

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）

分担者研究報告書

ウイルス感染症の診断、疫学および予防に関する研究

ハンタウイルス感染症の診断法

分担研究者 有川二郎 北海道大学大学院医学研究科 教授

研究要旨： ハンタウイルスはブニヤウイルス科に分類され、腎症候性出血熱(HFRS)とハンタウイルス肺症候群(HPS)の原因ウイルスである。両疾患ともに持続感染したげっ歯類を自然宿主とする人獣共通感染症である。HFRSの流行は中国、極東ロシアや欧州を中心に広くユーラシア大陸全域で、また HPS は南北アメリカ大陸で報告され、公衆衛生上の大きな問題となっている。本研究では、迅速にハンタウイルス感染を検出するための血清診断法の開発、広い範囲のハンタウイルスをカバーする PCR 法の開発、およびアジアにおけるいわゆる不明熱にハンタウイルスが関与しているかどうかについて検討を行う。

A. 研究目的

ハンタウイルスはブニヤウイルス科に分類され、腎症候性出血熱(HFRS)とハンタウイルス肺症候群(HPS)の原因ウイルスである。両疾患ともに持続感染したげっ歯類を自然宿主とする人獣共通感染症である。HFRSの流行は中国、極東ロシアや欧州を中心に広くユーラシア大陸全域で、また HPS は南北アメリカ大陸で報告され、公衆衛生上の大きな問題となっている。また、東南アジア諸国では、不明熱患者の発生が多く報告され、その中にハンタウイルスを原因とする流行の存在が危惧されてきた。これまで、タイをはじめベトナム、インドネシア、台湾などで人やげっ歯類にハンタウイルス抗体陽性例が報告され、東南アジア諸国において

も流行の存在が示唆されてきたが、感染の状況についての情報は極めて不足している。

ハンタウイルスのうち、Hantaan virus (HTNV)、Seoul virus (SEOV)、Dobrava virus (DOBV)およびPuumala virus (PUUV)の少なくとも4つの血清型がHFRSの原因となっていることを示す結果が数例ではあるが得られている。またSin Nombre virus (SNV)を始めとするアメリカネズミ亜科のげっ歯類によって媒介されるハンタウイルスはHPSの原因ウイルスである。非常に多種類のウイルスが南北アメリカ大陸で見いだされているが、ヒトへの病原性を示すものとしては北米大陸のSin Nombre virus (SNV) および南米大陸由来の

Andes virus (ANDV)、やや軽症である可能が議論されている Laguna Negra virus (LANV) が知られている。その他にも中米などからも多くのウイルスが検出されているが、多くのウイルスはヒトへの病原性については明らかになっていない。また、ANDV は多様性が高く、どこまでを ANDV の範疇とするのかについて未だ明確ではない。

HTNV、SEOV、DOBV および THAIV はネズミ亜科のげっ歯類、そして PUUV はハタネズミ亜科のげっ歯類に、SNV および ANDV はアメリカネズミ亜科の齧歯類によって媒介される。3つのグループのウイルスは互いに抗原性が大きく相違し交差反応性が低いことから、ハンタウイルス感染症の血清診断を行うためには少なくとも3種類の抗原が必要である。ANDV、SNV の抗原性は交差が強いため、どちらかひとつの抗原を用いてスクリーニングすることが可能である。逆にこの二つを血清学的に区別する場合中和試験が必要であるとされている。多くのハンタウイルスの中で ANDV のみがしばしばヒト-ヒト感染を起こすことが知られている。このため、輸入感染症として見いだされた場合迅速に ANDV か否かの鑑別が必要であると考えられる。しかしながら、交差中和試験には感染性のあるウイルスを多種類準備し、これを安全に取り扱う施設の準備も必要である。これらの準備は大変なコストがかかり、結果を得るまでに時間がかかる。私たちはこれまでネズミ亜科由来ウイルスについて、中和試験の代替として、核蛋白の型特異的エピトープを利用した鑑別 ELISA を報告して

きた。昨年度までに、HPS 関連ウイルスに関してこの試験の応用を進めてきたが、今年度はアルゼンチンの研究所との連携により、南米 HPS 患者および reservoir である齧歯類血清についてさらなる応用を試みた。

さらに、病原巣動物対策を実施するためには、これらの感染を迅速に摘発し鑑別する系を準備しておくことが、公衆衛生上必要があると考えられる。そこで、ラット属を病原巣動物とする SEOV を用いて野生ラットの抗体検出系を改善し、野外における持続感染成立のメカニズムを解明することを試みた。港湾の SEOV を保有するラットのグループから、採材を行い、年齢推定、抗ハンタウイルス保有状況 (IgM および IgG 抗体)、肺のウイルスゲノム量、および CTL 活性を測定できるサンプリングを行うことを試みた。

## B. 研究方法

「抗原」：各ハンタウイルス組換え核蛋白(NP)の全長(アミノ酸：全長抗原)あるいはN末端トランケートNPをバキュロウイルスベクター(AcNPV:BAC-TO-BAC GIBCO BRL)を用いて昆虫細胞(High Five)に発現させた。組み換えバキュロウイルス感染細胞はガラスプレート上に固着後アセトン固定し、間接蛍光抗体法(IFA)抗原とした。また、SDS で処理し、Western blotting 抗原とした。また、超音波処理後 ELISA 抗原とした。

「ELISA」：ELISA は基本的には既報の方法に従った (Araki et al J. Clin Microbiol. 2001) (Miyamoto Arch. Virol. 2003)。

「患者血清、免疫血清」：SNV に感染した米国の患者血清、カナダで捕獲されたシカシロアシマウスの血清、ベトナムで捕獲されたドブネズミおよびクマネズミの血清、アルゼンチンで捕獲され、保有するウイルスのタイプが PCR によって確定した齧歯類血清およびアルゼンチンの HPS 患者血清のうち PCR で罹患ウイルス型が決定されている血清を用いた。陽性コントロールとして、SNV ウイルスの組換え核蛋白を免疫し家兎血清を用いた。また、ラット (WKAH/hkm, 5 週齢メス) に SEOV を接種し経時的に採血をし抗体の消長を観察した。

(倫理面からの配慮について)

用いた感染血清 (患者血清) は米国およびアルゼンチンの研究所から分与されたものである。当該研究所で既に研究目的で使用が認められているものであり、さらに無記名で分与されたものであることから、倫理面からの問題はない。各種免疫血清の採血は、何れも深麻酔後全採血、安楽死処分を行ったものであり、動物福祉の観点からも問題はないと判断された。

#### C. 研究結果

##### (1) 南米由来 HPS 関連ウイルス感染鑑別診断法の開発

南米由来の HPS の主な原因ウイルスである、ANDV と LANV の感染の簡易鑑別診断法をヒトおよび病原巣動物で開発することを目的に抗原の作製を行った。ANDV、および LANV の組換え NP 抗原の N 末端を 50 アミノ酸あるいは 100 アミノ酸を欠いたトランケート抗原をバキュロウイルスベクターで発現させ抗原とした。これらの組換え抗原の発現量と抗原性

