

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461607

研究課題名(和文) ワクチンの同時接種・筋注の安全性評価

研究課題名(英文) Vaccine safety on intramuscular injection and simultaneous administration

研究代表者

中山 哲夫 (NAKAYAMA, TETSUO)

北里大学・感染制御科学府・教授

研究者番号：60129567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：現在、わが国で使用されているワクチンをマウスに筋注し安全性を評価した。現行ワクチン製剤はかつての筋拘縮症のような筋組織の壊死、癒痕化を起こすことはなく安全に使用できることが明らかとなった。接種部には炎症性肉芽腫が認められ接種3時間後から接種部位に炎症性サイトカイン(IL-6, IL-1, TNF- α)やIL-4, G-CSFが産生され7日後には検出できなくなる。接種部位には好中球が遊走し炎症反応を惹起し獲得免疫を誘導する。ワクチン接種後の副反応として発熱を認めた児ではG-CSFが高値を示し、ワクチン接種後の免疫応答に炎症反応が重要な役割を担っていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：All current vaccines were investigated in mouse model. Inflammatory nodules spread into muscle bundle space without the degeneration and atrophic changes of muscle cells, which were observed in muscle contracture. Cytokine profiles were examined in muscle tissues after immunization. IL-1, IL-6, TNF- α , IL-4, and G-CSF levels increased 3 h after vaccination with Alum-adjuvanted vaccines at the injection sites, and decreased 7 days and afterwards. No significant difference in inflammatory cytokines was observed between the febrile and non-febrile groups, but higher than in normal subjects. The mean G-CSF level was higher in the febrile group than in non-febrile group. Inflammatory responses are shown to modulate adaptive immune responses and associate with local reactions as adverse reactions.

研究分野：小児科学

キーワード：筋注 自然免疫 獲得免疫 炎症性サイトカイン アジュバント 炎症反応

1. 研究開始当初の背景

(1) 昭和 30 年代に抗菌剤、解熱剤を筋注し大腿四頭筋拘縮症が問題となった。これらの薬剤は pH、浸透圧、溶血性等が生理的許容範囲を大きく逸脱した製品が多かった。ワクチン接種による拘縮症の報告は認めないものの、大腿四頭筋拘縮症及び類似疾患の発症は注射によることが多いと考えられるので注射を必要とする場合には十分な配慮を行うことと日本整形外科学会からの要望書が昭和 50 年 4 月に提出された。これを受けて翌年、日本小児科学会筋拘縮症委員会から以下の提言が出された^{1, 2)}。筋注に安全な部位はない。安全な年齢はない。筋注の適応は通常において極めて少ない。この提言以降、筋注という医療行為は封印された。一方、諸外国ではわが国からの報告を受けていち早く抗菌剤と解熱剤の筋注はやめるようになり 1960 年代後半以降欧米からの報告例はない。家兎の病理組織所見は小児の筋拘縮症の所見と一致し炎症細胞の浸潤、筋細胞の破壊、壊死、線維性瘢痕化が認められることから筋注製剤は動物実験でその評価をするべきであると提言している³⁾。

(2) 2011 年 3 月に同時接種後の死亡例が報告され問題となったが、諸外国での重篤な副反応の出現頻度を超えるものではなく乳幼児突然死症候群と考えられ因果関係はないと判断された⁴⁾。接種するワクチンの種類が増加し同時接種が余儀なくされている。

2. 研究の目的

(1) 2008 年以降インフルエンザ桿菌ワクチン (Hib)、肺炎球菌ワクチン (PCV)、ヒトパピローウイルスワクチン (HPV) が認可され、暫定的に定期接種に組み込まれて接種されるようになった。HPV ワクチン以外は皮下接種が原則となっている。しかし、外国ではアジュバントを含有したワクチンは筋注が原則である^{5, 6)}。現在使用されているワクチン製剤の安全性を評価するためにマウスに接種しその病理組織像を検討し筋注が筋拘縮症の病態を起こさず、皮下接種と同等の安全性を有する事を科学的根拠に基づいて提示することを目的とした。

