

接種群 41 例中 12 例(29.3%)であったのに対し、鳥居接種群では 13 例中 8 例(61.5%)と有意に高く( $P=0.03975$ )、耳下腺腫脹期間も星野株接種群  $4.17 \pm 2.26$  日に対し、鳥居株接種群  $5.69 \pm 2.56$  日と、鳥居株接種群の方が長期間であった( $P=0.04535$ )。

#### 5) 唾液中へのムンプスウイルス排泄期間の検討

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 4)。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 5)。

隔日腫脹群において、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

欧米諸国ではムンプスワクチンは定期接種であり、ムンプス流行はよくコントロールされているが、本邦ではムンプスワクチンは任意接種のため、接種率が 20~30%と低く、ムンプス流行が持続している。この 3 年間の研究で、臨床上のムンプス診断基準、一次性ワクチン不全(PVF)・二次性ワクチン不全(SVF)の診断基準に基づく SVF の発症頻度、ムンプス再感染例の存在について明らかにし、ムンプス IgM 抗体測定キットの問題点、ワクチン株によるムンプス再感染の臨床像の違い、ムンプス登校登園基準について検討した。

ムンプスの臨床像の診断基準として、感染症サーベイランス事業では、2 日以上持続する急性耳下腺腫脹と他の原因がないことが示されている。今回の検討では、ワクチン歴の有無にかかわらずこの診断基準に加え、地域での流行と白血球数  $8000/\text{cmm}$  未満を加えることで、より診断が確実になることが示された。

ウイルス感染症診断のゴールドスタンダードは、病変部位からのウイルス分離であり、血清

IgM 抗体・IgG 抗体の測定は診断の参考になる。今回の検討では、ムンプスワクチンフェーラーの 70%は SVF、PVF は 30%であること、臨床上月ムンプス初感染と思われても、血清抗体パターンからムンプス再感染と診断される症例があることを明らかにした。

ウイルス分離は医療保険制度に認められていない検査のため、臨床の現場ではムンプス診断に血清抗体測定がよく行われている。ムンプス IgM 抗体測定感度は、A 社は同等の頻度が少なくウイルス分離結果とよく一致したが、B 社は同等の頻度が高く、メーカーによる差が認められた。また、ワクチン歴がある急性耳下腺腫脹例の診断には、IgM 抗体測定だけでは限界があることも示された。

本邦において、ワクチン株によるムンプス VF 例のウイルス学的検討および臨床像の検討は行われていない。今回星野株接種群と鳥居株接種群と比較したところ、VF 例の唾液からのウイルス分離率は、星野株が有意に低く、また臨床像も星野株接種群の方が軽症であった。以上の結果から、唾液からウイルスが分離される症例は、より典型例に近い臨床像を示すと推察された。

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。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。

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6)。

#### E. 結論

臨床上のムンプス診断基準を提唱し、一次性ワクチン不全(PVF)・二次性ワクチン不全(SVF)の診断基準に基づくSVFの発症頻度は70%であり、ムンプス再感染例が存在することを明らかにした。また、メーカーによるムンプスIgM抗体陽性率に差があること、ワクチン株によるムンプス再感染の臨床像の違いについても明らかにした。ムンプス登校登園基準について検討した。最後に、ムンプスの病態から考えられる登校登園停止期間を提案した。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 庵原俊昭：母児感染各論—水痘帯状疱疹ウイルス、産婦人科の実際 2006; 55:413-421
- 2) 庵原俊昭：ムンプスワクチン、加藤達夫編：予防接種のすべて 2006、日本小児医事出版社 2006、99-103
- 3) 庵原俊昭：ムンプスウイルス、日本小児感染症学会編集、小児感染症マニュアル 2007、東京医学社 2006、99-103

4) 落合 仁、庵原俊昭、他：小学校流行時におけるムンプスワクチン有効性の検討、小児科臨床 2007; 60:489-494

5) 落合 仁、庵原俊昭、他：ワクチン歴によるムンプス発症時のIgM抗体・IgG抗体の比較検討、小児科臨床 2007; 60:501-506

6) 庵原俊昭：ムンプス感染対策：診断・登校登園停止期間・ムンプスワクチン、小児科臨床 2007; 60:2215-2221

7) 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

8) 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  
2. 学会発表

1) 庵原俊昭、他：ワクチン接種歴によるムンプス発症時のIgM抗体・IgG抗体の比較検討、第47回日本臨床ウイルス学会 2006.6.3-4

2) 庵原俊昭、他：ワクチン後の自然ムンプス罹患例における株ごとのウイルス学のおよび臨床的特徴、第54回日本ウイルス学会 2006.11.19-21

3) 渡辺正博、庵原俊昭、他：ムンプスの臨床診断に有用な因子についての検討、第48回日本臨床ウイルス学会 2007.6.2-3

4) 庵原俊昭、他：測定キットによるムンプス発症時のムンプスIgM抗体検出率の検討、第55回日本ウイルス学会 2007.10.21-23

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特記することなし。

(表1) ムンプス診断に対する因子分析

因子	OR	95%CI	P value
ワクチン歴なし			
流行あり	12.494	4.823~32.371	<0.0001
WBC<8000/cmm	8.819	3.637~21.381	<0.0001
ワクチン歴あり			
流行あり	3.859	1.574~9.465	0.003
WBC<8000/cmm	3.837	1.566~9.402	0.003

