

分離陽性は4症例（5、6、7、9）のみ（36.4%）であった。症例5、7について末梢血液中のウイルス感染はワクチン未接種症例での血中ウイルス量と同等の $10^{3.0}$ CCID<sub>50</sub>/mlであった。6経年以降のSVFは38/57症例でウイルス分離率に上昇傾向がみられた。これらの成績から現行麻疹ワクチンによる感染防御期間は6～10年程度と考えられた。

#### 【考察】

わが国の現行麻疹ワクチンはそれぞれの特性を示す。発熱率、免疫原性も一様ではなく、ワクチン接種で獲得される感染防御期間も同一とは言えないが、今回の成績はワクチン接種で終生免疫は成立しえないことを示唆するものであり、近年、中学、高校における麻疹罹患児に相当数のワクチン既接種者が含まれることと符合する。

最近、麻疹の罹患年令に高齢化がみられ成人麻疹も稀ではなくなっている。わが国での麻疹ワクチンは1回接種方式が採用されており、接種率は70%程度と低迷している。その結果、感染機会の減少とともにワクチン未接種者（感受性者）は蓄積する。これは近年、中学、高校における麻疹流行、成人麻疹が増加傾向にあることと密接に関連するものと考えられる。すでに欧米諸国では麻疹ワクチンは2回接種方式が採用されており、麻疹EPIは成功裡に推移している。わが国の麻疹対策の立ち遅れは国際的にも指摘されている。成人麻疹、特に妊婦麻疹（早死産の誘因：Eberhart-Phillips JE, Frederick PD, Baron RC, Mascola L: Measles in pregnancy: a descriptive study of 58 cases. *Obstet Gynecol*, 82 : 797-801, 1993）を予防するためにもワクチンの2回接種を導入すべきであると考えられる。

研究協力者：片山未来、佐藤直子、岡田晴恵、佐藤威、砂川富正（国立感染症研）

#### 協力機関

川崎市立病院、北里研究所、大阪公衛研、国立公衆衛生院、東京都立駒込病院、武蔵野日赤病院、秋田県衛生科学研究所、東大病院、帝京大学病院、大阪環境科学研究所、名古屋市衛生研究所、愛媛県衛生研究所、国立三重病院、秋田県衛生科学研究所、広島市衛生研究所、東海大学病院、鳥取県衛生研究所、島根県衛生公害研究所、諸岡医院（福岡市）、福岡市衛生試験所、国立精神・神経センター、山形市立済生館病院、宗像水光会総合病院、名鉄病院（名古屋）近畿大学病院、岡藤小児科（姫路）、九大医療技術短大、国立習志野病院、谷津保健病院（千葉）、永井小児科（高松）、藤田保健衛生大学、北海道大学病院、九州大学病院、中村小児科（石川県）、広瀬小児科（佐賀市）、横浜市民病院、鈴木小児科（宇部市）、札幌市立病院、和歌山県衛公研センター、出口小児科（長崎）、滋賀県立衛生環境センター、三宅小児科（東京）、静岡県立こども病院、新潟県保健環境科学研究所、国立精神・神経センター、茨城県衛生研究所、友部町国保病院（茨城）、埼玉県衛生研究所、群馬県衛生環境研究所、大宮赤十字病院、山梨県立衛生公害研究所、神奈川県衛生看護専病院、

宮崎県衛生環境研究所、川崎市衛生研究所、沖縄県衛生環境研究所、八重山保健所（沖縄県）、佐賀県衛生研究所、青森県環境保健センター、横須賀共済病院、箕面市立病院、市立堺病院（大阪）、新潟県立十日町病院、市立池田病院、愛染橋病院（大阪）、高知県衛生研究所、東京女子医大病院、鹿児島県環境保健センター、静岡市保健所（検体受領順）

謝辞：検体の採取、提供にご協力いただいた上記68施設の諸先生方に深謝します。

表-1 麻疹ワクチン既接種者の麻疹罹患

症例	年齢 (性)	ワクチン (経年)	ウイルス 分離	検体採取 発疹後(日)	症例	年齢 (性)	ワクチン (経年)	ウイルス 分離	検体採取 発疹後(日)
1	2M	1	-	2	30	10M	8	+	2
2	2M	1	-	2	31	11M	8	-	3
3	2M	1	-	3	32	10M	9	+	2
4	2M	1	-	2	33	10F	9	+	1
5	4M	1	+ 3.0*	2	34	12F	9	+	2
6	4M	1	+	1	35	12M	11	+	2
7	3M	2	+ 3.0	1	36	12M	11	+	2
8	3M	2	-	1	37	12F	11	-	4
9	3M	2	+	2	38	13F	11	+	3
10	3M	2	-	1	39	13F	11	+	3
11	3M	2	-	1	40	13F	11	+	3
12	10M	3	-	2	41	13F	12	+	2
13	4M	3	+	3	42	14F	13	+	3
14	4M	3	+	2	43	14F	13	+	3
15	5F	3	-	2	44	14F	13	+	2
16	5F	4	+	1	45	15F	13	-	4
17	5M	4	-	2	46	15F	14	-	4
18	9M	4	+	2	47	16F	15	-	3
19	6M	5	+	2	48	17M	15	-	3
20	7F	6	-	3	49	18M	16	+	3
21	7F	6	+	1	50	19F	16	+ <1.0	2
22	8F	6	+	1	51	18F	17	-	2
23	8F	7	-	2	52	18F	17	-	4
24	8F	7	-	4	53	22M	17	-	3
25	8F	7	-	2	54	20M	18	+ 1.5	3
26	9M	7	-	2	55	20F	19	+	2
27	9F	8	+	2	56	22M	20	-	4
28	9F	8	+	3	57	22M	20	+ 1.0	3
29	9M	8	+	1					

\* 検体中のウイルス量 (感染価:CCID<sub>50</sub>/ml)

## アジュバント併用経鼻インフルエンザワクチンに用いられている コレラ・アジュバントの作用機構

分担研究者 倉田 毅 (国立感染症研究所)  
(協力研究者 田村 慎一)

### 【目的】

我々はこれまで、マウスを用いた実験系において、現行のインフルエンザワクチンを、微量(0.2%)のコレラ毒素(CT)や大腸菌易熱性毒素(LT)を含むそのBサブユニットをアジュバント(CTB\*あるいはLTB\*)として経鼻接種することにより、上気道上に分泌型のIgA抗体を誘導でき、それに伴い変異ウイルスの流行にも対応する交叉感染防御を準備できることを報告してきた。一方、CTは粘膜の上皮細胞やマクロファージに作用してIL-1等のサイトカインの産生を促進したり、抗原提示機能を高めることが報告されている。これらのことは、CTが粘膜の免疫系に作用して、抗原に特異的な適応免疫応答ばかりでなく、非特異的な自然免疫応答をも増強していることを示唆している。そこで本研究では、CTB\*併用経鼻インフルエンザワクチン投与によって誘導される抗原に非特異的な自然免疫応答を、ウイルス感染に対する非特異的な防御能その他を指標にして検討した。

