

図 3. 感染性ウイルス粒子での挿入遺伝子の確認

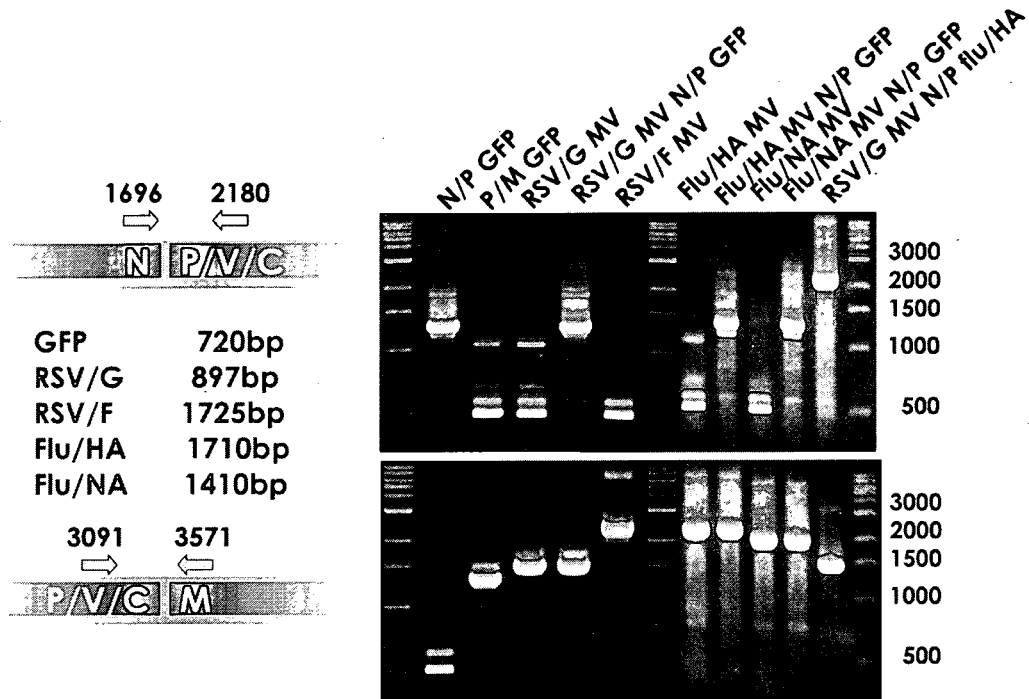


図 4. RSV G タンパクを発現する組換え麻疹ウイルスの性状

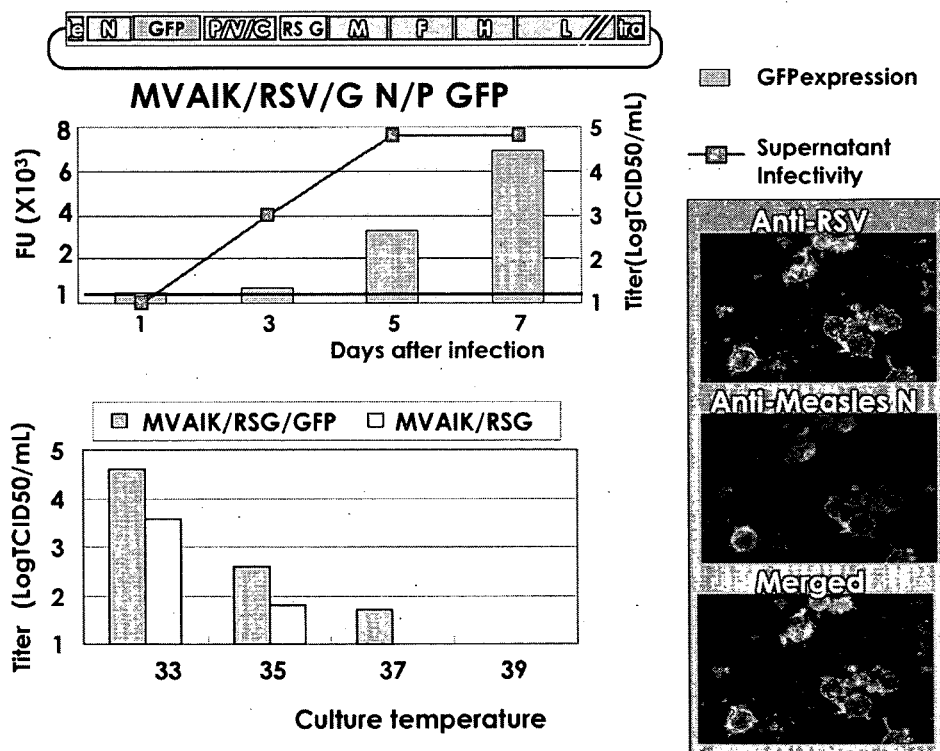


図5. インフルエンザ HA タンパクを発現する組換え麻疹ウイルスの性状

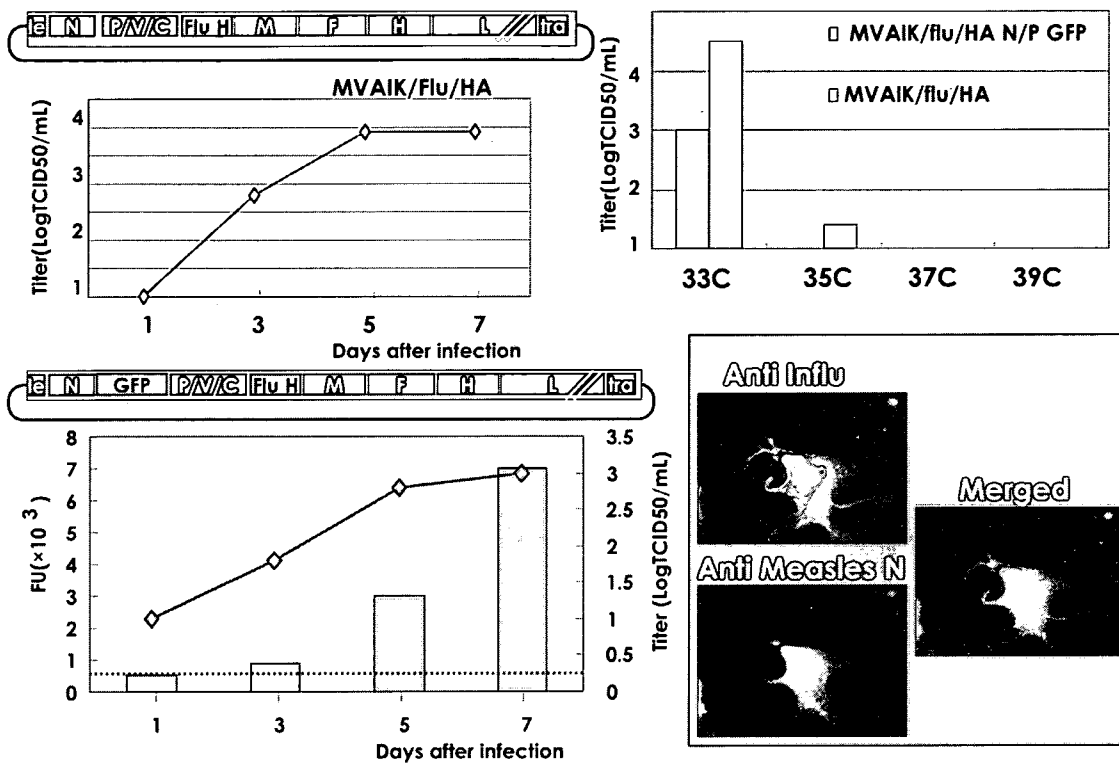
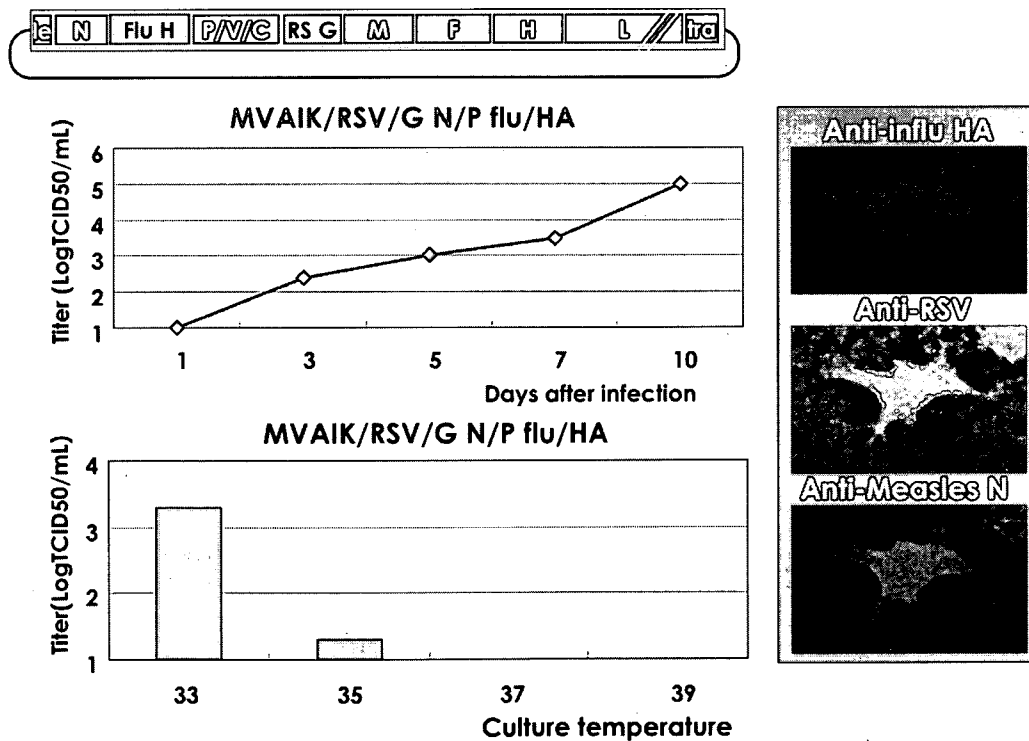


