

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

ムンプス・水痘・肺炎球菌感染症の臨床像と今後の対策

分担研究者 庵原俊昭（国立病院機構三重病院小児科）

研究協力者 中野貴司、神谷 齊（国立病院機構三重病院小児科）

落合 仁（落合小児科）

渡辺正博（すずかこどもクリニック）

二井立恵、伊佐地真知子（白子クリニック小児科）

研究要旨 2008年米国では、唾液腺中に含まれるムンプスウイルス遺伝子の検出成績から、登校登園停止期間を耳下腺腫脹後9日間から5日間に短縮した。本邦でもムンプス発症児の登校登園停止期間の変更が必要かを検討した。ほぼ同時期に耳下腺が腫脹した症例では、耳下腺腫脹開始後6日を越えると、耳下腺や顎下腺が腫脹していたとしても唾液からムンプスウイルス分離されなくなり、一方、片側の耳下腺腫脹開始から6～9病日経過して反対側の耳下腺が腫脹した例では、反対側の耳下腺腫脹時の唾液からウイルスは分離された。以上の結果から、ほぼ同時期に耳下腺が腫脹した症例では、耳下腺や顎下腺が腫脹していたとしても6病日を経過すると登校登園を許可しても周囲への感染リスクはないと考えられ、一方、片側の耳下腺しか腫脹しなかった例では、9病日までは反対側が腫脹するリスクを伝え、腫脹したときは休校休園すべきと思われた。

A. 研究目的

ムンプスは、パラミクソウイルス科に属するムンプスウイルスの飛沫感染により、ヒトヒト感染する全身性ウイルス感染症である。潜伏期間は16～18日間であり、2日以上持続する急性耳下腺腫脹が臨床上的特徴である。2008年米国では、唾液腺中に含まれるムンプスウイルス遺伝子の検出成績から、ムンプスの登校登園停止期間を耳下腺腫脹後9日間から5日間に短縮した。一方、わが国ではムンプスの登校登園停止期間は、依然として耳下腺腫脹が消失するまでとなっている。

ムンプスの多くの例では、片側の耳下腺腫脹開始後48時間以内に反対側の耳下腺腫脹を認めるが、時に6日間以上の間をあけて反対側の耳下腺が腫脹することがある。今回、わが国のムンプス登校登園停止期間を再検討する目的で、耳下腺腫脹時期による唾液からのウイルス分離について検討を行った。

B. 研究方法

対象は、耳下腺腫脹開始後2病日以内の唾液からムンプスウイルスが分離され、腫脹開始3病日以降に2回目のウイルス分離を行ったムンプスワクチン歴のない35例である。片側の耳

下腺腫脹開始後24時間以内に反対側の耳下腺腫脹した同時腫脹例が25例（同時腫脹群）、片側の耳下腺腫脹開始後6日以上経過して反対側の耳下腺が腫脹した隔日腫脹例が10例（隔日腫脹群）である。

綿棒で唾液を採取後生理食塩水に再浮遊させ、ミリポアフィルターで濾過後、Vero細胞に接種した。ムンプスウイルスに特異的な細胞変性効果(CPE)を認めたとき、分離陽性と判定した。統計学的解析はt検定を用いて行った。

C. 研究結果

(1) 耳下腺腫脹時期とウイルス分離

耳下腺腫脹0～2病日に唾液からムンプスウイルスが分離された同時腫脹群では、3～5病日になるとウイルス分離率は56%に低下し、6病日を過ぎると、耳下腺や顎下腺の腫脹が残っていても、17例全例の唾液からムンプスウイルスは分離されなかった（表1）。一方、隔日腫脹群では、最初の腫脹を認めた後6病日以上経過して反対側の耳下腺腫脹を認めたが、耳下腺腫脹時に分離を試みた10例全例の唾液からムンプスウイルスが分離された（表2）。なお、隔日腫脹群におけるサンプルを細胞に接種後CPE出現までの日数は、0～3病日採取サンプルでは

5.5±1.8日(範囲:3~9日)であったのに対し、6~9病日採取サンプルでは7.8±2.6日(範囲:5~13日)と、0~3病日に採取したサンプルの方が、CPE出現までの日数が有意に短期間であり(P=0.0371)、唾液中に含まれるウイルス量が多いことを示唆する結果であった。

(2)耳下腺腫脹時の血清抗体価

最初に耳下腺腫脹を認めたときの抗体価を3例で測定した。IgM抗体は、陽性1例、同等1例、陰性1例であり、IgG抗体は陽性2例、陰性1例と、2例においては耳下腺腫脹時にすでに血清抗体が検出された。

D. 考察

ムンプスは人から人に飛沫感染する感染症で、本邦の学校保健法によると登校登園停止期間は耳下腺腫脹が消失するまでとなっている。一方、米国におけるムンプスの登校登園停止期間は、以前は唾液からのムンプスウイルス分離結果から耳下腺腫脹開始後9日間と定められていたが、2006年の各地の大学におけるムンプス流行時の研究結果から、2008年からはムンプスの登校登園停止期間を5日間に短縮した(MMWR 2008;57:1103)。

今回、米国の登校登園停止期間の変更を受け、本邦におけるムンプスの登校登園停止期間の再検討を行った。

ムンプスでは、多くの例では片側の耳下腺腫脹後24時間以内に反対側の耳下腺腫脹を認めるが、一部の例では6病日以上過ぎてから反対側の耳下腺腫脹を認めることがある。今回の検討では、同時腫脹群では耳下腺腫脹後6病日を過ぎると、耳下腺や顎下腺が腫脹していても唾液からウイルスは分離されず、周囲への感染の危険性がないことが示されたが、隔日腫脹群では、6~9病日後でも反対側の耳下腺腫脹時に唾液からウイルスが分離された。

隔日腫脹群の片側腫脹から反対腫脹までの期間は最大9病日であり、9病日後でも反対側耳下腺腫脹を認めた3例全例の唾液からムンプスウイルスが分離された。この結果は、ムンプスでは最大9病日まで唾液からムンプスウイルスが分離されるという以前の報告を支持する結果であったが、同時腫脹群では6病日を過ぎると唾液からウイルスが分離されなくなっていた。以上の結果から、ムンプスの登校登園停止期間

は、ムンプスとして一律に決めるのではなく、ムンプスの病態に応じた登校登園停止期間を検討すべきであることが示唆された。

今回の検討結果から考えられるムンプスの登校登園停止期間は、①ほぼ同時期に両側の耳下腺が腫脹した児では、腫脹開始後5日を経過し、耳下腺が縮小し始めるまでは登校登園を停止する、②時期において反対側耳下腺が腫脹した児では、遅れて腫脹した側の耳下腺が縮小し始めるまで登校登園を停止するであり、注意事項としては、①片側の耳下腺腫脹後9日を過ぎるまでは反対側耳下腺腫脹のリスクがあること、②登校登園停止期間の基準となる病態は耳下腺腫脹であり、顎下腺腫脹ではないこと、である(表3)。

ムンプスでは血中抗体が存在していても、耳下腺腫脹時には唾液からムンプスウイルスが分離される。この要因として、唾液腺にはバリアーがあり、血中抗体が存在していたとしても唾液腺で増殖するウイルスに対しては働きにくくなっていることが関与している。なお、局所性IgA抗体が出現すると唾液からウイルスが分離さなくなることが示されている。

E. 結論

ムンプスの病態から登校登園停止期間を提案した。同時に耳下腺腫脹した例では米国と同様に登校停止期間5日間の基準が適応できるが、9病日まで反対側耳下腺が腫脹する危険性があり、登校を許可したとしても家族の注意深い観察が必要である。また、数日間以上の病日において反対側耳下腺が腫脹したときも、耳下腺腫脹時に唾液からウイルスが分離されるため、このような例では、耳下腺腫脹の退縮が始まるまで登校登園を停止すべきである。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 庵原俊昭：おたふくかぜの再感染と Vaccine failure の臨床. 臨床とウイルス 2008; 36:50-54
- 2) 庵原俊昭、落合 仁、他：唾液からのウイルス分離成績からみたムンプス患児の登校登園停止期間. 日本小児科医会会報 2008; 36:163-166