### 【方法】

免疫と感染；BALB/cマウス(6週令、雌)に、麻酔条件でインフルエンザウイルスA/PR/8/34(PR8)(H1N1)由来のワクチン(1 $\mu$ g)をCTB\*(1 $\mu$ g)と共に経鼻免疫した。マウスに、麻酔条件でPR8ウイルス液(10<sup>6.5</sup> EID<sub>50</sub>)を少量(1 $\mu$ l)ずつ左右鼻孔に滴下することによって感染した。ウイルス価；ウイルス感染後の鼻の洗浄液中のウイルス価を、MDCK細胞を用いたブラック法によって決定した。抗体価；ワクチン投与後の鼻洗浄液中の抗体価をELISA法によって測定した。鼻関連粘膜リンパ組織(NALT)の非T細胞；NALTよりリンパ球を取り出し、そのCD4及びCD8陽性細胞をDYNALのマグネットを用いた細胞分画法により除去した。抗体産生細胞(AFC)数；インフルエンザウイルスに特異的なAFCは、ELISPOT法により測定した。サイトカインmRNA；分離NALTの細胞からRNAをTRIZOLを用いて抽出した。その中の1 $\mu$ gのRNAからRT-PCRによって単鎖cDNAを合成し、そのcDNAを基にIL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-15、IL-18、 $\beta$ -actinの3'-および5'-プライマー存在条件でそれぞれのサイトカインのcDNAをPCRにより増幅した。それぞれの

サイトカイン mRNA 量は、得られた  $\beta$ -actin の cDNA 量を LightCycler を用いて定量し、その一定量に対するそれぞれのサイトカインの相対的な cDNA 量（アガールゲルの電気泳動上のエチジウムブロミド染色されたバンドの強度）によって決定された。NALT 細胞培養上清中の IL-1  $\beta$  及び IFN- $\gamma$  活性；市販の ELISA キットを用いて測定した。

#### 【成果】

(1) インフルエンザウイルス感染後の鼻洗浄液中のウイルス価、NALT の AFC 応答、鼻洗浄液中の抗体価の変動；マウスに PR8 ウイルスを少量経鼻投与すると、3 日目に鼻洗浄液のウイルス価 (PFU/ml) が最大になり、NALT の AFC 応答は 5 日目から検出され、続いて鼻洗浄液中に抗体応答が出現した。即ち、ウイルス感染 5 日目以後に適応免疫応答が出現した。従って、適応免疫応答が始まる 5 日目以前に自然免疫応答の検出が容易であると考えられた。そこで以下の実験では、適応免疫応答の影響を受けずにウイルス価が最高値である感染 3 日後のウイルス価 (PFU/ml) を、アジュバントによる非特異的な感染防御免疫誘導の指標とした。

(2) CTB\*併用ワクチン或いは CTB\*のみを経鼻免疫したマウスの免疫からチャレンジ感染までの日数のインフルエンザ感染防御能力に及ぼす影響；ワクチンを免疫後 3 日以上経過したマウスにおいて、ウイルス感染 3 日目のウイルス価の有意のしかし部分的な減少が認められた (Figure 1)。CTB\*のみを免疫したマウスにおいても同様の現象が認められ、この部分的な感染防御効果は 5 日目に最大になり、14 日位迄持続した。またこの防御効果は、CTB\*の投与量が 0.3  $\mu$ g 以上の時に用量依存的に観察された。

(3) CTB\*免疫マウスの NALT の非 T 細胞のサイトカイン mRNA の発現；CTB\*免疫後 3 日目のマウスからの NALT の非 T 細胞群では、非免疫マウスに比較して、IL-15 および IL-18 の mRNA の発現が顕著に認められた。

(4) 分離された NALT 細胞の培養系における CTB\*存在下での IL-1  $\beta$  の分泌；非免疫マウスから分離された NALT の細胞を、0.5-5  $\mu$ g/ml の CTB\*の存在条件で 24 時間培養した時、培養上清中に培養 3 時間目頃から IL-1  $\beta$  が放出された。

(5) NALT 細胞の抗原非存在下での培養上清への IFN- $\gamma$  の分泌；CTB\*免疫後 3 日目にマウスから分離された NALT の細胞を 24 時間抗原不在下で培養した時、培養上清中に IFN- $\gamma$  が放出された。

#### 【考察】

本実験において、CTB\*併用経鼻インフルエンザワクチンが、非特異的な自然免疫を刺激することによって、ワクチン投与の 3 日目から部分的なウイルス感染防御を誘導するこ

とが明らかになった (Figure 1)。この CTB\* による非特異的な感染を防御する能力は、NALT の非 T 細胞、即ち、分離 NALT の一部分である粘膜の上皮細胞やマクロファージによる IL-15 や IL-18 の mRNA の発現と相関していた。また、CTB\* 免疫後 3 日目にマウスから分離された NALT の細胞を 24 時間抗原不在下で培養した時、培養上清中に IFN- $\gamma$  が放出された。これらのサイトカインは NK 活性と関連があることから、CTB\* の非特異的な感染防御能力に NK 活性が関与していることが示唆された。また、CTB\* 存在条件での非免疫マウスの NALT 細胞による IL-1  $\beta$  の放出は、CTB\* による非特異自然免疫応答誘導に IL-1  $\beta$  の関与を強く示唆していた。

【結論】

CTB\*併用経鼻インフルエンザワクチンが、非特異的な自然免疫を刺激することによって、ワクチン投与の 3 日目から部分的なウイルス感染防御を誘導するばかりでなく、5 日目以降はウイルス特異的な適応免疫を刺激することによって、完全な感染防御を誘導することが示唆された。そして、この非特異的な自然免疫の刺激には、CTB\* による鼻腔粘膜の NK 細胞活性の増強や、粘膜の上皮やマクロファージによる IL-1  $\beta$  の放出の促進が関与していることが示唆された。

