インフルエンザの母児免疫に関する研究

徐 慶 一 郎* 街 風 喜 雄**

STUDIES ON THE MATERO-FOETAL IMMUNIZATION AGAINST INFLUENZA

KEIICHIRO JO and YOSHIO TSUMUJI

(受稿 8 月 27 日, 1962)

まえがき

妊娠中の母親にワクチンを接種し、本人のみならず、新生児にも積極的に免疫を与えようとする母児免疫の試みは、わが国においては、真柄ら一門¹⁷⁻¹⁹⁾により早くからとりあげられた。その結果デフテリア、破傷風、ガス壊疽、ブドウ球菌の感染防止に、母親に対するこれらのトキソイド免疫が有効であることが認められた。その際母体において産生された免疫抗体は出産時新生児によく移行し、臍帯血中の抗体価は、概ね母体血のそれに等しいか、時により高いことが認められた。妊娠中母親が自然感染その他により既に高い抗体を有している時に新生児は出産時母親より受働的な免疫をえて感染を免かれるが、これを全く欠如する際新生児は出生直後から、疾患感染の危険にさらされる。百日咳や破傷風などにおいて、今日も母子免疫が重要視されているのは、自然の状態で母体血中の抗体価が少量ないし、欠如し新生児が母親より受働性免疫を獲得しにくい点にあると考えられる。

一方ウイルス性疾患においては、多くの場合母親が自然感染（多くの場合不顕性感染）による抗体を有しており、特にワクチン注射による母子免疫の必要を認めないことが多い。しかし、一昨年、熊本県人吉市においてみられたごとく、インフルエンザの流行に際して、一旦新生児が罹患すると、非常に重症で、時に致死的でさえある（木葉ら¹⁰⁾）。本例においては、昭和35年1月9日から29日の間に、出生直後の新生児16名中11名が罹患、その5名が死亡している。この他、近代設備を有する

大病院の新生児室においてウイルス性肺炎の流行が一度おこると、多数の犠牲者が生ずる危険のあることは、過去において多数経験されている。かかる際、妊娠中の母体を予め、積極的に免疫し、新生児に受働的な免疫を与えておけば、その災害から免かれうる可能性は十分に期待される処で、今回の実験も、そのような出生直後の新生児に対する感染防止を第一の目的として試みられたものである。

本実験を通じて、1) ワクチン接種による母体の免疫抗体産生

2) 母体免疫抗体の新生児への移行

a) 抗体の種類による移行の難易

b) 移行経路ないし移行機転（子宮内における移行の経路、母乳を通じての移行の可能性の有無）

などの諸問題を究明しようとした。

インフルエンザ抗体としては、測定容易で性状の明から補体結合抗体ならびに血球凝集抑制抗体の両者を選び、ウイルス免疫学的な検討を行なった。

本報においては、1960年、1961年初頭に行なつた実験に関してえられた成績を報告する。

実験材料ならびに実験方法

I. 免疫方法

1) 使用ワクチン a) A₁(大町1/53株) A₂(足立2/57株) B(世田谷3/56株) 3型混合普通ワクチンで、国家検定に合格し、市販されているもの(力価各型100 CCA/ml), b) A₂(足立株), B(Lee株) 2型混合アジュバント加ワクチン(千葉血清研究所製インフルエンザ研発斑用)で力価各型200 CCA/mlのもの。

2) ワクチン接種対象

関東通信病院で需診中で妊娠8~9カ月の妊婦 1960年26名、1961年35名につきワクチン接種が行なわれ

* 関東通信病院臨床検査科

** 関東通信病院産婦人科

Microbiological Laboratory, and Department of Obstetrics & Gynecology., Kanto-Teishin Hospital, Tokyo

た。

3) ワクチン接種方法

a) 3型混合ワクチンを皮内0.1 ml づつ1～3回, 2週間隔で接種(1960年)

b) 3型混合ワクチンを初回1.0 ml 皮下注射後2週間隔で0.1 ml づつ, 1～2回皮内追加注射(1961年)

c) アジュバント加ワクチンを0.5 ml 皮下1回注射(1961年)

