

## 2007年に分離された麻疹ウイルスの性状

中山哲夫<sup>1)</sup>、宮田章子<sup>2)</sup>、吉田菜穂子<sup>3)</sup>、藤野元子<sup>4)</sup>、吉川哲史<sup>5)</sup>、庵原俊昭<sup>6)</sup>、浅野善造<sup>5)</sup>

- 1) 北里生命科学研究所 ウイルス感染制御、2) 宮田小児科、3) 立川共済病院 小児科、  
4) 東京都済生会中央病院 小児科、5) 藤田保健衛生大学 小児科、6) 国立病院機構三重病院 小児科

【研究要旨】2007年3月より東京都で高校生・大学生を中心に麻疹が流行しワクチン接種歴を有する Secondary vaccine failure (SVF) 症例は典型的な症状を認めることがなく診断に苦慮した。こうした症例の臨床検体を対象にウイルス分離、RT-PCR, RT-LAMP法により遺伝子の検出を行った。典型的な症状を認めた4例のうち2例から麻疹ウイルスが分離され全例から遺伝子が検出された。一方、非典型的なSVF 症例18例からはウイルス分離は陰性であったが、RT-PCRでは9例(50%)、RT-LAMPでは12例(67%)から麻疹ウイルス遺伝子が検出された。2007年に分離された麻疹ウイルスのN, H遺伝子の解析を行いD5に属する遺伝子型の流行であることが明らかとなった。1990年から2005年まで流行していた株は D5(Palau/93 type)であったが系統樹解析からD5 Palau typeとは異なるD5 Bangkok/93 typeに属していた。2006年に愛知県で散発流行例から分離されたD9株とともに抗原性の変化を調べた。AIK-Cワクチン株、D5 Palau type, D5 Bangkok type, D9株に対する中和抗体価には2管以上の差は認めず抗原性には大きな差はないと考えられた。

### 【研究目的】

最近10年では2001年に麻疹の全国的な流行が認められ、患者の60%以上は5歳未満のワクチン未接種児であったことから1歳での麻疹ワクチン接種率をあげるため、「1歳のお誕生日に麻疹ワクチンを」のキャンペーンが始まり2-3歳での麻疹ワクチン接種率が93%まで上昇し、報告される麻疹症例は2005年には545例にまで減少し、更に2006年から麻疹・風疹(MR)二混ワクチンの2回接種が始まり麻疹のコントロールが期待された。その矢先2007年に成人麻疹の流行が問題となった。

WHOは麻疹排除のためにはウイルス分離、EIA 血清診断等の実験室診断を充実することが必要であり各地域にRef. Lab.を定めウイルス学的診断精度を高めるようにしている。我々は臨床例を迅速に診断する必要性からRT-PCR法、RT-LAMP法を報告しその有用性を報告してきた。

麻疹ウイルス野生株は23群のgenotypeに分類され世界各地で特有の遺伝子型が流行し分離されたウイルスの遺伝子を検索することでウ

イルスの伝播を推定できる。麻疹ウイルスの遺伝子型別分類はNタンパクC末端500塩基とHタンパク遺伝子全長の塩基配列を決定することがWHOから推奨されている。世界中で広く使用されている麻疹ワクチンは1954年に分離されたEdmonston株から弱毒されており我が国で使用されている3株ともにgenotype Aに属するウイルスである。我々は1984年から麻疹ウイルスの分子疫学調査を続け流行ごとに遺伝子型が変わってきたことを報告し、一部の流行株の中にはワクチン株と抗原性が少しずれる株があることを報告している。全国的な流行ごとに遺伝子型が変化することから2007年の流行に際し分離された株、2006年の愛知県で分離された散発例から分離されたD9株を含めてウイルスの性状を検討した。

### 【対象と方法】

①2007年3月から外来で麻疹様患者22例から咽頭拭い液を採取した。3日以上発熱、色素沈着を伴う典型的な麻疹患者4例、1-2日間の軽度の発熱、色素沈着を伴わない非典型麻疹症例18例の2群に分けてウイルス分離、遺伝子

検出を行った。②咽頭ぬぐい液 0.1ml を B95a に接種し細胞変性効果 (Cytopathic effect; CPE) の出現を指標にして2代まで継代した。③咽頭拭い液 0.2ml から RNA を抽出し、麻疹ウイルス遺伝子の検出はすでに報告した RT-PCR, RT-LAMP 法により行った。④ 2006-07 年に三重県で分離した麻疹ウイルス 2 株 (MVi/Mie.JPN/19.07, 23.07)、東京での分離株 2 株 (MVi/Tokyo.JPN/17.07, 18.07)、2006 年の愛知県の散发例から分離された MVi/Aichi.JPN/44.06 対象とした。⑤ WHO の推奨する Nタンパク C 末 500 塩基、Hタンパク翻訳領域全長を PCR で増幅し Dye termination 法により塩基配列を決定した。⑥ B95a 細胞、Vero 細胞を用いて異なる温度での増殖能を比較した。⑦ 2007 年麻疹が流行する前に採取し保存してあった血清を用いて攻撃ウイルスを AIK-C 株、野生分離株と代えて中和試験を行い抗原性の検討をおこなった。

## 【結果】

### 1) 非典型的な症例における麻疹の診断

典型的な麻疹 4 例、15 歳以上の SVF 症例で非典型的な麻疹症例 18 例のウイルス学的検索の結果を表 1 に示した。典型的な 4 例は 3 例が成人麻疹で 1 例はワクチン接種歴があった。1 例は 18 歳の麻疹症例で麻疹脳炎を合併していた。4 例中 2 例からウイルス分離が陽性で遺伝子は全例から検出された。一方、非典型的な 18 例はいずれもワクチン接種歴を有し非典型的な症状で 37-38°C の軽度の発熱と色素沈着を認めない発疹を認めた SVF 症例と思われた。ウイルス分離は全例陰性であったが、RT-PCR で 9 例 (50%)、RT-LAMP で 12 例 (67%) から麻疹ウイルス遺伝子が検出された。

### 2) 遺伝子系統樹解析

臨床検体、分離株から Nタンパク遺伝子 C 末 500 塩基を PCR で増幅し精製し塩基配列を決定しすでに報告されている標準株の塩基配列とともに系統樹解析を行いその結果を図 2 に示した。1985 年までは C1, 1985-1990 年までは D3, 1990-1997 年までは D5, 1997-1999 年までは Chicago type D3, 2001-2005 年までは H1 と麻

疹の流行ごとに主流株の遺伝子型は異なっていた。2007 年の流行で分離された株は D5 に属していた。D5 は 1990 年から我が国で流行し、一時的に 1997-99 年は Chicago type D3, 2000-2002 年までは H1 に置き換わり 2000 年からは H1 と混合流行していた。D5 標準株には Palau.BLA/93 と Bangkok.THA/93 の 2 株があり疫学的に Palau は日本人旅行者から伝播した株であり 1990 年から日本に流行していた株であるが、2007 年に分離された株は Bangkok type に属し以前から流行していた株が変異を蓄積したと考えるよりは外国から流入した株と考えられる。Bangkok.THA は 1993 年分離株であるが同系統のウイルスは Phnom Penh で 2002 年、Taiwan で 2003 年に検出されており、また同じ subcluster の株は英国で 2005 年に検出されており東南アジアから伝播したものと推察された。

MVi/Aichi.JPN/44.06 は D9 に属し、2004 年に山形の散发流行例から分離された株と同じ Genotype であった。

H 領域においても解析し N 領域の解析結果と同様に 2007 年分離株は D5 に属し以前の流行株とは異なる Bangkok type に属することが明らかとなった。

### 3) 抗原性の差

麻疹ワクチン AIK-C 株 [genotype A], MVi/Aichi.JPN/44.06 [D9], MVi/Tokyo.JPN/2000-K [Palau type D5], MVi/Tokyo.JPN/17.07 [Bangkok type D5] を中和抗体測定用の攻撃ウイルスとして AIK-C ワクチン株に対して  $<2^2$  から  $2^7$  までの血清を用いて中和抗体価を測定し結果を図 3 に示した。各血清は、D5 Palau type, D5 Bangkok type, D9 の最近流行株に対する中和抗体はワクチン株に対する抗体価と 2 管以上の差はなく抗原性には最近の genotype では差がないと考えられた。

### 4) 39°C での増殖能

麻疹ウイルスは 39-40°C の高温では増殖率が低下するが、Chicago type D3, Palau type D5 の一部の株では 39-40°C でよく増える株が存在することを報告した。

MVi/Aichi.JPN/44.06 [D9] を 33, 35, 37, 39°C

で培養し1, 3, 5, 7日後の培養上清を採取し感染価を測定し結果を図4に示した。33℃と35℃では感染価は差がなく39℃培養ではその1/1000に低下することが解った。D5 Palau type の MVi/Toyo.JPN/93-S と今回の流行で分離した Bangkok type D5 を35℃と39℃で培養し5日後の上清中の感染価を測定した。Palau type D5 の MVi/Toyo.JPN/93-S は39℃でも35℃と同様に増殖したが、2007年の分離した Bangkok type D5 は39℃培養での感染価は1/10-1/400に低下した。

### 【考察】

WHO は2010年を目標に麻疹による死亡を1999年のレベルの1/10以下にすることを目標として掲げ、日本が属するWHO 太平洋西部地域は2012年に麻疹排除を目標としている。

