

感受性、マーモセット及び乳飲みラットの神経病原性の程度はいずれも Y125 株 < Y213 株である。それぞれのウイルス液よりゲノム RNA を抽出精製し、RT-PCR とダイレクトシーケンスによってゲノムのほぼ全領域の塩基配列を決定した。塩基配列の解析には GENETYX-MAC を用いた。

## C. 結果

### (1-1) 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、岡山県の各地で 2000～2002 年に分離されたムンプスウイルス 60 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(表 1)。

配列に基づいて株の遺伝子型別を行ったところ、大半の分離株は遺伝子型 G(37/60)あるいは遺伝子型 K(11/60)に、この他の少数の株が H 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(図 1)。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(6/60 株)ではあるが依然として分離された(表 1)。

### (1-2) ウイルス中和試験

B 遺伝子型のワクチンである Hoshino 株を接種して 3 週間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(図 2)。このことから、少なくとも試験に用いた株に関する限り B 遺伝子型のウイルスと 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。

### (2-1) 乳飲みラット脳内接種試験

野外株(Odate 株、02-49 株)については、4～5 匹、ワクチン株(A 株及び B 株)については 9～10

匹について調べた。野外 Odate 株では 3/4、野外 02-49 株では 2/5 で水頭症の発症が認められた。一方、ワクチン A 株では 0/10、B 株では 0/9 と水頭症の発症が認められなかった。このことから、ヒトでの髄膜炎発生頻度と、ラットの水頭症発生頻度の間には、ある程度の相関があるように思われた(表 2)。

### (2-2) マーモセット脊髄内接種試験

野外株(Odate 株)接種群では 4/4、ワクチン株(C 株)接種群では 3/8 からウイルスが分離された(表 3)。ウイルス RNA は野外 Odate 株接種群では 4/4、市販ワクチン C 株では 5/8 が陽性であった。接種後 2 週目の病理組織学的検索では野外 Odate 株接種群は全例に顕著な髄膜炎が認められたのに対し、市販ワクチン C 株では軽度であった。

### (3) 同一親株から派生したウイルス性状の異なる Y125 株と Y213 株のゲノムの比較

Y125 株と Y213 株とのゲノム配列にはアミノ酸レベルで、N 遺伝子内に 2 カ所、P/V 遺伝子内に 1 カ所、M 遺伝子内に 1 カ所、F 遺伝子内に 1 カ所、L 遺伝子内に 2 カ所の合計 7 カ所に違いが見いだされた。

## D. 考察

なぜ今までにない規模で 2000 年～2002 年に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。各地の地検の協力を得て流行期の 60 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おり、流行の主体は、過去の分離株とは異なる遺伝子型 G が 37/60、遺伝子型 K が 11/60 であり、ワクチン株と同じ B 遺伝子型は 6/60 であることが判明した。このことから、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た。

ウイルスの遺伝子型の変化は、抗原性にも変化を及ぼしている可能性も考えられるため、G 及び K 遺伝型の代表ウイルスが B 遺伝子型に属するワクチン株の抗体で中和されるか否かを検証したが、我々が実験した限りでは、B 遺伝子型株同様に新型株も中和され、遺伝子型間で中和抗原エпитープに大幅な変化があるという結論には至らなかった。

実際、罹患者の年齢は幼少児であり、以前の流行パターンで見られる年齢構成と変化はない。仮に、ワクチンの効果が減弱していたならばより年齢の進んだ、二次性ワクチン効果不全(SVF)による患者の数が増えそうであるが、それは観察されていない。これらの事実は、ワクチンの有効性を支持しているものと考えられる。流行規模拡大した原因は、おそらく集団内にムンプスウイルス感受者がいつになく増えた事であろうと推察される。今後の対策として考えられるは、ワクチン接種率の向上である。

しかしながら、国産おたふくかぜワクチンには、少なからず副反応があり、ワクチン接種率向上努力を躊躇させる要因となっている。2004年厚生労働科学研究費補助金事業(医薬品安全総合事業)の永井らの報告では国産ワクチンの無菌性髄膜炎の発生頻度は 0.03~0.06%であるとしている。同調査で、野外株の感染による無菌性髄膜炎の発生頻度が 1.24%であるので、これに比べれば低い値ではあるが、海外でよく使われる Jerryl-Lynn 株が 0.0001%(Merck 社資料)である事と比べると明らかに発生頻度が高い。

ムンプスウイルスのヒトでの神経病原性を正しく評価できる実験系の導入が、副反応の少ないワクチンの開発には必須である。ハムスターあるいはマウスを用いた脳内接種試験(McCarthyら、*J. Med. Virol.*, 5:1-15, 1980)があるが、ハムスターの脳内接種試験成績を基に開発された国産ワクチンのヒトでの副反応発生率をみる限り、ヒトの神経病原性との相関は低いと言わざるを得ない。その他に乳飲みラット(Rubinら、*J.*

*Virol.*, 72:8037-8042, 1998, *ibid*, 74:5382-5384, 2000)とマーモセット(Saikaら、*J. Med. Virol.*, 66:115-122, 2002)を用いた試験が報告されている。今回我々は、Rubinらの方法に従って明らかに無菌性髄膜炎発症頻度の高い野外株と低いワクチン株を乳飲みラットの脳内に接種したところ、確かに野外株とワクチン株で差がとれ、ヒトの神経病原性と相関する結果が得られた。また同様に、齋加らの方法にしたがって野外株とワクチン株をマーモセットの脊髄内に接種したところ、野外株とワクチン株で差が得られた。すなわち、どちらの動物試験方法もムンプスウイルスの神経病原性を評価する方法として妥当であることが確認された。今後は、より多くの株で同じ様に再現されるかを確認して試験方法の妥当性を高めるとともに、ウイルス量、病変度数などのパラメーターを加えて定量的解析が可能か否かの検討が必要である。この一方で、ヒト骨髄神経芽腫由来 SH-SY5Y 細胞では、神経病原性の高いムンプスウイルスは増えやすく、低い株では増えにくいという報告もあり(Santos-Lopez, G et al., *Mirrobes Infect.* 8:332-339, 2006)、必ずしも動物実験でなくても評価できるかもしれない。いずれにせよ、さらなる検証が必要であり、すぐさま評価方法として利用できない。

千葉血清研究所では、アフリカミドリザル腎細胞を用いて分離し、ニワトリ胚細胞とカニクイザル腎細胞で継代後、再びニワトリ胚細胞に馴化させた NK-M46 株をおたふくかぜ生ワクチンの種ウイルスとして使い、国内市場に出していた。しかし、他の国産ワクチンと同様に接種後の副反応として少なからずの無菌性髄膜炎が発生したため、あらたなワクチン開発に着手していた。そのための親株が野外分離 Y7 株である。温度感受性を指標にして Y7 から継代された株が Y125 と Y213 である。齋加ら(千葉県衛生研究所)は、その株を引き継ぎ、乳飲みラット及びマーモセットを用いて神経病原性を評価したところ

