

Fig. 2. Recovery of the clone virus from an infectious cDNA clone of pKRT and the growth properties of the clone and original virus. (a) Recovery of infectious clone. Vero and RK13 cells were transfected with viral genomic RNA synthesized from pKRT. The culture medium was harvested and the infective titer was determined by the plaque assay. The average titer for two independent experiments is shown. (b) Growth kinetics of KRT and rKRT at 35 and 39°C. RK13 cells were infected at a MOI of 0.01. The culture medium was harvested and the infective titer was measured by the plaque assay. The results show the average for three independent experiments and the error bar indicates \pm standard deviation (SD). (c) Growth kinetics of RVi/Matsue.JPN/68 and rRViM at 35 and 39°C.

Nde I (gp 1872), Nhe I (gp 2803), Bsm I (gp 3243), and Eco RV (gp 4213), shown in Fig. 5.

There were three nucleotide substitutions with two amino acid changes [G and D at amino acid (a.a.) position 1007, H and Y at 1042] in the Nhe I-Bsm I region of p150 between the KRT strain and wild-type RVi/Matsue.JPN/68 strain. Nucleotide mutations were introduced either independently or in combination into pKRT by PCR amplification with the GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen), using as a forward primer, 5'-GCCGGCACCCTGGCGGACCGGCTCAGCG-3' (gp 3053–3082), and as a reverse primer, 5'-GGTCCGCGCGGTCGCCGGCGGGCAAGAT-3' (gp 3043–3072), for the mutation of G to A at gp 3060 (G to D at a.a. position 1007) and 5'-GGTGCGAAGTCTGCCGGAt-ACCGCGTCA-3' (gp 3147–3176) and 5'-CCGCGAGATTCGCACCC-CTGGCATCCGC-3' (gp 3135–3163) for the mutations of C to T at gp 3164 and C to T at gp 3166 (H to Y at a.a. position 1042, nucleotide mutations indicated in lower case). The three point-mutated viruses were designated G1007D, H1042Y and G1007D-H1042Y, respectively (Fig. 6). Two recombinant viruses H1042Y-RViM p90 and H1042Y-RViM SP were constructed, using the restriction enzyme sites Bsm I (gp 3243), Not I (gp 6623), Xmn I (gp 6514), and Eco RI (3' end) as shown in Fig. 7.

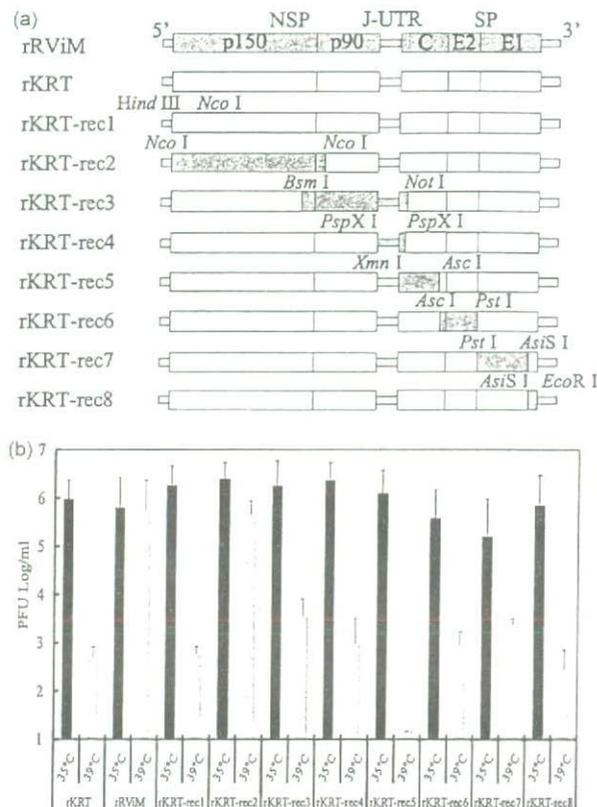


Fig. 3. Construction of a series of recombinant viruses based on rKRT and growth at 35 and 39°C. (a) Construction of rKRT-rec1–8 based on the rKRT. The genomic structure of RV is indicated in the panel. The broad boxes demonstrate ORFs containing the NSP (p150 and p90) at the 5' end and the SP (capsid, E2, and E1) at the 3' end. Narrow boxes between two ORFs indicate untranslated regions (5' UTR, J-UTR, and 3' UTR). A series of viruses, rKRT-rec1–8, based on rKRT backbone were constructed by replacing the fragments of rKRT with those of rRViM after digestion with appropriate restriction enzymes. Fragments derived from rRViM are shown as gray bars and from the rKRT backbone, as open bars. (b) Infectivity of respective recombinant viruses at 35 and 39°C. RK13 cells were infected at a MOI of 0.01. The culture medium was harvested at 96 hpi, and the infective titer was measured. The black columns indicate the infective titers at 35°C and the gray columns, those at 39°C. The average infective titers in three independent experiments are shown and the error bar indicates \pm SD.

2.5. Recovery of clone viruses from infectious cDNA clones of RV

The full-length viral genomic RNA was synthesized from the infectious cDNA clones with the mMESSAGE mMACHINE T7 kit (Applied Biosystems) following the instruction manual. Vero and RK13 cells were prepared at 8.0×10^5 cells/well in 6-well Plates 24 h before RNA transfection. After the cells were washed with 2.0 ml of OPTI-MEM, RNA transfection was carried out with a mixture of 12.5 μ g of synthesized RNA and 15.0 μ l of DMRIE-C (Invitrogen) in 1.0 ml of OPTI-MEM. After incubation at 35°C for 4 h, the mixture was removed and replaced with 2.0 ml of MEM containing 5% FBS. For calculating the recovery kinetics of clone viruses, a 100- μ l aliquot of culture fluid was harvested every 24 h until 120 h after transfection. The kinetics of infectious clone viruses was monitored with a plaque assay.

2.6. Analysis of temperature sensitivity

Monolayers of RK13 cells in 6-well plates were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01. After adsorption, each well was washed twice with 2.0 ml of PBS and replaced with 2.0 ml of MEM

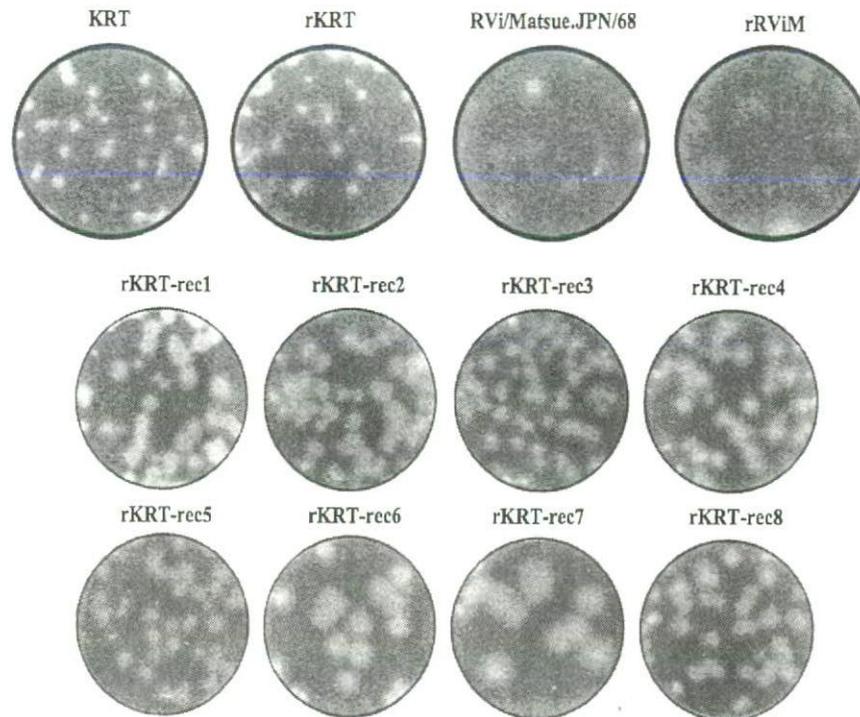


Fig. 4. The plaque morphology of rKRT, rRViM, the original KRT and RVi/Matsue.JPN/68, and the chimeric viruses. Plaques were visualized by fixation with a staining solution containing crystal violet.

containing 5% FBS and antibiotics. The plates were incubated at 35 or 39 °C in a 5% CO₂ incubator, and the culture medium was collected at 24, 48, 72, 96, or 120 h post-infection (hpi). The infective titer of the medium was determined by the plaque assay.

2.7. Viral titration by plaque assay

Monolayers of RK13 cells in 6-well plates were infected with 10-fold serial dilutions of samples. The inoculum was removed after 1 h of contact at room temperature and replaced with 3.0 ml of MEM containing 2% FBS, 40 µg/ml of DEAE dextran, 0.07% sodium bicarbonate, 0.7% agarose, penicillin 100 U/ml and streptomycin 100 U/ml. The plates were incubated at 35 °C in a 5% CO₂ incubator. On day 7 post-infection, plaques were visualized by staining with PBS containing 0.1% crystal violet and 4% formalin [9,14,15].

2.8. Nucleotide sequence accession numbers

The entire sequences of the KRT vaccine strain and wild-type RVi/Matsue.JPN/68 strain were submitted to the GenBank database with accession numbers AB222608 and AB222609, respectively.

3. Results

3.1. Identification of the full-length genome sequence of the KRT vaccine strain and wild-type RVi/Matsue.JPN/68 strain

The live attenuated rubella vaccine KRT was developed by passaging a wild-type rubella virus in rabbit cells. It has been reported that the progenitor wild-type virus of the KRT strain was isolated from a patient with rubella in Matsue city, Japan in 1968 [6]. Although the progenitor was not available, the RVi/Matsue.JPN/68 strain was isolated in the same city in the same year. Consequently, RVi/Matsue.JPN/68 was used as a reference for the wild-type of the

KRT strain in this study. KRT has a temperature sensitivity (*ts*) phenotype, while the wild-type strains have no temperature sensitivity (non-*ts*) phenotype. The *ts* phenotype of KRT means restricted viral replication at 39 °C [7]. Although little is known about the mechanism of *ts*, it is widely recognized that the phenotype relates to viral attenuation [7,16–19]. The genome of both the KRT and RVi/Matsue.JPN/68 strains was 9762 nt in length. Both genomes consisted of a 40-nt 5' UTR, 6348-nt NSP, 123-nt J-UTR, 3189-nt SP, and 62-nt 3' UTR, and were classified into the clade Ia. At the nucleotide level, the entire genomes of the two strains varied by 2.38% (232/9762 nt), while at the amino acid level, they varied by 1.04% (33/3179 a.a.). Tables 1 and 2 show the nucleotide and amino acid differences between the KRT and RVi/Matsue.JPN/68 viruses. Nucleotide differences in the E2 region were highest at 3.19% (27/846 nt) with 2.84% (8/282 a.a.) of amino acids differing. In each region 1.77–3.19% of nucleotides differed and 0.12–2.84% of amino acids differed.

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

Infectious cDNA clones were constructed from the KRT and RVi/Matsue.JPN/68 viruses (Fig. 1). The amplified cDNA fragments were cloned into pUC18 and these clones were assembled into a full-length cDNA clone by using appropriate restriction enzymes. To synthesize the viral RNA, the T7 promoter sequence and a polyA tract were introduced into the full-length cDNA clone. The infectious cDNA clones of KRT and RVi/Matsue.JPN/68 were named pKRT and pRViM, respectively.

