

ムンプス・水痘の臨床像ならびに今後の対策についての検討

分担研究者 庵原俊昭（国立病院機構三重病院小児科）

研究協力者 菅 秀、神谷 齊（国立病院機構三重病院小児科）

落合 仁（落合小児科）

渡辺正博（すずかこどもクリニック）

二井立恵、伊佐地真知子（白子クリニック小児科）

研究要旨 ムンプスの臨床経過と一致させるために、改良されたムンプス IgM 抗体検出試薬が 2010 年に市販された。改良品では既存品で弱陽性を示した検体がすべて陰性となるため、ワクチン未接種群、ワクチン後早期腫脹群の診断には大きな影響はないと予測されたが、ワクチン後後期腫脹群では 1 例を除き全例で IgM 抗体が検出されなくなった。この結果から、ワクチン後のムンプス診断やムンプス再感染の診断には唾液からのウイルス分離やムンプス IgG 抗体の同時測定が必要と思われた。

現在ムンプスワクチンの定期接種化が検討されている。ムンプスワクチンの適切な接種年齢を検討するために、年齢別のムンプスワクチン後の耳下腺腫脹率を検討したところ、野生株以外が原因と考えられる耳下腺腫脹率は、1 歳群が 0.73% と一番低く、年齢が高くなるにつれ耳下腺腫脹率が上昇し、7-10 歳群では 2.58% であった。この結果から、現在日本で市販されているムンプスワクチンを用いるならば、ムンプスワクチン後の髄膜炎を含めた副反応を予防するためには、1 歳時の接種が適切な接種時期と思われた。

A. 研究目的

ムンプスは、パラミクソウイルス科に属するムンプスウイルスの飛沫感染により、ヒトヒト感染する全身性ウイルス感染症である。潜伏期間は 16～18 日間であり、2 日間以上持続する急性耳下腺腫脹が臨床上的の特徴である。しかし、ムンプス以外にも急性耳下腺腫脹をきたす疾患があることや、ムンプスワクチンを受けていてもムンプス発症を認めることから、ムンプスワクチン後の耳下腺腫脹例やムンプス非流行時の耳下腺腫脹例においては、ウイルス学的方法を用いて診断することが求められている。

ムンプスのウイルス学的診断方法として、多くは血清 IgM 抗体検出が用いられている。しかし、捕捉法により作成された酵素免疫法(EIA)を用いて IgM 抗体を測定すると、ときに抗体陽性が長期間持続することや (IgM 抗体のテイリング)、突発性難聴者において陽性を示すことがあり、臨床経過と抗体測定結果とが一致することが求められた。2009 年度に捕捉法を用いたムンプス IgM 抗体検出試薬が改良され、2010 年から改良品 (ムンプス IgM 抗体検出試薬 II) が市販された。今回改良品によるムンプス IgM 抗体の検出と唾液からのウイルス分離、ムンプス

臨床像との関係について検討した。

また、ムンプスワクチンの定期接種化が求められており、定期接種するに当たってムンプスワクチンの副反応軽減が求められている。今回ワクチン接種年齢による耳下腺腫脹の頻度を検討し、ムンプスワクチンの副反応軽減策についても検討を行った。

B. 研究方法

1) ムンプス EIA-IgM 抗体測定方法の検討

対象は、急性耳下腺腫脹を認め、保護者および本人に同意を得た後、急性期に唾液および血清を採取した 201 人 (ムンプスワクチン歴なし 145 人、ワクチン後 30 日以内に耳下腺腫脹を認めた早期腫脹群 9 人、ワクチン後 1 ヶ月以上経過して耳下腺腫脹を認めた後期腫脹群 47 人) である。採取した唾液は Vero 細胞を用いてウイルス分離を行い、血清は以前市販されていたムンプス EIA-IgM 抗体検出試薬 (既存品)、および改良ムンプス EIA-IgM 抗体検出試薬 (改良品) を用いてムンプス IgM 抗体を測定した。なお、改良品では、二次反応に加えるムンプス抗原の濃度、三次反応に加えるペルオキシダーゼ標識抗ムンプスウイルス IgG モノクローナル

抗体の濃度を変更している。

2) 年齢によるムンプスワクチン副反応出現率の検討

対象は1998年から2009年の間にムンプスワクチン星野株の接種を受けた、ムンプスワクチン歴および自然感染歴がない3561人である。接種時の年齢は1歳～40歳で、中央値は2歳である。ワクチン接種後28日以内に耳下腺腫脹を認めた場合、唾液を採取しVero細胞を用いてウイルス分離を行った。ウイルスが分離されたときは由来株の同定を行った。

C. 研究結果

1) ムンプス EIA-IgM 抗体測定方法の検討

既存品および改良品ともに、 ≤ 0.8 抗体指数を陰性、 $0.8 \sim 1.2$ 抗体指数を判定保留、 $1.2 \sim 2.4$ 抗体指数を弱陽性、 $2.4 \sim 9.6$ 抗体指数を中等度陽性、 ≥ 9.6 抗体指数を強陽性とする、既存品で判定保留、弱陽性と判定された血清は、改良品ではすべて陰性となり、既存品で中等度陽性であった血清36検体は、改良品では中等度陽性16検体、弱陽性14検体、判定保留6検体となり、現行品で強陽性であった65検体は、改良品ではすべて中等度陽性になった(表1)。

2) ウイルス分離を基準としたときの各群における IgM 抗体検出試薬の感度と特異度(表2)

唾液からのウイルス分離陽性を基準に、判定保留を陰性に含めたときの、各群の既存品および改良品の感度、特異度、全体一致率を検討した。ワクチン未接種群では、既存品の感度は91.1%(92/101)、特異度81.8%(36/44)、全体一致率88.3%(128/145)であったのに対し、改良品では感度79.2%(80/101)、特異度86.4%(38/44)、全体一致率81.4%(118/145)であった。早期腫脹群では、既存品および改良品とも感度100%(6/6)、特異度33.3%(1/3)、全体一致率77.8%(7/9)であり、後期腫脹群では、既存品の感度28.6%(6/21)、特異度92.3%(24/26)、全体一致率63.8%(30/47)であったのに対し、改良品では感度4.8%(1/21)、特異度100%(26/26)、全体一致率57.4%(27/47)であった。今回の改良により、早期腫脹群を除く他の群では、感度は低下したが特異度は上昇した。

3) 病日による IgM 抗体の検出率の検討(表3)

ワクチン未接種群のムンプス IgM 抗体検出率は、既存品では1病日(耳下腺腫脹開始日)82.6%(38/46)、2病日97.8%(46/45)、3病日

100%(7/7)であり、改良品では1病日69.6%(32/46)、2病日84.8%(39/46)、3病日100%(7/7)と、1病日および2病日の陽性率が低下したが、3病日では全員が陽性となった。なお、ワクチン接種後後期腫脹群では改良により、ほとんどの例でIgM抗体が検出されなくなり、病日による陽性率の検討は不可能であった。

4) 年齢によるムンプスワクチン後の耳下腺腫脹の検討

1歳群ではワクチン接種後1641人中16人(0.98%)が腫脹し、野生株が4人、ワクチン株が6人から分離され、6人からは分離されなかった(表4)。2-3歳群1102人では24人(2.18%)が腫脹し、野生株が9人、ワクチン株が8人から分離され、7人は分離陰性であった。4-6歳群526人では20人(3.80%)が腫脹し、野生株が10人、ワクチン株が4人から分離され、6人は分離陰性であった。7-10歳群155人では10人(6.45%)が腫脹し、野生株が6人、ワクチン株が3人から分離され、1人は分離陰性であった。11歳以上群では137人中4人(2.92%)からすべて野生株が分離された。

野生株が分離された症例を除いたときの耳下腺腫脹率は、1歳群0.73%、2-3歳群1.36%、4-6歳群2.63%、7-10歳群2.58%と年齢が高くなるにつれ耳下腺腫脹率が有意に増加した(表5)。

D. 考察

1) ムンプス EIA-IgM 抗体測定方法の検討

ムンプスのウイルス学的診断には、保険診療上血清IgM抗体測定が頻用されている。しかし、抗体陽性が長期間持続すること(テイリング)や、突発性難聴者においてときに陽性を示すことがあり、測定キットの改良が求められていた。今回IgM抗体測定の反応系に用いるムンプスウイルス抗原量やペルオキシダーゼ標識抗ムンプスウイルスIgGモノクローナル抗体の濃度を調整して、測定キットの改良が行われた。既存品と改良品でムンプス血清IgM抗体を測定すると、既存品で弱陽性(1.2～2.4抗体指数)を示す血清はすべて陰性となり、テイリングや非特異陽性を示すリスクが軽減したと判定された。

