

性器ヘルペス

川名 尚

Genital herpes

Takashi Kawana

Department of Obstetrics and Gynecology,
Teikyo University Faculty of Medicine, Mizonokuchi Hospital

Abstract

Genital herpes (GH) is the second leading cause of sexual transmitted disease in women and the third in men. About 40 % of female genital herpes is caused by herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and the remaining by type-2 (HSV-2). Fifty four percent of primary female GH was caused by type-1, whereas 86 % of recurrent cases by type-2. For rapid diagnosis of GH, LAMP (loop-mediated isothermal amplification), HSV DNA nuclear amplification method developed in Japan, was applied and favorable results were obtained. We compared three gG based type specific antibody kits (Platteria, HerpeSelect and Captia). Among these, Platteria was shown to be most sensitive and specific.

Key words: genital herpes, herpes simplex virus type 1 and 2, LAMP, type specific antibody kit

はじめに

性器ヘルペスは単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus: HSV) 1型 (HSV-1) または2型 (HSV-2) の感染によって発症する代表的なウイルス性性感染症である。性感染症の中で女性では性器クラミジア感染症に次いで第2位に、男性では淋菌感染症に次いで第3位に位置する重要な疾患である。

HSVは、感染後知覚神経節に潜伏感染し時々再活性化して再び皮膚粘膜に出現し、これが感染源となって感染が広まっていく。潜伏感染しているHSVを排除できる薬剤はなく、しかも恐らく潜伏感染は一生続くとみられている。

このような独特な感染病理のため、性器ヘルペスはしばしば再発することが特徴的であり、繰り返す再発によって心身の大きなストレスになることが多い。現在いかに再発を制御するかが性器ヘルペスにおける最大の課題であり、このために開発された継続的に抗HSV薬を服用する再発抑制療法は、頻繁に再発を繰り返す性器ヘルペス患者には福音となった。

1. 性器ヘルペスの疫学

性器クラミジア感染症や淋菌感染症のような抗生物質が有効な性感染症が2002年をピークに減少傾向に転じたのに対し、性器ヘルペスは若い女性を中心に増加の傾向にある(図1)。男



図1 年齢別にみた性器ヘルペスウイルス感染症報告数の年次推移
(厚生労働省, 感染症発生動向調査)

性より女性の方が約2倍多い。この増加傾向には次のような要因が関係している。まず前述のとおり、HSVはヒトに感染すると比較的速やかに知覚神経を上行し知覚神経節に潜伏感染する。潜伏感染しているHSVは、しばしば再活性化されて知覚神経を下行して皮膚・粘膜に現れ、ここで増殖して主に水疱性・潰瘍性病変を形成する。皮膚・粘膜に出現しても必ずしも発症することはなく、無症候でHSVを排泄することも多い。潜伏感染しているHSVは、宿主の免疫によって排除されることはないので一生続くことになる。こうして生涯にわたり感染源となる。この点が他の性感染症と大きく異なる点である。

次の要因は、一般人口におけるHSVに対する抗体保有率がこの30年間で激減していることである。20歳代の抗体保有率は1970年代では80%強であったが、この10年間では50%を下回っている。HSVは接触感染が主な感染様式であるが、成人してからヒトとヒトが濃厚に接触するのは性的接触による場合が多いので、抗体(免疫)のない成人がHSVに感染しているヒトと性的接触すれば感染することになる。抗体のない成人が増えているので、性的活動が活発になれば性器のHSV感染例も増えることになる。

最も重要な点は、HSV感染を完治させる方法がなく、しかし再発を繰り返すのであるから性器ヘルペスの症例は減ることはなく常に蓄積されることである。

我が国における性器ヘルペスは年間7万例程度と推計されているが、無症候のものを入れると20万例以上になると著者は考えている。

なお、厚生労働省の感染症発生動向調査によると、性器ヘルペスは2006年以降次第に減少傾向にあるが、これは2006年より性器ヘルペスについては初発のみを登録し再発は登録しないことになったためであり、決して性器ヘルペスが減少しているのではない。

2. 臨床症状

臨床的には性器ヘルペスは初めて発症する初発と繰り返し発症する再発に分類されている。

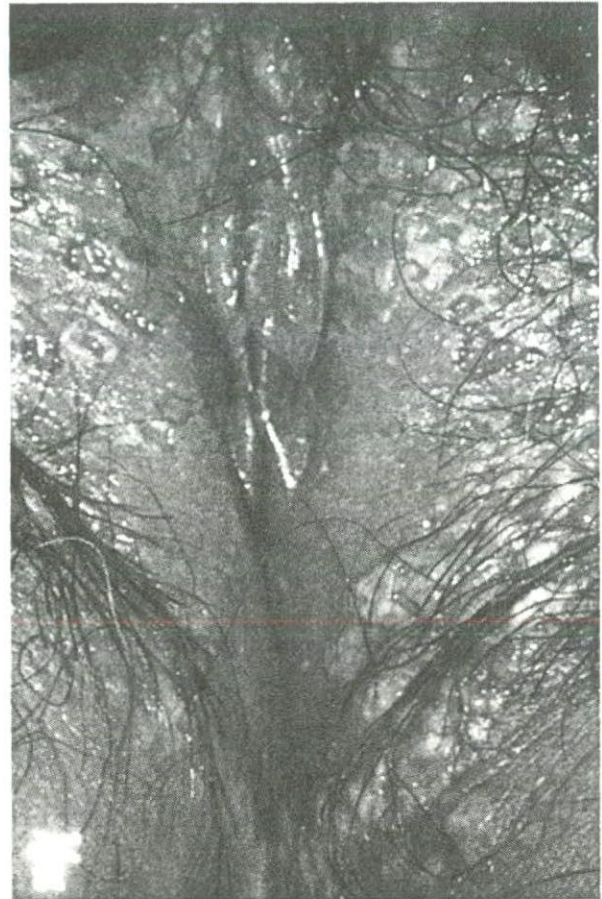


図2 HSV-1による初感染例

初発は、更に初感染初発と非初感染初発に分けられる。前者は初めての感染によって、後者は既に無症候で感染していたHSVの再活性化によって初めて発症する場合をいう。

a. 初 発

1) 初感染初発

感染の機会があってから平均3-5日(2-21日)の潜伏期の後に発症することが多い。女性では比較的突然に外陰部に浅い潰瘍や水疱が出現する。病変の数は数個から無数のものまでである(図2)。両側のソケイ部のリンパ節の腫脹圧痛はほぼ必発である。約6-7割に発熱、全身倦怠感などの全身症状を伴う。男性では龟头や陰茎にかけてかゆみや違和感を伴った直径1-2mmの複数の水疱が出現し、第3-5病日から水疱が破れて融合し、円形の有痛性の浅い潰瘍となり1週間前後に最も重症化する。その間ソケイ部のリンパ節の腫脹や尿道分泌物もみられる。

オーラルセックスが一般的に行われるようになったため口腔咽頭の感染もみられる一方で、口唇ヘルペスが感染源となることもしばしばみられている。髄膜刺激症状のため頭痛や項部硬直、時に羞明感を訴える。また、Elsberg症候群として知られている仙骨神経根神経障害を併発し、排尿排便困難となり、時に尿閉に至ることもある。髄膜刺激症状やElsberg症候群は明らかに1型感染例より2型感染例に多く、性器における2型の向神経性がうかがわれる。初感染初発では発症時にHSV抗体が陰性で2-3週後に陽転する。無治療でも約2-3週間で自然治癒するが、抗HSV薬を投与すると約1週間でかなり軽快する。

2) 非初感染初発

発症は初めてであるが、無症候のうちに既に知覚神経節に感染していたHSVが再活性化され発症したものである。したがって、発症時に既にHSV抗体(IgG抗体)が陽性である。症状は前述の初感染と同様であるが、病変の数はより少なくソケイリンパ節の腫脹の頻度も少ない。発熱などの全身所見はみられず治癒までの期間も短く、全体としてより軽症であることが多い。

著者の経験した初発例のうちHSV-1による場合は約20%が、HSV-2による場合は約40%が非初感染初発であった。

b. 再 発

以前に発症したことがある例が再び発症した場合を再発としている。知覚神経節に潜伏感染しているHSVの再活性化によって発症する。大体同じ部位に再発することが多いが、時に別の部位や臀部に発症することもある。病変は小さい水疱や潰瘍性病変が1-数個出現する(図3)。発熱することなくソケイリンパ節が腫脹することは少ない。多くは1週間以内に自然治癒する。男性でも再発時には初感染とほぼ同じ部位にまたは臀部や大腿部に水疱性あるいは浅い潰瘍性病変を形成するが、症状は軽く1週間程度で治る。再発する前に大腿後面に神経痛様の疼痛があったり、再発する局所に違和感を感じるなどの前兆が約30-50%の患者にみられる。再発の頻度はHSV-2感染例の方がHSV-

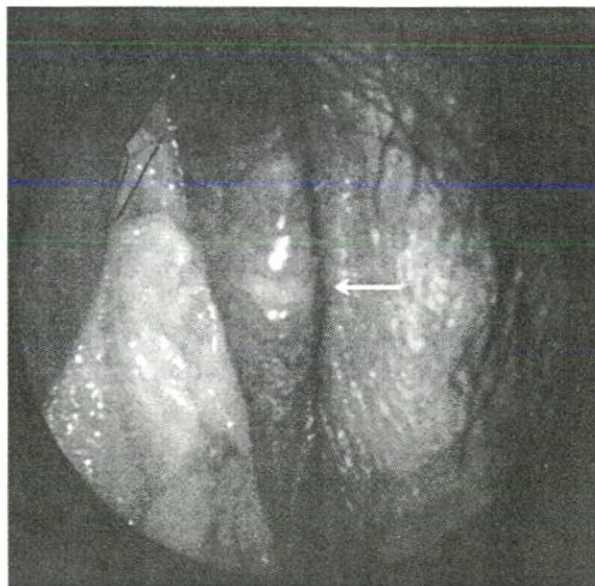


図3 HSV-2による再発性器ヘルペス

1感染例よりもはるかに多い。再発回数は時とともに次第に減少する例のある一方で、あまり変わらないものや逆に増えるものなどがあることが知られている。再発の契機となるのは、心身の疲労、風邪などの発熱、女性では月経などが多く、これらのことが全身や局所の免疫能の低下をもたらすからではないかと考えている。