II. 検体採取と保存

血液ならびに初乳の採取, 保存。

ワクチン接種直前に母体血, 分娩時に母体血ならびに臍帯血, 分娩後成るべき早期の母乳(初乳もしくはこれに準ずるもの)を採取し, 血液より血清を分離し, 母乳はそのまま, -20°C の冷凍器内に使用時まで保存した。

III. 検体の処理方法

1) 血清の処理: 補体結合(以下 CF)反応の際には, 56°C , 30分加温, 非働化後使用, 血球凝集抑制(以下 HI)試験には, 3倍量コレラ菌(558株)培養口液(力価測定その2単位を使用)を加え, 37°C 16時間放置後 56°C 30分非働化して使用。

2) 母乳の処理: 母乳10 ml とクロロホルム5 ml を(もしくはその割合に)スクリュウチューブに入れよく振とう, 次に Difco Rennin 5%液を0.5 ml 加え振とう, 37°C 1時間, 恒温槽に放置後, 3000 r.p.m 15分間遠心する。上層(乳漿), 中層(脂肪層), 下層(クロロホルム層)の三層に分れるので, ピペットで上層を分離する(Stokers ら)²²⁾。次に, コレラ菌558株培養口液で血清と同様に処理 56°C 30分非働化後, HI 試験に使用した。

IV. 反応術式

1) 補体結合反応:

V 抗原: A₂(足立株) B(世田谷株)を10日発育鶏卵, 漿尿腔内接種48時間後の漿尿液を採取供用。

S 抗原: A₂(足立株) B(世田谷株)感染漿尿膜10%磷酸緩衝食水乳剤を10,000 r.p.m 30分遠心, 上清を分離し, 更に低温でニワトリ血球を作用させ, ウイルスと吸着させた後, 低温遠心しその上清を使用。

補体結合反応術式としては, 小試験管を用いた, 総量0.6 ml の小量法(米国陸軍々医学校変法)を使用した。

なお, CF 抗原価の測定は, 患者血清の中でV抗体, Sおよび抗体価の高いものを選び, 各小量宛分注保有し, これを標準血清とみなして, VならびにS抗体との間に boxtitration を行ない, 各抗原の力価を測定その2単位を使用した。

2) 血球凝集抑制試験術式

血球凝集素として, インフルエンザ A₂(足立株)およびB(世田谷株)両株の感染漿尿液を使用, プラスチック板(80穴)を用いた。総量0.8 ml の標準術式により抗体価測定を行なった。

実験成績:

A. 補体結合抗体測定成績

1) ワクチン接種による CF-V ならびに CF-S 抗体価の上昇(図1, 2, 3, 4)

1960年度 CF-V 抗体(26組)CF-S 抗体(24組), 1961

Fig. 1 Flu-CF-V Antibody Titer (1960)

Fig. 2 Flu-CF-S Antibody Titer (1960)

Fig. 3 Flu-CF-V Antibody Titer (1961)

Fig. 4 Flu-CF-S Antibody Titer (1961)

年度 CF-V 抗体(35組) CF-S 抗体(35組)についてワクチン接種前後の動きか、図1, 2, 3, 4に示されている。図中黒丸はA型抗体, 白丸はB型抗体を示し, 丸は1回, 三角は2回, 四角は3回, 2重丸はアジュバント加ワクチン接種を示している。

CF-V 抗体は1960年, 1961年度ともに上昇が認められるが, 1961年度は1960年度に較べ上昇率が著明であり, 特にアジュバント加ワクチン接種者では, その上昇度の著明なことが認められた。

CF-S 抗体は, 両年度ともワクチン接種による上昇が認められず, 特に1961年度においては, A型ないしB型両抗体ともその $\frac{1}{2}$ が陰性(1:4以下)にとどまった。CF-S 抗原は使用ワクチンに含まれていないから, ワクチン接種による抗原の動きはみられないのが当然で本抗体の変動は自然感染によるものと考えられる。

2) 母体血と臍帯血の CF-V および CF-S 各抗体測定値の比較。(図5, 6, 7, 8, 9, 10)