次に、改良することでムンプス診断に問題が生じないかを、唾液からのウイルス分離を基準として、ワクチン歴により感度と特異度、および病日によるIgM抗体陽性率を検討した。ワク

チン未接種群では、改良により感度が低下したため、IgM 抗体陽性率は 1 病日では 82.6%から 69.6%に、2 病日では 97.8%から 84.8%に低下したが、3 病日では改良品でも 100%陽性になっており、ワクチン未接種群において IgM 抗体でムンプスを診断するためには、2 病日以降で検査することが望ましいと思われた。

ワクチン後早期腫脹群では既存品、改良品ともに感度、特異度に変化はなく、改良による影響を認めなかった。しかし、ワクチン後後期腫脹群では改良により 1 例を除き IgM 抗体が検出されなくなり、ワクチン後後期腫脹群では IgM 抗体検出によるムンプスの診断は困難となった。

以前から、ムンプス罹患後やムンプスワクチン後に急性耳下腺腫脹を認めたときの診断には、唾液からのウイルス分離が有用であることが示されており、唾液からのウイルス分離が困難な時は、血清 IgM 抗体と IgG 抗体の同時測定の有用性が示されている。IgM 抗体のレベルにかかわらず、急性期血清 IgG 抗体が 25.8EIA 価以上ならば、二次免疫応答の可能性が高く診断の助けとなる。

2) 年齢によるムンプスワクチン副反応出現率の検討

ムンプスでは顕性感染率は 70%と言われているが、発症時の年齢が高くなるほど耳下腺腫脹率が高くなり、4 歳以上では 90%が腫脹する。また、発症時の年齢が高くなるほど、耳下腺腫脹期間が長くなり、髄膜炎や難聴の発症頻度が高いことが示されている。一般にウイルス感染症の症状出現には、ウイルスの直接増殖とそれに伴う免疫反応が関係しており、年齢が高くなるほど免疫反応が高まるため、臨床症状がより典型的となり、より経過が長期化する。このような現象は、麻疹、風疹、EB ウイルス感染などでも認められている。

現在ムンプスワクチンの定期接種化が計画されている。以前 MMR ワクチンが導入された時ムンプスワクチンによる無菌性髄膜炎が問題となったが、ムンプスワクチン導入に当たっては、ムンプスワクチンによる髄膜炎合併をいかに減少させるかが問題となっている。今回の検討では、ムンプスワクチンを受けた 3561 人全員が髄膜炎を合併しなかったために、年齢によるムンプスワクチン髄膜炎の合併率の検討は不可能であったが、耳下腺腫脹の合併率は低年齢ほど低いことが示された。

ムンプス髄膜炎の発症年齢は、ムンプス発症年齢よりも 1.5 歳年齢が高くなっており、年齢が高くなるほど発症率も高くなっている。これらのことや今回の年齢別のムンプスワクチン後耳下腺腫脹率の検討から、ムンプス髄膜炎を含めたムンプスワクチン後の副作用を軽減させるためには、1 歳時 MR ワクチン接種後に接種することが望ましいと思われた。

E. 結論

ムンプスの臨床経過と一致させるために、改良されたムンプス IgM 抗体検出試薬が市販された。改良品では既存品の弱陽性がすべて陰性となるため、ワクチン未接種群、ワクチン後早期腫脹群では診断に大きな影響を及ぼさないと考えられたが、ワクチン後後期腫脹群ではほとんど全例において IgM 抗体が検出されなくなるため、ワクチン後のムンプス診断には唾液からのウイルス分離やムンプス IgG 抗体の同時測定が必要と思われた。

また、ムンプスワクチン後の髄膜炎を含めた副反応を予防するためには、1 歳時に接種することが適切と思われた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 庵原俊昭:ムンプス. 小児科診療 73:s152-s154, 2010
- 2) 庵原俊昭:任意接種のワクチン「ムンプス」. 臨床検査 54:1339-1344, 2010
- 3) 庵原俊昭:ムンプスワクチン. 小児内科. 42:1984-1987, 2010
- 4) 庵原俊昭:ムンプスワクチン:現状と今後. 臨床とウイルス 38:386-392, 2010

2. 学会発表

- 1) 木下星次郎、伊藤守弘、庵原俊昭、幸脇貴久、鶴留雅人、伊藤康彦:ムンプスウイルスの臓器・組織親和性を規定する因子の同定. 第 58 回日本ウイルス学会 (徳島、11 月)
- 2) 落合 仁、庵原俊昭、神谷 齊、中山哲夫:ムンプスワクチン接種年齢による副反応出現率の検討. 第 14 回日本ワクチン学会 (東京、12 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記することなし。

(表1) 既存品と改良品のIgM抗体の関係

既存品 IgM抗体価	改良品IgM抗体価(抗体指数)					合計
	≥9.6	9.6≥2.4	2.4≥1.2	1.2>0.8	≤0.8	
≥9.6	0	65	0	0	0	65
2.4≤9.8	0	16	14	6	0	36
1.2≤2.4	0	0	0	1	13	14
0.8<1.2	0	0	0	0	9	9
≤0.8	0	0	0	0	77	77
合計	0	81	14	7	99	2011

陰性≤0.8抗体指数、判定保留(±): 0.8<1.2抗体指数、陽性≥1.2抗体指数、
1.2≤2.4: 弱陽性、2.4≤9.8: 中等度陽性、≥9.8強陽性

既存品IgM抗体価: 0.15~14.86抗体指数

改良品IgM抗体価: 0.05~7.35抗体指数

(表2) 各群における既存品と改良品の感度、特異度、抗体一致率

		感度(%)	特異度(%)	抗体一致率(%)
未接種群	既存品	91.1	81.8	88.3
	改良品	79.2	86.4	81.4
早期腫脹群	既存品	100	33.3	77.8
	改良品	100	33.3	77.8
後期腫脹群	既存品	28.6	92.3	63.8
	改良品	4.8	100	57.4

早期腫脹群はワクチン接種後30日以内に耳下腺腫脹が出現、後期腫脹群はワクチン接種後1か月以上経過して耳下腺腫脹

(表3) ワクチン歴による病日ごとのIgM抗体陽性率と平均抗体価

ワクチン歴		既存品		改良品	
		陽性率(%)	平均抗体価*	陽性率(%)	平均抗体価*
未接種群	1病日	82.6(38/46)	7.74±5.12	69.6(32/46)	2.97±2.20
	2病日	97.8(45/46)	9.53±4.49	84.8(39/46)	3.63±1.88
	3病日	100(7/7)	14.01±0.87	100(7/7)	5.14±0.88
後期腫脹群	1病日	44.4(4/9)	2.01±3.12	11.1(1/9)	0.77±1.24
	2病日	0(0/9)	0.54±0.26	0(0/9)	0.18±0.08
	3病日	66.7(2/3)	1.47±1.33	0(0/3)	0.52±0.48

*抗体指数

(表4) 年齢群別耳下腺腫脹率とウイルス分離

	接種者数	腫脹者数(%)	ウイルス分離		
			野生株	星野株	陰性
1歳	1 6 4 1	1 6 (0.98)	4	6	6
2-3歳	1 1 0 2	2 4 (2.18)	9	8	7
4-6歳	5 2 6	2 0 (3.80)	1 0	4	6
7-10歳	1 5 5	1 0 (6.45)	6	3	1
11歳以上	1 3 7	4 (2.92)	4	0	0

(表5) 年齢によるムンプスワクチンによる耳下腺腫脹率

年齢	例数	耳下腺腫脹*	腫脹率(%)	OR	P value
1歳	1 6 4 1	1 2	0.73		ref
2-3歳	1 1 0 2	1 5	1.36	1.87	0.10137
4-6歳	5 2 6	1 0	1.90	2.63	0.01985
7-10歳	1 5 5	4	2.58	3.60	0.01917

*野生株分離陽性例を除く例数

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

東アジアで流行するムンプスウイルスの分子系統学的解析に関する研究

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 駒瀬勝啓、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）
Tuul Renchin (NCCD of Mongolia)

