

(3) D社標準試薬の国際単位化

2倍段階希釈したNIBSCの水痘抗体国際標準血清を用いて標準曲線を作成し、D社EIA法に用いる各種濃度の標準血清（市販）の抗体価を、D社EIA-IgG抗体測定試薬で測定し、算出した。

(4) D社EIA法とSI社EIA法の互換性の検討

176人から採取した血清を用いて、D社EIA法およびSI社EIA法を用いて水痘抗体価を測定し、互換性を抗体陽性率、単回帰解析から検討した。

(5) SY社EIA法の互換性の検討

SY社EIA法の添付文書から他のEIA法（メーカー不明）との互換性を抗体陽性率から検討した。

(6) 統計学的解析

χ^2 検定、単回帰分析を用いて行った。

(倫理面の配慮)

血清を採取するに当たっては、保護者または本人の同意を得てから採取し、測定結果を保護者または本人に還元した。また、結果の公表に当たっ

ては氏名が特定されないよう配慮した。

C. 研究結果

(1) NT法とIAHA法の互換性の検討（表1）

NT抗体4倍以上を陽性、IAHA抗体4倍以上を陽性とする、30サンプルの検討では、感度90%、特異度100%、陽性一致率（positive predictive value, PPV）100%、陰性一致率（negative predictive value, NP）95%と、高い一致率が認められた。単回帰解析では、相関係数 $R=0.92304$ （ $P<0.0001$ ）、相関直線 $Y=0.96X+0.07$ と、極めて高い相関が認められた。以上の結果からNT抗体4倍はIAHA抗体4倍に相当し、256倍という高い抗体価まで極めて強い相関が認められた

(2) IAHA法とD社EIA法の互換性の検討（表2）

IAHA抗体4倍以上を陽性、D社EIA抗体4.0EIA価以上を陽性とする、感度97.2%、特異度100%、陽性一致率100%、陰性一致率88.9%と、

表1 水痘NT抗体と水痘IAHA抗体との相関

		NT抗体（2 ⁿ 倍）								
		1	2	3	4	5	6	7	8	合計
IAHA抗体 （2 ⁿ 倍）	1	2	0	1						2
	2									0
	3									0
	4				1					1
	5					2	1			3
	6				1	1				2
	7							1	1	2
	8								1	1
	合計	2	0	1	1	1	3	1	1	2

表2 水痘IAHA抗体と水痘D社EIA抗体との相関

		D社EIA抗体（EIA価）								
		<2	2<4	4<8	8<16	16<32	32<64	64<128	≥128	合計
IAHA 抗体	<2倍	16	8							24
	2倍									0
	4倍			1	3					4
	8倍				4					4
	16倍	1		3	10	2				16
	32倍		1	4	9	18	3			35
	64倍					8	13	7		28
	128倍						7	5		12
	256倍							3	4	7
	512倍							1		1
合計	17	10	14	19	28	23	16	4	131	

高い一致率が認められた。単回帰解析では、相関係数 $R=0.92429$ ($P<0.0001$)、相関直線 $Y=1.10X+0.18$ と、高い抗体価まで極めて強い相関が認められた。以上の結果からIAHA抗体4倍はD社EIA法抗体4.0EIA価に相当すると結論した。

(3) D社標準試薬の国際単位化

世界保健機関 (WHO) は、一部の血清抗体 (麻疹、風疹、B型肝炎、A型肝炎、HIVなど) については国際標準品を作成し、測定方法に関わらず抗体価を国際単位で表示するよう求めている。水痘も国際標準品が作成されている。今回、NIBSCの水痘抗体国際標準血清を用い、D社EIA法測定に用いる各種濃度の標準血清 (市販) の抗体価を測定した。4回測定した平均値は、2.0EIA価は100mIU/ml、4.0EIA価は200mIU/ml、8EIA価は390mIU/ml、32EIA価は1480mIU/ml、64EIA価は3010mIU/ml、128EIA価は5860mIU/mlであった。

(4) D社EIA法とSI社EIA法の互換性の検討 (表3)

メーカーが示すSI社EIA抗体の判定は、陰性50mIU/ml未満、判定保留50~100mIU/ml、陽性100mIU/ml以上である。この基準でD社EIA法との互換性を検討すると、感度98%、特異度50%、陽性一致率78%、陰性一致率94%と、特異度、陽性一致率ともに低率であった。次に、SI社の判定保留を50~200mIU/ml、陽性を200IU/ml以上とすると、D社EIA法で判定保留 (2.0EIA価~4.0EIA価) の血清が、SI社EIA法でも判定保留に含まれるようになり (変更前13/45 (29%) から変更後33/45 (73%))、感度96%、特異度84%、陽性一致率92%、陰性一致率91%と高い互換性が認められるようになった。なお、D社EIA法とSI社EIA

法の相関係数は0.85757 ($P<0.0001$) であり、極めて強い相関が認められた。

(5) SY社EIA法の互換性の検討 (表4)

SY社EIA法の添付文書から他社のEIA法 (メーカー不明) との互換性を検討したところ、感度89.8%、特異度96.5%、陽性一致率99.0%、陰性一致率71.3%であった。以上の結果から、他社のEIA法で陰性または判定保留と判定する低い抗体価の血清を、SY社EIA法では陽性閾値に含んでいることが示された。なお、SY社EIA法は定性試薬であり、定量性は示されていない。

D. 考察

本邦では水痘抗体測定方法として、NT法、IAHA法、EIA法 (3社から市販) が用いられている。各抗体測定方法の長所、短所について表5にまとめた。今回各種抗体測定方法の互換性を、感度、特異度、抗体陽性一致率、抗体陰性一致率の面から検討し、一部の組み合わせでは単回帰分析も加えて検討を行った。なお、抗体測定方法の定義から、NT抗体2倍は抗体陽性であるが、抗体測定方法の理論から考えられる水痘発症の予防抗体価はNT法4倍である。今回の検討ではNT抗体2倍未満を陰性、2倍を判定保留 (同等, equivalent)、4倍以上を陽性と定義した。

表4 水痘SY社EIA抗体と他社EIA抗体との比較

		他社 EIA		合計
		陽性	陰性	
SY社	陽性	292	33	325
	陰性	3	82	85
合計		295	115	410

表3 水痘D社EIA抗体価とSI社EIA抗体価との相関

	SI社 EIA 抗体 (×100mIU/ml)								合計	
	<0.5	0.5<1	1<2	2<4	4<8	8<16	16<32	≥32		
D社	<2	13	1	1			2		17	
EIA	2<4	4	13	20	6	2			45	
抗体	4<8	1		1	18	16	2		38	
(EIA 価)	8<16	1		2	1	11	13		28	
	16<32					1	14	9	24	
	32<64						3	15	3	21
	64≤							3	3	
合計		19	14	24	25	30	34	27	3	176

表5 代表的な水痘抗体測定方法とその特徴

測定方法	長所	短所
NT	<ul style="list-style-type: none"> ・感染防御抗体を測定 ・高い抗体価まで直線状に測定 	<ul style="list-style-type: none"> ・時間と手間がかかる ・多数の検体測定に不向き
IAHA	<ul style="list-style-type: none"> ・高い抗体価まで直線状に測定 ・多数の検体処理が可能 	<ul style="list-style-type: none"> ・ヒトO型赤血球を使用 ・ヒトにより赤血球の感受性が異なる ・ときに非特異凝集がある
EIA	<ul style="list-style-type: none"> ・多数の検体測定が可能 ・機械化が進んでいる 	<ul style="list-style-type: none"> ・高い抗体価は低めに検出される ・感染防御抗体を測定していない

表6 水痘抗体測定方法と陽性閾値

測定方法	単位	陰性	判定保留*	陽性*
NT	倍	< 2	2	≥ 4
IAHA	倍	< 2	2	≥ 4
D社 EIA	EIA 価	< 2.0	2.0~4.0	≥ 4.0
SI社 EIA	mIU/ml	< 50	50~200	≥ 200

NT：中和法、IAHA：免疫付着赤血球凝集法、EIA：酵素免疫法

*判定保留域では特異抗体は検出されるが、発症予防レベルではない。水痘の発症予防抗体価は確立されていないが、NT抗体測定理論からNT抗体4倍以上が発症予防抗体価と推定される。Gershon AAのグループは発症予防抗体価をFAMA抗体4倍以上としている。

今回の検討では、NT抗体4倍はIAHA抗体4倍、D社EIA抗体4.0EIA 価、国際単位では200mIU/mlに相当することを示した。また、D社EIA法とSI社EIA法の互換性の検討から、SI社EIA抗体陽性閾値を200mIU/mlに設定すると、D社EIA法との互換性が上昇した。この結果からもD社EIA抗体4.0mIU/mlは200mIU/mlに相当することが示された。また、本邦で頻用されている水痘抗体測定方法の陽性閾値と一致させるためには、SI社EIA法の抗体陽性閾値を添付文書に記載されている100mIU/ml以上ではなく、200mIU/ml以上にする方が適切であると判断された。なお、SY社EIA法は陽性閾値の範囲が広く、他の抗体測定方法で陰性または判定保留とされている抗体価を陽性と判定している可能性が示唆され、本邦の血清疫学調査に用いるには不適切と判定した。