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記することなし。

(表1) 同時腫脹群における唾液からのウイルス分離率

病日	例数	分離陽性数	陽性率(%)
0～2	25	25	100
3～5	9	5	56
6～9	17	0	0

(表2) 隔日腫脹群の反対側耳下腺腫脹時期とウイルス分離

症例	反対側耳下腺 腫脹児の病日(日)	CPE出現までの日数	
		0～3病日	6～9病日
1	6	6	5
2	6	7	10
3	6	4	5
4	7	6	7
5	7	3	5
6	8	6	8
7	8	5	7
8	9	9	10
9	9	3	8
10	9	6	13

(表3) 臨床経過によるムンプスの登校登園停止期間(案)

1) ほぼ同時期に両側の耳下腺腫脹した児では、腫脹開始後5日を経過し、腫脹した耳下腺が縮小し始めるまでは登校登園を停止する。

2) 時期をおいて反対側の耳下腺が腫脹した児では、遅れて腫脹した側の耳下腺が縮小し始めるまでは登校登園を停止する。

注意1)：片側の耳下腺腫脹後9日を過ぎるまでは、反対側の耳下腺腫脹に注意する

注意2)：登校登園停止期間は耳下腺腫脹の病態を基準とする

予防接種で予防可能疾患の今後の感染症対策に
必要な予防接種に関する研究

ムンプスウイルスの中枢神経病原性遺伝子に関する研究

分担研究者 木所 稔（国立感染症研究所・ウイルス第三部・主任研究官）
研究協力者 齋加志津子（千葉県衛生研究所・感染症学研究室）
加藤 篤、久保田耐（国立感染症研究所・ウイルス第三部）
永田典代（国立感染症研究所・感染病理部）
網 康至、須崎百合子（国立感染症研究所・動物管理室）

研究要旨 ムンプスウイルスの中枢神経病原性に関わる遺伝子を特定することはムンプスウイルスの病原性発現機構を解明できるだけでなく、新規ワクチンの開発や品質管理上でも重要な意味を持つ。そこで我々はムンプスウイルスの病原性解明のためのツールとして、マーモセットの感染モデル系とムンプスウイルスのリバースジェネティクス法の確立を試みた。その結果、マーモセットの感染モデル系によってワクチン株間のわずかな病原性の違いを区別できることが示された。また、リバースジェネティクス法によって作製した組換えムンプスウイルスは原株の性状を反映しないことが明らかになった。

A. 研究目的

他の先進諸国においては MMR ワクチンの 2 回接種によっておたふくかぜの流行がほぼ制圧されている一方、日本においてはワクチンの普及が進まず、おたふくかぜの流行を制御できていない。こうした国内の現状を打開するためには安全性の高い新規ワクチンの開発が必要であるが、ワクチンの安全性を評価できるモデル系が無いことが大きな障害であった。我々はマーモセットの発症モデル系によってムンプスウイルスのヒトにおける中枢神経病原性を評価できることを見だし、同時に温度感受性を指標にして中枢神経病原性の異なるワクチン候補株 Y125 と Y213 を分離した。Y125 株はマーモセットと新生ラットに全く病原性を示さないのに対し、Y213 株は高い病原性を示した。そこで我々はムンプスウイルスのリバースジェネティクス法を確立することによってこれら 2 株のゲノム配列の違いを基に中枢神経病原性遺伝子を同定することを試みた。また、マーモセットによるおたふくかぜワクチンの安全性評価の方法をより厳密なものとするため、現行のワクチン株と野外株をマーモセットに脳内接種し、病原性の評価を行った。

B. 研究方法

(1) リバースジェネティクス法の確立とキメラウイルスの作成

T7 プロモーターの直下に Y125 株と Y213 株

由来の全長ゲノム cDNA を連結したプラスミドを構築した。併せて、のキメラウイルスを作製するため、Y125 と Y213 とゲノム cDNA を BssH II、XbaI、SwaI で切断し、相互に入れ換えた 6 種類のキメラ cDNA を作成した（図 1）。これらの全長ゲノム cDNA を、NP、P、L の各遺伝子を発現する 3 種類のヘルパープラスミドと共に BHK/T7 細胞にトランスフェクトした（図 2）。翌日 Vero 細胞をオーバーレイして培養を続け、CPE が極期に達したところでハーベストした。回収された組換えウイルスについて、プラークサイズ（図 3）、温度感受性（以下 ts）（図 4）、および新生ラットにおける中枢神経病原性を調べ（図 5）、原株との比較を行った。また、原株のゲノム配列の多様性を評価するために、全ゲノムの 94% に相当する領域を 6 つに分けて（A-F 領域）TA-cloning し、各領域から得られた個々のクローンについてシーケンスを調べ、コンセンサス配列に比較してどの程度の多様性があるかを調べた（図 6）。組換えウイルス rY213 株についても A 領域（リーダー配列から NP 遺伝子まで）について同様の解析を行い原株との比較を行った。

(2) マーモセット脳内接種試験

ワクチン株として Jeryl Lynn 株、星野株、鳥居株、占部 M3 株（統一株 MMR 用ワクチン株）を用いた（表 1）。野外株としては 02-49 株と大館株を用いた。日本クレアから購入した 14 ヶ月齢（雄）のマーモセットを用い、1 群 3 頭（大

館株接種群のみ1頭、また星野株接種群は実験途中で麻酔の事故により1頭死亡、左右の脳内に各ウイルス液を 10^3 PFU/匹で接種した。接種後0、7、10日目に咽頭スワブ、尿、末梢血リンパ球を採取した。また、接種後3、7、9日目に麻酔下でMRIによる頭部の撮像を行った(MRIの結果については昨年度報告書に記載)。動物は接種後10日目に安楽殺させ、病理解剖に供した。病理解剖においては中枢神経の各部位(前頭葉、後頭葉、側頭葉、視床、中脳、小脳、橋、延髄、脊髄)、腺組織(耳下腺、顎下腺、精巣、精巣上体)、リンパ組織(扁桃、胸腺、脾臓)、主要臓器(膵臓、心臓、肝臓、腎臓)の一部、咽頭スワブ、尿および髄液を採取し、直ちにドライアイスで凍結し、 -80°C に保存した。

(3) 総 RNA の抽出

マームセットの解剖時に採取し、凍結保存した組織片に RNA 抽出用溶解バッファーを加え、オートミル(トッケン)でホモジナイズした後に、ホモジェネートから RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて総 RNA を抽出した。

経時的に採取した咽頭スワブ、尿、末梢血リンパ球についても同じキットで総 RNA を抽出した。これらの RNA 溶液の一部から RNA PCR Kit (AMV) (TaKaRa)を用いて cDNA を合成し、リアルタイム PCR に用いた。

(4) リアルタイム PCR によるムンプスウイルスゲノムの定量的検出

ムンプスウイルスゲノムの検出には NP 遺伝子内で株間の変異が比較的少ない領域(1253-1328塩基)を標的に、増幅用プライマーとして MuNP1253s

(5'-TTCCTCCAGTTCAACAGCAA-3') 及び MuNP1328as

(5'-CCGTCGTCATCTGATTCCTC-3')を用いた。検出用プローブとしてはロシュのユニバーサルプローブライブラリー#62 (UPL#62)を用い、LightCycler480 (ロシュ)で測定した。