研究要旨 近隣諸国で流行するムンプスウイルスの解析は、国内での流行動態を理解する上でも、ワクチン対策においても重要である。そこで我々はモンゴル国内で流行するムンプスウイルスについて分子疫学的解析を行うと共に、その抗原性と中枢神経病原性についても解析した。その結果、モンゴル由来株は遺伝子型 H に分類されたが、既存の H 型からは系統学的に大きく異なり、1990 年代末に埼玉県や韓国で分離された株と共に新規の亜型（H3）に分類される事が明らかになった。また、一連の解析結果から従来の遺伝子型分類の基準は見直しが必要であることが示された。加えて、これまで西半球に主に分布すると考えられていた遺伝子型 H のウイルスにも、東アジア由来の一群があることが示唆された。その抗原性は他の遺伝子型に比べて遺伝子型 A から最も乖離しており、この株の流行が Jeryl-Lynn 株のワクチン効果を減じる可能性が示唆された。従来、遺伝子型 H のウイルスは中枢神経病原性との関連性が高いという報告があるが、この分離株の病原性は通常の国内分離株と同程度に低かった。

A. 研究目的

近隣諸国で流行するムンプスウイルスの分子疫学的解析とその性状解析は、国内での流行動態を深く理解するためにも、ワクチン対策上においても重要である。また、感染症サーベイランスが未整備の地域にとってはこうした調査は国際協力の側面からも意義がある。

今回我々は、モンゴル国内で採取されたムンプス患者の材料を手に入れることができたため、そこから分離されたウイルスとその遺伝子について分子系統学的解析を行い、過去の国内および国外の流行株との関連について解析を行った。併せて、分離ウイルスについては、新生ラットの感染発症モデルを用いた中枢神経病原性の評価と、抗ムンプスウイルス高度免疫血清による抗原解析を行った。

B. 研究方法

(1) ムンプス患者由来材料

モンゴル国 NCCD の呼吸器感染症外来にムンプス患者として入院した 32 名から採取された咽頭拭い液 32 検体、および血清 31 検体を試験に供した。

(2) ウイルス分離

2000xg, 10 分間遠心したムンプス患者由来の咽頭拭い液の上清を Vero 細胞に接種し、2 週間培養した。CPE が出現した場合にはその極期にハーベストした。1 回目の培養で CPE 陰性の検体は更に Vero 細胞にもう 1 代継代培養した。

(3) 分子系統学的解析

咽頭ぬぐい液から検出された 21 例の SH 遺伝子領域 cDNA に加えて、1 例の分離ウイルス株の全ゲノム配列を決定し、データベースに登録された既知の塩基配列を基に、F 遺伝子、HN 遺伝子、及び全ゲノム配列について NJ 法を用いて分子系統学的解析を行った。それらの結果を、SH 遺伝子に基づいた系統解析の結果と比較し、モンゴル国内流行株の分子系統学的な位置づけを試みた。

(4) 新生ラット脳内接種試験

試験にはモンゴル分離株 (MuVi-MNG09-024) のほか対照として 2 つの国内分離株 02-49 株（遺伝子型 J）、および大館株（遺伝子型 I）を用いた。生後 24 時間以内の Lewis 系ラットの右脳に 100 PFU の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 (%) を求め、これを neurovirulence test score (NVT 値) とした。
(5) 分離ウイルスの抗原性の検討

Enders 株 (遺伝子型 A) に対する高度免疫ウサギ血清を用いて、モンゴル分離株のほか Enders 株、占部株 (遺伝子型 B)、02-49 株、北海道株 (遺伝子型 B)、36-1079 株 (遺伝子型 L) (遺伝子型 J)、および大館株に対する中和曲線を求めた。4 倍階段希釈された高度免疫血清とウイルスを等量混合し、37°C、2 時間インキュベーションした後、48 ウェルマルチプレートに培養した Vero 細胞にサンプルを接種し、各血清希釈倍率ごとのウイルスカ価を測定した。これをグラフにプロットし、ウイルスごとの中和曲線を得た。

(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。

ヒト由来材料の取扱いについては国立感染症研究所医学研究倫理審査委員会の審査を受け、当該研究の材料については審査を受ける必要が無いとの判断を得ている。

C. 結果

(1) SH 遺伝子に基づく分子系統学的解析

モンゴル国内で採取された 32 例の咽頭ぬぐい液から検出された 21 例の SH 遺伝子領域 cDNA に加えて、1 例の分離株の全ゲノム配列を決定し、データベースに登録された既知のシーケンスを基に、SH 遺伝子について分子系統学的解析を行った (図 1)。その結果、モンゴル株は全て同一のクラスターに分類され、遺伝子型 H に最も近縁であった。しかし、モンゴル分離株は遺伝子型 H の標準株に対して、6.3 から 8.2% の配列の違いがあることから、従来の遺伝子型分類の基準 (標準株に対して 5% 以上の違い) からすると新規の遺伝子型に分類される。一方で、遺伝子型 H の中でもモンゴル株に最も近縁である 1990 年代末に埼玉県や韓国、およびスイスで分離された一群のウイルス株では、その塩基配列の違いは 4.1 から 6.3 % で、必ずしも 5% を超えなかった (図 2)。また、これらのウイルス間では他の遺伝子型 H のウイルスには存在しない SH タンパク質のアミノ酸配列に特徴的なモチーフ (19 番目のシステインと 26 番目のイソ

ロイシン) が保存されていることが判明した (表 1)。これらの結果から、モンゴル株を新規の遺伝子型に分類することは、必ずしも適当ではないことが示唆された。

(2) F 遺伝子、HN 遺伝子、及び全ゲノムに基づく系統解析

SH 遺伝子に基づく分子系統学的解析の結果から、モンゴル株を新規の遺伝子型に分類することに疑問が生じたため、モンゴル分離株 (MuVi-MNG09-024) ゲノムの全塩基配列を決定し、F 遺伝子、HN 遺伝子、及び全ゲノムの塩基配列に基づく系統解析を行い、モンゴル株と遺伝子型 H との系統学的関連についてさらに詳細な解析を行った (図 3-5)。その結果、F、HN 遺伝子、及び全ゲノムに基づくモンゴル株と遺伝子型 H ウイルス株間の遺伝的多様性はそれぞれ、0.5-1.6%、1.3-3.1%、2.0-2.3% の範囲にとどまった。これらの値は、他の遺伝子型における型内部における塩基配列の多様性の範囲を超えるものではなかった (表 2)。

以上の結果から、モンゴル由来株は新規の遺伝子型とは言い難く、遺伝子型 H に分類されるのが適当であると判断された。

また、これらの結果は、WHO が推奨するムンプスウイルスの系統学的分類の基準が必ずしも適切ではないことを示唆しており、基準の見直しが必要であることを意味している。

(3) 抗ムンプスウイルス高度免疫血清によるモンゴル株の抗原性の検討

検討した株の中ではモンゴル分離株と遺伝子型 L の 36-1079 株が最も中和されにくく、最も低い希釈倍率の抗血清 (1:4 倍) においても完全には中和されなかった (図 6)。一方、遺伝子型 G の北海道株は Enders 株に次いで中和されやすいことが分かった。

(4) 新生ラット感染モデル系による中枢神経病原性の評価

新生ラットに対する病原性は強毒株の大館株に比べ、明らかに病原性は低く、その違いは統計学的に有意であった ($p = 0.00027$) (図 7)。一方、対照においた通常の国内分離株 02-49 との間には有意差は認められなかった。

D. 考察

今回の解析で、モンゴル由来株の遺伝子型は H に分類されたが、系統学的に既存の H 型からは大きく離れており、1990 年代末に埼玉県と韓国で分離された株に最も近縁であった。今回の一連の解析結果から、SH 遺伝子領域のみでは適

切な系統学的解析を行うには十分ではなく、F 遺伝子、あるいは HN 遺伝子の遺伝情報を加味して判断する必要があることを示している。その原因は SH 遺伝子領域が他のゲノム領域に比べて変異が起こりやすいのに対し、解析に用いる配列長が 316 塩基では短すぎるためと思われる。従って、従来 WHO が推奨してきた遺伝子型決定の基準は変更する必要がある、これまで報告されてきた 13 の遺伝子型についても F 遺伝子、あるいは HN 遺伝子の配列情報を加えて再分類する必要がある。

今回の報告で、新たな亜型 H3 として分類したモンゴル株を含まれる一群のウイルスは、ほとんどが日本、韓国、モンゴルと言った東アジアで分離されていることから、これまで西半球に主に分布すると考えられていた遺伝子型 H ウイルスにも東アジア由来の一群があることが示唆された。

Enders 株（遺伝子型 A）に対する高度免疫血清を用いた中和試験の成績から、モンゴル株の抗原性は他の遺伝子型に比べて遺伝子型 A から最も離れていることが示めされた。この結果から、この株の流行は Jeryl-Lynn 株のワクチン効果を減じる可能性が有ることを示唆している。