水痘の発症予防抗体価は確立されていない。Gershon等のグループはFAMA抗体4倍以上を水痘発症予防抗体と提唱している。今回の検討では、NT抗体測定方法の原理から理論上推測される発症予防抗体価はNT抗体4倍と定義し、各種抗体価の陽性閾値について検討した。今回検討した5種類の測定方法のうち、NT法を基準としたとき

の4種類の抗体測定方法の陰性、判定保留、陽性範囲を表6にまとめた。なお、測定原理上判定保留域も特異抗体が検出される範囲である。判定保留の人は、曝露されると発症予防は困難であるが、水痘に対する免疫記憶は有しているので、早期に二次免疫応答が始まり、軽症に経過する人と推測している。

今回の検討から水痘抗体各種測定方法の陽性閾値の互換性が示された。今後血清疫学調査をするにあたっては、各種測定方法の長所、短所からEIA法が優れており、陽性閾値の互換性からD社EIA法が適切な方法と結論された。

E. 結論

水痘抗体測定方法には、NT法、IAHA法、EIA法などがあり、EIA測定試薬は3社から市販されている。各種抗体測定法の互換性について検討を行ったところ、理論上推測される水痘発症予防抗体価NT抗体4倍は、IAHA抗体4倍、D社EIA抗体4.0EIA価に相当し、NIBSC標準血清抗体価200mIU/mlに相当した。各種抗体測定方法の互換性および特徴から、水痘の血清疫学調査には、D社EIA法が優れていると結論した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 庵原俊昭：ムンプス. 小児科54：1753-1760, 2013
- 2) 落合 仁, 庵原俊昭：2度の水痘流行を経験した保育園における水痘ワクチンの効果の検討. 日本小児科医会会報46：159-162, 2013
- 3) 庵原俊昭：ムンプスウイルス感染症：流行性耳下腺炎（おたふくかぜ）. 日本臨牀24：s459-s462, 2013
- 4) 庵原俊昭：ウイルス感染症に既罹患か否か検査を行うのはCF法, HI法, EIA法のどれがよいですか？田原卓浩総編集, 総合小児医療「プライマリ・ケアの感染症」, pp38-41, 2013中山書店, 東京

2. 学会発表

- 1) 木所 稔, 庵原俊昭, 中山哲夫, 竹田 誠：国内で流行するムンプスウイルスの分子系統学的解析. 第54回日本臨床ウイルス学会 2013.6.8-9
- 2) 菅 秀, 浅田和豊, 庵原俊昭：家族内感染による水痘罹患に伴った劇症型溶連菌感染症の1乳児例. 第54回日本臨床ウイルス学会 2013.6.8-9
- 3) 庵原俊昭：日本で開発された水痘ワクチンが果たしてきた役割と今後の期待. 第45回日本小児感染症学会総会・学術集会 2013.10.27-28 札幌

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記することなし

本邦における水痘ワクチン二回接種の適切なスケジュールに関する検討

研究分担者：吉川 哲史（藤田保健衛生大学医学部教授）

研究協力者：河村 吉紀（藤田保健衛生大学小児科）

飯田 史（藤田保健衛生大学小児科）

大橋 正博（豊川市民病院小児科）

加藤 伴親（豊川市民病院小児科）

研究要旨 水痘ワクチンの追加接種における有効性、安全性を評価することを目的として、本学ならびに豊川市民病院の予防接種外来を受診した健康小児を対象に、水痘ワクチンの2回接種を実施した。接種間隔は3～7ヵ月で、各対象者について水痘抗体価測定、水痘皮内抗原検査と副反応調査を行った。追加接種後抗体は、IAHA法、gp-ELISA法ともに全例陽転であった。また追加接種後抗体価は初回接種後抗体価に比較し高い抗体価（ブースター効果）を示した。ただし、接種間隔が3～4ヵ月と短い群が、5～7ヵ月群と比較して追加接種後のgp-ELISA抗体価が低い傾向が見られた。細胞性免疫能については皮内テストで評価したが、接種間隔による皮内抗原検査結果の比較では、発赤径の大きさ、陽性率ともに両群間で差は認めなかった。また全例で、初回接種、追加接種ともに特に問題となる副反応はなかった。

A. 研究目的

平成26年秋から、念願の水痘ワクチン定期接種化が決定された。定期接種化に伴い、高い接種率の達成と十分な感染防御能の誘導には、MRワクチンとの同時接種に加え2回接種が必須である。我々はこれまで厚生労働科研の分担研究として、MRワクチンと水痘ワクチンの同時接種の効果と安全性について評価し、その結果を報告した（大橋正博ら、日児誌、2013, 117; 1416-1423）。本研究では、引き続き重要な課題である水痘ワクチン2回接種の適切な接種間隔の決定、およびその効果、安全性を評価することを目的とする。

B. 研究方法

1. 対象

大学病院および豊川市民病院小児科へ水痘ワクチン接種を希望して来院した患児の中で、水痘ワクチン2回接種に同意した1歳以上の健康小児とした。

2. 方法

2回のワクチン接種前、接種4週間後に血清3mlを採取しウイルス抗体価の推移を評価するとともに、4回目の採血時（2回接種の4週間後）に水痘細胞性免疫を評価するため水痘抗原皮内反応検査を実施した。2回のワクチン接種間隔は3から12ヵ月とし、副反応については、記録用紙を用いて保護者に4週間記録を依頼した。

検査項目

- ①血清中水痘ウイルス抗体価測定：IAHA法、gp-ELISA法を使用。（抗体測定は採血後分離した血清を本学にて連結可能匿名化し、ID番号をつけた上で阪大微生物病研究会、観音寺研究所へ送り測定）
- ②水痘皮内抗原検査：市販の水痘抗原を皮内注射し24時間、48時間後の発赤径を測定し評価した。
- ③副反応調査：記録用紙を保護者へ渡し、接種後1か月間観察。調査項目：体温測定、発疹の有無など。
- ④接種1年後、2年後の水痘罹患調査：往復はが

きによる調査。調査項目：罹患時期、発疹数、発熱の有無、感染源、治療の有無。

(倫理面の配慮)

以下のような対策を講じ、本学倫理審査委員会で本研究計画は承認された (No.12-018)。

- ①プライバシー保護：登録された患者の個人情報は、名前が特定される形では公表されない。連結可能匿名化により個人情報を保護する。対照表は暗号化した上で、パスワードにて管理されたエクセルファイルにて管理する。検体輸送に際し、検体ラベルにはコード番号のみを記載し、別に保管した対照表を基に主任研究者のみ連結化が可能となるような形をとる。
- ②予想される利益と不利益：被験患児に対する利益としては、VZVに対する免疫の付与がある。不利益及び危険性：水痘ワクチンおよび水痘皮内抗原は実際に臨床現場で使用されているものであり、危険性はない。不利益としては、接種前後に抗体反応、細胞性免疫能評価のため皮内検査を実施されることがあげられる。
- ③利益相反：本研究において利益相反はない。使用する水痘ワクチンは研究費で購入し被験者へ無償供与される。研究費は厚生労働科学研究費を使用する。
- ④説明と同意：本研究の実施に際しては、説明文書に従い保護者へ説明を行い、自由意志に基づく同意が得られた上で行なう。
- ⑤検体の再利用：本研究以外に検体の使用はしない。研究終了後廃棄する。

C. 研究結果

平成25年12月31日の時点で37名の被験者に水痘ワクチンを接種し、そのうち18名で追加接種が完了した。現段階で全ての抗体価測定結果がられた14名についての結果を示す。

1. 水痘抗体価

1) 初回接種時の水痘抗体価の推移

初回接種後IAHA法では14例中10例 (71.4%)、gp-ELISA法では14例中12例 (85.7%) で抗体陽転した (表 1-1)。

2) 追加接種時の水痘抗体価の推移

追加接種前には6例でIAHA法では検出感度以下まで抗体価が低下していたが、これらの対象者

表 1-1 水痘抗体価 (初回接種)

対象	接種 間 隔	初回接種			
		pre		post	
		IAHA	gp-ELISA	IAHA	gp-ELISA
1	3	<2	<50	32	909
2	3	<2	<50	8	198
3	3	<2	<50	16	280
4	3	<2	<50	16	116
5	4	<2	<50	<2	116
6	4	<2	<50	64	613
7	4	<2	<50	4	109
8	5	<2	<50	64	719
9	5	<2	<50	nd.	79
10	5	<2	<50	<2	<50
11	6	n.d	<50	64	630
12	6	<2	<50	16	371
13	6	<2	<50	16	198
14	7	<2	<50	<2	<50

n.d.: not determined

表 1-2 水痘抗体価 (追加接種)