(ロジステック回帰分析)

OR: オッズ比、CI 信頼区間

(表2) 測定キットによる急性期ムンプス血清IgM抗体の検出

ワクチン歴	ウイルス 分離	例数	A社IgM抗体			B社IgM抗体		
			陽性	同等	陰性	陽性	同等	陰性
なし	陽性	47	45	2	0	34	11	2
	陰性	33	5	1	27	1	4	28
あり	陽性	17	8	1	8	6	5	6
	陰性	22	3	3	16	1	4	17

ワクチン歴なし群；A社の一致率90.0%、同等率3.8%、B社の一致率77.5%、同等率18.8%

ワクチン歴あり群；A社の一致率61.5%、同等率10.3%、B社の一致率59.0%、同等率23.1%

(表3) 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4) 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5) 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) 時期を置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を基準とする

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
（分担研究年度終了報告書）

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）  
村木優子（阪大微研観音時）

**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。併せてヒト神経芽腫由来細胞 SH-SY5Y でのムンプスウイルスの増殖性を指標にした培養細胞レベル評価系の有用性についても検討した。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 cDNA からウイルスを回収することに成功した。しかし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。また SH-SY5Y 細胞を用いた評価系では高病原性の占部 M3 株と低病原性の占部 M5 株において、SH-SY5Y 細胞での増殖性に有意な差は認められず、ムンプスウイルス病原性の評価系としては信頼性に欠けることが明らかになった。

**A. 研究目的**

日本以外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はほぼ制圧されている。一方、日本国内においては MMR 統一株に含まれていた占部株による無菌性髄膜炎の事故以来、おたふくかぜワクチンの普及は進まず、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。また、Reyes-Leyva らは、病原性の異なるムンプスウイルス占部株 variant のヒト神経芽腫由来細胞 SH-SY5Y の増殖性が、ヒトでの神経病原性の程度と相関する (*Microbes Infect.* 8:332-339, 2006) ことを発表している。そこで、より簡便なムンプスウイルスの病原性評価法として SH-SY5Y

細胞を用いたウイルスの増殖性に基づく病原性評価法についても検討した。

## B. 研究方法

### (1) SH-SY5Y 細胞による ムンプスウイルス病原性の評価

ATCC よりヒト神経芽腫由来細胞株 SH-SY5Y 細胞(CRL-2266)を購入し、MEM 培地に 10%牛胎児血清、1%アミノ酸強化液を加えて培養を行った。ムンプスウイルスとして MMR 統一株に用いられたワクチン株である占部 M3 株とそこから派生したより弱毒型の占部 M5 株を用いた。SH-SY5Y 細胞を 6 well plate に播種し、細胞密度が 70% ( $1 \times 10^6$  cells/well) になったときに、1 well あたり  $1 \times 10^4$  pfu のムンプスウイルスを感染させた (0.01 pfu/cell)。1 時間の吸着の後、ウイルス液を除き、SFM(インビトロジェン)培地で 2 回洗った後に、1 ml の SFM 培地を加え 6 日間培養した。細胞とウイルスを 0、1、2、3、4、6 日後に回収し、遠心した上清液を用いてウイルス力価測定とウイルスゲノムの RT-PCR 検出及び copy 数測定に用いた。

### (2) 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, SmaI 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 2)。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 3)。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、ブランクサイズ (図 4)、温度感受性 (以下 ts) (図 5)、および新生ラットにおける中枢神経病原性を調べ (図 6)、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 7)。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。

### (3) 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。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、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。撮像モードは 2D マルチスライスモードの他に、組織の硬さの違いを強調するために T2 強調モードでの撮像も試みた。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。動物は接種後 10 日目に安楽殺させ、病理解剖に供した。各組織および検体内のウイルス量はリアルタイム PCR によって測定した。検出用プローブとしてロシュのユニバーサルプローブライブラリー (UPL) を用いた。同一検体についてムンプスウイルス RNA (NP 遺伝子領域) とハウスキーピング遺伝子の 1 つである GAPDH 遺伝子の mRNA コピー数を測定し、個々の検体の反応系に導入した cDNA 量の違いを GAPDH mRNA のコピー数によって平準化した (ウイルス RNA のコピー数を GAPDH の  $10^7$  コピー当たりの値として算出)。

(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) ヒト神経芽腫細胞でのムンプスウイルス増殖性

培養上清中のウイルスゲノムの copy 数をそれぞれリアルタイム PCR によって測定した (図 1)。感染後 2~3 日目は占部 M3 株の増殖性が占部 M5 株よりもやや早くピークに達するが、遅れて 4 日目には占部 M5 株も同レベルにまで到達し、両株の増殖性に明確な差は認めなかった (図 1)。