従来、遺伝子型 H のウイルスは病原性との関連性が高いという報告がある。しかし、新生ラットの感染モデル系による評価ではモンゴル株の中枢神経病原性は高くはなかった。対照として用いた通常の国内分離株 02-49 株も高病原性との関連が報告されている遺伝子型 J であるが、病原性は低い。一方、ヒトにおいて高い髄膜炎発生率が問題視され、ラットにおける病原性も非常に高い大館株は遺伝子型 I であるが、同時期に韓国で流行した近縁のウイルスについては高い病原性との関連性を否定する報告がある。以上のことから、遺伝子型と病原性との関連性は低いと考えられた。

E. 結論

1. モンゴル分離株は遺伝子型 H (新規の亜型 H3) に分類される。
2. 従来のムンプスウイルスの遺伝子型分類基準は見直しが必要である。
3. H3 亜型のウイルスは従来の H 型ウイルスが主に西半球で流行しているのとは異なり、主に日本を含む東アジアで流行している。
4. モンゴル分離株の抗原性は A 型から大きく乖離している。

5. モンゴル分離株は従来 H 型で言われてきたような高い中枢神経病原性を示さないことから、遺伝子型と病原性との関連性は低いと考えられる。

F. 健康危害情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kidokoro M., R. Tuul, K. Komase, P. Nymadawa. Characterization of mumps viruses circulating in Mongolia: identification of a novel cluster of genotype H. J Clin Microbiol 2011, in press
2. Hikichi M., M. Kidokoro, T. Haraguchi, H. Iba, H. Shida, H. Tahara, T. Nakamura. MicroRNA regulation of glycoprotein B5R in oncolytic vaccinia virus reduces viral pathogenicity without impairing its antitumor efficacy. Molecular Therapy 2011, in press

2. 学会発表

1. 木所 稔、駒瀬勝啓、Tuul Renchin、モンゴル国内で流行するムンプスウイルスの分子系統学的解析—続報—、第 58 回日本ウイルス学会、徳島、2010 年 11 月
2. 木所 稔、駒瀬勝啓、Tuul Renchin、東アジアで流行するムンプスウイルスの分子系統学的解析、第 14 回日本ワクチン学会、東京、2010 年 12 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

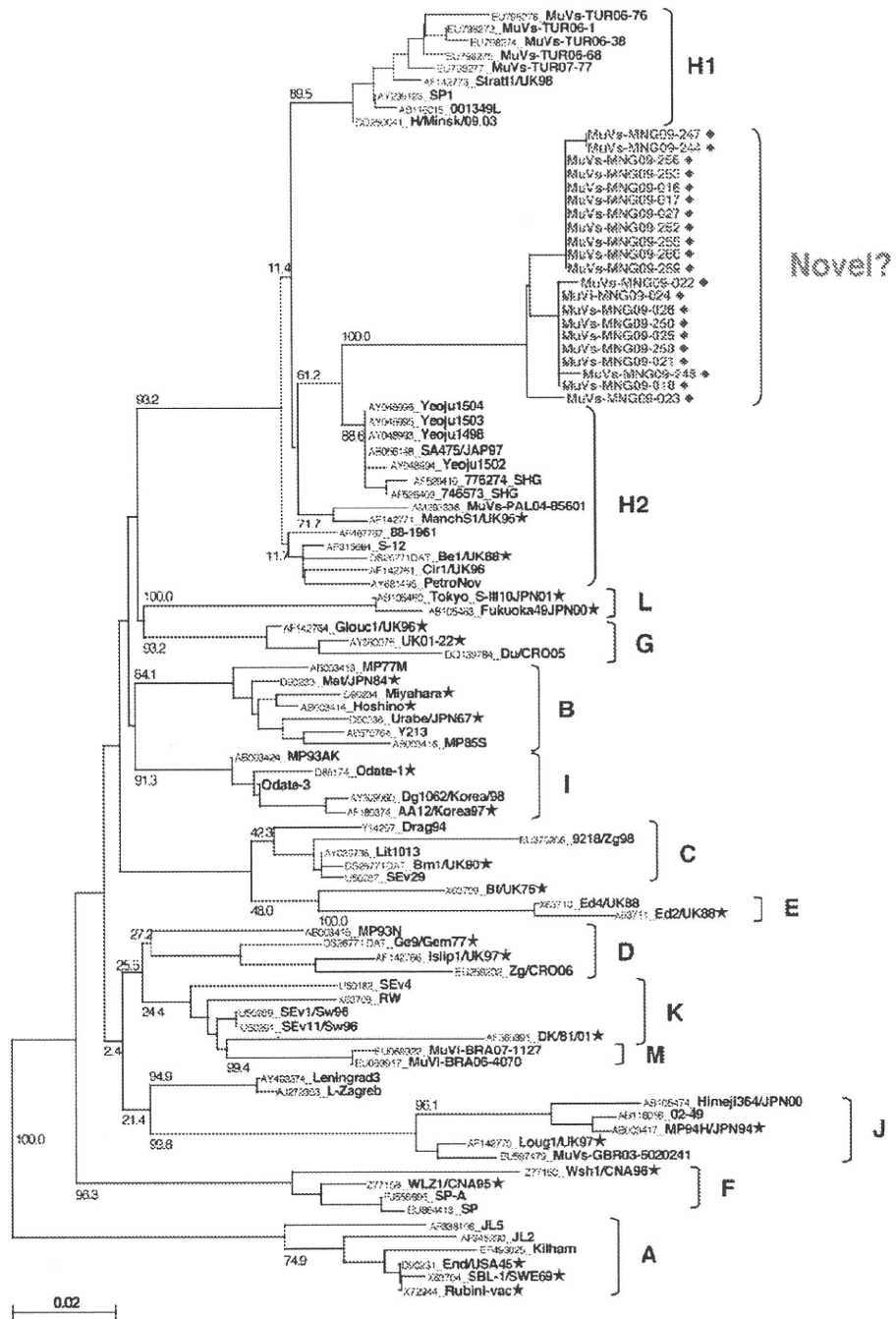
無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し



