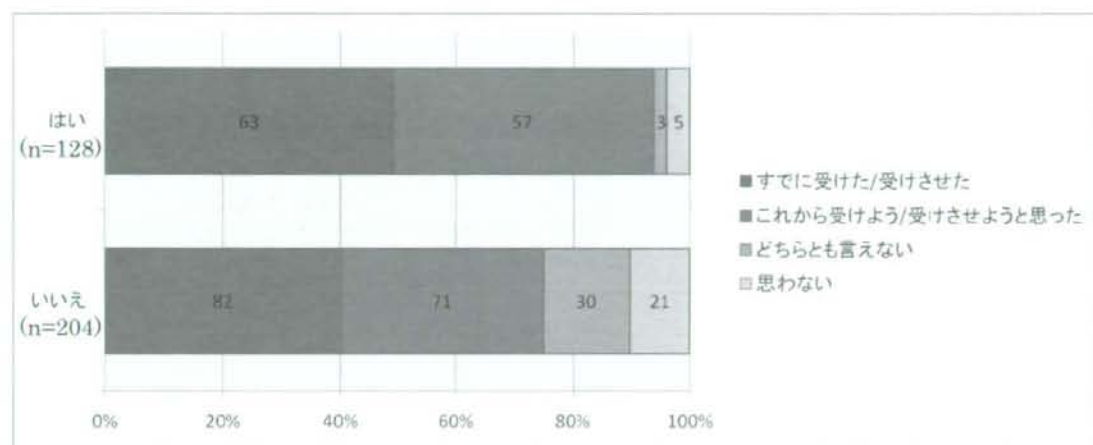


図7: アンケート調査回答: 家族に対象者がいる/回答者自身が対象者であるかどうか(「はい」か「いいえ」での回答)による接種行動への状況



厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）  
分担研究報告書

インフルエンザ随伴症状の発現状況に関する調査研究  
研究分担者 廣田 良夫（大阪市立大学大学院医学研究科 公衆衛生学教授）

研究要旨

横田班が 2006/07 シーズンに実施した調査データを解析した。オセルタミビル服薬の multivariate odds ratio (OR)は、「全異常行動」に対して 0.62 (95%CI: 0.51-0.76)、「異常行動 A」に対して 1.23 (0.37-4.23)であり、「オセルタミビル使用と異常行動の間に、有意な正の関連を認めるには至らなかった」。但し、これらの所見は「オセルタミビル使用と異常行動の間に関連がない」ことを意味するものではない。本結果の妥当性と信頼性は十分保証されていない。「異常行動 A」を発現した患者を症例とした、症例対照研究が必要である。

研究協力者：

奥村彰久（順天堂大学 小児科学）、小笹晃太郎（京都府立医科大学 地域保健医療疫学）、鈴木宏（新潟大学 国際感染医学）、中村好一（自治医科大学 公衆衛生学）、細矢光亮（福島県立医科大学 小児科学）、森雅亮（横浜市立大学 発生成育小児医療学）、森満（札幌医科大学 公衆衛生学）、山口直人（東京女子医科大学 衛生学公衆衛生学）、伊藤一弥（大阪市立大学 公衆衛生学）、田邊卓也（市立枚方市民病院 小児科）、中野貴司（国立病院機構三重病院 国際保健医療研究室）、福島若葉（大阪市立大学 公衆衛生学）

A. 研究目的

オセルタミビル使用と重大な精神・神経症状（異常行動など）の発現が関心を集めている。この関連を検討することを目的に、既存データを解析する。

B. 研究方法

平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業の分担研究班として、横田俊平・横浜市立大学教授らが 2006/07 シーズンに約 10,000 人の小児を対象にオセルタミビルと異常行動に関する調査を実施した。

厚生労働省安全対策課が横田班よりデータの貸与を受け、これを本分担研究班が CRO（研究開発業務委託機関）を活用しながら解析する。CRO は平成 19 年 6 月に調査票の確認点検作業を開始し、8 月には共立薬科大学（現、慶應義塾大学薬学部）および星薬科大学において薬剤師によるデータの点検を行った。平成 19 年度にデータベースの作成と粗解析を実施、これを踏まえ平成 20 年度に総合解析を実施した。

C. 研究結果

協力医療機関は 697 施設、うち医師用調

査票の提出があったのは 664 施設、患者家族用調査票の提出があったのは 690 施設であった。提出された症例数は 10,745 人、うち医師用調査票の提出があった症例は 10,316 人、患者家族用調査票の提出があった症例は 10,103 人、医師用調査票・患者家族用調査票ともに提出があった症例は 9,674 人であった。

医師用調査票の提出があった 10,316 人のうち、登録時年齢が 18 歳以上であった 21 人を除外した。更に、受診前に異常行動を発現した者 351 人、および「異常行動の有無」と「異常行動の A・E」の両方が欠損であった者 278 人を除外し、最終的に 9,666 人を解析対象とした。

異常行動の発現頻度は、「全異常行動」1,126 人(12%)、「異常行動 A」35 人(0.4%)、「異常行動 B・E」1,073 人(11%)であった。「異常行動 A」は「事故につながったり、他人に危害を与えたりする可能性がある異常な行動」であり、最も重篤な異常行動である。

施設差を考慮した conditional logistic model による解析の結果、オセルタミビル服薬の multivariate odds ratio (OR)は、「全異常行動」に対して 0.62 (95%CI: 0.51-0.76)、「異常行動 A」に対して 1.23 (0.37-4.23)、「異常行動 B・E」に対して 0.60 (0.49-0.74)であった。同様の OR は、10 歳未満に限定すると 0.65 (0.55-0.78)、0.95 (0.32-2.85)、0.64 (0.54-0.77)、10 歳以上に限定すると 0.80 (0.58-1.10)、1.41 (0.30-6.78)、0.75 (0.54-1.03)となった。

その他、男、異常行動の既往、経過中の最高体温、などが異常行動に対する OR 上昇と関連を認めた。

#### D. 考察

今回の解析では「オセルタミビル使用と異常行動の間に、有意な正の関連を認めるには至らなかった」。オセルタミビル服薬の OR は、最も重篤な「異常行動 A」に対し 1 を超えたが、有意には至らなかった。但し、これらの所見が、「オセルタミビル使用と異常行動の間に関連がない」ことを意味するものではないことに注意が必要である。

本調査においては、解析の段階で克服できない selection bias (選択バイアス)、confounding by indication (適応による交絡)、時間性情報の不整合などが、結果の妥当性と信頼性に影響を及ぼしていると考えられる。堅固な結論を得るためには「異常行動 A」を発現した患者を症例とした、症例対照研究が必要である。そして研究の計画段階から、疫学者が参画する研究班を組織すべきである。

#### E. 結論

オセルタミビル使用と異常行動の間に、有意な正の関連を認めるには至らなかった。堅固な結論を得るためには「異常行動 A」を発現した患者を症例とした、症例対照研究が必要である。そして研究の計画段階から、疫学者が参画する研究班を組織すべきである。