対象	接種 間 隔	追加接種			
		pre		post	
		IAHA	gp-ELISA	IAHA	gp-ELISA
1	3	32	369	64	6125
2	3	32	126	64	4140
3	3	<2	97	8	709
4	3	<2	81	64	3969
5	4	<2	56	32	2687
6	4	16	380	64	3824
7	4	n.d.	99	128	7497
8	5	8	627	≥256	21543
9	5	<2	65	128	9972
10	5	n.d.	195	128	4081
11	6	4	304	≥256	22818
12	6	<2	182	64	5708
13	6	<2	144	32	5138
14	7	8	539	64	6007

n.d.: not determined

表2 ブースター効果

採血時期		IAHA (log 2)			gp-ELISA (log 10)		
		接種間隔		P 値	接種間隔		P 値
		3-4 か月	5-7 か月		3-4 か月	5-7 か月	
初回	前	全例陰性	全例陰性	—	全例陰性	全例陰性	—
	後	3.43±1.99	3.33±2.73	0.57	2.38±0.37	2.26±0.50	0.52
追加	前	2.33±2.58	1.33±1.51	0.49	2.13±0.32	2.36±0.34	0.2
	後	5.57±1.27	6.71±1.11	0.15	3.53±0.33	3.94±0.30	0.07

表3 皮内反応結果

判定	接種間隔	
	3-4 か月	5-7 か月
(-)	1	1
(+)	2	1
(++)	4	5
陽性率	85.70%	85.70%

も含めgp-ELISA法では全例抗体陽性だった。さらに、追加接種により全例がIAHA、gp-ELISA法ともに抗体陽性となった(表1-2)。

3) ブースター効果

接種間隔毎のブースター効果を比較をした結果、gp-ELISA法で5~7か月間隔の抗体価が3~4か月より高値を示す傾向を示した(表2)。

2. 水痘皮内抗原検査

水痘ワクチン追加接種4週間後に水痘皮内抗原検査を実施した。水痘抗原「ビケン」を使用して実施した。抗原検査判定は添付文書にしたがい、接種後発赤長径が5mm未満は(-)陰性、5~9mmは(+)陽性、10mm以上は(++)中等度陽性とした。接種間隔による皮内抗原検査の比較では、発赤径の大きさ、陽性率ともに両群間で差は認めなかった(表3)。

3. 接種後の副反応

水痘ワクチン追加接種が終了した14名において、特に問題となる副作用は認められなかった。

D. 考察

対象数はまだ少ないが、水痘ワクチンを3~4か月あるいは5~7か月間隔で2回接種し、IAHA、gp-ELISA法で抗体価の推移を解析した結果、全例で抗体陽転を確認した。また追加接種後抗体価は、初回接種時比べ高い抗体価(ブースター効果)を示し、十分な免疫誘導に有効であると考えられた。しかしながら、接種間隔が3~4か月と短い群が、5~7か月群と比較して追加接種後のgp-ELISA抗体価が低い傾向が見られたため、この点については症例数を増し早急に再解析する必要がある。

今後は、さらに研究参加者を募り、検査対象数を増やすことを課題とする。また、今回は接種間隔が比較的短期(3~7か月)の成績であったが、より長期間隔での接種者の解析を進めてゆくとともに、今後はこれらの症例についても接種後罹患者の有無を解析する必要がある。

E. 結論

水痘ワクチンの追加接種は、安全に実施可能であり、かつ十分な抗体反応や細胞性免疫が得られることが示唆された。しかしながら対象数が少なく、今後症例の蓄積が必要と思われた。また、より適切な接種スケジュールの決定のため、3~4か月後の接種群では十分なブースター効果が得られないのか早急に解決する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

MRワクチンと水痘ワクチン同時接種の効果なら
びに安全性, 大橋正博ら, 日児誌, 2013, 117 ;
1416-1423

2. 学会発表

大橋正博、河村吉紀、吉川哲史

本邦における水痘ワクチン二回接種の適切なスケ
ジュールに関する検討、第54回日本臨床ウイルス
学会

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当せず

水痘の流行解析のための検査法改良とワクチン製剤の分析

研究分担者：井上 直樹（岐阜薬科大学感染制御学研究室・教授）

（10月まで国立感染症研究所ウイルス第1部・室長）

研究要旨 弱毒生水痘ワクチン（岡株）は安全性・有効性に優れたワクチンであり、来年度にも定期接種となる予定である。定期接種化に伴い、血清学検査により感受性者の割合を継続的にモニターすること、接種直後や接種後一定期間後に発症した水痘・帯状疱疹がワクチン株に由来するものであるのかを明確にすることなどが、ワクチンの有効性と安全性という観点から求められる。本年度は、1）各種のVZV抗原を発現させた細胞抽出液をELISA抗原として用いることで、糖蛋白B（gB）及びgEを組合せたELISAが、市販キットと高い相関を示すこと、2）市販キットを用いて小児で陰性や判定保留となった例に陽性が含まれる問題点があること、3）ワクチン株と野生株の判別をプライマー3'端にワクチン特異的配列を利用したnested PCR法が利用できることを示した。

A. 研究目的

水痘は年間100万人程度が罹患し、合併症や重症化に伴い4000人の入院、10人程度の死亡が推測されている。弱毒生水痘ワクチン（岡株）は、高橋らにより世界に先駆けて開発されたワクチンで、その安全性・有効性はWHO専門家委員会においても高く評価されている。我国での接種率は40%程度と推定されているが、米国をはじめとした多数の国においては、全小児への接種を目指した取り組みが実施されている。米国やドイツなどでは、水痘ワクチンの定期化により、罹患者数・入院者数・死亡者数の激減が、すでに実証されている。ファクトシートなども含め様々なエビデンスの積み上げの結果、我国においても来年度からの定期接種化が予定されることとなっている。

定期接種化に伴い、血清学検査により感受性者の割合を継続的にモニターすること、ワクチン接種直後や一定期間後に発症した水痘や帯状疱疹がワクチン株の由来であるのかどうかを明確にすることなどが、ワクチンの有効性と安全性の観点から求められると考えられる。そこで、本年度は、現在検査センターなどで用いられている市販の血清学的検査の問題点の整理、及びワクチン株と野生株を鑑別する核酸検査の簡便化を検討した。

B. 研究方法

1. VZV感染細胞抗原を用いた血清学検査

ELISAには、デンカ生研社のウイルス抗体EIA「生研」水痘IgGを市販キットとして用いた。蛍光抗体法（IFA）用には、VZVを感染させたVero細胞をスライドとしたデンカ生研製品を用いた。いずれも、製品添付書の条件で、反応を行った。

2. VZV蛋白発現プラスミドの作製

ワクチン株V-OkaのゲノムDNAより、各ORFに対応するDNA断片をPCRで増幅し、pcDNA3にクローニングした。血清学検査のために以下のORFをコードするプラスミドを用いた：ORF4, 9A(gN), 14(gC), 16, 31(gB), 37(gH), 40, 44, 50(gM), 60(gL), 61, 62, 63, 66, 67(gI), 68(gE)。

3. 遺伝子導入細胞を用いた血清学検査

T75フラスコにまいた293T細胞に、リン酸カルシウム法を用いて20 μ gの発現ベクターDNAを導入した。2日間培養後、細胞を回収し、凍結融解後、Bioruptorにより超音波破碎し、4 $^{\circ}$ Cで600xg、10分間遠心した上清を細胞抽出液とした。Carbonate緩衝液で蛋白量1 μ g/wellで抗原をコード後、一般的な条件でELISAを実施した。また、IFA用には、遺伝子導入及び未導入の細胞を滴下

し乾燥後アセトンで固定したスライドを用意した。

4. DNAの精製

ワクチン株V-Oka及び親株P-OkaゲノムDNAは、Strausらの方法に従いnucleocapsid DNAとして精製した。即ち、感染細胞を集め、界面活性剤を含む緩衝液で溶解後、細胞由来の核酸を酵素分解し、ここからウイルスカプシドを含む分画を超速心により回収後、プロテアーゼ処理、フェノール抽出によりカプシド中のゲノムDNAを精製した。血液からのDNA精製にはQIAamp DNAMini kit (QIAGEN) を用い、また、髄液及び水疱内容液については、Viral RNA kit (QIAGEN) を使用した。

5. ワクチン株と野生株の分別

感染研「病原体検査マニュアル」に記載したPCR産物の制限酵素切断によるRFLP法を標準として用いた。但し、VL1については、5'端を2残基短くしたプライマーとした。今回新たに検討したnested PCR法には、ORF62A部位については、VL6と図5に記載したプライマーで3'端が異なるものを4種類用意した。同様にORF62B及びORF62C部位については、YL3とYU3をそれぞれ図5に記載のプライマーとを組合せて、PCRを行った。

PCR産物を電気泳動したバンドからQIAEXIIを用いてDNA断片を精製後、塩基配列を決定した。(倫理面への配慮)