◆ モンゴル分離株 ★ リファレンス株

図1 SH 遺伝子に基づく分子系統学的解析

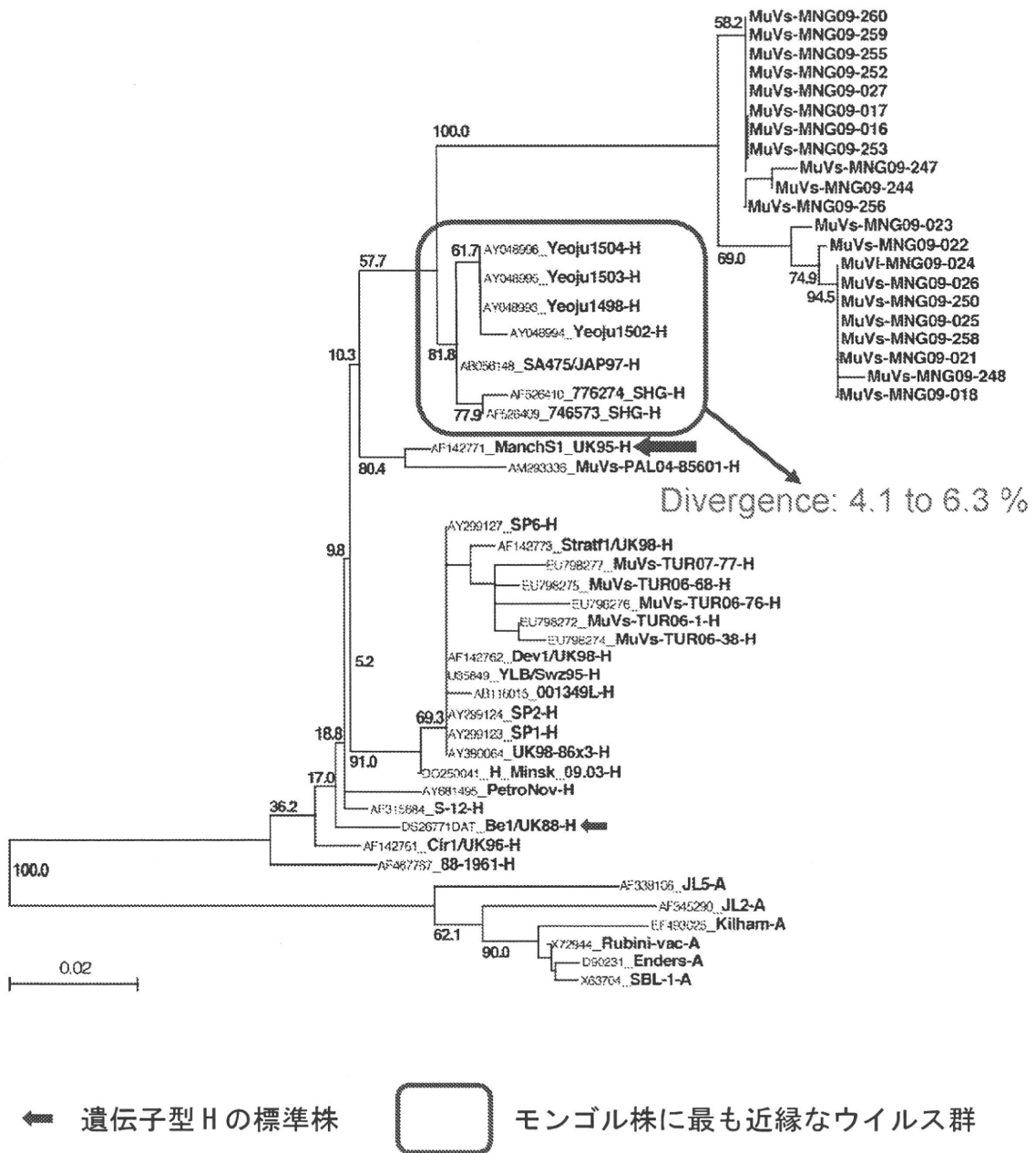


図2 SH 遺伝子に基づくモンゴル株と遺伝子型Hウイルスの系統学的関係

表1 遺伝子型HウイルスSH蛋白質アミノ酸配列の比較

Strain	Proposed genotype	Consensus amino acid sequence*							
		1	10	20	30	40	50	57	
		MPAIQPPEHLTIFILLILLYLITLY WITLTI TYKTARHATLQRSFRWFSFDHPL							
AF142771_Manch1	H2
AM29333_MuVs-PAL04-85601	H2L
DS26771DAT_Bel/UK88	H2	Y.....N..
AB056148_SA475/JPN07	H3	G.....	I.....
AY048993_Yeoj u1498	H3	G.....	I.....
AY048994_Yeoj u1502	H3	G.....	I.....
AY048995_Yeoj u1503	H3	G.....	I.....
AF526409_7465 73_SHG	H3	G.....	I.....
AF526410_776274_SHG	H3	G.....	I.....Y..
MuVs-MNG09-023	H3	G.....	I.....LH.....
MuVi-MNG09-024	H3	G.....	I.....LH...R..
MuVs-MNG09-025	H3	G.....	I.....LH...R..
MuVs-MNG09-244	H3	G.....	I.....T..LH...R..
MuVs-MNG09-248	H3S..	G.....	I.....LH...R..
AB116015_0013 49L	H1	...K..F..	...S..	...A..

* Numbers on the consensus amino acid sequence show the amino acid residue numbers. The dots in alignment exhibit identical sequences to the consensus sequence.