#### F. 研究発表

本分担研究班の内容を、日本疫学会の学会誌「Journal of Epidemiology」の Supplement として公表予定。

神谷 齊及び全国の研究者

## 風疹ウイルスゲノムのアミノ酸配列の解析と自然淘汰圧との研究

研究協力者	牛島廣治	藍野大学	藍野健康科学センター	教授
共同研究者	周玉梅	東京大学大学院医学系研究科		院生
		ジョージア州立大学		研究員
	Frey TK	ジョージア州立大学		教授

### 研究要旨

我々は風疹ウイルスの全塩基配列を決めるとともに、他の報告と比較検討してきた。ここでは昨年へ続きアミノ酸配列を検討した。HVR では各株間でアミノ酸の大きな置換がある事、また他の領域にもあることを見出した。また風疹ウイルスの intergenotype, intragenotype の組換え、正の淘汰を推定した。

### A. 研究目的

風疹ウイルスはヒトの急性発疹を伴う感染症をきたす。また先天性風疹症候群として奇形を伴う疾患を起こす。野生の風疹ウイルスの遺伝子配列からの分子情報は風疹のサーベイランスに重要である。しかしながら、現時点まで13の遺伝子型の中の2つの遺伝子型のみ全遺伝子配列が決められている。われわれは本研究班で過去に、風疹ウイルスの遺伝子配列のデータベースを広げ、そして風疹ウイルスのゲノムの進化パラメータを評価するために、6つの遺伝子型の9株について全ゲノム配列を決めた。以前に報告された全ゲノム配列とあわせて8つの主な遺伝子型に属する19ウイルスゲノムを塩基配列の解析を行った。その結果総じて、19全ゲノムを比較した結果、ともに同じ長さの2つの ORF と5' 末端と3' 末端の非翻訳領域があった。2つの ORF の間の junction 非翻訳領域だけに僅かの欠失変異が見られた。そして風疹ウイルス

のゲノムは良く保持されていたことが示唆された。塩基配列において遺伝子の最大の observed distance と genetic distance はそれぞれ8.74%と100塩基部位で14.78の置換であった。これらの相違の程度はゲノムの部位でほとんど同じであるが2つの部位だけで異なることが見られた:N 末端領域のメチル/グアニル/ルトランスフェラーゼ領域は変異が少ないこと、一方 P150 の非構造タンパク (NSP) の中央部の超可変領域(HVR)はもっと相違があることを示した。今回、アミノ酸配列の解析と進化について昨年データに加えて述べる。

### B. 材料と方法

1. 既に全塩基配列がわかっている8つのゲノタイプの19株のゲノムのアミノ酸配列を用いた。
2. Gene/Region 別に区別し、配列の Composition と Plotsimilarity を検討した。

3. TN93+ $\Gamma$  と WAG 置換モデルを用い、コドンの塩基配列 (sequences at three codon positions and all coding sequences) とアミノ酸の配列に対し、比較系統樹解析と分解進化ネットワーク系統樹解析を行った。
4. 非同義置換率と同義置換率との割合 ( $\omega$ ) を計算し、各 Gene/Region を受けた自然淘汰圧を調べた。
5. 各ゲノタイプのウイルスを精製し、ウイルスの構造タンパク質に対する抗体を用い、WB により抗原抗体反応を調べた。

#### C. 結果と考察

1. アミノ酸配列を解析した結果、NSP (非構造領域) および SP (構造領域) の株間はそれぞれ 4.5% と 3.8% の差があるだけであるが、HVR においては最大 33.6% の差があった。P150 および E2 の方が P90 および E1 よりも差が大きかった。すなわち P90 および E1 の同義置換が P150 および E2 よりも大きかった。全体的に、ゲノムは、疎水性と脂肪族アミノ酸が多く、特に、HVR と capsid では、プロリンとアルギニンが多かった (Table 1, 2)。
2. さらにを行った NSP と SP 遺伝子の 3 つのコドン部位の配列とアミノ酸配列による系統樹 (Fig 1-a, b) とその遺伝子の塩基配列に対する分解進化ネットワーク系統樹解析 (Fig 2) を行ったところ、NSP 遺伝子による結果、その 2 種類の系統樹は、あるウイルスの間に共通するネットワークの存在関係を示し、intra- と inter-genotype の遺伝子の組み換えが風疹ウイルスゲノムの進化を強く支持する (drive) ことを考えられた。
3. 非同義置換率と同義置換率との割合 ( $\omega$ ) の計算を行い、正の自然淘汰を受けたアミノ酸部位を調べた。風疹ウイルスのゲノムにおいては多くの所ではかなり負の自然淘汰 (純化淘汰) を選択されていたが、HVR 領域の 4 か所、capsid および E1 タンパクの 2 か所ずつで正の自然淘汰が示された (成績省略)。これらの正の自然淘汰を受けた部位の機能により、この正の自然淘汰は風疹ウイルスの複製、免疫、感染性に関連する利点があると思われた。
4. Clade 1 の E2 に反応するが Clade 2 の E2 に反応しないモノクローナル抗体を見出し、E2 領域の異なった抗原反応性が認められた (Fig4)。これを用いると 2 つの Clade に属するウイルスを区別することができると思われた。(前回報告)

D. 結論：われわれが全塩基配列を決めた株を含めて代表的な型の風疹ウイルスのアミノ酸配列の比較を比較した。HVR では各株間でアミノ酸の大きな置換があるものの他の領域でもあった。風疹ウイルスの intergenotype, intragenotype の組換え、正の淘汰が推定された。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

