

風疹ウイルスの弱毒化の分子的基盤に関する研究 —TO-336 ワクチン株の 5'領域の役割—

牛島 廣治、柿澤 淳子、沖津 祥子（東京大学大学院医学系研究科国際保健学専攻発達医科学）

〔背景と目的〕

風疹ウイルスは Togaviridae 科に属する、約 10,000 塩基の 1 本鎖+RNA ウイルスである。5'末端側に 2 つの非構造蛋白 (p150 と p90) と 3'末端側に 3 つの構造蛋白 (C, E2, E1) がコードされている。1967 年富山県の患者より分離された野生株ウイルス (TO-336wt) と、TO-336wt から弱毒化して得られたワクチン株ウイルス (TO-336vac) の全塩基配列について昨年報告した。TO-336vac は TO-336wt とは核酸で 21 個の違いがあり、その結果として 10 個のアミノ酸の置換が見られた。核酸 21 個の変異のうち、13 個は非構造蛋白翻訳領域 (NSP-ORF) にあり、5 つは構造蛋白翻訳領域 (SP-ORF) に、後の 3 つは非翻訳領域 (UTR) にある。10 個のアミノ酸の置換のうち 2 つはプロテアーゼ領域に、2 つはヘリカーゼ領域に、2 つは E1 領域に、残りの 4 つは機能が不明な領域にあった。さらに、塩基配列が報告されている 2 つのワクチン株、RA27/3 と Cendehill とともに比較した。RA27/3 では弱毒化決定部位が、5'末端から核酸 816 番目までの領域、NSP-ORF、SP-ORF の 3 領域に見い出されている。この事を考慮すると TO-336 株においても同様の部位が弱毒化に関係すると思われる。その初めとして 5'末端側領域についてウイルスの増殖およびプラーク形態との関連を調べて検討した。

〔方法〕

TO-336vac の変異のうち 5'末端から 36, 999, 1327, 1708, 1757 番目の 5 つの核酸に注目した。ところで pRobo402 は既に Therien 株 (野生株) から作られた感染性 cDNA である。ここでは、上記 5 個の核酸変異を含む、pRobo402 の 5'末端から 1871 番目までの領域を TO-336vac または TO-336wt と置換し、2 つのキメラウイルス (TOvac-Robo と TOwt-Robo) を作製した。これら 5 個の変異がウイルスの増殖およびプラークの形態に及ぼす影響を見た。

〔結果〕

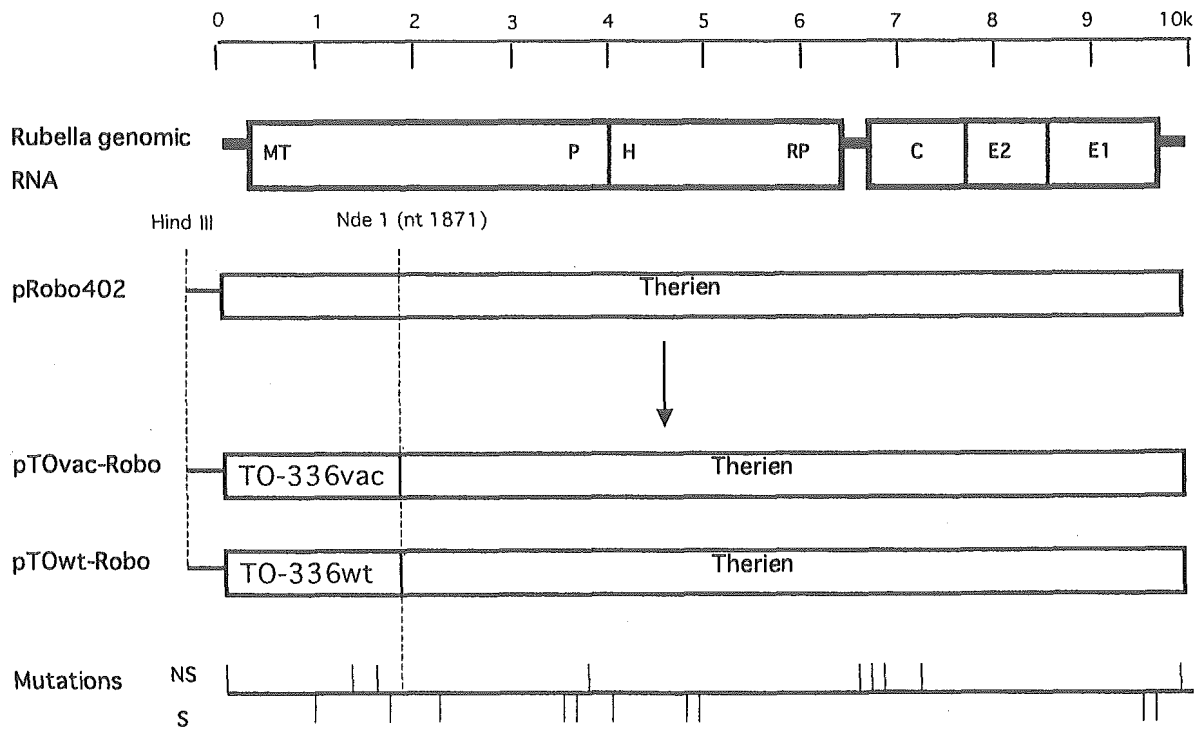
総じて 5 つの変異は培養 11 日間の 1-3 日目にウイルスの増殖に影響を及ぼしていた。しかしながらプラークサイズに殆ど違いは見られなかった。従って、5 つの変異はウイルスの増殖に何らかの影響を示していた。

〔考察〕

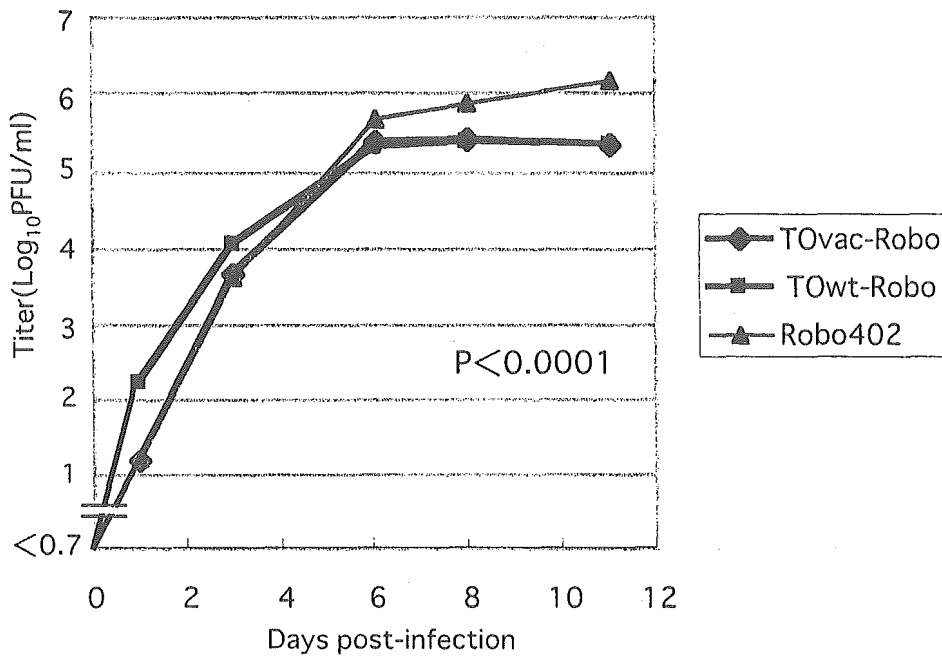
今回は 5 個の変異に注目して弱毒化に関与する部位の検討をするため、その他の部位は Therien 株を用いた。その結果どの変異かは決定できなかったが、5 個の変異はウイルスの増殖に感染早期に関係していた。今後、5 個の変異のどこに決定部位があるかということと、RA27/3 で見られた NSP-ORF、SP-ORF の部位についても検討する必要がある。