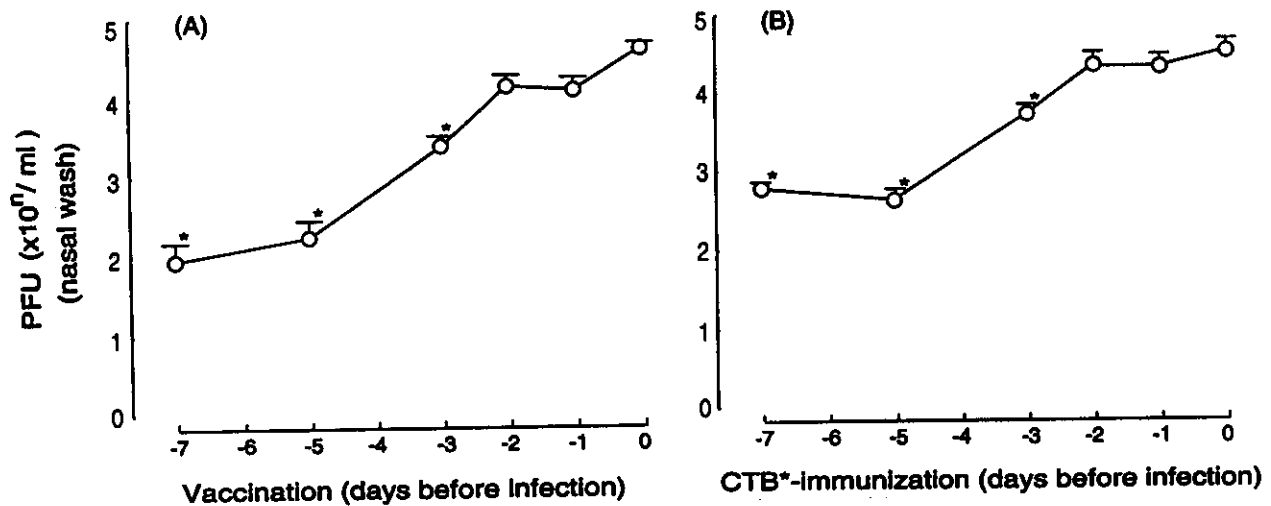


Fig. 1. Kinetics of virus titres in the nasal washes of mice immunized intranasally with either CTB\*(1  $\mu$ g/mouse)-combined vaccine (1  $\mu$ g/mouse) (A) or CTB\* (1  $\mu$ g/mouse) alone (B) various days previously and inoculated with the PR8 virus. Nasal wash samples were obtained from the immunized mice 3 days after the virus inoculation and assayed for the virus titres (PFU). Each value represents the mean +SD of the virus titre/ml in the nasal washes of the mice in each group of six mice. The asterisk (\*) represents a statistically significant difference from non-immunized and infected mice (day 0).

## 流行株対応型の遺伝子組み換え麻疹ワクチン

中山 哲夫（北里研究所 基礎研究所 ウイルス1室）  
駒瀬 勝啓（北里研究所 生物製剤研究所）

### 麻疹の流行疫学と新規ワクチンの発想

麻疹は依然として流行し撲滅には至らず、全世界で毎年4000万以上の子供達が麻疹に罹患し100万人の生命を奪っており、乳幼児死亡の主要な原因となっている<sup>1)</sup>。我が国でも、地域的に小流行を繰り返しており、感染症サーベイランスには毎年2-3万人の麻疹が報告され、数十例前後の麻疹による死亡例が報告されている。麻疹ウイルスは1954年に分離され、最初に分離されたEdmonston株が実験室標準株となり世界中の多くの麻疹ワクチンはEdmonston株から弱毒されたものであり、我が国では現在4株の麻疹ワクチンが製造されている。麻疹生ウイルスワクチンはその有効性と安全性は確立されており、WHOの予防接種拡大計画(EPI)は現在9ヶ月に麻疹ワクチンを接種する事を推奨し世界中の80%以上の子供達はワクチン接種を受けている。にもかかわらず、未だに毎年4000万人の子供達が麻疹に罹患し、その1/3が9ヶ月未満の乳幼児である。麻疹を撲滅するためには9ヶ月以前の子供達に免疫を与える目的で6ヶ月に麻疹ワクチンを接種する必要がある、移行抗体の残っている6ヶ月児に安全に接種できて免疫賦与効果が高いワクチンが望まれていた。

北里研究所で開発した弱毒麻疹ワクチンAIK-C株はEdmonston野生株を33℃でヒツジ腎細胞に継代しsmall plaqueをcloningし、ニワトリ胎児胚細胞にadaptationさせvaccine seed strainを樹立した<sup>2)</sup>。1972年開発以来既に1500万dose以上が接種され、重篤な副反応の報告もなく接種後の発熱の頻度も低く、6ヶ月児を対象に他のワクチンとの比較接種試験を行なった海外での臨床試験の結果AIK-C株は抗体陽転率が最も高く、乳幼児に接種して最も安全で有効なワクチンであることからEPIの推奨株とされている<sup>3)</sup>。

麻疹ウイルスは一本鎖negative sense RNAウイルスであり、DNAウイルスに比べ変異がおおきいことが知られている。EPIは麻疹の撲滅を目指しており、そのために麻疹の流行疫学監視体制を強化し、野生株伝播状況を遺伝子学

的に確認すべく現在世界中の野生株麻疹ウイルスの遺伝子分類が行われ8群15typeに分類されている4)。我々は1984年から麻疹の分子疫学を行っており結果を図1に示した。1985年以前の麻疹(JPN<1985)はC1、1985-90はD3、1990-97はD5と流行年代毎に主要流行株の genotype が変化してきた。1997年から最近の流行株(MVi/Tokyo-SA/97, MVi/Tokyo-YA/99)は再びD3に変化していることを報告した5)。最近流行株がD3に戻っているが、遺伝子レベルでは以前1985-90年代に流行していたD3ではなく同じD3 genotypeの中でもclusterは異なっており、1989年にアメリカで分離されたChicago 1株に近縁のウイルスであることが明らかとなっている5)。2000年になってからまたD5に戻っている。

