

2013/8077A

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

ムンプスに関する重大なワクチンギャップを  
抜本的に解決するための研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者：木所 稔

平成 26(2014)年 3 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

ムンプスに関する重大なワクチンギャップを  
抜本的に解決するための研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者：木所 稔

平成 26(2014)年 3 月

## 目 次

### I. 総括研究報告書

- ムンプスに関する重大なワクチンギャップを抜本的に解決する  
ための研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1  
木所 稔

### II. 分担研究報告書

1. マーモセット感染モデルによるムンプスワクチンの  
安全性・有効性の解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 9  
木所 稔 他
2. ムンプスワクチン効果に関する臨床的検討・・・・・・・・・・ 17  
庵原 俊昭 他
3. ムンプスワクチン効果に関する基盤的研究・・・・・・・・・・ 25  
中山 哲夫
4. ムンプス特異的細胞性免疫ならびにサイトカイン変動  
の測定・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 30  
竹田 誠 他
5. ムンプスウイルス神経病原性の病理学的解析・・・・・・・・ 35  
長谷川 秀樹 他
6. ムンプスウイルス動物モデルに関する基盤的研究・・・・・・ 39  
網 康至 他
7. 新規ワクチン開発のための基盤的研究・・・・・・・・・・・・ 43  
加藤 大志

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・ 47

### IV. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 49

# I. 総括研究報告書

## ムンプスに関する重大なワクチンギャップを抜本的に解決するための研究

研究代表者：木所 稔（国立感染症研究所ウイルス第三部第三室 室長）

### 研究要旨

我々は、短期間で確実に安全で有効なワクチンプログラムを実現するため、既存のワクチン（Jeryl Lynn 株（以下 JL 株）と国産ワクチン株）の長所生かした相互補完的免疫プログラム（JL 株で基礎免疫を行い、国産ワクチン株で追加免疫を行う）の確立をめざす。その評価のためにマーモセットを用いた動物モデルの確立を検討する。同時に、リバースジェネティクス等の最新の技術や、臨床的研究からの情報に基づいた新規ワクチンの開発も併せて検討する。

コモンマーモセットはムンプスウイルスに対する感受性が高く、優れたモデル動物である。今年度は基礎実験として、マーモセットにおけるムンプスワクチンの適正な接種用量を決定し、併せて副反応の指標となるバイオマーカーの検索を行った。JL 株を 3 通りの接種用量（12, 68, 650 PFU/頭）で免疫したところ、最低用量接種群でもワクチンウイルスによるウイルス血症が観察され、中用量（68 PFU/頭）以上の接種用量群で中和抗体が陽転し、マーモセットの感受性の高さが確認された。誘導された中和抗体価は用量依存的であり、抗体価の推移から 68PFU が接種用量として適当と判断された。ワクチン接種前後の体温、活動性、体重、血中アミラーゼの変化を連続的にモニターしたところ、いずれの接種群においても、目立った変化は認められなかった。また、臨床症状を呈することも無なかった。白血球数、リンパ球数にも変動は認められなかった。しかし、一部の個体で、接種後 1～2 週に血中 LDH 値が上昇したことから、コモンマーモセット感染における一つのバイオマーカーになりうることが示唆された。

国産ムンプスワクチン株は JL 株と比べて、免疫原性は優れているが安全性に懸念が持たれている。今回の検討で国産ムンプスワクチン株は、接種率が高くなると高い流行抑制効果を示し、優れた免疫原性があることを確認した。また、自然ムンプスでは発症時の年齢が高くなるにつれ無菌性髄膜炎を合併するリスクが高くなり、ワクチン後の無菌性髄膜炎も接種時の年齢が高いほど発症リスクが高率になると推定された。ワクチン後の耳下腺腫脹の検討では、接種時の年齢が高くなるにつれ耳下腺腫脹率が有意に上昇していた。以上の結果から、国産ワクチン株は 1 回接種でも優れた免疫原性を有しており、ムンプスワクチン後の髄膜炎合併率を減らすためには、耳下腺腫脹を合併する頻度が低く、無菌性髄膜炎発症リスクが低いと推定される 1 歳が適切な接種時と判断された。

ムンプス生ワクチンは免疫原性と安全性の受容幅が狭く、古典的方法での開発は困難と考えられる。そこで、新規生ワクチンの発想として、既に有効性と安全性が担保されている麻疹ワクチン AIK-C 株をベクターとして使用する事を検討した。AIK-C 株ゲノム上の P/M junction にムンプスウイルスの HN, F 遺伝子翻訳領域を導入し感染性ウイルスを回収した。回収したウイルスの感染細胞に HN, F タンパク質発現を確認した。培養上清からショ糖密度勾配超遠心法によりウイルス粒子を精製し麻疹ウイルス粒子画分にムンプスウイルスタンパク質は検出されず、麻疹ウイルス粒子内にはムンプスタンパク質は組込まれておらず、AIK-C 株の宿主細胞への指向性を変化させる可能性が無

い事が明らかになった。

本分担研究班では、マーモセットの細胞性免疫の評価系、ならびにマーモセットのサイトカイン変動の解析法を開発し、最終的には、国産ワクチン株と JL 株との免疫原性の違いを明らかにするとともに、最も有効なワクチン接種プログラム（例えば一回目の接種を JL 株、二回目の接種を国産ワクチン株など）の確立に役立てる。本年度の検討の結果、細胞性免疫の解析については、（1）刺激抗原を JL 株の全粒子とし、サンドイッチ ELISA 法（U-CyTec biosciences 社の CytoMax ELISA キットを用いる）を用いて末梢血単核球から分泌される IFN- $\gamma$  を測定すること、（2）Fujii らの手法（PLoS One 2013, 8:e56296）による RT-PCR 法にて、末梢血単核球中の各種サイトカイン遺伝子の発現変動を測定すること、（3）フローサイトメトリーにて末梢血中のリンパ球サブセットの変動を測定することを決定した。

