

厚生労働科学研究費補助金(平成 26 年度)

「新しく開発された Hib, 肺炎球菌、ロタウイルス、HPV等の各ワクチンの  
有効性と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】ヒトパピローマ(HPV)ワクチンは接種後の慢性疼痛を含めた神経症状から勧奨接種が止まったままである。接種部位の疼痛を含めた局所反応は接種後 48 時間までに認められることから定期接種のワクチンを接種し接種部位の筋肉組織のサイトカイン産生能を検討しサーバリックス接種後には高値の炎症性サイトカインが検出されることを報告した。平成 26 年度は 2 社の HPV, 2 社の DPT/IPV 4 混、4 社の DPT, Hib, PCV13 接種後 4 週間、更に再接種後 1 週間で経時的に筋組織でのサイトカイン産生能を検討した。サーバリックス接種 3 時間後から IL-1 $\beta$ , IL-6, G-CSF, MCP-1 が産生され 7 日以降では検出されない。再免疫 2 日後では同様にこれらのサイトカインが増加したが 5 日後では減少していた。ガーダシル接種後では MCP-1 は 24 時間後から産生され 5 日にピークを示し、5-7 日後に IL-4 の産生が認められ、再接種後でも同様であった。TNF- $\alpha$  の産生は 7 日後にピークを示した。DPT 単独接種後と DPT/IPV 4 混接種後のサイトカイン産生は同様のプロファイルを示した。IL-1 $\beta$ , IL-6, G-CSF, MCP-1 が接種 5 日後に検出され IL-4 は微研製の DPT, DPT/IPV 4 混は 7 日後、他社の DPT は 5 日後にピークを認めた。PCV13 接種後では 5-7 日後に IL-1 $\beta$ , IL-4, G-CSF の産生がみとめられ MCP-1 は 2-7 日後にかけて産生が認められ再接種後では 2 日後にピークが認められた。Hib 接種後では炎症性サイトカインの顕著な変化は認めなかった。アルミアジュバントを含んだワクチンは接種後 3-6 時間後から炎症性サイトカインが産生されワクチンの種類によってサイトカインプロファイルが異なる。アジュバントを含んだワクチン接種後炎症性肉芽腫は Ly-6G 陽性の好中球が集まり、Hoehst染色では細胞から放出された DNA が認められた。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 patterns (DAMPs) にシグナルが入り炎症性サイトカインを産生し、IL-4 産生を誘導し CD4helper 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 年以降欧米で使用されているワクチンが相次いで認可され HPV は筋注のワクチンとして接種が始まった。

抗生剤と鎮痛解熱剤の混合接種が大腿四頭筋短縮症、筋拘縮症の原因である事が判明し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。我が国で定期接種となっている不活化ワクチンをマウ

スに接種して以下の結論を得ている。

- 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、線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。
- 4) 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と考えられた。

2014年度は現在定期接種となっているワクチンをBALB/cマウスに筋注し2, 5, 7日後、2, 4週後、再接種2, 5, 7日後の筋組織のサイトカインを測定した。

## 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(微研、武田、化血、北里第一三共)、Hib(サノフィー)、DPT/IPV4混(微研、化血)、PCV13(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を0.1ml左大腿筋肉内接種し2, 5, 7日後、2, 4週後、さらに同一側に再接種し2, 5, 7日後に麻酔後全採血し、接種側の大腿筋を採取した。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砕し遠心上清を0.45  $\mu$ mのフィルターで濾過後BioPlex mouse cytokine panel(IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, Eotaxin, G-CSF, KC, MCP-1, and TNF- $\alpha$ )を用いてサイトカインを測定した。

### B-3. 免疫組織染色

サーバリックス、ガーダシル接種後の組織をホルマリン固定し、Hoechst染色で組織DNAを、Ly-6G染色で好中球を染色した。

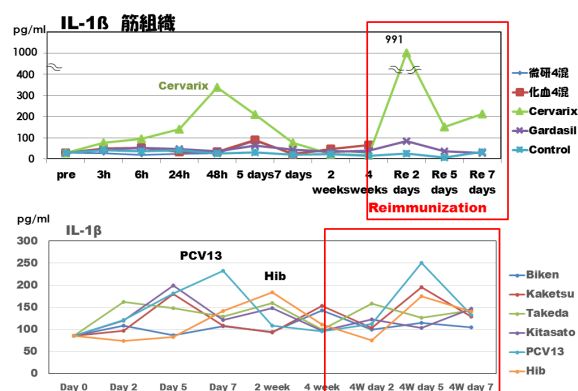
## C. 結果

### C-1. 各ワクチン接種後の筋肉内のサイトカイン

昨年度までの報告で48時間の観察期間中IL-2, IL-4, IL-10, Eotaxin, TNF- $\alpha$ には大きな変化は認めなかったが、接種後3時間後から接種側の筋肉組織からIL-1 $\beta$ , IL-6, G-CSFが検出された。長期の観察を行いIL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, G-CSF, MCP-1, TNF- $\alpha$ の変動を認めた。