2007年の流行の特徴は高校生・大学生を中心とした成人麻疹でワクチン接種を受けていないものだけでなくSVFの症例も多く、軽症例は麻疹と診断されず一過性に麻疹ウイルスを排泄することから新たな感染源として流行を拡大したと考えられる。今回、検討した臨床的に典型的な麻疹の症状を示さない軽度の発熱・発疹例のなかに麻疹症例が認められることが明らかとなった。

2007年に分離された株は Genotype D5 に属しその中でも Bangkok type に分類され、1990年代から2005年まで流行していた株が変異を蓄積したと考えるよりは外国から流入した株と考えられる。Bangkok, THA は1993年の分離株であるが Phnom Penh で2002年、Taiwan で2003年に検出されており、また同じ subcluster の株は英国で2005年に検出されており東南アジアから伝播したものと推察された。

現行の麻疹ワクチンは1954年に分離された Edmonston 株から弱毒したもので抗原変異してワクチンにより獲得した抗体からエスケープするのではと懸念されるが、現在までのところ中和抗体でみると2管以内の変異で現行のワクチンで十分有効であると考えられた。2006-07年に分離された D9, D5 株はワクチン株との抗原性から大きくずれていないことが明らかとなった。

麻疹ウイルスはヒトとともに移動し社会経済の globalization に伴い麻疹ウイルスにも「国境」がなくなってきた。麻疹撲滅のためには、世界の情勢に歩調をあわせたワクチン政策をとる必要がある。2012年麻疹排除を目標として2008年から中学1年生、高校3年生を対象にMR ワクチンキャッチアップキャンペーンが始まり、麻疹、風疹の排除が期待される。しかしながら、現在も、麻疹の流行がくすぶっており4月、5月の流行が懸念される。

表 1. 典型的麻疹症例と非典型的麻疹症例のウイルス分離と遺伝子検出

Table 1-A. 典型的麻疹症例のウイルス学的検査

Case	Vac	V. Iso.	RT-PCR	LAMP
1(23Y)	+	+	+	+
2(19Y)	-	-	+	+
3(18Y) Encephalitis	-	-	+	+
4(8Y) Gitterman synd.	-	+	+	+

