

- N, Katayama K. Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. *Arch Virol* 150: 21-36, 2005
19. Li L, Phan TG, Nguyen TA, Kim KS, Seo JK, Shimizu H, Suzuki E, Okitsu S, Ushijima H. Molecular epidemiology of adenovirus infection among pediatric population with diarrhea in Asia. *Microbiol Immunol* 49:121-128, 2005.
20. Hansman G, Yoshida H, Kuramitsu M, Katayama H, Takeda N, Ushijima H, Surenkhand G, Gantulga D, Kuroiwa C. Viral gastroenteritis in Mongolian infants. *Emerging Infect Dis* 11: 180-182, 2005
21. Yan H, Abe T, Gia Phan T, Anh Nguyen T, Iso T, Ikezawa Y, Ishii K, Okitsu S, Ushijima H. Outbreak of acute gastroenteritis associated with group A rotavirus and genogroup I astrovirus among adults in a mental health care facility in Japan. *J Med Virol* 75 475-481, 2005.
22. Phan TG, Tuan AN, Nishimura S, Nishimura T, Yamamoto A, Okitsu S, Ushijima H. Etiologic agents of acute gastroenteritis among Japanese infants and children: virus diversity and genetic analysis of sapovirus. *Arch Virol* 150: 1415-1424, 2005.
23. Wiens M, Korzhev M, Thakur NL, Perovic-Ottstadt S, Breter HJ, Ushijima H, Diehl-Seifert B, Muller I.M, Muller W.E.G. Innate immune defense of the sponge *Suberites domuncula* against bacteria involves a MyD88-dependent signaling pathway: Induction of a perforin-like molecule. *J Biological Chemistry* 280: 27949-27959, 2005.
24. Kano N, Lee S, Iwai K, Nagase T, Komatsu M, Muraki T, Ushijima H. A trial study on gender-based violence with ecological framework in one city in Ibaraki prefecture. *Ibaraki Pref. Medical Univ* 10: 75-84, 2005.
25. Phan TG, Nyuyen T, Shimizu H, Yagyu F, Okitsu S, Muller WEG, Ushijima H. Identification of enteroviral infection among infants and children hospitalized with acute gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. *J Med Virol* 77:257-264, 2005.
26. Yoshinaga M, Phan TG, Nguyen TA, Yan H, Okitsu S, Muller WEG, Ushijima H. Changing distribution of group A rotavirus G-types and genetic analysis of G9 circulating in Japan. *Arch Virol* 151:183-192, 2006
27. Muller WEG, Borejko A, Brandt D, Osinga R, Ushijima H, Hamer B, Krasko A, Xupeng Muller IM, Schroder HC. Selenium affects biosilica formation in the demosponge *Suberites domuncula*: Effect on gene expression and spicule formation. *FEBS J* 272: 3838-3852, 2005
28. Akihara S, Phan TG, Nguyen TA, Hansman G, Okitsu S, Ushijima H. Existence of multiple outbreaks of viral gastroenteritis among infants in a day care center in Japan. *Arch Virol* 150: 2061-2075, 2005.

29. Akihara S, Phan GT, Nguyen TA, Okitsu S, Mueller WEG, Ushijima H. Identification of Sapovirus .Infection among infants in a day care center. *J Med Virol* 77:595-601, 2005.
30. Huy TTT, Ishikawa K, Ampofo W, Izumi T, Nakajima A, Ansah J, Tetteh JO, Nii-Trebi N, Aidoo S, Ofori-Addjei D, Sata T, Ushijima H, Abe K. Characteristic of Hepatitis B virus in Ghana: Full length genome sequences indicates the endemicity of genome E in West Africa. *J Med Virol* 78: 178-184, 2005
31. Ali M, Miyoshi C, Ushijima H: Emergency medical services in Islamabad, Pakistan: a public-private partnership. *Public Health.* 120:50-57, 2006.
32. Khamrin P, Peerakome S, Wongsawasdi L, Tonusin S, Sornchai P, Maneerat V, Khamwan C, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. Emergence of human G9 rotavirus with an exceptionally high frequency in children hospitalized with diarrhea in Chiang Mai, Thailand. *J Med Virol* 78: 273-280, 2005.
33. Phan TG, Nguyen TA, Kuroiwa T, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Nishimura T, Yamamoto A, Okitsu S, Ushijima H. Viral diarrhea in Japanese children: results from a one- year epidemiologic study. *Clin Lab* 51: 183-191, 2005
34. Phan TG, Mnguyen TA, Yan H, Yagyu F, Kozlov V, Kozlov A, Okitsu S, Muller WEG, Ushijima H. Development of a novel protocol for RT-multiplex PCR to detect diarrheal viruses among infants and children with acute gastroenteritis in Eastern Russia. *Clin Lab* 51:429-435, 2005
35. Schroeder HC, Borelko A, Korzhev M, Tahir MN, Tremel W, Eckert C, Ushijima H, Mueller I, Mueller WEG. Co-expression and functional interaction of silicaten with galectin: Matrix-guided formation of siliceous spicules in the marine demosponge *Suberites Domuncula*. *J Biol Chem* 2006 [E-Pub]
36. Muller WEG, Ushijima H, Batel R, Krasko A, Borejko A, Muller I, Schroeder HC. Novel mechanism for the radiation-induced bystander effect: nitric oxide and ethylene determination the response in sponge cells. *Mutation Res* 2006 [E-Pub]
37. Hasegawa H, Ichinohe T, Strong P, Watanabe I, Ito S, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T. Protection against influenza virus infection by intranasal administration of HA vaccine with chitin microparticles as an adjuvant. *J Med Virol* 75:130-136, 2005
38. Ichinohe T, Watanabe I, Ito S, Fujii H, Moriyama M, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Synthetic double-stranded RNA [poly (I:C)] combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. *J Virol* 79: 2910-2919, 2005

外来性蛋白を発現する組み換え麻疹 AIK-C 株の確立

中山 哲夫、藤野 元子、吉田菜穂子（北里生命科学研究所ウイルス感染制御）

駒瀬 勝啓（北里研究所生物製剤研究所）

【目的】麻疹ワクチン AIK-C 株は Edmonstom 株を羊腎細胞で継代し低温馴化株を plaque cloning して樹立したワクチン株で Vero 細胞に small plaque を誘導し、39-40°C の増殖は 33°C の 1 万分の 1 という温度感受性 (temperature sensitivity; ts) を有している。これらの生物学的性状に關与する遺伝子を解析し、Vero 細胞に small plaque を作る細胞融合能が低いことは F 蛋白 278 位のアミノ酸が Leu であること、高温で増殖しない ts の性状は P 蛋白 439 位の Pro が AIK-C の生物学的性状を担っていることを報告してきた。これらの性状はワクチン株弱毒化の一因であると考えられる。AIK-C 株は既に 2000 万ドース以上がヒトに接種されその有効性と安全性は担保されている。麻疹ウイルスは RNA ウイルスで遺伝子操作が困難であると言われてきたが全長 RNA を cDNA に変換し感染性ウイルスを回収する reverse genetics の技法が開発され、我々も AIK-C 麻疹ワクチン株をベースとした reverse genetics の技法を確立しワクチンデザインが可能となった。未だワクチンが開発されていないウイルス、現行ワクチンでは有効性・安全性に問題があるウイルスに対して、製造承認され広く使用され安全性の保証されている AIK-C 株を生ワクチンウイルスベクターとして外来遺伝子を組み込んだ組換え麻疹ウイルスワクチンを作成する事を目的とした。

