

 1 : Detection of HBsAg (0.2 IU/ml) by various diagnostic kits

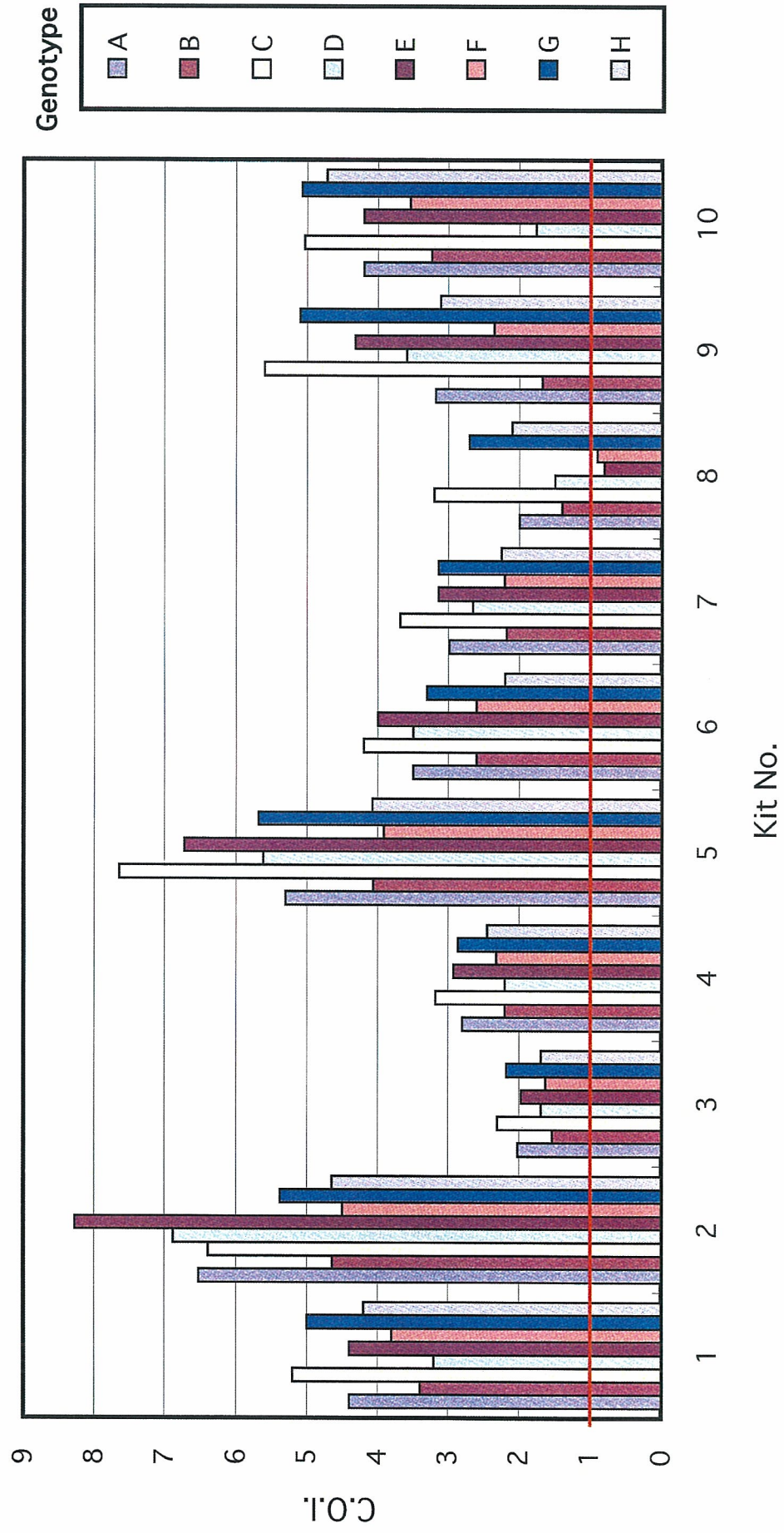


Figure 2 : Amino Acid Sequences of HBsAg

“a” determinant encoded by various HBV genotypes

Genotype	98	100	110	120	130	140	150	161																												
A	LDY	QGM	LPVC	PLIP	GS	TTT	STG	PCKTCTT	PAQ	GN	SM	FP	SC	CC	CTK	PT	D	G	N	C	T	C	I	P	I	P	S	S	W	A	F	A	K	Y		
B	LDY	QGM	LPVC	PLIP	GS	TTT	STG	PCKTCTT	PAQ	GT	SM	FP	SC	CC	CTK	PT	D	G	N	C	T	C	I	P	I	P	S	S	W	A	F	A	K	Y		
C	LDY	QGM	LPVC	PLIP	GS	TTT	STG	PCKTCTT	PAQ	GT	SM	FP	SC	CC	CTK	PT	D	G	N	C	T	C	I	P	I	P	S	S	W	A	F	A	R	F		
D	LDY	QGM	LPVC	PLIP	GS	TTT	STG	PCR	TCTT	PAQ	GT	SM	Y	P	SC	CC	TK	PT	D	G	N	C	T	C	I	P	I	P	S	S	W	A	F	G	K	F
E	LDY	QGM	LPVC	PLIP	GS	TTT	STG	PCR	TCTT	LAQ	GT	SM	FP	SC	CC	SK	PT	D	G	N	C	T	C	I	P	I	P	S	S	W	A	F	G	K	F	
F	LDY	QGM	LPVC	PLIP	GS	TTT	STG	PCKTCA	TLAQ	GT	SM	FP	SC	CC	SK	PT	D	G	N	C	T	C	I	P	I	P	S	S	W	A	L	G	K	Y		
G	LDY	QGM	LPVC	PLIP	GS	PTT	STG	PCKTCTT	PAQ	GN	SM	Y	P	SC	CC	CTK	PT	D	G	N	C	T	C	I	P	I	P	S	S	W	A	F	A	K	F	
H	LDY	QGM	LPVC	PLIP	GS	TTT	STG	PCKTCTT	LAQ	GT	SM	FP	SC	CC	CTK	PT	D	G	N	C	T	C	I	P	I	P	S	S	W	A	F	G	K	Y		