再発を繰り返す患者にとっては、肉体的ばかりでなく精神的にも大きなストレスとなりQOL(quality of life)を著しく損ねることになる¹⁾。このような観点から、抗HSV薬を継続的に服用し再発を抑制する‘再発抑制療法’が開発され、本療法は我が国でも保険で可能になった。

c. 多彩な臨床症状

HSVの独特な感染病理によって性器ヘルペスの臨床症状は多彩となる。むしろ典型的な症例は少ないといわれている。その諸相を表1に示した。

外陰に病変がある場合の典型的な例は前述した。非典型的な例としてはうっかりすると見逃しやすいピンホールの極く小さい病変、片側性に発症するもの、潰瘍の形が円形でなく線状のもの、浅い潰瘍でなく深いものなどがある。診断に困るのは外陰に病変のない場合である。しばしば肛門に潰瘍性病変が、臀部に水疱性病変がみられることがある。女性では外陰に病

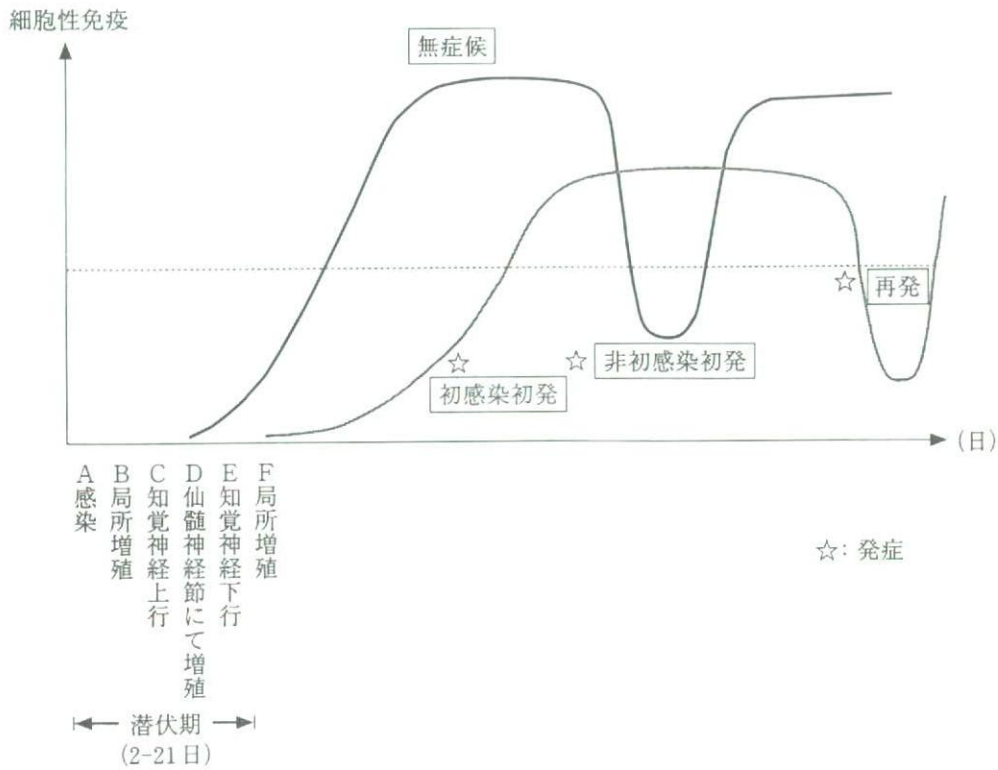


図4 経時的にみた性器ヘルペスの感染病理

表1 性器の単純ヘルペスウイルス感染のスペクトラム

1. 外陰の病変のあるもの	
1) 典型例	浅い潰瘍, 円形, 多発・対称性
2) 非典型例	a) ピンホール b) 片側・多発 c) 線状 d) 深い潰瘍
2. 外陰に病変のないもの	
1) 肛門	
2) 臀部	
3) 子宮頸管炎	
4) 尿道炎	
5) Elsberg 症候群	
6) 再発性髄膜炎(Mollaret)	
7) 外陰痛	
8) 全身症状(性器ヘルペス症候群)	
3. 無症候性 HSV 排泄	
1) HSV-2 抗体陽性者	
2) HSV-1 抗体陽性者の一部	

変がなく子宮頸部に病変がみられることがある。尿道炎という形をとることもある。末梢神経障害としての排尿障害や大腿後部の神経痛や違和感など、神経障害が唯一の症状のこともある。

再発性の髄膜炎もみられる。

無症候性に HSV が排泄されることも多いようである。HSV-2 抗体陽性者の多くは後述のように HSV-2 を性器に排出している。まれではあるが、上半身に再発型病変を呈することもあり全身性の疾患となることもある。Obara らは HSV-2 が頸、胸、腰、仙髄の神経節に広く検出されると報告しているが、この全身的な広がりを説明するものであろう²⁾。以上のように性器ヘルペスは広いスペクトラムをもっている。

3. 感染病理

a. 経時的にみた性器ヘルペスの感染病理 (図4)

著者は HSV の感染から発症までの経時的な流れを次のように考えている。皮膚や粘膜の微小な傷から HSV に感染すると、まず局所で増殖する。間もなく知覚神経末端に入り知覚神経を上行して知覚神経節(仙髄神経節)にて増殖するとともに潜伏感染する。これが再活性化され再び知覚神経を下行してその支配領域の皮膚・

表2 HSVの分離部位と型

		1型	2型	合計
性器	女性	233(40.9%)	336(59.1%)	569(100%)
	男性	1(7.1%)	13(92.9%)	14(100%)
	合計	234(40.1%)	349(59.9%)	583(100%)
非性器	口唇	24	0	24
	顔	3	1	4
	眼	5	0	5
	上半身皮膚	2	0	2
	合計	34(94.7%)	1(2.6%)	35(100%)

粘膜、時に子宮頸管に出現する。この際、宿主の自然免疫能の強い場合や免疫が速やかに産生されていると症状は出ないで無症候に終わるが、免疫のできていない宿主ではHSVが増殖し発症することになる(初感染初発)。無症候ですんだ宿主も免疫の低下が起こると発症する(非初感染初発)。その後宿主の免疫の低下に伴って再発を繰り返す。後述するように2型感染例は1型感染例より再発しやすいが、これは免疫反応の起こり方や免疫反応からの逃避の能力の違いによるものではないかと考えている。

b. HSVの型と臨床型

HSVには抗原的に一部異なる1型と2型の2つの型がある。1型と2型では培養細胞での増殖能の違いなど、生物学的な違いがある。最も興味深いことはヒトにおけるその自然感染部位の違いで、米国からの報告では1型は眼、口、脳など上半身に、2型は性器などの下半身に感染するという棲み分けが行われているというものであった³⁾。著者も我が国で同じ検討を行ったところ米国と少し違うことがわかった。眼、口、顔などの上半身から分離した株はほとんどすべて1型であったが、女性性器から分離した株は1型が40%、2型が60%という結果になった(表2)。このデータから、我が国では女性の性器ヘルペスは1型によることもかなりあることがわかったが、1型は口に由来する可能性が高いことから、オーラルセックスあるいは唾液を介して感染した可能性が高いと考えられる。実は、性器ヘルペスは2型の感染によって起き

表3 臨床分類とHSVの型

	1型	2型	合計
初発	296(54.3%)	249(45.7%)	545(100%)
再発	35(13.7%)	220(86.3%)	255(100%)
合計	331(41.4%)	469(58.6%)	800(100%)

るといわれていた米国では、最近1型による性器ヘルペスが激増していると報告されている⁴⁾。その理由の一つに、エイズを恐れるあまりオーラルセックスがより一層頻繁に行われるようになったことがあげられている。一方、見方を変えると2型はほとんど性器からしか分離されていないので、2型は性器に親和性が高く性器と性器の接触により感染すると考えられる。

表3は、著者の経験した800例の女性性器ヘルペス患者について、その臨床型と分離したHSVの型との関係をみたものである。全体としては1型が41.4%、2型が58.6%であり、我が国の女性性器ヘルペスからはかなりの頻度で1型が分離されることが判明した。

臨床型との関係をみると初発545例のうち296例(54.3%)が1型であり、249例(45.7%)が2型であった。初発では2型よりむしろ1型の方が多かった。一方、再発255例についてみると2型が86.3%であり大部分は2型によって発症している。

すなわち、女性性器に関しては1型と2型が感染するが1型より2型の方が潜伏感染しやす

表4 性器ヘルペスの感染病態

臨床分類	発症時の血清抗体			感染 HSV	感染病態	型別でない HSV抗体に よる分類
	型別でない HSV抗体	型別抗体による				
		HSV-1抗体	HSV-2抗体			
初発	-	-	-	HSV-1	HSV-1 初感染	初感染
	-	-	-	HSV-2	HSV-2 初感染	
	+	+	-	HSV-1	HSV-1 非初感染初発	非初感染
	+	-	+	HSV-2	HSV-2 非初感染初発	
	+	+	-	HSV-2	HSV-2 初感染	
	+	+	+	HSV-2	HSV-2 非初感染初発	
再発	+	+	-	HSV-1	HSV-1 の再発	再発
	+	-	+	HSV-2	HSV-2 の再発	再発
	+	+	+	HSV-2		