[謝辞]

この研究は、国立感染症研究所で行われ、加藤茂孝、海野幸子、田代真人先生に深謝します。



Structure of rubella virus genome and construction of plasmid pTOvac-Robo and pTOwt-Robo



Growth curves of TOvac-Robo, TOwt-Robo and Robo402

ムンプスウイルスの国内分離情況

加藤 篤、久保田 耐、田代 真人 (国立感染症研究所ウイルス第三部)

【目的】流行性耳下腺炎、通称おたふくかぜは、耳下腺の腫脹、発熱や全身倦怠感、食欲不振、頭痛などを特徴とするムンプスウイルスによって引き起こされる主に幼小児の感染症である。おたふくかぜを予防する唯一の方法は乾燥弱毒生おたふくかぜワクチンの接種である。わが国のおたふくかぜワクチンは1981年に初めて弱毒生ワクチンとして出荷され、一時期麻疹、風疹ワクチンと混合してMMRワクチンとして定期接種された時期もあった。しかし、現在は単味ワクチンとして任意接種されている。

ワクチンが開発される以前は、ほぼ3~4年毎におたふくかぜの大きな国内流行が起きていたが、ワクチンの普及に伴い1989年以降久しく見られなくなっていた。ところが、2000後半から2002前半にかけて再び全国的に大きな流行が起きたため、我々は各地の衛生研究所の協力を仰いで、分離株を収集し、その遺伝子型別を行うことによりどの様な株が国内で流行しているのかを確かめ、現行ワクチン株との比較を行うことを目的とした。

【材料と方法】自然感染症例の患者より分離されたムンプスウイルス株を各地の衛生研究所から分与を受けて試験に供した(表1)。共通プライマーを用いたRT-PCRによりSH遺伝子部分を増幅して塩基配列を決定し、データベース上の他の株との同一性を比較してA~Kの11種類の遺伝子型を同定した。それぞれの遺伝子型のウイルスから任意の一株を選んでそのHN遺伝子の塩基配列を決定し、HN遺伝子に基づく株型別とSHの遺伝子に基づく株型別結果と比較した。ウイルス中和試験は、B遺伝子型に属するワクチン株を接種したサル血清を用いてG株とK株に対して定法に従って行った。

【結果】

SH遺伝子にもとづく株型別

北海道、岩手県、神奈川県、新潟県、愛知県、愛媛県、岡山県、鹿児島県の各地で2000~2002年に分離されたムンプスウイルス70株についてSH遺伝子の塩基配列を決定したところ、今までに報告されていないSHの塩基配列が23種類見つかった。それぞれの株はこの新しい23種類の配列のどれか、あるいは過去に報告された配列のどれかに属した。同一地地域でも異なる配列を持つウイルスが得られることから、今回の流行は、時間的にも地理的にも単一株によ



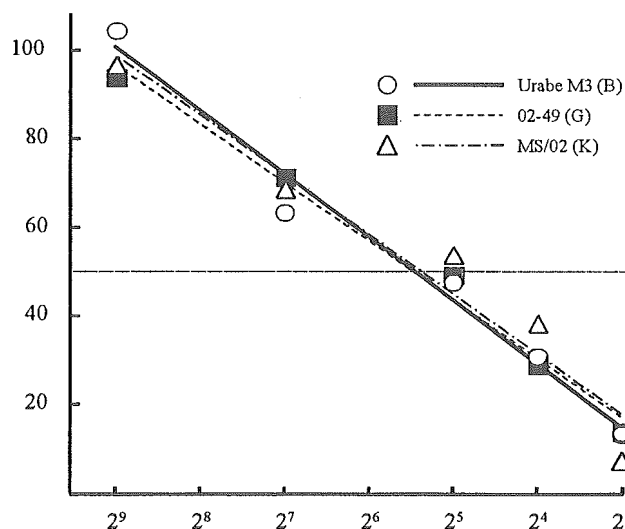
る流行ではないことを示された。配列に基づいての株型別を行ったところ、大半の分離株は G(37/70) あるいは K(11/70)型に、この他の少数の株が H 型または A 型に属しており、現行生ワクチンが由来する 1989 年以前の国内分離株(B 遺伝子型)とは別の遺伝子型を示した(上図)。ただし、旧来の B 遺伝子型がまったく無くなったわけではなく、少数(6/70 株)ではあるが依然として分離された(表 1)。今回の流行の主体になった株は以前から国内にあった株が再流行したのではなく、新しい株の流行であることが示された。

HN 遺伝子の配列

ムンプスウイルスの SH 遺伝子は変異を許容する度合いが高く、遺伝子型別の標的として使われている。ところが、感染防御に関わる抗原性の変化には、むしろ HN あるいは F 遺伝子の変化が重要である。そこで、SH 遺伝子で A、B、G、H、I、K 遺伝子型に分類されたウイルスから任意に一株を選び、HN 遺伝子の蛋白質コード部分の配列を決定した。HN 遺伝子の変化は SH 遺伝子に見られた変化よりも割合としては少ないものの確かに認められ、このことから近年流行株の抗原性が変わりつつあることが予想された。

ウイルス中和試験

HN の配列に変化から HN の抗原性が変化している可能性があるものの、それが即ち B 遺伝子型のワクチンが他の遺伝子型の新型株に対して防御効果が弱くなっていることを示すものではない。そこで、より直接的に B 遺伝子型のワクチンである Hoshino 株を接種して 3 週後のカニクイザルの抗血清を用いて、同じ B 遺伝子型に属する Urabe 株と、新潟県で 2001 年に分離された K 遺伝子型に属する 02-49 株、北海道で 2002 年に分離された G 遺伝子型に属する MS/02 株との中和曲線を比較した。Vero 細胞を用いたブラック減少法で比較したところ、50%中和指数で三つの株の間で差は認められなかった(下図)。このことは、B 遺伝子型ウイルスと G あるいは K 遺伝子型ウイルスの間には、決定的なウイルス中和抗原の違いは認められなかった。



【考察】なぜ、2000 年～2002 年のムンプスウイルスの流行が起きたのかの原因を知ることは公衆衛生上大切なことである。そこで各地の地検の協力を得て流後期の 70 株を収集し、どのような株が流行したのかを SH 遺伝子型別により調査をした。この結果、配列の異なる複数の株が流行していたことが判った。遺伝子型別から流行の主体は、過去の分離株とは異なる G 型株が 37/70、K 遺伝子型 11/70 であり、ワクチン株と同じ B 遺伝子型は 6/70 であることが判明した。このことは、大幅な株の入れ替えが全国的に起こっていることを示している。このような新しい遺伝子型の株の出現は、日本だけにとどまらず、韓国、スウェーデンでも報告されており、世界規模で起きている可能性を示唆