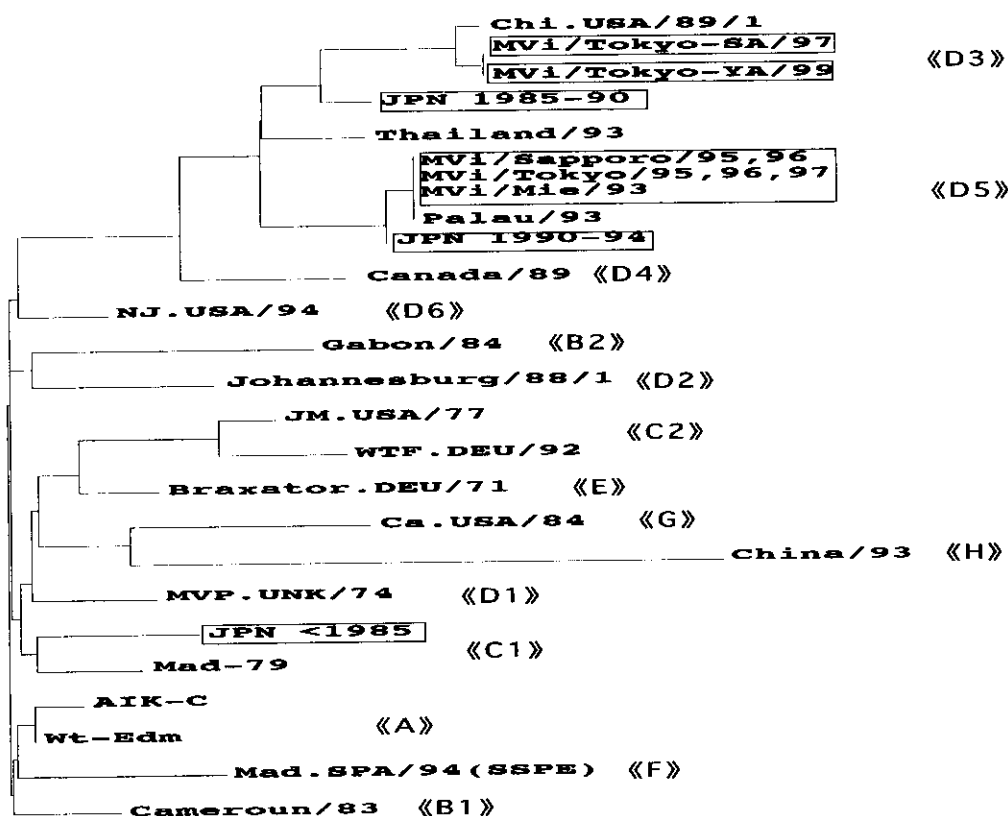


図1 麻疹ウイルスの系統樹解析

遺伝子学的検索により流行野生株が変化している事が明らかとなったが、一方ワクチンの抗原性は1954年に分離されたEdmonston株でありワクチンが



効かなくなるにはないかの危惧がある。今のところ、大幅に抗原性が変化していることはないものの変異が蓄積してくるとワクチンの効果が減衰する危険性はある。そのときに生ワクチンの開発をしても遅く、我々は、AIK-C 株という世界でも優れた弱毒麻疹生ワクチンを持っており、その全長遺伝子も既に決定し、それに基づき全長 cDNA を構築し感染性ウイルス粒子を回収する事が可能となった。麻疹ウイルスは1本鎖 negative sense RNA ウイルスで遺伝子操作が困難であったが、cDNA に変換できたことから遺伝子操作を行い、ウイルスの生物学的性状の関連性を検討する事が可能となり、変異流行株が出現しても AIK-C ワクチン株を骨幹に野生株との組み換え麻疹ウイルスを作製し対応ができるものと考えらる。

#### 感染性ウイルス粒子の回収と麻疹ワクチン AIK-C 株の性質

AIK-C ワクチンシード株の全長遺伝子配列は既に報告した 6)。この塩基配列を元に RT-PCR で DNA を増幅し、5' leader から F 蛋白翻訳領域の下流 7238 までの AIK-C の前半のプラスミド 1 と、H、L 蛋白、trailer 配列の後半のプラスミド 3 に分けて構築し 1、3 を特異的な制限酵素で切断し各全長 cDNA を挿入したプラスミド(pIC-MVAIK-S)を構築した (図 2)。ウイルスの複製、転写活性に必要な N、P、L 蛋白翻訳領域を T7 promotor の下流に挿入した発現プラスミッドとともに、T7 RNA polymerase を発現するワクシニアウイルスを感染させた B95a 細胞に co-transfection し、上清を B95a 細胞に接種し感染性ウイルスを回収した。AIK-C 株は 33℃ でよく増殖するが、39℃ では全く増殖しない温度感受性(temperature sensitive; ts)の性状と Vero 細胞に small plaque を形成するが、野生分離株は large plaque を形成し 39℃ でも増殖する違いがある。ウイルスの転写、複製に関与する N、P、L 蛋白の発現プラスミッドを構築し、ルシフェラーゼ遺伝子に麻疹の leader, trailer sequence を付加したレポーター遺伝子を用いて転写、複製効率を検討すると AIK-C 株の ts は P 蛋白の 439 Pro の変異が担っていることが明らかとなった。また、細胞融合に関しては、F、H 蛋白発現プラスミッドを T7 RNA polymerase を発現する vaccinia virus を用いた発現実験で AIK-C 株の small plaque は F 蛋白 278 番目の Leu が重要な働きを担っている事が明らかとなった。Edmonston の F 蛋白の 278Phe を導入した前半のプラスミッド 2 を構築しプラスミッド 3 と再構成し pIC-MVAIK-L を構築した。

麻疹ワクチン株や Vero 細胞で分離した株は CD46 を receptor として結合し感染し、CD46 の発現を down regulation する 7)。一方、B95a 細胞やヒト B リンパ球株化細胞で分離された最近の麻疹ウイルス株は CD46 以外の

SLAMがその receptor であることが明らかとなった8)。こうした野生株とワクチン株の細胞親和性に対する異なる生物活性の差はH蛋白にあると考えられている9)。また、中枢神経病原性はマウス脳に adaptation した麻疹ウイルスのH蛋白と Edmonston ワクチン株とのキメラウイルスをマウスに接種し中枢神経病原性はH蛋白領域が担っていることが報告されている10)。野生株のH蛋白とキメラウイルスを構築する方法を図2に示した。AIK-C ワクチン株の後半のプラスミドのH蛋白翻訳領域と1987年にB95a細胞で分離された野生株(87-K)のH蛋白翻訳領域のPCR産物をNhe I, Pvu IIの制限酵素を用いてAIK-CのcDNAに野生株のH蛋白を挿入したプラスミド4を構築しプラスミド2と再構築し野生株のF278位のアミノ酸とH蛋白の野生株を持ったキメラプラスミド(pIC-MV87-K-L)を構築した。AIK-CのH蛋白を87-K株のH蛋白に替えたpIC-MV87-K-Sはプラスミド1と4から再構築した。

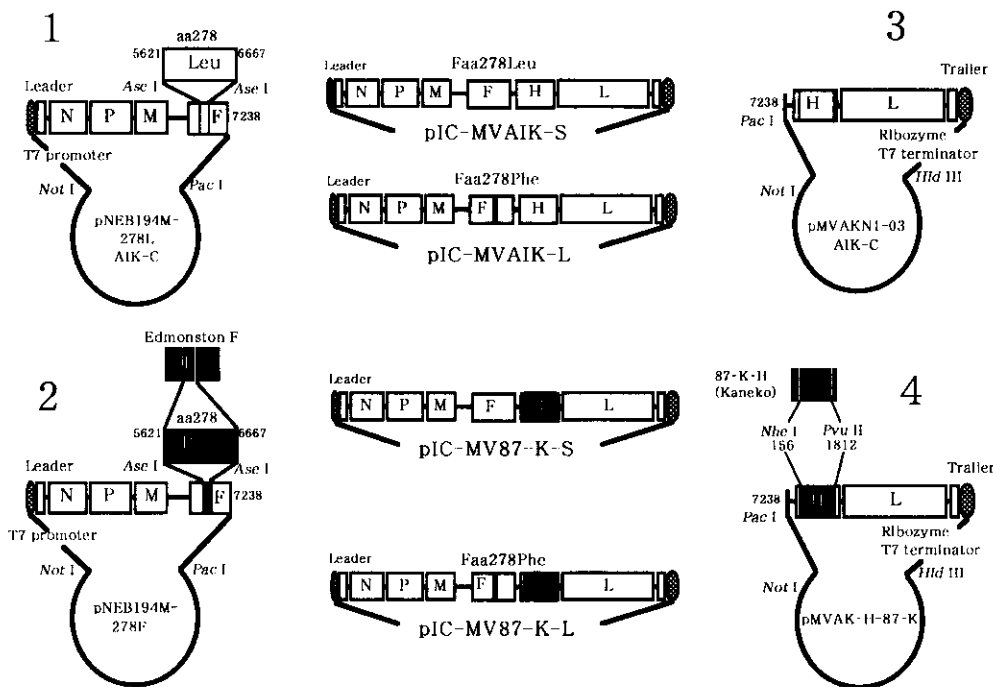


図2 野生株H蛋白遺伝子を組み込んだキメラAIK-Cウイルスの構築  
キメラAIK-Cウイルスの性状

AIK-CのcDNAから回収した感染性ウイルス(IC-MVAIK-S)、AIK-CのF蛋白278のLeuをPheに野生株の変異を導入したcDNAから回収した感染性ウイルス(IC-MVAIK-L)、87-K野生株のH蛋白との組み換えcDNA