### (2) 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

Y213 株由来 cDNA (pMuV213) とキメラ cDNA (pMuVBS5) を導入した細胞からウイルスが回収された (それぞれ rY213 と rBS5) (図 2)。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、ブランクサイズは原株の Y213 株あるいは弱毒型の Y125 株よりもさらに小さく (図 4)、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 5)。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 6)。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 rY213 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 7)。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希で、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 7)。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 7)。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。

### (3) マーモセット脳内接種試験

MRI の結果では野外株接種個体、ワクチン接種個体の一部に脳室の拡張が認められ、接種後 9 日目に最も大きくなる傾向が認められた (図 8)。しかし、生理食塩水接種個体においても拡張が認められるなど、株の病原性との関連は認められなかった。組織の水分子の自由度の差を強調するための T2 強調モードでの撮像においても特段の明確な組織上の変化をとらえることは出来なかった。

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 9)。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差は認められなかった (図 9)。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 10、表 2)。また、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く、リンパ節の胚中心にウイルス抗原の局在が確認された (図 11)。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 9)、大館株のリンパ系組織親和性を裏付ける結果であった。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 10)、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 10、表 2)。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。

## D. 考察

Brown ら(カナダ、オタワ大)はカナダで使われた SKB 社製の占部株ワクチンのヒトでの副反応解析結果から HN 遺伝子の配列の違いにより、神経病原性の比較的高い 1081 番目の塩基が A (HN-A<sub>1081</sub>) のものと、低い G (HN-G<sub>1081</sub>) のものがあることを示している (*J. Infect Dis.* 174:619-622, 1996, *Virology* 287:234-241, 2001)。昨年、Reyes-Leyva らは、ヒト神経芽腫細胞 SH-SY5Y で占部 HN-A<sub>1081</sub> 株は、占部 HN-G<sub>1081</sub> 株よりも蛋白質発現、ウイルス複製、ウイルス産生において勝っており、神経病原性を培養細胞で評価できる可能性を示唆した論文を発表した (*Microbes Infect.* 8:332-339, 2006)。そこで、MMR の臨床反応からヒトにおける中枢神経病原性が異なると予想される阪大微研の占部 M3 株と占部 M5 株の神経病原性がこの SH-SY5Y 細胞を用いて評価可能かどうかを検証した (図 1)。占部 M3 は MMR 統一株に用いられたと考えられ、新生ラットにおける病原性も高い。一方の占部 M5 は MMR 自社株に用いられたと予想されるロットで、新生ラットでの病原性は低い。しかし、これらの株の SH-SY5Y 細胞でのウイルス増殖性とヒトでの無菌性髄膜炎の頻度並びに、新生ラットの水頭症発生頻度との間には、なんら相関関係を見いだす事はできなかった。診断の簡便性、基礎実験への応用などの観点から魅力的な診断方法ではあるもののヒト細胞株での更なる検討も必要と考えるが、少なくとも SH-SY5Y 細胞では神経病原性の評価はできないと結論された。

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 rY213 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。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全く同一の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7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。従って、コンセンサスシーケンスに基づく cDNA からリバーシ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高い。今後は、この仮説を裏付けるために rY213 株の遺伝学的多様性を人為的に高くした場合に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、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。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原株の性状をより忠実に反映できる可能性は有るが、実用化されているワクチンについてその性状をリバーシジェネティクスによって解析するには、その継代歴がオリジナルのウイルスから少なくとも数代継代されていることから限界があるかもしれない。

マーモセットの脳内接種実験では接種後の脳室拡張を MRI 撮像によって経時的、被侵襲的に観察した。しかし、脳室拡張の程度には株による明確な傾向は認められず、生理食塩水接種個体においても拡張が認められたことから、必ずしも病原性との関連性は強くないと考えられた。MRI による撮像には動物の麻酔条件、補綴方法などを含め数多くの撮像上のパラメータが影響するため、我々が望むような画像情報を得るためにはさらなる詳細な条件検討が必要であることが判明した。同時に従来の病理学的な診断と MRI 画像との関連づけを行っていくことも重要である。

我々は MRI に加えて、接種後 10 日後におけるウイルス量と病理的变化の関連性についても解析した。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、意外なことに中枢神経組織内のウイルス量は必ずしも病理学的変化と相関しなかった。その理由の一つとして、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、Jery 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より炎症の程度が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のモデル系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よりもヒトでの現象をより忠実に再現できることが示めされ、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. ヒト神経芽腫細胞 SH-SY5Y 細胞ではムンプスウイルスの神経病原性の評価はできない。
2. リバーシジェネティクス法によって cDNA からウイルスを回収できた。
3. 組換えウイルス rY213 の性状は原株 Y213 とは異なり、高い弱毒性を示した。

4. 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。
5. 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、リバース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。
6. マーモセットの脳内接種実験で MRI 撮像による脳内の病理変化をとらえることはできなかった。
7. マーモセットの中枢神経組織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。
8. 強毒株ではリンパ組織への親和性が認められた。
9. 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。
10. 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

(欧文)

