

表6 ワクチン歴によるムンプス例の急性期血清抗体パターン

ワクチン歴	IgM 抗体 (抗体指数)	IgG 抗体 (EIA 単位)		合計	p value
		<25.8	≥25.8		
なし	<2.5	3	2	5	0.99566
	≥2.5	71	9	80	
あり	<2.5	0	7*	7	0.00833
	≥2.5	3†	0	3	

*: SVF の抗体パターン

(落合 仁ほか, 2007²⁾より一部改変)

†: PVF の抗体パターン

血清抗体は陽転化している (IgM 抗体陽性, IgG 抗体弱陽性), 抗体パターンから髄膜炎の由来株を同定するのは不可能である。

エンテロウイルス流行時にムンプスワクチン接種後無菌性髄膜炎を発症したときは、髄膜炎を引き起こしたウイルスの同定に注意が必要である。血清抗体による診断は不可能であり、髄液からムンプスウイルスまたはエンテロウイルスを分離するか、PCR 法でムンプスウイルスまたはエンテロウイルスの遺伝子を検出することが大切である。

5. ムンプスワクチン接種後1カ月以上経過して発症する急性耳下腺腫脹例

ムンプスワクチン接種後1カ月以上経過して急性耳下腺腫脹を発症した場合、ムンプス非流行時にはムンプス以外が原因であり、ムンプス流行時には多くはムンプス感染による症状である。ムンプスワクチン後の抗体陽性率が麻疹ワクチンや風疹ワクチンよりも低いことから、以前はムンプスワクチン後の自然ムンプス罹患の多くは1次性ワクチン不全 (primary vaccine failure: PVF) と考えられていたが、その後の疫学およびウイルス学的検討から、VF 例の多くは免疫の減衰による2次性ワクチン不全 (secondary vaccine failure: SVF) であることが示されている²¹⁾²²⁾。なお、自然感染例と比べると、SVF 例の唾液からのウイルス分離率は低率であり、唾液中のウイルス量は少ないため、周囲への感染力は弱いと推察されている²³⁾。

ムンプス PVF と SVF の抗体パターンを表6

に示した。PVF 例ではムンプス初感染の抗体パターンと同様であるが、SVF 例ではムンプス EIA-IgM 抗体陰性または2.5抗体指数未満の弱陽性、EIA-IgG 抗体25.8EIA 単位以上の高値である²¹⁾。ウイルス抗原と抗体との結合力を検査する avidity 検査も診断に有用な検査である²⁴⁾。ウイルス感染の初感染では抗原との結合力が弱い IgG3 分画に属する抗体が早期に出現するため avidity は低値を示し、ワクチン後の感染や再感染では感染早期から抗原との結合力が強い IgG1 分画に属する抗体が出現するため avidity は高値を示す。なお、avidity の検査は、コマーシャルラボでは一般に行われていない。

6. 急性耳下腺腫脹の既往がある人のムンプス流行時の急性耳下腺腫脹例

ムンプス流行時に認めた急性耳下腺腫脹の既往はムンプスの可能性が高く、ムンプス非流行時に認めた急性耳下腺腫脹はムンプス以外の可能性が高い。また、2回目の急性耳下腺腫脹であってもムンプス流行時、特に明らかな接触がある場合は、多くはムンプスウイルス感染によるムンプスである。血清抗体を測定し診断する。初感染の場合はムンプス EIA-IgM 抗体陽性、EIA-IgG 抗体弱陽性であり、再感染の場合は SVF と同じ抗体パターンを呈している。

7. ムンプス流行中の成人の急性耳下腺腫脹例

ムンプス流行時ときに子どもから保護者にウイルスが感染し、保護者がムンプスを発症することがある。成人ムンプス例では初感染と同じ

抗体パターンを示す例と SVF と同じ抗体パターンを示す例がある。EIA-IgG 抗体高値の SVF 抗体パターンを示す例は自然感染の再感染と考えられている²⁰⁾。SVF 抗体パターンを示した例は、初感染抗体パターンを示した例よりも軽症に経過する、なおムンプスでは自然感染の再感染が予想よりも多いことが指摘されている²¹⁾。

おわりに

ウイルス感染症診断の基本を示すとともに、急性耳下腺腫脹既往後やムンプスワクチン接種後に急性耳下腺腫脹を示す例の診断方法、ムンプス流行中に無菌性髄膜炎や難聴を示す例におけるムンプスとの関連を診断する方法について解説した。血清 EIA-IgM 抗体、EIA-IgG 抗体測定にくわえ、唾液や髄液からのウイルス分離やウイルス遺伝子検出、ムンプス由来株の同定は、さまざまな病態の急性耳下腺腫脹例をムンプスと診断するうえで重要な検査方法である。

文献

- 1) 庵原俊昭：流行性耳下腺炎（ムンプス）。臨床とウイルス 2007；65（S3）：s380-s383
- 2) 喜多村 健、中島 務：急性高度難聴に関する調査研究より得られたムンプス難聴の疫学調査研究。病原微生物検出情報 2003；24：107-109
- 3) 庵原俊昭：ウイルス感染症の診断。小児科診療 2005；68：1992-1999
- 4) 庵原俊昭ほか：アメリカ微生物学会（ASM）のウイルス分離用採取ガイドラインからみたわが国コマーシャルラボの採取方法の検討。小児感染免疫 1999；11：103-107
- 5) 庵原俊昭ほか：ムンプスウイルスを含むワクチンの接種歴を有する児の耳下腺腫脹時におけるムンプスウイルスの分離。小児感染免疫 2000；12：237-241
- 6) 寺田喜平ほか：麻疹、風疹、水痘、ムンプスに対する抗体測定方法と陽性率の比較。感染症学雑誌 2000；74：670-674
- 7) 庵原俊昭：ムンプス感染対策：診断。登校登園停止期間・ムンプスワクチン。小児科臨床 2007；60：2215-2221
- 8) 落合 仁ほか：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 2007；60：501-506
- 9) 落合 仁ほか：ムンプス流行時期による星野株接種後 30 日以内の急性耳下腺腫脹例の検討。小児科臨床 2008；61：805-809
- 10) 庵原俊昭ほか：ムンプスワクチン星野株接種後 4 週以内に唾液腺腫脹を認めた症例の検討。小児感染免疫 1999；11：264-266
- 11) Kashiwagi Y et al：Detection of mumps virus genome directly from clinical samples and a simple method for genetic differentiation of the Hoshino vaccine strain from wild strains of mumps virus. J Med Virol 1997；52：195-199
- 12) Okafuji T et al：Rapid diagnostic method for the detection of mumps virus genome by loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol 2005；43：1625-1631
- 13) 高良聡子ほか：最近経験したムンプス難聴の 3 例—その発生頻度の検討も含めて。外来小児科 1999；2：23-27
- 14) 福田 諭：ウイルス感染による難聴。日本医事新報 2006；4228：1-6
- 15) Nagai T et al：A comparative study of the incidence of aseptic meningitis in symptomatic natural mumps patients and monovalent mumps vaccine recipients. Vaccine 2007；25：2742-2747
- 16) Briss PA et al：Sustained transmission of mumps in a highly vaccinated population：Assessment of primary vaccine failure and waning vaccine-induced immunity. J Infect Dis 1994；169：77-82
- 17) Dayan GH et al：Recent resurgence of mumps in the United States. N Engl J Med 2008；258：1580-1589
- 18) 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特徴。小児科 2001；42：1144-1149
- 19) 庵原俊昭ほか：ワクチン後のムンプス罹患例におけるムンプス IgG 抗体とその avidity の検討。臨床とウイルス 1996；24：389-393
- 20) 庵原俊昭：おたふくかぜ再感染と Vaccine Failure の臨床。臨床とウイルス 2008；36：50-54
- 21) Yoshida N et al：Mumps virus reinfection is not a rare event confirmed by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. J Med Virol 2008；80：517-523

感染症・予防接種レター(第46号)

日本小児保健協会予防接種・感染症委員会では「感染症・予防接種」に関するレターを毎号の小児保健研究に掲載し、わかりやすい情報を会員にお伝えいたしたいと存じます。ご参考になれば幸いです。

日本小児保健協会予防接種・感染症委員会

委員長 加藤 達夫 副委員長 岡田 賢司 庵原 俊昭 宇加江 進 古賀 伸子
住友眞佐美 多屋 馨子 馬場 宏一 三田村敬子

ムンプス最近の話題

ムンプスはおたふくかぜ、流行性耳下腺炎とも呼ばれ、パラミクソウイルス科ルブラウイルス属に属するムンプスウイルスによる全身性ウイルス感染症である。本邦ではムンプスワクチンは任意接種のため接種率は30%程度と低く、4年ごとに大きな流行を認めている。ムンプスに関する最近の話題を提供する。

最初の話題は、アメリカではムンプスによる休園休校期間を、2007年から今までの9日間から5日間に変更したことである^{1,2)}。最近の分子疫学研究から、耳下腺炎発症後4日を経過すると唾液中のウイルス量が急速に低下し、耳下腺腫脹後5日を超えると感染するリスクが低下するためである(表1)³⁾。本邦で行われたムンプスウイルスの分離成績でも、耳下腺がほぼ同時に腫脹した症例では、耳下腺腫脹後6日を過ぎればムンプスウイルスが分離されなくなっており、ムンプスの休園休校期間の見直しが提案されている⁴⁾。

次の話題はムンプス難聴の頻度である。ムンプスの神経合併症として無菌性髄膜炎は有名であるが、ムンプス難聴も神経合併症の一つであり、予後の悪い合併症である。ムンプスウイルスが内耳有毛細胞に感染して発症する。多くは片側のみ障害を受ける。ムンプス難聴の頻度は、以前は20,000人に1人と言われていたが、最近の日本の調査では400~700人に1人と、比較的頻度の高い合併症であることが示されている^{5,7)}。成人では難聴の発症早期にめまいを伴うことがある。一方、小児では耳下腺腫脹が治ってから難聴に気づくことが多く、その時点では聴力の回復は困難であり、補聴器により聴力を高めることも不可能である。なおムンプスウイルスを含むワクチンによる難聴の頻度は、600万~800万人に1人とされている(表2)。

最後の話題はムンプス脳炎の頻度と予後である。ムンプス脳炎では中脳水道が狭窄し水頭症を合併する。発症頻度は400~5,000人に1人で

表1 病日による唾液中のムンプスウイルス量

1) ELISA法によるウイルス量 ³⁾			
病日	例数	ウイルス量 (10 ³ PFU/0.2ml)	P value
0	18	0.89±0.81	0.0741
1~2	10	1.54±1.01	
3~5	9	0.49±0.77	0.0275
2) RT-PCR法によるムンプスウイルスRNA陽性率 ⁴⁾			
病日	例数	陽性数	陽性率
1~3	20	7	35%
4~7	3	0	0%
8~14	4	0	0%
3) ムンプスウイルス分離陽性率 ³⁾			
病日	例数	分離陽性数	陽性率
0~2	25	25	100%
3~5	9	5	56%
6~9	17	0	0%