(2) 欧米では同時接種、筋注が普通に行われているが、その科学的根拠は乏しく、ワクチン接種後にどのような現象が起きているのか、筋注だけの

問題ではなく以下のサイトカイン動態、接種後の組織を検討した。

- ①同時刺激のサイトカイン誘導能を検討し安全性の高い組み合わせを検討する。
- ②ワクチン接種後に発熱を認めた例と発熱を認めなかった小児でのサイトカインの比較をおこなう。
- ③ワクチン接種による免疫誘導のメカニズム、ワクチンの安全性の指標となるバイオマーカーをさぐる。

ワクチンは特異的な免疫応答を誘導することを目的とする。そのためには自然免疫系に刺激を入れることでサイトカインを誘導することが必須である。I 型 IFN は MHC I と共に認識される co-stimulatory molecule の発現を増強し CD8+細胞に認識され CTL 活性を誘導する。炎症性サイトカインは MHC II とともに認識される co-stimulatory molecule の発現を増強し CD4+T リンパ球に抗原が認識され Th1, Th2 応答へと分化誘導して獲得免疫を調節する^{7, 8)}。

ワクチンの筋注の安全性の評価だけでなく、ワクチン接種後局所でどのような自然免疫応答が起きているかを検討することでワクチンの主反応としての免疫応答と副反応を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 筋注と皮下注の病理所見の検討

勸奨接種のワクチンとなっている DPT、Hib、PCV7、日本脳炎ワクチン、HPV サーバリックス、ガーダシルをもちいた。各群 3-4 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 1 カ月後の組織を採取した。筋注と皮下接種の長期観察は DPT を 1 カ月ごとに 3 回接種し 3, 6, 9, 12 カ月後の組織を採取しホルマリン固定しパラフィン包埋した。包埋組織切片を HE 染色とアルミ染色を行った。さらに、iNOS, arginase 染色を行った。(実験プロトコールは北里生命科学研究所 動物実験員会で認可された)

(2) リンパ球のサイトカイン産生能

2 カ月から 7 歳までの 29 例の乳幼児からへパリン採血し末梢リンパ球を採取し $10^6/ml$ に調整し 0.5ml を RPMI 1640 medium で培養しワクチン製剤 $50 \mu l$ で刺激した。24 時間後に培養上清を採取し

BioPlex ヒトサイトカイン 17plex でサイトカインを測定した。(東京医科大学倫理委員会で承認された)

(3) ワクチン接種後発熱児のサイトカイン

同時接種、もしくは単独接種後 37.5°C以上の発熱を認めた 61 例の乳幼児からワクチン接種 24-48 時間以内に血清を採取した。コントロールとして同時接種、単味ワクチン接種後発熱を認めなかった乳幼児 18 例から同じく 24-48 時間以内に血清を採取した。血清中のサイトカインは BioPlex ヒトサイトカイン 17plex を用いて測定した。ワクチン接種前の正常乳児の血清を 10 例から採取した。(北里研究所病院 倫理委員会で承認された)

(4) 筋注組織のサイトカイン産生能

HPV, DPT/IPV ワクチン接種前, 3, 6, 24, 48 時間後, 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。筋肉組織をホルマリン固定し HE 染色とアルミ染色を行った。

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。

(5) 免疫組織染色

ワクチン接種後の組織をホルマリン固定し、パラフィン包埋後切片を固定し抗原を表出後 F4/80 (mouse F4/80, AbD Serotec, USA), Hoechst33342 (Sigma Aldrich) 染色で組織 DNA を、Ly-6G (Santa Cruz Biotechnology) で好中球を染色した。炎症反応タンパクの検出は iNOS 抗体 (Becton Dickinson), arginase I 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いた。