を Western blotting および IFA で確認した。

##### (2) ラットにおけるハンタウイルス持続感染メカニズムの解明

ベトナムハノイのハイフォン港にて SEOV 感染ラットを捕獲し、ラット持続感染系と免疫状態との比較の評価に用いた。抗体陽性率はおよそ 34% であり、2005 年度とほぼ同様の IgG 抗体陽性率を示し、コロニーとして持続的に SEOV を保有していることが示された。がプラトーに達する。PCR でも抗体保有個体の約 7 割がゲノムを保有していることが示された。この塩基配列は 2005 年の調査で得られた配列と同一であった。これらの個体から、脾臓細胞を分離保存した。さらに肺の組織から RNA も保存した。野外ラットでの IgM 抗体、CTL、ウイルスゲノム量を測定・比較する研究は過去にレイが無く、持続感染成立のメカニズムを解明するため有効であることが考えられた。

#### D. 考察

##### (1) HPS 関連ウイルス感染鑑別診断法の開発

ANDV/LANV 感染の簡易鑑別診断法に用いる抗原の発現に成功した。今年度はこのシステムを検証するために多くの陽性血清が得られた。一方、昨年度に検証を開始した北米由来血清は未だ不十分であり、今後も北米・南米の共同研究者に依頼して、患者血清および病原巣動物の血清の収集を進める必要がある。

(2) 昨年度は実験的に SEOV 感染させたラットでの免疫応答の解析を進めてきた。今年度は野外例の解析を開始した。サンプルとして取

り上げた港湾に常在する S E O V の配列を基本にリアルタイム PCR のシステムを確立すること、および、野外ラットでの ELISPOT による CTL 応答測定を早急に確立刷る必要がある。

## E. 結論

ハンタウイルスはその宿主によって、ネズミ亜科由来、ハタネズミ亜科由来、新世界ネズミ由来、およびトガリネズミ目（食虫類由来）ウイルスの4つのグループに分けられ、その多様性から診断法はそれぞれについて必要である。また、次々と新規ウイルスが報告されつつあり、近い将来より多くのグループが認められるようになる可能性がある。それらについて情報を収集し、診断法を迅速に準備していくことが公衆衛生対策上必要であると考えられる。

## 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Tegshduuren E, Yoshimatsu K, Taruishi M, Endo R, Shimizu K, Koma T, Yasuda PS, Kariwa H, Arikawa J, and Ishihara C. :Studies on the susceptibility of the Japanese grass vole, *Microtus montebelli*, to Tula virus and Puumala virus of the hantaviruses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2010. in press.

2) Mertens, M., Wolfel, R., Ullrich, K., Yoshimatsu, K., Blumhardt, J., Romer, I., Esser, J., Schmidt-Chanasit, J., Groschup, M.H., Dobler, G., Essbauer, S.S., and Ulrich, R.H. :Seroepidemiological study in a Puumala virus outbreak area in South-East

Germany. *Med Microbiol Immunol* Volume 198, Number 2 /P83-91, 2009

3) Chandy, S., Yoshimatsu, K., Boorugu, H.K., Chrispal, A., Thomas, K., Peedicayil, A., Abraham, P., Arikawa, J., Sridharan, G. :Acute febrile illness caused by hantavirus: Serological and molecular evidence from India. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Elsevier, Volume 103, Issue, Pages S1-S1, 2009

4) Thang, T.T., Yoshimatsu, K., Araki, K., Lee, B.H., Okumura, M., Taruishi, M., Endo, R., Nakamura, I., Koma, T., Yasuda, S., Shimizu, K., Ninh, T.U., Arikawa, J. Molecular epidemiological and serological studies of hantavirus infection in Northern Vietnam. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 71(10);P1357-1363, 2009

5) Chandy, S., Okumura, M., Yoshimatsu, K., Ulrich, R.G., John, G.T., Abraham, P., Arikawa, J., Sridharan, G. Hantavirus species in India : A retrospective study. *Indian J Med Microbiol* 2009;27:P348-50

6) Schmidt-Chanasit, J., Essbauer, S., Petraityte, R., Yoshimatsu, K., Tackmann, K., Conraths, F.J., Sasnauskas, K., Arikawa, J., Thomas, A., Pfeffer, M., Scharninghausen, J.J., Spletstoesser, W., Wenk, M., Heckel, G., Ulrich, R.G. Extensive host sharing of central European Tula virus. *Journal of Virology*. Vol.84, No.1. 2009

### 2. 学会発表

新井 智、田原研司、Oh Hong-Shik、高田伸弘、Song Jin-Won、Kang hae Ji、N.Bennett Shannon、多屋馨子、有川二郎、岡部信彦、Yanagihara Richard: Genetically distinct hantavirus in the Asian lesser white-toothed shrew on Jeju island, Korea.: 第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル(2009.10)

2) 吉川佳佑、苅和宏明、瀬戸隆弘、真田崇弘、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫、

極東ロシアの野鼠からのハンタウイルスの分離と人におけるウイルス感染状況の調査 第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル(2009.10)

3) 吉田喜香、苺和宏明、Ramos Celso, Hernandez Cornelio S. Almaraz Maria L.R. 高野絢子、戸谷理詩、宮下大輔、Ngonda Saasa、瀬戸隆弘、真田崇弘、吉川佳佑、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫: メキシコの野生げっ歯類が保有するハンタウイルスの遺伝子解析 第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル(2009.10)

4) エルテネサイハンテグシドーレン、清水健太、吉松組子、遠藤理香、駒 貴明、安田俊平、有川二郎、石原智明: トガリネズミ目(旧食虫目)由来ハンタウイルスThottapalayamウイルス(TPMV)核蛋白の単クローン抗体を用いた抗原領域の解析 第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル(2009.10)

5) 安田俊平、吉松組子、遠藤理香、清水健太、駒 貴明、Erdenesaikhan Tegshduuren, 垂石みどり、有川二郎: ハンタウイルス自然感染ラットと実験感染ラットにおける病態の比較 第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル(2009.10)

6) 駒 貴明、吉松組子、垂石みどり、遠藤理香、清水健太、安田俊平、エルテネサイハンテグシドーレン、海老原秀喜、Cornelio S. Hernandez, Maria L.R. Almaraz, Celso Ramos, 宮下大輔、瀬戸隆弘、

苺和、宏明、高島郁夫, Delia Enria, 有川二郎: 新世界ハンタウイルス感染の血清型鑑別ELISA法の確立 第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル(2009.10)

7) 遠藤理香、吉松組子、駒 貴明、清水健太、安田俊平、Erdenesaihan Tegshduuren, 垂石みどり、海老原秀喜、宮下大輔、瀬戸隆弘、Cornelio S. Hernandez, Maria L.R. Almaz, Celso Ramos, 苺和宏明、高島郁夫、有川二郎: 汎用PCRプライマーを用いたハンタウイルス遺伝子検出スクリーニング法の確立 第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル(2009.10)