表2 自然ムンプスとムンプスワクチン

症状	自然感染	ワクチン
耳下腺炎	70%	3%
髄膜炎	50%	不明
髄膜炎 発熱性	3%~10%	1~1,000~10,000
難聴	0.02%~0.3%	4~1,000,000
難聴	1/400~700	1~6,000,000~8,000,000
睾丸炎	25%*	ほとんどなし**
胸腺腫脹	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
肺炎	1%**	ほとんどなし

*: 思春期以降の頻度、睾丸炎のリスク(1.5%)

** : 詳細な頻度は不明

第一三半期の経緯に感染:1/3が成人、典型的な発症はない

ある。最近行われた本邦の脳炎・脳症全国調査によると、ムンプス脳炎の割合は、インフルエンザ脳症(23%)、HHV-6,7脳症(10%)、ロタウイルス関連脳症(4%)に次ぐ、マイコプラズマ脳炎脳症と同じ頻度の3%である⁶⁾。ムンプス脳炎では発症時MRIの異常は認めにくい⁷⁾が、脳波異常の頻度が高い特徴がある。死亡率7%、後遺症率28%と予後不良である。なお、ムンプスワクチンによる脳炎の頻度は、100万人あたり4人以下とされている。

ムンプスはワクチン予防可能疾患であり、集団免疫率により流行排除が期待される疾患である。年間子どもの出生数が100万人、ワクチン接種率30%、ムンプス顕性感染率70%とすると、少なく見積もっても年間ムンプス難聴は約500人、ムンプス脳炎は約80人発症している。ムンプス難聴、ムンプス脳炎を予防する手段は、ムンプスワクチンを接種することである。ムンプスワクチンは生ワクチンであり、ワクチン接種により極めてまれではあるが難聴や脳炎を発症するが、その発症頻度は、自然感染により合併するリスクの1,000分の1である。

ムンプスワクチンの接種率を高め、流行を抑制するためには定期接種化が必要である。先進

国でムンプスウイルスを含むワクチンを定期接種していない国は日本だけである(表3)。

文 献

- 1) AAP: Infection prevention and control in pediatric ambulatory settings. Pediatrics 2007; 120: 650-665.
- 2) CDC: Updated recommendations for isolation of persons with mumps. MMWR 2008; 57: 1103-1105.
- 3) Okafuji T, et al: Rapid diagnostic method for detection of mumps virus genome by loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol 2005; 43: 1625-1631.
- 4) Bitsko RH, et al: Detection of RNA of mumps virus during an outbreak in a population with a high level of measles, mumps, and rubella vaccine coverage. J Clin Microbiol 2008; 46: 1101-1103.
- 5) 庵原俊昭. ムンプス感染対策: 診断・登校登園停止期間・ムンプスワクチン. 小児科臨床 2007; 60: 2215-2221.
- 6) 高良聡子, 他. 最近経験したムンプス難聴の3例—その発症頻度の検討も含めて. 外小児科 1999; 2: 23-27.
- 7) 喜多村健, 中島 努. 急性高度難聴に関する調査研究より得られたムンプス難聴の疫学調査研究. 病原微生物情報 2003; 24: 107-109.
- 8) 和田智顕, 他. 小児における急性脳炎・脳症の病態解明と診断法および治療法の確立に向けて—急性脳炎・脳症全国調査(2005-2006)解析結果—。第56回日本ウイルス学会抄録集 2008: 258.

表3 ムンプスワクチン: 世界の状況(2004)

WHO/UNICEFの分類	定期接種*		合計
	実施	未実施	
開発国	26(96%)	1	27
経済発展国	25(93%)	2	27
途上国	58(66%)	30	88
極貧国	0	50	50
合計	109	83	192

*2回接種: 89ヶ国, 1回接種20ヶ国
Weekly Epidemiological Record 48, 418-424, 2005より作成

Ⅲ 各論：任意接種

(1) ムンプス

国立病院機構三重病院院長 庵原 俊昭

キーワード ムンプスウイルス、ムンプスワクチン、ワクチン不全、無菌性髄膜炎、難聴

はじめに

ムンプスは、小児期の代表的な全身性ウイルス感染症であり、わが国では流行性耳下腺炎、おたふくかぜとも呼ばれている。パラミクソウイルス科ブラウウイルス属に属するムンプスウイルスにより、ヒト-ヒト感染する。ムンプスウイルスの自然宿主はヒトだけであり、ワクチン接種率を高めることで流行の抑制が可能な感染症の一つである。ムンプスウイルスのエンベロープ上にはヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ (HN) とフュージョン (F) の二種類の糖タンパクがあり、細胞への感染 (レセプターはシアル酸) およびウイルスの中和に関与している¹⁾。ムンプスウイルスは、

株ごとの変異が多い small hydrophobic の遺伝子配列により遺伝子型が分類されており、A から M までの 13 種類の遺伝子型が知られている^{2,3)}。近年、日本、アメリカ、イギリスで主に流行しているのは G 型である。ムンプスワクチンの現状とわが国のムンプス対策の問題点について解説する。

1. ムンプスの臨床症状 (表)

ムンプスの基本再生産数は 4~7、集団免疫率は 75~86% であり、潜伏期間は 12~25 日間 (通常 16~18 日間) である⁴⁾。ムンプス臨床像の特徴は 2 日以上持続する急性耳下腺腫脹であり、1 週間腫脹が持続する。耳下腺腫脹を認めるのはム

ムンプス自然感染の症状とワクチンの副反応

症状	自然ムンプス	ムンプスワクチン
耳下腺炎	70%	3%
無菌性髄膜炎		
細胞数増多	50%	不明
症候性	3~10%	1/2,000~10,000
脳炎	0.02~0.3%*	4/1,000,000
難聴	1/400~1,000	1/6,000,000
精巣炎	25%†	ほとんどなし
両側精巣炎	10%†	ほとんどなし
卵巣炎	5%‡	ほとんどなし
乳腺炎	15~30%†	ほとんどなし
膵炎	4%	ほとんどなし

* 脳炎例の 1.5% は死亡する

† 思春期以降の男性の頻度、小児ではまれ、両側腫脹は精巣炎例の 15~30%

‡ 思春期以降の女性の頻度、第一三半期の妊婦がムンプスに罹患すると 27% が自然流産する。ムンプスウイルスに特異的な先天性奇形はない。

(庵原俊昭：日本臨床 2007；65(s3)：s380 より、一部改変)

ンプスウイルス感染者の70%である。反対側の耳下腺腫脹を90%に認める。多くは2、3日以内に反対側耳下腺の腫脹を認めるが、時に7日以上の間隔を空けて反対側が腫脹することがある⁵⁶⁾。いずれの耳下腺腫脹時にも唾液からムンプスウイルスは分離され、周囲に感染させるリスクがある。顎下腺、舌下腺も腫脹する。

2. ムンプスの合併症 (表)

無菌性髄膜炎は頻度の高い合併症である。髄液の細胞数増多をムンプス発症者の半数に認めるが、症候性髄膜炎の合併率は3～10%である。ムンプス流行時には耳下腺腫脹を伴わないムンプスウイルスによる無菌性髄膜炎を認めることがある。ムンプスウイルスによる無菌性髄膜炎は予後の良い合併症である。

ムンプスウイルスによる他の神経合併症として脳炎と難聴がある。いずれも予後が悪い合併症である。脳炎の発症頻度は0.02～0.3%であり、発症者の1.5%が死亡する。中脳水道の狭窄により水頭症を合併することがある。難聴の合併率は、以前は1/20,000と言われていたが、最近の日本の調査では1/400～1,000と高頻度である⁷⁾。ムンプス流行時には耳下腺腫脹を伴わないムンプスウイルスによる突発性難聴例を認めることがある。ムンプス難聴は多くは片側であるが、聴力の回復が困難である。年長者では難聴出現時にめまいを合併し、時にめまいが難聴よりも先行することがある。

思春期以降の男性では25%に精巣炎を合併する。両側精巣炎をきたす頻度は、精巣炎発症者の15～30%である。ムンプス精巣炎を発症すると、その後精子形成能は低下するが、不妊になるのは極めて稀である。思春期以降の女性がムンプスに罹患すると、乳腺炎を15～30%に、卵巣炎を5%に合併する。第一三半期の妊婦がムンプスに罹患すると、25%の妊婦は自然流産する。なお、ムンプスウイルスに特異的な先天性奇形は報告されていない。男女合わせた睪炎の合併率は4%である。

3. ムンプスワクチンの効果

現在使用されているムンプスワクチンはすべて弱毒生ワクチンである。世界では、Jeryl Lynn株、Urabe Am9株、Jeryl Lynn株由来RIT4385株がよく使用されており、Leningrad-Zagreb株、Leningrad-3株、Rubini株も使用されている。わが国では星野株、鳥居株が市販されている。いずれの株もワクチン後の抗体陽転率は90～95%である。

欧米でのムンプス流行時の検討では、Urabe Am9株の有効率はJeryl Lynn株よりも少し高く、Rubini株の有効率は極めて低率である¹⁸⁾。ムンプスワクチンの有効率は、1回接種では69%、2回接種では88%である。一方、わが国のムンプスワクチンのムンプス流行時の有効率は75～90%である⁹⁾。株ごとの有効率の報告は少ないが、小学校流行時の調査によるとそれぞれの有効率は、星野株82.2%、鳥居株81.4%であり、統計学的には有意な差は認められていない¹⁰⁾。

ムンプスワクチン不全 (vaccine failure: VF) の原因は、以前は一次性ワクチン不全 (primary VF) と考えられていたが、その後の検討からムンプスVFの多くは二次性ワクチン不全 (secondary VF: SVF) であることが示されている⁶⁹⁾。わが国のVF例の検討では、70%がSVF、30%がPVFである。VFが発症する主たる要因はワクチン後の免疫の減衰である。ワクチン株と流行株の中和抗原性の違いの関与も指摘されているが、相違がないとの意見もあり一定の見解は得られていない⁴¹⁾。

ムンプスVFの診断には、急性期の血清IgM抗体とIgG抗体を酵素抗体 (EIA) 法で同時に測定することが大切であり、唾液からのウイルス分離も診断の助けになる⁹⁾。PVFではIgM抗体中等度以上陽性 (≥ 2.5 抗体指数)、IgG抗体弱陽性であり、SVFではIgM抗体陰性または弱陽性 (<2.5抗体指数)、IgG抗体高値 (≥ 25.8 EIA単位) である。

VF例の唾液からのウイルス分離率は、ムンプ

ス初感染例よりも低率であり、分離される期間も短期間である。しかし、初回に接種された株によりVF例の唾液からのウイルス分離率は異なっており、星野株接種群の方が鳥居株接種群よりもウイルス分離率は低率であり (RR=0.59)、臨床症状も軽症である⁹⁾。

4. ムンプスワクチンの合併症 (表)

ムンプスワクチン後の耳下腺腫脹率は3%である。多くはワクチン接種後17～20日頃に出現する。耳下腺腫脹例からワクチン株は分離されるが、周囲の人の顕性感染は極めて稀である¹⁰⁾。わが国ワクチン株の症候性無菌性髄膜炎の発症率は、Nagai等は1/2,700と報告している¹⁰⁾。ワクチン株による無菌性髄膜炎は予後の良い合併症である。ムンプスワクチン接種後脳炎や難聴を合併することはあるが、極めて稀である。また、精巣炎や乳腺炎の発症率は、頻度が極めて低いため不明である。