Vac: past history of measles vaccination,  
V. Iso: Virus isolation

Table 1-B. 15歳以上の非典型的麻疹症例のウイルス学的検査

V. Iso(+)	RT-PCR(+)	LAMP(+)
0/18	9/18	12/18

図 1. N タンパク C 末の塩基配列による系統樹解析

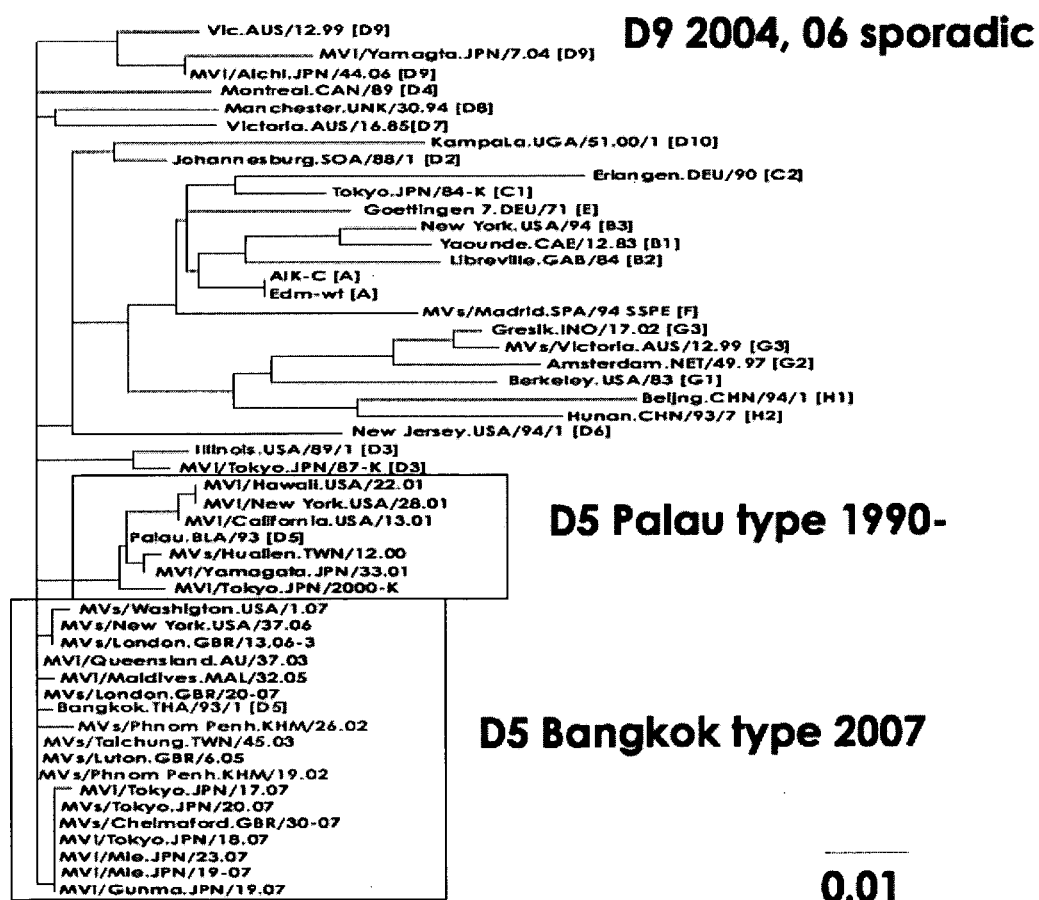


図3. 異なる遺伝子型の麻疹ウイルスに対する中和抗体

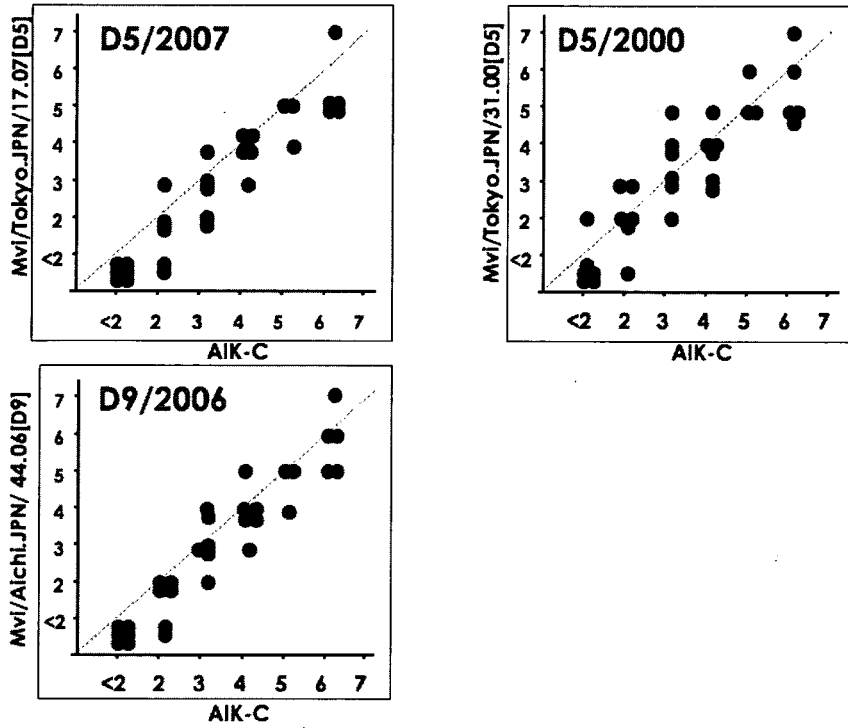


図4. 最近流行株の温度感受性

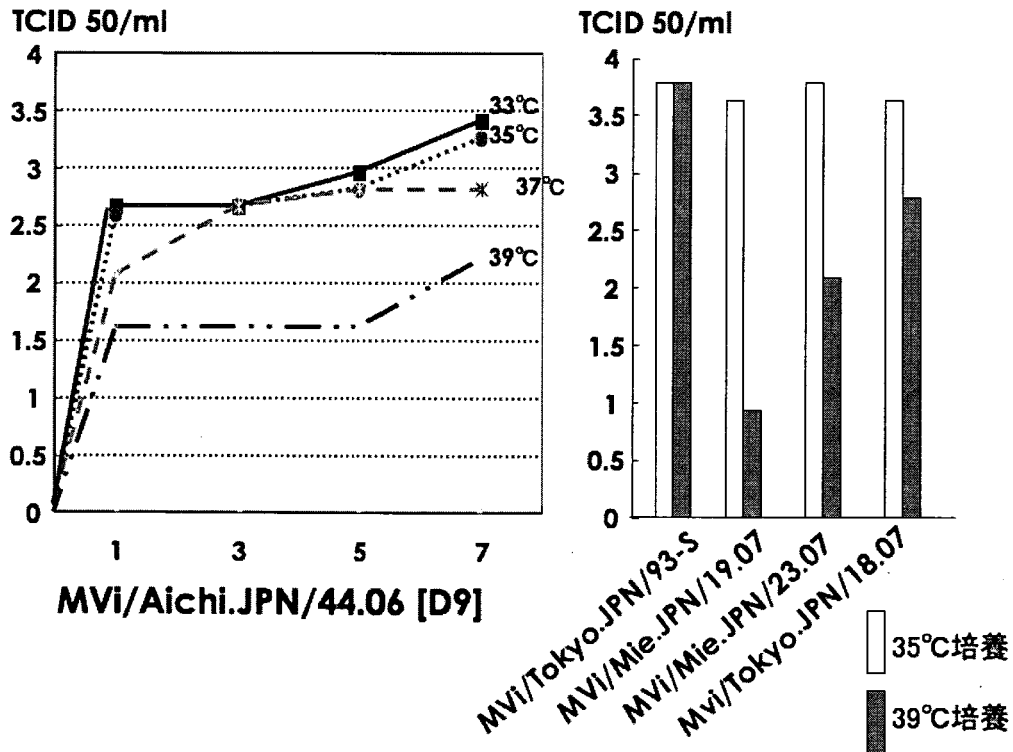


図5. Non-structure p150 内のキメラウイルスの作製と温度感受性

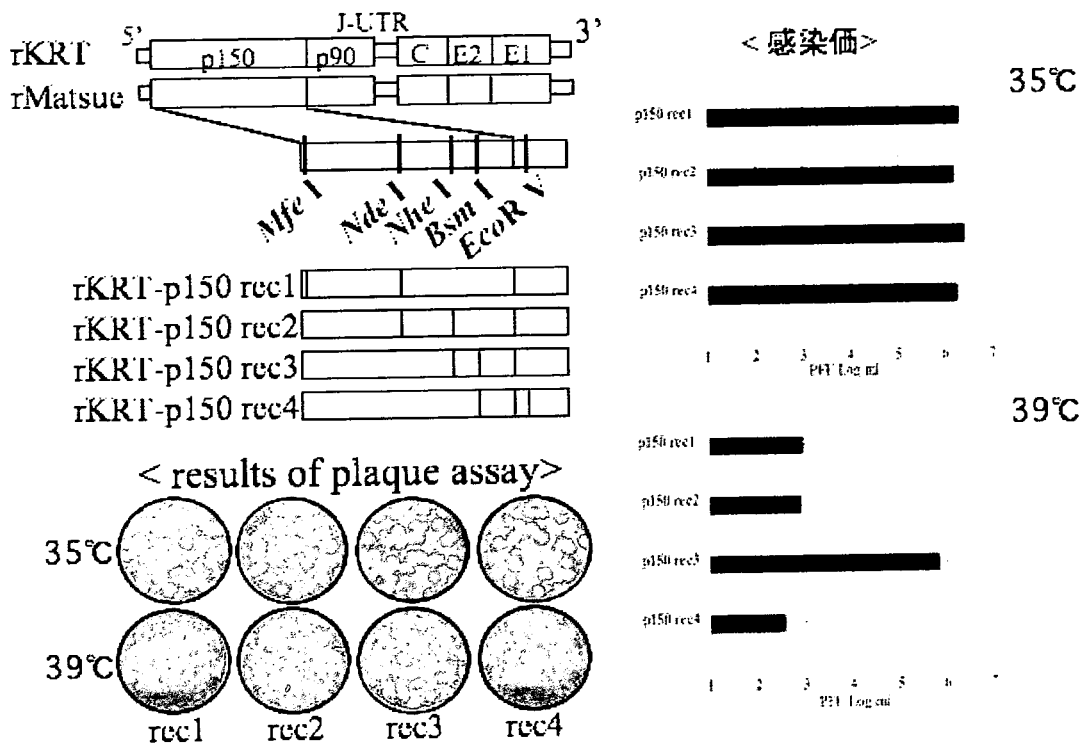
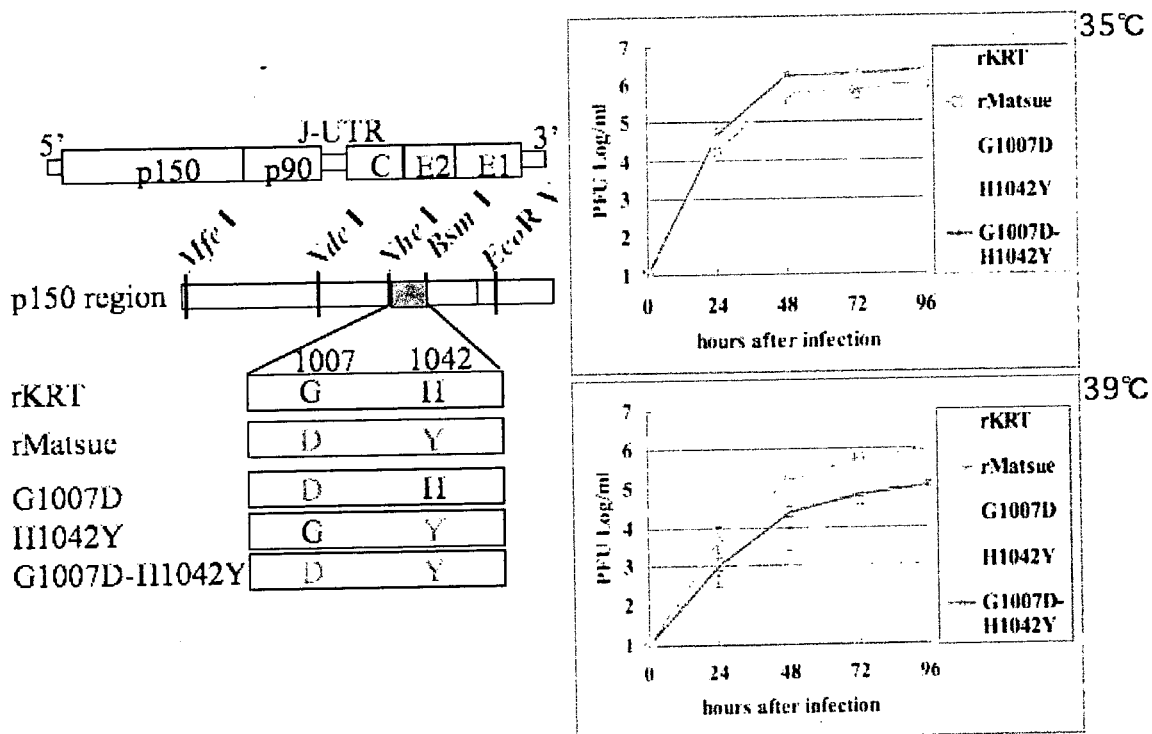


図6. P159 の 1007、1042 位のアミノ酸を置換した組換えウイルスの作製と温度感受性



厚生労働科学研究費補助金  
「ワクチンの有効性向上のためのエビデンス及び方策に関する研究」班  
研究報告書

麻疹中和(NT)抗体陰性者における麻疹 EIA-IgG 抗体 -2つの EIA キットでの比較-

楠原浩一、保科隆之、齋藤光正、原 寿郎 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野)

研究要旨

院内感染対策として医学部学生の麻疹に対する免疫状況を調査する過程で、中和抗体陰性者における2つの酵素抗体法(EIA)キット(「生研」と「バイダス」)の測定結果を比較する機会を得た。「生研」で EIA 価 4.0 以上の(+)であった 22 名のうち、EIA 価 10 未満の者では 14 名中 5 名が「バイダス」で(-)、6 名が(±)であった。「生研」で EIA 価が 8.0 以上 10 未満の者では「バイダス」での(-)はみられなかった。「生研」で 10 以上の 8 名は全て「バイダス」でも(+)であった。今回の結果は、EIA-IgG「生研」の低値陽性は、異なる EIA キットでは(-)や(±)となる場合があることを示している。医療従事者や医療系学生を対象として EIA-IgG「生研」によって麻疹の免疫の有無を調べる場合には、「EIA 価 8 未満または 10 未満」をワクチン接種対象に含めるなどの対応が必要である可能性が示唆された。

A. 研究目的

麻疹は院内感染対策上重要なウイルス感染症であり、医療従事者や医療系学生に対して麻疹抗体の測定とその結果に基づく感受性者へのワクチン接種を行うことが推奨されている。麻疹抗体の測定法には、赤血球凝集抑制(HI)、補体結合反応(CF)、中和法(NT)、酵素抗体法(EIA)、粒子凝集法(PA)がある。それぞれ、感度が低い(HI と CF)、時間がかかる(NT)、外注ができない(PA)などの問題点があり、多くの医療機関では、高感度でかつ短時間で結果が得られ外注が可能な EIA による抗体測定を行っている。その一方で、EIA は、抗原と結合する抗体を測定しており必ずしも中和活性を反映しないため、「免疫あり」と判定する EIA 価の基準が確立していない。本学では 2001 年度より臨床実習配属前の医学部学生の麻疹抗体測定と感受性者へのワクチン接種を行っている(水痘、風疹、ムンプスは 2002 年度より)。麻疹抗体は HI または NT で測定してきたが、2006 年度より NT と EIA-IgG を併用し、NT 陰性で EIA 価が 10 未満の者を暫定的に「感受性あり」としてワクチン接種対象としている。2007 年度は、春の関東地方を中心とした麻疹の流行の影響で、全国的に麻疹抗体の測定依頼が殺到して測定キットの供給不足が発生し、例年使用している EIA キット