8) 清水健太、イブラハムイマヌリサ、吉松組子、遠藤理香、安田俊平、駒 貴明、エルテネサイハンテグシドーレン、有川二郎: インドネシアのげっ歯類におけるハンタウイルス感染症の疫学 第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル(2009.10)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金・地球規模保健課題推進研究事業  
(国際医学協力研究事業)  
分担者研究報告書

ハンタウイルス感染症の疫学的研究

分担研究者 苺和宏明 北海道大学大学院獣医学研究科 准教授

研究要旨

ハンタウイルスはげっ歯類を病原巣動物として自然界に分布し、人が感染すると腎症候性出血熱(HFRS)やハンタウイルス肺症候群(HPS)などの重篤な疾病を引き起こす。ハンタウイルスには様々なウイルスが知られているが、遺伝子性状や抗原性状はウイルスごとに大きく異なっている。中国、韓国、ロシア、ヨーロッパ諸国などのユーラシア大陸では HFRS が流行しているのに対し、米国やアルゼンチンなど、南北アメリカ大陸の諸国では HPS が多発している。わが国には年間 42 万匹以上のげっ歯類が HFRS の流行国などから輸入されているものの、検疫所などで輸入動物を対象としたハンタウイルス感染に対する検査は行われていない。従来の検査法ではハンタウイルスの種類やげっ歯類の種類に応じて様々な試薬を準備しなければならないため、一般の検査機関でハンタウイルス感染動物を効率的に検出することは困難であった。そこで本研究では、ウイルスやげっ歯類の種類にとらわれずにハンタウイルス抗体の検出が可能な ELISA 法の確立を試みた。まず、3 種類のハンタウイルスのヌクレオキャプシドタンパク質(NP)を大腸菌中で発現させ、これらを等量ずつ混合することによって ELISA の抗原とした。また、様々な動物種の抗体検出を一種類の試薬で行うために、ペルオキシダーゼ標識 Protein G を標識試薬として採用した。本 ELISA により、様々なハンタウイルス感染動物の抗体が検出可能であった。また、ハンタウイルス感染野生げっ歯類の血清にも本 ELISA を応用し、IFA の結果と比較したところ、敏感度、特異度がそれぞれドブネズミの血清では 90.9%と 94.4%、ハントウアカネズミの血清では 90%と 100%、エゾヤチネズミとセスジネズミの血清では敏感度と特異度がいずれも 100%となった。したがって、本 ELISA は検疫所などにも導入可能な信頼性の高い血清診断法であることが示された。

A. 研究目的

ハンタウイルスはげっ歯類を自然宿主とする、マイナス一本鎖の RNA ウイルスで、Hantaan、Seoul、Puumala、Sin Nombre など 20 種類以上のウイルスの存在が知られている。本ウイルスは人に感染すると腎症候性出血熱(HFRS)やハンタウイルス肺症候群(HPS)など

の重篤な疾患を引き起こす。わが国には年間 42 万匹以上のげっ歯類が HFRS の流行国などから輸入されているものの、検疫所などにおけるハンタウイルス感染動物の検査体制は未整備のままである。

従来のハンタウイルスの検査法ではウイル

スの種類やげっ歯類の種類に応じて様々な試薬を準備しなければならないため、一般の検査機関でハンタウイルス感染動物を効率的に検出することは困難であった。そこで本研究では、ウイルスやげっ歯類の種類にとらわれずにハンタウイルス抗体を簡便に検出することが可能な ELISA 法の確立を試みた。

## B. 研究方法

### 1. ハンタウイルスのヌクレオキャプシドタンパク質(NP)の発現

3 種類 of ハンタウイルス [Amur virus (AMRV)、Hokkaido virus (HOKV)、および Sin Nombre virus (SNV)] の S 遺伝子を pET43.1b ベクターに組み込み、NusA タンパク質との融合タンパク質として NP を大腸菌中で発現させ、ELISA 用の抗原に用いた。また、NusA タンパク質も大腸菌中で発現させ、対照抗原として用いた。

### 2. ハンタウイルス感染および免疫血清 ハンタウイルス感染および免疫血清は以下のものを用いた。

- 1) Puumala virus (PUUV) 感染マウス血清
- 2) Seoul virus (SEOV) 感染ラット血清
- 3) SEOV 感染マウス血清
- 4) Hantaan virus (HTNV) 感染マウス血清
- 5) Amur virus (AMRV) 感染マウス血清
- 6) Sin Nombre virus (SNV) NP 免疫家兎血清

### 3. 野生げっ歯類の血清

1990 年に北海道旧・上磯町(現・北斗市)で野生げっ歯類の疫学調査を行い、28 匹のドブネズミを捕獲した。また 2004 年には北海道中川町で 47 匹のエゾヤチネズミを捕獲した。さらに 2002 年と 2005 年にはロシア連邦ハバロフスクでそれぞれ 46 匹のセ

スジネズミと 29 匹のハントウアカネズミを捕獲した。

## 4. ELISA による抗体検出

AMV、HOKV、および SNV の NP と NusA のコートされた 96 穴プレートに牛血清アルブミンでブロッキングし、げっ歯類等の血清をアプライした。抗体の検出はペルオキシダーゼ標識 Protein G で行った。各血清について NP に対する吸光度から NusA に対する吸光度を差し引いたものを ELISA の吸光度とした。

(倫理面からの配慮について)

ハンタウイルス感染動物の飼育は北海道大学大学院獣医学研究科の動物実験に関するガイドラインと北海道大学病原体等安全管理規定に従って、BSL3 実験室内で行われた。

## C. 研究結果

大腸菌で発現させた 3 種類のハンタウイルス NP を抗原とした ELISA を用いて、ハンタウイルス感染動物の抗体検出を試みた。PUUV 感染マウス血清、SEOV 感染ラット血清、SEOV 感染マウス血清、HTNV ウイルス感染マウス血清、および AMRV ウイルス感染マウス血清において血清の濃度に依存した ELISA の吸光度が得られた。また、SNV NP 免疫家兎血清は 800 倍希釈血清でも 2.0 以上の高い吸光度を示した。したがって、本 ELISA により様々な動物種の多様な抗ハンタウイルス抗体を検出できることが明らかになった。

続いて野生げっ歯類における抗ハンタウイルス抗体の検出を試みた。まずドブネズミ 28 例について ELISA を実施したところ、10 例が陽性となり、これらはいずれも IFA でも陽性であった。ドブネズミの血清において IFA と比較

した抗体検出 ELISA の感度率は 90.9%、特異度は 100%であった。ハントウアカネズミについての ELISA では、29 例中 9 例が陽性であり、IFA に対する感度率と特異度はそれぞれ 90%と 100%であった。エゾヤチネズミについて ELISA を実施したところ、47 例中 5 例が陽性であり、IFA と比較した感度率と特異度はいずれも 100%であった。セスジネズミについての ELISA では、46 例中 5 例が陽性で、IFA に対する感度率と特異度はいずれも 100%であった。