5. ムンプスワクチン接種の実際

わが国ではムンプスワクチンは単独ワクチンであり、接種料金の公的補助が受けられない任意接種として1回接種が行われている。先進国でムンプスワクチンの定期接種を行っていない国は日本だけである。わが国のムンプス罹患年齢のピークは4～6歳であり、保育園や幼稚園での流行時に罹患しているため、初回の適切な接種時期は、1歳を越えて保育園や幼稚園などの集団生活に入る前である。ムンプスワクチン後の抗体陽転率や抗体レベルから、確実な予防を期待するためには、2回接種が勧められる。

6. ムンプスワクチンの問題点

1人あたりのムンプスワクチン費用を6,000円として、ムンプスワクチンを定期接種化すると、年間424億円の医療費の削減が期待できる¹⁰⁾。しかし、MMRワクチン導入時に無菌性髄膜炎の発症率が高かったことが現在までトラウマとして残っており、わが国ではムンプスワクチンの定期

接種化が遅れている。

年間の出生数が100万人、ワクチン接種率30%、顕性感染率70%とすると、年間の顕性ムンプス患者数は49万人である。ムンプス難聴の頻度を1/1,000とすると年間難聴者は490人、脳炎の発症率を0.1%、脳炎による死亡者数を発症者の1.5%とすると、脳炎発症者数は490人、死亡者数は7人となる。一方、ワクチン接種率を90%、髄膜炎発症率を1/2,700とすると、ワクチンによる髄膜炎発症者数は333人となり、年間の難聴発症者数や脳炎発症者数よりも少数である。自然感染による予後の悪い合併症の発症者数とワクチンによる予後の良い合併症である髄膜炎の発症者数の検討や医療経済面の効果を考え併せると、ムンプスワクチンは早期に定期接種化すべきワクチンである。

今世界で市販されているムンプスワクチンは、ワクチン後の抗体反応をみると少し弱毒化されすぎているきらいがある。また、カンザス州の大学での流行のように、2回接種による集団免疫率を保っていても、ムンプスが流行することがある^{11,12)}。これらのことから、今よりも免疫原性が高いワクチンを開発するか、接種方式を変更する必要性が指摘されている^{12,13)}。

おわりに

ムンプスは軽症の感染症と考えられているが、難聴や脳炎などの予後の悪い合併症がある。先進国ではMMRワクチンとしてムンプスワクチンを定期接種化し、難聴や脳炎の発症を抑制している。一方、わが国ではムンプスワクチンは依然任意接種であり、ムンプスの流行が続いている。医療費抑制が唱えられている現在、わが国でもムンプス対策を明確化し、医療費削減効果のあるムンプスワクチンを定期接種化する時期に来ていると思われる。

文献

1. Hviid A, Rubin S, Mublemann K. Mumps. *Lancet*, 371 (9616) : 932-944, 2008

2. Inou Y, Nakayama T, Yoshida N, et al. Molecular epidemiology of mumps virus in Japan and proposal of two new genotypes. *J Med Virol*, 73 (1) : 97-104, 2004
3. Santos CL, Ishida MA, Foster PG, et al. Detection of a new mumps virus genotype during parotitis epidemic of 2006-2007 in the state of Sao Paulo. *J Med Virol*, 80 (2) : 323-329, 2008
4. 庵原俊昭「小児科領域の院内感染 ムンプス」小児科、49 (5) : 694-698, 2008
5. 庵原俊昭「流行性耳下腺炎(ムンプス)」日本臨床、65(s3) : 380-383, 2007
6. 庵原俊昭「ムンプス感染対策：診断・登校登園停止期間・ムンプスワクチン」小児科臨床 60(11) : 2215-2221, 2007
7. 庵原俊昭「ワクチンで予防可能な疾患の病原診断とその読み方3 ムンプス」小児科、2009 (印刷中)
8. Dayan GH, Rubin S. Mumps outbreaks in vaccinated populations: Are available mumps vaccines effective enough to prevent outbreak? *Clin Infect Dis*, 47 (11) : 1458-1467, 2008
9. 庵原俊昭「おたふくかぜの再感染と Vaccine Failure の臨床」臨床とウイルス、36(1) : 50-54, 2008
10. 落合仁、庵原俊昭、中野貴司「小学校流行時におけるムンプスワクチン有効性の検討」小児科臨床 60 (3) : 489-494, 2007
11. Rubin SA, Qi L, Audet SA, et al. Antibody induced by immunization with Jeryl Lynn mumps vaccine strain effectively neutralizes a heterologous wild-type mumps virus associated with a large outbreak. *J Infect Dis*, 198 (4) : 508-515, 2008
12. Date AA, Kyaw MH, Rue AM, et al. Long-term persistence of mumps antibody after receipt of 2 measles-mumps-rubella (MMR) vaccinations and antibody response after a third MMR vaccination among a university population. *J Infect Dis*, 197 (12) : 1662-1668, 2008
13. 落合仁、庵原俊昭、神谷齊他「ムンプス流行時期による星野株接種後 30 日以内の急性耳下腺腫脹例の検討」小児科臨床、61 (4) : 805-809, 2008
14. Nagai T, Okafuji T, Miyazaki C, et al. A comparative study of the incidence of aseptic meningitis in symptomatic natural mumps patients and monovalent mumps vaccine recipients in Japan. *Vaccine*, 25 (14) : 2742-2747, 2006
15. 菅原民枝、大日康史、多屋馨子他「ムンプスワクチンの定期接種化の費用対効果分析」感染症学雑誌、81 (5) : 555-561, 2007
16. Dayan GH, Quinlisk MP, Parker AA, et al. Recent resurgence of mumps in the United States. *N Engl J Med*, 358 (15) : 1580-1589, 2008
17. Cortese MM, Jordan HT, Curns AT, et al. Mumps vaccine performance among university students during a mumps outbreak. *Clin Infect Dis*, 46 (8) : 1172-1180, 2008
18. Peltola H, Kulkarni PS, Kapre SV, et al. Mumps outbreaks in Canada and the United States: Time for new thinking on mumps vaccine. *Clin Infect Dis*, 45 (4) : 459-466, 2007

* * *

ムンプス—再感染と vaccine failure

庵原俊昭*

Toshiaki Ihara

落合 仁**

Hitoshi Ochiai

はじめに

ムンプスはパラミクソウイルス科ルブラウイルス属に属するムンプスウイルスによる、全身性ウイルス感染症である。潜伏期間は通常 16~18 日であり、2 日以上持続する急性耳下腺腫脹が臨床像の特徴である。飛沫または接触により感染したムンプスウイルスは、上気道で増殖した後ウイルス血症により全身の親和性臓器（耳下腺、顎下腺、舌下腺、精巣、卵巣、中枢神経系、内耳、腎臓、膵臓、乳腺など）に到達し、そこで増殖して臨床症状が出現する。

経験上、麻疹や水痘などの全身性ウイルス感染症は、自然感染後の再感染は少ないと考えられているが、ムンプスではこれらの疾患と比べ再感染の頻度が高いとされている¹⁾。ムンプス再感染および vaccine failure (VF) の診断および臨床像について解説する。

1. 再感染および vaccine failure の診断

反復性耳下腺炎、化膿性耳下腺炎、唾石症など、ムンプス以外にも急性耳下腺腫脹をきたす疾患があり、臨床症状だけでムンプスの診断は困難である。一般に、園や学校でムンプスの流行があるときの急性耳下腺腫脹の原因は、多くはムンプスであり、ムンプスの流行がないときの急性耳下腺腫脹の原因はムンプス以外である²⁾。ムンプスワクチン後の VF には、ワクチン後に免疫獲得ができ

なかったために自然ムンプスに罹患する一次性 VF (primary VF: PVF) と、ワクチン後に免疫は獲得したが、その後の免疫の減衰のために自然ムンプスに罹患する二次性 VF (secondary VF: SVF) とがある。

ムンプス再感染またはムンプスワクチン後のムンプス感染を診断するためには、ウイルス学的検査が必要である。ウイルス感染症診断のゴールドスタンダードは、病変部位からのウイルス分離であり、ムンプスにおいては唾液からのウイルス分離である。ウイルス分離が困難なときは、polymerase chain reaction (PCR) 法または loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を用いて、唾液からのウイルス RNA を検出する方法もある³⁾。なお、ムンプス PCR 法および LAMP 法は、一部の研究施設でしか行われておらず、コマーシャルラボでの検査は行われていない。

急性期血清抗体測定もムンプス再感染および VF の診断に有用である⁴⁾。表 1 に急性耳下腺腫脹例の血清 IgM 抗体および IgG 抗体レベルから診断されるムンプスの病態を示した。多くのムンプス初感染および PVF の急性期血清抗体パターンは、IgM 抗体および IgG 抗体ともに陽性で、IgM 抗体は 2.5 抗体指数以上の中等度以上の陽性、IgG 抗体は 2.0 抗体価以上から 25.8 抗体価未満の軽度から中等度の陽性を示している。一方、ムンプス再感染および SVF の急性期血清抗体パターンは、IgM 抗体陰性または弱陽性 (<2.5 抗体指数)、IgG 抗体は 25.8 抗体価以上の高値を示している⁵⁾。なお、ムンプスでは全身で増殖するウイルス量が少ないためか、酵素免疫法 (EIA) で測定される血清 IgG 抗体価は、麻疹や水痘と比べると低値である。

* 国立病院機構三重病院小児科
〒514-0125 津市大里窪田町 357)
TEL 059-232-2531 FAX 059-232-5994
E-mail: ihara@mie-m.hosp.go.jp

** 落合小児科医院

表 1 急性耳下腺腫脹例におけるムンプス抗体の特徴と診断

既往歴	ワクチン歴	IgM 抗体	IgG 抗体	診断*
なし	なし	+++	+	ムンプス初感染*
なし	なし	++	+++†	ムンプス再感染†
なし	なし	-	++†	ムンプス以外の原因
なし	あり	+++	+	PVF*
なし	あり	++	+++	SVF†
なし	あり	-	+	ムンプス以外の原因
あり	なし	-	+	ムンプス以外の原因
あり	なし	++	+++	ムンプス再感染†

PVF：一次性ワクチン不全 (primary vaccine failure), SVF：二次性ワクチン不全 (secondary vaccine failure)

* 急性期 IgM 抗体 \geq 2.5 抗体指数、急性期 IgG 抗体 $<$ 25.8EIA 価

† ムンプスの顕性感染率は 70%

‡ 急性期 IgM 抗体 $<$ 2.5 抗体指数、急性期 IgG 抗体 \geq 25.8EIA 価

(龍原⁹⁾ 2008 より一部改変)

ウイルス抗原と抗体との結合力をみる avidity 検査も初感染または PVF と、再感染または SVF を鑑別するのに有用な検査である¹⁰⁾。初感染または PVF において急性期早期に出現する IgG 抗体は、IgG3 分画に属する抗原との結合力が弱い (avidity が弱い) 抗体である。一方、再感染または SVF において急性期早期に出現する抗体は、IgG1 分画に属する抗原との結合力が強い (avidity が強い) 抗体である。保険検査として認められていないため、avidity 検査も一部の研究施設でしか行われていない。