図6. RSV・G, インフルエンザ HA タンパクを発現する組換え麻疹ウイルスの性状



# 風疹ワクチン高橋株の p150 タンパクの 1042 位の His が温度感受性を規定する

坂田真史<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 I
- 2) 国立感染症研究所 ウイルス第三部第二室

**【研究要旨】**風疹高橋株は35°Cでよく増殖し、39°Cでは35°Cの1/1000と増殖能が低下する温度感受性 (temperature sensitivity; ts) の性状を有している。ts の性状は多くのワクチンの弱毒マーカーと考えられており高橋株の ts の性状に関与する遺伝子領域を決定することを目的とした。高橋株から全長の感染性 cDNA を構築し感染性ウイルスを回収する reverse genetics 法を確立し高橋株の分離された同年代に分離された野生株との間で組換えウイルスを作成し温度感受性を検討し非構造タンパクの p150 の 1042 位の Histidine が高橋株の温度感受性を規定していることが明らかとなった。

**【目的】**野生分離株を本来の宿主と異なる細胞で継代することで弱毒化されることが知られている。世界では RA27/3 株がひろく使用されており我国では 4 株が開発され使用されてきた。弱毒風疹生ワクチン高橋株は 1960 年代後半に我が国で分離された野生株をウサギ辜丸細胞、ウサギ腎細胞で継代し低温馴化株を樹立しワクチン株として製造している。弱毒のマーカーとしての生物学的性状に関与する遺伝子を解析し、高温で増殖しない温度感受性 (temperature sensitivity; ts) の性状に関与する遺伝子を特定することを目的とした。

風疹ウイルスは一本鎖 + センス RNA ウイルスで全長 10,000 塩基弱の核酸を有しており、ワクチン株 RA27/3 をベースにした感染性 cDNA を構築した報告がある。しかしながら、弱毒のマーカーに関連する遺伝子は特定されていない。

北里研究所で開発された高橋株の全長 cDNA クローンを作製し組換えウイルスを回収する reverse genetics (RG) の system を確立し、同年代に分離された野生株との間で組換えウイルスを作製し異なる温度で培養し ts に関与するワクチンウイルスに特異的な変異を特定することを目標とした。

## 【方法】

1) 弱毒風疹生ワクチン高橋株のワクチンシードから genome RNA を抽出し RT-PCR で 6 フラグメントに分割し pUC18 ベクター multi-cloning

site を利用し風疹ウイルスゲノム内に存在する制限酵素部位を利用し全長 9762 塩基を組み込んだプラスミドを構築した。

- 2) 遺伝子発現には T7 プロモーターの下流に風疹ウイルス遺伝子を配した。RG 法により作製するウイルスの遺伝子マーカーとしてアミノ酸変異を起こさないように 9647 位の遺伝子 T→A に置換し組換えウイルスの遺伝子マーカーとした。
- 3) in vitro で RNA を合成し Vero 細胞に transfection し、感染性ウイルスを回収した。
- 4) 風疹ウイルス感染価の測定は Vero 細胞単層培養に接種し plaque 形成法で算出した。
- 5) 1960 年代に分離された野生株から同様に RG の手法で感染性 cDNA を構築した。
- 6) 高橋ワクチン株と野生分離株に共通する制限酵素部位を利用し組換え風疹ウイルスを作製し、ts の性状を検討した。

## 【結果】

- 1) ワクチンシードウイルスから RT-PCR で 6 フラグメントを増幅し Nde I, Nhe I, Bgl II, Asc I, Pst I の制限酵素部位を利用し全長 cDNA を構築し pUC18 の multicloning site の Hind III, Eco RI にクローニングした。T7, SP6 プロモーター配列を付加し、翻訳されるアミノ酸に変異を起こさないように 9647 位の T と A に置換し組換えウイルスの tag マーカーとした (図 1)。In vitro RNA 合成し作製した RNA を電気泳動し構築したサイズの RNA が合成されていることを確認した (図 1)。
- 2) 合成した RNA を Vero 細胞、RK13 細胞に

transfectionし経時的に培養上清中のウイルス量を測定した。24 時間後には感染性ウイルスが検出され RK13 細胞では 48 時間後、Vero 細胞では 96 時間後にはピークに達しその後は変化がなかった。ワクチン株(KRT)は 35°C でよく増殖するが 39°C では 35°C の 1/1000 以下である。RG の手法で作製した組換えウイルス(rKRT)も同様に ts の性状を示した。野生株(RVi/Matsue.JPN/68)は 39°C と 35°C で同程度に増殖し、RG 法で作製した rMatsue 株も同様の性状を示した(図2)。

3) 1960 年代後半に分離された風疹野生株と遺伝子配列の違いを検討した。構成蛋白遺伝子領域 C 蛋白で 4 アミノ酸、E2 蛋白で 8 カ所、E1 蛋白で 5 アミノ酸の差を認めた。非構成蛋白 p150 では 15 アミノ酸、p90 には 1 カ所のアミノ酸に変異を認めた。

4) ワクチン株(rKRT)と野生株(rMatsue)の間で Nco I, Bsm I, Nco I, PspX I, Not I, Asc I, Pst I, AsiS I の 8 箇所の制限酵素部位を利用して 8 種類の組換えプラスミドを作製し感染性ウイルスを回収し 35°C と 39°C での培養上清の感染価を測定し図3に結果を示した。ワクチン株(KRT)をベースの rec2 から作製したウイルスは 39°C 培養で野生株と同様の増殖能を示した。逆に、野生株(Matsue)をベースに組換えプラスミドを作製し同様に温度感受性を検討し結果を図4に示した。rec2 のから作製したウイルスは 39°C での増殖能はワクチン株よりは高いものの他の組換えウイルスより低い増殖能を示した。以上の結果から高橋株の ts を担う遺伝子領域は p150 と想定された。

5) p150 領域に存在する MfeI, Nde I, Nhe I, Bsm I, EcoR V の制限酵素部位を利用し 4 種類の組換え体を作製し 35°C と 39°C の増殖能を検討した。p150rec3 から作製した組換えウイルスは 35°C の培養と同程度の感染価をした(図5)。Nhe I と Bsm I の間には高橋ワクチン株(KRT)と野生株(Matsue)のあいだには 1007, 1042 位の 2ヶ所のアミノ酸変異を認める。野生株のこの領域を導入したワクチンウイルスは 39°C でよく増殖したことからこの部位に ts のポイントが存在すると考えられた。

6) KRT の 1007 位は G, 1042 位は H で Matsue 株では 1007 位は D, 1042 位は Y で、PCR で人為的に変異を導入し 1007D/1042H, 1007G/1042Y, 1007D/1042Y の組換え体を作製し感染性ウイルスを回収し 35°C, 39°C での増殖能を検討した。1042 位が His である組換えウイルスは 39°C での感染価は他の組換えウイルスより低いことがわかった。

#### 【考察】

我国で開発された風疹ワクチンは ts の性状を有しており、生体深部の高い温度で増殖しにくいことは弱毒化と関連しているものと考えられる。いままで風疹ワクチンウイルスの弱毒化の分子基盤はあきらかにされてなかった。ウイルスの生物活性に関連する分子基盤を解析するために感染性風疹ウイルスを回収する Reverse genetics の手法を確立した。高橋ワクチン株は ts の性状を示し、野生株との間で組換えウイルスを作製し ts を検討した結果 p150 が ts を決定する遺伝子領域であり 1042 位にアミノ酸が Histidine であることが ts の性状関連する部位であることが明らかとなった。p150 はウイルスの転写・複製にかかわる領域と考えられているが、機能ドメインは解明されていない。

図1 風疹ウイルス感染性cDNAの構築

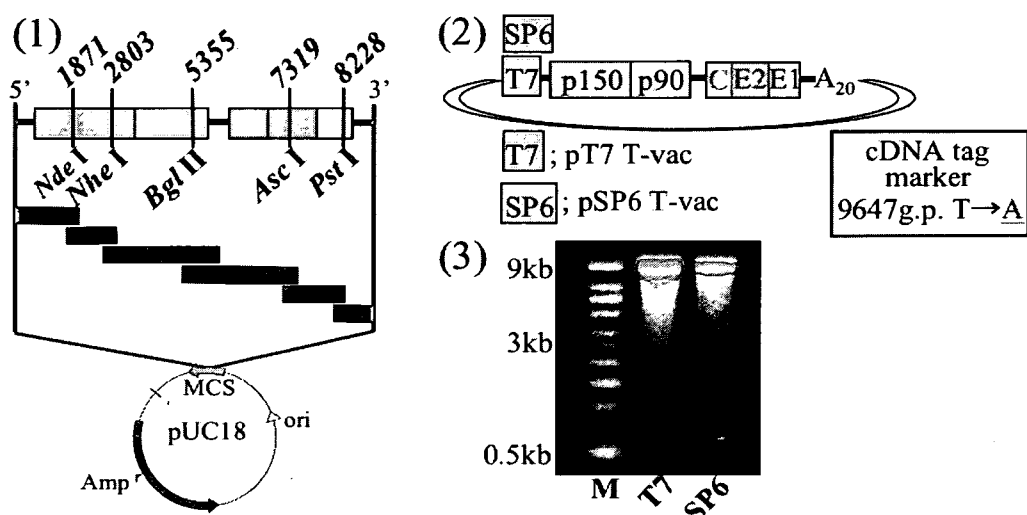


図2、風疹高橋ワクチン株(KRT)と野生株(RVi/Matsue.JPN/68)の温度感受性と Reverse genetics 法で作製したウイルスの温度感受性