「生研」(デンカ生研)での測定が困難となった。そのため、EIA「バイダス(Vidas)」(日本ビオメリュー)での測定を先行させ、後日「生研」での測定を行った。今回、これら NT 抗体陰性者の2つの EIA-IgG キットでの測定結果を比較し、「免疫あり」の判定基準を検討した。

B. 研究方法

【対象】

麻疹 NT 抗体を測定した本学医学部学生 108 名のうち、NT 抗体陰性であった 29 名(26.9%)。

【方法】

各 EIA キットによる測定は委託検査機関で行われた。陽性陰性の判定基準は下記のとおりである。

1) EIA-IgG「生研」の判定基準:

$<2.0:(-)$ ,  $2.0 \leq <4.0:(\pm)$ ,  $\geq 4.0:(+)$

2) EIA-IgG「バイダス」の判定基準:

$<0.5:(-)$ ;  $0.5 \leq <0.7:(\pm)$ ,  $\geq 0.7:(+)$

また、国立感染症研究所感染症情報センターの「医療機関での麻疹対応ガイドライン」にワクチン接種を推奨する基準( $\leq 1:64$ )が記載されている PA 法による測定も併せて行った。

(倫理面への配慮)

抗体測定は文書による同意を得て行った。

### C. 研究結果

2つのEIAキットにより測定したEIA価の比較を図に示した。NT抗体陰性者29名における「生研」と「バイダス」のEIA価の相関係数は0.70、 $P < 0.001$ であった。「生研」でEIA価4.0以上の(+)であった22名のうち、EIA価10未満の者では14名中5名が「バイダス」で(-)、6名が(±)であった。「生研」でEIA価が8.0以上10未満の者では「バイダス」での(-)はみられなかった。「生研」で10以上の8名は全て「バイダス」でも(+)であった。併せて行ったPA法による抗体価が1:64以下であったのは、「生研」「バイダス」とも(-)の2名と「生研」「バイダス」とも(±)の1名であった。

### D. 考察

「生研」で(+)と判定された22名は全てPA法での抗体価が1:128以上であり、また「バイダス」では最少検出限界が「生研」よりも高く設定されていることを示唆する報告<sup>1)</sup>もあることから、「バイダス」での(-)、(±)が必ずしも「感受性あり」とは言えない。しかし、今回の結果は、EIA-IgG「生研」の低値陽性は、異なるEIAキットでは(-)や(±)となる場合があることを示しており、この中に感受性のある者が含まれている可能性を否定できない。飯田らはNT抗体価との比較検討からEIA-IgG「生研」ではEIA価おおそ6以上が感染防御レ

ベルに相当するのではないかと述べている<sup>2)</sup>。院内感染対策として医療従事者や医療系学生を対象としてEIA-IgG「生研」によって麻疹の免疫の有無を調べる場合には、(+) (EIA価4以上)を一律に「免疫あり」と判定するのではなく、「EIA価8未満または10未満」をワクチン接種対象とするなどの対応が必要である可能性が示唆された。

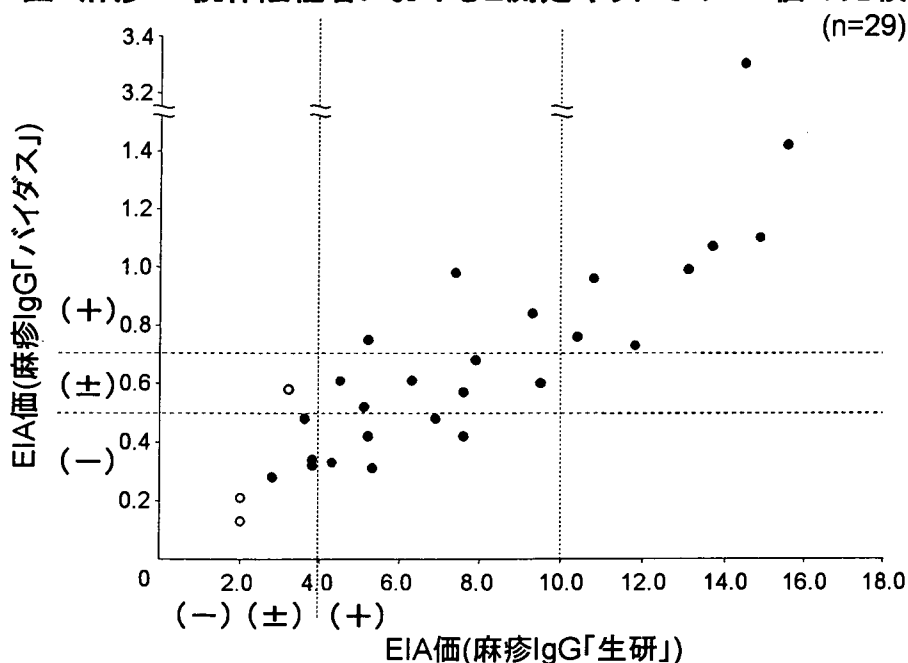
### E. 結論

EIA-IgG「生研」の低値陽性は、異なるEIAキットでは(-)や(±)となる場合がある。医療従事者や医療系学生を対象としてEIA-IgG「生研」によって麻疹の免疫の有無を調べる場合には、「EIA価8未満または10未満」をワクチン接種対象とするなどの対応が必要である可能性が示唆された。

### [参考文献]

- 1) 坂本福美ほか: 血清麻疹特異IgG抗体測定の比較検討. JARMAM 5:103-8, 1993
- 2) 飯田慶治ほか: 健康人における麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、風疹ウイルス、水痘・帯状ヘルペスウイルスの検査方法別抗体分布および検査結果の比較(1993年、2005年調査結果から)厚生労働省「ワクチンの安全性向上のための品質確保の方策に関する研究」研究班平成17年度研究報告書, p67-71, 2006.

図 麻疹NT抗体陰性者における2測定キットでのEIA価の比較



○: PA抗体価 ≤ 1:64, ●: PA抗体価 ≥ 1:128



# 麻疹既往歴を有する小児に対するMRワクチン追加接種の安全性と効果の検討 -臨床反応と抗体応答-

熊谷 卓司 医療法人社団恒仁会くまがい小児科院長  
庵原 俊昭 国立病院機構三重病院院長  
中山 哲夫 北里生命科学研究所教授  
神谷 齊 国立病院機構三重病院名誉院長

**研究要旨** 麻疹・風疹混合 (MR) ワクチンの2回目接種に際しては、すでにどちらかの疾患に罹患した児に対する安全性を示す必要がある。実際には既往歴のある小児に麻疹・風疹生ワクチンを接種しても特段の問題を生じないことは世界的に認知されている事実であるが、罹患者のみに注目して行われた研究は少ない。本研究では、北海道で麻疹が流行した2000年から2001年にかけて麻疹に罹患し、その後数年を経過した小児に informed consent を得た上で、MRワクチンの追加接種を行い、臨床反応、ELISA抗体価の推移について検討を行った。その結果、麻疹罹患歴のある小児に対するMRワクチン追加接種は特に問題となる副反応を生ずることなく安全に施行可能であることが明らかとなった。さらに今回の麻疹罹患児においては麻疹ウイルスに対する抗体反応に有意ではあるが、ごくわずかの追加免疫効果が観察され、一方ワクチン接種により免疫が獲得されていた風疹については著明な追加免疫効果が見られた。

## A. 研究目的

多くの先進国では、麻疹・ムンプス・風疹混合 (MMR) ワクチンの2回接種が行われ、これらの感染症の流行が制圧されつつある。世界保健機構 (WHO) は、先進国で麻疹流行を制御するため、麻疹ウイルスを含むワクチンを2回接種することを勧めている。しかし、本邦では2005年まで麻疹ワクチンの定期接種は1回であり、しかも接種率が十分でなかったために、数年毎の流行が見られた。また、風疹ワクチンも1回接種であり、麻疹ワクチンよりも接種率が低いため、2002年～2004年にかけて日本各地で流行した。

本邦では2006年4月からMRワクチンの2回接種がスタートした。しかし、MRワクチン2回目接種の安全性についての情報が不十分なため、実際にスタートするのは2006年4月以降にMRワクチンを受けた小児からとなった。麻疹ワクチン・風疹ワクチンの2回目接種を早期に広く行うためには、MRワクチンの2回目接種の有効性・安全性を示す必要がある。本研究は、麻疹に罹患した病歴を有する小児へMRワクチンを接種し、2回目接種の安全性・有効性を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 対象者

2001年に北海道で麻疹が流行した際に自然麻

疹に罹患した病歴を有する、就学時年齢の小児18例を対象とした。対象者の demographic data を Table に示す。男児10人、女児8人であり、平均月齢は86ヵ月 (range, 80~104ヵ月) であった。麻疹罹患時の平均月齢は15.9ヵ月であった。18例中、16例は風疹ワクチン歴があり、その大部分はA社製であった。16例の風疹ワクチン接種時平均月齢は23.1ヵ月であった。2例はワクチン歴が不明であった。全例に風疹の罹患歴はなかった。

保護者から下記に記載する方法で informed consent を得た上で、MRワクチンを追加接種した。MRワクチン追加接種に使用した製品は、A社製8例、B社製10例であった。