Fig. 5 Flu-CF-V Antibody Titer (1960)

Fig. 6 Flu-CF-S Antibody Titer (1960)

Fig. 7 Flu-CF-V Antibody Titer (1961)

Fig. 8 Flu-CF-S Antibody Titer (1961)

Fig. 9 Flu CF-V Antibody Titer(1961)

Fig. 10 Flu-CF-S Antibody Titer(1961)

1960年, 1961年, ワクチン接種の各25組ならびに35組, 1961年, ワクチン未接種対照の22組の母児血清につき, CF-VならびにCF-S抗体価の測定が行なわれた。その結果, CF-V抗体の場合は, ワクチン接種の有無に関係なく, 両年度ともその値が等しいか, むしろ臍帯血に高めにでた。特に1960年免疫群(図5)と1961年(図6)にその傾向が明かであった。

反之, CF-S抗体に関しては, 母体血と臍帯血の値が等しいか, 母体側に高い傾向が認められた(図6, 8, 10)

B. 血球凝集抑制抗体測定成績

1) ワクチン接種によるHI抗体価の上昇(図11, 12)
1960年, 1961年各26組, 32組のワクチン接種前後の血清につきHI抗体価が測定された。その結果, ワクチン接種により母体血中には, 両年度とも明瞭なHI抗体

Fig. 11 Flu-HI Titer(1960)

Fig. 12 Flu.HI Titer(1961)

価の上昇が認められ、特に1961年度アジュバント加ワクチン接種者群については、その上昇度が著しかった。(図12の2重丸)

2) 母体血と臍帯血のHI価測定値の比較(図13, 14)

1960年, 1961年, 免疫群の各25組ならびに35組および1961年ワクチン未接種対照群の22組の母児血清につき, HI価測定が行なわれた。その結果母体血と臍帯血のHI抗体価は, 免疫の有無に拘わらず, よく相関し両者の値のほぼ等しいことが明かにされた。1960年度に

Fig. 13 Flu-HI Titer(1960)

Fig. 14 Flu-HI Titer(1961)

おいては, その測定値のバラツキが大きく, 母体血にやや高い値が示された。

3) 初乳におけるHI抗体の検出(図16, 17)

1961年免疫群31組, 対照群22組の各母児血清につきHI抗体価測定が行なわれた。その結果, 1961年免疫群の31例中22例にA₂-抗体, 5例にB抗体が検出され, また対照群にも, 19例中9例にA₂抗体, 2例にB抗体が証明された。免疫群と対照群の値を比較すると, 免疫

Fig. 15 Flu-HI Titer(1961)

Fig. 16 Flu-HI Titer(1961)

群において、その陽性率が高く、その値も高かった。しかし、免疫群の母体血の HI 価は、対照群のそれに比し著して高いに拘わらず、免疫群の初乳中の HI 価は、対照群のそれに比し、高くはあるにしても、その差が著明でなく、また、母乳血中と初乳中の HI 価の相関性は明瞭ではなかつた。

考 按

インフルエンザウイルスに対する個体の免疫ないし感

Fig. 17 Flu-HI Titer(1961)

染防禦力の全てが、血中抗体により表示されるものとは断言できないが、過去におけるインフルエンザの流行や多くの実験に示されたように、一定量以上の血中抗体 (HI 抗体では 1:64 以上) が存在されれば、該ウイルスの侵入に際し、感染防禦の成立することが明かにされている (Fukumi²⁷⁾ (Hillman ら²⁸⁾)。

今日の実験において、妊娠 8～9 カ月の母親に現行市販ワクチン (100 CCA/ml 力価のもの) を皮下 1.0 ml 後皮内に 0.1 ml、1～2 回 2 週間隔で注射を行なった場合、あるいはアジュバント加ワクチン (200 CCA/ml 力価) 0.5 ml を皮下一回注射した場合、分娩時に母親血中に感染防禦に充分な抗体 (HI ならびに CF-V) の産生が認められ、特にアジュバント加ワクチン接種者において諸報告 (佐野²⁹⁾) にみられるように免疫抗体産生率が著明であつた。また同時に、臍帯血中にも、これに相応する抗体の存在が証明され、母親と同じ程度に新生児にも充分な免疫力を附與しうることが明かにされた。その際母体血と臍帯血中抗体価を比較してみると、抗体の種類により、両者の等しい場合、前者が後者より高い場合、この反対に、後者が前者より高い場合が認められた。すなわち HI 抗体では、両者に若干差があるにしても概してその価がほぼ等しいが、CF-F 抗体では、どちらかといえば、臍帯血に高く、CF-S 抗体では、母体血に高いことが認められた。