II. 再感染の臨床像

以前、ムンプス再感染はないとされていたが、EIA 法で血清 IgM 抗体と IgG 抗体が測定できるようになり、急性期の血清抗体パターンからムンプス再感染と思われる症例が報告されるようになってきた¹²⁾。また、急性期血清抗体の検討から、成人ムンプス例では再感染パターンを示す例の頻度が高いことも示されている⁹⁾。一般に、ムンプスでは発症年齢が成人に近づくほど顕性感染率が高くなり、耳下腺腫脹期間も長くなるが¹⁰⁾、ムンプス再感染例では、発症年齢が高いにもかかわらず、両側耳下腺腫脹期間が短く、無菌性髄膜炎合併頻度も低率であるなど軽症化が認められている^{2,9)}。

ウイルス学および疫学的にムンプス再感染が証明された 2 例を紹介する (表 2)。症例 1 は 4

歳時、児が通っている保育園でムンプス流行中に発症した症例で、唾液からムンプスウイルスが分離され、ウイルス学的にムンプスと診断された症例である。児の発症後 16 日目に父が、17 日目に弟がムンプスを発症し、家族内感染をした親子とも、唾液からムンプスウイルスが分離された。2 回目の発症は 6 歳時地域で流行中に急性耳下腺腫脹を認め、急性期血清抗体パターン (IgM 抗体 2.36 抗体指数、IgG 抗体 57.1EIA 価) からムンプス再感染と診断した。

症例 2 は 1 歳時、4 歳上の姉が通っている保育園でムンプスの流行があり、唾液からムンプスウイルスが分離された姉の発症後 19 日目に右側耳下腺腫脹を認めた症例で、唾液からムンプスウイルスは分離できなかったが、右側の耳下腺腫脹が 5 日間持続し、疫学的関連性と臨床経過からムンプスと診断した。2 回目の耳下腺腫脹は 4 歳時、児の通っている保育園でムンプスの流行中に急性耳下腺腫脹を認め、急性期血清抗体パターン (IgM 抗体 1.24 抗体指数、IgG 抗体 33.0EIA 価) からムンプス再感染と診断した。

ムンプス初感染の臨床症状は、年齢が高くなるにつれ、耳下腺腫脹期間が長くなり、発熱率も高くなる¹⁰⁾。今回紹介した 2 例の初回発症時と 2 回目発症時の臨床症状を比較すると、2 回目発症時のほうが耳下腺腫脹期間および発熱期間ともに短く、成人の再感染例と同様に小児でも再感染時には軽症化が認められている。ムンプスの既往歴が

表 2 再感染例のムンプスの診断と臨床経過

	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)
1. 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	二次感染パターン*	施行せず	二次感染パターン†
疫学的関連性	あり	あり	あり	あり
2. 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
発熱の有無	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

あったとしても、ムンプスが流行しているときに認められた急性耳下腺腫脹の原因はムンプスの可能性があり、ウイルス学的検討が必要である。

III. vaccine failure の臨床像

欧米で使用されているムンプスワクチンの有効率は 80~90% であり、ヨーロッパの経験では Urabe 株の有効率が一番高く、次いで Jeriy Lynn 株である^{11,12)}。一方、わが国で使用されているムンプスワクチンの有効率も 80~90% である。現在、わが国では星野株と鳥居株が市販されているが、有効率には差は認められていない¹³⁾。

ムンプスワクチン後の自然ムンプス発症時の急性期抗体パターンの検討によると、ムンプス VF の 70% が SVF であり、30% が PVF である⁹⁾。ムンプス SVF の発症因子として、ワクチン接種からムンプス曝露までの期間が指摘されている¹⁴⁾。最近、米国の大学生の間でムンプスウイルスを含むワクチンを 2 回接種していたにもかかわらず、自然ムンプスを発症した症例があり、免疫原性の高いワクチンの開発、接種回数増加など、欧米ではムンプス対策が再考され始めている^{11,15)}。

VF 例では唾液からムンプスウイルスが分離される頻度が低く、唾液からの排泄期間も短いため周囲への感染リスクは軽減している。実際家族内二次感染リスクを検討した報告では、ワクチン歴が

ない家族では 21 例中 20 例に家族内二次発症を認めているのに対し、ワクチン歴がある家族の家族内二次発症は 4 例中 2 例であり、家族内感染リスクが約半分 (RR=0.53) に軽減している⁷⁾。

VF 例の臨床経過は、両側耳下腺腫脹をきたす頻度が低く、耳下腺腫脹期間も短く、発熱の合併率も低く、発熱期間も短くなるなど軽症化している (修飾ムンプス)。また、無菌性髄膜炎を合併する頻度もムンプス初感染の 1/10 に軽減している。なお、現在学校保健法に定めるムンプスの登校停止期間は耳下腺腫脹が消失するまでである。ひとつの小学校でムンプスが流行したときの休学期間は、ワクチン歴がなかった群では 7.7±2.5 日であったのに対し、ワクチン歴があった群では 5.2±2.6 日と 2.5 日間短縮しており¹⁴⁾、ワクチン後の自然ムンプス罹患は軽症化することを示している。

ワクチン後の自然ムンプス罹患例において、唾液からのウイルス分離に影響を及ぼす因子として、接種したワクチン株の影響が示されている (表 3)⁹⁾。接種してから発症までの期間に差がなく、自然ムンプス発症時の抗体パターンから多くの症例が SVF にもかかわらず、星野株接種群のウイルス分離率は 47.7% であったのに対し、鳥居株接種群のウイルス分離率は 80.6% (RR=1.7) と、ウイルス分離率が高率であった。また、臨床経過を比較しても、鳥居株接種群のほうが発熱率が高く、耳下腺腫脹期間も長く、臨床症状に差が認められ

表 3 ワクチン株ごとの自然ムンプス罹患時のウイルス学検討と臨床像

		東野株接種群	鳥居株接種群	P-value
ウイルス分離	例数	44	31	
	期間 (月)*	52.9 ± 30.2	49.9 ± 24.3	n. s.
	陽性数 (%)	21 (47.7)	25 (80.6)	0.00359
抗体	例数	30	8	
	EIA-IgM 抗体 <5.0 抗体指数 (%)	28 (93.3)	7 (87.5)	n. s.
	EIA-IgG 抗体 平均抗体価†	23.3 ± 21.7	42.2 ± 22.9	0.00296
臨床像	例数	41	13	
	発熱 あり (%)	12 (29.3)	8 (61.5)	0.03975
	両側耳下腺腫脹 あり (%)	18 (43.9)	9 (69.2)	n. s.
	耳下腺腫脹期間 日数	4.17 ± 2.26	5.69 ± 2.56	0.04535

* ワクチン接種から耳下腺腫脹までの期間 † EIA 値 (虎原⁶⁾ 2008 より一部改変)

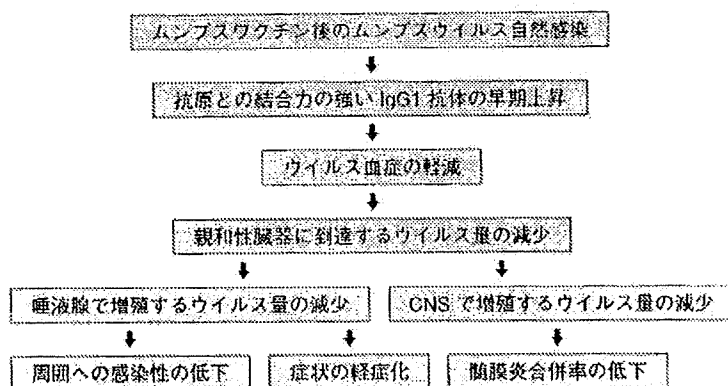


図 ムンプスワクチン後の自然ムンプス感染時の病態 (仮説) (虎原⁷⁾ 2001 より一部改変)

ている。なお、一般にムンプス SVF において、唾液からウイルスが分離される症例ほど、典型例に近い臨床経過が認められている。

IV. 再感染および vaccine failure における軽症化の病態 (図)

ウイルス感染症においては、ウイルス増殖による細胞障害と、ウイルス増殖に対応して出現するホストの免疫反応により臨床症状が出現する。ムンプス再感染およびムンプス SVF では臨床症状の軽症化が認められている。軽症化する病態を図に示した⁷⁾。再感染では、ウイルスとの結合力が強い IgG1 に属する血清中和抗体が早期に上昇するため、ウイルス血症が軽減化し、親和性臓器に到達するウイルス量が減少する。また、親和性臓器に

到達したとしても、親和性臓器において早期に免疫記憶細胞が反応し、分泌型 IgA 抗体が早期に産生され、特異的細胞性免疫が早期に反応するため、症状が軽減し、合併症の頻度が低下すると推測されている。

おわりに

ムンプス再感染、ムンプス VF の診断基準、病態について解説した。急性耳下腺腫脹は比較的よく経験する臨床像である。ムンプス流行時に認める急性耳下腺腫脹はムンプスウイルス感染による可能性が高く、ムンプス既往歴やムンプスワクチン歴があったとしても、唾液からのウイルス分離や血清抗体を測定し、確定診断することが臨床上有意義である。

文 献

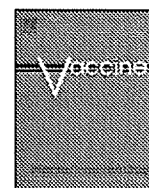
- 1) Yoshida N, Fujino M, Miyata A, et al: Mumps virus reinfection is not a rare event confirmed by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J Med Virol* 80: 517-523, 2008
- 2) Gut J-P, Lablache C, Behr S, et al: Symptomatic mumps virus reinfection. *J Med Virol* 45: 17-23, 1995
- 3) 庵原俊昭, 落合 仁, 中野貴司, 他: ムンプスウイルスを含むワクチンの接種歴を有する児の耳下腺腫脹時におけるムンプスウイルス分離の検討, *小児感染免疫* 12: 237-241, 2000
- 4) Kashiwagi Y, Kawashima H, Takekuma K, et al: Detection of mumps virus genome directly from clinical samples and a simple method for genetic differentiation of the Hoshino vaccine strain from wild strains of mumps virus. *J Med Virol* 52: 195-199, 1997
- 5) Okafuji T, Yoshida N, Fujino M, et al: Rapid diagnostic method for the detection of mumps virus genome by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol* 43: 1625-1631, 2005
- 6) 庵原俊昭: おたふくかぜの再感染と Vaccine Failure の臨床, *臨床とウイルス* 36: 50-54, 2008
- 7) 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特徴, *小児科* 42: 1144-1149, 2001
- 8) 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
- 9) 庵原俊昭, 谷口清州, 神谷 齊, 他: ワクチン後のムンプス罹患例におけるムンプス IgG 抗体とその Avidity の検討, *臨床とウイルス* 24: 389-393, 1996
- 10) 庵原俊昭: 年齢によるムンプス臨床像の相違, *小児科* 43: 217-222, 2002
- 11) Hviid A, Rubin S, Muhlemann K: Mumps. *Lancet* 371: 932-944, 2008
- 12) Bonnet M, Dutta A, Weinberger C, Plotkin SA: Mumps vaccine virus strains and aseptic meningitis. *Vaccine* 24: 7037-7045, 2006
- 13) 落合 仁, 庵原俊昭, 中野貴司, 他: 小学校におけるムンプスワクチン有効性の検討, *小児科臨床* 60: 489-494, 2007
- 14) Briss PA, Fehrs LJ, Parker RA, et al: Sustained transmission of mumps in a highly vaccinated population: Assessment of primary vaccine failure and waning vaccine-induced immunity. *J Infect Dis* 169: 77-82, 1994
- 15) Dayan GH, Rubin S: Mumps outbreaks in vaccinated populations: Are available mumps vaccines effective enough to prevent outbreak? *Clin Infect Dis* 471: 1458-1467, 2008