4. 研究成果

(1) 現行ワクチンの筋肉内接種の安全性

小児に使用されているワクチンをマウス 3-4 匹の大腿外側に筋肉内接種し 1 か月後の組織の HE 染色の結果を **図 1** に示した。

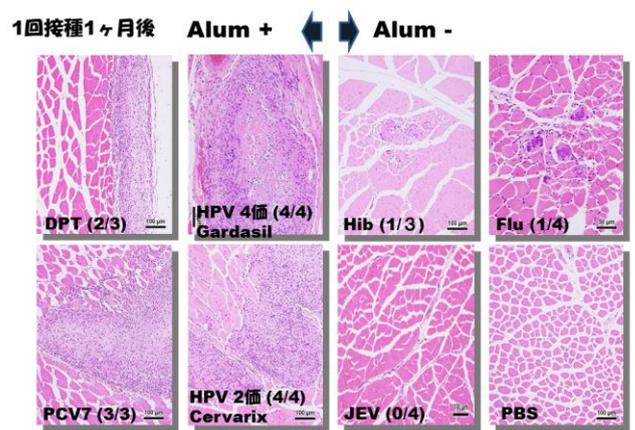


図 1. 現行ワクチン筋注 1 か月後の組織像

① Hib, 日本脳炎 (JEV)、インフルエンザ (Flu) のアルミを含んでいないワクチンでは何も所見がないか針をさす事に起因する炎症を認める。Hib 接種後の 3 匹中 1 匹において、インフルエンザワクチン接種後 4 匹中 1 匹に限局的な炎症性細胞の浸潤が認められた。

② アルミを含んだワクチン (DPT, PCV, HPV) 接種後ではアルミを貪食したマクロファージによる異物性肉芽腫を形成する。中心部はやや灰白色を帯びた不定形無構造の壊死組織で、周囲には好中球、マクロファージ、リンパ球および形質細胞が浸潤した炎症性肉芽腫が観察された。

現行のワクチン製剤の筋注ではかつての筋拘縮症に観察された筋肉組織の広範な変性壊死は認めなかった⁹⁾。

(2) 現行ワクチンの皮下接種と筋注の比較

DPT を 3 回皮下接種、筋注後の長期間の組織所見を **図 2** に示した。

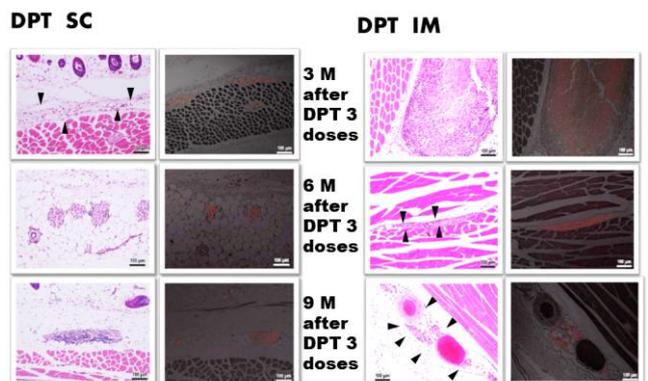


図 2. DPT 皮下接種と筋注の比較

筋注 3 ヶ月後も肉芽腫は大きく残っているが、6 か月後から縮小し 9 ヶ月後はさらに縮小している。筋注後の組織像を皮下接種後と比較すると筋注 3 ヶ月後の肉芽腫は皮下接種より大きいですが 6 か月、9

カ月時では皮下接種後と同様の大きさで結節性肉芽腫にはアルミが残存している。

1年後の皮下接種、筋注の組織を比較すると、皮下接種1年後では3匹中2匹、筋注では3匹中1匹に結節性肉芽腫が残っており、筋注の方が早く吸収されることが明らかとなった⁹⁾。

(3) 接種局所の炎症反応

炎症細胞が浸潤した肉芽腫が形成されることは明らかとなった。接種局所の炎症反応の有無を検討した。DPT、ガーダシル、サーバリックス接種1カ月後の筋組織のHE染色、iNOS、arginase染色の結果を図3に示した。



