

(表3) ウイルス分離とIgM抗体との関係(ワクチン歴群)

			IgM抗体			合計	感度	特異度	一致率
			陽性	保留	陰性				
現行品	ウイルス分離	陽性	11	2	14	27	40.7%		
		陰性	4	4	21	29		86.2%	64.3%
改良品	ウイルス分離	陽性	7	2	18	27	25.9%		
		陰性	2	0	27	29		93.1%	64.3%

現行品 : P=0.05969、改良品 : P=0.01597

(表4) 自然ムンプス再感染例の診断と臨床経過

	症例1 (男児)		症例2 (女児)	
	初回 (4歳)	2回目 (6歳)	初回 (1歳)	2回目 (4歳)
診断				
地域の流行	あり	あり	あり	あり
家族の発症	あり	なし	あり	なし
ウイルス分離	陽性	施行せず	陰性	陽性
急性期血清抗体	施行せず	二次免疫応答*	施行せず	二次免疫応答†
疫学的関連性	あり	あり	あり	あり
臨床経過				
耳下腺腫脹部位	両側	片側 (左)	片側 (右)	片側 (右)
耳下腺腫脹期間	7日間	3日間	5日間	2日間
発熱	あり (39°C)	なし	あり (37.6°C)	なし
発熱期間	4日間	0日間	1日間	0日間

*IgM抗体=2.36抗体指数、IgG抗体=57.1EIA価

†IgM抗体=1.24抗体指数、IgG抗体=33.0EIA価

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興再興感染症研究事業）
（分担研究報告書）

ワクチン戦略による麻疹および先天性風疹症候群の排除、およびワクチンで
予防可能疾患の疫学並びにワクチンの有用性に関する基礎的臨床的研究

ムンプスウイルスの中枢神経病原性遺伝子に関する研究

分担研究者 木所 稔（国立感染症研究所・ウイルス第三部・主任研究官）
研究協力者 加藤 篤（国立感染症研究所・ウイルス第三部）
網 康至、須崎百合子（国立感染症研究所・動物管理室）
永田典代（国立感染症研究所・感染病理部）

研究要旨 ムンプスウイルスの中枢神経病原性に関わる遺伝子を特定することはムンプスウイルスの病原性発現機構を解明できるだけでなく、新規ワクチンの開発やワクチンの品質管理上においても重要な意味を持つ。そこで我々はムンプスウイルスの病原性解明のためのツールとして、リバースジェネティクス法を確立し、強毒株 Y213 から組換えウイルス rY213 を作成した。しかし、rY213 は弱毒化しており原株の性状を反映しないことが明らかになった。その原因は rY213 の遺伝的多様性の低下によるものと推定された。そこで r213 の遺伝的多様性を変異原処理によって増加させたところ r213 の病原性が原株と同程度に回復したことから、ムンプスウイルスの病原性に遺伝的多様性が関与することが示唆された。

A. 研究目的

他の先進諸国においては MMR ワクチンの 2 回接種によっておたふくかぜの流行がほぼ制圧されている一方、日本においてはワクチンの普及が進まず、おたふくかぜの流行を制御できていない。こうした国内の現状を打開するためには安全性の高い新規ワクチンの開発が必要であるが、ワクチンの安全性を評価できるモデル系が無いことが大きな障害であった。

そこで我々は、マーモセットを用いた発症モデル系の確立を試み、これによってムンプスウイルスのヒトにおける中枢神経病原性を評価できることを見いだした。一方、新規ワクチン株を開発するために、温度感受性を指標にして中枢神経病原性が低く免疫原性の良い Y125 株を作出し、同時に高病原性の Y213 株を分離した。我々はこれら 2 株のゲノム配列の違いを基に中枢神経病原性遺伝子を同定するため、リバースジェネティクス法を確立した。しかし、高病原性株 Y213 を基にして作成された組換えウイルス rY213 は著しく弱毒化しており（図-1、図-2）、その原因がウイルスの quasispecies の持つ遺伝的多様性の違いにあると予想された。ポリオウイルスでは遺伝的多様性が中枢神経系への侵襲性に大きく関与することが報告されていることから、組換えムンプスウイルスの弱毒化に

も遺伝的多様性の低下が関与している可能性が示唆された。

そこで我々は、組換えウイルスを変異原存在下で培養することによってその遺伝的多様性を人為的に上昇させ、それによって中枢神経病原性が回復するか否かを新生ラットの感染モデル系によって評価し、遺伝的多様性と中枢神経病原性との関連を調べた。

B. 研究方法

(1) リバースジェネティクス法による組換えウイルスの作製

T7 プロモーターの直下に Y213 株由来の全長ゲノム cDNA を連結したプラスミドを、NP、P、L の各遺伝子を発現する 3 種類のヘルパープラスミドと共に BHK/T7 細胞にトランスフェクトし、組換えウイルス rY213（以後 rY213/ori）を回収した。

(2) リバビリン存在下での組換えウイルスの培養

rY213/ori を moi=0.01 で Vero 細胞に接種し、0.4mM リバビリン存在下で 2 代継代培養した。このウイルスをリバビリン非存在下で更に 1 代 Vero 細胞で継代し（rY213/Rib）、以後の実験に供した。

(3) 遺伝的多様性の評価

原株 Y213 のゲノム配列の多様性を評価するために、全ゲノムの 94%に相当する領域を 6 つに分けて RT-PCR で増幅し、PCR 産物を TA-cloning した。各領域から得られた個々の TA クローンについて塩基配列を決定し、コンセンサス配列に比較してどの程度の多様性があるか塩基置換の比率を調べた。同様に組換えウイルスについてもリバビリン処理の前後の rY213/ori と rY213/Rib の各ウイルスについてリーダー配列から P 遺伝子までの領域 (23nt-3152nt) について同様の解析を行い原株との比較を行った (図-3)。

(2) 新生ラット脳内接種試験

生後 24 時間以内の Lewis 系ラットの右脳に 100 PFU のムンプスウイルス液を接種し、一ヶ月後に MRI によって脳室の拡張を観察した。得られた頭部の断面画像から脳全体の面積に対する脳室の面積比パーセントを求め、これを neurovirulence score (NV 値) とした。

(倫理面への配慮)

動物実験は全て国立感染症研究所動物実験委員会の審査を受け、動物に対する苦痛低減措置、および使用個体数が適切であるという承認を得た上で、国立感染症研究所動物実験委員会実施規程に基づき実施した。

C. 結果

(1) リバビリン処理組換えウイルスの遺伝的多様性

リバビリン存在下で 2 代継代培養した組換えウイルス rY213/Rib に由来する TA クローンの塩基配列を調べたところ、変異率は 0.241% で、原株 Y213 のウイルス液の 0.117% の約 2 倍、処理前のウイルス rY213/ori の 0.006% よりも 40 倍増加していた (図-4)。なお、変異のパターンはランダムで、メジャーポピュレーションの存在は認められなかった。rY213/ori の塩基置換は調べた全塩基配列 15,540 塩基中に 1 箇所のみであった。ちなみに RT-PCR に用いた逆転写酵素のエラー率が 0.01% とされていることから rY213/ori の変異率はバックグラウンドと同等と言える。

