

図1 感染症サーベイランス体制

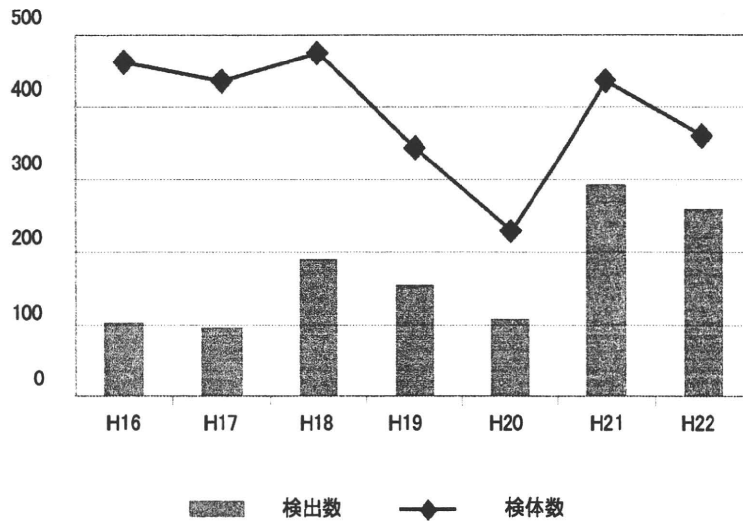


図2 群馬県感染症発生動向調査病原体検査
(平成16年1月～平成22年11月)

**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**

「地方衛生研究所における麻しんの検査体制に関する調査」

研究分担者	調 恒明	山口県環境保健センター
研究協力者	渡邊宜朗	山口県環境保健センター
	戸田昌一	山口県環境保健センター
	濱岡修二	山口県環境保健センター
	富田正章	山口県環境保健センター

研究要旨

2012年までの麻しん排除達成のためには、ワクチン接種率95%以上の達成と維持、及び100万人に1人未満の麻しん患者発生の科学的証明とその維持が必要である。後者については、麻しんの実験室診断と流行株の把握を地方衛生研究所におけるPCR検査と塩基配列決定により行う。本研究では、地方衛生研究所における検査体制の確立に向けて、現状の把握を目的として調査を行った。その結果、技術的にはほぼ全ての地方衛生研究所でPCR検査が可能だが、全数検査体制に移行するには人員、予算に課題がある地方衛生研究所がある事等が分かった。

A. 研究目的

2007年12月28日に厚生労働省から告示された「麻疹に関する特定感染症予防指針」に基づき、国を主導として各自治体において予防接種の積極的な勧奨、サーベイランスの強化及び検査体制の確立等がなされてきた。

定点報告から全数報告に切り替わった2008年には、11,015例の麻疹患者の発生報告があったが、予防接種第3期及び第4期開始の効果もあり2009年の報告数は739例と激減した。そして、2010年は第39週までで395例と昨年同期の641例を大幅に下回っており、麻疹排除に向け確実に前進していることがうかがえる。

この度のアンケート調査は、麻疹排

除達成のために必須である地方衛生研究所での確実な検査診断体制の構築に向け、各地方衛生研究所の現状を把握し、課題と問題点を抽出・分析することにより、麻疹疑い例を含めた全数検査体制への移行に向けた体制構築に資することを目的として実施した。

B. 研究方法

アンケートの実施方法については、昨年9月22日から30日にかけて地方衛生研究所ネットワーク共用システムに登録のある全国77カ所の地方衛生研究所(以下地衛研という)に2009年8月末現在での状況について回答を依頼した。

C. 研究結果

72カ所の地衛研から回答があり、中核市等設置の3機関を除く69機関の地衛研で麻疹検査を実施されていた。検査未実施の3機関については、所在の都道府県の地衛研で検査可能な体制が整っており、未回答の地衛研を除き、回答のあった地衛研の管轄の地域では、麻疹患者発生時の検査対応が可能であることがわかった。PCR検査については、検査を実施している69機関のうち1機関を除く68機関で実施されていた。ウイルス分離については44機関、IgM抗体検査については、麻疹・風疹リファレンスセンターを中心として9カ所で実施されていた。

検査実績については、2009年においては、検体の提出がなく未実施の機関が35機関あり約半数で実績がなかった。検査件数については、全体で325症例あり、PCRは363件実施され、地衛研毎の実施件数は10件以下が多く、5機関で30件以上の実績があった。ウイルス分離は13機関211件実施されており、IgM抗体検査は7機関140件、その他IgG抗体検査またはPA法による抗体検査を実施している機関もあった。2009年と2010年8月までの実績を比較すると2010年8月現在で、検査症例数も461例と増加し、54機関で実施されていることが確認できた。これは、報告数は減少傾向にあるものの検査件数は増加しているため、リーフレット等による啓発活動の成果及び医療機関と保健所との連携が深まっていることを示している。

一方、疑い症例を含む全数検査体制への移行については、27機関で体制

が整備されており、回答保留を含む未整備の42機関にあっても対応可能という回答を25機関から得た。対応が困難と回答のあった地衛研からは、困難な理由として予算と人的要件が大半を占めており、自治体の方針が明確に示されていないなどの回答もあった。

麻疹の検査診断体制が整備されていない理由として行政と医療の連携の希薄さが指摘された。検査技術は確保されているのに、医療機関や患者から協力が得られないなど地衛研、保健所及び医療機関との連携については、自治体により温度差があることが明らかになった。その他、行政として全数検査の実施に踏み切る根拠に乏しい、国からの文書による通知・届出基準の改定の必要性及び医療機関への周知不足等が指摘された。

D. 考察

各地衛研における検査体制の整備への課題として、予算と人員の不足及び自治体によっては検体採取にいたるシステムが構築されていないなどが挙げられた。

この度の結果が、各自治体の本庁及び医師会等と協議する上で、検査体制構築のための一助となることを期待するとともに、現状について国に働きかけるなど、適切な予算措置の実現に向けて取り組む必要性を感じた。

また、各ブロックにおいては、麻疹・風疹リファレンスセンターを中心に抗体検査の実施や各地衛研への技術的支援を行うなど、麻疹排除に向け自治体単位だけでなく地域間及び国と地方との連携をより密に行かなければならない。