Clone viruses of rKRT and rRViM were obtained after transfection of RNA synthesized *in vitro* from the infectious cDNA clones of RVs. To monitor the kinetics of recovery after the transfection of RNA into Vero and RK13 cells, aliquots were harvested and viral titers were determined by plaque assay (Fig. 2a). Maximum infec-

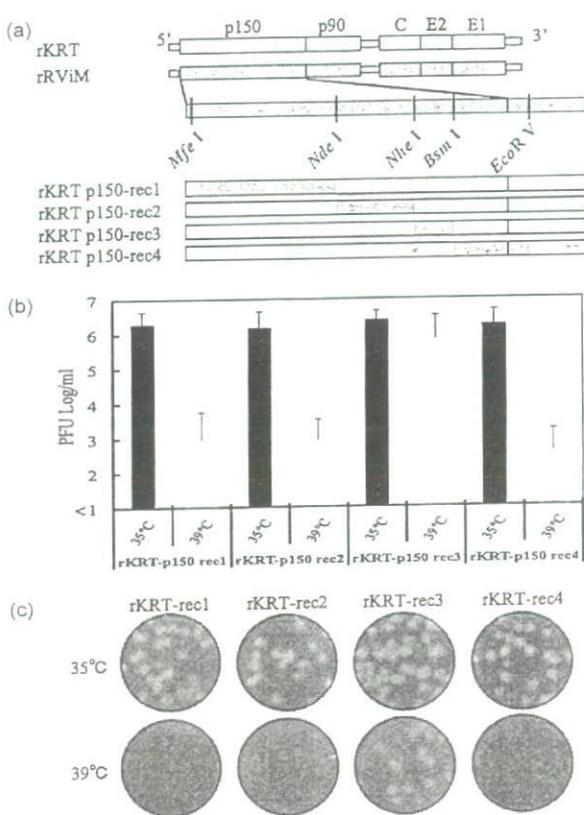


Fig. 5. Construction and characteristics of the recombinant viruses rKRT-p150-rec1~4. (a) Construction of a series of recombinant viruses in the p150 region based on rKRT and rRViM. Gray bars represent the regions derived from rRViM and open bars, those from rKRT. Four chimeric viruses were generated by introducing a part of the p150 region of rRViM into rKRT using appropriate restriction enzyme sites. (b) Infectivity of recombinant viruses. RK13 cells were infected with the rKRT p150 chimeric viruses. The black and gray columns show the infective titers at 35°C and 39°C, respectively. The average infective titer in three independent experiments is shown and the error bar indicates \pm SD. (c) Plaque assay. Panels at 35°C demonstrate the results of the plaque assay in 10^{-4} dilutions and panels at 39°C, these in 10^{-3} dilutions.

tivity of the infectious clone virus (rKRT), 1.0×10^6 PFU/ml, was obtained in Vero cells 96 h after transfection, while the peak of infectivity in RK13 cells reached 2.0×10^5 PFU/ml 72 h after transfection. Thereafter, the clone viruses were recovered at 96 h after transfection in Vero cells. The viruses were propagated within two passages in Vero cells and used for further experiments.

It has been reported that KRT had the *ts* phenotype but the wild-type strain did not [7]. The growth of KRT at 39°C decreased to 1/1000 of that at 35°C. The infectivity of RVi/Matsue.JPN/68 at 39°C was approximately 1/5 of that at 35°C. The growth patterns of the recombinant viruses, rKRT and rRViM, were similar to those observed for the original viruses (Fig. 2b and c).

The clone viruses were efficiently recovered from the infectious cDNA clone of the KRT vaccine strain and of the wild-type RVi/Matsue.JPN/68 strain. The clones retained the characteristics of the original viruses *in vitro*.

3.3. Construction of chimeric viruses and properties of viral replication at 35 and 39°C

In order to determine the genomic region responsible for the *ts* phenotype of the KRT vaccine strain, eight recombinant chimeric viruses were constructed based on rKRT, replacing parts of the KRT

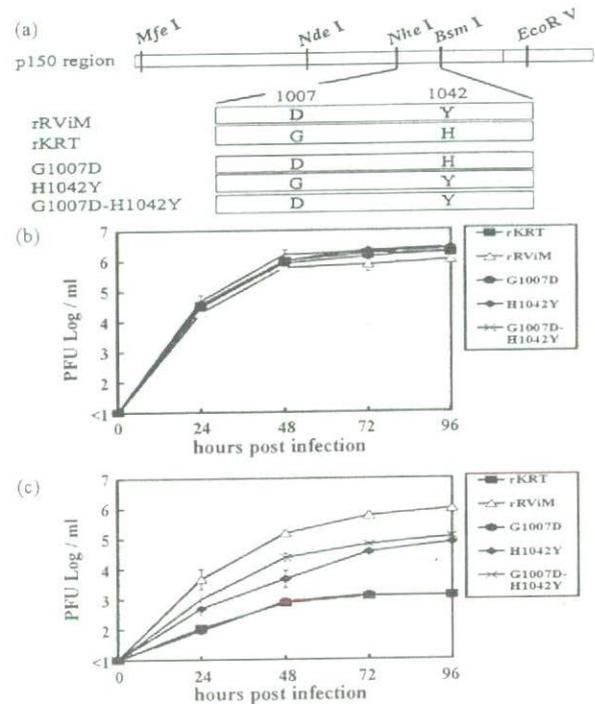


Fig. 6. Growth kinetics of point-mutated RVs at 35 and 39°C. (a) Amino acid differences in the Nhe I-Bsm I region of p150 between KRT and RVi/Matsue.JPN/68 and construction of mutated viruses. Mutated viruses were generated by introducing the amino acid residues of rRViM into rKRT. Three constructs, G1007D, H1042Y, and G1007D-H1042Y, are illustrated. (b) Growth kinetics of the mutated viruses at 35°C. The results show the average for three independent experiments and the error bar indicates the \pm SD. (c) Growth kinetics of mutated viruses at 39°C.

genome with the corresponding sequence of RVi/Matsue.JPN/68 (Fig. 3a). Suitable restriction enzymes were used in order to exchange the fragments of individual proteins and UTR regions between the KRT and RVi/Matsue.JPN/68 viruses. For example, rec2 was constructed by exchanging the amino acids in the p150 gene without exchanging those in the p90 gene.

To identify the region responsible for the *ts* phenotype, we examined the growth properties of the recombinant chimeric viruses (rKRT-rec1~8), rKRT, and rRViM, in RK13 cells at 35 and 39°C. As shown in Fig. 3b, the rKRT-rec1~8 chimeric viruses, except rec2, demonstrated a reduction in growth at 39°C and the difference in infective titer at 39°C versus 35°C varied from 1/100 to 1/10000, similar to that for rKRT. However, rKRT-rec2 grew well at 39°C in comparison with the other recombinant viruses, its infectivity being 1/10 that at 35°C. We also obtained complementary results with recombinant chimeric viruses based on rRViM (data not shown). Replacement of the p150 of rKRT with that of rRViM abrogated the *ts* phenotype and the introduction of the p150 of rKRT into rRViM reduced the growth at 39°C with less efficiency. Thus, the *ts* phenotype of KRT depends on the p150 region.

The morphology of plaques was reported to differ among strains [9,10,20,21], and such a difference between KRT and RVi/Matsue.JPN/68 is shown in Fig. 4. KRT produced mainly small plaques with sharp and clear margins, while RVi/Matsue.JPN/68 generated mainly large plaques with vague and opaque margins. The clone viruses, rKRT and rRViM, exhibited the same plaque morphology as the original viruses. In addition, the plaques differed in size among the recombinant chimeric viruses. Among a series of rKRT-recs, rKRT-rec1, 2, 3, 4, 5, and 8 showed similar plaques, while rKRT-rec6 and rec7 generated apparently large plaques with clear and sharp margins. These results suggested that the envelope

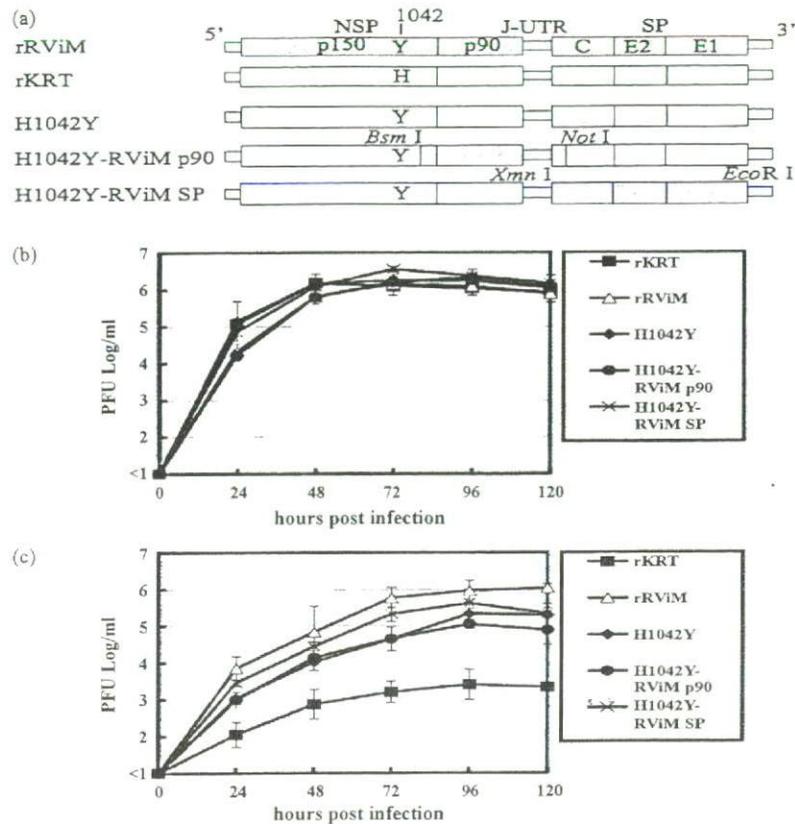


Fig. 7. Additive effect of other genomic regions on temperature sensitivity. (a) Construction of recombinant viruses (H1042Y-RViM p90 and H1042Y-RViM SP). The gray bars represent the fragments derived from rRViM and the white bars are those from rKRT. The recombinant viruses H1042Y-RViM p90 and H1042Y-RViM SP having the p90 and SP of rRViM together with the amino acid substitution H1042Y were generated, using the appropriate restriction enzyme sites (Bsm I, Not I, Xmn I, and Eco RI). (b) Growth kinetics of the recombinant viruses at 35°C. The infective titer is shown as the average for three independent experiments and the error bar indicates \pm SD. (c) Growth kinetics of recombinant viruses at 39°C.

proteins, E1 and E2, of RVi/Matsue.JPN/68 were relevant to large plaques.

3.4. Identification of the amino acid residue in p150 responsible for the temperature sensitivity

The chimeric viruses altered in the p150 region (rKRT-rec2) varied in *ts* phenotype. Since there were 15 amino acid differences in the p150 region between the two strains, four recombinant viruses (rKRT p150-rec1–4) were generated based on rKRT, replacing the fragments in the p150 region between rKRT and rRViM (Fig. 5a). The growth of the rKRT p150-recs was investigated at 35 and 39°C in RK13 cells and the results are shown in Fig. 5b and c. All rKRT p150-recs showed similar infectivity, over 10^6 PFU/ml at 35°C, but the infective titers of p150-rec1, 2, and 4 were less than 10^3 PFU/ml at 39°C. Only rKRT p150-rec3 demonstrated efficient growth, over 10^5 PFU/ml, at 39°C. rKRT p150-rec3 consisted of the fragment between Nhe I and Bsm I in the p150 region of rRViM which seemed to be relevant to the *ts* phenotype of KRT. There were two amino acid differences in the Nhe I-Bsm I region of p150 between the two strains, at positions 1007 and 1042 (see Table 2). The amino acid at position 1007 of p150 was changed from aspartic acid (D) in RVi/Matsue.JPN/68 to glycine (G) in KRT. The other at position 1042 was changed from tyrosine (Y) in RVi/Matsue.JPN/68 to histidine (H) in KRT. In order to decide the amino acid residue(s) responsible for the *ts* phenotype, three mutated viruses, G1007D, H1042Y, and G1007D-H1042Y, containing a substitution at position 1007, 1042, or both of RVi/Matsue.JPN/68, were constructed (Fig. 6a).