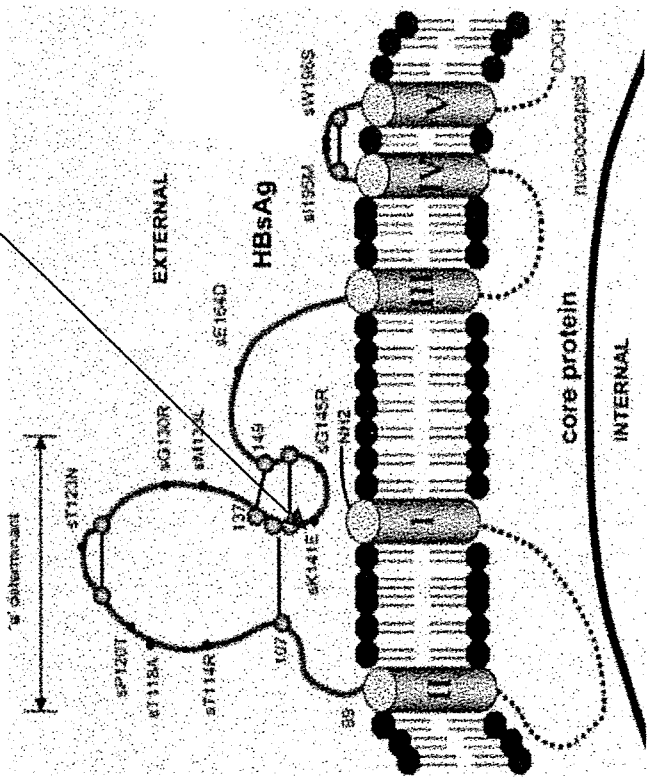
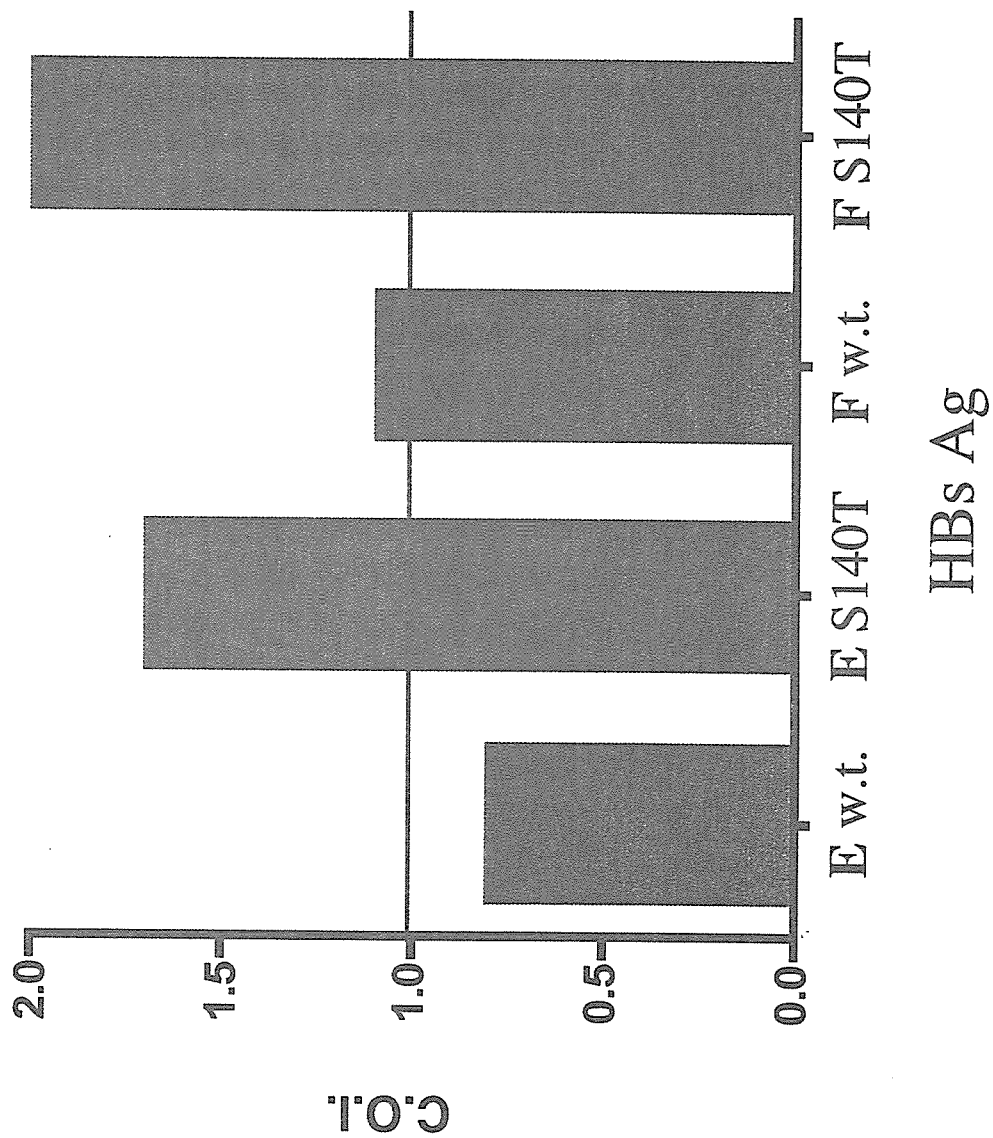


図 3 : Effect of amino acid substitution in position 140 of the HBsAg “a” determinant on detection by No.8 diagnostic kit



厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書
HBs 抗原変異と HBs 抗原検出法に関する研究

分担研究者：山口 一成 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 部長
協力研究者：水沢左衛子 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 主任研究官

Small HBs 抗原はB型肝炎ウイルス感染の主要マーカーであるが、共通抗原基 a に変異を起こした HBs 抗原変異株が分離されるようになって、診断薬の評価のために種々の変異型 HBs 抗原を含むパネルの整備が求められている。昨年度の研究において *in vitro* mutagenesis 法を用いて4種類の変異型 HBs 抗原を作製した。本研究はこれらの変異型 HBs 抗原を国内で販売されている 5 種類の高感度 HBs 検出キットを用いて測定した。測定に影響を与える変異はキットにより異なった。この結果から、遺伝子組換え法によって作成した変異型 HBs 抗原パネルの診断用 HBs 抗原検出試薬の評価系としての有用性が示された。また、*in vitro* mutagenesis 法を改良した結果、変異型 HBs 抗原の効率的な作成が可能になった。

A. 研究目的

HBs 抗原はB型肝炎ウイルス感染の主要マーカーであるが、近年抗原変異株が分離されるようになった。しかし、診断用 HBs 抗原検出試薬の中には変異型 HBs 抗原を検出できない例のあることが報告されている。これらの変異はB型肝炎ワクチン接種やHBs抗体の投与によって共通抗原基 a (中和抗体認識部位、図1) に変異を起こしたエスケープ変異やHBV 持続感染者から自然経過の中で生じた変異として報告されており、B 型肝炎の予防・治療のうえで問題となっている。そこで、診断用 HBs 抗原検出試薬の評価のために種々の変異型 HBs 抗原を含むパネルの整備が求められているが、このような変異型 HBs 抗原を含む血漿は入手が困難であり、また、量にも限りがある。昨年度において *in vitro* mutagenesis により共通抗原基 a に変異を導入した 4 種類の変異型 HBs 抗原を作製した。

本研究においては①これらの変異型 HBs 抗原パネルの HBs 抗原検出キットの評価系としての有用性の検討と②効率の良い *in vitro* mutagenesis 法の改良とを目的とした。

B. 研究方法

1) 変異型 HBs 抗原

日本でもっともよく見られる subtype adr, genotype C の HBV-DNA 国内標準品由来のプラスミド c11.2 (本研究班分担研究者 岡田) に *in vitro* mutagenesis 法によって4種類のアミノ酸置換 (G145R、G145A、M133T 及び T123N) を導入したプラスミドを作製した。野生型及び変異体プラスミドを lipofectin 試薬を用いてヒト肝細胞由来細胞株に DNA 感染させ、培養上清を HBs 抗原の材料とした。HBs 抗原濃度は、現在唯一「HBs 抗原定量キット」として承認されているアーキテクト・HBsAg QT (アボットジャパン (株)) を用いて測定し、それぞれの検体を 0.2 IU

(International Unit)/ml の濃度に調整して検体として用いた。G 代表的なエスケープ変異 G145R については 2 つのクローン G145R-1 と G145R-11 を用いた。

2) HBs 抗原検出キット

国内で販売されているキットなかの 5 種類の高感度 HBs 抗原検出キットを使用した。

3) Reverse PCR 法による変異型プラスミドの作製

図 1-B に示すように、置換する塩基配列を持ったプライマーとそれに隣接する逆向きのプライマーを用いて Reverse PCR 法によってプラスミド全体を増幅後、アガロースゲル電気泳動で増幅産物を精製、ライゲーションしてトランスフォーメーションに用いた。PCR には KOD plus DNA Polymerase (TOYOBO) を用いた。置換部位の塩基配列を確認後、Small HBs 領域全体の塩基配列を決定して置換部位以外に変異が無いことを確認した。

(倫理面への配慮) 本研究では研究材料として国内標準品由来の DNA 組み換え体を用いたので、倫理面での配慮は特に必要ない。

C. 研究結果

1) HBs 抗原検出キットによる変異型 HBs 抗原の測定 (図 1)

測定値は各キットの cut-off 値に対する比 (C.I.O) であらわした。各検体をアーキテクト・HBsAg QT (アボットジャパン株式会社) を用いて測定し、それぞれを 0.2 IU (International Unit)/ml の濃度に調整して測定試料として用いた。アーキテクト・HBsAg QT で改めて測定した結果をキット No.1 とし示した。測定した 4 種類の変異のうち

G145A と M133T はいずれのキットによっても検出できた。G145R-1 と G145-11 はキット No.2 と No.3 では陽性と判定できたが、キット No.4 と No.5 では cut-off 値付近であった。一方、T123N はキット No.2 と No.3 では cut-off 値付近であったが、キット No.4 と No.5 では野生型よりも測定値は高かった。

2) 変異型プラスミドの作製法の改良

本研究で用いた 4 種の変異体は図 1-A に示すように 2 つの断片に分けて PCR で増幅した産物をアガロースゲル電気泳動で精製し、別途調整したベクターにライゲーションして作製した。図 1-A に一例をしめすが、8 個のクローンを調べて、置換部位の塩基配列が正しいものが 5 個、このうち 2 個について HBs インサート全体の塩基配列を決定した結果、置換部位以外に変異を起こしていないクローンは 1 個であった。