Y125 株 > Y212 株 > Y7 株という結果を得た(本研究班報告書)。そこで、病原性の異なる Y125 株 と Y212 株のアミノ酸コード領域を比較したところ、わずかに N、V、M、F、L 遺伝子内の 7 カ所の違いしかないことが判明した。神経病原性と遺伝子の関連については、Urabe 株の継代の結果生じた株組成の違いと接種されたヒトでの病原性の違いをがすでに考察されており、HN 遺伝子との相関性が議論されたことがある(Amexis G., et al, *Virology* 287:234-241, 2001)。今回の解析結果に HN 遺伝子は含まれていないが、ウイルスの神経病原性を支配する遺伝子領域は、何通りもの組み合わせがある可能性があり、今回はその内の一つを示した例と思われる。7 つの変異すべてが重要なのか、あるいはさらに絞り込む事ができるのか否かについては、今後の解析が必要である。

#### E. 結論

今後もワクチンの摂取率が上がらなければ 3～4 年周期で流行性耳下腺炎が発生する。現に昨年末から再びおたふくかぜの患者数が増加している。分離株は、いまのところ遺伝子型 G に属しており、ウイルス学的性状は、前回の流行ウイルスと大差ないものと予想している。ムンプスワクチンには副反応というリスクが少なからず伴う。しかし、ワクチン接種による予防効果は十分期待できるので、社会的、経済的有効性に関する効果を検証していく事が接種率向上に必要であろう。もっともよい方策は、より安全で有効なワクチンを導入することであるが、国産ワクチンを一から開発するには、ヒトでの神経病原性を反映したウイルス病原性評価系を作る事から始めなければならず、時間が必要である。一番手っ取り早い方法は、海外から Jerry-Lynn 株を輸入する事であると思われる。

#### F. 健康危害情報

流行性耳下腺炎の大規模な流行が全国的に起

こった。この流行は 3～4 年周期で今後も続きそうである。おたふくかぜ生ワクチンは、副反応としての無菌性髄膜炎が 0.03~0.06%の頻度で発生する。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yokota S, Saito H, Kubota T, Yokosawa N, Amano K, and Fujii N, : Measles virus suppresses interferon- $\alpha$  signaling pathway: suppression of Jak1 phosphorylation and association of viral accessory proteins, C and V, with interferon- $\alpha$  receptor complex. *Virology* 306:135-146 (2003)
2. Saika S, Kidokoro M, Aoki, and A, Ohkawa T. Neurovirulence of mumps virus: Intraspinal inoculation test in marmosets. *Biologicals*, 32, 147-152. (2004)
3. Kubota, T., N. Yokosawa, S. Yokota, N. Fujii, M. Tashiro, and A. Kato. Mumps virus V protein antagonizes interferon without the complete degradation of STAT1. *J. Virol.* 79:4451-4459 (2005).
4. Kidokoro, M., M. Tashiro, and H., Shida. Genetically stable and fully effective smallpox vaccine strain constructed from highly attenuated vaccinia LC16m8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 4152-4157 (2005)
5. 杉本正信、大石和恵、木所 稔、橋爪 壮 国産天然痘ワクチンの新たな役割 蛋白質核酸酵素 48:1693-1701 (2003)
6. 加藤 篤 ウイルス感染とインターフェロンシステムからの回避 臨床免疫 41:611-616 (2004)

##### 2. 学会発表

(国際学会)

1. Kubota, T., N. Yokosawa, S. Yokota, M. Tashiro, A. Kato, N. Fujii. Association of mumps virus V protein with RACK1 results in dissociation of STAT1 from the alpha interferon receptor complex. XII International Conference of Negative Strand Viruses, Pisa, Italy, 2003 June 14-19.
2. Kato, A., C.C. Grogan, F. Sugahara, T. Sakaguchi, S.A. Moyer, M. Tashiro, Y. Nagai. Identification of the amino acid residues of Sendai virus C protein that are critically required for its interferon antagonism. XII International Conference of Negative Strand Viruses, Pisa, Italy, 2003 June 14-19.
3. Kato, A., C. Cortese-Grogan, S. A. Moyer, F. Sugahara, T. Sakaguchi, M. Tashiro, and Y. Nagai. Characterization of the amino acid residues of Sendai virus C protein that are involved in its interferon antagonism. Workshop on Replication and Cell Biology of Negative Strand RNA Viruses. Evanston, IL, USA June 12-16, 2004
4. Kidokoro, M., M. Tashiro, and H. Shida: Novel genetically stable vaccine strains constructed from vaccinia LC16m8 and m0, IVth World Congress on Vaccines and Immunology (WCVI), Tsukuba, September 30-October 3, 2004
5. Kato, A., K. Kiyotani, M. Tashiro and Y. Nagai Sendai virus strategy to circumvent the self-limiting growth due to autocrine and paracrine interferons. IUMS, ICV, San Francisco, July 23-28, 2005
1. 加藤 篤：ウイルス感染とインターフェロン・サイトカインシステムからの回避 第 68 回日本インターフェロン・サイトカイン学会 東京、2003 年 7 月
2. 小長谷昌功、斎藤早久良、荻野利夫、加藤 篤：SeV C 発現 L 細胞における 2 本鎖 RNA 誘導性細胞死の抑制と影響因子 第 51 会日本ウイルス学会総会、京都、2003 年 10 月
3. 飯田章博、井上 誠、喜納宏昭、徳炭由美子、北里海雄、朱 亜峰、加藤 篤、永井美之、長谷川護：細胞質遺伝子治療の確立へ：リバーズジェネティクスを活用した遺伝子治療用センダイウイルスベクターの開発 第 51 会日本ウイルス学会総会、京都、2003 年 10 月
4. 加藤 篤、久保田 耐、小長谷昌功、田代真人、永井美之：センダイウイルス C 蛋白質の抗インターフェロン効果と RNA 合成抑制能 第 51 会日本ウイルス学会総会、京都、2003 年 10 月
5. 木所 稔、田代真人、堀内 清、志田壽利：痘瘡ワクチン株 LC16m8 由来リバータントウイルスの生物学的性状の解析、第 51 回日本ウイルス学会総会、京都、2003 年 10 月
6. 横沢紀子、横田伸一、岡林環樹、久保田 耐、藤井暢弘：ムンプスウイルス V タンパク質による STAT1 および STAT3 のユビキチン化機構の解析 第 51 会日本ウイルス学会総会、京都、2003 年 10 月
7. 加藤 篤、小長谷昌功、久保田 耐、田代真人、永井美之：宿主自然免疫に対抗するセンダイウイルス C 蛋白質 第 26 回日本分子生物学会年会、神戸、2003 年 12 月
8. 北嶋正大、安井文彦、井上真吾、森田公一、鮫島由紀恵、村井 深、水野喬介、木所 稔、志田壽利、橋本真一、松島綱治、小原道法：組換えワクシニアウイルスによる SARS ワクチンの開発、第 8 回日本ワクチン学会、札幌、2004 年 10 月

(国内学会)

