーバリックスでは接種後3時間で非接種部位の10~20倍の高値のIL-1β, IL-6, G-CSFが検出され48時間後まで上昇した。ガーダシルは6時間後にIL-1βのピークを示し、IL-6, G-CSFは24時間後にピークを示した。DPT, Hib, PCV7, 日本脳炎ワクチン接種後3-5倍以内で特に顕著なサイトカインの産生は認めなかった。

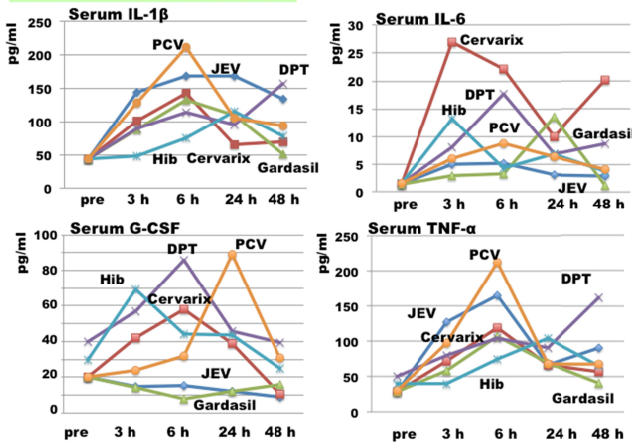
図1. 肉組織のサイトカイン産生 ワクチン接種部位/被接種部位



### C-2. 血清のサイトカイン

血清中のサイトカインの動きを図2に示した。IL-1βはPCV7, 日本脳炎, DPT, サーバリックス, ガーダシルともに接種6時間後に、Hibは接種24時間後にピークを認めた。G-CSFはHib, DPT, サーバリックス, PCV接種後3, 6, 24時間後に増加するが、サイトカインの量には有意差は認めなかった。IL-6はサーバリックス接種3時間後に産生のピークを認め他のワクチン接種後よりは有意に高い値を示した。他のワクチン接種後でも24時間以内に産生のピークを認めた。TNF-αは接種後6時間でピークを認めた。サーバリックス接種後局所の筋肉組織では高値のIL-1β, IL-6, G-CSFが検出され、血清中にも増加することが想定されたが、各ワクチン接種後の血清中のサイトカイン産生量と大きな差は認めなかった。

図2. 血清中のサイトカイン産生

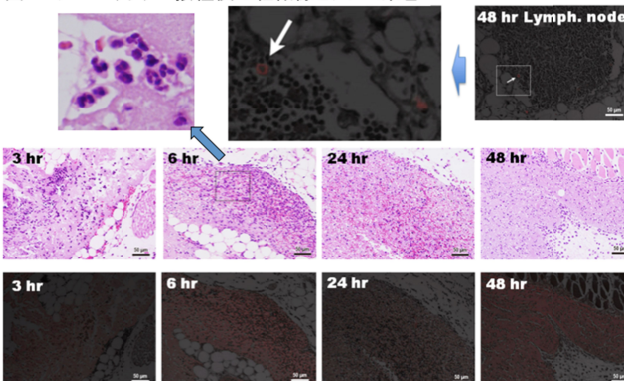


### C-3. サーバリックス接種後の組織像

サーバリックス接種後の筋肉組織の病理像を図3に示した。接種3時間後には炎症性細胞が浸潤しており6時間後の細胞を拡大して示した。多くは多核白血球で一部好酸球が混在している。48時間後の所属リンパ節のなかには矢印で示したようにアルミを貪食した細胞が流入していることが明らかとなった。