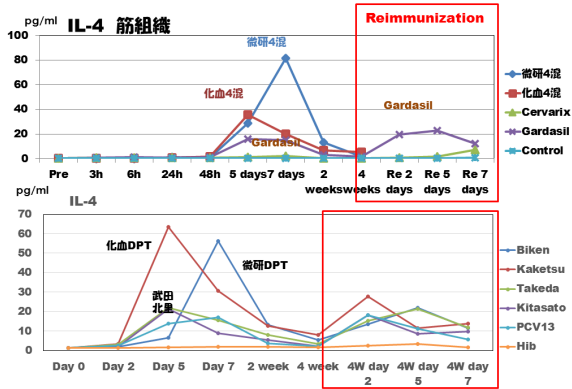
#### C-1-1. IL-1 $\beta$

上段にサーバリックス、ガーダシル、4混(微研、化血)接種後の産生量の変化を示した。サーバリックス接種後48時間に産生のピークを認め、再接種後でも2日後にピークが観察された。4混接種後でも産生が増加する傾向がみられ、下段に各社のDPT, PCV13, Hib接種後のIL-1 $\beta$ を示した。武田DPTは2日後に増加し化血、北里のDPT接種後5日後で増加し、PCV13接種後では7日後にピークが認められた。Hibは2週後の増加が認められた。再接種でも初回免疫と同様に2-5日後に産生の増加が認められた。



#### C-1-2. IL-4

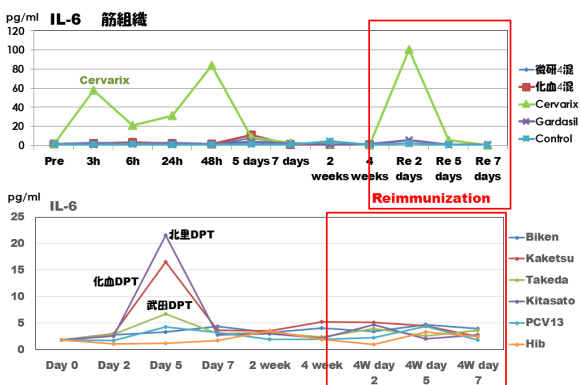
上段にサーバリックス、ガーダシル、4混(微研、化血)接種後の産生量の変化を示した。サーバリックス接種後ではIL-4の産生は検出されず、化血4混では接種5日後、微研4混では7日後、ガーダシル接種後では2-5日にIL-4の産生が認められた。再接種後でも同様であった。



下段に各社の DPT, PCV13, Hib 接種後の IL-4 の変化を示した。化血、武田、北里 DPT は 5 日、微研 DPT は 7 日、PCV13 は 5-7 日後に IL-4 産生が認められ、再接種後の同様に 2-5 日に増加した。Hib は経過中 IL-4 の産生は認めなかった。

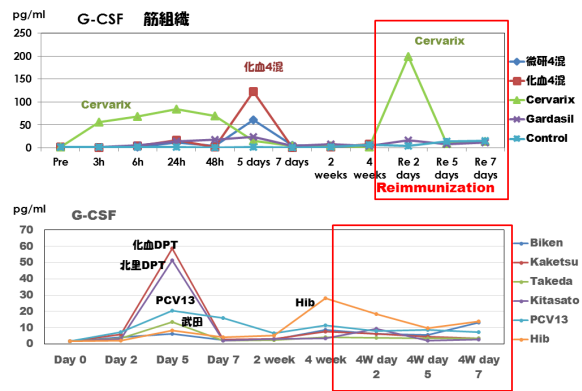
### C-1-3. IL-6

上段にサーバリックス、ガーダシル、4 混(微研、化血)接種後の産生量の変化を示した。サーバリックス接種後では 3 時間後から産生され 48 時間後に産生のピークを認め再接種後では 2 日後にピークを認めた。4 混接種後でも 5 日後に変動が認められ、下段に各社の DPT, PCV13, Hib 接種後の IL-6 の変化を示した。Hib, PCV13, 微研 DPT では IL-6 の産生は認めなかった。再接種後では IL-6 の顕著な変動が認められなかった。



### C-1-4. G-CSF

上段にサーバリックス、ガーダシル、4 混(微研、化血)接種後の産生量の変化を示した。サーバリックス接種後では 3 時間後から 48 時間まで産生され 4 混接種では 5 日後にピークが観察された。再接種後では 2 日後に増加が認められた。