国立感染症研究所及び岐阜薬科大学において、ヒトを対象とする医学研究倫理審査会において承認された内容に則り、個人情報の保護に配慮して研究が実施された。

C. 研究結果

1. 各種のVZV抗原を発現させた細胞抽出液を抗原として用いたELISAの検討

現在検査センターなどで用いられるVZVに対するIgG測定用のELISA製品は、全て抗原として、感染細胞を用いている。このため、他の単純ヘルペスウイルスなどと弱い交差反応があり、陰性者において、時として陰性陽性が判定保留となるグレーゾーンの結果を起こすことがある。そこで、VZVの特定の蛋白のみを発現させて、感度と特異性を向上させることができなさを検討した。

ウイルス粒子表面に発現する8種類の糖蛋白、および感染細胞で発現量が多いものや潜伏感染時にも発現が知られるものなど8種類の蛋白を抗原として、ELISAを行った。gE及びgHについては、それぞれgI及びgLと複合体を形成するため、これらについては複合体として発現させた細胞抽出液も検討した。比較として、市販のデンカ生研のキットを用いた。市販キットでは、成人ボランティア36人の血清検体中、30検体が陽性、4検体が判定保留、2検体が陰性であった。一方、16種類のVZV抗原のうち、ODカットオフを0.1とすると、gB、gC、gE、gE/gI、gH/gL及びORF62蛋白を抗原とした場合のみ、陽性反応が見られた。その分布を図1に示した。gE/gIはFc受容体としての機能が知られることから予想されたこではあったが、実際、市販キットで明らかに陰性となるものまで反応が見られた。また、gCに対する反応は弱く抗原としては、不適であることが明らかとなった。gB及びgEを抗原としたELISAの結果が比較的良好であったことから、これらのデータ比較を行った。図2に示すように、gBとgEを抗原としたELISA間、gEを抗原としたELISAと市販キット間には一定の相関が見られた。gBとgEの両者を抗原とすると市販キットと高い相関が見られた。

次に、陽性者が全て水痘罹患である成人ボランティアの代わりに、ワクチン接種者が多い小児で同様の検討を行った。図3に示すように、市販キットで陰性であるにもかかわらずgB及びgEでそれぞれ陽性となるものが3例、逆に市販キットで陽性であるにもかかわらず陰性となるものが4例であり、成人の場合と異なり、gBとgEの両者を抗原とするELISAと市販キットには十分な相関が見られなかった。

その原因を検討するため、ELISAに加えて、過去に市販されていたVero細胞にVZVを感染させた細胞を用いたIFA用スライド、ならびに遺伝子導入でgBもしくはgEを発現させた細胞を用いたホームメイドのスライドにより、ELISAで相反のあった血清について検討を行った。表1に示すように、市販キットで判定保留となった2検体と陰性の1検体は、一部IFAにおいて陽性となった。一方、市販キット陽性でgB・gE発現細胞で陰性と相反していた4例は、IFAで1例は判定保留、

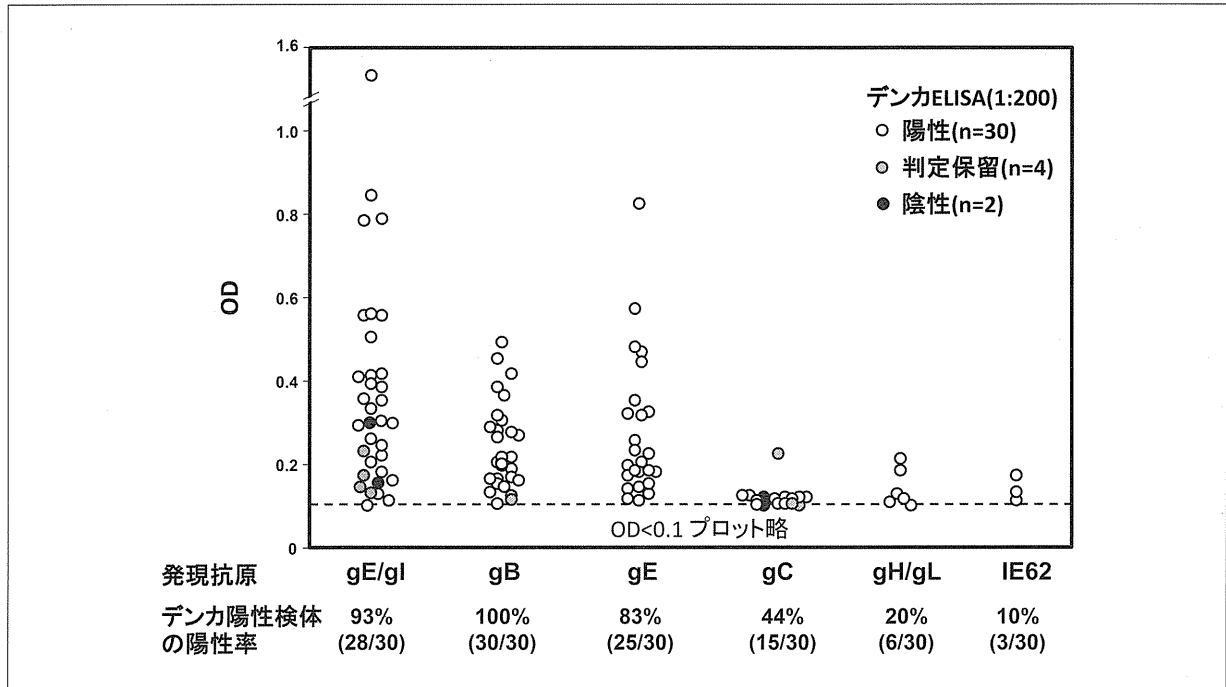


図1 各種のVZV抗原を用いたELISAにおける成人ボランティア血清の反応性

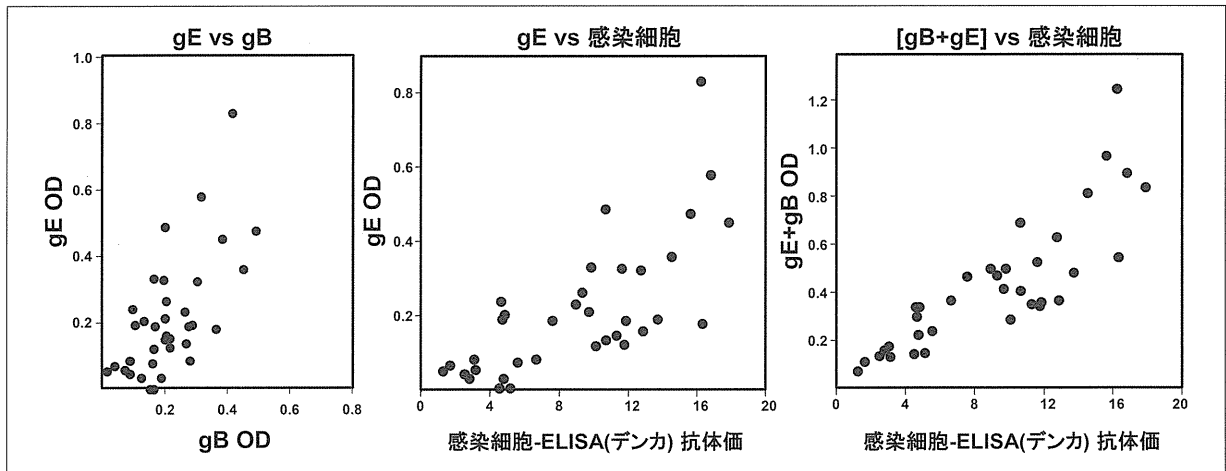


図2 成人ボランティア血清を用いた場合のgE及びgBを抗原としたELISAと市販キットとの相関

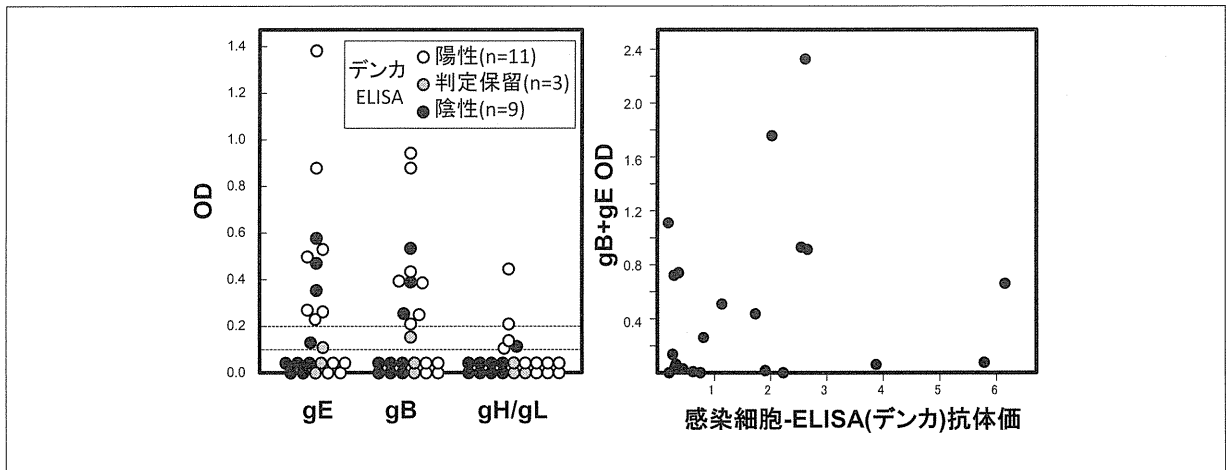


図3 小児ボランティア血清を用いた場合のgE及びgBを抗原としたELISAと市販キットとの相関

表1 相反結果を得た血清を用いた蛍光抗体法での検討 (グレー=陽性)