同様に図 1-B に Reverse PCR 法の一例を示すが、12 個のクローンを調べて、置換部位の塩基配列が正しいものが 11 個、このうち 2 個について HBs インサート全体の塩基配列を決定した結果、いずれにも置換部位以外の変異は無かった。

D. 考察

共通のバックグラウンドに導入した 4 種類の遺伝子組換え変異型 HBs 抗原を国内で使用している 5 種類の HBs 抗原検出キットを用いて測定した結果、変異 G145R と T123N とではキットによって性能に与える影響が異なった。この結果は、HBs 抗原検出試薬の評価系としての遺伝子組換え HBs 抗原パネルの有用性を示している。

また、*in vitro* mutagenesis 法を改良した結果、変異型 HBs 抗原の効率的な作成が可能に

なった。そこで、国内で報告されている変異や海外から持ち込まれる可能性のある変異を反映した遺伝子組換え HBs 抗原パネルを整備すれば、HBs 抗原検出試薬の性能の向上に寄与することが可能となる。

E. 結論

HBs 抗原検出試薬の評価系としての遺伝子組換え HBs 抗原パネルの有用性がされた。また、*in vitro* mutagenesis 法を改良した結果、変異型 HBs 抗原の効率的な作成が可能になった。

F. 健康危険情報

該当しない

G. 研究発表

(1) 論文発表

“Evaluation of 10 commercial diagnostic

kits for in vitro expressed hepatitis B virus (HBV) surface antigens encoded by HBV of genotypes A to H “

Mizuochi, T., Y. Okada, K. Umemori, S. Mizusawa, and K. Yamaguchi,

J. Virol. Methods 136:254-256, 2006.

「国内で販売されている 10 種類の高感度キットを用いた異なる HBV genotype 由来 HBs 抗原の検出(続報)」水落利明、岡田義昭、梅森清子、水澤左衛子、山口一成、「臨床検査」(印刷中)

(2) 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

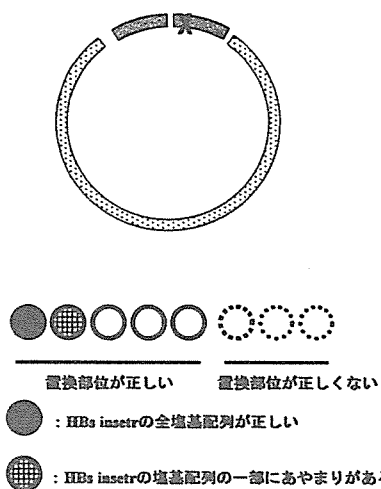
(1) 特許取得 なし

(2) 実用新案登録 なし

(3) その他 なし

図1：変異型プラスミドの作製法の改良

(A) 従来法



(B) Reverse PCR

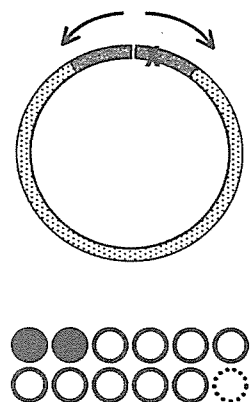
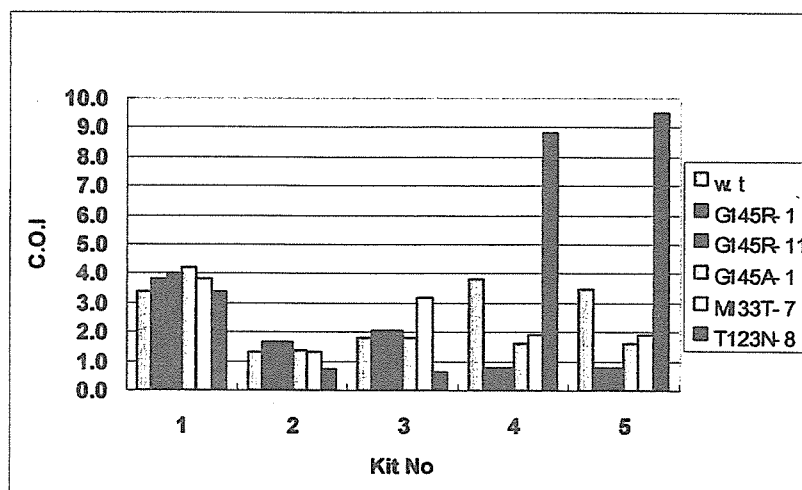


図2：各HBs抗原検出キットによるHBs変異型抗原の測定



研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>海野幸子</u>	予防接種 光と影	臨床とウイルス	34	245-252	2006
<u>庵原俊昭</u>	麻疹・風疹・水痘・ムンプスに対する病院および地域における感染制御対策の最近の動向	医療	60	483-488	2006
<u>庵原俊昭</u>	風疹、先天性風疹症候群	小児内科	38	308-309	2006
<u>川名 尚</u>	母子感染に関する新しい流れ	帝京平成看護短期大学紀要	16	9-12	2006
<u>川名 尚</u>	周産期感染症の最近の動向と課題	産婦人科の実際	55	307-315	2006
<u>種村光代</u>	産科領域における風疹対策	小児科	47	988-995	2006
<u>T.Mizuochhi,</u> <u>Y. Okada,</u> <u>S. Mizusawa,</u> <u>K. Yamaguchi,</u> <i>et.al</i>	Evaluation of 10commercial diagnostic kits for in vitro expressed hepatitis B virus(HBV)surface antigens encoded by HBV of genotypes A to H	J Virol Methods	136	254-256	2006
<u>水落利明、</u> <u>岡田義昭、</u> <u>水澤左衛子、</u> <u>山口一成 他</u>	国内で販売されている10種類の高感度キットを用いた異なる HBV genotype 由来 HBs 抗原の検出(続報)	臨床検査	印刷中		2007

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別冊 (平成18年度)

風 疹

海 野 幸 子 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 生物系審査部
(元国立感染症研究所 ウイルス第3部)

1. はじめに

風疹は、発疹を伴う主として小児の罹る全身性のウイルス感染症である。三日はしかとよばれるように、小児においては麻疹に比べ症状が軽い。しかし、妊娠初期に感染すると、出生児に先天性の異常がもたらされることがある。この先天性風疹症候群（Congenital Rubella Syndrome：CRS）が、風疹において最も深刻な問題である。風疹とCRSの関連は1941年のGreggの指摘にさかのぼり、原因である風疹ウイルスはその21年後の1962年に米国で初めて分離された。

1962～1965年の世界的な風疹大流行時に、米国では1,250万人が風疹に罹り2万例のCRSが発生したため、予防接種政策の必要性が強く促された。短期間の開発により1969～1970年にはHPV-77とCendhillワクチンが認可され、続いて1979年には、始め欧州で認可されたRA27/3ワクチンが米国に導入された。我が国では、1964～1965年に当時米国の統治下にあった沖縄で大流行があり、408人のCRS児が生まれた。我が国でもワクチンの開発が1970年から開始され、1975年には弱毒生風疹ワクチンの製造が認可されて、1977年から定期接種に組み入れられた。その後30年あまりが経過した現在、我が国の風疹ワクチンとその予防接種の足跡を振り返ってみる。

2. 風疹と先天性風疹

風疹は、春先から初夏に流行し、1～9歳の

感染者が多い。風疹は飛沫により伝播するが、その感染力は麻疹よりも弱い。2～3週間の潜伏期間の後に、軽い発熱や倦怠感、耳介後部のリンパ節腫脹と発疹が出現するが、不顕性感染も多い。小児よりも成人の臨床症状が顕著となるが、一般に予後は良好である。成人に一過性の関節痛や関節炎が生じることがある。まれな合併症として、血小板減少や脳炎がある。発疹の前後1週間は上気道からウイルスが排出され、感染源となる。