「ラオス人民共和国ビエンチャン市での小学校の風疹及び麻疹抗体保有率」を参照。

## 2. 学会発表

この課題については特はない。

Table 1. Amino acid frequencies of genomic regions of rubella virus genome

AA \ Regions	NSP	p150	MT	HVR	XD	NP	P90	HEL	RDRP	SP	C	E2	E1
Ala A	<b>15.1</b>	<b>15.7</b>	<b>15.7</b>	<b>19.9</b>	<b>21.4</b>	<b>12.6</b>	<b>14.1</b>	<b>13.7</b>	<b>13.3</b>	<b>11.4</b>	<b>10.8</b>	<b>12.3</b>	<b>11.3</b>
Arg R	<b>9.7</b>	<b>9.8</b>	<b>12.9</b>	<b>10.6</b>	<b>8.8</b>	<b>10.2</b>	<b>9.5</b>	<b>11.4</b>	<b>8.8</b>	7.9	<b>13.4</b>	7.0	5.0
Asn N	1.5	1.3	0.0	1.3	1.8	2.6	1.8	2.7	1.6	2.1	1.7	2.1	2.5
Asp D	5.6	5.3	2.9	7.3	2.8	4.3	6.1	6.7	5.2	4.0	5.3	3.5	3.4
Cys C	3.1	3.5	1.4	0.7	4.6	4.9	2.5	3.2	2.1	3.8	0.7	5.0	5.0
Gln Q	2.5	2.2	0.0	1.8	0.2	2.0	3.1	2.4	3.5	3.8	5.0	3.0	3.5
Glu E	5.6	4.9	8.6	3.4	2.4	4.7	6.6	5.6	7.3	3.9	5.6	1.5	4.3
Gly G	7.3	7.6	3.3	7.2	<b>8.8</b>	9.9	6.7	6.7	6.5	<b>9.9</b>	9.7	<b>10.6</b>	<b>9.6</b>
His H	3.3	3.6	7.1	0.9	4.2	3.7	3.0	2.9	3.3	4.1	2.0	7.5	3.5
Ile I	2.7	2.0	4.3	0.2	3.6	0.4	3.8	4.7	3.6	1.6	1.1	0.9	2.3
Leu L	<b>8.6</b>	<b>8.3</b>	<b>12.9</b>	2.7	<b>9.5</b>	6.9	<b>9.0</b>	<b>8.8</b>	<b>8.7</b>	7.7	6.8	9.7	7.1
Lys K	1.5	1.3	2.9	0.0	0.6	0.6	2.0	2.0	2.1	1.3	1.2	0.5	1.9
Met M	1.6	1.2	0.0	0.0	0.7	1.6	2.1	0.8	2.7	1.3	1.7	2.0	0.6
Phe F	2.1	1.6	0.0	1.0	0.6	1.0	2.8	2.4	3.1	2.4	2.0	2.1	2.9
Pro P	<b>8.7</b>	<b>10.7</b>	5.7	<b>27.3</b>	7.7	<b>10.5</b>	5.4	3.6	6.7	<b>11.0</b>	<b>13.5</b>	<b>10.8</b>	<b>9.6</b>
Ser S	3.9	4.6	5.3	6.4	3.8	6.4	2.9	3.2	2.7	4.7	5.5	3.6	4.8
Thr T	5.4	4.4	5.7	5.2	4.1	5.0	7.0	7.7	6.8	7.5	6.3	7.8	8.1
Trp W	2.3	2.8	4.3	0.0	1.2	3.0	1.5	2.0	1.3	2.9	2.3	3.2	3.1
Tyr Y	2.6	2.0	1.4	0.3	1.8	2.0	3.4	4.0	3.1	2.4	1.3	1.8	3.3
Val V	7.0	7.2	5.7	3.7	8.4	7.5	6.8	5.7	7.7	6.3	4.0	5.2	8.3

1. Amino acid frequencies with the top three ranks of each indicated genomic region are in boldface.
2. Amino acid frequencies of each indicated genomic region were calculated by using the 19 virus amino acid sequences. NSP: non-structural protein, aa 1-2116, p150: aa 1-1301, MT: methyltransferase, aa 64-133, HVR: hypervariable region, aa 694-800, XD: X domain, aa 818-986, NP: non-structural protease, aa 1001-1300, p90: aa 1302-2116, HEL: helicase region, aa 1335-1586, RdRp: RNA-dependent RNA polymerase region, aa 1596-2116, SP: structural protein, aa 1-1063, C: aa 1-300, E2: aa 301-582, E1: aa 583-1063.

**Table2. Maximum-likelihood parameter estimates for genomic regions of the rubella virus genome**

Region	No. of sites	No. of constant sites	% of constant sites	Observed d (range)	Genetic d (range)	Genetic d (ave.)	$\alpha$
NSP	2116	1892	89.4	0.38-4.44	0.38-5.13	2.73	0.09
p150	1301	1107	85.1	0.46-6.38	0.47-7.50	4.05	0.14
p150: MT	70	69	98.6	0.00-1.43	NA	NA	NA
p150: HVR	107	40	37.4	0.93-33.64	0.96-47.03	20.44	2.12
p150: XD	169	141	83.4	0.00-9.47	0.00-10.68	4.43	0.19
p150: NP	300	256	85.3	0.33-7.33	0.34-9.03	4.15	0.17
p90	815	785	96.3	0.00-1.72	0.00-1.80	0.69	0.08
p90: HEL	252	236	93.7	0.00-3.17	0.00-3.35	1.27	0.38
p90: RdRp	521	507	97.3	0.00-1.34	0.00-1.38	0.46	0.02
SP	1063	953	89.7	0.19-3.76	0.19-4.12	2.41	0.13
C	300	265	88.3	0.00-4.67	0.00-5.06	2.60	0.24
E2	282	239	84.8	0.00-6.74	0.00-8.28	3.97	0.22
E1	481	449	93.3	0.21-2.29	0.21-3.08	1.37	0.06

1. All parameters were estimated by using tree-puzzle version 5.2 program with setting of the WAG- $\Gamma$  substitution model. 2. All parameters were calculated by using the 19 virus amino acid sequences. The abbreviations of regions were indicated in table 4-2. 3. NA: not available, because the values of the parameter estimates are close to internal upper or lower bounds of 95% confidence interval.  $\alpha$ : rate heterogeneity shape parameter. d: distance