また、メキシコの野生げっ歯類を検体として本 ELISA を実施したところ、ハンタウイルス抗体を保有していることが Western blot で確認されている血清は ELISA でも明らかな陽性を示し、Western blot 陰性の血清は ELISA でも陰性であった。

#### D. 考察

これまで、ハンタウイルス感染げっ歯類の抗体検査にはウイルスの種類やげっ歯類の種類に応じて多種類の抗原と標識抗体を準備する必要があった。今回開発を試みた抗体検出用の ELISA では、抗原性の大きく異なる 3 種類のウイルスの NP をあらかじめ混合して抗原とすることで、多種類のハンタウイルスに対する抗体を捕捉することが可能と考えられる。また、抗体の検出は各種動物の IgG に対して結合性が知られている Protein G をペルオキシダーゼ標識したものをを用いるので、動物ごとに抗血清を用意する必要もない。今回、本 ELISA によって、HTNV、AMRV、SEOV、HOKV、PUUV、SNV、およびメキシコのハンタウイルスに対する抗体を検出することができた。上記ウイルスのうち、HTNV、AMRV、SEOV、PUUV、および SNV は人に病原性を示すことが知られ

ているばかりでなく、互いに抗原性も大きく異なっている。また、動物種も、少なくともマウス、ラット、セスジネズミ、ハントウアカネズミ、エゾヤチネズミ、ウサギ、およびメキシコのげっ歯類に应用可能であることが判明した。

#### E. 結論

わが国には年間 42 万匹以上ものげっ歯類が輸入されているにも関わらず、輸入時にげっ歯類を対象としたハンタウイルス感染の検査は行われていない。今回開発した ELISA は簡便で、従来法の IFA と比べても信頼性の高い診断法であることが明らかになった。様々なげっ歯類のハンタウイルス感染を検出できるため、本 ELISA は今後、検疫所や衛生研究所などの検査機関へ導入することが可能であると考えられる。

なお、本研究はハバロフスク・ペスト防疫研究所の Leonid I. Ivanov 博士、メキシコ国立公衆衛生研究所の Celso Ramos 博士、メキシコ国立自治大学の Cornelio S. Hernandez 博士および Maria L. R. Almaraz 博士との共同研究である。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kariwa H, Tkachenko EA, Morozov VG, Seto T, Tanikawa Y, Kolominov SI, Belov SN, Nakamura I, Hashimoto N, Balakiev AE, Dzagurnova TK, Daud NH, Miyashita D, Medvedkina OA, Nakauchi M, Ishizuka M, Yoshii K, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I. Epidemiological study of

hantavirus infection in the Samara Region of European Russia. J Vet Med Sci. 71: 1569-1578. 2009.

## 2. 学会発表

- 1) 吉川佳佑、苺和宏明、瀬戸隆弘、真田崇弘、石塚万里子、吉松組子、有川二郎、Leonid Ivanov、好井健太郎、高島郁夫：極東ロシアのげっ歯類からのハンタウイルスの分離とウイルス遺伝子の性状解析：第 147 回日本獣医学会学術集会、宇都宮（2009, 4）
- 2) 秋山稔、村田亮、高島郁夫、苺和宏明、渡辺智正、倉根一郎、前田潤子、前田秋彦：PCR 法を用いた組み換えウエストナイルウイルスの作製：第 148 回日本獣医学会学術集会、鳥取（2009, 9）
- 3) 村田亮、橋口和明、好井健太郎、野田寛、伊川綾恵、原田祐里、苺和宏明、高島郁夫：極東ロシアの野鳥におけるウエストナイル熱の血清疫学調査と中和試験の評価：第 148 回日本獣医学会学術集会、鳥取（2009, 9）
- 4) 持館景太、好井健太郎、大森優紀、千葉裕美子、村田亮、真田崇弘、前田潤子、苺和宏明、高島郁夫：日本国内におけるダニ媒介性脳炎の血清疫学調査：第 148 回日本獣医学会学術集会、鳥取（2009, 9）
- 5) 高野絢子、大森優紀、好井健太郎、石塚万里子、村田亮、苺和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス Sofjin 株のレプリコンの構築：第 148 回日本獣医学会学術集会、鳥取（2009, 9）
- 6) 好井健太郎、苺和宏明、高島郁夫、Holbrook Micael：オムスク出血熱ウイルスの感染性 cDNA の構築：第 148 回日本獣医学会学術集会、鳥取（2009, 9）
- 7) 吉田喜香、苺和宏明、高野絢子、戸谷理

- 詩、宮下大輔、Saasa Ngonda、瀬戸隆弘、真田崇弘、吉川佳佑、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：メキシコの野生げっ歯類が保有するハンタウイルスの遺伝子解析：第 148 回日本獣医学会学術集会、鳥取（2009, 9）
- 8) 持館景太、好井健太郎、大森優紀、千葉裕美子、村田亮、真田崇弘、前田潤子、苺和宏明、高島郁夫：日本国内におけるダニ媒介性脳炎の血清疫学調査：日本獣医公衆衛生学会北海道地区大会、札幌（2009, 9）
- 9) 吉川佳佑、苺和宏明、瀬戸隆弘、真田崇弘、石塚万里子、吉松組子、有川二郎、Leonid Ivanov、Raisa Slonova、好井健太郎、高島郁夫：極東ロシアのげっ歯類からのハンタウイルスの分離と人におけるウイルス感染状況の調査：日本獣医公衆衛生学会北海道地区大会、札幌（2009, 9）
- 10) 好井健太郎、苺和宏明、高島郁夫：オムスク出血熱ウイルスの感染性 cDNA の構築：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京（2009, 10）
- 11) 高野絢子、大森優紀、好井健太郎、石塚万里子、村田亮、苺和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス Sofjin 株のレプリコンの構築：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京（2009, 10）
- 12) 前田秋彦、前田潤子、村田亮、白藤浩明、金平克史、苺和宏明、高島郁夫、倉根一郎：ウエストナイルウイルスと日本脳炎ウイルスの鑑別中和試験法の開発：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京（2009, 10）
- 13) 持館景太、好井健太郎、大森優紀、千葉裕美子、村田亮、真田崇弘、前田潤子、苺和宏明、高島郁夫：日本国内におけるダニ媒介性脳炎の血清疫学調査：第 57 回日本ウイル

ス学会学術集会、東京(2009, 10)

14) 吉川佳佑、苺和宏明、瀬戸隆弘、真田崇弘、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫:極東ロシアのげっ歯類からのハンタウイルスの分離と人におけるウイルス感染状況の調査:第57回日本ウイルス学会学術集会、東京(2009, 10)

15) 吉田喜香、苺和宏明、Celso Ramos、Cornelio Sanchez- Hernandez、Maria Loudres Romero-Almaraz、高野絢子、戸谷理詩、宮下大輔、Saasa Ngonda、瀬戸隆弘、真田崇弘、吉川佳佑、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫:メキシコの野生げっ歯類が保有するハンタウイルスの遺伝子解析:第57回日本ウイルス学会学術集会、東京(2009, 10)