く、また再活性化されやすいことを意味している。このことは男性についても同じで、男性の再発型でもほとんどが2型の感染である。

このように性器ヘルペスには1型と2型の感染があり、初感染と再活性化があるのでこれらの組み合わせを感染しているHSVの型と発症時の型特異的抗体の検出で整理すると表4のように9種類になる。この感染病態を決定するには、感染しているHSVの型と型特異的抗体の測定が必須である。

c. 無症候性ウイルス排泄者

HSVに感染してもその70%は無症候であるといわれている。しかし、このような症状のなかった人でもHSVを性器に排泄することがわかっている。Waldらは血清抗体を調べることによって2型に感染していることがわかっているが性器の症状の全くない男女53人について94日間毎日性器から検体をとって調べたところ、なんとその70%強の人にHSVが排泄されていて、その頻度は月に1度くらいであったというのである⁵⁾。この研究では、性器ヘルペスの症状のある例でも調べているが、こちらの方はやや頻度は高いもののそれほどの差はみられていない。HSVの排泄の頻度は月に1度程度ではあるが、HSVに免疫のない人がこういうときに運悪く性的接触があると感染することになる。ただ、ウイルスの排泄の頻度がこの程度なので

性器ヘルペスの症例が爆発的に増えることはない。

4. 性器ヘルペスの診断

性器ヘルペスの症状は多彩であるため性器ヘルペスであるのに他の疾患と誤ったり、逆に性器ヘルペスでない疾患を性器ヘルペスとしてしまうことがしばしばみられる。したがって、臨床検査により診断を確立する必要がある。

性器ヘルペスでは血清診断は難しく病原診断が必須である。現在保険で行うことのできる蛍光抗体法による病原検出検査は、性器ヘルペスのような病変が小さい場合は非常に感度が悪い。

最近、遺伝子増幅法であるPCR法やLAMP法(loop-mediated isothermal amplification)が開発されている。田中らは、新たに設計したプライマーを用いたreal-time PCR法を開発した⁶⁾。著者らは我が国で開発された遺伝子増幅法であるLAMP法を性器ヘルペスの診断に応用している。LAMP法はPCR法と違って等温で反応が進むので器械は簡単な構造でよく、感度・特異度はPCR法に劣らず、しかも臨床の現場で使える可能性がある。現在までの結果は良好で将来性が期待できる⁷⁾。次に型特異的抗体を測定するには、HSVの表面にあるグリコプロテインのG(gG)を抗原として用いるキットによらなければならない。1型と2型には共通抗原がある

が、gGには1型と2型で抗原性の違いがあるからである。現在我が国で広く用いられているHSV抗体測定キットは1型抗体も2型抗体も検出してしまうので、型特異的抗体測定には用いられない。世界的に市販されている型特異的抗体キットであるHerpeSelect、Captia、Platteriaについて著者らはその精度について検討してきた。いずれもIgG抗体を測定するキットである。2型抗体についてはPlatteriaの感度がやや良かった。一方、1型抗体についてはPlatteria>HerpeSelect>Captiaの順で感度が良かった⁸⁾。

現在は保険適用はないが、型特異的な診断が保険で行えるようになることを切に希望している。

5. 性器ヘルペスの治療

治療の原理は、抗単純ヘルペスウイルス剤(抗HSV剤)によってHSVの増殖を抑え宿主の免疫力により治癒に導くことである。

HSVは感染すると速やかに仙髄神経節に潜伏感染してしまっていて、現在用いられている抗HSV剤はこれを排除することができない。したがって抗HSV剤で一応治療しても多くの場合、特に2型では再発することは免れない。現在、我が国で用いられている抗HSV剤はアシクロビル(ゾピラックスなど)、バラシクロビル(バルトレックス)で、これらは経口投与が可能である。ビダラビン(アラセナAなど)は軟膏として用いられている。

a. 初発性器ヘルペス

バラシクロビル500mg/錠を1日2回投与するか、アシクロビル200mg/錠を1日5回投与する。投与日数であるが通常5-7日間程度で症状はかなり改善されるが、完治しないときは更に延長する。著者は外陰の症状が改善されても、特に初感染の場合は7-10日間は服用した方がよいと考えている。その理由は、仙髄神経節でのHSVの増殖を極力抑えておくことが将来の再発の頻度を減らすのに役立つ可能性があるからであり、米国のCDCのガイドラインでも7-10日間の投与を勧めている⁹⁾。治療は抗HSV剤の全身投与で十分であり、一般的には局所の抗

HSV剤軟膏塗布は不要である。

b. 再発性器ヘルペス

1) 発症時治療

再発は症状も軽く病変も小さいので投与日数は短くてよい。バラシクロビル500mg/錠を1日2回かアシクロビル200mg/錠を1日5回服用する。再発したらなるべく早く服用することが望ましく、24時間以内に開始することが勧められる。24時間以内に受診することが難しい場合も多いので、あらかじめ薬を渡しておくことも行われる。投与期間は3-5日間程度でよいことが多い。

再発する前に大腿後面の神経痛様の疼痛や外陰部の違和感などの前兆を感じる患者においては、前兆のあったときに服用すると発症しないですむことが多い。

また、病変が小さく症状もごく軽い再発の場合はビタラビンやアシクロビルの軟膏の塗布でもよい。

2) 再発抑制療法

頻繁に再発を繰り返す患者は、再発時の身体的な障害だけではなくいつ再発するのかわからないという不安、性的パートナーや家族などへの感染に対する不安など精神的な負担も大きくQOLが損なわれている。これに対してアシクロビル、バラシクロビルなどの抗ウイルス剤を毎日服用する再発抑制療法が開発された¹⁰⁾。2006年9月より我が国でもバラシクロビル錠(500mg)1錠を1日1回服用による本療法が保険適用となった。本療法は、再発するまでの期間を有意に延長させ、また再発しても症状が軽くなることだけでなく性的パートナーへの感染率を有意に減少させることが証明されている。保険で行う場合は、おおむね年6回以上再発する患者が対象となる本療法は、患者のQOLの改善が目的であるので治療の目標を患者とよく話し合う。服用期間は取りあえず1年間を目標とする。長期に服用するので副作用が心配されるが、時に胃腸障害、頭痛を訴える例はあるものの本療法による特有な有害事象は知られていない。本薬剤による胎児毒性は低くFDAの薬剤胎児危険度はBランクに分類されているが、

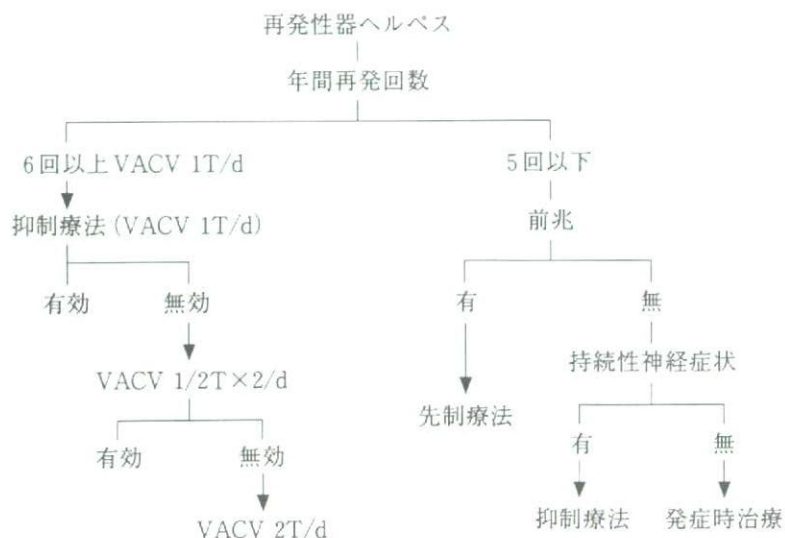


図5 再発性器ヘルペスの治療法の選択(川名)

抑制療法中に妊娠した場合は服薬を中止することになっている。現在まで抑制療法中に妊娠・分娩した例に異常児は生まれていない。長期に服用するため本剤に耐性ウイルスの出現が危惧されるが、実際はそのようなことはない。

著者の再発性器ヘルペスの治療法の選択を図5に示した。まず年間の再発回数が6回以上で患者の希望があれば抑制療法を行う。バラシクロビル(VACV)1錠1日1回の服用で始める。この方法で服用中に再発してしまう場合は1/2錠を1日2回にすると、血中濃度の日内変動の差が小さくなるので再発しなくなる例が多いようである。年間再発回数が5回以下の場合には発症時治療が原則であるが、持続性に坐骨神経痛症状を訴える場合などは抑制療法の適応があると考えている。再発抑制療法に対しては患者ごとにその姿勢が異なる。発症時の症状が非常に軽いときは既婚者で中年の女性は抑制療法を必ずしも希望しないが、未婚者で新しい恋人がで

きたような女性ではパートナーへの感染を恐れてその希望は強い。抑制療法を1年間行った後の再発の頻度がどうなるかは、患者にとって大きな関心事である。抑制療法後に再発回数が減少したという報告もある一方、不変であったとの報告もある。確かに再活性化されたHSVの増殖を抑えておけば知覚神経節におけるHSVの量は次第に減少していく可能性はあるので、中止した後の再発回数は減少することもあり得る。この点は今後の大きな課題と考えている。

おわりに

性器ヘルペスの制御には抑制療法によりHSVの排泄を抑えること、型特異的抗体の測定によりパートナーにHSV-2感染のあることを知らせること、そして、コンドーム推奨が重要であるとの提言がある¹⁾。

性器ヘルペスが若い女性を中心に増加しつつある現在、傾聴すべき提言であろう。

■ 文 献

- 1) Patel R, et al: Impact of suppressive antiviral therapy on the health related quality of life of patients with recurrent genital herpes infection. *Sex Transm Infect* 75(6): 398-402, 1999.
- 2) Obara Y, et al: Distribution of herpes simplex virus types 1 and 2 genomes in human spinal ganglia studied by PCR and in situ hybridization. *J Med Virol* 52(2): 136-142, 1997.
- 3) Nahmias AJ, et al: Clinical aspects of infection with herpes simplex viruses 1 and 2. In: *The Human Herpesviruses: An Interdisciplinary Perspective, and Management*(ed by Nahmias AJ, et al), p3-9, Elsevier, New York, 1981.