## 1b SP

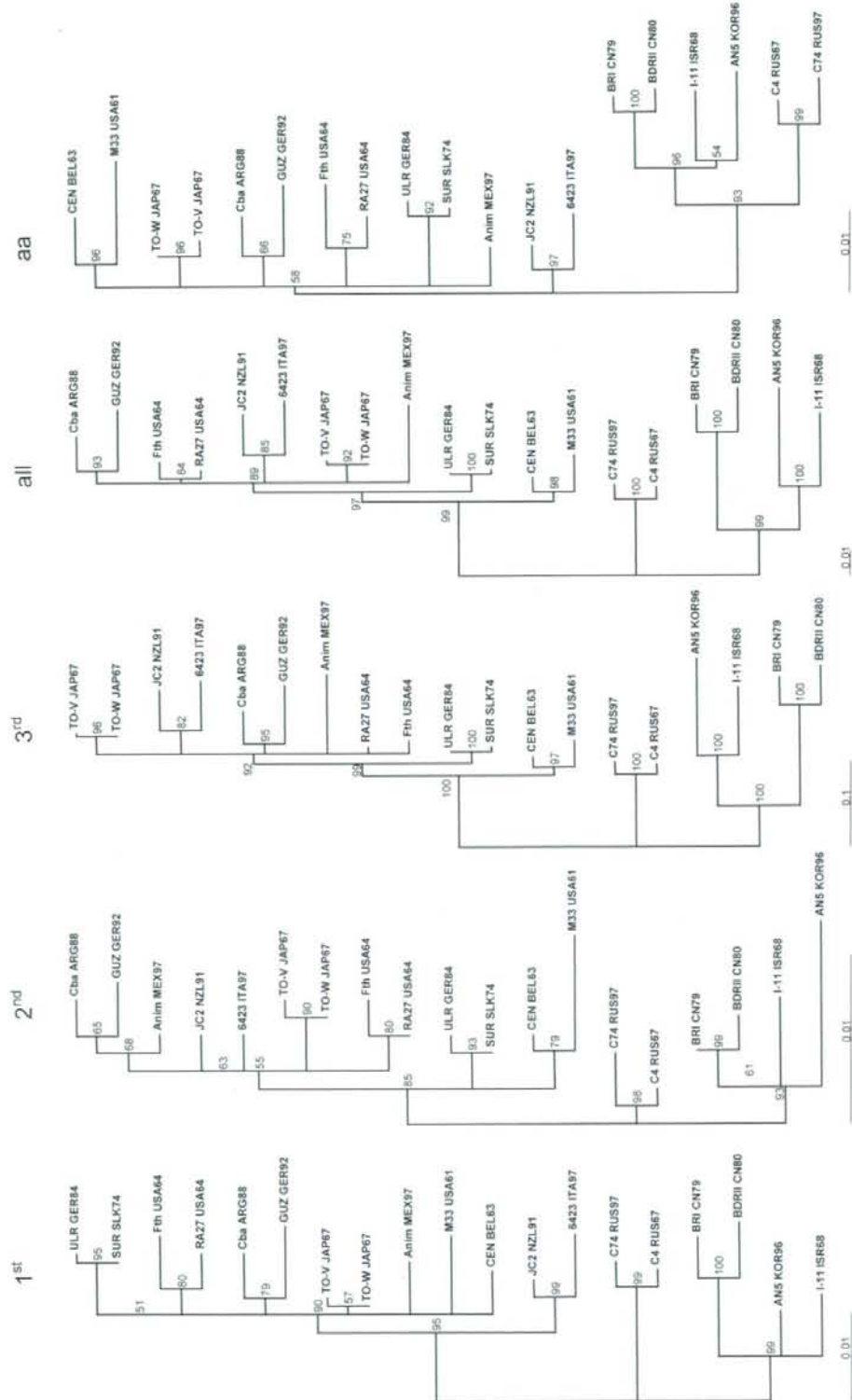


Figure 1—a.b. Phylogenetic trees of NSP-ORF (2a) and SP-ORF (2b) amino acid sequences and sequences at each of three codon positions (1<sup>st</sup>: first position; 2<sup>nd</sup>: second position; 3<sup>rd</sup>: third position; all: overall positions; aa: amino acid sequences). Trees were constructed by using TREE-PUZZLE (version 5.2) with 50,000 puzzle steps; reliability values are indicated on each node. Genetic distance (substitutions in 100 nt aa) calculated by using the TN93 +  $\Gamma$  (for nucleotide sequences) and WAG +  $\Gamma$  (for amino acid sequences) substitution model is indicated by the bar below each tree.

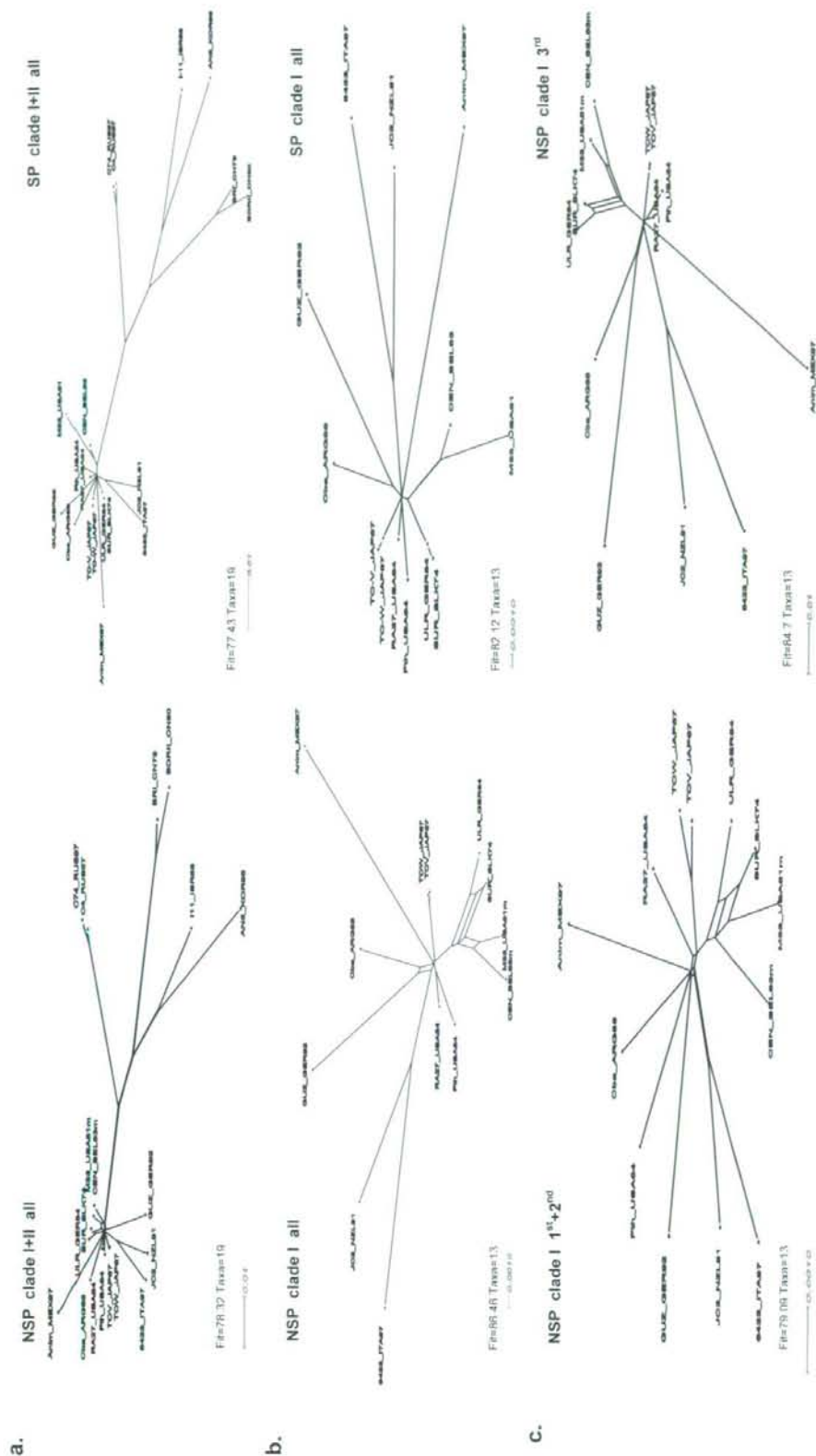


Figure 2. Split decomposition phylogenetic network trees based on sequences of NSP- and SP-ORF of rubella genome. (a). Trees were constructed using the NSP- and SP-ORF sequences of nineteen strains of Clade 1 and 2. (b). Trees were constructed using the NSP- and SP-ORF sequences of thirteen strains of Clade 1. (c). Trees were constructed using the NSP-ORF sequences at first and second codon positions and third codon position of thirteen strains of Clade 1. All trees were constructed using split decomposition method as implemented in SplitTree 4.0 software package (built 2006Mar08, version 4.3). The genetic distances (substitutions in 100 nt) for all trees were calculated using the TN93 + I substitution model in program TREE-PUZZLE (version 5.2) with 50,000 puzzle steps. The value is denoted by the bar below each tree. The fit index (%) and the number of taxa of each tree are denoted on the below of each tree as well.