(2) 新生ラットモデルによるリバビリン処理組換えウイルスの中枢神経病原性の評価

リバビリン処理によって組換えウイルスの遺伝的多様性が原株と同等以上に上昇したので、このウイルスの中枢神経病原性を新生ラットの脳内接種試験で評価した。14 匹の新生ラットに

rY213/Rib を脳内接種したとろ、全頭で脳室の拡張が観察され、ほとんど拡張が認められなかった rY213/ori の反応とは明らかに異なっていた (図 5)。MRI の脳断面画像から算出された脳室拡張率 (NV 値) の平均値は、30.7% と原株 Y213 の値 32.0% とほぼ同等であった (図 5)。

D. 考察

リバースジェネティクス法によってコンセンサスシーケンスに基づいて作製された組換えウイルスは原株の性状を反映せず高度に弱毒化していた。その原因の一つとして、原株の持つ遺伝的多様性がモノクローナルな組換えウイルスでは失われていることが考えられた。この仮説を裏付けるために、組換えウイルスを変異原として知られるリバビリンの存在下で培養することによって、人為的に rY213 の遺伝学的多様性を高くした場合に病原性が復帰するかを調べた。

その結果、リバビリン処理後のウイルス rY213/Rib の遺伝的多様性は処理前のウイルス rY213/ori の 40 倍に増加し、それに伴ってラットに対する中枢神経病原性も原株の Y213 と同程度にまで復帰した。今回調べた範囲においては rY213/Rib の変異のパターンはランダムであり、その quasispecies にメジャーなポピュレーションは存在しなかった。これらの結果からリバースジェネティクスで作製された組換えウイルスが原株の性状を反映しない原因の一つは遺伝的多様性の低下であることが示唆された。Vignuzzi らはポリオウイルスで、遺伝子の多様性の程度が中枢神経系への侵襲性に直接関与していることを報告しているが (Nature, 2006, 19; 439 (7074): 344-348)、ムンプスウイルスにおいても同様の現象が起こりうることを今回の実験結果は示唆している。しかし、今回の解析においては rY213/Rib のゲノムの全領域については解析を行っているわけではないので、今回解析していないゲノム領域に何らかの共通する変異が起こっている可能性は排除できない。今後はこの点についてさらに解析を進めていくつもりである。

今年度はマーモセットのモデル系に関する研究については報告しなかったが、今後更にこのモデル系についても研究を重ねていくつもりである。

E. 結論

1. rY213 を ribavirin 処理することによって病原性が復帰した。

2. ribavirin 処理により quagispecies の多様性が 40 倍上昇し、且つ mejour population が存在しないことから遺伝的多様性が病原性に影響を与えていることが示唆された。
3. Quagispecies の多様性のみがムンプスウイルスの病原性を規定しているかについては、さらなる解析検討が必要である。
4. リバースジェネティクスによる病原性解析には quagispecies の遺伝的多様性をどのように反映させるかを考慮する必要がある。

F. 健康危害情報 無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki H, Kidokoro M, Fofana IB, Ohashi T, Okamura T, Matsuo K, Yamamoto N, Shida H. Immunogenicity of newly constructed attenuated vaccinia strain LC16m8Delta that expresses SIV Gag protein. Vaccine 2009; 27: 966-971

2. 学会発表

1. 木所 稔、齋加志津子、田代真人、加藤篤：リバースジェネティクスによって作製したムンプスウイルスの病原性復帰と遺伝的多様性との関連性に関する解析、第 57 回日本ウイルス学会、東京、2009 年 10 月
2. 木所 稔、駒瀬勝啓、Tuul Renchin、モンゴル国内で分離された新規 genotype ムンプスウイルスの性状について、第 57 回日本ウイルス学会、東京、2009 年 10 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