- 4) Roberts CM, et al: Increasing proportion of herpes simplex virus type 1 as a cause of genital herpes infection in college students. *Sex Transm Dis* 30: 797-800, 2003.
- 5) Wald A, et al: Reactivation of genital herpes simplex virus type 2 infection in asymptomatic seropositive persons. *N Engl J Med* 342(12): 844-850, 2000.
- 6) 田中道子ほか: Real-time PCR法による性器感染ヘルペスウイルスの検出: 臨床検体への応用. 第48回日本臨床ウイルス学会, 2007年6月3日, 富山.
- 7) 塚越静香ほか: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法による性器ヘルペス迅速診断. *日性感染症誌* 17(1): 104-109, 2006.
- 8) 西澤美香, 川名 尚: 新しい単純ヘルペスウイルス型特異抗体キット PLATELIA HSV の評価. 第49回日本臨床ウイルス学会, 2008年6月14日, 名古屋.
- 9) CDC: Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2002. *MMWR Recomm Rep* 51(RR-6): 1-78, 2002.
- 10) Leone PA, et al: Valacyclovir for episodic treatment of genital herpes: a shorter 3-day treatment course compared with 5-day treatment. *Clin Infect Dis* 34: 958-962, 2002.
- 11) Hook EW, Leone P: Time to translate new knowledge into practice: a call for a national genital herpes control program. *J Infect Dis* 194(1): 6-7, 2006.

風疹ワクチンの効果と再感染

駒瀬勝啓 国立感染症研究所 ウイルス第3部第2室

〔はじめに〕

弱毒性ウイルスワクチンは一度接種すれば、終生続く免疫が得られるとの認識がある。生ウイルスワクチンの一つである風疹ワクチンも終生免疫をなすと考えられている。事実、米国CDCの発行する「Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases (10th edition : 2007 Feb)」、俗にPink bookと呼ばれているワクチン、予防接種の教科書の最新版には、風疹ワクチンRA27/3株の免疫持続期間(duration of immunity)は「lifelong」と記載されている¹⁾。Longman 英英辞典でこの「lifelong」を調べると「continuing or existing all through your life」とあり文字通り「生涯続く、終生の」の意味であり、単に「かなりの長期の」を意味する形容詞ではない。また、出口らも日本のワクチン株、TO-336株の誘導する免疫は終生免疫だろうと推測している²⁾。一方で、風疹ワクチンが開発されてから多くのワクチン効果に関する研究がなされ、その中で風疹ワクチンの効果の減衰、予防接種後の再感染、或いは自然感染者の再感染の報告も多数なされている。終生免疫に関してはその機構がまだ十分に解明されていないが、ウイルスが感染から回復しても体内で持続感染し、免疫系を刺激し続けるという説と環境中に存在するウイルスに暴露されることによりしばしば不顕性感染を起し、免疫が刺激され維持されるとの説が有力である。前者については、回復後、風疹ウイルスが持続感染するとの明らかな情報はない。一方、環境内のウイルスの暴露でメモリーB細胞がしばしば刺激を受けることで半永久的に存在するとの報告があるが³⁾、日本においてはワクチンの普及により1999年以降、風疹の流行はほとんどなく、環境内の野外ウイルスに暴露される機会は著しく減っていると想像される(図1)。このような状況下においても自然感染、あるいはワクチン接種によって得られた免疫が終生持続するのかが検証する必要がある。特に風疹ワクチンは他の多くの小児用ワクチンと異なり、妊娠した女性を風疹感染から予防し、先天性風疹症候群(congenital rubella syndrome : CRS)を持つ子供の出生を防ぐことが期待されるワクチンである。ワクチンの予防効果の持続性、再感染に対する認識は重要であり、予防接種スケジュールを検討する上でも考慮しなければならない問題である。本稿では風疹ワクチン接種後の再感染について考察してみたい。

風疹、先天性風疹症候群(CRS)と風疹ウイルス

風疹は風疹ウイルスに感染後、約16~18日の潜伏期間をおいて発症する急性発疹性疾患で、主な症状としては発疹、中程度の発熱(37.5~38.5℃)、リンパ節の腫脹などを示すが、これ

ら3徴候のいずれかを示さない症例も多く、その場合は診断が困難である。また感染者の15~30%は不顕性感染といわれている。症状は一般に軽く、予後のよい感染症と考えられているが、数千人に一人の頻度で血小板減少性紫斑病、急性脳炎、溶血性貧血等の合併症に至ることがあ

Rubella vaccination and rubella re-infection

Katsuhiko KOMASE, Department of Virology III, National Institute of Infectious Diseases

別刷請求先: 駒瀬勝啓 208-0011 東京都東村山市学園4-7-1 国立感染症研究所 ウイルス第3部第2室

Tel: 042-561-0771 Fax: 042-567-5631

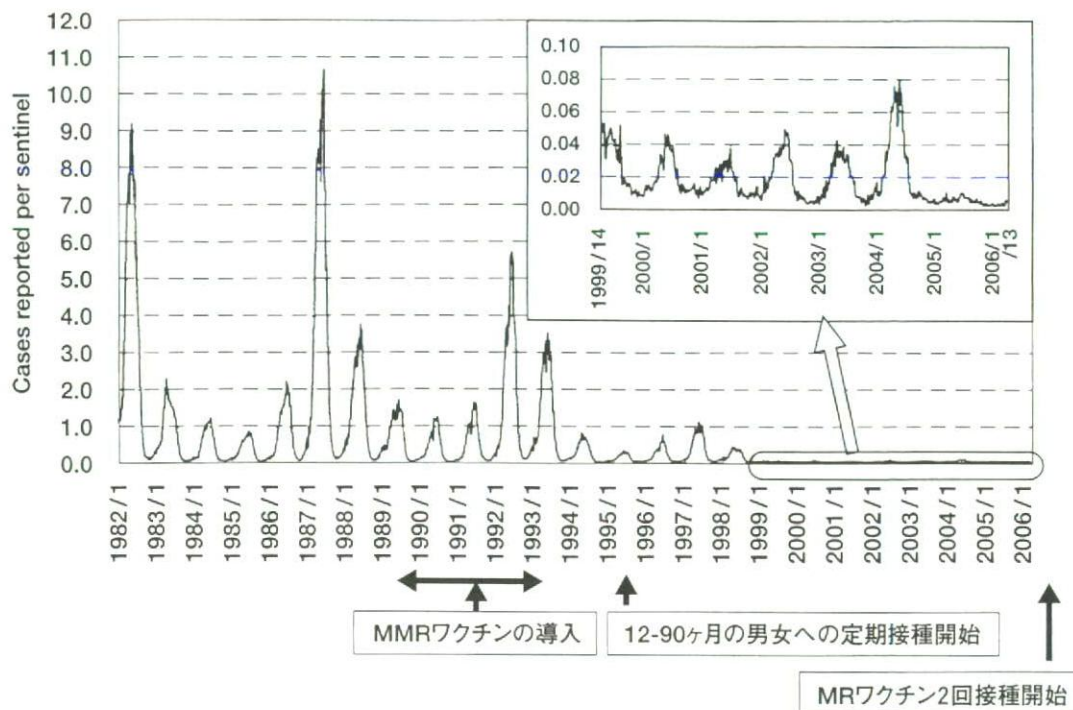


図1 定点からの風疹患者報告数（感染症情報センター・流行予測事業より引用）

る。発疹が3日程度で収まることから「三日はしか」とも呼ばれている。成人への感染では発疹、発熱の期間が長く、特に女性では約70%が関節痛を伴う。また、妊娠初期の女性に風疹ウイルスが感染すると、胎盤を通して胎児に感染し、先天性風疹症候群（CRS）と呼ばれる先天性の障害を胎児にもたらす事がある。CRSの主な障害としては、心疾患、難聴、白内障、網膜症などが挙げられる。CRSを持つ子供を産む頻度、あるいは重症度、障害の種類は風疹に感染した妊娠時期によってかなり異なるが、妊娠12週までに感染すると50%以上の子がCRSとして生まれるとの報告がある。この、不幸なCRS児の出生を防ぐ事が、風疹をコントロールする最大の理由である。

風疹の病因ウイルスである風疹ウイルスは、*Togaviridae* 科 *Rubivirus* 属に属し、約9,700塩基からなるプラス鎖RNAゲノムを持つ。また、感染細胞に由来するエンベロープに被われている。血清学的には亜型のない単一のウイルス種であり、人が唯一の自然宿主である。ゲノム解析により現在では2つのclade (clade 1, clade 2)、さらに13の genotype (4つの provisional genotypeを含む) に分類されている⁴⁾。風疹ウイルスは