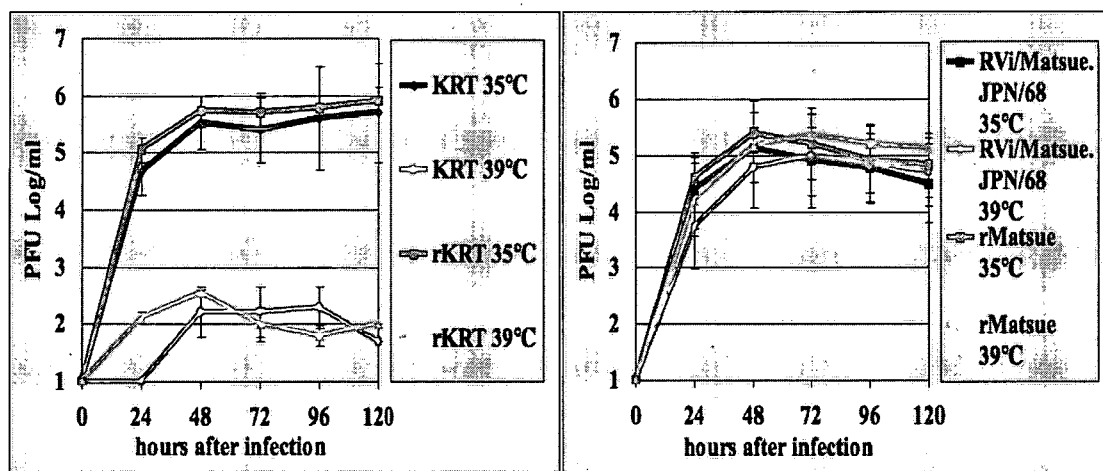


表1 風疹高橋ワクチン株と野生株(RVi/Matsue.JPN/68)の塩基配列の差

vac/wt (%)	NSP			J-UTR	SP			3'UTR
	5'UTR	p150	p90		C	E2	E1	
<b>Nt</b>	40	3903	2442	123	900	846	1443	62
vac/wt (%)	2(5.0)	69(1.8)	65(2.7)	5(4.2)	27(3.0)	27(3.2)	36(2.5)	1(1.6)
<b>A.A.</b>		1301	814		300	282	481	
vac/wt (%)		15(1.2)	1(0.1)		4(1.3)	8(2.8)	5(1.0)	