している。少なくとも SH 遺伝子に塩基置換が見られる場合には HN 遺伝子も頻度は低い塩基置換が見られる。このことから、抗原性にも変化が現れている可能性も考えられるが、我々が実験した限りでは G 及び K 遺伝子型の代表ウイルスは B 遺伝子型のウイルスと同様に B 遺伝子型に属するワクチン抗体で同じように中和される。このことから、すべてのウイルスについて試して訳ではないものの、今のところは遺伝子型間で中和抗原エピトープには大幅な変化は起きていないと言えると思われる。

となると、現行ワクチンの効果が減弱したという事実はないことになる。表に示した患者の年齢は幼少児であり、以前の流行パターンと変化はない。仮に、ワクチンの効果が現弱していたならばより年齢の進んだ患者の数が増えそうであるが、それは観察されていない。これらの事実もワクチンの有効性を支持しているものと考えられる。では、なぜ新しい遺伝子型の株が出現したのかについては、今回の試験ではウイルス学的あるいは免疫学的な要因を明らかにできなかった。

Sample name	Isolation (year)	Genotype	Clinical symptoms	Source	Sex	Age (year)	Location (prefecture)	Accession number
1045	2000	G	P	TS	F	2	Ehime	AB115997
1443	2000	K	LN	TS	F	12	Ehime	
011184L	2000	G	P, M	-	F	-	Kanagawa	AB116014
001349L	2000	H	M	CSF	-	-	Kanagawa	AB116015
1282	2001	G	M	CSF	M	4	Ehime	AB115998
1498	2001	G	URI	TS	F	4	Ehime	
1631	2001	G	M	CSF	M	9	Ehime	AB115999
888	2001	G	P	TS	M	11	Ehime	AB116000
778	2001	G	F	TS	F	4	Ehime	
1083	2001	G	P	TS	M	5	Ehime	
1431	2001	G	F	TS	M	4	Ehime	
1162	2001	G	M	TS	M	5	Ehime	
1550	2001	G	F	TS	M	7	Ehime	AB116001
13	2001	G	M	TS	M	3	Ehime	AB116002
293	2001	G	F	TS	M	6	Ehime	
1589	2001	G	P	TS	M	3	Ehime	AB116003
804	2001	B	F	TS	M	4	Ehime	AB116004
850	2001	B	P	TS	F	9	Ehime	
1301	2001	B	P	TS	F	3	Ehime	
1315	2001	B	P	TS	M	5	Ehime	
938	2001	B	P	TS	F	5	Ehime	
851	2001	K	P	TS	F	8	Ehime	AB116006
893	2001	K	P	TS	F	4	Ehime	
975	2001	K	URI	TS	F	1	Ehime	
1199	2001	K	P	TS	M	5	Ehime	
96	2001	G	M	CSF	F	1	Ehime	
1155	2001	G	M	TS	F	3	Ehime	
1244	2001	G	M	CSF	M	4	Ehime	
1245	2001	G	F	TS	F	10	Ehime	
01-2204	2001	A	M	CSF	M	4	Kagoshima	
01-2205	2001	A	M	CSF	M	5	Kagoshima	
011107L	2001	G	M	CSF	-	-	Kanagawa	AB115970
011140ts	2001	G	M	TS	-	-	Kanagawa	
01-19	2001	K	P	TS	F	2	Niigata	
02-49	2001	K	P	TS	F	12	Niigata	AB116016
10879/00	2001	G	M	TS	M	8	Aichi	
20301/00	2001	G	M	TS, CSF	M	6	Aichi	
4-1172	2001	K	-	-	-	-	Okayama	AB116007
36-1073	2002	G	-	-	-	-	Okayama	AB116009
18-73	2002	G	-	-	-	-	Okayama	
20-747	2002	G	-	-	-	-	Okayama	AB116013
02-31	2002	G	P	TS	-	5	Niigata	
36-1079	2002	H	-	-	-	-	Okayama	AB116011
36-1172	2002	H	-	-	-	-	Okayama	
22-119	2002	B	-	-	-	-	Okayama	
62-23	2002	K	-	-	-	-	Okayama	AB116010
62-25	2002	K	-	-	-	-	Okayama	AB116012
62-20	2002	K	-	-	-	-	Okayama	AB116008
18-58	2002	G	-	-	-	-	Okayama	
18-59	2002	G	-	-	-	-	Okayama	
62-24	2002	G	-	-	-	-	Okayama	
MS/02	2002	G	M	CSF	M	3	Hokkaido	AB116018
FK02105T	2002	G	P	TS	-	-	Iwate	
FK02107T	2002	G	P	TS	-	-	Iwate	
FK02112T	2002	G	P	TS	-	-	Iwate	
FK02118T	2002	G	P	TS	-	-	Iwate	
FK02114T	2002	G	P	TS	-	-	Iwate	AB115971
K02-20	2002	A	-	-	F	-	Kagoshima	
02-3001	2002	A	P	TS	M	10	Kagoshima	
02-3002	2002	A	P	TS	M	5	Kagoshima	
02-3003	2002	A	P	TS	F	4	Kagoshima	
02-3004	2002	A	P	TS	M	3	Kagoshima	
02-3005	2002	A	P	TS	F	10	Kagoshima	
02-3006	2002	A	P	TS	F	5	Kagoshima	
02-3007	2002	A	P	TS	M	3	Kagoshima	
02-3008	2002	A	P	TS	F	2	Kagoshima	
02-3009	2002	A	P	TS	M	7	Kagoshima	
02-34	2002	G	P	TS	F	5	Niigata	AB116017

(表 1) 2000年から2002年にかけて国内で分離されたムンプスウイルス

臨床症状は P; 耳下腺炎、M; 髄膜炎、URI; 上気道炎、F; 発熱を示す。材料は TS; 咽頭拭い液、CSF; 髄液を示す。遺伝子データベースの登録番号のないサンプルは、その塩基配列が既知あるいは、今回決めてた塩基配列のどちらかに一致していたために登録しなかったもの。

抗体測定法研究会の開催

井上 栄（大妻女子大）

宮沢 博（杏林大学）

第4回抗体測定法研究会を平成16年2月17日13-16時 感染研で開いた。出席者は、東京近辺のワクチン関係研究者・臨床家、全国のワクチンメーカー・試薬メーカー・臨床検査センターからのもので、約60人の出席があった。

発表内容は予防接種関連の抗体測定に絞らずに、迅速病原体検出法も含めることにした。9演題があり、抄録は本報告書の次ページ以下に掲載されている。特別講演として栄研化学㈱の納富継宣先生に「LAMP法の原理および特徴とSARSコロナウイルス検出への応用」をお話いただいた。

以下、各演題名と討論内容について簡単に述べる。

1. 風疹抗体測定法のための国内標準品の作製（海野ら）。2. HI法、EIA法、NT法に対する抗麻疹標準血清作製の試み（齋藤ら）。感染研がWHOの風疹、麻疹ヒト抗体の標準品を参照として国内標準品を試作した。以前から「ウイルス検査技術連絡会」などから標準品の要望があった。IgM抗体陽性血清に関しては抗体価を設定するのではなく、EIA法での検出を目的とするので、その抗体検出期間を定める必要があるとの議論があった。