The growth kinetics at 35 and 39°C are shown in Fig. 6b and c. G1007D, H1042Y, and G1007D-H1042Y grew well at 35°C with similar titers, but G1007D showed poor growth similar to rKRT at 39°C. Whereas, H1042Y and G1007D-H1042Y showed more efficient growth at 39°C with 100-fold higher titers than rKRT. These results indicated that the histidine at position 1042 of p150 was responsible for the *ts* phenotype of the KRT.

3.5. Additive effect of other regions on the *ts*

The histidine at position 1042 of p150 was considered to be responsible for the *ts* phenotype of KRT, but the growth kinetics of H1042Y and G1007D-H1042Y at 39°C did not completely match that of rRViM. The peak infective titers of those viruses at 39°C were about 1/10 lower than those of rRViM (Fig. 6c). There remained the possibility that other gene(s) influenced the growth properties at restrictive temperatures in relation with the tyrosine at position 1042, thus we examined the additive effect of other gene(s) to allow better growth at 39°C. We constructed two additional recombinant viruses having p90 or structural proteins (SP) including capsid, E2, and E1 of RVi/Matsue.JPN/68 together with the substitution H1042Y (Fig. 7a). There was no difference in growth among the recombinant viruses (H1042Y, H1042Y-RViM p90 and H1042Y-RViM SP) at 35°C. The growth kinetics of H1042Y and H1042Y-RViM p90 showed a very similar pattern at 39°C, while the growth of H1042Y-RViM SP was greater than that of H1042Y, the maximum titer (at 96 hpi) approaching that of rRViM. These results suggested that the p90 of RVi/Matsue.JPN/68 had no additive effect with the

tyrosine at position 1042 of p150 on the growth at a restrictive temperature, whereas the SP region of RVi/Matsue.JPN/68 did have an additive effect.

4. Discussion

For the prevention of CRS and rubella epidemics, live attenuated rubella vaccines have been used in vaccination programs in many countries. Although these vaccines have high efficacy and a low incidence of adverse reactions, their attenuation mechanism is not well understood. A few studies reported replication properties, plaque morphology and cell tropism of the RA27/3 and Cendehill vaccine strains, leading to some insight into the attenuation. RA27/3 has been used widely for vaccination programs and was reported to have unique characteristics *in vitro*, probably related to the attenuation, in comparison with the wild-type virus (Therien strain). RA27/3 formed smaller plaques with lower growth than Therien due to mutations in the 5' UTR, the protease motif of p150, and the capsid region [8–10,22]. The Cendehill strain is known to cause acute arthritis at a very low incidence, a phenomenon that seems to correlate with a drastic reduction in growth in synovial cells compared with the wild-type virus [8,23]. Chantler et al. [20] also reported differences in plaque morphology and growth properties among rubella virus strains. All Japanese vaccines, RA27/3, and Cendehill, exhibit the *ts* phenotype, which is probably linked with immunogenic markers in rabbits and guinea pigs [7,16,20,24]. In some single positive strand RNA viruses, such as *Togaviridae* and *Flaviridae* family viruses: sindbis virus, semliki forest virus, tick-borne encephalitis virus and dengue virus, the *ts* phenotype was shown to be related to attenuation in animal models [17,19,25,26]. Therefore, the *ts* phenotype of the KRT vaccine strain was considered a biological marker of attenuation.

In this study, the biological characteristics of the KRT vaccine were compared with those of RVi/Matsue.JPN/68, which was isolated in the same city and year as the KRT progenitor. The genomes of both strains consisted of 9762 nt and there were 232 nucleotide differences with 33 amino acid changes between the two. These differences were more frequent than those between the TO-336 vaccine and TO-336 progenitor wild-type strains: Kakizawa et al. [27] reported that the two genomic sequences differed at 21 nt with 10 amino acid changes. Although KRT and RVi/Matsue.JPN/68 belong to genotype Ia of rubella virus, consisting of the RA27/3, Cendehill, and TO-336 vaccine strains, and other wild-type strains, none of the mutations observed in KRT was common to those vaccine strains [8,27–32]. Thus, the region(s) responsible for the *ts* phenotype would differ among vaccine strains.

In order to investigate the genetic determinant(s) of the *ts* phenotype in KRT, we developed a RG system with KRT and RVi/Matsue.JPN/68. There were significant biological differences between KRT and RVi/Matsue.JPN/68. The clone virus, rKRT, and its original virus produced small plaques with sharp and clear margins, while rRViM and its original virus produced large plaques with vague and opaque margins. rKRT, rRViM, and their original viruses grew well at 35 °C without any changes in growth kinetics, but the growth kinetics differed significantly at 39 °C. The clones, rKRT and rRViM, showed the same biological characteristics as the original viruses.

A series of recombinant viruses (rKRT-rec1–8) based on rKRT and rRViM were generated, to investigate the contribution of individual regions of the genome to the *ts* phenotype of KRT. rKRT-rec2 (replacement of the p150 region) differed in phenotype from the original virus, however, the others showed similar growth properties to the parental viruses. We also found that some parts of

the genome affected the morphology of plaques in the process of detecting the region responsible for the *ts* phenotype. The difference in the morphology of the plaques between the two strains was determined with crystal violet staining. Crystal violet stains living cells, and therefore plaque morphology, e.g. vague, opaque, clear and sharp may reflect apoptotic cell distribution, probably related to the difference in the regulation of viral replication and cytopathic effect between the two strains. Moreover, the introduction of E1 and E2 proteins of RVi/Matsue.JPN/68 changed the small plaques of rKRT to large ones. E1 and E2 having N-linked glycosylation sites (Asn-X-Ser/Thr) form heterodimers and compose the viral particle. After the formation of the heterodimer, N-linked glycosylation occurred during transport to the budding site. E1 and E2 play a key role in budding at the plasma membrane of infected cells, and the attachment to and entry of an uninfected cell occur through the fusion activity of these proteins [33,34]. It has also reported that the formation of the heterodimer and N-linked glycosylation influence infectivity and membrane fusion activity [35–41]. There were 13 amino acid differences in the E1 and E2 proteins, one of which was in the predicted N-linked glycosylation site at amino acid position of the E1 region (Table 2). This difference causes the absence of one predicted N-linked glycosylation site in E1 of KRT. As a result, two predicted N-linked glycosylation sites exist in the E1 region of KRT and three sites in that of RVi/Matsue.JPN/68, and a difference in the molecular weight of E1 between the two strains was observed by Western blotting (data not shown). The recombination of E1 and E2 (rKRT-rec6 and rec7) obviously altered plaque size. Thus, the large plaques of RVi/Matsue.JPN/68 might suggest an efficient expansion of infection *in vitro*. The different numbers of predicted N-linked glycosylation sites and amino acid changes may be involved in the membrane fusion activity and conformational change of those proteins leading to an influence on viral spread from cell to cell. Further investigation is required to clarify whether the characteristic morphology of plaques is correlated with the attenuation process.

There are 15 amino acid differences in the p150 region between the KRT and RVi/Matsue.JPN/68 strains. Four recombinant viruses (rKRT p150-rec1–4) and mutated viruses (G1007D, H1042Y, and G1007D-H1042Y) demonstrated that the histidine at position 1042 was critical for the *ts* phenotype of KRT. Although the growth of the H1042Y mutant was 100-fold greater than that of rKRT at 39 °C, the peak infective titer was 1/10 that of rRViM. Therefore, the additive effect of the other region(s) on growth at 39 °C was investigated, together with H1042Y. Although the p90 region of RVi/Matsue.JPN/68 had no additive effect on the *ts* phenotype, SP (structural proteins: capsid, E2, and E1) exhibited an additive effect on replication at 39 °C. The reduction in peak titer of the H1042Y mutant may be due to the differences in genetic background between KRT and RVi/Matsue.JPN/68.

In this study, we did not evaluate the effect of this histidine on p150 and the defective viral life cycle. The p150 region encodes a methyltransferase motif having a role in the capping of viral RNA and a cysteine protease domain that cleaves a precursor p200 polyprotein to p150 and p90 proteins as functional units. Balistreri et al. [42] reported that variation in the *ts* phenotype of Semliki forest virus having mutations in the protease domain indicated a great reduction of protease activity compared to the wild-type virus at a restricted temperature. The change in the *ts* phenotype of Sindbis virus with mutations in the protease domain reduced subgenomic RNA synthesis [43–46]. These reports provided new insights into the mechanism of the *ts* of KRT. Because the histidine at position 1042 is located in the protease domain, it may cause defects in NSP processing or viral RNA replication; synthesis of negative strand RNA (cRNA), subgenomic RNA, and progenitor genomic RNA.

Acknowledgements

We would like to thank F. Momose, PhD and Y. Morikawa, PhD for their matchless technical competence and thoughtful advice.