図3. ワクチン株をベースとした組換え風疹ウイルスの作製と温度感受性

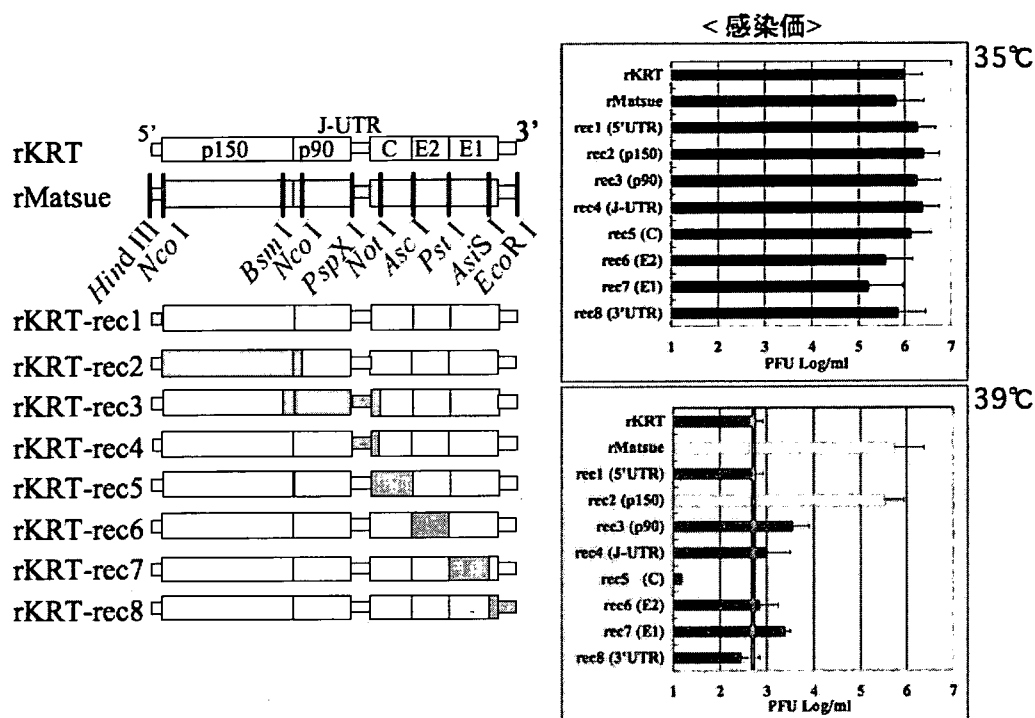


図4. 野生株をベースとした組換え風疹ウイルスの作製と温度感受性

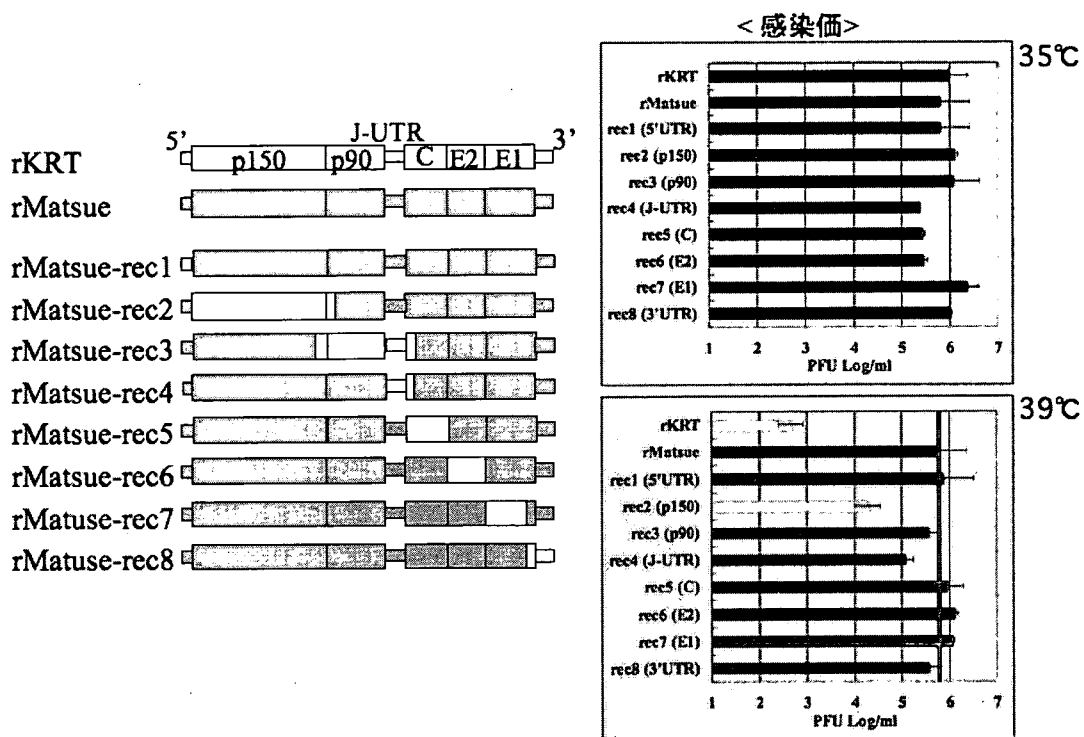


図5. Non-structure p150 内のキメラウイルスの作製と温度感受性

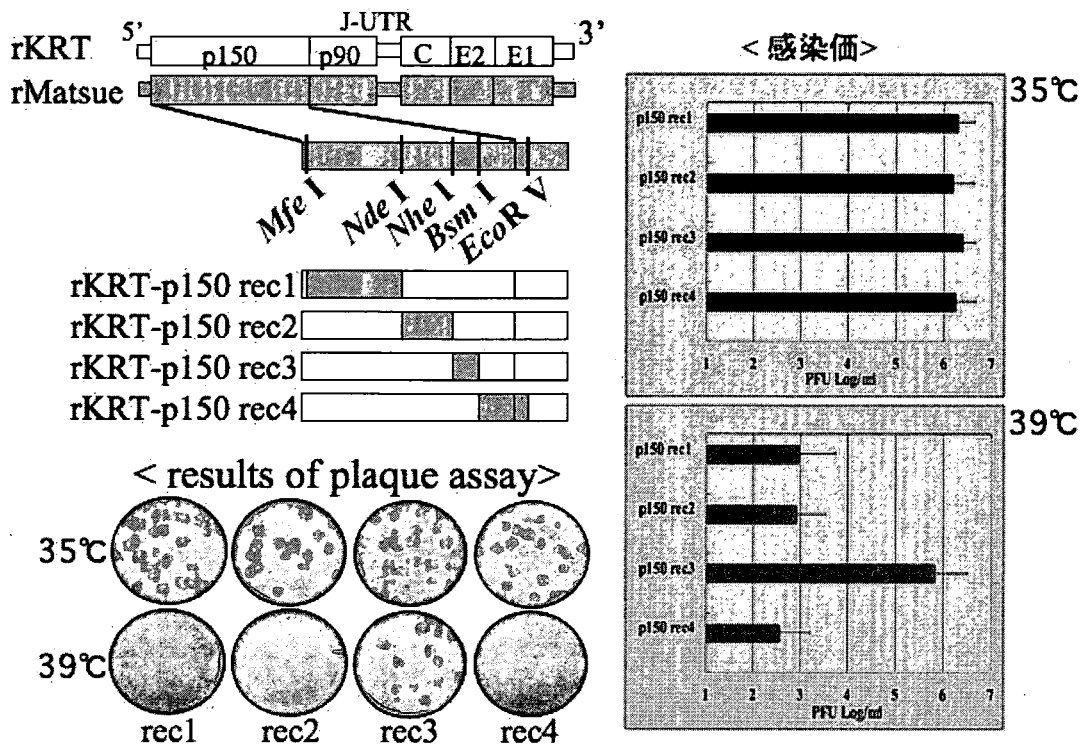
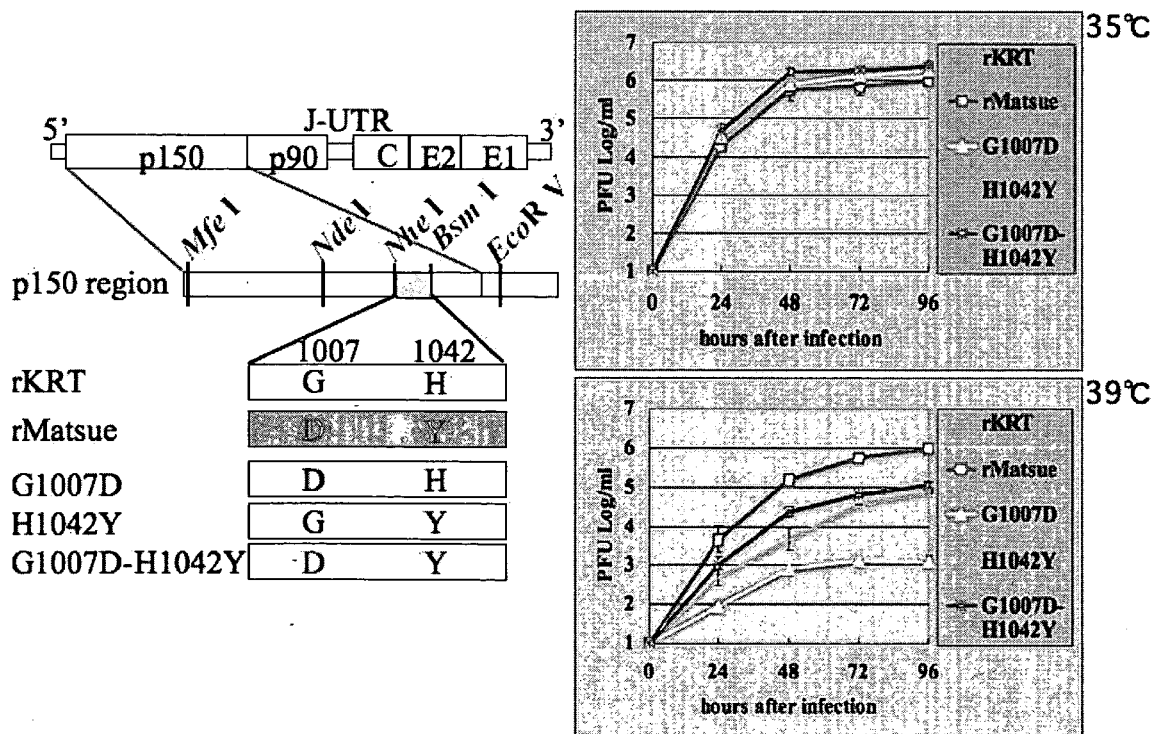


図6. P159 の 1007、1042 位のアミノ酸を置換した組換えウイルスの作製と温度感受性



予防接種連続投与後に発症した血小板減少症患者児における血小板結合 IgG 抗体の検討

The characterization of serial vaccination-related binding IgG antibodies on platelets in a patient with thrombocytopenia

泉 達郎、

岡崎直歩、武口真広、半田陽祐、宮原弘明、是松聖悟、末延聡一

研究要旨 1歳0-2か月時に、4週毎8週間で、麻疹-風疹(MR)ワクチン、水痘(VZ)ワクチン、おたふくかぜ(Mu)ワクチンを連続して接種し、12日後、1歳3か月時、発熱とともに体幹に点状血斑が出現し、血小板減少 5,000/ml を認めた。血清 MR、VZ、Mu ウイルス抗体価は、最後の MuIgG 抗体以外いずれの IgM と IgG 抗体が上昇、PAIgG39.0ng/10<sup>7</sup>cells(9.0-25.0)であった。プレドニゾロンにて一過性の効果を示すも、血小板減少は4か月間以上持続し、途中の感染にて増悪した。1歳5か月血小板 2.7×10<sup>4</sup>/μl、PAIgG 286ng/10<sup>7</sup>cells 時に全血 10ml より血小板を単離し、血小板表面に結合している IgG 抗体は M7.3mg/dl、R2.1mg/dl、VZ<2.0mg/dl、Mu<2.0mg/dl と MR ウイルスの IgG 抗体を検出し、血小板減少症の基礎的成因、治療の改善について検討した。

#### A.研究目的

ウイルス感染や予防接種後に発症する特発性血小板減少症の原因を特定する事は容易ではないが、血清 PAIgG の上昇を伴う事より、血小板を単離し、血小板に結合している各種ウイルスの IgG 抗体を測定し、成因抗体を同定し、血清抗体価との対比を検討した。血小板減少症の遷延化と、IgG 抗体の結合、結合解離による慢性化への治療方法の改善について検討した。

#### B.研究方法

1歳時に4週間毎、8週間で、MR、VZ、Mu ワクチンを連続投与した女兒の臨床経過と血液一般、血清化学、ウイルス抗体価、骨髄検査を施行した。第1回入院時プレドニン 4mg/kg で治療を開始し、血小板は治療初期に一過性の改善を示すも、血小板減少症は遷延し、発症3か月 PAIgG286ng/10<sup>7</sup>cells の時点で全血 10ml より血小板を単離し、下記の方法で血小板に結合している各ワクチンウイルス IgG 抗体を検討した。EDTA30 μmol を含有する試験管に全血 10ml を採血し、ただちに、4℃下で 200g、10 分間遠心分離し(Kubota KS-20,000S 日本)、血小板を含む血漿と血球を分離し、更に、4℃、2,250g、15 分間遠心分離、上清を廃棄し、血小板を豊富に含むペレットを採取した。そのペレットを 3ml 精製水に 90 秒間浮遊させ、混入している赤血球を膨張破裂させ、3.6%NaCl、水を 1ml 加えて等張化させ、その作用を停止させた。4℃下、100g10 分間遠心、ペレットの破裂した赤血球膜を除去し、更に、4℃、2,250g15 分間遠心し、上清を廃棄し、ペレットを 0.05%Tween-PBS1.5ml に浮遊させ、超音波破壊混合後、血清と同様に ELISA 法にて抗体価を測定した。

尚、本症例の検査、治療については御両親に説明し、許可の下、施行した。



### C. 研究結果

臨床経過と血液一般、生化学、血清ウイルス抗体価、PAIgG、骨髓所見、単離血小板結合、ワクチンウイルス IgG 抗体価を示す(図1)。プレドニン 4mg/kg 投与にて、急速に血小板は回復するも、その効果は一過性で、血小板減少は4か月間以上遷延した。第1回入院時よりPAIgG $39.0\text{ng}/10^7\text{cells}$ と高値を示した。抗核抗体、LEテスト、RF、抗血小板抗体は、経過を通して陰性であった。投与されたワクチンウイルスの血清抗体価は、第1回入院時、麻疹 IgM/G 抗体 0.53/37.4mg/dl、風疹 IgM/G 抗体 0.28/3.8 mg/dl、水痘 IgM/G 抗体 0.24 /3.8 mg/dl、おたふく IgM/G 抗体 6.8/<2.0 mg/dl と、IgG 抗体はおたふく以外すべて上昇していた。発症3か月後に、単離した血小板に結合している上記ワクチンウイルス IgG 抗体価は、麻疹 7.3 mg/dl(+)、風疹 2.1 mg/dl(+)、水痘<2.0 mg/dl(-)、おたふく<2.0 mg/dl(-)であった。

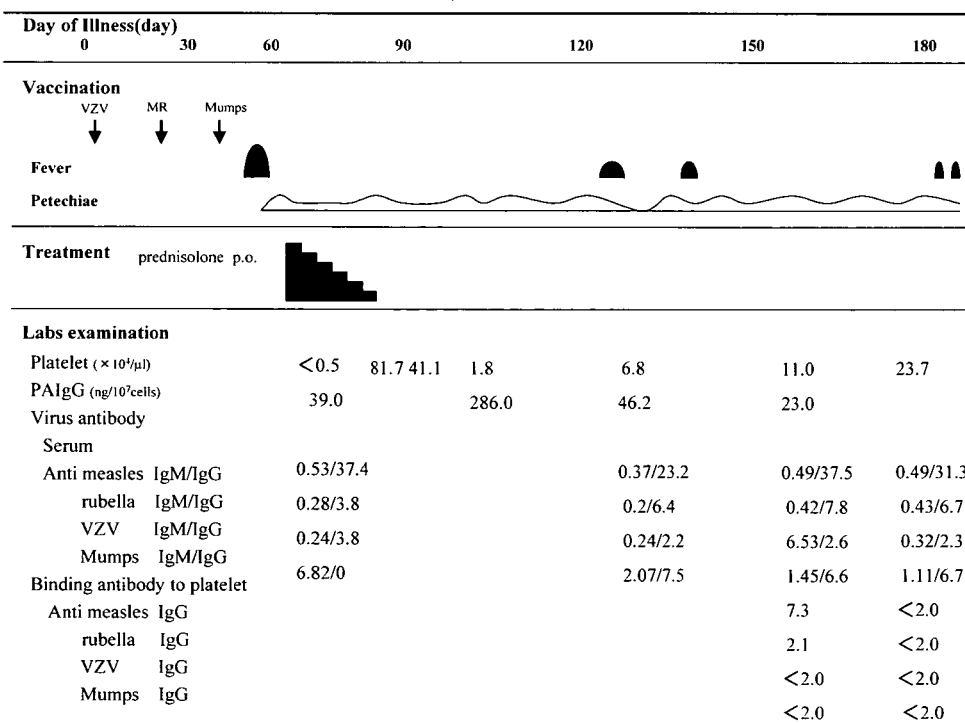
### D. 考察

単離した血小板に結合していたワクチンウイルス IgG 抗体価は麻疹 7.3 mg/dl、風疹 2.1 mg/dl で、水痘とおたふくは陰性であった。この値は血清ウイルス抗体価の上昇と相関していた。血小板減少は、PAIgG の推移と一致しており、本症例の血小板減少症は麻疹、または、麻疹と風疹ワクチンに伴う IgG 抗体の上昇と血小板への結合に関係していることを示唆した。