	対象	ワクチン接種	ELISA			IFA抗体価		
			感染細胞抗体価	gB OD	gE OD	感染細胞	gB	gE
1	小児	有	1.09	<0.1	0.13	<10	<10	<10
2	小児	有	<1	0.53	0.58	<10	<10	10
3	小児	有	1.19	0.25	0.47	<10	<10	20
4	小児	有	1.52	0.39	0.35	20	判定不能	判定不能
5	成人		4.51	0.16	<0.1	10	80	NT
6	成人		5.14	0.17	<0.1	40	80	NT
7	小児	有	7.67	<0.1	<0.1	10	<10	<10
8	小児	有	8.95	<0.1	<0.1	40	判定不能	判定不能
9	小児		15.50	<0.1	<0.1	40	80	80
10	小児		23.13	<0.1	<0.1	>80	>80	80

感染細胞
ELISAの感度

gB/gE発現細胞
ELISAの
感度

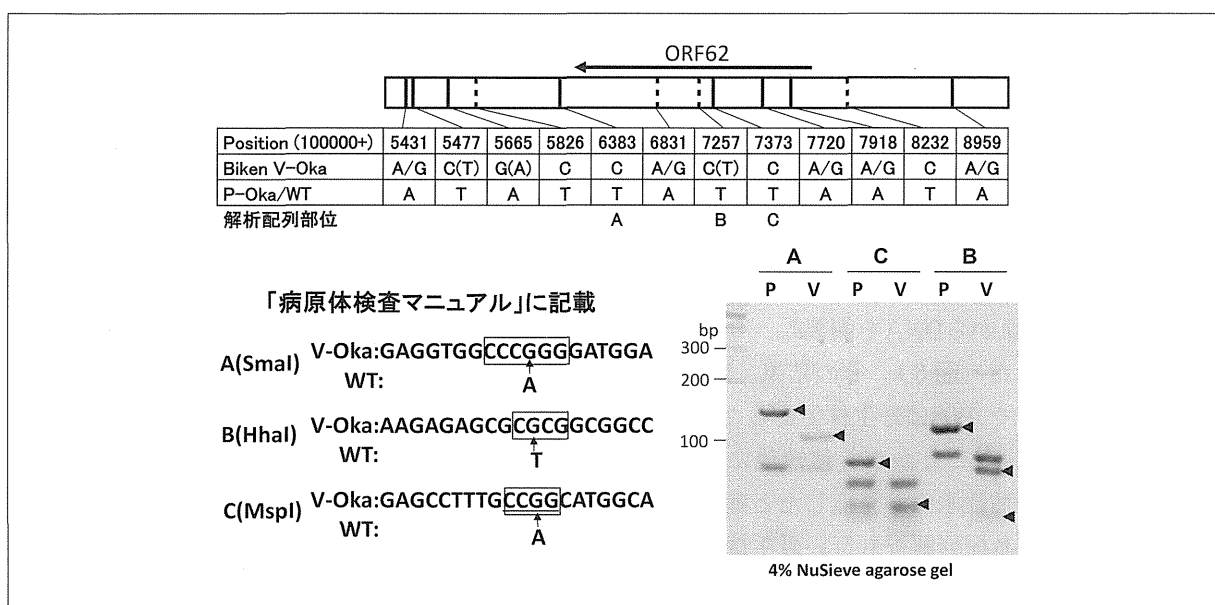


図4 病原体マニュアルに記載したRFLP法

残り3例は陽性が確認された。

2. ワクチン株と野生株をPCRのみで分別する方法の検討

水痘帯状疱疹ウイルスのゲノムは約15万塩基対より成り、ワクチン株とその親株の全塩基配列の比較から、1) 両株間での差異は42箇所の配列のみに過ぎないこと、2) いくつかの配列部位では親株とワクチン株配列の“混じり”が存在することが報告されている。100%がワクチン株の配列部位もある一方で野生型が混じっている配列部位もあることから、水痘ワクチンは、いわゆるmixed populationであることが知られている。我々はこれまでに蛍光エネルギー移動 (FRET) を応用したLightCyclerによるTm値解析法を用いて野生株

型塩基配列の混在を遺伝子レベルで定量化し、製剤の品質管理に利用できることを示してきた。しかし、定期接種化に伴って、ワクチン接種直後及び一定期間後に発症した水痘・帯状疱疹がワクチン株に由来するものであるのかどうかを明確にすることが求められる機会が増加すると思われる。こうしたニーズに対しては、多くの施設にTm解析法の実施を求めることは現実的ではない。そこで、感染研の「病原体検出マニュアル」には、200-300bp程度の短いPCR産物を制限酵素処理し、そのパターンによりワクチン株由来かを判別するRFLP法を記載し、簡便に判別できるようにしてきた(図4)。しかしながら、水疱内容液を用いれば、1回のPCRで十分なDNA産物を得ること

ができるが、髄液や血液検体では、ウイルス量が少なくnested PCRが必要となることもあり、現行のRFLP法では対応できない場合がある。そこで、nested PCRを実施する際に、ワクチン株と野生株で異なる配列を3'端にもつプライマーをデザインする工夫により、1st PCR産物の精製や制限酵素処理を行わなくてもPCRのみでワクチン株を同定できる方法を、ワクチン株 (V-Oka) とその親株 (P-Oka) を用いて、確立した (図5)。

実際の臨床材料で方法の検証を行った。用いた検体は、ワクチン接種者の帯状疱疹からの2次感染という極めて珍しい症例として過去に報告したI05の水疱内容液 (Otsuka et al., 2009), ワクチン接種歴があり、肝移植後に播種性水痘を発症したI06の血清、ワクチン接種6年後髄膜炎を伴う帯状疱疹を発症した例で、接種後3年目に弟の水痘に伴う曝露があった9歳の症例I08の髄液、そして野生株が明らかに感染した症例として、関節リウマチに伴いステロイド投与があり、重症汎発性帯状疱疹を発症し最終的に敗血症から死亡した84歳の症例B08の全血からDNAを調製し、今回確立した方法で解析した (図6)。その結果、I05は予想通りワクチン株で、B08は野生株であった。一方、I06は野生株であったことから、移植後に曝露した野生株に伴い播種性水痘が発症したと考えられた。念のために塩基配列解析も行い野生株であることが確認された。I08については、ワクチン株及び野生株の両者が混在している可能性があることが示された。しかし、塩基配列解析を行ったところ、野生株の配列であった。

D. 考察

1. 血清学検査について

検査センターで用いられる市販のELISAとVZV糖蛋白B (gB) 及びgE発現細胞を抗原とした方法と比較したところ、成人ボランティア血清では強い相関が見られたが、小児23例 (ワクチン接種17例を含む) では、相反する結果が何例かで見られ、IFAなど他の方法での検討から、少なくとも2例 (全体の約1割) が市販ELISAで偽陰性もしくは判定保留となっており、判定カットオフの設定や感度そのものの改善が必要である可能性があると思われた。また、ワクチン接種後ELISAで陰性の場合、抗体陽転率の決定などには、IFAなど追加の方法での確認を行い、正確な陽転率を求める必要があると思われる。

様々なVZV抗原を検討する中で、gE、gBが主要なVZV抗体の標的であることが明らかにする一方、gCに対して反応する血清は極わずかであり、欧州で「Line assay」としてコマーシャル化されているgCに対する抗体を指標にした自然感染とワクチン接種の分別は、方法として不可能である