接種前、接種2および4週間後の合計3回、各回末梢血2mlずつを採取し血清を凍結保存した。

### 2. 臨床経過観察

4週間にわたる経過観察用紙を配布し臨床反応を調査した。家族による、連日の体温測定ならびに発疹・呼吸器感染症状の有無、胃腸炎症状の有無、局所反応としての接種部位の発赤・腫脹の有無について観察を依頼した。経過観察表には所見なし、軽度、中等度、高度の4段階に分けて記載する欄を設けた。

### 3. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) IgG抗体価測定

**Table.** Clinical data on recipients of booster immunization with measles-rubella combined vaccine.

Subject no.	Age (year.month.)	Sex	Clinical reactions	Interval after vaccination <sup>a</sup>	Past history (Age)		MR vaccine manufacturer	Rubella vaccine manufacturer <sup>c</sup>
					Natural measles	Rubella vaccination <sup>b</sup>		
1	8y8m	F	Mild rhinorrhea	days 9~12	3y0m	Not vaccinated	A	-
2	8y4m	F	Mild erythema at the injection site	days 0~7	2y4m	unknown <sup>d</sup>	B	-
3	7y7m	F	None	-	2y1m	2y9m	A	A
4	7y4m	M	None	-	1y5m	6y7m	B	C
5	7y4m	M	Nausea	days 0~5	1y4m	1y3m	A	A
6	7y3m	M	Mild diarrhea, abdominal pain	days 1~6	1y4m	2y6m	B	A
7	7y3m	M	General malaise, mild abdominal pain	days 1~3	1y4m	2y3m	A	A
8	7y2m	F	None	-	1y3m	1y8m	B	A
9	7y1m	M	Mild cough, rhinorrhea	days 1~5	1y1m	1y5m	A	A
10	7y0m	F	Mild rhinorrhea	day 1	1y3m	2y4m	B	A
11	6y11m	M	Mild rhinorrhea	days 1~4	1y0m	1y3m	A	A
12	6y11m	M	Mild diarrhea, abdominal pain	days 7~10	1y0m	1y8m	B	A
13	6y10m	M	None	-	0y11m	1y2m	A	A
14	6y10m	M	None	-	0y11m	1y6m	B	A
15	6y9m	F	Mild abdominal pain	days 7~8	0y10m	1y11m	B	A
16	6y8m	F	None	-	1y0m	3y9m	B	B
17	6y11m	M	Mild headache	day 10	1y0m	1y4m	A	A
18	6y9m	F	Mild erythema at the injection site	days 0~4	0y10m	1y3m	B	A

<sup>a</sup>The day of booster vaccination is designated as day 0.

<sup>b</sup>No subject had a history of natural rubella.

<sup>c</sup>Manufacturer of primary rubella vaccine.

<sup>d</sup>Her parents lost her immunization record and had no memory regarding her history of rubella vaccination.

凍結保存した血清を用いて麻疹および風疹抗原に対する ELISA IgG 抗体価を測定した (SRL).

#### 4. 統計学的方法

統計ソフトとして StatFlex を用いた。抗体価の継時的推移について、分散分析の nonparametric method である Friedman 検定を行った後、post-test として Dunn 検定による多重比較を行った (ピーク値の検出)。

(倫理面への配慮)

本研究は国立病院機構三重病院倫理委員会の認可を得て行った。

#### 1. 対象となる個人の人権擁護のための対策

本研究では全般にわたり、世界医師会による 1964 年採択の「ヘルシンキ宣言」および厚生労働省による平成 15 年 7 月 30 日施行の「臨床研究に関する倫理指針」を遵守して行った。

被験者を依頼するにあたっては、同意を得る前に保護者 (親御様) が質問する機会と、本臨床研究に参加するか否かを判断する十分な時間を与えた。同意書には、説明を行った担当医、患者の保護者が署名し、各自日付を記入した。採血サンプルはくまがい小児科にて血液細胞を分離し、凍結保存後、連結可能匿名化を行い、その後、SRL に送付した。また、研究によって得られたデータ

は各個人が同定されないような形でのみ発表する。

## 2. 対象となる個人に理解を求め、同意を得る方法

### ア 説明の具体的内容(必要性, 効果, 危険性等)

被験者が参加する決定を下す前に、保護者に対して説明文書を用いて下記の内容を十分に説明した。

本臨床研究の根拠, 意義, 目的及び方法, 予想される結果, 本臨床研究に参加しないことによって不利益を受けないこと, 本臨床研究を受けることに同意した場合でも随時参加を辞められること。

### イ 同意を得る方法

あらかじめ用意した書面および口頭説明によって同意を得た。

## 3. 予期される危険性とその対策

本研究で用いるサンプルは末梢血で、各 2ml の採血量であり、被験者に余分な負担は与えていない。用いられた麻疹・風疹混合ワクチンは市販のものであり、通常の初回接種時以上の危険性は臨床経験上並びに文献検索上考えられなかった。

## C. 研究結果

### 1. MR 追加接種に対する臨床反応

Table に被接種者が示した臨床反応を示す。副反応が現れると想定される時期と無関係に、偶発症と思われる軟便・腹痛症状を呈した被接種者が 5 例、同様に軽度の鼻汁・咳嗽症状が 4 例、頭痛が 1 例に見られた。

局所反応は驚くほど少なく、接種部位の軽度の発赤が B 社 MR ワクチン被接種者で 2 例認められたのみで腫脹を呈した例は無かった。

全体として問題視されるような副反応は認めず、被接種者家族からも特段の懸念の表明はなかった。

### 2. 麻疹 ELISA IgG 抗体価推移

Figure 1 に麻疹 ELISA IgG 抗体価の継時的推移を示す。この assay 系の negative cut off 値は <2.0 であり、全例で接種前値から極めて高い抗体価を示した。MR 追加接種後の抗体価は有意差はあるものの軽度の上昇にとどまった (Friedman 検定,  $P=0.0471$ )。Dunn 検定によってそのピーク値を検

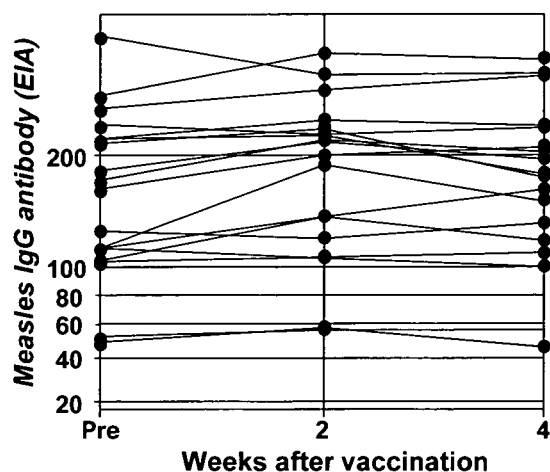


Figure 1. Development of ELISA IgG antibody specific to measles antigen in subjects. Abscissa represents weeks after immunization and the ordinate the ELISA titer. Closed circles represent ELISA antibody titer. Negative cutoff value is <2.0.

討すると、それは接種後 2 週目の検体に見られ ( $P<0.02$ ), 4 週目の検体では接種前値と有意差を認めなかった。

### 3. 風疹 ELISA IgG 抗体価推移 (Figure 2)

MR ワクチン接種前検体の風疹抗体価は麻疹のそれに比して明らかに低値であった。ワクチン接種後、著明な booster 効果を認め (Friedman 検定,  $P<0.0001$ ), そのピーク値は接種第 2 週後に観察された (Dunn 検定, 第 2 週の Q' value が 5.20 に対して第 4 週のそれは 3.61 であり, いずれも  $P<0.001$ )。

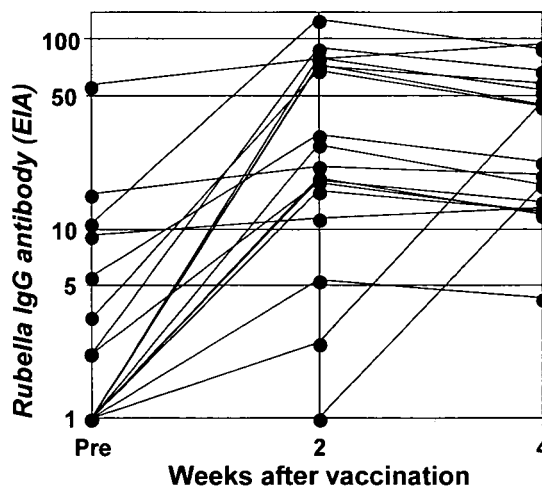


Figure 2. Development of ELISA IgG antibody specific to rubella antigen in subjects. Abscissa defines weeks after vaccination and the ordinate the ELISA IgG titer. Closed circles represent ELISA antibody titer. Negative cutoff value is <2.0.