従来、特発性血小板減少症は、感染や予防注射による IgG 抗体産成により血小板表面に結合し、脾臓マクロファージ FC 受容体で喰喰破壊されると考えられているが、骨髓の巨核数の減少も同様の機序が作用していると考えた。発症後、4か月の期間中 数回の感染、発熱によって、血小板減少は増悪しており、非特異的ウイルス感染症後に血小板低下が増悪する所見は、麻疹単一より、本症例は麻疹と風疹ワクチンウイルスの複数 IgG 抗体の血小板への結合が、血小板減少症を発症させていると考えた。今後、症例を追加し、前方視的に検討する必要がある。

治療は第1回入院時のプレドロン投与のみにて経過観察中である。更に増悪する時は  $\gamma$ -globulin 療法やペパリン、ペルサンチン等血小板凝集抑制剤による IgG 抗体の血小板抑制効果の検討を計画している。

Fig. Clinical Course



## 風疹ウイルスのゲノタイプ間のアミノ酸配列

牛島廣治 (鹿児島国際大学/東京大学)、周 玉梅 (ジョージア州立大学)、  
Frey TK (ジョージア州立大学)

要旨 今まで風疹ウイルスのアミノ酸配列の特徴を詳しく調べたものがない。概ねゲノタイプが異なっても NSP 領域の変異は最大 4.4%、SP 領域の変異は最大 3.7% である。しかし遺伝子の部位によってはさらに異なり、HVR は最大 33.6% であった。E2 領域や P150 領域は E1, P90 より非同義置換が多かった。全体的に疎水性および脂肪族アミノ酸の比率が高く HVR ではプロリンが 27.3% であった。Clade1 のコドンの塩基、アミノ酸を調べたところ NSP の方に組換え (リコンビナント) が見られるが SP には組換えが見られないと思われた。また同義置換に対する非同義置換の割合を見ると HVR に 4ヶ所、C と E1 に 2ヶ所大きく見られ Positive selection と考えられた。この場所が複製、免疫、感染性に関係があるように思われた。また E2 に対するモノクローナル抗体で Clade1 は検出できるが Clade2 は検出できないものを見出した。この事は E2 で Clade1 と 2 を分けることが可能と思えた。

### はじめに

遺伝子配列と同様に蛋白質のアミノ酸配列はウイルスの系統すなわち進化を推論するのに役立つ。アミノ酸の置換は、遺伝子の選択圧あるいは自然選択による変化と考えられる。 $\omega$  = 非同義置換 / 同義置換は選択圧を示す。 $\omega$  が 1 以上であると選択圧が強いことを示し、このことによってウイルスの進化、変異が起きやすい。

風疹ウイルスはエンベロープを有する (+) RNA ウイルスでトガウイルス科のルビウイルス属に属する。約 10 kb の遺伝子配列で 2 つの ORF, 3 つの UTR, 5' 末端はキャップ構造を持ち、3' 末端は polyA からなる。E1 領域および SP-ORF 領域の配列から風疹ウイルスは 2 つの Clade に、さらに 10 のゲノタイプに分かれる。

ここではまず 8 つのゲノタイプの中の 19 ゲノムについてアミノ酸配列を比較した。

次に Codon の系統的な比較を行った。さらに  $\omega$  を各領域ごとに比較した。

### 方法

ワクチン株を含む 19 株の全シーケンスは既に報告した。これらの株は 10 のゲノタイプの中の 8 つのゲノタイプに属する。13 株が CladeI、6 株が CladeII である。13 の領域を解析した。GCG パッケージの pileup プログラムを用い、Clustal W software で解析した。Triplet-puzzle version 5.2 program を用いて triplet codon position やアミノ酸配列を解析した。GCS software package の plot similarity も解析に用いた。Split tree version 4.0 software package や simplot software version 3.5.1 を用いて分割した部分の解析や組換えを調べた。

また培養後精製したウイルス蛋白をゲル泳動し、SP 部位の 3 つのモノクローナル抗

体で染めた。

### 結果と考察

風疹ウイルスのゲノムには疎水性で脂肪族アミノ酸が多い。特に HVR にはプロリンが多い。株間の領域での遺伝子変異は HVR と MT 領域を除いて類似していた。しかしアミノ酸では一定ではなかった。HVR が一番株間で差がある。同義置換は p150 や E2 よりも p90 や E1 多い。非同義置換は逆に p150 や E2 のほうが p90 や E1 より多い。NSP 領域は系統樹的にコドンの 1, 2, 3 番で見ると組換えが起きる可能性を示している。NSP-ORF の HVR や SP-ORF の C および E1 領域は positive pressure がかかっていると思われる。そしてウイルス抗原の進化に向かっていていると考えられる。

図 1：風疹ウイルスはすべての部位において疎水性で脂肪族アミノ酸（アラニン、ロイシン、バリン、プロリン）が多い。特に HVR にはプロリンが多い。

図 2：風疹ウイルスの各アミノ酸配列部位におけるか株間の相同性(Similarity)についてみると HVR が一番低い（相同性約 40%）。他は NP(約 55%)、C(約 75%)、E2(約 70%)である。

図 3, 4 (省略) NSP および SP 領域のゲノムのコドンの第一、二、三番目、全体の塩基およびそのアミノ酸の系統樹を見た。NSP 領域では組換えが起きて NSP の進化が起りやすいことを示唆したが SP では組換えおよび進化は示唆されなかった。

図 5 SUR\_SVK74 株と M33\_USA61 株、ULR\_GER84 株、その他と Simplot の

Bootsanning で比較したところ NSP 領域内で組換えが起きるが SP では見られなかった。

図 6 Clade1 と Clade2 の株に対して E1, E2, C のモノクローナル抗体混合で見たところ、用いた Clade1 の E2 モノクローナル抗体で Clade2 の株は反応しないことがわかった。Clade1 と 2 は E2 のアミノ酸の違いが大きい。

表 1 選択圧 (強いところは太字で示す)

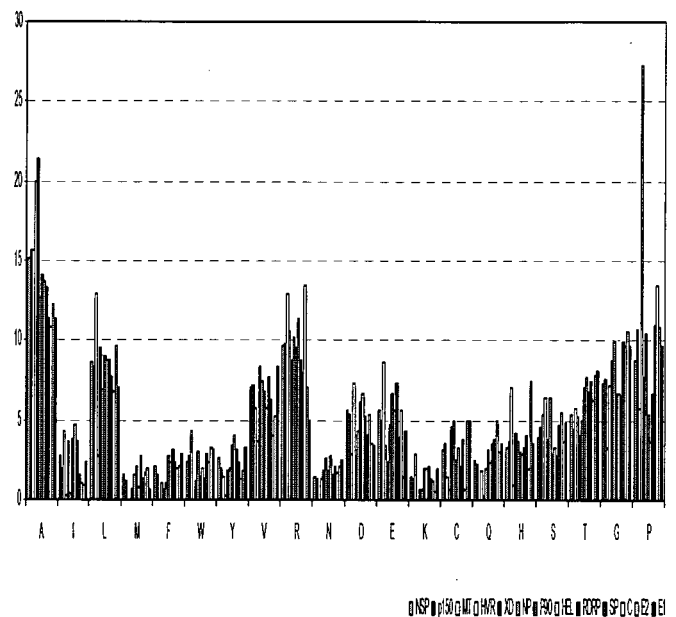


Figure 2. Amino acid sequence plotsimilarity of NSP and SP gene of rubella virus

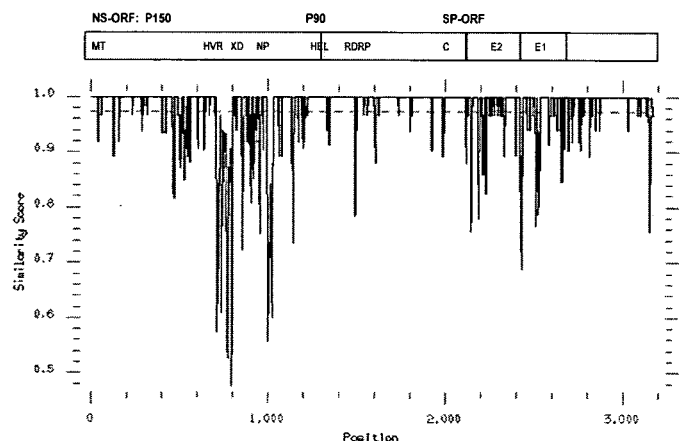
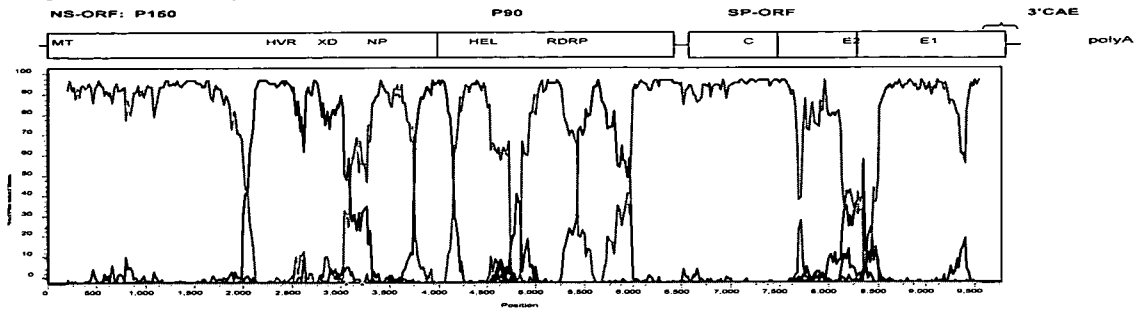