今年度は、動物モデルとして使用している霊長類と齧歯類の神経細胞を分類するため、ホルマリン固定パラフィン包埋切片における神経細胞マーカーの有用性について免疫組織化学法を用いて検討した。その結果、カニクイザルとマーモセットの脳組織標本において神経細胞、神経幹細胞、各種のグリア細胞と上皮細胞を分類することが可能な抗体を選出することができた。

現行ワクチン株の問題解決策の一つとして、MuV の神経病原性発現機構を明らかにし、その分子メカニズムに基づいた弱毒候補株を遺伝子組換えによって作出することを考案した。本研究ではそのために必要な MuV の遺伝子操作系の確立を行った。MuV の神経病原株である Odate 株の全ゲノムをクローニングし、ヘルパープラスミドと共に細胞に導入することで、組換え MuV (rOdate) を作出した。rOdate はラットの脳内において親株である Odate 株と同等の増殖能を示し、さらにラットに対して高い神経病原性を示した。

#### 研究分担者：

- ・ 庵原俊昭（国立病院機構三重病院 院長）
- ・ 中山哲夫（北里生命科学研究所 所長）
- ・ 竹田 誠（国立感染症研究所ウイルス第三部 部長）
- ・ 長谷川 秀樹（国立感染症研究所感染病理部 部長）
- ・ 網 康至（国立感染症研究所動物管理室 主任研究官）
- ・ 加藤大志（国立感染症研究所ウイルス第三部 研究員）

#### A. 研究目的

MMRによる2回接種が定期接種されている他の先進諸国とは異なり、我が国ではおたふくかぜ(以下ムンプス)ワクチ

ンの接種率が低迷しているため、ムンプスの流行はいまだに制御されていない。現在、難聴等の合併症への懸念から、我が国においてもムンプスワクチンの定期接種化が強く求められている。しかし、国産ワクチンは、有効性が高い反面、副反応としての無菌性髄膜炎発生率の高い点が懸念されている。一方、世界中で用いられている Jeryl-Lynn 株（以下 JL 株）は安全性が高い反面、2回接種が定着している国々においてアウトブレイクが止まらないことから有効性が疑問視されている。安全性と有効性を両立した新規ワクチンが望まれるが、過弱毒化しやすいムンプスウイルスの特性故にその開発は困難であり、加えてその評価のためには無菌性髄膜炎を想定した大規模な臨床試験

が必要となる。

そこで我々は、既存のワクチン（JL株と国産ワクチン株）の長所生かして相互補完的に利用する（JL株で基礎免疫を行い、追加免疫を国産ワクチン株で行う）ことによって、短期間で確実に、安全で有効なワクチンプログラムの確立をめざす。併せて、その評価のためにマーモセットを用いた動物モデルの確立を検討すると共に、リバーシジェネティクス等の最新の技術や、臨床的研究からの情報に基づいた新規ワクチンの開発を検討する。

## B. 研究方法

本研究班は研究代表者1名と臨床および基礎の研究者6名の分担研究者から構成されており、「ムンプスに関する重大なワクチンギャップを抜本的に解決するための研究」について、多角的に研究を行っている。

### （倫理面への配慮）

本研究において国立感染症研究所における動物実験は、国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得て行った。

ムンプスワクチン後に耳下腺腫脹を認めた症例からの唾液の採取、ムンプスワクチン後の髄膜炎症例からの髄液の採取は、保護者の同意を得てから行った。発表に当たっては、氏名が同定されないよう配慮した。

## C. 研究結果

### （1）研究代表者：木所 稔 他

マーモセットにおけるムンプスワクチンウイルスの適正な接種用量を決定する

こと、および、接種に伴う副反応の指標となるバイオマーカーの検索を行った。Jeryl Lynn株を3通りの接種用量（12, 68, 650 PFU/頭）で免疫したところ、最低用量接種群でもワクチンウイルスによる viremia が観察され、中和抗体も 68 PFU 以上の接種群で陽転し、改めてマーモセットのムンプスウイルスに対する感受性の高さが確認された。誘導された中和抗体価は用量依存的であり、抗体価の推移から 68PFU が接種用量として適当と判断された。ワクチン接種前後の体温と活動性の変化を連続的にモニターしたところ、いずれの接種群においても、目立った変化は認められなかった。

### （2）研究分担者：庵原 俊昭 他

今回の検討で本邦のムンプスワクチン株は、接種率が高くなると高い流行抑制効果を示し、優れた免疫原性があることを確認した。また、自然ムンプスでは発症時の年齢が高くなるにつれ無菌性髄膜炎を合併するリスクが高くなり、ワクチン後の無菌性髄膜炎も接種時の年齢が高いほど発症リスクが高率になると推定された。ワクチン後の耳下腺腫脹の検討では、接種時の年齢が高くなるにつれ耳下腺腫脹率が有意に上昇していた。以上の結果から、本邦のワクチン株は1回接種でも優れた免疫原性を有しており、ムンプスワクチン後の髄膜炎合併率を減らすためには、耳下腺腫脹を合併する頻度が低く、無菌性髄膜炎発症リスクが低いと推定される1歳が適切な接種時と判断された。