3. 日本脳炎ワクチン接種集団から自然感染個体を識別するNS1抗体測定のためのELISA（小西ら）。ワクチンに含まれない非構造蛋白NS1に対する抗体を測定することで自然感染を調べることができるが、非粒子状抗原は免疫刺激能が低く、産生された抗体の濃度が低く、その持続も短いことが問題点である。

4. 逆サンドイッチELISAによる微量抗体測定—原理と応用（宮沢ら）。この測定法は、同一エピトープの繰り返しを持たない蛋白（非ウイルス粒子）に対する高親和性抗体を高感度、高特異性で測定でき、かつ異なった動物間での抗体濃度を比較できる、という利点がある。牛、豚、人血清中の腸管出血性大腸菌毒素に対する抗体濃度を比較できた。

5. インフルエンザワクチンに対する抗体レスポンスの頭打ち現象について（堺ら）。

6. 高齢者施設において、同一の入所者、職員を対象としてインフルエンザワクチン連続2年接種成績について（堺ら）。インフルエンザHI抗体価が低い個体では、ワクチン接種（1回）で抗体価が上昇したが、抗体価が高い個体では、抗体価が上昇しない例が多かった。中高年者では上昇した抗体価は持続しないが、毎年のワクチン接種で抗体価が上昇した。

7. 麻疹、ムンプスのLAMP法による迅速診断（藤野ら）。LAMP法を使って60分以内で麻疹、ムンプスウイルスの検出・定量が可能になった。ムンプス生ワクチン接種で耳下腺が腫脹した者では唾液中のウイルス量が多かった。再感染でのウイルス量は少なかった。

8. リアルタイムPCRによるデングウイルスの血清型分類（伊藤ら）。患者血清からRNAを抽出しリアルタイムPCRで感度よくデング熱ウイルスを型別検出できた。

9. IV型遺伝子を持つE型肝炎ウイルス様中空粒子の作製と抗原性の解析（李ら）。ウイルス様中空粒子（VLP）には型特異および型共通エピトープが存在するが、IV型VLPを抗原としたELISAで他の型の抗体も検出できた。

風疹抗体測定法のための国内標準品の作製

海野 幸子、加藤 宏幸、大槻 紀之（国立感染症研究所ウイルス第三部）

堀内 善信（国立感染症研究所細菌第2部）

目的

近年、風疹抗体の測定法として酵素抗体法（EIA）が普及するようになり、従来の赤血球凝集阻止（HI）抗体価と EIA による抗体価の相関性に関する情報が求められている。また、抗体測定キットによって抗体価の表示が異なるために、得られた抗体価の比較を難しくしている。異なる方法で測定された風疹抗体価を統一的に評価するためには、抗体価表示を統一し、HI 抗体価と EIA 抗体価の相関する範囲、キットの特性等が明らかにされる必要がある。そこで、抗体価表示の統一をはかるために国際標準品に準拠した国内標準品候補を作製した。

材料と方法

風疹の既往歴のあるヒト血清を集めて IgG 抗体測定のための国内標準品候補（JPN'03）とし、IgM 抗体測定用標準品候補（IgM-JPN'03）は、風疹に自然感染した発症 2 週後の成人血清を集めて作製した。国際標準品として WHO の RUBI-1-94（800 IU/ml）を用いた。EIA 抗体価はデンカ生研キットを用いて測定し、Bioassay Assist の平行定量法による解析から WHO 標準品に対する相対抗体価を算定した。HI 抗体価測定法はデンカ生研の HA 抗原を用いて、感染症流行予測調査事業検査術式に従った。血清の希釈は 2 倍希釈と 1.2 倍希釈を行った。中和抗体は、2003 年に分離された野外風疹ウイルスを用いてプラーク法で測定した。全ての抗体測定法で試料の独立した 3～4 希釈列を測定に用い、繰り返し 3 回の試験結果を解析に付した。

結果と考察

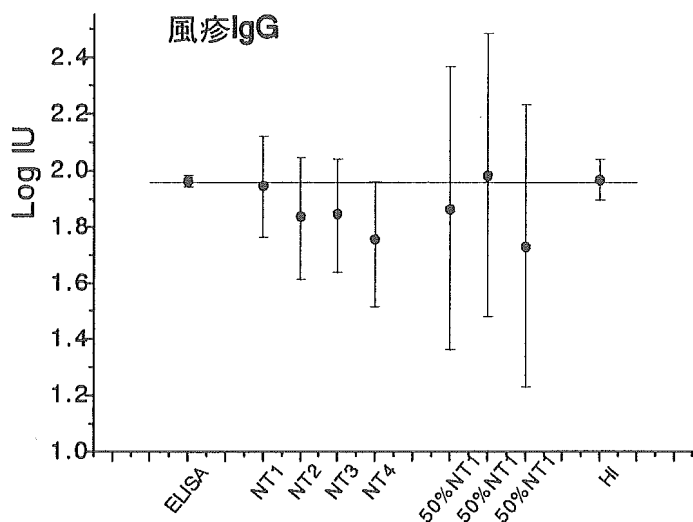
JPN'03 の EIA による IgG 抗体価：3 回の実験で得られた各用量計 9 個の測定値をそれぞれ繰り返し測定値として分析し、得られた誤差を加味して、平行線定量法で相対抗体価を算出した。

中和抗体価：WHO 標準品および国内標準品候補の 6～7 用量について中和活性を測定した。結果は対照ウイルスによるプラーク数を 100%として%に変換し、対数用量に対する中和直線を求め、平行線定量法による国内標準品候補の WHO 標準品に対する相対抗体価を求めた。この場合実測値は実験毎に異なることから、各実験独立に価を算定した。その結果は 50%プラーク抑制による中和抗体価から算出した相対抗体価とよく一致した。

HI 抗体価：1.2 倍間隔の 4 独立段階希釈系列の HI 価を測定した。全ての結果より共通分散を算定し、誤差の推定に用いた。

こうして得られた結果より、加重平均により WHO 標準品に対する国内標準品候補の抗体価を計算した。JPN'03 の IgG 抗体についての結果は図に示すように、EIA、中和、HI 何れによる測定値も、誤差の範囲でよく一致していた。国内標準品候補 JPN'03 の抗体価は 90.9(86.9 – 95.1) IU/ml と推定された。EIA、中和、HI の何れでも標準品との相対比較による測定を行うことにより、共通の結果が得られることが期待された。

IgM-JPN'03 についても、JPN'03 と同様に WHO 標準品に対する相対抗体価を計算したが、JPN'03 と異なり、EIA、中和、HI でそれぞれ全く異なる結果となった。それはこの血清に IgM と IgG 抗体が混在しているためと考えられ、IgM-JPN'03 の相対抗体価については、更に検討が必要であった。



血清に IgM と IgG 抗体が混在しているためと考えられ、IgM-JPN'03 の相対抗体価については、更に検討が必要であった。

HI 法、EIA 法、NT 法に対する抗麻疹標準血清作製の試み

齋藤 義弘、田代 真人 (国立感染症研究所ウイルス第3部)

