

ヘルペスウイルス感染予防のための サブユニットワクチンの開発と接種法の検討

山梨県立衛生公害研究所
吉野 亀三郎

研究目的

過去に於けるわれわれのこの方面の研究結果を総合して言える事は次のように要約しうる。すなわち、妊娠中にヘルペスウイルスのⅠ型(HSV—1)またはⅡ型(HSV—2)の初感染を受けた場合も、また回帰性ヘルペスの再発を見た場合も、胎児に対する影響は極めて稀な例外を除いては余り問題になるようなものは無いから、それだけでは人工中絶の指示にはならない。ただし、妊娠末期に妊婦が陰部ヘルペス症になった場合には十分な検査を経て、帝王切開を指示するか否かを決定すべきである。その検査の中とくに重要なのは母体に血中中和抗体が有るか否かを見ることと、陰部局部にウイルス排泄が有るか否かを検査する事であり、HSV—1に対する充分高い抗体が有れば新生児の致死感染は予防できるという見地から、中和抗体測定とウイルス分離同定の迅速で高感度の術式を開発した。しかし、もっと完全でしかも稀有と見られる胎児への影響も防ぎうる道はワクチンによって、とくにIgG中和抗体を母体に産生せしめる事である。従来はこのウイルスの発癌性を恐れて、不活化ワクチンも生ワクチンも実用に供されていない。タンパクを単離してサブユニットワクチンを製する試みのすべては、動物実験でも高レベルの抗体産出を見ていないのが世界の現状である。

われわれはサブユニットワクチンを製して、それをモルモットの皮内に繰返し接種する事によりアジュバント無しでも高いレベルのIgG中和抗体が出来る事を認め、将来臨床的応用への道を開くことが出来た。

材料と方法

免疫実験にはモルモットを使用した。体重は約400gのものを用いた。サブユニットワクチンはCappelの法によって製した。HSV—1のHF株感染Vero細胞から得たウイルス液を15000rpm 60分遠心し、その沈渣をTSM緩衝液(0.01M Tris pH7.4, 0.15M NaCl, 0.01M MgCl₂)に再浮遊し2℃にて、30~70%

蔗糖濃度勾配加 Earle 液中で Beckman SW27 ローターで遠心し、中央のウイルスバンドを取り、この操作をもう一回行ない最後に1%NP40を含むTSM緩衝液に浮遊し37℃1時間放置した。次に蔗糖の65%1ml, 50%4ml, 25%4mlを含むTSM緩衝液の不連続勾配中で Beckman SW41 ローターを用い35000rpm 2時間半、15℃で遠心し、25%層の上部をとり10mM Tris 緩衝液 pH7.4で5℃で透析した。タンパク量は Bradford の法で測定した。この液は1%PVP食塩水処理ミリポア膜で除菌した。その抗原価は川名らのウエル内吸収法で計った。

すなわち、細胞培養維持液(MM:2%非働コウシ血清加イーグルMEM培地)でウサギ免疫血清を階段稀釈したもの1滴(0.025ml)と、同じくMMで稀釈した上のタンパク液の諸稀釈2滴をプラスチックトレイ(96穴平底)で混ぜ37℃3日後1000 TCDのインディケーターウイルスとVero細胞浮遊液(5×10⁵/ml)を1時間間隔で与え4日CO₂フラン器培養後染色し、対照(タンパク液の代りにMMを用いた列)の中和値が1/8に下るタンパク量をAAUとして表わした(antibody—absorbing unit)。上タンパク液の2つのロットは何れも20μg/mlで8AAUの値を示した。

免疫モルモットの血中中和抗体価の測定も多田らのマイクロトレイ法により、補体は1溶血単位/0.1mlのモルモット血清を用いた。

動物免疫のスケジュールは表1に示す通りで、そのうち第1回実験で1~4群、第2回に5~7群、第3回に8~11群を行なった。生ウイルス(live)、紫外線不活化ウイルス(UV)、サブユニットワクチン(Subunit)を比べ、示されたAAUにMMで稀釈し、腹腔内(ip)、両後肢足蹠内(ip)または脊部皮内(id)、4ヶ所にそれぞれ1回量0.5, 0.05×2, 0.1×4mlずつ、5週間隔で2回接種した。ただし、サブユニット皮内群中9群では初め1週間隔で2回次に5週後に1回、10群では初めから毎週接種した。足蹠群中8群ではフロイント完全アジュバントを等量混合したので実際の注射量は表示の倍増

である。すべての群は最終免疫から7日後に採血した。血清は56℃30分加熱して中和値を検査した。

結 果

表1に示すごとく、腹腔内でも足蹠接種でも、生ウイルスに次ぎUV不活化ウイルス、次にサブユニットワクチンの順に免疫力は次第に落ち、とくにサブユニットワクチンでは極めて抗体産生がわるく、アジュバントを加えて足蹠に入れてもほとんど中和抗体の産生は見られなかった。ところがアジュバント無しで皮内に入れた場合はサブユニットワクチンでも非常に免疫力が増大し、同じ8AAUの生ウイルスを腹腔に2回接種したのとはほぼ同等の抗体産生が6回接種群で見られた。

皮内接種群で得られた中和抗体は補体の効果から見てIgGである事は明瞭で、足蹠に生ウイルスを入れて得られた中和抗体が補体の効果から見てIgM的と判定されると全く対比的である。

考 察

従来このウイルスのみならず一般にウイルスのタンパクのサブユニットワクチンは完全粒子ワクチンより免疫力が劣ると考えられており、この点を補うために精製タンパクを重合させたりリポゾームにしたりしてその抗原力を上げる工夫も行なわれている。しかるに今回の実験ではHSV-1のエンベロープタンパクが皮内接種という形式で与えられたとき、著しい免疫効果を示す事が判り、しかも得られる抗体がIgGである事は始めに掲げた目的に合致するものであるので、この点は直ちに将来ヒトに対する応用につながるものと期待しうる。