### （3）研究分担者：中山 哲夫

新規生ワクチンの発想として、既に有

効性と安全性が担保されている麻疹ワクチン AIK-C を生ワクチンウイルスベクターとして使用する事を検討した。全長遺伝子の P/M junction にムンプスウイルスの HN, F 遺伝子翻訳領域を導入し感染性ウイルスを回収した。回収したウイルスの感染細胞に HN, F タンパク質発現を確認した。培養上清からショ糖密度勾配超速心法によりウイルス粒子を精製し麻疹ウイルスのバンドの部分にムンプスウイルスタンパク質は検出されず麻疹ウイルス粒子には挿入したムンプスタンパク質は組込まれていない事が明らかになった。

(4) 研究分担者：竹田 誠 他

本分担研究班では、マーモセットの細胞性免疫の評価系、ならびにマーモセットのサイトカイン変動の解析法を開発し、最終的には、国産ワクチン株と JL 株との免疫原性の違いを明らかにするとともに、最も有効なワクチン接種プログラム（例えば一回目の接種を JL 株、二回目の接種を国産ワクチン株など）の確立に役立てる。本年度の検討の結果、細胞性免疫の解析については、(1) 刺激抗原を JL 株の全粒子とし、サンドイッチ ELISA 法 (U-CyTec biosciences 社の CytoMax ELISA キットを用いる) を用いて末梢血単核球から分泌される IFN- $\gamma$  を測定すること、(2) Fujii らの手法 (PLoS One 2013, 8:e56296) による RT-PCR 法にて、末梢血単核球中の各種サイトカイン遺伝子の発現変動を測定すること、(3) フローサイトメトリーにて末梢血中のリンパ球サブセットの変動を測定することを決定した。

(5) 研究分担者：長谷川 秀樹 他

今年度は、動物モデルとして使用している霊長類と齧歯類の神経細胞を分類するため、ホルマリン固定パラフィン包埋切片における神経細胞マーカーの有用性について免疫組織化学法を用いて検討した。その結果、カニクイザルとマーモセットの脳組織標本において神経細胞、神経幹細胞、各種のグリア細胞と上皮細胞を分類することが可能な抗体を選出することができた。

(6) 研究分担者：網 康至 他

ムンプスウイルスに対して高感受性の実験動物であるコモンマーモセットにワクチン株である Jeryl Lynn 株を 12~650PFU 接種し、その病態について臨床血液学的に解析を行った。接種した全ての個体は、臨床症状を呈すること無く、白血球数、リンパ球数に変動は認められなかった。一部の個体で、接種後 1~2 週に血中 LDH の上昇が観察された。これは、副反応としての髄膜炎の発症率が極めて低いワクチン株の、コモンマーモセットへの感染における一つの性状であると考えられる。

(7) 研究分担者：加藤 大志 他

現行の国産おたふくかぜ生ワクチンに起こる無菌性髄膜炎の問題の解決策の一つとして、原因ウイルスであるムンプスウイルス (MuV) の神経病原性発現機構を明らかにし、その分子メカニズムに基づいた弱毒候補株を遺伝子組換えによって作出することを考案した。本研究ではそのために必要な MuV の遺伝子操作系の確立を行った。MuV の神経病原株である Odate 株の全ゲノムをクローニングし、ヘルパープラスミドと共に細胞に導入す

ることで、組換え MuV rOdate を作出した。rOdate はラットの脳内において親株である Odate 株と同等な増殖を示し、さらに感染ラットに対して神経病原性を示した。

#### D. 考察

本研究班は、JL 株と国産ワクチン株とを相互補完的に用いるワクチンプログラムの導入を目的としている。その評価系としてムンプスウイルスに感受性の高いコモンマーモセットを用いる。平成 25 年度はその基礎研究として、マーモセットにおけるワクチン株の適正免疫用量を検討した結果、ヒトの臨床試験での抗体応答に近い 68 PFU/頭が初期免疫用量として適正であると判断された。この結果から、マーモセットのムンプスウイルスに対する感受性がヒト以上に高いことが示唆された。併せて、ワクチン接種による副反応のバイオマーカーとして、体重、体温、活動性の変化に着目したが、接種に関連した変化は認められなかった。これは JL 株が非常に安全性の高い株であるためと考えられる。

国産ムンプスワクチン株は JL 株に比べて、無菌性髄膜炎の発症率が高い点が問題となっているが、本研究での流行抑制効果に関する検討では、接種率が 80% 程度に維持されると、ムンプスの流行規模は 85.7% 減少していた。また、公費助成により接種率が高くなった市では、任意接種でムンプスワクチンを接種している近隣の市よりもムンプス発症者数が有意に減少していた。以上の結果から、集団免疫の面からも本邦ムンプスワクチン

株は有効性が高いワクチンであることが確認された。また、今回のムンプス髄膜炎の年齢による発症リスクの検討では、年齢が高くなるにつれ無菌性髄膜炎の発症リスクが上昇していた。この結果から、ムンプスでは主症状である耳下腺腫脹だけではなく、合併症である髄膜炎も年齢が高くなるにつれ発症リスクが高くなることが示された。ムンプスワクチン後の無菌性髄膜炎例の発症リスクは、2-3 歳群を 1 としたとき、4-6 歳群で 2.08、7-10 歳では 19.28 となり、自然感染、ワクチン接種後のいずれにおいても、年齢が高くなるにつれ無菌性髄膜炎を合併しやすく、無菌性髄膜炎を合併したほとんどの症例は耳下腺腫脹を伴うことが示された。ワクチン接種後の耳下腺腫脹率も年齢と共に上昇することから、1 歳でムンプスワクチンを接種すれば、ワクチンによる耳下腺腫脹と無菌性髄膜炎の合併リスクも減少すると推察された。