16) 駒貴明、吉松組子、垂石みどり、遠藤理香、清水健太、安田俊平、エルテネサイハンテグシドーレン、海老原秀喜、Cornelio S. Hernandez、Maria L. R. Almaraz、Celso Ramos、宮下大輔、瀬戸隆弘、苺和宏明、高島郁夫、Delia Enria、有川二郎:新世界ハンタウイルス感染の血清鑑別 ELISA 法の確立:第57回日本ウイルス学会学術集会、東京(2009, 10)

17) 遠藤理香、吉松組子、駒貴明、清水健太、安田俊平、エルテネサイハンテグシドーレン、垂石みどり、海老原秀喜、Cornelio S. Hernandez、Maria L. R. Almaraz、Celso Ramos、苺和宏明、高島郁夫、有川二郎:汎用 PCR プライマーを用いたハンタウイルス遺伝子検出スクリーニング法の開発:第57回日本ウイルス学会学術集会、東京(2009, 10)

18) 村田亮、好井健太郎、苺和宏明、高島郁夫:極東ロシアの野鳥におけるウエストナイル熱の血清疫学調査と中和試験の評価:第57回日本ウイルス学会学術集会、東京

(2009,10)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(地球規模保健課題推進研究事業)

分担者研究報告書

ウイルス性出血熱の診断法の開発に関する研究

高度弱毒化天然痘ワクチン LC16m8 の霊長類への接種時の皮膚病変:重症

潰瘍病変のウイルス学的解析

分担研究者 西條政幸

国立感染症研究所ウイルス第1部第3室室長

協力研究者 森川茂

国立感染症研究所ウイルス第1部第1室室長

協力研究者 倉根一郎

国立感染症研究所ウイルス第1部部長

研究要旨:1980年に天然痘の根絶宣言が世界保健機構によってなされた。現在では、痘瘡ウイルスによるヒトの感染症、いわゆる天然痘は地球上から根絶されている。しかし、近年痘瘡ウイルスを用いたバイオテロ対策の一環として、先進諸国では痘瘡ワクチンの再生産と備蓄がなされている。我が国では、高度弱毒化細胞培養痘そうワクチン LC16m8 株の再生産と備蓄がなされている。LC16m8 は温度感受性(41°Cでは増えられない)と細胞選択性(初代ウサギ腎臓細胞やRK-13細胞で増殖可能だが、Vero細胞では増殖できない)という性質を有する。これらの特徴は、ワクチニアウイルスの膜蛋白のひとつである *B5R* 膜蛋白をコードする遺伝子に一塩基欠損(フレームシフト変異)が生じたことによるものである。この性質により LC16m8 株はワクチン接種部位に比較的軽い潰瘍性病変しか誘導しない。しかし、LC16m8 は増殖を細胞内で繰り返すことにより、*B5R* 遺伝子の塩基欠損部位付近に一塩基挿入がおり *B5R* 機能が回復して、温度感受性レベルが低下し、かつ、細胞選択性の性質が消失する変異株(LC16m8-revertant 株)が生じることが知られている。8頭のカニクイザルにLC16m8 株を左上腕外側に接種したところ、1頭において重度の潰瘍性病変が認められた。ワクチン接種部位から接種後4日目に分離されたウイルスは、全て *B5R* 遺伝子に変異のないLC16m8 株であった。このことは、例え LC16m8 株接種部位に重症潰瘍性病変が出現したとしても、それは LC16m8 株により誘導されたもので、LC16m8-revertant 株によるものではないことを示している。

A. 研究目的

2001年9月11日のニューヨーク市とワシントンDCでのテロ事件、および、その後の炭疽菌によるバイオテロリズム事件の発生で、バイオテロリズム事件は現実のものになった。痘瘡

(いわゆる天然痘)ウイルスが用いられるバイオテロリズムが発生した場合に備えて、先進国の一部では天然痘ワクチンの再生産と備蓄がなされている。我が国では痘そうワクチン LC16m8 株(以下、LC16m8)が再生産され、将

来のバイオテロリズムの結果として発生する天然痘の出現に備えている。

LC16m8 は, *Lister* 株に由来するワクチンで, ウサギ初代腎細胞で増殖させ, それをもとに製造される細胞培養痘そうワクチンである。*Lister* 株や *Dryvax* 株痘そうワクチンに見られる重篤な副作用 (全身性ワクチニア感染症, 脳炎など) のないワクチンである。しかし, LC16m8 は, 痘そうウイルスやサル痘ウイルスが分類されるオルソポックスウイルスが, 全身感染を引き起こす際に重要な働きをする成熟ウイルス (extracellular enveloped virion, EEV) に対する中和抗体を誘導する膜タンパク *B5R* の遺伝子に 1 塩基欠損があり, 完全な *B5R* を発現しない。この遺伝子変異のために, 細胞選択性 (初代ウサギ腎臓細胞や RK-13 細胞で増殖可能だが, Vero 細胞では増殖できない) と小プラーク形成能 (ニフトリ有精卵漿尿膜に小さなポックを形成する性質) という特徴を有する。この特徴により LC16m8 株はワクチン接種部位に比較的軽い潰瘍性病変しか誘導しないと考えられている。一方, LC16m8 は増殖を細胞内で繰り返すことにより, *B5R* 遺伝子の塩基欠損部位付近に一塩基挿入がおこり *B5R* 機能が回復して, 温度感受性レベルが低下し, かつ, 細胞選択性の性質が消失する変異株 (LC16m8-revertant) が生じることが知られている。国内に備蓄されている LC16m8 ワクチンに含まれる感染性ウイルスの 0.1% が, その LC16m8-revertant であることが確認されている。LC16m8 を細胞内で増殖させるだけで, LC16m8-revertant の

増殖性の効率の方が LC16m8 のそれよりも高いために, LC16m8-revertant が優勢になってくる。

8 頭のカニクイザルに痘瘡ウイルスと同様にポックスウイルス科オルソポックス属に分類され, 霊長類において天然痘類似疾患 (サル痘) を引き起すサル痘ウイルスを感染させ, その直後および 1 日後に LC16m8 によるワクチン接種を実施した。8 頭の中の 1 頭に, LC16m8 接種 4 日目から強い潰瘍性病変が認められたものが認められた。この病変が, LC16m8-revertant が増殖したことによるものであれば, LC16m8 の安全性に問題が生じる。そこで, その LC16m8 接種部位に生じた強い潰瘍性病変をウイルス学的に解析した。

## B. 研究方法

- 1) ウイルスおよびワクチン。サル痘ウイルス 2 株 (Zr-599 株) を用いた。高度弱毒細胞培養ワクチン LC16m8 (千葉血清製造) を用いた。 $10^7$ PFU の Zr-599 株をカニクイザルの鼻腔内に噴霧して感染させた。LC16m8 接種は, 二又針による多圧接種法によった。
- 2) カニクイザル。8 頭のカニクイザルを用いた。本研究は, LC16m8 暴露後接種の霊長類におけるサル痘発症予防効果を検討する研究の一環で実施された。
- 3) LC16m8 接種部位からのウイルス分離。強い潰瘍性病変が認められた個体 (#4857) の LC16m8 接種部位から, 滅菌綿棒を用いて擦過スワブを採取し,