9. 加藤 篤、久保田 耐、田代真人、永井美之：  
センダイウイルス C 蛋白質による抗インターフェロン効果 第 52 会日本ウイルス学会総会、横浜、2004 年 11 月
10. 久保田 耐、横沢紀子、横田伸一、藤井暢弘、田代真人、加藤 篤：ムンプスウイルスによる STAT1 分解とは異なる経路を介した宿主 IFN 情報伝達阻害 第 52 会日本ウイルス学会総会、横浜、2004 年 11 月
11. 村木優子、真鍋貞夫、福家 巧、石川豊数、加藤 篤、田代真人、山西弘一、高橋理明：ムンプスウイルスの神経病原性評価法としてのマーマセット接種試験の妥当性について 第 52 会日本ウイルス学会総会、横浜、2004 年 11 月
12. 木所 稔、田代真人、志田壽利：遺伝的安定性に優れた高度弱毒天然痘ワクチン株の開発、第 52 回日本ウイルス学会総会、横浜、2004 年 11 月
13. 北島正大、安井文彦、井上真吾、森田公一、鮫島由紀恵、村井 深、水野喬介、木所 稔、志田壽利、橋本真一、松島綱治、小原道法：ワクシニアウイルス弱毒株 LC16m8 株を用いた SARS ワクチンの開発、第 52 回日本ウイルス学会総会、横浜、2004 年 11 月
14. 北島正大、安井文彦、井上真吾、森田公一、鮫島由紀恵、村井 深、水野喬介、木所 稔、志田壽利、橋本真一、松島綱治、小原道法：SARS 遺伝子組換えワクシニアウイルスによるワクチン効果の検討、第 34 回日本免疫学会、札幌、2004 年 12 月
15. 加藤 篤、清谷克寛、久保田 耐、田代真人、永井美之 センダイウイルス抗インターフェロン能力の感染に及ぼす意味、第 16 回日本生体防御学会学術総会、東京、2005 年 8 月
16. 安井文彦、北島正大、井上真吾、新井正明、森田公一、村井深、水野喬介、木所稔、志田壽利、松島綱治、小原道法：ワクシニアウイルスを母体とした SARS ワクチンの開発、日本予防医学リスクマネジメント学会第 3 回総会、東京、2005 年 9 月
17. 木所稔、田代真人：遺伝的安定性と免疫原性に優れた弱毒痘瘡ワクチン株の開発と BSR 遺伝子の機能、第 9 回日本ワクチン学会、大阪、2005 年 10 月
18. 加藤 篤、清谷克寛、久保田 耐、田代真人、永井美之 センダイウイルス抗インターフェロン能力の感染に及ぼす意味、第 53 回日本ウイルス学会総会、横浜、2005 年 11 月
19. 木所 稔、齋加志津子、窪谷弘子、加藤篤、田代真人：ムンプスウイルスの中枢神経病原性に関わる遺伝子の同定と解析、第 53 回日本ウイルス学会総会、横浜、2005 年 11 月
20. 安井 文彦、北島 正大、横地祥司、井上 真吾、森田 公一、志田 壽利、木所 稔、村井 深、松島 綱治、小原 道法：SARS コロナウイルスの全構造蛋白質発現型組換えワクシニアウイルスによるワクチン効果の検討、第 53 回日本ウイルス学会総会、横浜、2005 年 11 月
21. 安井文彦、北島正大、横地祥司、井上真吾、森田公一、志田壽利、木所稔、村井深、松島綱治、小原道法：SARS コロナウイルスの全構造蛋白質発現型組換えワクシニアウイルスによるワクチン効果の検討、日本分子生物学会・第 28 回年会、福岡、2005 年 12 月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
無し
2. 実用新案登録  
無し
3. その他  
無し

名称	分離年	遺伝子型	臨床症状	検体	性別	年齢	発生県	Accession number
1045	2000	G	P	TS	F	2	Ehime	AB115997
1443	2000	K	LN	TS	F	12	Ehime	
011184L	2000	G	P, M	M	F	7	Kanagawa	AB116014
001349L	2000	H	P, M	CSF	M	7	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	M	7	Kanagawa	AB115970
011140ts	2001	G	M	TS	M	4	Kanagawa	
01-19	2001	K	-	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	-	M	3	Hokkaido	AB116018
FK02105T	2002	G	P	TS	M	8	Iwate	
FK02107T	2002	G	P	TS	F	5	Iwate	
FK02112T	2002	G	P	TS	M	8	Iwate	
FK02118T	2002	G	P	TS	F	4	Iwate	
FK02114T	2002	G	P	TS	F	7	Iwate	AB115971
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を示す。

年齢不詳のものもあるが、分かっている範囲では本流行期の罹患年齢は、12 歳以下であり成人が罹患例はこのリストにはない。

分離ウイルスは咽頭ぬぐい液、髄液と様々であり、特に髄膜炎患者由来の検体が多い事はない。

株		遺伝子型	ラット* 水頭症頻度	ヒト 髄膜炎頻度
野外株	Odate-1	I	3 / 4 (75%)	~10%
	02-49	K	2 / 5 (40%)	~2%
ワクチン株	国内	A	0 / 10 (0%)	~0.05%
		B	0 / 9 (0%)	~0.05%
	海外	Jerry-Lynn	A	0 / 10 (0%)

\*乳飲みラット 1 匹あたり 100 pfu/10 ul で脳内接種したときの頻度

表 2 ラットを用いた神経毒力試験とヒトでの髄膜炎発症頻度

群	検体	pre	1w	2w	3w	4w
対照	血液	0/4	0/4	0/4	0/2	0/2
	Swab	0/4	0/4	0/4	0/2	0/2
ワクチンC株	血液	0/8	0/8	3/8	0/4	0/4
	Swab	0/8	0/8	0/8	0/4	0/4
Odate株	血液	0/4	4/4	1/4	0/2	0/2
	Swab	0/4	0/4	1/4	0/2	0/2