文 献

1. Yeager, A. S. et al. : *Infect. Immun.* 29 : 532, 1980.
2. 吉野 亀三郎 : 昭56妊婦管理班研究報告 : 219, 1982.
3. Hagashi, Y. et al. : *Microbiol. Immunol.* 26 : 541, 1982.
4. Duff, R. et al. : *Nature* 223 : 48, 1971.
5. Duff, R. et al. : *J. Virol.* 12 : 209, 1973.
6. Cappel, R. : *Arch. Virol.* 52 : 29, 1976.
7. Cappel, R. et al. : *Arch. Virol.* 65 : 15, 1980.
8. Kitces, E. et al. : *Infect. Immun.* 16 : 955, 1977.
9. Kutinova, L. et al. : *Acta Virol.* 24 : 391, 1980.
10. Skinner, G. R. B. et al. : *Med. Microbiol. Immunol.* 166 : 119, 1978.
11. Zaia, J. A. et al. : *J. Inf. Dis.* 132 : 660, 1975.
12. Klein, R. J. et al. : *Arch. Virol.* 68 : 73, 1981.
13. Yanagi, K. : *J. Virol.* 38 : 737, 1981.
14. Bradford, M. M. : *Anal. Biochem.* 72 : 248, 1976.
15. Yoshino, K. et al. : *Arch. Ges. Virusforsch.* 35 : 399, 1971.
16. Kawana, T. et al. : *Microbiol. Immunol.* 24 : 1163, 1980.
17. Tada, A. et al. : *Microbiol. Immunol.* 22, 415, 1978.
18. Balcarova, J. et al. : *J. Gen. Virol.* 53 : 85, 1981.
19. Yoshino, K. et al. : *Microbiol. Immunol.* 26 : 753, 1982.

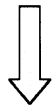
Group	Antigen	AAU of antigen	Route ^{a)}	Adjuvant	Dose ^{b)}	Neutralizing antibody in individual animals ^{c)}		
1	Live	32	i.p.	—	2 × 0.5 ml	40/160, 40/320, 40/80,	40/160, 40/320, 40/80	80/640, 20/320,
2	Live	8	i.p.	—	2 × 0.5 ml	20/80, 0/20,	40/160, 10/320	10/20,
3	UV	8	i.p.	—	2 × 0.5 ml	0/0, 10/40,	0/10, 20/80	0/20,
4	Subunit	8	i.p.	—	2 × 0.5 ml	0/0,	0/0,	0/0
5	Live	8	f.p.	—	2 × 0.1 ml	40/> 320, 40/> 320,	20/> 320, 80/> 320	40/> 320,
6	UV	8	f.p.	—	2 × 0.1 ml	0/0, 20/80,	0/40, 40/80,	10/80, 40/160
7	Subunit	8	f.p.	—	2 × 0.1 ml	0/0,	0/0,	0/0
8	Subunit	8	f.p.	+	2 × 0.1 ml ^{d)}	0/0, 0/0,	0/0, 0/0,	0/0, 0/0
9	Subunit	8	i.d.	—	6 × 0.4 ml	20/80, 80/40,	10/40, 80/40,	20/40, 160/160
10	Subunit	8	i.d.	—	3 × 0.4 ml	0/0, 20/20,	0/0, 20/20,	10/20, 40/20
11	Subunit	8	i.d.	—	2 × 0.4 ml	0/0, 0/10,	0/0, 0/10,	0/0, 0/40

^{a)} i.p.: intraperitoneal, f.p.: foot-pad, i.d.: intradermal.

^{b)} The first and last injections were 5 weeks apart. See the text for details.

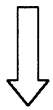
^{c)} Reciprocal of end point dilution without complement/that with complement. 0 means less than 10.

^{d)} The actual dose given was double this amount (total dose inoculated into both hind foot-pads) because the vaccine had been diluted 1:1 with adjuvant.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



研究目的

過去に於けるわれわれのこの方面の研究結果を総合して言える事は次のように要約しよう。すなわち、妊娠中にヘルペスウイルスの 型(HSV-1)または 型(HSV-2)の初感染を受けた場合も、また回帰性ヘルペスの再発を見た場合も、胎児に対する影響は極めて稀な例外を除いては余り問題になるようなものは無いから、それだけでは人工中絶の指示にはならない。ただし、妊娠末期に妊婦が陰部ヘルペス症になった場合には十分な検査を経て、帝王切開を指示するか否かを決定すべきである。その検査の中とくに重要なのは母体に血中中和抗体が有るか否かを見ることと、陰部局部にウイルス排泄が有るか否かを検査する事であり、HSV-1 に対する充分高い抗体が有れば新生児の致死'的感染は予防できるという見地から、中和抗体測定とウイルス分離同定の迅速で同感度の術式を開発した。しかし、もっと完全でしかも稀有と見られる胎児への影響も防ぎうる道はワクチンによって、とくに IgG 中和抗体を母体に産生せしめる事である。従来はこのウイルスの発癌性を恐れて、不活化ワクチンも生ワクチンも実用に供されていない。タンパクを単離してサブユニットワクチンを製する試みのすべては、動物実験でも高レベルの抗体産出を見ていないのが世界の現状である。

われわれはサブユニットワクチンを製して、それをモルモットの皮内に繰返し接種する事によりアジュバント無しでも高いレベルの IgG 中和抗体が出来る事を認め、将来臨床的応用への道を開くことが出来た。