#### D. 考 察

麻疹の流行が大規模に起こることが少なくなり、本研究のようなデザインに基づく検討を行うことが困難になりつつある。本研究でも実際に研究に参加することを承諾された被検者の 2 倍以上に及ぶ条件合致者が居たが、全ての検討過程を完遂した被検者は 18 例に留まった。

Vaccine preventable disease に罹患した後、一定期間後に当該の vaccine を追加接種しても何らの問題を生じないことはすでに経験的にはよく知られた事実である。麻疹についてもその事情は変わらない。しかし、MR ワクチンが新たに認可され、さらに booster 接種を行うにあたって、それに伴う副反応の危険性を除外し、追加免疫効果を確認することにはワクチン行政上の意義と、罹患済み者の為だけに monovalent vaccine を用意しておく必要がなくなるという社会的に practical な意味がある。

本研究において、特段の臨床副反応が認められなかったことは予想されたことではあるが、具体的なデータを示したという意味で、行政判断を行う policy maker にとっては有用な結果となろう。特筆すべきは、全身反応はもとより、ほとんど見るべき局所反応すらなかった点で改めて A, B 両社製の MR ワクチンの安全性が示されたと考える。偶発症と思われる胃腸症状、上気道炎症状が見られたのは本研究が年末から 1 月にかけて行われ上気道炎、胃腸炎流行時期と重なったためと考えられた。

抗体反応については自然感染により priming を受けた麻疹に対するものと、大部分がワクチンによった風疹との間に大きな差異が認められた。すなわち、麻疹抗体価は booster 接種前にすでに高値でワクチン接種による大きな上昇は観察されなかった。これに対して、大部分の被験者がワクチンにより priming を受けた風疹に対する抗体価は接種前値が陰性ないしは低値であり、booster 接種により著明な上昇を示した。さらに、接種前値が陰性であった例でもそのピーク値が接種後 2 週目にあつたことは、この免疫応答が primary ではなく secondary で有ることを示している。すなわち、ワクチンによって priming を受けた小児に対する booster ワクチン接種の意義がここでも強く確認されたことを示している。これは麻疹、風疹にとどまらず、その他の vaccine preventable diseases においても同様の事情であることを想像

させる成績である。

本研究のように、vaccine preventable diseases の既往歴を有する対象者に対する当該ワクチン接種の可否に注目した研究は殆ど見られない。Red Book 2006 の記載も、「既に免疫のある被接種者に対するワクチン接種が害になるという証拠は無い」と言う記載に留まっており、DTaP の繰り返し接種の際の局所反応についての言及がなされているに過ぎない[1]。これは既感染者への偶発的な生ワクチン接種臨床経験の蓄積からそれによる問題が生じないことが経験的に知られているという事情を示している。

Virtanen らは 1162 例の一卵性および二卵性双生児における MMR ワクチン副反応について double blind crossover trial を行った[2]。この研究は MMR ワクチンについて primary, booster を問わず副反応を調査した研究であり、1%が麻疹に対する免疫を有する 14~18 ヶ月齢若年群に比して 89%が免疫を有する 6 歳以上の年長群において副反応が 16 分の 1 であり、それは麻疹に対する免疫を有していることによると結論している。この免疫を有する年長群に 21 ペアの麻疹罹患歴を有する双生児が含まれており、この群を含めて事実上 MMR に対して nonreactogenic であった。

さらに、Chen らは 401 例および 133 例の大学生に各々 MMR ワクチンおよび麻疹ワクチンを接種し、391 例のワクチン接種を受けなかった対照群とワクチン接種後の副反応について調査し報告している[3]。この研究が行われたのは 1985 年であり、一部得られた接種前血清検体の麻疹抗体陽性率は 93.5%であった。また、この当時の米国における大学年齢層集団における麻疹感受性者は 2~15%と報告されており、この研究における被接種者の大部分は既に自然感染による免疫を獲得していたと想像されている。そのような集団でも注目される副反応は見られず、既に免疫状態にある者への追加免疫接種は何らの有害事象をもたらさないと結論している。

Booster ワクチン後の抗体反応については、既に報告があり、booster 被接種者が有している免疫がワクチン接種による場合と自然感染による場合で明らかな相違がある。Christenson らは自然麻疹罹患患者では booster ワクチン接種前にすでに抗体価が高く、MMR booster 接種を行っても有意な抗体価の上昇を得られなかったと報告している[4]。同様に高抗体価の存在は booster 接種に対

する抗体価上昇を妨げるという報告が Wong-Chew ら, および Ceyhan らによってなされており [5] [6], 著者らが得た成績と同様の所見であった。

今回の被接種者が初回免疫後比較的短期間に抗体価の低下を示した理由は明らかでない。Johnson らは風疹抗体価が麻疹抗体価に比して早期に低下することを示している [7]。しかし追加免疫によって著明な抗体価の上昇を観察しており, 著者らの観察と同様の結果であった。Vaccine preventable diseases の撲滅には複数回のワクチン接種が必要であることを改めて示したものと思われる。

### E. 結論

麻疹罹患者に対する MR ワクチン接種は特段の副反応が無く安全で, 風疹については著明な追加免疫応答が得られた。麻疹, 風疹の撲滅に向けて MR ワクチン追加接種を積極的に行うべき根拠を示し得たと考えている。

### F. 文献

- [1] American Academy of Pediatrics. Active Immunization. In: Pickering LK, Baker CJ, Long SS, McMillan JA, eds. Red Book: 2006 Report of the Committee on Infectious Diseases. 27th ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics; 2006:9-54.
- [2] Virtanen M, Peltola H, Paunio M, Heinonen OP.

Day-to-day reactogenicity and the healthy vaccinee effect of measles-mumps-rubella vaccination. *Pediatrics* 2000;106:E62.

- [3] Chen RT, Moses JM, Markowitz LE, Orenstein WA. Adverse events following measles-mumps-rubella and measles vaccinations in college students. *Vaccine* 1991;9:297-9.
- [4] Christenson B, Bottiger M. Measles antibody: comparison of long-term vaccination titres, early vaccination titres and naturally acquired immunity to and booster effects on the measles virus. *Vaccine* 1994;12:129-33.
- [5] Wong-Chew RM, Beeler JA, Audet S, Santos JI. Cellular and humoral immune responses to measles in immune adults re-immunized with measles vaccine. *J Med Virol* 2003;70:276-80.
- [6] Ceyhan M, Kanra G, Erdem G, Kanra B. Immunogenicity and efficacy of one dose measles-mumps-rubella (MMR) vaccine at twelve months of age as compared to monovalent measles vaccination at nine months followed by MMR revaccination at fifteen months of age. *Vaccine* 2001;19:4473-8.
- [7] Johnson CE, Kumar ML, Whitwell JK, Staehle BO, Rome LP, Dinakar C, et al. Antibody persistence after primary measles-mumps-rubella vaccine and response to a second dose given at four to six vs. eleven to thirteen years. *Pediatr Infect Dis J* 1996;15:687-92.

### H. 研究発表

本研究内容の一部は平成 19 年 12 月, 第 11 回日本ワクチン学会学術集会 (横浜) において口演した。

## 麻疹ワクチン歴による麻疹発症時の麻疹ウイルス感染末消血単核球数と咽頭からのウイルス分離に関する研究

庵原俊昭（国立病院機構三重病院院長）

中野貴司（国立病院機構三重病院臨床研究部国際保健医療室室長）

**研究要旨** 麻疹における二次性ワクチン不全(SVF)の病態を明らかにするために、麻疹ウイルス感染末消血単核球(PBMC)数( $\log_{10} n/10^7$ )を測定するとともに、SVF 者から周囲への感染リスクについて検討を行った。0~1 病日の麻疹ウイルス感染 PBMC 数は、ワクチン歴なし群  $4.03 \pm 0.80$  であったのに対し、ワクチン歴あり群では  $1.91 \pm 0.92$  と 1/130 の量であった。また、咽頭からのウイルス分離では、ワクチン歴なし群では 5 例全員からウイルスは分離できたが、ワクチン歴あり群では 3 例中 1 例しかウイルスは分離できなかった。以上の結果から、SVF 患者では麻疹ウイルス感染 PBMC 数が有意に少なく、この病態が SVF 患者における症状の軽症化および周囲への感染リスク軽減に関与していると推察された。

### A.研究目的

麻疹は感染力が極めて強い感染症であり、流行を予防するための集団免疫率は 90~95%である。麻疹ワクチン接種率が中途半端な状態だと、数年ごとに麻疹が流行し、流行時の発症者に占める麻疹ワクチン後の麻疹発症者の割合が高くなる。しかし、ワクチン後の麻疹発症者の多くは軽症であり、ワクチン接種後の免疫が減衰し、免疫力が発症防御レベル以下に低下したときに発症する二次性ワクチン不全(SVF)である。麻疹 SVF の病態を明らかにするために麻疹ウイルス感染末消血単核球(PBMC)数を測定するとともに、SVF 者から周囲への感染リスクについて検討を行った。

### B.研究方法

対象は、麻疹ワクチン歴のない麻疹患者 28 例（1~18 歳、中央値 5.5 歳）、麻疹ワクチン後の麻疹患者 5 例（2~14 歳、中央値 12 歳）である。採取した末消血からフィコール比重遠心法にて PBMC を分離した。24 穴マイクロプ

レートに培養した B95a 細胞に、10 倍段階希釈した PBMC を加え 1 週間観察した。ウイルス感染細胞数は limiting dilution 法にて算出し、PBMC $10^7$  個あたりの感染細胞数で表した ( $\log_{10} n/10^7$ )。また、咽頭拭い液を採取後培養液に浮遊させ、0.45  $\mu$ m フィルターでろ過後、B95a 細胞に接種した。麻疹ウイルスに特異的な CPE が出現した時、ウイルス分離陽性と判定した。なお、末消血および咽頭拭い液は、保護者および年長児では本人の同意を得た後採取した。