Epilepsy exposure course (てんかん研修初期コース)のご案内

国立病院機構静岡てんかん・神経医療センターでは、てんかん診療経験の比較的少ない若手医師を対象に、てんかん・てんかん発作の国際分類に従った外来診断を行うための、問診法、脳波・画像診断を修得するための研修コースを開始しました。週単位で、基本的な診断法を身につけることができるように計画しています。

詳しくはホームページ (<http://www.hosp.go.jp/~szec2/07/EpilepsyExposureCourse.htm>) をご参照ください。

担当: 高橋幸利 (臨床研究部長), TEL: 054-245-5446



Immunogenicity of newly constructed attenuated vaccinia strain LC16m8 Δ that expresses SIV Gag protein

Hajime Suzuki^a, Minoru Kidokoro^b, Ismael Ben Fofana^{a,1}, Takashi Ohashi^a, Tomotaka Okamura^c, Kazuhiro Matsuo^{c,2}, Naoki Yamamoto^c, Hisatoshi Shida^{a,*}

^a Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University, Kita-15, Nishi-7, Kita-ku, Sapporo 060-0815, Japan

^b Department of Virology III, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan

^c AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 August 2008

Received in revised form

23 November 2008

Accepted 6 December 2008

Available online 7 January 2009

Keywords:

SIV gag

Vaccinia m8 Δ

IFN- γ -producing T cells

ABSTRACT

We developed the method to efficiently construct recombinant vaccinia viruses based on LC16m8 Δ strain that can replicate in mammalian cells but is still safe in human. Immunization in a prime-boost strategy using DNA and LC16m8 Δ expressing SIV Gag elicited 7–30-fold more IFN- γ -producing T cells in mice than that using DNA and non-replicating vaccinia DIs recombinant strain. As the previous study on the DNA-prime and recombinant DIs-boost anti-SIV vaccine showed protective efficacy in the macaque model [Someya K, Ami Y, Nakasone T, Izumi Y, Matsuo K, Horibata S, et al. Induction of positive cellular and humoral responses by a prime-boost vaccine encoded with simian immunodeficiency virus gag/pol. *J Immunol* 2006;176(3):1784–95], LC16m8 Δ would have potential as a better recombinant viral vector for HIV vaccine.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

As vehicles for delivering antigens of HIV-1, replication-defective viral vectors have been extensively studied because of their safety. For example adenovirus and vaccinia virus-based vectors expressing Gag, Nef, and other components of HIV-1 have been evaluated in monkeys [1,3] and human trials [2,4,5]. They, however, generally have not induced sufficient level of immunity nor protected human from HIV-1 infection although they elicited considerable anti HIV/SIV immunities in animal models [6]. Moreover, controversial results have been reported on containment of challenged viruses depending on SIV or SHIV, a hybrid virus between HIV-1 and SIV, in monkey models [1,7]. Therefore more effective vehicles may be needed for HIV vaccine development.

Replication-competent vaccinia virus that has been proven to be safe in human vaccination against small pox could be a good candidate for a better vehicle. Vaccinia LC16m8 strain has been shot to 100,000 people without any serious adverse effects [8]. The LC16m8, however, has been found to be genetically unsta-

ble and to generate spontaneously more virulent revertants from stock of LC16m8 viruses. To improve LC16m8, we identified the B5R gene responsible for the reversion, and constructed genetically stable LC16m8 Δ , which is essentially as same as LC16m8 in antigenicity and safety in mice, and approximately 1000-fold more immunogenic than non-replicating vaccinia, MVA strain. In particular, LC16m8 Δ never elicited any symptoms in severe combined immunodeficiency disease mice even at 10^7 pfu dose [9]. Therefore LC16m8 Δ could be a better vehicle for vaccines against HIV and other human diseases.

Gag proteins of HIV-1 and SIV are major antigens to elicit cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses. Activity of anti Gag CTL in HIV-1-infected people inversely correlates with their viral loads [10]. In some monkey experiments of SIV infection, the strength of anti Gag CTL has been reported to correlate with the containment of SIV [11]. Therefore, we constructed LC16m8 Δ that expresses the gag gene of SIVmac239 to compare its ability to elicit anti Gag immunity with replication-defective vaccinia virus DIs strain, which has been reported to be immunogenically similar to MVA [12], and to evaluate its potential as a recombinant vector for HIV vaccine development.

During the course of constructing LC16m8 Δ -based recombinant viruses, we encountered a drawback, such as inefficient incorporation of the foreign gene by conventional method in which an *in vivo* recombination process is involved. Therefore, in this paper we firstly describe our new device including construction of a new strain m8 Δ vnc110, which prompts construction of m8 Δ express-

* Corresponding author. Tel.: +81 11 706 7543; fax: +81 11 706 7543.

E-mail address: hshida@igm.hokudai.ac.jp (H. Shida).

¹ Present address: Microbiology Division, New England Primate Research Center, Harvard Medical School, One Pine Hill Drive, Southborough, MA 01772 USA.

² Present address: Research and Development Department, Japan BCG Laboratory, 3-1-5 Matsuyama, Kiyose, Tokyo 204-0022, Japan.

ing the *gag* gene of SIV by *in vitro* ligation of the vaccinia genome with foreign DNA.

2. Materials and methods

2.1. Cells and viruses

Rabbit RK13 cells were cultured in RPMI1640 supplemented with 10% FCS. Human HeLa, mouse L929, NIH3T3, hamster BHK, and primary chicken embryo fibroblast (CEF) cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FCS. Canarypox virus (a kind gift of National Institute of Animal Health) [13], and LC16m8 Δ [9] and DIs [14] strains of vaccinia virus were used. Viral titers were calculated on the basis of the number of plaques on CEF. The titer of LC16m8 Δ was similar when titrated on RK13 and CEF monolayers.

2.2. Construction of pJWSIVgag

To construct the plasmid that expresses the SIV *gag* gene under the cytomegalovirus promoter, the *gag* coding region was amplified with a pair of primer SIVGAGF1 (GCCAAGCTTGCCACC-ATGGCGGTGAGAACTCCGTCTGTGTCAGG; the underlined sequence is HindIII site) and SIVGAGR1 (CGCGCCCGGGCTACTGGT CTCCTC-CAAAGAGAGAATTGAGGTGCAGC; the underlined sequence is XmaI site) using pSIVmac239 [15] as a template under the condition: 2 min at 94°C, 20 cycles of 30 s at 94°C, 60 s at 60°C, 2 min at 72°C, and a final extension for 5 min at 72°C. The *gag* fragment generated was digested with HindIII and XmaI, and then ligated with the enzyme-digested pJW322, which harbors the cytomegalovirus promoter derived from pJW4303 [16] (a kind gift of Dr. Y. Takebe).

2.3. Construction of m8 Δ vnc110

To generate a transfer plasmid pVNC110, the *vnc/KE* sequence (5'-GGTACCCGCCCGGGCCGGACCCGGCCCGCCGAATTC-3') containing four restriction enzyme sites (SrfI, SfiI, RsrII, and FseI), which are not present in the vaccinia virus genomes, was inserted between KpnI and EcoRI sites of pSFJ1-10, which harbors a strong composite promoter consisting of the cowpox A-type inclusion body (ATI) and multiple mutated-p7.5 promoters (PSFJ1-10 promoter), which are sandwiched with the segments of the vaccinia hemagglutinin (*HA*) gene [17,18]. pVNC110 resultant was verified by sequencing to harbor these sites downstream of PSFJ1-10 promoter, which is sandwiched by the segments of the vaccinia *HA* gene.

Next, we transfected 1.5 μ g of pVNC110 to 1×10^5 BHK cells, which had been infected with LC16m8 Δ at 0.05 moi, to construct m8 Δ vnc110. After the culture at 33°C for 2 days, the progeny viruses were harvested and their plaques were formed on RK13 cell monolayer. The candidate viruses were selected on the basis of HA⁻ phenotype [19]. To ascertain whether the virus contains the expected sequences of pVNC110 in the *HA* gene, the virus-enriched fraction was prepared by disruption of the infected cells by repeated freeze and thaw followed by clarification by low speed centrifugation and concentration by centrifugation at 15,000 rpm for 30 min in microcentrifuge at 4°C. Then, it was used as a template for PCR with a pair of the primers vvHA867s (GGATC-TACACATTCACCAGA) and vvHA1009as (CTAGTGTATGTGACGGTGT), the sequences of which were present in the *HA* gene, under the condition: 2 min at 94°C, 30 cycles of 30 s at 94°C, 60 s at 54°C, 60 s at 72°C, and a final extension for 5 min at 72°C. Virus containing the sequence of VNC110 produced a 1 kb fragment of PCR product.

2.4. Construction of m8 Δ SIVgag

Viral particles of m8 Δ VNC110 were purified by method including banding in sucrose gradient centrifugation [20], and then

viral DNA was isolated by phenol extraction method. The vaccinia DNA was digested with CpoI and FseI followed by purification with phenol extraction and ethanol precipitation. The *gag* region in SIVmac239 genome was amplified by PCR using pSIVmac239 [15] as a template with a pair of the primers CPO-SIV *gag* f2 (TTTCGGACCCGCCACCATGGCGGTGAGAACTCCGTCTTG; underlined sequence is CpoI site) and FSE-SIV *gag* r1 (TATGGCCGGCCCTAC-TGGTCTCCTCCAAAGAGAGA; underlined sequence is FseI site) under the condition: 2 min at 94°C, 20 cycles of 30 s at 94°C, 60 s at 60°C, 2 min at 72°C, and a final extension for 10 min at 72°C. The *gag* fragment was digested with CpoI and FseI followed by purification with PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany). The digested vaccinia genome (5 μ g) and *gag* fragment (0.3 μ g) were ligated using a ligation kit (Takara, Otsu, Japan) according to the manual, purified by phenol extraction and concentrated by ethanol precipitation. The ligated DNA was transfected with lipofectamine LTX (Invitrogen, Carlsbad, USA) to 3.5×10^5 BHK cells that had been infected at 10 moi with canarypox virus. Usage of avipox viruses as a helper virus has been well established [21]. After 2 days culture at 33°C, the progeny viruses were harvested by repeated freeze and thaw and titrated on the monolayer of RK13 cells. m8 Δ SIVgag was cloned from single plaque and its homogeneity was evaluated by staining the plaques with sera of monkey infected with SIVmac239 and alkaline phosphatase-conjugated anti monkey IgG antibody followed by NBT/BCIP coloring reaction. All plaques were positively stained.