Figure 5. Bootscanning of SUR\_SVK74 strain with M33\_USA61, ULR\_GER84 and A, B, C, D, E genotype strains



BootScan - Query: S\_SUR\_SVK74

FileName: C:\Program Files\RaySoft\SimPlot\simplot\_19snt\_sp-nsp\19s-nsp\_m33-cen-ym\13s-nt\_m33-cen-ym\_clus.txt  
 Window: 400 bp, Step: 20 bp, GapStrip: On, Reps: 100, FB4 ("Maximum Likelihood"), TA: 7.0, Neighbor-Joining

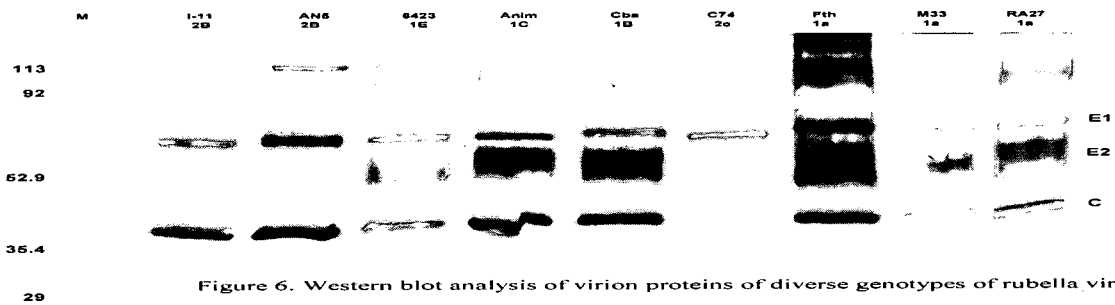


Figure 6. Western blot analysis of virion proteins of diverse genotypes of rubella virus

Table. Positively selected sites as identified under M3 (dichotom) and M8 (beta & w)

Region	Site	M3 positively selected sites (p<50%, p<90%, p<95%, p<99%)	M8	Related function	References
NSP	2110	717R, 751A, 772P, 774P, 775S*, 789P**, 930C, 1000Q, 1023P	474P, 502Y, 717R*, 721S, 730P, 740P*, 751A, 775L, 772P, 774A*, 775S**, 789P**, 1000Q, 1023P, 1031S, 1147Q, 1177K, 930C*, 1200P, 1959T	All located at HVR, unknown function	
P150	1301	717P**, 751A, 772P, 774P, 775S, 789P**, 930C, 956A, 1000Q, 1023P	474P, 502Y, 717R**, 721S, 730P, 740P*, 751A, 770L, 772P, 774A*, 775S**, 777E, 784R, 791C, 798P**, 930C*, 956A*, 1000Q, 1023P, 1031S, 1147Q, 1177K, 1206P, 1550T		
P150:HVR	107	24L* (717 in NSP), 26A, 46P*, 58V, 95A, 77P, 79P*, 81* (774 in NSP), 82T, 91H, 106P**	70P, 81T, 106P** (700P in NSP)		
P150:XD	166	None	113C		
P150:NP	300	None	60, 23P, 31B, 147Q, 177K, 200P		
P90	815	None	258T		
P90:HEL	252	None	225T		
P90:RDRP	221	None	None		
SP	1043	None	348*, 97P, 313S*, 314P, 542L*, 590T**	RNA and p32 protein binding antibody epitope	Liu et al., 1996 Bensch et al., 2000
SP:C	300	348***, 97P***	600T, 1941L*		
SP:E2	282	None	348*, 97P		
SP:E1	481	17T***, 458L**	6A, 13P*, 14L, 242F, 17T** (290T in SP), 48T, 499L** (1041L in SP)	transmembrane domain of E1	Hobman et al., 1994a Yao et al., 1999

Note:  
 \* Positive selection sites tested using the EDS with posterior probability p<00% were in boldface.

## 母乳の風疹ウイルス中和活性能に関する研究

牛島廣治（鹿児島国際大学/東京大学）、早川有子（群馬パース大学）、

駒瀬勝啓（国立感染症研究所）

### 要旨

昨年度の母乳中の風疹抗体(IgA)の存在を見出した。本年度は母乳中の風疹抗体(IgA)の高い群と低い群において母乳の風疹中和活性を調べた。風疹中和活性はいずれの群においても低かったが、わずかの例において中和活性が見られた。しかし風疹 I g A 抗体とは関係がなかった。

### A. 研究目的

母乳中の風疹抗体(IgA)について前回のことを報告した。1. 母乳中には、風疹ウイルスに特異的な IgA が存在する。2. 総 IgA、総蛋白、風疹 IgA は、成乳より初乳に高濃度に含まれる。3. 風疹 IgA は、初乳と成乳の間で正の相関がみられた。母乳中の風疹 IgA と総 IgA の間で正の相関傾向がみられた。5. 妊娠中の風疹血清抗体値(HI)と母乳中の風疹抗体値(EIA)で正の相関傾向がみられた。

そこで、今回はこの母乳中の風疹 IgA 抗体が風疹ウイルスに対する中和活性と関係があるかを調べた。すなわち風疹 IgA 抗体量が高い人の母乳が中和活性価も高いかどうかを明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

群馬県（中毛地区）の某病院で同意を得られた正常褥婦（分娩後から5日間）及び1ヵ月後の褥婦、406名を対象とした。その中で、血清中の風疹抗体値（HI法）が既知であり、初乳・成乳とも採取できた205名を対象に母乳中の風疹 IgA 抗体量を酵素抗体法で調べ、そのうちの初乳20検体（風疹抗体価高い10例、風疹抗体価低い10例）

で、風疹 IgA の高・低抗体価で風疹ウイルスへの中和活性能に差がでるかどうかの実験を行なった。測定方法は、風疹ウイルスとして武田ワクチン T0-336 株を用いた。培養細胞 PK13 を用い、ウイルス感染の阻止をプラーク 50%抑制法で調べた。倫理的側面への配慮は、母親には研究の主旨を書面により十分説明し、研究協力についての承諾も書面にて得た。初乳とはここでは、分娩後から5日間に分泌される乳汁とした。母乳が入っていない場合を100とし、ある濃度の母乳でどのくらいプラークが存在するか割合で調べた。

### C 研究結果

図1には風疹 IgA 抗体が高かった10例の中和活性を示す。横軸は母乳の希釈率  $3 \times 2^n$  を示し、縦軸は母乳を含まない対照のプラークの数を100として、割合を示した。右下の枠の中には各症例の風疹 IgA を単位として示した。#151は3倍希釈で22.0%、6倍希釈で47.3%を示すも他の場合は50%を抑制の有無の基準とすると抑制が見られなかった。#151でも50%抑制が希釈が低い濃度であった。図2には風疹 IgA 抗体 (<1.0U) が低かった10例について同様の図

を示した。#148は3倍希釈で21.2%、6倍希釈で32.2%を示すも他は著名な抑制は示さなかった。3倍希釈、6倍希釈、12倍希釈、24倍希釈、48倍希釈で風疹IgA高価群と低値群でプラーク形成の抑制を比較したところ有意差は24倍以外で見られなかった(24倍  $p=0.04$  他は  $p>0.05$ )。中和活性が見られた#151と#148は特にアンケートで特記すべきことはなかった。

#### D 考察

通常ヒトの血清中の風疹HI抗体価は風疹中和能と相関があると報告されている。しかし母乳中に存在するIgAの中和能は過去においても報告がなされていない。そこで昨年度の報告での母乳中風疹IgA抗体の測定に続いてその高値群10例と低値群10例において50%プラーク抑制の中和活性を調べたところ高値群で中和活性をより有するとの結果は得られなかった。