1. Saika S, Kidokoro M, Kubonoya H, Ito K, Ohkawa T, Aoki A, Nagata N, Suzuki K. Development and biological properties of a new live attenuated mumps vaccine. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2006 Mar-May;29(2-3):89-99.
2. Nakatsu Y, Takeda M, Kidokoro M, Kohara M, Yanagi Y. Rescue system for measles virus from cloned cDNA driven by vaccinia virus Lister vaccine strain. *J Virol Methods.* 2006 Oct;137(1):152-155.
3. Kitabatake M, Inoue S, Yasui F, Yokochi S, Arai M, Morita K, Shida H, Kidokoro M, Murai F, Le MQ, Mizuno K, Matsushima K, Kohara M. 2007 SARS-CoV spike protein-expressing recombinant vaccinia virus efficiently induces neutralizing antibodies in rabbits pre-immunized with vaccinia virus. *Vaccine.* 25(4):630-637
4. Kitabatake M, Inoue S, Yasui F, Yokochi S, Arai M, Morita K, Shida H, Kidokoro M, Murai F, Le MQ, Mizuno K, Matsushima K, Kohara M., SARS-CoV spike protein-expressing recombinant vaccinia virus efficiently induces neutralizing antibodies in rabbits pre-immunized with vaccinia virus., *Vaccine.* 2007; 25: 630-637.

5. Kato A, Kiyotani K, Kubota T, Yoshida T, Tashiro M, Nagai Y. Importance of the anti-interferon capacity of Sendai virus C protein for pathogenicity in mice. *J Virol.* 2007; 81:3264-3271.
6. 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
7. 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

(和文)

1. 加藤篤, おたふくかぜワクチン, 臨床とウイルス 34(4):261-270 (2006)
2. 加藤篤, 木所 稔 第十五改正日本薬局方解説書 乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン 廣川書店 G:44-46 2006年
3. 加藤篤 シンプル微生物学 改訂第4版 パラミクソウイルス 東匡伸, 小飛恵二 編集 pp269-272 南江堂 2006年5月1日発行
4. 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. 学会発表

1. 齊加志津子, 一戸貞人: ムンプスウイルスのラット脳内接種におけるサイトカイン発現, 第48回日本臨床ウイルス学会, 富山, 2007年6月
2. 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
3. 木所 稔, 齋加志津子, 田代眞人, 加藤 篤: リバース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
4. 木所 稔, 網 康至, 須崎百合子, 永田典代, 長谷川秀樹, 久保田耐, 田代眞人, 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  
発明の名称: 流行性耳下腺炎ワクチン  
出願番号: 特願 2006-097980
2. 実用新案登録  
無し
3. その他  
無し



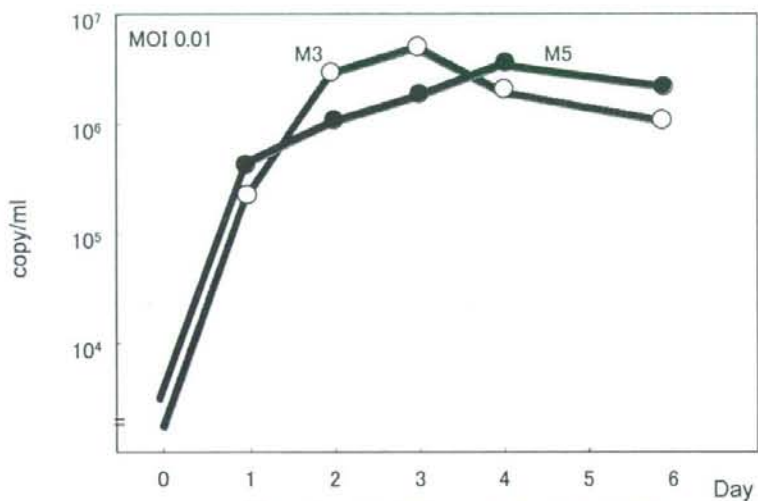
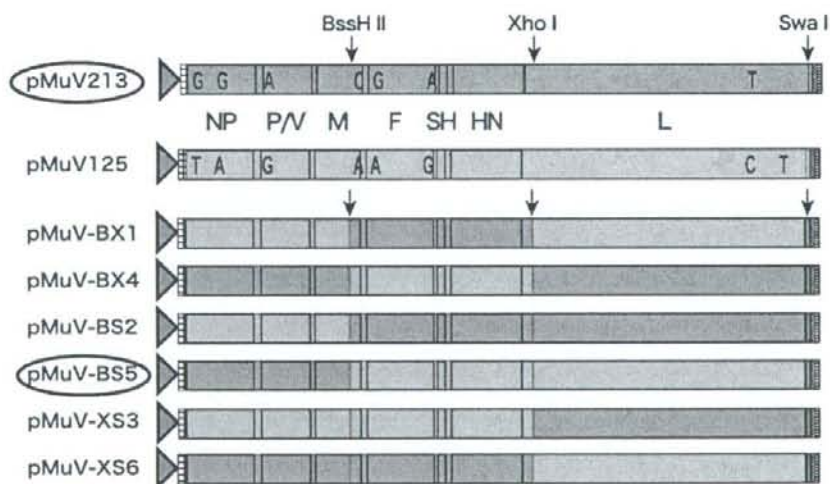