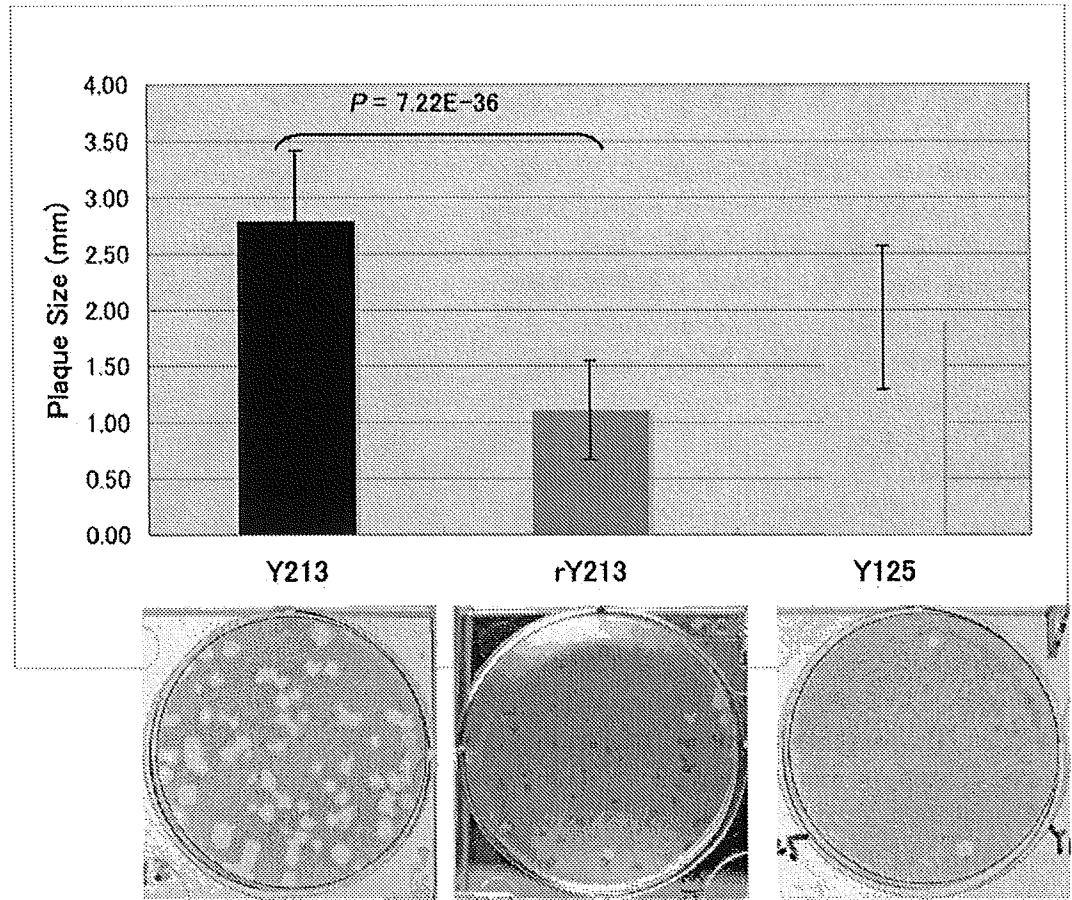


図-1 原株と組換えウイルスの性状の比較（プラークサイズ）

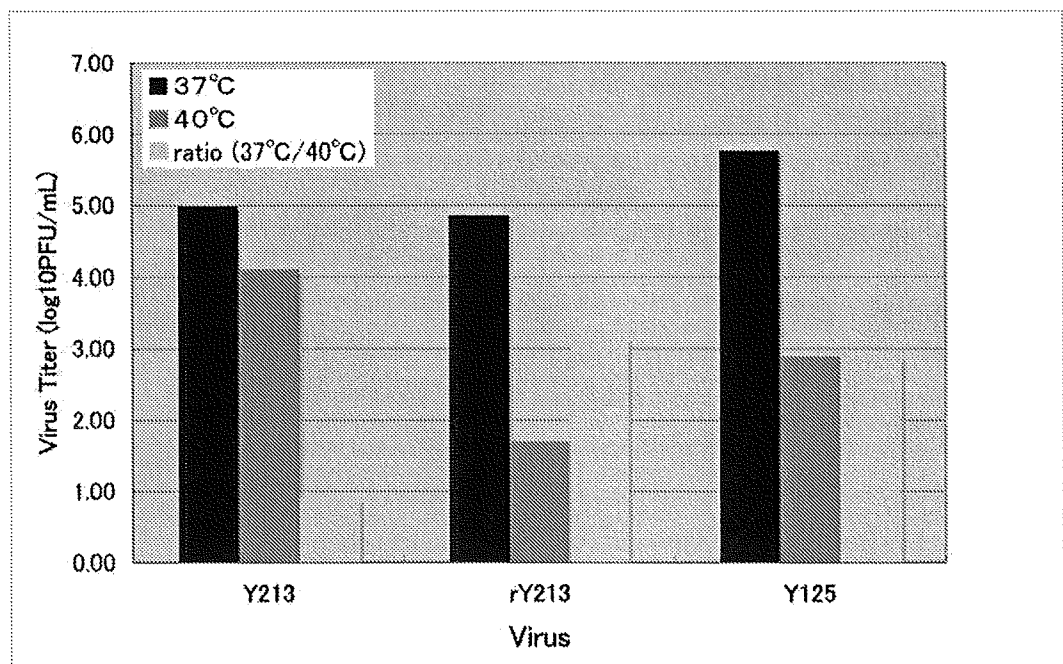


図-2 原株と組換えウイルスの性状の比較（温度感受性）

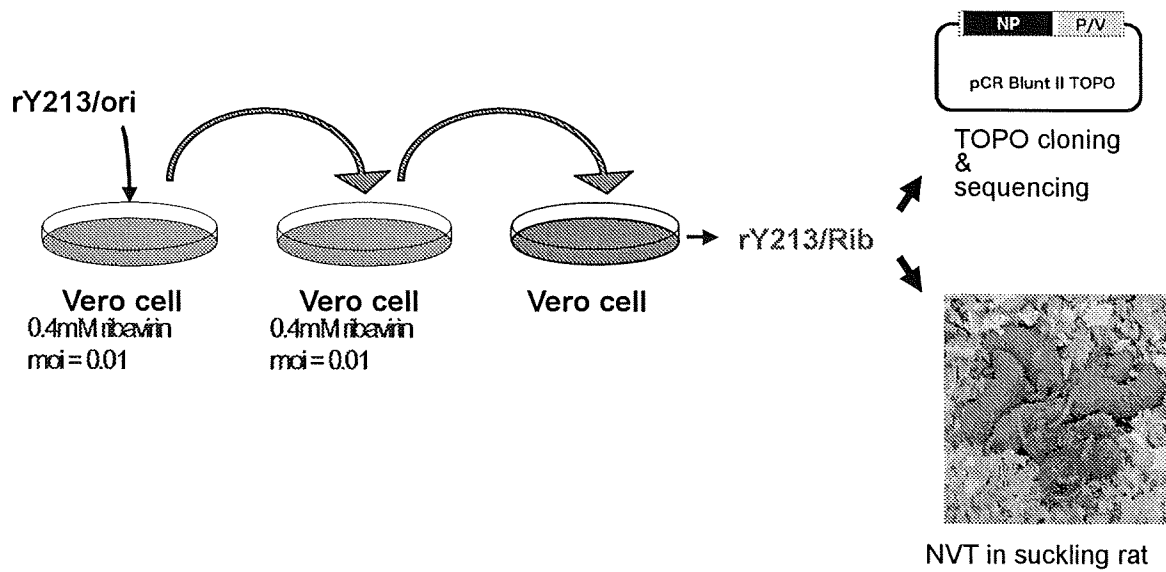


図-3 リバビリンによる組換えウイルスへの突然変異誘導

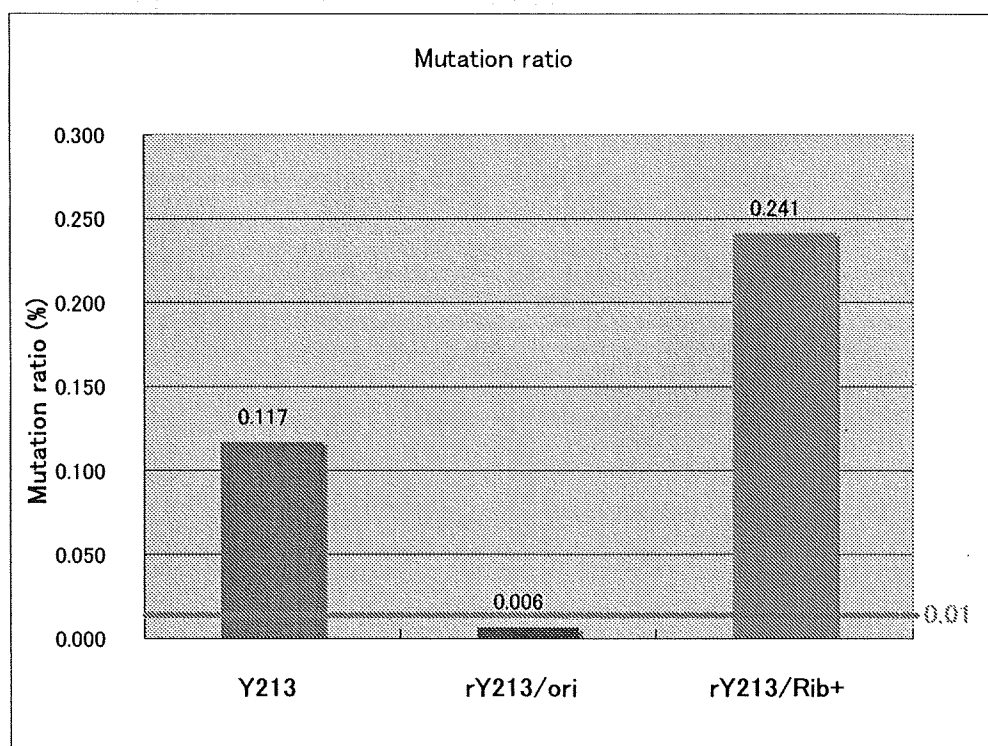


図-4 リバビリン処理による遺伝的多様性の変化

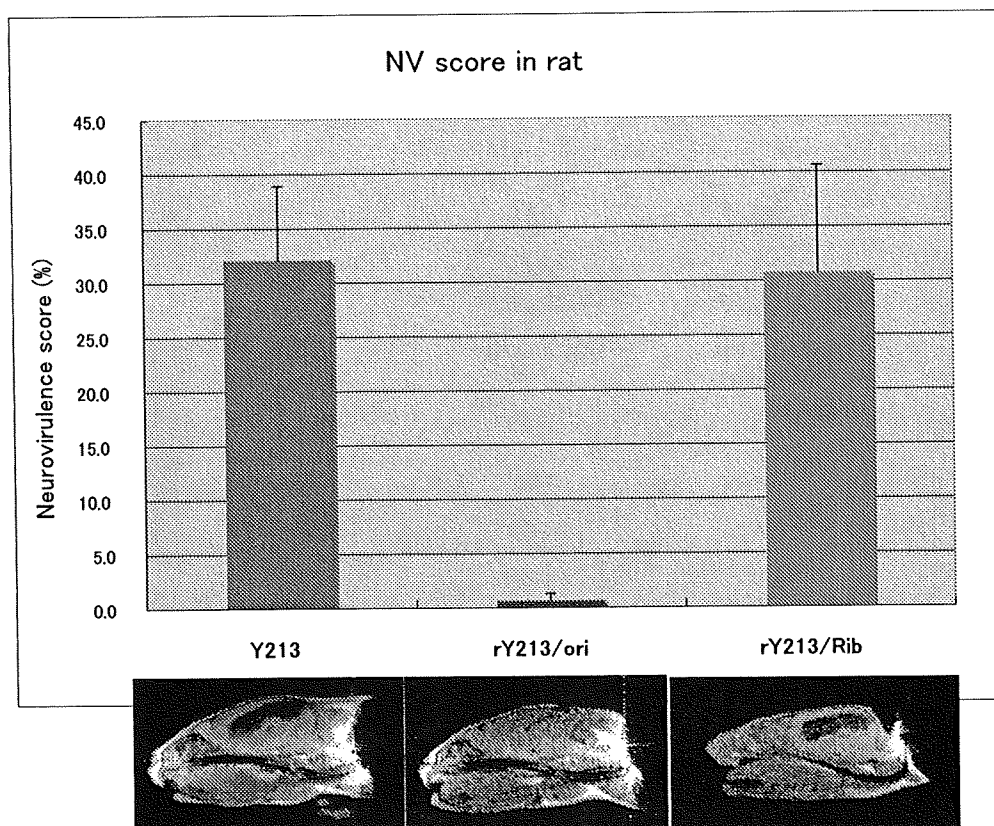


図-5 リバビリン処理による中枢神経病原性の変化

IV. 水痘、带状疱疹

（分担）研究報告書

ワクチン戦略による麻疹および先天性風疹症候群の排除、およびワクチンで予防可能疾患の疫学並びにワクチンの有用性に関する基礎的臨床的研究：医原性免疫不全宿主に発症した水痘または帯状疱疹による重症化例の全国調査

（分担）研究者 浅野喜造 藤田保健衛生大学医学部、教授

研究要旨

2007年1月から2008年12月までの2年間に、医原性免疫不全宿主に発症した水痘または帯状疱疹による重症例の発生頻度、臨床経過を明らかにするため全国規模でのアンケート調査を実施した。回収率は71.6%であり、水痘6症例、帯状疱疹1症例が報告された。性別は全例男児であり、平均年齢は8.0歳、基礎疾患としては悪性腫瘍が6例と最多であった。多くは予後良好であったが播種性水痘による死亡例も1例認められた。

A.研究目的

米国では1996年に水痘ワクチンの universal immunization がスタートし、接種率向上に伴い水痘罹患例と入院例の減少が報告されている。一方、我が国では水痘ワクチンは任意接種のため、未だその接種率は40%程度と低迷し毎年水痘の流行が認められている。

一般的な水痘、帯状疱疹の臨床経過と異なり、免疫不全宿主におけるこれら疾患は、頻度は低いものの極めて重症化し莫大な医療コストがかかると予測される。よって水痘ワクチンの定期接種化により、免疫不全宿主の重症水痘・帯状疱疹例がなくなることが最終的な医療費削減につながる事が考えられる。ワクチンの定期接種化を進めるにあたり、費用対効果を考慮することは必須であり、そのためには現状の把握は重要な課題である。そこで本研究では、医原性免疫不全宿主に発症した水痘または帯状疱疹による重症化症例の発生頻度、臨床経過を明らかにするため全国規模でのアンケート調査を実施した。

B.研究方法

1.対象

小児科の入院施設がある、全国3357施設を対象にアンケート調査を行った。観察期間は2007年1月から2008年12月までの2年間とし、医原性免疫不全宿主に発症した水痘、帯状疱疹による重症化症例を調査した。

2.方法

1. 一次調査