### C.研究結果

ワクチン歴のない自然麻疹患者では、3 病日まで全員の PBMC から麻疹ウイルスは分離され、最長 10 病日まで麻疹ウイルスは分離された（発疹出現日を 0 病日）。発疹出現前（-2 日~-1 日病日）の感染細胞数は  $4.01 \pm 0.43$ 、発疹出現 0~1 病日の感染細胞数は  $4.03 \pm 0.80$  とほぼ同等であったが、発疹出現 2~3 病日になると  $2.42 \pm 0.67$  と約 1/40 に減少し、4~6

病日では $0.69 \pm 0.29$ と約 $1/2200$ に減少していた(表1)。一方ワクチン歴のある麻疹患者においては、0~1病日では全員から分離され、その感染細胞数は $1.91 \pm 0.92$ と、ワクチン歴のない麻疹患者の約 $1/130$ の量であった( $P=0.0002$ )(表2)。

0~1病日における咽頭からのウイルス分離では、ワクチン歴のない麻疹患者5例からは全員麻疹ウイルスが分離されたが、ワクチン歴のない麻疹患者3例からは1例しかウイルスが分離できなかった。

#### D. 考察

麻疹の集団免疫率はきわめて高く、流行を排除するためには95%以上のワクチン接種率が必要である。しかし、本邦ではワクチン接種率が中途半端であり、しかも2005年までは定期接種が1回接種であったため、5年ごとに麻疹流行を認めていた。特に2007年度の流行では、発症者にしめる大学生の割合が高率であり、その半数は麻疹ワクチン歴があった軽症のSVF例であった。

今回の検討では、麻疹ウイルス血症のピークは発疹出現前2日から発疹出現後1日の4日間であり、その後病日ごとに麻疹ウイルス感染PBMC数は、1日当たり $1/5.5$ ずつ減少していた( $Y=-0.74X+4.35$ 、 $X$ :病日、 $Y$ :感染PBMC数( $10^n$ )、 $R=0.999$ 、 $P=0.0276$ )。一方、麻疹ワクチン後のSVF例においては、0~1病日においても麻疹ウイルス感染PBMC数は $1.91 \pm 0.92$ と、ワクチン歴のない麻疹患者の約 $1/130$ と有意に少量であった。

この結果は、SVF例において、以前接種したワクチンにより誘導された免疫は、麻疹ウイルス曝露時には発症予防レベル以下に低下していたが、麻疹ウイルスの感染により早期に免疫応答し、体内での麻疹ウイルス増殖を抑制したためと推察された。また、ウイルス感染PBMC数(ウイルス血症の程度)と症状の重

篤度が相関すると推察された。

咽頭拭い液からのウイルス分離の検討では、ワクチン歴のない麻疹患者では全例からウイルスは分離されたが、ワクチン歴のある麻疹患者では3例中1例しか分離できなかった。この結果は、麻疹ワクチン歴があると、その後に麻疹を発症したとしても周囲への感染リスクは、ワクチン歴がない麻疹患者よりも低率であると推察された。また、周囲への感染リスクは体内で増殖しているウイルス量に関係しているとも推察された。

#### E. 結論

SVF患者では、麻疹ウイルス感染PBMC数は有意に少なく、ウイルス感染PBMC数が少ないことが、症状の軽症化および周囲への感染リスク軽減に関与していると推察された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

庵原俊昭:麻疹ウイルス. 杉本恒明、矢崎義雄編、内科学第九版、286,2007,朝倉書店

庵原俊昭:予防接種をめぐる問題. 小児科診療70:2117,2007

庵原俊昭:人から人に感染する感染症の流行対策:現在の麻疹流行を考える. 小児保健研究66:720,2007

##### 2. 学会発表

庵原俊昭:MR ワクチン2回接種と今後の麻疹・風疹対策. 第11回日本ワクチン学会、2007.11.8-9、横浜

長井 誠、庵原俊昭、他:2006-07年に分離された麻疹ウイルスの性状. 第11回日本ワクチン学会、2007.11.8-9、横浜

#### H. 知的財産の出願・登録状況

特記することなし。

(表1) 病日による麻疹患者の麻疹ウイルス感染 PBMC 数 (ワクチン歴なし)

病日(日)	例数	陽性率	感染 PBMC 数( $\log_{10} n/10^7$ )	P value
-2-1	7	100	4.01±0.43	0.9513
0~1	13	100	4.03±0.80	
2~3	8	100	2.62±0.32	0.0001
4~6	9	78	0.69±0.29	<0.0001

(表2) ワクチン歴による麻疹患者の麻疹ウイルス感染 PBMC 数と咽頭からのウイルス分離 (0~1 病日)

ワクチン歴	例数	咽頭 ウイルス分離	感染 PBMC 数( $\log_{10} n/10^7$ )	P value
なし	13	5/5*	4.03±0.80	
あり	5	1/3	1.91±0.92	0.0002

\*陽性数/検査数



## RSV, インフルエンザウイルス抗原を発現する組換え麻疹ワクチン AIK-C 株の樹立

澤田成史<sup>1)</sup>, 樋口 彰<sup>1)</sup>, 駒瀬勝啓<sup>2)</sup>, 中山哲夫<sup>1)</sup>

- 1) 北里生命科学研究所 ウイルス感染制御 1
- 2) 国立感染症研究所 ウイルス第三部第二室

【研究要旨】弱毒麻疹ワクチンAIK-C株は安全で有効なワクチンとして世界的に知られておりAIK-CのReverse genetics systemを開発し安全性の確立された生ワクチンウイルスベクターとして利用することを検討した。N/P, P/M junctionにAsc I配列を導入し外来性ウイルスタンパク遺伝子を挿入した。現在ワクチンの開発されていないRespiratory syncytial virus (RSV) F, Gタンパク翻訳領域、インフルエンザウイルスHA, NA翻訳領域を挿入しこれらのタンパクが発現されていることを確認した。更に、N/P junctionにinfluenza HA、P/M junctionにRSV G遺伝子を導入し多価ウイルス抗原を発現する組換え麻疹ウイルスを作製した。ワクチン化には超えなければならない障壁があるが、新規ワクチン開発の生ワクチンウイルスベクターとして有用と考えられる。

### 【研究目的】

我々の研究室では麻疹ウイルス AIK-C 株の感染性 cDNA クローンを樹立し、弱毒のマーカーを検討してきた。弱毒のマーカーとしては 39°C の高温で増殖しない温度感受性 (temperature sensitivity: ts) を特徴としており P タンパクが ts の性状に関連していることを明らかとしてきた。また、AIK-C 株全長の感染性 cDNA の中に外来遺伝子を導入して多価抗原を発現する弱毒麻疹ワクチンウイルスベクターとして利用することを検討してきた。今回、Respiratory syncytial virus (RSV) とインフルエンザウイルスの感染防御抗原と考えられている外殻タンパクを発現する組換え麻疹ウイルスを作製しその性状を解析した。

### 【研究方法】

- 1) RSV は臨床分離例の Subgroup A の G タンパク、F タンパクの翻訳領域全長を RT-PCR 法で増幅した。インフルエンザワクチンの原液 New York 株の HA, NA タンパク翻訳領域全長をおなじく RT-PCR 法で増幅した。プライマー 5' 末端には Nco I, Not I の制限酵素配列を付加し塩基配列を確認後制限酵素で処理した。
- 2) 麻疹 AIK-C 株全長 cDNA クローンは

Asc I 制限酵素部位を N/P, P/M junction 部位に導入してあり、外来遺伝子は Nco I, Not I でクローニングし Asc I sites に導入する(図 1)。P/M junction に RSV F, G, Influenza HA, NA タンパク遺伝子を導入した cDNA を構築した。更に、N/P junction に GFP 遺伝子を挿入しウイルスの増殖を可視化、数値化できるようにした。N/P junction に Influenza HA, P/M junction には RSV G タンパク遺伝子を導入した多価ウイルス遺伝子発現組換え麻疹 AIK-C ワクチンウイルス cDNA を作製した。構築した組換え cDNA を模式的に図 2 に示した。

- 3) 組換え cDNA から感染性キメラウイルスの回収は 293T 細胞に T7 RNA polymerase を発現する組換え Vaccinia virus を感染させ、麻疹ウイルスの転写・複製に必要な N, P, L 遺伝子発現プラスミドとともに組換え cDNA を co-transfection し 2 日後に B95a 細胞と混合培養した。
- 4) B95a 細胞に回収したウイルスを接種し virus growth kinetics と異なる温度で培養することで温度感受性(ts)検討した。
- 5) RSV ウイルス抗原の発現、インフルエンザウイルス抗原の発現は各ウイルスに対する polyclonal 抗体を用い、麻疹ウイルスの発現は N タンパクに対する monoclonal 抗

体を使用し、各々異なる蛍光ラベルした二次抗体で免疫蛍光染色をおこなった。

### 【結果】

感染性 cDNA の構築と感染性ウイルスの回収

N/P junction, P/M junction に RSV F/G, Influenza HA/NA 遺伝子を挿入した cDNA から感染性ウイルスを回収し、回収したウイルスにデザインした遺伝子が挿入されているかどうかを RT-PCR で確認し結果を図 3 に示した。N/P, P/M junction 近傍のプライマーを用いて PCR 反応を行い、N/P junction に何も挿入されてなければ 485bp のバンドが確認され、P/M junction では何も挿入されてなければ 481bp のバンドが検出される。挿入されている遺伝子は GFP 遺伝子で 720bp、RSV/G 897bp、RSV/F 1725bp、Flu/HA 1710bp、Flu/NA 1410bp の塩基が付加された PCR 産物が確認されることになる。回収されたキメラウイルスの PCR 産物を電気泳動したところデザインした挿入遺伝子のバンドを確認することができた。回収したウイルスの性状(増殖能、ts、挿入タンパク発現、安定性、粒子形成)について調べた。