☐ モンゴル株に最も近縁なウイルス群

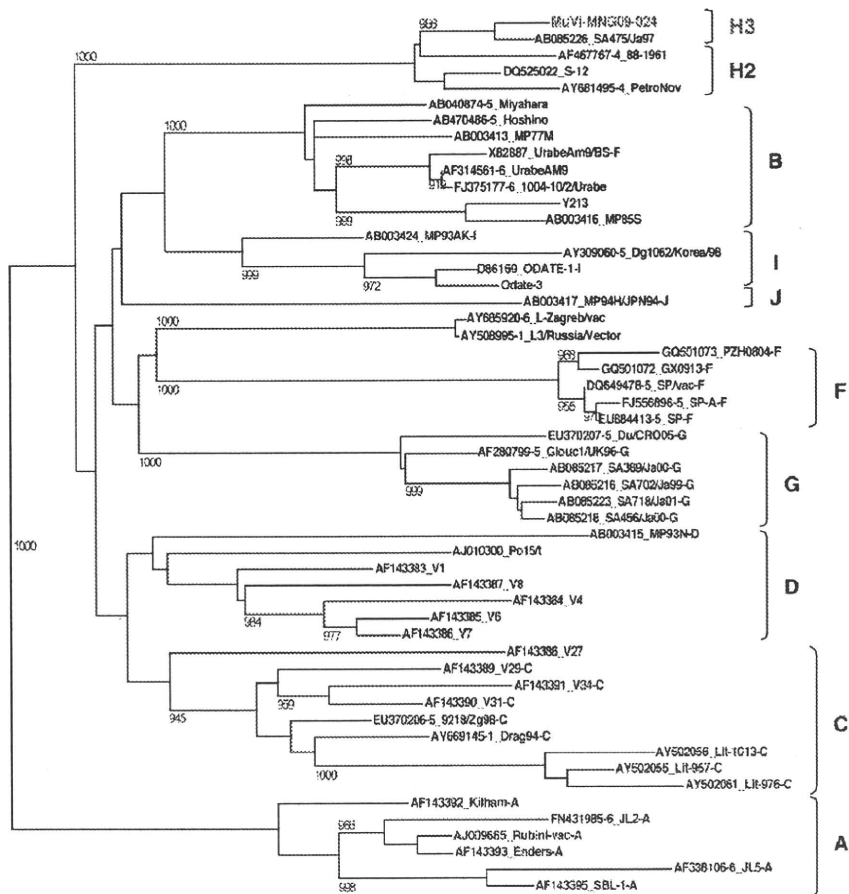


図3 F 遺伝子に基づく系統樹

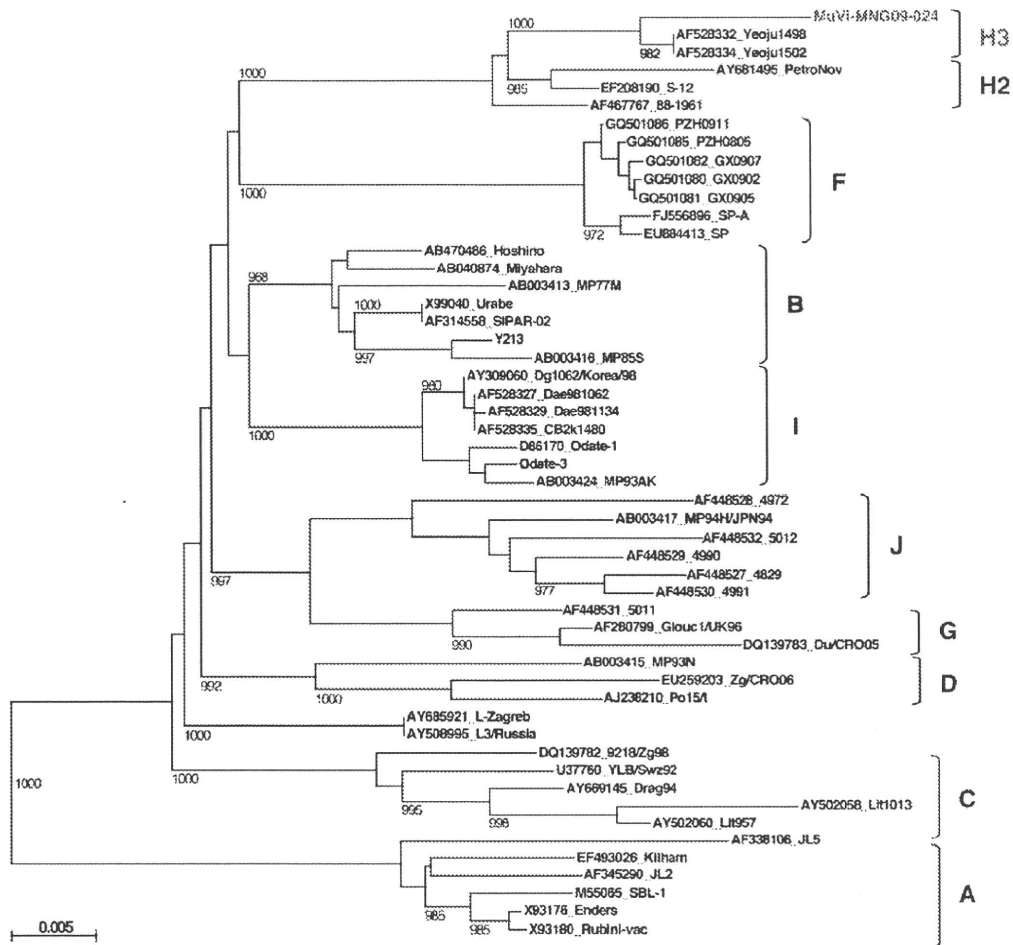


図4 HN 遺伝子に基づく系統樹

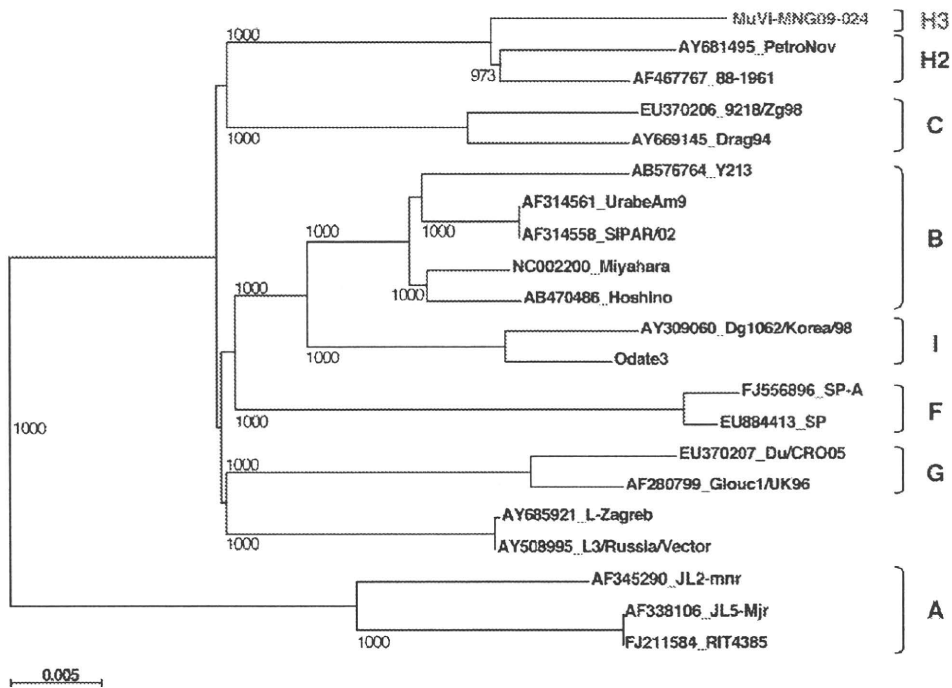


図5 全ゲノム塩基配列に基づく系統樹

表2 遺伝子型内における多様性の比較

	F	HN	全ゲノム
MNG-MuV vs H	1.6%	3.6%	2.3%
Others	4.9%	4.9%	2.7%

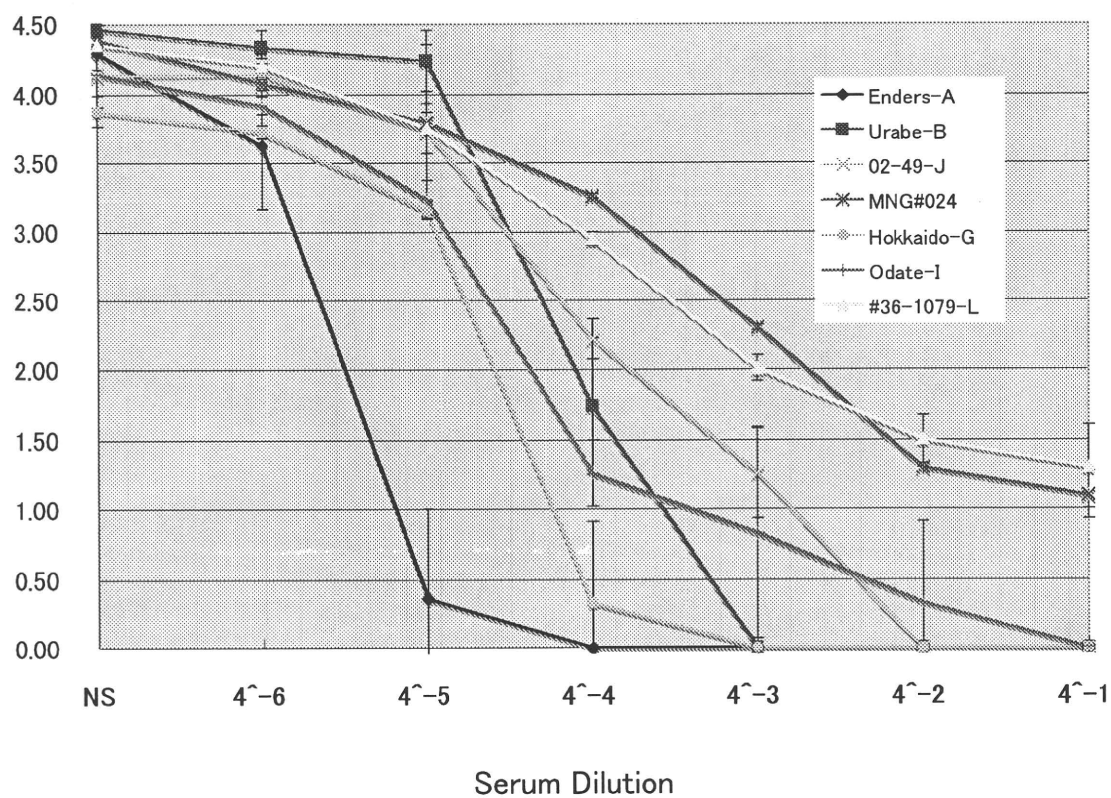


図6 抗ムンプス高度免疫血清による中和曲線の比較

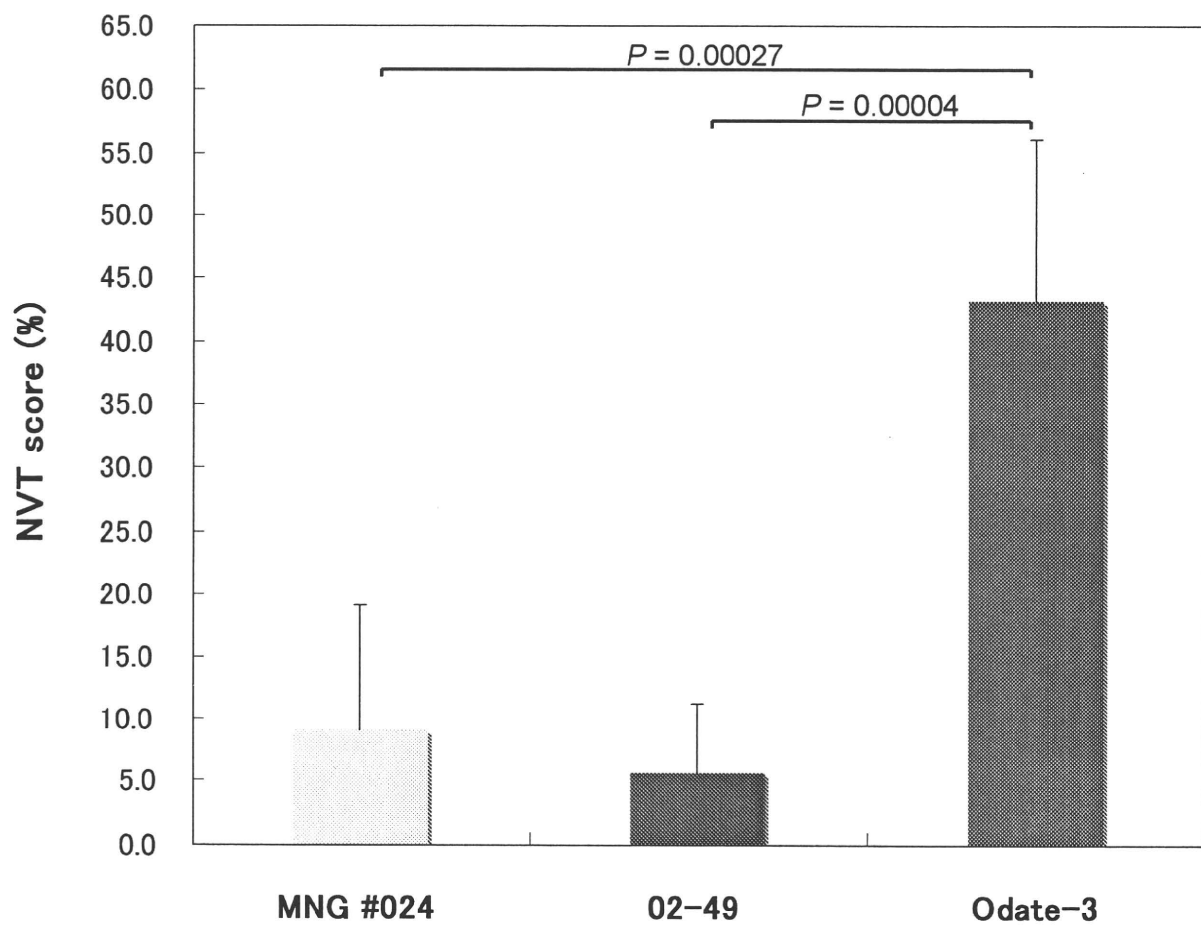


図7 新生ラットにおける中枢神経病原性

水痘ウイルスに対する細胞性免疫応答の測定

（分担）研究者 森 康子 神戸大学大学院医学研究科教授

研究要旨

水痘は水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）の初感染によって発症し、そのウイルスは初感染後宿主の知覚神経節に潜伏感染する。免疫抑制状態でウイルスが再活性化すると帯状疱疹を発症させる。帯状疱疹の発症予防には液性免疫に加え、細胞性免疫応答が関与していることが示唆されている。我々は、VZV 特異的な細胞性免疫応答を IFN γ -ELISPOT 法をもちいて測定し、細胞性免疫応答と病態についての関連性を解析する。

A. 研究目的

水痘は水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）の初感染によって発症し、そのウイルスは宿主の知覚神経節に潜伏感染する。そして免疫抑制状態でウイルスが再活性化すると帯状疱疹を発症させる。水痘発症予防法として現在、水痘生ワクチンが存在する。水痘生ワクチンは現在任意接種であるが将来は定期接種になることが強く望まれる。

帯状疱疹の発症予防には液性免疫に加え、細胞性免疫応答が関与していることが示唆されている。

本研究では、水痘ワクチン接種者においてウイルス特異的な細胞性免疫応答を測定し、ワクチン効果と細胞性免疫応答の相関性を解析したい。また、免疫抑制者においてウイルス特異的な細胞性免疫能を測定し、帯状疱疹発症の相関性を解析したいと考える。細胞性免疫応答は、IFN γ -ELISPOT 法を用いて行う。

B. 研究方法

本研究は、臨床研究に関する倫理指針を遵守し、関連する機関の倫理委員会において承認を得た上で研究を行った。

IFN γ -ELISPOT 法

採血した血液を Ficoll により末梢血単核球 (PBMC) を分離、採取する。

IFN γ 抗体をコートした 96 穴メンブレンプレートに PBMC を 2×10^5 個あるいは 4×10^5 個加え、その上に不活化した水痘ワクチン原液（阪大微研、 9×10^5 pfu/ml）を最終濃度 3×10^4 pfu/ml になるように希釈し、加える。一方、T 細胞の応答を見るため、PHA による刺激も同時に行う。37°C、5% CO $_2$ 条件下で 32-36 時間培養した後、プレートを洗浄

し、ビオチン標識抗 IFN γ 抗体(clone B133.5, Endogen)、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(1:1000,BD)、TMB-H 発色液(Moss)を反応させることによりスポットを得る。スポット数の測定は KS-ELISPOT 測定装置(Karl Zeiss)により行う。

C. 研究結果

今回は、コントロール血液を用いて IFN γ -ELISPOT 法測定法を確立した。

D. E. 考察・結論

次年度は、患者検体を用いて本法により VZV 特異的な細胞性免疫を測定する。

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

研究協力者

（独）医薬基盤研究所
湯 華民、岡本成史
藤田保健衛生大学医学部
吉川哲史

（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（H21-新興-一般-002）：小児リウマチ疾患患児における水痘感染制御方法の確立ならびにサイクリングプローブ法による水痘野生株とワクチン株の鑑別法開発