リアルタイム PCR によるムンプスウイルスゲノムの定量をより厳密に行うため、組織由来の検体についてはハウスキーピング遺伝子の1つである GAPDH 遺伝子のコピー数を測定し、検体間のアプライした RNA 量のばらつきを補正した。GAPDH 遺伝子の定量には増幅用プライマーとして Marm-GAPDHfv

(5'-CATGGCCTCCAAGGAATAAG-3') 及び Marm-GAPDHrv

(5'-CTTTTCCTCTCGTGCTCTCG-3')を用い、検出用プローブとしてはロシュの UPL#131 を用い

た。GAPDH 遺伝子コピー数の測定は常にムンプスウイルスゲノムの測定と同一のプレート上で行い、ウイルスゲノム量は GAPDH 遺伝子 10^7 コピー当たりのコピー数で算定した。ただし、咽頭スワブと尿については、補正を行わずに測定値をそのまま用いた。測定は同一検体について3回以上繰り返し、その平均値を求めた。

(倫理面への配慮)

動物実験は全て国立感染症研究所動物実験委員会の審査を受け、動物に対する苦痛低減措置、および使用個体数が適切であるという承認を得たので、国立感染症研究所動物実験委員会実施規程に基づき実施した。

C. 結果

(1) リバースジェネティクス法で得られた組換えムンプスウイルスの性状解析

トランスフェクト後1週間ほどで Y213 株由来 cDNA (pMuV213) とキメラ cDNA (pMuVBS5) を導入した細胞にムンプスウイルス特有の CPE が出現し、ウイルスが回収された(それぞれ rY213 と rBS5)。そこでまず rY213 株について原株との生物学的性状の比較を行った。その結果、プラークサイズは原株の Y213 株あるいは弱毒型の Y125 株よりもさらに小さく(図3)、温度感受性試験では rY213 株は原株には無い強い ts を獲得していることが判明した(図4)。また、新生ラットに対する中枢神経病原性を測定した結果、高病原性の Y213 株に由来するにもかかわらず病原性が著しく低下しており、脳室の拡張がほとんど認められなかった(図5)。以上の結果より、Y213 株の cDNA からリバースジェネティクスによって作製された組換えウイルス rY213 は、高病原性である原株 Y213 の性状を反映せず、弱毒化していることが明らかとなった。

こうした r213 株と原株との性状の違いが遺伝的な多様性の違いに基づく可能性が考えられることから、これら2株の遺伝学的多様性の違いを調べた(図6)。その結果、原株の Y213 株ではコンセンサス配列と同一配列のクローンはむしろ希であり、且つ個々のクローンはそのほとんどが相互に異なる部位に塩基置換を持っており、いわゆるメジャーポピュレーションは存在しなかった(図6)。一方、rY213 株についても A 領域について同様の解析をしたところ塩基置換の頻度は Y213 の $1/4$ であり、調べたクローンの $3/5$ はコンセンサス配列と同一であった(図6)。従って、予想通り rY213 株の遺伝的

多様性は Y213 株に比べて低いことが示唆された。

(2) マーモセット脳内接種試験

リアルタイムPCRによる中枢神経組織のウイルス量は 02-49 株で最も高く、Jeryl Lynn 株で最も低かった (図 7、8)。他のワクチン株および大館株ではその中間のウイルス量を示し、これらの株間では大きな違いは認められなかった (図 8)。従って、中枢神経組織内のウイルス量は必ずしもヒトにおける中枢神経病原性を反映するものではなかった。

一方、中枢神経系における病理学的な変化においては、大館株による病変が最も強く、次いで 02-49 株、ワクチン株の順であった (図 9、表 2)。ワクチン株接種群の中では占部 M3 株接種群の病変が最も強く、ワクチン株中では唯一視床の実質にまでウイルス抗原が検出されたのに対し (図 9)、鳥居株と Jeryl Lynn 株接種群においては病変が最も軽微であった (図 9)。以上の結果から、マーモセットにおける病理学的変化の程度はヒトでの病原性と良く相関していることが示された。大館株においては他のウイルス株と異なり、リンパ系組織における病変が強いのが特徴的であった (図 10)。リアルタイム PCR の結果でも大館株では扁桃、および胸腺におけるコピー数が他のウイルス株に比べて際だって高く (図 7、8)、大館株のリンパ系組織親和性を裏付ける結果であった。

D. 考察

全長ゲノム cDNA から感染性ウイルスが回収され、ムンプスウイルスのリバースジェネティクス法を確立することができた。しかしながら Y213 株に由来する r Y213 株の生物学的性状を原株と比較したところ、コンセンサスシーケンスに基づいて作製された組換えウイルスは原株の性状を反映せず高度に弱毒化した。その原因の一つとして考えられるのは、遺伝的多様性の違いである。事実、Vignuzzi らはポリオウイルスで、遺伝子の多様性の程度が中枢神経系への侵襲性に直接関与していることを報告している (Vignuzzi M., et al. Nature. 2006, 19; 439 (7074): 344-348)。原株のウイルスサンプルは複数の quasispecies の集合体であり、ダイレクトシーケンスによって得られる塩基配列の情報 (コンセンサスシーケンス) はこれらの相互に塩基配列が異なる quasispecies のシグナルの総和と考えられる。従ってコンセンサスシーケン

スと同じ塩基配列を持つウイルスは存在しないか、存在したとしてもマイナーポピュレーションである可能性が高い。図 6 の結果は、その可能性を示唆している。また、原株の生物学的性状についても個々の quasispecies の性状の総和であると考えられる。これらの理由からリバースジェネティクス法で得られたウイルスは、原株の生物学的性状を反映できない可能性がある。今後は、この仮説を裏付けるために r Y213 株の遺伝的多様性を人為的に高くした場合にその性状がどのように変化するかを調べる予定である。

今回実験に用いた Y213 株はブランク純化からわずか 4 代継代しただけのウイルスサンプルであり、通常の生ワクチンのマスターシードウイルスに相当する継代歴である。もちろんブランク純化直後のウイルスから cDNA を調製して組換えウイルスを作れば元のウイルスの性状をより忠実に反映できる可能性は考えられるが、ワクチンとしての使用を考えた場合にオリジナルのウイルスから少なくとも数代以上の継代は避けられない。そして、継代を重ねた上で性状を確認しない限り意味がない。従って、ワクチンの性状解析にリバースジェネティクスを用いようとするならば、どうしても quasispecies の問題は避けることができないことになる。今後の大きな課題である。

マーモセットの脳内接種実験では接種後 10 日後におけるウイルス量と病理学的変化の関連性を調べた。病理学的な変化においてはヒトにおける中枢神経病原性と強い相関が認められた。が、意外なことにウイルス量の結果は必ずしも病理学的変化と相関しなかった。その原因としては、株によって増殖の動態が異なっているためにピークの時期が前後することが考えられる。

また、鳥居株の病理変化がヒトにおける副反応に比べて弱く、Jeryl Lynn と同程度であった。これは観察の時期が接種後 10 日目であるため、炎症反応のピークよりやや早いことによると考えられる。事実、その後の実験で接種後 2 週目に観察した鳥居株被接種個体では炎症の程度がより高い傾向が認められた。今回の実験ではウイルス量と病理変化との相関を見る目的から観察期間を 10 日間に設定したが、ウイルス量が病理変化に相関しないことと、過去の観察結果から接種後 2 週目での観察がより適切であると考えられる。

大館株がリンパ組織に高い親和性を持つことが今回の実験で始めて示されたが、この株の

ヒトにおける高い病原性との関連性を考えると興味深い。

今回の成績で新生ラットとの比較をする上で特に重要なのは、新生ラットでは常に星野株の反応が占部 M3 株よりも高く出るという逆転現象があるのに対し、マーモセットでは占部株でより強い反応が認められており、ヒトにおける反応をより忠実に再現できた点である。今回の結果からマーモセットの感染モデル系は新生ラットの系よりもヒトでの現象をより忠実に再現できることが示唆され、このモデル系がおたふくかぜワクチンの安全性評価に有効である可能性が示唆された。