図1. SH-5YSY細胞でのUrabe株の増殖性



○..... cDNA からウイルスが回収されたコンストラクト

図2 キメラ cDNA の作製

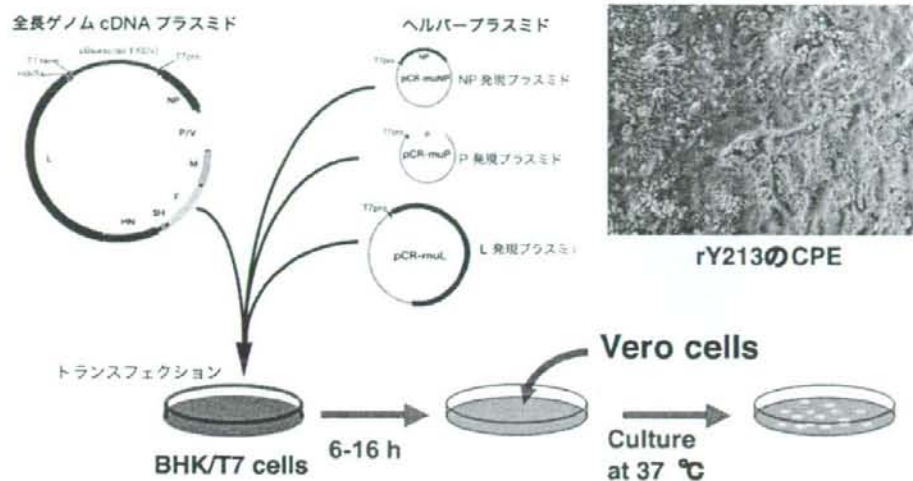


図3 cDNA からのムンプスウイルスの回収

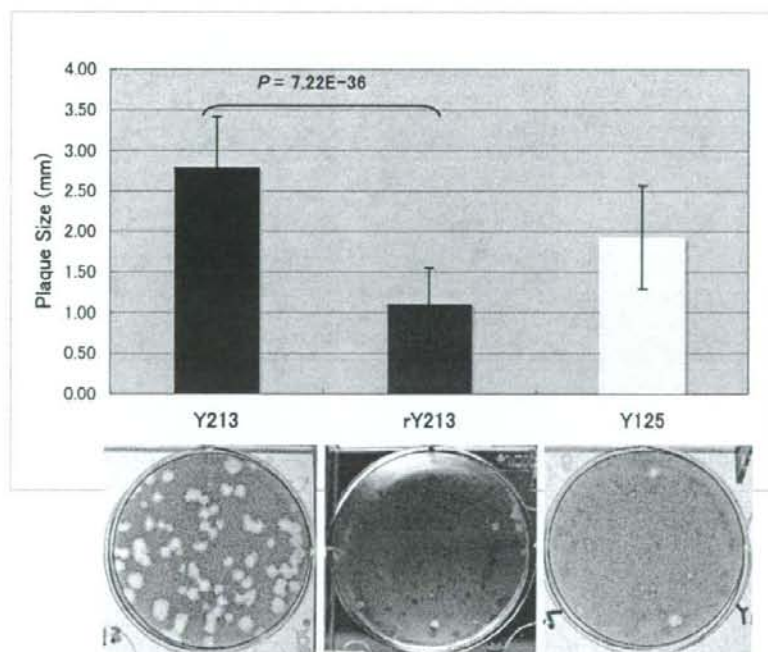


図4 rY213 の生物学的性状 (plaque size)

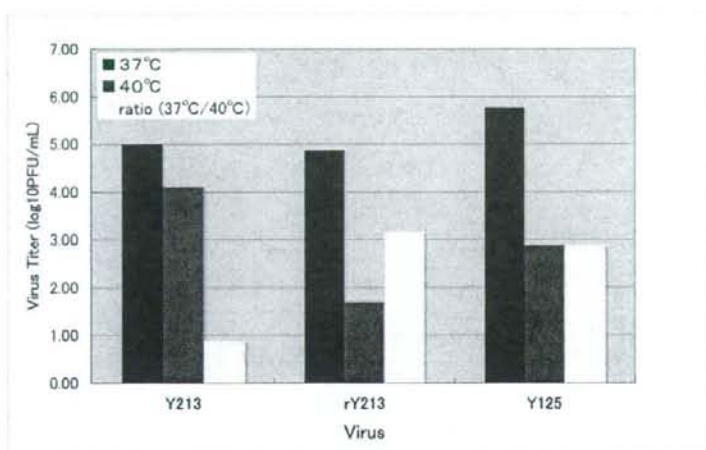


図5 rY213の生物学的性状(温度感受性)