References

- [1] Chantler J, Wolinsky JS, Tingle A. Rubella virus. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*, 4th edition Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 963–90.
- [2] Frey TK. Molecular biology of rubella virus. *Adv Virus Res* 1994;44:69–160.
- [3] Banatvala JE, Brown DW. Rubella. *Lancet* 2004;363(9415):1127–37.
- [4] WHO. Rubella vaccines. WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 2000.
- [5] Plotkin SA. Rubella eradication. *Vaccine* 2001;19(25–26):3311–9.
- [6] Shishido A, Ohtawara M. Development of attenuated rubella virus vaccines in Japan. *Jpn J Med Sci Biol* 1976;29(October (5)):227–53.
- [7] Ohtawara M, Kobune F, Umino Y, Sugiura A. Inability of Japanese rubella vaccines to induce antibody response in rabbits is due to growth restriction at 39 degrees C. *Arch Virol* 1985;83(3–4):217–27.
- [8] Lund KD, Chantler JK. Mapping of genetic determinants of rubella virus associated with growth in joint tissue. *J Virol* 2000;74(January (2)):796–804.
- [9] Pugachev KV, Abernathy ES, Frey TK. Improvement of the specific infectivity of the rubella virus (RUB) infectious clone: determinants of cytopathogenicity induced by RUB map to the nonstructural proteins. *J Virol* 1997;71(January (1)):562–8.
- [10] Pugachev KV, Galinski MS, Frey TK. Infectious cDNA clone of the RA27/3 vaccine strain of Rubella virus. *Virology* 2000;273(1):189–97.
- [11] Tzeng WP, Frey TK. Complementation of a deletion in the rubella virus p150 nonstructural protein by the viral capsid protein. *J Virol* 2003;77(September (17)):9502–10.
- [12] Yao J, Gillam S. Mutational analysis, using a full-length rubella virus cDNA clone, of rubella virus E1 transmembrane and cytoplasmic domains required for virus release. *J Virol* 1999;73(June (6)):4622–30.
- [13] Wang CY, Dominguez G, Frey TK. Construction of rubella virus genome-length cDNA clones and synthesis of infectious RNA transcripts. *J Virol* 1994;68(June (6)):3550–7.
- [14] Fogel A, Plotkin SA. Markers of rubella virus strains in RK13 cell culture. *J Virol* 1969;3(February (2)):157–63.
- [15] Umino Y. Improved potency assay of rubella vaccine: parameters for plaque formation. *J Virol Methods* 1995;51(February (2–3)):317–28.
- [16] Plotkin SA, Cornfeld D, Ingalls TH. Studies of immunization with living rubella virus. Trials in children with a strain cultured from an aborted fetus. *Am J Dis Child* 1965;110(October (4)):381–9.
- [17] Schluter B, Bellomy B, Brown A. Pathogenesis of temperature-sensitive mutants of sindbis virus in the embryonated egg. I. Characterization and kinetics of viral multiplication. *Infect Immun* 1974;9(January (1)):68–75.
- [18] Krieger JN, Scherer WF, Wiebe ME, Pancake BA, Harsanyi ZP. A hamster-attenuated, temperature-sensitive mutant of Venezuelan encephalitis virus. *Infect Immun* 1979;25(September (3)):873–9.
- [19] Ehrengreber MU, Renggli M, Raineteau O, Hennou S, Vaha-Koskela MJ, Hinkkanen AE, et al. Semliki Forest virus A7(74) transduces hippocampal neurons and glial cells in a temperature-dependent dual manner. *J Neurovirol* 2003;9(February (1)):16–28.
- [20] Chantler JK, Lund KD, Miki NP, Berkowitz CA, Tai G. Characterization of rubella virus strain differences associated with attenuation. *Intervirology* 1993;36(4):225–36.
- [21] Kouri G, Aguilera A, Rodriguez P, Korolev M. A study of microfoci and inclusion bodies produced by rubella virus in the RK-13 cell line. *J Gen Virol* 1974;22(January (1)):73–80.
- [22] Pugachev KV, Frey TK. Effects of defined mutations in the 5' nontranslated region of rubella virus genomic RNA on virus viability and macromolecule synthesis. *J Virol* 1998;72(January (1)):641–50.
- [23] Miki NP, Chantler JK. Differential ability of wild-type and vaccine strains of rubella virus to replicate and persist in human joint tissue. *Clin Exp Rheumatol* 1992;10(January-February (1)):3–12.
- [24] Linnemann Jr CC, Hutchinson L, Rotte TC, Hegg ME, Schiff GM. Stability of the rabbit immunogenic marker of RA 27-3 rubella vaccine virus after human passage. *Infect Immun* 1974;9(March (3)):547–9.
- [25] Romyantsev AA, Murphy BR, Pletnev AG. A tick-borne Langat virus mutant that is temperature sensitive and host range restricted in neuroblastoma cells and lacks neuroinvasiveness for immunodeficient mice. *J Virol* 2006;80(February (3)):1427–39.
- [26] Blaney Jr JE, Johnson DH, Firestone CY, Hanson CT, Murphy BR, Whitehead SS. Chemical mutagenesis of dengue virus type 4 yields mutant viruses which are temperature sensitive in vero cells or human liver cells and attenuated in mice. *J Virol* 2001;75(October (20)):9731–40.
- [27] Kakizawa J, Nitta Y, Yamashita T, Ushijima H, Katow S. Mutations of rubella virus vaccine TO-336 strain occurred in the attenuation process of wild progenitor virus. *Vaccine* 2001;19(April (20–22)):2793–802.
- [28] Zhou Y, Ushijima H, Frey TK. Genomic analysis of diverse rubella virus genotypes. *J Gen Virol* 2007;88(March (Pt 3)):932–41.
- [29] Frey TK, Abernathy ES, Bosma TJ, Starkey WG, Corbett KM, Best JM, et al. Molecular analysis of rubella virus epidemiology across three continents, North America, Europe, and Asia, 1961–1997. *J Infect Dis* 1998;178(September (3)):642–50.
- [30] Pugachev KV, Abernathy ES, Frey TK. Genomic sequence of the RA27/3 vaccine strain of rubella virus. *Arch Virol* 1997;142(6):1165–80.
- [31] Dominguez G, Wang CY, Frey TK. Sequence of the genome RNA of rubella virus: evidence for genetic rearrangement during togavirus evolution. *Virology* 1990;177(July (1)):225–38.
- [32] Clarke DM, Loo TW, Hui I, Chong P, Gillam S. Nucleotide sequence and in vitro expression of rubella virus 24S subgenomic messenger RNA encoding the structural proteins E1, E2 and C. *Nucleic Acids Res* 1987;15(April (7)):3041–57.
- [33] Doms RW, Lamb RA, Rose JK, Helenius A. Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology* 1993;193(April (2)):545–62.
- [34] Anthony RP, Brown DT. Protein–protein interactions in an alphavirus membrane. *J Virol* 1991;65(March (3)):1187–94.
- [35] Ramanujam M, Hofmann J, Nakhasi HL, Atreya CD. Effect of site-directed asparagine to isoleucine substitutions at the N-linked E1 glycosylation sites on rubella virus viability. *Virus Res* 2001;81(December (1–2)):151–6.
- [36] Law LM, Duncan R, Esmaili A, Nakhasi HL, Hobman TC. Rubella virus E2 signal peptide is required for perinuclear localization of capsid protein and virus assembly. *J Virol* 2001;75(February (4)):1978–83.
- [37] Yao J, Gillam S. A single-amino-acid substitution of a tyrosine residue in the rubella virus E1 cytoplasmic domain blocks virus release. *J Virol* 2000;74(April (7)):3029–36.
- [38] Qiu Z, Tufaro F, Gillam S. The influence of N-linked glycosylation on the antigenicity and immunogenicity of rubella virus E1 glycoprotein. *Virology* 1992;190(October (2)):876–81.
- [39] Qiu Z, Yao J, Cao H, Gillam S. Mutations in the E1 hydrophobic domain of rubella virus impair virus infectivity but not virus assembly. *J Virol* 2000;74(July (14)):6637–42.
- [40] Garbutt M, Law LM, Chan H, Hobman TC. Role of rubella virus glycoprotein domains in assembly of virus-like particles. *J Virol* 1999;73(May (5)):3524–33.
- [41] Yang D, Hwang D, Qiu Z, Gillam S. Effects of mutations in the rubella virus E1 glycoprotein on E1–E2 interaction and membrane fusion activity. *J Virol* 1998;72(November (11)):8747–55.
- [42] Balistreri G, Caldentey J, Kaariainen L, Ahola T. Enzymatic defects of the nsP2 proteins of Semliki Forest virus temperature-sensitive mutants. *J Virol* 2007;81(March (6)):2849–60.
- [43] Lulla V, Merits A, Sarin P, Kaariainen L, Keranen S, Ahola T. Identification of mutations causing temperature-sensitive defects in Semliki Forest virus RNA synthesis. *J Virol* 2006;80(March (6)):3108–11.
- [44] Suopanki J, Sawicki DL, Sawicki SG, Kaariainen L. Regulation of alphavirus 26S mRNA transcription by replicase component nsP2. *J Gen Virol* 1998;79(February (Pt 2)):309–19.
- [45] De I, Sawicki SG, Sawicki DL. Sindbis virus RNA-negative mutants that fail to convert from minus-strand to plus-strand synthesis: role of the nsP2 protein. *J Virol* 1996;70(May (5)):2706–19.
- [46] Hahn YS, Strauss EG, Strauss JH, Rice CM, Levis R, Huang HV. Mapping of RNA-temperature-sensitive mutants of Sindbis virus: assignment of complementation groups A, B, and G to nonstructural proteins Production of infectious RNA transcripts from Sindbis virus cDNA clones: mapping of lethal mutations, rescue of a temperature-sensitive marker, and in vitro mutagenesis to generate defined mutants. *J Virol* 1989;63(7):3142–50.

麻疹・風疹・ムンプス（流行性耳下腺炎） ・水痘感染対策：抗体測定とその評価

国立病院機構三重病院 院長 庵原俊昭

要旨

麻疹・風疹・ムンプス・水痘は、ワクチン接種により集団免疫率を高めると、流行の排除が可能な感染症である。個人の免疫状態を評価するには、酵素免疫法（EIA）が優れており、麻疹では中和法（NT）、風疹では赤血球凝集抑制法（HI）、水痘では免疫付着赤血球凝集法（IAHA）がEIAと同じ感度をもっている。麻疹・風疹・ムンプス・水痘抗体価には、抗体陽性レベル、発症予防レベル、感染予防レベルがあり、発症予防レベル未満の人にはワクチン接種が勧められる。EIA法の発症予防レベルは、いずれの感染症でも4.0EIA価と推定されている。

成人の麻疹・風疹・ムンプス・水痘発症時には確定診断が大切である。ワクチン後の自然罹患や再感染が疑われるときは、IgM抗体、IgG抗体の測定およびウイルス分離を行なうべきである。再感染時の免疫状態に応じて、再感染時でも急性期のIgM抗体は検出され、IgG抗体も必ずしも高値を示さないときがある。なお、再感染者の臨床症状は軽症なことが多く、臨床経過に応じて登校停止期間を判定すべきである。

はじめに

麻疹・風疹・ムンプス（流行性耳下腺炎）・水痘は小児の4大ウイルス感染症と呼ばれ、いずれも有効な生ワクチンが市販されている。定

期接種となっている麻疹や風疹では、小児の流行規模は小さくなっているが、任意接種であるムンプスや水痘では接種率が30%程度であり、小児での流行が持続している。人から人に感染するワクチン予防可能疾患では、小児の接種率が中途半端に上昇すると、流行間隔は延長し、流行時の発症者にしめる思春期の人や成人の割合が増加する¹⁾。2007年の高校生や大学生の麻疹流行は、このような状況下でおこった流行である。本稿では、抗体測定を中心に麻疹・風疹・ムンプス・水痘（MRMV）感染対策について解説する。

MRMV 感染予防対策

MRMVのように人から人に感染する感染症では、集団の免疫率を高めて流行をコントロールする集団レベルの感染対策と、個人個人の免疫力を評価し、その免疫力に応じて対策を図る個人レベルの感染対策とがある。

A. 集団レベルの感染対策

MRMVとも自然宿主は人のみであり、高い接種率で2回ワクチンを接種すると、流行の排除が可能な疾患である。MRMVワクチンで期待される高い接種率とは、流行を阻止するための集団免疫率を越える接種率である。MRMVの集団免疫率を表1に示した^{1, 2)}。麻疹の集団免疫率を越える接種率で麻疹・風疹混合（MR）ワクチンを接種すると、麻疹だけではなく風疹

(表1) 麻疹・風疹・ムンプス・水痘の疫学と感染対策

	麻疹	風疹	ムンプス	水痘
集団免疫率 (%)	90~95	80~85	85~90	90
流行間隔 (年) *	2	6~9	3~4	毎年
潜伏期間 (日) 通常	8~12	16~18	16~18	14~16
最大	~18	~23	~25	~21
感染期間 (日)	-5~4	-5~7	-2~5	-2~5
感染対策				
曝露前	ワクチン	ワクチン	ワクチン	ワクチン
曝露後: ワクチン	有効†	有効‡	無効¶	有効†
γグロブリン	0.25ml/kg	0.55ml/kg	無効	IGIV