今後はムンプスウイルスの病原性だけではなくムンプスワクチンの efficacy を評価するためのモデルとしてマーモセットの可能性を検討することを考えている。

E. 結論

1. rY213 の性状は原株とは異なり、高い弱毒性を示した。
2. Y213 のゲノム配列の多様性を調べたところ、コンセンサス配列と同一配列のクローンは希であり、個々のクローンは相互に異なる塩基配列を持っており、メジャーポピュレーションは存在しなかった。
3. 組換えウイルスが原株の性状を反映しないのは、原株のウイルスサンプルが複数の quasispecies の集合体であり、その性状は個々の quasispecies の性状の総和であるため、リバーシジェネティクスによる single clone 解析ではその多様性を反映できない可能性が考えられた。
4. マーモセットの CNS におけるウイルス量は必ずしもヒトにおける病原性を反映しない。
5. 強毒株ではリンパ組織への親和性が認められた。
6. 病理学的変化の程度はほぼヒトにおける病原性と一致していた。
7. 一連の結果から、マーモセットの感染モデル系は野外株およびワクチン株間の病原性の違いを評価できる優れた感染モデル系であることが示唆された。

F. 健康危害情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 木所 稔, おたふくかぜの再感染と vaccine failure の基礎. 臨床とウイルス 2008;36:39-49
2. Yasui F, Kai C, Kitabatake M, Inoue S, Yoneda M, Yokochi S, Kase R, Sekiguchi S, Morita K, Hishima T, Suzuki H, Karamatsu K, Yasutomi Y, Shida H, Kidokoro M, Mizuno K, Matsushima K, Kohara M. Prior immunization with SARS-CoV nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. J Immunol. 2008; 181: 6337-6348
3. Suzuki H, Kidokoro M, Fofana IB, Ohashi T, Okamura T, Matsuo K, Yamamoto N, Shida H. Immunogenicity of newly constructed attenuated vaccinia strain LC16m8Delta that expresses SIV Gag protein. Vaccine 2009; 27: 966-971

2. 学会発表

1. M. Kidokoro, S. Saika, N. Nagata, Y. Ami, Y. Suzuki, A. Kato, T. Kubota, N. Okabe, S. Ichinohe, M. Tashiro. NOVEL ANIMAL MODEL FOR MUMPS VIRUS NEUROVIRULENCE - EVALUATION OF THE NEUROVIRULENCE SAFETY OF MUMPS VACCINES IN COMMON MARMOSETS. WCVII 2008, ミラノ, 2008 年 9 月
2. 木所 稔、齋加志津子、田代真人、加藤 篤：リバーシジェネティクスによって作製したムンプスウイルスの病原性は原株の性状を反映しない、第 56 回日本ウイルス学会、岡山、2008 年 10 月
3. 木所 稔、網 康至、須崎百合子、永田典代、長谷川秀樹、久保田耐、田代真人、岡部信彦、加藤 篤、マーモセット感染モデルによるムンプスワクチン株の中枢神経病原性の評価、第 8 回日本ワクチン学会、熊本、2008 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

図1 キメラ cDNA の作製

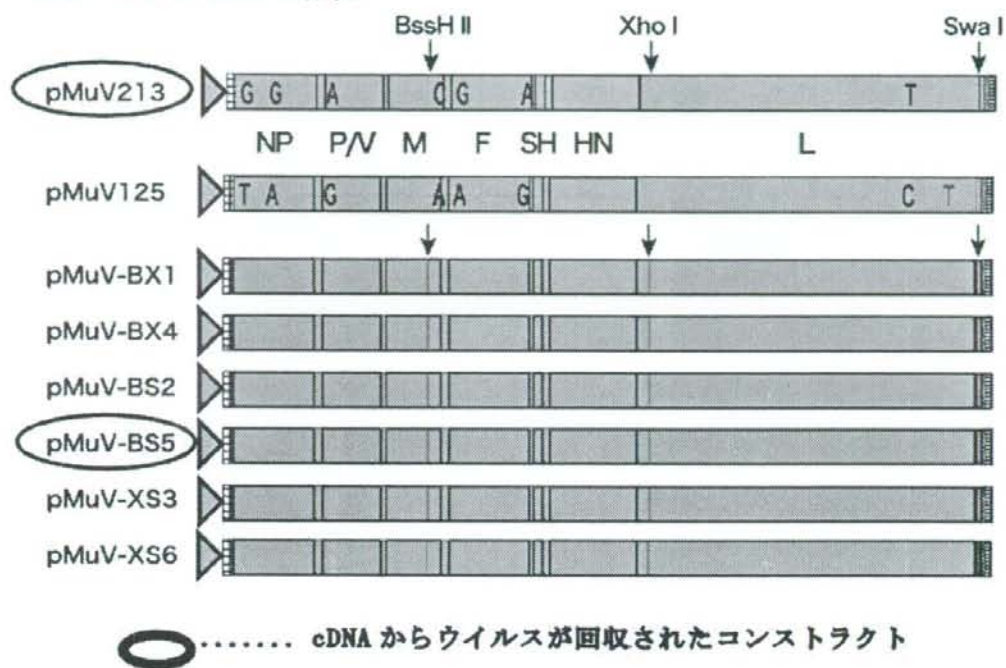


図2 cDNA からのムンプスウイルスの回収

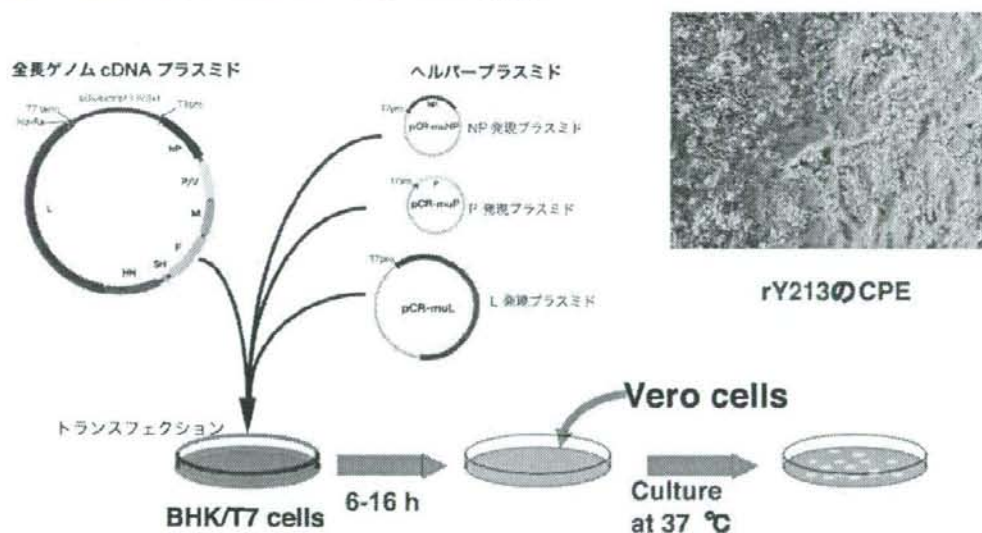


図3 rY213の生物学的性状 (plaque size)