このような現象は、母体にワクチン注射を行なわなかつた対照群においても認められた。

インフルエンザ免疫抗体の母体から新生児への移行に

関しては、古くは Burnet (1938), 平野 (1941⁹⁾), 良田 (1938²⁷⁾) の中和抗体に関する報告があり、良田は、臍帯血と母体血の抗体価を比較し、前者に高かったと述べている。また尾辻 (1952²⁰⁾) は母体血と臍帯血ならびに母乳中の HI 価を測定し、HI 抗体は胎盤を通じて、完全に新生児に移行するが、母乳には移行しないと述べている。

次にひと以外の動物に関しては、Young ら (1950²⁵⁾) は豚インフルエンザ抗体が母親豚から初乳を通じて新生仔に移行することを述べている。北岡ら (1956¹²⁾) はインフルエンザ A₁ (FMI) の HI 抗体は母親ラッテから新生仔へ、胎盤を介して移行するが、その抗体価は母ラッテの 1/4 程度であると述べている。しかし、ラッテの場合は、発疹チフス発疹熱 CF 抗体徐 (1953¹¹⁾)、日本脳炎中和抗体石黒 (1959¹⁰⁾) の実験に示されたごとく、生後、母乳を通じての移行が、胎盤移行より以上に重要視されねばならないであろう。

以上インフルエンザ抗体についても他の多くの抗体で示されたように動物の種類により移行の経路が異っており、ひとの場合は、胎盤通過ないし子宮内での移行が主な経路であり、初乳を介しての移行は現在まで否定的であった。

今回の実験において、母乳乳漿中に見出された血球凝集抑制物質は、RDE 処理で消失しないところから、一応 non specific Inhibitor とは考えられないが、抗体としての特異性状については、更に検討の要がある。また、乳漿中の本抗体の消長ならびに、本抗体の新生児腸管からの吸収の可能性については実験を重ねる必要がある。

次に、子宮内において抗体の移行の問題であるが、ひととは hemochorial type の胎盤を有し、一応抗体の移行が胎盤を通じて容易に行なわれるとされているが、抗体の種類により、移行度に難易があり、それは単なる拡散によるものではないことが認められている。すなわち、動物実験によれば、同じ凝集素や溶血素でも、homologous の抗体は移行するが、heterologous のものは移行せず、その際抗体の大きさのみには関連しないことから、胎盤の細胞には、Selective Function が考えられる。(Calman ら⁴⁾)。また、同じ腸チフスの凝集素でも、H 凝集素と O 凝集素では、胎盤移行性に差がみられ (Smith²²⁾)、前者は移行しないことが認められている。更にポリオの中和抗体について各型の間に、移行性に差のあることが指摘されている。(Lipton ら¹⁵⁾)

Rh-凝集素については、不完全抗体は完全抗体より過性が容易で (Coomb ら⁵⁾) これと同様なことはニワトリのサルモネラ抗体 (Buxton²³⁾)、ひとの結核菌抗体 (進藤 1957²³⁾)、などについても証明されている。

また、母児間に移行のみられる抗体につき、母体血と臍帯血抗体価を比較すると胎児側に抗体価の高いことが、日本脳炎 (北岡ら¹²⁾)、インフルエンザ (良田²⁷⁾)、デフテリア (真柄¹⁷⁾)、(Barr ら¹¹⁾)、ブドウ球菌 (Murray ら¹⁹⁾) などにつき証明されている。その理由として、