図3. DPT、ガーダシル、サーバリックス接種1カ月の組織の炎症反応

炎症性肉芽腫の周辺部にはF4/80で染まるマクロファージであることが明らかとなった。iNOSはLPSもしくはIFN- γ により誘導され、アルギニンを経質としてNOを産生する反応を触媒する。arginaseはアルギニンを分解する酵素でDPT、ガーダシル接種後ではiNOS、arginaseが検出された。サーバリックス接種後ではiNOSは陰性でarginaseがdiffuseに検出された。炎症反応が認められる。DPT3回皮下接種、筋注し半年、1年後の組織ではiNOS、arginaseは検出されなかったことから結節は残っているが炎症反応は消失していることが明らかとなった⁹⁾。

(4) ワクチン同時刺激によるリンパ球のサイトカイン産生能

2か月から7歳までの29名の健康小児を対象に末梢リンパ球を採取し、乳児期に同時接種の対象となるDPT、Hib、PCV7の単味、2種、3種を同時刺激し24時間後の培養上清を採取しサイトカインプロファイルを検討した¹⁰⁾。17種類のサイトカ

インの中で単独接種、二種、三種の刺激でIL-1 β 、IL-6、G-CSF、TNF- α の炎症性サイトカインで結果を図4に示した。

IL-1 β はDPT、Hib、PCV7のうちでPCV7での刺激では高値の産生量を示しDPT/Hibの二種の刺激はPCV7単独と同量のIL-1 β の産生がみられ、PCV7を含む複数の刺激で産生量は増加した。Hibの刺激で高値のIL-6の産生が認められるが複数の刺激による産生の増強は認められなかった。G-CSF、TNF- α はPCVを含んだ複数のワクチン刺激で産生の増加が認められた¹⁰⁾。

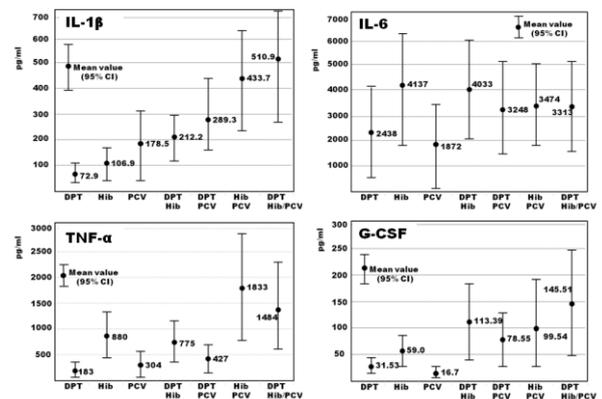


図4. DPT、Hib、PCVワクチンの単味、二種、三種同時刺激によるサイトカイン産生能

乳幼児期には獲得免疫が確立できていないため、感染防御能として自然免疫系の機能が優位に働く。2か月から7歳2か月までの乳幼児のIL-1 β の産生能はDPT、Hib、PCVの単味・複数同時刺激では乳児で高い傾向が認められた。

(5) ワクチン接種後の発熱例の血清中のサイトカイン

リンパ球をワクチン製剤で刺激するとIL-1 β 、IL-6、G-CSF、TNF- α の炎症性サイトカインの産生が認められた。炎症性サイトカインは発熱と関連しワクチン接種後の副反応とも関連すると考えられ、特にIL-1 β 、IL-6は発熱因子と考えられている。ワクチン接種後24時間以内に発熱を認め48時間以内に得られた血清と、ワクチン接種後48時間以内に発熱を認めなかった例の血清サイトカインを検討した。発熱例61例から血清が得られワクチン接種の組み合わせは細菌性不活化ワクチンの中ではPCV単独もしくはPCV7を含んだ同時接種であった。