安全性の高い麻疹ワクチン株 AIK-C にムンプスウイルスの HN および F 遺伝子を組み込んだ組換えワクチンを作製した。組み込んだムンプスウイルスタンパク質により、麻疹ウイルスの細胞指向性に変化が生じるリスクを評価するため、精製した組換えウイルス粒子上のムンプス蛋白質を調べたが、HN も F タンパク質も検出されず、麻疹ワクチンウイルスの細胞指向性に影響がないことが示唆された。

ムンプスウイルス神経病原性を解析する上で必要な、非ヒト霊長類と齧歯類の神経細胞マーカーの選択を行った結果、神経細胞、神経幹細胞、各種のグリア細胞

胞と上皮細胞を分類することが可能な抗体が明らかとなった。

安全性の高い JL 株を皮下接種したコモンマーモセット個体について臨床血液学的解析を行ったところ、全ての個体でウイルス血症が認められたにもかかわらず、リンパ球減少を生じなかった。これはワクチン株の弱毒性を示唆している。一方、2 個体において血中 LDH の上昇が認められたが、アミラーゼ上昇が認められなかったことから、局所リンパ節におけるウイルス増殖の比較的高い個体で、血中の LDH 上昇を示したものと考えられる。今回得られた結果は、コモンマーモセットを用いたムンプスウイルスの病原性評価の基礎となると考えられる。

本研究において野外強毒株 Odate 株の遺伝子操作系を確立した。作出された組換え rOdate 株の NVT スコアは親株である Odate 株に比べて、若干低いものであったが、これまでに報告されている非神経病原株に比べて高いものであった。さらに、ラットの脳内における増殖能も Odate 株とほぼ同等であることから、rOdate は Odate 株の神経病原性を保持しており、MuV の神経病原性を評価することが可能な遺伝子操作系であると考えられた。

## E. 結論

中和抗体応答から、マーモセットにおけるワクチン株の適正免疫用量は 68 PFU/頭であり、これはマーモセットのムンプスウイルスに対する感受性の高さを示すものであり、ムンプス感染モデルとしての有用性を示している。また、JL 株

接種後においては体重、体温、活動性に関連する変化は認められなかった。

本邦のムンプスワクチン株は、接種率が高くなると高い流行抑制効果が認められた。また、自然ムンプスでは発症時の年齢が高くなるにつれ無菌性髄膜炎を合併するリスクが高く、ワクチン後の無菌性髄膜炎も接種時の年齢が高いほど発症率が高い傾向があり、すべて耳下腺腫脹を合併していた。耳下腺腫脹もワクチン接種時の年齢が高くなるにつれ、有意に上昇した。以上の結果から、ムンプスワクチン後の髄膜炎合併を減らすためには、1歳で接種することが効果的と判断された。

新規ワクチン開発のために、ムンプスウイルス HN, F タンパク質を発現する組換え麻疹ワクチン株を作成した。ムンプスウイルスタンパク質は組換えウイルス粒子には取り込まれていない事を確認した。

ホルマリン固定パラフィン包埋切片におけるカニクイザルとマーモセットの脳組織標本において免疫組織化学法を用いて神経細胞マーカーの有用性について検討したところ、神経細胞、神経幹細胞、各種のグリア細胞と上皮細胞を分類することが可能な抗体を選出した。

コモンマーモセットに JL 株に接種用量を変えて接種した時、臨床症状を呈すること無く、白血球数、リンパ球数に変動は認められなかったが、接種用量により接種後 1～2 週に、個体により血中 LDH の上昇が観察された。これは、副反応としての髄膜炎の発症率が極めて低いワクチン株の性状であると考えられる。

本研究において MuV の神経病原性を評価できる遺伝子操作系を確立することが

できた。今後MuVの神経病原発現機構を明らかにし、より安全なおたふくかぜワクチンの開発を行う上でこのMuV遺伝子操作系は有用なツールになると期待される。

#### F. 健康危害情報

なし

#### G. 研究発表

論文発表および学会発表については各分担報告書に記載。

#### H. 知的財産の出願・登録状況

特記事項なし。

## Ⅱ. 分担研究報告書

## マーモセット感染モデルによるムンプスワクチンの安全性・有効性の解析

研究代表者：木所 稔（国立感染症研究所 ウイルス第三部 室長）  
研究協力者：網 康至（国立感染症研究所 動物管理室）  
須崎 百合子（国立感染症研究所 動物管理室）  
加藤 大志（国立感染症研究所 ウイルス第三部）  
青木 なつ子（国立感染症研究所 ウイルス第三部）

**研究要旨** 新たなワクチンプログラムの確立のためには優れた動物モデルが不可欠である。我々は過去の研究において、コモンマーモセットがムンプスウイルスに対する感受性が高く、優れたモデル動物であることを明らかにした。今年度は基礎実験として、マーモセットにおけるムンプスワクチンウイルスの適正な接種用量を決定すること、および、接種に伴う副反応の指標となるバイオマーカーの検索を行った。Jeryl Lynn 株を3通りの接種用量（12, 68, 650 PFU/頭）で免疫したところ、最低用量接種群でもワクチンウイルスによる viremia が観察され、中和抗体も 68 PFU 以上の接種群で陽転し、改めてマーモセットのムンプスウイルスに対する感受性の高さが確認された。誘導された中和抗体価は用量依存的であり、抗体価の推移から 68PFU が接種用量として適当と判断された。ワクチン接種前後の体温と活動性の変化を連続的にモニターしたところ、いずれの接種群においても、目立った変化は認められなかった。