堀内 善信 (国立感染症研究所細菌第2部)

【目的】

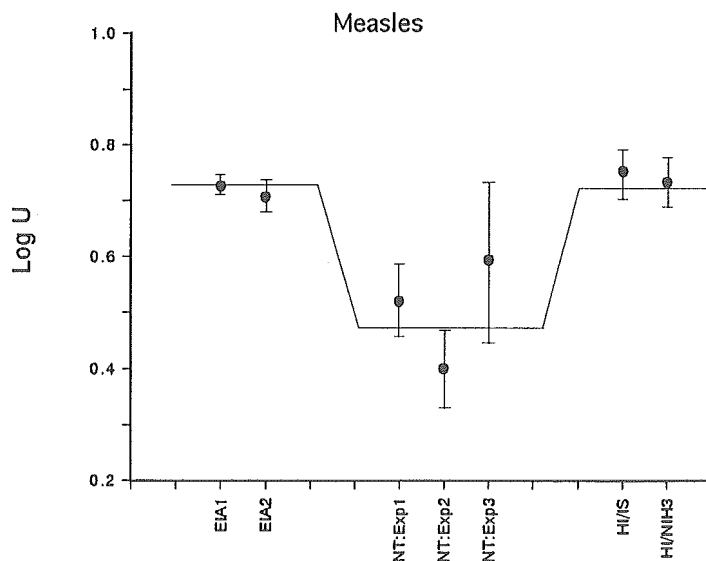
現在 WHO を中心として、血清抗体価を抗体測定方法にかかわらず統一して表示する動きがある。表示を統一することによって、国際間、施設間あるいは測定方法間の比較が可能となる。今回我々は、新たに候補品を決めて、HI 法、EIA 法、NT 法に対する国内標準血清の作製を試みたので報告する。

【方法】

麻疹国際標準血清 (2nd international standard, 66/202) は英国 NIBSC より入手し、1 アンプルを 1ml の精製水で溶解し、5IU/ml として使用した。国内標準血清の候補品としては、麻疹罹患後 1 年を経過した成人男性の血清を使用した。HI 試験は、デンカ生研の HA 抗原 (豊島株) を用い、血清の希釈は測定値の変動を見るために 2 倍段階希釈ではなく、1.2 倍段階希釈で行った。EIA 法はデンカ生研のキット (麻疹 IgG(II)-EIA) を使用し、血清を 1:200~1:25600 までの 2 倍段階希釈で希釈した。得られた吸光度を「Bioassay Assist」の平行線定量法にて解析した。中和試験は指示細胞に Vero 細胞を、攻撃ウイルスとして Edmonston 株を使用し、50% プラック減少法にて中和価を求めた。いずれの試験法においても 1 回につき 3 独立希釈で抗体価を測定し、同じ試験を 3 回繰り返すことによって国際標準血清に対する候補品の相対力価を統計学的に算出することを試みた。

【結果および考察】

今回用いた候補血清の国際標準品に対する相対力価は HI 法と EIA 法において誤差の範囲内で一致し、その力価は 5.453 (5.313~5.596) IU/ml と算出された。しかし中和試験での相対力価は、HI 法と EIA 法のそれと比較して乖離が認められ、さらなる検討を必要とした。



日本脳炎ワクチン接種集団から自然感染個体を識別する NS1 抗体測定のための ELISA 法

小西 英二、正田 瑞恵（神戸大学医学部医療基礎）

近藤 高志（JRA総研分子生物）

〔目的〕日本脳炎ウイルス（JEV）は、自然界においてブタを増幅動物、コガタイエカを媒介蚊とし、ヒト及びウマに致死性の脳炎を引き起こす。日本では過去に患者・患畜が年間数千例あったが、日本脳炎ワクチンの導入以来激減し、1992 年以降患者数は年間 10 人未満であり、患畜は 1986 年から報告がない。ワクチン導入後の患者・患畜数の減少は、ワクチンの効果を示すが、一方で、この減少は感染蚊との接触機会の減少に起因すると考えられるようになってきた。この点を明らかにするためには、現在の日本における自然感染率の調査が不可欠である。しかし、従来の血清診断法（中和試験や赤血球凝集抑制試験）では、ワクチンが誘導した抗体と、自然感染が誘導した抗体を区別することができなかった。当教室では、ワクチン接種集団の中から感染個体を識別するために、NS1 抗体を測定する免疫染色法を開発した。今回、より簡便な ELISA 法を確立するために、ウマ血清を用いて最適条件を検討した。

〔材料と方法〕抗原として NS1 連続発現細胞の培養液を用いた。ELISA 用プレートにウサギ過剰免疫血清を捕捉抗体として感作し、NS1 抗原、被検血清、アルカリフォスファターゼ標識抗ウマ IgG、パラニトロフェニールリン酸と順次反応させた。検体は、競走馬（3 歳馬）から採取された血清、北海道日高地方で飼育された JE ワクチン未接種の 1 歳馬の血清、また実験感染馬血清であった。

〔結果〕捕捉抗体の濃度は 1:10000 が適当であり、ウエルあたりの最適抗原量は 3 ng であった（培養液には通常 70-250ng/ml の NS1 抗原が含まれる）。1:100 希釈の血清濃度を用いる 1 点法のボーダーラインを、北海道日高地方（非流行地）のウマ血清で得られた ELISA 値から計算して、0.122 とした。ELISA の結果は、免疫染色法により得られた結果と定性的によく一致し（85.3%）、また定量的に相関した（ $r=0.799$ ）。実験感染馬血清を調べた結果、感染後長くとも 5 週間で NS1 抗体が陽性になることが明らかにされた。

〔考察〕日本脳炎ワクチンは、ウイルス粒子を精製してワクチン抗原に使用しているため、ワクチン接種者においては構造タンパク質に対してのみ抗体が誘導される。一方、自然感染を受けた場合は非構造タンパク質に対する抗体も誘導されるため、非構造タンパク質に対する抗体を検出することにより自然感染を受けた個体を識別できる。非構造タンパク質の中で、NS1 が最も適切な抗体検査法の抗原であると考えられる。多数検体を処理するためには ELISA 法が適すると考えられるが、これまでの報告では患者における高いレベルの NS1 抗体は測定できても、不顕性感染者における低レベルの抗体は測定できないくらいに感度が低いものであった。今回、ウマ血清においては感度高く測定する ELISA 法が確立できた。今後ヒトの NS1 抗体測定に応用したい。

逆サンドイッチ ELISA による微量抗体の測定—原理と応用

宮沢 博、坂内 久一（杏林大学保健学部）

佐藤彰一郎（長野県衛生公害研究所） 井上 栄（大妻女子大）

【目的】 間接法ELISAはわずかな検体量で、クラス別に抗体価を測定できる有用な方法である。しかしながら、ごく微量な抗体を測定しようとする、非特異吸着が問題となりうまくいかないことも多い。逆サンドイッチELISAは原理的に特異抗体反応と非特異吸着とを区別し、微量抗体の測定を可能とした方法である。本法の原理と特徴について紹介する。