ワクチン接種後の発熱例においては炎症性サイ

トカインが高値を示す事が予想されワクチン接種前の正常児 10 例を含めた各サイトカインの平均値を表 1 に示した¹⁰⁾。

表 1. ワクチン接種後発熱例と非発熱児の血清サイトカイン値の比較

	Cytokine profile 発熱+			Cytokine profile 発熱-			正常 (n=10)
	≥3 本 (n=30)	2 本 (n=12)	1 本 (n=19)	≥3 本 (n=5)	2 本 (n=7)	1 本 (n=6)	
IL-1β	0.68	0.78	0.83	1.12	0.52	1.53	0.12
IL-4	0.41	0.29	0.35	1.32	0.22	0.43	0.21
IL-6	29.44	12.53	23.72	13.43	21.79	36.60	2.55
IL-10	7.34	3.6	7.85	5.96	3.54	7.49	1.58
IL-12	12.93	6.4	7.87	10.5	7.1	15.29	0.43
G-CSF	87.24	37.41	39.88	7.44	13.32	5.59	1.18
IFN-γ	49.95	42.95	33.26	61.63	19.7	28.18	5.24
MIP-1β	66.81	59.97	72.51	113.06	91.7	111.73	48.99
TNF-α	13.43	4.86	11.3	4.68	11.75	36.36	1.35
PGE2	148.62	114.36	219.3	329.5	170.5	381.13	N.T.

発熱例では G-CSF が高値を示す。

ワクチン接種後に発熱を認めなかった例はワクチン接種前の正常児の血清と比較してすべての炎症性サイトカインは高値を示し、発熱児の血清中の炎症性サイトカインは発熱を認めなかった児の血清と比較して有意差は認めず、発熱児では G-CSF が高値を示し、3 本の同時接種で最も高いサイトカイン値を示した¹⁰⁾。

(6) 各ワクチン接種後局所のサイトカイン

サーバリックス、ガーダシル接種 3, 6, 24 時間後, 5, 7 日後, 2, 4 週後に筋組織を採取し更に 4 週後に再接種し 2, 5, 7 日まで検討した。サーバリックス接種 48 時間後に IL-β, IL-6, G-CSF は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。IL-4 は検出されなかった。

ガーダシル接種後では 5-7 日後に IL-4, MCP-1, TNF-α の産生が認められ再接種後においても同様のサイトカイン応答を示した。

DPT, PCV13, Hib 接種についても検討しワクチンの種類によって異なるが接種 1 週以内に IL-1β, IL-4, IL-6, G-CSF が検出され 1 週以降にはベースラインに戻り再接種後でも初回接種後と同様の応答を示した。

(7) ワクチン接種後早期組織所見

6 時間後の炎症性肉芽腫を形成する細胞を拡大すると多核白血球が主体で好酸球の浸潤も認められた。48 時間後の所属リンパ節にはアルミを貪食した細胞は極めて少数であった⁹⁾。

炎症性肉芽腫の形成初期は形態的には好中球で Ly-6G 陽性であった。組織切片を Hoechst 33342 で染め拡大した組織像を図 5 に示した。

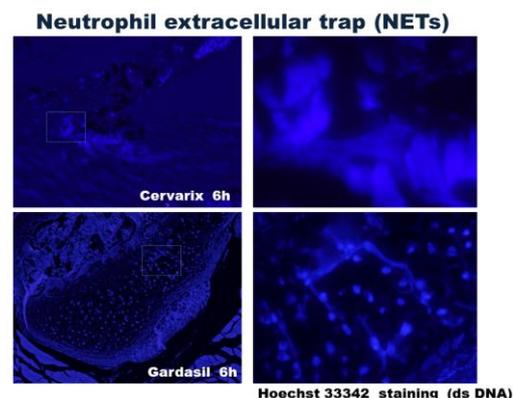


図 5. サーバリックス、ガーダシル接種後の Hoechst 染色

Hoechst 染色は DNA を染めるものである。サーバリックス、ガーダシル接種後好中球が炎症性肉芽腫を形成しており細胞 DNA を染めると円形に染まるが一部不定形の DNA が放出されたような所見が認められ好中球が自己融解し自己の DNA を放出し neutrophil extracellular trap (NETs) を形成している所見である¹¹⁾。