## Respiratory syncytial virus (RSV) F,G タンパクを発現する 組換え麻疹ワクチン AIK-C 株の免疫原性

澤田成史<sup>1)</sup>, 樋口 彰<sup>1)</sup>, 駒瀬勝啓<sup>2)</sup>, 中山哲夫<sup>1)</sup>

- 1) 北里生命科学研究所 ウイルス感染制御 I
- 2) 国立感染症研究所 ウイルス第三部第二室

【研究要旨】弱毒麻疹ワクチンAIK-C株は安全で有効なワクチンとして世界的に知られておりAIK-Cの Reverse genetics systemを開発し安全性の確立された生ワクチンウイルスベクターとして利用し、現在ワクチンの開発されていないRespiratory syncytial virus (RSV)に対する組換え生麻疹ワクチンの開発を試みた。麻疹AIK-C全長感染性cDNAのP/M junctionにAsc I 配列を導入しRSV subgroup AのF, Gタンパク遺伝子を挿入し感染性組換え麻疹ワクチン株(MVAIK/RSV-F とMVAIK/RSV-G)を回収した。F, Gタンパクが発現されていることを確認し、精製ウイルス粒子のWestern blottingではウイルス粒子にはRSV外殻タンパクが取り込まれていないことを確認した。麻疹感受性動物であるコットンラットに免疫し麻疹ウイルス、RSVに対する抗体産生能を検討した。ワクチン接種3週間後には麻疹ウイルスPA抗体が産生され、RSV中和抗体は1週間後から検出されMVAIK/RSV/F 免疫後には高い中和抗体が誘導されSubgroup Bに対する交叉免疫を誘導できた。一方、MVAIK/RSV/Gは中和抗体誘導能が低く交叉免疫を示さなかった。更に、MVAIK/RSV/Fの細胞性免疫能の誘導、RSV challenge試験を行う必要がある。

### 【研究目的】

麻疹ワクチン AIK-C 株の感染性 cDNA クローンを樹立し、弱毒のマーカ―を検討してきた。弱毒のマーカ―としては 39°C の高温で増殖しない温度感受性 (temperature sensitivity: ts) を特徴とし P タンパク 439 位の Pro が ts の性状に関連していることを明らかとしてきた。また、AIK-C 株全長の感染性 cDNA の中に外来遺伝子を導入して多価抗原を発現する弱毒麻疹ワクチンウイルスベクターとして利用することを検討してきた。昨年度には Respiratory syncytial virus (RSV) の感染防御抗原と考えられている F もしくは G 外殻タンパクを発現する組換え麻疹ウイルスを作製しその性状を解析し、今回はコットンラットに免疫し免疫原性を検討した。

### 【方法】

1) RSV は臨床分離例の Subgroup A の F タンパク、G タンパクの翻訳領域全長を RT-PCR 法で増幅した。プライマー5'末端には Nco I, Not I の制限酵素配列を付加し増幅後制限酵素で処理し、クローニングした。

2) Asc I 制限酵素部位を P/M junction 部位に導入し、R1, R2 配列を付加し外来遺伝子は Nco I, Not I でクローニングし P/M junction に RSV F, G タンパク遺伝子を導入した cDNA を構築した。

3) 組換え cDNA から感染性キメラウイルスの回収は 293T 細胞に T7 RNA polymerase を発現する組換え Vaccinia virus を感染させ、麻疹ウイルスの転写・複製に必要な N, P, L タンパク発現プラスミドとともに組換え cDNA を co-transfection し 2 日後に B95a 細胞と混合培養した。

4) 7 週齢メスのコットンラットに組換え麻疹ウイルス 10<sup>5.0</sup> TCID<sub>50</sub> のウイルス液を筋注し、接種前、1、3、5、8 週で採血した。麻疹ウイルス抗体は PA 法、RSV は 50 PFU に調整した Subgroup A, B ウイルスを用いて 50% plaque 抑制法で測定した。

### 【結果】

1) 回収した組換え麻疹ウイルスの性状  
P/M junction に RSV F, G 遺伝子を挿入し

た cDNA から感染性ウイルスを回収し、回収したウイルスにデザインした遺伝子が挿入されているかどうかを RT-PCR で確認した。

回収した MVAIK/RSV/F, MVAIK/RSV/G を B95a 細胞に接種し細胞融合を示した部位に一致して麻疹ウイルス N タンパク RSV 抗原の発現が確認された。

## 2) 組換え麻疹ウイルスの免疫能

外来遺伝子を挿入していない MVAIK と RSV を組込んだ MVAIK/RSV/F, MVAIK/RSV/G ウイルス  $10^{5.0}$  TCID<sub>50</sub> のウイルス液を各株あたり2頭に筋注し、接種前、1、3、5、8 週で採血した。血清は PBS で 10 倍に希釈し麻疹ウイルス抗体は PA 法で測定した。3週後から 1:160 以上の高い抗体価が検出された(図1)。

RSV subgroup A の流行株を 50 pfu に調整し 2 倍階段希釈したラット血清と中和反応後 Hep2 細胞をもちいて 50% plaque 抑制法により RSV 中和抗体を測定し結果を図2に示した。MVAIK を接種した 2 頭には RSV 中和抗体は誘導されなかった。MVAIK/RSV/G を接種した 2 頭のうち 1 頭は接種 1 週後に 1:60 の中和抗体が検出されたがもう一頭では 5 週後に 1:20 の中和抗体が検出された。MVAIK/RSV/F を接種した 2 頭は 1:80 以上の高い中和抗体を 8 週まで維持していた。

挿入した RSV は subgroup A に属する流行株を用いて MVAIK/RSV/F, MVAIK/RSV/G を作製し免疫後に得られた血清の subgroup B に対する交叉免疫能を検討した。同じく流行株の subgroup B を 50 pfu に調整し 50% plaque 抑制法により中和抗体を測定し図3に示した。MVAIK/RSV/G 接種後の血清は subgroup B に対する中和抗体は検出できなかったが MVAIK/RSV/F 接種後の血清では 1:80 以上の高い中和抗体価を示した。

## 【考察】

MVAIK/RSV/F, MVAIK/RSV/G で免疫すると麻疹ウイルスに対する抗体は接種 3 週から検出されるが、RSV に対する抗体は接種 1 週後から検出された。組換え麻疹ウイルスの増殖により麻疹ウイルスに対する抗体が誘導され増殖の過

程で RSV F, G タンパクは細胞外にも放出されることで早期から RSV に対する中和抗体が検出されたとかんがえられる。

小児の呼吸器感染症として RSV は再感染を繰り返す、未熟児出生、心奇形児では重篤化し死亡の原因ともなる。RSV の中和活性は F タンパクが優位で G タンパクに対する抗体では中和活性が低いことが知られている。現在では RSV F タンパクに対するヒト型モノクローナル抗体が予防的に使用されており、使用対象に制限があり、高価であることからワクチンに開発が望まれている。今回の免疫原性の検討でも、いずれの組換えウイルスでも中和抗体は誘導するが MVAIK/RSV/G では中和抗体の抗体価も低く、異なる subgroup に対する交叉免疫原性がないことが明らかとなり、一方 MVAIK/RSV/F は高い中和抗体を誘導し交叉免疫活性を示したことから MVAIK/RSV/F がワクチン候補として有望であると思われる。

RSV は、かつて全粒子不活化ワクチンが使用されたが免疫効果は低く、不活化ワクチン接種者が RSV に罹患すると逆に重篤な下気道感染症を起こした。不活化ワクチンの失敗は不活化の過程で中和活性の主抗原である F タンパクが変性し有効な中和抗体を誘導できなかったことに由来する。また、G タンパクは Th2 に偏った免疫応答を誘導することで不活化ワクチンは Th2 に偏った反応で気道の過敏応答にも関与する可能性が想定される。一方、F タンパクは Th1 の反応を誘導することが知られている。RSV subunit vaccine としての可能性は使用する抗原の種類と組み合わせ、投与経路、有効なアジュバントの開発等の問題がある。