【原理】 逆サンドイッチELISAの反応原理はつぎの通り。1. BSAを含むcoating bufferで抗原を希釈し、薄く均一に固相化する。2. 検体血清を反応させる。3. ビオチン化抗原を反応させる。4. ストレプトアビジン酵素複合体を反応させる。5. 基質を加えて検出する。本法では特異抗体の片手が固相上の抗原、もう一方の手が液層中のビオチン標識抗原を捕えてはじめて反応が成立する。一方、非特異的に吸着した抗体では液層中抗原を捕らえられないので反応は起こらない。このように特異反応と非特異吸着の分別ができるので、バックグラウンドが極めて低く抑えられ、検出感度が向上する。検出される抗体は、多価で高親和性の抗体（IgG4以外のクラス）である。同じ測定系でさまざまな動物につかえるので、人畜共通病原体の血清疫学に利用できる。またウサギなどの免疫血清を参照血清に使用できる利点がある。

【応用例】 ヒト、ブタとウシ血清中のverocytotoxin (VT)抗体測定

デンカ生研より分与いただいたVT1と抗VT1ウサギ血清を用いて逆サンドイッチ系を作製した。まずVT1 0.3 $\mu\text{g/ml}$ +BSA 25 $\mu\text{g/ml}$ で固相化し、血清は1:4から10倍階段希釈し反応させた。ビオチン標識VT1 (0.05 $\mu\text{g/ml}$) を反応させ、次いでSA- β -gal, 4MUGで検出した。抗VT1ウサギ血清の希釈曲線を描きブランクの2倍を1U/mlとした。この参照血清の検量線より検体の抗体濃度を求め、4 U/ml以下を陰性とした。健常成人202例、ブタ190例、ウシ93例についてVT1抗体を測定した。保有率はヒト5%、ブタ23%、ウシ99%であった。抗体陽性例の幾何平均抗体価はそれぞれ107U/ml, 203U/mlと6030U/mlであった。ヒト血清について逆サンドイッチELISAと間接法ELISAとを比較した結果、およそ20倍の感度差があった。血清をProtein G sepharose 処理すると逆サンドイッチ抗体活性はほとんど除去され、活性の主体はIgGであった。

【留意点】 逆サンドイッチELISAには可溶性抗原が適する。抗原の繰り返しがあると両手がふさがってしまうと考えられるためである。抗体以外でも陽性となりうるので、抗体がどうかは確認する必要がある。

インフルエンザワクチンに対する抗体レスポンスの頭打ち現象についてー 1997-1998 年シーズン以来連続 7 シーズンにわたる 高齢者施設におけるインフルエンザワクチン接種の経験から

堀 春美（東海大学医学部公衆衛生・社会医学、東海大学医学部小児科予防接種センター、
東海大学医学部・医学部付属病院・健康科学部保健管理室）

木村三生夫（東海大学）

【目的】インフルエンザ予防接種は、既存の免疫のあるものへの追加免疫効果を期待する予防接種であること、現行の法制化された予防接種（第 2 類疾病対象）が乳幼児・学童ではなく、高齢者を対象としていることの 2 つの点において、従来の定期予防接種（第 1 類疾病対象）異なるものである。我々は 1997-1998 年シーズン以来、高齢者施設において、施設入所者および成人職員を対象としてインフルエンザ予防接種を柱としたインフルエンザ対策を行ってきた。その結果、成人・高齢者のインフルエンザワクチンに対する抗体反応は、従来の D P T、D T、麻疹ワクチンなどのプライマリの免疫を付与するために小児に接種されるワクチンに対する抗体反応とは様相を異にすることがわかったので報告する。

【方法】1997-1998 年シーズンより 2003-2004 年シーズンまでシルバーリハビリテーション協会関連の青森県内介護老人保健施設 5 施設の入所者、職員を対象として、接種前採血、インフルエンザワクチン接種を行ってきた。対象者総数は、入所者約 450 名、職員約 450 名、合計約 900 名である。そのうちの 2 施設では、接種後採血、流行後採血、罹患調査を行っている。血清 H I 抗体検査は、青森県環境保健センターで国立感染症研究所指針に従って行った。抗原は毎年の各ワクチン株である。

【結果】2001-2002 年シーズンの結果を紹介する。入所者 246 名、平均年齢 80.8 歳（50 歳台 3 名、60 歳-103 歳 243 名）、職員 204 名 平均年齢 34.5 歳（1 名 70 歳台、20 歳-59 歳 203 名）の抗体測定結果を表 1 に示す。いずれの型でも入所者は職員に比較して $\geq 1:10$ 抗体保有率、 $\geq 1:40$ 抗体保有率、幾何平均抗体価（GMT）ともに低い。接種前後での 4 倍以上の抗体上昇率は、職員か入所者であるかによってより、（すなわち、年齢の影響より）接種前抗体価の影響の方が大きい傾向があったので、入所者、職員合わせて、接種前抗体価別に 4 倍以上上昇した例の割合を比較した。いずれの型においても、接種前抗体価が 20 以下であると 4 倍以上上昇率が 50%-60%であったのに対して、接種前抗体価が 40 以上であると、4 倍以上上昇率は、極端に低下し、10%-20%台であった。

表1. インフルエンザワクチン接種前後の抗体保有状況 2001-2002年シーズン

		A/ニューカレドニア /20/99(H1N1)				A/パナマ/2007/99 (H3N2)				B/ヨハネスバーグ /5/99			
		入所者		職員		入所者		職員		入所者		職員	
例数		207		144		207		143		206		144	
4倍以上上昇率		105	51%	64	44%	98	47%	46	32%	85	41%	43	30%
≥1:10抗体 保有率	接種前	77	37%	110	76%	121	58%	125	87%	106	51%	127	88%
	接種後	171	83%	139	97%	189	91%	141	99%	178	86%	143	99%
≥1:40抗体 保有率	接種前	29	14%	56	39%	54	26%	58	41%	38	18%	80	56%
	接種後	118	57%	118	82%	143	69%	116	81%	110	53%	128	89%
平均抗体価 GMT 2 ⁿ x 10	接種前	-0.16		1.19		0.41		1.22		0.10		1.68	
	接種後	1.79		3.13		2.40		2.64		1.67		3.05	

【考案】DPT ワクチンのI期追加接種の効果、日本脳炎ワクチンの追加免疫効果を見る場合のようにプライマリの免疫がついている際の接種前後追加免疫効果を知るには接種前後で血清抗体が4倍以上上昇したかどうかで判断するのが普通である。しかし、成人・高齢者におけるインフルエンザ予防接種においては、接種前後の血清HI抗体の4倍以上上昇率は、接種前抗体価に大きく左右されることが明らかとなった。ワクチンの免疫原性を血清HI抗体の4倍以上上昇率で単純に比較することができず、また、集団ないし個人の体液性免疫反応の強弱を単純に血清HI抗体の4倍以上上昇率で述べ立てることもできない。また、抗体反応の強弱の境となる40倍という抗体価（以前の表示法では128倍）は感染防御レベルとされるものである。すなわち、成人・高齢者におけるインフルエンザワクチン接種においては、ワクチン株に対する血清HI抗体価が丁度感染防御レベルのところまで頭打ちになってしまう現象があることが明らかとなった。同じ型のワクチン株を毎年接種すると、抗体反応をする個体が減ってしまうことになる。また、40倍で頭打ちになっているので、2管程度のインフルエンザウイルスのantigenic driftがあるとワクチンが効かないというデメリットを生じる。