IGIV: 静注用γグロブリン

* ワクチンが広く使用される前

† 曝露後72時間以内に接種

‡ 理論上有効

¶ 発症予防効果は劣るが、流行を早期に終息させる効果はある

の流行排除も可能である。

中途半端な接種率とはMRMVの集団免疫率を少し下回る接種率である。人から人に感染する感染症では、感受性者が蓄積すると流行が再燃する。ワクチンが広く行なわれていないときの流行間隔を表1に示した。ワクチンにより免疫を獲得する人の割合が増加すると流行間隔が延長し、結果としてワクチンを受けていない人、ワクチンを受けたがワクチンによる免疫を獲得していない人（一次性ワクチン不全, PVF）、ワクチンにより獲得した免疫が発症予防閾値以下に低下した人（二次性ワクチン不全, SVF）が思春期や成人に蓄積し、一度感染が高校や大学に持ち込まれると流行が拡大する。麻疹ワクチン接種率から推定される、PVFおよびSVFを含めた大学生の麻疹感受性者率は10~20%である。

麻疹ワクチンの接種率が高い米国での流行調査では、成人発症者の多くはワクチン未接種者であり、2回ワクチン接種者の発症率は極めてまれである³⁾。また、ムンプス流行時の調査でも、ムンプスウイルスを含むワクチンの2回接種者の発症率は、1回接種者の発症率よりも有意に低率である⁴⁾。

B. 個人レベルの感染対策

既往歴やワクチン歴から免疫状態を推定するとき、水痘の既往歴は信頼がおけるが、流行が

小さくなった麻疹、類似した臨床症状がある風疹やムンプスの既往歴には注意が必要である。地域や園、学校での流行時に罹患した麻疹、風疹、ムンプスは本物である可能性が高いが、流行がないときの罹患の多くは他の疾患によるものである。1歳未満の風疹は、多くは突発性発疹の誤解である。

ワクチン歴に関しても母子手帳の記録は信用できるが、記録がないワクチン歴の報告は、原則ワクチン歴不明と判断し、未接種者として取り扱う。MRMVの既往歴・ワクチン歴を覚えているのは学生の約半数である⁵⁾。

流行時の発症歴がある者、MRMVワクチン歴が1回でもある者は、免疫があると判断する。既往歴やワクチン歴が不明な者、ワクチン後の抗体持続に不安を感じる者は、抗体測定を行なう必要がある。

抗体測定の基本は、生物学的活性を持った抗体を測定する中和 (NT) 法である⁶⁾。しかし、NT法は測定に用いる細胞とウイルスの組み合わせにより、抗体価が低く検出される危険性や、手間と時間がかかる欠点がある。麻疹や風疹などは、ウイルスが細胞に感染するときヘマアグルチニンが重要な役割を果たしている。このタンパクの働きを抑制する抗体を測定している赤血球凝集抑制 (HI) 法も、生物学的活性を持った抗体を測定する方法である。HI法は

(表2) MRMV の免疫状態を調べるときの抗体測定方法

測定方法	麻疹	風疹	ムンプス	水痘
mNT	◎	○*	○	○*
EIA	◎	◎	◎	◎
HI	△	◎	×	-†
IAHA	-	-	-	◎
CF	×	×	×	×

mNT：マイクロ中和法，EIA：酵素抗体法，HI 赤血球凝集抑制法，IAHA：免疫付着赤血球凝集法，CF：補体結合法

◎：適切な方法，○：手間がかかるが適切な方法，△：感度が劣る方法，×：不適切な方法

* コマーシャルラボでは測定していない

† 当該ウイルスに対する測定系がない

(表3) MRMV の発症予防と感染予防レベル

	測定方法	抗体価*		
		陽性	発症予防	感染予防
麻疹	mNT	≥ 2 倍	≥ 4 倍	≥ 32 倍
	EIA-IgG	≥ 2.0	≥ 4.0	≥ 16.0
風疹	HI	≥ 8 倍	≥ 8 倍†	≥ 64 倍
	EIA-IgG	≥ 2.0	≥ 4.0	≥ 16.0
ムンプス	EIA-IgG	≥ 2.0	≥ 4.0	≥ 16.0
水痘	IAHA	≥ 2 倍	≥ 4 倍‡	≥ 32 倍‡
	EIA-IgG	≥ 2.0	≥ 4.0	≥ 16.0

* 多くの人で推定される抗体レベル

† 風疹 HI8 倍 (15IU) では、時に非特異凝集がある

‡ 麻疹 mNT 抗体の結果から推定されるレベル

ウイルスの種類により感度が低くなる欠点がある。

MRMV に対する免疫の有無を調べるには、感度よく多量の検体を短時間に測定できる酵素免疫法 (EIA) が優れている (表2)。EIA 法は抗原と結合する抗体のタンパク量を測定しており、生物学的抗体量とは必ずしも一致しない問題点や、高い抗体価が低めに測定される欠点がある。しかし、抗体の陽性閾値は NT 法と一致するように設定されており、抗体陰性や低い陽性レベルの抗体価は NT 法とよく一致している。なお、補体結合 (CF) 抗体は感染後比較的早期に消失するため、CF 法を免疫の確認に用いるのは不適切である。

免疫の有無を調べるための MRMV の適切な抗体測定方法を表2に、MRMV ワクチン要接種者の判定基準を表3に示した。

免疫を確認する方法として、麻疹では NT 法と EIA 法が優れている。NT 法や EIA 法と比較

すると、麻疹 HI 法の感度は80%程度であり、陽性率は低下するが、HI 抗体陽性者は全例 NT 法および EIA 法で陽性である^{6,7)}。なお、保検適応は受けていないが、最近一部のコマーシャルラボで受身凝集 (PA) 法を用いて、麻疹抗体が測定されるようになった。PA 法の抗体陽性閾値は16倍であるが、麻疹 NT 抗体2倍に相当する PA 抗体価は128倍であり、発症予防閾値は256倍と推定されている¹⁸⁾。

風疹では HI 法と EIA 法が優れている。ムンプスでは HI 法の抗体陽性率は EIA 法と比較すると50%と低く、EIA 法が優れている⁸⁾。水痘では EIA 法と免疫付着赤血球凝集 (IAHA) 法が優れている。IAHA では時に非特異凝集のため判定困難な場合があり、このときは EIA 法で測定する。なお、適切な方法で測定したときの成人の抗体陽性率は、麻疹98%、風疹94%、ムンプス85%、水痘98%であり、ムンプスが一番低率である⁷⁾。

感染者と接触した場合、免疫のある人すべてにブースターがかかるのではなく、その人の免疫状態に応じて臨床反応や免疫反応が異なっている。接触時の臨床反応と抗体反応やワクチン接種後の抗体反応から、MRMVの抗体レベルには、通常の臨床症状が出現するレベル（抗体陰性）、発症するが軽症で経過し抗体価の上昇がおこるレベル（軽症発症レベル）、発症しないが抗体価の上昇がおこるレベル（発症予防抗体ブースターレベル）、発症もせず抗体価の上昇もおこらないレベル（感染予防レベル）の4段階が存在する^{1, 8)}。MRMVの感染防御や発症防御には抗体だけではなく特異的細胞性免疫も関与しているため、厳密にこれらのレベルを線引きできないが、麻疹ではおよそその抗体レベルが示されている。麻疹の抗体陽性レベルは $\geq 75\text{mIU}$ （NT ≥ 2 倍、EIA $\geq 2.0\text{EIA}$ 価）、発症予防レベルは $\geq 120\text{mIU}$ （NT ≥ 4 倍、EIA $\geq 4.0\text{EIA}$ 価）、感染予防レベルは $\geq 800\text{mIU}$ （NT ≥ 32 倍、EIA $\geq 16.0\text{EIA}$ 価）であり、発症予防レベルは抗体陽性レベルの2倍となっている。なお、EIA抗体は必ずしも感染防御能を反映していないこと、麻疹EIA-IgG抗体4.0～5.3EIA価の人が2年後に麻疹を発症したことなどから、麻疹EIA-IgG抗体8EIA価未満にワクチンを接種するという意見もあるが¹⁹⁾、多くの人（98%）の発症が予防できる抗体価はNT抗体4倍であり、その値に相当するEIA-IgG抗体は4.0EIA価である。

麻疹の抗体陽性レベル、発症予防レベルから推測されるMRMVの発症予防レベルを表3に示した。陽性閾値の2倍が発症予防閾値であり、この値より低い人は曝露を受けると発症する危険性があるため、ワクチン接種が勧められる。なお、MRワクチンの追加接種の成績から推測される風疹の感染予防レベルは、HI ≥ 64 倍、EIA $\geq 16.0\text{EIA}$ 価である^{9, 10)}。

MRMV 感染時対策

MRMVの流行が高校や大学で始まったとき、パニックに陥らないよう集団レベルおよび個人

レベルの適切な対応が必要である。

A. 集団レベルの感染時対策

大学生のMRMV抗体陽性率は80%以上であり、MRMV患者発症時の適切な流行阻止対策は、発症者の登校停止と未罹患未接種者の登校停止および早期ワクチン接種の勧奨である¹¹⁾。MRMV発症者は少なくとも発症2日前から周囲に感染させており（表1）、感染拡大を防ぐには、発症リスクが高い未罹患未接種者の登校停止が大切である。未罹患未接種者の登校停止期間は、一般には通常の潜伏期間を越えるまでであるが、米国では最大の潜伏期間を越えるまでとしている¹²⁾。なお、学校内三次感染を予防するために行なう学級閉鎖や学校閉鎖の期間は、通常の潜伏期間を越えるまでが適切であり、発症者を認めてから数日間の閉鎖は無意味である。

多くの者が免疫を有していると、一人が発症したとしても周囲へ感染は拡大しないので、MRMV発症を認めたとき、未罹患未接種者にワクチン接種を勧めることは、流行の拡大防止および早期終結に有用な方法である。緊急にワクチンを接種した者は登校を許可する。

B. 個人レベルの感染時対策

1. MRMVの血清診断

成人のMRMV発症にあたっては、ウイルス学的に診断を確認することが大切である。ウイルス学的な確定診断の方法は、①IgM抗体の検出（EIA法）、②抗体の有意上昇（HI、NT、IAHAでは2管（4倍）以上の上昇、EIAでは2倍以上の上昇）、③末梢血単核球、咽頭（ムンプスでは唾液、水痘では水泡）などからのウイルス分離である⁶⁾。早期診断にはIgM抗体の検出が適している（表4）。同じ全身性ウイルス感染症でも、麻疹、風疹、水痘とムンプスでは病態が異なっている。ムンプスではほとんどの初感染者はIgM抗体が検出されるが、麻疹では初感染者でも発症早期のIgM抗体陽性率は80%程度であり、臨床的に否定できないときは数日後に再検査する必要がある^{13, 14)}。

ワクチン接種後の自然罹患や自然感染の再感

(表4) MRMV 感染急性期の抗体反応

感染症	感 染	IgM 抗体	IgG 抗体
麻疹・風疹・ 水痘	初感染	- ~ + + *	-
	ワクチン後感染または再感染		
	低い免疫状態†	+	+
	やや低い状態	-	+++
ムンプス	初感染	+ + ~ + + +	+
	ワクチン後感染または再感染		
	低い免疫状態	+	+++
	やや低い免疫状態	-	+++

* 麻疹の急性期 IgM 抗体陽性率は70%

† 再感染時の免疫状態

(表5) 麻疹・風疹・ムンプス・水痘の登校停止期間

	日 本	米 国
麻疹	解熱後3日を経過するまで*	発疹出現後4日間
風疹	紅斑性発疹が消失するまで	発疹出現後7日間
ムンプス	耳下腺腫脹が消失するまで*	耳下腺腫脹後9日間
水痘	すべての発疹が痂皮化するまで*	発疹出現後5日間または発疹が痂皮化するまで