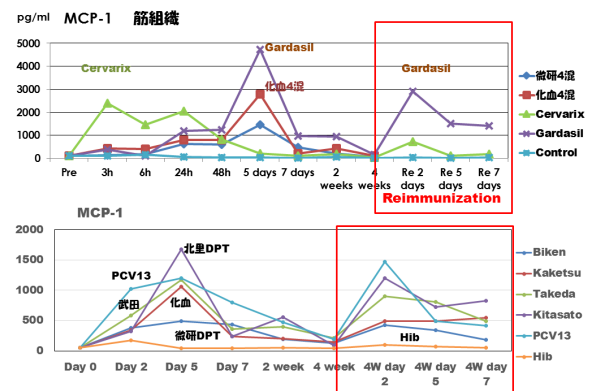


下段に各社の DPT, PCV13, Hib 接種後の G-CSF の変化を示した。化血、北里、武田の DPT は接種 5 日後に、PCV13 接種 5-7 日後に G-CSF が産生され Hib 接種 4 週で G-CSF が検出された。再接種では大きな変動は認めなかった

### C-1-5. MCP-1

上段にサーバリックス、ガーダシル、4 混(微研、化血)接種後の産生量の変化を示した。サーバリックス接種後では 3 時間後から産生され 48 時間後では減少していた。ガーダシル、化血 4 混で 5 日後のピークを認めた。ガーダシル再接種 2 日後に MCP-1 の産生の増加が認められた。

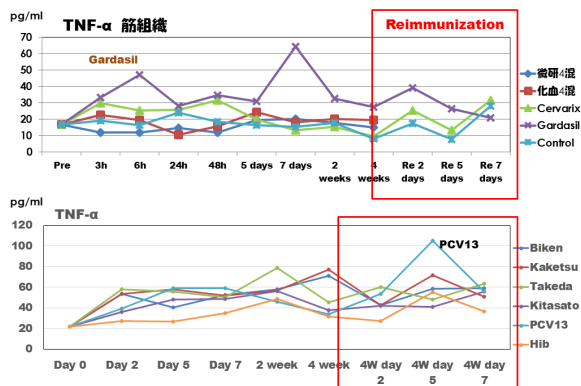
下段に各社の DPT, PCV13, Hib 接種後の MCP-1 の変化を示した。Hib 以外のワクチン接種後では 2-5 日に MCP-1 の増加が認められた。



### C-1-6. TNF-α

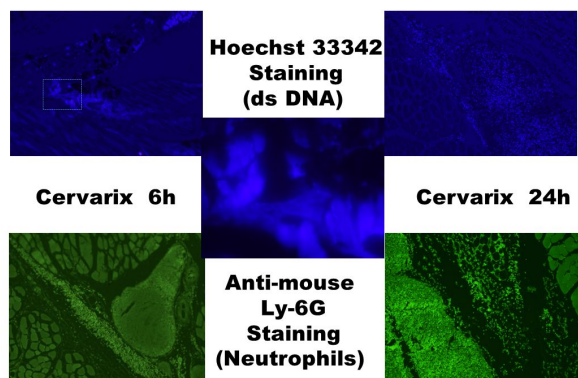
上段にサーバリックス、ガーダシル、4 混(微研、化血)接種後の産生量の変化を示した。ガーダシル接種 3 時間後から産生され始め 6 時間で増加し一時低下し 7 日後に再び増加し、再接種後でも 2 日後から増加した。下段に各社の DPT,

PCV13, Hib 接種後の TNF- $\alpha$  の変化を示した。接種後から大きな変動は認めないが PCV13 再接種 5 日後に TNF- $\alpha$  の増加が認められた。



### C-2 . 組織所見

サーバリックス接種後の局所の疼痛は接種部位の炎症反応によるものと考えられる。接種 3 時間後には好中球が浸潤し肉芽腫が形成され始める。サーバリックス接種 6、24 時間後の組織を Ly-6G を用いて免疫染色をおこなった。肉芽腫の中に Ly-6G 陽性の好中球が検出された。また、Hoechst33342 を用いて DNA を染色し中央に拡大して示した。細胞 DNA だけでなく不定形の DNA が染色されて融解した細胞から放出されたものと推察された。



### D. 考察

アジュバント非含有ワクチンの Hib は接種後の組織でのサイトカインの産生は認めなかった。サーバリックスはアルミアジュバント以外にも monophosphoryl lipid A (MPL) が用いられている。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、NF $\kappa$ B 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-1 $\beta$ , IL-6, G-CSF, MCP-1 が産生された。IL-4 の産生は認めないことから Th2 にシフトした免疫応答ではないことが示唆された。

ガーダシル接種後では MCP-1 は 24 時間後から産生され 5 日にピークを示し、5-7 日後に IL-4 の産生が認められ、再接種後でも同様であった。TNF- $\alpha$  の産生は 7 日後にピークを示した。