【方法】AIK-C 全長 cDNA の N/P、P/M、H/L junction に AscI 制限酵素部位を導入し β galactosidase 遺伝子を導入した pAIK- β gal N/P、pAIK- β gal P/M、pAIK- β gal H/L プラスミドを構築した(図 1)。293T 細胞にキメラプラスミドと共に、感染性ウイルスを回収するために T7 RNA polymerase のもとで麻疹ウイルス N, P, L 蛋白を発現する helper plasmid を co-transfection させた。2 日後に麻疹ウイルスに感受性の高い B95a 細胞と co-culture を行い麻疹ウイルス特異的な CPE の出現を観察した。他の外来ウイルス遺伝子としてムンプスウイルス HN 遺伝子をクローニングして recombinant infectious clone を作成し感染性ウイルス回収を試みた。

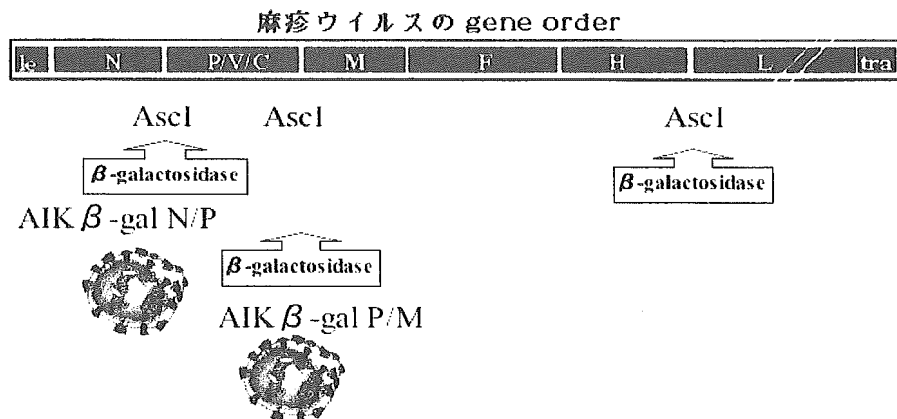


図 1 外来遺伝子挿入部位の検討

【結果】

- 1) 構築した pAIK- β gal N/P、pAIK- β gal P/M、pAIK- β gal H/L の遺伝子配列の模式図を図1に示した。感染性ウイルス AIK- β gal N/P、AIK- β gal P/M を回収出来たが、pAIK- β gal H/Lからは安定して感染性ウイルスを回収できなかった。
- 2) 回収されたウイルスを Vero 細胞に感染させ β galactosidase の発現を確認できた。AIK- β gal P/M が β galactosidase を効率に発現しており麻疹ウイルス N 蛋白に対する monoclonal 抗体で染色すると麻疹ウイルス蛋白の発現も確認された。経時的にウイルス感染価を測定すると AIK- β gal P/M のウイルスの増殖がよいことが明らかとなった (図2)。
- 3) ムンプスウイルス HN 遺伝子を P/M junction に挿入し pAIK-MpHN を構築し感染性ウイルス AIK-MpHN を回収した (図3)。Vero 細胞に感染させ麻疹ウイルスに対する polyclonal 抗体で染色し麻疹ウイルス蛋白の発現が確認され、同時にムンプス HN monoclonal 抗体で HN 遺伝子の発現が確認された (図4)。