* 症状により伝染のおそれがないと認められたときはこの限りではない

染を疑うときは、IgM 抗体測定に加え、IgG 抗体測定とウイルス分離を同時に行う方が好ましい。SVF や再感染の場合、感染時に有している免疫状態に応じて、臨床反応や抗体反応に色々なパターンが認められる。抗体価が陰性レベルに近いときは、体内で増殖するウイルス量が多くなり、臨床症状も通常経過に近く、発症時 IgM 抗体が低いながらも検出されるが、IgG 抗体は陽性であり、数日後には急上昇している¹⁵⁾。一方、抗体価が発症予防レベルに近いときは、体内で増殖するウイルス量も少なく、臨床症状も軽症であり、発症時の抗体反応は IgM 抗体陰性で IgG 抗体は上昇している。

2. 発症後および曝露後の対応 (表1)

本邦と米国の感染発症後の登校停止期間を表5に示した。本邦における停止期間は、もっぱら周囲へ伝染させるリスクが高い期間である。ワクチン後の自然感染例では軽症化するので、主治医が症状により伝染のおそれがないと認め

たときは登校が許可される。

麻疹では20分間、水痘では60分間(顔と顔を会わせては5分間)同じ部屋にいと感染する¹⁶⁾。伝染力から推測される風疹とムンプスの伝染期間は、水痘よりも長い60分間以上であり、仲の良い人から感染する。麻疹と水痘では曝露後72時間以内にワクチンを接種すれば発症が予防される。風疹でも理論上72時間以内に接種すれば発症予防すると考えられている。ムンプスでは、曝露当日に接種しても発症予防効果は57%であるが、発症したとしても軽症化が期待される¹⁷⁾。

免疫不全者や妊娠している人には生ワクチン接種は禁忌であり、 γ グロブリン投与が勧められている。麻疹では γ グロブリンの効果が認められており、風疹や水痘でも効果が期待されている。水痘予防に対して水痘高単位 γ グロブリンが米国では使用されており、市販されていない本邦では静注用 γ グロブリン(IVIG)が代

用されている。水痘発症予防の投与量は確立されていないが、一般に200~400mg/kgが使用されている。なおムンプスに対してはγグロブリン、IVIGともに無効である。

まとめ

高校や大学における麻疹・風疹・ムンプス・水痘の感染予防対策について解説した。麻疹と風疹は、MRワクチンの補足的接種による2回接種により流行阻止が期待されている。また、ムンプスと水痘では、思春期になっても未罹患の人には、発症時の重篤度を考えワクチン接種が勧められる。

引用文献

- 1) 庵原俊昭. 小児感染症の基本的考え方. 日本小児皮膚科学会雑誌25 : 93-96, 2006.
- 2) Nokes DJ, Anderson RM: The use of mathematical models in the epidemiological study of infectious diseases and in the design of mass immunization programmes. *Epidem Inf* 101 : 1-20, 1988.
- 3) Parker AA, Staggs W, Dayan GH, et al: Implications of a 2005 measles outbreak in Indiana for sustained elimination of measles in the United States. *N Engl J Med* 355 : 447-455, 2006.
- 4) CDC: Mumps outbreak at a summer camp-New York 2005. *MMWR* 55 : 459-462, 2006.
- 5) 寺田喜平, 新妻隆広, 大門祐介, 他. 麻疹, 風疹, 水痘, ムンプスに対する抗体測定法と要請率の比較. *感染症学雑誌*74 : 670-674, 2000.
- 6) 庵原俊昭. ウイルス感染症の診断. *小児科診療*68 : 1992-1999, 2005.
- 7) 庵原俊昭. 麻疹・風疹・水痘・ムンプスに対する病院および地域における感染制御対策の最近の動向. *医療*60 : 483-488, 2006.
- 8) 庵原俊昭. ウイルス検査法とその評価. 2007SRL宝函 ; s4-s16, 2007.
- 9) 庵原俊昭, 中野貴司, 神谷 齊, 他. 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—種々な免疫状態児への接種と接種率向上対策—. 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, p19-24, 2007.
- 10) 庵原俊昭, 岡田賢司, 中野貴司, 他. 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研究. 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, p25-31, 2007.
- 11) AAP: School Health, Red Book 27th eds, p145-153, Elk Grove Village, 2007.
- 12) AAP: Mumps, Red Book 27th eds, p464-468, Elk Grove Village, 2007.
- 13) 落合 仁, 庵原俊昭, 中野貴司. 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*60 : 501-506, 2007.
- 14) Helfand RF, Heath JL, Anderson LJ, et al: Diagnosis of measles with an IgM capture EIA: The optimal timing of specimen collection after rash onset. *J Infect Dis* 175 : 195-199, 1997.
- 15) 庵原俊昭. ムンプスワクチン接種後のムンプス罹患時における病態と臨床像の検討. *小児科* 42 : 1144-1149, 2001.
- 16) AAP: Varicella-zoster infections, Red Book 27th eds, p711-725, Elk Grove Village, 2007.
- 17) 庵原俊昭. ムンプス. *臨床とウイルス*30 : 28-32, 2002.
- 18) 高山直秀, 庄田亜紀子, 岡崎隆行, 他. 妊婦における麻疹中和抗体価, HI抗体価, PA抗体価の相関と各測定法の発症予防レベル. *感染症学誌* 81 : 675-680, 2007.
- 19) 玉置尚司, 田村英一郎, 小林正久, 他. 医学部学生の麻疹抗体保有状況とその問題点. *日本小児科学会雑誌* 109 : 1102-1105, 2005.

検



ワクチン接種とウイルス抗体検査の評価

庵原 俊昭

国立病院機構三重病院院長

Key words

ワクチン、発症予防、感染予防、ウイルス抗体、EIA 法

1. はじめに

ウイルス感染症には、感染した部位でウイルスが増殖して症状が出現する局所性ウイルス感染症と、感染した部位でウイルスが増殖後、ウイルス血症により親和性臓器に散布され、そこで増殖して症状が出現する全身性ウイルス感染症とがある¹⁾。

局所性ウイルス感染症を引き起こすウイルスには、インフルエンザウイルス、RSウイルス、ライノウイルスなどの呼吸器症状を引き起こすウイルス、ロタウイルス、ノロウイルスなどの消化器症状を引き起こすウイルスが含まれる。一方、全身性ウイルス感染症を引き起こすウイルスとして、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ムンプスウイルス、パルボウイルス B19 などがある。

本稿では、麻疹、風疹などワクチンが開発されている全身性ウイルス感染症の予防における抗体の役割について解説する。

2. ウイルス感染症の病態と免疫

ウイルス感染症の特異免疫には、液性免疫(主としてIgG抗体)、細胞性免疫(主としてT細胞)、粘膜免疫(主

としてIgA抗体)があり、これらの免疫が複合して感染からの回復や発症予防にはたっている。局所性ウイルス感染症では、IgA抗体を含む粘膜免疫が重要な役割を果たしている。血中から滲み出すIgG抗体も感染防御に関係しているが、発症防御のためには高い抗体価が必要である。インフルエンザでは、赤血球凝集抑制(HI)抗体価40倍での発症予防効果は50%、160倍だと発症予防効果は90%である。

一方、全身性ウイルス感染症では、血中IgG抗体と細胞性免疫が発症予防に重要な役割を果たしている。このタイプは潜伏期間が長いため、曝露時の免疫レベルが低くても、多くは感染したウイルスの増殖による症状出現までに免疫が先に賦活(ブースター)されるため発症が阻止されるが、時に免疫の賦活が追いつかない場合は発症し、軽症に経過する(修飾感染)。

3. ウイルス感染と抗体

ウイルスに対する免疫力を調べる方法として、一般に抗体が測定されている。それぞれのウイルスに対し数種の抗体測定方法が開発されているが、抗体の生物学的活性(ウイルス増殖を抑制する免疫力)を測る中和(NT)法が抗体測定の基本である。HI法も抗体の生物学的活性を測定している。いずれの方法も専門的な手技が必要な手間のかかる検査方法である。一方、酵素免疫(EIA)法、受身凝集法(PA)、ラテックス凝集(LA)法は抗体の蛋白量を測定しており、必ずしも生物学的活性を反映していない欠点はあるが、比較的手技は容易である。

ウイルス抗体価は2を底とする対数に変換すると正規分布する。各抗体価を2を底とする対数に変換後に、抗体の生物学的活性を測定している測定方法と抗体の蛋白量を測定しているEIA-IgG法を比較すると、麻疹では、

PROFILE

庵原 俊昭



1974年に三重県立大学医学部卒業後、同年三重大学小児科に入局。2年間の小児科臨床研修の後、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)の病態についての研究を開始する。その後、VZV、麻疹、ムンプス、インフルエンザなどワクチン予防可能疾患の病態を中心に研究を行っている。専門分野は小児科学、ウイルス学、感染免疫学である。

NT抗体 64 (2⁶) 倍までは中和抗体とEIA抗体はよく相関し ($r = 0.9626$, $p < 0.0001$)、相関直線の傾きは0.91であるが、NT抗体 64倍を越えると、相関直線の傾きが0.40となり、EIA抗体はNT抗体に対して低く表示される(図1)。一方、風疹では、HI抗体価が高くなってもHI抗体とEIA抗体は一本の相関直線に乗って上昇し、きわめて高い相関を示している(図2、 $r = 0.9551$, $p < 0.0001$)。以上の結果は、EIA-IgG法で測定される抗体も、NT法やHI法と同様に定量性があることを示している。

4. 抗体の国際表示

世界保健機関(WHO)はウイルス抗体価の国際単位

(IU/mL)表示を目指しており、B型肝炎ウイルス(HB)抗体のIU表示は日本でも採用されている。WHOは麻疹、風疹、水痘、パルボウイルスも標準血清を用意してIU表示を勧めており、日本でも採用が検討されている。麻疹では(EIA価×46)によりmIU/mLに、風疹では(EIA価×2.4)によりIU/mLに換算される²⁾。また麻疹NT抗体4(2²)倍は200mIU/mLに相当する。なお麻疹では、EIA抗体2.0EIA価およびPA抗体128倍がNT抗体2倍に³⁾、風疹では、EIA抗体4.0EIA価がHI抗体8倍にほぼ一致する。