議論が必要である。

E. 結論

この調査の後、平成 22 年 11 月 11 日付けで、厚生労働省より各都道府県等向けに、「麻しんの臨床診断例について出来る限り検体を採取し地方衛生研究所で PCR 検査を行う」とする通知が出された。この後、多くの自治体で麻しんの臨床診断例について全数検査体制に移行しつつある。今後、麻しんの全数検査体制の確立、維持には、予算措置が必要と思われる。

また、臨床診断例のみを検査対象とすると、人口 10 万人あたり 2 例以上の検査による麻しん否定例という WHO のもう一つの基準をクリアできない可能性が高い。従って、検査対象をどこまで広げるのかについて今後

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

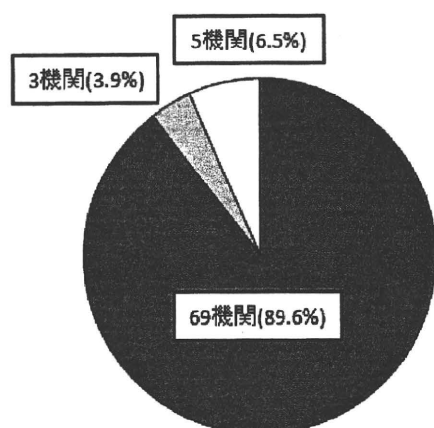
G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

アンケート集計結果

1 麻疹検査実施状況

(回答率：93.5%)



■検査実施
□検査未実施
□無回答

実施状況	回答数
検査実施	69
検査未実施	3
無回答	5

2 検査項目別実施地衛研数

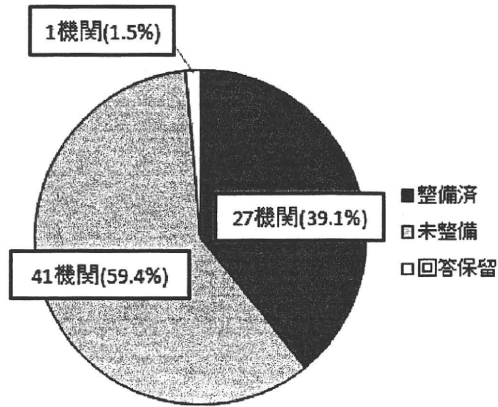
検査項目	回答数
PCR検査	68
塩基配列解析	45
ウイルス分離	44
IgM抗体検査	9
IgG抗体検査	5
PA抗体価	2

3 年別検査実績

検査項目	2009年	2010年
検査実施機関	34	54
症例数	325	461
PCR検査	363	610
塩基配列解析	9	15
ウイルス分離	211	309
IgM抗体検査	140	91
IgG抗体検査	2	3
PA抗体価	99	111

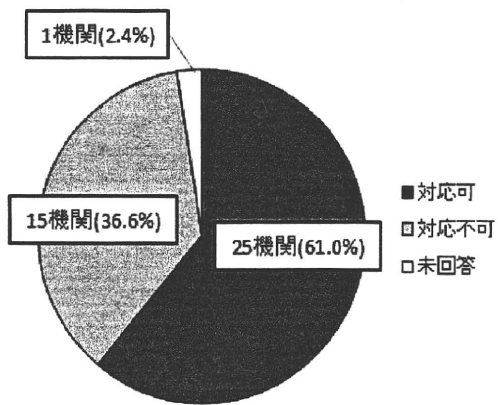
4 全数検査体制への移行について

4-1 整備状況



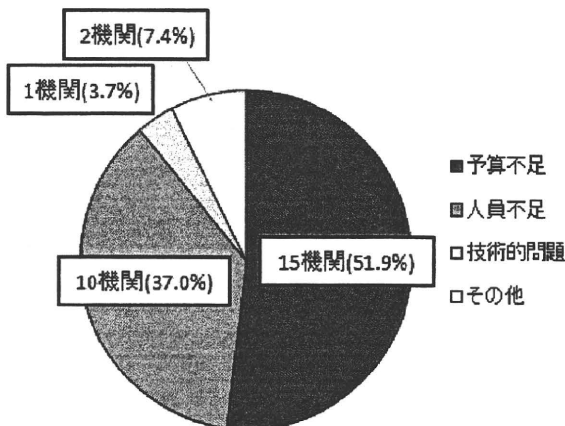
整備状況	回答数
整備済	27
未整備	41
回答保留	1
合計	69

4-2 未整備の地衛研における全数検査への対応について



対応の可否	回答数
対応可	25
対応不可	15
未回答	1
合計	41

4-3 整備への課題について



主な要因	回答数
予算不足	14
人員不足	10
技術的問題	1
その他※	2
合計	27

※1 県の方針が不明確
 ※2 「疑」の定義が不明確

5 麻疹検査診断体制移行への問題点について

- (1) 本庁の体制 10 機関
- (2) 保健所の協力 4 機関
- (3) 医療機関の協力 13 機関
- (4) その他 14 機関

※その他の意見として、医療機関への周知不足、国からの通知がないなど検査体制整備への根拠の希薄さが指摘された。

6 国からの通知の必要性について

ご回答いただいた 36 機関のうち、通知を必要と回答があったのは、26 機関であった。

その理由として、主に各自治体における体制整備、予算及び人員の確保及び医療機関及び地域住民への啓発が挙げられた。

7 その他の意見

- ・ 民間試験検査機関での実態把握が必要
- ・ 除外診断のための疑い例は、地衛研で実施する必要はない
- ・ 発症から適切な時期での検体採取が必要
- ・ 「疑い例」の定義の見直しが必要
- ・ 精度の高い IgM ELISA 法の導入
- ・ パルボウイルスを同時検出できるマルチプレックス PCR 法の開発を希望する
- ・ リアルタイム PCR による検査の迅速化
- ・ 簡易なスクリーニング法を示してほしい
- ・ 国と地方自治体、感染研と地衛研の意見交換ならびに具体的な取り組み方法についての意思統一が必要
- ・ 全数検査体制の移行については、検体数によるため想定が困難
- ・ 全国一律の明確な「麻疹疑い症例の定義」が必要