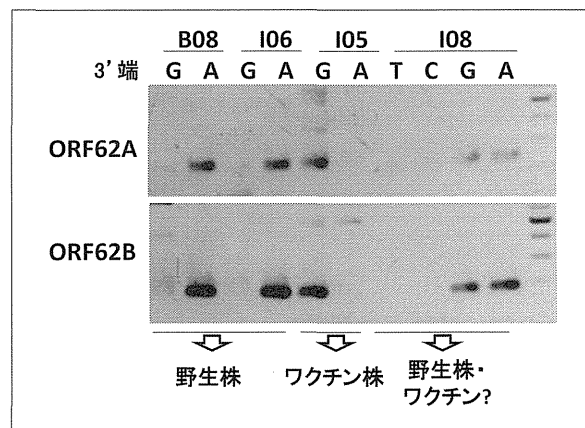


図6 臨床検体を用いた方法の検証

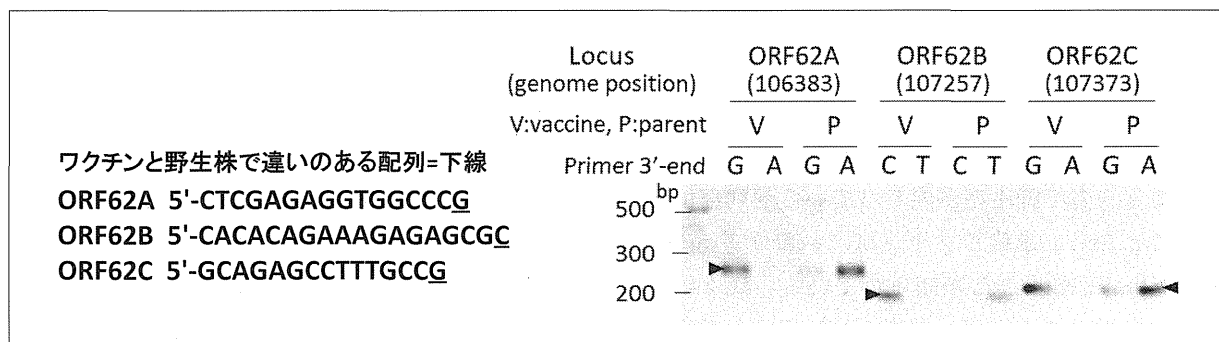


図5 プライマー3'端に特異配列を導入したNested PCR

とともに、そもそも抗原としても有用と思われな
いという結果を得た。

成人ボランティアでは、gBとgEを抗原として
用いることで血清学的検査として十分であったも
のが、小児では偽陰性のものが出てくることから、
これらの抗原に対する抗体形成に時間がかかる、
もしくは自然曝露によるブースターが必要である
などのことが考えられ、今後、方法の改良のため
に、その原因を調べていきたい。

2. ワクチン株と野生株の分別法について

「病原体検出マニュアル」に記載した方法の限
界である感度と煩雑さを、nested PCRプライマー
のデザインにより改善することができた。しかし、
問題点としては、nested PCR産物を電気泳動す
るため、PCR法の管理が不十分であると以後の検
査で偽陽性が発生する懸念がある。このことは、
nested PCRとした部分の反応をリアルタイム
PCRとして、電気泳動をしないようにすることで
解決するように方法を今後改良したい。今回の試
験法では、I08のようにワクチン株と野生株の混
じりが疑われる場合、塩基配列解析では少量の混
入で一方しか同定できないが、共に陽性となる可
能性があり、株の正確な同定に限界がある。こう
した際には、FRETによるTm値解析法を用いる、
ないしは新たな方法の考案が必要と思われた。

E. 結論

- 1) 水痘罹患歴のある成人では、現行のウイルス
感染細胞を抗原とする市販ELISAの代わり

に、糖蛋白E (gE) 及びgBを抗原として血
清学検査を行うことが可能である。

- 2) ワクチン接種小児では、市販ELISAで偽陰
性もしくは判定保留の中に陽性例があること
から、判定カットオフの設定や感度そのもの
の改善が必要であると思われる
- 3) 自然感染とワクチン接種の分別を、gCに対
する抗体を指標とする欧州のコマーシャル化
された方法は、gCに対する抗体陽性血清が
極めて少ないことから、非現実的である。
- 4) プライマー3'端にワクチン特異的配列を利
用したnested PCR法を用いることで、ワク
チン株と野生株の判別を簡便にできる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kakuta R, Okata U, Funakoshi T, Fujio Y, Inoue
N, Takahashi S, Amagai M, Ohyama M.
Unusually extensive disseminated herpes zoster
with multiple ulcer formation in a methotrexate-
treated rheumatoid arthritis patient. J
Dermatol 印刷中

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

組換え水痘ワクチンに関する研究

研究分担者：森 康子（神戸大学大学院医学研究科）

研究協力者：村上 宏起（神戸大学大学院医学研究科）

研究要旨 水痘ワクチンがコードするORF13に対する抗体の作製を試み、ORF13を認識する抗体を得ることができた。

A. 研究目的

我々はこれまでに、水痘ウイルス（VZV）をベクターとして、ムンプスウイルスの表面抗原であるFusion蛋白や、Hemagglutinin-Neuraminidase蛋白を発現させた組換え水痘ワクチンウイルスを作製してきた。それらのワクチンウイルスをモルモットに接種することで、VZVとムンプスウイルスの両方に対する中和抗体価が誘導されることを報告してきた。

組換え水痘ウイルスを作製に関して外来抗原遺伝子発現カセットを、VZVのORF13と置換している。このORF13を欠損させることによる組換えウイルスの増殖性や病原性への影響を確認するにあたり、VZV ORF13の解析が必要となる。そこで今回、その解析のためにORF13に対する抗体の作製を行った。

B. 研究方法

動物の免疫にもちいるVZV ORF13の発現プラスミドを細胞にトランスフェクションして、回収後、抗原蛋白質の精製を行った。その蛋白質をラビットに免疫して、抗VZV ORF13ラビット血清を得た。ラビット血清の解析を行った。

VZV ORF13抗体の作製

GST（グルタチオン-S-トランスフェラーゼ）融合VZV ORF13発現プラスミドを作製し、GST融合VZV ORF13を発現させた。精製したVZV ORF13タンパクを動物免疫用の抗原とした。

動物への免疫

精製したVZV ORF13をマウスとラビットへ免疫することにより抗体を作製した。

ウェスタンブロッティング

抗体のポジティブコントロールとして、VZV ワクチン株vOka感染細胞と、VZV ORF13を発現させた細胞をもちいた。また、ネガティブコントロールとして、通常の細胞と、ORF13欠損組換え水痘ウイルス感染細胞をもちいた。

（倫理面への配慮）

本実験は神戸大学医学研究科で行った。当該研究機関における承認済みの動物実験計画書に基づいて動物実験を行った。

組換えウイルス実験に関しては大臣確認および当該研究機関における遺伝子組換え安全委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

ウェスタンブロッティング

マウスハイブリドーマは、数種類のクローンを得ることが出来たが、ウェスタンブロッティングでバンドは検出されず、VZV ORF13と反応する抗体はマウスからは得られなかった（図1）。

ラビット血清では、VZV ORF13をもつvOka感染細胞（図2レーン3）と、ORF13を発現さ

せた293T細胞（図2レーン5）において、バンドが確認できた。また、ORF13を欠損させた組換え水痘ウイルス感染細胞（図2レーン2）ではバンドは確認できなかった。