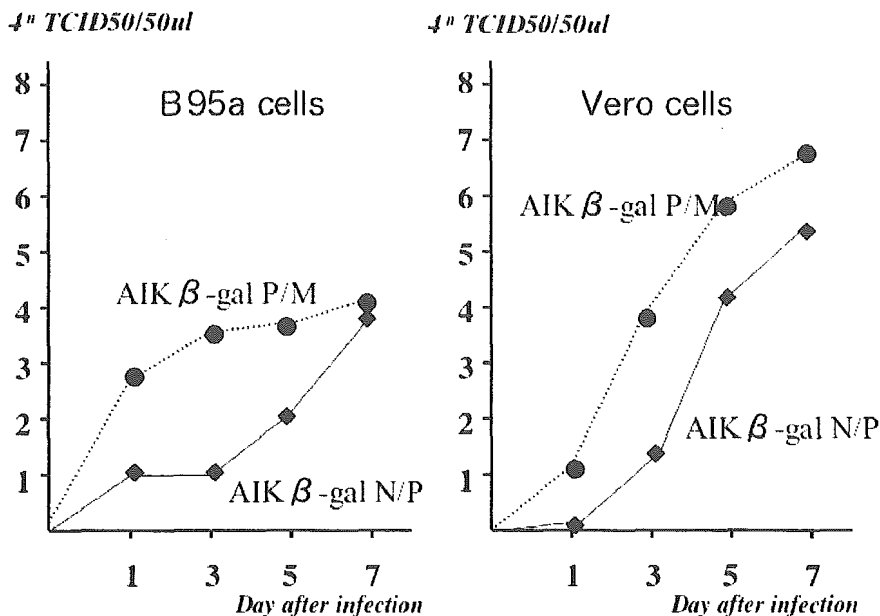


図2 AIK β -gal N/P と AIK β -gal P/M ウイルスの増殖能

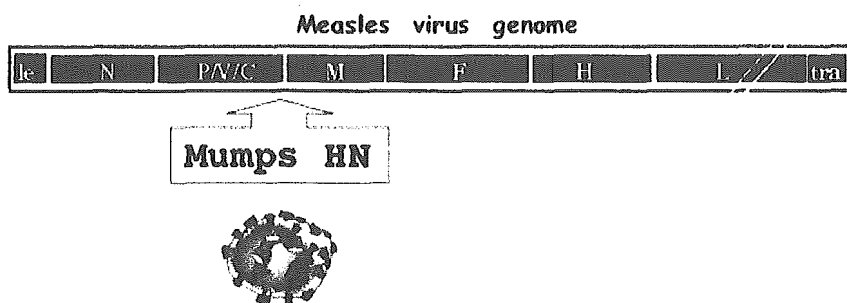


図3 ムンプス HN 遺伝子を挿入した遺伝子の構築

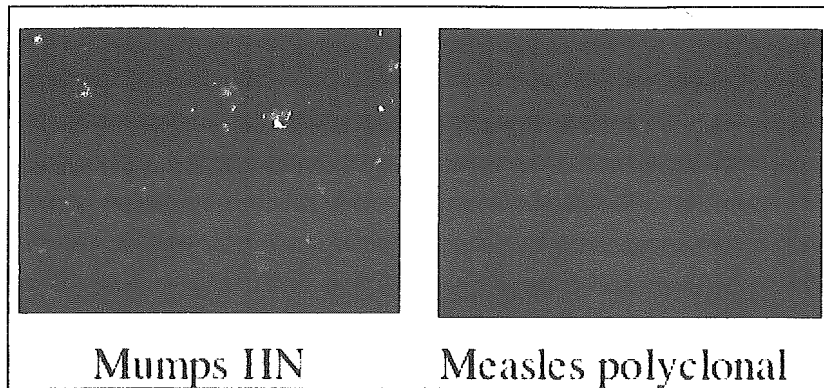


図4 組み換え麻疹ウイルスの麻疹ウイルス抗原、ムンプスウイルス抗原の発現

【考案】

麻疹ワクチンウイルス AIK-C 株を安全なウイルスベクターとして約 3000 塩基ぐらゐまで挿入可能であることがあることがわかり、キメラワクチンウイルスベクターとしての展開が可能と考えられる。外来遺伝子挿入部位としては P/M junction に挿入したプラスミドから感染性ウイルスの回収率がよかったことは、麻疹ウイルスの gene order に沿って mRNA の量が減少することから外来遺伝子が N/P junction に挿入される事で P 蛋白 mRNA の量が減少し翻訳される量が低下しウイルスに転写・複製活性に必要な N-P-L 複合体を形成するときの N, P 蛋白の比率に影響するものと考えられる。ムンプスウイルス以外にも Respiratory syncytial virus (RSV) の様に未だ有効なワクチンが開発されていないウイルス感染症に対する応用が考えられる。

ムンプスウイルスは再感染・顕性発症することがある

中山 哲夫、藤野 元子、吉田菜穂子（北里生命科学研究soウイルス感染制御）

崎山 弘、宮田 章子、永井 崇雄、庵原 俊昭（日本外来小児科学会ワクチン研究検討会）

【はじめに】

ムンプスウイルスは、急性耳下腺炎をおこし、自然感染後には終生免疫を獲得し耳下腺炎を繰り返すことは無いと考えられてきた。一方、臨床的には急性耳下腺炎を繰り返す児を経験する事は多く、再発性耳下腺炎として曖昧な診断がなされている。急性耳下腺の原因としてはムンプスウイルス以外にサイトメガロウイルス、パラインフルエンザウイルス等のウイルス感染症の他にも唾液腺石による閉塞、細菌性感染を鑑別診断すべきである。我々は、2000-2001年にムンプス自然感染における無菌性髄膜炎の頻度を調査した際に、ウイルス学的に診断された1075例のムンプス感染症の中にウイルス分離、RT-PCRで遺伝子が検出されたムンプス再感染例が3例存在し、ムンプスウイルスは再感染・顕性発症をおこしていることが明らかとなった。

過去に、ムンプスの既往歴、ワクチン接種歴があつて急性耳下腺炎の症状を呈し再感染が疑われた例についてウイルス学的検討を行った。

【対象と方法】

急性耳下腺で受診した症例の中でワクチン接種歴・既往歴別に4群に分類した。(ワクチン歴+、既往歴+；3例)、(ワクチン歴+；34例)、(既往歴+；17例)、コントロールとして(ワクチン歴-、既往歴-；17例)合計71例を対象とした。咽頭拭い液を採取後-70℃に保存した。ウイルス分離は咽頭拭い液0.1mlをVero細胞に接種しCPE出現を指標に2代まで継代した。咽頭拭い液0.2mlよりRNAを抽出し、既に報告したRT-LAMP法でムンプスウイルス遺伝子を検出した。

Real time RT-LAMPでLAMP陽性となる時間をmonitorすることで検体中のウイルス量を算定した1)。71例中55例から血清が得られ、8M尿素で処理しavidityを測定した2)。

【結果】

1)表1に各群別のウイルス分離、LAMP陽性率を示した。ウイルス分離は29/71(41%)、咽頭拭い液(Nasopharyngeal secretion NPS)のLAMP陽性は48/71(68%)、血清LAMP陽性は6/55(11%)であった。ワクチン歴・既往歴もある3例中2例からウイルスが分離され全例からムンプス遺伝子が検出された。ワクチン歴、既往歴があつてもムンプスウイルスの感染が認められる。

表1 ユィルス分離とLAMP陽性率

	症例数	ウイルス分離+	LAMP NPS	LAMP Serum
ワクチン+、既往歴+	3	2/3	3/3	0/3
ワクチン+、既往歴-	34	13/34	24/34	5/27
ワクチン-、既往歴+	17	3/17	9/17	0/16
ワクチン-、既往歴-	17	11/17	12/17	1/9
	71	29/71	48/71	6/55

2) 既往歴を有する 20 例と既往歴のない 51 例を比較し表 2 に結果を示した。ウイルス分離、咽頭拭い液 LAMP 法による遺伝子検索でも既往歴のない群で陽性率が高かった。しかしながら、既往歴を持つ 20 例中 5 例からウイルスが分離され、8 例から遺伝子が検出された。

表 2 既往歴、ワクチン歴群別のウイルス分離率と LAMP 陽性率

	症例数	ウイルス分離+	NPS LAMP+
既往歴+	20	5/20(25%)	8/20(40%)
既往歴-	51	24/51(47%)	36/51(71%)
既往歴 or ワクチン歴+	54	18/54(33%)	32/54(59%)
既往歴-, ワクチン歴-	17	11/17(65%)	12/17(71%)
ワクチン歴+	34	13/34(38%)	24/34(71%)

3) 既往歴の有無、ワクチン接種の有無で血清 LAMP 陽性率を比較して表 3 に示した。既往歴を有する 19 例中血清 LAMP は全例陰性であったが既往歴のない 36 例中 6 例で血清 LAMP 陽性であった。ワクチン接種歴の有無ではワクチン接種歴があっても血清 LAMP 陽性が 30 例中 5 例に陽性であった。

表 3 既往歴、ワクチン歴の有無による血清 LAMP 陽性率

既往歴	症例数	Serum LAMP+
+	19	0/19
-	36	6/36
ワクチン歴	症例数	Serum LAMP+
+	30	5/30
-	25	1/25

4) 71 例中ムンプス IgG, IgM EIA 抗体を検査した IgG EIA+ の 51 例において IgM EIA の有無によるウイルス分離 NPS LAMP、血清 LAMP 陽性率を比較した(表 4)。IgM 陽性群でウイルス分離は 15/26(58%)と IgM 陰性群での 5/25(20%)より高い陽性率を示した。LAMP 法でも陽性率は高く遺伝子が検出された検体中のウイルス量を算出した。IgM 陽性群では平均約 28 分で陽性になりウイルス量も多い。一方、IgM 陰性群では平均 40 分で検出されるようになった。IgM 陽性群で血清 LAMP は 4/22 が陽性であった。

表 4 IgM EIA 陽性群と陰性群でのウイルス分離、遺伝子検出

	症例数	ウイルス分離+	NPS LAMP+	Serum LAMP+
IgG+, IgM+	26	15/26	21/26 (1716 sec.)	4/22
IgG+, IgM-	25	5/25	15/25 (2382 sec.)	1/25