### A. 研究目的

おたふくかぜ(以下ムンプス)ワクチンは現在最も定期接種化が求められているワクチンの一つである。しかし、国産ムンプスワクチンにおいては、副反応としての無菌性髄膜炎がワクチン普及の足かせとなっており、一方、世界中で最も広く用いられている Jeryl-Lynn 株(以下 JL 株)は安全性が高い反面、この株を含む MMR ワクチンの2回接種が定期接種化されて久しい欧米諸国においては、たび重なるムンプスのアウトブレイクを抑制できないことから、その有効性が疑問視

されている。新規ワクチンの開発が望まれるが、過弱毒しやすいというムンプスウイルスの特性故にムンプスワクチン開発の歴史は失敗の連続であり、加えてその評価には無菌性髄膜炎発症を想定した大規模な臨床試験が求められ、容易ではない。

そこで我々は、既存のワクチン(JL 株と国産ワクチン株)を相互補完的に組み合わせる(JL 株で基礎免疫を行い、追加免疫を国産ワクチン株で行う)ことによって、現実的かつ確実な方法で、安全で有効なワクチンプログラムの確立

をめざす。併せて、その評価のための動物モデルの確立と最新の技術や情報に基づいた新規ワクチンの開発を検討する。

新たなワクチンプログラムの評価には優れた動物モデルが必須である。我々は、コモンマーモセットがムンプスウイルスに対する感受性が高く、ヒトでの感染病態を再現できるのみならず、免疫応答においても高い感受性を示すことを過去の研究で明らかにしている。

今年度は基礎実験として、マーモセットにおけるJL株の接種ドースを決定すること、および、接種に伴う副反応の指標となるバイオマーカーの検索を行った。

## B. 研究方法

### 1) マーモセット接種実験

約1歳齢、♂のコモンマーモセット (Callithrix jacchus) (日本クレア) (EDM:C.Marmoset(Jic)) 6頭を麻酔下で開腹し、体温測定用発信プローブTA10TA-F40 (プライムテック) を腹腔内に挿入したのち縫合し、1週間の馴化期間を置いた。その後、Jeryl Lynn株を、12 PFU (動物番号 5178、5180)、68 PFU (動物番号 5179、5182)、650 PFU (動物番号 5181、5183) をそれぞれ2頭ずつに皮下接種した (表1)。接種したJL株の接種用量は、接種後のバックタイトレーションによって確定した。接種後、体温と活動性のリアルタイム測定、体重測定と臨床観察を行うとともに、麻酔下で経時的に大腿静脈より採血を行った。EDTA処理血液から血漿と末梢血リンパ球を分離し、中和抗体価とワクチンウイルスのゲノムコピー数を測定した。

### 2) リアルタイムPCR

EDTA処理血液から血漿を分離した後、RNeasy Blood Mini Kit (QIAGEN)を用いて、末梢血リンパ球の総RNAを抽出した。

PrimeScript RT reagent Kit(TaKaRa)を用いて、総RNAからランダム6merによりcDNAを合成し、リアルタイムPCR用に供した。リアルタイムPCRによるワクチンウイルスゲノム数測定は、ムンプスウイルスNP遺伝子1,398nt-1,455nt領域を標的として、Universal ProbeLibrary #62 (Roche)、LightCycler480 Probes Master 試薬 (Roche) と LightCycler 480 システム (Roche) を用いて行った。

### 3) 補体添加中和法

非働化処理したマーモセット血漿を、1%トレハロース、0.2%ゼラチン、2%FCSを含むイーグルMEMで4<sup>1</sup>から4<sup>4</sup>倍まで段階希釈し、そこに血清の半分量のムンプスウイルス液(野外分離株Y01,遺伝子型G)と半分量の100希釈したモルモット補体(デンカ生研)を加え、十分に混和した。37°Cで2時間インキュベーションした後、24ウェルプレートに培養したVero細胞に接種し、37°Cで1時間吸着させ、0.5%アガロースを含むイーグル培地を重層し、4日間培養した。そこにニュートラルレッドを含むイーグル培地を重層し、細胞を染色した後、グルタルアルデヒドで細胞を固定し、プラーク数をカウントした。中和抗体価は、プラーク数を50%減じる血清の希釈倍率として算出した。

### (倫理面の配慮)

本実験は、国立感染症研究所動物実験

委員会の承認を得て行った。

## C. 研究結果

### 1) マーモセットにおけるワクチン接種後の体温、活動性のリアルタイム測定

ワクチンウイルスによる副反応のバイオマーカーを検索する目的から、体重の変化に加え（図 1）、マーモセットの腹腔内に体温測定用発信プローブを埋め込み、リアルタイムで体温と活動性を測定することにより、ワクチン接種後の体温と活動性の変化を測定した（図 2）。体温はいずれの個体においても規則的な日周期変動を示したが、ワクチン接種が原因と思われる体温の上昇などの変化は認められなかった。また、活動性についても、ワクチン接種に関連する変化は認められなかった（図 2）。

体重に関しても、接種後はいずれの個体においても増加が認められ、接種による影響は認められなかった（図 1）。

### 2) リアルタイム PCR によるワクチンウイルスのウイルス血症の測定

接種後のワクチンウイルスの感染動態を評価するため、経時的に採取した末梢 PBL に含まれるワクチンウイルスゲノム量をリアルタイム PCR で測定した（図 3）。

ウイルスゲノムはいずれの個体においても接種後 2 週目から検出され、高用量（650 PFU/頭）と中用量（68 PFU/頭）を接種した個体 3 頭では少なくとも 4 週目までウイルスゲノムが検出された。また、低用量（12PFU/頭）接種群においても接種後 2 週目にゲノムが検出されたことから、ごく僅かなウイルス量でもワクチン