はじめに一次調査として、全国の3357施設に往復はがきによるアンケートを郵送した。設問は①症例の有無、症例があった場合は②疾患(水痘か帯状疱疹のどちらか)、③年齢、③性別、④基礎疾患、⑤予後について行った。

2. 二次調査

一次調査で対象症例があると報告した8施設、9症例についてさらに詳細な解析を進めるために二次調査を実施した。調査内容は以下の通りである。

1) 水痘ワクチン接種歴

a) あり、b) なし、c) 不明 から選択。

2) 水痘罹患歴

a) あり、b) なし、c) 不明 から選択。

3) 合併症

疾患名を記入

4) 基礎疾患

疾患名を記入

5) 後遺症

a) あり、b) なし、c) 死亡 から選択。

6) 入院期間

入院期間を記入

7) 感染源

a) 家族内、b) 院内感染、c) 幼稚園・学校、
d) その他、e) 不明 から選択。

7) その他特記すべき事

合併症・後遺症の詳細等を記入

C. 研究結果

1) 医原性免疫不全宿主に発症した水痘、帯状疱疹による重症化症例の発生頻度

一次調査のアンケート回収数は2406施設（回収率71.6%）であった。閉院・閉科・記載不備などを除いた有効回答数は2248施設（回収率70.0%）あり、そのうち医原性免疫不全宿主に発症した水痘、帯状疱疹による重症化症例は8施設から9症例が報告された。この8施設に二次調査を依頼しさらに詳細に調査したところ、患児が免疫不全状態ではなかった例が1例、免疫不全は存在したものの医原性ではなく先天性であったものが1例、今回の観察期間からは外れる症例が1例含まれていたためこれら3例は除外した。また二

次調査で新たに1例追加記入されていた施設もあり、最終的に6施設・7症例について解析を行った。

2) 疾患

医原性免疫不全宿主に発症した水痘または帯状疱疹による重症化症例は計7症例認め、水痘6例、帯状疱疹1例であった。

3) 年齢、性別

平均年齢は8.0歳(4~18歳)であり、4歳・5歳が各2例ずつと半数以上を占めた。その他は7歳・13歳・18歳が各1例あった。今回の調査では女兒の報告はなく7例全例男児であった。

4) 水痘ワクチン接種歴、水痘罹患歴

2例については記載がなかったが、記載のあった5例はすべて水痘ワクチン接種歴がなく水痘罹患歴もなかった。

5) 感染経路

院内感染例を1例認めた。残りは家族内1例、幼稚園1例、外出先が1例、不明が1例、未記入が2例であった。

6) 基礎疾患

基礎疾患としては悪性腫瘍が6例と最多であり、そのうち詳細不明な例を除けば全例白血病であった。その他としては腎疾患が1例であった。

7) 合併症

合併症は脳炎・脳症が2例、肺炎1例、肝炎1例、播種性血管内凝固症候群1例、基礎疾患の悪化が1例、播種性水痘が1例という結果であった。

8) 入院期間・後遺症・予後

入院期間の記載は2例のみであったが、臨床経過の記載内容をみると長期間の入院が推測された。今回の調査では死亡例を1例認めたが、その他の症例で後遺症を残したものはなかった。