5) 既往歴、ワクチン接種歴がありながら急性耳下腺炎を発症した児からウイルス分離され遺伝子が検出された事からウイルス学的にも再感染が強く示唆された。血清を採取できた児で血清 IgG EIA avidity を検討しウイルス分離、LAMP 法での遺伝子検索を行い表5に結果を示した。血清学的に、初感染時には Avidity の低い IgG 抗体が検出されるが、再感染時には Avidity の高い抗体が検出される。Avidity が40%以上で再感染が強く疑われた例でウイルスが分離され遺伝子が検出され、咽頭拭い液からのウイルス分離率、遺伝子検出率は Avidity 40%以下の初感染群と有意差は認めなかった。しかしながら血清の LAMP 陽性率は再感染群では陽性率が低値を示した。

表5 血清 Avidity とウイルス分離、LAMP 法による遺伝子検出

Avidity	症例数	ウイルス分離+	NPS LAMP+	Serum LAMP+
≥40%	16	6/16 (37.5%)	10/16 (62.5%)	1/16 (6.3%)
<40%	32	11/32 (34.4%)	24/32 (75%)	5/32 (15.6%)

【考案】ムンプスでは耳下腺炎を繰り返す症例を経験する。こうした例は再発性耳下腺炎、唾液腺石、細菌感染症と考えられムンプスに再感染することはないように考えられてきた。耳下腺腫脹を認め来院した児の既往歴、ワクチン接種歴を有し再感染が疑われた症例からムンプスウイルスが分離され遺伝子が検出された。既往歴は必ずしもムンプスウイルス感染を示すことではないために血清 Ig G EIA avidity を検討することで再感染と考えられた症例から、ウイルス分離、遺伝子が検出されることが明らかとなった。既往歴のある再感染例では血清 LAMP 陽性率が低くウイルス血症をおこしにくいと考えられたが、ワクチン接種歴を有する再感染例は初感染と同様ウイルス血症が認められる。また、IgM EIA 陽性は生体内でのウイルス増殖能を反映しておりウイルス分離率、遺伝子量も高値を示した。ウイルス学的にもムンプスウイルスの再感染による顕性発症が認められる事が明らかとなった。

文献

- 1) Okafuji T, Yoshida N, Fujino M, Motegi Y, Ihara T, Ota Y, Notomi T, Nakayama T. Rapid diagnostic method for the detection of mumps virus genome by loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol 43: 1625-1631, 2005.
- 2) Narita M, Matsuzono Y, Takekoshi Y, Yamada S, Itakura O, Kubota M, Kikuta H, Togashi T. Analysis of mumps vaccine failure by means of avidity testing for mumps virus-specific immunoglobulin G. Clin Diagn Lab Immunol 5;799-803, 1998

RT-LAMP 法を用いたムンプスウイルス星野株と野生株との鑑別

中山 哲夫、藤野 元子、吉田菜穂子（北里生命科学研究所周ウイルス感染制御）

1989 年から統一株 MMR、各社独自の MMR ワクチンが認可され接種されたが、ムンプスワクチン株による無菌性髄膜炎の多発により 1993 年に MMR ワクチンの接種は事実上中止となった。その後、ムンプスワクチンは任意接種のワクチンとして使用されているが接種率は低くムンプスは毎年流行を繰り返している。無菌性髄膜炎の頻度は約 3,000-10,000 接種機会に 1 例の頻度であると報告されている。野生株の流行があるなかでワクチン接種を行うことから、ワクチン接種後の副反応症例の中には野生株による反応が紛れ込んでくる可能性がある。

ワクチン株と野生株の鑑別は、分離したウイルスの性状により判定していたが、我々は臨床検体から RNA を抽出し RT-PCR を行い特異的な制限酵素を用いてその切断パターンで判定する RT-PCR RFLP を報告した¹⁾。RT-PCR 法よりも感度の高い RT-LAMP 法が開発され、LAMP 法は臨床検体から遺伝子を抽出後 60 分以内に結果が得ることができる方法である²⁾。ワクチン株と野生株を鑑別できる領域に RT-LAMP primers を設定し効率よくムンプスウイルス遺伝子を増幅し鑑別できる方法を開発した。

【方法】

ムンプス星野株ワクチン接種後に無菌性髄膜炎、急性耳下線炎、副睾丸炎を発症した患児から採取された髄液、咽頭拭い液を対象とした。臨床検体 200ul より RNA を抽出し RT-LAMP 法によるムンプスウイルス遺伝子の検索をおこなった。既に報告した LAMP primer set と同じ HN 領域に設定したが、増幅の対象領域は異なる部位を選んだ。ワクチン株と野生株との鑑別は RT-LAMP 産物を Sca I 制限酵素を用いて電気泳動することで鑑別した。

【結果】

- 1) LAMP primer は HN 領域の 7711 塩基部位から 7943 位までに LAMP primer set を設定した (図 1)。ムンプス星野株を対象に LAMP 反応の検出感度を調べた。星野株のウイルス浮遊液 (感染価: 1.6×10^6 TCID₅₀/200ul) 200 ul より RNA を抽出して 25ul の滅菌蒸留水に溶解した。1:10 の階段希釈を作成しその 5 ul を用いて LAMP 反応を行い結果を図 2 に示した。RT-LAMP 法では 10^{-7} 希釈まで検出された。検出感度は 0.03 TCID₅₀ であった。
- 2) 現在まで我が国で流行してきた野生株は B, D, G, I, J, L の genotype が流行してきた。ワクチン株はすべて B 群に属し星野株特異的な制限酵素部位(7880-7885; Sca I)を target とした (図 1)。星野ワクチン株は LAMP 産物内に Sca I 制限酵素配列を有し、LAMP primer 設定部位からはずしてあり星野株の LAMP 産物を Sca I で処理し電気泳動することで野生株かワクチン株かの鑑別ができる。結果の一部を図 3 に示した。星野株では Sca I 処理で LAMP 特異的なラダーパターンが消失する。一方、野生流行株には 1 塩基の置換で Sca I 配列が消失し Sca I 処理でもラダーパターンのままである。