麻疹ウイルス *H* 遺伝子の時系列系統解析に関する研究

研究分担者	木村博一	国立感染症研究所感染症情報センター
研究協力者	齋藤美香 小澤邦壽	群馬県衛生環境研究所
	平良勝也	沖縄県衛生環境研究所
	水田克巳	山形県衛生研究所
	野田雅博	国立感染症研究所ウイルス第三部
	永田紀子	茨城県衛生研究所
研究代表者	竹田 誠	国立感染症研究所ウイルス第三部

要旨

分子疫学的手法における麻疹ウイルス (MeV) の感染経路をさらに効果的かつ詳細に把握するため、最尤法 (ML 法) による各遺伝子型の MeV の時系列系統解析に関する研究を行った。ML 法において、最適な統計学的な条件を適合させることにより、MeV の推定分岐年と進化速度 (置換数/サイト/年) の 2 つのスケールを有する *H* 遺伝子の分子系統樹の作成が可能になった。その結果、現在まで本邦で検出された D3、D5、D9 および H1 型の MeV は 1970~80 年頃に分岐・出現したことが推測された。

A. 目的

2008 年以降、国内の麻疹患者発生数は激減しているが、本疾患の国レベルでの排除を達成するためには、さらに国内患者発生数を減らす必要がある。したがって、今後も分子疫学解析による本疾患の詳細な感染経路の解明はますます重要になると考えられる。今まで、麻疹ウイルス (MeV) を含む種々のウイルスの分子疫学解析には、標的ウイルス遺伝子の塩基配列を基とした近隣結合法 (NJ 法) などが多く用いられてきた。しかし、これらの解析法においては、時系列的な解析要素がないため、流行株の時系列的な伝播を解明することが困難であった。最近、この欠点を補うため、いくつかの時系列系統解析法が考案された。今回、最尤法 (maximum likelihood method, ML 法) による種々の遺伝子型の MeV の詳細な時系列系統解析を行った。

B. 方法

沖縄県と山形県で流行した麻疹ウイルス分離株 5 株 (D3, D5, D8, D9 および H1) と WHO 推奨参照株 27 株の *H* 遺伝子塩基配列 (1854nt) を材料とした。本邦の分離株は、SLAM/Vero 細胞で培養後、RT-PCR により *H* 遺伝子を増幅し、増幅産物をダイレクトシーケンス法により塩基配列解析を行った。WHO 参照株の塩基配列は、GenBank から得た。

分岐年代の推定は、最尤法 (maximum likelihood method, ML 法) に適合する統計解析ソフトウェア (TipDate v1.2) を使用した。ML 法での仮説検定では、SR (= single rate 時計) モデルと SRDT (= single rate dated tips 分枝先端を分離年とした時計) モデルによる尤度を求めた。PhyML (v3.0) で解析した DR (= different rate 非時計) モデルの尤度と、TipDate で解析し

た SR モデル・SRDT モデルの ML 系統樹による尤度の仮説検定を行った。検定の有意水準には χ^2 分布を用いた。なお、塩基置換速度モデルは、全て HKY85 モデルを使用した。また、TipDate で SR、SRDT モデルを実行するための条件設定は、DR モデルと同じ条件にした。

C. 結果

ML 法を用いて DR モデルに対する SR モデルを仮定した場合の仮説検定の結果、 χ^2 分布による評価は計算値上 $p < 0.001$ であった。つまり、有意水準 0.1% で考慮した場合、DR モデルと SR モデルの対数尤度に有意な差が見られたことから、SR モデルは棄却された。次に、SRDT モデルによる仮定の場合、 $p = 0.0016$ となった。つまり、有意水準 0.1% で考慮した場合、DR モデルと SRDT モデルの対数尤度に有意な差が見られなかったことから、SRDT モデルは棄却されず採択可能となった。したがって、SRDT モデルを用い、分子系統樹を作成した (図)。その結果、本邦で現在までに検出されている D3、D5、D9 および H1 型は 1970~80 年頃に分岐・出現したことが示唆された。

D. 考察

今回の結果から、MeV の *H* 遺伝子においては、時系列解析が可能な ML 法による分子系統樹は、SRDT モデルを適合することで作成できることがわかった。一方、SR モデルは系統樹作成に適合しないこともわかった。また、今回、SRDT モデルで作成した分子系統樹 (図) から、D3、D5、D9 および H1 型は 1970~80 年頃に出現したと推測された。また、遺伝子型によるクラスターの分類、そして各分離株の分離年代と進化速度 (置換数/サイト/

年) の 2 つのスケールが系統樹上成立可能であった。今回は、 χ^2 分布の有意水準を 0.1% とした場合に、SRDT モデルは棄却されなかった。しかし、DR モデルと SR・SRDT モデルの間での統計学解析に必要な条件設定の曖昧さや最尤法の検定で生じる棄却領域の過誤など、今後さらに検討することにより、さらに適切な MeV の時系列解析が可能な分子系統樹作成が可能であることもわかった。

E. 結論

ML 法により、麻疹ウイルス *H* 遺伝子の時系列系統解析が可能となった。より最適な分子系統樹を作成するには、適切かつ精度の高い統計学解析の条件設定を行うためのさらなる検討が必要であることが示唆された。