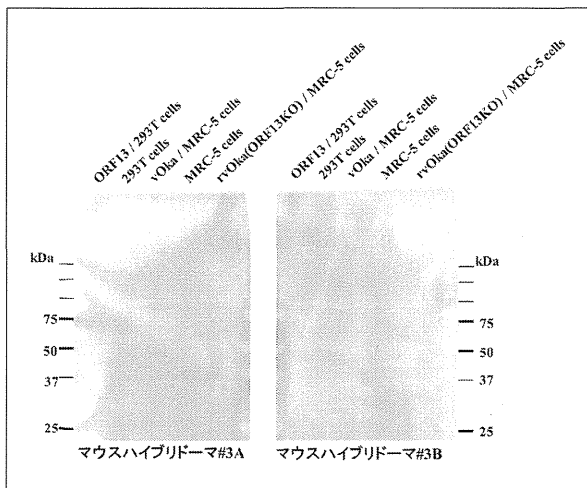


図1 ウェスタンブローティング-マウスハイブリドーマ
マウスハイブリドーマ培養上清を一次抗体として使用した。バンドは確認できなかった。

D. 考察

ウェスタンブローティングにおいて、VZV ORF13のバンドが確認でき、抗VZV ORF13ラビット血清を得ることが出来た。

今後は、本抗体を用いてORF13のさらなる機能解析を行う予定である。

E. 結論

今後は、本抗体を用いてORF13のさらなる機能解析を行う予定である。

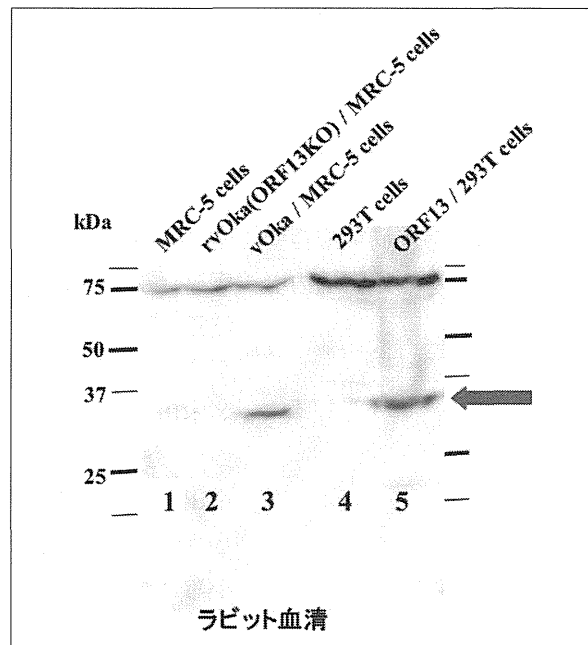


図2 ウェスタンブローティング-ラビット血清

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

ムンプスの国内サーベイランスネットワークの構築と国内流行状況の解析

研究分担者：木所 稔（国立感染症研究所ウイルス第三部第三室長）

研究協力者：庵原 俊昭（国立三重病院）

渡辺 正博（すずかこどもクリニック）

落合 仁（落合小児科医院）

名木田 章（水島中央病院小児科）

西村 秀一（仙台医療センター）

中田 歩（仙台市衛生研究所）

小森 はるみ（茨城県衛生研究所）

小倉 惇（千葉県衛生研究所）

横井 一（千葉市環境保健研究所）

佐野 貴子（神奈川県衛生研究所）

渡部 香（新潟県保健環境科学研究所）

児玉 洋江（石川県保健環境センター）

池ヶ谷 朝香（静岡県環境衛生科学研究所）

皆川 洋子（愛知県衛生研究所）

柴原 乃奈（静岡市環境保健研究所）

赤地 重宏（三重県保健環境研究所）

山田 香織（滋賀県衛生科学センター）

中田 恵子（大阪府立公衆衛生研究所）

秋吉 京子（神戸市環境保健研究所）

山本 美和子（広島市衛生研究所）

松本 一繁（高知県衛生研究所）

世戸 伸一（北九州市環境局環境科学研究所）

戸田 昌一（山口県環境保健センター）

清田 直子（熊本県保健環境科学研究所）

研究要旨 日本国内におけるムンプスウイルスの流行状況を把握するためのサーベイランスネットワークの構築をめざし、全国の地方衛生研究所をに協力を求めたところ、20ヶ所の衛生研究所の協力が得られた。その結果、95件のウイルス検出情報を集積できた。解析の結果、2013年の流行の主体は相変わらず遺伝子型 Gであったが、従来の西日本型（Gw）と東日本型（Ge）とが全国的に混在して流行しており、Gwが流行の69%を占めていた。

また、昨年度解析した分離株の中にワクチン株による2次感染が疑われる分離株3株が含まれていた。それらのゲノムを解析したところ、いずれの株においてもL遺伝子にのみアミノ酸変異が認められた。これらの変異は、通常のワクチン副反応例から分離されたウイルスでは認められなかった。

A. 研究目的

日本国内ではMMRワクチンの中止以降ムンプスワクチンの接種率が低迷し、おたふくかぜの流行はいまだに制御できていない。こうした現状を踏まえ、ムンプスワクチンの定期接種化の社会的ニーズが高まっている。

一方海外に目を向けると、日本以外の先進諸国においてはMMRワクチン2回接種の普及にもかかわらず、おたふくかぜのたび重なるアウトブレイクが問題となっている。

今後ワクチンの導入によっておたふくかぜ流行の制御を確実なものにするためには、ムンプスウイルスの国内における流行動態の把握、抗原性の解析、病原性発現機構の解明など、いくつかの解決すべき課題がある。なかでも、国内での流行動態を把握するための網羅的、経時的な分子疫学データの集積は、ワクチンの効果を的確に評価し行政上の施策に反映させる上で必須である。しかしながら、それを実現するための全国的なサーベイランスのネットワークシステムはいまだ無く、その構築は急務となっている。そこで我々はこの研究班において、地方衛生研究所や定点病院等の協力を仰ぎ、その基礎となるべき病院や地衛研と感染研とを繋ぐネットワークの構築し、それによってムンプスウイルスの国内流行状況の概要を把握することを目指す。

B. 研究方法

(1) 全国的なサーベイランスのネットワークシステムの構築

全国の地方衛生研究所の担当者に、研究の趣旨と協力を求めるメールを送付し、20ヶ所の地衛研から協力を得た。

(2) 分子系統学的解析

昨年度決定した全株と今年度地衛研から提供を受けた95株、および過去に感染研において解析した株のSH遺伝子領域の塩基配列を、2010年のWHO Mumps Nomenclature Update Meetingで新たに提案された遺伝子型標準株の塩基配列を基に、NJ法を用いて分子系統解析を行った。今回は、遺伝子型Gだけでなく、遺伝子型Bについても詳細な系統解析を行った。

(3) ワクチン株による2次感染疑い例由来分離ウイルスのゲノム解析

一連の系統解析の結果、遺伝子型Bの分離株の中にワクチン株（星野株、および鳥居株）と同一配列を持つ分離ウイルスが6株存在した。それらの中の4株について、由来する患者にワクチン履歴が無い3株（星野株由来2株、鳥居株由来1株）と、接種履歴があった1株（星野株由来）について、ダイレクトシーケンシングによって全ゲノム配列を決定し、元となるワクチン株のゲノム配列と比較した。

（倫理面への配慮）

本研究に用いる検体、および検体に関連する患者情報を収集するに当たっては、国立感染症研究所倫理審査委員会において、研究計画の内容に関する審査を受け、承認を得た上で行った。

C. 研究結果

(1) 全国的なサーベイランス網構築の試み

全国の地方衛生研究所にムンプスのサーベイランス情報を集積するために、情報の提供の協力を呼びかけたところ、20ヶ所の地衛研から協力を得ることができた。そこで、現時点で各地衛研に集められているムンプスウイルスの検出情報（塩基配列、および検体に係わる患者情報）2005年から2013年までの検出例95例を、感染研に提供して頂いた（図1、2）。

その内22株はワクチン株（ワクチン接種後の副反応例）であった。その他の分離株73例は1例を除いて遺伝子型Gであった。1例はA型であった。G型の内、西日本型（Gw）が50例、東日本型（Ge）は22例であった。今回集計した結果ではGwとGeの地理的分布に明確な違いは認められず、むしろ流行の仕方に経時的な違いが認められた。つまり、Gwは早い時期から検出されはじめ、特に2013年には全国的に流行の主流を占めている。一方、Geは2010,2011年に流行した後、2012年以降は流行が下火になっている傾向が見て取れる。