生ワクチンの方向性として従来のワクチン株の開発方法である低温馴化株が開発されたが安全性が十分ではなくこの低温馴化株の reverse genetics 法を確立し L 遺伝子に変異を導入したり、インターフェロン産生を調節する NS-1, NS-2 欠損株が検討されているが有効で安全なワクチンは開発されていない。ウシバラインフルエンザをヒト型にして RSV 遺伝子を導入した組換え生ワクチンが考えられているが生ワクチンとしての経験がなくまた免疫原性も低く課題が多

い。AIK-C ワクチンはすでに有効性と安全性が確立されており組換え生ワクチンウイルスベクターとして RSV ワクチンを開発し、麻疹ワクチンは現在皮下接種であるが、吸入でも有効であることが知られおり RSV の外殻タンパクを発現する AIK-C 麻疹ワクチンウイルスを経鼻ワクチンとして利用することが可能である。今回は抗体産生しか検討できなかったが、細胞性免疫能の検討、RSV challenge 試験を行う予定である。

図1. 麻疹 PA 抗体の推移

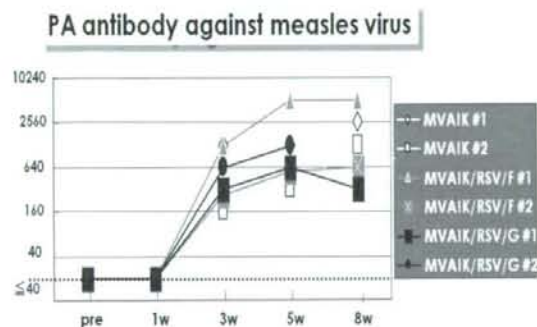


図2. RSV subgroup A の中和抗体の推移

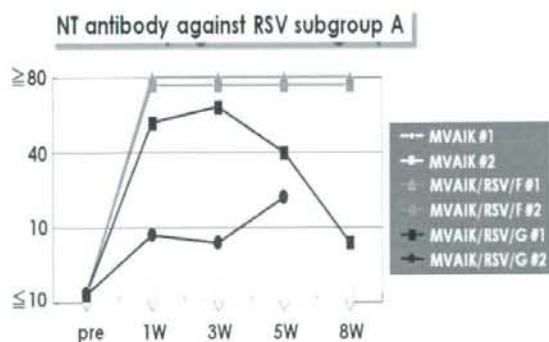
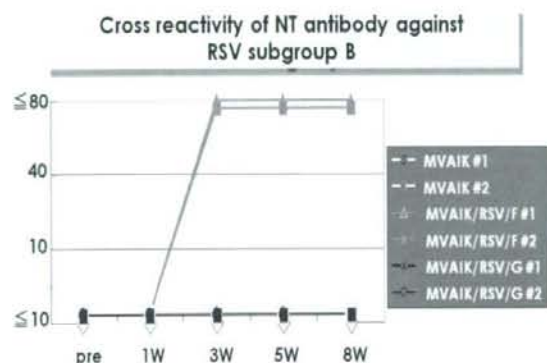


図3 RSV subgroup B 中和抗体の推移



## 組換え麻疹・風疹・ムンプス(rMMR)ワクチンの作製

樋口 彰<sup>1)</sup>、澤田成史<sup>1)</sup>、駒瀬勝啓<sup>2)</sup>、中山哲夫<sup>1)</sup>

1) 北里生命科学研究所 ウイルス感染制御 1

2) 国立感染症研究所 ウイルス第三部第二室

**【研究要旨】**弱毒麻疹ワクチンAIK-C株は安全で有効なワクチンとして世界的に知られておりAIK-Cの Reverse genetics systemを開発し安全性の確立された生ワクチンウイルスベクターとして利用し、麻疹 AIK-C全長感染性cDNAのN/P junctionに風疹ウイルスE1遺伝子、P/M junctionにムンプスウイルスHN遺伝子を組み込んだcDNAから感染性ウイルス(rMMR E1/MpHN)と風疹ウイルスE1と共にムンプスウイルスFタンパクのtransmembrane領域以下を欠失させた組換えウイルス(rMMR E1/MpF)を作製した。感染細胞に挿入した風疹E1、ムンプスウイルス抗原が発現していた。ウイルス粒子を精製し、ウイルス粒子にはムンプスF、HNタンパクは取り込まれてないが風疹E1タンパクが取り込まれている可能性が考えられた。

### 【背景】

1989年からわが国においても麻疹・風疹・ムンプス三種混合生ワクチン(MMR)が使用されたが、予想外にムンプスワクチン成分による無菌性髄膜炎の頻度が高く1993年にはその接種が事実上中止となった。2006年から麻疹、風疹の免疫能強化のために麻疹・風疹二混生ワクチン(MR)を用いて1-2歳と小学入学前の2回接種法に移行し、麻疹排除に近づくことが期待されたが、2007年には、大学生、高校生を中心とした成人麻疹が流行し社会問題となった。2008年から中学1年、高校3年生を対象に5年間のcatch-up campaignを始めることですべての学童が複数回接種を受ける機会を得ることが可能となる。ムンプスワクチンはMMRの事実上中止の後には任意接種のワクチンで接種率は30%前後から上がらずに3-5年毎の流行を繰り返している。

原則としてMMRワクチンは一回の接種で互いに干渉することなく3種類のウイルス感染症に対する免疫能を賦与することが可能で、効率よく予防接種政策を推進することができることから欧米を中心に普及してきた。更に、水痘を加えたMMRV4種混合生ワクチンを勧奨接種としこれらの感染症は激減している。わが国でも予防接種を効率よく実施するためにMMRの復活が望まれている。その障壁となることは無菌性髄膜炎の原因であったムンプスワクチン成分であり、世界中で広く利用されているJeryl Lynn株を含んだメル

ク社製のMMRの治験が実施されたが、いまだに認可されていない。北里研究所で開発された麻疹ワクチン AIK-C 株は 1954 年に分離された Edmonston 野生株からヒトジ腎細胞、鶏胎児胚細胞を用いて 33°C で継代し small plaque cloning を行い樹立された株で、弱毒化のポイントは 39°C でのウイルス増殖は 33°C の増殖の 1/10<sup>4.0</sup> 以下となる温度感受性(temperature sensitivity: ts)が担っており接種後生体内での増殖が低いことが弱毒性と関連していると考えている。

麻疹ウイルスはRNAウイルスで遺伝子操作することで全長cDNAから感染性ウイルスを回収するRG法が確立され、麻疹ウイルスの性状の解析に利用され麻疹ウイルスの性状の解析に分子生物学的アプローチが始まった。麻疹ウイルスの性状の解析のみならず、既に安全性の確立されている麻疹生ワクチンを生ワクチンウイルスベクターとして外来性遺伝子を挿入しワクチンの開発されていないウイルス感染症や、現行ワクチンに問題があるウイルス感染症に対する新規概念のワクチン開発の道が開かれた。AIK-C ワクチン株を基盤とした多価抗原を発現する組換え麻疹生ワクチンウイルスベクターとして風疹ウイルスのE1領域、ムンプスウイルスのFもしくはHNタンパクを挿入した組換え麻疹ウイルス(recombinant MMR; rMMR)を作製した。