CRSは風疹の胎内感染によって必ず発生する訳ではなく、妊娠期間中の母親の感染時期により、その発生頻度、重症度が大きく異なる。発生頻度は報告によって異なるが、妊娠の初めの3ヶ月までは、33～90%に白内障や心疾患、難聴の3症状が複合的に現れる。次の3ヶ月では難聴が11～24%に、20週を越えるとたとえ感染があっても症状は見られなくなる¹⁾。通常、CRSの発生は風疹の初感染に多く、再感染では極めて少ない。風疹の診断と感染時期の特定は、その後の不必要な中絶を避けるために重要である。

現在、CRSは、感染症法の新5類感染症として全例報告の対象疾患である。また、風疹も同類の定点把握疾患として全国3,000の小児科定点による報告が感染症発生動向調査として集約されている。

風疹に罹ってからCRSを防ぐ方法はなく、妊娠期間中に風疹ウイルスに感染しないこと以外の対策はない。あらかじめワクチン接種によって抗体を付与することで、妊婦を感染か

Rubella

Yukiko UMINO, Office of Biologics, Pharmaceuticals and Medical Devices Agency

ら守ることが風疹ワクチンの第一義の目的である。

3. 風疹ワクチンの開発と製造

我が国で現在用いられている弱毒生ワクチンは To-336(武田薬品工業株式会社), 松浦(阪大微生物病研究会), 高橋(北里研究所), 松葉(化学及血清療法研究所)の各株で製造された4種である(表1)。1970年のワクチン開発当時, 我が国で流行していた風疹ウイルスは米国のウイルスよりも CRS の発生が低いと考えられていたために, 1966~1969年に日本の風疹患者から分離された風疹ウイルスを元に, ワクチン株の開発が行われた²⁾。また, 病原性の弱毒化が胎児に対する催奇形性の減弱に直接関連するかどうか調べる事が出来ないために, ワクチン被接種者からワクチンウイルスが風疹抗体を持たない接触者へ伝播しないことが CRS を防ぐために使われるワクチンとしての必須条件とされた。前者の性質については, 後に植田らの注意深い疫学研究により我が国に流行した風疹ウイルスの CRS 発生率 (0.1~6.1症例/年毎の

10万人出生)は, 米国の風疹ウイルスと差がないことが明らかにされた³⁾。分離ウイルスをそれぞれ種々の細胞に低温 (29~34℃) で継代することにより, ワクチン株の策出に成功した。この弱毒化の過程で, 人への病原性の低下がヒトと同じウイルス量を接種したウサギやモルモットでの抗体誘導能の低下に平行していた。そのため, 接種された動物の80%以上は抗体を産生しないことが弱毒マーカーとなり, ワクチン株としてのもう一つの条件となった。松葉株は, このマーカーに適合せず, 更なる弱毒化を加える必要があったため, 認可が他の3株よりも数年遅れた。最終的にこれらの要件を満たし, 且つ人への免疫原性と安全性が確認された先のワクチンが認可された。同時に, 風疹ワクチンの生物学的製剤基準として, 実際のワクチンは認可ワクチンから5代の細胞継代の範囲で製造されなくてはならないこと, また, 基本的製造方法と各行程における安全性を確認する試験, および有効性の指標としての力価(感染性ウイルス量)試験の実施が定められた。以降のワクチン製造はこの基準を遵守し, 認可ワクチンと

表1 風疹ワクチン (文献4より改変)

ウイルス株名	分離場所・年	継代歴*	弱毒化過程の培養温度 (℃)	ワクチン製造細胞*	製造機関
松浦	大阪・1966	GMK ₁₄ E ₆₅ Q ₁₁	32~35	Q	阪大微生物病研究会
To-336	富山・1967	GMK ₇ GPK ₂₀ RK ₃	29~32	RK	武田薬品工業株式会社
高橋	松江・1968	GMK ₄ RT ₃₆ RK ₁	30	RK	北里研究所
松葉	熊本・1969	GMK ₃ SK ₆₀ RK ₁₁	29~34	RK	化学及血清療法研究所
RA27/3	米国・1965	WI-38 ₂₅	30~35	HDCS	Merk, SmithKline-RIT, Aventis, Serum Institute of India など

* GMK: ミドリザル腎細胞, E: 孵化鶏卵羊膜腔, Q: ウズラ胚細胞
GPK: モルモット腎細胞, RK: ウサギ腎細胞, RT: ウサギ睾丸細胞
SK: ブタ腎細胞, WI-38: ヒト二倍体細胞, HDCS: ヒト二倍体細胞株
数値は継代数

同じ培養条件で行われねばならない。マーカー試験もこの生物学的製剤基準に盛り込まれた。後に、ワクチンウイルスが元の株に比べ温度感受性であることが明らかにされ、動物において免疫原性が低下するのは、それらの体温（39℃以上）ではワクチンウイルスの増殖が著しく抑制されるためと考えられた⁴⁾。日本のワクチン株は、当然、全てマーカー試験の基準を満たし、株間に若干違いがあるものの、39℃の細胞培養でのウイルス増殖は37℃に比べ約1/1,000～1/10,000に低下した。現在、日本と中国を除く世界で汎用されているRA27/3は、マーカー試験に適合せず²⁾、39℃の細胞培養での増殖抑制の程度は1/30と野外ウイルスよりも高いが日本のワクチン株に比べ低かった（海野、個人情報）。この性質の違いは、開発当時外国の風疹ワクチンは被接種者からのウイルス伝播が完全にはなくなっていなかったため、マーカー試験を指標にしてRA27/3より弱毒化したウイルスを得ようとした結果と考えられた。RA27/3の作出過程でも低温培養が行われたが、ヒト二倍体細胞だけを用い継代数が少ないことが日本の株と異なった⁵⁾。他のワクチンの例からも温度感受性がヒトへの病原性低下と関連していると考えられるが、風疹ワクチン株としての病原性弱毒の閾値は、マーカー試験を満たすほどに温度感受性である必要はないのかもしれない。

一般に生ワクチン製造の際のウイルスの感染効率は低く、ウイルスを収穫するまでの培養期間に複数回の増殖サイクルを経ている。そのため変異が蓄積される可能性があり、生ワクチンは全く均一なウイルス集団ではないと考えられている。その意味で、マーカー試験はワクチンに含まれる主たる割合を占めるワクチンウイルスの性質が製造ロット毎に変化していないことを確認する役割も果たしている。

製造が承認されたワクチンと同じ性質のワクチンを恒常的に製造するためには、よく性質が調べられている均一で大量の種ウイルスを連続的に出発材料とする製造方法、すなわちシードロットシステムによる製造が基本である。目下、厚生労働省科学研究班で、各製造所の実情に立ったシードロットシステムの具体案が議論されているが、その導入が急がれる。また、製

造承認株からの細胞による継代幅は、継代によるワクチンの免疫原性への影響が確認されて定められた訳ではない。ヒトへの有効性はワクチンの力価だけでは把握しがたい。今後、これまでよりも継代を進めたワクチンが製造される場合は、市販後の有効性についての調査が重要となる。

ウシ海綿状脳症の発生以来、ワクチン製造に用いられるウシ血清や細胞（動物）およびトリプシンなどの生物由来原料の品質および安全性確保のために基準が定められ、病原体の混入がないことが厳しく規制されている。例えば、ウシ血清はBSE非発生国産を用い、培養された細胞はウイルス感染後に洗浄されて血清を含まない培地で培養されることで、ワクチンに含有される異種血清アルブミンは50ng未満に抑えられている。しかし、可能な限り動物由来原料を使用しない製造法を模索することも将来の課題である。

4. ワクチン株の性状

開発時の野外接種試験において、ワクチンを接種して6週間後のHI抗体による4株の抗体陽転率（HI抗体8倍以上）は91～100%と高く、獲得されるHI抗体価は、 $2^{5.7-7.4}$ を示した。To-336と松葉の抗体の持続期間は、それぞれ10、20数年と報告されている^{6,7)}。4株とも小児では発熱、発疹、リンパ節腫脹の臨床反応はほとんど見られず、青年女子では発熱（0～2%）、発疹（0～4%）、リンパ節腫脹（0～3.8%）、特に関節痛（0.2～5%）などが認められた。4株の中でTo-336がやや臨床反応が強かった。被接種者の約1/3からウイルスの排出が認められたが、接触者へ伝播することはなかった。