ンウイルスがマーモセットの体内で増殖していることが確認され、改めてマーモセットのムンプスウイルスに対する感受性の高さが証明された。

### 3) 中和抗体価の誘導

今回の実験の主目的は初回免疫における適正な接種用量を決めることにある。そこで、3 種類の接種用量（それぞれ 12, 68, 650 PFU/頭）で誘導される抗体を、ムンプスワクチンの臨床試験で広く用いられている補体添加中和法で測定した（図 4）。その結果、誘導された中和抗体価は用量依存的であり、高用量接種群で最も高く（接種後 12 週で平均  $4^{4.0}$ ）、中用量接種群はより低い抗体価（同、平均  $4^{1.8}$ ）であった。また、低用量接種群ではいずれの個体でも中和抗体は検出されなかった。同様の傾向は ELISA 法による測定でも認められ、ELISA 抗体価でも用量依存的な抗体応答が確認された。また、低用量接種群では ELISA 法でも抗体は検出されなかった（データ非掲載）。

ヒトの臨床試験のデータではワクチン株で誘導される平均抗体価が  $4^{2.0}$  程度であることから、初期免疫に用いる用量としては、中用量（68 PFU/頭）が適正であると考えられた。この結果からも、マーモセットがムンプスウイルスに対して感受性が高いことをうかがい知ることができる。

## D. 考察

我々の研究班は、JL 株と国産ワクチン株とを相互補完的に用いるワクチンプログラムの導入を目的としており、その評価系としてムンプスウイルスに感受性の高いコモンマーモセットを用いる。平成

25年度はその基礎研究として、マーモセットにおけるワクチン株の適正免疫用量を検討した。併せて、ワクチン接種による副反応のバイオマーカーの検索も試みた。

今回用いた3用量（12, 68, 650 PFU/頭）の中では、ヒトの臨床試験での抗体応答に近い68 PFU/頭が初期免疫用量として適正であると判断された。ヒトでのJL株の接種用量が5,000~10,000 PFUであることから考えて、マーモセットのムンプスウイルスに対する感受性がヒト以上に高いことが示唆された。抗体応答は認められなかったものの、最低用量(12 PFU/頭)接種群においてもウイルス血症が観察されたこともその証左であろう。

ワクチンによる副反応のマーカーとして、体重、体温、活動性の変化に着目したが、関連する変化は認められなかった。もっとも、JL株は非常に安全性が高いことで定評がある株なので、反応が出ないのは当然かもしれない。それ以外にも網の分担研究において、白血球数、リンパ球数、血中LDH、血中アミラーゼの変化を追跡しており、一部の個体でLDH値の有意な上昇を観察している。しかし、その他の値には変化が認められなかった。その原因も、JL株の特性による可能性がある。今後の実験では対照群として、国産ワクチン株や野外分離株の接種を予定しており、それらの結果によって、有効な副反応マーカーが見つかる可能性がある。

我々は以前、コモンマーモセットにおいてムンプスウイルス野外強毒株の末梢感染によって髄膜炎を発症することを報告し（Saika S et al., 2002）、マーモセッ

トがムンプス感染モデル動物として有用であることを報告した。今回の実験結果は、マーモセットがムンプスワクチンの免疫原性を評価するためのモデル系としても有効であることを示唆している。

今後は、JL株または国産ワクチン株による追加免疫を行った後、野外株による攻撃接種によって、ワクチンの有効性を評価していく予定である。

## E. 結論

中和抗体応答から、マーモセットにおけるワクチン株の適正免疫用量は68 PFU/頭であり、ヒトにおける接種用量を大きく下回っていた。これはマーモセットのムンプスウイルスに対する感受性の高さを示すものであり、ムンプス感染モデルとしての有用性を示している。

JL株接種後においては体重、体温、活動性に関連する変化は認められなかった。

## F. 健康危害情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nagata S, Maedera T, Nagata N, Kidokoro M, Takeuchi K, Kuranaga M, Takeda M, Kato A. Comparison of the live attenuated mumps vaccine (Miyahara Strain) with its parent in preadapted position of attenuation process. *Journal of Vaccines & Immunization* [in press] (2013).
- 2) Sato H, Jing C, Isshiki M, Matsuo K, Kidokoro M, Takamura S,

Zhang X, Ohashi T, Shida H. Immunogenicity and safety of the vaccinia virus LC16m8Δ vector expressing SIV Gag under a strong or moderate promoter in a recombinant BCG prime-recombinant vaccinia virus boost protocol. Vaccine 31, 3549-3557 (2013).

- 3) 木所稔、竹田誠：ムンプスウイルスの新たな分類基準と国内流行状況、病原微生物検出情報 (IASR) 34(8)、224-225(2013)

## 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総会、2013 年 6 月
- 2) 新妻隆広、大日方薫、木所稔：授乳婦へのムンプスワクチン接種後、母乳中より検出されたムンプスワクチ

ンウイルス、第 54 回日本臨床ウイルス学会総会、2013 年 6 月

- 3) 新妻隆広、大日方薫、木所稔：ムンプスウイルス耳下腺炎の経過中に発症した自己免疫性辺縁系脳炎、第 54 回日本臨床ウイルス学会総会、2013 年 6 月
- 4) 加藤大志、齋加志津子、久保田耐、網康至、須崎百合子、加藤篤、竹田 誠、木所稔：ムンプスウイルス P タンパク質に導入されたアミノ酸変異による病原復帰機構の解析、第 61 回日本ウイルス学会総会、2013 年 11 月
- 5) 田中敏博、木所稔、渡辺正博、庵原俊昭：授乳婦に対するムンプスワクチン接種の安全性. 第 17 回日本ワクチン学会学術集会 2013 年 11 月