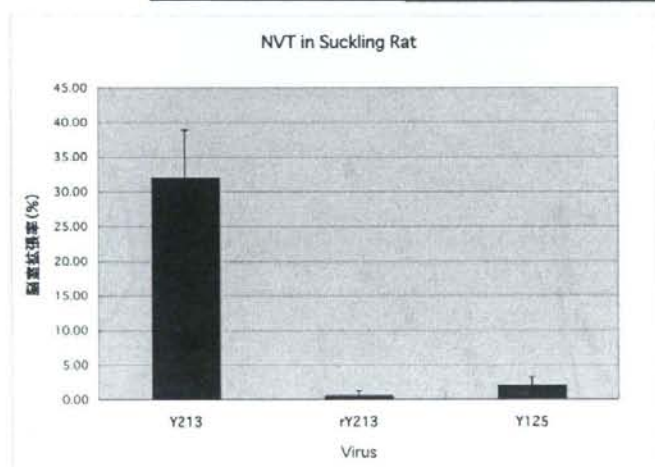
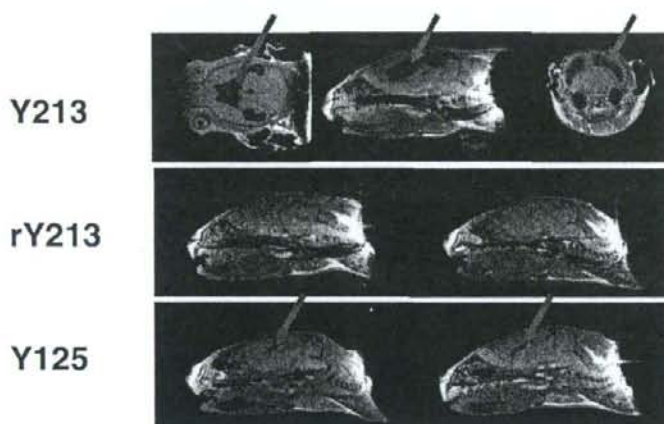


図6 rY213の生物学的性状(新生ラットにおける中枢神経病原性)