（分担）研究者 吉川哲史 藤田保健衛生大学医学部、教授

研究要旨

小児リウマチ疾患患児については、様々な免疫抑制療法を受けるため水痘の重症化ならびに帯状疱疹発症のリスク上昇が懸念される。そこで、我々はあいち小児医療センターと共同で、若年性特発性関節炎（JIA）患児に対し治療開始前に水痘ワクチンを接種、治療経過中の水痘特異的液性免疫と細胞性免疫について解析することを計画した。また、今後水痘ワクチンの定期接種化が進むにつれ、ワクチン接種者における水疱性皮膚疾患の際に水痘野生株とワクチン株の鑑別が重要となる。我々はこれまで LAMP 法による水痘野生株とワクチン株の鑑別法を報告したが、今回サイクリングプローブ法という新しい技術を応用して、水痘野生株とワクチン株の鑑別方法を開発した。基礎検討の結果、野生株、ワクチン株各々の DNA を特異的に増幅可能なことが明らかとなった。また、Multiplex の系についても検討したが、同様に標的 DNA を特異的に増幅することが証明された。

A. 研究目的

近年、小児リウマチ疾患は、新規免疫抑制療法の導入により疾患予後が目覚ましく改善している。しかしながら、免疫抑制療法を長期間受けるため日和見感染症は重大な問題であり、中でもこのような免疫抑制状態下では水痘が重症化することは良く知られている。水痘ワクチンを用いた感染予防は、小児リウマチ疾患患児を水痘罹患から守る有用な方策と考えられ、あいち小児医療センターでは水痘免疫のない JIA 患児に対して免疫抑制療法開始前にワクチンを接種し、感染予防を行っている。本研究では、このような介入方法が水痘感染予防に有効か評価することを目的とした。

一方、今後水痘ワクチンの定期接種化が進むと、ワクチン接種者に水疱性皮膚疾患が生じた場合、水痘野生株、ワクチン株、あるいは単純ヘルペスウイルスをはじめとしたその他の起病病原体が迅速に判別することが必要となる。これまで、PCR 産物の制限酵素切断パターン（RFLP）解析や型特異的プローブを用いたリアルタイム PCR 法などによる鑑別法が考案され、我々の施設でも LAMP 法と RFLP 解析を組み合わせた方法を既に報告している（Higashimoto et al. J Clin Microbiol, 2008）。今年度の研究では、最近タカラバイオが開発した SNP 検出に優れたサイクリングプローブ法を用いた水痘野生株とワクチン株の鑑別法開発を試みた。

B. 研究方法

1. JIA 患児における治療開始前水痘ワクチン接種の有用性についての検討

対象：あいち小児保健医療総合センター感染免疫科に入院した JIA 患児 29 名。全例がメトトレキサート少量パルス療法を受けており、3 名はエタネルセプト、5 名はトシリズマブの投与を受けている。

方法：治療開始前に水痘既往歴がなく水痘ワクチンを接種した症例 12 例、水痘既往のあった症例 15 例、水痘既往があったがワクチンを接種した症例 2 例から、治療中に血清 1ml とヘパリン加血 5ml を採取。血清は抗体測定用に保存、全血は ELISPOT 解析用に単核球を比重遠心法で分離し液体窒素中に保存した。水痘抗体価は IAHA 法と ELISA 法（IgG）で測定した。

2. サイクリングプローブ法による水痘野生株とワクチン株の鑑別法開発

VZV ワクチン株と野生株間で遺伝子変異が多く認められる ORF 62 の中に標的領域を設定し、プライマー（野生株、ワクチン株共通）、と野生株、ワクチン株用の型特異的プローブを設計した。この方法は、RNA と DNA からなるキメラプローブと Rnase H の組み合わせによる高感度な標的塩基配列検出法で、プローブは RNA 部分を挟んで一方が蛍光物質で、もう一方がその蛍光物質のクエンチャーで標識されている。このプローブは、インタクトな状態ではクエンチングにより消光しており、増幅産物中の相補的な配列とハイブリッドした後に RNase H により切断されることにより、強い蛍光を発するようになる。よって、プローブの RNA 部分がミスマッチであれば RNase H により切断されることはないので、一塩基の違いも認識できる。

標的領域をサブクローニングし DNA を抽出後、

コピー数を決定、段階希釈して感度決定などの基礎検討に用いた。リアルタイムPCR反応はSepOne (ABI)で行い、それぞれの型特異プローブによるシングル反応に加え、両プローブをミックスしたMultiplex 反応でも検討した。