この事は我々が以前にブタコロナウイルスに対するヒト母乳中のIgA抗体と中和活性との比較においても相関がない結果を得たことと一致する。

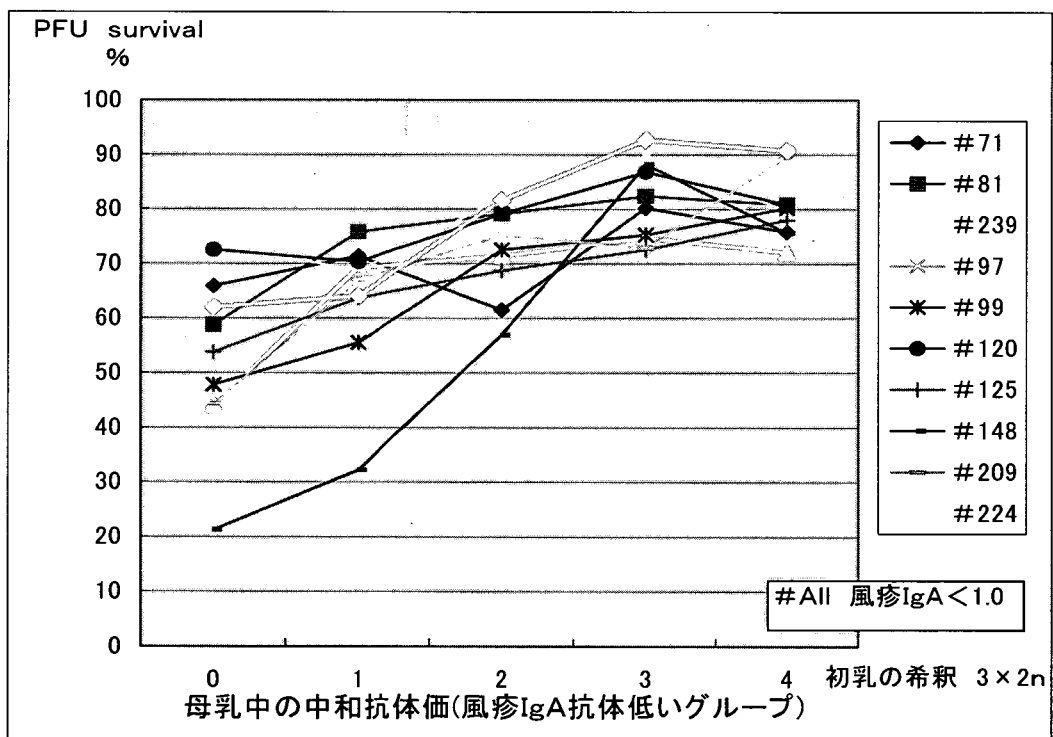
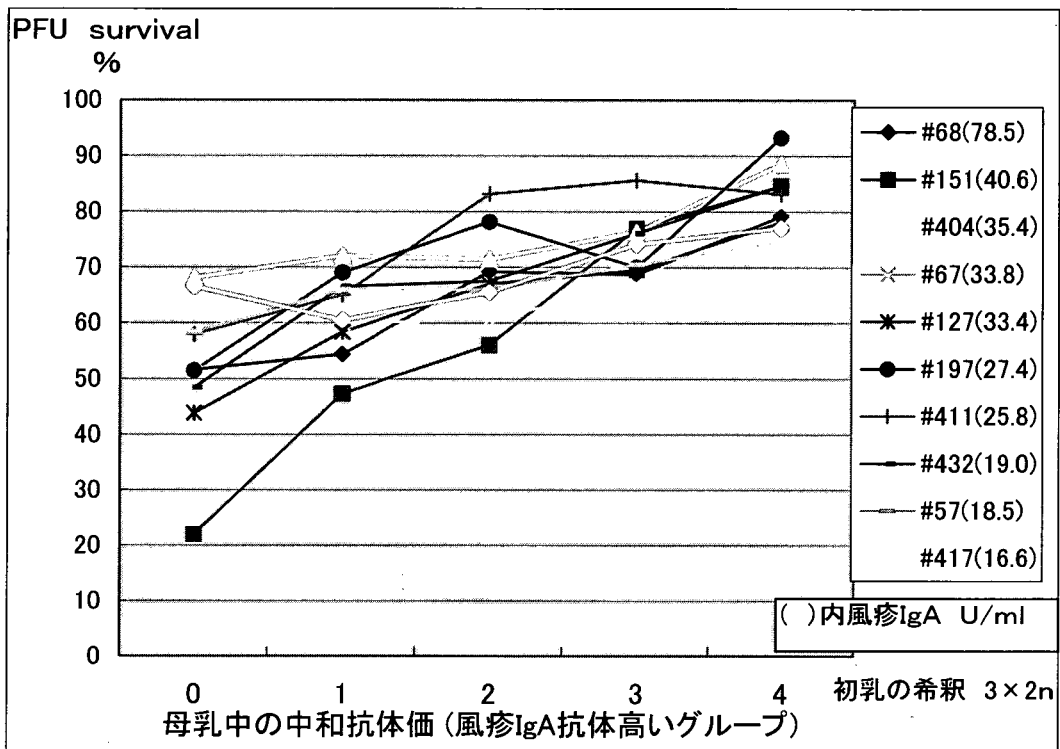
母乳中にはIgAのみならずラクトフェリ

ンなど非特異的にウイルスを中和する作用物質がある。したがって今回の結果も風疹特異IgA以外の母乳中物質が作用している可能性がみられ#151と#148が他の例と比較して中和能が僅かに見られた理由も風疹IgA以外の物質が考えられる。

風疹抗体を有しない母親に分娩後にワクチンを投与したところ母乳中にウイルス抗体が分泌され、児の血清抗体も上昇したと報告がある。また同時に母乳中にウイルスも存在していると報告している。このような原因として母乳中に風疹抗体はあるものの完全に予防出来ないことも考えられる。またワクチンの投与によって母親が一時ウイルス血症となったことも考えられる。

#### E 結論

母乳中の風疹抗体(IgA)の高い群と低い群において母乳の風疹中和活性を調べた。風疹中和活性はいずれの群においても低かったが、わずかの例において中和活性が見られたが風疹IgA抗体とは関係がなかった。



参考資料

表 1 母乳中の風疹 IgA 抗体価高値の中和活性価

No	68	151	404	67	127	197	411	432	57	417
0	51.6	22	68.1	53.4	43.8	51.4	57.9	48.4	58.4	66.5
1	54.4	47.3	72	60	58.4	69	65	66.5	66	60.5
2	69.2	56	71.4	60.5	67	78.1	83.1	67.5	66	65.5
3	68.7	76.9	76.4	67	69.5	70	85.6	76.1	70.5	74.1
4	79.1	84.6	88.5	65	78.1	93.2	83.1	84.6	74.6	77.1

縦軸は希釈倍数 3X 2<sup>n</sup>、横軸は検体番号

表 2 母乳中の風疹 IgA 抗体価低値の中和活性価

No	71	81	239	97	99	120	125	148	209	224
0	65.9	58.8	44	73.6	47.8	72.5	53.8	21.2	44.3	62
1	71.4	75.8	69.2	68.7	55.5	70.3	63.7	32.2	67	64
2	61.5	79.1	71.4	81.9	72.5	79.1	68.7	56.9	75.1	81.6
3	80.2	82.4	74.7	89.6	75.3	86.8	72.5	88.2	73	92.7
4	75.8	80.8	72	79.7	80.2	80.8	78	75.6	89.7	90.7

縦軸は希釈倍数 3X 2<sup>n</sup>、横軸は検体番号

表 3 初乳中の風疹 IgA 抗体価

高 値 群	68	151	404	67	127	197	411	432	57	417
No										
風疹 IgA 抗体価 U/ml	78.5	40.6	35.4	33.8	33.4	27.4	25.8	19	18.5	16.6
低 値 群	71	81	239	97	99	120	125	148	209	224
No										
風疹 IgA 抗体価 U/ml	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0



# 麻疹及び風疹の定期予防接種の接種体制に関する 全国自治体への調査報告

日本外来小児科学会 予防接種委員会

藤岡雅司、永井崇雄、落合 仁、崎山 弘、田原卓浩、  
寺田喜平、宮崎千明、横田俊一郎、吉川哲史

## 【要旨】

麻疹及び風疹の定期の予防接種に関する法令が、平成 17 年 7 月 29 日と平成 18 年 6 月 2 日に続けて改正された。接種対象者や使用できるワクチンの種類が短期間に変更されただけでなく、制度変更に伴う救済的な経過措置が設定されなかったため、定期の予防接種の実施主体である市町村等はその対応に追われる事態になった。一連の法令改正に対する市町村等の対応を調べるために、麻疹及び風疹の定期予防接種の接種体制に関するアンケート調査を行った。調査項目は、平成 18 年 8 月時点での麻疹及び風疹の定期予防接種の接種方式、接種時期の制限や実費徴収の有無、未接種者への対応、健康被害への補償体制などである。

47 都道府県と 15 政令指定都市の 62 自治体の担当課に調査用紙を送付し、36 府県、14 政令市の合計 50 の自治体から回答が得られた(回収率:80.6%)。

接種方式は、88.3%が個別接種であった。接種時期の期間限定は 88.0%でなかった。実費徴収は、98.7%で実施していなかった。

未接種者への行政措置については、対応しない自治体が 40.3%、対応する自治体が 56.0%であった。対応しない理由として、「法に基づく予防接種でないから」を挙げたのは 70.4%の自治体であった。「接種費用にかかる財政的問題のため」、「被害補償にかかる財政的問題のため」を挙げた自治体が、それぞれ 14.0%、13.0%であった。行政措置の対象者の年齢は、厚生労働省の技術的助言に沿って「平成 18 年 3 月 31 日までに 1 歳以上 7 歳半未満であった者」としていたのは 31.8%で、「平成 18 年 4 月 1 日以降の接種日の時点で 2 歳以上 7 歳半未満の者」としたのは 44.6%であった。行政措置に使用するワクチンの種類は、単抗原、混合ワクチンすべて使用可能としていたのは 52.7%であった。健康被害を補償する行政措置災害補償保険の契約は 92.3%の自治体で加入済みであったが、政令指定都市の 54.6%は契約の予定もないと回答した。平成 19 年度も実施する予定の自治体は 14.4%であった。

今回の法令改正では、接種体制に関する重要な事項が短期間に 2 回も変更された。そのため、定期予防接種の実施主体である市町村は、住民や委託医療機関に対する広報活動だけでなく、新たな財政措置の調整など、短期間での対応を余儀なくされた。また、定期接種対象者の年齢の延長や複数のワクチンの併用など、制度変更に伴う救済的な経過措置が設定されなかったため、結果的に行政措置接種という任意接種で対応せざるを得ない状況になっている。定期予防接種は市町村等の自治事務であり、法令を遵守して実施しなければならない。したがって、現場に混乱を来さないためにも、政府や厚生労働省には、接種側にも被接種側にも配慮した予防接種を受けやすい体制作りにつながる法令改正が望まれる。