DPT 単独接種後と DPT/IPV 4 混接種後のサイトカイン産生は同様のプロファイルを示した。IL-1 $\beta$ , IL-6, G-CSF, MCP-1 が接種 5 日後に検出され IL-4 は微研製の DPT, DPT/IPV4 混は 7 日後、他社の DPT は 5 日後に IL-4 のピークを認めた。

PCV13 接種後では 5-7 日後に IL-1 $\beta$ , IL-4, G-CSF の産生がみとめられ MCP-1 は 2-7 日にかけて産生が認められ再接種後では 2 日後にピークが認められた。再接種 5 日後に TNF- $\alpha$  の産生が認められた。ワクチンの種類、製造所によりアルミニウムアジュバントの濃度、剤型にも差が認められる。

Vaccine	Adjuvants
DPT Takeda	0.1 mg
DPT Biken	0.08 mg
DPT Kaketsu	1.5 mg ALCL3 (0.25 mg AL)
DPT Kitasato	0.9 mg ALCL3 (0.15 mg AL)
PCV13	0.125 mg
HPV Cervariz	0.5 mg + MPL 50 $\mu$ g
HPV Gardasil	0.225 mg
Hib	-

ワクチンの種類、使用するアジュバントにより自然免疫系に入りサイトカインの誘導プロファイルに差が認められる。単球、マクロファージが産生する MCP-1, G-CSF のケモカインが動き、IL-1 $\beta$ , IL-6 の炎症性サイトカインが誘導され炎症反応、IL-4 産生を介して CD4 Th2 response の誘導へとつながるサイトカイン応答が認められた。

組織の免疫染色の結果から好中球の浸潤と融解した細胞から DNA が放出されていることが明らか



となった。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。好中球は自己融解し(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 マクロファージへの変化は炎症反応の沈静化 remodeling に働くと考えられ、以下の現象がワクチン接種後に起こっていると考えている。

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。

#### ワクチン接種後に何が起きているのか？



#### E. 結論

勧奨接種のワクチン接種後 4 週までと再接種後の局所のサイトカインを検討した。アルミアジュバントを含んだワクチン接種後単球、マクロファージ等から G-CSF, MCP-1 等のケモカインが産生され G-CSF により好中球が遊走し、自己融解し DNA が放出され DAMPs に刺激を入れ inflammasomes を活性化し炎症性サイトカインを産生する。IL-4 が CD4Th2 応答を介して獲得免疫を調節する。自己融解した細胞残骸を貪食する M1 マクロファージが集簇し次いで炎症反応を制御する Treg, M2 マクロファージへと変化し炎症反応は修復する。

#### F. 2014 年度研究業績

##### 論文発表

- 1) Kashiwagi Y, Miyata A, Kumagai T, Maehara K, Suzuki E, Nagai T, Ozaki T, Nishimura N, Okada K, Kawashima H, Nakayama T. Production of inflammatory cytokines in response to diphtheria-pertussis-tetanus (DPT), haemophilus influenzae type b (Hib), and 7-valent pneumococcal (PCV7) vaccines. *Human vaccine & Immunother* 2014; 10: 677-685.
- 2) Kashiwagi Y, Maeda M, Kawashima H, Nakayama T. Inflammatory responses following intramuscular and subcutaneous immunization with aluminum- adjuvanted or non-adjuvanted vaccines. *Vaccine* 2014; 32: 3393-3401.
- 3) Yamaji Y, Nakayama T. Recombinant measles viruses expressing respiratory syncytial virus proteins induced virus-specific CTL responses in cotton rats. *Vaccine* 2014; 32: 4529-4536.
- 4) Kumagai T, Yoshikawa T, Shiraki K, Yoshida M, Nakayama T, Ihira M, Asano Y. Virus specific cell-mediated immunity may play a role in controlling reactivated human herpes virus 6B in patients under measles induced immunosuppression. *J Med Virol* 2014; 86:658-665.
- 5) Kumagai T, Nakayama T, Okuno Y, Kase T, Nishimura N, Ozaki T, Miyata A, Suzuki E, Okafuji T, Okafuji T, Ochiai H, Nagata N, Tsutsumi H, Okamoto M, Sakoda Y, Kida H, Ihara T. Human immune response to influenza A(H1N1) pdm2009 in patients with natural infection and in vaccine recipients in the 2009 pandemic. *Viral Immunology* 2014; 27:368-374.
- 6) Jin L, Örvell C, Myers R, Rota PA, Nakayama T, Forcic D, Hiebert J, Brown KE. Genetic diversity of mumps virus and global distribution of the 12 genotypes. *Rev Med Virol* 2014; DOI:10.1002/rmv.1819

#### 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