#### 1) MVAIK/RSV/G MVAIK/RSV/G N/P GFP

RSV/G 蛋白遺伝子を挿入した pMVAIK/RSV/G、GFP 蛋白遺伝子を同時に組み込んだ pMVAIK/RSV/G N/P GFP から感染性ウイルスを回収できた。回収したウイルスを B95a 細胞に接種し 1,3,5,7 日後の培養上清と細胞内感染性ウイルスを検討し結果を図 4 に示した。培養上清中の感染価は 3、5 日後にピークを迎え感染価は  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml で細胞内には上清中のウイルスの約 10 倍のウイルス量が存在することが明らかとなった。ウイルスの増殖を数値化するために GFP 遺伝子を挿入した MVAIK/RSV/G/N/PGFP の増殖能を検討した。B95a 細胞に接種し同様に 1,3,5,7 日後のウイルス感染価を測定すると接種 5 日後の感染価は  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml となった。GFP の発現は Baseline が 500-700 の蛍光強度を示しウイル

スの増殖に伴い細胞内で発現され 7 日までに増加し約 7000FU を示しウイルスも 33°C で培養した場合が最も増殖し、39°C では感染性ウイルスは検出されなかった。またウイルスの増殖に伴い GFP 蛋白の発現も増加していた。以上の結果から RSV/G 遺伝子を組み込んだ組換え麻疹ウイルスは 39°C で増殖しない ts の性状を保持していることが明らかとなった。MVAIK/RSV/G N/P GFP を感染させた B95a 細胞の GFP 蛋白発現を確認しその後エタノールで固定した。一次抗体として抗 RSV-polyclonal 抗体、抗 MV-N-monoclonal 抗体を反応させ、FITC, Rhodamine でラベルした二次抗体で免疫蛍光染色を行った。麻疹 N タンパクは細胞融合した細胞質全体が染色され、同じ細胞に RSV/G 蛋白を発現していることが明らかとなった。

#### MVAIK/Flu/HA MVAIK/Flu/HA N/P GFP

Influenza/HA 蛋白遺伝子を挿入した pMVAIK/Flu/HA、更に GFP 遺伝子を同時に組み込んだ pMVAIK/Flu/HA N/P GFP から感染性ウイルスを回収できた。回収したウイルスを B95a 細胞に感染させウイルス増殖能を検討し結果を図 5 に示した。ウイルス接種 5-7 日の上清中に  $10^{3.4}$  TCID<sub>50</sub>/ml の感染性ウイルスが検出され、33°C で培養した場合が最も増殖し 39°C では感染性ウイルスは検出されなかった。また、GFP 遺伝子を組み込んだ pMVAIK/Flu/HA N/P GFP ウイルスは増殖に伴い接種 7 日後に 7000FU の GFP 蛋白の発現を確認できた。抗 Flu-polyclonal 抗体、抗 MV-N-monoclonal 抗体を一次抗体として反応させ FITC, Rhodamine でラベルした二次抗体をもちいて免疫蛍光染色を行った結果、麻疹ウイルス N タンパクの発現部位と一致してインフルエンザ HA タンパクの発現が確認された。

#### 3) MVAIK/RSV/G N/P Flu HA

麻疹ワクチン AIK-C 株の感染性 cDNA クローンの P/M junction に RSV、インフルエンザの遺伝子を挿入し感染性ウイルスを回収でき麻疹ワクチン株としての性状である ts の性状を保持し外来性タンパクを発現している

ことが明らかとなった。更に N/P junction にレポーター遺伝子として GFP を挿入した組換えウイルスも回収可能であることが確認された。麻疹ウイルスベクターとして N/P junction にも外来ウイルス遺伝子を挿入し多価ウイルス抗原を発現する組換え麻疹ウイルスの可能性を検討した。N/P junction に Flu/HA タンパク、P/M junction に RSV/G タンパク遺伝子を挿入した pMVAIK/RSV N/P Flu/HA を構築し感染性ウイルス MVAIK/RSV N/P Flu/HA を回収することができた。このウイルスを B95a 細胞に接種し 1, 3, 5, 7, 10 日後の培養上清中の感染価を測定し図 6 に示した。培養 5-7 日までは  $10^{3.3-5.5}$ TCID<sub>50</sub>/ml であったが、10 日後には  $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml と高い感染価を得ることができた。温度感受性に関しては今までの結果と同様に 33°C で培養した場合が最も増殖し、39°C では感染性ウイルスは検出されなかった。RSV-polyclonal 抗体、抗 MV-N-monoclonal 抗体、抗 Flu-polyclonal 抗体を一時抗体とし、FITC, Rhodamine, Alex350 でラベルした二次抗体をもちいて免疫蛍光染色を行った。RSV/G 蛋白、Flu/HA 蛋白いずれも MV/N 蛋白が発現している部位と同じ部位に発現していることが確認された。

#### 【考察】

N/P、P/M junction の 2 箇所外来ウイルス抗原遺伝子を挿入した感染性 cDNA クローンからキメラ麻疹ウイルスを回収し、AIK-C 株のもつ弱毒マーカーである ts を保持し外来ウイルスタンパクが発現していることが確認された。ウイルス培養液を超遠心精製したウイルス粒子画分から外来ウイルスタンパクは検出できず能動的に麻疹ウイルス粒子には取り込まれていないと考えられた。小児の呼吸器感染症として RSV は再感染を繰り返す、未熟児出生、心奇形児では重篤化し死亡の原因ともなる。現在では RSV F タンパクに対するヒト型単抗体が予防的に使用されているが、使用対象に制限があり、高価であることからワクチンに開発が望まれていた。

一方、インフルエンザ感染は乳幼児、老人

にとって大きな問題であり、現在は HA タンパク画分を精製不活化したワクチンが使用されているが有効性には問題点がある。現行インフルエンザワクチンは皮下接種のワクチンで感染の最初の部位である局所免疫を与えることができないため重症化は押えても感染を予防することはできない。麻疹ワクチンは、インフルエンザや RSV と同様に呼吸器感染するウイルスで麻疹ワクチンは現在皮下接種であるが、吸入でも有効であることが知られている。インフルエンザ、RSV の外殻たんぱくを発現する AIK-C 麻疹ワクチンウイルスを経鼻ワクチンとして利用することを考えている。

図 1. AIK-C 全長感染性 cDNA に外来性遺伝子を導入方法

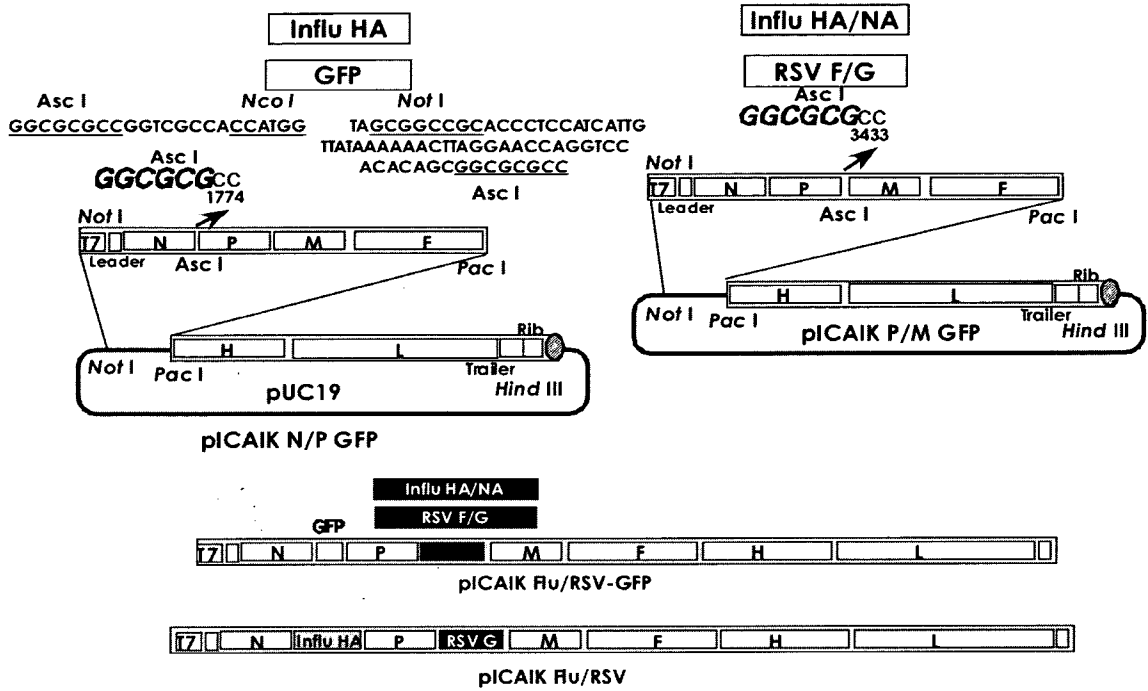


図 2. 感染性キメラプラスミドの構築