厚生労働省による平成8年度から14年度の37,918人を対象者とする予防接種後副反応の調査結果によれば4株の副反応に大差は見られなかった。副反応として、38.5℃以上の発熱；6.5%，発疹；2.7%，リンパ節腫脹；0.9%，関節痛；0.6%が発生した。局所反応は、To-336株と松葉株で1.5%と1.2%であるのに対し、高橋株では7.4%，次いで松浦株で3.8%とワクチンによる違いが見られた。発熱の報告が

開発当時より多かったが、他は開発時の結果と変わらなかった。

他方、成人への接種において RA27/3 と比較された To-336 の抗体陽転率は 97% で 100% の RA27/3 に比べやや低いが、RA27/3 よりも僅かに高い抗体を誘導することが報告された⁸⁾。また、To-336 は発疹、リンパ節腫脹、関節症状のいずれの臨床反応も明らかに RA27/3 より弱かった。両者の被接種者からウイルス排出はあるが、伝播は認められなかった。ワクチン接種後 6 ～ 8 年の抗体陽性率は RA27/3 が 100% であるのに対し To-336 のそれは 93% だった⁹⁾。

前述のように、ワクチン株による CRS 発生は実験的に否定された訳ではないので、妊婦には接種してはならない。接種前少なくとも 1 ヶ月間避妊し、接種後は 2 ヶ月の避妊が必要である。しかし、誤って妊娠中に接種しても、これまで出生児に異常が発生した報告はないので、妊娠継続を諦める必要はない¹⁰⁾。

5. ワクチン接種プログラムの変遷と風疹流行および CRS の発生

既に、米国では風疹流行の主体である感受性小児に免疫を与えて流行そのものを阻止しようと小児を対象にワクチン接種が行われていたが、我が国では、CRS の発生を防ぐために妊婦の感染防止に重点において、妊娠前の思春期の女性に接種を行う英国の方式にならって、1977 年に中学生女子 (12 ～ 15 歳) を対象とする定期接種が開始された。その理由は、当時は大流行の直後で、1) 次の流行までに出来るだけ多数の妊婦に免疫を与えるという緊急性、2) 開発されたばかりで、ワクチンによる免疫の持続について不安があったため、なるべく妊娠年齢に近いところで接種する、また、3) ワクチン被接種者から周囲の妊婦に感染を起こす不安を少なくするため、中学生のいる家庭では妊婦のいることが少ないと言う点を配慮したことだった。その後 1989 ～ 1992 年には、麻疹ワクチンの定期接種の際に麻疹・おたふくかぜ・風疹混合 (MMR) ワクチンが一部に使用された。次いで、1994 年に予防接種法が改正され、風疹ワクチンの接種対象者は男女小児 (生後 12 ～ 90 ヶ月未満 (標準 ; 12 ～ 36 ヶ月)) に広げられた。

接種対象年齢が引き下げられたことによりワクチン接種の機会を失う男女 (1979 年 4 月 2 日 ～ 1987 年 10 月 1 日生まれ) が中学生で接種を受けられるように 2003 年までの経過措置が施された。この時ワクチンの定期接種はそれまでの集団接種から個別接種と接種方式も変更され、このことが特に経過措置対象者の接種率の低下を招くことになった。

1982 年から始められた感染症発生動向調査によると、風疹流行は 5 年ごとに全国的に繰り返され、それに伴って多くの CRS が発生していたが、1994 年以降全国流行はほとんど見られなくなった^{11,12)} (図 1)。1999 年以降の減少は顕著で、2003 年までの定点報告数は毎年約 3,000 に留まり、CRS の発生も各年 1 例にまで減少した。これは、MMR の使用に引き続いて、1994 年からの小児への接種によって、風疹感受性の小児が大幅に減少したことによる。しかしながら、2004 年に地域流行が起き、風疹報告数が 4,239 に増加し、10 例の CRS が発生した。感染者の年齢はそれまでの 1 ～ 5 歳から 10 ～ 14 歳と 20 歳以上に上昇し、しかも男性が多い特徴を示した¹¹⁾。この現象は、Anderson らに指摘されているように、小児へのワクチン接種率が風疹流行を完全に阻止するほど十分に高くないために、ワクチン接種を受けず自然感染による抗体獲得もないままに成長した思春期層や青年層が感染して患者年齢を上昇させたと考えられた¹⁴⁾。幸い 2004 年の流行は 2005 年に持ち越されることなく、風疹の報告数は 894 例と過去最低値に、CRS は 2 例に留まった¹³⁾。次いで、2006 年 4 月から定期接種に MR ワクチンによる 2 回接種 (12 ～ 24 ヶ月と 5 ～ 7 歳未満で就学前 1 年) が導入された。これは、1 回目のワクチン接種で免疫の獲得が不十分であった者や抗体が低下してしまった者に 2 回目の接種で免疫を付与或は強化するのが目的である。更に 6 月から風しん或は麻疹単味ワクチンによる 2 回接種も可能となった。

2004 年の感染症流行予測調査の結果では、1 ～ 4 歳のワクチン接種率は 75% に過ぎなかった。5 ～ 9 歳までに 92% に達した接種率は 10 歳から少しずつ減少し、経過措置対象者だった 16 ～ 25 歳では 71% に低下した (図 2)。