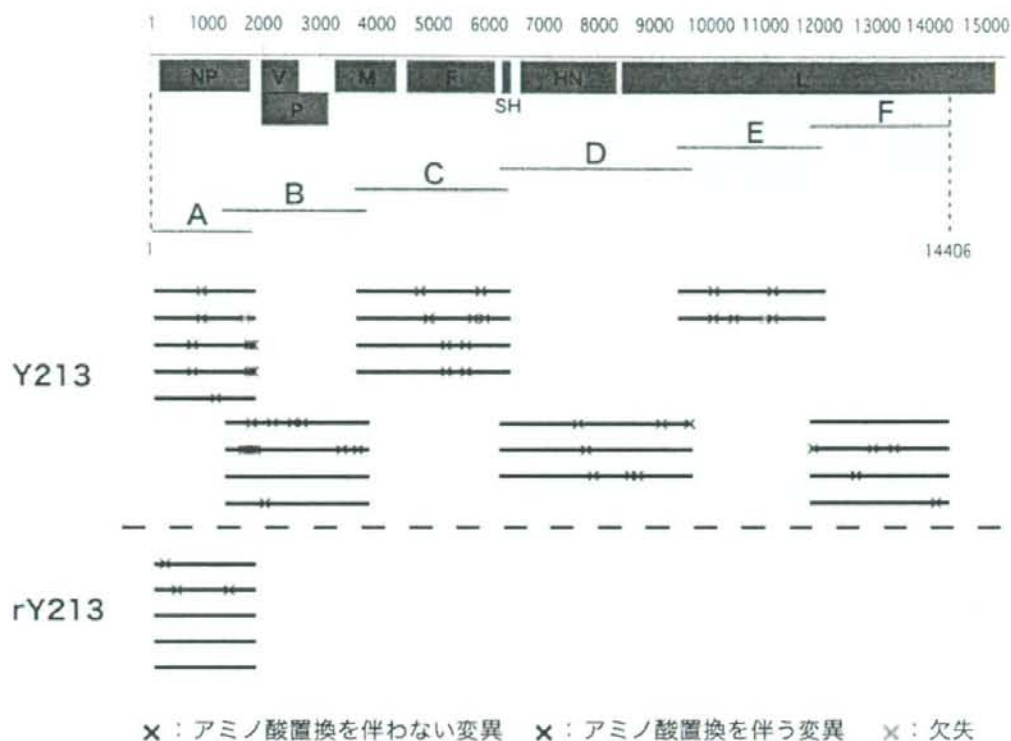


図7 Y213 株および rY213 株の遺伝的多様性

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%

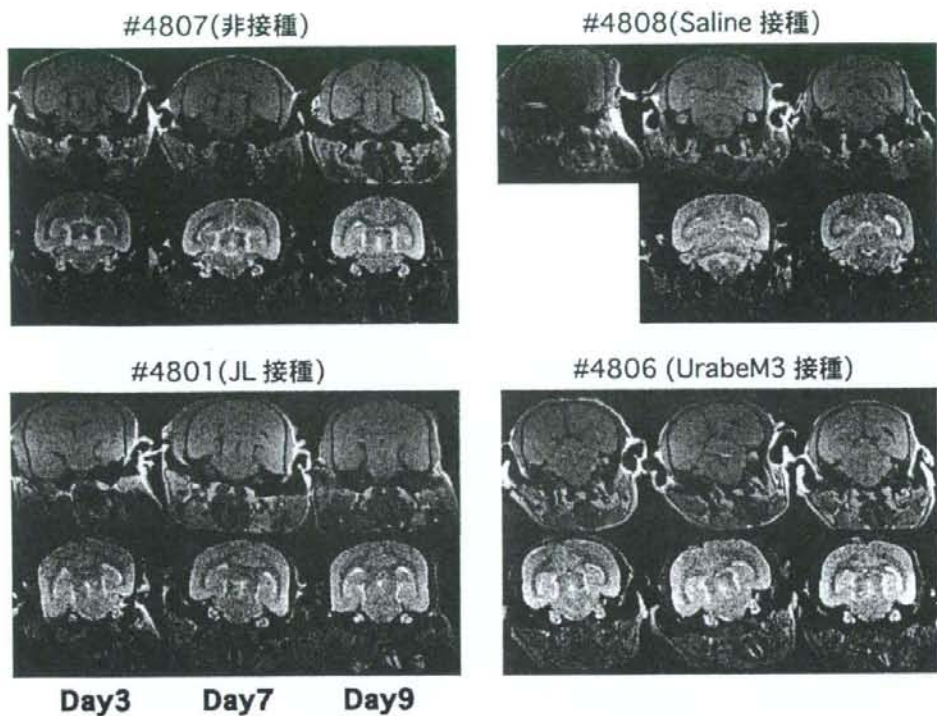


図8 ムンプスウイルス脳内接種マーモセットのMRI撮像 (下段はT2強調画像)

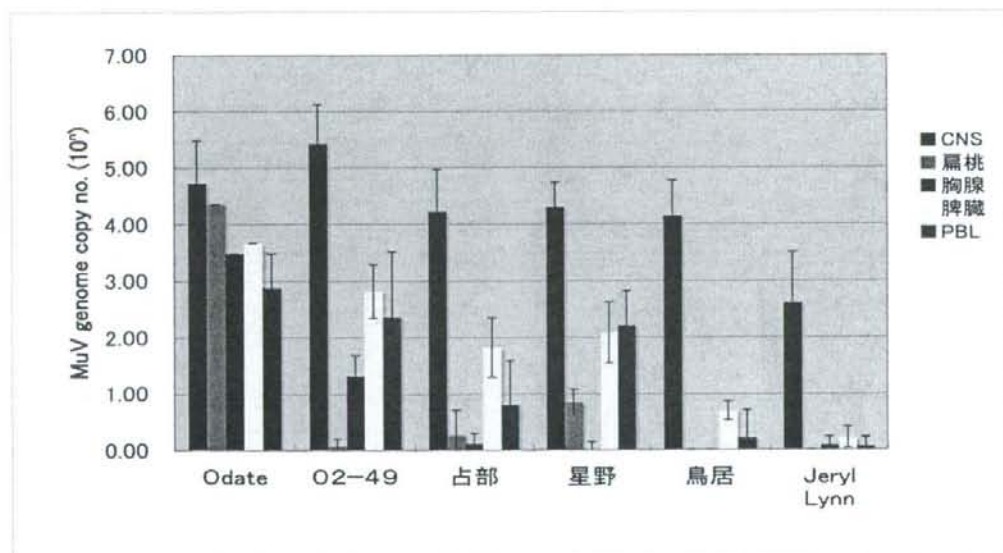


図9 ウイルスゲノムの局在

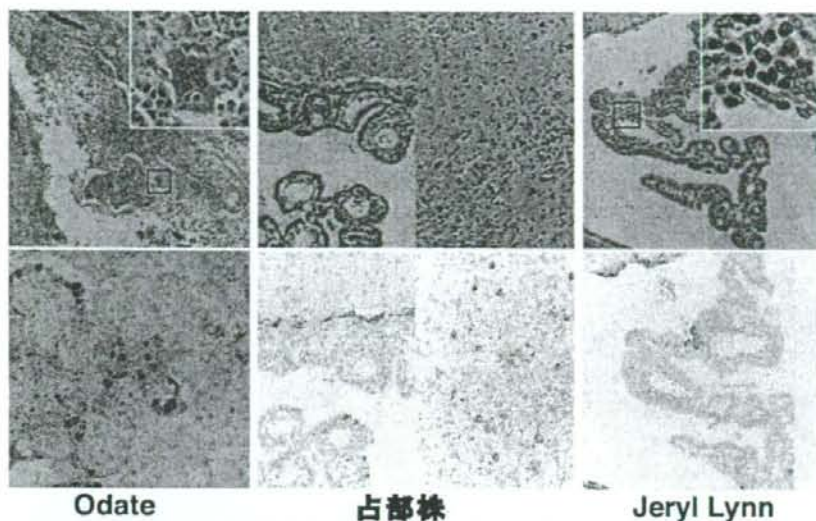


図 10 脳内の病理変化とウイルス抗原の局在

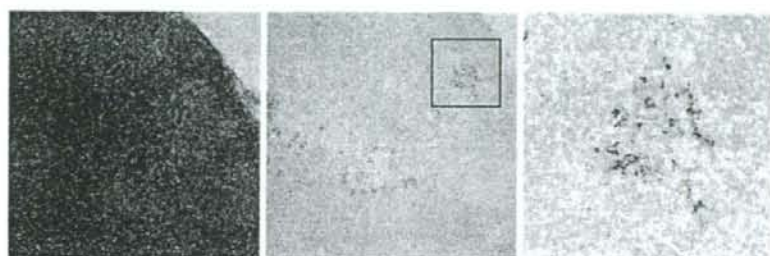


図 11 大館株の lymphotropism (リンパ節)