## 【背景】

平成 17 年 7 月 29 日に予防接種関連法令が改正され、平成 18 年 4 月 1 日から麻しん及び風しんの定期の予防接種の方法が大幅に変更された。定期接種として使用できるワクチンが弱毒生麻しん風しん混合(以下、MR)ワクチンだけと定められた。そして、定期の予防接種の対象年齢が 1 歳と就学前年の各々 1 年間の計 2 年間に短縮された。また、制度変更に伴う経過措置が設定されなかった。その結果、新制度の下では、一方の接種済み者や罹患者は、もう一方の定期の予防接種を受けられなくなることや、2 歳以上の未接種者は就学前まで放置されることなど、法令改正にかかる問題点の指摘が関連学会や関連団体などから相次いだ。結局は、改正法令施行から 2 か月後の平成 18 年 6 月 2 日に関連法令の再改正が行なわれ、一部の問題点は解決した。しかし、改正法令が公布されてからの 10 か月間、定期接種の実務を行なう市町村や医療関係者は厚生労働省の対応に翻弄され続けた。

## 【目的】

今回の一連の麻しん及び風しんの定期接種に関わる予防接種関連法令の改正によって、定期接種の実施主体である市町村や地区の医師会、小児科医会等は、その対応で混乱した。すなわち、当初の改正法令の公布から施行までの経過と、異例の短期間で法令の再改正が行なわれたための二重の混乱である。

今回のアンケートは、このような経過の中で、定期接種の実施主体である市町村の対応を調査するために実施した。日本外来小児科学会では一昨年に BCG の制度変更についての全国調査も行った。BCG 調査で指摘した問題点も参考に、今回の麻しん及び風しんの定期接種についての一連の混乱の原因も検討した。

## 【方法】

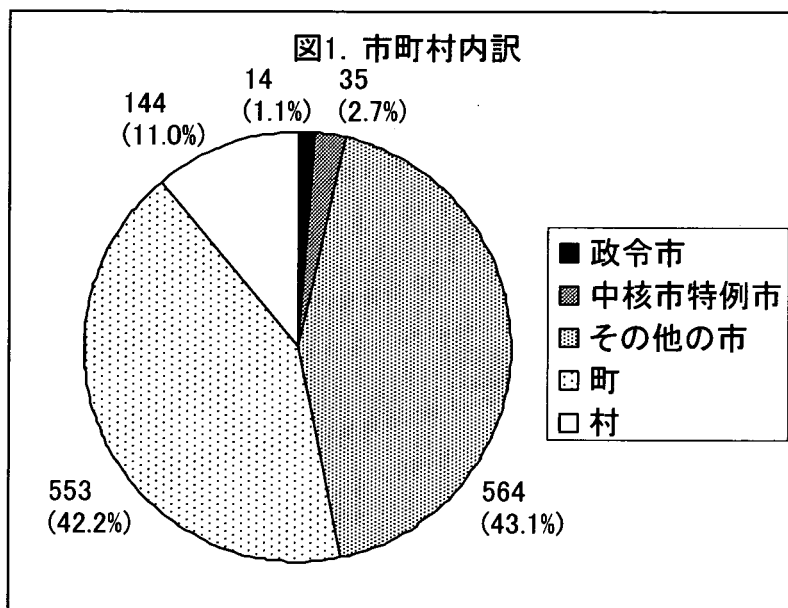
全国すべての都道府県及び政令指定都市の予防接種担当課に対しアンケート調査を行った。都道府県に対しては市町村の対応を集計した回答を依頼した。質問の内容は、平成 18 年 8 月時点での麻しん及び風しんの定期予防接種の実施体制(接種方式、接種時期の制限や実費徴収の有無)、未接種者への対応と健康被害への補償体制である。また、今回の法令改正に対する地方自治体の立場での意見も自由記載で依頼した。回答は久留米大学医療センター小児科に回収して集計し、日本外来小児科学会予防接種委員会において結果の分析を行った。

## 【結果】

### 1) 回収率と市町村数の内訳

47 都道府県と 15 政令指定都市の合計 62 自治体にアンケートを送付し、36 府県と 14 政令指定都市の合計 50 自治体から回答が得られた。回収率は 80.6%であった。平成 18 年 8 月 1 日現在の全国の市町村数は 1,819 で、集計した市町村の総数は 1,310(72.0%)であった。

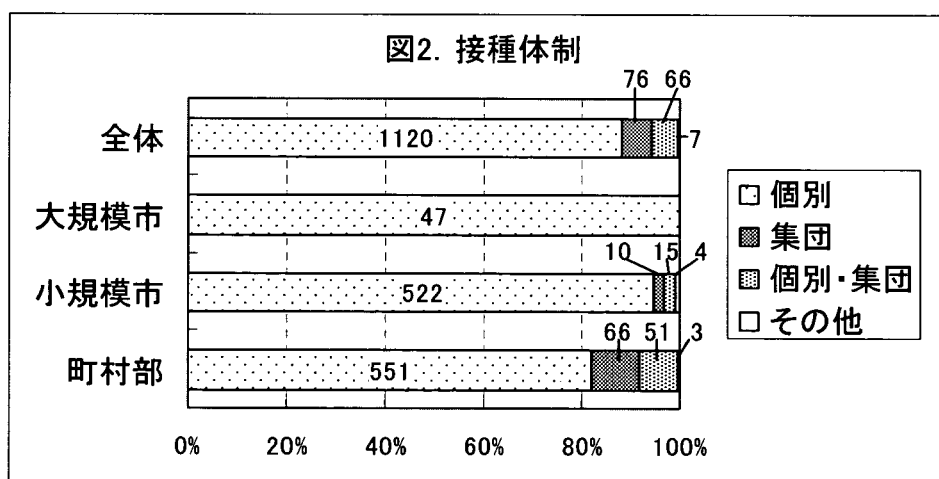
図 1 に回答した市町村の内訳を示す。このうち政令指定都市と中核市・特例市を合わせて大規模市、その他の市を小規模市、町と村を合わせて町村部とすると、それぞれ 49(3.7%)、564(43.1%)、697(53.2%)となった。残念ながら、今回は東京都から回答が得られなかったため、特別区は集計に含まれていない。



### 2) 接種方式について

平成 18 年度の麻しん及び風しんの定期予防接種の接種方式は、回答のあった 1,269 市町村の中で、1,120 (88.3%) が個別、76 (6.0%) が集団、66 (5.2%) が個別と集団の併用、7 (0.6%) がその他であった。

図 2 に上記の市町村規模別にその内訳を示す。個別接種の割合は、大規模市で 100%、小規模市では 94.7%、町村部では 82.1%であった。町村部では集団が 9.8%、併用が 7.6%であり、市町村の規模が小さくなるほど集団接種体制が残っていた。



### 3) 接種時期の制限について

一年のうちで、麻しん及び風しんの定期の予防接種を受けられない期間があるという市町村は、回答のあった 1,265 市町村のうち 128 (10.1%) であった。市町村規模別にみると、接種時期に制限のある市町村は、大規模市では 0%、小規模市では 4.5%、町村部では 15.4%であった。自治体の規模が小さいほど接種時期に制限を設けていた。

### 4) 実費徴収について

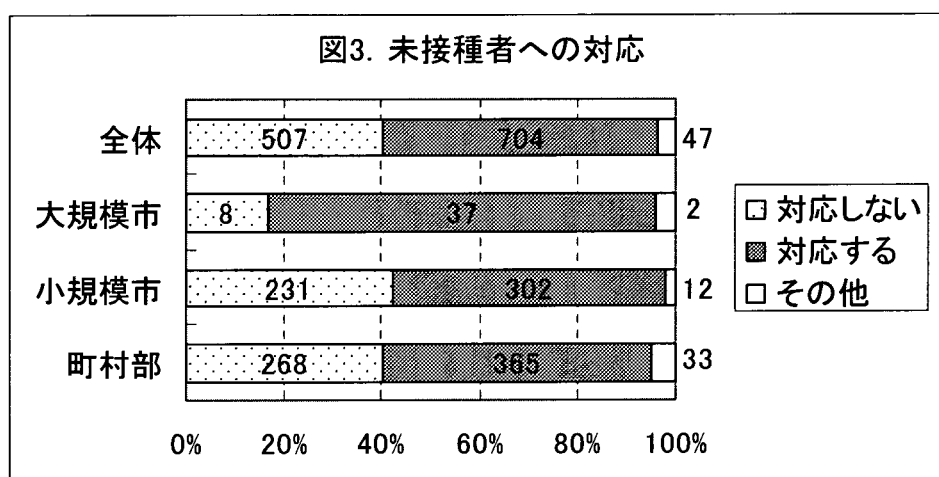
麻しん及び風しんの定期の予防接種に際し実費徴収を行っている市町村は、回答のあつ

た 1,276 市町村のうち 13(1.0%)であった。市町村規模別にみると、実費徴収を行っている市町村は、大規模市では 0%、小規模市では 0.4%、町村部では 1.6%であった。数は少ないものの、自治体の規模が小さいほど実費徴収実施の割合が大きくなった。

#### 5) 未接種者に対する市町村独自の対応について

第 1 期、第 2 期の対象外である未接種者に対する平成 19 年 3 月 31 日までの市町村独自の対応は、回答のあった 1,258 市町村の中で、507(40.3%)が「対応しない」、704(56.0%)が「対応する」、47(3.7%)が「その他」であった。

図 3 に上記の市町村規模別にその内訳を示す。大規模市では 17.0%が「対応しない」、78.7%が「対応する」、4.3%が「その他」に、小規模市では 42.4%が「対応しない」、55.4%が「対応する」、2.2%が「その他」に、町村部では 40.2%が「対応しない」、54.8%が「対応する」、5.0%が「その他」になった。大規模市に対応する自治体が多かった。



#### 6) 未接種者に対して市町村独自の対応をしない理由

未接種者に救済措置などの対応を行わないとした 507 市町村で、その理由について回答を求めた。図 4 に示すように、「法に基づく予防接種でないから」を理由に挙げたのが最も多く全体の 70.4%、「接種費用にかかる財政的問題のため」が 14.0%、「被害補償にかかる財政的問題のため」が 13.0%、「その他」が 24.5%であった。「その他」の具体例としては、「平成 18 年 3 月末までに十分勧奨を行った」「定期接種の接種率が高いため」というものがあった。