5. 抗体の感染予防レベルと発症予防レベル

局所性ウイルス感染症では、抗体の感染予防レベルと

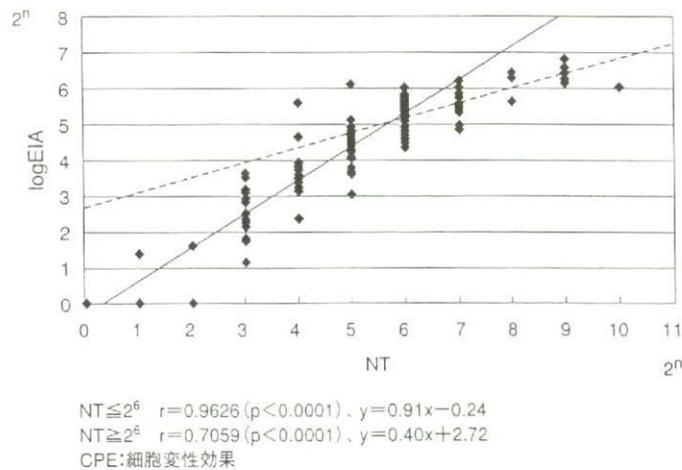


図1 麻疹 mNT (マイクロ中和) 抗体 (100% CPE 抑制) と EIA-IgG 抗体との関係

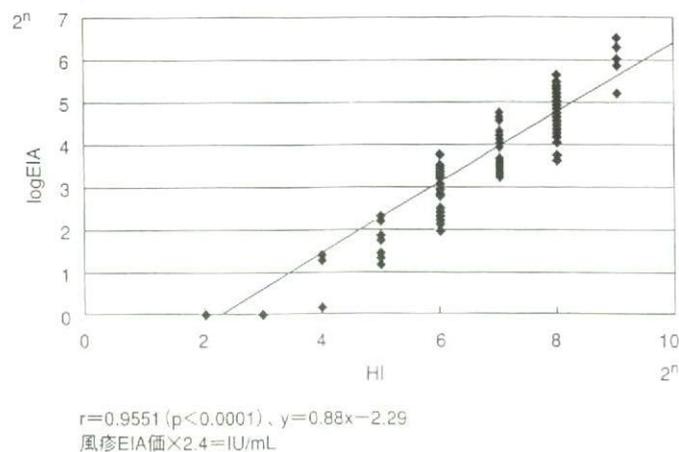


図2 風疹 HI 抗体と風疹 EIA-IgG 抗体との関係

発症予防レベルは近似するが、全身性ウイルス感染症では、感染後の免疫賦活により発症が阻止されるため、発症予防レベルと感染予防レベルは異なり、発症予防レベルは感染予防レベルよりも低値である。全身性ウイルス感染症では発症予防に抗体だけではなく他の免疫もはたらくため、クリアカットに発症予防レベルは線引きできないが、おおよそのレベルが提唱されている。麻疹では、98%の発症予防レベルは125mIU/mL、100%の発症予防レベルは200mIU/mLであり、感染予防レベルは500～1,000mIU/mLである⁴⁹⁾。また、風疹の発症予防レベルは10IU/mLであり、感染予防レベルは16IUとの報告はあるが、いまだ確立されていない⁷⁹⁾。

これらの国際単位をなじみのある抗体表示で示したのが表1である。ムンプスと水痘の発症予防レベルと感染予防レベルは報告されていないため、麻疹のNT抗体の抗体陽性レベル、発症予防レベル、感染予防レベルから推測される抗体価を表示している。なお、表1に示した抗体測定方法が、ワクチン後の免疫状態や感染既往を調べるための適切な測定方法である。以前よく使われた麻疹HI法の抗体陽性率は、NT法やEIA法よりも20%ほど低率である¹⁰⁾。またCF抗体は感染後早期に消失するため、免疫力を調べるときにCF法を用いるべきではない。

6. まとめ

本稿ではウイルス抗体の特徴と測定結果の意味付けについて解説した。ワクチン後の免疫状態を調べるためには適切な抗体測定方法を用いるべきであり、抗体レベルに応じてワクチン再接種などの適切な対応策が必要である。

文献

- 1) 庵原俊昭. 小児感染症の基本的考え方. 日本小児皮膚科学会雑誌2006; 25: 93-96
- 2) デンカ生研社内資料.
- 3) 高山直秀, 他. 妊婦における麻疹中和抗体価, HI抗体価, PA抗体価の相関と各測定法の発症予防レベル. 感染症学雑誌2007; 81: 675-680.
- 4) Chen RT, et al. Measles antibody: Reevaluation of protective titers. J Infect Dis 1990; 162: 1036-1042.
- 5) Samb B, et al. Serologic status and measles attack rates among vaccinated and unvaccinated children in rural Senegal. Pediatr Infect Dis J 1995; 14: 203-209.
- 6) Lee M, et al. Protective titers of measles neutralizing antibody. J Med Virol 2000; 62: 511-517.
- 7) Tischer A, et al. Immune response after primary and re-vaccination with different combined vaccines against measles, mumps, rubella. Vaccine 2000; 18: 1382-1392.
- 8) 玉置尚司, 他. 医学部学生の麻疹抗体保有状況とその問題点. 日本小児科学会雑誌2005; 109: 1102-1105.
- 9) Skendzel L. Rubella immunity. Defining the level of protective antibody. Am J Clin Pathol 1996; 106: 170-174.
- 10) 庵原俊昭. 麻疹・風疹・水痘・ムンプスに対する病院および地域における感染制御対策の最近の動向. 医療2006; 60: 483-488.

表1 MRMVの発症予防と感染予防レベル

	測定方法	陽性	抗体価	
			発症予防*	感染予防
麻疹	mNT	≧2倍	≧4倍	≧32倍
	EIA-IgG	≧2.0	≧4.0	≧16.0
	PA	≧16倍	≧256倍	
風疹	HI	≧8倍	≧8倍†	≧64倍‡
	EIA-IgG	≧2.0	≧4.0	≧16.0‡
	LA	≧6IU/mL	≧10IU/mL	≧16IU/mL
ムンプス	EIA-IgG	≧2.0	≧4.0‡	≧16.0‡
水痘	IAHA	≧2倍	≧4倍‡	≧32倍‡
	EIA-IgG	≧2.0	≧4.0‡	≧16.0‡

* 多くの人(98%)で推定される抗体レベル

† 風疹HI8倍では時に非特異凝集がある

‡ 麻疹mNT抗体、EIA-IgG抗体の結果から推定されるレベル

mNT：マイクロ中和法

麻疹，風疹，ムンプス ワクチンの現状

Clinical and epidemiological aspects of measles, rubella, and mumps vaccine

庵原 俊昭

国立病院機構三重病院 小児科



庵原 俊昭 (いはら としあき)
1974年三重県立大学医学部卒業，同大学小児科。'81～'83年フィラデルフィア小児病院留学。'88年国立療養所三重病院小児科医長。'92年同病院副院長。2004年国立療養所三重病院から国立病院機構三重病院に病院名変更。'05年国立病院機構三重病院院長。研究テーマ：ワクチン予防可能疾患の病態の究明（特にムンプス，麻疹，水痘，風疹）

Key Words: measles vaccine, rubella vaccine, mumps vaccine, MR vaccine, MMR vaccine

■ Abstract ■

麻疹，風疹，ムンプスは，いずれも人から人に感染する感染症であり，ワクチンにより集団免疫率が維持されるならば流行の排除が可能な疾患である。2012年の麻疹排除を目指し，2006年からMRワクチンの2回接種が始まり，更に2008年度からは5年間の時限措置で，中学校1年生に相当する年齢の者（3期），高校3年生に相当する年齢の者（4期）へのMRワクチン定期接種が開始された。MRワクチンの使用により風疹排除も期待される。一方，ムンプスワクチンは任意接種のため，接種率は30%と低率であり，流行排除にほど遠い状態である。1994年の麻疹ワクチンおよび風疹ワクチンの男女小児への接種開始以降，麻疹風疹の流行規模は縮小し，免疫賦活の機会が減少している。麻疹風疹の流行排除を目指すためには，少なくとも高い接種率（ $\geq 95\%$ ）で2回MRワクチンを接種することが大切である。

■ はじめに

人から人に感染する感染症では，多くの人が免疫を持つと流行排除が可能である。この流行を排除することができる免疫率が集団免疫率であり，麻疹では90-95%，風疹では80-85%，ムンプスでは85-90%である（表1）¹⁾。集団免疫率が高い感染症ほど，一人の人が周囲の免疫のない人に感染させる数（基本再生産数）が高く，流行周期も短期間である。集団免疫率を人為的に維持する方法がワクチン接種であり，移行抗体の消失後早期に接

種しないと，集団免疫率の維持は困難である。

多くの子どもの麻疹，風疹，ムンプスの移行抗体消失時期は1歳であり²⁾，このため1歳早期に麻疹・風疹混合(MR)ワクチン接種が勧められている。本稿では，麻疹ワクチン，風疹ワクチン，ムンプスワクチンの日本の現状を紹介する。

■ 麻疹ワクチンの現状

日本では1969年に麻疹弱毒生ワクチンが開発された。最初は任意接種としてスタートし，1978年になり定期接種に加えられた。1989年からは麻疹ムンプス風疹(MMR)ワクチンが，定期接種として麻疹ワクチンと併用されたが，ムンプスワクチンによる無菌性髄膜炎の発症率が高かったため，1993年にMMRワクチンの実施が見合わされた。1994年から麻疹ワクチンと風疹ワクチンがそれぞれ単独で1歳以上の小児に男女とも接種されるようになり，その後2005年7月からは麻疹ワクチン，風疹ワクチンに加え麻疹風疹混合(MR)ワクチンの接種が可能となった。

本邦は，世界保健機関(WHO)西太平洋地域(WPR)の方針にしたがい，2012年までに麻疹を排除する計画を立てている。そのためには，①麻疹

■ Toshiaki Ihara
National Hospital Organization Mie National Hospital

表1 麻疹・風疹・ムンプスの流行抑制のための集団免疫率

感染症	流行周期* (年)	基本再生産数 (R_0)	集団免疫率 (%)
麻疹	2	1.6~2.1	90~95
風疹	5~10	7~9	80~85
ムンプス	4	1.1~1.4	85~90

$$\text{集団免疫率} = (1 - 1/R_0) \times 100$$

*ワクチン接種率が低いとき

表2 風疹の流行と日本の風疹ワクチン接種方式

1956~1958	風疹流行
1964~1965	沖縄で風疹流行
1966	風疹流行
1976~1977	風疹流行
1977	・中学生女子に集団接種開始 (定期接種)
1981~1982	風疹流行
1987~1988	風疹流行
1989	・小児の麻疹接種時にMMR接種開始
1992~1993	風疹流行
1993	・MMR接種の中止
1994	・男女小児 (12~90ヶ月) に定期接種開始 ・男女中学生に定期接種開始 (2003.9.30まで)
2001	・中学生定期接種の年齢枠拡大 (2003.9.30まで) *
2002~2004	地域 (岡山、鹿児島、大分、埼玉、群馬など) で風疹流行†

* : 1979.4.2~1987.10.1に生まれた者を中心に陰性者に接種

†風疹が流行するとCRS児が出生する

ウイルスを含むワクチン(measles virus containing vaccine, MCV)を高い接種率 (集団免疫率を越える接種率; $\geq 95\%$) で2回接種, ②麻疹サーベイランスの全数把握, ③麻疹アウトブレイク時の積極的接触者調査と感受性者へのMCV接種, ④定期接種外年齢層のリスクグループ (医療関係者, 保育関係者, 教育関係者など) への任意接種の勧奨, が大切である。

麻疹排除を目標に2006年からMRワクチンの2回接種が始まった。本邦の接種対象年齢は, 1期: 生後12月から24月に至るまでの間にある者, 2期: 5歳以上7歳未満の者であって小学校就学1年前の間にある者, である。2期の接種時期に関しては欧米各国で異なっている。二次性ワクチン不全 (SVF) 対策としては小学校卒業前1年間が適切であるが, 1期初回接種もれ者対策, 一次性ワクチン不

全 (PVF) 対策を考えると小学校就学前が適切である。1期のMRワクチン接種率が95%を越えている国では2期接種時期は遅い方がいいが, 本邦のMRワクチン1期接種率は90%程度であり, 小学校での麻疹流行を排除するためには小学校就学前が2期接種時期として適切である。

2006年からMRワクチン2期接種が開始されたが, 2006年, 2007年と高校生, 大学生を中心に麻疹が流行した。この結果を受け, 早期の麻疹流行排除を目指し, MCV2回接種を受けた人の層を厚くするために, 2008年度から5年間の時限措置として, 中学校1年生相当年齢の者 (3期) と高校3年生相当年齢の者 (4期) へのMRワクチン接種が開始された。1期, 2期, 3期, 4期とも, 麻疹単独ワクチン接種よりもMRワクチンを接種することが勧められている。麻疹罹患児を含め麻疹抗体を有する者に,