から回収した組み換え麻疹ウイルス(IC-MV87-K-L)について元のウイルスである AIK-C 株と野生株 87-K の生物学的性状を図3に示した。87-K, IC-MV87-K-L は Vero 細胞に接種しても細胞融合はみとめず、IC-MVAIK-S は Vero 細胞に接種し細胞融合は認めるが細胞融合は小さく、IC-MVAIK-L は大きな細胞融合を認め、AIK-C 株は大小の plaque が混在した。IC-MVAIK-S はF蛋白 278 が leu で、IC-MVAIK-L は野生株型のF蛋白 278 は Phe の変異を導入したものである。AIK-C 株は 33℃で増殖し、39℃で増殖しない ts の性状を持っていることがワクチン株のマーカである。各ウイルスを B95a 細胞に接種し、ウイルスの増殖パターンを検討したところ、AIK-C の cDNA を骨幹に構築した IC-MVAIK-S, IC-MVAIK-L ともに 39℃では増殖しなかった。一方、野生株の Edmonston と 87-K は 39℃でも増殖し、野生株のH蛋白を AIK-C に組み込んだ組み換え麻疹ウイルス IC-MV87-K-L は 39℃では増殖せず、ts の性質を保持していた。同様に、IC-MV87-K-S も ts の性状を保っていた。

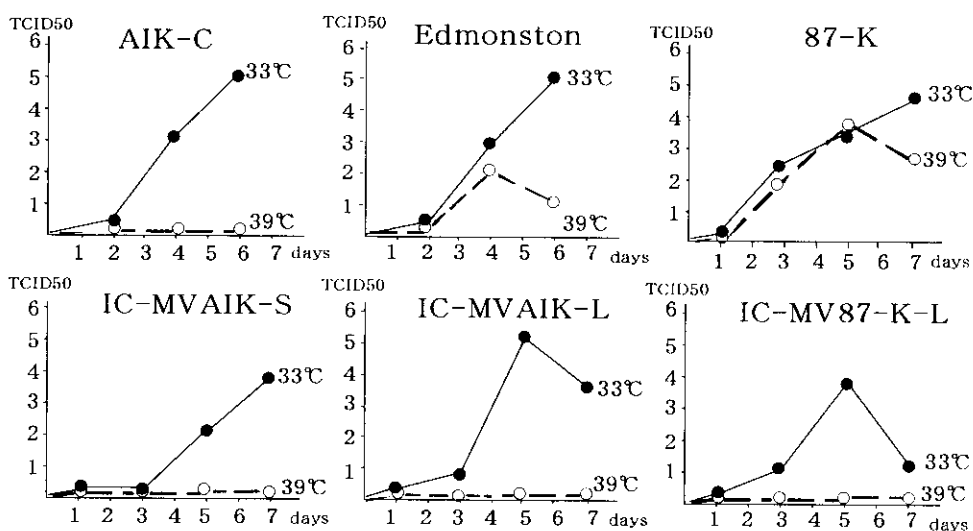


図3 キメラ麻疹ウイルスの増殖パターン

弱毒麻疹ウイルス AIK-C 株の全長 cDNA から感染性ウイルス粒子を回収し、各領域の遺伝子の変化とウイルスの生物活性の変化を解析し、温度感受性、増殖能が低いこと、細胞融合能の差を担っている遺伝子が明らかとなり、さらに病原性弱毒のメカニズムが遺伝子レベルで明らかとなれば、ワクチン株にその領域を切り込んだ組み換え麻疹ワクチンウイルスを構築する事が可能である。

変異に対応できる組み換え麻疹ワクチンの技術を確立したが、感染性ウイルスの回収に EB ウイルスを産生する B95a や、vaccinia を使用していることから、まだ改良の余地が多く残っているおり、現行ワクチン接種を強化し、麻疹の撲滅が望まれる。

#### 参考文献

1. Redd S. et al: Measles vaccine. Plotkin S.A. Orenstein W. A. Edited Vaccine 3rd edition pp222-266, W.B. Saunders, 1999.
2. Makino S. : Development and characteristics of live AIK-C measles virus vaccine: a brief report. Rev. Infect. Dis. 5:504-505, 1983.
3. Nkrumah F. K. et al: Comparison of AIK-C measles vaccine in infants at 6 months with Schwarz vaccine at 9 months: a randomized controlled trial in Ghana. WHO Bulletin 76: 353-359, 1998.
4. Expanded Programme on Immunization (EPI) Standardization of the nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses. WHO Weekly Epidemiological Record 1998. 73: 265-272.
5. Takahashi M. et al: A single genotypes of measles virus is dominant whereas several genotypes of mumps virus are co-circulating. J. Med. Virol. (in press)
6. Mori T. et al: Molecular cloning and complete nucleotide sequence of genomic RNA of the AIK-C strain of attenuated measles virus. Virus Genes. 7:67-81, 1993.
7. Lecouturier V. et al: Identification of two amino acids in hemagglutinin glycoprotein of measles virus (MV) that govern hemadsorption, HeLa cell fusion, and CD46 downregulation: phenotypic markers that differentiate vaccine and wild-type MV strains. J. Virol. 70:4200-4204, 1996.
8. Tatsuo H., et al: SLAM(CDw150) is a cellular receptor for measles virus. Nature 406:893-897.
9. Johnston I. C. D. et al: A recombinant measles vaccine virus expressing wild-type glycoprotein: consequences for viral spread and cell tropism. J Virol 73 (8): 6903-6915, 1999
10. Duprex W. P. et al: The H gene of rodent brain-adapted measles virus confers neurovirulence to the Edmonston vaccine strain. J Virol 73 (8):6916-6922, 1999.