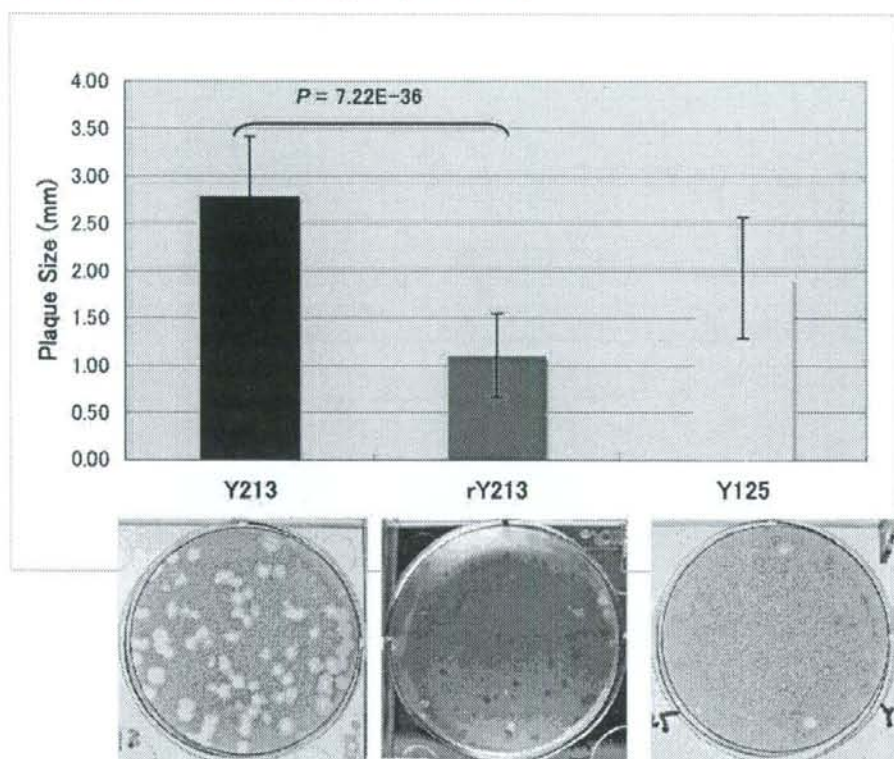


図4 rY213の生物学的性状 (温度感受性)

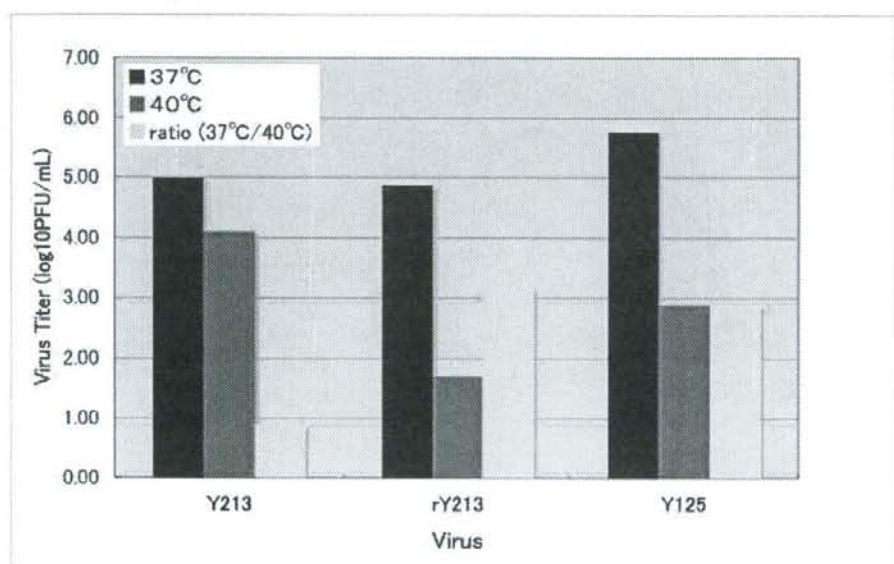


図5 rY213の生物学的性状(新生ラットにおける中枢神経病原性)

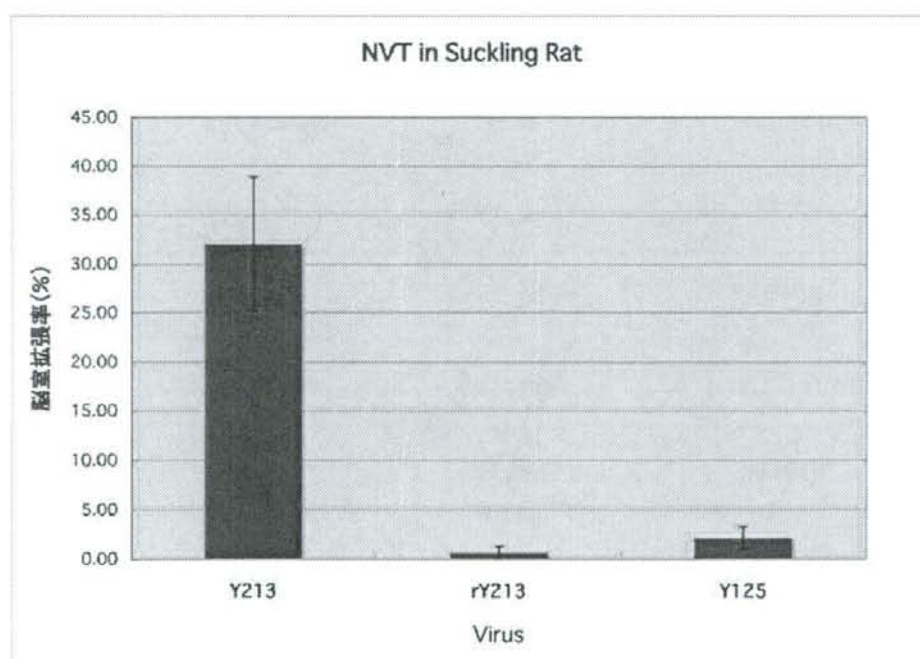
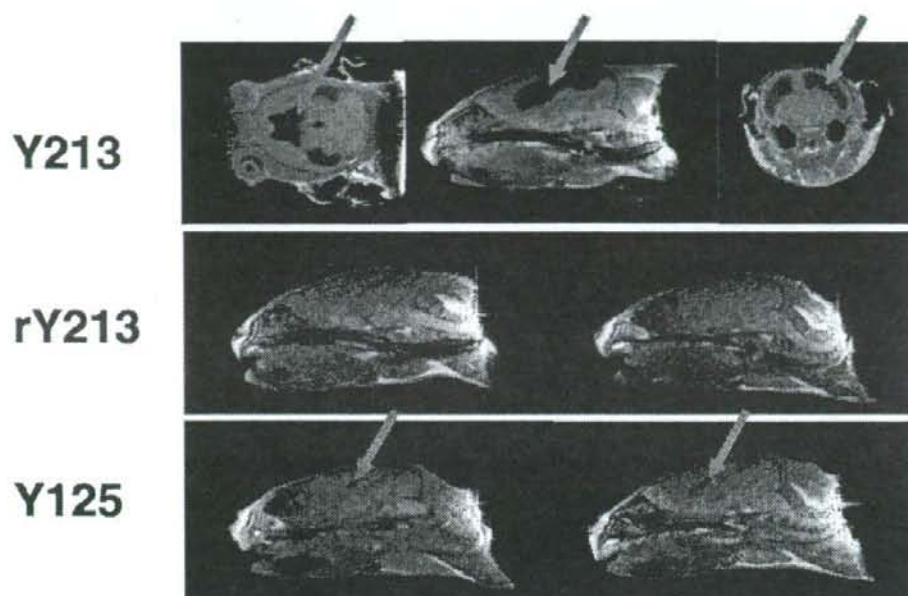