## H. 知的財産の出願・登録状況

特記事項なし。

表1 実験に使用したマーマセットと接種用量

Animal No.	Born	Sex	Dose PFU/head
5178	2012.10.10	M	12
5179	2012.10.10	M	68
5180	2012.10.14	M	12
5181	2012.10.14	M	650
5182	2012.10.23	M	68
5183	2012.10.23	M	650

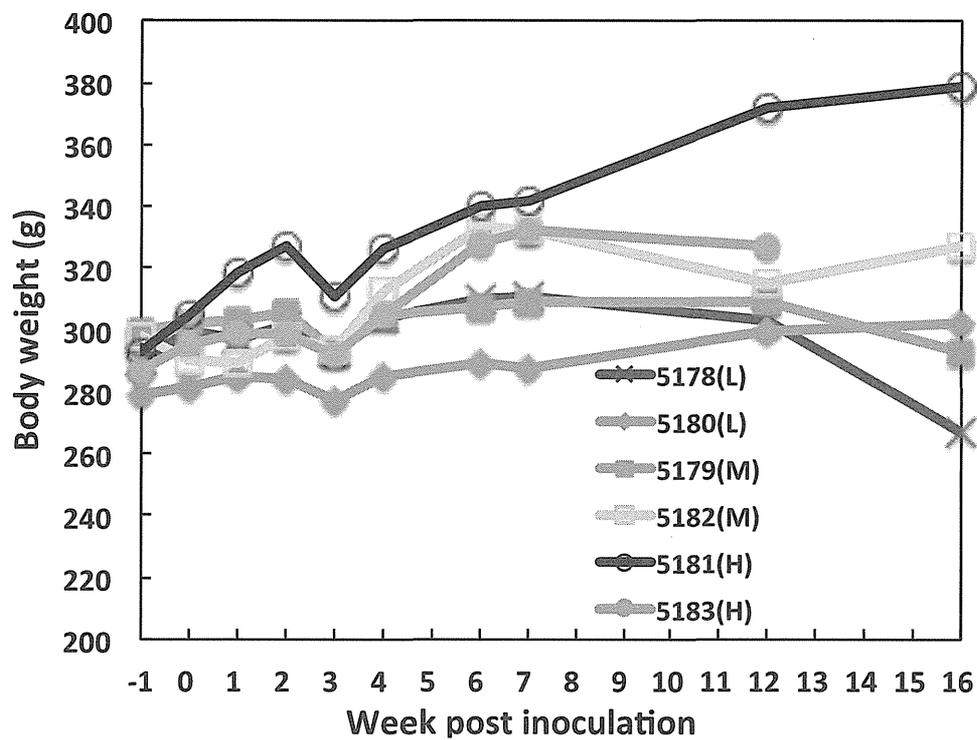