年齢群別の抗体保有率は、20 ～ 24 歳群まで

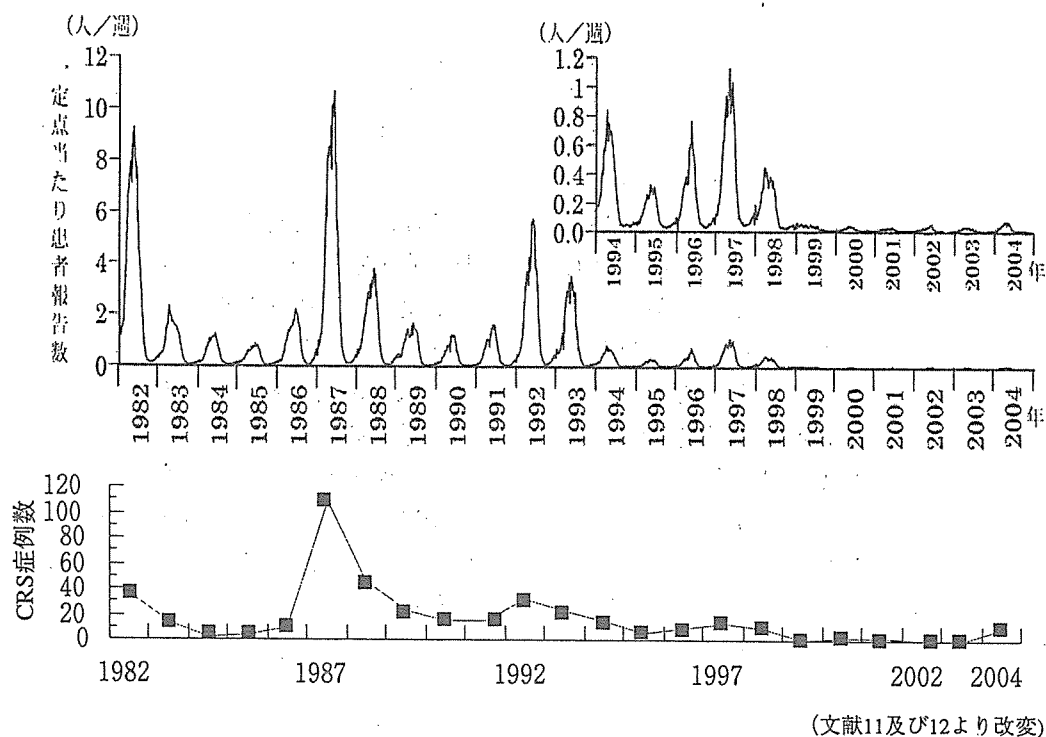


図1 風疹流行と CRS 発生

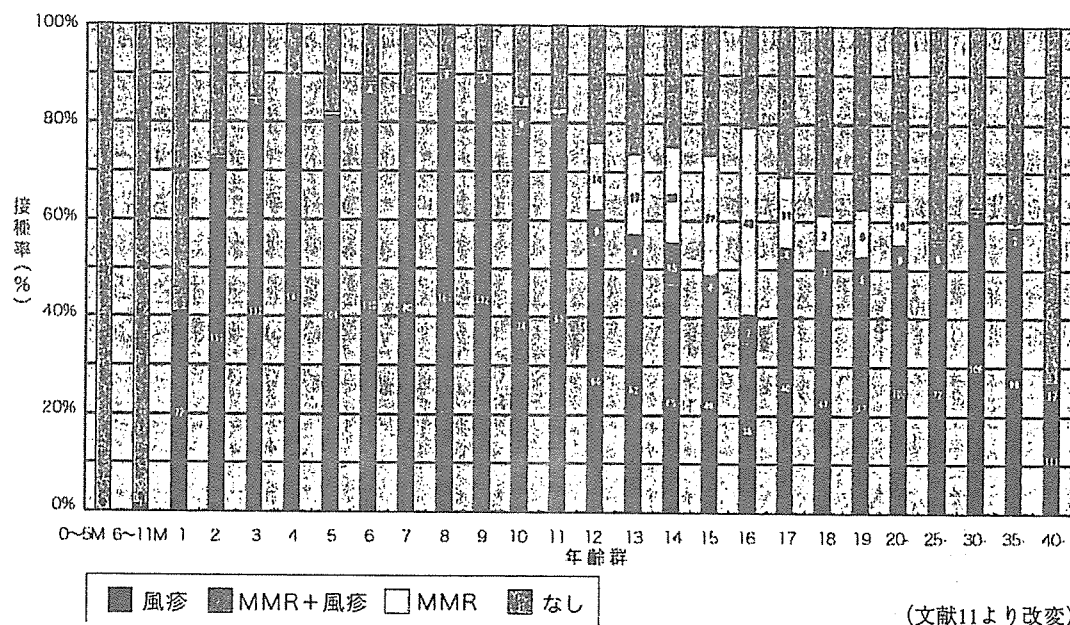


図2 風疹ワクチンと MMR ワクチン接種率

上昇して男性は89%に、女性は94%に達した。女性は更に年齢と共に上昇して35～39歳群では97%の高値を示したが、男性は25～29歳群で71%に落ち込み、そのまま35～39歳群まで75%を下回った(図3)。この男女における抗体保有率の大きな違いは、女性は中学生でワクチン

接種を受け、男性は非接種対象であったため、予防接種による効果が明らかだった。また、HI 抗体32倍以上を陽性とする、10～14歳群の男女および女性の25～44歳までに陽性率の低下が見られ、これらの層の保有抗体価が低いことが示唆された。前者は MMR ワクチンが使用

された世代に相当した¹¹⁾。

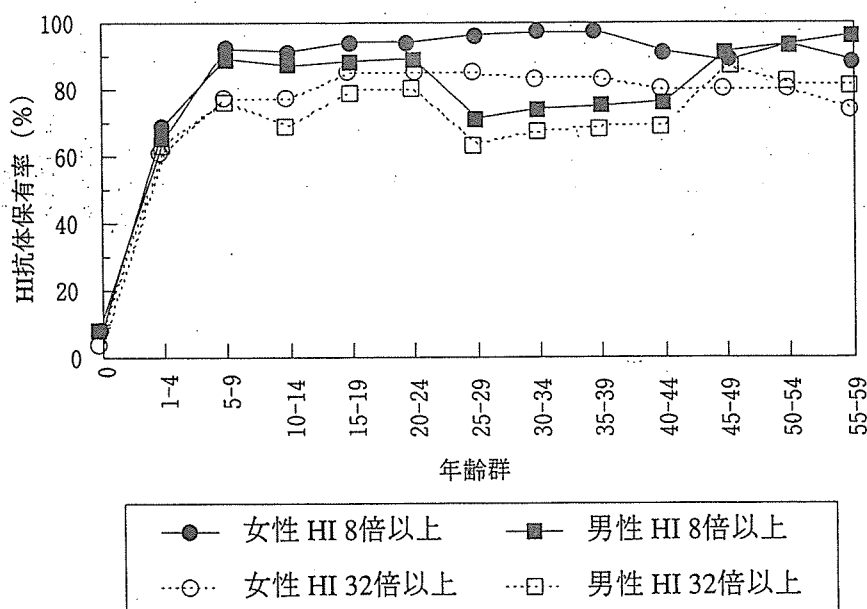
ワクチンによって獲得した抗体は自然感染に比べて低い。その結果その抗体の減衰は自然感染よりも早いことが予想される。加えて、風疹の流行が抑制されたためワクチン接種後に自然感染によって免疫が強化されることは期待できない。今後、多くがワクチンを接種した世代となるため、妊娠可能年齢まで抗体が持続するかどうか、女性の抗体保有率と抗体価の把握が益々重要となる。ある臨床検査施設において2003年に風疹に対する HI 抗体が測定された約2万人の妊婦と推定される女性の年齢のピークは29～30歳だった¹⁵⁾。ワクチン接種後、出産まで20数年は CRS を防御出来るだけの抗体が保持されていなくてはならない。ワクチンを接種したにも拘らず風疹に感染し CRS 児を出産した例は少ないながら報告されている。それら妊婦は、妊娠中の風疹感染以前に HI 抗体価16～32倍の抗体を保有していた¹⁶⁾。人口統計によれば20～39歳の女性は約1,720万人いる。この層の HI 抗体32倍以上の抗体保有率は平均84%だったことから、HI 抗体16倍以下の女性は275万人と算出された。このように妊娠可能年齢層の女性に多くの低抗体保有者を残す状況では、世界保健機構 (WHO) が忠告しているように小児への80%以上の高い接種率を実現すること

と同時に、妊婦を風疹感染から守る対策が採られる必要がある。

他方、異なるワクチン接種戦略で出発した英国と米国でも、風疹流行を抑制し CRS を防止するためにプログラムの変更がなされた。英国では、風疹流行を抑制することが出来ず、妊娠可能年齢層の女性への接種と平行して最終的に小児へ MMR ワクチンによる2回接種が導入された¹⁷⁾。一方米国では、徹底的な小児への接種で風疹流行の抑制と CRS の減少に成功したが、青年層の風疹流行を経験し、この層の女性への接種キャンペーンを行った。現在は小児への MMR ワクチンの2回接種が行われており、2004年には自国の風疹ウイルスの伝播はないと発表した¹⁸⁾。

6. 流行ウイルスとワクチン株

風疹ウイルスはトガウイルス科のルビウイルス属に分類される。1本のプラス鎖 RNA を内包するコア (C 蛋白) をエンベロープが取り囲む、直径60～70nm の球形のウイルスである。エンベロープには2つの糖蛋白質 (E1およびE2) がスパイクを形成している。E1上に、細胞への感染および赤血球凝集を担う抗原部位が存在し、E1は感染防御抗原と考えられている^{19,20)}。感染により3つの蛋白質に対する抗体が産生される



(文献11より改変)

図3 年齢群別風疹 HI 抗体保有状況 (2004年)

が、長期に持続するのはE1抗体である。E2はエンベロープ上でE1とヘテロダイマーを形成していると考えられているが、その生物学的性質はよくわかっていない。血清型は1種であるが、プラークの形態や温度感受性の異なるウイルスが存在する。40年前の分離株を元に開発されたワクチン株と現在流行しているウイルスとの間に抗原性の乖離が起きているかどうかは、ワクチンの効果を評価する上で重要である。4つのワクチン株のE1遺伝子の全塩基配列は互いに98~99%相同であり、中でも高橋と松葉は同じ配列を示した²¹⁾。ワクチン株と2001~2003年の流行ウイルスのE1遺伝子の塩基配列は96~98%の相同性を示した²²⁾。推定されるアミノ酸配列の相同性は98~99%と高く、E1の生物活性を担う抗原部位のアミノ酸配列も株間で0~3個の変化しかなかった。それらもワクチン株或は流行ウイルスに共通するような特定の変化を示すものではなかった。E2のアミノ酸配列の相同性も97~99%と高く、流行ウイルスのE1およびE2遺伝子に大きな変異は認められなかった。又、ワクチン接種者の血清中和抗体価はワクチンウイルスと流行ウイルスのどちらのウイルスに対しても同等な価を示し、ワクチン株と流行ウイルスの間に抗原性の大きな乖離は起きていないと推測された。