2.5. Construction of rDIs/PSFJ/SIVgag

To construct a complementary transfer vector for the deleted region of DIs, we used a pDIsgptmH5 plasmid (a kind gift of Dr. K. Ishii) that possesses both the modified H5 promoter and the *E. coli* guanine phosphoribosyltransferase (*gpt*) gene driven by a P7.5 promoter, which are sandwiched with the DIs fragments adjacent to the deleted region [22]. A vaccinia synthetic PSFJ1-10 promoter sequence [17] was amplified by PCR at 52°C of the annealing temperature using a pair of the primers: PSFJ1-10s (ACATGCATGCATGAAGTTGAAGATGATG; underlined sequence is SphI site) and PSFJ1-10r (GATATCCTCGAGCAGCACACCGTGCAATAAATT; underlined sequence is EcoRV and XhoI sites). To substitute the PSFJ1-10 promoter for the mH5 promoter, the PCR product was inserted into the SphI and EcoRV sites of pDIsgptmH5, generating pUC/DIs/PSFJ that could express the foreign antigen gene under the control of the PSFJ1-10 promoter. A DNA fragment encoding the full-length *gag* gene of SIVmac239 was amplified by PCR at 55°C of the annealing temperature using a pair of the primers: *gag*-s (CCCCCGGATGGCGGTGAGAACTCC; underlined sequence is SmaI site) and *gag*-r (CCGGAGCTCCTACTGGTCTCCTCCAAAGAG; underlined sequence is SacI site), and inserted into the SmaI and SacI sites of pUC/DIs/PSFJ to generate the transfer vector, named pUC/DIs/PSFJ/SIVgag. This plasmid (10 μ g) was transfected by Gene-Pulser (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, USA) to CEF infected with DIs at 1.0 moi. Recombinant DIs clones expressing the SIV *gag* gene were selected in the presence of *gpt* [23].

2.6. Western blotting

m8 Δ SIVgag and rDIs/PSFJ/SIVgag were infected to various cells at 3 or 5 moi and cultured for 24 h at 33°C. Then the infected cells and culture medium were collected and their protein amounts were quantified by BCA assay. Appropriate amounts of the cell lysates and medium fraction indicated in the figure legends were subjected to 12% SDS-PAGE and immunologically detected using 500-fold-diluted sera from SIVmac239-infected monkey and alkaline phosphatase-conjugated anti monkey IgG antibody (Promega, Madison, USA) followed by NBT/BCIP coloring reaction.

2.7. Immunization

Seven-week-old female C57/BL6 mice were purchased from CLEA Co. Ltd. (Tokyo, Japan). Fifty microgram of pJWSIVgag was intramuscularly injected into the right and left quadriceps, and 1×10^6 pfu of vaccinia viruses were inoculated intradermally according to the schedule indicated in Figs. 3A and 4A. All mice were maintained according to the institutional animal care and the guidelines of Hokkaido University. The study was conducted in a biosafety level 2 facility under the approval of an institutional committee for biosafety and in accordance with the requirements of the World Health Organization.

2.8. Assay of cellular immune response by IFN- γ ELISPOT

SIV Gag specific IFN- γ producing cells were quantified 2 or 3 weeks after the final immunization using an ELISPOT kit for mouse IFN- γ (R&D Systems, Minneapolis, USA). The excised spleens were disrupted with a syringe plunger and passed through a cell strainer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). Isolated spleen cells were suspended at 10^6 cells/ml in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin and streptomycin. Aliquots (100 μ l) were plated into wells that were coated with anti-mouse IFN- γ antibody and stimulated with SIV Gag-specific 15 mer overlapping peptide pools (0.5 μ g of peptides/ 10^5 cells) (A gift of AIDS Research and Reference Reagent program, Catalog #6204). Cells mock-stimulated with medium alone served as a negative control while cells treated with 50 ng/ml of phorbol 12-myristate (PMA) and 0.5 μ g/ml of calcium ionomycin were used as a positive control to ascertain the number of viable T cells. After 24 h incubation, IFN- γ secreting cells were detected according to the manufacturer's instructions. Numbers of spot forming cells (SFC) were determined using the ImmunoScan Plate Reader with ImmunoSpot software (Cellular Technology Limited, Cleveland, USA).

2.9. Proliferation assays

Lymphocyte proliferation was measured by incorporation of BrdU into the stimulated-lymphocytes using cell proliferation ELISA BrdU kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Isolated spleen cells (1×10^5) were cultured in a 96-well assay plate (BD Falcon, Franklin Lakes, USA) in the presence or absence of recombi-

nant SIV Gag protein (SIVmac251 p27; Advanced Biotechnologies, Inc., Columbia, USA) at 5.0 μ g/ml for antigen-specific stimulation. The plates were incubated for 2 days at 37 °C, and then another 24 h in the presence of BrdU (100 μ M). Uptake of BrdU was determined using luminometer (Wallac 1420; PerkinElmer, Branchburg, USA). The results were expressed as the stimulation index (SI), which was calculated as a ratio of relative light unit per second in the presence to that in the absence of the antigen.

2.10. Statistical analysis

Data were expressed as arithmetic mean \pm standard error of means (mean \pm S.E.M.). The data analysis was carried out by using Student's *t*-test (EXCEL version 11.5, Microsoft). A *P*-value of <0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Construction of m8 Δ SIVgag

Fig. 1 illustrates the outline for construction of m8 Δ SIVgag. Firstly we constructed m8 Δ VNC110 strain by usual method in which pVNC110 was transfected to BHK cells that had been infected with LC16m8 Δ . Resultant m8 Δ VNC110 harbors PSFJ1-10 promoter followed by the multi-cloning sites containing the restriction enzyme sites which are not present in the vaccinia genome. To construct m8 Δ SIVgag, the genomic DNA extracted from Δ VNC110 virions was digested with CpoI and FseI, which do not cut the other part of the vaccinia genome, and ligated with SIV gag fragment *in vitro*. Then the ligation mixture was transfected to BHK cells that had been infected with canarypox virus, which cannot replicate in mammalian cells. A clone, named m8 Δ SIVgag3, that was isolated from one among six plaques formed by the progeny viruses produced SIV Gag protein judged by staining the plaques with sera derived from a SIV-infected monkey.

3.2. Comparison of Gag production by LC16m8 Δ and DIs-based recombinants

Previously Honda's group constructed replication-deficient vaccinia DIs strain-based recombinant, which had immunogenicity similar to MVA-based recombinant [12]. We now compared by

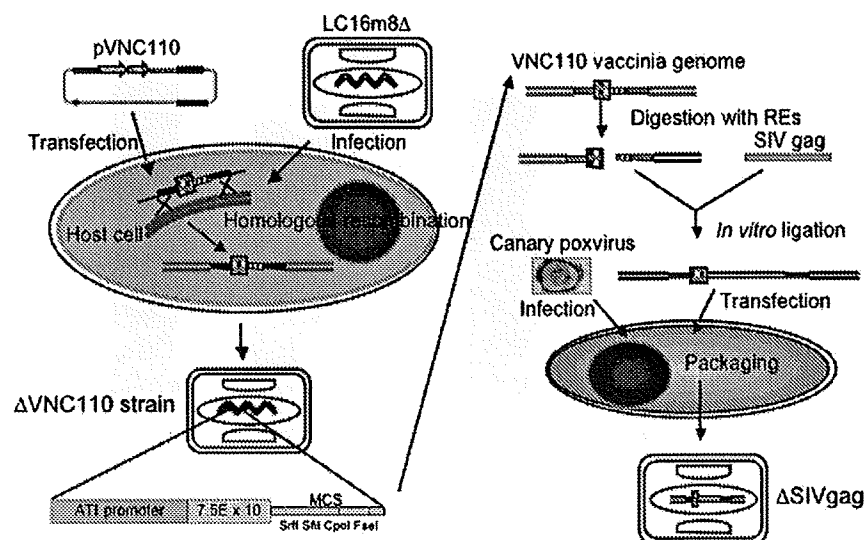


Fig. 1. Schematic presentation for construction of m8 Δ SIVgag.

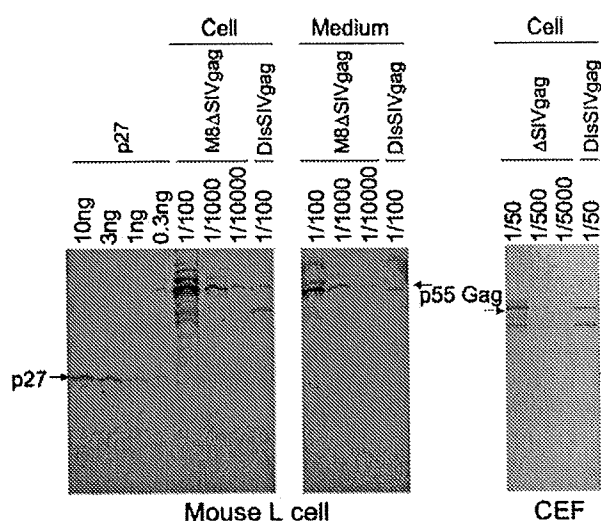


Fig. 2. Western blotting for p55 Gag produced by vaccinia recombinants. Appropriate fractions (1/50–1/10,000) of the cell lysates and medium prepared from m8ΔSIVgag- or rDIs/PSFJ/SIVgag-infected cells were subjected to Western blotting. One hundredth of the cell lysates contains approximately 1 μg of proteins.

Western blotting the amount of Gag protein produced by LC16m8Δ and DIs, both of which used the same promoter for expression of the foreign gene (Fig. 2). In mouse L cells, where DIs is not able to replicate, approximately 100-fold more amount of Gag protein was detected in both medium and cells infected at high multiplicity with m8ΔSIVgag than that in the cells infected with

rDIs/PSFJ/SIVgag, whereas m8ΔSIVgag produced Gag protein just several fold more than rDIs/PSFJ/SIVgag in CEF in which both viruses replicate. In human HeLa, mouse NIH3T3, and rabbit RK13 cells m8ΔSIVgag again produced Gag protein 100-fold more than rDIs/PSFJ/SIVgag (data not shown). These results suggest that production of Gag is affected by not only the promoter just upstream of the foreign gene but also the replication capability of the vector virus.