D. 考察

一次調査の回収率は70%で、水痘6例、帯状疱疹1例の計7例の重症例の報告があった。重症例の半数以上の4例が大学病院、1例が小児病院からの報告であった。医原性の免疫不全患者は大学病院などの比較的大規模な施設で治療を受ける場合が多いと考えられる。また水痘、帯状疱疹が重症化した際も同様の施設で治療を受けることが多いと思われ、今回の調査はそれを裏付ける結果となった。一次調査の返信状況をみると、未回答の大学病院、小児病院や他の大規模施設で未報告例が若干ある可能性はあるが、今回の調査により現状のほぼ全貌を把握できたのではないかと考えられる。

今回、7例のうち2例の記載不備例を除く5例全例で水痘ワクチン接種歴はなく、水痘罹患歴もなかった。また発症年齢は4~5歳が半数以上を占め、通常の水痘好発年齢と矛盾しない結果であった。よって、定期接種化に際し最も現実的な接

種時期である、1期MRワクチン接種との同時接種を実施すれば今回の報告例は全例発症阻止できた可能性が高い。さらに、感染経路についても一般的な水痘同様家族内、保育施設に加え院内感染例を1例認めた。免疫不全宿主は現行の弱毒生ワクチン接種を受けることができない場合も多く、ワクチンによる個人防衛手段だけではこのような症例をなくすことは不可能である。よって、水痘ワクチン定期接種を導入し herd immunity を向上させ、水痘流行を阻止することがこのような免疫不全宿主をVZV感染から守るために極めて重要なことが理解できる。

基礎疾患は7例中6例が悪性腫瘍で1例が腎疾患であった。白血病患児での播種性水痘は良く知られており、血液・腫瘍専門医の間でもこのような症例で皮疹出現前に激しい腰背部痛が前駆症状として認められることは良く認識されている。合併症・予後に関しては、骨髄移植後に graft versus host disease 治療のため免疫抑制剤投与を受けていた患児が播種性水痘となり死亡したが、他の症例では長期間の治療を要したものの特に大きな後遺症を残すことなく治癒していた。これは、主治医の適切な早期診断、治療が功を奏した可能性が考えられる。幸い、固形臓器移植症例や小児リウマチ性疾患、炎症性腸疾患患児は今回の報告例の中には認められなかった。しかしながら、このような基礎疾患を持つ患児での重症水痘例の報告も多く、今後も引き続き今回同様の調査を継続してゆく必要があるものと思われる。

今回、入院期間の記載は2例のみであったが、臨床経過の記載内容をみると急性骨髄性白血病の水痘症例において脳炎を合併し、長期間のアシクロビル投与に抵抗性でホスカルネットが奏功した症例などいずれも長期間の入院が推測された。また死亡例については、莫大な医療費だけでなく患児の生涯賃金損失分も考慮せねばならず、その経済的損失は計り知れない。しかしながら、今後ワクチンの費用対効果をより明確にするためには、今回報告されたような症例に投入された医療資源の正確な情報が必要と思われ今後の全国調査で是非解明してゆきたい。

E. 結論

医原性免疫不全宿主における水痘重症化例の全国アンケート調査を実施した。水痘6症例、帯状疱疹1症例が報告された。基礎疾患としては悪性腫瘍が6例と最多であったが、当初懸念したりウマチ性疾患、炎症性腸疾患患児などは報告がなかった。多くは予後良好であったが播種性水痘による死亡例も1例認めた。今後の調査継続が必要と考えられる。

G. 研究発表

1.論文発表

Characterization of neutralizing epitopes of varicella-zoster virus glycoprotein H. Akahori Y, Suzuki K, Daikoku T, Iwai M, Yoshida Y, Asano Y, Kurosawa Y, Shiraki K. J Virol. 2009 ;83:2020-4.

2.学会発表

中井英剛、菅田健、吉川哲史、浅野喜造

医原性免疫不全宿主に発症した水痘または帯状疱疹による重症化例の検討

第13回日本ワクチン学会学術集会

9/27/09、札幌

中井英剛、菅田健、吉川哲史、浅野喜造

医原性免疫不全宿主に発症した水痘または帯状疱疹による重症化例の検討

第41回日本小児感染症学会学術集会

11/14-15/09、福井、福井

H.知的財産権の出願・登録状況

該当せず

研究協力者

藤田保健衛生大学医学部小児科

中井英剛、吉川哲史

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興再興感染症研究事業）
分担研究報告書

水痘ワクチン株の弱毒化に関する研究

研究分担者 森 康子 神戸大学大学院医学研究科
研究協力者 腰塚 哲朗 医薬基盤研究所

研究趣旨：水痘帯状疱疹ウイルスワクチン株(vOka 株)は野生株(pOka 株)と比較して、ゲノム上に複数の点変異が確認される。ORF0 における点変異は、pOka ORF0 遺伝子のストップコドンの位置に生じており、vOka ORF0 は C 末端にアミノ酸配列の延長が起こっている。vOka ORF0 はアミノ酸配列の延長以外に、pOka ORF0 にはない翻訳後修飾が行われている可能性があった。Endo-glycosidase 処理によりバンドの変化が見られたことから、vOka ORF0 は N 型糖鎖付加を受けていることが分かった。また、VZV-BAC を利用し、ORF0 を入れ替えた変異株を作製したところ、培養細胞中での増殖能はそれぞれの親株と比較して変化しなかった。しかしながら vOka ORF0 は vOka 株特異的な糖タンパク質と考えられるため、vOka 株特異的な感染動態に関与している可能性がある。

A. 研究目的

水痘帯状疱疹ウイルス(Varicella zoster virus: VZV) はヒトを自然宿主とするヘルペスウイルスの中で、唯一、効果的なワクチンが実用化されている。現行の水痘生ワクチンである Oka ワクチン株 (vOka 株) は高い免疫原性が維持され、弱毒性、安全性が確認されている唯一の水痘ワクチン株であり、水痘発症に対する予防効果も高いことが知られている。vOka 株感染動態の解明とその親株(pOka 株)との比較は他のウイルスにおけるワクチン開発にも有用である。昨年、vOka 株 ORF0 遺伝子のストップコドンにおける点変異が大きなアミノ酸置換を伴い、vOka ORF0 の見た目の分子量を大きく変化させることを報告した。しかしながら、この分子量変化の生物学的意義については明らかとなっていなかった。そこで、

ORF0 に対する糖鎖修飾の有無、および ORF0 のストップコドンを置換した変異体を作成し、ウイルスの増殖能を検討した。

B. 研究方法

(1) ウイルスと細胞

VZV は pOka 株および vOka 株を用いた。ウイルスの作成には MeWo 細胞を用いた。

MeWo 細胞は 8% FCS を含む DMEM 培地にて培養した。感染細胞の培養には 3% FCS を含む DMEM 培地を用いた。

293T 細胞は 10% FCS を含む DMEM 培地にて培養した。

(2) N 型糖鎖付加の検討

ウイルス感染 MeWo 細胞および ORF0 発現 293T 細胞を RIPA buffer により可溶化し、PNGase-F および Endo-H 処理することで N 型糖鎖付加の解析を行った。

(3) ORF0 変異株の作出

pOka 株 ORF0 のストップコドンを実アルギニンに置換した組換えウイルス rpOka-vORF0 および vOka 株 ORF0 のアルギニンをストップコドンに置換した組換えウイルス rvOka-pORF0 は two-step Red recombination 法により作出した。