MEM-2FBS (維持培地) に混和した。そのサンプルから Vero 細胞および RK-13 細胞を用いてウイルス分離操作を実施した。培養 5 日目には、細胞変性効果の有無を確認した上で、細胞を含むように維持培地を採取した。そのサンプルを -80℃ の冷凍庫に保管して急速冷凍し、次いで 37℃ の恒温槽を用いて解凍した。続いてそのサンプルを分速 3500 回転で遠心処理し、その上清に含まれるウイルスの感染価を、RK-13 細胞を用いた TCID50 法により決定した。

- 4) 潰瘍性病変から分離されたウイルスの B5R 遺伝子の部分塩基配列の決定。強い潰瘍性病変から分離されたウイルスを、ブランク法を用いてクローニングし、10 株のクローンを得た。それぞれのクローンを RK-13 細胞で増殖させた後、それぞれのクローンのウイルス性遺伝子を Viral Nucleic Acid Purification Kit (Roche Diagnostics 社) を用いて精製した。次いでそれらをテンプレートとして B5R 遺伝子において LC16m8 に認められる 1 塩基欠損部位を含む部分遺伝子を、適切にデザインしたプライマーセットを用いて増幅し、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。

(倫理面からの配慮について)

本研究は、国立感染症研究所動物実験委員会の承認のもとに実施された。

## C. 研究結果

- 1) LC16m8 接種部位の病変。LC16m8 が接種されたカニクイザルの 3 日目または 4 日目接種部位に認められた病変を図 1 に示した。個体#4857 に認められた皮膚病変は、他の個体のそれらに比べて強い潰瘍、発赤、滲出性の特徴を示している(図 1)。個体#4857 の同部位の皮膚病変の経時的病変の推移を図 2 に示した。
- 2) LC16m8 接種部位からのウイルス分離と同定。個体#4857 の第 4 日 LC16m8 接種部位から採取された擦過サンプルを、Vero 細胞および RK-13 細胞を用いてウイルス分離を実施した。RK-13 細胞によるウイルス分離検査では細胞変性効果が、Vero 細胞のそれでは細胞変性効果は認められなかった。分離されたウイルスはワクチニアウイルスと同定された。RK-13 細胞によるウイルス分離では、第 5 日目には 68000 TCID50/ml の感染力価のウイルスが認められたが、Vero 細胞による分離では感染性ウイルスは認められなかった[検出限界以下(<100 TCID50/ml)の感染力価]。
- 3) 潰瘍性病変から分離されたワクチニアウイルスの B5R 遺伝子塩基配列。潰瘍性病変から分離されたワクチニアウイルス 10 クローンの B5R 部分遺伝子の塩基配列は、LC16m8 の B5R のそれと全く同じであった。

## D. 考察

本研究では、LC16m8 の接種により重度の潰瘍性皮膚病変が引き起される場合のウイルス学的特徴を解析した。

LC16m8 はサル痘の予防に効果があること

が確認されており、ヒトにおける天然痘の予防にも有効であることが推定される。さらに、LC16m8 の B5R 膜蛋白の遺伝子に 1 塩基欠損があることにより、LC16m8 が増殖する際に、完全な B5R 膜蛋白は発現されない。この特徴により、細胞選択性と小プラーク形成能が獲得され、それが高度弱毒化の原因のひとつと考えられている。しかし、今回の検討により LC16m8 接種によっても、時としてひどい潰瘍性病変が引き起されることが明らかになった。ただし、今回の検討では、LC16m8 接種後にサル痘ウイルスを感染させていることから、強い潰瘍性病変誘導にそれが関与している可能性は否定できない。

本研究において、そのひどい潰瘍性病変が、いわゆる LC16m8-revertant によって引き起されたものでないことが証明された。LC16m8 接種により強い潰瘍性病変が副作用として出現したとしても、それはいわゆる LC16m8-revertant によるものではなく、LC16m8 自体にそのような病変を誘導する性質が備わっていることを示唆している。

#### E. 結論

LC16m8 接種により強い潰瘍性病変が副作用として誘導される可能性が示唆された。しかし、それはいわゆる LC16m8-revertant によるものではなく、LC16m8 自体にそのような病変を誘導する性質が備わっていることによると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Iizuka, I., Saijo, M., Shiota, T., Ami, Y., Suzuki, Y., Nagata, N., Hasegawa, H., Sakai, K., Fukushi, S., Mizutani, T., Ogawa, M., Nakauchi, M., Kurane, I., Mizuguchi, M., Morikawa, S.: Loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assay for monkeypox virus infections. *Journal of Medical Virology* 80:1102-1108, 2009
- 2) Saijo, M., Ami, Y., Suzuki, Y., Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Iizuka, I., Shiota, T., Sakai, K., Ogata, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Sata, T., Kurata, T., Kurane, I., Morikawa, S.: Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in nonhuman primates. *Journal of General Virology* 90:2266-2271, 2009
- 3) Nakauchi, M., Fukushi, S., Saijo, M., Mizutani, T., Ure, A. E., Romonowski, V., Kurane, I., Morikawa S.: Characterization of monoclonal antibodies to Junin virus nucleocapsid protein and application to the diagnosis of hemorrhagic fever

caused by South American  
arenaviruses. *Clinical and Vaccine  
Immunology* 16:1132-1138, 2009

4) Saijo, M. : Emerging and re-emerging  
infection threats to society.  
*Journal of Disaster Research*  
4:291-297, 2009

5) Saijo, M., Morikawa, S., Kurane,  
I. :Diagnostic systems for viral  
hemorrhagic fevers and emerging  
viral infections prepared in the  
National Insititute of Infectious  
Diseases. *Journal of Disaster  
Research* 4:315-321, 2009

6) Morimoto, K., Saijo, M. : Imported  
rabies cases and preparedness for  
rabies in Japan. *Journal of Disaster  
Research* 4:346-357, 2009

7) Yagi, T., Hattori, H., Ohira, M.,  
Nakamichi, K., Takayama-Ito, M.,  
Saijo, M., Shimizu, T., Ito, D.,  
Takahashi, K., Suzuki, N. :  
Progressive multifocal  
leukoencephalopathy developed in  
incomplete Heerfordt syndrome, a  
rare manifestation of sarcoidosis,  
without steroid therapy responding  
to cidofovir. *Clinical Neurology and  
Neurosurgery* (in press)

## 2. 学会発表

1) 塩田智之、森川茂、飯塚愛恵、倉根一  
郎、西條政幸 : 293T細胞を用いたHSV-1

組換えチミジンリン酸化酵素の発現と  
薬剤感受性試験への応用. 第19回日本  
抗ウイルス療法研究会, 東京 (2009. 6)