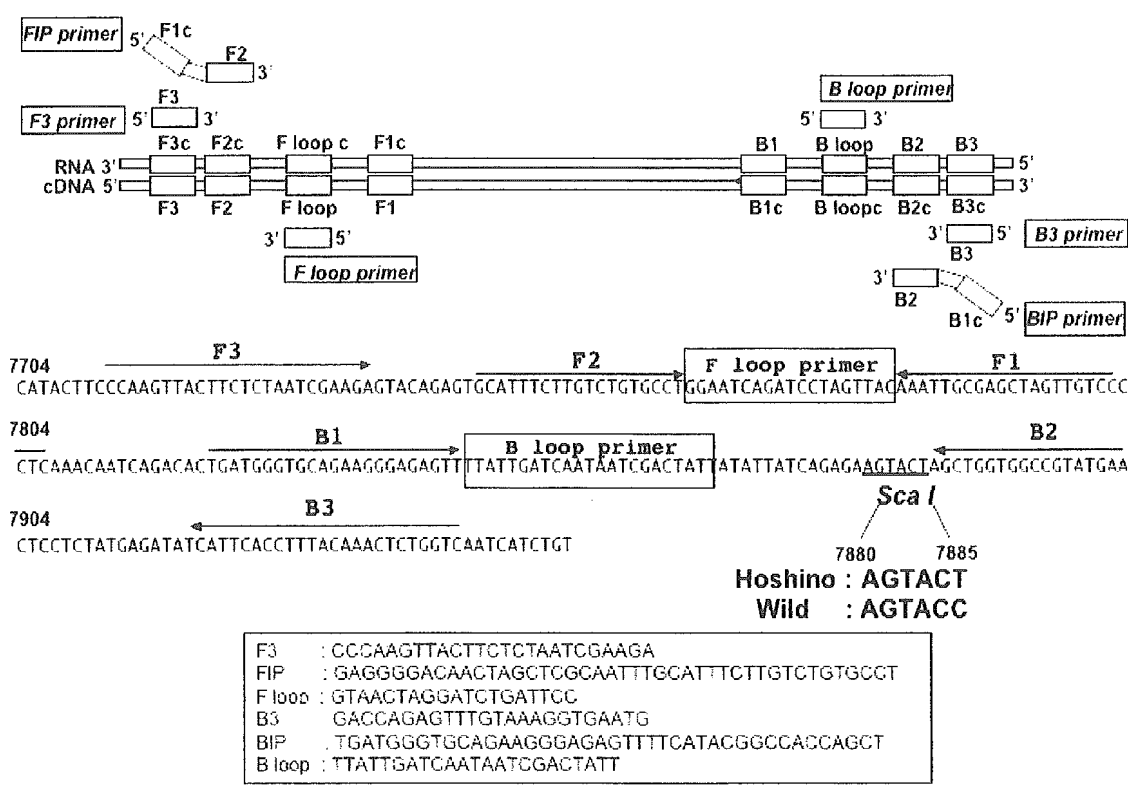


図1 ムンプス星野ワクチン株と野生株鑑別のためのLAMPプライマー

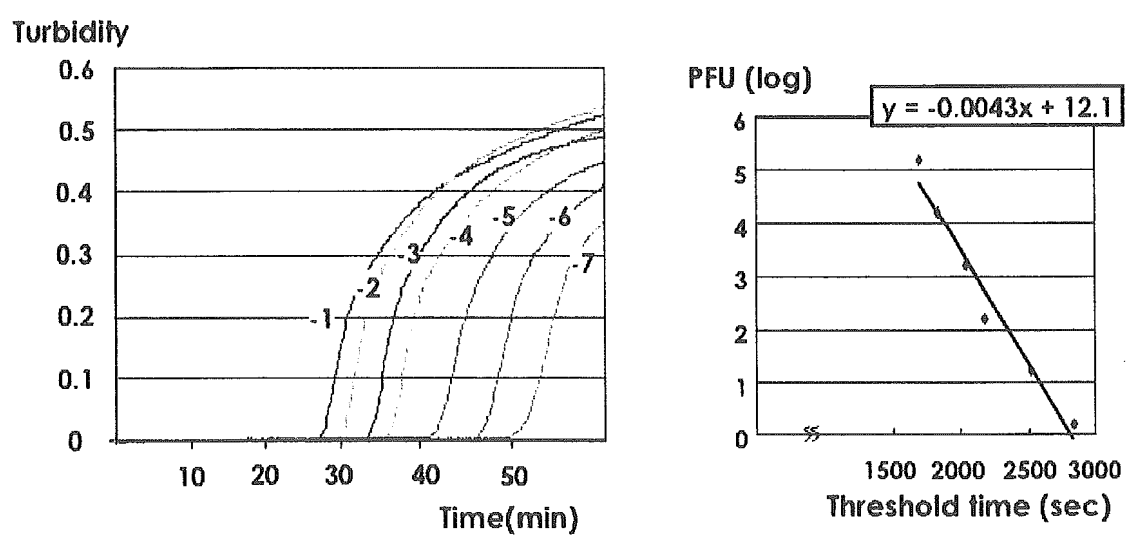


図2 RT-LAMP法の検出限界

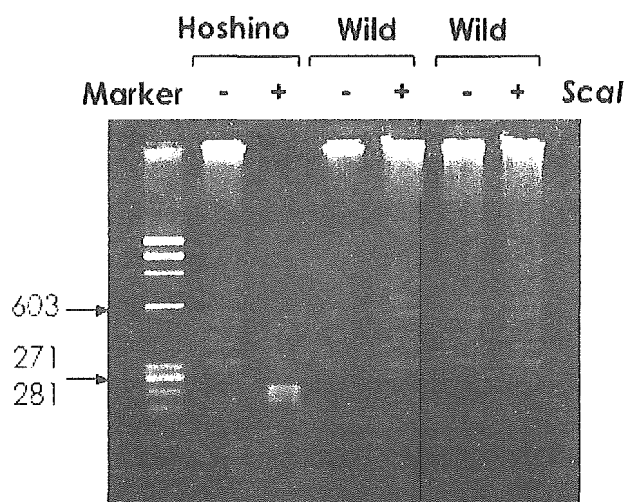


図3 星野ワクチン株と野生株の鑑別

- 3) ワクチン接種後無菌性髄膜炎の髄液 19 例中 18 例から LAMP 法でムンプス遺伝子が検出され、16 例がワクチン株と判定された。ワクチン接種後急性耳下腺炎を起こした患児から得られた咽頭拭い液 16 例中 11 例はワクチン株と判定された。ワクチン接種後 12 日後に副睾丸炎をおこした 1 例の咽頭拭い液から野生株が検出された。

表 1. ワクチン接種後の副反応例の遺伝子鑑別

	症例数	LAMP (+)		LAMP (-)
		Hoshino	Wild	
無菌性髄膜炎	19	16	2	1
急性耳下腺炎	16	11	5	0
副睾丸炎	1	0	1	0

- 4) ワクチン株と判定された 3 例、野生株と判定された 4 例において LAMP 産物を F loop primer を用いて塩基配列を決定した。Sca I 処理によりワクチン株と判定された例は塩基配列の結果からもワクチン株と同定された。

【考察】

ウイルス学的検索の基本はウイルス分離であるが、臨床検体からのウイルス分離の成否は検体採取の方法、その後の保存状況、輸送条件等に影響される。遺伝子検索はこうしたウイルス分離の欠点を補い、効率にウイルス遺伝子を検出できるようになった。ムンプスウイルスは RNA ウィルスで RT-PCR を行い、感度を高めるために nested-PCR を行う。感度は高くなるが、一度反応チューブを開けるために carry-over, contamination の危険性がある。RT-LAMP 法は多くのウイルス感染症でその有用性が報告されてきている。我々はムンプス LAMP 法を開発し 0.1 TCID50 以下のウイルスを検出でき RT-nested PCR と同等もしくは高い検出感度を示すことを報告した。RT 反応と LAMP 反応を同じチューブで反応を進めることができ contamination の危険性も低く感度も高い検査法で

ある。

今回、野生株とワクチン株を鑑別するための LAMP primer を設定した。検出感度は 0.03TCID₅₀/sample で以前の報告とほぼ同程度で臨床的には問題なく応用できることが明らかとなった。臨床検体からウイルス RNA を抽出し LAMP 反応、Sca I 処理、電気泳動と一連の操作は約 2 時間で最終判定できる。ワクチン接種後の副反応例の判定を容易なものとし精度の高い市販後調査を行う事ができる。

文献

- 1) Kashiwagi, Y., Kawashima H, Takekuma K, Hoshika A, Mori T, Nakayama T. Detection of mumps virus genome directly from clinical samples and a simple method for genetic differentiation of the Hoshino vaccine strain from wild strains of mumps virus. J Med Virol 52; 195-199, 1997.
- 2) Okafuji T, Yoshida N, Fujino M, Motegi Y, Ihara T, Ota Y, Notomi T, Nakayama T. Rapid diagnostic method for the detection of mumps virus genome by loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol 43: 1625-1631, 2005.