図6 Y213株およびrY213株の遺伝的多様性

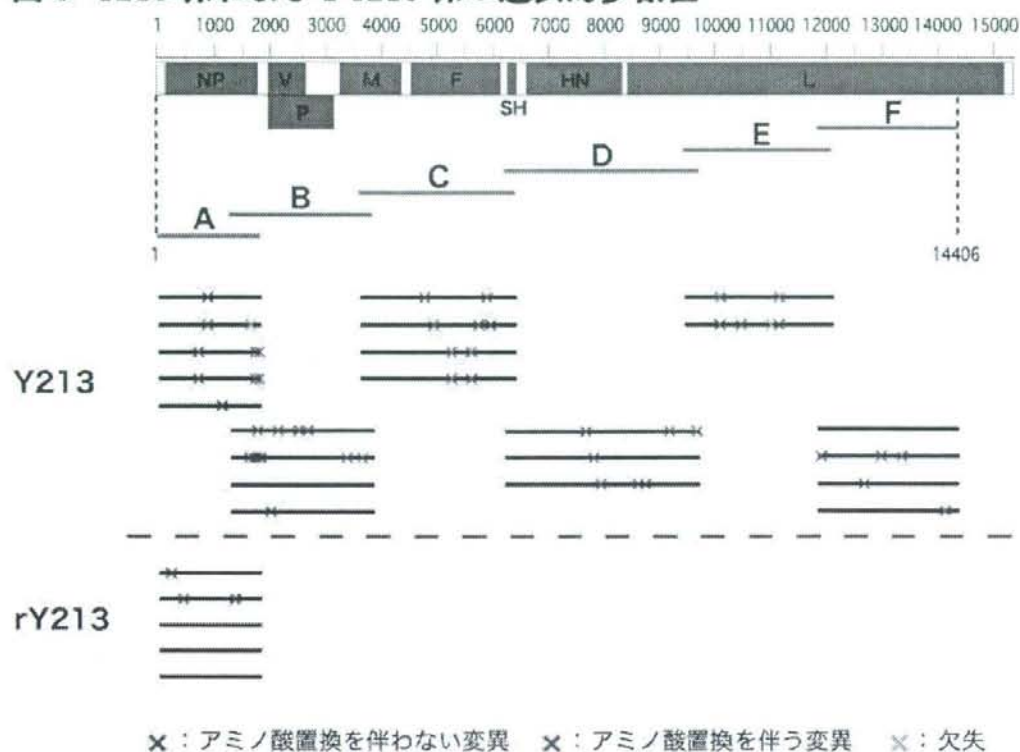
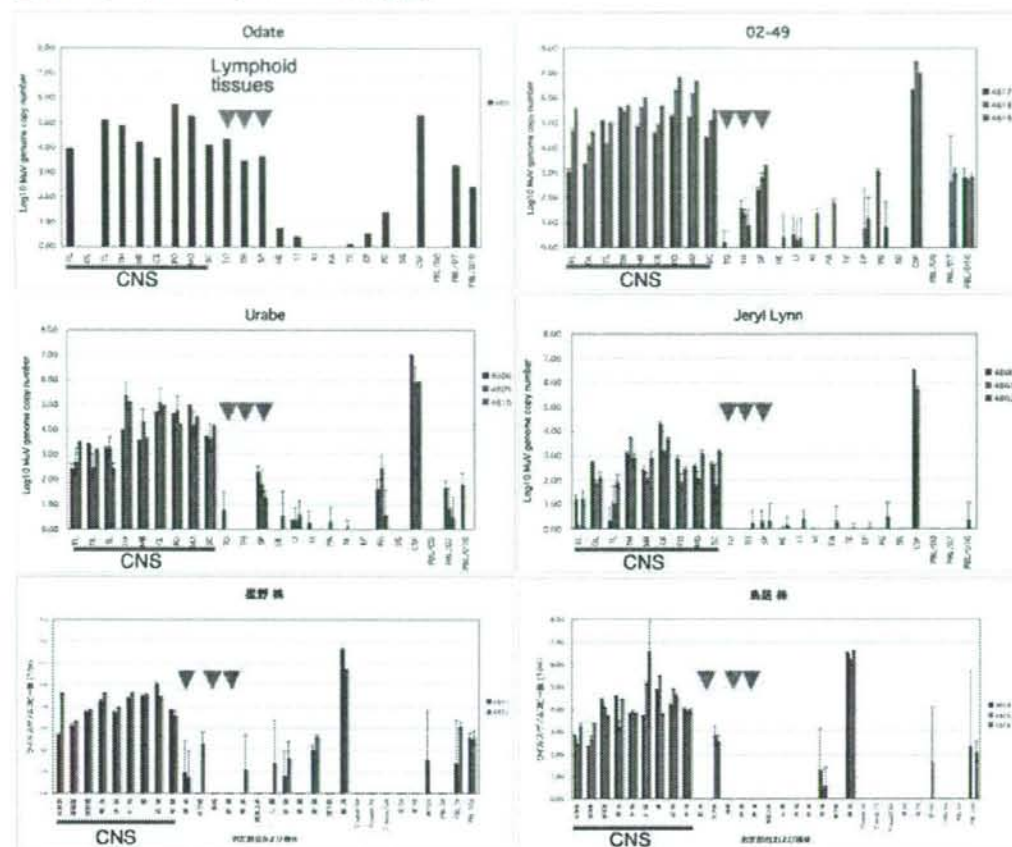


表1 マーモセットに接種されたムンプスウイルス株

Strain	属性	Genotype	ヒトでの髄膜炎 発症率
大館	Wild type	I	>70%
02-49	Wild type	G	5-10%?
Jeryl Lynn	Vaccine	A	0.001%
占部株	Vaccine	B	0.25%
星野株	Vaccine	B	0.04%
鳥居	Vaccine	B	0.05%

図7 ウイルスゲノムの局在



- | | |
|---------|---------------|
| FL: 前頭葉 | HE: 心臓 |
| OL: 後頭葉 | PA: 脾臓 |
| TL: 側頭葉 | LI: 肝臓 |
| TM: 視床 | KI: 腎臓 |
| MB: 中脳 | PG: 耳下腺 |
| CE: 小脳 | TE: 精巣 |
| PO: 橋 | EP: 精巣上体 |
| MO: 延髄 | SG: 顎下腺 |
| TO: 扁桃 | CSF: 髄液 |
| TH: 胸腺 | CNS: 中枢神経系の組織 |
| SP: 脾臓) | ▼ : リンパ系組織 |

図8 ウイルスゲノムの局在(まとめ)