図1 マーマセットの体重変化

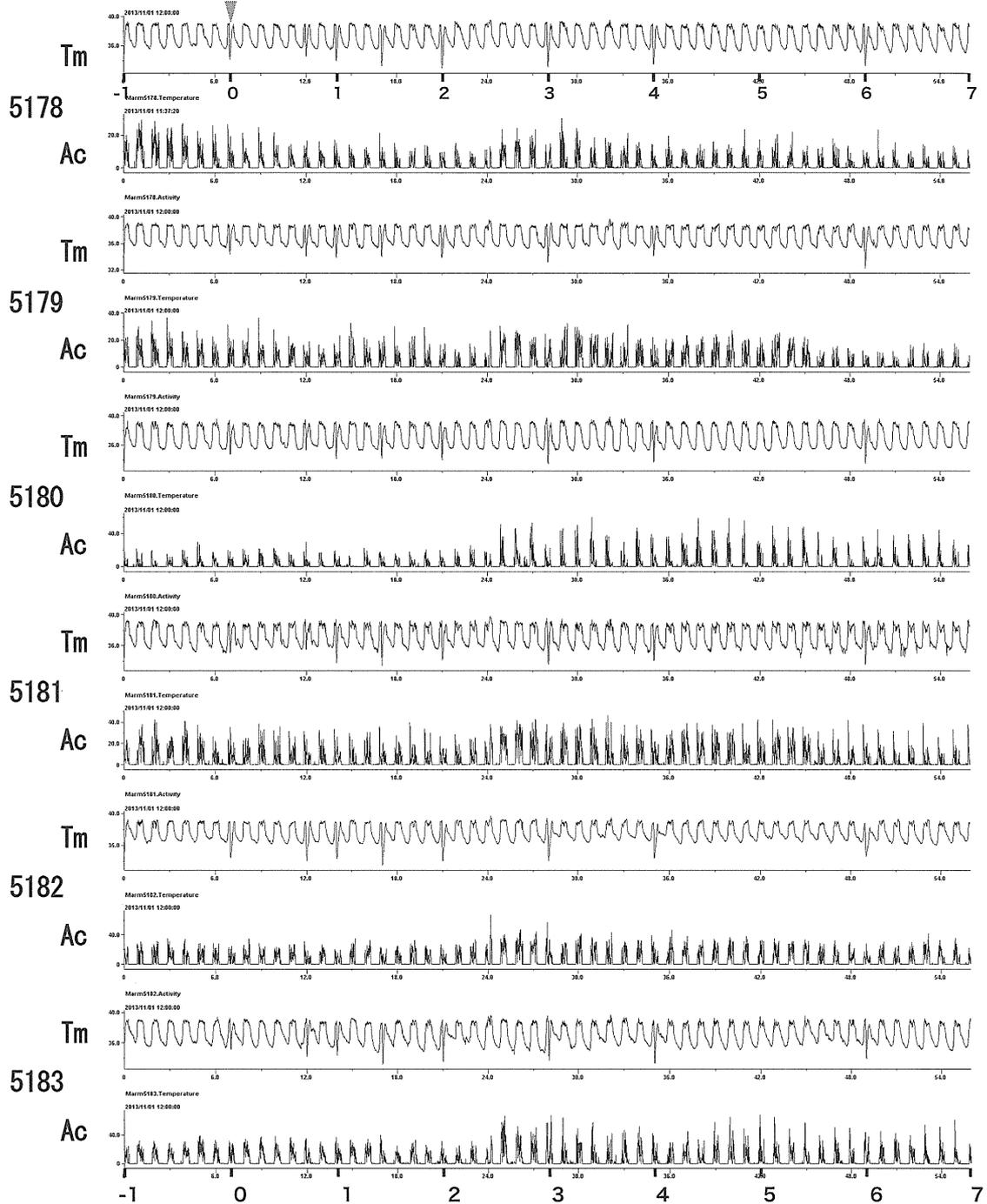


図2 マーモセットの体温と活動性の変化

Tm:体温、Ac:活動性、横軸は接種後の週数、矢印はJL株接種

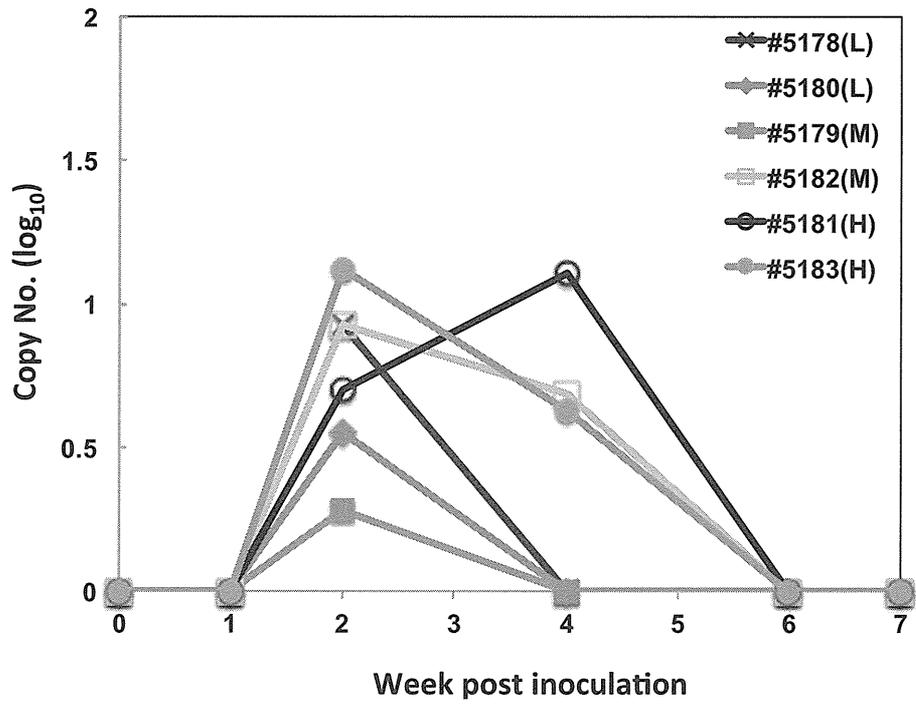


図3 JL株接種後の末梢PBL中ウイルスゲノム数の変化

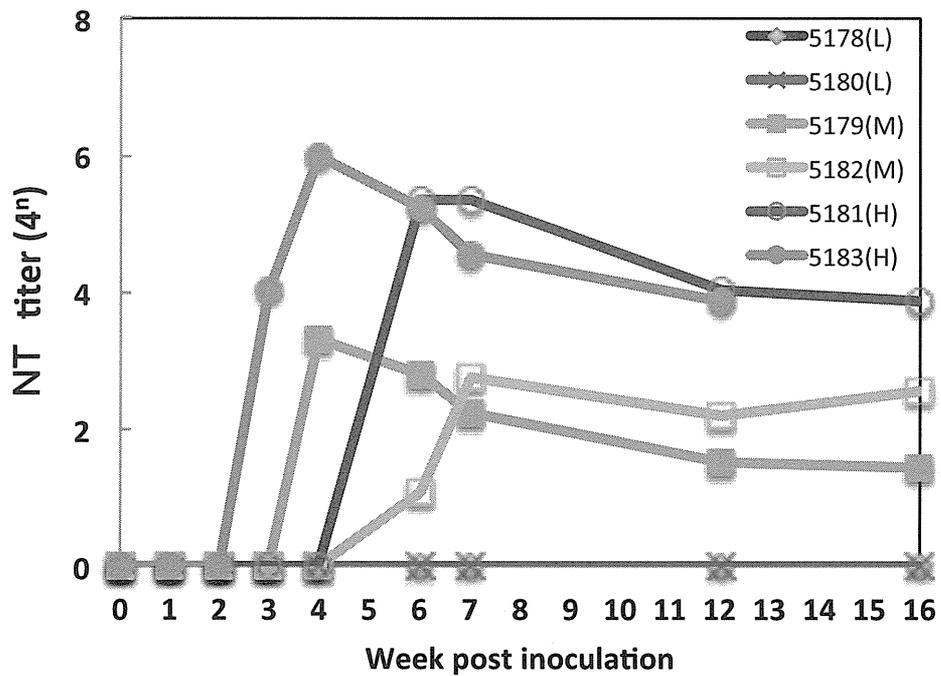


図4 JL株接種後の中和抗体価の推移