## 1996-2000年の日本におけるロタウイルス胃腸炎の 分子疫学的研究と血清型 G9 ロタウイルスの遺伝子解析

牛島 廣治、周 玉梅、西村 修一、金 保洙、黒岩 利正  
兼次 邦男、西村 忠史、杉田久美子、中谷 茂和、上田 勇一

(東京大学大学院医学系研究科国際保健学専攻産婦人科学下痢症ウイルス研究班)

### [目的]

小児下痢症及びそれによる死亡は世界的に重要な問題であり、その原因としてA群ロタウイルス感染が主要である。本症を予防できる手段としてワクチンの開発が重要である。我々は15年以上にわたる日本国におけるロタウイルスのG血清型の分布を調べている。ここではRT-PCRを加えた1996年以降の成績について報告する。本研究は1996-2000年の5地域におけるヒトロタウイルスG血清型を調べ、各地域におけるG血清型の流行の特徴を比べ、G血清型の変異は地域、年代と如何の関係を考查した。または、1998-2000年の新たな流行株G9に関しては更なる検討を加えた。

### [材料及び方法]

本研究は1996.7から2000.6までに札幌、東京、舞鶴、大阪、佐賀にある病院の小児外来急性下痢症16歳以下の患者から採集した便液を対象とした。毎年7月から翌年の6月までは一年間とした。札幌、東京、舞鶴、大阪、佐賀にはそれぞれ211、293、1123、351、240検体を採取した。これらの2218検体に対し、A群ロタウイルスポリクローナル抗体を用いたEIA或はLatexでスクリーニングし、ロタウイルス陽性検体はG血清型(1-4)のモノクローナル抗体を用いたEIAで、G血清型の検査した。EIAで血清型不明な検体に対し、RT-PCRでG血清型の再検査を行った。さらに、それによる検出された9型の検体に関し、RNA-PAGE、PCR、Sequence及びEIAなど方法で、9型のRNAのe-type、NSP4亜型、VP4遺伝子型、VP7核酸とアミノ酸の配列及びVP7抗原性を解析した。

### [結果]

ロタウイルスの検出率は最も高いと低いところは98年の東京(42.5%)と97年の札幌(6.5%)であった。平均としては、舞鶴は検出率が32.1%で、他の地域より高く、札幌は14.2%で、他の地域より低く、統計的な有意差があった。

本研究によりロタウイルス感染の年齢分布については、1歳から2歳までのグループには検出率が33%で、最も高かった。新生児から6ヶ月までのグループと4歳以上グループには検出率が低く、他のグループと統計的な有意差があった。または、東京、舞鶴、大阪、佐賀には2月から4月までに感染ピークがあり、各季節のロタウイルス検出率には統計的な有意差があった。ところが、札幌にはロタウイルス感染の季節性が見付からなかった。

1996-1998年には、全ての地域には圧倒的にG1が多いもののG2、G3、G4、G9も

僅かながら認められた。G9 が 1998-1999 に東京、札幌で、1999-2000 に佐賀で見られ、いずれもその年とその地域のロタウイルス陽性検体の半数以上を占め、1 型かわりに 9 型が優位な血清型となった。舞鶴には 1998-2000 に 9 型が検出されなかったが、1 型も例年より低く、2 型と 4 型の検出率が高くなった。

本研究で見つかった 9 型の遺伝子の特徴を詳しく解析してみた。1996-1999 年に検出された 9 型は VP4 遺伝子型、NSP4 亜型、RNA の e-type の Combination が P[8]-NSP4Wa-group-LongPattern で、1999-2000 年には、P[8]-NSP4Wa-group-LongPattern、P[4]-NSP4KUN-group-ShortPattern と P[4]/P[8]-NSP4KUN/Wa-group-LongPattern という混和型の 3 種類 Combination があった。VP7 遺伝子のアミノ酸 Sequence 分析により、本研究で発見された 9 型は 116E 株とのホモロジが 91.7% 以上であったことがわかった。1999-2000 年の 9 型は 1998-1999 年の 9 型とのホモロジが 96.3-96% であったが、タイの 1997 年に検出された 9 型とのホモロジが 99.1% 以上であった。且つ、1999-2000 年の 9 型は 1997 年のタイの 9 型と第 9、44、208 と 267 アミノ酸残基に同じ Mutation があった。とくに、208 アミノ酸残基が親水性のトレオニンが疎水性のイソロイシンに変わった。VP7 アミノ酸の系統樹解析は 1999-2000 年の 9 型がタイの 9 型株と最も近く、血清型の間には、9 型がウマのロタウイルス G14 と近いことが示された。三種類の 9 型モノクローナル抗体に対する反応性を比べたことから、1998-1999 と 1999-2000 年に分離された 9 型は反応性が違い、1999-2000 年の 9 型が 1997 年のタイの 9 型株と一致した。臨床的には G9 が G1-4 と差は見られなかった。

偶然で同時に下痢した親子の便から 9 型が検出され、VP7 遺伝子を Sequence してみた。大人株と子供株には 100% アミノ酸ホモロジがあった。

長期間にわたって G 血清型がどのように変化していくか調査するため、我々は、1984 年から 2000 年までの 16 年間連続的にロタウイルス血清型 G1-4 の分布を調べ、16 年間の変化趨勢がわかった。15 年間で、G1 が漸進的に上昇し、1997 年に 93% でトップになり、1999 年から突然に低くなり、これに伴い、9 型と 2 型が再出現した。

#### [結論と考察]

本研究により、1996 から 2000 年までの小児におけるロタウイルス感染状況がわかった。本感染は地域性が存在し、寒い地域には感染が低いことが示唆された。

G9 が 1998-2000 年に各地域で流行したが、1998-1999 の 9 型は 1999-2000 年 9 型と由来が異なり、1999-2000 年の 9 型の流行が 1997 年にタイの 9 型の流行となんにか関係があると示唆された。諸外国でも G9 も出現が見られ、世界的な傾向であり、ワクチンの開発に当たっては G9 も考慮する必要が考えられた。

VP7 のアミノ酸の特徴とモノクロー抗体に対する反応性により、9 型ロタウイルスが二つ或いは二つ以上のサブタイプが存在していることが初めに明らかになった。

16 年間に連続的な G 血清型を調べることから、1 型ロタウイルスの感染が自然的な流行サイクル存在していることが考えられた。

## measles vaccine failure 症例における麻疹ウイルスセプターの遺伝子解析

楠原 浩一、佐々木由佳、中尾 太  
原 寿郎（九州大学大学院医学研究院成長発達医学）  
広瀬 瑞夫（広瀬小児科医院）

### 【目的】

麻疹ワクチン後の抗体価に影響を与える遺伝的要因として、これまでHLA クラスIおよびクラスII アリルやtransporter associated with antigen processing (TAP)-2 の遺伝子多型が報告されているが、measles vaccine failure (MVF) の宿主側遺伝的要因については明らかではない。

CD46は、麻疹ウイルス(MV)とくに実験室株/ワクチン株のレセプターとして機能している。我々は、SSPEとCD46遺伝子のMVとの結合にかかわる領域(exon1～4の翻訳領域)との関連を解析する過程で、3つの新しい遺伝子多型を見出した。この中にはCD46とMV-H蛋白との結合に最も重要なアミノ酸である59Argの置換をもたらす多型(G/A176)も含まれていた。結合部位の変化によるCD46のMVワクチン株への親和性低下がMVFを引き起こしている可能性を検討するために、MVF症例におけるこれらの多型の頻度を調査した。また、昨年MVの野生株および実験室株/ワクチン株のレセプターであることが報告されたSLAM(signaling lymphocytic activation molecule)についても、MV結合部位であるIgVドメインとその5'側のleader sequenceをコードする領域の遺伝子解析を行った。