2) Bukbuk DN, Saijo M, Georges-Courbot  
MC, Marianneau P, George A, Shuetsu  
F, Mizutani T, Kurata T, Kurane I,  
Morkawa S. Recombinant nucleocapsid  
protein-based diagnosis of and  
seroepidemiological study on Lassa  
fever. The 109th ASM General Meeting,  
Philadelphia, PA (2009.05)

3) Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N,  
Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Iizuka  
I, Shiota T, Fukushi S, Mizutani T,  
Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa  
S. Pathology of monkeypox in nonhuman  
primates leading to the difference in  
virulence between Congo Basin and  
West African strains. 43rd Annual  
Meeting of the US-Japan Cooperative  
Medical Science Program and Special  
Minisymposium on enterovirus 71,  
Philadelphia, PA (2009.07)

4) 西條政幸, 網至康, 須崎百合子, 永田  
典代, 長谷川秀樹, 新村靖彦. 横手公  
幸, 飯塚愛恵, 塩田智之, 佐多徹太郎,  
倉田毅, 倉根一郎, 森川茂. 痘そうワ  
クチンLC16m8およびLister株免疫時に  
おけるIMVおよびEEV蛋白に対する抗体  
応答とサル痘予防効果. 第13回日本ワ  
クチン学会学術総会, 札幌 (2009.09)

5) 中道一生, 伊藤陸代, 奴久妻聡一, 森  
本金次郎, 倉根一郎, 西條政幸. 脳脊

- 髄液中のJCポリオーマウイルスを検出するためのリアルタイムPCR検査系の確立と進行性多巣性白質脳症（PML）の診断支援．第57回日本ウイルス学会学術集会，東京（2009.10）
- 6) 酒井宏治，永田典代，岩田奈織子，長谷川秀樹，松井珠乃，網康至，平井理香，須崎百合子，水谷哲也，福士秀悦，緒方もも子．西條政幸，藤本嗣人，山田靖子，岡部信彦，佐多徹太郎，倉根一郎，森川茂．第57回日本ウイルス学会学術集会，東京（2009.10）
  - 7) 永田典代，岩田奈織子，長谷川秀樹，西條政幸，森川茂，佐藤由子，佐多徹太郎．SARS-CoV感染動物における宿主Th1/Th2バランスと重症化の関連．第57回日本ウイルス学会学術集会，東京（2009.10）
  - 8) 塩田智之，飯塚愛恵，森川茂，倉根一郎，水口雅，西條政幸．293T細胞を用いた単純ヘルペスウイルスならびに水痘帯状疱疹ウイルス組換えチミジンリン酸化酵素の発現と薬剤感受性試験への応用．第57回日本ウイルス学会学術集会，東京（2009.10）
  - 9) 森川茂，福士秀悦，酒井宏治，永田典代，長谷川秀樹，松井珠乃，水谷哲也，平井理香，網康至，緒方もも子，西條政幸，山田靖子，岡部信彦，佐多徹太郎，倉根一郎．カニクイザルの致死的イヌジステンパーウイルス感染事例の解析．第57回日本ウイルス学会学術集会，東京（2009.10）
  - 10) 飯塚愛恵，塩田智之，西條政幸，福士秀悦，水谷哲也，緒方もも子，倉根一郎，水口雅，森川茂．痘そうワクチンLC16m8株の温度感受性に関する解析．第57回日本ウイルス学会学術集会，東京（2009.10）
  - 11) 水谷哲也，前田健，渡辺俊平，久和茂，吉川泰弘，明石博臣，中内美名，酒井宏治，福士秀悦，緒方もも子，西條政幸，倉根一郎，森川茂．ウイルスの網羅的検出法（RDV法ver 3.1）を用いたコウモリ由来新規 $\beta$ ヘルペスウイルスの同定第57回日本ウイルス学会学術集会，東京（2009.10）
  - 12) 中内美名，福士秀悦，水谷哲也，緒方もも子，西條政幸，倉根一郎，Austin Ure，Victor Romanowski，森川茂．南米出血熱の実験室診断法の開発．第57回日本ウイルス学会学術集会，東京（2009.10）
  - 13) 中道一生，伊藤陸代，奴久妻聡一，森本金次郎，倉根一郎，西條政幸．定位微量投与系を用いたマウスポリオーマウイルスの脳における持続感染様式の解析．第57回日本ウイルス学会学術集会，東京（2009.10）
  - 14) 岩田奈織子，永田典代，辻隆裕，長谷川秀樹，佐藤由子，横田恭子，水谷哲也，西條政幸，森川茂，佐多徹太郎．SARS-CoV感染動物モデルを用いたUV不活化SARS-CoVの免疫効果と副作用について．第57回日本ウイルス学会学術集会，東京（2009.10）

15) 佐山勇輔，福士秀悦，斎藤麻理子，飯塚愛恵，水谷哲也，緒方もも子，西條政幸，鈴木陽，神垣太郎，玉記雷太，倉根一郎，押谷仁，森川茂．フィリピンのレストンエボラウイルス感染症のウイルス遺伝子解析と感染状況の実態調査．第57回日本ウイルス学会学術集会，東京（2009.10）

16) 西條政幸，網康至，須崎百合子，塩田智之，飯塚愛恵，永田典代，岩田奈織子，長谷川秀樹，緒方もも子，福士秀悦，水谷哲也，倉根一郎，佐多徹太郎，倉田毅，森川茂．コンゴ盆地型および

西アフリカ型サル痘ウイルスの臓器親和性と病原性．第57回日本ウイルス学会学術集会，東京（2009.10）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



図 1. LC16m8 を左上腕に接種された個体の接種部位における皮膚病変. LC16m8 接種後 3 日目の病変(4 個体, 上段)と 4 日目の病変(4 個体, 下段).