ムンプスウイルス、おたふくかぜ生ワクチンの神経病原性評価

加藤 篤、木所 稔、田代 真人（国立感染症研究所ウイルス第三部）

永田 典代、岩田奈織子、佐多徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）

網 康至（国立感染症研究所動物管理室）

【背景と目的】

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、ワクチンの副反応としての無菌性髄膜炎が無視できないレベルに達したために定期接種が中止され、現在は単味ワクチンとして任意接種されている。

国産おたふくかぜワクチンの副反応として引き起こされる無菌性髄膜炎の頻度は、自然感染した場合に起こる頻度に比べれば十分に低いものである。しかしながら、海外で用いられているおたふくかぜワクチンの多くに含まれる Jeryll-Lynn 株の副反応発生率は、わが国のおたふくかぜワクチンに比べて 1/100 以下と言われており、海外ワクチンに比べて国産品が劣っている事是否定できない(表)。これが唯一の理由とは言えないが、わが国のおたふくかぜワクチン接種率は先進諸国で最低の部類になっている。そのため、度々全国的な流行が起きている。流行発生後、集団内を抵抗力をもった児童が占めるに従って流行は沈静化する、しかし、抵抗力を持たない児童が補充されて一定割合以上になると流行が再燃する。このサイクルは、だいたい、3~4 年である。今回は、2000 年後半から 2002 年にかけて流行期を迎え、2005 年から今年にかけて再び流行の兆しをみせている。

ムンプスウイルスには血清型は無いが、ウイルス遺伝子を解析すると若干の多様性があり、それに基づき A~K の 11 種類の遺伝子型に分ける事ができる。前回の流行期には、G または K 遺伝子型が主に分離された。今回の流行においては、今の所は、分離した株はすべて G 遺伝子型に属しており前回の 2000 年~2002 年の流行とウイルス学的には大差ないものと予想している。

流行を繰り返さないためには、副反応の少ない優れた国産ワクチンの開発、あるいは海外品の導入が望まれる。国産のおたふくかぜワクチンは、かつてムンプスワクチン研究班が主体となって乳飲みハムスターの脳内接種実験で Jeryll-Lynn 株より病原性が少ない優れた株として選別され、カニクイザルを用いた試験、さらにヒトでの臨床試験で有効性と安全性が確認され上で承認された経緯を持つ製剤である。にもかかわらず、実際に多くのヒトに接種されると Jeryll-Lynn 株より神経病原性が高いものであった。これは、用いた動物実験がヒトでの病原性を反映していないか、あるいは、感度が期待された程ではなかったことを意味する。そこで、今回我々は手始めに、ムンプスウイルスのヒトでの神経病原性を測定する動物試験として報告されている乳飲みラット実験系の妥当性を検討した。

【材料と方法】

<動物及び接種方法、接種量> SPF LEW/Crj (Lewis) 妊娠メスラットを日本チャールス・リバー株式会社より購入し、生まれて 24 時間以内の乳飲みラットを実験に使用した(図 1)。接種量 100 pfu/ 10 ul で左視床に接種した。接種後、30 日目に脳の採取し、固定後の脳断面に於ける水頭症の発生により評価した。

<ムンプスウイルス> 髄膜炎の発生頻度が自然感染患者の 10%程を占めたとされる I 遺伝子型の Odate-1 株(秋田衛生研究所よりの分与)、前回 2002 年の流行時に分離された髄膜炎発生頻度 2%程の K 遺伝子型の 02-49 株(新潟衛生研究所よりの分与)、ワクチン株として B 遺伝子型の国産ワクチン A 株と B 株及び、A 遺伝子型の海外ワクチン Jerryl-Lynn 株を用いた(表)。

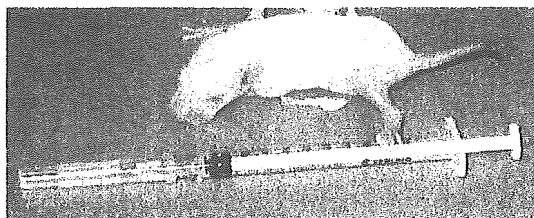


図1. 接種3日目のラット

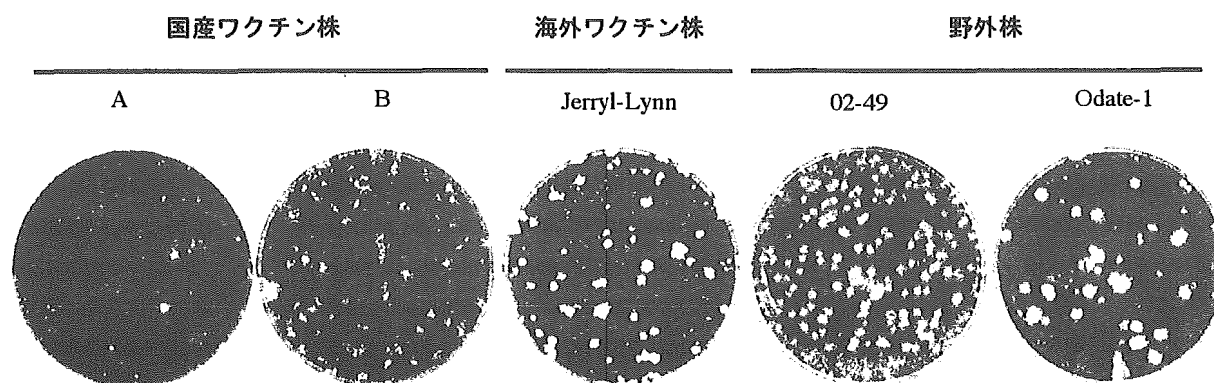
<ウイルスブラックと力価> Vero 細胞を用いたブラックタイトレーション法によりウイルスの力価を測定した。6 穴プレートに均一になるように細胞を培養し、培地を抜き取った後に 0.1 ml の希釈したウイルスを 37℃で 1 時間吸着させた。0.5% (w/v) アガロースを含む MEM 培地を重層し、1 週間培養後に細胞を 0.5% (v/v) グルタルアルデヒド溶液で固定し、アガロースを除いた後にアミドブラック 10B で染色し、出現したブラックの形状観察を行った。ブラック数と希釈率からウイルス力価を算出した。