表3 自然ムンプスとムンプスワクチンの副反応

症状	自然感染	ワクチン
耳下腺炎	70%	3%
髄膜炎 細胞増多	50%	不明
症候性	3%~10%	1/1,000~10,000
脳炎	0.02%~0.3%	4/1,000,000
難聴	1/400~1,000	ほとんどなし*
精巣炎	25%**	ほとんどなし
両側腫脹	10%**	ほとんどなし
乳腺炎	15%~30%**	ほとんどなし
卵巣炎	5%**	ほとんどなし
脾炎	4%**	ほとんどなし

*：詳細な頻度は不明

**：思春期以降の頻度、精巣炎発症後に睾丸癌を発症するリスクは1.5%
第一三半期の妊婦に感染すると、1/3が流産するが特異的な奇形はない

MRワクチンを接種しても特に副反応の増加は示されていない³⁾。

本邦では、3種類の弱毒麻疹生ワクチンと2種類のMRワクチンが市販されている。麻疹の感染防御、感染からの治癒機転には、液性免疫だけではなく細胞性免疫も重要な働きをしている。両方の免疫を誘導するためには生ワクチン接種が必須である。

■風疹ワクチンの現状

風疹対策には、先天性風疹症候群(CRS)児出生を予防するために中学生女性だけに接種する方式(通称：イギリス方式)と、風疹流行自体をコントロールし、結果としてCRS児の出生を予防する方式(通称：アメリカ方式)とがある。本邦では1977年から中学生女子を対象に風疹ワクチンの定期接種が開始されたが、その後も5年ごとに風疹の流行があり⁴⁾、風疹が流行すると流行時期にあわせてCRS児の出生が認められていた(表2)。

風疹の流行排除を目指し、1989年にMMRワクチンを導入し、MMRワクチン実施見合わせ後の1994年から、12ヶ月から90ヶ月までの男女小児に風疹ワクチン接種が開始された。男女小児への接種が開始された結果、本邦の風疹流行間隔は、それまでの5年ごとから10年ごとへと延長したが、2002年~2004年にかけて成人を中心に日本各地で散発的

に風疹流行が認められた。

単独ワクチン接種時日本各地で麻疹排除運動がおこり、麻疹ワクチンの接種率は上昇したが、風疹ワクチン接種率は麻疹ワクチンよりも低率であった。しかし2005年からMRワクチンが導入され、2006年からMRワクチンの2期接種が始まり、2008年度からは5年間の時限措置であるが、MRワクチンの3期、4期接種が始まった。風疹の集団免疫率は80-85%と麻疹よりも低率であり、MRワクチン接種率向上により麻疹排除が達成されると、同時に風疹およびCRSの排除も達成される。

風疹の発症予防閾値は10IU/ml(HI抗体8倍に相当)、再感染予防閾値は15IU/ml(HI抗体16倍に相当)である^{5, 6)}。風疹流行時に一部の妊婦で風疹不顕性感染により、CRS児の出生が認められている⁷⁾。現在本邦では妊娠中に風疹抗体を測定し、HI抗体16倍以下の妊娠可能年齢の人には産褥期に風疹ウイルスを含むワクチンの接種が勧められている。

3期、4期の定期接種時および妊娠可能年齢の人への風疹ウイルスを含むワクチンを接種するときは、妊娠していないことを確認してから接種し、接種後は2ヶ月間の避妊が勧められている。しかし、このように配慮しても、極めてまれに風疹ワクチン接種後妊娠に気づく時がある。現在までの

ところ、誤って妊婦に接種しても風疹ワクチンによるCRS児の出生はなく、また先天性奇形を持って出生する児の増加がないため（一般の妊娠でも2-3%の奇形合併率がある）、アメリカでは妊婦に誤って風疹ワクチンを接種しても人工妊娠中絶を勧めていない⁸⁾。

■ムンプスワクチンの現状

ムンプスウイルスは神経親和性が強いウイルスであり、また、培養細胞で継代すると容易に弱毒化するウイルスである。ワクチンを開発するにあたっては、免疫原性を保ちながら神経親和性を低下させる必要がある。世界で広く使用されているJeryl-Lynn株の無菌性髄膜炎発症率は100万接種に1であるが、ムンプス流行時の有効性はUrabe株よりも劣っている⁹⁾。しかし、Jeryl-Lynn株をはじめムンプスウイルスを含むワクチンを2回定期接種している国では、ムンプス患者数は99%減少しており、ムンプスワクチンの有効性は示されている。

日本では、星野株、鳥居株、宮原株の3株が市販されている。本邦ムンプスワクチンの無菌性髄膜炎発症率は2000～6000接種に1である¹⁰⁾。ムンプスでは無菌性髄膜炎以外にも、脳炎、難聴、精巣炎などの合併症があるが、ムンプスワクチンによる難聴、精巣炎などの副作用は極めてまれである（表3）。

本邦では1989年から1993年にかけて使用されたMMRワクチンによる無菌性髄膜炎のトラウマがあるため、先進国の中で唯一ムンプスワクチンの定期接種を行っていない国であり、定期接種化については消極的である。少なくとも現行のムンプスワクチンと同等の免疫原性があり、しかも無菌性髄膜炎合併率が低いムンプスワクチン株が開発されるまでは定期接種化は困難である。

本邦のムンプスワクチン接種率は30%程度であり、集団免疫率からはほど遠いレベルである。現在のワクチン接種率ではムンプスの流行周期を延長させる力はなく、今後も4年ごとのムンプス流行は持続し、そのたびに無菌性髄膜炎を合併する児

や難聴を発症する児を認めることが予測される。

■おわりに

麻疹、風疹、ムンプスは人から人に感染する感染症であり、ワクチンによる集団免疫率が維持されるならば流行の排除が可能な疾患である。流行規模が小さくなると免疫の賦活を受ける機会が減少するため、麻疹、風疹、ムンプスの流行排除を目指すためには、少なくとも高い接種率で2回ワクチンを接種することが大切である。

文 献

- 1) Nokes DJ, Anderson RM: *Epidem Inf* 101: 1-20, 1988.
- 2) 庵原俊昭, 中野貴司, 神谷 齊, 他: 平成17年度研究報告書, 72-74, 2006年3月.
- 3) 庵原俊昭, 岡田賢司, 中野貴司, 他: 平成18年度研究報告書, 25-31, 2007年3月.
- 4) 庵原俊昭: 風疹. 臨床と微生物29: 489-493, 2002.
- 5) Skendzel LP: Rubella immunity: *Amer J Clin Patho* 106:170-174, 1996.
- 6) Matter L, Kogelschatz K, Germann D: *J Infect Dis* 175:749-755, 1997.
- 7) Hornstein L, Levy U, Fogel A: *N Engl J Med* 319:1415-1416, 1988.
- 8) Plotkin SA, Reef S: Rubella vaccine. In *Vaccine*, eds by Plotkin SA, Orenstein WA. 4th edition, Saunders, Philadelphia, 707-743, 2004.
- 9) Plotkin SA: Mumps vaccine. In *Vaccine*, eds by Plotkin SA, Orenstein WA. 4th edition, Saunders, Philadelphia, 441-469, 2004.
- 10) Nagai T, Okafuji T, Miyazaki C, et al: *Vaccine* 25:2742-2747, 2007.

News (学会情報)

●第36回日本潰瘍学会

開催日 9月5日(金)～6日(土)

〔代表者〕 浅香 正博(北海道大学教授)

〔会 場〕 札幌市・ウェルシティ札幌(北海道厚生年金会館)

〔連絡先〕 北海道大学大学院医学研究科消化器内科学分野:

TEL (011) 716-1161(内5918)/FAX (011) 706-7867

常設事務局URL=<http://www.jp-ulcer-research.org/>

開催案内URL=<http://www.jsur2008.com/>

感染制御のための
微生物学講座
細菌

百日咳

蒲地 一成 (Kazunari KAMACHI)

国立感染症研究所 細菌第二部

Department of Bacterial Pathogenesis and Infection
Control, National Institute of Infectious Diseases

◆はじめに

百日咳は百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) の気道感染によって引き起こされる急性呼吸器感染症であり、特有の咳発作を特徴とする。百日咳菌は患者の上気道分泌物の直接接触や飛沫により感染し、麻疹ウイルスと並び高い感染力を有する。百日咳対策にはワクチンによる予防が最も効果的であり、ワクチンの普及に伴い世界の百日咳患者数は激減した。わが国では1981年に現行の沈降精製ジフテリア・百日せき・破傷風三種混合ワクチン(DPT)が導入され、その後患者数は着実に減少傾向にある。しかし、近年、ワクチン効果が減弱した青年・成人層も百日咳に罹患することが明らかとなり、わが国でも他の先進国と同様に青年・成人の罹患者が急増している。

◆百日咳菌とその病原因子

百日咳菌は0.2～0.5±0.5～2 μmのグラム陰性の短桿菌であり、べん毛および芽胞形性能を持たず非運動性である(図1)。本菌は血液を添加した培地によく生育するが必ずしも血液成分を必要としない。感染の初期段階として菌はまず上部気道に感染し、次いで気管支および小気管支の粘膜上皮細胞または繊毛間で増殖する。感染は呼吸器系に限局すると考えられているが、血液中から百日咳菌が分離された症例が国外で数例報告されている。百日咳菌以外にヒトに感染する *Bordetella* 属細菌にはパラ百日咳菌 (*B. parapertussis*)、*B. holmesii* などがあるが、百日咳菌に比較してその分離例は少ない。

百日咳菌は百日咳毒素、アデニル酸シクラーゼ毒素、繊維状赤血球凝集素、線毛、パータクチンなどの病原因子を産生し、特に重要な病原因子は百日咳毒素 (PT) である。本毒素は *Bordetella* 属細菌の中でも百日咳菌に特有であり、白血球増多

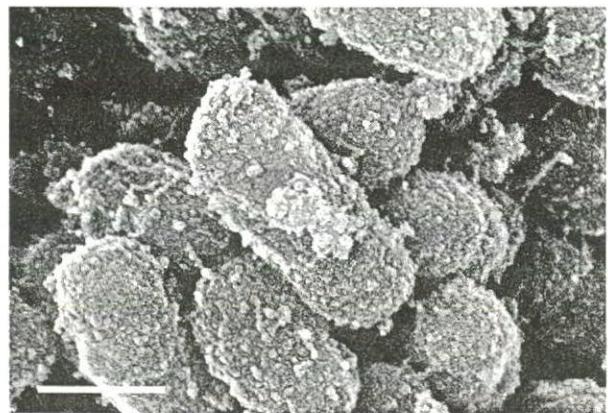


図1 百日咳菌の走査電顕像
(写真はワクチン株である東浜株。Bar=0.5μm)

作用、ヒスタミン感受性亢進作用、インスリン分泌促進といった多様な生物活性を示す。PTは宿主のG蛋白にADPリボシル基を付加することにより、cAMPの過剰生産をもたらす。無毒化されたPTトキシイドはすべての精製百日咳ワクチンに含まれており、百日咳ワクチンに必須な防御抗原でもある。なお、パラ百日咳菌と気管支敗血症菌 (*B. bronchiseptica*) にもPT遺伝子様の配列が存在するが、毒素蛋白質の発現は認められていない。その他の毒素として、タイプIII分泌装置により分泌される機能蛋白質 (エフェクター) があり、近年一部の百日咳菌で発現することが報告された¹⁾。このエフェクター蛋白質は菌体からニードル様の装置を介して直接宿主細胞に注入され、孔形成により細胞機能を低下させる。

◆百日咳の疫学

百日咳は感染症発生動向における小児科定点把握疾患の5類感染症であり、全国約3,000の定点から毎週患者数が報告される。わが国の患者発生数を見る