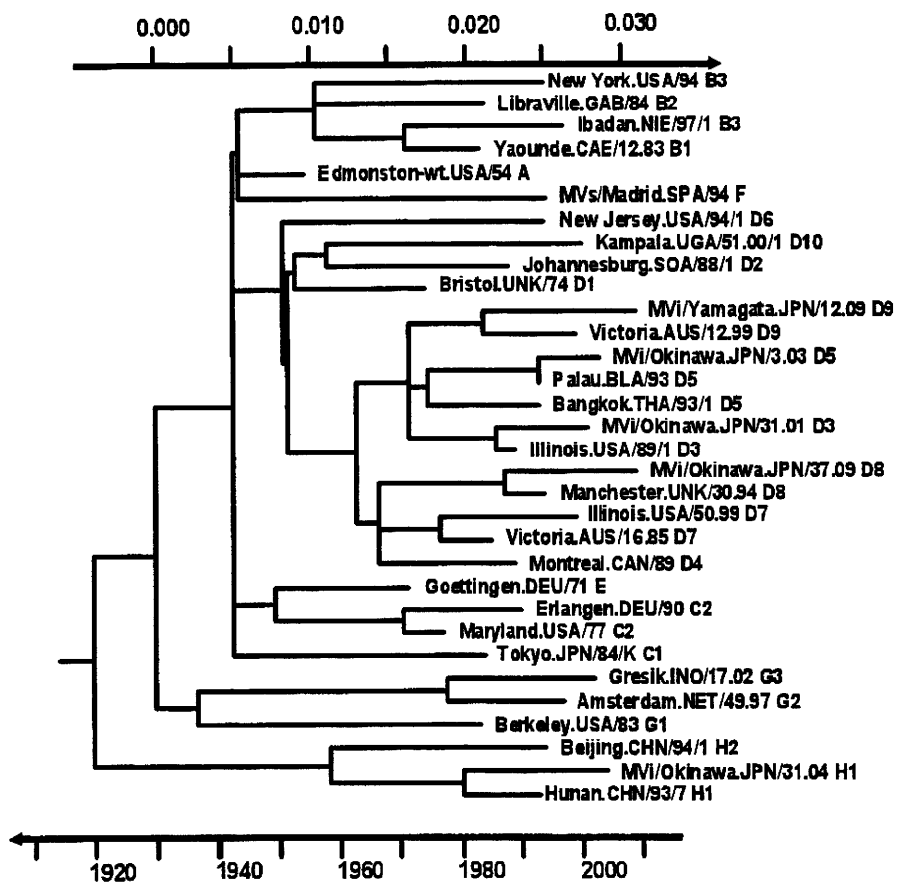


図 ML 法による麻疹ウイルス H 遺伝子分子系統樹

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
研究報告書

麻疹ウイルスの抗原性に関する研究

研究代表者 竹田 誠 (国立感染症研究所ウイルス第三部)
研究協力者 田原舞乃 (国立感染症研究所ウイルス第三部)

研究要旨

麻疹排除計画は、麻疹ウイルスが単一血清型しか持たない病原体であり、今後も長期にわたり現在のワクチンが世界中全ての流行株に対して高い効果を発揮するという予測が前提となっている。しかしながら、その予測を裏付ける科学的根拠はほとんど示されていない。本研究では、その予測が正しいか否かを科学的に明らかにし、わが国ならびに世界的な麻疹排除計画へ貢献することを目的とした。麻疹ウイルスの抗原性を決める主要ウイルス抗原は H タンパク質である。H タンパク質に対する十数種のモノクローナル抗体と9種の異なる遺伝子型流行株の H タンパク質を発現する組換え麻疹ウイルス(感染を定量するためルシフェラーゼを発現する)、ならびに異なる麻疹ウイルス受容体(SLAM、CD46、上皮細胞受容体)をもつ細胞株3種を用いた中和解析を行った。その結果、Hタンパク質上に7種の抗原(中和)エピトープ(Ia、Ib、IIa、IIb、III、IV、V)が存在すること、ならびにそのうちの Ia、V が、麻疹ウイルスの単一血清型を決めている重要なエピトープであることが示された。一方、その他の5つのエピトープは、流行株によって抗原性が大きく変化していることが示された。翌年度以降は、Ia、V のエピトープが長期に保存されるかどうかを解析していく。

A. 研究目的

麻疹排除計画は、麻疹ウイルスが単一血清型しか持たない病原体であり、今後も長期にわたり現在のワクチンが世界中全ての流行株に対して高い効果を発揮するという予測が前提となっている。しかしながら、その予測を裏付ける科学的根拠はほとんど示されていない。本研究では、その予測が正しいか否かを科学的に明らかにし、わが国ならびに世界的な麻疹排除計画へ貢献することを目的とした。

B. 研究方法

麻疹ウイルスの抗原性を決める主要ウイルス抗原は H タンパク質である。H タンパク質に対する十数種のモノクローナル抗体と9種の異なる遺伝子型流行株の H タンパク質を発現する組換え麻疹ウイルス(感染を定量するためルシフェラーゼを発現する)、ならびに異なる麻疹ウイルス受容体(SLAM、CD46、上皮細胞受容体)をもつ細胞株3種を用いた中和解析を行っ

た。

用いた H タンパク質に対するモノクローナル抗体は B5、E81、E396、B12、E500、A2、A26、E128、E185、E39、E103 (計 11 種) で、競合 ELISA 法にて、それぞれ B5、E81、E396、B12、E500 の 5 種がエピトープ I を、A2、A26、E128 の 3 種がエピトープ II を、E185、E39、E103 のそれぞれが、エピトープ III、IV、V を認識することが、佐藤威ら (元感染研) によって明らかにされている。

用いた細胞株は、B95a 細胞、Vero 細胞、II-18 細胞の 3 種類で、それぞれが、麻疹ウイルスの受容体である SLAM、CD46、上皮細胞受容体 (ECR) を発現している (CD46 は、ワクチン株だけが用いる受容体である。また、II-18 細胞は ECR に加えて CD46 を発現している)。

ウイルスは 8 種類を用意した。用いたウイルス株はワクチン株 (遺伝子型 A)、ならびに野外流行株 7 種 (遺伝子型 D3、D5、D8、H1、B3、D4、D9) である。H タンパク質以外のウイルスタンパク質や遺伝子領域の影響を排除するために、H 遺伝子 (H タンパク質をコードする) だけを組換えた (すなわち他のゲノム領域が統一された) ウイルスを作製した。さらにウイルスの感染力や増殖力を正確且つ定量的に解析するために 8 種全てのウイルスにレポータータンパク質 (ルシフェラーゼ) 遺伝子を導入した。

中和解析は、各種モノクローナル抗体を 2 段階希釈していき、ウイルス感染 (ルシフェラーゼ値) を 50% 以上阻止する最大希釈倍率を中和価として判定した。

C. 研究結果

中和価の結果から、11 種のモノクローナル抗体が性質的に 4 つのカテゴリに分類されることが示された。カテゴリ 1 は、B95a 細胞への感染 (SLAM を介した感染) と II-18 細胞への感染 (ECR を介した感染) の双方を非常に効率よく中和し、しかも、