### 【対象】

#### 1)MVF症例14名

ワクチン接種前後や自然麻疹罹患時の麻疹抗体の推移に基づく推定により以下の2群に分類した。

primary vaccine failure(PVF) : 4名  
secondary vaccine failure(SVF): 10名

#### 2)対照群

CD46: 小児科患者および健康成人計32名、SSPE患者40名  
SLAM: 正常小児9名

### 【方法】

#### 1) cDNAの作成 :

末梢血単核球から抽出したRNAからFirst Strand cDNA合成キット(Pharmacia)を用いてcDNAを作成し、PCRのtemplateとした。

#### 2) PCRとsequencing

CD46については、そのcDNA 3か所に設定したprimerを用いてsingle PCRまたはsemi-nested PCRを行い、direct sequencingによってexon 1の翻訳領域およびexon 2～exon 4 (SCR-1, 2をコード)の塩基配列を決定した。SLAMについても、cDNA 3か所に設定したprimerを用いてsemi-nested PCRを行い、direct sequencingによってexon 1の翻訳領域～exon 2 (leader sequenceとIgVドメインをコード)の塩基配列を決定した。

#### 3) RFLP(restriction fragment length polymorphism)

SLAMのleader sequenceに見出された新しい多型(C/A33)を検出するために、対照群9名および上記のsemi-nestedPCRでbandが得られなかったMVF症例6名の血液から抽出したDNAを鋳型としてexon 1内のPCRを行い、DdeIを用いたRFLPを行い遺伝子型を決定した。

【結果】

1) CD46 exon 1-4 翻訳領域の塩基置換の頻度

塩基置換	アミノ酸置換	例数			
		MVF	対照群	SSPE	合計
38 C→T*(exon 1)	13 Ser→Phe (leader seq.)	2# (14%)	2 (6%)	2 (5%)	6 (7%)
453 C→T*(exon 4)	なし				
176 G→A*(exon 2)	59 Arg→Gln (SCR-1)	0 (0%)	1 (3%)	0 (0%)	1 (1%)
なし		12 (86%)	29 (91%)	38 (95%)	79 (92%)
合計		14 (100%)	32 (100%)	40 (100%)	86 (100%)

\*ヘテロ接合、#PVF1例+SVF1例

2) SLAM exon 1-2 翻訳領域の塩基置換の頻度

semi-nested PCR でbandが得られたMVF症例8名のうち4名にC/A33をヘテロで検出した。この多型はleader sequenceのアミノ酸置換(11Phe→Leu)を伴っていた。他の塩基には全例で置換を認めなかった。

3) SLAM C/A33 多型の頻度 (PCR+direct sequencing またはRFLPによる)

塩基置換	アミノ酸置換	例数		
		MVF	対照群	合計
33 C→A*(exon 1)	11 Phe→Leu (leader seq.)	4# (29%)	2 (22%)	6 (26%)
なし		10 (71%)	7 (78%)	17 (74%)
合計		14 (100%)	9 (100%)	23 (100%)

\*ヘテロ接合、#SVF4例

【考察】

CD46 exon1-4の翻訳領域では、MVF14名中2名にleader sequenceのアミノ酸置換を伴う多型をヘテロで認めた。頻度は、対照群やSSPE患者よりやや高かったが、例数が少なく有意ではなかった。また、G/A176を含めウイルス結合部位であるSCR-1,2にアミノ酸置換を生ずる塩基置換は認めなかった。SLAM exon1-2の翻訳領域については、14例中2例にleader sequenceのアミノ酸置換を伴う多型を認めたが、対照群と同頻度であった。direct sequencing可能であった8名にはウイルス結合部位であるIgVドメインにアミノ酸置換を生ずる塩基置換を認めなかった。今回の検討では、麻疹ウイルスレセプターのウイルス結合部位のアミノ酸配列とMVFとの有意の関連は見出せなかった。今後、さらに症例を集積しSLAM遺伝子の他の領域も含めて検討を行う予定である。



## 新しい国産不活化ポリオワクチンの小児への接種

若林 建吾、安部 忍、堀江 均、土居 穰、橋爪 壯（日本ポリオ研究所）  
千葉 峻三（札幌医大・小児科）  
平山 宗宏（母子愛育会日本子ども家庭総合研究所）

【目的】経口生ポリオワクチンによるポリオワクチン関連麻痺を抑制し、世界からポリオウイルス撲滅のため、安全で有効な不活化ポリオワクチンの開発を目指している。今回、ポリオウイルス弱毒株を用い製造された不活化ポリオワクチン (IPV-JP) が実際の接種対象者であるポリオワクチン歴の無い小児に対して行った臨床試験結果を報告する。

【材料および方法】 IPV-JP 弱毒ポリオウイルス1型、2型、3型の Sabin 株をそれぞれ Vero 細胞で増殖させ、濃縮精製後フォルマリンで不活化した。各型の不活化ポリオウイルス液を混合し、保存剤として2-フェノキシエタノールを0.5%に添加した。接種は0.5mLを皮下注射した。

対象者 生後3～90ヶ月で生ポリオワクチン未接種の健康な男女小児。

試験方法 IPV-JP を4週間隔で2回皮下接種し、その2週後に1回目の OPV、更に6週後に2回目の OPV を接種した。試験期間中、1回目の IPV-JP 接種前、2回目の IPV-JP 接種の2週後、1回目の OPV-JP 接種の6週後の3時点で血中中和抗体価を測定し、有効性の判断材料とした。安全性に関しては、各ワクチン接種後1週間の体温測定および毎日の自他覚症状の観察を保護者が行い、各ワクチン接種日の4回の通院日に担当医師が診察を行った。保護者の観察記録および担当医師の判断で有害事象および副作用を記録した。

中和抗体測定 HEp2C 細胞を用いたマイクロ法で試験を行った。試験方法は WHO 推挙する方法に則り、2倍階段希釈した被験血清 (56℃30分加熱非働化) と100CCID<sub>50</sub>の各型 Sabin 株 (国内参照ウイルス) を等量混合し、36℃3時間および4℃一夜の中和を行った後、細胞浮遊液と混合し、37℃で7日間培養した。50%血中中和血清希釈倍数の逆数を抗体価とした。

【結果および考察】 開始症例数108例、有効評価症例数100例行い、IPV-JP に関連する副作用と思われるもので、重篤なものはなく、IPV-JP 接種後に2～3日で消失する発赤が22例 (15人) で認められたのみであった。またポリオ中和抗体に関しては、IPV-JP の2回接種後、全ての型にお

いて明らかに有効な上昇がみられた。なお、施設間、男女に有意差は認められなかった。その後の OPV の1回接種の効果は、IPV-JP 接種によって十分高い抗体価を示した場合には認められなかったが、比較的上昇が低い場合には更なる抗体価の上昇として認められた。以上の結果から IPV-JP は安全で有効な優れたポリオワクチンであることが示唆された。