表 3 マーモセットを用いた神経毒力試験接種後の血液及び咽頭拭い液中からウイルス分離された数を示している

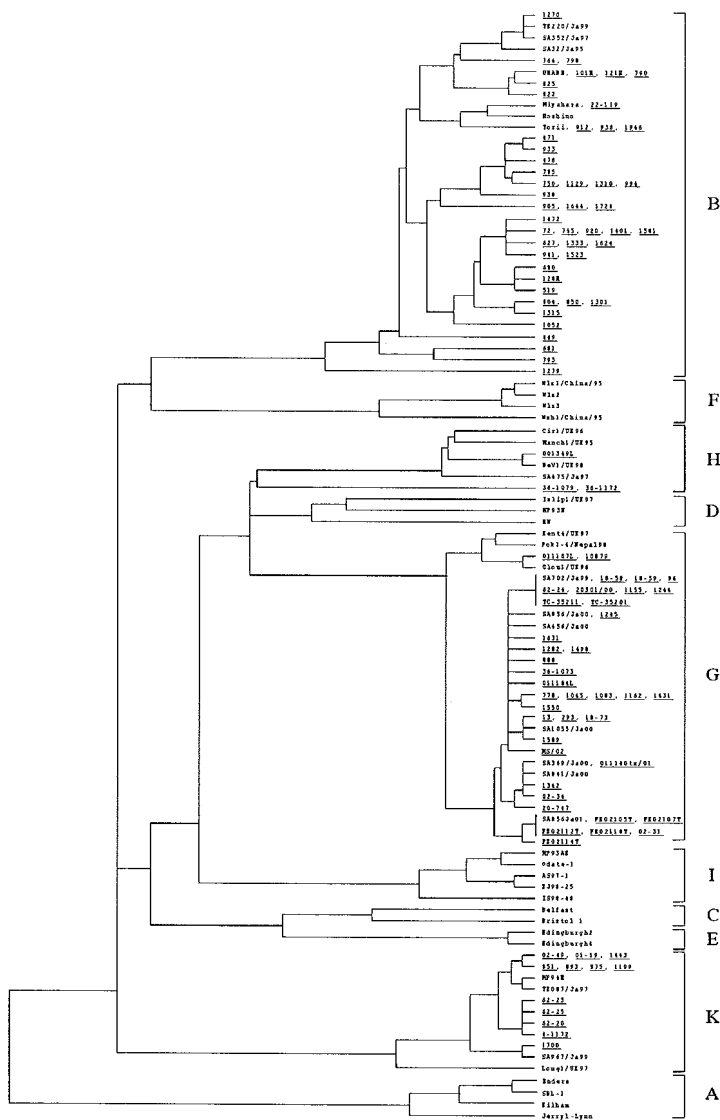


図 1 国内分離ムンプスウイルスの SH 遺伝子に基づく系統樹

SH 遺伝子の塩基配列を基に、NJ 法で計算した系統樹。現在までにムンプスウイルスは A-K の 11 型別に分けられている。2000-2002 の分離株は主に G 遺伝子型と K 遺伝型に分類される。国産ワクチン株は遺伝子型 B に分類される。世界的に使われているワクチンに含まれる Jerryl-Lynn 株は遺伝子型 A に分類される。

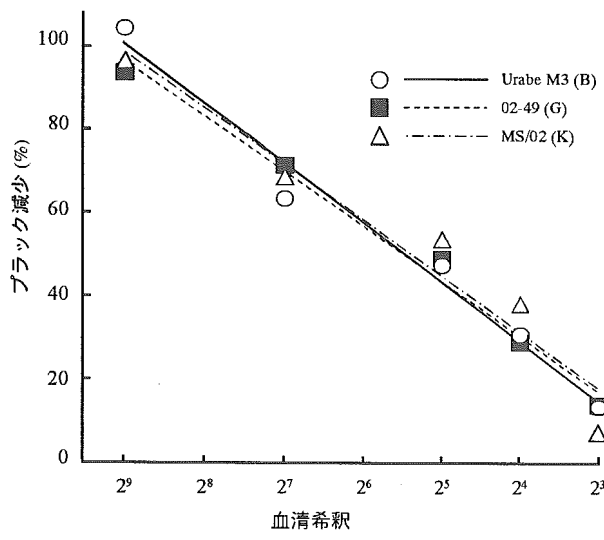


図 2 新しく分離されたムンプスウイルスの感染像とワクチン抗体による中和  
従来型の Urabe 株 (B 遺伝子型) と新しく分離された MS/03 株 (G 遺伝子型)、02-49 株 (K 遺伝子型) を国産ワクチンの一つである Hoshino 株 (B 遺伝子型) をカニクイザルに実験感染させて得た血清で中和した。横軸は、血清希釈。縦軸はプラック減少 (%) で示す。

水痘、流行性耳下腺炎、肺炎球菌による肺炎等の今後の感染症対策に必要な予防接種に関する研究

## 北海道における水痘、ムンプス、肺炎球菌感染症などによる入院例の検討

分担研究者 堤 裕幸 札幌医科大学医学部小児科教授

**研究要旨** 北海道における、水痘、ムンプス、肺炎球菌感染症などによる入院症例について調査した。初年度（平成 15 年度）は、予備調査として、札幌市内の大学病院を含む 4 つの総合病院小児科における入院症例を調査し、次年度と最終年度（平成 16 年度、17 年度）は、初年度の 4 病院を含む道内の 24 医療機関における入院症例を調査した。札幌市内では各病院で毎年数例の水痘、ムンプスによる入院があり、肺炎球菌感染症に付いては、少ないながら髄膜炎、敗血症を確認した。全道における調査でも、毎年 25～40 例の水痘、ムンプスによる入院を、毎年数例の化膿性髄膜炎を含む重症の肺炎球菌感染症を確認できた。以上より、都市部および全道レベルにおいても vaccine-preventable disease である水痘、ムンプス、肺炎球菌感染症の一般小児における重要性が明らかとなった。

### A. 研究目的

北海道は面積を国土の 22%を占めるが、人口は 580 万人と約 4.5%である。道内の札幌医科大学小児科の 24 箇所の関連施設の入院症例は、北海道全体の約 1/3 にあたると考えられ、それら入院施設における水痘、ムンプス、肺炎球菌感染症などによる入院の実数を把握することで、北海道全体、ひいては本邦全体の入院数を推測することも可能である。その様にしてこれらワクチン予防可能疾患である 3 疾患の重要性を把握し、ワクチン定期接種の導入の是非に付いて検討することを目的とした。

### B. 研究方法

表 1 に示す札幌医科大学付属病院小児科と、その関連病院である小児の入院設備を有する道内 23 医療機関に、2004-2005 年の 2 年間、アンケート調査を依頼した。内容は 1 年間の水痘、带状疱疹（2005 年のみ）、ムンプス、肺炎球菌感染症による入院とその内容である。各施設小児病棟における 1 年間の総入院数についても答え

ていただいた。検索は入院台帳、あるいは退院台帳を用い、個々の例については、必要であれば入院カルテの検索を依頼した。

### C. 研究結果

依頼した全医療機関から回答が寄せられた（回答率 100%）。各医療機関の上記疾患による入院数、および総入院数について表 1 に 2 年間の結果をまとめて示す。小児科の総入院数に付いては、病院の規模、その性格によりかなりの開きがあり、2 年間の入院数が 54 名から 2,613 名に及んだが、合計では 33,651 名であった。小児科入院については 23 機関から上記の疾患のうち何らかによる入院例有りとの回答があったが、水痘、ムンプスについては、1～13 名の入院数であった。水痘の入院数の合計は 59 名で、総入院数の 0.18%、ムンプスの入院は合計 62 名で総入院数の 0.18%であった。

肺炎球菌感染症による入院は 14 機関より合計 229 名が報告されたが、施設ごとの報告数は 1～46 名と幅が大きかった。化膿性髄膜炎の起因菌



として同定されたのは8例、敗血症が2例あり、他に、肺炎、急性中耳炎などが含まれた(表2)。

次に、水痘、帯状疱疹による入院の主な入院理由に付いて検討した(表3)。小児科における水痘入院患児59名のうち重症のためが13名と最多であり、続いて肺炎や急性胃腸炎の合併のためが続いた。無菌性髄膜炎と髄膜脳炎による入院がそれぞれ1例ずつみられた。帯状疱疹による入院は2005年の単年度の調査であるが、8名中6例が重症化のためであった。札幌医大病院における4名の入院は、血液腫瘍疾患や血液幹細胞移植後などの基礎疾患を有する児に発生したものであった。Ramsay Hunt症候群の合併による入院が2例確認された。

ムンプスによる小児科入院62名の入院理由を表4に示す。やはり無菌性髄膜炎が30名と最も多く半数を占めた。次に重症化のためが16名であった。睾丸炎の併発が1名にみられた。

## 考察

2004-2005年の2年間にわたるアンケート調査結果をまとめた。いずれの年も回答率100%で、小児科の総入院数は2004年が16,698名、2005年が16,953名と同様であり、ほぼ同規模の調査が2年続けてできたと考えられる。