C. 研究結果

1. JIA 患児における治療開始前水痘ワクチン接種の有用性についての検討

今回の検討では、ELISPOT アッセイによる水痘特異的細胞性免疫能の解析はできなかった。細胞の保存条件等に問題があり、現在その点を改良している。一方、液性免疫については図1に示す通りで、水痘ワクチン接種群が既往のある群に比べ抗体価は有意に低く、陽性率も低かった。

図 1. JIA の免疫抑制療法開始前水痘ワクチン接種群と水痘罹患の既往がある患児群間での治療開始後水痘抗体価の比較

水痘罹患 vs 水痘ワクチン接種

	①群 ワクチン接種 (n=12)		②群 水痘罹患 (n=15)	
	抗体価(2 nd)	陽性率	抗体価(2 nd)	陽性率
IAHA法	2.67*	66.70%	4.87*	86.70%
ELISA法	—	100%	—	100%

* p=0.02

2. サイクリングプローブ法による水痘野生株とワクチン株の鑑別法開発

ワクチン株、野生株の単独リアルタイムPCR 反応は、10-10⁶ コピー/反応の間で優れた直線性と相関係数(野生株 R²=0.99 ワクチン株 R²=0.98)を示した(図2)。この条件下でワクチン株プローブは10⁵コピーの野生株と、野生株プローブは10⁵コピーのワクチン株と交差反応を示さなかった。Multiplex 反応においても交差反応を認めず、それぞれ標的遺伝子配列を特異的に増幅可能であった(図3)。

図 2. 野生株用プライマー・プローブ、ワクチン株用プライマー・プローブの基礎検討(感度と交差反応性)

感度と交差反応性の検討結果

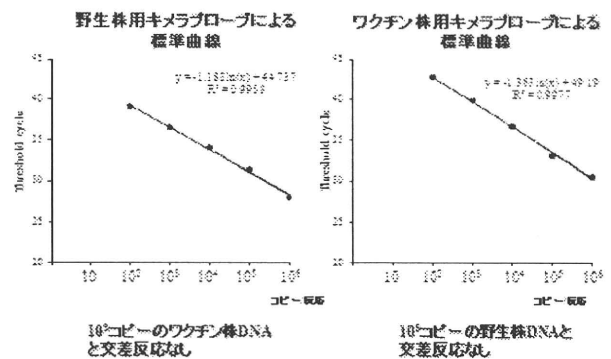
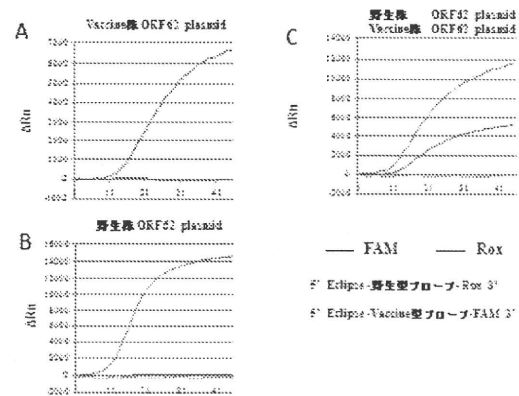


図 3. Multiplex PCR 法での交差反応についての検討。サイクリングプローブを用いたMultiplex PCRの検討



D. 考察

JIA 患児は、診断確定後いわゆる免疫抑制療法の開始までに若干の時間的余裕があるため(NSAIDs による治療時期)、今回計画したような免疫抑制療法開始前の水痘ワクチン投与が可能となる。今回は水痘特異的液性免疫の解析だけにとどまったが、ワクチン接種群と水痘既往のある患児との間での抗体価比較が可能となった。また、ワクチン接種後の観察期間やその間の水痘患者との接触歴、水痘感染の有無などの情報は集めていないが、今後これらの情報を収集しつつ、水痘特異的細胞性免疫能の解析を進めてゆく予定である。ELISPOT アッセイの実施に際し、検体の輸送や細胞保存条件等に検討の余地があり、今後そのあたりの条件設定が研究遂行上の鍵になると思われる。

サイクリングプローブ法による水痘野生株、ワクチン株間の鑑別法は、これまで通り両株間の遺伝子多型が多いことで知られている gene 62 領域にプライマーとプローブを設計した。以前我々が開発した LAMP 法による解析は、LAMP 法による遺伝子増幅は簡便かつ迅速に実施可能であるが、

結局 RFLP 解析にさらに手間がかかることが最大の問題であった。それに対して本方法は蛍光検出の可能なリアルタイム PCR 法用の機器が必要ではあるが、プライマー、プローブの設計も容易で、かつ極めて優れた SNP 解析能力を持つ。今回の基礎検討でも、各々の標的遺伝子の特異的に検出することはもちろんであるが、multiplex の系でも各標的遺伝子配列を特異的に検出できることが明らかとなった。今後は臨床検体の解析を進め、臨床応用上の有用性を解析してゆく予定である。

E. 結論

JIA 患児の治療前水痘ワクチン接種者における水痘特異的液性免疫の持続状況を明らかにした。また、サイクリングプローブ法という新規プローブ技術を使った SNP 解析で、水痘野生株とワクチン株の鑑別が可能なことを明らかにした。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当せず

2. 学会発表

該当せず

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当せず

研究協力者

豊川市民病院小児科

大橋正博

あいち小児保健医療総合センター、感染免疫科

岩田直美

神戸大学大学院医学研究科、臨床ウイルス学分野

森 康子

IV. 日本脳炎

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

接種施策変更に伴う乾燥細胞培養日本脳炎ワクチン接種の動向：福岡市の経験

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

乾燥細胞培養日本脳炎ワクチンは平成 21 年 6 月に発売され、平成 22 年 4 月から積極的勧奨が再開された。同年 8 月末に積極的勧奨の差控えによる接種遅れ者への対応と 2 期の定期接種に使用可能になった。それらの施策変更前後の接種状況を福岡市において調査した。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たが、1 期追加、2 期接種、接種遅れ者への接種は伸び悩んでいた。今後、積極的勧奨の拡大と年齢超過者への救済措置が課題である。

A. 研究目的

2009 年 2 月に乾燥細胞培養ワクチン(以下、新ワクチンと略す)が製造承認され、6 月 2 日に発売され、1 期の定期接種として接種可能になった。平成 22 年 4 月には標準的接種年齢(3 歳)で積極的勧奨を再開した。8 月には 2 期の定期接種として接種が可能になり、同時に、国の積極的勧奨の差控えにより接種が遅れていた 1 期接種の残り回数を、定期接種年齢内で定期接種として可能とする施策がとられた。これらの施策変更によって実際の予防接種がどのように反応したのか、福岡市で調査し検討した。

B. 研究方法

福岡市における乾燥細胞日本脳炎ワクチン(新ワクチン)の月別、期別、接種実数を市の保健福祉局より提供を受け、調査、解析した。また、年次別の日本脳炎ワクチンの実施率を検討した。なお、調査期間における 1 期接種対象年齢の福岡市の年間出生数は約 13,000 人で推移していた。

また、データの一部に平成 21 年度に接種されたマウス脳由来日本脳炎ワクチン(旧ワクチン)の接種数データも加えた。

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

図1に、福岡市における平成 21 年度の接種期別の新旧ワクチンの接種数を示した。

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、秋に接種数が大幅に減少したが、年度末に再上昇した。2 期接種は定期接種として接種できなかったため、秋以降接種数は低下していった。

図2に、平成 22 年度における期別、月別接種者数の推移を示した。平成 22 年 3 月で旧ワクチンの最終ロットの有効期限が終了し、4 月から 3 歳の接種勧奨が再開されたため、4 月からの接種は全て新ワクチンになった。

新ワクチンによる 1 期接種は 4 月から順調に伸び、7-8 月を頂点とし、秋にもよく接種が進んだ。8 月末に 2 期接種に新ワクチン使用が認められたため、9 月から 2 期接種が始まり 10 月に頂点となった。

一方、国の積極的勧奨の差控え中に接種が遅れていた 1 期接種の救済策が同じく 8 月末に示されたことを受けて、9 月から特例接種の 1 期初回分、1 期追加分が始まったが、接種数は多くなかった。

福岡市における平成 17 年度～22 年度(11 月までの暫定値)における新旧ワクチンの合計の接種数(図3)と実施率(図4)に示した。積極的勧奨の差控えが行われた平成 17 年度に激減し、翌平成 18 年度に最低値を示したが、平成 19 年度から上昇に転じ、その後はほぼ直線的に上昇し、平成 20 年度には 1 期初回が 82.0%、1 期初回追加が 38.5%、2 期が 32.3%に回復した。新ワクチン