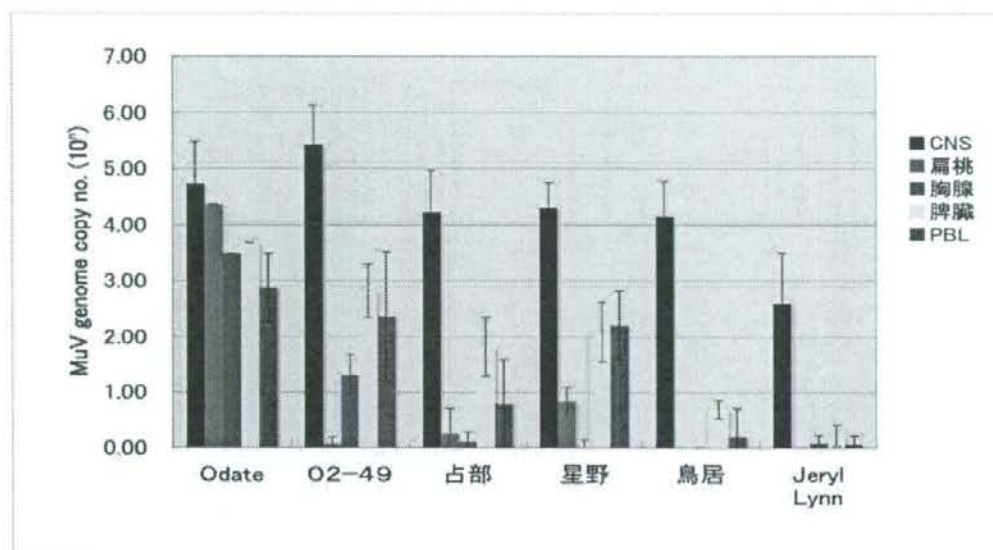


図9 脳内の病理変化とウイルス抗原の局在

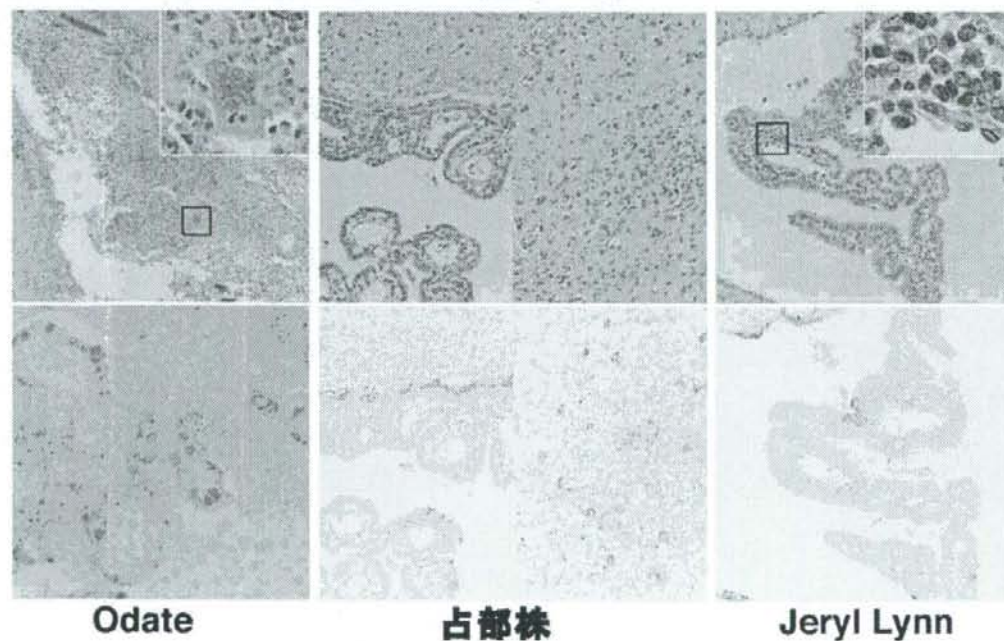


図 10 大館株の lymphotropism (リンパ節)

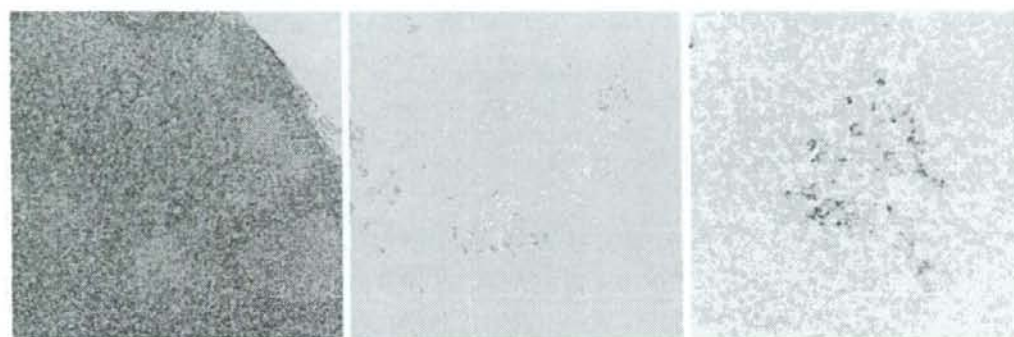


表 2 結果のまとめ

	野外株			ワクチン株		
	大館	02-49	占部	星野	鳥居	Jeryl Lynn
ヒトでの腫 瘍発症率	>70%	5-10%	0.25%	0.04%	0.05%	0.001%
ウイルス コピー数 (10 ⁿ)	4.73	5.43	4.22	4.30	4.15	2.60
抗原陽性細 胞	+++	++	++	++	+	+
炎症反応	++++	+++	++ ~ +++	++	+	+

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
予防接種で予防可能疾患の今後の感染症対策に必要な予防接種に関する研究

分担研究報告書

風疹に関する予防対策，今後の風疹ワクチンのあり方に関する研究

主任研究者：岡部信彦（国立感染症研究所感染情報センター長）

分担研究者：平原史樹 横浜市立大学大学院医学研究科

生殖生育病態医学講座（産婦人科学）教授

研究協力者

種村光代 名古屋市立大学大学院遺伝医学非常勤講師（産婦人科学）

寺田喜平 川崎医科大学小児科第1講座准教授

川名 尚 帝京平成短期大学副学長帝京大学医学部附属溝口病院産婦人科教授

多屋馨子 国立感染症研究所感染情報センター室長 第3室（予防接種室）

駒瀬勝啓 国立感染症研究所 室長 ウイルス第3部・第2室

奥田美加 横浜市立大学附属市民総合医療センター助教（産婦人科）

要約：周産期に於ける再興感染症は近年の成人期におけるこれらの感染流行に伴って深刻な問題を惹起している。2004年風疹流行にともなう母児感染の予防対策構築に関する研究班により「風疹流行および先天性風疹症候群の発生抑制に関する緊急提言」が発せられ、妊娠女性における先天性風疹症候群（CRS）の撲滅を目指した取り組みがスタートした。本研究年度においては幸いに明らかなCRSの発症は見られなかった。しかしながら、産褥女性のうちHI抗体価が16倍以下のワクチン接種対象者は全体の21%に及び、そのうち説明と同意により81.5%の産褥女性がワクチン接種を受け、免疫抗体獲得等の効果が得られた。また本年度までに164例の罹患の疑いのある妊娠女性を2次施設で対応した結果を分析し、風疹患者との接触なしの症例が圧倒的に多く91.5%を占めており、発疹のみられた症例は18.5%にみられたが、いずれからもCRSの発症はみられなかった。また、他の再興感染症である麻疹、水痘、流行性耳下腺炎の成人発症は妊娠女性にまで及び、全国の産科機関65施設のうち21機関（32.3%）の周産期母子医療センターにおいてこれらの取り扱い例が認められ、他の妊娠女性への2次感染予防、外来受診時、入院時の感染隔離、分娩室での感染予防、母体管理、新生児の管理等々の問題が大きな課題となっていることが示され、周産期管理の視点からこれら再興感染症罹患妊婦の問題に取り組む必要性が示された。

見出し語：先天性風疹症候群（CRS）、妊娠、麻疹、水痘、流行性耳下腺炎

緒言・研究目的：

2003 年末より 2004 年初頭にかけて生じた本邦各地における風疹の局地的な流行により、例年は年間 1 名前後であった先天性風疹症候群 (CRS) 罹患児の報告が著明に増加する傾向を受け、2004 年本研究班の前身班である風疹流行にともなう母児感染の予防対策構築に関する研究班により、「風疹流行および先天性風疹症候群の発生抑制に関する緊急提言」が発せられた。引き続き冬季にも風疹の流行が危惧されたが幸い明らかな流行は見られず、最終的に CRS の報告は 2004 年の 10 名に対し本研究年度は明らかな CRS の発症は見られなかった。また一方で CRS のリスク評価は血清学的診断のみでは困難であり、誤ったリスク評価による無用な人工妊娠中絶が問題視されている。本研究班を中心に、表 1 に示した風疹関連の妊婦相談 2 次窓口を設け、各地区、ブロックでの相談事例の対応を行ってきた。本研究ではこうした状況のなかで本邦における風疹り患の恐れのある妊婦の 2 次相談窓口症例の検討を行うとともに、感受性者へのワクチン接種の状況を分析した。

さらに近年、目だってその取り扱いが問題とされてきた麻疹、水痘、流行性耳下腺炎も同じく再興感染症として成人期の男女間で感染伝播をおこし、妊娠女性がその中に含まれるに至っており、その実態に関しても調査することとした。