水痘による入院は、ここ2年間、32、27症例と同等であり、両年とも重症化による入院が主であった。今回新たに調査に加えた帯状疱疹による入院は8名と少なく、更にその半数の4名は大学病院における悪性の基礎疾患を有した児におけるものであり、一般小児科における重要度はそれ程高くなかった。ムンプスによる入院は24と38症例で2年目に多かったが、その内容は無菌性髄膜炎が半数と同様であった。睾丸炎や難聴の合併例は、泌尿器科や耳鼻科にて加療されている可能性がある。

肺炎球菌感染症については229例の報告があり、化膿性髄膜炎8例、敗血症2例の重症例を確認できた。報告数に付いては10施設からは入

院無しとのことであり、14施設からの報告も1例から46症例と幅があった。この入院数の多寡は総入院数とは相関しておらず、呼吸器感染症に対して気道材料からの細菌培養がほぼルーチンに行われている施設から多くの入院例が報告された可能性がある。よって肺炎、咽頭扁桃炎、気管支炎例の報告が多くあるものの、その起菌としての評価には十分に注意を要すると考えられた。

今回の調査の入院施設は道内の小児の全入院施設のほぼ3分の1に相当すると考えられ、小児科以外の入院も考慮すると、北海道全体におけるこれら疾患の入院数はこの数倍と概算できる。つまり、水痘による入院は年間140名前後、ムンプスによるものは200名前後、肺炎球菌による髄膜炎、敗血症は20名前後と予測される。これらに、成人の重症水痘や、年長児や成人男性におけるムンプス睾丸炎の併発も考慮する必要がある。

更に、一般市中病院には隔離部屋などの設備が乏しいことから、これら感染症小児は、入院が必要とされても、外来にて加療されているケースも想定される。以上を総合して考えた場合、定期ワクチン導入によりこれら疾患の防衛を図ることは重要と考えられる。

## 結論

平成16-17年の複数年の調査で、北海道内における水痘、帯状疱疹、ムンプス、肺炎球菌による感染症の重要性を確認することができた。定期ワクチン導入により、これら疾患の防衛を図ることは重要と考えられる。

## 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

第9回日本ワクチン学会(2005.10.15-16)  
田中香織、堤 裕幸。2004年北海道内24施設における水痘、ムンプス、肺炎球菌感染症などに

よる入院例の検討

知的財産権の出願・登録状況

特に無し。

---

表1 2005-2006年の北海道内24施設の小児科における水痘、ムンプス、肺炎球菌感染症による入院

病院名	水痘	ムンプス	肺炎球菌感染症	総入院数
札幌医大病院	1		2	1,182
NTT 東日本札幌	4	4	28	2,191
国立西札幌病院		2	1	1,329
札幌社会保険総合	5	11		2,143
斗南病院	3	1	39	1,162
道立小児センター			3	795
小樽協会病院	3	1		1,631
余市協会病院	1			294
市立函館病院	3	4	31	1,988
町立松前病院	1			159
道立江差病院	2			819
八雲総合病院	1	2	11	797
市立室蘭総合病院	3	3	22	2,136
苫小牧市立病院	5	13	7	2,613
浦河赤十字病院	2	2	13	1,408
岩見沢市立病院	4	7	4	1,963
町立南幌病院	1			54
砂川市立病院				1,761
滝川市立病院	10	2	1	1,728
旭川赤十字病院	1	5		1,816
留萌市立病院	6	3		1,973
公立芽室病院	1	1	21	735
市立釧路病院	1	1	46	2,370
町立別海病院	1			904
合計	59 (0.18%)	62 (0.18%)	229 (0.68%)	33,651

表 2 重篤な肺炎球菌感染症

肺炎球菌感染症： 229 名	
化膿性髄膜炎：	8
敗血症：	2

表 3 水痘、帯状疱疹による小児科入院の主な理由

水痘：59 名		帯状疱疹： 8 名 (2005 年のみ)	
重症：	13	重症化：	6
合併症：肺炎	4	合併症：	
無菌性髄膜炎	1	Ramsay Hunt 症候群	2
髄膜炎	1		

表 4 ムンプスによる小児科入院の主な理由

ムンプス：62 名	
重症：	16
合併症：無菌性髄膜炎	30
睾丸炎	1

水痘、流行性耳下腺炎、肺炎球菌による肺炎等の今後の感染症対策に必要な予防接種に関する研究

## 成人における肺炎球菌性肺炎と肺炎球菌ワクチンの効果に関する研究

分担研究者 大石 和徳 大阪大学微生物病研究所教授

研究協力者：吉嶺裕之、古本朗嗣、渡辺 浩

（長崎大学熱帯医学研究所、感染症予防治療分野）

川上健司（長崎神経医療センター）

研究要旨：2001年～2003年に、本邦の全国20施設において成人の肺炎球菌性市中肺炎114症例の臨床細菌学的検討を実施した。高齢、呼吸器疾患、糖尿病、脳血管障害などが肺炎発症のリスク因子であった。肺炎球菌114株において最も高頻度の*pbp* ゲノタイプは*pbp 1a+2x+2b* (genotype PRSP: 36.8%)で、高頻度のマクロライド耐性遺伝子は*ermB* 遺伝子(50%)であった。血清型は19F(29.1%)>23F(13.2%)>6B(12.3%)>3(11.4%)であり、114株の血清型の23価ワクチンに含まれる割合は82.5%であった。ほとんどの19Fと23F株はgenotype PRSPであり、その分子疫学的検討から国内で多剤耐性肺炎球菌が伝播していることが示唆された。慢性呼吸器疾患患者に対する肺炎球菌ワクチン接種により、血清型19F、23F、6B、14に対する血清中特異抗体濃度は有意に増加するが、接種後2年間で減衰傾向が認められた。慢性呼吸器疾患患者の小規模前向き比較試験において、インフルエンザワクチンと肺炎球菌ワクチンの併用接種群ではインフルエンザワクチン単独接種群に比較して、急性増悪の回数が有意に減少することが示された。今後は、本邦におけるより大きいスケールの前向き比較試験を実施し、インフルエンザワクチンと肺炎球菌ワクチンの併用接種の肺炎発症頻度、肺炎に対する医療経済的効果を明らかにする必要がある。

大石和徳・大阪大学微生物病研究所 教授

### A. 研究目的

肺炎球菌は市中肺炎の主要な起炎菌であり、その薬剤耐性化が臨床的な問題になっている。侵襲性肺炎球菌に対する肺炎球菌莢膜ポリサッカライドワクチン（以下肺炎球菌ワクチン）の有用性はすでに確立されているが、菌血症を伴わない肺炎に対する肺炎球菌ワクチンに対する効果は明らかでない。米国では、65歳以上の高齢者に対する肺炎球菌ワクチン接種率は60%以上であるのに対して、本邦では未だ2%に過ぎない。

本邦ではインフルエンザワクチンが65歳以上の高齢者に対し定期接種化されている現実を考えれば、肺炎球菌ワクチンはインフルエンザワクチンと同様に定期接種化することが望まれる。しかしながら、本邦における肺炎球菌ワクチンの有用性に関するエビデンスは未だ少ないのが現状である。