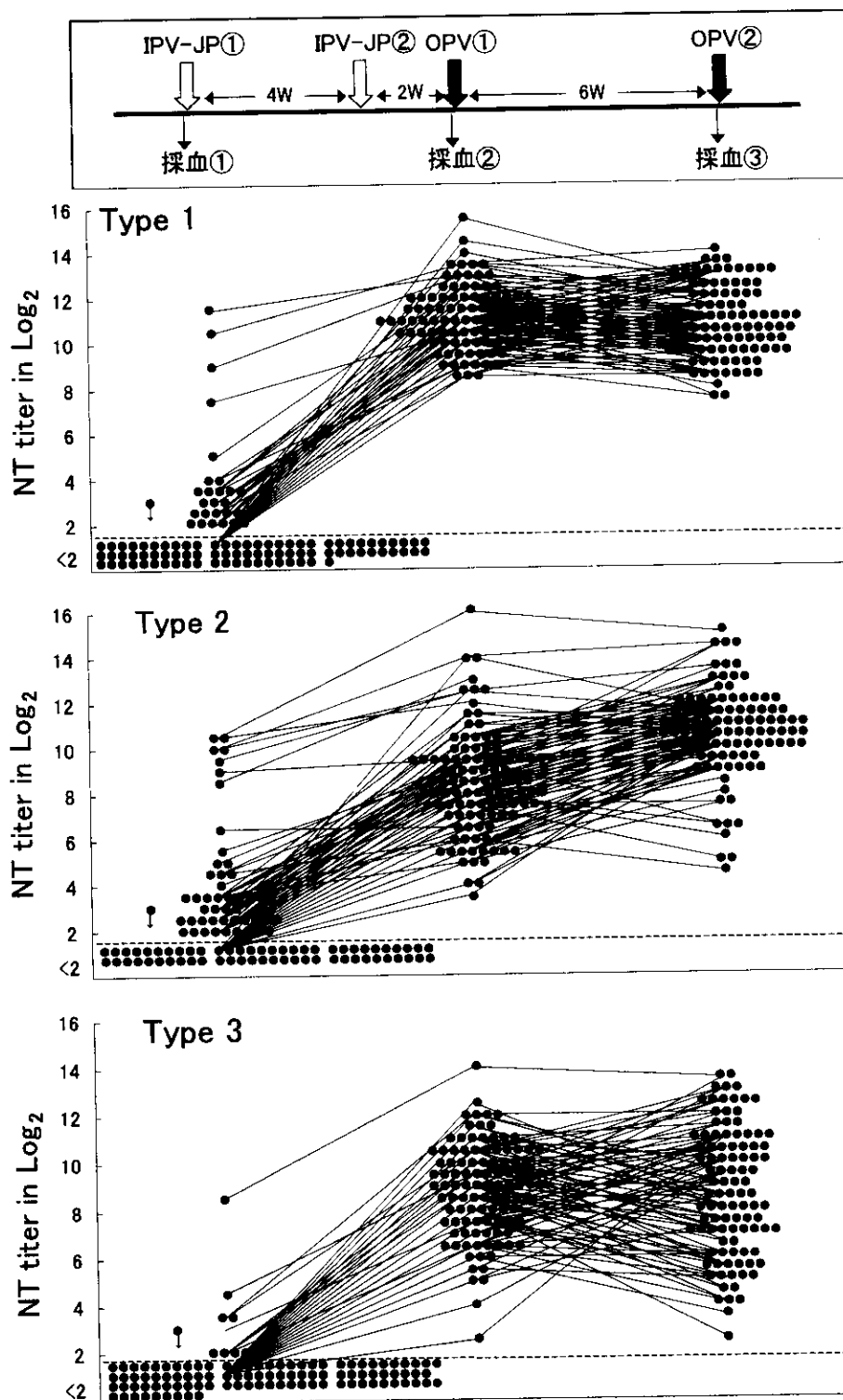


図 接種スケジュールと血中中和抗体価の変動

# 百日咳罹患調査集計報告

—平成12年（2000年）次（3年度）報告—

## 集計担当

堺 春美、木村三生夫

百日咳罹患調査協力機関、担当者（順不同）

布上 董（中村学園大学）、入部 兼繁（市立熊本市民病院）、出口 雅経（出口小児科医院）

## 集計担当

堺 春美、木村三生夫

百日咳罹患調査協力機関、担当者（順不同）

布上 董（中村学園大学）、入部 兼繁（市立熊本市民病院）、出口 雅経（出口小児科医院）

## 【目的】

本年度は、わが国が1981年に世界に先駆けて改良百日咳ワクチンに全面的に切りかえてちょうど20周年となった。その間における各方面の努力が実り、わが国の百日咳流行はほぼ抑止された。

しかし、百日咳菌がわが国から消滅したわけではなく、百日咳患者はきわめてわずかではあるが発生している。百日咳はワクチンによって根絶できる疾患ではなく、絶えざる努力によってワクチンの接種率を高く維持することによって、流行を抑止すべき疾患である。本年度も従来年度と全く同様の方法で百日咳患者調査を行い、わが国の百日咳の実態を知ることを目的とした。

## 【方法】

あらかじめ研究協力者を募り、従来と同一の様式の調査表を配布した。2000年4月から2001年3月までに報告された調査票について、例年と同様に集計した。

## 【結果】

報告された例数（発端者および、詳細な記載のある家族内発生例）は、計26例、内訳は中村学園大学10例、市立熊本市民病院4例、出口小児科医院12例であった。昨年度報告数（76例）を大幅に下回り、一昨年度の報告数（28例）のレベルまで下がっている。

性別は男14例、女12例であった。小児が25例、年齢は1月（生後41日）から11歳、成人が1例、年齢は34歳であった。全体の53%（14/26）は3歳未満であり、入院例も3歳未満に多かった。（表1）脳症合併例はなく、死亡例もなかった。

表1. 百日咳患者年齢、入院の有無（2000年度報告分）

年齢	例数	入院	入院率
0-2月	1	1	100%
3-5月	2	2	100%
6-11月	4	1	25%
1歳0月-1歳5月	2	0	0%
1歳6月-1歳11月			
2歳0月-2歳5月	4	1	25%
2歳6月-2歳11月	1	1	100%
3歳	1	0	0%
4歳			
5歳	1	1	100%
6歳	3	1	33%
7歳	3	0	0%
8歳			
9歳	2	1	50%
10歳			
11歳	1	0	0%
13歳			
14歳			
27-42歳	1	0	0%
合計	26	9	34%

DPTワクチン歴のある例が5例あった。（表2）表3にそのまとめを示す。

1期初回のみで2歳1月児の例は接種と罹患の間隔は1か月であった。

1期3回終了の2例では、いずれも3回目の接種から4年後の罹患であった。

1期追加接種完了例では、7歳児例は、追加接種完了後5年、11歳児例は追加接種完了後8年を経過してからの罹患であった。

表3. DPTワクチン歴あり例のまとめ

接種回数	症例数	年齢
1期初回のみ	1	2歳1月
1期2回目まで	0	
1期3回目まで	2	5歳（入院）、6歳
1期追加完了	2	7歳、11歳
歴あるも詳細不明	0	
合計	5	

菌分離が行われた例はなく、26例全例で凝集抗体価が測定され、2例を除く24例で東浜株あるいは山口株で20倍以上であった。