1) 臍帯血中に非特異的な抗体が存在し、特異抗体に加わって高くする (真柄¹⁸⁾)。

2) 妊娠中に免疫する際には、抗原が胎児に移行、胎児において抗体が産生される (真柄¹⁹⁾)。

3) 母体抗体がそのまま移行するのではなく、その抗体が、特異的な部分を残してある程度分解されて胎児に移行し、胎児体内で特異抗体に再合成される (Calman ら⁴⁾)。

4) 抗体が羊水内に移行し、胎児がこれを吸飲濃縮する (Brambell²¹⁾)。

などの考えがある。

何れにしても子宮内における抗体の移行は単なる胎盤通過以外に種々の可能性が考えられ、その機構は複雑なことが考えられる。

結 論

妊娠 8 ~ 9 カ月の妊婦 1) に市販インフルエンザ A₁, A₂, B 混合ワクチン (100 CCA/ml 力価) 皮内 0.1 ml づつ 2 週間隔で 1 ~ 3 回 2) ワクチンを皮下 1.0 ml 1 回後、皮内 0.1 ml づつ、2 週間隔で 1 ~ 2 回 3) A₂, B 両型混合アジュバント加ワクチン (200 CCA/ml 力価) 0.5 ml 1 回注射し、注射前後の母体血、分娩時の母体血、臍帯血、初乳を採取し、CF-V, CF-S, HI 抗体価の測定を行なった。

その結果母体血中には、CF-V, HI 抗体価の上昇が認められ、特に普通ワクチン皮下 1 回に、次いで皮内 2 回接種の場合、あるいはアジュバントワクチン接種者では著明であった。CF-S 抗体は、反之、上昇が認められなかった。臍帯血中には母体血よりやや高い価の CF-V 抗体、やや低い価の CF-S 抗体、またほぼ同値の HI 抗体が証明できた。また、初乳中にも母親血より低い値の HI 抗体 (推定) が証明できた。以上の結果から妊娠 8 ~ 9 カ月の妊婦にインフルエンザワクチンを接種することにより、積極的に新生児に免疫を与えることが証明された。

本論文の要旨は、第 13 回日本産婦人科学会総会、第 34 回日本伝染病学会総会並びに第 9 回日本ウイルス学会総会において発表を行った。

本研究の実施に際し、北里研究所五十嵐技士、群馬中央病院、高橋技士、当院、臨床検査科、産婦人科各医局員の技術的援助を得たので、深謝します。

Summary

For the purpose to prevent the serious influenza infection among newborns, the following experiment to testify the possibility of the materno-fetal immunization against influenza were performed. Pregnant women at their 8-9th month of gestation were injected with commercial trivalent (A1, A2, B) type vaccine and adjuvant added bivalent (A2, B) type vaccine, specially prepared by Chiba Serum Institute for experimental purpose. These vaccine have the potency of 100 CCA/ml and 200 CCA/ml per each type, respectively. The mother bloods taken just before the injection and at delivery, and cord bloods and colostrum collected at delivery were tested for their contents of influenza CF-V, CF-S and HI antibodies.

As the results, the increase of CF-V and HI titer in the mother bloods were observed after vaccine injection, especially when subcutaneous 1 ml injection following two intradermal 0.1 ml injection of routine commercial vaccine, or when 0.5 ml adjuvant added vaccine were injected subcutaneously. On the contrary, the increase of CF-S titers were not observed.

In the cord bloods somewhat higher titers of CF-V, somewhat lower titers of CF-S and nearly equal titer of HI antibodies were demonstrated, as comparing with those in the mother bloods.

In the mother colostrum, HI antibodies of lower titers comparing with those of mother bloods were demonstrated.

From above data it became evident, that the materno-fetal immunity against influenza is completely established by active immunization of pregnant women at their 8-9th month of gestation.