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
ヒトでの髄膜炎 発症率	>70%	5-10%	0.25%	0.04%	0.05%	0.001%
ウイルス コピー数 ( $10^6$ )	4.73	5.43	4.22	4.30	4.15	2.60
抗原陽性細胞	+++	++	++	++	+	+
炎症反応	++++	+++	++ ~ +++	++	+	+

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
加藤 篤, 木所 稔	乾燥弱毒生おたふ くかぜワクチン	杉山雄一	第十五改正日 本薬局方解説 書	廣川書店	東京	2006	G:44-46
加藤 篤	パラミクソウイル ス	東国伸、 小熊恵二	シンプル微生 物学 改訂第 4版	南江堂	東京	2006	269-272

## 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
加藤篤	おたふくかぜワクチン	臨床とウイルス	34	261-270	2006
Saika S, Kidokoro M, Kubonoya H, Ito K, Ohkawa T, Aoki A, Nagata N, Suzuki K.	Development and biological properties of a new live attenuated mumps vaccine.	Comp Immunol Microbiol Infect Dis.	29	89-99	2006
Nakatsu Y, Takeda M, Kidokoro M, Kohara M, Yanagi Y.	Rescue system for measles virus from cloned cDNA driven by vaccinia virus Lister vaccine strain.	J Virol Methods.	137	152-155	2006
Kitabatake M, Inoue S, Yasui F, Yokochi S, Arai M, Morita K, Shida H, Kidokoro M, Murai F, Le MQ, Mizuno K, Matsushima K, Kohara M.	2007 SARS-CoV spike protein-expressing recombinant vaccinia virus efficiently induces neutralizing antibodies in rabbits pre-immunized with vaccinia virus.	Vaccine.	25	630-637	2007
Kitabatake M, Inoue S, Yasui F, Yokochi S, Arai M, Morita K, Shida H, Kidokoro M, Murai F, Le MQ, Mizuno K, Matsushima K, Kohara M.	, SARS-CoV spike protein-expressing recombinant vaccinia virus efficiently induces neutralizing antibodies in rabbits pre-immunized with vaccinia virus.	Vaccine	25	630-637	2007
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	36	39-49	2008
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.	181	6337-6348	2008
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	27	966-971	2009

平成 18-20 年度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  
(岡部班) 分担研究報告書

『分担研究課題 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: 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. 平成 18-20 年度にかけては幸いに明らかな CRS の群発事例は見られなかった. また, 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設けられた「風疹り患の恐れのある妊娠女性」に対する 2 次相談施設においては, 平成 18-20 年度の間に 164 例の罹患の疑いのある妊娠女性をカウンセリング対応し, これらの中から明らかな先天性風疹症候群の事例は認められず, また無用な妊娠中絶が阻止されるなど, 一定の健康施策への効果がみられた. しかしながら, 妊娠世代の成人女性のうち HI 抗体価が 16 倍以下のワクチン接種対象者は依然全体の約 20% を占め, 周産期領域における風疹感染は大きな問題として残されており, 産褥女性へのワクチン接種による一定の効果があることも結果として得られるに至った. さらには, 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, 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, 2 次相談施設, その他の再興感染症



## 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ま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 名に対しその後は明らかな CRS の群発例はみられなかった。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ことも従来より指摘されてきた。本研究班を中心に、表 1 に示した風疹関連の妊婦対応 2 次相談窓口を設け、図 1、に従った管理方針のもとに各地区、ブロックでの相談事例への対応を行ってきた (図 2)。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 次相談窓口症例対応の検討を行うとともに、感受性者へのワクチン接種推進の状況を分析した。

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した。

## 研究方法

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対応 164 例の解析検討を行った。

また管理指針の出された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、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

本研究班では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ったところ、2 次施設相談例においては、2008 年までを含めると 164 例の相談事例が寄せられた (表 2, 3)。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。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。一方、不安を最終的に解決できず妊娠中絶に至った症例は 2 例にみられた。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が、とりわけ IgM 抗体の持続陽性例が 2 次相談施設に寄せられる傾向が目立った。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新たな傾向として判明した。

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依然全体の約 20% を占めており、施設によっては適応症例の 81.5% の産褥女性がワクチン接種を受け、うち 83.3% の症例で HI 抗体価も 4 倍以上上昇するなど相当の効果が得られたことが報告されるなど、有効な取組の事例も観察された (表 4)。しかしながら、全国的には風疹の母児感染例の恐れは依然存在したままとなっている。

一方、全国の医育機関 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おり、高次医療機関が再興感染症妊婦の受け入れで、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を払っていることが判明した (表 5)。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、いずれも、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。

いずれにしても、2004 年の風疹の小流行後、CRS の発症はいったん収まっているが、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。

風疹をふくめて、今後は多様な再興感染症の症例の蓄積と分析をおこないその対策を検討することが肝要である。

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 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