【結果】

ウイルスブラックの性状

野外株 Odate-1 株と 02-49 株は、どちらも Vero 細胞で非常に大きく、縁辺部の形状のはっきりとしたブラックを形成した。一方、国産ワクチン株 A 株と B 株は小さなブラックを形成し、特に A 株にはピンホール状の多数のブラックが、B 株では A 株に比べて大きいものの縁辺部の形状のはっきりしないブラックが観察された。この条件下で海外のワクチン株である Jerryl-Lynn 株は、野外株よりはやや小さいが、国産ワクチンに比べて大きくて縁辺部のはっきりしたブラックを形成した。(図 2)。

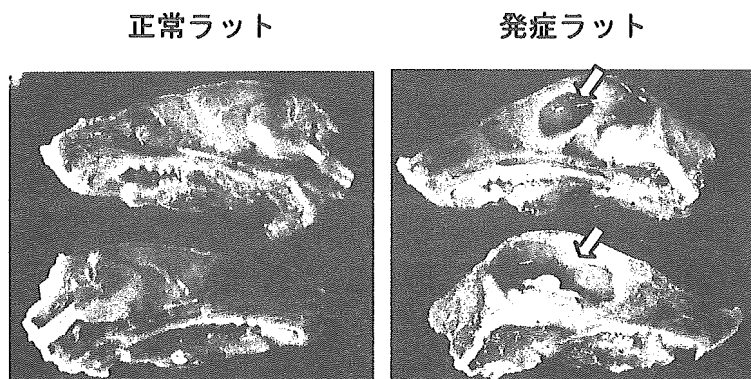
図2. ムンプスウイルス株とブラックの形状



ラット接種成績

Rubin ら(*J. Virol.*, 72:8037-8042, 1998)の方法に従い、神経病原性の異なる5株のムンプスウイルス (100 pfu / 10 ul)を脳内接種した。接種後30日目に脳を採取し、脳内の拡張の様子から水頭症発生の有無(図3)を評価した。

図3. ラット頭部縦断面



野外株については、4~5匹、ワクチン株については9~10匹について調べた(表)。野外株では水頭症の発症が認められたが、ワクチン株では認められなかった。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、大雑把にはある程度の相関があるように思われた。国産と海外のワクチン株内では、今回の試験では差は認められなかった。

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 %)	~0.1%
		B	0 / 9 (0 %)	~0.1%
	海外	Jerryl-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 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

【考 察】

現在、国産のおたふくかぜ生ワクチン3株が出荷されており、いずれもB遺伝子型に属している。ワクチンの有効性という観点からは、2000年~2002年に全国規模で流行したG遺伝子型株、K遺伝子型に属する新しい株に対しても機能することが知られている。また、2005年から始まった流行も今の所G遺伝子型の株が主体と予想され、現行国産ワクチンで対処できるものと予想される。一方、安全性の観点からは、海外のおたふくかぜ生ワクチン Jerryl-Lynn 株に比べて副反応としての無菌性髄膜炎の発生率が高く(表)、ワクチンを普及させ接種率を向上させるための障害とな

っている。よりよいおたふくかぜ生ワクチンの導入あるいは開発が求められているのが現状である。

ワクチンの安全性を評価する品質管理方法として、現在でもいくつかの試験がワクチン製造所の自家試験、並びに国家試験でも行われている。なかでもブラックサイズマーカー試験は、小さなブラックを作るウイルスはヒトでの病下性が低下している証しとして導入されたが、国産ワクチンより副反応率の低い Jerryl-Lynn 株のブラックサイズが国産ワクチンよりも大きく明瞭であることから、既にマーカー試験本来の意味は失なわれていると解釈できる(図 1)。サルを用いた弱毒確認試験も行われているが、とてもヒトでの発生頻度が 0.1%程度の神経病原性を定量的に検出できるほど鋭敏ではない。今後、新しいワクチンを開発するためにも、現行ワクチンの安全性確認のためにも、ヒトでの神経病原性を鋭敏に閏知する実験系が必要とされている。

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、確かに野外株では水頭症の発症頻度が 40~75%、ワクチン株である国産 A、B 株と海外 Jerryl-Lynn 株では 0%になり、ヒトの神経病原性と相関する結果が得られ、有望な試験方法であることが伺えた。

しかし、ヒトでの無菌性髄膜炎発症頻度に明らかな違いがある国産ワクチン株と海外 Jerryl-Lynn 株の差を示すには至っておらず、ヒトでの発生頻度が 0.1%程度のものを測定可能にする工夫が必要である。たとえば、病理組織化学的パラメーターの導入、用いるラットの匹数を増やす、あるいは接種ウイルス量を増やす事等の追加検証が考えられる。また、未だ限られた株での試験成績であるので、用いる野外株並びにワクチン株の数を増やしてヒトでの神経病原性と何処まで相関するのかを詳しく検証する必要があると思われた。

【結語】

おたふくかぜ生ワクチンを普及させるためには、ワクチンの安全性と有効性をきちんとモニターしていく必要がある。なかでも神経病原性を鋭敏に測定できる優れた動物実験系を開発し、新しいワクチンの開発あるいは現行ワクチンの品質管理に応用することが強く求められている。

風疹ウイルス分離株の多様性について

牛島 廣治、周 玉梅 (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)

Teryl Frey (米国ジョージア州立大学生物学教室)

要旨

風疹ウイルスの遺伝子型間の関係を明らかにするために、5つの遺伝子型の6株において全遺伝子の決定と、8つの遺伝子型を代表する42株のNSプロテアーゼ(NP)、SGプロモーター(SGP)の解析をおこなった。

既に全遺伝子配列が報告されている2つの遺伝子型の10株とともに、総計8つの遺伝子型の16株において比較した結果、ともに同じ長さの2つのORFと3つの非翻訳領域があった。ただ遺伝子型2Bの2株においてSGP領域において1塩基短かった。塩基配列において遺伝子の最大の変異は9%であった。NP,SGPおよびE1領域で8遺伝子型の42株で系統樹を調べたところ、1Bを除く全て同じ系統樹が書けた。以前はE1領域のみの報告であったがNP,SGP、E1ともに風疹ウイルスの全体、組み換え、進化を理解するのに有用であることがわかった。興味深いことは遺伝子型2Bに加えて、遺伝子型1BにおいてSGP領域に僅かの変異が見られた。したがってSGP領域が遺伝子型を決めるのに有用なことが示唆された。さらにE2領域でclade 1に反応するモノクローナル抗体がclade 2 (遺伝子型2A, 2Bおよび2C)のどのウイルスとも反応しないことがわかり、2つのcladeの鑑別がウエスタンブロット法で可能なことがわかった。