日本脳炎ワクチン接種後では炎症性肉芽腫は認められず炎症像は観察されなかった。

図3. サーバリックス接種後の組織像とアルミ染色



### D. 考案

勧奨接種のワクチンのアジュバントの量はワクチンごとに異なっており、1ドース0.5 mlあたりでDPTは0.1 - 0.15mg、PCVは0.125 mg、ガーダシルは0.225mgのアルミを含んでおり、サーバリックスは0.5mgのアルミ + 50µgのMPLの複合アジュバントが用いられている。アルミアジュバントを含んだワクチン接種後では接種部位に好中球が集まりその後自己融解したDNAや細胞成分が自然免疫系の damage associated molecular

patterns (DAMPs)に刺激を入れ炎症性サイトカインを誘導する。サーバリックスに用いられているMPLはサルモネラのLPSを無毒化したものでTLR4のligandとして作用し、NFκBを活性化し細胞内の転写活性を高めinflammasomeを活性化することで炎症性サイトカインを誘導する。サーバリックスは自然免疫系に強いシグナルを入れ炎症性サイトカインを誘導することが考えられる。今回検討した接種局所の筋肉組織内でIL-1β, IL-6, G-CSFが他のワクチンと比較して高値を示していた。しかしながら、いずれのワクチン接種後でも局所にはTNF-αの産生は認められなかった。サーバリックス接種後局所では高値のサイトカインが検出されても血清中のサイトカイン量は他のワクチン接種後と大きな差は認められなかった。

以上のことから、サーバリックス接種後局所の炎症性サイトカインは接種直後の疼痛と関連すると考えられ、血清中のサイトカインの量は他のワクチン接種後と大きな差は認められないことから全身的な副反応との関連性は低いものと考えられた。

今回の実験から、ワクチン接種後の免疫応答をまとめると、アジュバントを含んだワクチン接種によりG-CSFが産生され、局所に好中球が集まる。好中球は自己融解(neutrophil extracellular traps: NETs)、漏出したDNA、活性酸素はDAMPsを刺激することで炎症性サイトカインを産生する。炎症性サイトカインはマクロファージを活性化して初期には自己融解した好中球を貪食するM1マクロファージが集まり、次いで炎症反応を押さえ込むためにM2マクロファージが出現してくる。M2、M2 likeマクロファージへの変化は炎症反応の沈静化、remodelingに働く(図4)。

ワクチンによる免疫応答には自然免疫が大きな役割を担っており、すべての有効なワクチンは自然免疫系に刺激を入れる事によりサイトカインを誘導し獲得免疫を調節している事が明らかとなってきた。

### E. 結論

今回は接種早期の48時間以内の局所と血清中

のサイトカインを検討した。サーバリックスは接種局所で高値のIL-1 $\beta$ , IL-6, G-CSFのサイトカインを産生するが、血清中のサイトカインは他のワクチン接種後と同じレベルであった。このことからサーバリックス接種後局所の疼痛にはワクチン接種後による炎症性サイトカイン産生が関与しているが、その後は減少し1カ月後には炎症の修復機転にあり慢性疼痛との関連性は説明できない。

### ワクチン接種後に何が起きているのか?



図4. ワクチン接種後の免疫応答

### 1 論文発表

- 1) Matsubara K, Fujino M, Takeuchi K, Iwata S, Nakayama T. A new method for the detection of neutralizing antibodies against mumps virus. PLOS ONE 2013; 8: e65281.
- 2) Nakayama T. Vaccine chronicle in Japan. J Infect Chemother 2013; 19: 787-98.
- 3) Ikeno S, Suzuki MO, Muhsen M, Ishige M, Kobayashi-Ishihara M, Ohno S, Takeda M, Nakayama T, Morikawa Y, Terahara K, Okada S, Takeyama H, Tsunetsugu-Yokota Y. Sensitive detection of measles virus infection in the blood of humanized mouse by one step quantitative RT-PCR. Front Microbiol 2013; 11 October doi: 10.3389/fmicb.2013.00298
- 4) Yui I, Fujino M, Sawada A, Nakayama T. Novel clinical features of recurrent human respiratory syncytial virus infection. J Med

- Virol 2013; Oct 25. doi: 10.1002/jmv.23809.
- 5) Sawada A, Yamaji Y, Nakayama T. Mumps Hoshino and Torii vaccine strains were distinguished from circulating wild strains. J Infect Chemother 2013; 19: 480-485.
  - 6) Nakayama T, Sawada A, Kubo H, Kaida A, Tanaka T, Shigemoto N, Komase K, Takeda M. Simple method for differentiating measles vaccine from wild-type using loop-mediated isothermal amplification. Microbiol Immunol 2013; 57: 246-251.

### G. 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