(4) ウイルス増殖実験

組換えウイルスの MeWo 細胞における増殖能を plaque 形成能により比較した。

C. 研究結果

(1) vOka ORF0 に対する糖鎖付加

点変異の結果、vOka ORF0 は pOka ORF0 と比較して C 末端に少なくとも 26 アミノ酸が付加されている。しかしながら、見た目の分子量を比較すると、vOka ORF0 は付加されているアミノ酸の数以上に分子量変化が起こっている。この変化の原因を明らかにするために糖鎖付加の有無を検討した。pOka 株あるいは vOka 株感染細胞抽出液について、PNGase-F 処理したところ、pOka ORF0 は PNGase-F 処理により分子量の変化が見られなかったが、vOka ORF0 はその分子量に変化が見られた (図 1)。一方で、

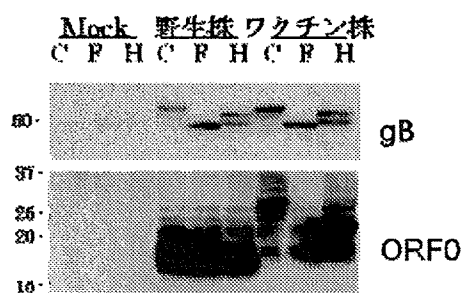


図 1) ORF0 への N 型糖鎖付加の検討。VZV 感染 MeWo 細胞 lysate を PNGase-F (F) あるいは Endo-H (H) 処理し、ウエスタンブロットにより解析した。gB は糖タンパク質のコントロールとして使用した。(C: control)

High-mannose 型糖鎖を切断する酵素である Endo-H 処理では、両者ともに大きな分子量の変化は確認できなかった。同様に、293T 細胞内で発現させた pOka ORF0 は PNGase-F 処理により分子量の変化は見られなかったが、vOka ORF0 は PNGase-F 処理により分子量変化が観察された (data not shown)。

(2) 組換えウイルスの作出

pOka 株 ORF0 のストップコドンは pOka 株ゲノムの 560 番目の塩基にコードされている。vOka 株ではこのストップコドンがアルギニンに置換し、ORF0 の C 末端に新たな配列が付加されている。今回、two-step Red recombination 法を用い、pOka 株ゲノム 560 番目にある ORF0 のストップコドンをアルギニンに置換した変異株 (rpOka-vORF0 株)、あるいは vOka 株 ORF0 のアルギニンをストップコドンに置換した変異株 (rvOka-pORF0 株) を作出した。

得られた変異株感染細胞抽出液をウエスタンブロット法により検討したところ、rpOka-vORF0 では vOka 株型の、rvOka-pORF0 では pOka 株型の ORF0 が発現

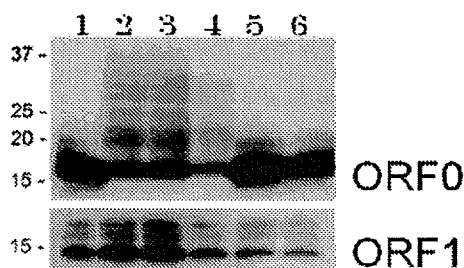


図 2) ORF0 変異株における ORF0 発現の検討。rpOka-vORF0 株 (lanes 2, 3) において、vOka 型の ORF0 が、rvOka-pORF0 株 (lanes 5, 6) において、pOka 型の ORF0 が発現していた。lane 1: rpOka; lanes 2, 3: rpOka-vORF0; lane 4: rvOka; lanes 5, 6: rvOka-pORF0。ORF1 は ORF0 の隣にコードされる遺伝子である。

していることが確認された (図 2)。

得られた変異株の増殖能力をそれぞれの親株 (rpOka 株および rvOka 株) と比較した。各親株および変異体の Cell-free virus を MeWo 細胞へ感染させ、一週間培養し、プラークサイズの大小を比較した。その結果、rpOka 株と rpOka-vORF0 株のプラークサイズに大きな差異は認められなかった。同様に rvOka 株と rvOka-pORF0 株のプラークサイズにも大きな差異は認められなかった (data not shown)。

D. 考察

以上の結果より、vOka 株 ORF0 遺伝子に生じた点変異が原因となって、vOka ORF0 は N 型糖鎖付加を受けていることが分かった。また、ORF0 における点変異は培養細胞中における VZV 増殖能に変化を与えないことが分かった。

vOka ORF0 のみが N 型糖鎖付加を受けていたことから、ORF0 の C 末端側領域が糖鎖付加を受けていると考えられる。昨年、ORF0 が VZV のウイルス粒子構成成分であり、C 末端側をウイルス粒子表面へ露出させていることを報告した。このことを考慮すると、vOka ORF0 はワクチン株特異的な糖タンパク質であると考えられる。vOka ORF0 に特異的な C 末端側領域がウイルス粒子表面に露出されていると考えられるため、vOka ORF0 はワクチン株が宿主細胞へ侵入する過程などに関与している可能性がある。

E. 結論

VZV pOka 株と vOka 株で大きな変化のある分子である ORF0 はワクチン株特異的な

糖タンパク質であることが分かった。この変異は培養細胞中でのウイルス増殖に影響を与えなかったが、vOka 株増殖過程に何らかの影響を与えていると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表
投稿中

2. 学会発表

1) Koshizuka T, Yamanishi K, Mori Y. (2009) Comparison and characterization of VZV encoded ORF0 of the parental and vaccine strains. (The 34th International Herpesvirus Workshop. Ithaca, NY. Jul. 2009)

2) 腰塚 哲朗, 山西 弘一, 森 康子. (2009) 水痘帯状疱疹ウイルスワクチン株 ORF0 は糖タンパク質である. (第 57 回 日本ウイルス学会、東京、2009 年 10 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

V. 日本脳炎

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

積極的勧奨の差し控え中に発売された組織培養日本脳炎ワクチンの接種状況に
関する研究:全国と福岡市の比較

研究分担者 宮崎千明 (福岡市立西部療育センター)

研究要旨

平成 21 年度 6 月から接種が開始された組織培養日本脳炎ワクチンの接種状況(11 月末まで)を全国と福岡市で比較した。全国的には新ワクチンの登場で、実施率は 19 年度の 13.7% から、本年度末には 25%を超える接種率が期待されたが、なお低い水準にある。福岡市では新ワクチンの 1 期初回の接種数は順調に伸び、8 月と 9 月に頂点があり、11 月までの実施率は平成 20 年度とほぼ同率を示し、年度末までには最終的には 60%程度の接種率になると思われた。接種の立ち上がりはやや遅れたが、新型インフルエンザ流行の影響はなかったと思われた。今後、国における日本脳炎ワクチンの積極的勧奨の再開と、2 期接種、年齢超過者への救済措置が課題である。

A. 研究目的

平成 17 年 5 月にマウス脳由来日本脳炎ワクチン接種(以下、旧ワクチンと略す)の積極的勧奨が差し控えられたが、2009 年 2 月に組織培養ワクチン(以下、新ワクチンと略す)が製造承認され、6 月 2 日から 1 期の定期接種に組み込まれた。そこで、平成 21 年度、福岡市における新旧 2 種の日本脳炎ワクチンの接種状況を調査し、積極的勧奨再開後の接種動向予測を行う。