高齢者施設において、同一の入所者、職員を対象とした インフルエンザワクチン連続2年接種成績について

堺 春美（東海大学医学部公衆衛生・社会医学、東海大学医学部小児科予防接種センター、
東海大学医学部・医学部附属病院・健康科学部保健管理室）
木村三生夫（東海大学）

【目的】 予防接種にかかわる抗体測定は、（１）ワクチン抗原に対して個人が抗体反応を示したか否か、（抗体反応があったことによって、ワクチンに抗原性があったと結論する）、（通常は血清抗体価の4倍以上上昇）（２）予防接種によって、抗体価がいわゆる感染防御レベルに達したか、（インフルエンザでは血清 HI 抗体価 1:40）（３）予防接種の効果はいつまで継続するか、（４）ある個体が自然感染あるいは予防接種による抗原刺激を受けたという足跡があるか（インフルエンザでは血清 HI 抗体価 1:10）否か、を知る目的で行われる。わが国において、法律によるインフルエンザ予防接種（第2類疾病、65歳以上を対象）は、2001-2002年シーズンから開始されたばかりである。したがって、高齢者に対するインフルエンザ予防接種の高齢者における抗体反応に関するデータは国内外に殆どない状態である。また、インフルエンザ予防接種は、毎年連続・継続して接種することが原則となっている予防接種である。

（超）高齢者を対象とし、毎年接種し、追加免疫効果を期待し、しかも毎年の春先にその年の秋冬に流行しそうな型を予測してワクチン製造を行わなければならないのが現行のインフルエンザワクチンの宿命である。我々は介護老人保健施設において、同一人を対象として2年連続インフルエンザ予防接種を行い、抗体反応を分析し、また、某全寮制小中学校（定員100名）に在籍している学童32名に対しても、同一人を対象として2年連続インフルエンザ予防接種を行って結果を比較したので報告する。

【方法】 2000-2001年シーズンおよび2001-2002年シーズンにシルバーリハビリテーション協会関連の青森県内介護老人保健施設2施設の入所者73名（平均年齢80.8歳）、職員76名（平均年齢35.1歳）に対して連続2シーズンにわたって、接種前採血、インフルエンザワクチン接種、接種後採血、流行後採血、罹患調査を行った。血清HI抗体検査は、青森県環境保健センターで国立感染症研究所指針に従って行った。抗原は毎年の各ワクチン株である。また、〇市E全寮制小中学校に2年連続在籍した学童32名（平均年齢9.1歳）も同様に2シーズンにわたってインフルエンザ予防接種ならびに採血を行って血清HI抗体を測定した。

【結果】 2000-2001年シーズンおよび2001-2002年シーズンのインフルエンザワクチンは、A/ニューカレドニア/20/99 H1N1、A/パナマ/2007/99 H3N2 が共通して含まれていた

ので、この2株について血清 HI 抗体価の推移を解析した。いずれの型についても 2000-2001 年接種前 $\geq 1:40$ 抗体保有率、接種前幾何平均抗体価、接種後 $1:40$ 抗体保有率、接種後幾何平均抗体価 (GMT)、2001-2002 年接種前 $\geq 1:40$ 抗体保有率、接種前幾何平均抗体価 (GMT)、接種後 $1:40$ 抗体保有率、接種後幾何平均抗体価のすべてについて、学童、職員、入所者の順であった。職員および入所者では次年度は初年度に及ばないという結果を得た。これは、職員あるいは入所者では、同一のインフルエンザワクチンに対して、低応答、不応答になる傾向があることを示している。インフルエンザワクチンに対する体液性免疫反応の記憶について、記憶力、記憶保持能力共に学童は抜群に優れ、入所者では劣っており、職員はその中間であった。

【考案】

諸外国ならびにわが国において、定期予防接種はすべて小児を対象としたものであったが、2001 年 11 月の予防接種法改正によって、65 歳以上を対象としたインフルエンザ予防接種は第 2 類予防接種として法制化された。わが国の平均寿命は 1947 年には、男 50 歳、女 54 歳であった。地球上には、現在でもこのレベルの国が多数ある。このような状況の中で、わが国のインフルエンザ予防接種は (1) 既存の免疫のある集団ないし個体に追加免疫効果を期待して行う、(2) 65 歳以上の集団という世界的には極めて異例の集団を対象とする、という 2 つの特殊性をもつ。

インフルエンザワクチン接種による抗体反応には、被接種者が若いか (学童) か若くないか (中・高年)、接種前抗体価が低いか (20 倍以下) あるいはいわゆる感染防御レベル (40 倍) 以上か、前年度のワクチンに同じ型が含まれていたか否か、また、夏季のシーズンオフに感染を受けたか否かなど複数の因子が関与していることが明らかとなっている。インフルエンザワクチンはやればやるほど血清 HI 抗体価が上昇するものでなく、頭打ち現象があること、高齢者では、前年度と同じ型のワクチンに対して低応答、不応答になる傾向があること、体液性免疫能の記憶力、記憶保持能力が低下していることは向後の高齢者対象とするインフルエンザ予防接種において十分留意すべきである。

麻疹、ムンプスの LAMP 法による迅速診断

藤野 元子、吉田菜穂子、中山 哲夫（北里生命科学研究soウイルス感染制御1）

【目的】麻疹、ムンプスは臨床診断が主であり、血清診断が補助的に行われることが多いが時間がかかり、ウイルス分離、抗原検出はほとんど行われていない。このことは診断の不確定さを生むと共に、感染の拡大の原因ともなっている。我々は麻疹、ムンプスの LAMP 法を用いた迅速診断法を確立する事を目的とした。

【方法】麻疹の N 蛋白、ムンプスの HN 蛋白翻訳領域に 6 箇所の遺伝子配列を認識する 4 種類の primer を設定し、さらに感度を上げるため loop primer を内部に設定した。AMV reverse、鎖置換型 RNA polymerase を用い、一定温度で 60 分増幅反応を行った。1) 既知の感染価のウイルスを用いた感度の測定、2) 日本で流行を認めた各 genotype での検出感度の違い、3) 臨床サンプルでの RT-PCR 法との検出度の比較を行った。

【結果】麻疹、ムンプスともに増幅産物をリアルタイムに捉えることができた。最終産物の電気泳動ではラダーパターンが得られ、増幅領域内制限酵素処理で増幅領域に一致する長さのバンドが得られた。①麻疹分離株 (genotype D5) で約 0.1 TCID₅₀ まで検出可能であり、genotype A, D5, Chicago D3, H1 も同様に検出でき genotype 間で差は認められなかった。②ムンプス分離株 (genotype G) で約 0.01 PFU まで検出でき、genotype B, G, K, L で同様に検出感度に差を認めなかった。③臨床サンプル麻疹 6 検体で PT-PCR 陽性 LAMP 陽性 4 例、RT-PCR 陰性 LAMP 陽性 1 例、PT-PCR 陰性 LAMP 陰性 1 例であった。ムンプス 75 検体でウイルス分離陽性 30 例、RT-PCR 陽性 47 例、LAMP 陽性 48 例、RT-PCR 陽性 LAMP 陰性 1 例、RT-PCR 陰性 LAMP 陽性 2 例であった。