主に飛沫感染によって伝播し、一人の感染者から周囲の免疫を持たない人に感染する数を示す基本再生産数 (basic reproduction number) は5～7人と報告されている。この数字は麻疹や水痘より弱く、おたふく風邪とはほぼ同等の感染力を示している。また、集団内での流行を防ぐ集団免疫率 (herd immunity) は80～85%である。感染者が風疹ウイルスを排出する期間は発疹出現の前後約1週間である。不顕性感染者もウイルスを排出する事がある。

風疹ワクチンは、野生株をウサギ初代腎細胞、ウズラ初代胚細胞などで継代することで弱毒化した生ウイルスワクチンである。日本では1970年に発足した風疹ワクチン研究会の主導のもと、1960年代後半に日本で分離された5株の野生株から、TO-336株（武田薬品工業）、松浦株（阪大微研）、高橋株（北里研）、松葉株（化血研）、TCRB株（千葉血清）の5つのワクチンを独自に開発した。その後、千葉血清が廃業し、現在は4つワクチンが製造、使用されている。なお世界的にはRA27/3株が広く使用されている。ワクチン接種後の再感染には2つの要因がある。一つはワクチン接種しても抗体が陽転しない場合である（primary vaccine failure: PVF）。

もう一つは、抗体は獲得したがその後抗体価が減衰し、感染防御、あるいは発症防御に不十分になる場合である (Secondary vaccine failure : SVF)。風疹ワクチンの抗体陽転率 (HI 抗体価を 8 倍以上を獲得) はワクチン株によって異なるがほぼ 95% である。よってワクチン接種者の 5% 程度は接種後も風疹ウイルスに感受性を持つことになるがこれらは本稿ではあまり関係がない。では、風疹ウイルスに対する免疫を持った者での再感染はあるのだろうか？

風疹の再感染例

我が国では 1999 年に導入された感染症法で風疹、先天性風疹症候群を 4 類感染症とし、風疹は小児科定点観測疾患とし、先天性風疹症候群 (CRS) は全数把握疾患とした。2003 年の感染症法改正でそれぞれ 4 類疾患から 5 類疾患へ変更になったが、報告の体制は現在も同じである。つまり再感染率が高いと想像される 15 歳以上に風疹の症例があっても CRS でなければ報告される可能性は低い事になる。2008 年からは風疹

の全数把握が導入される予定であるが、現在においては日本における風疹の再感染の報告は乏しい。一方、日本において、過去の感染、あるいはワクチン接種の履歴がある者で、風疹ウイルスの再感染によって CRS を発症したと考えられる例が 1987 年から 2005 年の間に少なくとも 18 件ある (表 1)⁵⁻⁷⁾。これらは風疹抗体価、あるいは抗体を獲得してからかなりの時間が経過している事を推測できる IgG avidity 値 80 以上等で CRS の原因となった再感染以前に、風疹抗体の存在が証明できたケースである。これらの中には再感染の 10ヶ月前には風疹 HI 抗体価 64 だった症例もある。半数の 9 例が自然感染後の再感染である。再感染時に顕性感染だったのは 6 例のみであり、残りは不顕性感染であった。また、再感染後は抗体価が上昇している。

海外では風疹ワクチン開発の当時に多くの効果に関する報告があり、実際に流行時の再感染を証明している報告も多い。Horstmann らは米国で初期に承認された HPV-77 ワクチン (RA27/3 株が開発されたため使用されなくなった) 接

表 1 日本における風疹の再感染によると考えられる CRS 症例

症例	感染前		再感染時 発疹	感染後			児の IgM 抗体	一次免疫	報告年
	HI 抗体価	測定時期		HI 抗体価	IgM 抗体価	IgG 抗体 Avidity			
1	8	2 年前	+	64	NT	NT	-	自然感染	1987
2	16	罹患前	不明	NT	NT	NT	NT	不明	1987
3	16	6 年前	+	64	NT	NT	+	自然感染	1988
4	64	3 年前	-	256	-	NT	+	自然感染	1989
5	16	4 年前	+	512	4.11	83.3	+	自然感染	1992
6	64	3 年前	-	256	-	NT	+	自然感染	1992
7	64	10ヶ月前	-	1024	-	81.5	+	自然感染	1994
8	NT		-	256	-	97.6	+	ワクチン	1995
9	8	2 年前	-	512	2.84	95.7	+	不明	1995
10	NT		+	256	+/-	94.6	人工流産	ワクチン	1996
11	16	3 年前	+	4096	7	100	人工流産	自然感染	1996
12	NT		-	1024	-	95.1	人工流産	自然感染	1996
13	NT		-	256	1.84	94	人工流産	自然感染	1996
14	NT		-	256	3.6	81.4	+	ワクチン	1996
15	16	4 年前	-	512	-	NT	+	ワクチン	1998
16	32	8 年前	-	512	-	NT	+	ワクチン	1999
17	16	8 週前	-	512	-	NT	+	ワクチン	1999
18	8	4 年前	+	512	+	NT	+	不明	2004

国立感染症研究所、感染症情報センター HP より改変

<http://idsc.nih.gov/jp/iasr/27/314/dj3145.html>

<http://idsc.nih.gov/jp/iasr/24/277/dj2774.html>

<http://idsc.nih.gov/jp/iasr/21/239/dj2395.html>

種者の80%，自然感染者の3.4%が風疹流行時に再感染したと報告している。この時、発症した者はいなかったがワクチン接種者1名からウイルスが分離されている。また、再感染者のHI抗体価のGMT値が大きく上昇したことから、ウイルスの増殖があったと推測している。HI抗体価が64以下では再感染のリスクが高いと結論している⁸⁾。また、現在、世界的に最も使用されている風疹ワクチン、RA27/3株では、皮下接種、あるいは経鼻接種の後、野生株で攻撃実験を行い、皮下接種者の18.5%，経鼻接種の14%に再感染したと報告している。前述のHPV-77株より再感染率が低いことはRA27/3株には粘膜上に抗体を分泌する事に関連しているとしている⁹⁾。また、FogelらはRA27/3, Cendhill, HPV-77で免疫した後、RA17/3株を経鼻接種して再感染率を調べている。Cendhillでは66.7%，HPV-77では45.7%，RA27/3株でも7.1%の再感染があったと報告している¹⁰⁾。

また、日本では2006年から弱毒乾燥生麻疹風疹混合ワクチン（MRワクチン）の2回接種の導入が決まり、2回目接種の安全性を検討する目的で麻疹ワクチン、風疹ワクチン既接種者へのMRワクチンの接種が行われた。その結果、2度目のMRワクチンの接種後、HI抗体価の有意な上昇が認められたのはHI抗体価32倍以下の者では81.1%，64倍以上の者では10.2%とHI抗体価に依存した結果が得られている（表2）¹¹⁾。皮下接種で行われるワクチン

表2 風疹ワクチン接種者へのMRワクチン接種による風疹HI抗体価の変動

接種前 HI抗体価	接種後 HI抗体価			合計
	不変	1管上昇	有意上昇	
<8			6	6
8			7	7
16		1	8	9
32	1	8	22	31
64	11	28	11	50
128	27	10	1	38
256	11	3		14
512	7			7
合計	57	50	55	162

平成18年度「麻疹・風疹(MR)混合ワクチンの接種効果・安全性・接種率に関する研究」報告書より著者の了解のもとに引用

接種は、咽頭、上気道等の呼吸器を介する自然感染と異なり、再感染のモデルには適切とはいえないが、少なくとも血中抗体価が低い場合には弱毒されたワクチンでも感染が成立し、抗体価を上昇させることを示している。これら日本における風疹の再感染に由来するCRSの症例や、海外の再感染の報告から、風疹の再感染に関して以下のことがいえそうである。

- 1) 風疹ウイルスの再感染はある。
- 2) 再感染はHI抗体価64倍以下の比較的低い場合に起こる事が多い。
- 3) 再感染時に症状を示す場合と示さない場合があるが、不顕性感染が多い。
- 4) ワクチン接種者、自然感染者ともに再感染する可能性がある。
- 5) 再感染、あるいはワクチンの再接種によって、抗体価は上昇する。
- 6) 妊娠時の再感染によってCRS児を出生することがある。
- 7) 再感染が不顕性感染だった場合でもCRS児を出生することがある。

風疹抗体価の減衰

風疹ウイルスは再感染することがある。現在ではSVFという考え、つまりワクチン効果の減衰という考えが定着しつつあるが、風疹抗体価は実際に減衰しているのだろうか？

日本では1994年に1歳児への風疹定期接種が開始されてから大きな風疹の流行はない。2004年に地域的な流行があったが、1993年以前の数10分の1の規模である。国立感染研感染症情報センターが行っている感染症流行予測調査の2005年度報告書の予防接種歴別風疹HI抗体保有状況から1～20歳の各年齢の抗体陽性者が保有する平均HI抗体価をグラフにした（図2）。2005年当時の予防接種スケジュールでは12ヶ月～90ヶ月での接種が勧奨されているので、2歳以降でも接種する小児が存在したはずだが、1歳（HI抗体価 $2^{7.2}$ ）での平均HI抗体価をピークに、12歳前後（HI抗体価 $2^{5.3}$ ）まで約2管減衰する。またこの間の抗体価の分布は1歳児ではHI抗体価64以下の者が約20%であったが10歳を超えるあたりで約60%となる（図3）¹²⁾。これらの結果は個人の経年的な抗体価では