緒言

風疹ウイルスはヒトの急性発疹を伴う感染症とされており、また先天性風疹症候群として奇形を伴う疾患である。風疹ウイルスはトガウイルス科のルビウイルス属でありエンベロープを有する、一本鎖のRNAウイルスである。約10kbで2つのORFと3つのUTR、5'末端にキャップ構造、3'末端にポリA構造を持つ。E1領域ならびに幾つかのウイルスのSP-ORFの遺伝子配列から、風疹ウイルスは9つの遺伝子型を含む2つのcladeに分けられる。先天性風疹症候群の重篤な疾患のためワクチンの接種が必要であるが、同時に風疹ウイルスの地域、時代による違いを分子疫学的に知ることが必要である。今回、前回から解析した分離株の遺伝子解析をさらに進め、2, 3の新しい知見を得たので報告する。

方法

ウイルスRNA抽出、cDNAの増幅ならびに遺伝子解析

E1領域の系統樹からウイルス株を選び、Vero細胞にMOI=0.1で培養しウイルスを得た。

その後ウイルス遺伝子を得、特異プライマーを用いた RT-PCR で増殖し、その後遺伝子解析を行った。

遺伝子アラインメントと系統樹解析

Clustal W multiple sequence alignment program (Version 1.8), Pile Up, Plotsimilarity and Old distance program in the GCG package software, Tree-puzzle (Version 5.2) および Mrbayes program (Version 3.1) が遺伝子のアライメントならびに系統樹の作成に用いられた。

ウイルス蛋白のウエスタンブロット解析

Vero 細胞で増殖したウイルスは、感染 6 – 7 日後に採取され PEG で濃縮される。密度勾配の超遠心で分画を得た後に、4°C で保存される。ウイルス蛋白は電気泳動をした後に 3 つの蛋白 (C, E1, E2) の MA b 蛋白のカクテルに浸した後にアルカリホスファターゼ標識抗マウス IgG を用いて反応させた。

結果と考察

さまざまな風疹ウイルス遺伝子型に対して 90% 以上の核酸の相同性が見られた。J-UTR 領域において 1 塩基あるいは 2 塩基欠損が 2 B あるいは 1 B の遺伝子型において認められた。この部分のみが風疹ウイルスで変化が認められることから極めて安定性があることがわかった。この部分の変化が subgenomic RNA の合成あるいは機能に影響を及ぼすか否かは興味深い。

ゲノム HVR 領域 (2120–2440) の系統樹に関する遺伝子配列から 最大 26.1% の変化、GC から最大 83.8% の変化、1 以上の α 値、最低の k 値を示すことはこの領域が異なる進化のプレッシャーを受けていることがわかった。この領域の生物学的機能を今後検討したい。

NS プロテアーゼ、SG プロモーター (J-UTR) 領域の系統樹からともに遺伝子型 1B において異なる分岐を持つことがわかり、この領域に異なった進化率が存在することがわかった。

E2 領域の異なった抗原反応性が E2 領域で認められた。

Figure 1. Phylogenetic relationship of rubella virus genotypes. The phylogenetic tree was constructed using E1 sequences (nts 8291-9469) by MrBayes program (version 3.1) with setting of 600,000 ngen, 100 samplefreq, 4 nchains, 250 burnin. The reference strains of each genotype were marked by yellow, the strains sequenced in this studies were marked by blue.

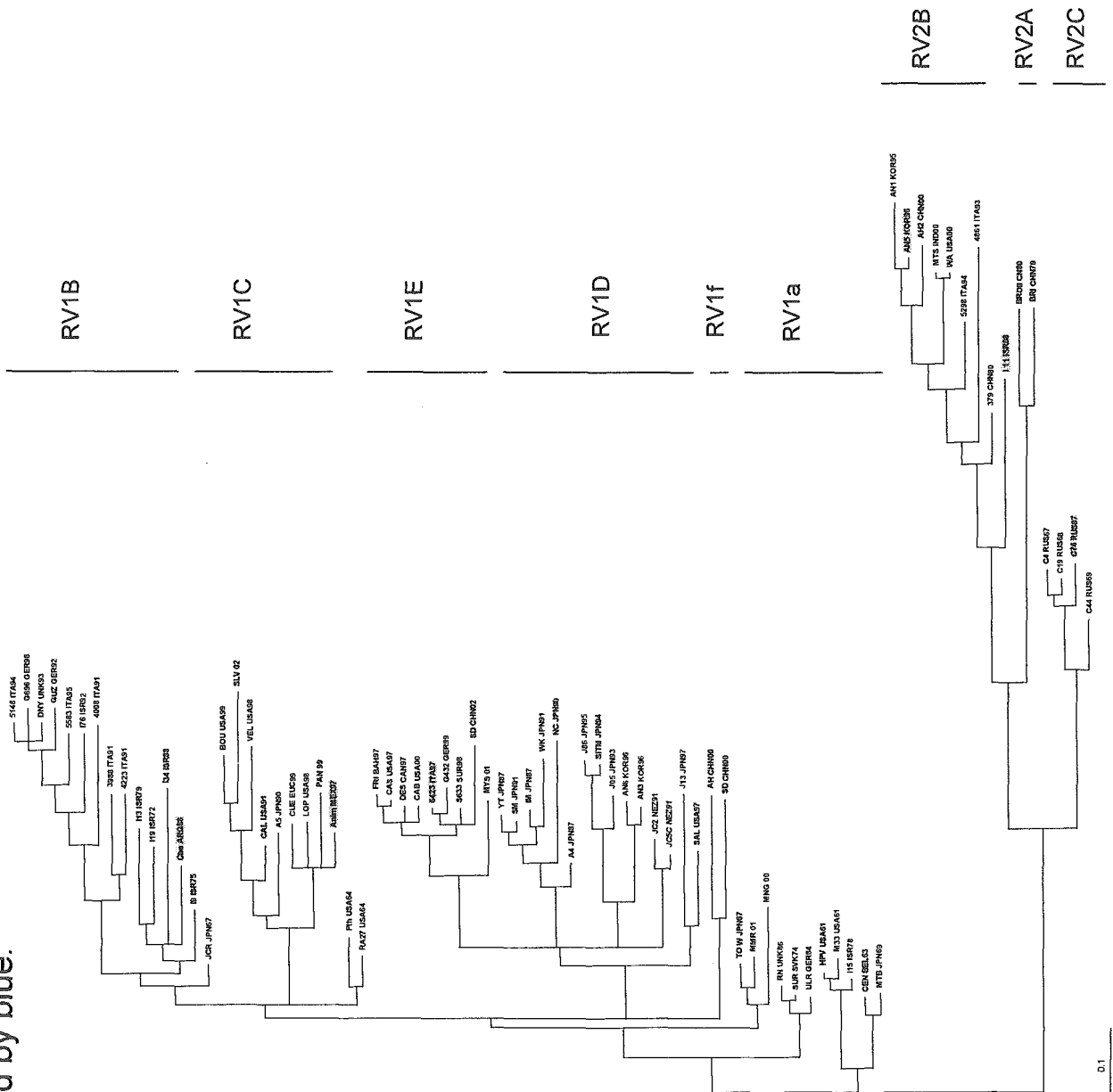


Figure 2. Phylogenetic tree. Tree was built with sixteen whole genomes by Tree-puzzle program (version 5.2) with 10,000 puzzle step. Numbers indicated the reliability values for each grouping.