### 【対象と方法】

1) 風疹ウイルスとムンプスウイルス遺伝子

挿入する風疹ウイルスは北里研究所製造の高橋株のE1領域をRT-PCRで増幅した。ムンプスウイルスは同様に星野ワクチン株のHN領域、Fタンパクのtransmembrane以下の領域を除いたectodomainをRT-PCRで増幅した。

## 2) rMMRの構築

N/P junctionの1774位CCの上流にGGCGCGを導入しGGCGCGCCのAsc I制限酵素部位を新たに導入し麻疹ウイルスのmRNAのR1, R2配列を付加し風疹ウイルスE1遺伝子はNco I, Not I制限酵素部位にクローニングした。ムンプスウイルスHN, F遺伝子はP/M junctionの3433位の上流に同様にGGCGCGを導入しGGCGCGCCのAsc I制限酵素部位を導入しムンプスウイルス遺伝子を挿入した。全長ウイルス遺伝子は6の倍数になるように感染cDNAクローンを構築した(図1)。

## 3) 感染性ウイルス(rMMR)の回収

293T細胞にT7 RNA polymeraseを発現する非増殖性の組換えワクチニアウイルスを感染させ全長cDNAをN, P, L発現プラスミドとともにtransfectionし2日後にB95a細胞と混合培養し細胞変性効果を目標とし感染性ウイルス粒子を回収した。

## 4) 挿入遺伝子のタンパク発現

麻疹ウイルスNタンパク、風疹ウイルスE1タンパクに対するmonoclonal抗体を、ムンプスウイルスF, HNタンパクに対してはPolyclonal抗体を用い免疫蛍光染色を行った。

### 【結果】

#### 1) rMMRの性状

風疹ウイルスの感染防御能はHA活性を有するE1領域と考えられ、ムンプスウイルスのF, HN領域が中和に関する抗原エпитープと考えられており、麻疹AIK-CのN/P junctionに風疹ウイルスE1, P/M junctionにムンプスHNを挿入したMVAIK Rb E1/MpHNと、P/M junctionにムンプスFを挿入したMVAIK Rb E1/MpFとの性状を解析した。麻疹ウイルスNタンパク monoclonal抗体、風疹E1タンパク monoclonal抗体、ムンプス polyclonal抗体で免疫蛍光染色を行い図2に結果を示した。導入したウイルスタンパクは細胞内で発現が確認された(図2)。

#### 2) rMMRウイルスの性状

rMMRをB95a細胞で増殖させ30%、45%、60%の不連続蔗糖密度勾配で超速心分離し各分画を電気泳動しWestern blottingを行った。MVAIK Rb E1/MpFはムンプスFタンパクのtransmembraneからcytoplasmic domainの領域を欠失させ分泌型のタンパクとしてデザインした。組換え麻疹ウイルス粒子の分画であるFraction 3にはムンプス抗原は検出されなかったが風疹E1は薄いバンドが検出されたことからウイルス粒子に風疹E1タンパクは取り込まれている可能性がある(図3)。

#### 3) rMMRの増殖能

MVAIK Rb E1/MpHNと、MVAIK Rb E1/MpFをB95a, Vero細胞に接種し培養上清中のウイルス感染価を調べた。親株のAIK-Cと同様に39℃では増殖しないtsの性状は保持されていた。33℃における増殖能を図4に示した。AIK-C全長に1種類の外来遺伝子を導入したMVAIK MpHN, MVAIK MpF $\Delta$ TM, MVAIK RbE1と比較すると2種類の遺伝子を挿入したMVAIK Rb E1/MpHN, MVAIK Rb E1/MpFのrMMRウイルスは増殖が遅くなることがわかった。

### 【考察】

AIK-C麻疹生ワクチンはわが国を中心に既に2000万人が接種を受け重篤な副反応は少なく、アフリカ等の開発途上国でも6か月の乳幼児に対する接種試験の結果からも世界中の麻疹生ワクチンの中でも最もすぐれた麻疹ワクチンの一つであると評価されている。麻疹ワクチンAIK-C株を生ワクチンウイルスベクターとして用い、風疹、ムンプス抗原を発現する組換え麻疹ウイルスを作製した。Fタンパク、HNタンパクを組み込んだ2種類のrMMRを作製したが、感受性動物に接種し中和抗体誘導能を検討する必要がある。製剤化するためには以下の改良が必要となる。

① 鶏胎児胚細胞で増殖すること ② 感染性ウイルス回収の過程で293T, B95a細胞と生ワクチン製造に認可されていない細胞を用いているので改善が必要である。③ 回収過程で非増殖性のVaccinia virusを用いている。

以上の課題を克服する必要がある。rMMRだ



けでなく、いまだに有効なワクチンが開発されて  
いない感染症に対するワクチン開発のツールと  
なる。

図1. 感染性 rMMR cDNA の構築

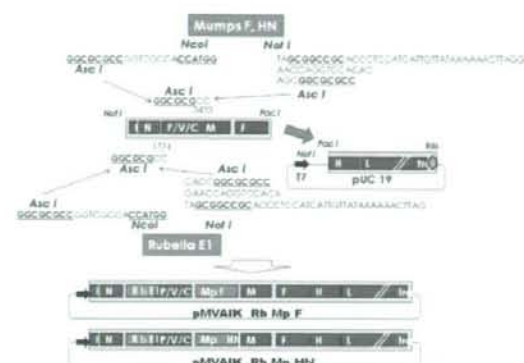


図2. 挿入遺伝子からのタンパク発現

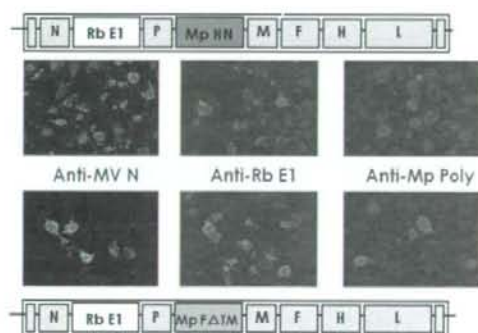


図3. rMMR ウイルス粒子の性状

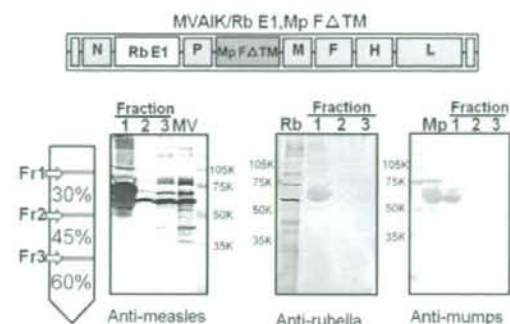
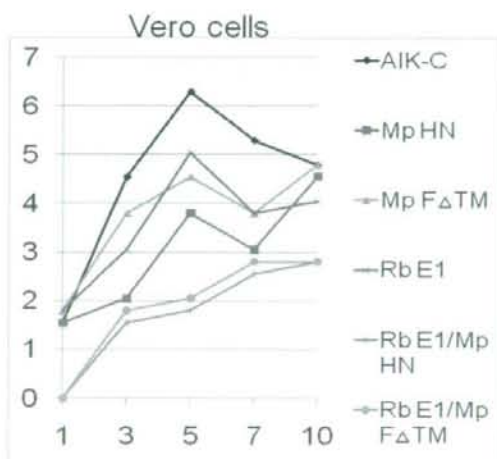