平成15-17年度の研究では、1)本邦の成人の肺炎球菌性肺炎患者の臨床的特徴と起炎菌の薬剤耐性（耐性遺伝子の解析も含む）、血清型分布、

分子疫学的特徴を明らかにすること、2) 慢性呼吸器疾患患者における肺炎球菌ワクチン接種後の血清免疫学的応答とその経年的推移を明らかにすること、3) 肺炎のハイリスク群である65歳以上の高齢者や慢性呼吸器疾患患者における、インフルエンザワクチンと肺炎球菌ワクチンの併用接種のインフルエンザワクチン単独接種に対する優位性を明らかにすることである。

## B. 研究方法

1) 2001年～2003年にかけて全国20の医療施設において成人の肺炎球菌性市中肺炎患者114例を臨床細菌学的に検討した。分離された菌株の薬剤感受性検査、(*pbp* 遺伝子、マクロライド耐性遺伝子検査を含む)、莢膜血清型に加えてパルスフィールド電気泳動(PFGE)を実施し、その分子疫学的特徴と血清型や薬剤耐性との関連性を検討した。2) 慢性呼吸器疾患患者84症例に対して肺炎球菌ワクチンを接種し、1ヶ月後、1年後、2年後の血清を採取し、-80℃で保存した。血清中の血清型特異的IgG濃度については本邦におけるペニシリン耐性肺炎球菌(PRSP)の主要な血清型である6B, 19F, 23Fおよび14について第三世代ELISA法で測定した。

3) 慢性呼吸器疾患患者に対する肺炎球菌ワクチンとインフルエンザワクチンの併用効果；慢性呼吸器疾患患者に対して2001年にインフルエンザワクチンと肺炎球菌ワクチンの併用接種(A群、n=94)とインフルエンザワクチン接種(B群、n=96)を実施した。インフルエンザワクチンは年1回の接種とした。両群における接種後2年間の急性増悪回数、感染による急性増悪回数、肺炎球菌感染エピソードについて検討した。

4) 65歳以上の高齢者に対する肺炎球菌ワクチンとインフルエンザワクチンの併用効果2：2005年9月に長崎県東彼杵郡においてインフォームドコンセントを得た676名の65歳以上の成人に対して、封筒法により肺炎球菌ワクチンとインフルエンザワクチン併用接種群、インフルエンザワクチン接種群にランダム化した。年齢、

性別、基礎疾患、生活状態をA,B群間で比較する。肺炎球菌ワクチン接種後の副反応について調査する。ワクチン接種後の肺炎発症頻度(First endpoint)、発熱のエピソード、入院回数、肺炎による入院医療費(Second endpoint)を研究参加者に対して電話調査を行い、肺炎発症時にはその医療費について個別に調査する。

## C. 研究結果

肺炎菌性肺炎患者114例のうち96.5%が菌血症を伴わない肺炎であり、致命率は4.4%であった。リスク因子は高齢、呼吸器疾患、糖尿病、脳血管障害などであった。最も高頻度の*pbp* ゲノタイプは*pbp 1a+2x+2b* (genotype PRSP: 36.8%)、次が*pbp2x* (28.2%)であった。高頻度のマクロライド耐性遺伝子は*ermB* 遺伝子(50%)であった。高頻度の血清型は19F(29.1%)> 23F(13.2%)>6B(12.3%)>3(11.4%)であった。114株の血清型が23価ワクチンに含有される頻度は82.5%であった。ほとんどの19Fと23Fはgenotype PRSPであった。パルスフィールド電気泳動によるDNAパターン分析では25株の19F中14株は同一パターンを示し、血清型23F15株中6株は同一パターンを示した。この結果は、国内で多剤耐性肺炎球菌が伝播していることを示唆している。2) 慢性呼吸器疾患84症例におけるワクチン接種前の血清型6B, 14, 19F, 23Fに対する血清中特異IgG相乗平均濃度(mg/ml)は4.35, 6.47, 5.37, 3.07であり、ワクチン接種1ヶ月後にはいずれの血清型についてもIgG抗体濃度は有意に増加した(P<0.01)。接種前値に対する接種1ヶ月後の増加比は6Bと19Fで1.47と1.38と低値であるのに対し、血清型14と23Fは2.33, 2.09と高かった。また、増加比が2以上の高応答者の比率は6B, 19Fで23.8%、19%と低く、14, 23Fでは45.2%と44.0%と高かった。2年間の特異IgG濃度の推移は、いずれの血清型でも接種1ヶ月後が最も高く、6ヶ月、1年後、2年後と緩やかに減衰した。3) 190例の慢性呼吸器疾患患者において、2年

間の観察期間でインフルエンザワクチン単独接種群に比較して、インフルエンザワクチンと肺炎球菌ワクチンの併用接種群における急性増悪のエピソード数が有意に減少した (79 vs 98:  $P=0.079$ )。さらに、感染による急性増悪エピソードも有意に減少した (49 vs 78:  $P=0.019$ )。副作用は一過性の発熱が両群に 1 例づつ認められた。さらに、併用群では単独群に対して、肺炎の発症エピソード数が減少する傾向を示した。

4) 65 歳以上の高齢者 676 名を A. 肺炎球菌ワクチンとインフルエンザワクチン併用接種 339 名 (男性 128 名)、B. インフルエンザワクチン接種のみ 337 例 (男性 111 名) にランダムに割り当てられた。A 群、B 群の肺炎既往歴 (5.9%, 5.9%), 呼吸器疾患 (18.9%, 14.2%), 高血圧・心疾患 (65.2%, 64.1%), 腎疾患 (12.4%, 10.1%), 杖歩行 (10.6%, 6.2%), 長期臥床 (6.5%, 6.5%), 経口摂取不能 (1.5%, 1.5%) であり、両群における有意差は認められなかった。肺炎球菌ワクチン接種者 339 名のうち、322 名は副反応を報告した。副反応は 28 名 (11.5%) に認められ、いずれも局所の疼痛を訴えた。3 cm 以上の腫脹が認められたのは 11 名であり、1 例は治療を要した。しかし、入院を必要とする副反応は認められなかった。

#### D. 考察

近年、本邦における成人の肺炎球菌性肺炎の起炎菌はペニシリン、セフェム耐性、マクロライド耐性の頻度は高率であり、ハイリスクグループである高齢者、慢性呼吸器疾患患者において肺炎球菌ワクチンによる予防戦略は重要と考えられる。また、23 価肺炎球菌ワクチンの本邦における呼吸器病原性肺炎球菌株の高いカバー率から、肺炎球菌ワクチン接種は有用と考えられる。慢性呼吸器疾患患者に対する肺炎球菌ワクチン接種により、血清型 19F, 23F, 6B, 14 に対する血清中特異抗体濃度は有意に増加するが、接種後 2 年間で減衰傾向をしめした。このことから、慢性呼吸器疾患患者のみならず、健康高齢者、若年者と比較しながら血清中特異抗