WHOは、2004年に風疹ウイルスのE1遺伝子の一部の塩基配列を用いた系統樹解析によってウイルスを分類する方法を定めた²³⁾。それにより風疹ウイルスは2つの遺伝子型(1および2)に分類され、更に1型は1B, 1C, 1D, 1E, 1Fに、2型は2A, 2Bに分類された。1型は欧米および日本を含むアジアに広く分布し、2型は中国、インド、イタリアなどアジアと欧州の一部で分離されている。中国で用いられているワクチン株は遺伝子型2に、日本のワクチン株およびRA27/3は、目下分類を再検討されている1aに分類されている。我が国の流行ウイルスは1aから1Dに変化してきたと考えられているが、2001年以降の流行ウイルスはそれ以前の流行株から枝分かれする傾向を示した²⁴⁾。流行ウイルスの遺伝子型の解析は米国のように国産風疹ウイルスの流行が無い国には、風疹が発生したときの伝播経路を特定できるという点で有用

である。我が国にとっては、目下のところ風疹輸出国であるかどうかはわかる。

7. 終わりに

RA27/3と直接比較されたのはTo-336だけであるが、我が国の風疹ワクチンの性能はRA27/3に勝るとも劣らない。これまでに、ワクチン接種は風疹流行を抑制しCRSを大幅に減少させる成果をあげた。今後、2回接種による風疹抑制への効果が大いに期待される。しかし、一旦成人に風疹の流行が入り込めば、妊娠女性の感染の危険は避けられない。現在、次の出産に向けて抗体を獲得するよう産褥ワクチン接種の取り組みが行われている¹³⁾。更に、初めての出産を控える女性を対象としたより広範なワクチン接種の取り組みも、小児への高いワクチン接種率の確保と同時に行われることが望まれる。そのための方策を英国や米国の経験に学ぶところは大きい。

一方、世界ではWHOによる麻疹排除計画が推進される中、90ヶ国以上で麻疹・おたふくかぜ・風疹(MMR)ワクチンが使用されたことにより、発展国では麻疹のみならず風疹およびCRSの減少が著しい。更に、WHOによる麻疹・風疹の研究室ネットワークによるサーベイランスが強化され、2010年までに世界のCRS発生率を1/100,000(出生人口)以下とする目標が掲げられている。我が国では実験室確定診断に基づいた風疹の全例と先天性風疹感染(CRI)を含めたCRSの把握が急務である。そして我が国の優れた風疹ワクチンおよびその製造と品質管理技術は、風疹対策の立ち遅れているアジアを援助する新たな光となるに違いない。

参考文献

- 1) Miller E, Craduck-Watson JE, Pollock TM : Consequences of confirmed maternal rubella at successive stages of pregnancy. *Lancet* ii : 781-784, 1982
- 2) Shishido A, Ohtawara M : Development of attenuated rubella virus vaccines in Japan. *Jpn J Med Sci Biol* 29 : 227-253, 1976
- 3) Ueda K, Tokugawa K, Nishida Y, Kimura M : Incidence of congenital rubella syndrome in Japan

- (1965-1985). A nationwide survey of the number of deaf children with history of maternal rubella attending special schools for the deaf in Japan. *Am J Epidemiol* 124 : 807-815, 1986
- 4) Ohtawara M, Kobune F, Umino Y, Sugiura A : Inability of Japanese rubella vaccines to induce antibody response in rabbits is due to growth restriction at 39°C. *Arch Virol* 83 : 217-227, 1985
 - 5) Plotkin SA, Farquhar JD, Katz M, Buser F : Attenuation of RA27/3 rubella virus in WI-38 human diploid cells. *Am J Dis Child* 118(2) : 178-185, 1969
 - 6) Hoshino M, Oka Y, Deguchi M, Hirayama M, Kono R : The ten year follow-up of the persistence of humoral antibody to rubella virus acquired by vaccination with the Japanese To-336 vaccine. *J Biol Stand* 10 : 213-219, 1982
 - 7) Asahi T, Ueda K, Hidaka Y, Miyazaki C, Tanaka Y, Nishima S : Twenty-three-year follow-up study of rubella antibodies after immunization in a closed population, and serological response to revaccination. *Vaccine* 15 : 1791-1795, 1997
 - 8) Best JM, Banatvala JE, Bowen JM : New Japanese rubella vaccine : comparative trial. *Br Med J* 27 : 221-224, 1974
 - 9) O'Shea S, Best JM, Banatvala JE, Marshall WC, Dudgeon JA : Rubella vaccination : persistence of antibodies for up to 16 years. *Br Med J* 285 : 253-255, 1982
 - 10) Rubella vaccination during pregnancy-United States, 1971-1986 : *MMWR* 36 : 457-461, 1987
 - 11) 2004年度厚生労働省感染症流行予測調査, 風疹 : 115-149, 2005
 - 12) Katow S : Surveillance of congenital rubella syndrome in Japan, 1978-2002 : effect of revision of the immunization law. *Vaccine* 22 : 4084-4091, 2004
 - 13) 国立感染症研究所, 厚生労働省結核感染症課 : 特集, 麻疹・風疹 2006年3月現在, 病原微生物検出情報 27(4) : 85-105, 2006
 - 14) Anderson RM, Grenfell BT : Quantitative investigation of different vaccination policies for the control of congenital rubella syndrome(CRS) in U.K. *J Hyg Cam* 96 : 305-3033, 1986
 - 15) 斉藤正明, 海野幸子 : 抗体検査から見た2003年の風疹 第52回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2004年
 - 16) 国立感染症研究所, 厚生労働省結核感染症課 : 特集, 麻疹・風疹 1995~1999年, 病原微生物検出情報 21(1) : 85-105, 2000
 - 17) Dudgeon JA : Selection immunization : protection of the individual. *Rev Infect Dis* 7(suppl) : S185-S190, 1985
 - 18) CDC : Achievements in public health : elimination of rubella and congenital rubella syndrome, United States, 1969~2004, *MMWR* 54 : 1-4, 2005
 - 19) Oker-Blom C, Kalkkinen N, Kaariainen L, Petterson RF : Rubella virus contains one capsid protein and three envelope glycoproteins, E1, E2a, E2b. *J Virol*, 46 : 964-973, 1983
 - 20) Waxham MN, Wolinsky JS : Immunochemical identification of rubella virus hemagglutinin. *Virology* 126 : 194-203, 1983
 - 21) Katow S, Minahara H, Ota T, Fukushima M : Identification of strain specific nucleotide sequences in E1 and NS4 genes of rubella virus vaccine strains in Japan. *Vaccine* 15(14) : 1579-1585, 1997
 - 22) 海野幸子, 加藤宏幸, 田代真人, 中島節子 : 風疹ワクチン株と現在流行している野生株の遺伝子配列及び抗原性の比較. 第51回日本ウイルス学会学術集会, 京都, 2003年
 - 23) WHO, Standardization of the nomenclature for genetic characteristics of wild-type rubella viruses. *WER* 80 : 125-132, 2005
 - 24) Umino Y, Kato H, Otsuki N, T-Taya K, Tada Y, Okabe N, Tashiro M : Current situation of rubella in Japan : assessment of vaccination program. Fourth World Congress of Vaccine and Immunization, Tsukuba, Japan, September 30, 2004

133

風疹, 先天性風疹症候群

rubella, congenital rubella syndrome

Key words: 風疹, 先天性風疹症候群, 風疹ウイルス,
風疹ワクチン, MR ワクチン

風 疹

定義・概念 風疹はRNAウイルスであるトガウイルス科ルビウイルス属に属する風疹ウイルスの感染症で, 上気道粘膜からの飛沫(飛沫感染)および接触感染により感染する。临床上, 風疹ウイルスが感染するのはヒトだけである。発熱, 上気道炎症状, 頸部および耳介後部リンパ節腫脹に引き続き, サーモンピンク色の斑丘疹が出現する。

疫学 風疹は冬～春にかけて流行し, 好発年齢は5～15歳である。基本再生産数は6～7で, 流行を阻止するための集団免疫率は80～85%である。不顕性感染率は25～50%である。年少児ほど不顕性感染率が高く, 年齢が高くなるにつれ顕性感染率が上昇する。

わが国では, 中学生女子に風疹ワクチンの集団接種を開始する1977年までは約10年ごとに大流行があり, 集団接種開始後も約5年ごとに全国的な流行が認められた。1989～1993年にかけて麻疹・おたふくかぜ・風疹(MMR)ワクチンが接種され, さらに1994年から小児全員に風疹ワクチンを定期接種するようになり, 風疹の全国的な流行は認められなくなっている。2002～2004年にかけて風疹ワクチン接種率が低い地域を中心に風疹の小流行を認めたが, 全国規模の流行には至らなかった。