すべての株に対して有効なものである。カテゴリ 2 は、B95a 細胞への感染 (SLAM を介した感染) と II-18 細胞への感染 (ECR を介した感染) の双方を非常に効率よく中和するが、一部の株に対しては、その有効性が大幅に低下しているものである。カテゴリ 3 は、B95a 細胞への感染 (SLAM を介した感染) を中和する能力はほとんどなく、II-18 細胞への感染 (ECR を介した感染) のみ効果的に中和し、さらに一部の株に対しては、その有効性が大幅に低下しているものである。カテゴリ 4 は、B95a 細胞への感染 (SLAM を介した感染) を中和する能力はほとんどなく、II-18 細胞への感染 (ECR を介した感染) を中和する能力も中等度で、さらに一部の株に対しては、その有効性が大幅に低下しているものである。

エピトープ I を認識するとされた抗体 (B5、E81、E396、B12、E500) には、カテゴリ 1 に分類されるものとカテゴリ 4 に分類されるものがあることが示された。そこでエピトープ I を、それぞれエピトープ Ia と Ib とに分類した。またエピトープ II を認識するとされた抗体 (A2、A26、E128) には、カテゴリ 2 に分類されるものとカテゴリ 4 に分類されるものがあることが示された。そこでエピトープ II を、それぞれエピトープ IIa と IIb とに分類した。

結果、エピトープ Ia ならびに V (カテゴリ 1 の抗体で認識されるもの) は、流行株間、ワクチン株において非常に高く保存されており、しかも SLAM ならびに ECR を介した感染の双方に深く関与していることが明らかになった。一方、他のエピトープ (Ib、IIa、IIb、III、IV) は、保存性は高くなく、株によっては大きく抗原性が変化していると考えられた。

D. 考察

今回の解析からエピトープ Ia ならびに V が、麻疹ウイルスの単一血清型を決定する重要なエピトープであることが示唆され

た。それらのエピトープを認識するモノクローナル抗体は、B5、E81、E396、E103 である。今後、これらのモノクローナル抗体を用いてエピトープ Ia ならびに V の H タンパク質上の位置ならびに、それらのエピトープを構成するアミノ酸残基を明らかにし、麻疹根絶計画に極めて重要と考えられるこれらのエピトープが将来的にも保存性が保たれるかどうかについて、来年度以降解析する計画である。一方、Ia ならびに V 以外のエピトープ (Ib、IIa、IIb、III、IV) は、保存性は高くなく、すでに多くの流行株で抗原性が変化していることが明らかになった。このことがワクチンの効果に将来影響を及ぼす可能性について来年度以降解析していく計画である。

E. 結論

麻疹ウイルスの単一血清型を決めていると予想されるエピトープを認識するモノクローナル抗体の選別に成功した。麻疹根絶計画に極めて重要と考えられるこれらのエピトープが将来的にも保存性が保たれるかどうかについて、来年度以降解析する計画である。

E. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 竹田誠、駒瀬勝啓 (2010) 世界麻疹排除計画と世界麻疹風疹実験室ネットワーク、病原微生物検出情報、31、35-36。
2. 田原舞乃、染谷健二、竹田誠 (2010) ウイルスのリバーシジェネティクス、化学療法の領域、26。
3. 竹田誠、駒瀬勝啓、森嘉生 (2011) 世界麻疹排除計画の現状と世界麻疹風疹実験室ネットワークの役割、病原微生物検出情報、32、33-34。
4. 駒瀬勝啓、竹田誠 (2011) 麻しん排除

を目指した麻しん検査診断体制の問題点、病原微生物検出情報、32、41-42。

5. 染谷健二、駒瀬勝啓、竹田誠 麻疹の検査診断法と全数検査診断に向けた取り組み 小児科 51: 1311-1318 (2010)

6. 染谷健二、駒瀬勝啓、竹田誠 麻疹風疹実験室ネットワーク 臨床検査医学書院 54(11): 1322-1327 (2010)

7. Shirogane Y, Takeda M, Tahara M, Ikegame S, Nakamura T, Yanagi Y. Epithelial- mesenchymal transition abolishes the susceptibility of polarized epithelial cell lines to measles virus. *J Biol Chem* 285:20882- 20890, 2010

8. Ayata, M., Takeuchi, K., Takeda, M., Ohgimoto, S., Kato, S., Sharma, LB., Tanaka, M., Kuwamura, M., Ishida, H., Ogura, H. (2010) The f gene of the osaka-2 strain of measles virus derived from a case of subacute sclerosing panencephalitis is a major determinant of neurovirulence. *J Virol*. [Epub ahead of print]

9. Bankamp, B., Takeda, M., Zhang, Y., Xu, W., Rota, PA. Genetic characterization of measles vaccine strains. *J Infect Dis*. (in press)

10. Otsuki, N., Abo, H., Kubota, T., Mori, Y., Umino, Y., Okamoto, K., Takeda, M., Komase, K. Elucidation of the full genetic information of Japanese rubella vaccines and the genetic changes associated with in vitro and in vivo vaccine phenotypes. *Vaccine* (in press)

2. 学会発表

1. 關 文緒、染谷 健二、田原 舞乃、中津 祐一郎、駒瀬 勝啓、竹田 誠 麻疹ウイルス H タンパク質アミノ酸 546 番目のグリシン変異における上皮細胞への感染性および機能変化、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島県郷土文化会館、2010 年 11 月 7 日～9