CRS の解決には本邦から風疹の流行を根絶する以外に方法はなく、そのために効果的なワクチン接種率の向上について検討することとした。また妊娠女性や一般集団における風疹抗体価や妊娠分娩転

婦を調査することにより、CRS リスクに関する適切な情報提供についても検討する。

研究方法

本研究では昨年引き続き、風疹撲滅に関するメーリングリストによる専門家間の情報交換を継続して行うとともに 2004 年に発信された「風疹流行および先天性風疹症候群の発生抑制に関する緊急提言」への対応措置に関する検討を行い、その後の取り組みの検証、とりわけ成人女性へのワクチン接種に関する分析をおこなった。また、2004 年 9 月以降、2008 年までに登録された「風疹り患の恐れのある妊娠女性」に対する二次相談施設での解析結果を検討した。

一方、麻疹、水痘、流行性耳下腺炎罹患妊婦の取り扱い症例の動向を全国の医育機関附属病院（多くは周産期母子医療センターを併設）において調査した。

研究結果と考察

CRS 消滅に向けて、成人に対する風疹ワクチンの推進が進められ、産褥期での風疹ワクチン接種の取り組みが行われているが、産褥女性のうち HI 抗体価が 16 倍以下のワクチン接種対象者は全体の 21% を占めており、そのうち説明と同意により 81.5% の産褥女性がワクチン接種を受けた。これらのうちワクチン接種後 4 週後に HI 抗体価の測定をおこなったところ、HI 抗体価が 4 倍以上上昇したケースは 83.3% に及び、相当の効果が得られたことが示された (表 2)。

2 次施設相談例においては、本年度 2008 年までを含めると 164 例の相談事例が寄せられた。内訳は接触なしの症例が圧倒

的に多く 91.5%を占めており、発疹のみられた症例は14例(8.5%)であった。また、これらの妊婦の風疹ワクチン接種歴をみると、明確にワクチン歴ありとされたものは39例23.8%で接種歴なしは57例30.5%、接種が明確でないと「ワクチン歴なし」のカテゴリーに入れるべき症例を加えるとほぼ76%に相当する症例が感受性者であったと推定された(表3)。また胎児診断例は存在したが、陽性例は認められなかった。いずれにしてもこれらの2次施設への相談例からは、CRSの発症例の報告はなく、いずれの症例も周囲に風疹の流行はみられず、特段問題とする症例ではなかったことが推察された。また、特に最近ではIgG親和性測定件数が増加していることが情報として寄せられた。

全国の医療機関80施設の産科診療部門(多くは周産期母子医療センター)に麻疹、水痘、流行性耳下腺炎罹患妊婦の取り扱い症例の動向の問い合わせを行いその結果65施設(81.3%)より回答が寄せられ、32.3%の21施設において感染妊婦の受け入れが行われていた(表4)。

2004年の風疹の小流行後、CRSの発症はいったん収まってはいるが、いまだ感受性者の著減は望めていないところから再びのCRS発生は想定範囲内にあり、予断を許す状況にはない。

今回の研究結果から、産科医師により産褥女性に対する地道なワクチン推奨が効果を上げることが示されたが、国民的推奨を行う必要があると思われた。

また、本年度も2次施設には妊婦の風疹り患に関する様々な相談が寄せられて

いたことから、これらの施設での専門的アドバイス、カウンセリングが無用な不安をあおることなく、したがって、不要な妊娠中絶を阻止したと考えられ、有用なシステムでありその継続が重要であることが証明された。

一方、成人患者の麻疹、風疹、その他の感染症の罹患が問題視されている。風疹ワクチンはMR混合接種、2回接種へと移行し、長期的には、その実施努力によって撲滅は可能と考えられるが、更に問題とクローズアップされたのは、近年の各地の大学での麻疹、水痘、流行性耳下腺炎による学内閉鎖であり、これらの状況はそのまま、周産期医療機関での妊娠女性の罹患へと直結した問題となる。事実、30%以上の施設でこれらの取り扱いがあり、そのたびに、周囲の通院・入院妊娠女性(同じく感受性者が多く含まれる)への2次感染予防の方策、外来受診時、入院時の感染隔離、分娩室での感染予防、母体管理、新生児の管理等々と極めて甚大なエネルギーと周囲への不安を惹起することとなる。この問題は新たな周産期医療における課題であり、急ぎ検討を要する事項と考えられた。いずれにしても、周産期管理における重大かつ深刻な問題を投げかけている。

風疹をふくめて、今後はこれら再興感染症の症例の蓄積と分析をおこなうことが肝要である。

業績

門脇 綾、齋藤圭介、野中愛子、大井由佳、

- 最上多恵, 長谷川哲哉, 野村可之, 小川幸, 奥田美加, 高橋恒男, 平原史樹: 分娩直前に水痘を発症した1例. 日本産科婦人科学会神奈川地方部会誌, **44**(2): 147-149, 2008.
- Ogawa M, Yanoma S, Nagashima Y, Okamoto N, Ishikawa H, Haruki A, Miyagi E, Takahashi T, Hirahara F, Miyagi Y: Paradoxical discrepancy between the serum level and placental intensity of PP5/TFPI-2 in preeclampsia and/or intrauterine growth restriction: possible interaction and correlation with glypican-3 hold the key. *Placenta*, **28**: 224-232, 2007.
- 平原史樹: 生殖医療の先天異常への影響. 臨床婦人科産科, **61**(9): 1123-1129, 2007.
- 平原史樹: 妊娠とくすり. 女性外来診療マニュアル. 症状・症候から診断・治療へーII. 産科編一. 産婦人科治療, **94**(Suppl.): 397-401, 2007.
- 平原史樹: 先天異常モニタリング: わが国と世界の取り組み. 日本産科婦人科学会雑誌, **59**(9): N-246-N250, 2007.
- 住吉好雄: 日本における妊婦、胎児の内分泌攪乱化学物質(ビスフェノールA)曝露状況. *Endocrine Disrupter NEWS LETTER*, **10**(2): 3, 2007.
- 奥田美加, 高橋恒男, 平原史樹: 母子感染とその対策 妊婦における風疹抗体価. 産婦人科治療, **95**(7): 55-60, 2007.

表1 「風疹り患の恐れのある妊娠女性」に対する2次相談施設
および対応担当医師

北海道	北海道大学附属病院産科 水上尚典
東北	東北公済病院産婦人科 上原茂樹 東北大学周産期母子センター 室月淳
関東	三井記念病院産婦人科 小島俊行 帝京平成短期大学 川名尚 横浜市立大学附属病院産婦人科 平原史樹 国立成育医療センター周産期診療部 久保隆彦
東海	産科婦人科種村ウィメンズクリニック 種村光代
北陸	石川県立中央病院産婦人科 干場勉
近畿	国立循環器センター周産期科 池田智明 大阪府立母子センター産科 末原則幸
中国	川崎医科大学附属病院産婦人科 下屋浩一郎
四国	国立香川小児病院産婦人科 森根幹生
九州	宮崎大学附属病院産婦人科 金子政時 九州大学附属病院産婦人科 諸隈誠一

表2 分娩例630例(横浜市大)

風疹HI	人数											
256~1024	117	<table border="1"> <tr> <td>入院中接種</td> <td>107</td> </tr> <tr> <td>1カ月後接種</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>希望せず</td> <td>17</td> </tr> <tr> <td>接種不適</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>接種漏れ</td> <td>2</td> </tr> </table>	入院中接種	107	1カ月後接種	3	希望せず	17	接種不適	6	接種漏れ	2
入院中接種	107											
1カ月後接種	3											
希望せず	17											
接種不適	6											
接種漏れ	2											
32~128	378											
16	46											
8	19											
<8	52											
抗体価不明	18											

135例(21.4%)
分娩後ワクチン対象者

接種率
110/135=81.5%