3.3. Immunogenicity of LC16m8Δ and DIs-based recombinants

Next, we evaluated the immunogenicities of these recombinant viruses in mice by priming with plasmid pJWSIVgag expressing the gag gene followed by boosting with these recombinant viruses. Considering the preceding reports that viral vectors failed to elicit enough immunities in human although they were nicely antigenic in mice under optimal immunization schedule [4,24], we compared their immunogenicities under the suboptimal condition that includes two or three priming with pJWSIVgag followed by boosting once with 1×10^6 pfu of the recombinant viruses. We have assessed the number of IFN-γ producing cells by ELISPOT assay 2 weeks after a shot of the recombinant viruses, and found that sevenfold more cells were induced by prime-boost vaccination with pJWSIVgag and SIVm8Δgag than that of rDIs/PSFJ/SIVgag (Fig. 3). We also evaluated the induction of Gag specific IFN-γ producing cells by single immunization with pJWSIVgag, SIVm8Δgag or rDIs/PSFJ/SIVgag. In contrast to prime-boost regimen, significant positive spots were not detected by ELISPOT assay (data not shown). When assayed 3 weeks after final immunization with the viruses, differences were more prominent in that only one among four mice immunized with rDIs/PSFJ/SIVgag were ELISPOT positive com-

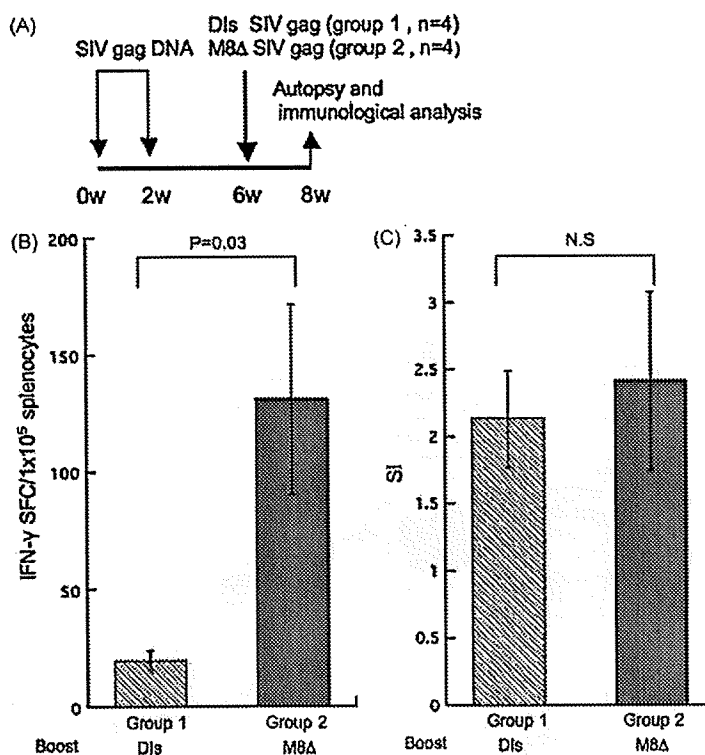


Fig. 3. Comparison of booster effect by m8ΔSIVgag and rDIs/PSFJ/SIVgag. (A) Schematic drawing of experimental design for immunization. Mice were immunized twice with SIVgag DNA followed by one boost with rDIs/PSFJ/SIVgag (group 1) or m8ΔSIVgag (group 2). (B) Frequency of SIV Gag-specific IFN-γ-producing cells in immunized mice. Spleen cells were stimulated with pooled SIV Gag peptides, and IFN-γ-producing cells were detected by IFN-γ-specific ELISPOT assays. Data are expressed as the mean number of SFC per 10^5 splenocytes \pm S.E.M. (C) Induction of SIV Gag-specific lymphocyte proliferatives response. Spleen cells were cultured in the presence or absence of SIV p27 antigen, and incorporation of BrdU was measured as described in Section 2. Proliferative responses were presented as the value of the stimulation index (SI). Data are mean \pm S.E.M. N.S. means not significant.

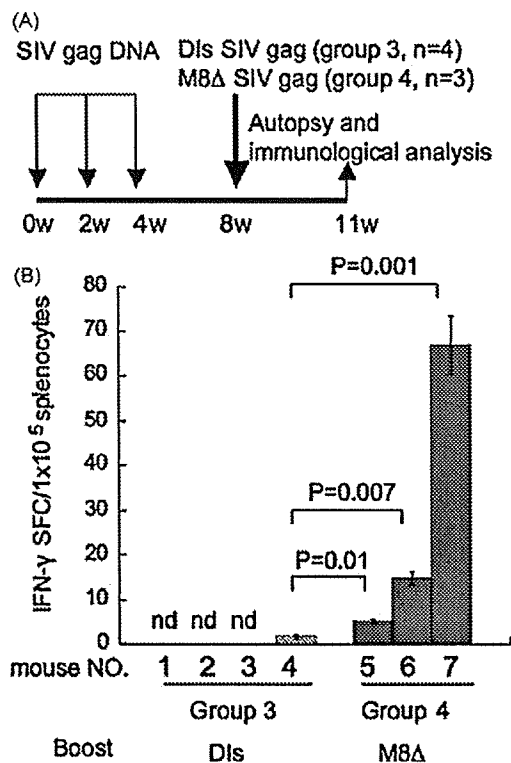


Fig. 4. Comparison of immunogenicities of m8ΔSIVgag and rDIs/PSFJ/SIVgag. (A) Schematic drawing of experimental design for immunization. Mice were immunized three times with SIVgag DNA followed by one boost with rDIs/PSFJ/SIVgag (group 3) or m8ΔSIVgag (group 4). (B) Frequencies of SIV Gag-specific IFN-γ-producing cells in individual immunized mice were presented as the number of SFC per 10⁵ splenocytes. SFC of individual mouse was counted in triplicate and presented as the means ± S.E.M.

pared with all positive mice with m8Δgag and average of ELSPOT was approximately 30-fold more in mice immunized with m8Δgag than rDIs/PSFJ/SIVgag (Fig. 4). To monitor the sensitivity of ELISpot assays, we always included positive controls that were splenocytes stimulated with PMA and ionomycin, and ascertained that they produced 300–500 spots/10⁵ splenocytes in every experiment (data not shown).

Proliferation capacities of the lymphocytes derived from the immunized mice were also compared based on BrdU incorporation. Splenocytes from both immunized groups showed low levels of T-cell proliferation in response to stimulation with SIV Gag protein (Fig. 3). But we did not find significant difference between the mice immunized by either virus in contrast to the results of ELISpot assay described above.

4. Discussion

In this study, we devised a new method involving *in vitro* ligation to efficiently construct recombinant vaccinia viruses expressing the foreign genes. We could construct SIV Gag expressing m8Δ only by this technique but not by the conventional method, which involves *in vivo* ligation. Moreover, we have successfully constructed two additional recombinant viruses expressing the chimeric genes, which contain rat MHC class I with an epitope sequence fused with β2 microglobulin. Approximately 60% of the progeny viruses expressed the transgenes even when no methods were used to enrich the recombinants (They will be published elsewhere.), suggesting that this new technique is generally applicable to construct m8Δ-based recombinant viruses.

Here, using the same promoter in both recombinant DIs and LC16m8Δ strains of vaccinia, we have demonstrated a much more efficient expression of SIV Gag transgene by the latter in several mammalian cells, which were infected at a high dose of inoculum. In contrast, less difference was observed in the level of Gag protein expression in CEF probably because both recombinant viruses propagated at comparable level in this cell type. These results suggest that vaccinia viruses, which propagate better, could provide more efficacious expression of immunogens of interest.

The propagation capability and related efficacy of Gag production by these recombinant vaccinia viruses may reflect their immunogenicity. IFN-γ producing T cells evaluated by ELISpot were more efficiently elicited by m8ΔSIVGag and lasted longer than those by rDIs/PSFJ/SIVgag. Since several non-replicating vaccinia virus vectors including DIs, MVA, and NYVAC have been shown to be similarly immunogenic in mice [12,25], replication-competent vector such as LC16m8Δ may be more immunogenic than general non-replicating vectors. Since anti-SIV vaccination comprising the DNA-prime and recombinant DIs-boost has been reported to elicit protective immunity in the macaque model [26], it may be expected that m8ΔSIVGag would confer better protection against SIV challenge.

Our results are in contrast with reports by Hirsch et al., that showed similar level of immunogenicity between SIV Gag recombinant MVA and a replication-competent vaccinia vectors when a very high dose of vaccine was applied [27]. However, it should be important to evaluate the immunogenicities of vaccinia recombinants under the suboptimal immunization schedule, including a single boost with a low dose of vaccinia recombinants, which was adopted in this study, given that unsuccessful outcome of the human trials by the vaccines [2,4] that had been appreciated based on protective immune responses elicited by optimal immunization schedule in model animals [24,28].

Mucosal immunity has been suggested to be important for protection against HIV, because it sexually transmit in most cases. Since history of exposure of replicating virus in mucosal tissues has been reported to prime the mucosal immune system and lead to the induction of secretory IgA [29], it is expected that LC16m8Δ vaccination via the mucosal route may induce effective mucosal immunity. Moreover, replicating adenovirus vector has also been reported to be more effective than non-replicating one [30].

In contrast to the more efficient induction of IFN-γ producing T cells by m8ΔSIVGag, the Gag-specific lymphocyte proliferation responses were similarly elicited by both recombinants. Vaccinia viruses produce various kinds of immunomodulatory factors, which may tend to elicit uneven immunities [31]. Therefore, it is conceivable that quantitative and qualitative differences of the factors produced by LC16m8Δ and DIs strains may cause the diverged immune responses.

In summary, we devised an efficient method to construct a recombinant virus based on LC16m8Δ and evaluated it as a vaccine candidate. This replication-competent virus vector showed merits for further development in the viewpoint of its ability to elicit enhanced cell-mediated and hopefully humoral and mucosal immune responses.

Acknowledgements

We thank A. Hirano and N. Mizuno for technical assistance. This work was supported by grants from the Ministry of Sports and Culture (Japan), and the Ministry of Health and Welfare (Japan). pJW4303, pUC/DIs/mH5, and the SIV-specific 15 mer overlapping peptide pools were kindly supplied by Dr. Y. Takebe (NIID), Dr. K. Ishii (NIID), and the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, respectively. A canarypox virus, a kind gift of National

Institute of Animal Health was obtained through Dr. S. Morikawa (NIID).