日

2. 田原 舞乃、駒瀬 勝啓、染谷 健二、關 文緒、中津 祐一郎、藤井 薫、柳 雄介、竹田 誠麻疹ウイルス主要表面抗原 H タンパク質の抗原性変化、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島県郷土文化会館、2010 年 11 月 7 日～9 日
3. 中津 祐一郎、鈴木 忠樹、馬 学旻、關 文緒、駒瀬 勝啓、柳 雄介、竹田 誠、イメージング技術を用いた麻疹ウイルス L タンパク質の細胞内動態の解析、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島県郷土文化会館、2010 年 11 月 7 日～9 日
4. 田原 舞乃、駒瀬 勝啓、染谷 健二、関 文緒、中津 祐一郎、藤井 薫、柳 雄介、竹田 誠、麻疹ウイルスの抗原性変化、第 14 回日本ワクチン学会学術集会、九段会館、2010 年 12 月 11 日～12 日
5. 岡本貴世子、阿保均、大槻紀之、森嘉生、竹田誠、駒瀬勝啓。風疹ウイルス遺伝子検出による実験室診断技術の改良。第 58 回日本ウイルス学会学術集会
6. 阿保均、森嘉生、岡本貴世子、大槻紀之、竹田誠、駒瀬勝啓。風疹ウイルス遺伝子検出 RT-LAMP 法の改良。第 14 回日本ワクチン学会学術集会
7. 竹田誠、白銀勇太、田原舞乃、中津祐一郎、橋口隆生、柳雄介、麻疹ウイルスの上皮細胞感染機構、第 58 回日本ウイルス学会、2010 年 11 月、徳島
8. 伊藤由梨、福原秀雄、酒匂幸、橋口隆生、梶川瑞穂、竹田誠、柳雄介、前仲勝実、イヌジステンパーウイルス H タンパク質と受容体 SLAM との分子認識、第 58 回日本ウイルス学会、2010 年 11 月、徳島
9. 大槻紀之、阿保均、久保田耐、森嘉生、海野幸子、岡本貴世子、竹田誠、駒瀬勝啓、風疹ウイルスによるモルモットでの抗体誘導は温度感受性と一致

- するわけではない、第 58 回 日本ウイルス学会、2010 年 11 月、徳島
10. 竹田誠、麻疹排除に向けた現状と課題～基礎研究者の立場から～、第 14 回日本ワクチン学会、2010 年 12 月、東京
 11. 大槻紀之、阿保均、久保田耐、森嘉生、海野幸子、岡本貴世子、竹田誠、駒瀬勝啓、TO-336 風疹ワクチン株及びその関連株における温度感受性とモルモットにおける抗体誘導能の比較、第 14 回日本ワクチン学会、2010 年 12 月、東京
 12. 竹田誠、麻疹の伝染力の分子基盤、日本ウイルス学会北海道支部 第 44 回夏期シンポジウム「麻疹を中心としたウイルス感染と宿主の感染防御機構」北海道虻田郡洞爺湖町、2010 年 7 月 24、25 日
 13. Takeda, M., Shirogane, Y., Tahara, M., Hashiguchi, T., Ikegame, S., Iwasaki, M., Nakamura, T., Maenaka, K., and Yanagi, Y. (2010 June 21–25. Brugge, Belgium) Measles virus infects epithelial cells. Negative Strand Virus Meeting 2010.
 14. Nakatsu, Y., Takeda, M., Iwasaki, M., and Yanagi, Y. (2010 June 21–25. Brugge, Belgium) The C protein of highly attenuated measles virus vaccine strain is fully functional in supporting virus growth. Negative Strand Virus Meeting 2010.
 15. Tahara, M., Someya, K., Seki, F., Nakatsu, Y., Fujii, K., Yanagi, Y., Takeda, M., and Komase, K. (2010 June 21–25. Brugge, Belgium) Antigenic variations among currently circulating wild-type measles virus strains. Negative Strand Virus Meeting 2010.
 16. Takeda, M. (2010 July 12–13. Osaka, Japan) Molecular basis for efficient transmission of measles virus. International Symposium on Organelle Network: Microbiology, Immunology, and Cell Biology.

17. Takeda, M., Tahara, M., and Komase, K. (2010 September 9–10. Taipei, Taiwan) Taking action towards elimination of measles in Japan. The 7th Taiwan–Japan Symposium on Immunization and Travel Medicine.
18. Takeda, M. (2010 November 24–25. Beijing, China) Measles control in Japan. The 4th China–Korea–Japan forum on communicable disease control and prevention in China.

第2回班会議 平成23年1月24日、25日

麻疹ウイルスの抗原性に関する研究

早期麻疹排除及び排除状態の維持に関する研究班

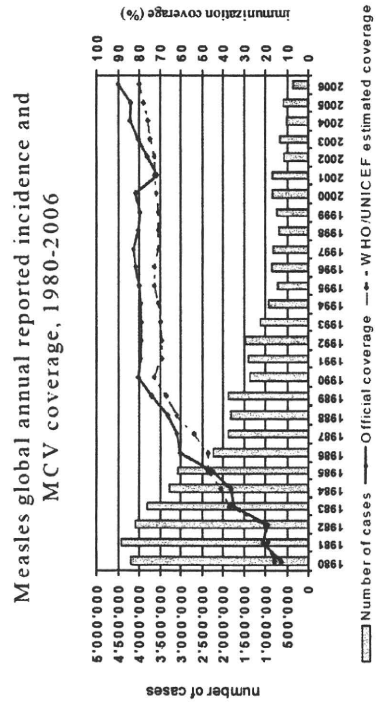
研究の目的

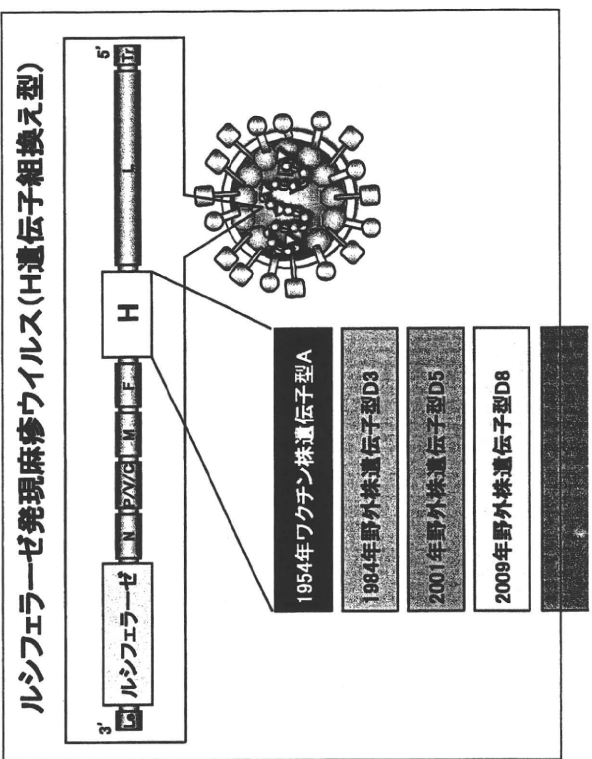
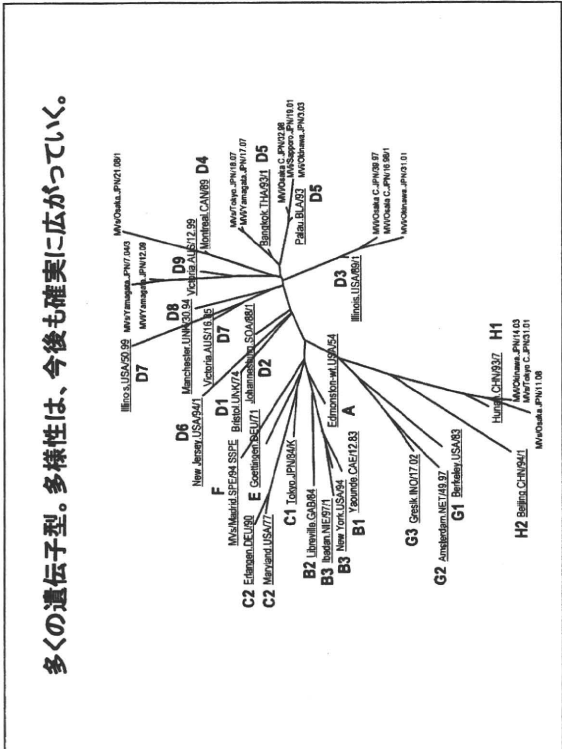
麻疹ウイルスが単一血清型であることを決めている抗原決定基(アミノ酸残基)を明らかにする