文 献

1) Barr M. Glenny A.T. and Randall K.J. (1949) : Concentration of diphtheria antitoxin in cord blood, and rate of loss in babies. *Lancet* 2, 324-326. —2) Brambell F.W.R, Holliday R. Brierley J and Hemming W.A. (1954) : Transference of passive immunity from mother to young. *Lancet* 1, 964-965. —3) Buxton A (1954) : On the transference of bacterial antibodies from the hen to the chick, *J. Gen Microbiol.* 10, 394-410. —4) Calman R. M and Murray J (1951) : The transfer of antibodies across the placenta. *Endeavour*, 10, 27-32. —5) Coombs R. R. Mourant A. E. and Race RR (1946) : In vivo isosensitization of red cells in babies with hemolytic disease. *Lancet*, 1, 264-266. —6) Dean D.J. (1952) : Postnatal immunity in mouse Encephalomyelitis, *J. Immunol.* 68, 549-557. —7) Fukumi H. (1959) : Human vaccination experiments with asian influenza

vaccine in Japan. *Bull. W. H. O.* 20, 355-376. —8) Hillman M.R. Flathey F.J. Anderson S A and Leucking M. L. (1958) : Antibody response in volunteers to asian influenza vaccine. *J A M A* 166, 1134-1140. —9) 平野憲正 (1941) : 新生児の免疫に就て, *血清学免疫学雑誌*, 2, 295-306. —10) 石黒和彦 (1956) : 日本脳炎抗体の母親ラッテから新生仔への移行に関する研究, *ウイルス*, 6, 112-121. —11) JO. K (1953) : on the transmission of antibodies from mothers to their offsprings in experimental typhus fever Experiments in albinorats and guinea pigs. *Jap. J. Med. Sci & Biol.* 6, 299-310. —12) 北岡正見, 三浦悌二 (1950) : 新生児とその母親血清の灰白髄炎並に日本脳炎ウイルスに対する中和抗体について, 新生児臍帯血における中和抗体の濃縮現象, *医学と生物学*, 17, 171-173. —13) 北岡正見, 石黒和彦 (1956) : インフルエンザウイルス A' (FMI) で免疫した母親ラッテとその新生仔との血球凝集抑制抗体の比較, コレラ菌培養濃度による非特異凝集抑制物質の除去, *ウイルス*, 6, 99-102. —14) 木葉矩弘, 山下馨 (1961), 当病院に集団発生した新生児肺炎に就て, 第13回日本産婦人科学会総会報告. —15) Lipton M. M. and Steigman A. J (1957) : Neonatal Immunity I Disparity in maternal infant poliomyelitis antibody. *Proc. Soc. Exp. Biol & Med* 96, 348-352. —16) Murray J. Calman R. M and Lipin A (1950) : Transmission of staphylococcal antitoxin from mother to child. *Lancet* 2, 14-16. —17) 真柄正直, 小豆畑久治 (1936) : 乳児の抗「デフテリー」先天免疫について, *実験医学雑誌*, 20, 1517-1607. —18) 真柄正直 (1942) : 母児免疫について, *医学の進歩*, 第1輯, 143-167. —19) 真柄正直, 山田道生 (1954) : 母児免疫, *総合医学*, 11, 161-163. —20) 尾辻春三 (1952) : ハーストテストによる新生児血清及び母乳の中和抗体について, *医学研究*, 22, 145. —21) Parish H. J. (1951) : Inherited immunity *Brit Med J.* 2, 1164-1168. —22) Smith R.T. (1960) : Response to active immunization of human infants during the neonatal period. *Ciba Foundation Symposium on Cellular Aspects of Immunity* J. and A Churchill, London, 348-358. —23) Stoker M. G. P. and Marmion B.P. (1952) : Detection of 2 fever antibodies in whey by the antiglobulin sensitization test and other technique *J. Hyg.* 50, 1-11. —24) 佐野一郎 (1961) : 流感の予防, 診断と治療, 49, 877-883. —25) 市川洋一 (1957) : 結核の不完全抗体の研究と新しい不完全抗体証明法について, *細菌誌*, 12, 389-395. —26) Young G.A. and Underdahl N.R. (1950) : Neutralization and hemagglutination inhibition of swine influenza virus by serum from suckling swine and by milk from their dams *J. Immunol* 65, 369-373. —27) 良田圭子 (1938) : 入血清を以てせるインフルエンザウイルスの中和試験, *東京女医学会雑誌*, 8, 54-62.