図4. 組換えウイルスの Vero 細胞における増殖能



厚生労働科学研究費補助金  
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)  
分担研究者報告書

麻疹検査診断ネットワークについて

研究分担者：駒瀬勝啓<sup>1</sup>

研究協力者：長野秀樹<sup>2</sup>、岡野素彦<sup>2</sup>、青木洋子<sup>2</sup>、小川知子<sup>2</sup>、倉本早苗<sup>2</sup>、  
皆川洋子<sup>2</sup>、加瀬哲男<sup>2</sup>、小倉肇<sup>2</sup>、千々和勝巳<sup>2</sup>、平良勝也<sup>2</sup>、田中智之<sup>3</sup>、木村博一<sup>4</sup>

<sup>1</sup>国立感染症研究所ウイルス第3部、<sup>2</sup>麻疹・風疹レファレンスセンター、  
<sup>3</sup>堺市衛生研究所、<sup>4</sup>国立感染症研究所情報センター

研究要旨

2012年までの麻疹排除達成をめざして2008年1月から麻疹は全数届出疾病となった。しかし、2008年の麻疹報告症例のうち検査診断がされているのは約35%であり、臨床診断による報告が主であった。世界保健機構(WHO)による麻疹排除の達成の定義には、麻疹疑い例の80%以上が検査診断されている事が要件としてあげられている。麻疹排除の達成の過程において、検査診断が一般的に行える環境が必要となる。迅速な実験室診断を実現するために、医療機関、保健所、地方衛生研究所、感染研間の連携による検査実施体制の確立を目指している。そのため、9ヶ所の地方衛生研究所を麻疹・風疹レファレンスセンターとし、感染研と各県、政令都市の地衛研を結ぶ麻疹検査診断ネットワークの中核とした。また、標準検査診断法の運用方法、標準参照品等による試験精度管理法を検討した。麻疹排除達成に必要な麻疹検査診断体制が地衛研、感染研間で構築されつつある。

研究目的

「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」に基づく届出基準の改正により、2008年1月1日より麻疹及び風疹は全数届出疾病となった。また、平成19年12月28日に告示された「麻疹に関する特定感染症予防指針」では、麻疹が一定数以下になった場合、原則、全数検査診断を行う事とし、麻疹検査診断体制の強化を盛り込んでいる。麻疹検査診断の必要性は下記の理由による。

1. 麻疹は感染力の非常に強い感染症であり、迅速かつ正確に感染者を把握する事が感染の拡大阻止、さらには社会的混乱を最少にすることに有効である。
2. 臨床症状だけでは診断が困難な修飾麻疹が増

加している。

3. 日本が所属するWHO西太平洋事務局(WPRO)の定めた麻疹排除の評価基準には、年間人口100万人あたり、確定麻疹症例数が1未満であること、95%以上の予防接種率により国民の95%以上が麻疹に対する免疫を維持していること等と共に、麻疹検査診断による精度の高い麻疹サーベイランス体制の確立をあげている。
4. 麻疹検査診断により得られるウイルスゲノムの情報はウイルスの由来、移動コース等のトレースを可能にし、感染源の同定、あるいは海外からの輸入例か否の判断ができる。

このような背景をふまえて、本研究は医療機関、

保健所、地方衛生研究所、感染研を結んだ、麻疹検査診断体制を構築することを目的としている。

#### 方法、結果:

##### 麻疹検査診断ネットワークの構築

2008年6月に行われた衛生微生物技術協議会研究会・レファレンス委員会において、地衛研、感染研による麻疹、風疹検査診断体制の強化のための麻疹・風疹レファレンスセンターの設置が承認された。感染研が世話役となり、北海道、東北、関東・甲・信・静岡、東海、北陸、近畿、中国・四国、九州、ならびに沖縄の9地区の地衛研の中にレファレンスセンターを設置し、感染研、レファレンスセンター、地衛研の各役割を以下のように定めた。1) 感染研においては標準的な麻疹検査診断方法の確立、検査等に必要な標準品の準備・配布、研修、精度管理等の実施、厚労省、WHOへの報告等、2) レファレンスセンターにおいては感染研からの情報、標準品等を地区内の地衛研へ連絡、配布、検査診断についての助言等。さらに地区内の地衛研に集められた血清、血漿検体を用いた麻疹IgM抗体測定の実施。また、必要に応じて感染研と共に地区内の地衛研のバックアップ。3) 地衛研においては、入手した尿、咽頭拭い液、血液からRT-PCR法を中心とした麻疹検査診断、塩基配列解析、genotype解析の実施(図1)。

##### 標準検査診断法の策定

レファレンスセンターを通じた地衛研へのアンケートでは、RT-PCR法による麻疹検査診断が最も対応可能であるとの意見が多かった。また、麻疹IgM ELISA法は、麻疹の発症初期検体においてはRT-PCR法より感度が劣る傾向があること、パルボウイルスB19等と交差反応を起こす事などから、標準検査診断法としてRT-PCR法を採用した。麻疹検査マニュアル第2版にある2つのRT-PCR法の

感度を評価し、感度の優れているH遺伝子RT-PCRを第一選択とし、陽性だった場合、genotype決定のためのNP遺伝子解析を実施する手順を決定した。また、RT-PCRの精度管理するための標準RNAを配布した。レファレンスセンターが実施する麻疹IgM ELISAに関しては、WHOの基準に従って、麻疹IgM ELISA習熟度試験を実施した。すべてのセンターはWHOの基準をクリアした。

考察: 麻疹検査診断による麻疹サーベイランス体制は、麻疹の感染拡大阻止だけでなく、麻疹排除までの過程に必須な麻疹動向の正確な把握のためにも重要である。また、精度の高いサーベイランス体制は麻疹排除がなされたことを証明するためにWHOからも要求されている。本研究による麻疹検査診断ネットワークは、これらの期待に応えるものである。一方、現在は医療機関において、麻疹検査診断の必要性があまり認識されていない場合があり、検体採取のタイミングを逸することがある。医療関係者には、例え典型例であっても検査診断を実施するという認識を共有してもらう事が必要となる。また検体、情報の伝達、運搬等を担う保健所を含む行政側との積極的な連携が、今後、麻疹検査診断体制の強化に重要であろう。

#### 結論:

地方衛生研究所、感染研間の連携による麻疹検査実施体制ができつつある。今後、検査診断による麻疹サーベイランス体制の強化には、行政、医療機関との連携、認識の共有が重要となってくる。

健康危険情報: なし

#### 1. 研究発表

IASR Vol.30 No2, 2009

2. 知的財産権の出願・登録状況(予定をふくむ)

2) 実用新案登録; なし

1) 特許; 特になし

3) その他; なし