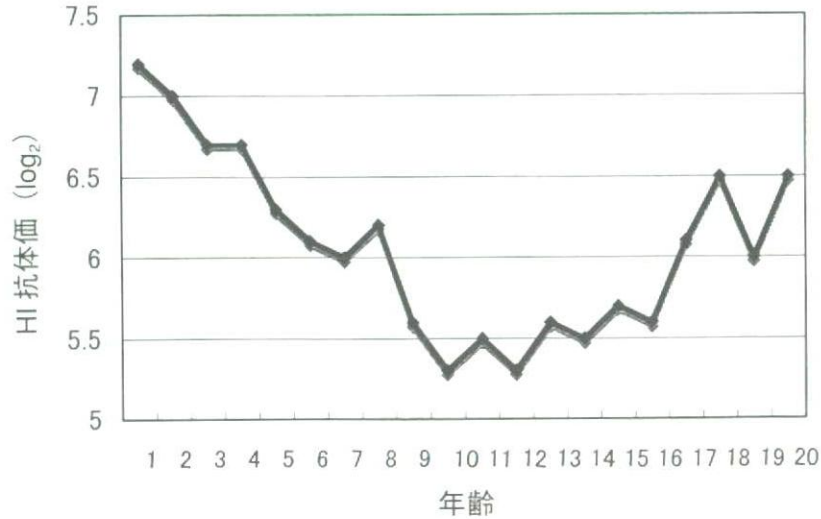


図2 各年齢における風疹抗体陽性者の平均 HI 抗体価 (2005年度)
(平成17年度 感染症流行予測調査報告書より)

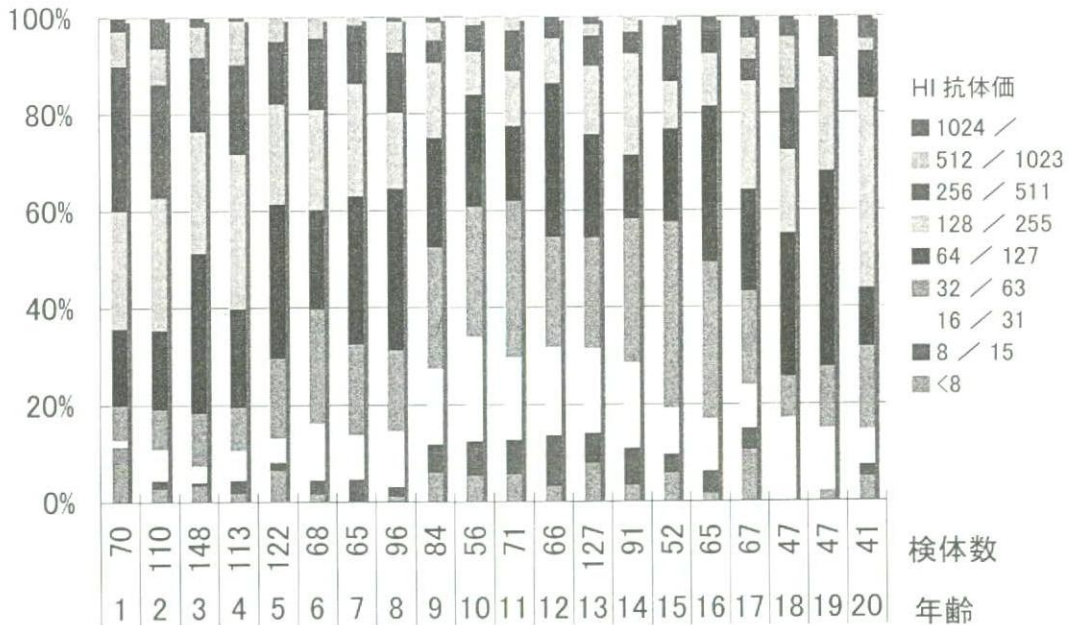


図3 各年齢における風疹 HI 抗体価の分布
(平成17年度 感染症流行予測調査報告書より)

なく、それぞれの年齢の人の平均抗体価であるが、1歳前後にワクチン接種によって獲得した抗体が、流行がない状況では減衰していく事を示していると考えられる。また、その10歳時には約半数が感染阻止に必要な抗体価と考えられる HI 抗体価64より低い。そして抗体価が上昇し始める年齢は、流行があった年代とほぼ一致する。RA27/3株を開発した Plotkin らも、RA 27/3 ワクチンの接種者全員ではないが、1～2

年間で HI 抗体価が1/2に、3年後には1/4になったと報告している。一方で5年間後においても2名はまだ40倍、80倍の HI 抗体価を保持していたと報告している⁹⁾。また、Black らは同様に RA27/3株をアマゾンのインディアンに接種した結果、風疹の流行が過去においても、またワクチン接種後においてもなかった地域でも、すべての接種者で抗体は保持されていたが、4ヶ月から2年半の間にその抗体価が1/2

になった者もいたとの報告している。この間、流行がおこる地域での HI 抗体価は維持されていた¹³⁾。また、20名の RA27/3接種者のうち、10年間に4名の HI 抗体価は1/4に、GMT 値は129.9から65.0に減衰していたとの報告もある¹⁴⁾。また Best らは米国で承認をうけた3つのワクチン、Cendehill, HPV-77, RA27/3の9～21年後の抗体陰性者の比率を報告し、RA27/3株で1%、Cendehill 株で2.7%、HPV-77株で7.3%と報告している¹⁵⁾。Zealley らは6～7年後の結果を示し、RA27/3株で2.8%が、Cendehill 株で7.6%、自然感染者では1.3%が抗体陰性になっていたと報告している。これらはワクチン株の抗体価が減衰することを示すとともに、株によって抗体価の持続性、効果に差があることを示している¹⁶⁾。日本では Asahi 等が Matsuba 株が誘導する HI 抗体価について23年間の follow up study を行っている。ワクチン接種5～8ヶ月後の HI 抗体価の GMT 値は $2^{6.3}$ は23年後には $2^{3.5}$ へ減衰し、しかも15.4%において抗体陰性になっていたと報告している¹⁷⁾。比較的最近の報告ではフィンランドで行われた、MMR ワクチンの2回接種の後15年の follow up study がある。1回目接種14～18ヶ月、2回目接種、6歳時の予防接種スケジュールのグループは1回目のワクチン接種後は100%の抗体陽転率を示したが、15歳時の抗体陽転率は99%を維持していたが、すでに接種者の31%が感染予防レベルを下まわっていたと報告している¹⁸⁾。またルクセンブルグの Kremer らは MMR ワクチンの2回接種後の抗体価の減衰率は-2.9% (confidence interval 値: -0.7% to -4.8%) であったと報告している¹⁹⁾。

上記のように、多くの follow up study でワクチン接種、自然感染に関わらず抗体価が時間とともに減衰していくという報告をしている。

以上から、風疹の終生免疫に機構の少なくとも一つは、従来からいわれている、一度得られた抗体が減衰することで環境中のウイルスが再感染し、それによって抗体価が回復し、見かけ上は抗体価が維持されているようにみえる事によると思われる。また、再感染時では、症状を示さない事や軽いことが多い事から、風疹の再

感染そのものがあまり注目されてこなかった事も終生免疫に対する評価がなされなかった要因でもあろう。風疹ウイルスの発症阻止抗体価、感染阻止抗体価はまだ議論の余地があろうが、HI 抗体価64倍の以下の時には、風疹に再感染する可能性がある。1989年の MMR ワクチンの導入 (1993年に中止)、またその後の12～90ヶ月の男女を対象とした風疹ワクチンの定期接種化で、日本における風疹の流行は確実に少なくなっている (図1)。このことは、風疹に感染する機会がなくなるというポジティブな面とともに、妊娠可能年齢に達する前に免疫を保持し、長期間維持し、さらには強化できる機会が減少したことも意味する。かつてギリシャでは小児に実施した MMR ワクチン接種が不徹底だったため、風疹の流行が中途半端に減少し、風疹に対して感受性を持つ成人が増加し、その結果、CRS が増加したことがあった²⁰⁾。また、2004年の地域的流行時には、流行地以外からも CRS の報告があり、流行は大きくなかったにも関わらず10名の CRS が報告された。現行の MR ワクチン2回接種法は1歳、並びに小学校入学前に接種する。従来 of 1回接種法よりは風疹の流行を抑制する意味でも、風疹に対する抗体を維持する意味でもよりよい方法であることは間違いないが、2回目接種後の抗体価の変動にも留意が必要である。また海外からのウイルスの侵入も考えられる。抗体価が時間とともに減衰し、ウイルスが再感染する可能性がある以上、どのような接種法を用いても、すべての妊娠可能年齢の女性が、感染阻止できるレベルの抗体価を常に維持させるのは難しい。ワクチン効果の持続性を過信せずに、妊娠可能年齢に達した女性は、自らの風疹に対する免疫状態に留意し、必要に応じて早めにワクチン接種を行う事が CRS のリスクを最少にする方法であろう。

参考文献

- 1) Rubella Chapter (PinkBook) URL : <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/rubella.pdf>
- 2) 出口雅経, 平山宗宏, 星野正雄, 岡 右之, 甲野礼作, 国産風疹ワクチン (TO336株) 接種後10年間の抗体追跡調査, 日本医事新報 :