B. 研究方法

福岡市における日本脳炎ワクチンの月別、ワクチン別、期別接種実数を調査した。また、年次別の日本脳炎ワクチンの実施率を検討した。また、厚労省が示した日本脳炎ワクチンの接種者数と比較した。

なお、本稿でいう予防接種実施率とは、標準的接種年齢の対象者数で実際の接種者数を除いたものであり、ある特定年齢児における予防接種率を示すものではない。

また、個人情報を取り扱わず、接種数のみをデータとして用いた(倫理面への配慮)

C. 研究結果

全国の日本脳炎実施率を平成 7 年から平成 19 年まで経時的にみると、平成 18 年度が最低の実施率を示し、平成 19 年度はやや

回復し、1 期初回が 13.7%であった(図 1)。

平成 21 年度における全国の日本脳炎ワクチン接種者数の暫定速報値をみた。図 2 に示すように、6 月から 1 期初回で新ワクチン接種が始まり、9 月が接種の頂点となり、10 月以降接種率は低下した。

図 3 に接種回別の新旧ワクチンの接種数を示したが、1 期初回接種の 91.4%で新ワクチンが使用された。

次に、福岡市における新旧ワクチンの接種状況を調査した。図 4 に示すとおり、6 月の接種開始から速やかに新ワクチンの接種者数が上昇した。

図 5 には平成 20 年度と 21 年度における 1 期初回接種者数の月別推移を示した。新ワクチンは 6 月以降 9 月まで順調に接種数を伸ばした。旧ワクチンの接種は 4 月～6 月まで横ばいで推移し、新ワクチンの登場後接種数が減少し、11 月にはほぼ新ワクチンのみに移行した。新旧ワクチンの合計では接種の頂点が例年より 1 か月遅れて 8 月になり 9 月も接種者数が多かった。

1 期追加接種では、新ワクチンの接種は少なく、旧ワクチンが主に使用された。平成 20 年度と比べて頂点は例年よりやや遅れて 8 月になった(図 6)。

2 期接種では新ワクチンが定期接種としては使用できなかったため、旧ワクチンのみの

接種だったが、平成21年度に比べてほぼ同等か、若干接種者数が上昇した(図7)。

福岡市における平成16年度～21年度(11月までの暫定値)における新旧ワクチンの合計の実施率を図8に示した。平成17年度に最低値を示したが、平成18年度から上昇に転じ、平成20年度には1期初回が68.8%、1期追加が36.5%、2期が26.8%に回復し、平成21年度は11月までの暫定値ながら平成20年度と同じ数値を示した。

D. 考察

日本脳炎ワクチンの積極的勧奨が差し控え後5シーズンが過ぎ、2006年には3歳、2009年には1歳と7歳の小児日本脳炎患者が発生したと報告された。

組織培養日本脳炎ワクチン(新ワクチン)は平成21年2月に承認され、6月から発売され、それに合わせて1期接種のみに新ワクチンの使用が定期接種として認められた。しかし2期接種では、新ワクチンの安全性と有効性が確認できないとの理由で定期接種として認められず、マウス脳由来ワクチン(旧ワクチン)のみが使用されている。また、既に供給量が減っていた旧ワクチンの最終ロットが平成21年度末には有効期限が切れる事態となった。

接種勧奨の差し控え後も、希望者には定期接種ができるとされていたが、予防接種実施率は全国的に極めて低調に推移した。しかし福岡市では、日本脳炎患者発生リスクとワクチンの副反応の比較から、接種医も接種を受ける側もワクチン接種には積極的に、新ワクチン登場前の平成20年度に、既に接種者数は1期で60%を越える水準まで回復していた。そして新ワクチンの登場を機に、1期初回では新ワクチンへの切り替えが比較的スムーズに進みなお60%台を維持できそうであり、新ワクチンは順調に接種医と被接種者の保護者に受け入れられたと考えられる。

しかし全国的にみると、新ワクチンが6月に1期接種で使用可能にはなったものの、新ワクチンの供給量が十分でなく、国が「積極的勧奨の差し控え」を継続したため、各自治体は消極的な姿勢を変えられず、新ワクチンの1期における接種数は11月までに約50万回にとどまり、実施率はなお、低い水準にあった。

平成21年度に福岡市では新型インフル

エンザH1N1の流行が6月頃から始まったが、日本脳炎ワクチンの主な接種時期である7-9月にはまだ大きな流行になっていなかったためか、その影響は11月までの接種数には大きな影響を与えなかったようである。

E. 結論

組織培養日本脳炎ワクチンは平成21年6月以来、福岡市では順調に接種が進んできたが、全国的にはまだ実施率は低く、未接種、未感染小児が多数蓄積されている。複数の小児日本脳炎患者の発生もみられる現状から、国により日本脳炎ワクチンの勧奨の再開と、それに必要な新ワクチンの十分な供給が期待される。

F. 文献

G. 研究発表(日本脳炎関連分)

1. 論文発表(原著)なし

2. 論文発表(総論)