(2) 1986年から2013年までの国内流行株の解析と遺伝子型Bの詳細な系統解析

昨年度解析したムンプスウイルス分離株の情報に、新たに今年度地衛研から提供を受けた95株、および過去に感染研において収集した株のSH遺

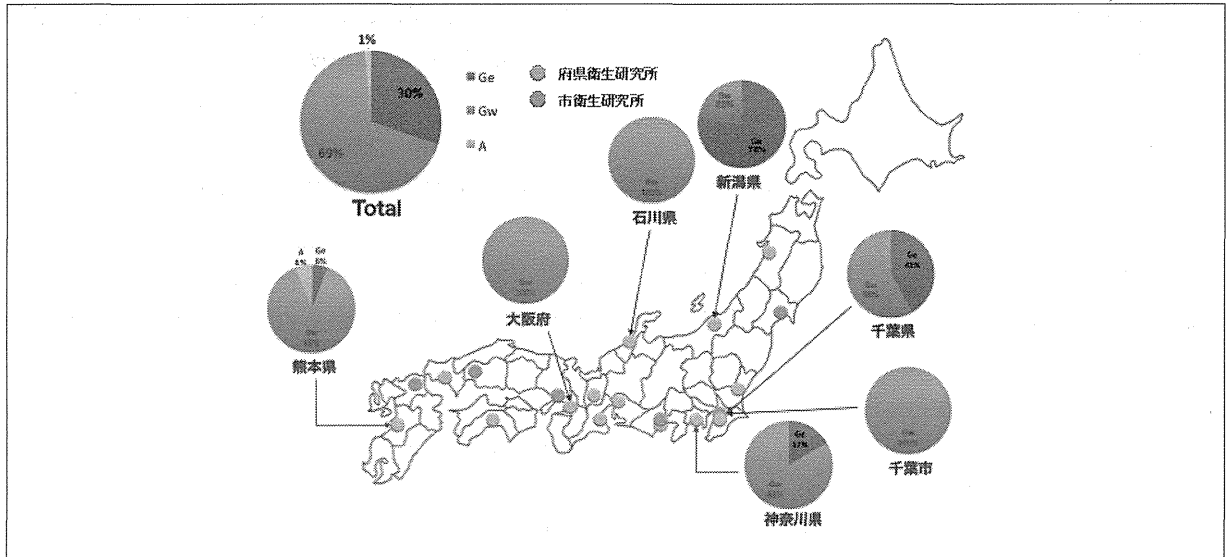


図1 今年度の協力地方衛生研究所と検出された遺伝子型

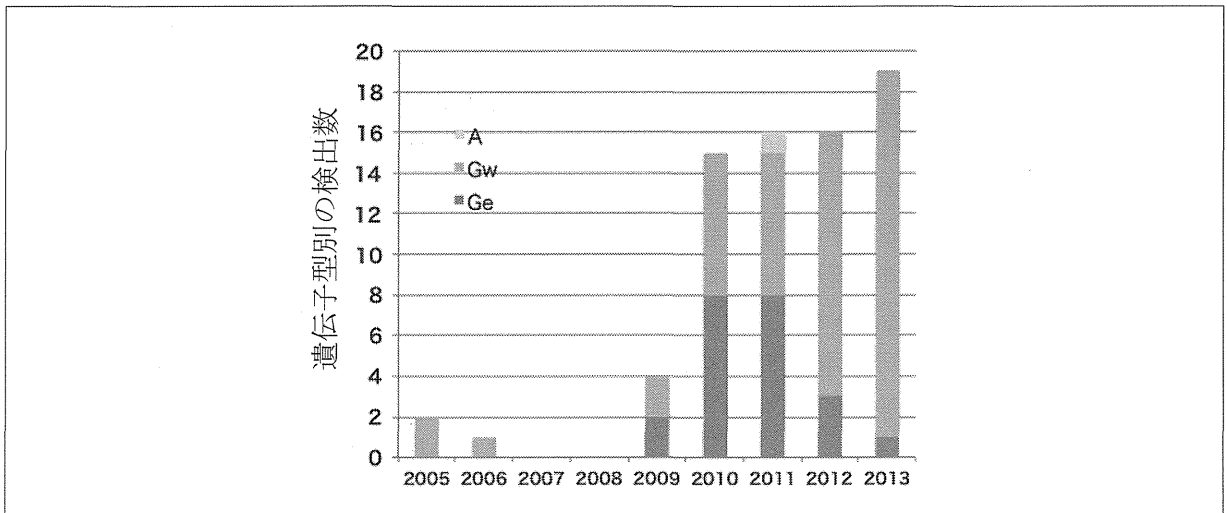


図2 地方衛生研究所で検出された遺伝子型の経時的変化

伝子領域の塩基配列を加えて解析し、1986年から現在までの流行株の変遷を再度概観した（図3）。また、今年度は遺伝子型Bについて、より詳細な解析を行った（図4）。

全体的な傾向は昨年度の解析と変わりはないが、遺伝子型Lは2002年にも検出されていた。また、最も古い遺伝子Gは1997年に検出されている。珍しい例としては、2000年にHが、2012年にはAが1例ずつ検出されている。

B型の系統関係をより詳細に解析してみると、大きく2つの系統に分類されることが判明した（図4）。一方のB1には占部株を除く国産ワクチン株が全て含まれるのに対し、今回解析した分離株は全てもう一方のB2に分類された。

また、野外株として分離されたはずのウイルスの中にワクチン株と同一の配列を持つものが5株含まれることが明らかとなった。これらの分離株はいずれも2000年以降に分離されており、B型の純粋な野外株は2002年以降は分離されていないことが判明した。これらのワクチン株の由来を知るために、検体を採取した患者のワクチン歴を調べた。

(3) ワクチン株による2次感染疑い例由来分離ウイルスのゲノム解析

遺伝子型B内での詳細な系統解析の結果、ワクチン株（星野株、および鳥居株）と同一配列を持つ分離ウイルス5株について、由来する患者のワクチン履歴を調べた（表1）。その結果、2株に

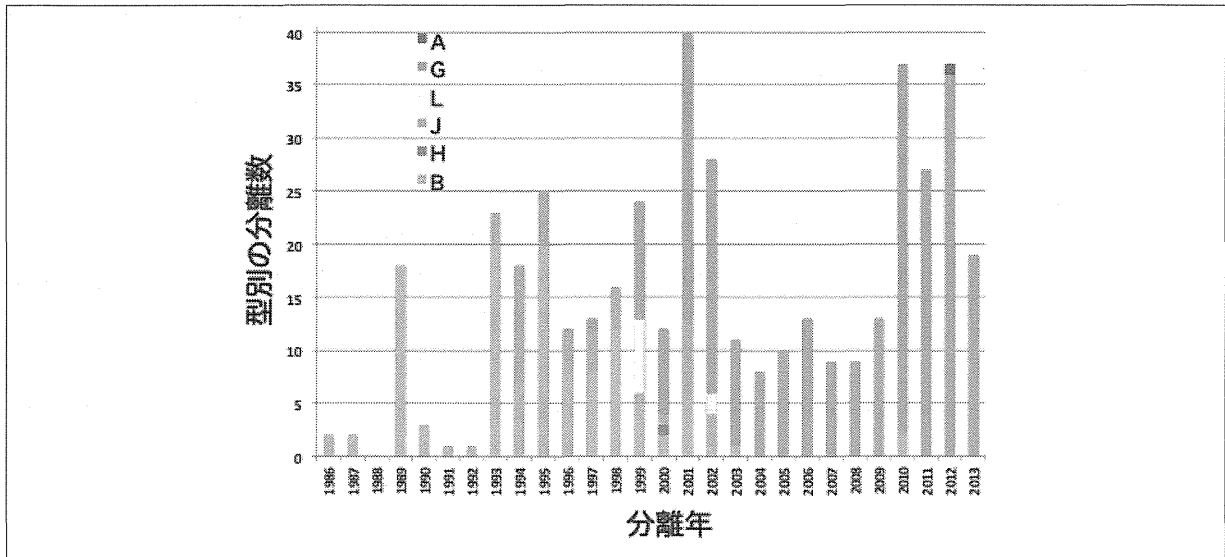


図3 ムンプスウイルス国内流行株の推移

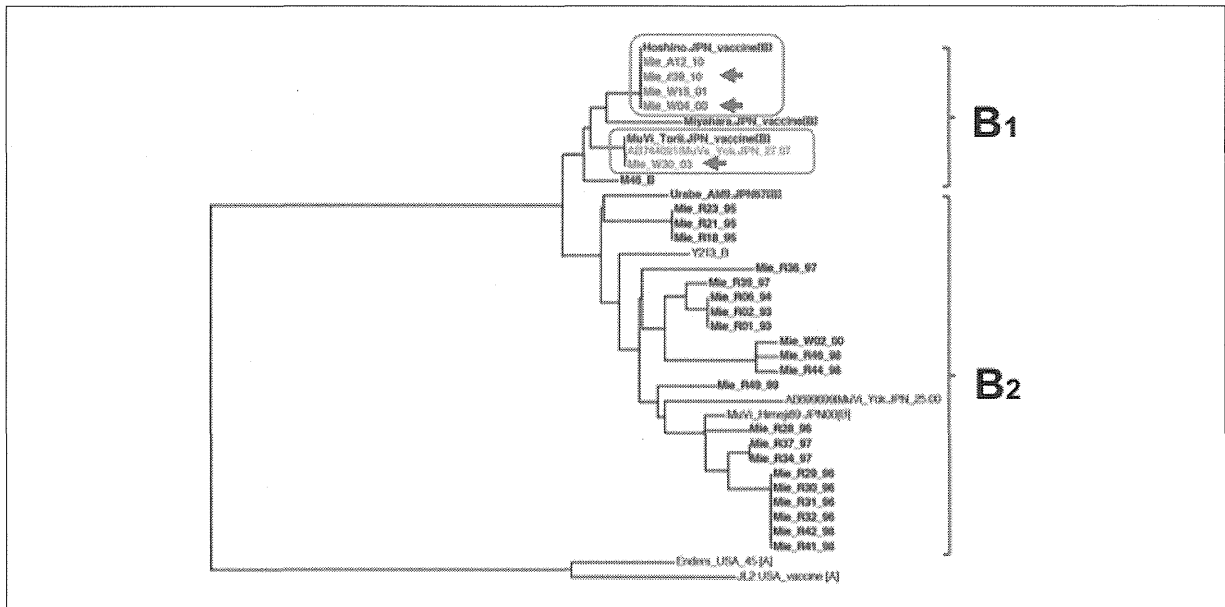


図4 遺伝子型Bのバリエーション
矢印はワクチンウイルスによる2次感染例

表1 ワクチン株由来分離株の検体情報

No.	年齢	発症日	結果	ワクチン接種歴	ムンプス流行	コメント
W4	6歳	2.25. 00	B(星野)	未接種	あり	CPEの形はワクチン株
W15	1歳	6.19. 01	B(星野)	H13.6.4	あり	
W30	5歳	8.12. 03	B(鳥居)	未接種	あり	保護者に確認済み
#39		H22.10.1	B(星野)	未接種	あり	保護者に確認済み
A12	2歳	H22.6.30	B(星野)	H22.6.12	あり	