- 3029, 31-34, 1982
- 3) Amanna IJ, Carlson NE, Slifka MK : Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. *N Engl J Med* 357(19) : 1903-15, 2007
 - 4) WER, 15 June 2007, Vol 82, 24. URL : <http://www.who.int/wer/2007/wer8224.pdf>
 - 5) 2000～2005年の風疹および先天性風疹症候群の発生動向とその関連性 IASR URL : <http://idsc.nih.gov/jp/iasr/27/314/dj3145.html>
 - 6) 先天性風疹症候群の1例—岡山県 IASR URL : <http://idsc.nih.gov/jp/iasr/24/277/dj2774.html>
 - 7) 母体の再感染による先天性風疹症候群—自験例と日本における23症例の検討— IASR URL : <http://idsc.nih.gov/jp/iasr/21/239/dj2395.html>
 - 8) Horstmann DM, Liebhaber H, Le Bouvier GL, Rosenberg DA, Halstead SB : Rubella : reinfection of vaccinated and naturally immune persons exposed in an epidemic. *N Engl J Med* 8 283(15) : 771-8, 1970
 - 9) Plotkin SA, Farquhar JD, Ogra PL : Immunologic properties of RA27/3 Rubella virus vaccine. *JAMA* 225(6) : 585-590, 1973
 - 10) Fogel A, Gerichter CB, Barena B, Handsher R, Heeder E, Response to experimental challenge in persons immunized with different rubella vaccine. *J Pediatr* 92 : 26-29, 1978
 - 11) 庵原俊昭, 岡田賢司, 中野貴司, 神谷 齊, 二井立恵, 伊佐地真知子, 落合 仁, 渡辺雅弘 : 麻疹ワクチン, 風疹ワクチン接種小児への麻疹・風疹 (MR) 混合ワクチン追加接種の有効性および安全性の検討. 厚生労働科学研究費助成金, 新興再興感染症研究事業, 麻疹・風疹 (MR) 混合ワクチンの接種効果・安全性・接種率に関する研究, H18年度総括・分担研究報告書 : pp.25-31
 - 12) 厚生労働省健康局結核感染症課, 国立感染症情報センター, 平成17年度感染症流行予測調査報告書, pp.113-152
 - 13) Black FL, Lamm SH, Emmons JE, Pinheiro FP : Reaction to rubella vaccine and persistence of antibody in virgin-soil population after vaccination and wild-virus-induced immunization. *J infect Dis* 133(4) : 393-398, 1976
 - 14) Shineerson JM : Persistent of antibody 10 years after vaccination with Wistar RA27/3 strain live attenuation rubella vaccine. *British Med J* 28 : 1580-1581, 1980
 - 15) Best JM. Rubella vaccines ; Past present and future. *Epidemiol Infect* 107 : 17-30, 1991
 - 16) Zealley H, Edmond E, Rubella screening and immunisation of schoolgirls : results six to seven years after vaccination. *British Med J* 284 : 382-384, 1982
 - 17) Asahi T, Ueda K, Hidaka Y, Miyazaki C, Tanaka Y, and Nishima S. Twenty-three-year follow-up study of rubella antibodies after immunization in a closed population, and serological response to revaccination. *Vaccine* 15 ; 1791-1795, 1997
 - 18) Davidkin I, Peltola H, Leinikki P, and Valle M, Duration of rubella immunity induced by two-dose measles, mumps and rubella (MMR) vaccination. A 15-year follow-up in Finland. *Vaccine* 18 : 3106-3112, 2000
 - 19) Kremer JR, Schneider F, Muller CP, Waning antibodies in measles and rubella vaccinees — a longitudinal study. *Vaccine* 24 : 2594-2601, 2006
 - 20) Panagiotopoulos T, Antoniadou I, Valassi-Adam E. Increase in congenital rubella occurrence after immunization in Greece : retrospective survey and systematic review. *BMJ* 319 : 1462-67, 1999



Histidine at position 1042 of the p150 region of a KRT live attenuated rubella vaccine strain is responsible for the temperature sensitivity

Masafumi Sakata^a, Katsuhiko Komase^b, Tetsuo Nakayama^{a,*}

^a Laboratory of Viral Infection I, Kitasato Institute for Life Sciences, 5-9-1 Shirokane, Minato-ku, 108-8541 Tokyo, Japan

^b Department of Virology III, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 July 2008

Received in revised form 2 October 2008

Accepted 19 October 2008

Available online 7 November 2008

Keywords:

Rubella virus

KRT vaccine strain

Temperature sensitivity

Reverse genetics

ABSTRACT

The Japanese live attenuated KRT rubella vaccine strain has a temperature sensitivity (*ts*) phenotype. The objective of this study is to identify the region responsible for this phenotype. Genomic sequences of the KRT strain and the wild-type strain (RVi/Matsue.JPN/68) with the non-*ts* phenotype were investigated and reverse genetic systems (RG) for these strains were developed. The *ts* phenotype of KRT varied drastically on replacement of the p150 gene (encoding a methyltransferase and a nonstructural protease). Analysis of four chimeric viruses showed the region responsible for the *ts* phenotype to be located between BsmI and Nhe I sites (genome position 2803–3243). There were two amino acid differences at positions 1007 and 1042. Mutations were introduced into the KRT cDNA clone, designated G1007D, H1042Y and G1007D-H1042Y. H1042Y and G1007D-H1042Y grew well at a restrictive temperature with a 100-fold higher titer than G1007D and the KRT strain, but a 10-fold lower titer than RVi/Matsue.JPN/68. Since the growth of H1042Y was not completely the same as that of the wild-type strain at the restrictive temperature, we also assessed whether other genomic regions have an additive effect with H1042Y on the *ts* phenotype. H1042Y-RViM SP having structural proteins of RVi/Matsue.JPN/68 grew better than H1042Y, similar to RVi/Matsue.JPN/68. Thus, we concluded that one mutation, of the histidine at position 1042 of p150, was essential for the *ts* phenotype of the KRT strain, and structural proteins of KRT had an additive effect with H1042Y on the *ts* phenotype.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Rubella virus (RV) is the sole member of the genus *Rubivirus* in the family *Togaviridae*. RV is an enveloped, single-stranded, positive-sense RNA virus with an approximately 10-kb genome, having a cap structure at the 5' end of the genome and polyA tail at the 3' end. The genome contains three untranslated regions (UTRs) and two open reading frames (ORFs). One UTR is located at the 5' end, one at the 3' end, and one between the ORFs. The UTR between the two ORFs is the junction-UTR (J-UTR). The 5' end ORF encodes two nonstructural proteins (NSPs) named p150 and p90, while the 3' end ORF encodes three structural proteins (SPs); capsid protein and the two envelope proteins, E1 and E2. NSPs are translated from genomic RNA and act as a viral genome replication complex. The full-length negative-sense RNA (cRNA) is replicated from genomic RNA. cRNA acts as a template for replicating progeny viral RNA and sub-genomic RNA (SG RNA). Three SPs, capsid, E2, and E1, are translated from SG RNA to form virion structures. Nucleocapsids are

comprised of the genomic RNA and capsid protein, and constitute progeny virions surrounded by a lipid viral membrane embedded with E1 and E2 [1,2].

RV infection is one of many transmissible diseases in infants and children. Most patients with RV demonstrate mild symptoms, maculopapular rash, lymphadenopathy, low-grade fever, conjunctivitis, sore throat and arthralgia, and recover in several days without any complications or sequelae. However, infection in unimmunized women during the early stages of pregnancy, especially within the first trimester, cause fetal death or congenital rubella syndrome (CRS). CRS is characterized by multiple malformations: deafness, cataracts, cardiac disease and neurological abnormalities [3–5]. For the prevention of CRS, live attenuated vaccines have been used in vaccination programs in many countries. Recently, in the United States and several European countries, the indigenous circulation of rubella virus has been disrupted and CRS has been eliminated [3]. The prevention of CRS and rubella epidemics mainly depends on efficacious vaccination programs. In Japan, a nationwide outbreak of rubella has not occurred since 1993, but some cases of CRS in sporadic regional outbreaks have been reported. Rubella infection still remains an important issue in Japan and the accelerated control of RV infection is anticipated for the elimination of CRS.

* Corresponding author.

E-mail address: tetsuo-n@lisci.kitasato-u.ac.jp (T. Nakayama).

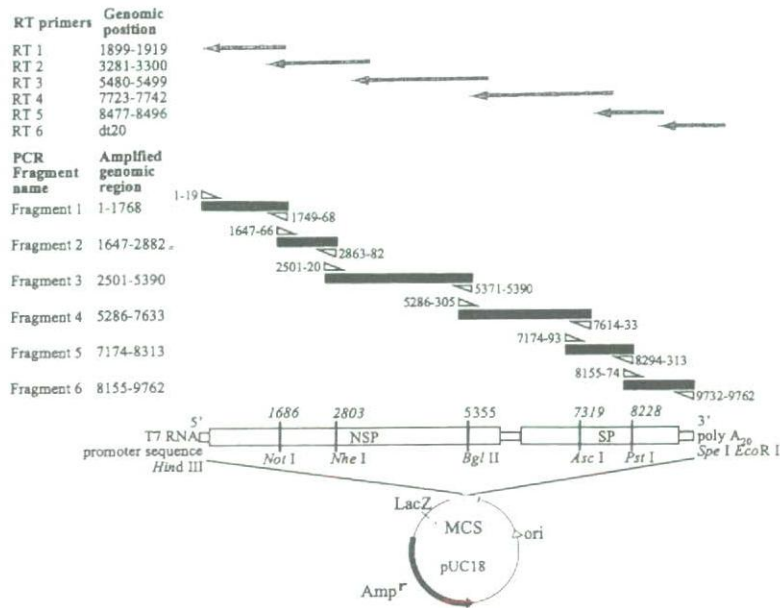


Fig. 1. Construction of the infectious cDNA clones from KRT and RVi/Matsue.JPN/68. Gray arrows indicate the RT primers and direction of cDNA synthesis, and numbers are genomic positions of RT primers. The six RT products were amplified by PCR with primer sets. Open arrowheads indicate the positions of primers. Six PCR fragments were cloned at Eco RI and Hind III in the MCS of pUC18. The full-length cDNA clones were constructed by combining each cDNA clone, using the restriction enzyme sites described in the panel.

Four live attenuated rubella vaccine strains have been used in Japan. The attenuation process differed for each strain with serial passages of the wild-type rubella viruses in different primary cells and cell lines at 35 °C or less [6]. Ohtawara et al. [7] also reported that all Japanese rubella vaccine strains exhibit unique characteristics of temperature sensitivity (*ts*) in cultured cells. Although the wild-type strains show approximately 10-fold lower infective titers at a restrictive temperature of 39 °C than at a permissive temperature of 35 or 37 °C, the vaccine strains with *ts* phenotype demonstrate growth at 39 °C that is 1/1000 that at 35 or 37 °C.