1)宮崎千明:日本脳炎ワクチン. 小児科診療 72:2287-2291, 2009

2)宮崎千明に日本脳炎ワクチン. 母子保健情報 Vol59, 73-75, 2009

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

図1) 日本脳炎ワクチン期別・年度別実施率

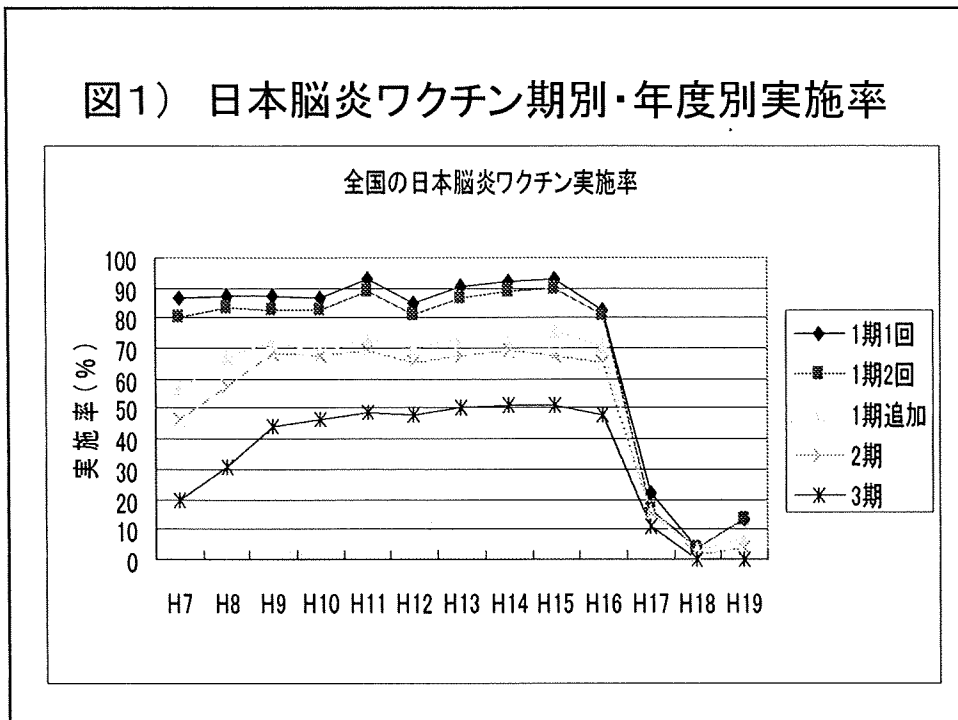


図2) 日本脳炎ワクチン期別・月別接種数：
全国H21年暫定値

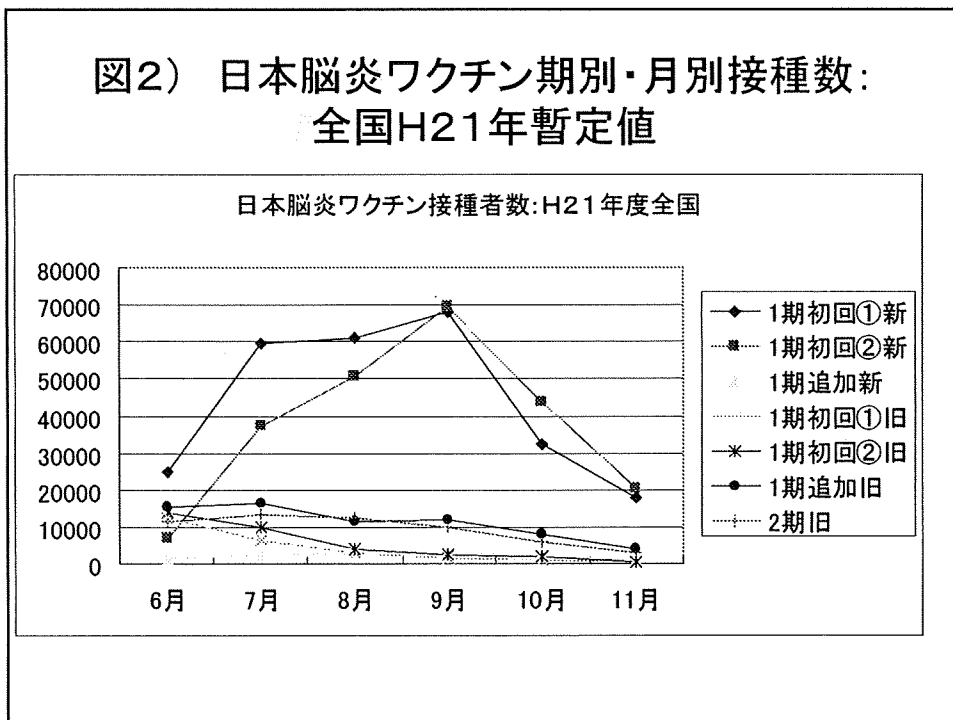


図3) 日本脳炎ワクチン期別・新旧ワクチン別接種数:全国H21年暫定値

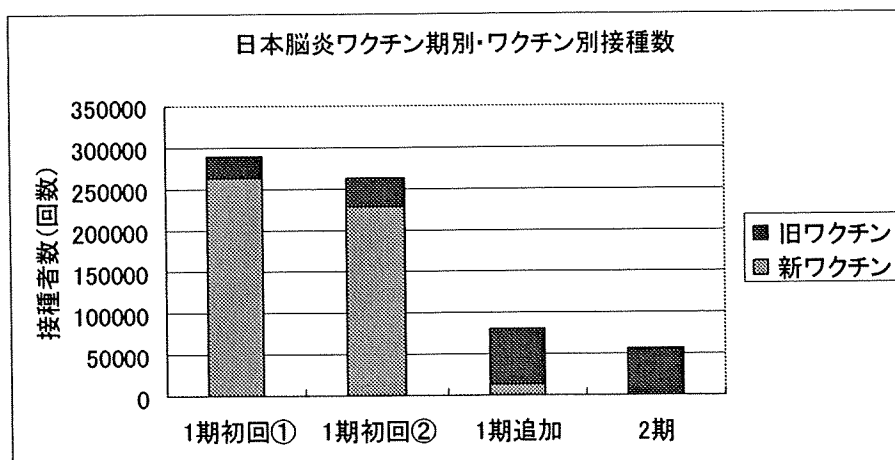


図4) 福岡市における日本脳炎ワクチンの接種者数:H21年度

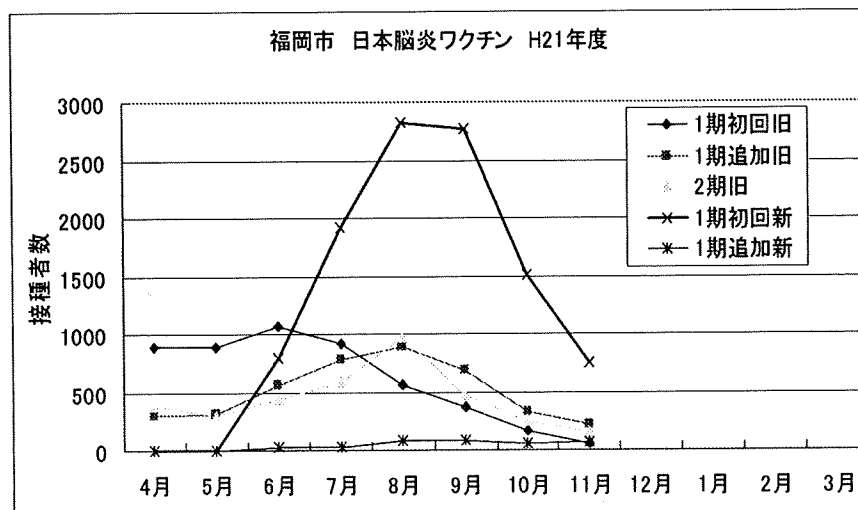


図5) 福岡市における日本脳炎ワクチンの接種者数:H21年度 1期初回

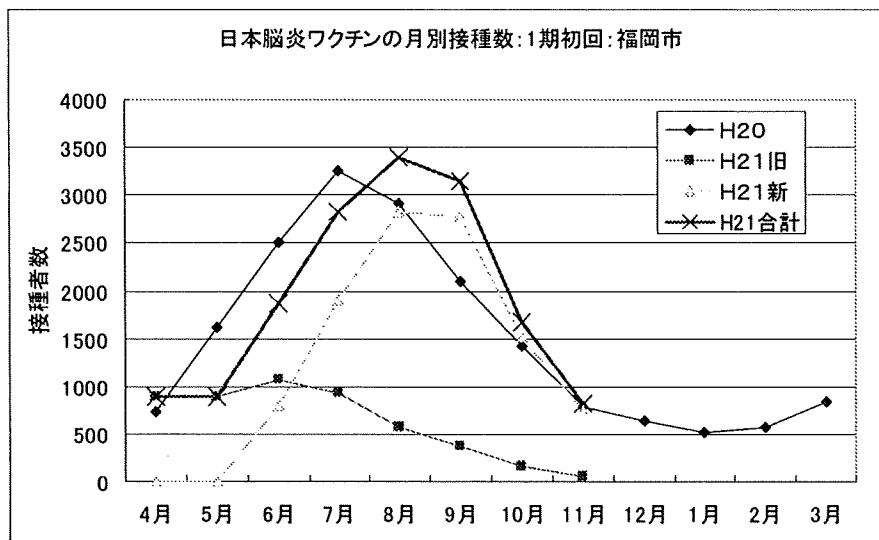


図6) 福岡市における日本脳炎ワクチンの接種者数:H21年度 1期追加