【考察】LAMP 法は RT-PCR と同等の感度、特異性があり、ゲノム抽出後 60 分以内の迅速診断が可能である。麻疹の定型的症状の出現する前や secondary vaccine failure に伴う非典型例、耳下腺腫脹反復例といった判断が難しい場合での鑑別診断に有用である一方、早期から隔離できるため感染の拡大防止、院内感染の予防が可能である。検量線を基にしたウイルス量の推定も可能となり、臨床病態の解析に有用な手段ともなりうる。サーベイランスの精度の向上が望め、ワクチン政策に対しても有用であると考えられる。

[本研究は栄研化学株式会社との共同研究である]

e-mail: motokof@lisci.kitasato-u.ac.jp

Real Time PCR による Dengue virus の血清型分類

伊藤美佳子、山田堅一郎、高崎 智彦、根路銘令子、
田島 茂、倉根 一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部）

デングウイルス感染症は東南アジア・南米を中心として広がっており、re-emerging infectious disease（再興感染症）の一つとして、世界的に重要な感染症になっている。わが国では国内感染のない感染症であるが、当研究室では、これらの輸入デング症例の実験室診断を実施している。流行地からの入・帰国者などによって輸入感染症として診断される症例が増加している。そこで、簡便で迅速にデングウイルス遺伝子を検出する Real Time PCR を用いた検出法を検討した。

プライマーおよびプローブは、世界の分離株を比較・検討し、各血清型間において相同性が低く、なおかつ各血清型内において保存された部位に作製した。Real Time PCR は HI 試験、IgM-ELISA、RT-PCR などにより初感染のデング熱感染を診断した検体について、1% NP-40 により患者血清を処理した後に直接反応系に用いた場合、および患者血清からウイルス RNA を抽出した後に反応系に用いた場合の 2 つの反応系について検出感度を比較した。

患者血清からウイルス RNA を抽出した場合、血清型特異的プライマーおよびプローブにより Dengue virus は高感度で各血清型に分類された。一方、1% NP-40 により患者血清を処理した場合、患者血清からウイルス RNA を抽出した場合と比較すると感度が低下した。

本法は Real Time で定量的にウイルス遺伝子量を推定できるため、患者のデングウイルス感染に対するデータを簡便で迅速に得ることができる。患者血清からウイルス RNA を抽出した検体を反応系に用いる場合は RT-PCR と比較して感度が高く、今後本法を診断法として活用していくことが可能となった。

IV型遺伝子を持つE型肝炎ウイルス様中空粒子の作製と 抗原性の解析

李 天成、武田 直和、宮村 達男（国立感染症研究所ウイルス第二部）

【目的】E型肝炎ウイルス (HEV) は経口伝播型急性肝炎の重要な病因ウイルスのひとつである。まだ増殖のための培養系はない。HEV には少なくとも 4 つの遺伝子型 (Genotype) が存在する。血清型は全て同一であろうと推測されているが、明確な実験データはない。Genotype 間の構造蛋白のホモロジーは核酸で 80%前後、アミノ酸レベルで 90%以上である。ワクチンの開発、ならびに高感度抗体検査法を確立するためには HEV の血清型の違いを明らかにしておく必要がある。

【材料と方法】急性 E 型肝炎患者血清中に HEV Genotype IV(GIV)の遺伝子を同定した。構造蛋白をコードする ORF2 の全長及び N 末端から 111 アミノ酸を欠失した領域を RT-PCR 法で増幅した。増幅産物を用いて定法どおり組換えバキュロウイルスを作製し、構造蛋白をウイルス様中空粒子 (VLP) として発現した。ウサギ抗 VLP 抗体、E 型肝炎患者血清、単クローン抗体を用い、ウェスタンブロット法と ELISA 法で GI VLP と GIV VLP の抗原性を比較した。

【結果】GIV VLP を抗原に用いた ELISA 法で、GI、GIII、GIV HEV に感染し E 型肝炎を発症した患者血清から高感度かつ特異的に IgG、および IgM 抗体を検出した。GI VLP のみならず GIV VLP を抗原用いた ELISA 法も E 型肝炎の診断に有用であった。単クローン抗体を用いた解析の結果、Genotype 間には抗原性の異なるエピトープが存在し、一部のエピトープは立体構造に依存する事が明らかになった。

【考察】本実験によって、初めてGenotype間の抗原性の比較が可能になった。VLPには抗原性の違うエピトープが存在すること、一部のエピトープの抗原性は立体構造に依存すること、等が明らかになり、これらのエピトープがワクチンの効果に及ぼす影響を検証することが今後の研究課題である。

(2) ワクチン改良の必要性
に関する臨床疫学的研究

(岡部班)

ワクチン改良の必要性に関する臨床疫学的研究

分担研究者 岡部 信彦（国立感染症研究所）

研究協力者 宮崎 千明（福岡市立西部療育センター）

研究要旨 本研究班では、ワクチン改良が求められる問題点を解析し、それにより、より安全な予防接種が実施され、我が国における感染症対策に資するための研究を行った。研究の遂行にあたっては全国の臨床医、疫学者、ワクチン関連保健行政担当者などの協力を得て、多くの情報を収集した。麻疹については、麻疹の elimination という目標に対し、また現実の年長者での麻疹発生などの対して、2 回接種導入に関する具体的な検討を始めるときが来ていると言える。風疹については風疹流行再燃の可能性を秘めており、それに伴い先天性風疹症候群発生の危険性が危惧される。事実 2003-2004 年には限定的ではあるが風疹の流行がみられている地域数は増加し、またその様な地域では先天性風疹症候群が発生しており、風疹対策は重要かつ緊急事項であるといえる。水痘・ムンプスについては、ワクチンには一定の効果があり、麻疹・ポリオなどとは同列に論じられないが、小児に対して予防することでそのメリットが高い疾患としての定期接種化などが議論された。DTP については、特に成人での予防接種の考え方導入の必要性、百日咳における新生児の危険性から早期接種の必要性などが議論された。免疫異常者に対するワクチン接種は一例一例慎重に検討し実施し、その結果を積み重ねて行くことが重要であるといえる。AND 調査は引き続き行われ、小児の神経系疾患の発生動向を知るという、貴重なデータが本年度も提供された。

本調査で理解されることは、単年度、短期間の研究調査で仕上がるものではなく、その継続性、連続性、集積性が重要である。感染症対策に重要な手段である予防接種を、より安全に推進していくための貴重な背景となるこれらの研究調査が、何らかのかたちで引き継がれることを強く望むものである

A. 研究目的

ワクチンの改良が要望される問題点等を把握するために、全国医の臨床医等から情報を収集し、ワクチンの有効性や副反応、さらに背景にある予防接種対象疾患の状況を把握して解析を行い、最終的には感染症対策の一環となる臨床疫学的調査研究の実施を目的とする。

B. 研究方法

全国のワクチン・予防接種に関する臨床医学、疫学、ワクチン研究者、各地域における予防接種事業の指導的立場の臨床医、保健行政担当者等の効力を得て、ワクチン研究を臨床研究とコーディネートするかたちで実施した。また本年度も書類（印刷および電子媒体、e-mail の使用）によって研究協力者との情報