抗原性のズレが今後生じる可能性があるかを明らかにする

麻疹ウイルスには、血清型はひとつしかない
抗原性変異は、起こらないと考えられている

ワクチン接種は、確実に患者数を減少させていく。



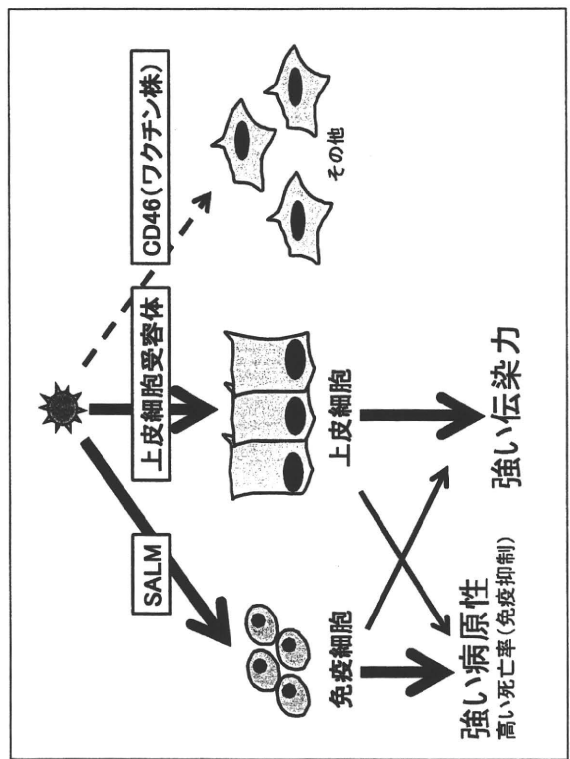


競合ELISA法で抗原認識部位毎にI~VIに分類されたHタンパクに対するモノクローナル抗体(そのうちの11種を実験に使用)

B5	B1	E36	B2	E50	A2	A3	E12	E15	E3	E10	V
----	----	-----	----	-----	----	----	-----	-----	----	-----	---

By Takeshi A. Sato

ルシフェラーゼ活性を50%以上減少させる最大希釈倍率を中和活性として表示



細胞
(受容体)

ウイルス株

モノクローナル抗体



Genotype	E1		E2		E3		E4		E5		E6		E7		E8		E9		E10		
	MS	EP1	EP2	EP3	EP4	EP5	EP6	EP7	EP8	EP9	EP10	EP11	EP12	EP13	EP14	EP15	EP16	EP17	EP18	EP19	
PP5s	81920	2560	320	<80	<40	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
184 A (strain)	40360	>5120	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640
2007 D3 (strain)	81920	>5120	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640
2008 D8 (strain)	>163840	>5120	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640
2009 D9 (strain)	>163840	>5120	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640
2009 D9 (strain)	81920	>5120	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640
2009 D9 (strain)	>163840	>5120	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640	>640
1997 A (strain)	81920	81920	10240	1280	180	640	640	640	640	640	640	640	640	640	640	640	640	640	640	640	640
1997 D9 (strain)	81920	>163840	>20480	80	80	10	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
2001 D9 (strain)	81920	81920	10240	280	20	<10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
2001 D9 (strain)	>163840	81920	>20480	20	320	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
2009 H1 (strain)	>163840	>163840	>20480	640	40	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
2009 D9 (strain)	81920	81920	5120	220	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
2010 D9 (strain)	>163840	81920	10240	640	30	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Ver0	>640	>640	>640	80	>640	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

まとめ

麻疹ウイルスの単一血清型に最も重要な抗原決定基を認識するモノクローナル抗体の選別に成功した。

来年度には、その抗原決定基を構成するアミノ酸残基を明らかにし、麻疹ウイルスの抗原性のズレの発生の可能性の有無について、結論を導く計画である。

将来の麻疹ワクチン施策の立案に役立つ重要な知見を提供できると考えている。

ウイルス株ご提供への謝辞

沖縄県衛生環境研究所平良勝也 先生
Mvi/Okinawa. JPN/37.09 (genotype D8)

早期麻疹排除及び排除状態の維持に関する研究

研究分担者 柳 雄介 九州大学大学院医学研究院ウイルス学分野

研究要旨

麻疹は、今なお世界中で多くの感染者と死者を出している感染力の非常に強い急性ウイルス感染症である。その病原体である麻疹ウイルスは、呼吸器から体内へ侵入し、免疫系細胞に特異的に発現する SLAM (CD150) を受容体として細胞に感染する。本研究では、ウイルス側で受容体結合能を担う麻疹ウイルス H 蛋白質 (MV-H) と細胞側で受容体として機能する SLAM の複合体の X 線結晶構造を決定した。その結果、MV-H と SLAM の結合は、近縁の他のパラミクソウイルスの受容体結合様式とは大きく異なっていることが明らかになった。また、その結合様式から、麻疹ウイルスの血清型が一つである理由、麻疹ワクチンが長年にわたり有効性を保ち続けている理由をうまく説明することができた。これらの結果は、麻疹排除に向けて行われている生ワクチン接種の有効性を強く支持するものである。