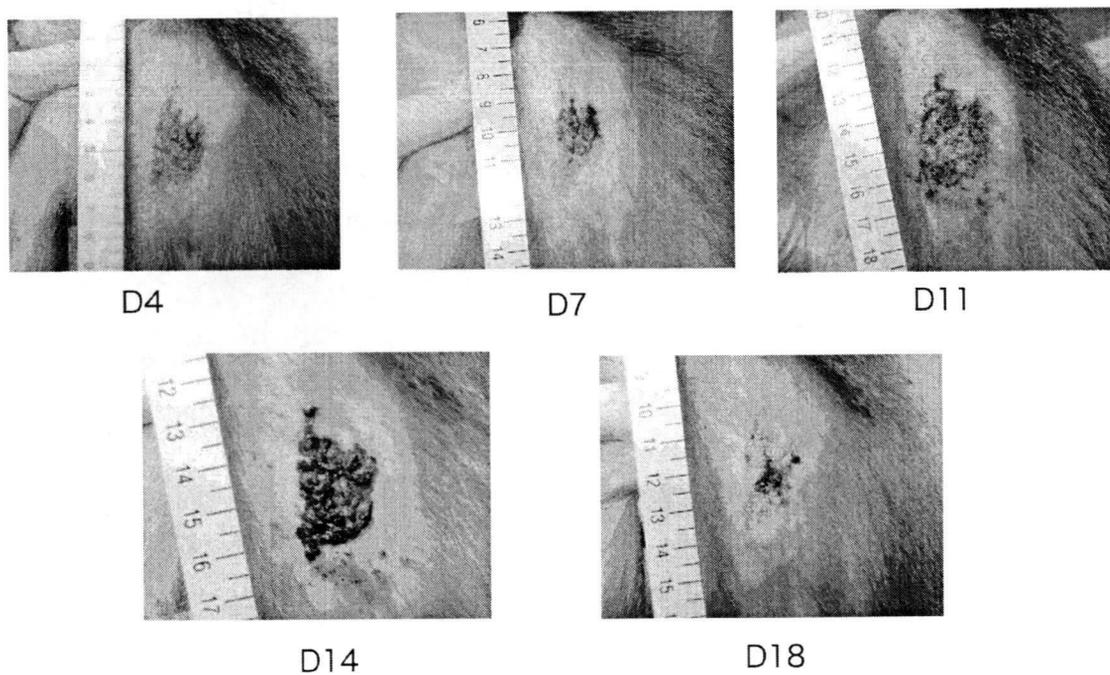


図 2. LC16m8 接種部位に強い潰瘍性病変が認められた個体における, 同部位の病変の経時的な推移.

ウイルス性下痢症の疫学、ワクチンと疾病負担に関する研究

研究分担者 中込 治 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨: ロタウイルス胃腸炎の重症化による入院を減らすことを目的とした安全で有効な 2 種類のワクチンが開発され、世界 100 カ国以上でいずれかのワクチンの使用が承認されている。われわれは、わが国におけるウイルス性下痢症の疫学と疾病負担に関する研究を行い、わが国にはすでにロタウイルスワクチンが導入されている国と変わらない疾病負担があることを明らかにしてきた。本研究は、わが国で、ロタウイルスワクチンが承認された場合の効果を評価する基礎的資料として、ワクチンの定期接種導入で先行するブラジルにおける単価 G1P[8]ロタウイルスワクチンの効果を検証することを目的として行った。この結果、ブラジルでは、ロタウイルスワクチンの定期接種への導入後の 2 年間に於いて単価 G1P[8]ワクチンのロタウイルス下痢症発症予防に対する有効性(vaccine effectiveness)は 73% (95%Confidence interval:41-88%)であった。本研究の期間中、地域で流行していたロタウイルスの遺伝子型は、その約 80%がワクチン株とは完全に異型である G2P[4]であった。したがって、本研究の結果として、完全に異型である G2P[4]株が大半を占め、しかも、発展途上国という状況下で、73%という比較的高い有効性を示したことは、この単価ロタウイルスワクチンが血清型の壁を超えて有効に働いている証拠である。ロタウイルスワクチンが、わが国の定期接種に導入されれば、重症ロタウイルス下痢症の減少に大きな効果がもたらせるものと考えられた。

A. 研究目的

急性胃腸炎は世界的にみると小児期の疾病と死亡の主要な原因であり、5 歳未満の小児死亡の約 17%を占める)。急性胃腸炎を起こす病原体は多いが、その中で A 群ロタウイルスは最も重要な病原体として知られている。地球規模で見ると、1 年間にロタウイルス下痢症に罹患する小児は 1.1 億人以上、そのうち医療機関を受診する者は 2500 万人、入院にいたる小児は 200 万人、さらにロタウイルス下痢症で死亡するのは 50 万人

以上と推定されている。世界中の小児は 3~5 歳までに少なくとも 1 度のロタウイルス感染を経験する。

そこで、ロタウイルス胃腸炎の重症化による入院を減らすことを目的とした安全で有効な 2 種類のワクチンが開発された。メルクが開発した 5 価ウシ・ヒトロタウイルス組換え体ワクチンである RotaTeq とグラクソスミスクラインが開発した単価ヒトロタウイルスワクチンである Rotarix である。いずれかのワクチンを承認している国は、すでに

100 カ国以上におよんでいる。2006 年以降アメリカ合衆国、オーストラリア、ヨーロッパや中南米の一部の国など 12 カ国で乳児全員を対象にした定期予防接種が開始され、国によってはロタウイルス胃腸炎による入院が減少しはじめている。

しかし、わが国では、いずれのロタウイルスワクチンも承認されていない。そこで、このような世界を取り巻く現状にかんがみ、本研究では、わが国でロタウイルスワクチンの使用が承認され、導入された場合の効果を評価する基礎として、ワクチンの定期接種で先行するブラジルにおける単価ロタウイルスワクチンの効果を検証することを目的とした。

## B. 研究方法

ブラジル、ペルナンブーコ州都レシフェにある中核的小児病院を併設するフィゲイラ教授記念総合医学研究所において、2006 年 3 月から 2008 年 1 月までの 2 年間に、5 歳未満の小児下痢症患者から便検体を収集するとともに、ロタウイルスワクチン接種歴をワクチンカードにより確認した。ロタウイルスの検出は ELISA(Rotaclone)によった。陽性の者をロタウイルス下痢症とし、ロタウイルス陰性の下痢症患者を対照として、ワクチンの有効性(%)を $(1-OR) \times 100$ により算出した。

(倫理面からの配慮について)

本研究は、英国リバプール大学と学術交流協定を締結し、熱帯における感染症研究に関してリバプール大学との間で研究協力の覚書を交換した上で、リバプール大学の海外拠点の 1 つを利用して行ったものである。当該研究は、リバプール大学の倫理委員会およびフィゲイラ教授記念総

合医学研究所の倫理委員会の承認を受けた。なお、長崎大学の研究者は検体から個人情報へは遡及できないようになっている。

## C. 研究結果

調査期間における小児下痢症患者 675 人のうちワクチン接種の対象となった年齢の小児は 303 人であった。ロタウイルスワクチンの接種者は 234 人であり、未接種者は 69 人、すなわち接種率は 77%であった。ワクチンカードを保有する対象年齢児中のロタウイルス下痢症患者は 29 人(9.6%)であり、このうち、ワクチン接種者は 15 人(6.8%)、ワクチン未接種者は 14 人(20%)であった。すなわち、ワクチンのロタウイルス下痢症発症予防に対する有効性(vaccine effectiveness)は 73% (95% Confidence Interval:41-88%)であった。

## C. 考察

ブラジルでは、ロタウイルスワクチンの定期接種への導入から 2 年が経過して、全期間での平均の接種率は 77%と高く、当地での最近の接種率は 90%に及んでいる。この単価 G1P[8]ロタウイルスワクチンの有効性は 73%と算出され、このワクチンの第 3 相臨床試験の結果に比べて若干低いように見える。しかし、本研究の期間中、地域で流行していたロタウイルスの遺伝子型(血清型)は、その約 80%がワクチン株とは完全に異型である G2P[4]であった。しかも、今までの臨床試験がすべて、このワクチンと血清学的に同型の G1P[8]が大半を占める状況下で行われてきたことを考えると、完全に異型である G2P[4]株が大半を占める状況下で、しかも、発展途上国において、73%という比較的高い有効性を示したことは、この