In this study, we determined the complete genomic sequences of both the KRT live attenuated rubella vaccine and the wild-type RVi/Matsue.JPN/68 strain circulating at the same time and in the same region as the progenitor wild-type of KRT. Reverse genetic systems (RG) for the two strains were developed [8–13], and a series of recombinant chimeric viruses and point-mutated viruses were generated from KRT and RVi/Matsue.JPN/68 and point-mutated viruses were generated to investigate the region responsible for the *ts* phenotype. Through infection experiments in cultured cells, the p150 gene, especially the histidine at position 1042, was determined to be responsible for the *ts* phenotype of the KRT strain. This is the first report to identify the region responsible for the *ts* phenotype of a live attenuated rubella vaccine at the molecular level.

2. Materials and methods

2.1. Cells and viruses

Vero and RK13 cells were maintained in Eagle's minimum essential medium (MEM) (Sigma–Aldrich, MO, USA) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 U/ml). RVs of the KRT and RVi/Matsue.JPN/68 strains propagated in RK13 and Vero cells were used in this study. The KRT vaccine strain was supplied by the Kitasato Institute Research Center Biologicals and the wild-type RVi/Matsue.JPN/68 strain was kindly provided by Y. Umino, NIID Japan.

2.2. Preparation of viral RNA, amplification of viral cDNA and nucleotide sequencing

Monolayers of RK13 cells grown in 6-well plates were infected with RVi/Matsue.JPN/68, and the culture medium was harvested on day 5 post-infection. Viral RNA was extracted from the culture medium of RVi/Matsue.JPN/68 and bulk material of the KRT vaccine with MagExtractor -Viral RNA- (TOYOBO, Osaka, Japan) following the instruction manual, and used for first-strand cDNA synthesis. The primers used for reverse transcription (RT) and the polymerase chain reaction (PCR) are shown in Fig. 1. First-strand cDNA synthesis was carried out at 50 °C for 1 h in a 10- μ l reaction mixture containing viral RNA, 5 pmol of reverse primer based on the RV genome or poly deoxythymidine (poly dT) primer, 100 U of SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen, CA), 40 U of RNasin Plus Ribonuclease Inhibitor (Promega, Madison, WI) 5.0 mM DTT, 125 μ M dNTP Mix (125 μ M each of dATP, dGTP, dCTP and dTTP), 50 mM Tris–HCl, 75 mM KCl, and 300 μ M MgCl₂. First-strand cDNA, PCR, and sequencing primers were designed by referring to the sequence reports of TO-336 wt (Genbank accession number AB047330), TO-336vac (AB047329) and RA27/3 vaccine (L78917). For sequencing the 5' and 3' end of the genome, 5' and 3'-Full RACE core kits (TaKaRa, Shiga, Japan) were used with 5'-TCACTGACCTGCATCT-3' (genome position [gp] 219–234) and poly dT. The first-strand cDNA was amplified by nested or semi-nested PCR in six overlapping fragments. The amplification was performed in a 50- μ l reaction mixture, containing cDNA, 25 pmol of the primer set, 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) and TaKaRa La Taq polymerase (TaKaRa) with the PCR mixture provided by the manufacturer. The reaction was carried out under thermal cycling conditions for 3 min at 95 °C followed by 30 cycles of 20 s at 95 °C, 30 s at 62 °C, and 90 s at 68 °C with some modifications. PCR products were excised and used for sequencing with a DYEnamic ET Terminator Cycle sequencing Kit (GE Healthcare Bio-Science, NJ), and analyzed with a 377 XL DNA sequencer (Applied Biosystems, CA). M13RV and M13m4 sequencing primers were used to determine the nucleotide sequence of the

Table 1

Comparison of nucleotide (nt) and amino acid (a.a.) sequences between KRT (vac) and RVi/Matsue.JPN/68 (wt).

	5'UTR ^a	NSP ^b		J-UTR ^a	SP ^c			3'UTR ^a
		p150	p90		C	E2	E1	
nt	40	3903	2442	123	900	846	1443	62
vac/wt ^d (%)	2 (5.0)	69 (1.77)	65 (2.66)	5 (4.17)	27 (3.0)	27 (3.19)	36 (2.49)	1 (1.61)
a.a.		1301	814		300	282	481	
vac/wt ^d (%)		15 (1.15)	1 (0.12)		4 (1.33)	8 (2.84)	5 (1.04)	

^a UTR was an untranslated region.^b NSP was a nonstructural precursor polyprotein encoding two nonstructural proteins, p150 and p90.^c SP was a structural precursor polyprotein encoding three proteins, capsid, E2, and E1.^d The number of nucleotides or amino acid residues differed between the KRT vaccine (vac) and wild RVi/Matsue.JPN/68 (wt) strains.

5' and 3' ends of the genome cloned into the multi-cloning site (MCS) of pUC18 that were constructed with the 5' and 3'-Full RACE core kits.

2.3. Construction of infectious cDNA clones of KRT and RVi/Matsue.JPN/68

Based on the entire genome sequence of the KRT and RVi/Matsue.JPN/68 strains, viral cDNA was synthesized with six primers and cDNAs were amplified with KOD plus DNA polymerase (TOYOBO). The amplified regions and primer sets are summarized in Fig. 1. For cloning of the cDNAs into the MCS of pUC18, Hind III (*italic: aagctt*) and Eco RI (*italic: gaattc*) restriction enzyme sequences were linked to the 5' end of the forward and reverse primers, respectively. These fragments were digested with Hind III and Eco RI and cloned into the MCS of pUC18. All fragments inserted into the plasmid were confirmed by using appropriate restriction enzymes and sequenced. Individual clones were digested with restriction enzymes as shown in Fig. 1 and ligated with each other to construct the full-length cDNA clones of KRT and RVi/Matsue.JPN/68. The T7 RNA promoter sequence was introduced at the 5' end and a polyA tail at the 3' end of the full-length cDNA, and sub-cloning of cDNAs covering the 5' and 3' ends of the viral genome was carried out. The T7 RNA promoter sequence (double underline) was introduced after amplification, using as a forward primer 5'-tgtaagctttaatacagctcactatagCAATGGGAGCTATCGGACC-3' for KRT and 5'-tgtaagctttaatacagctcactatagCAATGGAAGCTATCGGACC-3' for RVi/Matsue.JPN/68 (gp 1–19) with the reverse primer 5'-agtgaattcACTCGGCAGCAGACCAGCCG-3' (gp 2863–2882). A polyA tail was also introduced after the amplification, using as a forward primer, 5'-agtaaagcttGTCTCTTGATCAGCCCTCG-3' (gp 8110–8129) and reverse primer, 5'-attagaattcactagT₁₉CTATGCAGCAACAG-3' (gp 9649–9762), which includes restriction sites for Eco RI and Spe I (*italic: actagt*) downstream of the poly dT₁₉ tract [11]. Modified 5' and 3' ends were confirmed by sequencing and reintroduced into the full-length cDNA with appropriate restriction enzymes. The infectious cDNA clones constructed from KRT and RVi/Matsue.JPN/68 were named pKRT and pRViM, respectively.

2.4. Construction of cDNA clones of recombinant chimeric viruses and point mutation viruses

Recombinant cDNA clones based on pKRT and pRViM were generated by using appropriate restriction enzymes. Along with the genome structure of RV, we generated eight recombinant infectious cDNA clones designated pKRT-rec1–8. The recombinant construct pKRT-rec1 was generated by replacing the region from Hind III to Nco I (gp 5' end to 39) containing the 5' UTR sequence, respec-

tively. The recombinant rec2 and rec3 constructs which cover the entire ORF of the NSP genes (p150 and p90) were generated by replacing the region between the two Nco I sites (gp 39–4023) containing most of the p150 gene and the region from Bsm I to Not I (gp 3243–6623) containing most of the p90 gene, respectively. The recombinant rec4 construct was generated by replacing the region between the two PspX I sites (gp 6338–6557) containing the J-UTR sequence. As for the ORF of the SP genes, the recombinant rec5, rec6, and rec7 constructs were generated by replacing the region from Xmn I to Asc I (gp 6514–7319), Asc I to Pst I (gp 7319–8232), and Pst I to AsiS I (gp 8232–9457), for C, E2, and E1, respectively. The recombinant rec8 construct was generated by replacing the region from AsiS I to Eco RI (gp 9457–3' end) containing the 3' UTR sequence. To construct the recombinant cDNA clones in the p150 region, we generated the four recombinant constructs pKRT-p150 rec1, 2, 3, and 4 by using the restriction enzyme sites Mfe I (gp 126),

Table 2

Differences in amino acid residues of KRT and RVi/Matsue.JPN/68.

Coding region	Amino acid position	Strain		
		KRT	RVi/Matsue.JPN/68	
p150	295	A	T	
	407	S	G	
	466	L	F	
	483	A	T	
	674	V	I	
	717	L	S	
	739	P	H	
	740	S	L	
	751	V	A	
	777	E	G	
	790	V	A	
	795	G	D	
	961	V	A	
	1007	G	D	
p90	1042	H	Y	
	195	I	T	
Capsid	11	G	A	
	34	P	S	
	72	K	R	
	226	H	T	
E2	-6	V	A	
	7	H	D	
	14	P	L	
	104	S	P	
	105	L	F	
	122	S	A	
	234	P	S	
	235	P	S	
	E1	5	A	T
		177	D	N
203		M	L	
333		T	A	
398		R	A	