体濃度の長期的な推移を観察する必要が有ると考えられた。その結果によっては、肺炎球菌ワクチンの再接種の承認を検討することが必要と考えられる。また、肺炎球菌ワクチンとインフルエンザワクチンとの併用接種の有用性について、対象者数は少なかったものの、肺炎のハイリスク患者ではインフルエンザワクチン単独群に比較して、感染性急性増悪あるいは肺炎頻度が減少することが示唆された。今後は、65 歳以上の高齢者における前向き比較試験において、インフルエンザワクチンと肺炎球菌ワクチンの併用接種群の有用性を、医療経済的視点から明らかにしていく必要が有る。このようなワクチンの医療経済性については厚生労働省も重要視しており、肺炎球菌ワクチンの定期接種化に向けて本邦独自のデータの蓄積が望まれる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Takahashi H, Oishi K, Yoshimine H, Kumatori A, Moji K, Watanabe K, Nalwoga H, Buguruka S, Kebba A, Mugerwa R, Mugenyi P. Decreased serum opsonic activity for *Streptococcus pneumoniae* in HIV-infected Ugandan adults. Clin Infect Dis. 37: 1534-40, 2003.
2. Watanabe H, Asoh N, Hoshino K, Watanabe K, Oishi K, Kositsakulchai W, Sanchai T, Kunsuikmengrai K, Kahintapong S, Khantawa B, Tharavichitkul P, Sirisanthana T, Nagatake T. Antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* and molecular characterization of multidrug-resistant serotype 19F, 6B, and 23F Pneumococci in northern Thailand. J Clin Microbiol. 41:4178-83, 2003.
3. Saha SK, Baqui AH, Darmstadt GL, Ruhulamin M, Hanif M, El Arifeen

- S, Santosham M, Oishi K, Nagatake T, Black RE. Comparison of antibiotic resistance and serotype composition of carriage and Invasive Pneumococci among Bangladesh children: Implications for treatment Policy and vaccine formulation. *J Clin Microbiol*. 41:5582-5587, 2003.
4. Amano H, Morimoto K, Senba M, Wang H, Ishida Y, Kumatori A, Yoshimine H, Oishi K, Mukaida N, Nagatake T. Essential contribution of monocyte chemoattractant protein-1/C-C chemokine ligand-2 to resolution and repair processes in acute bacterial pneumonia. 2004; *J. Immunol* 172:398-409.
  5. Watanabe H, Hoshino K, Sugita R, Asoh N, Watanabe K, Oishi K, Nagatake T. Possible high rate of transmission of nontypeable *Haemophilus influenzae* including  $\beta$ -lactamase-negative, ampicillin resistant strains between children and their parents. *J. Clin. Microbiol* 2004; 42:362-365.
  6. Saha SK, Baqui AH, Darmstadt GL, RuhulAmin M, Hanif M, Arifeen SE, Oishi K, Santosham M, Nagatake T, Black RE. Invasive *Haemophilus influenzae* type b diseases in Bangladesh, with increased non-susceptibility to antibiotics-urgent need for Hib vaccine program. *J. Pediatrics*, 142:227-233, 2005
  7. Motomura K, Masaki H, Terada M, Onizuka T, Furumoto A, Asoh N, Oishi K, Nagatake T. Usefulness of the Japanese Respiratory Society guidelines for community pneumonia : a retrospective analysis of community-acquired pneumonia between 2000 and 2002 in a general hospital. *Respirology*. 10:208-214, 2005.
  8. Watanabe H, Kaji C, Anh DD, Huong PLH, Anh NTH, Huong VT, Phuong HVM, Thi PT, Suu PT, Nguyet NTT, Rusizoka OS, Watanabe K, Nagatake T, Oishi K. A comparative molecular analysis of *Haemophilus influenzae* among children less than 5 years of age with acute lower respiratory tract infections and meningitis in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol*, 43:2474-2476, 2005.
  9. Watanabe H, Hoshino K, Sugita R, Asoh N, Guio H, Qin L, Kaji C, Watanabe K, Oishi K, and Nagatake T. Molecular analysis of intrafamilial transmission in *Moraxella catarrhalis*. *Int J Med Microbiol* , 295: 187-191, 2005.
  10. Oishi K, Yoshimine H, Watanabe H, Watanabe K, Tanimura S, Iwagaki A, Nagai H, Goto H, Kudoh S, Kuriyama T, Fukuchi Y, Matsushima T, Shimada K, MatsumotoK, Nagatake T. Drug-resistant genes and serotypes of pneumococcal strains of community-acquired pneumonia among adults in Japan. *Respirology*. 2006 (in press).
  11. Qin L, Watanabe H, Yoshimine H, Guio H, Watanabe K, Kawakami K, Iwagaki A, Nagai H, Goto H, Kuriyama T, Fukuchi Y, Matsushima T, Kudoh S, Shimada K, Matsumoto K, Nagatake T, Oishi K. Antimicrobial susceptibility and serotype distribution of Streptococcus pneumoniae isolated from patients with community-acquired pneumonia and molecular analysis of multidrug-resistant serotype 19F and 23F strains in Japan. *Epidemiol. Infect.* 2006 (in press)



12. 大石和徳、呼吸器感染症ワクチンの動向：肺炎球菌ワクチン. 分子呼吸器病学 7 : 441-447, 20
13. 大石和徳、成人における肺炎球菌ワクチンの今日的な位置づけ. 呼吸. 23:257-263, 2004
14. 川上健司、大石和徳. I 高齢者感染症の特徴 7. 高齢者へのワクチン. 化学療法の領域 増刊号 高齢者感染症のすべて, 医薬ジャーナル社, 2004年, 50-54.
15. 久富由紀、大石和徳. 肺炎球菌・インフルエンザワクチン. 市中肺炎の外来マネジメント. 医薬ジャーナル社, 2004年, 129-132.
16. 大石和徳. 肺炎球菌ワクチン-5年後の再接種の是非-. 呼吸器科. 8(1) 68-72, 2005.
17. 大石和徳. 細菌性肺炎(肺炎球菌性肺炎を中心に). 日本内科学会雑誌. 94(11): 2256-2260, 2005.
18. 大石和徳. 肺炎球菌性肺炎とその対策. 臨床と研究. 82(12):1983-1986, 2005.

## 2. 学会発表

1. 大石和徳：ワクチン療法「肺炎球菌ワクチン」、第43回日本呼吸器学会総会(福岡)：ミニシンポジウム2
2. 大石和徳：その理論と実際「肺炎球菌ポリサッカライドワクチンの現状：その基礎と臨床」、第86回日本細菌学会関東支部会(第52回日本感染症学会東日本地方会、第50回日本化学療法学会東日本支部会との合同学術集会)(横浜)：ワークショップ9新しいワクチン戦略-
3. Oishi K. Clinical and epidemiological study of respiratory pathogenic *Streptococcus pneumoniae* and the immunological effects of pneumococcal polysaccharide vaccine

among elderly patients with chronic lung diseases in Japan. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Acute Respiratory Infections (ARI) Panel: C March-21-22, 2004, San Francisco, USA

4. 大石和徳：シンポジウム3. ワクチンをめぐる話題「肺炎球菌ワクチンの現状と課題」、第53回日本感染症学会東日本地方会、第51回日本化学療法学会東日本支部会合同学術集会(新潟) 2004年10月22日
5. 古本朗嗣, 山領 豪, 大石和徳, 永武毅, 川上健司, 真崎宏則：第3世代ELISAを用いて慢性呼吸器疾患患者の肺炎球菌ワクチン接種前後での血清中肺炎球菌莢膜ポリサッカライド(CPS) IgGの検討. 第78回日本感染症学会総会, 東京, 2004年4月6-7日.
6. 池田秀樹, 小山 純, 大石和徳, 永武毅, 鬼塚正三郎：肺炎球菌(type 3)の気道免疫における特異抗体(CPS抗体、PspA抗体)誘導と樹状細胞の動態について. 第24回気道分泌研究会 北海道, 2004年5月29日.
7. 古本朗嗣, 山領 豪, 渡辺 浩, 大石和徳, 永武毅：慢性呼吸器疾患患者における肺炎球菌ワクチン(PV)接種前後の経時的血清型特異的莢膜ポリサッカライド(CPSIgG)濃度の推移の検討. 第74回日本感染症学会西日本地方会総会 島根, 2004年11月25-26日.
8. 古本朗嗣, 大石和徳, 永武毅, 末安禎子, 相澤久道, 岩永知秋：A-2-2 慢性呼吸器疾患患者の急性増悪に対する肺炎球菌ワクチンとインフルエンザワクチンの併用効果の検討. 第56回日本結核病学会九州地方会総会第53回日本呼吸器学会九州地方会総会福岡, 2004年11月11-12日.
9. 大石和徳：肺炎球菌ワクチン：成人、

小児領域における今後の展望. 第 37 回日  
本小児感染症学会教育セミナー, 三重,  
2005 年 11 月 11 日.