A. 研究目的

麻疹ウイルスは、パラミクソウイルス科モルビルウイルス属に属するマイナス鎖 RNA ウイルスで、エンベロープ膜上に受容体結合蛋白質である hemagglutinin (H) 蛋白質と膜融合を担う fusion (F) 蛋白質という 2 つの糖タンパク質を持っている。麻疹ウイルスは受容体に結合後、細胞表面での膜融合により細胞に侵入する。麻疹ワクチンで誘導される抗体は、H 蛋白質と受容体の結合を阻害することによりウイルスを中和すると考えられる。われわれは先に麻疹ウイルス H 蛋白質 (MV-H) を単独の状態で構造決定し、その二量体構造を明らかにした。本研究では、抗体による中和やウイルスの細胞侵入機構を明らかにするために、MV-H と受容体 SLAM の複合体 (MV-H-SLAM) の構造決定を試みた。

B. 研究方法

MV-H も SLAM も共に高度に糖鎖修飾されてお

り、糖鎖が結晶化を阻害すると考えられた。そこで、酵素欠損により均一なハイマンノース型の糖鎖修飾をおこなうヒト培養細胞株 (293SGnTI(-)細胞) を用いて分泌型のタンパク質として発現させた。MV-H とヒト SLAM の組み合わせでは結晶を得ることができなかったため、小型霊長類であるマーモセットの SLAM (麻疹ウイルスの受容体として機能することがわかっている) を用い、さらにリジン残基を化学修飾によりメチル化することで結晶化に成功した。得られた低分解能データを基に分解能を改善するために、パッキングに悪影響を与えると考えられる SLAM の糖鎖付加部位周辺に変異を導入し (N102H と R108Y)、さらに II 型の膜タンパク質である MV-H と I 型の膜タンパク質である SLAM を (Gly-Gly-Gly-Ser)₃ リンカーで融合タンパク質として発現させることで、複合体として安定化させ大量調製することができた。結合実験やウイルス感染実験に基づき MV-H に SLAM を介した感染を増強する変

異 (L482R)を導入し、最終的に分解能3.15 Å で複合体の結晶構造を決定することができた。

(倫理面への配慮)

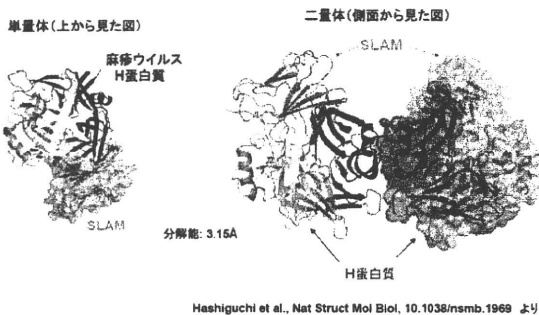
本研究にはヒトや動物を用いる実験が含まれず、倫理面の問題は特にないと考えられる。

C. 研究結果

1. MV-H-SLAM の複合体構造

MV-Hは6組のベータシートが円を描くように配置されたベータプロペラ構造をしていた。同様の骨格をもつインフルエンザウイルスのノイラミニダーゼや、他のパラミクソウイルスの受容体結合タンパク質では、ベータプロペラの上部中央でリガンドや受容体と相互作用するのに対して、MV-Hは、ベータプロペラの側面でSLAMと結合していた(図1)。H蛋白質およびSLAMの変異体の機能解析から両者の結合に重要であろうと報告されていたアミノ酸残基のほとんどが実際の結合に関わっていた。これらの部位は抗ウイルス薬の標的になりうる。

図1 麻疹ウイルスH蛋白質とSLAMの複合体の結晶構造

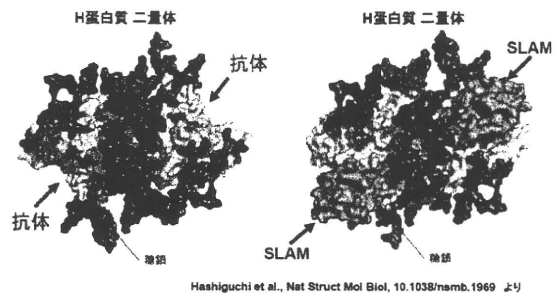


2. 麻疹ワクチンの有効性の構造基盤

MV-H 単独の構造から、MV-H は表面の大部分が糖鎖によって覆われており、一箇所だけが大きく露出していると予想された。この部分はSLAMの結合部位と予測される一方で、MV-H に対する抗体のエピトープの大多数も同じ領域にマッピングされた。すなわち、MV-H では、受容体結合部位と抗体の結合可能部位が共通領域に限定されると考えられた。今回、実際に複合体の構造を決定すると、確かに

MV-H 上の糖鎖に覆われていない領域のほとんどを占める形でSLAMが結合することが確認された(図2)。MV-Hに対する抗体から回避するようなウイルス変異体は、受容体との結合をも失うことになり、ウイルスにとって致命的である。このことが、50年以上も同一系統の麻疹ワクチンが有効であること、麻疹ウイルスが単一血清型であることの原因であると考えられる。これは、C型肝炎ウイルスやHIVが変異を容易に起こすためワクチン開発が困難であるのとは対照的であり、現在行われている生ワクチンによる麻疹排除の有効性を支持するものである。

図2 麻疹ウイルスH蛋白質上の抗体とSLAMの結合部位



3. 麻疹ウイルスの細胞侵入機構

様々な条件下での結晶を解析したところ、配向の異なる二種類のMV-H-SLAM四量体が検出された。MV-HとSLAMの四量体構造は、ウイルスエンベロープ膜と細胞膜間の距離を非常に近接させ(約140Å)、膜融合を誘導するために理想的な疎水性環境を形成していると思われる(図3)。さらに、MV-HとSLAM四量体の配向変化が、麻疹ウイルスの細胞侵入にとって重要なF蛋白質の活性化による膜融合の引き金となっていることが示唆された。

図3 麻疹ウイルスの細胞侵入モデル