DPT の皮下接種と筋注の組織像の比較試験の結果、肉芽腫は皮下接種でも筋注でも同様に形成されておりワクチン接種の安全性に関して差はないことが明らかとなった¹⁰⁾。また、現行のワクチン製剤によってかつて筋拘縮症に観察された筋肉組織の広範な変性壊死は認めないことから筋注という接種行為は正当に評価されるべきと考える。ワクチン抗原、使用するアジュバントにより自然免疫系に刺激が入りワクチンの種類によりサイトカインプロファイルに差が認められる。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 が放出され自然免疫系に刺激を入れ inflammasome を活性化し炎症性サイトカインを産生する。IL-4 が CD4 helper 機能を介して免疫細胞を分化誘導することで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。こうした一連の炎症反応がワクチンの獲得免疫の誘導には必須である。

<引用文献>

- ① 日本小児科学会筋拘縮症委員会. 筋拘縮症に関する報告書. 日児誌, 1983, 87:1067-1105
- ② 宮田雄祐, 他. 薬剤の種類と頻回注射の意義. 注射による筋短縮症 注射による筋短縮症全国自主検診医師団 三一書房 1996, pp177-213
- ③ 注射による筋短縮症全国自主検診医師団 学術調査委員会. 注射による筋短縮症 1996
- ④ 厚生労働省. ヒブワクチンを含むワクチン同時接種後の死亡報告について
www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r98520000014ac1.html
- ⑤ CDC. General recommendations on immunization - Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR 2011, 260, 1-60
- ⑥ WHO. Immunisation in Practice. A practical resource guide for healthcare workers. Geneva, World Health Organisation 2004.
- ⑦ Siegrist CA. Vaccine immunology. Vaccines 6th edition, Elsevier Saunders, Philadelphia, 2013, pp14-32
- ⑧ Philbin VJ, et al. Developmental biology of the innate immune response: implications for neonatal and infant vaccine development. Pediatr Res 65, 2009, 98R-105R
- ⑨ Kashiwagi Y, et al. Inflammatory responses following intramuscular and subcutaneous immunization with aluminum-adjuvanted or non-adjuvanted vaccines. Vaccine 32, 2014, 3393-3401
- ⑩ Kashiwagi Y, et al. Production of inflammatory cytokines in response to diphtheria-pertussis-tetanus (DPT), haemophilus influenzae type b (Hib), and 7-valent pneumococcal (PCV7) vaccines. Human Vac & Immunother 10, 2014, 677-685
- ⑪ Munks MW, et al. Aluminum adjuvants elicit fibrin-dependent extracellular traps in vivo. Blood 116, 2010, 5191-5199

5. 主な発表論文等 (計 2 件)

- 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.

学会発表 (計 5 件)

- ① 中山哲夫: シンポジウム ワクチンにより免疫はいかに構築されるか 第 19 回日本ワクチン学会 11 月 14-15 日 (2015) 「名鉄犬山ホテル (愛知県犬山市)」
- ② 中山哲夫: シンポジウム ワクチンギャップの解消 過去の歴史に学ぶこれからのワクチン開発 第 47 回日本小児感染症学会 10 月 31-11 月 1 日 (2015) 「福島ビューホテル (福島県福島市)」
- ③ 中山哲夫: ヒトパピローマウイルス (HPV) ワクチン接種後の自然免疫応答-マウスモデル- 第 18 回日本ワクチン学会 12 月 6-7 日 (2014) 「福岡国際会議場 (福岡県福岡市)」
- ④ 中山哲夫: ワクチン接種直後から局所で何が起っているのか? 第 17 回日本ワクチン学会 11 月 30-12 月 1 日 (2013) 「三重県総合文化センター (三重県津市)」
- ⑤ 小口 薫, 中山哲夫, 他: ワクチン接種後発熱した症例におけるサイトカイン値の測定 第 45 回日本小児感染症学会 10 月 26-27 日 (2013) 「ロイトン札幌 (北海道札幌)」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山哲夫 (NAKAYAMA Tetsuo)
北里大学・感染制御科学府・教授
研究者番号: 6 0 1 2 9 5 6 7

(2) 研究分担者

柏木保代 (KASHIWAGI Yasuyo)
東京医科大学 医学部・准教授
研究者番号: 0 0 2 8 7 1 2 9