H. 知的所有権の取得状況

なし

水痘、流行性耳下腺炎、肺炎球菌による肺炎等の今後の感染症対策に必要な予防接種に関する研究

## 水痘ワクチン弱毒化に関する研究

分担研究者 森 康子 医薬基盤研究所・基盤研究部・部門長

### 研究要旨

我々は、水痘ワクチンの特性を分子レベルで解析するため、水痘ワクチン株（v-0ka）およびその親株（p-0ka）の全塩基配列の決定を行い、前初期タンパクである ORF62 においてアミノ酸配列の相同性の違いを見いだした。またブランク純化によりワクチン株は、数種のクローンの mixed population であることが判明した。さらに詳細に水痘ワクチン株の分子機構を検索するため、p-0ka および v-0ka の全ゲノムを bacterial artificial chromosome (BAC) へ組み込むことを試み成功した。さらに p-0la BAC クローンをを用いて大腸菌内で、ORF62 が置換された VZV クローンを作製し、MRC-5 細胞に導入することによって、ウイルス特異的な CPE の出現を観察した。

分担研究者；森 康子

医薬基盤研究所・基盤研究部・部門長

### A. 研究目的

水痘ワクチンの弱毒化の機構を解明するため、その特性を分子レベルで解析することを目的とした。

### B. 研究方法

水痘ワクチン株（v-0ka）およびその親株（p-0ka）の全塩基配列の決定を行い、その違いを比較検討した。

p-0ka および v-0ka の全ゲノムを bacterial artificial chromosome (BAC) へ組み込み、p-0ka および v-0ka の独立したクローンを得た。

### C. 研究結果

水痘ワクチン株（v-0ka）およびその親株（p-0ka）の全塩基配列の決定を行い、前初期タンパクである ORF62 においてアミノ酸配列の相同性

の違いを見いだした。さらに v-0ka と p-0ka において ORF62 の転写活性化能を比較したところその活性化能は p-0ka においてより強力であった。

v-0ka 株をブランク純化することにより数種のクローンを得、ORF62 の塩基配列を比較検討したところ、塩基配列に違いが認められ、数種のクローンからなることが判明した。

さらに水痘ワクチン株の機序を検索するため、p-0ka および v-0ka の全ゲノムを bacterial artificial chromosome (BAC) へ組み込むことを試み成功した。80 個の独立した v-0ka-BAC クローンを得た。各々のクローンの ORF62 の塩基配列を決定し、P-0ka の塩基配列と比較検討したところ、2 種類の独立したクローンに分別された。これらのクローンを MRC-5 細胞に遺伝子導入することにより、ウイルス特異的な CPE が観察された（図 1）。

アミノ酸配列の相同性に違いの見られた ORF62 に関して親株とワクチン株間での組換えを試み

た。ワクチン株 ORF62 遺伝子を親株 ORF62 遺伝子と置き換えた親株 VZV を作製した。作製方法は、p-OKA BAC クローン(p-OKA-BAC)を用いた大腸菌内での置換で行った。今回、組換えによって得られたクローンは、ワクチン株、親株間で ORF62 のアミノ酸が置換されていた8カ所のうち、内部4カ所が置換されていた(図2)。

大腸菌内で得られた上記組換えクローンの DNA を抽出し、MRC-5 細胞に導入することにより、ウイルスの再構築を試み、成功した。現在、ORF62 が、組換えられた p-Oka、original の p-Oka および v-Oka の性状解析の比較を行っている。

#### D. 考察

水痘ワクチン株の弱毒化に ORF62 が関与している可能性が示唆された。またプラーク純化によりワクチン株は、数種のクローンの mixed population であることが判明した。また BAC ベクターへの v-Oka ゲノムのクローニングにより得られたクローンにおいては、ORF62 の塩基配列に限定した場合、2種類のクローンである可能性が考えられた。今後、他の部位のアミノ酸配列の比較も行っていきたいと考えている。

また、大腸菌内で、ORF62 (内部アミノ酸) を組換えた p-Oka クローンの作製に成功し、今後、本クローンを用いて、ORF62 のワクチン株弱毒化への関与を解析していきたいと考えている。

#### E. 結論

水痘ワクチン株の特性を決定する遺伝子として ORF62 の関与が示唆された。また水痘ワクチン株は mixed population であることが判明した。

#### F. 健康危険情報

特に健康状態に問題はない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nagaike, K, Mori, Y, Gomi, Y, Yosii, H, Takahashi M, Wagner, M, Koszinowski, U and Yamanishi, K. Cloning of the varicella-zoster virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*. VACCINE. 28;22(29-30):4069-74, 2004

##### 2. 学会発表

吉井洋紀、森 康子、長池一博、五味康行、Pranee Somboonthum、高橋理明、山西弘一 VZV ワクチン株の分子学的解析。第20回ヘルペスウイルス研究会 2005年6月23日、24日、名古屋

吉井洋紀、五味康行、山岸義晃、高橋理明、山西弘一、森 康子 水痘带状疱疹ウイルスワクチン株の分子学的性状解析

第53回日本ウイルス学会学術集会 2005年11月20日~22日(横浜)

吉井洋紀、森 康子、長池 和広、Pranee Somboonthum、五味 康行、高橋 理明、山西 弘一. BAC ベクターを用いた組換え水痘带状疱疹ウイルスの作成第19回ヘルペスウイルス研究会、2004年6月17日~19日、愛知県知多郡

長池 和広、森 康子、五味 康行、吉井 洋紀、高橋 理明、Markus Wagner、Ulrich Koszinowski、山西 弘一. 水痘带状疱疹ウイルスの組換えウイルス作製、第20回中国四国ウイルス研究会、2004年6月26日、27日 高知県南国市

長池 和広、森 康子、五味 康行、吉井 洋紀、高橋 理明、Markus Wagner、Ulrich Koszinowski、山西 弘一. 水痘带状疱疹ウイルスの組換えウイルス作製、第8回日本ワクチン学会、2004年10月9日、10日 北海道札幌市

吉井 洋紀、森 康子、指原 淳志、山岸 義晃、五味 康行、高橋 理明、山西 弘一. BAC ベクターを用いた組換え水痘带状疱疹ウイルスの作成第52回日本ウイルス学会学術集会. 2004年11月21日~23日、横浜市

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願