References

- [1] Casimiro DR, Wang F, Schleif WA, Liang X, Zhang Z, Tobery TW, et al. Attenuation of simian immunodeficiency virus SIVmac239 infection by prophylactic immunization with DNA and recombinant adenoviral vaccine vectors expressing Gag. *J Virol* 2005;79(24):15547–55.
- [2] Cox KS, Clair JH, Prokop MT, Sykes KJ, Dubey SA, Shiver JW, et al. DNAgag/Ad5gag and Ad5gag/Ad5gag vaccines induce distinct T cell response profiles. *J Virol* 2008;82(16):8161–71.
- [3] Vogel TU, Reynolds MR, Fuller DH, Vielhuber K, Shipley T, Fuller JT, et al. Multi-specific vaccine-induced mucosal cytotoxic T lymphocytes reduce acute-phase viral replication but fail in long-term control of simian immunodeficiency virus SIVmac239. *J Virol* 2003;77(24):13348–60.
- [4] Goonetilleke N, Moore S, Dally L, Winstone N, Ceberé I, Mahmoud A, et al. Induction of multifunctional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T cells capable of proliferation in healthy subjects by using a prime-boost regimen of DNA- and modified vaccinia virus Ankara-vectored vaccines expressing HIV-1 Gag coupled to CD8 T-cell epitopes. *J Virol* 2006;80(10):4717–28.
- [5] Harari A, Bart PA, Stöhr W, Tapia G, Garcia M, Medjitna-Rais E, et al. An HIV-1 clade C DNA prime, NYVAC boost vaccine regimen induces reliable, polyfunctional, and long-lasting T cell responses. *J Exp Med* 2008;205(1):63–77.
- [6] Walker BD, Burton DR. Toward and AIDS Vaccine. *Science* 2008;320(5877):760–4.
- [7] Shiver JW, Fu TM, Chen L, Casimiro DR, Davies ME, Evans RK, et al. Replication-competent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature* 2002;415(6869):331–5.
- [8] Hashizume S, Yoshizawa H, Morita M, Suzuki K. Properties of attenuated mutant of vaccinia virus, LC16m8, derived from Lister strain. In: Ouinan GV, editor. *In Vaccinia viruses as Vectors for Vaccine Antigens*. Amsterdam: Elsevier; 1985. p. 421–8.
- [9] Kidokoro M, Tashiro M, Shida H. Genetically stable and fully effective smallpox vaccine strain constructed from highly attenuated vaccinia LC16m8. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(11):4152–7.
- [10] Kiepiela P, Ngumbela K, Thobakgale C, Ramduth D, Honeyborne I, Moodley E, et al. CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat Med* 2007;13(1):46–53.
- [11] Matano T, Kobayashi M, Igarashi H, Takeda A, Nakamura H, Kano M, et al. Cytotoxic T lymphocyte-based control of simian immunodeficiency virus replication in a preclinical AIDS vaccine trial. *J Exp Med* 2004;199(12):1709–18.
- [12] Okamura T, Someya K, Matsuo K, Hasegawa A, Yamamoto N, Honda M. Recombinant vaccinia DIs expressing simian immunodeficiency virus gag and pol in mammalian cells induces efficient cellular immunity as a safe immunodeficiency virus vaccine candidate. *Microbiol Immunol* 2006;50(12):989–1000.
- [13] Amano H, Morikawa S, Shimizu H, Shoji I, Kurosawa D, Matsuura Y, et al. Identification of the canarypox virus thymidine kinase gene and insertion of foreign genes. *Virology* 1999;256(2):280–90.
- [14] Ishii K, Ueda Y, Matsuo K, Matsuura Y, Kitamura T, Kato K, et al. Structural analysis of vaccinia virus DIs strain: application as a new replication-deficient viral vector. *Virology* 2002;302(2):433–44.
- [15] Kestler H, Kodama T, Ringler D, Marthas M, Pedersen N, Lackner A, et al. Induction of AIDS in rhesus monkeys by molecularly cloned simian immunodeficiency virus. *Science* 1990;248(4959):1109–12.
- [16] Lu S, Manning S, Arthos J. *Antigen Engineering in DNA Immunization*. Totowa, NJ: Humana Press; 1999. pp. 355–74.
- [17] Jin NY, Funahashi S, Shida H. Constructions of vaccinia virus A-type inclusion body protein, tandemly repeated mutant 7.5 kDa protein, and hemagglutinin gene promoters support high levels of expression. *Arch Virol* 1994;138(3–4):315–30.
- [18] Shida H, Tochikura T, Sato T, Konno T, Hirayoshi K, Seki M, et al. Effect of the recombinant vaccinia viruses that express HTLV-I envelope gene on HTLV-I infection. *EMBO J* 1987;6(11):3379–84.
- [19] Shida H, Matsumoto S. Analysis of the hemagglutinin glycoprotein from mutants of vaccinia virus that accumulates on the nuclear envelope. *Cell* 1983;33(2):423–34.
- [20] Joklik WK. The purification of four strains of poxvirus. *Virology* 1962;18:9–18.
- [21] Scheiflinger F, Dorner F, Falkner FG. Construction of chimeric vaccinia viruses by molecular cloning and packaging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(21):9977–81.
- [22] Ishii K, Hasegawa H, Nagata N, Mizutani T, Morikawa S, Suzuki T, et al. Induction of protective immunity against severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection using highly attenuated recombinant vaccinia virus DIs. *Virology* 2006;351(2):368–80.
- [23] Wolffe EJ, Isaacs SN, Moss B. Deletion of the vaccinia virus B5R gene encoding a 42-kilodalton membrane glycoprotein inhibits extracellular virus envelope formation and dissemination. *J Virol* 1993;67(8):4732–41.
- [24] Hanke T, Blanchard TJ, Schneider J, Hannan CM, Becker M, Gilbert SC, et al. Enhancement of MHC class I-restricted peptide-specific T cell induction by a DNA prime/MVA boost vaccination regime. *Vaccine* 1998;16(5):439–45.
- [25] Gómez CE, Nájera JL, Jiménez EP, Jiménez V, Wagner R, Graf M, et al. Head-to-head comparison on the immunogenicity of two HIV/AIDS vaccine candidates based on the attenuated poxvirus strains MVA and NYVAC co-expressing in a single locus the HIV-1BX08 gp120 and HIV-1(HIB)Gag-Pol-Nef proteins of clade B. *Vaccine* 2007;25(15):2863–85.
- [26] Someya K, Ami Y, Nakasone T, Izumi Y, Matsuo K, Horibata S, et al. Induction of positive cellular and humoral responses by a prime-boost vaccine encoded with simian immunodeficiency virus gag/pol. *J Immunol* 2006;176(3):1784–95.
- [27] Hirsch VM, Fuerst TR, Sutter G, Carroll MW, Yang LC, Goldstein S, et al. Patterns of viral replication correlate with outcome in simian immunodeficiency virus (SIV)-infected macaques: effect of prior immunization with a trivalent SIV vaccine in modified vaccinia virus Ankara. *J Virol* 1996;70(6):3741–52.
- [28] Juillard V, Villefroy P, Godfrin D, Pavirani A, Venet A, Guillet JG. Long-term humoral and cellular immunity induced by a single immunization with replication-defective adenovirus recombinant vector. *Eur J Immunol* 1995;25(12):3467–73.
- [29] Herremans TM, Reimerink JH, Buisman AM, Kimman TG, Koopmans MP. Induction of mucosal immunity by inactivated poliovirus vaccine is dependent on previous mucosal contact with live virus. *J Immunol* 1999;162(8):5011–8.
- [30] Peng B, Wang LR, Gómez-Román VR, Davis-Warren A, Montefiori DC, Kalyanaraman VS, et al. Replicating rather than nonreplicating adenovirus-human immunodeficiency virus recombinant vaccines are better at eliciting potent cellular immunity and priming high-titer antibodies. *J Virol* 2005;79(16):10200–9.
- [31] Seet BT, Johnston JB, Brunetti CR, Barrett JW, Everett H, Cameron C, et al. Poxviruses and immune evasion. *Annu Rev Immunol* 2003;21:377–423.

Characterization of Neutralizing Epitopes of Varicella-Zoster Virus Glycoprotein H^V

Yasushi Akahori,¹ Kazuhiro Suzuki,^{1,2} Tohru Daikoku,³ Masae Iwai,³ Yoshihiro Yoshida,³ Yoshizo Asano,⁴ Yoshikazu Kurosawa,¹ and Kimiyasu Shiraki^{3*}

Institute for Comprehensive Medical Science, Fujita Health University,¹ and Institute for Antibodies Ltd.,² Toyoake, Aichi 470-1192, Japan; Department of Virology, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan³; and Department of Pediatrics, School of Medicine, Fujita Health University, Toyoake, Aichi 470-1192, Japan⁴

Received 6 October 2008/Accepted 30 November 2008

Varicella-zoster virus (VZV) glycoprotein H (gH) is the major neutralization target of VZV, and its neutralizing epitope is conformational. Ten neutralizing human monoclonal antibodies to gH were used to map the epitopes by immunohistochemical analysis and were categorized into seven epitope groups. The combinational neutralization efficacy of two epitope groups was not synergistic. Each epitope was partially or completely resistant to concanavalin A blocking of the glycomoiety of gH, and their antibodies inhibited the cell-to-cell spread of infection. The neutralization epitope comprised at least seven independent protein portions of gH that served as the target to inhibit cell-to-cell spread.

Varicella-zoster virus (VZV) glycoprotein H (gH) is the major target for neutralization (4, 5, 7, 9, 18), and it plays an important role in viral entry and cell-to-cell spread of infection (1, 3, 11, 12, 15). We isolated human monoclonal antibodies (MAb) to gH using an antibody library called AIMS4 constructed from B-lymphocyte-rich tissues of several dozen people (6, 19). Nine clones were selected for their neutralizing ability and their Fab sequences of heavy (H) and light (L) chains and used, in addition to TI-57, an anti-gH human MAb from a hybridoma, to characterize the neutralization epitopes of gH (18). Our system makes it possible to use the Fab form, which has about one-third the molecular weight of immunoglobulin G (IgG), in order to eliminate the spatial interaction between the Fc or other unreacted Fab of IgG molecules on one gH molecule. The neutralizing epitopes of gH are conformational, making gH hardly detectable by Western blot or enzyme-linked immunosorbent assay, and therefore, the conformational epitopes were mapped immunohistochemically. The combinational neutralizing activity between two species of Fab protein A (Fab-pp) forms and the inhibition of cell-to-cell infection were characterized, and the neutralization domain of gH was found to comprise a cluster of the seven neutralization epitopes and to prevent cell-to-cell infection.

Human embryonic lung cells were used to propagate Oka varicella vaccine, and cell-free virus was obtained by sonication of infected cells in SPGC medium (phosphate-buffered saline [PBS] containing 0.1% sodium glutamate, 5% sucrose, and 10% fetal bovine serum) followed by centrifugation (13, 14, 16).

Except for TI-57, each MAb was expressed in two forms: Fab-pp and Fab with an avidin tag (Fab-Avi-tag). Fab-pp cor-

responds to an Fab molecule fused with two domains of the Fc-binding protein A from *Staphylococcus aureus* (8) and purified on an IgG-conjugated column (19). Fab-Avi-tag is composed of an Fab bearing a 23-amino-acid-long peptide tag that can be biotinylated by the bacterial BirA biotin ligase (1). Fab-Avi-tag antibodies were purified by using SoftLink soft release avidin resin (Promega, Madison, WI).

To map the neutralizing epitope by Fab-pp, VZV-infected cells in 24-well plates were fixed by air-drying and then with 50% methanol and 50% acetone. The Fab-pp form (5 μ g/ml in 0.5 ml of PBS with 3% skim milk) was used to block gH epitopes for 24 h at 4°C, and then 0.1 ml containing 1 to 10 μ g Fab-Avi-tag was added and incubated at 4°C overnight. After incubation with streptavidin conjugated with peroxidase, competition for the gH epitope by the first Fab-pp and the challenging Fab-Avi-tag reaction was visualized by using a Dako liquid diaminobenzidine substrate chromogen detection system (17).

To assess the relationship between the glycomoiety and epitope, VZV-infected cells in eight-chamber culture slides were fixed by air drying and 50% methanol and 50% acetone. Then, the cells were treated with 0.5 ml/well of 200 μ g/ml concanavalin A (ConA) (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) in PBS for 1 h and with bovine serum for 1 h. After being washed with PBS, the cells were incubated with 1 μ g/ml Fab-pp from each clone or 1:50-diluted zoster serum at 37°C for 1 h, washed with PBS, and incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-human IgG (H+L) rabbit serum (Wako) at 37°C for 1 h. The cells were observed under a fluorescence microscope.

The cells in six-well plates were infected with 50 PFU/0.05 ml of cell-free virus for 1 h and incubated for 1 h without antibody after washing the cells and then in the medium containing 500 μ g/ml of the Fab-pp of clones 10, 11, 24, 36, 60, or 94 for 4 days without a change of medium (19). After fixation with 5% formalin, the cells were stained with methylene blue.

Blocking with PBS failed to inhibit the staining with each

* Corresponding author. Mailing address: Department of Virology, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan. Phone: 81-76-434-7255. Fax: 81-76-434-5020. E-mail: kshiraki@med.u-toyama.ac.jp.

^V Published ahead of print on 10 December 2008.