風疹が流行すると, そのたびに先天性風疹症候群(congenital rubella syndrome: CRS)児が出生する。CRS児出生を予防するためには風疹ワクチン接種により集団免疫率を高め, 風疹流行を阻止することが大切である。

病態生理 潜伏期間は14～23日, 通常16～18日である。風疹ウイルスは飛沫感染・接触感染により経気道的に感染する。感染したウイルスは上気道粘膜や局所リンパ節で増殖した後, リンパ流から血流に入り親和性のある臓器に運ばれる(1次ウイルス血症)。網内系などで増殖したウイルスは再度血流に入り全身に運ばれ(2次ウ

イルス血症), そこで感染して典型的な臨床症状を呈してくる。皮膚に到達したウイルスの増殖とそれに対する免疫反応との結果により皮疹が出現する。

周囲の人に感染させる期間は, 発疹出現数日前～発疹出現後5～7日間である。

臨床症状 顔面から始まる全身性の斑丘疹状発疹の出現, 37.5℃以上の発熱, 全身のリンパ節腫脹(とくに頸部と耳介後部に著明)が主症状である。発熱, 頭痛, 咽頭痛, 鼻汁, 咳嗽などの上気道炎症状の後, 発疹が出現する。成人では38.5℃以上の発熱が数日間持続する。発疹は小児では数日の経過で色素沈着を残さずに消退するが, 成人では色素沈着を残すことがある。リンパ節腫脹は小児でも成人でも数週間持続する。

思春期や成人例, とくに女性では関節炎を5～30%に認める。膝関節痛を訴えることが多い。発疹出現後2～3日して関節痛が出現する。

発疹出現後数日して1,600～6,000人に1人の割合で脳炎を発症する。ウイルスの直接浸潤によるものではなく, 免疫学的機序により発症する。風疹脳炎の予後は良好である。きわめてまれに進行性風疹全脳炎(progressive rubella panencephalitis: PRP)を合併する。PRPは麻疹の亜急性硬化性全脳炎に類似した病像を示し, 予後不良である。

血小板減少性紫斑病は3,000人に1人の割合で発症する合併症で, 免疫学的機序により発症する。予後は良好である。その他, 心筋炎, 肝炎, 溶血性貧血などもまれに合併する。

検査成績・診断 周囲の流行状況から風疹を疑い, ①突然の全身性の斑丘疹状発疹の出現, ②37.5℃以上の発熱, ③頸部・耳介後部のリンパ節腫脹を認めたとき, 臨床的に風疹と診断する。

ウイルス学的には血中IgM抗体の検出〔酵素抗体(EIA)法〕, 血中抗体〔赤血球凝集抑制(HI)法〕の有意上昇(2～3週間の間隔をあけて血清抗体価を測定し, 4倍以上の抗体価上昇), または咽頭粘膜や血中からの風疹ウイルス分離陽性のいずれか1つを満たした場合, 風疹と診断する。風疹の流行規模が小さくなった現在, 臨床的に風疹を疑った場合はウイルス学的に確定診断する必要がある。

風疹に対する免疫状態を調べるために血清抗体を測定するときは, HI法かEIA法を用いる。補体結合(CF)

庵原俊昭 Toshiaki Ihara

国立病院機構三重病院

〒514-0125 津市大里窪田町357 TEL 059-232-2531 FAX 059-232-5994 E-mail: ihara@mie-m.hosp.go.jp

表 先天性風疹症候群 (CRS) の診断 (CDC)

A. CRS の臨床症状
1) 白内障/先天性緑内障, 色素性網膜症, 先天性心疾患 (動脈管開存, 末梢性肺動脈狭窄が多い) 感音性聴覚障害*
2) 紫斑, 肝脾腫, 黄疸, 小頭症, 発達遅滞, 髄膜炎, 骨透亮像
B. 風疹ウイルス感染の診断
1) 風疹 IgM 抗体陽性 (出生時に陰性ならば 1 か月後に再検査)
2) 風疹 IgG 抗体の持続陽性 (移行抗体ならば 1 か月当たり 1/2 の割合で低下する)
3) 風疹ウイルスの分離陽性 (咽頭拭い液, 鼻腔, 血液, 尿, 髄液) [†]
4) ウイルス抗原の検出 (RT-PCR 法など)
C. CRS の臨床分類
CRS 候補例: 1) の臨床症状を 2 項目満たす症例
2) の臨床症状 1 項目に 2) の臨床症状を 1 項目満たす症例
CRS 確定例: CRS の臨床症状があり, ウイルス学的に感染が証明された症例
風疹感染 (CRI) 例: CRS の臨床症状がなく, ウイルス学的に感染が証明された症例

RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction, CRS: congenital rubella syndrome,

CRI: congenital rubella infection

*: 聴覚障害のみの症例もある †: 長期間ウイルスが分離される

(CDC: MMWR50, RR-12, 2001 を一部改変)

法は不適切である。

治療・予防 風疹ウイルスに対する特異的な治療方法はない。発熱, 関節痛に対しては解熱薬や鎮痛薬を投与する。血小板減少性紫斑病合併時, 血小板数の回復が遅い場合はγグロブリンを投与する。

風疹の予防には風疹ワクチンを接種する。風疹ワクチンは副反応が少ないワクチンで, 小児ではときに発熱, 発疹, リンパ節腫脹を認める。成人女性に接種した場合, 6%に接種 1~2 週間後に関節炎を認める。

2006 年 4 月からは, 小児に対して麻疹・風疹 (MR) ワクチンの定期接種が開始された。麻疹の既往歴やワクチン歴がある場合は, 風疹ワクチンを使用する。

風疹ワクチンを成人や授乳婦に接種しても副反応の増加は認められない。成人女性に接種する場合は 2 か月間の避妊が必要である。誤って妊婦へ接種した場合, ウイルス学的に CRS 児の出生は証明されていないので, 積極的な流産は勧められていない。

風疹ワクチンの接触後緊急接種の効果については証明されていないが, 理論上接触後 72 時間以内に接種すると発症が予防されることが考えられている。γグロブリンの発症予防効果は証明されていない。

先天性風疹症候群

病態生理 妊婦が妊娠 16 週頃までに風疹に罹患する

と, 母体のウイルス血症により運ばれた風疹ウイルスが胎盤に感染する (胎盤炎)。胎盤で増殖した風疹ウイルスは血行性に胎児に感染し, 種々の臓器の細胞傷害や細胞分裂の停止を起こし, 結果として特異的な臨床症状を引き起こす (表)。CRS の発症頻度は, 妊娠 1 か月までは 50%, 妊娠 2 か月では 20~30%, 妊娠 3~4 か月では 5% である。妊娠 24 週以降に妊婦が風疹に罹患しても CRS は発症しない。

臨床症状 白内障・緑内障, 網膜症などの眼疾患, 先天性心疾患 (動脈管開存, 肺動脈狭窄が多い), 感音性難聴が 3 大症状である。典型例では低出生体重で出生し, 出生時に血小板減少による紫斑, 肝脾腫などを伴っている。妊娠早期に風疹に罹患した母親から生まれた児ほど症状は典型的であり, 妊娠 16~20 週に胎児が風疹ウイルスの感染を受けたときは, 感音性難聴のみを認める。

診断 CRS の診断基準を表に示した。臨床的に疑われる場合は, ウイルス学的に血中 IgM 抗体の検出 (EIA 法), 血中抗体 (HI 法) の持続陽性, 咽頭粘膜, 血液, 尿, 髄液からのウイルス分離陽性などから診断する。鑑別疾患として, 先天性トキソプラズマ症, 先天性サイトメガロウイルス感染症, 先天性単純ヘルペスウイルス感染症などがある。

医療

IRYO

国立医療学会誌
JAPANESE JOURNAL
OF
NATIONAL MEDICAL SERVICES

2006 VOL. 60 NO. 8

総説

麻疹・風疹・水痘・ムンプスに対する病院および地域における感染制御対策の最近の動向

国立病院機構三重病院 院長

庵原 俊昭

国立医療学会
JAPANESE SOCIETY OF NATIONAL MEDICAL SERVICES